0.15~0.3 g of the sample is electrolyzed with a GC cathode and a platinum anode at 2.5 V for 4 hr. Copper deposited is dissolved in nitric acid and determined by the photometric neocuproine method.

The lower limits of determination are about 0.1 ppm.

(Received Apr. 8, 1968)

イオン交換クロマトグラフィーによるサリチル酸、キノフェン、アミノピリンの分離*

渡辺 兵蔵**， 鈴木 隆男***

解熱鎮痛剤であるサリチル酸、キノフェンおよびアミノピリンを、イオン交換クロマトグラフ的に分離する方法を検討した。

pH 4.6 に緩衝化した Amberlite CG-50 (Type II) のカラム (9×200~250 mm) に、混合試料 (各成分 1~2 mg) を通じたのち、エタノール 10 vol% を含む pH 4.6 の酢酸緩衝液を通じると、サリチル酸、キノフェンの順に溶出される。キノフェンの溶離が終わったところ、希塩酸 (0.1~1N) に切り替えるとアミノピリンが溶出される。定量は各成分の溶離液について、サリチル酸は波長 295 mμ，キノフェンは 255 mμ，アミノピリンは 250 mμ で吸光度を測定し、検量線より求めた。回収率は 3 成分とも平均 95% 以上であった。

1 緒 言

解熱剤の分離にイオン交換樹脂を利用した例として、吉野ら¹⁾ は多段式 カラムを用いて キニン、アミノピリン、カフェイン、アンチピリンおよびアセトアニリドの分離を行なった。Sjöström ら²⁾ はカフェインとアンチピリンの分離に Fe³⁺ 型イオン交換樹脂を用い、松本³⁾ はスルピリンの分離に、pH 6.0 に緩衝化した Amberlite CG-50 を用いて、分解物などを樹脂中に捕そくし、スルピリンは水洗により通過させて分離定量している。また関ら⁴⁾ はベンゼン核を有するカルボン酸 (サリチル酸、安息香酸など) を Amberlite IRC-50 の水素形に通じたのち、アセトン-メチルケトン-0.2N 塩酸を溶離剤として分離を行なった。

著者らは解熱鎮痛剤であるサリチル酸、キノフェンおよびアミノピリンをイオン交換クロマトグラフ的に分離定量する目的で、弱酸性陽イオン交換樹脂 Amberlite CG-50 を用いて種々検討した結果、3 成分を定量的に

分離できたので報告する。

2 実 験 法

2.1 実験試料および装置

サリチル酸およびキノフェンは日局のものを、エタノールから 2 回再結晶したものを用いた。アミノピリンは日局のものを水より 2 回再結晶して用いた。いずれも 1.0 mg/ml の濃度に溶かし別々に保存した。キノフェンは水に不溶のため、少量の希アンモニア水 (1N) に溶かし、水でうすめて 100 ml とした。

緩衝液は 0.2M 酢酸緩衝液を用いた。弱酸性陽イオン交換樹脂は Amberlite CG-50 (Type II) を常法に従ってコンディショニングを行なったのち、水素形として水洗し水中に保存した。

吸光度測定には回折格子型分光光度計 (日立 101) を使用した。また pH 測定にはガラス電極 pH メーター (東洋産業モデル 3) を用いた。

2.2 実験方法

水素形の樹脂約 10~13 cc に、目的の pH の緩衝液 100~200 ml**** を加えて 1 夜放置して樹脂を緩衝化したのち、内径 9 mm のガラス管に充てんしカラムをつく

* 医薬品分析におけるイオン交換樹脂の応用 (第 10 報)。前報は渡辺兵蔵：日化，83，54 (1962)。

** 県立山形工業高等学校：山形市緑町 1 丁目

*** 共立薬品工業株式会社：山形市蔵王桜田字四つ掘

**** エタノールを 10 vol% 加えておいたほうが、溶離の途中で樹脂の膨潤がなくつごうがよい。

る。樹脂の緩衝化 pH はろ液の pH を測定して決めた。

混合試料(各成分 1~2 mg) を緩衝液でうすめて 10 ml としカラムに通じる。通過後樹脂の緩衝化に用いたのと同じ緩衝液(エタノール 10 vol% を含む)を溶離液として通じる。流速は 0.3~0.5 ml/min 程度である。はじめサリチル酸が溶離し, ついでキノフェンが溶離してくる。キノフェンの溶離が終わったころ, 希塩酸(0.1~1N)に切り替えるとアミノピリンが溶出してくる。通過液は 1 フラクション 10 ml ずつサイフォンピペットで分取し, サリチル酸は波長 295 m μ , キノフェンは 255 m μ , アミノピリンは 250 m μ で吸光度を測定した。キノフェンとアミノピリンは Fig. 2 に示したように, 極大吸収がほとんど重なるので塩化第二鉄による呈色反応もあわせ用いた。キノフェンは呈色しないが, アミノピリンは紫色になるので区別できる。分離のめやすは吸光度で示し, 実際の定量の際は各成分のフラクションを一つにまとめて吸光度を測定し, あらかじめ作成した検量線から含有量を求めた。

3 実験結果と考察

3.1 樹脂の種類による吸着の相違

予備実験として, キノフェンとアミノピリンの樹脂の種類および樹脂形に対する吸着量をバッチ法で測定した。キノフェンおよびアミノピリンの各 1.0 mg/ml に水を加えて正確に 10 ml とし, これに樹脂 1.0 g を加えてときどき振り混ぜ, 1 時間後上澄液 1 ml をとり, 水でうすめて正確に 100 ml とし, 吸光度を測定して残留量を求め, はじめ加えた量から差し引いて吸着量を求めた。その結果を Table I および II に示した。

Table I からキノフェンは陽イオン交換樹脂の水素形

Table I Adsorption of chinophen (Batch method)

Kinds of resin	Adsorbed weights (μ g/g)				
	R-H	R-Na	R-NH ₄	R-OH	R-Cl
Amberlite CG-50	650	0	0		
" CG-120	1000	0	0		
" IR-410				556	742

Sample: 1 mg/10 ml; Resin: 1 g; Standing time: 1 hr

Table II Adsorption of aminopyrine (Batch method)

Kinds of resin	Adsorbed weights (μ g/g)				
	R-H	R-Na	R-NH ₄	R-OH	R-Cl
Amberlite CG-50	742	0	0		
" CG-120	888	180	82		
" IR-410				0	0

Sample: 1 mg/10 ml; Resin: 1 g; Standing time: 1 hr

に吸着されるが, ナトリウム形やアンモニウム形には吸着されない。キノフェンはまた陰イオン交換樹脂にも交換吸着される。これはカルボキシル基のほかに核窒素有するので, 両性的な性質を有するためと思われる。一方アミノピリンは陽イオン交換樹脂にのみ吸着され, 陰イオン交換樹脂には吸着されない。また弱酸性型では水素形に吸着されるが, ナトリウム形やアンモニウム形には吸着されることがわかった。

3.2 吸収曲線と検量線

溶離液の定量には簡単な吸光度法を用いることにした。Fig. 1 にサリチル酸, キノフェンおよびアミノピリンの紫外吸収曲線を示した。キノフェンは波長 255 m μ 付近と 325 m μ 付近に, サリチル酸は 225 m μ 付近と 295 m μ 付近に, アミノピリンは 250 m μ 付近に極大吸収があることがわかった。キノフェンの吸収曲線は酸性の場合と, 中性, アルカリ性とは若干異なるが, pH 3.6~6.9 の範囲では, 255 m μ における極大吸収は変わりなかった。また波長 325 m μ における吸収は定量には使えないことがわかった⁵⁾。

Fig. 1 Absorption spectra of chinophen, aminopyrine and salicylic acid

(1) Chinophen 10 μ g/ml in water; (2) Aminopyrine 10 μ g/ml in 0.1N HCl; (3) Salicylic acid 10 μ g/ml in water

検量線は緩衝液の pH, エタノールの含有量などによって, 直線の傾斜は若干異なるが, サリチル酸とキノフェンは pH 4.6, エタノール含有量 10 vol% の場合の検量線を Fig. 2, 3 に示した。またアミノピリンは塩酸の濃度によって若干異なるが, その 1 例を Fig. 4 に示した。キノフェンの場合は 10 μ g/ml, サリチル酸は 20 μ g/ml, アミノピリンは 25 μ g/ml までの濃度範囲でベールの法則を満足することがわかった。

Fig. 2 Calibration curve for chinophen

Solvent: Acetate buffer soln. (pH 6.4)+Ethanol (9:1); Wavelength: 255 mμ; Reference: Reagent blank

Fig. 3 Calibration curve for salicylic acid

Solvent: Acetate buffer soln. (pH 4.6)+Ethanol (9:1); Wavelength: 295 mμ; Reference: Reagent blank

3.3 水素形の樹脂を用いた場合

予備実験としてはじめH形の樹脂を用いて、溶離液に0.1M 塩化アンモニウム、塩化ナトリウムおよび酢酸ナトリウムを選び実験したところ、いずれの場合もサリチル酸とキノフェンが重なり不適当と思われた。次に溶離

Fig. 4 Calibration curves for aminopyrine

Solvent: (1) 0.1N HCl, (2) 1N HCl; Wavelength: 250 mμ; Reference: Reagent blank

液に水を用いると、サリチル酸とキノフェンは一応分離されるが、いずれも定量的に溶離されない。そこで水にエタノールを加えてやると、かなり効果があるが、キノフェンの回収率がわるく、エタノールの含有量が20 vol% 以上になると、サリチル酸とキノフェンの一部が重なり、また樹脂が膨潤するため流速がおちて不適当である。

混合試料をH形のカラムに通じたのち、pH 2.0 の緩衝液を通じると、キノフェンとアミノピリンの溶離が逆転する。しかしアミノピリンとサリチル酸が重なる。pH 7 以上の緩衝液を用いると、サリチル酸とキノフェンが重なり不適当である。次に pH 5.6 ぐらいの緩衝液を用いると、サリチル酸とキノフェンが分離するが、回収率がわるく、樹脂が水素形から一部ナトリウム形に変わるため膨潤し、流速がおちて長時間を要するので適当でない。

3.5 樹脂を緩衝化した場合

3.5.1 分配係数と pH との関係 樹脂を pH の異なる緩衝液で緩衝化した場合の各試料の分配係数 (K_d) をパッチ法で測定した。pH 7 以下は酢酸緩衝液、pH 7 以上はアンモニア緩衝液を用いた。

風乾した水素形の樹脂 0.1 g を 50 ml 入りの三角フラスコにひょう取し、これに pH の異なる緩衝液 20 ml を加え、ときどき振り混ぜ2時間放置後、試料 1 ml (1.0 mg) を加えじゅうぶん振り混ぜたのち1夜静置して平衡に到達させた。それからろ紙でろ過しろ液の pH を測定した。ついでろ紙を水で洗い、さきのろ液と洗液

を合わせて全量を 100 ml とし, 水を対照として吸光度を測定した. 別に試料を加えないで同様操作した場合をブランクとして残留量および吸着量を求めた. 分配係数は次式により算出した.

$$K_d = \frac{\text{吸着量 (\%)}}{\text{非吸着量 (\%)}} \cdot \frac{\text{液量 (ml)}}{\text{樹脂量 (g)}}$$

実験の結果を Fig. 5 に示した. キノフェンは酸性側で吸着されるが, pH の上昇につれて吸着されなくなる. アミノピリンは pH 4.5 付近に最大吸着量があり, pH 4.5 以下および以上では吸着されにくくなる. またサリチル酸は pH 2 付近で若干吸着されるが, これはおそらく分子吸着と思われる. Fig. 5 から 3 者の分離には pH 4~5 ぐらいが適当である.

3.5.2 分配係数に及ぼすエタノールの影響 溶離剤にエタノールを加えると溶離効果を増すが, これを確かめるために, キノフェンの場合について調べた. pH 4.4 の緩衝液にエタノールを種々の割合で加えた場合の K_d を測定した. K_d の測定法は 3.5.1 と同様である. その結果を Fig. 6 に示した. Fig. 6 によるとエタノールの含有量が増すと K_d が減少することがわかる.

Fig. 5 Effect of pH on distribution coefficient of chinophen (1), aminopyrine (2) and salicylic acid (3)

Resin : 0.1 g ; Sample : 1.0 mg ; Standing time : 20 hr

Fig. 6 Effect of ethanol on distribution coefficient of chinophen

Resin : 0.1 g ; Buffer soln. pH 4.4 ; Chinophen : 1 mg ; Standing time : 20 hr

3.5.3 カラムの長さとの関係 樹脂を pH 4~5 ぐらいに緩衝化した場合, 分離が能率よく行なわれるような条件を知るために, カラムの長さとの関係を調べた.

サリチル酸とキノフェンの分離がむずかしいので, 両者の場合について, ピークまでの容積を測定し Table III のような結果を得た. なおエタノールの影響について調べた.

サリチル酸のピークはカラムの長さにはほとんど影響されないが, キノフェンのピークはカラムの長さ, pH およびエタノールの有無によって影響される. たとえば pH 4.6 エタノール含有量 10 vol% の場合は, カラムの長さが 10 cm 程度ではサリチル酸とキノフェンの一部が重なり不適當である. またカラムの長さが 30 cm 程度になると, サリチル酸とキノフェンのピークが離れすぎて長時間を要する. カラムの長さが 20 cm 程度でもエタノールを含まない場合は, やはりピークが離れすぎて不適當であることがわかった. Table III から pH が比較的低い場合はカラムの長さを短くし, pH が比較的高い場合はカラムの長さを長くすべきであることがわかる.

3.5.4 分離条件 樹脂を pH 4~5 ぐらいに緩衝化しておき, 同じ緩衝液を溶離剤とした場合は, サリチル酸とキノフェンは分離されるが, 多量の溶離液を必要とし, しかも定量的に溶離されない. pH 4.6 の場合の例を Fig. 7 に示した. 次に溶離液にエタノールを 10 vol%

Table III Relationship between length of column and volume of peak

No.	Length of column (mm)	Buffered pH	Salicylic acid (ml)	Chinophen (ml)	Notes
1	125	4.4	20	100	
2	140	"	30	130	
3	130	"	20	90	Ethanol 10%
4	190	"	30	150	"
5	200	4.6	30	180	
6	105	"	30	60	Ethanol 10%
7	150	"	30	100	"
8	200	"	30	100	"
9	290	"	30	160	"
10	180	"	20	70	Ethanol 20%
11	160	4.8	30	70	" 10%
12	190	5.0	30	130	Tailing
13	195	"	20	80	Ethanol 10%

Sample : Salicylic acid 2mg, Chinophen 1mg ;
Underlined part doubles in same part

Fig. 7 Elution curve

S : Salicylic acid (2.0 mg) ; C : Chinophen (1.0 mg) ;
A : Aminopyrine (2.0 mg) ; Resin : Amberlite CG-50
(200~400 mesh, pH 4.6) ; Column : 9×200 mm

Fig. 8 Elution curve

S : Salicylic acid (1.0 mg) ; C : Chinophen (1.0 mg) ;
A : Aminopyrine (1.0 mg) ; Resin : Amberlite CG-50
(200~400 mesh)buffered pH 4.0 ; Column : 9×210mm

の割合で加えた場合について、溶離の状態と pH との関係調べた。その例を Fig.8~12 に示した。pH 4~4.4 ではサリチル酸とキノフェンのピークが離れすぎる

Fig. 9 Elution curve

S : Salicylic acid 2.0 mg ; C : Chinophen 1.0 mg ;
A : Aminopyrine 1.0 mg ; Resin : Amberlite CG-50
(200~400 mesh, pH 4.6) ; Column : 9×190 mm

Fig. 10 Elution curve

S : 2.0 mg ; C : 1.0 mg ; A : 1.0 mg ;
Column : 9×170 mm

Fig. 11 Elution curve

S : 2.0 mg ; C : 1.0 mg ; A : 1.0 mg ;
Column : 9×190 mm

ので、pH 4.6 ぐらいが適当と思われた。pH 5 ぐらいになるとサリチル酸とキノフェンのピークが接近し、pH 5~6 ぐらいになるとサリチル酸とキノフェンの一部が重なり、アミノピリンも溶離されてしまう。

Table IV Separation of salicylic acid, chinophen and aminopyrine

No.	Salicylic acid			Chinophen			Aminopyrine		
	Added (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)	Added (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)	Added (μ g)	Found (μ g)	Recovery (%)
1	1000.0	942	94.2	1000.0	1078	107.8	1000.0	1001	100.1
2	2000.0	2040	102.0	"	1104	110.4	"	1030	103.0
3	"	1904	95.0	"	1032	103.2	"	1090	109.0
4	"	2010	100.5	"	1015	101.5	"	900	90.0
5	1000.0	1030	103.0	"	1025	102.5	"	950	95.0
6	2000.0	2040	102.0	"	930	93.0	"	936	93.6
7	1000.0	950	95.0	"	865	86.5	"	990	99.0
8†	2000.0	1970	98.4	2000.0	1980	99.0	2000.0	1888	94.4
9	"	1950	97.5	1000.0	1032	103.2	"	1880	94.0
10†	"	1970	98.5	2000.0	2035	103.5	"	1785	89.3
Mean			98.63			101.06			96.74

Amberlite CG-50 (Type II); Bufferized pH: 4.6; Column: 9×200 mm; † 9×250 mm

Fig. 12 Elution curve

S: 2.0 mg; C: 1.0 mg; A: 1.0 mg;
Column: 9×175 mm

Fig. 13 Elution curve

S: 2.0 mg; C: 2.0 mg; A: 2.0 mg;
Column: 9×250 mm

タノールの量は 10 vol% とした. また各成分 2.0 mg の場合について検討したところ, カラムの長さは 25 cm ぐらいが適当であることがわかった. その例を Fig. 13 に示した.

アミノピリンの溶離は溶離液の pH を上げててもよいが, むしろ希塩酸のほうが効果的である. 塩酸の濃度は 0.1~1.0 N の間で変わらないようである.

3.6 分離例

以上の実験結果を参考にして, 各成分の含有量を変えた場合の分離例を Table IV に示した. 回収率は 10 回の平均値, サリチル酸 98.63%, キノフェン 101.06%, アミノピリン 96.74% であった.

4 総 括

サリチル酸, キノフェンおよびアミノピリンの 1~2 mg を, 弱酸性陽イオン交換樹脂 Amberlite CG-50 (Type II) の pH 4.6 に緩衝化したカラムを用い, 溶離液にエタノール 10 vol% を含む pH 4.6 の緩衝液を用いて 3 成分を分離することができた. 回収率はいずれも平均 95% 以上であった.

本法は分離にやや長時間を要するが, 操作が簡単で定量も紫外吸収スペクトルを利用できるので便利である.

終わりにのぞみ, ご指導をいただいた大阪市立工業研究所吉野俊雄博士に深謝する.

(昭和 41 年 10 月, 日本化学会・日本分析化学会東北地方大会; 昭和 42 年 10 月, 日本分析化学会第 16 年会において一部講演)

文 献

pH 4.6 の場合エタノールの含有量を 20 vol% にすると, サリチル酸とキノフェンの一部が重なるので, エ

- 1) 吉野俊雄, 杉原瑞穂: 科工, **31**, 300 (1957).
- 2) O. E. Sjöström, L. Nykänen: *J. Am. Pharm.*

Assoc., 47, 248 (1958).

3) 松本引一：薬理学, 25, No. 4, 62 (1965).

4) T. Seki, K. Inamori, K. Sano : *J. Biochem.*, 46, 1953 (1959).

5) 渡辺兵蔵：山形工業高校紀要, No. 2, 7 (1967).

☆

Separation of salicylic acid, chinophen and aminopyrine by ion-exchange chromatography.
Hyozo WATANABE* and Takao SUZUKI** (*Yamagata Technical High School Midori-cho, Yamagata-shi ; **Kyoritu Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Zaōsaku-rada, Yamagata-shi)

The separation of salicylic acid, chinophen and

aminopyrine by the use of weakly acidic resins (Amberlite CG-50, type II) has been investigated.

The mixed sample (1~2 mg) was adsorbed on a column (9×200~250 mm) buffered to pH 4.6, and the buffer solution of pH 4.6 including 10 vol% of ethanol was passed through the column for eluting salicylic acid and, successively, chinophen.

Dilute hydrochloric acid (0.1~1N) was then applied to elute aminopyrine.

The components in effluents were determined by u. v. spectrophotometry.

The average recovery of each component was higher than 95%.

(Received Apr. 8, 1968)

金属炭化物、窒化物および硫化物の赤外吸収スペクトル*

神森 大彦，佐藤 公隆，黒沢 文夫**

金属炭化物 12 種，窒化物 11 種および硫化物 7 種の合わせて 30 種の無機物質の赤外吸収スペクトルを測定し，その分析への応用性について検討した．試料調製は臭化カリウム錠剤法により，測定は $1400\sim 400\text{cm}^{-1}$ (約 $7\sim 25\mu$) の波数 (波長) 範囲で行なった．その結果， Al_4C_3 ， B_4C の炭化物， AlN ， BN ， Si_3N_4 ， WN の窒化物および Al_2S_3 ， FeS_2 ， MnS ， NiS ， PbS の硫化物に特性吸収が認められた．特に窒化ホウ素はきわめて感度がよく，臭化カリウム 300 mg に対して $2\sim 3\mu\text{g}$ でも検出できることがわかった．

1 緒 言

鋼中での介在物や析出物はきわめて重要な役割を果たしており，それらを抽出分離して定量することにより，その挙動を明確に捕えようとする試みが盛んに行なわれている．最近では，従来の電解法や湿式法に加えて機器分析法，たとえばデリバトグラフィー，X線回折，電子線回折，X線マイクロアナライザー (EPMA) などの手段の利用が活発になってきている．しかし，これらの方法はいずれも長所短所があるため，決定的な手段になるとはかぎらない．このような理由から，今まで無機分析にはほとんど利用されていなかった赤外吸収スペクトル法を応用してみるのも興味深いと考えられる．

赤外吸収スペクトル法は，a) 試料が 1 mg 以下でもよいこと，b) デリバトグラフィーなどのように反応と

か分解を利用していないこと，また c) 非晶質でも検出できることなどの利点があるので，試料に応じて適宜利用すれば今まで得られなかった重要な情報が得られるものと期待される．しかし，本報で対象とするような無機物質の吸収スペクトルの集積はほとんどなく，一部に Ramdas の報告¹⁾のみみられるにすぎないのが現状である．

著者らは，赤外吸収スペクトル法の鉄鋼分析への応用研究^{2)~6)}を進めているが，今回はこのような観点からさきに報告した酸化物²⁾に引き続いて炭化物，窒化物および硫化物，合わせて 30 種についてその赤外吸収スペクトルを検討した．

2 実 験

2.1 測 定

Perkin-Elmer 521 型回折格子分光光度計を使用した．実験は臭化カリウム錠剤法によった．すなわち試料約 1 mg (BN の場合は $20\mu\text{g}$) を微量天秤ではかりとり，臭化カリウム粉末 300 mg と合わせ，めのう乳ばちで均

* 赤外吸収スペクトルの鉄鋼研究への応用 (第 5 報)．
第 4 報は神森大彦，山口直治，佐藤公隆，黒沢文夫：金属誌，32, 779 (1968)

** 八幡製鉄株式会社東京研究所：神奈川県川崎市井田