

含有三唑的苯并[d]噁唑类衍生物的合成及其抗惊厥活性评价

谭月德 何晓艳 饶保奇 程彬彬 宋明霞 邓先清*

(井冈山大学医学部 基础医学与药学院 吉安 343009)

摘要 设计并合成了一系列三唑-苯并噁唑类化合物, 采用最大电惊厥模型(MES)和皮下戊四唑模型(Sc-PTZ)评价了其抗惊厥活性, 用旋转棒法测定了其神经毒性. 药理实验显示, 大部分化合物在 MES 和 Sc-PTZ 模型中均表现出不同程度的抗惊厥活性, 其中 2-(3-氟苄基)噻唑-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5i**)的抗惊厥活性最强, 其在 MES 和 Sc-PTZ 模型中的半数有效剂量 ED₅₀ 分别为 11.4 和 31.7 mg/kg, 半数神经毒性剂量 TD₅₀ 为 611.0 mg/kg, 保护指数 PI 值分别为 53.6 和 19.3, 明显优于对照药卡马西平和丙戊酸钠. GABA 合成酶抑制剂硫代氨基脲的预处理使得化合物 **5i** 的抗惊厥活性明显下降, 说明化合物 **5i** 的抗惊厥作用至少部分是通过作用于 GABA 神经能系统譬如增加 GABA 神经递质来实现的.

关键词 抗癫痫药; 抗惊厥; 苯并[d]噁唑; 三唑; MES; Sc-PTZ

Synthesis and Evaluation of the Anticonvulsant Activities of Triazole-Containing Benzo[d]oxazoles

Tan, Yuede He, Xiaoyan Rao, Baoqi Cheng, Binbin
Song, Mingxia Deng, Xianqing*

(Basic Medical and Pharmacy College, Department of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an 343009)

Abstract A series of 2-thioalkyl-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)benzo[d]oxazoles were designed and synthesized. Their anticonvulsant activities were evaluated using maximal electroshock shock (MES) and subcutaneous pentylenetetrazole (scPTZ) seizure models in mice. The neurotoxicity was evaluated with rotarod test. The pharmacology results showed that most compounds exhibited anticonvulsant activity in MES and Sc-PTZ models. Among them, 2-(3-fluobenzyl)thio-5-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)benzo[d]oxazole (**5i**) was the most potent with ED₅₀ value of 11.4 and 31.7 mg/kg in MES and Sc-PTZ models, respectively. The TD₅₀ value of **5i** was 611.0 mg/kg, which resulted in the protective index (PI=TD₅₀/ED₅₀) value of 53.6 and 19.3. The pretreatment of thiosemicarbazide (an inhibitor of γ -aminobutyric acid synthesis enzyme) significantly decreased the active of **5i** in MES, which suggested that the GABAergic system may contribute at least in part to the anticonvulsive action.

Keywords antiepileptic drugs; anticonvulsant; benzo[d]oxazole; triazole; MES; Sc-PTZ

癫痫(epilepsy)即俗称的“羊角风”或“羊癫风”, 是大脑神经元突发性异常放电导致的短暂性大脑功能障碍的一种慢性疾病. 全球癫痫患者约 6000 万人, 其中 80%在低中等收入国家^[1]. 癫痫已经是神经科仅次于头痛的第二大常见病. 自 20 世纪末以来, 世界卫生组织 WHO 已将癫痫列为重点防治的神经精神系统疾病之一^[2].

临床应用中可供使用的传统抗癫痫药有很多, 例如苯巴比妥、苯妥英、卡马西平、丙戊酸钠等. 这些药物都能够在不同程度上保护患者不发生各种癫痫性惊厥, 但具有较大的副作用和耐受性. 近年来, 这些传统抗癫痫药物逐渐被新的药物取代, 如卢非酰胺、拉莫三嗪、氨己烯酸、托吡酯、左乙拉西坦片、非氨酯、普瑞巴林等^[3]. 虽然这些新的抗癫痫药物表现出更好的药代动力

* E-mail: dengxianqing1121@126.com

Received April 13, 2016; revised May 15, 2016; published online June 2, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21562028), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Nos. 20151BAB213008, 20142BAB215022), the Youth Science Foundation of JiangXi Educational Committee (No. GJJ14570) and the Doctoral Foundation of Jinggangshan University (No. JZB1316).

国家自然科学基金(No. 21562028)、江西省自然科学基金项目(Nos. 20151BAB213008, 20142BAB215022)、江西省教育厅科技计划项目(No. GJJ14570)和井冈山大学博士启动基金(No. JZB1316)资助项目.

学性质和药效,但其仍难以避免各种副作用如嗜睡、呕吐、头痛、恶心和认知障碍等,且大多数药物的抗癫痫谱较窄,只对某种类型的癫痫发作起作用^[4,5]。因此,避免和克服传统抗癫痫药物的缺点,寻找具有更好疗效和更低毒性的抗癫痫新化学实体仍然具有重要意义。

三氮唑类化合物已被报道具有多种活性。如抗真菌、抗细菌、抗结核、抗炎镇痛、抗惊厥、抗癌以及催眠^[6~8]等作用。近年来通过把1,2,4-三唑与一些特定的基团连接从而寻求更好的抗癫痫药物,成为抗癫痫药物新药研发的热点之一^[9~12]。苯并噁唑是一类非常重要的氮杂环化合物,是有机合成的重要先导骨架和母体。由它们衍生的化合物往往具有较高生物活性,加上它们具有选择性好、毒性低等特点,在医药和农药合成方面常被用作重要的结构组成单元。在医药合成中,苯并噁唑衍生物可以用于制备具有消炎止痛、抗菌、抗真菌等药物^[13~15]。近年来有文献表明,苯并噁唑衍生物还表现出一定的抗癫痫活性^[16]。本实验采用活性基团拼接原理,将苯并噁唑与三唑相连,同时考虑中枢系统药物需要透过血脑屏障,在噁唑环上通过硫原子引入了一系列亲脂性片段,设计合成了一系列三唑-苯并噁唑类化合物。Unverferth 等^[17]通过研究大量临床有效的抗癫痫药物的结构特点,提出了三点药效团模型。基于该假说,本实验设计的目标化合物同样也包含这三个药效团:疏水性单元(A)、电子供体(D)、氢键供/受体(HAD)(图1)。

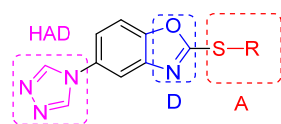


图1 抗癫痫药物三点药效团模型的结构要求

Figure 1 Structural requirement for anticonvulsant model bearing three component pharmacophore

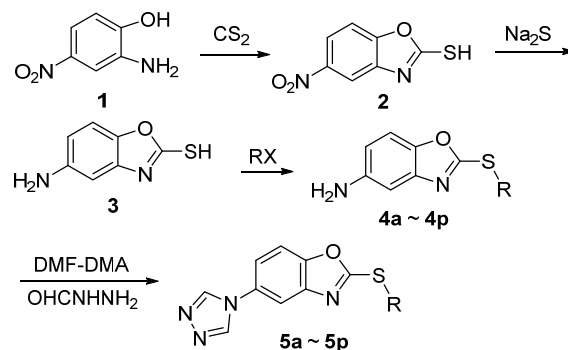
目标化合物的结构通过红外光谱、核磁共振谱及质谱确证。抗惊厥活性和神经毒性分别使用小鼠最大电惊厥实验(maximal electroshock, MES)、皮下戊四唑实验(sc-PTZ)和旋转棒法(rotarod test)进行评价。

1 结果与讨论

1.1 合成部分

目标化合物 **5a~5p** 的合成如 Scheme 1 所示。以 4-硝基-2-氨基苯酚为原料,将其与 CS_2 在 KOH 催化下环合得到 5-硝基-2-巯基-苯并[d]噁唑(**2**),用 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 还原化合物 **2** 得到 5-氨基-2-巯基-苯并[d]噁唑(**3**)。化合物 **3** 和各种卤代烷在乙腈溶剂中 K_2CO_3 存在下可以快速的进行烷基化反应,生成 5-氨基-2-硫烷基-苯并[d]噁唑(**4a~4p**),该中间体无需纯化直接与 N,N -二甲基甲酰胺二甲基缩醛(DMF-DMA)和甲酰肼反应得到目标化合物

5a~5p。目标化合物的结构经核磁共振和质谱等谱学方法得到确证。



图式1 化合物 **5a~5p** 的合成路线

Scheme 1 The synthetic route of compounds **5a~5p**

产物的波谱特征以化合物 **5a** 为例。在 ^1H NMR 中,三唑环的两个 H 的单吸收峰出现在 δ 8.48 处,与苯环的吸收峰较好的区分;芳香氢区域出现了典型的 1,3,4 取代型吸收峰, δ 7.26 处的 dd 峰是 6 位上氢的吸收峰,被邻位和间位的氢先后分裂,偶合常数分为 8.6 和 1.8 Hz; δ 7.56 和 7.59 处的双峰是 7 位和 4 位氢的吸收峰,其偶合常数分别为 8.6 和 1.8 Hz,与 6 位氢的偶合常数对应;硫丙烷侧链上氢的吸收峰则出现在高场 δ 3.30~1.09 的位置。 ^{13}C NMR 谱也准确地给出了该化合物结构的各种信息,恰好是 11 种不同类型的碳(三唑上两个碳化学环境相同)。在高分辨质谱中,化合物 **5a** 的理论值为 261.0805,实际测定值为 261.0799,进一步确证了其分子结构。

1.2 药理部分

1.2.1 抗惊厥活性和神经毒性的初步评价

本实验采用了 MES 和 Sc-PTZ 模型来评价目标化合物 **5a~5p** 的抗惊厥活性。这两个模型目前依然是抗癫痫药物筛选的首要选择,被美国国立卫生研究院(NIH)推荐为主要的抗癫痫药物筛选模型^[18]。其中 MES 模型用于筛选能对抗全身强直阵挛性发作的候选药^[19],而 Sc-PTZ 模型则用来筛选失神发作的候选药物^[20]。本实验首先对化合物 **5a~5p** 进行了 30, 100 和 300 mg/kg 三个剂量的活性和神经毒性评价,其结果见表 1。

由表 1 可见,化合物 **5a~5p** 都具有不同程度的抗惊厥活性。在 MES 模型中,化合物 **5f~5m** 和 **5o** 在 30 mg/kg 低剂量时给药 0.5 h 后显示出抗惊厥活性,并且在 4 h 后还保持了一定的抗惊厥活性;化合物 **5a~5e** 和 **5n** 在 100 mg/kg 时显示出中等的抗惊厥活性。在 Sc-PTZ 模型中,化合物 **5f~5m** 和 **5o** 表现出了不同程度的抗惊厥活性,其中 **5f** 和 **5h~5j** 四个化合物在给药 4 h 后依然具有活性。大部分化合物在 4 h 后仍然具有抗惊厥活性,

表 1 化合物 5a~5p 抗癫痫活性和神经毒性的初步评价

Table 1 Preliminary anticonvulsant activity and neurotoxicity data of 5a~5p

Compd.	R	Intraperitoneal injection in mice ^a					
		MES screening ^b		scPTZ screening ^c		NT screening ^d	
		0.5 h	4 h	0.5 h	4 h	0.5 h	4 h
5a	C ₃ H ₇	100	—	—	—	—	—
5b	C ₄ H ₉	100	—	—	—	300	—
5c	C ₅ H ₁₁	100	300	—	—	300	—
5d	C ₆ H ₁₃	100	300	—	—	—	—
5e	C ₇ H ₁₅	100	300	—	—	—	—
5f	C ₈ H ₁₇	30	100	300	300	—	—
5g	CH ₂ C ₆ H ₅	30	100	100	—	—	—
5h	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>o</i> -F)	30	100	100	300	300	—
5i	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>m</i> -F)	30	30	30	100	—	—
5j	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>p</i> -F)	30	100	100	300	—	—
5k	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>o</i> -Cl)	30	100	300	—	—	—
5l	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>m</i> -Cl)	30	100	100	—	300	—
5m	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>p</i> -Cl)	30	300	300	—	—	—
5n	CH ₂ C ₆ H ₃ (2,4-Cl ₂)	100	300	—	—	—	—
5o	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>p</i> -CH ₃)	30	100	300	—	—	—
5p	CH ₂ C ₆ H ₄ (<i>p</i> -OCH ₃)	300	—	—	—	—	—

^a Number of animal used is 3~5, Doses of 30, 100, and 300 mg/kg were administered. The figure in the table indicates the minimum dose whereby bioactivity was demonstrated in half or more of the mice. The animals were examined at 0.5 and 4 h after injection administered. A dash indicates the absence of anticonvulsant activity and neurotoxicity at the maximum dose administered (300 mg/kg). ^b Maximal electroshock test. ^c Subcutaneous pentylenetetrazole test. ^d Neurotoxicity screening (rotarod test).

说明其具有较长的作用时效; 部分化合物在 MES 和 Sc-PTZ 模型中均表现出保护活性, 说明其对强直性发作和失神发作均有效。神经毒性方面, 只有化合物 5b, 5c, 5h 和 5l 在 300 mg/kg 时表现出神经毒性, 并且 4 h 后没有神经毒性表现。

1.2.2 抗惊厥活性和神经毒性定量评价

基于初期药理实验的结果, 对活性最好的化合物 5i 进行了活性和毒性定量评价。化合物 5i 和阳性对照药卡马西平和丙戊酸钠的实验结果见表 2。化合物 5i 在 MES 和 Sc-PTZ 模型中的 ED₅₀ 分别为 11.4 和 31.7 mg/kg, 半数神经毒性剂量 TD₅₀ 为 611.0 mg/kg, 从而得出其保护指数 PI (TD₅₀/ED₅₀) 值分别为 53.6 和 19.3。与丙戊酸钠相比, 化合物 5i 无论是抗 MES 活性还是抗 Sc-PTZ 活性都要高于丙戊酸钠, 且其神经毒性也更低。与卡马西平相比, 虽然化合物 5i 的抗 MES 活性要略低于卡马西平, 但其保护指数 PI 值要明显高于卡马西平, 保护指数同时考虑活性和毒性, 对抗癫痫药物来说是更加可靠的评

价指标。

1.2.3 抗惊厥作用机制的初步探索

目前已发现的抗癫痫药物按作用机制主要分成三类: 第一类是膜稳定剂, 如 Na⁺ 或 K⁺ 通道阻滞剂, 典型药物有卡马西平、苯妥英钠等; 第二类是平衡神经递质释放的药物, 如 N/P/Q 型 Ca²⁺ 通道阻滞剂加巴喷丁和 SV2A 配体左乙拉西坦等; 第三类是提高 GABA 介导的兴奋性抑制的药物, 如丙戊酸钠、苯二氮卓类等。

对氯苯丙氨酸(PCPA)是一种选择性很高的脑内色氨酸羟化酶的抑制剂, 能阻滞脑内 5-羟色胺(5HT)的生物合成, 使脑内的 5-HT 的含量显著下降^[21]。硫代氨基脲(TSC)是 GABA 合成酶谷氨酸脱羧酶(GAD)的抑制剂, 能阻滞脑内 GABA 的生物合成, 使脑内的 GABA 水平显著下降^[22]。在本实验中, 通过对小鼠进行 PCPA 和 TSC 预处理, 使小鼠脑内 5-HT 或 GABA 神经递质的含量显著降低, 然后用这些小鼠来评价化合物 5i 在 MES 模型中的 ED₅₀。结果显示 PCPA 处理过的小鼠测定的 5i

表 2 化合物 5i 抗癫痫活性和神经毒性的定量评价^a

Table 2 Quantitative anticonvulsant activity and neurotoxicity date of 5i

Compd.	ED ₅₀ ^b /(mg•kg ⁻¹)		TD ₅₀ ^b /(mg•kg ⁻¹)	PI ^d	
	MES	scPTZ		MES	scPTZ
5i	11.4 (9.8~13.1)	31.7 (28.8~34.9)	611.0 (534.6~698.5)	53.6	19.3
Carbamazepine	9.8 (8.9~10.8)	>100	44.0 (40.2~48.1)	4.5	<0.44
Valproate	264 (247~338)	149 (123~177)	418 (369~450)	1.6	2.8

^a 10 animals were used for each group; polyethylene glycol 400 (0.05 mL, ip.) was used as solvent. ^b ED₅₀-median effective dose required to assure anticonvulsant protection in 50% animals. ^c TD₅₀-median toxic dose eliciting minimal neurological toxicity in 50% animals. ^d PI-protective index (TD₅₀/ED₅₀).

的 ED_{50} 没有明显变化; 而 TSC 处理过的小鼠测定的 ED_{50} 明显增大, 与正常小鼠测定的 ED_{50} 具有显著性差异(图 2). GABA 是大脑主要的抑制性神经递质, 被广泛应用于癫痫疾病的治疗. GABA 能神经递质被抑制就会促进或导致惊厥发作^[23], 而适当的增加 GABA 能神经递质可以抑制大脑的过度兴奋放电, 从而抑制惊厥发作. GABA 合成酶抑制剂的预处理使得化合物 **5i** 的抗惊厥活性明显下降, 这说明化合物 **5i** 的抗惊厥作用至少部分是通过作用于 GABA 神经能系统譬如增加 GABA 神经递质来实现的.

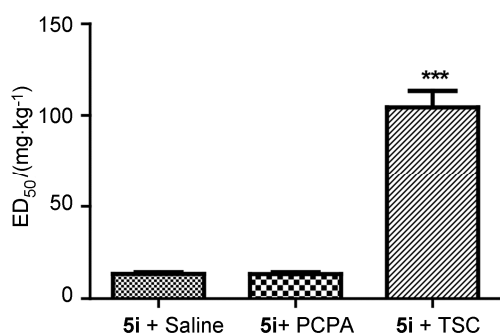


图 2 PCPA 和 TSC 预处理对化合物 **5i** 抗 MES 活性的影响

Figure 2 Effects of the PCPA and TSC on the anticonvulsive action of **5i** against MES

The statistical analyses were performed using commercially available GraphPad Prism version 5.0 for Windows. Data are presented as median effective doses (ED_{50} with SEM values), at which **5i** protected 50% of animals against seizures. All drugs were administered i.p. in a single injection 30 min before electroconvulsions. The ED_{50} with the SEM were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. *** $p < 0.0001$ vs. control (animals treated with **5i** plus saline)

2 结论

本文通过拼合原理并结合抗癫痫药物的结构特点, 设计合成了一系列未见文献报道的 5-三唑-苯并[d]噻唑类化合物, 其结构均经过光谱方法确证. 体内抗癫痫活性评价表明, 该系列化合物均表现出不同程度的抗惊厥活性, 尤其是在 Sc-PTZ 模型中的活性, 使得该类化合物适用于失神发作类癫痫的治疗. 化合物 **5i** 的高活性和低神经毒性, 使得其具备了较高的保护指数, 是一个有开发潜力的候选化合物. 此外, 初步推测化合物 **5i** 的抗惊厥作用机制涉及到 GABA 神经能系统, 这为以后的机制研究提供了方向.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点采用毛细管法测定(温度计未经校正); 核磁共振用 BURKER AV-300 型核磁共振仪(bruker, 瑞士)测定, 四甲基硅(TMS)为内标, 溶剂用 $CDCl_3$, 化学位移值以

δ 表示; IR 谱采用 IRPrestige-21 型红外光谱仪(KBr 压片)测定; 高分辨质谱在 MALDI-TOF/TOF 型(Bruker Daltonik, 德国)质谱仪上测定. 本实验所用试剂均为 AR 级或 CP 级.

3.2 实验方法

3.2.1 5-硝基-2-巯基-苯并[d]噻唑(**2**)的合成方法

在 100 mL 圆底烧瓶中加入 1.54 g (0.01 mol) 4-硝基-2-氨基苯酚、0.84 g (0.011 mol) 二硫化碳、0.62 g (0.011 mol) 氢氧化钾, 再加入 15 mL 乙醇和 3 mL 水, 在油浴锅中加热回流(80 °C), 用薄层色谱法(TLC)[展开剂 $V(CHCl_3):V(CH_3OH)=60:1$]检测反应进程. 反应完全后, 浓缩反应溶剂一半以除去 CS_2 , 再加入 100 mL 水和 1 mL 冰醋酸, 搅拌 5 min 后抽滤, 水洗, 乙醇重结晶得到化合物 **2**, 淡黄色固体, 产率为 71%. 熔点测定为 241~243 °C(文献值^[24] 244~245 °C).

3.2.2 5-氨基-2-巯基-苯并[d]噻唑(**3**)的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入 1.2 g (0.005 mol) $Na_2S \cdot 9H_2O$, 用 5 mL 水溶解, 再加入 0.2 g (0.001 mol) 5-硝基-2-巯基-苯并[d]噻唑的乙醇溶液中回流. TLC 检测反应完全后, 减压蒸干乙醇, 加水 30 mL, 用稀 HCl 调至 pH=7, 固体析出, 抽滤, 水洗, 干燥后乙醇重结晶, 得到化合物 **3**, 灰白色固体, 产率为 74%. 熔点测定为 264~265 °C(文献值^[24] 267~268 °C).

3.2.3 5-氨基-2-硫烷基-苯并[d]噻唑(**4a~4p**)的合成通法

将 5-氨基-2-巯基-苯并[d]噻唑、相应的卤代烷、碳酸钾按照 1:1.1:1.1 的摩尔比混合于 20 mL 乙腈中, 于 70 °C 下反应. TLC 监测反应, 反应结束后减压蒸干乙腈, 加入 30 mL 水, 二氯甲烷萃取(30 mL×3), 无水硫酸镁干燥、过滤、减压蒸除二氯甲烷得到化合物 **4a~4p** 粗品, 无需纯化直接用于下一步.

3.2.4 2-硫烷基-5-(4H-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噻唑(**5a~5p**)的合成通法

将甲酰胺和 DMF-DMA 混合于 5 mL 乙腈加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 放到 60 °C 油浴锅中搅拌 30 min 后, 再将 5-氨基-2-硫烷基-苯并[d]噻唑和 4 mL 乙酸加入到烧瓶中(5-氨基-2-硫烷基-苯并[d]噻唑:甲酰胺:DMF-DMA=1:2:2), 升温至 110 °C 左右, 反应 4~24 h. TLC 监测反应, 结束后减压蒸干溶剂, 残渣用硅胶柱层析分离[V (二氯甲烷): V (甲醇)=100:1]纯化得到目标化合物 **5a~5p**. 其产率、熔点、波谱数据如下.

2-丙硫基-5-(4H-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噻唑(**5a**): 白色固体, 收率 53%. m.p. 72~74 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 1.09 (t, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.84~1.91 (m,

2H, CH₂), 3.30 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, SCH₂), 7.26 (dd, $J=1.8$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.56 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.59 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-4), 8.48 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.7, 151.6, 143.4, 142.0, 130.5, 118.3, 112.7, 111.0, 34.4, 22.6, 13.2; IR (KBr) ν : 1522 1499 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₂H₁₃N₄OS ([M+H]⁺) 261.0805, found 261.0799.

2-丁硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5b**): 灰色固体, 收率 56%. m.p. 96~98 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.98 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.49~1.56 (m, 2H, CH₂), 1.79~1.89 (m, 2H, CH₂), 3.34 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, SCH₂), 7.26 (dd, $J=2.2$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.56 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.60 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-4), 8.48 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.7, 151.7, 143.4, 142.0, 130.4, 118.3, 112.7, 111.0, 32.20, 31.16, 21.79, 13.53; IR (KBr) ν : 1522, 1499 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₃H₁₅N₄OS ([M+H]⁺): 275.0961, found 275.0961.

2-戊硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5c**): 灰色固体, 收率 55%. m.p. 76~77 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.93 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.35~1.51 (m, 2H, CH₂), 1.80~1.91 (m, 2H, CH₂), 3.33 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, SCH₂), 7.26 (dd, $J=2.2$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.60 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.59 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-4), 8.49 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.7, 151.7, 143.4, 142.0, 130.4, 118.3, 112.7, 111.0, 32.5, 30.8, 28.8, 22.1, 13.9; IR (KBr) ν : 1522, 1498 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₄H₁₇N₄OS ([M+H]⁺): 289.1118, found 289.1118.

2-己硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5d**): 灰色固体, 收率 51%. m.p. 96~97 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.90 (t, $J=6.9$ Hz, 3H, CH₃), 1.32~1.52 (m, 6H, (CH₂)₃), 1.80~1.90 (m, 2H, CH₂), 3.33 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, SCH₂), 7.28 (dd, $J=2.2$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.57 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.60 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-4), 8.48 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.7, 151.7, 143.4, 142.0, 130.5, 118.3, 112.7, 111.0, 32.5, 31.2, 29.1, 28.3, 22.5, 14.0; IR (KBr) ν : 1522, 1497 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₅H₁₉N₄OS ([M+H]⁺) 303.1274, found 303.1274.

2-庚硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5e**): 灰色固体, 收率 57%. m.p. 73~75 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.87 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.29~1.50 (m, 8H, (CH₂)₄), 1.79~1.89 (m, 2H, CH₂), 3.32 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, SCH₂) 7.28 (dd, $J=2.0$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.56 (d, $J=$

8.6 Hz, 1H, H-7), 7.60 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-4), 8.52 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.7, 151.6, 143.4, 142.0, 130.5, 118.3, 112.7, 111.0, 32.5, 31.6, 29.1, 28.7, 28.6, 22.6, 14.04; IR (KBr) ν : 1523, 1497 (C=N) cm⁻¹; ESI-HRMS calcd for C₁₆H₂₁N₄OS ([M+H]⁺): 317.1431, found 317.1443.

2-辛硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5f**): 灰色固体, 收率 55%. m.p. 83~85 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.88 (t, $J=6.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.29~1.49 (m, 10H, (CH₂)₅), 1.80~1.90 (m, 2H, CH₂), 3.33 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, SCH₂), 7.26 (dd, $J=2.0$, 8.5 Hz, 1H, H-6), 7.57 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-7), 7.61 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-4), 8.49 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 168.8, 151.7, 143.4, 142.0, 130.5, 118.3, 112.7, 111.0, 32.5, 31.8, 29.1, 29.1, 29.0, 28.6, 22.6, 14.1; IR (KBr) ν : 1523, 1496 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₇H₂₃N₄OS ([M+H]⁺) 331.1587, found 331.1576.

2-(苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5g**): 白色固体, 收率 59%. m.p. 158~161 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 4.59 (s, 2H, SCH₂), 7.27 (dd, $J=2.1$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.31~7.48 (m, 5H, benzyl-H), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, H, H-7), 7.64 (d, $J=2.1$ Hz, H, H-4), 8.51 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 167.9, 151.7, 143.3, 142.0, 135.4, 130.5, 128.9, 128.1, 118.5, 112.9, 111.1, 77.5, 77.1, 76.7, 36.7; IR (KBr) ν : 1524, 1503 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₆H₁₂N₄OS ([M+H]⁺): 309.0805, found 309.0804.

2-(2-氟苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5h**): 白色固体, 收率 52%. m.p. 123~125 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 4.61 (s, 2H, SCH₂), 7.06~7.64 (m, 7H, Ar-H), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 167.7, 161.0 (d, ¹ $J_{C-F}=246.8$ Hz), 151.8, 143.2, 142.0, 131.2, 130.6, 130.1 (d, ³ $J_{C-F}=8.2$ Hz), 124.4 (d, ³ $J_{C-F}=3.6$ Hz), 123.0 (d, ² $J_{C-F}=14.4$ Hz), 118.6, 115.7 (d, ² $J_{C-F}=21.0$ Hz), 112.9, 111.2, 30.0; IR (KBr) ν : 1525, 1502 (C=N) cm⁻¹. ESI-HRMS calcd for C₁₆H₁₁F-N₄OS ([M+H]⁺) 327.0710, found 327.0711.

2-(3-氟苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5i**): 白色固体, 收率 54%. m.p. 181~182 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 4.61 (s, 2H, SCH₂), 7.06~7.64 (m, 7H, Ar-H), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 167.5, 162.8 (d, ¹ $J_{C-F}=245.4$ Hz), 151.8, 143.2, 142.0, 138.1 (d, ³ $J_{C-F}=7.5$ Hz), 130.6, 130.4 (d, ³ $J_{C-F}=8.3$ Hz), 124.8, 118.7, 116.1 (d, ² $J_{C-F}=21.9$ Hz), 115.2 (d, ² $J_{C-F}=21.1$ Hz), 113.0, 111.2, 36.0; IR (KBr) ν :

1524, 1500 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}-\text{N}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 327.0710, found 327.0710.

2-(4-氟苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5j**): 白色固体, 收率 57%. m.p. 174~175 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.61 (s, 2H, SCH_2), 7.03 (t, $J=8.5$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.29 (dd, $J=1.9$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.46 (dd, $^2J_{\text{H-F}}=7.4$ Hz, $J_{\text{H-H}}=5.3$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.63 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, H-4), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 167.6, 164.2 (d, $^1J_{\text{C-F}}=245.9$ Hz), 151.7, 143.2, 142.0, 131.4, 130.8 (d, $^3J_{\text{C-F}}=8.2$ Hz), 130.6, 118.6, 115.8 (d, $^2J_{\text{C-F}}=21.5$ Hz), 112.9, 111.2, 35.9; IR (KBr) ν : 1528, 1508 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 327.0710, found 327.0720.

2-(2-氯苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5k**): 白色固体, 收率 57%. m.p. 166~167 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.69 (s, 2H, SCH_2), 7.24~7.65 (m, 7H, Ar-H), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 167.9, 151.8, 143.2, 142.0, 134.5, 133.6, 131.3, 130.6, 129.9, 129.7, 127.1, 118.5, 112.9, 111.1, 34.5; IR (KBr) ν : 1523, 1498 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 343.0415, found 343.0415.

2-(3-氯苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5l**): 白色固体, 收率 54%. m.p. 147~148 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.53 (s, 2H, SCH_2), 7.29~7.64 (m, 7H, Ar-H), 8.49 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 167.4, 151.8, 143.2, 142.0, 138.7, 134.6, 130.6, 130.1, 129.2, 128.3, 127.2, 118.7, 113.0, 111.2, 35.9; IR (KBr) ν : 1522, 1497 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 343.0415, found 343.0415.

2-(4-氯苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5m**): 白色固体, 收率 59%. m.p. 174~176 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.54 (s, 2H, SCH_2), 7.28 (dd, $J=1.8$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.32 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.43 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.63 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-4), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 167.5, 151.8, 143.2, 142.0, 134.2, 134.0, 130.6, 130.4, 129.0, 118.7, 113.0, 111.2, 35.9; IR (KBr) ν : 1523, 1501 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 343.0415, found 343.0415.

2-(2,4-二氯苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5n**): 白色固体, 收率 64%. m.p. 171~172 $^{\circ}\text{C}$;

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.63 (s, 2H, SCH_2), 7.22 (dd, $J=2.0$, 8.3 Hz, 1H, H-5'), 7.29 (dd, $J=2.1$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.58 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.61 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, H-6'), 7.64 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-4), 8.50 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 167.5, 151.8, 143.2, 142.0, 135.1, 134.8, 132.4, 132.1, 130.6, 129.7, 127.4, 118.7, 112.9, 111.2, 34.5; IR (KBr) ν : 1520, 1493 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 377.0025, found 377.0025.

2-(4-甲基苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5o**): 棕色固体, 收率 67%. m.p. 174~175 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2.34 (s, 3H, CH_3), 4.55 (s, 2H, SCH_2), 7.17 (d, $J=7.7$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.27 (dd, $J=2.2$, 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.36 (d, $J=7.7$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.57 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.63 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, H-4), 8.49 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 168.0, 151.7, 143.3, 142.0, 138.0, 132.3, 130.5, 129.5, 129.0, 118.5, 112.9, 111.1, 36.5, 21.2; IR (KBr) ν : 1525, 1499 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 323.0961, found 323.0961.

2-(4-甲氧基苯甲基)硫基-5-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯并[d]噁唑(**5p**): 棕色固体, 收率 57%. m.p. 183~184 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.54 (s, 2H, SCH_2), 6.88 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.27 (dd, $J=2.0$, 8.5 Hz, 1H, H-6), 7.40 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, benzyl-H), 7.57 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-7), 7.62 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-4), 8.49 (s, 2H, Triazole-H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 168.1, 159.5, 151.7, 143.3, 142.0, 130.5, 130.4, 127.3, 118.5, 114.2, 112.8, 111.1, 55.3, 36.4; IR (KBr) ν : 1527, 1502 (C=N) cm^{-1} . ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 339.0910, found 339.0913.

3.2.5 抗惊厥活性和神经毒性评价

按照美国NIH的抗癫痫药物开发方案, 采用最大电惊厥实验和皮下戊四唑实验评价目标化合物的抗惊厥活性, 旋转棒法评价目标化合物的神经毒性^[25,26]. 实验动物采用昆明种小鼠, 体质量 20~24 g, 雄性, 实验前一周饲养于 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 45%~65%的实验室中, 可以自由采食和饮水. 目标化合物溶于聚乙二醇 400 中以 0.05 mL/20 g 容积腹腔注射. 初期实验中, 评价化合物在 300, 100 和 30 mg/kg 三个下的抗惊厥活性和神经毒性. 基于初期实验结果选择活性较好的化合物按照改良寇氏法进行定量活性和毒性评价, 获得其 ED_{50} 和 TD_{50} 并计算出 95%可信限.

最大电惊厥实验^[25]: 在最大电惊厥实验中, 使用

110 V, 60 Hz 的交流电, 小鼠耳电极通电 0.2 s, 出现后肢强直的视为惊厥。正式实验前一天预筛小鼠, 出现惊厥的小鼠用于正式实验。给药后 0.5 和 4 h 对小鼠进行电击, 观察药物的抗 MES 活性。

皮下戊四唑实验^[26]: 小鼠给药后 0.5 和 4 h 皮下给予 85 mg/kg 的戊四唑(该剂量可以使 97% 以上的小鼠产生连续 5 s 的阵挛性惊厥), 小鼠单独放置在鼠笼中观察 30 min, 以没有出现连续 5 s 以上的阵挛性惊厥为有效, 认为该药物可以对抗由戊四唑诱导的惊厥。

神经毒性实验^[26]: 神经毒性实验采用旋转棒法, 于给药 0.5 和 4 h 后将小鼠置于直径 1 英寸、转速为 6 r·min⁻¹ 的木棒上, 在连续三次的测试中小鼠均不能在木棒保持 1 min 而掉下视为有神经毒性, 反之则无神经毒性。

PCPA 和 TSC 预处理对化合物抗 MES 活性影响实验^[27]: 90 只小鼠分成两组分别给予对氯苯丙氨酸(PCPA) 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹、硫代氨基脲(TSC) 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和生理盐水连续 3 d。最后一天给药后的小鼠分别用于测定化合物 **5i** 在 MES 实验中的 ED₅₀ 值。将 PCPA 和 TSC 预处理后的 ED₅₀ 值与对照组(生理盐水组)的 ED₅₀ 值进行比较, 判断是否具有显著性差异。

辅助材料(Supporting Information) 化合物的核磁共振氢谱、碳谱和高分辨质谱图谱。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Yogeewari, P.; Sriram, D.; Thirumurugan, R.; Raghavendran, J. V.; Pavana, R. K.; Sudhan, K.; Stables, J. P. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6202.
- [2] Chang, B. S.; Lowenstein, D. H. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1257.
- [3] Ying, Y.; Cui, J. H.; Zhang, H. *China Pharm.* **2012**, *21*, 110 (in Chinese).
(应义, 崔九虎, 张慧, 中国药业, **2012**, *21*, 110.)
- [4] Kayani, S.; Sirsi, D. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **2012**, *4*, 51.
- [5] Ijff, D. M.; Aldenkamp, A. P. *Handb. Clin. Neurol.* **2013**, *111*, 707.
- [6] Zhou, C.-H.; Wang, Y. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 239.
- [7] Cheng, Y.; Wang, H.; Dinesh, A.; Zhou, H. C. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 1 (in Chinese).
(程宇, 王辉, Dinesh Addla, 周成合, 有机化学, **2016**, *36*, 1.)
- [8] Ma, Z. H.; Liu, Z. M.; Chen, Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 1965 (in Chinese).
(马忠华, 刘祖明, 陈琼, 有机化学, **2008**, *28*, 1965.)
- [9] Jin, Y. Z.; Guan, L. P.; Zhao, L. M.; Piao, H. R.; Quan, Z. S. *Chin. J. Org. Chem.* **2007**, *27*, 1567 (in Chinese).
(金云哲, 关丽萍, 赵立明, 朴虎日, 全哲山, 有机化学, **2007**, *27*, 1567.)
- [10] Deng, X. Q.; Xiao, C. R.; Wei, C. X.; Quan, Z. S. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 2082 (in Chinese).
(邓先清, 肖春瑞, 魏成喜, 全哲山, 有机化学, **2011**, *31*, 2082.)
- [11] Wang, Y.; Zhou, C. H. *Sci. China: Chem.* **2011**, *41*, 1429 (in Chinese).
(王艳, 周成合, 中国科学: 化学, **2011**, *41*, 1429.)
- [12] Plech, T.; Luszczyk, J. J.; Wujec, M.; Flieger, J.; Pizoń, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 208.
- [13] Luo, B. *M.S. Thesis*, Northwest A&F University, Yangling, **2013** (in Chinese).
(罗波, 硕士论文, 西北农林科技大学, 杨凌, **2013**.)
- [14] Yildiz, O. I.; Tekiner, G. B.; Yalcin, I.; Temiz, A. O.; Aki, S. E.; Altanlar, N. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2004**, *37*, 402.
- [15] Unlu, S.; Baytas, S. N.; Kupeli, E.; Yesilada, E. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2003**, *37*, 402.
- [16] Diaz-Molina, M.; Sanchez-Rodriguez, M. N.; Bu, M.; Perez-Saad, H. *Rev. Neurol.* **2005**, *40*, 652.
- [17] Unverferth, K.; Engel, J.; Hofgen, N.; Rostock, A.; Gunther, R.; Lankau, H. J.; Menzer, M.; Rolfs, A.; Liebscher, J.; Muller, B.; Hofmann, H. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 63.
- [18] White, H. S. *Epilepsia* **2003**, *44*, 2.
- [19] Smith, M.; Wilcox, K. S.; White, H. S. *Neurotherapeutics* **2007**, *4*, 12.
- [20] White, H. S. *Epilepsia* **1997**, *38*, S9.
- [21] Jouviet, M. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21*(2 Suppl.), 24S.
- [22] Loscher, W. *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 1397.
- [23] Gale, K. *Epilepsia* **1992**, *33*, S3.
- [24] Leon, K.; Murray, S. C. *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 758.
- [25] Krall, R. L.; Penry, J. K.; White, B. G.; Kupferberg, H. J.; Swinyard, E. A. *Epilepsia* **1978**, *19*, 409.
- [26] Porter, R. J.; Cereghino, R. J.; Gladding, G. D.; Hessie, B. J.; Kupferberg, H. J.; Scoville, B.; White, B. G. *Cleveland Clin. Q.* **1984**, *51*, 293.
- [27] Kilian, M.; Frey, H. H. *Neuropharmacology* **1973**, *12*, 681.

(Lu, Y.)