甾体肟醚化合物的合成及抗肿瘤活性研究

黄燕敏^a 苏绍焯^b 贾琳怡^c 甘春芳^a
林啟福^a 孔二斌^a 崔建国^{*,a}

(^a 广西师范学院化学与生命科学学院 南宁 530001)

(^b 广西特种设备监督检验院 南宁 530219)

(^c 广西南宁市第三十七中 南宁 530001)

摘要 肟醚类化合物往往表现出很好的杀虫、除草、抗菌、抗病毒以及抗肿瘤等生理活性,因而受到人们的广泛关注.从胆甾醇、豆甾醇出发,通过不同的合成路线,制备得到系列 3-取代、6-取代及 22-取代甲氧基肟醚和苄氧基肟醚甾体化合物,通过 IR、NMR 及 MS 等现代分析方法对合成物进行了结构表征.同时,分别采用人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(Bel-7404)和鼻咽癌细胞(CNE-2)对合成产物及部分合成中间体进行了体外抑制肿瘤细胞生长增殖活性研究.结果表明,某些具有 22-取代结构的甲氧基肟醚及苄氧基肟醚甾体化合物对这些肿瘤细胞株表现出较好的抑制活性,其中 22-降-3 β -羟基-22-苄氧基-豆甾-6-缩胺硫脲(**15**)对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的 IC₅₀ 值为 5.7 μ mol/L.

关键词 胆甾醇; 豆甾醇; 甾体肟醚化合物; 抗肿瘤活性; 生理活性

Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Some Steroidal Oxime Ether

Huang, Yanmin^a Su, Shaoyang^b Jia, Linyi^c Gan, Chunfang^a
Lin, Qifu^a Kong, Erbin^a Cui, Jianguo^{*,a}

(^a Chemistry and Life Science College, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001)

(^b Guangxi Special Equipment Supervision and Inspection Institute, Nanning 530026)

(^c Guangxi Number Thirty-seven Middle School, Nanning 530001)

Abstract Oxime ethers display remarkable insecticidal, weeding, antibacterial, antiviral and anticancer physiological activities. Series of steroidal oxime ethers with the structure of 3-, 6- or 22-*O*-methyloxime or *O*-benzyloxime were designed and synthesized by different synthetic route using cholesterol or stigmasterol as starting materials. Their structures were characterized by IR, NMR and MS. Antiproliferative activities of the compounds were assayed by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method. Some compounds displayed distinct cytotoxicity against SGC-7901, Bel-7404 and CNE-2 cancer cell lines. Our results reveal that the compounds with the structure of 22-*O*-methyloxime and 22-*O*-benzyloxime have better antiproliferative activities. 3 β -Hydroxy-22-*O*-benzyloxime-22,23-secostigmastan-6-thiosemicarbazone (**15**) displays an excellent antiproliferative activity against CNE-2 cancer cells owning an IC₅₀ value of 5.7 μ mol/L.

Keywords cholesterol; stigmasterol; steroidal oxime ether; antiproliferative activity; bioactivity

甾体激素在维持生命、调节性能及免疫功能、对机体的发育及计划生育等方面有着不可替代的作用,被称为人类生命的金钥匙.人们在研究中发现,对甾体的结构进行不同的改造,包括在甾核中引入不同的杂原子或不同官能团,此时甾体化合物本身常常会在生命体中出

现不同的生理活性变化,比如在甾体的不同部位引进肟类官能团,会导致化合物出现心脏有着正向肌性作用的生理活性^[1]、抗癌活性^[2,3]、抗菌及避孕等生理活性^[4,5].

肟醚化合物是一类具有显著生理活性的化合物,该类化合物具有很好的杀虫、杀螨、除草、抗菌、抗病毒

* E-mail: cuijg1954@126.com

Received March 22, 2014; revised April 21, 2014; published online May 7, 2014.

Project supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2010GXNSFD013019) and the Natural Science Fund of Education Department of Guangxi Province (No. 201202ZD059).

广西自然科学基金(No. 2010GXNSFD013019)和广西教育厅重点基金(No. 201202ZD059)资助项目.

等生物活性^[6], 大多具有高效、低毒、低残留等优点, 因此甾体类化合物作为一类农药已经在农业上得到较广泛的研究和应用. 如美国联邦公司开发生产的甾体类杀菌剂霜脲霉(Cymoxan)及除草剂禾草灭(Alloxydim), 它们都是具有甾体结构的化合物. 而对于具有甾体结构的甾体类甾体化合物, 文献中报道不多. Jindal 等^[7]合成了系列具有 3-甾体及 17-甾体结构的雄甾烷类衍生物, 发现该类化合物具有明显的抗肿瘤活性, 对肺癌细胞 (NCI-H23, NCI-H522) 及结肠癌细胞 (SW-620, COLO 205) 等多种肿瘤细胞具有显著抑制作用. Lee 等^[8]合成了一种具有甾体结构的甾体激素配合物, 该化合物能成功透过细胞膜, 并监测基因的转录. Khan 等^[9]合成了一类 6-甾体化合物, 此类化合物具有很好的抗菌活性, 其中当 3-位为氯取代时抗菌效果优于临床用药氯霉素. 周雪琴等^[10]合成了一类具有 A-环内酰胺结构的 17-甾体化合物, 这些化合物均具有较好的 5 α -还原酶抑制活性, 其中某些化合物的效果与非那雄胺相当. Ivan 等合成了一类 19-甾体化合物, 它们具有通过调节受体调节离子通道的渗透能力^[11], 同时具有调节中枢神经系统的功能^[12].

我们^[13~15]在前期对甾体类化合物研究的基础上, 开展了对甾体类化合物的合成及生理活性研究. 从天然甾醇豆甾醇及胆甾醇出发, 通过不同的化学反应, 共合成了 18 个分别具有 3-甾体、6-甾体或 22-甾体结构

的甾体类化合物, 并研究了它们体外抑制肿瘤细胞生长增殖活性, 结果发现某些具有 22-甲基甾基及 22-苄基甾基的化合物具有很好的体外抑制肿瘤细胞生长增殖活性.

1 结果与讨论

1.1 化学部分

化合物 **1**, **8**, **18** 及 **21** 的合成见文献^[15].

首先, 我们合成了具有 3,22-二甲基甾体结构的甾体化合物 **3~5** (Scheme 1).

从豆甾-3,6-二酮(**1**)出发, 通过臭氧化反应使 **1** 的 22-位双键断裂, 生成豆甾-3,6-二酮-22-醛(**2**). 化合物 **2** 的结构可从其 NMR 谱得到证实, 在 **2** 的 ¹H NMR 中, δ 9.48 处的化学位移是醛基上 H 的特征峰; 而 ¹³C NMR 中 δ 204.6 的共振吸收进一步证实了 22-醛基的生成. **2** 进一步与甲氧氨盐酸盐反应, 得到具有 3,22-二甲氧甾体结构的化合物 **3**. **3** 的结构从 ¹H NMR 中化学位移为 δ 3.82 和 3.84 的两个与氧相连的甲基单峰得到证实. 另外, 从化合物 **3** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 中都没有发现异构体的存在. 从化合物 **2** 的结构来看, 22-醛基比 3-羰基及 6-羰基更为活泼, 易于发生反应. 而从化合物 **2** 中 3-羰基和 6-羰基的空间位阻来看, 6-羰基相邻的 5-位碳是一个叔碳, 同时由于 19-甲基及 5-位及 7-位 α -键氢的影

Reagents and conditions: (a) 1) O_3 / -78°C , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ($V:V=4:1$); 2) Me_2S ; (b) $\text{NH}_2\text{OCH}_3\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (c) NaBH_4 , CH_3OH ; (d) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Scheme 1

响, 因此空间位阻较大. 而相对于 3-羰基来看, 其相邻的 2-位碳及 4-位碳均是仲碳, 同时 2,4-位上的 α -键氢离 3-羰基较远, 因此空间位阻较小, 所以反应主要发生在 3-位羰基(图 1).

图 1 化合物 2 的构象式

Figure 1 The conformation of compound 2

22-降-6-氧代豆甾-3,22-二甲氧基肟(3)通过硼氢化钠还原, 得到化合物 4. 有趣的是, 从化合物 4 中分离得到异构体 4a 和 4b, 化合物 4a 和 4b 中两个甲氧基肟基保留, 仅仅是 6-羰基被还原为羟基. 从 4a 和 4b 的 ^{13}C NMR 中明显可以看到, 3 在 δ 209.9 的 6-羰基化学位移已经消失, 代之以 δ 71.0 和 70.9 的 6-羟基碳的化学位移. 从 ^1H NMR 中 δ 3.80~3.83 与羟基相连碳上氢的化学位移, 进一步证实化合物 3 的 6-羰基已经被还原成为 6-羟基, 而 δ 3.79 和 3.81 两个与氧相连甲基单峰的存在, 表明两个甲氧基在反应中没有被还原.

从 4a ^1H NMR 中 δ 2.93 (dd, $J=15.0, 3.3$ Hz, 1H) 的化学位移分析, 可认定为 $\text{C}_4\text{-}\beta\text{-H}$ 的共振吸收峰, 其在 $\text{C}_4\text{-}\alpha\text{-H}$ 和 $\text{C}_5\text{-H}$ 的作用下形成了 dd 峰, 同时由于 3-OCH₃ 的去屏蔽影响移向低场, 其构型为 (3*Z*,22*E*)-22-降-6-羟基豆甾-3,22-二甲氧基肟. 同样分析, 化合物 4b 构型为 (3*E*,22*E*)-22-降-6-羟基豆甾-3,22-二甲氧基肟. 化合物 3 与盐酸羟胺反应, 则得到化合物 5, 反应中 3 的 6-羰基被转变为 6-肟基, 其结构从 NMR 谱分析, 5 具有 (3*E*,6*E*,22*E*)-构型, 可能是此种构型可以使 3-甲氧基肟基中的甲氧基和 6-肟基中的羟基达到最大程度的远离, 使

产物更加稳定. 反应中未有分离得到另一(3*Z*)-异构体.

从化合物 2 出发, 在三水乙酸钠存在下与苯氧胺盐酸盐反应, 得到化合物 6. 从 6 的 NMR 谱中可以明显看到, 6 是一个由 (3*E*,22*E*)-及 (3*Z*,22*E*)-异构体构成的混合物, 两者的比例大约为 1:1. 化合物 6 没有经过分离, 直接通过 NaBH_4 还原, 得到 6-羰基被还原的产物 7, 产物 7 进一步分离得到异构体 7a 和 7b (Scheme 2). 在 7a 的 ^1H NMR 谱中, 在 δ 3.26 ($J=15.3, 3.0$ Hz, 1H) 处出现一个 dt 吸收峰, 这可认定为 $\text{C}_2\text{-}\beta\text{-H}$ 的化学位移, 7a 具有 (3*E*)-的苯氧胺基结构. 而在 7b 的 ^1H NMR 谱中, 在 δ 3.05 ($J=15.0, 3.0$ Hz, 1H) 处存在一个 dd 峰, 可认定为 $\text{C}_4\text{-}\beta\text{-H}$ 的化学位移, 即 7b 具有 (3*Z*)-构型.

另外, 从化合物 8 出发通过 3-羟基乙酰化保护得到化合物 9, 9 经过臭氧氧化反应得到 22-双键断裂的产物 10, 10 的结构从其 ^1H NMR 中 δ 9.60 (d, $J=3.0$ Hz, 1H) 的低场化学位移得到证实, 这是 22-双键发生断裂后形成醛基的标志. 从 10 的 ^{13}C NMR 来看, δ 204.7 是 22-醛基中羰基碳的化学位移, 而 δ 210.0 是 6-位羰基碳的化学位移. 化合物 10 与等物质的量的苯氧基胺反应得到化合物 11, 从 11 的 ^1H NMR 来看, δ 5.04 处 2 个氢的积分面积是苯基中 CH_2 的化学位移, 而低场 δ 7.35~7.29 中 5 个氢积分面积是苯环上 H 的化学位移. 另外, 从其 ^{13}C NMR 来看, 我们清楚地看到, 在化合物 10 中 δ 204.7 醛基碳的化学位移已经消失, 在 δ 155.8 出现了新的 22-碳的信号, 说明 22-醛基已经转变成为肟基. 而 δ 210.1 的 6-酮羰基碳化学位移的保留, 进一步说明在这里是 22-醛基发生了反应, 而 6-酮羰基没有发生变化. 对化合物 11 的 6-位羰基进行不同的官能团转换, 可分别得到具有 6-肟基结构的化合物 12, 具有 6-氨基硫脲结构的化合物 14 和具有 6-甲氧基肟基结构的化合物 16. 进一步对

Reagents and conditions: (a) $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (b) $\text{NaBH}_4, \text{CH}_3\text{OH}$

Scheme 2

Reagents and conditions: (a) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$; (b) 1) $\text{O}_3/-78^\circ\text{C}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ($V:V=4:1$); 2) Me_2S ; (c) $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (d) $\text{NHOH}\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (e) $\text{KOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ ($V:V=5:95$); (f) $\text{NH}_2\text{NHCSNH}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$, $\text{pH}=4$; (g) $\text{KOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ ($V:V=5:95$); (h) $\text{NH}_2\text{OCH}_3\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}/\text{NaOAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (i) $\text{KOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ ($V:V=5:95$)

Scheme 3

Reagents and conditions: (a) $\text{CH}_3\text{ONH}_2\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}$, NaOAc , 65°C ; (b) $\text{ArCH}_2\text{ONH}_2\cdot\text{HCl}/95\% \text{ EtOH}$, NaOAc , 65°C

Scheme 4

Reagents and conditions: (a) $\text{CH}_3\text{ONH}_2 \cdot \text{HCl}/95\% \text{ EtOH}$, NaOAc 65°C ; (b) NaBH_4 , CH_3OH ; (c) $\text{ArCH}_2\text{ONH}_2 \cdot \text{HCl}/95\% \text{ EtOH}$, NaOAc , 65°C ; (d) NaBH_4 , CH_3OH

Scheme 5

12, **14** 和 **16** 的 3-位乙酰氧基水解去保护分别得到化合物 **13**, **15** 和 **17**. 化合物 **12**~**17** 的结构都从它们的光谱、波谱及质谱数据得到表征确定.

为了探索不同取代位置结构的甾醚取代基对甾体化合物抑制肿瘤细胞生长增殖活性的影响. 从化合物 **18** 出发, 化合物 **18** 分别与甲氧胺盐酸盐及苄氧胺盐酸盐反应, 得到化合物 **19** 和 **20**. 从 ^1H NMR 谱来看, 化合物 **19** 在 δ 3.21 ($J=13.8, 4.5 \text{ Hz}$, 1H) 处及化合物 **20** 在 δ 3.29 ($J=13.3, 4.5 \text{ Hz}$, 1H) 处存在的 dd 峰化学位移可推断为 $\text{C}_7\text{-}\alpha\text{-H}$ 的位移信号, 它们在甾醚键中 O 原子的负诱导效应影响下移向低场, 这说明化合物 **19** 和 **20** 具有 6-*E* 构型.

从化合物 **21** 出发, 分别与甲氧胺盐酸盐和苄氧胺盐酸盐反应, 控制适量的反应的物质的量比, 分别得到化合物 **22** 和 **24**, **22** 和 **24** 进一步通过硼氢化钠还原, 得到 6-羰基还原产物 **23** 和 **25**, 反应过程中 3-甾醚结构保留. 化合物 **21**~**25** 的结构都通过光谱、波谱及质谱数据得到表征.

1.2 生物部分

分别采用人胃癌细胞 (SGC-7901)、肝癌细胞 (Bel-7404) 和鼻咽癌细胞 (CNE-2), 使用 MTT 法对所合成的目标产物及部分中间体进行体外抑制肿瘤细胞生长增殖活性测试, 结果如表 1 所示. 从表中数据可以发现: 对于拥有 3,22-二甲氧基甾醚结构的化合物 **3**~**5** 来说, 具有 6-羟基取代的化合物 **4a** 和 **4b** 对 SGC-7901 和 Bel-7404 细胞具有明显的抑制生长增殖活性, 但是对鼻咽癌细胞 CNE-2 则抑制活性不明显. 具有 6-苄基取代的化合物 **5** 对此三种细胞株都具有较好的抑制作用, 而具有 6-羰基取代的化合物 **3** 却没有明显的抑制活性. 原因可能是羰基还原为羟基及转换为苄基后, 一方面加大了

化合物的水溶性, 另一方面由于羟基和苄基易于与细胞中的蛋白质或 DNA 形成分子间氢键, 会增强化合物与蛋白质或 DNA 的亲合作用, 进一步增加化合物的细胞毒性. 从具有 3,22-二甲氧基甾醚结构的立体异构体 **7a** 和 **7b** 来看, 具有 3*Z* 构型的化合物 **7b** 比具有 3*E* 构型的异构体 **7a** 对 SGC-7901 和 CNE-2 细胞具有更好的抑制活性. 对 Bel-7404 细胞来说, 6-羰基还原后的产物 **7a** 和 **7b** 比它们还原的前体化合物 **6** 的抑制活性要好, 这进一步说明羟基的存在对提高化合物细胞毒性的重要性.

对于 22-苄氧基甾醚类化合物来说, 具有 6-苄基取代的化合物 **12** 及具有 6-氨基硫脲基取代的化合物 **15** 具有较好的细胞毒性, 特别是化合物 **15** 对鼻咽癌细胞 CNE-2 抑制生长增殖作用的 IC_{50} 值为 $5.7 \mu\text{mol/L}$, 优于阳性对照物顺铂, 具有一定的抑制选择性, 对此在进一步研究探讨. 化合物 **13** 和化合物 **15** 相比较, 明显地化合物 **15** 对 Bel-7404 及 CNE-2 细胞的抑制活性要高于化合物 **13**, 说明 6-氨基硫脲基取代比 6-苄基取代具有更强的细胞毒性, 是更好的活性基团.

另外, 对于具有胆甾烷支链结构的甾体化合物来说, 具有 6-苄基取代结构的化合物 **19** 和 **20** 对胃癌细胞 SGC-7901 表现出一定的抑制活性. 然而, 同样具有 3,6-二取代结构的特征, 取代官能团相同但是取代位置刚好相反的 3-苄基甾醚类甾体化合物 **23** 和 **25** 对此种细胞却没有表现出明显的抑制作用. 由此可见对于甾体化合物来说, 甾核中官能团取代位置的不同, 对化合物的生理活性会产生较大的影响.

从表 1 结果还可以看到, 具有 22-苄基取代结构的此类甾体化合物比具有胆甾烷支链结构的此类苄基化合物具有更好的细胞毒性, 这可能是前者比后者具有更大水溶性的原因, 还需要我们进一步的研究探讨.

表 1 目标产物的体外抗肿瘤活性[IC₅₀/(μmol·L⁻¹)]^aTable 1 *In vitro* antiproliferative activities [IC₅₀/(μmol·L⁻¹)] of target compounds

Compound	SGC-7901	Bel-7404	CNE-2
3	>100	>100	>100
4a	17.3	24.7	>100
4b	69.1	17.3	>100
5	19	14	14.1
6	44.9	>100	>100
7a	>100	18.4	>100
7b	40.5	29.5	84.7
11	30.4	22.3	>100
12	15.2	13.3	76.2
13	14.5	>100	99.6
14	68.8	>100	74.1
15	21.0	45.6	5.7
16	26.8	>100	>100
17	27.1	>100	>100
19	48.6	>100	ND ^b
20	52	38	ND
23	>100	72.0	ND
25	>100	80	ND
Cisplatin	6.7	10.1	16.8

^a Data represent the mean values of three independent determinations; ^b Not determined.

2 结论

采用不同的合成路线, 我们分别合成了某些具有 3-取代、6-取代及 22-取代甲氧基脲醚和苄氧基脲醚结构的甾体化合物, 这些化合物的结构通过现代分析方法得到了表征确认。同时, 对合成产物及部分合成中间体进行体外抑制肿瘤细胞生长增殖活性研究表明, 某些具有 22-取代结构的甲氧基脲醚及苄氧基脲醚甾体化合物对人胃癌细胞(SGC-7901)、肝癌细胞(Bel-7404)和鼻咽癌细胞(CNE-2)具有较好的抑制生长增殖活性; 具有 22-脲醚取代结构的化合物比具有胆甾烷支链结构的脲醚化合物具有更好的细胞毒性。研究结果为我们设计合成具有更好抗肿瘤活性的甾体化合物提供了有用的参考。

3 实验部分

3.1 化学合成部分

3.1.1 试剂和仪器

合成所用试剂如无特别说明均为分析纯, 溶剂按常规方法进行处理干燥。IR 测定采用 Nicolet FT-360 傅立叶红外光谱仪; 熔点测定采用 X₆ 显微熔点测定仪, 温度计未经校正; ¹H NMR, ¹³C NMR 测定采用德国 Bruker AV-500 型和 Bruker AV-300 型超导核磁共振仪, 化学位移值用 δ 表示, 偶合常数 *J* 用 Hz 表示; 高分辨质谱采用美国 Agilent 6210 TOFMS 质谱仪。

化合物 **1**, **8**, **18**, **21** 的合成见参考文献[15]。

3.1.2 22-降-3,6-二氧代豆甾-22-醛(**2**)的合成

将 500 mg (1.17 mmol) 化合物 **1** 加入带有支管的圆底烧瓶中, 加入 16 mL 二氯甲烷和 4 mL 甲醇, 溶解完全后置于液氮冷却的乙酸乙酯保温瓶中, 待体系温度冷却到 -78 °C 后, 通入富含 O₃ 的氧气流, TLC 跟踪反应 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=4:1], 溶液变为淡蓝色后停止通入 O₃, 继续通入氧气 20 min, 待体系升至室温, 加入 3 mL 二甲硫醚, 搅拌过夜。减压蒸去大部分溶剂, 得到白色固体的混合油状物, 该油状物用 60 mL 二氯甲烷溶解, 并依次用水、饱和氯化钠水溶液洗, 有机层用无水硫酸钠干燥。减压蒸去溶剂, 得到无色透明油状物。快速柱层析分离[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=4:1]得到固体化合物 **2** 242 mg, 产率 60%。m.p. 168~169 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 0.69 (s, 3H, 18-CH₃), 0.87 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, 21-CH₃), 2.78 (dd, *J*=13.5, 4.0 Hz, 1H, C⁵-H), 9.54 (d, *J*=6.5 Hz, 1H, C²²-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 209.4 (3-C), 209.3 (6-C), 205.7 (22-C), 56.5 (14-C), 55.5 (5-C), 52.4 (17-C), 51.0 (20-C), 49.0 (13-C), 46.2 (9-C), 43.5 (7-C), 41.0 (10-C), 39.0 (4-C), 37.7 (12-C), 37.6 (2-C), 37.4 (1-C), 37.2 (8-C), 26.9 (16-C), 24.4 (15-C), 21.6 (11-C), 13.6 (19-C), 12.6 (18-C), 12.5 (21-C); IR (KBr) ν: 2931, 2871, 2734, 1709, 1463, 1386, 1265, 1227, 920 cm⁻¹。

3.1.3 22-降-6-氧代豆甾-3,22-甲氧基脲(**3**)的合成

将 100 mg (0.29 mmol) 化合物 **2** 溶于 20 mL 95% 乙醇, 然后加入三水乙酸钠 79 mg (0.58 mmol), 加热搅拌溶解, 待溶解后分批缓慢加入甲氧基胺盐酸盐 51 mg (0.58 mmol), 控制反应温度在 65 °C 左右, TLC 跟踪反应, 1 h 后停止反应。减压抽除大部分乙醇, 出现大量白色固体, 加入少许蒸馏水, 有白色沉淀生成, 用乙酸乙酯萃取(20 mL×3), 合并有机层, 有机层依次用水洗, 饱和食盐水各洗一次, 然后用无水硫酸钠干燥。过滤, 减压蒸去溶剂, 得到白色固体。将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=8:1], 得到化合物 **3** 200 mg, 产率 67.1%。m.p. 120~122 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.73 (s, 3H, 18-CH₃), 0.85 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, 21-CH₃), 2.37~2.30 (m, 3H, C⁵-H 及 C⁷-H), 3.22~3.10 (m, 2H, C²-β-H 及 C⁴-β-H), 3.82 (s, 3H, 22=NOCH₃), 3.84 (s, 3H, 3=NOCH₃), 6.43 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, C²²-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 209.9 (6-C), 158.3 (3-C), 155.7 (22-C), 61.5 (22=NOCH₃), 61.1 (3=NOCH₃), 58.0 (5-C), 56.5 (14-C), 53.9 (17-C), 53.6 (13-C), 46.6 (9-C), 43.1 (7-C), 41.8 (12-C), 39.2 (10-C), 37.8 (8-C), 37.1 (20-C), 32.2 (3-C), 26.8

(4-C), 26.8 (2-C), 24.1 (1-C), 21.4 (16-C), 20.4 (15-C), 17.2 (21-C), 12.4 (19-C), 12.3 (18-C); IR (KBr) ν : 3407, 2933, 2864, 1711, 1634, 1458, 1433, 1380, 1303, 1241, 1041 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 403.2961, found 403.2959.

3.1.4 22-降-6-羟基豆甾-3,22-二甲氧基甾(4)的合成

室温下将 200 mg (0.40 mmol) 化合物 **3** 溶解于 20 mL 无水甲醇中(其中加入约 2 mL 二氯甲烷助溶), 待溶解完全后, 20 min 内分批加入 31 mg (0.80 mmol) NaBH_4 . TLC 监测反应, 无原料点随即用 1 mol/L HCl 淬灭反应, 减压蒸去大部分甲醇, 用乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机层, 有机层用蒸馏水、饱和食盐水各洗一次, 无水硫酸钠干燥. 减压蒸去溶剂, 得到白色固体, 将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 6 : 1$]得到化合物(3*Z*,22*E*)-22-降-6-羟基豆甾-3,22-二甲氧基甾(**4a**) 68 mg, 产率 34.2%. m.p. 149~150 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.74 (s, 3H, 18- CH_3), 1.09 (s, 3H, 19- CH_3), 1.11 (d, $J=8.1$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.36 (m, 1H, C^{20} -H), 2.93 (dd, $J=15.0, 3.3$ Hz, 1H, C^4 - β -H), 3.79 (s, 3H, 3- NOCH_3), 3.81 (s, 3H, 22- NOCH_3), 3.80~3.84 (m, 1H, C^6 -H), 7.18 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, C^{22} -H); ^{13}C NMR δ : 160.2 (3-C), 155.5 (22-C), 71.0 (6-C), 61.1 (22- NOCH_3), 61.0 (3- NOCH_3), 55.9 (14-C), 53.9 (17-C), 47.8 (9-C), 42.9 (5-C), 42.8 (13-C), 39.8 (7-C), 39.7 (10-C), 39.6 (12-C), 37.1 (8-C), 36.1 (20-C), 30.2 (4-C), 27.8 (2-C), 27.6 (1-C), 25.2 (16-C), 24.3 (15-C), 20.9 (11-C), 18.1 (21-C), 14.9 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3440, 2933, 2868, 2806, 1638, 1560, 1417, 1045, 886 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 405.3117, found 405.3106.

同时, 分离得到异构体(3*E*,22*E*)-22-降-6-羟基豆甾-3,22-二甲氧基甾(**4b**) 58 mg, 产率 29.1%. m.p. 168~170 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.74 (s, 3H, 18- CH_3), 1.10 (s, 3H, 19- CH_3), 1.11 (d, 3H, $J=6.6$, 21- CH_3), 2.36 (m, 1H, C^{20} -H), 2.55 (t, 1H, $J=14.1$ Hz, C^4 - α -H), 3.16~3.10 (m, 1H, C^2 - β -H), 3.79 (s, 3H, 22- NOCH_3), 3.81 (s, 3H, 3- NOCH_3), 3.83~3.80 (m, 1H, C^6 -H), 7.18 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, C^{22} -H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 160.2 (3-C), 155.5 (22-C), 70.9 (6-C), 61.1 (22- NOCH_3), 61.0 (3- OCH_3), 55.9 (14-C), 53.9 (17-C), 49.0 (9-C), 42.9 (5-C), 42.8 (13-C), 39.8 (7-C), 39.6 (12-C), 38.9 (10-C), 37.1 (8-C), 36.1 (20-C), 31.7 (4-C), 30.2 (2-C), 27.6 (1-C), 24.3 (16-C), 21.2 (15-C), 21.0 (11-C), 18.1 (21-C), 14.8 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3440, 2945, 2843, 1629, 1560, 1417 cm^{-1} .

3.1.5 (3*E*,6*E*,22*E*)-22-降-6-羟亚胺基-豆甾-3,22-二甲氧基甾(5)的合成

100 mg (0.20 mmol) 化合物 **3** 溶于 15 mL 95%乙醇, 然后加入三水乙酸钠 34 mg (0.24 mmol), 加热搅拌溶解, 溶解后一次性加入盐酸羟胺 26 mg (0.38 mmol), 控制反应温度在 65 $^{\circ}\text{C}$ 左右, TLC 跟踪反应, 2 h 后停止反应. 减压抽除大部分乙醇, 出现大量白色固体, 然后加入少许蒸馏水, 有白色沉淀生成, 随即加入乙酸乙酯溶解, 用乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机层. 有机层依次用水、饱和食盐水各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压抽除溶剂, 得到无色油状物, 采用柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 6 : 1$]得到白色固体化合物 **5** 51 mg, 产率 49.3%. m.p. 236~238 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.71 (s, 3H, 18- CH_3), 0.86 (s, 3H, 19- CH_3), 1.12 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.41~2.28 (m, 1H, C^{20} -H), 2.70 (br d, $J=13.8$ Hz, 1H, C^4 -H), 3.20~3.11 (m, 1H, C^2 - β -H), 3.35 (dd, $J=13.8, 4.2$ Hz, 1H, C^7 - α -H), 3.81 (s, 3H, 3- NOCH_3), 3.85 (s, 3H, 22- NOCH_3), 7.19 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, C^{22} -H), 9.43 (s, 1H, NOH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 160.6 (6-C), 158.0 (3-C), 155.4 (22-C), 61.2 (22- NOCH_3), 61.0 (3- NOCH_3), 56.5 (14-C), 53.9 (17-C), 50.9 (9-C), 44.4 (13-C), 43.1 (5-C), 43.0 (10-C), 39.4 (12-C), 37.1 (20-C), 36.6 (8-C), 35.2 (2-C), 29.7 (7-C), 29.3 (1-C), 28.2 (16-C), 27.6 (4-C), 24.1 (15-C), 21.3 (11-C), 20.8 (19-C), 18.1 (19-C), 11.8 (18-C); IR (KBr) ν : 3411, 2933, 2868, 1643, 1458, 1384, 1045, 906 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 418.3070, found 418.3058.

3.1.6 22-降-6-氧代豆甾-3, 22-二甲氧基甾(6)的合成

将 100 mg (0.29 mmol) 化合物 **2** 溶于 20 mL 95%乙醇, 然后加入三水乙酸钠 84 mg (0.61 mmol), 加热搅拌溶解, 待溶解后分批缓慢加入苄氧胺盐酸盐 88 mg (0.61 mmol), 约 10 min 内加完, 控制反应温度在 65 $^{\circ}\text{C}$ 左右, TLC 跟踪反应, 1 h 后停止反应. 减压蒸去大部分乙醇, 出现大量白色固体, 然后加入少许蒸馏水, 有白色沉淀生成. 用乙酸乙酯萃取 3 次(20 mL $\times$ 3), 合并有机层, 有机层依次用水洗, 饱和食盐水各洗 1 次, 然后用无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压蒸去溶剂, 得到白色固体. 将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 6 : 1$]得到化合物 **6** 64 mg, 产率 39.8%. m.p. 42~43 $^{\circ}\text{C}$; 化合物 **6** 是由(3*E*,22*E*)-及(3*Z*,22*E*)-异构体组成的混合物, 比例为 1 : 1 (^1H NMR 确定). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.72 (s, 18- CH_3), 0.85 (s, 19- CH_3), 1.14 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 3.26~3.28 (m, 0.5H, C^2 - β -H, *Z*), 3.33~3.31 (m, 0.5H, C^4 - β -H, *E*), 5.07 (s, 2H, 3-N=

OCH₂Ph), 5.08 (d, $J=2.7$ Hz, 2H, 22-N=OCH₂Ph), 7.35 (t, $J=3.0$ Hz, 1H, C²²-H), 7.38~7.28 (m, 10H, 3,22-C₆H₅); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 12.4 (18-C), 18.1 (19-C), 20.7 (21-C), 21.3 (11-C), 21.4 (15-C), 24.0 (16-C), 26.9 (1-C), 27.2 (2-C), 27.4 (4-C), 37.1 (20-C), 37.9 (10-C), 39.1 (8-C), 41.8 (12-C), 43.2 (7-C), 46.6 (13-C), 53.6 (9-C), 53.8 (17-C), 56.5 (5-C, *E*), 56.7 (5-C, *Z*), 58.0 (14-C), 75.3 (3-OCH₂, *Z*-isomer), 75.4 (3-OCH₂, *E*-isomer), 75.5 (22-OCH₂), [127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 137.7, 138.0, 138.1] (3, 22-C₆H₅), 155.8 (22-C), 158.9 (3-C, *Z*), 159.1 (3-C, *E*), 210.0 (6-C). IR (KBr) ν : 3427, 2941, 2864, 2357, 1711, 1629, 1458, 1376, 1082, 1049, 918, 694 cm⁻¹.

3.1.7 22-降-6-羟基豆甾-3,22-二苄氧基脲(7)的合成

室温下将 175 mg (0.32 mmol) 化合物 **6** 溶解于 20 mL 无水甲醇中(加入约 2 mL 二氯甲烷助溶), 待溶解完全后, 20 min 内分批加入 24 mg (0.64 mmol) NaBH₄. TLC 监测反应, 无原料点后即用 1 mol/L HCl 淬灭反应, 减压蒸去大部分甲醇, 用乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机层. 有机层用水、饱和食盐水各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 减压蒸去溶剂, 得到白色固体, 将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=6:1], 得到化合物(3*E*,22*E*)-22-降-6-羟基豆甾-3,22-二苄氧基脲(**7a**) 71 mg, 产率 40.3%. m.p. 118~119 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.75 (s, 18-CH₃), 1.13 (s, 19-CH₃), 1.14 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, 21-CH₃), 2.12 (dd, $J=14.7$, 3.0 Hz, 1H, C₄- β -H), 2.45~2.35 (m, 1H, C₂₀-H), 2.57 (t, $J=14.1$ Hz, 1H, C₄- α -H), 3.26 (dt, $J=15.3$, 3.0 Hz, 1H, C₂- β -H), 3.80~3.87 (m, 1H, C₆-H), 5.07 (s, 2H, 22-NOCH₂), 5.084 (s, 2H, 3-NOCH₂), 7.38~7.28 (m, 10H, C₆H₅ $\times$ 2), 7.38 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, C²²-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 160.8 (3-C), 156.2 (22-C), [138.2, 137.8, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 127.9, 127.9, 127.8, 127.6] (C₆H₅ $\times$ 2), 75.4 (3-OCH₂), 75.2 (22-OCH₂), 71.0 (6-C), 55.9 (14-C), 53.94 (17-C), 53.88 (9-C), 49.0 (5-C), 42.9 (7-C), 39.7 (13-C), 39.6 (10-C), 38.9 (12-C), 37.2 (8-C), 36.1 (20-C), 31.7 (4-C), 30.2 (2-C), 27.6 (16-C), 24.3 (15-C), 21.5 (1-C), 21.0 (11-C), 18.1 (21-C), 14.9 (19-C), 12.4 (18-C). IR (KBr) ν : 3440, 2929, 1629, 1552, 1413, 1017, 698 cm⁻¹; HREIMS calcd for C₃₆H₄₉N₂O₃ [M+H]⁺ 557.3743, found 557.3741.

另外, 分离得到 **7a** 的异构体 22-降-(3*Z*,22*E*)-6-羟基豆甾-3,22-二苄氧基脲(**7b**): 52 mg, 产率 29.6%. m.p. 60~61 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.75 (s, 18-CH₃), 1.11 (s, 19-CH₃), 1.13 (d, $J=6.6$ Hz, 3H,

21-CH₃), 2.44~2.34 (m, 1H, C²⁰-H), 3.05 (dd, $J=15.0$, 3.0 Hz, 1H, C₄- β -H), 3.86~3.80 (m, 1H, C₆-H), 5.06 (s, 2H, 22-NOCH₂), 5.09 (s, 2H, 3-NOCH₂), 7.38~7.29 (m, 10H, 2 $\times$ C₆H₅), 7.37 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, C²²-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 160.8 (3-C), 156.2 (22-C), [138.2, 137.8, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.0, 127.7, 127.6] (C₆H₅), 75.4 (3-NOCH₂), 75.2 (22-NOCH₂), 71.0 (6-C), 55.9 (14-C), 53.94 (17-C), 53.90 (9-C), 47.7 (5-C), 42.9 (7-C), 39.8 (13-C), 39.7 (10-C), 39.6 (12-C), 37.2 (8-C), 36.1 (20-C), 30.2 (4-C), 27.8 (2-C), 27.6 (16-C), 25.5 (1-C), 24.3 (15-C), 20.9 (11-C), 18.1 (21-C), 14.9 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3423, 2361, 2340, 1634, 1560, 1417, 1119, 1037, 1021 cm⁻¹; HREIMS calcd for C₃₆H₄₉N₂O₂ [M+H]⁺ 557.3743, found 557.3753.

3.1.8 3 β -乙酰氧基豆甾-6-酮(9)的合成

100 mg (0.93 mmol) 化合物 **8** 溶于 4 mL 吡啶中, 待溶解完全后, 慢慢滴加 0.4 mL 乙酸酐, 继续搅拌 30 min, 然后将反应物于室温下静置 24 h. 加蒸馏水 15 mL, 用乙酸乙酯萃取(15 mL $\times$ 3), 有机层依次用 1 mol/L 盐酸, 饱和碳酸氢钠溶液, 水各洗 1 次, 最后用饱和食盐水洗至中性, 无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压蒸出溶剂, 得到白色固体, 柱层析分离[流动相: V (乙酸乙酯): V (石油醚)=1:8]得白色固体 **9** 89 mg, 产率 81.2%. m.p. 138~140 °C (lit.^[16]: 146~147 °C); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.69 (s, 3H, 18-CH₃), 0.78 (s, 3H, 19-CH₃), 0.80 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26-CH₃ or 27-CH₃), 0.82 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, 26-CH₃ or 27-CH₃), 0.80 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26-CH₃ or 27-CH₃), 1.03 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21-CH₃), 2.04 (s, 3H, 3-CH₃CO), 2.36~2.25 (m, 2H, 7-CH₂), 4.74~4.63 (m, 1H, C³- α -H), 5.03 (dd, $J=15.3$, 8.4 Hz, 1H, C²²-H), 5.16 (dd, $J=15.3$, 8.4 Hz, 1H, C²³-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 210.4 (6-C), 170.6 (3-COCH₃), 138.0 (22-C), 129.6 (23-C), 72.8 (3-C), 56.8 (14-C), 56.5 (17-C), 55.9 (5-C), 53.8 (9-C), 51.2 (24-C), 46.7 (7-C), 42.9 (13-C), 41.0 (20-C), 40.4 (12-C), 39.3 (10-C), 37.9 (8-C), 36.4 (1-C), 31.9 (25-C), 28.7 (16-C), 26.8 (2-C), 26.1 (28-C), 25.4 (4-C), 24.0 (15-C), 21.5 (11-C), 21.3 (3-CH₃CO), 21.2 (27-C), 21.1 (26-C), 19.0 (21-C), 13.0 (19-C), 12.3 (18-C), 12.2 (29-C); IR (KBr) ν : 2958, 2872, 1740, 1707, 1466, 1384, 1240, 1025, 976 cm⁻¹.

3.1.9 22-降-3 β -乙酰氧基豆甾-6-酮-22-醛(10)的合成

制备方法与化合物 **2** 类似, 以化合物 **9** 为原料, 产率 74.1%. 白色固体, m.p. 154~156 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.73 (s, 3H, 18-CH₃), 0.80 (s, 3H, 19-CH₃),

1.15 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21-CH₃), 2.05 (s, 3H, 3-CH₃CO), 2.37~2.26 (m, 2H, 7-CH₂), 4.74~4.63 (m, 1H, C³- α -H), 9.60 (d, $J=3.0$ Hz, 1H, C²²-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 210.0 (6-C), 204.7 (22-C), 170.6 (3-COCH₃), 72.8 (3-C), 56.5 (14-C), 55.9 (5-C), 53.8 (9-C), 50.9 (17-C), 49.4 (20-C), 46.5 (7-C), 43.5 (13-C), 41.0 (12-C), 39.1 (10-C), 37.8 (8-C), 36.4 (1-C), 26.9 (2-C), 26.8 (4-C), 26.1 (16-C), 24.3 (15-C), 21.4 (3-CH₃CO), 21.3 (11-C), 13.4 (19-C), 13.0 (18-C), 12.4 (21-C); IR (KBr) ν : 2937, 2880, 2831, 1723, 1707, 1446, 1384, 1241, 1070 cm⁻¹.

3.1.10 22-降-3 β -乙酰氧基豆甾-6-酮-22-苄氧基脲(**11**)的合成

制备程序与化合物 **6** 类似, 但是以化合物 **10** 为原料, 化合物 **10** 与苄氧胺盐酸盐的投料摩尔比为 1 : 1, 产率 70.6%. 得到白色固体. m.p. 100~102 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.68 (18-CH₃), 0.764 (19-CH₃), 1.11 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, 21-CH₃), 2.02 (s, 3H, 3-COCH₃), 2.33~2.23 (m, 2H, C⁷-H), 2.42~2.32 (m, 1H, C²⁰-H), 4.72~4.61 (m, 1H, C³- α -H), 5.04 (s, 2H, OCH₂Ph), 7.27 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, C²²-H), 7.35~7.29 (m, 5H, C₆H₅); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 210.1 (6-C), 170.6 (OCOCH₃), 155.8 (22-C), [127.8, 128.1, 128.1, 128.4, 128.4, 137.7] (C₆H₅), 75.4 (22-NOCH₂), 72.8 (3-C), 56.4 (5-C), 53.7 (14-C), 53.7 (17-C), 46.5 (13-C), 43.2 (9-C), 43.2 (7-C), 40.9 (10-C), 39.1 (12-C), 37.8 (8-C), 37.1 (20-C), 36.4 (1-C), 27.4 (2-C), 26.8 (4-C), 26.1 (16-C), 24.0 (15-C), 21.4 (3-CH₃CO), 21.3 (11-C), 18.1 (21-C), 13.0 (19-C), 12.3 (18-C); IR (KBr) ν : 3432, 2925, 2859, 2353, 1634, 1380, 1057, 882, 694, 600 cm⁻¹; HREIMS calcd for C₃₁H₄₄NO₄ [M+H]⁺ 494.3270, found 494.3283.

3.1.11 22-降-3 β -乙酰氧基豆甾-6-羟亚胺基-22-苄氧基脲(**12**)的合成

将 100 mg (0.20 mmol) 化合物 **11** 溶于 20 mL 95% 乙醇, 然后加入三水乙酸钠 27 mg (0.20 mmol), 加热搅拌溶解, 待溶解后, 分批缓慢加入盐酸羟胺 21 mg (0.30 mmol), 约 10 min 内加完, 控制反应温度在 65 °C 左右, TLC 跟踪反应, 3 h 后停止反应, 减压蒸去大部分乙醇, 出现大量白色固体. 然后加入少许蒸馏水, 有白色沉淀生成, 用乙酸乙酯萃取(20 mL×3), 合并有机层, 有机层依次用水洗, 饱和食盐水各洗 1 次, 然后用无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压蒸去溶剂, 得到白色固体. 将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 6 : 1$]得到化合物 **12** 68 mg, 产率 66.0%. m.p. 140~141 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.69 (s, 3H, 18-CH₃), 0.79 (s, 3H, 19-CH₃) 1.12 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21-CH₃),

2.05 (s, 3H, 3-CH₃CO), 2.45~2.33 (m, 1H, C²⁰-H), 3.34 (dd, $J=13.5, 4.5$ Hz, 1H, C⁷- α -H), 4.75~4.65 (m, 1H, C³- α -H), 5.06 (s, 2H, OCH₂), 7.28 (d, $J=5.7$ Hz, 1H, C²²-H), 7.39~7.28 (m, 5H, C₆H₅), 9.07 (s, 1H, NOH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.7 (COCH₃), 159.3 (6-C), 156.1 (22-C), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.7] (C₆H₅), 75.4 (OCH₂), 73.2 (3-C), 56.4 (14-C), 54.2 (17-C), 53.8 (9-C), 49.3 (13-C), 43.1 (5-C), 39.3 (10-C), 38.9 (12-C), 37.1 (4-C), 35.9 (1-C), 35.7 (20-C), 29.6 (8-C), 27.6 (7-C), 27.5 (2-C), 27.1 (16-C), 24.1 (15-C), 21.5 (3-CH₃CO), 21.4 (11-C), 18.1 (21-C), 12.6 (19-C), 12.4 (18-C); HREIMS calcd for C₃₁H₄₅N₂O₄ [M+H]⁺ 509.3379, found 509.3381.

3.1.12 22-降-3 β -羟基豆甾-6-羟亚胺基-22-苄氧基脲(**13**)的合成

将化合物 **12** 100 mg 溶于 20 mL KOH/CH₃OH (1 mol/L) 中(加入约 2 mL 二氯甲烷助溶), 在室温下搅拌反应, TLC 跟踪反应, 30 min 后反应停止. 减压蒸去溶剂得到白色固体, 加入 20 mL 水, 用乙酸乙酯萃取(20 mL×3), 合并有机层并依次用水、饱和食盐水各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 减压蒸去溶剂得到白色固体. 柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$]得到白色固体化合物 **13** 86 mg, 产率 92.9%. m.p. 140~141 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.67 (18-C), 0.77 (19-C), 1.11 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, 21-CH₃), 2.20 (br s, 1H, OH), 2.43~2.32 (m, 1H, C²⁰-H), 3.32 (dd, $J=13.5, 4.2$ Hz, 1H, C⁷- α -H), 3.62~3.55 (m, 1H, C³- α -H), 5.05 (s, 2H, OCH₂), 7.28 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, C²²-H), 7.37~7.28 (m, 5H, C₆H₅), 9.39 (br s, 1H, NOH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 159.6 (6-C), 156.1 (22-C), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.7] (C₆H₅), 75.4 (OCH₂), 71.1 (3-C), 56.5 (14-C), 54.2 (17-C), 53.8 (9-C), 49.5 (13-C), 43.1 (5-C), 39.4 (10-C), 38.9 (12-C), 37.2 (4-C), 36.2 (1-C), 35.6 (20-C), 31.5 (8-C), 30.7 (2-C), 29.6 (7-C), 27.6 (16-C), 24.2 (15-C), 21.4 (11-C), 18.1 (21-C), 12.6 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3407, 2937, 2868, 1650, 1454, 1376, 1254, 1200, 1049, 972, 910 cm⁻¹; ESI-MS m/z : 467.3 (M+H)⁺. HREIMS calcd for C₂₉H₄₃N₂O₃ [M+H]⁺ 467.3274, found 467.3271.

3.1.13 22-降-3 β -乙酰氧基豆甾-22-苄氧基脲基-6-缩胺硫脲(**14**)的合成

100 mg (0.20 mmol) 化合物 **11** 置于 100 mL 反应瓶中, 加入 30 mL 无水乙醇, 滴入 2~3 滴冰醋酸控制溶液 pH=3~5, 在 80 °C 搅拌溶解, 加入 36 mg (0.40 mmol) 硫代氨基脲, TLC 板跟踪反应. 约 2 h 后没有原料

点停止反应, 减压蒸去大部分乙醇, 得到淡黄色固体. 加入 20 mL 水, 用乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机层并依次用水、饱和食盐水各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 减压蒸去溶剂得到淡黄色固体. 柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=80:1$]得到化合物 **14** 81 mg, 产率 70.6%. m.p. 107~108 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.64 (s, 3H, 18- CH_3), 0.68 (s, 3H, 19- CH_3), 1.07 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.03 (s, 3H, 3- CH_3CO), 2.69 (br d, $J=10.5$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H}$), 4.72~4.61 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 5.01 (s, 2H, OCH_2), 6.91 (d, $J=3.9$ Hz, 1H, NH_2), 7.18 (d, $J=3.9$ Hz, 1H, NH_2), 7.25 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, $\text{C}^{22}\text{-H}$), 7.33~7.25 (m, 5H, C_6H_5), 9.07 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.7 (C=S), 170.7 (COCH_3), 155.8 (6-C), 155.4 (22-C), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.7] (C_6H_5), 75.4 (OCH_2), 73.3 (3-C), 56.1 (14-C), 54.0 (17-C), 53.7 (9-C), 50.8 (5-C), 43.2 (13-C), 39.5 (12-C), 39.1 (10-C), 37.0 (4-C), 36.3 (1-C), 36.3 (8-C), 32.0 (20-C), 27.9 (7-C), 27.5 (2-C), 27.0 (16-C), 24.2 (15-C), 21.5 (3- CH_3CO), 21.3 (11-C), 18.1 (21-C), 12.6 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3419, 2941, 2864, 1723, 1597, 1495, 1372, 1245, 1086, 1025 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 567.3369, found 567.3384.

3.1.14 22-降-3 β -羟基-22-苄氧肟基-豆甾-6-缩胺硫脲(**15**)的合成

制备方法与化合物 **13** 相同, 得到淡黄色固体 **15**, 产率 74.4%. m.p. 137~138 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.66 (s, 3H, 18- CH_3), 0.68 (s, 3H, 19- CH_3), 1.09 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.40~2.32 (m, 1H, $\text{C}^{20}\text{-H}$), 2.75~2.61 (m, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 3.64~3.57 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 5.03 (s, 2H, OCH_2), 7.02 (br s, 1H, NH_2), 7.423 (br s, 1H, NH_2), 7.26 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, $\text{C}^{22}\text{-H}$), 7.35~7.28 (m, 5H, C_6H_5), 9.05 (br s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 178.4 (C=S), 155.9 (6-C), 155.8 (22-C), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.6] (C_6H_5), 75.4 (OCH_2), 70.8 (3-C), 56.2 (14-C), 54.1 (17-C), 53.7 (9-C), 51.0 (5-C), 43.2 (12-C), 39.5 (13-C), 39.4 (4-C), 39.2 (10-C), 37.1 (1-C), 36.4 (8-C), 31.9 (20-C), 31.6 (7-C), 30.8 (2-C), 27.6 (16-C), 24.3 (15-C), 21.4 (11-C), 18.1 (21-C), 12.7 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3415, 2929, 2847, 1593, 1495, 1376, 1266, 1241, 1151, 1082, 1041, 853, 735, 694 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 525.3263, found 525.3265.

3.1.15 22-降-3 β -乙酰氧基-6-甲氧肟基-豆甾-22-苄氧基肟(**16**)的合成

将 100 mg (0.20 mmol) 化合物 **11** 溶于 30 mL 95%乙

醇, 然后加入三水乙酸钠 27 mg (0.20 mmol), 加热搅拌溶解, 待溶解后分批缓慢加入甲氧基胺盐酸盐 33 mg (0.40 mmol), 约 10 min 内加完, 控制反应温度在 65 °C 左右, TLC 跟踪反应, 2 h 后停止反应, 减压抽除大部分乙醇, 出现白色固体, 加入少许蒸馏水, 有白色沉淀生成, 用乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机层, 有机层依次用水、饱和食盐水各洗 1 次, 用无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压抽除溶剂, 得到白色固体. 将此固体采用柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=20:1$]得到化合物 **16** 69 mg, 产率 64.9%. m.p. 47~48 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.70 (s, 3H, 18- CH_3), 0.78 (s, 3H, 19- CH_3), 1.11 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.04 (s, 3H, 3- COCH_3), 2.40~2.32 (m, 1H, $\text{C}^{20}\text{-H}$), 3.21 (dd, $J=13.5$, 4.5 Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.72~4.63 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 5.05 (s, 2H, OCH_2), 7.18 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, $\text{C}^{22}\text{-H}$), 7.36~7.25 (m, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.7 (COCH_3), 158.3 (6-C), 155.3 (22), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.7] (C_6H_5), 75.4 (OCH_2), 73.5 (3-C), 61.2 (OCH_3), 56.4 (14-C), 54.2 (17-C), 53.8 (9-C), 49.2 (13-C), 43.1 (5-C), 39.4 (10-C), 38.7 (12-C), 37.1 (4-C), 36.0 (1-C), 35.6 (20-C), 30.1 (8-C), 27.6 (7-C), 27.0 (2-C), 24.1 (16-C), 21.5 (15-C), 21.4 (3- CH_3CO), 21.3 (11-C), 18.1 (21-C), 12.5 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3444, 3411, 2937, 1732, 1638, 1617, 1450, 1384, 1237, 1053, 600 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 523.3536, found 523.3549.

3.1.16 22-降-3 β -羟基-6-甲氧肟基-豆甾-22-苄氧基肟(**17**)的合成

制备方法与化合物 **13** 相同. 得到白色固体 **17**, 产率 75.4%. m.p. 69~70 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.69 (s, 3H, 18- CH_3), 0.75 (s, 3H, 19- CH_3), 1.11 (s, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.40~2.30 (m, 1H, $\text{C}^{20}\text{-H}$), 3.21 (dd, $J=13.8$, 4.5 Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.61~3.51 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 5.04 (s, 2H, OCH_2), 7.18 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, $\text{C}^{22}\text{-H}$), 7.36~7.25 (m, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 158.8 (6-C), 155.4 (22-C), [127.8, 128.2, 128.2, 128.4, 128.4, 137.7] (C_6H_5), 75.4 (OCH_2), 71.1 (3-C), 61.2 (OCH_3), 56.5 (14-C), 54.3 (17-C), 53.7 (9-C), 49.4 (13-C), 43.1 (5-C), 39.4 (10-C), 38.7 (12-C), 37.1 (4-C), 36.2 (1-C), 35.7 (20-C), 31.6 (8-C), 30.8 (2-C), 30.2 (7-C), 27.7 (16-C), 24.1 (15-C), 21.4 (11-C), 18.1 (21-C), 12.6 (19-C), 12.4 (18-C); IR (KBr) ν : 3432, 2925, 2859, 2353, 1634, 1466, 1380, 1057, 882, 694, 600 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 481.3430, found 481.3431.

3.1.17 3 β -羟基胆甾-6-甲氧基肟(**19**)的合成

100 mg (0.25 mmol)化合物 **18** 溶于 20 mL 95%乙醇中, 溶解后加入 34 mg (0.25 mmol)三水乙酸钠, 保持反应温度在 65 °C, 搅拌 10 min 后加入 26 mg (0.3 mmol)甲氧胺盐酸盐. TLC 监测[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=2:1$]反应, 继续反应 6 h, 无原料点后停止反应. 减压蒸出大部分溶剂, 加入适量水, 用乙酸乙酯萃取, 有机相分别用饱和 NaHCO_3 溶液、水、饱和 NaCl 溶液各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 过滤, 减压蒸去溶剂, 粗产品经柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=6:1$]得到 80 mg 白色固体产物 **19**, 产率 75%. m.p. 164~165 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.65 (s, 3H, 18- CH_3), 0.75 (s, 3H, 19- CH_3), 0.86 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.87 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.91 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 3.21 (dd, $J=13.8, 4.5$ Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.62~3.52 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.81 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 159.0 (6-C), 71.2 (3-C), 61.1 (OCH_3), 56.6 (14-C), 56.2 (17-C), 54.3 (9-C), 49.4 (13-C), 42.9 (5-C), 39.7 (10-C), 39.5 (24-C), 38.7 (4-C), 36.2 (12-C), 36.1 (22-C), 35.8 (20-C), 35.7 (1-C), 31.7 (8-C), 30.9 (2-C), 30.2 (16-C), 28.2 (7-C), 28.0 (25-C), 24.1 (23-C), 23.8 (15-C), 22.8 (26-C or 27-C), 22.6 (26-C or 27-C), 21.4 (11-C), 18.6 (21-C), 12.1 (19-C), 12.5 (18-C); IR (KBr) ν : 3362, 2937, 2864, 1458, 1380, 1053, 976, 865 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 432.3842, found 432.3818.

3.1.18 3 β -羟基胆甾-6-苄氧基肟(**20**)的合成

制备方法与化合物 **19** 类似, 以苄氧胺盐酸盐代替甲氧胺盐酸盐, 得到白色固体产物 **20**, 产率 59%. m.p. 133~135 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.66 (s, 6H, 18- CH_3 and 19- CH_3), 0.885 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.890 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.92 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 3.29 (dd, $J=13.3, 4.5$ Hz, 1H, $\text{C}^7\text{-}\alpha\text{-H}$), 3.61~3.51 (m, 1H, $\text{C}^3\text{-}\alpha\text{-H}$), 5.08 (s, 2H, OCH_2), 7.38~7.26 (m, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 160.0 (6-C), [138.8, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.5] (C_6H_5), 75.2 (OCH_2Ph), 71.3 (3-C), 56.6 (14-C), 56.2 (17-C), 54.3 (9-C), 49.6 (5-C), 42.9 (24-C), 39.7 (13-C), 39.5 (4-C), 38.8 (12-C), 36.3 (10-C), 36.1 (22-C), 35.8 (20-C), 35.7 (1-C), 31.6 (8-C), 30.7 (16-C), 30.9 (2-C), 28.2 (7-C), 28.0 (25-C), 24.2 (19-C), 23.8 (15-C), 22.8 (26- or 27-C), 22.6 (26- or 27-C), 21.4 (23-C), 18.7 (11-C), 12.4 (21-C), 12.1 (18-C); IR (KBr) ν : 3370, 2945, 1462, 1372, 1049, 856, 739, 702 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 508.4155, found 508.4153.

3.1.19 胆甾-6-酮-3-甲氧基肟(**22**)的合成

100 mg (0.25 mmol)胆甾-3,6-二酮(**21**)溶于 20 mL 95%乙醇, 溶解完全后加入 34 mg (0.25 mmol)三水乙酸钠, 保持反应温度在 65 °C; 搅拌 10 min 后分批缓慢加入 26 mg (0.3 mmol)甲氧胺盐酸盐. TLC 监测[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=2:1$], 无原料点后停止反应. 减压蒸出大部分溶剂, 加入适量水, 先用乙酸乙酯萃取, 有机相再分别用饱和碳酸氢钠溶液、水、饱和食盐水各洗 1 次, 无水硫酸钠干燥. 减压蒸去溶剂, 粗产品经柱层析分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$]得到 75 mg 白色固体产物 **22**. 产率 70%. m.p. 122~124 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.71 (s, 3H, 18- CH_3), 0.876 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.880 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.92 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 1.12 (s, 3H, 19- CH_3), 2.01 (dt, $J=12.6, 3.2$ Hz, 1H, $\text{C}^8\text{-H}$), 2.09 (br d, $J=14.4$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H}$), 2.56 (t, $J=13.8$ Hz, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 3.15 (dd, $J=15.3, 5.1$ Hz, 1H, $\text{C}^2\text{-}\beta\text{-H}$), 3.83 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 210.2 (6-C), 158.5 (3-C), 61.1 (OCH_3), 57.9 (5-C), 56.8 (14-C), 56.2 (17-C), 56.1 (9-C), 46.7 (13-C), 42.9 (12-C), 39.5 (10-C), 39.0 (24-C), 38.9 (22-C), 36.1 (20-C), 35.7 (8-C), 31.7 (7-C), 31.6 (2-C), 30.2 (16-C), 28.1 (1-C), 28.0 (25-C), 24.8 (4-C), 23.9 (15-C), 23.8 (23-C), 22.8 (27-C), 21.6 (26-C), 21.1 (11-C), 18.7 (21-C), 12.4 (19-C), 12.0 (18-C); IR (KBr) ν : 2937, 1703, 1458, 1380, 1057 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 430.3685, found 430.3688.

3.1.20 6-羟基胆甾-3-甲氧基肟(**23**)的合成

制备方法与化合物 **4** 类似, 以化合物 **22** 为原料, 得到白色固体 **23**, 产率 65%. m.p. 163~165 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.71 (s, 3H, 18- CH_3), 0.876 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.880 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.92 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 21- CH_3), 1.12 (s, 3H, 19- CH_3), 3.14 (dd, $J=15.3, 5.1$ Hz, 1H, $\text{C}^2\text{-}\beta\text{-H}$), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (m, 1H, $\text{C}^6\text{-H}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 160.3 (3-C), 71.2 (6-C), 61.0 (OCH_3), 56.3 (14-C), 56.1 (17-C), 56.1 (9-C), 49.1 (5-C), 42.7 (13-C), 39.8 (10-C), 39.5 (12-C), 39.0 (24-C), 38.9 (22-C), 36.1 (20-C), 31.7 (2-C), 31.7 (7-C), 30.2 (8-C), 30.2 (16-C), 28.0 (1-C), 28.0 (25-C), 24.3 (4-C), 24.2 (23-C), 23.9 (15-C), 22.8 (27-C), 22.6 (26-C), 21.1 (11-C), 18.7 (21-C), 14.9 (19-C), 12.1 (18-C); IR (KBr) ν : 3387, 2921, 2855, 1642, 1462, 1380, 1053 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 432.3842, found 432.3852.

3.1.21 胆甾-3,6-二酮-3-苄氧基酯(**24**)的合成

合成方法与化合物 **22** 相同, 采用苄氧胺盐酸盐代替甲氧胺盐酸盐。得到白色固体产物 **24**, 产率 61%. m.p. 115~117 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.69 (s, 3H, 18- CH_3), 0.85 (s, 3H, 19- CH_3), 0.884 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.888 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.93 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, 21- CH_3), 2.38~2.21 (m, 4H, $\text{C}^4\text{-H}$ and $\text{C}^7\text{-H}$), 3.28 (dd, $J=13.8$, 3.6 Hz, 1H, $\text{C}^2\text{-}\beta\text{-H}$), 5.06 (s, 2H, OCH_2), 7.38~7.30 (m, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 210.4 (6-C), 159.2 (3-C), [127.6, 128.0, 128.0, 128.3, 128.3, 138.0] (C_6H_5), 75.3 (OCH_2), 56.7 (5-C), 56.1 (14-C), 53.7 (17-C), 53.6 (9-C), 46.7 (13-C), 43.0 (7-C), 41.9 (10-C), 41.8 (12-C), 39.5 (24-C), 38.0 (22-C), 37.1 (20-C), 36.1 (8-C), 35.7 (4-C), 28.0 (25-C), 28.0 (16-C), 27.3 (2-C), 24.0 (1-C), 23.8 (15-C), 22.8 (26-C), 22.6 (27-C), 21.5 (23-C), 20.7 (11-C), 18.7 (21-C), 12.5 (19-C), 12.0 (18-C); IR (KBr) ν : 3415, 1703, 1466, 1386, 1237, 1041, 914 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 506.3998, found 506.4009.

3.1.22 6-羟基胆甾-3-苄氧基酯(**25**)的合成

制备方法与化合物 **4** 类似, 以化合物 **24** 为原料, 得到白色固体 **25**, 产率 65%. m.p. 146~148 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.72 (s, 3H, 18- CH_3), 0.887 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.891 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, 26- CH_3 or 27- CH_3), 0.93 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, 21- CH_3), 1.12 (s, 3H, 19- CH_3), 2.02 (dt, $J=12.6$, 3.2 Hz, 1H, $\text{C}^8\text{-H}$), 2.12 (br d, $J=14.7$ Hz, 1H, $\text{C}^4\text{-H}$), 2.57 (t, $J=13.8$ Hz, 1H, $\text{C}^5\text{-H}$), 3.25 (dd, $J=15.3$, 4.8 Hz, 1H, $\text{C}^2\text{-}\beta\text{-H}$), 3.86~3.80 (m, 1H, $\text{C}^6\text{-H}$), 5.08 (s, 2H, OCH_2), 7.39~7.29 (m, 5H, C_6H_5); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 160.9 (3-C), [127.6, 127.9, 127.9, 128.3, 128.3, 138.3] (C_6H_5), 75.2 (OCH_2), 71.1 (6-C), 56.3 (14-C), 56.1 (17-C), 53.9 (9-C), 49.1 (5-C), 42.7 (13-C), 39.9 (10-C), 39.8 (7-C), 39.5 (12-C), 39.0 (24-C), 36.2 (22-C), 36.1 (20-C), 35.8 (8-C), 31.7 (4-C), 30.2 (16-C), 28.2 (25-C), 28.0 (2-C), 24.2 (1-C), 23.8 (15-C), 22.8 (26-C), 22.6 (27-C), 21.5 (23-C), 21.1 (11-C), 18.7 (21-C), 14.9 (19-C), 12.1 (18-C); IR (KBr) ν : 3370, 2929, 2859, 1638, 1454, 1364, 1033 cm^{-1} ; HREIMS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{NO}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 508.4155, found 508.4144.

3.2 体外抗肿瘤活性研究

使用顺铂(Cisplatin)作为阳性对照, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测试所合成的目标化合物对人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(Bel-7404)和鼻咽癌细胞(CNE-2)的体外生长增殖抑制活性。所有细胞分别采用 RPMI-1640 培养液(加入 10% 牛血清和 0.1 g/L 青霉素

G+0.1 g/L 硫酸链霉素)在 37 °C 于 5% CO_2 的潮湿气氛中培养。

实验步骤如下: 步骤 1: 首先将有机化合物溶解在 DMSO 中, 配制成 10 mg/mL 的 DMSO 溶液保存在冰箱; 步骤 2: 将对数生长期的肿瘤细胞分别以约 $(3\sim4)\times 10^4$ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔接种 200 μL , 置于 CO_2 培养箱中培养 24 h; 步骤 3: 按预设的浓度梯度(最高浓度设为 80 $\mu\text{g/mL}$)加入待测样品, 每一浓度梯度设 3 个平行孔, 同时分别采用顺铂作为阳性对照和等量的 DMSO 作为阴性对照; 步骤 4: 在二氧化碳培养箱中于 37 °C 培养 72 h 后, 每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL), 然后在二氧化碳培养箱中继续温育 4 h; 步骤 5: 抽取上清液, 然后加入 200 μL 的 DMSO, 在振荡器上震荡 10 min 溶解沉淀, 随后用酶标仪在 490 nm 波长测定 OD 值。通过下式求出样品一定浓度下样品对细胞的抑制率:

$$\text{抑制率} = [(\text{对照 OD} - \text{空白 OD}) - (\text{给药 OD} - \text{空白 OD})] / (\text{对照 OD} - \text{空白 OD}) \times 100\%$$

然后以抑制率对药物浓度作图, 求出每个样品的 IC_{50} 值。如果化合物在最高浓度没有抑制作用, 一般测定 1 次, 其它的每个样品平行测定 3 次, 计算平均值, 偏差大的需要进一步测定。

References

- [1] Gobbi, M.; Armaroli, S.; Banfi, L.; Benicchio, A.; Carzana, G.; Fedrizzi, G.; Ferrari, P.; Giacalone, G.; Giubileo, M.; Marazzi, G.; Micheletti, R.; Moro, B.; Pozzi, M.; Scotti, P. E.; Torri, M.; Cerri, A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4601.
- [2] Cushman, M.; He, H.-M.; Katzenellenbogen, J. A.; Varma, R. K.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Ram, S.; Sachdeva, Y. P. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2323.
- [3] Huang, Y.-M.; Cui, J.-G.; Zhong, Z.-G.; Gan, C.-F.; Zhang, W.-Y.; Song, H.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3641.
- [4] Shi, J.-F.; Xu, F.; Liao, Q.-J. *J. China Pharm. Univ.* **1987**, *18*, 169 (in Chinese).
(施菊芳, 徐芳, 廖清江, 中国药科大学学报, **1987**, *18*, 169.)
- [5] Khana, S. A.; Asiri, A. M.; Saleem, K. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 7.
- [6] Fan, L.; Cui, J.-G.; Wei, Y.-L.; Huang, Y.-M. *Mod. Agrochem.* **2008**, *7*, 6 (in Chinese).
(范磊, 崔建国, 韦英亮, 黄燕敏, 现代农药, **2008**, *7*, 6.)
- [7] Jindal, D. P.; Chattopadhyaya, R.; Guleria, S.; Gupta, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 1025.
- [8] Lee, J.; Zylka, M. J.; Anderson, D. J.; Burdette, J. E.; Woodruff, T. K.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13164.
- [9] Khan, S. A.; Asiri, A. M.; Saleem, K. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 7.
- [10] Wu, X.-D.; Liu, D.-Z.; Zhou, X.-Q.; Yang, X.-W.; Zhu, K.-M. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 1487 (in Chinese).
(吴学丹, 刘东志, 周雪琴, 杨雄文, 朱孔明, 化学学报, **2009**, *67*, 1487.)
- [11] Cerny, I.; Pouzar, V.; Hill, M.; Havlikova, H.; Hampl, R. *Steroids* **2006**, *71*, 120.
- [12] Morris, K. D. W.; Amin, J. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 56.

- [13] Cui, J.-G.; Huang, L.-L.; Fan, L.; Zhou, A.-M. *Steroids* **2008**, *73*, 252.
- [14] Cui, J.-G.; Fan, L.; Huang, L.-L.; Liu, H.-L.; Zhou, A.-M. *Steroids* **2009**, *74*, 62.
- [15] Cui, J.-G.; Fan, L.; Huang, Y.-M.; Xin, Y.; Zhou, A.-M. *Steroids* **2009**, *74*, 989.
- [16] Takatsuto, S.; Ikekawa, S. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 439.

(Li, L.; Lu, Z.)