

# 3-芳基-1*H*-5-取代吡唑酰肼类化合物的合成与生物活性初探

林立文,谢 权,朱明辉,杨 琳,李思凡,邓先清

(井冈山大学 医学部,江西 吉安 343009)

**摘要** 目的合成一系列3-芳基-1*H*-5-取代吡唑酰肼类化合物,用于抗癫痫和抗炎活性筛选。方法以苯乙酮(或取代苯乙酮)为起始原料与草酸二乙酯发生缩合反应,然后与水合肼环化、肼解,最后与芳香醛(酮)缩合得到目标化合物5a-5o。采用最大电惊厥实验(MES)和皮下戊四唑实验(scPTZ)筛选其抗癫痫活性,旋转棒法评价其神经毒性;采用脂多糖(LPS)诱导TNF- $\alpha$ 释放模型评价化合物的体外抗炎活性。结果部分化合物显示出抗最大电惊厥活性,大多数化合物显示出抗戊四唑诱导惊厥的活性。化合物5f在30 mg/kg下仍表现良好的抗戊四唑所致惊厥活性。所有化合物在300 mg/kg剂量下均未表现出神经毒性。大部分化合物在20  $\mu$ g/mL剂量下可以显著抑制LPS诱导的TNF- $\alpha$ 浓度的升高,其中化合物5b,5h和5k的抑制率高于50%,与阳性药地塞米松相当。结论本研究报告的3-芳基-1*H*-5-取代吡唑酰肼类化合物具有较好的抗癫痫活性,尤其对戊四唑诱导癫痫更为敏感。此外,该系列化合物在细胞炎症模型中的表现出良好的体外抗炎活性。该研究为研究失神发作类癫痫和炎症的治疗药物提供了一定依据。

**关键词** 吡唑;酰肼;抗癫痫;抗炎;TNF- $\alpha$

**中图分类号** R914.4

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Synthesis of 3-Aryl-1*H*-Pyrazole-5-Acylhydrazones and Their Biological Activities

LIN Liwen, XIE Quan, ZHU Minghui, YANG Lin, LI Sifan, DENG Xianqing

(Medical College, Jinggangshan University, Ji'an, 343009, China)

**Abstract Objective:** To synthesis a series of 3-aryl-1*H*-pyrazole-5-acylhydrazones and investigate their biological effects. **Methods:** The target compounds 5a-5o were synthesized by condensation of acetophenone (or substituted acetophenone) with diethyl oxalate, cyclization and hydrazinolysis with hydrazine hydrate, and condensation with aromatic aldehydes (ketones) successively. Their anticonvulsant activities were screened using maximal electroshock shock (MES) and subcutaneous pentylenetetrazole (scPTZ) seizure models in mice. Their neurotoxicity was evaluated with rotarod test. *In vitro* LPS-induced TNF- $\alpha$  model was used to evaluate their anti-inflammatory activity. **Results:** Their anticonvulsant activities, especially the anti-PTZ activity were confirmed by the both models. Most of them markedly inhibited the expression of TNF- $\alpha$  at the concentration of 20  $\mu$ g/mL. Compounds 5b, 5h, and 5k were comparable to dexamethasone

收稿日期:2020-09-07

基金项目:国家自然科学基金项目(21562028);江西省自然科学基金项目(20202BABL206154)资助

通讯作者:邓先清,男,汉族,博士,副教授,研究方向:合成药物研究, E-mail: dengxianqing1121@126.com。

with a TNF- $\alpha$  inhibitory rate of more than 50%. **Conclusion:** The 3-aryl-1*H*-pyrazole-5-acylhydrazones reported in this work exhibited anticonvulsant and anti-inflammatory activities. This finding provides a certain basis for the research and development of new drugs for the absence seizure and inflammation.

**Key words** pyrazole; acylhydrazone; anticonvulsant; anti-inflammatory; TNF- $\alpha$

## 0 引言

癫痫是多种原因引起脑部神经元群阵发性异常放电所致的反复性的、突发性的脑功能短暂异常的疾病。临床表现有大发作、小发作、失神发作、局限性和混合性发作等类型。据世界卫生组织统计,现今全球大概有5000万的癫痫患者,而我国有近1000万的癫痫患者,每年新增癫痫患者约50万人<sup>[1]</sup>。现有药物可以控制70%左右患者的癫痫发作,但仅仅是抑制发作,并不能治愈,需要长期服药(半年以上甚至终身),因而带来了严重的耐药性和毒副作用的问题<sup>[2]</sup>。开发新的具有广谱、强效、毒副作用小的新型抗癫痫药物(AEDs)仍然是癫痫治疗的重要方向。

吡唑是一种含氮五元杂环化合物,它的芳香性和富电子性质使其易于与各种不同的酶和受体结合,从而赋予其广泛的生物活性。如抗炎<sup>[3]</sup>,抗菌<sup>[4]</sup>,及抗癫痫活性<sup>[5,6]</sup>。课题组在前期工作中设计了一系列芳基吡唑缩氨基脲类化合物并对其抗癫痫活性进行了初步探索,结果表明该类化合物大多数都具有良好的抗癫痫活性,尤其是对戊四唑诱导的癫痫小鼠,显示出较好的保护作用<sup>[7]</sup>。酰脲是一类酰肼与羰基化合物缩合而成的结构片段,其结构中含有酰胺和席夫碱,后两者在抗癫痫药物设计中被广泛应用<sup>[8-9]</sup>。为了获得新的抗癫痫活性结构,本实验基于前期研究中发现的芳基吡唑缩氨基脲类化合物,将酰脲替代上述化合物中的氨基脲片段,设计合成了一系列3-芳基-1*H*-5-取代吡唑酰脲类化合物并对其进行了抗癫痫活性和神经毒性的初步评价。

近年来,研究发现炎症因子能够直接影响神经元以及胶质细胞的电活动,调节中枢神经兴奋性,在颞叶内侧癫痫患者手术切除的脑组织标本上可以观察到TNF- $\alpha$ 表达上调<sup>[10,11]</sup>。此外,癫痫发作也会引起神经炎症反应,进一步加重中枢神经系统的损伤,形成难治性癫痫的病理基础<sup>[12]</sup>。自靶向COX-2的塞来昔布被上市用于炎症治疗以来,大量吡唑类抗炎药物和抗炎活性分子被发现和报道<sup>[13,14]</sup>,而酰脲结构在抗炎药物中同样被广泛报道<sup>[15]</sup>。因此,基于我们的目标化合物中也含有吡唑和酰脲结构,以及炎症与癫痫发病的相关性,我们也对目标化合物的抗炎活性进行了评价。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

核磁共振分析采用BURKER AV-300型核磁共振仪(Bruker, Switzerland),四甲基硅(TMS)为内标,溶剂使用 $\text{CDCl}_3$ 或 $\text{DMSO}-d_6$ ;高分辨质谱采用UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF质谱仪(Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany)测定;熔点采用毛细管法测定(温度计未经校正)。实验所用试剂包括苯乙酮(99%,阿拉丁试剂公司)、苯甲醛(99%,阿拉丁试剂公司)、草酸二乙酯(99%,天津博迪化工股份有限公司)、水合肼(80%,上海化学试剂厂),和其他常规溶剂(分析纯,麦克林试剂有限公司)。

### 1.2 化合物合成

1.2.1 化合物3a-3f的合成。以化合物3a为例<sup>[16]</sup>:在100 mL圆底烧瓶中加入40 mL新配制的乙醇钠溶液(1 mol/L),冰浴下滴加苯乙酮(4.8 g, 40 mmol)和草酸二乙酯(5.85 g, 40 mmol),滴毕,于30 °C反应2.5 h(TLC跟踪,展开剂 $V_{\text{石油醚}}/V_{\text{乙酸乙酯}}=6:1$ )。反应液凝固成固体时,反应完成,得中间体2a。中间体2a不经过后处理,直接滴加冰醋酸0.6 mL,调节至pH 6-7(固体全部溶解),室温搅拌0.5 h后再滴加80%水合肼3.0 mL(48 mmol),90 °C下加热回流2 h(TLC跟踪,展开剂 $V_{\text{石油醚}}/V_{\text{乙酸乙酯}}=6:1$ )。冷却,浓缩一半溶剂,残留物在搅拌下倒入到冰水中,析出固体,抽滤,乙醇重结晶得到黄色固体3a。采用相同方法,用其他取代苯乙酮为原料制备得到化合物3b-3f。

1.2.2 化合物4b-4f的合成。以化合物4a为例:在100 mL圆底烧瓶中依次加入化合物3a(2.16 g, 10 mmol)和80%水合肼(10 mL, 160 mmol)。混合物于120 °C下回流反应2 h(TLC跟踪,展开剂 $V_{\text{石油醚}}/$

$V_{\text{乙酸乙酯}} = 1 : 2$ )。冷却至室温,抽滤,乙醇重结晶得白色固体**4a**。采用相同方法制备得到化合物**4b-4f**。

1.2.3 化合物**5a-5o**的合成。以化合物**5a**为例<sup>[17]</sup>:在100 mL圆底烧瓶中依次加入20 mL无水乙醇,化合物**4a**(4.04 g, 20 mmol)和苯甲醛(2.12 g, 20 mmol)。加毕,于90 °C下回流反应2 h(TLC跟踪,展开剂  $V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 1 : 4$ )。冷却至室温,抽滤,乙醇重结晶得白色固体**5a**。相同方法下,化合物**4a**和其他取代的苯甲醛及呋喃甲醛反应得到化合物**5b-5h**,化合物**4a**分别与苯乙酮及4-氯苯乙酮反应得到化合物**5i**和**5j**;化合物**4b-4f**分别与苯甲醛反应得到化合物**5k-5o**。化合物**5a-5o**的理化数据如下:

*N*-(苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5a**):熔点 236-239 °C,产率 75 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  7.25(s, 1H, Pz-H), 7.40-7.86(m, 10H, Ph-H), 8.56(s, 1H, N=CH), 11.73(s, 1H, CONH), 13.82(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  158.64, 155.88, 148.07, 147.21, 144.21, 135.00, 130.44, 129.52, 129.31, 129.07, 127.53, 125.88, 103.97. ESI-HRMS calcd for  $C_{17}H_{15}N_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 291.1240; found: 291.1238.

*N*-(2-氟苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5b**):熔点 218-220 °C,产率 70 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.25(s, 1H, Pz-H), 7.28-7.99(m, 9H, Ph-H), 8.81(s, 1H, N=CH), 11.94(s, 1H, CONH), 13.83(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  161.26(d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 247.7$  Hz), 158.71, 147.09, 144.23, 140.74, 132.28(d, <sup>3</sup> $J_{\text{C-F}} = 7.5$  Hz), 129.55, 129.34, 129.08, 126.85, 125.92, 125.60, 125.39, 116.46(d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 20.3$  Hz), 104.05. ESI-HRMS calcd for  $C_{17}H_{14}FN_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 309.1146; found: 309.1143.

*N*-(3-氟苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5c**):熔点 216-218 °C,产率 73 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.24(s, 1H, Pz-H), 7.28-7.86(m, 9H, Ph-H), 8.55(s, 1H, N=CH), 11.84(s, 1H, CONH), 13.82(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  162.90(d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 242.4$  Hz), 158.71, 147.09, 146.62, 144.23, 137.56, 131.42(d, <sup>3</sup> $J_{\text{C-F}} = 8.3$  Hz), 129.56, 129.10, 125.91, 125.63, 123.95, 117.15(d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 21.4$  Hz), 113.29(d, <sup>3</sup> $J_{\text{C-F}} = 21.2$  Hz), 104.06.  $C_{17}H_{14}FN_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 309.1146; found: 309.1144.

*N*-(4-氟苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5d**):熔点 230-233 °C,产率 75 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.26(s, 1H, Pz-H), 7.29-7.86(m, 9H, Ph-H), 8.53(s, 1H, N=CH), 11.75(s, 1H, CONH), 13.82(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  163.56(d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 247.2$  Hz), 158.66, 147.36, 146.99, 144.17, 131.52, 129.70(d, <sup>3</sup> $J_{\text{C-F}} = 7.6$  Hz), 129.50, 129.00, 125.83, 116.38(d, <sup>3</sup> $J_{\text{C-F}} = 21.8$  Hz), 103.85, 103.18. ESI-HRMS calcd for  $C_{17}H_{14}FN_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 309.1146; found: 309.1151.

*N*-(4-氯苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5e**):熔点 278-280 °C,产率 79 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.24(s, 1H, Pz-H), 7.50-7.75(m, 7H, Ph-H), 7.85(d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, Ph-H), 8.55(s, 1H, N=CH), 11.80(s, 1H, CONH), 13.82(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  158.67, 147.16, 146.68, 144.22, 134.82, 133.96, 129.53, 129.41, 129.29, 129.11, 125.92, 125.66, 104.02. ESI-HRMS calcd for  $C_{17}H_{14}ClN_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 325.0851; found: 325.0846.

*N*-(4-溴苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5f**):熔点 290-292 °C,产率 79 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.25(s, 1H, Pz-H), 7.40-7.73(m, 7H, Ph-H), 7.85(d, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ph-H), 8.53(s, 1H, N=CH), 11.81(s, 1H, CONH), 13.82(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  158.64, 147.14, 146.77, 144.24, 134.29, 132.32, 129.51, 129.38, 129.07, 129.03, 125.89, 123.60, 104.00. ESI-HRMS calcd for  $C_{17}H_{14}BrN_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 369.0346; found: 369.0344.

*N*-(4-甲基苯亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5g**):熔点 295-297 °C,产率 91 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.35(s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 7.24(s, 1H, Pz-H), 7.28(d, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ph-H), 7.39-7.63(m, 5H, Ph-H), 7.85(d, 2H,  $J = 7.4$  Hz, Ph-H), 8.51(s, 1H, N=CH), 11.66(s, 1H, CONH), 13.80(s, 1H, Pz-NH)。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  158.53, 148.10, 147.30, 144.16, 140.22, 132.25, 129.92, 129.50, 129.03, 127.52, 125.87, 125.67, 103.91, 21.50. ESI-HRMS calcd for  $C_{18}H_{17}N_4O^+$  ( $[M+H]^+$ ): 305.1397; found: 305.1399.

*N*-(呋喃-2-基亚甲基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(**5h**):熔点 223-225 °C,产率 67 %。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  6.53-6.55(m, 1H, Fur-H), 6.91(d, 1H,  $J = 3.6$  Hz, Fur-H), 7.23(s, 1H, Pz-H), 7.40-7.86

(m, 6H, Ph-H, Fur-H), 8.44(s, 1H, N=CH), 11.75(s, 1H, CONH), 13.80(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  158.55, 150.17, 147.18, 145.48, 144.19, 137.77, 129.56, 129.09, 129.05, 125.92, 113.44, 112.66, 104.02. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 281.1033; found: 281.1030.

3-苯基-*N'*-(1-苯亚乙基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5i): 熔点 266-268 °C, 产率 70 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.39(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.27(s, 1H, Pz-H), 7.38-7.86(m, 10H, Ph-H), 10.40(s, 1H, CONH), 13.86(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  158.38, 147.20, 144.31, 138.48, 133.66, 129.92, 129.53, 129.06, 128.87, 126.88, 125.86, 125.73, 103.74, 14.06. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 305.1397; found: 305.1396.

*N'*-(1-(4-氯苯基)亚乙基)-3-苯基-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5j): 熔点 251-253 °C, 产率 81 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.38(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.29(s, 1H, Pz-H), 7.39-7.90(m, 9H, Ph-H), 10.43(s, 1H, CONH), 13.85(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  158.39, 152.29, 147.19, 144.44, 137.30, 134.62, 129.49, 129.07, 128.91, 128.64, 126.12, 125.82, 103.80, 14.07. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 339.1007; found: 339.1010.

*N'*-苯亚乙基-3-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5k): 熔点 268-270 °C, 产率 47 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.24(s, 1H, Pz-H), 7.30-7.91(m, 9H, Ph-H), 8.56(s, 1H, N=CH), 11.73(s, 1H, CONH), 13.80(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  162.58(d,  $^1J_{\text{CF}} = 243.3$  Hz), 158.60, 148.06, 147.27, 143.30, 135.00, 130.40, 129.31, 128.15(d,  $^3J_{\text{CF}} = 7.8$  Hz), 127.50, 125.75(d,  $^4J_{\text{CF}} = 3.0$  Hz), 116.52(d,  $^2J_{\text{CF}} = 21.4$  Hz), 104.06. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{FN}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 309.1146; found: 309.1144.

*N'*-苯亚乙基-3-(4-氯苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5l): 熔点 267-269 °C, 产率 67 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.32(s, 1H, Pz-H), 7.43-7.49(m, 3H, Ph-H), 7.56(d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.72-7.74(m, 2H, Ph-H), 7.87(d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 8.53(s, 1H, N=CH), 11.78(s, 1H, CONH), 13.89(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  158.52, 156.47, 148.35, 148.26, 134.86, 133.49, 132.44, 130.53, 129.53, 129.31, 127.57, 107.01, 104.27.  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 325.0851; found: 325.0846.

*N'*-苯亚乙基-3-(4-溴苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5m): 熔点 258-260 °C, 产率 76 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7.32(s, 1H, Pz-H), 7.46-7.87(m, 9H, Ph-H), 8.52(s, 1H, N=CH), 11.79(s, 1H, CONH), 13.90(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  157.47, 148.27, 137.40, 134.85, 132.44, 131.89, 130.54, 129.32, 129.04, 127.79, 127.57, 123.90, 104.28. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrN}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 369.0346; found: 369.0345.

*N'*-苯亚乙基-3-(4-甲基苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5n): 熔点 248-249 °C, 产率 71 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.35(s, 3H, Ph- $\text{CH}_3$ ), 7.21(s, 1H, Pz-H), 7.30(d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.44-7.74(m, 7H, Ph-H), 8.53(s, 1H, N=CH), 11.73(s, 1H, CONH), 13.73(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  158.48, 148.10, 148.07, 138.39, 138.30, 134.93, 130.46, 130.04, 129.46, 129.31, 127.53, 125.76, 103.36, 21.30. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 305.1397; found: 305.1394.

*N'*-苯亚乙基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰胺(5o): 熔点 239-241 °C, 产率 73 %。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  3.81(s, 3H, Ph- $\text{OCH}_3$ ), 7.05(d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, Ph-H), 7.12(s, 1H, Pz-H), 7.44-7.73(m, 5H, Ph-H), 7.77(d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, Ph-H), 8.53(s, 1H, N=CH), 11.68(s, 1H, CONH), 13.64(s, 1H, Pz-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  161.05, 159.95, 147.98, 135.01, 131.10, 130.41, 129.31, 128.47, 127.51, 127.35, 114.91, 114.23, 103.01, 55.72. ESI-HRMS calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 321.1346; found: 321.1340.

### 1.3 化合物抗惊厥活性及神经毒性评价

按照美国 NIH 的抗癫痫药物开发方案, 采用最大电惊厥模型和皮下戊四唑模型评价目标化合物的抗癫痫活性, 旋转棒法评价目标化合物的神经毒性<sup>[18,19]</sup>。实验动物采用昆明种小鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(湘) 2016-0003), 体重 18-22 g, 雌雄均可。实验前 3 d 饲养于 23-27 °C、相对湿度 45%-65% 的实验室中, 实验时间以外可以自由采食和饮水。测试化合物均用 DMSO 溶解, 以

0.05 mL/20 g容积腹腔注射,评价化合物在 30、100、300 mg/kg 三个剂量下的抗癫痫活性和神经毒性。活性观测时间为给药后 0.5 h。

最大电休克发作实验(MES):使用 110 V,60 Hz 的交流电,小鼠耳电极通电 0.3 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。腹腔给药 0.5 h 后对小鼠进行电刺激,观察药物的抗电诱导惊厥活性,不出现后肢强直,视为化合物在该剂量下有效。

皮下戊四唑实验(sc-PTZ):小鼠给药 0.5 h 后皮下给予 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,认为该化合物可以对抗由戊四唑诱导的惊厥。

神经毒性实验:神经毒性实验采用旋转棒法,腹腔给药 0.5 h 后将小鼠置于直径 1 英寸、转速为 6 r/min 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。

#### 1.4 细胞培养与 ELISA 实验(TNF- $\alpha$ 浓度测定)

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞(北京协和细胞库,北京)用添加了 10% FBS(BI 生物有限公司,批号:1552680)、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素混合液(索莱宝科技有限公司,批号:20160909)的 RPMI 1640 完全高糖培养基(杭州四季青生物工程有限公司,批号:170504)于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。每 24 h 更换培养基,细胞生长至 90% 传代。待细胞传至 3 代,状态稳定后,用于实验。将细胞接种到 24 孔板中,培养 24 h 后,药物组加入 20  $\mu$ g/mL 的化合物或阳性药地塞米松(DXMS)预处理 4 h,然后加入 LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)(1  $\mu$ g/ml)培养 24 h。收集培养液,1000 rpm 离心 10 min 后取上清液,使用小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(San diego, CA, USA)检测 TNF- $\alpha$  浓度水平<sup>[20]</sup>。

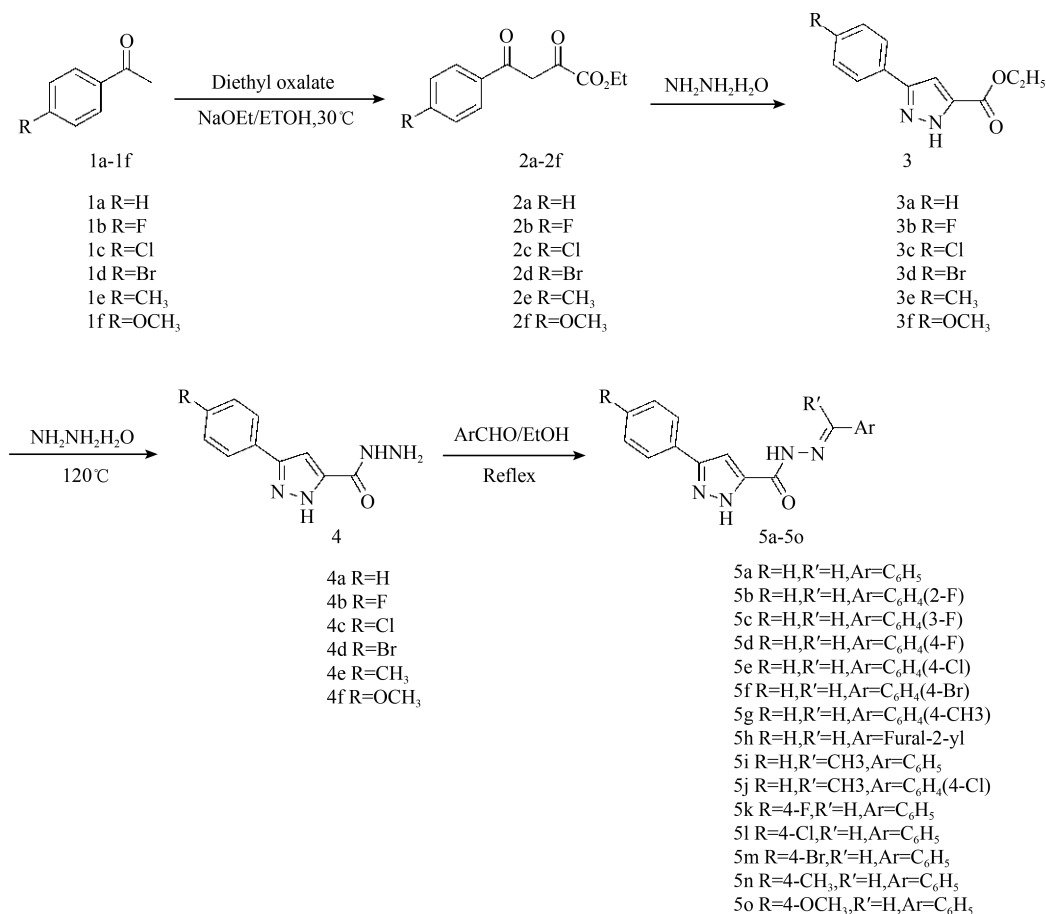


图1 目标化合物 5a-5o 的合成路线

## 2 结果与讨论

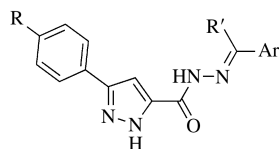
### 2.1 合成部分

本实验以以苯乙酮(或取代苯乙酮)为起始原料,先后与草酸二乙酯发生缩合反应,与水合肼进行环化、

缩合,最后与芳香醛(酮)缩合得到目标化合物5a-5o(见图1)。化合物2的制备过程中,使用新制备的乙醇钠并保证反应体系无水比较关键,反应体系中水的存在会降低乙醇钠的活性从而阻止反应的进行。该反应结束后反应体系会凝固成固体,这是因为化合物2在碱性条件下以盐的形式存在,在乙醇中溶解度变低导致的。加入醋酸调整pH到7可以使其转换成分子形态,溶解度增加,从而溶解到乙醇溶液中。再加入水合肼在90℃下回流,可以得到环合后的吡唑甲酰乙酯3。化合物3直接与水合肼发生肼解得到酰肼化合物4。该反应中我们尝试了不同溶剂,发现反应至少需要110℃的反应温度,才能确保反应进行。如甲苯作溶剂同样得到预计产物,但比较发现水合肼直接充当溶剂,可以加快反应速度,并且易于后处理。最后,在醋酸催化下,化合物4与各种羰基化合物缩合得到目标化合物5a-5o。

化合物5a-5o的结构通过核磁共振氢谱、碳谱和质谱得到了确证。结构解析以化合物5a为例:在 $^1\text{H-NMR}$ 中, $\delta$  7.25处的单峰为吡唑环上C-H的吸收峰, $\delta$  7.40-7.86范围的多重峰为两个苯环上10个质子的吸收峰, $\delta$  8.56处的单峰为席夫碱上的质子信号, $\delta$  11.73和13.82位置的两个单峰则分别为酰胺氮和吡唑氮上的两个质子的吸收峰。 $^{13}\text{C NMR}$ 谱也准确的给出了该化合物结构的各种信息,恰好是13种不同化学环境的碳。高分辨质谱分析中,化合物5a ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )理论分子质量为291.1240,实测值为291.1238,结合氢谱和碳谱可以确证其分子结构。

表1 化合物5a-5o的抗癫痫活性及神经毒性



Compounds	R	R'	Ar	Intraperitoneal injection in mice <sup>a</sup>		
				MES <sup>b</sup>	scPTZ <sup>c</sup>	NT <sup>d</sup>
5a	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	100	-
5b	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (o-F)	-	-	-
5c	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (m-F)	-	100	-
5d	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (p-F)	100	100	-
5e	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (p-Cl)	100	100	-
5f	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (p-Br)	-	30	-
5g	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (p-CH <sub>3</sub> )	300	100	-
5h	H	H	2-furan	-	-	-
5i	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	300	-
5j	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (p-Cl)	-	-	-
5k	F	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	300	100	-
5l	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	100	-
5m	Br	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	100	-
5n	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	100	-
5o	OCH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	300	-	-

注:a 每组动物数3只,给药剂量为30,100,300 mg/kg,腹腔给药。表中数据表示该剂量下超过一半小鼠被保护,检测时间为给药后0.5 h后,-表示在300 mg/kg下未见活性或者神经毒性;b 最大电休克发作实验;c 皮下戊四唑实验;d 神经毒性评价(转棒实验)。

## 2.2 药理实验部分

2.2.1 抗癫痫活性。本实验采用MES和sc-PTZ模型来评价目标化合物5a-5o的抗癫痫活性。虽然这两个模型在对难治性癫痫的药物筛选方面有所欠缺,但目前依然是抗癫痫药物筛选的首要选择,被美国NIH列举为主要的抗癫痫药物筛选模型<sup>[21]</sup>。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<sup>[22]</sup>,而sc-PTZ模型则用来筛选失神发作的候选药物<sup>[23]</sup>。本实验对目标化合物进行了30,100和300 mg/kg三个

剂量的活性和神经毒性的初步评价,其结果见表 1。化合物 5d 和 5e 在 100 mg/kg 剂量下表现出抗电刺激所致惊厥活性,化合物 5g, 5k 和 5o 在 300 mg/kg 剂量下表现出对抗电刺激所致惊厥活性。其他化合物在最大剂量 300 mg/kg 下未见抗电惊厥活性。

scPTZ 实验中,绝大多数化合物在 100 mg/kg 剂量下表现出抗戊四唑所致惊厥活性,说明该系列化合物对戊四唑所致癫痫更为敏感,其中化合物 5f 在 30 mg/kg 剂量下仍表现出抗癫痫活性。旋转棒实验模型中,所有化合物在 300 mg/kg 剂量下均未表现出神经毒性。

2.2.2 抗炎活性。脂多糖(LPS),革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分,被认为是通过刺激炎性细胞因子(如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的释放而启动炎症过程的主要危险因素<sup>[24]</sup>。LPS 诱导 TNF- $\alpha$  释放模型被认为是一种有效的用于筛选抗炎活性的体内外模型<sup>[25,26]</sup>。在本研究中,我们通过建立 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型来筛选化合物 5a-5o 的体外抗炎活性。如图 2 所示,被 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞 TNF- $\alpha$  浓度显著升高,阳性药 DXMS 可以显著抑制 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  浓度的升高,在 20  $\mu$ g/mL 剂量下抑制率达到 62%。化合物中 5a-5f, 5h 和 5k-5m 在 20  $\mu$ g/mL 剂量下可以显著抑制 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  浓度的升高。简单的构效关系分析可以发现,氟取代化合物 5b, 5k 和 呋喃化合物 5h 具有最好的抗炎活性,抑制率分别为 64%, 61% 和 55%,与阳性药地塞米松相当。而给电子基团甲基或者甲氧基取代的 5g, 5n 和 5o 则抗炎活性偏弱,对 LPS 诱导 TNF- $\alpha$  表达的抑制率分别为 23%, 21% 和 11%,统计与模型组相比没有显著性差异。不同氟取代化合物中,邻位氟取代的化合物抑制活性更好(5b > 5c, 5d),卤素取代的化合物中,氟取代化合物抑制活性优于氯溴取代化合物(5d > 5e, 5f; 5k > 5l, 5m)。

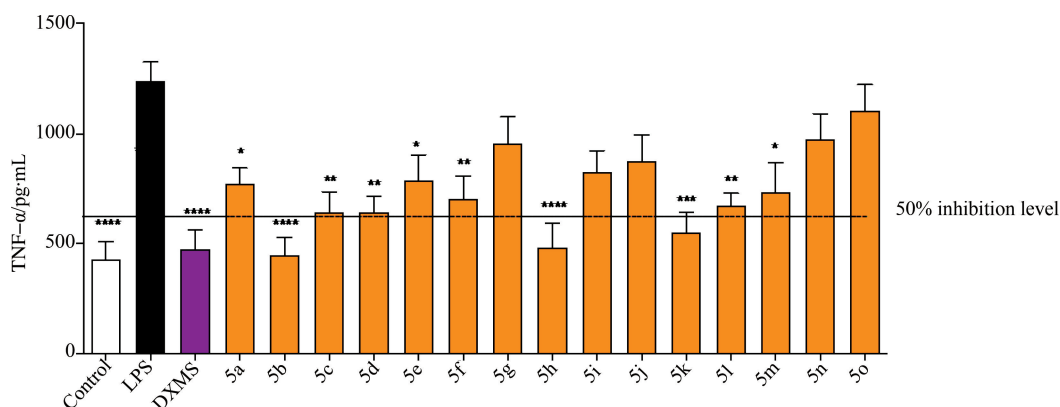


图 2 化合物 5a-5o(20  $\mu$ g/mL)在 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型中的抗炎活性(与 LPS 组比较, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001, 未标注组  $p$ >0.05, 没有显著性差异, 统计分析采用 ANOVA followed by Dunnett's test)

### 3 结论

本文合成了一系列 3-芳基-1*H*-5-取代吡唑酰胺类化合物,其结构均经过光谱学方法确证。体内抗癫痫活性评价表明:该系列化合物大部分表现出不同程度的抗癫痫活性,尤其是对 sc-PTZ 模型更为有效,且化合物未见明显神经毒性。此外,该系列化合物在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型中可以显著抑制 TNF- $\alpha$  的释放,说明其具有良好的抗炎作用。该研究为研究失神发作类癫痫和炎症的治疗药物提供了一定基础。

### 参 考 文 献

- [1] 梁树立.重视老年癫痫的外科治疗[J].中华老年心脑血管病杂志,2018,20(8):7-9.
- [2] 林玉冰,许梅花.抗癫痫药物的研究进展[J].养生保健指南,2019(24):237-238.
- [3] GANGULY S, JACOB S K. Therapeutic outlook of pyrazole analogs: A mini review[J]. Mini Rev Med Chem, 2017, 17(11): 959-983.
- [4] LIU J J, ZHAO M Y, ZHANG X, et al. Pyrazole derivatives as antitumor, anti-inflammatory and antibacterial agents[J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13(13): 1957-1966.
- [5] ALI R, KHAN M A, SIDDIQUI N. Past, present and future of antiepileptic drug therapy - finding a place for heterocyclics[J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(12): 1024-1050.
- [6] SECCI D, BOLASCO A, CHIMENTI P, et al. The state of the art of pyrazole derivatives as monoamine oxidase inhibitors and antidepressants[J]. Mini Rev Med Chem, 2017, 17(11): 984-1000.

- sant/anticonvulsant agents[J].*Curr Med Chem*,2011,18(33):5114-5144.
- [7] SONG M X,WU Y,DENG X Q.Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of pyrazolyl semicarbazones.Part II[J].*Letters in Drug Design & Discovery*,2016,13(8):800-808.
- [8] KRIVOSHEIN A V.Antiepileptic drugs based on the  $\alpha$ -substituted amide group pharmacophore:from chemical crystallography to molecular pharmaceutics[J].*Curr Pharm Des*,2016,22(32):5029-5040.
- [9] ANGELOVA V,KARABELIOV V,ANDREEVA-Gateva P A,et al.Recent developments of hydrazide/hydrazone derivatives and their analogs as anticonvulsant agents in animal models[J].*Drug Dev Res*,2016,77(7):379-392.
- [10] 彭安娇,何时旭,朱曦,等.炎症在癫痫发病机制中的研究进[J].*癫痫杂志*,2018,4(1):36-39.
- [11] BALOSSO S,RAVIZZA T,ARONICA E,et al.The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures[J].*Exp Neurol*,2013,247(9):267-271.
- [12] VLIET E,ARONICA E,VEZZANI A,et al.Review:Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy:emerging evidence from preclinical and clinical studies[J].*Neuropathol Appl Neurobiol*,2018,44(1):91-111.
- [13] SHARMA S,KUMAR D,SINGH G,et al.Recent advancements in the development of heterocyclic anti-inflammatory agents[J].*Eur J Med Chem*,2020,200(8):112438.
- [14] SHARMA V,BHATIA P,ALAM O,et al.Recent advancement in the discovery and development of COX-2 inhibitors:Insight into biological activities and SAR studies(2008-2019) [J].*Bioorg Chem*,2019,89(5):103007.
- [15] KAJAL A,BALA,S,SHARMA N,et al.Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agents[J].*Int J Med Chem*,2014,14:761030.
- [16] KAMAL A,SHAIK AB,POLEPALLI S,et al.Pyrazole-oxadiazole conjugates:synthesis,antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization[J].*Organic & Biomolecular Chemistry*,2014,12(40):7993-8007.
- [17] 李月强,李春霞,武福燕,等.基于 2-羟基 1-萘甲醛缩甘氨酸席夫碱镍配合物的合成及其高效构建 C-C 键[J].*聊城大学学报(自然科学版)*,2019,32(1):81-87.
- [18] KRALL R L,PENRY J K,White B G,et al.Antiepileptic drug development:II.Anticonvulsant drug screening[J].*Epilepsia*,1978,19(4):409-428.
- [19] Porter RJ.Antiepileptic drug development program[J].*Prog Clin Biol Res*,1984,51(2):53-66.
- [20] 徐宝贵,李松慧,宋明霞,等.锦绣杜鹃花抗菌、抗炎活性及其有效部位研究[J].*聊城大学学报(自然科学版)*,2018,31(3):86-92.
- [21] WOLFGANG L.Animal models of seizures and epilepsy:past,present,and future role for the discovery of antiseizure drugs[J].*Neurochem Res*,2017,42(7):1873-1888.
- [22] SMITH M,WILCOX K S,WHITE H S.Discovery of antiepileptic drugs[J].*Neurotherapeutics*,2007,4(1):12-17.
- [23] WHITE H S.Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs[J].*Epilepsia*,1997,38(1):S9-17.
- [24] WASEEM T,DUXBURY M,ITO H,et al.Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways[J].*Surgery*,2008,143(3):334-342.
- [25] GURUVAYOORAPPAN C,KUTTAN G.(+)-Catechin inhibits tumour angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages[J].*Innate Immunity*,2008,14(3):160-174.
- [26] 刘铁民,邱宗忠,郭海东.中药方剂对过度训练大鼠血清 TNF- $\alpha$  含量及小肠组织 NO 水平影响的研究[J].*聊城大学学报(自然科学版)*,2007,20(3):89-92.