doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2020.09.08

加米霉素的合成及其晶体结构测定

崔志刚,王 建,甄盼盼,余贵菊,杨 雪,王 猛,姜淋洁,娄艳华,程雪娇*

(天津市中升挑战生物科技有限公司, 天津 300380)

[收稿日期] 2020 - 06 - 03　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2020) 09 - 0049 - 06　[中图分类号] S859.796

[摘　要]　通过更换反应试剂和改变中间体的纯化方法,对加米霉素的合成进行了工艺优化,使整个反应过程更适合放大生产,且安全环保、成本更低廉。以 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A (E)肟为原料,在碱性催化剂作用下生成 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A (Z)肟,再经过贝克曼重排反应生成红霉素亚胺醚,然后硼氢化钠还原生成 9 - 脱氧 - 8a - 氮杂 - 8a - 同型红霉素 A,最后还原胺化反应得到加米霉素;并首次获得加米霉素单晶,X - 射线衍射单晶结构测定表明,其结构为单斜晶系,C2 空间群,具有手性,晶胞参数:a[Å] = 27.536(6),b[Å] = 9.6582(19),c[Å] = 18.529(4),α[°] = 90,β[°]° = 114.00(3),γ[°] = 90,V[Å3] = 4501.6(15),Z = 4,Dc[mg/m^3] = 1.177,m[mm^{-1}] = 0.086,F(000) = 1750,GOF = 1.043,Rint = 0.0417,R1a,wR2b[I > 2σ(I)] = 0.0492,0.1291,Residuals[eÅ - 3] = 0.0564,0.1354。加米霉素晶型的确定为后续研究加米霉素制剂新剂型等方面提供了新选择。

[关键词]　加米霉素;合成;晶体结构

Synthesis and Crystal Structure Determination of Gamithromycin

CUI Zhi - gang, WANG - Jian, ZHEN Pan - pan, YU Gui - ju, YANG - Xue, WANG Meng, JIANG Lin - jie, LOU Yan - hua, CHENG Xue - jiao*

(*Tianjin Speerise Challenge Biotechnology Co., Ltd, Tianjin* 300380, *China*)

Corresponding author: *CHENG Xue - jiao, E - mail*: 515587301@*qq.com*

Abstract: In this paper, the synthesis process of gamamycin was optimized by changing the reaction reagent and the purification method of the intermediate, so that the whole reaction process is more suitable for the scale - up production, and more safe for environmental protection and lower cost. 9 (Z) - 9 - deoxo - 9 - hydroxyiminoerythromycin A is generated from the starting material 9 (E) - 9 - deoxo - 9 - hydroxyiminoerythromycin A in the presence of base catalyst, following by Beckmann rearrangement to give the

作者简介: 崔志刚,硕士,中级工程师,从事药物合成研究。

通讯作者: 程雪娇。E - mail: 515587301@qq.com

erythromycin imines ether mixture. Then 9 - deoxo - 8a - aza - 8a - homoerythromycin A is obtained via reduction by sodium borohydride reagent. Finally, gamithromycin is synthesized by the reductive amination. Notably, the single crystal of gamithromycin was firstly obtained and determined by X - ray single crystal diffraction study. The single crystal data demonstrates that it belongs to monoclinic crystal system and space group C2, and has chirality, with parameters: a[Å] = 27.536(6), b[Å] = 9.6582(19), c[Å] = 18.529(4), α[°] = 90, β[°] = 114.00(3), γ[°] = 90, V[Å3] = 4501.6(15), Z = 4, Dc[mg/m^3] = 1.177, m[mm - 1] = 0.086, F(000) = 1750, GOF = 1.043, Rint = 0.0417, R1a, wR2b[I > 2σ(I)] = 0.0492, 0.1291, Residuals[e Å - 3] = 0.0564, 0.1354. The determination of the crystalline structrue of gamithromycin provides new options for the subsequent study of new dosage forms of gamithromycin preparations.

Key words: gamithromycin; synthesis; crystal structure

加米霉素[1](Gamithromycin) 化学名(IUPAC): 13 - [(2,6 - 二脱氧 - 3 - C - 甲基 - 3 - O - 甲基 - α - L - 吡喃核糖基) 氧] - 2 - 乙基 - 3,4,10 - 三脱氧 3,5,8,10,12,14 - 六甲基 - 7 - 丙基 - 11 - [[3,4,6 - 三脱氧 - 3 - (二甲氨基) - β - D - 吡喃木糖基]氧] - (2R,3S,4R,5S,8R,10R,11R,12S,13S,14R) - 1 - 氧杂 - 7 - 氮杂环 - 15 - 单环。分子式: $C_{40}H_{76}N_2O_{12}$, CAS 号: 145435 - 72 - 9, 是一种新型的第二代大环内酯类兽用抗生素。法国梅里亚公司(MERIAL. CO)生产的以加米霉素为主要有效成分的注射剂 ZACTRAN, 经欧盟药品监督管理局兽药署的审核, 已经实现市场化生产和销售, 加米霉素结构和功效已经得到了欧盟药监局兽药署的认可, 可用于食用动物的食用, 具有吸收快、体内分布广泛、体内残留低、安全性高等优点, 暂无不良反应报道, 是一种明确可以使用的兽用抗生素, 在兽医临床具有广阔的应用前景, 目前国内很多厂家已成功申报二类新兽药。对于作为药物或保健食品成分使用的化合物而言, 晶体结构对化合物的稳定性, 生物利用度等指标有重要影响。目前, 研究晶体结构最常见和比较准确的方法是 X - 射线单晶衍射法。文献中已有报道该化合物的合成[2], 通常以 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A (E)肟为原料, 经过构型转化反应, 贝克曼重排反应, 还原反应, 还原胺化反应得到加米霉素, 但是仍存在工艺不适合放大生产、不利于环保、生产成本高等问题。基于以上问题, 对加米霉素的合成工艺进行优化改进, 改变中间体的纯化方法, 更换一些反应试剂, 从而获得一种更适合放大生产的工艺, 并且使整个反应过程更加安全环保, 成本更加低廉。同时, 首次获得加米霉素单晶, 通过 X - 射线衍射单晶结构测定其结构, 并确定其构型。

1　材　料

1.1　仪器与试剂　XT - 4A 显微熔点仪, 上海济成分析仪器有限公司; ARX 400 MHz 核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; Bruker Smart Apex 单晶衍射仪, 德国 Bruker AXS 公司。

1.2　主要药品及试剂　氢氧化锂(纯度: 98%), 无水乙醇(AR), 二氯甲烷(AR), 丙酮(AR), 对甲苯磺酰氯(AR), 碳酸氢钠(AR), 硼氢化钠(AR), 正丙醛(AR, 97%), 钯碳(含钯 5%)(纯度: 95%), 甲醇(AR), 甲基叔丁醚(AR), 以上试剂均购于国药集团(天津)有限公司; 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A(E)肟, 批号: 130603, 纯度: 95%, 购于浙江国邦药业有限公司; TLC 展开剂: 二氯甲烷: 无水甲醇: 氨水 = 20∶1∶0.1。

2　方法与结果

2.1　加米霉素合成路线[3-4]

2.1.1　9－脱氧－9－同型红霉素 A(Z)肟的制备[5-7]　向 500 mL 三口瓶中加入 9－脱氧－9－同型红霉素 A (E) 肟 50.0 g、氢氧化锂 4.8 g 和无水乙醇 500 mL,混合搅拌,室温反应 4 h;向反应体系中滴加稀盐酸调节 pH 至 8 ~ 9,然后加水 100 mL,析出固体,过滤,烘干;所得固体用 150 mL 二氯甲烷打浆 1 h,过滤,烘干得产品 43.5 g,收率: 87%;熔点: 158 ~ 162 ℃;^{1}HNMR($CDCl_3$):5.01(dd,H－13),4.87(d,H－1″),4.40(d,H－1′),3.98(m,H－5″),3.80(s,H－11),3.49(m,H－5),3.27(s,OCH_3),3.21(dd,H－2′),2.99(t,H－4″),2.87(m, H－2,H－8,H－10),2.74(m,H－10),2.43(m,H－3′),2.32(d,H－2″),2.27(s,N(CH_3)$_2$),1.91(m,H－4),1.87(m,H－14),1.63(m,H－4′),1.37(m6－CH_3),1.28(d,10－CH_3),1.24(d,5″－CH_3),1.18(d－5′－CH_3),1.12(d,2－CH_3),1.11(s,12－CH_3),1.08(d,8－CH_3),1.04(d,4－CH_3),0.79(t,CH_2CH_3)。

2.1.2　9－去氧－12－脱氧－9,12－环氧－8a,9－二脱氢－8a－氮杂－8a－高红霉素 A 的制备　向 500 mL 三口瓶中加入 9－脱氧－9－同型红霉素 A(Z)肟 40.0 g 和 200 mL 丙酮,搅拌,溶解,降温至－5 ~ 5 ℃,滴加含对甲苯磺酰氯 20.4 g 的丙酮溶液 100 mL,搅拌,反应 0.5 h,然后滴加三乙胺 10 mL,搅拌,反应 1.5 h,TLC 检测反应完成,过滤,滤饼用 200 mL 二氯甲烷溶解,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到产品 37.2 g,收率 95.4%,熔点:105 ~ 110 ℃;^{1}HNMR($CDCl_3$):5.17(dd,H－13),4.73(d,H－1″),4.47(d,H－1′),4.15(dq,H－5″),4.09(dd,H－3),3.99(brs,H－5),3.81(t,H－11),3.68(m,H－8),3.65(m,H－5′),3.40(ddd,H－2′),3.23(s,OCH_3),2.96(t,H－4″),2.70(m,H－2,H－8,H－10),2.70(OH－10),2.68(m,H－3′),2.57(brd,11－OH),2.45(p,H－2),2.31(s,N(CH_3)$_2$),2.28(d,H－2″),2.20(d,4″－OH),2.07(ddq,H－14a),1.90(brd,H－7a),1.75(dd,H－7b),1.74(m,H－4),1.70(m,H－4′),1.69(m,H－14b),1.46(dd,H－2′′),1.40(S,6－CH_3),1.29(m,H－4′),1.27(d. 10－CH_3),1.27(d,5″－CH_3),1.25(d,2－CH_3),1.24(d,5′－CH_3),1.21(S,3″－CH_3),1.18(s,12－CH_3),1.07(d,8－CH_3),1.01(d,4－CH_3),0.88(t,CH_2CH_3)。

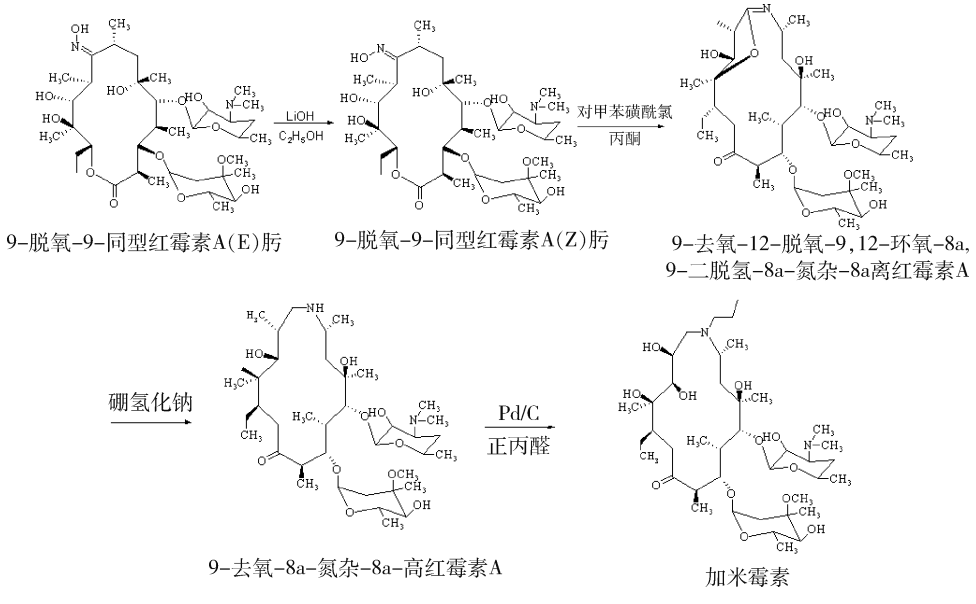

图 1　加米霉素合成路线

Fig 1　Synthetic route of Gamithromycin

2.1.3　9－去氧－8a－氮杂－8a－高红霉素 A 的制备[8-9]

向 500 mL 三口瓶中加入 9－去氧－12－脱氧－9,12－环氧－8a－氮杂－8a－高红霉素 A 35.0 g,甲醇 175 mL,搅拌溶解,降温－5～5 ℃,分批加入硼氢化钠 9.0 g,加毕,搅拌反应 2 h,滴加稀盐酸,调节 pH 至 6～7,搅拌反应 0.5 h,过滤,浓缩得到粗品 9－去氧－8a－氮杂－8a－高红霉素 A;将粗品加入到 280 mL 甲基叔丁醚中,滴加三氟乙酸 6.6 g 成盐,搅拌 1 h,过滤,滤饼加入到 200 mL 的 10% 的碳酸钾溶液中,搅拌,加入 175 mL 二氯甲烷,萃取,无水硫酸钠干燥,浓缩,得到纯品 32.9 g;收率:93.5%;熔点:176～180 ℃;^{1}HNMR($CDCl_3$) 5.00(d,H－1″),4.75(dd,H－13),4.48(br,d,H－3),4.34(d,H－1′),4.02(dq,H－5″),3.56(br,H－11),3.52(m,H－5),3.31(s,OCH_3),3.16(dd,H－2′),3.01(brd,H－4″),2.78(m,H－8),2.69(dq,H－2),2.59(dd,H－9a),2.42(brt,H－9b),2.30(d,H－2″),2.26(s,$N(CH_3)_2$),1.91(m,H－14a),1.77(brp,H－4),1.61(brd,H－4′),1.55(dd,H－2′),1.44(m,H－14b),1.38(m,H－7),1.36(s.6－CH_3),1.21(s,3″－CH_3),1.20(d,5′－CH_3),1.18(d,2－CH_3),1.06(s,12－CH_3),1.10(d,8－CH_3),1.04(d,4－CH_3),0.94(d,10－CH_3),0.86(d,CH_2CH_3)。

2.1.4　加米霉素的合成[10]　向 500 mL 高压釜中分别加入 9－去氧－8a－氮杂－8a－高红霉素 A25 g,正丙醛 100 g,冰醋酸 3.0 g,搅拌至溶解,加入钯/碳催化剂 8.0 g,密封高压釜,釜内用氮气置换三次,氢气置换三次,充入氢气至压力 1.4～1.6 MPa,35～45 ℃保温反应,观测压力不再下降。卸压,取样点板,检测原料反应完全,开启釜盖,加入纯化水 200 mL,过滤,滤液加入 150 mL 二氯甲烷,降温至 20 ℃以下,用 20% 盐酸调节 pH≤4,萃取分液;水相再加入二氯甲烷 150 mL,用 20% 氢氧化钠溶液调节 pH≥10,萃取分液,无水硫酸钠干燥,浓缩,得到加米霉素成品 20.0 g,收率:80%;^{1}HNMR($CDCl_3$):5.00(d,H－1″),4.75(dd,H－13),4.48(br,d,H－3),4.34(d,H－1’),4.02(dq,H－5″),3.56(br,H－11),3.5(m,H－5),3.31(s,OCH_3),3.16(dd,H－2′),3.01(brd,H－4″),2.78(m,H－8),2.69(dq,H－2),2.59(dd,H－9a),2.42(brt,H－9b),2.30(d,H－2″),2.26(s,$N(CH_3)_2$),1.91(m,H－14a),1.77(brp,H－4),1.61(brd,H－4′),1.55(dd,H－2′),1.44(m,H－14b),1.38(m,H－7),1.36(s.6－CH_3),1.21(s,3″－CH_3),1.20(d,5′－CH_3),1.18(d,2－CH_3),1.06(s,12－CH_3),1.10(d,8－CH_3),1.04(d,4－CH_3),0.94(d,10－CH_3),0.86(d,CH_2CH_3)。

2.2　加米霉素的单晶培养及晶体结构测定[11]

将 1.0 g 纯度 99% 的加米霉素白色固体加入到 20 mL 乙腈中,70 ℃加热溶解,冷却,静止放置,析出晶体。选取大小为 0.22 mm×0.18 mm×0.18 mm 的单晶,用 Bruker Smart ApexII CCD 衍生仪收集衍生数据。

2.2.1　晶体结构描述[12]　晶体属于单斜晶系,C2 空间群,具有手性,纯度大于 99%,晶胞参数如表 1 和图 2 所示。

表 1　加米霉素晶体结构数据

Tab 1　Crystal Structure Data of Gamithromycin

晶系	单斜晶系
空间群	C2
A[Å]	27.536(6)
b[Å]	9.6582(19)
c[Å]	18.529(4)
α[°]	90
β[°]°	114.00(3)
γ[°]	90
V[$Å^3$]	4501.6(15)
Z	4
D_c[mg/m^3]	1.177
μ[mm^{-1}]	0.086
F(000)	1750
GOF	1.043
R_{int}	0.0417
R_1[a], wR_2[b][I>2σ(I)]	0.0492, 0.1291
Residuals [e $Å^{-3}$]	0.0564, 0.1354

[a]$R_1 = \Sigma ||F_o| - |F_c||/|F_o|$. [b]$wR_2 = [\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2/\Sigma w(F_o^2)^2]^{1/2}$

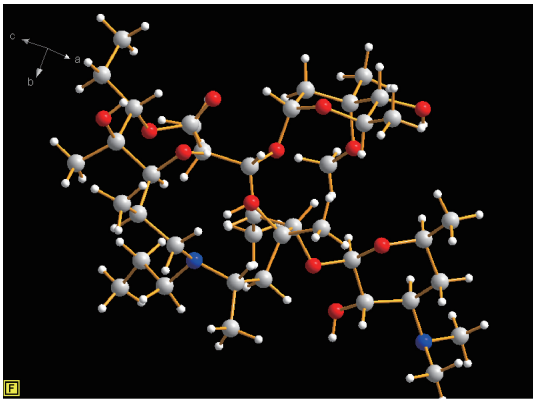

图 2　加米霉素的分子立体构型

Fig 2　Molecular Stereo Configuration of Gamithromycin

3　讨　论

本研究以 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A（E）肟为原料，通过构型转化反应，贝克曼重排反应，硼氢化钠还原反应和还原胺化反应得到加米霉素。其中，在构型转化这步反应中，由于在纯化过程中也有可能发生构型转化，因此，寻找一个合适的纯化试剂很重要。本文中采用二氯甲烷进行纯化，原因是原料 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A（E）肟易溶于二氯甲烷，而 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A（Z）肟不溶于二氯甲烷，通过打浆搅拌的方法使成品纯度在 97% 以上，高于已报道文献[13]中纯度；该过程操作简单，容易得到纯品，适合大规模生产；文献[13]中，后处理方法采用先萃取再浓缩的方法得到产品，但是在后处理的过程中容易构型再次转变成原料，导致纯度不高。

在制备 9 - 去氧 - 12 - 脱氧 - 9，12 - 环氧 - 8a，9 - 二脱氢 - 8a - 氮杂 - 8a - 高红霉素 A 的过程中，如果 9 - 脱氧 - 9 - 同型红霉素 A（Z）肟纯度不高，反应中会产生很多杂质，该步骤也是难度比较大的一个步骤，本文使用三乙胺作为有机碱，不但减少杂质的数量，还减少了对身体的危害，保证了生产的安全性，该步收率远高于文献[13]报道的收率，文献[13]中所用到的碱为有机碱吡啶及无机碱碳酸氢钠，有机碱吡啶有一定毒性，不适合放大生产，碳酸氢钠会产生一个比较大的杂质，9 - 羰基 - 8a - 氮杂 - 8a - 同型红霉素 A，很难除去。

在还原反应时，本文后处理未进行纯化操作直接进行还原胺化反应，减少操作步骤，降低产品损失，高于文献收率，工艺经优化后适合放大生产。对比文献[13]采用先还原再纯化的方法，然后再进行胺化反应，导致收率偏低。

加米霉素样品用乙腈作溶剂得到加米霉素单晶，确定了加米霉素晶体的空间点群和构效方式；加米霉素属于大环内酯类化合物，有多个手性中心，会形成很多不同构型，而通过加米霉素单晶解析最终确定了加米霉素的绝对构型，由于该晶体具有很好的晶型结构，对后续研究加米霉素新剂型，丰富临床给药方式，改善药代动力学，减少刺激性提高安全性等方面，具有一定的参考价值。

参考文献：

[1]　江志尧. 加米霉素及中间体的合成与抑菌活性研究[D]. 重庆：重庆大学，2010.
Jiang Z Y. Synthesis and Antibacterial Activity Gamithromycin and Its Intermediates[D]. Chongqing：Chongqing university. 2010.

[2]　Wilkening. Robert，R. 9 - Deoxo - 9(z) - hydroxy - iminoerythromycin. A. and Oderivatives thereof：Germany，0503932[P]. 1992 - 12 - 03.

[3]　王 勇，等. 一种加米霉素的制备方法：中国，201310367791.7[P]. 2013 - 12 - 25.
Wang Y. *et al*. Preparation method of Gamithromycin：China，201310367791.7[P]. 2013 - 12 - 25.

[4]　Zita Mendes，Lisboa(PT)；Carlos Silva Henriques，Forte Dacasa (PT)；William Heggie，Cabanas (PT). Method of Synthesiing Macrolide Compounds：USA，20100145035 A1[P]. 2010 - 01 - 10.

[5]　Wilkening. Robert R. Novel process for the preparation of 9 - deoxo - 9(z) - hydroxyimino Erythromycin A：Germany，0503949[P]. 1997 - 02 - 12.

[6]　Huntinec Antun，Kragol Goran，Kujundzic Nedjeljko，*et al*. 2' - O - 3' - N - Bridged Macrrolided：USA，2009130189A1[P]. 2009 - 10 - 29.

[7]　Mendes Zita，Henriques Antonio，Carlos，*et al*. Method of synthesizing macrolidecompounds：USA，2010048486A[P]. 2010 - 04 - 29.

[8]　Heck，James V. 9 - Deoxo - 8α - aza - 8α - homoerythromycin a derivates modifled at the 4″ - and 8α - positions：Germany，

0508699[P]. 1992 – 03 – 04.

[9] 王建华, 江志尧. 一步法合成 9 – 去氧 – 8α – 氮杂 – 8α – 同型红霉素 A [J]. 合成化学,2010, 18 (2): 265 – 268.
Wang J H, Jiang Z Y. Synthesis of 9 – Deoxo – 8a – aza – 8a – homoerythromycin A by One step[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2010, 18 (2): 265 – 268.

[10] 付君平, 等. 一种还原胺化制备加米霉素的方法: 中国, 105646618 A[P]. 2016 – 06 – 08.
Fu J P, *et al*. Method for preparing Gamithromycin by Reductive Amination: CN, 105646618 A[P]. 2016 – 06 – 08.

[11] 崔志刚, 等. 一种加米霉素单晶型物及其制备方法: 中国, 201510102774. X[P]. 2017 – 09 – 05.
Cui Z G, *et al*. A single crystal of Gamithromycin and its preparation method: CN, 201510102774. X[P]. 2017 – 09 – 05.

[12] 邓志华, 姚国伟. 红霉素 A 6.9 – 亚胺谜的合成及晶体结构的测试[J]. 有机化学, 2003, 23(8): 867 – 872.
Deng Z H, Yao G W. Synthesis and Crystal Strure of Erthromycin A 6,9 – Imino Ether[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2003. 23(8): 867 – 872.

[13] 于丽佳. 加米霉素的合成与工艺路线研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
Yu L J. Study on the Synthesis Route of Gamithromycin [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.

(编 辑: 侯向辉)