

TE-031のヒト尿中代謝物の単離同定

安達 孝・森本繁夫・渡辺慶昭・曾田 馨
大正製薬株式会社総合研究所

TE-031(6-O-Methylerythromycin A)のヒトにおける代謝を検討する目的で、TE-031を経口投与した際得られた尿より代謝物の単離を行った。その結果、数種の代謝物が単離され、これらは質量分析、 ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルの解析により、N-demethyl TE-031(M-1), decladinosyl TE-031(M-4), (14R)-14-hydroxy TE-031(M-5), (14S)-14-hydroxy TE-031(M-6), decladinosyl-(14R)-14-hydroxy TE-031(M-8)と構造決定された。

TE-031は大正製薬株式会社に開発された新規14員環マクロライド系抗生物質で、Fig. 1に示す様にエリスロマイシンAの6位水酸基がメチル化されたもの(6-O-methylerythromycin A)である¹⁾。本報ではTE-031を健康成人に投与した際の尿中代謝物の単離同定について報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. ヒト尿の採取

健康成人ボランティア8名にTE-031, 300 mg(cap-sule)を1日2回、計15回経口投与し、得られた尿を室温で保存し、24時間毎に合わせて直ちに抽出した。

2. 代謝物の検索

代謝物の検索方法として薄層クロマトグラフィー(メルク社製5715シルカゲルプレート、展開溶媒: CHCl_3 - $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$, 9:1:0.1(V/V)、検出法: 2%硫酸セリウム/2N H_2SO_4 をスプレーし、110°Cで5分間加熱)および高速液体クロマトグラフィー(カラム: 東洋曹達(株)製 TSK gel ODS 120 A(7.8 mm I.D.×300 mm)、溶媒: $\text{MeOH-H}_2\text{O-ethanolamine}$, 85:15:0.04(V/V)、検出:

UV 220 nm)を使用した。

3. 代謝物の単離

各代謝物の単離精製はメルク社製シリカゲル60を充填したカラムクロマトグラフィーおよびLicroprep 60を用いたカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: CHCl_3 - $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$, 20:1:0.1~10:1:0.1)により行った。M-8を除く代謝物はメタノール、あるいはエタノールより結晶化し構造決定用試料とした。

4. 分析機器

質量分析(MS):

Secondary ionization mass spectrum(SIMS)は、日立製作所製 M-80型質量分析計を使用し、以下の条件で測定した。

一次イオン化ガス: キセノン

一次加速電圧: 8 kV

二次加速電圧: 3 kV

マトリックス: グリセリン

Fast atom bombardment mass spectrum(FAB-MS)は、日本電子(株)製 JMS-DX 303型質量分析計を使用し、以下の条件で測定した。

一次イオン化ガス: キセノン

一次加速電圧: 6 kV

二次加速電圧: 3 kV

マトリックス: グリセリン

核磁気共鳴(NMR):

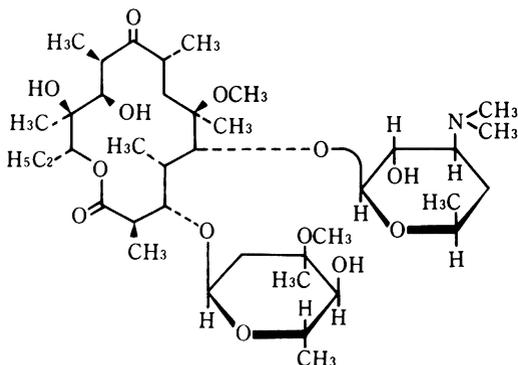
日本電子(株)製 GX-400型を使用し、重クロロホルム中で測定した(内部標準: テトラメチルシラン)。

II. 実験結果

1. 代謝物の検索結果

Fig. 2に尿抽出物の薄層クロマトグラム、Table 1にTE-031および各代謝物の高速液体クロマトグラフィーの分析結果を示した。各代謝物は単離した順にM-1~M-8と命名した。

Fig. 1 Chemical structure of TE-031



2. 代謝物の抽出単離

Fig. 3 に示す方法で代謝物の抽出単離を行った。すなわち、尿を炭酸水素ナトリウム水溶液で pH 10 に調整し、酢酸エチルで抽出した。有機層は尿由来の沈殿を含みエマルジョンとなったので、これをろ別したのち飽和食塩水で洗浄後乾燥した。酢酸エチルを濃縮乾固したのち、残渣をエタノールより結晶化した。結晶区分、ろ液区分をそれぞれシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、各代謝物を単離精製した。最終的に M-1, M-5, M-6, M-7 はエタノールより、また M-4 はメタノールより結晶化して構造決定用試料とした。

3. 代謝物の同定

Fig. 3 に示す方法によって得た各代謝物につきマススペクトル、 ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルを測定し、構造を解析した。Fig. 4 に各代謝物の構造を示す。TE-031 および各代謝物のマススペクトル分析結果を Table 2 に示す。

^1H および ^{13}C NMR スペクトルでの主なケミカルシフ

ト値を Table 3, 4 に示す。なお、M-7 の化学構造については、現在検討中である。

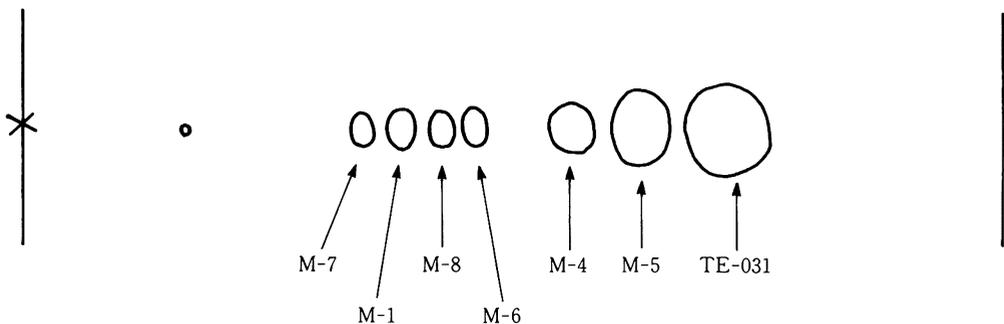
1) M-1 の化学構造

M-1 は FAB-MS の結果、プロトン化分子イオン (MH^+) が TE-031 に比較して 14 質量数少ない m/z 734 に認められ、TE-031 から 1 個のメチル基が脱離した化合物と考えられた。Fig. 5 に示した M-1 の ^1H NMR スペクトルでは、TE-031 (Fig. 6) におけるジメチルアミノ基 ($3'\text{-NMe}_2$, 2.28 ppm) が消失し、0.14 ppm 低磁場シフトした 2.42 ppm にメチルアミノ基 ($3'\text{-NMe}$) が認められることから M-1 の構造を、N-demethyl TE-031 と推定した。M-1 は、TE-031 の合成中間体 N-demethyl TE-031 oxime の脱オキシム化反応によって得られたもの²⁾と各種スペクトルが完全に一致し、その構造を N-demethyl TE-031 と同定した。

2) M-4 の化学構造

M-4 は FAB-MS の結果、プロトン化分子イオン (MH^+) が TE-031 に比較して 158 質量数少ない m/z 590 に

Fig. 2 Thin layer chromatogram of the extract of urine



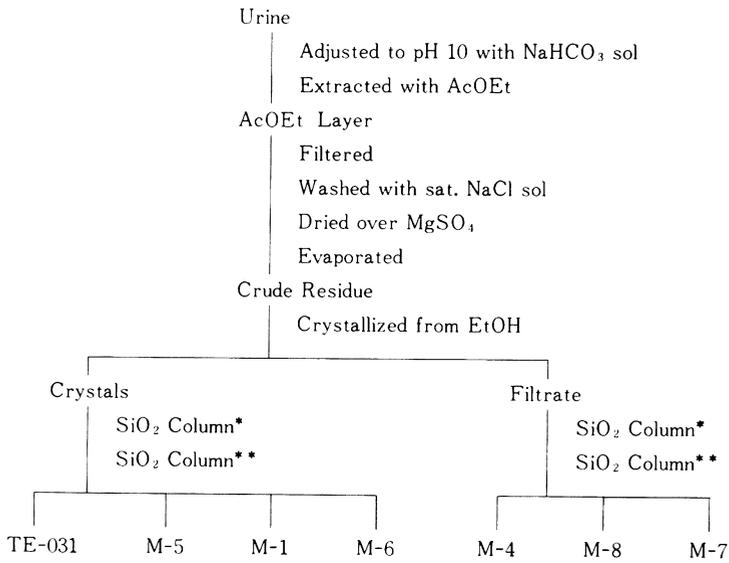
Rf value : TE-031 (0.72), M-5 (0.63), M-4 (0.57)
 M-6 (0.46), M-8 (0.43), M-1 (0.38), M-7 (0.35)
 TLC plate : Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
 Solvent : CHCl_3 -MeOH- NH_4OH , 9 : 1 : 0.1 (V/V)
 Detection : 2% Ce (SO_4) $_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ / 2N H_2SO_4
 Sample : 1000 μg

Table 1 HPLC analysis of TE-031 and its metabolites

Compound	TE-031	M-1	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8
Retention time	12.3	10.8	7.3	9.5	7.6	7.2	6.3

Column : TSK gel ODS 120A (7.8mm I.D. \times 300mm)
 Solvent : MeOH- H_2O -ethanolamine, 85 : 15 : 0.04 (V/V)
 Flow rate : 2.5ml/min UV : 220nm Temperature : 40°C

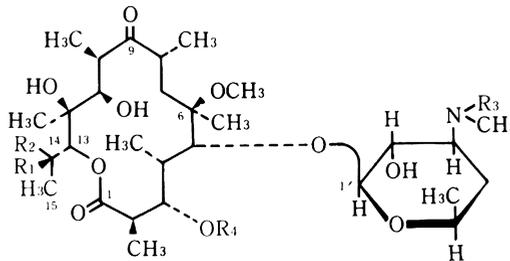
Fig. 3 Extraction and purification procedure for metabolites



* : Silica gel 60 (Merck), CHCl₃-MeOH-NH₄OH, 20:1:0.1, 10:1:0.1

** : Licroprep 60 (Merck), CHCl₃-MeOH-NH₄OH, 20:1:0.1

Fig. 4 Structure of TE-031 and its metabolites



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TE-031	H	H	Me	Cladinose
M-1	H	H	H	Cladinose
M-4	H	H	Me	H
M-5	OH	H	Me	Cladinose
M-6	H	OH	Me	Cladinose
M-8	OH	H	Me	H

Table 2 Mass spectral analysis of TE-031 and its metabolites

Compound Fragmentation	m/z					
	TE-031	M-1	M-4	M-5	M-6	M-8
MH ⁺	748	734	590	764	764	606
MH ⁺ -158	590	576	—	606	606	—
Base peak	158	144	158	158	158	158

Table 3 ¹H NMR chemical shifts of the metabolites of TE-031

Compound Proton	Chemical shifts ^{a)} / Multiplicity ^{b)}					
	H-13	H-14	H-15	6-OMe	3'-NMe ₂	3''-OMe
M-1	5.06 dd	1.48, nd ddq	0.84 t	3.04 s	2.42 ^{c)} s	3.32 s
M-4	5.18 dd	1.49, 1.94 ddq	0.84 t	2.97 s	2.25 s	—
M-5	4.94 d	4.13 dq	1.10 d	3.02 s	2.28 s	3.33 s
M-6	5.06 d	4.40 dq	1.13 d	3.03 s	2.28 s	3.33 s
M-8	5.03 d	4.14 dq	1.11 d	2.96 s	2.25 s	—
TE-031	5.05 dd	1.48, 1.92 ddq	0.85 t	3.04 s	2.28 s	3.33 s

^{a)} : ppm downfield from internal TMS in CDCl₃

^{b)} : d; doublet, dd; double-doublet, dq; doublet of quartet, ddq; double-doublet of quartet, s; singlet, t; triplet

^{c)} : 3'-NHMe

nd : Not determined because of the complexity of the spectrum

Table 4 ¹³C NMR chemical shifts of the metabolites of TE-031

Compound Carbon	Chemical shifts ^{a)}					
	C-13	C-14	C-15	6-OMe	3'-NMe ₂	3''-OMe
M-1	76.7	21.1	10.6	50.6	33.2 ^{b)}	49.5
M-4	76.6	21.4	10.4	49.5	40.2	—
M-5	74.5	66.5	19.8	50.6	40.2	49.5
M-6	75.8	66.2	20.9	50.7	40.3	49.5
M-8	74.7	66.7	19.6	49.5	40.2	—
TE-031	76.7	21.1	10.6	50.7	40.3	49.5

^{a)} : ppm downfield from internal TMS in CDCl₃

^{b)} : 3'-NHMe

認められ、クラジノースが脱離した化合物と考えられた。Fig. 7 に示した M-4 の ^1H NMR スペクトルではクラジノースに由来するシグナル ($3''\text{-OMe}$, $\text{H-}1''$ など) が認められないことより、M-4 の構造は decladinosyl TE-031 と考えられた。TE-031 は希塩酸処理により、decladinosyl TE-031 に変換され³⁾、このものと比較したところ、各種スペクトルが完全に一致し、M-4 の構造を decladinosyl TE-031 と同定した。

3) M-5 および M-6 の化学構造

M-5 および M-6 は FAB-MS の結果、ともにプロトン化分子イオン (MH^+) が TE-031 に比較して 16 質量数多い m/z 764 に認められ、TE-031 に酸素原子が導入された化合物と考えられた。Table 3 に示すように ^1H NMR スペクトルでは TE-031 に比べ、14 位プロトン ($\text{H-}14$) が大きく低磁場シフトしており、M-5, M-6、でそれぞれ 4.13 ppm, 4.40 ppm にシグナルが認められた。この低磁場シフトは TE-031 の 14 位水酸化によるものと考えられた。また、M-5, M-6 の 13, 14, 15 位プロトン ($\text{H-}13$, 14, 15) の分裂パターンはそれぞれ doublet, doublet of quartet, doublet であり、このことは TE-031 の 14 位メチレン炭素が、M-5 および M-6 ではメチン炭素に変換されていることを示している。

Fig. 8 ~ 10 に TE-031, M-5, M-6 の ^{13}C NMR スペクトルを示す。Table 3 に示した M-5, M-6 の 14 位炭素 ($\text{C-}14$) のケミカルシフト値は、それぞれ 66.5 ppm, 66.2

ppm であり TE-031 と比較すると 14 位水酸化に起因する大きな低磁場シフトが観測された。以上の結果より M-5, M-6 の構造を、14-hydroxy TE-031 と推定した。

M-5, M-6 の 14 位の立体構造については、 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルの詳細な解析により、それぞれ R 体, S 体と決定されている^{4,5)}。

4) M-8 の化学構造

M-8 は SIMS の結果、プロトン化分子イオン (MH^+) が m/z 606 に認められた。これは M-5 あるいは M-6 からクラジノースが脱離したものに相当する。Fig. 11 に示した ^1H NMR スペクトルでは、クラジノースに由来するシグナルが認められなかった。Table 3 および 4 に示した M-8 のプロトンおよびカーボンシグナルは、クラジノースを除いて M-5 のそれらと類似していること、さらに、M-8 の 13 位, 14 位プロトン間の結合定数 (9.0 Hz) は M-5 のそれ (9.2 Hz) と類似していることから、M-8 の構造を decladinosyl-(14 R)-14-hydroxy TE-031 と推定した。

III. 考 察

TE-031 のヒト尿中代謝物を薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーで検索し、M-1, M-4, M-5, M-6, M-7, M-8 を見出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、結晶化によりこれらを単離した。Mass, ^1H -NMR および ^{13}C -NMR 分析の結果、これらの代謝物は N-ジメチルアミノ基のメチル基が脱離した N-de-

Fig. 5 ^1H NMR spectrum of M-1 in CDCl_3 (400 MHz)

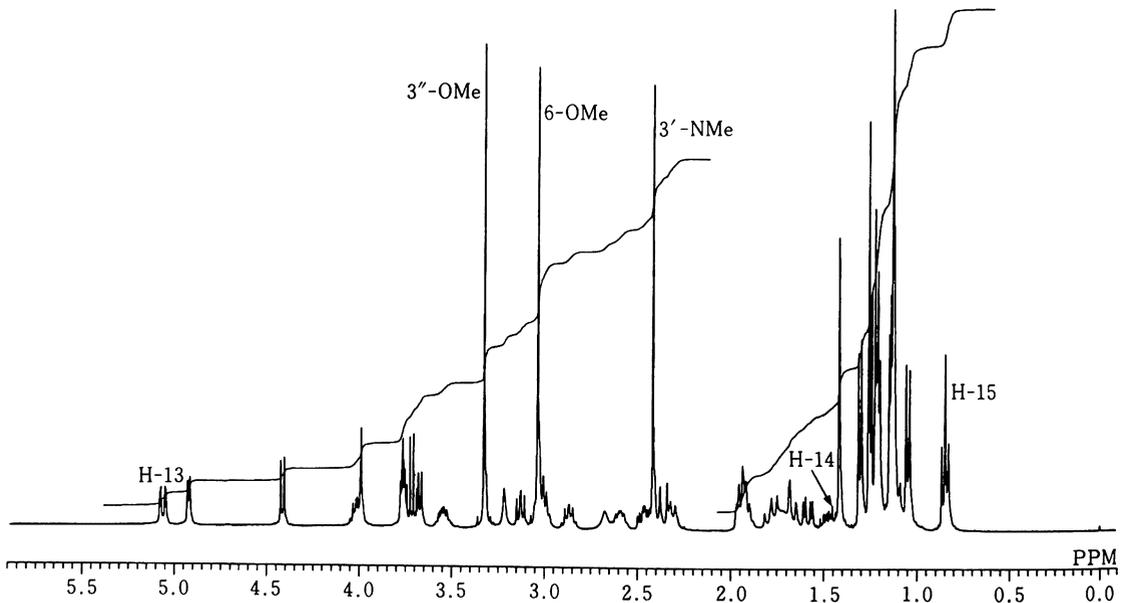


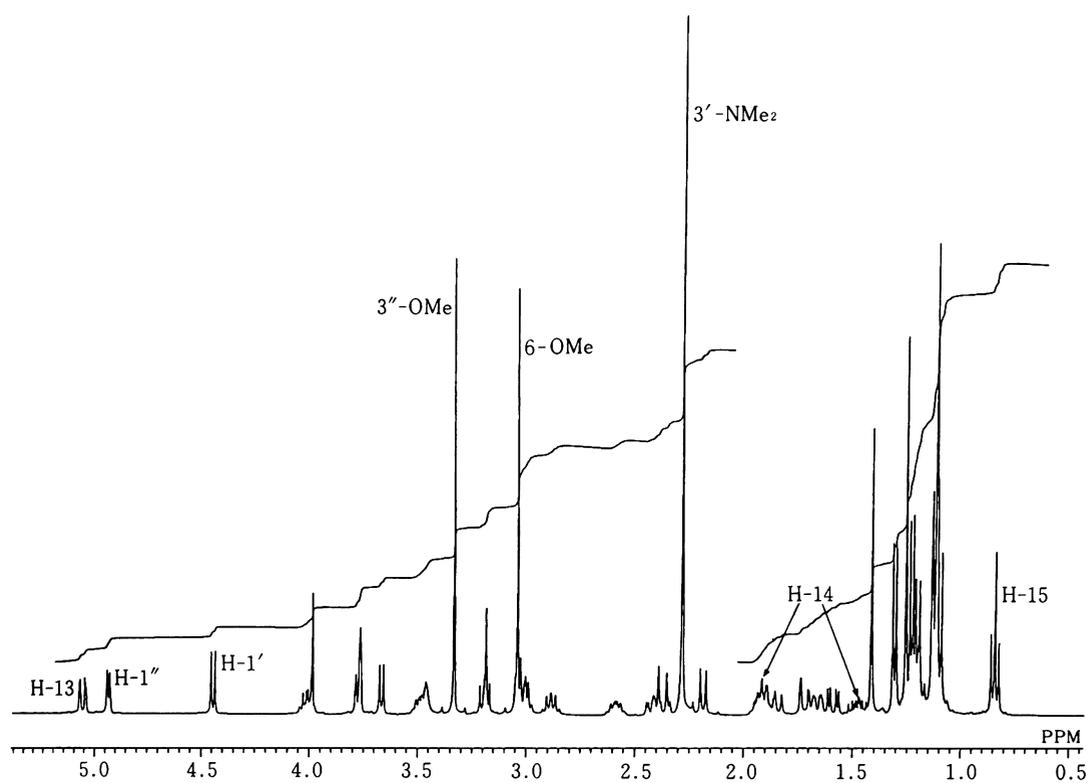
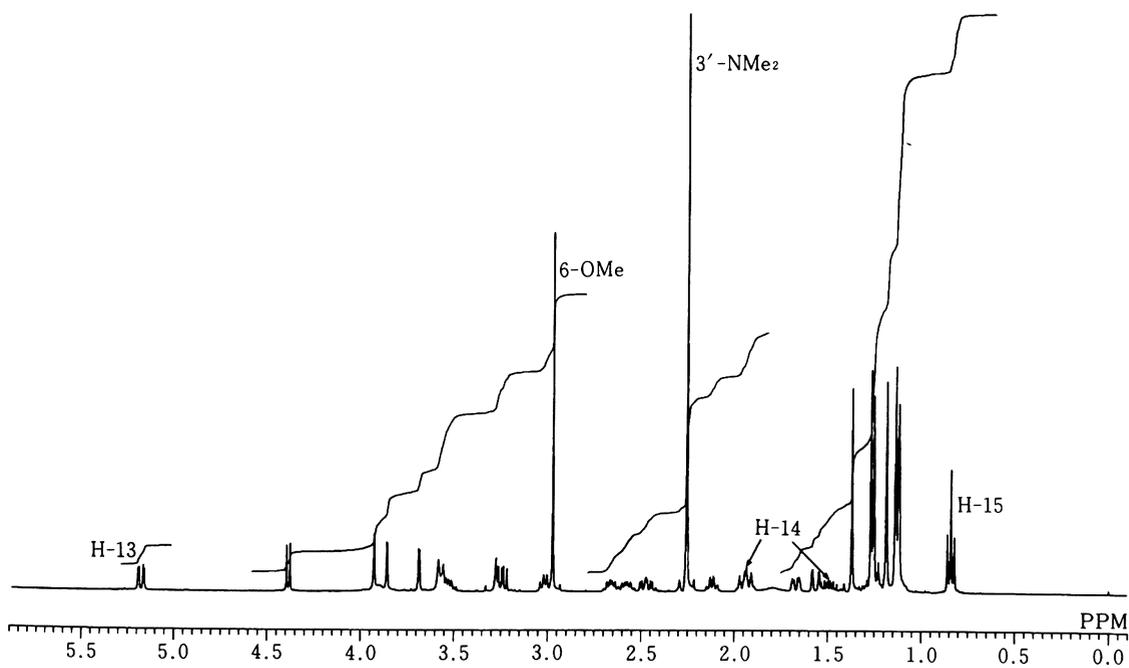
Fig. 6 ^1H NMR spectrum of TE-031 in CDCl_3 (400 MHz)Fig. 7 ^1H NMR spectrum of M-4 in CDCl_3 (400 MHz)

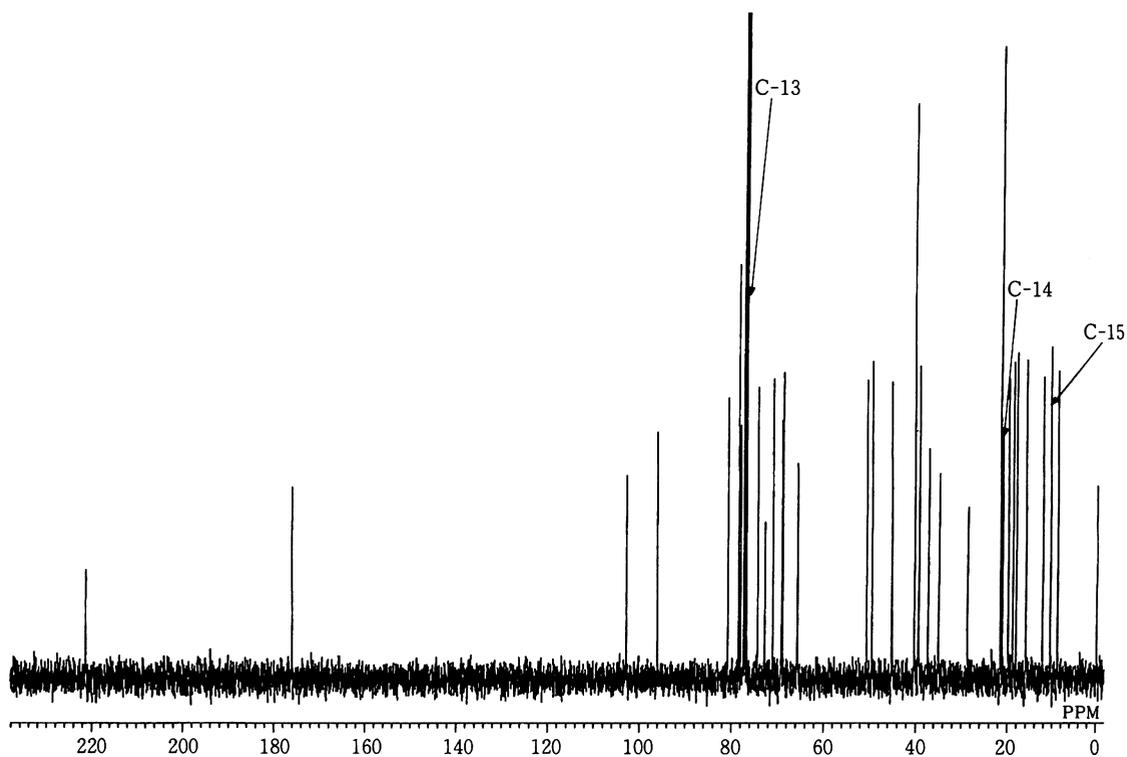
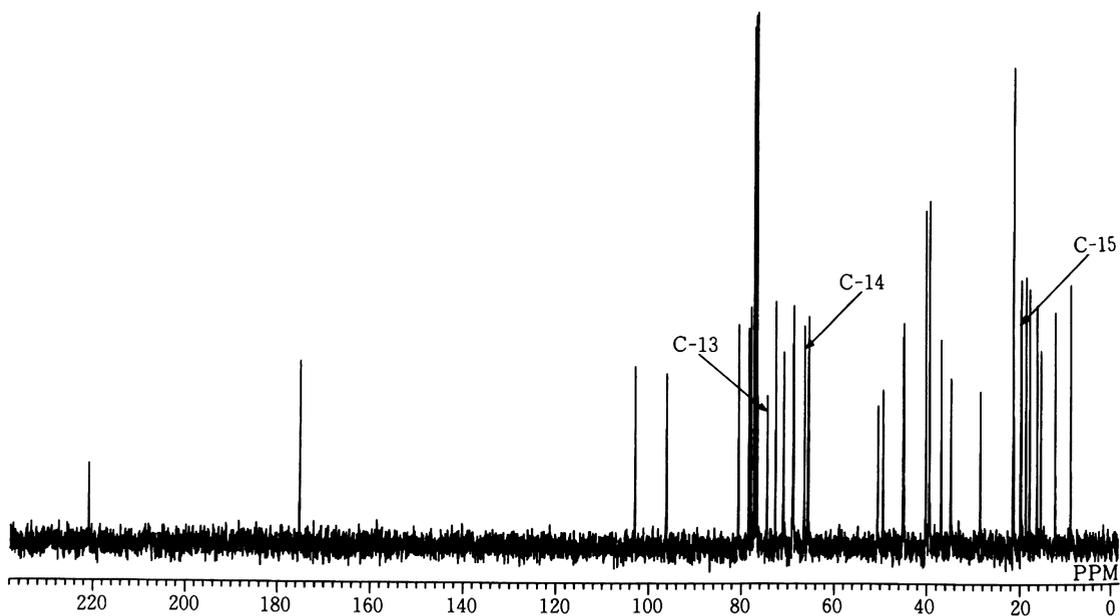
Fig. 8 ^{13}C NMR spectrum of TE-031 in CDCl_3 (100.4 MHz)Fig. 9 ^{13}C NMR spectrum of M-5 in CDCl_3 (100.4 MHz)

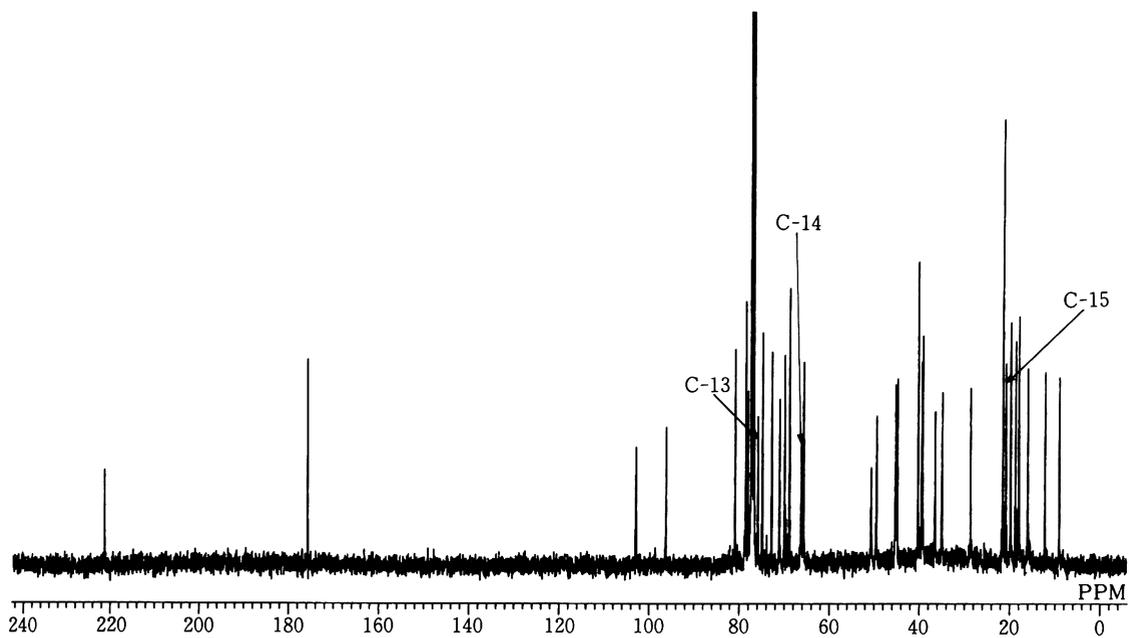
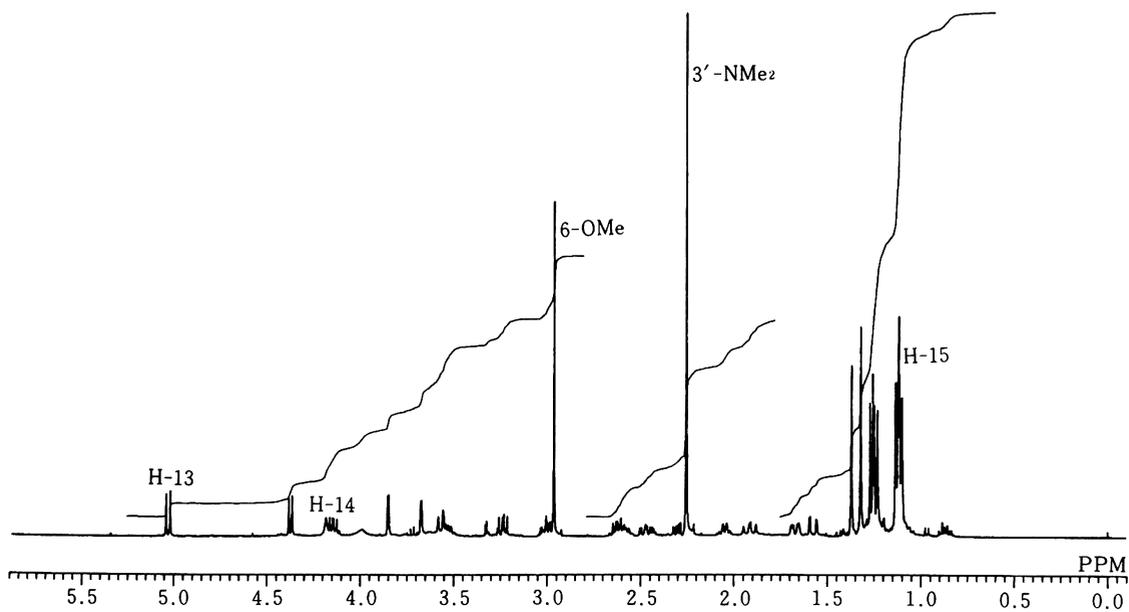
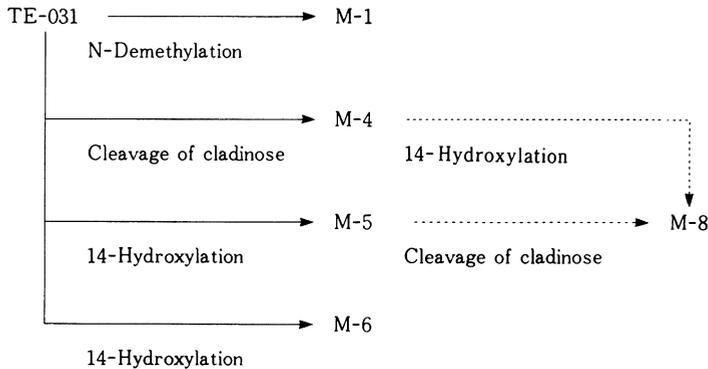
Fig. 10 ^{13}C NMR spectrum of M-6 in CDCl_3 (100.4 MHz)Fig. 11 ^1H NMR spectrum of M-8 in CDCl_3 (400 MHz)

Fig. 12 Proposed metabolic pathway of TE-031 in humans



methyl TE-031 (M-1), ラクトン環の14位が水酸化された(14 R)-および(14 S)-14-hydroxy TE-031 (M-5, M-6), TE-031およびM-5のクラジノースが脱離した decladinosyl TE-031 (M-4), decladinosyl-(14 R)-14-hydroxy TE-031 (M-8)と構造決定した。

各代謝物の構造より TE-031のヒトにおける代謝経路を推定した (Fig. 12)。

従来, エリスロマイシンの代謝に関しては, 3'-N 脱メチル化, クラジノースの脱離, 6,9:9,12-スピロケタルの生成などが知られている⁶⁻⁹⁾。

今回, TE-031のヒトにおける代謝研究の過程で, エリスロマイシンを含む14員環マクロライドで従来知られていなかった代謝経路である14位水酸化を見出すことができた。

文 献

- MORIMOTO, S.; Y. TAKAHASHI, Y. WATANABE & S. ÔMURA : Chemical modification of erythromycins. I. Synthesis and antibacterial activity of 6-O-methylerythromycins. *J. Antibiot.* 37 : 187-189, 1984
- WATANABE, Y.; S. MORIMOTO, M. GOI, M. MITSUKUCHI, T. ADACHI, J. NAKAGAMI, T. ASAKA, T. EGUCHI, & K. SOTA : Method for selective methylation of erythromycin A derivatives. ヨーロッパ公開特許第158467号明細書, 1985
- MORIMOTO, S.; T. ADACHI, Y. TAKAHASHI, T. ASAKA, M. KASHIMURA, Y. WATANABE, S. OMURA & K. SOTA : A new macrolide antibiotic, TE-031 (A-56268). *Synthesis and biological properties.* 26 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy (ICAAC), Abstracts 409, 1986
- NAGATE, T.; T. ADACHI, T. OTAKE, H. YOSHIDA, J. MIYAJI, E. SEKIGUCHI, S. MORIMOTO & S. OMURA : A new macrolide antibiotic, TE-031 (A-56268); Structures and activities of metabolites. *ibid.*, Abstracts 410, 1986
- ADACHI, T.; S. MORIMOTO, H. KONDOH, T. NAGATE, Y. WATANABE & K. SOTA : 14-Hydroxy-6-O-methylerythromycins A. Active metabolites of 6-O-methylerythromycin A in human. *J. Antibiot.* submitted for publication
- WELLES, J. S.; R. C. ANDERSON & K. K. CHEN : A metabolite of erythromycin. *Antibiotics Ann.* 2 : 291-294, 1954-55
- 古川 博 : Erythromycin およびその誘導体の体内動態および代謝に関する研究. *Chemotherapy* 16 : 799-804, 1968
- MAJER, J.; C. RAYA & J. W. CORCORAN : Metabolites of erythromycin in man. 15th Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy (ICAAC), Abstracts 14, 1975
- MAJER, J.; R. S. STANASZEK, S. L. MUELLER & G. MARTI : N-Didemethyl-N-propionyl-6,9;9,12-erythromycin A-spiroketal, A new metabolite of erythromycin ethyl succinate in man. *Drug Metab. Dispos.* 6 : 673-676, 1978

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF METABOLITES OF
TE-031(A-56268)IN HUMAN URINE

TAKASHI ADACHI, SHIGEO MORIMOTO, YOSHIAKI WATANABE and KAORU SOTA
Research Center, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., Saitama

We studied the metabolism of TE-031(6-O-methylerythromycin A, A-56268)after oral administration in humans and isolated several metabolites from urine. The structure of these metabolites was determined as N-demethyl TE-031(M-1), decladinosyl TE-031(M-4), (14R)-14-hydroxy TE-031(M-5), (14S)-14-hydroxy TE-031(M-6)and decladinosyl-(14R)-14-hydroxy TE-031(M-8)by means of mass, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy.