熊去氧胆酸有关物质的合成

张倚鸣[1,2]，冉启军[3]，程 铖[1]，汤 磊[1]，王建塔[1,2]，朱高峰[2*]
（1. 贵州医科大学药学院，贵州贵阳 550004；2. 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心，贵州贵阳 550004；
3. 贵州省公共资源交易中心，贵州贵阳 550002）

摘要：为进行熊去氧胆酸原料药的质量控制，合成了 7 个有关物质。分别以鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、石胆酸为原料，经氧化、酯化、酰化、还原等步骤，分别制得有关物质 3,7- 二氧代胆烷酸、7α- 羟基 -3- 氧代胆烷酸、7- 氧代石胆酸、3- 羟基 -6- 氧代胆烷酸、3,6- 二氧代胆烷酸、3- 氧代胆烷酸、3β,7α- 二羟基胆烷酸，收率分别为 68%、17%、74%、60%、76%、70%、15%。上述有关物质的化学结构经 NMR 和 HRMS 确证。

关键词：熊去氧胆酸；有关物质；合成
中图分类号：R914；TQ463 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)04-0533-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.008

Synthesis of the Related Substances of Ursodeoxycholic Acid

ZHANG Yiming[1,2], RAN Qijun[3], CHENG Cheng[1], TANG Lei[1], WANG Jianta[1,2], ZHU Gaofeng[2*]
(*1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; 2. Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004; 3. Guizhou Public Resource Trading Center, Guiyang 550002*)

ABSTRACT: In order to perform the quality control of ursodeoxycholic acid, seven related substances were synthesized. 3,7-Dioxocholanoic acid, 7α-hydroxy-3-oxocholanoic acid, 7-oxolithocholic acid, 3-hydroxy-6-oxocholanoic acid, 3,6-dioxocholanoic acid, 3-oxocholanoic acid and 3β,7α-dihydroxycholanoic acid were synthesized from chenodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid, or lithocholic acid via oxidation, esterification, acylation and reduction. The yields were 68%, 17%, 74%, 60%, 76%, 70% and 15%, respectively. The chemical structures of above related substances were confirmed by NMR and HRMS.

Key Words: ursodeoxycholic acid; related substance; synthesis

熊去氧胆酸（ursodeoxycholic acid，**1**），化学名为 3α,7β- 二羟基 -5β- 胆甾烷 -24- 酸，是中药熊胆的有效成分，临床上主要用于治疗胆结石、原发性硬化性胆管炎和病毒性肝炎等多种胆汁淤积性肝病[1]，还可用于治疗慢性肝炎和肝移植后排斥反应[2—3]，2016 年美国 FDA 批准其用于治疗原发性胆汁性肝硬化[4—6]。**1** 制剂在我国已经得到广泛开发和应用，如 **1** 片、**1** 胶囊[7—8]。**1** 还是牛磺熊去氧胆酸的合成原料。

1 最初是从熊胆中获得的，目前主要通过人工合成制备。原料药中有关物质的研究与控制是药品质量控制的关键，与药品的临床安全息息相关。《中华人民共和国药典》2020 年版中收载的 **1** 有关物质有 3 个，分别为鹅去氧胆酸（**2**）、石胆酸（**11**）、胆酸；《欧洲药典》9.0 版收载了 9 个，分别为 **2**、胆酸、**11**、熊果胆酸、脱氧胆酸、3α- 羟基 -7- 羰基 -5β- 胆烷酸、3α,7β- 二羟基 -5β- 胆烷酸甲酯、3β,7β- 二羟基 -5β- 胆烷酸、3α,7β- 二羟基 -5β- 胆烷醇。通过对 **1** 的合成路线及原料来源分析[9—15]，除已报道的

收稿日期：2022-11-11
基金项目：贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划项目（黔教合KY字[2017]072）、贵州省卫生健康委科学技术基金项目（gzwkj2022-469）、贵州省科技计划项目黔科合支撑[2020]4Y234
作者简介：张倚鸣（1997—），男，硕士研究生，专业方向：药物代谢动力学与药物合成。
通信作者：朱高峰（1982—），男，正高级实验师，硕士生导师，从事药物合成及药物代谢动力学研究。
E-mail：zgf-gy@126.com

有关物质外，在其贮存和制备过程中可能还会引入的有关物质如：3,6- 二氧代胆烷酸（**3**）、3- 羟基 -6- 氧代胆烷酸（**4**）、3- 氧代胆烷酸（**5**）、3,7- 二氧代胆烷酸（**6**）、7- 氧代石胆酸（**7**）、7α- 羟基 -3- 氧代胆烷酸（**8**）、3β,7α- 二羟基胆烷酸（**9**）。有关物质 **3** ～ **9** 的结构式及合成路线如图 1 所示。

有关物质 **3** ～ **7** 合成路线中起始原料分别为猪去氧胆酸（**10**）、**11** 和 **2**。原料的 3C、6C 或 7C 位羟基为 α-OH，为二级醇，可氧化成酮，需选择适宜氧化剂进行氧化[16—18]。高锰酸钾作为氧化剂氧化羟基成酮时，反应会继续氧化使碳碳键断裂，不适于路线设计；可考虑选择 Jones 试剂氧化。

在有关物质 **8** 的合成过程中，**2** 的 3C、7C 位羟基存在不同的空间位阻，3C 位空间位阻较小，反应较 7C 位容易进行。但直接氧化，3C、7C 位都会进行反应。故在合成 **8** 的过程中，3C、7C 位羟基同时进行乙酰化保护后，3C 位进行选择性去乙酰化、氧化，7C 位再去乙酰化，可得目标物。

在有关物质 **9** 的合成方案选择过程中，拟设定 2 种路线：①根据光延反应，对起始化合物 3C 位羟基进行构型转化；②以 **2** 为起始原料，与甲磺酰氯发生反应生成相应的磺酸酯，再通过乙酸钠试剂的进攻，发生双分子亲核取代反应，使 3C 位羟基翻转。由于光延反应的副产物较难分离，最后采用了路线②。合成过程中，**2** 首先进行 3C 位羟基磺酸酯化[17]，继续在乙酸钠和 *N*,*N*- 二甲基甲酰胺（DMF）条件下进行双分子亲核取代反应，得到 β 构型化合物，最后在碱性条件下水解得到目标产物。该方法收率低，但反应过程中使用的相关试剂易得，反应条件适宜，制得产物纯度也较高。

实验部分

3,6- 二氧代胆烷酸（3）

Jones 氧化剂的配制：将三氧化铬（6.9 g，69 mmol）加至 30 mL 量瓶中，加少量水溶解，冰水浴搅拌下滴加浓硫酸（6.9 mL），加水定容后待用。

将化合物 **10**（2.5 g，6.4 mmol）加至反应瓶中，加入丙酮（40 mL）和水（2 mL），于 －10 ℃滴加 Jones 氧化剂（5.6 mL，12.8 mmol），滴完后转至冰水浴中搅拌反应 2 h，加入异丙醇（5 mL），搅拌 1 h，抽滤，滤液于 40 ℃减压浓缩，残留物中加入乙酸乙酯（50 mL）和水（50 mL），分层，有机相用水（20 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥，再经硅胶（10 g）过滤，滤液减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱纯化［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 5 ∶ 1）的混合溶液］，得白色固体 **3**（1.9 g，76%），mp 160 ～ 161 ℃（文献[19]：161 ～ 162 ℃），纯度 98.2%［HPLC 归一化法：色谱柱 Waters XBridge C_{18} 柱（4.6 mm× 150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为 1 mmol/L 磷酸二氢钾水溶液（以磷酸调至 pH 3），B 为乙腈，梯度洗脱（0—45 min，B 30%—95%；45—48 min，B 95%；48—50 min，B 95%—30%）；流速 1 mL/min；检测波长 205 nm；柱温 30 ℃；进样量 40 μL。相对保留时间 1.25］。^{1}H NMR（600 MHz, $CDCl_3$）δ: 2.57 ～ 2.64（m, 1H）, 2.19 ～ 2.46（m, 7H）, 2.02 ～ 2.14（m, 4H）, 1.77 ～ 1.96（m, 3H）, 1.42 ～ 1.69（m, 4H）, 1.07 ～ 1.39（m, 7H）, 0.93 ～ 0.97（m, 6H）, 0.70（s, 3H）；^{13}C NMR（150 MHz, $CDCl_3$）δ: 211.00, 208.86, 179.95, 59.71, 57.48, 56.78, 55.80, 53.39, 43.11, 42.15, 40.92, 39.89, 39.49, 38.31, 37.99, 36.70, 35.22, 30.98, 27.95, 23.92, 22.47, 21.31, 18.23, 12.01；ESI-HRMS（*m*/*z*）: 387.253 5［M － H］$^-$。

3- 羟基 -6- 氧代胆烷酸（4）

将 **10**（6 g，15.28 mmol）溶于丙酮（90 mL）和水（30 mL）的混合溶液中，降温至 10 ℃，加入溴化钠（0.1 g，0.972 mmol）和 20% 硫酸（2 mL），搅匀，于 －20 ℃缓慢滴加含溴酸钠（1 g，6.62 mmol）的水（10 mL）溶液，加毕于 －5 ℃反应 4.5 h，加入 20% 亚硫酸氢钠溶液（10 mL）终止反应，随后加入水（300 mL），搅拌过夜。抽滤，滤饼用水洗涤，减压干燥，再经硅胶柱色谱纯化［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 3 ∶ 1）的混合溶液］，得白色固体 **4**（3.6 g，60%），mp 158 ～ 160 ℃（文献[20]：159 ～ 160 ℃），纯度 99.6%（HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间为 1.11）。^{1}H NMR（600 MHz, $CDCl_3$）δ: 4.11（dt, *J*=11.9、4.7 Hz, 1H）, 2.30 ～ 2.44（m, 4H）, 2.17 ～ 2.30（m, 2H）, 1.99 ～ 2.07（m,

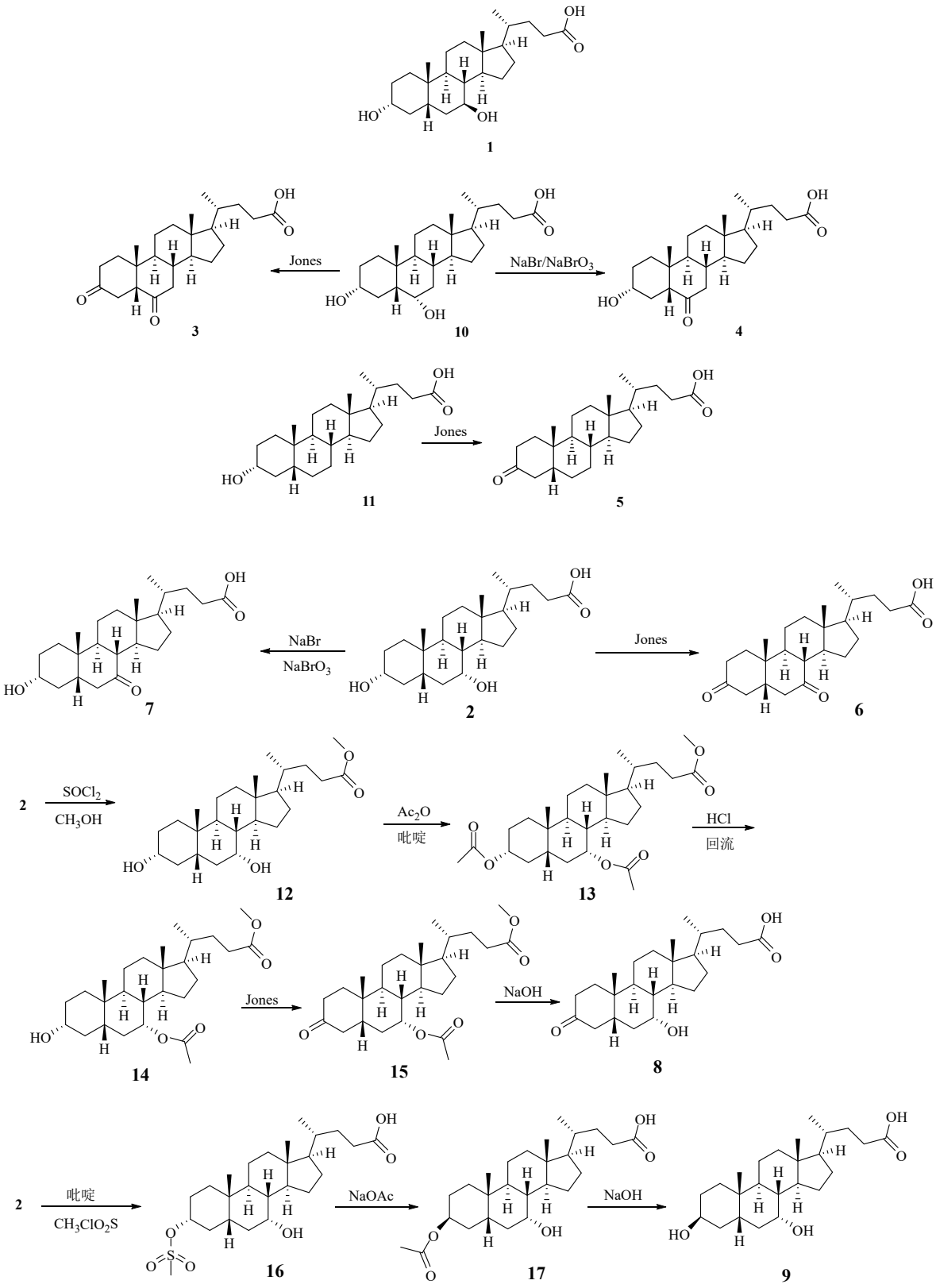


图 1　1 的化学结构及有关物质 3 ～ 9 的合成路线

Fig.1　Chemical Structure of **1** and Synthetic Routes of the Related Substances **3** – **9**

3H), 1.85 ～ 1.94(m, 1H), 1.78 ～ 1.85(m, 1H), 1.74(dt, *J*=12.7、4.2 Hz, 1H), 1.60 ～ 1.66(m, 1H), 1.50 ～ 1.57(m, 1H), 1.41 ～ 1.49(m, 4H), 1.08 ～ 1.39(m, 8H), 1.01(s, 3H), 0.94(d, *J*=6.5 Hz, 3H), 0.68(s, 3H)；^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$)δ: 212.46, 179.45, 67.75, 56.11, 55.92, 50.12, 42.86, 40.24, 39.82, 37.07, 36.22, 36.05, 35.29, 34.55, 34.28, 30.95, 30.73, 30.20, 28.09, 24.16, 22.84, 21.09, 18.25, 12.07；ESI-HRMS(*m*/*z*): 389.268 2[M－H]$^-$。

3- 氧代胆烷酸（5）

将 **11**(1 g，2.657 mmol) 溶于丙酮 (60 mL) 中，于 －20 ℃滴加 Jones 氧化剂 (1.5 mL，3.5 mmol)，滴完后转至冰水浴中搅拌反应 2 h，室温反应 2 h。加入异丙醇 (5 mL)，搅拌 1 h，减压蒸除丙酮，向残留物中加入乙酸乙酯 (60 mL) 和水 (50 mL)，萃取，有机相依次用饱和碳酸氢钠溶液 (30 mL)、饱和氯化钠溶液 (30 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 5 ∶ 1）的混合溶液］分离，得白色固体 **5**(0.7 g，70%)，mp 119 ～ 121 ℃（文献[21]：121 ～ 123 ℃），纯度 98.3%（HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间 2.05)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)δ: 2.70(dd, *J*=15.1、13.4 Hz, 1H), 2.22 ～ 2.45(m, 3H), 2.13 ～ 2.20(m, 1H), 1.98 ～ 2.07(m, 3H), 1.77 ～ 1.92(m, 3H), 1.56 ～ 1.72(m, 4H), 1.04 ～ 1.55(m, 13H), 1.02(s, 3H), 0.94(d, *J*=6.5 Hz, 3H), 0.69(s, 3H)；^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$)δ: 213.70, 180.08, 56.43, 55.95, 44.33, 42.80, 42.36, 40.73, 40.05, 37.21, 37.01, 35.53, 35.30, 34.89, 31.00, 30.74, 28.15, 26.62, 25.77, 24.16, 22.65, 21.20, 18.26, 12.09；ESI-HRMS(*m*/*z*)：373.274 4[M－H]$^-$。

3,7- 二氧代胆烷酸（6）

将 **2**(2.5 g，6.4 mmol) 溶于丙酮 (30 mL) 中，于 －10 ℃滴加 Jones 氧化剂 (5.6 mL，12.8 mmol)，滴完后转至冰水浴中搅拌反应 2 h，加入异丙醇 (5 mL)，搅拌 1 h，抽滤，滤液减压蒸除溶剂，残留物用乙酸乙酯 (100 mL) 萃取，有机相用水 (100 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液蒸除溶剂，剩余白色蜡状物 (2.0 g) 经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 5 ∶ 1）的混合溶液］分离，得 **6**(1.7 g，68%)，mp 159 ～ 161 ℃（文献[22]：158 ～ 160 ℃），纯度 98.2%（HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间 1.07]。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)δ: 2.88(dd, *J*=12.9、5.7 Hz, 1H), 2.50(t, *J*=11.3 Hz, 1H), 2.35 ～ 2.45(m, 1H), 2.15 ～ 2.33(m, 8H), 2.02 ～ 2.12(m, 2H), 1.79 ～ 2.00(m, 4H), 1.41 ～ 1.70(m, 4H), 1.08 ～ 1.40(m, 8H), 0.89 ～ 1.06(m, 4H), 0.70(s, 3H)；^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$)δ: 211.33, 210.48, 179.89, 54.79, 49.57, 48.84, 47.77, 44.99, 42.91, 42.86, 42.68, 38.85, 36.74, 35.42, 35.17, 31.44, 30.99, 30.71, 28.23, 24.76, 22.43, 22.12, 18.35, 12.10；ESI-HRMS(*m*/*z*): 387.252 8[M－H]$^-$。

7- 氧代石胆酸（7）

于 1 L 三口瓶中加入 **2**(24 g，61 mmol)、丙酮 (320 mL)、水 (100 mL)、10%硫酸 (12 mL) 和溴化钠 (0.48 g，4.66 mmol)，冰浴降温至 10 ℃，滴加溴酸钠 (4.66 g，31 mmol) 的水 (20 mL) 溶液。加毕于 0 ～ 5 ℃反应 1 h，升至室温继续反应 6 h。加入 5%亚硫酸氢钠溶液 (33 mL) 淬灭反应，将反应液倒入水 (800 mL) 中，搅拌 1 h 后抽滤，滤饼减压干燥，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 3 ∶ 1）的混合溶液］分离，得白色固体 **7**(17.8 g，74%)，mp 197 ～ 200 ℃（文献[23]：199 ～ 200 ℃），纯度 98.4%（HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间 1.15)。^{1}H NMR (600 MHz, MeOD)δ: 3.48 ～ 3.57(m, 1H), 2.95 ～ 3.02(m, 1H), 2.54(t, *J*=11.1 Hz, 1H), 2.30 ～ 2.38(m, 1H), 2.13 ～ 2.25(m, 2H), 2.01 ～ 2.08(m, 1H), 1.77 ～ 1.97(m, 6H), 1.09 ～ 1.69(m, 16H), 0.91 ～ 1.05(m, 4H), 0.71(s, 3H)；^{13}C NMR(150 MHz, MeOD)δ: 213.62, 176.71, 70.07, 54.88, 49.26, 49.02, 46.09, 44.98, 43.00, 42.42, 38.96, 36.83, 35.17, 34.90, 33.78, 30.93, 30.60, 29.23, 27.88, 24.39, 22.09, 21.42, 17.47, 11.10；ESI-HRMS(*m*/*z*): 389.268 4[M－H]$^-$。

7α- 羟基 -3- 氧代胆烷酸（8）

于 －20 ℃向甲醇 (200 mL) 中滴加氯化亚砜

(2 mL，27.5 mmol)，滴完后加入**2**(7.84 g，20 mmol)，－20 ℃反应 24 h，减压浓缩，残留物用乙酸乙酯 (200 mL) 溶解，用饱和碳酸钠溶液 (100 mL×2) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除乙酸乙酯，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：二氯甲烷和甲醇 (体积比 40 ∶ 1) 的混合溶液］分离，得白色固体 3α,7α- 二羟基 -5β- 胆烷酸甲酯 (**12**，6.3 g，77 %)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.85 (q, *J*=3.0 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.42 ～ 3.51 (m, 1H), 2.30 ～ 2.39 (m, 1H), 2.16 ～ 2.27 (m, 2H), 1.60 ～ 2.02 (m, 10H), 1.06 ～ 1.56 (m, 12H), 0.86 ～ 1.04 (m, 7H), 0.66 (s, 3H)；ESI-HRMS (*m*/*z*): 429.297 0 $[M+Na]^+$。

取 **12** (7.9 g，19.5 mmol) 加入吡啶 (24 mL) 和乙酸酐 (16 mL，170 mmol) 中，室温反应 72 h，倒入碎冰 (150 g)，加 2 mol/L 盐酸调至 pH 2，用乙酸乙酯 (150 mL) 萃取，有机相依次经 10 % 盐酸 (100 mL)、饱和碳酸钠溶液 (100 mL) 和饱和氯化钠溶液 (100 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯 (体积比 5 ∶ 1) 的混合溶液］分离，得白色固体 3α,7α- 二乙酰氧基 -5β- 胆烷酸甲酯 (**13**，6 g，76 %)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.88 (q, *J*=3.1 Hz, 1H), 4.55 ～ 4.63 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.31 ～ 2.39 (m, 1H), 2.18 ～ 2.27 (m, 1H), 1.67 ～ 2.10 (m, 14H), 1.55 ～ 1.65 (m, 3H), 1.23 ～ 1.53 (m, 8H), 1.02 ～ 1.21 (m, 5H), 0.89 ～ 0.97 (m, 6H), 0.65 (s, 3H)；ESI-HRMS (*m*/*z*): 513.319 8 $[M+Na]^+$。

取 **13** (1.6 g，3 mmol) 加至甲醇 (40 mL) 和浓盐酸 (3 mL) 的混合溶液中，于 90 ℃回流 3 h，冷却至室温，减压蒸除甲醇，残留物用饱和碳酸氢钠调至 pH 8 ～ 9，用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压回收溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯 (体积比 3 ∶ 1) 的混合溶液］分离，得白色固体 3α- 羟基 -7α- 乙酰氧基 -5β- 胆烷酸甲酯 (**14**，1.1 g，67 %)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.87 (q, *J*=3.1 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.45 ～ 3.53 (m, 1H), 2.31 ～ 2.39 (m, 1H), 2.18 ～ 2.27 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 1.91 ～ 2.02 (m, 3H), 1.75 ～ 1.89 (m, 3H), 1.23 ～ 1.72 (m, 14H), 0.97 ～ 1.20 (m, 4H), 0.86 ～ 0.94 (m, 6H), 0.65 (s, 3H)；ESI-HRMS (*m*/*z*): 471.308 3 $[M+Na]^+$。

将 **14** (3 g，6.7 mmol) 溶于丙酮 (40 mL) 中，于 －20 ℃滴加 Jones 氧化剂 (3 mL，6.9 mmol)，滴完后转至冰水浴中搅拌反应 2 h，再于室温反应 2 h，加入异丙醇 (10 mL)，搅拌 1 h，40 ℃减压蒸除溶剂，残留物加入乙酸乙酯 (120 mL) 和水 (100 mL)，有机相依次用饱和碳酸氢钠溶液 (60 mL)、饱和氯化钠溶液 (60 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥、硅胶 (5 g) 过滤，滤饼用乙酸乙酯 (20 mL) 洗涤，收集滤液，40 ℃减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯 (体积比 3 ∶ 1) 的混合溶液］分离，得白色固体 **15** (2.22 g，74 %)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.97 (q, *J*=3.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.99 (t, *J*=14.4 Hz, 1H), 2.32 ～ 2.44 (m, 2H), 2.17 ～ 2.27 (m, 2H), 1.74 ～ 2.15 (m, 10H), 1.62 ～ 1.69 (m, 2H), 1.51 ～ 1.59 (m, 1H), 1.00 ～ 1.50 (m, 14H), 0.92 ～ 0.96 (m, 3H), 0.69 (s, 3H)；ESI-HRMS (*m*/*z*): 469.292 5 $[M+Na]^+$。

将 **15** (2.1 g，4.7 mmol) 溶于甲醇 (40 mL) 中，加入 10 % 氢氧化钠溶液 (9 mL，20.5 mmol)，加热回流 12 h，减压蒸除甲醇，残留物加水 (70 mL) 溶解，加 6 mol/L 盐酸调至 pH 1 ～ 2，抽滤，滤饼用水洗涤，减压干燥，经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯 (体积比 3 ∶ 2) 的混合溶液］分离，得白色粉末 **8** (1.2 g，57 %)，mp 111 ～ 113 ℃ (文献[24]：113 ～ 115 ℃)，纯度 99.7 % (HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间 1.43]。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.93 (q, *J*=3.5 Hz, 1H), 3.34 ～ 3.43 (m, 1H), 2.36 ～ 2.43 (m, 2H), 2.09 ～ 2.31 (m, 3H), 1.87 ～ 2.07 (m, 5H), 1.74 ～ 1.86 (m, 2H), 1.09 ～ 1.69 (m, 14H), 1.00 (s, 3H), 0.95 (d, *J*=6.8 Hz, 3H), 0.77 ～ 0.90 (m, 1H), 0.70 (s, 3H)；^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 213.56, 179.65, 68.53, 55.81, 50.31, 45.60,

43.17, 42.76, 39.53, 39.36, 36.96, 36.81, 35.35, 35.32, 33.86, 33.30, 30.97, 30.77, 28.14, 23.68, 21.94, 20.99, 18.26, 11.81；ESI-HRMS(*m/z*): 389.268 0[M－H]$^-$。

3β,7α- 二羟基胆烷酸（9）

将 **2**(3.92 g，10 mmol) 溶于吡啶 (40 mL) 中，冰水浴下加入甲磺酰氯 (1.38 g，12 mmol)，加毕反应 3 h，反应物倒入冰 (250 mL) 中，加 2 mol/L 盐酸调至 pH 1 ～ 2，用乙酸乙酯 (100 mL) 萃取，有机相经 1 mol/L 盐酸 (100 mL) 和饱和氯化钠溶液 (100 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：二氯甲烷和甲醇（体积比 40 ∶ 1）的混合溶液］分离，得无色透明油状物 **16**(2 g，51%)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.48 ～ 4.56 (m, 1H), 3.87 (q, *J*=3.1 Hz, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.57 (q, *J*=12.8 Hz, 1H), 2.36 ～ 2.44 (m, 1H), 2.22 ～ 2.30 (m, 1H), 1.75 ～ 2.06 (m, 7H), 1.59 ～ 1.72 (m, 2H), 1.23 ～ 1.57 (m, 10H), 1.09 ～ 1.23 (m, 2H), 0.99 ～ 1.08 (m, 1H), 0.78 ～ 0.98 (m, 7H), 0.67 (s, 3H)；ESI-HRMS(*m/z*): 469.262 8 [M－H]$^-$。

向 **16**(1.6 g，3.4 mmol) 中加入乙酸钠 (0.6 g，7.3 mmol)、DMF (40 mL) 和四丁基溴化铵 (0.2 g，0.62 mmol)，于 100 ～ 110 ℃反应 17 h，减压蒸除 DMF，残留物用乙酸乙酯 (30 mL) 溶解，用水 (50 mL) 萃取，经饱和氯化钠溶液 (20 mL×3) 洗涤，减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 3 ∶ 1）的混合溶液］分离，得白色固体 3β- 乙酰氧基 -7α- 羟基胆烷酸（**17**，0.96 g，60%）。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.62 ～ 5.67 (m, 1H), 4.24 (q, *J*=6.7 Hz, 1H), 2.25 ～ 2.37 (m, 1H), 2.13 ～ 2.21 (m, 1H), 1.46 ～ 2.01 (m, 8H), 1.15 ～ 1.45 (m, 15H), 0.93 ～ 1.14 (m, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.86 (d, *J*=6.5 Hz, 3H), 0.75 ～ 0.84 (m, 1H), 0.60 (s, 3H)；ESI-HRMS(*m/z*): 433.293 7[M－H]$^-$。

取 **17**(0.1 g，0.23 mmol)，加入甲醇 (10 mL) 和 10%氢氧化钠溶液 (2 mL，4.6 mmol)，于 80 ℃回流搅拌 10 h，减压除去大部分甲醇，加 2 mol/L 盐酸调至 pH 2，加水 (15 mL)，再加乙酸乙酯 (40 mL) 萃取水相，用饱和氯化钠 (40 mL×2) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱［洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 1 ∶ 1）的混合溶液］分离，得白色固体粉末 **9**(0.05 g，50%)。mp 202 ～ 203 ℃（文献[25]：204 ～ 206 ℃），纯度 98.0%（HPLC 归一化法，条件同 **3**，相对保留时间 1.35)。^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.97 (q, *J*=2.9 Hz, 1H), 3.72 ～ 3.80 (m, 1H), 2.43 ～ 3.49 (m, 1H), 2.17 ～ 2.27 (m, 1H), 2.02 ～ 2.15 (m, 1H), 1.85 ～ 2.01 (m, 2H), 1.74 ～ 1.84 (m, 2H), 1.45 ～ 1.72 (m, 4H), 0.97 ～ 1.43 (m, 17H), 0.73 ～ 0.95 (m, 6H), 0.60 (s, 3H)；^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 178.18, 79.46, 69.45, 57.33, 51.53, 43.69, 43.23, 41.07, 40.52, 36.73, 35.90, 35.14, 34.77, 33.85, 32.32, 32.01, 30.79, 29.18, 24.60, 23.68, 22.90, 22.37, 18.83, 12.21；ESI-HRMS(*m/z*): 391.284 4[M－H]$^-$。

参考文献：

[1] RAZORI M V, MAIDAGAN P M, CIRIACI N, *et al*. Anticholestatic mechanisms of ursodeoxycholic acid in lipopolysaccharide-induced cholestasis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, **168**: 48-56.

[2] CAZZAGON N, FLOREANI A. Primary biliary cholangitis: treatment [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2021, **37**(2): 99-104.

[3] FINCH M L, MARQUARDT J U, YEOH G C, *et al*. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, **54**(8): 288-303.

[4] WON P J, HUU H N, LAN H N. Analysis of ursodeoxycholic acid using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Curr Pharm Anal*, 2016, **12**(3): 185-191.

[5] ASHOK P, YOGESH P T, SUNNY R, *et al*. Determination of ursodeoxycholic acid in bulk and tablets by RP-HPLC [J]. *J Pharm Res*, 2010, **3**(7): 1573-1575.

[6] 隋玉荣, 丁　一, 黄哲甦. 两种熊去氧胆酸软胶囊主药含量测定方法的比较[J]. 中国药房, 2013, **24**(24): 2287-2289.

[7] 刘利军, 张晓艳, 贾建静, 等. TLC 法检测熊去氧胆酸中的胆石酸[J]. 华西药学杂志, 2012, **27**(5): 593-594.

[8] 金 玉, 郑长青. RP-HPLC 法测定熊去氧胆酸胶囊中熊去氧胆酸及有关物质的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, **31**(4): 288-292.

[9] 谢 强, 王 坤, 陶家林. 熊去氧胆酸生产中相关物质的分析[J]. 合成化学, 2017, **25**(2): 152-154.

[10] TEIITI K, AKIO S, TETSUO S, *et al*. Syntheses of ursodesoxycholic acid and its conjugated bile acid [J]. *Proc Jpn Acad*, 1954, **30**(5): 391-392.

[11] TAKASHI I, FREDERIC C C. Potential bile acid metabolites. 6. 3,7-Dihydroxy-5β-cholanic acids and related compounds [J]. *J Org Chem*, 1982, **7**(15): 2972-2978.

[12] 庄治平, 陈 英, 周维善. 5β,3α-羟基-7-羰基-胆烷酸的还原反应[J]. 有机化学, 1986, **6**(4): 281-285.

[13] 张国平, 余晓岗, 严崇萍. NBS 氧化制备熊去氧胆酸中间体7-氧代石胆酸[J]. 中国医药工业杂志, 1996, **27**(5): 234.

[14] DONNA D, ANDRALI, SREENATH S, *et al*. Novel FXR (farnesoid X receptor) modulators: Potential therapies for cholesterol gallstone disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, **24**(18): 3986-3993.

[15] WINSTON J A, THERIOT C M. Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota [J]. *Gut Microbes*, 2019, **11**(2): 1-14.

[16] JOSHI G, BHADRA S, GHOSH S, *et al*. Making full use of the oxidizing equivalents in bromate in the selective oxidation of thiols, sulfides, and benzylic/secondary alcohols into disulfides, sulfoxides, and aldehydes/ketones [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2010, **49**(3): 1236-1241.

[17] MÁJER F, SHARMA R, MULLINS C, *et al*. New highly toxic bile acids derived from deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and lithocholic acid [J]. *Bio Med Chem*, 2014, **22**(1): 256-268.

[18] KASPAR M, KUDOVA E. Selectivity of oxidizing agents toward axial and equatorial hydroxyl groups [J]. *J Org Chem*, 2022, **87**(14): 9157-9170.

[19] THOMPSON H W, LALANCETTE R A, BRUNSKILL A P. (−)-3,6-Dioxo-5β-cholanic acid: hydrogen bonding in the hemihydrate of a steroidal diketo acid [J]. *Acta Crystallogr C*, 2001, **57**(5): 632-633.

[20] EINARSSON K. On the formation of hyodeoxycholic acid in the rat: bile acids and steroids 154 [J]. *J Biol Chem*, 1966, **241**(3): 534-539.

[21] DO NASCIMENTO P G, LEMOS T L, ALMEIDA M C, *et al*. Lithocholic acid and derivatives: antibacterial activity [J]. *Steroids*, 2015, **104**: 8-15.

[22] HAN Y T, YUN H. A practical and eco-friendly synthesis of oxo-bile acids[J]. *Org Prep Proced Int*, 2016, **48**(1): 55-61.

[23] NAGUNURI G C L, KATANGOOR V, SURIGILLA V, *et al*. Efficient process for obeticholic acid: synthesis, structural assignment, and control strategy for diastereoisomeric impurities [J]. *Org Process Res Dev*, 2022, **26**(12): 3265-3275.

[24] FANTIN G, FOGAGNOLO M, MEDICI A, *et al*. Synthesis of 7- and 12-hydroxy- and 7,12-dihydroxy-3-keto-5β-cholan-24-oic acids by reduction of 3,7-, 3,12- and 3,7,12-oxo derivatives [J]. *Steroids*, 1993, **58**(11): 524-526.

[25] IIDA T, CHANG F C. Potential bile acid metabolites. 6. Stereoisomeric 3,7-dihydroxy-5beta-cholanic acids [J]. *J Org Chem*, 1982, **47**(15): 2966-2972.