文章编号:1674-2869(2024)01-0018-09

替诺福韦合成工艺的优化及抗菌活性研究

顾 梅[1],徐华诚[*2],段帅凯[3],陈连清[3],李泉丹[1],习本军[4]
1. 北大医药股份有限公司,重庆 401121;
2. 福安药业集团重庆礼邦药物开发有限公司,重庆 401121;
3. 中南民族大学化学与材料科学学院,湖北 武汉 430074
4. 湖北三峡实验室,湖北 宜昌 443007

摘 要:为了优化替诺福韦合成工艺,以腺嘌呤和(*R*)-碳酸丙烯酯为起始原料,经开环缩合、取代、水解得到替诺福韦。通过高效液相色谱法(HPLC)监控整个反应过程,其中开环缩合的最佳反应条件为反应温度120 ℃,反应时间22 h;取代的最佳反应条件为反应温度60 ℃,反应时间6 h;水解的最佳反应时间20 h。在最优化条件下总收率达69.2%。通过紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱探讨其光物理性能,发现可以根据不同化合物的荧光发射波长差异来监测反应方向和反应程度;通过抗菌活性测试,发现对低浓度的金黄色葡萄球菌有一定的抗菌活性。该合成工艺实现了副产物回收套用,节约生产成本,提高产能。

关键词:替诺福韦;高效液相色谱法中控;荧光监测;工艺优化;抗菌活性
中图分类号:TB383 **文献标识码**:A **DOI**:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ. 202209016

Synthesis optimization and antibacterial activities of tenofovir

***GU Mei*[1], *XU Huacheng*[*2], *DUAN Shuaikai*[3], *CHEN Lianqing*[3], *LI Quandan*[1], *XI Benjun*[4]**
1. PKU Health Care Corp., Ltd., Chongqing 401121, China;
2. Fu'an Pharmaceutical Group Chongqing LYBON Pharm-Tech. Co., Ltd, Chongqing 401121, China;
3. College of Chemistry and Materials Science, South-Central MinZu University, Wuhan 430074, China;
4. Hubei Three Gorges Laboratory, Yichang 443007, China

Abstract: To optimize the synthetic process of tenofovir, we synthesized tenofovir using adenine and (*R*)-propylene carbonate as starting materials through ring-opening condensation, substitution and hydrolysis. The processes of reactions were monitored by using high performance liquid chromatography. The best synthesis conditions for ring-opening condensation and substitution reaction were at 120 ℃ for 22 h and at 60 ℃ for 6 h, respectively. The best reaction time of hydrolysis is 20 h. The total yield is 69.2% under optimal conditions. The photophysical properties were investigated by UV-vis absorption spectroscopy and fluorescence emission spectroscopy, and the direction and extent of reaction can be monitored according to the wavelengths of fluorescence emission of different compounds. Tenofovir shows certain antibacterial activities against Staphylococcus aureus at a low concentration. This synthetic process realizes the by-product recovery and application, saves the production cost, and improves the production capacity.

Keywords: tenofovir; HPLC central control; fluorescence monitoring; process optimization; antibacterial activity

收稿日期:2022-09-13
基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金项目(CXY22006、CZY23013);湖北三峡实验室开放/创新基金(SC232015)
作者简介:顾 梅,硕士,高级工程师。Email: MeiGuCQ@126.com
***通信作者**:徐华诚,硕士,工程师。Email: xhuacheng@126.com
引文格式:顾梅,徐华诚,段帅凯,等. 替诺福韦合成工艺的优化及抗菌活性研究[J]. 武汉工程大学学报,2023,45(6):18-26.

替诺福韦，化学名*R*-9-(2-磷酸甲氧基丙基)腺嘌呤，通过研究表明，对多种病毒株都具有很好的抑制作用，是国内外治疗艾滋病(human immunodeficiency virus，HIV)和慢性乙型肝炎(hepatitis B virus，HBV)的首选药物之一[1-2]，且具有很高的安全性和很好的治疗效果[3-5]。但因为它是单磷酸腺苷类似物，无水溶性，也无法经胃肠道完全吸收，药物作用很低。所以必须先酯化为富马酸替诺福韦酯，是一种新型核苷酸类逆转录酶抑制剂[6-8]，具有水溶性，经口服吸入后迅速转变成具有活性的替诺福韦。然后在蛋白激酶的作用下经过磷酸化过程，转化成活化的物质替诺福韦双磷酸盐。主要以以下两种方式来控制病毒：一是对抗性地与有机物脱氧核糖复合来控制病毒聚合酶；二是进入病毒DNA后致使DNA链不再延长[9]，从而达到医治艾滋病和慢性乙肝的功效。

近年来，替诺福韦及其关键中间体的合成路线文献报道很多。张杰等[10]以腺嘌呤和(*R*)-碳酸丙烯酯制备(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤[*R*-9-(2-Hydroxypropyl)adenine，HPA]，后处理用甲苯共沸蒸馏带出*N*，*N*-二甲基甲酰胺(*N*，*N*-dimethylformamide，DMF)，甲醇/异丙醇混合体系结晶；HPA与(二乙氧基磷酰基)甲基4-甲基苯磺酸[Diethyl (tosyloxy) methylphosphonate，DESMP]在叔丁醇镁作用下反应，得到(*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤(tenofovir diethyl ester，TDE)，最后在溴化三甲基硅烷作用下水解，得到替诺福韦。但整个过程使用溶剂种类多，无法回收套用；且TDE未做后处理，未去除镁离子直接往下投料，会有大量镁盐残留，导致大量镁盐包裹部分产物、不易抽滤分离，大大影响反应收率，产物收率达到50%。王志刚等[11]以腺嘌呤和(*R*)-1，2-亚丙基碳酸酯为原料，制备HPA，后处理采用甲醇/异丙醇混合体系结晶，乙醇重结晶；然后HPA与DESMP在叔丁醇镁作用下反应，得到TDE，在溴化钠、氯化三甲基硅烷共同作用下水解得到替诺福韦。但该路线使用溶剂种类多，无法回收套用，在最优条件下收率仅49.6%。刘嘉等[12]以*S*-环氧丙醇为主要反应原料合成替诺福韦，通过钯碳的催化还原及催化加氢反应将*S*-环氧丙醇还原为(*R*)-1，2-丙二醇，与碳酸乙酯进一步反应制得(*R*)-碳酸丙烯酯。然后又通过与腺嘌呤反应得到产物HPA，在叔丁醇钠作用下与DESMP反应得TDE，最后TDE在溴化三甲基硅烷催化剂作用下水解后得到最终产物替诺福韦。但此方法存在反应过程复杂，使用溶剂种类多，无法回收套用，原料*S*-环氧丙醇价格比较贵、难以贮存的问题，总收率仅30%。李陈等[13]以(*R*)-碳酸-1，2-丙二醇酯和腺嘌呤为原料，对替诺福韦的药物合成过程进行了改进优化，考察了分步合成法和一锅法这两种工艺的参数条件及优劣，但从不同放大倍数对收率影响来看，收率为35.9%~37.8%，不易实现工业化生产。

本文采用一锅法合成替诺福韦，利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography，HPLC)和荧光法对整个反应进程进行跟踪监测，合成路线如图1所示，先在三乙胺催化作用下，化合物**1**亚磷酸二乙酯和多聚甲醛缩合，得到化合物**2**羟亚甲基磷酸二乙酯，然后加入对甲苯磺酰氯发生酰化反应，三乙胺作为缚酸剂，制得化合物**3**对

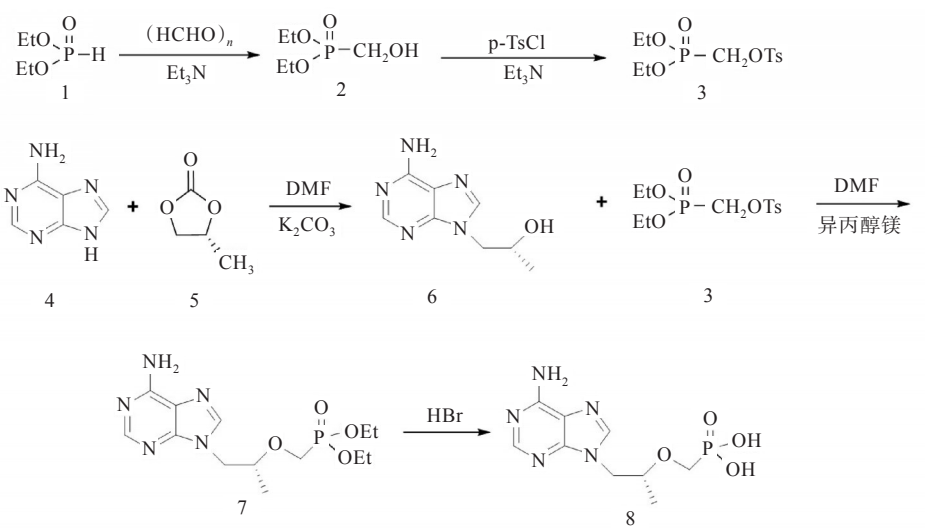

图1　替诺福韦的合成路线

Fig. 1　Synthesis route of tenofovir

甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯用于后续实验。以化合物**4**腺嘌呤和化合物**5**(*R*)-碳酸丙烯酯为起始原料,经开环缩合反应生成化合物**6**(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤[14-16];以异丙醇镁为碱,化合物**6**与化合物**3**发生取代反应生成化合物**7**(*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤[17-19];化合物**7**在酸性条件下水解得到替诺福韦[20-22],即化合物**8**,利用化合物的荧光发射波长不同来监测反应方向和反应程度,希望可以找到量产替诺福韦的最优化工艺条件。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1)试剂:腺嘌呤、(*R*)-碳酸丙烯酯、碳酸钾、异丙醇镁、*N*,*N*-二甲基甲酰胺、丙酮、氢氧化钠、氯化钠、碳酸钠、氢溴酸、亚磷酸二乙酯、多聚甲醛、对甲苯磺酰氯、甲苯、三乙胺、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙酸、甲醇、磷酸、磷酸氢二钠。以上试剂和药品均为市售化学纯度,使用前未经进一步纯化。甲醇、叔丁醇为色谱纯,购买于阿拉丁试剂,购买于国药试剂。

2)仪器:核磁共振仪(德国Bruker AVANCE III 400 M型);显微熔点仪(瑞士Buchi B-540型);高效液相色谱仪(日本岛津SPD-20A型);傅里叶红外光谱仪(日本岛津FT-IR-8400型);荧光光谱仪(美国PerkinElmer PELS-55型);紫外-可见分光光度计(日本岛津Perkin-Elmer Lambda-Bio35型);电子天平(德国赛多利斯Practum224/313-1CN型);台式真空干燥箱(上海一恒仪器DZF-6032型);真空泵(上海力辰科技2XZ-25B型);防爆旋蒸仪(东京理化N-1100V-W/WD型)。

1.2 方 法

1.2.1 对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯(化合物**3**)的制备 在N_2保护下,将亚磷酸二乙酯110.40 g(0.80 mol)、甲苯320 mL依次加入1 L的三口反应瓶中,室温搅拌20 min后,加入多聚甲醛29.45 g(0.98 mol),缓慢滴加三乙胺64 mL,室温下搅拌10 min后缓慢升温至80 ℃搅拌2 h,然后缓慢升温至100~110 ℃ 回流反应2 h,旋蒸除去溶剂,得无色透明液体羟亚甲基磷酸二乙酯127.20 g,产率94.6%。然后在0 ℃条件下,依次将羟亚甲基磷酸二乙酯125.80 g、甲苯300 mL加入到1 L三口反应瓶中,通入N_2保护,搅拌20 min后,缓慢少量多次加入对甲苯磺酰氯156.44 g(0.82 mol),继续搅拌反应1 h,滴加三乙胺110 mL,恒温水浴10 ℃搅拌2 h后,升温至20 ℃,取样进行HPLC中控(要求羟亚甲基磷酸二乙酯质量分数≤2%,否则延长反应时间1 h再次取样中控反应),用有机滤膜抽滤,然后先用甲苯洗涤,再用碳酸钠溶液(质量分数5%)洗涤滤饼,合并洗液和滤液,旋蒸除去溶剂,得到对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯200.48 g,收率82.9%。HPLC纯度:96.80%,m.p.105~110 ℃。核磁共振氢谱(nuclear magnetic resonance,^{1}H NMR)(400 MHz,$CDCl_3$):δ(化学位移)7.81(d,*J*=7.4 Hz,2H),7.38(d,*J*=6.2 Hz,2H),4.15~4.19(m,6H),2.46(s,3H),1.33(t,*J*=8.2 Hz,6H)。IR(KBr),ν_{max}:3 072,2 990,2 907,1 334,1 159,768,1 625,1 592,1 560,1 456,1 273,1 454,1 218,1 078 cm^{-1};ESI-MS(*m*/*z*):323[M+H]$^+$。

1.2.2 (*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤(化合物**6**)的制备 向2 L三口瓶中加腺嘌呤100 g(0.74 mol),碳酸钾10.50 g(0.074 mol),DMF 1 L,通入N_2保护,室温搅拌20 min后再添加(*R*)-碳酸丙烯酯100 g(0.98 mol),添加完毕后开始升温,待内温升至120 ℃,计时反应。控温120 ℃反应直到体系溶清,取样进行HPLC中控(要求腺嘌呤质量分数≤2%,否则延长反应时间2 h再次取样中控反应),反应合格后降温至80 ℃以下,测定体系荧光,并开启真空减压蒸馏DMF,蒸出650 mL后停止蒸馏,将剩余物料加热升温至120 ℃,待体系溶清后自然冷却至室温,再用冰盐水继续降温至5 ℃以下,保温析晶2 h后减压过滤,用100 mL预冷的DMF洗涤滤饼,合并滤液。在70 ℃下将滤饼干燥12 h,得到类白色固体。滤液在80 ℃下,真空减压蒸馏DMF,当蒸出350 mL后停止蒸馏,再将剩余物料加热升温至120 ℃,待体系溶清后自然冷却至室温,然后用冰盐水继续降温至5 ℃以下,保温析晶2 h后减压过滤,用20 mL预冷的DMF洗涤滤饼,在70 ℃下将滤饼干燥12 h,得到类白色固体。将两次固体合并,共得126.40 g,收率88.4%。HPLC纯度:98.20%,m.p.193~195 ℃。^{1}H NMR(400 MHz,$CDCl_3$):δ(化学位移)8.20(s,1H),8.03(s,1H),7.13(s,2H),5.01(d,*J*=6.8 Hz,1H),3.8(m,3H),1.08(d,*J*=6.4 Hz,3H)。IR(KBr),ν_{max}:3 418,3 320,3 181,2 930,1 664,1 610,1 574,1 473,1 415,1 298,1 182,943,718,645 cm^{-1};ESI-MS(*m*/*z*):194[M+H]$^+$。

1.2.3 (*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤(化合物**7**)的制备 在N_2的保护下,向1 L的三口反应瓶中加入(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤

102.10 g (0.53 mol),异丙醇镁51.60 g (0.36 mol),DMF 500 mL,开启搅拌,升温至50~55 ℃,开始添加对甲苯磺酰氧基磷酸二乙酯200 g (0.62 mol),约40 min添加完成,然后逐渐升温至60 ℃,同时开启真空减压蒸馏,计时反应,反应6 h后取样进行HPLC中控[要求(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤质量分数≤2%,否则延长反应时间1 h再次取样中控反应],反应完成后升温至80 ℃左右,测定体系荧光,减压蒸馏DMF,待减压蒸馏至无馏分流出时,冷却至室温,得到黄色油状化合物**7**,不需要处理直接进行下一步反应。

1.2.4　*替诺福韦*(化合物**8**)*的制备*　继上一步一锅法合成替诺福韦,向反应瓶中加入500 mL丙酮搅拌溶解,加入氢溴酸(质量分数48%) 122 g (0.72 mol),过滤除盐,用400 mL丙酮洗涤滤饼,合并滤液,减压浓缩至无馏分流出后,向浓缩物中加入氢溴酸(质量分数48%) 350 g (2.07 mol)搅拌溶解。加热升温至75 ℃反应20 h,取样HPLC中控(要求磷酸单酯质量分数< 2%,否则延长反应时间2 h再次取样中控反应),反应合格后,测定体系荧光,用质量分数40% NaOH溶液调节pH至3.0,降温至0~5 ℃,渐渐有固体析出,2 h后,抽滤,然后用100 mL预冷的纯化水洗涤,于70 ℃减压真空干燥12 h,得类白色粉末状固体123.21 g,再用纯化水重结晶,得白色粉末状固体103.35 g,总收率69.2%。HPLC纯度:98.31%,m.p.278~290 ℃。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):δ(化学位移) 8.25 (s,1H),8.06 (s,1H),7.30 (s,1H),4.20 (m,3H),3.85 (m,3H),3.45 (d,*J*=6.4 Hz,2H),1.19 (d,*J*=5.8 Hz,3H)。IR (KBr),ν_{max}:3 390,3 106,2 964,1 697,1 410,1 236,1 104,1 075,934,750,715,480 cm^{-1};ESI-MS(*m*/*z*):288 [M+H]$^+$。

2　结果与讨论

2.1　对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯(化合物3)反应条件的筛选

在三乙胺(TEA)催化作用下,由羟亚甲基磷酸二乙酯120.80 g (0.72 mol)和对甲苯磺酰氯136.61 g (0.72 mol)合成化合物**3**,为研究产物产率与TEA用量、反应时间的关系,分别量取100、105、110、115和120 mL TEA进行反应。为促进反应的正向进行,TEA除催化作用外,还会中和反应过程中产生的盐酸。在相当反应条件下,产物产率与TEA用量、反应时间的关系如图2所示。

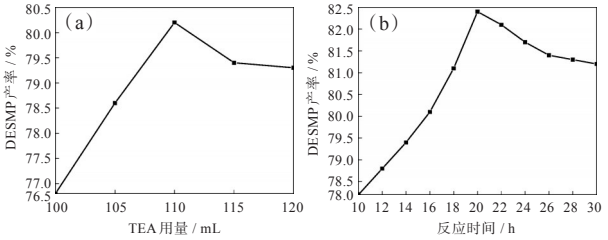

图2　不同因素对DESMP产率的影响:
(a) TEA用量,(b) 反应时间

Fig. 2　Effects of factors on DESMP yield:
(a) TEA dosages, (b) reaction time

当TEA用量100 mL时,对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯产率只有76.8%。当TEA用量110 mL时,产物产率达到80.2%,随后产物产率有所降低,且基本趋于稳定,综合考虑,选TEA用量110 mL。在反应过程中,随着温度升高,反应速率加快,当反应温度升高至20 °C时,反应20 h,收率提高至82.4%,当反应进行20 h以上时,产率有所降低且趋于稳定,考虑到成本及反应时间,认为在TEA用量110 mL,20 ℃下反应20 h为最佳条件。

2.2　(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤反应条件的HPLC中控筛选

在化合物**6**的合成中,反应温度有差别,腺嘌呤参与反应时会有不同的异构体产生,从而影响反应的收率和纯度,如N-1、N-3、N-7、N-9和N-10这几种同分异构体,其分子结构式如图3所示。

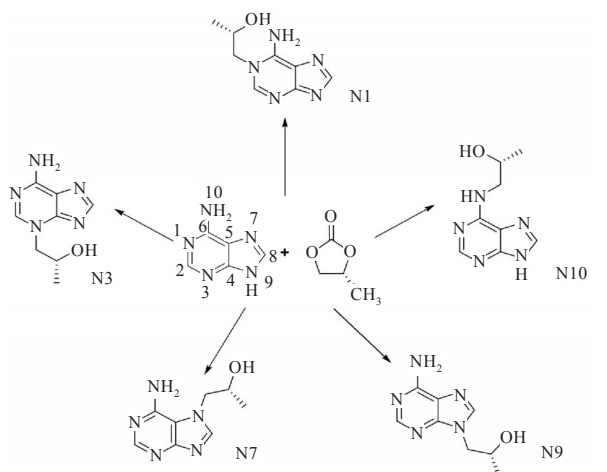

图3　几种同分异构体的分子结构

Fig. 3　Molecular structure of several isomers

本研究通过HPLC来检测不同反应温度、不同原料比例和不同溶剂比例下反应液中产品的纯度,如图4所示。

当原料腺嘌呤的质量分数≤2%时停止反应,确定反应时间,同时得到化合物**6**的含量,实验结果如表1所示。

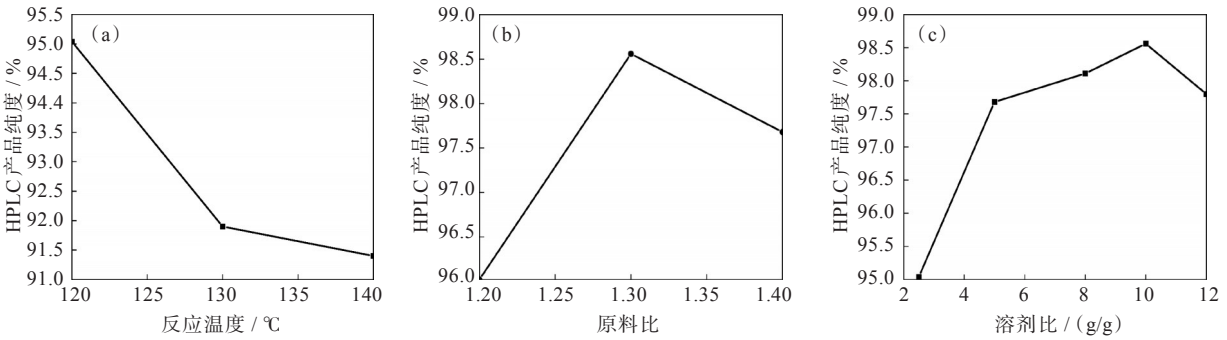

图4 不同因素对化合物6含量的影响:(a)反应温度,(b)原料比,(c)溶剂比

Fig. 4 Effects of factors on content of compound **6**: (a) reaction temperatures, (b) ratios of raw materials, (c) solvent ratios

表1 (*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤的最佳反应条件的筛选

Tab. 1 Screening of optimum reaction conditions for (*R*)-9-(2-hydroxypropyl) adenine

编号	*n*(*R*-碳酸丙烯酯) / mol	DMF质量分数 / (g/g)	*n*(碳酸钾) / mol	反应温度 / ℃	HPLC产品纯度 / %
1	1.30	2.5	0.10	140	91.40
2	1.30	2.5	0.10	130	91.90
3	1.30	2.5	0.10	120	95.04
4	1.30	5.0	0.10	120	97.68
5	1.30	8.0	0.10	120	98.11
6	1.30	10.0	0.10	120	98.56
7	1.30	12.0	0.10	120	97.85
8	1.40	10.0	0.10	120	97.68
9	1.20	10.0	0.10	120	96.02

适当升高反应温度,发现副反应的反应速率加快,副产物含量增加,产品含量降低,当反应温度为120 ℃时,产品含量最高;随着溶剂用量增加,副反应反应速度减缓,产品纯度逐渐提高,当溶剂比例为10 g/g时,产品含量最高;当(*R*)-碳酸丙烯酯用量为1.30 mol时,产品含量最高。因此,本研究选取120 ℃作为最佳反应温度,(*R*)-碳酸丙烯酯1.30 mol,DMF 10 g/g,碳酸钾0.10 mol,反应22 h,化合物**6**含量达到98.56%,HPLC图谱见图5。通过减压浓缩除溶剂DMF,先升温溶解,再降温结晶,最后过滤得到产物,收率88.4%。因为采用反应溶剂作为结晶溶剂,所以单一溶剂可回收再利用,节约生产成本,提高了产能。

本研究采用HPLC进行监控反应过程,所有HPLC分析采用C18柱(5 μm,250 mm×4.6 mm)色谱柱;流动相:以甲醇−0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液(用磷酸调节pH至5.0)-叔丁醇(体积比16∶21∶4)为流动相A,以甲醇−0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液(用磷酸调节pH至5.0)-叔丁醇(体积比29∶8∶4)为流动相B;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:260 nm;进样量为10 μL。通过液相图谱可知,腺嘌呤与(*R*)-碳酸丙烯酯反应时,整个反应体系

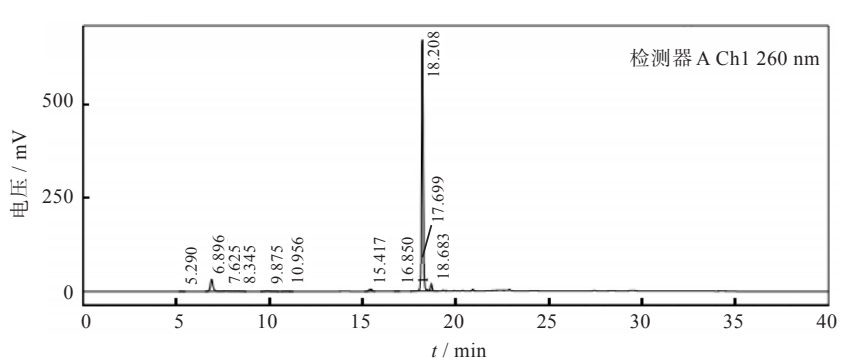

图5 化合物6最佳反应条件下的HPLC图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of compound **6** under optimal reaction conditions

有较多异构体生成，主产物化合物**6**纯度98.56%（18.208 min），原料腺嘌呤余0.10%（9.875 min），*N*-1异构体纯度0.46%（6.896 min），*N*-3异构体纯度0.04%（7.625 min），*N*-7异构体纯度0.05%（8.345 min），*N*-9异构体纯度0.18%（15.417 min），*N*-10异构体纯度0.28%（18.683 min）。

2.3　(*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤反应条件的HPLC中控筛选

在化合物**7**的合成中，考察了反应温度及常压、减压蒸馏对反应时间和化合物**7**含量的影响，如图6所示。

采用HPLC进行监控反应过程，结果如表2所示。在相同反应时间条件下，随着反应温度升高，反应液含量降低，常压下60 ℃，反应17 h，产品含量最高；通过减压蒸馏除去副产物异丙醇，可明显加快反应速度，反应时间由原来17 h缩短至6 h，反应液含量也提高到98.29%。

从图7可以看出，产品化合物**7**纯度98.29%（25.655 min），33.425 min处为过量原料**3**的峰，20.276、24.358、26.952 min等杂质峰为原料化合物**6**残留异构体与原料**3**反应生成的副产物的峰。在后处理中采用丙酮做溶剂，加氢溴酸后与镁离子生成溴化镁在体系中析出，高效快速地除去镁离子，且副产物溴化镁可回收，溶剂丙酮可回收套用，后处理工艺利于放大生产，节约生产成本。

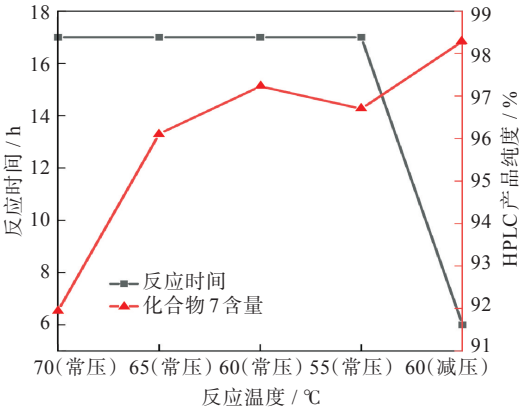

图6　反应温度对反应时间和化合物7含量的影响

Fig. 6　Influence of reaction temperature on reaction time and compound **7** content

2.4　替诺福韦反应条件的HPLC中控筛选

在替诺福韦（化合物**8**）的合成过程中，测定了通过HPLC中控反应时间对反应的影响结果，如表3所示。

化合物**7**的水解过程如图8所示，在阿伦尼乌斯酸酸性条件下分步水解，首先得到磷酸单酯化合物**9**，再进一步水解得到化合物**8**，化合物**7**、**8**和**9**含量和反应时间的关系如图9所示。

本研究中当反应进行8 h后，磷酸二乙酯已基本水解完，液相图谱见图10，从图中可以看出，原料化合物**7**基本水解，剩余1.65%（25.889 min），产品化合物**8**纯度50.72%（16.694 min），磷酸单酯**9**

表2　(*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤的最佳反应条件的筛选

Tab. 2　Screening of optimal reaction conditions (*R*)-9-[2-(diethoxyphosphoryl methoxy)propyl] adenine

编号	*n*(对甲苯磺酰氧基磷酸二乙酯) / mol	异丙醇镁 / mol	DMF质量分数 / (g/g)	反应温度 / ℃	反应时间 / h	HPLC产品纯度 / %
1	1.20	0.70	5	70(常压)	17	91.94
2	1.20	0.70	5	65(常压)	17	96.11
3	1.20	0.70	5	60(常压)	17	97.23
4	1.20	0.70	5	55(常压)	17	96.70
5	1.20	0.70	5	60(减压)	6	98.29

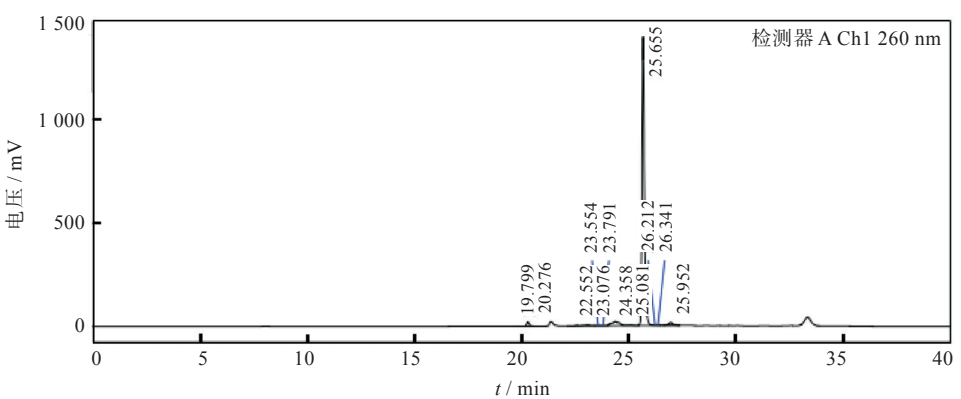

图7　化合物7最佳反应条件下的HPLC图谱

Fig. 7　HPLC chromatogram of compound **7** under optimal reaction conditions

表3 替诺福韦反应条件的筛选

Tab. 3 Screening of tenofovir reaction conditions

编号	n(氢溴酸) / mol	反应温度 / ℃	反应时间 / h	HPLC产品纯度 / %	w(磷酸单酯) / %	w(原料) / %
1	4.0	100	4	19.40	59.87	20.46
2	4.0	100	8	50.72	45.87	1.65
3	4.0	100	12	80.19	18.22	0.40
4	4.0	100	16	89.81	8.07	0.23
5	4.0	100	20	96.21	1.75	0.21

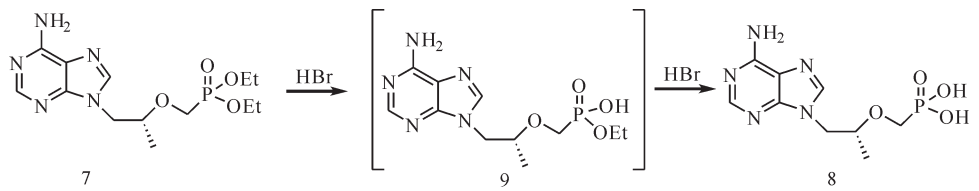

图8 化合物7水解过程

Fig. 8 Hydrolysis process of compound **7**

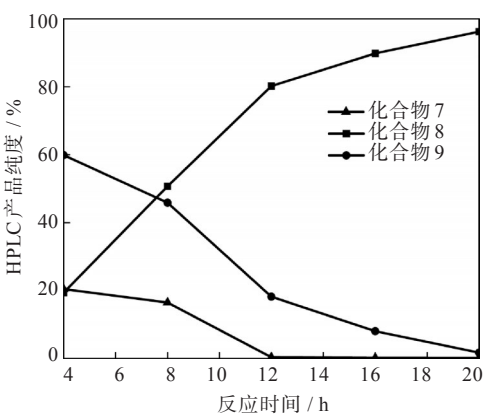

图9 化合物7、8和9含量和反应时间的关系

Fig. 9 Relationship between content of compounds **7**, **8** and **9** and reaction time

含量45.87%(21.342 min)。

随着反应的不断进行,主产物替诺福韦含量逐步增加,同时副产物磷酸单酯含量逐步减少,当反应经过20 h后,磷酸单酯含量减少到1.75%,替诺福韦含量达到96.21%,液相图谱见图11,此时磷酸单酯含量<2%,认为反应结束,因此水解最佳时间为20 h。

2.5 荧光监测反应数据

化合物**6**(*R*)-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤、化合物**7**(*R*)-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤和化合物**8**替诺福韦溶液的紫外-可见吸收波长和荧光发射波长数据如表4所示。由于化合物**6**、**7**和**8**分别连接不同类型的取代基,因此具有推动和拉动电子的不同感应效应,得到了不同的紫外-可见吸收波长和荧光发射波长;另外,分子结构中不同共轭程度也对其有影响,当具有更大共轭体系时,紫外-可见吸收波长和荧光发射波长均会产生一定程度的红移。从光物理测试结果发现,化合物**6**、**7**和**8**均具有一定的荧光量子产率,能够将吸

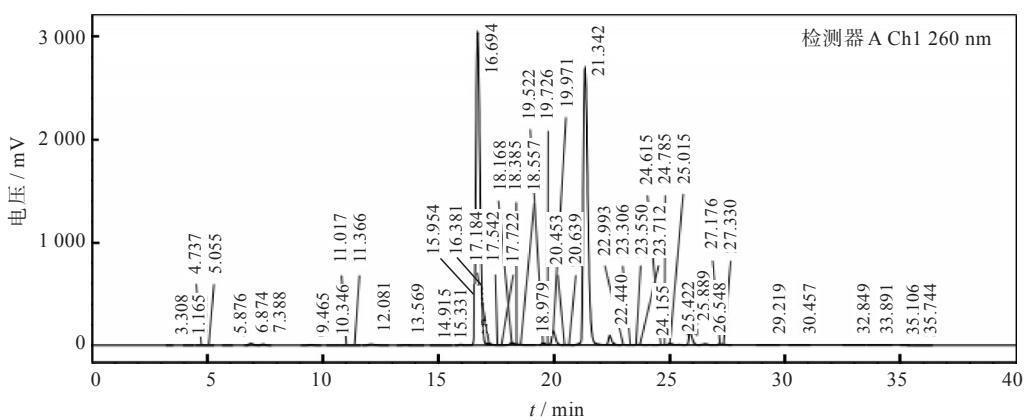

图10 化合物7水解8 h HPLC图谱

Fig. 10 HPLC chromatogram of compound **7** after hydrolysis for 8 h

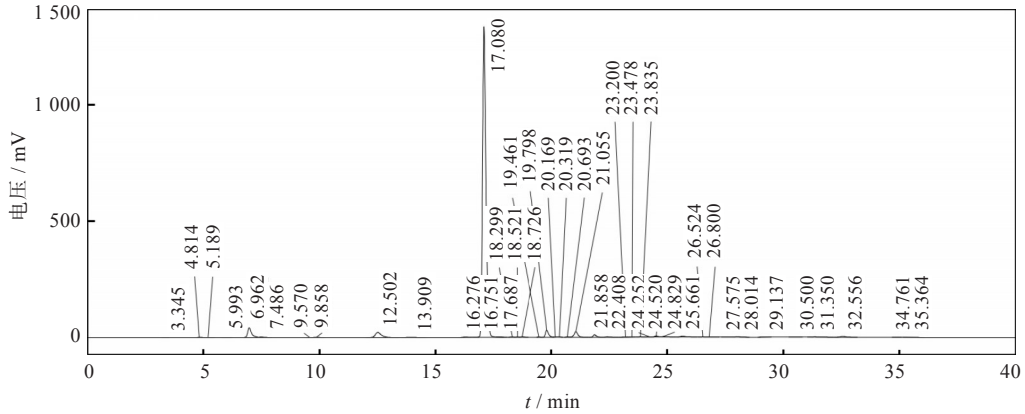

图11　化合物7水解20 h HPLC图谱

Fig. 11　HPLC chromatogram of compound **7** after hydrolysis for 20 h

收的光能转变成荧光发射。因此，可以通过紫外-可见吸收波长和荧光发射波长的差异，来监测合成工艺中化合物**6**、**7**和**8**反应方向和反应程度。

表4　化合物6、7和8的紫外–可见吸收波长和荧光发射波长数据

Tab. 4　UV-vis absorption wavelength and fluorescence emission wavelength data of compounds **6**, **7** and **8**

化合物	λ_{abs} [a]		λ_{em} / nm		斯托克位移 / nm	Φ_f / %[c]
	波长 / nm	logε	溶液[a]	膜[b]		
6	258	1.5	337	345	79	19.8
7	263	1.4	343	348	80	18.6
8	268	1.2	356	359	88	17.9

注：[a] 在25 ℃的二氯甲烷溶液中；[b] 在有机玻璃膜中（5.0% 重量比）；[c] 在二氯甲烷溶液中相对于硫酸奎宁氢盐测量荧光量子产率。

2.6　抗菌活性评价

化合物**6**（*R*）-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤、化合物**7**（*R*）-9-[2-(二乙氧基磷酰甲氧基)丙基]腺嘌呤和化合物**8**替诺福韦对金黄色葡萄球菌的抗菌效果如表5所示。由表5可见：化合物**6**、**7**和**8**的抗金黄色葡萄球菌（*P. vulgaris* CMCC49102）活性均表现出较高活性，随着浓度的降低，所有化合物的抗菌活性逐渐减弱，但仍有一定程度的活性，且化合物**8**的抗菌活性明显高于化合物**6**和**7**。

表5　化合物6、7和8对金黄色葡萄球菌的抗菌活性评价

Tab. 5　Evaluation of antibacterial activity of compounds **6**, **7** and **8** against Staphylococcus aureus

化合物	对不同质量浓度的金黄色葡萄球菌的抗菌活性		
	10.0 mg/L	1.0 mg/L	0.1 mg/L
6	+	+	–
7	++	+	–
8	++	+	+

注：++表示抗菌活性高，+表示抗菌活性中等，–为抗菌活性较弱。

3　结　论

本文对替诺福韦合成工艺优化进行了一定探讨，通过HPLC对整个反应进程进行监控，荧光进行了监测。先以亚磷酸二乙酯和多聚甲醛为原料，三乙胺为催化剂和缚酸剂，经缩合、酰化制得对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯用于后续实验。以腺嘌呤和（*R*）-碳酸丙烯酯为原料，在碳酸钾作用下经开环缩合得到（*R*）-9-(2-羟基丙基)腺嘌呤，在异丙醇镁作用下，采用减压蒸馏除副产物异丙醇，在丙酮体系中，加氢溴酸除盐，氢溴酸水解反应经一锅法制得替诺福韦。通过紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱探讨其光物理性能，发现可以根据化合物的荧光发射波长不同来监测反应方向和反应程度；通过抗菌活性测试，发现低浓度的替诺福韦溶液对金黄色葡萄球菌也有一定的抗菌活性。通过研究得到反应最佳工艺条件为：制备对甲苯磺酰氧甲基膦酸二乙酯中，三乙胺最佳用量110 mL，最佳反应温度20 ℃，最佳反应时间20 h；在碳酸钾作用下开环缩合，最佳反应温度120 ℃，最佳反应时间22 h；将异丙醇镁作为碱，反应最佳温度60 ℃，减压蒸馏条件下，最佳的反应时间为6 h；在氢溴酸作用下水解，最佳反应时间为20 h。在最优化条件下，一锅法合成替诺福韦总收率达到69.2%，整个研究为寻求量产替诺福韦的最佳化工艺条件和即时监测和中控反应过程提供了实验依据。

参考文献

[1]　LI B J, LIU Z Z, LIU X, et al. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate and tenofovir alafenamide fumarate in preventing HBV vertical

transmission of high maternal viral load [J]. Hepatology International, 2021, 15(5): 1103-1108.
[2] QURESHI A, OUATTARA L A, EISAYED N S, et al. Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of mono- and di-substituted phosphonamidate conjugates of tenofovir [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4447.
[3] SEVENLER D, BARDON A, FERNANDEZ S M, et al. Immunoassay for HIV drug metabolites tenofovir and tenofovir diphosphate [J]. ACS Infectious Diseases, 2020, 6(7): 1635-1642.
[4] TSENG C H, HSU Y C, CHEN T H, et al. Hepatocellular carcinoma incidence with tenofovir versus entecavir in chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis [J]. The Lancet Gastroenterology and Hepatology, 2020, 5(12): 1039-1052.
[5] LIM J, CHOI W M, SHIM J H, et al. Efficacy and safety of tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve chronic hepatitis B [J]. Liver International, 2022, 42(7): 1517-1527.
[6] LI Y P, YANG B, QUAN Y N, et al. Advancement of prodrug approaches for nucleotide antiviral agents [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2021, 21 (32): 2909-2927.
[7] KALCIC F, ZGARBOVA M, HODEK J, et al. Discovery of modified amidate (ProTide) prodrugs of tenofovir with enhanced antiviral properties [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 64 (50): 16425-16449.
[8] 尚胜捷, 王璨, 陈云峰. 抗病毒药物中间体替诺福韦的合成工艺研究 [J]. 武汉工程大学学报, 2022, 44 (6): 619-623, 663.
[9] AMBLARD F, PATEL D, MICHAILIDIS E, et al. HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 240: 114554.
[10] 张杰, 施务务, 葛少波, 等. 替诺福韦的合成工艺研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(50): 130.
[11] 王志刚, 聂静, 王治国. 泰诺福韦的合成工艺研究 [J]. 湖北理工学院学报, 2015, 31(5): 46-49.
[12] 刘嘉, 李科, 孙海玲, 等. 替诺福韦的合成工艺改进 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(1): 31-32.
[13] 李陈, 杨芳, 郭建琼, 等. 替诺福韦的合成工艺优化研究 [J]. 化学研究与应用, 2018, 30(6): 970-973.
[14] DIETZ J P, FERENC D, JAMISON T F, et al. Di-tert-butyl phosphonate route to the antiviral drug tenofovir [J]. Organic Process Research & Development, 2021, 25 (4): 789-798.
[15] ZHANG Q Q, PENG Y M, HOU J, et al. An *O*-benzyl phosphonamidate prodrug of tenofovir for the treatment of hepatitis B virus infection [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 65 (13): 9493-9505.
[16] RILEY D L, WALWYN D R, EDLIN C D. An improved process for preparation of tenofovir disoproxil fumarate [J]. Organic Process Research & Development, 2016, 20(4): 742-750.
[17] YOSHIDA Y, HONMA M, KIMURA Y, et al. Structure, synthesis and inhibition mechanism of nucleoside analogues as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 16 (5): 743-766.
[18] YANG J T, LI Z, HU F F, et al. Synthesis of multimeric impurities of tenofovir disoproxil fumarate [J]. Organic Preparations and Procedures International, 2019, 51 (4): 397-402.
[19] DERSTINE B P, TOMLIN J W, PECK C L, et al. An efficient synthesis of tenofovir (PMPA): a key intermediate leading to tenofovir-based HIV medicines [J]. Organic Process Research & Development, 2020, 24 (8): 1420-1427.
[20] MANDALA D, THOMPSON W A, WATTS P. Synthesis routes to anti-HIV drugs [J]. Tetrahedron Letters, 2016, 72 (24): 3389-3420.
[21] SUVEGES N S, RODRIGUEZ A A, DIEDERICHS C C, et al. Continuous-flow synthesis of (*R*)-propylene carbonate: an important intermediate in the synthesis of tenofovir [J]. European Journal of Organic Chemistry, 2018, 2018 (23): 2931-2938.
[22] WANG A P, WU S, TAO Z Y, et al. Design, synthesis, and anti-HBV activity of new bis(L-amino acid) ester tenofovir prodrugs [J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2019, 10 (6): 991-995.

本文编辑:张 瑞