薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (4) 395-399 (1982)

酸素存在下におけるテオフィリン水溶液中での脂肪族ジアミンの光安定性

石黒義信,* 沢田 勝, 星田晴彦, 河部 靖

エーザイ株式会社分析研究所

Photo-stability of Aliphatic Diamines in Aqueous Theophylline Solutions under Oxygen

YOSHINOBU ISHIGURO,* MASARU SAWADA, HARUHIKO HOSHIDA and KIYOSHI KAWABE

Analytical Research Laboratory, Eisai Co., Ltd., Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo

(Received December 5, 1981)

The photo-stability and the structures of photo-oxidation products of ethylenediamine and propylenediamine in aqueous solutions with or without theophylline were investigated.

Formaldehyde formed from ethylenediamine and propylenediamine, and acetaldehyde from propylenediamine were characterized as 2,4-dinitrophenylhydrazones.

Glyoxal formed from ethylenediamine was characterized as glyoxime.

It was found that photodegradation of ethylenediamine and propylenediamine was more rapid in aqueous solutions than in aqueous theophylline solutions.

Keywords—ethylenediamine; propylenediamine; 2,4-dinitrophenylhydrazone; formaldehyde; acetaldehyde; glyoxal; glyoxime; photo-stability; photo-oxidation

著者らは先に¹⁾種々のアミン水溶液におけるテオフィリンの光安定性について検討し、テオフィリンはエチレンジアミンおよびプロピレンジアミン共存の場合、分解が著しいことを報告した。

そこで今回はエチレンジアミンテオフィリン (アミノフィリン) およびプロピレンジアミンテオフィリン水溶液さらに、テオフィリンを含まないエチレンジアミン、プロピレンジアミン水溶液中でのジアミンの光安定性について検討を加えた。

酸素存在下で光照射により、ジアミンから生じたモノカルボニル化合物は 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (2,4-DNPH) 誘導体として、またジカルボニル化合物はオキシム誘導体として単離確認することが出来た。

実 験 の 部

試料および試薬 エチレンジアミンおよびプロピレンジアミンは市販品を蒸留精製して使用した。9,10-Phenanthraquinone は市販品をクロロホルムに溶かし、フロリジル® のカラムで精製して使用した。局方アミノフィリンはエーザイ K.K. 製を使用した。テオフィリン、塩酸ヒドロキシルアミン、酢酸ナトリウム(無水)、ホルマリン、アセトアルデヒドおよび 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンは市販特級品を使用した。グリオキザールは市販の 40% 水溶液をそのまま使用した。グリオキシムの標品として市販品をエタノールより再結晶したものを使用した。ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの 2,4-DNPH の標品は衛生試験法²⁾ にしたがって調製した。

HPLC 装置 UV 254 nm 検出器付島津デュポン高速液体クロマトグラフ LC-2F 型を使用した。

光照射方法 試料液 100 ml 中にジアミン 0.5 mmol, テオフィリン 1 mmol を含むようにエチレンジアミン水溶液 (pH 9.60), プロピレンジアミン水溶液 (pH 10.04), アミノフィリン水溶液 (pH 8.69) およびプロピレンジアミンテオフィリン水溶液 (pH 8.75) を調製し、その 1.5 ml を内容積 4.8 ml の石英セルに分注し酸素置換後密栓し、殺菌灯 (波長 253.7 nm, 15 W×2, ナショナル製, 高さ 20 cm) を用い 25±2°C で光照射を行った。

エチレンジアミン, プロピレンジアミンの定量 著者³⁾らの報告した定量法に準じて行った。

光分解生成物 I, II の単離 石英容器に入れ酸素置換後、殺菌灯下に 1 ヶ月間放置しておいたプロピレンジアミン水溶液 (0.3 mmol/ml) の 300 ml に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの 2N 塩酸飽和溶液 50 ml を加え、

氷浴中に1時間放置後析出する黄橙色結晶を濾取し、薄層クロマトグラフィー (TLC) 剥離法により精製し光分解生成物 I および II の 2,4-DNPH 誘導体をそれぞれ 159 mg, 166 mg 得た。

プロピレンジアミンテオフィリン水溶液 (プロピレンジアミン 0.3 mmol/ml, テオフィリン 0.6 mmol/ml) の 300 ml についても同様に処理し、光分解生成物 I および II の 2,4-DNPH 誘導体をそれぞれ 86 mg, 65 mg 得た。

またエチレンジアミン水溶液 (0.3 mmol/ml) およびアミノフィリン水溶液 (エチレンジアミン 0.3 mmol/ml, テオフィリン 0.6 mmol/ml) の 300 ml についても同様に処理し、光分解生成物 I の 2,4-DNPH 誘導体をそれぞれ 208 mg, 50 mg 得た。

光分解生成物 III の単離 光分解生成物 I, II の検索に用いた試料液について光分解生成物 III の単離を試みた。光照射したエチレンジアミン水溶液の 50 ml に酢酸ナトリウム (無水) 1.1 g, 塩酸ヒドロキシルアミン 1.0 g を加えて沸騰水浴上で1時間加熱反応させた。その後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣にエタノール 25 ml を加えて溶かし、冷後析出する結晶を濾別し濾液を減圧濃縮し、得られた残渣を TLC 剥離法により精製し光分解生成物 III のオキシム誘導体を 50 mg 得た。またアミノフィリン水溶液についても同様に処理し光分解生成物 III のオキシム誘導体を 18 mg 得た。

結果および考察

1. 光分解生成物の検索

1) **2,4-DNPH 誘導体による分離** 光照射した4種の試料液中にカルボニル化合物が生成しているか否か調べるため、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加え 2,4-DNPH 誘導体に導いた。それぞれの反応物につき山中⁴⁾の分離条件により TLC を行い、Fig. 1 のようなクロマトグラムを得た。

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of the 2,4-Dinitrophenylhydrazone of Carbonyl Compounds in Photo-irradiated Diamine Solutions

Conditions
Plate : Silicagel F₂₅₄ (Merck precoated).
Solvent: petroleum ether-ethyl ether=4:1
1; authentic sample of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds,
2; ethylenediamine solution,
3; aminophylline solution,
4; propylenediamine solution,
5; propylenediamine theophylline solution,
a; formaldehyde, b; acetaldehyde, c; photo-decomposition product I, d; photo-decomposition product II.

Fig. 2. HPLC of the 2,4-Dinitrophenylhydrazone of Carbonyl Compounds in Photo-irradiated Propylenediamine Solutions

Conditions
Column ; Nucleosil® 10 C₁₈ (4.6 mm i.d. × 25 cm)
Mobile phase ; CH₃OH-H₂O=7:3
Flow rate ; 1.0 ml/min.
Detector ; UV₂₅₄ nm.
1; formaldehyde, 2; acetaldehyde, 3; photo-decomposition product I, 4; photo-decomposition product II, 5; theophylline.
(A) authentic sample of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds,
(B) propylenediamine solution,
(C) propylenediamine theophylline solution.

またプロピレンジアミン水溶液、プロピレンジアミンテオフィリン水溶液での 2,4-DNPH 誘導体について Vigh ら⁵⁾ の分離条件で逆相液体クロマトグラフィーを行い、Fig. 2 に示すような結果を得た。

光分解生成物 I の 2,4-DNPH 誘導体は 4 種の試料液に含まれ、ホルムアルデヒド-2,4-DNPH の標品と *R_f* 値, retention time が一致した。TLC 剥離精製法により光分解生成物 I の 2,4-DNPH を単離した。

光分解生成物 I の 2,4-DNPH はマスペクトルにおいて分子イオンピーク (M^+) を 210 に示し、その開裂パターンは Stanley ら⁶⁾ のホルムアルデヒド-2,4-DNPH のスペクトルデータと一致し、赤外線吸収 (IR) スペクトルは Ross⁷⁾ のホルムアルデヒド-2,4-DNPH のスペクトルデータと一致した。NMR スペクトル ($CDCl_3$) において、 δ 6.72 (1H, d, $J=11$ Hz, $-N=C\langle\begin{smallmatrix} H \\ H \end{smallmatrix}\rangle$), δ 7.10 (1H, dd, $J=0.8$ and 11 Hz, $-N=C\langle\begin{smallmatrix} H \\ H \end{smallmatrix}\rangle$), δ 7.94 (1H, d, $J=10$ Hz, C_6 -proton), δ 8.34 (1H, ddd, $J=0.8$ and 2.5 and 10 Hz, C_5 -proton), δ 9.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, C_3 -proton) の各シグナルを示した。また Table I に示したように元素分析値は分子式 $C_7H_6N_4O_4$ を支持することから光分解生成物 I の 2,4-DNPH はホルムアルデヒド-2,4-DNPH と考えられる。

光分解生成物 II の 2,4-DNPH はプロピレンジアミン水溶液、プロピレンジアミンテオフィリン水溶液に含まれ、アセトアルデヒド-2,4-DNPH の標品と *R_f* 値, retention time が一致した。TLC 剥離精製法により光分解生成物 II の 2,4-DNPH を単離した。

光分解生成物 II の 2,4-DNPH はマスペクトルにおいて分子イオンピーク (M^+) を 224 に示し、その開裂パターンは Stanley ら⁶⁾ のアセトアルデヒド-2,4-DNPH のスペクトルデータと一致し、IR スペクトルも Ross⁷⁾ のそれと一致した。NMR スペクトル ($CDCl_3$) において、 δ 2.13 (3H, d, $J=6$ Hz, $C-CH_3$), δ 7.54 (1H, q, $J=6$ Hz, $N=CH$), δ 7.88 (1H, d, $J=10$ Hz, C_6 -proton), δ 8.25 (1H, dd, $J=2.5$ and 10 Hz, C_5 -proton), δ 9.06 (1H, d, $J=2.5$ Hz, C_3 -proton) の各シグナルを示した。また Table I に示したように元素分析値は分子式 $C_8H_8N_4O_4$ を支持することから光分解生成物 II の 2,4-DNPH はアセトアルデヒド-2,4-DNPH と考えられる。

2) オキシム誘導体による分離 ジカルボニル化合物の 2,4-DNPH 誘導体は分子量が大きくなり可溶性溶媒もきわめて少なくその取扱いが不便である。そこで光照射した試料液中のジカルボニル化合物をオキシム誘導体として単離することを試みた。それぞれの反応物につき TLC を行い、Fig. 3 のようなクロマトグラムを得た。

また、エチレンジアミンおよびアミノフィリン水溶液でのオキシム誘導体について逆相液体クロマトグラフィーを行い、Fig. 4 に示すような結果を得た。

光分解生成物 III のオキシム誘導体はエチレンジアミンおよびアミノフィリン水溶液で検出され、グリオキサールのオキシム誘導体であるグリオキシムの標品と *R_f* 値, retention time が一致した。TLC 剥離精製法により光分解生成物 III のオキシム誘導体を単離した。

光分解生成物 III のオキシム誘導体はマスペクトルにおいて分子イオンピーク (M^+) を 88 に示し、NMR スペクトル ($DMSO-d_6$) において、 δ 7.68 (2H, s, $=CH-CH=$), δ 11.95 (2H, br s, $2\times OH$) の各シグナルを示し

TABLE I. Physical Properties of Photo-decomposition Products

Photo-decomposition product No.	Appearance	mp (°C) ^{a)}	Formula	Analysis (%)		
				Calcd	Found	
				C	H	N
2,4-DNPH ^{b)} of I	Yellow needles	166—167	$C_7H_6N_4O_4$	40.01 (40.26)	2.88 2.85	26.66 26.41
2,4-DNPH ^{b)} of II	Yellow needles	165—166	$C_8H_8N_4O_4$	42.86 (42.81)	3.57 3.41	25.00 25.07
Oxime derivative of III	Gray powder	169—171	$C_2H_4N_2O_2$	27.27 (27.33)	4.54 4.39	31.82 31.68

a) All melting points are uncorrected.

b) 2,4-DNPH=2,4-dinitrophenylhydrazone.

Fig. 3. Thin-Layer Chromatogram of the Reaction Products obtained from Hydroxylamine and Dicarboxyl Compound in Photo-irradiated Diamine Solutions

Conditions

Plate ; Silicagel F₂₅₄ (Merck precoated).

Solvent ; CHCl₃·CH₃OH=4:1

Indicator; UV Lamp.

1; glyoxime, 2; ethylenediamine solution,

3; aminophylline solution, 4; propylenediamine solution,

5; propylenediamine theophylline solution, a; theophylline, b;

photo-decomposition product III.

Fig. 4. HPLC of the Oxime Derivative of Dicarboxyl Compound in Photo-irradiated Ethylenediamine Solution and Aminophylline Solution

Conditions

Column ; Nucleosil® 10 C₁₈ (4.6 mm i.d. × 25 cm).

Mobile phase; CH₃OH·H₂O=95:5.

Flow rate ; 1.0 ml/min.

Detector ; UV₂₅₄ nm.

1. photo-decomposition product III. 2. theophylline.

(A) glyoxime, (B) ethylenediamine solution, (C) aminophylline solution.

た。また Table I に示したように元素分析値は分子式 C₂H₄N₂O₂ を支持することから光分解生成物 III のオキシム誘導体はグリオキシムと考えられる。

なお 1 ヶ月間、光照射したエチレンジアミン水溶液でのホルムアルデヒドとグリオキザールとの生成モル比は 1:7 であったが光照射時間が短い場合にはグリオキザールの比率が高く、長い場合にはホルムアルデヒドの比率が高くなる傾向が見られた。プロピレンジアミン水溶液でのホルムアルデヒドとアセトアルデヒドとの生成モル比は 1:1 で、光照射時間による影響はほとんど見られなかった。

以上の結果から Chart 1 に示すようなジアミンの分解機構が示唆される。

エチレンジアミンおよびアミノフィリン水溶液ではエチレンジアミンの脱アミノと酸化によりグリオキザールが生成し、さらにこの一部が分解してホルムアルデヒドが生成したと考えられる。

また、プロピレンジアミンとプロピレンジアミンテオフィリン水溶液ではプロピレンジアミンの C₁ と C₂ の

a: photo-decomposition product I.

b: photo-decomposition product II.

c: photo-decomposition product III.

Chart 1

間での酸化開裂と脱アミノによりホルムアルデヒドとアセトアルデヒドが生成したと考えられる。

2. 酸素存在下におけるジアミン水溶液の光安定性

4種の試料液でのジアミンの光安定性を検討し Fig. 5 に示すような結果を得た。

光照射時間とジアミンの残存率の対数との間には直線関係が成立したことより、酸素存在下におけるジアミンの光分解反応は擬一次反応にしたがって進行するものと考えられる。エチレンジアミン、アミノフィリン、プロピレンジアミンの水溶液およびプロピレンジアミンテオフィリン水溶液でのジアミンの分解の $k_{obs.}$ (h^{-1}) はそれぞれ 1.76×10^{-2} , 4.51×10^{-3} , 3.12×10^{-2} , 2.38×10^{-3} となり、エチレンジアミン、プロピレンジアミンともテオフィリンが共存する場合より単独の水溶液の方がはるかに分解しやすいことが分かった。ジアミン (DA) の光酸素酸化反応は (1) 式のように、 $DA \cdots O_2$ で示される基底状態の弱い CT complex を経由して進むものと想像される。⁸⁾

テオフィリン (TP) が共存する場合はジアミンの分解速度が下る。これに対する可能な説明として、主照射光である 253.7 nm の光を吸収するテオフィリンのフィルター効果によるか、あるいは TP の励起状態からの酸素酸化分解 ((2) 式) が (1) 式と競争的に起こるためと考えられる。

謝辞 本研究に際し、種々御助言を賜った京都大学工学部合成化学教室教授 松浦輝男博士に深謝致します。また御協力頂いたエーザイ株式会社・製薬研究所町田善正博士ならびに里 忠機器分析室長をはじめ室員諸氏に感謝致します。

引用文献および注

- 1) 石黒義信, 沢田 勝, 楠部健一, 河部 靖, 薬誌, **101**, 1159 (1981).
- 2) “衛生試験法・注解,” 日本薬学会編, 金原出版, 東京・大阪・京都, 1980, p.1102.
- 3) 石黒義信, 田部井智三, 沢田 勝, 田中安子, 河部 靖, 薬誌, **100**, 576 (1980).
- 4) 山中英明, 塩見一雄, 宮原むつ子, 菊池武昭, 食衛誌, **20**, 270 (1979).
- 5) Gy. Vigh, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, M. Petró-Turcza, I. Szárföldi-Szalma, *J. Chromatogr.*, **193**, 432 (1980).
- 6) James B. Stanley, David F. Brown, Vincent J. Senn, F.G. Dollear, *J. Food Sci.*, **40**, 1134 (1975).
- 7) J.H. Ross, *Anal. Chem.* **25**, 1288 (1953).
- 8) a) H. Tsubomura, T. Yagishita, H. Toi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 3051 (1973); b) N. Kulevsky, Chien-hua Niu, V.I. Stenberg, *J. Org. Chem.*, **38**, 1154 (1973).

Fig. 5. Photo-degradation of Diamines in Aqueous Solutions and in Aqueous Theophylline Solutions under Germicidal Lamp

○—○—; ethylenediamine in aqueous solution,
●—●—; ethylenediamine in aqueous theophylline solution
□—□—; propylenediamine in aqueous solution,
■—■—; propylenediamine in aqueous theophylline solution.