康布瑞汀磷酸酯二钠盐合成工艺的优化

肖繁花 吴范宏*

(上海应用技术学院化学与环境工程学院 上海 201418)

摘要 对康布瑞汀磷酸酯二钠盐的合成工艺进行优化. 确定了以 3,4,5-三甲氧基苯甲醛为原料, 经还原、溴代、成磷盐合成中间体 3, 4, 5-三甲氧基苄溴三苯基磷盐; 磷盐与 3-三苯甲氧基-4-甲氧基苯甲醛经 Wittig 反应、脱三苯甲基保护基、与亚磷酸二苄酯成酯、脱苄基成钠盐得到康布瑞汀磷酸酯二钠盐的方法. 所得康布瑞汀磷酸酯二钠盐(**1**), HPLC 纯度达 99.5%. 总收率为 43.0%. 经优化后的工艺原料价廉易得, 操作简便, 成本低廉, 适合于工业化生产.

关键词 康布瑞汀磷酸酯二钠; 抗癌药; 合成

Process Optimization for the Synthesis of Disodium Combretastatin A-4 Phosphate

Xiao, Fanhua Wu, Fanhong*

(School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418)

Abstract The method for the synthesis of disodium combretastatin A-4 phosphate was studied. The target product was prepared from 3,4,5-trimethoxyl benzaldehyde as the starting material, through 7-step reactions including reduction, bromation, phosphonium salt formation, Wittig reaction, detritylation reaction, dibenzylphosphorylation reaction, deprotection and disodium salt formation. Disodium combretastatin A-4 phosphate (**1**) was prepared with HPLC purity of 99.8% and the total yield of 43.0%. The optimized synthetic process has the advantages of available starting material, simplicity and cheapness, which was more suitable for industrialized production.

Keywords disodium combretastatin A-4 phosphate; anti-cancer drug; synthesis

康布瑞汀磷酸酯二钠盐(combretastatin A4 phosphate, 简称 CA4P, **1**)是抗肿瘤药 CA4 的一种前药^[1-3]. 由美国 OXIGENE 公司开发的新型抗肿瘤前体药物, 其原药为 CA4 (Combretastatin A4), 系从非洲灌木 Combretum Caffrum 的树皮中分离得到的一种多羟基二苯乙烯类天然产物. CA4 是微管蛋白结合剂(目前最为有限的一类抗癌药物), 能干扰肿瘤血管内皮细胞的有丝分裂过程, 具有很强的抗血管效应、抑制癌细胞增长、抑制微管蛋白聚集及放疗增敏作用, CA4 还因其前体设计而具有适合临床应用的良好药代动力学性质并对瘤体呈现靶向性, CA4 对所有癌症模型均显示体内活性, 被誉为血管靶向剂(Vascular targeting agent, VTA)中的佼佼者, 是全球范围内第一个进入临床研究的 VTA^[4]. 目前 CA4 正在美国和欧洲进行 III 期临床试验, 且已获准进入美国食品及药品管理局(FDA)快速通道审批. 由于 CA4 的水溶性很差, 不易被人体吸收, 而且

毒副作用大, 使它的应用受到很大的限制. 在对其结构修饰研究中发现, CA4 的磷酸二钠盐 CA4P 是一种水溶性前药分子, 使它更易于体内给药^[5,6].

据文献和专利报道 CA4P 的合成主要分为 CA4 的合成和由 CA4 合成 CA4P 两部分. CA4 的合成关键一步形成二苯乙烯结构的双键, 主要有 Perkin 反应、Wittig 反应、Suzuki 反应等方法^[7-9]. 通过对各种方法比较, 本文选择了适合于工业化的 Wittig 反应方法. 以 3,4,5-三甲氧基苯甲醛为原料, 经还原、溴代、成磷盐合成中间体 3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基磷盐(**7**); 磷盐与 3-三苯甲氧基-4-甲氧基苯甲醛(**2**)经 Wittig 反应、脱三苯甲基保护基得到 CA4 (**9**). 由 CA4 磷酸化合成 CA4P 所用的试剂有亚磷酸二苄酯、双-(2,2,2-三氯乙基)磷酰氯苄、烷基胺磷化物等^[10-12]. 本文采用自制的亚磷酸二苄酯作为磷酸化试剂. 通过对工艺进行改进和优化, 确定了一条适合于工业化生产的合成 CA4P 的路线. 总收率达到

* E-mail: wfh@sit.edu.cn

Received January 16, 2013; revised February 21, 2013; published online March 7, 2013.

43.0%. 合成路线如 Scheme 1 所示.

1 结果与讨论

最后一步磷酸化反应所用试剂亚磷酸二苄酯(DBP)国内没有生产和出售, 进口试剂非常昂贵. 在亚磷酸二苄酯的制备中, 采用了价廉易得的原料; 提纯使用快速过柱的方法得到了含量 85% 的 DBP, 在磷酸化反应中与进口的 DBP 比较, 得到完全一致的效果. 大幅度减低了最后一步的原料成本.

在异香草醛的羟基保护反应中, 文献[4, 8]采用与价格昂贵的叔丁基二甲氯硅烷反应生成硅醚的方法, 不仅成本高, 而且反应条件苛刻, 不利于工业化生产. 我们参考文献[13], 使用三苯甲基氯为保护试剂, 使用价廉易得的原料和溶剂和常规操作, 得到中等产率和纯度较高的异香草醛保护体 **3**.

在中间体 **5** 的合成中, 采用价廉的硼氢化钾代替价高的硼氢化钠, 硼氢化钾与 3,4,5-三甲氧基苯甲醛的摩尔比由文献的 0.44 : 1 下降到 0.30 : 1, 采用先浓缩、再加水和二氯甲烷萃取的后处理方法, 还原反应的收率接近 100%. 在磷盐 **7** 的合成中, 粗品精制文献[13]采用甲苯、丙酮分别洗涤 2 次的方法, 但文献没有提供磷盐的纯度数据. 我们按照文献[13]操作, 发现得到的磷盐中夹杂了较多的杂质, 纯度为 87.5%. 为此我们采用了将粗品用乙醇重结晶的方法, 使磷盐的纯度达到 98% 以

上.

化合物 **8** 的制备 Wittig 反应是整个工艺中的关键一步. 反应中形成的双键有顺反异构体, 研究发现反应物的物质的量比、反应温度等对反应产物中顺反异构体的比例有很大的影响. 通过实验确定了反应物物质的量比为: 磷盐 **7** : 异香草醛保护体 **3** : 正丁基锂 = 1 : 1 : 1.2; 反应温度为 $-20 \sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$; 得到的化合物 **8** 的顺反异构体的比例为 6.1 ~ 7.2 : 1.

化合物 **9** 的合成是在强酸性条件下醚键的脱保护水解反应. 文献[13]报道在甲苯中与浓盐酸反应, 粗品经甲苯三次淋洗, 收率为 45 ~ 65%, 也没有化合物 **9** 的纯度数据. 按照文献操作, 我们发现, 不仅 **9** 的收率很低 (44%), 而且 HPLC 含量只有 75% 左右, 同时我们在水层发现还有很多产品, 但纯度很低 (HPLC 含量 50%). 我们将反应溶剂由甲苯改为乙醇, 不仅简化了后处理步骤, 而且大大提高了产品的纯度和反应的收率.

在 CA4 与亚磷酸二苄酯的磷酸化反应中, 考察了亚磷酸二苄酯与化合物 **9** 的投料比对反应的影响. 文献中亚磷酸二苄酯与化合物 **9** 的物质的量比为 1.42 : 1, 过量的亚磷酸二苄酯不仅造成了很大的浪费, 而且没有反应的亚磷酸二苄酯会夹杂在产品中, 不易去除, 导致化合物 **10** 的精制难度增加和反应收率的降低. 实验表明亚磷酸二苄酯与化合物 **9** 的最佳物质的量比为 1.1 : 1. 得到粗品中除了少量未反应的原料外, 通常含有 5%

Scheme 1

左右的反式异构体, 一般需要过柱的方法^[1]将其去除. 本文采用了乙醇-石油醚混合溶剂重结晶的方法, 非常方便地将化合物 **9** 的纯度提高到 98% 以上.

最后一步脱苄基成钠盐反应中, 反应温度对反应的收率和产品的质量有非常大的影响. 反应温度过高, 反式异构体的含量明显增加. 反应温度过低, 不利于工业化生产. 为此确定反应的最佳温度为 $-5\sim 0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 结论

以 3,4,5-三甲氧基苯甲醛为原料, 经还原、溴代、成磷盐、Wittig 反应、脱三苯甲基保护基、与亚磷酸二苄酯成酯、脱苄基成钠盐等步骤, 合成制得康布瑞汀磷酸酯二钠盐. 所得康布瑞汀磷酸酯二钠盐(**1**), HPLC 纯度达 99.5%. 总收率为 43.0%. 经优化后的康布瑞汀磷酸酯二钠盐的合成工艺, 原料价廉易得、工艺操作简便, 原料成本大幅度下降. 该工艺已实现了中试规模的工业化生产.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Brucker AM500 (500 MHz)核磁共振仪, TMS 为内标; GC 测定含量, 仪器为岛津 SH IMADZU. HPLC 测定含量, 仪器为岛津 SH IMADZU(进样泵: LC - 10AT, 检测器: SPD210A).

异香草醛、三苯甲基氯、3,4,5-三甲氧基苯甲醛、三溴化磷、三氯化磷、硼氢化钾、三苯基膦、正丁基锂、二异丙基乙基胺、三甲基溴硅烷、4-二甲基氨基吡啶、甲醇钠溶液, 以上原料均为国产市售工业品. 苄醇、二甲苯胺、三乙胺、乙酸乙酯、正庚烷、石油醚、二氯甲烷、无水乙醇、四氢呋喃、乙腈、浓盐酸、氢氧化钠、碳酸氢钠、无水硫酸镁、硅胶、磷酸二氢钾、四氯化碳、甲醇、丙酮, 以上试剂均为国产分析纯或化学纯. 反应所用的溶剂均经过无水处理.

3.2 实验方法

3.2.1 亚磷酸二苄酯(DBP)的合成

在 5000 mL 的三口瓶中, 加入干燥过的甲苯 2500 mL、三氯化磷(343.4 g, 2.5 mol), 氮气保护下搅拌降温到 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. 滴加苄醇(541 g, 5.0 mol)、二甲苯胺(655 g, 5.4 mol)和甲苯 600 mL 的混合液, 滴完继续反应半小时. 继续滴加苄醇(270 g, 2.5 mol), 滴加完搅拌过夜. 加入 1000 mL 水, 分液, 甲苯层依次用水 1000 mL, 11%氨水 1000 mL, 水 1000 mL 洗涤. 有机相经干燥、过滤和浓缩得到油状液体粗品 700 g(文献值^[15]640 g). 粗品用硅胶柱快速过柱, 得到 DBP 产品 500 g, GC 含量 85%. 折纯

收率 65%.

3.2.2 3-三苯甲氧基-4-甲氧基苯甲醛(**3**)的合成

在 500 mL 四口瓶中加入异香草醛(50 g, 0.329 mol)、三苯甲基氯(103.7 g, 0.372 mol)和干燥四氢呋喃(180 mL). 氩气保护, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30 min. 向反应体系中滴加三乙胺(64.8 mL, 0.468 mol), TLC 跟踪反应结束后, 向反应体系中加入水(200 mL), 降温到 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. 加入乙酸乙酯(54 mL)、正庚烷(108 mL), 生成有颗粒状浅黄色固体, 抽滤, 所得固体依次用水(90 mL $\times$ 2)、乙酸乙酯-正庚烷(体积比=1:2, 54 mL $\times$ 2)、石油醚(55 mL $\times$ 2)洗涤, 真空干燥, 得到淡黄色固体 101.6 g, HPLC 含量 98.1%. 收率 78.3%(文献值^[13] 65%~75%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 3.62 (s, 3H), 6.68~7.48 (m, 18H), 9.54 (s, 1H).

3.2.3 3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基磷盐(**7**)的合成

将 3,4,5-三甲氧基苯甲醛(86.9 g, 0.443 mol)溶于无水乙醇(400 mL)中, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下分批加入硼氢化钾(7.2 g, 0.134 mol), TLC 跟踪反应结束后, 加入水(12.5 mL). 浓缩得到淡黄色油状物, 加入水(75 mL)和二氯甲烷(100 mL), 分层, 水层用二氯甲烷(25 mL $\times$ 2)萃取. 合并有机层, 饱和食盐水 50 mL $\times$ 2 洗至近中性, 干燥、过滤、浓缩得到淡黄色油状液体(化合物 **5**) 89 g, 含量 98%以上, 收率 100%.

在 500 mL 的反应瓶中, 将油状化合物 **5** (45 g, 0.227 mol)溶于 230 mL 甲苯, 搅拌, 降温至 $-5\sim 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 滴加三溴化磷(11 mL, 30.8 g, 0.323 mol), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续搅拌至反应完全. 加水(15 mL)分层, 有机层用饱和碳酸氢钠(25 mL $\times$ 3)洗涤至 $\text{pH}=7.5\sim 8$, 干燥、过滤, 滤液中加入三苯基膦(61 g, 0.233 mol), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌 48 h. 过滤、真空干燥, 得到的粗品用无水乙醇重结晶, 得到白色结晶固体 85 g, HPLC 含量 98.4%. 收率 80.0%(文献值^[14] 69.3%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 3.52 (s, 6H), 3.77 (s, 3H), 5.39 (s, 2H), 6.47 (s, 2H), 6.68~7.71 (m, 15H).

3.3.4 3,4,5,4'-四甲氧基-3'-三苯甲氧基-二苯乙烯(**8**)的合成

在 500 mL 四口瓶中, 在氩气保护下, 加入 3,4,5-三甲氧基苄溴三苯基磷盐 **7** (65 g, 0.122 mol)、无水四氢呋喃(112 mL). 在 $-20\sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 滴加正丁基锂的正己烷溶液($2.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 61 mL, 0.146 mol). 滴完后搅拌 60 min, 滴加化合物 **3** (48.8 g, 0.122 mol)的四氢呋喃(220 mL)溶液, 滴完后自然升温至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 搅拌过夜. 次日反应完毕后, 将温度降至 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加入饱和食盐水 280 mL. 分液, 有机层用饱和食盐水(100 mL $\times$ 2)洗涤, 干燥、浓缩, 残液加入 3 倍体积的无水乙醇搅拌, 抽滤、真空干燥, 得白色固体 56 g, HPLC 含量 99%(顺反比例

为=87:12), 收率 83%(文献值^[13]71%~92%, 顺反比例为 60:40~75:25).

3.3.5 3,4,5,4'-四甲氧基-3'-羟基-顺式-二苯乙烯(**9**)的合成

在 200 mL 的三口瓶中, 加入化合物 **8** (55 g, 0.099 mol)、乙醇 60 mL. 在 25 °C 水浴下滴加 37%浓盐酸(90 mL), 1 h 滴完后. 继续反应 3 h. 加水(55 mL)中止反应. 有固体析出, 过滤、真空干燥, 得产物 35.0 g, HPLC 含量 82%. 折纯收率 92%. (文献值^[13]45%~65%, 无纯度数据.)不需提纯可直接用于下一步反应.

将上述粗品用乙醇-石油醚($V:V=1:2$)混合溶剂重结晶, 得到化合物 **9** 纯品, HPLC 纯度 99.8%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 3.69 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 5.58 (s, 1H), 6.41 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.53 (s, 2H), 6.73 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.79 (dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=2.0$ Hz, 1H).

3.3.6 3,4,5,4'-四甲氧基-顺式-二苯乙烯-3'-O-磷酸二苯酯(**10**)的合成

在 500 mL 四口烧瓶中, 通入氩气, 加入 **9**(折纯后 20 g, 0.0632 mol)、干燥乙腈 150 mL 搅拌溶解, 冷却到 -25 °C, 依次加入干燥四氯化碳(12.7 g)、二异丙基乙基胺(12.3 g)和 4-二甲基氨基吡啶(0.8 g), 缓慢滴加亚磷酸二苄酯(18.2 g, 0.0695 mol)与干燥乙腈(50 mL)混合溶液, 控制温度在 -10 °C 以下, 2 h 内滴加完毕. TLC 跟踪显示原料点消失后, 继续反应 3.5 h. 自然升温到 20~25 °C, 加入 0.5 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(52.5 mL)中止反应. 水层用乙酸乙酯(300 mL×2)萃取, 合并有机层, 依次用蒸馏水(250 mL×3)、食盐水(250 mL×3)洗涤至中性, 干燥、浓缩得到油状物粗品 50 g.

将上述油状物粗品 50 g 用无水乙醇和石油醚($V:V=1:1$, 150 mL)重结晶, 得到白色固体 32 g, 收率 88%. HPLC 含量 98%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 3.68 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 5.12~5.14 (m, 4H), 6.42~6.49 (m, 4H), 6.79 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.32 (s, 10H); ³¹P NMR (CDCl₃, 202.5 MHz) δ : -2.83 (s).

3.3.7 3,4,5,4'-四甲氧基-顺式-二苯乙烯-3'-O-磷酸二钠盐(**1**)的合成

在 1000 mL 反应瓶中, 加入化合物 **10** (90 g, 0.16 mol)、无水乙腈 450 mL, 氩气保护下, 冷却到 -5 °C 搅拌, 快速滴加新蒸三甲基溴硅烷(59.4 mL, 0.45 mol) (10 min 左右滴完), 滴加完毕后搅拌 30 min. -5 °C 下滴加

甲醇/甲醇钠溶液(浓度 29.8%, 163 g, 0.90 mol). 继续搅拌 30 min, 加入丙酮-甲醇溶液(80 mL, 体积比=1:1), 常温搅拌过夜. 过滤、真空干燥, 得到磷酸酯二钠盐粗品 96 g. 粗品经丙酮-水($V:V=5:1$)混合溶剂重结晶 2 次, 真空干燥得到白色粉末固体 58.8 g, 收率 80%(以化合物 **9** 计算, 最后两步的收率为 70.4%, 文献^[13]最后两步的收率 40%~55%), HPLC 含量 99.5%, 其它指标符合质量要求. ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ : 3.64 (s, 6H), 3.70 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.41 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.56 (s, 2H), 6.62 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.39 (s, 1H); ¹³C NMR (D₂O, 125.8 MHz) δ : 58.67, 58.74, 63.67, 109.29, 115.25, 124.10, 125.27, 131.37, 132.89, 133.08, 136.59, 138.52, 145.90, 151.90, 154.87; ³¹P NMR (D₂O, 202.5 MHz) δ : 3.25 (s) (与文献^[13]一致).

References

- [1] Zhang, X.; Zhang, J.-C. *China Pharmacy* **2007**, 18(10), 779 (in Chinese). (张璇, 张建存, 中国药房, **2007**, 18(10), 779.)
- [2] Hua, W.-T.; Du, D.-M.; Zhang, H.; Wu, Q.-H. *CN 1465580*, **2004** [*Chem. Abstr.* **2004**, 142, 316955].
- [3] He, Y.-J.; Zhang, J.; Liu, J.; He, W.-W.; Zhou, S.; Tian, X.; Xu, X.-P. *West China J. Pharm. Sci.* **2008**, 23(6), 663 (in Chinese). (何应金, 张洁, 刘静, 何雯雯, 周莎, 田信, 徐小平, 华西药科学杂志, **2008**, 23(6), 663.)
- [4] Lippert, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 605.
- [5] Gill, S. G.; Grobelny, D.; Flynn, B. *Org. Prep. Proc. Int.* **2006**, 38(6), 604.
- [6] Yong, Z.-Q.; Xu, X.-P.; Chen, Y.-C.; Bao, X.; Weng, L.-L.; Zheng, H. *Chin. Chem. Lett.* **2006**, 17(1), 23.
- [7] Zou, Y.; Zhong, R.-Q.; Zhang, X.-J.; Zhou, Y.; Wang, Z.-X.; Lin, H.-Z., *CN 1660745*, **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, 145, 83106].
- [8] Yang, Z.-Q.; Qiu, G.-F.; Liang, S.-C.; Hu, X.-M. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* **2005**, 22(3), 210 (in Chinese). (杨兆琪, 邱国福, 梁淑彩, 胡先明, 中国现代应用药学, **2005**, 22(3), 210.)
- [9] Li, P.; Zeng, Y.-J.; Deng, J.-B.; Li, H.-Y.; Zhou, W.; Chen, C.-H. *CN 101220054A*, **2008** [*Chem. Abstr.* **2008**, 149, 246648].
- [10] Ma, S.-N.; He, Q.-K.; Cai, Z.-W.; Zuo, X.-Y. *CN 1737004*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, 146, 145878].
- [11] Peng, H.-W.; Yang, W.; Zhao, B.; Dong, Z.-Y.; Deng, J.-B.; Zhou, W. *CN 101323626A*, **2008**.
- [12] Zou, Y.; Huang, W.-M. *CN 101186620*, **2008** [*Chem. Abstr.* **2008**, 149, 68779].
- [13] Faye, S.; Jonathan, G.; Reem, H.; John, H. *WO 2002006279*, **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, 136, 134622].
- [14] Liu, S.-X.; Shen, P.-Q. *Qilu Pharm. Affairs* **2007**, 26(2), 107 (in Chinese). (刘双喜, 沈配倩, 齐鲁药事, **2007**, 26(2), 107.)
- [15] Schlitzer, M. *Synthesis* **2007**, 3553.

(Lu, Y.)