

## 二塩基酸色素との会合体のサーモクロミズムを利用した キニーネの抽出吸光光度定量

大野 典子, 酒井 忠雄<sup>Ⓔ\*</sup>

(1985年5月30日受理)

キニーネは中性付近において、プロモフェノールブルー (BPB) やプロモクレゾールグリーン (BCG) と 2:1 の会合体を生成し、1,2-ジクロロエタン及びクロロホルムに抽出される。BPB-キニーネは 590 nm に、BCG-キニーネは 550 nm に吸収極大を持つ電荷移動錯体であり、温度変化に伴って定量的サーモクロミズムを示す。温度の上昇に伴う吸光度変化の比  $\Delta A/\Delta t$  値は濃度に比例し、しかも低濃度領域のキニーネの定量が可能になった。又 20°C から 10°C に冷却すると吸光度が 24~28% 増加し感度の増大が図れる。BPB 系では  $(0.4\sim 3)\times 10^{-5}$  M, BCG 系では  $(1.0\sim 5.0)\times 10^{-5}$  M の範囲でキニーネを定量でき、相対標準偏差は 2% であった。

### 1 緒 言

アミン、第四級アンモニウム塩などの窒素含有の有機化合物の定量法として、フタレイン系二塩基酸色素とのイオン会合体の抽出を利用した比色定量法が種々報告されている。Irving<sup>1)</sup> はプロモクレゾールグリーン (BCG) を用いて長鎖アミンを、堀岡<sup>2)</sup> は BCG, プロモチモールブルー (BTB) を用いて塩基性医薬品を定量した。又 Auerbach<sup>3)</sup> はプロモフェノールブルー (BPB) を用いて第四級アンモニウム塩の定量を試みた。これらの方法は pH 4~5 の酸性領域あるいはアルカリ領域で行われ、抽出会合体は色素自身の色に依存した黄色又は青色に発色する。ところが、pH 6~8 の中性付近における第四級アンモニウム塩及びアミン類の抽出性を検討したところ、比較的分子が大きく、窒素原子を 2 個持ちヘテロ環をもつキニーネ ( $pK_{a1}=4.1$ ,  $pK_{a2}=8.0$ ) が抽出された。しかも抽出有機相は、色素の分子色にもイオン色にも依存しない赤紫色に発色する。著者らは既に、一塩基酸色素テトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE) がアミンと赤色の電荷移動錯体を形成し<sup>4)</sup>、この電荷移動錯体がサーモクロミズム現象を示すことを報告した<sup>5)</sup>。そこでキニーネと二塩基酸色素との会合体の抽出挙動及び温度に対する影響を種々検討したところ、この赤紫色会合体は電荷移動錯体であり、しかもサーモクロミズムを示すことを見いだした。

会合体の吸光度は温度の上昇に比例して減少するため、温度変化に伴う吸光度変化の比  $\Delta A/\Delta t$  値 ( $\Delta t=45^\circ\text{C}-20^\circ\text{C}$ ) を求めたところ、濃度に比例した。しかも  $\Delta A/\Delta t$ -濃度の検量線を用いることにより、定量範囲が広くなり、立沢らの方法<sup>6)</sup> では困難であった低濃度領域のキニーネの定量が可能となった。又、抽出有機相を冷却すると吸光度が増加し、10°C で測定することにより、24~28% の感度増大を図ることもできた。

溶液内でのサーモクロミズム現象は珍しく、著者<sup>5)</sup> により分析化学への導入が試みられたが、二塩基酸色素においてもサーモクロミズム現象が観察されたので、二塩基酸色素の新しい利用法として分析化学への導入を試みた。

キニーネは抗原虫薬、下熱薬としてマラリア、熱性疾患の治療に使用される。定量法には、滴定法<sup>7)</sup>、蛍光法<sup>8)</sup> がある。又吸光光度法<sup>9)</sup>、抽出吸光光度法<sup>10)11)</sup> が報告されているが、選択性が十分でない。

### 2 実 験

#### 2.1 装 置

吸収スペクトル、吸光度の測定には、日立製 056 形 X-Y レコーダー及び日立製 556 形ダブルビーム分光光度計を使用し、セルは光路長 1 cm のふた付き石英セルを用いた。コマツヤマト製 CTE-220 型恒温水循環装置と恒温セルホルダーを接続して測定温度の調節を行った。セル内の温度は安立計器製 HP-4F 型サーモメーターによりチェックした。日立堀場製 M-7 II pH メーター、イワキ製 KM 式万能シェーカー及びクボタ製 KS-

\* 朝日大学教養部化学教室(旧岐阜歯科大学): 501-02  
岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851

4000 型遠心器を使用した。

## 2.2 試薬

キニーネ標準溶液：塩酸キニーネ（二水和物，片山化学工業製）0.3969 g を水に溶かして 100 ml とし， $1 \times 10^{-2}$  M 溶液を調製し，適宜希釈して使用した。

緩衝溶液：0.3 M リン酸二水素カリウムと 0.1 M ホウ砂の混合溶液に，0.5 M 硫酸又は 1 M 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を調節した。

BPB 溶液：BPB（片山化学工業製）0.1608 g を緩衝溶液（pH 6.5）に溶かし， $2.4 \times 10^{-3}$  M 溶液を調製した。

BCG 溶液：BCG（東京化成工業製）0.1396 g を緩衝溶液（pH 7.2）に溶かし， $2 \times 10^{-3}$  M 溶液を調製した。

## 2.3 標準操作

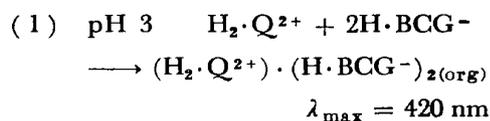
操作 1  $2 \times 10^{-4}$  M キニーネ標準溶液 1~6 ml をメスフラスコに採り， $2.4 \times 10^{-3}$  M BPB 溶液 1 ml，緩衝溶液（pH 6.5）15 ml を加え，水で 50 ml に希釈する。これを分液漏斗に移し，クロロホルム 10 ml と共に 5 分間振り混ぜる。有機相を分取した後遠心分離する。水を対照に 20°C，45°C における吸光度を 590 nm で測定する。

操作 2  $5 \times 10^{-4}$  M キニーネ標準溶液 1~5 ml， $2 \times 10^{-3}$  M BCG 溶液 2 ml，緩衝溶液（pH 7.2）15 ml をメスフラスコに採り，以下操作 1 と同様に行う。抽出溶媒は 1,2-ジクロロエタン 10 ml を加える。測定波長は 550 nm である。

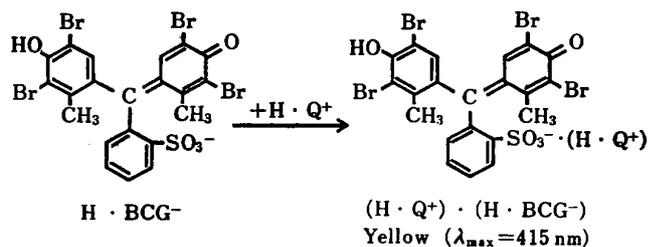
## 3 結果と考察

### 3.1 二塩基酸色素とキニーネの会合体

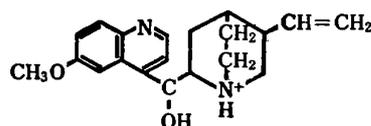
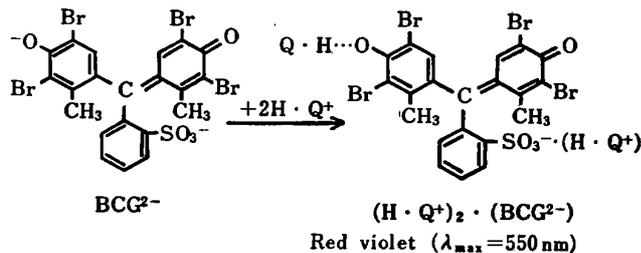
二塩基酸色素は pH により解離状態が異なるので抽出機構は複雑である。Chart 1 に BCG ( $pK_a=4.7$ ) とキニーネの抽出機構を示す。BCG は pH 4.7 以下の酸性溶液中では， $-SO_3H$  基を有する 1 価陰イオン ( $H \cdot BCG^-$  と表記) である。連続変化法により組成を検討したところ，pH 4.7 付近においては，プロトン化したキニーネ陽イオン ( $H \cdot Q^+$  と表記) がスルホン酸基に結合して，Irving らの報告<sup>1)</sup>にあるように，1:1 会合体 ( $\lambda_{max}=415$  nm) を形成し，又 pH 3 付近においては，プロトンが 2 個付加したキニーネ ( $H_2 \cdot Q^{2+}$ ) が  $H \cdot BCG^-$  と 1:2 会合体 ( $\lambda_{max}=420$  nm) を形成しているものと思われる。これを式で表現すると次のようになる。



pH 4.7~5.1

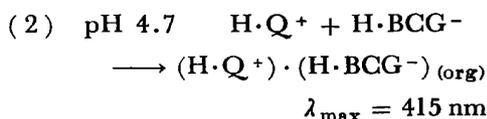


9.7 > pH > 5.1



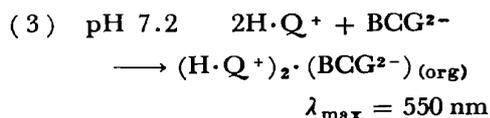
H · Q<sup>+</sup>: Quinine cation

Chart 1



ここで org は有機相を示す。これらの会合体は色素の酸性色に依存した黄色を発し，有機相中でイオン対として存在していると思われる。

しかし pH 7.2 においては，BCG の水酸基のプロトンも解離し，2 価陰イオン  $BCG^{2-}$  となっている。従ってキニーネ ( $H \cdot Q^+$ ) は  $BCG^{2-}$  と 2:1 会合体を形成する。



溶媒に誘電率の高いニトロベンゼンを使用すると，2:1 会合体が抽出され青色 ( $\lambda_{max}=630$  nm) を発する。この発色は第四級アンモニウム塩を抽出したときと同様であることから，ニトロベンゼンへの抽出はイオン対抽出であると思われる。これに対し，pH 7.2 で 1,2-ジクロロエタン，クロロホルムに抽出される赤紫色会合体

(3) は, 色素の酸性色にもアルカリ性色にも属さない中間色を示すことから, 電荷移動錯体と思われる。

BPB ( $pK_a=3.8$ ) でも同様に, pH 2.8 で 1:2, pH 3.8 で 1:1 のイオン対を形成するが, pH 6.5 においては 2:1 の組成の電荷移動錯体 ( $\lambda_{max}=590$  nm) を形成する。

ベンゼン, ヘキサンなど誘電率の低い溶媒は会合体の抽出性が悪い。逆に誘電率の高いニトロベンゼン, メチルイソブチルケトンなどの溶媒は抽出性は良いが, 電荷移動錯体は形成されず, 又多くの塩基性化合物がイオン対を形成するため選択性にも欠ける。結果として電荷移動錯体の形成に適した溶媒は, 中程度以下の誘電率をもち, 会合性を高める溶媒, すなわちクロロホルム, 1,2-ジクロロエタン, クロロベンゼン, ジクロロメタンなどである。BPB 系ではクロロホルム, BCG 系では 1,2-ジクロロエタンを用いた場合, 会合体が最も良く抽出され, 電荷移動錯体の発色も著しく安定であった。

### 3.2 抽出試薬の検討

スルホフタレイン系色素である BPB, BCG, プロモクロレゾールパープル (BCP), テトラプロモフェノールブルー (TBPB), プロモクロフェノールブルー (BCPB), チモールブルー (TB), 又フタレイン系色素である  $\alpha$ -ナフトールフタレイン (NP), チモールフタレイン (TP) について, キニーネとの会合体の抽出性を検討した結果を Table 1 に示す。  $pK_{a2}$  値が高い TB, NP, TP はキニーネと 1:1 会合体 ( $\lambda_{max}=400\sim 410$  nm) を生成するが, 2:1 の赤紫色会合体を生成しない。  $pK_{a2}$  値が 3.8~6.0 に存在する 5 種の色素は赤紫色会合体を生成するが, TBPB は会合体が不安定で相対標準偏差も大きい。 BPB, BCG, BCPB, BCP は 2 個のフェノール基を有し, BPB, BCG はオルト位に電子吸引性の強い臭素を各 2 個ずつ持つが, BCPB は臭素 1 個が塩素と置き換

わった構造を, BCP は電子供与性のメチル基と置換した構造をしている。従って BCPB, BCP は分子全体への電子の分布が抑えられ, 電子が効果的に分布している BPB, BCG が会合体の生成に有利であると推定される。しかし BCG が BPB より感度が低いのは, メチル基が導入され抽出率が低いためと思われる。以上の 4 種の色素は安定な電荷移動錯体を生成するが, その抽出率及び発色強度は BPB > BCG > BCPB > BCP の順であった。

### 3.3 二塩基酸色素-キニーネ会合体のサーモクロミズム

著者<sup>5)</sup> は一塩基酸色素とアミンの会合体がサーモクロミズムを示すことを報告したが, 二塩基酸色素とキニーネの形成する電荷移動錯体が同様なサーモクロミズム現象を示すことを見いだした。 Fig. 1 に BPB-キニーネ会

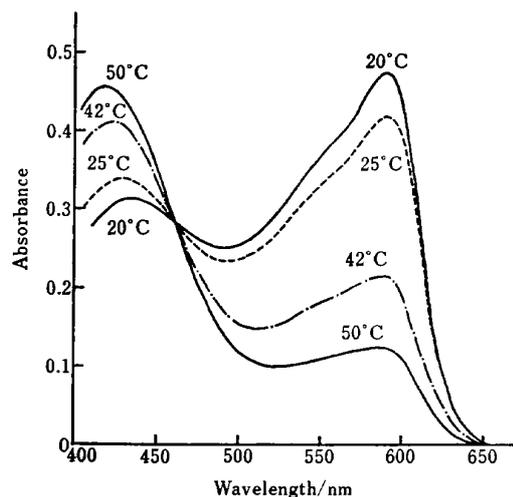


Fig. 1 Change in absorption spectra of the charge transfer complex between bromophenol blue (BPB) and quinine induced by thermochromism

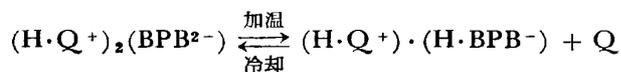
Quinine :  $1.2 \times 10^{-5}$  M, BPB :  $4.8 \times 10^{-5}$  M, pH : 6.5, Solvent : chloroform, Ref. : water

Table 1 Characteristics of diprotic acid dyes and their extractabilities of ion-associates with quinine

Dye	$pK_{a2}$	$\lambda_{max}$ of dye in water/nm	pH on extraction	$\lambda_{max}$ of associate/nm	Absorbance of $1.2 \times 10^{-5}$ M quinine associate
Bromophenol blue	3.8	591	6.5	590†	0.478†
Bromocresol green	4.6	615	7.2	550	0.150
Bromochlorophenol blue	3.8	590	6.2	585	0.110
Bromocresol purple	6.0	589	7.9	585	0.40††
Tetrabromophenol blue	3.8	611	7.5	580	0.6
Thymol blue	8.8	597	—	—	—
$\alpha$ -Naphtholphthalein	7.9	653	—	—	—
Thymolphthalein	9.6	596	—	—	—

Solvent : 1,2-Dichloroethane; † Chloroform; ††  $2 \times 10^{-4}$  M quinine

合体の吸収スペクトルの変化を示す。抽出有機相を 20°C から 50°C まで昇温したところ、590 nm における吸収は大きく減少し、逆に 420 nm 付近の吸収に増大がみられた。又 460 nm に等吸収点を示した。従ってこの変化は



の平衡移動によるものと推測される。

### 3.4 検量線

抽出有機相を 20°C から 50°C まで昇温し、各温度における吸光度を測定した。Fig. 2 に示すように、液温の上昇に比例して吸光度は減少した。そこで温度変化に伴う吸光度変化の比  $\Delta A/\Delta t$  値 ( $\Delta t$  は 45°C-20°C とした) を求めたところ、水溶液中のキニーネの濃度に比例し、 $\Delta A/\Delta t$ -濃度を検量線として用いると、低濃度領域のキニーネの定量が可能であることが分かった。Fig. 3, 4 に検量線を示す。濃度-吸光度の検量線 (曲線 2) では直線性を示す範囲が狭く、低濃度領域 (BPB 系では  $1.2 \times 10^{-5}$  M 以下, BCG 系では  $2.4 \times 10^{-5}$  M 以下) では、直線から大きくずれる。これは BPB, BCG がスルホン酸基を持つこと、-2 価の電荷を持つことのため、抽出性が低いことに起因すると思われる。溶媒に

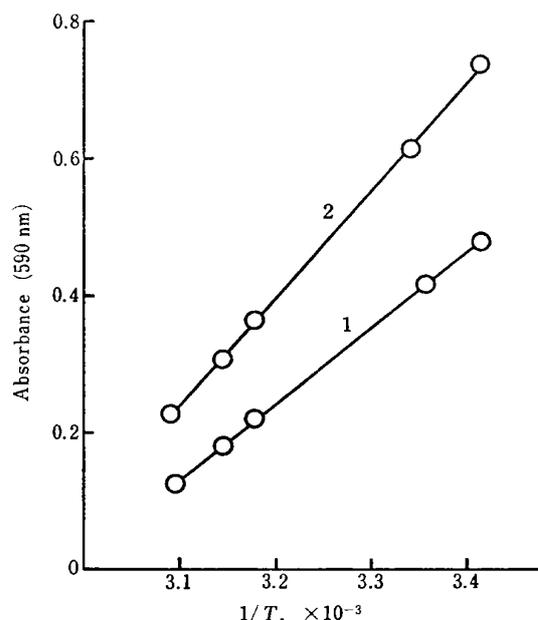


Fig. 2 Effect of temperature on BPB-quinine associates

1 :  $1.2 \times 10^{-5}$  M quinine, 2 :  $1.6 \times 10^{-5}$  M quinine;  
BPB :  $4.8 \times 10^{-5}$  M, pH : 6.5, Solvent : chloroform;  
Ref. : water

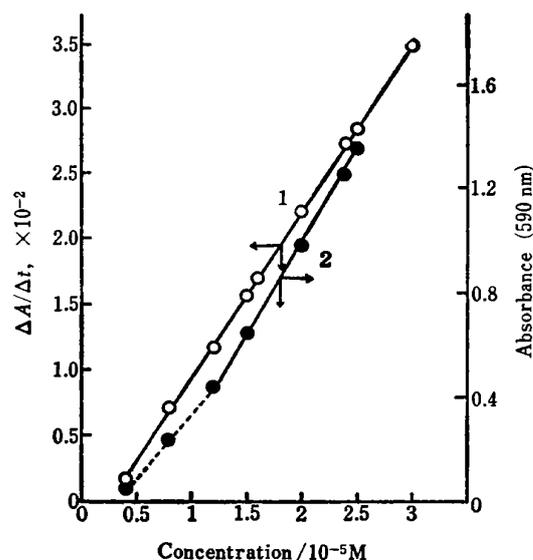


Fig. 3 Calibration curves for quinine with BPB

BPB :  $4.8 \times 10^{-5}$  M, pH : 6.5, Solvent : chloroform;  
Ref. : water

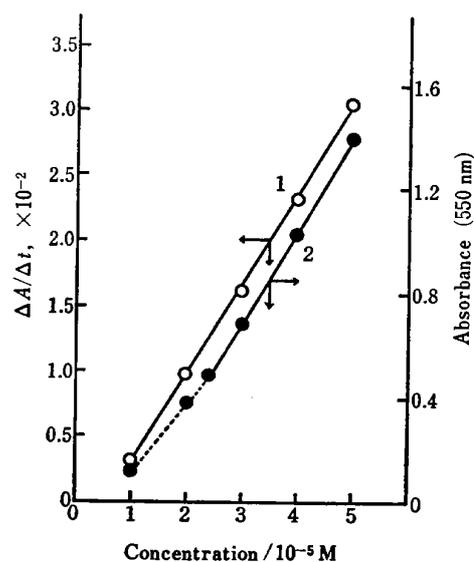


Fig. 4 Calibration curves for quinine with bromocresol green (BCG)

BCG :  $8 \times 10^{-5}$  M, pH : 7.2; Solvent : 1,2-dichloroethane, Ref. : water

ニトロベンゼンを用いると抽出性は高められるが、電荷移動錯体の抽出には不適當であり、又抽出が選択的ではない。

吸光度に代わって  $\Delta A/\Delta t$  値を縦軸に用いた場合、低濃度領域まで直線性を示した (曲線 1)。BPB 系では  $(0.4 \sim 3) \times 10^{-5}$  M, BCG 系では  $(1.0 \sim 5.0) \times 10^{-5}$  M の範囲でキニーネの定量が可能となった。  $1.2 \times 10^{-5}$  M キニーネ標準溶液を用いた 10 回の繰り返し測定値に対する相対標準偏差は 2% であった。

抽出有機相を 20°C から冷却していくと、2 : 1 会合

体の会合が促進され吸光度が増加した。  $1.2 \times 10^{-5}$  M キニーネ-BPB 会合体の吸光度は  $20^\circ\text{C}$  で 0.478 であるが、  $10^\circ\text{C}$  に冷却すると 0.593 (24% 増) となった。又  $2.4 \times 10^{-5}$  M キニーネ-BCG 会合体の場合、  $20^\circ\text{C}$  で 0.490 であるが、  $10^\circ\text{C}$  では 0.629 (28% 増) に増加した。従ってキニーネの微量定量を目的とする場合、冷却効果を応用し高感度化を図ることができる。

### 3.5 共存物質の影響

種々の無機、有機イオンを  $10^{-3}$  M ~  $2 \times 10^{-2}$  M 共存させ、その影響を検討した。ナトリウム、カリウム、マグネシウム、ニッケル、銅、鉄、アンモニウムなどの陽イオン及び炭酸イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、塩化物イオンなどの陰イオンは全く影響を与えなかった。鎮痛を目的に複合されるカフェイン、アミノピリン、又賦形剤として添加されるグルコースなども  $10^{-3}$  M 共存しても影響を与えなかった。窒素含有の有機化合物についても検討を行った。その結果を Table 2 に示す。pH 3.8 における抽出では、ほとんどすべてのアミン類が会合体を生成するため選択性がない。pH 6.5 ではエフェドリン、パパベリン、エセリン、メチルエフェドリンなどはキニーネの定量を妨害しない。ところが 10 倍量のプロカイン、0.5~1 倍量のジブカイン、ジフェンヒドラミン、クロルフェニラミンは 4~9% の正の誤差を与えた。そこで  $\Delta A/\Delta t$  値を用いるサーモクロミズム法を検討したところ、これらアミンの影響をわずかではあるが抑制することができた。これはアミンの抽出率が低く、キニーネ会合体の  $\Delta A/\Delta t$  値が大きいため、影響が小さ

Table 2 Effect of diverse substances on the determination of quinine

Substance	Molar ratio	Recovery, %		
		pH 3.8 <sup>a)</sup>	pH 6.5 <sup>b)</sup>	Thermochromism method <sup>b)</sup>
Chlorpheniramine	0.5	134	106	103
Dibucaine	0.5	135	104	100
Diphenhydramine	1.0	163	105	101
Procaine	0.5	116	100	100
	10	224	109	104
Ephedrine	10	113	100	100
Methylephedrine	5		100	
Eserine	5		100	
Papaverine	10		100	
Triethanolamine	10		100	
Triethylamine	10		100	
Tetraethylammonium	10		100	
Tetramethylammonium	10		100	

Quinine taken : a)  $4 \times 10^{-6}$  M, b)  $1.2 \times 10^{-5}$  M; BPB : a)  $3.2 \times 10^{-4}$  M, b)  $4.8 \times 10^{-5}$  M

いためと思われる。従って  $\Delta A/\Delta t$ -濃度の検量線を用いることにより選択性も更に向上する。

### 3.6 製剤中のキニーネの定量

錠剤中のキニーネを定量し、その結果を Table 3 に示す。含有量 10 mg に対し、サーモクロミズム法で 10.2 mg の定量値を得、BPB による抽出法及び TBPE 抽出法とほぼ一致した。ジフェンヒドラミン 10 mg を含有する試料については、TBPE 法では +69%、BPB 法では +10% の多大な誤差を与えた。ところが、サーモクロミズム法で定量したところ、10.16 mg の値が得られ、ジフェンヒドラミンの影響を受けることなく、キニーネを定量することができた。

Table 3 Determination of quinine in tablets

Sample number	Quinine added/mg	Quinine found		
		TBPE method/mg	BPB method/mg	Thermochromism method/mg
1	10.0	10.5	10.3	10.2†
2	10.0	16.9	11.0	10.16††

† Mean value of three determinations; †† Mean value of two determinations

Other components :

	Sample 1	Sample 2
Powdered Aloes	40 mg	40 mg
Powdered Rhubarb	100	100
Aromatic powder	20	20
Powdered Myrrh	50	50
Powdered Saffron	10	10
Iron(III) sulfate	10	10
Diphenhydramine hydrochloride	0	10

以上の結果、TBPE- $R_3N$  の抽出系と同様に、BPB、BCG など数種の二塩基酸色素によるイオン会合体にもサーモクロミズム現象が観察され、この現象を応用することにより、キニーネの選択的定量が可能となった。

この手法はイオン会合性試薬の新しい利用法の一つであり、今後は熱力学的パラメーターによる検討を試みたい。

### 文 献

- 1) H. M. N. H. Irving, J. J. Markham : *Anal. Chim. Acta*, **39**, 7 (1967).
- 2) 堀岡正義 : 薬誌, **77**, 200, 206 (1957).
- 3) M. E. Auerbach : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **15**, 492 (1943).
- 4) T. Sakai, I. Hara, M. Tsubouchi : *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1254 (1976).
- 5) 酒井忠雄, 大野典子 : 分化, **27**, 410 (1978).
- 6) 立沢政義, 中山修三, 大河原晃 : 分化, **19**, 761 (1970).

- 7) 第9改正日本薬局方, C-364(1976), (廣川書店).
- 8) M. Montagu, P. Levillain, M. Rideau, J. C. Chènieux; *Talanta*, **28**, 709 (1981).
- 9) 森 逸男, 藤田芳一, 坂口紀美子, 坪根朋子: 分化, **30**, 679 (1981).
- 10) M. Malat; *Anal. Chim. Acta*, **109**, 191 (1979).
- 11) 松岡俊恵, 三井利幸, 藤村義和: 衛生化学, **28**, 274 (1982).

## ☆

**Extraction-spectrophotometric determination of quinine using thermochromism of its diprotic acid dye complexes.** Noriko OHNO and Tadao SAKAI (Department of Chemistry, School of Liberal Arts, Asahi University, 1851, Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02)

Quinine cation ( $H \cdot Q^+$ ) was extracted into organic solvents with diprotic acid dyes, such as bromophenol blue (BPB) and bromocresol green (BCG), to form a 2:1 ion-associate,  $(H \cdot Q^+)_2 \cdot BPB^{2-}$  or  $(H \cdot Q^+)_2 \cdot BCG^{2-}$ . These ion-associates exhibited characteristics of charge transfer complexes and showed reversible thermochromism. The ratio of decrease of absorbance to temperature change ( $\Delta A/\Delta t$ ) was in proportion to the quinine concentration in aqueous phase ( $\Delta A = A_{20^\circ C} - A_{45^\circ C}$ ,  $\Delta t = 45^\circ C - 20^\circ C$ ), and a good linearity was obtained within a wide concentration range of quinine  $0.4 \sim 3.0 \times 10^{-5}$  M. BPB-quinine associate extracted into chloroform at pH 6.5 had an absorption

maximum at 590 nm. Maximum absorbance wavelength of BCG-quinine associate at pH 7.2 was at 550 nm in 1,2-dichloroethane and the calibration graph was linear throughout the concentration range of  $1.0 \sim 5.0 \times 10^{-5}$  M quinine. Procaine, ephedrine, eserine, papaverine, triethanolamine, and tetraethylammonium did not interfere with the quinine assay in 5~10 fold ratio. Neither diphenhydramine, chlorpheniramine, and dibucaine in 0.5~1.0 fold molar excess over  $1.2 \times 10^{-5}$  M quinine had influences. Consequently, this method was proved to be selective for quinine determination compared with other spectrophotometric methods. In addition, the absorbance of ion-associates increased with a decrease in temperature; that is, the absorbance at  $10^\circ C$  was 24% larger than that at  $20^\circ C$ . The increase in absorbance with cooling seemed to be due to the enhanced ion-association in the organic phase. This method can be applied to selective determination of quinine in tablets. Furthermore, sensitivity of the method can be increased by lowering temperature of ion-associates.

(Received May 30, 1985)

**Keyword phrases**

thermochromism of ion-associates with diprotic acid dyes; extraction-spectrophotometry of quinine; charge transfer complex; enhancement of sensitivity by cooling.