脱水芒硝で乾燥，脱色後減圧下に乾固し，残留する餡状物にベンゼン少量を加えて器壁を研磨すると次第に固化．これを濾取し，得られる mp 123~127°(decomp) の粗結晶 (収量 1 g) を 99% エタノールから 2 回再結晶，mp 133~134°(decomp) の無色柱状結晶．本品の元素分析値は TB₂D の sulfoxide によく一致．C₁₉H₂₄O₃N₄S₂ 計算値 C 54.26, H 5.75, N 13.32, 実験値 C 54.17, H 5.99, N 13.23. ブタノール抽出液を脱水芒硝で乾燥，ブタノールを減圧下に留去し，残留する餡状物に酢酸エチル少量を加えて器壁を研磨すると固化．これを濾取し，酢酸エチル少量と水浴上に加熱後再び濾取，mp 165~170°(decomp) の粗結晶 (Rf 0.41) 0.8 g を得．thiamine disulfide と混融しても mp は変化しない．ブタノール抽出母液は弱塩酸酸性とした後減圧下に濃縮乾固，熱エタノールで抽出，抽出液を減圧下に濃縮して得られる残留物 (Rf 0.29 に thiamine, Rf 0.38 に thiamine disulfide を検出) を少量の水に溶かし，ロダンカリウム 0.5 g を加え炭酸水素ナトリウムで中和し，析出する結晶を熱湯から再結晶すると mp 188°(decomp) の無色柱状結晶，thiamine ロダン塩と混融しても変化しない．

TMD の過安息香酸による酸化 TMD 0.98 g をクロロホルム 30 cc に溶かし，過安息香酸のクロロホルム溶液 (C₆H₅COOOH=0.059 g/cc) 7.2 cc を氷冷下に加え，氷室に 90 時間放置し，クロロホルム溶液を傾瀉して析出物を分離．析出物を水に溶かし PPC にかけてと thiamine (Rf 0.30), thiamine disulfide (Rf : 0.38) 及び微量の酸化成績体 (Rf 0.56) が検出された．クロロホルム溶液は炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄後，クロロホルムを留去すると餡状物質 (Rf 0.56) が残留するが結晶化しなかつた．

TPD の過安息香酸による酸化 TPD 0.5 g をクロロホルム 10 cc に溶かし氷冷下過安息香酸クロロホルム溶液 (C₆H₅COOOH=0.048 g/cc) 8 cc を加え，0° で 2 時間反応させ，上記と同様に処理して PPC により thiamine (Rf 0.29), thiamine disulfide (Rf 0.40) 及び酸化成績体 (Rf 0.72) を検出したが目的物は餡状となり結晶化しなかつた．

武田薬品工業株式会社研究所

U.D.C. 545.844.42 : 545.3 : 547.587.11

173. 木下彌兵衛，森山繁隆： 沝紙微量電気泳動法による医薬品の分析 (第 3 報*)

サリチル酸及びその誘導体の分離及び確認

Yahyoe Kinoshita and Shigetaka Moriyama : Analyses of Drugs and Chemicals by Paper Electrophoresis. III. Separation and Identification of Salicylic Acid and its Derivatives.

(Pharmaceutical School, Nagoya City University**)

In continuation of previous works,^{1,2)} separation and determination of salicylic acid, acetylsalicylic acid, phenyl salicylate, sodium *p*-aminosalicylate, and salicylamide were attempted by paper electrophoresis. Migration values and conditions of each compound are indicated in Figs. 1~7. It was found that phenyl salicylate alone stayed in the original spot while the other four compounds exhibited the maximum difference in the migration distance at around pH 4.0, using any of the buffers. Detection of the migrated position was made by the Ōkuma's reagent,⁵⁾ and the limit of detection was 5~10 γ. In the case of a mixture of these five compounds, as shown in Table I, the separatory detection of each is made as follows: Three kinds of sample solutions, 1% ethanolic solution, and treated with alkali and acid, are submitted to electromigration under the same conditions, and each compound is determined from its migration value, direction of migration, and coloration to the reagent. Ōkuma's reagent consists of 1% sodium nitroprusside, 1% hydroxylamine hydrochloride, and 1N sodium hydroxide, each of which is sprayed on an air-dried filter paper, in that order.

(Received March 12, 1956)

前報^{1,2)}に続いて，サリチル酸及びその誘導体のうち，日本薬局方収載のサリチル酸，アセチルサリチル酸，サリチル酸フェニル，パラアミノサリチル酸ナトリウム及び N. N. R. 収載のサリチルアミドにつき同様に沝紙微量電気泳動法を利用して分離及び確認を行つた．電圧，泳動時間，温度のそれぞれと泳動距離との関係は前報^{1,2)}

* 第 76 回 日本薬学会年会 (1956) で一部発表．

** Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya.

1) 木下，森山：本誌 74, 1032 (1954)．

2) 木下，森山：本誌 75, 795, (1955)．

Fig. 1.

Relationship between the Migration Value of Salicylic Acid and pH (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 min.)

Fig. 2.

Relationship between the Migration Value of Acetylsalicylic Acid and pH (400V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 min.)

Fig. 3.

Relationship between the Migration Value of Salicylamide and pH (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 min.)

Fig. 4.

Relationship between the Migration Value of p-Aminosalicylic Acid and pH (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 min.)

で得られた結果と同様であつた。泳動には Clark-Lubs, Sørensen 及び Kolthoff の緩衝液を使用し、それぞれの泳動距離を測定したが Fig. 1~4 で見られるように、緩衝液の成分が異なると泳動距離も異なり、pH 以外の条件を一定にして、前記の三系列の緩衝液を用いて泳動を行うと、いずれの系列の緩衝液の場合でも、サリチルアミド、サリチル酸フェニル以外のものはすべて陽極側に泳動し、サリチルアミドは pH 8.0 までは陰極側に泳動するが、それ以上アルカリ性となると陽極側に動き、pH 10.0 になるとサリチル酸等の泳動距離とはほぼ同様となる。またサリチル酸フェニルはいずれの場合でも pH 値に関係なく原点に止まる。これらの結果から見ると、

Fig. 5.

Migration Values of Several Salicylic Acid Derivatives at various pH Values by Clark-Lubs' Buffer Solutions (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 mins.)

Fig. 6.

Migration Values of Several Salicylic Acid Derivatives at pH Values by Sørensen's Buffer Solutions (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 mins.)

Fig. 7.

Migration Values of Several Salicylic Acid Derivatives at pH Values by Kolthoff's Buffer Solutions (400 V, 1 mA/1 cm., 15°, 60 mins.)

いずれの緩衝液を使用しても pH 4.0 附近でおのおのの化合物の泳動距離の差が最大となる (Fig. 5~7). 但し, アセチルサリチル酸とパラアミノサリチル酸ナトリウムとは殆んどすべての pH でその泳動距離がほぼ等しくなるが, 両者がおのおのの単独であるときは色調の相違によつて比較的容易に判別することが出来る. しかし, 両者が混合しているとき, または緩衝液の成分の影響によつて色調による判別が困難なときは別に新たに試料のエタノール溶液をとり, 実験の部に記したように, アルカリで処理するか, 或いは塩酸で処理すると, どちらの場合でもその一方の化合物が変形されるので泳動距離に変化が起るから分離の目的を達することが出来る.

泳動像の検出法については, 塩化第二鉄による方法³⁾, ジアゾ化したスルファニール酸, またはアントラニール酸等による方法⁴⁾等を試みたが, いずれも試薬が保存に耐えなかつたり, 検出反応の鋭敏度が低くなつたりして, 満足出来るような結果が得られなかつた. 著者等は犬熊氏⁵⁾の方法により, 泳動後, 風乾した沝紙片にニトロプルシッドナトリウム溶液, 塩酸ヒドロキシルアミン溶液, 水酸化ナトリウム液を順次噴霧して, サリチル酸誘導体を帯緑青色ないし帯青紫色斑点として検出した. この方法によると, 鋭敏度は試験管内で溶液として反応させたときと同様で, かえつて呈色に要する時間が短縮される. 確認限度はサリチル酸フェニルは 10 γ , その他のサリチル酸誘導体はいずれも 5 γ であつた. これらの結果を要約して Table I に示す.

Table I. Coloration by Ōkuma's Reagent⁵⁾ and the Direction of Electrophoresis

(Condition of Electrophoresis: pH 4.0, Clark-Lubs' Buffer, 400 V, 1 mA./cm., 15°, 60 mins.)

Substance*	Salicylic acid	Acetylsalicylic acid	Phenyl salicylate	Salicyl amide	Sodium p-amino-salicylate
Treatment					
Non-treatment	greenish blue (-)	greenish blue (-)	greenish blue (±)	bluish purple (+)	brownish blue (-)
Boiling with 1 N NaOH** (60 mins.)	"	greenish blue (-) a)	greenish blue (-) a)	greenish blue (-) a)	"
Boiling with conc. HCl*** (60 mins.)	"	greenish blue (-)	"	"	greenish blue (+) b)

Note: (-) ... Direction of electrophoresis to anode

(+) ... Direction of electrophoresis to cathode

(±) ... Original point

* 1% EtOH soln. ** 1% EtOH soln.+1 N NaOH (1:1), *** 1% EtOH soln.+conc. HCl (1:1)

a) Migration value of salicylic acid b) Migration value of m-aminophenol

実験の部

装置及び操作 泳動装置は第 1 報¹⁾とほぼ同様であるが, 泳動条件を同一にするため, 東洋沝紙 No. 50, 6×40 cm のものを使用, 同一の沝紙に 5 種の試料を中央の原線上に約 1 cm の間隔で点滴した, したがつて沝紙を挟むガラス板は巾を広くし, パラフィンを塗布しない部分は 6.5 cm の巾とした. また温度の影響をなるべく少なくするために泳動室は 15±1° に調節. 試料は 1% エタノール溶液とし, その 0.001~0.005 cc を点滴した.

3) 日局 VI 収載.

4) R. L. Hossfeld: J. Am. Chem. Soc. 73, 852 (1951).

5) 犬熊: 本誌 72, 872 (1952).

この程度の量であれば泳動像は鮮明な斑点として認めることが出来る。

泳動像の検出 泳動後の濾紙片を十分に風乾, 1%ニトロプルシッドナトリウム水溶液, 1%塩酸ヒドロキシルアミン水溶液, 1*N* 水酸化ナトリウム溶液を順次噴霧, 少時放置すると発色し始め, 1 分間後に呈色度は最高となる。この方法によるとサリチル酸, アセチルサリチル酸及びサリチル酸フェニルは帯緑青色, サリチルアミドは帯青紫色, パラアミノサリチル酸ナトリウムは帯褐青色を呈し, その確認限度はサリチル酸フェニルは 10 γ , 他は 5 γ であった。

電圧, 時間または温度と泳動距離の関係 サリチル酸を試料として Clark-Lubs 緩衝液 pH 4.0 のものを使用して, 電圧, 時間または温度を前報^{1,2)}と同様にして, 順次変化させおのおのの化合物の泳動を行つたが, これらの結果も前報^{1,2)}と同様に電圧及び時間に関してはそれらは泳動距離と直線的関係を示し, 温度に関しては温度の上昇と共に泳動距離は増大するが直線的な関係は示さなかつた。

泳動に使用する緩衝液の成分と泳動距離の関係 Clark-Lubs, Sørensen, Kolthoff の三種の緩衝液を使用し, 400 V, 1 mA/cm, 15°, 60 分の条件で泳動を行つた。その結果は Fig. 1~4 に示す。

同系列の緩衝液の各 pH 値と泳動距離の関係 上記三種のいずれの緩衝液を使用しても, サリチル酸フェニルだけは pH 値の如何に拘らず全く泳動しないで原点に止まり, サリチルアミドは pH 8.0 以下では陰極側に泳動するが, pH 8.0 以上となると陽極側に泳動し, pH 10.0 以上になると他のサリチル酸誘導体の泳動位置に接近するこの二種以外のサリチル酸誘導体はどの場合でも常に陽極側に泳動し, pH 4.0 以下では pH 値が大きくなるにしたがつて泳動距離は急激に増大するが, pH 4.0 以上となると, 泳動距離の増加の程度は小さくなり, pH 9.0~10.0 では泳動像が僅かではあるが鮮明を欠くようになる。

サリチル酸誘導体の混合物の分離確認 混合物の分離は Fig. 5~7 に示すように Clark-Lubs または Kolthoff の緩衝液の場合では, pH 4.0 でアセチルサリチル酸とパラアミノサリチル酸ナトリウムとが接近した位置に泳動する以外は, 他のおのおのの泳動距離の差は最大となるから, この二種以外のサリチル酸誘導体の分離は 5~10 γ の確認限度で行うことが出来る。アセチルサリチル酸とパラアミノサリチル酸ナトリウムとを分離するには試料の 1%エタノール溶液に同容の 1*N* 水酸化ナトリウム溶液を加えて, 約 1 時間還流冷却器を付して弱く煮沸した液について, Clark-Lubs, Kolthoff, Sørensen のいずれかの緩衝液の pH 4.0 のものを使用して泳動を行うと, アセチルサリチル酸は脱アセチル化されてサリチル酸ナトリウムとなるが, パラアミノサリチル酸ナトリウムは変化しないでそのままであるから泳動距離の差が大きくなり分離することが出来る。しかし, サリチル酸とこれら二種の誘導体とが共存するときは, 始めから存在していたサリチル酸による像か, アセチルサリチル酸が脱アセチル化して生じたサリチル酸による像か判別出来ない。このような場合は, 別に新たにそれら混合試料をとり, 1%エタノール溶液とし, それに同容の濃塩酸を加えて約 1 時間還流冷却器を付して煮沸した液について前と同じ緩衝液で pH 4.0 のものを使用して泳動を行うと, サリチル酸とアセチルサリチル酸は塩酸による処理に影響されないで, 未処理の場合と同様な泳動距離で陽極側に泳動するが, パラアミノサリチル酸ナトリウムは殆んど大部分がメタアミノフェノールとなり陰極側に泳動し, 一部分はパラアミノサリチル酸エチルエステルとなり原点に止まるから, 塩酸による処理前とは泳動方向が全く逆となることによりサリチル酸及びアセチルサリチル酸から分離確認することが出来る。この際サリチル酸フェニル及びサリチルアミドは陽極側に移動するから障害とはならない。メタアミノフェノールの泳動像もサリチル酸誘導体の検出に使用した試薬によつて青緑色に認められる (Table I)。

名古屋市立大学薬学部