

A Method for Monitoring the Process of Synthetic Reaction of Alfacalcidol by IR and UV

Min Wang, Minggang Wang

Qingdao Chiatai Haier Pharmaceutical Co., Ltd., Qingdao
Email: wangmin.zdhr@haier.com, wangmg@haier.com

Received: Jul. 9th, 2013; revised: Jul. 23rd, 2013; accepted: Jul. 28th, 2013

Copyright © 2013 Min Wang, Minggang Wang. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: This paper is about synthesizing alfacalcidol, monitoring the reaction process and determining the end of the reaction. **Method:** Monitoring the process of the synthetic reaction of alfacalcidol by IR and UV. **Results:** This is an effective method to monitor the synthesis process and avoid the incomplete reaction or the overreaction, which can lead to the increase of the side product. Furthermore, the method increases the yield of the reaction and improves the good reproducibility. The yield is stable. **Conclusion:** The method is easy, rapid and accurate. It is suitable for the pharmaceutical manufacture.

Keywords: Alfacalcidol; IR and UV; Monitor

以 IR 及 UV 法监测阿法骨化醇合成反应进程

王 敏, 王明刚

青岛正大海尔制药有限公司, 青岛
Email: wangmin.zdhr@haier.com, wangmg@haier.com

收稿日期: 2013 年 7 月 9 日; 修回日期: 2013 年 7 月 23 日; 录用日期: 2013 年 7 月 28 日

摘 要: 目的: 合成阿法骨化醇, 准确监测反应进程并判定反应终点。 **方法:** 以 IR 及 UV 法监测阿法骨化醇合成反应进程。 **结果:** 以 IR 及 UV 法能准确有效的监测阿法骨化醇合成反应进程, 避免了反应不完全或过度反应导致副产物增加的弊端, 提高了反应收率, 且重现性好, 收率稳定。 **结论:** 本方法操作简单、迅速、准确、有效, 适合于工业化生产。

关键词: 阿法骨化醇; IR 及 UV; 监测

1. 引言

阿法骨化醇(alfacalcidol,1)化学名为 9,10-开环胆甾-5Z,7E,10(19)-三烯-1 α ,3 β -二醇。它是 VD₃ 的一种重要活性代谢物, 口服后由小肠吸收, 经肝脏中的 25-羟化酶作用, 迅速转化为骨化三醇而起作用。临床主要用于治疗骨质疏松症、佝偻病、骨软化症及各种肾性骨病^[1-7]。

根据文献方法^[8-12], 阿法骨化醇合成反应过程的

检测、终点的判定采用的都是薄层层析(TLC)法, 该方法对试验条件要求简单, 只需要一个层析缸及一些硅胶板即可, 且操作方便, 易于掌握, 因而被广泛用于化学合成反应的过程监测及终点的判定。

但由于阿法骨化醇的合成反应较激烈, 反应时间短, 副反应较多, 且副产物与主成分的极性很接近, 如果采用常规的 TLC 方法来检测反应进程的话, 会遇到两个很大的麻烦: 1) 因反应副产物与主成分的极性

很接近, 故用 TLC 方法很难完全分开, 这就很难准确对反应进程进行监测; 2) 因 TCL 一般都需要 5~10 分钟才能出结果, 这往往不能即时反映合成反应的进程, 从而会导致反应过度, 以至于产生较多的副产物。因此, 必须找到一种更加迅速及准确的监测反应进程及终点的方法。

2. 方法

2.1. 合成路线

本研究采用 IR 及 UV 法来监测阿法骨化醇合成反应进程, 结果证明能更加准确地判断合成反应进程, 提高了反应收率。总收率约为 20%, 合成路线见图 1。

2.2. 实验仪器

红外吸收光谱采用 Lmpact410 型红外分光光度计。紫外吸收光谱采用 Shimadzu-265 紫外吸收光谱仪。

2.3. 实验方法

2.3.1. 维生素 D₃ 对甲苯磺酸酯(2)的合成

用 IR 监测反应的进程:

红外光谱吸收峰中会出现 1350 cm^{-1} (s)为 S=O 吸收峰, 918 cm^{-1} (s)为-S-O-吸收峰。而 VD₃ 的-OH 峰 (3310 cm^{-1})则会逐步减弱直至消失。当 VD₃ 的-OH 峰 (3310 cm^{-1})完全消失后即是反应终点。

将维生素 D₃ 10 g 和对甲苯磺酰氯 12 g 一起加入反应瓶中, 以 50 mL 吡啶溶解完全, 混匀后置于冰箱(2~4℃)中放置 48 h。

反应完成后, 加入 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液, 搅拌 15 min 以分解过量的对甲苯磺酰氯。以 1500 mL 乙酸乙酯萃取。有机层分别以 3%稀盐酸(500 mL × 2), 饱和碳酸氢钠溶液(500 mL × 1)和饱和氯化钠溶液(500 mL × 1)洗涤, 然后以无水硫酸镁脱水, 过滤。滤液减压浓缩至干, 得浅黄色固体即粗品 VD₃ 对甲苯磺酸酯 13.5 g, 收率 97.0%, 此粗品可直接用于下步反应。

2.3.2. 3,5-环合维生素 D₃ (3)的合成

用 IR 及 UV 监测反应的进程:

红外光谱吸收峰中: 会出现醚的 C-O 峰 [1090 cm^{-1} (s)], 而磺酸酯的特征峰(1350 cm^{-1} 和 918 cm^{-1})会逐步减弱直至消失。

紫外光谱原共轭双键峰会逐步减弱直至消失, 仅

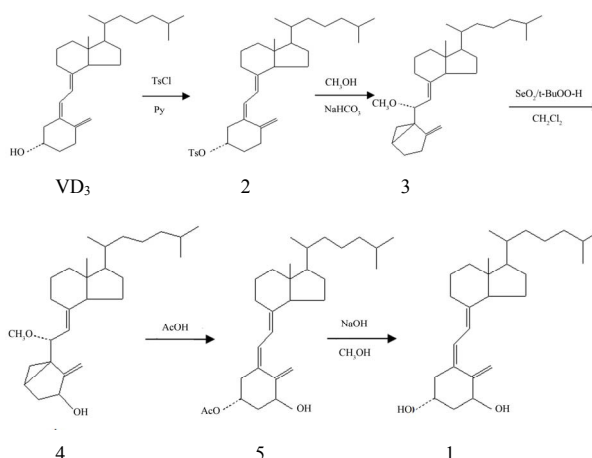


Figure 1. Synthetic route of Alfacalcidol
图 1. 阿法骨化醇的合成路线

在 $\lambda = 204\text{ nm}$ 处有吸收。

此时即是反应终点。

在 3000 mL 的三口瓶中加入化合物 2(13.0 g)、碳酸氢钠 32.5 g 及甲醇 2500 mL, 55°C 搅拌 8 h。

反应完成后, 减压回收甲醇, 用 1500 mL 乙酸乙酯萃取。酯层水洗至中性, 以无水硫酸镁脱水, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 得浅黄色油状物即 3,5-环合维生素 D₃ 9.4 g, 收率 97.5%, 此粗品可直接用于下步反应。

2.3.3. 1 α -OH-3,5-环合维生素 D₃ (4)的合成

用 IR 监测反应的进程:

红外光谱吸收峰中: 会出现越来越强的 OH 峰 (3400 cm^{-1}), 同时以用 TLC 辅助检测反应的进行:

硅胶 HF254。

展开剂乙酸乙酯-正戊烷(3:7)。

待原料点完全消失后即是反应终点。

在 3000 mL 的三口瓶中加入化合物 3 (9.3 g), 二氧化硒 0.65 g, 过氧化叔丁醇 12.8 mL 及二氯甲烷 2500 mL, 室温搅拌 50 min。

反应液依次以 10%氢氧化钠溶液(200 mL × 2), 水 (400 mL × 2)洗涤, 有机层以无水硫酸镁脱水, 过滤, 滤液减压浓缩至干得黄色油状物。柱层析[柱层层析硅胶, 乙酸乙酯-环己烷(1:1)为洗脱剂]分离提纯, 减压浓缩后得浅黄色油状物即 1 α -OH-3, 5-环合 VD₃ 纯品 4.2 g, 收率 43.4%。

2.3.4. 1 α -OH 维生素 D₃-3-乙酸酯(5)的合成

用 IR 监测反应的进程:

红外光谱吸收峰中：会出现越来越强的 β -乙酸酯中羰基峰(1740 cm^{-1})，而醚的 C-O 峰(1090 cm^{-1} (s)) 会逐步减弱直至消失。

待醚的 C-O 峰(1090 cm^{-1} (s))完全消失后即是反应终点。

在 250 mL 的三口瓶中加入化合物 4 (4.2 g)及冰醋酸 120 mL, 55°C 搅拌 15 min。

反应完成后减压浓缩至干, 得浅黄色泡沫状物质, 柱层析(柱层层析硅胶, 乙酸乙酯 - 环己烷(1:8) 为洗脱剂)分离纯化, 减压浓缩后得白色泡沫状物质即 1α -OH 维生素 D_3 -3-乙酸酯 2.4 g, 收率 53.5%。

2.3.5. 1α -OHVD3 (1)的合成

用 IR 监测反应的进程:

红外光谱吸收峰中：会出现越来越强的 1α , β -OH 峰(3400 cm^{-1})，而羰基峰(1740 cm^{-1})会逐步减弱直至消失。待羰基峰(1740 cm^{-1})完全消失后即是反应终点。

在 500 mL 的三口瓶中加入化合物 4 (2.4 g), 5% 的氢氧化钠甲醇溶液 20 mL 及甲醇 200 mL, 室温搅拌 3 h。反应液以 1500 mL 乙酸乙酯萃取, 有机层水洗至中性后以无水硫酸镁脱水, 过滤, 减压浓缩至干得浅黄色固体, 以乙酸乙酯-正己烷(1:3)重结晶, 滤集结晶, 40°C 真空干燥 2 h 得白色针状结晶 1.7 g, 收率 78.3%。

3. 实验数据结果

3.1. 熔点测定(见表 1)

仪器: XT6 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)

条件: 样品真空干燥后测。

熔点与文献值相符。

3.2. 紫外吸收光谱和解析(见表 2)

仪器: Shimadzu-2401 PC 紫外吸收光谱仪。

溶剂: 无水乙醇。

试液浓度: $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

紫外吸收光谱表明, 本品在 265 nm 和 211 nm 波长处有最大吸收, 在 227 nm 波长处有最小吸收, 与文献值相符, 说明分子中存在共轭双键, 与阿法骨化醇分子结构相一致。

Table 1. Melting point determination data

表 1. 熔点测定数据对照表

	样品值	文献值
熔点($^\circ\text{C}$)	$138^\circ\text{C}\sim 139^\circ\text{C}$	$137^\circ\text{C}\sim 140^\circ\text{C}$

Table 2. UV absorption spectrum analytical table

表 2. 紫外吸收光谱解析表

	样品	文献
λ_{max}	265 nm	265 nm
λ_{max}	211 nm	210 nm
λ_{min}	227 nm	227 nm
ϵ (max)	17,469	17,400

3.3. 红外吸收光谱图及解析(见表 3)

仪器: Perkin-Elmer 983 型红外分光光度计。

测定条件: KBr 压片。

红外吸收光谱表明, 本品在 3399 cm^{-1} 附近有强吸收峰, 说明分子结构中存在羟基, 在 2869 cm^{-1} 附近有弱吸收峰, 在 1640 cm^{-1} 附近有中等强度的吸收峰, 说明分子结构中存在 C=C 双键, 这与阿法骨化醇的分子结构相一致。

3.4. 质谱图及各峰解析对照表(见表 4)

仪器: AEI MS-50 质谱仪。

条件: EI 70Ev。

质谱数据表明, 分子离子峰与阿法骨化醇分子量相符, 碎片离子符合阿法骨化醇的结构。

3.5. ^1H 和 ^{13}C 核磁共振谱及解析(见表 5 和表 6)

仪器: 日本 SEOL 公司 AL-300NMR。

溶剂: DMSO。

内标: TMS。

通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱成功地找到了 ^1H NMR 中 H 质子和 ^{13}C NMR 谱中 C 核的归属。这与阿法骨化醇的分子结构相符合。

4. 讨论

阿法骨化醇的合成反应较激烈, 反应时间短, 副反应较多, 且副产物与主成分的极性很接近, 如果采用常规的 TLC 方法来检测反应进程的话, 会遇到两个

以 IR 及 UV 法监测阿法骨化醇合成反应进程

Table 3. IR absorption spectrum analytical table
表 3. 红外吸收光谱及解析表

样品吸收峰(cm^{-1})及强度	振动类型	基团
3399	O-H 伸缩	-OH
2869	=C-H 伸缩	-C=CH
1640	C=C 伸缩	-C=CH ₂ , -CH=CH-
1058	C-O 伸缩	-C-OH

Table 4. MS peak analytical table
表 4. 质谱峰解析对照表

样品 m/z (%RA)	文献值	碎片离子
400 (14.4)	400	C ₂₇ H ₄₄ O ₂ ⁺
382 (50)	382	C ₂₇ H ₄₂ O ⁺
364 (8.5)	364	C ₂₇ H ₄₀ ⁺
349 (12.0)		C ₂₆ H ₃₇ ⁺
251 (37.6)		C ₁₉ H ₂₃ ⁺
237 (8.5)		C ₁₈ H ₂₁ ⁺
134 (100)	134	C ₁₀ H ₁₄
117 (30.9)	117	C ₉ H ₉

Table 5. ¹H NMR analytical table
表 5. ¹H 核磁共振解析表

氢原子序号	样品化学位移(ppm)	文献中化学位移(ppm)
6H	6.38 (1H,d) J = 11.1 Hz	6.39 (1H, d) J = 11.2 Hz
7H	6.02(1H,d) J = 11.1 Hz	6.04 (1H, d) J = 11.2 Hz
19(Z)-H	5.33 (1H, s)	5.26 (1H, s)
19(E)-H	5.01 (1H, s)	4.97 (1H, s)

很大的麻烦：1) 因反应副产物与主成分的极性很接近，故用 TLC 方法很难完全分开，这就很难准确对反应进程进行监测；2) 因 TCL 一般都需要 5~10 分钟才能出结果，这往往不能即时反映合成反应的进程，从而会导致反应过度，以至于产生较多的副产物。

本研究采用 IR 及 UV 法来监测阿法骨化醇合成反应进程，根据实验数据及实验结果，证实本方法能更加迅速、准确地判断合成反应进程，从而避免了反应不完全或过度反应导致副产物增加的弊端，特别是第二步反应 3,5-环合维生素 D₃ (3)的合成，由于原料与产物的极性相近，用 TLC 监测很难判断反应终点，因此不是没反应完就是反应过度，从而导致本步的收

Table 6. ¹³C NMR analytical table
表 6. ¹³C 核磁共振解析表

碳序号	样品化学位移(ppm)	文献中化学位移(ppm)
1-C	70.77	71.0
2-C	42.81	43.4
3-C	66.81	67.1
4-C	45.21	45.9
5-C	132.75	135.3
6-C	124.96	124.5
7-C	116.90	118.6
8-C	143.29	141.9
9-C	29.09	29.8
10-C	147.56	149.3
11-C	22.82	23.1
12-C	40.46	41.7
13-C	45.90	46.7
14-C	56.56	57.7
15-C	23.60	24.5
16-C	27.62	28.6
17-C	56.34	57.3
18-C	11.99	12.4
19-C	111.73	111.8
20-C	36.10	37.3
21-C	18.83	19.3
22-C	36.10	37.6
23-C	23.83	21.8
24-C	39.48	40.1
25-C	28.00	29.1
26-C	22.28	23.1
27-C	22.56	23.2

率总是在 70%左右徘徊，而采用 IR 及 UV 法来监测本步反应，则能准确的判断反应终点，使得本步的收率达到了 97.5%。而反应总收率也从 10%~15%提高了 20%，且重现性好，收率稳定。因此采用 IR 及 UV 法来监测阿法骨化醇合成反应进程，是一种科学可行的方法。

5. 结论

以 IR 及 UV 法能迅速准确监测阿法骨化醇合成

反应进程, 避免了反应不完全或过度反应导致副产物增加的弊端, 提高了反应收率, 且重现性好, 收率稳定。本方法操作简单、迅速、准确、有效, 适合于工业化生产。

参考文献 (References)

- [1] Posner GH and Kahraman M. (2003) Organic chemistry of vitamin D analogues (deltanoids). *European Journal of Organic Chemistry*, **20**, 3889-3895.
- [2] Babina M, Krautheim M, Grutzkau A, et al. (2000) Human leukemic mast cells (HMC-1) are responsive to 1- α , 25-dihydroxyvitamin D₃: Selective promotion of ICAM-3 expression and constitutive presence of vitamin D₃ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**, 1104-1110.
- [3] Li XY, Boudjelal M, Xiao JH, et al. (1999) 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ increase nuclear vitamin D receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Molecular Endocrinology*, **13**, 1686-1694.
- [4] Chen TC, Schwartz GG, Burnstein KL, et al. (2000) The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D₃ and 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂ as therapeutic agents for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, **6**, 901-908.
- [5] Brown AJ. (2001) Therapeutic uses of vitamin D analogues. *American Journal of Kidney Diseases*, **38**, 3-19.
- [6] Goltzman D, Miao DS, Panda DK, et al. (2004) Effect of calcium and the vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **89-90**, 485-489.
- [7] Yamada S, Shimizu M and Yamamoto K. (2003) Structure-function relationships of vitamin D including ligand recognition by the vitamin D receptor. *Medicinal Research Reviews*, **23**, 89-115.
- [8] Enrico G, Baggiolini, Jerome A, Iacobelli and Bernard M. (1986) Hennessy, stereocontrolled total synthesis of 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol and 1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol. *The Journal of Organic Chemistry*, **51**, 3098-3105.
- [9] William S. Johnson, John D. Elliott and Gunnar J. (1984) Hanson asymmetric synthesis via acetal templates. A stereoselective approach to a key intermediate for the preparation of vitamin D metabolites. *Journal of the American Chemical Society*, **106**, 1138-1139.
- [10] Paaren HE, DeLuca HF and Schnoes HK. (1980) Direct C(1) hydroxylation of vitamin D₃ and related compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, **45**, 3253-3258.
- [11] Tadashi Sato, Hiroshi Yamauchi and Yoshitake Ogata. (1978) Studies on 1 α -hydroxyl derivatives of vitamin D₃. I. syntheses of 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 2983-2940.
- [12] DeLuca. (1985) Method for preparing 1 α -hydroxyvitamin D compounds. US 4554106.