薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (9) 974-978 (1983)

ガスクロマトグラフィーによる Labetalol 異性体の分別定量

五郎丸毅,^{*,a} 松木洋子,^a 松浦 博,^a 馬場茂雄^b

徳島大学薬学部,^a 東京薬科大学^b

Gas Chromatographic Separation of the Diastereomers of Labetalol as *n*-Butylboronate

TSUYOSHI GOROMARU,^{*,a} YŌKO MATSUKI,^a HIROSHI MATSUURA,^a
and SHIGEO BABA^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima,^a Shomachi
1-chome, Tokushima, 770, Japan and Tokyo College of Pharmacy,^b
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan

(Received April 20, 1983)

Labetalol (LA) is a new kind of antihypertensive agent that consists of two racemic mixtures, LA-1 (*R*·*S*+*S*·*R*) and LA-2 (*R*·*R*+*S*·*S*). These racemic mixtures show a difference in their pharmacological activity. We developed the separative determination of LA-1 and LA-2 by gas chromatography in order to clarify the difference in their excretion and metabolism in human subject. LA was heated with *n*-butylboronic acid in pyridine at 60°C for 2 h and the reaction mixture injected into gas chromatograph (1.5% OV-1, 285°C). LA-2 boronate had a retention time of 4 min and LA-1 boronate of 5 min, and the resolution of these peaks was almost complete. Linear relationship between peak height ratio and weight ratio of LA-1 to LA-2 was observed.

By this method, urinary excretion of LA-1 and LA-2 was examined after single oral administration of LA·HCl (100 mg/body) to three healthy volunteers. Urine was collected for 24 h after administration. To the urine sample was added prochlorperazine maleate as an internal standard, and extracted with ethyl acetate before or after treatment with β -glucuronidase. The percentage of the dose (50 mg as each racemic mixture) excreted as LA-1, its phenolic glucuronide, LA-2 and its phenolic glucuronide were in the range of 1.2—2.4, 11.2—24.6, 0.6—1.3 and 4.7—11.2, respectively.

Keywords—labetalol; 5-{1-hydroxy-2-[(1-methyl-3-phenylpropyl)amino]ethyl}salicylamide; diastereomer; *n*-butylboronate; gas chromatographic separation; labetalol metabolism

Labetalol (5-{1-hydroxy-2-[(1-methyl-3-phenylpropyl)amino]ethyl}salicylamide, LA) は L. H. C. Lunts ら¹⁾ によって合成されたアドレナリン作動性 α , β 遮断薬で血圧降下薬, トランゼートとして我国においても使用が開始された薬物である. LA は分子内に 2 個の不斉炭素を有し, 4 種の光学異性体 *R*·*R*, *S*·*R*, *R*·*S* および *S*·*S* 体が存在するが中でも *R*·*R* 体が最も高い β 遮断作用を有し,²⁾ また 2 種のラセミ体 *R*·*S*+*S*·*R* (LA-1) と *R*·*R*+*S*·*S* (LA-2) とを比較した場合にも LA-2 の β 遮断作用が大である.³⁾ ヒトと実験動物とでは LA の代謝が異なるので, LA の体内挙動を把握するには各異性体に注目してヒトにおける挙動を検討することが重要であると考えられる. LA-1, LA-2 はジアステレオマーであるからクロマトグラフィーにより分離することが可能であるので, 今回はまずこれらの挙動を検討することとした.

すでに Munro ら⁴⁾ は LA のアミド基をニトリル基に誘きガスクロマトグラフィー (GC) により分離できることを報告している. 著者らは生体試料中の

Chart 1. Chemical Structure of LA

両ラセミ体を分離定量するため、誘導体調製が極めて容易な cyclic boronate⁵⁾ とする方法を検討した結果、LA を *n*-butylboronic acid と反応させることにより LA-1, LA-2 を完全に GC 分離できることを見出した。さらに LA 服用後のヒト尿中の両者の定量への応用を検討した。

実 験 の 部

試薬 LA 塩酸塩, LA-1 塩酸塩 (純度 99.2%) および LA-2 塩酸塩 (純度 99.5%) はいずれも新日本実業株式会社より提供されたものを使用した。 *n*-Butylboronic acid は Aldrich Chemical 製を, prochlorperazine maleate は吉富製薬製を, β -glucuronidase は P-L Biochemicals 製の Marine Mollusc 由来のものを使用した。

GC およびガスクロマト質量分析 (GC-MS) 条件 GC 測定は島津 GC-4CM 型ガスクロマトグラフを用い, 1.5% OV-1/Chromosorb W (80—100 mesh) を内径 4 mm 長さ 1 m のガラスカラムに充てんしたものを用いて水素炎イオン化検出器により次の条件で行った。キャリアガス: N_2 (40 ml/min), 注入口温度: 300°C, 検出器温度: 300°C, カラム温度: 純品の場合 285°C, 抽出物の場合は尿成分のテーリングによる影響を避けるため 250—285°C (10°C/min) の昇温条件で行った。GC-MS 測定は島津 GCMS-7000 型ガスクロマトグラフ-質量分析計を用い, GC 条件は上記と同一でイオン化電圧 20 eV で行った。

添加実験 ヒトのブランク尿 20 ml に LA 塩酸塩を 50—250 μ g 添加し, pH 8 に調整した後, 内部標準として prochlorperazine maleate 50 μ g を加え酢酸エチル 20 ml で 2 回振とう抽出した。分離した酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後, 溶媒を減圧下で留去した。得られた抽出物をデシケーター (シリカゲル) 中で減圧下一夜乾燥し, これに *n*-butylboronic acid のピリジン溶液 (50 mg/ml) を 25 μ l 加え 60°C で 2 時間加熱し誘導体とした。この 1 μ l を GC に注入して測定を行った。

ヒトにおける尿中排泄量の測定 志願した 3 人の健康成人男子 (K, 22 才, G, 41 才, Y, 22 才) にそれぞれ LA 塩酸塩 100 mg を水溶液として服用させ, 服用後 0—1, 1—2, 2—3, 3—4, 4—6, 6—8, 8—10, 10—12, 12—14, 14—24 時間尿を採取した。未変化体については各時間尿 20 ml をそのまま上記添加実験と同一条件で抽出した。LA のフェノール性グルクロナイド (Glu-I) については各時間尿 5—10 ml を蒸留水で 20 ml にメスアップ後 pH 5.0 に調整し, β -glucuronidase 5000 単位を加え 37°C で 24 時間振とうして酵素水解を行い, 以下同様に抽出した。なおこの場合, 酵素水解前後の尿を XAD-2 カラムで処理し, 得られた MeOH 溶出物について, 前報⁶⁾と同様に TLC により Glu-I が完全に LA に水解され, 一方アルコール性グルクロナイド (Glu-II) は全く水解されないことを前もって確認した。

結 果 お よ び 考 察

まず最初に LA の GC による定量法の確立を試みた。LA はアミド基, フェノール性水酸基, アルコール性水酸基, 二級アミノ基を有し難揮発性の物質であり, また一般的な誘導体, メチル, シリル, アシル化体としても GC 分析は困難である。⁶⁾ 一方アルキルホウ酸類は複合官能基を有する化合物と反応し安定な環状のホウ酸エステルを与え, エフェドリンでは本誘導体とすることにより不完全ではあるがプソイドエフェドリンと GC 分離できるという報告⁷⁾がある。

そこで LA 塩酸塩に *n*-butylboronic acid を反応させたところ, Fig. 1(A) に示すようによく分離したシャープなピーク 1, 2 を与えた。これらのピークは LA-1 塩酸塩, LA-2 塩酸塩を同様に誘導体として得られるピーク (Fig. 1, B および C) と t_R が一致し各ラセミ体が分離されたものと考えられる。このことを確認するため LA 由来のピーク 1, 2 のマススペクトルを測定した (Fig. 2)。両マススペクトルは完全に一致し, 小さいながら分子イオンが m/z 460 に認められる。分子イオンより水素分子, メチル基, *n*-ブチル基が脱離したイオンがそれぞれ m/z 458, 445, 403 に出現している。また m/z 355 は分子イオンより側鎖フェニルエチル基が脱離したものの, m/z 271 は *n*-ブチル基および側鎖メチルフェニルプロピル基が脱離し水素が 1 個転位したものによるものと考えられる。このことより LA 誘導体の構造は Fig. 2 中に示すように LA のアミド基とフェノール性水酸基およびアルコール性水酸基と二級アミノ基との間の 2 個所で cyclic boronate を形成したのと考えられる。以上のように LA の異性体を GC 分離できることが確認されたが, 定量にあたっては誘導体形成時における両異性体間の反応速度の差についても考慮する必要がある。この点についてピーク 1, 2 のピーク高比を種々の反応条件で測定したところ 60°C で 2 時間以降は一定で, ピーク面積も等しくなりこの条件で異性体の定量が行えることを認めた。

Fig. 1. Gas Chromatograms of LA (A), LA-1 (B) and LA-2 (C) as *n*-Butylboronate
Conditions: 1.5% OV-1/Chromosorb W (80—100 mesh), 3 mm $\times$ 1 m, column temperature: 285°C.

Fig. 2. Mass Spectra of Peaks 1 and 2

These peaks are same as shown in Fig. 1 (A).

次に LA-1 塩酸塩 250 μ g に対して LA-2 塩酸塩を 50—300 μ g 添加した場合、ならびに LA-2 塩酸塩 250 μ g に対して LA-1 塩酸塩 50—300 μ g 添加した場合について検討した。Fig. 3 にその 1 例を示すがいずれの場合も添加重量比とピーク高比は極めて良好な直線性を示し、また添加重量比とピーク面積比とは一致しており両

Fig. 3. Linear Relationship between Peak Height Ratio and Weight Ratio of LA-1 to LA-2

Fig. 4. Gas Chromatograms of the Extracts from the Urine before (A) or after (B) Treatment with β -Glucuronidase in Subject K

Conditions: 1.5% OV-1/Chromosorb W (80–100 mesh), 3 mm $\times$ 1 m, column temperature: 250–285°C (10°C/min).

異性体は同一感度を有することが認められた。この方法により本実験に使用した LA 塩酸塩中の LA-1, LA-2 の含量比および標準偏差を求めてみると、 0.996 ± 0.0160 ($n=5$) となり LA-1 が $49.9 \pm 0.40\%$ を占める等量の混合物であった。

ヒト尿中の LA の定量のため、内部標準と LA 塩酸塩をヒトのブランク尿に添加し検量線を作製した。この場合も LA-1, LA-2 について良好な直線性が得られ、内標に対する各異性体の添加重量比 (y) とピーク高比 (x) の関係はそれぞれ $y=1.31x+0.19$ ($r=0.999$) および $y=1.17x+0.15$ ($r=0.998$) で、尿成分の妨害をうけることなく定量できることが認められた。LA-1, LA-2 の定量限界はそれぞれ $6 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ および $5 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ であり、添加範囲 $25\text{—}125 \mu\text{g}/20 \text{ ml}$ ($n=5$) における測定値の変動係数は LA-1 では 2.9% , LA-2 では 4.3% であった。

ところで LA はヒトにおいてそのほとんどが 2 種のグルクロン酸抱合体 Glu-I および Glu-II に代謝されるが、^{6,8)} Glu-II は通常の酵素水解、酸加水分解によつては LA とすることは困難であるので、⁶⁾ 今回は Glu-I のみを定量することとし酵素水解前後の LA の増加分を Glu-I 量とした。3 名の被験者について LA 塩酸塩 100 mg 服用後の尿中の LA および Glu-I の定量を実施し、その時のクロマトグラムの一部を Fig. 4 に、また結果を累積排泄量として Table I に示した。

Fig. 4 に見られるように LA-1, LA-2 の排泄には明らかな相違が認められ、ヒトにおける両異性体の挙動が等しくないことを示している。また累積排泄量は LA-1, LA-2 それぞれの投与量各 50 mg に対する % で表わしたが、未変化体は投与量の $1\text{—}2\%$ にすぎず服用後 8 時間までに排泄は終了しており、すみやかに代謝されるものと考えられる。代謝物 Glu-I には個人差が認められ $5\text{—}25\%$ の排泄率である。Martin ら⁹⁾ の ^3H 標識体による結果ではヒトにおいて ^3H -activity の 60% 程度が 24 時間尿

TABLE I. Urinary Excretion of LA-1 and LA-2 in Human Subject after Administration of LA

Subject	Age	Excreted amount (% of dose)					
		LA-1			LA-2		
		Unchanged	Glu-I	Total	Unchanged	Glu-I	Total
K	22	1.5	11.2	12.7	0.6	4.7	5.3
G	41	1.2	24.6	25.8	1.3	11.2	12.5
Y	22	2.4	11.7	14.1	1.1	7.9	9.0

中に排泄されることが明らかとなっているので、Glu-II としてかなりの量が排泄されているものと推定される。

各異性体の排泄については、未変化体では被験者 K, Y で LA-1 の方が LA-2 に対して2倍程度多く排泄されるが、被験者 G では両者に著しい相違は見られない。Glu-I については各被験者ともに LA-1 の排泄が大であるが LA-1, LA-2 の排泄比は各被験者により異なる。このように両異性体の挙動に相違のあることが明らかとなったが、これは当然 LA の4種の光学異性体の挙動の相違により生じたもので、その原因については今回の検討では明確にすることはできない。ただ Glu-II の生成が認められないラット⁶⁾について本方法で行った結果は未変化体ならびに Glu-I の各異性体の排泄量にほとんど差のないことを示しており、ヒトの場合に示された相違は Glu-II の生成、つまり不斉炭素に結合した水酸基へのグルクロン酸抱合過程に立体的要因による速度の相違が生じたためとも考えられる。

謝辞 本研究に際し貴重な試料を御提供いただいた新日本実業株式会社に深く感謝致します。また一部実験に御協力いただいた徳島大学薬学部、飯田かな子、津田美佐子の両嬢にもあわせて謝意を表します。

引用文献および注

- 1) L. H. C. Lunts, 特公, 昭 48-43341 (1973).
- 2) E. H. Gold, 特公, 昭 55-55147 (1980).
- 3) Y. Nakagawa, N. Shimamoto, M. Nakazawa, S. Imai, *Jpn. J. Pharmacol.*, **30**, 743 (1980).
- 4) G. Munro, J. H. Hunt, L. R. Rowe, M. B. Evans, *J. Pharm. Pharmacol.*, **28** Suppl., 27 (1976).
- 5) G. M. Anthony, C. J. WBrooks, B. S. Middleditch, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, 205 (1970).
- 6) 馬場茂雄, 五郎丸毅, 原 健一, 肥後喬一, 木南純二, 万宝国久, 医薬品研究, **9**, 1031 (1978).
- 7) G. M. Anthony, C. J. WBrooks, I. Maclean, I. Sangster, *J. Chromatog. Sci.*, **7**, 623 (1969).
- 8) R. Hopkins, L. E. Martin, J. Oxford, N. Scully, Abstracts Papares, Symposium on Conjugation Reactions in Drug Biotransformation, Turku, Finland, July 1978, p. 500.
- 9) L. E. Martin, R. Hopkins, R. Bland, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **3** Suppl., 695 (1976).