抗癌药物达卡巴嗪的合成工艺优化

肖胜伟^a 刘志军^a 柳 杨^a 陈河如^{*,a,b}^(a) 暨南大学药学院中药及天然药物研究所 广州 510632)^(b) 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室 广州 510632)

摘要 以廉价易得的甘氨酸为原料, 经酯化、甲酰化、脱水、酰氨化得到异氰基乙酰胺, 四步总收率 42.9%。异氰基乙酰胺与氨基脒在碱性条件下环合得到重要中间体 5-氨基-4-咪唑甲酰胺, 收率 68.2%。随后经重氮化, 与二甲胺偶联, 得最终产物达卡巴嗪, 总收率 22.3%。所有中间体以及目标产物的结构均由 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 ESI-MS 确证。合成路线具有原料廉价、反应条件温和、总收率较高等特点, 是一条经济实用的合成工艺路线。

关键词 达卡巴嗪; 工艺优化; 药物合成; 抗癌

Optimization of the Synthetic Process of Antineoplastic Drug Dacarbazine

Xiao, Shengwei^a Liu, Zhijun^a Liu, Yang^a Chen, Heru^{*,a,b}^(a) Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)^(b) Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Dacarbazine has been prepared started from glycine, which was carried on firstly through a four-step process including esterification, formylation, dehydration, amidation to give 2-isocyanoacetamide with a total yield of 42.9%. 2-Isocyanoacetamide was then cyclized with cyanamide under basic condition to afford the important intermediate 5-amino-1H-imidazole-4-carboxamide with yield of 68.2%. This intermediate undergoing diazotization and following coupling reaction with dimethylamine led to the target compound. The overall yield was 22.3%. All the intermediates and the target products dacarbazine were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS. The current process is economic efficient characterized by applied cheap materials, mild conditions, and good overall yield.

Keywords dacarbazine; process optimization; drug synthesis; anticancer

达卡巴嗪作为细胞非特异性药物有着广谱的抗癌活性, 能够抑制肉瘤 S180、白血病 L1210 及腺癌 755, 一直以来是临床上用于治疗恶性黑色素瘤的首选药物^[1,2]。达卡巴嗪在体内可以被转化为一种与嘌呤的生物合成中间产物相似的化合物, 可能对嘌呤的生物合成具有干扰作用。该药进入人体后在肝微粒体的作用下, 去甲基化成为单甲基化合物, 显示出直接的细胞毒作用, 主要作用于细胞周期的 G2 期, 通过烷基化作用抑制 DNA、RNA 及蛋白质的合成, 发挥抗肿瘤作用。由于该药对某些癌症的治疗有着不可或缺的地位, 近年来更有将其应

用于肿瘤的联合免疫治疗的报道^[3]。因此, 一直以来, 人们致力于该化合物合成工艺的研究, 期望获得一条简便、绿色、经济的合成路线。

据文献调研, 目前达卡巴嗪的合成路线有三条 (Scheme 1)。第一条路线是由 Alexandrina 等^[4]报道的。他们直接以 5-氨基-4-咪唑甲酰胺为原料, 首先将氨基重氮化得重氮盐, 再与二甲胺偶联获得达卡巴嗪。另外两条合成路线其实都是对第一条路线的改进, 即解决如何合成 5-氨基-4-咪唑甲酰胺的问题, 其它步骤与路线 1 同。作者认为, 以 4-咪唑甲酸为原料合成 5-氨基-4-咪唑

* E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

Received October 18, 2014; revised December 19, 2014; published online January 7, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172982).

国家自然科学基金(No. 81172982)资助项目。

甲酰胺的路线^[5], 存在原料价格高、工艺过程安全隐患大(需要催化氢化)等缺点. 而基于二氨基马来腈的合成路线^[6], 虽然路线简洁, 但需要用到剧毒的氢氰酸为原料, 安全隐患更大. 另外, 二氨基马来腈的成本也相当昂贵. 因此, 有必要探索更优化的 5-氨基-4-咪唑甲酰胺合成路线.

通过逆合成分析, 5-氨基-4-咪唑甲酰胺(**5**)的合成以廉价的甘氨酸和氨基腈(或尿素)为主要原料来实现(Scheme 2). 首先是甘氨酸经甲酯化、甲酰化、脱水成异氰、最后转酰胺化得 α -异氰基乙酰胺(**4**), 该化合物在碱性环境下与氨基腈或尿素发生串联反应和电子重排形成咪唑环, 得关键中间体 5-氨基-4-咪唑甲酰胺(**5**). 每步反应的具体实验条件均在参考相关文献^[7~12]的基础上进一步优化而得.

1 结果与讨论

按照 Scheme 2 所示路线合成达卡巴嗪. 首先是 α -异氰基乙酰胺(**4**)的合成, 经 4 步反应完成. 第一步是甘氨酸羧基的甲酯化, 利用过量甲醇作为底物兼溶剂, 在二氯亚砷(SOCl_2)的作用下以 93.0% 的收率获得甘氨酸甲酯盐酸盐(**1**); 第二步将氨基甲酰化, 反应试剂为 $\text{HCOOCH}_3/\text{Et}_3\text{N}$, 室温搅拌即可反应, 收率为 78.0%; 甲酰氨基脱水成异氰基的反应在 POCl_3 的作用下顺利进行, 收率 65.0%; 第四步是将 α -异氰基乙酰胺(**3**)转化为

α -异氰基乙酰胺(**4**), 只需要在室温条件下, 在浓度为 7 mol/L 的 NH_3 /甲醇溶液中进行反应, 即可以高达 91.0% 的收率获得酰胺化产物 **4**.

本文路线中, 由 α -异氰基乙酰胺(**4**)与适当的试剂合成 5-氨基-4-咪唑甲酰胺(**5**)是关键步骤. 参考文献^[10~12], 作者选择氨基腈或尿素为合适的试剂在碱性条件下与化合物 **4** 反应获得 **5**. 本实验对碱性试剂、溶剂、温度及反应时间等因素进行探索(表 1), 发现以氨基腈为底物, NaH 为碱性试剂, THF 为溶剂, 0 °C 投料反应, 室温下反应 3 h 为最佳条件, 能够以 68.0% 的收率获得化合物 **5**(表 1, Entry 7); 同样条件下, 以尿素为底物, 其收率只有 13.0%(表 1, Entry 3). 虽然以 $t\text{-BuOLi}$ 为碱性试剂的收率略高一些(表 1, Entry 8), 但需要在较低温度下进行, 所以我们认为, 反应条件仍以表 1 Entry 7 为佳.

起初我们选择廉价的尿素作为原料与化合物 **4** 合成 **5**, 尝试了许多实验条件, 结果都不太理想(表 1, Entries 1~6). 这可以从图 1 的反应机理中得到合理的解释. 化合物 **4** 首先在碱的作用下形成碳负离子中间体 **X**, **X** 进攻尿素的羰基形成中间体 **U1**. 由于尿素的羰基有两个氨基的共轭作用, 其接受亲核试剂进攻的能力被削弱, 所以由 **X** 生成 **U1** 的过程并不十分有利. **U1** 发生分子内亲核加成反应, 同时从体系中捕获质子转化 **U2**, **U2** 脱水形成咪唑环的结构, 这一过程在碱性环境下, 需要比较大的活化能才能促使反应的进行; 相比之下, 氨基腈

图式 1 文献报道的达卡巴嗪合成路线

Scheme 1 Synthetic processes of dacarbazine reported by literature

图式 2 达卡巴嗪的优化合成路线

Scheme 2 The optimized synthetic process of dacarbazine

表 1 合成 5-氨基-4-咪唑甲酰胺的反应条件

Table 1 Synthetic conditions of 4-amino-5-imidazolecarboxamide

Entry	原料	碱性试剂	溶剂	温度/时间	收率/%
1	尿素	CH ₃ ONa	CH ₃ OH	0 °C r.t./4 h	17.0
2	尿素	NaH	THF	0 °C/5 h	0.0
3	尿素	NaH	THF	0 °C→r.t./5 h	13.0
4	尿素	NaH	THF	60 °C/5 h	0.0
5	尿素	<i>t</i> -BuOLi	THF	−15 °C→r.t./5 h	30.0
6	尿素	<i>t</i> -BuOLi	<i>t</i> -BuOH	−15 °C→r.t./5 h	21.0
7	氨基腈	NaH	THF	0 °C→r.t./3 h	68.2
8	氨基腈	<i>t</i> -BuOLi	THF	−15 °C→r.t./5 h	69.3

图 1 5-氨基-4-咪唑甲酰胺的形成机理

Figure 1 The formation mechanism of 4-amino-5-imidazolecarboxamide

的氰基碳为 sp 杂化, 其亲核加成的活性比尿素的羰基高, 因此, 由 **X** 生成 **C1** 比较容易进行. 更进一步地, 由 **C1** 发生分子内亲核加成反应形成 **C2** 是一个有利的过程. 另外, **C2** 只需通过分子内电子重排, 将环外双键转化为环内双键, 形成咪唑芳香体系, 这是个热力学有利的转化, 反应活化能小. 由此可见, 氨基腈是比尿素更为合适的、与化合物 **4** 反应形成 **5** 的反应试剂.

氨基腈是重要的农药中间体, 大量用于农药的制备合成, 在医药工业上广泛用作生产盐酸阿糖胞苷的原料, 价格低廉, 易于获取, 使本合成路线实现工业化生产的可能性增加. 最后, 化合物 **5** 在 NaNO_2/HCl 作用下形成重氮盐, 然后与二甲胺耦合得到目标产物达卡巴嗪, 收率 76.2%.

2 结论

成功地以廉价的甘氨酸为原料, 经过五步应合成了重要前体化合物 5-氨基-4-咪唑甲酰胺, 再经过重氮化和偶合反应成功地合成了抗肿瘤药物达卡巴嗪, 总收率 22.3%. 相对于文献报道的其它方法而言, 该路线所用原料价廉易得、反应条件温和, 总收率较高. 同时提供了一种高效合成取代咪唑衍生物的新方法.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker-AV300MHz 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公

司); DHG-9140A 型恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); CLJBQ-3 型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); EYELA 型旋转蒸发器(东京理化器械独资工厂); LGJ-12 冷冻干燥机(巩义市英峪予华仪器有限公司); FA2104 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); TU-1810S 紫外分光光度计(北京普析通仪器有限公司); LC-UV100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司); DZF-150 型小型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); X-5 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司). 甘氨酸、尿素、氨基腈、二甲胺等均为 aladdin 试剂(上海晶纯科技有限公司).

3.2 实验方法

3.2.1 甘氨酸甲酯(**1**)的合成

合成方法参照文献[7]. 称取甘氨酸 7.5 g (100 mmol)于 500 mL 圆底烧瓶中, 用 200 mL 重蒸过的甲醇做溶剂, 冰浴中搅拌冷却 15 min. 用注射器量取 22 mL(约 300 mmol)二氯亚砷, 慢慢滴加入反应瓶中, 于室温下反应过夜. 室温下旋转蒸除去多余的二氯亚砷和甲醇, 残留物用尽量少的热甲醇溶解, 然后快速地加入大量冷乙醚并将反应瓶放入冰浴中快速冷却, 此时析出大量白色的固体, 抽滤洗涤得白色固体 11.6 g, 收率 93.0%. m.p. 174~175 °C(文献值^[7] m.p. 174~175 °C); ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 3.90 (s, 2H), 3.78 (s, 3H); ¹³C

NMR (75 MHz, D₂O) δ : 168.7, 53.4, 40.2; MS-ESI m/z : 179.2 [2M+H]⁺.

3.2.2 *N*-甲酰甘氨酸甲酯(2)的合成

合成方法参考文献[8]. 称取甘氨酸甲酯 3.56 g (0.4 mol)、甲酸甲酯 10 mL、三乙胺 5 mL 置于反应瓶中, 在室温下搅拌 3 d 后, 将反应瓶置于 0 °C 下静置 30 min, 使固体析出, 过滤除去固体杂质; 将液体减压旋干得到无色油状物质, TLC 检测表明纯度合格, 不需进一步分离纯化; 将油状物置于真空干燥箱中干燥, 得无色液体 2.95 g, 收率为 78.0%. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 8.25 (s, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.83 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 171.7, 164.6, 52.8, 39.8; MS-ESI m/z : 118.2 [M+H]⁺.

3.2.3 α -异氰基乙酸甲酯(3)的合成

合成方法参考文献[9]. 将 *N*-甲酰甘氨酸甲酯 2.75 g (23.5 mmol) 溶解在 100 mL 重蒸的无水二氯甲烷(DCM)中, 接着加入三乙胺 8.1 mL (58.7 mmol), 将反应混合物置于冰浴中搅拌冷却 15 min. 待冷却完全后, 慢慢滴加三氯氧磷 2.2 mL (23.5 mmol) 于反应体系中, 而后继续在冰浴中搅拌反应 1 h. 随后将溶液升至室温, 并缓慢加入饱和 Na₂CO₃ 溶液直至 pH 显示为碱性. 继续搅拌至水相和有机相充分分层, 分液漏斗分出有机层. 水层用 DCM 萃取(30 mL $\times$ 3). 合并有机层, 用饱和食盐水洗涤 3 次, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 过滤洗涤, 合并滤液并旋干, 得粗品 α -异氰基乙酸甲酯, 该粗品用 RP-HPLC 分离纯化, 真空干燥后得具极强刺激性气味的暗棕色液体 1.51 g, 收率 65.0%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 4.21 (s, 2H), 3.72 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 164.5, 160.5, 53.1, 43.2; MS-ESI m/z : 98.2 [M-H]⁻.

3.2.4 α -异氰基乙酰胺(4)的合成

合成方法参考文献[9]. 取 α -异氰基乙酸甲酯 1.0 g (5.0 mmol) 于 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 5.0 mL 甲醇, 翻口胶塞密闭. 用注射器将溶有 7 mol/L 氨气的甲醇溶液 1.5 mL (10.5 mmol) 加入反应体系中, 于室温下搅拌过夜. 反应结束后旋蒸除去过量的氨和甲醇, 将残留物(黄色固体)重新溶解于 10.0 mL 甲醇中, 加入 5% 的活性炭, 于 50 °C 下搅拌 2 h. 混合物通过硅藻土过滤, 将滤液浓缩得到灰白色固体. RP-HPLC 分析表明纯度 95%, 无需进一步分离纯化, 将产物真空干燥, 得灰白色固体 765 mg, 收率 91.0%. m.p. 113~114 °C (文献值^[10] m.p. 113~114 °C); ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 4.71 (s, 2H), 4.37 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 168.4, 156.2, 44.6; MS-ESI m/z : 85.1 [M+H]⁺.

3.2.5 5-氨基-4-咪唑甲酰胺(5)的合成

合成方法参考文献[10~12]. 取 NaH (60%) 280

mg(约 7.0 mmol)于氮气保护下加入重蒸的四氢呋喃(THF) 10 mL, 冰浴冷却 15 min; 取 420 mg (5.0 mmol) α -异氰基乙酰胺溶解于 5 mL 重蒸的 THF 中, 将其滴加到上述体系中, 搅拌反应 0.5 h; 另取氨基胍 210 mg (5.0 mmol) 溶于 THF 中, 通过注射器缓慢加入到反应体系中. 加料完毕, 撤去冰浴, 使体系慢慢升至室温, 继续加班反应 3 h, 过程中析出部分固体. 反应结束, 加入 5.0 mL 水淬灭反应, 并用稀盐酸调节 pH 至 9 左右, 旋干溶剂后用甲醇溶解残留物, 以短的固相萃取柱和 0.25 μ m 滤膜过滤样品后, 样品用 RP-HPLC 纯化[淋洗剂为 *V*(甲醇): *V*(水)=15:85], 合并馏分, 旋蒸除去甲醇, 残留液冻干得灰白色固体粉末 430 mg, 收率 68.2%. m.p. 169~171 °C(文献值^[13] m.p. 168~170 °C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.45 (br, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.80 (s, 2H), 5.56 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 167.2, 146.1, 129.8, 109.2; MS-ESI m/z : 127.1 [M+H]⁺.

3.2.6 达卡巴嗪的合成

合成方法参考文献[4]. 取 5-氨基-4-咪唑甲酰胺 378 mg (3.0 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 1.0 mL 蒸馏水冰浴搅拌; 取 1.2 mL(约 12.0 mmol)浓盐酸用 2.0 mL 水稀释后慢慢加入反应瓶中, 反应始终保持在冰浴下进行; 取亚硝酸钠(NaNO₂) 207 mg (3.0 mmol) 溶解在 1.0 mL 蒸馏水中慢慢加入到反应体系中, 用淀粉碘化钾试纸检测确证反应过程亚硝酸钠过量. 此时反应液变成深红色, 反应始终保持在冰浴下进行. 搅拌 0.5 h 后, 往反应体系中滴加含有 40% 二甲胺的水溶液 0.5 mL (4.5 mmol), 继续低温反应 2 h. 反应结束, 将反应液冻干. 将冻干的残留物用水溶解后过固相色谱柱和 0.25 μ m 滤膜, 样品用 RP-HPLC 纯化[淋洗剂为 *V*(甲醇): *V*(水)=15:85], 合并馏分, 低温旋蒸除去甲醇, 残留液冻干得淡红色固体粉末 415 mg, 收率 76.2%. m.p. 203~205 °C (文献值^[4] m.p. 203~205 °C); ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 15.14 (br, 1H), 9.03 (br, 2H), 8.52 (s, 1H), 2.51 (s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 152.8, 152.6, 143.9, 119.8, 34.4; MS-ESI m/z : 181.3 [M-H]⁻.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 1~5 及达卡巴嗪的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Wexler, P. In *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed., Ed.: Andrea, M., Manchester, 2014, pp. 1132~1134.
- [2] Zheng, M.; Sun, G. J. *J. Pract. Oncol.* **1998**, 13(6), 328 (in Chinese).

- (郑敏, 孙国君, 实用肿瘤学杂志, **1998**, 13(6), 328.)
- [3] Pretto, F.; Elia, G.; Castioni, N.; Neri, D. *Cancer Immunol. Immunother.* **2014**, 63(9), 901.
- [4] Alexandrina, C.; Cornea, F.; Ionescu, C. D. *RO 80163*, **1983** [*Chem. Abstr.* **1984**, 101, 151849].
- [5] Jain, M. L.; Tsao, Y. P.; Ho, N. L.; Cheng, J. W. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6472.
- [6] Mitsuru, T.; Masami, H.; Yoshikazu, I. *JP 544941*, **2004** [*Chem. Abstr.* **2004**, 354906].
- [7] Chaudhary, S.; Singh, K. R. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, 5(4), 196.
- [8] Panella, L.; Aleixandre, A. M.; Kruidhof, G. J.; Robertus, J. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2026.
- [9] Tomasz, G.; Robert, H.; Scott, H. *US 13983747*, **2013** [*Chem. Abstr.* **2012**, 157, 383004].
- [10] Elders, N.; Ruijter, E.; Frans, J. J. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 6096.
- [11] Elders, N.; Ruijter, E.; Frans, J. J. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 4961.
- [12] Murakami, T.; Otsuka, M.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23(45), 4729.
- [13] Saladino, R.; Crestini, C.; Ciambecchini, U.; Ciciriello, F.; Costanzo, G.; Di Mauro, E. *ChemBioChem* **2004**, 5, 1558.

(Li, L.; Lu, Z.)