

• 实验研究 •

吡唑并嘧啶类化合物的合成及其催眠作用的研究

张 帅¹, 黄荣清^{2*}

1. 淄博市技师学院, 山东 淄博 255000

2. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850

摘 要: **目的** 设计并合成吡唑并嘧啶类化合物, 并对其催眠作用进行研究。**方法** 以乙酰类衍生物和 *N,N*-二甲基甲酰胺二甲基缩醛为起始原料, 再与 3-氨基-4-氰基吡唑反应制备一系列吡唑并嘧啶类化合物; 分别对阈下剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用和阈上剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用进行研究。**结果** 设计并合成了 7 个目标化合物, 其结构经 ¹H-NMR 和 ESI-MS 确证。阈下剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用研究表明化合物 AL-5、AL-7 有一定的协同戊巴比妥钠的催眠作用 ($P < 0.05$), 化合物 AL-1、AL-3 具有明显的催眠作用 ($P < 0.01$)。阈上剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用研究表明 AL-1、AL-3、AL-5 和 AL-7 组的睡眠持续时间均显著延长 ($P < 0.01, 0.05$), 表明这些化合物有镇静催眠的效果。**结论** 改进了吡唑并嘧啶类化合物的合成工艺, 操作简单、成本低、产率较高; 通过小鼠的行为学观察法对化合物的药效做了初步的评价, 为今后的合成研究提供了方向。

关键词: 吡唑并嘧啶类化合物; 非苯二氮草类; 镇静催眠; 合成工艺; 催眠作用

中图分类号: R914.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2018)05-1009-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.05.001

Synthesis of pyrazolopyrimidine derivatives and their hypnotic activities

ZHANG Shuai¹, HUANG Rong-qing²

1. Zibo Technician College, Zibo 255000, China

2. Institute of Radiation and Radiation Medicine, Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To design and synthesize pyrazolopyrimidine derivatives, and to study their hypnotic activities. **Methods** Ethyl ketone derivatives and *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal were used as the starting material, and reacted with 3-aminopyrazole-4-carbonitrile to synthesize the target compounds. The hypnotic activities of subliminal dose and threshold dose of pentobarbital sodium in mice were studied. **Results** Seven targeted compounds were designed and synthesized, and their chemical structures were confirmed by ¹H-NMR and ESI-MS. The study on hypnotic activities of subliminal dose of pentobarbital sodium in mice showed that compounds AL-5 and AL-7 had cooperated with the hypnotic effect of pentobarbital sodium ($P < 0.05$). And compounds AL-1 and AL-3 had the significant hypnotic activities ($P < 0.01$). The study on hypnotic activities of threshold dose of pentobarbital sodium in mice showed that sleep duration in AL-1, AL-3, AL-5, and AL-7 groups were significantly prolonged ($P < 0.05, 0.01$), indicating these compounds had the hypnotic activities. **Conclusion** This study improves the synthesis process of pyrazolopyrimidine derivatives with simple operation, low cost, and high yield. And the pharmacodynamics of these compounds are preliminary evaluated through the behavioral observation method of mice, and to provide the direction for future synthesis research.

Key words: pyrazolopyrimidine derivatives; non-benzodiazepines; sedative hypnotic; synthesis process; hypnotic activities

失眠是指睡眠的发生和(或)维持发生障碍导致睡眠缺失, 睡眠质量不能满足个体的生理需要, 加之对睡眠所持心态的影响, 导致白日疲乏、犯困、萎靡等一系列神经精神症状^[1]。近年来, 因失眠患

收稿日期: 2018-01-10

作者简介: 张 帅 (1988—), 研究方向为新药质量标准。E-mail: xhd0526@126.com

*通信作者 黄荣清 (1965—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为新药质量标准研究。E-mail: huangrq@tom.com

者以及抑郁症患者的不断增加,镇静催眠药市场也日趋火热起来。茚地普隆为第3代非苯二氮草类药物,在国内,此类药物以进口为主。因此,通过开发本品可以降低失眠症患者的用药金额,使广大患者在治疗失眠症时将有更多的选择,经济负担也会相对减轻,必将带来巨大的社会效益和经济效益。本研究的主要内容为茚地普隆衍生物吡唑并嘧啶类的化合物合成以及药理活性筛选,药理实验方法中常利用药物与戊巴比妥钠的协同作用^[2],来考察药物的镇静催眠作用。测试时间对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的实验结果有显著性影响^[3]。通过对合成条件的研究,讨论不同的反应条件对合成的影响,以期找出一条可行的、具有经济效益和环保效应的合成路线,以达到提高转化率,改进品质的目的;通过对小鼠的行为学观察药理活性实验,筛选出药理活性较好的化合物,能够更好的把握合成研究的方向。

1 仪器与试药

BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); EPS-2001 电子天平(长沙湘平科技发展有限公司); YRT-3 熔点仪; Varian Unity Inova 400 核磁共振仪(美国 Varian 公司); Agilent 1260-6410 三重四级杆液-质联用色谱仪; 对硝基苯乙酮(上海有朋化工有限公司,质量分数 98%); 3-乙酰氨基苯乙酮(国药集团化学试剂有限公司,质量分数 98%); 对甲氧基苯乙酮(北京偶合科技有限公司,质量分数 97%); 苯乙酮(国药集团化学试剂有限公司,质量分数 98%); 对氯苯乙酮、2-乙酰吡嗪、2-乙酰噻吩、3-氨基-4-氰基吡唑均由北京偶合科技有限公司提供,质量分数均为 99%; 0.9%生理盐水、阳性对照药茚地普隆(军事医学科学院); ICR 小鼠,体质量 18~22 g,雄性,清洁级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 合成研究

2.1.1 β -二甲基氨基-1-(对硝基苯基)-2-丙烯-1-酮(B-1)的合成^[4] 在 100 mL 三口瓶中,放入对硝基苯乙酮(A-1, 4.95 g, 0.03 mol)和 *N,N*-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(DMF-DMA, 10.7 g, 0.09 mol),搅拌混合,通入氮气,油浴中 110~130 °C 回流 4.5 h,反应完毕后减压浓缩,析出固体。用二氯甲烷-乙醚(1:10) 120 mL 研洗,滤过得橙色结晶,干燥

后称重 5.2 g,产率 78.8%。

2.1.2 [7-(4-硝基苯基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶(AL-1)的合成 在 100 mL 三口瓶中,放入化合物 B-1 (1.8 g, 0.008 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (1.62 g, 0.015 mol), 加入冰醋酸 50 mL, 搅拌混合, 通入氮气, 油浴加热回流 1.5 h, 反应完毕, 放冷, 用二氯甲烷-正己烷(1:1)的混合溶液洗涤, 滤过, 得浅黄色固体 1.8 g, 产率 83%。mp 245~246 °C。ESI-MS m/z : 288.1 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.98 (1H, d, $J=4.48$ Hz, H-5), 8.90 (1H, s, H-2), 8.46 (2H, d, $J=8.68$, ArH), 8.35 (2H, d, $J=8.96$ Hz, ArH), 7.69 (1H, d, $J=4.48$ Hz, H-6)。

2.1.3 [7-(3-乙酰氨基苯基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶(AL-2)的合成 化合物 B-1 (1.1 g, 0.005 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (0.54 g, 0.005 mol) 反应得白色粉末状固体 0.9 g, mp 255~256 °C, 产率 73%; ESI-MS m/z : 278.1 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.25 (1H, s, NH), 8.90 (1H, d, $J=4.76$ Hz, H-5), 8.87 (1H, s, H-2), 8.33 (1H, s, ArH), 7.84 (1H, d, $J=8.4$ Hz, ArH), 7.70 (1H, d, $J=8.56$ Hz, H-6), 7.54 (2H, q, ArH), 2.09 (3H, s, CH₃)。

2.1.4 [7-(4-氯苯基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶(AL-3)的合成 化合物 B-1 (0.42 g, 0.002 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (0.22 g, 0.002 mol) 反应得浅黄色固体 0.3 g, mp 252~253 °C, 产率 75%; ESI-MS m/z : 255 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.91 (1H, d, $J=4.48$ Hz, H-5), 8.88 (1H, s, H-2), 8.14 (2H, d, $J=7.8$ Hz, ArH), 7.72 (2H, d, $J=7.12$ Hz, ArH), 7.61 (1H, d, $J=4.76$ Hz, H-6)。

2.1.5 [7-(2-吡嗪基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶(AL-4)的合成 化合物 B-1 (1.77 g, 0.01 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (1.08 g, 0.01 mol) 反应得黄白色固体 1.22 g, mp 209~210 °C, 产率 55%; ESI-MS m/z : 233.1 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.96 (1H, s, pyrazinyl), 9.03 (1H, d, $J=4.48$ Hz, H-5), 9.0 (2H, m, pyrazinyl), 8.94 (1H, s, H-2), 8.01 (1H, d, $J=4.48$ Hz, H-6)。

2.1.6 [7-(2-噻吩基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶(AL-5)的合成 化合物 B-1 (1.81 g, 0.01 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (1.08 g, 0.01 mol) 反应得淡黄

色固体 1.51 g, mp 261~262 °C, 产率 67%; ESI-MS m/z : 227 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.99 (1H, s, H-2), 8.85 (1H, d, $J=5.04$ Hz, H-5), 8.60 (1H, dd, $J=3.9$ 、1.0 Hz, thienyl), 8.21 (1H, m, thienyl), 8.06 (1H, d, $J=4.73$ Hz, H-6), 7.44 (1H, t, $J=5.04$ Hz, thienyl)。

2.1.7 [7-(4-甲氧基苯基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶 (AL-6) 的合成 化合物 B-1 (0.5 g, 0.002 6 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (0.28 g, 0.002 6 mol) 反应得淡黄色固体 0.37 g, mp 212~213 °C, 产率 57%; ESI-MS m/z : 251.1 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.86 (1H, d, $J=1.96$ Hz, H-5), 8.85

(1H, s, H-2), 8.18 (2H, d, $J=1.96$ Hz, ArH), 7.57 (1H, d, $J=4.76$ Hz, 6-H), 7.18 (2H, d, $J=8.94$ Hz, ArH), 3.89 (3H, s, OCH₃)。

2.1.8 [7-(4-甲氧基苯基)-3-氰基吡唑并[1,5-a]嘧啶 (AL-7) 的合成 化合物 B-1 (0.88 g, 0.005 mol) 和 3-氨基-4-氰基吡唑 (0.65 g, 0.006 mol) 反应得白色针状结晶 0.61 g, mp 231~232 °C, 产率 55%; ESI-MS m/z : 221.1 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.78 (1H, d, $J=4.49$ Hz, H-5), 8.44 (1H, s, H-2), 8.02 (2H, m, ArH), 7.63 (3H, m, ArH), 7.17 (1H, d, $J=4.26$ Hz, H-6)。

目标化合物 AL-1~AL-7 的合成路线见图 1。

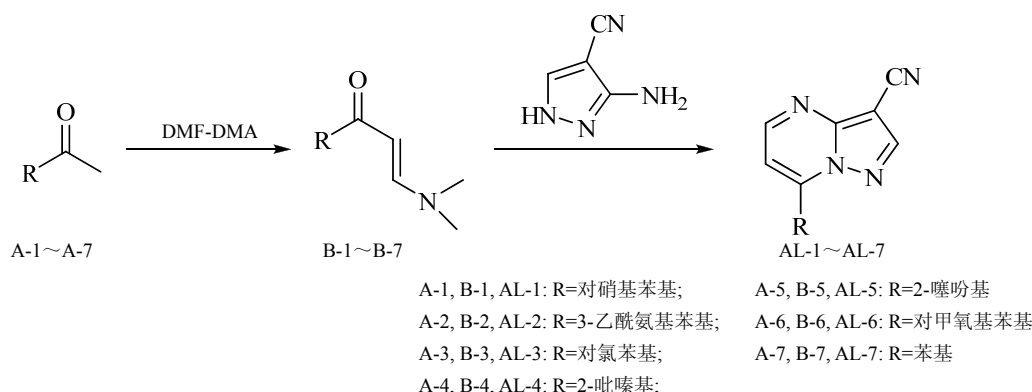


图 1 吡唑并嘧啶类化合物的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of pyrazolam pyrimidine compounds

2.2 催眠作用研究

2.2.1 戊巴比妥钠阈下催眠作用研究

将 ICR 小鼠随机分为 9 组, 分别为对照组、AL-1~AL-7 组和茛地普隆组, 每组 10 只, 组间平均体质量差 ≤ 1 g。测定前将小鼠置于温度为 (28 $\pm$ 2) °C、室内湿度为 (50% $\pm$ 10%) 的安静环境中适应 48 h, 明暗节律 (12 h/12 h), 自由饮水。各组药物配成相应浓度后均 ig 5 mg/kg, 给药后 30 min iv 戊巴比妥钠 25 mg/kg, 在 iv 后 10 min 观察小鼠翻正反射消失与否, 动物翻正反射消失达 1 min 以上者, 视为已发生睡眠。记录被催眠鼠的数量, 计算睡眠发生率。不同药物对阈下剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠情况见表 1。

睡眠发生率=翻正反射消失的样本数/每组样本数

结果表明, 与对照组比较, 茛地普隆组的睡眠发生率为 100%, 两组比较差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 说明该方案用于研究药物的催眠活性是可行的。化合物 AL-5、AL-7 有一定的协同戊巴比妥钠

表 1 小鼠的睡眠发生率 ($n=10$)

Table 1 Sleep incidence of mice ($n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	翻正反射/例		睡眠发生率/%
		消失	存在	
对照	—	0	10	0
AL-1	5	7	3	70**
AL-2	5	2	8	20
AL-3	5	8	2	80**
AL-4	5	1	9	10
AL-5	5	4	6	40*
AL-6	5	3	7	30
AL-7	5	5	5	50*
茛地普隆	5	10	0	100**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

的催眠作用 ($P<0.05$), 化合物 AL-1、AL-3 的睡眠发生率与对照组比较有显著性差异 ($P<0.01$), 因此可将化合物 AL-1、AL-3 作为候选药物进行深

入研究。

2.2.2 戊巴比妥钠阈上催眠作用研究^[5]

将ICR小鼠随机分为9组,分别为对照组、AL-1~AL-7组和茚地普隆组,每组10只,组间平均体质量差 ≤ 1 g。测定前将小鼠置于温度为 $(28\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、室内湿度为 $(50\%\pm 10\%)$ 的安静环境中适应48 h,明暗节律(12 h/12 h),自由饮水。各组药物配成相应浓度后均ig 10 mg/kg,给药后30 min iv 戊巴比妥钠 50 mg/kg,在iv后10 min观察小鼠的翻正反射消失与否,动物反正反射消失达1 min以上者,视为已发生睡眠。以小鼠翻正反射消失至恢复的时间间隔作为睡眠持续时间,观察不同药物对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠持续时间的影响。不同药物对阈上剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用见表2。

表2 小鼠的睡眠时间 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 2 Sleep time of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	睡眠持续时间/min
对照	—	29.16 $\pm$ 11.98
AL-1	10	55.48 $\pm$ 9.88**
AL-2	10	32.67 $\pm$ 21.69
AL-3	10	57.70 $\pm$ 20.22*
AL-4	10	45.23 $\pm$ 29.74
AL-5	10	46.58 $\pm$ 8.44*
AL-6	10	41.03 $\pm$ 29.68
AL-7	10	57.54 $\pm$ 18.55*
茚地普隆	10	81.12 $\pm$ 13.95**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

阈上剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用研究结果显示茚地普隆组的睡眠持续时间是 (81.12 ± 13.95) min,与对照组的睡眠持续时间 (29.16 ± 11.98) min相比较具有统计学意义($P<0.01$),证明该方法可行。其中AL-1、AL-3、AL-5和AL-7的睡眠持续时间均显著长于对照组($P<0.01$ 、 0.05),表明这些化合物有镇静催眠的效果。

3 讨论

3.1 合成研究

从多条合成路线中根据反应时间、反应条件、试剂价格、毒性、以及环境污染等方面综合考虑,最终确定了该合成工艺路线。本文对吡唑并嘧啶类化合物的合成工艺,操作简单,成本低,产率较高,适合工业化生产,化合物都经¹H-NMR和液质联用色谱仪进行了结构确证;在产物纯化过程中,产物通过减压蒸馏、冷却、干燥即可得到较纯净的产物,操作简单;整个反应过程中通过通入N₂,能够减少副反应物的产生,提高产率;反应温度是在不断的尝试过程中,最终确定了在此温度下既能保证产率,又缩短了反应时间。

3.2 催眠作用研究

本文分别对阈下、上剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用进行研究。阈下剂量戊巴比妥钠所致小鼠的催眠作用实验中药物所用剂量均为5 mg/kg,此剂量是通过不同剂量1、3、5、7 mg/kg进行实验考察,以及查阅相关文献资料而确定,通过实验发现化合物AL-1、AL-3、AL-5、AL-7有一定的协同戊巴比妥钠的催眠作用。在阈上剂量戊巴比妥钠的催眠作用实验中,AL-1组具有极显著性差异,延长程度最为明显,增强了戊巴比妥钠对小鼠的催眠作用,对以后合成方向的选择和研究具有重要意义。

参考文献

- [1] 失眠定义、诊断及药物治疗共识专家组. 失眠定义、诊断及药物治疗共识(草案) [J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(2): 141-143.
- [2] 靳照宇, 王希勤. 一种新的大鼠睡眠自动分析系统 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(5): 411-414.
- [3] Thiele W J, O'Donnell P B. Polymorphs of *N*-methyl-*N*-(3-{3-[2-thienylcarbonyl]-pyrazol-[1,5-a]-pyrimidin-7-yl} phenyl)acetamide and compositions and methods related thereto [P]. US: 6544999, 2003-04-08.
- [4] 徐淑云, 卞如廉, 陈修. 药理学实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 356.
- [5] 张均田. 现代药理试验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.