薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
85 (3) 245 ~ 250 (1965)

UDC 615.75-07 : 543.422.5

39. 小野真市, 尾西良一, 丹下順弘, 川村邦夫, 今井敏彦: 総合感冒剤中の主成分の
定量法に関する研究(第2報^{*1}) アミノピリンの比色定量法

Shin-ichi Ono, Ryoichi Onishi, Masahiro Tange, Kunio Kawamura and
Toshihiko Imai: Studies on Analysis of Mixed Anti-cold
Pharmaceutical Preparations. II. Colorimetric
Determination of Aminopyrine.

(Osaka Plant, Takeda Chemical Industries, Ltd.^{*2})

Colorimetric determination of aminopyrine in mixed anti-cold pharmaceutical preparations was studied, and a highly selective and precise method has been established. The mechanism of color development was found to be due to the oxidative condensation of 4-aminoantipyrine produced from aminopyrine by oxidative demethylation with phenol in a weak alkaline medium yielding an indophenol type pigment. Optimum conditions for color development were investigated thoroughly, and the different effects in various buffer solutions on the color development have also been studied. N-Methylaminoantipyrine produced by the dissociation of sulpyrine gave the same coloration as aminopyrine, but the interference of N-methylaminoantipyrine could be eliminated by its acetylation. Conditions of the acetylation were also discussed. The acetylation gave satisfactory result both in aqueous medium and in chloroform.

(Received September 18, 1964)

著者等は第1報でスルピリンの定量法について報告した。引き続きスルピリンと同様解熱鎮痛剤として汎用され、総合感冒剤中に処方される機会の多いアミノピリン(ジメチルアミノアンチピリン, 以下DMAAと略)の新定量法について報告する。

従来DMAAの定量法としては、重量法,¹⁾ 酸化滴定法,²⁾ キレート滴定法,³⁾ 非水滴定法,⁴⁾ 塩化第二鉄・フェリシアン化カリウムによる比色法,⁵⁾ リンモリブデン酸による比色法⁶⁾ などがあるが、いずれも総合感冒剤中のDMAAの定量法としては、感度または選択性の点で十分でなかった。

著者等はインドフェノール法をDMAAの定量に利用することを試みたところ、フェノールと酸化的に縮合してインドフェノール型色素を生成することを見いだしたので、定量の諸条件を検討し満足すべき結果を得た。また製剤中スルピリンの配合に起因して同一呈色を示すN-メチルアミノアンチピリン(以下MAAと略)の影響を除くため、アセチル化処理を行なう着想を進めて研究した結果、その分離定量に成功した。

4-アミノアンチピリン(以下AAと略)とフェノール類の酸化的縮合反応⁷⁾において、pHが大きな影響を与えることが知られているが、⁸⁾ Lacoste等⁹⁾はイオン強度によっても影響されること、また南原等¹⁰⁾も緩衝液の

*1 第1報: 本誌, 85, 239 (1965).

*2 Juso-nishino-cho, Higashi-yodogawa-ku, Osaka.

- 1) 厚生省薬務局編: “医薬品製造指針,” 156 (1962); Method of Analysis, Assoc. Off. Agr. Chem., 9th. Ed., 487 (1960).
- 2) Österreichisches Arzneibuch, 9. Ausgabe, 618 (1960); N. A. Olenivich: Sbornik Khim. Fakul'teta, 3, 67 (1953) (C. A., 50, 14181b (1956)).
- 3) 入谷: 本誌, 83, 98 (1963).
- 4) 鹿島: 本誌, 74, 463 (1954); B. Láng, et al.: Z. anal. Chem., 158, 339 (1957); L. Sáfárik: Českosl. Farm., 6, 514 (1957) (Anal. Abst., 5, 2376 (1958)).
- 5) 菅野, 他: 薬事, 6, 101 (1964).
- 6) 辻: 日本薬学会第84年年会にて発表 (1964).
- 7) E. Emerson: J. Org. Chem., 8, 417 (1943).
- 8) R. W. Martin: Anal. Chem., 21, 1419 (1949); M. B. Ettinger, et al.: Anal. Chem., 23, 1783 (1951).
- 9) R. J. Lacoste, et al.: Anal. Chem., 31, 1246 (1959).
- 10) 南原, 他: 本誌, 80, 1663 (1960).

組成によって呈色度が異なることを報告している。著者等はまず DMAA の水溶液 (100 $\mu\text{g./ml.}$) について緩衝液の種類と pH を変えて呈色度の変化を調べた結果、リン酸またはホウ酸系の Clark-Lubs 緩衝液および pH 8 の炭酸水素ナトリウム水溶液では全く呈色せず、酢酸アンモニウム緩衝液および塩化アンモニウム緩衝液ではほぼ同様の呈色度を与え、pH 8 付近で最も吸光度が高いことがわかった (Fig. 1)。そこで著者等は酢酸アンモニウム緩衝液を用い、pH、フェリシアン化カリウム溶液の濃度、反応時間などについて検討した結果、pH 8.0、フェリシアン化カリウム溶液の濃度 1%，反応時間 30 分の条件を選び、DMAA 0~150 $\mu\text{g.}$ の濃度範囲で Beer の法則にしたがう定量法を定めることができた。つぎに反応機構を推定するため DMAA と AA について定量法 I にしたがって操作測定したところ、両者の可視部吸収スペクトルは一致し、その λ_{max} はいずれも 458 $\text{m}\mu$ であった。またその呈色液について Kiesel Gel G を用いる薄層クロマトグラフィーを 3 種の溶媒系〔メタノール、メタノール・エチルエーテル (5+1)、メタノール・クロロホルム (1+1)〕について行なった結果、いずれでも 1 スポットを示し、両者の R_f 値は一致した。以上のことから著者等は DMAA の反応機構を Chart 1 のように推定した。

Chart 1.

本法はその反応機構から考えて、通常総合感冒剤に配合される解熱鎮痛剤、鎮咳剤、抗ヒスタミン剤などによって妨害されない選択性の高い方法である。DMAA と類似した構造を有するスルピリンそのものは本反応によって呈色しないが、水溶液中でスルピリンが一部解離して生成する MAA は同様に呈色する。著者等はスルピリンの解離生成物が monomethylamino 基をもつ点に着目してアセチル化したところ、この化合物 (N-アセチル MAA) はインドフェノール型色素を生成しないこと、およびアミノピリンの原料である AA についても同様であることを見いだした。前述したように本反応は pH およびイオン強度によって影響されるので、アセチル化操作によって生じた酢酸ナトリウムは縮合反応に影響して呈色度を低下させるため、アセチル化前処理を必要とする。DMAA の定量においては、標準についても試料と同様の操作を行なう必要がある。またさらにアセチル化操作における無水酢酸と炭酸水素ナトリウムの量的関係においては、等モルのとき最も吸光度が高いことがわかった。等モルでないときには酢酸による pH の低下または炭酸水素ナトリウムの過量による発色妨害により、いずれも呈色度が低下するものと思われる。

つぎに著者等はアセチル化に伴う塩類の影響を除く方法を考究した。通例製剤中の DMAA はアルカリ性でクロロホルム抽出されるので、この抽出液をそのままアセチル化することを試みた。まず MAA のクロロホルム溶液に無水酢酸を加え、つぎに過剰量の炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムまたは水酸化ナトリウムの水溶液を加えて振り混ぜ、分液し、水層の塩類と分離したのち、クロロホルム層を蒸発し、定量法 I にしたがって操作したところ、MAA はこの方法でアセチル化され、N-アセチル MAA となるため呈色しないことがわかった。そこで DMAA と MAA のクロロホルム溶液について無水酢酸の量とアルカリの量とを変化させて実験し、いずれの場合にも回収率は無処理の DMAA を標準としてほぼ 100% であった。この方法によるときには、水溶液で行なう場合と異なり、アセチル化操作において無水酢酸およびアルカリは正確に加える必要はない。

著者等は以上述べた方法を 2 種の液剤型の総合感冒剤に応用して、いずれも満足すべき結果を得た。

以上のように本法は総合感冒剤中のアミノピリンの比色定量法として、操作も比較的簡単であり、選択性が高く、また再現精度も優れており、ますます配合成分の複雑化しつつある総合感冒剤中のアミノピリンの定量法として、きわめて有用な方法であると考えられる。

実 験 の 部

試薬および装置 DMAA、フェノール：日本薬局方。AA：東京化成製。Kiesel Gel G nach Stahl：Merck 社製。他は試薬特級を使用。酢酸アンモニウム緩衝液：1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ に 10% アンモニア水を滴加して pH

を調整。塩化アンモニウム緩衝液: $1M$ NH_4Cl に 10% アンモニア水を滴加して pH を調整。酢酸アンモニウム・塩化アンモニウム緩衝液: $0.5M$ CH_3COONH_4 ・ $0.5M$ NH_4Cl に 10% アンモニア水を滴加して pH を調整。吸光度の測定: Beckman DU 型分光光度計, 島津自記式分光光度計 IV-50A 型。液層 10 mm. のセルを使用。

定量法 I (スルピリンを含有しないとき)。DMAA の水溶液 ($100 \mu g./ml.$) 1.0 ml. を共せん試験管にとり, pH 8.0 の酢酸アンモニウム緩衝液^{*3} 2.0 ml., 0.2% フェノール水溶液 1.0 ml., 1% $K_3Fe(CN)_6$ 水溶液 2.0 ml. を加えて混和したのち, 30 min. 放置する。つぎに $CHCl_3$ 10.0 ml. を加え, 30 sec. 激しく振り混ぜたのち, 水層を分液して除き, $CHCl_3$ 層に無水 Na_2SO_4 1 g. を加え, 振り混ぜたのち, 458 m μ で吸光度を測定する。水 1.0 ml. をとり同様に空試験を行なう。

II (スルピリンを含有するとき)。試料の DMAA 5 mg. に相当する量を取り, 水適量, 4% NaOH 水溶液 10 ml. を加え, $CHCl_3$ 20 ml. ずつで 4 回抽出し, 抽出液をろ過し, N_2 ガスを送風しながら丁度蒸発するまで水浴上で加温する。残留物に $NaHCO_3$ 1.80 g. および水 10 ml. を加え, マグネチックスターラーで攪拌しながら Ac_2O 1.0 ml. を徐々に滴加したのち 10 min. 攪拌し, 水を加えて 50.0 ml. とし, 以下 I 法による。標準についても蒸発残留物と同様に操作する。

III (スルピリンを含有するとき)。試料の DMAA 5 mg. に相当する量を取り, 水適量および 4% NaOH 水溶液 10 ml. を加え, $CHCl_3$ 20 ml. ずつで 4 回抽出し, この抽出液に Ac_2O 1 ml. を加え, 混和したのち, 10% Na_2CO_3 水溶液 20 ml. を加え, 5 min. 振り混ぜる。 $CHCl_3$ 層をろ過し, 水層について $CHCl_3$ 20 ml. ずつで 2 回抽出し, 抽出液をろ過し, $CHCl_3$ 層を合わせ, N_2 ガスを送風しながらほとんど蒸発乾固するまで水浴上で加温し, さらにほとんどにおいがなくなるまで室温で N_2 ガスを送風する。残留物に水適量を加え, 暫時振り混ぜたのち, 水を加えて 50.0 ml. とし, 以下 I 法による。

緩衝液の組成, pH と呈色度 DMAA の水溶液 (約 $100 \mu g./ml.$) 1.0 ml. をとり, pH 7.5, 8.0 の Clark-Lubs 緩衝液 (KH_2PO_4 -NaOH), pH 8.0, 8.5 の Clark-Lubs 緩衝液 (KCl - H_3BO_3 -NaOH), pH 8 の 5% $NaHCO_3$ 水溶液, pH 7.5, 8.0, 8.5 の酢酸アンモニウム緩衝液, pH 7.5, 8.0, 8.5 の塩化アンモニウム緩衝液, pH 7.5, 8.0, 8.5 の酢酸アンモニウム・塩化アンモニウム緩衝液各 2.0 ml. を加え, 以下定量法 I に準じて操作し, 吸光度を測定したところ, Clark-Lubs 緩衝液および 5% $NaHCO_3$ では呈色せず, 酢酸アンモニウムおよび塩化アンモニウム緩衝液では概ね同程度の吸光度が得られ, かつ pH 8 付近でもっとも高かった (Fig. 1)。

以下の実験はアセチル化に伴う酢酸イオンの混入の影響からくる推計処理の複雑化を避けるため, 酢酸アンモニウム緩衝液で行なった。

呈色の最適条件 DMAA の水溶液 (約 $100 \mu g./ml.$) 1.0 ml. につき, 酢酸アンモニウム緩衝液, 0.2% フェノール水溶液を用

Fig. 1. Effect of pH and Buffer on Absorbance

- $1M$ NH_4Cl buffer
- ×— $0.5M$ $AcONH_4$, $0.5M$ NH_4Cl buffer
- $1M$ $AcONH_4$ buffer
- △— Clark-Lubs' buffer
- 5% $NaHCO_3$

TABLE I. Effects of pH, Reaction Time and Concentration of $K_3Fe(CN)_6$ on Absorbance

Concn. of $K_3Fe(CN)_6$ (%)	Reaction time (min.)	pH		
		7.6	7.8	8.0
0.2	5	0.320	0.370	0.405
0.2	10	0.370	0.430	0.462
0.2	15	0.395	0.450	0.495
0.5	5	0.440	0.472	0.505
0.5	10	0.457	0.496	0.516
0.5	15	0.460	0.498	0.524
1.0	5	0.459	0.492	0.515
1.0	10	0.459	0.500	0.516
1.0	15	0.460	0.500	0.524

*3 pH 8.0 の塩化アンモニウム緩衝液または pH 8.0 の酢酸アンモニウム・塩化アンモニウム緩衝液を用いてもよい。

Fig. 2. Effect of Reaction Time at pH 8 on Absorbance

を用い、定量法 I にしたがって操作し、吸収スペクトルを測定した (Fig. 3). つぎに 1 ml. 中の DMAA の量を 20~150 $\mu\text{g.}$ にとり、定量法 I にしたがって操作したところ、この範囲では Beer の法則にしたがう結果が得られた (Fig. 4).

Fig. 3. Absorption Spectra of the Colored Solution Produced from 100 $\mu\text{g./ml.}$ of Aminopyrine and 4-Aminoantipyrene by the Standard Procedure

— Aminopyrine
- - - 4-Aminoantipyrene

Fig. 4. Relationship between Concentration of Aminopyrine and Absorbance

DMAA と AA の酸化縮合物の比較 DMAA, AA の水溶液 (100 $\mu\text{g./ml.}$) 各 1.0 ml. について、定量法 I にしたがって操作し、吸収スペクトルを測定した (Fig. 3). つぎに呈色液 (CHCl_3 液) を Kiesel Gel G のプレート (20×20 cm.) にスポットし、 MeOH , MeOH -エーテル (5+1), MeOH-CHCl_3 (1+1) で展開したところ、いずれの溶媒系でも両物質の R_f 値は一致し、かつ 1 スポットであった (Table II).

TABLE II. R_f Values in Thin-layer Chromatography

Solvent system	Pigment produced from	
	DMAA	AA
CH_3OH	0.70	0.70
$\text{CH}_3\text{OH-CHCl}_3$ (1+1)	0.78	0.78
$\text{CH}_3\text{OH-(C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (5+1)	0.84	0.84

DMAA: Aminopyrine, AA: 4-Aminoantipyrene.

MAA, AA のアセチル化 MAA の調製: 守田¹¹⁾の方法にしたがって得た黄色油状物をベンゼンに溶かし、アルミナのカラムを通し、蒸発乾固. 残留物をエーテルから再結晶して淡黄色結晶を得た. m.p. 約 60°. MAA

11) 守田: 本誌, 82, 50 (1962).

20 mg., AA 5 mg. をそれぞれ水 10 ml. に溶かし, 定量法 II にしたがって操作したが, 呈色しなかった. なお反応水溶液を 10% H_2SO_4 で酸性にし, CHCl_3 でくりかえし抽出し, 蒸発し, その蒸発残留物につき, 定量法 I を行なったが, 呈色しなかった. さらに MAA 20 mg. をとり, CHCl_3 80 ml. に溶かし, 定量法 III に準じ, アルカリとして 10% NaHCO_3 , 10% Na_2CO_3 , 5% NaOH をそれぞれ 20 ml. 用い行なったところ, いずれも呈色しなかった.

水溶液中でのアセチル化における試薬量の検討 DMAA の水溶液 (500 $\mu\text{g./ml.}$), DMAA+MAA の水溶液 (DMAA 500 $\mu\text{g./ml.}$, MAA 2000 $\mu\text{g./ml.}$), MAA の水溶液 (2000 $\mu\text{g./ml.}$) 各 10.0 ml. ずつをとり, それぞれに NaHCO_3 1.48, 1.63, 1.78 g. (Ac_2O 1.0 ml. と等モル量), 1.93, 2.08 g. ずつを加え, 以下定量法 II に準じて操作し, 吸光度を測定したところ, 1.78 g. のとき吸光度が最高で, NaHCO_3 の量の変動が定量値変動の原因となることがわかった (Table III).

TABLE III. Effect of the Amount of NaHCO_3 on Absorbance

Amount of NaHCO_3 (g.)	Absorbance		
	DMAA ^{a)}	DMAA+MAA ^{b)}	MAA ^{c)}
1.48	0.269	0.274	0.002
1.63	0.485	0.487	0.001
1.78	0.501	0.502	0.000
1.93	0.452	0.452	0.001
2.08	0.414	0.417	0.000

Amount of acetic anhydride is 1 ml.

1.78 g. of NaHCO_3 is equivalent to 1 ml. of acetic anhydride.

DMAA: Aminopyrine, MAA: N-Methylaminoantipyrine.

a) 5 mg. of DMAA was diluted to 50 ml. after acetylation procedure.

b) 5 mg. of DMAA and 20 mg. of MAA were diluted to 50 ml. after acetylation procedure.

c) 20 mg. of MAA was diluted to 50 ml. after acetylation procedure.

クロロホルム溶液中でのアセチル化の条件 DMAA 約 50 mg., MAA 約 200 mg. を精密に量り, CHCl_3 に溶かして 200.0 ml. とし, この液 20 ml. ずつをとり, CHCl_3 各 60 ml. を加え, Ac_2O の量, アルカリの種類, アルカリの量の 3 要因を 2 水準で 2³ 型に割りつけ, 定量法 III に準じて操作し, 無処理の DMAA を標準として回収率を求めた (Table IV).

TABLE IV. Conditions for Acetylation in Chloroform Effects of the Amount of Acetic Anhydride and Alkali on Recovery

Amount of acetic anhydride (ml.)	Kinds of alkali	Amount of alkali	
		12 m. eq. ^{a)}	19 m. eq. ^{a)}
0.5	NaOH	98.7	100.2
0.5	Na_2CO_3	100.0	100.4
1.0	NaOH	100.7	99.5
1.0	Na_2CO_3	100.4	101.2

Recovery of aminopyrine without acetylation: 100%

One ml. of acetic anhydride is equivalent to 10.6 m. eq. of alkali

a) Milligram-equivalent weight.

TABLE V. Determination of Aminopyrine in Pharmaceutical Preparations

No.	Suspension ^{a)}		Liquid ^{b)}			
	Procedure I		Procedure II		Procedure III	
	Found (mg./ml.)	Recovery (%)	Found (mg./ml.)	Recovery (%)	Found (mg./ml.)	Recovery (%)
1	2.997	99.9	2.490	99.6	2.483	99.3
2	2.979	99.3	2.490	99.6	2.525	101.0
3	2.997	99.9	2.470	98.8	2.490	99.6

4	2.985	99.5	2.485	99.4	2.473	98.9
5	2.997	99.9	2.508	100.3	2.520	100.8
6	2.997	99.9	2.485	99.4	2.475	99.0
7	3.027	100.9	2.535	101.4	2.520	100.8
8	3.003	100.1	2.485	99.4	2.455	98.2
9	3.033	101.1	2.483	99.3	2.495	99.8
10	2.976	99.2	2.500	100.0	2.505	100.2
Mean	2.999	100.0	2.493	99.7	2.494	99.8
Standard deviation		0.62		0.71		0.94

a) Aminopyrine	3.0 mg.	b) Aminopyrine	2.5 mg.
Noscapine	0.5 mg.	Sulpyrine	15.0 mg.
Phenacetin	10.0 mg.	Chlorpheniramine maleate	0.2 mg.
Chlorpheniramine maleate	0.4 mg.	<i>d,l</i> -Methylephedrine hydrochloride	1.25 mg.
<i>d,l</i> -Methylephedrine hydrochloride	0.42 mg.	Dihydrocodeine phosphate	0.75 mg.
Caffeine	1.4 mg.	Caffeine	2.5 mg.
Dibenzoylthiamine	0.4 mg.	N-Acetyl- <i>p</i> -aminophenol	5.0 mg.
Add water to make	1.0 ml.	Taurine	15.0 mg.
		D-Pantothenyl alcohol	1.0 mg.
		Riboflavin	0.25 mg.
		Ascorbic acid	10.0 mg.
		Potassium guaiacolsulfonate	2.5 mg.
		Ethanol	0.03 ml.
		Add water to make	1.0 ml.

Determination was performed with 10 ml. of suspension.

Determination was performed with 2.0 ml. of liquid.

総合感冒剤についての定量結果 液剤型および懸濁液剤型の総合感冒剤の合成試料を Table V に示す処方
で調製し、液剤型の場合には定量法 II, III により、懸濁液剤型の場合には定量法 I により、日をかえて 10 回の
定量を行なって、Table V に示す結果を得た。

終わりに臨みこの研究について御鞭撻を賜った山崎栄一工場長および種々御指導を賜った中山 巖試験部
長、京都大学 宇野豊三教授に感謝いたします。

武田薬品工業株式会社大阪工場