5 个氨基糖苷类抗菌药降解杂质的合成

李爱波，裴　东*
（重庆药友制药有限责任公司，重庆 401121）

摘要：降解产物是氨基糖苷类抗菌药共有的一类杂质，药典对其限度均有要求。文章报道了妥布霉素、西索米星、奈替米星、卡那霉素和阿米卡星降解杂质的合成方法，通过酸水解法或衍生化氧化裂解法合成了 4 个一级降解杂质与 1 个共有的二级降解杂质，HPLC 纯度均大于 95%。这 5 个降解杂质的结构经 ^{1}H NMR 和 LC-MS 确证，可作为氨基糖苷类抗菌药质量控制的杂质对照品。

关键词：氨基糖苷类抗菌药；妥布霉素；西索米星；奈替米星；卡那霉素；阿米卡星；降解杂质；合成
中图分类号：R978.1；TQ460.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2023)10-1436-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.10.006

Synthesis of the Degradation Impurities of 5 Aminoglycoside Antibiotics

LI Aibo, PEI Dong*
(*Chongqing YaoPharma Co., Ltd., Chongqing 401121*)

ABSTRACT: Degradation products are the common impurities of some aminoglycoside antibiotics, and their residue definitions are strictly controlled in the pharmacopoeia. In this paper, the synthesis methods of degradation impurities of tobramycin, sisomicin, netilmicin, kanamycin and amikacin were investigated. Four primary degradation impurities and one common secondary degradation product were prepared by acid hydrolysis or derivative oxidation with HPLC purity of more than 95%. The structures of aforementioned five compounds were confirmed by ^{1}H NMR and LC-MS, which could be used as the references for the quality control of the aminoglycoside antibiotics.

Key Words: aminoglycoside antibiotics; tobramycin; sisomicin; netilmicin; kanamycin; amikacin; degradation impurity; synthesis

氨基糖苷类抗菌药（aminoglycoside antibiotics）是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗菌药，属于广谱抗感染药物，对革兰阳性菌包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）和耐甲氧西林表皮葡萄球菌（MRSE），以及需氧革兰阴性杆菌具有强大的抗菌活性，但对革兰阴性球菌的作用较差。其中，链霉素（streptomycin）、卡那霉素（kanamycin）还对结核分枝杆菌有效[1]。常见的氨基糖苷类抗菌药有妥布霉素（tobramycin）、西索米星（sisomicin）、奈替米星（netilmicin）、卡那霉素、阿米卡星（amikacin）、新霉素（neomycin）、链霉素、庆大霉素（gentamicin）、依替米星（etimicin）等。

氨基糖苷类抗菌药中的有关物质主要为合成前体、异构化产物、其他副产物和贮存期降解物。其中，降解杂质是氨基糖苷类抗菌药共有的一类杂质。有的药典对此类降解杂质的限度做了特殊要求，如《欧洲药典》（EP 10.0）中规定，硫酸奈替米星中的降解杂质“impurity B”（即尼布拉明，**1**）不得超过 1%。氨基糖苷类抗菌药的降解主要通过糖苷键断裂的方式进行，通过 1 ～ 3 次降解，得到相应等级的降解产物（图 1）。

对降解杂质的研究不仅可为原料药或制剂的制备工艺和质量控制提供参考依据，同时也是发现新药的有效途径。例如新霉胺（neamine）是新霉素

收稿日期：2022-10-13
作者简介：李爱波（1990—），男，工程师，从事药物合成研究。
通信作者：裴　东（1982—），男，高级工程师，从事药物合成、连续流工艺研究。
E-mail：captain_pd@163.com

(neomycin) 的1种降解杂质（图2），但近年来研究[2]表明其能有效抑制血管生成素的转移，从而同时抑制肿瘤细胞增殖、肿瘤组织新血管生成，是抗肿瘤药的优良先导化合物。

目前，有关氨基糖苷类抗菌药的合成研究较多，但对其降解杂质合成方法的报道较少。TAKAGI等[3]报道将妥布霉素加至6 mol/L盐酸中，加热至100 ℃反应2 h，可得到其一级降解杂质**1**，如图3所示。由于糖苷键的稳定性不同，其降解主产物为AB环产物（1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,6*R*）-4,6-二氨基-3-[[（2*R*,3*R*,5*S*,6*R*）-3-氨基-6-（氨甲基）-5-羟基四氢-2*H*-吡喃-2-基]氧代]环己烷-1,2-二醇（**1**，78%），仅能得到极少量的BC环产物（2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*）-4-氨基-2-[[（1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,6*R*）-4,6-二氨基-2,3-二羟基环己基]氧代]-6-（羟甲基）四氢-2*H*-吡喃-3,5-二醇（**2**，0.5%）。PAULSEN等[4]报道将西索米星乙酰化保护后，经高碘酸钠裂解，可得到其AB环一级降解杂质（1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,6*R*）-4,6-二氨基-3-[[（2*S*,3*R*）-3-氨基-6-（氨甲基）-3,4-二氢-2*H*-吡喃-2-基]氧代]环己烷-1,2-二醇（**3**，如图4所示）。由于双键的存在，西索米星不能直接在酸性条件下进行醇解；如果在酸性条件下水解，也只能得到其二级降解杂质。

本研究选取5种常见的氨基糖苷类抗菌药（妥布霉素、西索米星、奈替米星、卡那霉素、阿米卡星）为研究对象，对其进行酸性水解或衍生化

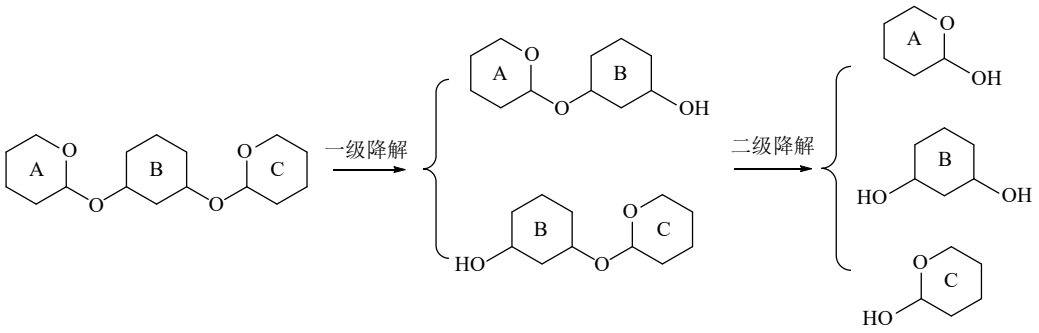


图1 氨基糖苷类抗菌药的降解方式

Fig.1 The Degradation of Aminoglycoside Antibiotics

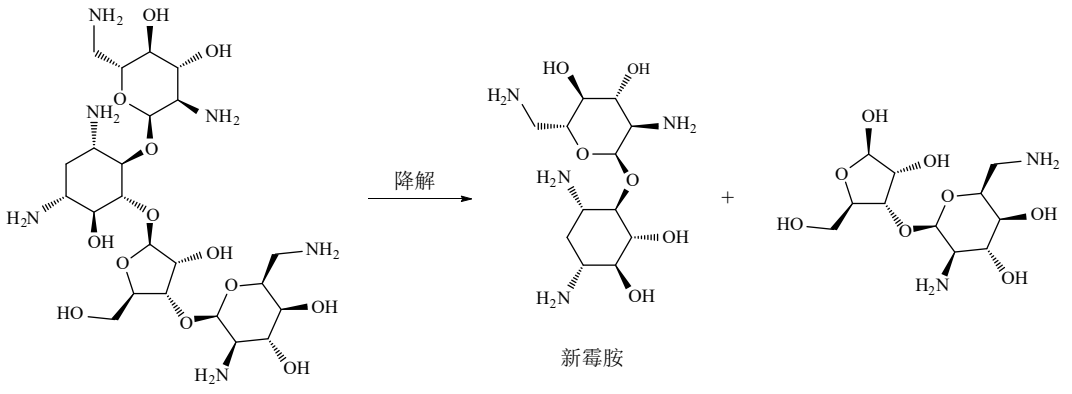


图2 新霉素降解生成新霉胺

Fig.2 Degradation of Neomycin to Neamine

裂解。将药物加至 6 mol/L 盐酸中加热至回流反应 2 h。试验表明，仅妥布霉素得到 AB 环一级降解主产物 **1**，其他 4 种抗菌药均得到 B 环二级降解产物 (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,6*S*) -4,6- 二氨基环己基 -1,2,3- 三醇 (**4**)，如图 5 所示。推测原因是妥布霉素的 A 环糖苷键旁为氨基取代，且六元环中不含双键。当糖苷键旁为氨基取代时，氨基上的氢可以和糖苷键上的氧形成氢键，减少糖苷键氧的亲核性，从而增加糖苷键的稳定性，避免其进一步水解成二级降解产物；当六元环中含双键时，在酸性条件下易受水分子中羟基的进攻而发生加成反应，同样得不到相应的降解产物，比如奈替米星和西索米星。

当糖苷键旁存在羟基时，该糖苷键对酸的稳定性下降。基于上述试验结果，对于卡那霉素和阿米卡星，改用 1.5 mol/L 盐酸于 75 ℃反应 20 h，进行缓慢降解，如图 6 所示。卡那霉素降解分离得到的主产物是其 BC 环一级降解产物 **2**，而阿米卡星降解分离得到的主产物是卡那霉素的 AB 环一级降解产物 (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*) -2-(氨甲基)-6-[[(1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,6*S*) -4,6- 二氨基 -2,3- 二羟基环己基] 氧代] 四氢 -2*H*- 吡喃 -3,4,5- 三醇 (**5**)。推测是阿米卡星的酰胺键在长时间的酸性加热条件下也被水解，所以未能得到其相应的一级降解杂质。

奈替米星和西索米星由于结构中含有双键，在酸性条件下不能得到其一级降解杂质。参考文献 [4] 将奈替米星和西索米星先进行乙酰化保护，再用高碘酸钠进行裂解。西索米星裂解得到了其 AB 环一级降解杂质 **3**(图 4)，而奈替米星未能得到其 AB 环一级降解杂质。

本研究探索了 5 种常见氨基糖苷类抗菌药的降解产物，成功制备了妥布霉素的一级降解杂质 **1**(即 EP 10.0 中收载的杂质 B)，卡那霉素的一级降解杂质 **2**，西索米星的一级降解杂质 **3**，阿米卡星的一级降解杂质 **5**，以及 4 种抗菌药共有的二级降解杂质 **4**，经 HPLC 检测，纯度均大于 95%，又经 ^{1}H NMR 和 LC-MS 确证结构。关于这些化合物的立体构型，本研究没有深入探索，仅假设药物降解时，立体构型没有发生变化。通过对降解杂质的研

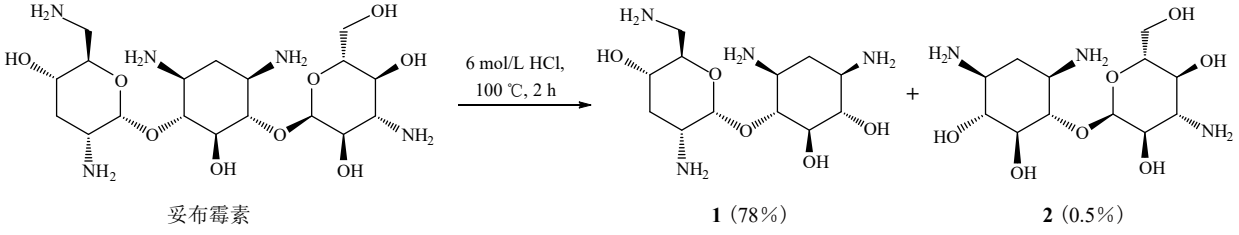


图 3　妥布霉素酸性水解

Fig.3　Acid Hydrolysis of Tobramycin

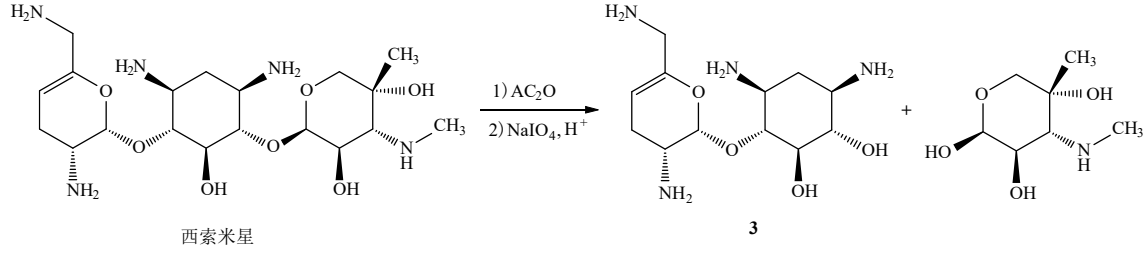


图 4　西索米星衍生化后裂解

Fig.4　Degradation of Sisomicin after Derivatization

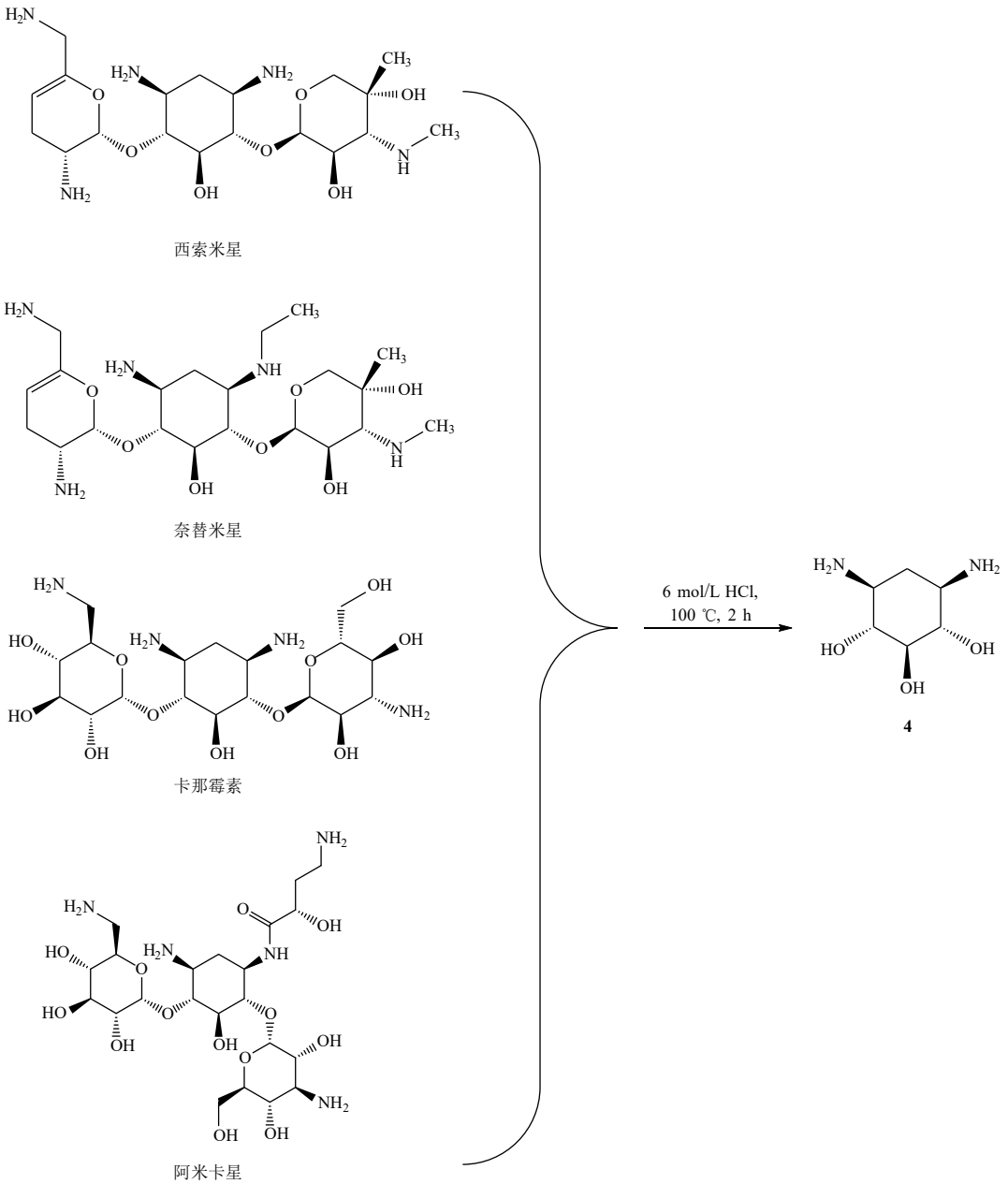


图 5　4 种氨基糖苷类抗菌药经 6 mol/L 盐酸降解得到 4

Fig.5　Degradation of Four Aminoglycoside Antibiotics by 6 mol/L Hydrochloric Acid to Compound **4**

究，可以对氨基糖苷类抗菌药的原料药和制剂进行更好的质量控制。

实验部分

（1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,6*R*）-4,6- 二氨基 -3-[[（2*R*,3*R*,5*S*,6*R*）-3- 氨基 -6-（氨甲基）-5- 羟基四氢 -2*H*- 吡喃 -2- 基]- 氧代] 环己烷 -1,2- 二醇（1）

将妥布霉素（3 g，6.42 mmol）加至 6 mol/L 盐酸（60 mL）中，搅拌溶清，升至 100 ℃反应 2 h，于 50 ℃减压浓缩至干，向剩余物中加入甲醇（100 mL），加热至回流反应 0.5 h，蒸除约一半溶剂，于室温下向剩余物中缓慢滴加乙醇（60 mL），滴毕搅拌 30 min，过滤，滤饼用乙醇（20 mL）洗涤后，于 45 ℃减压干燥 10 h，得类白色固体 **1**（1.0 g，51％）。纯度 95.7％［HPLC 归一化法：色谱柱 Cambridge C_{18} 柱

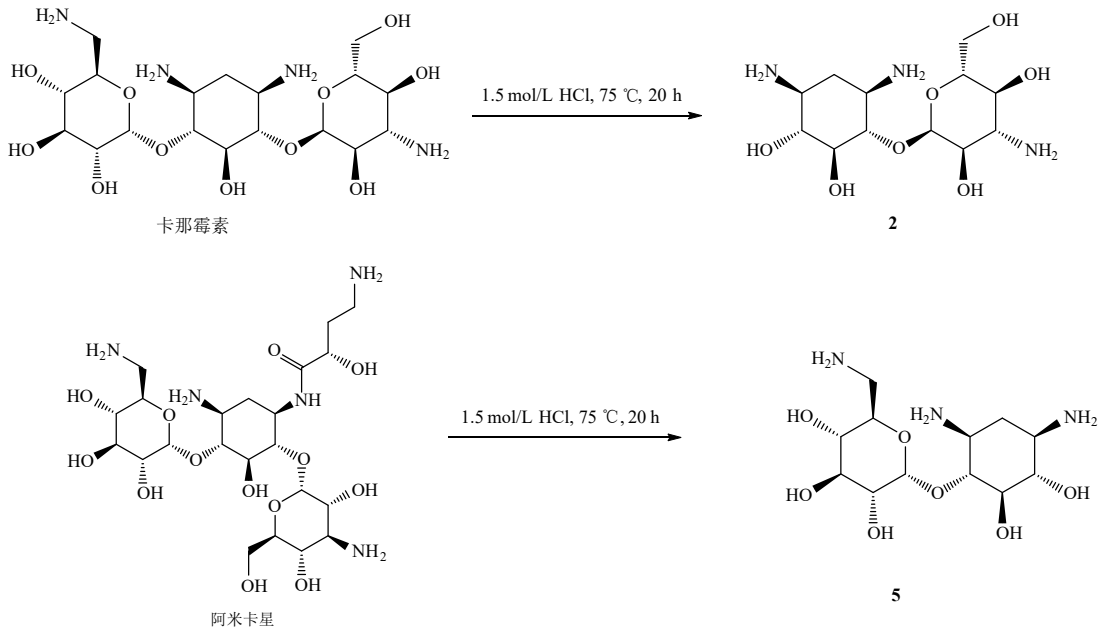


图 6　卡那霉素和阿米卡星经 1.5 mol/L 盐酸降解

Fig.6　Degradation of Kanamycin and Amikacin by 1.5 mol/L Hydrochloric Acid

(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相 0.2 mol/L 三氟乙酸溶液；柱温 35 ℃；流速 0.4 mL/min；检测器示差折光检测器。相对保留时间 0.79(相对于妥布霉素峰)]。mp 250 ～ 252 ℃。^{1}H NMR(400 MHz, D_2O)δ: 5.14(d, *J*=3.6 Hz, 1H), 3.61(ddd, *J*=10.2、8.4、4.6 Hz, 1H), 3.45(ddd, *J*=18.5、13.3、6.9 Hz, 2H), 3.26(q, *J*=9.7 Hz, 1H), 3.00 ～ 3.17(m, 2H), 2.94(dt, *J*=12.6、4.1 Hz, 1H), 2.74 ～ 2.88(m, 2H), 2.68(ddd, *J*=12.0、9.9、4.1 Hz, 1H), 1.95(ddt, *J*=26.1、12.9、4.3 Hz, 2H), 1.57(dd, *J*=23.9、11.9 Hz, 1H), 1.16(q, *J*=12.3 Hz, 1H)；ESI-MS(*m*/*z*): 329.18[M+Na]$^+$。

(1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-4,6-二氨基环己基-1,2,3-三醇 (4)

将卡那霉素 (3 g，6.19 mmol) 加至 6 mol/L 盐酸 (60 mL) 中，搅拌溶清，升至 100 ℃反应 2 h，于 50 ℃减压浓缩至干，经柱色谱[洗脱剂 二氯甲烷、甲醇与 25%氨水(体积比 4 ∶ 4 ∶ 1)]分离纯化，收集 TLC[展开剂 甲醇和 25%氨水(体积比 5 ∶ 2)]组分(R_f 值 0.32)，于 50 ℃减压浓缩，剩余物用乙醇 (60 mL) 打浆，过滤，滤饼于 45 ℃减压干燥 10 h，得类白色固体 **4**(0.5 g，50%)。纯度 97.5%[HPLC 条件同化合物 **1**，相对保留时间为 0.69(相对于卡那霉素峰)]。mp 223 ～ 225 ℃(文献[5]：225 ～ 228 ℃)。^{1}H NMR(400 MHz, D_2O)δ: 3.16(dt, *J*=34.1、9.2 Hz, 3H), 2.60 ～ 2.84(m, 2H), 1.97(dd, *J*=8.9、3.9 Hz, 1H), 1.21(q, *J*=12.3 Hz, 1H)；ESI-MS(*m*/*z*): 163.10[M+H]$^+$。

(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-4-氨基-2-[[(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4,6-二氨基-2,3-二羟基环己基]氧代]-6-(羟甲基)-四氢-2*H*-吡喃-3,5-二醇 (2)

将卡那霉素 (4 g，8.26 mmol) 加至 1.5 mol/L 盐酸 (80 mL) 中，搅拌溶清，升至 75 ℃，反应 20 h，于 50 ℃减压浓缩至干，经柱色谱(洗脱剂同上)分离纯化，收集 TLC(展开剂同上)组分(R_f 值 0.48)，于 50 ℃减压浓缩，剩余物用乙醇 (60 mL) 打浆，过滤，滤饼于 45 ℃减压干燥 10 h，得类白色固体 **2**(0.8 g，30%)。纯度 95.5%[HPLC 条件同化合物 **1**，相对保留时间为 0.76(相对于卡那霉素峰)]。mp 240 ～ 242 ℃(文献[6]：238 ～ 242 ℃)。^{1}H NMR(400 MHz, D_2O)δ: 4.98(d, *J*=3.7 Hz, 1H), 3.85(dt, *J*=10.0、3.1 Hz, 1H), 3.63 ～ 3.72(m, 3H), 3.46 ～ 3.55(m, 1H), 3.26 ～ 3.42(m, 3H), 3.21(dd,

J=19.3、8.9 Hz, 1H), 3.06(tdd, *J*=16.4、9.8、4.2 Hz, 2H), 2.14(dt, *J*=12.7、4.2 Hz, 1H), 1.46(dt, *J*=12.5、9.0 Hz, 1H)；ESI-MS(*m*/*z*): 324.17[M+H]$^+$。

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(氨甲基)-6-[[(1*R*,2*R*,3*S*,4*R*,6*S*)-4,6-二氨基-2,3-二羟基环己基]氧代]四氢-2*H*-吡喃-3,4,5-三醇 (5)

将阿米卡星 (1 g，1.70 mmol) 加至 1.5 mol/L 盐酸 (20 mL) 中，搅拌溶清，升至 75 ℃，反应 20 h，冷却至室温，50 ℃减压浓缩至干，经柱色谱 (洗脱剂同上) 分离纯化，收集 TLC (展开剂同上) 组分 (R_f 值 0.52)，50 ℃浓缩，剩余物用乙醇 (60 mL) 打浆，过滤，滤饼于 45 ℃减压干燥 10 h，得类白色固体 **5** (0.2 g，27%)。纯度 95.0% [HPLC 条件同化合物 **1**，相对保留时间为 0.84 (相对于阿米卡星峰)]。mp 230～233 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ: 4.94 (d, *J*=3.9 Hz, 1H), 3.83 (dt, *J*=10.1、3.3 Hz, 1H), 3.62～3.74 (m, 2H), 3.49 (dd, *J*=10.5、3.8 Hz, 1H), 3.32 (td, *J*=9.5、4.8 Hz, 2H), 3.14～3.26 (m, 2H), 2.79～3.07 (m, 3H), 2.00 (dt, *J*=12.8、4.2 Hz, 1H), 1.29 (q, *J*=12.5 Hz, 1H)；ESI-MS(*m*/*z*): 324.17[M+H]$^+$。

(1*S*,2*R*,3*R*,4*S*,6*R*)-4,6-二氨基-3-[[(2*S*,3*R*)-3-氨基-6-(氨甲基)-3,4-二氢-2*H*-吡喃-2-基]氧代]-环己烷-1,2-二醇 (3)

将西索米星 (4 g，8.93 mmol) 加至水 (120 mL) 和甲醇 (80 mL) 的混合溶液中，再加入三乙胺 (2.64 mL)，搅拌 10 min 后加入乙酸酐 (4.16 mL)，反应 15 min，于 60 ℃减压浓缩至干，经柱色谱 (洗脱剂同上) 分离纯化，收集 TLC (展开剂同上) 组分 (R_f 值 0.85)，于 50 ℃减压浓缩，得类白色固体 (2.8 g)，下一步备用。

将上述固体 (2.8 g) 加至水 (17.5 mL) 和 25% 氨水 (2.8 mL) 的混合溶液中，搅拌均匀，降至 0 ℃。将高碘酸钠 (3 g，13.89 mmol) 溶于水 (42 mL) 中，再滴加至上述体系中，滴毕，于 0～5 ℃反应 2 h，于 60 ℃浓缩至干，将剩余物加至乙醇 (45 mL) 和氯仿 (45 mL) 的混合溶液中，搅拌 15 min，过滤，滤饼于 60 ℃减压干燥 6 h，得类白色固体 (1.1 g)，下一步备用。

将上述固体 (1.1 g) 加入 80% 氢氧化钾溶液 (15 mL) 中，升至 60 ℃反应，TLC (展开剂同上) 跟踪反应。反应液于 60 ℃浓缩至干，经柱色谱 (洗脱剂同上) 分离纯化，收集 TLC (展开剂同上) 组分 (R_f 值 0.62)，于 50 ℃减压浓缩，得类白色固体 **3** (0.3 g，11%)。纯度 95.4% [HPLC 条件同化合物 **1**，相对保留时间为 0.50 (相对于西索米星峰)]。mp 170～172 ℃ (文献[4]：171～174 ℃)。^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ: 5.25 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 3.43 (d, *J*=78.2 Hz, 2H), 3.08 (d, *J*=61.8 Hz, 4H), 2.65 (d, *J*=33.8 Hz, 2H), 2.09 (s, 1H), 1.72～1.98 (m, 2H), 1.03～1.15 (m, 1H)；ESI-MS(*m*/*z*): 289.18[M+H]$^+$。

参考文献：

[1] 诸玲玲, 孟现民, 张永信. 氨基糖苷类药物的发展历程[J]. 上海医药, 2011, **32**(7): 5.

[2] 刘亚萍. 新霉胺体内外抗肿瘤的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学硕士毕业论文, 2015.

[3] TAKAGI Y, MIYAKE T, TSUCHIYA T, *et al*. Synthesis of 3'-deoxykanamycin B (tobramycin)[J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1976, **49**(12): 3649-3651.

[4] PAULSEN H, JANSE R, STADLER P. Bausteine von oligosacchariden, XXV. Selektiver abbau von sisomicin zu sisamin[J]. *Chem Ber*, 1981, **114**: 837-842.

[5] DALY J, DURANT R C, FRIESS S L, *et al*. Labilization of ester bonds in aminocyclitol derivatives. Ⅱ. Polyacetates of deoxystreptamine[J]. *J Am Chem Soc*, 1960, **82**(22): 5928-5934.

[6] OGAWA H, ITO T, KONDO S, *et al*. Chemistry of kanamycin. V. The structure of kanamycin[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1958, **11**(4): 169-170.