

环维黄杨星 D 的结构改造及生物活性

邓 兰^{1*}, 黄 衡², 徐鸣夏¹, 周世清², 王兴文², 卢 淼², 任 昉², 李岱庆²

(1. 四川大学 华西药学院, 2. 四川倍达尔新技术开发有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 通过对植物活性单体——环维黄杨星 D 的结构改造, 以寻求疗效更好、治疗安全范围更宽的心血管药物。方法 根据合理药物设计原理, 设计合成目标化合物, 并研究其生物活性。结果 获得 10 个环维黄杨星 D 新衍生物, 经光谱证明了结构。结论 选取部分环维黄杨星 D 新衍生物进行耐缺氧、抗心律失常药理实验, 结果表明部分化合物药理活性优于环维黄杨星 D。

关键词: 环维黄杨星 D; 结构改造; 耐缺氧; 抗心律失常

中图分类号: R916.2; R916.691 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)06 - 0434 - 05

Structural modification and bioactivity of cyclovirobuxine D

DENG Lan^{1*}, HUANG Heng², XU Ming-xia¹, ZHOU Shi-qing², WANG Xing-wen²,
LU Miao², REN Fang², LI Dai-qing²

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, 2. Sichuan Better New Technology Development Co. Ltd., Chengdu 610041, China)

Abstract: **Aim** To search for new compounds for the treatment of cardiovascular diseases by structural modification of cyclovirobuxine D. **Methods** According to rational drug design principle, a series of cyclovirobuxine D analogues were prepared, and their bioactivities were tested. **Results** Ten new compounds were synthesized and confirmed by spectra. **Conclusion** Endurance lacking oxygen activity and antiarrhythmia effects of some analogues of cyclovirobuxine D were tested. Some compounds showed better activity than cyclovirobuxine D.

Key words: cyclovirobuxine D; structural modification; endurance lacking oxygen; antiarrhythmia effects

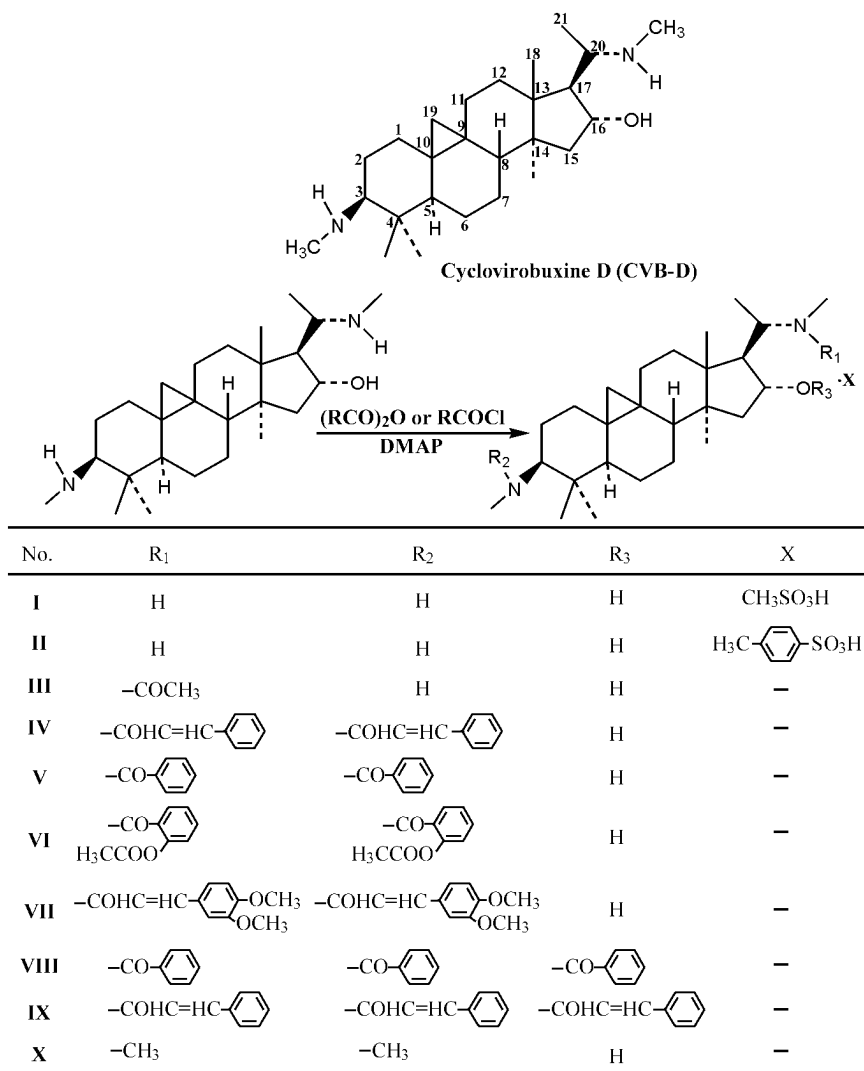
环维黄杨星 D (cyclovirobuxine D) 是从黄杨科植物小叶黄杨 (*Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. var. *sinica* Rehd. et Wils) 中提取得到的植物活性单体^[1], 对治疗冠心病、心绞痛及心律失常等心血管疾病确有疗效, 为我国首创的治疗心脑血管疾病新药^[24], 商品名为黄杨宁, 已被收入 2000 版药典。药理实验及临床研究表明, 环维黄杨星 D 使用安全范围较窄^[5,6], 且是酯溶性生物碱, 水溶性差, 目前仅有黄杨宁片剂上市, 不能满足临床对多种剂型的用药要求, 同时环维黄杨星 D 的稳定性及生物利用度尚需提高。因此, 本文对环维黄杨星 D 进行结构改造, 以

期获得活性更好, 能满足临床对多种剂型的要求。

结构改造设计, 一是使氮成盐, 以增强稳定性或改变给药途径, 使适合于静脉注射, 如甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐等。二是将 C₃、C₂₀ 位氨基及 C₁₆ 位的羟基酰化, 延缓药物在体内的代谢, 开发长效类药物, 或增加药物的活性。另一方面, 在环维黄杨星 D 结构中引入具有心血管活性的肉桂酸、乙酰水杨酸、阿魏酸等, 以达到协同或增效的目的。由于 C₃、C₂₀ 位氨基及 C₁₆ 位羟基活性有差异, 可选择性地进行反应, 以获得对环维黄杨星 D 的构效考查。三是对两个仲胺基进行甲基化, 以研究活性的差异。

收稿日期: 2003-07-07.

* 通讯作者 Tel: 86 - 28 - 85092382, Fax: 86 - 28 - 85087512,
E-mail: denglan234@sina.com



Scheme 1 Route of synthesis of compounds I - X

由环维黄杨星 D 的化学结构可以看出, C₃, C₂₀ 位的氨基与 C₁₆ 位的羟基的化学活性有一定的差异, 其中 C₁₆ 羟基位于甾体环的 α 位, 其空间位阻最大, 活性最低, 而 C₃ 位氨基由于与甾体环直接相连, 其空间效应的影响使其活性弱于 C₂₀ 位氨基。实验结果证实了这样的分析。以酰氯为酰化剂在常温下获得 C₃, C₂₀ 位均被酰化的化合物, 强化反应条件, 如加入催化剂 DMAP(二甲基氨基吡啶), 加热反应, 并延长反应时间, 则可得到 C₃, C₂₀ 及 C₁₆ 位均被酰化的三酰化物, 但收率较低。如果改用酰化能力较弱的酸酐, 则可选择性地得到 C₂₀ 位氨基单酰化物。不同位置的酰化所引起的化合物生物活性的改变, 有利于对环维黄杨星 D 的构效关系进行研究。

选取有代表性的化合物(I, III, IV, VI, VIII 和 X) 进行小鼠常压耐缺氧(表 1) 及抗心律失常试验

(表 2)。表 2 为动物给药后, 再经氯仿造型, 未发生心室纤颤的统计数据, 故 P 值愈高, 表明化合物抗心律失常的活性愈强。

Table 1 Effect of new compounds on endurance lacking oxygen on constant pressure (n = 9, $\bar{x} \pm s$)

Compd.	Dosage / mg·kg ⁻¹	Result / min
NS	-	28 ± 5
CVB-D	1.6	32 ± 6
I	1.6	33 ± 8
III	1.6	36 ± 7
IV	1.6	42 ± 7* #
VI	1.6	39 ± 6* #
VIII	1.6	37 ± 8
X	1.6	37 ± 9

*P < 0.05 vs NS; #P < 0.05 vs CVB-D

经初步药理筛选, 所合成的化合物均有一定程

度的药理活性,其中以化合物 IV 及 VI 作用最强。药理分析表明,环维黄杨星 D 的氨基进行酰化能延长药物作用时间,增强药理活性,但 C₂₀ 位氨基单酰化物和 C₂₀,C₃,C₁₆ 位三酰化物没有 C₂₀,C₃ 位双酰化物的效果好,这可能与分子和受体结合的空间构象有关;结构中同时引入肉桂酸、阿司匹林能起到药物的协同作用,增强了小鼠耐缺氧能力。对氨基进行甲基化以及化合物成盐,活性没有明显增强。

Table 2 Effect of new compounds on antiarrhythmia arosed by chloroform (x²)

Compd.	n	Dosage/mg·kg ⁻¹	Negative ratio/ %	x ²
NS	23	-	43	-
CVB-D	25	36.63	56	0.11
I	25	36.63	52	0.09
III	25	36.63	70	2.21
IV	25	36.63	80	5.35* #
VI	24	36.63	67	1.70
VIII	25	36.63	64	1.29
X	23	36.63	65	1.40

*P < 0.05 vs NS; #P < 0.05 vs CVB-D

实验部分

熔点用 RD-1 型熔点测定仪测定(温度未校正);质谱用 FINNIJN LCQ DECA 和 VG7070E 双聚焦磁型质谱仪测定;红外光谱用 PE-983 型红外光谱仪测定,溴化钾压片;核磁共振谱用 Bruker AC-E200 和 Varian INVOA-400 型核磁共振仪测定;元素分析仪为 PE-240 型。柱色谱用硅胶 H(10~40 μ 或 160~200 目,青岛海洋化工厂生产),TLC 用硅胶 GF₂₅₄ 高效板(烟台化工研究所)。所用试剂均为市售分析纯和化学纯。

1 9β,19-环-16α-羟基-4,4,13,14-四甲基-3-甲基氨基-17-(1-甲基氨基)乙基孕甾烷甲磺酸盐(I)的制备

将环维黄杨星 D 0.1 g(0.25 mmol)溶于干燥氯仿 15 mL 中,室温下,滴加甲磺酸 32 μL(0.5 mmol),反应 2 h,蒸去溶剂,得白色固体,甲醇-乙醚重结晶,得产物 0.11 g,收率 91.7%,mp 282~284 °C。¹HNMR(400 MHz, D₂O) δ:4.374.41(1H, septet, 16-H), 3.51-3.59(1H, m, 3-H), 2.922.97(1H, m, 17-H), 2.87(3H, s, CH₃SO₃H), 2.792.81(6H, m, 2N-CH₃), 1.19(3H, s, CH₃), 1.17(3H, s, 18-CH₃), 1.12(6H, s, 2CH₃), 1.01(3H, s, 21-CH₃), 0.69(1H, d, 19β-H), 0.50(1H, d, 19α-H); MS-EI: m/z 402(M⁺), 395, 356, 239, 143, 83, 70。

同法制得 9β,19-环-16α-羟基-4,4,13,14-四甲基

-3-甲基氨基-17-(1-甲基氨基)乙基孕甾烷对甲苯磺酸盐(II),白色固体,收率 95.2%,mp 172-175 °C。¹HNMR(400 MHz, D₂O) δ:7.757.77(2H, d, PhH), 7.427.45(2H, d, PhH), 4.354.40(1H, septet, 16-H), 3.513.55(1H, m, 3-H), 2.912.95(1H, m, 17-H), 2.79-2.81(6H, m, 2N-CH₃), 2.46(3H, s, CH₃-Ph), 1.17(3H, s, CH₃), 1.16(3H, s, 18-CH₃), 1.10(6H, s, 2CH₃), 0.94(3H, s, 21-CH₃), 0.65(1H, d, 19β-H), 0.45(1H, d, 19α-H); MS-EI: m/z 402(M⁺), 388, 329, 313, 256, 191, 109, 68, 43。

2 9β,19-环-16α-羟基-4,4,13,14-四甲基-3-甲基氨基-17-[1-(甲基乙酰基)氨基]乙基孕甾烷(III)的制备

将环维黄杨星 D 0.1 g(0.25 mmol),乙酸酐 30 μL(0.32 mmol)溶于干燥氯仿 15 mL 中,室温反应 5 h,蒸去溶剂,柱色谱得产品,白色固体 0.056 g,收率 51%,mp 277~279 °C。元素分析 C₂₈H₄₈N₂O₂,各元素质量分数为理论值(%):C 75.63, H 10.88, N 6.30;实验值(%):C 75.48, H 10.92, N 6.25;¹HNMR(400 MHz, CDCl₃) δ:4.995.03(1H, septet, 16-H), 4.504.53(1H, m, 3-H), 4.154.18(1H, m, 17-H), 2.93-2.96(6H, m, 2N-CH₃), 2.20(3H, s, CH₃CO), 1.13(3H, s, CH₃), 1.09(3H, s, 18-CH₃), 0.92(6H, s, 2CH₃), 0.83(3H, s, 21-CH₃), 0.59(1H, d, J = 3.8 Hz, 19β-H), 0.35(1H, d, J = 3.8 Hz, 19α-H); MS-EI: m/z 441(M-3), 402, 387, 372, 328, 131, 70, 58。

3 9β,19-环-16α-羟基-4,4,13,14-四甲基-3-(甲基肉桂酰基)氨基-17-[1-(甲基肉桂酰基)氨基]乙基孕甾烷(IV)的制备

将环维黄杨星 D 0.2 g(0.5 mmol),三乙胺 2 mL 溶于干燥氯仿 15 mL 中,室温下,缓慢加入肉桂酰氯 0.16 g(1.0 mmol),反应 2 h,依次用 2 mol·L⁻¹盐酸,5%碳酸氢钠,蒸馏水洗涤氯仿液,无水硫酸钠干燥,蒸去溶剂,氯仿-乙酸乙酯重结晶,得白色固体 0.27 g,收率 82%,mp 262-265 °C。元素分析 C₄₄H₅₈N₂O₃,各元素质量分数为理论值(%):C 79.72, H 8.82, N 4.23;实验值(%):C 79.68, H 8.88, N 4.15;¹HNMR(400 MHz, CDCl₃) δ:7.287.91(10H, m, Ph-H), 7.64-7.67(2H, m, 2CH=), 6.786.99(2H, m, =CH), 5.17-5.26(1H, septet, 16-H), 4.664.69(1H, m, 3-H), 3.75-3.80(1H, m, 17-H), 3.033.13(6H, m, 2N-CH₃), 1.21(3H, s, CH₃), 1.16(3H, s, 18-CH₃), 1.12(6H, s, 2CH₃), 0.92(3H, s, 21-CH₃), 0.62(1H, d, 19β-H),

0.40 (1 H, d, 19 α H); MS-EI: m/z 663 (M+1), 531, 474, 338, 162, 131, 71。

同法制得 9 β ,19-环-16 α -羟基-4,4,13,14-四甲基-3-(甲基苯甲酰基)氨基-17-[1-(甲基苯甲酰基)氨基]乙基孕甾烷(V),白色固体,收率 81%,mp 285~288 °C。元素分析 C₄₀H₅₄N₂O₃,各元素质量分数为理论值(%):C 78.65,H 8.91,N 4.59;实验值(%):C 78.43,H 9.01,N 4.46;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.357.52(10H,m,Ph-H),5.145.16(1H,septet,16-H),4.694.72(1H,m,3-H),3.934.03(1H,m,17-H),2.80-3.12(6H,m,2N-CH₃),1.18(3H,s,CH₃),1.11(3H,s,18-CH₃),1.02(6H,s,2CH₃),0.71(3H,s,21-CH₃),0.55(1H,d,19 β -H),0.37(1H,d,19 α -H);MS-EI: m/z 610(M-1),459,269,162,146,105,40,29。

9 β ,19-环-16 α -羟基-4,4,13,14-四甲基-3-(甲基乙酰水杨酰基)氨基-17-[1-(甲基乙酰水杨酰基)氨基]乙基孕甾烷(VI),白色固体,收率 80%,mp 190-192 °C。元素分析 C₄₄H₅₈N₂O₇,各元素质量分数为理论值(%):C 72.70,H 8.04,N 3.85;实验值(%):C 72.58,H 8.26,N 3.76;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.018.08(8H,m,Ph-H),5.025.09(1H,septet,16-H),4.584.62(1H,m,3-H),3.453.58(1H,m,17-H),2.95-3.12(6H,m,2N-CH₃),2.26(6H,s,2COCH₃),1.21(3H,s,CH₃),1.20(3H,s,18-CH₃),1.13(6H,s,2CH₃),1.07(3H,s,21-CH₃),0.59(1H,d,J=3.6 Hz,19 β -H),0.36(1H,d,J=3.6 Hz,19 α -H);MS-ESI: m/z 727(M⁺),662,620,579,437,275,121。

9 β ,19-环-16 α -羟基-4,4,13,14-四甲基-3-[甲基(3,4-二甲氧基)肉桂酰基]氨基-17-[1-[甲基(3,4-二甲氧基)肉桂酰基]氨基]乙基孕甾烷(VII),白色固体,收率 82%,mp 268270 °C。元素分析 C₄₈H₆₆N₂O₇,各元素质量分数为理论值(%):C 73.62,H 8.50,N 3.58;实验值(%):C 73.51,H 8.62,N 3.52;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.287.91(6H,m,Ph-H),7.64-7.67(2H,m,2CH=),6.746.99(2H,m,2=CH),5.12-5.29(1H,septet,16-H),4.584.67(1H,m,3-H),3.79-3.83(12H,m,4-CH₃O),3.753.82(1H,m,17-H),3.02-3.15(6H,m,2N-CH₃),1.21(3H,s,CH₃),1.16(3H,s,18-CH₃),1.11(6H,s,2CH₃),0.92(3H,s,21-CH₃),0.62(1H,d,19 β -H),0.39(1H,d,19 α -H);MS-ESI: m/z 783(M⁺),652,531,338,131,71。

4 9 β ,19-环-16 α -苯甲酰氧基-4,4,13,14-四甲基-3-(甲基苯甲酰基)氨基-17-[1-(甲基苯甲酰基)氨基]

乙基孕甾烷(VIII)的制备

将环维黄杨星 D 0.2 g(0.5 mmol),三乙胺 2 mL 溶于干燥氯仿 15 mL 中,室温下,缓慢加入苯甲酰氯 180 μ L(1.5 mmol),室温反应 2 h,再回流反应 10 h,停止反应,依次用 2 mol·L⁻¹盐酸、5%碳酸氢钠、蒸馏水洗涤氯仿液,无水硫酸钠干燥,蒸去溶剂,柱色谱得白色固体 0.18 g,收率 50%,mp 296 298 °C。元素分析 C₄₇H₅₈N₂O₄,各元素质量分数为理论值(%):C 78.95,H 8.18,N 3.92;实验值(%):C 78.87,H 8.22,N 3.88;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.158.04(15H,m,Ph-H),5.355.46(1H,septet,16-H),5.185.28(1H,m,3-H),4.684.72(1H,m,17-H),2.953.12(6H,m,2N-CH₃),1.16(3H,s,CH₃),1.11(3H,s,18-CH₃),1.06(6H,s,2CH₃),0.98(3H,s,21-CH₃),0.50(1H,d,19 β -H),0.31(1H,d,19 α -H);MS-EI: m/z 715(M⁺),631,592,442,387,279,174,105。

同法制得 9 β ,19-环-16 α -肉桂酰氧基-4,4,13,14-四甲基-3-(甲基肉桂酰基)氨基-17-[1-(甲基肉桂酰基)氨基]乙基孕甾烷(IX),白色固体,收率 50%,mp 323325 °C。元素分析 C₅₃H₆₄N₂O₄,各元素质量分数为理论值(%):C 80.26,H 8.13,N 3.53;实验值(%):C 80.12,H 8.89,N 3.26;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :7.237.63(15H,m,Ph-H),6.317.17(3H,m,3CH=),7.567.72(3H,m,3=CH),5.185.25(1H,septet,16-H),4.584.69(1H,m,3-H),3.853.92(1H,m,17-H),2.933.15(6H,m,2N-CH₃),1.21(3H,s,CH₃),1.16(3H,s,18-CH₃),1.10(6H,s,2CH₃),0.91(3H,s,21-CH₃),0.55(1H,d,19 β -H),0.32(1H,d,19 α -H);MS-ESI: m/z 791(M-1),660,467,131,71。

5 9 β ,19-环-16 α -羟基-4,4,13,14-四甲基-3-(二甲氨基)氨基-17-[1-(二甲氨基)氨基]乙基孕甾烷(X)的制备

将环维黄杨星 D 0.2 g(0.5 mmol)溶于干燥氯仿 25 mL 中,室温下滴加硫酸二甲酯 0.13 g(1.0 mmol),在 3035 °C 反应 30 min,再加热回流 3 h,冷却后加入 50%氢氧化钠溶液,析出固体,过滤,干燥,以氯仿-乙酸乙酯重结晶,得白色产品 0.16 g,收率 75%,mp 235237 °C。元素分析 C₂₈H₅₀N₂O,各元素质量分数为理论值(%):C 78.08,H 11.70,N 6.50;实验值(%):C 77.92,H 11.85,N 6.43;¹H NMR(400 MHz,CDCl₃) δ :4.284.36(1H,septet,16-H),3.653.72(1H,m,3-H),2.852.93(1H,m,17-H),2.722.82(12H,m,2N-CH₃),1.19(3H,s,CH₃),1.15(3H,s,18-

CH₃), 1.11 (6H, s, 2CH₃), 1.02 (3H, s, 21-CH₃), 0.65 (1H, d, 19 β -H), 0.49 (1H, d, 19 α -H); MS-EI: m/z 430 (M⁺), 387, 330, 251, 159, 84, 58。

6 小鼠常压耐缺氧实验

取小白鼠若干只(♀ ♂不拘), 称重, 编号, 按体重分组。分别 ig 给予各组动物相应的药物, 给药后 1 h, 将小鼠放入盛有钠石灰 20 g 的广口瓶中(每只广口瓶只放 1 只小鼠), 用凡士林涂抹瓶口盖严。使之不漏气, 立即重新计时, 以呼吸停止为指标, 观察小鼠因缺氧而死亡的时间, 与对照组比较进行 *t* 检验。

7 氯仿引起的抗心律失常实验

取体重 2528 g 小鼠若干只, ♀ ♂各半, 随机按体重分组。每组分别 ig 相应药物, 1 h 后, 将小鼠逐个放入含有氯仿 2 mL 的棉球的倒置 500 mL 烧杯内(每换一次小鼠需加 0.5 mL 氯仿), 让小鼠吸入氯仿直至呼吸停止, 立即将小鼠取出, 直接开胸, 肉眼观察心脏活动节律, 心室纤颤发生率。

References:

- [1] Liang BW, Deng CA, Wang XB, *et al.* Separation and structural research of buxus alkaloids I, II, III, IV [J]. *Chin Pharm Bull* (药学通报), 1981, 16(4) :3 - 4.
- [2] Fang TH, Xu HQ, Xu L, *et al.* Protective action of huangyangning against acute experimental cerebral ischemia in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 1997, 28(7) :413 - 414.
- [3] Wang YX, Tan YH, Sheng BH. Interaction of cyclovirbuxine-D with some inotropic agents on contractile force of isolated guinea pig myocardium [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1994, 29(1) :20 - 22.
- [4] Liang T, Fang TH, Yao XJ, *et al.* Pharmacologica research of cyclovirbuxine-D [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2001, 17(1) :35 - 37.
- [5] Liu XJ, Yao MH, Fang TH, *et al.* Some cardiovascular effects of cyclovirbuxine-D [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1982, 3(2) :101 - 104.
- [6] Hu SL, Zhou NH, Fan SF. Experimental analysis of the antiarrhythmic and arrhythmia-inducing actions of cyclovirbuxine D [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1981, 2(2) :101 - 107.