

2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐的合成方法改进

张恩, 何慧丽, 任景丽, 宋菲, 黄荣梅, 杨东晓, 刘宏民

(郑州大学 药学院 新药研究开发中心 河南 郑州 450001)

摘要: 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(6)是用于细胞增殖和细胞毒性试验的CCK-8试剂盒的主要成分,该试剂盒具有操作方便、重复性好、灵敏度高等优点。改进了化合物(6)合成方法,使用N-溴代丁二酰亚胺(NBS)氧化甲胍(5)中间体,路线总收率34.4%。同时,利用高分辨质谱(HRMS)、核磁共振(NMR)、熔点测定、紫外光谱(UV)方法对目标产物(6)进行了结构验证。实验方法具有路线简单、操作安全、原料价廉易得等优点,并且后处理简单,适合工业生产。

关键词: 水溶性四氮唑; N-溴代丁二酰亚胺; 合成; 结构表征

中图分类号: O 621.3

文献标志码: A

文章编号: 1671-6841(2013)03-0094-04

DOI: 10.3969/j.issn/1671-6841.2013.03.022

0 引言

2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(6),亦称WST-8,是由日本同仁化学研究所研发的一种水溶性四氮唑盐类化合物^[1],主要用于细胞增殖、细胞毒性试验。市售Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒是一种以(6)为主成分的细胞活性检测剂,该试剂盒性状稳定、灵敏度高、对人体安全,经还原生成的甲胍水溶性好,使用方便,具有很大的应用价值^[2-3]。但是由于CCK-8昂贵的价格,国内研究机构常用廉价但是精确度相对不高的3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法测定细胞增殖和细胞毒性试验^[4-6]。因此研究WST-8的合成方法,并进一步开发、降低CCK-8试剂盒的价格对于药学研究具有显著的意义。国内外对WST-8的合成研究较少,文献[7-15]研究了(6)及其衍生物的合成方法和电化学性能。我们对四氮唑类化合物(6)的合成方法^[1,13]进行了优化,改进如下:(a)优化反应中间体甲胍(5)合成反应的后处理;(b)改进氧化甲胍的方法,使操作简单、安全。

我们研究了改进的化合物(6)的合成方法,并通过HRMS、NMR等仪器对目标产物进行了结构确证。合成路线如图1所示,以苯甲醛-2,4-二磺酸钠(1)和对硝基苯肼(2)作原料,甲醇作溶剂,生成苯肼(3);苯肼(3)与2-甲氧基-4-硝基重氮盐(4)在甲醇和水的混合试剂中反应,经处理得到甲胍(5);甲胍(5)经NBS氧化关环,重结晶得水溶性四氮唑(6),总收率34.4%。

1 实验部分

1.1 主要实验仪器与试剂

Bruker DPX400型核磁共振仪,TMS作内标;XT4A型显微数字熔点测定仪;OSB-2100型旋转蒸发仪;Shimadzu TCC-240A型紫外可见全波长扫描仪;JA2003N型电子分析天平;DZF-6020型真空干燥箱。

收稿日期:2013-05-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目,编号U1204206;教育部博士点新教师项目,编号20114101120013;中国博士后项目,编号20100480857,201104402。

作者简介:张恩(1982-),男,讲师,博士,主要从事药物合成新方法研究,E-mail:zhangen@zzu.edu.cn;通讯作者:刘宏民(1960-),男,教授,博士,主要从事抗肿瘤药物研究,E-mail:liuhm@zzu.edu.cn。

苯甲醛-2,4-二磺酸钠为工业品;其他试剂均为分析纯.

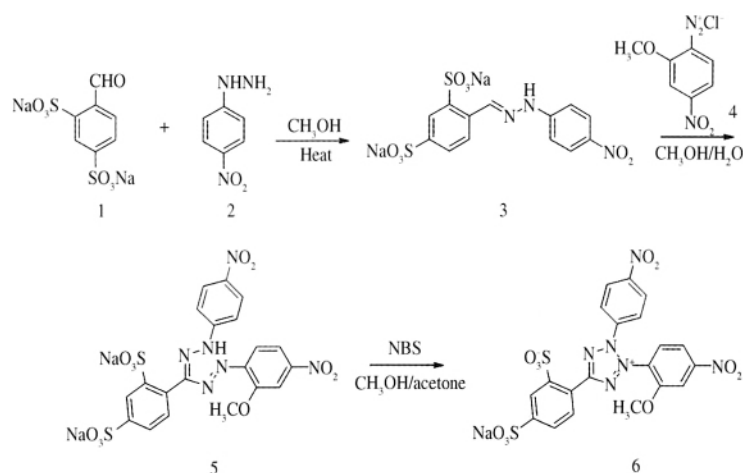


图1 水溶性四氮唑(6)合成路线

Fig. 1 Synthesis of WST-8 (6)

1.2 苯甲醛-2,4-二磺酸钠对硝基苯腙(3)的合成

取对硝基苯腙 1 (4.94 g, 32.2 mmol) 于 500 mL 三口瓶中, 加入甲醇 (150 mL), 加热回流搅拌至溶解. 冷却到 50 °C, 缓慢加入 2,4-二磺酸钠苯甲醛 (10.0 g, 32.2 mmol), 恒温 50 °C, 继续搅拌 3 h, 原料反应完全. 减压抽滤, 用甲醇 (20 mL) 洗涤, 真空干燥, 得橙红色固体粉末 2,4-二磺酸钠对硝基苯腙 (11.165 g, 25.1 mmol, 收率 78.0%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ_{H} : 8.32 (s, 1H), 8.06 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.80 (d, 2H, $J=9.3$ Hz), 7.66 (dd, 1H, $J=8.2$ Hz, $J=1.7$ Hz), 6.82 (d, 2H, $J=9.1$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ_{C} : 149.84, 142.13, 140.32, 138.99, 137.70, 134.29, 127.79, 126.87, 126.33, 124.23, 111.68.

1.3 2-甲氧基-4-硝基苯基重氮盐(4)的合成

取 2-甲氧基-4-硝基苯胺 (3.7 g, 22.0 mmol) 于 50 mL 单口瓶, 冰浴冷至 0 °C, 加入盐酸溶液 (37% 的浓盐酸 6.67 mL 加水稀释到 15 mL). 搅拌 5 min 后缓慢滴加 (1.64 g, 23.7 mmol) 亚硝酸钠水 (10 mL) 溶液中. 加毕, 继续搅拌 30 min, 即得重氮盐溶液. 备用 (即制即用).

1.4 甲胂(5)的合成

取 2,4-二磺酸钠对硝基苯腙 (10.0 g, 22.4 mmol) 于 500 mL 三口瓶, 加甲醇 (200 mL), 未全溶. 搅拌 5 min 后向其中边加 NaOH (3.6 g, 90.0 mmol) 的水溶液 (15 mL) 边加重氮盐 (4) 的溶液. 加毕, 冰浴搅拌 2 h, 室温搅拌 2 h, 此时反应体系为墨绿色. TLC 检测反应终点. 用稀盐酸溶液 (8 mL, 体积浓度 19%) 调至深红色. 蒸干溶剂, 加入乙酸乙酯 (200 mL) 超声, 减压抽滤, 得红棕色固体甲胂 (12.054 g, 19.3 mmol, 收率 86.2%); mp: >300 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ_{H} : 8.33 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 8.03~8.00 (m, 3H), 7.69 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J=13.9, 8.9$ Hz, 4H), 3.65 (s, 3H).

1.5 水溶性四氮唑(6)的合成

取甲胂 (12.054 g, 19.3 mmol) 于 500 mL 单口瓶, 加甲醇 (120 mL), 未全溶, 体系呈深红棕色. 搅拌 5 min 后加入 NBS (5.0 g, 28.1 mmol) 的丙酮溶液 (100 mL). 搅拌约 1 h, 颜色变浅, 继续搅拌直至反应体系呈黄色. 减压抽滤, 得黄绿色固体粉末 (9.07 g). 重结晶 (乙醇: 水 = 4:1), 真空干燥, 得浅黄色固体粉末四氮唑盐 (6.211 g, 9.9 mmol, 收率 51.6%); mp: >300 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ_{H} : 8.37 (d, 1H, $J=0.8$ Hz), 8.32 (d, 2H, $J=8.9$ Hz), 8.17 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 8.03~7.94 (m, 5H), 7.85 (s, 1H), 3.56 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ_{C} : 165.10, 153.11, 152.52, 150.49, 147.42, 144.37, 136.94, 133.34, 129.56, 128.41, 126.37, 125.91, 125.41, 124.87, 121.72, 117.07, 109.72, 57.30. HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{NaO}_{11}\text{S}_2$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 622.9879; found, 622.9876.

2 结果与讨论

2.1 设计路线的创新点分析

本路线与文献[1,13]报导的路线相比,有3个优点:

1) 甲贖(5)粗品通过乙酸乙酯处理后,性状从粘稠的固体变为颗粒状固体,利于抽滤及下一步反应操作.

2) 首次使用 N-溴代丁二酰亚胺(NBS)氧化来合成水溶性四氮唑,避免了使用亚硝酸异戊酯^[1]、氯气^[13]等毒性大、成本高的氧化剂.

3) 路线操作简便、安全,总收率 34.4%.

2.2 最大吸收波长分析

图2为水溶性四氮唑(6)与中间体甲贖(5)的紫外可见全波长扫描图,从图中可以看出,水溶性四氮唑(6)的最大吸收波长在260 nm,可见光区无吸收;中间体甲贤(5)的最大吸收波长在455 nm,紫外光区无吸收,与文献报道一致.

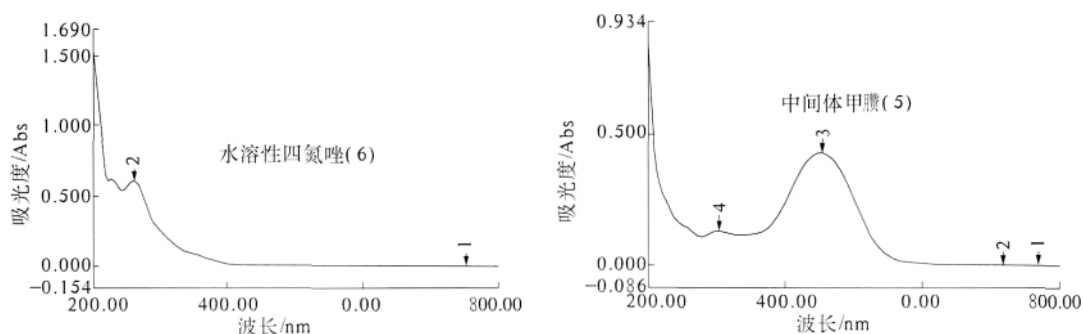


图2 水溶性四氮唑(6)和中间体甲贤(5)的紫外可见全波长扫描图

Fig. 2 UV-Vis spectrum of water-soluble tetrazolium salt (6) and intermediate formazan (5)

2.3 结构表征分析

通过 HRMS、NMR、熔点测定、UV 等方法对目标产物水溶性四氮唑(6)进行了结构确证,结果发现,与文献[1]报道一致.本文改进合成 WST-8 的方法,路线简单易操作,原料价廉易得,总收率高于文献值,具有开发应用价值.

参考文献:

- [1] Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, et al. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability [J]. *Talanta*, 1997, 44(7): 1299-1305.
- [2] 侯春梅,李新颖,叶伟亮,等. MTT法和CCK-8法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. *军事医学科学院院刊*, 2009, 33(4): 400-401.
- [3] 谢光洪,许远靖,田武林,等. β -HB对牛皱胃平滑肌细胞活性影响——MTT法和CCK-8法的比较研究[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(3): 436-438.
- [4] 孟志卿,鲜于梁燕,杨玲. 超声对体外培养大鼠血管平滑肌细胞增殖影响[J]. *信阳师范学院学报:自然科学版*, 2011, 24(2): 212-214.
- [5] 毛俐,刘丽敏,刘延成,等. 苦参碱Fe(III)化合物的合成和抗肿瘤活性[J]. *广西师范大学学报:自然科学版*, 2008, 26(2): 60-63.
- [6] 张雁冰,戴桂馥,侯立芬,等. 马桑叶中黄酮类化合物的生物活性研究[J]. *郑州大学学报:理学版*, 2009, 41(4): 62-66.
- [7] 谷保祥. 四氮唑类生物染色剂的合成研究[D]. 南京:东南大学,2006.
- [8] 谷保祥,王明亮. 氯化3-(1-萘基)-2,5-二苯基-2H-四唑鎓的制备[J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(1): 10-11.
- [9] 沈文广. 水溶性四氮唑盐的合成研究[D]. 南京:东南大学,2007.

- [10] 沈文广,王明亮,谷保祥. 一种水溶性四氮唑盐的合成[J]. 化学试剂,2007,29(2):107-108.
- [11] 陈财库. 手性樟脑衍生物的合成研究[D]. 南京:东南大学,2008.
- [12] 陈财库,王明亮. 四氮唑-*L*-樟脑磺酸盐的合成[J]. 化工时刊,2008,22(3):7-9.
- [13] 高卫民. 水溶性四氮唑盐类生物细胞活力检测剂的合成和性质研究[D]. 南京:东南大学,2008.
- [14] 高卫民,王明亮. 2-(对甲基苯基)-3-(对硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑单钠盐的合成与表征[J]. 化学试剂,2008,30(2):135-136.
- [15] 金诚,高卫民,王明亮,等. 2,3-双(4-甲基-2-磺基苯基)-5-膦基-2H-四唑单钠内盐的合成与电化学性能研究[J]. 化学试剂,2010,35(5):440-442.

An Improved Synthesis of Sodium 4-(3-(2-Methoxy-4-Nitrophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-Tetrazol-3-ium-5-yl) Benzene-1,3-Disulfonate

ZHANG En, HE Hui-li, REN Jing-li, SONG Fei, HUANG Rong-mei,
YANG Dong-xiao, LIU Hong-min

(New Drug Research & Development Center, School of Pharmaceutical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Sodium 4-(3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazol-3-ium-5-yl) benzene-1,3-disulfonate (WST-8) was the main component of cell counting kit-8 (CCK-8), which was used for cell proliferation and cell toxicity test. The kit had advantages of convenient operation, good repeatability and high sensitivity. (6) was synthesized by an improved method in 34.4% over yield. N-bromobutanamide (NBS) was used as oxidant for formazan (5) for the first time. Meanwhile, the structure of product (6) was verified by HRMS, NMR, melting point test and UV. The method was simple and easy to operate, thus it had good development and utilization value.

Key words: water-soluble tetrazolium salt; N-bromobutanamide; synthesis; structural characterization

(上接第80页)

The Study on Raman Spectrum of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neural Cells

ZHANG Xiao-li¹, LIU Lu², DIAO Zhen-qi¹, LI Yun-tao¹, XIONG Yang¹,
ZHANG Jian-min¹, TANG Wei-yue¹

(1. The College of Physics and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. The Nursing College, Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Isolated and cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were induced to differentiate into neural cells (NCs). The BMSCs and NCs were analyzed by the change of configuration, the relative content of nucleic acid, lipid and protein using laser Raman spectrometer. Significant difference in the average spectra of BMSCs and NCs was found: the peaks at 646 cm⁻¹ and 719 cm⁻¹ disappeared, and a new Raman peak at 1603 cm⁻¹ appeared in the NCs, attributed to the bending vibration of C—C of phenylalanine and tyrosine; the peak at 1738 cm⁻¹ shifted to 1746 cm⁻¹. These changes showed that Raman spectrum was expected to become a new method to identify BMSCs and NCs.

Key words: BMSCs; NCs; Raman spectra; differentiation