

· 论著 ·

正交设计优化光敏剂二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯的合成工艺

单彬¹, 孙渺², 孟志², 韩贵焱², 钱其涵², 刘明辉¹, 姚建忠^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 优化光敏剂二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯 (1) 的合成工艺。方法 采用“一锅法”, 以脱镁叶绿酸 a (3) 为原料, 通 N₂ 条件下经碱甲醇液作用下 E 环开裂后直接添加 1/20 体积量的水, 回流水解制得化合物 1。选择影响其合成产率的开环反应时间 (A)、回流水解反应时间 (B)、氢氧化钾甲醇液浓度 (C)、3 与氢氧化钾的质量投料比 (D) 为主要考察因素, 每个因素各取 3 个水平, 采用 L₉ (3⁴) 正交试验法优化目标物 1 的最佳合成工艺。结果 合成化合物 1 的最优反应条件为 B₁C₂A₂D₁, 工艺收率从 43.0% 提高到 56.5%。结论 该工艺具有操作简便、安全、收率高等优点, 适合工业化生产。

[关键词] 工艺改进; 二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯; 正交设计; 光敏剂

[中图分类号] R916.42

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)02-0122-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.007

Optimization of synthesis of photosensitizer chlorin e₆-C₁₅ monomethyl ester by the orthogonal design

SHAN Bin¹, SUN Miao², MENG Zhi², HAN Guiyan², QIAN Qihan², LIU Minghui¹, YAO Jianzhong^{1,2} (1. Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the synthesis of photosensitizer chlorine e₆-C₁₅ monomethyl ester (1). **Methods** Target compound 1 was synthesized through E ring cracking of pheophorbide a (3) in methanol solution of potassium hydroxide followed by adding H₂O for ester hydrolysis with “one-pot” process. Four main factors that influencing the synthetic yield of target compound 1 are ring cleavage reaction time (A), reflux hydrolysis reaction time (B), alkali concentration (C) and weight ratio of material 3 to alkali (D). Each of the four factors was chosen at three levels and evaluated by the orthogonal experimental design of L₉ (3⁴). **Results** The optimization terms of the synthesis of target compound 1 were B₁C₂A₂D₁. The yield of compound 1 was raised from 43.0% to 56.5%. **Conclusion** The developed process has the advantages of simple operation, good safety and high reaction yield, and is suitable for industrial production.

[Key words] process improvement; chlorine e₆-C₁₅ monomethyl ester; orthogonal design; photosensitizer

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种肿瘤治疗新技术, 即用特定波长的光辐照摄入光敏剂的病灶组织, 由光敏剂诱发产生单线态氧等细胞毒活性氧物质而导致靶组织细胞坏死或凋亡^[1]。与第一代临床卟啉类光敏剂如血卟啉衍生物 (hematoporphyrin derivative, HpD) 相比, 二氢卟吩类光敏剂如叶绿素降解产物及其衍生物等具有结构明确、红光治疗区 (>

600 nm) 最大吸收波长红移至 670~700 nm 且吸收系数高一个数量级、光敏作用强、体内清除速度快、光毒性小等优点, 已成为新一代 PDT 光敏新药研究的热点之一^[2-4]。其中, 维替泊芬 (verteporfin) 和他拉泊芬 (talaporfin) 于 2001 年和 2004 年先后在美国及日本获准上市^[5]。

二氢卟吩 e₆-C₁₅ 单甲酯 (1) 为叶绿素 a 降解产物, 研究表明^[6], 其光敏化力及对小鼠肉瘤-180 移植瘤的 PDT 疗效显著高于 HpD, 肿瘤/正常皮肤分布比达 2~10, 48 h 体内基本清除完毕, 皮肤光毒性小, 且理化性质稳定, 是新一代有希望的光动力治癌候选药物。文献^[7]报道, 以蚕沙叶绿素 a 粗提物 (糊状叶绿素) 经酸降解制得的脱镁叶绿酸 a (3) 粗品为原料, 其乙醚液在 0.5% (W/V) 氢氧化钾甲醇

[基金项目] 国家自然科学基金 (81172950); 上海市科委重点科技攻关项目 (11431920401)

[作者简介] 单彬, 硕士研究生. E-mail: shanbin19890518@163.com

[通讯作者] 姚建忠. 研究方向: 抗肿瘤和抗真菌药物研究. Tel: (021)81871235; E-mail: yaojz@sh163.net

溶液中于通氮气条件下,开环反应得到二氢卟吩 e₆ 二甲酯(2),2再经约1% (W/V)氢氧化钾的甲醇-水 (V/V, 20:1)回流水解合成得目标产物1(图1),

但其反应收率偏低(43.0%)。本实验旨在采用“一锅法”简化合成操作,并利用正交试验设计优化其合成反应工艺,提高其合成收率。

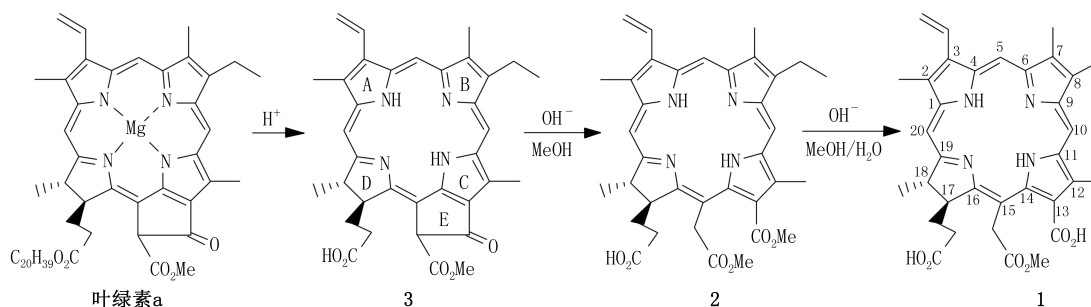


图1 二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯(1)的合成

1 材料与仪器

用 HPLC 法测定:Water-600 型高效液相仪(美国),分离柱:ZORBAX ODS 柱(0.46 cm×25 cm),流动相:60% THF 水溶液+10% 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液,流速:1 ml/min,检测波长:401 nm,灵敏度:0.1 AUFS。柱层析硅胶 H(60 型)由青岛海洋化工集团公司出品。糊状叶绿素由浙江省海宁市天然色素厂生产。脱镁叶绿酸 a(2)粗品按文献[8]方法制备,其余所用化学试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 正交试验设计 为了优化合成目标化合物 1 的最佳合成工艺,采用 L₉(3⁴)正交设计^[9]对反应条件进行优选。根据反应的性质并参照文献方法,我们尝试用“一锅法”,即原料 3 经氢氧化钾甲醇液作用下 E 环室温开裂生成 2 后,直接添加 1/20 体积量的水回流水解合成制得目标产物 1。重点考察了影响其合成收率的开环反应时间(A)、回流水解反应时间(B)、氢氧化钾甲醇液浓度(W/V,C)、3 与氢氧化钾的质量投料比(X:Y,D)4 个主要因素,每个因素各取 3 个水平(表 1)。

表 1 正交试验设计因素水平表

水平	因素			
	A 开环反应时间(t/h)	B 水解反应时间(t/h)	C 碱浓度(W/V,%)	D 质量投料比
1	2.0	0.5	0.5	3:1
2	4.0	1.0	1.0	2:1
3	8.0	1.5	2.0	1:1

2.2 二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯(1)的合成 称取 X g 同一批号脱镁叶绿酸 a(3)粗品(HPLC 法检测纯度

为 55%),加入 Y g 氢氧化钾溶于甲醇而成的某浓度(W/V,C)的醇碱溶液,室温通氮气搅拌反应一定时间(A),然后加入 1/20 体积量的水,迅速回流反应一定时间(B),停止反应,加 2 倍体积量水稀释,用 10% 硫酸调节 pH 值至 5~6,过滤,五氧化二磷(P₂O₅)真空干燥,得黑色粉末 1 粗品。

3 结果

3.1 二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯(1)合成反应条件的优化 将表 1 按 L₉(3⁴)正交表的试验序号顺序,依次采用相应条件重复进行 3 次平行试验。根据上述合成方法,每次试验均取同一批号 2 粗品 5.0 g (HPLC 法检测相对含量为 55%,理论上含 3 纯品 2.75 g),所得 1 粗品均为 4.5 g,非常稳定。用 HPLC 法测定 1 粗品的相对百分含量即纯度来衡量其产率的高低。

极差分析数据和计算结果见表 2。正交分析所用正交表各列除因子列外,无空白列作对照,故采用重复试验方差分析的方法^[10],计算各因子列的 F 比值,方差分析结果见表 3。

表 3 方差分析表明,因素 B、C、A 对结果的影响均非常显著。表 2 极差(R)分析结果进一步显示,各因素对产物 1 粗品纯度的影响按 B>C>A>D 顺序递减。因此,制备目标产物 1 的最优反应条件应为 B₁C₂A₂D₁。

3.2 二氢卟吩 e₆-C₁₅单甲酯(1)最优合成反应条件的验证 以 3 粗品 15.0 g (HPLC 法检测纯度为 55%,理论上内含纯品 8.25 g,13.94 mmol)按上述最优反应条件,即加入 1.0% (W/V)的氢氧化钾甲醇溶液 500 ml,室温通氮气搅拌反应 4 h 后,再加水 25 ml,迅速回流反应 0.5 h,停止反应,加 2 倍体积量水稀释,用 10% 硫酸调节 pH 值至 5~6,过滤,

表2 L₉(3⁴)正交试验结果及极差分析数据

试验号	A 因素	B 因素	C 因素	D 因素	相对含量 (%)			合计	平均相对含量 (%)
1	1	1	1	1	49.1	50.6	49.4	149.1	49.7
2	1	2	2	2	47.2	45.1	45.4	137.7	43.9
3	1	3	3	3	30.1	31.8	28.7	90.6	30.2
4	2	1	2	3	50.8	52.3	53.2	156.3	52.1
5	2	2	3	1	37.4	40.3	39.9	117.6	39.2
6	2	3	1	2	35.6	35.1	39.7	110.4	36.8
7	3	1	3	2	40.7	43.2	42.7	126.6	42.2
8	3	2	1	3	37.5	40.6	40.1	118.2	39.4
9	3	3	2	1	34.3	34.5	35.9	104.7	34.9
K ₁	123.8	144.0	125.9	123.8					
K ₂	128.1	122.5	130.9	122.9					
K ₃	116.5	101.9	111.6	121.7					
k ₁	41.3	48.0	42.0	41.3					
k ₂	42.7	40.8	43.6	41.0					
k ₃	38.8	34.0	37.2	40.6					
R	3.9	14.0	6.4	0.7					

表3 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	75.447	2	37.724	17.05	P<0.005
B	887.807	2	443.904	200.59	P<0.005
C	235.727	2	117.864	53.26	P<0.005
D	5.287	2	2.644	1.19	
SS _{e2}	39.840	18	2.213		

$F_{0.005(2,18)} = 7.21$

P₂O₅ 真空干燥,重复实验 3 批,平均每批得黑色粉末 1 粗品 13.2 g, HPLC 法检测所得 1 粗品的相对百分含量(纯度)非常稳定,平均为 53.9%。

3.3 二氢卟吩 e₆-C₁₅ 单甲酯(1)的色谱制备 将上述 3 批 1 粗品分别用硅胶 H 柱色谱法分离,以氯仿-丙酮-甲醇-甲酸(10 : 1 : 1 : 0.1, V/V/V/V)洗脱,平均每批得 1 纯品 4.8 g(HPLC 法检测纯度为 98.5%),反应工艺的平均收率为 56.5%。

3 讨论

本实验以正交试验设计对文献报道的二氢卟吩 e₆-C₁₅ 单甲酯(1)的合成反应条件进行优化,获得了最佳反应条件 B₁ C₂ A₂ D₁。在此条件下,以放大量的同一批号脱镁叶绿酸 a(3)粗品 15.0 g(HPLC 法检测纯度为 55%)为原料,进行 3 次重复验证实验,所得 1 粗品的相对百分含量(纯度)基本一致且相对稳定,并与小样正交试验优选结果吻合,说明正交试验优选出的合成工艺条件合理且稳定可行。与文献[6]相比,该合成工艺优化为“一锅法”,剔除了易燃溶剂乙醚,减少了碱及甲醇的用量,缩短了开环反应时间,工艺收率也从 43.0% 提高到 56.5%。因此,

本实验结果为二氢卟吩 e₆-C₁₅ 单甲酯(1)较大规模的制备、分离提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] Juzeniene A, Moan J. The history of PDT in Norway Part one: identification of basic mechanisms of general PDT [J]. Photodiag Photodyn Ther, 2007, 4(1): 3-11.
- [2] Xu DY. Research and development of photodynamic therapy photosensitizers in China [J]. Photodiag Photodyn Ther, 2007, 4(1): 13-25.
- [3] Yao JZ, Zhang WN, Sheng CQ, et al. Design, synthesis, and in vitro photodynamic activities of benzo-chlorophorpyrin derivatives as tumor photosensitizers [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(1): 293-297.
- [4] Zhang JL, Deng L, Yao JZ, et al. Synthesis and photobiological study of a novel chlorin photosensitizer BCPD-18MA for photodynamic therapy [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(18): 5520-5528.
- [5] 张丹萍,陈志龙,杨晓霞. 光动力药物的研究与开发[J]. 药学进展, 2007, 31(12): 529.
- [6] 方 瑛,许德余. 二氢卟吩 e₆-C₁₅ 单甲酯:一种发展中的第二代光动力抗癌新药候选化合物[J]. 中国激光医学杂志, 1999, 8(4): 235.
- [7] 方 瑛,许德余. 蚕沙叶绿素的降解及二氢卟吩 e₆ 醚类衍生物的合成[J]. 有机化学, 1995, 15(5): 493.
- [8] 姚建忠,许德余,陈文晖,等. 蚕沙叶绿素的降解及二氢卟吩 P₆ 酰胺衍生物的合成[J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(9): 403.
- [9] 周怀梧. 医药用数理统计[M]. 济南:山东教育出版社, 1986: 148.
- [10] 张春华,严云良. 医药用数理统计[M]. 北京:科学出版社, 2001: 205.

[收稿日期] 2014-08-26 [修回日期] 2014-11-17

[本文编辑] 李睿曼