

[薬学雑誌  
YAKUGAKU ZASSHI  
113 (7) 515-524 (1993)]

### アラントインの安定性とその分解生成物の同定

山本信也,<sup>\*,a</sup> 大友三男,<sup>b</sup> 小松一男,<sup>a</sup> 高松 翼,<sup>a</sup> 松岡昌弘<sup>a</sup>  
(株)資生堂研究開発本部安全性・分析センター分析研究グループ,<sup>a</sup>  
(株)資生堂掛川工場技術部 QA グループ<sup>b</sup>

### Stability of Allantoin and Identification of Its Degradation Compounds

Shinya YAMAMOTO,<sup>\*,a</sup> Mitsuo OHTOMO,<sup>b</sup> Kazuo KOMATSU,<sup>a</sup>  
Tasuku TAKAMATSU,<sup>a</sup> and Masahiro MATSUOKA<sup>a</sup>

*Analytical Research Group, Safety and Analytical Research  
Center, Shiseido Research and Development Headquarters,<sup>a</sup>  
1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223, Japan and  
QA Group, Technical Division, Shiseido Kakegawa  
Factory,<sup>b</sup> 1120 Nagaya, Kakegawa 436, Japan*

(Received February 1, 1993)

The stability of allantoin was studied in pH 3.0, 6.0, and 8.0 buffer solutions at 50°C for 55 d. Allantoin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a cation exchange mode and colorimetry. The known degradation compounds, allantoic acid and glyoxylic acid, were simultaneously determined by ion chromatography. Urea was determined by HPLC with an ion pair mode.

In the stability studies on pH 6.0 and 8.0 solutions, new degradation compounds of allantoin were identified as two growing unknown peaks in the HPLC chromatogram. Isolation of these compounds by preparative HPLC and <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C-NMR spectra revealed that they were condensates of allantoin and glyoxylic acid, which also reacted positively in phenylhydrazine colorimetry. The amounts of these compounds were calculated from the determination results of other allantoin related compounds in the buffer solutions and were estimated as the biggest amount among all other compound. As they were found to be stable in an alkaline solution, conditions for hydrolysis in the colorimetric determination of allantoin were further examined. It was found that the longer hydrolysis gave more than 90% recovery in the colorimetry.

**Keywords**—allantoin; degradation; glyoxylic acid; HPLC

### 緒 言

アラントインは抗炎症作用や細胞賦活作用を有するために皮膚外用剤や点眼剤等の処方に幅広く用いられている。しかしながら、製剤処方によってはアラントイン含量は低下することが以前から指摘され、実際、化粧品や軟膏中のアラントイン<sup>1,2)</sup>及びクロルヒドロキシアルミニウムアラントイン<sup>3)</sup>の含量が経時により低下するという報告もされている。これまで、アラントインの分解については、アラントイン酸を経由し、グリオキシル酸と尿素になると考えられてきた。これによれば、製剤中のアラントインを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により直接定量<sup>1-4)</sup>する場合、処方

量の低下が認められるが、グリオキシル酸を基質とする Rimini-Schryver 比色定量法<sup>5)</sup>によれば処方量が回収されるという結果もうなずける。しかし一方で、製剤の中には比色法においても処方量を回収できない事実がしばしば認められたことから、アラントインの異なった分解経路の存在が示唆された。

本項では、アラントインの安定性についての詳細な検討を行うこと、すなわち、種々の緩衝液中でのアラントインの分解過程について、各種液体クロマトグラフィー (LC) を用いて追跡することにより、新たな分解生成物の構造を決定した。更に、その生成量を考察することで、それらの生成機構、並びに比色定量法における定量値低下の原因を明らかにすることができたので報告する。

## 実 験 の 部

**1. 試料, 標準物質及び試薬** アラントインはパーマケム・アジア (株) 製のものを用い、純度は 98% 以上である。

アラントイン酸はナカライテスク (株) 製、グリオキシル酸・一水塩は和光純薬工業 (株) 製、尿素は関東化学 (株) 製の各々試薬特級を用いた。

アラントインの定量に用いた比色定量用試薬、加速安定性試験に用いた緩衝液及び各種 LC 用移動相溶媒の調製には、各々試薬特級品及び一部 HPLC 用グレード品を使用した。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定に用いた重ジメチルスルフォキシド ( $\text{DMSO}-d_6$ ) はメルク社製のものである。

**2. 使用機器** アラントインの直接定量法として用いた HPLC 装置は日本分光工業 (株) 製・TRI ROTAR-III であり、紫外分光光度検出器は同社製 UVIDEC 100-III である。カラムは三菱化成工業 (株) 製強酸性カチオン交換樹脂・MCI gel CKO8S を充填した内径 8 mm, 長さ 50 cm のものを使用した。

アラントイン酸、グリオキシル酸の定量に用いたイオンクロマトグラフィー (IC) 装置は、Dionex 社製の QIC アナライザーに内径 4 mm, 長さ 25 cm の同社製 HPIC-AS4 カラムを接続した。

尿素的定量に用いた HPLC 装置は、日立製作所 (株) 製 635 型に日本分光工業 (株) 製の紫外分光光度検出器・UVIDEC 100-III を接続し、カラムは山村化学研究所 (株) 製・YMC-Pak A-312 (ODS), 内径 6 mm, 長さ 15 cm を使用した。

5 ml of the diluted buffer containing 0.05 mg  
of allantoin in 25 ml volumetric flask  
|  
← 1 ml of 0.5 N NaOH  
placed in a boiling water bath for 7 min  
|  
← 1.5 ml of 0.5 N HCl  
← 1 ml of 0.33% aqueous phenylhydrazine hydrochloride solution  
placed in a boiling water bath for 2 min  
|  
immediately plunged into an ice-salt bath ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) for 30 min  
|  
← 4 ml of concentrated hydrochloric acid  
← 1 ml of 1.67% aqueous potassium ferricyanide solution  
shaken for 10 min  
|  
filled to the mark with distilled water  
|  
stand for 1 h  
|  
measurement of absorption curve from 400 to 620 nm

Fig. 1. The Procedure for Colorimetric Determination of Allantoin in Buffer

TABLE I. HPLC Conditions of Allantoin Related Compounds

Compound	Allantoin	Allantoic acid	Glyoxylic acid	Urea
Separation mode	Cation exchange	Anion exchange		Ion pair
Column	MCI gel CK08S 8 mm i.d. × 50 cm	HPIC-AS4 4 mm i.d. × 25 cm		YMC-Pak A312 6 mm i.d. × 15 cm
Mobile phase	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>		0.01 M SDS pH 2.0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Flow rate (ml/min)	1	1.5		1
Column temperature (°C)	50	Ambient		40
Detector (nm)	UV 210	Conductivity detector		UV 200
Injection volume (μl)	15	50		20
Retention time (min)	16.0	4.8	6.0	9.4
Determination limit (ng) <sup>a)</sup>	60	50	50	60
Detection limit (ng) <sup>b)</sup>	10	10	50	60

a) Lower limit of the calibration curve. b) S/N=5.

アラントインの比色定量には、日本分光工業(株)製の紫外・可視分光光度計・UVIDEC 610-Cを使用した。

分解生成物の構造解析に用いた核磁気共鳴(NMR)装置は、日本電子(株)製・GX-400型で、<sup>1</sup>H(400MHz)、<sup>13</sup>C(100MHz)、<sup>15</sup>N(40MHz) NMR スペクトルを測定した。

**3. アラントインの安定性試験条件** pH 3.0の緩衝液は0.01 M 酢酸-酢酸ナトリウム、pH 6.0, 8.0の緩衝液は0.01 M リン酸二水素カリウム-0.005 M ホウ砂で調製した。この3種の緩衝液に防腐を目的として、エタノールを5% (v/v) 加えた後、10 mM アラントイン溶液を調製した。これらの溶液を50°Cの恒温槽中に55日間保存し、経時におけるアラントイン及びその関連物質の定量を行い、加速安定性試験とした。

**4. 定量法** アラントインの比色定量は、Young, Conwayの方法<sup>5)</sup>に準じた。この操作手順をFig. 1に示す。

HPLC 用試験溶液は、緩衝液をイオン交換水で適時希釈して調製した。

**5. HPLC 条件** 本試験で用いた HPLC 条件、関連標準物質の保持時間、検出限界等について Table I にまとめた。IC においては、移動相溶液中のホウ砂濃度が低くなるに従い、アラントイン酸、グリオキシル酸共に、カラムに強く保持されるようになることから、両者の溶出が10分以内で、かつ分離が最も良好になる3 mM に設定した。この条件におけるクロマトグラムを Fig. 2 に示した。また、IC 分析の際に、カラムの交換容量を復帰させ、再現性のある結果を得るため、試料導入毎に1.5 M 炭酸ナトリウム水溶液 50 μl を注入した。尿素については、Taylor らによるゲル浸透クロマトグラフィーでの分析例<sup>6)</sup>もみられるが、ここでは、逆相分配型(ODS)カラムを用いたイオン対法によって定量した。以上の分析条件における各々の検量線はすべて原点を通る良好な直

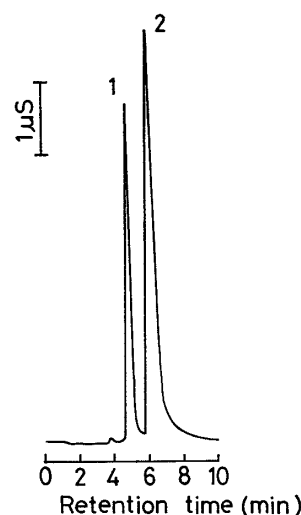


Fig. 2. Separation of Allantoic Acid and Glyoxylic Acid by IC

(1) allantoic acid, (2) glyoxylic acid.

線関係にあった。

## 結果及び考察

### 1. 緩衝液中におけるアラントインの安定性

一般に、アラントイン (I) はアルカリ条件下において不安定であり、Chart 1 に示すように、アラントイン酸 (II) を経由してグリオキシル酸 (III) と尿素 (IV) に加水分解されることが知られている。<sup>4)</sup>

Fig. 3 に pH 6.0 及び pH 8.0 の緩衝液におけるアラントインの残存率、これに伴うアラントイン酸、グリオキシル酸及び尿素の生成率を示した。ここで、各々の生成率は、定量結果を相当するアラントインのモル濃度に換算した後、さらにアラントインの初期モル濃度に対する割合 (%) として算出した。

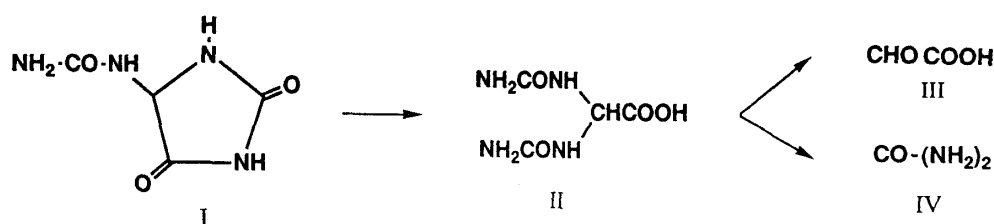


Chart 1

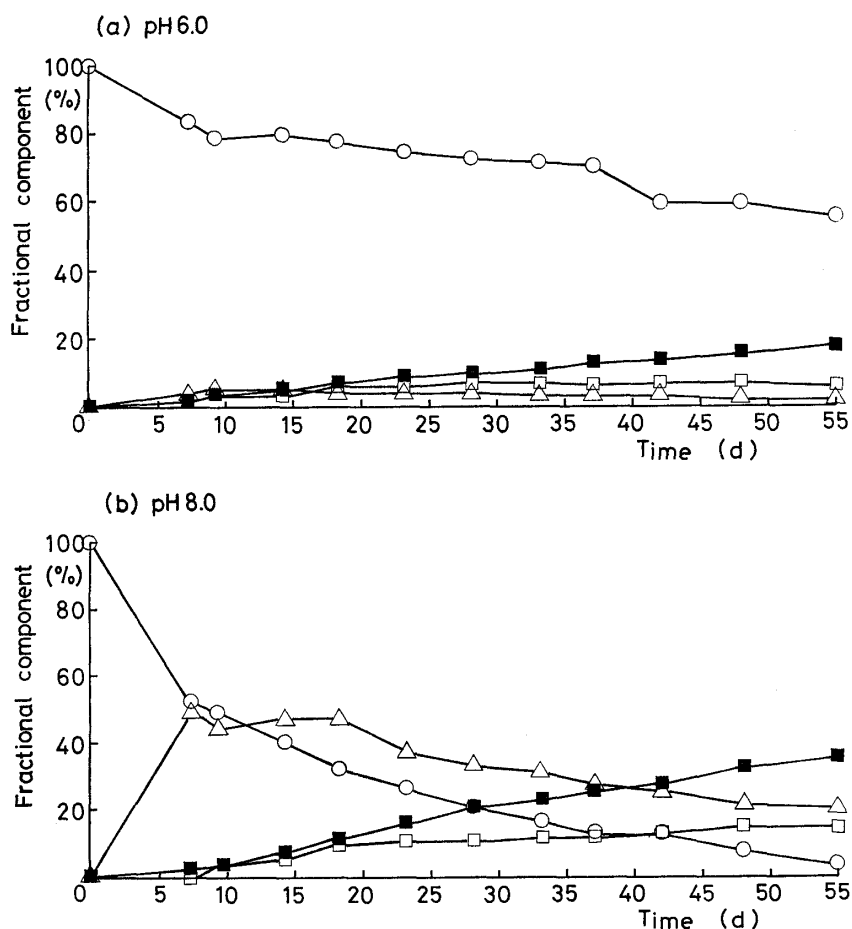


Fig. 3. Degradation of Allantoin in the Buffer Solutions Stored at 50°C  
○, allantoin; △, allantoic acid; □, glyoxylic acid; ■, urea.

pH 3.0 の緩衝液中のアラントインは 50°C 保存 1 カ月においても初期含量の 98% が残存しており、かつ分解物 3 種はいずれも検出されなかった。これらの結果から、アラントインは酸性条件下では極めて安定に存在するが、pH が中性からアルカリ性になるに従い不安定になることを確認した。<sup>7)</sup>

また、最も不安定であった pH 8.0 の場合について、分解生成物の状況をみると、分解中間体であるアラントイン酸は、当初、アラントインの分解に伴ってその生成量を増すが、経時 20 日頃より、その生成量よりもアラントイン酸自体の分解量が上回っていることが分かる。

アラントインの最終分解生成物であるグリオキシル酸と尿素は、アラントイン及びアラントイン酸の分解に伴って次第に増加している。予想としては、アラントインに対しモル比換算することで両者の生成比は一致すると思われたが、Fig. 3 (a) (b) 共にグリオキシル酸の生成比が明らかに少なく、グリオキシル酸の関与する他の反応が起きていることが示唆される。グリオキシル酸は、別の実験系で 50°C、30 日の保存条件において安定であることを確認しており、グリオキシル酸以降の分解は考えにくい。

一方、アラントインの安定性を調べる上において、比色定量法、すなわちグリオキシル酸に起因する量を求めることも重要な意味を持つと思われる。以後、これを呈色量と定義し、Fig. 4 に pH 6.0 及び 8.0 の系における呈色量の変化を示した。なお、変化は初期呈色量を 100% として、その割合、すなわち呈色率 (%) として示した。さらに、これに対応すると考えられるアラントイン、アラントイン酸及びグリオキシル酸の割合合計 (%), アラントイン、アラントイン酸及び尿素の割合合計 (%) を Fig. 3 の結果から求めて比較した。理論上、これら 3 者の値は一致するものと思われたが、総じて呈色率と比較して、HPLC 定量結果による割合合計 (%) は低く、アラントインの経時分解が進むに伴い両者の差は大きくなっていることが分かる。さらに、HPLC 定量結果の中でも高い値を示した尿素を含めたときの割合合計 (%) と呈色率を比較しても、pH 6.0 の系では両者の差

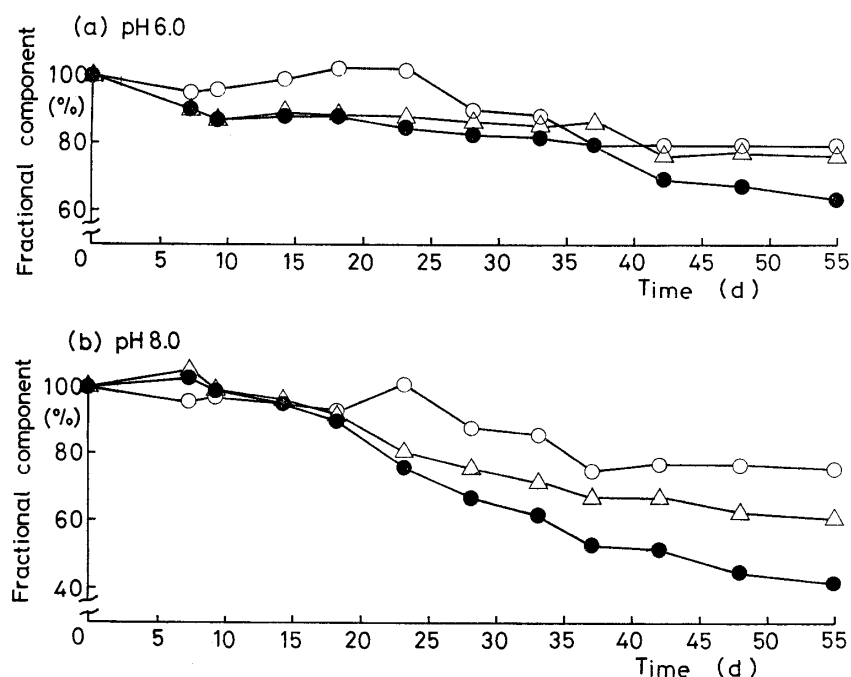


Fig. 4. Comparison of the Colorimetric Method and the HPLC Method in Determining the Rate of Degradation of Allantoin in the Buffer Solutions Stored at 50°C

○, colorimetric determination of I; ●, sum of the HPLC determination results of I, II and III; △, sum of the HPLC determination results of I, II and IV.

は微妙であるが、pH 8.0 の系では明らかに差が認められ、呈色率の方が高くなっている。以上の結果より、アラントインの分解経路として、Chart 1 で示した以外の機構が考えられ、この過程による生成物は分解したグリオキシル酸を伴った呈色陽性物質であることが推定された。

## 2. 呈色陽性物質の存在と分取

著者らは先の実験でアラントインの残存率を求める際のクロマトグラムにアラントインのピーク他、保持時間約 9 分にアラントインの減少に伴って増加する 2 本のピークを認めた。pH 8.0 の系で経時 14 日後におけるクロマトグラムを Fig. 5 に示したが、次に、これらの成分の構造を明らかにするために分取を試みた。pH 8.0 の緩衝液を用い、アラントインの飽和濃度に近い 0.5% (w/v) 溶液を調製し、50°C の恒温槽に 37 日間放置した。移動相中のリン酸濃度は 0.01% まで低下させて分取を行った。このときのクロマトグラムを Fig. 6 に示したが、2 本のピーク並びに、これらとアラントインとの分離にはほとんど影響を与えなかった。また、カラム内径が 8 mm と比較的大きいために、先の高濃度溶液を 100  $\mu$ l 導入しても、ピークの分離能にほとんど影響はみられなかった。この条件で、2 本のピークに分取操作を 30 回繰り返して、減圧濃縮後にデシケーター中で減圧乾燥した各々の乾固物（ピーク 1: 約 3 mg, ピーク 2: 約 1 mg）を得た。

## 3. 分解生成物の構造解析

分取した乾固物について、NMR によって構造を解析した。まず、アラントインについて、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  及び  $^{15}\text{N}$ -NMR スペクトルを測定し、各々の信号について帰属を行った。Table II にアラントインの  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  及び  $^{15}\text{N}$  のケミカルシフト値と帰属結果をまとめた。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトル中のアミノ及びアミドプロトンの確認のために、 $^1\text{H}$  検出の  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ : シフト相関 2D-NMR 法 (HMQC) を、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルは、 $^1\text{H}$  検出の  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ : シフト相関 2D-NMR 法 (HMQC 及び HMBC) を測定した。これらによって、5.72 ppm のアミノプロトン、6.85 及び 7.98 ppm のアミドプロトンが明らかになったが、10.48 ppm のプロトンには窒素は結合しておらず、水酸基プロトンとした方が妥当であった。アラントインの構造式では 3 個のアミドプロトンが存在しているが、実際には、2 位のカルボニル基がプロトン化している状態で存在しているものと思われた。

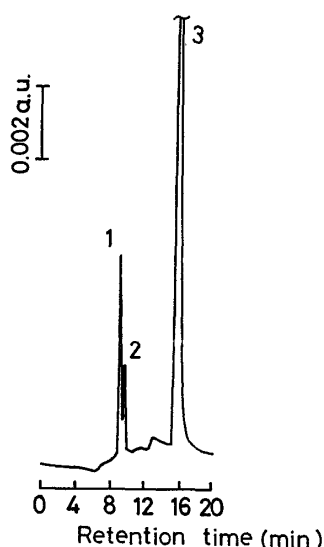


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Allantoin in pH 8.0 Buffer Solution Stored at 50°C for 14 d  
(1), (2), unknown degradation products of allantoin; (3), allantoin.

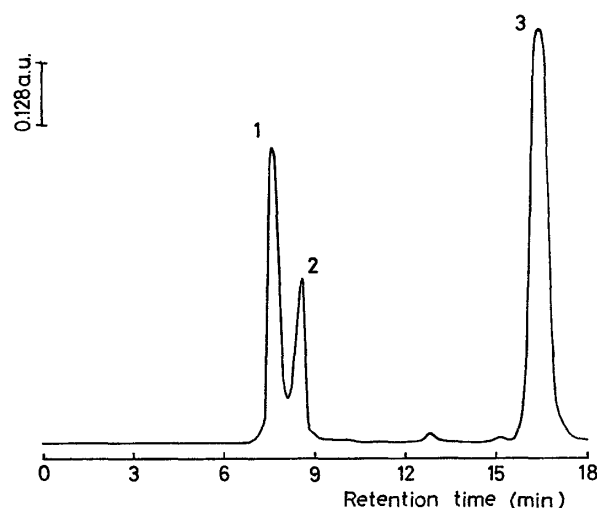
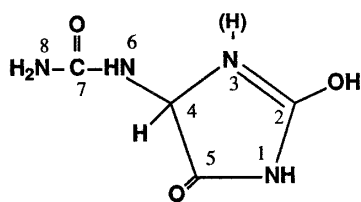
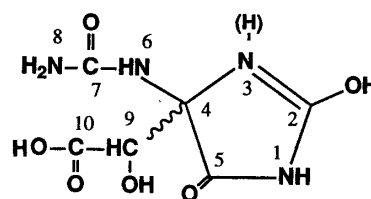


Fig. 6. Preparative HPLC Chromatogram of Allantoin in pH 8.0 Buffer Solution Stored at 50°C for 37 d  
(1), (2), unknown degradation products of allantoin; (3), allantoin.

TABLE II. Chemical Shifts in  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$ -NMR Spectra of Allantoin (ppm)

allantoin

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$
1	7.98 (s)		98.3
2	10.48 (s)	156.64	
3			143.3
4	5.25 (d-d)	62.38	
5		173.39	
6	6.85 (d)		87.3
7		157.29	
8	5.72 (s)		73.2

TABLE III. Chemical Shifts in  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$ -NMR Spectra of Degradation Products of Allantoin (ppm)

degradation products (1) (2)

	$^1\text{H}$		$^{13}\text{C}$		$^{15}\text{N}$
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)
1	7.22 (s)	7.14 (s)			97.0
2	9.97 (s)	9.91 (s)	157.38	157.05	
3					ND
4			73.96	73.96	
5			174.09	173.68	
6	7.83 (s)	7.55 (s)			90.2
7			156.29	156.85	
8	5.85 (s)	5.77 (s)			73.2
9	3.52 (d)	3.50 (d)	70.54	72.89	
10	ND	ND	171.66	170.19	

次に、分取物 (1) (2) のケミカルシフト値を Table III に示した。  $^1\text{H}$  検出の  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ : シフト  
 相関 2D-NMR 法やアラントインの帰属結果を  
 もとに、これらはヒダントイン環の 4 位にグリ

オキシル酸が結合したものであると推定された。(1) 及び (2) は、 $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  の信号が Table III  
 に示すように、それぞれ対になっていることと、推定構造の 4 位と 9 位が不斉炭素であることか  
 ら、これらはジアステレオマーの関係にあると思われる。

#### 4. アラントイン-グリオキシル酸縮合物の安定性

緩衝液中のアラントインの分解過程において、アラントイン-グリオキシル酸縮合物 (AG) が生  
 成することが分かったことから、先に定量したアラントイン関連成分の組成に関する考察を行っ  
 た。AG が Chart 2 のように生成すると仮定すれば、AG の生成割合  $V=2$  (IV-III) として計算  
 される。これを AG 理論値として Fig. 7 に示し、併せてクロマトグラム上における AG のピー  
 ク高さと呈色率及びこれを反映していると思われるアラントイン、アラントイン酸、グリオキシル

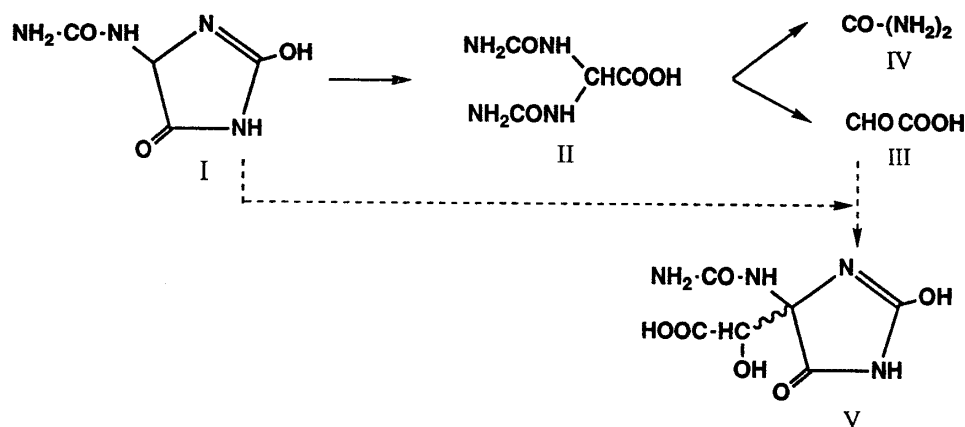


Chart 2

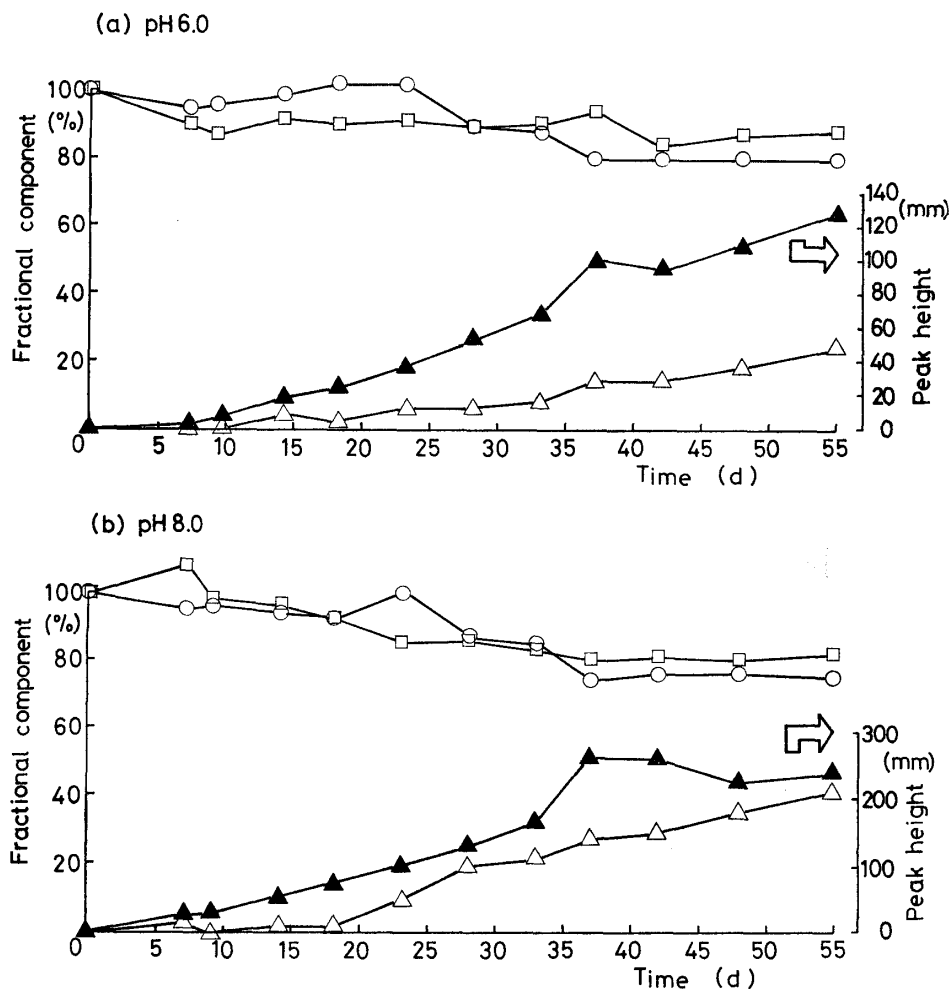


Fig. 7. Comparison of the Calculated Amounts and the Peak Heights of Allantoin-Glyoxylic Acid Condensates

△, calculated amount of V, ( $V=2\{IV-III\}$ ); ▲, peak height of V by HPLC; □, sum of the determination of I, II, III and V; ○, colorimetric determination of I.

酸及び AG の割合合計 (%) をプロットした。AG のピーク高さは、2 本の和として求めたが、ほぼ AG 理論値に対応した増加を示している。この結果、今回新たに同定した AG はアラントインの分解生成物の中で、最も大きな割合を占めていることが推定される。一方、分解成分と呈色率の関係については、これまで呈色率を反映すると思われたアラントイン、アラントイン酸及びグリオキシル酸の割合合計 (%) が呈色率よりも著しく低かったものが、新たに AG を加えることで、両者はほぼ一致した値になることが分かった。しかし、更に詳細に比較していくと、2 種の緩衝液系共、AG の生成率が高まるにつれて、呈色率と割合合計 (%) は逆転し、呈色率が低くなる傾向が認められる。

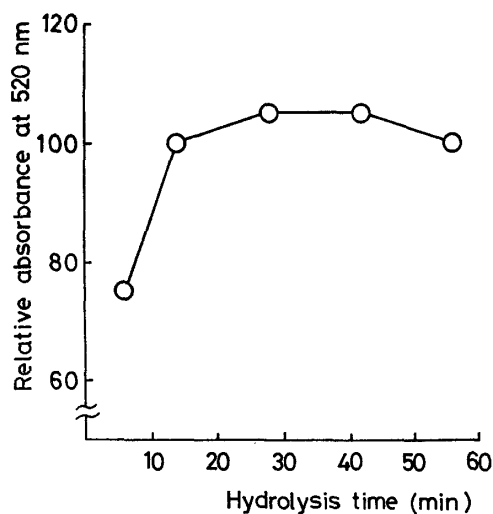


Fig. 8. Effect of Hydrolysis Time of Allantoin-Glyoxylic Acid Condensates on Relative Absorbance at 520 nm



TABLE IV. Recoveries of Allantoin by Colorimetric Determination

Alkali hydrolysis time		7 min	30 min
50°C, 48 d	pH 6.0 buffer solution	Recovery (%)	80.3
		C.V. <sup>a)</sup> (%)	3.9
	pH 8.0 buffer solution	Recovery (%)	77.3
		C.V. <sup>a)</sup> (%)	5.8
			91.1
			2.4
			90.0
			1.8

a) Coefficient of variation. Analytical results were average of  $n=4$ .

AG はアラントインと異なり、pH 8.0 のアルカリ条件下でも安定に存在している。そこで、AG の比色操作の適用性についての検討を行った。分取の際に用いたアラントインの 0.5% 溶液の 50°C, 37 日間保存品について、その 100  $\mu$ l を HPLC 装置に注入し、AG 成分を一括分取した。1 回の分取量は約 2 ml であり、これに 3 ml の水を加えて試験溶液とし、Fig. 1 の比色操作中における 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を加える際のアルカリ分解時間に対する吸光度変化を調べた。この結果を Fig. 8 に示した。AG のアルカリ分解時間については、従来の 7 分間の条件では不十分であり、30 分間以上必要であることが分かった。

経時 48 日間保存後の pH 6.0 及び 8.0 の緩衝液について、アルカリ分解時間を従来の 7 分間と 30 分間にした場合の呈色率を Table IV にまとめた。これから、2 種の緩衝液とも 30 分間のアルカリ分解時間によって、比色法におけるアラントインとしての回収率は 90% 以上となるほか、定量値の変動係数も従来条件に比べ小さくなっており、分析精度の向上にもなっていることが分かった。

## ま と め

緩衝液中のアラントインの分解過程について、種々の HPLC を用いて追跡定量した。

その結果、アラントインの分解生成物として、従来から知られているアラントイン酸、グリオキシル酸以外の呈色陽性物質を見出だした。これを分取し、NMR 法によってアラントインとグリオキシル酸の縮合物であることを明らかにした。これは、既に分解生成したグリオキシル酸と残存のアラントインが反応したものと思われ、アラントイン量に換算した場合、今回検討した条件下では、分解生成物の中で最も多く存在していることが推定された。また、この縮合物はアルカリ条件下でも安定に存在するため、従来の比色定量法で用いられているアルカリ加水分解条件では完全に分解されず、比色法においてアラントインの定量値が低下する原因になっていることが分かった。検討の結果、アルカリ分解時間を従来の 7 分から 30 分間に長くすることによって、50°C で 48 日間保存した pH 6.0 及び 8.0 の緩衝液中のアラントインは 90% 以上の回収率を得ることができた。このように、アルカリ加水分解時間の検討をも踏まえて、分解物の同定結果を更に指示するものとした。以上の知見は、アラントインを含有する製剤の処方設計、あるいは製剤中での安定性を評価する上で有用な知見を与えるものと思われるが、残る 10% 余りについては不明であり、今回用いた定量法における誤差、再現性を考慮しても無視できるものではなく、依然として他の未知分解物の存在が示唆される。

## 引 用 文 献

- 1) R. J. Trivedi, *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, **71**, 290 (1988).
- 2) 萩原輝彦, 秋山和幸, 都衛研研究年報, **42**, 15 (1991).
- 3) J. Kawase, H. Ueno, K. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **253**, 237 (1982).

- 
- 4) Z. R. Zaidi, F. J. Sena, C. P. Basilio, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 997 (1982).
  - 5) E. Young, C. Conway, *J. Biol. Chem.*, **142**, 839 (1942).
  - 6) R. Taylor, R. J. Pragnell, J. V. McLaren, *J. Chromatogr.*, **195**, 154 (1980).
  - 7) 相楽和彦, 須藤桂一, 吉田継親, 生薬, **42**, 4, 268 (1988).