

^{13}C -美沙西丁的制备研究进展

付国桢, 胡石林, 曾 静, 叶一鸣

中国原子能科学研究院, 北京

收稿日期: 2023年1月13日; 录用日期: 2023年1月30日; 发布日期: 2023年2月28日

摘 要

目的: 为 ^{13}C -美沙西丁的合成方法进行总结并提供参考。方法: 本文通过查阅相关文献, 系统归纳了 ^{13}C -美沙西丁各种合成方法在安全性、产率、经济性、工艺复杂程度等方面的优缺点。结果与结论: ^{13}C -美沙西丁现有的制备方式多为用 ^{13}C -碘甲烷、 ^{13}C -甲醇、 ^{13}C -硫酸二甲酯等甲基化试剂与对乙酰氨基酚反应获得。采用Mitsunobu醚化反应制备 ^{13}C -美沙西丁, 反应物毒性低、产率和纯度较高、反应流程比较简单, 是一种合适的方法, 有着广阔的发展前景。

关键词

^{13}C -美沙西丁, 肝功能检测, 合成方法

Research Progress in the Preparation of ^{13}C -Methacetin

Guozhen Fu, Shilin Hu, Jing Zeng, Yiming Ye

China institute of Atomic Energy, Beijing

Received: Jan. 13th, 2023; accepted: Jan. 30th, 2023; published: Feb. 28th, 2023

Abstract

Objective: To summarize and provide a reference for the synthetic methods of ^{13}C -Methacetin. **Methods:** This paper systematically summarized the advantages and disadvantages of various synthetic methods of ^{13}C -Methacetin in terms of safety, yield, economy, process complexity, etc. **Results and Conclusion:** The existing methods of preparation of ^{13}C -Methacetin are mostly obtained by reaction of ^{13}C -iodomethane, ^{13}C -methanol, ^{13}C -dimethyl sulfate and other methylating agents with acetaminophen. Using Mitsunobu etherification reaction to prepare ^{13}C -Methacetin is a suitable method with low toxicity, high yield and purity of reactants, and simple reaction process. It is an appropriate method and has broad development prospects.

Keywords

¹³C-Methacetin, Liver Function Test, Synthetic Method

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着科技的发展和医学的进步,人们迫切需要无创、更加安全和准确的疾病检测方式。近年来,呼气试验的兴起,为解决这个问题提供了一条途径。呼气试验可以应用于很多方面,如被标记的尿素可以安全、有效、准确地检测幽门螺旋杆菌,被标记的蛋氨酸可以评价肝脏线粒体功能[1],被标记的苯丙氨酸可以安全、可靠地测定肝脏细胞质功能[2][3],被标记的辛酸可以测定胃溃疡和十二指肠溃疡患者的胃固体排空功能[3][4],等等。其中,¹³C-美沙西丁呼气试验(¹³C-Methacetin Breath Test, ¹³C-MBT)是一种能够安全、方便、快捷、无创、定量地检测肝脏储备功能的方法。

长期以来,我国的¹³C都完全依赖进口,国内的低温精馏法生产¹³C同位素示范生产线还在试运营阶段,且¹³C在幽门螺旋杆菌的检测方面有很大的需求,研发新药也需要¹³C,目前¹³C的产能远远不够,因此近年来对¹³C-MBT的临床研究和制备研究都不多。本文通过查阅文献资料对¹³C-MBT在检测肝功能等方面的表现以及现有的¹³C-美沙西丁合成方法展开综述,对每种合成方法的优缺点进行了总结,提出了采用Mitsunobu反应制备¹³C-美沙西丁的最优方法。

2. ¹³C-美沙西丁与肝脏储备功能的检测

人体最重要的代谢器官肝脏有极强的储备和再生能力,肝储备功能是指所有肝实质细胞功能的总和,受肝实质细胞容量、功能及肝脏有效血流灌注等因素的影响。很多慢性肝脏病变会影响肝脏的储备功能,即肝脏的自我修复和再生能力受到损害。临床上判断肝脏损害的金标准是经皮肝穿刺活病理学检查,但其有创且不易重复检查,且在临床中不能动态监测肝功能。临床常用的生化检查(包括各种肝酶、胆红素和蛋白质检查)特异性不强[5],仅能在一定程度上反映肝实质损害程度和静态肝功能代偿情况。经典的Child-Pugh分级(将患者有无肝性脑病及程度、腹水情况、血清胆红素、血清白蛋白浓度及凝血酶原时间分别记分并相加,根据总和判断肝脏储备功能)易受医师主观因素影响,不能够对肝细胞的总体储备功能量化地反映出来,导致对于肝脏受损引起的并发症以及手术适应症与预后效果等方面进行判断与预测存在困难[6]。吲哚氰绿(ICG)清除试验是肝脏专属指标,但受肝脏血流与侧支循环影响较大,在评估肝硬化和重度肝硬化患者的病情时会受到一定的影响,需结合有效肝血流进行判断[5],并且敏感程度比美沙西丁呼气试验较低、响应也更晚。已有研究证明,通过¹³C-MBT可以检测肝脏总体储备功能,具有安全、简便、准确、快速、可重复应用等特点[6]-[20],有很高的临床价值,具体方面包括:对病毒性肝炎造成的损伤和治疗后的疗效进行评估;评估肝硬化状况及治疗情况;帮助建立个体化肝癌介入治疗方案[9];评价肝脏围手术期肝功能;通过¹³C-MBT动态监测肝功能,对肝移植时机和移植后效果进行观察和判断[9]。

美沙西丁(对甲氧基乙酰苯胺)通过口服方式经血液循环进入肝脏,肝细胞通过滑面内质网上及微粒体内的混合功能氧化酶作用进行代谢,最终将甲氧基的碳以二氧化碳形式排出体外。将美沙西丁的甲氧基碳替换为¹³C后,测定¹³C-美沙西丁代谢分解产生¹³C-二氧化碳的速度和量就可以直接反映氧化酶的活性

和储备能力。不管由什么因素引起,肝细胞一旦受损,都可使混合功能氧化酶系统功能受损,使其去甲基化能力下降,即分解 ^{13}C -美沙西丁的能力下降,从而表现为呼出气体中 ^{13}C -二氧化碳的含量下降。

^{13}C -MBT 通过检测肝细胞分解 ^{13}C -美沙西丁产生的 $^{13}\text{CO}_2$ 的 DOB (丰度)、CUM (累积呼出丰度与正常值的比值)、MV (代谢速率)等方面的微小差异准确评估肝细胞的储备和代偿功能,可以准确检测慢性肝损伤、急性肝损伤、非酒精性脂肪性肝病等肝病。Shirin 等人[10]、Hydzik 等人[11]、万荣等人[12]、Dinesen 等人[13]分别对肝功能衰竭大鼠、蘑菇中毒患者、肝硬化患者、慢性丙型肝炎病毒感染患者进行了 ^{13}C -MBT,得出结论: ^{13}C -MBT 与传统 Child-Pugh 分级结果一致且组间差异显著,能对肝脏储备功能做出准确、有效的评估,能预测晚期纤维化和肝硬化,并能作为肝移植桥接治疗和肝透析治疗开始的最佳时机和强度的辅助指标。毛静怡等人[14]发现, ^{13}C -MBT 比吡啶氧绿清除试验更敏感,尤其适用于急性肝损害的早期诊断。

研究发现, ^{13}C -美沙西丁在机体内代谢迅速,小剂量给药情况下一般不表现出不良反应,也不容易发生过敏等症状,仅需口服药物后吹气进行检测,患者依从性好,且此方法特异性强,尤其适用于儿童、孕妇和多器官功能衰竭患者[9]。陈源等人[15]、Iwasaki 等人[16]、孔桂平等[17]分别对肝豆状核变性患儿、遗传性过敏性皮炎婴儿、肝病患儿和正常儿童进行 ^{13}C -MBT,得出结论: ^{13}C -MBT 可以安全、准确地判断肝病患儿肝功能的严重程度。Krumbiegel 等人[18]用 ^{13}C -MBT 和 ^{14}C -MBT 分别对孕妇和儿童的肝脏储备功能进行了检测,发现 ^{14}C -MBT 可能导致 ^{14}C 在人体内微量残留, ^{13}C -MBT 对儿童和孕妇更加安全。

Hermann 等人[19]设计了 2DOB 试验,先注射 ^{13}C -碳酸氢盐,30 min 后注射 ^{13}C -美沙西丁,产生两条 DOB 曲线,根据实验结果定义了一个评分函数,能够更准确地判断肝脏解毒速度。Georgios 等人[20]首次使用 ^{13}C -MBT 在肝手术中测量肝功能,发现 ^{13}C -MBT 能在术中实时、准确地测量肝功能,但注射 ^{13}C -美沙西丁 6 小时后,呼出气中仍含有 $^{13}\text{CO}_2$,会影响第二次术中测量的基线,需避免短时间内连续测量。

根据以上研究,我认为 ^{13}C -MBT 能检测患者的肝功能,且具有即时、定量、方便、无创性、患者依从性好的优势,可帮助临床医师对患者肝功能做出准确的判断。虽然短时间连续应用方面可能受到限制,但仍可作为肝功能定量、定性检测的重要指标参与肝功能检测。

3. ^{13}C -美沙西丁的合成方法研究现状

3.1. ^{13}C -美沙西丁合成方法简介

在合成过程中,原料成本基本集中在标记化合物上,因此对 ^{13}C -美沙西丁进行合成时只需要考虑如何将 ^{13}C 标记到甲氧基碳位置即可,比较简单的方法就是用对乙酰氨基酚、对乙酰氨基酚钠(钾)、对溴乙酰苯胺等与 ^{13}C 标记的甲基化试剂反应制得。如果反应产物美沙西丁难以分离提纯,也可以考虑先进行甲基化反应后再反应生成乙酰氨基。

^{13}C -美沙西丁的几种合成方式主要可以分为直接取代和中间产物取代两种方式,直接取代主要有以下四种方式:① 对溴乙酰苯胺与 ^{13}C -甲醇钠反应;② 对乙酰氨基酚钠(钾)与 ^{13}C -碘甲烷反应;③ 对乙酰氨基酚与 ^{13}C -甲醇反应;④ 对乙酰氨基酚与 ^{13}C -硫酸二甲酯反应。甲醇的甲基化活性相对较低,为了获得较高的产率和纯度,可以将甲醇先合成为甲基化活性较高的中间产物再进行取代反应,即中间产物取代方式,例如先将对甲苯磺酸与 ^{13}C -甲醇反应生成中间体 ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯,再与对乙酰氨基酚反应, ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯的甲基化活性要比 ^{13}C -甲醇高得多,因此有助于提高纯度。为了提高 ^{13}C -甲醇的甲基化活性,也可选择用 ^{13}C -甲醇合成 ^{13}C -碘甲烷、 ^{13}C -碳酸二甲酯、 ^{13}C -三氟甲磺酸甲酯、 ^{13}C -氟磺酸甲酯等甲基化活性较高的中间产物来实现甲基化。这种方式相对复杂,但有助于提高产物纯度。

在分离和纯化方面,根据极性的不同,通过色谱柱分离可以实现美沙西丁的分离。利用酚和醚溶解度差异,重结晶方法也可以比较方便地分离,文献中提到可以用水或乙醇进行重结晶。因为对乙酰氨基

酚沸点较高, 约 387°C, 甲醇沸点仅有 64.7°C, 碳酸二甲酯等其他甲基化试剂的沸点也普遍较低, 而美沙西丁沸点为 280°C~285°C, 生成的副产物 N-(4-羟基-3-甲基苯基)乙酰胺和 N-(4-羟基-3,5-二甲基苯基)乙酰胺沸点分别为 368.7°C 和 356.9°C, 在合适情况下可以考虑减压蒸馏来进行分离。这几种分离方式中, 色谱柱分离更加适用于小量和微量产物的分离, 重结晶更加适用于大量产物的分离。

分离完成后, 可以利用分子筛、活性炭、离子树脂等进行脱杂脱色, 再利用重结晶进行纯化。

3.2. ¹³C-美沙西丁的直接制备方法

3.2.1. ¹³C-硫酸二甲酯作为甲基化试剂

对于 ¹³C-美沙西丁合成方法的探索早在 1989 年就开始了, 最早提出的方法就是用 ¹³C-硫酸二甲酯作为甲基化试剂与对乙酰氨基酚进行反应得到 ¹³C-美沙西丁。¹³C-硫酸二甲酯是很强的甲基化试剂, 用氢氧化钠与对乙酰氨基酚反应得到的对乙酰氨基酚钠能在很温和的条件下与 ¹³C-硫酸二甲酯进行取代反应生成 ¹³C-美沙西丁, 反应方程式如图 1。目前, 这种方法已经不再使用, 原因主要是 ¹³C-硫酸二甲酯毒性很强且致癌、危险性大, 生产过程排放的废水对环境污染严重, 且根据它的反应式, 即使反应进行特别完全, 也有至少一半的 ¹³C 得不到充分利用。

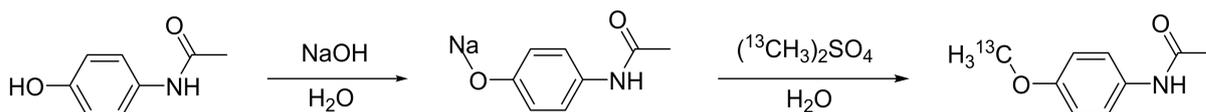


Figure 1. Reaction equation when ¹³C-dimethyl sulfate is used as methylating agent

图 1. ¹³C-硫酸二甲酯作为甲基化试剂反应方程式

Avramova 等人[21]为了避免长时间加热, 选用甲基化活性很高的 ¹³C-硫酸二甲酯作为甲基化试剂, 与对乙酰氨基酚钠反应, 温度控制在 15°C 至 30°C, 可以获得 87% 的产率, 对 ¹³C 来说产率约为 44%, 并不算高。

3.2.2. ¹³C-碘甲烷作为甲基化试剂

¹³C-碘甲烷也是很强的甲基化试剂, 且相比 ¹³C-硫酸二甲酯毒性小很多, 因此继续使用 ¹³C-硫酸二甲酯作为甲基化试剂后, 又提出了使用 ¹³C-碘甲烷作为甲基化试剂的方法。将对乙酰氨基酚活化为对乙酰氨基酚钠后, 与碘甲烷进行取代反应即可生成 ¹³C-美沙西丁, 反应方程式如图 2。相似地, 将对乙酰氨基酚活化为对乙酰氨基酚钾与碘甲烷进行取代反应也可生成 ¹³C-美沙西丁, 反应方程式如图 3。这种方法合成容易、方便, 产率也比较高, 但因为 ¹³C-碘甲烷价格很高, 用 ¹³C-碘甲烷进行合成在成本上没有优势, 因此研究者在广泛寻找替代方法。

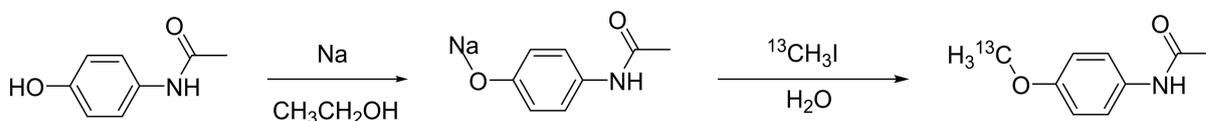


Figure 2. Reaction equation when ¹³C-iodomethane is used as methylating agent with sodium acetaminophen

图 2. ¹³C-碘甲烷作为甲基化试剂与对乙酰氨基酚钠反应方程式

陈万木等人[22]向无水乙醇中加入钠, 再加入对乙酰氨基酚, 搅拌十分钟使对乙酰氨基酚转化为对乙酰氨基酚钠, 然后加入 ¹³C-碘甲烷加热回流一小时, 过滤并将溶剂蒸发掉, 用热水进行重结晶得到产品, 收率为 91%。他们经过研究发现, 反应温度约为 60°C、反应时间四十分钟时, 反应进行比较彻底, 升温 and 延长反应时间对收率提升不大, 对乙酰氨基酚与 ¹³C-碘甲烷的进料比例为 1.2:1 时, 收率比较高。

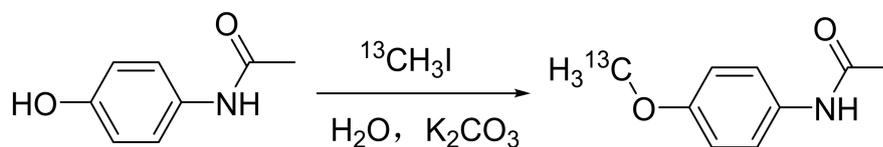


Figure 3. Reaction equation when ^{13}C -iodomethane is used as methylating agent with potassium acetaminophen

图 3. ^{13}C -碘甲烷作为甲基化试剂与对乙酰氨基酚钾反应方程式

El'man 等人[23]在 $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、碳酸钾存在条件下使用 ^{13}C -碘甲烷与对乙酰氨基酚钾一步合成 ^{13}C -美沙西丁, 分离产物有较高的选择性, 产率为 97.8%, 质量纯度为 99.6%, 同位素纯度为 99.1%。

3.2.3. ^{13}C -甲醇钠与对溴乙酰苯胺反应

根据卤代苯的芳香亲核取代反应, 溴苯可与醇钠反应生成醚, 先将 ^{13}C -甲醇与钠反应生成 ^{13}C -甲醇钠, 再与对溴乙酰苯胺反应可以得到 ^{13}C -美沙西丁, 但这种方式的收率很低, 并不适合。反应方程式如图 4。

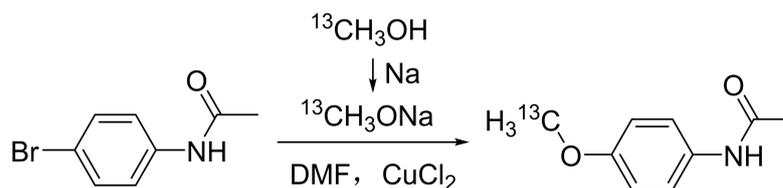


Figure 4. Reaction equation of ^{13}C -sodium methoxide with p-bromoacetanilide

图 4. ^{13}C -甲醇钠与对溴乙酰苯胺反应方程式

陈万木等人[22]向 ^{13}C -甲醇中加入钠并蒸发掉过量的 ^{13}C -甲醇得到 ^{13}C -甲醇钠, 以无水 DMF 作为溶剂, 加入对溴乙酰苯胺和催化量的氯化亚铜, 加热回流两小时, 减压蒸馏蒸掉 DMF, 向剩余物中加入水, 用浓盐酸调节 pH 至 5~6, 用乙醇乙酯萃取得到有机相后干燥过滤, 蒸掉溶剂即可得到产品, 收率 32%。

3.2.4. ^{13}C -甲醇作为甲基化试剂

^{13}C -碘甲烷价格高昂且有毒, 优化 ^{13}C -美沙西丁的合成方式就要寻找更加安全环保、价格低廉的甲基化试剂, ^{13}C -甲醇就是可行的选择。 ^{13}C -甲醇的甲基化活性并不高, 因此需要合适的活化方法对 ^{13}C -甲醇进行活化。

Mitsunobu 反应是一种能够活化醇羟基的双分子亲核取代反应, 醇在偶氮二甲酸二乙酯(DEAD)或偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)和三苯基膦的作用下形成活性中间体, 被亲核试剂(该反应中亲核试剂为酚羟基)进攻之后碳氧键会发生断裂。实验中, ^{13}C -甲醇的碳氧键可以通过上述反应机理活化, 然后酚羟基进攻活化中间体即可生成 ^{13}C -美沙西丁, 反应原理如图 5。这种方法反应条件温和、反应物毒性小、安全性高、经济性也较好, 而且有不错的产率和纯度, 是非常合适的合成方法。

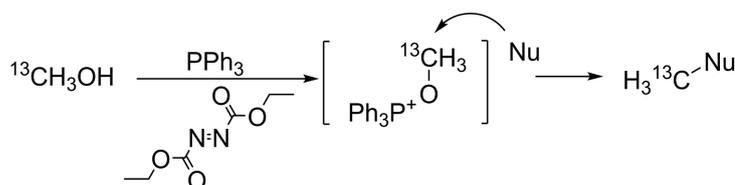


Figure 5. Principle of Mitsunobu reaction [24]

图 5. Mitsunobu 反应原理[24]

陈凯等人[24]以 Mitsunobu 反应作为关键反应, 以 ^{13}C -甲醇为标记试剂, 配合官能团转化, 合成了 ^{13}C -

美沙西丁, 样品纯度为 99.2%, 同位素丰度为 99.2%, 以 ^{13}C -甲醇计收率为 63%。他们直接用对乙酰氨基酚与 ^{13}C -甲醇反应, 发现 ^{13}C -美沙西丁与反应的副产物三苯基氧化膦极性接近, 分离困难, 不适宜放大研究, 为此他们将反应原料对乙酰氨基酚更换为氧羰酰-4-羟基苯胺, 首先通过 Mitsunobu 反应得到极性小的中间产物, 与副产物三苯基氧化膦分离后, 再与乙酰氯反应生成 ^{13}C -美沙西丁, 反应原理如图 6。

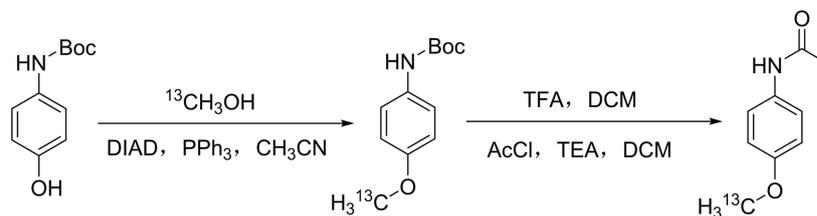


Figure 6. Mitsunobu reaction equation including functional group conversion [24]

图 6. 配合官能团转化的 Mitsunobu 反应方程式[24]

在此基础上, 他们发现用乙腈作为溶剂, 用偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)进行反应可以得到更高的收率, 具体数据如表 1。

Table 1. Effect of Mitsunobu reaction conditions on yield [24]

表 1. Mitsunobu 反应条件对收率的影响[24]

反应条件(浓度均为 0.25 mmol/mL)	收率/%
DEAD、PPh ₃ 、DCM	53
DEAD、PPh ₃ 、THF	52
DEAD、PPh ₃ 、CH ₃ CN	61
DIAD、PPh ₃ 、DCM	56
DIAD、PPh ₃ 、THF	62
DIAD、PPh ₃ 、CH ₃ CN	70

卢伟京等人[25]用活化试剂将 ^{13}C -甲醇与对乙酰氨基苯酚分别转化为对应的活性中间体, 再反应生成了美沙西丁, 粗产品在乙醇中重结晶获得目标产品, 经计算合成产率为 70.7%, ^{13}C 丰度为 99%, 产品纯度为 99.8%, 但文献中并未给出具体的活化方法, 难以重现。

除 Mitsunobu 反应之外, 根据甲醇与苯酚反应生成苯甲醚的反应条件, 磷酸铜作为催化剂时对生成醚的选择性较高, 可选用磷酸铜作为催化剂。图 7 是甲醇作为甲基化试剂可能发生的反应[26]。

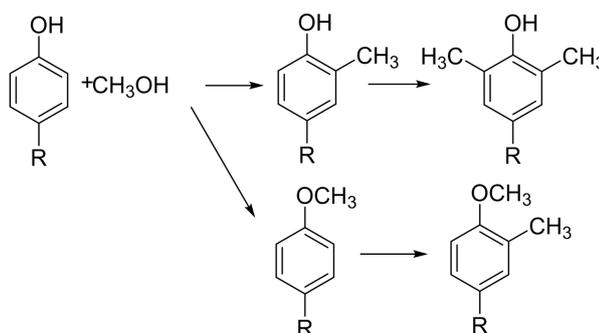


Figure 7. Possible reactions when methanol is used as methylating agent [26]

图 7. 甲醇作为甲基化试剂可能发生的反应[26]

3.3. ^{13}C -美沙西丁的间接制备方法

为了提高 ^{13}C -甲醇的甲基化活性,有人提出可以通过先合成甲基化活性高的中间产物,再与对乙酰氨基酚反应,这种方法有助于提高产物纯度,但操作步骤比较复杂。

3.3.1. ^{13}C -碘甲烷作为甲基化试剂

^{13}C -甲醇可以合成 ^{13}C -碘甲烷,当产率比较高时可以很方便地合成 ^{13}C -美沙西丁。使用碘化钾、磷酸可以将 ^{13}C -甲醇中的羟基碘化,反应条件温和,但收率不高;使用红磷、碘将 ^{13}C -甲醇中的羟基碘化可得到较高收率。得到 ^{13}C -碘甲烷后,在碱性条件下直接与对乙酰氨基酚反应即可得到 ^{13}C -美沙西丁,反应原理如图 8。此方法分离过程简单、经济性较好,但过程比较复杂且对温度控制和加料速度有较高的要求。

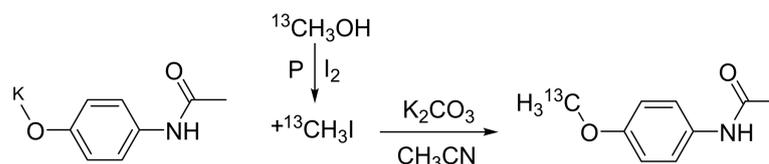


Figure 8. Reaction principle when ^{13}C -iodomethane is used as methylating agent
图 8. ^{13}C -碘甲烷作为甲基化试剂的反应原理

陈凯等人[27]用红磷和碘将 ^{13}C -甲醇中的碳氧键转化为碳卤键,具体方法为在 -15°C 下加入红磷、水、碘单质、 ^{13}C -甲醇,升温至回流后保温 2 h,后蒸馏收集 45°C 的冷凝液。获得 ^{13}C -碘甲烷后,以碳酸钾作为碱,乙腈作为溶剂,先将对乙酰氨基酚与乙腈、碳酸钾混合,反应液浓度为 1 mol/L,搅拌 1 h;再加入冷凝液(^{13}C -碘甲烷),在 35°C 条件下搅拌 2 h,过滤取滤液,加入 10% 的氢氧化钠水溶液并搅拌 10 min 除去未参加反应的对乙酰氨基酚,取有机相,用乙醇重结晶得到产物,反应总收率在 65% 左右,纯度约 99%。

3.3.2. ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯作为甲基化试剂

对甲苯磺酸价格低廉,且对甲苯磺酸甲酯有不错的甲基化活性,毒性比碘甲烷更低,且有不易挥发、易纯化、检测方便等优势,可以作为合适的中间产物,反应原理如图 9。

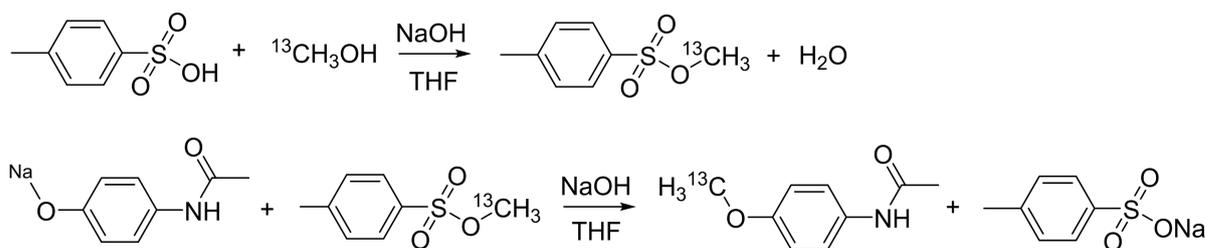


Figure 9. Reaction principle when ^{13}C -methyl p-toluenesulfonate is used as methylating agent
图 9. ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯作为甲基化试剂的反应原理

龚爱华等人[28]以 ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯作为中间产物合成了 ^{13}C -美沙西丁,包括取代反应阶段,即用对甲苯磺酰氯或对甲苯磺酸与 ^{13}C -甲醇在碱性条件下合成 ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯;甲基化反应阶段,即 ^{13}C -对甲苯磺酸甲酯于碱性条件下与对乙酰氨基酚反应得到 ^{13}C -美沙西丁粗品;精制阶段,通过重结晶方法进行精制。专利中没有给出具体产率和纯度,难以与其他方法进行比较。

3.3.3. ^{13}C -碳酸二甲酯作为甲基化试剂

作为替代硫酸二甲酯的甲基化试剂,碳酸二甲酯甲基化活性比甲醇更高,而且相对于传统的甲基化试剂,比如硫酸二甲酯、氟磺酸甲酯等更加环保且安全,但在取代反应时与硫酸二甲酯一样,一半被标

记的碳会生成甲醇，需要考虑如何回收以降低成本。

碳酸二甲酯可与苯酚可以反应生成苯甲醚，这种方式产物选择性好、纯度高，分离过程容易，反应过程不生成毒性物质，相对比较安全、无污染，因为碳酸二甲酯的活性比较高，反应速度也比较快。根据碳酸二甲酯与苯酚反应生成苯甲醚的实验条件， ^{13}C -碳酸二甲酯和对乙酰氨基酚可在碱性环境下发生反应得到 ^{13}C -美沙西丁，同时生成 ^{13}C -甲醇和二氧化碳，反应条件相对温和。 ^{13}C -甲醇可以回收并重新合成 ^{13}C -碳酸二甲酯，从而提高 ^{13}C 的利用率。反应方程式如图 10。目前还没有用这种方法合成 ^{13}C -美沙西丁的具体试验。

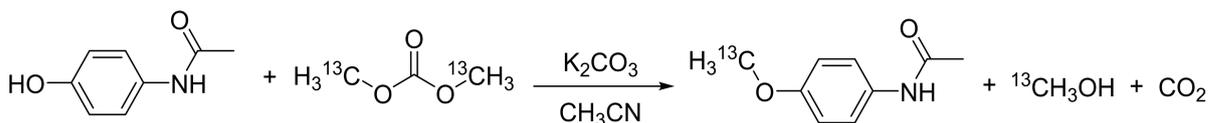


Figure 10. Reaction equation when ^{13}C -dimethyl carbonate is used as methylating agent with acetaminophen

图 10. ^{13}C -碳酸二甲酯作为甲基化试剂与对乙酰氨基酚反应方程式

以下是反应原理，如图 11 [26]。

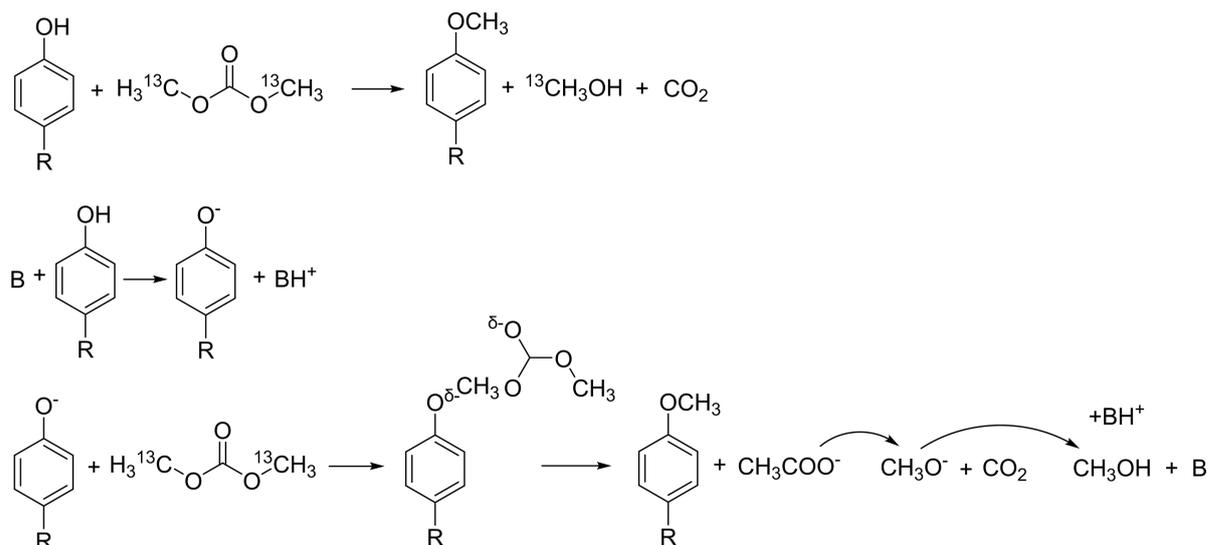


Figure 11. Reaction principle when dimethyl carbonate is used as methylating agent [26]

图 11. 碳酸二甲酯作为甲基化试剂反应原理[26]

3.4. 结论与分析

对前面的方法进行总结，在采用直接取代的方法中， ^{13}C -硫酸二甲酯毒性很强， ^{13}C -碘甲烷价格高昂且具有较高的毒性，因此用 ^{13}C -甲醇作为反应物相对更有优势。而且现在 ^{13}C 大多由 CO 低温精馏分离得到，因此 ^{13}C -甲醇、 ^{13}C -碘甲烷、 ^{13}C -硫酸二甲酯等大都是由 ^{13}CO 逐步合成的，其中 ^{13}C -碘甲烷大多以 ^{13}C -甲醇为原料进行合成，因此原料为 ^{13}CO 时，直接用 ^{13}C -甲醇作为甲基化试剂可以省略一部分中间步骤，因此用 ^{13}C -甲醇作为甲基化试剂进行合成有明显的优越性。用 ^{13}C -甲醇与对乙酰氨基酚进行反应在价格和安全性上都比较有优势，但是需要寻找合适的活化剂和催化剂等，在上述几种合成方法中，Mitsunobu 醚化反应是一个比较好的合成方法。

使用间接取代方法进行反应，主要原因是 ^{13}C -甲醇的甲基化活性比较低，由于对成本和产物纯度等方面的考虑，可以将价格相对低廉的 ^{13}C -甲醇中的 ^{13}C 转移到甲基化活性高的中间体上，再与对乙酰氨基

基酚反应。这个方法可以明显提高产物纯度、降低分离难度，因此有一定的应用价值。使用红磷、碘将 ^{13}C -甲醇中的羟基碘化后与对乙酰氨基酚反应，收率较高，经济性较好，但过程比较复杂且对温度控制和加料速度有较高的要求。根据此思路，也可以选择合成 ^{13}C -碳酸二甲酯、 ^{13}C -三氟甲磺酸甲酯、 ^{13}C -氟磺酸甲酯等甲基化活性高的试剂来实现甲基化，其中 ^{13}C -碳酸二甲酯更加环保且安全，但在取代反应时，一半被标记的碳会生成 ^{13}C -甲醇，需要考虑如何回收以降低成本。如果选择采用合成 ^{13}C -碳酸二甲酯，再与对乙酰氨基酚进行取代反应的方法进行反应，首先需要考虑 ^{13}C -碳酸二甲酯的合成方式。目前，碳酸二甲酯的合成方式主要包括酯交换法、甲醇氧化羰基化法、尿素醇解法，其中甲基碳均来源于甲醇，甲醇可由 CO 或 CO_2 催化加氢获得。三种方法优劣如表2。

Table 2. Comparison of synthetic processes of dimethyl carbonate

表 2. 碳酸二甲酯合成工艺路线对比

生产方法	环氧丙烷酯交换法	环氧乙烷酯交换法	甲醇直接氧化羰基化法	甲醇间接氧化羰基化法	尿素直接醇解法	尿素间接醇解法
优势	技术成熟，产品质量好	技术成熟，中间产品碳酸乙烯酯附加值高	原料易得，流程短，环境友好	原料易得，不产生共沸物，分离容易	原料易得，流程短，能耗低	原料易得
劣势	环氧丙烷价格高；催化剂用量大	环氧乙烷危险系数高，不便于运输；催化剂用量大	甲醇转化率低，催化剂对设备有腐蚀性，反应产物影响催化剂活性	NO 有毒性，反应剧烈难以控制	单程转化率不高，尿素分解影响产品质量	丙二醇易形成高聚物影响收率，尿素分解影响产品质量

使用 ^{13}C -碳酸二甲酯的目的是将被标记的碳原子连接到对乙酰氨基酚上，且 ^{13}C 价格高昂，因此选用的应当是 ^{13}C -甲醇转化率更高的方案，如酯交换法。在碳酸二甲酯与对乙酰氨基酚反应过程中会生成甲醇，此时利用甲醇氧化羰基化法进行甲醇回收可以明显提高 ^{13}C 的利用率。

如果可以找到合适的条件使产物纯度和产率都较高，出于对安全性、成本等方面的考虑，直接用 ^{13}C -甲醇进行合成仍然是更加方便的方法。如果直接选用 ^{13}C -甲醇作为甲基化试剂，面临的问题就是 ^{13}C -甲醇的甲基化活性低，并且可能存在 C -甲基化副产物，因此需要考虑如何提高 ^{13}C -甲醇的反应活性和提高产物的选择性。用甲醇进行甲基化主要使用的催化剂中，磷酸铜催化剂对甲醇与酚反应的选择性较好，且具有较好的稳定性，是比较合适的一种催化剂。根据甲醇与苯酚反应生成苯甲醚的反应条件，直接用甲醇进行合成应当需要比较高的温度，如果需要固体催化剂，可以用氧化铝作为载体，以磷酸铜等作为催化活性成分通过浸渍制备。

^{13}C 为稳定同位素，参加反应不影响反应过程，对制备方法进行探索时可用非标记试剂进行反应。如果用非标记甲醇进行试剂合成，可以直接利用实验结果合成；如果用非标记碳酸二甲酯试合成，因为被标记的碳酸二甲酯货源较少，因此需要多一步合成，用甲醇作为原料合成碳酸二甲酯。

Mitsunobu 醚化反应这个方法反应条件是最温和的，能保证较高的产率、生产过程的安全性高，因此是目前比较合适的方法，如果产物能方便地分离和纯化，非常适合用此方法进行生产。总的来说，Mitsunobu 醚化反应是比较适合的一个方法，如果不考虑经济性和毒性，直接用 ^{13}C -碘甲烷进行合成也是一个简单有效的方案。

4. 结语

^{13}C -MBT 可以安全、简便地检测肝脏储备功能，可以更加便捷无创且更客观地评价疾病进展、给出

准确评估,有着广阔的应用前景。目前,我国还没有大规模应用 ^{13}C -MBT 进行肝脏功能检测,随着 ^{13}C 未来产能的提高,需要更加安全、经济性好且可大量生产的方法制备 ^{13}C -美沙西丁。现有的制备方法中,Mitsunobu 反应是一种比较有优势的方法,避免了有毒且价格昂贵的 ^{13}C -碘甲烷的使用,并且以 ^{13}C -甲醇计算有 63% 的产率。除此之外,用 ^{13}C -碘甲烷进行合成是一种比较成熟的方法,先将 ^{13}C -甲醇活化生成中间体,再与对乙酰氨基酚反应也是一个可行的方法。综合反应物毒性、产率和纯度、反应流程等方面,Mitsunobu 反应是在各方面比较合适的方法,有着广阔的发展前景。

参考文献

- [1] 聂秀丽, 管樑, 石洪成, 等. ^{13}C 蛋氨酸呼气试验评估肝脏线粒体功能[J]. 标记免疫分析与临床, 2012, 19(3): 140-143.
- [2] 杜杰, 郑松柏. L-[1- ^{13}C]-苯丙氨酸呼气试验检测健康人肝脏储备功能的增龄变化[C]//2015 年老年医学学术年会论文汇编. 2015: 71.
- [3] 杜希英, 秦绪记, 杜光菊, 等. ^{13}C 呼气试验——一种非侵入的临床检测方法[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(3): 202-205.
- [4] 王永席, 贾泽博, 翟红兵, 等. ^{13}C -辛酸呼气试验测定消化性溃疡患者胃固体排空功能的临床研究[J]. 国际消化病杂志, 2016, 36(4): 242-244.
- [5] 徐耀, 王继焕, 翁玲, 等. 无创式肝脏储备功能 ICG 检测仪新近进展及三波长肝功能储备仪的分光光度检测模型分析[J]. 中国医疗器械信息, 2021, 27(20): 11-14+74. <https://doi.org/10.15971/j.cnki.cmdi.2021.20.006>
- [6] 王永席, 翟红兵, 苏旅明, 等. ^{13}C -噻塞西啶呼气试验测定肝脏储备功能及其相关指标的临床研究[J]. 中国医刊, 2010, 45(4): 62-64.
- [7] Lara Barúque, S., Razquin, M., Jimenez, I., et al. (2000) ^{13}C -Phenylalanine and ^{13}C -Methacetin Breath Test to Evaluate Functional Capacity of Hepatocyte in Chronic Liver Disease. *Digestive and Liver Disease*, **32**, 226-232. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(00\)80825-7](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(00)80825-7)
- [8] 张学秀, 姚建宁, 张延祯, 等. ^{13}C -美沙西丁呼气试验在原发性胆汁性胆管炎中的临床应用[J]. 肝脏, 2019, 24(9): 1025-1028. <https://doi.org/10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2019.09.016>
- [9] 董玮, 张永利. ^{13}C -噻塞西啶呼气试验测定肝硬化患者肝脏储备功能的临床价值[J]. 医学综述, 2016, 22(6): 1171-1173+1176.
- [10] Haim, S., Hussein, A., Tamar, S., et al. (2008) Utility of a ^{13}C -Methacetin Breath Test in Evaluating Hepatic Injury in Rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **23**, 1762-1768. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05431.x>
- [11] Piotr, H., et al. (2008) Usefulness of ^{13}C -Methacetin Breath Test in Liver Function Testing in Amanita Phalloides Poisoning: Breast Feeding Woman Case. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, **46**, 1077-1082. <https://doi.org/10.1080/15563650802353309>
- [12] 万荣, 吴云林, 王虹, 等. ^{13}C -美沙西丁呼气试验判断肝硬化患者肝功能[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(9): 137-139.
- [13] Dinesen, L., Caspary, W.F., Chapman, R.W., et al. (2008) ^{13}C -Methacetin-Breath Test Compared to Also Noninvasive Biochemical Blood Tests in Predicting Hepatic Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis C. *Digestive and Liver Disease*, **40**, 743-748. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.01.013>
- [14] 毛静怡, 李鑫, 王晨, 等. ^{13}C -美沙西丁呼气试验和吡啶氧绿清除试验对急性肝损害大鼠肝功能评价的比较[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(11): 867-870.
- [15] 陈源, 张会丰, 窦志艳, 等. 红外线同位素能谱分析仪 ^{13}C -美沙西汀呼气试验对肝豆状核变性患儿肝功能评估的价值[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(20): 1558-1559.
- [16] Iikura, Y., Iwasaki, A., Tsubaki, T., et al. (1995) Study of Liver Function in Infants with Atopic Dermatitis Using the ^{13}C -Methacetin Breath Test. *International Archives of Allergy and Immunology*, **107**, 189-193. <https://doi.org/10.1159/000236973>
- [17] 孔桂萍, 刘志峰, 金玉. ^{13}C -美沙西丁呼气试验对儿童肝脏疾病的诊断价值[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(7): 507-510
- [18] Krumbiegel, P., Gunther, K., Faust, H., et al. (1985) Nuclear Medicine Liver Function Tests for Pregnant Women and Children. 1. Breath Tests with ^{14}C -Methacetin and ^{13}C -Methacetin. *European Journal of Nuclear Medicine*, **10**, 129-133. <https://doi.org/10.1007/BF00252720>

- [19] Hermann-Georg, H., *et al.* (2020) A Novel Variant of the ^{13}C -Methacetin Liver Function Breath Test That Eliminates the Confounding Effect of Individual Differences in Systemic CO_2 Kinetics. *Archives of Toxicology*, **94**, 401-415. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02654-0>
- [20] Makridis, G. Oldhafer, K.J. (2020) First Intraoperative Measurement of Liver Functional Capacity during Liver Surgery Using the ^{13}C -Methacetin Breath Test: Early Results of a Pilot Study. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, **27**, 280-281. <https://doi.org/10.1002/jhbp.699>
- [21] Avramova, P., Iordanova, K., Ivanov, I., *et al.* (1989) Laboratory Technology for Preparation of Methacetin. *Farmatsiya (Sofia)*, **39**, 4-6.
- [22] 陈万木, 吕东煜, 袁慧星, 等. ^{13}C 美沙西丁的制备研究[J]. 兰州医学院学报, 2000(1): 1-2. <https://doi.org/10.13885/j.issn.1000-2812.2000.01.001>
- [23] El'man, A.R., Davydov, I.E., Kononov, L.O., *et al.* (2014) Synthesis of (^{13}C -Methoxy)Methacetin for Isotopic Breath Tests. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **48**, 279-283. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1094-7>
- [24] 陈凯, 代德胜, 王春玲, 等. 美沙西丁-甲氧基- ^{13}C 及其类似物的合成[J]. 同位素, 2021, 34(5): 480-486.
- [25] 卢伟京, 卢浩, 杨维成, 等. 自制美沙西丁-甲氧基- ^{13}C 的表征[J]. 同位素, 2010, 23(4): 216-220.
- [26] 杨晴. 多相催化法合成苯甲醚及其它芳香醚[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连海事大学, 2019. <https://doi.org/10.26989/d.cnki.gdlhu.2019.000809>
- [27] 陈凯, 卿晶, 代德胜, 等. 美沙西汀-甲氧基- ^{13}C 的合成工艺研究[J]. 广州化工, 2022, 50(11): 46-48.
- [28] 龚爱华, 马胜利. 美沙西丁的制备方法[P]. 中国, CN201711068683.4. 2018-05-10.