トリフェニルメタン系色素とアミンのイオン対化合物を用いる 分光光度定量法とその機構

緒方 惟治， 坂口 武一， 市川 芳子，
出口富美子， 船岡 紀子， 清田千生美*

(1974 年 7 月 1 日受理)

テトラブロムフェノールフタレインエチルエステル(TBPE)を用いて第3級アミン誘導体である4,4'-diethylaminoethoxy- α, β -diethyldiphenylethane $\cdot 2\text{HCl}$ (I), 10-diethylaminopropylphenothiazine(II), 3-phenyl-5-diethylaminoethyl-1, 2, 4-oxadiazol $\cdot$ citrate(III), 3-diethylaminoethoxycarbonyl-pyridine $\cdot$ citrate(IV) 及び 3-(β -diethylaminoethyl)-4-methyl-7-carboethoxy-methoxy-2-oxo-(1, 2-chromene) $\cdot \text{HCl}$ (V) をアルカリ水溶液から 1, 2-ジクロロエタンに抽出すると、有機相は λ_{max} 600 nm 付近に極大吸収を示した。この波長において至適 pH, 定量範囲, 結合比及び変動係数について検討したところ Table 1 の結果を得た。また本法での呈色機構を明らかにするため、モデル実験として TBPE とトリエチルアミン (TEA) との結合体を酢酸エチル溶液から結晶として単離し、その構造を赤外吸収スペクトル及びマッススペクトルから検討したところ、色素とアミンはイオン対結合体を形成していることを認めた。

1 緒 言

TBPE は pH 4.5~5.5 において黄色から青色に変化するトリフェニルメタン系色素である。この色素を用いた定量に関する報告は極めて少なく、過去において石館、坂口¹⁾²⁾ はたんぱく質の微量定量に用い、最近においては坪内が第3級アミン類あるいは第4級アンモニウム塩類の分光光度定量法を行ったにすぎない³⁾。そこで著者らはこの色素を用いて第3級アミンを有する医薬品の定量を試みた。またスルホフタレイン系色素を用いるアミン類の抽出定量⁴⁾ もなされていることから、TBPE を用いる反応での呈色物質を単離し、スルホフタレイン系色素とアミン類との結合体とを比較検討した。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

TBPE エチルアルコール溶液：TBPE カリウム塩(和光純薬特級品) 700mg をエチルアルコール 100 ml に 40°C 加温下溶解する ($1 \times 10^{-3}\text{M}$)。

緩衝液：0.2M リン酸水素二ナトリウムと 0.1M ほう砂の各水溶液を同量混合し、希硫酸化ナトリウム及び希硫酸水溶液を用いて所定の pH に調製した。

検体水溶液：化合物 (I)~(V) の各 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 溶液を調製し、水で所定の濃度とした。

ヨウ化メチル：和光純薬特級品を用いた。

エチルアルコール：和光純薬特級品を (78.4~78.5)°C で蒸留した。

水は再蒸留水を使用した。

酢酸エチル：和光純薬特級品を (77.1~77.2)°C で蒸留した。

色素類：TBPE, ブロムフェノールブルー, ブロムチモールブルー, ブロムクレゾールパープル及びブロムクレゾールグリーン(和光純薬特級品)を各々 (0.2~0.5) g とり (10~20) ml の酢酸エチルに溶解した。

アミン類：トリエチルアミン, ペンジルアミン, トリ-*n*-ブチルアミン, シクロヘキシルアミン, ジシクロヘキシルアミン及びエチレンジアミン(和光純薬特級品)を各々 $2 \times 10^{-3}\text{M}$ 酢酸エチル溶液とした。なお3級塩基医薬品類は千葉大学附属病院薬局より提供されたものであり、これら化合物 (I)~(V) の構造は次のとおりである。

* 千葉大学薬学部：千葉県千葉市弥生町 1-33

2.2 装置

分光光度計：日立 EPS-3 型自記分光光度計及び 181 型

赤外分光光度計：日立 215 型赤外分光光度計

pH 計：日立-堀場 M-5 型 pH 計

融点測定器：柳本微量融点測定装置 MP-S2 型

質量分析計：日立 RMU 6-E 型質量分析計

3 実験操作

3.1 分光光度定量操作

100 ml 共せん付き比色管または、100 ml 分液漏斗に所定の pH 緩衝液 5 ml を入れ、ヨウ化メチル 0.25 ml と 2.0 ml の検液を加え 30 秒間振とうし、TBPE エチルアルコール溶液 2.0 ml を加え水で全量 25 ml とする。1,2-ジクロロエタン 10 ml をこれに加えて 2 分間振とうの後 5 分間静置し、濾紙を通して有機相を分取する。1,2-ジクロロエタンを対照として比色定量する。

3.2 結合体単離操作

各色素の酢酸エチル溶液にかくはんしながら各アミン類の $2 \times 10^{-3} \text{M}$ 酢酸エチル溶液 10 ml を滴加させ、得られた結合体をガラスフィルターで濾別後風乾し、エチルアルコールから再結晶した。TBPE-トリエチルアミン結合体は結晶析出まで室温、7 日間を要した。また、Sp 色素とアミンとの 1:1 結合体は沈殿物が黄色であるときにアミンの滴加を中止する必要がある。

4 結果と考察

4.1 分光光度定量分析

この定量での試薬ブランクは λ_{max} 410 nm に吸収を示し、pH 変化には依存しなかった。次に第 3 級アミン類とともに行うと試薬ブランクに妨害されことなく λ_{max} (584~612) nm 付近に新たな吸収を示した (Fig. 1)。

Fig. 1 Absorption spectra of TBPE and its addition product with amine in 1,2-dichloroethane

A: TBPE; B: Addition product with amine; Reference: 1,2-Dichloroethane

この呈色反応は色素のアニオンとアミンのカチオンとが水溶液中でイオン対を形成して有機相に移行したと考えられる。各化合物の吸収波長、至適 pH、定量領域、変動係数値及び結合比について Table 1 に示す結果を得た⁵⁾⁶⁾。

化合物によりその吸収波長は異なるが λ_{max} (584~612) nm に最大吸収を示し pH は 8~11 であった。また定量可能領域はほぼ $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7} \text{M}$ でこの領域での変動係数値は (1.63~2.41)% であった。次に結合比は化合物 (I) で色素:化合物 (I) は 2:1, (II), (III) では 1:1 であったが、(IV), (V) ではモル濃度比 0.6 で 1:1, 1:2 の中間で理論的結合比は得られなかった。そこで以上の呈色物質のモデルを結晶として単離し、呈色反応機構の解明の一手段とした。

4.2 結合体の単離

アニオン色素とアンモニウムカチオンとのイオン対に

Table 1 Spectrophotometric results of compound (I)-(V)

Compound	Absorption wavelength (nm)	pH (optimum)	Calibration range† (M)	Coefficient variation†† (%)	Continuous variation††† ratio	TBPE : Compound
I	612	11	$4 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-6}$	1.68	0.35	2 : 1
II	608	8	$8 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-5}$	2.41	0.5	1 : 1
III	610	7 ^{a)} , 8 ^{b)}	$4 \times 10^{-5} \sim 4 \times 10^{-4}$	1.63 ^{a)} , 6.13 ^{b)}	0.5	1 : 1
IV	612	10	$4 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-5}$	1.65	0.6	?
V	584	8	$8 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-6}$	1.88	0.6	?

a) Without CH₃I; b) With CH₃I; † Final concentration; †† S/ $\bar{x}$; ††† [Compound]/([Compound]+[TBPE])

関しては既に報告されてきた^{2)4)7)~9)}. 著者らはブロムフェノールブルー (BPB), ブロムチモールブルー (BTB), ブロムクレゾールパープル (BCP), ブロムクレゾールグリーン (BCG) とトリエチルアミン (TEA), ベンジルアミン (BA), トリー-*n*-ブチルアミン (TBA), シクロヘキシルアミン (CHA), ジシクロヘキシルアミン (DCHA) 及びエチレンジアミン (EDA) の結合体について, また, TBPE においては TEA との結合体について単離し構造解析を行った. この単離において BPB, BCP は無色で酢酸エチルに溶解し, モル比 1 : 1 量までアミンを加えると黄色の沈殿を生ずるが更に加えると沈殿は赤紫色を呈しはじめた. BTB, BCG は加えるアミン量によらず黄色沈殿を生じた. 以上はアミン滴加と同時に沈殿を生じたが TBPE-TEA 結合体では室温中 7 日間を要した.

4.3 イオン対化合物の構造解析

先に得た結合体の融点及び元素分析値を Table 2 に示した.

まず 1 : 1 結合体は TBPE-TEA; BPB-TEA, CHA, DCHA; BCP-TEA, TBA, BA, CHA, DCHA であ

り 1 : 2 結合体は BPB-TEA, CHA; BCG-TEA, BA, CHA, DCHA; BTB-BA, DCHA であった. 1 : 1, 1 : 2 結合体ともに単離できたものは先に示した BPB-TEA, CHA のみであった. なお, BTB-EDA は 4 : 3 の理論値とほぼ合致した.

結合体の構造解析は赤外吸収スペクトルとマスマスペクトルにより検討された. 赤外吸収スペクトルは Fig. 2 に示すように BPB-TEA 1 : 1 結合体ではキノイドのカルボニル基伸縮振動の吸収が 1640cm^{-1} 付近に現れ, この 1 : 2 結合体ではこの 1640cm^{-1} 付近の吸収は 1540cm^{-1} 付近に移動した. この波長の移動はイオン対がカルボニルを介して生じた証拠である (Fig. 2).

TBPE-TEA 1 : 1 結合体については BPB とアミンの 1 : 1 から 1 : 2 結合体へと進行する機構で, そのスペクトルは 1650cm^{-1} 付近にあるカルボニル基伸縮振動の吸収はアミンと結合することにより 1550cm^{-1} 付近まで大きく移動した. 次に質量分析計による BPB-TEA 1 : 1, 1 : 2 結合体のスペクトルを Fig. 3 に示す.

測定条件は結合体では direct inlet system, heater temp. : 170°C ; 70 eV で TEA については heated inlet system, evaporation/source temp. : $58^\circ\text{C}/200^\circ\text{C}$; 70 eV

Table 2 (1 : 1) and (1 : 2) ion pair compound of dyes with amines

Dyes	Amines	Molar ratio	mp ($^\circ\text{C}$)	Analysis (%)					
				Calcd.			Found		
				C	H	N	C	H	N
TBPE	TEA ^{a)}	1 : 1	148	44.07	3.83	1.84	44.25	3.82	1.86
BPB	{	TEA	200	38.94	3.24	1.82	39.15	3.08	1.87
		{ 1 : 2	189	42.69	4.59	3.21	42.89	4.61	3.36
		CHA	266~268	39.03	3.03	1.82	39.31	3.45	1.80
		{ 1 : 2	208~210	42.87	4.19	3.23	43.27	4.56	3.22
BCP	{	DCHA	250 ^{b)}	43.74	3.91	1.65	43.83	3.88	1.63
		TEA ^{c)}	174~175	50.55	4.88	2.13	50.73	5.07	2.13
		TBA	184~187	54.62	5.98	1.93	54.69	6.02	1.89
		BA ^{a)}	198~202	51.94	3.90	2.16	51.59	3.84	2.12
BCG	{	CHA	225~230 ^{a)}	50.72	4.57	2.19	50.76	4.59	2.19
		DCHA	234 ^{b)}	54.93	5.45	1.94	54.95	5.47	1.95
		TEA ^{a)}	144~146	44.02	4.93	3.11	42.60	4.80	3.07
		BA	190~192	46.08	3.54	3.07	45.09	3.37	2.98
BTB	{	CHA	199~202	44.22	4.50	3.13	43.23	4.39	3.04
		DCHA	208~210	50.96	5.70	2.64	50.77	5.61	3.64
		BA	155~170	58.72	5.53	3.34	58.53	5.52	3.33
		DCHA	166	62.06	7.56	2.84	61.83	7.52	2.78
	EDA ^{d)}	—	205~207	51.13	5.12	3.14	49.34	5.34	3.55

a) Crude compound; b) Sublimation; c) Recrystallization from acetone; d) 4 : 3 (?)

Fig. 2 IR spectra of ion pair compound between indicator and TEA

a : Free TBPE; a' : TBPE-TEA (1 : 1); b : BPB-TEA (1 : 1); b' : BPB-TEA (1 : 2); c : BCP-TEA (1 : 1); d : BCG-TEA (1 : 2)

Fig. 3 Mass spectra of TEA, BPB and ion pair compound of BPB-TEA

a : TEA; b : BPB; c : Ion pair compound of BPB-TEA; Condition : 70 eV, 170°C

Fig. 4 Structure of ion pair compound of TBPE-TEA

である。結合体のスペクトルは m/e 100 及び 101 質量単位以下の領域を除き BPB のスペクトルと同様であった。これは 1 : 2 結合体における 1 個のアミン分子が

この条件下で完全解離し、他方が水素化され安定となり 1 : 1, 1 : 2 とともに同じスペクトルを与えたものと考えられる。

また、TBPE-TEA 1 : 1 結合体においてもやはり最高質量ピークは遊離型 TBPE 分子イオンのものであった。以上の結果から TBPE-TEA 結合体は Sp 系色素とアミンとの結合体と同様にイオン対化合物として結合しているものと推定した。この構造式を Fig. 4 に示す。

本研究においてアミン類医薬品を寄贈された本学附属病院永瀬一郎薬剤部長に厚く感謝する。また元素分析及び質量分析を担当された本学薬学部中央分析室の大井宏子嬢及び石田富美子嬢に感謝する。

文 献

- 1) 石館守三, 坂口武一: *Ber.*, **74**, 1 (1941).
- 2) 石館守三, 坂口武一: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **17**, 5 (1942).
- 3) M. Tsubouchi: *J. Pharm. Sci.*, **60**, 943 (1971).
- 4) V. S. Konyushko: *Zh. Anal. Khim.*, **19** (8), 1012 (1964).
- 5) 坂口武一, 緒方惟治, 市川芳子: 日本薬学会第 92 年会講演要旨集, IV, p. 110 (1972).
- 6) 坂口武一, 緒方惟治, 出口富美子, 船岡紀子: 日本薬学会第 93 年会講演要旨集, IV, p. 2 (1973).
- 7) T. Higuchi, A. Michaelis, T. Tan, A. Hwwitz: *Anal. Chem.*, **39**, 974 (1967).
- 8) J. S. Moore, G. O. Phillips, D. M. Power, J. V. Davis: *J. Chem. Soc. (A)*, **1970**, 1155.
- 9) V. Das Gupta, H. B. Herman: *J. Pharm. Sci.*, **62**, 311 (1973).
- 10) 緒方惟治, 清田千生美, 坂口武一: 日本分析化学会第 22 年会講演要旨集, p. B422 (1973).

Spectrophotometric determination of amines with the use of ion pair complex with triphenylmethane dyes. Koreharu OGATA, Takeichi SAKAGUCHI, Yoshiko ICHIKAWA, Fumiko DEGUCHI, Noriko FUNAOKA and Chiomi KIYOTA (Division of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba, 1-33, Yayoi-cho, Chiba-shi, Chiba)

Ion pair compounds between tetrabromophenolphthalein ethylester (TBPE) and tertiary amine derivatives were extracted from the alkaline aqueous solution into 1,2-dichloroethane (DCE) phase and determined colorimetrically of the maximum absorption at about 600 nm. The analysis was carried out as follows; 5 ml of standard pH buffer solution (0.5M sodium phosphate+0.1M borax), 0.25 ml of methylodide and 2.0 ml of sample solution were mixed in a 100 ml colorimetric tube or a separatory funnel being shaken for 30 seconds. Then 2.0 ml of 10^{-3} M TBPE ethanol solution was added and the solution was diluted to 25 ml with water.

To this solution was added 10 ml of DCE and the solution was shaken for 2 min. The mixture was settled for 5 min. The fraction of the organic phase was separated with a filter paper and the colorimetric measurement was made by using DCE as a reference. The sample solution was taken so as the final concentration fell in the range of 10^{-7} to 10^{-4} M. The binding ratio of the dye to amines such as 4,4-diethylaminoethoxy- α , β -diethyldiphenyl-ethane 2HCl, 10-diethylaminopropyl phenothiazine and 3-phenyl-5-

diethylaminoethyl-1,2,4-oxadiazol citrate was 2/1, 1/1, and 1/1, respectively. However, in both compounds of 3-(diethylaminoethoxy-carbonyl pyridine citrate and 3-(β -diethylaminoethyl)-4-methyl-7-carboethoxy-2-oxo-(1,2-chromene) HCl, the ratio was found as 0.6 which did not show multiple constitution for a pairing complex. In order to study the composition of the latter product colored crystalline compound was prepared as a model compound with TBPE and triethylamine. The latter product was crystallized from ethyl acetate solution. Similarly, crystalline products were obtained from tertiaryamines and sulfophthalein series dyes. The infrared absorption spectra of the latter two compounds suggested the similar mechanism of ionic binding at quinoid carbonyl, and furthermore, the mass spectra of the latter two compounds revealed the same conclusion. Hence, it was concluded that the colored products were ion pair compounds and the binding mechanism in this color reaction was also based on ion pairing reaction.

(Received July 1, 1974)

Keywords

Ion-pair

Spectrophotometry of tertiary amines

Tetrabromophenolphthalein ethylester

デジタルポーラログラフ法の測定精度

桜井 定人, 仁木 栄次*

(1974 年 12 月 3 日受理)

拡散電流をデジタル化して測定するデジタルポーラログラフ法を使用して、 10^{-3} M $\sim 5\times 10^{-6}$ Mのカドミウムイオンとニッケルイオンとのポーラログラムの拡散電流を変動係数として 0.09% $\sim$ 0.18%で測定した。実際の定量分析の際に問題になる、同一試料溶液の拡散電流の測定日間のばらつきと、同一測定日内のばらつきとの不偏分散間には、有意水準 5% で有意な差がないことが分かった (試料 10^{-3} M Cd^{2+} , Ni^{2+})。また試料調製に基づく形波ポーラログラムのピーク電流のばらつきと、同一試料についてのばらつきとの不偏分散間には、有意水準 1% で有意な差が認められた (試料 5×10^{-4} M Cd^{2+})。更に近接した半波電位を有するインジウムイオンとカドミウムイオンとを、濃度比 1:1 $\sim$ 1:10 で含有した溶液のポーラログラムから、カドミウムイオンのポーラログラムを示差法によって差し引いて、少量成分であるインジウムイオンのピーク電流を変動係数として、0.1% $\sim$ 0.6% で測定した。

* 東京大学工学部工業化学科: 東京都文京区本郷 7-3-1