

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

259757

(11) B₁

(51) Int. Cl.⁴
C 07 C 62/06

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 03 86
(21) PV 1980-86.P

(40) Zveřejněno 15 03 88
(45) Vydáno 10.05.89

(75)
Autor vynálezu

JIRSA MILAN doc. MUDr. DrSc.,
KLINOT JIŘÍ doc. RNDr. CSc.,
KORDAČ VÁCLAV prof. MUDr. DrSc., PRAHA,
BRODINA ROBERT ing., ŘÍČANY

(54)

Způsob čištění surových žlučových kyselin

Účelem řešení je příprava žlučových kyselin, zejména kyseliny chenodeoxycholové o vysoké čistotě. Uvedeného účelu se dosáhne intenzivní acetylací esterů žlučových kyselin, krystalizací získaných derivátů, jejich alkalickou hydrolýzou a vysrážením minerální kyselinou s výhodou H_2SO_4 a HCl .

Vynález se týká způsobu čištění surových žlučových kyselin, zejména kyseliny chenodeoxycholové, založeném na jejich převedení na komplexně acetylované estery.

Jsou známé způsoby čištění žlučových kyselin např. tak, že je směs esterů žlučových kyselin hydrolyzována (KOH, NaOH), přičemž dojde i k rozštěpení aminokyselinových konjugátů těchto kyselin, jestliže jsou v této formě přítomné. Okyselením (HCl, H₂SO₄) a extrakcí vhodným rozpouštědlem (ethylacetát, ethyl-ether, isopropylether, diisopropylether) je izolována směs volných žlučových kyselin. Z nich lze jednotlivé kyseliny nejlépe získat převedením těchto volných kyselin na soli kovů II. skupiny (Ca, Ba, Sr), které se dají dobře rozlišit a oddělit na základě různé rozpustnosti ve vhodných rozpouštědlech. Okyselením je pak získána žádaná kyselina v čistém stavu. Surovou kyselinu chenodeoxycholovou lze přečistit také řadou dalších způsobů - převedením na sodnou nebo draselnou sůl, kontinuální extrakcí ethylacetátem nebo směsí isobutylalkohol-toluen (45:55) a okyselením nebo krystalizací z acetonitrilu obsahujícího 0 až 10 % vody a přidaného k surové kyselině v poměru 8:1 až 40:1, rekrystalizací z dichlormethanu, z dichlor-ethanu, esterifikací, čištěním esteru na alumině směsí rozpouštědel alkohol-chloroform a hydrolyzou esteru, acylací hydroxylové skupiny organickou kyselinou v póloze 3 a nebo 7 následující rekrystalizací, hydrolyzou a neutralizací, rekrystalizací z vodné směsi nižšího alkylacetátu a alkanu nebo nejnověji pomocí vysokotlaké kapalně chromatografie na hydrofilní stacionární fázi. Japonský patent popisuje rozdělení kyseliny ursodeoxycholové a chenodesoxycholové na koloně plněné poly(styren-divinylbenzenem) promýváním methanolem (s obsahem 5% vody). Evropský patent využívá k rozdělení těchto dvou kyselin silylační metody, silylované kyseliny se pak snadno rozdělí krystalizací. Nevýhodou těchto způsobů je jejich zdoluhavost a technologická náročnost. Další nevýhodou je to, že nekompletně acetylovaná kyselina chenodeoxycholová nezaručuje dostatečnou možnost čištění jednoduchou rekrystalizací.

Výše uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se žlučová surová kyselina převede na methylester, příp. jiný ester, a intenzívně se acetyluje běžnými acetylačními, příp. acylačními činidly, výhodně směsí acetanhydridu a pyridinu na vroucí vodní lázni nebo ketenem nebo acetylchloridem apod. Získá se kompletně acetylovaný ester, který výborně krystalizuje z methanolu nebo ethanolu. Takto lze žlučové kyseliny ve formě těchto derivátů dobře zbavit provázejících nečistot.

Příklad:

100 g methylesteru kyseliny chenodeoxycholové je smíšeno se 100 ml acetanhydridu a 50 ml pyridinu a zahříváno na zpětném chladiči na vodní lázni 8 hod. Potom ochlazeno a ponecháno 24 hod při pokojové teplotě. Acetylační roztok je pak ředěn a opakovaně vytřepáván 1 N HCl po 50 ml a po přidání 100 ml chloroformu, až vrchní vrstva zůstává kyselá. Chloroformová vrstva je pak intenzívně třepána se síranem sodným suchým a s uhličitánem vápenatým tak dlouho, až výtřepek s vodou nereaguje kyselé. Potom je chloroformový roztok odpařen na sirupovitou konzistenci a rozpuštěn ve 200 ml až 300 ml methanolu. Po ochlazení dochází ke krystalizaci. Bílé krystalky jsou izolovány na odsávačce a promyty malým množstvím chlazeného methanolu. Tato rekrytalizace je opakována 2 až 3x, výtěžek je (podle obsahu suroviny) např. 53 g.

53 g acetylovaného esteru je pak zahříváno s 200 až 300 ml methanolického KOH na zpětném chladiči po dobu 3 hod (methanolický KOH: v 10 ml H_2O se rozpustí 12 g KOH a přidá se 90 ml methanolu). Po skončení hydrolýzy se větší část methanolu oddestiluje, zbytek se ředí vodou, okyselí, promyje destilovanou vodou a bílá sypká sraženina se izoluje na odsávačce. Rekrytalizuje se obvyklým způsobem. Po rekrytalizaci se převádí na modifikaci o bodu tání více jak $160^{\circ}C$.

Kontrola čistoty izolované chenodeoxycholové kyseliny byla prováděna pomocí bodu tání, TLC, GLC, enzymatickým stanove-

ním pomocí 3-hydroxy steroid dehydrogenázy, NMR, hmotovou spektrometrií, IR spektry, elementární analýzou. Čistota je vyšší než 95%.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob čištění surových žlučových kyselin, zejména kyseliny chenodeoxycholové, vyznačený tím, že se intenzívně acetylují estery žlučových kyselin, získané deriváty krystalizují a volné kyseliny se z nich připraví alkalickou hydrolyzou a vysrážením minerální kyselinou, s výhodou H_2SO_4 a nebo HCl .

259757