·研究报告·

正交设计法优化新型氮唑类抗真菌化合物关键中间体的合成工艺

吴俊琪[a]，叶小飞[b]，黄　蕾[a]，柴晓云[a]，金永生[a]，俞世冲[a]（第二军医大学，a.药学院有机化学教研室；b.卫勤系卫生统计学教研室，上海 200433）

［摘要］ **目的**　优化新型氮唑类抗真菌化合物关键中间体的合成工艺。**方法**　采用正交设计法，重点考察反应温度、投料比、反应时间及溶剂 4 个因素对收率的影响。**结果**　反应温度对反应收率的影响最为显著，其次是反应时间；投料比及溶剂对收率影响不明显。**结论**　新工艺的收率可达 50% 左右，反应杂质少，后处理简便。

［关键词］ 正交设计；氮唑类；抗真菌；合成
［中图分类号］ O621.3　［文献标志码］ A　［文章编号］ 1006-0111(2016)02-0171-03
［DOI］ 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.018

Orthogonal design optimization in synthesis of novel triazole antifungal compounds as key intermediates

WU Junqi[a], YE Xiaofei[b], HUANG Lei[a], CHAI Xiaoyun[a], JIN Yongsheng[a], YU Shichong[a] (a. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, b. Department of Medical Statistics, Faculty of Health Service, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

［**Abstract**］ **Objective**　To optimize novel triazole antifungal compounds synthesis of key intermediates. **Methods**　The orthogonal experimental design is used, emphasizing on four factors including the reaction temperature, the weight ratio of material, reaction time and solvent on the yield. **Results**　The effect of reaction temperature on the reaction yield is the most significant, followed by reaction time; the weight ratio of material and solvent on the yield impact is not obvious. **Conclusion**　The new technology has several advantages and yields up to about 50%, less reactive impurities, easy post processing.

［**Key words**］ orthogonal experimental design; triazole compounds; antifungal; synthesis

伏立康唑（voriconazole）是一种新型的三唑类抗真菌药物[1]，具有抗菌谱广、抗菌效力强的特点[2]，尤其对于侵袭性曲霉菌浸润感染疗效好，用于侵袭性曲霉病、波伊德假霉样真菌及足放线病菌属感染、镰刀菌属感染的治疗[3,4]。目标化合物 **3** 是合成伏立康唑衍生物的关键中间体。目标化合物的常规方案收率低[5]、合成困难。本研究旨在利用正交设计法优化其合成工艺，以期提高收率。

1　实验部分

目标化合物 **3** 参照文献[6,7]方法制备（图 1），所用试剂皆为市售分析纯。

1.1　正交试验设计　为了确定目标产物的最佳反应条件，采用正交试验设计对该反应进行优选。根据文献[2]，重点测试了反应温度（A）、反应中原料和异丙胺的投料比（X：Y，B）、反应时间（C）以及溶剂（D）4 个因素对收率的影响，每个因素各取 3 个水平（表 1）。

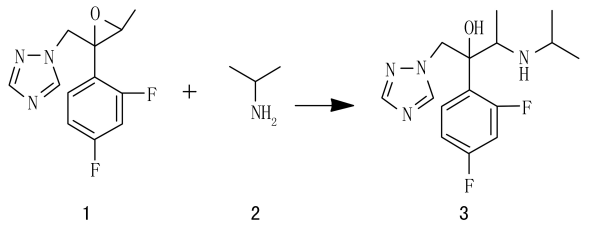

图 1　目标化合物 3 的合成路线

1.2　目标化合物 **3** 的制备　称取 X mol (2*R*, 3*S*)-2-(2,4-二氟苯基)-3-甲基-[(1*H*-1,2,4-三氮唑-1-基)甲基]环氧乙烷，加入圆底烧瓶，加入 Y mol 异丙胺、2X mol $Ti(O\text{-}isoPr)_4$ 和溶剂（D）适量，加热搅拌至一定温度（A），反应一定时间（C）。反应结束后，减压蒸干溶剂，用二氯甲烷将其溶解，并加入适

［基金项目］ 第二军医大学本科学员创新实践能力孵化基地项目（2015YJ-06）
［作者简介］ 吴俊琪，本科生. E-mail：wujq0724@163.com
［通讯作者］ 俞世冲，副教授. 研究方向：抗真菌药物研究. Tel：(021)81871228-17；E-mail：yuscc1008@163.com

表 1　正交试验设计因素水平表

水平	A 因素（t/℃）	B 因素（投料比 X∶Y）	C 因素（t/h）	D 因素（溶剂）
1	25	1∶2	1	乙腈
2	95	1∶3	5	异丙醇
3	120	1∶4	9	乙醇

量水搅拌至产生乳状沉淀后，抽滤得滤液。滤液分层，有机层用饱和 NaCl 溶液洗数次，后加入适量的 1 mol/L 盐酸，并分离得到水层和有机层。有机层用无水硫酸钠除水后蒸干，可回收得原料；向水层加入适量碳酸钠至溶液呈中性，以二氯甲烷萃取后得有机层，用无水硫酸钠除水后蒸干，可得淡黄色产物。

2　结果与讨论

2.1　结果　将表 1 按 $L_9(3^4)$正交表所列条件重复进行 3 次平行试验[7]，收率取平均值。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，所以采用常规方法，将离差平方和中的最小项作为误差的估计，用以计算各因子列的 F 比值[9]，方差分析结果见表 3。

表 2　正交试验结果及极差分析

No.	A	B	C	D	收率(%)
1	1	1	1	1	6.60
2	1	2	2	2	6.40
3	1	3	3	3	8.70
4	2	1	2	3	13.26
5	2	2	3	1	15.78
6	2	3	1	2	7.00
7	3	1	3	2	48.40
8	3	2	1	3	11.50
9	3	3	2	1	29.30
$K1$	21.70	68.26	25.10	51.68	
$K2$	36.04	33.68	48.96	61.80	
$K3$	89.20	45.00	72.88	33.46	
$k1$	7.23	22.75	8.37	17.23	
$k2$	12.01	11.23	16.32	20.60	
$k3$	29.73	15.00	24.29	11.15	
R	22.50	11.53	15.93	9.45	

2.2　讨论　温度(A)的影响：方差分析结果表明，温度对收率的影响十分显著。当温度为 25 ℃时，收率低，温度为 120 ℃(封管加热)时，收率大幅提高。但如果温度继续上升，易导致化合物分解，综合考虑多方因素，优选封管 120 ℃加热。

投料比(B)的影响：原料与异丙胺的投料比对反应收率影响相对较小。反应收率随投料比的增大呈先降后升，该现象是其受其他因素影响所致。

表 3　方差分析结果

方差	离均差平方和(SS)	自由度(DF)	均方(MS)	F	P
A	877.53	2	438.77	7.00	＜0.05
B	196.67	2	98.34	1.57	＞0.05
C	367.94	2	183.97	2.93	＞0.05
D	125.41	2	62.70	1.00	＞0.05
误差	125.41	2	62.70		
总的变异	1 567.55	8			

注：$F_{0.05}(2,4)=6.94$

反应时间(C)的影响：反应时间对反应收率的影响较大，随着反应时间的延长，收率有不断升高的趋势。从反应过程来看，过长的反应时间会导致反应液在薄层色谱检测中显示杂质增多。因此，C_2(5 h)为适宜条件。

溶剂(D)的影响：极差分析表明，溶剂对反应收率的影响最小。3 种溶剂收率略有差别，选用异丙醇作为溶剂的收率最高。

合成反应条件的优化结果：正交试验分析结果表明，各因素对目标产物收率的影响按 A＞C＞B＞D 顺序递减，A 因素对收率的影响特别显著，B、D 因素影响不显著。因此，该合成反应的最佳条件为 $A_3C_2B_1D_2$。从结果来看，收率仍未达到理想目标，需寻找其他方法改进，如选用更优的反应促进剂等。

2.3　小结　以本研究确定的条件合成目标化合物 **3**，可达到 48.4% 的收率，但仍需另辟蹊径以不断提高收率。新工艺反应后处理方式简便，并可回收原料，同时减少了环境污染，降低了成本，产物提纯方法简便，利于进行下一步衍生物的合成。

【参考文献】

[1] 徐　波，蒋　琰，张万年，等. 抗真菌药物靶标及其抑制剂的研究进展[J]. 药学实践杂志，2013，31(5)：321-325.

[2] Pemán J, Salavert M, Cantón E, *et al*. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections [J]. Therapeut Clinic Risk Manag, 2006, 2(2): 129.

[3] 倪生良，沈荣明，夏　平，等. 三唑类抗真菌药物伏立康唑的合成[J]. 精细石油化工，2006，23(4)：33-36.

[4] Miller JL, Schell WA, Wills EA, *et al*. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the new triazole albaconazole against *Cryptococcus neoformans*[J]. Antimicrob Agent Chemother, 2004, 48(2): 384-387.

[5] Yu S, Wang L, Wang Y, *et al*. Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives containing 1, 2, 3-triazole group [J]. RSC Adv, 2013, 3(3), 13486-13490.

[6] Ichikawa T, Yamada M, Yamaguchi M, *et al*. Optically active antifungal azoles. XIII. Synthesis of Stereoisomers and Metabolites of 1-[(1R, 2R)-2-(2, 4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1, 2, 4-triazol-1-yl) propyl]-3-[4-(1H-1-tetrazolyl) phenyl]-2-imidazolidinone (TAK-456)[J]. Chemic Pharmaceut Bull, 2001, 49(9): 1110-1119.

[7] Cao X, Sun Z, Cao Y, *et al*. Design, synthesis, and structure activity relationship studies of novel fused heterocycles-linked triazoles with good activity and water solubility [J]. J Med Chem, 2014, 57(9): 3687-3706.

[8] 梁文杰,钟　宏,何谋海. 乙氧基羰基异硫氰酸酯的合成工艺[J]. 化工进展,2011, 30(S1):610-612.

[9] 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**] 2015-11-20　[**修回日期**] 2015-12-30
[**本文编辑**] 李睿旻

(上接第 118 页)

[3] Romani L, Zelante T, Palmieri M, *et al*. The cross-talk between opportunistic fungi and the mammalian host via microbiota's metabolism[J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(2): 163-171.

[4] Mallick EM, Bennett RJ. Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003661.

[5] Staniszewska M, Bondaryk M, Pilat J, *et al*. Virulence factors of *Candida albicans*[J]. Przegl Epidemiol, 2012, 66(4): 629-633.

[6] Zhu W, Filler S G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(3): 273-282.

[7] Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(4): 176-180.

[8] Sun N, Fonzi W, Chen H, *et al*. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 532-542.

[9] Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance[J]. Front Pharmacol, 2014, 5:202.

[10] Ene IV, Adya AK, Wehmeier S, *et al*. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen[J]. Cell Microbiol, 2012, 14(9): 1319-1335.

[11] Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence[J]. Nature, 2001, 412(6842): 83-86.

[12] Cheah HL, Lim V, Sandai D. Inhibitors of the glyoxylate cycle enzyme ICL1 in *Candida albicans* for potential use as antifungal agents[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95951.

[13] Kemsawasd V, Viana T, Ardo Y, *et al*. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015.

[14] Gagiano M, Bauer F-F, Pretorius IS. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae[J]. FEMS Yeast Res, 2002, 2(4): 433-470.

[15] Buu LM, Chen YC. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*[J]. J Biomed Sci, 2014, 21: 22.

[16] Han TL, Cannon RD, Villas-B? as S-G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing[J]. Fungal Genet Biol, 2011, 48(8): 747-763.

[17] Brown AJ, Brown GD, Netea MG, *et al*. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(11): 614-622.

[18] Vieira N, Casal M, Johansson B, *et al*. Functional specialization and differential regulation of short-chain carboxylic acid transporters in the pathogen *Candida albicans*[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(6): 1337-1354.

[19] Kitahara N, Morisaka H, Aoki W, *et al*. Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation [J]. Amb Express, 2015, 5(1): 127.

[20] Ramirez MA, Lorenz MC. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes[J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(2): 280-290.

[21] Sellam A, van het Hoog M, Tebbji F, *et al*. Modeling the transcriptional regulatory network that controls the early hypoxic response in *Candida albicans*[J]. Eukaryot Cell, 2014, 13(5): 675-690.

[22] Dunkel N, Biswas K, Hiller E, *et al*. Control of morphogenesis, protease secretion and gene expression in *Candida albicans* by the preferred nitrogen source ammonium[J]. Microbiology, 2014, 160(Pt 8): 1599-1608.

[23] Ramachandra S, Linde J, Brock M, *et al*. Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans*[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92734.

[24] Yan L, Zhang JD, Cao YB, *et al*. Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain[J]. J Proteome Res, 2007, 6(6): 2248-2256.

[25] Xu Y, Sheng F, Zhao J, *et al*. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates[J]. Arch Microbiol, 2015.

[**收稿日期**] 2015-08-23　[**修回日期**] 2015-09-29
[**本文编辑**] 李睿旻