丁苯酞-哒嗪酮衍生物的设计、合成及其抗凝活性研究

贾 镇# 张关丽# 李 毅 李 永 汤 磊 樊玲玲*

（贵州医科大学药学院 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心 贵阳 550025）

摘 要 为了提高丁苯酞的抗血小板凝集活性，以 6-氨基丁苯酞为起始原料，经重氮化/还原、环化、水解、脱氯、醚化和磺酰化反应合成了 20 个新型的丁苯酞-哒嗪酮衍生物，其结构经 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 HRMS 确证。体外抗血小板凝集活性测试结果表明，化合物 **6a**、**6b** 和 **6k** 对二磷酸腺苷（ADP）诱导的血小板凝集的抑制活性（IC_{50} = 44.9 ~ 180.0μmol/L）优于先导化合物丁苯酞（IC_{50} = 1252μmol/L）和阳性对照阿司匹林（IC_{50} = 1140μmol/L）；同时，化合物 **6b**（IC_{50} = 63.6μmol/L）和 **6k**（IC_{50} = 191.9μmol/L）对花生四烯酸（AA）诱导的血小板凝集也表现出显著的抑制活性。本研究为丁苯酞-哒嗪酮骨架在治疗缺血性脑卒中方面的研究提供了理论参考。

关键词 丁苯酞衍生物 哒嗪酮 设计 合成 血小板凝集活性

Design, Synthesis and Anticoagulant Activity of Butylphthalide-Pyridazinone Derivatives

Jia Zhen#, Zhang Guanli#, Li Yi, Li Yong, Tang Lei, Fan Lingling*

(School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guizhou Province Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang, 550025)

Abstract In order to improve the antiplatelet agglutination activity of butylphthalide, 6-aminobutylphthalide was used as the starting material, twenty novel butylphthalide-pyridazinone derivatives were synthesized by diazotization/reduction, cyclization, hydrolysis, dechlorination, etherification and sulfonation acylation. Their structures were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. The results of antiplatelet agglutination activity test in *vitro* show that compounds **6a**, **6b** and **6k** exhibite better inhibitory activity (IC_{50} = 44.9 ~ 180.0 μmol/L) against ADP-induced platelet aggregation than the lead compound butylphthalide (IC_{50} = 1252μmol/L) and positive control aspirin (IC_{50} = 1140 μmol/L). Meanwhile, compound **6b** (IC_{50} = 63.6 μmol/L) and **6k** (IC_{50} = 191.9 μmol/L) also possess significant inhibitory activity against AA-induced platelet aggregation. This study provides a theoretical reference for the study of butylphthalide-pyridazinone skeleton in the treatment of ischemic stroke.

Keywords Butylphthalide derivative, Pyridazinone, Design, Synthesis, Anti-platelet aggregation activity

脑卒中（Cerebral stroke）是由于脑部血管突然破裂或因血管阻塞导致血液不能流入大脑而引起脑组织损伤的一类疾病，临床上按照其发病诱因的不同可分为缺血性和出血性脑卒中，其中缺血性脑卒中占比为 80% ~ 85%。目前，脑卒中也是我国成人致死、致残的首位病因，且随着人口老龄化和城镇化进程的加速，脑卒中流行趋势明显，其所带来的经济负担也日益增加[1,2]。可见，对于缺血性脑卒中的预防和治疗具有重要意义。

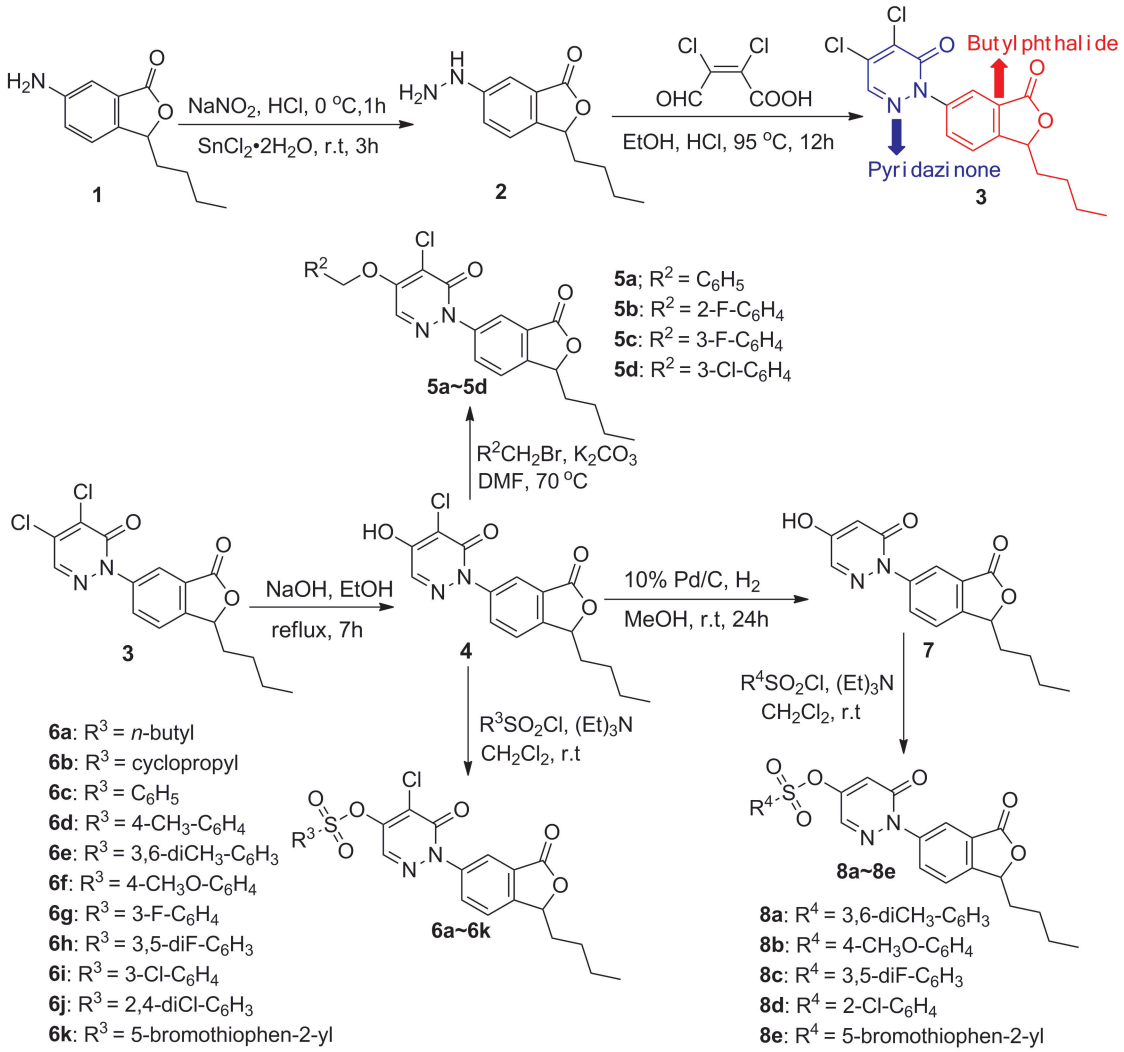
丁苯酞（Butylphthalide，NBP）是从天然食用植物芹菜籽中提取得到的活性成分，也是我国自主研发的治疗缺血性脑卒中 I 类新药。药理学研究表明丁苯酞具有保护线粒体、改善脑血管侧支循环、保护血脑屏障、抗血小板聚集等作用，但其在临床使用时总体疗效并不高，常与抗血小板凝集药物氯吡格雷、阿司匹林或神经保护药物依达

* 联系人，樊玲玲 女，博士，教授，主要从事药物化学研究，E-mail：fanling1025@126.com；#共同第一作者

国家自然科学基金项目（32060627）、贵州省科技计划项目（黔科合基础-ZK[2023]一般 309）、贵州省普通高等学校青年科技人才成长计划项目（黔教合 KY 字[2022]246 号）和贵州省 2021 年大学生创新创业训练计划项目（S202110660026）资助

2023-07-06 收稿，2023-07-30 接受

拉奉等联用协同治疗缺血性脑卒中[3,4]。哒嗪酮(Pyridazinone)因其具有抗炎镇痛、抗病毒、治疗心脑血管疾病、抗结核、神经保护等广泛的生物活性,近年来备受药物化学家的关注[5~8]。鉴于此,为了提高丁苯酞的抗血小板凝集活性,本文采用药物化学中经典的药效团拼合原理设计、合成了20 个新型的丁苯酞-哒嗪酮类衍生物(图式 1)。最后,采用 Born 氏比浊法测试了目标化合物对二磷酸腺苷(Adenonisine disphosphate,ADP)和花生四烯酸(Arachidonicacid,AA)所诱导的血小板凝集的抑制活性。期望本文可为缺血性脑卒中治疗药物的筛选提供参考。



图式 1 目标化合物 5a~5d、6a~6k 和 8a~8e 的合成路线

Scheme 1 The synthetic route of the target compounds 5a~5d, 6a~6k and 8a~8e

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

半自动血小板分析仪(北京中勤世帝生物科技技术有限责任公司);Xevo G2-XS 四极杆-飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司);X-4 显微熔点测定仪(巩义市予华仪器有限责任公司);Bruker AVANCE NEO 核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

二磷酸腺苷(ADP,99%,北京索莱宝科技有限公司);花生四烯酸(AA,98.5%,Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司);丁苯酞(98%,上海毕得医药科技股份有限公司);其他实验所用试剂均为市售分析纯级。GF254 薄层层析硅胶和 200~300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司)。动物:新西兰大白兔(购自贵州医科大学动物中心)。

1.2 化合物的合成

起始原料 6-氨基丁苯酞(**1**)的制备参照课题组前期合成方法[9]。

1.2.1 中间体 3-丁基-6-肼基异苯并吡喃-1(3*H*)-酮(**2**)的合成

将 5.0g(24.4mmol)6-氨基丁苯酞(**1**)溶于 50mL 浓盐酸和 36mL 水中,0~5℃下缓慢滴加 1.8g(25.6mmol)亚硝酸钠水溶液,TLC 检测化合物 **1** 完全生成重氮盐后,向反应液中缓慢滴加 11.0g(48.7mmol)二水合氯化亚锡的浓盐酸溶液,将反应液自然升至室温后搅拌 3h。减压抽滤后将所得滤饼溶于 50mL 二氯甲烷和 50mL 水中,快速搅拌下用 10mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 11,再用二氯甲烷(50mL×5)萃取,饱和食盐水洗涤、无水 Na_2SO_4 干燥,有机相浓缩后重结晶得白色固体化合物 **2**(4.46g,83.1%)。熔点 96~97 ℃;^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d_6)δ:7.33(d,J=9.0Hz,1H),7.13(d,J=7.4Hz,2H),5.51~5.41(m,1H),3.60(s,1H),2.05~1.91(m,1H),1.68~1.57(m,1H),1.40~1.26(m,3H),1.26~1.17(m,1H),0.86(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ:170.7,153.5,138.5,125.9,122.2,118.9,104.5,80.8,33.8,26.2,21.8,13.8;HR-MS(ESI),m/z:$C_{12}H_{17}N_2O_2$,221.1290(理论值 221.1290)[M+H]$^+$。

1.2.2 中间体 2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4,5-二氯哒嗪-3(2*H*)-酮(**3**)的合成

将 4.4g(20.0mmol)化合物 **2** 和 6.8g(40.0mmol)糠氯酸溶解在 10mL 浓盐酸和 50mL 无水乙醇中,氮气保护下回流反应 12h。将反应液冷却至室温待固体析出,抽滤、用乙醇洗涤滤饼,干燥后得 3.96g 白色固体化合物 **3**(产率 56.3%)。熔点 205~206 ℃;^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d_6)δ:8.40(s,1H),8.02(d,J=1.8Hz,1H),7.96(dd,J=8.4、1.8Hz,1H),7.85(d,J=8.4Hz,1H),5.77~5.72(m,1H),2.16~2.08(m,1H),1.81~1.72(m,1H),1.45~1.25(m,4H),0.88(t,J=7.0Hz,3H);^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ:168.9,155.7,150.0,141.5,136.7,136.0,134.0,131.8,125.9,123.2,122.1,81.3,33.2,26.4,21.8,13.7;HR-MS(ESI),m/z:$C_{16}H_{15}Cl_2N_2O_3$,353.0462(理论值 353.0460)[M+H]$^+$。

1.2.3 中间体 2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-氯-5-羟基哒嗪-3(2*H*)-酮(**4**)的合成

将 3.0g(8.5mmol)化合物 **3** 和 2.7g(48.1mmol)KOH 溶于 30mL 无水乙醇,氮气保护下回流反应 7h。待反应液冷却至室温后加入 50mL 水稀释,用 6mol/L 的 HCl 调节 pH=1 后有固体产物析出,抽滤、洗涤,滤饼用乙醇重结晶得 1.45g 白色固体化合物 **4**(产率 51.2%)。熔点 216~218 ℃;^{1}H NMR(600 MHz,DMSO-d_6)δ:12.56(s,1H,OH),8.00(s,1H),7.97(s,1H),7.92(d,J=8.4Hz,1H),7.81(d,J=8.4Hz,1H),5.73~5.71(m,1H),2.11~2.09(m,1H),1.77~1.73(m,1H),1.37~1.29(m,4H),0.89(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ:169.6,158.4,155.3,149.9,142.5,133.0,132.3,126.2,123.4,122.5,112.5,81.7,33.8,26.9,22.3,14.2;HR-MS(ESI),m/z:$C_{16}H_{16}ClN_2O_4$,335.0796(理论值 335.0799)[M+H]$^+$。

1.2.4 中间体 2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-羟基哒嗪-3(2*H*)-酮(**7**)的合成

将 1.0g(3.0mmol)化合物 **4**、150mg 10% Pd-C 和 2mL 三乙胺溶于 10mL 无水乙醇中,氢气保护下室温反应 24h。TLC 监测反应完毕,硅藻土抽滤,旋干滤液后加入 15mL 水,乙酸乙酯(30mL×3)萃取、饱和食盐水洗涤、无水 Na_2SO_4 干燥,有机相浓缩后用乙醇重结晶得 400mg 白色固体化合物 **7**(产率 44.6%)。熔点 208~209 ℃;^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d_6)δ:11.78(s,1H),7.96(d,J=2.0Hz,1H),7.93(dd,J=8.2、2.0Hz,1H),7.88(d,J=3.0Hz,1H),7.78(d,J=8.2Hz,1H),6.12(d,J=2.4Hz,1H),5.75~5.67(m,1H),2.17~2.05(m,1H),1.81~1.69(m,1H),1.44~1.25(m,4H),0.88(t,J=7.1Hz,3H);^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ:169.2,160.8,159.2,148.9,142.0,134.4,131.5,125.7,122.9,121.5,105.1,81.2,33.3,26.4,21.8,13.8;HR-MS(ESI),m/z:$C_{16}H_{17}N_2O_4$,301.1187(理论值 301.1188)[M+H]$^+$。

1.2.5 化合物 **5a~5d** 的合成

将 100mg(0.30mmol)化合物 **4**、取代苄溴(0.31mmol)和碳酸钾(0.38mmol)溶于 0.75mL DMF 中,氮气保护下 70℃反应。TLC 监测反应完毕,加入 20mL 乙酸乙酯,10mL 饱和 NH_4Cl 溶液洗涤、无水 Na_2SO_4 干燥,有机相浓缩后经硅胶柱层析分离纯化得化合物 **5a~5d**。

5-(苄氧基)-2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-氯哒嗪-3(2*H*)-酮(**5a**):产率

81.3%,白色固体,熔点 183~185 ℃,HPLC 纯度 98.4%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.06(d,J=2.4Hz,1H),7.98~7.96 (m,2H),7.51(d,J=8.4Hz,1H),7.47~7.40(m,5H),5.53~5.48(m,1H),5.43(s,2H),2.11~2.01(m,1H),1.84~1.75(m,1H),1.55~1.31(m,4H),0.91(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,DMSO-d_6)δ:169.0,157.5,154.5,149.7,141.8,135.2,131.8,129.7,128.7,128.6,127.8,125.8,123.1,122.0,115.4,81.2,71.9,33.2,26.4,21.8,13.7;HR-MS(ESI),m/z:$C_{23}H_{22}ClN_2O_4$,425.1269 (理论值 425.1268) [M+H]$^+$。

2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-氯-5-(2-氟苄氧基)哒嗪-3(2H)-酮(**5b**):产率 58.8%,白色固体,熔点 172~174 ℃,HPLC 纯度 97.2%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.08(d,J=1.8Hz,1H),8.02(s,1H),7.91(dd,J=7.8、2.4Hz,1H),7.54~7.51(m,2H),7.42~7.39(m,1H),7.25~7.23(m,1H),7.17~7.13(m,1H),5.52~5.50(m,1H),5.48(s,2H),2.08~2.03(m,1H),1.82~1.77(m,1H),1.49~1.37(m,4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ:169.4,161.2,159.5,158.2,154.0,149.6,142.1,131.1,129.7,128.9,127.1,124.8,122.6,122.0,121.6,118.8,115.9,81.4,66.3,34.4,26.9,22.4,13.8;HR-MS(ESI),m/z:$C_{23}H_{21}ClFN_2O_4$,443.1169 (理论值 443.1174) [M+H]$^+$。

2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-氯-5-(3-氟苄氧基)哒嗪-3(2H)-酮(**5c**):产率 62.5%,白色固体,熔点 164~166 ℃,HPLC 纯度 98.0%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.06(d,J=2.4Hz,1H),7.98(dd,J=7.8、1.8Hz,1H),7.95(s,1H),7.52(d,J=8.4Hz,1H),7.44~7.40(m,1H),7.23(d,J=7.8Hz,1H),7.18(d,J=7.8Hz,1H),7.11~7.08(m,1H),5.52~5.50(m,1H),5.42(s,2H),2.08~2.03(m,1H),1.82~1.76(m,1H),1.51~1.35(m,4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ:169.4,163.9,162.3,158.2,154.0,149.6,142.1,136.8,131.0,130.9,128.8,127.2,122.6,122.1,118.8,116.2,114.2,81.4,71.5,34.4,26.9,22.4,13.8;HR-MS(ESI),m/z:$C_{23}H_{21}ClFN_2O_4$,443.1170(理论值 443.1174) [M+H]$^+$。

2-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-氯-5-(3-氯代苄氧基)哒嗪-3(2H)-酮(**5d**):产率 56.7%,白色固体,熔点 165~167 ℃,HPLC 纯度 97.5%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.07(d,J=1.8Hz,1H),7.98(dd,J=8.4、2.4Hz,1H),7.95(s,1H),7.52(d,J=8.4Hz,1H),7.45(s,1H),7.38~7.33(m,3H),5.52~5.50 (m,1H),5.39(s,2H),2.09~2.03(m,1H),1.82~1.75(m,1H),1.56~1.32(m,4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ:169.4,158.2,153.9,149.6,142.0,136.3,135.1,130.9,130.4,129.3,128.8,127.2,127.1,125.2,122.5,122.0,118.8,81.4,71.5,34.3,26.9,22.4,13.8;HR-MS(ESI),m/z:$C_{23}H_{21}Cl_2N_2O_4$,459.0878(理论值 459.0878) [M+H]$^+$。

1.2.6 化合物 **6a~6k** 和 **8a~8e** 的合成

将化合物 **4** 或 **7**(0.3mmol)、取代磺酰氯(0.36mmol)和三乙胺(0.36mmol)溶解于 2mL 二氯甲烷中,室温搅拌至反应完全。直接将反应液浓缩后硅胶柱层析分离纯化得化合物 **6a~6k** 和 **8a~8e**。

丁磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6a**):产率 49.7%,白色固体,熔点 118~119 ℃,HPLC 纯度 98.1%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.16(s,1H),8.13(d,J=1.8Hz,1H),7.96(dd,J=8.4、2.4Hz,1H),7.56(d,J=8.4Hz,1H),5.54~5.52(m,1H),3.52~3.49(m,2H),2.09~2.05(m,3H),1.86~1.78(m,1H),1.61~1.37(m,6H),1.04(t,J=7.2Hz,3H),0.94(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ:169.3,157.6,150.1,146.5,141.7,133.8,130.8,127.7,127.3,122.7,122.3,81.4,53.3,34.4,26.9,25.4,22.4,21.4,13.8,13.4;HR-MS(ESI),m/z:$C_{20}H_{23}ClN_2O_6SNa$,477.0860(理论值 477.0863) [M+Na]$^+$。

环丙磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代-哒嗪-4-基酯(**6b**):产率 67.7%,白色油状物,HPLC 纯度 96.9%;^{1}H NMR (600 MHz,$CDCl_3$) δ:8.15(s,1H),8.13(d,J=1.8Hz,1H),7.97(dd,J=8.4、1.8Hz,1H),7.57(d,J=8.4Hz,1H),5.54~5.52 (m,1H),2.90~2.86(m,1H),2.10~2.03(m,1H),1.87~1.76(m,1H),1.56~1.32(m,8H),0.93(t,J=7.2Hz,

3H)；^{13}C NMR(151MHz,$CDCl_3$) δ:163.3,151.6,144.1,140.8,135.7,128.0,124.8,122.1,121.3,116.7,116.3,75.4,28.4,24.2,20.9,16.4,7.8,1.4；HR-MS (ESI), *m/z*: $C_{19}H_{20}ClN_2O_6S$,439.0731(理论值 439.0729)[M+H]$^+$。

苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6c**)：产率 55.7%,白色固体,熔点 44~45 ℃,HPLC 纯度 97.0%；^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.12~8.11(m,2H),8.04~8.03(m,2H),7.96(dd,*J*=8.4、1.8Hz,1H),7.82~7.79(m,1H),7.67~7.64(m,2H),7.55(d,*J*=2.4Hz,1H),5.54~5.52(m,1H),2.10~2.04(m,1H),1.84~1.77(m,1H),1.52~1.35(m,4H),0.93(t,3H,*J*=7.2Hz)；^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.2,165.3,157.6,149.9,146.6,141.6,134.1,131.0,130.7,128.4,127.2,125.6,122.6,122.2,115.0,81.4,55.9,34.3,26.8,22.4,13.8；HR-MS (ESI), *m/z*: $C_{22}H_{20}ClN_2O_6S$,475.0723(理论值 475.0731)[M+H]$^+$。

4-甲基苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6d**)：产率 32.7%,白色固体,熔点 51~52 ℃,HPLC 纯度 98.0%；^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$) δ:8.12~8.11(m,2H),7.95(dd,*J*=8.4、1.8Hz,1H),7.90(d,*J*=8.4Hz,2H),7.55(d,*J*=7.8Hz,1H),7.44(d,*J*=8.4Hz,2H),5.53~5.51(m,1H),2.51(s,3H,CH_3),2.06~2.04(m,1H),1.81~1.78(m,1H),1.50~1.37(m,4H),0.93(t,*J*=7.2Hz,3H)；^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.7,147.3,142.9,137.0,133.1,127.8,123.1,117.9,117.2,116.9,81.5,34.3,26.9,22.3,13.8;HR-MS (ESI),*m/z*: $C_{23}H_{22}ClN_2O_6S$,489.0880(理论值 489.0887)[M+H]$^+$。

3,6-二甲基苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6e**)：产率 50%,白色固体,熔点 45~46 ℃,HPLC 纯度 97.8%；^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.11(d,*J*=1.8Hz,1H),8.09(s,1H),7.95(dd,*J*=8.4、1.8Hz,1H),7.78(s,1H),7.54(d,*J*=8.4Hz,1H),7.45~7.43(m,1H),7.35(d,*J*=7.8Hz,1H),5.53~5.51(m,1H),2.78(s,3H,CH_3),2.40(s,3H,CH_3),2.09~2.04(m,1H),1.83~1.77(m,1H),1.49~1.33(m,4H),0.93(t,*J*=7.2Hz,3H)；^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.2,157.6,149.9,146.7,141.6,136.9,136.4,136.3,133.9,133.5,133.2,130.7,130.4,128.1,127.2,122.6,122.2,81.4,34.3,26.8,22.4,20.8,20.2,13.8；HR-MS (ESI), *m/z*: $C_{24}H_{24}ClN_2O_6S$,503.1041(理论值 503.1044)[M+H]$^+$。

4-甲氧基苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6f**)：产率 48.2%,白色固体,熔点 133~134 ℃,HPLC 纯度 98.2%；^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.13(s,1H),8.12(d,*J*=2.4Hz,1H),7.96~7.93(m,3H),7.55(d,*J*=8.4Hz,1H),7.07~7.06(m,2H),5.53~5.51(m,1H),3.93(s,3H),2.09~2.04(m,1H),1.84~1.77(m,1H),1.51~1.37(m,4H),0.93(t,*J*=7.2Hz,3H)；^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.2,157.5,150.0,146.5,141.6,135.7,134.8,133.9,130.7,129.9,128.6,128.5,127.2,122.6,122.2,81.4,34.3,26.8,22.4,13.8;HR-MS (ESI),m/z: $C_{23}H_{22}ClN_2O_7S$,505.0831(理论值 505.0836)[M+H]$^+$。

3-氟苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6g**)：产率 75.7%,白色油状物,HPLC 纯度 97.9%；^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.09(d,*J*=1.8Hz,1H),8.05~8.03(m,2H),7.94(dd,*J*=8.4、1.8Hz,1H),7.83(d,*J*=2.4Hz,1H),7.53(d,*J*=7.8Hz,1H),7.35(t,*J*=7.8Hz,2H),5.52~5.50(m,1H),2.08~2.03(m,1H),1.80~1.77(m,1H),1.59~1.36(m,4H),0.93(t,*J*=7.2Hz,3H)；^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.2,157.4,150.1,146.4,142.9,141.5,135.0,133.7,132.9,132.6,132.0,130.7,128.5,128.0,127.3,122.6,122.3,81.4,34.3,26.9,22.4,13.8；HR-MS (ESI), *m/z*: $C_{22}H_{19}ClFN_2O_6S$,493.0644(理论值 493.0636)[M+H]$^+$。

3,5-二氟苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6h**)：产率 63.8%,白色固体,熔点 39~40 ℃,HPLC 纯度 97.5%；^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.13~8.12(m,2H),7.96(dd,*J*=7.8、2.4Hz,1H),7.61~7.59(m,2H),7.56(d,*J*=8.4Hz,1H),7.28~7.25(m,1H),5.54~5.52(m,1H),2.09~2.04(m,1H),1.83~1.79(m,1H),1.50~1.36(m,

4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ: 169.1, 163.8, 162.1, 157.3, 150.1, 146.1,141.5,137.6,133.5,130.7,128.7,127.3, 122.6, 112.5, 111.7, 81.42, 34.3, 26.9, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{22}H_{18}ClF_2N_2O_6S$, 511.0539 (理论值 511.0542) [M+H]$^+$。

3-氯苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6i**):产率 61.4%,白色固体,熔点 43~44 ℃,HPLC 纯度 96.7%;^{1}H NMR (600 MHz,$CDCl_3$) δ:8.13~8.12 (m,2H),8.04(t,J=1.8Hz,1H),7.96(dd,J=7.8、1.8Hz,1H),7.93~7.91(m,1H),7.78~7.76 (m,1H),7.62(t,J=7.8Hz,1H),7.56~7.54(m, 1H),5.54~5.52(m,1H),2.10~2.04(m,1H), 1.84~1.78(m,1H),1.49~1.39(m,4H),0.93 (t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ: 169.2,157.4,150.1,146.3,141.6,136.4,136.2, 135.8,133.7,131.1,130.7,128.6,128.5,127.3, 126.6, 122.6, 122.3, 81.4, 34.3, 26.8, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{22}H_{19}Cl_2N_2O_6S$, 509.0342 (理论值 509.0341) [M+H]$^+$。

2,4-二氯苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6j**):产率 27.7%,白色油状物,HPLC 纯度 98.0%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$) δ:8.13(s,1H),8.11(d, J=7.8Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 8.4、1.8Hz, 1H), 7.70 (d, J = 1.8Hz, 1H),7.55(d,J=8.4Hz,1H),7.50(dd,J=8.4、1.8Hz,1H),5.54~5.52(m,1H),2.09~2.04(m, 1H), 1.81~1.78(m,1H),1.48~1.38(m,4H), 0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$) δ:169.2,157.4,150.1,146.4,142.9,141.5,135.0, 133.7, 132.9, 132.6, 132.0, 130.7, 128.5, 128.0, 127.3,122.6,122.3,81.4,34.3,26.9,22.4,13.8; HR-MS(ESI),m/z: $C_{22}H_{18}Cl_3N_2O_6S$, 542.9948(理论值 542.9951) [M+H]$^+$。

5-溴噻吩-2-磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-5-氯-6-氧代哒嗪-4-基酯(**6k**):产率 75.8%,白色固体,熔点 132~133 ℃,HPLC 纯度 96.8%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.13~8.11(m,2H),7.97(dd,J=7.8、2.4Hz,1H),7.63 (d,J=4.2Hz,1H),7.56(d,J=8.4Hz,1H),7.22 (d,J=3.6Hz,1H),5.54~5.52(m,1H),2.10~2.04(m,1H),1.84~1.78(m,1H),1.50~1.33 (m, 4H), 0.93 (t, J = 7.2Hz, 3H);^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ:169.2,157.4,150.1,146.2, 141.6,137.0,134.0,133.7,131.4,130.7,128.9, 127.3, 125.7, 122.6, 122.3, 81.4, 34.3, 26.9, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{20}H_{17}BrClN_2O_6S$, 558.9403 (理论值 558.9400) [M+H]$^+$。

3,6-二甲基苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-6-氧代哒嗪-4-基酯(**8a**):产率 70.8%,白色油状物,HPLC 纯度 97.5%;^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ:8.08(d,J=1.8Hz, 1H),7.93(dd,J=8.4、1.8Hz,1H),7.85(d,J=2.4Hz,1H),7.81(s,1H),7.52(d,J=7.8Hz, 1H),7.44(d,J=7.8Hz,1H),7.35(d,J=7.8Hz, 1H),6.71(d,J=2.4Hz,1H),5.52~5.50(m, 1H),2.71(s,3H),2.41(s,3H),2.07~2.02(m, 1H),1.81~1.76(m,1H),1.50~1.36(m,4H), 0.92(t, J = 7.2Hz, 3H);^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ: 169.4, 160.0, 150.9, 149.7, 141.5, 137.1,136.2,135.7,133.8,133.1,132.9,130.8, 130.7, 127.1, 122.5, 122.1, 118.3, 81.4, 34.3, 26.9,22.4,20.8,19.9,13.8;HR-MS(ESI),m/z: $C_{24}H_{25}N_2O_6S$,469.1434(理论值 469.1433) [M+H]$^+$。

4-甲氧基苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-6-氧代哒嗪-4-基酯(**8b**):产率 38.3%,白色固体,熔点 160-162 ℃,HPLC 纯度 98.1%;^{1}H NMR (600MHz,$CDCl_3$)δ:8.08(d,J=2.4Hz,1H),7.94~7.90(m,3H),7.82(d,J=3.0Hz,1H),7.53(d,J=7.8Hz,1H),7.08(d,J=9.0Hz,2H),6.73(d,J=3.0Hz,1H),5.52~5.50 (m,1H),3.93(s,3H),2.07~2.04(m,1H),1.81~1.78(m,1H),1.49~1.36(m,4H),0.93(t,J=7.2Hz,3H);^{13}C NMR (151MHz,$CDCl_3$)δ:169.4, 165.2,160.1,151.0,149.7,141.6,134.1,130.9, 130.9,127.2,125.3,122.6,122.2,118.5,115.1, 81.4, 56.0, 34.4, 26.9, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{23}H_{23}N_2O_7S$, 471.1228 (理论值 471.1226) [M+H]$^+$。

3,5-二氟苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-6-氧代哒嗪-4-基酯(**8c**):产率 45.4%,白色固体,熔点 154~155 ℃,HPLC 纯度 98.2%;^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$)δ:8.10(d,J=1.8Hz,1H),7.95(dd,J=8.4、2.4Hz,1H),7.86

(d, J=3.0Hz, 1H), 7.57~7.55(m, 2H), 7.54(d, J=8.4Hz, 1H), 7.28~7.24(m, 1H), 6.80(d, J=3.0Hz, 1H), 5.55~5.48(m, 1H), 2.11~2.03(m, 1H), 1.85~1.76(m, 1H), 1.56~1.33(m, 4H), 0.92(t, J=7.2Hz, 3H); ^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ: 169.3, 163.8, 162.2, 159.7, 150.3, 141.5, 137.4, 133.3, 130.7, 127.2, 122.5, 122.2, 118.9, 112.1, 111.4, 81.4, 34.4, 26.9, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{22}H_{19}F_2N_2O_6S$, 477.0936(理论值 477.0932) $[M+H]^+$。

2-氯苯磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-6-氧代哒嗪-4-基酯(**8d**):产率 65%,白色固体,熔点 104-106 ℃,HPLC 纯度 96.9%; ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.09 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.00(t, J=1.8Hz, 1H), 7.94(dd, J=8.4、1.8Hz, 1H), 7.90(d, J=7.8Hz, 1H), 7.84 (d, J=3.0Hz, 1H), 7.77 (dd, J=8.4、1.2Hz, 1H), 7.63(t, J=7.8Hz, 1H), 7.53(d, J=8.4Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.4Hz, 1H), 5.52~5.50 (m, 1H), 2.09~2.03 (m, 1H), 1.82~1.77 (m, 1H), 1.51~1.36 (m, 4H), 0.93 (t, J=7.2Hz, 3H); ^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ: 169.4, 159.8, 150.5, 149.8, 141.5, 136.3, 136.0, 135.7, 133.6, 131.1, 130.8, 128.3, 127.2, 126.5, 122.5, 122.2, 118.7, 81.4, 34.3, 26.8, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{22}H_{20}ClN_2O_6SNa$, 497.0552 (理论值 497.0550) $[M+H]^+$。

5-溴噻吩-2-磺酸-1-(1-丁基-3-氧代-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-6-氧代哒嗪-4-基酯(**8e**):产率 50.5%,白色固体,熔点 172~173 ℃,HPLC 纯度 98.3%; ^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ: 8.10 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.95 (dd, J=8.4、2.4 Hz, 1H), 7.87 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.62(d, J=3.6Hz, 1H), 7.54 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.22(d, J=3.6Hz, 1H), 6.83 (d, J=2.4Hz, 1H), 5.55~5.50(m, 1H), 2.11~2.02(m, 1H), 1.85~1.76(m, 1H), 1.54~1.34 (m, 4H), 0.92 (t, J=7.2Hz, 3H); ^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$) δ: 169.4, 159.8, 150.6, 149.8, 141.5, 137.0, 133.7, 133.6, 131.3, 130.8, 127.2, 125.3, 122.6, 122.2, 118.8, 81.4, 34.4, 26.9, 22.4, 13.8; HR-MS (ESI), m/z: $C_{20}H_{18}BrN_2O_6S_2$, 524.9746 (理论值 524.9741) $[M+H]^+$。

1.3 体外抗血小板凝集活性测试[10,11]

采用 Born 氏比浊法测试目标化合物对二磷酸腺苷(ADP)和花生四烯酸(AA)诱导的家兔血小板聚集的抑制活性。家兔心脏取血,用体积分数 3.8%枸橼酸钠 1∶9抗凝,以 1000r/min 离心 10min,制备富血小板血浆(PRP),剩余部分以 3000r/min 离心 15min,制备贫血小板血浆(PPP)。将所测试化合物用 DMSO 溶解后配制成不同浓度梯度备用。按比浊法进行血小板聚集活性试验。测定管中加入 PRP 248μL 和不同浓度的受试化合物 2μL,空白组加入 2μL DMSO 溶液,温孵 5min,再加入 ADP(终浓度 40μmol/L)或 AA(终浓度 500μmol/L)10μL 为诱导剂,观察记录 5min 内最大血小板聚集率,每个浓度平行测定 5 次,并取其平均值。利用 Graphpad prism 6.07 求出目标化合物对血小板聚集的半数抑制浓度(IC_{50})。阳性对照组为丁苯酞和阿司匹林。

2 结果与讨论

20 个目标化合物对 ADP 和 AA 诱导的血小板聚集的抑制活性如表 1 所示。从表中可以看出与先导化合物丁苯酞及阳性对照阿司匹林相比较,化合物 **6a**(IC_{50} = 180.0μmol/L)、**6b**(IC_{50} = 44.9μmol/L)和 **6k**(IC_{50} = 79.0μmol/L)对 ADP 诱导的血小板凝集的抑制活性显著优于丁苯酞(IC_{50} = 1252μmol/L)和阿司匹林(IC_{50} = 1140μmol/L),而化合物 **6f**、**6g**、**6j**、**8c** 和 **8e** 的 IC_{50} 为 709.5~963.0μmol/L,活性略高于丁苯酞与阿司匹林。对于花生四烯酸(AA)所诱导的血小板凝集,仅化合物 **6b**(IC_{50} = 63.6 μmol/L)表现出与阿司匹林(IC_{50} = 75.2μmol/L)相当的抑制活性,而化合物 **6k** 的活性(IC_{50} = 191.9μmol/L)优于先导化合物丁苯酞(IC_{50} = 262.5μmol/L)。总体而言,在所制备的目标化合物中,化合物 **6b** 和 **6k** 对 ADP 和 AA 诱导的血小板聚集均有优异的抑制活性,具有进一步研究价值。

初步构效关系研究表明:(1)在丁苯酞-哒嗪酮骨架中引入醚键所制备的化合物活性低于含有磺酸酯结构的衍生物(**5a~5d** *vs* **6a~6k**);(2)将哒嗪酮结构中的氯原子去掉后其抗血小板凝集活性相对减弱(**6f** *vs* **8a**, **6k** *vs* **8e**);(3)在哒嗪酮结构中引入环丙烷磺酸酯结构(**6c**)后其抗血小板凝集活性大幅度提高。此研究结果为后期该类化合物的结构优化指明了方向。

表 1 化合物体外抗血小板凝集半数有效抑制浓度 (IC_{50}/(μmol/L))

Tab. 1 Values of target compounds against platelet aggregation *in vitro* (IC_{50}/(μmol/L))

化合物	抗血小板凝集 IC_{50}		化合物	抗血小板凝集 IC_{50}	
	ADP	AA		ADP	AA
丁苯酞	1252	262.5	**6f**	802.4	454.3
阿司匹林	1140	75.2	**6g**	963.0	>1200
5a	>1200	>1200	**6h**	>1200	951.1
5b	>1200	>1200	**6i**	>1200	>1200
5c	>1200	>1200	**6j**	709.5	754.4
5d	>1200	>1200	**6k**	**79.0**	**191.9**
6a	**180.0**	804.6	**8a**	>1200	>1200
6b	**44.9**	**63.6**	**8b**	>1200	>1200
6c	>1200	485.1	**8c**	753.1	545.0
6d	>1200	962.5	**8d**	>1200	>1200
6e	>1200	439.8	**8e**	805.0	>1200

3 结论

本文根据药物化学中的药效团拼合原理设计、合成了 20 个新型的丁苯酞-哒嗪酮衍生物,采用 Born 比浊法分别测试了目标化合物对 ADP 和 AA 所诱导的血小板凝集的抑制活性。实验结果表明,化合物 **6a**、**6b** 和 **6k** 对 ADP 诱导的血小板凝集的抑制活性优于先导化合物丁苯酞和临床常用抗血小板凝集药物阿司匹林,其中化合物 **6b** 和 **6k** 对 AA 诱导的血小板凝集也表现出显著的抑制活性,可作为潜在的治疗缺血性脑卒中的候选化合物进行深入研究。初步构效关系研究表明在丁苯酞骨架中引入含有氯原子和磺酸酯结构的哒嗪酮骨架可显著提高其抗血小板凝集活性。因此,本论文为丁苯酞-哒嗪酮骨架在治疗缺血性脑卒中方面的研究提供了一定的理论参考。

参 考 文 献

[1] Feigin V L, Brainin M, Norrving B, et al. Int. J. Stroke., 2022, 17(1): 18~29.

[2] 王拥军, 熊云云, 李子孝, 等. 中国卒中杂志, 2022, 17(01): 1~20.

[3] 蔡文娟, 姜静, 王丽芳, 等. 临床合理用药, 2023, 16(15): 52~54.

[4] 司肖曼, 李富慧. 临床医学工程, 2023, 30(05): 621~622.

[5] Akhtar W, Shaquiquzzaman M, Akhter M, et al. Eur. J. Med. Chem., 2016, 123 (47): 256~281.

[6] 宋琰, 仓婕, 孟蕾, 等. 药学实践杂志, 2014, 32(02): 107~109.

[7] 王曙东, 陈兴东, 赵庆杰, 等. 药学实践杂志, 2011, 29(05): 362~365.

[8] 王祥智, 覃军, 刘毅敏, 等. 化学研究, 2006, 1: 65~67.

[9] Li Y, Luo Z F, Luo B L, et al. Chem. Biodivers., 2020, 17: e2000435.

[10] 罗碧兰, 刘自兵, 李毅, 等. 化学试剂, 2020, 42(06): 636~640.

[11] 樊玲玲, 李毅, 罗碧兰, 等. 化学通报, 2019, 82(02): 128~132.