

溶媒抽出/フローインジェクション法によるベンザル コニウムの迅速吸光光度定量

宮路 敏彦[®], 日比 清勝^{*}, 酒井 忠雄^{**}

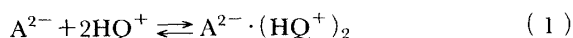
(1989年8月7日受理)

プロモフェノールブルー (BPB) は中性付近において $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M 濃度のキニーネと 1:2 のイオン会合体 ($\lambda_{\max}$ 590 nm) を形成する。この pH 領域では 10^{-6} M 濃度のベンザルコニウムは BPB^{2-} とイオン会合体を形成しないが、 10^{-5} M 以上のキニーネが共存すると微量のベンザルコニウムが共抽出され、そのイオン会合体のモル吸光係数は 610 nm において $50500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ となる。この抽出系はベンザルコニウムに対して選択性に優れていることから、FIA に適用した。溶媒抽出/FIA 法では $5 \times 10^{-6} \sim 1.5 \times 10^{-4}$ M の範囲で良い直線関係が得られ、 1×10^{-4} M ベンザルコニウムの 10 回の繰り返し定量の相対標準偏差は 1.1% であった。又、1 時間当たり 24 試料の速さで定量できる。本法は医薬品中のベンザルコニウムの日常分析に有用である。

1 緒 言

プロモフェノールブルー (BPB) やチモールブルー (TB) などの二塩基酸染料 (以下 H_2A と略記) は古くよりイオン会合性試薬として用いられている。これらの染料は -1 価の HA^- 型あるいは -2 価の A^{2-} 型として利用されることが多い。前者は pH 2~3 においてアミン類や第四級アンモニウムイオンと 1:1 のイオン会合体を形成する。この会合体の有機溶媒への抽出性は優れているが、モル吸光係数は 1 万程度と小さく選択性に欠ける¹⁾。一方 pH 9~10 においては第四級アンモニウムイオン (以下 R_4N^+ と略記) と 1:2 のイオン会合体を形成する。この会合体のモル吸光係数は 3~4 万程度であるが抽出率は高くなく、又検量線は直線性に乏しい²⁾。そこで著者の一人酒井は A^{2-} 型を用い、抽出率の増大とモル吸光係数の向上を目的に二塩基酸染料の新しい利用法について種々検討したところ、バルキーな三級アミンであるキニーネが一定量共存すると、微量の第四級アンモニウム塩の抽出性が著しく向上すること、更には $\text{A}^{2-}(\text{R}_4\text{N}^+)_2$ イオン会合体より大きなモル吸光係数が得られること、直線性の良い検量線が得られることなどを見いだした³⁾⁴⁾。

中性付近にて $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M のキニーネ (HQ^+) は



の会合体を形成する。この pH 領域では微量 (10^{-6} M) の第四級アンモニウム塩は A^{2-} とイオン会合体を形成しないが、式(1)の抽出系に共存させると第四級アンモニウムイオンであるベンゼトニウムやベンザルコニウムが定量的に抽出され、その会合体の抽出率も向上されることを報告した⁵⁾。この抽出系はアミン類の妨害が少なく、第四級アンモニウム塩に対して選択的であることから医薬品の分析に応用されているが⁶⁾、このイオン会合形成反応を FIA に導入し、ベンザルコニウムの選択的かつ多検体分析について検討したところ、相対標準偏差も小さく再現性の良い結果を得、医薬品の品質管理にも迅速な分析法として有用と思われるので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

ベンザルコニウム標準溶液: 塩化ベンザルコニウム (東京化成工業製) を 105°C で乾燥後、0.354 g を水に溶解、100 ml とし 10^{-2} M 溶液を調製し、適宜希釈して使用した。なお、塩化ベンザルコニウムの分子量は日本薬局方 XI C-319 に従い、354.02 として計算した。

キニーネ溶液: 塩酸キニーネ (和光純薬工業製) 0.397 g を水に溶解し 100 ml とし、 10^{-2} M 溶液を調製し適宜希釈して使用した。

* 日本分光工業(株): 192 東京都八王子市石川町 2967-5

** 朝日大学教養部化学教室: 501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851

プロモフェノールブルー: プロモフェノールブルー (和光純薬工業製) 0.161 g を pH 6.8 の緩衝液に溶かし, 水を加えて pH 7.5 の緩衝液で希釈して 5×10^{-5} M 溶液を調製した.

リン酸緩衝液 (0.8 M, pH 7.5): リン酸と 0.8 M リン酸二水素カリウムの混合溶液に 0.5 M 硫酸又は 1 M 水酸化カリウム溶液を加えて pH を調節した.

その他の試薬はいずれも市販の特級品を用い, 水は蒸留水を使用した.

2.2 装置

吸光スペクトルの測定には日本分光工業製 UVIDEDEC-610C 型分光光度計を使用した. pH の測定には日立-堀場製 F-7II 型 pH メーターを使用した.

フローインジェクション装置は日本分光工業製プランジャー型 4 チャンネル全溶媒用高圧ポンプ付き FIU-300N を, 検出器は日本分光工業製 870-UV 型紫外可視検出器を用いた. セルは容量 8 μ l, 光路長 10 mm のテフロン製フローセルを用い, 記録計は同社製 RC-150 型記録計を使用した.

ベンザルコニウム定量のフローシステムを Fig. 1 に示す. 流路は 4 流路系で, キャリヤー溶液 (CS) は pH 7.5 のリン酸塩緩衝液を流量 0.75 ml/min で送液し, その流路に試料溶液を六方インジェクションバルブで 100 μ l 注入する. 試液として RS₁ から 1×10^{-4} M キニーネ溶液, RS₂ から 5×10^{-5} M BPB 溶液を共に流量 0.25 ml/min で送液する. 注入した試料溶液と 2 種類の試液は反応コイル R₂ で混合, 反応し, OS で送液 (1.25

ml/min) された抽出溶媒 1,2-ジクロロエタン (DCE) と SG で混合され, セグメントが形成される. 有機相は多孔質ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜 (孔径 0.5 μ m) を利用した相分離器 (PS) で分離され, その発色有機相は 610 nm で検出される. 有機相の回収率を高めるため R₄ に内径 0.5 mm, 長さ 3 m のバックプレッシャーコイルを用いた.

3 結果と考察

3.1 イオン会合体の吸収スペクトル

BPB による各種イオン会合体の吸収スペクトルを Fig. 2 に示す. 曲線 3 は 4.8×10^{-5} M BPB を用い, 4×10^{-5} M キニーネを pH 6.8 で DCE に抽出したときの有機相の吸収スペクトルで 590 nm で $\lambda_{\max}$ を示す. 曲線 2 は 2×10^{-6} M ベンザルコニウムを同条件で抽出したものであるが, この条件では 10^{-6} M のベンザルコニウムはほとんど抽出されない. しかし曲線 3 の抽出系に同濃度のベンザルコニウムを共存させると, ベンザルコニウムは顕著に抽出されることが分かった (曲線 1). この抽出種の吸光度は曲線 2 と曲線 3 を得た条件と同じにもかかわらず, それぞれの吸光度の和よりもはるかに大きいことから新しい会合体が形成され, 抽出率が增大したと思われる. 既報⁵⁾でも報告しているが曲線 3 の会合体は $\text{BPB}^{2-} \cdot (\text{HQ}^+)_2$, 曲線 2 は $\text{BPB}^{2-} \cdot (\text{R}_4\text{N}^+)_2$ として抽出されるものと思われるが, $\text{BPB}^{2-} \cdot (\text{R}_4\text{N}^+)_2$ の $\lambda_{\max}$ が 610 nm 付近にあるのに対し $\text{BPB}^{2-} \cdot (\text{HQ}^+)_2$ の $\lambda_{\max}$ は 590 nm 付近に存在するこ

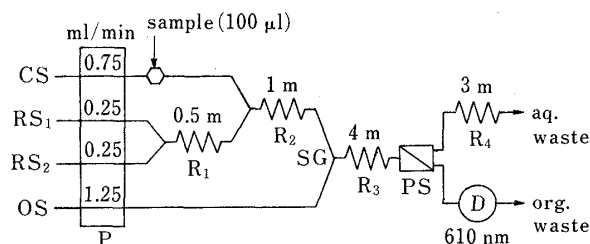


Fig. 1 Extraction-FIA system for benzalkonium determination

CS: phosphate buffer solution (pH 7.5); RS₁: 1×10^{-4} M quinine standard solution; RS₂: 5×10^{-4} M BPB in buffer solution; OS: 1,2-dichloroethane; R₁: mixing coil (0.5 mm i.d. $\times$ 0.5 m); R₂: reaction coil (0.5 mm i.d. $\times$ 1 m); R₃: extraction coil (0.5 mm i.d. $\times$ 4 m); R₄: backpressure coil (0.5 mm i.d. $\times$ 3 m); SG: segmentor; PS: phase separator; D: spectrophotometer; P: pump

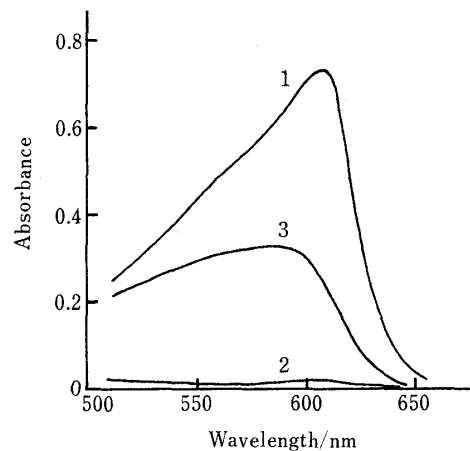


Fig. 2 Absorption spectra of ion associates with BPB

1: 2×10^{-5} M quinine; 2: 2×10^{-6} M benzalkonium; 3: 2×10^{-6} M benzalkonium in the presence of 2×10^{-5} M quinine; pH: 6.8; BPB: 4.8×10^{-5} M; Reference: water

とから, 2 種の会合体は異なった性質の化学種であると思われる. 又曲線 1 は $\text{BPB}^{2-} + \text{HQ}^+ + \text{R}_4\text{N}^+ \rightleftharpoons [\text{HQ}^+ \cdot \text{BPB}^{2-}]^- \cdot \text{R}_4\text{N}^+$ の三元イオン会合体が形成され, 抽出率の向上が見られると思われる. 又三元イオン会合体の発色が BPB^{2-} の色 (λ_{max} 610 nm) によるものであることから深色効果も伴いモル吸光係数が大きくなると思われる. なお, BPB^{2-} -ベンザルコニウム会合体の検量線の直線範囲から算出したモル吸光係数は約 $35000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり, 三元イオン会合体のモル吸光係数は $50500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった.

3・2 反応コイル及び抽出コイルの長さの影響

$1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ベンザルコニウム標準溶液, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ キニーネ溶液, $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ BPB 溶液及び DCE を Fig. 1 の流路系を用い, 2・2 の流量で流し, 反応コイル (R_2) 及び抽出コイル (R_3) の長さの影響について検討した. その結果を Fig. 3 に示す. 反応コイルは長くするに従ってピーク高さは減少した. これはそれぞれの試薬の混合, 及び反応が瞬時に完結し, コイルが長くなると拡散の影響を受けるものと思われる. 又抽出コイルは 2 m までは急激な増加が見られ, 4 m で最大のピーク高さが得られた. この反応系は BPB^{2-} に会合した二つのキニーネ陽イオンが陽イオンであるベンザルコニウム一つと置き換わる反応を利用したものであり, 又 BPB^{2-} が電荷の大きい二塩基酸染料であることから, 抽出速度が一塩基酸染料によるイオン会合体の抽出速度⁷⁾より小さい⁵⁾ため, 4 m が必要であると思われる.

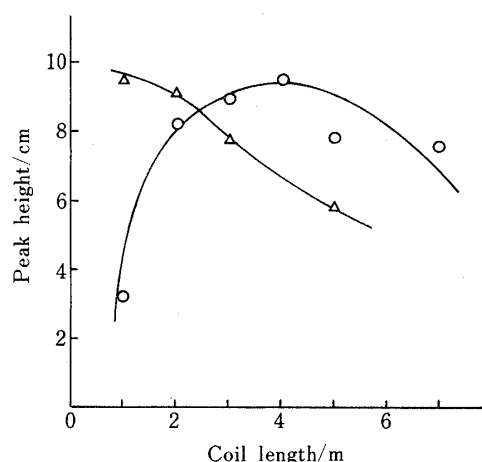


Fig. 3 Effects of reaction coil length (Δ) and extraction coil length ($\circ$) on peak height

Sample: $100 \mu\text{l}$ of $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ benzalkonium chloride;
Wavelength: 610 nm

3・3 試薬濃度の影響

三元イオン会合体の形成にキニーネ及び BPB の濃度が影響することが報告されているが⁵⁾, FIA 法における影響について検討を行った. その結果を Fig. 4 に示す. キニーネの濃度が増加すると BPB-キニーネ会合体の抽出も促進され, ピーク高さも大きくなる傾向を示した. $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以上ではバックグラウンドの吸光度の影響によりベースラインに乱れが生じた. 本実験ではピーク高さがほぼ最大となる $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ キニーネを用いた. 又 BPB の濃度を変化させ, その影響について検討した結果, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ で最大のピーク高さを示した. それ以下では三元イオン会合形成に試薬が不十分であり, ピーク高さが低くなると思われる. 一方 BPB 濃度が高くなると, BPB-キニーネ会合体の抽出が優先され, 三元イオン会合体の形成が抑制されるためピーク高さが減少するものと思われる. 又試薬から試験液の影響により検量線の直線範囲が狭くなる傾向が見られた. 従って本実験では $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ を用いた.

3・4 有機相と水相の体積比の影響

水相の流量を一定にし, 有機溶媒の流量を変化させ, 水相と有機相の体積比とピーク高さの関係について検討した {Fig. 5(1)}. その結果, 有機相/水相の比が小さいときはピーク高さは大きくなり, 又その比が大きくなるとピーク高さが小さくなる傾向を示したが, これは本水らの結果⁸⁾と一致する. 前者には濃縮効果が見られ, 後者は拡散の影響があると思われる. バッチ法における

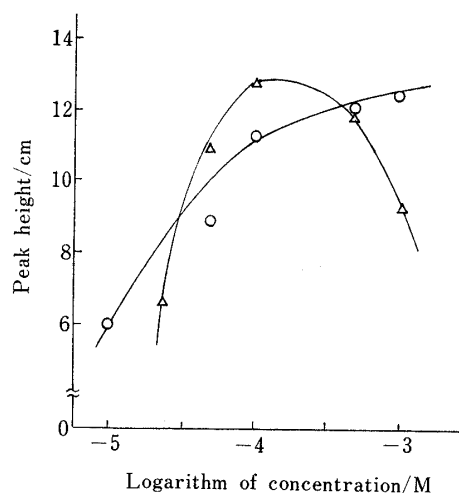


Fig. 4 Effects of concentration of quinine hydrochloride ($\circ$) and Bromophenol Blue (Δ) on peak height

Sample: $100 \mu\text{l}$ of $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ benzalkonium chloride;
Wavelength: 610 nm

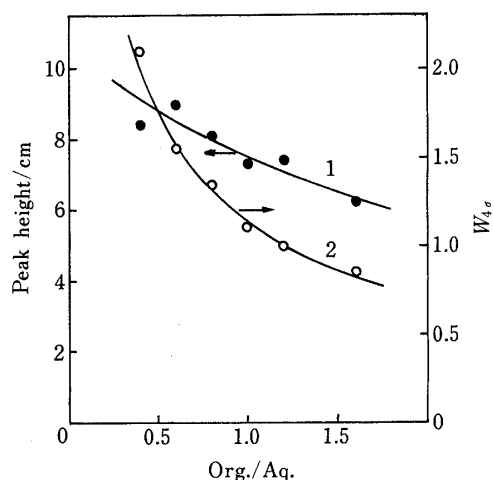


Fig. 5 Effects of organic phase/aqueous phase ratio on peak height (1) and peak dispersion ($W_{4\sigma}$) (2)

Sample: 100 μ l of 1×10^{-4} M benzalkonium chloride;
Wavelength: 610 nm

溶媒抽出法の利点の一つは濃縮効果であるが、FIA 法はバッチ法ほど顕著な濃縮効果は見られなかった。又 Fig. 5(2)に水相と有機相の体積比を変えたときのピークの広がりを経線法による 4σ の値で示した。有機相/水相の比が大きくなるにつれ、その値が小さくなり、分析速度を上げることができるが、ピーク高さが小さくなるため、ピーク高さと分析速度を考慮し、又 $W_{4\sigma}$ の傾きの緩やかになる所を選び、本実験では有機相:水相=1:1となる 1.25 ml/min で DCE を流した。

3.5 相分離器の比較

溶媒抽出-FIA 法では有機相の回収率を高めることが感度の向上に最も重要となる。そこで多くの相分離器が考案製作されているが⁹⁾、著者らも本水¹⁰⁾や三瀬¹¹⁾によって提唱されたものと類似の相分離器 [Fig. 6(a)(b)] 二つを製作し、その性能について比較検討を行った。(a)は孔径 0.5 μ m の PTFE 膜を、(b)は孔径 2 μ m の PTFE チューブを用いた。回収された有機相のフローシグナルを Fig. 6 に示す。(a)による有機相の回収率は 90% であった。(a)が(b)に比べて 16% 高いピーク高さを示した。又(b)では使用した PTFE チューブの孔径が 2 μ m と大きいので、耐久性に乏しい結果を得たが、三瀬は良好な結果を得ている¹¹⁾ので更に検討する必要がある。本実験では、ピーク高さと耐久性を重視して(a)を用いることとした。

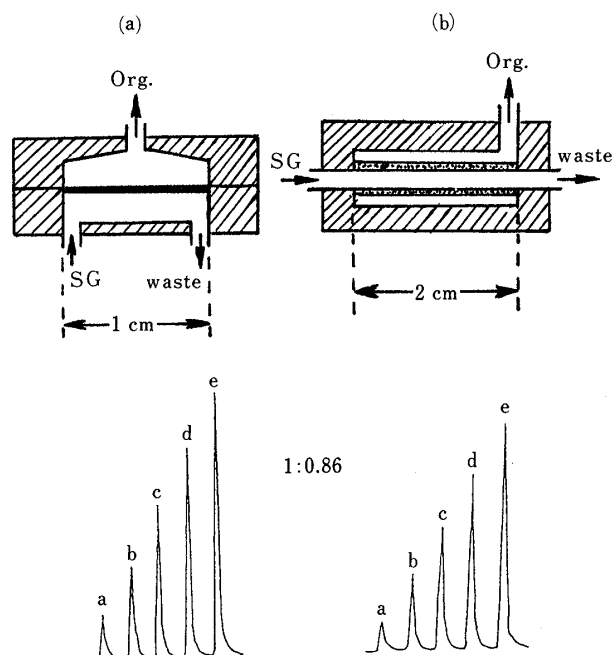


Fig. 6 Phase separators with microporous PTFE membrane and PTFE tubing and the flow signals for benzalkonium

Benzalkonium concentration ($\times 10^{-5}$ M): a, 2; b, 4; c, 6; d, 8; e, 10. (a) Membrane: Gore-tex seat; Pore size: 0.5 μ m; (b) Tubing: Gore-tex tubing (1.0 mm i.d.); Pore size: 2.0 μ m. SG: segment; Org.: organic phase

3.6 検量線

Fig. 1 のフローシステムを用い、種々の濃度のベンザルコニウム標準溶液を 100 μ l 注入して作成した検量線のプロファイルを Fig. 7 に示す。ベンザルコニウム濃度が $2 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-4}$ M (7.08~53.1 μ g/ml) の範囲で良い直線性を示し、かつ再現性の良いピーク高さが得られ定量下限は 5×10^{-6} M であった。 1×10^{-4} M ベンザルコニウムの 10 回の測定結果より得られた相対標準偏差は 1.1% であった。又 1 時間当たりの試料処理数は 24 で、バッチ法と比べると再現性、試料処理数の点で優れていると思われる。

3.7 実試料への応用

ベンザルコニウムやベンゼトニウムなどの第四級アンモニウム塩は殺菌性があることから、消毒薬としてよく用いられる。救急ばんそうこうにも塩化ベンザルコニウムが使用されていることから、ばんそうこう中のベンザルコニウムの定量を試みた。試料溶液は 10% 酢酸 2.0 ml に救急ばんそうこう (1.5 cm $\times$ 2.0 cm) (市販品、標記濃度約 6 mg/l のロットの異なる製品) 1 枚を 15 分

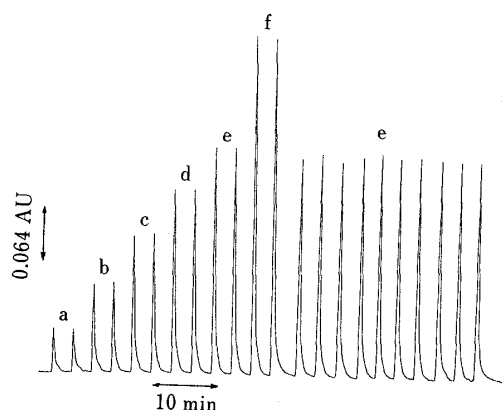


Fig. 7 FIA signals for benzalkonium chloride and reproducibility for 1×10^{-4} M benzalkonium chloride

Benzalkonium concentration ($\times 10^{-5}$ M): a, 2; b, 4; c, 6; d, 8; e, 10; f, 15. Sample: 100 μ l; BPB: 5×10^{-5} M; Quinine: 1×10^{-4} M; Solvent: DCE; Wavelength: 610 nm

Table 1 Determination of benzalkonium in pharmaceuticals (mg/l)

Sample	FIA	Orange II method
1	5.77	5.70
2	5.40	5.49
3	5.89	5.53
4	6.54	6.55
5	6.26	5.90

浸してベンザルコニウムを抽出し、その抽出液を 5 M 水酸化カリウムで中和して調製した。5 種類の試料溶液について本法及びオレンジ II 法¹²⁾により定量した結果を Table 1 に示す。両法における結果はほぼ一致し、又標記濃度ともほぼ一致した値が得られた。従って本法はベンザルコニウムの多検体分析法として有用であると思われる。

文 献

- 1) H. M. N. H. Irving, J. J. Markham: *Anal. Chim. Acta*, **39**, 7 (1967).
- 2) 金田吉男, 慶田雅洋: 衛生化学, **22**, 370 (1976).
- 3) T. Sakai, N. Ohno: *Chem. Lett.*, **1982**, 107.
- 4) T. Sakai: *Anal. Chim. Acta*, **147**, 331 (1983).
- 5) T. Sakai: *Analyst* (London), **108**, 608 (1983).
- 6) 酒井忠雄, 小島 聡, 佐伯栄二, 田中昌也: 分析化学, **35**, 177 (1986).
- 7) M. Tsubouchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **44**, 1560

(1971).

- 8) S. Motomizu, Y. Hazaki, M. Oshima, K. Toci: *Anal. Sci.*, **3**, 265 (1987).
- 9) 酒井忠雄: ぶんせき, **1987**, 260.
- 10) 本水昌二: *J. Flow Inject. Anal.*, **5**, 71 (1988).
- 11) 三瀬皓愛: *J. Flow. Inject. Anal.*, **5**, 87 (1988).
- 12) G. V. Scott: *Anal. Chem.*, **40**, 768 (1968).



Rapid spectrophotometric determination of benzalkonium in pharmaceuticals by extraction/FIA.

Toshihiko MIYAJI, Kiyokatu HIBI* and Tadao SAKAI**
(*Japan Spectroscopic Co., Ltd., 2967-5, Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192; **Department of Chemistry, Asahi University, 1851, Hozumi, Hozumi-cho, Gifu 501-02)

Bivalent BPB anion reacts with 10^{-5} M quinine in neutral media to form a 1 : 2 charge transfer complex in 1,2-dichloroethane, but not with 10^{-6} M benzalkonium. However, trace amounts of benzalkonium could be extracted into 1,2-dichloroethane with BPB only when $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M quinine was added in the extraction system giving a blue product. The molar absorptivity of the product was $50500 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 610 nm. The blue product can be used for selective and rapid spectrophotometric determination of benzalkonium by the FIA method. The carrier solution (0.8 M phosphate buffer, pH 7.5) was pumped at a 0.75 ml/min flow rate and 1×10^{-4} M quinine standard solution and 5×10^{-5} M BPB were pumped at 0.25 ml/min each. Sample solutions (100 μ l) were injected into the carrier stream by a six-way injection valve and mixed with the reagents in a 1 m reaction coil. The ion associate formed by quinine, BPB and benzalkonium was extracted into the organic phase in a 4 m extraction coil. The organic phase was separated by a phase separator with either a microporous polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane (pore size 0.5 μ m) or PTFE tubing (pore size 2 μ m), and put through a 8- μ l flow cell. Then the absorbance was measured at 610 nm and recorded as peak-shaped signals. Benzalkonium in the range of 5×10^{-6} M to 1.5×10^{-4} M could be determined and the relative standard deviation was 1.1% for 10 determinations of 1×10^{-4} M benzalkonium. The sample throughput was 24/h. The FIA method proposed here can be applied to the selective and rapid assay of benzalkonium in pharmaceuticals.

(Received August 7, 1989)

Keyword phrases

formation of ternary ion associate by quinine, BPB and benzalkonium; FIA coupled with solvent extraction; selective and rapid assay of benzalkonium in pharmaceuticals.