酞嗪并三唑或四唑类衍生物的合成及其抗惊厥活性研究

张海明 张洪健 田玉顺* 全哲山*

(延边大学药学院 延吉 133002)

摘要 设计合成了 6-取代-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪和 6-取代四氮唑并[5,1-*a*]酞嗪四个系列 16 个衍生物。其化学结构均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、IR 和 HRMS 确证。药理方面, 利用最大电惊厥法(MES), 以小鼠腹腔给药测定其抗惊厥活性。实验结果显示 *N*-(4-溴苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪-6-胺(**7a**)的抗惊厥活性最强, 其半数有效量 ED_{50} 为 $5.89 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 抗惊厥作用强于对照药卡马西平。

关键词 酞嗪; 三唑; 四唑; 合成; 抗惊厥; 最大电惊厥法

Synthesis and Anticonvulsant Activity Evaluation of Phthalazine and Heterocyclic Derivatives

Zhang, Haiming Zhang, Hongjian Tian, Yushun* Quan, Zheshan*

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002)

Abstract Four series of derivatives, 6-substituted-1,2,4-triazolo[3,4-*a*] phthalazine derivatives and 6-substituted tetrazolo[5,1-*a*]phthalazine derivatives have been synthesized. The structures of compounds are confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and HRMS. The anticonvulsant effects of the compounds are evaluated with maximal electroshock test by intraperitoneally injected in mice. The experimental results show that *N*-(4-bromophenyl)tetrazolo[5,1-*a*]phthalazin-6-amine (**7a**) was the most potent compound, with a median effective dose of $5.89 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Its anticonvulsant effect is better than the reference drug, carbamazepine.

Keywords phthalazine; triazolo; tetrazolo; synthesis; anticonvulsant; the maximal electroshock

癫痫是大脑神经元突发性异常放电, 导致短暂大脑功能障碍的一种慢性神经系统疾病, 并且随患病时间的推移反复发作; 癫痫的发病原因非常复杂, 遗传、脑损害与脑损伤、环境因素、发热、精神刺激等是常见的影响因素^[1,2]。据世界卫生组织(WHO)研究报告表明, 目前全世界有超过 6000 万的患者饱受癫痫疾病的困扰, 其中 80%在发展中国家, 每年还出现 200 万新增癫痫病例^[3]。手术治疗、针灸治疗和药物治疗等方法是常用的治疗方法, 其中, 药物治疗是临床抗癫痫的首选方法, 主要防止和控制癫痫的发作。苯妥英、苯巴比妥、卡马西平、丙戊酸等是目前临床常用的传统抗癫痫药(AEDs)。20 世纪 80 年代以来, 国外开发上市的新抗癫痫药有加巴喷丁、奥卡西平、托吡酯、拉莫三嗪等。但应用现有这些抗癫痫药物治疗癫痫, 只能使 60%~70%的癫痫患者的症状得到有效控制, 另有 30%~40%的患者得不到

良好的效果^[4~7]。而且如果长期服用这些药物, 会产生全身性毒性作用、神经系统毒性、嗜睡、胃肠道紊乱和巨幼红细胞性贫血等多样的副作用, 增加中毒、致畸的风险^[8]。因此, 研究低毒有效的新一代抗癫痫药物仍具有重要意义。

文献报道, 酞嗪类化合物具有抗惊厥作用^[9]。而前期研究工作中, 我们发现三唑类和四唑类衍生物也具有较好抗惊厥作用^[10~14]。谭月德等^[15]在 2016 年发现 5-三唑苯并[d]噁唑类化合物具有较好的抗惊厥活性。为了获得抗惊厥作用更强的化合物, 本工作利用新药设计中拼合原理, 设计合成了 6-取代-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪和 6-取代四氮唑并[5,1-*a*]酞嗪四个系列衍生物, 共 16 个新化合物。其中, 酞嗪并三唑或四唑为结构主体, 而 6 位不同基团取代用于调节分子的疏水性, 从而改变其脂水分分配系数, 以求达到更好的抗惊厥活性。

* Corresponding author. E-mail: ld-l@163.com

Received March 2, 2017; revised March 30, 2017; published online May 10, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21272005).

国家自然科学基金(No. 21272005)资助项目。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

目标物的合成参考文献[16~21]方法, 首先以双酞嗪为起始原料, 用三氯氧磷进行氯代反应, 得到双氯代产物 **1**. 化合物 **1** 再与水合肼发生肼代反应, 得到肼代化合物 **2**. 化合物 **2** 与原甲酸三乙酯在 100 °C 下发生环合反应, 得到酞嗪并三唑中间体 **3**. 化合物 **3** 以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂, 与各种吡啶胺类、苯胺类、苯硫醇于 100 °C 反应, 得到目标化合物 **5a~5g** 和 **6a~6c**. 化合物 **2** 与亚硝酸钠, 以水作溶剂, 酸性条件发生重氮化及环合反应, 生成酞嗪并四唑中间体 **4**. 中间体 **4** 以乙腈为溶剂, 于 80 °C 下, 与各种苯胺类和苯硫醇类反应得到酞嗪并四唑系列目标化合物 **7a~7c** 和 **8a~8c**.

Reagents and conditions: (a) POCl_3 , 80~110 °C, 75%~80%; (b) $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, reflux, 65%~72%; (c) $\text{CH}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3$, 100 °C, 70%~80%; (d) H_2O , HCl , NaNO_2 , <5 °C, 65%~72%; (e) RNH_2 , DMF, NaOH , 100 °C; (f) RSH , DMF, NaOH , 100 °C; (g) RNH_2 , CH_3CN , K_2CO_3 , reflux; (h) RSH , CH_3CN , K_2CO_3 , reflux

图式 1 酞嗪衍生物的合成路线

Scheme 1 Synthesis of phthalazine derivatives

1.2 化合物的生物活性分析

通过 I 期药理实验, 初步评价了目标化合物 **5a~5g**, **6a~6c**, **7a~7c** 和 **8a~8c** 的抗惊厥活性. 如表 1 所示, 在 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下, 大多数化合物都显示了不同程

表 1 化合物的小鼠抗惊厥作用 I 期实验数据^a

Table 1 Phase I anticonvulsant data of compounds in mice

Compd.	R	MES(n_1/n_2) ^a		
		30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
5a		—	0/3	1/3
5b		0/3	1/3	3/3
5c		1/3	2/3	3/3
5d		0/3	1/3	3/3
5e		—	0/3	2/3
5f		—	0/3	1/3
5g		2/3	3/3	3/3
6a		0/3	2/3	3/3
6b		3/3	3/3	3/3
6c		1/3	3/3	3/3
7a		3/3	3/3	3/3
7b		0/3	2/3	3/3
7c		1/3	2/3	3/3
8a		—	0/3	1/3
8b		—	0/3	2/3
8c		0/3	1/3	2/3

^a MES(n_1/n_2) is number of animals exhibiting activity/number of animals tested; “—”: not test.

度的抗惊厥活性,而在 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下,只有部分化合物表现出明显的抗惊厥活性,其中化合物 **5c**, **5g**, **6a~6c**, **7a~7c** 表现最为突出,化合物 **6b** 和 **7a** 在 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 仍表现出显著的抗惊厥活性. 在酞嗪并三唑系列化合物中,与硫醇反应后的化合物 **6** 其抗惊厥活性明显优于与芳胺反应后的产物 **5**; 酞嗪并四唑系列化合物 **7a~7c** 和 **8a~8c** 药理结果显示,其结构中的 NH 被 S 替代后使化合物的抗惊厥活性减弱,说明 NH 结构对化合物的抗惊厥活性影响较大. 化合物 **8** 与化合物 **6** 相比,四唑环替代三唑环后,其活性也呈现减弱趋势,说明四唑环对化合物的抗惊厥效能不如三唑环高. 对化合物 **7a** 活性最优的探讨主要分为两个方面: 一方面,化合物 **6a**, **7a** 和 **8a** 的取代 R 基团上都是 *p*-Br, 化合物 **6a** 与 **8a** 相比,化合物 **6a** 的活性优于化合物 **8a**,说明化合物中三唑基团对抗惊厥活性的效能优于四唑基团,而化合物 **7a** 与 **8a** 的区别在于 NH 取代 S,说明 NH 的抗惊厥效能更高,然而, **6a** 抗惊厥活性却不如 **7a**,说明可能 NH 对抗惊厥的活性效能优于三唑环的效能, NH 是关键活性基团,可能与某些酶发生相互作用而发挥抗惊厥活性; 另一方面,化合物 **7a~7c** 对位分别是 Br, Cl, F 原子,而化合物 **7a** 取代基对位恰巧为吸电子能力处于中间的 Br 原子,则说明化合物 **7a** 的活性最好可能是因为各基团效能综合的结果使此时的脂水分配系数最适合透过血脑屏障从而发挥抗惊厥作用.

根据 I 期药理实验的结果,进一步进行了 II 期药理实验,对具有较好活性的化合物 **6b** 和 **7a** 进行研究,以定量评价其抗惊厥活性. 2 个目标化合物和阳性对照药卡马西平的实验结果见表 2,化合物 **6b** 和 **7a** 的 ED_{50} 分别为 14.94 和 $5.84 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,其中化合物 **6b** 活性稍弱于阳性对照药卡马西平,而化合物 **7a** 的 ED_{50} 明显低于阳性对照药卡马西平(11.80 mg/kg),具有进一步开发的价值.

表 2 化合物 **5i** 和 **6d** 的小鼠抗惊厥作用 II 期实验数据

Table 2 Phase II anticonvulsant data of compounds **5i** and **6d** in mice

Compd.	R	$\text{ED}_{50}/(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$
6b		$14.94 (11.78\sim20.92)^a$
7a		$5.89 (4.27\sim7.59)^a$
Carbamazepine		$11.80 (8.96\sim12.81)^a$

^a 95% confidence intervals given in parentheses.

2 结论

以双酮酞嗪为先导化合物,经氯代、胍代、环合,获

得双酮酞嗪并三唑或四唑中间体,然后在其 6 位引入不同取代基,最终得到四个系列 16 个目标化合物,所合成化合物结构均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、IR 和 HRMS 确证. 在对抗最大电惊厥(MES)法实验中,化合物 **7a** 的抗惊厥活性最为显著,其 ED_{50} 为 5.89 mg/kg ,明显优于阳性对照药卡马西平,对研究开发新型抗癫痫候选药物具有重要意义.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用毛细管法测定,温度计未经校正; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 用 BRUKER AV-300 型核磁共振仪器测定(TMS 为内标, CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂); IR 谱采用 FI-1730 型红外光谱仪(KBr 压片)测定; HRMS 数据来源于 MALDI-TOF/TOF; 本实验所用试剂均为分析纯或化学纯.

3.2 化合物的合成

3.2.1 1,4-二氯酞嗪(**1**)和 1-胍基-4-氯酞嗪(**2**)的合成

按照文献[22]方法制备,合成方法与数据表征与文献一致.

3.2.2 6-氯-[1,2,4]三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪(**3**)的合成

将化合物 **2** (2 g , 10 mmol)溶解在 60 mL 的原甲酸三乙酯中, 150°C 搅拌回流 2 h ,薄层色谱(TLC) ($V_{\text{DCM}}:V_{\text{MeOH}}=30:1$)显示反应完反应,减压蒸出溶剂,水洗干燥,硅胶柱层析(二氯甲烷)得化合物 **3** 为白色固体,产率: $70\%\sim80\%$. m.p. $177\sim179^\circ\text{C}$ (文献值^[22]: $176\sim177^\circ\text{C}$); ^1H NMR (300 MHz , CDCl_3) δ : $9.01 (\text{s}, 1\text{H})$, $8.73 (\text{d}, J=7.9 \text{ Hz}, 1\text{H})$, $8.30 (\text{d}, J=8.2 \text{ Hz}, 1\text{H})$, $8.05 (\text{td}, J=7.8, 1.2 \text{ Hz}, 1\text{H})$, $7.96\sim7.88 (\text{m}, 1\text{H})$.

3.2.3 化合物 **5a~5g** 和 **6a~6c** 的合成通法

以 *N*-(5-氟吡啶-2-基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺(**5a**)的合成为例. 将化合物 **4** (0.3 g , 1.5 mmol)、氢氧化钠(0.07 g , 1.8 mmol)和 2-氨基-5-氟吡啶(0.2 g , 1.8 mmol)分散在 5 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 100°C 下搅拌反应 2 h , TLC ($V_{\text{DCM}}:V_{\text{MeOH}}=30:1$)显示反应结束,减压蒸出大部分 DMF,加入 50 mL 冰水,析出沉淀,减压抽滤得滤饼,水洗 3 遍,干燥,用乙醇重结晶得纯品 **5a**.

N-(5-氟吡啶-2-基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺(**5a**): 棕色固体,产率 40.9% . m.p. $300\sim304^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) δ : $10.03 (\text{s}, 1\text{H}, \text{NH})$, $9.28 (\text{s}, 1\text{H}, \text{CH})$, $8.64 (\text{d}, J=7.7 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{ArH})$, $8.50 (\text{d}, J=7.4 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{ArH})$, $8.40 (\text{s}, 1\text{H}, \text{PyH})$, $8.14\sim7.98 (\text{m}, 2\text{H}, \text{Py-H})$, $7.91 (\text{d}, J=7.6 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{ArH})$, $7.81 (\text{s}, 1\text{H}, \text{ArH})$;

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 154.24, 149.72, 141.67, 139.88, 135.68, 135.35, 134.01, 131.04, 125.91, 125.73, 125.48, 123.90, 123.17, 119.43, 116.51, 110.36; IR (KBr) ν : 3262.86 (N-H), 1520 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 281.0951, found 281.0935.

N-(6-氯吡啶-3-基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺 (**5b**): 合成方法及投料比同上, 产品为棕色固体, 产率 40.9%. m.p. 320~322 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.58 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, CH), 8.86 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, Py-H), 8.57 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.49 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 8.28 (dd, $J=8.7$, 2.7 Hz, 1H, Py-H), 8.03 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.95 (t, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, Py-H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 149.89, 143.77, 142.92, 141.53, 139.97, 136.62, 134.10, 132.31, 131.08, 125.23, 124.36, 123.83, 123.36, 119.15; IR (KBr) ν : 3282.28 (N-H), 1517.14 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 297.0655, found 297.0641.

N-(3-氟苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺 (**5c**): 合成方法及投料比同上, 产品为淡黄色粉末, 产率 65.9%. m.p. 314~318 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.42 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, CH), 8.59 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.48 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, ArH), 8.01 (t, $J=7.1$ Hz, 1H, ArH), 7.95 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, $J=11.7$ Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (dd, $J=14.7$, 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.91 (t, $J=6.9$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 164.24, 149.82, 142.02, 141.47, 140.02, 133.93, 131.00, 130.55, 125.26, 123.83, 123.31, 119.31, 117.26, 109.91, 109.62, 108.42, 108.07; IR (KBr) ν : 3237.14 (N-H), 1514.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 280.0988, found 280.0991.

N-(3-溴苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺 (**5d**): 合成方法及投料比同上, 产品为棕色固体, 产率 54.0%. m.p. 302~304 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.39 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, CH), 8.59 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.50 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 8.08~7.91 (m, 3H, ArH), 7.86 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, ArH), 7.45~7.21 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 149.90, 141.89, 141.52, 139.98, 133.97, 131.04, 126.02, 125.27, 123.94, 123.85, 123.33, 121.87, 120.49, 120.0, 119.34; IR (KBr) ν : 3188.57 (N-H), 1514.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrN}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 340.0198, found 340.0190.

N-(4-三氟甲基苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-

胺 (**5e**): 合成方法及投料比同上, 产品为白色粉末, 产率 12.3%. m.p. 296~298 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.65 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, CH), 8.62 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.56~8.46 (m, 1H, ArH), 8.09~7.93 (m, 4H, ArH), 7.74 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 149.80, 144.07, 141.57, 139.97, 134.08, 131.05, 126.32, 126.27, 125.43, 123.89, 123.33, 121.16, 119.39; IR (KBr) ν : 3288.57 (N-H), 1517.72 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 330.0967, found 330.0953.

N-(3,4-二氯苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺 (**5f**): 合成方法及投料比同上, 产品为黄色粉末, 产率 77.1%. m.p. 325~330 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.52 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, CH), 8.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, ArH), 8.54~8.47 (m, 1H, ArH), 8.13 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, ArH), 8.04 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.96 (t, $J=7.0$ Hz, 1H, ArH), 7.83 (dd, $J=8.9$, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 149.77, 141.51, 140.46, 140.01, 135.60, 134.06, 131.29, 131.06, 130.85, 125.31, 124.74, 123.85, 123.34, 122.71, 121.58, 119.28; IR (KBr) ν : 3237.14 (N-H), 1514.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 330.0313, found 330.0301.

N-苯基-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪-6-胺 (**5g**): 合成方法及投料比同上, 产品为淡黄色粉末, 产率 20.6%. m.p. 260~263 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.28 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, CH), 8.60 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.48 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 8.00 (t, $J=7.4$ Hz, 1H, ArH), 7.92 (t, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.39 (t, $J=7.9$ Hz, 2H, ArH), 7.11 (t, $J=7.3$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 150.22, 141.52, 140.10, 139.89, 133.76, 130.97, 129.09, 125.26, 123.80, 123.69, 123.27, 122.16, 119.43; IR (KBr) ν : 3351.7 (N-H), 1517.14 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 262.1093, found 262.1079.

6-(4-溴代硫苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪 (**6a**): 合成方法及投料比同上, 产品为淡黄色固体, 产率 23.1%. m.p. 170~174 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.77 (s, 1H, CH), 8.70 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 8.23 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 8.08~7.94 (m, 1H, ArH), 7.90~7.81 (m, 1H, ArH), 7.73~7.61 (m, 2H, ArH), 7.58~7.50 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 157.33, 137.15, 134.10, 132.85, 130.94, 125.62, 125.47, 124.87, 123.79, 122.86, 122.63; IR (KBr) ν : 1502.86 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.9810,

found 356.9814.

6-(4-氯代硫苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪(**6b**): 合成方法及投料比同上, 产品为黄色固体, 产率 23.9%. m.p. 166~168 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.36 (s, 1H, CH), 8.52 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 8.24 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, ArH), 8.07 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.93 (t, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.58, 141.84, 140.10, 136.99, 135.32, 135.04, 131.81, 130.23, 126.53, 126.12, 123.42, 122.83, 122.56; IR (KBr) ν : 1502.86 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.0315, found 313.0300.

6-(4-氟代硫苯基)-1,2,4-三氮唑并[3,4-*a*]酞嗪(**6c**): 合成方法及投料比同上, 产品为白色固体, 产率 54.5%. m.p. 194~196 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.32 (s, 1H, CH), 8.51 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.08 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.94 (t, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.83~7.73 (m, 2H, ArH), 7.46~7.34 (m, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 165.64, 162.31, 157.91, 157.89, 142.12, 139.10, 138.11, 138.00, 134.04, 130.92, 125.38, 123.73, 122.82, 122.52, 121.50, 121.45, 117.10, 116.81; IR (KBr) ν : 1502.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FN}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 297.0610, found 297.0641.

3.2.4 6-氯-四唑并[1,5-*a*]酞嗪(**4**)的合成

量取盐酸 3 mL (6 mol/L), 用 40 mL 水稀释, 称取化合物 **2** (2 g, 10 mmol) 溶解在稀释备用的盐酸水溶液中, 将亚硝酸钠(0.7 g, 10 mmol)溶解到水(15 mL)中, 缓慢滴加至事先冰浴的反应体系中, 确保整个反应体系温度在 5 °C 下, TLC 跟踪, 3 h 反应完全, 析出淡棕色沉淀, 抽滤得滤饼, 乙醇重结晶得纯品 1.36 g, 化合物为土黄色, 产率 65%~72%^[23]. m.p. 188~190 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.79 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.23~8.18 (m, 1H), 8.15~8.09 (m, 1H).

3.2.5 化合物 **7a**~**7c** 和 **8a**~**8c** 的合成通法

以 *N*-(4-溴苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪-6-胺(**7a**)的合成为例. 将化合物 **4** (0.3 g, 1.5 mmol) 和对溴苯胺(0.31 g, 1.8 mmol)溶于乙腈(25 mL)中, 再加入碳酸钾(0.25 g, 1.8 mmol), 温度升至 80 °C, 回流 2 h, TLC (V_{DCM} : V_{MeOH} = 30:1)监测, 反应完全后, 减压除去大部分乙腈, 倒入碎冰水中, 析出沉淀, 抽滤, 水洗至中性, 真空干燥, 用乙醇进行重结晶得纯品 **7a**.

N-(4-溴苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪-6-胺(**7a**): 淡黄色粉末, 产率 62.3%. m.p. 258~260 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.78 (s, 1H, NH), 8.75 (d, $J=7.1$ Hz, 1H,

ArH), 8.63~8.51 (m, 1H, ArH), 8.22~8.02 (m, 2H, ArH), 7.81 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.64 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.52, 140.53, 138.77, 134.43, 132.70, 132.03, 125.46, 124.71, 124.55, 122.38, 120.55, 116.28; IR (KBr) ν : 3282.66 (N—H), 1505.71 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrN}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 341.0150, found 341.0139.

N-(4-氯苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪-6-胺(**7b**): 制备方法 及投料比同上, 产品为黄色粉末, 产率 58.1%. m.p. 258~262 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.78 (s, 1H, NH), 8.81~8.70 (m, 1H, ArH), 8.62~8.50 (m, 1H, ArH), 8.19~8.02 (m, 2H, ArH), 7.86 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, ArH), 7.49 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 151.45, 140.41, 138.25, 134.29, 132.57, 129.01, 128.21, 125.39, 124.61, 124.11, 122.29, 120.41; IR (KBr) ν : 3336.28 (N—H), 1514.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 297.0655, found 297.0641.

N-(4-氟苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪-6-胺(**7c**): 制备方法 及投料比同上, 产品为淡黄色固体, 产率 46.3%. m.p. 272~274 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.72 (s, 1H, NH), 8.71 (d, $J=7.1$ Hz, 1H, ArH), 8.53 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.08 (t, $J=8.5$ Hz, 2H, ArH), 7.80 (dd, $J=8.6, 4.9$ Hz, 2H, ArH), 7.30 (t, $J=8.7$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 160.81, 158.60, 157.62, 151.88, 140.42, 135.52, 134.32, 132.65, 125.33, 125.16, 125.06, 124.65, 122.29, 120.43, 116.02, 115.73; IR (KBr) ν : 3274.56 (N—H), 1511.43 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 281.0951, found 281.0939.

6-(4-溴代硫苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪(**8a**): 制备方法 及投料比同上, 产品为白色粉末, 产率 71.1%. m.p. 240~242 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.66 (s, 1H, ArH), 8.44 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, ArH), 8.21 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.15 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.72 (s, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.89, 141.98, 137.82, 135.68, 133.61, 133.35, 126.17, 125.89, 124.92, 124.72, 124.44, 121.42; IR (KBr) ν : 1474.29 (C=N) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrN}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 359.9762, found 359.9729.

6-(4-氯代硫苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪(**8b**): 制备方法 及投料比同上, 产品为白色固体, 产率 63.1%. m.p. 232~236 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.66 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, ArH), 8.45 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 8.22 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 8.15 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.67 (d, $J=7.6$ Hz, 2H,

ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.99, 141.96, 137.67, 135.98, 135.67, 133.60, 130.43, 126.13, 125.31, 124.90, 124.40, 121.39; IR (KBr) ν : 1480 ($\text{C}=\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 314.0267, found 314.0258.

6-(4-氟代硫苯基)-四唑[5,1-*a*]酞嗪(**8c**): 制备方法 及投料比同上, 产品为白色固体, 产率 63.1%. m.p. 232~236 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.64 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 8.44 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 8.22 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 8.13 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.82 (dd, $J=8.3, 5.4$ Hz, 2H, ArH), 7.46 (t, $J=8.7$ Hz, 2H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.57, 162.27, 160.39, 141.90, 138.72, 138.61, 135.62, 133.57, 126.04, 124.88, 124.31, 121.72, 121.68, 121.30, 117.78, 117.48; IR (KBr) ν : 1494.29 ($\text{C}=\text{N}$) cm^{-1} ; ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{FN}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298.0563, found 298.0549.

3.2 抗惊厥药理实验

药理实验方法参照美国卫生研究院抗癫痫药物开发计划的抗癫痫药物筛选程序^[24,25]. 采用最大电惊厥(MES)实验评价化合物抗惊厥药理活性, 此方法能够迅速、全面地筛选化合物的抗惊厥活性. 实验采用昆明种小鼠, 体重 18~22 g (鼠龄周 4~5 周)为测试动物, 雌雄各半. 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. 抗惊厥药理实验主要分成两个阶段, I 期和 II 期药理实验; 在最大电惊厥实验中, 使用 50 mA, 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.

3.2.1 小鼠体内 I 期实验

在 I 期药理实验中, 将小鼠随机分组, 每组 3 只. 将药物溶解在适量二甲亚砜(DMSO)中, 分别以 30, 100, 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 不同的剂量, 给与小白鼠腹腔注射; 给药 0.5 h 后进行最大电惊厥实验, 记录不同剂量下的抗惊厥小鼠的个数, 以此来初步评价化合物的抗惊厥活性.

3.2.2 小鼠体内 II 期实验

为定量评价 I 期药理实验中筛选出的活性化合物, 在 II 期药理实验中主要测定其抗惊厥的半数有效量, 并计算其 95%可信限. 阳性对照药依然选用临床上常用抗癫痫药卡马西平.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5a~5g**, **6a~6c**, **7a~7c**, **8a~8c** 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] Gasior, M.; Carter, R. B.; Goldberg, S. R.; Witkin, J. M.; Pharmacol, J. Exp. Ther. **1997**, 282, 544.
- [2] McCormick, D. A.; Contreras, D. Annu. Rev. Physiol. **2001**, 63, 815.
- [3] Strine, T. W.; Kobau, R.; Chapman, D. P.; Thurman, D. J.; Price, P.; Balluz, L. S. Epilepsia **2005**, 46, 1133.
- [4] Sirven, J. I.; Noe, K.; Hoerth, M.; Dratzkowski, J. Mayo. Clin. Proc. **2012**, 87, 879.
- [5] Kwan, P.; Brodie, M. J. N. Engl. J. Med. **2000**, 342, 315.
- [6] Penovich, P. E.; Willmore, L. J. Epilepsia **2009**, 50, 38.
- [7] Bialer, M.; Johannessen, S. I.; Kupferberg, H. J.; Levy, R. H.; Perucca, E.; Tomson, T. Epilepsy Res. **2007**, 73, 2.
- [8] Bootsma, H. P.; Ricker, L.; Hekster, Y. A.; Hulsman, J.; Lambrechts, D.; Majoie, M.; Schellekens, A.; Krom, D. M.; Aldenkamp, A. P. Seizure **2009**, 18, 328.
- [9] Ramaiya, S.; Sundararaj, K. G.; Somasundaram, R.; Joseph, T. L. Eur. J. Med. Chem. **2002**, 37, 793.
- [10] Guo, L. J.; Wei, C. X.; Jia, J. H.; Zhao, L. M.; Quan, Z. S. Eur. J. Med. Chem. **2009**, 44, 954.
- [11] Sun, X. Y.; Wei, C. X.; Deng, X. Q.; Sun, Z. G.; Quan, Z. S. Pharmacol. Rep. **2010**, 62, 273.
- [12] Wang, S. B.; Deng, X. Q.; Zheng, Y.; Yuan, Y. P.; Quan, Z. S.; Guan, L. P. Eur. J. Med. Chem. **2012**, 56, 139.
- [13] Zhu, Z. S.; Wang, S. B.; Deng, X. Q.; Liu, D. C.; Quan, Z. S. Lett. Drug Des. Dis. **2014**, 11, 628.
- [14] Wang, S. B.; Deng, X. Q.; Liu, D. C.; Zhang, H. J.; Quan, Z. S. Med. Chem. Res. **2014**, 23, 4619.
- [15] Tan, Y. D.; He, X. Y.; Rao, B. Q.; Cheng, B. B.; Song, M. X.; Deng, X. Q. Chin. J. Org. Chem. **2016**, 36, 2449 (in Chinese). (谭月德, 何晓艳, 饶宝奇, 程彬彬, 宋明霞, 邓先清, 有机化学, **2016**, 36, 2449.)
- [16] Zhang, L.; Guan, L. P.; Sun, X. Y.; Wei, C. X.; Chai, K. Y.; Quan, Z. S. Chem. Biol. Drug Des. **2009**, 73, 313.
- [17] Deng, X. Q.; Wei, C. X.; Song, M. X.; Quan, Z. S. Arzneim. Forsch. **2010**, 60, 587.
- [18] Bian, M.; Deng, X. Q.; Gong, G. H.; Wei, C. X.; Quan, Z. S. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **2013**, 28, 792.
- [19] Street, L. J.; Sternfeld, F.; Jelley, R. A.; Reeve, A. J.; Carling, R. W.; Moore, K. W.; McKernan, R. M.; Sohal, B.; Cook, S.; Pike, A.; Dawson, G. R.; Bromidge, F. A.; Wafford, K. A.; Seabrook, G. R.; Thompson, S. A.; Marshall, G.; Pillai, G. V.; Castro, J. L.; Atack, J. R.; MacLeod, A. M. J. Med. Chem. **2004**, 47, 3642.
- [20] Wu, Y.; Sun, L. P.; Ma, L. X.; Che, J.; Song, M. X. Chem. Biol. Drug Des. **2013**, 81, 591.
- [21] Wang, C. J.; Cao, Q. P.; Yang, H.; Song, P. P.; Xue, D. Q.; Cui, F.; Gu, Y. F.; Zhang, X. S.; Tian, Y. N.; Zhang, Q. R.; Liu, H. M. Chin. J. Org. Chem. **2016**, 36, 1627 (in Chinese). (王超杰, 曹钦坡, 杨慧, 宋攀攀, 薛登启, 崔飞, 顾一飞, 张孝松, 田亚楠, 张秋荣, 刘宏民, 有机化学, **2016**, 36, 1627.)
- [22] Xue, D. Q.; Zhang, X. Y.; Wang, C. J.; Ma, L. Y.; Zhu, N.; He, P.; Shao, K. P.; Chen, P. J.; Gu, Y. F.; Zhang, X. S.; Wang, C. F.; Ji, C. H.; Zhang, Q. R.; Liu, H. M. Eur. J. Med. Chem. **2014**, 85, 235.
- [23] Bian, M.; Deng, X. Q.; Gong, G. H.; Wei, C. X.; Quan, Z. S. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **2013**, 28, 792.
- [24] Okada, R.; Negishi, N.; Nagaya, H. Brain Res. **1989**, 480, 384.
- [25] Liu, D. C.; Deng, X. Q.; Wang, S. B.; Quan, Z. S. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) **2014**, 347, 269.

(Cheng, F.)