

蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展

孙崇峰, 范圣此*, 罗毅, 孟兆青, 徐晶晶

山东宏济堂制药集团股份有限公司, 山东 济南 250103

摘要: 蟾酥为我国传统名贵中药, 其化学成分复杂, 具有广泛的药理活性。蟾酥的化学成分主要包括蟾蜍内酯类、吲哚类生物碱、甾醇类及其他类化合物。现代药理学研究表明, 蟾酥具有抗肿瘤、强心、抗炎、局麻、镇痛等多种药理活性。对近年来蟾酥化学成分、药理活性及其人工合成等方面的研究进展进行综述, 以期对蟾酥的物质基础研究、药效机制阐释及其开发利用提供参考。

关键词: 蟾酥; 蟾蜍内酯类; 吲哚类生物碱; 抗肿瘤; 强心; 抗炎; 人工合成

中图分类号: R282.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3183-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.034

Research progress on chemical constituents and artificial synthesis of *Bufois Venenum*

SUN Chong-feng, FAN Sheng-ci, LUO Yi, MENG Zhao-qing, XU Jing-jing

Shandong Hongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250103, China

Abstract: *Bufois Venenum*, as a precious Chinese materia medica, has complex chemical constituents and has been widely used in clinical treatment with significant effects. The chemical constituents in *Bufois Venenum* mainly included bufadienolides, indole alkaloids, and steroids, etc. Modern pharmacological research has demonstrated its antitumor, cardiac, anti-inflammatory, and narcotic analgesic, etc. This paper reviewed the chemical constituents, pharmacological activity, and artificial synthesis of *Bufois Venenum*, providing theoretical reference for material basic research, pharmacodynamic mechanism interpretation, development, and utilization.

Key words: *Bufois Venenum*; bufadienolides; indole alkaloids; antitumor; cardiac effect; anti-inflammatory; artificial synthesis

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥分泌物, 主产于山东、江苏、安徽、河南、河北、辽宁、吉林及黑龙江等地。其性温, 味辛, 有毒, 归心经, 具有解毒、止痛、开窍醒神之功效, 用于治疗痈疽疔疮、咽喉肿痛、中暑神昏、痧胀腹痛吐泻^[1]。现代药理学研究表明, 蟾酥具有增强心肌收缩力、升压、抑制血小板聚集、增加冠状动脉血流、抗炎、抗辐射、抗肿瘤、降压和麻醉等药理活性^[2-3]。

蟾酥为我国传统名贵中药, 是国家重点保护的 II 级野生药材, 也是 28 种毒性中药材品种之一, 在国内外应用广泛。《部颁标准》和《中国药典》2015 年版 88 个成方制剂 (329 个批号) 中均含有蟾酥,

如喉症丸、麝香保心丸、蟾酥注射液等。德国将蟾酥制剂应用于临床治疗冠心病, 日本以蟾酥为原料生产了救生丹^[4]。蟾酥药理活性独特, 近年来, 其抗肿瘤活性引起了国内外学者的广泛关注^[5]。但是, 目前蟾酥的化学成分及药理活性研究还不够全面深入, 其药效成分、毒性成分及作用机制还尚未完全明确, 限制了蟾酥的开发利用。本文对近年来蟾酥化学成分、药理活性及其人工合成等方面的研究进展进行综述, 以期对蟾酥的物质基础研究、药效机制阐释及其开发利用提供参考。

1 化学成分

查阅国内外文献, 发现蟾酥中的化学成分分为小分子和大分子化合物。目前关于小分子化合物研究较多, 包括蟾蜍内酯类、吲哚类生物碱、甾醇类

收稿日期: 2018-05-06

作者简介: 孙崇峰, 男, 硕士研究生。E-mail: 1055735309@qq.com

*通信作者 范圣此, 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药资源的研究与开发。E-mail: fanshengci2008@sina.com

及其他类化合物, 大分子化合物主要为蛋白质^[6-7]。其中, 蟾蜍内酯和吲哚生物碱为研究最多的成分。蟾酥药材的质量分析多集中于蟾蜍内酯成分, 而吲哚生物碱类成分研究较少^[8-9]。曲婷等^[10]采用 HPLC 法同时对不同产地蟾酥中的蟾蜍内酯类和吲哚生物碱类化合物进行含量测定, 结果发现五羟色胺类的 *N*-甲基五羟色胺、*N,N*-二甲基五羟色胺、*N,N,N*-三甲基五羟色胺、蟾蜍噁啉的总含量在 3.31%~17.72%; 日蟾毒它灵、蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的总含量在 4.23%~15.93%。蟾酥中虽然存在一些胆甾醇、精氨酸等其他类化合物, 但目前没有含

量测定方面的研究, 且尚未见相关活性报道。

蟾蜍内酯类化合物主要是蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物, 其紫外光谱最大吸收波长在 300 nm 左右, 结构为甾类化合物在 C-17 位上接 1 个 α -吡喃酮基, 包括蟾蜍毒素类和蟾毒配基类化合物, 其中蟾蜍毒素为蟾毒配基 C-3 位被精氨酸二碳酸酯、硫酸酯等取代的衍生物, 二者属于脂溶性化合物。蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物根据配基母核上取代基不同分为 5 类, 分别为蟾毒灵类 (I)、脂蟾毒配基类 (II)、沙蟾毒精类 (III)、假蟾毒精类 (IV)、环酯蟾毒配基类 (V), 母核结构见图 1, 相关化合物见表 1。

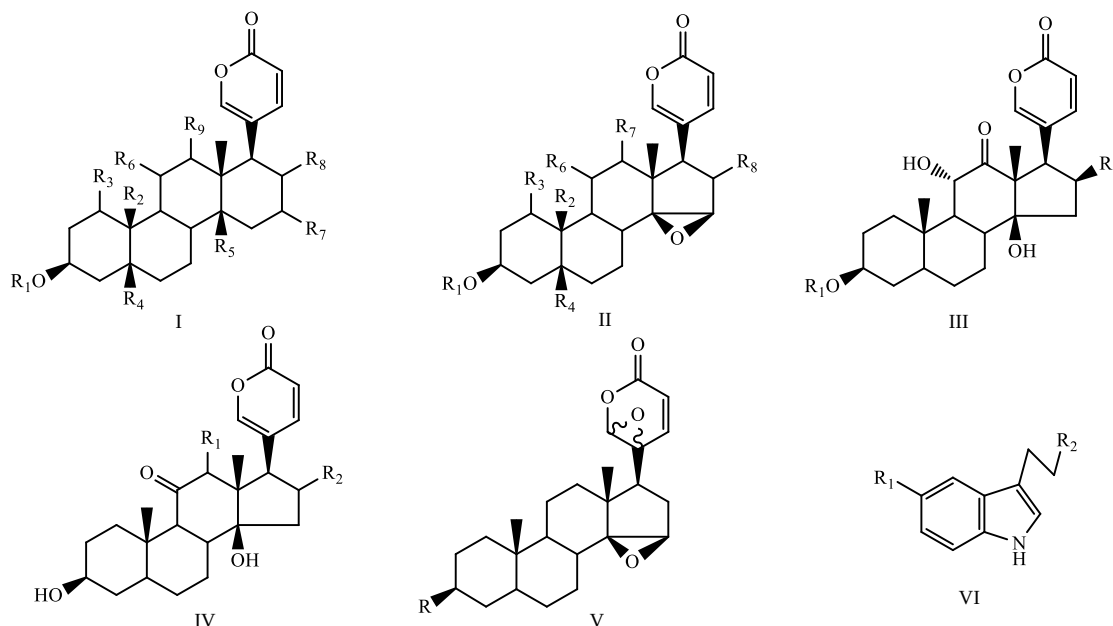


图 1 蟾酥中蟾毒配基类和吲哚生物碱类结构母核

Fig. 1 Mother nucleus structures of bufadienolides and indole alkaloids contained in *Bufo venenum*

吲哚生物碱类化合物主要包括蟾毒色胺类和其他蟾毒色胺类。其为神经递质 5-羟色胺及其代谢产物, 属于水溶性化合物。蟾毒色胺类是指以母核 VI (图 1) 为代表的化合物 (表 1), 主要包括 5-羟色胺、蟾毒色胺、蟾蜍吡咯胺 (bufopyramide) 等, 还有少量的其他蟾毒色胺类化合物, 如蟾蜍噁啉、蟾蜍丁酸、蟾蜍吡嗪酰胺、bufoserotonin C、沙棘胺 (hippophamide) 等。

由于蟾酥中较多化合物结构母核相似, 如蟾蜍毒素类和蟾毒配基类等。加之蟾酥是由蟾蜍耳后腺和皮肤腺体的白色浆液经加工干燥后得到的, 在这过程中上述化学成分之间也会发生相应的转化。蟾蜍毒素容易水解为蟾毒配基, 同时蟾酥中含有的蛋白/酶或可催化其发生生物转化, 故蟾蜍毒素类成分

在新鲜蟾酥和蟾酥干品中差异显著, 且在新鲜蟾酥中含量较高。而蟾毒配基类化合物在鲜蟾酥和蟾酥干品中的含量也有差异, 如脂蟾毒配基和华蟾酥毒基在鲜蟾酥中含量更高^[35]。干燥温度较高也会使蟾毒配基的内酯环转变为反邻羟基桂皮酸盐, 而使蟾毒配基类成分含量降低。另外, 蟾酥中含有的蛋白质在加热干燥过程中也会发生变性^[36-37]。

2 药理活性

现代药理学研究表明, 蟾酥具有多种药理活性。其中, 抗肿瘤、强心、麻醉、镇痛等作用为蟾酥活性的研究热点^[38]。目前已有活性报道的化合物多为蟾毒配基类化合物和蟾毒色胺类化合物。蟾蜍毒素类化合物虽然也是蟾酥的主要组成部分, 但其药理活性的相关报道还较少, 见表 1。

表 1 蟾酥中的化合物及其相关活性

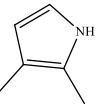
Table 1 Chemical constituents and related activities of *Bufo venenosus*

序号	化合物	结构类别	取代基	活性	机制
1	蟾毒灵	I	$R_1=R_3=H, R_2=CH_3, R_5=OH, R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H$	抗肿瘤作用 强心作用 麻醉、止痛 抗炎作用	促进细胞凋亡 ^[11] 、下调酪蛋白激酶-2 活力 ^[12] 、诱导细胞分化 ^[13] 、抑制细胞增殖 ^[14] 、激活线粒体介导的细胞凋亡通路 ^[15] 抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[16] 、抑制 $L-Ca^{2+}$ 释放通道 ^[17] 可能与中枢阿片受体有关 ^[18] 下调环氧化酶-2 (COX-2) 蛋白表达水平, 抑制核转录因子- κB (NF- κB) 表达及磷酸化 ^[19]
2	1 β -羟基蟾毒灵		$R_1=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_3=\beta-OH, R_5=OH$	抗肿瘤作用	抑制口腔表皮样癌 KB 细胞、人原髓细胞白血病 HL-60 细胞 ^[20]
3	19-氧代蟾毒灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CHO, R_5=OH$	抗肿瘤作用	抑制 KB、HL-60 细胞 ^[20]
4	日蟾毒它灵		$R_1=R_3=R_4=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_5=OH, R_6=\alpha-OH$	强心作用	抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21]
5	蟾毒它灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_5=OH, R_6=\beta-OAc$	强心作用 抗肿瘤作用	抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21] 激活线粒体介导的细胞凋亡通路 ^[22]
6	去乙酰蟾毒它灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_5=OH, R_6=\beta-OH$	强心作用	抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21]
7	噻根草配基		$R_1=R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CHO, R_4=R_5=OH$	抗肿瘤作用	DNA 损伤、线粒体损伤、细胞周期阻滞与细胞凋亡 ^[23]
8	远华蟾毒精		$R_1=R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_4=R_5=OH$	强心作用 抗肿瘤作用	抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21] 调节氧化应激与凋亡通路 ^[24]
9	5 β -羟基蟾毒它灵		$R_1=R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_4=R_5=OH, R_6=\beta-OAc$		
10	噻根草醇		$R_1=R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_2OH, R_4=R_5=OH$		
11	19-羟基蟾毒灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_2OH, R_5=OH$		
12	蟾毒灵 3-单辛酸酯		$R_1=CO(CH_2)_6COOH, R_2=CH_3, R_5=OH, R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H$		
13	15 β -羟基蟾毒灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_5=OH, R_7=\beta-OH$		
14	12 α -羟基蟾毒灵		$R_1=R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_5=R_9=OH$		
15	远华蟾毒精 3-辛酸酯		$R_1=CO(CH_2)_6COOH, R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H, R_2=CH_3, R_4=R_5=OH$		
16	hellebrigenol-3-O-sulfite		$R_1=SO_3H, R_2=CH_2OH, R_4=OH, R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H$		
17	hellebrigenin-3-O-sulfite		$R_1=SO_3H, R_2=CHO, R_4=OH, R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H$		
18	19-hydroxybufalin-3-O-sulfite		$R_1=SO_3H, R_2=CHO, R_3=R_4=R_6=R_7=R_8=R_9=H$		
19	desacetylbufotalin-3-O-sulfite		$R_1=SO_3H, R_2=CH_3, R_8=OH, R_3=R_4=R_6=R_7=R_9=H$		
20	telocinobufagin-3-O-sulfite		$R_1=SO_3H, R_2=CH_3, R_4=OH, R_3=R_6=R_7=R_8=R_9=H$		
21	脂蟾毒配基	II	$R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H, R_2=CH_3$	抗肿瘤作用 强心作用 麻醉、止痛	通过影响线粒体通路 ^[22] 抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21]
22	脂蟾毒精		$R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H, R_2=CHO$	强心作用	抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶 ^[21]
23	3 β -甲基脂蟾毒配基		$R_1=HCO, R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H, R_2=CH_3$	抗肿瘤作用	抑制 KB、HL-60 肿瘤细胞系 ^[20]
24	华蟾酥毒基		$R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H, R_2=CH_3, R_8=\beta-OAc$	抗肿瘤作用 强心作用	抑制癌细胞芳香化酶 mRNA 表达和雌二醇合成、抑制癌细胞增殖、抗肿瘤血管生成、增强机体免疫 ^[25] 抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶、增加动作电位 ^[21]
25	19-氧代去乙酰华蟾毒精		$R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H, R_2=CHO, R_8=\beta-OH$	抗肿瘤作用	抑制 KB、HL-60 细胞 ^[20]
26	marinobufagin		$R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=H, R_2=CH_3, R_4=OH$	降压、镇痛、 抗肿瘤、抗菌	
27	去乙酰华蟾毒精		$R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H, R_2=CH_3, R_8=\beta-OH$		

续表 1

序号	化合物	结构类别	取代基	活性	机制
28	6 α -羟基华蟾毒精		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₅ = α -OH, R ₈ = β -OAc	抗肿瘤作用	抑制 KB、HL-60 肿瘤细胞系 ^[20]
29	华蟾毒它灵		R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₄ =OH, R ₈ = β -OAc	强心作用 抗肿瘤作用	抑制抑制 Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶 ^[21] 引起线粒体亲环素 D 依赖的非凋亡性死亡 ^[26]
30	12 β -羟基脂蟾毒精醇		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₇ = β -OH		
31	脂蟾毒精醇		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₂ OH		
32	脂蟾毒配基-3-单辛酸酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOH, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H		
33	脂蟾毒配基-3-辛二酰精氨酸酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COArgOH, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H		
34	脂蟾毒配基-3-庚二酰精氨酸酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₅ COArgOH, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H		
35	1 β -羟基华蟾毒精		R ₁ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₃ = β -OH, R ₈ = β -OAc		
36	12 β -羟基华蟾毒精		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₇ = β -OH, R ₈ = β -OAc		
37	5 β ,12 β -二羟基华蟾毒精		R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₄ =OH, R ₇ = β -OH, R ₈ = β -OAc		
38	华蟾毒精-3-单辛酸酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOH, R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₈ = β -OAc		
39	去乙酰华蟾毒精-3-单辛酸酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOH, R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₈ = β -OH		
40	脂蟾毒配基-3-己二酰精氨酸		R ₁ =CO (CH ₂) ₄ COArgOH, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H		
41	华蟾毒精醇		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₂ OH, R ₈ = β -OAc		
42	去乙酰华蟾毒它灵		R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₄ =OH, R ₂ =CH ₃ , R ₈ = β -OH		
43	去乙酰华蟾毒精醇		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₂ OH, R ₈ = β -OH		
44	19-氧代华蟾毒它灵		R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CHO, R ₄ =OH, R ₈ = β -OAc		
45	19-氧代华蟾毒精		R ₁ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CHO, R ₈ = β -OAc		
46	华蟾毒它灵-3-辛二酸半酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOH, R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₄ =OH, R ₈ = β -OAc		
47	华蟾毒精-3-辛二酰甲酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOCH ₃ , R ₈ =OAc, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =R ₄ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H		
48	蟾蜍他里宁		R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =H, R ₂ =CHO, R ₄ =OH		
49	沙蟾毒精	III	R ₁ =R ₂ =H	强心作用 抗肿瘤作用	抑制 Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶 ^[21] 下调 β -catenin、抑制血管生成 ^[27]
50	沙蟾毒精 3-辛二酸半酯		R ₁ =CO (CH ₂) ₆ COOH		
51	沙蟾毒精 3-硫酸酯		R ₁ =SO ₃ H		
52	16-乙酰氧基沙蟾毒精		R ₁ =H, R ₂ = β -OAc		
53	假蟾毒精	IV	R ₁ = α -OH, R ₂ =H		
54	异沙蟾毒精		R ₁ = β -OH, R ₂ =H		
55	20S,21-环氧脂蟾毒配基	V	R=OH		
56	20R,21-环氧脂蟾毒配基		R=OH		IL-6 受体激动剂 ^[28]
57	3-甲酰氧基-20R,21-环氧脂蟾毒配基		R=COOH		IL-6 受体激动剂 ^[29]
58	3-甲酰氧基-20S,21-环氧脂蟾毒配基		R=COOH		
59	3-O-20S,21-环氧脂蟾毒配基		3-羰基		
60	isobufalin methyl ester	其他蟾蜍			
61	bufogargarizin	内酯类			
62	3-氧代华蟾毒它灵				
63	蟾毒配基烯酮				
64	5 β ,12 β -12,14-dihydroxy-11-oxobufa-3,20,22-trienolide				
65	5 β ,12 β -12,14-dihydroxy-11-oxobufa-2,20,22-trienolide				
66	5 β ,12 α -12,14-dihydroxy-11-oxobufa-3,20,22-trienolide				
67	14 β -artebufogenin				
68	bufogargarizins A				
69	bufogargarizins B				
70	bufospirostenin				
71	bufogargarizin				

续表 1

序号	化合物	结构类别	取代基	活性	机制
72	5-羟色胺	VI	$R_1=OH, R_2=NH_2$	麻醉、止痛	抑制性神经递质, 具有免疫调节作用 ^[30]
73	蟾毒色胺		$R_1=OH, R_2=N(CH_3)_2$	麻醉、止痛	致幻作用 ^[31]
74	蟾毒色胺内盐		$R_1=O^-, R_2=N^+(CH_3)_3$	麻醉、止痛	神经肌肉阻断活性 ^[32]
75	N-甲基-5-羟色胺		$R_1=OH, R_2=NHCH_3$		
76	bufobutanoic acid		$R_1=OH, R_2=NHCO(CH_2)_2COOH$		
77	bufopyramide		$R_1=OH, R_2=N(COCH_3)CO$ 		
78	蟾毒色胺氮氧化物		$R_1=OH, R_2=(CH_3)_2N\rightarrow O$		
79	蟾毒丁酰胺		$R_1=OH, R_2=NHCO(CH_2)_2CONHCHCOOH(CH_2)_3NH(NH_2)C=NH$		
80	蟾蜍绿啉		$R_1=CH_3, R_2=N^+(CH_3)$		
81	hufoserotonin A		$R_1=OH, R_2=NHCONH_2$		
82	hufoserotonin B		$R_1=OH, R_2=NHCO(CH_2)_6COOH$		
83	N'-formylserotonin		$R_1=OH, R_2=NHCHO$		
84	5-hydroxy-N-acetyltryptamine		$R_1=OH, R_2=NHCOCH_3$		
85	蟾蜍噻啉	其他蟾毒色胺类		治疗原发肝癌 ^[32]	
86	蟾蜍丁酸			抑制小鼠 P388 淋巴细胞性白血病细胞 ^[33]	
87	蟾蜍吡嗪酰胺				
88	hufoserotonin C				
89	hippophamide				
90	obtucarbamate A	其他类		止咳作用 ^[34]	
91	正十五烷酸				
92	4,4'-二苯甲烷二氨基甲酸甲酯				
93	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯				
94	邻苯二甲酸二异辛酯				
95	肾上腺素				
96	胆甾醇				
97	辛二酸				
98	7 α -羟基胆甾醇				
99	β -谷甾醇				
100	菜油甾醇				
101	γ -氨基丁酸				
102	精氨酸				
103	吗啡				

初京波等^[25]研究表明, 蟾毒灵、华蟾毒配基、脂蟾毒配基等为蟾酥中的抗肿瘤活性化合物, 其作用机制包括诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、促进或增强肿瘤细胞的分化、抑制肿瘤血管的形成、免疫增强作用等。徐瑞成等^[14]采用 HL-60 细胞作为靶细胞, 观察蟾毒灵诱导的细胞分化, 通过免疫组化法检测增殖细胞核抗原 (PCNA) 和细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 p21WAF1 的表达。结果发现蟾毒灵能够通过诱导 HL-60 细胞分化发挥抗肿瘤作用, 其机制与上调 p21WAF1 的表达、下调 PCNA 表达有关。

蟾毒灵、脂蟾毒配基等蟾毒配基类化合物具有类似洋地黄的强心作用, 属强心甾类化合物, 前者作用更明显, 能直接加强心肌收缩力^[39]。其强心作用机制包括抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶、促进 ATP 合成、影响 L 型电压依赖性 Ca^{2+} (L - Ca^{2+}) 通道、增加动作电位等^[16]。Steyn 等^[40]研究发现, 蟾毒灵既可抑制 Na^+, K^+ -ATP 酶的活性, 从而使心肌细胞内 Na^+ 浓度增高, Ga^{2+} 则通过 Na^+/Ga^{2+} 交换进入心肌细胞; 又可抑制 L - Ca^{2+} 释放通道, 使细胞内钙离子浓度进一步增加, 最终在 Ca^{2+} 的影响下, 心肌收缩力加大^[17]。

另据报道,蟾酥配基类化合物结构和构象决定了其对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性抑制能力的大小。 $5\beta,14\beta$ -雄甾烷- $3\beta,14\beta$ -二醇含有 17β 内酯(丁烯羟酸内酯或 α -吡喃酮)是强心苷和蟾酥内酯抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性最佳的结构母核。Bhattacharya 等^[41]研究发现,蟾毒色胺内盐具有神经肌肉阻断活性,其体外活性与筒箭毒碱活性相当,具体作用机制有待进一步探讨。

蟾酥作为药效确切的中药,同时也具有较强的毒性。其有效成分蟾毒配基类和蟾蜍毒素类化合物也具有毒性,通过作用于心脏迷走神经中枢或末梢,或直接作用于心肌,使房室传导阻滞,引起心率缓慢、心律不齐等症状,最终导致心搏停止于收缩期。同时,蟾毒色胺类化合物有致幻作用;儿茶酚类化

合物可引起各器官组织的微小血管剧烈收缩,导致组织缺血缺氧^[42]。

3 蟾酥化学成分的人工合成

由于蟾酥的化学成分具有抗肿瘤、强心和镇痛等多种较强的药理活性,20 世纪 60~80 年代对其中的若干活性化合物进行了大量的合成研究,包括蟾毒配基类(如蟾毒灵、脂蟾毒配基等)、蟾毒色胺类(如蟾毒色胺)和其他类(如胆甾醇等)。

3.1 蟾毒内酯类成分的人工合成

3.1.1 蟾毒内酯类成分的化学合成 半合成法合成蟾毒内酯类化合物通常选用的原料有醋酸雄烯醇酮(androstenolone acetate)、孕酮衍生物 3β -hydroxypregn-5-en-20-one、可的松(cortisone)、胆酸(cholic acid)及脱氧胆酸(deoxycholic acid, 图 2)。

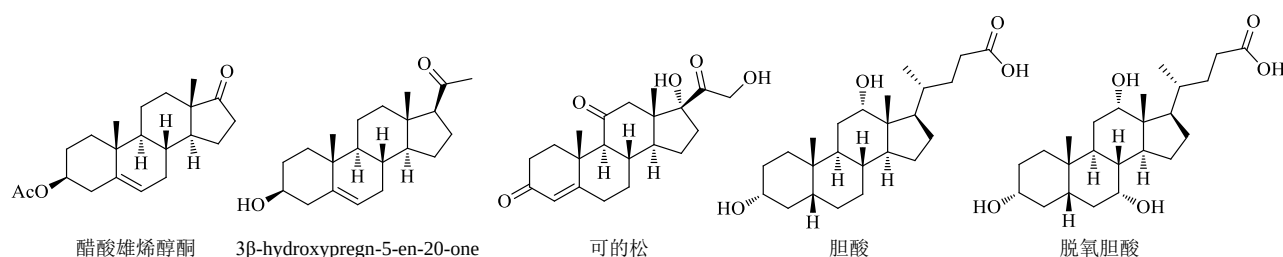


图 2 蟾毒内酯类化学合成中常用的起始原料

Fig. 2 Common starting materials from chemical synthesis of bufadienolides

蟾毒内酯类化合物的合成方法主要有 2 种:(1)选取适宜的甾体为原料,对 C-17 位取代基进行衍生可得到 5 碳链取代甾体前体,随后进行环化(必要时再进行 1 步消除)而得到产物。(2)选取适合的甾体化合物,衍生得到 C-17 位烯基硅醚甾体前体,再在 Pd 催化下与卤代 α 吡喃酮发生偶联反应得到。

20 世纪 60~90 年代以前的工作主要是采用第 1 种方法,这种方法涉及到多步官能团转化,步骤较长且收率较低。1969 年, Sondheimer 等^[43]报道首例蟾毒灵的合成(表 2),经过 15 步转化后,以不到 1% 收率得到终产品。Pettit 等^[44]、Yoshii 等^[46]及 Bauer 等^[48]从不同原料出发,最终也没有得到收率超过 10% 的产物。20 世纪 90 年代以后,过渡金属催化的偶联反应在蟾酥化学成分的合成上得到了应用。1996 年, Liu 等^[50]实现了 Stille-Kosug 偶联法合成蟾毒灵,总收率为 28%。这种点对点合成法避免了冗长而低效的官能团转化过程,同时有利于进行发散合成而得到更多可能的先导化合物。然而这种偶联的合成法需要用到锂试剂、较高的温度和无氧的条件,因此对操作要求较高,不利于推广工业化。

另外,其他蟾毒内酯类成分的合成有少量文献报道,传统合成路线中酯蟾毒配基是蟾毒灵的前体化合物, Sondheimer 等^[43]、Pettit 等^[44-45]、Yoshii 等^[46]均完成了此化合物的全合成。此外, Kamano 等^[53-54]还完成了蟾毒它灵到酯蟾毒配基的转化,并成功转化合成了系列蟾酥产物 15β -羟基蟾毒灵、远华蟾毒精。

3.1.2 蟾毒内酯类成分的生物合成 目前已有文献报道^[55]蟾毒内酯类化合物的生物合成,生物体内存在如下合成途径:乙酸→甲羟戊酸→异戊烯→焦磷酸酯→角鲨烯→角鲨烯 2,3-氧化物→羊毛甾醇→胆固醇。其中,胆固醇可能是蟾毒内酯类成分沙蟾毒精在蟾蜍体内生物合成的相关前体物质。Garraffo 等^[56]通过对胆固醇进行 H^3 标记法发现产物沙蟾毒精保留了原有的标记 H^3 。目前研究尚难以阐明原料产物的转化关系及蟾毒内酯类成分的具体酶代谢途径。从胆固醇到蟾毒内酯的生物合成过程也有待进一步研究确定。

3.2 蟾毒色胺类和甾醇类成分的人工合成

蟾酥中蟾毒色胺类和甾醇类活性成分的合成方法见表 3。1935 年, Hoshino 等^[57]首次合成蟾毒色胺,但其起始原料较难取得,路线也相对复杂。其

表 2 蟾毒内酯成分的化学合成方法

Table 2 Chemical synthesis methods of bufadienolides

化学成分	方法	主要步骤	总收率
蟾毒灵	Sondheimer 法 ^[43]	从 11-脱氧氢化可的松出发, 通过官能团转化、增长碳链, 15 步合成蟾毒灵	<1%
	Digitoxigenin 法 ^[44]	从洋地黄毒苷配基出发, Witting 反应引入腈基, 再经过增长碳链, 成酯分子内成环, 13 步合成蟾毒灵	<1%
	洋地黄法 ^[45]	以洋地黄为原料, 将 17 位环丁酯侧链经历 12 步转化为环戊酯, 最终合成蟾毒灵	<1%
	Yoshii 法 ^[46]	从孕酮衍生物出发, 醛基化增长碳链得到不饱和醛, 再经过环丙烷化及酸化前体, 最终 9 步转化得到	<1%
	Wiesner 法 ^[47]	构建 19 位碳吡咯取代甾体衍生物, 经过 NBS 开环、NaBH ₄ 还原、盐酸化成环, 共 9 步转化得到	约 20%
	Watt 法 ^[48]	构建 19 位碳高烯丙醇甾体, 并由锂化反应结合氧化及关环反应合成得到, 共 7 步	6.3%
	硅烯醚加成法 ^[49]	以脱氧胆酸为原料, 先在 17 位碳上构建不饱和醛, 采用 Eu(fod) ₃ 催化 Mukaiyama-Michael 加成关环, 再酸化氧化消除得到	10%
	Stille-Kosug 偶联法 ^[50]	从雌酚酮出发, LDA 去质子化、成烯基三苯基硅醚雌酚酮衍生物, 随后在 Pd(0) 催化下, 与 Sn 取代的 α 吡喃酮环发生偶联, 进一步氢化、脱保护得到	28%
	Suzuki 偶联法 ^[51]	以雄甾酮为原料, 合成上述烯基三苯基硅醚雌酚酮中间体, 随后 Pd 催化下与 α 吡喃酮环硼酸酯发生偶联, 脱保护得到	26%
酯蟾毒配基	Sondheimer 法 ^[43]	从 11-脱氧氢化可的松出发, 14 步合成蟾毒灵	<1%
	Pettit 法 ^[44-45]	从洋地黄毒苷配基出发, 12 步合成蟾毒灵; 如果从洋地黄出发能够 11 步即可得到	<1%
	Yoshii 法 ^[46]	从孕酮衍生物出发, 醛基化增长碳链得到不饱和醛, 再经过环丙烷化及酸化前体, 最终 8 步转化得到	<1%
华蟾毒精	蟾毒它灵衍生法 ^[52]	从蟾毒它灵出发, 脱水、双羟化、脱水 4 步衍生得到	23%
15 β -羟基蟾毒灵	Pettit 法 ^[53]	从洋地黄出发, 多步合成得到	<1%
远华蟾毒精	Pettit 法 ^[54]	从洋地黄出发, 多步合成得到	<1%

表 3 蟾酥吲哚生物碱类和甾醇的人工合成方法

Table 3 Chemical synthesis methods of indole alkaloids and sterol

化学成分	方法	主要步骤	总收率
蟾毒色胺	化学合成法 ^[57]	从 2-(5-乙氧基-1 <i>H</i> -吲哚-3-基) 乙醇出发, 经过溴化、取代、脱保护得到	
	化学合成法 ^[58]	简单原料 2,5-二甲氧基苯甲醛出发, PtO ₂ 催化还原, 氯化、腈化得到 2,5-二甲氧基苯乙腈, 随后再经过 3 步反应增长碳链最终得到	
β -谷甾醇	生物提取法 ^[59]	以米糠油下脚为原料, 原料处理得干皂渣。干皂渣加入丙酮提取, 夹套蒸馏汽加热, 50~55 °C 回流提取 3~4 h, 得滤液, 最后通过重结晶得到	
	化学合成法 ^[60]	从豆甾醇出发, 先对 C ₃ -C ₄ 双键环氧化保护, 随后选择性还原 C ₂₃ -C ₂₄ 双键, 再一步酸去保护得到产物	53.4%
7 β -羟基胆甾醇	化学合成法 ^[61]	从胆固醇出发, 采取 C-3 羟基保护, 氧化、还原羰基、碱脱保护得到	52%
菜油甾醇	化学合成法 ^[62]	从甾醛出发与预先制备好的菜油甾醇手性侧链膦盐发生 Wittig 反应, 随后再进一步酸重排, 得到产物	12%
麦角甾醇	微生物发酵法 ^[63]	筛选优化的角麦酵母菌种并运用皂化、萃取、结晶法提取麦角甾醇, 提取率 6.55%	5.63 mg·g ⁻¹
	微生物发酵法 ^[64]	筛选一株产麦角甾醇较高的红曲菌, 在 28 °C 时, 以小米作为基质, 加水量为 60%, 在搅拌水中加入酵母膏和钙离子, 发酵 3 d, 可最大量产生麦角甾醇	8.12 mg·g ⁻¹
	基因工程 ^[65]	研究了 ERG6 基因片段的表达对酵母菌合成麦角甾醇的影响, 酿酒酵母单倍体菌株 YS58 用载体质粒 YEp352 和表达质粒 pPERG6 转化, 得到重组菌株 YS58 (pPERG6)	7.41 mg·g ⁻¹

后, Harley-Mason 等^[58]改进了合成路线, 选择简单原料 2,5-二甲氧基苯甲醛出发, 6 步合成得到蟾毒色胺。该路线的缺点在于需要使用贵重催化剂铂和剧毒试剂氰化钠, 在实验操作上具备一定难度。

β -谷甾醇的全合成研究目前尚未出现, β -谷甾醇的半合成研究选取豆甾醇为原料, 选择性地还原 C23-C24 双键得到产物。该方法的限制在于过程中往往会出现 C3-C4 过度还原产物, 而对 C3-C4 先进行保护再还原, 又不可避免地产生难以分离的 β -谷甾醇甲醚副产物, 增加分离难度, 使得大量制备非常困难。目前主要通过生物提取法从米糠油中获得 β -谷甾醇。

7 β -羟基胆甾醇和菜油甾醇也是组成蟾酥的重要组成部分, 对它们的合成研究仍然处于起步阶段。文献报道 7 β -羟基胆甾醇在生物体内是由胆固醇氧化得到^[61]。目前, 其化学合成路线主要依靠模仿生物体内的转化途径, 采取氧化还原方法得到。菜油甾醇在植体内多见, 因其侧链上具手性导致现有菜油甾醇的合法较繁琐, O'Connell 等^[62]采用 Wittig 反应成功将手麟盐前体与甾醛片段结合得到菜油甾醇前体, 收率较高, 但其手麟盐前体合成仍然相对复杂而难以大量制备。

麦角甾醇是蟾酥成分之一, 此外它也是许多甾醇类药物的重要原料。目前国内主要采取微生物发酵的手段, 从优选的酵母菌种或者红菌曲菌中取得麦角甾醇。通过各种生物发酵方法, 基本满足市场年 600 t 的使用量。此外基因工程技术在麦角甾醇酵母选育上也得到成功应用, 但由于该技术成本较高而没有得到广泛应用, 可以预见, 基因工程将会成为选育麦角甾醇高产菌株的一种非常重要、新颖的手段^[63-65]。

4 结语

经过系统的文献查阅及总结可知, 蟾酥具有复杂的化学成分和广泛的药理活性, 其抗肿瘤、强心和麻醉镇痛等活性最为显著。生物碱类成分为其中具有显著药理活性的主要成分, 是目前药理学、中药化学和合成化学关注的重点, 尤其是对蟾毒配基类化合物的研究最为深入。但是目前蟾酥基础研究仍存在很多空白, 例如, 蟾酥中各类成分含量的比例情况及除蟾毒配基类成分外的其他成分对药效的贡献情况等。此外, 由于蟾蜍野生资源日益减少, 导致蟾酥供不应求, 如何基于其传统功效及其活性成分开展蟾酥的替代品研究与开发, 也值得深入探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [3] 寇冠军, 秦姿凡, 邓雅芳, 等. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3185-3189.
- [4] 朱道玉. 蟾蜍的人工饲养 [J]. 农村经济与科技, 2000, 11(21): 36.
- [5] Gao H M, Popescu R, Kopp B, *et al.* Bufadienolides and their antitumor activity [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(5): 953-969.
- [6] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [7] 王子月, 周婧, 马宏跃, 等. 基于纳升高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱技术研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(8): 675-680.
- [8] Zhang P, Cui Z, Liu Y, *et al.* Quality evaluation of traditional Chinese drug toad venom from different origins through a simultaneous determination of bufogenins and indole alkaloids by HPLC [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(12): 1582-1586.
- [9] 代丽萍, 王智民, 高慧敏, 等. 蟾皮和华蟾素注射液中华蟾蜍毒素含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 224-226.
- [10] 曲婷, 高慧敏, 陈两绵, 等. 蟾蜍类药材中吲哚生物碱和蟾毒配基类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3086-3091.
- [11] 陈小义, 呼文亮, 徐瑞成. 蟾蜍灵对肝癌细胞 SMMC7721 的细胞毒作用及生长相关基因表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 293-296.
- [12] 高晓东, 陈桦, 丁润生, 等. 蟾酥灵对 HL-60/ADR 作用的研究 [J]. 交通医学, 2002, 16(5): 506-507.
- [13] Amamo Y, Cho Y, Matsunawa M, *et al.* Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotonic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells [J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 114(3/5): 144-151.
- [14] 徐瑞成, 陈小义, 陈莉, 等. 蟾蜍灵诱导白血病 HL-60 细胞分化及相关基因表达 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 151-153.
- [15] Xie C M, Chan W Y, Yu S, *et al.* Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(7): 1365-1375.
- [16] 姜艳, 朱会超, 任煜, 等. 蟾酥治疗心血管疾病的药理研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2012, 31(3): 187-189.
- [17] Biek R J, Poindexter B J, Sweney R R, *et al.* Effects of

- Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than Na, K-ATPase blocking [J]. *Life Sci*, 2002, 72(6): 699-709.
- [18] 杨静玉, 沙莎, 王立辉, 等. 蟾酥脂质微球注射液抗癌止痛作用及机制研究 [J]. 中国药理通讯, 2010(3): 24-25.
- [19] Chen Y Y, Lu H F, Hsu S C, *et al.* Bufalin inhibits migration and invasion in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells through the inhibitions of NF- κ B and matrix metalloproteinase-2/-9-signaling pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2013, 30(1): 74-82.
- [20] Nogawa T, Kamano Y, Yamashita A, *et al.* Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Chan Su [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(9): 1148-1152.
- [21] Li H X, Wang P, Gao Y, *et al.* Na⁺/K⁺-ATPase α 3 mediates sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to bufalin [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(3): 825-830.
- [22] Emam H, Zhao Q L, Furusawa Y, *et al.* Apoptotic cell death by the novel natural compound, cinobufotalin [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 199(3): 154-160.
- [23] Li J D, Li P H, Qun L P, *et al.* Hellebrigenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through inhibition of Akt [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, doi: 10.1016/j.cbi.2014.06.003.
- [24] 梁顺添, 李源, 李晓武, 等. 远华蟾蜍精通过调节应激与凋亡通路诱导结直肠癌细胞的凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(7): 921-926.
- [25] 初京波, 赵丽梅, 李蕾, 等. 蟾酥的抗肿瘤作用及作用机制 [J]. 山西中医, 2012, 28(7): 54-55.
- [26] Kai S, Lu J H, Hui P P, *et al.* Pre-clinical evaluation of cinobufotalin as a potential anti-lung cancer agent [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 768-774.
- [27] Chen L, Mai W, Chen M, *et al.* Arenobufagin inhibits prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating β -catenin [J]. *Pharmacol Res*, 2017, doi: org/10.1016/j.phrs.2017.07.009.
- [28] Boos T L, Cheng K, Greiner E, *et al.* Configurational reassignment and improved preparation of the competitive IL-6 receptor antagonist 20R, 21R-epoxyresibufogenin-3-formate [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4): 661-618.
- [29] Kino T, Boos T L, Sulima A, *et al.* 3-O-Formyl-20R, 21-epoxyresibufogenin suppresses IL-6-type cytokine actions by targeting the glycoprotein 130 subunit: Potential clinical implications [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(2): 437-444.
- [30] Costa T O, Morales R A, Brito J P, *et al.* Occurrence of bufotenin in the *Osteocephalus* genus (Anura: Hylidae) [J]. *Toxicon*, 2005, 46(4): 371-375.
- [31] Xie R F, Li Z C, Gao B, *et al.* Bufothionine, a possible effective component in cinobufocini injection for hepatocellular carcinoma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 692-700.
- [32] Kupferberg A, Cremel G, Behr P, *et al.* Differential sensitivity of astrocyte primary cultures and derived spontaneous transformed cell lines to 7 beta-hydroxycholesterol: effect on plasma membrane lipid composition and fluidity, and on cell surface protein expression [J]. *Mol Cell Biochem*, 1991, 101(1): 11-22.
- [33] Yoshiaki K, Hiroshi M, Rui T, *et al.* Bufobutanoic acid and bufopyramide, two new indole alkaloids from the Chinese traditional drug Chan Su [J]. *Heterocycles*, 1999, 50(1): 499-503.
- [34] 甘秀海, 赵超, 梁志远, 等. 百尾参止咳活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4099-4103.
- [35] 王子月, 王洪兰, 周婧, 等. 利用UPLC-TQ-MS比较蟾酥鲜品和蟾酥商品化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3967-3973.
- [36] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [37] 许保军, 夏华玲, 赵新杰, 等. 炮制对蟾酥药材中蟾毒内酯的影响 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 722-723.
- [38] 辛秀兰, 张宝璟, 苏东海, 等. 中药蟾酥的药理作用研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(3): 588-600.
- [39] 岳素荣, 贺吉香. 蟾酥研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(11): 222-224.
- [40] Steyn P S, van Heerden F R. Heerden Bufadienolides of plant and animal origin [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(4): 397-413.
- [41] Bhattacharya S K, Sanyal A K. Neuromuscular blocking activity of bufotenidine isolated from *Arundo donax* L. [J]. *Die Naturwissenschaften*, 1972, 59(12): 650-651.
- [42] 梁晓萍, 张政, 胡坪, 等. 蟾酥急性毒性的代谢组学研究 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(1): 38-43.
- [43] Sondheimer F, McCrae W, Salmond W G. Synthesis of bufadienolides. Synthesis of bufalin and resibufogenin [J]. *J Am Chem Soc*, 1969, 91(5): 1228-1230.
- [44] Pettit G R, Houghton L E, Knight J C, *et al.* Bufadienolides. 11. Bufalin and resibufogenin [J]. *J Org Chem*, 1970, 35(9): 2895-2898.
- [45] Pettit G R, Dias J R. Bufadienolides. 13. Conversion of 3 beta-hydroxy-17-oxoandrost-5-ene to 3beta-acetoxy-5beta, 14 alpha-bufa-20, 22-dienolide [J]. *J Org Chem*, 1971, 36(21): 3207-3211.

- [46] Yoshii E, Koizumi T, Ikeshima H, *et al.* Studies on the synthesis of cardiotonic steroids. I. Efficient synthesis of cardenolides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1975, 23(11): 2496-2506.
- [47] Jaggi F J, Tsai Thomas Y R, Wiesner K. On cardioactive steroids VII. The conversion of digitoxigenin to isomers of natural bufalin and resibufogenin [J]. *Heterocycles*, 1982, 19(4): 647-652.
- [48] Bauer P E, Kyler K S, Watt D S. A synthesis of 3 β -hydroxy-5 β ,14 α -bufa-20,22-dienolide from deoxycorticosterone [J]. *J Org Chem*, 1983, 48(1): 34-39.
- [49] Hoppe H W, Welzel P. A synthesis of bufalin from deoxycholic acid [J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, 27(22): 2459-2462.
- [50] Liu Z, Meinwald J. 5-(Trimethylstannyl)-2H-pyran-2-one and 3-(trimethylstannyl)-2H-pyran-2-one: New 2H-pyran-2-one synthons [J]. *J Org Chem*, 1996, 61(19): 6693-6699.
- [51] Gravett E C, Hilton P J, Jones K, *et al.* A Suzuki coupling approach to bufadienolides [J]. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42(51): 9081-9084.
- [52] Pettit G R, Kamano Y. Steroids and related natural products. 78. Bufadienolides. 21. Synthesis of cinobufagin from bufotalin [J]. *J Org Chem*, 1972, 37(25): 4040-4044.
- [53] Kamano Y, Pettit G R, Tozawa M, *et al.* Steroids and related natural products. 93. Bufadienolides. 30. Synthesis of the Chan Su component 15. beta-hydroxybufalin [J]. *J Org Chem*. 1975, 40(14): 2136-2138.
- [54] Kamano Y, Pettit G R, Tozawa M, *et al.* Steroids and related natural products. 86. Bufadienolides. 27. Synthesis of telocinobufagin [J]. *J Org Chem*, 1974, 39(17): 2632-2634.
- [55] Santa Coloma T A, Garraffo H M, Pignataro O P, *et al.* Biosynthesis of bufadienolides in toads. V. The origin of the cholesterol used by toad parotoid glands for biosynthesis of bufadienolides [J]. *Steroids*, 1984, 44(1): 11-22.
- [56] Garraffo H M, Gros E G. Biosynthesis of bufadienolides in toads. VI. Experiments with [1,2- ^3H] cholesterol, [21- ^{14}C] coprostanol, and 5 beta- [21- ^{14}C] pregnanolone in the toad *Bufo arenarum* [J]. *Steroids*, 1986, 48(3/4): 251-257.
- [57] Hoshino T, Shimodaira K. Synthese des bufotenins und über 3-methyl-3- β -oxyäthyl-indolenin. Synthesen in der Indol-Gruppe. XIV [J]. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, 1935, 520(1): 19-30.
- [58] Harley-Mason J, Jackson A H. Hydroxytryptamines. Part I. Bufotenine, 6-hydroxybufotenine, and serotonin [J]. *J Chem Soc*, 1954, doi: 10.1039/JR9540001165.
- [59] 郑祖镇. 米糠油中提取谷甾醇的新工艺探索 [J]. 食品工业, 1980(4): 3-10.
- [60] Hang J, Dussault P. A concise synthesis of beta-sitosterol and other phytosterols [J]. *Steroids*, 2010, 75(12): 879-883.
- [61] 赵晓鸥. 7-酮基胆甾醇和 7 β -羟基胆甾醇的合成研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [62] O'Connell N M, O'Callaghan Y C, O'Brien N M, *et al.* Synthetic routes to campesterol and dihydrobrassicasterol: A first reported synthesis of the key phytosterol dihydrobrassicasterol [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(25): 4995-5004.
- [63] 张 毅. 一种酵母麦角固醇高产菌株及其选育方法与应用: 中国, CN201210364703. 3 [P]. 2012-09-27.
- [64] 朱效刚, 许赣荣, 李颖茵, 等. 红曲菌固态发酵产麦角甾醇工艺条件的优化 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 72-75.
- [65] 孟云霞, 何秀萍, 刘 楠, 等. 甾醇 C-24 甲基转移酶基因在酿酒酵母中的内源表达及工程菌麦角甾醇的合成 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(1): 40-45.