

文章编号:2095-0411(2017)01-0050-06

核磁共振技术在氨基糖苷类抗生素结构研究中的应用

李正义¹,王鹏飞¹,殷晓伟²,晏培培¹,邵丹迪¹,殷 乐¹,孙小强¹

(1. 常州大学 石油化工学院,江苏 常州 213164;2. 常州方圆制药有限公司,江苏 常州 213022)

摘要:综合运用¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 一维和二维核磁共振技术,详细对比研究了依替米星、1,3-二-N-乙基庆大霉素 C_{1a} 和 1,6'-二-N-乙基庆大霉素 C_{1a} 的结构特点,尤其是乙基所处不同氨基位点对于邻近碳氢化学位移的影响,建立了一种快速、准确分析氨基糖苷类抗生素结构的方法。

关键词:核磁共振技术;氨基糖苷类抗生素;依替米星;庆大霉素;结构鉴定

中图分类号:R 917

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2017.01.009

The Application of NMR Technology in Structural Research of Aminoglycoside Antibiotics

LI Zhengyi¹, WANG Pengfei¹, YIN Xiaowei², YAN Peipei¹, SHAO Dandi¹, YIN Yue¹, SUN Xiaoqiang¹
(1. School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Changzhou Fangyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhou 213022, China)

Abstract: The structure characteristics of ETM, 1,3-di-N-ethyl GMC_{1a} and 1,6'-di-N-ethyl GMC_{1a} have been comparatively studied in detail by means of 1D and 2D NMR technologies including ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC. In particular, the effects on the chemical shift of neighboring carbon and hydrogen influenced by ethyl group located on different amino groups were investigated. A rapidly and accurately structural analysis method for aminoglycoside antibiotics was established.

Key words: NMR technology; aminoglycoside antibiotics; etimicin; gentamicin; structural identification

氨基糖苷类抗生素是目前应用最为广泛的一类广谱抗菌抗生素^[1],其典型代表为庆大霉素(GM)及其衍生物^[2],结构如表 1 所示。其中庆大霉素 C_{1a}(GMC_{1a})由 3 个氨基糖苷构成,A 环为加洛糖胺,B 环为 2-脱氧链霉胺,C 环为绛红糖胺。而依替米星(ETM)是 GMC_{1a}组分经乙基化修饰后,获得的一种半合成氨基糖苷类抗生素,即 1-N-乙基 GMC_{1a},并获得了国家一类新药证书^[3]。它是治疗呼吸道感染、肾脏、泌尿系统感染、皮肤软组织感染等不可或缺的一类药物^[4]。药理、毒理显示 ETM 具有抗菌谱宽、抗菌活性强,对耳和肾的毒副作用小等优点,对革兰氏阴性菌和多数肠杆菌均有良好的抗菌作用,且与多种抗生素均有协同作用^[5],其临床应用的主要形式为硫酸依替米星^[6]。

抗生素药品因生产菌种不同、发酵工艺可变性大、可控性低以及分离纯化工艺多种多样等特点,从而致

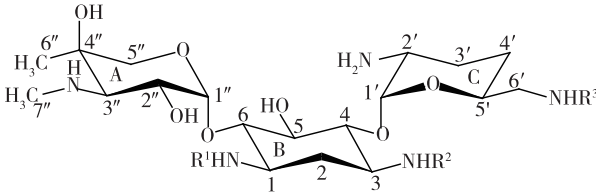
收稿日期:2016-06-08。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21572026);江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA150002);江苏省先进催化与绿色制造协同创新中心资助项目(ACGM2016-06-05)。

作者简介:李正义(1979—),男,江苏扬州人,博士,副教授,主要从事有机化学研究。通讯联系人:孙小强(1956—),E-mail: sunxiaoqiang@yahoo.com

使其纯度较全合成的化学药品低。此外,由于同系物、异构体和降解产物较多,且活性组分稳定性较差,进一步导致了抗生素杂质的多样性和未知性^[7-8]。因此,抗生素杂质的结构研究和控制是药品质量控制的重点和难点。氨基糖苷类抗生素在其生产过程中,环上 5 个氨基位点均可与试剂作用得到具有不同生理活性的类似结构,因此迫切需要建立一种快速、准确地分析和鉴定该类化合物结构的方法。刘军等^[9]用碘对 GMC_{1a} 的 3''-N 位进行脱甲基化,获得了 3''-N-脱甲基 GMC_{1a},利用质谱法(MS)和 1D NMR 对其结构进行了分析和测定;袁耀佐^[10]等利用高效液相色谱-电喷雾-离子阱质谱法(HPLC-ESI-IT-MSⁿ)对 ETM 中含有的 13 种杂质的结构进行了推定。目前,文献报道多采用高效液相色谱质谱联用技术(HPLC-MS)对氨基糖苷类抗生素中有关物质进行结构推定^[11-17],鲜有综合利用各种 NMR 技术来分析鉴定该类化合物及其相关杂质的结构。

表 1 氨基糖苷类抗生素的结构



Comp.	R ¹	R ²	R ³
GMC _{1a}	H	H	H
ETM	⁷ CH ₂ ⁸ CH ₃	H	H
1,3-二-N-乙基 GMC _{1a}	⁷ CH ₂ ⁸ CH ₃	⁹ CH ₂ ¹⁰ CH ₃	H
1,6'-二-N-乙基 GMC _{1a}	⁷ CH ₂ ⁸ CH ₃	H	^{7'} CH ₂ ^{8'} CH ₃

本文综合运用¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 等多种 NMR 技术对 ETM、1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 和 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a} 的结构进行了详细的对比研究,在此基础之上建立了一种快速鉴定氨基糖苷类抗生素结构的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker AVANCE III 300MHz 全数字化核磁共振谱仪;分析用电子天平(METTLER TOLEDO XS205),感量 0.01mg。
ETM(99.6%)、1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}(97.6%)和 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a}(98.8%)均由常州方圆制药有限公司提供;氘水(青岛腾龙),99.9%氘代。

1.2 实验步骤

¹H NMR 实验条件:激发脉冲角度 30°;时域 64K;谱宽 20,中心位移 6.175;探头温度 20℃;弛豫时间 1s;累计采样 16 次。
¹³C NMR 实验条件:激发脉冲角度 30°;时域 64K;谱宽 238,中心位移 99.989;探头温度 20℃;弛豫时间 2s;累计采样 1 024 次。
样品制备:分别精确称取 20mg ETM、1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 和 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a},并转移至核磁管中,各加入 0.5mL D₂O,完全溶解,采集 NMR 数据并处理谱图。

2 结果与讨论

2.1 ETM 的结构研究

首先,通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱等常规 1D NMR 可以确定 ETM 化学结构中的特征位点。如甲基碳(C_7'' , C_6'' , C_8)和甲基质子(H_7'' , H_6'' , H_8)的具体化学位移较易确定;通过 DEPT 谱可以确定 ETM 中唯一的季碳(C_4'')和其余碳的类型;对于仲碳, C_5'' 是唯一的连氧仲碳,化学位移最大容易确认,但其余各个仲碳和叔碳由于相近的化学环境,使得各个碳氢相互之间不易区分。尽管通过 DEPT 谱可以帮助确认连氧的异头碳,但无法精确区分 C_1'' 和 C_1' 及与其相连的 H_1'' 和 H_1' 。因此,无法精确解析彼此孤立的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱,需要借助如 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC 谱等 2D NMR 进行综合分析。

其次,由 HMBC 谱知, $\delta 101.3$ 叔碳与 H_5'' 具有远程相关关系,故可确定为 C_1'' ,则 C_1' 也可确定,再由 HSQC 谱确定 H_1'' 和 H_1' 。通过 HMBC 谱发现, $\delta 83.2$ 叔碳与 H_1'' 具有远程相关关系,可确定为 C_6 ; $\delta 75.6$ 叔碳与 H_1' 具有远程相关关系,可确定为 C_4 ;根据 ETM 的化学结构,则 $\delta 74.2$ 叔碳为 C_5 ,再由 HSQC 谱确定 H_6 、 H_4 、 H_5 。

最后,根据 ETM 的三环结构特征, ^1H - ^1H COSY 谱将质子划分为 3 个自旋体系(A、B、C 环)。以 A 环质子自旋体系为例, $\delta 4.23$ 质子与 H_1'' 偶合,可确定为 H_2'' ,同时 H_2'' 与 $\delta 3.47$ 质子偶合,可确定为 H_3'' 。同样地,综合 ^1H - ^1H COSY、HSQC 和 HMBC 谱可以归属 B 环和 C 环其余的碳氢。谱图数据的详细归属见表 2。

表 2 依替米星的核磁共振数据(D_2O)

No.	HSQC		^1H - ^1H COSY	HMBC	DEPT /($^\circ$)
	$\delta(\text{H})$ (J/Hz)	$\delta(\text{C})$			
1	3.52 m	55.8	3.88, 2.58, 2.07	3.88, 3.28, 3.09, 2.58, 2.07	90
2	2.58 m, 2.07 m	25.5	3.50, 3.52	3.52, 3.50	135
3	3.50 m	48.4 ¹⁾	4.04, 2.58, 2.07	4.04, 3.79, 2.58, 2.07	90
4	4.04 t (9.6)	75.6	3.79, 3.50	5.85, 3.79, 3.50, 2.58, 2.07	90
5	3.79 t (8.8)	74.2	4.04, 3.88	4.04, 3.88	90
6	3.88 t (9.2)	83.2	3.79, 3.52	5.10, 3.79, 3.52, 2.58, 2.07	90
7	3.28 m, 3.09 m	40.8	1.28	3.52, 1.28	135
8	1.28 t (7.2)	10.8	3.28, 3.09	3.28, 3.09	45
1'	5.85 d (3.4)	93.9	3.51	4.04, 2.02	90
2'	3.51 m	48.4 ¹⁾	5.85, 2.02	5.85, 2.02, 1.90, 1.54	90
3'	2.02 m	20.3	3.51, 1.90, 1.54	5.85, 3.51	135
4'	1.90 m, 1.54 m	25.3	4.12, 2.02	3.21, 3.04, 2.02	135
5'	4.12 m	65.8	3.21, 3.04, 1.90, 1.54	5.85, 3.21, 3.04	90
6'	3.21 dd (2.8, 13.7), 3.04 m	42.5	4.12	4.12	135
1''	5.10 d (3.8)	101.3	4.23	3.98, 3.48, 3.88, 3.47	90
2''	4.23 dd (3.6, 10.9)	66.4	5.10, 3.47	3.47	90
3''	3.47 d (10.8)	63.4	4.23	5.10, 4.23, 3.98, 3.48, 2.89, 1.31	90
4''	—	69.7	—	3.98, 3.48, 3.47, 2.89, 1.31	—
5''	3.98 d (12.9), 3.48 d (10.8)	67.6	—	5.10	135
6''	1.31 s	20.6	—	3.98, 3.48, 3.47	45
7''	2.89 s	34.6	—	3.47	45

1)谱峰重叠。

2.2 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 的结构研究

1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 在化学结构上仅比 ETM 多出一个乙基,但 GMC_{1a} 具有多个氨基位点,因此,第 2 个乙基位置的确定是谱图解析和结构鉴定的关键。1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 的 HMBC 谱显示支链亚甲基质子

H₉与叔碳 C₃具有远程相关关系,由此可确定第 2 个乙基接在 B 环上 3-N 位置。其余碳氢的归属可仿照 ETM 进行。谱图数据的详细归属见表 3。

表 3 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}的核磁共振数据(D₂O)

No.	HSQC		¹ H- ¹ H COSY	HMBC	DEPT/(°)
	δ(H) (J/Hz)	δ(C)			
1	2.70 m	56.9	3.27, 2.28, 0.92	3.27, 2.46, 2.28, 0.92	90
2	2.28 m, 0.92 m	28.6	2.70, 2.67	3.38, 3.27	135
3	2.67 m	55.2	3.38, 2.28, 0.92	3.62, 3.38, 2.69, 2.28, 0.92	90
4	3.38 t (9.4)	83.8	3.62, 2.67	5.18, 3.62, 2.67, 2.28, 0.92	90
5	3.62 t (9.2)	74.6	3.38, 3.27	3.38, 3.27	90
6	3.27 t (9.4)	85.4	3.62, 2.70	4.91, 3.62	90
7	2.46 m	40.2	1.04	2.70, 1.04	135
8	1.04 t (7.3)	13.9	2.46	2.46	45
9	2.69 m	39.9	1.02	2.67, 1.02	135
10	1.02 t (7.2)	13.6	2.69	2.69	45
1'	5.18 d (3.5)	100.5	2.87	3.38	90
2'	2.87 m	49.5	5.18, 1.73, 1.59	1.73, 1.59	90
3'	1.73 m, 1.59 m	25.5	2.87, 171, 1.42	5.18, 3.80, 1.71, 1.42	135
4'	1.71 m, 1.42 m	26.9	3.80, 1.73, 159	2.71, 1.73, 1.59	135
5'	3.80 m	69.7	2.71, 1.71, 1.42	5.18, 2.71	90
6'	2.71 m	44.3	3.80	3.80	135
1''	4.91 d (4.0)	101.1	3.77	3.96, 3.26, 3.27, 2.54	90
2''	3.77 dd (3.8, 11.1)	69.1	4.91, 2.54	2.54	90
3''	2.54 d (10.7)	63.2	3.77	4.91, 3.77, 3.26, 2.48, 1.15	90
4''	—	72.2	—	3.96, 3.26, 1.15	—
5''	3.96 d (12.5), 3.26 d (12.7)	67.8	—	4.91, 1.15	135
6''	1.15 s	21.4	—	3.26, 2.54	45
7''	2.48 s	36.6	—	2.54	45

2.3 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a}的结构研究

1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a}与 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}是同分异构体,只有一个乙基所处的氨基位点不同。1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a}的 HMBC 谱显示支链亚甲基质子 H_{7'}与仲碳 C_{6'}具有远程相关关系,由此可确定第 2 个乙基接在 C 环上 6'-N 位置。其余碳氢的归属可仿照 ETM 进行。谱图数据的详细归属见表 4。

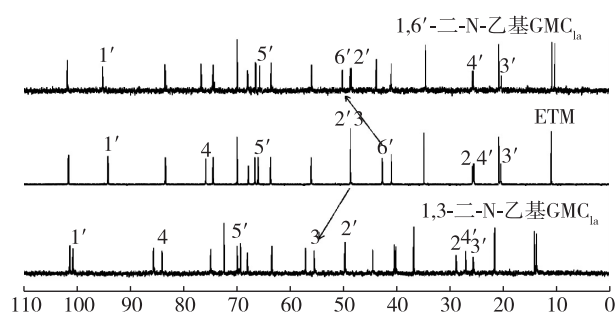
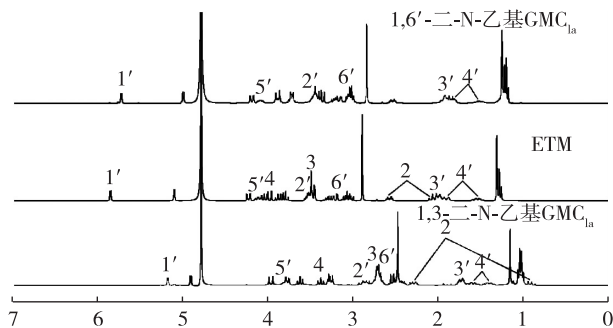
2.4 氨基糖苷类抗生素的结构对比研究

对比 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}与 ETM 的¹³C NMR 和¹H NMR 谱(图 1 和图 2),1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}分子中 3-N 位接上乙基后,C₃向低场发生较大移动,这是由于 3-N 位接上乙基后,降低了 C₃的电子云密度;与 ETM 相比,1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}中 C 环上的碳均不同程度地向低场移动,且 C 环上的质子也不同程度地向高场移动,这可能是由于 3-N 位接上乙基后,致使 3-N 原子上电子云密度增大,而 3-N 原子在空间位置上与 C 环比较接近,导致环上各个质子和碳的电子云密度分别增大和减小。此外,受 C₃影响,与其直接相连的 C₄和 C₂因电子云密度减小而向低场移动。

同样 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a}分子中 6'-N 位接上乙基后,C_{6'}也向低场发生了较大移动;但是,与 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}相比,其 3 个环上的碳氢均未发生明显化学位移变化。首先,6'-N 原子与 C 环相隔一个亚甲基,6'-N 原子和乙基在空间位置上均与 C 环主体相距较远,因此,6'-N 原子上取代基的变化对于 C 环上的碳氢的影响较弱;其次,乙基处在 C 环的外侧支链,与 A 环和 B 环均相距较远,不会引起环上碳氢的化学位移变化。

表 4 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a} 的核磁共振数据(D₂O)

No.	HSQC		¹ H- ¹ H COSY	HMBC	DEPT / (°)
	$\delta(\text{H})$ (J/Hz)	$\delta(\text{C})$			
1	3.42 m	55.7	3.68, 2.49, 1.84	3.68, 3.17, 3.00, 2.49, 1.84	90
2	2.49 m, 1.84 m	25.6	3.42, 3.40	3.42, 3.40	135
3	3.40 m	48.3	3.84, 2.49, 1.84	3.84, 2.49, 1.84	90
4	3.84t (7.3)	76.5	3.65, 3.40	5.68, 3.65, 2.49, 1.84	90
5	3.65t (8.8)	74.2	3.84, 3.68	3.84, 3.68	90
6	3.68t (6.7)	83.2	3.65, 3.42	4.94, 3.65, 3.42, 2.49, 1.84	90
7	3.17 m, 3.00 m	40.8	1.16	3.42, 1.16	135
8	1.16t (7.5)	10.6	3.17, 3.00	3.17, 3.00	45
1'	5.68d (3.6)	94.9	3.39	3.84	90
2'	3.39 m	48.5	5.68, 1.87	5.68, 1.87	90
3'	1.87 m	20.2	3.39, 1.78, 1.48	5.68, 3.39, 1.78, 1.48	135
4'	1.78 m, 1.48 m	25.5	4.04, 1.87	3.11, 3.01, 1.87	135
5'	4.04 m	65.5	3.11, 3.01, 1.78, 1.48	5.68, 2.98	90
6'	3.11d (2.8, 13.7), 3.01 m	50.0	4.04	4.04, 2.98	135
7'	2.98 m	43.6	1.14	3.11, 3.01, 1.14	135
8'	1.14t (7.5)	10.1	2.98	2.98	45
1''	4.94d (3.8)	101.5	4.13	3.68, 3.83, 3.37, 3.30	90
2''	4.13dd (3.5, 10.7)	66.2	4.94, 3.30	3.30	90
3''	3.30d (10.7)	63.3	4.13	4.94, 4.13, 3.83, 3.37, 1.20, 2.79	90
4''	-	69.7	—	3.83, 3.37, 1.20	—
5''	3.83d (12.7), 3.37d (12.7)	67.7	—	4.94, 1.20	135
6''	1.20s	20.6	—	3.30	45
7''	2.79s	34.4	—	3.30	45

图 1 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}、1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a} 和 ETM 的¹³C NMR 对比图图 2 1,3-二-N-乙基 GMC_{1a}、1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a} 和 ETM 的¹H NMR 对比图

3 结 论

综合运用¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC 和 HMBC 一系列 1D 和 2D NMR 波谱技术,实现了 ETM、1,3-二-N-乙基 GMC_{1a} 和 1,6'-二-N-乙基 GMC_{1a} 的碳氢化学位移的精确归属。通过对 3 个化合物的结构对比研究,建立了一种快速、准确分析氨基糖苷类抗生素结构的方法:①3-N 和 6'-N 氨基位点连接有乙基,其相连的碳原子 C₃ 和 C_{6'} 会向低场发生较大移动,由此根据与氨基相连碳原子化学位移的变化可以初步推测乙基或其他类似取代基团所处的氨基;②C 环上碳向低场移动,质子向高场移动,则乙基处在 3-N 位氨基上;A 环上碳向低场移动,质子向高场移动,则乙基处在 1-N 位氨基上;B 环上碳向低场移动,质子向高场移动,则乙基处在 2'-N 位氨基上;A、B、C 环上碳氢均未发生明显化学位移变化,则乙基处在 6'-N

位氨基上。由此可以快速、准确定位出乙基或其他类似取代基团所处环上的氨基位点。

参考文献:

- [1] BECKER B, COOPER M A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 8(1): 105-115.
- [2] AL-MAJDOUB Z M, OWOSENI A, GASKELL S J, et al. Effects of gentamicin on the proteomes of aerobic and oxygen-limited *Escherichia coli*[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(7): 2904-2910.
- [3] WU Y N, ZHAO W, ZHU X Y, et al. Improved liquid chromatography combined with pulsed electrochemical detection for the analysis of etimicin sulfate[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(8): 1471-1479.
- [4] LI Y B, DENG H Y, JU L, et al. Screening and validation for plasma biomarkers of nephrotoxicity based on metabolomics in male rats[J]. *Toxicology Research*, 2016, 5(1): 259-267.
- [5] 杨启文, 徐英春, 王辉, 等. 依替米星体外抗菌活性及其与 β -内酰胺类抗菌药物的协同作用研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(7): 1010-1013.
- [6] 赵卫, 袁耀佐, 芦丽, 等. HPLC-ELSD 法测定硫酸依替米星氯化钠注射液有关物质[J]. *药学研究*, 2013, 32(11): 634-637.
- [7] ÖZCAN K, AKSOY S Ç, KALKAN O, et al. Diversity and antibiotic-producing potential of cultivable marine-derived actinomycetes from coastal sediments of Turkey[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13(8): 1493-1501.
- [8] YUAN Y Z, ZHANG M, FAN X L, et al. Impurity profiling of etimicin sulfate by liquid chromatography ion-trap mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 70: 212-223.
- [9] 刘军, 胡小玲, 赵敏, 等. 3"-N-脱甲基庆大霉素 C1a 的合成及结构测定[J]. *中国抗生素杂志*, 2003, 28(6): 367-368.
- [10] 袁耀佐, 张玫, 钱文, 等. 高效液相色谱-电喷雾-离子阱质谱法推定硫酸依替米星中有关物质的结构[J]. *分析化学*, 2010, 38(6): 817-822.
- [11] HU P F, CHESS E K, BRYNJELSEN S, et al. Collisionally activated dissociations of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and their application in the identification of a new compound in tobramycin samples[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, 11(3): 200-209.
- [12] 王建, 洪利娅, 倪坤仪. 液相色谱-蒸发光散射-电喷雾离子阱质谱法测定硫酸异帕米星及其有关物质[J]. *分析化学*, 2006, 34: S19-S22.
- [13] 王建, 胡小军, 倪坤仪. HPLC-ELSD 和 HPLC-MSⁿ 分析硫酸奈替米星及其注射液[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(16): 1268-1271.
- [14] 王建, 李忠红, 倪坤仪, 等. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法分析 6 种氨基糖甙类抗生素[J]. *分析化学*, 2006, 34(7): 979-982.
- [15] LI B, ADAMS E, SCHEPDAEL A V, et al. Analysis of unknown compounds in gentamicin bulk samples with liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(3): 393-402.
- [16] LI B, SCHEPDAEL A V, HOOGMARTENS J, et al. Investigation of unknown related substances in commercial neomycin samples with liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(11): 1791-1798.
- [17] LI B, SCHEPDAEL A V, HOOGMARTENS J, et al. Characterization of impurities in sisomicin and netilmicin by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(22): 3455-3471.

(责任编辑:殷丽莉)