

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
94 (5) 633-638 (1974)

UDC 547.572.1.08:543.426

フェノール誘導体のけい光分析 (第2報¹⁾) アセトアミノフェンのけい光定量 その1²⁾

海東常敏, 相楽和彦, 吉田継親, 伊藤裕二

大正製薬株式会社品質管理部³⁾Studies on Fluorometric Analysis of Phenol Derivatives. II.¹⁾ Fluorometric
Determination of Acetaminophen. (I)²⁾

TSUNETOSHI KAITO, KAZUHIKO SAGARA, TSUGUCHIKO YOSHIDA, and YUJI ITO

Quality Control Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.³⁾

(Received December 11, 1973)

Fluorometric determination of acetaminophen (I) was studied and a recommended procedure was established. When I was oxidized with $K_3Fe(CN)_6$ in a slightly alkaline solution, a blue violet fluorescence developed and its intensity was increased by the addition of dimethylformamide. The fluorescent substance exhibited an absorption maximum at 303 m μ in ethanol which could not be observed in I, and it was considered that this absorption is closely related to fluorescence. Its chemical structure was found to be 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl from its analytical data. The analytical procedure was as follows: To 1 ml of I solution (20 μ g/ml), 2 ml of 0.2 M H_3BO_3 -KCl- Na_2CO_3 buffer solution (pH 8.5) was added, the mixture was cooled to 0°, and 1 ml of 0.05% $K_3Fe(CN)_6$ solution was added. After further standing for 5 min at 0°, 2 ml of 0.25% ascorbic acid solution and 5 ml of dimethylformamide were added and fluorescence intensity of the solution was measured at 425 nm, exciting at 337 nm.

アセトアミノフェン (I) は日局 8⁴⁾ に収載されている解熱鎮痛剤であるが、その定量には、I そのものを試料に用いる場合 (直接法) と加水分解して *p*-アミノフェノールとしたのち定量する方法 (間接法) がある。製剤中の定量に用いる直接法としては、カラム処理を伴う紫外吸光度法⁵⁾、ガスクロマトグラフ法⁶⁾、亜硝酸⁷⁾ またはインドフェノール型色素生成⁸⁾ による比色法が知られている。しかしけい光法に関しては報告が見られないので、種々検討を行ない、直接けい光法を確立し、製剤分析への応用を試みた。さらに反応物質の同定を行ない、2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl (II) であることを確認した。

発けい光条件とけい光スペクトル

I が弱アルカリ性で、各種の酸化剤により容易にけい光を発することを認めたので、定量化のため、酸化剤の種類、液性、反応温度および反応時間、溶媒について検討を行なった。酸化剤としては、 $K_3Fe(CN)_6$ 、クロラミン T、硫酸第一セリウムアンモニウム、 KIO_4 、 H_2O_2 について試験したが、いずれを用いても、強弱の差はあるがけい光が認められた。しかし、pH 8.5 において $K_3Fe(CN)_6$ を用いるとき、けい光強度は最も大であり、他の酸化剤は約 1/10 程度の値を示すにすぎなかった。つぎに反応液を希釈する溶媒にジメチルホルムアミド (DMF) を使うと、肉眼的にけい光の増大が認められた。すなわち、EtOH に比べ DMF を用いると、励起極大波長は

1) 第1法: 海東常敏, 粕谷浩次, 井上俊広, 分析化学, 20, 801 (1971).

2) 日本薬学会第91年会で発表, 福岡, 1971年4月.

3) Location: 3-34-1, Takada, Toshima-ku, Tokyo.

4) 第八改正日本薬局方第2部, 広川書店, 東京, 1971, p.9

5) J. Levine, J.R. Hohmann, J. Ass. Offic. Anal. Chem., 49, 533 (1966); K.T. Koshy, T.L. Loch, J. Pharm. Sci., 50, 113 (1961).

6) 鯉淵昌信, 柴崎利雄, 南川伝憲, 西川征男, 薬誌, 88, 877 (1968).

7) 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); L. Chafetz, J. Pharm. Sci., 60, 463 (1971).

8) 二宮昭夫, 薬誌, 85, 394 (1965).

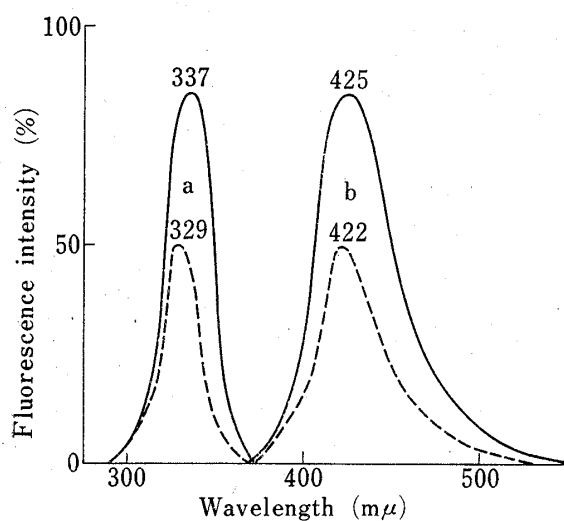


Fig. 1. Excitation and Emission Spectra

a: excitation spectra, b: emission spectra,
diluting solvent: —; DMF, ---; EtOH,
total volume: 11 ml [acetaminophen test soln. (20 μg/ml)
1 ml + pH 8.5 buffer soln. 2 ml + 0.05% $K_3Fe(CN)_6$ soln.
1 ml + 0.25% ascorbic acid soln. 2 ml + DMF or EtOH 5ml]

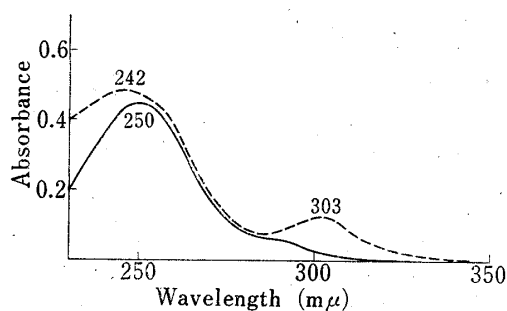


Fig. 2. Ultraviolet Spectra of Acetaminophen and Fluorescent Product

—: acetaminophen (5 μg/ml),
---: fluorescent product (5 μg/ml),
solvent: EtOH

329 mμ から 337 mμ に、けい光極大波長は 422 mμ から 425 mμ に変わり、けい光強度は約 1.7 倍増加する。Fig. 1 に定量法と同様に操作し、希釈溶媒に DMF または EtOH を用いたときの励起およびけい光スペクトルを示す。

けい光物質の特性と構造

1) 紫外吸収スペクトル 分離精製したけい光物質を EtOH に溶かし、吸収スペクトルを測定した。なお I についても同様に測定し、その結果を合わせて Fig. 2 に示した。けい光物質には I に認められない吸収が 303 mμ に現われ、この吸収は Table I に示した EtOH 溶媒のときの励起極大波長にほぼ一致することから、けい光発現にはこの 303 mμ の吸収が関与しているものと考えられる。

2) 赤外吸収 (IR) スペクトル I およびけい光物質の KBr 法によるスペクトルを Fig. 3 に示す。けい光物質では、3320, 3160 cm^{-1} に NH および OH の吸収があり、その他の吸収も I とほとんど一致するが、890 cm^{-1} にベンゼン環の孤立 H, 820 cm^{-1} にベンゼン環の隣接 2 水素の C-H が枝分かれしていることより、I と類似の構造を持つベンゼントリ置換体が予測される。

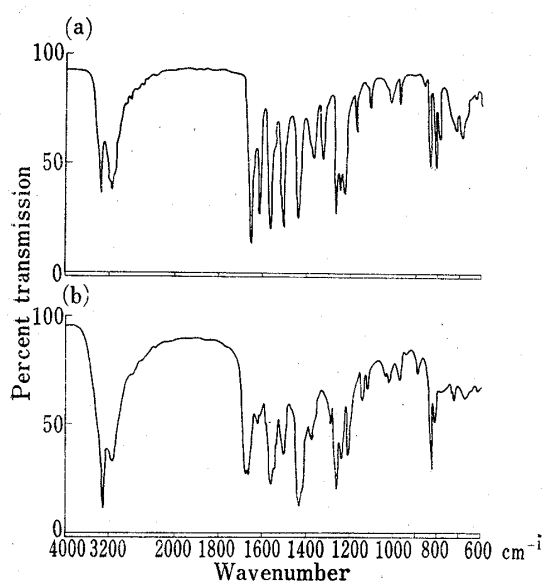


Fig. 3. Infrared Absorption Spectra of Acetaminophen (a) and Fluorescent Product (b) in KBr Tablet

3) マススペクトル I およびけい光物質のマススペクトルを Fig. 4 に示す。Fig. 4 よりけい光物質の分子ピーク m/e は 300 とみなされ、 m/e 258, m/e 216 にアセチル基が 1 個および 2 個はずれたフラグメント

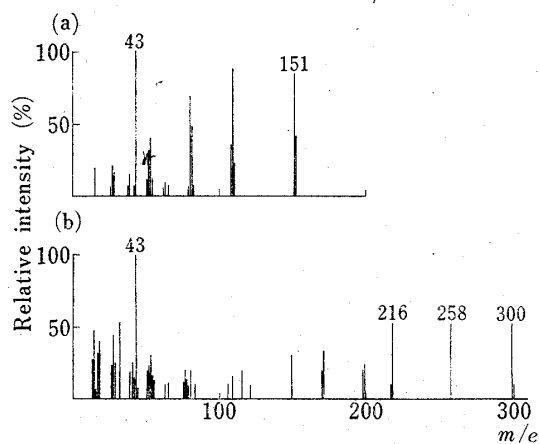


Fig. 4. Mass Spectra of Acetaminophen (a) and Fluorescent Product (b)

ピークが存在することと IR スペクトルより, I の 2 量体であることが予測される。

4) 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル I およびけい光物質を重メタノール溶液で測定した結果を Fig. 5 に示す。NMR スペクトルは $-C(=O)CH_3$ 基および芳香族プロトンの存在を示し, シグナル強度 (積分値) は I では $-C(=O)CH_3$ 3H, 芳香族プロトン 4H 分を与え, けい光物質では, それぞれ 6H 分を与えている。

IR スペクトルおよびマススペクトルから, Chart 1 においてけい光物質の構造は II あるいは III のいずれかと考えられるが, NMR スペクトルからは結合位置を推定した。OH 基は *o* 位のベンゼン環プロトンに対して, 高磁場側への化学シフトを与え, $-NHCOCH_3$ 基はほとんど影響を与えないため, $\tau 3.14$ 付近のシグナル (積分値 2H) は OH 基の *o* 位, $\tau 2.70$ 付近のシグナル (積分値 4H) は, $-NHCOCH_3$ 基の *o* 位のプロトンに帰属できる。したがってけい光物質は II (2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl) の構造であると推定した。なお単離した II は元素分析および示差熱分析の結果 1 分子の結晶水を含有することがわかった。

5) 溶媒効果 各種溶媒に溶かしたときの励起極大波長, けい光極大波長およびけい光強度は Table I に示すとおりである。Table I より DMF を用いるとき, 両極大波長は最も長波長側にあり, けい光強度も最も強いことがわかる。定量法で DMF を希釈溶媒に用いた理由である。

けい光反応の特異性

類似化合物 11 種について, I と同量を用い, 定量法に従って操作したところ, すべてけい光を現わさなかつ

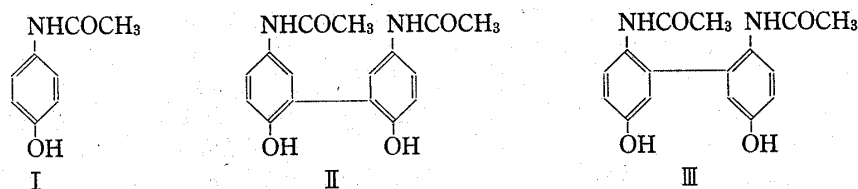


Chart 1

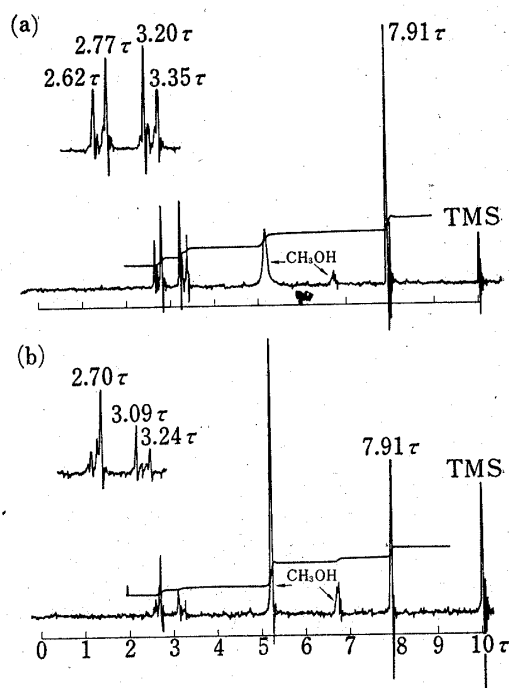


Fig. 5. Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Acetaminophen (a) and Fluorescent Product (b) in CD_3OD

TABLE I. Solvent Effects on Fluorescence Intensity of Fluorescent Product (II)

Solvent	λ_{ex}^a (m μ)	λ_{em}^b (m μ)	Fluorescence intensity
Dimethylformamide	360	434	100.0
Ethyl acetate	307	380	49.5
Isopropanol	307	380	40.7
Ethanol	307	380	36.1
<i>n</i> -Butanol	307	380	34.5
Methanol	307	380	31.7
Water	295	420	12.4
Benzene	307	380	3.7
Chloroform	303	370	1.1

a) excitation maximum

b) emission maximum

TABLE II. Interference of Similar and Co-existing Compounds on Determination of Acetaminophen

Interference	Similar compound	Co-existing compound
Minus	<i>p</i> -aminophenol <i>p</i> -phenylenediamine hydroquinone <i>o</i> -hydroxyacetanilide <i>p</i> -aminoacetanilide	aminopyrine sulpyrin thiamine mononitrate riboflavin ascorbic acid
Plus	—	aspirin salicylamide salicylsalicylic acid Na-salicylate

none; similar compound—acetanilide, phenacetin, *m*-hydroxyacetanilide, *p*-aminophenylacetate, ON-diacetyl-*p*-aminophenol, NN'-*p*-phenylene-bisacetamide,
co-existing compound—antipyrine, isopropylantipyrine, bromvalerylurea, caffeine, carbinoxamine maleate, chlorpheniramine maleate, ephedrine HCl, *dl*-methylephedrine HCl, ethenzamide, diphenhydramine HCl, phenylephrine HCl, glycerylguaiacol ether, K-guaiacol sulfonate, theophylline, nicotinamide, pyridoxine HCl, aminoethylsulfonic acid, Ca-pantothenate

た。これより本けい光反応は I にかなり特異的であると考え。ただし、これらの化合物のうち約半数は I と共存させると負の妨害を与える。つぎに製剤中の定量に応用するため、28 種の成分について、同量を共存させてその影響を調べた。サリチル酸誘導体のようなそれ自身がけい光を発するものは正に、アミノピリン、スルピリンなどの還元性を有する化合物は負に妨害することがわかった。これらの結果は合わせて Table II に示した。

実験の部

機器 日立分光けい光光度計 MPF-2A 型, 島津ダブルビーム分光光度計 UV-200 型, 日本分光赤外分光光度計 DS701G 型, 日立マスペクトロメーター RMS-4 型, 日立核磁気共鳴スペクトロメーター R-20 型 (60 MHz).

試薬 アセトアミノフェン (I): 日局 8 適品, 0.05% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液, 0.25% アスコルビン酸溶液, pH 8.5 緩衝液: 1/5M $H_3BO_3 \cdot KCl$ 溶液 H_3BO_3 (12.4 g と KCl 14.9 g を水 1 liter に溶かす) 80 ml に 1/5 M Na_2CO_3 溶液約 20 ml を加え, pH を 8.5 に調整する。その他の試薬は試薬特級を用いた。

定量法 I の 20 $\mu g/ml$ 溶液 1 ml を共せん試験管にとり, pH 8.5 緩衝液 2 ml を加え, 0° の氷浴中に 5 分間放置したのち, 0.05% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液 1 ml を加え, 再び 0° で 5 分間放置する。この液に 0.25% アスコルビン酸溶液 2 ml を加え, つぎに DMF 5 ml を加えたのち, 励起波長 337 m μ , けい光測定波長 425 m μ におけるけい光強度を測定する。この値から別に水 1 ml を用いて同様に操作して得た空試験値を差し引く。

定量条件の検討 1. $K_3Fe(CN)_6$ 濃度の影響— $K_3Fe(CN)_6$ の濃度を 0.01—0.2% まで変え, けい光強度を測定した。Fig. 6 に示すように 0.05% で最高値を示したので, この濃度を採用した。

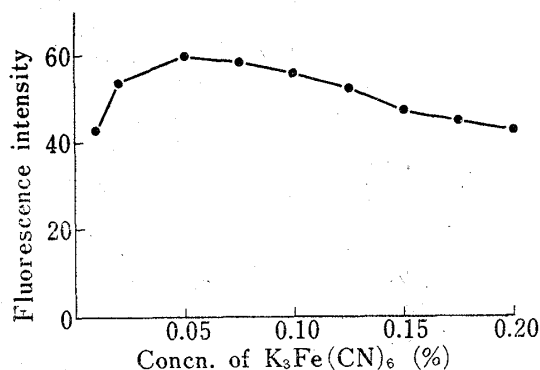


Fig. 6. Effect of $K_3Fe(CN)_6$ Concentration on Fluorescence Intensity

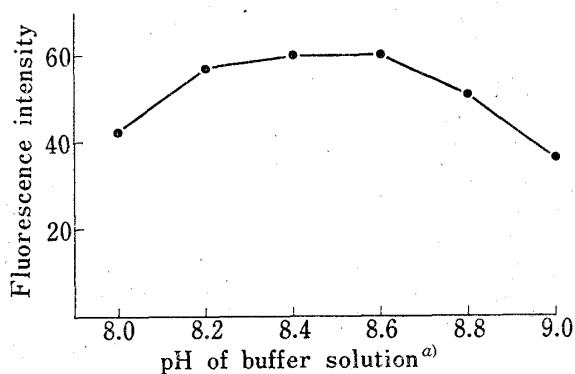


Fig. 7. Effect of pH on Fluorescence Intensity

^{a)} Atkins-Pantin 1/5M H_3BO_3 - KCl - Na_2CO_3 buffer solution

2. 緩衝液の pH の影響——Atkins-Pantin の $1/5\text{M H}_3\text{BO}_3\text{-KCl-Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液を用い、pH 8.0—9.0 におけるけい光強度を測定した。Fig. 7 に示すように pH 8.4—8.6 の間で一定値を示したので pH 8.5 を用いることにした。また pH 10.0 においてはほとんどけい光は認められなかった。なお pH 8.5 の Sørensen, Kolthoff, Palitzsch, Britton-Robinson, Michaelies などの各緩衝液についても検討したが、前記 Atkins-Pantin の緩衝液が最も高いけい光強度を示した。

3. アスコルビン酸濃度の影響——アスコルビン酸の濃度を 0.125—0.5% まで変え、けい光強度を測定した結果、Fig. 8 に示すように濃度による影響はみられなかったので、0.25% を採用した。

4. 反応温度と時間および検量線——反応温度を $0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 60^\circ$ とし、反応時間を 1—30 分まで変化させたときのけい光強度を調べた。Fig. 9 に示すように、 $0-40^\circ$ までは反応時間の増加によりけい光強度は増大する。 60° では反応時間による影響はほとんど見られないが、けい光強度は他の温度に比べ減少している。つぎに I の $10-50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の標準液を調製し、反応時間を 5 分間と定め、反応温度を変化させたとき、Fig. 10 に示すように 0° 以外の温度では原点を通る直線は得られなかった。したがって定量法では反応率はやや低くなるが、検量線が原点を通る $0^\circ, 5$ 分間を採用した。

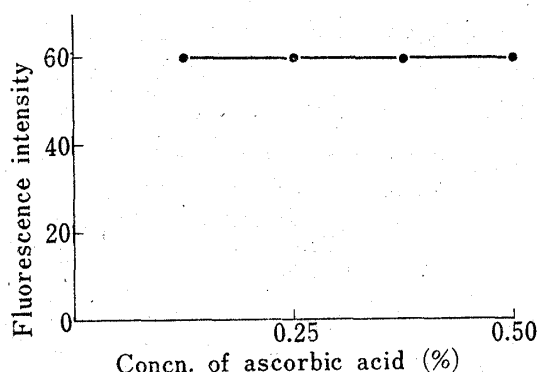


Fig. 8. Effect of Ascorbic Acid Concentration on Fluorescence Intensity

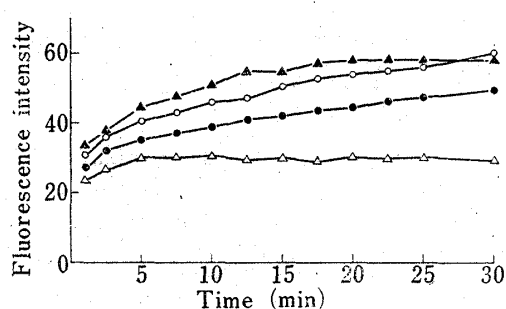


Fig. 9. Relationship between Reaction Time and Fluorescence Intensity at Various Temperature

—●—: 0° , —○—: 20° , —▲—: 40° , —△—: 60°

5. DMF 量の影響——定量法に従い 0° で 5 分間反応させた液 6 ml に、DMF を 0—11 ml (11 ml 以上加えると液が白濁する) 加え、得られた液について、それぞれの励起およびけい光極大波長におけるけい光強度を測定し、Table III に示した。その結果、DMF 添加量 4—5 ml でほぼ一定かつ最大のけい光強度を示したので定量法では DMF 添加量を 5 ml とした。

6. けい光の安定性——定量法に従い操作した液について、0—2 時間まで放置し、けい光強度を測定したところ、変化は認められなかった。

製剤中の定量 合成試料 A (液剤) および B (カプセル剤) について、上記のような操作法により定量したところ、Table IV に示すように良好な結果が得られた。

操作法——試料 A: 試料 1 ml に水を加えて $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液となるよう希釈し、試料溶液とする。別に I の $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液をとり、標準溶液とし、それぞれの液 1 ml について定量法と同様に操作し、定量値を算出する。

試料 B: I 330 mg に対応する量を量り、EtOH で抽出し 100 ml とする。この液 1 ml に水を加えて $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液となるよう希釈し、試料溶液とし、以下 A と同様に操作し、定量値を算出する。

反応生成物の単離 I 2 g に水 100 ml を加え少時加温して溶かし、冷後濃アンモニア水 5 ml を加え、10% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液 40 ml を徐々に加え 5 分間放置する。つぎにアスコルビン酸 2 g を加えたのち塩酸酸性とする。析出する沈殿をろ取し、 $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (1:1) 混液より数回再結晶したのち、 80° で 2 時間 P_2O_5 下で減圧乾燥する。白色結晶。mp $216-218^\circ$. Anal. Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 60.38; H, 5.66; N, 8.81; H_2O , 5.66. Found: C, 60.39; H, 5.51; N, 8.69; H_2O , 5.51.

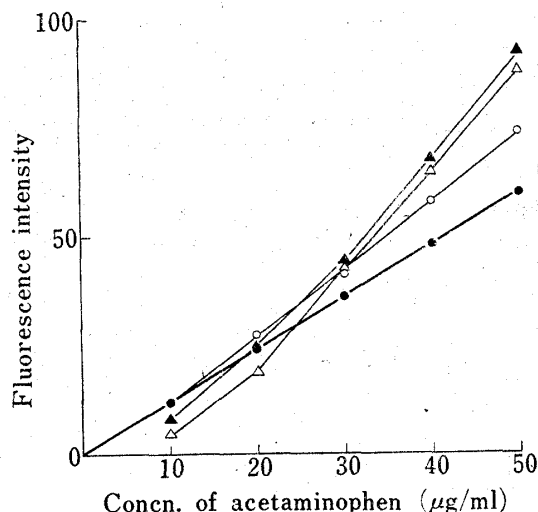


Fig. 10. Calibration Curves at Various Reaction Temperature

—●—: 0° , —○—: 20° , —▲—: 40° , —△—: 60° , reaction time: 5 min

TABLE III. Effect of DMF added to Reaction Solution^{a)} on Fluorescence Intensity

DMF added (ml)	$\lambda_{ex}^{b)}$ (m μ)	$\lambda_{em}^{c)}$ (m μ)	Fluorescence intensity
0	320	420	27.0
1	328	424	67.9
2	331	425	88.3
3	333	425	96.2
4	335	425	100.2
5	337	425	100.0
7	337	425	94.1
9	340	425	88.2
11	340	425	82.6

a) acetaminophen test soln. (20 μ g/ml) 1 ml + pH 8.5 buffer soln. 2 ml + 0.05% $K_3Fe(CN)_6$ soln. 1 ml + 0.25% ascorbic acid soln. 2 ml

b) excitation maximum

c) emission maximum

TABLE IV. Determination of Acetaminophen in Synthetic Preparations

No.	Preparation A (syrup) ^{a)}		Preparation B (capsule) ^{b)}	
	Found (mg/36 ml)	Recovery (%)	Found (mg/3 cap.)	Recovery (%)
1	297.4	99.1	917.6	101.9
2	294.3	98.1	892.3	99.1
3	300.2	100.0	908.2	100.9
4	294.1	98.0	895.1	99.4
5	297.0	99.0	917.4	101.9
mean	296.6	98.8	906.1	100.6
cv		0.8		1.3

a) preparation A: acetaminophen 300 mg, carbinoxamine maleate 2.4 mg, dextromethorphan HBr 15 mg, *dl*-methylephedrine HCl 9.6 mg, guaiacolglyceryl ether 60 mg, caffeine 30 mg in 36 ml

b) preparation B: acetaminophen 900 mg, carbinoxamine maleate 7.5 mg, dextromethorphan HBr 45 mg, *dl*-methylephedrine HCl 30 mg, guaiacolglyceryl ether 150 mg, caffeine 90 mg, thiamine HNO_3 24 mg, riboflavin 12 mg in 3 capsules

謝辞 本研究の発表の機会を与えられた大正製薬株式会社 寺島文一郎常務ならびに元素分析, IR, マススペクトルおよび NMR の測定をされた当社機器分析室の諸氏に感謝致します。