

· 研究简报 ·

地西洋半抗原衍生物的合成

张晨曦, 刘娟, 薛志勇*

(武汉纺织大学 化学与化工学院, 湖北 武汉 430073)

摘要: 以 2-氨基-5-氯二苯甲酮和氯乙酰氯为原料, 经酰胺化、六亚甲基四胺关环、硫酸二甲酯甲基化、引入丁酸叔丁酯和三氟乙酸水解等 5 步反应, 设计并合成了一种地西洋半抗原衍生物, 其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 MS(ESI) 表征。

关键词: 地西洋衍生物; 酰胺化反应; 半抗原; 酯水解; 合成

中图分类号: O62; R914.5

文献标志码: A

DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.21301

Synthesis of Hapten of Diazepam Derivatives

ZHANG Chenxi, LIU Juan, XUE Zhiyong*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan Textile University, Wuhan 430073, China)

Abstract: A hapten of Diazepam derivatives was designed and synthesized. It was synthesized by a five-step reaction of amidation, ring closure by hexamethylenetetramine, methylation by dimethyl sulfate, introduction of tert-butyl butyrate, and hydrolysis by trifluoroacetic acid, using 2-amino-5-chlorobenzophenone and chloroacetyl chloride as raw materials. The structure of the final product was confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and MS(ESI).

Keywords: Diazepam derivative; amidation reaction; hapten; ester hydrolysis; synthesis

安定通用名为地西洋, 是苯二氮卓类药物(BDZ), 为第二代催眠药^[1]。安定作用与利眠宁相似, 有镇静、抗惊厥、使肌肉松弛等作用, 适用于精神抑郁型焦虑、紧张、不安、失眠等症状, 对抗惊厥和癫痫抑制作用很显著。安定为中枢神经抑制药, 可引起中枢神经系统不同部位的抑制^[2]。然而, 安定在发挥药效时, 也会产生诸多副作用, 例如头痛、嗜睡、无力等, 连续使用容易成瘾^[3-6]。

随着地西洋在内的镇静剂类药物在临床上的广泛应用, 其间接的毒副作用越来越引起人们的重视。近几年, 很多水产养殖户为了提高鱼类成活率, 在养殖和运输过程中使用过量的地西

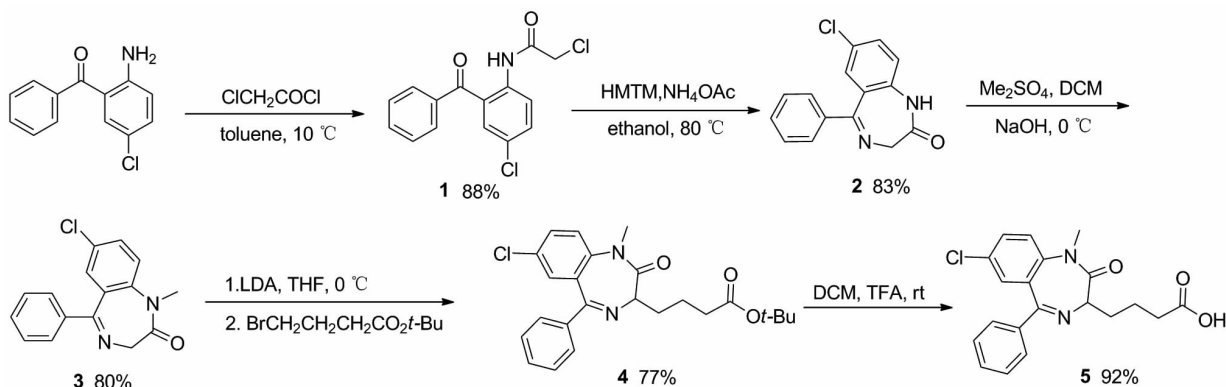
洋^[7-10]。农业部 235 号公告的附件《动物性食品中兽药最高残留量》中明确规定地西洋等镇静剂类药物只能用于治疗, 不得在动物性食品中检出。2011 年的“瘦肉精事件”后, 卫生部于 2011 年 4 月发布的食品中可能违法添加的非食用物质名单中就包括地西洋药物。因此, 建立快速高效检测食品中地西洋残留量的方法具有重要意义^[11]。目前, 研究人员主要使用乙醚等有机溶剂从体液或脏器中采样后, 采用气相色谱法、高效液相色谱法或薄层色谱扫描法等对安定进行检测^[12-13]。这类方法使用的仪器昂贵, 需要高昂的资金和资深技术人员的维持才能开展工作, 普及难度较高。

收稿日期: 2021-12-29; 修订日期: 2022-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21602163); 湖北省自然科学基金资助项目(2016CFB261); 湖北省教育厅中青年人才项目(Q20161607); 生物质纤维与生态染整湖北省重点实验室开放课题(STRZ201907)

第一作者简介: 张晨曦(1994-), 女, 汉族, 河南巩义人, 硕士研究生, 主要从事有机合成研究。E-mail: 2918403971@qq.com

通信联系人: 薛志勇, 博士研究生, 副教授, E-mail: xuezhiyong@whu.edu.cn



Scheme 1

如果采用免疫学技术,用特异性抗体标记,通过抗原、抗体特异性反应可直接用于检测,简单高效便捷,节约成本。地西洋本身为小分子物质,不具有免疫性,需要与高分子结合才能刺激机体产生特异性抗体,但地西洋分子中不含可与蛋白质分子发生酰化反应或重氮化反应的羧基,所以需要通过化学合成的方法在地西洋原有的结构中引入一个羧基团,就可以与蛋白质分子反应来制备安定的半抗原-载体复合物^[14-16]。

本课题组以 2-氨基-5-氯二苯甲酮和氯乙酰氯为原料,通过酰化、六亚甲基四胺关环、硫酸二甲酯甲基化、引入丁酸叔丁酯和三氟乙酸水解等 5 步反应,设计并合成了一种含有丁酸结构的地西洋半抗原衍生物(**5**, Scheme 1)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker ADV ANCE III 300 MHz 型核磁共振仪(CDCl_3 为溶剂,TMS 内标);XE-VOG2-XS 型质谱仪。

所用试剂均为分析纯。

1.2 合成

(1) 化合物 1 的合成

将 6.9 g(0.03 mol)的 2-氨基-5-氯二苯甲酮和加入圆底烧瓶中,加入 20 mL 甲苯,搅拌使其溶解;冰水浴冷却($10\text{ }^\circ\text{C}$ 左右),将 2.5 g(0.03 mol)的氯乙酰氯和 2 mL 甲苯的混合溶液缓慢加入圆底烧瓶中,反应 2 h。减压浓缩,残余物加入乙醇搅拌,抽滤得白色固体化合物 **1** 8.1 g,收率 88%; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 11.45 (s, 1H), 8.61 ~ 8.58 (m, 1H), 7.75 ~ 7.26 (m, 7H),

4.20 ~ 4.18 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 197.84, 165.41, 137.66, 137.59, 133.83, 133.17, 132.70, 130.02, 128.43, 125.60, 123.09, 43.07; MS (ESI) m/z : 308 $\{[M + H]^+\}$ 。

(2) 化合物 2 的合成

将 6.16 g(0.02 mol)的化合物 **1** 和 6.16 g(0.045 mol)的六亚甲基四胺,3.4 g(0.045 mol)的醋酸铵放入烧瓶中,加入 250 mL 乙醇溶解, $80\text{ }^\circ\text{C}$ 加热回流,搅拌 6 h,浓缩加水搅拌,然后真空干燥 12 h。加 50 mL 甲苯洗涤,抽滤得白色固体化合物 **2** 4.48 g,收率 83%; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 10.06 (s, 1H), 7.46 ~ 7.34 (m, 6H), 7.34 ~ 7.29 (m, 1H), 7.29 ~ 7.08 (m, 1H), 4.24 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 172.21, 169.96, 138.80, 137.52, 131.87, 130.66, 129.63, 129.05, 128.77, 128.50, 128.41, 122.85, 73.98, 56.69; MS (ESI) m/z : 271 $\{[M + H]^+\}$ 。

(3) 化合物 3 的合成

将 5.4 g(0.02 mol)的化合物 **2** 和 3.8 g(0.03 mol)的硫酸二甲酯置于圆底烧瓶中,加入二氯甲烷 35 mL 溶解,再加入 17 mL($3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)NaOH 溶液,冰浴 30 min 之后,室温反应 2 h。加入二氯甲烷萃取,有机相旋干,得到粗产品,用乙酸乙酯和石油醚重结晶得纯产品白色固体地西洋 **3** 4.5 g,收率 80%; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.61 ~ 7.58 (m, 2H), 7.52 ~ 7.39 (m, 4H), 7.39 ~ 7.26 (m, 2H), 4.84 ~ 4.81 (d, 1H), 3.78 ~ 3.76 (d, 1H), 3.39 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 169.96, 168.95, 142.62, 138.19, 131.48, 130.72, 130.09,

129.93, 129.49, 129.29, 128.43, 122.54, 56.96, 34.89; MS(ESI) m/z : 285 $\{[M+H]^+\}$ 。

(4) 化合物 4 的合成

将 2 g(7 mmol)地西洋置于圆底烧瓶中,无水无氧条件下,加入无水四氢呋喃 20 mL 溶解,冰浴下,缓慢滴加 LDA 3.5 mL(10.6 mmol),锂化 1 h,加入 1.88 g(8.4 mmol)溴丁酸叔丁酯,反应过夜,加水搅拌,用乙酸乙酯萃取,旋干,用[乙酸乙酯:石油醚=1:5]柱层析纯化得黄色油状液体化合物 4 2.29 g, 收率 77%; ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.34 ~ 7.33(s, 2H), 7.33 ~ 7.23(m, 4H), 7.23 ~ 7.19(m, 2H), 3.33(s, 4H), 2.27 ~ 2.23(m, 2H), 2.21 ~ 2.12(m, 1H), 1.61 ~ 1.60(m, 1H), 1.38 ~ 1.37(m, 2H), 1.35(s, 9H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 75 MHz) δ : 173.07, 170.32, 167.20, 142.33, 138.16, 131.44, 130.48, 129.71, 129.58, 129.19, 128.41, 122.71, 80.09, 63.39, 35.50, 35.13, 31.15, 29.44, 28.14, 21.80, 7.95; MS(ESI) m/z : 427 $\{[M+H]^+\}$ 。

(5) 化合物 5 的合成

将 1 g(2.3 mmol)化合物 4 和 2 mL 三氟乙酸加入圆底烧瓶,加入 5 mL 二氯甲烷,室温反应搅拌过夜,经硅胶柱[乙酸乙酯:石油醚=1:3]层析得黄色固体化合物 5 0.78 g, 收率 92%; ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.55 ~ 7.42(m, 6H), 7.39 ~ 7.21(m, 2H), 3.52 ~ 3.48(m, 1H), 3.36(s, 3H), 2.43 ~ 2.40(m, 2H), 2.29 ~ 2.17(m, 2H), 1.86 ~ 1.66(m, 2H); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 75 MHz) δ : 170.03, 168.41, 142.36, 137.36, 132.03, 131.18, 130.05, 130.02, 129.85, 129.49, 128.53, 122.87, 63.03, 35.33, 33.93, 30.57, 21.37, 14.20; MS(ESI) m/z : 371 $\{[M+H]^+\}$ 。

2 结果与讨论

用廉价易得的 2-氨基-5-氯二苯甲酮和氯乙酰氯为起始原料,合成了一种含有羧基基团的地西洋衍生物,并对关键步骤的合成工艺进行了优化。

2.1 投料比对地西洋引入丁酸叔丁酯反应的影响

表 1 为地西洋与二异丙基氨基锂的投料比对

地西洋引入丁酸叔丁酯反应的影响,结果可知,当地西洋与二异丙基氨基锂的投料比为 1:1 时,产率最高,当二异丙基氨基锂的量增加时,产率下降,可能是因为过量的 LDA 会与溴丁酸叔丁酯发生消除反应,进而影响地西洋引入丁酸叔丁酯反应。所以地西洋与二异丙基氨基锂的最佳投料比为 1:1,产率高达 77%。

表 1 投料比对地西洋引入丁酸叔丁酯反应的影响*

Table 1 Effects of feeding ratio on diazepam in the introduction of <i>tert</i> -butyl butyrate			
$n_a:n_b$	1:1.5	1:1	1:0.9
产率/%	68	77	70

* a 为地西洋,b 为 LDA。

2.2 三氟乙酸用量对叔丁酯水解反应的影响

表 2 为三氟乙酸用量对叔丁酯水解反应的影响,1 g 化合物 4 和 5 mL 二氯甲烷,研究不同三氟乙酸的用量对反应收率影响,结果可知,当三氟乙酸的用量为大于 2 mL 时,收率最高为 92%,所以三氟乙酸用于叔丁酯水解反应的最佳用量为 2 mL。

表 2 三氟乙酸用量对叔丁酯水解反应的影响

Table 2 Effect of the amount of trifluoroacetic acid on the hydrolysis of <i>tert</i> -butyl ester		
No.	三氟乙酸用量/mL	产率/%
1	0.5	45
2	1	55
3	1.5	80
4	2	92
5	2.5	92

3 结论

以 2-氨基-5-氯二苯甲酮和氯乙酰氯为原料通过酰胺化,经 5 步反应合成了一种含羧基基团的地西洋衍生物,并优化了合成路线。该成果为合成含羧酸的地西洋衍生物提供了新思路。

参考文献

[1] 邹叔聘,王朝阳,刘博,等. 地西洋对胶质瘤术后睡眠障碍患者神经内分泌免疫因子表达水平的影响[J]. 中国医师杂志,2018. 20(11):1692-1694.
(ZOU S C, WANG C Y, LIU B, *et al.* Effect of dia-

- zepam on the expression of neuroendocrine immune factors in patients with sleep disorders after glioma surgery [J]. Chinese Journal of physicians, 2018, **20** (11):1692–1694.)
- [2] 周锋, 袁堃, 蒋硕勤, 等. GC/MS 法检验海洛因和安定[C]. 全国有机质谱学术会议: 中国分析测试协会, 2010.
(ZHOU F, YUAN K, JIANG S Q, *et al.* Determination of heroin and diazepam by GC/MS[C]. National Conference on organic mass spectrometry China analysis and Testing Association, 2010.)
- [3] 王立友, 李姗, 王芳, 等. 长期应用地西洋对豚鼠耳蜗微音器电位的影响[J]. 西北药学杂志, 2016(4): 3.
(WANG L Y, LI S, WANG F, *et al.* Effect of long-term application of diazepam on cochlear microphonic potential in guinea pigs[J]. Northwest Journal of Pharmacy, 2016(4):3.)
- [4] 李积东, 韵海霞, 车胜荣. 镇静催眠药研究新进展[J]. 西北药学杂志, 2001, **16**(5):231–232.
(LI J D, YUN H X, CHE S R. New research progress of sedative and hypnotic drugs[J]. Northwest Journal of pharmacy, 2001, **16**(5):231–232.)
- [5] 李林艳, 徐建. 苯二氮类药物依赖及其防治[J]. 药物不良反应杂志, 2012, **14**(4):228–231.
(LI L Y, XU J. Benzodiazepine dependence and its prevention and treatment[J]. Journal of Adverse Drug Reactions, 2012, **14**(4):228–231.)
- [6] O'BRIEN C P. Benzodiazepine use, abuse, and dependence[J]. J Clin Psy chiatry, 2005, **66**(S2):28–33
- [7] 李晋成, 刘欢, 吴立冬, 等. 动物体内麻醉剂残留检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2014, **35**(5):251–256.
(LI J C, LIU H, WU L D, *et al.* Research progress on detection technology of anesthetic residues in animals[J]. Food Science, 2014, **35**(5):251–256.)
- [8] 刘长琳, 何力, 陈四清, 等. 鱼类麻醉研究综述[J]. 渔业现代化, 2007, **34**(5):21–25.
(LIU C L, HE L, CHEN S Q, *et al.* A review of fish anesthesia research[J]. Fishery Modernization, 2007, **34**(5):21–25.)
- [9] 吕海燕, 王群, 刘欢, 等. 鱼用麻醉剂安全性研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, **3**(2):24–28.
(LV H Y, WANG Q, LIU H, *et al.* Research progress on safety of anesthetics for fish[J]. China Fisheries Quality and Standards, 2013, **3**(2):24–28.)
- [10] KE C L, LIU Q, LI L, *et al.* Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets[J]. Aquaculture, 2018, **484**:338–342.
- [11] 北京维德维康生物技术有限公司. 一种地西洋半抗原、人工抗原及其制备方法与应用: CN 202010654112.4[P]. 2020.
(Beijing weideweikang Biotechnology Co. Ltd. Diazepam hapten, artificial antigen and preparation method and application thereof: CN 202010654112.4 [P]. 2020.)
- [12] HUDECOVA T, BATOROVA V, HATRIK S, *et al.* Validation of an HPLC method for the analysis of decomposition products in injectable diazepam[J]. Ceska Slov Farm, 2004, **53**(5):228–233.
- [13] MEINITZER A, MARZ W, MANGGE H, *et al.* More reliable brain death diagnosis with chromatographic analysis of midazolam, diazepam, thiopentone and active metabolites[J]. Anal Toxicol, 2006, **30**(3):196–201.
- [14] RAO Z, PENG H D, YANG G C, *et al.* Novel synthesis of *N*4-substituted 1,4-benzodiazepine-2,5-diones using poly(ethyleneglyc01) as soluble polymer support[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2006, **9**(10):743–746.
- [15] DOURLAT J, LIU W Q, GRESH N, *et al.* Novel synthesis of *N*4-substituted 1,4-benzodiazepini-2,5-diones using poly(ethylene glycol), as soluble polymer support[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, **17**(9):2527–2530.
- [16] REITTRER B E, SACHDEBA Y P, WOLFE J F. Metalation of diazepam and use of the resulting carbanion intermediate in a new synthesis of 3-substituted diazepam derivatives[J]. J Org Chem, 1981, **46**(20):3945–3949.