文章编号:1000-5404(2008)07-0621-04

论著

海洋天然产物24-亚甲基胆固醇的高效合成

岳娟娟,周向东 (第三军医大学药学院药物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 高效合成海洋天然产物——24-亚甲基胆固醇。方法 以猪去氧胆酸为原料,$\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷为关键中间体,异丙基化为关键步骤,经7步反应合成目标分子。结果 以66%的总收率合成了目标分子,其结构为MS、IR、^{1}HNMR、^{13}CNMR所证实。结论 24-亚甲基胆固醇的合成,原料易得、路线简短、收率高、符合原子经济性。

关键词:猪去氧胆酸;24-亚甲基胆固醇
中图法分类号:R914.5;R931.77;R977.6 文献标识码:A

Highly efficient synthesis of marine natural product, 24-methylenecholesterol

YUE Juan-juan, ZHOU Xiang-dong (Department of Medical Chemistry, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To synthesize a marine natural product, 24-methylenecholesterol. Methods The target molecule was synthesized in 7 steps using hyodeoxycholic acid as the starting material, 3β-(tetrahydropyran-2-yloxy)-cholest-5-ene-24-ketone as the key intermediate and isopropylation as the key step. Results The target molecule was synthesized with a total yield of 66% and confirmed by MS, IR, ^{1}HNMR and ^{13}CNMR. Conclusion Our synthesis of 24-methylenecholesterol is characterized by easily acquired starting material, short synthetic route, high yield and atom-economic.

Key words: hyodeoxycholic acid; 24-methylenecholesterol

1955年,Idler首次从海洋贝类牡蛎和蛤中分离得到24-亚甲基胆固醇($\triangle^{5,24(28)}$-3β-羟基-28-高胆甾醇)6[1,2],随后又从其他海洋生物,如海绵(*Cliona celata*)、红藻、圆形短指软珊瑚(*Sinularia gyrosa*)、豆荚软珊瑚(*Lobophytum*)、台湾软珊瑚(*Sinularia gibberosa*)等中分离提取到这种化合物。研究表明:24-亚甲基胆固醇6具有降血压、降胆固醇、减慢心率、抗心律失常、血管解痉等多种生物活性[3,4]。最近报道:24-亚甲基胆固醇6能与葡萄糖基转移酶特异性结合,参与细胞代谢、信号转导等多种生命过程[5]。因此,24-亚甲基胆固醇6不仅可开发为心血管药物,还可作为化学探针探索细胞信号转导。

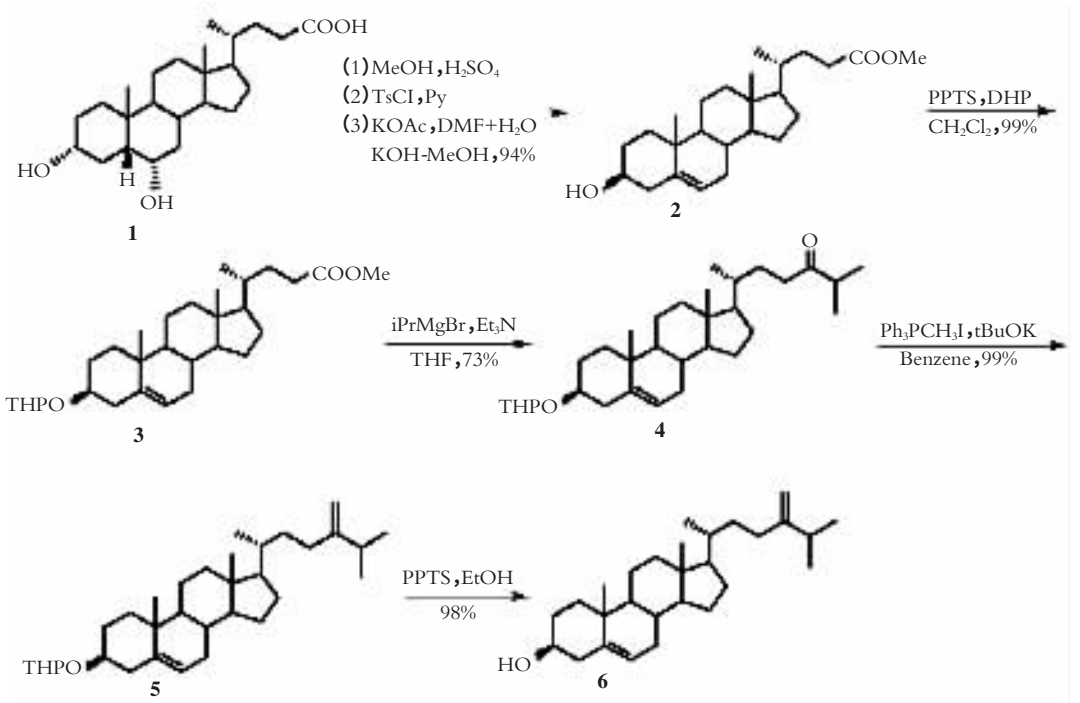
由于24-亚甲基胆固醇在海洋生物中含量甚微,通过提取不可能大量获得,而历史上化学合成方法匮乏。本研究以我国富有的,但大多被废弃并造成环境污染的重要甾体资源——猪去氧胆酸为原料,利用其完整的侧链,原子经济的高效合成目标分子——24-亚甲基胆固醇6。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

所有反应以薄层层析跟踪,使用烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂所生产的高效薄层层析硅胶板(型号CF-254),磷钼酸显色。快速柱层析用同厂生产的层析硅胶(10~40 μm),层析用石油醚均为AR 60~90 ℃。四氢呋喃在氮气保护下以钠和二苯甲酮回流至蓝色蒸出,待用;苯在氮气保护下以钠进行常压蒸馏;二氯甲烷、三乙胺以氢化钙回流数小时后蒸出待用。化合物熔点用上海精密科学仪器有限公司生产的WRR熔点仪测定,所有熔点未校正。^{1}H-核磁共振谱(proton magnetic resonance, PMR)和^{13}C-核磁共振谱(carbon magnetic resonance, CMR)由美国Varian公司生产的Mercury Plus-400核磁共振谱仪测定,四甲基硅烷(tetramethyl-silane, TMS)作内标,未经特别说明,均用氘代氯仿($CDCl_3$)作溶剂,化学位移用δ表示。质谱由HP5989A型质谱仪测定,红外光谱由傅立叶红外分光光度计FTIR-8700测定,用溴化钾(KBr)压片。合成路线见图1。

作者简介:岳娟娟,女,四川省巴中市人,硕士研究生,主要从事海洋甾醇的合成方面的研究。电话:13527484501
通信作者:周向东,电话:(023)68753701
收稿日期:2007-11-13 修回日期:2008-01-23



1 猪去氧胆酸 2:$\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯 3:$\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯 4:$\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷,关键中间体 5:$\triangle^{5,24(28)}$-3β-四氢吡喃氧基-28-高胆甾烷 6:$\triangle^{5,24(28)}$-3β-羟基-28-高胆甾醇

图1 24-亚甲基胆固醇的合成路线(总收率为66%)

1.2 $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯2的合成

首先,按照文献[6]报道的方法,以猪去氧胆酸为原料经甲酯化、对甲苯磺酰化、亲核取代-消除反应合成化合物2。

1.3 $\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯3的合成

100 ml茄形瓶中,加入磁子,真空火焰干燥,氮气保护下,冷至室温。快速加入含890 mg $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯2(2.29 mmol)的干燥二氯甲烷溶液30 ml,131 mg对甲苯磺酸吡啶嗡盐(Pyridinium P-toluenesulfonate, PPTS)(0.48 mmol)和2.3 ml二氢吡喃(Dihydropyran, DHP)(25.07 mmol),氮气保护下,室温搅拌过夜。减压除去二氯甲烷,3×30 ml乙酸乙酯提取,3×30 ml饱和碳酸氢钠,3×30 ml饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,除去溶剂得浅黄色固体3.608 g。快速柱层析(Pet: EtOAc/49: 1)后得白色针状晶体31.069 g。

1.4 $\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷4的合成

50 ml三颈瓶,加入磁子,147 mg镁屑(6.125 mmol),装入滴液漏斗和干燥的直型冷凝管,真空火焰干燥,氮气保护下,冷至室温。快速加入6 ml干燥四氢呋喃和少许碘粒。搅拌下,加入几滴异丙基溴,待反应引发后,滴加0.6 ml异丙基溴(6.424 mmol)至微沸,15 min内加完,保温回流1 h至镁屑基本消失。冷至室温,加入3.2 ml三乙胺(23.36 mmol)。于0~2 ℃滴加含691 mg $\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯3(1.46 mmol)的四氢呋喃溶液15ml,室温搅拌48 h。冰浴下滴加2%的盐酸,有大量气泡放出,滤去残渣,减压除去大部分四氢呋喃,3×15 ml乙酸乙酯提取,3×45 ml饱和碳酸氢钠,3×45 ml饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,除去溶剂得桔红色固体1.065 g。快速柱层析(Pet: EtOAc/49: 1)后得白色针状晶体4 516 mg。

1.5 $\triangle^{5,24(28)}$-3β-四氢吡喃氧基-28-高胆甾烷5的合成

50 ml茄型瓶,加入搅拌子,真空火焰干燥,氮气保护下,冷至室温。快速加入1.580 g碘代甲基三苯基膦(3.776 mmol),381 mg叔丁醇钾(3.398 mmol),干苯10 ml,室温搅拌1 h后,加入含364 mg $\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷4(0.755 mmol)的干苯溶液10 ml,搅拌3 h,薄层层析显示原料消失。40 ml乙酸乙酯溶解,3×40 ml蒸馏水,3×40 ml饱和氯化胺,3×40 ml饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,除去溶剂得黄色固体720 mg。快速柱层析(Pet: EtOAc/70: 1)后得白色针状晶体5 361 mg。

1.6 $\triangle^{5,24(28)}$-3β-羟基-28-高胆甾醇6的合成

25 ml茄型瓶,加入含361 mg $\triangle^{5,24(28)}$-3β-四氢吡喃氧基-28-高胆甾烷5(0.75 mmol)的乙醇溶液10 ml,加入19 mg对甲苯磺酸吡啶嗡盐(0.075 mmol),升温至55 ℃,4 h后,薄层层析显示原料消失。减压除去乙醇,用3×10 ml乙酸乙酯提取,3×10 ml饱和碳酸氢钠,3×10 ml饱和氯化钠洗涤,无水硫酸钠干燥,除去溶剂得白色固体300 mg。快速柱层析(Pet: EtOAc/5: 1)后得无色片状晶体6 293 mg。

2 结果

2.1 $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯2

$\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯2的收率94%,熔点:143.4~144.3 ℃。^{1}HNMR(400 MHz, $CDCl_3$)δ:0.679(s,3H,18-H_3),

0.925(d,3H,J = 6.4 Hz,21-H_3),1.006(s,3H,19-H_3),3.526(m,1H,3α-H),3.665(s,3H,$COOCH_3$),5.359(d,1H,J = 3.6 Hz,6-H)。

2.2　$\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯 3

收率 99%。**熔点**:145.5 ~ 147.2 ℃(文献[7]熔点:148 ~ 149 ℃);^{1}HNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:0.674(s,3H,18-H_3),0.924(d,3H,J = 6.4 Hz,21-H_3),1.005(s,3H,19-H_3),3.498(m,2H,6′-H_2,THP),3.664(s,3H,$COOCH_3$),3.925(dd,1H,J_1 = 7.2 Hz and J_2 = 5.6 Hz,3α-H),4.715(m,1H,2′-H,THP),5.346(t,1H,J_1 = 7 Hz and J_2 = 5.6 Hz,6-H)。

2.3　$\triangle^5$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷 4

收率 73%。**熔点**:128.2 ~ 129.3 ℃;ESI-MS(m/z):523(M + K)$^+$,399(M-THP)$^+$;IR(KBr 压片)cm^{-1}:1 728.1(C = O);^{1}HNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:0.678(s,3H,18-H_3),0.926(d,3H,J = 6.4Hz,21-H_3),1.005(s,3H,19-H_3),1.225(d,6H,J = 6.4 Hz,26-H_3 and 27-H_3),3.508(m,2H,6′-H_2,THP),3.910(dd,1H,J_1 = 6 Hz and J_2 = 5.2 Hz,3α-H),4.715(s,1H,2′-H,THP),4.998(m,1H,25-H),5.345(t,1H,J_1 = 5.6 Hz and J_2 = 5.2 Hz,6-H);^{13}CNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:173.801(24-C),141.5(5-C),121.657(6-C),96.949(2′-C,THP),76.082(3-C),67.298(6′-C),56.800(14-C),55.901(17-C),50.211(9-C),42.395(25-C),40.296(4-C),39.816(13-C),38.840(4′-C,THP),37.499(12-C),37.284(1-C),36.821(10-C),36.535(20-C),35.346(23-C),31.932(7-C),31.711(8-C),31.333(2-C),31.090(22-C),29.718(5′-C,THP),28.079(16-C),25.545(3′-C,THP),24.269(15-C),21.868(27-C),21.106(26-C),20.054(11-C),19.387(19-C),18.332(21-C),11.869(18-C)。

2.4　$\triangle^{5,24(28)}$-3β-四氢吡喃氧基-28-高胆甾烷 5

收率 99%。**熔点**:126.1 ~ 127.1 ℃;ESI-MS(m/z):505(M + Na)$^+$;IR(KBr 压片)cm^{-1}:3 090.8(C = CH_2),1 639.2(C = C),887.1(C = CH_2);^{1}HNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:0.679(s,3H,18-H_3),0.948(d,3H,J = 6.4 Hz,21-H_3),1.010(s,3H,19-H_3),1.027(dd,6H,J_1 = 7.2 Hz and J_2 = 6.8 Hz,26-H_3 and 27-H_3),3.523(m,2H,6′-H_2,THP),3.902(m,1H,3α-H),4.661(d,1H,J = 2.8 Hz,28-H),4.713(s,1H,28-H),5.354(d,1H,J = 5.6 Hz,6-H);^{13}CNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:156.933(24-C),141.030(5-C),121.52(6-C),105.985(28-C),96.973(2′-C,THP),76.113(3-C),62.852(6′-C,THP),56.836(14-C),56.089(17-C),50.279(9-C),42.431(4-C),40.316(13-C),39.863(12-C),38.861(4′-C,THP),37.523(1-C),37.283(10-C),36.853(20-C),35.789(23-C),34.791(25-C),33.869(7-C),31.986(8-C),31.350(2-C),31.049(22-C),29.761(5′-C,THP),28.159(16-C),25.558(3′-C,THP),24.323(15-C),21.960(27-C),21.107(26-C),20.078(11-C),19.411(19-C),18.752(21-C),11.893(18-C)。

2.5　$\triangle^{5,24(28)}$-3β-羟基-28-高胆甾醇 6

收率 98%。**熔点**:142 ~ 143 ℃(文献[2]熔点:143 ℃);EI-MS(m/z):381(M-H_2O)$^+$;IR(KBr)cm^{-1}:3 404.1(-OH),3 070.5(C = CH_2),1 647.1(C = C),887.2(C = CH_2);^{1}HNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:0.684(s,3H,18-H_3),0.949(d,3H,J = 6.4 Hz,21-H_3),1.010(s,3H,19-H_3),1.026(dd,6H,J_1 = 7.2 Hz and J_2 = 6.8 Hz,26-H_3 and 27-H_3),3.528(m,1H,3α-H),4.657(d,1H,J = 1.2Hz,28-H),4.713(s,1H,28-H),5.356(d,1H,J = 5.6 Hz,6-H);^{13}CNMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ:156.901(24-C),140.817(5-C),121.699(6-C),105.976(28-C),71.837(3-C),56.819(14-C),56.076(17-C),50.207(9-C),42.415(4-C),42.365(13-C),39.843(12-C),37.308(1-C),36.546(10-C),35.773(20-C),34.778(23-C),33.856(25-C),31.970(7-C),31.936(8-C),31.730(2-C),31.044(22-C),28.216(16-C),24.307(15-C),22.005(27-C),21.879(26-C),21.078(11-C),19.399(19-C),18.732(21-C),11.880(18-C)。

3　讨论

24-亚甲基胆固醇 6 是一种广泛存在于海洋生物中,具有多种生物活性的海洋天然甾醇,尤其对心血管方面的作用[4],可望开发成为治疗高血压、动脉粥样硬化等心脑血管疾病的新药。1956 年,文献[2,8]报道以$\triangle^5$-3β-乙酰氧基胆酰氯为原料,与二异丙基镉试剂反应以 46% 的收率合成 24-酮胆甾烷,再经 Wittig 反应、水解脱去乙酰基以 32% 的总收率得 24-亚甲基胆固醇 6,但二异丙基镉不仅毒性大还污染环境。近年,曾陇梅等[9,10]报道以大豆固醇为原料,经臭氧反应降解大豆固醇侧链成 22-醛,再与 Wittig 试剂反应构成$\triangle^{24(28)}$-28-高胆甾烷侧链,经 7 步反应,以 24% 的总收率合成 24-亚甲基胆固醇 6,此路线没有完整利用大豆固醇的侧链,极不符合原子经济性。

本研究以我国富有的、但大多被废弃并造成环境污染的重要甾体资源——猪去氧胆酸为原料,利用其完整的侧链,原子经济的高效合成 24-亚甲基胆固醇 6。合成路线如图 1 所示:以猪去氧胆酸为原料,先经甲酯化、对甲苯磺酰化、亲核取代-消除反应,合成$\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯 2,再将裸露的 3β-羟基用四氢吡喃保护得化合物 3,然后经异丙基格氏试剂选择性异丙基化合成关键中间体 24-酮化合物 4,最后与 Wittig 试剂反应,脱去保护基,得目标分子 6。本研究从猪去氧胆酸合成的关键前体$\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯 2 出发,保护后经异丙基格氏试剂与 24-酯亲核加成,选择性异丙基化生成 24-酮化合物 4,一步构成胆甾烷侧链,4 再经 Wittig 反应得$\triangle^{5,24(28)}$-化合物 5,脱去保护基后,原子经济的合成 24-亚甲基胆固醇 6。

按文献[6],猪去氧胆酸 1 经甲酯化、对甲苯磺酰化、亲核取代-消除三步反应,以 94% 的收率得$\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯 2,为避免 3β-羟基对异丙基格氏试剂

的分解，将2溶于二氯甲烷中，在对甲苯磺酸吡啶嗡盐的催化下与二氢吡喃室温搅拌过夜，以99%的收率得3β-羟基四氢吡喃保护的化合物3，然后进行关键步骤24-酮合成的探索。

我们在合成$\triangle^{24(25)}$-甾体化合物时发现[11]，猪去氧胆酸衍生物在-20 ℃与异丙基溴化镁-硼氢化锂反应时，由于温度较低，使异丙基溴化镁活性降低，对24-甲酯亲核加成生成24-酮，硼氢化锂在此条件下还原直接生成24-羟基化合物，但在硼氢化锂受潮失效或无硼氢化锂存在的情况下，反应可生成24-酮。因此，我们设想，利用温度控制异丙基溴化镁的活性对24-甲酯加成一步生成24-酮，而不进行24-酮的进一步加成。将$\triangle^{5}$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯3，在-20 ℃下直接与异丙基溴化镁反应以40%的收率得24-酮化合物4。为提高收率，采取-10 ℃下分批滴加格氏试剂法，当反应体系中原料24-甲酯过量时可抑制24-酮进一步加成，以70%的收率得24-酮化合物4，但此法操作较繁琐，反应时间长。据文献报道：在三乙胺存在下，格氏试剂与酯加成可直接得到酮[12]。利用三乙胺较大的分子体积，与格氏试剂络合形成镁-胺络合物，通过胺对镁的络合降低格氏试剂的活性，防止与24-酮进一步加成反应。室温下，将4倍当量三乙胺加入到新制的异丙基溴化镁-四氢呋喃溶液中，冷至0 ℃，缓慢滴入$\triangle^{5}$-3β-四氢吡喃氧基胆烷酸甲酯3，升至室温，搅拌反应48 h，以73%的收率合成了关键中间体$\triangle^{5}$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷4。^{1}HNMR谱显示：δ 1.225出现积分面积为6个H的双峰(26-CH_3和27-CH_3)，^{13}CNMR谱δ 173.801出现羰基碳，IR谱1 728 cm^{-1}有羰基吸收峰。

获得关键中间体$\triangle^{5}$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷4以后，4与碘代甲基三苯基膦进行Wittig反应，以99%的收率得到$\triangle^{5,24(28)}$-3β-四氢吡喃氧基-28-高胆甾烷5，5在乙醇中用对甲苯磺酸吡啶嗡盐脱去四氢吡喃保护基，以98%的收率获得24-亚甲基胆甾醇6。熔点：142～143 ℃｛文献[2]熔点：143 ℃｝，^{1}HNMR谱δ：4.657、4.713为28-H_2，^{13}CNMR δ：156.901、δ：105.976出现$\triangle^{24(28)}$-烯碳，红外光谱有3 070.5 cm^{-1}的末端烯烃特征吸收峰，由于24-亚甲基胆固醇的结构中含有一裸露羟基，容易脱去一分子水，质谱显示381(M-H_2O)$^{+}$的碎片离子峰(M为398)，24-亚甲基胆固醇的结构为波谱分析所证实。

至此，我们从猪去氧胆酸1出发，以$\triangle^{5}$-3β-四氢吡喃氧基-24-酮胆甾烷为关键中间体，异丙基格氏试剂异丙基化为关键步骤，经7步反应，以66%的总收率，成功的合成了目标分子24-亚甲基胆固醇6。合成路线的特点是：原料易得、合成路线短、总收率高、各步反应条件温和、各步反应产物均为固体、易于放大，且完整的利用了猪去氧胆酸的侧链，由24-甲酯一步合成24-酮，符合原子经济性，为将24-亚甲基胆固醇作为心血管药物的开发研究打下了基础。

（致谢：感谢蒋文、陈双全老师在化合物结构确证方面作出的帮助与指导，特别感谢周成合教授在质谱方面给予的帮助。）

参考文献：

[1] Idler D R, Fagerlund U H M. Marine Sterols. I. Isolation of 24-Methylenecholesterol from Molluscs[J]. J Am Chem Soc, 1955, 77(15): 4142-4145.

[2] Idler D R, Fagerlund U H M. Marine Sterols. Ⅲ. The Synthesis of 24-Methylenecholesterol and 25-Dehydrocholesterol[J]. J Am Chem Soc, 1957, 79(8): 1988-1991.

[3] Teshima S, Kanazawa A, Yoshioka M, *et al*. Hypocholesterolemic effect of 24-methylenecholesterol and 7-cholestenol in the rat[J]. J Steroid Biochem, 1974, 5(1): 69-72.

[4] 方振生，刘锡金，钟红茂，等. 软珊瑚提取物(24-亚甲基-胆固醇)对心血管生理活性的研究[J]. 热带海洋，1989，8(3)：68-74.

[5] Madina B R, Sharma L K, Chaturvedi P, *et al*. Purification and physico-kinetic characterization of 3beta-hydroxy specific sterol glucosyltransferase from Withania somnifera (L) and its stress response[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1774(3): 392-402.

[6] 郑 辉，徐长荣，周向东. 新型LXRs配体——环氧胆烷酸甲酯一类物的化学合成[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1091-1093.

[7] Acuna-Johnson A P, Oehlschlager A C, Pierce A M, *et al*. Stereochemistry of yeast Δ24-sterol methyl transferase[J]. Bioorg Med Chem, 1997, 5(5): 821-832.

[8] Riegel B, Kaye I A. The preparation of 24-Keto and 24-Hydroxycholesterol and Certain Derivatives[J]. J Am Chem Soc, 1944, 66(5): 723-724.

[9] Cui J G, Lin C W, Zeng L M, *et al*. Synthesis of polyhydroxysterols (Ⅲ): synthesis and structural elucidation of 24-methylenecholest-4-en-3β, 6α-diol[J]. Steroids, 2002, 67(13-14): 1015-1019.

[10] Lu W G, Zhang C X, Zeng L M, *et al*. Synthesis of polyhydroxysterols (Ⅴ): efficient and stereospecific synthesis of 24-methylene-cholest-5-ene-3β, 7α-diol and its C-7 epimer[J]. Steroids, 2004, 69(13-14): 803-808.

[11] Zhou X D, Cai F, Zhou W S. A new highly stereoselective construction of the sidechain of squalamine through improved Sharpless catalytic asymmetric dihydroxylation[J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42(13): 2537-2539.

[12] Kikkawa I, Yorifuji T. Convenient Synthesis of Alkyl Ketones from Carboxylic Esters[J]. Synthesis, 1980: 877-880.

（编辑 邓强庭）