

猪去氧胆酸的纯化和杂质的结构鉴定

罗 峰, 邓启华*, 叶昌伦

(四川化工职业技术学院制药与环境工程系, 四川 泸州 646005)

摘 要: 将猪去氧胆酸粗品形成甲酯, 然后用苯结晶, 分离出猪去氧胆酸甲酯, 再利用 NaOH 的乙醇-水溶液进行水解, 得到纯猪去氧胆酸; 对猪去氧胆酸粗品中含有的主要杂质进行了结晶分离, 通过 IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 谱, HDMS, DSC/TGA 和 2D-NMR 进行了结构鉴定, 确定其主要杂质为猪胆酸。

关键词: 猪去氧胆酸; 纯化; 杂质; 结构鉴定

中图分类号: R 979.1 **文献标志码:** A

文章编号: 0367-6358(2011)09-0543-04

Purification of Hyodeoxycholic Acid and Structural Identification of the Impurity

LUO Feng, DENG Qi hua*, YE Chang-lun

(Department of Pharmaceutical and Environmental Engineering, Sichuan Chemical Vocation Technology College Sichuan Luzhou 646005, China)

Abstract: Methyl hyodeoxycholate was obtained from impure hyodeoxycholic acid, and it was crystallized in benzene. The pure methyl hyodeoxycholate was then hydrolyzed by sodium hydroxide in aqueous ethanol, and pure hyodeoxycholic acid was obtained. The major impurity was separated by column chromatography, and it was confirmed as hyocholic acid by means of IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, HDMS, DSC/TGA, and 2D nuclear resonances.

Key words: hyodeoxycholic acid; purification; impurity; structure confirmation

猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid(3 α -5 β , 6 α)-3, 6-二羟基胆甾烷-24 酸, HDCA) 具有较多的药理作用, 如降血脂、镇痉、祛痰等, 为人工牛磺的重要成分; 临床上可用于治疗高血压、气管炎以及由肝胆疾病引起的消化不良, 对百日咳菌、金黄色葡萄球菌等也有抑制作用。HDCA 主要从猪胆汁或提取胆红素后的废料中进行提取分离, 分离工艺包括皂化和精制^[1-3]。

提取原料中除含 HDCA (下式 a) 外, 还含有相当数量的其他胆汁酸, 如鹅去氧胆酸(下式 b) 和猪胆酸(下式 c)^[4], 因此, 提取的猪去氧胆酸中都含有一定的杂质。目前, 市售的猪去氧胆酸虽然标示的

纯度大多为 98%, mp 197 °C 以上, 但大多是通过酸碱滴定法测定的。采用薄层色谱(TLC) 和 HPLC (蒸发散射光检测器) 测定发现, 绝大部分市售产品的 HDCA 含量不足 90% 左右。在 TLC 中, 猪去氧胆酸下边含有一个较大的杂质斑点。

当前, 纯化猪去氧胆酸的方法有乙酸乙酯重结晶法, 丙酮重结晶法, 甲醇(乙醇)-水重结晶法等, 需要使用大量溶剂。因此, 探索新的纯化猪去氧胆酸的方法对于提高产品质量, 减少药物不良反应等具有较大的应用价值。

将市售的猪去氧胆酸, 按照 1: 20(m/V) 的比例, 进行重结晶, 发现在乙酸乙酯、丙酮中都有大量

收稿日期: 2011-01-19

作者简介: 罗 峰(1971~), 男, 硕士, 讲师, 主要从事制药中间体及药物合成。* E-mail: dengqihua@sccvtc.cn

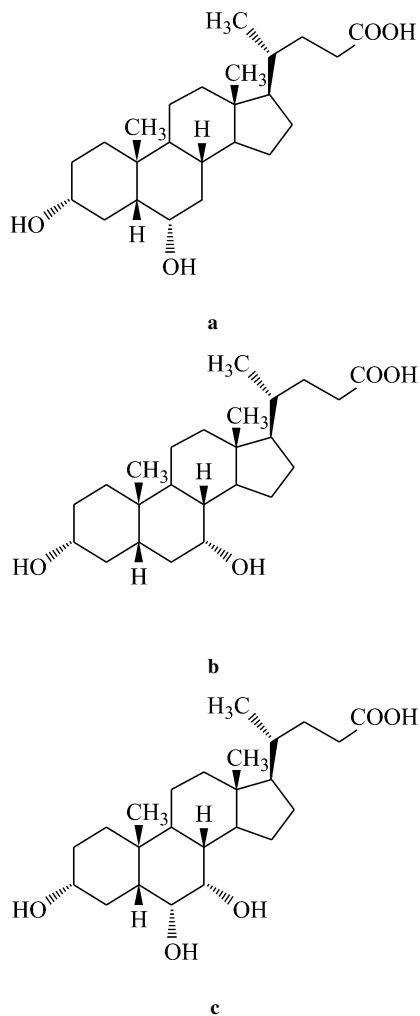


图 1

固体未溶解, 而使用乙醇-水或甲醇-水体系进行重结晶, 产物的纯度变化较小, 说明这些溶剂体系对猪去氧胆酸的纯化作用较差。

参照文献[4]的方法, 将市售猪去氧胆酸(含量 82%, HPLC 法)经甲酯化后, 用苯分离出纯猪去氧胆酸甲酯-苯加合物; 母液回收溶剂后, 加入乙酸酐将残留物中所有的羟基乙酰化, 利用结晶方法对杂质进行分离。猪去氧胆酸甲酯及杂质的酯化物经水解后, 得到较纯的猪去氧胆酸和杂质。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

熔点用 Yanaco 显微熔点仪测定, 温度未经校正; 薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄, 青岛海洋化工厂产品; HPLC 用 Alltech hplc 426, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器测定; 核磁共振氢谱用 Varian INOVA 400(美国) 高分辨率核磁共振波谱仪, TMS 作内标; 旋光度用 A 12630 APIV/6W(美国) 自动旋光仪测定; 高分辨率质谱用 Finnigan LCQ^{DECA}(美国) 型质谱仪测定; DSC 用 DSC Q100 测定; 所有试

剂和溶剂均为分析纯, 使用前未作特殊处理。

1.2 实验

1.2.1 猪去氧胆酸的纯化

在 1 L 烧瓶中加入 100 g 含量 82% (质量分数) 的猪去氧胆酸和 350 mL 无水甲醇, 搅拌溶解后, 冷却在冰水浴中, 缓慢滴加 30 mL 氯化亚砷, 控制滴加速度使反应液温度不超过 10°C, 滴加完后, 在室温下搅拌反应 5 h。冷却于冰水中, 往反应液中缓慢加入固体碳酸钠调节 pH 6~7。过滤, 用少量冷甲醇洗涤。滤液和洗液减压回收甲醇至尽, 得淡黄色固体, 再加入 200 mL 苯, 加热使完全溶解, 蒸馏出约 50 mL 苯, 冷却到室温, 并放置过夜。过滤, 固体用少量苯洗涤。固体再用苯重结晶, 得白色固体 96.4 g。

上述固体加入到含有 15 g NaOH 的 1:1(V/V) 乙醇-水(200 mL) 中, 加热回流 16 h, 稍冷后, 用盐酸调节 pH 至 2~3, 析出固体, 进一步冷却到室温, 过滤, 水和 50% (体积分数, 下同) 乙醇洗涤, 干燥, 得淡黄色猪去氧胆酸 78.5 g, 纯度 95.2%, 总回收率 95.7%, mp 198~200°C, $[\alpha]_D^{20} = +8.1^\circ$ ($c = 1\%$, 甲醇); m/z : 393.3113 ($M + H^+$, 理论值 393.2999), 415.2819 ($M + Na^+$)。

1.2.2 杂质的分离和纯化

将苯结晶和重结晶后的母液减压回收苯后得到的固体中, 加入 50 mL 乙酸酐, 2 g 无水乙酸钠, 加热回流 5 h, 然后减压回收大部分乙酸和乙酸酐, 得黄色油状物。往油状物中加入 50 mL 乙醚使之溶解, 依次用水、10% (质量分数) 的碳酸氢钠溶液、水洗涤至中性, 无水硫酸钠干燥。过滤, 回收乙醚至尽, 得黄色油状物。

往上述油状物中加入 50 mL 正己烷, 振荡溶解, 冷却到室温, 进一步在 0~5°C 下放置过夜。析出的固体经过滤, 己烷洗涤, 干燥。再依次用无水甲醇和苯重结晶, 得到白色固体 12.2 g, mp 184~186°C。

将所得纯产物悬浮于 50 mL 乙醇-水 1:1(V/V) 溶液中, 加入 5 g 固体 NaOH, 加热回流 6 h。稍冷后, 用盐酸调节到 pH 2~3, 然后冷却到室温。过滤, 用水洗涤 2 次, 再用 50% 乙醇洗涤, 干燥, 得淡黄色固体 8.5 g, 经与含量 82% 的猪去氧胆酸作 TLC 分析, 发现该固体即为猪去氧胆酸中所含有的杂质。

1.2.3 杂质的结构鉴定

杂质的 mp 186~188°C, $[\alpha]_D^{20} = +4.9^\circ$ ($c = 1.7\%$, 乙醇); m/z (HIMS): 409.2985 ($M + H^+$),

431.2817($M + Na^+$)。

IR (KBr) $\nu_{cm^{-1}}$: 3435.9, 2934.1, 1712.8, 1650.8, 1456.2, 1052.

杂质 ^{13}C NMR 与猪去氧胆酸的图谱比较^[5], 在 $(66 \sim 71) \times 10^{-6}$ 多了一个吸收峰, 说明杂质含有 3 个羟基, 其 24 甲酸甲酯 3, 6, 7 三醋酸酯化合物的

mp 为 $184 \sim 186^{\circ}C$, 结合文献[4] 和 Combined Chemical Dictionary 数据, 以及 IR 谱图与猪胆酸标准 IR 完全一致, 可以判定, 该杂质应该为猪胆酸(c)。杂质的 1H NMR、氢-氢相关谱数据见表 1, ^{13}C NMR、DEPT 谱、碳氢相关谱和碳氢远程偶合见表 2。

表 1 核磁共振氢谱(1H NMR) 数据、氢-氢相关谱(H_gCOSY) 及解析结果

$\delta/\times 10^{-6}$	氢数目	裂分情况	归属	氢-氢相关峰 $\delta/\times 10^{-6}$
11.96	1H	s	COOH(重水交换)	—
4.33	1H	d, ($J=4.4$ Hz)	OH-3(重水交换)	H-3
4.20	1H	d, ($J=5.6$ Hz)	OH-6(重水交换)	H-6
3.90	1H	s	OH-7(重水交换)	H-7
3.57	2H	brs	H-6, H-7	OH-7, H-8, OH-6
3.11	1H	brs	H-3	OH-3, H-2, H-4, H-2
2.19~2.33	1H	m	H-23	H-22, H-22
2.08~2.12	1H	m	H-23	H-22, H-22
1.80~1.92	1H	m	H-12	H-11
1.82~1.72	3H	m	H-2, H-4, H-16	H-2, H-3, H-5, H-15, H-17
1.56~1.72	4H	m	H-1, H-4, H-9, H-22	H-1, H-3, H-5, H-8, H-20, H-23
1.50~1.30	6H	m	H-1, H-2, H-5, H-8, H-20, H-11, H-15	H-2, H-4, H-6, H-7, H-9, H-11, H-12, H-14, H-16
0.96~1.29	8H	m	H-17, H-12, H-16(2H), H-11, H-15, H-22, H-14	H-1, H-3, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-20, H-23
0.88	3H	d, $J=6.4$ Hz	H-21	H-20
0.83	3H	s	H-19	—
0.60	3H	s	H-18	—

表 2 ^{13}C NMR、DEPT 谱、碳氢相关及碳氢远程偶合解析结果

$\delta/\times 10^{-6}$	DEPT	归属	碳氢相关谱($g\text{ HM QC}$)	碳-氢远程偶合
32.77	CH_2	C-1	1.80(H-1), 1.37(H-1)	4.33(OH-3), 1.70(H-2), 1.20(H-2), 0.83(H-19)
30.87	CH_2	C-2	1.76(H-2), 1.47(H-2)	4.33(OH-3), 1.80(H-1), 1.70(H-4), 1.18(H-1)
70.62	CH	C-3	3.11(H-3)	4.33(OH-3), 1.80(H-1), 1.18(H-1)
35.82	CH_2	C-4	1.70(H-4), 1.14(H-4)	4.33(OH-3), 1.80(H-1), 1.37(H-1), 1.70(H-2), 1.20(H-2)
48.26	CH	C-5	1.39(H-5)	4.20(OH-6), 3.57(H-6), 1.68(H-4), 0.83(H-19)
71.16	CH	C-6	3.57(H-6)	4.20(OH-6), 3.90(OH-7)
68.73	CH	C-7	3.57(H-7)	4.20(OH-7), 3.90(H-6), 3.57(H-6)
38.46	CH	C-8	1.37(H-8)	3.90(OH-7), 1.62(H-9), 1.46(H-14)
32.43	CH	C-9	1.62(H-9)	3.57(H-7), 1.90(H-12), 1.38(H-11), 1.14(H-11), 0.83(H-19)
35.77	C	C-10	—	1.80(H-1), 1.36(H-1), 1.62(H-9), 0.83(H-19)
20.53	CH_2	C-11	1.38(H-11), 1.14(H-11)	1.90(H-12), 1.64(H-9), 1.14(H-12)
39.54	CH_2	C-12	1.90(H-12), 1.16(H-12)	1.46(H-14), 1.10(H-11), 0.60(H-18)
42.24	C	C-13	—	1.92(H-12), 1.44(H-14), 0.60(H-18)
50.14	CH	C-14	1.46(H-14)	1.90(H-12), 0.97(H-15), 0.60(H-18)
23.32	CH_2	C-15	1.46(H-15), 0.97(H-15)	1.68(H-16), 1.46(H-14)
27.98	CH_2	C-16	1.78(H-16), 1.24(H-16)	1.46(H-15), 1.42(H-14), 1.10(H-17), 0.97(H-15)
55.72	CH	C-17	1.10(H-17)	1.80(H-16), 1.24(H-16), 0.86(H-21)
11.86	CH_3	C-18	0.60(H-18)	1.10(H-17), 1.36(H-14), 1.92(H-12)

23.36	CH ₃	C-19	0.83(H-19)	1.80(H-1), 1.37(H-1), 1.62(H-9)
35.18	CH	C-20	1.38(H-20)	2.20(H-23), 2.10(H-23), 1.68(H-22), 1.18(H-22), 1.10(H-17), 0.88(H-21)
18.37	CH ₃	C-21	0.88(H-21)	1.68(H-22), 1.18(H-22), 1.04(H-17)
30.92	CH ₂	C-22	1.68(H-22), 1.20(H-22)	2.20(H-23), 2.10(H-23), 1.38(H-20), 1.10(H-17), 0.88(H-21)
30.95	CH ₂	C-23	2.20(H-23), 2.10(H-23)	1.68(H-22), 1.18(H-22), 1.38(H-20)
175.14	C	C-24	—	2.20(H-23), 2.10(H-23)

在 DSC-TGA 分析中, 杂质的初始熔融温度为 185.42 °C, 熔融温度峰值为 186.29 °C。样品在 200 °C 前未见失重, 在 300 °C 时, 仅失重 6%。因此, 所测试样品的熔点 185.4~186.3 °C, 与 Merck 中记载的猪胆酸的熔点数据 188~190 °C 相近。

基于以上各项分析, 表明猪去氧胆酸中所含有的主要杂质为猪胆酸, 其化学名为(3 α , 5 β , 6 α , 7 α)-3, 6, 7-三羟基胆甾-24 酸。

2 结论

猪去氧胆酸粗品经甲酯化, 与苯形成复合物, 利用该复合物不溶于苯的特点, 从苯中分离出较纯的猪去氧胆酸甲酯, 然后进行水解, 对猪去氧胆酸进行纯化, 其纯度由 82% 提高到 95.2%, 操作简便, 节约大量有机溶剂; 通过结晶方法, 分离出猪去氧胆酸中

的杂质, 经氢谱、碳谱、核磁二维谱、DSC-TGA、IR、MS 等分析, 结合中间体三醋酸酯的熔点和旋光数据, 表明该杂质为猪胆酸。

参考文献:

- [1] 陆进, 杜守颖, 赵丽瑞, 等. 中国中药杂志[J], 2004, 29(5): 414-417.
- [2] 苏红, 叶利民, 杨轶滢, 等. 华西药学杂志[J], 2006, 21(4): 360-362.
- [3] 北京市中药三厂、中国医学科学院药物研究所心血管病协作小组. 化学通报[J], 1974(4): 20-21.
- [4] 沈季铭, 周维善. 医药工业[J], 1988, 19(12): 529-531.
- [5] 王凯, 张秀兰, 葛燕丽, 等. 化学世界[J], 2007, 48(5): 278-282.

(上接第 540 页)

参考文献:

- [1] 张正红, 吕亮. 合成化学[J], 2009, 17(3): 392-393.
- [2] 韩光, 王先友, 杨松松, 等. 中药学杂志[J], 2005, 40(9): 714-715.
- [3] 章思规. 实用精细化学品手册(上)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1996. 447.
- [4] Lusson C H P. US: 5 974 659[P], 1999-02-23.
- [5] 高春香, 杨希越, 张静, 等. 辽宁化工[J], 2007, 36

(2): 73-74.

- [6] 李斌栋, 吕春绪. 淮海工学院学报[J], 2000, 9(4): 25-26.
- [7] 章思规. 精细有机化学品技术手册(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 335-336.
- [8] 宋小平, 韩长日. 精细有机化工粗品实用生产技术(下册)[M]. 北京: 中国石化出版社, 2001. 1687.
- [9] 张明森. 精细有机化工中间体全书[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. 539.

(上接第 542 页)

4 结论

(1) 以 PEG-400 为相转催化剂合成 1-(2, 4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)-乙醇, 反应条件温和, 操作方便。

(2) 优化后最佳工艺为: 甲苯 45 mL, 咪唑 4.0 g, 1-(2, 4-二氯苯基)-2-氯-乙醇 10 g, 聚乙二醇-400 7.5 g, 氢氧化钠溶液浓度为 50% (质量分数), 反应温度为 70 °C, 反应时间为 6 h, 产率可达 84.6%。

参考文献:

- [1] 谈文柏, 程德猷, 朱巨帆. 中国医药工业杂志[J], 1982, (11): 3-5.

- [2] 王宇, 陈平, 陈明, 等. 中国现代应用药学[J], 2004, 21(4): 286-287.
- [3] 王明慧, 杨立荣, 吴坚平. 中国医药工业杂志[J], 2005, 36(8): 458-459.
- [4] 王明慧, 吴坚平, 杨立荣, 等. 高校化学工程学报[J], 2006, 20(6): 909-914.
- [5] 邵律成, 陈红, 王小燕. 药学实践杂志[J], 2007, 25(2): 102-103.
- [6] 段文生, 崔建兰, 祁晓静. 天津化工[J], 2010, 24(3): 21-24.
- [7] Godefroi E F, Heeres J, Cutsem J V, et al. J Med Chem[J], 1969, 12(5): 784.