原子吸光分析法によるマレイン酸クロルフェニラミンの間接定量*

喜谷 喜徳, 早乙女俊行**, 加藤 征将***, 小池 久**

(1973 年 9 月 5 日受理)

原子吸光分析法による医薬品の定量に関する研究の一環として, マレイン酸クロルフェニラミン (以下 MCP と略記) の定量を試みた。

MCP は水溶液中で銅と反応しないが, 1:1 のジコン-銅キレート¹⁾²⁾と反応し三元錯体を生成し, クロロホルムで抽出される。そこでこの抽出液中の銅を原子吸光分析法により測定すれば, 間接的に MCP を定量することが可能となるので, その定量条件を検討した。

その結果, pH 4.3 の Britton-Robinson 緩衝液を用い, 銅(II)濃度は MCP 濃度の 4 倍以上, ジコン濃度は MCP 濃度の約 1.3 倍以上, 振り混ぜ時間は 5 分間, 抽出回数は 1 回という条件により, MCP は 1.9~27.4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で吸光度比と直線関係が得られ, 標準偏差は 0.62 (相対標準偏差は 2.18%) であった。

三元錯体は薄層クロマトグラフィーに単一スポットを与え, MCP, ジコン, 銅の 3 成分より成ることが確認された。本法は原子吸光分析法による MCP の定量法として使用できる。

1 緒 言

マレイン酸クロルフェニラミン (以下 MCP と略記) はプロピルアミン型³⁾の抗ヒスタミン剤として重要な薬剤である。

著者らは医薬品の原子吸光分析法による定量法の研究の一環として, 今回は, MCP のように金属とのキレート生成官能基を持たずそのままでは原子吸光分析法が適用されないものについて検討した。すなわち, MCP のような第 3 級アミンは $-\text{SO}_3\text{H}$ のような陰イオンとなりうる基を有するキレート試薬とイオン会合体を生成し, さらに金属と三元錯体を生成するので, その三元錯体を有機溶媒に抽出し, 原子吸光分光光度計で金属を測定することによりキレート官能基を持たない医薬品でも定量が可能となると考えた。

MCP の定量法としては, 辻ら⁴⁾の行なったライネケット法⁵⁾, M. Hurd ら⁶⁾の König 反応を改良した比色法⁷⁾, 水酢酸を溶媒とした過塩素酸による非水滴定法⁸⁾, チオシアン酸コバルト法⁹⁾, ヨウ化ビスマスで沈殿後キレート滴定する方法¹⁰⁾, 紫外外部吸収スペクトル

法¹¹⁾, スルホフタレイン系色素による抽出比色法¹²⁾, 界面活性剤による滴定法¹³⁾, けい光光度法¹⁴⁾など各種報告されている。著者らは, キレート試薬としてのジコン^{****15)16)}が銅と 1:1 の水溶性キレートを生成し, これが第 3 級アミンである MCP の存在で, 1:1:1 の三元錯体を生成して, クロロホルムに抽出されることを見だし, この抽出液の銅を定量することによって間接的に MCP を迅速かつ簡便に定量しうる条件を見いだしたので報告する。

2 試薬および装置

2.1 試 薬

MCP 標準液: 日本薬局方品を乾燥し, 一定量を水に溶かし, $2.0 \times 10^{-3} M$ 溶液を調製, 必要に応じてこれを希釈して使用した。

塩化第二銅溶液: 和光純薬製特級品を水に溶かして, $5.0 \times 10^{-2} M$ 溶液を調製, 必要に応じて希釈し, 原子吸光分析法で標定したものを使用した。

ジコン溶液: 同仁薬化学製品 0.4624 g を 1N 水酸化ナトリウム溶液に溶解したのち, 水で正確に 100 ml とした。ジコンの純度は, 菅原ら¹⁷⁾の方法などにより求めた結果 64% であったので, この溶液は $6.4 \times 10^{-3} M$ となり, 必要に応じてこれを希釈した。実験に際しては, 用時調製して使用した。

クロロホルム, メチルアルコール, メチルイソブチル

**** ジコン (Zincon): $o\text{-}[\alpha\text{-(2-hydroxy-5-sulphophenylazo)benzylidene}]\text{-hydrazino}]\text{ benzoic acid, Na salt.}$

* 原子吸光分析法による微量医薬品の定量 (第 4 報)。前報は喜谷喜徳, 稲垣健治, 早乙女俊行, 小池久: 本誌, 22, 896 (1973)

** 名古屋市立大学薬学部: 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

*** 三和化学研究所: 愛知県春日井市下条町 1212

ケトン (以下 MIBK と略記) などの有機溶媒は和光純薬製特級品を脱水して使用し、塩酸は和光純薬製精密分析用を使用した。また、水は銅を含まないことを原子吸光度計で確認した脱イオン水を用いた。

2.2 装置

原子吸光分光光度計は日立 207 型を用い、日立製銅中空陰極ランプを光源とし、水冷魚尾式予混合バーナーを用い、空気-アセチレンフレームにより吸光度の測定を行なった。pH メーターは日立-堀場 M-5 型を、振り混ぜ器はイワキ製 KM 型を、また遠心機は久保田 KC-70 型を使用した。

3 定量操作

$1.3 \times 10^{-3} M$ ジンコン水溶液 1.0 ml を 30 ml の共せん遠沈管にとり、 $3.0 \times 10^{-3} M$ 塩化第二銅水溶液 1.0 ml、および pH 4.3 の Britton-Robinson 緩衝液を加えて、混和したのち、 $5.0 \times 10^{-4} M$ MCP 水溶液 1.0 ml とクロロホルム 10.0 ml をさらに加えて、5 分間振り混ぜ、4000 rpm で 5 分間遠心機にかける。その後上層の水溶液を取り除き、クロロホルム層 5.0 ml をとり、これに同容量のメチルアルコールを加え、じゅうぶんに混ぜ合わせて、原子吸光光度計で吸光度比を測定する。なお MCP 製剤の場合にはその水溶液をろ過したものを試料溶液とし、この操作を行なう。

4 定量条件の検討

4.1 原子吸光分光光度法の測定条件

測定波長: $3247 \text{ \AA}$, 電流値: 15 mA, スリット幅: 0.18 mm, アセチレン流量: 3.0 l/min, 空気流量: 16.0 l/min, バーナー位置: 1 (炎の先端より光束中心が 2.5 cm の距離) の条件で測定した。

4.2 pH の影響

MCP 水溶液、ジンコン水溶液および塩化第二銅の濃度をそれぞれ $5.0 \times 10^{-5} M$, $1.3 \times 10^{-4} M$, $3.0 \times 10^{-4} M$ とし、Britton-Robinson 緩衝液を用いて、pH を 3.0 から 5.5 まで変えクロロホルムで抽出し、有機相の吸光度を測定した。この結果を Fig. 1 に示す。

pH 4.0 から 4.5 の範囲で吸光度比は一定、最大となることがわかったので、定量には pH 4.3 の Britton-Robinson 緩衝液を使用することにした。

4.3 銅(II) 濃度の影響

MCP 濃度を、 $5.0 \times 10^{-5} M$ またジンコン濃度を、 $1.3 \times 10^{-4} M$ とし、塩化第二銅の濃度を変化させ、錯体の抽出に及ぼす影響を検討した。その結果を Fig. 2 に

Fig. 1 Effect of pH

MCP: $5.0 \times 10^{-5} M$; Cu(II): $3.0 \times 10^{-4} M$; Zincon: $1.3 \times 10^{-4} M$

Fig. 2 Effect of the metal concentration

MCP: $5.0 \times 10^{-5} M$; Zincon: $1.3 \times 10^{-4} M$; pH: 4.3 (Britton-Robinson buffer)

示す。塩化第二銅の濃度は $2.0 \times 10^{-4} M$ 以上あれば一定の吸光度比が得られた。この濃度は MCP 濃度の 4 倍モル以上に相当する。したがって本実験では、塩化第二銅濃度を MCP 濃度の 6 倍として測定を行なった。

4.4 ジンコン濃度の影響

MCP 濃度を $5.0 \times 10^{-5} M$, 銅(II) 濃度を $3.0 \times 10^{-4} M$ とそれぞれ一定に保ち、ジンコン濃度を変化させ、その影響を調べた結果、Fig. 3 に示すように $6.4 \times 10^{-5} M$ 以上すなわち、MCP 濃度の約 1.3 倍モル以上で一定、最大の吸光度比が得られた。したがって、定量法には MCP 濃度の 2.6 倍以上を用いることにした。

Fig. 3 Effect of the zincon concentration

MCP: $5.0 \times 10^{-5} M$; Cu(II): $3.0 \times 10^{-4} M$; pH: 4.3 (Britton-Robinson buffer)

4.5 振り混ぜ時間の影響

振り混ぜ時間を1~15分まで検討した結果, 4分以上で一定, 最大の吸光度比が得られたので, 本定量には振り混ぜ時間を5分間とした。

4.6 抽出回数

錯体の有機溶媒への抽出に及ぼす抽出回数の影響を調べるために, $5.0 \times 10^{-5} M$ の MCP を用いて, 3 の定量操作に従って, 2 種の溶媒 (MIBK とクロロホルム) について, 抽出回数の検討を行なった。その結果, MIBK では4回以上抽出を行なう必要があるが, クロロホルムでは1回でよいことがわかった。そこで, クロロホルム抽出液には同容量のメチルアルコールを混和して原子吸光度計で吸光度を測定した。MIBK の場合クロロホルムより, いくぶん高い吸収を示すのは溶媒効果の影響と思われる。

4.7 抽出錯体の組成

銅(II) とジコンの濃度比を1:1に保ち, MCP との連続変化法により組成の決定を行なった。その結果 Fig. 4 に示すように, MCP : 銅(II)-ジコン=1:1であることがわかった。さらに, モル比法によっても同じ結果が得られた。したがって, 抽出種の組成は MCP : ジコン : 銅(II)=1:1:1 と考えられる。

5 検 量 線

MCP 標準溶液を用いて3の定量操作を行ない, 銅の吸光度比を測定した。その結果, MCP 1.9~27.4 $\mu g/ml$ の濃度範囲において吸光度比との間に直線関係が得られた。

Fig. 4 Continuous variation method

[Cu(II)-Zincon]= $1.0 \times 10^{-4} M$; [MCP]= 1.0×10^{-4} ; pH: 4.3 (Britton-Robinson buffer)

6 薄層クロマトグラフィー

抽出種がいかなる成分の三元錯体であるかどうかを知るために薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記) により検討した。

TLC 用アルミナ B-10 (和光純薬製特級) で, 常法に従い, 0.25 mm の薄層を作り, これを $110^{\circ}C$ で約3時間加熱し, 乾燥したものを使用した。

展開溶媒には, *n*-ブチルアルコール:氷酢酸:水=4:1:2の混合溶媒を, ガラス板は縦20cm, 横10cm, 厚さ3mmのものをを用いた。薄層の下端3cmの所へ試料をスポットし, 上昇法により約15cm展開を行ない, 展開後ただちに乾燥し, 発色させた。

銅の発色試薬としてアンモニア蒸気-ジチゾン 0.05% クロロホルム液を用いて緑色にし, MCP はヨウ素蒸気で黄色に発色させた。

6.1 検 討

クロロホルム抽出液は単一スポットを与えた。この抽出種を濃塩酸で分解し, その塩酸溶液にメチルアルコールを加えて混和して試料溶液とし, 薄層板上にスポットして展開した結果, Table I に示すように三つのスポットが現われ, それらはそれぞれ比較により, MCP, ジコンおよび銅によるスポットと確認された。このことより, この三元錯体は MCP, ジコンおよび銅よりなることがわかった。

Table I R_f values of the ternary complex and its component on TLC

Sample	R_f value	Color
Ternary complex (in CHCl_3)	0.66	blue
Zincon (in $\text{HCl} + \text{CH}_3\text{OH}$)	0.73	red
MCP (in HCl)	0.90	yellow
Cu (in HCl)	0.16	green
Ternary complex decomposed by HCl (in $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH} + \text{CH}_3\text{OH}$)	0.73 0.90 0.16	red yellow green

Developer: n -Butylalcohol-acetic acid-water (4:1:2); Detection: MCP was detected with iodine in yellow. Cu was detected with ammonia and 0.05% dithizone chloroform solution in green.

7 製剤の検討

7.1 MCP 製剤の共存物質の影響

MCP は感冒薬のなかにも多く用いられているので、製剤中に含まれる共存物質の本法に及ぼす影響について検討した。

その結果、Table II に示すように、第3級アミンである塩酸 dl -メチルエフェドリン、塩酸ジフェンヒドラミンなどは共存による大きい影響を与えるが、他のものはほとんど影響しないことがわかった。

Table II Absorbance of MCP and other compounds

Compound	Taken (mg/ml)	Absorbance ratio (at 3247 Å)
MCP	0.02	0.600
dl -Methylephedrine HCl	0.10	0.210
Diphenhydramine HCl	0.02	0.883
Pyribital	1.00	0.000
Aminopyrine	0.40	0.036
Aminopyrine	0.10	0.008
Acetoaminophene	2.00	0.000
Noscapine	2.00	0.000
Ascorbic acid	2.00	0.000
Thiamine HCl	2.00	0.000
Caffeine	2.00	0.000
Phenacetin	2.00	0.000
Bromvalerylurea	2.00	0.000
Ethoxybenzamide	2.00	0.000
Isopropylantipyrine	1.00	0.000
Salicylamide	2.00	0.000
Procone	0.02	0.082
Papaverine HCl	0.10	0.192
Papaverine HCl	0.01	0.008
β -Hydroxybutyl- p -phenetidine	2.00	0.000
Ephedrine HCl	1.00	0.132
Ephedrine HCl	0.50	0.020
Ephedrine HCl	0.10	0.012
Sulpyrine	2.00	0.000
Lactose	2.00	0.000
Starch	2.00	0.000
None (Distilled water)	(0.02)	0.000

7.2 実際試料の定量

処方例 (解熱鎮痛薬) について、MCP を含む製剤の汙液を 試料溶液とし、3 の定量操作を行なった結果、Table III に示すように 100.2% の回収率が得られた。

Table III Assay of preparation

Ingredient:		
MCP	6 mg	
Salicylamide	284 mg	
Acetoaminophene	157 mg	$n = 5$
Caffeine	63 mg	$\bar{X} = 100.2\%$
β -Hydroxybutyl- p -phenetidine	240 mg	$\sigma = 1.75\%$
Lactose	100 mg	
Starch	150 mg	
Total	1000 mg	

7 結 言

以上の結果、金属配位官能基を持たない医薬品でも三元錯体を生成し、溶媒抽出が可能であれば、原子吸光分析法により、迅速に、かつ簡便に定量できることがわかった。

銅-ジズンコン-MCP 三元錯体の抽出種は 1:1:1 で、pH 4.3 においてクロロホルムに抽出され、この抽出液は薄層クロマトグラフィーにより単一スポットを与える。本法の再現性を検討した結果、標準偏差は 0.62 (相対標準偏差は 2.18%) であり、MCP の定量としてじゅうぶん使用できることがわかる。

(1973 年 4 月 5 日、日本薬学会)
(第 93 年会において一部発表)

文 献

- 1) 丹野和夫: 工化, **67**, 1202 (1964).
- 2) R. M. Rush, J. H. Yoe: *Anal. Chem.*, **26**, 1345 (1954).
- 3) 秋葉朝一郎, 桑原章吾: “薬学領域の病原微生物”, p. 70 (1968), (南山堂).
- 4) 辻 章夫: 月刊薬事, **2**, 24 (1960).
- 5) 板井孝信, 神谷庄造: 薬剂学, **17**, 180 (1957).
- 6) M. Hurd, B. S. Edward: *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **38**, 579 (1949).
- 7) 佐藤和男, 高田光昭: 薬剂学, **22**, 57 (1962).
- 8) 第八改正日本薬局方, p. C-1628 (1971), (広川書店).
- 9) 尾西良一, 森田泰輔, 川村邦夫: 薬誌, **90**, 46 (1970).
- 10) R. Ceglarski, J. Roman: *Parm. Polska*, **18**, 327 (1962); *Chem. Abstr.*, **58**, 10501 (1963).
- 11) D. Banes: *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, **34**, 703 (1951).
- 12) 堀岡正義: 薬誌, **77**, 200 (1957).
- 13) L. A. A. Rojas: *Anales Fac. Quim. Farm., Univ. Chile*, **15**, 101 (1963); *Chem. Abstr.*, **62**, 12976 (1965).

- 14) R. E. Jensen, R. t. Pelaum : *J. Pharm. Sci.*, **53**, 833 (1964).
- 15) J. H. Yoe, R. M. Rush : *Anal. Chim. Acta*, **6**, 526 (1952).
- 16) A. G. Morris : *Analyst*, **82**, 34 (1957).
- 17) 菅原正雄, 新山和人, 神原富民: 本誌, **22**, 1221 (1973).

☆

Indirect determination of chlorpheniramine maleate by atomic absorption spectrophotometry.

Yoshinori KIDANI, Toshiyuki SAOTOME*, Masayuki KATO** and Hisashi KOIKE* (*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1, Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi; **Sanwa Kagaku Kenkyusho, Co., Ltd., 1212, Gejo-cho, Kasugai-shi, Aichi)

Chlorpheniramine maleate (MCP) itself does not form a metal complex because MCP has not any chelating functional groups. However, MCP will be extractable with chloroform at a pH 4.3, when it is reacted with Zincon to form a ternary complex. Zincon is known to produce a blue complex with copper in a 1:1 molar ratio. Therefore, MCP is determined indirectly by measuring the absorbance of copper in the organic phase by atomic absorption spectrophotometry. A ternary complex of copper-Zincon-MCP is extracted with MIBK for four times, while it is extracted with chloroform more easily, although MIBK is known to be superior to chloroform as a solvent for atomic absorption spectrophotometry.

In this experiment, measurements were made with a Hitachi Model 207 atomic absorption spectrophotometer. The optimum working conditions for atomic absorption measurements are as follows: wavelength of copper, 3247 Å; lamp current of a hollow cathod lamp, 15 mA; slit width, 0.18 mm; air flow rate, 16.0 l/min, and acetylene flow rate, 3.0 l/min.

The procedure for the determination is as follows: One milliliter of an aqueous solution of $1.3 \times 10^{-3} M$ Zincon was taken into a 30 ml centrifuge tube, and

to this 1 ml of an aqueous solution of $3.0 \times 10^{-3} M$ cupric chloride and 7 ml of Britton-Robinson buffer solution, adjusted to pH 4.3, were added. Then 1 ml of an aqueous solution of $5.0 \times 10^{-4} M$ MCP was added and it was extracted with 10 ml chloroform. The mixture was shaken well for 5 minutes and was centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes. After the upper aqueous layer had been separated off, 5.0 ml of the chloroform layer was transferred into test tubes, and to this 5 ml of methanol was added. Finally the copper content of the organic phase was measured by an atomic absorption spectrophotometer against a reagent blank.

The optimum conditions for the extraction have been found that the concentration of cupric chloride is 4 times that of MCP and that the concentration of Zincon is 1.3 times that of MCP. The shaking period of time takes at least 4 min. As a larger absorbance was obtained in the pH range 4.0 to 4.5, Britton-Robinson buffer solution was used at pH 4.3 in this measurement. The calibration curve of MCP was linear over the range of 1.9 to 27.4 $\mu g/ml$.

In order to elucidate the composition of the ternary complex, the extracted solution was examined by thin-layer chromatography. A solvent system used was *n*-butyl alcohol-acetic acid-water (4:1:2) as a developer. After the development, MCP was detected with iodine vapor and copper was detected by spraying ammonia gas and a chloroform solution of 0.05% dithizone. The ternary complex extracted gave a single spot with an R_f of 0.66. When it was decomposed with conc. HCl, three spots with R_f values of 0.16, 0.73 and 0.90 were observed, which correspond to copper, Zincon and MCP, respectively.

It was shown that this method may be applicable to the determination of MCP in drug preparations, because no interference from the coexisting compounds, such as salicylamide, acetoaminophene, caffeine, β -hydroxybutyl-*p*-phenetidine, lactose and starch, etc., on the absorbance ratio were observed. The relative standard deviation was calculated to be 2.18%.

(Received Sept. 5, 1973)