

鸭胆汁中胆甾酸成分的研究*

龙康侯 成志毅

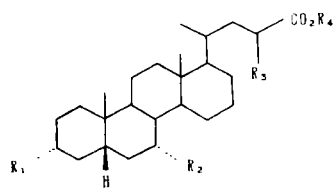
(中山大学化学系, 广州 510275)

摘要 研究了鸭胆汁中胆甾酸的成分, 发现其中除了含有鹅去氧胆酸(A_0)外, 还含另一个胆甾酸. 通过该胆甾酸和其合成衍生物的 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FAB-MS 等波谱数据, 推出这个胆甾酸的分子结构.

关键词 鸭胆汁, 二羟基胆甾酸, 三羟基胆甾酸

分类号 O 621.15

胆甾酸是高级动物胆汁中的主要成分之一, 不同种动物的胆汁中所含胆甾酸不尽相同, 而且往往不是单一的, 但都是以 5β -胆甾烷-24-酸为母体骨架的衍生物. 这类化合物大都具有溶解胆石, 降低血脂和杀菌消炎等活性. 对鸭胆汁中胆甾酸的成分的研究, 发现鸭胆汁中含 2 个胆甾酸. 一个是 $3\alpha, 7\alpha$ -二羟基- 5β -胆甾烷-24-酸 (俗称鹅去氧胆酸) (A_0); 另一个是 $3\alpha, 7\alpha, 23$ -三羟基- 5β -胆甾烷-24-酸.



	A_0	A_1	A_2	A_3	B_0	B_1	B_2	B_3
R_1	OH	OH	AcO	AcO	OH	OH	AcO	AcO
R_2	OH	OH	OH	=O	OH	OH	OH	=O
R_3	H	H	H	H	OH	OH	AcO	AcO
R_4	H	Me	Me	Me	H	Me	Me	Me

1 结果与讨论

采用通常的方法^[1], 从宰鸭场收集的胆汁中得到粗胆酸, 薄层层析显示 2 个斑点, 说明其中含有 2 个成分. 经酸催化甲酯化, 得粗胆甾酸甲酯混合物. 通过氧化铝柱层析分离, 用苯-乙酸乙酯梯度淋洗, 分别得到组分 A 和组分 B. 将组分 A 减压浓缩, 所得油状物用乙酸乙酯-环乙烷仔细重结晶, 得无色针状晶体 (A_1), 熔点 $92\sim 93^\circ\text{C}$ ^[2], FAB-MS 分子离子峰为 $405(\text{M}-1)^+$, $^1\text{H-NMR}$ (数据见表 1) 在 $0.6\sim 1.0\text{ppm}$ 范围有 3 个甲基峰是胆

收稿日期: 1993-05-03

* 高等学校博士学科点专项科研基金资助

甾烷的特征,说明该化合物是一个胆甾酸类化合物.处于 3.3ppm 和 3.7ppm 的化学位移信号表明该化合物含有两个羟基.一般禽类的胆汁都含有鹅去氧胆酸^[3],因此将 A₁ 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 与文献报导的鹅去氧胆酸甲酸相应的波谱数据相比较^[3],发现完全一致.证明原胆汁中含有鹅去氧胆酸(A₀).A₀ 的衍生物 A₂,A₃(合成得到)的各物理常数和波谱数据与文献报道的各化合物是一致的^[5].

表 1 A₀ 和 B₀ 及其衍生物特征氢 ¹H NMR 的化学位移值

Tab. 1 ¹H-NMR data of the characteristic hydrogen atoms of A₀, B₀ and their derivatives

	18-H	19-H	21-H	3-H	7-H	23-H
A ₀ *	0.65(s)	0.90(s)	0.95	3.3(宽)	3.7(尖)	1.0~2.5
B ₀ *	0.68(s)	0.89(s)	1.0(d)	3.5(宽)	3.8(尖)	4.16(q)
A ₁	0.62(s)	0.92(s)	0.95	3.6(宽)	3.8(尖)	1.0~2.5
B ₁	0.67(s)	0.89(s)	1.0(d)	3.6(宽)	3.77(尖)	4.2(q)
A ₂	0.68(s)	0.92(s)	0.94	4.6(宽)	3.8(尖)	1.0~2.5
B ₂	0.64(s)	0.92(s)	0.98(d)	4.6(宽)	3.8(尖)	5.3(q)
A ₃	0.64(s)	1.2(s)	0.92(d)	4.68(宽)	无	1.0~2.5
B ₃	0.68	1.2(s)	0.98(d)	4.7(宽)	无	5.3(q)

* 溶剂为 DMSO-d₆/CDCl₃(1:9),其它为 CDCl₃

将组分 B 浓缩所得油状物从丙酮-石油醚中重结晶,得针状晶体(B₁),熔点 101~102℃.将 A₁ 碱性水解,得游离酸(B₀),从乙酸乙酯-石油醚中析出,熔点 228~230℃, [α]_D²⁵ = +12.2°(无水乙醇).B₀ 和 B₁ 对应 A₀, A₁, ¹H NMR 非常相似,表明组分 B 也是一个胆甾酸,但 B₀, B₁ 的 ¹H NMR 在 4.2ppm 处多一个四重峰信号,表明这个胆甾酸比鹅去氧胆酸(A₀)多一个羟基,B₁ 的 FAB-MS 的分子离子峰为 421(M-1)⁺,比 A₁ 的 FAB-MS 的分子离子峰 m/z 大 16,证实了由核磁共振数据得出的推论,将 A₁ 和 B₂ 分别乙酰化,得 A₂ 和 B₂,B₂ 的 FAB-MS 分子离子峰比相应的 A₂ 的 m/z 大 58(CH₃CO₂-),与前面的推论是一致的.A₀, B₀ 及它们的衍生物的质谱中都有明显的 m/z 235 碎片离子,暗示这个羟基在侧链上.

在 B₀ 及其衍生物的 ¹H-NMR 中,3.6ppm 左右的化学位移信号和偶合情况都与相对应鹅去氧胆酸(A₀)及其衍生物非常一致,说明 B₀ 也有一个 3α-羟基,这是动物胆甾酸都具有的特征.将 A₂ 和 B₂ 分别用 Jones 试剂氧化后,产物 A₃ 和 B₃ 的 ¹H-NMR 中 3.8ppm 处信号消失.并都造成 10 位上的甲基质子化学位移信号向低场移动约 0.3ppm,证明 B₀ 与 A₀ 一样,有一个 7 位羟基,因为 10 位甲基(19-C)正好处在 7 位羰基的远程屏蔽区内.B₀ 及其衍生物的 ¹H-NMR 中,3.8ppm 处的化学位移信号的峰要比 3β-质子(3.5ppm)信号峰尖一些,与已知的 7α-羟基和 7β-羟基胆甾酸的 ¹H-NMR 相对比^[6],得出 7 位碳上的羟基为 α-构型.因为 7 位碳上的 β-构型以 e 链与 B 环相连.在固定环上 e 键氢受邻位氢和偶合常数要 α-键氢小一些.

表 2 A_1 和 B_1 的 ^{13}C -NMR 各碳化学位移值Tab. 2 ^{13}C -NMR data of A_1 and B_1

碳	A_1	B_1	碳	A_1	B_1	碳	A_1	B_1
1	35.5	35.5	10	35.0	35.1	19	22.8	22.8
2	30.7	30.7	11	20.6	20.6	20	33.3	32.4
3	72.0	72.0	12	39.8	39.9	21	18.3	18.0
4	39.6	39.7	13	42.7	42.9	22	31.0	41.0
5	41.5	41.5	14	50.5	50.5	23	31.0	68.2
6	34.6	34.7	15	23.6	23.6	24	174.7	126.5
7	68.4	68.4	16	28.1	28.2	25	51.4	52.4
8	39.5	39.5	17	55.8	55.6			
9	32.8	32.7	18	11.7	11.8			

将 A_1, B_1 的 ^{13}C -NMR 与文献报道的鹅去氧胆酸甲酯的 ^{13}C -NMR 数据相比较^[4], 确定了 B_1 的 ^{13}C -NMR 化学位移信号的归属(见表 2). 发现其羰基化学位移相对 A_1 的羰基信号向低场移动了 2 个 ppm; 甲氧基相比也向低场移动 1ppm, 按照前面的推论, 连在侧链上的羟基是接在 23 位碳上, 不仅羰基和甲氧基化学位移的移向低场可得以解释, 其 23-C, 22-C 及 20-C 的化学位移与 A_1 中相同位置的各碳的化学位移相比较, 所发生的变化也是合理的. 因为 23-C 上的氢原子被羟基取代后, 出现了 ^{13}C -NMR 中常见的 α, β, ν -效应. B_1 的 ^1H NMR 中 4.2ppm 处的化学位移信号是四重峰, 其偶合常数分别为 15Hz 和 3Hz, 这应是甾体的四个环和羰基这些较大基团造成 $C_{22}-C_{23}$ 单键旋转受阻, 使 22-C 上的两个氢原子磁不等性, 结果 23-C 上氢原子的化学位移信号裂分成四重峰.

23-C 的绝对构型有待进一步研究确定.

2 实验部分

熔点在显微镜熔点仪上测定, 温度未加校正. 核磁共振谱用 FX-90R 仪测定记录. 质谱用 ZAB-HS 型仪测定记录, 红外光谱用 5DX 仪测定记录, 旋光度由广东药检所代测.

2.1 A_1, B_1 的分离和纯化

将从宰鸭场收集来的鸭胆囊用不锈钢剪刀剪破胆皮, 使胆汁流入烧杯内, 取 100ml 胆汁加到盛有 200ml 热甲醇的三角瓶内, 冷却后滤除沉淀, 将滤液浓缩至原体积的三分之一. 加入 25ml 10%NaOH 溶液, 加热回流 24h, 冷却后倒入 500ml 水中, 用 10%HCl 调 pH 值至 2~1 左右, 将固体收集, 用水洗至中性, 干燥后溶于 200ml 乙酸乙酯中, 用活性炭脱色后, 蒸除溶剂得粗胆酸 5g.

将 10g 粗胆酸溶于 30ml 无水甲醇中, 再加入 0.4ml 浓硫酸, 在室温下搅拌过夜, 用固体碳酸氢钠中和硫酸, 滤除固体, 将滤液浓缩, 加至直径为 5cm, 内装 200g I 级氧化铝

的柱层析管内.用苯—乙酸乙酯梯度淋洗(9:1~5:5).得两个组分,按组分收集洗脱液,减压浓缩,得组分A约6g,组分B约2g.

将组分A用乙酸乙酯—环己烷溶解,放置数天,析出针状晶体 A_1 , m. p. 92~93°C^[2]; IR(cm^{-1}): 3450, 1743; $^1\text{H-NMR}$ (ppm): 3.8(s, 1H, 7 β -H), 3.65(s, 3H, 酯- CH_3), 3.6(宽, 1H, 3 β -H), 0.95(3H, 21-H), 0.92(s, 3H, 19-H), 0.63(s, 3H, 18-H); $^{13}\text{C NMR}$ 见表2; FAB-MS(m/z): 405($m-1$)⁺, 371($M-2\text{H}_2\text{O}$)⁺, 225.

将组分B用丙酮—石油醚重结晶,得针状晶体 B_1 , m. p. 101~102°C; IR(cm^{-1}): 3450, 1728. $^1\text{H NMR}$ (ppm): 4.2(q, $J_A=15\text{Hz}$, $J_B=3\text{Hz}$, 1H, 23-H); 3.84(s, 1H, 7 β -H), 3.77(s, 3H, 25-H), 3.6(宽, 1H, 3 β -H), 1.00(d, $J=7\text{Hz}$, 3H, 21-H), 0.89(s, 3H, 19-H), 0.67(s, 3H, 18-H); $^{13}\text{C-NMR}$ 见表2; FAB-MS(m/z): 421($M-1$)⁺, 403($M-\text{H}_2\text{O}$), 387($M-2\text{H}_2\text{O}$)⁺, 371($M-3\text{H}_2\text{O}$)⁺, 255.

2.2 A_1 和 B_1 水解制 A_0 和 B_0

将2g A_1 溶于60ml甲醇中,加入50mol/L KOH溶液10ml,回流2h,蒸除溶剂,残渣倒入50ml水中,用10% HCl调pH3~2,所得固体用乙酸乙酯—石油醚重结晶得 A_0 , m. p. 146~147°C^[1]; IR(cm^{-1}): 3445, 1707; $^1\text{H NMR}$ (ppm): 3.7(s, 1H, 7 β -H), 3.3(宽, 1H, 3 β -H), 0.95(3H, 21-H), 0.90(s, 3H, 19-H), 0.65(s, 3H, 18-H), FAB-MS(m/z): 391($M-1$)⁺, 357($M-2\text{H}_2\text{O}$)⁺, 255.

用上述方法得 B_0 , m. p. 228~230°C, $[\alpha]_D^{20}=+12.2^\circ$ (无水乙醇), IR(cm^{-1}): 3450, 1743; $^1\text{H-NMR}$ (ppm): 4.16(q, $J_A=15\text{Hz}$, $J_B=3\text{Hz}$, 1H, 23-H), 3.8(s, 1H, 2 β -H), 3.5(宽, 1H, 3 β -H), 1.0(d, $J=7\text{Hz}$, 3H, 21-H), 0.87(s, 3H, 19-H), 0.68(s, 3H, 18-H); FAB-MS(m/z): 407($M-$)⁺, 389($M-\text{H}_2\text{O}$)⁺, 373($M-2\text{H}_2\text{O}$)⁺, 357($M-3\text{H}_2\text{O}$)⁺, 255.

2.3 A_1 和 B_1 乙酰化得 A_2 和 B_2

将0.6g A_1 溶于5ml干苯中,加入2ml干吡啶和1ml乙酰酐.在室温下搅拌过夜,加1ml水破坏乙酰酐,将反应液移至分液漏斗中,用5ml碳酸氢钠饱和溶液洗涤一次,再用饱和盐水洗至中性,将有机层用无水硫酸钠干燥,将浓缩液用硅胶柱层析纯化(丙酮/石油醚),得到的产物用丙酮—石油醚重结晶,得针状晶体 A_2 , m. p. 61~62°C^[5], IR(cm^{-1}): 3450, 1728, 1718, 1250; $^1\text{H-NMR}$ (ppm): 4.56(宽, 1H, 3 β -H), 3.81(s, 1H, 7 β -H), 3.63(s, 3H, 25-H), 1.98(s, 3H, CH_3CO_2^-), 0.94(3H, 21-H), 0.92(s, 3H, 19-H), 0.68(s, 3H, 18-H); FAB-MS(m/z): 443($M-1$)⁺, 371($M-\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}$)⁺, 225.

用上述步骤也可制得针状晶体 B_2 , m. p. 142~143°C; IR(cm^{-1}): 3400, 1725, 1700, 1312; $^1\text{H NMR}$ (ppm): 5.3(q, $J_A=15\text{Hz}$, $J_B=3\text{Hz}$, 1H, 23-H), 4.6(宽, 1H, 3 β -H), 3.83(s, 1H, 7 β -H), 3.76(s, 3H, 25-H), 2.16(s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}_2-23$), 2.0(s, 3H, CH_3CO_2-3), 0.98(d, $J=7\text{Hz}$, 21-H), 0.92(s, 3H, 19-H), 0.64(s, 3H, 18-H); FAB-MS(m/z): 505($M-1$)⁺, 445($M-\text{AcOH}$)⁺, 429($M-\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}$)⁺, 255.

2.4 A_2 , B_2 Jones 试剂氧化得 A_3 和 B_3

将0.58g A_2 溶于50ml丙酮中,在0°C下,滴加5ml Jones试剂,再在室温下反应

15min, 加入 10ml 异丙醇, 5min 后将反应混合物倒入 500ml 冰水中, 将所得固体过滤, 用水洗至中性, 干燥后得 A_3 , m. p. 145~147°C, IR (cm^{-1}): 1728, 1714, 1258; ^1H -NMR (ppm): 4.68(宽, 1H, 3β -H), 3.68(s, 3H, 25-H), 0.88(m, 6-H 和 8-H), 2.0(s, 3H, CH_3CO_2 -), 1.2(s, 3H, 19-H), 0.92(d, $J=7\text{Hz}$, 3H, 21-H), 0.65(s, 3H, 18-H); FAB-MS(m/z): 447($M+1$)⁺, 387(M -AcOH)⁺.

用上述步骤也可得固体 B_3 , m. p. 161~164°C, IR (cm^{-1}): 1725, 1700, 1310; ^1H -NMR (ppm): 5.3(q, $J_A=15\text{Hz}$, $J_B=3\text{Hz}$, 1H, 23-H), 4.7(宽, 1H, 3β -H), 3.76(s, 3H, 25-H), 2.85(m, 6-H 和 8-H), 2.16(s, 3H, CH_3CO_2 -23), 2.0(s, 3H, CH_3CO_2 -37), 1.22(s, 3H, 19-H), 0.98(d, $J=7\text{Hz}$, 3H, 21-H), 0.68(s, 3H, 18-H); FAB(m/z): 505($M+1$)⁺, 445(M -AcOH)⁺.

参 考 文 献

- 1 江苏泰州生化制药厂. 生物化学与生物物理学进展, 1975(2):25
- 2 Hofman A F. Acta Chem Scand, 1963, 17:173
- 3 Matthews D E, Hayes J M Anal Chem, 1978, 50:1465
- 4 Takashi Iida *et al.* Organic Magnetic Resonance, 1983, 21:305
- 5 Baner J F, Blichenstaff R T. J Org Chem, 1975, 40:1579
- 6 Poucher C J. The Aldrich Library of NMR Spectry. Aldrich Chemical Company INC., Milwaukee Wisconsin, 1983, 2, 930

Study on the Composition of Bile Acids in Duck's Bile

Long Kanhuo* Cheng Zhiyi

Abstract A bile acid other than chenodeoxycholic acid was discovered in the bile of duck, its molecular structure was elucidated with ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FAB-MS spectra of the compound and its derivatives.

Keywords duck's bile, dihydroxyl bile acid, trihydroxyl bile acid

* Chemistry Department, Zhongshan University, Guangzhou 510275