

# 丁苯酞衍生物的设计、合成及神经细胞保护和抗血小板聚集活性研究

张 斌, 刘万冬, 李家明\*, 金 凡, 钱诗虎

(安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

**摘要:** 丁苯酞与阿魏酸对缺血性脑卒中都具有较好治疗效果。本研究采用分子杂交策略, 以苯甲酸为原料通过亲核取代、还原、酯化及消除反应合成 12 个丁苯酞衍生物, 经  $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、ESI-MS 确证其结构。首先, 采用 MTT 法测试所有化合物对氧糖剥夺诱导大鼠脑皮层神经元损伤的体外保护活性。其次, 采用 Bron 比浊法测定具有最好神经细胞保护活性化合物, 对花生四烯酸及二磷酸腺苷的血小板聚集的抑制活性。结果表明, 化合物 **7b** 不仅表现出强效的神经细胞保护活性, 还具有良好的抗血小板聚集活性, 存在研发成治疗缺血性脑卒中药物的潜力。

**关键词:** 丁苯酞衍生物; 缺血性脑卒中; 神经细胞保护; 抗血小板聚集

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)03-0478-06

## Design, synthesis, and neuroprotective and anti-platelet aggregation research of 3-*n*-butylphthalide derivatives

ZHANG Bin, LIU Wan-dong, LI Jia-ming\*, JIN Fan, QIAN Shi-hu

(College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**Abstract:** Butylphthalide and ferulic acid exhibit excellent therapeutic effects in ischemic stroke. In this research, twelve 3-*n*-butylphthalide derivatives were designed by molecular hybridization strategy. The target compounds were obtained by nucleophilic substitution, reduction reaction, esterification reaction and elimination reaction, and the structure was confirmed by  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  and ESI-MS. All compounds were evaluated for neuroprotective activity against OGD/R-induced neurotoxicity in rat cortical neurons by MTT assay. The compounds with the best neuroprotective activity were biologically evaluated for their ability to inhibit platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP) *via* the Bron method. The results indicate that **7b** exhibited potent neurocyte protective activity as well as prominent anti-platelet aggregation activity. Compound **7b** has potential to be developed as a drug for ischemic stroke.

**Key words:** 3-*n*-butylphthalide derivative; ischemic stroke; neuroprotective effect; anti-platelet aggregation

脑卒中是由脑组织缺血、缺氧所引起的一种急性脑血管疾病, 包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中两种类型, 其中缺血性脑卒中占总患病率的 75%~85%<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中是由脑部血管的暂时或永久性的阻塞, 促使局部脑组织供血不足, 最终导致神经细胞发生不可逆转的损伤, 是世界范围内致死和终身残疾的主要

原因。目前对于缺血性脑卒中的治疗主要集中于两个方面: 一是以溶栓、抗血小板聚集、扩张血管等为目的促进缺血区域的血液供应, 包括溶栓药物、抗血小板聚集药物、抗凝和降纤药物<sup>[2]</sup>。另一方面是以保护脑神经细胞的功能与结构为治疗目的, 减轻由于缺少血液供应而导致的神经细胞损伤或凋亡<sup>[3]</sup>, 主要有抗氧化应激药物、抗兴奋性毒性药物、炎症反应抑制剂等。面对临床上常用的改善脑部供血药物存在治疗时间窗窄以及神经保护剂治疗效果不突出等诸多问题<sup>[4]</sup>, 研发出一类具有改善脑部供血功效的神经保护剂对于缺血

收稿日期: 2019-12-03; 修回日期: 2019-12-31.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2018ZX09739-001).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-551-68129147, E-mail: lijiaming2017@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0969

性脑卒中的治疗具有重要意义。

丁苯酞 (3-*n*-butylphthalide, NBP, 图 1) 是从芹菜籽中提取出的一种苯并呋喃酮类化合物, 于 2002 年上市用于脑卒中的治疗<sup>[5]</sup>。丁苯酞可以通过提高脑血管内皮一氧化氮和前列腺素 2 的水平, 抑制神经元细胞凋亡; 改善局部脑血流量和脑微循环, 减轻由脑缺血引起的脑水肿症状; 抗血栓形成和抗血小板的聚集, 改善神经功能缺失, 减少脑梗死面积等<sup>[6]</sup>。尽管丁苯酞能够对脑缺血的多个病理环节有治疗作用, 但其自身的总体疗效不高, 常与其他药物联合使用<sup>[7]</sup>。基于丁苯酞以多通路、多靶点治疗脑卒中的特性, 以丁苯酞为先导化合物研发新型的神经细胞保护剂, 倍受药物化学家们的青睐。

阿魏酸 (ferulic acid, 图 1) 是活血化瘀药当归的主要有效成分<sup>[8]</sup>。药理学研究表明, 阿魏酸还能抑制由缺血缺氧所导致的兴奋性氨基酸的神经毒、胞内钙超载、氧自由基损伤等作用, 对缺血损伤产生耐受及自身保护作用, 进而减少脑梗死面积<sup>[9, 10]</sup>。此外, 阿魏酸能够选择性抑制血栓素合成酶的活性, 促 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 的比值升高, 抑制血小板聚集<sup>[11]</sup>。因此, 阿魏酸作为治疗脑卒中的活性小分子, 具有进一步研发的潜力。

基于丁苯酞与阿魏酸都具有改善脑循环和神经细胞保护作用, 将二者的结构进行拼合, 是否能够获得一类具有改善脑循环功效的神经细胞保护剂呢? 因此, 本研究将丁苯酞的烷烃链与阿魏酸上的酚羟基进行连接, 设计合成 12 个新型丁苯酞衍生物 (图 1), 通过大鼠神经元细胞的缺氧缺糖损伤模型考察其体外保护活性, 并对保护活性最好的化合物进行抗血小板聚集活性评测。此外, 对该系列化合物的构效关系进行了初步探讨。

## 结果与讨论

### 1 化学合成

目标化合物的合成如合成路线 1 所示。以市售苯

甲酸为原料, 二异丙胺保护羧基, 在叔丁基锂的作用下与  $\gamma$ -丁内酯进行亲核取代反应生成化合物 **3**。经还原、酯化反应后得到化合物 **5**, 羟基经对甲基苯磺酰氯活化后与阿魏酸及其衍生物取代获得目标化合物 **7a**~**7l**, 其中化合物 **7b** 用高效液相检色谱测其纯度。所有目标化合物结构均经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 ESI-MS 确证, 其熔点以及波谱数据见表 1。

### 2 目标化合物的药理活性

以丁苯酞为阳性对照药, 以浓度为 0.1、1、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  三种剂量, 检测丁苯酞衍生物对氧糖剥夺诱导大鼠脑皮层神经元损伤的保护作用 (动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准), 细胞存活率见表 2。结果表明, 与模型组对比, 合成的 12 个丁苯酞衍生物均具有一定的细胞保护活性, 且化合物的细胞保护活性与浓度呈正相关性。其中化合物 **7b** 和 **7e** 的细胞保护活性最为突出, 在剂量为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞保护活性显著优于阳性药丁苯酞, 引起进一步研究的兴趣。

分析 **7b** 与 **7e** 的结构发现, 与丁苯酞连接的另一片段分别是阿魏酸和水杨酸的类似物, 由此可进一步推断化合物 **7b** 与 **7e** 在具有出众的细胞保护活性同时还能改善脑部的血液循环。因此, 采用 Bron 比浊法测定化合物 **7b** 与 **7e** 由花生四烯酸 (AA) 及二磷酸腺苷 (ADP) 诱导的血小板聚集的抑制活性。结果如表 3 所示, 在由 AA 诱导的血小板聚集试验中, 化合物 **7b** 与 **7e** 的抑制活性略低于阳性药阿司匹林; 而在由 ADP 诱导血小板聚集的抑制活性试验中, **7b** 与 **7e** 的抑制血小板聚集活性要略好于阳性药。另外, 化合物 **7b** 在两种诱导剂诱导的抗血小板聚集活性实验中均表现出良好的抑制活性。

以剂量 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  初步探讨该系列化合物的构效关系, 如图 2 所示, 在剂量为 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的条件下, 化合物 **7a**、**7b**、**7e**、**7h**、**7k** 的细胞保护活性高于丁苯酞。相

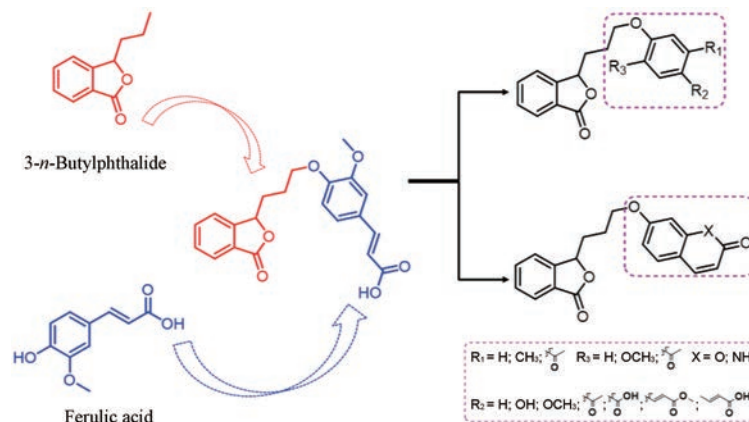
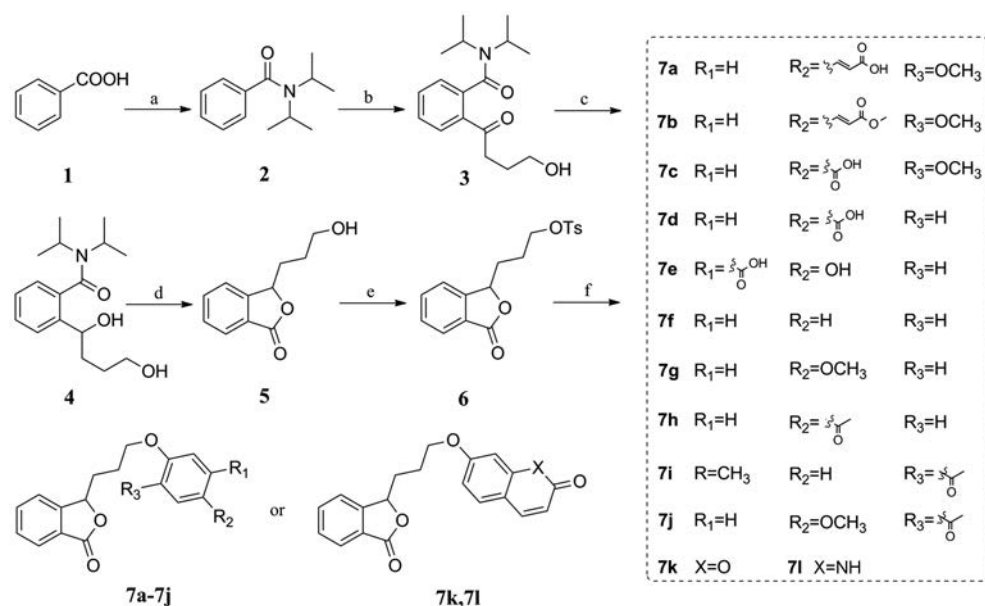


Figure 1 The design of 3-*n*-butylphthalide derivatives

**Table 1** Properties and spectral data of compounds **7a–7l**

Compd.	mp/°C	Character	<sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR, ESI-MS
<b>7a</b>	86–88	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 9.61 (s, 1H, Ar-H), 7.88–7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.75–7.68 (m, 1H, =CH), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.55 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, =CH), 6.48 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H, Ar-H), 5.73 (dd, <i>J</i> = 7.2, 3.8 Hz, 1H, OCH), 4.23–4.14 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.82 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.28–2.16 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 1.84–1.64 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.28, 167.42, 150.64, 150.40, 149.64, 145.16, 134.87, 129.75, 127.44, 125.74, 125.43, 123.29, 123.06, 115.80, 113.18, 111.22, 81.25, 68.25, 56.15, 51.75, 31.07, 24.72; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 366.93[M-H] <sup>-</sup>
<b>7b</b>	96–98	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 7.86 (m, 1H, Ar-H), 7.83–7.76 (m, 2H, Ar-H), 7.70 (m, 1H, =CH), 7.65–7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.35 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.56 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H, =CH), 5.79–5.72 (m, 1H, OCH), 3.80 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.71 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.30–2.19 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 1.92–1.73 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.28, 167.42, 150.64, 150.40, 149.64, 145.16, 134.87, 129.75, 127.44, 125.74, 125.43, 123.29, 123.06, 115.80, 113.18, 111.22, 81.25, 68.25, 56.15, 51.75, 31.07, 24.72; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 350.99 [M+H] <sup>+</sup> . Purity (HPLC): 96.67%
<b>7c</b>	91–92	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.89 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (m, 1H, Ar-H), 7.67–7.55 (m, 4H, Ar-H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 5.72 (dd, <i>J</i> = 7.3, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.41–4.27 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.91 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.37–2.28 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 1.98–1.83 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.27, 166.03, 151.99, 150.37, 147.82, 134.86, 129.75, 125.75, 125.42, 123.91, 123.07, 121.04, 115.64, 113.00, 81.18, 64.22, 56.06, 31.02, 24.46; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 341.04 [M-H] <sup>-</sup>
<b>7d</b>	140–142	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 7.86 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.85–7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.73–7.68 (m, 1H, Ar-H), 7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.52 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (s, 1H, Ar-H), 6.83 (m, 1H, Ar-H), 5.81–5.75 (m, 1H, OCH), 4.14 (t, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.33 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.69–2.55 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.04–1.76 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.27, 166.00, 162.42, 150.36, 134.86, 131.90, 129.75, 125.75, 125.42, 123.09, 120.83, 115.78, 114.88, 81.20, 67.79, 64.09, 31.03, 24.48; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 311.08 [M-H] <sup>-</sup>
<b>7e</b>	154–156	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.89 (dt, <i>J</i> = 7.7, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 (td, <i>J</i> = 7.5, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.68–7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.25 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.99 (dd, <i>J</i> = 8.9, 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 5.72 (dd, <i>J</i> = 7.3, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.48–4.36 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.40–2.29 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.03–1.85 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.27, 166.03, 151.99, 150.37, 147.82, 134.86, 129.75, 125.75, 125.42, 123.91, 123.07, 121.04, 115.64, 113.00, 81.18, 64.22, 56.06, 31.02, 24.46; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 327.01 [M-H] <sup>-</sup>
<b>7f</b>	70–72	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.89 (m, 1H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.66–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.31–7.22 (m, 2H, Ar-H), 6.94–6.87 (m, 3H, Ar-H), 5.70 (dd, <i>J</i> = 7.1, 4.0 Hz, 1H, OCH), 4.09–3.98 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.42–2.31 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.02–1.82 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.29, 158.95, 150.43, 134.86, 129.92, 129.74, 125.76, 125.42, 123.07, 120.95, 114.89, 81.29, 67.25, 31.12, 24.81; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 269.16 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7g</b>	68–70	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.89 (m, 1H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.68–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.15 (t, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.53–6.45 (m, 3H, Ar-H), 5.70 (dd, <i>J</i> = 7.1, 4.0 Hz, 1H, OCH), 4.07–3.96 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.77 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.39–2.31 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 1.98–1.82 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.29, 160.95, 160.23, 150.43, 134.86, 130.38, 129.74, 125.75, 125.42, 123.07, 107.03, 106.77, 101.18, 81.28, 67.38, 55.51, 31.13, 24.80; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 299.07 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7h</b>	97–99	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 8.02–7.95 (m, 2H, Ar-H), 7.89 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (m, 1H, Ar-H), 7.70–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.04–6.98 (m, 2H, Ar-H), 5.72 (dd, <i>J</i> = 7.2, 3.8 Hz, 1H, OCH), 4.18–4.11 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.57 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.43–2.34 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.02–1.90 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 196.70, 170.27, 162.83, 150.39, 134.87, 130.93, 130.33, 129.76, 125.74, 125.43, 123.07, 114.71, 81.23, 67.80, 31.00, 26.85, 24.68; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 311.17 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7i</b>	105–106	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 7.94 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.76–7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.57 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.87–6.79 (m, 1H, Ar-H), 6.74 (s, 1H, Ar-H), 5.60 (dd, <i>J</i> = 7.6, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.23–4.05 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.34–2.31 (m, 4H, CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> a), 2.14–1.92 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 198.33, 170.27, 158.55, 150.38, 145.05, 134.90, 130.21, 129.77, 125.76, 125.47, 125.44, 123.01, 121.59, 114.07, 81.18, 68.12, 32.27, 31.18, 24.70, 21.80; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 325.14 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7j</b>	109–111	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 7.95 (m, 1H, Ar-H), 7.84 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.58 (m, 1H, Ar-H), 7.47 (m, 1H, Ar-H), 6.55 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.43 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 5.60 (dd, <i>J</i> = 7.6, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.21–4.03 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.87 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.61 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.47–2.34 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.17–1.96 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 196.65, 170.27, 164.66, 160.60, 150.37, 134.89, 132.26, 129.77, 125.76, 125.45, 123.01, 120.83, 106.43, 99.42, 81.15, 68.30, 56.06, 32.29, 31.20, 24.60; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 341.11 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7k</b>	146–148	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 7.95 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.66 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.92–6.77 (m, 2H, Ar-H), 6.28 (d, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.60 (dd, <i>J</i> = 7.8, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.18–4.02 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.36 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.14–1.90 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.27, 162.14, 160.73, 155.84, 150.38, 144.76, 134.87, 129.93, 129.76, 125.74, 125.43, 123.07, 113.14, 112.92, 112.81, 101.65, 81.20, 68.23, 31.00, 24.60; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 337.17 [M+H] <sup>+</sup>
<b>7l</b>	193–194	White solid	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ 7.93–7.90 (m, 1H, Ar-H), 7.90–7.88 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (m, 1H, Ar-H), 7.68–7.56 (m, 3H, Ar-H), 6.90 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.85 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.45 (d, <i>J</i> = 9.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.73 (dd, <i>J</i> = 7.1, 3.7 Hz, 1H, OCH), 4.20–4.09 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.45–2.33 (m, 1H, CH <sub>2</sub> a), 2.07–1.88 (m, 3H, CH <sub>2</sub> b, CH <sub>2</sub> ); <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 170.28, 162.69, 160.75, 150.38, 141.09, 140.45, 134.87, 129.75, 129.70, 125.74, 125.42, 123.08, 119.02, 113.81, 111.24, 99.09, 81.28, 67.69, 31.04, 24.75; ESI-MS ( <i>m/z</i> ): 336.20 [M+H] <sup>+</sup>



**Scheme 1** Synthetic route of target compounds. Reagents and conditions: a: DCM, DMF,  $(\text{COCl})_2$ , 20 °C; DCM, 0 °C,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; b: *t*-BuLi, gamma-butyrolactone, THF, -78 °C, 1 h; c:  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, r.t., 12 h; d: TsOH, toluene, reflux, 24 h; e: Triethylamine, 4-dimethylamino pyridine, dichloromethane, r.t., 12 h; f:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 50 °C, 8 h

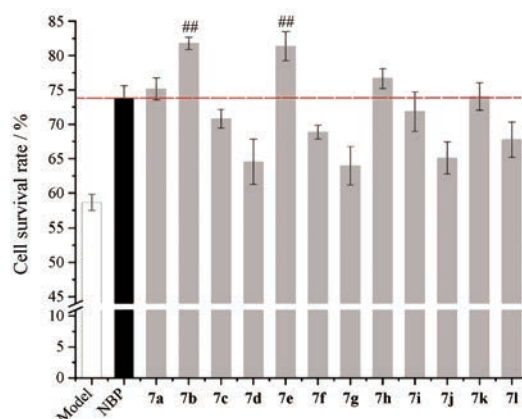
**Table 2** Neuroprotective effects of target compounds against OGD/R-induced neurotoxicity in rat cortical neurons. NBP: 3-*n*-Butylphthalide. \*\* $P < 0.01$  vs Model; \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs NBP

Compd.	Survival rate $\pm$ SD/%			
	Model	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
NBP	59.18 $\pm$ 0.92	67.66 $\pm$ 2.53**	73.89 $\pm$ 1.75**	87.72 $\pm$ 2.00**
7a	57.41 $\pm$ 0.99	63.28 $\pm$ 1.73**	75.16 $\pm$ 1.60**	86.56 $\pm$ 2.91**
7b	59.14 $\pm$ 1.27	72.81 $\pm$ 1.43***	81.78 $\pm$ 0.90***	88.33 $\pm$ 1.75**
7c	59.74 $\pm$ 1.00	65.37 $\pm$ 1.30**	70.82 $\pm$ 1.35**	78.90 $\pm$ 2.15**
7d	58.64 $\pm$ 1.59	60.65 $\pm$ 1.36	64.55 $\pm$ 3.30**	70.95 $\pm$ 1.54**
7e	58.10 $\pm$ 1.25	70.14 $\pm$ 2.32**	81.36 $\pm$ 2.11***	91.60 $\pm$ 2.22***
7f	60.06 $\pm$ 0.50	61.53 $\pm$ 2.16	68.87 $\pm$ 1.01**	73.17 $\pm$ 3.13**
7g	59.17 $\pm$ 1.22	59.43 $\pm$ 2.38	63.97 $\pm$ 2.79**	67.40 $\pm$ 1.83**
7h	58.44 $\pm$ 1.37	67.65 $\pm$ 0.97**	76.67 $\pm$ 1.44**	82.93 $\pm$ 0.43**
7i	58.09 $\pm$ 0.89	64.03 $\pm$ 2.21**	71.68 $\pm$ 2.89**	79.23 $\pm$ 0.82**
7j	57.56 $\pm$ 1.24	59.84 $\pm$ 2.34	65.11 $\pm$ 2.34**	67.26 $\pm$ 1.30**
7k	57.25 $\pm$ 1.95	67.14 $\pm$ 3.73**	74.05 $\pm$ 2.00**	79.06 $\pm$ 1.47**
7l	59.73 $\pm$ 1.31	61.44 $\pm$ 1.74	67.77 $\pm$ 2.58**	75.27 $\pm$ 2.94**

**Table 3** *In vitro* anti-platelet aggregation activities of the target compounds. AA: Arachidonic acid; ADP: Adenosine diphosphate

Compd.	$\text{IC}_{50}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	AA	ADP
7b	0.110	0.301
7e	0.398	0.573
Aspirin	0.056	0.890

比较化合物 7a、7b 而言, 阿魏酸片段上的羧酸替换成甲酯时能够显著提高化合物的细胞保护活性; 此外相对于化合物 7c、7d、7e 而言, 缺失邻位羟基提供的分子内氢键导致亲水性增强, 化合物的细胞保护活性也显著降低。由此可见苯环上连有亲酯基团对神经元细胞的保护更有利。此外, 对比化合物 7a 与 7c 发现连接在



**Figure 2** Neuroprotective effects of target compounds at the dose 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . ## $P < 0.01$  vs NBP

苯环上羧酸的碳链较长时保护活性较好; 对比化合物 7c 和 7d 发现苯环上邻位连有甲氧基也有助于细胞保护活性的增强。

### 3 小结

本研究采用分子杂交策略, 设计合成了 12 个新型丁苯酞衍生物, 目标化合物均经过  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、ESI-MS 确证其结构。采用氧糖剥夺诱导大鼠脑皮层神经元损伤模型对目标化合物进行活性初筛, 获得两个具有良好细胞保护活性的化合物 7b 与 7e。随后, 利用 Bron 比浊法对化合物 7b 与 7e 的抗血小板聚集活性进行评测, 发现化合物 7b 能够有效抑制由 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集。基于上述试验结果可知, 化合物 7b 在具有良好的抑制血小板聚集活性的同时, 还能表

现出强效的脑神经细胞活性, 因此认为化合物 **7b** 具有开发成治疗缺血性脑卒中药物的潜力。

## 实验部分

LCQ Advantage MAX 液质连用质谱仪 (美国 Finniga 公司)、Bruker 400 MHz 超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司)、SGWX-4 显微熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司)、DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市华仪器有限责任公司)、R1001-VN 旋转蒸发器 (郑州长城科工贸有限公司); 除特殊说明外, 所用试剂均为市售分析纯或化学纯产品。

### 1 化合物合成

**1.1 中间体 2 的合成** 在 500 mL 干燥的圆底烧瓶中加入化合物 **1** (24.4 g, 200 mmol), 再加入 300 mL 二氯甲烷以及 5 滴 *N,N*-二甲基甲酰胺搅拌溶解。在 20 °C 条件下缓慢滴加草酰氯 (38.1 g, 300 mmol), 滴加完全后, 升温至 25 °C, 搅拌反应 2.5 h。停止反应后将反应液减压浓缩, 除去多余的草酰氯, 得黄色稠状液体。将上述油状物溶于 200 mL 二氯甲烷中, 在 0 °C 条件下, 缓慢加入二丙胺 (40.4 g, 400 mmol) 与三乙胺 (40.4 g, 400 mmol) 的混合溶液中, 滴加完全后缓慢升至室温反应 8 h。反应结束后向反应液中滴加饱和氯化铵溶液 200 mL 淬灭反应, 再用二氯甲烷和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压浓缩反应液, 经柱色谱分离得白色固体 33.1 g, 收率 80.7%。

**1.2 中间体 3 的合成** 在 250 mL 干燥的三颈烧瓶中加入化合物 **2** (20.5 g, 100 mmol) 和 100 mL 无水四氢呋喃。在氮气保护下冷却反应液至 -78 °C 后, 缓慢滴加叔丁基锂 (1.3 mol·L<sup>-1</sup>, 90 mL, 120 mmol), 滴加完毕后保温反应 1 h。缓慢滴加  $\gamma$ -丁内酯 (11.2 g, 130 mmol), 滴加完毕后保温反应 1 h。反应结束后向反应液中滴加 200 mL 饱和氯化铵溶液淬灭反应, 再用二氯甲烷和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 经柱色谱分离得黄色油状物 25.0 g, 收率 76.0%。

**1.3 中间体 4 的合成** 在 1 L 干燥的圆底烧瓶中, 加入化合物 **3** (17.0 g, 58.4 mmol) 和无水甲醇 (400 mL), 在 10 °C 下搅拌溶解后缓慢分批加入硼氢化钠 (3.6 g, 94.7 mmol), 升至室温搅拌过夜。反应结束后将反应液移至冰浴条件下, 滴加 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 (300 mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后得白色固体 17.0 g, 收率 89.3%。

**1.4 中间体 5 的合成** 在 500 mL 干燥的圆底烧瓶中加入化合物 **4** (8.5 g, 29.0 mmol)、甲苯 200 mL 后加入一水对甲苯磺酸 (0.85 g, 4.5 mmol), 在氮气保护下升温至 128 °C 搅拌反应 24 h。反应完全后抽滤反应液并

浓缩滤液, 经柱色谱分离得黄色油状物 4.3 g, 收率 77.8%。

**1.5 中间体 6 的合成** 在 50 mL 干燥的圆底烧瓶中, 加入化合物 **5** (1.78 g, 10.0 mmol) 和二氯甲烷 50 mL, 随后在冰浴条件下, 依次加入对甲苯磺酰氯 (5.09 g, 15.0 mmol)、三乙胺 (2.8 mL, 20.0 mmol)、4-二甲氨基吡啶 (0.12 g, 1.0 mmol), 在氮气保护下, 升至室温搅拌反应 12 h。反应完全后向反应液中加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 20 mL, 再用二氯甲烷和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 经柱色谱分离得浅黄色固体 2.7 g, 收率 80.2%。

**1.6 7a~7j 的合成通法** 以 **7a** 为例, 将化合物 **6** (0.87 g, 2.5 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 再向反应液中缓慢加入阿魏酸 (0.49 g, 2.5 mmol), 加入碳酸钾 (0.7 g, 5 mmol) 后升温至 65 °C 搅拌反应。反应完全后冷却反应液至室温, 用 50 mL 水洗涤, 再用乙酸乙酯和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 经柱色谱分离得白色固体 0.45 g, 收率 49.1%。

**1.7 7k, 7l 的合成通法** 以 **7k** 为例, 将化合物 **6** (0.87 g, 2.5 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 再向反应液中缓慢加入对羟基香豆素 (0.37 g, 2.5 mmol), 加入碳酸钾 (0.7 g, 5 mmol) 后升温至 65 °C 搅拌反应。反应完全后冷却反应液至室温, 用 50 mL 水洗涤, 再用乙酸乙酯和饱和氯化钠多次萃取, 无水硫酸钠干燥, 经柱色谱分离得白色固体 0.46 g, 收率 54.8%。

## 2 目标化合物的生物活性评测

**2.1 大鼠脑皮层神经元细胞的体外保护活性测定** 参照文献<sup>[12,13]</sup>方法, 将 SD 大鼠乳鼠的神经元细胞以  $4 \times 10^4$  的细胞密度接种于 48 孔培养板中, 使用含有相应浓度待测化合物的 DMEM 培养基 (含 1% FBS) 常规培养 24 h。24 h 后将培养基更换成不含葡萄糖与血清的 DMEM 培养基, 并置于含有 5% CO<sub>2</sub>、95% N<sub>2</sub> 三气培养箱中培养 2 h; 完成缺氧过程后, 将培养基更换成完全 DMEM 培养基, 并置于含有 5% CO<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 完成复氧过程。采用 MTT 法测定线粒体脱氢酶的活性确定细胞活力, 以空白对照组的吸收值设定为 100%, 计算不同组别的神经元细胞存活率。公式: 存活率 = (实验组吸收值/空白对照组吸收值) × 100%。

**2.2 抗血小板聚集活性评测<sup>[14]</sup>** 采用 Bron 比浊法测定目标化合物对 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集的抑制活性。取雄性新西兰家兔 (体重 1.8~2.2 kg), 皮下注射 1% 盐酸普鲁卡因注射液局部浸润麻醉, 颈动脉插管取血。将血液与 3.8% 枸橼酸钠 (0.38 g 枸橼酸钠溶 10 mL 生理盐水) 以 9:1 混合, 以 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取富

血小板血浆 (PRP), 剩余部分以  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\ \text{min}$ , 取贫血小板血浆 (PPP)。先取 PPP  $300\ \mu\text{L}$  加入测试孔, 按“PPP”键进行定标。然后取 PRP  $280\ \mu\text{L}$  加入测试杯中, 加入不同浓度的药液  $10\ \mu\text{L}$ , 在  $37\ ^\circ\text{C}$  预温槽中预热  $3\ \text{min}$  后放入测试孔, 按“开始”键时立即加入诱导剂  $10\ \mu\text{L}$ , 测定  $5\ \text{min}$  内最大血小板聚集率, 并计算各化合物的  $\text{IC}_{50}$  值 (半数抑制浓度)。所有实验重复 3 次, 根据各组聚集率平均值与空白组聚集率均值计算聚集抑制率: 抑制率 (%) = (空白对照组最大聚集率均值 - 给药组最大聚集率均值) / 空白对照组最大聚集率均值  $\times 100\%$ 。

## References

- [1] Sheng X, Hua K, Yang C, et al. Novel hybrids of 3-*n*-butylphthalide and edaravone: design, synthesis and evaluations as potential anti-ischemic stroke agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 3535-3540.
- [2] Wang XY, Yu D. Progress in treatment of cerebral ischemic diseases [J]. *Chin J Clin (中华临床医师杂志)*, 2013, 7: 7112-7114.
- [3] Fu Y, Liao Q, Fan DS, et al. Advances in research of neuro protective agents treating ischemic stroke [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2011, 20: 973-977.
- [4] Li Y, Wang X, Fu R, et al. Synthesis and evaluation of nitric oxide-releasing derivatives of 3-*n*-butylphthalide as anti-platelet agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 4210-4214.
- [5] Yan XF, Zhan J, Huang YN, et al. Pharmacological action and clinical evaluation of butylphthalide [J]. *Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志)*, 2008, 17: 1498-1500.
- [6] Abdoulaye IA, Guo YJ. A review of recent advances in neuroprotective potential of 3-*N*-butylphthalide and its derivatives [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 5: 341-343.
- [7] Xu HL, Feng YP. Effects of 3-*n*-butylphthalide on thrombosis formation and platelet function in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2001, 36: 329-333.
- [8] Li WX, Guo JM, Tang YP, et al. Pharmacokinetic comparison of ferulic acid in normal and blood deficiency rats after oral administration of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* and their combination [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 3583-3597.
- [9] Cheng CY, Ho TY, Lee EJ, et al. Ferulic acid reduces cerebral infarct through its antioxidative and anti-inflammatory effects following transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36: 1105-1119.
- [10] Koh PO. Ferulic acid attenuates the down-regulation of MEK/ERK/p90RSK signaling pathway in focal cerebral ischemic injury [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 588: 18-23.
- [11] Wu YN, Liao FY, Liao WG, et al. Effect of ferulic acid on the brain pharmacokinetics of tetramethylpyrazine in conscious rats [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47: 973-979.
- [12] Yin J, Yin ZY, Jiang T, et al. Oxygen-glucose-deprivation/reoxygenation (O/R)-induced autophagic cell death depended on JNK-mediated phosphorylation of Bcl-2 [J]. *Acta Univ Med Nanjing (Nat Sci) (南京医科大学学报 自然科学版)*, 2016, 38: 1063-1074.
- [13] Gao Y, Liu WD, Ruan BF, et al. Synthesis and neuroprotective activity of resveratrol-3-*n*-butylphthalide hybrids [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1461-1469.
- [14] Liu WD, Zhu PH, Li JM, et al. Design, synthesis, and anti-platelet aggregation activities evaluation of oxiracetam derivatives [J]. *Chemistry*, 2019, 3: 275-279.