研究论文

环磷酰胺有关物质的合成

陈 成[1]，仲金璐[1]，程天星[1]，李 响[2]，程青芳[1]*

（1. 江苏海洋大学药学院，江苏连云港 222005；2. 连云港贵科药业有限公司，江苏连云港 222000）

摘要：为了控制环磷酰胺的质量，制备了 5 种有关物质：*N*,*N*- 双（2- 氯乙基）-*N*'-（3- 羟丙基）磷酸二酰胺酰氯（有关物质 A）、*N*,*N*- 双（2- 氯乙基）-*N*',*N*''- 双（3- 羟丙基）磷酸三酰胺（有关物质 B）、*N*,*N*- 双（2- 氯乙基）氨基氯磷酸（3- 氨基丙基）酯（有关物质 C）、*N*,*N*- 双（2- 氯乙基）氨基磷酸二（3- 氨基丙基）酯（有关物质 D）、双（2- 氯乙基）氨基磷酸（3- 氨基丙基）酯（有关物质 E），并通过 MS 和 NMR 对结构进行了确证。

关键词：环磷酰胺；抗肿瘤药；有关物质；合成

中图分类号：R914.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）05-0665-04

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.010

Synthesis of Related Substances of Cyclophosphamide

CHEN Cheng[1], ZHONG Jinlu[1], CHENG Tianxing[1], LI Xiang[2], CHENG Qingfang[1]*

(*1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005; 2. Lianyungang Guike Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000*)

ABSTRACT: In order to control the quality of cyclophosphamide, five related substances, namely *N*,*N*-*bis*(2-chloroethyl)-*N*'-(3-hydroxypropyl) phosphoric acid diamide acid chloride (related substance A), *N*,*N*-*bis*(2-chloroethyl)-*N*',*N*''-*bis*(3-hydroxypropyl) phosphoric triamide (related substance B), *N*,*N*-*bis*(2-chloroethyl) amido-chlorophosphate (3-aminopionate) (related substance C), *N*,*N*-*bis*(2-chloroethyl) phosphoramidate-*bis*(3-aminopionate) (related substance D), *bis*(2-chloroethyl) amido-phosphorsaeure-(3-aminopropyl) ester (related substance E), were prepared in this paper. Their structures were confirmed by MS and NMR.

Key Words: cyclophosphamide; antineoplastic; related substance; synthesis

环磷酰胺（cyclophosphamide，**1**），化学名为 *P*-[*N*,*N*- 二（2- 氯乙基）]-1- 氧 -3- 氮 -2- 磷杂环己烷 -*P*- 氧化物，是临床常用的烷化剂类免疫抑制剂。**1** 最早由德国 Merck 公司研发，于 1984 年在德国上市，商品名为 Endoxan，临床用于肿瘤免疫，适用于恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、淋巴细胞白血病、肺癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤的治疗[1—2]。

1 的合成路线报道较多，本研究参考文献[3—6]，以图 1 所示路线合成 **1** 时发现 5 种有关物质。由二（2- 氯乙基）氨基磷酰二氯（**3**）与 3- 氨基丙醇反应制备 **1** 时，会生成 **3** 与 3- 氨基丙醇分子中氨基反应的一元和二元酰胺化产物 *N*,*N*- 双（2- 氯乙基）-*N*'-（3- 羟丙基）磷酸二酰胺酰氯（有关物质 A）和 *N*,*N*- 双（2- 氯乙基）-*N*',*N*''- 双（3- 羟丙基）磷酸三酰胺（有关物质 B）；也会生成 **3** 与 3- 氨基丙醇分子中羟基反应的一元酯化产物 *N*,*N*- 双（2- 氯乙基）氨基氯磷酸（3- 氨基丙基）酯（有关物质 C）和二元酯化产物 *N*,*N*- 双（2- 氯乙基）氨基磷酸二（3- 氨基丙基）-

收稿日期：2021-11-28

作者简介：陈 成（1995—），男，硕士研究生，专业方向：药物合成及工艺改进。

通信作者：程青芳（1969—），教授，硕士生导师，从事制药工程的教学与研究。

E-mail：spring817191@sina.com

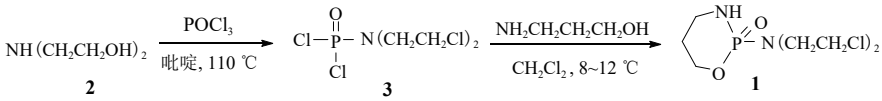


图 1　1 的合成路线

Fig.1　Synthetic Route of **1**

酯（有关物质 D）。有关物质 C 还会与 3- 氨基丙醇中离解的少量羟基或空气中的水分发生取代反应，进一步生成双（2- 氯乙基）氨基磷酸（3- 氨基丙基）- 酯（有关物质 E）。

除了美国药典 36 版规定的有关物质有相关报道外[7]，**1** 在生产、贮存过程中产生的有关物质及制备方法鲜有报道。本研究在前期课题组合成药物有关物质的基础上[8]，参考文献[9—12]，设计合成了上述 5 种有关物质（图 2），以期对 **1** 工艺开发过程中的质量控制和工艺改进提供帮助。其中有关物质 A、B、C、D 未见文献报道；有关物质 E 虽有文献报道其结构[5]，但未见报道合成方法。本研究将 **3** 与 3-（苄氧基）丙胺（**4**）发生一元或二元氨化反应后再用钯炭催化氢化脱去苄基得到有关物质 A 和 B。将 **3** 与（3- 羟丙基）氨基甲酸苄酯（**7**）发生一元或二元酯化反应后再用钯炭催化氢化脱去保护基得到有关物质 C 和 D，该反应在 0 ～ 5 ℃进行，操作比较简便。将制备有关物质 C 时得到的中间体 *P*-[*N*,*N*- 二（β- 氯乙基）]-*P*-（*N*- 苄氧甲酰基 -3- 氨基丙氧基）磷酰氯（**8**）与苄醇发生酯化反应，再用钯炭催化氢化脱去保护基即可制得有关物质 E。

实验部分

_N_,_N_- 双（2- 氯乙基）-_N'_-（3- 羟丙基）磷酸二酰胺酰氯（有关物质 A）

在 250 ml 三口烧瓶中加入 **3**（国康生物科技有限公司，98%，3.11 g，12 mmol）和二氯甲烷（100 ml），搅拌溶解，滴加 **4**（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，97%，1.65 g，10 mmol）的二氯甲烷（100 ml）溶液，－20 ℃搅拌反应 5 h，TLC（展开剂：二氯甲烷：甲醇 =5 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤滤除铵盐，滤液用水（50 ml×2）洗涤至水层 pH 6，收集二氯甲烷层，用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液于 30 ℃减压蒸除溶剂。所得黄色油状物 *N*,*N*- 双（2- 氯乙基）-*N*'-（3- 苄氧丙基）磷酸二酰胺酰氯（**5**）中加入乙腈（50 ml），在 －20 ℃搅拌析晶，抽滤，滤饼用四氢呋喃（300 ml）溶解后加入 10% 钯炭（3.0 g），氢气置换 3 次，通入氢气，常压下室温搅拌反应 12 h，TLC（展开剂：二氯甲烷：丙酮 =10 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤，滤液于 50 ℃减压蒸除溶剂，剩余黄色油状物经柱色谱（洗脱剂：二氯甲烷：丙酮 =10 ∶ 1）分离，得黄棕色油状物有关物质 A（2.10 g，70%），TLC（展开剂：二氯甲烷：丙酮 =3 ∶ 1，磷钼酸显色）显示 R_f=0.2、**1** 的 R_f=0.5。^{1}H NMR（500 MHz, DMSO-d_6）δ: 4.11 ～ 4.24（m, 2H）, 3.61 ～ 3.72（m, 4H）, 3.28 ～ 3.41（m, 6H）, 3.12 ～ 3.20（m, 2H）, 1.67 ～ 1.77（m, 2H）；^{13}C NMR（125 MHz, DMSO-d_6）δ: 67.67, 48.56, 42.81, 40.6, 25.96；ESI-MS（*m*/*z*）: 297.41[M+H]$^+$。

_N_,_N_- 双（2- 氯乙基）-_N'_,_N''_- 双（3- 羟丙基）磷酸三酰胺（有关物质 B）

在 100 ml 三口烧瓶中加入 **4**（4.13 g，25 mmol）、二氯甲烷（50 ml）、**3**（2.59 g，10 mmol）、三乙胺（4.04 g，40 mmol），0 ℃搅拌反应 2 h，TLC（展开剂：石油醚：乙酸乙酯 =3 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤滤除铵盐，滤液用水（50 ml×2）洗涤至水层 pH 6，收集二氯甲烷层，用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液于 30 ℃减压蒸除溶剂。所得黄色油状物 *P*-[*N*,*N*- 双（2- 氯乙基）]-*N*',*N*''- 双（3- 苄氧基丙基）- 磷酸三酰胺（**6**）中加入甲醇（100 ml），搅拌均匀后加入 10% 钯炭（3.5 g），氢气置换 3 次，通入氢气，常压室温搅拌过夜，TLC（展开剂：二氯甲烷：甲醇 =5 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤，滤液于 45 ℃减压蒸除溶剂，剩余浅黄色油状物经柱色谱（洗脱剂：二氯甲烷：丙酮 =15 ∶ 1）分离，得黄棕色油

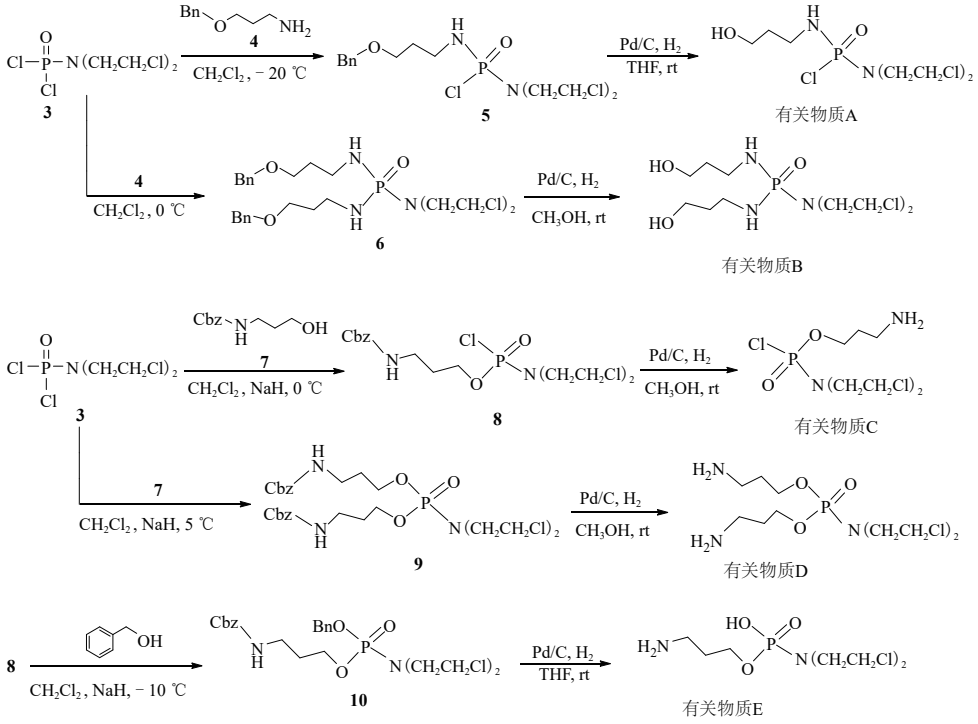


图 2　有关物质 A ～ E 的合成路线

Fig.2　Synthetic Routes of Related Substances A − E

状物有关物质 B(2.68 g，80%)，TLC(展开剂：二氯甲烷：丙酮 =10 ： 1，磷钼酸显色）显示 R_f=0.2、**1** 的 R_f=0.3。^{1}H NMR(500 MHz, DMSO-d_6) δ: 4.41(s, 2H), 4.06(s, 2H), 3.65(t, *J*=7.5 Hz, 4H), 3.44(dd, *J*=12.1、5.9 Hz, 4H), 3.21 ～ 3.30(m, 4H), 2.78(s, 4H), 1.48 ～ 1.59(m, 4H)；^{13}C NMR(125 MHz, CD_3OD) δ: 67.55, 58.89, 48.69, 38.83, 37.58；ESI-MS(*m*/*z*): 358.12[M+Na]$^+$。

***N*,*N*-双(2-氯乙基)氨基氯磷酸(3-氨基丙基)-酯**（有关物质 C)

在 500 ml 三口烧瓶中依次加入二氯甲烷(100 ml)、**3**(3.11 g，12 mmol)、**7**(2.09 g，10 mmol)，搅拌均匀后加入 60%氢化钠 (0.40 g，10 mmol)，0 ℃搅拌反应 2 h，TLC(展开剂：二氯甲烷：丙酮 =10 ： 1) 跟踪至反应完全。加入水 (100 ml)，分液，二氯甲烷层用水 (100 ml×2) 洗涤，用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液于 30 ℃减压蒸除溶剂。所得黄色油状物 **8** 中加入甲醇 (150 ml)，搅拌均匀后加入 10%钯炭 (3.5 g)，氢气置换 3 次，通入氢气，常压室温搅拌过夜，TLC(展开剂：石油醚：乙酸乙酯 =1 ： 1) 跟踪至反应完全。抽滤，滤液于 45 ℃减压蒸除溶剂，剩余黄棕色油状物经柱色谱（洗脱剂：二氯甲烷：丙酮 =20 ： 1) 分离，得黄棕色油状物有关物质 C(1.78 g，60%)，TLC(展开剂：二氯甲烷：丙酮 =6 ： 1，磷钼酸显色）显示 R_f=0.5、**1** 的 R_f=0.4。^{1}H NMR(500 MHz, DMSO-d_6) δ: 4.12 ～ 4.25(m, 2H), 3.59 ～ 3.76(m, 4H), 3.24 ～ 3.37(m, 6H), 3.03 ～ 3.20(m, 2H), 1.66 ～ 1.78(m, 2H)；^{13}C NMR(125 MHz, DMSO-d_6) δ: 67.67, 48.53, 42.80, 40.99, 25.94；ESI-MS(*m*/*z*): 297.63[M+H]$^+$。

***N*,*N*-双(2-氯乙基)氨基磷酸二(3-氨基丙基)-酯**（有关物质 D)

在 500 ml 三口烧瓶中依次加入二氯甲烷(100 ml)、**3**(2.59 g，10 mmol)、**7**(5.23 g，25 mmol)，搅拌均匀后加入 60%氢化钠 (1.00g，25 mmol)，5 ℃搅拌反应 2 h，TLC(展开剂：石油醚：乙酸乙酯 = 3 ： 1) 跟踪至反应完全。加入水 (100 ml)，分液，二氯甲烷层用水 (100 ml×2) 洗涤，用无水硫酸钠

干燥后过滤，滤液于 30 ℃减压蒸除溶剂。所得黄色油状物 *N*,*N*-双（2-氯乙基）氨基磷酸二［（3-苄氧甲酰胺基）丙基］酯（**9**）中加入甲醇（150 ml），搅拌均匀后加入 10%钯炭（3.0 g），氢气置换 3 次，通入氢气，常压室温搅拌过夜，TLC（展开剂：石油醚：乙酸乙酯 =1 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤，滤液于 45 ℃减压蒸除溶剂，剩余黄棕色油状物经柱色谱（洗脱剂：二氯甲烷：丙酮 =5 ∶ 1）分离，得黄棕色油状物有关物质 D（1.51 g，45%），TLC（展开剂：二氯甲烷：丙酮 =1 ∶ 1，磷钼酸显色）显示 R_f=0.4、**1** 的 R_f=0.8。^{1}H NMR（500 MHz, CD_3OD）δ: 4.10 ～ 4.17（m, 4H）, 3.71（t, *J*=6.8 Hz, 4H）, 3.41 ～ 3.48（m, 4H）, 2.84（td, *J*=7.3、2.7 Hz, 4H）, 1.91（q, *J*=6.7 Hz, 4H）；^{13}C NMR（125 MHz, MeOD）δ: 63.56, 52.92, 43.87, 36.38, 28.00；ESI-MS（*m*/*z*）: 336.23［M+H］$^+$。

双（2-氯乙基）氨基磷酸（3-氨基丙基）酯（有关物质 E）

在 500 ml 三口烧瓶中依次加入苄醇（1.08 g，10 mmol）、二氯甲烷（100 ml），搅拌均匀后加入 60%氢化钠（0.4 g，10 mmol），滴加 **8**（5.16 g，12 mmol）的二氯甲烷（100 ml）溶液，－10 ℃搅拌反应 2 h，TLC（展开剂：二氯甲烷：丙酮 =10 ∶ 1）跟踪至反应完全。加入水（100 ml），分液，二氯甲烷层用水（100 ml×2）洗涤，用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液于 30 ℃减压蒸除溶剂。所得黄棕色油状物 *P*-［*N*,*N*-二（β-氯乙基）］-*P*-（*N*-苄氧甲酰基-3-氨基丙氧基）-*P*-苄氧基-*P*-氧化物（**10**）中加入四氢呋喃（150 ml），搅拌均匀后加入 10%钯炭（3.50 g），氢气置换 3 次，通入氢气，常压室温搅拌过夜，TLC（展开剂：石油醚：乙酸乙酯 =1 ∶ 1）跟踪至反应完全。抽滤，滤液于 40 ℃减压蒸除溶剂，剩余黄棕色油状物经柱色谱（洗脱剂：二氯甲烷：甲醇 =15 ∶ 1）分离，得黄色油状物有关物质 E（1.25 g，45%），TLC（展开剂：二氯甲烷：甲醇 =5 ∶ 1，磷钼酸显色）显示 R_f=0.3、**1** 的 R_f=0.7。^{1}H NMR（500 MHz, CD_3OD）δ: 3.94（q, *J*=5.9 Hz, 2H）, 3.65（t, *J*=7.4 Hz, 4H）, 3.35 ～ 3.41（m, 4H）, 3.11（t, *J*=6.5 Hz, 2H）, 1.91 ～ 1.99（m, 2H）；^{13}C NMR（125 MHz, MeOD）δ: 61.22, 50.46, 42.20, 36.96, 27.77；ESI-MS（*m*/*z*）: 279.21［M+H］$^+$。

参考文献：

［1］ BOTTINI C, GENERALI D, BRIZZI M P, *et al*. Randomized phase Ⅱ trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients［J］. *J Clin Oncol*, 2006, **24**(22): 3623-3628.

［2］ NGAN H Y S, CHOO Y C, CHEUNG M, *et al*. A randomized study of high-dose versus low-dose *cis*-platinum combined with cyclophosphamide in the treatment of advanced ovarian cancer［J］. *Chemotherapy*, 2009, **35**(3): 221-227.

［3］ ZON G, LUDEMAN S M, EGAN W. High-resolution nuclear magnetic resonance investigation of the chemical stability of cyclophosphamide and related phosphoramide compounds［J］. *J Am Chem Soc*, 1977, **99**(17): 5785-5795.

［4］ GHOLIVAND K, DOROSTI N, SHARIATINIA Z, *et al*. Cyclophosphamide analogues: synthesis, spectroscopic study, and antitumor activity of diazaphosphorinanes［J］. *Med Chem Res*, 2011, **20**(8): 1287-1293.

［5］ BRANDT J A, LUDEMAN S M, ZON G, *et al*. Synthesis of 3-hydroxycyclophosphamide and studies related to its possible role in the metabolism of cyclophosphamide［J］. *J Med Chem*, 1981, **24**(12): 1404-1408.

［6］ ZON G, LUDEMAN S M, BRANDT J A, *et al*. NMR spectroscopic studies of intermediary metabolites of cyclophosphamide. A comprehensive kinetic analysis of the interconversion of *cis*-and *trans*-4-hydroxycyclophosphamide with aldophosphamide and the concomitant partitioning of aldophosphamide between irreversible fragmentation and reversible conjugation pathways［J］. *J Med Chem*, 1984, **27**(4): 466-485.

［7］ 袁红露. 环磷酰胺原料药中有关物质的分析方法［D］. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2013.

［8］ 张海霞, 胡浩强, 徐　盼, 等. 培美曲塞二钠有关物质的合成［J］. 中国医药工业杂志, 2019, **51**(8): 992-996.

（下转第671页）

2-hydrazino-1,4- or -3,4-dihydroquinazolines [J]. *ChemInform*, 2010, **22**(51): 123-134.

[6] 顾尚香, 姚卡玲. 二氧化硫脲对有机化合物的还原作用研究[J]. 有机化学, 1998, **18**(2): 157-161.

[7] 韩晓蕾, 崔 格, 吕海军, 等. 二氧化硫脲对啶酰菌胺关键中间体2-硝基-4-氯联苯结晶母液的选择性还原[J]. 农药, 2019, **58**(11): 796-798.

[8] 顾尚香, 姚卡玲. 利用二氧化硫脲制备对氨基苯酚[J]. 大学化学, 1997, (2): 43-44.

(上接第668页)

[9] KWON C H, BORCH R F, ENGEL J, *et al*. Activation mechanisms of mafosfamide and the role of thiols in cyclophosphamide metabolism [J]. *J Med Chem*, 1987, **30**(2): 395-409.

[10] 杨林芳, 王恩通, 左剑涛, 等. 二元醇与三氯氧磷的酯化反应研究[J]. 广东化工, 2015, **22**(42): 15-16.

[11] 房忠雪, 王 羽, 陈 运, 等. 一种环磷酰胺的合成方法: 中国, 110183211A [P]. 2019-09-27.

[12] 付 晖, 田金龙, 李新鹏, 等. 异环磷酰胺有关物质的合成[J]. 中国药物化学杂志, 2015, **25**(5): 386-388.