混合製剤の分析に関する研究 (第29報¹⁾)
総合感冒剤中のアセトアミノフェンの比色定量

井上哲男, 立沢政義,^{2a)} 李 樹其,^{2b)} 石井豊三^{2c)}
国立衛生試験所,^{2a)} 台湾省衛生試験所,^{2b)} 防衛庁陸上幕僚監部^{2c)}

Studies on Analysis of Pharmaceutical Preparations. XXIX.
Colorimetric Determination of Acetaminophen in
Anti-cold Pharmaceutical Preparations

TETSUO INOUE, MASAYOSHI TATSUZAWA,^{2a)}
SHU-CHI LEE^{2b)} and TOYOZO ISHII^{2c)}
National Institute of Hygienic Sciences,^{2a)} Taiwan Provincial
Hygienic Laboratory^{2b)} and Defense Agency General Staff Office^{2c)}

(Received May 2, 1975)

Spectrophotometric Determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations is described. Acetaminophen was hydrolysed by refluxing with perchloric acid to produce *p*-aminophenol which was reacted with *p*-dimethyl aminocinnamaldehyde in dilute trichloroacetic acid solution to give a red color, which showed absorption maximum at 520 nm. Interference by the presence of phenacetin and sulpyrine can be eliminated by their extraction with chloroform in basic medium or extraction with ethyl acetate in acidic medium.

緒 言

アセトアミノフェン (以下 AAP と略す) は、非ピリン系解熱鎮痛剤として総合感冒剤に配合される場合が多い。AAP の定量法としては、ニトロソ化による比色定量法,³⁾ 塩酸で加水分解して *p*-アミノフェノールとなしジアゾカップリング法,⁴⁾ インドフェノール法,^{5,6)} ペンタシアノアンミンフェロアート法⁵⁾ または、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド法⁷⁾ などで比色定量する方法がある。また、次亜塩素酸⁸⁾ またはフェリジアン化カリウム共存でインドフェノール反応を行ない比色定量する方

法⁹⁾ などがある。これらの方法は、それぞれ特長のある方法であるが、現在 総合感冒剤の AAP の定量には、通常、インドフェノール法が用いられている。

著者らは、高感度でかつ簡易な定量法の確立を目的として *p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド (以下 DAC と略す) による定量法の検討を行なった。DAC は芳香族アミンに対して高感度な試薬であることが知られている。著者らは、さきにエトキシベンズアミドの定量に DAC を用いる方法を報告¹⁰⁾ したが、AAP の定量にもこの方法を用いることにした。先づ AAP を過塩素酸で加

- 1) 第28報: 井上哲男, 立沢政義, 高部秀子, 衛生化学, **20**, 93 (1974).
- 2) a) Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo (東京都世田谷区上用賀); b) Kun Yang ST. Nankang, Taipei (台湾省台北市南港町昆陽街); c) Akasaka, Minato-ku, Tokyo (東京都港区赤坂).
- 3) 辻 章夫, 中村晃忠, 和田秋枝, 加藤せえ, 沢田 弘, 衛生化学, **10**, 236 (1964).
- 4) C. Inamdar, *Ind. J. Pharm.*, **36**, 7 (1941).
- 5) 辻 章夫, 北条正躬, 衛生化学, **10**, 241 (1964).
- 6) C.T.H. Ellcock, A.G. Fogg, *Analyst.*, **100**, 16 (1975).
- 7) M. Sanghavi, *Ind. J. Pharm.*, **35**, 172 (1973).
- 8) D.R. Davis, A.G. Fogg, J.S. Wragg, D.T. Burns, *Analyst.*, **99**, 12 (1974).
- 9) 二宮昭夫, 薬誌, **85**, 394 (1965).
- 10) 井上哲男, 立沢政義, 北条正躬, 薬剤学, **31**, 257 (1971).

熱分解して *p*-アミノフェノールとなし、トリクロル酢酸酸性でエタノール中で DAC と反応させ比色定量する。確立した方法は、過塩素酸による加水分解で分解時間が短縮化され、かつ DAC との反応も短時間で完了するため、従来の方法の1/2—1/3の時間で定量が可能であり、また、感度も2—10倍に上げることが出来た。混合製剤の場合共存成分の影響が少なく、常用の配合量ではフェナセチンおよびスルピリンが妨害となるのみである。これらが配合された場合、前者はアルカリ性でクロロホルム抽出により、また、後者は酸性で酢酸エチルで AAP を抽出することにより妨害を除去出来る。確立した定量法により市販の数種の総合感冒剤中の AAP を定量したところ、良好な結果を得た。

実験の部

1. 試料、試薬、試液および装置 AAP (日本薬局方品) および AAP を配合した市販製剤、その他試薬および試液は、日本薬局方品 および JIS 特級品を使用した。

0.5% DAC 溶液: DAC 0.5 g にエタノール 100 ml を加えて溶かす。5% トリクロル酢酸溶液: トリクロル酢酸 (以下 TCA と略す) 5 g をとり、水を加えて溶かし 100 ml とする。50% エタノール、10% 過塩素酸溶液、0.1N 水酸化ナトリウム液、希塩酸 (10%)、クロロホルム、酢酸エチル。

日立 EPS 型自記分光光度計、日立 124 型分光光度計。

2. 比色定量法 a. 標準溶液——AAP 50 mg をとり、10% 過塩素酸溶液 10 ml を加え、沸騰水浴中で30分間加熱する。冷後 50% エタノールを加えて標準溶液 (AAP 25 μ g/ml) を調製する。

b. 試料溶液——散剤、錠剤、顆粒剤およびカプセル剤: 試料を粉末とし、AAP 50 mg に対応する量を取り、アセトン 40 ml で1回、10 ml ずつ5回抽出し、濾過する。全抽出液を合わせ、アセトンを留去する。残留物に10% 過塩素酸溶液 10 ml を加え、以下、標準溶液と同様に操作し、試料溶液 (AAP 25 μ g/ml) を調製する。

c. 呈色操作および定量——標準溶液および試料溶液 2 ml ずつを取り、5% TCA 1 ml および 0.5% DAC 6 ml および 50% エタノールを加えて 50 ml とし、30分間放置する。この液につき別に 50% エタノール 2 ml をとり、同様に操作して得た液を対照として 520 nm における吸光度 A_S および A_T を測定する。さらに AAP 標準溶液の濃度 $\times A_T/A_S$ の値から試料中の AAP の量を算出する。

3. 呈色液の吸収曲線 AAP の溶液 (25 μ g/ml; 50% エタノール) および 50% エタノール 2 ml ずつを取り、定量法 c により操作し、空試験液を対照として 450

Fig. 1. Absorption Spectra of Colored Solution

—: colored solution of acetaminophen
.....: reagent blank

Fig. 2. Calibration Curve of Acetaminophen

—650 nm における吸収スペクトルを測定するとき Fig. 1 に示すとおりの 520 nm に吸収の極大を示した。また、水を対照として空試験液の吸収スペクトルを測定するとき 520 nm 付近にはわずかに吸収を認めた。

4. 標準曲線 標準溶液 (AAP 12.5—75 μ g/ml) のそれぞれ 2 ml ずつを取り、定量法 c により操作し、それぞれの呈色液の吸光度を測定し、標準曲線を作成するとき Fig. 2 に示すとおりの原点を通り、かつ直線性を得た。

5. 定量条件の検討 (i) AAP の分解時間と吸光度の関係——AAP 50 mg をとり 10% 過塩素酸溶液 10 ml を加え、5, 15, 20, 30, 40 および 60 分間のそれぞれの時間で沸騰水浴中で加熱し、冷後 50% エタノールを加えて AAP の溶液 (25 μ g/ml) を調製する。この液の 2 ml ずつを取り、以下、定量法 c により操作し、それぞれの吸光度を測定した結果、Fig. 3 に示すとおりの 30 分で一定の値を示した。

AAP の分解剤として塩酸が用いられていたが、これは分解に長時間 (60 分) を要した。その他、分解剤を検

Fig. 3. Relation between Time of Hydrolysis and Absorbance

—○—: colored solution of acetaminophen

討した結果、酢酸および TCA の如き有機酸では分解し難く、過ヨウ素酸、次亜臭素酸またはフェリシアン塩を用いた場合、酸化反応により、キノンイミンを生成し、好ましくなかった。従って AAP は、10%過塩素酸溶液中で沸騰水浴中で30分間加熱し分解することに決定した。

(ii) DAC 濃度と吸光度の関係——AAP の溶液 (25 $\mu\text{g/ml}$; あらかじめ過塩素酸で分解, 50%エタノール) および 50%エタノール 2 ml ずつをとり, それぞれに 0.5% DAC 溶液 1, 2, 4, 6, 8 および 10 ml を加え, 以下, 定量法 c により操作し, 吸光度を測定した結果, Fig. 4 に示すとおり, 6 ml で一定の吸光度を示した。また, 試薬ブランクの吸収は, DAC 量の増加にともない吸光度の増加を示した。従って DAC 量は, 試薬ブランクの吸収が少なく, かつ, 呈色液の吸光度の大となる条件の 6 ml を用いることにした。

(iii) TCA 量と吸光度の関係——DAC と芳香族アミンとの反応は, 塩酸酸性より, トリクロル酢酸酸性の方が良いことは知られているから本法も TCA を用いることにした。AAP の溶液 (25 $\mu\text{g/ml}$, あらかじめ過塩素酸で分解, 50%エタノール) および 50%エタノール 2 ml ずつをとり, 5% TCA 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4 および 5 ml ずつを加え, 以下, 定量法により操作し, それぞれの吸光度を測定した結果, Fig. 5 に示すとおり 0.5—2 ml までほとんど一定の値を示し, 以下 TCA 量の増加により吸光度の低下を示した。また試薬ブランクは, TCA 量の増加にともない吸光度の増加を示した。従って, TCA 量は, 試薬ブランクの吸収が少なく, かつ, 呈色液の吸光度の大となる条件の 1 ml を用いることに決定した。

(iv) 反応時間と吸光度の関係——AAP の溶液 (25 $\mu\text{g/ml}$, あらかじめ過塩素酸で分解, 50%エタノール)

Fig. 4. Effect of Concentration of *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde on Absorbance

—○—: colored solution of acetaminophen
—△—: reagent blank

Fig. 5. Effect of Concentration of Trichloroacetic Acid on Absorbance

—○—: colored solution of acetaminophen
—△—: reagent blank

Fig. 6. Relation between Reaction Time and Absorbance

—○—: colored solution of acetaminophen
—△—: reagent blank

および 50 % エタノール 20 ml ずつをとり、5 % TCA 1 ml, 0.5 % DAC 6 ml および 50 % エタノールを加えて 50 ml とした液につき、1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 および 100 分のそれぞれ放置し、以下、定量法により操作し、吸光度を測定するとき 30 分間で一定の値を示した。従って、反応時間は 30 分間とした。

(v) 呈色液の安定性——定量法 c により操作して得た呈色液は 90 分後も安定で、吸光度の変化を示さなかった。

6. 妨害成分の検討および除去 (i) 共存成分の影響——AAP 25 mg および AAP 25 mg に Table I に示す感冒剤に通常配合される成分のそれぞれ同量を加え、さらに 10 % 過塩素酸 10 ml を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、冷後 50 % エタノールを加えて試料溶液 (AAP 25 μ g/ml) を調製する。

試料溶液につき定量法 c により操作し、それぞれの吸光度を測定し、回収率を求めた結果、フェナセチンおよびスルピリンは、プラスに妨害した。また、アスピリン、ノスカピン、グリセリルグアヤコールエーテル、マレイン酸クロルフェニラミンなどは、マイナスに妨害した。フェナセチンおよびスルピリンは、加水分解によりフェネケジンまたは 4-メチルアミノアンチピリンとなり、DAC とシッフ塩を生成するためプラスに妨害する。その他、マイナスの妨害する成分は、分解時過塩素酸を消費し、AAP の分解が不十分になるためと考えられるがこれらの成分は、製剤の場合配合比が 1/5—1/10 量であり実際には問題とならない。マイナスに妨害する成分を 1:0.5 の比で配合し、妨害性を検討した結果、妨害とならなかった。

フェナセチンは、アルカリ性でクロロホルムを抽出して除去した後定量すれば妨害とならない。また、スルピリンは酢酸エチルに不溶であるが、AAP が可溶であるから、酸性で酢酸エチルで AAP を抽出することにより、スルピリンを除去出来る。その結果は Table I に示すとおりである。

(ii) 妨害物の除去——a. フェナセチン配合の場合：AAP 50 mg に対応する量を取り、0.1N 水酸化ナトリウム液 80 ml を加えて振り混ぜ、さらに水を加えて 100 ml とする。これを汙過し、汙液 50 ml をとり、クロロホルム 20 ml で 2 回振り混ぜ、水層を分取する。水層の 10 ml をとり、10 % 過塩素酸 10 ml を加え沸騰水浴中で 30 分間加熱する。冷後 50 % エタノールを加えて試料溶液 (AAP 10 μ g/ml) を調整する。

別に AAP 50 mg をとり、同様に操作して標準溶液を作成する。

TABLE I. Effect of Various Ingredients on Determination of Acetaminophen

Compounds	Coexisting ratio	Found (%)
Aspirin	1:1	90.2
	1:0.5	98.9
Phenacetin	1:1	178.5
	1:1	99.5 ^{a)}
Ethoxybenzamide	1:1	99.3
Aminopyrine	1:1	99.5
Antipyrine	1:1	89.2
	1:0.5	100.2
Sulpyrine	1:1	159.5
	1:1	99.8 ^{b)}
Barbital	1:1	99.8
Noscapine	1:1	82.7
	1:0.5	100.9
dl-Methylephedrine HCl	1:1	98.9
Glycerylguaiaacolether	1:1	92.7
	1:0.5	100.4
Caffeine	1:1	99.8
Diphenhydramine HCl	1:1	94.8
	1:0.5	99.7
Chlorpheniramine maleate	1:1	88.9
	1:0.5	100.3

a) eliminated by extraction with chloroform in alkali medium

b) eliminated by extraction with ethyl acetate in acidic medium

標準溶液、試料溶液および 50 % エタノール 5 ml ずつをとり、以下、定量法により操作し、吸光度を測定する。

b. スルピリン配合の場合：AAP 50 mg に対応する量を取り、水 80 ml を加え、必要なら加温する。振り混ぜ、さらに水を加え 100 ml とする。これを汉過し、汉液 10 ml をとり、希塩酸 5 ml を加え、酢酸エチル 30 ml で 3 回抽出する。酢酸エチル層を分取し、希塩酸 5 ml で洗い、酢酸エチル層を分取する。酢酸エチルを除去し、残留物に 10 % 過塩素酸 10 ml を加え、以下 a と同様に操作し、試料溶液を調製する。また別に AAP 50 mg をとり、同様に操作して標準溶液を調製する。

標準溶液、試料溶液および 50 % エタノール 5 ml ずつをとり、定量法 c により操作し、吸光度を測定する。

7. 調製試料および市販製剤の定量 市販製剤の処方から代表的なものを選び調製試料を作成し、定量を行なった。Table II に示すとおり 99.2—99.6 % の回収率を示した。

また市販の製剤中、錠剤、散剤およびカプセル剤について定量した結果、Table III に示すとおり、フェナセチンおよびスルピリンなど配合の場合も良好な結果を得た。

TABLE II. Results of Determination of Acetaminophen in the known Preparations

Sample I		Sample II		Sample III	
Acetaminophen	250(mg)	Acetaminophen	250(mg)	Acetaminophen	200(mg)
Ethoxybenzamide	150	Ethoxybenzamide	250	Ethoxybenzamide	300
Caffeine	45	Caffeine	30	Caffeine	75
Chlorpheniramine maleate	3	Chlorpheniramine maleate	2.5	Chlorpheniramine maleate	3
Starch	60	Noscapine	10	Pyribital	30
		Thiamine NO ₃	5	<i>dl</i> -Methylephedrine HCl	25
		Ascorbic acid	30	Dihydrocodeine	9
		CMC Ca	150	Thiamine NO ₃	3
		Starch	800	Starch	500
Recovery (%)		Recovery (%)		Recovery (%)	
99.2		99.3		99.6	
<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3	

TABLE III. Results of Determination of Acetaminophen in the Commercial Pharmaceutical Preparations

Sample I Contents (%)	Sample II Contents (%)	Sample III Contents (%)	Sample IV Contents (%)	Sample V Contents (%)
99.1	100.1	99.4	102.7	101.5
<i>n</i> =3	<i>n</i> =3	<i>n</i> =3	<i>n</i> =3	<i>n</i> =3

Sample I : acetaminophen 570 mg, ethoxybenzamide 292 mg, caffeine 90 mg, chlorpheniramine maleate 7.5 mg, starch 123 mg

II : acetaminophen 250 mg, ethoxybenzamide 250 mg, caffeine 50 mg, chlorpheniramine maleate 2.5 mg, noscapine 10 mg, thiamine NO₃ 5 mg, riboflavine 1 mg, ascorbic acid 28 mg, CMC Ca 160 mg, starch 810 mg

III : acetaminophen 420 mg, ethoxybenzamide 600 mg, chlorpheniramine maleate 7.2 mg, *dl*-methylephedrine HCl 48 mg, caffeine 150 mg, pyribital 72 mg, dihydrocodeine HCl 48 mg, thiamine NO₃ 6 mg, starch 1000 mg

IV : acetaminophen 100 mg, ethoxybenzamide 100 mg, phenacetin 280 mg, caffeine 100 mg, morcaine 600 mg

V : acetaminophen 100 mg, sulpyrine 100 mg, ethoxybenzamide 160 mg, caffeine 30 mg, *dl*-methylephedrine 16 mg, chlorpheniramine maleate 2.6 mg

謝辞 終わりにのぞみ本研究を行なうにあたり、終始御激励いただいた国立衛生試験所長 川城 巖博士な

らびに京都大学教授 宇野豊三博士に深謝いたします。