

## [<sup>14</sup>C]Temafloracinのラットにおける代謝物の単離, 同定および定量

河野通弘・児玉裕彦・遠藤美香・大塚峯三・高市雄之  
田辺製薬株式会社薬物代謝研究所\*

[<sup>14</sup>C]Temafloracin(TMFX)をラットに20mg/kg経口投与したときの血漿, 尿および胆汁中の代謝物について検討し, 以下の知見を得た。

1. ラットの血漿および尿中では主に未変化の TMFX として存在し, 血漿中および尿中の全放射能の 94% を占めていた。そのほかピペラジン環の開環した代謝物であるエチレンジアミン体(EDA), メチルエチレンジアミン体(MEDA)が微量検出された。

2. ラット胆汁より TMFX 以外に TMFX のエステル型グルクロン酸抱合体, TMFX の N-硫酸抱合体, EDA, MEDA および EDA, MEDA がさらに酸化的脱アルキル化された代謝物であるアミノキノロン体(AQ)が同定あるいは確認された。

3. ラット胆汁中での主代謝物は TMFX のエステル型グルクロン酸抱合体であり, ついで TMFX, TMFX の N-硫酸抱合体が多く存在した。その他の代謝物 AQ, EDA, MEDA は血漿, 尿および胆汁いずれにおいても各試料中総放射能の 0.6~2.7% に過ぎなかった。

以上より, TMFX はラットにおいては代謝を受けにくく, 大半が未変化体として挙動するものと考えられた。

**Key words** : temafloxacin, ラット, 代謝, グルクロン酸抱合体, 硫酸抱合体

Temafloracin, (±)-1-(2,4-difluorophenyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid monohydrochloride(TMFX)は Abbott 社で創製されたニューキノロン系合成抗菌剤であり, グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示し, 優れた抗菌力を有することが明らかにされている<sup>1,2)</sup>。

すでに, ラットに [<sup>14</sup>C]TMFX を単回あるいは反復経口投与した時の吸収, 分布および排泄について検討した<sup>3,4)</sup>。その結果, TMFX は消化管から速やかに吸収され, 中枢神経系, 眼球を除く殆どの組織に良好に分布した後, 尿と糞中へ排泄されること, 反復投与しても特定の臓器, 組織に蓄積・残留性のないことなどを明らかにした。今回, ラットに [<sup>14</sup>C]TMFX を経口投与後の血漿, 尿および胆汁中代謝物の同定と定量を行ったので報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 供試化合物

実験に使用した [<sup>14</sup>C]TMFX (Lot No. CSL-89-207-77-9) および非標識 TMFX (Lot No. AJM-120) は Abbott 社 (USA) より提供されたものである。標識体の比放射能は 2.33 MBq/mg, HPLC による放射化学的純度は 97% 以上であった。

また, 代謝物の同定のため下記の標品を使用した。アミノキノロン体(AQ), エチレンジアミン体(EDA), メチルエチレンジアミン体(MEDA) は Abbott 社で合成し, アミド体(Fig. 2 参照), 硫酸抱合体(Fig. 5 参照) は当研究所で合成した。β-グルクロニダーゼ(Type H-1, *Helix pomatia*), サルファターゼ(Type H-1, *Helix pomatia*), α-グルコシダーゼ(Type I, Bakers Yeast) は Sigma 社より購入したものを, β-グルコシダーゼ(Grade III, Almonds) は東洋紡より購入したものをを用い, その他の試薬は全て試薬特級を用いた。

#### 2. 実験動物

生後 7~10 週齢, 体重 210~282 g の Slc:SD 系雄性ラット(日本エスエルシー)を用いた。薬物投与前一晚絶食し, 投与後 6~8 時間に給餌(CE-2, 日本クレア)を再開した。水は全ての期間中自由に摂取させた。

#### 3. 投与液の調製および投与方法

[<sup>14</sup>C]TMFX に非標識 TMFX を加え希釈したのち精製水に溶解し, 1.02~2.81 MBq/20 mg/5 ml の投与液を調製した。また, 必要に応じて非標識 TMFX を精製水に添加し, 100 mg/7 ml の投与液を調製した。これらの投与液(20 mg/kg または 100 mg/kg)をゾンデにて胃内に強制投与した。

#### 4. 生体試料の採取

血漿は薬物投与 1 時間後にエーテル麻酔下、ヘパリン処理した注射筒を用いて腹部大動脈より採血し、直ちに遠心分離(3,000 rpm, 10min, 4℃)することにより得た。尿は薬物投与後のラットを直ちにステンレス製の代謝ケージに収容し、24 時間後までの自然排泄尿をドライアイス冷却下に採取した。総胆管にカニューレを施したラットに薬物を投与後、ポールマンケージ(夏目製作所)に収容し、8 時間後までに排泄された胆汁を氷冷下に採取した。これらの試料は分析に供するまで、-20℃で凍結保存した。

#### 5. 放射能の測定

血漿中の放射能はその一部を採取し Aquasol-2(DuPont/NEN Research products)10 ml に溶解した後、液体シンチレーションカウンター(2200CA, Packard)により測定した。尿は水で希釈したのちその一定量を Clear-sol I(ナカライテスク)10 ml に溶解後、胆汁は水で希釈したのちその一部を Hionic fluor(Packard)10 ml に溶解後放射能を測定した。HPLC 移動相中の放射能は直接ラジオアナライザー(Ramona-5-LS, Raytest)にて測定するか、またはフラクションコレクター(FRAC-100, Pharmacia Fine Chemicals)を用いて分取し、Clear-sol I を 10 ml 添加後測定した。

#### 6. 血漿試料の前処理法

血漿試料のアルカリ加水分解および HPLC 測定のための前処理は下記のごとく行った。血漿に等量の 1/15M リン酸緩衝液(pH 7.0)を加え希釈したのち、2N NaOH 水溶液を最終濃度が 0.4N になるように添加し、37℃, 1 時間水浴中にてインキュベーションした。反応終了液を 2N HCl 水溶液にて中和し、限外濾過器(Centrifree, Amicon)にて遠心濾過(2,500g, 30~60 min)した。非濾過画分の血漿に水を添加し再び遠心濾過する操作を 3~4 回行った。得られた濾液を集め凍結乾燥後、少量の水を加え溶解したのち、メンブレンフィルター(0.45 μm, SJHV004NS, 日本ミリポア工業)で濾過し HPLC の分析に供した。また別に、アルカリ処理を行わない血漿についても上記の処理を行い、アルカリ処理を行ったときの定量値との差から各代謝物のグルクロン酸抱合体量を算出した。

#### 7. 尿および胆汁試料の前処理法

尿および胆汁試料のアルカリ加水分解および前処理は下記のごとく行った。尿または胆汁に 2N NaOH 水溶液を添加し(最終濃度: 0.4N), 37℃, 1 時間インキュベーションした。反応終了液に前述のリン酸緩衝液を添加し、2N HCl 水溶液にて中和した。この溶液をメンブレンフィルターで濾過後 HPLC 分析に供した。

尿および胆汁中のグルクロン酸抱合体量も血漿と同様の方法により算出した。

#### 8. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

代謝物の分取・精製、標品との保持時間( $t_R$ )の確認および定量のための HPLC の測定条件は以下の通りである。ポンプは 6000A (Waters), 検出器は F1100 型蛍光検出器(Ex: 280 nm, Em: 460 nm, 日立製作所)または Model 481 型紫外分光検出器(280 nm, Waters)を用いた。カラムは TSK-gel ODS-80TM(150 mm × 4.6 mm ID, 東ソー)を、カラム温度 40℃, 流速 1.0 ml/min で使用した。代謝物の分取・精製は移動相(A): 0.1M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)-アセトニトリル(3:1, v/v)および移動相(B): 精製水-アセトニトリル(5:1, v/v)で行った。また、代謝物と標品の保持時間の確認は移動相(C): 緩衝液(0.4% 1-ラウリル硫酸ナトリウム, 0.01M アセトヒドロキサム酸, 0.08M リン酸, 0.02M リン酸二水素ナトリウム含有)-アセトニトリル(3:2, v/v), 移動相(D): 上記緩衝液-アセトニトリル(55:45, v/v), 移動相(E): 0.1M 酢酸アンモニウム-アセトニトリル(3:1, v/v)および移動相(B)で行った。

#### 9. 代謝物の検索

前述した各生体試料の前処理法に準じて調製したサンプルを、2 種の移動相(C)および(D)の HPLC に注入し、放射性ピークを検出した。また、蛍光吸収クロマトグラムを薬物無投与の各試料のそれと比較検討した。

#### 10. 抱合体の分離・精製

胆汁からの peak 1 および peak 2 の分離は以下のように行った。希釈胆汁を Mega Bond Elut C18 カラム (Analytichem International) に添加し、精製水および 1% メタノールでの溶出液から peak 2 画分を、40% メタノールでの溶出液から peak 1 画分を得た。

##### 1) Peak 1 の精製

上述の方法で得た peak 1 画分を蒸発乾固後、精製水に溶解し、再度 Mega Bond Elut C18 カラムに添加した。カラムを精製水で洗浄後、30% メタノールで溶出して得られた画分を蒸発乾固したのち精製水に溶解し、前述の移動相(B)を用いた HPLC により peak 1 を分取した。

##### 2) Peak 2 の精製

上述の方法で得た peak 2 画分に混在する peak 1 画分を除くため 0.1N NaOH 処理により peak 1 を加水分解して TMFX としたのち、再度 Mega Bond Elut C18 カラムに添加した。精製水および 1% メタノールでの溶出画分を蒸発乾固した後、精製水に溶解し、前述の移動相(A)を用いた HPLC により peak 2 を分取した。

この peak 2 画分を再度 Bond Elut C18 カラムに添加し、メタノールで溶出させることにより peak 2 を得た。

### 11. 抱合体の確認

胆汁からの精製試料および希釈胆汁を、1N NaOH, 1N HCl, 3N NH<sub>4</sub>OH, β-グルクロニダーゼ, アリルサルファターゼ, α-グルコシダーゼあるいはβ-グルコシダーゼと反応後 HPLC に注入し、未処置試料のクロマトグラムと比較することにより抱合体の有無を検討した。

### 12. TMFX 硫酸抱合体の化学合成

Straub らの方法<sup>6)</sup>に準拠し TMFX の硫酸抱合体を合成した。TMFX 2.50 g(5.51 mmol)を2N KOH 水溶液に溶解した。これに(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N-SO<sub>3</sub> 7.67 g(55.1 mmol, 10 等量)を加え室温にて攪拌した。反応液の一部を採取し HPLC にて分析し、TMFX の消失と N-硫酸抱合体の生成を確認したのち、反応終了とした。ついで、HPLC により硫酸抱合体画分を分取・精製した。

### 13. MS/MS 分析

装置は TSQ700 トリプルステージ四重極型 MS/MS システム(Finnigan MAT instruments, Inc.)を用いた。マトリックスはグリセロール：チオグリセロール：m-ニトロベンジルアルコール(2:2:1, v/v)で調製した。FAB は高速中性原子：Xe(8 kV に加速), コリジョンガス：Ar(～0.8 m Torr), コリジョンエネルギー：～20eV にて測定した。

## II. 実験結果

### 1. 代謝物の検索

ラットに [<sup>14</sup>C]TMFX を単回経口投与後の胆汁、尿および除蛋白後の血漿を HPLC に注入したときの放射能と蛍光強度を測定し、それらの典型的なクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

図で示されるように、放射性のピークは血漿、尿、胆汁中からそれぞれ 5 つずつ合計 6 種検出された。2 種の HPLC 移動相における合成標品の保持時間(t<sub>R</sub>)との比較(Table 1)から 6 つの放射性ピークのうち 4 つは TMFX, MEDA, EDA, AQ であることが確認された。構造未知の peak 1 と peak 2 は胆汁中に相当量認められたが、血漿と尿中にはわずしか認められなかった。なお、TMFX, MEDA, EDA, AQ, peak 1 は本蛍光検出条件下(Ex=280 nm, Em=460 nm)において蛍光性を示したが、peak 2 は蛍光性をほとんど示さなかった(Fig. 1-F)。

### 2. 代謝物(peak 1, 2)の構造確認と同定

Fig. 1 に示すように、胆汁中には構造未知の peak 1, 2 が多く認められたので、前述の方法に従い、peak 1,

2 を分離・精製した。

#### 1) Peak 1 の性質と構造確認

Peak 1 はアルカリ条件(1N NaOH)下で容易に加水分解され TMFX に変換するとともに、酸性(1N HCl)下でも 37°C, 1 時間のインキュベーションで約 40% が加水分解され TMFX に変換した(Table 2)。酵素による加水分解実験では、peak 1 はβ-グルクロニダーゼにより一部水解を受け TMFX となったが、完全には加水分解されなかった。サルファターゼ処理では、酵素中に混在するβ-グルクロニダーゼに起因すると推定される量の TMFX の生成が認められた。さらに、enoxacin(ENX)<sup>6)</sup>, lomefloxacin(LFLX)<sup>7)</sup>での報告と同様、アンモニア水で処理すると別途合成した TMFX アミド体と同一の t<sub>R</sub> にピークを示し、エステル型グルクロン酸抱合体の性質を示した(Fig. 2)。これらの結果から、peak 1 は TMFX のエステル型グルクロン酸抱合体であり、グルクロン酸部位が一部生体内あるいは胆汁中で転位<sup>8)</sup>を起こし、β-グルクロニダーゼ抵抗性の化合物に変換したものと推定された。

この構造を確認するために EI/MS, FAB/MS を測定したが、生体マトリックス由来のピークなどにより明確なスペクトルを得ることができなかった。そこで、positive FAB/MS/MS 測定を行った。標準物質の TMFX の FAB/MS/MS から擬分子イオン m/z 418[M+H]<sup>+</sup>が検出されている(Fig. 3-A)。上述のアルカリ加水分解実験や酵素処理の結果から、この抱合体の被抱合部分は TMFX であると判断されたので、この代謝物のフラグメントイオンとして 418 のイオンの存在することが想定される。そこで peak 1 のサンプルについて m/z 418 のベアレントイオンスキャンを行ったところ、m/z 594 のピークがおもな擬分子イオンとして検出された(Fig. 3-B)。594 と 418 との質量差 176 はグルクロン酸部分(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O)に相当する。また、この m/z 176 は電氣的に中性な部分として解離することが知られている<sup>9)</sup>ので、m/z 176 のニュートラルロススキャンを行った。その結果、m/z 594 が検出され(Fig. 3-C)、m/z 176 は m/z 594 から生成したことが確認された。さらに、m/z 594 に由来するフラグメントを見るためドーターイオンスキャンを行った(Fig. 3-D)。m/z 594, 418 以外に脱水によると推定される m/z 400 のピークが検出された。

以上の結果から peak 1 は TMFX がグルクロン酸抱合化されたものであり、さらに加水分解実験の結果をあわせるとその結合位置はカルボン酸であり、かつ抱合化されたのち、胆汁中などでグルクロン酸部位が C-1 位からアシル転位を起こした代謝物であると結論

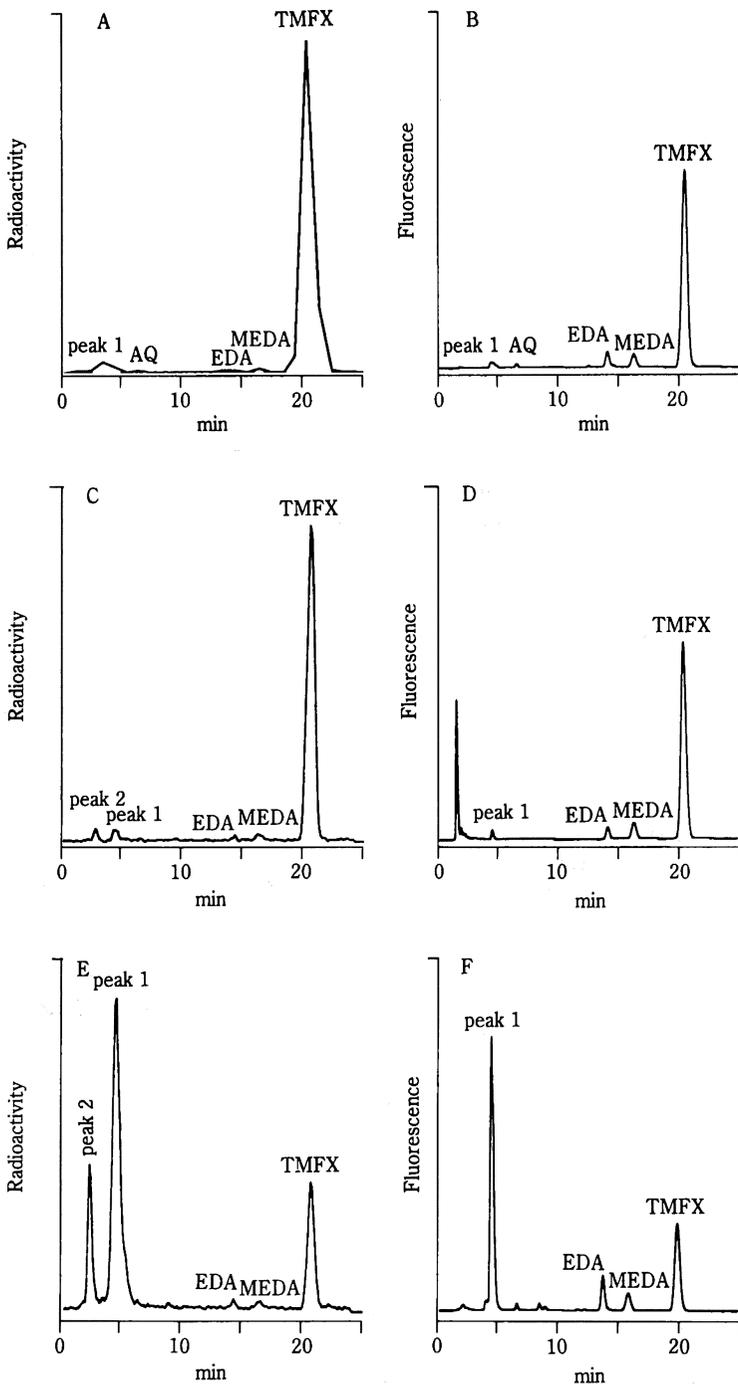


Fig. 1. Typical HPLC chromatograms obtained from plasma (1 h: A, B), urine (0~24 h: C, D) and bile (0~8 h: E, F) after oral administration of [<sup>14</sup>C] temafloxacin (20 mg/kg) to male rats.

された。

2) Peak 2 の性質と構造の同定

Peak 2 は peak 1 と異なり、37°C または 80°C のアルカリ条件 (1N NaOH) 下では加水分解されなかったが、酸性 (1N HCl) 下では 80°C、1 時間の加熱で大部分

加水分解し TMFX が生成した。また、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、サルファターゼ、 $\alpha$ -および  $\beta$ -グルコシダーゼによる加水分解は全く起きなかった (Table 3)。これらの結果から、peak 2 は TMFX の何らかの抱合体であると推定された。

Table 1. Retention times of temafloxacin (TMFX), its related compounds and its metabolites on HPLC

HPLC solvent <sup>2)</sup>		Retention time (min)					
		Bile	Std <sup>1)</sup>	Urine	Std <sup>1)</sup>	Plasma	Std <sup>1)</sup>
C	TMFX	20.0	20.0	20.2	20.1	20.3	20.2
	EDA	13.7	13.8	13.9	13.9	14.0	13.8
	MEDA	15.9	15.9	16.0	16.0	16.1	16.0
	AQ	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
D	TMFX	9.9	9.9	10.1	10.1		
	EDA	7.2	7.2	7.4	7.4		
	MEDA	8.1	8.1	8.3	8.3		
	AQ	5.3	5.4	5.5	5.5		
E	TMFX	7.8	8.0				
	EDA	4.0	4.1				
	MEDA	4.9	5.1				
	AQ	19.9	20.0				

<sup>1)</sup> Std shows that each of the standard samples of EDA, MEDA, AQ and TMFX was added to each biological sample, and then their retention times were analyzed by HPLC.

<sup>2)</sup> Solvent systems

C: Buffer (containing 0.4 % 1-sodium laurylsulfate, 0.01M acetoxyhydroxamic acid, 0.08M phosphoric acid, 0.02M sodium dihydrogenphosphate) - CH<sub>3</sub>CN (3:2, v/v)

D: Buffer (mentioned above) - CH<sub>3</sub>CN (55:45, v/v)

E: 0.1M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> - CH<sub>3</sub>CN (3:1, v/v)

EDA: ethylenediamine derivative of TMFX, MEDA: methylethylenediamine derivative of TMFX, AQ: aminoquinolone derivative of TMFX

Table 2. Effects of treatment with acid, alkaline,  $\beta$ -glucuronidase, arylsulfatase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase on the release of temafloxacin (TMFX) from the metabolite, peak 1

Treatment		Radioactivity recovered (%)		
		Peak 1	TMFX	TMFX amide
Control	(37°C, 1 h)	98	0	
1N HCl	(37°C, 1 h)	57	41	
1N NaOH	(37°C, 1 h)	2	94	
3N NH <sub>4</sub> OH	(37°C, 1 h)	0	62	36
$\beta$ -Glucuronidase	(37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	83	15	
Arylsulfatase	(37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	81	17	
$\alpha$ -Glucosidase	(37°C, 4 h) <sup>2)</sup> *	99	0	
$\beta$ -Glucosidase	(37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	99	1	

\*: The sources of each enzyme are shown in the text.

<sup>1)</sup> 0.25M Acetate buffer (pH 5.0)

<sup>2)</sup> 0.25M Acetate buffer (pH 6.0)

抱合体種を確認するために EI/MS, FAB/MS測定を行ったが、構造解析に十分なスペクトルを得ることができなかった。そこで positive FAB/MS/MS測定を行った。Peak 1 と同様、この抱合体には被抱合部分である TMFX 由来の  $m/z$  418 のイオンの存在が想定されるので、peak 2 の  $m/z$  418 によるペアレントイオンスキャンを行ったところ、 $m/z$  498 のピークがお

もな擬分子イオン( $[M+H]^+$ )として検出された (Fig. 4-A)。498 と 418 との差80は硫酸部分( $\text{SO}_3$ )に相当する質量数であり、この結果は硫酸抱合体から  $m/z$  80 が電気的に中性な部分として解離している可能性を示している。そこで  $m/z$  80 のニュートラルロススキャンを行ったところ  $m/z$  498 が検出され (Fig. 4-B)、確かに  $m/z$  80 は  $m/z$  498 から生成したことが明らかとな

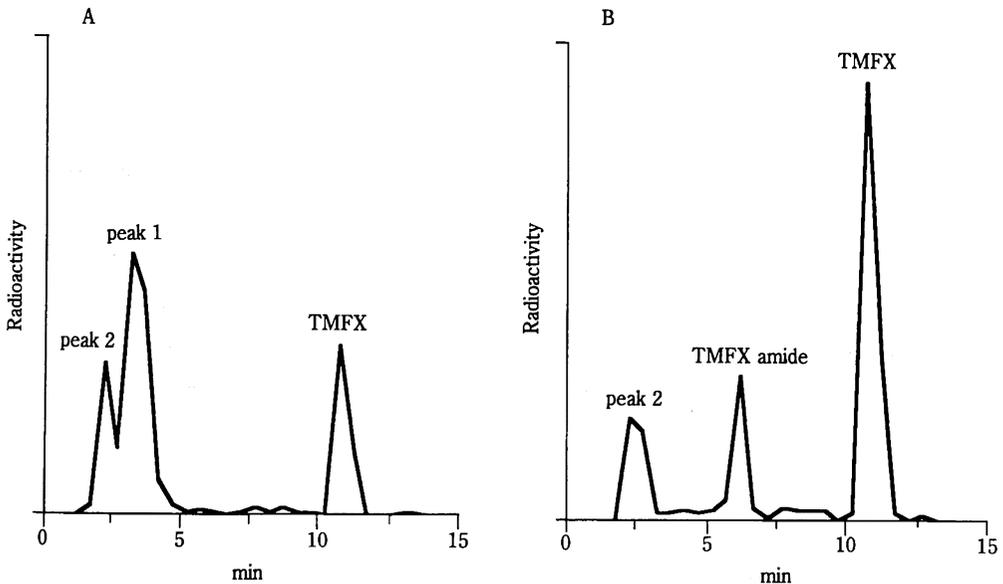
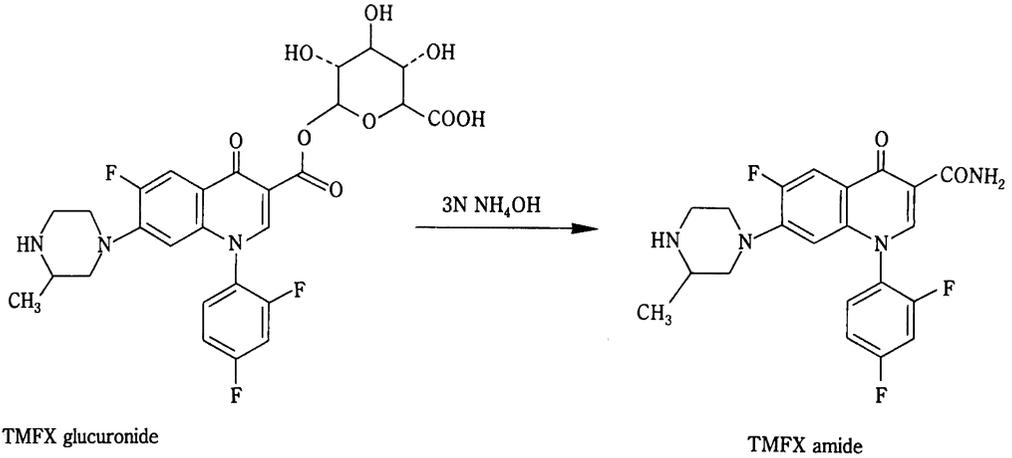
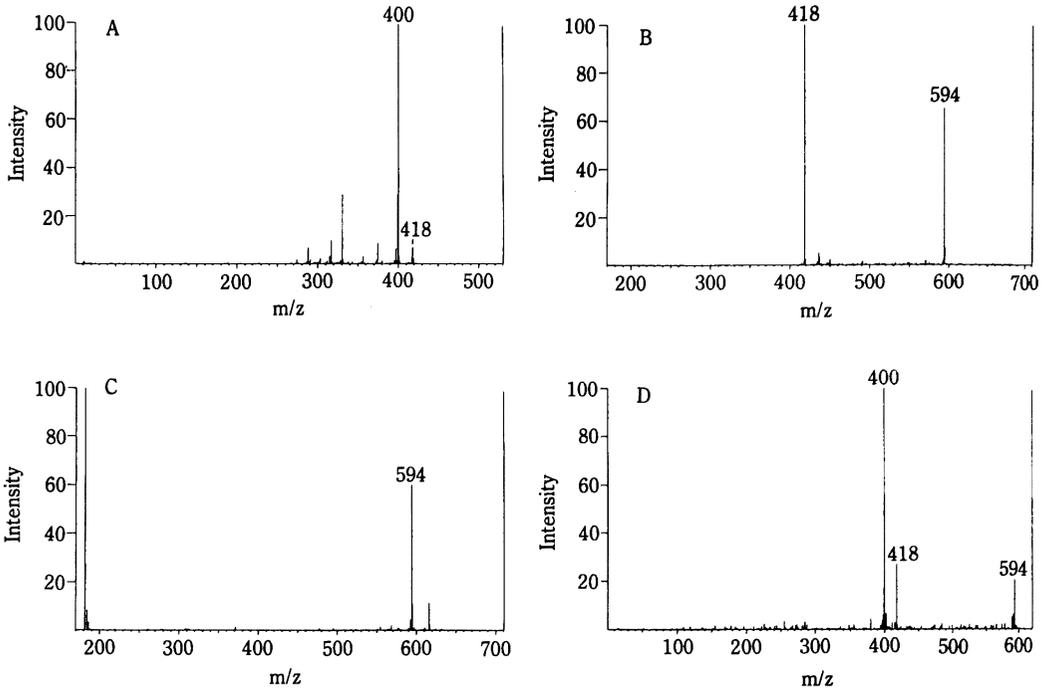


Fig. 2. HPLC chromatograms of 0–8 h bile incubated without (A) or with 3N  $\text{NH}_4\text{OH}$  (B).

った。さらに  $m/z$  498 に由来するフラグメントを見るためドーターイオンキャンを行ったところ、 $m/z$  498, 418 とそれ以外に脱水によると推定される  $m/z$  400 のピークが検出された (Fig. 4-C)。 $m/z$  126 は別途合成したサンプルにおいては検出されず、生体マトリ

ックス由来のピークと想定された。

以上の MS/MS の結果から peak 2 は TMFX の硫酸抱合体であることが示されたので、ピペラジン環の NH 基に硫酸基を導入する目的で Straub の方法<sup>9)</sup> に準拠し、TMFX と  $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$  から標準物質の合成を行



(A): Positive FAB/MS/MS; (B): Parent ion scan of  $m/z$  418; (C): Neutral loss scan of 176 amu; (D): Daughter ion scan of  $m/z$  594.

Fig. 3. Mass spectra of peak 1 isolated from rat bile (B~D) and the authentic sample of temafloxacin (A).

Table 3. Effects of treatment with acid, alkaline,  $\beta$ -glucuronidase, arylsulfatase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase on the release of temafloxacin (TMFX) from the metabolite, peak 2

Treatment	Radioactivity recovered (%)	
	Peak 2	TMFX
Control (80°C, 30 min)	97	0
1N HCl (80°C, 30 min)	11	88
1N NaOH (80°C, 30 min)	99	0
$\beta$ -Glucuronidase (37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	98	0
Arylsulfatase (37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	99	0
$\alpha$ -Glucosidase (37°C, 4 h) <sup>2)</sup> *	98	0
$\beta$ -Glucosidase (37°C, 4 h) <sup>1)</sup> *	99	0

\*: The sources of each enzyme are shown in the text.

<sup>1)</sup> 0.25M Acetate buffer (pH 5.0)

<sup>2)</sup> 0.25M Acetate buffer (pH 6.0)

った (Fig. 5)。HPLC 分析を移動相(A)および UV 検出器にて行うと、反応液中の生成物と peak 2 は TMFX よりも遅く溶出され、両者の  $t_R$  は一致した。さらに、合成 TMFX N-硫酸抱合体の MS/MS データは peak 2 と一致した (Fig. 4-D)。また、合成した TMFX N-硫酸抱合体はサルファターゼによる酵素水解を受けないこと、蛍光吸収性を示さない点でも peak 2 と同様の性質を示した。以上のことから、peak 2 は TMFX の N-硫酸抱合体と同定された。

### 3. 代謝物の定量

#### 1) 血漿中代謝物

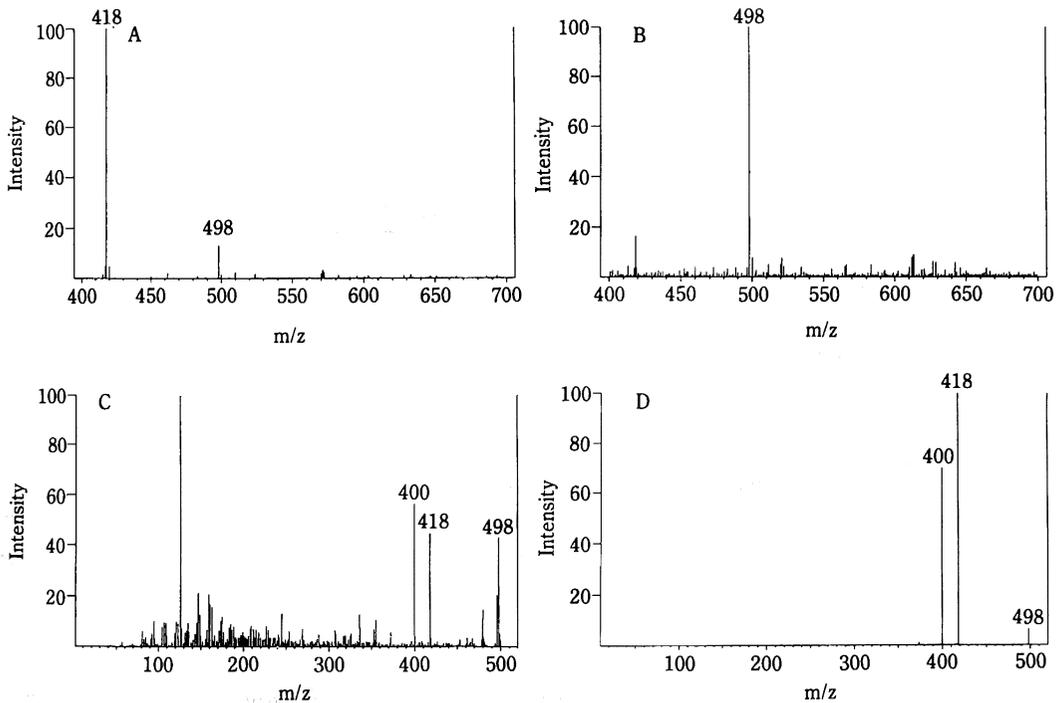
[<sup>14</sup>C]TMFX 投与後 1 時間における血漿中の各代謝物の存在割合を Table 4 に示した。血漿中放射能の 94% は未変化 TMFX であり、TMFX のグルクロン抱合体と硫酸抱合体はそれぞれ、3%、0.3% であった。そのほかピペラジン環の開環体である AQ, EDA, MEDA は遊離体と抱合体の合算量として、それぞれ血漿中放射能の 0.8%、1.0%、0.9% に過ぎなかった。

#### 2) 尿中代謝物

投与後 0~24 時間の尿中の各代謝物の存在割合を Table 5 に示した。血漿中と同様、尿中放射能の 94% が未変化 TMFX であり、TMFX のグルクロン抱合体と硫酸抱合体はそれぞれ 1.3%、1.7% であった。AQ, EDA, MEDA は遊離体と抱合体の合算量として、それぞれ尿中放射能の 0.6%、0.8%、1.4% に過ぎなかった。

#### 3) 胆汁中代謝物

投与後 0~8 時間の胆汁中の各代謝物の存在割合を Table 6 に示した。胆汁中放射能の 57% が TMFX のグルクロン抱合体であり、未変化体とその硫酸抱合体はそれぞれ 19%、17% であった。胆汁中の TMFX のグルクロン酸と硫酸抱合体の割合は、血漿および尿中に比べはるかに高かった。AQ, EDA, MEDA は遊離体と抱合体の合算量として、それぞれ胆汁中放射能の 1.8%、2.7%、2.6% であり、この割合は血漿や尿中と比べ若干高かった。



(A): Parent ion scan of  $m/z$  418; (B): Neutral loss scan of 80 amu; (C): Daughter ion scan of  $m/z$  498; (D): Daughter ion scan of the synthetic sample of temafloxacin N-sulfate

Fig. 4. Mass spectra of peak 2 isolated from rat bile (A~C) and synthesized temafloxacin N-sulfate (D).

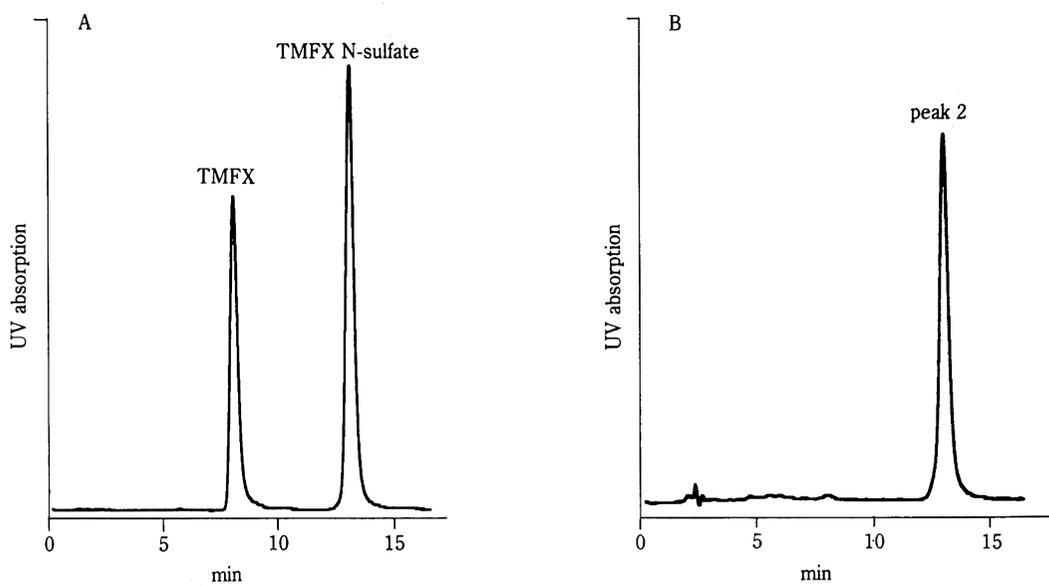
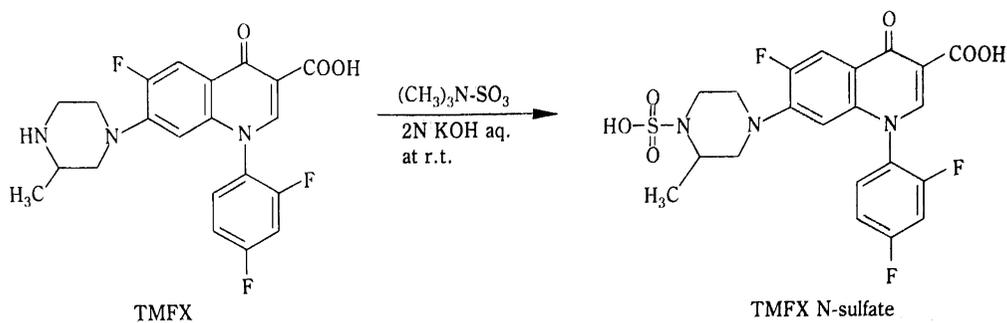


Fig. 5. HPLC chromatograms of synthesized temafloxacin N-sulfate (A) in the reaction mixture and peak 2 (B) extracted from bile.

Table 4. Concentrations of temafloxacin (TMFX) and its metabolites in plasma 1 h after oral administration of [ $^{14}\text{C}$ ] TMFX (20 mg/kg) to male rats

Form	$\mu\text{g equivalent/ml}$			
	TMFX	AQ	EDA	MEDA
Free	$2.9 \pm 0.2$	$0.02 \pm 0.00$	$0.02 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.00$
	( $93.8 \pm 0.5$ )	( $0.52 \pm 0.03$ )	( $0.65 \pm 0.24$ )	( $0.63 \pm 0.08$ )
Glucuronide	$0.1 \pm 0.0$	$0.01 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.00$	$0.01 \pm 0.00$
	( $3.1 \pm 0.5$ )	( $0.31 \pm 0.35$ )	( $0.33 \pm 0.13$ )	( $0.26 \pm 0.10$ )
Sulfate	$0.0 \pm 0.0$	ND	ND	ND
	( $0.3 \pm 0.2$ )			

Each value represents the mean and SD ( $n=3$ ).

Values in parentheses represent % of total plasma radioactivity.

ND: not detected.

### Ⅲ. 考 察

ラットに[<sup>14</sup>C]TMFX を単回経口投与後の血漿および尿中代謝物をラジオ HPLC により検索・定量した結果、各試料中放射能の約94%が未変化体であったことから、構造類似の LFLX<sup>7)</sup>, tosufloxacin (TFLX)<sup>10)</sup> などと同様、TMFX は代謝を受けにくく、大部分が未変化体として体内を挙動していることが明らかとなった。

ラットの血漿、尿および胆汁中から、未変化 TMFX のほかに TMFX のエステル型グルクロン酸抱合体、TMFX の N-硫酸抱合体、ピペラジン環が開環したエチレンジアミノ基を有する EDA, MEDA, さらに酸化的脱アルキル化された代謝物 AQ が微量代謝物として検出・構造確認された。これらの代謝物の構造から、本薬物のラットにおける代謝経路は Fig. 6 に示す通りであると推定された。

AQ, EDA, MEDA のようなピペラジン環が開裂して生じた代謝物は、ピペラジン骨格を有する norfloxacin (NFLX)<sup>11)</sup>, ENX<sup>12)</sup>, ciprofloxacin (CPF<sup>13)</sup>), LFLX<sup>7)</sup>

でも知られている。ピペラジン環の代謝物としては、そのほかに3位または5位のオキソ体や N-アシル体が、ピペラジン環に置換基のない NFLX, ENX, CPF<sup>13)</sup> で知られているが、3位にメチル基を有する LFLX ではそれらの代謝物は検出されておらず、2位および6位炭素の N-C 結合の酸化的開裂を経た代謝物が認められている。TMFX においても同様に、ピペラジン環が酸化された中間体を経て開環体が生成するものと考えられている<sup>14)</sup>。これらのことから、ピペラジン環の代謝は、3位にメチル基を導入することにより N-アシル化が制限され、オキソ体などの酸化中間体から開環体へ反応が進行するようになったと考えられ、ピペラジン環の代謝には環周辺の立体的障害が強く影響すると推察される。このことは3位と5位にメチル基が導入された sparfloxacin (SPFX)<sup>15)</sup> ではオキソ化とアシル化のみならず、開環体の生成も見られないことから支持される。しかし、量的に見るとこれら構造類似のニューキノロン系薬においてはいずれもピペラジン環が代謝を受けた代謝物は微量であり、大部分

Table 5. Excretion of temafloxacin (TMFX) and its metabolites in urine 0~24 h after oral administration of [<sup>14</sup>C] TMFX (20 mg/kg) to male rats

Form	% of Dose			
	TMFX	AQ	EDA	MEDA
Free	41.9 ± 1.3 (94.1 ± 0.3)	0.08 ± 0.07 (0.19 ± 0.17)	0.30 ± 0.03 (0.67 ± 0.08)	0.60 ± 0.13 (1.34 ± 0.28)
Glucuronide	0.6 ± 0.4 (1.3 ± 0.7)	0.19 ± 0.11 (0.39 ± 0.22)	0.04 ± 0.04 (0.08 ± 0.08)	0.02 ± 0.02 (0.04 ± 0.04)
Sulfate	0.8 ± 0.1 (1.7 ± 0.3)	ND	ND	ND

Each value represents the mean and SD (n=3).

Values in parentheses represent % of total radioactivity in the urine.

ND: not detected.

Table 6. Excretion of temafloxacin (TMFX) and its metabolites in bile 0~8 h after oral administration of [<sup>14</sup>C] TMFX (20 mg/kg) to male rats

Form	% of Dose			
	TMFX	AQ	EDA	MEDA
Free	4.4 ± 1.5 (18.8 ± 2.9)	0.04 ± 0.07 (0.15 ± 0.25)	0.14 ± 0.07 (0.56 ± 0.18)	0.13 ± 0.09 (0.52 ± 0.32)
Glucuronide	12.9 ± 3.0 (56.6 ± 2.2)	0.36 ± 0.13 (1.61 ± 0.62)	0.51 ± 0.27 (2.14 ± 0.71)	0.48 ± 0.12 (2.11 ± 0.42)
Sulfate	3.9 ± 1.3 (16.7 ± 2.3)	ND	ND	ND

Each value represents the mean and SD (n=3).

Values in parentheses represent % of total radioactivity in the bile.

ND: not detected.

は未変化体のままであった。

グルクロン酸抱合体の生成は、ENX<sup>12)</sup>, ofloxacin (OFLX)<sup>16)</sup>, LFLX<sup>7)</sup>, TFLX<sup>17)</sup> なども報告されており、キノロン系抗菌剤において共通の代謝経路と考えられる。TMFX のグルクロン酸抱合体は胆汁中の主代謝物(57%)であったが、血漿と尿中では1~3%と微量であった。TMFX グルクロン酸抱合体は、アルカリ条件下では容易に加水分解され TMFX に変換したが、 $\beta$ -グルクロナダーゼ処理では一部しか加水分解されず(Table 2)、 $\beta$ -グルクロナダーゼ抵抗性の強いグルクロン酸抱合体であると推定された。LFLX<sup>7)</sup>, OFLX<sup>16)</sup> のグルクロン酸抱合体は $\beta$ -グルクロナダーゼにより容易に加水分解され対応するアグリコンを生成することが知られている。一方、SPFX のグルクロン酸抱合体は、pH 7.4 以上の緩衝液やラットの生体試料に添加したときは $\beta$ -グルクロナダーゼでは水解されない化合物に変換することが認められている<sup>18)</sup>。このような現象は生体内物質である bilirubin や他の薬物の抱合体でも報告されており<sup>19-21)</sup>、この原因として、抱合されたグルクロン酸部分がアシル転位を起こし、その結果、抵抗性を示すものと推測されている。TMFX や SPFX のグルクロン酸抱合体がなぜ $\beta$ -グルクロナダーゼに抵抗性を示すかについては現時点までの検討では不明であるが、ピリルビン酸<sup>19)</sup>やフロセミド<sup>21)</sup>のグルクロン酸抱合体が、アルカリ性で容易にアシル転位を起こし

$\beta$ -グルクロナダーゼ抵抗性の化合物に変換することから、TMFX グルクロン酸抱合体においてもそれらの化合物と同様の機序によりアシル転位を起こしたものと推定された。

TMFX の硫酸抱合体は胆汁中の約 17% と比較的多く認められた。また、硫酸抱合体の結合位置は、合成標準物質との比較からピペラジン環の2級アミンであることが判明した。N-硫酸抱合体はピペラジン環を有するチアラマイド<sup>22)</sup>や類薬である CPFX<sup>13)</sup> で知られており、末端にピペラジン環を有する化合物では一般的な代謝経路であろうと推測されている。TMFX の硫酸抱合体はアリルサルファターゼで加水分解されなかった。N-硫酸抱合体は本酵素の基質とはならないので<sup>23)</sup>、この点も硫酸基の結合位置が窒素原子であることを支持している。

TMFX、そのグルクロン酸抱合体およびピペラジン環の開環体(AQ, EDA, MEDA)は蛍光吸収性を示すが、TMFX の N-硫酸抱合体のみは蛍光性を示さなかった。CPFX でもその硫酸抱合体の蛍光性が著しく減少することが報告されている<sup>24)</sup>。しかしながら、蛍光性の低下の原因あるいは化学構造上からの解釈については現在のところ明らかでない。

以上の結果から、ラットに TMFX を経口投与した時、本薬物はラット体内でほとんど代謝されないことが明らかとなった。生成した代謝物の中では TMFX

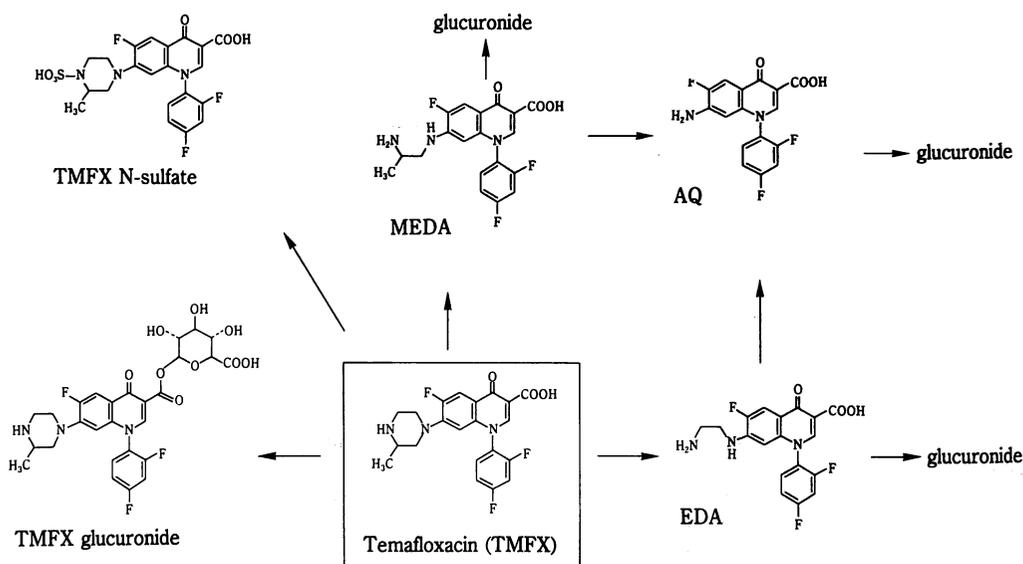


Fig. 6. Postulated metabolic pathways of temafloxacin in rats.

のエステル型グルクロン酸抱合体が最も多く、ついで TMFX の N-硫酸抱合体であり、そのほか、ピペラジン環が開裂した EDA, MEDA, AQ などの代謝物が生成した。また、代謝物の生成経路は Fig. 6 のように推定された。

### 謝 辞

本試験においてマススペクトルの測定に御協力いただいたフィンニガン・マツ・インスツルメンツ(株)の金井みち子氏ならびに田辺製薬(株)有機化学研究所の椎名園子氏に深謝致します。

(実施期間：1990年5月～1991年9月)

### 文 献

- 1) Hardy D J, Swanson R N, Hensey D M, Ramer N R, Bower R R, Hanson C W, Chu D T W and Fernandes P B: Comparative antibacterial activities of temafloxacin hydrochloride(A-62254) and two reference fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1768～1774, 1987
- 2) 松下忠弘, 押田忠弘, 恩田時男, 内藤真智子, 山口東太郎: Temafloxacin の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy* 41 (S-5): 67～80, 1993
- 3) 遠藤美香, 河野通弘, 山田泰弘, 大塚峯三, 高市雄之, 相原道明: [<sup>14</sup>C]Temafloxacin のラットにおける吸収, 分布および排泄. *Chemotherapy* 41 (S-5): 140～154, 1993
- 4) 相原道明, 重松昭世, 大塚峯三, 高市雄之: [<sup>14</sup>C] Temafloxacin のラットにおける反復経口投与時の吸収, 分布および排泄. *Chemotherapy* 41 (S-5): 155～163, 1993
- 5) Straub K, Davis M and Hwang B: Benzazepine metabolism revisited evidence for the formation of novel amine conjugates. *Drug Metab Dispos* 16: 359～366, 1988
- 6) 藤井敏彦, 古川日出男, 吉田耕治, 宮崎 亀, 橋本昌久: <sup>14</sup>C標識 AT-2266 のラットにおける体内動態, 第1報 1回投与試験. *Chemotherapy* 32(S-3): 117～135, 1984
- 7) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 長谷川洋通, 樋崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態 V, <sup>14</sup>C-NY-198 によるラット, イヌにおける代謝. *Chemotherapy* 36(S-2): 174～187, 1988
- 8) Dickinson R G, Hooper W D and Eadie M J: pH-Dependent rearrangement of the biosynthetic ester glucuronide of valproic acid to  $\beta$ -glucuronidase-resistant forms. *Drug Metab Dispos* 12: 247～252, 1984
- 9) Rudewicz P and Straub K M: Rapid structure elucidation of catecholamine conjugates with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 58 : 2928～2934, 1986
- 10) 田井 賢, 酒井広志, 新田 純, 早川大善, 杉本由美子, 林 清範, 前田豊男: ピリドンカルボン酸系抗菌剤の代謝研究 (第2報) (±)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-(2,4-difluorophenyl)-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid p-toluenesulfonate hydrate(T-3262)の血中, 尿中, 胆汁中及び糞中代謝物の定量. *Jap J Antibiotics* 42: 876～886, 1989
- 11) 永津芳雄, 遠藤恭平, 入倉 勉: <sup>14</sup>C標識 AM-715 による代謝に関する研究. *Chemotherapy* 29(S-4): 119～127, 1981
- 12) 関根 豊, 山口俊和, 宮本美枝, 鈴木玲子, 吉田耕治, 南 明, 中村信一, 橋本昌久: AT-2266の生体内動態 I, ラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝. *Chemotherapy* 32(S-3): 95～102, 1984
- 13) Gau W, Kurz J, Petersen U, Ploschke H J and Wuensche C: Isolation and structural elucidation of urinary metabolites. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 36(II): 1545～1549, 1986
- 14) Granneman G R: Pharmacokinetics of temafloxacin in subjects with various degrees of renal impairment. *Abbott-63004 Drug Metabolism Report No. 36*, 1989
- 15) 山口俊和, 横川真喜子, 坂下素子, 糸川 彰, 黒野益夫, 関根 豊: Sparfloxacin のラット, イヌ, サル, ヒトにおける代謝. *薬物動態*, 6: 21～32, 1991
- 16) 須藤賢一, 橋本浩一, 倉田忠司, 岡崎 治, 津村光義, 立澤晴男: DL-8280 の体内動態, 第3報 <sup>14</sup>C-DL-8280の各種動物における代謝. *Chemotherapy* 32(S-1): 1203～1209, 1984
- 17) 田井 賢, 小西義憲, 杉本由美子, 出町久美子, 前田豊男: ピリドンカルボン酸系抗菌剤の代謝研究(第1報), (±)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1-(2, 4-difluorophenyl)-1, 4-dihydro-4-oxo-1, 8-naphthyridine-3-carboxylic acid p-toluenesulfonate hydrate (T-3262)の尿中代謝物の単離及び同定. *Jap J Antibiotics* 42 : 868～875, 1989
- 18) Sudo K, Okazaki O, Tsumura M and Tachizawa

- H: Isolation and identification of metabolites of ofloxacin in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* 16: 725~732, 1986
- 19) Blanckaert N, Compennolle F, Leroy P, Houtte R V, Fevery J and Heirwegh K P M: The fate of bilirubin-IX<sub>a</sub> glucuronide in cholestasis and during storage *in vitro*. Intramolecular rearrangement to positional isomers of glucuronic acid. *Biochem J* 171: 203~214, 1978
- 20) Sinclair K and Caldwell J: The formation of  $\beta$ -glucuronidase resistant glucuronides by the intramolecular rearrangement of glucuronic acid conjugates at mild alkaline pH. *Biochem Pharmacol* 31: 953~957, 1982
- 21) Rachmel A, Hazelton G A, Yergey A L and Liberato D J: Furosemide 1-O-acyl glucuronide *in vitro* biosynthesis and pH-dependent isomerization to  $\beta$ -glucuronidase-resistant forms. *Drug Metab Dispos* 13: 705~710, 1985
- 22) Iwasaki K, Shiraga T, Noda K, Tada K and Noguchi H: Terminal N-sulphoconjugation of an alicyclic amine(piperazine), identified as a new metabolite of tiaramide in mouse and rat. *Xenobiotica* 13: 273~278, 1983
- 23) Jerfy A and Roy A B: Sulphated derivatives of some hydroxypyridines. *Aust J Chem* 23: 847~852, 1970
- 24) Scholl H, Schmidt K and Weber B: Sensitive and selective determination of picogram amounts of ciprofloxacin and its metabolites in biological samples using high-performance liquid chromatography and photothermal post-column derivatization. *J Chromatogr* 416: 321~330, 1987

### Isolation, identification and quantification of metabolites of [<sup>14</sup>C]temafloxacin in rats

Michihiro Kohno, Hirohiko Kodama, Mika Endo, Minezo Otsuka and Osasi Takaiti  
 Research Laboratory of Drug Metabolism, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.  
 2-2-50 Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan

The metabolism of temafloxacin (TMFX) was studied in rats after oral administration of [<sup>14</sup>C] TMFX (20 mg/kg).

1. In plasma and urine, unchanged TMFX accounted for 94% of total plasma or urinary radioactivity. Metabolites, EDA and MEDA, which were formed by oxidation and cleavage of the piperazine ring of TMFX, were detected with tracer amounts.

2. Two major metabolites together with unchanged TMFX were detected and identified in bile: glucuronic acid conjugate and sulfuric acid conjugate of TMFX. Three other minor metabolites, EDA, MEDA and aminoquinolone derivative (AQ) of TMFX, were also detected and characterized in bile.

3. The main metabolite in bile was the ester glucuronide of TMFX, followed by unchanged TMFX and TMFX N-sulfate. Other metabolites, AQ, EDA and MEDA, accounted for only 0.6 to 2.7% of total plasma, urinary and biliary radioactivity.

These results suggest that TMFX is hardly metabolized in rats, and most orally administered TMFX behaves as unchanged drug.