化学与生物转化法合成帕立骨化醇

万 阳 文 鹏 张 攀 陆 群*

(西南交通大学生命科学与工程学院 成都 610031)

摘要 以维生素 D₂ (**1**)为原料,通过七步有机合成反应和一次生物转化,成功获得了帕立骨化醇 **9**,并得到了一条新的合成帕立骨化醇的路线,收率为 3.24%。该合成方法路线短,操作简便,收率较文献中的方法有较大提高。所有产物结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 表征。

关键词 维生素 D₂; 羟基化; 帕立骨化醇

Novel Synthesis of Paricalcitol by Chem-biotransformation

Wan, Yang Wen, Peng Zhang, Pan Lu, Qun*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031)

Abstract Paricalcitol (**9**) was obtained from Vitamin D₂ via a route of the combination of seven-step organic reaction and biotransformation. The overall yield was 3.24%, which was higher than those of the reported methods. The structures of all intermediates and product were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS techniques.

Keywords vitamin D₂; hydroxylation; paricalcitol

维生素 D 的生物活性形式骨化三醇(calcitriol)是调节体内钙磷代谢平衡的激素。近年来,其在激素(甲状旁腺激素, PTH)分泌、细胞增殖分化以及免疫调节等一系列生理功能中所起的关键作用逐渐被人们认识^[1,2],也预示着其在相关领域的治疗潜能。然而受其高钙磷调节活性的影响,骨化三醇在作为 PTH 分泌抑制剂、抗细胞增殖剂或免疫调节剂使用时常常会发生高血钙的毒副作用。鉴于骨化三醇在临床使用时的上述局限性,已对骨化三醇做了大量化学结构修饰^[3],以使其钙调活性与其他活性相分离。由雅培公司(Abbott)开发的活性维生素 D 类似物帕立骨化醇^[4,5]能够选择性降低慢性肾病(CKD)患者血浆甲状旁腺激素(PTH)水平,而极少引起高钙血症^[6],以其为活性成分的商品 Zemplar 注射剂及胶囊分别于 1998 年和 2005 年上市,是目前应用范围最广的 CKD 患者继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)的预防及治疗药物。

关于帕立骨化醇的合成已经有许多报道^[7~13]。文献[7, 8]采用的是全合成方法,由来源于维生素 D₂、奎宁酸

和 2-甲基-3-羟基丙酸甲酯的三个合成子汇聚合成得到帕立骨化醇,由于全合成方法需要分别合成 A 环和 C/D 环合成子,合成路线长,产率低,不利于大量生产。以容易获得的维生素 D₂ 为前体进行结构修饰的方法缩短了合成路线,因此更具有实际生产意义。文献[9~11]采用的是全化学合成法,需要通过侧链断裂后再形成来实现 25 位羟基化,但需要多步基团保护和脱保护,使得步骤繁琐,收率较低。文献[12, 13]以 25-羟基-维生素 D₂ 为原料,前者通过烯丙位氧化反应实现 1 α 羟基化,然后通过双羟基化、氧化断键和羰基还原实现 19 位去甲基,而后者也通过双羟基化和氧化断键,然后对中间体烯烃的硼氢化反应实现 1 α 位羟基化。但二者的主要缺点是初始原料 25-羟基-维生素 D₂ 缺乏商业来源,难以大量获得^[11]。本研究从更易获得的维生素 D₂ 出发,而不是文献[12, 13]所采用的 25-羟基-维生素 D₂,通过化学合成获得 1 α -羟基-19-去甲维生素 D₂ 后利用生物转化法实现 25 位羟基化,所采用菌株为本实验室筛选所得 CGMCC 5098 放线菌。实验路线见 Scheme 1。

* E-mail: luqun1125@126.com

Received April 12, 2012; revised June 6, 2012; published online June 19, 2012.

Project supported by the Science and Technology Support Foundation of Sichuan Province (No. 2010SZ124).

四川省科技支撑基金(No. 2010SZ124)资助项目。

Scheme 1

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

^1H NMR 与 ^{13}C NMR 用 Varian INOVA-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标; MS 使用 Waters Quattro Premier XE Mass Spectrometer 型质谱仪测定, 甲醇为溶剂. 所用试剂均为国产(或进口)化学纯或分析纯.

1.2 6-甲氧基-3,5-环维生素 D_2 (2) 的合成

将维生素 D_2 (1) 10.00 g (25.25 mmol) 和对甲苯磺酰氯 12 g (63.16 mmol) 加入反应瓶中, 用 50 mL 吡啶完全溶解, 在恒温冷冻浴槽中 ($2\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$) 搅拌 48 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 5:1] 监测至反应完全. 加入 200 mL 饱和碳酸氢钠溶液, 立即有大量气泡产生, 并有固

体析出, 过滤, 固体用 200 mL 3% 盐酸洗涤, 收集固体成分, 晾干. 将所得干燥固体和碳酸氢钠固体 (50 g) 加入反应瓶, 用 500 mL 甲醇完全溶解, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌回流 5~6 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 10:1] 监测至反应完全. 减压回收甲醇, 向瓶中加入 200 mL 水, 反应液依次用乙酸乙酯萃取 (200 mL $\times$ 3), 饱和食盐水洗 (200 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得到棕色油状物 9.80 g 2, 收率为 94.7%. 此粗品可直接用于下步反应. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.23~5.13 (m, 2H, H-22, H-23), 5.03 (brs, 1H, H-19a), 4.98 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 1H, H-7), 4.87 (brs, 1H, H-19b), 4.16 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 1H, H-6), 3.24 (s, 3H, OMe), 2.68~2.60 (m, 1H, H-9a), 2.28~2.20 (m, 1H), 2.12~1.95 (m, 4H), 1.87~1.25 (m, 14H), 1.01 (d, $J=6.8$

Hz, 3H, H-21), 0.91 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.87~0.80 (m, 7H, H-4a, H-26, H-27), 0.73 (t, $J=4$ Hz, 1H, H-4b), 0.54 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 152.1, 143.3, 135.4, 131.8, 119.0, 103.8, 77.3, 56.3, 55.9, 45.2, 42.7, 40.3, 40.2, 35.4, 33.0, 30.1, 29.7, 29.3, 27.7, 25.3, 24.2, 23.5, 22.0, 21.0, 19.9, 19.5, 17.5, 16.3, 12.0; ESI-MS m/z : 433.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.3 10,19-双羟基-6-甲氧基-3,5-环维生素 D₂ (3)的合成

将 **2** (5.00 g, 12.20 mmol) 加入反应瓶, 用 500 mL 乙醇完全溶解, 加入 200 mL 3% KMnO_4 水溶液 (3.11 equiv.). -20°C 搅拌反应 2~3 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4:1] 监测至反应完全. 将反应液于 40°C 水浴搅拌 0.5 h, 过滤, 减压回收乙醇, 反应液依次用乙酸乙酯萃取 (200 mL $\times$ 3), 饱和食盐水洗涤 (200 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得到棕色油状物 5.75 g **3**. 此粗品可直接用于下步反应. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.19~5.08 (m, 2H, H-22, H-23), 4.78 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-6), 4.51 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-7), 3.64 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, H-19a), 3.53 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, H-19b), 3.18 (s, 3H, OMe), 2.56~2.46 (m, 1H, H-9a), 2.03~1.89 (m, 4H), 1.84~1.77 (m, 1H), 1.65~1.58 (m, 4H), 1.52~1.37 (m, 6H), 1.33~1.21 (m, 4H), 1.19~1.09 (m, 1H), 0.97 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.87 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-28), 0.79~0.76 (m, 6H, H-26, H-27), 0.49 (s, 3H, H-18), 0.42 (t, $J=6.4$ Hz, 1H, H-4b); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 145.6, 135.3, 131.9, 117.0, 83.5, 78.8, 67.6, 56.2, 55.7, 55.4, 45.1, 42.7, 40.2, 39.9, 35.2, 33.1, 32.9, 28.9, 27.6, 24.3, 23.3, 22.1, 21.0, 20.3, 19.9, 19.5, 17.5, 12.1, 11.7; ESI-MS m/z : 467.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.4 10-酮-6-甲氧基-3,5-环维生素 D₂ (4)的合成

将粗品 **3** (5.75 g, 12.95 mmol) 加入反应瓶, 用 100 mL 乙醇完全溶解, 加入 50 mL 10% 高碘酸钠水溶液 (1.81 equiv.), 冰浴搅拌 1 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4:1] 监测至反应完全. 将反应液过滤, 减压回收乙醇, 滤液依次用乙酸乙酯萃取 (100 mL $\times$ 3), 饱和食盐水洗涤 (200 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 12:1] 得到淡黄色油状物 1.95 g **4**, 二步收率为 38.8%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.24~5.13 (m, 2H, H-22, H-23), 4.73 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-6), 4.56 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-7), 3.23 (s, 3H, OMe), 2.70~2.58 (m, 1H, H-9a), 2.18~2.10 (m, 3H), 2.04~1.94 (m, 4H), 1.88~1.83 (m, 1H), 1.74~1.67 (m, 4H), 1.51~1.21 (m, 7H), 1.02 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.92 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.89~0.81 (m, 8H, H-26,

H-27, H-4a, H-4b), 0.53 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 214.1, 145.3, 135.4, 131.9, 116.9, 72.8, 56.2, 53.8, 45.1, 42.7, 40.7, 40.3, 40.0, 33.0, 32.9, 29.2, 27.6, 23.9, 23.3, 22.0, 21.4, 21.0, 19.9, 19.6, 17.5, 17.0, 12.1; ESI-MS m/z : 435.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.5 6-甲氧基-10-三氟甲磺酰-3,5-环维生素 D₂ (5)的合成

将 **4** (1.95 g, 4.73 mmol) 加入反应瓶中, 氮气保护下, 注入 1.8 mL 无水四氢呋喃使其完全溶解, 然后注入 LiHMDS (1 mol/L in THF) 9 mL (1.90 equiv.), -78°C 搅拌 1 h. 加入用 5 mL 无水四氢呋喃溶解的 TF_2NPh 3.04 g (1.80 equiv.), 继续低温 ($-78\sim-15^\circ\text{C}$, 缓慢升温) 搅拌 4~5 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 10:1] 监测至反应完全. 减压回收四氢呋喃, 向瓶中加入 50 mL 水, 依次用乙酸乙酯萃取 (50 mL $\times$ 3), 3% 盐酸 (50 mL $\times$ 2), 饱和碳酸氢钠 (50 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤 (50 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 100:1] 得到棕色油状物 1.98 g **5**, 收率为 77.0%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.28 (s, 1H, H-1), 5.24~5.12 (m, 2H, H-22, H-23), 4.55 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-7), 4.43 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-6), 3.25 (s, 3H, OMe), 2.67~2.54 (m, 2H), 2.35~2.31 (m, 1H, H-2b), 2.02~1.94 (m, 4H), 1.87~1.84 (m, 1H), 1.82~1.64 (m, 4H), 1.49~1.25 (m, 7H), 1.01 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.91 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.87~0.80 (m, 7H, H-26, H-27, H-4b), 0.51 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 152.4, 146.0, 135.4, 132.1, 116.5, 113.1, 74.3, 56.3, 56.3, 55.8, 45.2, 42.8, 40.4, 40.0, 33.1, 30.1, 29.7, 29.2, 27.7, 23.5, 22.1, 21.1, 19.9, 19.6, 18.7, 17.6, 16.8, 12.1; ESI-MS m/z : 567.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.6 6-甲氧基-1,10-烯-3,5-环维生素 D₂ (6)的合成

将 **5** (2.85 g, 5.23 mmol), 三苯基膦 137.07 mg (0.10 equiv.), 醋酸钨 58.72 mg (0.05 equiv.) 投入反应瓶, 用 2 mL DMF 完全溶解. 加入 N,N -二异丙基乙基胺 1.98 g (3.00 equiv.), 在氮气保护下, 注入无水甲酸 481.31 mg (2.00 equiv.), 60°C 水浴搅拌 0.5 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 50:1] 监测至反应完全. 向瓶中注入 25 mL 水, 依次用乙酸乙酯萃取 (25 mL $\times$ 3), 3% 盐酸 (25 mL $\times$ 2), 饱和碳酸氢钠 (25 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤 (25 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 150:1] 得到淡黄色油状物 1.36 g **6**, 收率为 65.7%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.98~5.92 (m, 1H, H-10), 5.41 (brd, $J=4.4$ Hz, 1H, H-1), 5.21~5.18 (m, 2H, H-22, H-23), 4.87 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H-7), 3.88 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-6), 3.29 (s, 3H, OMe),

2.59~2.55 (m, 2H, H-9a, H-2a), 2.30 (brd, $J=18$ Hz, 1H, H-2b), 2.03~1.95 (m, 4H), 1.88~1.83 (m, 1H), 1.75~1.24 (m, 10H), 1.05~1.01 (m, 4H, H-4a, H-21), 0.93~0.89 (m, 4H, H-4b, H-28), 0.85~0.82 (m, 6H, H-26, H-27), 0.52 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 142.7, 135.5, 134.5, 131.9, 127.8, 119.9, 78.4, 56.4, 60.0, 55.9, 45.3, 42.8, 40.4, 40.3, 40.0, 36.0, 33.0, 29.4, 27.8, 24.0, 22.0, 21.5, 21.1, 19.9, 19.6, 18.4, 17.6, 11.8; ESI-MS m/z : 419.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.7 1 α -羟基-6-甲氧基-19-去甲-3,5-环维生素 D₂ (7)的合成

将 **6** (500 mg, 1.26 mmol, 固体 9-BBN 339 mg (2.20 equiv.)), 加入反应瓶, 在氮气保护下, 注入 2 mL 无水四氢呋喃, 室温搅拌 2 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 50 : 1] 监测至反应完全. 加入 1 mL 水, 3 mL 氢氧化钠水溶液 (3 mol/L) 和 3 mL 30% 双氧水. 冰浴搅拌 0.5 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4 : 1] 显示反应完全. 反应液依次用乙酸乙酯萃取 (25 mL $\times$ 3), 3% 盐酸 (25 mL $\times$ 2)、饱和碳酸氢钠 (25 mL $\times$ 2)、饱和食盐水洗涤 (25 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 12 : 1] 得到无色油状物 183 mg **7**, 收率为 35.1%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.24~5.16 (m, 2H, H-22, H-23), 4.82 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-7), 4.12~4.02 (m, 1H, H-1), 3.97 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H-6), 3.25 (s, 3H, OMe), 2.59~2.55 (m, 1H, H-9a), 2.05~1.64 (m, 10H), 1.50~1.201 (m, 9H), 1.02 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.92 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.85~0.82 (m, 6H, H-26, H-27), 0.71 (dd, $J=3.6, 4.8$ Hz, 1H, H-4a), 0.57 (s, 3H, H-18), 0.36 (t, $J=4.4$ Hz, 1H, H-4b); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 143.9, 135.5, 132.0, 118.6, 78.4, 73.0, 56.0, 56.0, 55.9, 45.2, 42.8, 40.3, 40.2, 38.8, 37.9, 33.0, 31.5, 29.4, 27.7, 23.8, 22.0, 21.1, 19.9, 19.6, 18.3, 17.6, 17.5, 12.1; ESI-MS m/z : 437.33 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.8 1 α -羟基-19-去甲维生素 D₂ (8)的合成

将 **7** (150 mg, 0.36 mmol) 和 1 mL 冰醋酸加入反应瓶, 60 $^\circ\text{C}$ 搅拌 0.5 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4 : 1] 监测至反应完全. 反应液依次用乙酸乙酯萃取 (15 mL $\times$ 3), 饱和碳酸氢钠溶液 (25 mL $\times$ 2)、饱和食盐水洗涤 (25 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩. 将浓缩得到的油状物和 2 mL 10% KOH 甲醇溶液投入反应瓶, 冰浴搅拌 1 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 2.5 : 1] 监测至反应完全. 反应液依次用乙酸乙酯萃取 (25 mL $\times$ 3), 3% 盐酸 (25 mL $\times$ 2)、饱和碳酸氢钠 (25 mL $\times$ 2)、饱和食盐水洗涤 (25 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 5 : 1] 得到白色晶体粉末

120 mg **8**, 收率为 83.3%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.31 (d, $J=11.2$ Hz, 1H, H-6), 5.84 (d, $J=11.2$ Hz, 1H, H-7), 5.25~5.14 (m, 2H, H-22, H-23), 4.16~4.09 (m, 1H, H-1), 4.09~4.01 (m, 1H, H-3), 2.82~2.72 (m, 2H, H-9a, H-2a), 2.49~2.46 (m, 1H, H-4a), 2.24~2.19 (m, 2H), 2.04~1.45 (m, 11H), 1.36~1.25 (m, 5H), 1.01 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.92 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.85~0.81 (m, 6H, H-26, H-27), 0.55 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 141.9, 137.1, 133.9, 133.2, 123.5, 117.2, 67.9, 67.7, 57.8, 57.6, 46.7, 45.4, 44.4, 42.7, 41.9, 41.8, 37.7, 34.4, 29.8, 29.1, 24.5, 23.3, 21.8, 20.6, 20.2, 18.4, 12.8; ESI-MS m/z : 423.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1.9 帕立骨化醇(9)的生物合成

500 mL 摇瓶装 100 mL 培养液, 1.5% 葡萄糖, 1.5% 黄豆饼粉, 0.5% 玉米浆, 0.5% NaCl, 0.2% CaCO_3 , pH 7.0. 将培养基在 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min. 接入菌株 CGMCC 5098 的孢子悬液 2 mL, 27 $^\circ\text{C}$ 旋转, 转速 240 r/min, 培养 4 d. 将 50 mg 1 α -羟基-19-去甲维生素 D₂ (**8**), 10 mg β -环糊精, 10 mg 吐温-80 溶解于 2 mL 乙醇, 将此混合物加入培养液, 继续培养 3 d. 取出发酵液, 过滤, 滤液依次用乙酸乙酯萃取 (50 mL $\times$ 3), 3% 盐酸 (50 mL $\times$ 2)、饱和碳酸氢钠 (50 mL $\times$ 2)、饱和食盐水洗涤 (50 mL), 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析分离 [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 2 : 1] 得到白色晶体粉末 31 mg **9**, 收率为 59.6%. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.12 (d, $J=11.2$ Hz, 1H, H-6), 5.79 (d, $J=11.2$ Hz, 1H, H-7), 5.29~5.18 (m, 2H, H-22, H-23), 3.96~3.87 (m, 2H, H-1, H-3), 2.76~2.72 (m, 1H, H-9a), 2.51~2.47 (m, 1H, H-4a), 2.33~2.29 (m, 1H, H-4a), 2.14~2.04 (m, 2H), 1.99~1.89 (m, 4H), 1.74~1.16 (m, 11H), 1.04 (s, 3H, H-26), 1.00 (s, 3H, H-27), 0.94 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.90 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, H-28), 0.49 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 132.7, 129.1, 124.6, 122.1, 114.1, 107.9, 64.0, 58.7, 58.4, 48.5, 48.3, 39.9, 37.4, 36.1, 33.3, 32.6, 32.5, 28.3, 20.5, 19.7, 19.0, 16.7, 15.2, 14.0, 12.2, 6.4, 3.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 439.3188, found 439.3191.

2 结果与讨论

2.1 实验路线选择

本研究从更易获得的维生素 D₂ 而不是文献[12, 13] 所采用的缺乏商业来源的 25-羟基-维生素 D₂ 出发, 极大地降低了成本, 且避免了合成过程中对 25 位羟基保护和脱保护等一系列会影响反应产率的步骤, 通过化学合成获得 1 α -羟基-19-去甲维生素 D₂ 后, 利用生物转化

法实现 25 位羟基化, 获得了帕立骨化醇, 总收率为 3.24%.

2.2 化合物 3 和 7 的合成

通过第一步的羟基保护得到化合物 **2** 之后, 本研究摒弃了价格昂贵, 有毒有害的四氧化锇, 而选择价格便宜, 低毒低害的高锰酸钾, 来实现双键的双羟基化. 这种方法较文献中使用的四氧化锇而言, 不仅极大地降低了实验成本与实验操作难度, 且该步收率与文献报道相当. 化合物 **7** 是通过化合物 **6** 进行硼氢化氧化反应得到的, 选用位阻较大 9-BBN 作为硼氢化试剂, 可以顺利地实现 1α 位羟基化, 而不会得到 1β 羟基化物.

2.3 帕立骨化醇(9)的获得

对维生素 D 类似物进行生物转化羟基化已有文献报道^[14], 目前生物制备活性维生素 D₂ 或 D₃, 其羟基化作用主要发生在 1α 位和 25 位. 以维生素 D₂ 为底物的生物转化羟基化会得到 1α -羟基维生素 D₂, 25-羟基维生素 D₂ 以及 $1\alpha, 25$ -双羟基维生素 D₂. 这也是为什么 25-羟基维生素 D₂ 难以大量获得的重要原因之一. 本研究采用的策略是最后一步通过生物转化法实现 25 位羟基化. 在经过七步化学合成反应得到 1α -羟基-19-去甲维生素 D₂ (**8**)之后, 最后一步生物转化使用的是本实验室筛选所得的 CGMCC 5098 型放线菌株, 该菌株对 19-去甲维生素 D 类似物具有独特的 25-羟基化活性, 转化产率为 60%, 而本工作利用生物转化法对 19-去甲维生素 D 类似物进行 25 位羟基化乃属首次报道.

2.4 各中间体及目标化合物结构的鉴定

合成中间体及目标物的结构均经过 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 表征. 目标化合物与参考文献[13]数据一致. 6-甲氧基-3,5 环维生素 D₂ (**2**)经过高锰酸钾水溶液双羟基化之后其 ¹H NMR 谱图中在 δ 5.03 和 4.87 处的两个端烯氢的信号消失, 在 δ 3.64 和 3.53 增加了两个二重峰

信号, 为与新生成的羟基相连的亚甲基氢的信号; 6-甲氧基-1,10-烯-3,5-环维生素 D₂ (**6**)经过硼氢化氧化反应之后其 ¹H NMR 谱图中在 δ 5.95 和 5.41 处的两个内烯烃氢的信号消失, 在 δ 4.05 增加了一个多重峰信号, 为与新生成的羟基相连的次甲基氢的信号; 1α -羟基-19-去甲维生素 D₂ (**8**)在经过生物转化之后, 其 ¹³C NMR 谱图中 δ 在 64.0 处出现了一个峰, 为与新生成的 25 位羟基相连的碳的信号.

References

- [1] Ebert, R.; Schutze, N.; Adamski, J.; Jakob, F. *Mol. Cell Endocrinol.* **2006**, *248*, 149.
- [2] Abe, E.; Miyaura, C.; Sakagami, H.; Takeda, M.; Konno, K.; Yamazaki, T.; Yoshiki, S.; Suda, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 4990.
- [3] Yamada, S.; Shimizu, M.; Yamamoto, K. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 89.
- [4] Slatopolsky, E.; Cozzolino, M.; Lu, Y.; Finch, J.; Dusso, A.; Staniforth, M.; Wein, Y.; Webster, J. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 2020.
- [5] Yang, S.; Smith, C.; Dluca, H. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1158*, 279.
- [6] Slatopolsky, E.; Finch, J.; Ritter, C.; Denda, M.; Morrissey, J.; Brown, A.; DeLuca, H. *Am. J. Kidney Dis.* **1955**, *26*, 852.
- [7] Deluca, H. F.; Schnoes, H. K.; Perlman, K. L. *US 5281731*, **1994** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 124883].
- [8] Deluca, H. F.; Schnoes, H. K.; Perlman, K. L. *US 5086191*, **1992** [*Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 255878].
- [9] Li, L.-Q.; Yue, L.-R.; Xue, J.-J.; Xie, Z.-X.; Li, Y. *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 1.
- [10] Ng, C.-S.; Wei, C.-P. *US 007491712*, **2009** [*Chem. Abstr.* **2009**, *150*, 260414].
- [11] Bader, T.; Stutz, A.; Bichsel, H. U.; Stutz, A.; Fu, C.-C. *WO 2010009879*, **2010** [*Chem. Abstr.* **2010**, *152*, 19236].
- [12] Perlman, K. L.; Sicinski R. R.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1823.
- [13] Toyoda, A.; Nagai, H.; Yamada, T.; Moriguchi, Y.; Abe, J.; Tsuchida, T.; Nagasawa, K. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10002.
- [14] Takeda, K.; Asou, T.; Matsuda, A.; Kimura, K.; Okamura, K.; Okamoto, R.; Sasaki, J.; Adachi, T.; Omura, S. *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, *78*, 380.

(Zhao, C.)