

Monovalent 와 bivalent aminoantipyrine 유도체의 합성과 항염 진통활성

김승재 · 권오혁 · 전상철 · 박상민 · 임채욱 · 임철부*

중앙대학교 약학대학 의약품화학 교실

(Received May 20, 2002; Revised June 4, 2002)

Synthesis and Antiinflammatory-analgesic Activity of Monovalent and Bivalent Aminoantipyrines

Seung Jae Kim, Oh Hyeok Kwon, Sang Chul Jun, Sang Min Park,
Chaeuk Im, and Chul Bu Yim*

Division of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Six novel 4-aminoantipyrine derivatives as potential nonsteroidal antiinflammatory and analgesic compounds were prepared and their antiinflammatory-analgesic activity were compared with antipyrine. Succinyl chloride and Ac₂O were reacted with glycine, respectively, to give glycine compounds (3-4, 9-10), which were treated with hydroxysuccinimide and dicyclohexyl carbodiimide to yield active esters (5-6, 11-12), and then reacted with 4-aminoantipyrine to prepare 4-aminoantipyrine derivatives (7-8, 13-14). 4-Aminoantipyrine reacted with succinyl chloride and Ac₂O, respectively, to give succinyl bis aminoantipyrine (15) and acetyl aminoantipyrine (16). Compounds (7), (8) and (13) gave comparable antiinflammatory activity to antipyrine.

Keywords □ Antipyrine amide, analgesic agents, antiinflammatory agents

각종 치 키스테로이드성 항염진통제¹⁻³⁾가 개발되어 임상에 이용되고 있으나 위장장애와 같은 부작용과 노인성 인구의 증가 때문에 항염진통제의 개발 필요성이 점차 증가되고 있다. 4-Aminoantipyrine의 항염 및 진통작용이 보고된 후, 이 화합물을 구조개선을 통해 부작용을 감소시키고 효능이 보다 우수한 화합물을 얻으려는 연구가 활발히 이루어졌다.⁴⁻⁹⁾ 한편, 2개의 생리활성을 갖는 pharmacophore¹⁰⁾ spacer로 연결된 bivalent ligand¹⁰⁾ 구조가 drug design에서 매우 유용한 형태로 인식되고 있다. Bivalent ligand 구조의 약물은 주로 합성 항미생물제, opioid agonists-antagonists 및 choline제에 있고, 이 계열의 약물로 bisonium cholinergic agents, ambenonium chloride, demecarium bromide, ethambutol dihydrochloride, hexachlorophene 및 bithionol 등이 있다. Portoghesse¹¹⁾등은 Oxymorphone(opioid agonist)과 β-Naltrexamine(opioid antagonist)을 pharmacophore로 하는 수중의 bivalent ligand 화합물이 매우 선택적이며 강력한 생리활성을 갖고 있고, 인접한 수용체의 작용부위에 동시에 작용할 수

있도록 2개 pharmacophore 사이의 spacer가 적당한 길이를 갖는다면, entropic factor 등에 의하여 monovalent ligand보다 강력한 약물활성을 나타내며 spacer의 종류 및 길이와 약물활성에는 밀접한 상관성이 있다고 보고하였다. 이에 저자는 보다 우수한 항염 진통제를 탐색하고 구조와 활성관계를 규명할 목적으로, bivalent ligand 화합물 3종과 4-aminoantipyrine를 pharmacophore로 하는 monovalent ligand 화합물 3종을 합성하였다. Bivalent ligand 화합물의 경우, spanner의 길이 변화에 따른 partition coefficient의 변화가 최소가 되게 하려고 succinyl기를 spanner로 선택하였다. 합성화합물에 대한 항염실험은 carrageenin 족부 중에 대한 부종억제율을 측정하였으며, 진통실험은 writhing의 제효과를 측정하였다.

실험 방법

시약 및 기기

본 실험의 합성시약은 Aldrich사의 것을 사용하였고, 기타 합성에 필요한 시약은 일급시약을 사용하였다. Carrageenin은 Sigma사 제품을 사용하였고, Tween 80(polyoxyethylene sorbitan)은 일본 Junsei사 제품을 사용하였다. 그리고, 합성 화합물의 분

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) (02-820-5599) (팩스) 02-815-2199
(E-mail) chaeukim@cau.ac.kr

석시험에는 다음 기기를 사용하였다. TLC에서는 silica gel plate(Merck 60 F₂₅₄)를 사용하였고, UV light 또는 iodine vapor에 의하여 spot를 확인하였다. 융점측정은 Gallenham MFB를 사용하였고, IR 스펙트럼과 ¹H-NMR 스펙트럼은 Nicolet 5-MX와 Hitachi R-600으로 각각 측정하였으며, ¹H-NMR에서는 tetramethylsilane(TMS)를 내부 표준물질로 사용하였다.

합성

N,N-Succinyl bis(glycine) (3)의 합성 – Glycine 2.45 g (33.00 mmol)을 1.5M-NaOH용액(22 mL)에 녹인 후, 온도는 5°C 이하 pH는 10~11로 유지하면서 succinyl chloride 2.31 g (15.00 mmol)의 acetone용액(20 mL)을 1시간동안 가하면서 반응시킨다. 30분간 더 교반하여 반응을 완결한 후, 1M-HCl로 처리하여 반응액의 pH를 2로 조절하고 생성된 침전을 염수에서 재결정하여 결정성 분말 1.80 g을 얻었다.

Yield: 52%; mp: 211~213°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3280, 1700, 1630, 1540; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 2.39(s, 4H), 3.75(s, 4H).

N,N-Succinyl bis(glycylglycine) (4)의 합성 – Glycylglycine 4.35 g (3.00 mmol)을 사용하여 화합물 3과 동일한 방법으로 합성하여 결정성 분말 4.64 g을 얻었다.

Yield: 89%; mp: 246~248°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3280, 1710, 1660, 1635, 1550; Rf=0.41 (EtOH : EtOAC : H₂O : HOAc=2:2:1:1); ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 2.42(S, 4H), 3.76(s, 4H), 4.14(s, 4H).

N,N-Succinyl bis(4-glycyl aminoantipyrine) (7)의 합성 – 화합물 3 0.48 g (2.00 mmol)과 N-hydroxysuccinimide (SuOH) 0.49 g (4.24 mmol)을 DMF (80 mL)에 용해한 후, dicyclohexyl carbodiimide (DCC) 0.87 g (4.24 mmol)을 가하고 실온에서 24시간 반응시켰다. 부생된 dicyclohexylurea (DCU) 침전을 여과하여 제거한 후, 4-aminoantipyrine 0.89 g (4.40 mmol)을 가하고 실온에서 24시간 교반하여 반응시켰다. 반응액을 ethyl acetate로 추출한 후, 유기층을 물로 세척하고 Na₂SO₄로 건조하며 silica gel column으로 정제하여 결정성 분말 0.37 g을 얻었다.

Yield: 31%; mp: 225~227°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1625, 1580, 1440; Rf=0.49 (Acetone : CHCl₃=3:7); ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.69 (s, 6H), 2.40(s, 4H), 2.48(s, 6H), 3.78(s, 4H), 6.89~7.55(m, 10H).

N,N-Succinyl bis(4-glycylglycyl aminoantipyrine) (8)의 합성 – 화합물 4 1.38 g (4.00 mmol), SuOH 0.97 g (8.48 mmol), DCC 1.75 g (8.48 mmol) 및 4-aminoantipyrine 1.79 g (8.80 mmol)을 원료로 하여 화합물 7을 합성한 방법으로 결정성 분말 0.44 g을 얻었다.

Yield: 16%; mp: 224~226°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1630, 1580, 1450; Rf=0.54 (acetone : CHCl₃=3:7); ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.70 (s, 6H), 2.43(s, 4H), 2.49(s, 6H), 4.03(s, 4H), 4.34(s, 4H),

6.89~7.35(m, 10H).

Acetoglycine (9)의 합성 – Glycine 3.00 g (40.00 mmol)과 Ac₂O 4.48 g (44.00 mmol)을 원료로 하여 화합물 3을 합성한 방법으로 반응시킨 후, 생성된 침전을 ethanol로 재결정하여 결정성 분말 3.40 g을 얻었다.

Yield: 72%; mp: 192~194°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1720, 1630, 1560; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 2.01(s, 3H), 4.23(s, 2H).

Acetoglycyl glycine (10)의 합성 – Glycylglycine 2.64 g (20.00 mmol)을 사용하여 화합물 9과 동일한 방법으로 결정성 분말 1.50 g을 얻었다.

Yield: 43%; mp: 166~168°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1720, 1660, 1650; Rf=0.67 (EtOH : EtOAC : H₂O : HOAc=2:2:1:1); ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.02(s, 3H), 3.79(s, 2H), 4.27(s, 2H).

4-Acetoglycyl aminoantipyrine (13)의 합성 – 화합물 9 0.71 g (6.00 mmol), SuOH 0.76 g (6.40 mmol), DCC 1.32 g (6.40 mmol) 및 4-aminoantipyrine 1.21 g (6.00 mmol)을 원료로 하여 화합물 7를 합성한 방법으로 결정성 분말 0.33 g을 얻었다.

Yield: 18%; mp: 222~224°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1625, 1580, 1540, 1450; Rf=0.51 (EtOH : EtOAC : H₂O : NH₃=2:2:1:1); ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.72(s, 3H), 2.11(s, 3H), 2.45(s, 3H), 3.89(s, 2H), 6.95~7.45(m, 5H).

4-Acetoglycylglycyl aminoantipyrine (14)의 합성 – 화합물 10 1.04 g (6.00 mmol)을 사용하여 화합물 13을 합성한 방법으로 결정성 분말 0.54 g을 얻었다.

Yield: 24%; mp: 244~246°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3310, 1670, 1630, 1550, 1460; Rf=0.53 (EtOH : EtOAC : H₂O : NH₃=3:3:1:1); ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.73(s, 3H), 2.05(s, 3H), 2.52(s, 3H), 3.84(s, 2H), 4.35(s, 2H), 6.75~7.55(m, 5H).

N,N-Succinyl bis(4-aminoantipyrine) (15)의 합성 – 4-Aminoantipyrine 6.70 g (33.00 mmol)을 사용하여 화합물 3과 동일한 방법으로 합성하고 silica gel column으로 정제하여 결정성 분말 0.98 g을 얻었다.

Yield: 27%; mp: 191~193°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3290, 1680, 1620, 1580, 1460; Rf=0.53 (EtOH : EtOAC : H₂O : NH₃=2:2:1:1); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.10(s, 6H), 2.51(s, 4H), 3.03(s, 6H), 7.03~7.65 (m, 10H).

4-Acetyl aminoantipyrine (16)의 합성 – 4-Aminoantipyrine 2.03 g (10.00 mmol)과 Ac₂O 4.48 g (44.00 mmol)을 실온에서 반응시킨 후, 물을 넣어 허석시켜서 생성된 침전을 ethanol로 재결정하여 결정성 분말 1.05 g을 얻었다.

Yield: 43%; mp: 184~186°C; IR(KBr) cm⁻¹: 3320, 1660, 1635, 1550, 1460; Rf=0.68 (EtOH : EtOAC : H₂O : NH₃=2:2:1:1); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.98(s, 3H), 2.11(s, 3H), 3.02(s, 3H), 7.23~7.76

(m, 5H).

결과 및 고찰

동물 실험

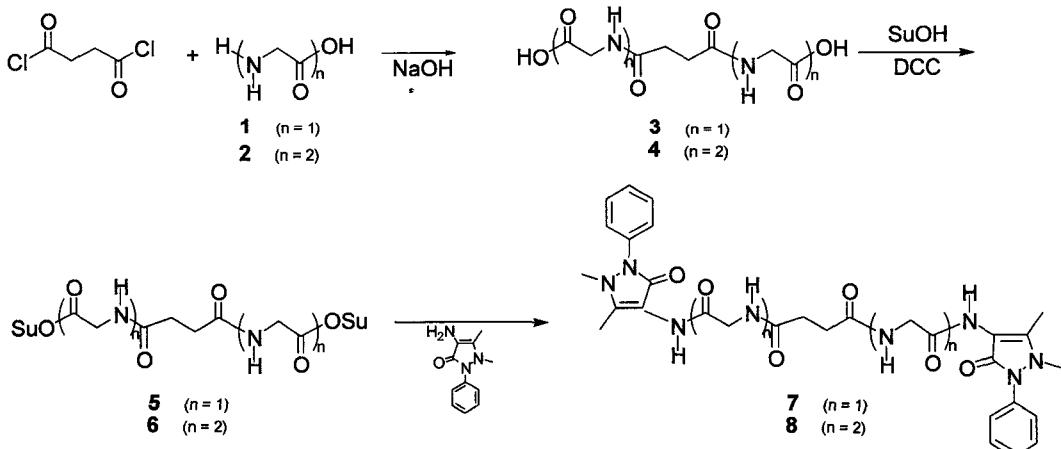
Carageenin 부종 실험 – 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 6마리 (90-135 g)를 한 군으로 하여 Winter¹²⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 오른쪽 뒷 발바닥 피하에 기엽제로 1% carageenin 생리식염액 0.1 mL를 주사한 후, 발 부피를 5시간동안 1시간 간격으로 plethysmometer를 사용하여 측정하였다. 검체와 대조약물은 10% Tween 80 용액에 혼탁하여 사용하였고, carageenin 주사 한 시간 전에 경구로 100 mg/kg을 투여하였다.

진통 실험 – 수컷 생쥐 6마리(13-18 g)를 한 군으로 하여 Koster¹³⁾의 방법에 따라 모든 검체와 대조약물을 100 mg/kg 경구 투여하고 30분 후, 0.7% acetic acid 0.1 mL/10g을 복강내 주사하여 10분 후부터 5분간 writhing 발생 수를 측정하였다.

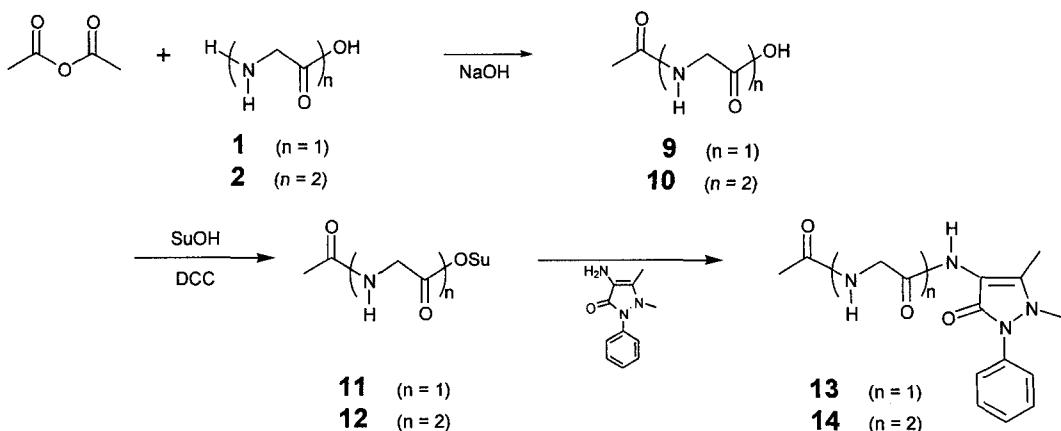
통계 – 실험 결과는 Student's *t*-test를 실시하여 *p*값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판단하였고, *P*<0.05와 *P*<0.01로 구별하여 나타내었다.

합성

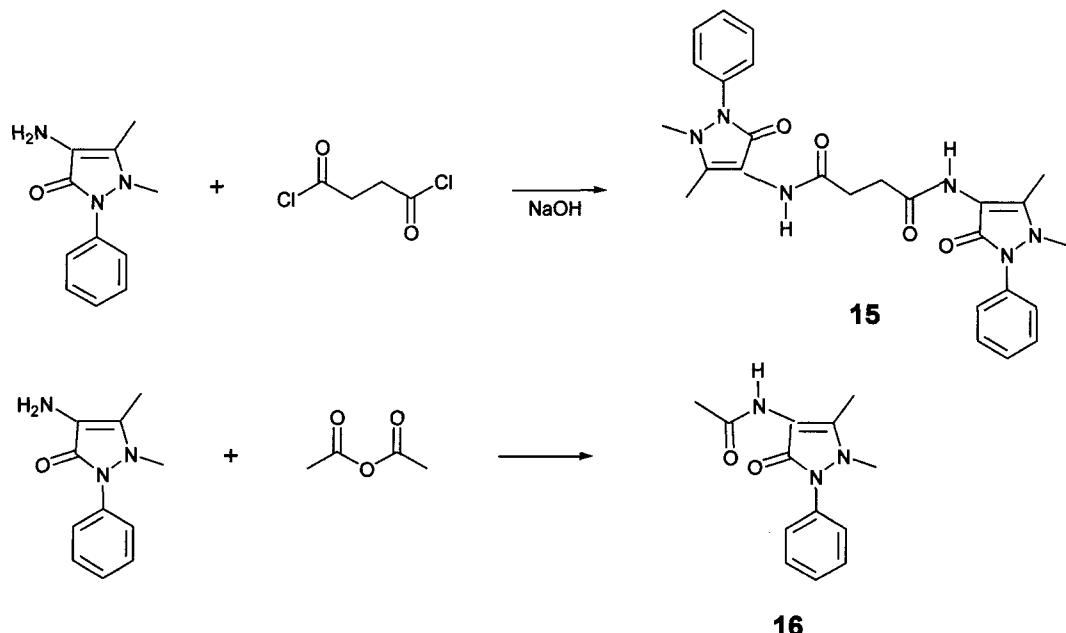
Glycine 또는 glycylglycine을 succinyl chloride로 처리하여 succinyl glycine 유도체 (3-4)를 만든 후, *N*-hydroxysuccinimide 및 dicyclohexyl carbodiimide와 반응시켜서 active ester화합물 (5-6)을 얻었고, 4-aminoantipyrine과 반응하여 bivalent ligand 화합물인 glycyl aminoantipyrine 유도체 (7-8)를 합성하였다 (Scheme 1). IR 스펙트럼에서 amide 형성에 의한 carbonyl기의 강한 흡수대가 1650 cm⁻¹부근에서 나타났고, ¹H-NMR 스펙트럼의 경우 1.70 ppm 근처에서 CH₃의 singlet 피크가 나타났고, 2.49 ppm 근처에서 NCH₃의 singlet 피크를 보여주었고, 2.42 ppm 근처에서 succinyl의 피크를 확인할 수 있었다. 비슷한 방법으로 Ac₂O를 사용하여 monovalent ligand 화합물인 acetoglycyl aminoantipyrine 유도체 (13-14)를 합성하였다 (Scheme 2). IR 스펙트럼에서 amide carbonyl기의 강한 흡수대가 1650 cm⁻¹부근에서 나타났고, ¹H-NMR 스펙트럼의 경우 2.08 ppm 근처에서



Scheme 1 – Synthesis of succinyl aminoantipyrines.

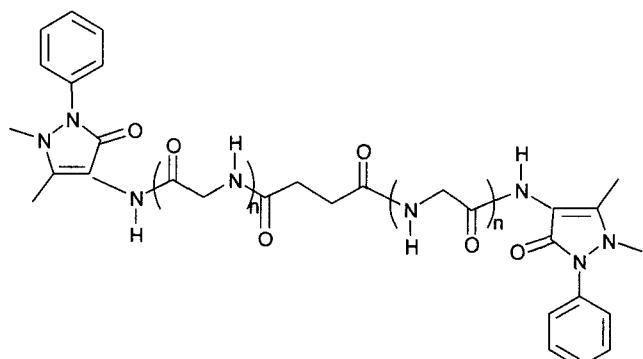


Scheme 2. Synthesis of 4-acetoglycyl aminoantipyrines.



Scheme 3 – Synthesis of aminoantipyrine derivatives.

Table I – Effect of the synthesized compounds on carrageenin-induced paw edema in rats.



Group	n	Swelling percentage (%) ^{a)}				
		1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
15	0	24.00 ± 3.12**	44.98 ± 10.17	49.79 ± 9.84	56.33 ± 5.89	64.94 ± 6.94
7	1	17.70 ± 2.83**	44.98 ± 2.90	50.53 ± 5.43*	47.27 ± 9.78*	37.67 ± 8.55
8	2	14.17 ± 2.00**	35.60 ± 6.20**	53.23 ± 5.19	46.15 ± 5.50**	45.58 ± 3.81
Control		37.55 ± 1.38	48.45 ± 3.38	70.77 ± 7.19	74.30 ± 6.07	74.27 ± 8.45
Antipyrine		19.28 ± 2.86**	32.40 ± 7.07	48.45 ± 10.18	53.10 ± 10.09	47.58 ± 10.49

Compounds were administered orally 100 mg/kg.

The number of animals in each group was 6.

^{a)}Each value represents the mean ± S.E. of the number of experiments.

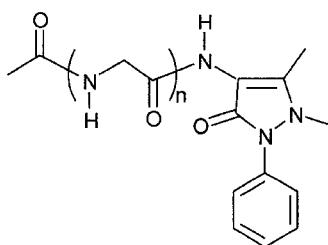
*P<0.05, **P<0.01, significantly different from control.

acetyl기의 CH₃ singlet 피이크가 나타났고, 2.48 ppm 근처에서 NCH₃의 singlet 피이크를 보여주었고, 3.87 ppm 근처에서 glycyl 기의 CH₂ 피이크를 확인할 수 있었다. 4-Aminoantipyrine을 각각 succinyl chloride 및 Ac₂O와 반응하여 N,N-succinyl bis(4-aminoantipyrine) (**15**)와 4-acetyl aminoantipyrine (**16**)을 합성

하였다(Scheme 3).

항염 효과 – 합성한 화합물 6종 (**7-8, 13-16**)에 대하여 각각 100 mg/kg 용량으로 carrageenin 부종실험을 실시하였다(Table I, II). 화합물 **7, 8** 및 **13**은 carrageenin 투여 후 1, 4, 5 시간에 각각 52.9%(P<0.01), 36.4%(P<0.05), 49.3% 와 62.3%(P<0.01),

Table II – Effect of the synthesized compounds on carrageenin-induced paw edema in rats.



Group	n	Swelling percentage (%) ^{a)}				
		1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
16	0	30.87 ± 4.92	47.15 ± 3.89	66.00 ± 2.56	64.33 ± 3.92	63.67 ± 3.45
13	1	17.05 ± 6.11**	41.75 ± 11.58	49.45 ± 10.57	50.33 ± 7.98**	44.09 ± 7.71*
14	2	30.16 ± 4.83	48.13 ± 6.25	61.63 ± 10.78	73.55 ± 9.79	72.83 ± 7.37
Control		37.55 ± 1.38	48.45 ± 3.38	70.77 ± 7.19	74.30 ± 6.07	74.27 ± 8.45
Antipyrine		19.28 ± 2.86**	32.40 ± 7.07	48.45 ± 10.18	53.10 ± 10.09	47.58 ± 10.49

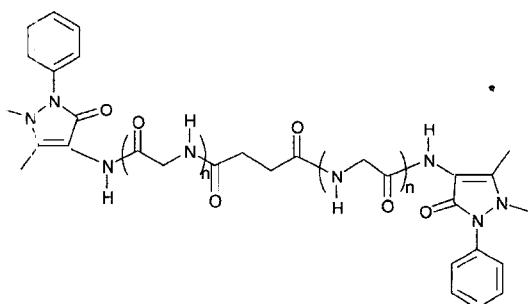
Compounds were administered orally 100 mg/kg.

The number of animals in each group was 6.

^{a)}Each value represents the mean ± S.E. of the number of experiments.

*P<0.05, **P<0.01, significantly different from control.

Table III – Effect of the synthesized compounds on acetic acid-induced writhing syndrome in mice



Group	n	No. of writhing ^{a)} (times/5 min)	Inhibition rate (%)
15	0	11.3 ± 2.6*	43.5
7	1	14.0 ± 3.0	30.0
8	2	9.0 ± 3.4*	55.0
Control		20.0 ± 1.4	-
Antipyrine		5.8 ± 1.8**	71.0

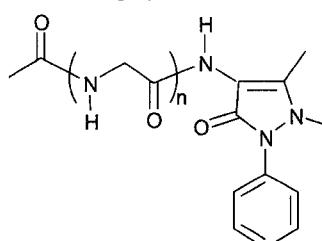
The number of animals in each group was 6.

^{a)}Each value represents the mean ± S.E. of the number of experiments.

*P<0.05, **P<0.01, significantly different from control.

37.9% (P<0.01), 38.2% 및 54.6% (P<0.01), 32.0% (P<0.01), 40.6% (P<0.05)의 부종 억제율을 보여주어 대조 약물인 antipyrine 보다 우수한 항염 활성을 보여주었으나 2, 3시간에서의 부종 억제율은 대조약물보다 약간 낮은 항염 활성을 보여주었다. 나머지 합성 화합물은 대조약물보다 약한 부종억제 효과를 나타내었다. ○ 실험에서 대조약물인 antipyrine 100 mg/kg 투여 군은 carrageenin 투여 후, 1, 2, 3, 4, 5시간에 각각 48.7% (P<0.01),

Table IV – Effect of the synthesized compounds on acetic acid-induced writhing syndrome in mice



Group	n	No. of writhing ^{a)} (times/5 min)	Inhibition rate (%)
16	0	7.3 ± 4.3*	63.5
13	1	10.0 ± 3.6*	50.0
14	2	12.2 ± 3.0*	39.0
Control		20.0 ± 1.4	-
Antipyrine		5.8 ± 1.8**	71.0

The number of animals in each group was 6.

^{a)}Each value represents the mean ± S.E. of the number of experiments.

*P<0.05, **P<0.01, significantly different from control.

33.1%, 31.5%, 28.5%, 35.9%의 부종 억제율을 보여주었다.

진통효과 – Acetic acid를 복강에 투여하여 유발된 writhing 증상에 대한 합성화합물 6종(7-8, 13-16)의 진통효과 실험을 실시하였다(Table III, IV). 화합물 8과 (16)는 각각 55.0%와 63.5%의 writhing 억제효과를 나타내어 대조 약물인 antipyrine에 근접한 진통효과를 보여주었으나, 화합물 7, 13, 14, 15는 30.0%, 50.0%, 39.0%, 43.5%의 writhing 억제효과를 나타내어 대조약물 보다 약한 진통효과를 보여주었다. 대조약물인 antipyrine의

writhing 억제효과는 71.0%이었다.

결 론

Succinyl chloride와 Ac₂O를 glycine과 반응하여 glycine유도체를 만들고, N-hydroxysuccinimide와 dicyclohexyl carbodiimide으로 처리하여 active ester화합물을 얻은 후, 4-aminoantipyrine과 반응하여 antipyrine의 amide화합물 6종을 합성하였다. 합성화합물의 carrageenin 족부종에 대한 항염실험에서 화합물 7, 8, 13은 antipyrine보다 우수하거나 유사한 항염효과를 보여주었으나 다른 화합물들은 낮은 항염활성을 나타내었다. 진통효과에 대한 실험에서 화합물 8과 16은 대조 약물인 antipyrine에 근접한 진통효과를 보여주었으나, 다른 화합물들은 antipyrine보다 낮은 진통활성을 나타내었다. 일반적으로 bivalent ligand 화합물(7-8, 15)이 항염실험에서 monovalent ligand 화합물(13-14, 16)보다 약간 우수하였고, pharmacophore인 antipyrine보다 약간 우수하거나 유사한 항염활성을 나타내었다.

문 헌

- 1) Buchanan, W. W. and Kean, W. F. : Current Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Therapy in Rheumatoid Arthritis, with Emphasis on Use in the Elderly, *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*, Marcel Dekker, 9 (1987).
- 2) Rang, H. P., Dale, M. M. and Ritter, J. M. : *Pharmacology*, Churchill living-stone 3rd ed., 251 (1996).
- 3) Lombardino, J. G. : *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*, John Wiley & Sons, New York, 1st ed. (1985).
- 4) Burdulene, D., Palaima, A., Stumbryavichyute, Z. and Talaikite, Z. : Synthesis and antiinflammatory activity of 4-aminoantipyrine derivatives of succinamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 33(4), 191 (2000).
- 5) Baraka, Y. M. and Bekemeier, H. : Antiinflammatory activity of 4-anisylidino(aminoantipyrine) in the carrageenin paw edema of the rat. *J. Drug Res.* 9(2), 183 (1977).
- 6) Sondhi, S. M., Sharma, V. K., Verma, R. P., Singhal, N., Shukla, R., Raghbir, R., Dubey, M. P. : Synthesis, anti-inflammatory, and analgesic activity evaluation of some mercapto pyrimidine and pyrimidobenzimidazole derivatives. *Synthesis* 5, 878 (1999).
- 7) Hammouda, M. : Synthesis of some new 4-substituted antipyrrines as potential antipyretic analgesics. *Arch. Pharmacal Res.* 15(1), 1 (1992).
- 8) Khamees, H. A., Bayomi, S. M., Kandil, H. A. and Tahir, K. E.: Synthesis and pharmacological screening of a new series of 3-(4-antipyril)-2-arylthiazolidin-4-ones. *Eur. J. Med. Chem.* 25(2), 103 (1990).
- 9) Fujimoto, Yasuo.: 4-Pyridoxylideneaminoantipyrine. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 49024972 19740305 Showa. (1974).
- 10) Portoghesi, P. S., Larson, D. L., Yim, C. B., Sayre, L. M., Ronsisvall, G., Tam, S. W. and Takemori, A. Z. : Opioid agonist and antagonist bivalent ligands. The relationship between spacer length and selectivity at multiple opioid receptors. *J. Med. Chem.* 29, 1885 (1986).
- 11) Erez, M., Takemori, A. E. and Portoghesi: Narcotic antagonistic potency of bivalent ligands which contain beta-naltrexamine. Evidence for bridging between proximal recognition sites. *J. Med. Chem.* 25, 847 (1982).
- 12) Winter, C. A., Riskey, E. A. and Nuss, G. W. : Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Med.* 111, 544 (1962).
- 13) Koster, R., Anderson, M. and De Beer, E. J.: Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18, 412 (1985).