強心性植物成分の研究 (第8報¹⁾) 強心配糖体 Proscillaridin の 硝酸エステル体の合成とその薬理作用

村上啓寿,^a 佐藤裕一,^a 棚瀬隆宏,^a 永井慎一,^a 植田泰誠,^a
榊原仁作,^{*,a} 安藤裕明,^b 堀田芳弘,^b 竹谷和視,^b 浅野正久^c
名古屋市立大学薬学部,^a 愛知医科大学,^b 名古屋市立大学医学部^c

Studies on Cardiac Ingredients of Plants. VIII.¹⁾ Preparation of Nitrates of Proscillaridin and Their Pharmacological Activities

Nobutoshi MURAKAMI,^a Yuichi SATO,^a Takahiro TANASE,^a
Shin-ichi NAGAI,^a Taisei UEDA,^a Jinsaku SAKAKIBARA,^{*,a}
Hiroaki ANDO,^b Yoshihiro HOTTA^b, Kazumi TAKEYA,^b
and Masahisa ASANO^c

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,^a Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan, Department of Pharmacology, Aichi
Medical University,^b Nagakute, Aichi 480-11, Japan and Department
of Pharmacology, Nagoya City University Medical School,^c
Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan*

(Received February 25, 1991)

To reduce the vascular contracting effect of the cardiac glycoside, proscillaridin (1), all kinds of its nitrates were prepared by utilizing effectively an isopropylidene function as a protective group.

The pharmacological activities of proscillaridin nitrates were evaluated by the use of isolated guinea-pig papillary muscle preparations and Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase preparations from the dog kidney. Furthermore, the effect for smooth muscle using the helical strips isolated from 13-week old spontaneously hypertensive rat was examined. The positive inotropic effects and Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase inhibition activities of mononitrates (6, 9, 15) and dinitrates (3, 4, 5) were a little less potent than 1, but those of trinitrate (2) were much reduced. Every nitrate did not exhibited a vascular contracting effect but a relaxing effect. Among them, the vascular relaxing effects of 2',3'-dinitrate (3) and 2',4'-dinitrate (4) were more potent than those of the other nitrates.

Keywords—cardiac ingredient; proscillaridin; nitrate; Na⁺, K⁺-ATPase; guinea-pig papillary muscle; positive inotropic effect (PIE); vascular relaxing effect

緒 言

鬱血性心不全の治療薬として繁用されている強心配糖体は、いまだに他に換えるものをみないほど優れた薬物とされている。²⁾ しかし強心配糖体は心筋収縮力増大とともに血管収縮作用を有することから、その血行動態への影響も懸念される。³⁾ また一方、これら強心配糖体の活性発現には糖部分の存在が必要とされており、Watsonらは生体内のレセプターとの結合位置は糖部水酸基にあると推定している。⁴⁾ しかしながら、この推論を裏付けるためにこれまで糖部水酸基の化学修飾により得られた誘導体で、その薬理作用の検討されたものは少ないことなどから、さらに詳細な検討が必要と思われる。我々の研究室では、これまで強心性植物成分の化学変換とその薬理作用に関する研究を行っており、その1つとしてユリ科植物の海葱の鱗茎より得られる proscillaridin⁵⁾ の化学修飾とその薬理作用について検討を重ねてきた。⁶⁾ 今回、本研究の一環として我々はニトログリセリンに代表される硝酸エステル類が血管拡張作用を有することに着目し、平滑筋収縮作用の緩和された新しい強心性薬物の開発と、生体内でのレセプターと糖部水酸基の関係についての情報を得ることを目的とし、強心配糖体 pro-

scillaridin の構成糖であるラムノース水酸基の硝酸エステル体の合成を行った.⁷⁾ 著者らはイソプロピリデン基及びアセチル基を保護基として用いることにより, 存在しうるすべての硝酸エステル体 7 種を合成した.

得られた硝酸エステル体は, dog kidney より抽出された Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase (Na^+ , K^+ -ATPase) の阻害活性を測定し pIC_{50} 値を算出することにより,⁸⁾ またモルモット摘出乳頭筋の陽性変力作用試験を行い pD_2 値を算出することにより強心活性の測定を行った. また血管平滑筋に対する作用は高血圧自然発症ラット (SHR) の腸間膜動脈を用いて測定を行った.⁹⁾

本報では, これら硝酸エステル体の合成とその Na^+ , K^+ -ATPase 抑制活性, 心筋, 平滑筋に対する作用について得られた知見を報告する.

硝酸エステルの合成

Proscillaridin 硝酸エステル体 5 種を Chart 1 に示した方法によって合成した. まず, proscillaridin (**1**) を CH_2Cl_2 に懸濁し, -15°C で発煙硝酸-無水酢酸 (1:9) 混液を滴下し, 30 分間攪拌した後, 反応液を後処理して得られる生成物をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , CHCl_3) で分離精製して **2**—**6** をそれぞれ 34, 14, 19, 15, 8% の収率で得た.

2 は元素分析の結果より $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{14}$ の組成を有することが判明し, 赤外吸収 (IR) スペクトルでは α -pyrone 環のカルボニル基に由来する 1715 cm^{-1} の他に, 1645 , 1270 cm^{-1} に硝酸エステルに特徴的な吸収が見られた. ^1H 核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR) を **1** と比較したところ α -pyrone 環に特徴的なシグナル 6.27 ppm (1H, dd, $J=0.8$, 9.7 Hz , 23-H), 7.23 ppm (1H, dd, $J=0.8$, 2.5 Hz , 21-H), 7.82 ppm (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz , 22-H) をはじめとしてステロイド部分に由来するシグナルには変化が見られなかった. しかし, 糖部のシグナルに関しては **1** の 3.86 ppm (1H, dd, $J=1.6$, 3.5 Hz , 2'-H), 3.70 ppm (2H, m, 3'-H, 5'-H), 3.42 ppm (1H, dd, $J=9.4$, 9.4 Hz , 4'-H) の 3 本のシグナルがそれぞれ約 1.7 ppm 低磁場ヘシフトして観測され, しかもカップリングパターン及び結合定数にはほとんど変化が見られなかった. したがって **2** の構造は 3β -[(6-deoxy-2,3,4-tri-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide と決定した.

また **3**—**5** については元素分析の結果より, その組成式が $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{12}$ であることが判明し, IR スペクトルにおいても **2** と同様に 1635 — 1650 , 1270 cm^{-1} 付近に硝酸エステルの存在を示唆する吸収が観測された. ^1H NMR スペクトルデータにおいては, **1** のラムノース 2', 3', 4' 位のプロトンシグナルのうち, **3** では 5.44 ppm (1H, d, $J=3.5\text{ Hz}$, 2'-H), 5.41 ppm (1H, dd, $J=3.5$, 9.5 Hz , 3'-H) と, **1** のシグナルに比べラムノース 2 位及び 3 位のプロトンシグナルが 1.6 — 1.7 ppm 低磁場ヘシフトしていることより **3** の構造を 3β -[(6-deoxy-2,3-di-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide であると決定した. **4** は 2' 位, 4' 位に相当するプロトンシグナルが, **5** は 3' 位, 4' 位に相当するプロトンシグナルがそれぞれ 1.5 — 1.9 ppm 低磁場ヘシフトしていることからそれらの構造を 3β -[(6-deoxy-2,4-di-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxy-

Chart 1

bufa-4,20,22-trienolide (4), 3 β -[(6-deoxy-3,4-di-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (5)であることを明らかにした。

6は、元素分析の結果より、ニトロ基が1個導入された構造であることが確認され、IR スペクトルデータにおいても 1645, 1270 cm⁻¹ に強い吸収をもっていることから1のモノニトロエステル体であることが判明した。また、¹H NMR において 3' 位に相当する 3.70 ppm のシグナルが 5.19 ppm へと低磁場シフトしていることから、6は 3 β -[(6-deoxy-3-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide と決定した。

Proscillaridin の糖水酸基を保護せず直接、発煙硝酸-無水酢酸の混液でニトロ化する方法では反応時間、温度、試薬の当量、混合比など条件を種々検討したが、proscillaridin 2'-mononitrate, 4'-mononitrate を得ることはできなかった。そこで我々はラムノース 2', 3' 位水酸基をイソプロピリデン基で保護した後、前述の方法で硝酸エステル化した上で、脱保護し proscillaridin 4'-mononitrate を合成することを検討した。まず、1を無水 dimethylformamide (DMF) 中 2,2-dimethoxypropane を加え *p*-TsOH 存在下、室温で 30 分間攪拌することにより7を定量的に得た。7は¹H NMR において 1.35 ppm と 1.52 ppm にイソプロピリデン基由来のメチルプロトンシグナルが観測され、また 3' 位のプロトンシグナルが1の 3.70 ppm より 4.10 ppm へ、2' 位のシグナルが 3.93 ppm から 4.15 ppm へと低磁場シフトしていることから7はラムノース 2, 3 位の水酸基がイソプロピリデン基により保護された化合物であることが判明した。これに前述の方法でニトロ化を行い、4' 位水酸基を硝酸エステルへと変換した後に、さらに8をメタノール中 *p*-TsOH 存在下で脱イソプロピリデン化を行い9を1より 49% の収率で得た (Chart 2)。

9は¹H NMR スペクトルにおいて、4' 位のプロトンシグナルが1の 3.42 ppm (1H, dd, *J*=9.4, 9.4 Hz) から 5.10 ppm (1H, dd, *J*=9.6, 9.6 Hz) へと低磁場シフトしていた。また IR スペクトル及び元素分析からモノニトロエステル構造が確認されたことにより、その構造を 3 β -[(6-deoxy-4-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-

Chart 2

Chart 3

TABLE I. ^1H NMR Data for Sugar Moiety of Proscillaridin Nitrates

Compound	1'-H	2'-H	3'-H	4'-H	5'-H	5'-CH ₃
Proscillaridin (1)	4.91 (1H, d, $J=1.6$)	3.86 (1H, dd, $J=1.6, 3.5$)	3.70 (2H, m)	3.42 (1H, dd, $J=9.4, 9.4$)	3.70 (2H, m)	1.28 (3H, d, $J=6.2$)
2'-Mononitrate (15)	5.05 (1H, d, $J=1.5$)	5.25 (1H, dd, $J=1.5, 3.7$)	4.07 (1H, dd, $J=3.7, 9.3$)	3.43 (1H, dd, $J=9.3, 9.3$)	3.78 (1H, dq, $J=6.4, 9.3$)	1.31 (3H, d, $J=6.4$)
3'-Mononitrate (6)	4.92 (1H, d, $J=1.5$)	4.13 (2H, br-s)	5.19 (1H, dd, $J=3.1, 9.6$)	3.68 (1H, dd, $J=9.6, 9.6$)	3.84 (1H, dq, $J=6.2, 9.6$)	1.32 (3H, d, $J=6.2$)
4'-Mononitrate (9)	4.98 (1H, s)	4.01-4.05 (2H, m)	4.01-4.05 (2H, m)	5.10 (1H, dd, $J=9.6, 9.6$)	3.91 (1H, dq, $J=6.3, 9.6$)	1.28 (3H, d, $J=6.3$)
2',3'-Dinitrate (3)	5.10 (1H, s)	5.44 (1H, d, $J=3.5$)	5.41 (1H, dd, $J=3.5, 9.5$)	3.54 (1H, dd, $J=9.5, 9.5$)	3.90 (1H, dq, $J=6.2, 9.5$)	1.33 (3H, d, $J=6.2$)
2',4'-Dinitrate (4)	5.08 (1H, d, $J=1.3$)	5.28 (1H, dd, $J=1.3, 3.7$)	4.29 (1H, dd, $J=3.7, 9.9$)	5.00 (1H, dd, $J=9.9, 9.9$)	3.92 (1H, dq, $J=6.2, 9.9$)	1.29 (3H, d, $J=6.2$)
3',4'-Dinitrate (5)	4.97 (1H, d, $J=1.8$)	4.22 (1H, dd, $J=1.8, 3.5$)	5.29-5.33 (2H, m)	5.38 (1H, dd, $J=9.5, 9.5$)	4.02 (1H, dq, $J=6.2, 9.5$)	1.31 (3H, d, $J=6.2$)
2',3',4'-Trinitrate (2)	5.14 (1H, d, $J=1.7$)	5.51 (1H, dd, $J=1.7, 3.3$)	5.55 (1H, dd, $J=3.3, 9.9$)	5.13 (1H, dd, $J=9.9, 9.9$)	4.07 (1H, dq, $J=6.2, 9.9$)	1.33 (3H, d, $J=6.2$)

Coupling constants are given in $J = \text{Hz}$.

TABLE II. Biological Activities of Proscillaridin Nitrates (2—6, 9 and 15)

Compound	pIC ₅₀ ±S.E. ^{a)}	pD ₂ ±S.E. ^{b)}
Proscillaridin (1)	7.44±0.02	7.41±0.14
2'-Mononitrate (15)	6.93±0.02	7.24±0.12
3'-Mononitrate (6)	6.83±0.04	7.14±0.06
4'-Mononitrate (9)	6.84±0.07	7.31±0.03
2',3'-Dinitrate (3)	6.79±0.07	6.28±0.05 ^{d)}
2',4'-Dinitrate (4)	6.99±0.04	6.87±0.07 ^{c)}
3',4'-Dinitrate (5)	6.46±0.03	6.74±0.05 ^{d)}
2',3',4'-Trinitrate (2)	4.91±0.16	5.10±0.09 ^{d)}

a) pIC₅₀ is the concentration of the test compounds required for 50% of the maximum inhibition of the activity of an Na⁺, K⁺-ATPase preparation from dog kidney. b) pD₂ is the concentration of the test compounds required for 50% of the maximum PIE in guinea-pig papillary muscles. c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$ significantly different from the value of 1.

14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide と決定した。

2'-モノニトロエステル体は以下のようにして合成した。化合物 (7) をアセチル化して得た 10 をメタノール *p*-TsOH 処理することにより脱イソプロピリデン化して proscillaridin 4'-monoacetate (11) を 90% の収率で得た。これは 2.13 ppm にアセチルメチル基のシグナルが観測されること、4' 位のプロトンシグナルが 4.78 ppm へと低磁場シフトしていることから、その構造を確認した。この 11 に対し前述の方法でニトロ化を行い、12, 13, 14 の混合物を得た。これらを分離せず MeOH 中 K₂CO₃ を用いて脱アセチル化したところ 15, 3, 6 の混合物を得た。この混合物をカラムクロマトグラフィー、及び逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC, Develosil ODS-5, MeOH : H₂O = 4 : 1) で分離精製し、15 を 60%, 6 を 22%, 3 を 6% の収率で得た (Chart 3)。

15 の構造は、元素分析より 1 個のニトロ基の存在が明らかになり、IR スペクトルでは硝酸エステル体に特徴的な吸収がみられたこと、さらに ¹H NMR では 1 の 3.92 ppm の 2' 位プロトンシグナルが 5.25 ppm に低磁場シフトしていることから 3 β -[(6-deoxy-2-O-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide であると確認された。

以上、今回、我々は発煙硝酸-無水酢酸の混液をニトロ化の条件とし、イソプロピリデン基を保護基として使用することにより proscillaridin (1) の、存在しうるすべての硝酸エステル体 (2—6, 9, 15) を合成した。

薬理作用

合成した各種硝酸エステル体のイヌ腎 Na⁺, K⁺-ATPase の阻害活性は、Schorner らの方法を用いて算出した。⁸⁾ また、陽性変力作用については、モルモット摘出右心室乳頭筋標本を用いて測定した。イヌ腎 Na⁺, K⁺-ATPase の 50% 阻害を示すのと、摘出乳頭筋の最大収縮の 50% 収縮を起こすのに必要な濃度の逆対数値をそれぞれ各化合物の pIC₅₀, pD₂ 値とし、pD₂ 値については Student の *t*-test により proscillaridin との有意差を検討し、¹⁰⁾ Table II に示した。各化合物の pD₂ 値と pIC₅₀ 値との関係は、回帰式 $pD_2 = 0.928 \times pIC_{50} + 0.593$ で表され、相関係数 $r = 0.91$ と高い相関性を示し、これは危険率 $p < 0.01$ で有意であった。現在、強心配糖体製剤として使用されているジゴキシン、ジギトキシンの pIC₅₀, pD₂ は 6.0—7.0 の間の値であることからモノニトロ体 (6, 9, 15)、ジニトロ体 (3, 4, 5) は母化合物より若干劣るものの、強心薬として充分使用できうる酵素阻害

TABLE III. Arterial Relaxant Responses to the Test Compounds in 35.9 mm KCl-Contracted Strips of the Mesenteric Artery Isolated from 13-Week Old Spontaneously Hypertensive Rats

Compound	Relaxation (%) ^{a)} 1 μ M	Relaxation (%) ^{a)} 5 μ M
2'-Mononitrate (15)	1.4±0.7	20.2± 3.4
3'-Mononitrate (6)	7.2±2.6	29.9± 1.2
4'-Mononitrate (9)	5.0±1.4	31.3± 7.0
2',3'-Dinitrate (3)	4.2±1.5	62.6± 2.4
2',4'-Dinitrate (4)	5.2±1.5	66.6±11.3
3',4'-Dinitrate (5)	13.0±4.5	37.0± 5.7
2',3',4'-Trinitrate (2)	10.6±4.7	30.2± 9.2
DMSO (solvent)	0.3±0.2	3.0± 0.9

a) Relaxation induced by the test compound is expressed as % (mean±S. E.) of the contraction induced by 35.9 mm KCl.

活性及び陽性変力作用を示した。しかしながら、トリニトロ体 (2) はほかの化合物よりも、酵素阻害能及び陽性変力作用が母化合物と比較し 100 分の 1 以下と著しく弱くなった。

合成した各種硝酸エステルの平滑筋に対する作用は、SHR の腸間膜動脈を用いて測定し、各化合物の 1 μM , 5 μM での弛緩の割合を百分率で表したものを Table III に示した。1 μM の濃度では、すべての化合物に弱いながら弛緩作用が見られた。弛緩作用は各化合物の 5 μM の濃度では顕著となり、2',3'-ジニトロ体、2',4'-ジニトロ体が他の化合物より強い弛緩作用を有していることが判明した。以上の結果より proscillaridin の糖部水酸基にニトロ基を導入することにより、血管収縮作用の発現は抑制され、むしろ血管弛緩作用が発現することが明らかとなった。

今回、我々が合成した硝酸エステル体のうち 3 種のモノエステル体は、ジエステル体、トリエステル体に比べ、強い Na^+ , K^+ -ATPase 阻害及び強心活性がみられ、特に 2'-及び 4'-mononitrate は母化合物に匹敵する活性を示した。また、糖部水酸基がジニトロ体及びトリニトロ体とより高度に硝酸エステルされるにつれ、酵素阻害活性及び陽性変力作用が低下していることも判明した。このことより、強心配糖体の薬理作用の発現には、何らかの形で糖部水酸基が関与していると推定される。今回の我々の実験結果は、糖部分にレセプターとの結合部位が存在しているという Watoson らの仮説を支持していると考えられ、興味深いと思われる。

また、proscillaridin の糖部水酸基にニトロ基を導入することにより、強心配糖体本来の作用であり、副作用の 1 つと考えられていた血管平滑筋収縮作用が消失し、血管弛緩作用が観測されたことは興味深く、副作用軽減のための化学修飾の方向を示唆するものと考えられる。これらの硝酸エステル体については、現在さらに詳細な薬理実験を行っている。

実験の部

融点は柳本微量融点測定装置を用いて測定し、未補正值である。旋光度は JASCO DIP-140 型を、IR スペクトルは JASCO IR-810 型を用いて測定した。HPLC は JASCO 880PU 型を、検出器は Shodex RI SE-11 を用いた。 ^1H NMR は JMN GSX-400 型を用いて測定し tetramethylsilane を内部標準とした。薄層クロマトグラフィーは Kieselgel 60F₂₄₅ (Merck) を用い、UV 照射又は $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ 試薬の発色により検出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは富士デヴィソン化学、シリカゲル BW-200 を用いた。

Proscillaridin の発煙硝酸-無水酢酸によるニトロ化 Proscillaridin (1, 1 g, 1.9 mmol) を CH_2Cl_2 (25 ml) に懸濁し、反応液を -15°C に冷却した後、発煙硝酸-無水酢酸 (1 : 9) の混液 (5 ml) を加えて -15°C で 30 分間攪拌した。反応終了後、水を加え K_2CO_3 で中和し CH_2Cl_2 で抽出、 MgSO_4 で乾燥した後、乾燥剤を濾別し溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , CHCl_3) に付し、2-6 をそれぞれ 427 mg (34%), 164 mg (14%), 222 mg (19%), 175 mg (15%), 87 mg (8%) 得た。

2: 黄色板状晶 mp $192-195^\circ\text{C}$ (*n*-hexane- Et_2O). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450 (OH), 1715 (CO), 1645, 1270 (ONO_2). $[\alpha]_D^{25} -52.7^\circ$ ($c=0.5$, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0.74 (3H, s, 13- CH_3), 1.07 (3H, s, 10- CH_3), 2.43 (1H, dd, $J=6.7$, 9.4 Hz, 17-H), 4.20 (1H, dd, $J=6.2$, 9.3 Hz, 3-H), 5.32 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, d, $J=9.5$ Hz, 23-H), 7.23 (1H, d, $J=1.7$ Hz, 21-H), 7.81 (1H, dd, $J=1.7$, 9.5 Hz, 22-H). Anal. Calcd $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{14}$: C, 54.14; H, 5.86; N, 6.32. Found: C, 54.39; H, 5.92; N, 6.23.

3: 無色針状晶 mp $196.5-198^\circ\text{C}$ (*n*-hexane- Et_2O). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3460 (OH), 1720 (CO), 1650, 1275 (ONO_2). $[\alpha]_D^{25} -61.2^\circ$ ($c=0.5$, MeOH). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0.74 (3H, s, 13- CH_3), 1.06 (3H, s, 10- CH_3), 2.46 (1H, dd, $J=6.8$, 9.4 Hz, 17-H), 4.18 (1H, dd, $J=7.5$, 7.7 Hz, 3-H), 5.33 (1H, s, 4-H), 6.26 (1H, d, $J=9.7$ Hz, 23-H), 7.25 (1H, d, $J=2.4$ Hz, 21-H), 7.87 (1H, dd, $J=2.4$, 9.7 Hz, 22-H). Anal. Calcd $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{12}$: C, 58.06; H, 6.45; N, 4.52. Found: C, 58.11; H, 6.53; N, 4.52.

4: 無色微細結晶 mp $140-141^\circ\text{C}$ (*n*-hexane- Et_2O). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3440 (OH), 1705 (CO), 1635, 1270 (ONO_2). $[\alpha]_D^{25} -70.6^\circ$ ($c=0.5$, MeOH). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.06 (3H, s, 10- CH_3), 2.47 (1H, dd, $J=6.8$, 9.6 Hz, 17-H), 4.15 (1H, dd, $J=6.1$, 9.5 Hz, 3-H), 5.31 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, dd, $J=0.8$, 9.9 Hz, 23-H), 7.23 (1H, dd, $J=0.8$, 2.4 Hz, 21-H), 7.81 (1H, dd, $J=2.4$, 9.9 Hz, 22-H). Anal. Calcd $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{12}$: C, 58.06; H, 6.45; N, 4.52. Found: C, 57.85; H, 6.40; N, 4.36.

5: 無色微細結晶 mp 216°C (CH_2Cl_2 -MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450 (OH), 1705 (CO), 1635, 1265 (ONO_2). $[\alpha]_D^{25} -58.2^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3+d_6\text{-DMSO}$, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.06 (3H, s, 10- CH_3), 4.13 (1H, dd, $J=6.1$, 9.5 Hz, 3-H), 5.29-5.33 (2H, m, 4-H, 3'-H), 6.25 (1H, d, $J=9.7$ Hz, 23-H),

7.25 (1H, d, $J=2.5$ Hz, 21-H), 7.89 (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{30}H_{40}N_2O_{12}$: C, 58.06; H, 6.45; N, 4.52. Found: C, 57.97; H, 6.20; N, 4.50.

6: 白色プリズム晶 mp 221–222.5°C (CH_2Cl_2 -MeOH). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3410 (OH), 1725 (CO), 1645, 1270 (ONO_2). $[\alpha]_D^{24} -58.3^\circ$ ($c=0.5$, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3+d_6$ -DMSO, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.07 (3H, s, 10- CH_3), 2.45 (1H, dd, $J=6.7$, 9.6 Hz, 17-H), 4.13 (2H, br s, 2'-H, 3-H), 5.32 (1H, s, 4-H), 6.23 (1H, d, $J=9.7$ Hz, 23-H), 7.25 (1H, d, $J=2.5$ Hz, 21-H), 7.91 (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{30}H_{41}NO_{10} \cdot 1/2H_2O$: C, 61.64; H, 7.19; N, 2.40. Found: C, 61.60; H, 7.17; N, 2.23.

3 β -[(6-Deoxy-2,3-*O*-isopropylidene- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (7) Proscillaridin (1, 500 mg, 0.94 mmol) を無水 DMF に溶解し 2,2-dimethoxypropane (3 ml), *p*-TsOH (30 mg) を加え室温で 30 分間攪拌した後, 反応液を氷水中にあげ EtOAc で抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した. $MgSO_4$ を加え乾燥した後, 乾燥剤を濾別し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , benzene: acetone=3:1) で精製して 7 を 522 mg (97%) 得た. 7: 無色微細結晶 mp 83–85°C (*n*-hexane-Et₂O). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3460 (OH), 1720 (CO). $[\alpha]_D^{26} -42.5^\circ$ ($c=0.9$, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.05 (3H, s, 10- CH_3), 1.29 (3H, d, $J=6.0$ Hz, 5'- CH_3), 1.35, 1.52 (3H each, both s, C(CH_3)₂), 2.46 (1H, dd, $J=6.9$, 9.6 Hz, 17-H), 3.42 (1H, dd, $J=7.0$, 9.2 Hz, 4'-H), 3.78 (1H, dq, $J=6.2$, 9.2 Hz, 5'-H), 4.10 (1H, dd, $J=5.7$, 7.0 Hz, 3'-H), 4.15 (1H, d, $J=5.7$ Hz, 2'-H), 4.19 (1H, dd, $J=6.0$, 7.9 Hz, 3-H), 5.14 (1H, s, 1'-H), 5.36 (1H, s, 4-H), 6.26 (1H, dd, $J=0.7$, 9.7 Hz, 23-H), 7.23 (1H, dd, $J=0.7$, 2.4 Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, $J=2.4$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{38}H_{46}O_8$: C, 69.43; H, 8.13. Found: C, 69.59; H, 8.11.

3 β -[(6-Deoxy-2,3-*O*-isopropylidene-4-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (8) 化合物 (7, 400 mg, 0.70 mmol) を CH_2Cl_2 (10 ml) に溶解し $-15^\circ C$ に冷却した後, 発煙硝酸-無水酢酸 (1:9) の混液を 0.5 ml 加えて $-15^\circ C$ で 1 時間攪拌した. 前述の方法で後処理を行い, 8 を定量的に得た. 8: 無色微細結晶 mp 135–137°C (*n*-hexane-Et₂O). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3460 (OH), 1720 (CO), 1640, 1275 (ONO_2). $[\alpha]_D^{26} -33.2^\circ$ ($c=0.5$, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.05 (3H, s, 10- CH_3), 1.24 (3H, d, $J=6.2$ Hz, 5'- CH_3), 1.35, 1.57 (3H each, both s, C(CH_3)₂), 2.46 (1H, dd, $J=6.9$, 9.4 Hz, 17-H), 3.88 (1H, dq, $J=6.2$, 10.1 Hz, 5'-H), 4.16 (1H, dd, $J=5.9$, 7.5 Hz, 3-H), 4.20 (1H, d, $J=5.5$ Hz, 2'-H), 4.25 (1H, dd, $J=5.5$, 10.1 Hz, 3'-H), 4.98 (1H, dd, $J=10.1$, 10.1 Hz, 4'-H), 5.19 (1H, s, 1'-H), 5.35 (1H, s, 4-H), 6.26 (1H, dd, $J=0.7$, 9.7 Hz, 23-H), 7.23 (1H, dd, $J=0.7$, 2.5 Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{38}H_{45}NO_{10}$: C, 64.36; H, 7.37; N, 2.28. Found: C, 64.41; H, 7.34; N, 2.19.

3 β -[(6-Deoxy-4-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (9) 化合物 (8, 40 mg, 0.065 mmol) を MeOH (3 ml) に溶解し, *p*-TsOH (3 mg) を加え, 室温で 1 時間攪拌した後, 反応液を氷水中にあげ $CHCl_3$ で抽出し得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した. $MgSO_4$ を加え乾燥した後, 乾燥剤を濾別し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , benzene: acetone=1:2) で精製し 9 を 41 mg (93%, 1 より 90%) 得た. 9: 無色微細結晶 mp 136–138°C (iso-Pr₂O-MeOH). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3440 (OH), 1710 (CO), 1640, 1275 (ONO_2). $[\alpha]_D^{24} -60.0^\circ$ ($c=0.8$, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.05 (3H, s, 10- CH_3), 2.46 (1H, dd, $J=6.9$, 9.4 Hz, 17-H), 4.13 (1H, dd, $J=6.1$, 7.8 Hz, 3-H), 5.31 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, dd, $J=0.8$, 9.7 Hz, 23-H), 7.23 (1H, dd, $J=0.8$, 2.5 Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{30}H_{41}NO_{10} \cdot H_2O$: C, 60.68; H, 7.30; N, 2.36. Found: C, 60.76; H, 7.19; N, 2.31.

3 β -[(4-*O*-Acetyl-6-deoxy-2,3-*O*-isopropylidene- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (10) 化合物 (9, 400 mg, 0.70 mmol) を無水 pyridine (6 ml) に溶解し反応液を $0^\circ C$ に冷却した後, 無水酢酸 (1 ml) を加えて室温で 11 時間放置し, 氷水中にあげ EtOAc で抽出した. 得られた有機層を 5% aq. HCl, sat. aq. $NaHCO_3$, 飽和食塩水で洗浄し, $MgSO_4$ で乾燥した後, 乾燥剤を濾別し溶媒を減圧留去し 10 を 421 mg (98%) 得た. 10: 無色微細結晶 mp 114–116°C (*n*-hexane-Et₂O). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3470 (OH), 1735 ($COCH_3$), 1720 (CO). $[\alpha]_D^{24} -21.6^\circ$ ($c=0.9$, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ): 0.73 (3H, s, 13- CH_3), 1.05 (3H, s, 10- CH_3), 1.15 (3H, d, $J=6.2$ Hz, 5'- CH_3), 1.35, 1.57 (3H each, both s, C(CH_3)₂), 2.10 (3H, s, $COCH_3$), 2.46 (1H, dd, $J=6.8$, 9.7 Hz, 17-H), 3.83 (1H, dq, $J=6.2$, 10.3 Hz, 5'-H), 4.15–4.20 (3H, m, 3-H, 2'-H, 3'-H), 4.86 (1H, dd, $J=7.4$, 10.3 Hz, 4'-H), 5.19 (1H, s, 1'-H), 5.36 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, dd, $J=0.7$, 9.7 Hz, 23-H), 7.23 (1H, d, $J=0.7$ Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, $J=2.5$, 9.7 Hz, 22-H). *Anal.* Calcd $C_{35}H_{48}O_9$: C,

68.61; H, 7.90. Found: C, 68.61; H, 7.98.

3 β -[(4-*O*-Acetyl-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (11) 化合物(10, 200 mg, 0.33 mmol) を MeOH (15 ml) に溶解し, *p*-TsOH (15 mg) を加えて室温で 1 時間攪拌した後, 前述の方法で後処理し, **11** を 178 mg (95%) 得た. **11**: 無色微細結晶 mp 109–111°C (*n*-hexane-Et₂O). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3450 (OH), 1740 (COCH₃), 1710 (CO). [α]_D²⁵ –66.3° (*c*=0.6, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.73 (3H, s, 13-CH₃), 1.05 (3H, s, 10-CH₃), 1.21 (3H, d, *J*=6.2 Hz, 5'-CH₃), 2.13 (3H, s, COCH₃), 2.46 (1H, dd, *J*=6.8, 9.5 Hz, 17-H), 3.87–3.95 (3H, m, 2'-H, 3'-H, 5'-H), 4.13 (1H, dd, *J*=5.9, 7.7 Hz, 3-H), 4.78 (1H, dd, *J*=9.4, 9.4 Hz, 4'-H), 4.99 (1H, s, 1'-H), 5.33 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, d, *J*=9.7 Hz, 23-H), 7.22 (1H, d, *J*=2.5 Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, *J*=2.5, 9.7 Hz, 22-H). Anal. Calcd C₃₂H₄₄O₉: C, 67.11; H, 7.74. Found: C, 67.21; H, 7.69.

11 のニトロ化 アセチル体 **11**, (150 mg, 0.26 mmol) を CH₂Cl₂ (3 ml) に懸濁し –15°C に冷却した後, 発煙硝酸-無水酢酸 (1:9) の混液 (0.7 ml) を加えて 30 分間攪拌した. 前述の方法で後処理を行い **12**, **13**, **14** 混合物を 157 mg (97%) 得た.

3 β -[(6-Deoxy-2-*O*-nitro- α -L-mannopyranosyl)oxy]-14 β -hydroxybufa-4,20,22-trienolide (15) 上記ニトロ化成績体 **12**, **13**, **14** の混合物 (157 mg, 0.25 mmol) を MeOH (10 ml) に溶解し 5% aq. NaHCO₃ (2 ml) を加えて室温で 15 分間攪拌し, 反応終了後 5% aq. HCl を加えて中和した. 溶媒を減圧留去した後, 残渣を氷水中にあげ CHCl₃ で抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄, MgSO₄ で乾燥した. 乾燥剤を濾別し, 溶媒を減圧留去して残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂, CHCl₃: MeOH=12:1) に付し **3** を 11 mg (7%, **1** より 6%), **15**, **6** の混合物を 130 mg (90%) 得た. この混合物を高速液体クロマトグラフィー (Develosil ODS-5, MeOH: H₂O=4:1, 2 ml/min) で分離精製し, **15** を 96 mg (66%, **1** より 60%), **6** を 35 mg (24%, **1** より 22%) 得た.

15: 無色微細結晶 mp 140–142°C (iso-Pr₂O-MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3430 (OH), 1710 (CO), 1645, 1275 (ONO₂). [α]_D²⁵ –58.8° (*c*=0.6, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 0.73 (3H, s, 13-CH₃), 1.05 (3H, s, 10-CH₃), 2.46 (1H, dd, *J*=6.6, 9.3 Hz, 17-H), 4.15 (1H, dd, *J*=6.0, 7.7 Hz, 3-H), 5.33 (1H, s, 4-H), 6.27 (1H, dd, *J*=0.9, 9.7 Hz, 23-H), 7.23 (1H, d, *J*=0.9 Hz, 21-H), 7.82 (1H, dd, *J*=2.5, 9.7 Hz, 22-H). Anal. Calcd C₃₀H₄₁NO₁₀·1/2H₂O: C, 61.64; H, 7.19; N, 2.40. Found: C, 61.61; H, 7.17; N, 2.23.

Na⁺, K⁺-ATPase 阻害活性の測定 硝酸エステル体を 37±0.5°C で Na⁺, K⁺-ATPase (シグマ社製) と処理し, 反応開始後 10–30 分間の reduced nicotinamide adenine dinucleotide の 340 nm における吸光度の減少より算出した. 試料は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し反応液の DMSO の濃度が 0.1% となるように添加した.

陽性変力作用の測定 モルモット摘出右心室乳頭筋標本を 30°C で O₂ 95%, CO₂ 5% で飽和した Krebs-Hanseleit 液 (Ca²⁺=2.0 mM) 中に懸垂し, 4 mN の張力をかけ, 1 Hz, 5 ms の duration, 閾値の 1.5 倍の電圧で駆動し, 収縮力を force-displacement transducer (日本光電, SB-1TH 型) で測定した. 筋は刺激装置 (日本光電, MSE-3 型) を用いて 1 Hz で駆動させ, 定常状態を得た後, 蒸留水に溶解した試験化合物を低濃度から累積的に加え, 収縮力の変化 (ΔF_c =薬物投与後の収縮力-コントロールの収縮力) と濃度作用曲線を描き, その最大収縮の 50% 収縮を起こすのに必要な濃度の逆対数値で表し, これを各化合物の pD₂ 値とした.

平滑筋弛緩作用の測定 平滑筋に対する作用は合成した各種硝酸エステル体について, SHR の腸間膜動脈を用いて検討した. SHR 腸間膜動脈のラセン状条片標本を 37°C で O₂ 95%, CO₂ 5% で飽和した Krebs-bicarbonate 液 (Ca²⁺=2.5 mM) 中に懸垂し, 0.5 g の張力をかけ, 張力変化は force-displacement transducer (日本分光 TB-612T 型) を介して記録した. 予め 65.9 mM KCl で最大収縮を測定し, 洗浄後, 35.9 mM KCl で収縮させ, 収縮が安定したところで各化合物の 1 及び 5 μ M を累積的に投与した. 投与により収縮反応がみられた場合は 65.9 mM KCl による最大収縮に対する % で表し, 弛緩反応が現れた場合は 35.9 mM KCl による収縮に対する % で表した.

謝辞 本研究において元素分析, NMR スペクトルの測定を行っていただいた本学総合機器分析施設の内藤敏子助手, 加藤節子氏に深謝いたします. 本研究は文部省科学研究費の援助のもと行われたものであり, 深謝いたします.

引用文献及び注

- 1) N. Murakami, T. Tanase, S. Nagai, Y. Sato, T. Ueda, J. Sakakibara, H. Ando, Y. Hotta, K. Takeya, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1962 (1991).

- 2) R. J. Luchi, J. W. Gruber, *Am. J. Med.*, **45**, 322 (1968).
- 3) D. T. Mason, "Handbook of Experimental Pharmacology," Vol. 56/I, K. Greeff ed., Springer-Verlag, New York, 1981, pp. 497—516.
- 4) F. C. K. Chin, T. R. Watoson, *J. Med. Chem.*, **28**, 509 (1985).
- 5) A. Stoll, W. Kreis, *Helv. Chem. Acta*, **16**, 703 (1933).
- 6) a) J. Mori, S. Nagai, J. Sakakibara, K. Takeya, Y. Hotta, H. Ando, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1839 (1987); b) 榊原仁作, 森 淳, 永井慎一, 堀田芳弘, 竹谷和視, *日薬理誌*, **90**, 115 (1987); c) J. Mori, S. Nagai, J. Sakakibara, K. Takeya, Y. Hotta, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 48 (1988).
- 7) R. Megges, K. Repke, B. Streckenbach, R. Franke, G. Kamman, Ger. Patent 2019967 (1970) [*Chem. Abstr.*, **74**, 31915j (1971)].
- 8) W. Schorner, C. von Libery, R. Kramer, W. Seubert, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 334 (1967).
- 9) 榊原仁作, 植田泰誠, 大崎 勉, 竹谷和視, 安藤佐和子, *薬誌*, **105**, 730 (1985).
- 10) Na^+ , K^+ -ATPase 阻害活性の測定は摘出乳頭筋の収縮作用に対する予備実験として行ったため, 測定数は 3 回とした. また pD_2 の測定に関しては 5 回行った. したがって pIC_{50} についての統計処理はここでは行わなかった.