

胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的合成

白少飞^{1,2}, 孙 雯^{1,2}, 刘 前^{1,2}

(1. 上海化工研究院有限公司 生物医药检测中心, 上海 200062;

2. 国家同位素工程技术研究中心 上海分中心, 上海 200062)

摘要: 针对我国胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 产品制备方法空白, 以乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 和 4-胆甾烯-3-酮为起始原料, 合成胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 。总体标记合成路线采用胆固醇基础结构拆分后引入标记砌块再重构目标化合物结构的方案, 其中 4-胆甾烯-3-酮通过开环氧化、合环得到标记前体, 乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 作为 ^{13}C 标记引入砌块与标记前体通过乙酰化反应得到乙酰化标记中间体, 最后乙酰化标记中间体再经过碳环重构、酯化、还原反应得到 ^{13}C 二标记的类固醇激素类化合物胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 。其中还原反应显示出一定的不对称合成现象。以投入的乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 的物质的量计算反应总产率为 16.2%。所得终产品经 MS、NMR 和 HPLC 表征确认, 液相色谱纯度 $\geq 96\%$, 液相质谱检测丰度 $\geq 98 \text{ atom} \% ^{13}\text{C}$, 该产品可用于临床质谱、生物医药等领域检测用稳定同位素内标试剂以及临床质谱用疾病筛查试剂盒原料。

关键词: 胆固醇-3; 4- $^{13}\text{C}_2$; 稳定同位素标记化合物; 类固醇激素; 内标试剂; 试剂盒

中图分类号: O628.2+1

文献标志码: A

文章编号: 1000-7512(2024)03-0227-10

doi: 10.7538/tws.2024.37.03.0227

Synthesis of Isotope-labeled Cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

BAI Shaofei^{1,2}, SUN Wen^{1,2}, LIU Qian^{1,2}

(1. Shanghai Research Institute of Chemical Industry CO., LTD., Shanghai 200062, China;

2. National Isotope Engineering Technology Research Center-Shanghai-Sub-Center, Shanghai 200062, China)

Abstract: The ^{13}C -labeled synthesis of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ was based on phenyl acetate-1,2- $^{13}\text{C}_2$ and 4-cholesten-3-one. 4-Cholesten-3-one was reacted in a certain proportion solvent mixed by isopropanol and water to obtain the carboxylic acid intermediate through ring opening oxidation reaction using potassium permanganate and sodium periodate as oxidant, and then reacted with acetate under heat and reflux in nitrogen protection to produce the ring-closure carbonyl intermediate. The acetylation labeled intermediate was synthesized with the ring-closure carbonyl intermediate and phenyl acetate-1,2- $^{13}\text{C}_2$ in tetrahydrofuran as solvent, using sodium hydride as catalyzer through acetylation reaction. Finally the cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ was obtained sequentially by carbon ring reconstruction reaction, esterification and reduction reaction with the acetylation labeled intermediate as raw material. The reduction reaction showed a certain degree of asymmetric synthesis phenomenon. The yield based on the amount of substance of acetate-1,2- $^{13}\text{C}_2$ was 16.2%. The structure of target product was confirmed by MS, NMR and HPLC. Its chemical purity (HPLC)

收稿日期: 2024-02-09; 修回日期: 2024-04-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFF0701900)

通信作者: 刘 前

was higher than 96%, and isotopic abundance was higher than 98% (atom ^{13}C). This product can be used as the stable isotope internal standard reagent for detection in the field of clinical mass spectrometry and biomedical. It can also be used as a raw material of the test kit for clinical mass spectrometry disease detection.

Key words: cholesterol-3; 4- $^{13}\text{C}_2$; stable isotope labeled compound; steroid hormone; internal standard reagent; test kit

类固醇类激素是人体内由胆固醇通过不同的酶形成的一系列激素,对人体生长、发育、生殖、代谢等起着重要的调节作用。这类激素代谢紊乱是许多疾病的肇因,准确检测其变化情况在疾病的诊断中具有重要参考价值^[1-5]。

胆固醇(Cholesterol)是类固醇激素中的一种,具有甾-5-烯-醇的类固醇结构,广泛存在于动物体内,与细胞膜的形成密切相关,是胆汁酸、甾醇类激素、维生素D等合成所需的生物活性物质之一,是人类动物组织细胞所不可缺少的重要物质。大量的流行病学研究证实,胆固醇水平和冠心病的发病关系密切,其在人体中的含量的升高也是动脉粥样硬化性心血管病的衡量因素之一^[6-8]。近年来研究发现,人体内胆固醇含量与多种肿瘤相关,如乳腺癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌和肾癌;此外其含量还与胆结石、脂肪肝、以及糖尿病等多种疾病有关^[9-12]。

传统临床医学上对胆固醇这类类固醇激素的检测最常用的方法是酶联免疫吸附法(ELISA)和放射免疫法(RIA)。由于在人体内含量差异很大($\text{ng/mL} \sim \text{pg/mL}$),传统ELISA和RIA检测方法所需样本量大、耗时长,且受限于抗体的交叉反应,常出现定量不准确及假阳性的结果,进而影响相关疾病的诊断与治疗^[13-17];另外胆固醇等类固醇激素的检测容易与人体内其他具有相似结构的物质混淆。2018年后中国的临床用稳定同位素稀释质谱法也进入了快速发展的时期,在多个临床检测领域已经替代或者部分替代了传统的生化诊断分析方法,稳定同位素标记的类固醇激素试剂是该类激素临床用稳定同位素稀释质谱法检测的核心,因此胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 成为胆固醇临床质谱检测应用于冠心病、动脉粥样硬化、肿瘤、脂肪肝、胆结石以及糖尿病等多种疾病诊治的核心^[18-24]。但目前以胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 为代表的用于维生素检

测、肿瘤筛查所必需的类固醇类的检测试剂国内尚无法自主合成,其生产和供应被发达国家垄断,相关试剂价格昂贵而且供应受限,胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的价格高达70000元/g。这严重制约我国胆固醇等类固醇激素的临床质谱的科研检测进展、新型检测方法的探索、试剂盒的生产、临床检测实际使用的扩展。

目前国内尚无胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的合成报道,国外仅有采用基团保护策略进行合成胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的方法报道^[25]。该方法所采用的酰氯标记砌块稳定性差且产率较低,使得昂贵的 ^{13}C 原料利用率降低,成本较高;基团保护策略,涉及两个基团的保护与去保护过程,导致整体合成步骤偏长,过程复杂。国外仅有一些与胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 具有相似结构化合物的 ^{13}C 标记引入策略的报道:Isa等^[26]以 ^{13}C -叶立德为引入试剂,与 α 、 β -不饱和羰基双键氧化裂解中间体反应,制备孕酮。但该氧化过程副反应多,过程长,使用了贵金属催化,造成成本急剧上升;Berthonneau等^[27]报道了A环引入苯硫酚活化再氧化的策略,采用 ^{13}C -Wittig试剂作为碳源,类固醇骨架引入活化基团;但该方法实验步骤长、氧化操作复杂,羰基非对应选择性还原后产生复杂的混合物,造成提纯困难,制备效率低。

本研究针对我国胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 产品制备方法空白,结合ISA和Berthonneau等的 ^{13}C 标记引入策略^[26-27],设计了胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的合成路线:从4-胆甾烯-3-酮出发,通过开环氧化反应得到中间体I,中间体I再合环改变碳环结构得到中间体II,然后以乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ (上海化工研究院自主产品)为 ^{13}C 标记引入砌块与中间体II进行乙酰化反应引入标记得得到标记中间体III,中间体III再通过碳环重排反应、酯化反应、还原反应依次得到中间体IV、中间体V,并最终合成胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ (VI)。该合成路线原料

丰富易得、价格较低;选取乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 作为标记砌块,在较后步骤引入,尽可能的减少贵重原料的消耗,经济适用性可以更强且能更好的规避产品丰度稀释的风险;另外,反应路线具有拓展性,可后续开发三碳标记胆固醇或“移植”于具有类似结构的其他标记类固醇临床诊断试剂的研制,如 ^{13}C 标记的孕酮、孕烯醇酮、睾酮、17 α -羟基孕酮、雄烯二酮等,形成系列化合物。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

JNM-ECZ500 500 MHz 核磁共振波谱仪:日本电子株式会社;Accela-TSQ Quantum 高效液相

色谱-串联三重四级杆质谱仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Aquity H-Class 超高效液相色谱仪:美国 Waters 公司。

4-胆甾烯-3-酮、二氯甲烷、碳酸钠、高锰酸钾、高碘酸钠、乙酸酐:AR,安徽泽升科技有限公司;异丙醇、苯酚、钠氢、硼氢化钠:AR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸、乙酸、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、醋酸钠、四氢呋喃、对甲苯磺酸:AR,江苏强盛功能化学股份有限公司;乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2 \geq 98 \text{ atom}\% ^{13}\text{C}$:上海化工研究院有限公司。

1.2 实验方法

胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的合成总路线示于图1。

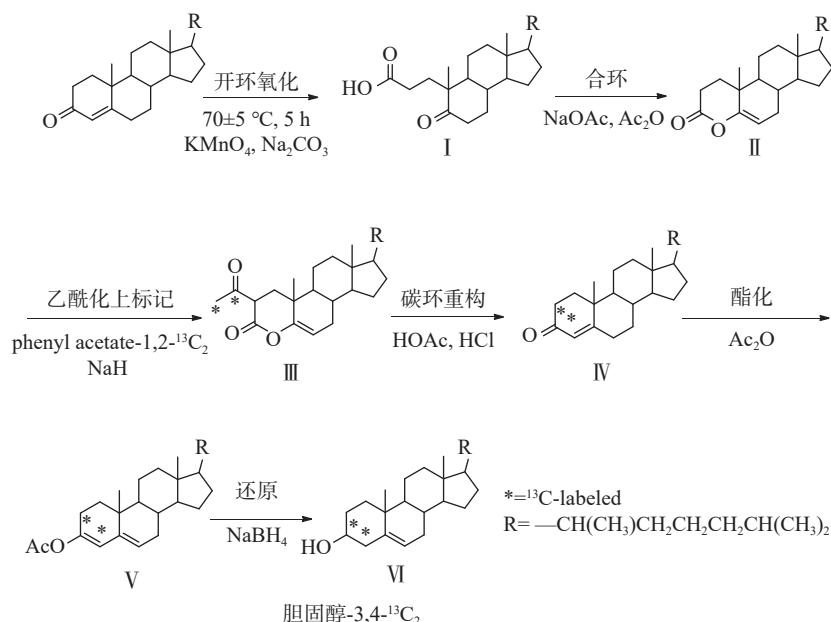


图1 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的合成总路线

Fig.1 Overall synthesis route of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

1.2.1 开环氧化羧酸中间体(I)的合成 在2 L 单口烧瓶中,加入20.0 g(52 mmol) 4-胆甾烯-3-酮、9.7 g(62 mmol)碳酸钠、800 mL 异丙醇,70 °C 下搅拌溶解后,滴入由1.2 g(7.5 mmol)高锰酸钾、63.0 g(28 mmol)高碘酸钠和400 mL 水配置的溶液,控制滴加温度在(70±5) °C,滴加速度20 mL/min,滴加结束后继续保温反应5 h。反应结束后,冷却,抽滤,滤饼用100 mL 5%氢氧化钠溶液洗涤,再用200 mL 二氯甲烷洗涤,分液除去有机相,留取水相,旋蒸除去大部分异

丙醇,调节水相pH至3.0,用250 mL 二氯甲烷萃取,有机相用300 mL 水洗涤,无水 NaSO_4 干燥,过滤旋蒸除溶后得淡黄色固体粗品19.1 g,产品经柱层析提纯,流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})$,柱层析梯度为1:9~3:7,最后提纯得白色固体15.1 g,收率71.8%(以反应投入的4-胆甾烯-3-酮的物质的量计算)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 2.53 (td, 1H), 2.34 (ddd, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 2.01 (d, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.70 (d, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.50

(m, 2H), 1.24 (m, 12H), 1.01 (m, 3H), 0.86 (m, 12H), 0.71 (s, 3H); ^{13}C NMR (120 MHz, CDCl_3), δ : 215.33, 179.16, 56.09, 55.83, 50.50, 48.07, 42.59, 39.56, 39.41, 38.22, 36.18, 35.80, 34.96, 31.52, 29.30, 29.14, 28.15, 28.09, 24.31, 23.89, 22.89(2C), 21.52, 20.44, 18.67, 12.06; LC-MS, m/z : 实测值 405 $[\text{M}+1]^+$; 理论值 404。

1.2.2 合环羰基中间体(II)的合成 在 500 mL 双口烧瓶中, 加入 15.1 g (37 mmol) I、7.5 g (91 mmol) 醋酸钠、150 mL 乙酸, 氮气保护下, 加热至 135 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌回流反应 24 h。反应结束后, 旋蒸除溶剂得粗品, 粗品经柱层析提纯, 流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 10$, 得到无色液体 10.5 g, 收率 72.8% (以反应投入的 I 物质的量计算)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 5.24 (d, 1H), 2.59 (m, 1H), 2.28 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.84 (m, 2H), 1.58 (m, 7H), 1.31 (m, 4H), 1.06 (m, 13H), 0.87 (m, 9H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (120 MHz, CDCl_3), δ : 168.76, 154.48, 105.71, 56.29, 56.09, 48.81, 42.59, 42.52, 39.56(2C), 38.22, 36.22, 36.18, 35.81, 34.96, 31.52, 29.26, 28.22, 24.31, 23.89, 22.89(2C), 21.53, 20.44, 18.67, 11.97; LC-MS, m/z : 实测值 387 $[\text{M}+1]^+$; 理论值 386。

1.2.3 乙酰化标记中间体(III)的合成 在 250 mL 单口烧瓶中, 加入 10.5 g (27 mmol) II、4.3 g (108 mmol) 钠氢 (60%)、3.8 g (27 mmol) 乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 、100 mL 无水四氢呋喃, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 4 d。反应结束后, 旋蒸除溶剂得粗品, 粗品经柱层析提纯, 流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷})$, 柱层析梯度为 1 : 19~3 : 17, 最后得白色固体 7.0 g, 收率 59.1% (以反应投入的乙酸苯酯-1,2- $^{13}\text{C}_2$ 的物质的量计算), 同位素丰度 98.2 atom% ^{13}C 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 5.26 (s, 1H), 2.43 (m, 1H), 2.08 (m, 4H), 1.87 (m, 2H), 1.59 (m, 7H), 1.31 (m, 4H), 1.12 (m, 13H), 0.87 (m, 9H), 0.69 (s, 3H); ^{13}C NMR (120 MHz, CDCl_3), δ : 199.97, 175.29*, 153.67, 105.13, 56.28, 56.12, 49.07, 42.44, 39.57,

39.35, 36.22, 35.81, 35.12, 32.02, 29.38, 28.09, 25.71(2C), 25.37, 24.27, 23.89, 22.90, 22.64, 21.10, 19.30, 19.04, 18.65*, 11.94; LC-MS, m/z : 实测值 431 $[\text{M}+1]^+$; 理论值 430。

1.2.4 碳环重构反应中间体(IV)的合成 在 250 mL 单口烧瓶中, 加入 7.0 g (16 mmol) III、140 mL 乙酸、28 mL 盐酸 (36.5%), 80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 2 d。反应结束后, 加入 200 mL 水, 200 mL 乙酸乙酯萃取有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸除溶得粗品, 粗品经柱层析提纯, 流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 10$, 得淡黄色固体 4.1 g, 收率 65.2% (以反应投入的 III 的物质的量计算)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 5.86 (dd, 1H), 5.54 (d, 1H), 2.34 (m, 4H), 2.01 (m, 2H), 1.82 (m, 2H), 1.58 (m, 7H), 1.31 (m, 4H), 1.08 (m, 13H), 0.89 (d, 6H), 0.85 (dd, 3H), 0.69 (s, 3H); ^{13}C NMR (120 MHz, CDCl_3), δ : 199.99*, 171.57, 123.60*, 56.19, 55.96, 53.90, 42.47, 39.71, 39.57, 38.67, 36.20, 35.77(2C), 34.16, 33.94, 33.04, 32.13, 28.26, 28.09, 24.26, 23.89, 22.89, 22.64, 21.11, 18.72, 17.47, 12.03; LC-MS, m/z : 实测值 387 $[\text{M}+1]^+$; 理论值 386。

1.2.5 酯化反应中间体(V)的合成 在 250 mL 单口烧瓶中, 加入 4.1 g (11 mmol) IV、70 mL 乙酸酐, 80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 24 h。反应结束后, 旋蒸除溶得粗品, 粗品经柱层析提纯, 流动相为 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 10$, 得白色固体 2.3 g, 收率 50.6% (以反应投入的 IV 的物质的量计算)。LC-MS, m/z : 实测值 427 $[\text{M}+1]^+$; 理论值 426。

1.2.6 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ (VI) 的合成及表征 在 250 mL 单口烧瓶中, 加入 2.3 g (5 mmol) V、30 mL 甲醇、30 mL 四氢呋喃, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应, 加入 0.4 g (10 mmol) 硼氢化钠, 继续反应 24 h。反应结束后, 加入 20 mL 水, 稀盐酸 (5%) 至 pH 为 3.0, 100 mL 二氯甲烷萃取, 100 mL 饱和氯化钠溶液洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸除溶得粗品, 粗品经柱层析提纯, 流动相 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 6$ (加 2% 异丙醇), 最终得到胆固醇-3,4-

表 1 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 高效液相色谱检测条件

Table 1 HPLC detection conditions of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

色谱柱	柱温/ $^{\circ}\text{C}$	流动相	流速/ $(\text{mL} \cdot \text{min}^{-1})$	检测器	检测波长/nm
Avantor ACE (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm)	40	$V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 95 : 5$, 等度洗脱	0.8	PDA	210

$^{13}\text{C}_2$ 白色固体 1.8 g, HPLC 检测纯度 $\geq 96.0\%$ (HPLC 检测条件见 表 1, 结果示于 图 2), LC-MS 检测丰度为 98.1 atom% ^{13}C , 收率 82.9% (以反应投入的 V 的物质的量计算)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.662 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.839~0.857 (m, 6H, $-\text{CH}_3$), 0.892~0.905 (m, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.916~0.979 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 0.991 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.024~1.588 (m, 20H, $-\text{CH}_2-$), 1.693~1.805 (m, 1H, $-\text{OH}$), 1.812~1.861 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.926~2.015, [m, 2H, $-\text{C}(\text{OH})\text{H}-^{13}\text{CH}_2-\text{C}(\text{C})=\text{CH}-\text{CH}_2-$], 2.055~2.431, [m, 2H, $-\text{C}(\text{OH})\text{H}-^{13}\text{CH}_2-\text{C}(\text{C})=\text{CH}-\text{CH}_2-$], 3.329~3.677 (m,

1H, [m, 1H, $-\text{C}(\text{OH})\text{H}-^{13}\text{CH}_2-\text{C}(\text{C})=\text{CH}-\text{CH}_2-$], 5.317~5.346 (m, 1H, $-\text{C}(\text{OH})\text{H}-^{13}\text{CH}_2-\text{C}(\text{C})=\text{CH}-\text{CH}_2-$]. ^{13}C NMR (120 MHz, CDCl_3), δ : 11.948, 18.805, 19.488, 21.168, 22.656, 22.919, 23.915, 24.382, 28.103, 28.325, 31.582, 31.874, 31.980, 35.877, 36.273, 36.580, 37.332, 39.602, 39.861, 42.228~42.514*, 42.399, 50.205, 56.227, 56.845, 67.889~72.014*, 125.859~126.228, 140.669~140.990. LC-MS, m/z : 实测值 371 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 理论值 388。

2 结果与讨论

2.1 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 与天然丰度胆固醇的对比

从核磁氢谱角度分析(图 3), ^{13}C 标记胆固醇的核磁氢谱中, 相比天然丰度胆固醇, 与被标记碳连接的氢的氢谱出峰会发生裂分, 对比图示于 图 4, 为胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 和天然丰度胆固醇的核磁氢谱局部对比图, 图 5 为胆固醇标记位置, 从图中可知, 在化学位移 3.50 左右的峰归属为胆固醇 4 位碳上的氢, 化学位移 2.35 左右的峰归属为胆固醇 3 位碳上的氢, 由于 3,4 位上的碳被

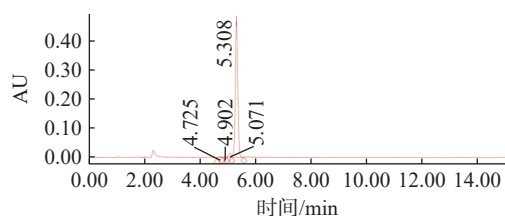


图 2 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 高效液相色谱图
Fig.2 HPLC spectrum of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

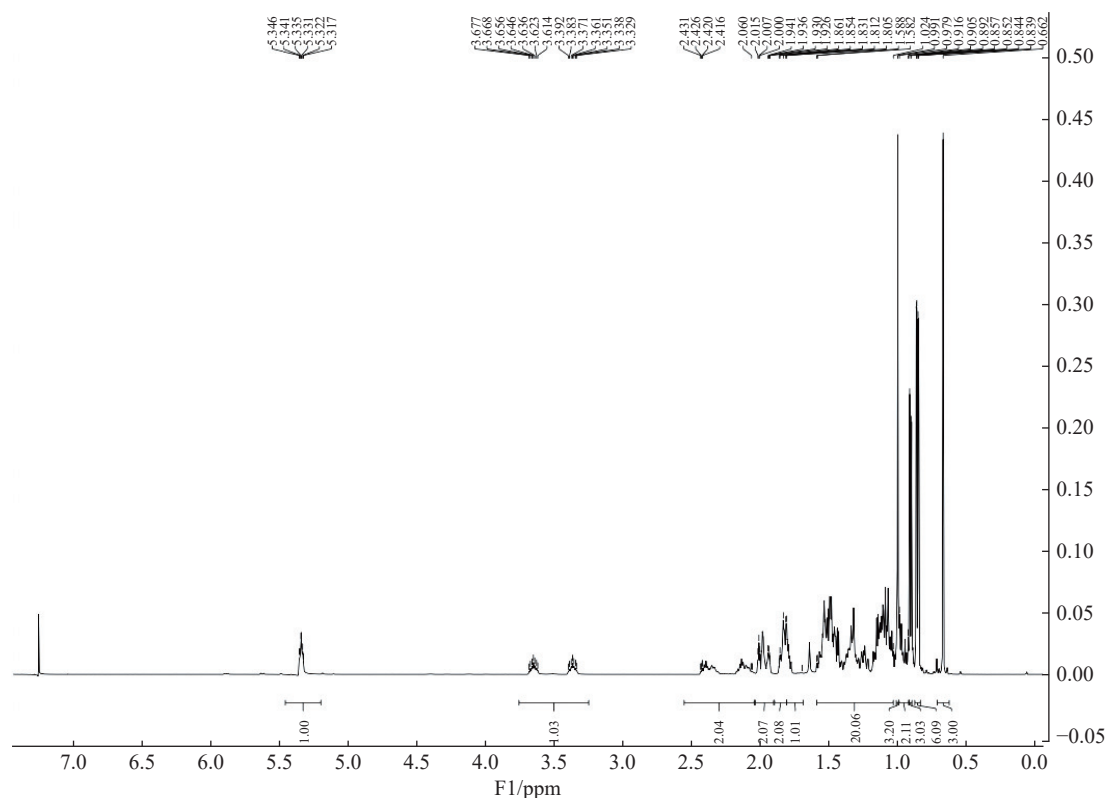


图 3 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 核磁氢谱
Fig.3 ^1H NMR spectrum of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

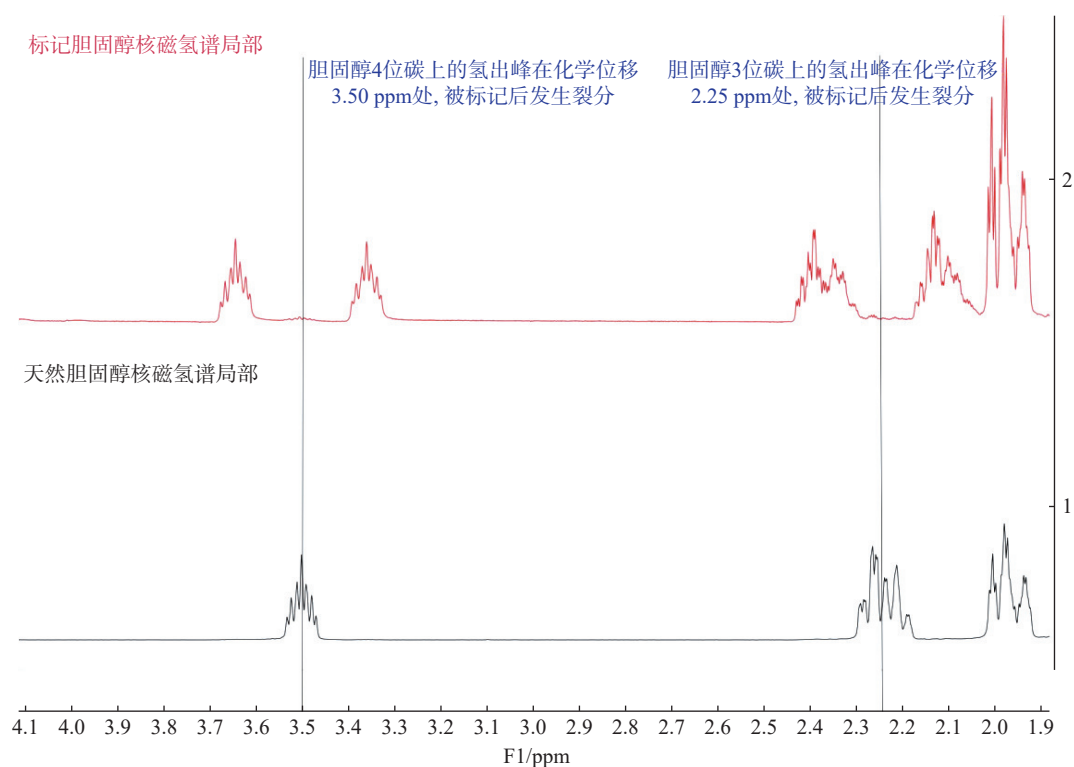


图4 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 和天然胆固醇的核磁氢谱局部对比图

Fig.4 Comparison chart in ^1H NMR spectrum of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ and cholesterol

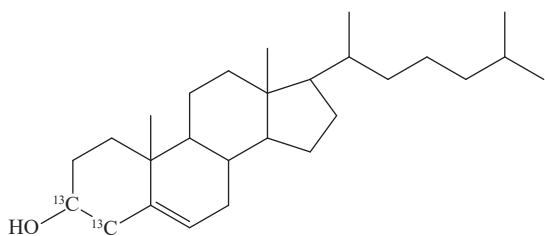


图5 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 标记位置

Fig.5 Isotope-labeled location of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$

^{13}C 取代,导致该位置上的氢的核磁氢谱中出峰分别裂分为两组。

从核磁碳谱角度分析(图6), ^{13}C 标记胆固醇的核磁碳谱中,相比天然丰度胆固醇,被标记碳对应的出峰信号强度极高,与天然丰度胆固醇核磁碳谱出峰强度不在一个数量级。胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的核磁碳谱示于图7,图中化学位移42.228~42.514处和67.889~72.014处为标记位置碳的出峰,可见出峰强度远高于未标记位置。

2.2 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的差向异构现象

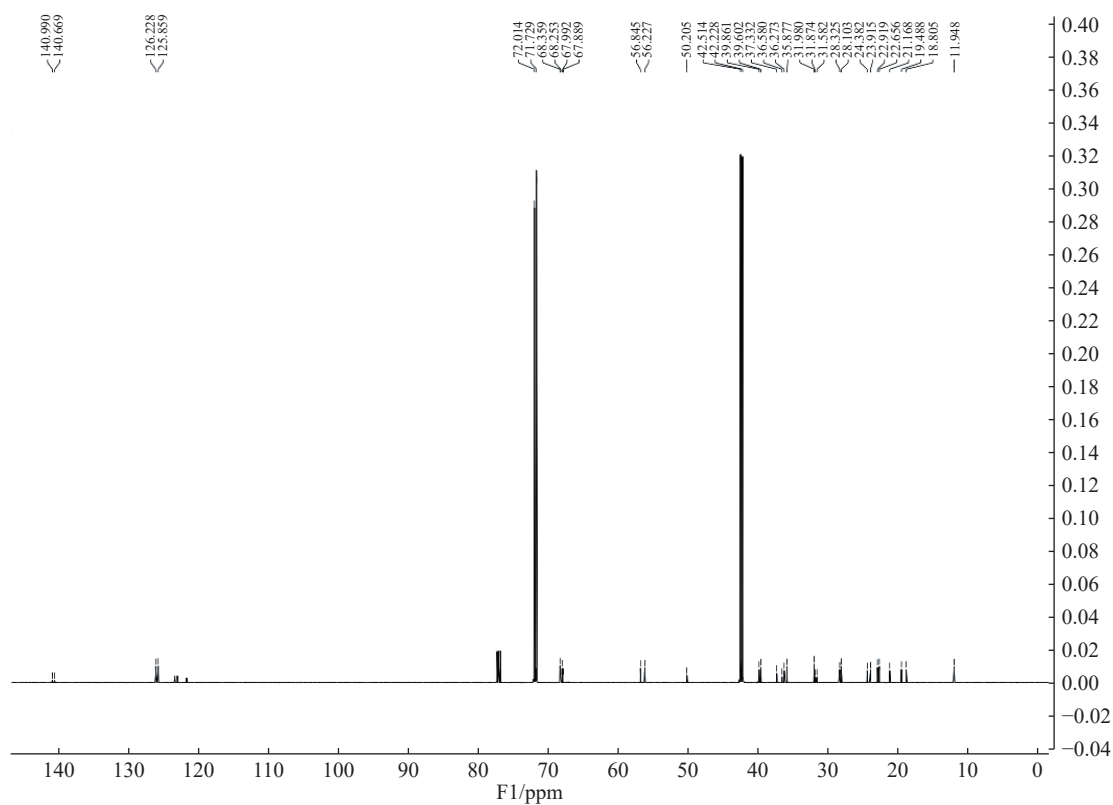
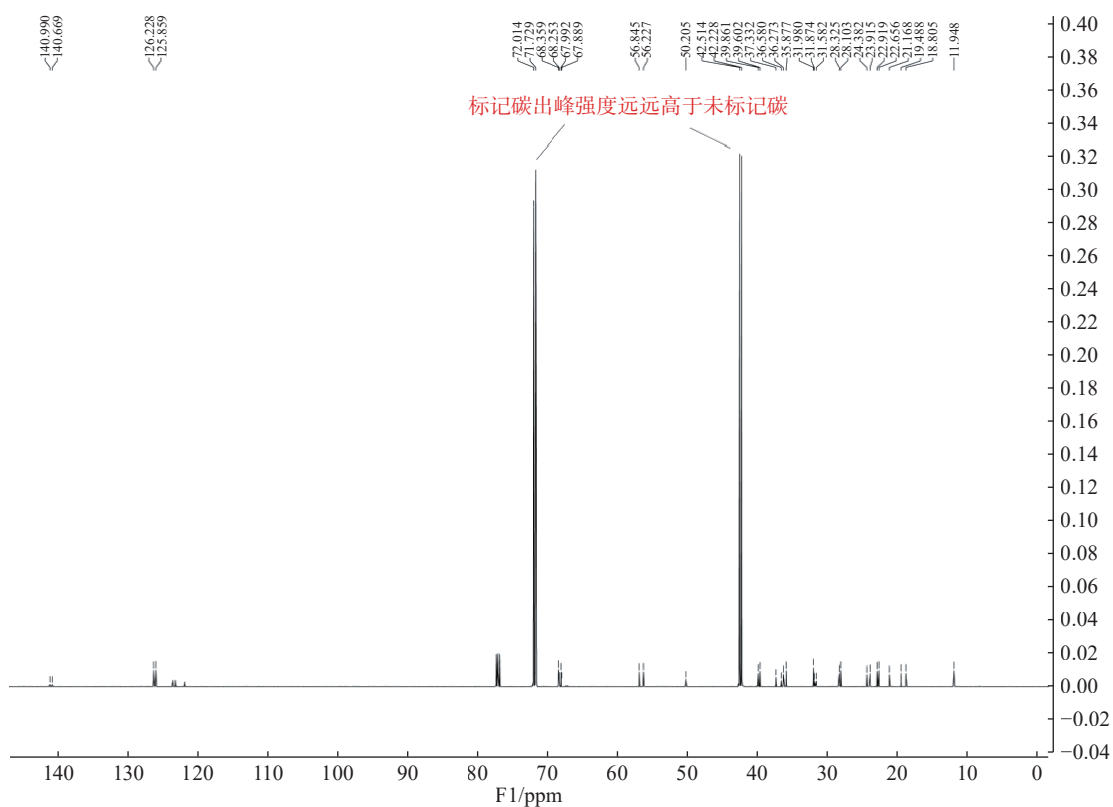
在胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的柱层析提纯过程中,通过TLC和LC-MS检测(图8)发现目标产物点为

两个距离较近点,这说明由V到胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 的还原反应中生成了非对映异构体,出现了差向异构现象。分析原因可能是因为最后一步的还原反应中,在3位标记碳位置形成了一个新的手性中心,而在该手性中心形成过程中受胆固醇分子内部其他手性中心的影响产生了一定的选择性,生成了一对非对映异构体,该对非对映异构体在柱层析分离条件下极性有所差异,分离度较好。

2.3 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 合成路线的稳定性测试

由于 ^{13}C 标记的乙酸苯酯价格昂贵,因此采用3.7 g(27 mmol)天然丰度的乙酸苯酯和20.0 g(52 mmol) 4-胆甾烯-3-酮为起始原料,对目标产物产率的稳定性进行实验,共进行3组平行实验,合成的方法步骤同1.2.1~1.2.6节中所述,每组所得天然丰度的胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 产品的质量及总产率(以投入的乙酸苯酯的物质的量进行计算)列于表2。

由表2可知,三次平行实验所得目标产物总产率(已投入的乙酸苯酯的物质的量计算)范围在16.1%~16.6%之间,波动在1%之内,因此

图 6 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 核磁碳谱Fig.6 ^{13}C NMR spectrum of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 图 7 胆固醇-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 核磁碳谱特征分析Fig.7 Feature analysis of the cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$'s ^{13}C NMR spectrum

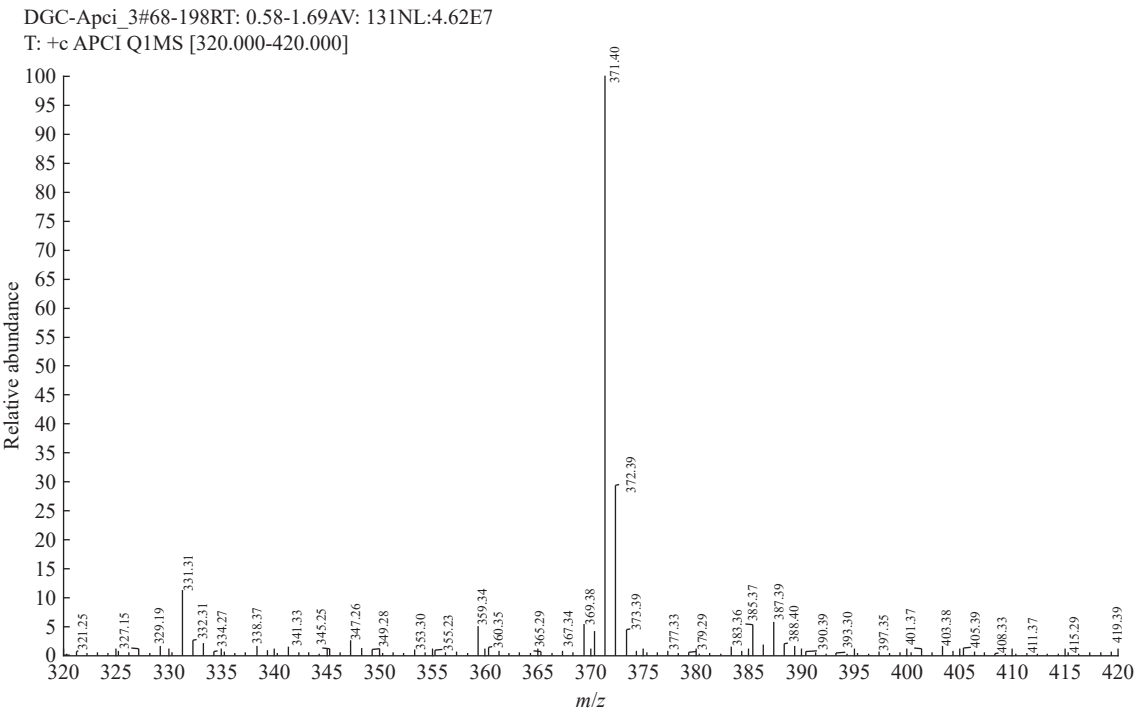


图 8 胆固醇-3,4-¹³C₂ 质谱
Fig.8 LC-MS spectrum of cholesterol-3,4-¹³C₂

表 2 胆固醇-3,4-¹³C₂ 合成路线的稳定性测试
Table 2 Stability testing of overall synthesis route of cholesterol-3,4-¹³C₂

实验组号	目标产品质量/g	总产率/%
1	1.73	16.38
2	1.70	16.10
3	1.75	16.57

该路线产率稳定性较好。

3 结 论

(1)从 4-胆甾烯-3-酮出发,通过开环氧化、合环,然后将乙酸苯酯-1,2-¹³C₂ 作为 ¹³C 标记砌块通过乙酰化反应引入结构,再通过碳环重排反应、酯化反应、还原反应,最终成功合成得到了胆固醇-3,4-¹³C₂。

(2)标记路线选取乙酸苯酯-1,2-¹³C₂ 作为标记砌块,在较后步骤引入,减少了贵重原料的消耗,经济适用性更强且保证了产品的高丰度。所得胆固醇-3,4-¹³C₂ 产品按乙酸苯酯-1,2-¹³C₂ 投入的物质的量计算总产率为 16.2%。胆固醇-3,4-¹³C₂ 的结构经 ¹H NMR、¹³C NMR 以及 LC-MS 确证;LC-MS 检测产品丰度为 98.1 atom% ¹³C,未出现明显稀释;HPLC 检测胆固醇-3,4-¹³C₂ 的

纯度≥96%。产品可用于临床及生物医药领域稳定同位素稀释质谱法检测用内标试剂以及临床质谱用疾病筛查试剂盒原料。

(3)通过与天然丰度胆固醇对比,对胆固醇-3,4-¹³C₂ 的核磁氢谱、核磁碳谱、TLC 检测以及空间结构进行分析,发现了其核磁行为特征和差向异构现象:胆固醇-3,4-¹³C₂ 标记碳上的氢的核磁氢谱出峰会出现裂分现象,标记碳的核磁碳谱出峰响应值远高于未标记位置;由 V 到胆固醇-3,4-¹³C₂ 的还原反应出现一定的选择性合成。

参考文献:

[1] Krone N, Hughes B A, Lavery G G, et al. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 121(3-5): 496-504.

[2] Gachet M S, Rhyn P, Bosch O G, et al. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acyl ethanolamines and steroids in human plasma[J]. *Journal of*

- Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2015, 976-977: 6-18.
- [3] Ray J A, Kushnir M M, Yost R A, et al. Performance enhancement in the measurement of 5 endogenous steroids by LC-MS/MS combined with differential ion mobility spectrometry[J]. *International Journal of Clinical Chemistry*, 2015, 438: 330-336.
- [4] Chang T Y, Chang C C Y, Ohgami N, et al. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 129-157.
- [5] Dong X Y, Tang S Q, Chen J D. Dual functions of Insig proteins in cholesterol homeostasis[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11: 173.
- [6] 李其华, 韦耀达. 单核细胞与高密度脂蛋白胆固醇比值评估中年人群发生冠心病及重度冠状动脉病变的价值研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2023, 31(4): 20-25, 34.
- Li Qihua, Wei Yaoda. Value of monocyte/high-density lipoprotein cholesterol ratio in evaluating the coronary heart disease and severe coronary artery lesions in middle-aged people[J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2023, 31(4): 20-25, 34 (in Chinese).
- [7] 李聪, 高永红. 非高密度脂蛋白胆固醇水平与老年冠心病患者冠脉病变程度的相关性分析[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(8): 66-69.
- Li Cong, Gao Yonghong. Association between non-high-density lipoprotein cholesterol levels and the degree of coronary artery lesion in elderly patients with coronary heart disease[J]. *China Medical Herald*, 2023, 20(8): 66-69 (in Chinese).
- [8] 李芮, 张永亮. 肥胖或超重人群中鼾症与动脉硬化的关系[J]. *中国医药*, 2023, 18(2): 216-219.
- Li Rui, Zhang Yongliang. The relationship between snoring and arteriosclerosis in obese or overweight people[J]. *China Medicine*, 2023, 18(2): 216-219 (in Chinese).
- [9] Yang X, Zhou Y, Mao J, et al. Mechanisms of induction of tumors by cholesterol and potential therapeutic prospects[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2021, 144: 112277.
- [10] Caroline G, Lobna O, Michelle P, et al. Identification of a positive association between mammary adipose cholesterol content and indicators of breast cancer aggressiveness in a French population[J]. *The Journal of Nutrition*, 2021, 151(5): 1119-1127.
- [11] Tao J H, Wang X T, Yuan W, et al. Reduced serum high-density lipoprotein cholesterol levels and aberrantly expressed cholesterol metabolism genes in colorectal cancer[J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2022, 10(14): 4446-4459.
- [12] Caballero G M, Gros E G. Synthesis of [21-¹³C]-cholesterol[J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1994, 34(2): 127-130.
- [13] Rosner W, Auchus R J, Azziz R, et al. Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: An endocrine society position statement[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92(2): 405-413.
- [14] Kushnir M M, Blamires T, Rockwood A L, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals[J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(7): 1138-1147.
- [15] Salameh W A, Redor-Goldman M M, Clarke N J, et al. Validation of a total testosterone assay using high-turbulence liquid chromatography tandem mass spectrometry: Total and free testosterone reference ranges[J]. *Steroids*, 2010, 75(2): 169-175.
- [16] Rosner W, Hankinson S E, Sluss P M, et al. Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98(4): 1376-1387.
- [17] Santen R J, Demers L, Ohorodnik S, et al. Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy[J]. *Steroids*, 2007, 72(8): 666-671.
- [18] 刘蕾, 周伟燕, 孙春华, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清总胆固醇[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(3): 250-254.
- Liu Lei, Zhou Weiyan, Sun Chunhua, et al. Determination of total cholesterol in serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2007, 30(3): 250-254 (in Chinese).
- [19] 周伟燕, 李红霞, 张传宝, 等. 同位素稀释质谱法在美国 CDC-CRMLN 计划中的比对结果分析[J]. *临床检验杂志*, 2017, 35(9): 690-695.
- Zhou Weiyan, Li Hongxia, Zhang Chuanbao, et al. Analysis for comparative results of isotope dilution mass spectrometry in CDC-CRMLN project[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2017, 35(9): 690-695 (in Chinese).
- [20] 张天娇, 张江涛, 张传宝, 等. 血清尿素同位素稀释气相

- 色谱质谱法的建立和研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(5): 536-539.
- Zhang Tianjiao, Zhang Jiangtao, Zhang Chuanbao, et al. Determination of serum urea by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry: a candidate reference method[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 31(5): 536-539 (in Chinese).
- [21] Siekmann L, Schönfelder A, Siekmann A. Isotope dilution-mass spectrometry of total glycerol in human serum—a reference method in clinical chemistry[J]. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 1986, 324(3): 280-281.
- [22] Ellerbe P, Sniegowski L T, Welch M J. Isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method for determining total glycerides and triglycerides in serum[J]. *Clinical Chemistry*, 1995, 41(3): 397-404.
- [23] 郭玮. 液相色谱-质谱检测类固醇激素: 方法学变革助力精准诊疗[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(6): 399-402.
- Guo Wei. Steroid hormone profiling by LC-MS: The change in methodology powering precision medicine[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 42(6): 399-402 (in Chinese).
- [24] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(10): 770-779.
- Chinese Society of Laboratory Medicine, National Center for Clinical Laboratories. Suggestions on clinical application of liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2017, 40(10): 770-779 (in Chinese).
- [25] Yuan S S. Synthesis of 3,4- $^{13}\text{C}_2$ -steroids[J]. *Steroids*, 1982, 39(3): 279-289.
- [26] de Avellar I G J, Vierhapper F W. Novel partial synthetic approaches to replace carbons 2,3,4 of steroids. A methodology to label testosterone and progesterone with ^{13}C in the steroid A ring. part 1[J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(51): 9957-9965.
- [27] Berthonneau C, Nun P, Rivière M, et al. Hemisynthesis of 2,3,4- $^{13}\text{C}_3$ -1,4-androstadien-3,17-dione: a key precursor for the synthesis of $^{13}\text{C}_3$ -androstanes and $^{13}\text{C}_3$ -estranses[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2018, 83(7): 3727-3737.