

## 用多种核磁共振波谱技术确定乳糖酸阿奇霉素的化学结构

乔 梁 高从元 刘洪峰\* 涂光忠\*\* 刘雪辉\*\*\*

(北京医科大学医药卫生分析中心, 北京 100083)

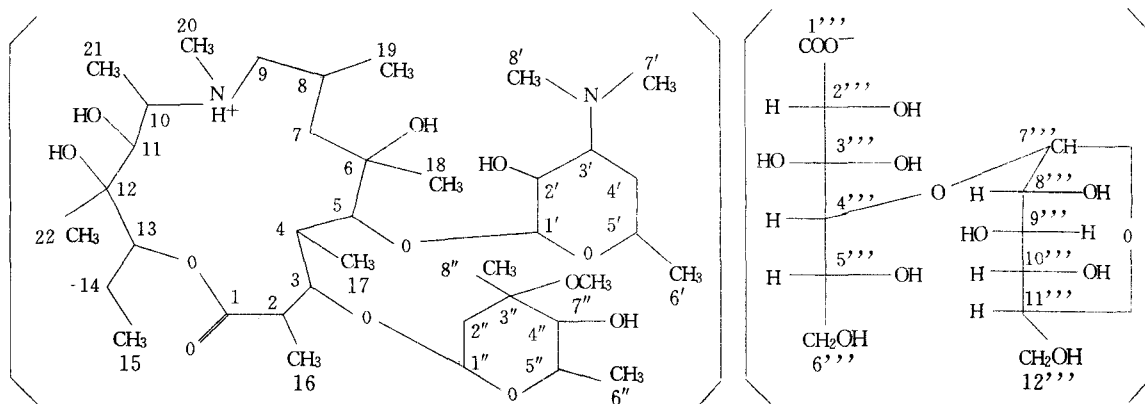
**摘 要** 核磁共振波谱技术尤其是二维波谱技术是有机大分子化学结构鉴定的强有力的测试工具和信息获得手段。本文用多种一维和二维技术(如: DEPT、COSY、TOCSY、HETCOR 和 HMBC 等)成功地确定了一种新药, 大环内酯类抗生素的化学结构为乳糖酸-9-脱氧-2 $\alpha$ -氮杂-9 $\alpha$ -甲酯-9 $\alpha$ -红霉素 A。其药品名为乳糖酸阿奇霉素(Azithromycin Lactobionate)。

**关键词** 阿奇霉素 乳糖酸盐 二维核磁共振

大量研究结果表明, 核磁共振波谱技术, 尤其是以二维核磁共振为主的多维核磁共振波谱技术, 在有机生物大分子的结构研究中, 已经越来越显示其强大的生命力, 成为复杂有机大分子结构鉴定中不可缺少的, 信息量最多, 作用最大的测试手段。

据国内外多家研究报导: 阿奇霉素是一种由红霉素衍生而来的新型大环内酯类抗生素药物, 有很强的抗菌消炎作用, 尤其对获得性肺炎和盆腔炎有较好的疗效。已经研制的主要为口服制剂, 但存在着血药浓度低、起效慢和生物利用度不高等缺点。为此, 国内外近年来一直在进行各

种注射剂的研究。乳糖酸阿奇霉素为阿奇霉素与乳糖酸形成的大环内酯有机酸盐。经证实, 此药克服了原单一游离生物碱口服制剂的一些主要缺点, 为临床治疗提供了更有效的药物与剂型。经用多种核磁共振波谱技术, 包括一维碳谱中的无畸变极化转移增强谱(DEPT), 二维波谱中的同核标量偶合相关谱(COSY)、全相关谱(TOCSY 或 HOHAHA)、异核位移相关谱(HETCOR)和氢检测异核多键相关谱(HMBC)等, 并结合其它谱信息(红外、质谱等)研究论证其化学结构为乳糖酸-9-脱氧-2 $\alpha$ -氮杂-9 $\alpha$ -甲酯-9 $\alpha$ -红霉素 A。其结构如下:



## 1 实验部分

分别用德国 Bruker 公司的 AM-500 和美国

Varian 公司的 INOVA-500 型的两种超导核磁共振波谱仪测定。其中除 TOCSY (HOHAHA) 和 HMBC 两种二维谱由 INOVA-500 型测定外, 其

\* 北京科力洋医药技术科贸中心 100078

\*\* 北京微量化学所, 北京 100091

\*\*\* 北京医科大学天然与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083

余各谱(一维和二维)均用 AM-500 型谱仪测定。

$^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  谱的工作频率分别为 500MHz 和 125MHz 以二甲基亚砷(DMSO)为溶剂,四甲基硅(TMS)为内标,测定时温度均为室温。

同核标量偶合相关谱(COSY)为绝对值型,其混合脉冲  $45^\circ$ ,数据矩阵为  $1024 \times 512$ ,谱宽为 2762.43Hz( $F_1$  和  $F_2$  数值相等);

异核相关偶合谱(HETCOR),取固定延迟  $D_3 = 3.4\text{ms}$ ,相当于  $J_{\text{CH}}$  约为 150Hz,谱宽  $F_1$  为 9226.1Hz,  $F_2$  为 17241.38Hz;

全相关谱(TOCSY 或 HOHAHA)弛豫延迟为 1.00s,混合时间为 0.05s,采样时间为 0.206s,总时间为 88min,数据矩阵为  $1024 \times 2048$ ,谱宽为 3104Hz( $F_1 = F_2$ );

HMBC 谱采用绝对值模式,谱宽为  $F_1 = 2813.0\text{Hz}$ ,  $F_2 = 30000.0\text{Hz}$ ;采样数据矩阵为  $1024 \times 1024$ , $F_1$  维充零至 256 进行 FT 变换,弛豫延迟为 1.00s,Sine bell 为 0.065s,总采样时间为 11.5h。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分子式和分子量的确定

本品为白色无定型粉末,用美国 LS 公司 LD11700 型,MALDI 公司 BIFLEX III 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(TOF-MS)和意大利 Carb Erba 公司 1106 型元素分析仪测定。证实分子中有质量数为 749 的阿奇霉素分子和质量数为 358 的乳糖酸分子,分子式为  $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12} \cdot 2\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ,分子量为 1465.59。

### 2.2 主要结构单元和功能基的确定

#### 2.2.1 分子中不饱和度的计算

由不饱和度计算公式和分子式可知,本品中应有 6 个不饱和度。用美国 Beckman 公司的 DU-7 型紫外光谱仪测定,本品无紫外吸收,证实本品中无共轭双键和芳香基团存在。

用美国 Perkin-Elmer 公司 200 型傅里叶红外光谱仪测定,证实分子中有两类羰基存在,分别为内酯基( $1725\text{cm}^{-1}$ ,  $1166\text{cm}^{-1}$ )和羧酸基;碳谱和氢谱不仅得到了同样结果,而且证实此两类羰基是一个内酯羰基(177.1ppm)和两个等价的化学位移(174.7ppm)相同的羧酸羰基。此外,其余分子中不再存在任何双键、叁键和芳香基团(见 1~3 表)。

此类三个羰基只能贡献出 3 个不饱和度,故本品分子中必定还有三个脂肪环存在。

表 1 乳糖酸阿奇霉素氢谱数据与解析

原子 序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	裂分 多重性	偶合常数 (JHz)	原子 序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	裂分 多重性	偶合常数 (JHz)
1''	4.84	t	4.6	2'	2.78	t	7.5
13	4.75	d	10.2	2	2.67	m	
1'	4.43	t	7.5	7'	2.45	s	
7'''	4.20	d	7.3	8'	2.45	s	
5''	4.19	d	7.3	20	2.29	s	
3	4.09	dd		7 <sub>a</sub>	2.27	m	
5',11	4.02	m		7 <sub>b</sub>	2.24	m	
3'''	3.93	m		4 <sub>a</sub>	2.24	m	
4'''	3.82	m		4	1.90	m	
5''	3.75	m		8	1.90	m	
3'	3.70	m		2 <sub>a</sub> ''	1.77	m	
10'''	3.68	m		14 <sub>a</sub>	1.77	m	
2'''	3.66	m		4 <sub>b</sub> '	1.51	d	6.5
4'''	3.65	m		2 <sub>b</sub> ''	1.51	m	
5	3.58	d	2.6	14 <sub>b</sub>	1.38	m	
12 <sub>a</sub> '''	3.54	d	7.1	18	1.19	s	
12 <sub>b</sub> '''	3.48	d	7.1	6'	1.13	s	
9 <sub>a</sub>	3.40	dd	6.1	6''	1.09	d	6.2
6 <sub>a</sub> '''	3.37	dd	5.7	7''	1.08	s	
9 <sub>b</sub>	3.37	dd	6.1	22	1.07	d	6.2
6 <sub>b</sub> '''	3.36	m		21	1.06	d	4.5
11'''	3.32	m		16	1.06	d	4.5
8'''	3.30	m		19	0.93	d	3.2
8''	3.22	s		17	0.85	d	6.7
9'''	3.16	t	7.6	15	0.78	t	9.4
4''	2.92	d	7.3				
10	2.90	d	9.4				

表 2 阿奇霉素氢谱数据与解析

原子 序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	裂分 多重性	偶合常数 (JHz)	原子 序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	裂分 多重性	偶合常数 (JHz)
1''	4.83	d	4.7	4	1.86	m	
13	4.72	d	10.2	8	1.86	m	
1'	4.38	d	7.4	2 <sub>a</sub> ''	1.75	m	
5''	4.15	d	7.3	14 <sub>a</sub>	1.75	m	
3	4.06	m		4 <sub>b</sub> '	1.51	d	6.5
4''	3.91	s		14 <sub>b</sub>	1.38	m	
3'	3.65	m		18	1.16	s	
11	3.59	d	9.7	6'	1.12	s	
5	3.49	d	7.0	7''	1.06	s	
5'	3.43	d	6.0	6''	1.06	s	
9 <sub>a</sub>	3.41	d	7.0	22	1.04	s	
9 <sub>b</sub>	3.36	d	5.9	21	1.01	d	7.6
8''	3.21	s		16	0.99	d	5.2
2'	3.10	t	8.0	19	0.94	s	
10	3.10	t	8.0	17	0.92	d	5.2
2	2.64	m		15	0.78	t	9.4
7'	2.49	s					
8'	2.49	s					
7 <sub>a</sub>	2.46	m					
7 <sub>b</sub>	2.45	m					
20	2.27	s					
4 <sub>a</sub> '	2.26	d	12				

表3 乳糖酸阿奇霉素的碳谱数据与解析

原子序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	碳原子数	碳类型	阿奇霉素相应位移	原子序号	化学位移 ( $\delta_{\text{ppm}}$ )	碳原子数	碳类型	阿奇霉素相应位移
1	177.13	1	COO	177.10	12''''	62.40	2	CH <sub>2</sub>	
1''''	174.73	2	COOH		*9	60.47	1	CH <sub>2</sub>	61.45
7''''	104.98	2	CH		6''''	60.47	2	CH <sub>2</sub>	
1'	101.74	1	CH	102.18	8''	48.83	1	OCH <sub>3</sub>	48.78
1''	94.51	1	CH	94.51	2	44.71	1	CH	44.73
4''''	83.99	2	CH		4	41.58	1	CH	41.90
5	82.97	1	CH	82.71	*8	41.58	1	CH	41.90
3	77.40	1	CH	77.39	7	41.00	1	CH <sub>2</sub>	41.64
4''	76.20	1	CH	76.36	*7'	40.06	1	CH <sub>3</sub>	40.32
11''''	75.63	2	CH		*8'	40.06	1	CH <sub>3</sub>	40.32
13	75.63	1	CH	74.89	20	35.82	1	CH <sub>3</sub>	35.73
3''	73.62	1	C	73.60	*4'	34.60	1	CH <sub>2</sub>	34.70
9''''	73.25	2	CH		2''	30.24	1	CH <sub>2</sub>	29.98
6	72.80	1	C	72.77	18	25.78	1	CH <sub>3</sub>	26.08
12	72.80	1	C	72.57	22	22.04	1	CH <sub>3</sub>	22.08
10''''	71.63	2	CH		6'	21.23	1	CH <sub>3</sub>	21.46
3''''	71.45	2	CH		7''	21.02	1	CH <sub>3</sub>	20.99
5''''	71.45	2	CH		14	20.89	1	CH <sub>2</sub>	20.99
8''''	71.18	2	CH		6''	18.41	1	CH <sub>3</sub>	18.45
2''''	70.50	2	CH		16	17.62	1	CH <sub>3</sub>	17.68
*10	69.74	1	CH	70.60	19	14.78	1	CH <sub>3</sub>	14.78
*2'	69.74	1	CH	70.60	15	10.93	1	CH <sub>3</sub>	10.93
*11	68.18	1	CH	68.73	17	8.98	1	CH <sub>3</sub>	9.03
5'	68.18	1	CH	68.73	21	7.01	1	CH <sub>3</sub>	6.77
*3'	66.59	1	CH	67.00					
5''	64.90	1	CH	64.75					

注:乳糖酸阿奇霉素的碳谱数据中带\*的碳的化学位移值与阿奇霉素中的相应位移值比较与变化可表明在两个氨基上的成盐情况。

### 2.2.2 三个脂及环及其类型确证

根据碳谱和氢谱信息情况(见1~3表),并结合与阿奇霉素有关数据比较(见表3)和母核情况,可以证实3个脂肪环应分别为两个6元含氧脂肪环和一个含内酯的大脂肪环(15元环)。

### 2.2.3 主要功能基团的确证

(1)碳谱的无畸变极化转移增强谱(DEPT)证实,分子中共有一个甲氧基(48.8ppm),13个甲基(2×40.1ppm、35.9ppm、25.8ppm、

22.0ppm、21.2ppm、21.0ppm、18.4ppm、17.6ppm、14.8ppm、10.9ppm、9.0ppm和7.0ppm),9个亚甲基(-CH<sub>2</sub>) (2×62.4ppm、3×60.5ppm、41.0ppm、34.6ppm、30.2ppm和20.9ppm),33个次甲基(-CH),以及3个季碳(2×72.8ppm和73.6ppm),两个羰基(2×174.7ppm)和一个内酯(177.1ppm)及23个羟基存在,完全与乳糖酸阿齐霉素的分子式相吻合(见表3和图1)。

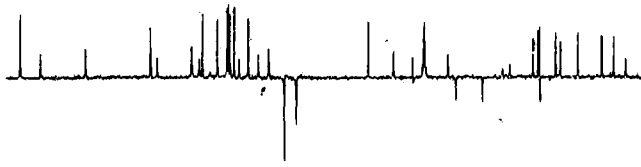


图1 乳糖酸阿奇霉素 DEPT135°谱图

(2) 同核标量偶合相关谱 ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY)、异核标量偶合相关谱 ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSY 或 HETCOR) 和全相关谱 (TOCSY 或 HOHAHA) 将一维氢谱和碳谱中各信号进行了进一步的确切归属, 其数据与结果 (见表1和表3以及(2~5图))。

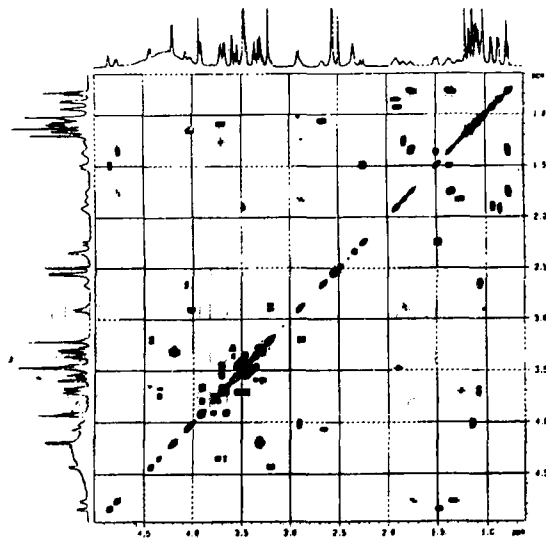


图2 乳糖酸阿奇霉素二维氢-氢相关谱

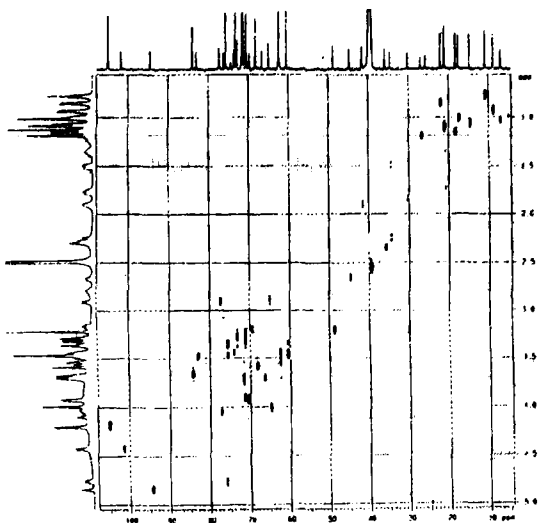


图3 乳糖酸阿奇霉素二维碳-氢异核相关谱

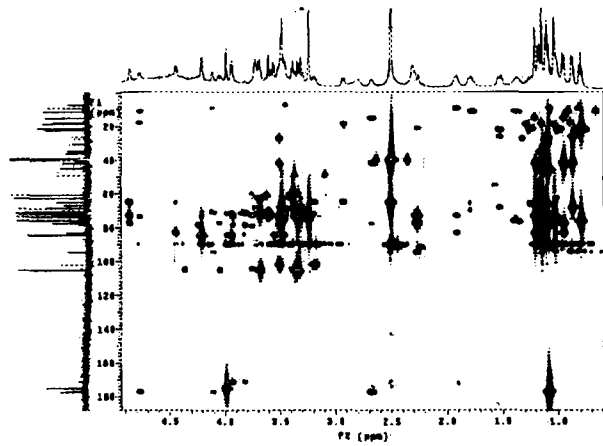


图4 乳糖酸阿奇霉素二维反相碳-氢异核相关谱

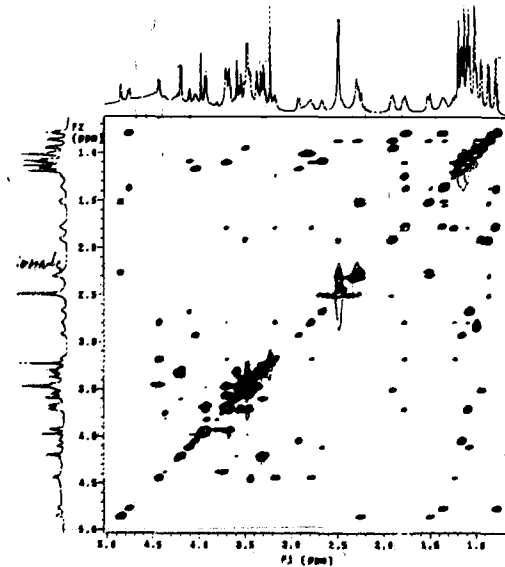


图5 乳糖酸阿奇霉素二维全相关谱

### 2.3 乳糖酸阿奇霉素成盐的确证

2.3.1 为将上述情况再和碳谱中的有关信号值等结合考虑, 明显说明在第一个样品中大环内酯生物碱部分已和乳糖酸基结合成盐, 即该分子应为乳糖酸阿奇霉素。

2.3.2 这种结合的证据在碳谱中尤为明显。在表3中, 与阿奇霉素 $\delta$ 对应的 $\delta$ 值相比发现表中带\*号的各 $\delta$ 值均向高场移动。即 $\delta_c$ 值减小, 表明生物碱阿奇霉素在本品中已与有机乳糖酸结

合成盐,且成盐处就在两个氮上,成盐后即质子化后,由于电场效应的影响,使与氮相连的 $\alpha$ 碳和 $\beta$ 碳均向高场位移(一般位移 $0.5\sim 4\text{ppm}$ )。

2.3.3 这种结合情况在红外光谱中也得到了证实。其中二者成盐后到形成亚胺离子( $-\text{NH}^+$ )的 $2720\text{cm}^{-1}$ 和 $2360\text{cm}^{-1}$ 峰,有 $1605\text{cm}^{-1}$ 和 $1079\text{cm}^{-1}$ 乳糖酸阴离子吸收峰,还有与吸电子的N相连的 $-\text{NCH}_2$ 成盐后(即成 $-\text{NH}^+\text{CH}_2-$ 离子)向低波数移动等情况都证实了分子中两大结构单元确已结合成盐,且成盐的位置应在N上,形成了由离子键组成的阴阳离子两大部分。

由上述数据和解析,确证本品是一种大环内酯类抗生素新药,是由乳糖酸和阿奇霉素两部分结合而成的,分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12} \cdot 2\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ,结构式为乳糖酸-9-脱氧-2 $\alpha$ -氮杂-9 $\alpha$ -甲酯-9 $\alpha$ -红霉素A的化合物。其药品名被命名为乳糖酸阿奇红霉素(Azithromycin Lactobionate)。

说明:本文着重在用多种核磁共振技术确定化学结构,至于所用其它谱如:IR、UV和MS等谱图佐证,限于篇幅一律不列出谱图及数据。

### 参考文献

- [1] 王泽民等. 当代结构药物全集. 222~223, 1993, 北京科技出版社
- [2] 龚运淮. 天然有机化合物的 $^{13}\text{C}$ 核磁共振化学位移, 405~409, 418~420, 1986, 科学出版社
- [3] 梁晓天. 核磁共振高分辨氢谱的解析和应用, 282~288, 234~236, 1976, 科学出版社
- [4] 陈德昌. 碳谱及其在中草药化学中的应用, 276~279, 1991, 人民卫生出版社
- [5] 董庆年. 红外光谱法, 149~150, 167~171, 1977, 石油化学出版社
- [6] Eur. Pat, 10923 (1984), CA, 101-211651

## Identification of the Chemical Structure on A New Drug of Antibiotic Using Various NMR Techniques

Qiao Liang, Liu Hongfeng, Tu Guangzhong, Liu Xuehui, Gao Congyuan

(Beijing Medical University, Medicinal and Healthy Analysis Center, Beijing 100083)

**Abstract** The chemical structure of lactobionic acid-9-deoxo-2 $\alpha$ -aza-9 $\alpha$ -formaldehyde- $\alpha$ -homoergthromycin A, a new drug of antibiotic with a big-ring lactone, has been successfully identified by various NMR techniques. It was named "Azithromycin Lactonionate".

**Key words** Azithromycin, Lactobionate, Dimentional NMR

由北京电子仪器行业协会科技委员会和《现代仪器使用与维修》杂志社等单位联合主办的“99’系统集成技术研讨会”定于8月下旬在浙江舟山举行,现正开始征集论文,投稿者请与北京银河电子技术公司马嘉联系。电话:(010) 68326126 (传真):(010) 68326126