



В.І. Гусаров, С.М. Коваленко, Л.В. Євсєєва

Виділення жовчних кислот з жовчі великої рогатої худоби

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: жовчні кислоти, холева кислота, дезоксихолева кислота, виділення.

Ключевые слова: желчные кислоты, холевая кислота, дезоксихолева кислота, выделение.

Key words: bile acids, cholicacid, deoxycholicacid, isolation.

Запропоновано спосіб виділення та отримано препаративні кількості індивідуальних жовчних кислот – холевой та дезоксихолевої – зі свіжої та висушеної жовчі великої рогатої худоби, а також з жовчі, що зберігалась 1 рік. Структуру сполук підтверджено даними спектроскопії ЯМР ^1H та мас-спектрометрії, а чистоту – хроматографічними методами.

Предложен способ выделения и получены препаративные количества индивидуальных желчных кислот – холевой и дезоксихолевой – из свежей и высушенной желчи крупного рогатого скота, а также из желчи, хранившейся 1 год. Структура соединений подтверждена данными спектроскопии ЯМР ^1H и масс-спектрометрии, а чистота – хроматографическими методами.

A method for isolating of pure bile acids was proposed. The preparative quantities of mention above compounds were obtained. Cholicand desoxycholic acids were obtained from fresh and dried bovine bile and mof bile, which was kept 1 year. The structure of the compounds was confirmed by ^1H NMR and mass spectrometry data. Purity of compounds was confirmed by chromatography.

Пошук нових фармакологічно активних сполук і подальше створення на їх основі лікарських препаратів є одним із найважливіших завдань фармацевтичної науки. Перспективними об'єктами досліджень є жовчні кислоти (ЖК), що застосовуються як самостійні лікарські засоби [1], так і в якості матриць для моделювання нових біологічно активних молекул за рахунок закріплення на них структурних елементів-фармакофорів [2–8]. У результаті на базі структур ЖК створено сполуки з широким спектром біологічної дії: антимікробною, протівірусною [2,3], цитостатичною [4–6], гіпоглікемічною [7,8] тощо.

Жовчні кислоти (рис. 1) належать до стероїдів і є похідними холанової кислоти. Первинні ЖК – холева (ХК) і хенодезоксихолева – синтезуються в печінці. Вторинні – дезоксихолева (ДЖК) і літохолева – утворюються в тонкій кишці з первинних кислот під дією бактерійної мікрофлори. У жовчі людини містяться також алохолева і урсодезоксихолева кислоти – стереоізомери відповідно

холевой та хенодезоксихолевої кислот. У фізіологічних умовах ЖК вони зв'язані у кон'югати з гліцином або таурином [9].

ЖК відіграють важливу роль у перетравленні і всмоктуванні ліпідів за рахунок поверхнево-активних властивостей. Ще одна суттєва роль ЖК – регуляція синтезу та деградації холестерину та інших стероїдів, зокрема гормонів. ЖК беруть участь у регуляції екскреторної функції печінки. Жовчні солі діють як фізіологічні послаблюючі речовини, підсилюючи перистальтику кишечника [10,11].

Методи отримання вільних ЖК з жовчі зводяться до гідролізу їх кон'югатів за допомогою лугів [12,13,14] або ферментів [15] (рис. 2).

Мета роботи

Розробка методу препаративного виділення з жовчі індивідуальних ЖК з чистотою більше 99% для використання у якості стандартів та для подальшого синтезу похідних ЖК.

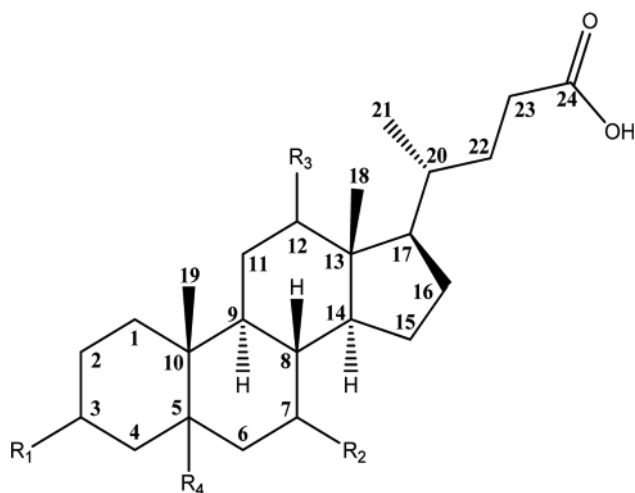


Рис. 1. Структура деяких жовчних кислот.

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \beta\text{-H}$ – холева кислота

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \beta\text{-H}$ – хенодезоксихолева кислота

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \beta\text{-H}$ – дезоксихолева кислота

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \beta\text{-H}$ – літохолева кислота

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-H}$ – алохолева кислота

$R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \beta\text{-OH}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \beta\text{-H}$ – урсодезоксихолева кислота

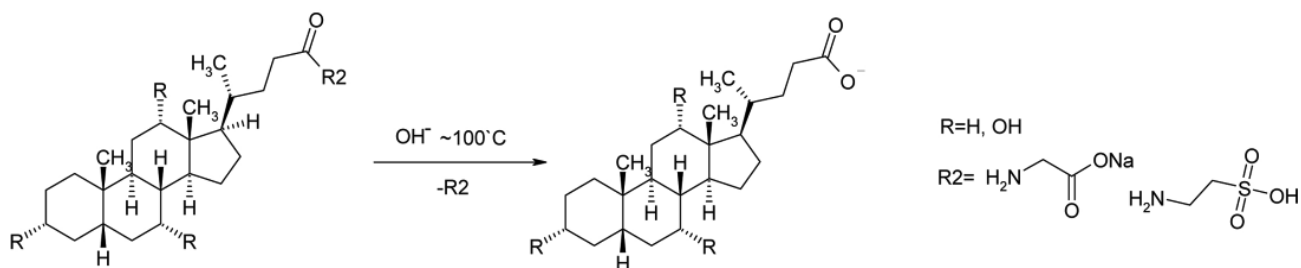


Рис. 2. Схема гідролізу кон'югатів жовчних кислот.

Матеріали і методи дослідження

Для аналітичної тонкошарової хроматографії (постадійний контроль) застосовували алюмінієві пластинки Silufol® UV-254. Проявник – 5% розчин фосфорномолибденової кислоти в ізопропанолі. Для колонкової хроматографії низького тиску використовували силікагель марки КСК з розміром часток від 0,25 до 0,75 мм та адаптований високоєфективний рідинний хроматограф VarianProStar (насосиProStar 210, УФ-спектрофотометричний детектор ProStar 325). Температуру плавлення визначали на блоці Кофлера. Мас-спектри отримано на мас-спектрометрі PE SCIEX API 165. Спектри ¹H-ЯМР записано на спектрометрі VarianMercury 200 (робоча частота – 200 МГц) в ДМСО-d₆, внутрішній стандарт – ТМС.

Результати та їх обговорення

Об'єктами дослідження була жовч великої рогатої худоби свіжа, жовч, яку зберігали при кімнатній температурі протягом року, і висушена жовч.

Для отримання вільних ЖК до 1,0 л сирової жовчі додавали 100 г гідроксиду калію і кип'ятили протягом 20 год. Наявність вільних ЖК та їх кон'югатів у процесі гідролізу контролювали за допомогою ТШХ (система розчинників: етилацетат – метанол – вода (77:15:8)). Після закінчення реакції розчин охолоджували, додавали кислоту хлористоводневу концентровану до рН 3,5. Рідину відділяли декантацією, отриману зелену аморфну масу, що містила суміш вільних ЖК і жовчних пігментів, подрібнювали та висушували (час сушіння – близько 2 тижнів).

При виділенні вільних ЖК з висушеної жовчі («Жовч очищена, суха», виробництво ДП «ЕЗМП ІБОНХ НАН України», ТУ 10.02.01.112-89), її розчиняли в 10% розчині КОН з розрахунку 100 г сухої жовчі на 1 л розчину. Гідроліз проводили за методикою, яку використовували для свіжої жовчі. Суттєвих відмінностей у процесі не спостережено.

При виділенні вільних ЖК з жовчі, яку зберігали протягом 1 року при кімнатній температурі, спочатку відфільтровано воскоподібний продукт оранжевого кольору, що утворився за цей час у жовчі. Його маса складала 6 г на 1 л жовчі. Імовірно, продукт є сумішшю тваринного жиру і пігментів жовчі. Відокремлення цього продукту змінило характер отриманої після гідролізу суміші ЖК: замість аморфної маси виділяли дрібні кристали, що добре піддавались фільтруванню й висушуванню за 4–5 діб.

Залежно від того, які ЖК планували отримувати (тільки ХК або ХК та ДХК), використано різні методики виділення.

Для отримання ХК висушений порошок суміші вільних ЖК кип'ятили зі зворотним холодильником 30 хв з 40 мл абсолютного етанолу, охолоджували та залишали при +5°C. Через добу утворювались кристали, що відокремлювали, промивали та двічі перекристалізували з абсолютного етанолу. Отримували ХК у вигляді кристало-сольвату з етанолом. Структуру сполуки доведено результатами ПМР-спектроскопії. Після висушування при температурі 140°C до постійної маси спостерігали зникнення сигналів, що відповідають протонам етанолу. Вихід ХК з сирової жовчі складає 12,4 г з 1 л. Вихід ХК з сухої жовчі – 14,1 г з 100 г сировини.

У разі, якщо потрібно виділити ХК і ДХК, суміш кислот, отриману після гідролізу, розчиняли при кип'ятінні у 120 мл 10% розчину гідроксиду натрію, розбавляли до 1,2 л і додавали хлористоводневу кислоту до рН 8 за універсальним індикатором. Суміш нагрівали до кипіння, додавали розчин хлористого магнію (9,7 г MgCl₂·6H₂O в 10 мл киплячої води). Осад, що виділився, відфільтровували та відкидали. Фільтрат нагрівали до кипіння, додавали розчин хлористого магнію (48 г MgCl₂·6H₂O в 55 мл окропу) і нагрівали протягом години до 95–100°C. Отриману масу охолоджували до 25–30°C, а магнієву сіль ДХК, що утворилась, відфільтровували, промивали невеликою кількістю холодної води, перекристалізували спочатку з 60% оцтової кислоти (двічі), потім з метанолу (двічі). Вихід 2,1 г з літру жовчі. Холеву кислоту з фільтрату виділяли за описаною методикою. Перекристалізували з метилового спирту. Вихід – 13 г ХК з 1 л жовчі.

Після кристалізації маточні розчини, що містили невелику кількість ХК та накопичували ДХК та інші ЖК, переробляли. Спочатку упарювали розчинник, потім розділяли на складові за допомогою колонкової хроматографії. Використовували колонку діаметром 2,5 см та 1 м заввишки. У якості елюенту використовували етилацетат. Збирали фракції по 15 мл. Всього отримано 92 фракції. Контроль складу фракцій проводили методом ТШХ. Фракції, що мали схожий склад, об'єднували, розчинник упарювали.

Фракції 9–11 утворили темний маслянистий осад масою менше 1 мг. Надалі не використовували.

З фракцій 13–17 отримано дрібні, забарвлені у жовтуватий колір кристали, маса 150 мг. За результатами ТШХ та ПМР ідентифіковані як ДХК.

З фракцій 38–54 отримано великі жовтуваті кристали (1,9 г). За результатами ТШХ, ПМР і температурою плавлення ідентифіковані як аллохолева кислота.

Фракції 67–72 утворили білий аморфний порошок (0,7 г). За результатами ТІХ та ПМР ідентифіковані як ХК.

Об'єднані фракції 18–25 і 26–35 мали вигляд аморфних мас зеленого кольору і містили принаймні по 3 компоненти. Розділені за допомогою препаративної хроматографії низького тиску на скляній хроматографічній колонці розміром 90 × 2,5 см. Швидкість рухомої фази складала 20 мл/хв. Тиск на колонці – 8–10 атм. Детектування проводили за довжини хвилі 254 нм.

Для хроматографування об'єднаної фракції 26–35 для нанесення на колонку суміш розчиняли у мінімальній кількості метанолу, у якості рухомої фази використовували суміш метанол – хлороформ (1:3). Час аналізу склав 35 хв. Зібрано 3 фракції, перша містила ДХК, третя – аллохолову кислоту. Друга виявилась їх сумішшю, надалі не використана.

Для хроматографування об'єднаної фракції 18–27 для нанесення на колонку суміш розчиняли у мінімальній кількості метанолу, у якості рухомої фази використовували суміш гексан – хлороформ – метанол (2:2:1). Час аналізу склав 50 хв. Отримано додаткову кількість кристалів, ідентичних кристалам з фракції 38–54 (аллохолова кислота), та не ідентифіковану кристалічну речовину стероїдної структури (за даними ПМР).

(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-3,7,12-тригідроксихолан-24-ова кислота (холева кислота). M/z: 355,4; 373,5; 391,2. ¹H-ЯМР, δ , м.д.: 0.56 (s, 3H, C-18), 0.80 (s, 3H, C-19), 0.92 (d, 3H,

C-2, J=4.2 Hz), 1.35 (m, 12H), 1.68 (m, 6H), 2.12 (m, 6H), 3.35 (m, 1H, C-7), 3.58 (m, 1H, C-3), 3.75 (m, 1H, C-12), 4.02 (d, 1H, OH-7), 4.12 (d, 1H, OH-3), 4.33 (d, 1H, OH-12), 11.85 (sbr, 1H, COOH-24). Tпл = 198°C;

(3 α ,5 β ,12 α)-3,12-дигідроксихолан-24-ова кислота (дезоксихолева кислота). ¹H-ЯМР, δ , м.д.: 0.54 (s, 3H, C-18), 0.88 (s, 3H, C-19), 0.94 (d, 3H, C-2, J=4.1 Hz), 1.28 (m, 14H), 1.67 (m, 8H), 2.15 (m, 2H), 3.75 (s, 1H, C-12), 4.19 (d, 1H, C-12), 4.45 (s, 1H), 12.03 (s br, 1H, COOH-24). Tпл = 177°C.

(3 α ,5 α ,7 α ,12 α)-3,7,12-тригідроксихолан-24-ова кислота (аллохолова кислота). ¹H-ЯМР, δ , м.д.: 0.56 (s, 3H, C-18), 0.80 (s, 3H, C-19), 0.92 (d, 3H, C-2, J=4.2 Hz), 1.35 (m, 12H), 1.68 (m, 6H), 2.12 (m, 6H), 3.35 (m, 1H, C-7), 3.58 (m, 1H, C-3), 3.75 (m, 1H, C-12), 4.02 (d, 1H, OH-7), 4.12 (d, 1H, OH-3), 4.33 (d, 1H, OH-12), 11.85 (sbr, 1H, COOH-24). Tпл = 186°C;

Висновки

Розроблено спосіб виділення індивідуальних жовчних кислот та отримано близько 80 г холевої і близько 3 г дезоксихолевої кислоти.

Розроблено методику препаративного хроматографічного виділення індивідуальних первинних і вторинних ЖК методом рідинної хроматографії.

Методом препаративної рідинної хроматографії отримано стандартні зразки ХК, ДХК, аллохолової кислоти.

Список літератури

1. *Машковський М.Д.* Лекарственные средства / Машковський М.Д. – 15-е изд., перераб. и доп. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2007. – 1200 с.
2. *Lehmann T.J.* Synthesis and Properties of Bile Acid Phosphoramidites 5'-Tethered to Antisense Oligodeoxynucleotides Against HCV / T.J. Lehmann, J.W. Engels // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2001. – Vol. 9, №7. – P. 1827–1835.
3. *Reinke R.A.* Dicafeoyltartaric Acid Analogues Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Integrase and HIV-1 Replication at Nontoxic Concentrations / R.A. Reinke, P.J. King, J.G. Victoria // *Journal Of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Vol. 45, №17. – P. 3669–3683.
4. *Li M.* Synthesis of Gymnasterone B, an antitumor steroid from *Gymnascelladankaliensis* / M. Li, P. Zhou, A. Wu // *Tetrahedron Letters*. – 2006. – Vol. 47, №20. – P. 3409–3412.
5. *Paschke R.* Novel spacer linked bile acid–cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization / R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz // *Inorganica Chimica Acta*. – 2000. – Vol. 304, №2. – P. 241–249.
6. *Paschke R.* Cholic acid–carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds / R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz // *Journal Of Inorganic Biochemistry*. – 2003. – Vol. 94, №4. P. – 335–342.
7. *von Geldern T.W.* Liver-Selective Glucocorticoid Antagonists: A Novel Treatment for Type 2 Diabetes / T.W. von Geldern, N.T. Philip, K.T. James // *Journal Of Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 47, №17. – P. 4213–4230.
8. *Richards S.J.* Synthesis and activity of novel bile-acid conjugated glucocorticoid receptor antagonists / S.J. Richards, T.W. von Geldern, P. Jacobson // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2006. – Vol. 16, №23. – P. 6086–6090.
9. *Химическая энциклопедия: В 5 т. / Гл. ред. И.Л. Кнунянц.* – М.: Сов. энцикл., 1990. – Т. 2.
10. *Березов Т.Т.* Биологическая химия: Учебник / Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. – 3е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
11. *Наглядная биохимия: Справочное издание / Я. Кольман, К.Г. Рем.* – М.: Мир, 2000. – 393 с.
12. *Гаттерман Л.* Практические работы по органической химии / Гаттерман Л., Виланд Г. – М.: Химия, 1948. – 516 с.
13. *Лазурьевский Г.В.* Практические работы по химии природных соединений. Методы выделения, разделения и идентификации / Г.В. Лазурьевский, И.В. Терентьева, А.А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1961. – 192 с.
14. *Вульфсон Н.С.* Препаративная органическая химия / Вульфсон Н.С.; пер. с польск. В.В. Шпанова. – М.: ГХИ, 1959. – 888 с.
15. *Tonelli A.D.* Bile acid kinetics in man studied by radiothin-layer chromatography and densitometry coupling / Tonelli A.D., Gattavecchia E., Mazzella G. // *Journal Of Chromatography B*. – 1997. – Vol. 700, №24. – P. 59–66.

Відомості про авторів:

Гусаров В.І., аспірант каф. управління якістю НФаУ, м. н. с. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Коваленко С.М., д. хім. н., професор, зав. каф. управління якістю НФаУ, зав. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Євсєєва Л.В., ст. н. с. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Адреса для листування:

Гусаров Віктор Ігорович. 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, каф. управління якістю НФаУ. E-mail: gusarovi@ukr.net

Надійшла в редакцію 04.05.2011 р.