解熱鎮痛剤中のアセチルサリチル酸、バルビタール (ピラビタール中のものを含む) の分離定量

湯本 芳雄, 橋爪 六郎 (都立衛生研究所*)

Separation and Determination of Acetylsalicylic acid and Barbital in Pharmaceutical Preparations. (Including in the Coexistence of Pyrabital)

Yoshio Yumoto, Rokurō Hashizume
(Tokyo-to Laboratories for Medical Sciences*)

Acetylsalicylic acid and barbital in pharmaceutical preparations were determined by the A.O.A.C. and isopropylamine-cobalt acetate method respectively. The influences of the coexisted substances on the above mentioned chemicals were also examined. Quantitative thin-layer chromatographic analysis of acetylsalicylic acid and barbital was achieved by carrying out on a micro scale with a high degree of precision, simplicity and rapidity. The spots were scraped from the plates and the fractions of acetylsalicylic acid and barbital which were extracted with chloroform-methanol, acetic acid-chloroform and acetone-methanol from the silica gel, were determined by colorimetric and UV absorption method. The routine separation analysis of acetylsalicylic acid and barbital may be performed by this method.

(Received May 26, 1964)

緒 言

acetylsalicylic acid, phenacetine, caffeine, (以下それぞれ A, P, C と略記する) の定量法としては, A・O・A・C. による化学的抽出分離定量法¹⁾, Holt²⁾, Green³⁾, Wilson および Hilty⁴⁾ などによって提案された方法がある。Jones⁵⁾, Tinker ら⁶⁾ は A のクロロホルム溶液について, UV によって定量している。Parke⁷⁾, 大場ら⁸⁾ はクロロホルム溶液について, IR によって簡単に定量を行なっている。NF XI に記載されている A, P, C 錠の定量法としては Levine⁹⁾ による方法が採用されている。著者らは実際に混合カゼ薬の分析を行なう必要が生じたので A・O・A・C. による方法に準じて行ない, また薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記する) による分離定量を行なった。barbital (以下 B と略記する) の定量法としては 0.01 N-水酸化ナトリウム液の 240 mμ における UV 法¹⁰⁾, キレート滴定法¹¹⁾, 比色法¹²⁾ などが報告されている。この他に B の定量法として酸化法, 沈澱法, 中和法, ポーラログラフ法, ガスクロマトグラフ法, IR 法などが報告されているが, 一般にそれぞれ適当な分離操作を行わなければ適用が難しい。著者らは比色法により行ない, また TLC による分離定

量を行なったので以下に実験結果と若干の考察を加え報告する。

実験および結果

1. 製剤中の A の定量法

(1) 試 薬

- ① クロロホルム
- ② 炭酸水素ナトリウム液: 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液
- ③ 水酸化ナトリウム試液: N-水酸化ナトリウム水溶液
- ④ 0.1 N-臭素液
- ⑤ 塩酸
- ⑥ ヨウ化カリウム試液: N-ヨウ化カリウム水溶液
- ⑦ 0.1 N-チオ硫酸ナトリウム液

(2) 定量操作

A として約 500 mg に対応する試料を精密に量り, 温クロロホルム 15 ml ずつで 3 回抽出を行ない, グラスフィルターでろ過する。グラスフィルター上の残留物は, さらに温クロロホルム 5 ml ずつで 3 回洗う。ろ液と洗液を合わせて分液ロートにとり, 炭酸水素ナトリウム液 25 ml ずつで 3 回抽出し, 炭酸水素ナトリウム液を合し, これにクロロホルム 20 ml を加えて洗ったのち, 炭酸水素ナトリウム液を分取し, これに水酸化ナトリウム

* 東京都新宿区百人町4-539; No. 539, 4-chome, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo.

試液 5 ml を加え水浴上, 30 分間加熱し, 冷後水を加えて正確に 250 ml とする。この液 25 ml をヨウ素びにとり, 0.1 N-臭素液 30 ml, 水 25 ml および塩酸 5 ml を加え, 直ちに密栓し 30 分間ときどき振りまぜたのち, さらに 15 分間放置する。次にヨウ化カリウム試液 5 ml を加え, 再び栓を施して静かに揺動したのち, 0.1 N-チオ硫酸ナトリウム液で滴定する(V)。同様の方法で空試験を行ない補正する(Vo)。(指示薬; デンプン試液)

0.1 N-臭素液 1 ml = 3.003 mg $C_9H_8O_4$ 試料中の A の含量 C (%) は次式によって求められる。

$$C(\%) = 3.003 \times (V_o - V) \times 100 / \text{検体秤取量 (mg)}$$

(3) 共存薬品の影響

この定量法を妨害しない物質は, pyrabital, barbitol, bromvalerylurea, N-acetyl-p-aminophenol, ethoxybenzamide, noscapine-HCl, sulpyrine, chlorpheniramine maleate, nicotinamide, vitamin B₂ phosphate sodium salt, vitamin B₁, vitamin C, taurine, phenacetine, caffeine など, 妨害するものは kenten (sodium 2,6-dibutylnaphthalene monosulfate) salicylamide, chinophen などである。この方法は A として定量するのではなく, サリチル酸として定量する方法であるから, 障害物がないときは塩化第二鉄およびジアゾ化 P-ニトロアニリンによる比色定量法も用いられる。

2. TLC による A の分離定量

吸着剤として silica gel G (Merck 社製, 硫酸カルシウム含有) を用い, 500 μ の厚さに引き, 110° で 30 分間乾燥したものを用い, 試料溶液 (エタノール, クロロホルムなどを溶媒とする) 適当量 (試料中の成分比, 分析目的に応じ 0.2~数 10 mg) をシリカゲル薄層板上にマイクロシリンジを用い正確に採取する。(1つの原点に 200~2000 μ g) 次に展開剤として Fig. 1 のようにクロロホルム: アセトン: ジエチルアミン (50:50:5) を用い, 約 13.5 cm 展開すると, およそ $R_f \times 100$ で A (0), P (72), C (63), アミノピリン (78), アンチピリン (61) に分離する。この分離スポットは, 紫外線 (3650 Å) により観察するとき, A は明瞭な黄色の螢光を呈する。薄層上にしるしをしてスポット区分をかきとり, 分離する。この A の分離点から成分を抽出する溶媒を検討したところ, アセトン, クロロホルム, および二塩化エチレンなどは単独では, あまり抽出効果がよくなく, これらの溶媒にメタノールを混和すると抽出効果がよくなり, 特にクロロホルム: メタノール (70:30) がよい。また 1% 酢酸・クロロホルムもよいことがわかった。

Fig. 1 Thin-layer Chromatography of Antipyretics which Contains Acetylsalicylic acid.

この事実はシリカゲルの silanol 基と A の OH, COOH 基の極性基との水素結合によるものと考えられる。分離したシリカゲル粉末から A を抽出して, 塩化第二鉄による比色で定量するときは, クロロホルム: メタノール (70:30) の混液 10 ml ずつで, 5 回抽出し, そのろ液を水浴上で蒸発乾固する。残渣に 0.1 N-水酸化ナトリウム液 5 ml を加え水浴上で 10 分間加熱, 冷後 0.1 N-硫酸 5 ml を加えたのち, 1% 塩化第二鉄液 1 ml を加えて全量 20 ml とし, 比色定量する。A 標準溶液を用い塩化第二鉄によって発色させた溶液の 540 m μ の吸光度を測定して検量線を作製した。Fig. 2 にその結果を示す。吸光度は発色後約 5 時間はまったく変化しない。この場合 A のクロロホルム・メタノール抽出液を減圧で留去し, 残渣にクロロホルムを加えて溶かし, 277 m μ における吸光度より A を定量することが可能であるが, 多少の分解はまぬかれないので, 分離したシリカゲル粉末に氷酢酸: クロロホルム (1:99) の混液 10~20 ml を加えて 2~3 分間振り混ぜたのち, ろ過し, ろ液について 280 m μ および 310 m μ における吸光度を測定すれば A およびサリチル酸の同時定量を行なうことができる。Fig. 3 は A の氷酢酸・クロロホルム溶液およびクロロホルム溶液について 280 m μ および 277 m μ における吸

Fig. 2 The Calibration Curve of the Spectrophotometric Determination of Acetylsalicylic acid by Ferric chloride Method.

Fig. 3 Calibration Curves of Acetylsalicylic acid
(1) — $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{CHCl}_3$ (1 : 99) solution (at $280 \text{ m}\mu$)
(2) — CHCl_3 solution (at $277 \text{ m}\mu$)

Table I Recovery of Acetylsalicylic acid by Means of Thin-layer Chromatographic Assay.

Sample No.	Compounds mixed			Acetylsalicylic acid, Found.			
	Acetylsalicylic acid, mg.	Phenacetine, mg.	Caffeine, mg.	Colorimetric method, mg.	Error %	UV-method* mg.	Error %
1	300	200	100	297.1	-1.0	286.3	-4.6
2	250	200	70	245.5	-1.8	246.7	-1.3
3	250	125	70	246.3	-1.5	245.5	-1.8
4	250	125	50	241.2	-3.6	242.2	-3.2
5	250	125	50	243.7	-2.6	247.7	-1.0
6	250	100	50	247.2	-1.2	246.2	-1.6
7	250	100	50	245.2	-2.0	244.7	-2.2

* Extracted with 1% $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{CHCl}_3$ from the silicagel.

光度を測定した結果得られた検量線である。A, P, C の混合医薬品について, A を TLC により分離し, 塩化第二鉄比色法および UV 法で定量した結果を Table I に示す。このようにいずれの場合もおおよそ $\pm 2.5\%$ 以内の変動で A を回収することができる。

3. 製剤中の B の定量法

(1) 試薬

① 無水メタノール: J P VII メタノール (カールフィッシャー用) を用いる。

② 酢酸コバルト溶液: 105° で 2 時間乾燥した酢酸コバルト 0.125 g に無水メタノールを加えて 100 ml とする。

③ イソプロピルアミン溶液: イソプロピルアミン 25 ml に無水メタノールを加えて 100 ml とする。

④ メタノール・クロロホルム混液: 無水メタノール 5 ml にクロロホルムを加えて 100 ml とする。

⑤ B 標準液: 105° で 2 時間乾燥した B 50 mg を精密に量り, 無水メタノール 2.5 ml を加えて溶かしたのち, クロロホルムを加えて正確に 50 ml とする。

(2) 定量操作

B として約 50 mg に対応する試料を精密に量り, エーテル 20 ml ずつで 3 回抽出しろ過する。残留物, ろ紙, ロートをエーテル 10 ml ずつで 2 回洗い, 洗液を汙液に合し, 水浴上でエーテルを留去する。残留物を 100° で 10 分間乾燥したのち, 無水メタノール 2.5 ml を加えて溶解させ, クロロホルムを加えて正確に 50 ml とする。この溶液および B 標準液各 3 ml をとり, おのおのにメタノール・クロロホルム混液 2 ml, イソプロピルアミン溶液 5 ml および酢酸コバルト溶液 5 ml を加え, 振りまぜ, 15 分後, クロロホルムを加えて 25 ml とする。メタノール・クロロホルム混液 5 ml について同様に操作したものを対照として 565 $\text{m}\mu$ における吸光度をそれ

それ測定し A および A₀ とする。試料中の B の含量 C (%) は次式によって求められる。

$$C(\%) = W \times A / A_0 \times 100 / \text{試料秤取量}(\text{mg})$$

W : B 標準液の B の秤取量(mg)

B 標準液について波長 565 mμ における吸光度を測定し、検量線を作製した。Fig. 4 にその結果を示す。B 誘導体は塩基性物質の共存下において、酢酸コバルトと反応して紫～紫紅色を呈する。この反応は $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ -\text{N}-\text{C}-\text{N}- \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ の構造を有するものに共通する反応である。

Fig. 4 Calibration Curve of Barbital

(3) 共存薬品の影響

この定量法を妨害しない物質は、bromvalerylurea, bromdiethylacetylurea, chlorpheniramine maleate, migerenin, dl-methylephedrine-HCl, aminopyrine, antipyrine, sulpyrine, N-acetyl-*p*-aminophenol, caffeine, phenacetine, nicotinamide, ephedrine-HCl, acetylsalicylic acid, kentene などで、妨害するものは amobarbital, allobarbital, phenobarbital, pentobarbital, diphenylhydantoin, allopypirabital, N-methyl-ethylphenylbarbital, theophylline, theobromine などである。以上のように $>\text{N}-\text{H}$ がすべて $>\text{N}-\text{CH}_3$ になった caffeine は呈色せず、従ってこの反応で有色錯塩を形成するには $-\text{N}-\text{C}-\text{N}-$, $-\text{N}-\text{C}=\text{N}-$ の構造を有するもののうち、N の 1 つは N-H であることが必要であり、bromvalerylurea, bromdiethylacetylurea は $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ -\text{N}-\text{C}-\text{N}- \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ を有するが呈色を示さない。従ってこの反応による呈色は $-\text{NH}$ の H は酸性を呈するものでなければならない¹³⁾。

4. TLC による B の分離定量

2. と同様のシリカゲル薄層板上に試料溶液 (エタノール, アセトンなどを溶媒とする。) 適当量 (0.1 ~ 数 10 mg) をマイクロシリンジを用いて正確に採取する。展開剤として、クロロホルム : アセトン : ジエチルアミン (50 : 40 : 10) を用い、2. と同様に展開すると、およそ $R_f \times 100$ で B (38), アミノピリン (85), A (0), P (78), アンチピリン (67), C (62) に分離する。この分離スポットは紫外線 (3650 Å を用いるよりも 2536 Å がよい) により観察すると、B は暗色のハン点として観察できるから、薄層上にしるしをしてハン点区分をかきとり分離する。分離したシリカゲル粉末から B を抽出して、UV により定量を行なうときは、アセトン : メタノール (70 : 30) の混液 10 ml づつで 5 回抽出、ろ過してろ液を蒸発乾固し、残渣に 0.01 N-水酸化ナトリウム液一定量を加えて溶かし、240 mμ における吸光度を測定して B を定量する。この場合吸光度はアルカリ濃度により敏感に影響をうけるので、B 標準液に用いたと同じ水酸化ナトリウム液を用いる。B の 0.01 N-水酸化ナトリウム溶液の 240 mμ における吸光度を測定して検量線を作製した。Fig. 5 にその結果を示す。

Fig. 5 Calibration Curve of Barbital

Table II Recovery of Barbital by Means of Thin-layer Chromatographic Assay.

Sample, mg	Barbital, Found, mg.			
	UV-method	Error %	Colorimetric method	Error %
Barbital 50	49.3	-1.4	50.5	+1.0
Aminopyrine 100				
Barbital 50	49.1	-1.8	49.0	-2.0
Aminopyrine 150				
Barbital 50	49.1	-1.8	49.3	-1.4
Aminopyrine 200				
Pyrabital 200	58.7	-3.2	60.2	+0.7
Pyrabital 200	57.2	-2.4	56.2	-4.1

Bおよびアミノピリンの混合物ならびにピラビタール中のBを TLC により分離し, UV 法, 比色法により, 定量した結果を Table II に示す。このように TLC を用いて行なう分離定量法は簡易迅速に, かつ十分に信頼できる定量値を得ることができる。終りにあたり TLC について有益な助言を賜った, 日東理化学研究所木下正一氏に厚く感謝します。

文 献

- 1) Method of Analysis A.O.A.C., 9 th Ed., 489 (1960).
- 2) F. E. Holt : J. Am. Pharm. Assoc., **35**, 71 (1946).
- 3) M. Green, N. Green : Ibid., **36**, 235 (1947).
- 4) J. B. Wilson, W. W. Hilty : Ibid., **35**, 97 (1946).
- 5) M. Jones, R. L. Thatcher : Anal. chem., **23**, 957 (1951).
- 6) R. B. Tinker, A. J. McBay : J. Am. Pharm. Assoc., **43**, 315 (1954).
- 7) T. V. Parke, A. M. Ribley, E. E. Kennedy, W. W. Hilty : Anal. Chem., **23**, 953 (1951).
- 8) 大場琢磨, 小川秀子, 佐子茂, 小林茂子, 中島利章, 吉川克業 : 衛生試験, **77**, 67 (1959).
- 9) J. Levine : J. Am. Pharm. Assoc., **46**, 687 (1957).
- 10) A. F. Rotondrao : J. Assoc. Offic Agr. Chemists, **38**, 809 (1955).
- 11) 立沢政義 : 衛生試験, **77**, 109 (1959).
- 12) F. D. Snell, C. T. Snell : Colorimetric methods of Analysis, Vol. IV, 99 (1955), Van Nostrand, New York.
- 13) 塚元久雄, 吉村実 : 薬誌, **78**, 28 (1958).

最新刊

桜井喜一・野上 寿・福沢 寿・不破竜登代 共 著

調剤指針注解

A 5 判 480 頁
価 2000 円 千 実費

本書は調剤指針の注解書で, 指針に記載されていない部分についても必要な解説を行ない, 特に内外新処方方を挙げ理解しやすいよう多くの実例や, 新しい製剤器械, 説明図を示し, 新研究をとりいれて詳述している。また本書は著名病院薬局長の分担執筆になり, 明快かつ適切に解説している。薬大製剤学の教材としても好適。

季刊 薬 剤 学 24 卷

薬学会薬剤学委員会編
年極前納 価 1500 円 千 共

薬剤学の新知識, 報文, 外国文献速報などを満載した病院薬局, 製剤業者の必読雑誌

東京都千代田区神田和泉町 1-11
電話 東京 (866) 2037・8407
振替 東京 8 0 6 6 5

薬 事 日 報 社

大阪市東区道修町 4 の 32 乾福ビル内
電話 北 浜 (231) 3261・7229