

药物/荧光染料缀合体前体- β (3-羧基伞形酮)-D-半乳糖苷钾盐的合成

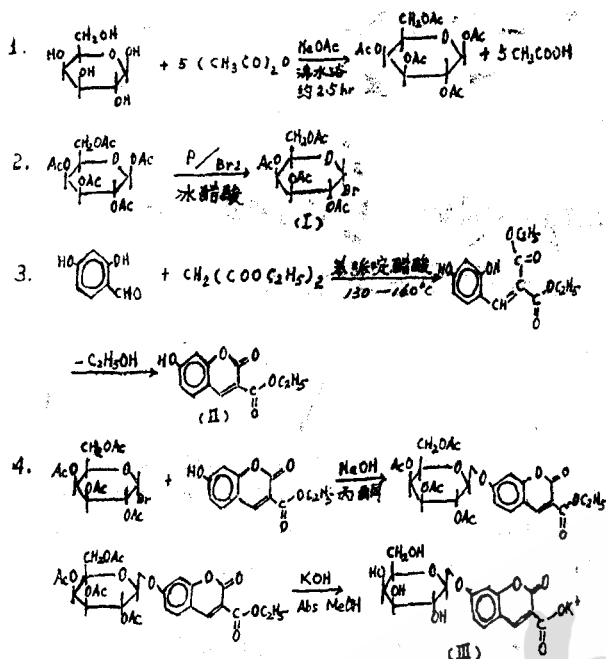
浙江医科大学药理学系(杭州310006)孙廷辉 骆文莹 包晓春 刘志强

提要 本文介绍药物/荧光染料缀合体前体- β (3-羧基伞形酮)-D-半乳糖苷钾盐的合成方法。以D-半乳糖为原料,经酯化,溴代制得 α -溴-四乙酰半乳糖(I),另以2,4-二羟基苯甲醛为原料,与丙二酸二乙酯在哌啶的催化作用下经过Knoevenagel缩合反应,再环合成3-乙氧甲酰基-7-羟基香豆素(II)。然后将(I)和(II)连接再脱去乙酰基即制得药物/荧光染料缀合体前体- β (3-羧基伞形酮)-D-半乳糖苷(III)钾盐。

引言

荧光免疫测定法(FIA)中的荧光增强法是一种良好的超微量测定法,很适用于血药浓度的测定(如庆大霉素、紫苏霉素等的测定)^[1],该法的原理是先按本文的方法制得药物/荧光染料缀合体的前体(III),然后将(III)与药物(如庆大霉素)结合制成底物标记抗原,这种游离状态的底物标记抗原与 β -半乳糖苷酶反应时生成荧光产物,但当其与抗体结合后,酶反应不发生。在样品中有待测药物(如庆大霉素)时,就与底物标记抗原竞争结合抗体,使产生游离状态的底物标记抗原面产生酶反应,荧光增强的程度与样品中的药物含量成正比,该法具有样品量小,快速和灵敏等优点且为均相反应,不需分离操作,因此方法简便易行。本法的关键是制备药物/荧光染料缀合体的前体(III)。为了保护半乳糖的羟基,先将半乳糖上的羟基完全酰化,所有的羟基都容易被醋酐乙酰化,不同的催化剂对生成物的立体构型有影响,用酸性催化剂, HClO_4 或 ZnCl_2 , 产物为 α -五乙酰半乳糖^[2],用碱性催化剂, NaOAc ,

产品是 β -五乙酰半乳糖,此法所得的 β -五乙酰半乳糖结晶性比较好,而前一种方法(HClO_4)得到的是油状的乙酰化产物,由于 C_1 上的乙酰基比其它碳原子上的要活泼得多,可被卤族原子所取代,由于氟代乙酰糖活泼性太差而碘代乙酰糖又不稳定,故用Br或Cl作为卤代原子,而不用F或I。文献中是先制备溴试剂再和乙酰糖反应。经过多次试验发现该法不理想,我们的改进法为先加入红磷,然后边振摇边加入溴液,使溴与红磷边反应边参与下一步反应,该法简便,产率提高。3-乙氧甲酰基-7-羟基香豆素(II)是由2,4-二羟基苯甲醛和丙二酸二乙酯在冰醋酸、苯和哌啶存在下经Knoevenagel缩合而成,(I)和(II)在碱性条件下连接成四乙酰半乳糖苷-3-羧基乙氧基-伞形酮,反应中两者以糖苷键连接, C_1 的构型发生Walden转换,由原来的 α -构型溴代乙酰糖反应后变成 β -构型糖苷、再经水解脱去乙酰基,即得产品 β -(3-羧基伞形酮)-D-半乳糖苷的钾盐,整个制备过程可以下列反应式表示:



实验部份

Thiele 熔点测定管, 温度计, 未经校正; 红外分光光度仪为岛津 IR-460型; 核磁共振仪为 Jeol FX-90Q 型。

(1) β -D-五乙酰半乳糖的制备^{[3][4]}

称取无水醋酸酐 4.0g 及干燥的 D-半乳糖 5.0g 置于 100 ml 的圆底烧瓶中, 加入 25 ml 醋酐, 置于沸水浴上加热约 2.5 hr, 时加搅拌, 反应完后将淡棕黄色产物倒入 250 ml 冰水中, 不断搅拌使烧杯底部的糖浆状物逐渐凝固而析出结晶, 如仍为油状物, 可用玻棒磨擦杯壁以诱导结晶产生, 放置过夜, 倾去上层液体, 结晶用冰水洗涤二次, 过滤收集结晶, 呈淡黄色, 用 70% 乙醇重结晶一次, 得白色粉末状结晶, 干燥后测熔点 mp. 140~142°C (文献为 141°C), 秤重得 5.4 g, 产率为 50% (文献为 51%)。

(2) α -溴代四乙酰半乳糖 (I) 的制备

将 5.0g β -五乙酰半乳糖置于 100 ml 圆底烧瓶中, 加入 20~25 ml 的冰醋酸, 振摇

使其溶解, 加入 1.5 g 红磷并使其悬浮在冰醋酸中, 逐滴加入 9.0 g 溴并不断地振摇, 控制反应温度在 20°C 以下, 必要时可用冰水浴冷却, 密闭室温下放置四小时, 过滤, 滤液中加入 20 ml 氯仿, 振摇混匀, 用冰水洗涤三次, 每次约 10 ml, 再用饱和 NaHCO_3 水溶液洗三次, 水层和 NaHCO_3 水溶液用少量氯仿反提一次, 合并氯仿层, 加无水硫酸钠脱水后减压蒸去氯仿得到糖浆状物质, 加入等量的乙醚, 搅拌, 立即有白色沉淀产生再在 0°C 以下放置 24 hr, 抽滤得白色粉状结晶, mp. 80~83°C (文献为 83~84°C), 秤重 4.13 g、收率 79% (文献为 76%)。

(3) 3-乙氧甲酰基-伞形酮 (II) 的制备^{[5][6]}

将 25 ml 丙二酸二乙酯、15.2 g 2,4-二羟基苯甲醛、1.2 ml 醋酸、30 ml 苯、12 滴哌啶置于 100 ml 圆底烧瓶中, 安装冷凝管及油水分离器, 在磷酸浴上加热回流, 约五个半小时, 冷却后静置过夜, 抽滤得淡黄色粉末状固体, 用 95% 乙醇重结晶一次得淡黄色针状结晶, mp. 166~168°C, 秤重 6.2g, 产率 24%。

IR(KBr) cm^{-1} : 3550 (OH 游离), 3100 (OH, 氢键), 1740 (C=O, α 、 β 不饱和和内酯), 1700 (C=O, 1620、1560、1505 (苯环 C=C 骨架伸缩), 1220, 1120 (C-O-C), 850、800、(苯环 1、2、4 取代), 1445、1380 (乙基 C-H)。¹HNMR (DMSO- d_6) δ ppm: 1.1—1.3(t)- CH_3 , 4.1—4.3 (q)- CH_2 , 6.6 (q) H^5 , 6.8 (d) H^6 , 7.5—7.6 (d) H^4 , 8.5(s) H^8 。

(4) 四乙酰半乳糖苷——3-乙氧甲酰基-伞形酮的制备^[7]

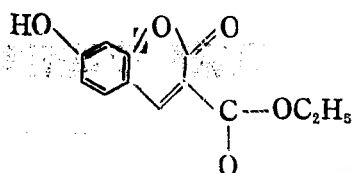
将2.5 g α -溴代四乙酰半乳糖和1.8 g 3-乙氧基甲酰基伞形酮溶于50 ml 丙酮中, 逐滴加入12.5 ml 的1M NaOH液, 室温放置20 hr, 在通风柜中挥去丙酮, 加入100 ml 氯仿使糖浆状物溶解, 分出氯仿层, 用5% NaOH液洗涤三次, 再用蒸馏水洗涤二次, 氯仿层用无水硫酸钠脱水, 减压蒸去氯仿, 得淡黄色糖浆状物质, 加入50%乙醇20 ml并不断用玻棒搅拌和磨擦直至糖浆状物转变为固体静置约四小时, 抽滤得淡黄色固体, 用50%乙醇重结晶得白色细针状结晶, 抽滤, 干燥, mp. 155°~156°C, 称重1.2 g, 产率35%, IR(KBr)cm⁻¹: 1750 (C=O不饱和和内酯), 1700 (C=O), 1620、1560、1500 (苯环C=C骨架伸缩), 1430、1375 (C-H 乙基), 1210、1080 (C-O-C)。

(5) β -(3-羧基伞形酮)-D-半乳糖苷钾盐(Ⅲ)的制备^{[6][7]}

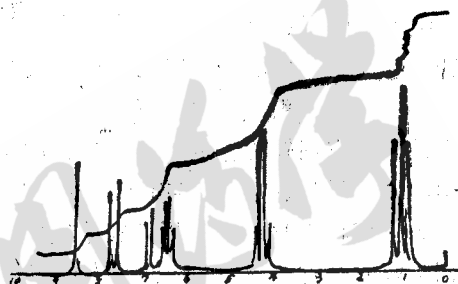
称取1.0 g 四乙酰半乳糖苷-3-乙氧基甲酰伞形酮并混悬于3 ml 无水甲醇中, 逐滴加入2.5% KOH/无水甲醇4 ml并不断振摇, 完全溶解后放置24 hr, 析出黄色沉淀, 抽滤后, 干燥。用水-丙酮重结晶二次得淡绿色粉末状固体。mp. 257—261°C (分解), 称重, 得0.2 g, 产率28%

IR (KBr) cm⁻¹: 3300(OH), 1700 (不饱和和内酯C=O), 1585、1395 (C-O, 羧

酸盐C=O的非对称振动), 1620、1560、1500 (苯环C=C骨架伸缩), 1100 (仲醇C-O), 1050(伯醇C-O)。



的 NMR



参 考 文 献

- [1] 南京药学院药分教研室编:《体内药物分析》
- [2] Arthur C. Cope et al., J. Amer. chem. soc. (1941) 63, 3452—3456
- [3] 《实用有机化学手册》上海科学技术出版社, P325
- [4] 张维杰主编:《复合多糖生化研究技术》P203
- [5] M. Barczai-Martos, F. Körösy, Nature. (1950) No. 4192, 369
- [6] John. F. Burd et al., Clin. Chem. (1977) 23 (8) 1402—1408
- [7] J. W. Woollen et al., Clin. Chim. Acta, (1965) 12. 647—658

Synthesis of the Precursor of Drug/Fluorescent Dye Conjugate-Potassium Salt of β -[7(3-Carboxycoumarinoxy)] D-Galactoside

Sun Tinghui Luo Wenying Bao Xiaochun Liu Zhiqiang
(School of Pharmacy, Zhejiang Medical University. Hangzhou, 310006)

Abstract

In this paper, we described the synthesis of a precursor of the drug/fluorescent dye conjugate-potassium salt of β -[7(3-Carboxycoumarinoxy)] D-galactoside. Raw material, D-galactose was acetylated and brominated to form α -bromo-tetraacetyl galactose (I); another starting material, 2,4 dihydroxybenzaldehyde underwent a Knoevenagel condensation with diethylmalonate in acetic acid and a catalyst-piperidine forming 3-carboethoxy-7-hydroxycoumarin (II). The final product, Potassium salt of β -[7(3-Carboxycoumarinoxy)]-D-galactoside was prepared by a conjugation of (I) and (II) and followed by the deacetylation of its intermediate.