

• 实验研究 •

帕拉米韦及其中间体酯化物结构的 X 射线衍射分析

吕丽娟¹, 张村子¹, 兰 静², 陈 滔^{1*}, 范喜园¹

1. 天津泰普药品科技发展有限公司, 天津 300193

2. 天津市药品审评中心, 天津 300191

摘要: 目的 验证所合成的化合物为目标产物——帕拉米韦中间体酯化物及帕拉米韦成品, 并通过 X 射线衍射技术探讨化合物晶型。方法 选择适宜的条件, 培养出适合单晶 X 射线衍射分析的单晶体, 对所得单晶数据进行结构解析, 得到化合物的三维空间结构信息, 与文献进行比对; 同时通过单晶结构数据模拟获得化合物的粉末 X 射线衍射理论图谱, 用于晶型研究。结果 单晶 X 射线衍射结构分析结果表明, 帕拉米韦中间体酯化物及成品的化学结构、构型与文献报道完全一致; 粉末 X 射线衍射理论图谱可作为晶型对照图谱使用, 并进一步表明中间体存在多晶型现象。结论 单晶 X 射线衍射分析法可准确测定含多手性中心的帕拉米韦中间体酯化物及成品的空间结构, 充分证实了该药物合成过程与结果的正确性; 粉末 X 射线衍射理论图谱可为化合物晶型研究提供有力支持。

关键词: 帕拉米韦; 中间体; X 射线衍射; 结构; 晶型

中图分类号: R917; R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)04-0347-04

X-ray diffraction analysis of peramivir and its esterized intermediate

LV Li-juan¹, ZHANG Cun-zi¹, LAN Jing², CHEN Tao¹, FAN Xi-yuan¹

1. Tianjin Taipu Pharmaceutical Science & Technology Development Co., Ltd., Tianjin 300193, China

2. Tianjin Center for Drugs Evaluation, Tianjin 300191, China

Abstract: **Objective** To validate the synthesized compounds to be the target products—peramivir esterized intermediate and peramivir and discuss the polymorphs of compounds by X-ray diffraction technique. **Methods** Suitable conditions were selected to cultivate single crystal for the single crystal X-ray diffraction (SXRD), the crystal structure data were analyzed and then three-dimensional structure information of these compounds were obtained and compared with the literature. Meanwhile, the crystal structure data were simulated to obtain powder X-ray diffraction (PXRD) theoretical graphs of compounds for the study of polymorphs. **Results** SXRD results showed that the chemical structures and configurations of peramivir intermediate and product were completely consistent with those in the literature; PXRD theoretical graphs could be used as standard graphs of polymorphs and proved that polymorphism existed in the intermediate. **Conclusion** SXRD could be used to determine the space structure of peramivir intermediate and product with multiple chiral centers accurately and fully confirm the correctness of the drug synthesis and results; PXRD theoretical graphs could be used to provide a strong support for the study of polymorphs.

Key words: peramivir; intermediate; X-ray diffraction; structure; polymorphs

帕拉米韦 (RWJ-270201), 化学名为(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*)-3-[(1*S*)-1-(乙酰氨基)-2-乙基丁基]-4-胍基-2-羟基-环戊烷基羧酸三水合物, 由 BioCryst 公司开发的以流感病毒表面糖蛋白神经氨酸酶为作用靶点的新型环戊烷类抗流感病毒制剂, 通过抑制流感神经氨

酸酶间相互作用, 阻止子代的病毒颗粒在宿主细胞的释放和增殖而达到防治 A、B 型流感的作用。2009 年 10 月 23 日, FDA 根据美国疾病控制和预防中心的要求, 针对抗病毒药帕拉米韦发布了一项紧急使用授权, 批准该药可静脉注射用于部分已证实或疑

收稿日期: 2012-06-01

作者简介: 吕丽娟 (1982—), 女, 内蒙古呼伦贝尔市人, 博士, 助理研究员, 主要从事药物分析及药物晶型研究。

Tel: 13821536691 E-mail: lvlijuan1982@yahoo.com.cn

*通讯作者 陈 滔 E-mail: chent@tjipr.com

似 H_1N_1 型流感感染的住院成人和儿童患者，2010 年 1 月由日本盐野义公司在日本上市^[1-2]。帕拉米韦中间体酯化物化学名为 (3a*R*,4*R*,6*S*,6a*S*)-(+)-4-[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-(1'-乙基丙基)-3a,5,6,6a-四氢-4*H*-环戊烷并[d]异噻唑-6-羧酸甲酯，为帕拉米韦合成工艺中的关键中间体之一^[1]。多手性中心药物的结构确证是药品研发质量研究中的一个难点问题。本实验采用单晶 X 射线衍射法和粉末 X 射线衍射法相结合，对含多手性中心的帕拉米韦中间体酯化物及成品进行了结构确证，并对帕拉米韦药品研发过程中的晶型问题进行了初步探讨。

1 仪器与试剂

Rigaku Saturn 944 CCD、Rigaku Saturn 724 CCD 面探测器。帕拉米韦中间体酯化物及成品样品均由本公司自制；所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 单晶体的培养

根据帕拉米韦中间体酯化物的理化性质，参考溶解度试验结果，分别选取甲醇、乙醇、丙酮、 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF)、水作为单晶培养用溶剂。考察了不同溶剂、温度、浓度对实验结果的影响，经多次考察发现甲醇-水 (6:1) 可得到适于衍射实验的单晶体。故最佳单晶培养方法为：取帕拉米韦中间体酯化物约 10 mg，置于洁净玻璃试管中，用适量甲醇-水 (6:1) 溶解，使溶液接近饱和状态为宜，置于 4 °C 恒温条件下放置 7 d，即获得无色透明棱柱状晶体。

同法确定了帕拉米韦成品的最佳单晶培养方法为：取帕拉米韦成品约 10 mg，置于洁净玻璃试管中，用适量甲醇-水 (1:1) 溶解，使溶液接近饱和状态为宜，置于 25 °C 恒温条件下放置 10 d，即获得无色透明棱柱状晶体。

2.2 中间体酯化物空间结构分析

仪器条件：CuK α 辐射，人工多层膜聚焦镜，准直管 0.30 mm，管压 45 kV，管流 0.88 mA。衍射分析所用晶体大小为 0.16 mm×0.14 mm×0.12 mm。总衍射点为 19 434 个，独立衍射点为 3 296 个，可观察点为 3 052 个。

用直接法 (shelxs-97) 解析晶体结构，确定其属于单斜晶系，空间群为 $P2_1$ ，晶胞参数： $a=0.550\ 30\ (10)\ \text{nm}$ ， $b=1.661\ 7\ (3)\ \text{nm}$ ， $c=1.079\ 7\ (2)\ \text{nm}$ ， $\alpha=90.00^\circ$ ， $\beta=91.326\ (8)^\circ$ ， $\gamma=90.00^\circ$ ，晶胞体积 $V=0.987\ 0\ (3)\ \text{nm}^3$ ，晶胞内分子数 $Z=2$ 。不对称单位化学计量式为 $C_{18}H_{30}N_2O_5$ ，相对分子质量为 354.44。根据 Cahn-Ingold-Prelog 体系 R,S 标记法，所得合成帕拉米韦中间体酯化物的绝对构型是 3a*R*,4*R*,6*S*,6a*S* 型，其化学名为 (3a*R*,4*R*,6*S*,6a*S*)-(+)-4-[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-(1'-乙基丙基)-3a,5,6,6a-四氢-4*H*-环戊烷并[d]异噻唑-6-羧酸甲酯。单晶结构分析结果表明：晶态下分子内无氢键联系；分子间存在氢键联系为： $N_2\cdots O_4$ ：0.327 1 (2) nm。晶态下分子以氢键作用力和范德华力维系其在空间的稳定排列。

分子绝对构型、分子立体结构椭球图和分子晶胞堆积图见图 1。

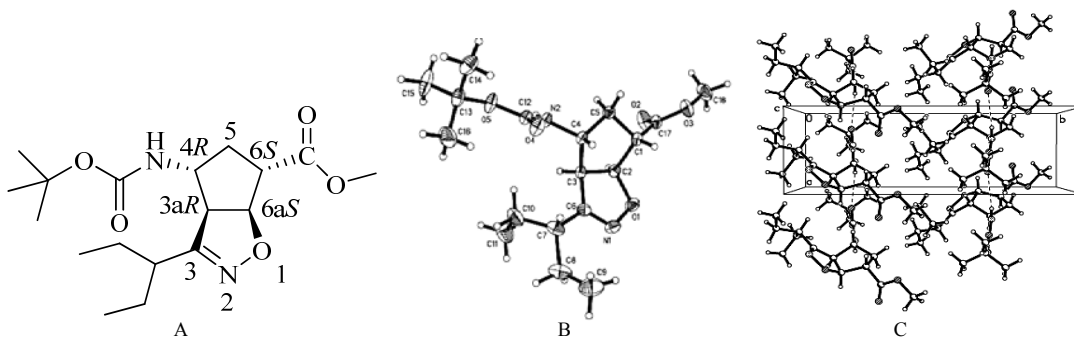


图 1 帕拉米韦中间体酯化物的分子绝对构型 (A)、分子立体结构椭球图 (B) 和分子晶胞堆积图 (C)

Fig. 1 Molecular absolute configuration (A), molecular three-dimensional ellipsoid diagram (B), and molecular lattice packing diagram (C) of peramivir esterized intermediate

对帕拉米韦中间体酯化物单晶结构数据进行模拟计算，得到相应的粉末 X 射线衍射理论图谱。另将文献报道^[3]的帕拉米韦中间体酯化物的单晶数据进行

模拟计算，得到粉末 X 射线衍射理论图谱。见图 2。

2.3 成品空间结构分析

仪器条件：MoK α 辐射，人工多层膜聚焦镜，

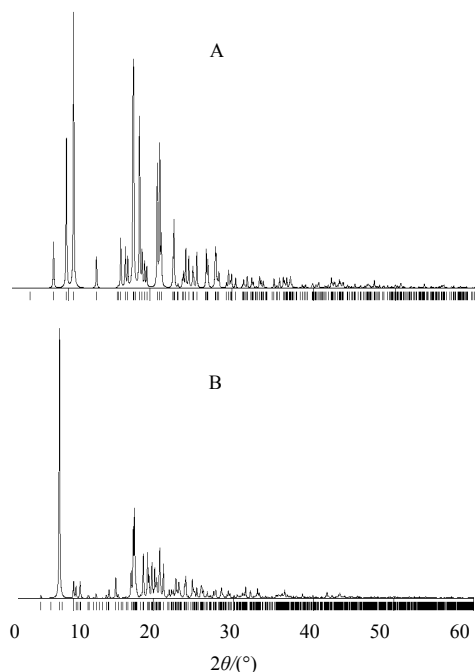


图 2 帕拉米韦中间体酯化物自制品 (A) 和文献数据 (B) 的粉末 X 射线衍射理论图谱

Fig. 2 PXRD theoretical graphs simulated homemade sample (A) and literature data (B) of peramivir esterized intermediate

准直管 0.30 mm, 管压 50 kV, 管流 24 mA。衍射分析所用晶体大小为 0.36 mm×0.34 mm×0.30 mm。总衍射点为 160 053 个, 独立衍射点为 10 004 个, 可观察点为 10 000 个。

用直接法 (shelxs-97) 解析晶体结构, 最终确

定其属于四方晶系, 空间群为 $P4_22_12$, 晶胞参数: $a=2.696\ 7\ (4)\ \text{nm}$, $b=2.696\ 7\ (4)\ \text{nm}$, $c=2.293\ 7\ (5)\ \text{nm}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, 晶胞体积 $V=16.681\ (5)\ \text{nm}^3$, 晶胞内分子数 $Z=32$, 单位晶格的独立区域中有 4 个分子。不对称单位化学计量式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 0.25\text{CH}_3\text{OH} \cdot 2.94\text{H}_2\text{O}$, 其中帕拉米韦 $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$ 的计算相对分子质量为 328.4。由于化合物在合成过程中所有手性原料在反应中手性原子绝对构型不会发生变化, 最终分子在合成过程中引入的手性原子可由原料分子中手性原子的绝对构型确定, 即 1' 原子的绝对构型由其他手性原子确定。由于帕拉米韦中间体酯化物中 1、2 位手性中心构型皆为 *S* 型, 3、4 位手性中心构型皆为 *R* 型, 根据 Cahn-Ingold-Prelog 体系 *R,S* 标记法和分子结构图可知, 连接在 1' 位手性碳原子的 4 个基团从大到小排列顺序为: 乙酰氨基 > 2-羟基-4-胍基环戊烷基 > 2-乙基丁基 > 氢。若把氢原子远离观察点, 这时, 除氢原子外的 3 个基团从大到小的排列顺序是逆时针排列的, 即为 *S* 型。因此可得本品绝对构型是 1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*, 1'*S* 型, 其化学名为: (1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*) -3-[(1*S*)-1-(乙酰氨基)-2-乙基丁基]-4-胍基-2-羟基-环戊烷基羧酸。单晶结构分析结果表明: 晶体中有两个分子无序, 溶剂分子也无序。分子中羧酸上的氢转移到胍的氮上形成内盐, 晶态下分子以静电作用、氢键作用及范德华力维系其在空间的稳定排列。分子绝对构型、分子立体结构椭球图和分子晶胞堆积图见图 3。

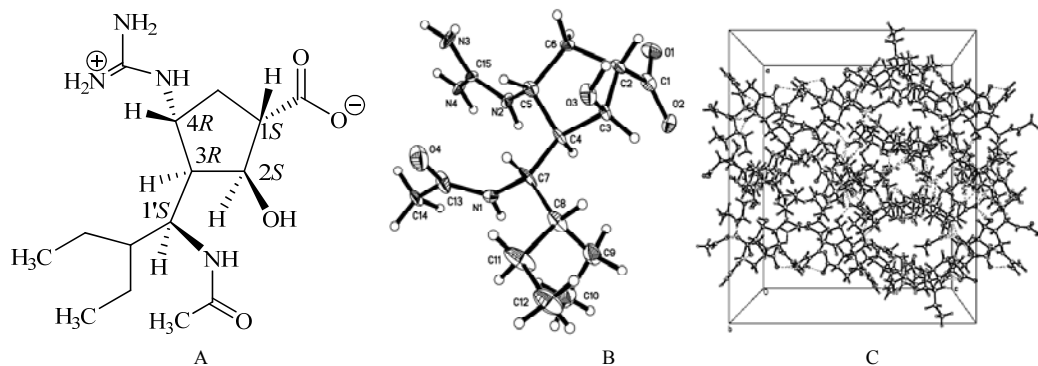


图 3 帕拉米韦的分子绝对构型 (A)、分子立体结构椭球图 (B) 和分子晶胞堆积图 (C)

Fig. 3 Molecular absolute configuration (A), molecular three-dimensional ellipsoid diagram (B), and molecular lattice packing diagram (C) of peramivir

本研所得帕拉米韦单晶为含有甲醇的溶剂化物, 通过对该单晶结构数据进行模拟计算, 得到其

相应的粉末 X 射线衍射理论图谱。另将文献报道^[4]的帕拉米韦三水合物的单晶数据进行了模拟计算,

得到粉末 X 射线衍射理论图谱。见图 4。

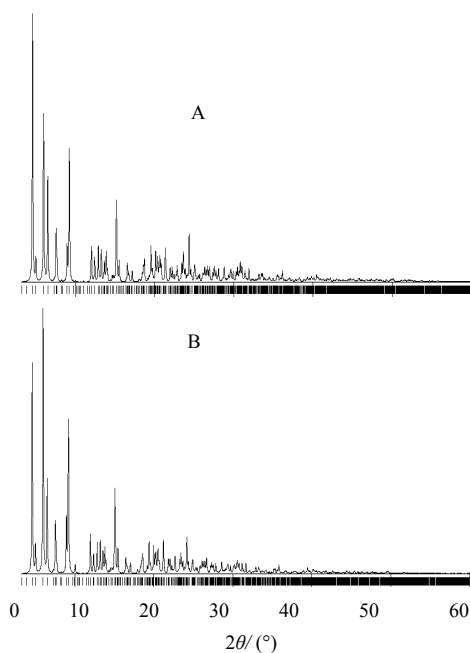


图 4 帕拉米韦自制品 (A) 和文献数据 (B) 的粉末 X 射线衍射理论图谱

Fig. 4 PXRD theoretical graphs simulated from homemade sample (A) and literature data (B) of peramivir

3 讨论

由于帕拉米韦合成路线较长, 采用适宜的方法尽早判断出中间体的构型对后续工艺的进行十分有利; 由于帕拉米韦手性中心较多, 在采用四谱分析构型时未能获得有效结果。本研究表明, 在四谱对化合物空间结构的确证无能为力之时, 单晶 X 射线衍射法在结构确证中表现出独特优势。

一颗好的单晶体是单晶 X 射线衍射法得以应用的基本前提。单晶体培养过程中应注意溶液的过饱和度、溶剂的溶解性和挥发性、析晶的速度和温度等, 应避免析晶过快, 同时析晶过程中还应避免强烈震动^[5]。

通过对化合物单晶结构数据进行模拟计算, 得到其相应的粉末 X 射线衍射理论图谱, 将实验图谱与理论图谱进行对照, 可用于定性鉴别或定量分析化合物晶型, 充分体现了粉末 X 射线衍射分析在实

际应用中的意义所在^[6]。

通过对帕拉米韦中间体酯化物单晶结构数据进行模拟计算, 获得了该化合物的一种新晶型 (单斜晶系, $P2_1$ 空间群) 的晶型对照图谱, 与文献报道的已有晶型 (三斜晶系, $P-1$ 空间群) 完全不同, 再一次证实了固体化学药物存在多晶型现象的普遍性。

通过对文献报道的帕拉米韦三水合物单晶结构数据进行模拟计算, 获得了该化合物的该种晶型对照图谱, 将本研究中所获得的含甲醇溶剂化物的晶型对照图谱与其进行比对, 结果显示两者 $2\theta=10^\circ$ 处出现细微差别, 同时提示应结合其他分析方法对终产品中残留的有机溶剂进行限度控制。

致谢: 感谢南开大学元素有机化学国家重点实验室宋海斌、王洪根在单晶数据收集及解析中给予的帮助。

参考文献

- [1] Chand P, Kotian P L, Dehghani A, *et al.* Systematic structure-base design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent antiinfluenza activity [J]. *J Med Chem*, 2001, 44(25): 4379-4392.
- [2] 赵丽嘉, 王利华, 胡雅萍, 等. A/B 型流感病毒治疗药物——帕拉米韦水合物 (Peramivir hydrate) [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(5): 400-406.
- [3] Mineno T, Miller M J. Stereoselective total synthesis of racemic BCX-1812 (RWJ-270201) for the development of neuraminidase inhibitors as anti-influenza agents. [EB/OL]. [2003-06-10]. http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/jo034316b/suppl_file/jo034316bsi20030610_122637.pdf.
- [4] Keller E, Krämer V. Crystal structure of the trihydrate of the neuraminidase inhibitor $C_{15}H_{28}N_4O_4$ (Peramivir), a potential influenza A/B and avian-influenza (H5N1) drug [J]. *Z Naturforsch B*, 2007, 62b: 983-987.
- [5] 陈小明, 蔡继文. 单晶结构分析原理与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 44-47.
- [6] 吕丽娟, 赵 健, 陈 华, 等. 托伐普坦的结构确证和晶型探讨 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(3): 192-195.