DOI:10.16016/j.1000-5404.201601023

用猪去氧胆酸立体选择性合成脑甾醇的新方法

白晓杰[1],吴四维[2],周向东[1] (400038 重庆,第三军医大学药学院药物化学教研室[1];400067 重庆,重庆工商大学环境与生物工程学院应用化学系[2])

[摘要] **目的** 探讨立体选择性合成脑甾醇的新方法。**方法** 以猪去氧胆酸为原料,经甲酯化、还原、Wittig 反应、Sharpless 不对称双羟化等 9 步反应合成脑甾醇,其中以乙酰链甾醇为关键中间体,以 Sharpless 不对称双羟化反应为关键步骤。**结果** 以 52% 的总收率、97% de 的立体选择性合成脑甾醇,其结构用质谱(MS)、核磁共振氢谱(^{1}HNMR)、核磁共振碳谱(^{13}CNMR)、红外光谱(IR)和元素分析等证实。**结论** 新的合成方法立体选择性高、收率高、每个中间体均为晶体易于重结晶纯化,可用于大量合成脑甾醇。

[关键词] 脑甾醇;猪去氧胆酸;乙酰链甾醇;Sharpless 不对称羟化反应;立体选择性
[中图法分类号] R914.5; R927; R977.6 [文献标志码] A

Stereoselective synthesis of cerebrosterol from porcine hyodeoxycholic acid

Bai Xiaojie[1], Wu Siwei[2], Zhou Xiangdong[1] ([1]Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Applied Chemistry, College of Environment and Biology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing, 400067, China)

[**Abstract**] Objective To establish a method to stereoselectively synthesize cerebrosterol. Methods The target molecule was synthesized through 9 steps including methyl esterification, reduction, Wittig reaction, Sharpless catalytic asymmetric dihydroxylation, *etc.*, with hyodeoxycholic acid as starting material, demosterol acetate as key intermediate, and Sharpless catalytic asymmetric dihydroxylation as key step. Results Cerebrosterol was synthesized with the total yield of 52% and stereoselectivity of 97% de, and it was identified by mass spectrometry (MS), proton magnetic resonance spectroscopy (^{1}HNMR), carbon magnetic resonance spectroscopy (^{13}CNMR), infrared spectroscopy (IR), elemental analysis, *etc.* Conclusion The synthesis of cerebrosterol is characterized by high yield, high stereoselctivity, easy recrystallization and purification of each intermediate, and feasible scalability.

[**Key words**] cerebrosterol; hyodeoxycholic acid; desmosterol acetate; Sharpless catalytic asymmetric dihydroxylation; stereoselectivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (20072047). Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: zhouxd88@126.com

脑甾醇(cerebrosterol)主要以微量存在于人[1]和动物脑中[2-3]。由于胆固醇不能突破血脑屏障,大脑中的胆固醇只能在大脑合成。脑甾醇是脑内唯一能突破血-脑屏障而进入血液循环系统的氧化胆固醇,不仅对大脑内保持胆固醇的内环境平衡有重要意义,而且脑甾醇在血液中含量的高低与年龄、发育状况和神经退行性疾病有密切关系[4],如老年痴呆[5-6]、帕金森综合征[7]和亨廷顿舞蹈病[8]等。除此之外,脑甾醇可以作为在血液中检测到的能表征大脑发育及病变的器官特异性生物标记物[9]。控制脑甾醇在血液中的含量,对于预防神经退行疾病具有重要意义[10]。

脑甾醇是 LXRs 受体的激动剂。动物中 LXR 基因敲除导致伴随脂质在神经元、星形胶质细胞和脑膜积累的年龄相关性神经退行性病变[11-12]。LXR 缺损的老鼠被发现出现动脉粥样硬化、糖尿病、生殖障碍以及癌症、神经退行性疾病[13]和青光眼[14]。因此,LXRs 受体成为治疗动脉粥样硬化、糖尿病、男性和女性的生

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(20072047)
[通信作者] 周向东,E-mail:zhouxd88@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1500.015.html(2016-03-22)

殖障碍、癌症、神经退行性疾病[14]和胆结石等疾病[15]新药的分子靶。

1975 年,Koizumi 等[16]从已知构型的 24S,25-环氧胆固醇苯甲酸酯经锂铝氢还原合成脑甾醇,确定了脑甾醇 24S-羟基的绝对构型。大豆固醇为原料,Patrick 等[17]以非天然的 D-缬氨酸为手性源、Moriarty 等[18]以天然的 L-构型缬氨酸为手性源合成脑甾醇(总收率分别为 37%、42%)。但需降解大豆固醇侧链,而未充分利用其侧链,不符合原子经济性。随后,开展了以胆烷酸及其衍生物为原料,以手性试剂的不对称合成脑甾醇的研究。Koizumi 等[19]以 $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸为原料,用手性 Noyori 试剂立体选择性合成脑甾醇(总收率37%、94% de)。Okamota 等[20]以 $\triangle^5$-3β-乙酰氧基-胆烷-24-醛作底物,以(+)-DBNE[(+)-N,N-二丁基胺-1-苯基丙烷-1-醇]作手性配体,与 2.2 当量异丙基锌反应,以得 3β-乙酰脑甾醇(收率 63%,87% de),其立体选择性不高。在研究脑甾醇的高效不对称合成方法中,我们曾用 3,6-二甲氧基甲基猪去氧胆酸为原料以 $(DHQ)_2PHAL$ 为配体 Sharpless 双羟化反应为关键步骤[21]和以 1,2-O-异丙基-5-去氧-5-吗啉基-α-D-呋喃木糖为配体,二异丙基锌试剂加成[22]两种方法合成脑甾醇(总收率 40%,99% de;总收率 53%,99.9% de)。尽管立体选择性高,但是大部分中间体为油状物不能用重结晶纯化,或用到易燃易爆手性锌试剂,不利于大量合成。

本研究报道新的合成方法以立体选择性合成脑甾醇,旨在为其生物医学研究和药学研究奠定物质基础。

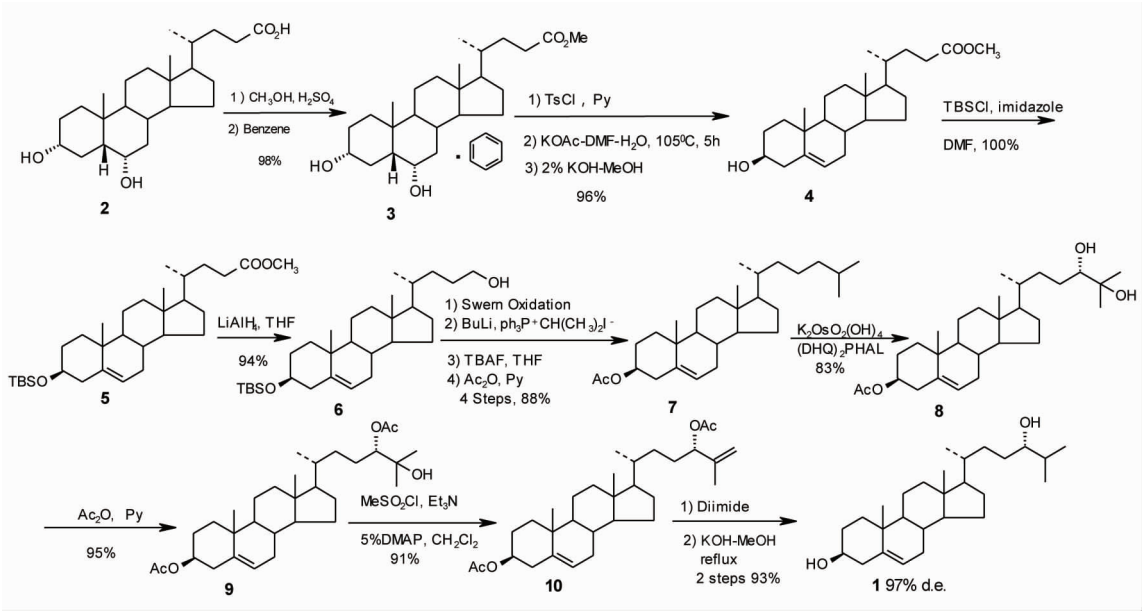
1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

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生产的高效薄层层析硅胶板(HF256),磷钼酸、钼酸铵高锰酸钾或碘显色。快速层析用烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂生产的层析硅胶(硅胶 H,10~40 μm),层析用石油醚均为 60~90 ℃。四氢呋喃均在氮气保护下以钠和二苯甲酮回流至蓝色蒸出待用。吡啶、二氯甲烷以氢化钙回流数小时后蒸出待用。化合物熔点用 Buch 535 熔点仪测定,所有熔点均未校正。所有波谱分析在中科院上海有机化学研究所测定。所有化合物旋光值由 Perkin-Elmer241MC 旋光仪测定。红外光谱由 Shimadzu-440 红外光谱仪测定,固体样品用 KBr 压片测定。^{1}HNMR 和 ^{13}CNMR 由 Bruker AM300 (300 MHz)型核磁共振仪测定,四甲基硅烷(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 δ 值单位为 ppm。质谱由 HP5890A 型质谱仪测定。元素分析由中科院上海有机化学研究所分析测试中心以 ELEMENT ANALYZER-MOD. 1106 仪测定。

1.2 合成路线

见图 1。



9 步反应,总收率 52%,立体选择性 97% de

图 1 猪去氧胆酸合成脑甾醇路线

1.2.1 猪去氧胆酸甲酯-苯复合物(3)的合成 将100 g(245.9 mmol)猪去氧胆酸(2)置于500 mL蛋型瓶中,加入300 mL甲醇溶解后,滴加4 mL浓硫酸,回流4 h,TLC监测。至原料消失后,加入碳酸氢钠中和至中性,过滤,滤液减压蒸馏除去甲醇溶剂后得淡黄色油状液体,加入300 mL苯,加热蒸馏至馏分澄清透明,停止回流,冷却结晶,析出大量白色固体,减压过滤,用冷的苯和石油醚(1∶1)溶剂洗涤2~3次,得猪去氧胆酸甲酯-苯复合物无色颗粒晶体121 g,收率98%。

1.2.2 $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯(4)的合成 12.858 g(37.67 mmol)猪去氧胆酸甲酯-苯复合物(3)溶于28 mL干吡啶中,冷至0 ℃,分批加入14.281 g(75 mmol)对甲苯磺酰氯。逐渐升温至室温,静置1 d,有大量固体析出。将混合物倾入加有碎冰块的10% HCl溶液中,剧烈搅拌30 min,过滤,用大量水洗至中性,烘干。粗品经乙酸乙酯重结晶后得针状晶体22.20 g。

250 mL蛋形瓶中,加入14.6 g(149 mmol)醋酸钾,7.0 mL水和80 mL DMF,加热至105 ℃,加入10 g(14 mmol)原料,保温5 h,冷至室温。有大量沉淀析出,倾入500 mL含碎冰块的5% HCl溶液中,有大量白色沉淀析出。减压过滤,用水洗至中性,烘干得粗品5.538 g。取3.027 g上述粗品溶于30 mL 2% KOH-MeOH,室温搅拌2 h,倾入300 mL含碎冰的10% HCl溶液中,有大量沉淀析出,用水洗至中性,烘干重3.120 g,重结晶得化合物(4)2.853 g。两步收率96%。

1.2.3 $\triangle^5$-3β-(二甲基-叔丁基硅基)-3β-羟基胆烷酸甲酯(5)的合成 100 mL干燥蛋形瓶中,加入13.375 g(34.47 mmol)原料,溶于40 mL DMF中,加入6.235 g(41.37 mmol)叔丁基二甲基氯硅烷和5.867 g(86.18 mmol)咪唑,室温搅拌过夜。用100 mL乙酸乙酯溶解,5×100 mL饱和$NaHCO_3$和3×50 mL饱和NaCl洗至中性,无水$NaSO_4$干燥,除去溶剂得粒状晶体17.305 g。收率定量。

1.2.4 $\triangle^5$-3β-(二甲基-叔丁基硅基)-3β,24-二羟基胆烷醇(6)的合成 100 mL干燥蛋形瓶中,装上滴液漏斗,真空火焰干燥,氩气保护下冷至室温,加入1.960 g(51.58 mmol)$LiAlH_4$和40 mL THF。滴加含17.305 g(34.47 mmol)原料的THF溶液20 mL。2 h后,TLC表明原料消失,加入$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$,有气体产生,搅拌2 h后,硅藻土过滤。3×20 mL乙酸乙酯洗涤,除去溶剂得针状晶体15.832 g,粗品Pet:EtOAc重结晶后得化合物(6)针状晶体15.321 g,收率94%。

1.2.5 乙酰链甾醇(7)的合成 200 mL蛋形瓶中,装上滴液漏斗,真空火焰干燥,氩气保护下冷至室温,加入50 mL干燥的CH_2Cl_2,冷至-78 ℃,滴加2.52 mL(28.90 mmol)草酰氯,搅拌均匀后,滴加4.1 mL(57.80 mmol)DMSO,有气泡产生,搅拌20 min后,滴加含原料11.415 g(24.08 mmol)的CH_2Cl_2溶液30 mL,搅拌25 min后,加入30 mL乙酸乙酯,搅拌30 min后,升至室温,3×100 mL饱和NH_4Cl溶液,3×100 mL半饱和NaCl溶液,3×100 mL饱和NaCl溶液洗涤,无水Na_2SO_4干燥后除去溶剂得粗品11.118 g。

250 mL蛋形瓶中,真空火焰干燥,氩气保护下,冷至室温,迅速加入20.352 g(47.116 8 mmol)$Ph_3PCH(CH_3)_2I$,加入60 mL THF,滴加29.45 mL 1.6 mol/L(47.12 mmol)的丁基锂。室温搅拌1 h。加入含11.118 g(23.555 mmol)原料的THF溶液70 mL,室温搅拌2 h。滴加100 mL饱和NH_4Cl溶液,有大量沉淀析出。加入100 mL乙酸乙酯,5×150 mL H_2O,3×150 mL 5% HCl,3×100 mL饱和$NaHCO_3$,3×150 mL饱和NaCl洗涤,无水Na_2SO_4干燥。除去溶剂得粗品12.500 g。

250 mL蛋形瓶中,真空火焰干燥,氩气保护下,冷至室温,迅速加入上述粗品原料12.500 g(23.555 mmol),抽气,通氩气,加入80 mL THF和28.27 mL 1 mol/L(28.27 mmol)的TBAF-THF溶液。室温搅拌2 h。加入80 mL乙酸乙酯,用3×100 mL饱和$NaHCO_3$,3×100 mL饱和NaCl洗涤,无水Na_2SO_4干燥,除去溶剂得粗品11.700 g。

250 mL蛋形瓶中,加入11.700 g上述粗品,用75 mL醋酐和75 mL吡啶溶解,静置过夜。加入50 mL乙酸乙酯,用大量水洗涤,3×50 mL 10% HCl,3×50 mL饱和$NaHCO_3$,3×50 mL饱和NaCl洗涤,无水Na_2SO_4干燥,除去溶剂得粗品11.500 g。快速柱层析得(7)8.825 g,四步收率88%。

1.2.6 $\triangle^5$-3β-乙酰基-3β,24S,25-三羟基胆甾二醇(8)的合成 100 mL蛋形瓶中,加入3.257 g(9.87 mmol)铁氰化钾,1.362 g碳酸钾(9.87 mmol),313 mg $CH_3SO_2NH_2$,128 mg(5% mol)$(DHQ)_2PHAL$,12 mg(1% mol)$K_2OsO_2(OH)_4$,和33 mL叔丁醇和水(1∶1)的混合溶液,搅拌溶解至均匀黄绿色溶液,加入1.4 g原料,搅拌20 h,有大量沉淀析出,冷至0 ℃,加入4.93 g亚硫酸钠搅拌1 h,3×25 mL乙酸乙酯萃取,分别用3×75 mL 2N KOH,10%盐酸,饱和碳酸氢钠和饱和食盐水洗至中性,无水硫酸钠干燥,除去溶剂得粗品1.553 g。快速柱层析得化合物(11)1.258 g,收率83%。

1.2.7 $\triangle^5$-3β,24S-二乙酰基-3β,24S,25-三羟基胆甾醇(9)的合成 25 mL蛋形瓶中,加入336 mg原料,4 mL醋酐,4 mL吡啶,室温搅拌9 h至原料消失,加入

50 mL 乙酸乙酯,分别用 5×75 mL 水、5% 盐酸溶液、饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤至中性,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗品 405 mg,快速柱层析得化合物(12)378 mg,收率 95%。

1.2.8 $\triangle^{5,25}$-3β,24S-二乙酰氧基胆甾二烯(10)的合成 10 mL 蛋形瓶中,真空火焰干燥,氩气保护下冷至室温,快速加入 110 mg 原料,1.075 mg(5% mol) DMAP,抽气,氩气保护下加入 2 mL CH_2Cl_2 和 0.09 mL 三乙胺,冷至 0℃,搅拌 10 min,滴加 0.0256 mL (0.33 mmol) $MeSO_2Cl$,有沉淀析出,2 h 后,加入 20 mL 乙酸乙酯,分别用 3×20 mL 水和饱和食盐水洗涤。无水硫酸钠干燥,浓缩得粗品 115 mg,快速柱层析得化合物(10)64 mg, 回收原料 37 mg,收率 91%。

1.2.9 脑甾醇(1)(24S-羟基胆固醇)的合成 25 mL 蛋形瓶中,加入 3.59 g 盐酸羟氨和 10 mL DMF,冰浴冷却下加入 3.41 g 85% KOH,搅拌 30 min 过滤。用 2~3 mL DMF 洗涤,滤液冷至 0 ℃,滴加 2.22 mL 乙酸乙酯,搅拌 30 min。20 min 内于 90~95 ℃下滴加上述滤液于含原料 35 mg 的 50 mL 蛋形瓶中,保温 5 h。停止反应,冷至室温,加入 15 mL 水,3×15 mL 乙酸乙酯提取,3×50 mL 水,3×50 mL 5% HCl, 3×50 mL 饱和 $NaHCO_3$,3×50 mL 饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,得粗品 40 mg。粗品用 5 mL MeOH 溶解,加水 0.5 mL,30 mg KOH 回流 5 h。减压除去甲醇,10 mL 乙酸乙酯溶解,3×10 mL 水洗,3×10mL 饱和 NaCl 洗至中性。无水 Na_2SO_4 干燥。后除去溶剂,快速柱层析得脑甾醇(1)26 mg , 收率 93% , 97% de(HPLC)。

2 结果

2.1 猪去氧胆酸甲酯-苯复合物(3)

mp:122~124 ℃。

2.2 $\triangle^5$-3β-羟基胆烷酸甲酯(4)

mp:143~144 ℃,与标准品混合熔点不降。

2.3 $\triangle^5$-3β-(二甲基-叔丁基硅基)-3β-羟基胆烷酸甲酯(5)

mp:138~140 ℃,与标准品混合熔点不降。

2.4 $\triangle^5$-3β-(二甲基-叔丁基硅基)-3β,24-二羟基胆烷醇(6)

mp:173~174 ℃,与标准品混合熔点不降。

2.5 乙酰链甾醇(7)

mp:90~91 ℃,与标准品混合熔点不降。

2.6 $\triangle^5$-3β-乙酰基-3β,24S,25-三羟基胆甾二醇(8)

mp: 135 ~ 136℃; $[\alpha]_D^{23}$ - 27.16° (C, 0.928, $CHCl_3$); MS-EI (m/z): 400 (M-HOAc), 382 (M-HOAc-H_2O); IR (film) cm^{-1}: 3445 (OH), 1735 (CH_3CO_2), 1469, 1376, 1248, 1035; ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm}: 0.68 (3H, s, 18-H_3), 0.94 (3H, d, J = 6.54Hz, 21-H_3), 1.02 (3H, s, 19-H_3), 1.18 (3H, s, 26-H_3), 1.22 (3H, s, 27-H_3), 2.04 (3H, s, CH_3CO_2), 2.32 (2H, d, J = 8.23Hz, 7-H_2), 3.28 (1H, m, 24β-H), 4.61 (1H, m, 3α-H), 5.38 (1H, d, J = 4.73, 6-H); 元素分析 ($C_{29}H_{48}O_4$ · 1/4 H_2O): 计算值: C, 74.88%; H, 10.51%; 实测值: C, 75.08%; H, 10.70%。

2.7 $\triangle^5$-3β,24S-二乙酰基-3β,24S,25-三羟基胆甾醇(9)

mp: 175 ~ 176℃; $[\alpha]_D^{22.5}$ - 31.13° (C, 0.469, $CHCl_3$); MS-EI (m/z): 485 (M + 1- H_2O), 442 (M-CH_3COOH), 425 (M + 1-CH_3COOH-H_2O); IR (film) cm^{-1}: 3470 (OH), 2970, 2938, 2866, 1734 (CH_3CO_2), 1713 (CH_3CO_2), 1438, 1376, 1246, 1038; ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm}: 0.67 (3H, s, 18-H_3), 0.93 (3H, d, J = 6.46Hz, 21-H_3) 1.02 (3H, s, 19-H_3), 1.198 (3H, s, 26-H_3), 1.204 (3H, s, 27-H_3), 2.03 (3H, s, 3β-CH_3CO_2), 2.11 (3H, s, 24α-CH_3CO_2), 4.60 (3β-H), 4.72 和 4.76 (1H, d, d, J1 = 2.42Hz, J2 = 10.145Hz, 24β-H), 5.37 (1H, d, J = 4.8Hz, 6-H); 元素分析 ($C_{31}H_{50}O_5$): 计算值: C, 74.06%; H, 10.02%; 实测值: C, 74.14%; H, 10.06%。

2.8 $\triangle^{5,25}$-3β,24S-二乙酰氧基胆甾二烯(10)

mp: 95 ~ 96 ℃; $[\alpha]_D^{24}$ - 43.3° (C, 0.127, $CHCl_3$); MS-EI (m/z): 424 (M-CH_3COOH), 364 (M-2CH_3COOH), 349 (M + 1-2CH_3COOH-H_2O); IR (KBr) cm^{-1}: 3080 (C = CH_2), 2943, 2889, 1733 (CH_3CO_2), 1654 (C = CH_2), 1374, 1263, 1239, 904 (C = CH_2); ^{1}HNMR (300MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm}: 0.67 (3H, s, 18-H_3), 0.93 (3H, d, J = 6.52Hz, 21-H_3), 1.02 (3H, s, 19-H_3), 1.72 (3H, s, 27-H_3), 2.03 (3H, s, 3β-CH_3CO_2), 2.06 (3H, s, 24β-CH_3CO_2), 4.60 (1H, m, 3α-H), 4.89 (1H, t, J = 1.42Hz, 26-H), 4.94 (1H, s, 26-H), 5.12 (1H, t, J = 6.83Hz, 24β-H), 5.38 (1H, d, J = 4.86Hz, 6-H); 元素分析 ($C_{31}H_{48}O_4$): 计算值: C, 76.82%; H, 9.98%; 实测值: C, 76.74%, H, 10.01%。

2.9 脑甾醇(1)(24S-羟基胆固醇)

mp: 181.1 ~ 181.9℃; $[\alpha]_D^{24}$ -49.47° (C, 0.028, $CHCl_3$); MS-EI (m/e): 402 (M), 384 (M-H_2O), 369 (M-H_2O-Me), 351 (M-2H_2O-Me); IR (cm^{-1}): 3369, 2939, 2869, 1466, 1377, 1054; ^{1} HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_{ppm}: 0.68 (3H, S, 18-CH_3), 0.89 (3H, d, J =

6.82Hz,21-CH_3),1.01(3H,s,19-CH_3),3.30(1H,m,24-H),3.53(1H,m,3α-H),5.35(1H,d,J=5.12Hz,6-H);^{13}CNMR(300 MHz,$CHCl_3$)δ_{ppm}:140.848(5-C),121.791(6-C),77.524(24S-C),77.302(24R-C),71.895(3-C),56.829(14-C),56.021(17-C),50.199(9-C),42.422(13-C),42.393(4-C),39.857(12-C),37.342(1-C),36.590(10-C),36.030(20-C),33.234(25-C),32.292(22-C),2.145(2-C),31.989(8-C),31.761(7-C),30.807(23-C),28.296(16-C),24.374(15-C),21.169(11-C),19.488(19-C),19.156(21-C),18.906(27-C),16.787(26-C),11.968(18-C);元素分析($C_{27}H_{46}O_2$·1/2 H_2O):计算值:C,78.78%,H,11.5%;实测值:C,78.58%,H,11.67%;97% de(HPLC 用 Inersil ODS-3 柱,82% CH_3CN-H_2O 作洗脱液)。

3 讨论

本研究合成脑甾醇的合成策略如图1所示。我们曾在24S,25-环氧胆固醇的立体选择性合成中建立了从猪去氧胆酸合成关键中间体乙酰链甾醇的合成方法[23],现对此方法进一步改进和优化,规模量合成乙酰链甾醇。由于猪去氧胆酸甲酯为油状物,不易结晶,而形成猪去氧胆酸甲酯-苯复合物后易结晶纯化。猪去氧胆酸甲酯-苯复合物(3)溶于吡啶中,加入对甲苯磺酰氯,静置过夜,后处理后重结晶得3α,6α-二对甲苯磺酸酯猪去氧胆酸甲酯,3α,6α-二对甲苯磺酸酯猪去氧胆酸甲酯于105 ℃下,在DMF-H_2O溶液中,与KOAc反应,两步一锅以96%收率得A,B-环构建产物△^{5}-3β-羟基胆烷酸甲酯(4)。△^{5}-3β-羟基胆烷酸甲酯(4)经二甲基叔丁基氯硅烷保护3β-位羟基定量得化合物(5)。(5)用锂铝氢还原以94%的收率得24-羟基化合物(6)。(6)用经Swern氧化后处理后得24-醛化合物粗品。24-醛化合物粗品与异丙基Wittig试剂反应后处理后得侧链构建产物△^{24}-化合物粗品。△^{24}-化合物粗品经四丁基氟化铵(TBAF)脱二甲基叔丁基氯硅基(TBS)保护后处理得链甾醇粗品。链甾醇粗品经乙酰化后处理,经快速柱层析纯化四步一锅以88%的收率得关键中间体乙酰链甾醇(7),合成规模达10 g以上。至此,我们从猪去氧胆酸出发,用6步反应,以78%的高收率合成乙酰链甾醇(7)。乙酰链甾醇(7)是昂贵的甾体重要中间体和生物活性物质。通过本合成方法可以以乙酰链甾醇(7)为原料,通过结构修饰引入各种官能团,合成大量的氧化胆固醇[23]和氧化链甾醇类似物,为建立结构多样化的LXRs配体库的合成和发现新的LXRs激动剂打下了物质基础。

获得关键中间体后,合成目标分子的关键步骤是对乙酰链甾醇(7)进行Sharpless不对称双羟化反应,以构建侧链24S-羟基手性结构后合成目标分子脑甾醇。通过对△^{24}-甾体化合物的Sharpless不对称双羟化反应的系统研究[24],以$(DHQ)_2PHAL$为手性配体,对乙酰链甾醇(7)进行不对称双经化反应。3 mol铁氰化钾,3 mol碳酸钾,1 mol $CH_3SO_2NH_2$,5% mol $(DHQ)_2PHAL$,1% mol $K_2OsO_2(OH)_4$和1.4~2倍标准Sharpless不对称双羟化反应体积的叔丁醇和水(1∶1)的混合溶液,于0 ℃下加入乙酰链甾醇(7),反应20 h,后处理后快速柱层析得预期24S,25-双羟化产物化合物(8),收率83%,立体选择性为98.6% de,优于文献[25]报道的88% de。(8)在醋酐-吡啶中选择性乙酰化以95%收率得24S-乙酰氧基化合物(9),(9)在甲磺酰氯-三乙胺和5% DMAP作用下脱水,以91%收率得$\Delta^{5,25}$-化合物(10),(10)经二酰亚胺还原反应,粗品在氢氧化钾-甲醇中回流,后处理后,快速柱层析分离,两步一锅以93%的收率、97% de立体选择性得目标分子脑甾醇(1),mp:181.1~181.9 ℃(文献[1]报道为175~176 ℃);$[\alpha]_D^{24}$ -49.47°(C,0.028,$CHCl_3$)(文献[1]报道为$[\alpha]_D$ -48.3 ℃ HCl_3);质谱显示质荷比为402的分子离子峰;红外光谱显示波数为3 369 cm^{-1}的羟基峰;核磁共振氢谱显示化学位移为3.30 ppm的含1个24质子多重峰;核磁共振碳谱显示化学位移为77.524 ppm的较(77.302 ppm的24R-羟基碳)为低场的24S-羟基构型的碳峰。并采用元素分析证实其结构。

本法采用猪去氧胆酸(2)为原料,以乙酰链甾醇(7)为关键中间体,以改良的Sharpless不对称双羟化反应为关键步骤,经9步反应高立体选择性合成脑甾醇,总收率为52%,立体选择性为97% de。本路线的特点是原料易得,具有原子经济性,各步反应条件温和,易于控制,各步所得化合物均为固体,易于重结晶纯化和放大。无论总收率和立体选择性,均优于以前报道[19-22]。此合成路线的建立,为脑甾醇的生物医学和药学研究奠定了物质基础,并为以胆固醇骨架为基础的结构多样化氧化甾醇类似物的设计合成打下了方法学基础。

志谢 感谢已故周维善院士、徐长荣老师对本研究所做工作及贡献,感谢中国科学研上海有机化学研究所夏立均先生所做的HPLC检测

参考文献:

[1] Ercoli A, de-Ruggieri P. The constitution of cerebrosterol, a hydroxycholesterol isolated from horse brain[J]. J Am Chem Soc, 1953, 75(13): 3284. DOI: 10.1021/ja01109a515

[2] Di-Frisco S, De-Ruggieri P, Ercoli A. Isolation of cerebrosterol from human brain[J]. Boll Soc Ital Biol Sper, 1953, 29(7): 1351 - 1352.

[3] Dhar A K, Teng J I, Smith L L. Biosynthesis of cholest-5-ene-3beta, 24-diol (cerebrosterol) by bovine cerebral cortical microsomes[J]. J Neurochem, 1973, 21(1): 51 - 60. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb04224.x

[4] Bjorkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, *et al.* Oxysterols and neurodegenerative diseases[J]. Mol Aspects Med, 2009, 30(3): 171 - 179. DOI: 10.1016/j.mam.2009.02.001

[5] Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(3): 687 - 691. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.059

[6] Schonknecht P, Lutjohann D, Pantel J, *et al.* Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls[J]. Neurosci Lett, 2002, 324(1): 83 - 85. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)00164-7

[7] Bjorkhem I, Lovgren-Sandblom A, Leoni V, *et al.* Oxysterols and Parkinson's disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease[J]. Neurosci Lett, 2013, 555: 102 - 105. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.09.003

[8] Leoni V, Long J D, Mills J A, *et al.* Plasma 24S-hydroxycholesterol correlation with markers of Huntington disease progression[J]. Neurobiol Dis, 2013, 55: 37 - 43. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.03.013

[9] Leoni V, Caccia C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases[J]. Biochimie, 2013, 95(3): 595 - 612. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.09.025

[10] Noguchi N, Saito Y, Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(3): 692 - 696. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.010

[11] Noguchi N, Urano Y, Takabe W, *et al.* New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 87: 366 - 372. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.036

[12] Sodhi R K, Singh N. Liver X receptors: emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease[J]. Pharmacol Res, 2013, 72: 45 - 51. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.03.008

[13] Viennois E, Pommier A J, Mouzat K, *et al.* Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(2): 219 - 232. DOI: 10.1517/14728222.2011.547853

[14] Fourgeux C, Bron A, Acar N, *et al.* 24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma[J]. Chem Phys Lipids, 2011, 164(6): 496 - 499. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.04.006

[15] Castro-Torres I G, de-Jesus-Cardenas-Vazquez R, Velazquez-Gonzalez C, *et al.* Future therapeutic targets for the treatment and prevention of cholesterol gallstones[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 765: 366 - 374. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.08.045

[16] Koizumi N, Morisaki M, Ikekawa N, *et al.* Absolute configurations of 24-hydroxycholesterol and related compounds[J]. Tetrahedron Letters, 1975, 16(26): 2203 - 2206. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)72677-3

[17] Patrick K, Yoichi N, Bang L, *et al.* A stereoselective synthesis and a convenient synthesis of optically pure (24R)- and (24S)-24-hydroxycholesterols[J]. Bull Soc Chim Fr, 1983, Ⅱ: 189 - 194.

[18] Moriarty R M, Enache L A, Kinney W A, *et al.* Stereoselective synthesis of squalamine dessulfate[J]. Tetrahedron Letters, 1995, 36(29): 5139 - 5142. DOI: 10.1016/0040-4039(95)01011-6

[19] Koizumi N, Ishiguro M, Yasuda M, *et al.* Stereoselective introduction of hydroxy groups into the cholesterol side chain. Preparation of (24R)- and (24S)-24, 25-dihydroxy- and (25R)- and (25S)-25, 26-dihydroxyvitamin D3 by asymmetric synthesis[J]. J Chem Soc Perkin Trans I, 1983, 1401 - 1410. DOI: 10.1039/P19830001401

[20] Okamoto M, Tabe M, Fujii T, *et al.* Asymmetric isopropylation of steroidal 24-aldehydes for the synthesis of 24(R)-hydroxycholesterol[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6(3): 767 - 778. DOI: 10.1016/0957-4166(95)00073-X

[21] Zhou X D, Zhou W S. A new highly stereoselective synthesis of cerebrosterol, an agonist of the nuclear receptor LXRs[J]. Tetrohedron, 2001, 57(39): 8291 - 8296. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)00812-2

[22] Zhang D H, Zhou X D, Zhou W S. A Short and Highly Stereoselective Synthesis of Cerebrosterol[J]. Chin J Chem, 2002, 20(11): 1145 - 1148. DOI: 10.1002/cjoc.20020201104

[23] 周向东, 郑辉, 周维善. 氧化甾醇受体(LXRs)配体的合成[J]. 科学通报, 2002, 47(24): 1868 - 1875. DOI: 10.3321/j.issn: 0023-074X.2002.24.007

[24] 周向东, 周维善. 高立体选择性的合成24R, 25-和24S, 25-二羟基甾体化合物: 中国, CN1254716[P]. [2000-05-31].

[25] Kolb H C, VanNieuwenhze M S, Barry-Sharpless K. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation[J]. Chem Rev, 1994, 94: 2483 - 2547. DOI: 10.1021/cr00032a009

(**收稿**:2016-01-06;**修回**:2016-03-07)

(编辑 张 维)