

薯蓣皂苷元抗肿瘤衍生物的合成及其生物活性的研究

罗卓玛^a 胡越高^a 王璐红^b 尹祥健^c
马晓东^b 杨鸿均^{*,a} 赵志刚^a

(^a西南民族大学化学与环境保护工程学院 成都 610041)

(^b大连医科大学药学院 大连 116044)

(^c四川川大华西药业股份有限公司 成都 610014)

摘要 以薯蓣皂苷元为先导物, 设计并合成了 9 个新的薯蓣皂苷元含氮衍生物, 其结构经过 ¹H NMR, ¹³C NMR, IR 和 HRMS 鉴定. 所有衍生物采用噻唑蓝(MTT)法进行抗肿瘤活性(A549, A431, H1975, HCT-116, Aspc-1, Ramos)的测定以及细胞毒性(HBE, LO-2)的研究. 研究表明, 大部分薯蓣皂苷元衍生物具有显著的抗肿瘤活性和低细胞毒性.

关键词 薯蓣皂苷元; 衍生物; 抗肿瘤活性; 酰胺

Study on the Synthesis and Bioactivity of Diosgenin Antitumor Derivatives

Luo, Zhuoma^a Hu, Yuegao^a Wang, Luhong^b Yin, Xiangjian^c
Ma, Xiaodong^b Yang, Hongjun^{*,a} Zhao, Zhigang^a

(^a College of Chemistry and Environmental Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041)

(^b College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044)

(^c Sichuan Chuanda Huaxi Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610014)

Abstract Nine novel diosgenin derivatives were designed and synthesized by using diosgenin as a precursor. Their structures were identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR and HRMS. Antitumor activity (A549, A431, H1975, HCT-116, Aspc-1, Ramos) and cytotoxicity (HBE, LO-2) were measured for all derivatives using thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT). The results show that most diosgenin derivatives have significant anti-tumor activity and low cytotoxicity.

Keywords diosgenin; derivative; antitumor activity; amide

薯蓣皂苷元(图 1)是从薯蓣科植物盾叶薯、穿龙薯蓣等根茎中分离出来的一种甾体类化合物^[1], 其化学名称为 Δ^5 -异螺旋甾烯-3 β -醇, 是合成甾体激素类药物和甾体避孕药的重要原料^[2], 具有降血脂、抗血栓、抗肿瘤等药理活性^[3-12]. 但是薯蓣皂苷元的药物脂溶性大, 口服生物利用度很低, 抗肿瘤活性较弱, 毒副作用较大, 这使得薯蓣皂苷元在医药上的应用受到限制. 近年来, 多个课题组对薯蓣皂苷元的 A 环 C-3 位羟基和 F 环 C-26 进行结构修饰和改造, 当引入亲水基团(如含氮基团、酰胺基团、盐类基团、糖类基团等)^[6,13-23], 水溶性增加,

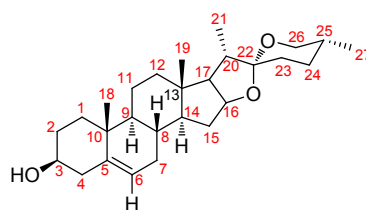


图 1 薯蓣皂苷元的结构

Figure 1 Structure of cyclovirobuxine

生物活性明显提高; 引入亲酯类的基团(如 *L*-苯丙氨酸、

* Corresponding author. E-mail: yanghj@swun.cn

Received November 8, 2017; revised January 5, 2018; published online January 18, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21602083), the Southwest University for Nationalities Graduate Student Innovative Project (No. CX2016SZ045), and the Sichuan Provincial Department of Education Research Project (No. 15ZB0487).

国家自然科学基金(No. 21602083)、西南民族大学研究生创新型科研(No. CX2016SZ045)、四川省教育厅研究(No. 15ZB0487)资助项目.

L-赖氨酸等)^[13,15-18], 水溶性降低, 生物活性较低. 实验表明, 薯蓣皂苷元的水溶性增加能提高其生物活性.

受到以上工作的启发, 我们设想对薯蓣皂苷元 C-3 位酰胺化再引入含氮基团, 通过提高水溶性来改善生物活性. 而且胺类衍生物结构具有独特的生物活性, 可以延长药物在体内的作用时间, 降低毒副作用, 提高药物的生物利用度^[24-31], 将薯蓣皂苷元 A 环 3 位改造成酰胺含氮类结构的化合物, 同类衍生物的合成鲜有报道, 因此我们设计了 C-3 位酰胺化后引入含氮基团.

本工作以薯蓣皂苷元为原料, 将 C-3 位羟基叠氮化, 然后使叠氮基还原为氨基得到化合物 **3**^[22], 再以三乙胺作碱, 与氯乙酰氯反应得到 C-3 位酰胺类化合物 **4**^[32], 最后化合物 **4** 再与含氮化合物反应, 得到一系列酰胺类含氮衍生物 **5**. 对目标化合物 **5** 进行药理活性研究, 考察不同衍生物的抗肿瘤活性.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物 5 的设计合成

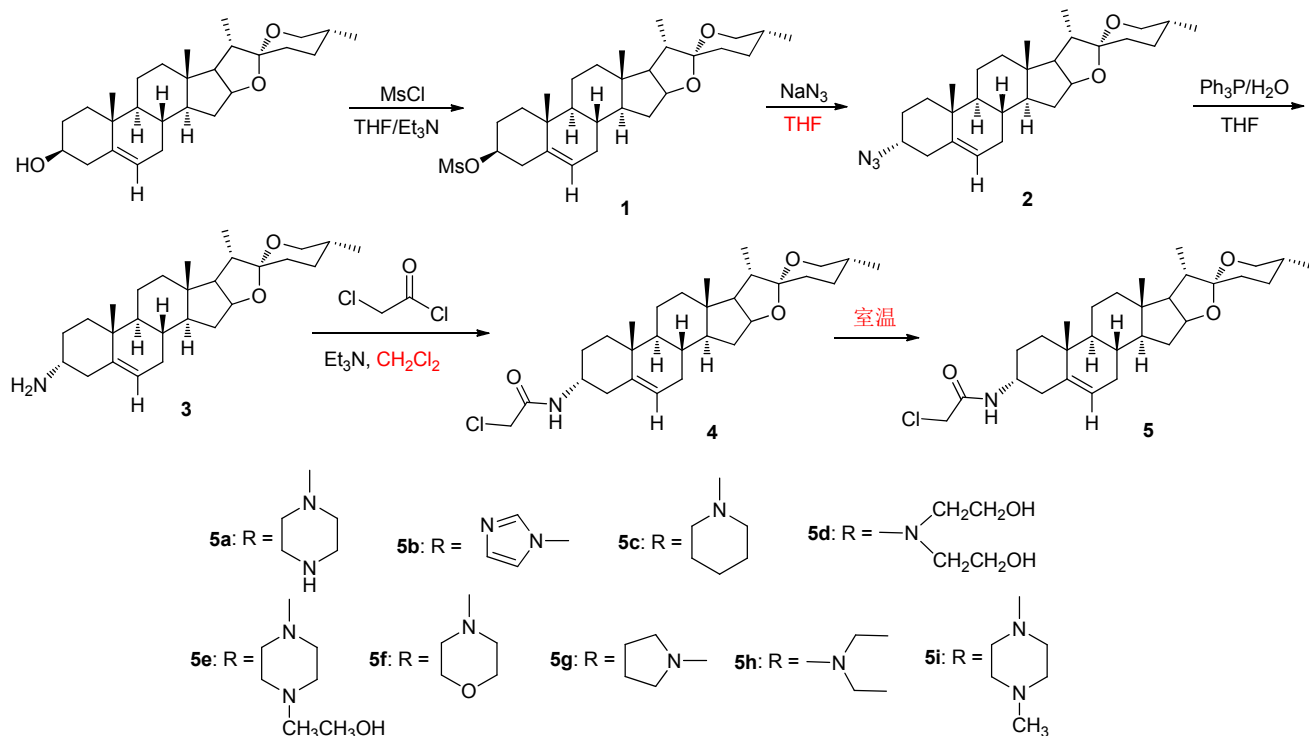
薯蓣皂苷元结构中存在不同的活性基团, 首先将 C-3 位羟基转变为酰胺基团, 再与含氮类化合物反应生成目标化合物 **5a~5i** (Scheme 1). 在这些衍生物合成中, 为了考察不同含氮化合物的药理活性, 本工作选择了不同结构特征的胺类化合物, 如含氮杂环类、含氮直链类.

1.2 目标化合物 5 的合成条件研究

在衍生物 **5** 的合成中, 对溶剂进行了筛选. 当以甲苯作溶剂时, 由于原料溶解性差, 原料无法反应完全; 当二氯甲烷、丙酮作溶剂时, 原料溶解性提高, 原料反应完全且产率显著提高. 本工作不仅考察了溶剂对反应的影响, 而且也考察缚酸剂对反应的影响. 反应物有机胺本身为碱, 因此在大部分衍生物的合成中, 不加碱的条件下就可完全反应, 但是在 **5b**、**5g** 的合成中, 不加碱的条件下, 反应不完全且副产物较多. 其原因可能是, 咪唑、四氢吡咯活性较差, 加入碱后可能会提高亲核试剂的活性. 当以丙酮作溶剂, 三乙胺为缚酸剂时, 副产物减少且原料反应完全, 产率提高到 86%.

1.3 目标化合物 5 的结构表征

薯蓣皂苷元含氮衍生物的 IR 谱图中, N—H 的伸缩振动峰在 3354~3553 cm^{-1} 左右, 酰胺结构的 C=O 的伸缩振动峰在 1651~1688 cm^{-1} . 在其 ^1H NMR 谱图中, 薯蓣皂苷元的特征峰分别是 δ 5.41~5.38 (H-6), 4.41 (H-16), 4.12 (H-3), 2.89~4.61 (CH_2 -H) 和 3.46~3.35 (H-26); 含氮衍生物中, δ 7.50, 7.14, 6.91 处为咪唑环上的质子峰, 吗啉环的质子峰在 δ 3.69 和 2.5 左右, 羟乙基哌嗪环的质子峰在 δ 3.04 左右, 哌嗪环的质子峰在 δ 2.97 左右, 四氢吡咯环的质子峰在 δ 3.13 和 2.5 左右, 二乙醇胺的质子峰在 δ 3.63 和 2.74 左右, 二乙胺的质子峰



图式 1 目标化合物 **5** 的合成
Scheme 1 Synthesis of compounds **5**

在 δ 2.50 左右. 在 HRMS 谱图中, 目标产物的 HRMS $[M+H]^+$ 实测值和理论计算值一致, 进一步证实了目标化合物的结构.

1.4 药理实验

采用噻唑蓝(MTT)法考察了所有衍生物对 A549(人肺癌细胞)、A431(人肺癌细胞)、H1975(人肺癌细胞)、HCT-116(人结肠癌细胞)、Aspc-1(人胰腺癌细胞)和 Ramos(人 B 淋巴瘤细胞)的抗肿瘤活性以及对 HBE(人支气管上皮细胞)、LO-2(正常肝细胞)的细胞毒性, 测定结果如表 1 所示.

薯蓣皂苷元含氮衍生物 IC_{50} 值显示, 大部分衍生物比薯蓣皂苷元具有高的肿瘤抑制活性和低的细胞毒性. 尤其是含有哌嗪环的衍生物 **5a**、**5e** 对大部分细胞抗肿瘤活性显著, 仅对 A431、Ramos 细胞抑制活性较差. 此外, 除衍生物 **5a** ($IC_{50}=5.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**5b** ($IC_{50}=10.91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**5d** ($IC_{50}=13.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)外, 其余衍生物对 HBE 细胞均显低的细胞毒性, 对 LO-2 细胞, 该系列衍生物的细胞毒性普遍较高. 中间体 **4** 和衍生物 **5** 对肺癌细胞 A549, H1975, A431 表现出良好的抑制活性, 对肺癌细胞 A431, 抑制活性较差, 其中化合物 **4**、**5a** 和 **5e**, 对 A549, H1975 和三种肺癌细胞都具有显著的抗肿瘤活性. 对于 HCT-116(人结肠癌细胞)、Aspc-1(人胰腺癌细胞), 化合物 **4** 和衍生物 **5** 有较好的生物活性, 对

Ramos(人 B 淋巴瘤细胞), 化合物 **5a**、**5c**、**5e**、**5i** 及 **4** 抗肿瘤活性较高, 其余衍生物抗肿瘤活性较差.

鉴于衍生物 **5e** 对大部分细胞有较好的抑制活性和较低的生物毒性, 我们对衍生物 **5e** 进行了酶活性的测试. EGFR 酶(表皮生长因子受体)广泛分布于哺乳动物上皮细胞、成纤维细胞、胶质细胞、角质细胞等细胞表面, EGFR 与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关. 因此, 我们选用 EGFR 考察 **5e** 的活性, 首先考察不同浓度 50, 100, 200, 500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下细胞的存活率, 计算得 IC_{50} 值为 $332.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 实验结果进一步体现了 **5e** 良好的生物活性.

1.5 水溶性实验

用紫外分光光度法测定薯蓣皂苷元及其衍生物在水中的溶解性^[33,34], 在紫外可见分光光度计上于 200~900 nm 范围内扫描, 在 271 nm 处有特征吸收峰, 确定检测波长为 271 nm, 测定结果如表 2 所示.

薯蓣皂苷元衍生物 **5a**~**5i** 及中间体 **4** 的水溶性相对于薯蓣皂苷元在水中的溶解度分别比薯蓣皂苷元增加了 1.5~2.5 倍不等, 其中 **5a**, **5d**, **5e** 溶解性较好, 为薯蓣皂苷元的 2.2 倍以上, 生物活性也相对较好($IC_{50}=3.66\sim12.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); **5c**、**5i** 溶解性一般, 为薯蓣皂苷元的 1.7 倍以上, 生物活性部分较好($IC_{50}=6.82\sim29.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); **4**, **5b**, **5f**, **5g**, **5h** 水溶性较差, 生物活性大部

表 1 薯蓣皂苷元衍生物的抗肿瘤活性及细胞毒性 [$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]
Table 1 Antitumor activity and cytotoxicity [$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$] of diosgenin derivatives

Compound	Antitumor activity						Cytotoxicity	
	A549	A431	H1975	HCT-116	Aspc-1	Ramos	HBE	LO-2
5a	5.13	4.12	6.66	5.83	7.73	10.97	5.72	5.62
5b	2.24	8.87	22.57	8.57	18.71	>40	10.91	11.95
5c	28.21	8.77	57.88	10.49	15.06	29.60	51.85	11.86
5d	5.00	8.24	41.56	11.15	23.53	>40	13.50	20.73
5e	3.36	2.47	8.16	6.03	6.73	12.01	63.07	4.15
5f	12.05	33.72	74.03	31.58	29.66	>40	85.49	>40
5g	23.50	19.44	46.97	18.13	29.57	>40	55.74	22.63
5h	4.50	18.77	41.83	5.60	29.06	>40	>80	26.18
5i	12.22	6.82	17.10	9.17	13.55	19.87	55.38	8.74
4	2.89	3.19	<5	9.34	13.37	3.56	22.91	4.25
阿霉素	0.78	<2.5	<5	>12.5	<5	<2.5	<5	7.88
薯蓣皂苷元	71.23	4.74	50.59	31.41	63.11	>40	45.56	>40

表 2 薯蓣皂苷元及薯蓣皂苷元衍生物的水溶性
Table 2 Water-solubility of diosgenin and diosgenin derivatives

Compound	Solubility/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Compound	Solubility/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
薯蓣皂苷元	0.247	5e	0.620
中间体 4	0.387	5f	0.382
5a	0.545	5g	0.398
5b	0.315	5h	0.361
5c	0.431	5i	0.422
5d	0.570		

分较低($IC_{50} = 12.05 \sim 74.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 该系列衍生物中, 水溶性较好的化合物在药理实验中也表现出了良好的生物活性, 这为下一步设计薯蓣皂苷元衍生物提供了新的方向.

1.6 分子对接模型

利用 AutoDock 分子对接软件, 对比 **5e**、吉非替尼(Gefitinib)与 EGFR 的结合情况. 从结合位点分析, 化合物 **5e** 与 EGFR 的结合区域及占据位点与 Gefitinib 的结合位点部分相同(图 2), 如 Asp-855、Leu-718、Gly-719、Val-726、Ala-743 等结合位点一致, 说明了甾体骨架对于生物活性的重要性. 此外, **5e** 结构中哌嗪环上的羟基与 Ser-720 结合可能形成氢键, 使得 **5e** 和 EGFR 结合更牢固, 因而提高化合物 **5e** 的抗肿瘤活性. 在化合物 **5e**、**5a**、**5d** 的结构中均含有活泼氢, 而且药理活性都较高. 可能原因是这些化合物能与 EGFR 中的 Ser-720 形成氢键增强结合, 提高抗肿瘤药理活性.

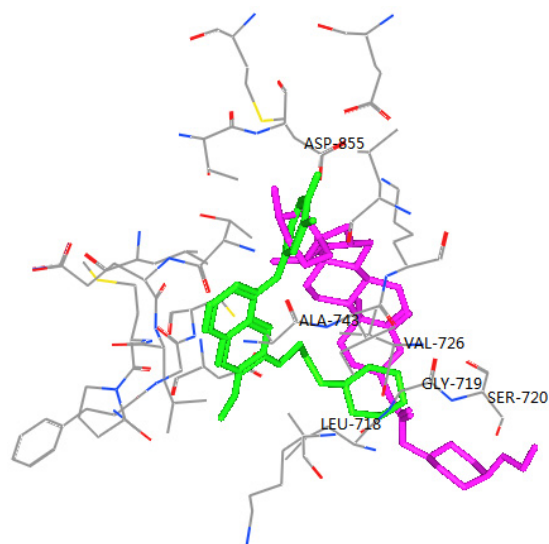


图 2 化合物 **5e**(红色)、Gefitinib(绿色)与 EGFR 的对接模型
Figure 2 Docking model of compound **5e** (red) and Gefitinib (green) with EGFR

2 结论

以薯蓣皂苷元为先导物, 设计合成了 9 个新型薯蓣皂苷元含氮衍生物, 其结构经 ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR 和 HRMS 鉴定. 所有衍生物都经过了抗肿瘤活性和细胞毒性的研究, 与薯蓣皂苷元对比, 大部分衍生物及中间体显示出高抑制活性和低细胞毒性, 其中含有哌嗪环的衍生物 **5a**, **5e** 及中间体 **4** 显示出了较强的抑制活性, **5c**, **5e**~**5i** 衍生物对 HBE 细胞显示低的细胞毒性. 本文的研究结果对薯蓣皂苷元的结构修饰和不同基团抗肿瘤

活性的研究提供一定的参考价值.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Agilent-400 (400 MHz)型核磁共振仪, TMS 作内标, CDCl_3 作溶剂; SGW-4 显微熔点测定仪(上海精密科学仪器有限公司), 温度计未经校正; LCQ ADVANTAGE MAX 质谱仪; SGW-1 型旋光仪(上海仪电物理光学仪器有限公司); FTS 3000 傅里叶变换红外光谱仪(美国 DIGILAB 公司), KBr 压片; UV-210A 型紫外分光光度计; 硅胶 GF₂₅₄ 高效板(烟台江友硅胶开发有限公司). 其余试剂均为分析纯试剂.

3.2 细胞的培养

收集对数期生长的 A549, A431, H1975, HCT-116, Aspc-1, Ramos, HBE 和 LO-2 细胞, 调整悬浊液浓度, 每孔体积 100 μL , 7×10^3 个细胞, 接种到 96 孔板. 细胞贴壁后, 0%胎牛血清 RPMI-1640 培养液饥饿 10 h, 对照组用 10% FBS RPMI-1640 培养, 36 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 50 h.

3.3 MTT 法测定药理活性及细胞毒性

A549, A431, H1975, HCT-116, Aspc-1, Ramos, HBE 和 LO-2 八种细胞培养后, 加入 100 μL MTT 溶液, 4 h 后终止培养, 每孔加入 100 μL 三联液, 在摇床上轻微振荡, 使结晶全部溶解. 用酶联检测仪测定各孔吸光度值, 选择 570 nm 波长, 以 RPMI-1640 培养液空白调零, 测各孔的吸光度值. 细胞生长抑制率(%)=(对照组吸光度值-实验组吸光度值)/对照组吸光度值 $\times 100\%$. GraphPad 软件中的 GraphPad prism 针对抑制浓度作图, 由 $\log[\text{抑制率}]$ 相对于反应, 可变斜率模型估算出 IC_{50} 值.

3.4 水溶性实验

用紫外分光光度法测定薯蓣皂苷元及薯蓣皂苷元衍生物在水中的溶解度^[33,34], 用甲醇配制薯蓣皂苷元及衍生物 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度梯度制备标准曲线. 分别称取 3 mg 薯蓣皂苷元、薯蓣皂苷元中间体及衍生物溶于 5 mL 蒸馏水中, 室温超声 15 min, 过滤待测. 在紫外可见分光光度计上于 271 nm 处测定.

3.5 化合物 1~3 的合成

化合物 **1**~**3** 按照文献[22]制备, 且表征数据与文献一致.

(25*R*)-3 α -甲磺酰基螺甾烷-5-烯(**1**): 产率 96%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.42 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, 6-H), 4.51~4.45 (m, 1H, 3-H), 4.40 (q, $J=7.4$ Hz, 1H, 16-H), 3.46 (dd, $J=3.1, 3.3$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=10.9$ Hz,

1H, 26 β -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 138.81, 123.65, 109.40, 82.02, 80.87, 66.96, 62.16, 56.48, 49.95, 41.72, 40.37, 39.77, 39.25, 38.89, 36.98, 36.64, 32.13, 31.93, 31.50, 31.45, 30.40, 29.07, 28.91, 20.93, 19.34, 17.26, 16.39, 14.64; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 493.2988, found 493.2999.

(25*R*)-3 α -叠氮基螺甾烷-5-烯(**2**): 产率 97%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.39 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.40 (q, $J=7.4$ Hz, 1H, 16-H), 3.84~3.86 (m, 1H, 3-H), 3.46 (dd, $J=2.8, 3.1$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 138.25, 123.01, 109.40, 80.94, 66.97, 62.20, 58.30, 56.60, 49.96, 41.75, 40.37, 39.87, 37.35, 36.18, 33.73, 32.10, 31.95, 31.53, 31.45, 30.45, 28.96, 26.23, 20.65, 19.16, 17.29, 16.43, 14.67; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 440.3277, found 440.3278.

(25*R*)-3 α -氨基螺甾烷-5-烯(**3**): 产率 45%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.38 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, 6-H), 4.41 (q, $J=7.45$ Hz, 1H, 16-H), 3.46 (dd, $J=3.1, 3.6$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=10.8$ Hz, 1H, 26 β -H), 3.20 (brs, 1H, 3-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 138.92, 123.36, 109.42, 80.97, 66.97, 62.23, 56.65, 50.46, 47.07, 41.75, 40.38, 39.92, 39.87, 37.69, 33.16, 32.27, 31.97, 31.53, 30.44, 29.84, 29.35, 28.95, 20.71, 19.01, 17.28, 16.42, 14.67; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 414.3372, found 414.3366.

3.6 (25*R*)-3 α -氯乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**4**)的合成

氮气保护下, 将化合物 **3** (1.95 g, 4.7 mmol)溶于 CH_2Cl_2 (60 mL)中, 0 $^\circ\text{C}$ 下加入三乙胺(2.6 mL, 18.7 mmol), 滴加氯乙酰胺(0.7 mL, 9.3 mmol), 滴毕在 0 $^\circ\text{C}$ 下继续 4.5 h. 停止反应加水(60 mL $\times$ 3)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩. 柱色谱分离得化合物 **4**^[32] (1.20 g, 52%). m.p. 183~187 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -123.8 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 6.72 (brs, 1H, N-H), 5.44 (d, $J=5.1$ Hz, 1H, 6-H), 4.40 (q, $J=7.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.12 (q, $J=2.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.00 (d, $J=4.8$ Hz, 2H, CH_2 -H), 3.46 (dd, $J=2.8, 3.1$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 164.71, 138.36, 123.89, 109.31, 80.74, 66.82, 62.06, 56.34, 50.58, 46.01, 42.88, 41.59, 40.20, 39.65, 37.51, 36.94, 34.29, 32.07, 31.79, 31.36, 31.33, 30.26, 28.77, 25.98, 20.55, 18.85, 17.10, 16.23, 16.23 14.49; IR (KBr) ν : 3286, 2955, 1683, 1651, 1538, 1059, 903 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 490.3088, found 490.3160.

3.7 化合物 5 的合成

3.7.1 **5a**, **5d**, **5e**, **5i** 的合成

称取中间体 **4** (0.15 g, 0.31 mmol)和哌嗪(0.13 g, 1.5 mmol)溶于丙酮(8 mL)中, 在 60 $^\circ\text{C}$ 下回流反应 6 h. 停止反应, 减压蒸去溶剂, 加 10 mL H_2O 析出固体, 抽滤、烘干滤饼, 重结晶得产物 **5a**.

(25*R*)-3 α -哌嗪乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5a**): 白色固体, 收率 91%. m.p. 174~177 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -103.5 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.44 (brs, 1H, N-H), 5.38 (d, $J=5.0$ Hz, 1H, 6-H), 4.41 (q, $J=7.54$ Hz, 1H, 16-H), 4.12 (s, 1H, 3-H), 3.46 (d, $J=10.2$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.37 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 168.80, 139.26, 123.05, 109.25, 80.70, 77.19, 62.05, 61.97, 56.55, 54.18, 51.07, 46.14, 44.94, 41.58, 40.21, 39.68, 37.58, 37.26, 34.68, 32.37, 31.79, 31.38, 31.36, 30.26, 28.77, 20.54, 18.93, 17.11, 16.26, 14.51, 0.98; IR (KBr) ν : 3350, 2948, 2870, 1683, 1521, 1461, 1058 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 540.4165, found 540.4167.

同法制备 **5d**, **5e** 和 **5i**.

(25*R*)-3 α -二乙醇胺乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5d**): 白色固体, 收率 67%. m.p. 234~236 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -117.5 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.33 (brs, 1H, N-H), 5.39 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, 6-H), 4.40 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, 16-H), 4.17 (s, 1H, 3-H), 3.63 (t, $J=4.7$ Hz, 4H, OHCH_2 -H), 3.47 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.37 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H), 3.20~3.40 (m, 2H, CH_2 -H), 2.74 (t, $J=4.7$ Hz, 4H, NCH_2 -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 165.73, 137.96, 137.75, 130.60, 124.31, 119.50, 109.20, 80.70, 77.19, 66.79, 62.01, 56.20, 50.57, 50.24, 45.60, 41.57, 40.14, 39.53, 37.43, 37.04, 34.56, 31.85, 31.32, 30.25, 28.77, 25.96, 20.47, 18.74, 17.10, 16.20, 14.51; IR (KBr) ν : 3435, 3349, 2953, 1659, 1526, 1053, 984 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 559.4111, found 559.4106.

(25*R*)-3 α -羟乙基哌嗪乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5e**): 白色固体, 收率 66%. m.p. 202~204 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -98.5 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.47 (brs, 1H, N-H), 5.38 (s, 1H, 6-H), 4.45~4.37 (m, 1H, 16-H), 4.18~4.06 (m, 1H, 3-H), 3.62 (d, $J=4.7$ Hz, 2H, CH_2 -H), 3.46 (d, $J=10.3$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=11.0$ Hz, 1H, 26 β -H), 3.04~2.91 (m, 2H, HOCH_2 -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 168.88, 139.30, 122.98, 109.30, 80.68, 77.21, 66.82, 62.03, 61.17, 59.39, 57.74, 56.81, 53.35, 53.27, 51.06, 44.85, 41.56, 40.23, 39.80, 37.51,

37.28, 37.28, 34.63, 32.40, 31.76, 31.33, 31.29, 30.23, 28.73, 26.28, 20.53, 18.93, 17.10, 16.26, 14.48, 0.97; IR (KBr) ν : 3367, 2957, 1672, 1526, 1058, 985 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 584.4427, found 584.4421.

(25*R*)-3 α -*N*-甲基哌嗪乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5i**): 收率 68%. m.p. 173~177 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -121 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.50 (brs, 1H, N-H), 5.38 (s, 1H, 6-H), 4.42 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, 16-H), 4.13 (s, 1H, 3-H), 3.47 (d, $J=10.5$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.37 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H), 2.98 (s, 2H, N-CH₂-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 168.90, 139.26, 128.03, 109.28, 80.70, 77.20, 66.82, 62.04, 61.15, 56.81, 55.56, 53.17, 51.04, 46.07, 44.79, 41.56, 40.23, 39.81, 37.48, 37.31, 34.63, 32.37, 31.77, 31.34, 31.30, 30.24, 28.74, 26.33, 20.55, 18.95, 17.10, 16.27, 14.48, 0.98; IR (KBr) ν : 3357, 2950, 1687, 1513, 1462, 1053 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554.4322, found 554.4327.

3.7.2 (25*R*)-3 α -咪唑乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5b**)的合成

将中间体 **4** (0.13 g, 0.26 mmol)、咪唑(0.18 g, 2.6 mmol)和 CH_2Cl_2 (10 mL)加入圆底烧瓶中, 加入三乙胺 (0.22 mL, 1.6 mmol)在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下回流反应, 用薄层色谱 (TLC)跟踪反应. 用水洗涤、干燥、过滤得 0.12 g 米白色固体 **5b**, 产率 86%. m.p. 179~180 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -106.5 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.50 (s, 1H, 咪唑-H), 7.14 (s, 1H, 咪唑-H), 6.91 (s, 1H, 咪唑-H), 5.41 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, 6-H), 5.17 (brs, 1H, N-H), 4.61 (s, 2H, CH₂-H), 4.41 (q, $J=7.4$ Hz, 1H, 16-H), 4.07 (s, 1H, 3-H), 3.46 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.36 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 165.73, 137.92, 137.75, 130.60, 124.31, 119.50, 109.20, 80.70, 66.79, 62.01, 56.20, 50.57, 50.24, 45.60, 41.57, 40.14, 39.53, 37.43, 37.04, 34.56, 31.94, 31.76, 31.36, 31.27, 30.25, 28.77, 25.96, 20.47, 18.74, 17.10, 16.20, 14.51; IR (KBr) ν : 3408, 2968, 1685, 1082, 806 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 522.3696, found 522.3699.

3.7.3 (25*R*)-3 α -哌啶乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5c**)的合成

依次将中间体 **4** (0.09 g, 0.18 mmol)、 CH_2Cl_2 (3 mL)和哌啶(0.2 mL, 1.9 mmol)加入圆底烧瓶中室温反应, 反应结束后, 减压蒸去溶剂, 加水析出固体, 抽滤, 滤饼用水洗涤三次, 烘干, 得 0.08 g 化合物 **5c**, 产率 81%.

m.p. 128~132 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -112 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.95 (brs, 1H, N-H), 5.39 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, 6-H), 4.42 (q, $J=7.4$ Hz, 1H, 16-H), 4.11 (s, 1H, 3-H), 3.46 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.35 (t, $J=13.4$ Hz, 1H, 26 β -H), 2.89 (s, 2H, CH₂-H), 2.39 (d, $J=26.8$ Hz, 4H, 哌啶-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 139.14, 123.03, 109.27, 80.72, 77.19, 66.81, 62.18, 62.04, 56.67, 54.86, 50.89, 44.91, 44.56, 41.56, 40.21, 39.75, 37.50, 37.21, 34.60, 32.33, 31.78, 30.26, 28.76, 26.41, 26.18, 23.74, 20.54, 18.95, 17.10, 16.27, 14.50, 0.98; IR (KBr) ν : 3553, 3355, 2941, 1677, 1522, 1054 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539.4213, found 539.4206.

3.7.3 (25*R*)-3 α -吗啉乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5f**)和(25*R*)-3 α -二乙胺乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5h**)的合成

将中间体 **4** (0.31 g, 0.63 mmol)溶于吗啉(10 mL)中, 室温搅拌 10 h 后停止反应. 反应液中加入水有固体析出, 抽滤、滤饼用水洗涤(5 mL $\times$ 3)、烘干、重结晶得 0.30g 化合物 **5f**, 产率 88%. m.p. 218~220 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -120 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.48 (brs, 1H, N-H), 5.39 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, 6-H), 4.43 (q, $J=7.5$ Hz, 1H, 16-H), 4.14 (s, 1H, 3-H), 3.69 (s, 4H, 吗啉环-H), 3.48 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.38 (t, $J=10.8$ Hz, 1H, 26 β -H), 2.97 (d, $J=3.9$ Hz, 2H, CH₂-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 139.27, 13.06, 109.23, 80.68, 77.21, 67.18, 66.80, 62.05, 61.60, 56.57, 53.63, 51.09, 45.01, 41.58, 40.21, 39.68, 37.56, 37.26, 34.66, 32.34, 31.78, 31.36, 30.25, 28.77, 26.19, 20.54, 18.94, 17.11, 16.26, 14.51; IR (KBr) ν : 3354, 2955, 2894, 1687, 1515, 1119, 1049, 905 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 541.4005, found 541.4007.

同法制备 **5h**. 米白色固体, 收率 58%. m.p. 173~177 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -121 (c 0.002, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.69 (brs, 1H, N-H), 5.37 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, 6-H), 4.41 (q, $J=7.4$ Hz, 1H, 16-H), 4.12 (s, 1H, 3-H), 3.46 (d, $J=10.7$ Hz, 1H, 26 α -H), 3.37 (t, $J=10.9$ Hz, 1H, 26 β -H), 2.98 (s, 2H, N-CH₂-H), 2.54 (dd, $J=9.0, 11.4$ Hz, 4H, N-CH₂-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 110.0, 109.27, 80.76, 77.18, 66.82, 62.83, 62.06, 41.58, 40.21, 39.71, 38.79, 37.47, 32.18, 31.80, 31.35, 30.27, 28.77, 26.21, 20.55, 18.98, 17.11, 16.26, 14.51, 0.99, 0.05; IR (KBr) ν : 3374, 2943, 1686, 1514, 1061, 905, 803 cm^{-1} ; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 527.4213, found 527.4224.

3.7.4 (25R)-3 α -四氢吡咯乙酰胺基螺甾烷-5-烯(**5g**)的合成

依次将中间体 **4** (0.13 g, 0.26 mmol)、CH₂Cl₂ (7 mL)、四氢吡咯(0.25 mL, 3.0 mmol)和三乙胺(0.20 mL, 1.5 mmol)加入圆底烧瓶中室温反应, TLC 跟踪反应直至反应完全. 减压蒸去溶剂, 加水析出固体, 抽滤、滤饼用水洗涤(5 mL $\times$ 3)、烘干、重结晶得 0.10 g 化合物 **5g**, 产率 77%, m.p. 164~167 °C; [α]_D²⁷ -101 (c 0.002, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.45 (brs, 1H, N-H), 5.37 (d, *J*=5.2 Hz, 1H, 6-H), 4.41 (q, *J*=7.5 Hz, 1H, 16-H), 4.12 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, 3-H, CH₂-H), 3.46 (dd, *J*=4.3, 4.4 Hz, 1H, 26 α -H), 3.37 (t, *J*=10.9 Hz, 1H, 26 β -H), 3.13 (q, *J*=16.2 Hz, 2H, N-CH₂-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 138.98, 123.13, 109.26, 80.73, 77.19, 66.81, 62.05, 58.35, 56.55, 54.12, 50.79, 45.20, 41.57, 40.21, 39.70, 37.48, 37.22, 34.53, 32.30, 31.79, 31.34, 30.26, 28.76, 26.22, 23.97, 20.54, 18.99, 17.11, 16.26, 14.50, 0.99; IR (KBr) ν : 3356, 2949, 2868, 2795, 1688, 1515, 1057, 903, 804 cm⁻¹; HRMS (ESI) calcd for C₃₃H₅₂N₂O₃ [M+H]⁺ 525.4056, found 525.4049.

辅助材料(Supporting Information) 中间体 **4** 和目标化合物 **5a~5i** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, HRMS (ESI) 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Tang, S. R.; Yang, R. T.; Pan, F. S. *J. Plant. Resour. Environ.* **2007**, *16*, 64 (in Chinese). (唐世荣, 杨如同, 潘福生, 植物资源与环境学报, **2007**, *16*, 64.)
- [2] Sun, Q.; Ju, Y.; Zhao, Y. F. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* **2002**, *33*, 276 (in Chinese). (孙麒, 巨勇, 赵玉芬, 中草药, **2002**, *33*, 276.)
- [3] Matthew, J. K.; Mary, L. T.; Jing, Z. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3209.
- [4] Liu, C.; Wang, Z. Z.; Zheng, W. *West China J. Pharm. Sci.* **2009**, *24*, 483 (in Chinese). (刘超, 王珍珍, 郑微, 华西药科学杂志, **2009**, *24*, 483.)
- [5] Yue, L.; Chen, L.; Kou, J. P. *Chin. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *15*, 233 (in Chinese). (岳蕾, 陈玲, 寇俊萍, 中国临床药理学与治疗学, **2010**, *15*, 233.)
- [6] Zeng, C. L.; Gen, Q.; Wu, Y. K. *West China J. Pharm. Sci.* **2011**, *26*, 423 (in Chinese). (曾春玲, 耿倩, 吴亚克, 华西药科学杂志, **2011**, *26*, 423.)
- [7] Wang, B.; Chun, J.; Liu, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8822.
- [8] Wang, Y.; Pan, K.; Chang, T. J. *Nat. Prod.* **2011**, *74*, 580.
- [9] Yayoi, T.; Naoko, K.; Akinori, H. *Steroids* **2009**, *74*, 504.
- [10] Wang, L. J.; Wang, Y.; Chen, S. W. *China J. Chin. Mater. Med.* **2002**, *27*, 777 (in Chinese). (王丽娟, 王岩, 陈声武, 中国中药杂志, **2002**, *27*, 777.)
- [11] Cecile, C.; Bertrand, L. *Cell Res.* **2004**, *14*, 188.
- [12] Huo, R.; Zhou, Q. L.; Wang, B. X. *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 1077.
- [13] Fu, W. W.; Wu, Y. K.; Fan, J. Z. *West China J. Pharm. Sci.* **2010**, *25*, 658 (in Chinese). (傅微微, 吴亚克, 范举正, 华西药科学杂志, **2010**, *25*, 658.)
- [14] Liao, P. F.; Dong, J. H.; Fan, J. Z. *West China J. Pharm. Sci.* **2013**, *28*, 364 (in Chinese). (廖鹏飞, 董江红, 范举正, 华西药科学杂志, **2013**, *28*, 364.)
- [15] Wu, Y. K.; He, G.; Fu, W. W. *West China J. Pharm. Sci.* **2012**, *27*, 22 (in Chinese). (吴亚克, 何谷, 傅微微, 华西药科学杂志, **2012**, *27*, 22.)
- [16] Dong, J. H.; He, G.; Wu, Y. K. *Chin. Pharmacol. Bull.* **2012**, *47*, 1407 (in Chinese). (董江红, 何谷, 吴亚克, 中国药科学杂志, **2012**, *47*, 1407.)
- [17] Zhang, H. B.; Yang, X. D.; Qin, C.; Liu, Y. L.; Li, L.; Liu, J. P. *CN* **1876672**, **2006**.
- [18] Zhang, R.; Guo, X. R.; He, Y.; Huang, W. *West China J. Pharm. Sci.* **2013**, *28*, 229 (in Chinese). (张瑞, 郭秀蓉, 何杨, 黄文, 华西药科学杂志, **2013**, *28*, 229.)
- [19] Ding, X. Y.; He, G.; Jiang, H. P. *West China J. Pharm. Sci.* **2012**, *46*, 539 (in Chinese). (丁晓勇, 何谷, 蒋红平, 药科学报, **2012**, *46*, 539.)
- [20] Geng, Q.; Zeng, C. L.; Fu, W. W. *West China J. Pharm. Sci.* **2009**, *24*, 475 (in Chinese). (耿倩, 曾春玲, 傅微微, 华西药科学杂志, **2009**, *24*, 475.)
- [21] Lu, L. H.; Wu, D. S.; Peng, L. F.; Xu, M.; Lu, X. P.; Mei, S. X. *J. Yunnan Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2015**, *37*, 415 (in Chinese). (陆礼和, 吴德松, 彭玲芳, 徐明, 陆雪萍, 梅双喜, 云南大学学报(自然科学版), **2015**, *37*, 415.)
- [22] Zheng, W.; Jiang, H. P.; Wu, Y. K. *West China J. Pharm. Sci.* **2011**, *26*, 107 (in Chinese). (郑微, 蒋红平, 吴亚克, 华西药科学杂志, **2011**, *26*, 107.)
- [23] Fu, X. L.; Han, Y. M.; Zhang, S. J. *Drugs Clin.* **2011**, *26*, 46 (in Chinese). (付晓丽, 韩英梅, 张士俊, 现代药物与临床, **2011**, *26*, 46.)
- [24] Fan, L. H.; Cui, J. G.; Gan, C. F.; Su, S. Y. *Chem. Res. Appl.* **2012**, *24*, 8 (in Chinese). (范良华, 崔建国, 甘春芳, 苏绍祥, 化学研究与应用, **2012**, *24*, 8.)
- [25] Fujii, N.; Mallari, J. P.; Hansell, E. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 121.
- [26] Renard, D.; Perruchon, J.; Giera, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8123.
- [27] Stulov, S. V.; Zavialova, M. G.; Mehtiev, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5495.
- [28] Handratta, V. D.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C. O. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2972.
- [29] Bandy, A. H.; Mir, B. P.; Lone, I. H. *Steroids* **2010**, *75*, 805.
- [30] Xie, W. G.; Peng, H. R.; Zalkow, L. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 699.
- [31] Burbiel, J.; Bracher, F. *Steroids* **2003**, *68*, 587.
- [32] Lian, P.; Li, L. L.; Geng, C. R.; Zhen, X. C.; Fu, W. J. *Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1616.
- [33] Wang, Q. Q. *M.S. Thesis*, Anhui Medical University, Hefei, **2016** (in Chinese). (王欠欠, 硕士论文, 安徽医科大学, 合肥, **2016**.)
- [34] Ai, Y. S.; Liu, L. Q.; Xu, C. H.; Chen, H. T.; Sun, X. X. *Her. Med.* **2015**, *24*, 626 (in Chinese). (艾义生, 刘力强, 徐楚鸿, 陈华庭, 孙小香, 医药导报, **2015**, *24*, 626.)

(Zhao, C.)