

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C07J 1/00 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

专利号 ZL 200410094131.7

[45] 授权公告日 2008年2月13日

[11] 授权公告号 CN 100368426C

[22] 申请日 2004.12.30

[21] 申请号 200410094131.7

[73] 专利权人 中国人民武装警察部队医学院

地址 300162 天津市河东区万新村武警医学院

[72] 发明人 李灵芝 崔颖 张永亮 崔勇

[56] 参考文献

US4790961A 1988.12.13

WO0144190A1 2001.6.21

WO2004026804A1 2004.4.1

CN1546451A 2004.11.17

CN1105669A 1995.7.26

雌激素哌嗪类衍生物的合成及其促骨生长活性. 李灵芝等. 中国药物化学杂志, 第10卷第1期. 2000

骨靶向雌激素中间体-雌激素哌嗪衍生物的合成. 李灵芝等. 武警医学院学报, 第8卷第1期. 1999

审查员 刘元霞

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所

代理人 陆艺

权利要求书4页 说明书21页

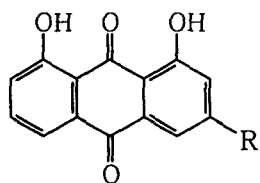
[54] 发明名称

大黄蒽醌衍生物及其制备方法和以该衍生物为活性成份的药物组合物

[57] 摘要

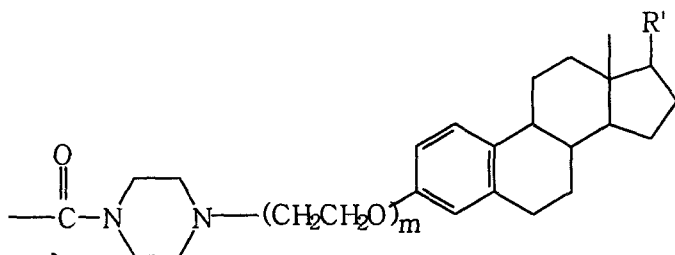
本发明公开了大黄蒽醌衍生物及其制备方法和以该衍生物为活性成份的药物组合物, 大黄蒽醌化合物既可作为趋骨性载体, 又可以与雌激素协同对骨发挥作用, 优于其他骨靶向载体的是大黄蒽醌具有抗肿瘤作用, 对雌激素替代疗法可能导致的子宫内膜癌和乳腺癌具有抑制作用。

1. 大黄蒽醌衍生物，用下述通式表示：

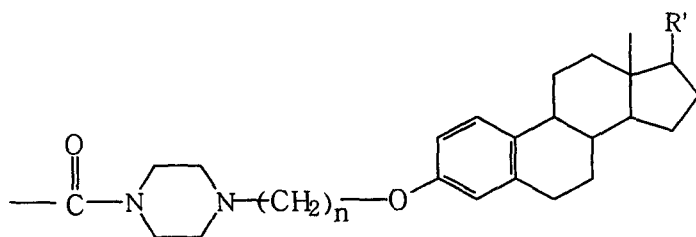


(A)

其中：R 为

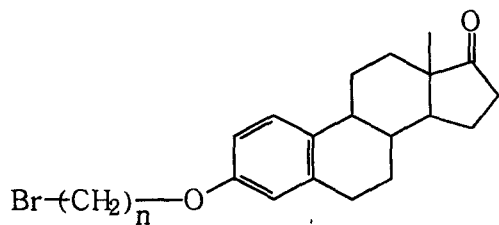


或为



所述 R' 为羟基或羰基，所述 m 表示 1~8，所述 n 表示 2~6。

2. 根据权利要求 1 所述的大黄蒽醌衍生物，其特征是所述 n 为 3~4。
3. 根据权利要求 1 所述的大黄蒽醌衍生物，其特征是所述 m 为 3~5。
4. 一种大黄蒽醌衍生物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-[N^1 -(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基- N^1 -烷基]醚 (III) 的制备方法，其特征是由以下步骤组成：
 - (1) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-溴烷基醚 (I) 的制备



(I)

在反应容器中将摩尔比为 6: 30-60: 1-3 的雌酚酮:1,2-二溴乙烷或 1,3-二溴丙烷或 1,4-二溴丁烷或 1,5-二溴戊烷或 1,6-二溴己烷:四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 3-6 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/13-1/11 的 50%氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 40-100°C 反应 30-120 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 (I), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基;

(2) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17-酮-3-(哌嗪基-N¹-烷基)醚 (II) 的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5-1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1-2 倍于反应物重量的 N,N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50-100°C, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20-1/10 的化合物 (I), 保温反应 2-5 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1-5 倍的水溶解, 二氯甲烷或氯仿或甲苯或乙酸乙酯提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体的化合物 (II), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基;

(3) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17-酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽酮-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-烷基]醚 (III) 的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-2.5 的化合物 (II): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0°C 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1-2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 在 20-30°C, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的化合物 (III), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

5. 一种大黄蒽醌衍生物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-烷基]醚 (V) 的制备方法, 其特征是由以下步骤组成:

(1) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-烷基)醚 (IV) 的合成: 在反应容器中, 将 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17-酮-3-(哌嗪基-N¹-烷基)醚 (II) 溶于 10-50 倍于反应物重量的甲醇中, 在 0°C 下加入 1-1.5 倍于反应物重量的硼氢化钾, 保温反应 2-5 小时, 向反应液中滴加 1N-6N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 过滤得白色或乳白色固体的化合物 (IV), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基;

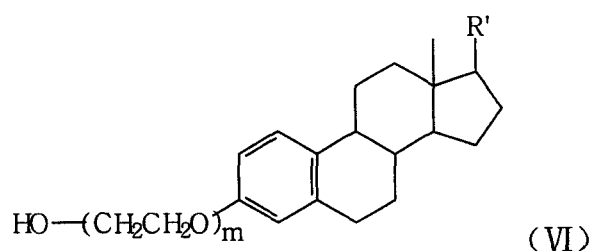
(2) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-烷基醚 (V) 的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-2.5 的化合物 (IV): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0°C 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1-2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 20-30°C, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的化合物 (V), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

6. 一种大黄蒽醌衍生物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17-酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基)醚 (IX) 的制备方法, 其特征是由以下步骤组成:

(1) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17-酮-3-聚乙二醇基醚的合成 (VI):

在反应容器中, 将摩尔比为 1-2: 1: 0.05-0.5 的聚乙二醇苯磺酸单酯: 雌酚酮: 四正丁基溴化铵加入至相当于反应物重量 4-8 倍甲苯中, 升温至 60°C-100°C, 滴入摩尔数 10-15

倍于雌酚酮摩尔数的 20%-50%氢氧化钠溶液, 反应 2-4 小时, 分出甲苯层, 水洗甲苯层至中性, 活性炭脱色, 回收甲苯, 得微黄色固体的化合物(VI), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;



(2) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17-酮-3-苯磺酰聚乙二醇基醚 (VII)

的合成:

在反应容器中, 将摩尔比 1: 4-6 的化合物(VI): 10-30%氢氧化钠与四氢呋喃混匀, 使化合物(VI)的四氢呋喃溶液的摩尔浓度为 0.004-0.01mol/L, 滴加重量百分比 2%-4%的苯磺酰氯的四氢呋喃溶液 15-30ml, 继续搅拌 3 小时, 减压除去四氢呋喃, 半固体物溶于氯仿或二氯甲烷或甲苯后以 2N-4N 氢氧化钠洗涤, 水洗至中性, 活性炭脱色, 回收溶剂, 得浅黄色油状物 (VII), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;

(3) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基) 醚(VIII)的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5-1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1-2 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50-100℃, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20-1/10 的化合物 (VII), 保温反应 2-5 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1-5 倍的水溶解, 二氯甲烷或氯仿或甲苯或乙酸乙酯提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体或无色油状物(VIII), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;

(4) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-聚乙二醇基] 醚(IX)的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-2.5 的化合物(VIII): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1-2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 在 20-50℃, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体 (IX), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8。

7. 一种大黄蒽醌衍生物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基) 醚 (XI) 的制备方法, 其特征是由以下步骤组成:

(1) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基) 醚(X)的合成:

在反应容器中, 将 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基) 醚(VIII)溶于其重量 10-50 倍的甲醇中, 在 0℃下加入 1-1.5 倍硼氢化钾, 保温反应 2-5 小时, 向反应液中滴加 1N-6N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 得白色或乳白色固体或无色油状物(X), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;

(2) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基)醚 (XI)的合成

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-1.5 的化合物(X): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入与大黄酸等摩尔的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 20-30℃, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得橙黄色或棕黄色固体的化合物(XI), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8。

8. 一种含有权利要求 1-3 任一项的大黄蒽醌衍生物的药物组合物, 其特征在于由权利要求 1 或 2 或 3 所述的大黄蒽醌衍生物及其药学可接受的载体组成。

9. 权利要求 1-3 任一项的大黄蒽醌衍生物的应用, 其特征是在制备抗骨质疏松药物中的应用。

大黄蕙醌衍生物及其制备方法和以该衍生物 为活性成份的药物组合物

技术领域

本发明涉及大黄蕙醌衍生物，其制备方法和以该衍生物为活性成份的药物组合物，以及它们在制备防治骨质疏松药物中的应用。

背景技术

雌激素对骨代谢具有保护作用。当生理或病理原因导致内源性雌激素缺乏时，该作用也随之丧失，引发进行性骨量丢失（绝经后妇女每年丢失 4.2% 的骨量）、骨质疏松、甚至骨折。随着人类社会老龄化，女性将有 1/3 的生命在绝经后度过，骨质疏松性骨折已成为威胁老年女性身心健康和影响生活质量的仅次于心血管疾病的严重疾病。开发新型防治骨质疏松药物对于提高患者生活质量，减轻社会经济负担具有极其重要的意义。预防绝经后骨质疏松主要是消除产生失骨的原因，阻止进行性失骨，故迄今临床仍广泛采用雌激素替代疗法（ERT）为主要防治措施。但 ERT 用药周期长，长期使用可能由于其全身分布而增加子宫内膜癌及乳腺癌发病的危险性，因此许多病人不愿接受 ERT。如何使药物在作用于骨组织的同时尽可能避开对机体其它组织尤其是乳腺、子宫等器官的作用仍是药物工作者所面临的一大难题。

由于骨组织结构的特殊性，天然雌激素很难入骨，如将雌激素与趋骨性载体相连，制备为骨靶向雌激素，使其选择性分布于骨，即可相对降低其在子宫、乳腺的浓度。文献：

- 1 Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, et al. Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrug I. v. effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. *J Drug Target* 1998, 5(2):29-38
- 2 Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, et al. Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrug V. *Biol Pharm bull*, 1997, 20(11):1183-1187
- 3 Bauss F, Esswein A, Reiff K, et al. Effects of 17beta-estradiol-bisphosphate conjugates, potential bone-seeking estrogen pro-drugs, on 17beta-estrogen serum kinetics and bone mass in rats. *Tissue Int.* 1997, 59:168-173
- 4 Tsusashi N, Yabuki M, Harada H, et al. Tissue distribution and pharmacological potential of SM-16869, a novel oestrogen-bisphosphonate hybrid compound. *J Pharm Pharmacol* 2000, 52(1):27-37
- 5 郑虎, 吴勇, 陈建, 等. 甾体-双磷酸酯化合物的合成及防治骨质疏松作用研究. *药学学报*, 1998, 33(5): 339-343

6 Uludag H, Yang J. Targeting systemically administered proteins to bone by bisphosphonate conjugation. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(3) :604-611 已报道的趋骨性载体有双磷酸(盐), Zheng H, Weng LL. Bone-resorption inhibition/osteogenesis promotion pharmaceutical composition USP 5, 698, 542, 1997-12-16. USP 6, 028, 207, 2000-2-22. 报道趋骨性载体有四环素等。双磷酸盐类本身抑制破骨细胞骨吸收的作用非常强, 且沉积于骨表面的双磷酸盐降解缓慢, 在人体内其终末半衰期从数月到数年不等, 故长期使用可能导致新骨钙化不足(临床使用羟乙磷酸钠(Etidronate)治疗时曾发现有骨软化症发生)。我们在合成四环素-雌激素偶连物时发现, 由于四环素稳定性差, 为合成过程中产物的分离纯化带来一定困难, 也影响了偶联物在体内的稳定性。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术中的不足, 利用大黄蕙醌的趋骨性将雌激素带入骨组织, 以提高骨组织雌激素浓度, 降低其在非骨组织浓度的同时, 使雌激素和大黄蕙醌这两种不同的化合物能在同一靶部位发挥各自的作用, 在骨组织产生协同作用。

本发明提供了高效低副作用的骨导向雌激素——大黄蕙醌衍生物;

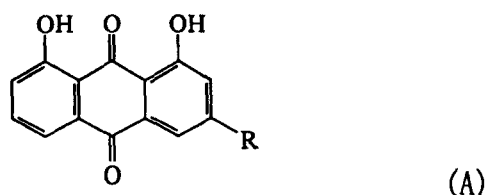
本发明的第二个目的是提供大黄蕙醌衍生物的制备方法;

本发明的第三个目的是提供以大黄蕙醌衍生物为活性成份的药物组合物;

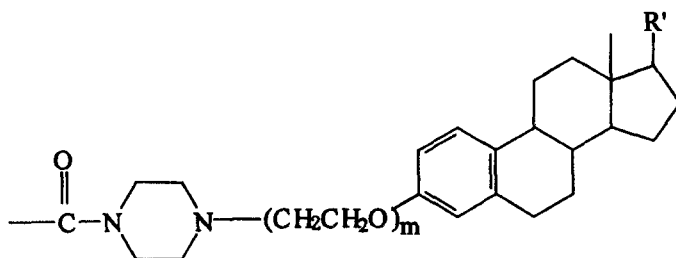
本发明的第四个目的是提供大黄蕙醌衍生物和组合物在制备防治骨质疏松药物中的应用。

本发明的技术方案概述如下:

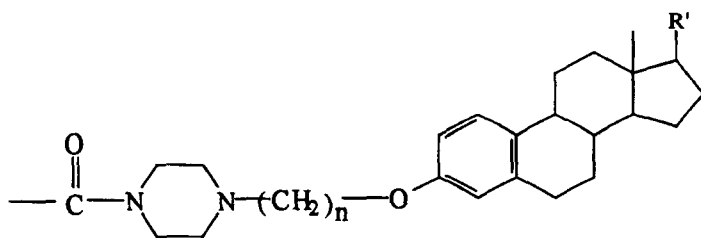
大黄蕙醌衍生物, 用下述通式表示:



其中: R 为



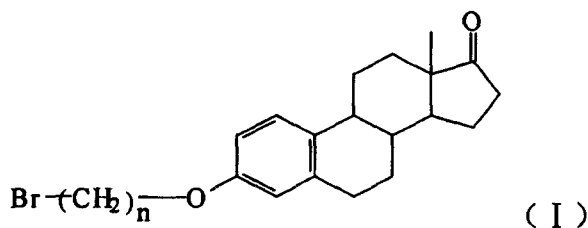
或为



所述 R' 为羟基或羰基, 所述 m 表示 1~8, 所述 n 表示 2~6。n 优选为 3~4。m 优选 3~5。

一种大黄蒽醌衍生物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-烷基]醚 (III) 的制备方法, 由以下步骤组成:

(1) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-溴烷基醚 (I) 的制备



在反应容器中将摩尔比为 6: 30~60: 1-3 的雌酚酮: 1,2-二溴乙烷或 1,3-二溴丙烷或 1,4-二溴丁烷或 1,5-二溴戊烷或 1,6-二溴己烷: 四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 3-6 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/13-1/11 的 50% 氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 40-100℃ 反应 30-120 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 (I), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

(2) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-烷基) 醚 (II) 的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5-1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1-2 倍于反应物重量的 N,N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50-100℃, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20-1/10 的化合物 (I), 保温反应 2-5 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1-5 倍的水溶解, 二氯甲烷或氯仿或甲苯或乙酸乙酯提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体的化合物 (II), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

(3) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-烷基] 醚 (III) 的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-2.5 的化合物 (II): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0℃ 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1-2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 在 20-30℃, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10% 碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的化合物 (III), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

一种大黄蒽醌衍生物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-烷基] 醚 (V) 的制备方法, 以下步骤组成:

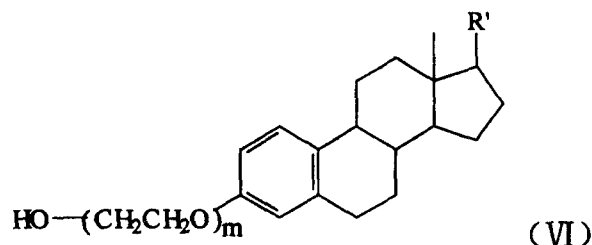
(1) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-烷基)醚(IV)的合成: 在反应容器中, 将 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-烷基)醚(II)溶于 10-50 倍于反应物重量的甲醇中, 在 0℃下加入 1-1.5 倍于反应物重量的硼氢化钾, 保温反应 2-5 小时, 向反应液中滴加 1N-6N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 过滤得白色或乳白色固体的化合物(IV), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

(2) 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪]-N¹-烷基醚(V)的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5-2.5 的化合物(IV): 大黄酸溶于 10-20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1-2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 20-30℃, 反应 8-14 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解, 1-10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的化合物(V), 所述烷基表示 C2~C6 的烷基。

一种大黄蒽醌衍生物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪]-N¹-聚乙二醇基)醚(IX)的合成, 由以下步骤组成:

(1) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-聚乙二醇基醚的合成(VI):

在反应容器中, 将摩尔比为 1-2: 1: 0.05-0.5 的聚乙二醇苯磺酸单酯: 雌酚酮: 四正丁基溴化铵加入至相当于反应物重量 4-8 倍甲苯中, 升温至 60℃-100℃, 滴入摩尔数 10-15 倍于雌酚酮摩尔数的 20%-50%氢氧化钠溶液, 反应 2-4 小时, 分出甲苯层, 水洗甲苯层至中性, 活性炭脱色, 回收甲苯, 得微黄色固体的化合物(VI), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;



(2) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰聚乙二醇基醚(VII)的合成:

在反应容器中, 将摩尔比 1: 4-6 的化合物(VI): 10-30%氢氧化钠与四氢呋喃混匀, 使化合物(VI)的四氢呋喃溶液的摩尔浓度为 0.004-0.01mol/L, 滴加重量百分比 2%-4%的苯磺酰氯的四氢呋喃溶液 15-30ml, 继续搅拌 3 小时, 减压除去四氢呋喃, 半固体物溶于氯仿或二氯甲烷或甲苯后以 2N-4N 氢氧化钠洗涤, 水洗至中性, 活性炭脱色, 回收溶剂, 得浅黄色油状物(VII), 所述聚乙二醇基的聚合度为 1-8;

(3) 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基)醚(VIII)的合成: 在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5-1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1-2 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50-100℃, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20-1/10 的化合物(VII), 保温反应 2-5 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1-5 倍的水溶解, 二氯甲烷或氯仿或甲苯或乙酸乙酯提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体或无

色油状物(VIII)，所述聚乙二醇基的聚合度为1-8；

(4)3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9,10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-聚乙二醇基]醚(IX)的合成：在反应容器中，将摩尔比为1:0.5-2.5的化合物(VIII)：大黄酸溶于10-20倍于反应物重量的无水丙酮中，0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数1-2倍的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，在20-50℃，反应8-14小时，蒸除丙酮，加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解，1-10%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色或橙黄色固体(IX)，所述聚乙二醇基的聚合度为1-8。

一种大黄蒽醌衍生物3,17-二羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-3-[N¹-(1,8-二羟基-9,10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基)醚(XI)的合成，由以下步骤组成：

(1)3,17-二羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基)醚(X)的合成：

在反应容器中，将3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-酮-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基)醚(VIII)溶于其重量10-50倍的甲醇中，在0℃下加入1-1.5倍硼氢化钾，保温反应2-5小时，向反应液中滴加1N-6N盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，得白色或乳白色固体或无色油状物(X)，所述聚乙二醇基的聚合度为1-8；

(2)3,17-二羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-3-[N¹-(1,8-二羟基-9,10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基)醚(XI)的合成

在反应容器中，将摩尔比为1:0.5-1.5的化合物(X)：大黄酸溶于10-20倍于反应物重量的无水丙酮溶液中，0℃下加入与大黄酸等摩尔的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，20-30℃，反应8-14小时，蒸除丙酮，加氯仿或甲苯或乙酸乙酯溶解，1-10%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得橙黄色或棕黄色固体的化合物(XI)，所述聚乙二醇基的聚合度为1-8。

· 含有大黄蒽醌衍生物的药物组合物，是在大黄蒽醌衍生物中加入药学可接受的载体。大黄蒽醌衍生物用途，是在制备抗骨质疏松药物中的应用。

本发明具有如下优点：

1. 大黄蒽醌化合物既可作为趋骨性载体，又可以与雌激素协同对骨发挥作用。
2. 优于其他骨靶向载体的是大黄蒽醌具有抗肿瘤作用，对雌激素替代疗法可能导致的子宫内膜癌和乳腺癌具有抑制作用。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

实施例1

3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-酮-3-溴乙基醚的制备(化合物(I)之一)

在反应容器中将摩尔比为6:30:1的雌酚酮:1,2-二溴乙烷:四正丁基溴化铵，溶于相当于物料总量3倍的甲苯中，加入上述溶液体积的1/13的50%氢氧化钠溶液，薄层层析追踪反应，于50℃反应60分钟，静置冷却，分出甲苯层，浓缩得略带黄色的固体，乙醇重结晶，得白色或乳白色结晶的化合物3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-酮-3-溴乙基醚。

实施例 2

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴丙基醚的制备 (化合物 (I) 之二)

在反应容器中将摩尔比为 6: 60: 2 的雌酚酮: 1,3-二溴丙烷: 四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 6 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/11 的 50%氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 40℃反应 120 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴丙基醚。

实施例 3

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴丁基醚的制备 (化合物 (I) 之三)

在反应容器中将摩尔比为 6: 60: 2 的雌酚酮: 1,4-二溴丁烷: 四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 4 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/12 的 50%氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 100℃反应 30 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴丁基醚。

实施例 4

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴戊基醚的制备 (化合物 (I) 之四)

在反应容器中将摩尔比为 6: 45: 2 的雌酚酮: 1,5-二溴戊烷: 四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 5 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/12 的 50%氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 100℃反应 30 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴戊基醚。

实施例 5

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴己基醚的制备 (化合物 (I) 之五)

在反应容器中将摩尔比为 6: 50: 1 的雌酚酮: 1,6-二溴己烷: 四正丁基溴化铵, 溶在相当于物料总量 6 倍的甲苯中, 加入上述溶液体积的 1/11 的 50%氢氧化钠溶液, 薄层层析追踪反应, 于 80℃反应 60 分钟, 静置冷却, 分出甲苯层, 浓缩得略带黄色的固体, 乙醇重结晶, 得白色或乳白色结晶的化合物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-溴己基醚。

实施例 6

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-乙基) 醚的合成: (化合物 (II) 之一)

在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50℃, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20 实施例 1 制备的化合物, 保温反应 2 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1 倍的水溶解, 二氯甲烷提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体的化合物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-乙基) 醚。

实施例 7

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-丙基) 醚的合成: (化合物 (II) 之二)

在反应容器中, 将摩尔比为 10: 1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 2 倍于反应物重量

的N,N二甲基甲酰胺,升温至外温100℃,加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的1/10实施例2制备的化合物,保温反应2小时,减压浓缩至干,加入相当于反应物体积2倍的水溶解,氯仿提取,回收溶剂,得白色或乳白色固体的化合物3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-丙基)醚。

实施例8

3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-丁基)醚的合成:(化合物(II)之三)

在反应容器中,将摩尔比为10:1的六水合哌嗪:无水碳酸钠溶于1倍于反应物重量的N,N二甲基甲酰胺,升温至外温80℃,加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的1/15实施例3制备的化合物,保温反应5小时,减压浓缩至干,加入相当于反应物体积3倍的水溶解,甲苯提取,回收溶剂,得白色或乳白色固体的化合物3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-丁基)醚。

实施例9

3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-戊基)醚的合成:(化合物(II)之四)

在反应容器中,将摩尔比为10:1的六水合哌嗪:无水碳酸钠溶于2倍于反应物重量的N,N二甲基甲酰胺,升温至外温80℃,加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的1/20实施例4制备的化合物,保温反应5小时,减压浓缩至干,加入相当于反应物体积3倍的水溶解,乙酸乙酯提取,回收溶剂,得白色或乳白色固体的化合物3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-戊基)醚。

实施例10

3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-己基)醚的合成:(化合物(II)之五)

在反应容器中,将摩尔比为10:1的六水合哌嗪:无水碳酸钠溶于2倍于反应物重量的N,N二甲基甲酰胺,升温至外温80℃,加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的1/20实施例5制备的化合物,保温反应5小时,减压浓缩至干,加入相当于反应物体积3倍的水溶解,乙酸乙酯提取,回收溶剂,得白色或乳白色固体的化合物3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-(哌嗪基-N¹-己基)醚。

实施例11

3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-[N⁴-(1,8-二羟基-9,10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-乙基]醚的合成:(化合物(III)之一)

在反应容器中,将摩尔比为1:0.5的实施例6制备的化合物:大黄酸溶于10倍于反应物重量的无水丙酮中,0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数1倍的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,在20℃,反应10小时,蒸除丙酮,加氯仿溶解,1%碳酸氢钠溶液洗,回收溶剂,粗品经硅胶柱层析,分离得金黄色固体的3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-[N⁴-(1,8-二羟基-9,10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-乙基]醚。

$^1\text{HNMR}$: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 3.93(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H N(CH₂)) 3.47(t 2H N(CH₂)) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.69(t 2H ArOCCH₂) 2.45(m 4H N(CH₂)₂) 0.88(S 3H 18-CH₃) IR: 2930, 2875, 1734, 1670, 1611 MS (m/z): 649.1 (54.6) mp. 182 °C 分解。

实施例 12

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-丙基]醚的合成: (化合物 (III) 之二)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2.5 的实施例 7 制备的化合物: 大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0°C 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 在 30°C, 反应 8 小时, 蒸除丙酮, 加甲苯溶解, 10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-丙基]醚。

$^1\text{HNMR}$: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 3.93(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H N(CH₂)) 3.47(t 2H N(CH₂)) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.45~2.41(m 6H N(CH₂)₂, NCH₂C) 2.37~2.33(m 2H OCCH₂) 0.88(S 3H 18-CH₃) IR: 2930, 2875, 1734, 1670, 1611 MS (m/z): 663.5 (132.9) mp. 187°C 分解。

实施例 13

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-丁基]醚的合成: (化合物 (III) 之三)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2 的实施例 8 制备的化合物: 大黄酸溶于 15 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0°C 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 在 30°C, 反应 14 小时, 蒸除丙酮, 加乙酸乙酯溶解, 10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-丁基]醚。

$^1\text{HNMR}$: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 3.93(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H N(CH₂)) 3.47(t 2H N(CH₂)) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.45~2.41(m 6H N(CH₂)₂, NCH₂C) 2.37~2.33(m 2H OCCH₂) 0.88(S 3H 18-CH₃) IR: 2930, 2875, 1734, 1670, 1611 MS (m/z): 677.4 (58.9) mp. 189°C 分解。

实施例 14

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-17 酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-戊基]醚的合成: (化合物 (III) 之四)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2.5 的实施例 9 制备的化合物: 大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮中, 0°C 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙

基碳二亚胺盐酸盐，在 25℃，反应 8 小时，蒸除丙酮，加乙酸乙酯溶解，1%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得橙黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-戊基]醚。

实施例 15

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-己基]醚的合成：(化合物(III)之五)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 2.5 的实施例 10 制备的化合物：大黄酸溶于 15 倍于反应物重量的无水丙酮中，0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，在 20℃，反应 10 小时，蒸除丙酮，加氯仿溶解，6%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得橙黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-己基]醚。

实施例 16

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-乙基)醚的合成：(化合物(IV)之一)：

在反应容器中，将实施例 6 制备的化合物溶于 10 倍于反应物重量的甲醇中，在 0℃下加入 1 倍于反应物重量的硼氢化钾，保温反应 2 小时，向反应液中滴加 1N 盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，过滤得白色或乳白色固体的化合物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-乙基)醚。

实施例 17

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-丙基)醚的合成：(化合物(IV)之二)：

在反应容器中，将实施例 7 制备的化合物溶于 50 倍于反应物重量的甲醇中，在 0℃下加入 1.5 倍于反应物重量的硼氢化钾，保温反应 5 小时，向反应液中滴加 6N 盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，过滤得白色或乳白色固体的化合物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-丙基)醚。

实施例 18

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-丁基)醚的合成：(化合物(IV)之三)：

在反应容器中，将实施例 8 制备的化合物溶于 25 倍于反应物重量的甲醇中，在 0℃下加入 1 倍于反应物重量的硼氢化钾，保温反应 4 小时，向反应液中滴加 5N 盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，过滤得白色或乳白色固体的化合物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-丁基)醚。

实施例 19

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-(哌嗪基-N¹-戊基)醚的合成：(化合物(IV)之四)：

在反应容器中，将实施例 9 制备的化合物溶于 40 倍于反应物重量的甲醇中，在 0℃下加

入 1.5 倍于反应物重量的硼氢化钾，保温反应 5 小时，向反应液中滴加 6N 盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，过滤得白色或乳白色固体的化合物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-戊基) 醚。

实施例 20

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-己基) 醚的合成：(化合物(IV)之五)：

在反应容器中，将实施例 10 制备的化合物溶于 10 倍于反应物重量的甲醇中，在 0℃ 下加入 1 倍于反应物重量的硼氢化钾，保温反应 2 小时，向反应液中滴加 1N 盐酸中和至中性，蒸除甲醇，残渣水洗，过滤得白色或乳白色固体的化合物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-己基) 醚。

实施例 21

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-乙基醚的合成：(化合物(V)之一)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 0.5 的实施例 16 制备的化合物：大黄酸溶于 10 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中，0℃ 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，20℃，反应 14 小时，蒸除丙酮，加氯仿溶解，1%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-乙基醚。

¹HNMR: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 4.05(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.71 (t 1H 17-CH) 3.47(t 2H NCH₂) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.69(t 2H ArOCCH₂) 2.45~2.41(m 4H N(CH₂)₂) 0.75(S 3H 18-CH₃) IR: 3370, 2930, 2875, 1671, 1608 MS(m/z): 651.4 (76.3) mp. 187℃ 分解。

实施例 22

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-丙基醚的合成：(化合物(V)之二)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 2.5 的实施例 17 制备的化合物：大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中，0℃ 下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，30℃，反应 8 小时，蒸除丙酮，加甲苯溶解，10%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-丙基醚。

¹HNMR: 12.07(S 1H ArOH) 11.91(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 4.02(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.71 (t 1H 17-CH) 3.47(t 2H NCH₂) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.69(t 2H ArOCCH₂) 2.45~2.41(m 4H N(CH₂)₂) 0.75(S 3H 18-CH₃) IR: 3370, 2930, 2875, 1671, 1608 MS(m/z): 665.6 (281.3) mp. 192℃ 分解

实施例 23

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-丁基醚的合成: (化合物(V)之三)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2 的实施例 18 制备的化合物: 大黄酸溶于 15 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 25℃, 反应 10 小时, 蒸除丙酮, 加乙酸乙酯溶解, 8%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-丁基醚。

¹HNMR: 12.06(S 1H ArOH) 11.94(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.71~7.67(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.16(d 1H ArH) 6.66~6.57(m 2H ArH) 3.95(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.71 (t 1H 17-CH) 3.47(t 2H NCH₂) 2.86~2.84(m 2H ArCH₂) 2.69(t 2H ArOCCH₂) 2.45~2.41(m 4H N(CH₂)₂) 0.75(S 3H 18-CH₃) IR: 3370, 2930, 2875, 1671, 1608 MS(m/z): 679.7 (543.5) mp. 190℃ 分解

实施例 24

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-戊基醚的合成: (化合物(V)之四)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2 的实施例 19 制备的化合物: 大黄酸溶于 18 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 27℃, 反应 12 小时, 蒸除丙酮, 加乙酸乙酯溶解, 10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-戊基醚。

实施例 25

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-己基醚的合成: (化合物(V)之五)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 2 的实施例 20 制备的化合物: 大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 30℃, 反应 12 小时, 蒸除丙酮, 加乙酸乙酯溶解, 10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得金黄色或橙黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-己基醚。

实施例 26

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-乙二醇基醚的合成: (化合物(VI)之一):

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 1: 0.05 的乙二醇苯磺酸单酯: 雌酚酮: 四正丁基溴化铵加入至相当于反应物重量 4 倍甲苯中, 升温至 60℃, 滴入摩尔数 10 倍于雌酚酮摩尔数的 20%氢氧化钠溶液, 反应 4 小时, 分出甲苯层, 水洗甲苯层至中性, 活性炭脱色, 回收甲苯, 得微黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-乙二醇基醚。

实施例 27

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-二聚乙二醇基醚的合成: (化合物(VI)之二):

在反应容器中, 将摩尔比为 2: 1: 0.5 的二聚乙二醇苯磺酸单酯: 雌酚酮: 四正丁基溴化铵加入至相当于反应物重量 6 倍甲苯中, 升温至 80℃, 滴入摩尔数 13 倍于雌酚酮摩尔数的 50%氢氧化钠溶液, 反应 3 小时, 分出甲苯层, 水洗甲苯层至中性, 活性炭脱色, 回收甲苯, 得微黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-二聚乙二醇基醚。

实施例 28

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-三聚乙二醇基醚的合成: (化合物(VI)之三):

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 1: 0.1 的三聚乙二醇苯磺酸单酯: 雌酚酮: 四正丁基溴化铵加入至相当于反应物重量 8 倍甲苯中, 升温至 100℃, 滴入摩尔数 15 倍于雌酚酮摩尔数的 30%氢氧化钠溶液, 反应 2 小时, 分出甲苯层, 水洗甲苯层至中性, 活性炭脱色, 回收甲苯, 得微黄色固体的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-三聚乙二醇基醚。

实施例 29

按照实施例 28 的步骤和各种反应物的比例, 用四聚乙二醇苯磺酸单酯至八聚乙二醇苯磺酸单酯分别替代三聚乙二醇苯磺酸单酯, 分别制成聚合度为 4-8 的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-聚乙二醇基醚。

实施例 30

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰乙二醇基醚的合成: (化合物(VII)之一)

在反应容器中, 将摩尔比 1: 4 的实施例 26 制备的化合物: 10%氢氧化钠与四氢呋喃混匀, 使化合物的四氢呋喃溶液的摩尔浓度为 0.004mol/L, 滴加重量百分比 2%的苯磺酰氯的四氢呋喃溶液 15ml, 继续搅拌 3 小时, 减压除去四氢呋喃, 半固体物溶于氯仿以 2N 氢氧化钠洗涤, 水洗至中性, 活性炭脱色, 回收溶剂, 得浅黄色油状物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰乙二醇基醚。

实施例 31

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰二聚乙二醇基醚的合成: (化合物(VII)之二)

在反应容器中, 将摩尔比 1: 4 的实施例 27 制备的化合物: 20%氢氧化钠与四氢呋喃混匀, 使化合物的四氢呋喃溶液的摩尔浓度为 0.007mol/L, 滴加重量百分比 3%的苯磺酰氯的四氢呋喃溶液 20ml, 继续搅拌 3 小时, 减压除去四氢呋喃, 半固体物溶于甲苯以 4N 氢氧化钠洗涤, 水洗至中性, 活性炭脱色, 回收溶剂, 得浅黄色油状物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰二聚乙二醇基醚。

实施例 32

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰三聚乙二醇基醚的合成: (化合物(VII)之三)

在反应容器中, 将摩尔比 1: 6 的实施例 28 制备的化合物: 30%氢氧化钠与四氢呋喃混匀, 使化合物的四氢呋喃溶液的摩尔浓度为 0.01mol/L, 滴加重量百分比 4%的苯磺酰氯的四

氢呋喃溶液 30ml, 继续搅拌 3 小时, 减压除去四氢呋喃, 半固体物溶于二氯甲烷以 4N 氢氧化钠洗涤, 水洗至中性, 活性炭脱色, 回收溶剂, 得浅黄色油状物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰三聚乙二醇基醚。

实施例 33

用实施例 32 的步骤, 用实施例 29 的化合物参与反应制成聚合度为 4-8 的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) 三烯-17 酮-3-苯磺酰聚乙二醇基醚。

实施例 34

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-乙二醇基) 醚的合成: (化合物(VIII) 之一)

在反应容器中, 将摩尔比为 10: 0.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 1 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 50°C, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20 的实施例 30 制备的化合物, 保温反应 2 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 1 倍的水溶解, 二氯甲烷提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体(3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-乙二醇基) 醚。

实施例 35

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基) 醚的合成: (化合物(VIII) 之二)

在反应容器中, 将摩尔比为 10: 1.0 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 2 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 100°C, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/10 的实施例 31 制备的化合物, 保温反应 2 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 3 倍的水溶解, 氯仿提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基) 醚。

实施例 36

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基) 醚的合成: (化合物(VIII) 之三)

在反应容器中, 将摩尔比为 10: 1.5 的六水合哌嗪: 无水碳酸钠溶于 2 倍于反应物重量的 N, N 二甲基甲酰胺, 升温至外温 100°C, 加入摩尔数为六水合哌嗪摩尔数的 1/20 的实施例 32 制备的化合物, 保温反应 5 小时, 减压浓缩至干, 加入相当于反应物体积 5 倍的水溶解, 甲苯提取, 回收溶剂, 得白色或乳白色固体物 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基) 醚。

实施例 37

用实施例 35 的步骤, 用实施例 33 的各个化合物分别进行反应制成聚合度为 4-8 的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17 酮-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基) 醚。

实施例 38

3-羟基-雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-17-酮-3-[N¹-(1,8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-乙二醇基] 醚的合成: (化合物 (IX) 之一)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 0.5 的实施例 34 制备的化合物：大黄酸溶于 10 倍于反应物重量的无水丙酮中，0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，在 20℃，反应 8 小时，蒸除丙酮，加氯仿溶解，1%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色固体 3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-乙二醇基]醚。

实施例 39

3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基]醚的合成：(化合物 (IX) 之二)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 2.5 的实施例 35 制备的化合物：大黄酸溶于 15 倍于反应物重量的无水丙酮中，0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 2 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，在 50℃，反应 10 小时，蒸除丙酮，加甲苯溶解，10%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色或橙黄色固体 3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基]醚。

¹HNMR: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 4.02(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.78(t 2H ArOCCH₂) 3.69(t 2H OCH₂) 3.47(t 2H NCH₂) 2.85~2.80(m 2H ArCH₂) 2.65(t 2H NCH₂C) 2.50(t 4H N(CH₂)₂) 0.87(S 3H 18-CH₃) IR: 2930, 2875, 1734, 1670, 1611 MS (m/z): 693.3 (54.1) mp. 145-146℃

实施例 40

3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基]醚的合成：(化合物 (IX) 之三)

在反应容器中，将摩尔比为 1: 2 的实施例 36 制备的化合物：大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮中，0℃下加入摩尔数为大黄酸摩尔数 1 倍的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，在 35℃，反应 14 小时，蒸除丙酮，加乙酸乙酯溶解，5%碳酸氢钠溶液洗，回收溶剂，粗品经硅胶柱层析，分离得金黄色或橙黄色固体 3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基]醚。

¹HNMR: 12.09(S 1H ArOH) 11.97(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 4.04(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.80(t 2H ArOCCH₂) 3.68~3.60(m 6H CH₂OCH₂CH₂) 3.47(t 2H NCH₂) 2.85~2.80(m 2H ArCH₂) 2.65(t 2H NCH₂C) 2.50(t 4H N(CH₂)₂) 0.87(S 3H 18-CH₃) IR: 2930, 2875, 1734, 1670, 1611 MS (m/z): 737.4 (76.3) mp. 126-128℃

实施例 41

用实施例 39 的步骤，用实施例 37 的各个化合物分别进行反应制成聚合度为 4-8 的 3-羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-17-酮-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基-N¹-聚乙二醇基]醚。

实施例 42

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-乙二醇基)醚的合成:(化合物(X)之一)

在反应容器中, 实施例 34 制得的化合物溶于其重量 10 倍的甲醇中, 在 0℃下加入 1 倍硼氢化钾, 保温反应 2 小时, 向反应液中滴加 1N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 得乳白色固体 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-乙二醇基)醚。

实施例 43

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基)醚的合成:(化合物(X)之二)

在反应容器中, 实施例 35 制得的化合物溶于其重量 25 倍的甲醇中, 在 0℃下加入 1.5 倍硼氢化钾, 保温反应 3 小时, 向反应液中滴加 6N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 得乳白色固体 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-二聚乙二醇基)醚。

实施例 44

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基)醚的合成:(化合物(X)之三)

在反应容器中, 实施例 36 制得的化合物溶于其重量 50 倍的甲醇中, 在 0℃下加入 1.0 倍硼氢化钾, 保温反应 5 小时, 向反应液中滴加 3N 盐酸中和至中性, 蒸除甲醇, 残渣水洗, 得无色油状物 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-三聚乙二醇基)醚

实施例 45

用实施例 43 的步骤, 用实施例 37 的各个化合物分别进行反应制成聚合度为 4-8 的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-(哌嗪基-N¹-聚乙二醇基)醚

实施例 46

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-乙二醇基)醚的合成:(化合物(XI)之一)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 0.5 的实施例 4 2 制备的化合物: 大黄酸溶于 10 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入与大黄酸等摩尔的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 20℃, 反应 8 小时, 蒸除丙酮, 加氯仿溶解, 1%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得橙黄色或棕黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-乙二醇基)醚。

实施例 47

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-二聚乙二醇基)醚的合成:(化合物(XI)之二)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 1.5 的实施例 4 3 制备的化合物: 大黄酸溶于 15 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0℃下加入与大黄酸等摩尔的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 25℃, 反应 12 小时, 蒸除丙酮, 加甲苯溶解, 5%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得橙黄色或棕黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5 (10)-三烯-3-[N⁴-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-二聚乙二醇基)醚。

$^1\text{H NMR}$: 12.05(S 1H ArOH) 11.93(S 1H ArOH) 7.84(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.64~6.56(m 2H ArH) 4.06(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.78 (t 2H ArOCCH₂) 3.71 (t 1H 17-CH) 3.69 (t 2H OCH₂) 3.47(t 2H NCH₂) 2.85~2.80(m 2H ArCH₂) 2.65 (t 2H NCH₂C) 2.50(t 4H N(CH₂)₂) 0.75(S 3H 18-CH₃) IR: 3370, 2930, 2875, 1671, 1608 MS (m/z): 695.6 mp. 144-145°C

实施例 48

3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-三聚乙二醇基)醚的合成: (化合物(XI)之三)

在反应容器中, 将摩尔比为 1: 1.0 的实施例 44 制备的化合物: 大黄酸溶于 20 倍于反应物重量的无水丙酮溶液中, 0°C 下加入与大黄酸等摩尔的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 30°C, 反应 14 小时, 蒸除丙酮, 加乙酸乙酯溶解, 10%碳酸氢钠溶液洗, 回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析, 分离得橙黄色或棕黄色固体的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-三聚乙二醇基)醚。

$^1\text{H NMR}$: 12.07(S 1H ArOH) 11.95(S 1H ArOH) 7.83(m 2H ArH) 7.73~7.69(m 1H ArH) 7.32~7.24(m 2H ArH) 7.17(d 1H ArH) 6.68~6.60(m 2H ArH) 4.04(t 2H ArOCH₂) 3.86(t 2H NCH₂) 3.80 (t 2H ArOCCH₂) 3.71 (t 1H 17-CH) 3.68~3.60 (m 6H CH₂OCH₂CH₂) 3.47(t 2H NCH₂) 2.85~2.80(m 2H ArCH₂) 2.65 (t 2H NCH₂C) 2.50 (t 4H N(CH₂)₂) 0.75(S 3H 18-CH₃) IR: 3370, 2930, 2875, 1671, 1608 MS (m/z): 739.6 mp. 132-134°C

实施例 49

用实施例 47 的步骤, 用实施例 45 的各个化合物分别进行反应制成聚合度为 4-8 的 3, 17-二羟基-雌甾-1, 3, 5(10)-三烯-3-[N¹-(1, 8-二羟基-9, 10-蒽醌-3-甲酰基)哌嗪基]-N¹-聚乙二醇基)醚。

实施例 50

将大黄蒽醌衍生物, 按常规方法, 制成各种剂型如: 片剂、胶囊剂、颗粒剂、软胶囊剂。

实施例 51、

药理活性实验结果

1 对体外培养胚胎长骨生长的影响

1.1 实验动物: 昆明种小鼠, 雌鼠体重(30±2)g, 雄鼠体重(40±2)g。动物喂养条件: 温度 24±2°C, 湿度(60±5)%, 颗粒饲料喂养, 自由饮水进食。选择健康雌、雄鼠, 晚上 8:30 按雌:雄为 2:1 的比例合笼, 次日早 8:30 分笼, 见雌鼠有白色阴栓者即认为交配, 隔离喂养, 并将其定为妊娠 0 天, 将妊娠第 16 天早上 8:30 的雌鼠定为妊娠 16 天。

1.2 长骨培养方法

将妊娠 16d 的小鼠脱颈椎处死, 无菌条件下取雌性胎鼠前肢置 pH7.2 的 Hank's 液中, 在解剖显微镜下剥离出尺骨。放入盛有 BGJb 培养基的密闭小室中, 分别加入待测药物后, 通入混合气体 (O₂:CO₂:N₂=45%:5%:50%) 1min, 气流量为 1.5L·min⁻¹, 通气完毕后, 置于旋转培养装置上, 于 (37.5±0.5)°C 旋转悬浮培养, 转速 35 r·min⁻¹, 24h 后补充气体 1 次。

培养 48h 后, 在带有测微目镜的体视显微镜下测定长骨长度。结果以 $x \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行组间 t 检验。

1.3 实验结果: 雌酚酮和大黄酸在 10^{-6} mol/L, 均能使长骨增长, 雌酚酮同时也能是骨干增长。在培养基中加入 10^{-6} mol/L 待测目标物, 培养 48h 后, 各组长骨骨总长增长值与对照组相比均有显著性差异, 但其作用强度与桥链的长度密切相关。桥链为乙基或丙基时, 化合物的活性较雌酚酮相比减弱, 当桥链为三甘醇时, 对骨的促生长活性增强。(见表 1)

表 1 目标物对长骨生长的影响 ($x \pm s$, $n = 10$)

组别	浓度 (mol/L)	培养 48h 后, 长骨增长值 (mm)	培养 48h 后, 骨干增长值 (mm)
对照组		0.32 ± 0.083	0.16 ± 0.065
雌酚酮	10^{-6}	0.83 ± 0.062**	0.30 ± 0.050*
化合物 (III) n=2	10^{-6}	0.63 ± 0.084*	0.28 ± 0.071
化合物 (III) n=3	10^{-6}	0.59 ± 0.081*	0.29 ± 0.098
化合物 (III) n=4	10^{-6}	0.76 ± 0.063*	0.38 ± 0.051*
化合物 (IX) m=2	10^{-6}	0.78 ± 0.098*	0.31 ± 0.031*
化合物 (IX) m=3	10^{-6}	0.95 ± 0.072**	0.35 ± 0.062*
大黄酸	10^{-6}	0.68 ± 0.059*	0.22 ± 0.050
大黄酸+雌酚酮	0.5×10^{-6}	0.84 ± 0.048**	0.32 ± 0.042*

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$; ** 与对照组相比, $P < 0.01$

2 对幼雌小鼠子宫增殖的影响

2.1 实验动物: 雌性昆明种小鼠, 15d 龄, 体重 10-12g。标准小鼠颗粒饲料, 含蛋白质 20%, 含钙 0.6%。

2.2 实验方法: 将小鼠进行阴道涂片检查, 角化细胞阴性的纳入实验分组。实验分正常对照组、雌酚酮组、化合物组、大黄酸组共 8 组。每组 10 只, 各组分别灌胃给药, 对照组给等体积 0.5%CMC-Na 溶液。连续给药 5 天, 最后一次给药后 24 小时, 脱颈椎处死小鼠, 称体重, 然后取出子宫, 轻挤出子宫腔内的液体, 迅速以万分之一天平称湿重, 求体重 - 子宫重量百分率, 比较组间差异。(子宫重量百分率 = 子宫湿重 / 小鼠体重。)

2.3 实验结果: 雌酚酮组引起小鼠子宫重量明显增加, 但其它组与正常对照组子宫重量比较, 除化合物 (9) M=3 低于正常组外, 其它无统计学差异, 而与雌酚酮组相比均有显著性差异 (表 2)。

表 2 目标物对幼雌小鼠子宫重量的影响 ($x \pm s$, $n = 10$)

组别	给药剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	体重 (g)	子宫重量 (mg)	子宫重量系数 (mg/g)
对照组		10	17.85 ± 0.82	18.6 ± 3.8	1.00 ± 0.22
雌酚酮	0.174	10	17.00 ± 0.90	55.26 ± 4.1*	3.49 ± 0.40*

化合物 (III) n=2	0.414	10	17.51±1.17	20.33±4.6*	1.16±0.27*
化合物 (III) n=3	0.423	10	17.61±1.24	16.15±2.5*	1.01±0.14*
化合物 (III) n=4	0.435	10	17.23±1.00	19.85±4.4*	1.28±0.28*
化合物 (IX) m=2	0.443	10	17.86±0.91	17.12±3.6*	1.07±0.22*
化合物 (IX) m=3	0.471	10	17.38±0.83	14.07±2.2*	0.92±0.14*
				*	*
大黄酸	0.100	10	16.69±0.89	18.21±2.2*	1.15±0.21*
大黄酸+雌酚酮	0.100+0.17	10	16.51±0.87	50.33±4.6	3.16±0.27*
	4			*	

*与对照组相比: P<0.05; *与雌酚酮组相比: P<0.05。

3 对乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的影响

MCF-7 细胞体外培养于完全 α -MEM 培养基中, 培养基内含 15% 胎牛血清、2.2g/L NaHCO₃、25mmol/L HEPES、100ug/ml 青霉素、100ug/ml 链霉素。置 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

取对数生长期生长状态良好的 MCF-7 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 加完全 α -MEM 培养基吹打混匀, 制成细胞悬液, 调整活细胞浓度为 2×10^4 个/ml, 接种于 96 孔培养板, 待 24h 细胞完全贴壁后, 加入待测物, 同时设空白对照组、雌酚酮、雌二醇及目标物组, 除对照组外, 其它各组均同时设 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L 三个浓度组, 每组设六个复孔。按上述分组加药, 于 48h 后每孔加 MTT (5mg/ml) 20 μ l, 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h 后倒掉培养基, 将板晾干, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 200 μ l 在摇板机上震荡 20 min, 以 490 nm 为测量波长, 655 nm 为参比波长用酶标仪测定各孔吸光度 (OD 值)。计算平均抑制率。结果见表 3。

表 3 目标物对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响

名称	增殖率 (%)		
	10^{-7} (mol/L)	10^{-6} (mol/L)	10^{-5} (mol/L)
雌酚酮	113.7	120.7	121.1
大黄酸	88.5	83.5	77.2
化合物 (III) n=2	84.0	68.1	64.4
化合物 (III) n=3	83.9	81.4	79.5
化合物 (III) n=4	89.5	92.3	96.2
化合物 (IX) m=2	86.2	88.7	93.2
化合物 (IX) m=3	95.6	95.0	94.3
雌二醇	122.1(c)	134.5(b)	137.0 (a)
化合物 (V) n=2	98.8	90.8	85.9
化合物 (V) n=3	98.4	97.3	96.7

化合物 (V)	n=4	95.6	96.7	101.1
化合物 (XI)	m=2	98.1	109.3	120.4
化合物 (XI)	m=3	109.2	115.1	124.5

注：1) 对照组增殖率为 100%。

2) a, b, c 分别表示雌二醇浓度为 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L 下的增殖率

由表 3 可见，雌酚酮及雌二醇均可刺激乳腺癌细胞 MCF-7 增殖，雌二醇活性高于雌酚酮，在本试验浓度范围内，其作用随浓度升高而增强。大黄酸则表现出抑制增殖作用，在本实验浓度范围内也呈现剂量依赖关系。所有目标化合物与其相母体化合物相比，均表现出不同程度的抑制 MCF-7 细胞增殖的作用。

4 目标物对去卵巢大鼠骨密度及生物力学性能的影响

SD 大鼠 70 只，体重 300-350g，切除双侧卵巢，分为假手术组、雌酚酮组、骨质疏松模型组和化合物 (III) n=2 组和化合物 (IX) m=3 组，每日灌胃给药 1 次，给药剂量分别为雌酚酮(按 70kg 人 12 mg/日计，大鼠每日 0.216mg/200g) 1.08mg/kg，化合物 (III) n=2 2.59 mg/kg(与雌酚酮等摩尔)，化合物 (IX) m=3 5.49 mg/kg(与雌酚酮等摩尔)，13 周后处死。取股骨做生物力学性能测定，测定最大负荷，计算结构强度。灰化后用原子吸收分光光度法测钙、磷含量。结果见表 4。

表 4 目标物对 OVX 大鼠股骨和胫骨生物力学性能的影响

组别	动物数	股骨最大负荷	股骨结构强度	胫骨最大负荷	胫骨结构强度
		N	N/mm	N	N/mm
Sham	10	109.8±10.2	298±20	72.4±3.5	114.1±21.5
OVX	10	90.7±11.1 ^{###}	245±13 ^{###}	61.0±7.9 [*]	103.9±19.8
雌酚酮	10	106.4±12.4 [*]	280±22 ^{**}	69.8±11.6	120.8±20.3
化合物 (III)	10	104.5±13.3 [*]	275±21 ^{**}	68.0±12.7	131.4±23.3 [*]
n=2					
化合物 (IX)	10	110.2±14.5 ^{**}	293±24 ^{**}	71.8±14.7	134.8±22.8 ^{**}
m=3					

注：#：与 Sham 比， $p<0.05$ ，##：与 Sham 比， $p<0.01$ 。*：与 OVX 比， $p<0.05$ ，**：与 OVX 比， $p<0.01$ 。

表 5 目标物对 OVX 大鼠股骨单位体积灰分和钙、磷元素含量的影响

组别	动物数	灰分	Ca	磷
		mg/cm ³	mg/cm ³	mg/cm ³
Sham	10	717±41	261±13	118±8
OVX	10	652±43 ^{###}	223±13 ^{###}	106±7 [*]

雌酚酮	10	693±40*	258±15**	114±9*
化合物(III)	10	701±48*	262±21**	116±10**
n=2				
化合物(IX)	10	719±32**	264±24**	119±7**
m=3				

注: #: 与Sham比, $p < 0.05$, ##: 与Sham比, $p < 0.01$. *: 与OVX比, $p < 0.05$, **: 与OVX比, $p < 0.01$.

由表4、5可知, 化合物(III) $n=2$, 和化合物(IX) $m=3$ 能提高去卵巢大鼠的骨矿含量, 增大其承载负荷的能力, 表明其能够对抗去卵巢导致的大鼠骨质丢失。

实施例 52

羟磷灰石吸附试验测定目标物对骨的吸附能力, 称取四环素和待测物, 配成浓度为 0.25mmol/L 的无水乙醇溶液, 吸取 5ml 待测溶液至 10ml 容量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 加入 25mg 羟磷灰石, 超声震荡 1 分钟, 与暗处室温平衡 16 小时后, 过滤, 用分光光度法测定吸收度, 吸附量计算公式: $A=V\Delta C/W$, V -溶液体积, ΔC -标准液与平衡液的浓度差, W -羟磷灰石重量。

结果见表6。

表6 目标物及四环素与羟磷灰石吸附试验数据

化合物	测定波长 (nm)	平衡浓度 (mmol/L)	吸附量 $\mu\text{mol/g}$
四环素	367	0.115	3.97
化合物(III) $n=2$	320	0.116	3.42
化合物(III) $n=3$	320	0.114	4.4
化合物(III) $n=4$	320	0.115	3.97
化合物(IX) $m=2$	320	0.114	4.4
化合物(IX) $m=3$	320	0.1135	4.6
大黄酸	320	0.111	5.6

由表6可知, 大黄酸向四环素一样, 体外对羟磷灰石具有较强的吸附能力, 这是由于大黄酸具有平面结构, 其 $1, 8$ 位羟基可分别与 9 位羰基一起螯合形成稳定的六元环, 具备了与骨组织羟磷灰石结合的结构条件, 大黄酸与雌酚酮连接后, 仍然不同程度地保留了其对羟磷灰石的吸附能力表明, 合成的大黄萘醌衍生物具有趋骨性。

我们通过体外羟磷灰石吸附实验证实大黄酸对羟磷灰石具有很强的亲和能力。大黄酸对羟磷灰石的亲和能力甚至超过了四环素。通过小鼠体内分布实验证实, 大黄酸极易入骨。家兔破骨细胞与牛骨磨片共培养时, 加入大黄酸可抑制破骨细胞的骨吸收。以上结果提示大黄萘醌化合物既可作为趋骨性载体, 又可能与雌激素协同对骨发挥作用。此外, 本发明的目的在于合成大黄萘醌与雌激素的偶连物, 目的是利用大黄萘醌的趋骨性将雌激素带入骨组织, 期望在提高骨组织雌激素浓度, 降低其在非骨组织浓度的同时, 使雌激素和大黄萘醌这两种不同的化合物能在同一靶部位发挥各自的作用, 在骨组织产生协同作用。提供一类高效低副

作用的骨导向雌激素。

综上所述，本研究合成的系列大黄酸-雌激素保留了雌激素对骨的作用，但对子宫却未表现出刺激性，与其母体雌激素相比，对乳腺癌细胞的增殖表现出一定程度的抑制作用。