アミノピリン関連化合物の *p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド による呈色反応と定量法¹⁾

嶋田健次, 池田満雄,^{2a)} 長瀬雄三^{2b)}
新潟薬科大学,^{2a)} 東京薬科大学^{2b)}

Color Reaction of Aminopyrine Related Compounds and the Colorimetric Determination with *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde¹⁾

KENJI SHIMADA, MITSUO IKEDA^{2a)} and YŪZŌ NAGASE^{2b)}
Niigata College of Pharmacy^{2a)} and Tokyo College of Pharmacy^{2b)}

(Received March 28, 1978)

As reported previously *p*-dimethylaminocinnamaldehyde reacts with 4-aminoantipyrine to produce an intense color, which can be used as an analytical reagent. A similar color reaction and colorimetric determination were examined with other aminopyrine-related compounds, 4-formylaminoantipyrine (I), 4-monomethylaminoantipyrine (II), and 4-acetylaminoantipyrine (III), and optimum reaction conditions for color development were examined. The relationship between absorbance and concentration of I, II, and III showed linear plots in the range of 0.6—2.5 $\mu\text{g/ml}$ of I and II, and 6.25—25.0 $\mu\text{g/ml}$ of III. Interference of water decreases the absorbance of aminopyrine-related compounds and indicated the necessity for removal of water. Thin-layer chromatography was applied for the detection of various aminopyrine-related compounds, using *p*-dimethylaminocinnamaldehyde, and it was found possible to detect these compounds distinctly.

Keywords—aminopyrine-related compounds; color reaction; *p*-dimethylaminocinnamaldehyde; analgesic; colorimetric determination

アミノピリン (AM) はピラゾロン系薬剤に属し、従来、有用な解熱鎮痛薬として薬効を発揮してきた。しかし、AM を経口投与したときに、AM は胃の中で亜硝酸塩と反応して、発ガン物質であるジメチルニトロソアミンを生じることが最近になって報告され、AM の安全性に関して疑問視され始めた。わが国では 1977 年にピラゾロン系の薬剤を一般薬として使用することが禁止された。

p-DACA を呈色試薬として応用した例には、ピルビン酸の吸光光度定量³⁾、芳香族アミンの呈色^{4,5)}、比色定量⁶⁾ およびビオチンの比色定量⁷⁾ などのアミンを中心とする報告が主である。

著者らは、先に AM 関連化合物の 1 種である 4-アミノアンチピリン (4-AA) の *p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド (*p*-DACA) による吸光光度定量法について報告した。⁸⁾ 今回、4-AA 以外の尿中代謝産物である 4-ホルミルアミノアンチピリン (4-FAA)、4-モノメチルアミノアンチピリン (4-MAA) および 4-アセチルアミノアンチピリン (4-AcAA) の *p*-DACA による呈色と、その比色定量への応用について検討した。

AM 関連化合物の構造を Chart 1 に一括した。著者らが先に報告し

4-AA	: R ₁ =H,	R ₂ =H
4-FAA	: R ₁ =H,	R ₂ =CHO
4-MAA	: R ₁ =H,	R ₂ =CH ₃
4-AcAA	: R ₁ =H,	R ₂ =COCH ₃
AM	: R ₁ =CH ₃ ,	R ₂ =CH ₃

Chart 1

- 1) 日本分析化学会第 26 年会で一部発表, 山口, 1977 年 10 月.
- 2) Location: a) 5829 Kamishin'ei, Niigata, 950-21, Japan; b) 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan.
- 3) 石井恵一郎, 岩本武治, 山西一彦, 分析化学, 24, 140 (1975).
- 4) 坂井節雄, 鈴木圭一, 森元, 藤野睦夫, 分析化学, 9, 862 (1960).
- 5) S.-C. Lee, J. Chromatogr., 93, 480 (1974).
- 6) M. Qureshi, I.A. Khan, Anal. Chim. Acta, 86, 309 (1976).
- 7) 嶋田健次, 長瀬雄三, 松本潮, 薬誌, 89, 436 (1969).
- 8) 嶋田健次, 長瀬雄三, 分析化学, 26, 712 (1977).

Fig. 1. Absorption Curves for AM Related Compounds developed with *p*-DACA

4-FAA (1.875 $\mu\text{g/ml}$): —,
4-MAA (1.875 $\mu\text{g/ml}$): —,
4-AcAA (25 $\mu\text{g/ml}$): ----.

Fig. 2. Effect of Reaction Temperature on Absorbance for AM Related Compounds developed with *p*-DACA

Each concentration: 2.5 $\mu\text{g/ml}$.

4-FAA : —○—,
4-MAA : —△—,
4-AcAA : —●—.

た⁸⁾ 4-AA は, AM 代謝産物中において脂肪族第一アミンに属するが, 4-FAA, 4-MAA および 4-AcAA は第二アミンに相当する。

4-FAA, 4-MAA および 4-AcAA の 3 種類を, *p*-DACA を用いて呈色させたときの呈色体の可視部吸収曲線を Fig. 1 に示す。それぞれの極大吸収波長は, 4-FAA が 515 nm, 4-MAA が 505 nm および 4-AcAA が 520 nm に存在することが認められた。4 位のアミノ基が第三アミンに属する AM は, *p*-DACA によって呈色せず, 可視部領域にはなんら吸収を示さなかった。また, 4-AcAA の吸光度は AM 以外の 3 種の関連化合物中で最低であった。

AM 関連化合物と *p*-DACA とを反応させたときの温度の影響についてまず検討した。AM 関連化合物の濃度をそれぞれ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ とし, 10°, 20°, 30°, 40° および 50° の 5 段階の反応温度で硫酸の存在下に *p*-DACA と 1 時間反応させたときの吸光度を測定した。その結果, Fig. 2 に示すように, 4-FAA は反応温度の影響をあまり受けないが, 4-MAA は反応温度を 50° に設定すると吸光度が著しく低下する。これに対して, 4-AcAA は反応温度の上昇に伴い, 吸光度の増加が顕著に現われてくる。この現象は, 温度を上昇させると, 4-AcAA のアセチル基が一部酸性溶媒中で加水分解を受けて 4-AA を生じ, 生成した 4-AA が *p*-DACA と反応して吸光度が増大するものと考えられる。したがって, 4-FAA および 4-MAA の吸光度が減少せず, 4-AcAA が加水分解を受けない温度として 20° を本呈色反応の至適温度とした。

ついで, *p*-DACA・エタノール溶液を 0.1, 0.2 および 0.5% の 3 種の濃度段階で, AM 関連化合物に加え, 20° で 1 時間反応させて吸光度を測定し, *p*-DACA の濃度が呈色体の吸光度に及ぼす影響について比較検討した。その結果, Fig. 3 に示すように, 4-FAA は *p*-DACA の濃度が 0.2% のときに吸光度は最大を示すのに対し, 4-MAA は 0.1, 0.2% とともに, ほぼ同等の値を示した。また, 4-AcAA でも, 0.2% 濃度のときに呈色体の吸光度は, ごく微小の差ではあるが最大となった。この現象は, 4-AA が 0.2% 濃度の *p*-DACA を加えたときに最大値を示した結果と一致する。⁹⁾ これらの結果から, 呈色試薬としての *p*-DACA・エタノール溶液の濃度は 0.2% とした。

AM 関連化合物のエタノール溶液に, 0.5% 濃度の硫酸・エタノール溶液と, 0.2% *p*-DACA 試液を添加後, 20° を維持しながら, 0.5, 1, 2, 4, 8 および 24 時間後の吸光度をそれぞれ測定し, 呈色体の安定性について検討した。その結果, Fig. 4 に示すように, 4-FAA および 4-MAA においては時間の経過に伴い, 吸光度は低下する。これに対して 4-AcAA では, 反応時間を長くするにつれて 4-AcAA の一部が加水分解されて吸光度は上昇してくる。4-MAA について 2%, 5% 硫酸を添加した際にも吸光度の低下は顕著に現われ, 2% 硫酸を添加

Fig. 3. Effect of Concentration of *p*-DACA on Absorbance for AM Related Compounds

4-FAA (2.5 µg/ml): —○—,
4-MAA (2.5 µg/ml): —△—,
4-AcAA (25 µg/ml): —●—.

Fig. 4. Effect of Reaction Period on Absorbance for AM Related Compounds

Each concentration: 1.875 µg/ml.

4-FAA: —○—, 4-MAA: —△—, 4-AcAA: —●—.

直後の吸光度 (0.457) が, 4 時間経過後には当初の 3 分の 1 以下 (0.130) に, 5% 硫酸でも, 2 分の 1 以下と極度に減少した. これらの結果を総合して, *p*-DACA による呈色体は, 硫酸・エタノールの濃度が 0.5% のときに吸光度が一層大きくなり, 呈色に際しては 0.5% が至適条件であることが確認された.

ついで, AM 関連化合物の *p*-DACA 呈色に及ぼす水の影響を調べるため, 含水率と呈色後の放置時間について検討した. Table I に示すように, AM 関連化合物において, 含水量が増加するにつれて吸光度の低下がみられる. 4-FAA および 4-AcAA では反応 24 時間後に比べて 1 時間後では含水量が増加すると吸光度は急激に低下し, 4-AcAA は Fig. 4 に示すように反応時間を長くすると吸光度は増大するが, 反応時間にかかわらず, いずれも含水量の増大とともに, 4-FAA や 4-MAA と同様に著しく低下した.

生体試料中の AM 代謝産物の分析に *p*-DACA による吸光度定量法を応用することを考慮に入れ, 除たんば

TABLE I. Effect of Water on Absorbance for AM Related Compounds developed with *p*-DACA

Water content %	4-FAA ^{a)}		4-MAA ^{a)}		4-AcAA ^{b)}	
	after 1 hr	after 24 hr	after 1 hr	after 24 hr	after 1 hr	after 24 hr
0	0.750	0.789	0.760	0.554	0.219	0.944
0.5	0.574	0.778	0.772	0.508	0.139	0.915
1.0	0.407	0.771	0.695	0.469	0.088	0.859
5.0	0.072	0.700	0.656	0.424	0.050	0.202
10.0	0.024	0.502	0.635	0.344	0	0.085

a) 2.5 µg/ml. b) 12.5 µg/ml.

TABLE II. Effect of TCA on Absorbance for AM Related Compounds

	H ₂ SO ₄	TCA		
	0.5%	0.5%	2.0%	5.0%
4-FAA ^{a)}	0.782±0.006	0.061±0.003	0.108±0.009	0.154±0.003
4-MAA ^{a)}	0.760±0.011	0.797±0.008	0.769±0.007	0.707±0.012
4-AcAA ^{b)}	0.443±0.005	0.016±0	0.033±0	0.058±0.003

n=5, mean±S.D.

a) 2.5 µg/ml. b) 25 µg/ml.

Fig. 5. Calibration Curves for AM Related Compounds

4-FAA : —○—,
4-MAA : —△—,
4-AcAA : ---●---

に最も近い物性を示すと報告されている⁹⁾が、*p*-DACA 呈色に関しては 4-MAA に類似した挙動を示した。これらの検量線を用いて、4-FAA, 4-MAA および 4-AcAA を定量し回収率を求めた。その結果、4-FAA および 4-MAA は 1.0—2.5 μg/ml の範囲において変動係数 1% 以内で、0.5 μg/ml に対しても、4-FAA は 1.21%, 4-MAA は 2.05% の誤差であった。4-AcAA においては、25 μg/ml において 1% 以内で、5—20 μg/ml でも 1—2% の誤差で定量が可能であった。

なお 4-FAA および 4-AcAA に塩酸を加えて加水分解し、薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによって生成物の検索を行なったところ、いずれからも 4-AA が生成していることを確認した。したがって、呈色強度の低い 4-AcAA のみを対象とする定量的場合には、反応温度を上昇させるか、酸加水分解によってまず 4-AA に誘導してから *p*-DACA 試薬によって呈色させて定量すれば、定量下限をいっそう低下させることが可能と考えられる。

一方、*p*-DACA を AM 関連化合物の呈色試薬として TLC へ応用したところ、AM 以外の 4-AA, 4-FAA, 4-AcAA, および 4-MAA はいずれも鋭敏に呈色する。しかし AM は 4 位が第三アミンのため *p*-DACA とは呈色せず、TLC 上で検出するには AM のみを I₂ で呈色させる方法をとった。井口⁹⁾はヨウ素によって 4-FAA を含めた AM 関連化合物の検出を行なっているが、著者らが検討した *p*-DACA 試薬を用いての AM 関連化合物の検出限界は、4-FAA 0.13 μg, 4-MAA および 4-AA では 0.02 μg, さらに 4-AcAA では 2.5 μg であった。したがって *p*-DACA 試薬は AM 関連化合物の検出・確認試薬としても有用と言えよう。

実 験 の 部

4-AA: 和光純薬製特級試薬をクロロホルムより再結晶した。

4-FAA: T. Goromaru ら¹⁰⁾の方法によって合成した。

4-MAA: 守田¹¹⁾の方法によって合成した。

4-AcAA: 和光純薬製試薬を希エタノールより再結晶した。

AM: 日本薬局方品をリグロイン (沸点 77—80° 留分) より再結晶した。

p-DACA: 第一化学薬品製特級試薬を希エタノールより再結晶した。

装置 可視部吸収スペクトルおよび吸光度の測定: 島津ダブルビーム分光光度計 UV-200 形。

標準操作法 AM 関連化合物のエタノール溶液 (0.5—2.5 μg/ml) に 0.5% 硫酸・エタノール溶液を 1.0 ml, 0.2% *p*-DACA・エタノール溶液を 1.0 ml, さらにエタノールを加えて正確に 10 ml とし, 20° で 60 分間反応

9) 野田敦子, 都築脩三, 局 伸男, 五郎丸毅, 金尾義治, 甲斐明美, 井口定男, 薬誌, 97, 623 (1977)。

10) T. Goromaru, A. Noda, K. Matsuyama, S. Iguchi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 24, 1376 (1976)。

11) 守田 実, 薬誌, 82, 50 (1962)。

させ、別に調製した試薬ブランクを対照とし、4-FAA は 515 nm, 4-AcAA については 520 nm で、4-MAA については 505 nm においてそれぞれの吸光光度を測定する。

謝辞 終わりに、本研究に御援助いただいた新潟技術学園長・小林 勝氏に厚く御礼申し上げます。

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (10) 1421—1427 (1978)

UDC 547.852.2.04.09 : 615.212.011.5.033.076.9

ピリダジノン誘導体の研究 (第 7 報¹⁾) 4-Ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3 (2H)-pyridazinone (M73101) のヒト尿中代謝産物の合成

高谷昌弘, 山田敏廣, 嶋村 浩

森下製薬株式会社薬理研究所²⁾

Studies on Pyridazinone Derivatives. VII.¹⁾ Synthesis of Urinary Metabolites of 4-Ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3(2H)-pyridazinone (M73101) in Human

MASAHIRO TAKAYA, TOSHIHIRO YAMADA and HIROSHI SHIMAMURA

Research Laboratories, Morishita Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received April 3, 1978)

Among seven metabolites which were isolated from the urine of man administered with 4-ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3(2H)-pyridazinone (M-73101), six metabolites were synthesized. Chemical structure of the synthesized samples was confirmed by instrumental analysis and direct comparison with the metabolites.

Keywords—4-ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3(2H)-pyridazinone (M 73101); analgesic-antiinflammatory drug; urinary metabolites of human; 5-substituted amino-3(2H)-pyridazinone; dihydro pyridazino[4,5-b][1,4]oxazin-8(7H)-one; 5-[N-carboxy-methyl-N-(2-hydroxyethyl)amino]-4-ethoxy-2-methyl-3(2H)-pyridazinone

著者ら³⁾は新しい鎮痛消炎薬を開発する目的で substituted amino-3 (2H)-pyridazinone 誘導体の合成を行ない、優れた鎮痛消炎作用を有する 4-ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3(2H)-pyridazinone (M 73101) を見出した。

現在、臨床第 3 相試験中であるが、臨床第 1 相試験(臨床的に異常を認めない 26—42 歳の健常な男子ボランティア 21 名に投与)⁴⁾において行なった M 73101 の尿中代謝産物の検索で、7 種類 (Chart 1, I—VII) の代謝産物が単離精製されている。しかしこれらの構造は各種機器分析データから提案されたものである。⁵⁾

今回、これらヒト尿中代謝産物の構造を化学的に確かめるとともに、その薬理作用を検討する目的で I—VI の代謝産物を合成したので報告する。なお VII の合成はまだ成功しておらず、現在検討中である。

1) 第 6 報: 高谷昌弘, 山下武彦, 小瀬木幸司, 薬誌, 98, 413 (1978).

2) Location: 1658, Ohshinohara, Yasu-Cho, Yasu-gun, Schiga, 520-23, Japan.

3) a) 高橋西蔵, 牧 敬文, 木津弘子, 高谷昌弘, 三木藤作, 薬誌, 86, 1082 (1966); b) *Idem, ibid.*, 86, 1168 (1966); c) 高橋西蔵, 牧 敬文, 高谷昌弘, 木津弘子, 薬誌, 88, 784 (1968); d) 高橋西蔵, 高谷昌弘, 牧 敬文, 里田 勲, 日本特許公告, 47-17790 (1972); e) 寺島建樹, 谷沢久之, 高谷昌弘, 牧 敬文, 日本薬学会第 96 年会講演要旨集, II-2, 名古屋, 1976 (M. Takaya, M. Sato, K. Terashima, H. Tanizawa, Y. Maki, *J. Med. Chem.*, 受理).

4) T. Seki, *Jap. J. Pharmacol.*, suppl, 26, 54 (1976).

5) a) 林 敏廣, 満生君江, 岸川虎比古, 日本薬学会第 96 年会講演要旨集, IV-166, 名古屋, 1976; b) 関 隆, 林 敏廣, 佐藤 誠, 山田敏廣, 大木正彦, 日本薬学会第 97 年会講演要旨集, IV-182, 東京, 1977.