同位体による薬物代謝の研究 (第 11 報¹⁾) ベンゼン核重水素標識
l-Ephedrine の合成およびその物理化学的性質²⁾

馬場茂雄, 川井邦男

東京薬科大学³⁾

Studies on Drug Metabolism by Use of Isotopes. XI.¹⁾ Studies on Synthesis
and Physiochemical Features of ²H-Labeled
l-Ephedrine on Benzene Ring²⁾

SHIGEO BABA and KUNIO KAWAI

Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received July 23, 1973)

As a fundamental study on the applicability of a drug labeled with deuterium on benzene ring for the human metabolic studies, *l*-ephedrine[arom.-²H₆] was synthesized by a reaction sequence starting with benzene[arom.-²H₆]. Infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectra of *l*-ephedrine[arom.-²H₆] and propiophenone[arom.-²H₆] were compared with those of the corresponding nonlabeled compounds. The bands at 700 and 750 cm⁻¹, which appear characteristically in monosubstituted benzene derivatives, disappear completely in the IR spectra of deuterated compounds, and absorptions for the aromatic C—H (3000—3100 cm⁻¹) and aromatic C=C (1600 cm⁻¹) shifted completely to 2280 cm⁻¹ and 1560 cm⁻¹ respectively. The signal for aromatic proton in NMR spectrum is completely lacking in the deuterated samples. From these data, it was concluded that *l*-ephedrine[arom.-²H₆] obtained here does not contain a perceptible amount of hydrogen on its benzene ring. Comparison of mass spectra of deuterated compounds with that of nonlabeled compounds, suggests that an intramolecular exchange reaction between deuterium on the benzene ring and hydrogen on the side chain does occur during the fragmentation process to a small but significant extent.

著者らは前報¹⁾において安定同位体 (stable isotope, SI) トレーサー法がヒトにおける薬物代謝の研究を行なうのにきわめて有効な方法であること、現時点では SI 標識原料としては C₆²H₆ (II_d) が最も有望であることを指摘し、さらに重水素標識体をヒトにおける実験に適用するための基礎的な検討を行ない、重水素による SI トレーサー法が実際に成立しうることを明らかにした。また、II_d より合成した *l*-ephedrine[arom.-²H₆] (Id) を用いてヒトでの代謝実験を行ない、その結果を本誌に速報した。⁴⁾ 一方、著者らはすでに *l*-ephedrine[α-¹⁴C] を用いてマウス、ラット、モルモットおよび家兎の *l*-ephedrine (I) 代謝には著しい種差が認められることを報告した。⁵⁾ ある薬物の代謝様式において各種実験動物とヒトの間にはどのような関係が成立しているかを明らかにすることは、新しい薬物の動物実験、たとえば、その薬物の体内分布、各種の毒性実験、催奇型作用の実験などによって得られた結果をヒトに外挿するに当たって有益な指針を与えると考えられる。そこで SI トレーサー法によるヒトにおける代謝を研究する題材としては、すでに代謝様式の動物種差が解明されている I を選んだ。

本報では I のヒトにおける代謝を研究するために必要な Id の合成およびその物理化学的性質について報告する。

1) 第 10 報: 馬場茂雄, 堀江正信, 薬誌, 94, 779 (1974).

2) 日本薬学会第 93 年会, 東京, 1973 年 4 月発表: 第 10 回理工学における同位元素研究発表会, 東京, 1973 年 4 月発表.

3) Location: 3-20-1, Kitashinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo.

4) 馬場茂雄, 川井邦男, 堀江正信, 志田保夫, 薬誌, 92, 1569 (1972).

5) 馬場茂雄, 榎垣一憲, 松田暁忠, 長瀬雄三, 薬誌, 92, 1270 (1972).

実験の部

装置 1) 紫外線吸収スペクトル (UV): 日立自記分光光度計 323 型, 2) 赤外線吸収スペクトル (IR): 日本分光 DS-701G 型, 3) 核磁気共鳴スペクトル (NMR): 日本電子 JNM-4H-100 型, 4) 質量スペクトル (MS): 日立 RMU-7L 型.

UV 測定 Propiophenone (III) および propiophenone[arom.- $^2\text{H}_5$] (IIIId) は 5.69×10^{-2} $\mu\text{mole/ml}$ の *n*-ヘキサン溶液で測定した.

IR 測定 III および IIIId は液膜で, I および Id は 0.279 mmole/ml の四塩化炭素溶液で, またこれらの塩酸塩は臭化カリウム錠剤で測定した.

NMR 測定 III および IIIId は四塩化炭素溶液とし, I および Id の塩酸塩は重水溶液として, 前者の場合には内部標準に TMS を用い, 後者の場合には内部標準は用いずに測定した.

MS 測定 III および IIIId は間接導入系を用い, I および Id の塩酸塩は直接導入系を用いて, イオン化電圧 70 eV で測定した.

***l*-Ephedrine[arom.- $^2\text{H}_5$] の合成** IIId (Merck 製, 99.5 atom% ^2H) 10 ml を原料として前報¹⁾ の *l*-ephedrine[arom. U- ^3H] の合成法に準じて行ない, 38.1% の全収率で *dl*-ephedrine[arom.- $^2\text{H}_5$] (IVd) を合成し, *l*-マンデル酸で光学分割して Id を得た (Chart 1).

非標識化合物 *l*-Ephedrine は三晃製薬工業株式会社製の局方品を, propiophenone は和光純薬工業株式会社製の一般試薬を使用した.

結果と考察

Id の合成に当って注目されたことは全合成段階における重水素標識の安定性であった. 重水素標識が合成の段階で脱離するとすれば, 得られた Id の isotopic purity が低くなり, Id およびその代謝産物の MS による定量が困難になるおそれがある. Chart 1 に示した各合成段階において重水素標識の脱離が最も心配されたのは, IIId にフリーデルクラフト (FC) 反応によってプロピオニル基を導入する段階であった. 一方, benzene- $^3\text{H}_1$ を FC 反応でプロピオニル化する場合, 計算値 (16.7%) よりも異常に大きな三重水素の脱落 (35.7%) が認められた²⁾ことから, FC 反応条件下における $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-}^2\text{H}$ の安定性に疑問が持たれた. しかし, 後述するように, ここに得られた IIIId および Id の IR と NMR では $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-}^1\text{H}$ の存在は全く認められなかった. このことから benzene- $^3\text{H}_1$ の FC 反応によって得られた propiophenone[arom. U- ^3H] における予想以上に大きな比放射能の低下は FC 反応におけるアイソトープ効果に帰せられた. Id の合成において重水素の脱離は全く認められなかったが, すべての反応に対して $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-}^2\text{H}$ は安定であると断定することはできない. Raymond 等は toluene- $^2\text{H}_8$ をクロルスルホン酸でスルホン化する際に約 8% の芳香核重水素の脱落が起ったことを報告している.⁶⁾ 現在のところ芳香核重水素標識の安定性についての報告例はきわめて少ないので, 合成反応における重水素標識の安定性を確実に予測することはむづかしく, したがって新しい重水素標識化合物を合成した場合には, その反応条件下における標識の安定性についても十分な考慮を払うことが必要である.

重水素標識体の物理化学的性質の検討は propiophenone[arom.- $^2\text{H}_5$] (IIIId) および *l*-ephedrine[arom.- $^2\text{H}_5$] (Id) について行なった.

ベンゼン核の水素をすべて重水素化した場合, UV にどのような影響がみられるかは興味深いことであるので

Chart 1. Synthetic Route of *l*-Ephedrine[arom.- $^2\text{H}_5$]

6) D. Raymond, Jr. Kimbrough, *J. Med. Chem.*, **15**, 409 (1972).

III および IIId の等モル濃度の *n*-hexane 溶液中で測定した。その結果、III および IIId と、ベンゼン核とカルボニル基との共役に基づく K 吸収帯は $\lambda_{\max}$ 238 nm (ϵ 12800) に、芳香族分子に特性的である B 吸収帯は $\lambda_{\max}$ 278 nm (ϵ 900) に認められ、両者の吸収帯の波長および強度には全く差が認められなかった。

軽水素体と重水素体の間に UV において全く差異は認められなかったが、IR においてはきわめて明らかな相違が認められた。III および IIId は液膜状で、また I および Id は CCl_4 溶液の形で IR を測定し、それぞれ Fig. 1 と Fig. 2 に図示した。なお、0.1 mm セルを用いた場合の CCl_4 の吸収のために測定できない 730—840 cm^{-1} の領域は I および Id の塩酸塩を KBr 錠剤の形で測定し、Fig. 2 に組み入れた。

著者らはすでに芳香核の特定位置を重水素化すると、IR 上にも部分的な変化が現われ、この変化から標識位置の推定ができるという^{2,3}の例を報告した。^{7,8} ベンゼン核を完全に重水素化した場合の IR 上の変化は全領域に及んだ。IIId および Id では、軽水素体に特徴的である 700, 750 cm^{-1} のモノ置換ベンゼンの $\delta_{\text{C}_{\text{arom.}}-^1\text{H}}$ (面外) 吸収帯は全く消失していた。また、3030—3090 cm^{-1} にみられる $\nu_{\text{C}_{\text{arom.}}-^1\text{H}}$ 吸収帯は完全になくなり、これに代って 2280 cm^{-1} に $\nu_{\text{C}_{\text{arom.}}-^2\text{H}}$ の吸収帯がはっきりと認められた。この結果は、C— ^2H の伸縮振動吸収帯は対応する C— ^1H 吸収帯の波数のほぼ $1/\sqrt{2}$ の領域に現われる⁹⁾ ことと、acetophenone[arom.- $^2\text{H}_5$] の $\nu_{\text{C}_{\text{arom.}}-^2\text{H}}$ 吸収帯が 2290 cm^{-1} に認められるという報告¹⁰⁾ などからも裏付けられた。ベンゼン核 C=C 伸縮振動吸収帯は普通 1600 cm^{-1} 付近に現われ、ベンゼン核に C=O, C=C が共役すると、この吸収帯の強度が著しく大きくなることが知られている。この共役系の存在する IIId の強い $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ 吸収帯は、III のこの吸収帯に対して約 40 cm^{-1} も低波数にはっきりと移動したのが認められた。一方、共役系の存在しない I のこの吸収帯は 1605 cm^{-1} に弱く現われるが、Id では 1570 cm^{-1} にかろうじて認められる吸収帯がこれに相当するものと考えられる。なお、ベンゼン核を重水素化した場合に見られる $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ の低波数側への移動については、最近 styrene- $^2\text{H}_8$ について同じような報告がなされている。¹¹⁾

当然のことではあるが、軽水素体および重水素体の NMR (Fig. 3, Fig. 4) には IR 以上に明らかな差異が認め

Fig. 1. IR Spectra of Propiophenone (Upper) and Propiophenone[arom.- $^2\text{H}_5$] (Lower) (Liquid Film)

Fig. 2. IR Spectra of *l*-Ephedrine (Upper) and *l*-Ephedrine[arom.- $^2\text{H}_5$] (Lower)

Each spectrum was determined as a CCl_4 solution of free base (0.279 m mole/ml) using 0.1 mm cell.

Spectrum between 730—840 cm^{-1} , scanned as a KBr tablet of each hydrochloride, was inserted between spectrum of free base.

7) 馬場茂雄, 森 幸雄, 岩原滋利, 薬誌, **89**, 1158 (1969).

8) 小西徹也, 馬場茂雄, 松浦恒雄, *Radioisotopes*, **20**, 665 (1971).

9) 中西香爾, “赤外線吸収スペクトル定性編,” 第7版, 南江堂, 東京, 1966, pp. 66—67.

10) W. D. Mross, G. Zundel, *Spectrochim. Acta*, **26A**, 1097 (1970).

11) W. D. Mross, G. Zundel, *Spectrochim. Acta*, **26A**, 1109 (1970).

られた。重水素標識体では IIIId, Id とともにベンゼン核プロトンに相当するシグナルは全く認められなかった。この実験事実は、前述の IR 測定結果とともに、IIId より Id を合成する反応条件下において $C_{\text{arom.}}-^2H_5$ は安定であることを支持している。また、III および IIIId の CH_2 基, CH_3 基のプロトンの δ 値を比較した結果は、ベンゼン核重水素標識により側鎖のプロトンは影響を受けないことを示した。

I と Id, および III と IIIId の MS の差異は UV, IR または NMR の場合よりはるかに複雑である。すなわち、後者の場合には測定条件下での標識の安定性に対して考慮を払う必要は全くないが、前者の場合には本

Fig. 3. NMR Spectra of Propiophenone (Left) and Propiophenone[arom.- 2H_5] (Right) (CCl_4)

Fig. 4. NMR Spectra of *l*-Ephedrine-HCl (Left) and *l*-Ephedrine[arom.- 2H_5]-HCl (Right) (D_2O)

Fig. 5. Mass Spectra of Propiophenone (Upper) and Propiophenone[arom.- 2H_5] (Lower)

Fig. 6. Mass Spectra of *l*-Ephedrine-HCl (Upper) and *l*-Ephedrine[arom.- 2H_5]-HCl (Lower)

来の差異のほかにフラグメンテーションの際に側鎖の軽水素とベンゼン核重水素が分子内で交換する可能性や重水素体ではフラグメンテーションの過程にアイソトープ効果が現われる可能性があるからである。たとえば、Holmes 等¹²⁾ は benzoic acid と benzoic acid[carboxyl-²H₁] の MS を比較検討した結果、後者の MS には m/e 105 ($C_6H_5CO^+$) のほかにベンゼン核上の軽水素の一部が COO^2H の重水素と交換して生じた m/e 106 ($C_6H_4^2H_1CO^+$) が現われることを報告している。

Fig. 5 に III および III d の MS を示した。

III の MS において比較的強いピーク強度を示すものは、 m/e 134 (M^+), m/e 105 ($C_6H_5CO^+$), m/e 77 ($C_6H_5^+$) であるが、III d では +5 の位置にそれぞれ対応したピークが現われた。 M^+ ピークでは分子内交換反応は認められなかったが、一部のフラグメントイオンピークには、前述した軽水素-重水素の交換現象が観察された。すなわち、III では m/e 104 に全くピークを認めないが、III d では m/e 109 に、 m/e 110 に対して約 14% の強度を有するピークが現われた。同じ現象が Id の MS において m/e 109, m/e 80, m/e 81 にも観察された (Fig. 6)。

I および Id の MS に共通していることは、側鎖の β 開裂により生じる m/e 58 ($CH_3CH=NH+CH_3$) が基準ピークであり、I では m/e 165, Id では m/e 170 にそれぞれ M^+ ピークを全く認めないことである。さらに、I の MS では m/e 77 ($C_6H_5^+$), m/e 91 ($C_6H_5CH_2^+$), m/e 105 ($C_6H_5CO^+$) が比較的強いピークとして、 m/e 117, m/e 132 にピークがわずかに認められ、Id の MS ではそれぞれ +5 の位置にピークが現われた。I の m/e 117, m/e 132 のピークが Id では m/e 122, m/e 137 に現われたことから、これらのフラグメントイオンピークはベンゼン核を有していることを示している。Fig. 6 に示した I の MS は Reisch 等による I の MS の結果にはば一致していた。¹³⁾

フラグメンテーションの際に側鎖の軽水素とベンゼン核上の重水素が一部交換するということは、重水素標識体およびその代謝産物を MS により定量する場合にきわめて重要なことを指摘している。すなわち、重水素標識体を軽水素体による逆希釈分析法で定量する場合、定量に使用するイオンピークとしては、これらの交換反応の影響を考慮する必要のないピークを選ぶか、適当なピークが見当たらない場合には交換による重水素標識体の見かけ上の減少を補正する必要がある。

Id にはこれらのスペクトルでは検出できるほどの軽水素体は混入していないという確実な証拠が得られ、Id の MS におけるフラグメントイオンピークの一部には側鎖上の軽水素とベンゼン核上の重水素が分子内交換反応を受けていることが示唆されたので、Id をヒトにおける薬物代謝の研究に適用するための基礎的な研究については続報にて報告する。

謝辞 終りに本研究に対して、御鞭撻を賜った東京薬科大学学長 長瀬雄三教授、UV を測定していただいた日製産業日立理化学機器センター、IR を測定していただいた日本分光株式会社に感謝の意を表します。

12) J. L. Holmes, F. Benoit, *Org. Mass Spectrom.*, **4**, 97 (1970).

13) J. Reisch, R. Pagnucco, H. Alfes, N. Jantos, H. Möllmann, *J. Pharm. Pharmacol.*, **20**, 81 (1968).