

绿色化学导向的一步法贝诺酯合成工艺研究及其体内动态评价

李炳良¹, 韩玉莹¹, 李典阳¹, 刘丹丹^{1,2,*}, 尚文斌^{1,2,*}

¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500

²昆明医科大学现代生物医药产业学院, 昆明 650500

摘要: 现行教材中贝诺酯的合成基于Schotten-Baumann酯化反应, 实验试剂SOCl₂会转化生成HCl和SO₂, 环境友好性低, 且实验步骤多。本改进实验利用碳二酰亚胺/4-DMAP缩合酯化反应一步合成贝诺酯, 通过熔点测定、NMR、HPLC-MS等产品进行结构表征与纯度测定, 并进行基于大鼠血浆和胆汁的体内动态分析。同时验证了药物设计拼合原理, 改进后的方法绿色高效, 安全性明显提高。

关键词: 贝诺酯; 一步合成; 碳二酰亚胺; 体内分析; 拼合原理

中图分类号: G64; O6

One-Step Synthesis of Benorilate Guided by Green Chemistry Principles and *in vivo* Dynamic Evaluation

Bingliang Li¹, Yuying Han¹, Dianyang Li¹, Dandan Liu^{1,2,*}, Wenbin Shang^{1,2,*}

¹ School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

² College of Modern Biomedical Industry, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

Abstract: The current synthesis of benorilate typically involves the Schotten-Baumann esterification, which generates harmful gases HCl and SO₂ from the reagent SOCl₂, posing environmental concerns. Moreover, the process entails multiple steps. In this study, we have optimized a one-step method using EDCI/4-DMAP esterification for the synthesis of benorilate. The product's structure and purity were characterized through melting point determination, NMR, and HPLC-MS analysis, followed by *in vivo* dynamic evaluation in rats based on plasma and bile samples. This evaluation confirmed the principles of drug design. The improved method not only enhances efficiency but also significantly improves experimental safety.

Key Words: Benorilate; One-step synthesis; EDCI; *In vivo* analysis; Combination principles

1 引言

贝诺酯^[1] (Benorilate)又名扑炎痛, 化学名为2-(乙酰氧基)苯甲酸-4'-(乙酰氨基)苯酯, 是乙酰水杨酸与对乙酰氨基酚经结构拼合形成的孪药, 既保留了两者的原有作用, 也兼有协同作用。具有对胃刺激性小、毒性低和作用时间长等特点, 临床上主要用于解热、镇痛和抗炎。在本科生药物化学、有机化学实验课程教学中是经典的实验教学内容之一^[2-5]。但是, 目前的实验教材中所涉及的贝诺酯合成方法皆基于经典的Schotten-Baumann酯化反应原理, 反应试剂SOCl₂是危险化学品, 实验过程会

收稿: 2023-11-21; 录用: 2024-01-05; 网络发表: 2024-04-07

*通讯作者, Emails: shangwenbin@kmmu.edu.cn (尚文斌); liudandan@kmmu.edu.cn (刘丹丹)

基金资助: 国家自然科学基金地区基金(22367018); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项面上基金资助项目(202201AY070001-005); 云南省科技厅基础研究专项青年项目(202201AU070135)

产生有害气体HCl和SO₂，并且该过程涉及三步转化反应，步骤多，实验耗时长。因此，贝诺酯的合成方法有进一步提升改进的空间^[6]。

近年来，缩合剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI)被广泛应用于酯键和酰胺键的构建，具有反应速度快、产率高、副反应少的特点。经合成工艺优化，本改进实验以乙酰水杨酸和对乙酰氨基酚为原料，在EDCI/4-DMAP条件下一步法合成得到贝诺酯^[7] (图1)。

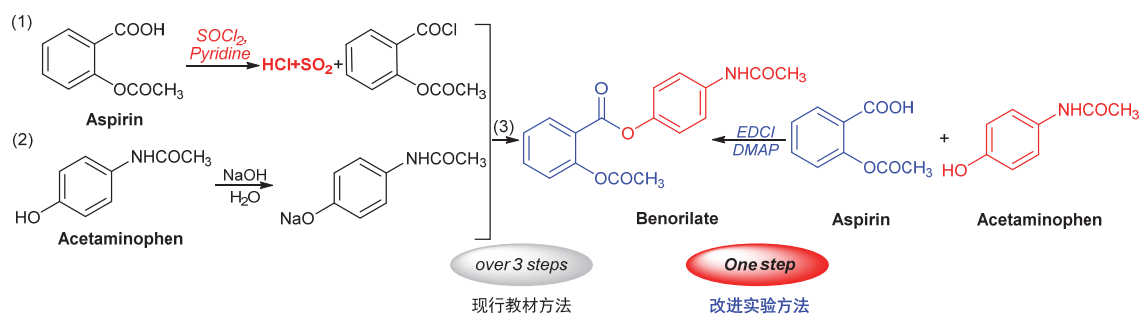


图1 现行教材方法与改进实验方法

2 实验部分

2.1 实验原理

拼合原理^[1,8] (图2)是药物设计中的常用策略之一，主要是指通过将两种药物的药效团结构拼合在一个分子内，或将两者的药效基团兼容在一个分子中，新形成的分子或兼具两者的性质，强化药理作用，减小各自相应的不良反应；或使两者取长补短，发挥各自的药理活性，协同完成治疗过程。如非甾体抗炎药贝诺酯即是利用拼合原理设计得到的药物，将乙酰水杨酸与对乙酰氨基酚通过酯键链接形成贝诺酯，在体内经分解重新生成原来的两个母体药物，兼顾乙酰水杨酸的解热镇痛抗炎药效和对乙酰氨基酚的解热镇痛药效，共同发挥解热镇痛抗炎作用，且贝诺酯的不良反应较小，适合老人和儿童使用。

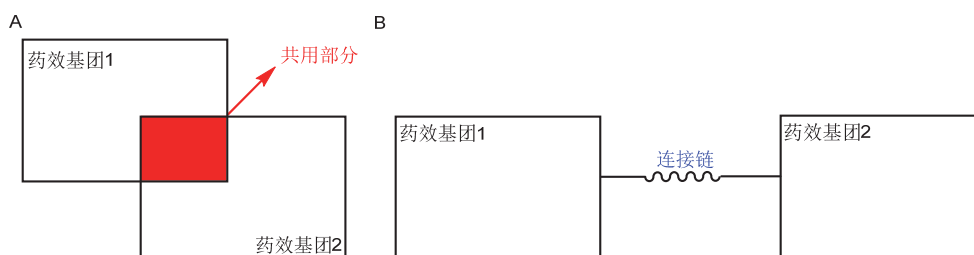


图2 药物设计拼合原理

本文以乙酰水杨酸、对乙酰氨基酚为原料，拟利用一步法制备合成贝诺酯。通过对Mitsunobu反应和碳二酰亚胺缩合酯化反应的研究，最终筛选得到了一种基于碳二酰亚胺EDCI和催化剂4-DMAP(4-二甲氨基吡啶)的缩合酯化反应体系^[9]。

利用碳二酰亚胺类缩合剂制备酯类和酰胺在有机合成中应用极为广泛^[10]，常用的催化剂有*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)和EDCI，使用该类缩合剂时一般需要加入酰类催化剂，如4-二甲氨基吡啶(4-DMAP)，其反应机理是缩合剂先与羧酸形成活性酯S₁，再与4-DMAP作用生成*N*-酰基二氢吡啶活性中间体S₂，从而增强酰化反应活性，最后形成酯化产物S，具体反应与历程如图3所示。该方法较传统方法而言，无危险化学品的使用，亦无有害产物生成，反应条件温和、耗时短、过程易控且产物易分离纯化。

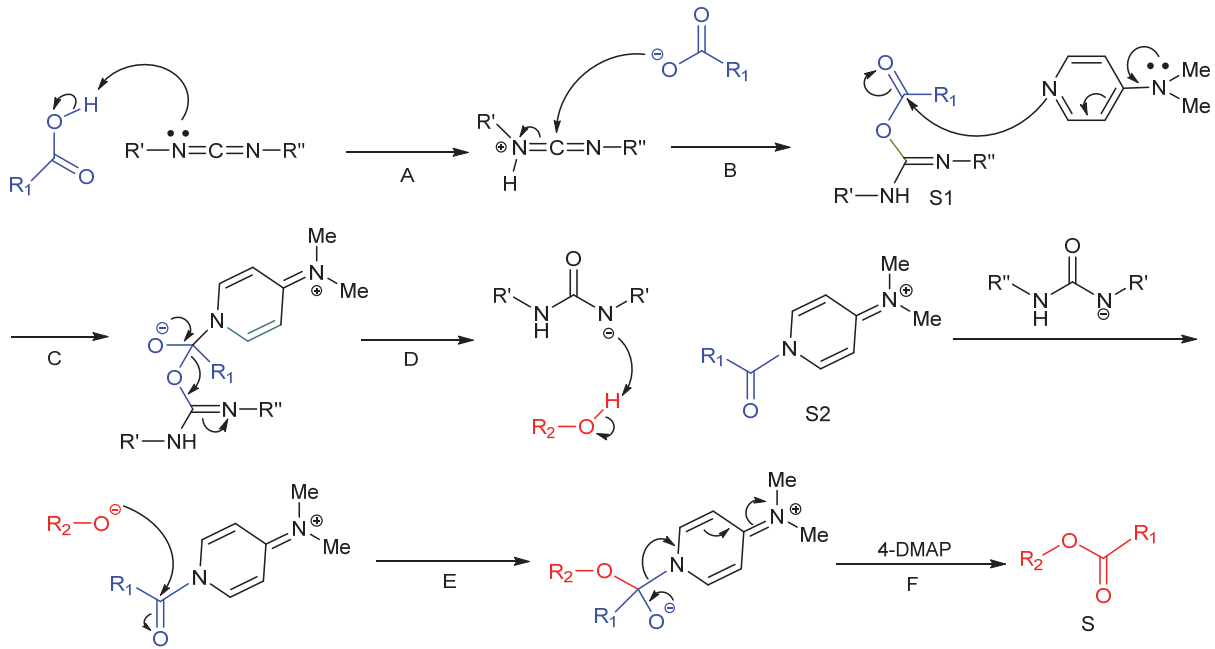


图3 碳二酰亚胺缩合酯化反应机理

2.2 试剂或材料

本实验所用试剂材料与实验动物见表1与表2。

表1 试剂与材料

| 主要试剂名称及缩略语 | 纯度 | 制造商 |
|------------------------------------|-------|-------------|
| 乙酰水杨酸 | 99% | Adamas (上海) |
| 对乙酰氨基酚 | 99%+ | Adamas (上海) |
| 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCl) | 99% | 安耐吉化学(安徽) |
| <i>N,N'</i> -二环己基碳二亚胺(DCC) | 99% | 上海思域化工科技 |
| 4-吡咯烷基吡啶(4-PPY) | 99% | 安耐吉化学(安徽) |
| 4-二甲氨基吡啶(4-DMAP) | 99% | 安耐吉化学(安徽) |
| 四氢呋喃(THF) | 99.5% | 安徽泽生科技 |
| 三苯基膦(PPh_3) | 98% | 萨恩化学技术(上海) |
| 偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD) | 97% | 安徽泽生科技 |

表2 实验动物

| 组别 | 检测时间 | 实验SD大鼠数量/只(平行各三组) | 组别 | 检测时间 | 实验SD大鼠数量/只(平行各三组) |
|-----|-------|-------------------|-----|-------|-------------------|
| 实验组 | 0-1 h | 3 | 实验组 | 5-6 h | 3 |
| | 1-2 h | 3 | | 6-7 h | 3 |
| | 2-3 h | 3 | | 7-8 h | 3 |
| | 3-4 h | 3 | 空白组 | 0-1 h | 1 |
| | 4-5 h | 3 | | 4-5 h | 3 |

体内动态分析受试动物：SD雄性大鼠 200 ± 10 g。体内动态分析受试药：取50 mg贝诺酯溶于0.8 mL DMSO溶液中制为饱和溶液。

贝诺酯大鼠口服 LD_{50} 值 = $10000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药量 = 体重200 g大鼠口服贝诺酯 LD_{50} 值 $\times 1/40$ 。麻醉用药：戊巴比妥钠。

2.3 实验仪器及用途

本实验所用实验仪器见表3。

表3 实验仪器

| 仪器型号 | 用途 | 制造商 |
|-------------------|----------|--------------|
| MS7-H550-Pro磁力搅拌器 | 有机合成 | 北京大龙兴创实验仪器股份 |
| 旋转蒸发仪 | 减压蒸馏浓缩 | 日本东京理化 |
| SHZ-D循环水式真空泵 | 减压 | 巩义市予华仪器 |
| 600M Hz超导核磁共振波谱仪 | 核磁共振氢谱测定 | 德国Bruker |
| 四极杆(Q-TOF)液质联用系统 | 体内动态评价 | 美国安捷伦 |
| 双目镜显微熔点测定仪 | 熔点测定 | 巩义市科瑞仪器 |

2.4 实验步骤方法

2.4.1 合成工艺研究

(1) Mitsunobu反应—— PPh_3/DIAD 反应体系(图4): 本研究首先利用Mitsunobu反应实现了一步法合成贝诺酯,但在乙酰水杨酸为1.80 g (10.0 mmol) 规模的反应中,反应时常需12 h,同时产物中有三苯基氧磷生成,难以通过重结晶纯化产物。若采用硅胶柱层析分离,则耗时长、成本高,教学可行性低,因而不考虑应用于实验教学环节^[11]。

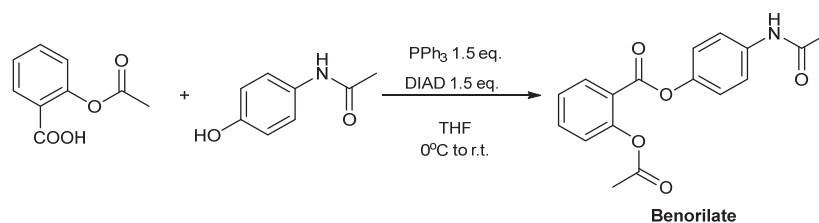


图4 Mitsunobu反应

(2) 碳二酰亚胺缩合酯化(图5)条件筛选^[12-14]: 本研究在原料乙酰水杨酸1.80 g (10.0 mmol)和对乙酰氨基酚1.81 g (12.0 mmol)规模的反应中考察了缩合剂DCC与EDCI (12.0 mmol)、催化剂4-DMAP与4-PPY (0.5 mmol)、溶剂丙酮与二氯甲烷(30 mL) (室温条件反应2 h)等对反应的影响,利用重结晶法纯化产品,综合评价产率 and 产品纯度(参考2020版中国药典),筛选得到EDCI/DMAP反应体系(表4)。

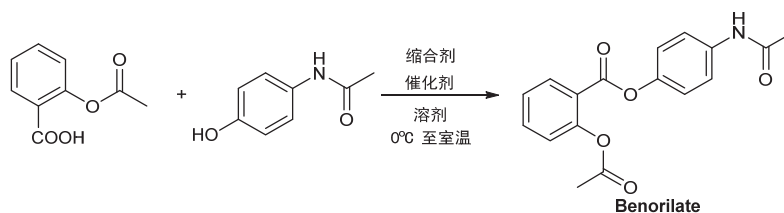


图5 碳二酰亚胺缩合酯化反应通式

表4 反应条件筛选

| 缩合剂 | 催化剂 | 溶剂 | 分离产率 | 纯度(HPLC) | 缩合剂 | 催化剂 | 溶剂 | 分离产率 | 纯度(HPLC) |
|-----|--------|---------|-------|----------|-----------------|---------------|----------------|--------------|-------------------|
| DCC | 4-DMAP | DCM | 38.5% | < 95% | EDCI·HCl | 4-DMAP | DCM | 52.7% | > 95% |
| DCC | 4-PPY | DCM | 43.2% | < 95% | EDCI·HCl | 4-PPY | DCM | 49.5% | > 95% |
| DCC | 4-DMAP | Acetone | 45.5% | < 95% | EDCI·HCl | 4-DMAP | Acetone | 53.5% | > 99.5% |
| DCC | 4-PPY | Acetone | 48.7% | < 95% | EDCI·HCl | 4-PPY | Acetone | 50.6% | > 99.5% |

实验操作过程：精确称取1.80 g (10.0 mmol, 1.0 equiv.)乙酰水杨酸与1.81 g (12.0 mmol, 1.2 equiv.)对乙酰氨基酚，转入配有磁力搅拌子的100 mL单颈圆底烧瓶中，加入30 mL丙酮溶解，冰水浴下搅拌。然后在5 min内分批次缓慢地加入2.29 g (12.0 mmol, 1.2 equiv.) EDCI·HCl和61 mg (5 mmol, 0.05 equiv) 4-DMAP，撤去冰水浴，室温下继续搅拌。反应过程通过TLC监测，1.5 h后，原料乙酰水杨酸消耗完全。将反应液转入250 mL分液漏斗中，并加入50 mL乙酸乙酯。加入30 mL浓度为1 mol·L⁻¹的盐酸溶液进行洗涤，重复该操作两次，然后加入30 mL浓度为1 mol·L⁻¹的NaOH溶液进行洗涤，重复该操作两次，再加入30 mL的饱和食盐水洗涤一次，后将上层有机相转入150 mL锥形瓶中。称取适量无水硫酸钠加入锥形瓶中，静置10 min，过滤，滤液通过减压蒸馏后得到白色固体2.20 g。将粗品转入250 mL圆底烧瓶中，用60 mL无水乙醇充分溶解粗品，加入2颗沸石、200 mg活性炭，在油浴下加热煮沸10 min，用砂芯漏斗(垫硅藻土)趁热抽滤。滤液在冰水浴中静置30 min，使贝诺酯结晶析出完全，再次减压抽滤，收集滤饼固体，转入结晶皿，干燥，称量，产量1.67 g，产率53.5%。

基于以上实验结果基础，在原料乙酰水杨酸10.0、11.0或12.0 mmol规模的基础上，以产率为指标进一步筛选得到各反应物料的最佳用量(表5)。此外，在1.5 h基础上延长反应时间，或升高反应温度至40 °C甚至60 °C，产率皆无明显提高。

表5 物料用量

| 乙酰水杨酸 | 对乙酰氨基酚 | EDCI·HCl | 4-DMAP | 核磁产率* |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|-------|
| 1.0 eq. | 1.2 eq. | 1.2 eq. | 0.1 eq. | > 50% |
| 1.2 eq. | 1.0 eq. | 1.2 eq. | 0.1 eq. | < 50% |
| 1.0 eq. | 1.1 eq. | 1.2 eq. | 0.1 eq. | < 50% |
| 1.1 eq. | 1.0 eq. | 1.2 eq. | 0.1 eq. | < 50% |
| 1.0 eq. | 1.0 eq. | 1.0 eq. | 0.1 eq. | < 40% |
| 1.0 eq. | 1.1 eq. | 1.1 eq. | 0.08 eq. | < 50% |
| 1.0 eq. | 1.1 eq. | 1.1 eq. | 0.05 eq. | < 50% |
| 1.0 eq. | 1.2 eq. | 1.2 eq. | 0.05 eq. | > 50% |

*内标：二苯乙腈

2.4.2 纯度测定与结构表征

(1) 熔点：通过显微熔点测定仪测定。

(2) 核磁共振氢谱：由600 MHz超导核磁共振波谱仪测定。

(3) 样品纯度测定，参照中华人民共和国2020年药典第二部方法：由岛津 LC-2050C 3D CN型高效液相色谱仪测定。色谱条件：色谱柱材料为十八烷基硅烷键合硅胶(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流速：1.0 mL·min⁻¹；进样量：10 μL；检测波长：245 nm；柱温：35 °C；流动相：以水(用磷酸调节pH至3.5)-甲醇(体积比44 : 56)为流动相。使用前需超声脱气。

(4) 高分辨质谱：由Agilent 6540 Q-TOF型质谱测定。

2.4.3 体内动态分析^[15]

(1) 取血浆样品：将体重为200 ± 10 g的SD雄性大鼠禁食12 h后，实验组(分三组)灌胃给予0.8 mL的贝诺酯DMSO饱和溶液，经大鼠的肝门静脉分别采集1、2、3、4、6、8 h大鼠血液2–4 mL；空白组灌胃给予0.8 mL的DMSO饱和溶液，经大鼠的肝门静脉采集1 h大鼠血液2–4 mL，在转速为4000 r·min⁻¹下离心10 min后取其上清液为血浆。

(2) 取胆汁样品：将体重为200 ± 10 g的SD雄性大鼠禁食12 h后，实验组(分三组)灌胃给予0.8 mL的贝诺酯DMSO饱和溶液，经大鼠的胆总管采集0–1 h、1–2 h、2–3 h、3–4 h、4–5 h、5–6 h、6–7 h、7–8 h大鼠的胆汁0.5–1 mL。空白组灌胃给予0.8 mL的DMSO饱和溶液，经大鼠的胆总管采集0–1 h、

1–2 h、2–3 h、3–4 h、4–5 h、5–6 h、6–7 h、7–8 h大鼠的胆汁0.5–1.0 mL。

(3) 生物样品的前处理：分别取相应时间点的血浆100 μL 、胆汁样品100 μL ，加入色谱纯甲醇900 μL ，涡旋震荡2 min，转速为4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心10 min后去除蛋白，用1.0 mL的注射器吸取上清液，经过0.22 μm 的有机滤头过滤至进样瓶中。

(4) 质谱条件：生物样品经高效液相色谱系统洗脱分离后，洗脱物进入电喷雾离子化检测器(ESI)进行质谱分析，分子离子碎片设定为Q1扫描，扫描范围是正离子模式下质荷比(m/z) 50–1000 Da，干燥气流40.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ，干燥温度(Temperature, TEM) 200 $^{\circ}\text{C}$ ，离子源电压(Ion source, IS) 5000 V，布帘气(Curtain gas, CUR) 20 psi，喷雾气(Ion source gas 1, GS1) 50 psi，辅助加热气(Ion source gas 2, GS2) 50 psi，去簇电压(Declustering potential, DP) 40 V，入口电压(Entrance potential, EP) 10 V。质谱分子离子峰的抽提方式为：正离子模式下， $m\cdot z^{-1}$ ： $[\text{M} + \text{H}]^{+} \pm 0.5$ 。

(5) 色谱条件：如表6所示。

表6 体内动态分析色谱条件

| Time/min | Flow/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) | A ^a /% | B ^b /% |
|----------|--|-------------------|-------------------|
| 0.00 | 0.8 | 30 | 70 |
| 5.00 | 0.8 | 45 | 55 |
| 10.00 | 0.8 | 60 | 40 |
| 20.00 | 0.8 | 60 | 40 |
| 25.00 | 0.8 | 30 | 70 |

^a A相为含0.01%甲酸的甲醇溶液；^b B相为含0.01%甲酸的水溶液

3 结果与讨论

3.1 产品性状

产品为白色结晶性粉末；产量：1.67 g；产率：53.5%。

3.2 产物纯度测定与结构表征结果

HPLC纯度 > 99.5%。¹H NMR (600 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.05 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.76 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)。HRMS (ESI⁺) calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^{+}$ 336.0842, found 336.0843. m.p. = 178–180 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 体内动态评价结果

(1) 胆汁样品检测：在胆汁样品组中检测到贝诺酯代谢产物——对乙酰氨基酚($m/z = 152.1$)，其强度表如表7所示。

表7 胆汁UPLC-MS分析结果

| 时间 | 峰强度 | m/z |
|-------|-------------------|-------|
| 0–1 h | 2×10^6 | 152.2 |
| 1–2 h | 6×10^5 | 152.4 |
| 2–3 h | 1×10^6 | 152.1 |
| 3–4 h | 3×10^6 | 152.3 |
| 4–5 h | 1.5×10^6 | 152.2 |
| 5–6 h | 3×10^6 | 152.3 |
| 6–7 h | 2.9×10^6 | 152.3 |
| 7–8 h | 2.9×10^6 | 152.3 |

(2) 血浆样品检测：在血浆组样品检测到贝诺酯代谢产物——对乙酰氨基酚($m/z = 152.1$)，其强度如表8所示。

表8 血浆UPLC-MS分析结果

| 时间 | 峰强度 | m/z |
|-----|-------------------|-------|
| 1 h | 2×10^6 | 152.1 |
| 2 h | 1.5×10^6 | 152.3 |
| 3 h | 1.5×10^6 | 152.6 |
| 4 h | 1.5×10^6 | 152.2 |
| 6 h | 1.2×10^6 | 152.3 |
| 8 h | 6×10^5 | 152.2 |

结果分析：在血浆及胆汁1–8 h内明显检测到贝诺酯的代谢产物对乙酰氨基酚，血浆分析表明其在3 h前后达到血药浓度峰值，胆汁分析表明3 h后很难检测到对乙酰氨基酚，说明其在0–2 h内在肝脏中快速代谢转化。以上体内动态评价结果与贝诺酯药代动力学参数一致，说明贝诺酯在体内能够快速分解代谢，生成母药——水杨酸与对乙酰氨基酚，进一步验证了药物设计的拼合原理。

4 结语

本改进实验实现了贝诺酯的一步法高效绿色合成。与现行教材方法相比，本实验操作简单、条件温和、耗时短、重现性好，且避免了有毒与腐蚀性化学试剂的使用，充分体现了绿色化学的理念。此外，本实验通过拓展体内动态评价环节，直观反映了药物在机体内的代谢情况，进一步验证了药物设计拼合原理^[8]。本实验融合了有机化学、仪器分析等化学实验的基本操作与大型仪器表征的技能训练，使学生掌握药物分子结构的解析能力；通过HPLC方法测定药物纯度，提高学生对药品质量控制的认知。本实验中的各模块既有相关性又有独立性，可开展独立单元实验或拓展综合串联实验，具有较强的综合性和创新性，同时也在实验教学过程中开拓了学生们的视野，让学生对药物研发历程有了具体的认知，增强了学生们的学科自信和专业使命感。

5 创新性/特点/特色声明

- (1) 操作简单，重现性好，反应条件温和，教学可行性高。
- (2) 具有原子经济性，体现绿色化学理念。
- (3) 通过体内分析验证拼合原理，既可开展独立单元实验又可拓展综合串联实验。

参 考 文 献

- [1] Aronson, J. K. *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; p. 840.
- [2] 尤启冬. 药物化学实验与指导. 第2版. 北京: 中国医药科技出版社, 2021.
- [3] 马玉卓. 药物化学实验(双语版). 北京: 科学出版社, 2016.
- [4] 刘文娟, 康浩. 药物化学实验操作技术. 北京: 北京科学技术出版社, 2016.
- [5] 叶晓霞, 李校堃. 药物化学模块实验教程. 北京: 高等教育出版社, 2015.
- [6] Castiello, C.; Junghanns, P. *Green Chem.* **2023**, 25, 2109.
- [7] 刘改枝, 薛令平. 河南科学, **2018**, No. 36, 1362.
- [8] 刘刚. 药物化学与药物研发案例. 北京: 清华大学出版社, 2022.
- [9] Chan, L. C.; Cox, B. G. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8863.

- [10] Matsugi, M.; Hagimoto, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, 7, 583.
- [11] Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2551.
- [12] 杨晨, 黄晓程. *广东化工*, **2018**, No. 45, 11.
- [13] Procopio, D.; Siciliano, C. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, 20, 1137.
- [14] Chen, Z. G.; Tan, R. X. *Green Chem.* **2009**, 11, 1743.
- [15] 陈俊, 高杰. *中国药科大学学报*, **1995**, No. 26, 14.