

引用:李孟娇,胡丽娜,伊世嘉,等. *N*-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-取代苯氧基乙酰胺衍生物的设计、合成及药理活性研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025,38(4):615-624.

Citation:LI Mengjiao, HU Lina, YI Shijia, JIN Bingbing, LEI Kang, WANG Shibin. Design, synthesis and anticonvulsant activity of *N*-(4-(4*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)-2-phenoxyacetamide derivatives[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2025,38(4): 615-624.

文章编号 1672-6634(2025)04-0615-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024120006

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-取代苯氧基乙酰胺衍生物的设计、合成及药理活性研究

李孟娇,胡丽娜,伊世嘉,晋冰冰,雷康,王世本

(聊城大学 药学与食品工程学院,山东 聊城 252059)

摘要 设计并合成了一系列含有三唑结构片段的抗癫痫化合物,目标化合物结构采用¹H NMR,¹³C NMR和HMRS方法进行确证。最大电休克(MES),皮下戊四唑(scPTZ)和旋转木棒(ROT)实验结果表明大部分化合物具有抗癫痫活性和较低神经毒性。其中,化合物5o在MES和scPTZ实验中测定的PI值分别为11.5和8.2,安全性高于阳性对照卡马西平(MES对照,PI为6.1)和乙琥胺(PTZ对照,PI为3.5)。脑组织中抑制性神经递质GABA含量测试进一步发现,化合物5o发挥抗癫痫活性可能与提高大鼠脑中GABA的含量相关。分子对接结果表明,化合物5o能够与GABA_A受体的苯二氮卓类药物结合活性位点氨基酸残基生成重要的作用力。该研究结果表明,化合物5o具有作为含有三氮唑结构片段先导化合物的潜力。

关键词 三氮唑;合成;抗癫痫;γ-氨基丁酸

中图分类号 TQ460.1

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Design, synthesis and anticonvulsant activity of *N*-(4-(4*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)-2-phenoxyacetamide derivatives

LI Mengjiao, HU Lina, YI Shijia, JIN Bingbing, LEI Kang, WANG Shibin

(School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract In this paper, a series of anticonvulsant derivatives containing triazole structure were designed and synthesized and the structures of the target compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HMRS methods. The results of maximal electroshock (MES), subcutaneous pentylenetetrazole (scPTZ) and rotating rod (ROT) assays showed that most of the compounds possessed anticonvulsant activity and low neurotoxicity. Among them, compound 5o showed a PI value of 11.5 and 8.2 in MES and scPTZ experiments, respectively, with a higher safety than the positive control carbamazepine of 6.1 (MES test) and ethosuximide of 3.5 (PTZ test). The test of inhibitory neurotransmitter GABA content in brain tissue

收稿日期:2024-12-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31701827);山东省自然科学基金项目(ZR2022MB064)资助

通信作者:王世本,男,汉族,博士,副教授,研究方向:药物化学,E-mail:wangshiben110@163.com.

further revealed that compound **5o** exerted anticonvulsant activity may be associated with increased GABA content in rat brain. The molecular docking results indicated that the potential compound **5o** was able to generate significant interaction force with the BZs binding active site amino acid residues of GABA_A receptor. The results of this study suggest that compound **5o** has the potential to serve as a lead compound containing a structural fragment of triazole.

Keywords triazole; anticonvulsant; synthesis; γ -gaba

0 引言

癫痫是神经系统常见疾病之一,以脑神经元异常放电引起反复痫性发作为特征,对患者的生理、认知及心理产生严重影响^[1-2]。癫痫的治疗包括药物治疗、手术治疗,生酮饮食(Ketogenic diet, KD)等方法。目前癫痫治疗仍以药物治疗为主,以控制发作或最大限度地减少发作次数,改善生活质量。目前上市的抗癫痫药物已达几十种,且临床上的用药方法常为单一用药,患者在单一用药无效后也会采取混合用药,但是,仍然有近 30% 的患者无法通过现有药物控制癫痫发作,且约 50% 的患者因无法忍受的副作用或特殊反应而治疗失败^[3-7]。因此,继续寻找新的、有潜力的抗癫痫化合物仍然具有重要意义^[8-9]。

1,2,4-三氮唑结构是药物设计中常被考虑的重要片段之一,且已被证明含有三氮唑结构的衍生物具有多种生物活性,如抗菌,抗炎,抗肿瘤,抗癫痫等^[10-15]。目前上市的含有 1,2,4-三氮唑结构片段的药物有:雷西纳德(Lesinurad,抗痛风),艾氟康唑(Efinaconazole,抗真菌),塞利尼索(Selinexor,多发性骨髓瘤),他拉唑帕利(Talazoparib,乳腺癌)等(图 1)。三唑仑(Triazolam)同样为具有三氮唑结构片段的抗癫痫药物,同时也具有镇静催眠作用。自此之后,越来越多的药物化学家开始关注具有抗癫痫活性的三唑衍生物的设计与合成^[16-19]。

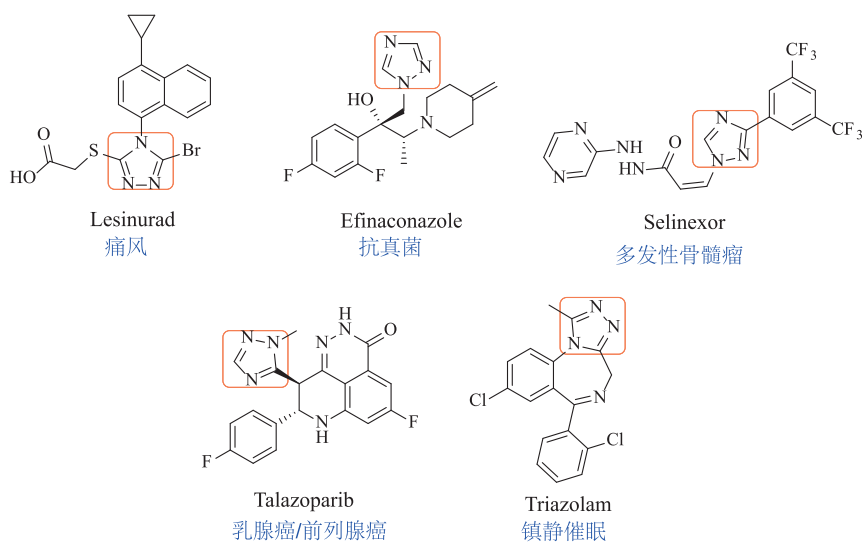


图 1 具有 1,2,4-三氮唑结构片段的药物

Fig. 1 Drugs containing the 1,2,4-triazole structure

前期研究中,课题组合成了一系列含有三氮唑结构的化合物(先导化合物 I, 图 2),并评价了其抗癫痫活性,药理结果显示,该系列化合物具有较好的抗癫痫活性^[20]。通过分子模拟对接发现,该系列化合物硫原子上连接的不同长短的烷基链与受体活性位点周围氨基酸没有形成关键作用力,推断该烷基链对活性影响不大,而结构中噁二唑片段能够与受体活性位点周围氨基酸形成 pi-pi 主要相互作用,对活性有较大的影响。因此,在接下来的化合物设计中去掉硫烷基链,引入更容易形成 pi-pi 相互作用的苯环结构代替噁二唑结构,期望得到活性更好的潜在化合物,并进一步探讨其构效关系。本课题以 4-(1H-1,2,4-三唑-1-基)苯胺为原料,选择药物设计中常用到的链接基团乙酰基为连接子,通过引入具有疏水作用的不同取代的苯基结构片

段,来调节化合物的脂溶性,设计合成了一系列目标化合物5a-o(图2)。

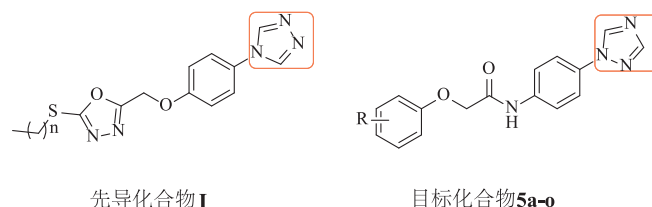


图2 先导化合物I和目标化合物5a-o的结构式

Fig. 2 Chemical structures of lead compound I and target compounds 5a-o

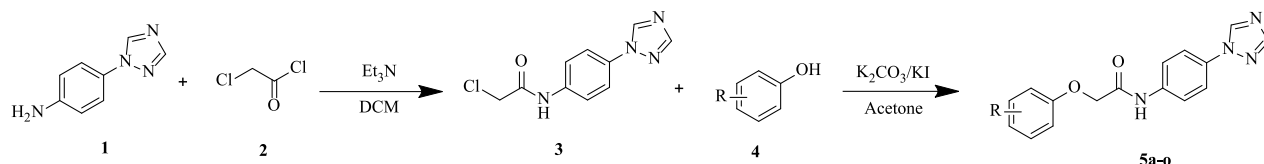
本研究中,将合成的目标化和物进行结构确证和药理实验测试。结构确证部分,采用核磁共振氢谱(^1H NMR),核磁共振碳谱(^{13}C NMR)和高分辨质谱(HRMS)方法验证。药理部分,采用最大电休克(MES)和皮下戊四唑(scPTZ)动物体内实验模型初步筛选目标化合物的抗癫痫活性,采用旋转棒(ROT)动物体内实验模型测试目标化合物的神经毒性。根据MES、scPTZ和ROT的初步药理实验结果,最终挑选出活性高,毒性低的潜在化合物,并进一步定量评价其抗癫痫活性和神经毒性。GABA含量低是诱发癫痫的一个重要因素,采用GABA含量评估实验方法进一步探讨潜在化合物对小鼠脑内抑制性递质GABA含量的变化影响,同时,采用Discovery Studio 2021(DS 2021)软件进行分子模拟,预测潜在化合物与GABA_A受体的相互作用力,分析其与受体可能的作用方式。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

目标化合物5a-o的合成路线如图3所示。首先,以4-(1*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯胺(化合物1)为原料、在碱性条件下与氯乙酰氯(化合物2)反应得到中间体*N*-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-氯乙酰胺(化合物3),该步反应具有较高的收率,且实验过程中注意反应温度,采用冰浴条件,以防副产物的产生。化合物3再碱性条件下与不同取代的苯酚(化合物4)反应得到目标化合物5a-o。实验共合成了15个目标化合物,均采用 ^1H NMR, ^{13}C NMR和HRMS方法进行结构确证。中间体3的结构解析:在 ^1H NMR中, δ 4.32处的单峰为与氯相连亚甲基上的吸收峰, δ 7.78~7.85处的两组双重峰为与三氮唑相连苯环上质子的吸收峰, δ 8.23,9.24处的单峰为三氮唑上质子的吸收峰, δ 10.63处的单峰是酰胺上的质子的吸收峰。 ^{13}C NMR谱也准确的给出了中间体3的结构信息,如 δ 44.01处的峰为亚甲基的碳, δ 120.57,120.65,132.92,138.46,处的峰为苯环上碳, δ 142.48,152.71处的峰为三氮唑上的碳, δ 165.33处的峰为羰基的碳。结合氢谱和碳谱可以确证其分子结构。

目标化合物5a-o的结构解析:以5a为例子,在 ^1H NMR中, δ 4.74处的单峰为与氧相连亚甲基上的吸收峰, δ 6.99~7.33处的多重峰为苯酚上质子的吸收峰, δ 7.81~7.85处的多重峰为与三氮唑相连苯环上质子的吸收峰, δ 8.22,9.23处的单峰为三氮唑上质子的吸收峰, δ 10.32处的单峰是酰胺上的质子的吸收峰。 ^{13}C NMR谱准确给出了化合物5a结构的各种信息, δ 67.58处的峰为亚甲基的碳, δ 167.33处的峰为羰基的碳等。高分辨质谱分析中,化合物5a理论分子量为295.1190,实际测定值为295.1197,相差小于10 ppm,结合氢谱和碳谱可以确证其分子结构。



注:5a: R = H; 5b: R = *o*-Cl; 5c: R = *m*-Cl; 5d: R = *p*-Cl; 5e: R = *o*-F; 5f: R = *m*-F; 5g: R = *p*-F; 5h: R = *o*-CF₃; 5i: R = *m*-CF₃; 5j: R = *p*-CF₃; 5k: R = *o*-CH₃; 5l: R = *m*-CH₃; 5m: R = *p*-CH₃; 5n: R = 2,6-Cl; 5o: R = 2,6-F。

图3 目标化合物5a-o的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of target compounds 5a-o

1.2 目标化合物的抗癫痫活性研究

利用 MES 和 scPTZ 两种实验动物模型,给药分为 30,100 和 300 mg/kg 三个剂量组,并分别在给药 0.5 和 4 小时后测试目标化合物 5a-o 的抗癫痫活性。MES 实验选用对该模型有效的卡马西平作为对照,scPTZ 实验选用对该模型有效的乙琥胺作为对照。MES 和 scPTZ 的药理实验结果见表 1。

从表 1 的 MES 实验结果可以看到,给药 0.5 小时后,在不同的剂量下,所有目标化合物都表现出了抗癫痫活性。如在 300 mg/kg 下,化合物 5b, 5f-h, 5j 和 5l 表现出了抗癫痫活性;在 100 mg/kg 下,化合物 5a, 5c-e, 5i, 5k 和 5m-n 表现出了抗癫痫活性;而在 30 mg/kg 下,只有化合物 5o 表现出了最好的抗癫痫活性。给药 4 小时后,除了化合物 5f, 5h, 5j 和 5l 四个化合物在三个剂量下没有活性,其余化合物均表现出不同程度的抗癫痫活性。

表 1 目标化合物 5a-o 的 MES 和 scPTZ 实验测试结果

Tab. 1 Results of MES and scPTZ tests for target compounds 5a-o

Compounds	MES ^a /(mg · kg ⁻¹)		Compounds	scPTZ ^a /(mg · kg ⁻¹)	
	0.5h	4 h		0.5 h	4 h
5a	100 ^b	100	5a	100	100
5b	300	300	5b	300	-
5c	100	300	5c	100	100
5d	100	300	5d	300	-
5e	100	100	5e	100	100
5f	300	-	5f	300	-
5g	300	300	5g	300	300
5h	300	-	5h	-	-
5i	100	300	5i	300	300
5j	300	-	5j	-	-
5k	100	100	5k	100	300
5l	300	-	5l	300	-
5m	100	100	5m	300	300
5n	100	300	5n	100	100
5o	30	100	5o	100	100

注:a每个剂量使用三只实验动物,在此剂量下至少有一只动物有效;-在 30,100 和 300 mg/kg 剂量下无效。

从表 1 的 scPTZ 测试结果可以看到。给药 0.5 h 后,除了化合物 5h 和 5j 两个化合物在三个剂量下没有活性,其余化合物均表现出不同程度的抗癫痫活性。如在 100 mg/kg 下,化合物 5a, 5c, 5e, 5k 和 5n-o 表现出了抗癫痫活性。给药 4 h 后,除了化合物 5b, 5d, 5f, 5h, 5j 和 5l 六个化合物在三个剂量下没有活性,其余化合物均表现出不同程度的抗癫痫活性。

利用 ROT 实验模型,给药剂量分别为 100 和 300 mg/kg 测试目标化合物 5a-o 的神经毒性,分别在给药 0.5 和 4 h 后进行测试。ROT 的药理实验结果见表 2。从表 2 可以看到,给药 0.5 h 后,除了化合物 5d,其余化合物在 300 mg/kg 下均没有神经毒性。给药 4 h 后,除了化合物 5d,其余化合物仍然没有神经毒性,与给药 0.5 h 结果相近。

从 5a-o 系列衍生物的 MES 和 scPTZ 药理实验结果中可以发现,苯环上各种吸、供电子取代基及位置不同(F,Cl,CF₃,CH₃),对化合物的抗癫痫活性起着重要的作用,它们都属于疏水性基团,与药物的脂水分配系数有密切关系。当引入苯环后增强了分子的疏水性,使化合物的解离能力减弱,从而易于通过血脑屏障,到达作用部位与受体结合,发挥作用。从实验结果中可以看到苯环上 4 位-氯(5d),2-氟(5e),3-三氟甲基(5i)和 2-甲基(5k)取代的化合物的活性要优于在其他位置原子取代的化合物。而苯环上 2,6-二氟(5o)双

取代的化合物活性要优于单氟原子被取代的化合物。这些初步的构效关系分析为今后化合物的结构优化提供了一定的借鉴基础。

表2 目标化合物5a-o的ROT实验测试结果

Tab. 2 Results of ROT test for target compounds 5a-o

Compounds	NT ^a /(mg·kg ⁻¹)		Compounds	NT/(mg·kg ⁻¹)	
	0.5 h	4 h		0.5 h	4 h
5a	>300	>300	5i	>300	>300
5b	>300	>300	5j	>300	>300
5c	>300	>300	5k	>300	>300
5d	300	300	5l	>300	>300
5e	>300	>300	5m	>300	>300
5f	>300	>300	5n	>300	>300
5g	>300	>300	5o	>300	>300
5h	>300	>300	-	-	-

注:a 每个剂量使用三只实验动物,在此剂量下至少有一只动物出现神经毒性。

对表1-2中的MES、scPTZ和ROT的药理活性和神经毒性结果进行分析,挑选出2个活性较好,毒性低的化合物5a和5o定量测定其半数有效剂量(ED_{50}),半数中毒剂量(TD_{50}),得到安全指数($PI = TD_{50}/ED_{50}$)。选择分别对MES和scPTZ实验动物模型有效的药物乙琥胺和卡马西平作为阳性对照,实验测试及分析结果见表3。

从表3中可以看到,化合物5o表现出最好的抗癫痫活性,在MES、scPTZ实验中测定的 ED_{50} , TD_{50} 值分别为45.6和63.9 mg/kg,ROT实验中测定的 TD_{50} 值为524.4 mg/kg, PI 值分别为11.5和8.2。在MES实验中,对照卡马西平的 ED_{50} , TD_{50} 值分别为11.4和69.3 mg/kg, PI 值为6.1,虽然卡马西平活性优于5o,但安全性远低于化合物5o。在scPTZ测试中,对照乙琥胺的 ED_{50} , TD_{50} 值分别为94.4和333.7 mg/kg, PI 值为3.5,活性和安全性两方面都低于化合物5o。

表3 定量评价潜在化合物5a和5o的活性

Tab. 3 Quantitative data of the potent compound 5a and 5o

Compounds	ED_{50} ^a	ED_{50}	TD_{50} ^b	PI ^c	
	(MES, mg/kg)	(scPTZ, mg/kg)	(NT, mg/kg)	MES	scPTZ
5a	72.3 (84.8~61.6)	65.7 (77.1~56.0)	461.4 (501.6~424.5)	6.4	7.0
5o	45.6 (53.5~38.9)	63.9 (75.0~54.5)	524.4 (570.1~482.4)	11.5	8.2
Carbamazepine	11.4 (12.4~10.5)	-	69.3 (75.4~63.8)	6.1	-
Ethosuximide	-	94.4 (86.8~102.6)	333.7 (362.8~306.9)	-	3.5

注:a ED_{50} : 半数有效剂量; b TD_{50} : 半数中毒剂量; c PI : 保护指数 (TD_{50}/ED_{50}); -未测试。

γ -氨基丁酸(GABA)为中枢主要的抑制性神经递质,脑内GABA功能不足,可能与一些神经疾病的发生有关,如惊厥和癫痫^[21]。为了研究潜在化合物5o发挥抗癫痫作用是否与增加脑内GABA浓度具有相关性,本实验选择Wistar大鼠进行脑组织GABA含量测定实验。化合物5o(给药剂量50 mg/kg)给药2 h和7 d后,测试大鼠脑内GABA含量的变化,选择地西泮(给药剂量3 mg/kg)作为阳性对照,测试结果见图4。从图4可以看到化合物5o和地西泮在给药2 h和7 d后,脑组织中的GABA含量都出现增加,而给药7 d后,增加较明显。该实验结果说明化合物5o可能通过影响GABA神经能系统发挥作用。

分子对接方法是计算机辅助药物研究领域的一项重要技术,其主要研究分子间(如配体和受体)相互作用,并预测其结合模式和亲合力的一种理论模拟方法。本实验选择化合物5o和地西泮作为配体,选择GABA_A受体作为受体(PDB代码: 6HUP,从RCSB PDB库获得),对接位置选择GABA_A受体的苯二氮卓

类药物(BZs)结合位点,采用分子模拟对接软件 DS 2021 进行对接,对接结果见图 5。

与 GABA_A 受体的 BZs 结合位点形成作用力的重要氨基酸残基有 TYR58, TYR160, TYR210, PHE77, THR 207, VAL203, HIS 102, SER205 和 SER206 等。从图 5 中可以看到, SER205 是一个重要的氨基酸,与对照地西洋形成氢键相互作用,与 TYR210 形成 pi-pi 相互作用,与 TYR58, PHE77, HIS 102, VAL203 形成 pi-烷基等相互作用。而化合物 5o 同样与 BZs 结合位点主要氨基酸残基形成作用力,如结构中的“O”原子与 SER205 形成氢键相互作用。与 HIS 102 和 TYR210 形成 pi-pi 相互作用,也能与 VAL203, ALA79 等形成作用力。综上,我们推测化合物 5o 与地西洋一样,作用方式可能也与 GABA_A 受体的 BZs 结合位点结合,而发挥药理作用。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

采用显微熔点仪(X-4, 上海, 中国)测定目标化合物的熔点。¹H NMR 和 ¹³C NMR 核磁数据由 Bruker AV-500(Bruker, 瑞士)型核磁共振波谱仪测定,目标化合物用 DMSO-*d*₆ 溶解,选用 TMS 作为内标,波谱数据缩写词表示方法:s, 单峰;d, 双重峰;t, 三重峰;q, 四重峰;m, 多重峰。采用高分辨率质谱仪(Bruker Daltonik, 德国)测定目标化合物的分子量。实验用对照品卡马西平, 乙琥胺, 地西洋, 溶剂, 试剂和硅胶等从阿拉丁, 安耐吉, 中国试剂网和青岛海洋化工厂等公司购买。

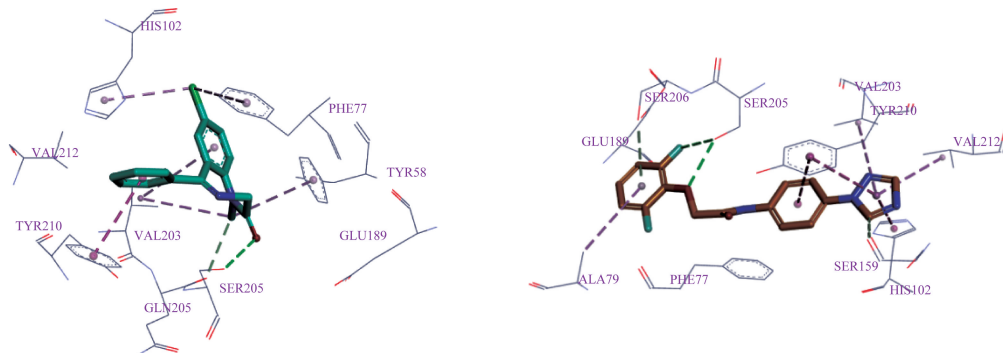
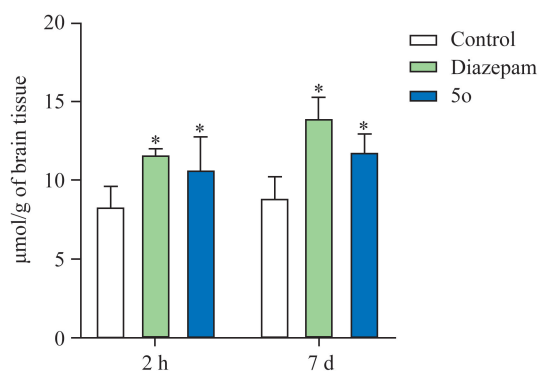


图 5 化合物 diazepam 和 5o 与 GABA_A 受体的 BZs 结合位点的相互作用

Fig. 5 Compound diazepam and 5o show interactions with residues present at the BZs binding site of the GABA_A receptor

2.2 实验方法

2.2.1 化合物 3 的合成。在 100 mL 圆底反应瓶中,加入原料 4-(1*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯胺(4.8 g, 30.0 mmol)、氯乙酰氯(33.0 mmol)和二氯甲烷(DCM, 30 mL),在冰浴条件下搅拌 10 min,然后缓慢滴加三乙胺(Et₃N, 3.0 g, 30.0 mmol),滴加完毕,继续常温搅拌反应 4h。采用薄层色谱(TLC)方法监测反应进程,反应完成后减压浓缩除去溶剂,加入 30 mL 水,搅拌,然后抽滤、水洗 3 次、干燥得粗品中间体 3(产率 56 %)。中间体 3 的核磁分析等结果如下: White solid, Yield 57 %, Mp 186~187 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.63 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, Triazole-H), 8.23 (s, 1H, Triazole-H), 7.85~7.78 (m, 6H, Ar-H), 4.32 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.33, 152.71, 142.48, 138.46, 132.92, 120.65, 120.65, 120.57, 120.57, 44.01。



注:(样本之间比较采用双因素 ANOVA 分析(Two-Way ANOVA),作图软件为 GraphPad Prism 8, * $p < 0.05$, 与空白组相比具有显著性差异, $n=5$ 。

图 4 目标化合物 5o 对脑组织 GABA 含量的影响

Fig. 4 Effect of target compound 5o on GABA content in brain tissue

2.2.2 目标化合物 5a-o 的合成。在 100 mL 圆底反应瓶中,加入各种取代的苯酚(20.0 mmol)、 K_2CO_3 (3.3 g, 24.0 mmol)、KI(0.5 g, 3.0 mmol)和丙酮(35 mL), 50℃下反应 0.5 h, 然后加入化合物 3(20.0 mmol), 升温至回流 7~9 h 并用 TLC 监测反应进程。反应完成后减压浓缩除去溶剂, 加入 30 mL 水, 然后抽滤、水洗、干燥得目标化合物 5a-o 的粗品, 所得粗品经柱层析 V(石油醚): V(乙酸乙酯)=10:1 纯化后得到纯品。每个目标化合物的核磁分析等结果如下。

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-苯氧基乙酰胺 (5a): White solid, Yield 44 %, Mp 173~174 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.32(s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.85~6.99 (m, 9H, Ar-H), 4.74 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 167.33, 158.25, 152.72, 142.48, 138.39, 132.86, 130.01, 129.83, 121.72, 121.01, 120.47, 115.68, 115.17, 67.58. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{15}N_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 295.1190; found: 295.1197.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(2-氯苯氧基)乙酰胺 (5b): White solid, Yield 62 %, Mp 195~196 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.33(s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.84~7.00 (m, 8H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 166.69, 153.91, 152.72, 142.47, 138.38, 132.85, 130.58, 128.74, 122.64, 121.95, 120.73, 120.56, 114.60, 68.14. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}ClN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 329.0800; found: 329.0807.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(3-氯苯氧基)乙酰胺 (5c): White solid, Yield 59 %, Mp 185~186 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.30 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~7.00 (m, 8H, Ar-H), 4.79 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 166.88, 159.21, 152.72, 142.48, 138.30, 134.14, 132.92, 131.39, 121.68, 121.03, 120.50, 115.52, 114.16, 67.70. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}ClN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 329.0800; found: 329.0808.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(4-氯苯氧基)乙酰胺 (5d): White solid, Yield 58 %, Mp 198~199 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.32(s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~7.04 (m, 8H, Ar-H), 4.75 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 167.00, 157.16, 152.72, 142.48, 138.33, 132.89, 129.75, 125.43, 121.01, 120.48, 117.01, 67.79. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}ClN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 329.0800; found: 329.0807.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(2-氟苯氧基)乙酰胺 (5e): White solid, Yield 63 %, Mp 157~158 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.32(s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.21 (s, 1H, Triazole-H), 7.84~7.00 (m, 8H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 166.69, 153.91, 152.72, 142.48, 138.38, 132.85, 130.58, 128.75, 122.64, 121.95, 120.73, 120.56, 114.60, 68.14. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}FN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 313.1095; found: 313.1103.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(3-氟苯氧基)乙酰胺 (5f): White solid, Yield 61 %, Mp 182~183 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.31(s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~6.81 (m, 8H, Ar-H), 4.78 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 166.89, 162.38, 159.77, 159.68, 152.72, 142.48, 138.32, 132.91, 131.28, 131.20, 121.02, 120.49, 111.45, 111.43, 108.46, 108.29, 103.06, 102.86, 67.79. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}FN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 313.1095; found: 313.1104.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯基)-2-(4-氟苯氧基)乙酰胺 (5g): White solid, Yield 37 %, Mp 207~208 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.30(s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~7.03 (m, 8H, Ar-H), 4.72 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 167.23, 158.30, 156.42, 154.62, 152.74, 142.49, 138.36, 132.89, 121.04, 120.48, 116.63, 116.56, 116.46, 116.28, 68.18. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}FN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 313.1095; found: 313.1103.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(2-(三氟甲基)苯氧基)乙酰胺 (5h): White solid, Yield 45 %, Mp 182~183 °C. 1H NMR (500 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 10.31(s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~6.81 (m, 8H, Ar-H), 4.78 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO_{d6}$) δ : 166.89, 162.38, 159.77, 159.68, 152.72, 142.48, 138.32, 132.91, 131.28, 131.20, 121.02, 120.49, 111.45, 111.43, 108.46, 108.29, 103.06, 102.86, 67.79. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{14}FN_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 313.1095; found: 313.1104.

Mp 168~169 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.35 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.21 (s, 1H, Triazole-H), 7.84~7.13 (m, 8H, Ar-H), 4.94 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 166.37, 156.35, 152.72, 142.48, 138.38, 134.62, 132.84, 127.32, 127.28, 125.30, 121.35, 120.60, 120.56, 117.77, 117.53, 114.26, 67.77. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 363.1063; found: 363.1074.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(3-(三氟甲基)苯氧基)乙酰胺 (5i): White solid, Yield 55 %, Mp 166~167 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.33 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~7.34 (m, 8H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 166.83, 158.57, 152.72, 142.48, 138.27, 132.94, 131.25, 121.06, 120.50, 119.27, 118.24, 118.21, 112.20, 112.16, 67.69. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 363.1063; found: 363.1067.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯基)-2-(4-(三氟甲基)苯氧基)乙酰胺 (5j): White solid, Yield 65 %, Mp 187~188 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.38 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.82~7.20 (m, 8H, Ar-H), 4.87 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 166.72, 161.15, 152.72, 142.48, 138.31, 132.91, 127.46, 127.44, 122.34, 122.09, 120.99, 120.50, 115.72, 67.50. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 363.1063; found: 363.1071.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(2-甲基苯氧基)乙酰胺 (5k): White solid, Yield 49 %, Mp 166~167 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.27 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.21 (s, 1H, Triazole-H), 7.82~6.87 (m, 8H, Ar-H), 4.75 (s, 2H, CH_2), 2.27 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 167.44, 156.51, 152.72, 142.47, 138.43, 132.83, 131.11, 127.40, 126.66, 121.44, 120.88, 120.50, 112.02, 67.92, 16.61. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 309.1346; found: 309.1355.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(3-甲基苯氧基)乙酰胺 (5l): White solid, Yield 50 %, Mp 187~188 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.29 (s, 1H, NH), 9.17 (s, 1H, Triazole-H), 8.17 (s, 1H, Triazole-H), 7.78~6.75 (m, 8H, Ar-H), 4.66 (s, 2H, CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 172.13, 163.03, 157.48, 147.22, 144.26, 143.14, 137.61, 134.49, 127.24, 125.78, 125.22, 120.70, 116.82, 72.34, 26.33. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 309.1346; found: 309.1357.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(4-甲基苯氧基)乙酰胺 (5m): White solid, Yield 68 %, Mp 196~197 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.28 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, Triazole-H), 8.22 (s, 1H, Triazole-H), 7.83~6.91 (m, 8H, Ar-H), 4.69 (s, 2H, CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 167.46, 156.17, 152.72, 142.47, 138.39, 132.84, 130.46, 130.33, 130.16, 121.00, 120.45, 115.47, 115.04, 67.80, 20.55. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 309.1346; found: 309.1354.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-4-基)苯基)-2-(2,6-二氯苯氧基)乙酰胺 (5n): White solid, Yield 55 %, Mp 169~170 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.31 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.21 (s, 1H, Triazole-H), 7.81~7.14 (m, 7H, Ar-H), 4.83 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6}) δ : 166.71, 156.31, 154.31, 152.71, 142.48, 138.33, 132.89, 124.09, 120.92, 120.52, 113.21, 113.04, 72.45. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 363.0410; found: 363.0420.

N-(4-(4*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯基)-2-(2,6-二氟苯氧基)乙酰胺 (5o): White solid, Yield 53 %, Mp 153~154 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) δ : 10.32 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, Triazole-H), 8.21 (s, 1H, Triazole-H), 7.81~7.15 (m, 7H, Ar-H), 4.83 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO_{d6})

δ : 166.72, 156.26, 154.35, 152.71, 142.48, 138.33, 134.97, 132.88, 124.09, 120.91, 120.52, 113.22, 113.04, 72.44. ESI-HRMS calcd for $C_{16}H_{13}Cl_2N_4O_2^+$ ($[M+H]^+$): 331.1001; found: 331.1012.

2.3 药理活性测定^[22-25]

采用昆明小鼠(18~22 g)和 Wistar 大鼠(280~300 g)进行动物实验。实验前大、小鼠的饲养温度:20~25 °C,湿度:45%~65%,除了实验外其余时间可以自由饮水和进食。所有动物实验使用已经过聊城大学实验动物伦理委员会同意(No. AP2024022942)。0.9% NaCl 和 DMSO 溶解测试化合物,采用腹腔或皮下方式给药。

MES 实验方法:该方法采用美国国立卫生研究院抗癫痫药物开发程序(ADD)中描述的方法进行。小鼠癫痫发作是由 60 Hz、50 mA 强度的交变电流引起的。腹腔给药 30 min 后,采用最大电休克仪进行实验,仪器设置电压 110 V,单刺激,刺激时间 0.2 s,小鼠两耳涂抹生理盐水,然后将两只电极夹住双耳,点击开始进行电击刺激,电击后小鼠后肢出现强直性伸直,则认为该药物对模型引发的癫痫发作无效,反之如能取消其四肢强直则认为有效。

scPTZ 实验方法:腹腔注射目标化合物 0.5 h 后,将溶于生理盐水的 PTZ(注射剂量为 85 mg/kg)皮下注射到小鼠中。将实验小鼠放入单独的笼子中观察 0.5 h,记录小鼠阵挛性发作、强直性发作的次数和死亡次数。

ROT 实验方法:所有的目标化合物分别溶解在 DMSO 中,腹腔注射目标化合物 0.5 h 后,采用疲劳转棒仪,将给药的小鼠放在直径约 3.2 cm 旋转棒上,以 10 r/min 的旋转速度旋转。在每次试验中,如果动物无法在杆上保持平衡至少 1 min,则表明化合物存在神经毒性。

GABA 含量测定方法:在匀浆器中称取约 0.05 g 脑组织样品,加入 450 μ L 提取液匀浆,匀浆后转移到 EP 管中,标上液面刻度,95 °C 加热 2 h。加热后,以 8 000 $\times$ g 离心 10 min,取上清液进行测定。(1) 标准管:取 30 μ L 不同浓度的标准品加入相应的 1.5 mL EP 管中。测量管:取 30 μ L 样品上清液加入 1.5 mL EP 管中。(2) 每管加入 50 μ L 缓冲溶液和 40 μ L 显色剂 A,混匀,室温放置 5 min。(3) 每管加入 60 μ L 显色剂 B,混匀,95 °C 加热 10 min,冰浴冷却。向步骤中的每个试管中加入 200 μ L 补充液,混匀。取 200 μ L 加入酶标板相对应的孔中,在 640 nm 波长下测量各孔的 OD 值。

3 结论

以 4-(1*H*-1,2,4-三唑-1-基)苯胺为原料,设计、合成了 15 个具有有三氮唑结构片段的目标化合物,所有目标化合物均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 分析手段进行结构确认。采用 MES、scPTZ 和 ROT 动物体内实验模型对所有目标化合物进行了抗癫痫活性、神经毒性初筛,并定量评价了潜在化合物的抗癫痫活性,获得了具有潜在抗癫痫活性的化合物 5o。化合物 5o 在 MES 和 scPTZ 实验中的 ED_{50} 值分别为 45.6 和 63.9 mg/kg, PI 值分别为 11.5 和 8.2,安全性优于对照卡马西平和乙琥胺。GABA 含量测试结果显示,与空白组相比化合物 5o 能够显著增加大鼠脑内 GABA 的含量。分子对接结果表明,化合物 5o 与 GABA_A 受体能够形成氢键等相互作用。综上,化合物 5o 可以作为新型的抗癫痫先导化合物用于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] SHAKIRULLAH, ALI N, KHAN A, et al. The prevalence, incidence and etiology of epilepsy[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2014, 2: 29-39.
- [2] PEPI C, MERCIER M, SALIMBENE L, et al. Post-traumatic stress-disorder in epilepsy: meta-analysis of current evidence[J]. Epilepsy & Behavior, 2024, 157: 109833.
- [3] BIALER M, WHITE H S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(1): 68-82.
- [4] KALILANI L, SUN X Z, PELGRIMS B, et al. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: a systematic review and meta-analysis[J].

- Epilepsia, 2018, 59(12): 2179-2193.
- [5] HU T T, ZHANG J F, WANG J X, et al. Advances in epilepsy: mechanisms, clinical trials, and drug therapies[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2023, 66(7): 4434-4467.
- [6] FISHER R S, ACEVEDO C, ARZIMANOGLU A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy[J]. Epilepsia, 2014, 55(4): 475-482.
- [7] COPELAND L, MEEK A, KERR M, et al. Measurement of side effects of anti-epileptic drugs (AEDs) in adults with intellectual disability: a systematic review[J]. Seizure, 2017, 51: 61-73.
- [8] PARTHASARATHI V, KANAGARAJ H. A pharmacological update of triazole derivative: a review[J]. Current Topics and Medicinal Chemistry, 2024, 24(23): 2033-2049.
- [9] RAUT D, BHATT L K. Evolving targets for anti-epileptic drug discovery[J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 887: 173582.
- [10] ALMASIRAD A, MOUSAVI Z, TAJIK M, et al. Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of new methyl-imidazolyl-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles[J]. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 22: 22.
- [11] FAIDALLAH H M, GIRGIS A S, TIWARI A D, et al. Synthesis, antibacterial properties and 2D-QSAR studies of quinolone-triazole conjugates[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 143: 1524-1534.
- [12] GÜZEL E, ACAR EVIK U, EVREN A E, et al. Kaplancıklı, Synthesis of benzimidazole-1,2,4-triazole derivatives as potential antifungal agents targeting 14 α -demethylase[J]. ACS Omega, 2023, 8(4): 4369-4384.
- [13] GUAN Q W, GAO Z M, CHEN Y T, et al. Structural modification strategies of triazoles in anticancer drug development[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 275: 116578.
- [14] WANG S B, LIU H, WANG X K, et al. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of 7-phenyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-b]pyridine derivatives[J]. Archiv der Pharmazie, 2019, 352(10): 1900106.
- [15] 李光勇, 雷康, 王世本. 1,2,4-三唑类化合物在抗癫痫领域的研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2018, 31(2): 33-42.
- [16] KAPRON B, ŁUSZCZKI J J, SIWEK A, et al. Preclinical evaluation of 1,2,4-triazole-based compounds targeting voltage-gated sodium channels (VGSCs) as promising anticonvulsant drug candidates[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94: 103355.
- [17] SARI S, KAYNAK F B, DALKARA S. Synthesis and anticonvulsant screening of 1,2,4-triazole derivatives[J]. Pharmacological Reports, 2018, 70(6): 1116-1123.
- [18] ALHAMZANI A G, YOUSEF T A, ABOU-KRISHA M M, et al. Design, synthesis, molecular docking and pharmacological evaluation of novel triazine-based triazole derivatives as potential anticonvulsant agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2022, 77: 129042.
- [19] WANG S B, LIU H, WANG X K, et al. Synthesis of 1,3,4-oxadiazole derivatives with anticonvulsant activity and their binding to the GABAA receptor[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 206: 112672.
- [20] OSOLODKIN D I, CHUPAKHIN V I, PALYULIN V A, et al. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in GABA_A receptor[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2009, 27(17): 813-821.
- [21] 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.
- [22] WHITE H S, WOODHEAD J H, FRANKLIN M R, et al. General principles: experimental selection, quantification and evaluation of antiepileptic drugs[M]. New York: Raven Press, 1995.
- [23] PORTER R J, CEREGHINO J J, GLADDING G D, et al. Antiepileptic drug development program[J]. Cleveland Clinic Quarterly, 1984, 51(2): 293-305.
- [24] KING E J, ARMSTRONG A R. A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity[J]. Canadian Medical Association Journal, 1934, 31(4): 376-381.
- [25] GOKANI V N, THAKKER M U, PATEL J G, et al. Thin-layer chromatographic method for estimation of gamma-aminobutyric acid from brain[J]. Indian Journal Physiology Pharmacology, 1979, 23(2): 101-104.

(责任编辑:刘庆松)