

免疫抑制剂子囊霉素的互变异构现象研究

易中宏, 岳崇斌, 易小莉, 杨文雨, 胡 红



重庆乾泰医药研究院有限公司 (重庆 400061)

【摘要】目的 研究子囊霉素在极性溶剂中的互变异构现象, 分离、纯化其互变异构体并确证其结构。**方法** 采用反相 HPLC 法跟踪分析在乙腈及乙腈-水溶液中子囊霉素及其互变异构体的平衡移动情况; 通过制备型 HPLC 对异构体进行分离纯化, 获得高纯度样品, 采用高分辨质谱、二维核磁共振波谱进行结构确证。**结果** 在乙腈及乙腈-水溶液中均检测到 2 个互变异构体, 乙腈-水溶液中子囊霉素的互变异构平衡更易于向形成异构体的方向移动; 分离纯化的子囊霉素异构体结构为 (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19S,26aS)-8-乙基-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-十六氢-5,19-二羟基-3-[(E)-2-[(1R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧环己基]-1-甲基乙烯基]-14,16-二甲氧基-4,10,12,18-四甲基-15,19-环氧-3H-吡啶并 [2,1-c] [1,4] 氧杂氮杂环二十三碳烯-1,7,20,21(4H,23H)-四酮。**结论** 在极性溶剂中, 子囊霉素的互变异构体主要为 C19 位差向异构体; 采用反相 HPLC 法制备差向异构体的方法可行有效。本研究为子囊霉素质量标准的建立提供了理论依据。

【关键词】 子囊霉素; 互变异构; 免疫抑制剂; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法; 结构确证

【中图分类号】 R969

【文献标识码】 A

Study on tautomeric phenomenon of immunosuppressant ascomycin in solution

YI Zhonghong, YUE Chongbin, YI Xiaoli, YANG Wenyu, HU Hong

Chongqing Qiantai Pharma Co., Ltd., Chongqing 400061, China

Corresponding author: YI Zhonghong, Email: yizhonghong@bright-gene.com

【Abstract】Objective To study the tautomerism of ascomycin in polar solvents, and isolate, purify and identify the structure of tautomeric compound of ascomycin. **Methods** The equilibrium of ascomycin and its tautomers in acetonitrile and acetonitrile-water solutions was analyzed by reversed-phase HPLC. The separation and purification of isomer was achieved through preparative HPLC to obtain high-purity samples. The structure was confirmed by high-resolution mass spectrometry and 2D nuclear magnetic resonance. **Results** Two tautomeric compounds were detected in acetonitrile and acetonitrile-water solutions, and the tautomeric equilibrium of ascomycin shifts faster remarkably in acetonitrile-water solution than acetonitrile. The structure of tautomeric compound of ascomycin was (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19S,26aS)-8-Ethyl-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19, 24,25,26,26a-hexadecahydro-5,19-dihydroxy-3-[(E)-2-[(1R,3R,4R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl]-14,16-dimethoxy-4,10,12,18-tetramethyl-15,19-epoxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4]oxaazacyclotricosine-1,7,20,21-(4H,23H)-tetrone. **Conclusion** The tautomer of ascomycin is primarily the C19 epimer in polar solvents. The method about preparation of ascomycin epimer compound by reverse phase HPLC is effective and efficient. This study provides a basis for establishing the quality standard of ascomycin.

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202501018

通信作者: 易中宏, 硕士, 高级工程师, Email: yizhonghong@bright-gene.com

【Keywords】Ascomycin; Tautomerism; Immunosuppressant; Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; Structure identification

子囊霉素 (ascomycin, FK-520) 是一种二十三元环的大环内酯类化合物, 免疫抑制剂他克莫司 (tacrolimus, FK-506) 的乙基类似物, 具有重要的药学价值^[1-9]; 1962 年由日本藤泽制药公司从含有吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*, KK317) 的土壤中分离得到。子囊霉素有抗真菌、免疫调节、抗惊厥和神经保护等多种生物活性, 其衍生物在药物研发中也具有广泛的应用前景^[10-11]。以子囊霉素为起始物料通过选择性的羟基酯化和氯化反应, 可以合成吡美莫司 (pimecrolimus)。2001 年 12 月由瑞士诺华制药公司研发的吡美莫司乳膏在美国获得全球首次批准上市, 主要用于治疗免疫功能正常人的特应性皮炎 (湿疹), 进一步凸显了子囊霉素及其衍生物在临床治疗中的重要性。

据文献^[12]报道, 他克莫司在乙醇溶液中存在互变异构现象, 且在含有水或醇的溶液中易与异构体之间发生相互转化。本研究采用反相 HPLC 法对子囊霉素在乙腈和乙腈-水溶液中的互变异构现象进行研究, 分离纯化得到了高纯度的差向异构体, 并进行结构确证。本研究为子囊霉素的有关物质和含量测定方法的建立提供科学依据, 同时为进一步优化其应用奠定理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪、LC-30AD 超高效液相色谱仪 (日本岛津公司, 配置美国 AB SCIEX 公司 SCIEX TRIPLE TOF 4600 高分辨质谱检测仪); XSR205DU 型十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Avance 600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Vion IMS QToF 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); NP7010C 制备型高效液相色谱仪 (江苏汉邦科技有限公司); 密理博 Milli-Q IQ7000 型超纯水系统 (德国 Merck 公司)。

1.2 主要药品与试剂

子囊霉素 (重庆乾泰医药研究院有限公司自制, 批号: CBR-AS0903, 纯度 98.6%; 批号: CBR-AS0704, 纯度 99.3%); 甲酸、乙腈、甲基叔丁基醚和氘代氯仿为色谱纯, 其余试剂均为分

析纯, 水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

采用 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (40:60); 检测波长: 220 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 50℃; 进样量: 10 μL。

2.1.2 液相色谱-质谱联用条件

采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (40:60); 流速: 0.25 mL/min, 柱温: 50℃; 进样量: 1 μL。

采用 DuoSpray 离子源、ESI 方式电离, 正离子扫描和全扫描模式; 雾化气: 55 psi; 加热气: 55 psi; 气帘气: 25 psi; 离子源温度: 600.0℃, 离子源喷射电压: 5 500.0 V。

2.1.3 有关物质检测色谱条件

采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相 A: 6 mmol/L 磷酸水溶液-[乙腈-甲基叔丁基醚 (81:19)] (4:1), 流动相 B: 6 mmol/L 磷酸水溶液-[乙腈-甲基叔丁基醚 (81:19)] (1:4), 梯度洗脱 (0~30 min, 72% A; 30~53 min, 72%→15% A; 53~54 min, 15%→72% A; 54~60 min, 72% A); 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 60℃; 进样体积: 10 μL; 运行时间: 60 min; 进样盘温度: 8℃。

2.2 高压制备色谱条件

流动相: 乙腈-水 (52:48); 流速: 50.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 进样体积: 5 mL; 柱温: 室温。

2.3 溶液的制备

取子囊霉素约 50 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 平行称取 2 份; 分别用乙腈、乙腈-水 (70:30) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 子囊霉素的互变异构考察

样品溶液配制后按“2.1.1”项下色谱条件立

即进样，记录色谱图（图1）。在乙腈-水（70：30）溶液中子囊霉素异构体的转化速度比在乙腈溶液中快；异构体1色谱峰前延，峰对称性较差。考察样品溶液在室温条件下放置8 h互变异构体的变化情况，检测数据见表1（按面积归一化法计

算异构体含量）。结果表明：在乙腈-水溶液中子囊霉素与异构体之间的转化在4 h内能达到平衡；而在乙腈中互变异构平衡在8 h未达到完全达平衡，但转化趋势已变缓慢，互变异构体的含量明显低于乙腈-水溶液中的含量。

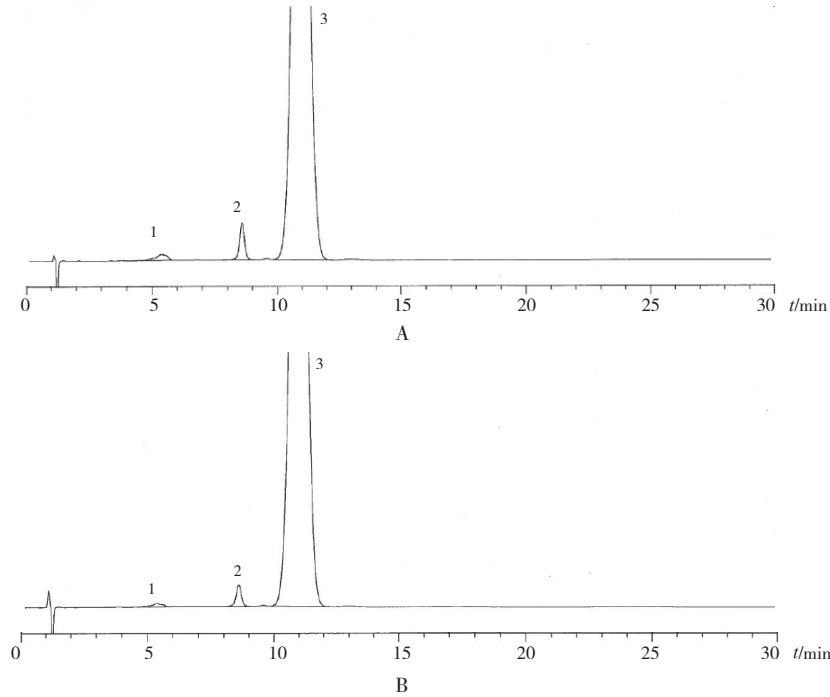


图1 不同溶液中子囊霉素HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatograms of ascomycin in different solutions

注：A. 乙腈-水（70：30）；B. 乙腈；1. 异构体1；2. 异构体2；3. 子囊霉素。

表1 子囊霉素溶液稳定性（%）

Table 1. Results of stability of ascomycin in solutions (%)

时间（h）	乙腈		乙腈-水（70：30）	
	异构体1	异构体2	异构体1	异构体2
0	0.36	1.02	0.63	1.54
1	0.93	2.68	3.38	5.86
2	1.08	3.17	4.32	7.39
3	1.17	3.50	4.55	7.79
4	1.23	3.73	4.59	7.87
5	1.28	3.91	4.60	7.89
6	1.32	4.04	4.59	7.90
7	1.34	4.15	4.58	7.90
8	1.36	4.23	4.56	7.90

样品溶液配制后按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录总离子流色谱图（total ion chromatogram, TIC, 图2）。基于他克莫司在极性溶液中互变异构体的形成机制，推测异构体1质谱峰为[M+Na-H₂O]⁺=814.471 5，异构体2质谱峰为[M+Na]⁺=814.472 8。

2.5 互变异构体的制备

取子囊霉素样品 20 g，用甲醇 210 mL 溶解，

加入 90 mL 水，混匀，滤过，在室温条件下放置 4 h，待异构体转化至平衡，作为制备异构体的样品溶液。按“2.2”项下条件制备，收集异构体 2；当异构体 2 出峰的信号强度大于 10 mAU 时开始收集组分，信号强度低于 20 mAU 时停止收集组分；用预加有一定体积二氯甲烷的三角瓶收集组分（三角瓶外加冰浴冷却），边收集边振摇；进样 1 针的组分收集完毕后，立即加入等体积的饱和氯化

钠溶液, 转入分液漏斗中, 充分振摇, 静置, 分层; 收集下层溶液, 加入适量无水硫酸镁, 充分振摇脱水, 用 0.45 μm 滤膜抽滤, 滤液于 -20°C 条

件下贮藏; 重复进样 10 针, 同上操作; 合并滤液, 减压浓缩至干, 得白色粉末 190 mg, 色谱纯度为 92.40% (面积归一化法), 于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏。

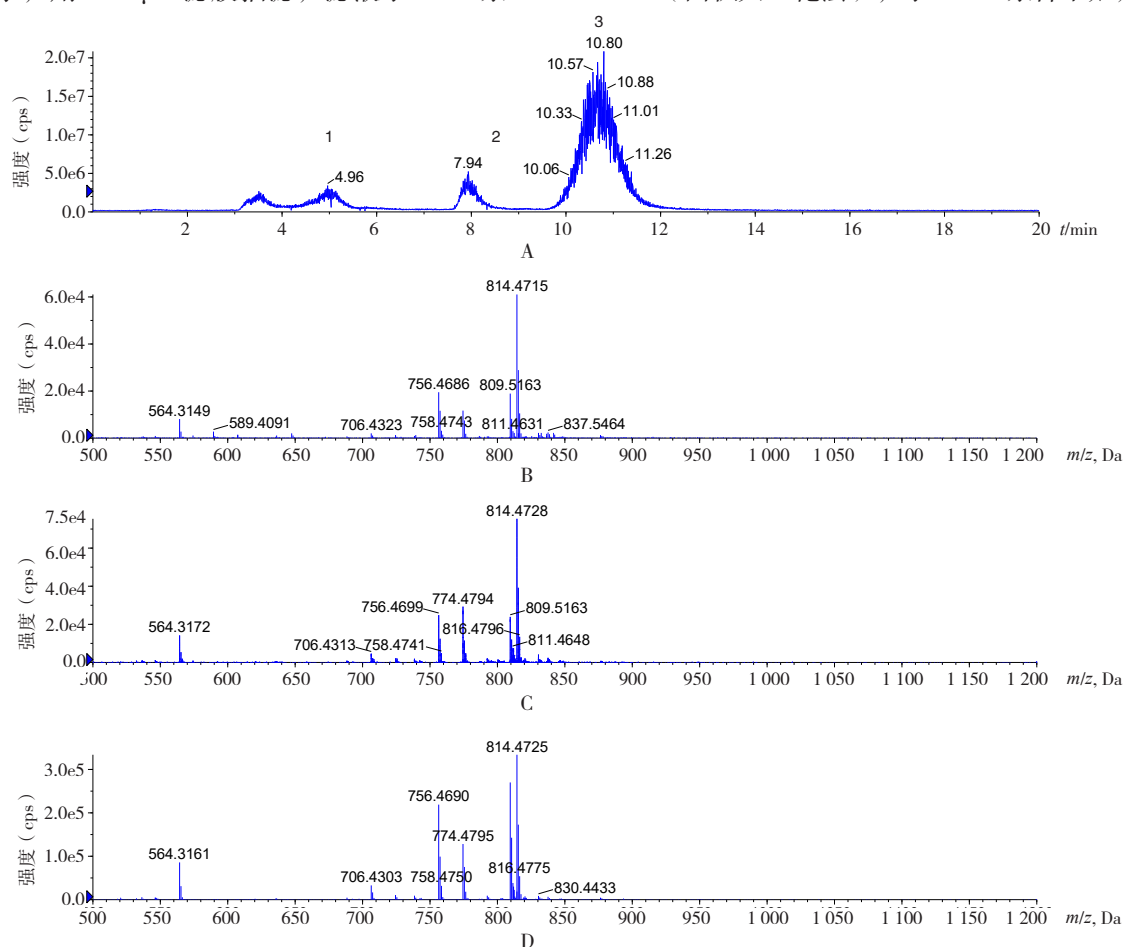


图2 子囊霉素的色谱/质谱图 (乙腈-水)

Figure 2. Chromatography/mass spectrometry of ascomycin (acetonitrile-water)

注: A. TIC 色谱图; B. 1号峰 (异构体1); C. 2号峰 (异构体2); D. 3号峰 (子囊霉素)。

2.6 结构鉴定

对子囊霉素和分离纯化出来的异构体 2 经高分辨质谱 (high-resolution mass spectrometry, HRMS)、二维核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMRS) 分析确证其结构 (图3), 结构鉴定具体内容如下所述。

2.6.1 HRMS分析

子囊霉素异构体 2 和子囊霉素的 HRMS 图谱上均可见 1 个明显的分子离子峰, 分别为 m/z 814.472 4 和 m/z 814.471 8; 样品在软电离环境中, 易产生 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 正离子峰。子囊霉素分子式为 $\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}$, 其钠离子准分子离子峰 $[\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}+\text{Na}]^+$ 理论计算值为 814.471 7。因此子囊霉素异构体 2 和子囊霉素的测定值与理论值均相符, 与子囊霉素化学分子式 ($\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}$) 相符。

2.6.2 NMRS分析

子囊霉素互变异构体 2 为白色固体。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) 谱中, 在高场区显示有 6 个甲基氢信号, 化学位移 (δ) 分别为 1.12 ppm (3H)、0.87 ppm (3H)、1.63 ppm (3H)、0.93 ppm (3H)、1.58 ppm (3H) 和 0.83 ppm (3H); 在低场区显示有 2 个烯氢质子信号, δ 分别为 5.34 ppm (1H) 和 5.00 ppm (1H); 在中场区显示有 3 个甲氧基氢信号, δ 分别为 3.57 ppm (3H)、3.39 ppm (3H) 和 3.39 ppm (3H)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) 谱中, 共显示有 43 个碳信号, 其中包括 2 个酮羰基碳信号 (δ : 210.8、210.8 ppm), 1 个酯羰基碳信号 (δ : 170.1 ppm), 1 个酰胺基碳信号 (δ : 167.0 ppm), 6 个甲基碳信号 (δ : 16.6、19.8、14.2、9.5、12.8、11.7 ppm), 3 个甲氧基碳信号

(δ : 56.6、57.3、56.5 ppm)，4个烯碳信号(δ : 132.5、129.9、131.6、132.5 ppm)。在HMBC图谱中，从 δ 1.12 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 1.12 ppm与 δ 98.6、38.0、38.4 ppm相关，从0.87 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 0.87 ppm与 δ 35.9、47.8、14.2 ppm相关，从1.63 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 1.63 ppm与 δ 47.8、132.5、129.9 ppm相关，从0.93 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 0.93 ppm与 δ 69.6、39.8、81.1 ppm相关，从1.58 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 1.58 ppm与 δ 81.1、131.6 ppm相关，从0.83 ppm (3H)甲基质子信号出发，可见 δ 0.83 ppm与 δ 24.0 ppm相关。对化合物的碳信号和氢信号进行归属(表2)，将子囊霉素异构体2和子囊霉素的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据经详细对比分析发现其核磁信号很相似。子囊霉素异构体2和子囊霉素的 ^{13}C -NMR图谱均给出43个碳信号，其中包括6个甲基、3个甲氧基、12个亚甲基、15个次甲基、2个烯季碳、1个半缩酮碳及4个羰基碳。因此，子囊霉素异构体2的平面结构与子囊霉素的结构一致。子囊霉素异构体2 C-10位上的羟基立体构型发生翻转(相较于子囊霉素 C-10位羟基构型)，导致该碳所在的六元氧杂环椅式构象上的较大基团(C-11位甲基、C-13位甲氧基

由子囊霉素氧杂六元环椅式构象的平伏键变成子囊霉素异构体2氧杂六元环椅式构象的直立键)的空间位置发生变化，排斥力增大使质子周围的电子云密度减少，屏蔽作用下降，C-11、12、13和14位共振信号不同程度向低场位移。由于构象变化，C-9位羰基处于空间位阻较大的位置(与C-11位甲基更接近)，使其周围电子云密度减少，导致C-9位羰基碳信号的化学位移左移。结合文献^[12-13]，确定子囊霉素异构体2为子囊霉素 C-10位上的差向异构体(图3，其中子囊霉素及其差向异构体的碳原子标记顺序与参考文献^[14-15]保持一致，以便于对比数据，确证结构)。

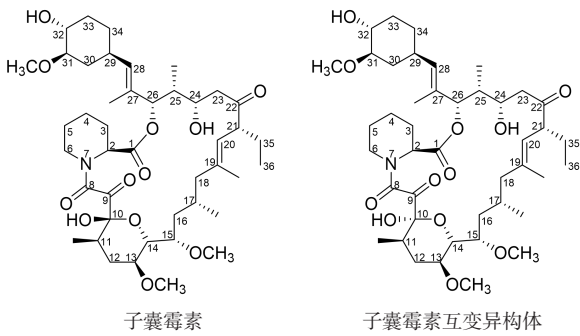


图3 子囊霉素和子囊霉素异构体2的化学结构
Figure 3. The structures of ascomycin and ascomycin tautomer

表2 子囊霉素及互变异构体的核磁数据 (ppm)
Table 2. NMR data for ascomycin and its tautomer (ppm)

序号	子囊霉素		子囊霉素互变异构体		子囊霉素*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	169.0, C	—	170.1, C	—	169.0, C	—
2	56.6, CH	4.59	55.8, CH	4.60	56.6, CH	4.61
3	27.6, CH ₂	2.05, 1.93	27.2, CH ₂	2.07, 1.86	27.6, CH ₂	2.09, 1.99
4	21.1, CH ₂	1.73, 1.38	20.8, CH ₂	1.73, 1.40	21.1, CH ₂	1.78, 1.43
5	24.2, CH ₂	1.73, 1.41	24.2, CH ₂	1.72, 1.40	24.2, CH ₂	1.78, 1.43
6	39.2, CH ₂	4.42, 3.01	39.2, CH ₂	4.43, 3.02	39.2, CH ₂	4.43, 3.02
8	164.7, C	—	167.0, C	—	164.7, C	—
9	196.2, C	—	210.8, C	—	196.1, C	—
10	97.1, C	—	98.6, C	—	97.0, C	—
11	34.6, CH	2.16	38.0, CH	3.27	34.6, CH	2.19
12	32.7, CH ₂	2.13, 1.45	38.4, CH ₂	2.27, 1.26	32.7, CH ₂	2.18, 1.48
13	73.7, CH	3.38	77.7, CH	3.57	73.7, CH	3.40
14	72.9, CH	3.66	73.4, CH	3.28	72.9, CH	3.68
15	75.2, CH	3.56	76.6, CH	3.57	75.2, CH	3.58
16	33.0, CH ₂	1.53, 1.05	35.9, CH ₂	1.53, 1.08	33.0, CH ₂	1.59, 1.06
17	26.3, CH	1.65	25.8, CH	1.64	26.3, CH	1.70
18	48.7, CH ₂	2.17, 1.80	47.8, CH ₂	2.13, 1.95	48.7, CH ₂	2.18, 1.82
19	138.7, C	—	132.5, C	—	138.7, C	—
20	123.1, CH	5.01	129.9, CH	5.34	123.1, CH	5.02
21	54.7, CH	3.19	58.6, CH	3.32	54.7, CH	3.21
22	213.4, C	—	210.8, C	—	213.4, C	—

续表2

序号	子囊霉素		子囊霉素互变异构体		子囊霉素*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
23	43.3, CH ₂	2.74, 2.08	43.7, CH ₂	2.74, 2.08	43.2, CH ₂	2.79, 2.09
24	70.0, CH	3.90	69.6, CH	3.94	70.0, CH	3.92
25	39.8, CH	1.90	39.8, CH	1.95	39.8, CH	1.91
26	77.4, CH	5.32	81.1, CH	5.32	77.3, CH	5.33
27	132.3, C	—	131.6, C	—	132.3, C	—
28	129.8, CH	5.08	132.5, CH	5.00	129.7, CH	5.10
29	34.9, CH	2.27	34.9, CH	2.28	34.9, CH	2.29
30	34.9, CH ₂	2.02, 0.95	34.6, CH ₂	1.99, 0.95	34.9, CH ₂	2.06, 0.97
31	84.2, CH	3.00	84.2, CH	3.00	84.2, CH	3.02
32	73.5, CH	3.38	73.5, CH	3.39	73.5, CH	3.41
33	31.2, CH ₂	1.97, 1.34	30.5, CH ₂	1.99, 1.36	31.2, CH ₂	2.01, 1.37
34	30.6, CH ₂	1.62, 1.05	30.6, CH ₂	1.62, 1.05	30.6, CH ₂	1.63, 1.06
35	24.5, CH ₂	1.75, 1.43	24.0, CH ₂	1.75, 1.43	24.5, CH ₂	1.78, 1.48
36	11.7, CH ₃	0.85	11.7, CH ₃	0.83	11.7, CH ₃	0.87
13-OMe	56.3, CH ₃	3.36	56.6, CH ₃	3.57	56.3, CH ₃	3.39
15-OMe	57.0, CH ₃	3.30	57.3, CH ₃	3.39	57.0, CH ₃	3.31
31-OMe	56.6, CH ₃	3.38	56.5, CH ₃	3.39	56.6, CH ₃	3.36
11-Me	16.2, CH ₃	0.98	16.6, CH ₃	1.12	16.2, CH ₃	1.00
17-Me	20.4, CH ₃	0.93	19.8, CH ₃	0.87	20.4, CH ₃	0.94
19-Me	15.8, CH ₃	1.59	14.2, CH ₃	1.63	15.8, CH ₃	1.60
25-Me	9.5, CH ₃	0.87	9.5, CH ₃	0.93	9.5, CH ₃	0.88
27-Me	14.0, CH ₃	1.63	12.8, CH ₃	1.58	14.1, CH ₃	1.63

注：*子囊霉素结构确证NMR文献^[14-15]数据。

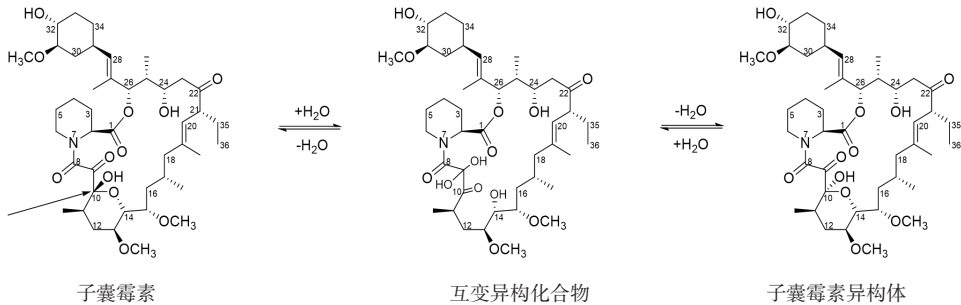


图4 子囊霉素的互变构平衡

Figure 4. Tautomeric equilibrium of ascomycin in solutions

3 讨论

基于文献调研，推测子囊霉素在极性溶剂中可能存在与他克莫司类似的互变异构现象。这一现象对于子囊霉素的结构表征和质量标准制定具有重要意义。为了验证推测，采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用方法，通过分子量确认子囊霉素在极性溶液中存在互变异构现象。互变异构化合物 I 和互变异构化合物 II 的形成机理如图 4 所示。结合文献^[12]，基于他克莫司的互变异构化现象推测，在极性溶剂中，首先在子囊霉素 C-10 位半缩酮位点发生裂解，随后在 C-9 位酮羰基（中

心羰基，更容易水合）处与水分子进行亲核加成，形成互变异构化合物 I。通过逆向反应机制，互变异构化合物 I 经过脱水关环可重新生成子囊霉素或转化为互变异构化合物 II（本文所述子囊霉素异构体 2）。同理，发生从互变异构化合物 II 到互变异构化合物 I 的类似转化，可能进一步形成子囊霉素自身类似的顺式和反式构象异构体，最终达到互变异构平衡状态。

关于异构体制备色谱条件的选择，最初试验设计是采用正相硅胶色谱柱制备，流动相为正己烷-二氯甲烷-乙腈，在硅胶分析柱上对流动相比比例进行筛选，确定流动相比比例为正己烷-二氯

甲烷-乙腈(3:3:3), 子囊霉素主峰与异构体峰能有效分离, 但异构体色谱峰展宽比较严重; 在正相硅胶制备柱上试验, 发现异构体峰展宽特别厉害, 导致分离效率下降, 制备效果不理想。基于开发子囊霉素有关物质 HPLC 检测方法的流动相体系, 采用乙腈-水流动相体系制备异构体, 分别试验了乙腈-水(60:40)、乙腈-水(55:45)、乙腈-水(52:48), 选择乙腈-水(52:48)为异构体制备的流动相条件。在试验中尝试利用反相高压制备色谱法分离纯化异构体 I (开环产物), 由于其在溶液中向子囊霉素和差向异构体转化速度较快, 暂时无法获得纯度大于 90.0% 的样品用于结构确证。

在开发子囊霉素的有关物质 HPLC 检测方法时, 考察了下述 5 种流动相体系: ①乙腈-水(60:40); ②乙腈-0.1% 磷酸水溶液(60:40); ③乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钠(60:40); ④流动相: 乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钠(磷酸调节 pH 至 2.5)(60:40); ⑤流动相 A: 6 mmol/L 磷酸水溶液-[乙腈-甲基叔丁基醚(81:19)](4:1), 流动相 B: 6 mmol/L 磷酸水溶液-[乙腈-甲基叔丁基醚(81:19)](1:4)。经过反复比较, 采用流动相⑤梯度洗脱可使子囊霉素、各异构体及杂质均能有效分离, 尤其是异构体 II 峰与子囊霉素峰对称性较好, 柱效明显提高; 在该流动相体系下异构体 I (开环产物) 能控制在较低的水平(小于 0.1%); 子囊霉素与较难分离的结构类似物他克莫司的分离度大于 4, 色谱条件的选择如下: ①检测波长为 220 nm, 使用磷酸作调节剂可以降低基线噪音提高方法的灵敏度; ②尽量减少未知杂质峰的形成以及使开环产物和差向异构体的形成达到最小化, 选择纯乙腈为溶剂; 在试验过程中发现不同品牌色谱级乙腈的水分含量不同, 需要选择水分含量极低(水分含量 $\leq 0.003\%$)的色谱纯乙腈来配制样品溶液; ③为了控制互变异构体的形成, 供试品溶液的温度需要控制在 8℃; ④有关物质检测时样品溶液的配制需要临用新制。使用拟订的有关物质方法检测子囊霉素成品, 结果表明: 成品中的开环产物均小于 0.10%、差向异构体均小于 1.0% (按峰面积归一化法计); 该有关物质方法能有效监控子囊霉素各异构体在溶液状态下的含量, 有助于实现对样品的准确分析。若异构体的含量明显

升高, 说明样品本身及其生产过程控制、内在质量稳定性有所偏离或变化。因含量测定方法中样品溶液进样针数较多, 运行时间较长, 样品溶液在放置过程中存在互变异构的转化, 故在含量测定项下将开环产物和差向异构体的峰面积计入主成分计算含量。

本研究为子囊霉素的有关物质和含量测定方法的建立奠定了基础, 未来研究方向补充子囊霉素及其异构体的生物活性数据, 明确其药理作用和毒性特征, 为新药开发和质量控制提供科学依据。

参考文献

- 1 Dome PA, Jeong P, Nam G, et al. Structure-guided design and synthesis of C22- and C32- modified FK520 analogs with enhanced activity against human pathogenic fungi[J]. *bioRxiv*, 2025, 122(1): e2419883121. DOI: [10.1101/2024.09.27.615491](https://doi.org/10.1101/2024.09.27.615491).
- 2 Rivera A, Lim WY, Park E, et al. Enhanced fungal specificity and in vivo therapeutic efficacy of a C-22-modified FK520 analog against *C. neoformans*[J]. *mBio*, 2023, 14(5): e0181023. DOI: [10.1128/mbio.01810-23](https://doi.org/10.1128/mbio.01810-23).
- 3 Hoy MJ, Park E, Lee H, et al. Structure-guided synthesis of FK506 and FK520 analogs with increased selectivity exhibit in vivo therapeutic efficacy against *Cryptococcus*[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0104922. DOI: [10.1128/mbio.01049-22](https://doi.org/10.1128/mbio.01049-22).
- 4 Zhou L, Zhou J, Chen TL, et al. Identification of ascomycin against zika virus infection through screening of natural product library[J]. *Antiviral Res*, 2021, 196: 105210. DOI: [10.1016/j.antiviral.2021.105210](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105210).
- 5 Paul C, Ho VC. Ascomycins in dermatology[J]. *Semin Cutan Med Surg*, 1998, 17(4): 256-259. DOI: [10.1016/s1085-5629\(98\)80021-7](https://doi.org/10.1016/s1085-5629(98)80021-7).
- 6 Mollison KW, Fey TA, Gauvin DM, et al. Discovery of ascomycin analogs with potent topical but weak systemic activity for treatment of inflammatory skin diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 1998, 4(5): 367-379. DOI: [10.1002/chin.199901272](https://doi.org/10.1002/chin.199901272).
- 7 Armstrong HM, Wong F, Holmes MA, et al. Potent immunosuppressive C32-O-arylethyl ether derivatives of ascomycin with reduced toxicity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9(14): 2089-2094. DOI: [10.016/s0960-894x\(99\)00336-4](https://doi.org/10.016/s0960-894x(99)00336-4).
- 8 Masuo M, Tadashi A. Identity of immunosuppressant FR-900520 with ascomycin[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1992, 45(1): 126-128. DOI: [10.7164/antibiotics.45.126](https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.126).
- 9 Hiroshi H, Tohru K, Susumu M, et al. FR-900520 and FR-900523, Novel immunosuppressants isolated from a streptomyces II. fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1988, 41(11): 1592-1601. DOI: [10.7164/antibiotics.41.1592](https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.1592).
- 10 Arai T, Kouama Y, Suenaga T, et al. Ascomycin, an antifungal

- antibiotic[J]. J Antibiot (Tokyo), 1962, 15(6): 231–232. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14040785/>.
- 11 Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuno G. Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants[J]. CNS Neurosci Ther, 2008, 14(1): 36–46. DOI: [10.1111/j.1527-3458.2008.00036.x](https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2008.00036.x).
- 12 Namiki Y, Kihara N, Koda S, et al. Tautomeric phenomenon of a novel potent immunosuppressant (FK506) in solution[J]. J Antibiot (Tokyo), 1993, 46(7): 1149–1155. DOI: [10.7164/antibiotics.46.1149](https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1149).
- 13 USP-NF2024[S]. 2024: e1–3.
- 14 Carney JR, Ashley GW, Arslanian RL, et al. Structure elucidation of new ascomycins produced by genetic engineering[J]. J Antibiot (Tokyo), 2005, 58(11): 715–721. DOI: [10.1038/ja.2005.97](https://doi.org/10.1038/ja.2005.97).
- 15 Or YS, Clark RF, Xie Q, et al. The chemistry of ascomycin: structure determination and synthesis of pyrazole analogues[J]. Tetrahedron, 1993, 49(39): 8771–8786. DOI: [10.1016/S0040-4020\(01\)81899-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81899-8).

收稿日期: 2025 年 01 月 05 日 修回日期: 2025 年 04 月 23 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳