

阿奇霉素中相关物质的研究

姜建国^{1*}, 张西茹¹, 吴如金², 杨 梁¹

(¹ 河北省药品检验所, 石家庄 050011; ² 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 研究阿奇霉素中的相关物质。方法: 运用色谱学和波谱学方法分离鉴定阿奇霉素中的相关物质。结果: 从阿奇霉素中分离得到 4 个相关物质, 鉴定了其中 2 个主要相关物质的结构分别为 3'-氮去甲基阿奇霉素和 12-脱氧阿奇霉素。结论: 4 个相关物质均为首次从阿奇霉素粗品中分离得到的新化合物, 但其中 2 个有待进一步鉴定。

【关键词】 阿奇霉素; 相关物质; 分离; 鉴定

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)01-0043-04

阿奇霉素^[1] (azithromycin) 是由南斯拉夫 Sourpliva 公司开发研制的新一代大环内酯类抗生素, 其作用机理与红霉素相似, 通过抑制细菌蛋白质的合成而起作用。具有抗菌谱广、副作用小、临床应用广泛等优点。目前, 国内已有多家药厂生产该产品及其制剂。试验发现, 阿奇霉素中至少含有 5 个相关物质, 其化学成分尚未见报道。本文用反相高效液相色谱法从阿奇霉素粗品中分离出 4 个相关物质, 并用现代波谱技术 (UV, IR, MS, NMR 及 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 等 2D 相关谱) 对其中 2 个主要相关物质的化学成分进行了鉴定, 这 2 个相关物质均系首次从阿奇霉素粗品中分得并鉴定的新化合物。

1 仪器与试剂

Waters 515 型液相色谱仪, Waters 2487 型紫外检测器和 996 型二极管阵列检测器, Waters 717 自动进样器, Luna C₁₈(2) 耐碱色谱柱 (10 mm×250 mm); 天津大学精密仪器厂 YRT-2 药物熔点仪, 温度未校正; 岛津 FTIR-8201 型红外分光光度计; PE-241MC 型分光旋光仪; Waters ZMD 质谱检测器 (ESI); Bruker Avance DRX-500 型核磁共振仪 (TMS 内标); 北京通用 UV-1221 型紫外分光光度计。

2 分离和制备

取阿奇霉素粗品 10 g, 用流动相 50 ml 溶解, 0.45 μm 滤膜滤过, 注入 Waters 515 型液相色谱仪,

以甲醇-水-三乙胺 (918 : 80 : 2) 为流动相, 按峰收集洗脱液, 于 50 °C 水浴上蒸发并同时用 N₂ 气轻吹液体表面至甲醇水挥发完全, 得相关物质 I、II、III 和 IV 粗品, 用上述色谱条件将制得的各相关物质粗品进行 2 次制备, 得相关物质 I (18 mg)、II (9 mg)、III (17 mg) 和 IV (72 mg) 精品。

3 结构鉴定

相关物质 III 白色晶状粉末, mp 114 ~ 116 °C (CH₃OH), 融熔时同时分解。UV (CH₃OH) λ_{max} (ε) 205 (4.42), 215 (3.11) nm; [α]_D²⁰ -45° (c 5.0 CH₃CH₂OH)。IR (KBr): ν₃₄₈₀, 2690, 1740, 1465, 1380, 1170, 1050 cm⁻¹。

从 ESI-MS 得出有关物质 II 的分子量为 734, 比阿奇霉素的分子量 748 少 14, 相当于 CH₂, 从而推测有关物质 II 的分子式为: C₃₇H₇₀N₂O₁₂ (IID)。

¹³CNMR (125 MHz CDCl₃) DEPT 谱显示有关物质 II 共有 37 条谱线, 其中 4 个季碳, 15 个叔碳, 5 个仲碳和 13 个伯碳。与阿奇霉素的碳谱相比较, 有关物质 II 少了一个甲基碳, 故可初步认为有关物质 II 可能为去甲基阿奇霉素。

有关物质 II 的 ¹HNMR (500 MHz) 和 ¹³CNMR (125 MHz) 的 δ 值及其归属列于表 1。 ¹H-¹H COSY、HMQC 和 HMBC 二维谱的解析列于表 2。表 1 和表 2 中的数据与文献 [2] 中阿奇霉素的相关数据相比较, 除 3' 位上少了一个甲基碳, 其余数据均极为一致, 故

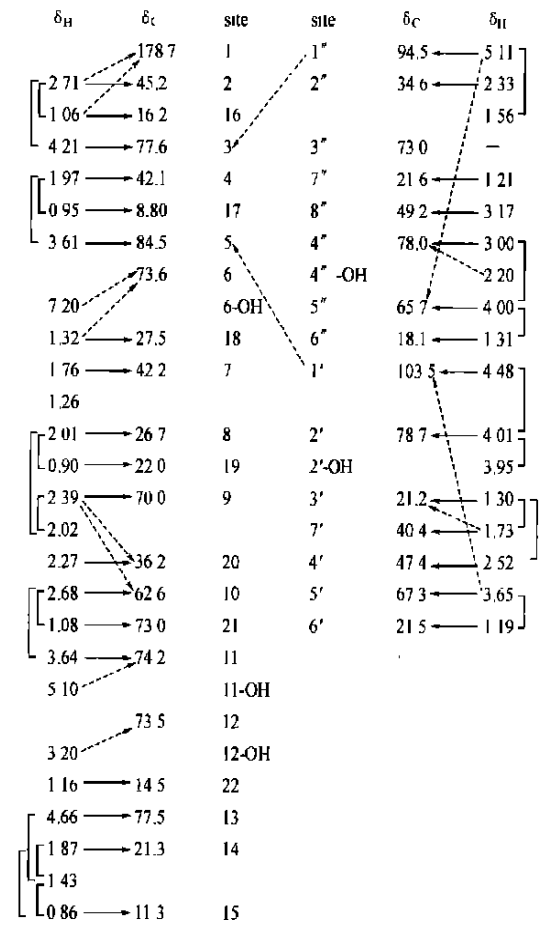
推测相关物质 III 为 3'-去甲基阿奇霉素 (3'-demethyl-lazithromycin), 其结构见图 1。

相关物质 III 的 ESI-MS 示有: m/z 734 (15, M^+), 558[75, M-(3'-O-糖)-H], 557[100, M-(3'-O-糖)], 396[8, 557-(5'-O-氨基糖)-H], 161[5, (5'-O-糖)+H], 113[95, 161-H₂O-NHCH₃]。质谱数据及上述裂解规律也佐证所推定结构的正确。

Tab 1. ¹H and ¹³CNMR spectra of related substance III in CDCl₃

Site	δ ¹³ C	δ ¹ H	J(HH) (Hz)	
1	178.7			
2	45.2	2.71	dq	7.5, 3.0
3	77.6	4.21	dd	5.5, 3.0
4	42.1	1.97	m	
5	84.5	3.61	m	7.5
6	73.6			
6-OH	7.20			
7	42.2	1.76	d	13.0
		1.26	t	12.0
8	26.7	2.01	m	
9	70.0	2.52	d	14.5
		2.02	t	10
10	62.6	2.68	dq	6.5, 2.0
11	74.2	3.64	dd	7.5, 2.0
11-OH		5.10	d	7.5
12	73.5			
12-OH		3.20	s	
13	77.5	4.66	dd	8.0, 6.5, 2.0
14	21.3	1.87	dd	14.5, 7.5, 3.0
		1.43	dd	14.5, 10.5, 7.5
15	11.3	0.86	t	7.5
16	16.2	1.06	d	7.0
17	8.8	0.95	d	7.5
18	27.5	1.32	s	
19	22.0	0.90	d	6.5
20	36.2	2.27	s	
21	7.30	1.08	d	6.5
22	14.5	1.16	s	
1'	103.5	4.48	d	1.5
2'	78.7	4.01	dd	7.5, 6.5
2'-OH		3.95		
3'	21.2	1.30	dd	13.5, 10.5, 7.5
4'	47.4	2.52	dd	14.0, 7.5, 4.5
5'	67.3	3.65	dd	11.0, 6.5, 4.5
6'	21.5	1.19	d	6.0
7'	40.0	2.30	s	
1''	94.5	5.11	d	5.0
2''	34.6	2.33	d	15.5
		1.56	dd	15.5, 5.0
3''	73.0			
4''	78.0	3.00	d	9.0
4''-OH		2.20	d	9.5
5''	65.7	4.00	dq	9.5, 6.5
6''	18.1	1.31	d	6.5
7''	21.6	1.21	s	
8''	49.2	3.17	s	

Tab 2. ¹H and ¹³CNMR spectra of related substance III in CDCl₃ and key correlation in ¹H-¹H cosy and HMQC, HMBC spectra



Key connections in ¹H-¹H cosy spectrum []
Key connections in HMQC spectrum ———→
Key connections in HMBC spectrum - - - - ->

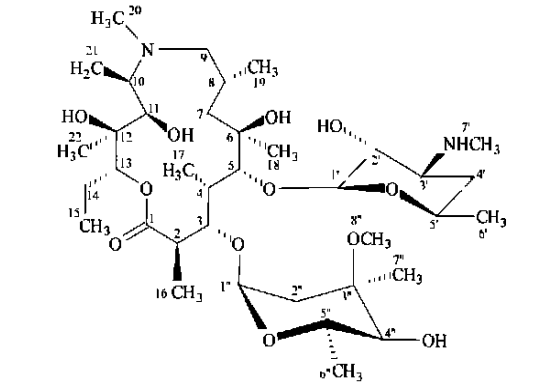


Fig 1 Structure of compound III

相关物质 IV, 白色针状结晶, mp 107 ~ 108 °C (CH₃OH), 融熔时同时分解。UV (CH₃OH) λ_{max} (log ε) 205 (4.38), (3.04) nm; [α]_D²⁰ -47° (c 5.0 CH₃CH₂OH)。IR (KBr): ν₃₅₀₀, 2965, 1465, 1380, 1185, 1050 cm⁻¹。

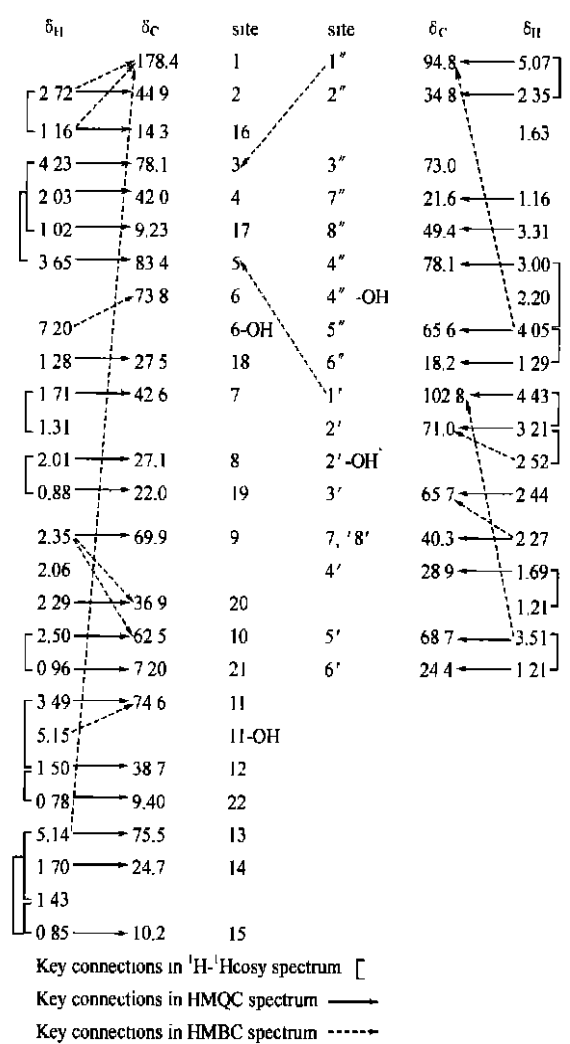
从 ESI-MS 得出有关物质 IV 的分子量为 732, 比阿奇霉素的分子量 748 少 16, 相当于一个氧原子从而初步推断 IV 的结构为: $C_{38}H_{72}N_2O_{11}$ (IV)。

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) DEPT 谱显示有关物质 IV 有 37 条谱线, 代表 38 个碳 (C-7' 和 C-8' 谱线重叠), 其中 3 个季碳, 16 个叔碳, 5 个仲碳和 13 个伯碳。与阿奇霉素的 DEPT 谱相比较少了一个季碳, 多了一个叔碳, 这可能是含羟基的季碳去氧 (脱羟基) 所致。与前面的推断相符合。

有关物质 IV 的 1H NMR (500 MHz) 和 ^{13}C NMR (125 MHz) 的 δ 值及其归属列于表 3。 1H - 1H cosy, HMQC, HMBC 二维谱的解析列于表 4。有关物质

Tab 3. 1H and ^{13}C NMR spectra of related substance IV in $CDCl_3$

Site	$\delta^{13}C$	δ^1H		J(HH) (Hz)
1	178.4			
2	44.9	2.72	dq	7.5, 3.0
3	78.1	4.23	dd	6.0, 3.0
4	42.0	2.03	m	
5	83.4	3.65	d	7.0
6	73.8			
6-OH		7.20		
7	42.6	1.71	d	14.5
		1.31	t	15.5
8	27.1	2.01	m	
9	69.9	2.35	d	15.0
		2.06	t	10.0
10	62.5	2.50	dq	6.5, 2.0
11	74.6	3.49	dd	9.5, 7.5, 2.0
11-OH		5.15	d	7.5
12	38.7	1.50	m	
13	75.5	5.14	dd	8.0, 6.5, 2.0
14	24.7	1.70	dd	14.5, 7.5, 3.0
15	10.2	0.85	t	7.5
16	14.3	1.16	d	7.0
17	9.20	1.02	d	7.5
18	27.5	1.28	s	
19	22.0	0.88	d	6.5
20	36.9	2.29	s	
21	7.2	0.98	d	6.5
22	9.40	0.78	d	7.0
1'	102.8	4.43	d	1.5
2'	71.00	3.21	dd	10.0, 7.5
2'-OH		2.52		
3'	65.7	2.44	dd	12.5, 11.0, 3.5
4'	28.9	1.69	dd	13.0, 3.5, 2.0
		1.21	m	
5'	68.7	3.51	dd	11.0, 6.5, 2.0
6'	21.4	1.21	d	5.5
7', 8'	40.3	2.27	s	
1''	94.8	5.07	d	4.5
2''	34.8	2.35	d	15.0
3''	73.0			
4''	78.1	3.00	d	9.0
4''-OH		2.20	d	9.5
5''	65.6	4.05	dq	9.5, 6.5
6''	18.2	1.29	d	6.5
7''	21.6	1.16	s	
8''	49.4	3.31	s	



IV 的 NMR 谱 (一维、二维) 与文献 [2] 中的阿奇霉素的 NMR 谱相比较, C-12 的 δ 值显著向高场位移 35.2, 其邻近碳原子 C-11, C-22, C-13 的 δ 值分别向低场位移 1.3, 1.6 和 3.7。表明这是由于 C₁₂-OH 脱氧所致, 故推定 IV 为 12-去氧阿奇霉素 (12-deoxy azithromycin) 其化学结构见图 2。

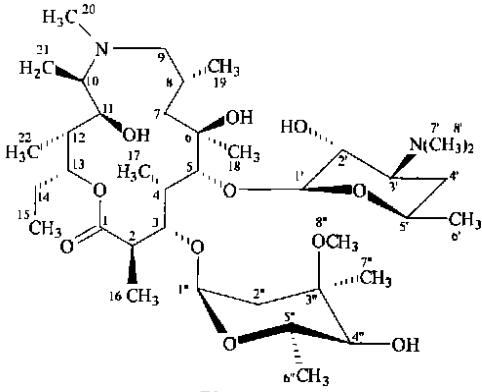


Fig 2 Structure of compound IV.

相关物质 IV 的 ESI-MS m/z : 733 ($M+H$)⁺, 573 [45, M-(3'-糖)], 555 [100, M-(3'-O-糖)-H], 380 [30, M-(3'-O-糖)-(5'-O-氨基糖)], 174 [75, 3'-O-糖]。质谱数据及其裂解规律也佐证所推定结构的正确。

【参考文献】

- [1] WS-256(X-221)-96. 中华人民共和国卫生部标准(试行)[S].
[2] Barber J. Assignments of the carbon-13 and proton of azithromycin in trichloromethane- d_3 [J]. *Magn Reson Chem*. 1991, 29(7): 740-743.

Studies of Related Substances of Azithromycin

JIANG Jian-Guo¹, ZHANG XI-Ru¹, WU Ru-Jin², YANG Liang¹

(¹Hebei Provincial Institute of Drug Control, Shijiazhuang 050011, China;

²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: To separate and to identify related impurities of azithromycin. METHOD: Chromatographic and spectroscopic methods were used to isolate and to identify the related substances in azithromycin. RESULT: There were four related impurities which were isolated from azithromycin and two of them were identified as 3'-N-demethyl-azithromycin and 12-deoxy-azithromycin. CONCLUSION: Two novel compounds, 3'-N-demethyl azithromycin and 12-deoxy-azithromycin as related substances of azithromycin were isolated and their structures were elucidated for the first time.

【KEY WORDS】 Azithromycin; Related substances; Isolation; Identification

· 药讯速递 ·

FDA 受理的在研新药

Atiprimod 药物开始 I、II 期临床试验

2003 年 9 月 Calliston 公司递交了多发性骨髓瘤药物 Atiprimod 的新药申请, 计划今年 1 月开始 I、II 期临床试验。Atiprimod 的独特之处在于它能抑制多发性骨髓瘤及其它实体瘤生长、转移关键因素: 血管内皮生长因子(VEGF)和白介素 6(IL-6), 从而抑制血管形成和肿瘤细胞增殖。Atiprimod 在病人骨头的重吸收效果还需加以评估。Callisto 公司正在和国家癌症研究所合作进行 Atiprimod 治疗其它癌症的临床前研究。

Andrx 公司 Valproate 药物获批在即

Andrx 公司最近宣称, FDA 已经给予该公司对 Valproate(丙戊酸盐)缓释片(125, 250, 500 mg)新药申请(NDA)的“可批准通知”, 不过 Valproate 缓释片得到最终批准和上市也许要推迟一段时间, 因为 Andrx 公司正为此药陷入与雅培公司的专利纠纷中。

Valproate 主要用于与双极情感障碍相关的急性躁狂发作、不同的癫痫发作的治疗以及对偏头痛的预防。

(源自《中国处方药》2004. 2)