

井上隆夫：安息香酸ナトリウムカフェインおよびサリチル酸ナトリウム  
テオブロミンの沝紙クロマトグラフィーによる定量

Takao Inoue : Determination of Caffeine-Natrium Benzoate and  
Theobromine-Natrium Salicylate by Paper Chromatography

Determination of two components in caffeine-natrium benzoate and theobromine-natrium salicylate was studied by paper chromatography and spectrophotometry. As to detection of these substances it was found that use of a short-wave ultraviolet of 250 ~ 270  $m\mu$  made it possible to detect benzoic acid as well as caffeine and theobromine, while salicylic acid gave a fluorescent spot under ultraviolet.

Caffeine and benzoic acid were separated by using the filter paper treated with borate buffer (pH 9.4) and *n*-BuOH saturated with the same buffer. The excellent separation of theobromine and salicylic acid was obtained with *n*-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O (5 : 1 : 4) as solvent system. Then new technique that the portion of 5 cm from the start line was moistened with the solvent and immediately developing was carried out as shown in Fig. 2, was applied in order to delay the large movement of salicylic acid.

Each substance separated on paper was eluted with water at 50° and determined spectrophotometrically.

著者は先にカフェインおよびテオブロミンを沝紙上に分離し、分別帯を抽出し紫外線スペクトルで定量を行なったが<sup>1)</sup>、今回これらを含む製剤の内、安息香酸ナトリウムカフェイン（以下 安ナカと記す）およびサリチル酸ナトリウムテオブロミン（以下ジウレチンと記す）の定量に応用した結果について報告する。カフェインと安息香酸、サリチル酸とテオブロミンは実験の部に示す条件により沝紙上でよく分離し、サリチル酸は蛍光を発するため検出は容易であるが、安息香酸がカフェインやテオブロミンと同様に 250~270  $m\mu$  の遠紫外線によって暗黒色のスポットとして沝紙上の検出が可能なが新たに見出された。したがって、これら成分はすべて試薬を噴霧することなく沝紙上の存在位置を確認することができ、かつ、安息香酸およびサリチル酸は共に極大吸収の波長における濃度と吸光度が直線関係を示し、Beerの法則に一致することが認められ微量定量の可能なことが判明した。日本薬局方第6版による定量法では、いずれも試料約1gを必要とし、キサンチン塩基と有機酸を適当な操作で分離し、各成分について重量法あるいは滴定法によって測定している。しかし本法によればさらに少量の試料について簡易に定量し得るのが特徴である。

実 験 の 部

1. 安ナカの定量

(1) 沝紙クロマトグラフィーによる分離

種々のpHの緩衝液によるバッファー・クロマトグラフィーを試みたところ、pH 9.4のホウ酸塩緩衝液を浸した沝紙およびこれを飽和した*n*-ブタノールで展開することにより、カフェインと安息香酸の分離に最良の結果が得られた。R<sub>f</sub>値はカフェイン0.57、安息香酸\*0.18である。

1) 井上：星薬科大学紀要 9, 3 (1960).

\* ナトリウム塩として存在する。

安息香酸の検出には pH 指示薬や、塩化第二鉄溶液を濾紙に噴霧する方法が用いられていたが、250~270  $m\mu$  の紫外線によって 50  $r$  以上の安息香酸は明瞭に検出することができた。Fig. 1 は安息香酸の 225  $m\mu$  における検量線である。

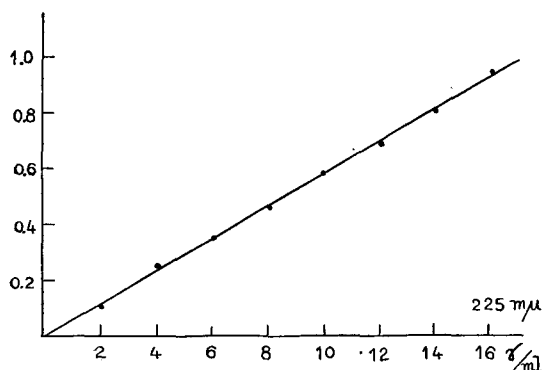


Fig. 1. 安息香酸の検量線(ナトリウム塩として測定)

に入れ、おのおのを水 5  $ml$  づつで 2 回、軽くせんをして 30 分間 50° で温浸する。冷後、抽出液を合し、分光光度計を用いてカフェイン抽出液は 273  $m\mu$ 、安息香酸抽出液では 225  $m\mu$  における吸光度を測定し、 $E_{1\%}^{1cm} = 505$  (カフェイン) および  $E_{1\%}^{1cm} = 585$  (安息香酸ナトリウム) の値より両者を算出する。Table I はその定量結果を示したもので回収率は 97% 以上である。通常、同一試料について数本の濾紙を用いて測定してその平均値

Table I. 回収率

No	成分	検体量	測定量
1	カフェイン	100 $r$	98.5 $r$
	安息香酸ナトリウム	"	99.1
2	カフェイン	"	98.2
	安息香酸ナトリウム	"	100.1
3	カフェイン	"	97.5
	安息香酸ナトリウム	"	98.8

版収載の定量法で行って得た含量を示したものできわめて近似した値が得られた。

Table II. アナカ中のカフェインおよび安息香酸の含量

試料	成分名	定量値( $r$ )	含量(%)	日局定量法による含量(%)
200 $r$	カフェイン	86.7	43.4	44.5
	安息香酸ナトリウム	105.3	52.7	52.5

Table III. 20%注射薬中のカフェインおよび安息香酸の含量

試料	成分名	定量値( $r$ )	含量(%)	日局定量法による含量(%)
200 $r$	カフェイン	97.4	48.7	49.0
	安息香酸ナトリウム	88.0	44.0	44.2

## (2) 回収率および定量結果

カフェインおよび安息香酸ナトリウムそれぞれ 20  $mg$  をメスフラスコにとり水を加えて 10  $ml$  とし検液とする。pH 9.4 のホウ酸塩緩衝液 (Sørensen) を調製し、東洋濾紙 No. 50 (2×40cm) をこれに浸した後、過剰の液を 2 枚の濾紙にはさんで除去し乾燥する。この濾紙にクロマト用マイクロピペットを用いて検液 0.05  $ml$  (各 100  $r$  に相当する) を原点にスポットし、前記緩衝液を飽和した  $n$ -ブタノールで約 30cm 展開する。濾紙を風乾後、2537 Å の紫外線<sup>1)</sup> でカフェインおよび安息香酸のスポットを検出し、各スポットの上下 5~7 mm の余分を残して分別帯を切取る。ついで、濾紙片を 2 個の試験管

を求める。また濾紙にもわずかに紫外線を吸収する不純物を含むことがあり、前報<sup>1)</sup> で行なったように試料を点じない濾紙について盲検値を測定しその差をとることが望ましい。

アナカを定量する場合には濾紙に点ずる量は 150~200  $r$  が適当である。すなわち、アナカの 20  $mg/ml$  の水溶液を調製しその 0.01  $ml$  (200  $r$  に相当する) を濾紙に点じ前述のように定量を行う。また、20%注射薬の場合は水で 10 倍に希釈しその 0.01  $ml$  (200  $r$  に相当する) を濾紙に点じて定量する。

Table II および Table III はアナカの局方品およびその注射薬の本法による定量結果ならびにそれぞれを日本薬局方第 6

## 2. ジウレチンの定量

### (1) 濾紙クロマトグラフィーによる分離

デオブロミンとサリチル酸は中性または塩基性溶媒では分離せず、酸性溶媒ではよく分離するが、サリチル酸が溶媒前線近くまで移動する。バッフアー・クロマトグラフィーでは pH 4.0 においてかなり分離するが、サリチル酸のスポットが長くなり定量には不適であった。

$n$ -ブタノール：酢酸：水 (5:1:4) ではサリチル酸のスポットは拡散せず

Fig. 2 (A) に見られるようにテオブロミンとよく分離するが、サリチル酸は先端付近まで移動する。溶媒前線には濾紙中の不純物が集りサリチル酸を抽出する際、ともに溶出してくるおそれがある。したがって著者は(B)に示すように展開直前に原点のスポットのわずかに上部より 5 cm の長さにわたり 溶媒で潤した後、直ちに展開を行う方法を考案した。展開剤は短時間に 原点附近に達するから、これが 5 cm の部分の下端にいたれば溶媒前線は直ちに 5 cm さきに移行し(A)の場合よりスポットは 3~4 cm 低くあらわれ、分離能に影響なくサリチル酸の Rf 値を小さくすることに成功した。Rf 値はテオブロミン 0.40, サリチル酸 0.71 を示す。

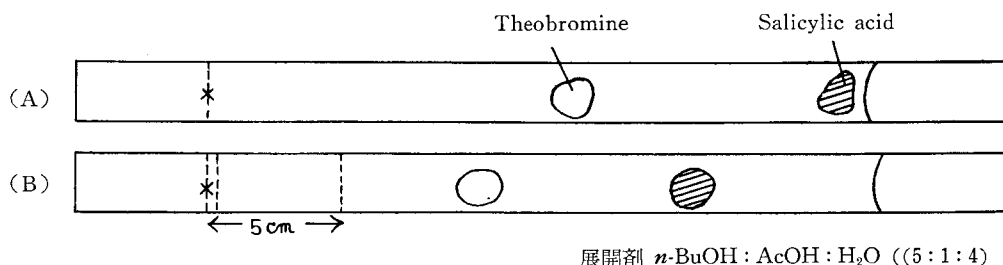


Fig. 2. 酢酸ブタノールによるジウレチンの分離

濾紙上の検出は、サリチル酸は紫外線で青色の蛍光を発し、また、テオブロミンは 2537 Å の紫外線で暗黒色のスポットとして確認し得る。サリチル酸には 231  $m\mu$  および 296  $m\mu$  に吸収の極大部を有するが、長波長部の方が他

Table IV. 回収率

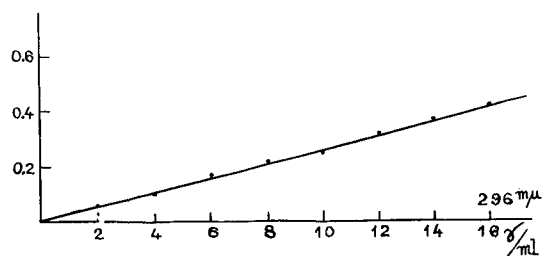


Fig. 3 サリチル酸の検量線

No	成 分	検体量	測定量
1	テオブロミン	100 $\gamma$	97.6 $\gamma$
	サリチル酸	"	98.9
2	テオブロミン	"	97.8
	サリチル酸	"	99.0
3	テオブロミン	"	98.8
	サリチル酸	"	99.1

の不純物の影響が少いので、296  $m\mu$  で定量を行なった。Fig. 3 は 296  $m\mu$  における検量線である。

## (2) 回収率および定量結果

テオブロミンおよびサリチル酸それぞれ 20mg をメスフラスコにとり水を加えて 10 ml とし検出とする。東洋濾紙 No.50 (2×40 cm) の原点に検液 0.05 ml (各 100  $\gamma$  に相当する) を点じ  $n\text{-BuOH} : \text{酢酸} : \text{水} (5:1:4)$  の上層で前記方法を用いて約 30 cm 展開する。風乾後、スポットを検出し、以下、アナカの場合と同様に水 5 ml ずつで 2 回、50° でスポットの部分抽出、冷後、水浸液を合してテオブロミンは 273  $m\mu$ , サリチル酸は 296  $m\mu$  における吸光度を測定し  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 504$  (テオブロミン) および  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 254$  (サリチル酸) の値によって両者を算出する。Table IV に見られるように回収率は 97% 以上を示した。ジウレチンの測定にあたっては 100~200  $\gamma$  を濾紙に点ずるのが適当である。Table V はジウレチン 200  $\gamma$  を試料として濾紙に点じ本法で定量した結果ならびに同一試料を日本薬局方第 6 版収載の方法で定量した含量を示す。

Table V. ジウレチン中のテオブロミンおよびサリチル酸の含量

試 料	成 分 名	定量値 ( $\gamma$ )	含量(%)	日局定量法による含量(%)
200 $\gamma$	テオブロミン	90.3	45.2	46.0
	サリチル酸	78.8	39.4	39.6