文 献

- 1) P. Spacu, C. Ianu : *Z. anal. Chem.*, **174**, 87 (1960).
- 2) H. Strger, A. Storz : *Pharmazie*, **16**, 126 (1961).
- 3) G. W. Hargreaves : *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **15**, 100 (1926).
- 4) M. E. Auerbach : *Anal. Chem.*, **15**, 492 (1943).
- 5) P. B. Marshall, E. W. Rogero : *Biochem. J.*, **39**, 258 (1945).
- 6) 堀岡正義 : 薬誌, **77**, 200 (1957).
- 7) 堀岡正義 : 同上, **77**, 206 (1957).

☆

Spectrophotometric determination of quinine hydrochloride in pharmaceutical preparations.

(Studies on analyses of mixed pharmaceutical preparations. XIII.) Masayoshi TATSUZAWA*, Shuji NAKAYAMA** and Akira OKAWARA*** (*National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya-ku, Tokyo; **Fujimoto Seiyaku Co. Ltd., Nishi-otuka-machi, Matubara-shi, Osaka-fu; ***Sampo Seiyaku Co. Ltd., Shinjuku-ku, Tokyo)

Quinine hydrochloride (I) reacts with Bromophenol Blue in an acid medium (pH 6.2) to give a red color. This chromogen can be extracted into benzene-

chloroform (1:1) and shows an absorption maximum at 585 m μ . The recommended analytical procedure is as follows.

Take a sample containing 40 mg of (I) in a stoppered flask. Add 5 ml of dil. HCl and 50 ml of water, and warm on a water bath at 60°C.

Cool to room temperature. Transfer the solution to a 100 ml volumetric flask, and add water to make up to 100 ml. Centrifuge this solution, and pipet 50 ml of the supernatant into a 100 ml beaker. Add 10 ml of 0.5M KH₂PO₄ solution and adjust pH to 6.2 with 0.1N NaOH. Transfer the solution to a 100 ml of volumetric flask, and add water to make up exactly to 100 ml.

Transfer a 2 ml aliquot into a 50 ml glass-stoppered centrifuge tube and add 2 ml of buffer (pH 6.2), 1 ml of 0.06% Bromophenol Blue solution and 20 ml of benzene-chloroform (1:1). Shake for about 5 min, centrifuge and allow to settle the benzene-chloroform layer.

Measure the absorbance at 585 m μ (E_T) against benzene-chloroform.

At the same time, measure the absorbance of the standard solution (E_S) and determined the amount of (I) by $E_T/E_S \times 1.100$.

Quinine sulfate was analysed by the same method, the value being calculated by $E_T/E_S \times 1.048$.

(Received Aug. 21, 1969)

混合製剤中のエチル炭酸キニーネの定量*

井上 哲男, 立沢 政義**, 中 込 誠***

(1969年8月21日受理)

エチル炭酸キニーネはアルカリ性で加熱するとキニーネとなり, これは酸性 (pH 6.2) でブロムフェノールブルーと反応させると赤色を呈する。これはベンゼン-クロロホルム混液 (1:1) で抽出すると 585 m μ に吸収の極大を示す。

この反応を利用して混合製剤中のエチル炭酸キニーネの比色定量法を確立した。

1 緒 言

最近, 混合製剤中エチル炭酸キニーネを配合したもの

* 混合製剤の分析に関する研究 (第14報). 第13報は立沢政義, 中山修二, 大河原 晃: 本誌, **19**, 761 (1970)

** 国立衛生試験所薬品部: 東京都世田谷区上用賀1丁目

*** 理研新薬株式会社: 東京都江戸川区平井

が多く市販され, これの定量法の作成が必要となり検討した結果, 新定量法を確立したので報告する。

エチル炭酸キニーネの比色定量法について報告はあまりなく, 滴定法, 紫外部吸収スペクトル法などでは混合製剤の場合共存成分の影響を受けやすく利用できない。本品は赤外線吸収スペクトル法^{1,2)}, けい光法などでも定量可能であるが, 一般性の点を考慮し, 比色法を検討した。

Chart 1

一般にアミン, 4級アンモニウム塩などはフタレイン系色素と結合して有機溶媒に可溶性の有色化合物を生成することが知られている^{3)~6)}. 著者はさきに塩酸キニーネ, 硫酸キニーネなどをブロムフェノールブルー (以下BPBと略記) と pH 6.2 で反応させ比色定量する方法を報告した⁷⁾. 本品もこの試薬で呈色するので比色定量を試みたが感度がきわめてわるく好ましくなかった. しかし本品はアルカリ性で加熱することによりエステル結合が切れてキニーネとなるので, いったん加水分解後色素法により定量することを試みたところ良好な結果を得たので報告する.

2 実験方法

2.1 装置および試薬

日立 EPS-3T 型自記分光光度計, 日立 124 型分光光度計, 日立 EPIG 型紫外分光光度計, 東亜電波 HM-5 型 pH メーター.

エチル炭酸キニーネ (日局適品) およびエチル炭酸キニーネを配合した市販製剤.

0.06% BPB 溶液: BPB 60 mg をとり, リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) を加えて溶かし 100 ml とする.

リン酸塩緩衝液 (pH 6.2): 0.2M リン酸二水素カリウム液 50 ml をとり, 0.2N 水酸化ナトリウム液を加えて pH 6.2 に調製し, 水を加えて 100 ml とする.

0.2M リン酸二水素カリウム液.

ベンゼン (特級), クロロホルム (特級), ベンゼン-クロロホルム混液 (1:1), エタノール (特級), 0.1N 塩酸, 1N 水酸化ナトリウム液, 0.2N 水酸化ナトリウム液, 希塩酸.

2.2 エチル炭酸キニーネ標準液

日本薬局方エチル炭酸キニーネをデシケーター (硫酸) で 24 時間乾燥したものの約 65 mg を精密に量り, 0.1N 塩酸 10 ml を加えて溶かし, さらに水を加えて 100 ml とする. この液 10 ml を正確に 50 ml のフラスコにとり, エタノール 3 ml および 1N 水酸化ナトリウム液 2 ml を加え, 還流冷却器を付け沸騰水中で 10 分間加熱する. 冷後, 0.2M リン酸二水素カリウム液 10 ml および希塩酸を加えて pH 6.2 に調整し, 50 ml のメスフラスコに移し, 水を加えて 50 ml とし, これを

エチル炭酸キニーネ標準液とする.

2.3 定量法

散剤, 錠剤, カプセル剤または粒剤.

本品の 20 包または 20 個以上をとり, その重量を精密に量り, 粉末とする. エチル炭酸キニーネ ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$) 約 65 mg に対応する量を精密に量り, 0.1N 塩酸 10 ml および水 50 ml を加え, とときき振り混ぜながら 60°C の水浴中で 10 分間加温する. 冷後, 100 ml のメスフラスコに移し, 水を加えて 100 ml とし, これを遠心分離する (必要なら過後 100 ml に調製する). 上澄液 10 ml を正確に量り, 50 ml のフラスコに入れエタノール 3 ml および 1N 水酸化ナトリウム液 2 ml を加え以下 2.2 に準じて操作し, これを試料溶液とする.

標準液 (S) および試料溶液 (T) の 3 ml ずつを 50 ml の遠心沈でん管にとり, 緩衝液 2 ml および 0.06% BPB 溶液 1 ml を加えて振り混ぜ, さらにベンゼン-クロロホルム混液 20 ml を正確に加えて 5 分間振り混ぜる. これを遠心分離後ベンゼン-クロロホルム層につきベンゼン-クロロホルムを対照として層長 10 mm で波長 585 m μ における吸光度 E_S および E_T を測定する.

エチル炭酸キニーネ ($\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$) の量 (mg)

$$= \text{標準品の量 (mg)} \times \frac{E_T}{E_S}$$

3 実験結果および考察

3.1 吸収曲線

標準溶液 (エチル炭酸キニーネ 130 $\mu\text{g/ml}$ 含有) 3 ml をとり, 定量法に従って発色操作を行なった液の吸収曲線は Fig. 1 に示すとおりで, 585 m μ に吸収極大を示した.

3.2 検量線

標準液 (エチル炭酸キニーネ 33 $\mu\text{g/ml}$ ~ 260 $\mu\text{g/ml}$) 3 ml ずつをとり 定量法に従って発色操作を行ない, それぞれの吸光度を測定した結果, Fig. 2 に示すとおり

Fig. 1 Absorption spectra of hydrolyzate and quinine ethylcarbonate-Bromophenol Blue complexes

--- Quinine ethylcarbonate 10 μ g; — Quinine ethylcarbonate (after hydrolysis) 390 μ g; 0.06% Bromophenol Blue : 1 ml; Buffer solution (pH 6.2) : 2 ml; CHCl_3 -Benzene (1 : 1) : 20 ml

Fig. 2 Calibration curve

0.06% Bromophenol Blue : 1 ml; Buffer solution (pH 6.2) : 2 ml; CHCl_3 -Benzene (1 : 1) : 20 ml

198~780 μ g の間において直線性を示した。また本品は約 98 μ g 以下では発色しない。

3.3 定量条件の検討

本法はエチル炭酸キニーネをアルカリ分解してキニーネとし BPB と反応させる方法であるから反応は前報で

報告した条件を準用した。したがって呈色試薬は0.06% BPB 溶液を用い pH 6.2 で反応させ、ベンゼン-クロロホルム混液 (1 : 1) で抽出する方法を行なった。

3.3.1 水解温度および水解時間と吸光度の関係

本品は BPB に対する反応性がわるく Fig. 1, Table I に示すとおりで感度が低い。したがってアルカリでエステル結合を切断し、キニーネとすることを試みた。

エチル炭酸キニーネ溶液 (650 μ g/ml) 10 ml をとり、エタノール 3 ml および 1N 水酸化ナトリウム液 2 ml を加え室温および沸騰水浴中において分解を行ない、試料溶液を調製後、定量法に従って操作し水解時間と吸光度の関係を検討した。本品は塩酸性では水溶性であるが、アルカリ性になると不溶性の遊離塩基を析出するため水解がふじゅうぶんになり、かつ長時間を要する欠点があった。したがって少量のエタノールを加えて遊離塩基を溶解して水解する方法を試みた。結果は Fig. 3 に示すとおり室温では水解しにくく熱時 5~10 分以上で最大の吸光度を示した。またアルカリおよびエタノール量を検討した結果、1N 水酸化ナトリウム液 2 ml, エタノール 3 ml が最適であった。またキニーネ塩としての回収率は 99.8% であった。

以上の結果から分解条件は 1N 水酸化ナトリウム液 2 ml, エタノール 3 ml を加え 10 分間水浴中で加熱することにした。

3.3.2 水解物の確認

エチル炭酸キニーネはアルカリ性で加熱するとキニーネとなることは知られている

Fig. 3 Effect of hydrolysis time

— Δ — 25°C; — $\circ$ — 100°C; Quinine ethylcarbonate : 390 μ g; 0.06% Bromophenol Blue : 1 ml; Buffer solution (pH 6.2) : 2 ml; CHCl_3 -Benzene (1 : 1) : 20 ml

Fig. 4 Infrared spectra of quinine ethylcarbonate (1), quinine (2) and hydrolyzate (3)

が, これを確かめるため水解物を単離し, 臭化カリウム法で IR を測定したところ沸騰水浴中 10 分以上加熱したものは, エチル炭酸キニーネ特有のエステル型カルボニル基に基づく 1749 cm^{-1} の吸収は完全に消失し, かつキニーネの IR スペクトルと一致した。

以上の結果から熱時 10 分でアルカリ分解した場合の成績体はキニーネであることが確かめられた。

3.3.3 共存物の影響 通常感冒剤に配合される塩基性物質につき加水分解後その影響を調べた。従来の色素法の条件 (pH 4.6) では BPB は多くの塩基性物質と反応するが pH 6.2 においてはエチル炭酸キニーネ以外の成分は反応しがたく, マレイン酸クロルフェニラミンおよびジフェンヒドラミンは 2 倍以上, メチルエフェドリンは 10 倍以上ではじめて反応する。また他の成分は 10 倍以上でも反応しなかった (Table I)。

以上のとおり本反応は選択性が大である点から混合製剤中のエチル炭酸キニーネの定量にはじゅうぶん実用性のある方法である。

3.3.4 調製試料および市販製剤の定量 Table II に示した処方ものを調製し, 本法により定量を行なったところ回収率は 98.68~99.25% で, 偏差 1.05, 1.28% で良好な結果を得た。

また, 市販製剤についての定量結果は Table III に示すとおりである。

Table I Effects of various compounds on absorbance

Compounds	Amount (mg)				
	0.2	0.4	0.8	2.0	4.0
Quinine ethylcarbonate†	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
"	0.24	0.48	0.95	1.58	1.58
Quinine hydrochloride†	0.22	0.55	1.02	1.59	1.59
Sulpyrine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aminopyrine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Barbital	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenacetin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetaminophen	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ethoxybenzamide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Salicylamide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetylsalicylic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Caffeine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ephedrine hydrochloride	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03
dl-Methylephedrine hydrochloride	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15
Noscapine hydrochloride	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Diphenhydramine hydrochloride	0.00	0.00	0.05	0.20	0.55
Phenylephrine hydrochloride	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Chlorpheniramine maleate	0.00	0.01	0.04	0.08	0.18
Codeine phosphate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Taurine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

† Without hydrolysis

4 結 語

本法はエチル炭酸キニーネをアルカリ分解してキニー

Table II Recovery of quinine ethylcarbonate in mixed samples

Compounds	A (mg)	B (mg)	C (mg)
Quinine ethylcarbonate	50	50	50
Aminopyrine	—	—	100
Phenacetin	80	300	100
Acetaminophen	—	—	50
Caffeine	20	50	10
Chlorpheniramine maleate	1.3	2.5	2.0
Sulpyrine	70	—	—
<i>dl</i> -Methylephedrine hydrochloride	9	15	10
Noscapine hydrochloride	—	10	—
Taurine	—	100	—
Lactose	50	—	—
CaCO ₃	200	—	—
Starch	100	100	100
$\bar{X}(n=5)$ (%)	99.25	98.68	98.95
σ (%)	1.05	1.28	1.05

Table III Analyses of quinine ethylcarbonate in commercial samples

	Sample		
	A (Granu.)	B (Granu.)	C (Tab.)
$\bar{X}(n=3)$ (%)	100.05	99.48	98.73

ネを生成させ、pH 6.2 で BPB と反応させ、色素結合体をベンゼン-クロロホルム混液で抽出して定量する方法である。

通常色素法によるアミンの定量は pH 4.6 で行なっているが、本法は pH 6.2 で定量するため選択性が大であり、妨害物がきわめて少ない。したがって混合製剤中のエチル炭酸キニーネの定量法としてじゅうぶん実用性のある方法である。

終わりに、本研究を行なうにあたり終始ご激励いただいた国立衛生試験所長石館守三博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 立沢政義：本誌，**17**，782 (1968)。

- 2) 立沢政義：公定書協会会報，**22**，46 (1968)。
- 3) M. E. Auerbach：Anal. Chem.，**15**，492(1943)。
- 4) P. B. Marshall, E. W. Rogero：Biochem. J.，**39**，258 (1945)。
- 5) 堀岡正義：薬誌，**77**，200 (1957)。
- 6) 堀岡正義：同上，**77**，206 (1957)。
- 7) 立沢政義，中山修二，大河原晃：本誌，**19**，761 (1970)。

☆

Spectrophotometric determination of quinine ethylcarbonate in pharmaceutical preparations.

(Studies on analyses of mixed pharmaceutical preparations. XIV.) Tetsuo INOUE, Masayoshi TATSUZAWA* and Makoto NAKAGOME** (*National Institute of Hygienic Sciences, Setagaya-ku, Tokyo; **Riken Shinyaku Co. Ltd., Edogawa-ku, Tokyo)

Quinine ethylcarbonate (I) is refluxed with 1N NaOH to liberate quinine which react with Bromophenol Blue in an acid medium (pH 6.2) to give a red color. This chromogen can be extracted into benzene-chloroform (1:1) and shows an absorption maximum at 585 mμ. The recommended procedure is as follows.

Take a sample containing 65 mg of (I) in a stoppered flask. Add 5 ml of dil. HCl and 50 ml of water, and warm on a water bath at 60°C. Cool to room temperature. Transfer the solution to a 50 ml volumetric-flask and add water to the make. Centrifuge the solution, and pipet 10 ml of the supernatant into a 50 ml flask. Add 3 ml of ethanol and 2 ml of 1N NaOH, and reflux the mixture for 10 min. Cool to room temperature. Add 10 ml of KH₂PO₄ solution and adjust pH to 6.2 with dil. HCl. Transfer the solution to a 50 ml volumetric flask, add dilute with water exactly to 50 ml.

Transfer a 3 ml aliquot into a 50 ml glass-stoppered centrifuge tube and add 2 ml of buffer (pH 6.2), 1 ml of 0.06% Bromophenol Blue solution and 20 ml of benzene-chloroform (1:1). Shake for about 5 min., centrifuge and allow to settle the benzene-chloroform layer. Measure the absorbance at 585 mμ (E_T) against benzene-chloroform. At the same time the absorbance of the standard solution (E_S) is determined and the amount of (I) is calculated by E_T/E_S .

(Received Aug. 21, 1969)

☆

☆