

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07C 35/34

C07C231/12

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99119659.7

[43]公开日 2000年4月5日

[11]公开号 CN 1249295A

[22]申请日 1999.9.24 [21]申请号 99119659.7
[71]申请人 许景峰
地址 100700 北京市东城区东四南门仓5号北京
军区总医院临床药物研究所
[72]发明人 许景峰 王金萍 齐平
杨永革 张梅

[74]专利代理机构 三高专利事务所
代理人 吴凤英

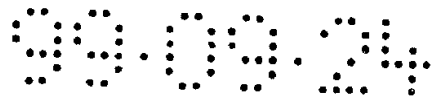
权利要求书2页 说明书13页 附图页数0页

[54]发明名称 具有心血管药理活性的合成化合物及制备方法

[57]摘要

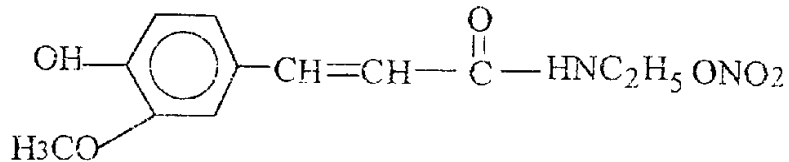
本发明涉及一种具有心血管药理活性的合成化合物,其特征在于该化合物名称为N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯,经过药理实验,证明该化合物可用于治疗心血管疾病,具有毒性低,副作用小,对肝、肺、脾、肾基本无影响,有明显抗心律失常,抗动脉粥样硬化,抗血小板聚集作用等优点及效果。

ISSN 1008-4274



权利要求书

1、具有心血管药理活性的合成化合物,其特征在于该化合物名称为N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯,分子式为: $C_{12}H_{15}N_2O_6$, 结构式为:



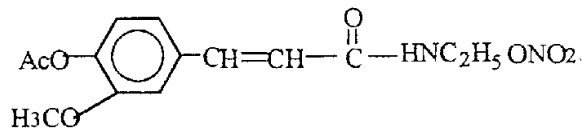
其物理性质:

m. p. 132-134°C

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} (CDCl_3) 3.9 (s, OMe), 6.2 (d, J 15.5 Hz, H^2), 7.0 (m, 3 ×
7.5 (d, 1H, J 15.5 Hz,), 5.8 (s, 1H), 3.7 (t, -2H, 4.6 (t, -2H) p. p. m 元素
分析: 理论值 C: 51.11, H: 4.97, N: 9.92. 实测值 C: 51.00, H: 4.92 N: 9.93.

IR: ν_{max} (KBr) cm^{-1} 3435, 3257, 1708, 1649, 1230, 987, 763; MS m/e 282
(M^+), 218, 203, 46。

2、具有心血管药理活性的合成化合物的中间体,其特征在于该
中间体名称为N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯,分子式为 $C_{14}H_{17}N_2O_7$
, 结构式:



其物理性质:

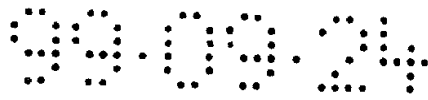
$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} (DMSO): 2.3 (s, 3H), 3.9 (s, 3H), 6.6 (d, 1H, J 15.8), 7.1 (m,
3H), 7.4 (d, 1H, J 15.8 Hz) 3.5 (t, 2H), 4.5 (t, 2H), 8.3 (bs, 1H) p. p. m

元素分析: 理论值: C: 51.85, H: 4.94, N: 34.57

实测值: C: 51.92, H: 4.91, N: 34.62

MS (FAB) m/e: 325.1 ($\text{M}^+ + 1$), 280.1, 237.1, 219.0, 177.0, 137.0, 43.1。

m. p: 114-115°C



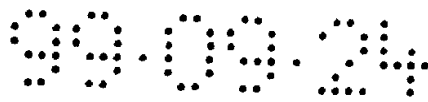
IR: V_{\max} (KBr) 3260, 3080, 1767, 1654, 1625, 1506, 1277, 1201, 883, 730, 691, 604。

3、如权利要求 1 所述的化合物的制备方法,其特征在于它按下述步骤进行:

a) 将 4-5g 乙酰阿魏酸加入二氯甲烷 500-1000ml 和 1-10 滴 N, N-二甲基甲酰胺,在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 冰浴进行搅拌,并缓缓滴入 2-10ml 草酰氯或氯化亚砷,时间为 0.5-1.5 小时,滴完后加热至 $15-80^{\circ}\text{C}$,继续搅拌 1-5 小时后减压蒸干溶剂,得到乙酰阿魏酰氯淡黄色固体;

b) 将 1-5g 氨基乙醇硝酸酯粉末,3-10g 碳酸氢钠或氢氧化钠溶于 500-1000ml 水中制成水溶液加入三颈瓶中,再加入甲苯 20-150ml,然后再将 (a) 项制备的 2-8g 乙酰阿魏酰氯用甲苯溶解,缓缓滴入瓶中,在 $30-60^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3-5 小时后减压抽滤,用丙酮重结晶,得到中间体 N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯白色粉末;。

c) 最后将 0.6-0.7g (1.85mol) (b) 项生成的 N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯加入 1.5-2.0ml 浓度为 25-28% 氨水,甲醇 6-8ml,水 70-100ml,加热至 60°C 回流 30-80min,减压蒸馏析出 N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯黄色固体,用乙酸乙酯重结晶,得到淡黄色本发明的合成化合物粉末。



说明书

具有心血管药理活性的合成化合物及制备方法

本发明涉及一种具有心血管药理活性的合成化合物及制备方法。

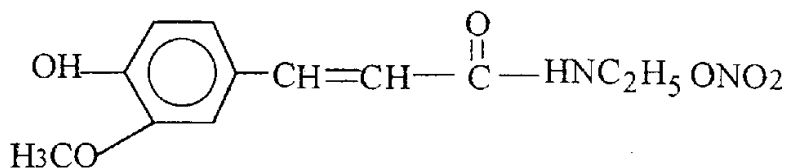
心血管疾病是发病率高,难以治愈的疾病之一,临床多采用硝酸酯类心血管药物治疗以硝酸甘油为代表,在心血管疾病的治疗中起着重要的临床作用,此类药物主要以扩张冠脉血管,增加心肌营养性血流量和减少心肌耗氧量而发挥心血管效应,临床上主要用于急慢性心绞痛的治疗。但是,由于它们的生物半衰期 ($t_{1/2}$) 相对较短,因此,现有的硝酸酯类药物均有其不足之处,长期应用不良反应多,其代谢物的堆积还降低疗效。

本发明的目的正是为了克服上述已有技术的缺点与不足,而提供一种可以提供一氧化氮的硝基供体化合物,即N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯拟用于治疗心血管疾病。

本发明还提供了该化合物的制备方法。

本发明的目的是通过下列技术方案实现的:

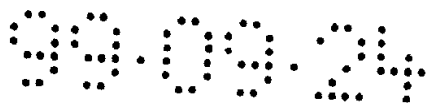
具有心血管药理活性的合成化合物,其特征在于该化合物名称为N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯,分子式为: $C_{12}H_{15}N_2O_6$, 结构式为:



其物理性质:

m. p. 132-134°C

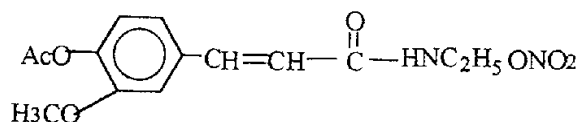
$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} (CDCl_3) 3.9 (s, OMe), 6.2 (d, J 15.5 Hz, H^2), 7.0 (m, 3 × H^3), 7.5 (d, J 15.5 Hz, H^1), 5.8 (s, 1H), 3.7 (t, -2H), 4.6 (t, -2H) p. p. m元素



分析：理论值 C: 51.11, H: 4.97, N: 9.92. 实测值 C: 51.00, H: 4.92 N: 9.93.

IR: V_{\max} (KBr) cm^{-1} 3435, 3257, 1708, 1649, 1230, 987, 763; MS m/e 282 (M^+), 218, 203, 46。

具有心血管药理活性的合成化合物的中间体, 其特征在于该中间体名称为 N-(2-羟乙基) 乙酰阿魏酰胺硝酸酯, 分子式为 $C_{14}H_{17}N_2O_7$, 结构式:



其物理性质:

$^1\text{H-NMR}$: δ H (DMSO): 2.3 (s, 3H), 3.9 (s, 3H), 6.6 (d, 1H, J 15, 8), 7.1 (m, 3H), 7.4 (d, 1H, J 15.8 Hz) 3.5 (t, 2H), 4.5 (t, 2H), 8.3 (bs, 1H) p. p. m

元素分析: 理论值: C: 51.85, H: 4.94, N: 34.57

实测值: C: 51.92, H: 4.91, N: 34.62

MS (FAB) m/e : 325.1 (M^++1), 280.1, 237.1, 219.0, 177.0, 137.0, 43.1。

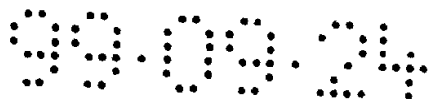
m. p: 114-115 $^{\circ}\text{C}$

IR: V_{\max} (KBr) 3260, 3080, 1767, 1654, 1625, 1506, 1277, 1201, 883, 730, 691, 604。

化合物的制备方法, 其特征在于它按下述步骤进行:

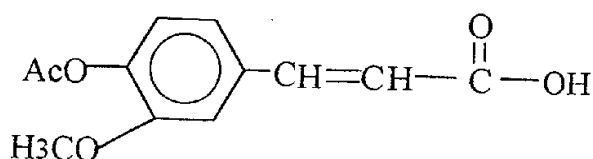
a) 将 4-5g 乙酰阿魏酸加入二氯甲烷 500-1000ml 和 1-10 滴 N, N-二甲基甲酰胺, 在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 冰浴进行搅拌, 并缓缓滴入 2-10ml 草酰氯或氯化亚砷, 时间为 0.5-1.5 小时, 滴完后加热至 $15-80^{\circ}\text{C}$, 继续搅拌 1-5 小时后减压蒸干溶剂, 得到乙酰阿魏酰氯淡黄色固体;

b) 将 1-5g 氨基乙醇硝酸酯粉末, 3-10g 碳酸氢钠或氢氧化钠溶于 500-1000ml 水中制成水溶液加入三颈瓶中, 再加入甲苯 20-150ml, 然后再将 (a) 项制备的 2-8g 乙酰阿魏酰氯用甲苯溶解, 缓缓滴入瓶中, 在 $30-60^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3-5 小时后减压抽滤, 用丙酮重结晶, 得到中间体 N-(2-羟乙基) 乙酰阿魏酰胺硝酸酯白色粉末;。

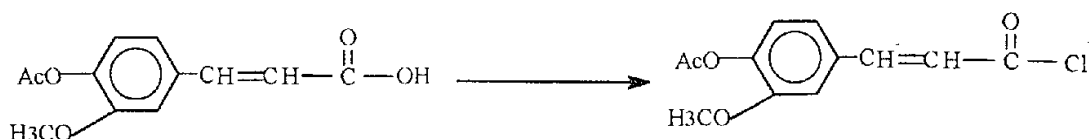


c) 最后将 0.6-0.7g (1.85mol) (b) 项生成的 N-(2-羟乙基) 乙酰阿魏酰胺硝酸酯加入 1.5-2.0ml 浓度为 25-28% 氨水, 甲醇 6-8ml, 水 70-100ml, 加热至 60℃ 回流 30-80min, 减压蒸馏析出 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯黄色固体, 用乙酸乙酯重结晶, 得到淡黄色本发明的合成化合物粉末。

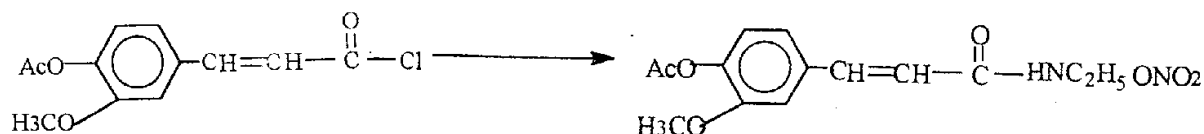
本发明的化合物采用的乙酰阿魏酸, 化学名为 3-(3-甲氧基-4-乙酰基) 苯基-2-丙烯酸, 结构式为



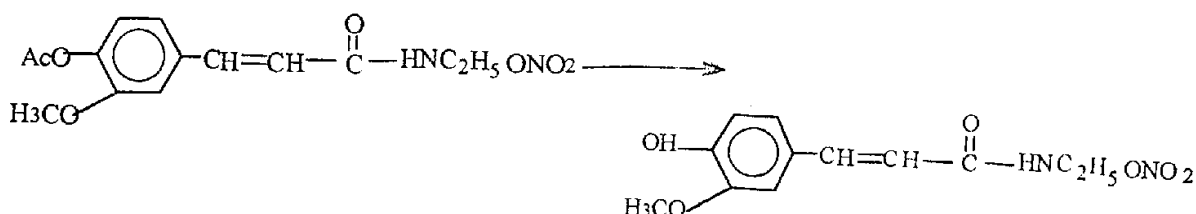
乙酰阿魏酸经过酰氯化生成乙酰阿魏酰氯, 学名为 3-(3-甲氧基-4-乙酰基) 苯基-2-丙烯酰氯, 其反应式及结构式为:

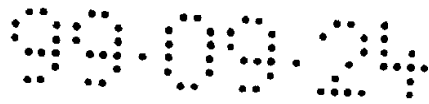


然后乙酰阿魏酰氯再经过氨基乙醇硝酸酯进行酯化反应, 其反应式及结构式如下:



生成物为 N-(2-羟乙基) 乙酰阿魏酰胺硝酸酯即为中间体, 中间体再经过脱乙酰基即得到本发明产品, 其反应式及结构式如下:





N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯是一种可以提供一氧化氮(NO)的硝基供体化合物,该化合物经过北京军区总医院临床药理研究,经药理实验观察发现,其具有治疗心血管疾病,抗血小板聚集的作用。

硝基扩血管药物在临床应用治疗心血管疾病已达百余年,直到80年代才逐步认识到其作用机理与一氧化氮的关系,随着血管内皮因子的化学本质的揭示,发现了NO兼有第二信使和神经递质的作用,因此它是一种新的细胞间信息交换的重要载体,在治疗心血管系统疾病而言,NO通过其松弛血管平滑肌而调节血管扩张力并调节局部组织血流分布,该药物除能扩张冠脉外,尚具有不依赖于血流动力学改变的直接发保护缺血心肌的作用,并能对抗多种实验性心律失常,具有明显的对抗心肌缺血再灌注损伤,包括心肌缺血再灌注心律失常的发生,通过NO途径升高血浆及血小板内的环鸟苷酸浓度,发挥环鸟苷酸第二信使的作用,抑制肌浆网对钙离子的释放,降低血浆及血小板中的钙离子浓度,对ADP引起的血小板聚集有明显的抑制作用,在抗冠状动脉粥样硬化方面有广阔的应用前景。

下面就药理作用实验结果分叙如下:

药理实验结果:

本实验由北京军区总医院临床药物研究所完成,并提供报告。

1、最大耐受性试验

取体重 $20 \pm 2g$ 的小鼠20只,雌雄各半,按 $0.8mg/20g$ 灌胃N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯,(浓度为 $125mg/ml$ 的混悬液),连续观察14天内动物的死亡情况,结果,14天内,所有动物进食活动正常,没有死亡,认定其口服N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯的 $LD_{50} > 5g/kg$,属于实际无毒。

2、NO₂代谢产物的测定结果:

取体重180-220g健康的Wistar大鼠30只,雌雄各半,随机分成为实验组和对照组,实验组按体重 $500 \mu g/kg$ 给药,药配成 $1mg/ml$ 溶液,对照组给等体积生理盐水,腹腔连续注射七天,七天后两组均取血 $1ml$,按照亚硝酸盐试剂盒的操作测定代谢产物的含量。

按公式样品含量($\mu mol/L$) = 样品吸收度 / 标准品吸收度 $\times 12.5$ 计算。见表1。

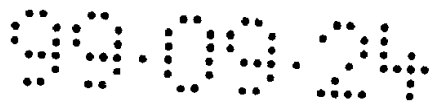


表 1 NO₂ 代谢产物的结果

| 组别 | 动物数 (n) | 吸收度 | NO ₂ 含量 (μmol/L) |
|-----|---------|---------------|-----------------------------|
| 给药组 | 15 | 0.646 ± 0.057 | 17.94 ± 1.58* |
| 对照组 | 15 | 0.514 ± 0.044 | 14.28 ± 1.09 |
| 标准品 | | 0.45 | 12.5 |

由于 NO 化学本质极不稳定且易与 O₂ 生成 NO₂·, 后者在体液中迅速转变为 NO₂ 和 NO₃ 而失活, 故本实验采用检测 NO₂ 盐的方法来反应体内 NO 的含量。N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯组检测发现, NO₂ 含量明显增加。对照组与 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯组比较: NO₂ 盐含量相差显著 (P<0.05)。提示 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯的作用机理与 NO 的途径有密切关系。

3、cGMP 的放射免疫测定:

取体重为 180-220g 健康的 Wistar 大白鼠 20 只, 雌雄各半, 随机分两组, 对照组给予生理盐水, 实验组按体重 500 μg/kg 给药, 腹腔连续注射七天, 七天后两组取血, 检测大鼠 cGMP 的正常值及心肌组织的 cGMP, 其结果如下: 见表 2。

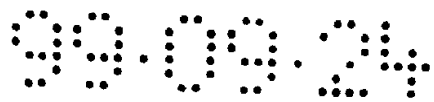
表 2 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯对血浆及心肌 cGMP 的影响

| 组别 | 动物数 | 血浆 cGMP (μmol/L) | 心肌 cGMP (μmol/L100mg) |
|-----|-----|-----------------------|-----------------------|
| 对照组 | 10 | 102.6193 ± 25.1726 | 19.7630 ± 6.4838 |
| 给药组 | 10 | 157.5960 ± 35.2279*** | 32.1056 ± 6.1290*** |

与对照组比较, **P<0.001

4、急性降压结果:

本实验在麻醉与非麻醉两个状态下观察 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝



酸酯的急性降压作用。

4. 1、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯对大量清醒状态下的急性降压作用

取健康Wistar大鼠45只,雌雄兼用,体重180-220g,随机分三组(15只/组)。第一组:腹腔注射生理盐水。第二组:腹腔注射N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯。第三组:腹腔注射硝酸甘油作阳性对照之用。各组均采用 $500\mu\text{g}/\text{kg}$,试验药均配成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的药液)。分别将三组大鼠装入鼠用尾动脉血压仪,待其血压稳定后,按上述剂量给药,测定给药后60分钟血压及心率。结果见表3:

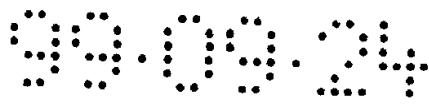
表3 清醒状态下N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯急性降压结果($500\mu\text{g}/\text{kg}$)

| 项目 | 血压平均值 mmHg | 心率平均值次/分 |
|------------------|-------------------|--------------|
| 正常值 | 130.93 ± 8.87 | 401 ± 36 |
| N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯 | 118.98 ± 8.34 | 390 ± 52 |
| 硝酸甘油 | 119.47 ± 8.90 | 388 ± 45 |

4. 2、麻醉状态下N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯的急性降压作用。

取健康Wistar大鼠70只,雌雄各半,体重180-220g,随机分三组,对照组给生理盐水(10只),其余二组均采用($500\mu\text{g}/\text{kg}$, $800\mu\text{g}/\text{kg}$, $1000\mu\text{g}/\text{kg}$)三个剂量组(试药均配成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的药液)。分别将三组大鼠用2.5%的乌拉坦按 $0.6\text{ml}/100\text{g}$ 麻醉,仰位固定,暴露气管T形切开,接动物用呼吸机,分离颈动脉。用肝素冲洗塑料管并将其插入分离颈动脉,接四道生理记录仪,记录血压及心率,分离股静脉待用。大鼠血压及心率稳定后,分别按上述剂量股静脉给药。连续测定给药后60分钟的血压及心率,其结果见表4。

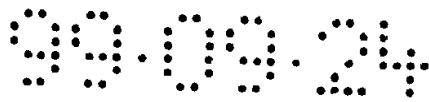
表6、麻醉状态下N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯的急性降压结果:



(血压: mmHg, 心率次/分)

| | | 生理盐水组 | 注射N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯 | | | 注射硝酸甘油 | | |
|-----------------------------------|-----|------------|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 小剂 量组 | 中剂 量组 | 大剂 量组 | 小剂 量组 | 中剂 量组 | 大剂 量组 |
| | | 动物数 10 (只) | 10 (只) | 10 (只) | 10 (只) | 10 (只) | 10 (只) | 10 (只) |
| 血 压 测 定 时 间 min | 1 | 124 | 120 | 95 | 85 | 119 | 90 | 80 |
| | 2 | 120 | 119 | 99 | 76 | 115 | 95 | 70 |
| | 3 | 125 | 112 | 90 | 80 | 113 | 81 | 66 |
| | 4 | 125 | 109 | 82 | 72 | 118 | 76 | 56 |
| | 5 | 128 | 110 | 85 | 66 | 119 | 80 | 45 |
| | 10 | 128 | 115 | 88 | 66 | 120 | 81 | 50 |
| | 15 | 126 | 115 | 89 | 63 | 123 | 97 | 56 |
| | 30 | 131 | 120 | 91 | 72 | 121 | 100 | 55 |
| | 45 | 124 | 120 | 93 | 70 | 124 | 105 | 90 |
| 60 | 125 | 124 | 99 | 74 | 123 | 119 | 100 | |
| 心 率 测 定 时 间 min | 1 | 400 | 395 | 388 | 360 | 405 | 400 | 296 |
| | 2 | 411 | 380 | 377 | 328 | 411 | 409 | 267 |
| | 3 | 360 | 377 | 369 | 300 | 415 | 390 | 264 |
| | 4 | 366 | 362 | 336 | 299 | 398 | 366 | 260 |
| | 5 | 355 | 344 | 321 | 251 | 326 | 379 | 268 |
| | 10 | 389 | 356 | 334 | 299 | 366 | 388 | 299 |
| | 15 | 399 | 399 | 370 | 265 | 377 | 395 | 310 |
| | 30 | 402 | 411 | 409 | 296 | 399 | 411 | 353 |
| | 45 | 420 | 419 | 423 | 322 | 402 | 412 | 360 |
| 60 | 409 | 369 | 365 | 303 | 405 | 399 | 375 | |

注: 大剂量组 (1000 μ g/kg), 中剂量组 (800 μ g/kg), 小剂量组 (500 μ g/kg)



清醒大鼠实验组表明,注射N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯后60分钟,有一定的降压作用,但心率似有上升之趋势,由于大鼠均清醒状态,血压下降时,正常功能的心脏由于Starting调节,心率加快来补偿。

麻醉大鼠实验组结果表明,注射N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯后2-35分钟,有一定的降压作用。给药后心率下降,大剂量(1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}$),心率下降可达24.6%。这一点对心血管系统疾病有特殊意义。

两种状态下,注射硝酸甘油后血压都下降,程度较大,但维持时间相对较短且心率都似有上升趋势。

5、该N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯对垂体后叶素引发心肌缺血的保护作用

取健康大鼠36只,雌雄各半,体重180-220g,随机分三组,分别给三组大鼠用25%的乌拉坦麻醉,仰位固定,分离股静脉,连接心电图机,记录II导联心电图,异常则弃去不用。第一组静脉注射N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯1mg/kg,第二组静脉注射生理盐水1mg/kg,注射后2分钟,股静脉注射垂体后叶素75 $\mu\text{g}/\text{kg}$,8秒注射完,注射后0-30秒,60秒,90秒,120秒,180秒,240秒,300秒,420秒,600秒和900秒各记录心电图一次。

给予垂体后叶素后心电图变化分二期:

第一期:注射后5-30秒,T波增高,ST段抬高 $>0.1\text{mV}$ 。

第二期:注射后30秒至数分,T波低平、双相、倒置、心率变慢,P-R、Q-T间期延长。

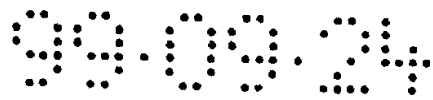
效果判定:以未出现上述第一期或第二期缺血性变化者为阴性。

心肌缺血阴性率 = 不出现心肌缺血的动物数 / 总动物数。

实验组与对照组进行卡方检验求P值:见表5

表5 实验组与对照组阴性率比较表

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 心肌缺血阴性率 |
|----------------------|---------------|---------|
| N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯 | 1 | 7/12: |
| 硝酸甘油 | 1 | 9/12** |
| 生理盐水 | 1ml | 1/12 |



与生理盐水比较 $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯对大鼠急性心肌缺血有保护作用,作用强度与硝酸甘油无显著性差别。

6、N-(2-羟乙基)N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯对心肌缺血再灌注损伤的保护作用

取健康Wistar大鼠45只,雌雄兼用,体重180-220g,分别将三组大鼠用2.5%的乌拉坦按0.6ml/100g麻醉,仰位固定,暴露气管T形切开,接动物用呼吸机,分离颈动脉。用肝素冲洗塑料管并将其插入分离的颈动脉,接四道生理记录仪,记录血压及心率,分离股静脉待用。在大鼠左侧第4-5肋间切开,剪断4、5肋骨,暴露心包,撕开心包膜,用手指从对侧轻压,将心脏推出。分离冠状动脉(LCA)起始部附近结扎5分钟(结扎即刻起分别按上述剂量静脉给药),然后放开再灌注60分钟。出现任何异常不作处理,以观察其自然演变。试验前、开胸、结扎LCA即刻、2、5、15、30、60分钟,同步记录心电图、动脉收缩压、平均压和舒张压。实验全程监测。各组均采取左室肌标本,作心肌电镜形态学检查。

对照组心律失常占100%,其中6只死亡,仅一只自动复律,N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯组心律失常占40%,无死亡,均自动复律,硝酸甘油组心律失常占60%,死亡3只,其余自动复律。N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯能降低再灌注室颤发生率,两组与对照组比较,具有显著性差异。

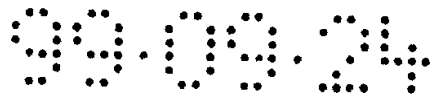
比较心肌左室压,N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯组与硝酸甘油组相比,后者无论在左室压及维持时间上都明显低于N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯组,提示二组在心肌缺血再灌注时尚可维持心功能,且心肌缺血再灌注组优于硝酸甘油组。

7、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯抗血小板聚集作用

从大体功能变化,单个血小板功能、形态、离子含量为研究对象,进行血小板聚集试验。

7.1 抑制血小板聚集试验

健康Wistar大鼠70只,雌雄各半,体重180-220g,随机取10只大鼠



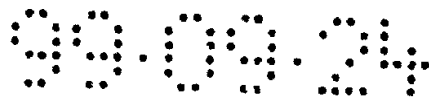
作生理盐水阴性对照组, 其余 60 只大鼠随机分成两组。

实验组: 静脉注射 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯, 阳性对照组: 静脉注射阿司匹林。各组均采用 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 三个剂量组, (均配成 1mg/ml 的液), 连续给药六天。在第三天, 第六天各采血 2ml, 其中 0.8ml 血加 0.2ml 枸橼酸钠 (3.8%) 抗凝, 另取 0.8ml 血加 0.2ml EDTA 抗凝, 将血标本放入血小板聚集仪用 ADP 诱导, 检测其聚集力的变化。

发现对照组血小板凝聚力明显高于 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯组和阿司匹林 (ASA) 组, 而血小板抑制力则明显低于 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯组和阿司匹林 (ASA) 组, 都有显著差异 ($P < 0.05$), N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯组与同剂量的阿司匹林 (ASA) 组比较, 两组也有显著差异, 其中 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯的血小板抑制力明显高于阿司匹林 (ASA), 而其血小板凝聚力则明显低于阿司匹林 (ASA), 且与剂量、持续给药时间呈正相关。

7.2 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯对血小板内钙与环鸟苷酸含量的影响

将 7.1 各组的第三天, 第六天采集的血 2ml, 按 1:9 的比例加入 3.8% 的枸橼酸钠抗凝, 800 转/分钟离心 5 分钟。制备出富血小板血浆 (PRP)。用贫血小板血浆 PPP, 将 PRP 中的血小板浓度调节至 200×10^9 个/L 后加入终浓度为 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 $\text{Flu} \mu 3\text{-AM}$ 。另取一份实验组的 PRP, 加入终浓度为 $0.5 \text{mmol}/\text{L}$ 的精氨酸甲酯 (L-NAME), 37°C 孵育 30 分钟, 加入 50 IU/ml 的 Apyrase 后, 2000 转/分钟离心 10 分钟得到血小板沉淀, 用无钙 HEPES 缓冲液洗涤一次后配成 $200 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板悬液, 在流式细胞仪上分别测得加入 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 ADP 和 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 A23187 的两个荧光强度值 A、B 及 A/B 值, 衡量 ADP 诱导的血小板钙离子升高的程度。发现注射 N-(2-羟乙基) 阿魏酰胺硝酸酯前后单个血小板的聚集度和 Ca^{2+} 的浓度有很大变化, 给药后单个血小板的聚集度和 Ca^{2+} 的浓度有很大变化, 给药后单个血小板的聚集度和 Ca^{2+} 的浓度都下降, 且与给药



剂量呈正相关。另一组给药后,同时给精氨酸甲酯(NO合成酶的抑制剂),发现单个血小板的聚集度和 Ca^{2+} 的浓度含量变化不大,且与只给N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯组有显著性差异。

7.3 血小板胞浆cGMP浓度检测

样品采集如上。将EDTA抗凝血制备的PRP作血小板计数后,取200 μ lPRP加入10 μ mol/L的ADP诱导血小板聚集。3000转/分钟,离心15分钟,弃去上清,沉淀以PH4.75的醋酸缓冲液悬浮后放入-20 $^{\circ}$ C冰箱冻融一次,离心取上清液用¹²⁵I-cGMP试剂盒检测血小板的cGmp的浓度。结果N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯组cGMP含量上升且与给药剂量呈正相关,而加入精氨酸甲酯(NO合成酶的抑制剂),cGMP含量与生理盐水组比较含量变化不大,与只给N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯比较有显著性差异,进一步证实了N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯先在介质里形成NO,然后激活环氧化酶,使组织中cGMP含量增加的途径。

本发明技术与已有技术相比具有如下优点及效果:

1、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯是一种新型硝基供体化合物,较安全可以长期使用。其毒性较低,副作用较少。对肝、肺、脾、肾基本无影响,而且不会引起心率加快,抑制心脏兴奋的传导,适用于低剂量长期使用。

2、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯的作用机理,虽不十分清楚,但其通过一氧化氮(NO)途径产生药理作用,现已证实NO是cGMP环化酶的激动剂,而cGMP激活相应的蛋白激酶,从而使平滑肌松弛。

3、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯在心血管系统中有其独特之处。它在降压的同时,可增加主动脉的血流量,由于外周动脉阻力下降,肾动脉及股动脉血流量是增加的。因此血压虽下降,但主动脉血流量增加,冠脉的灌注并不下降,其血流量也不减少。

4、近代,临床治疗冠状动脉阻塞性疾病采用溶血栓疗法,冠状动脉成型术、冠状动脉搭桥术、心内手术及心脏移植均可因心脏再灌注引起心率失常。室颤(VF)是造成死亡的主要原因,因此研究再灌



注心肌损伤的防治药物意义十分重大,而N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯降压的同时,冠脉的灌注并不下降的独特性可以有效的保护心肌,免受缺血再灌注的损伤,有效的防治了临床医生十分头疼的心肌“窃血”

5、在心血管系统疾病中,心律失常极为重要。房早、房速、房颤、室早(VPC)、室速(VT)及室颤(VF)等,常导致严重后果。因此对一个心血管系统用药来说,抗心律失常作用是一个重要方面,而N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯正具有明显的抗心律失常作用。

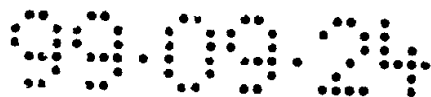
6、N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯应用前景范围较广,特别是心血管系统中,更具有其特殊性。临床常用阿司匹林(ASA)与钙拮抗剂-维拉帕米(Verapamil, Ver)或用肝素钠与硝酸甘油并用,利用两药的特性以期收到联合用药的效果,但效果并不理想,且长期应用不良反应较多,其代谢物的堆积还降低疗效。N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯具有降压,保护缺血心肌作用,同时动物实验也发现,N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯具有抗血小板聚集的作用。这一结果提示,阿魏酰胺似在抗动脉粥样硬化中有一定的应用前景。

实施例 1:

将乙酰阿魏酸 4g 加入二氯甲烷 500ml, 加入 N, N-二甲基甲酰胺 1 滴在 -15℃ 冰浴进行搅拌, 缓缓加入草酰氯 2ml, 时间 0.5 小时, 滴完后加热 15℃, 搅拌 5 小时, 减压蒸干溶剂, 得到 3g 乙酰阿魏酰氯, 再将氨基乙醇硝酸酯粉末 1g, 碳酸氢钠 10g 溶于 500ml 水中, 加入三颈瓶中, 再加入甲苯 20ml, 再将前述的乙酰阿魏酰氯 2g 的甲苯溶解缓缓滴入瓶中, 在 30℃ 搅拌 5 小时, 减压抽滤, 用丙酮重结晶, 得到白色粉末 0.35g 的 N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯, 最后将 0.6g (1.85ml) 的 N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯, 加入 25% 氨水 1.5ml, 甲醇 6ml, 水 7.5ml, 加热回流 30min, 减压蒸馏, 析出 N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯黄色固体, 用乙酸乙酯重结晶, 得到淡黄色粉末 0.4g 为本发明产品。

实施例 2:

将乙酰阿魏酸 5g 加入二氯甲烷 1000ml, 加入 N, N-二甲基甲酰胺 10 滴



在-5℃冰浴进行搅拌, 缓缓加入氯化亚砷10ml, 时间1.5小时, 滴完后加热80℃, 搅拌5小时, 减压蒸干溶剂, 得到4g乙酰阿魏酰氯, 再将氨基乙醇硝酸酯粉末5g, 氢氧化钠3g溶于1000ml水中, 加入三颈瓶中, 再加入甲苯150ml, 再将前述的乙酰阿魏酰氯2g的甲苯溶解缓缓滴入瓶中, 在60℃搅拌3小时, 减压抽滤, 用丙酮重结晶, 得到白色粉末1.6g的N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯, 最后将0.7g(1.85ml)的N-(2-羟乙基)乙酰阿魏酰胺硝酸酯, 加入25%氨水2.0ml, 甲醇8ml, 水100ml, 加热回流80min, 减压蒸馏, 析出N-(2-羟乙基)阿魏酰胺硝酸酯黄色固体, 用乙酸乙酯重结晶, 得到淡黄色粉末0.46g为本发明产品。