$$r_1 = \frac{nK_A(A)}{1 + K_A(A) + K_B(B)}$$

ここで、(A) は遊離薬品濃度、(B) は遊離添加物質濃度、 K_A は薬品の結合定数、 K_B は共通の結合点に対する添加物質の結合定数である。この式を用いれば r_1/r の極限值から共通の結合点に対する添加物質の結合定数が求まる。⁷⁾

$$\lim_{(A) \rightarrow 0} \frac{r_1}{r} = \frac{1}{1 + K_B(B)}$$

この方法により、BCP の K_B として $1.3 \times 10^3 M^{-1}$ 、フェニルブタゾンの K_B として $5.0 \times 10^3 M^{-1}$ という値が得られた。このことから共通の結合点に関してはフェニルブタゾンの方が4倍ほど強い結合定数を有していることがわかる。

終りに臨み、薬品を御贈与賜った武田薬品工業株式会社に謝意を表します。

京都大学薬学部

7) F. Karush: J. Phys. Chem., **56**, 70 (1952).

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
86 (9) 744 ~ 748 (1966)

UDC 543.544.25.062 : 547.233.2

120. 長谷川主計, 妹尾節哉: ガスクロマトグラフィーによる製剤中の Diisopropylamine Dichloroacetate の定量

Kazue Hasegawa and Setsuya Seno: Gas Chromatographic Determination
of Diisopropylamine Dichloroacetate in Pharmaceutical Preparations.

(Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd.*1)

Fundamental conditions were examined for the gas chromatographic determination of diisopropylamine dichloroacetate (DADA) by the method of nitrosation-extraction. To 10 ml. of the sample solution containing 1~10 mg. of DADA, 2.5 ml. of glacial acetic acid and 5 ml. of 50% sodium nitrite solution are added, and the mixture is allowed to react for 5 minutes at 60°. When cooled, the solution is made alkaline with 7 ml. of 50% potassium hydroxide solution, and extracted with 10 ml. of cyclohexane containing 5 mg. of *p*-dibromobenzene as an internal standard.

The extracted solution is centrifuged, concentrated in a vacuum to 0.5~1 ml., and injected at column temperature of 160° into the gas chromatograph with polyethylene glycol succinate (5%) on Celite 545 column.

When N-nitrosodiisobutylamine is used as an internal standard, 10 ml. of 0.5% diisobutylamine hydrochloride solution is added to the sample solution, nitrosated, and extracted with 10 ml. of cyclohexane.

The proposed method is reproducible and may be used for samples containing many other substances, such as biological fluids.

(Received October 5, 1965)

ジイソプロピルアミンジクロロアセテート (DADA) は強肝、解毒など特異な薬理作用を持ち、パンガミン酸の活性部分と考えられている化合物であるがその定量法はほとんどなかった。一般的にはアルカリ分解したのち生じた Cl を銀滴定する¹⁾ ことにより定量できるが、著者等は先に、アルカリ分解後、酸性でナフトレゾルシンを作用させて生じる色素を有機溶媒で抽出し、比色する方法²⁾ を報告した。また一般に脂肪族第2級アミンは酸性

*1 2, 1-Chome, Hiro-machi, Shinagawa-ku, Tokyo.

1) 稲葉, 長谷川: 未発表.

2) 丸山, 長谷川: 高峰研, **12**, 195 (1960).

で亜硝酸ナトリウムを反応させるとき紫外部に吸収を有する N-ニトロソアミンを生ずることが知られている³⁾が, 著者等はこのことを利用して DADA の亜硝酸によるニトロソ化物をシクロヘキサンで抽出し, 紫外部吸収を測定して定量する方法⁴⁾を報告した. しかし, これらの各法はいずれも単味製剤や比較的配合薬の少ない製剤には適用できたが, 配合薬の多い場合や生体試料には他の配合薬や共存物の影響が大きく, 直接的には適用できないという欠点があった.

今回, 著者等は前述の DADA のニトロソ化法による定量法⁴⁾において得られた N-ニトロソジイソプロピルアミン (nitroso-DIPA と略す) がガスクロマトグラフ分析可能なことを知り, DADA のガスクロマトグラフィー (GC と略す) による定量法を確立したので報告する.

装置および試薬 1. 装置: C.E.C.-ガスクロマトグラフ 26-201 型 (熱伝導度検出器, ブリッジ電流 200 mA) に, 長さ 2 m., 内径 $\frac{1}{4}$ in. の銅パイプにつぎのものを充填したカラムを付して使用した. 担体はいずれも 60~80 mesh のものを使用した. 1) シリコングリース (25%)/Chromosorb P, 2) polyethylene glycol succinate (PEGS) (5%)/Celite 545, 3) ジエタノールアミン (DEA) (20%)/Chromosorb P, 4) Apiezon L (10%)/Diasolid M, 5) Carbowax 6000 (10%)/Diasolid M.

2. 試薬: 1) 50% NaNO_2 水溶液, 2) 50% KOH 水溶液, 3) シクロヘキサン, 4) *p*-ジブロムベンゼン (DBB と略す), 5) ジイソブチルアミン塩酸塩 (DIBA $\cdot$ HC と略す), 6) AcOH.

3. 標準液 1) DADA 標準液: DADA 1 g. を精密に量りとり水に溶かして 100 ml. とし, さらに水で希釈して 0.01~0.2% とし標準液とする. 2) DBB 内部標準液: DBB 50 mg. を正確に量りとりシクロヘキサンに溶かして 100 ml. とする. 3) DIBA 内部標準液: DIBA $\cdot$ HCl 50 mg. を正確に量りとり水に溶かして 100 ml. とする.

定量法 1. 内部標準として DBB を用いる場合: DADA として 0.01~0.2% 水溶液を調製し, この液 10 ml. をとり酢酸 2.5 ml. と 50% 亜硝酸ナトリウム水溶液 5 ml. を加えて 60° で 5 分間振り混ぜながら加温する. 冷後, 50% 水酸化カリウム水溶液 7 ml. を加えて振り混ぜたのち, DBB 内部標準液 10 ml. を加えて激しく振り混ぜ, 遠心分離後シクロヘキサン層をとり, 減圧で 50° 以下で 0.5~1 ml. に濃縮したのち, その 10~50 μ l. をガスクロマトグラフに注入して, DBB のピーク高さに対する nitroso-DIPA のピーク高さの比を求め, 別に作製した検量線より DADA の含量を算出する. 本法が適用できるカラムは PEGS (5%)/Celite 545 (150~165°) および DEA (20%)/Chromosorb P (170~190°) である.

2. 内部標準として nitroso-DIPA を用いる場合: 試料溶液 10 ml. に DIBA 内部標準液 10 ml. を加えたのち, 以下 1 の方法により操作して, シクロヘキサン 10 ml. で抽出して GC を行なう. 本法が適用できるカラムは PEGS (5%)/Celite 545 (150~160°), Apiezon L (10%)/Diasolid M (180~200°), Carbowax 6000 (10%)/Diasolid M (170~190°) およびシリコングリース (25%)/Chromosorb P (170~190°) である.

定量条件の検討 1. 最適カラムと分析温度: 分析温度はシリコングリース 170~190°, PEGS 150~165°, DEA 170~190°, Apiezon L 180~190°, Carbowax 6000 170~190°, が適当で, どのカラムでも分析可能であるが, PEGS がもっとも感度が高く, テーリングが少なく, また抽出溶媒のピークとの分離性がよかったので主に PEGS を用いた.

TABLE I. Separation of Peaks

Stationary phase	Column temp. (°C)	Relative retention time to nitroso-DIPA	
		Nitroso-DIBA ^{a)}	<i>p</i> -Dibromobenzene
Silicone grease	180	1.80	2.07
Polyethylene glycol succinate (PEGS)	155	1.21	1.73
Diethanolamine (DEA)	180	1.20	1.32
Apiezon L	190	1.25	4.04
Carbowax 6000	180	1.35	—

a) Added as diisobutylamine HCl

3) M. J. Morgan: Mikrochim. Acta, 1958, 104.

4) 丸山, 長谷川: 分析化学, 10, 518 (1961).

TABLE II. Relationship between Volume of 50% KOH Solution and Ratio of Peak Height

Volume of 50% KOH soln. (ml.)	0	2	3	4	5	6	8	10
Ratio of peak height	1.90	1.85	1.84	1.99	2.85	2.87	2.87	2.90

AcOH 2.5 ml., 50% NaNO₂ soln. 5 ml., reacted for 5 min. at 65°, DADA soln. (1 mg./ml.) 10 ml., internal standard: *p*-dibromobenzene (0.5 mg./ml.) 10 ml., PEGS (155°)

Fig. 1. Gaschromatograms

- A PEGS (5%)/Celite 545 (60~80 mesh), 2 m., 155°
 B PEGS (5%)/Celite 545 (60~80 mesh), 2 m., 155°
 C Apiezon L (10%)/Diasolid M (60~80 mesh), 2 m., 190°
 D silicone grease (25%)/Chromosorb P (60~80 mesh), 2 m., 180°
 E DEA (20%)/Chromosorb W (60~80 mesh), 2 m., 180°
 F Carbowax 6000 (10%)/Diasolid M (60~80 mesh), 2 m., 180°
 1 solvent (cyclohexane)
 2 DADA (as N-nitroso-diisopropylamine)
 3 *p*-dibromobenzene (internal standard)
 4 N-nitrosodiisobutylamine (internal standard)

2. 内部標準物質：いろいろな化合物について DADA のニトロソ化物である nitroso-DIPA とのピーク分離性を調べたが、PEGs および DEA カラムでは DBB が、また PEGs, Apiezon L, Carbowax 6000 およびシリコングリースでは nitroso-DIBA が適当であった (Table I および Fig. 1).

3. 抽出溶媒の検討：いろいろな有機溶媒について検討したが、シクロヘキサンが抽出率、ピーク分離性の点でもっともすぐれていたためシクロヘキサンを用いることにした。

4. ニトロソ化の条件の検討：条件の検討には PEGs カラム、内部標準として DBB を用いた。

1) 50% 水酸化カリウム水溶液の添加量：酢酸の量を 2.5 ml. に固定し、50% 水酸化カリウム水溶液 0~10 ml. を加えて定量法の操作にしたがって GC を行ない DBB のピーク高さに対する nitroso-DIPA のピーク高さの比を求めた結果を Table II に示す。これより液が酸性~弱酸性では nitroso-DIPA が完全に抽出されないことがわかる。したがって本定量法では 7 ml. を加えることに定めた。

2) 50% 亜硝酸ナトリウム水溶液の添加量：酢酸 2.5 ml. に 50% 亜硝酸ナトリウム水溶液 2~10 ml.

TABLE III. Relationship between Volume of 50% NaNO₂ Solution and Ratio of Peak Height

Volume of 50% NaNO ₂ soln. (ml.)	2	3	5	7	10
Ratio of peak height	2.80	2.83	2.86	2.85	2.91

AcOH 2.5 ml., 50% KOH soln. 5 ml., reacted for 5 min. at 65°, DADA soln. (1 mg./ml.) 10 ml., internal standard: *p*-dibromobenzene (0.5 mg./ml.) 10 ml., PEGS (155°)

TABLE IV. Relationship between Reaction Temperature, Reaction Time and Ratio of Peak Height

Reaction temp. (°C)	Reaction time (min.)				
	2	5	7	10	15
50	2.61	2.86	2.90	2.85	2.85
60	2.86	2.82	2.95	2.87	2.85
70	2.84	2.87	2.90	2.88	2.53
80	2.11	2.19	1.96	1.62	1.08

AcOH 2.5 ml., 50% KOH soln. 7 ml., 50% NaNO₂ soln. 5 ml., DADA soln. (1 mg./ml.) 10 ml., internal standard: *p*-dibromobenzene (0.5 mg./ml.) 10 ml., PEGS (155°)

TABLE V. Reproducibility of Ratio of Peak Height

Concn. of DADA (%)	Ratio of peak height					Means	Standard deviation
0.010	0.33	0.34	0.36	0.36	0.34	0.34 ₆	0.01
0.025	0.62	0.65	0.68	0.62	0.65	0.64 ₄	0.03
0.050	1.43	1.43	1.39	1.45	1.41	1.42 ₂	0.02
0.100	2.87	2.82	2.82	2.88	2.84	2.84 ₆	0.03
0.150	4.35	4.33	4.35	4.40	4.47	4.38 ₀	0.06
0.200	5.78	5.73	5.71	5.65	5.86	5.74 ₆	0.06

Internal standard: *p*-dibromobenzene (0.5 mg./ml.) 10 ml., PEGS (155°)

を加えて温湯中で反応させて 50% 水酸化カリウム水溶液 7 ml. を加えて, その影響を調べた結果を Table III に示す. 2~10 ml. ではほとんど差がないので 5 ml. を用いることにした.

3) 反応温度と反応時間: 50°, 60°, 70° および 80° でそれぞれ 2~15 分間反応させてピーク高さの比を求めた結果を Table IV に示す. 50°, 2 分では完全に反応しないためかピーク高さの比はやや低い, 5~10 分では高くなり一定となる. 60° では 2~15 分, 70° では 2~10 分でピーク高さの比は一定であるが, 70°, 15 分ではやや低目となる. さらに 80° では 2 分でもピーク高さの比は明らかに低く, 以下時間が増すにつれて急激に低下する. これは温度が高いために, 生じた亜硝酸が揮発するためか, あるいは生じた nitroso-DIPA が分解するためと考えられる. したがって本定量法では 60° で 5 分間反応させることにした.

4) ピークの再現性: 以上で得られた適当と思われる条件で, DADA 標準液 0.01~0.2% 水溶液についてくり返しピーク高さの比を求めた結果を Table V に示す. これにより本法は再現性に富む, 精度のよい定量法であることがわかる.

検量線の作製 DADA 標準液の 10 ml. をとり, 定量法の 1 および 2 にしたがって操作したのち GC を行ない, 内部標準のピーク高さに対する nitroso-DIPA のピーク高さの比を求める. 得られた検量線の一例を Fig. 2 に示すが, いずれのカラムの場合にも濃度とピーク高さの比の間には直線性が認められる.

製剤中のジイソプロピルアミンジクロロアセテートの定量

いろいろな製剤について PEGS カラム, 温度 155°, 内部標準 DBB を用いて DADA を定量した結果を Table VI に示す. 試料 1 は DADA を水で抽出し, 試料 2 および 3 は水で希釈し, また試料 3 は 25% 酢酸水溶液で抽出して試料液とした. 試料 5 および 6 はクロロホルム-エタノール (1:1) で抽出したのち, 水浴上で溶媒を除いたのち残留物を水に溶かして試料液とした.

考 察

DADA は揮発しにくい直接熱伝導度型ガスクロマトグラフでは定量できなかったが, 本法によれば比較的精度よく定量できる. 本法は従来の滴定法¹⁾ 比色法²⁾ およびニトロソ化-UV 法⁴⁾ が適用できなかった試料 3~6 のような複雑な処方の製剤にも適用できることがわかり, さらに生体試料分析への適用も可能と考えられる. Table VI において試料 5 および 6 の定量値が低いのは DADA がケイ酸アルミニウムに吸着されるためと考えら

Fig. 2. Calibration Curves of Diisopropylamine Dichloroacetate (DADA)

1. PEGS: internal standard *p*-dibromobenzene, column temp. 155°, He 75 ml./min.
2. DEA: internal standard *p*-dibromobenzene, column temp. 180°, He 76 ml./min.
3. PEGS: internal standard nitroso-DIBA, column temp. 160°, He 71 ml./min.
4. Carbowax 6000: internal standard nitroso-DIBA, column temp. 180°, He 90 ml./min.
5. silicone grease: internal standard nitroso-DIBA, column temp. 180°, He 92 ml./min.
6. Apiezon L: internal standard nitroso-DIBA, column temp. 190°, He 80 ml./min.

TABLE VI. Determination of DADA in Pharmaceutical Preparations

Preparation	DADA (%)				Means
1	98.8 96.8	97.5	98.4	103.2	98.9
2	98.5 103.7	100.4	103.2	102.9	101.7
3	102.8 98.9	100.6 100.5	98.3 102.0	100.5	100.5
4	105.1	104.0	102.9		104.0
5	95.6				
6	96.5				

- 1: tablet that contains DADA, calcium gluconate, lactose and starch
 2: injection that contains DADA, sodium gluconate, benzylalcohol and water
 3: oral solution that contains DADA, sodium gluconate, D-panthenol, orotic acid, vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin C, nicotinamide, caffeine, dehydrocholic acid, sodium cyclamate, citric acid, sodium citrate, D-sorbitol, sugar, ethanol and water
 4: tablet that contains DADA, thioctamide, orotic acid, D,L-homocysteinethiolactone, sodium gluconate, vitamin A acetate, vitamin D₂ powder, vitamin E acetate, vitamin K₄ diacetate, vitamin B₁, vitamin B₂, sodium ascorbate, vitamin B₆, vitamin B₁₂, nicotinamide, pantothenic acid, calcium pantothenate, dehydrocholic acid, calcium phosphate, sodium sulfate, secondary calcium phosphate, caseiodine, ferric sulfate, lactose and starch
 5 & 6: tablet (5) and powder (6) that contain DADA, Takadiastase, aluminum silicate (Neutonin), sodium bicarbonate, calcium carbonate, calcium gluconate, nicotinamide, calcium pantothenate, sodium copper-chlorophyllate, L-menthol, scopoliae extract and seven crude drugs

れ、さらに抽出法を検討する必要がある。なお本法において nitroso-DIPA 抽出液を濃縮するさい nitroso-DIPA が一部揮散するのでなるべく減圧度を一定にする必要がある。しかし水素炎イオン化検出器を使用すれば濃縮操作を省略できる。

終わりに当たり、原稿の御校閲をいただいた東京大学教授田村善蔵先生に厚く御礼申し上げるとともに、発表を許可された木村生産技術研究所長、根来研究所次長ならびに芹沢試験研究室長に謝意を表します。

三共株式会社生産技術研究所