

## 香豆素苯并三唑的合成、抗微生物活性及其与氯霉素和氟康唑协同作用研究

时 园<sup>1</sup>, 周成合<sup>1\*</sup>, 周向东<sup>2</sup>, 耿蓉霞<sup>1</sup>, 吉庆刚<sup>1</sup>

(1. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715; 2. 第三军医大学药物化学教研室, 重庆 400038)

**摘要:** 以间苯二酚为起始原料, 经过环化、醚化、*N*-烷化等多步反应合成了一系列新型香豆素苯并三唑类化合物, 其结构经 <sup>1</sup>H NMR、IR、MS 和元素分析证实。体外考察了合成的香豆素类化合物抗革兰阳性菌、革兰阴性菌及真菌活性。结果表明香豆素苯并三唑能有效抑制细菌和真菌的生长, 其中化合物 **11a~11e** 和 **13a~13c** 抗普通变形杆菌 ATCC 6896 活性强于氯霉素 (chloromycin)。化合物 **11a** 和 **11b** 抑制金葡菌 ATCC 25923 和藤黄微球菌 ATCC 4698 的生长能力与氯霉素相当。化合物 **11a~11d** 抗烟曲霉菌 ATCC 96918 活性优于氟康唑 (fluconazole)。此外, 氯霉素或氟康唑与香豆素苯并三唑联用后, 不仅减少了用药剂量, 还拓宽了抗微生物谱, 尤其增强了抑制耐甲氧西林的金葡菌 N 315 和氟康唑不敏感的烟曲霉菌的生长能力。

**关键词:** 香豆素; 苯并三唑; 抗细菌; 抗真菌; 氯霉素; 氟康唑; 协同作用

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 07-0798-13

## Synthesis and antimicrobial evaluation of coumarin-based benzotriazoles and their synergistic effects with chloromycin and fluconazole

SHI Yuan<sup>1</sup>, ZHOU Cheng-he<sup>1\*</sup>, ZHOU Xiang-dong<sup>2</sup>, GENG Rong-xia<sup>1</sup>, JI Qing-gang<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** A series of new coumarin-based benzotriazole derivatives were successfully synthesized via a multi-step sequence of cyclization, etherification and *N*-alkylation, and were confirmed by <sup>1</sup>H NMR, IR, MS spectra as well as elemental analyses. All these synthesized coumarin compounds were evaluated for *in vitro* antimicrobial activities against four Gram-positive bacteria, four Gram-negative bacteria and three fungi by two fold serial dilution technique. The bioactive assay showed that all these prepared coumarin benzotriazoles could inhibit the growth of the tested bacterial and fungal strains. Title compounds **11a-11e** and **13a-13c** were more active than chloromycin on *Proteus vulgaris* ATCC 6896. Coumarin benzotriazoles **11a** and **11b** displayed comparable antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Micrococcus luteus* ATCC 4698 in comparison with reference drug chloromycin. Compared to fluconazole, compounds **11a-11d** displayed stronger inhibition on *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918. Moreover, coumarin-based benzotriazoles in combination with antibacterial chloromycin or antifungal fluconazole, showed notable antimicrobial efficacy with less dosage and broader antimicrobial spectrum. More importantly, fluconazole-insensitive *A. fumigatus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N 315 (MRSA) were sensitive to these combined drugs.

**Key words:** coumarin; benzotriazole; antibacterial; antifungal; chloromycin; fluconazole; synergistic effect

收稿日期: 2010-11-29.

基金项目: 国家人事部回国人员重点项目 (2002-99); 重庆市自然科学基金 (CSCT 2007BB5369, 2009BB5296); 西南大学人才引进基金 (SWUB2006018); 西南大学高新技术培育基金 (XSGX0602).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68254967, E-mail: zhouch@swu.edu.cn

香豆素是一类重要的含苯并  $\alpha$ -吡喃酮结构的芳香氧杂环化合物, 具有良好的热力学和光化学稳定性, 易于进行结构修饰并能方便地引入各种功能基团, 分子内具有较大的共轭体系和强的分子内电子转移能力, 这种特殊的刚性稠环结构特征使其在食品、燃料、香料、光电材料、医药、农药、超分子识别等众多领域具有广泛的潜在应用<sup>[1-3]</sup>。尤其是在医药领域, 它们在抗细菌、抗真菌、抗癌、抗病毒、抗氧化、抗凝、抗炎等方面发挥重要作用, 相关研究日益活跃, 发展十分迅速, 备受关注。一些香豆素类化合物如华法林 (warfarin)、双香豆素 (dicoumarol)、醋硝香豆醇 (acenocoumarol)、双香豆素乙酯 (ethyl biscoumacetate)、亮菌甲素 (armillarisin A)、羟甲香豆素 (hymecromone)、氯达香豆素 (chloridarol)、卡波罗孟 (carbochromen) 等已广泛应用于临床。更为重要的是越来越多的香豆素类化合物显示出对多类疾病的治疗具有巨大的发展潜力<sup>[3, 4]</sup>。

随着抗感染药物的广泛使用, 甚至滥用, 导致多药耐药菌株的不断出现。特别是在 2010 年出现的耐药性极强的超级病菌 (含有 New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1, NDM-1) 几乎能抵御所有的临床抗感染药物, 致使新型高效抗感染药物的开发已成为更为迫切的重大课题, 受到当今世界的广泛关注和重视<sup>[5-11]</sup>。众所周知, 喹诺酮类化合物是临床首选的人工合成抗感染药物之一, 该类药物具有抗菌谱广、生物相容性好、组织渗透性强、给药方便、口服利用率高、毒副作用小及开发成本低等诸多优点, 在治疗革兰阴性菌、革兰阳性菌、厌氧菌以及分枝杆菌等感染性疾病方面疗效显著。然而随着喹诺酮药物的大量而广泛甚至不合理的使用, 使得病原菌的耐药性问题日趋严峻, 喹诺酮类药物在临床上的作用越来越有限<sup>[12, 13]</sup>。由于喹诺酮类药物在感染性疾病治疗领域的优势, 吸引着许多工作者致力于喹诺酮 (吡啶酮酸类) 类似物香豆素 (苯并  $\alpha$ -吡喃酮) 类化合物的研究, 期望开发出类似于喹诺酮的抗微生物药物。一些天然的香豆素类化合物如香豆霉素 (coumermycin A<sub>1</sub>)、新

生霉素 (novobiocin)、氯新生霉素 (chlorobiocin) 等已得到广泛研究, 它们不仅可通过抑制三磷酸腺苷酶的活性阻碍 DNA 的超螺旋, 导致细菌死亡, 还可作用于 DNA 拓扑异构酶 II, 干扰 DNA 的复制、转录和染色体的分离, 从而有效抑制细菌的生长。然而该类化合物水溶性差、抑制革兰阴性菌的能力弱和毒副作用大等致使其至今未能广泛应用于临床。近些年来, 许多人工合成的香豆素类化合物显示出了良好的抗微生物活性及宽的抗微生物谱, 具有开发成药的希望, 值得一提的是一些化合物能有效地抑制耐甲氧西林金葡菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的生长, 致使无数研究者致力于香豆素类药物的开发。众多研究发现, 一些氮杂环如吡咯、噻唑、吡唑等引入到香豆素类化合物 (如 1~4) (图 1), 显示出良好的生物活性, 且其抗细菌、抗真菌能力比一些临床药物更强, 具有成药的潜力<sup>[14-19]</sup>。尽管已经有多种氮杂环被研究, 然而迄今为止将苯并三唑引入香豆素的研究未见文献报道。

苯并三唑是一个重要的芳香氮杂环化合物, 可作为苯并咪唑、咪唑、三唑等的等排体, 能通过形成氢键、离子键、分子间  $\pi$ - $\pi$  堆积、静电作用等有效调节药物分子的脂水分配系数, 改变药物分子的理化性质, 改善药物的药代动力学性质, 进而提高生物活性。因此, 苯并三唑环被广泛地用于构筑药物分子。一些结构简单的 *N*-取代的苯并三唑类化合物如 5~8 (图 2) 已经显示出了广谱抗微生物活性<sup>[20-23]</sup>。本课题组长期致力于结构新颖的唑类氮杂环抗感染药物研发<sup>[24-32]</sup>, 在近来的研究中发现将 1, 2, 4-三唑氮杂环引入香豆素所得到的香豆素三唑化合物具有良好的抗微生物活性, 具有发展成抗感染药物的潜力<sup>[33, 34]</sup>, 作为在该领域研究的继续, 本文将 1, 2, 3-苯并三唑作为 1, 2, 4-三唑的等排体与香豆素键连, 得到一系列香豆素苯并三唑新化合物, 并考察其体外抗微生物能力。一些文献显示, 桥链基团可调节药物分子的理化性质、脂水分配系数及空间构型等, 改善药物与靶点的结合, 从而影响其生物活性<sup>[35, 36]</sup>。鉴于此, 本

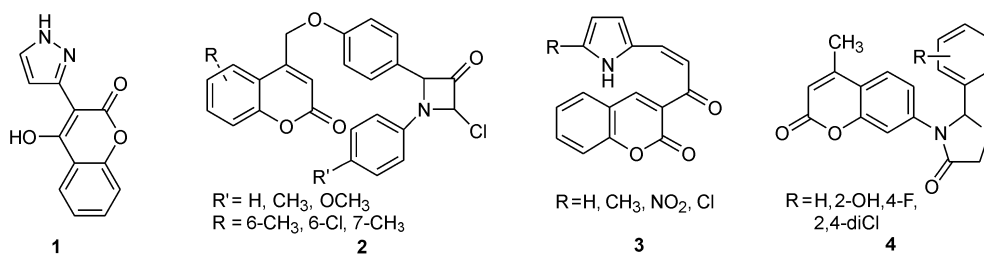


Figure 1 Structures of some coumarin-based nitrogen-containing heterocyclic compounds with potent antimicrobial activities

文考察不同长度的烷基链和取代位置不同的芳基链对香豆素苯并三唑类化合物体外抗微生物活性的影响。

许多研究表明,临床上将两种或两种以上药物联用所产生的协同作用常能提高药效和生物利用度、消除和减轻毒副作用及过敏反应、克服多药耐药性问题以及治疗单一药物不能治愈的严重混合性疾病,此外联合用药研发还存在开发成本低、周期短、成功可能性大等诸多优点<sup>[37]</sup>,因此其研究较活跃,应用也日趋广泛。将作用靶点不同的药物联用,如抗真菌药伏立康唑(voriconazole)、卡泊芬净(caspofungin)和两性霉素B(amphotericin B)合用,不仅可减少用药剂量,还能有效抑制氟康唑不敏感的曲霉菌属的生长<sup>[38]</sup>。香豆素类化合物是II型DNA拓扑异构酶、DNA回旋酶的抑制剂,而氯霉素和氟康唑则分别作用于细菌原核细胞内核糖体50s亚基和真菌羊毛甾醇14 $\alpha$ -去甲基化酶。因此,本文也考察了不同作用靶点的香豆素苯并三唑与氯霉素或氟康唑联用体外协同抗细菌和抗真菌活性。

目标化合物香豆素苯并三唑的合成见合成路线1。以间苯二酚为起始原料,与乙酰乙酸乙酯环化得中间体4-甲基-7-羟基香豆素9,进一步通过羟基的醚

化反应制备香豆素溴化物10a~10e和12a~12c,再与1H-1,2,3-苯并三唑的N-烷基化得到香豆素苯并三唑11a~11e和13a~13c。新化合物结构经<sup>1</sup>H NMR、IR、MS和元素分析证实。

## 结果与讨论

### 1 化学部分

#### 1.1 香豆素类化合物的合成

**1.1.1 7-羟基-4-甲基香豆素(9)的合成** 中间体7-羟基-4-甲基香豆素(9)的合成,文献方法一般以间苯二酚和乙酰乙酸乙酯为原料,以浓硫酸等强酸作催化剂制备,但该方法存在选择性差,伴有氧化、磺化等副反应,后处理繁琐、对环境污染大等缺点<sup>[4,39]</sup>。本文改用草酸作催化剂,无溶剂进行Pechmann环化制备香豆素9,产率可达95%。与浓硫酸作催化剂相比,本方法存在产率高、后处理简便、环境污染小及易于工业化等优点。

**1.1.2 香豆素溴化物10a~10e及12a~12c的合成** 化合物10a~10e及12a~12c的合成参照文献<sup>[40]</sup>方法。文献采用7-羟基-4-甲基香豆素、二溴化合物及碳酸钾的投料摩尔比为1:1:1,但反应中由于副产物双香豆素14(图3)的产生,导致产率较低,仅为44%。

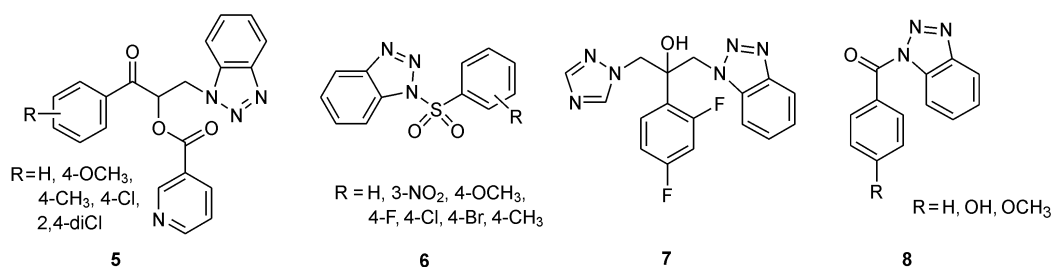
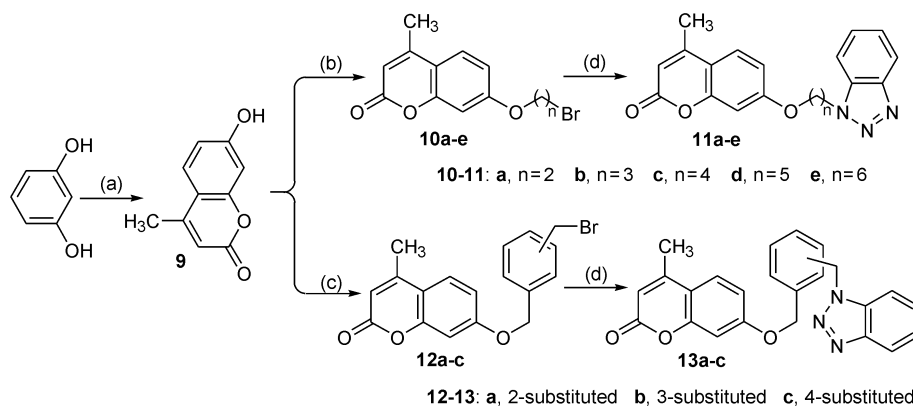


Figure 2 Structures of some benzotriazole derivatives as promising antimicrobial agents



Reagents and reaction conditions: (a) ethyl acetoacetate, oxalic acid, 80 °C, 8 h; (b) alkyl dibromide, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetone, reflux, 6-7 h; (c) aralkyl dibromide, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetone, reflux, 5-6 h; (d) 1H-1,2,3-benzotriazole, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 6-10 h

Scheme 1 Synthetic route of target coumarin-based benzotriazole compounds

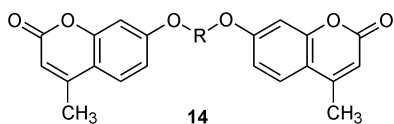


Figure 3 Structure of bis-coumarins

本研究对此实验方案进行了改进, 将投料比改为 1 : 1.2 : 1.5, 有效地减少了二溴化合物偶联两个香豆素形成副产物 **14**, 从而有利于目标香豆素溴化物的生成, 使得目标化合物 **10a~10e** 及 **12a~12c** 产率提高至 79%~86%。

**1.1.3 香豆素苯并三唑 11a~11e 和 13a~13c 的合成**  
苯并三唑存在 1*H*-1, 2, 3 苯并三唑和 2*H*-1, 2, 3 苯并三唑两种互变异构体 (图 4), 在碱性条件下形成的负离子存在 A、B 和 C 3 种共振式, 其中 A 和 C 实质上等同, 为动力学稳定共振式, 而 B 为热力学稳定共振式, 因此苯并三唑在碱性条件下可发生亲核取代反应, 产生 1 (或 3)-位、2-位氮取代产物。

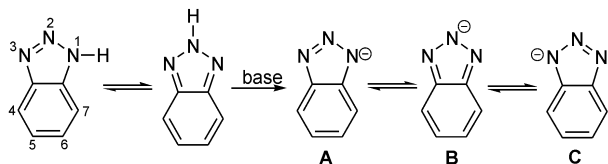


Figure 4 The tautomeric form of 1*H*-1, 2, 3-benzotriazole as well as their three resonance forms (A, B, C) in the presence of base

在低温或室温的弱碱性条件下, 苯并三唑主要以动力学稳定构象即 A 和 C 的形式存在, 易于得到 1 (或 3)-位 *N* 取代苯并三唑类化合物, 但是随着温度逐渐升高或碱性的增强, 动力学稳定的 A、C 构象转化为热力学稳定的 B 构象, 相应的得到 2-位 *N* 取代的苯并三唑类化合物<sup>[41, 42]</sup>。此外研究表明热力学稳定的 2-位氮取代的苯并三唑衍生物极性大于动力学稳定的 1 (或 3)-位氮取代的苯并三唑衍生物 (图 5)<sup>[43]</sup>。因此, 本文以乙腈作溶剂、碳酸钾作碱、50 °C 时先将碱与苯并三唑在乙腈中搅拌 1 h, 让其充分形成钾盐, 冷却至室温, 这时反应体系中主要以 A、C 构象负离子存在, 再加入香豆素溴化物, 生成 **I** 和 **II** 两种形式产物 (图 5), 且产物 **I** 即 1 (或 3)-位 *N* 取代产物的产率远远高于产物 **II** 即 2-位氮取代衍生物。此外, 苯并三唑稍过量, 使目标化合物香豆素苯并三唑以高产率 (79%~83%) 获得。

## 1.2 结构表征

香豆素新化合物 **11~13** 结构经 IR、<sup>1</sup>H NMR、MS 以及元素分析证实。

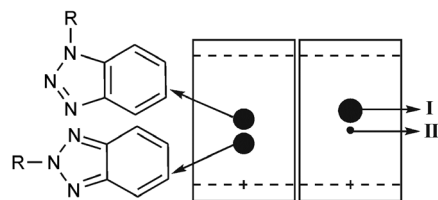


Figure 5 Thin layer chromatography of benzotriazole derivatives

红外波谱 (IR) 数据表明, 所有香豆素苯并三唑给出相似的红外吸收峰。其特征吸收峰波数变化不大。香豆素环上羰基 (C=O) 伸缩振动的特征吸收峰出现在 1 709~1 723  $\text{cm}^{-1}$ 。桥基对香豆素环上羰基的红外波数有一定影响。随着烷基桥链的增长, 羰基的红外吸收峰波数依次轻微增大, 当桥基碳原子达到 4 个时, 波数达到最大 (1 723  $\text{cm}^{-1}$ ), 烷基桥链继续增长时, 羰基峰移向低波数 (图 6)。若桥基中引入芳香环, 也出现类似现象。当桥基为邻位取代, 即其有效碳链为 4 个碳时, 化合物 **13a** 中羰基峰的红外波数最大, 为 1 722  $\text{cm}^{-1}$ 。随着有效碳链增长, 羰基红外吸收峰波数降低, 如化合物 **13b** (桥基为间二苄基, 有效桥链长度为 5 个碳原子) 和 **13c** (桥基为对二苄基, 有效桥链长度为 6 个碳原子) 羰基红外波数分别降为 1 716 和 1 705  $\text{cm}^{-1}$ 。

香豆素苯并三唑中芳环上的 C-H 伸缩振动则在 3 107~3 039  $\text{cm}^{-1}$  区域出现弱或中等强度的吸收带, 桥基类型如芳基和烷基、桥基长度、以及桥链芳环上取代位置对香豆素环和苯并三唑环上的 C-H 红外波数影响较小。

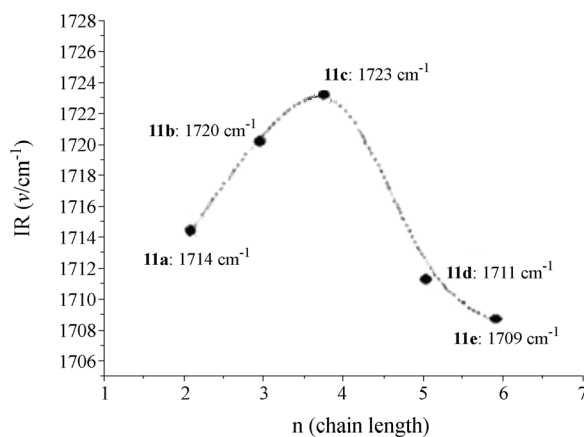


Figure 6 The IR data of carbonyl (C=O) target coumarin alkyl benzotriazole compounds **11a~11e**

核磁 <sup>1</sup>H 谱表明, 由于香豆素 **9** 具有较大的芳香共轭体系, 降低了羟基中质子的电荷密度, 使得羟基质子给出非常大的化学位移 ( $\delta$  13.44)。在各类香豆

素化合物中, 包括羟基未取代的香豆素 **9**、溴烷基类 **10**、溴芳基类 **12** 以及对应的苯并三唑类 **11** 和 **13**, 香豆素环上 3-位和 5-位质子以及 4-位甲基质子的化学位移没有大的变化, 分别出现在  $\delta$  7.48~7.53、6.13~6.16 和 2.35~2.40, 表明化合物 **9** 中香豆素环上 7-位羟基修饰后对远离取代基的环上 3-、5-位质子和 4-位甲基质子的化学位移影响不大。而距离 7-位取代基较近的香豆素上 6-位质子  $H^a$  和 8-位质子  $H^b$  的化学位移则发生明显的改变。香豆素环上 7-位羟基取代后的  $H^a$  和  $H^b$  的化学位移均移向高场。与化合物 **9** 比较, 含供电子的烷基香豆素 **10** 和 **11** 的  $H^a$  和  $H^b$  分别向高场移动约 0.08~0.1, 而芳基香豆素 **12** 和 **13** 的  $H^a$  和  $H^b$  向高场仅有轻微移动, 分别约 0.02~0.04 (表 1)。

**Table 1** Partial  $^1\text{H}$  NMR data of some synthesized coumarin compounds ( $\delta$ )

Compd.	$H^a$	$H^b$	$H^c$	$H^d$
<b>9</b>	6.89	6.89		
<b>10e</b>	6.78	6.78	4.71	3.54
<b>11a</b>	6.81	6.81	5.15	4.73
<b>11b</b>	6.81	6.81	4.98	4.11
<b>11c</b>	6.80	6.80	4.84	4.05
<b>11d</b>	6.79	6.79	4.74	4.02
<b>11e</b>	6.79	6.79	4.73	4.01
<b>12b</b>	6.85	6.85	4.88	4.11
<b>13a</b>	6.87	6.87	5.48	5.16
<b>13b</b>	6.86	6.86	5.44	5.13
<b>13c</b>	6.86	6.86	5.48	5.15

在化合物 **10**~**13** 中, 由于大共轭体系的香豆素环临近  $H^c$  质子, 使质子去屏蔽作用强于  $H^d$ , 导致  $H^c$  比对应的  $H^d$  有更大的低场化学位移。香豆素溴化物 **10** 和 **12** 中的 Br 被苯并三唑芳杂环取代后使其邻近的  $H^d$  质子去屏蔽效应增强, 致使对应的香豆素苯并三唑 **11** 和 **13** 中  $H^d$  质子向低场有较大幅度的移动, 且桥基类型与长度对  $H^c$  和  $H^d$  的化学位移有较大影响。烷基溴化物 **10** 中的  $H^c$  (**10e** 的  $H^c$  为 4.71) 和  $H^d$  (**10e** 的  $H^d$  为 3.54) 的化学位移比对应的芳基溴化物 **12** 的  $H^c$  (**12b** 的  $H^c$  为 4.88) 和  $H^d$  (**12b** 的  $H^d$  为 4.11) 小。含脂肪桥基的香豆素苯并三唑 **11** 中  $H^c$  在 4.73~5.15 和  $H^d$  在 4.01~4.73 分别出现三重峰, 其化学位移小于含芳香桥基的化合物 **13** 的单峰  $H^c$  (5.44~5.48) 和

$H^d$  (5.13~5.16)。且含脂肪桥基的化合物 **11** 中  $H^c$  和  $H^d$  随着烷基链增长, 其化学位移轻微地向高场移动。

此外, 化合物 **11a**~**11e** 和 **13a**~**13c** 中苯并三唑环上的质子由于离取代基较远, 其化学位移变化较小。

香豆素苯并三唑类化合物的质谱均呈现出  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  和  $[\text{M}+\text{H}]^+$  分子离子峰。元素分析数据进一步证实化合物结构与预期相符。

## 2 微生物活性部分

### 2.1 香豆素类化合物体外抗细菌活性

体外抗细菌活性数据见表 2。合成的香豆素类化合物 **9**~**13** 对所测试的细菌具有不同程度的抑制作用。羟基未取代的香豆素 **9** 对革兰阳性菌 *S. aureus*、*B. subtilis* 和 *M. luteus* 具有中等抑制活性 ( $\text{MIC} = 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 抗菌活性明显低于参考药物氯霉素 ( $\text{MIC} 4\sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。其羟基烷化后的化合物 **10a**~**10e** 和 **12a**~**12c** 抗细菌活性均大大减弱或消失, 表明香豆素环上烷基或芳基的引入不利于增强其抗细菌活性。然而, 化合物 **10a**~**10e** 和 **12a**~**12c** 的溴原子用苯并三唑环取代后得到的香豆素苯并三唑 **11a**~**11e** 和 **13a**~**13c** 具有显著的抗细菌 (MRSA 除外) 能力, 其活性比它对应的溴化物前体 **10a**~**10e** 和 **12a**~**12c** 强得多, 这表明苯并三唑对抗微生物能力起了重要作用。

香豆素苯并三唑 **11a**~**11e** 和 **13a**~**13c** 对 *B. Subtilis*、*E. coli*、*S. typhi*、*S. dysenteriae* 和 MRSA 具有中等、弱或无明显的抑制活性, 但能有效抑制 *S. aureus*、*M. luteus* 及 *P. vulgaris* 的生长, 其中含烷基桥链 ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub> 的化合物 **11a** 抑制革兰阳性菌 *S. aureus* 和 *M. luteus* 的生长能力 ( $\text{MIC} = 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与阳性对照氯霉素 ( $\text{MIC} = 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 相当, 含 ( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub> 桥链的化合物 **11b** 抗 *S. aureus* 和 *M. luteus* 的活性 ( $\text{MIC} = 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 是氯霉素的 2 倍, 本文制备的所有香豆素苯并三唑包括烷基类 **11a**~**11e** 和芳基类 **13a**~**13c** 对革兰阴性菌 *P. Vulgaris* 的抑制活性 ( $\text{MIC} = 4\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 均比氯霉素 ( $\text{MIC} = 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 高 2~4 倍。因此, 苯并三唑环的引入不仅显著提高了香豆素类化合物体外抗细菌活性, 还大大提高了香豆素类化合物抑制革兰阴性菌生长的能力。香豆素苯并三唑类化合物作为抗细菌药物显示出巨大潜力, 值得进一步研究开发。

香豆素苯并三唑类化合物中桥链基团对抗细菌活性具有显著的影响。烷基桥链化合物 **11a**~**11e** 抑制细菌生长的能力比芳基桥链的化合物 **13a**~**13c** 更

**Table 2** *In vitro* antimicrobial activities of synthesized coumarin compounds **9–13** expressed as MIC ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<sup>a, b, c</sup>. <sup>a</sup>Minimum inhibitory concentrations were determined by two-fold serial dilution method for microdilution plates. <sup>b</sup>A: Chloromycin; B: Fluconazole. <sup>c</sup>*S. aureus*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; MRSA: *Staphylococcus aureus* N 315; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *M. luteus*: *Micrococcus luteus* ATCC 4698; *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922; *P. vulgaris*: *Proteus vulgaris* ATCC 6896; *S. typhi*: *Salmonella typhi* ATCC 9484; *S. dysenteriae*: *Shigella dysenteriae* ATCC 49550; *C. albicans*: *Candida albicans* ATCC 76615; *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; *A. fumigatus*: *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918

Compd.	Gram <sup>+</sup> bacteria				Gram <sup>-</sup> bacteria				Fungi		
	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. fumigatus</i>
<b>9</b>	32	128	32	32	128	256	128	>256	128	128	128
<b>10a</b>	256	>256	>256	>256	256	256	128	128	256	256	>256
<b>10b</b>	128	256	128	128	256	256	256	>256	128	256	>256
<b>10c</b>	256	128	>256	256	128	256	128	256	128	256	>256
<b>10d</b>	128	256	128	256	>256	>256	>256	256	128	>256	256
<b>10e</b>	256	256	128	64	>256	256	256	>256	256	256	>256
<b>11a</b>	4	>256	64	4	64	8	128	128	32	64	64
<b>11b</b>	2	>256	32	2	32	4	128	128	64	64	64
<b>11c</b>	16	>256	32	32	32	4	32	32	32	64	64
<b>11d</b>	16	>256	64	32	64	8	32	32	64	128	64
<b>11e</b>	32	>256	128	64	128	8	>256	>256	64	128	128
<b>12a</b>	>256	>256	>256	256	>256	>256	>256	256	256	256	256
<b>12b</b>	256	>256	256	>256	>256	>256	>256	>256	256	256	256
<b>12c</b>	256	>256	256	256	>256	>256	>256	256	256	256	256
<b>13a</b>	64	>256	256	32	256	8	>256	>256	>256	>256	>256
<b>13b</b>	32	>256	256	64	256	8	>256	>256	256	256	>256
<b>13c</b>	64	>256	>256	64	>256	8	>256	256	>256	>256	256
<b>A</b>	4	16	8	4	8	16	4	4	—	—	—
<b>B</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	128

强, 且抗菌谱更宽。桥链的长度也影响抗菌活性, 短的烷基桥链如  $(\text{CH}_2)_2$  和  $(\text{CH}_2)_3$  的引入有助于提高香豆素苯并三唑类化合物抗革兰阳性菌 *S. aureus* 和 *M. luteus* 的活性, 随着碳链的增长, 活性降低, 而中等长度烷基桥链如  $(\text{CH}_2)_4$  和  $(\text{CH}_2)_5$  则有助于增强抑制 *S. typhi* 和 *S. dysenteriae* 生长的能力。而桥链基团对目标化合物抗 MRSA 及 *P. vulgaris* 活性似乎没有太大的影响。桥链基为芳香环时其取代位置的改变对化合物 **13a~13c** 的抗细菌活性也没有明显影响。由此可见, 桥链基团的变化不仅影响目标化合物的抗菌活性, 还具有选择性抑菌作用。该类化合物的抗细菌作用机制、构效关系及其结构优化还有待进一步研究。

## 2.2 香豆素类化合物体外抗真菌活性

体外抗真菌活性结果见表 2。中间体香豆素 **9** 及其溴化物 **10a~10e** 和 **12a~12c** 体外均无明显抗真菌活性。而目标化合物特别是香豆素苯并三唑 **11a~11e** 对所测试真菌, 包括对氟康唑不敏感的 *A. fumigatus* 均有中等的抑制活性, 且化合物 **11a~11d** 抗 *A. fumigatus* 活性 ( $\text{MIC} = 64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 强于参考药物氟康唑 ( $\text{MIC} = 128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。可见香豆素苯并三唑类

化合物抗曲霉菌领域的研究值得进一步探索。

## 2.3 香豆素苯并三唑 **11a**、**13c** 与氯霉素联用抗细菌活性

氯霉素与香豆素苯并三唑 **11a** 或 **13c** 联用抗细菌活性测试结果如表 3 所示。用  $0.5\sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的氯霉素与香豆素苯并三唑 (**11a** 或 **13c**) 联用即可发挥有效的抑菌作用, 用药剂量较香豆素苯并三唑 ( $2\sim 256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 或氯霉素 ( $4\sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 单独使用时显著减少, 抗菌能力增强了 4~8 倍, 且 FIC 指数均小于等于 0.5, 呈现出良好的协同抑菌作用。特别是化合物 **13c** 与氯霉素联用后对 *S. typhi*、*S. dysenteriae*、*E. coli* 及 *B. subtilis* 的抑制能力显著强于 **13c** ( $\geq 256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。此外, 最值得关注的是联合用药后具有显著的抗 MRSA 活性。众所周知, MRSA 作为感染性疾病的主要致病菌之一, 对喹诺酮、大环内酯、氨基糖苷、 $\beta$ -内酰胺以及参考药物氯霉素等临床抗菌药物都具有较强的耐药性。其所引起的感染, 如心内膜炎、肺炎等治疗十分困难, 严重危害了人类生命。因此, MRSA 感染的治疗成了当前医药领域的研究热点和难点。本研究发现仅  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的氯霉素分别与香豆素苯并三唑 **11a** 或 **13c** 联用后, 即可有效地抑制

MRSA 的生长, 抗 MRSA 活性是氯霉素的 8 倍。由此可见, 香豆素苯并三唑的添加在氯霉素抗菌活性中发挥了重要的作用, 它们的添加不仅提高了氯霉素的抗菌活性, 还拓宽了其抗菌谱。从理论上分析, 可能是由于香豆素类化合物和氯霉素抗菌作用靶点不同, 联用时相互影响产生的协同作用, 增强了抗菌作用, 减少了用药剂量, 提高了抗菌能力。其相关协同作用机制有待进一步研究。

#### 2.4 香豆素苯并三唑 11a 或 13c 与氟康唑联用抗真菌活性研究

氟康唑与香豆素苯并三唑 11a 或 13c 联用抗真菌活性测试结果 (表 4) 表明, 香豆素苯并三唑与氟康唑联用显示出良好的抗 *C. albicans*、*S. cerevisiae* 和 *A. fumigatus* 活性。氟康唑 ( $0.25\sim 0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 中添加一定量的香豆素苯并三唑 11a 或 13c 即能有效的抑制 *C. albicans* 和 *S. cerevisiae* 的生长。因此, 有望通过与香豆素苯并三唑联用来改善氟康唑因用药剂量大所导致的耐药性及毒性问题。该类研究还有望改善氟康唑抗菌谱窄的问题, 拓展唑类化合物在抗曲霉菌属领域的应用。

#### 3 小结

本文以间苯二酚和乙酰乙酸乙酯为起始原料经环化、醚化及 1*H*-1, 2, 3-苯并三唑的 *N*-烷化反应合成了一系列香豆素苯并三唑新化合物, 化合物结构经 IR、 $^1\text{H}$  NMR、MS 谱和元素分析证实。合成的化合物对所测试的细菌和真菌呈现出了不同程度的抑制

作用。其中目标化合物 11a 和 11b 抗 *S. aureus*、*M. luteus* 活性与氯霉素相当; 化合物 11a~11e 和 13a~13c 抑制 *P. vulgaris* 生长能力强于氯霉素; 化合物 11a~11d 对 *A. fumigatus* 抑制活性优于氟康唑。因此香豆素苯并三唑类化合物作为抗微生物药物具有开发潜力, 值得进一步研究。此外, 抗感染药物氯霉素、氟康唑与香豆素苯并三唑联用后, 抗微生物效果较其单独使用增强了 2~8 倍, 特别是香豆素苯并三唑与氯霉素联用后所显示的显著抗 MRSA 活性, 对多药耐药菌株的治疗及人类健康具有深远意义。此外, 与氟康唑联用所显示的良好抗 *A. fumigatus* 活性有望拓展唑类化合物在抗曲霉菌领域的应用。香豆素苯并三唑与更多临床抗感染药物联用值得进一步研究, 有望为感染类疾病的治疗作出贡献。

## 实验部分

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

熔点仪: X-6 型精密显微熔点测定仪 (温度未校正); 红外光谱仪: Bio-Rad FTS-185, Bruker RFS100/S (KBr 压片, 测试范围  $400\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ ); 核磁共振仪: Bruker AV 300 核磁共振仪 (TMS 内标); 质谱仪: LCMS-2010A (ESI 电离源); 元素分析仪: Carlo Erba 1106 型元素分析仪。

#### 1.2 试剂

硅胶: 青岛海洋化工厂; 间苯二酚、乙酰乙酸乙

**Table 3** Combination effect of coumarin benzotriazole compounds 11a and 13c with chloromycin against eight bacteria

Bacteria	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		FIC index	Effect	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		FIC index	Effect
	Chloromycin	11a			Chloromycin	13c		
<i>S. aureus</i>	1	0.5	0.375	synergistic	1	8	0.375	synergistic
MRSA	2	64	0.375	synergistic	2	64	0.375	synergistic
<i>B. subtilis</i>	2	8	0.375	synergistic	2	64	0.500	synergistic
<i>M. luteus</i>	1	1	0.500	synergistic	0.5	16	0.375	synergistic
<i>E. coli</i>	2	16	0.500	synergistic	2	32	0.375	synergistic
<i>P. vulgaris</i>	2	2	0.375	synergistic	4	2	0.500	synergistic
<i>S. typhi</i>	0.5	16	0.250	synergistic	1	32	0.375	synergistic
<i>S. dysenteriae</i>	1	32	0.500	synergistic	0.5	32	0.250	synergistic

**Table 4** Combination effect of coumarin benzotriazole compounds with fluconazole on three fungi

Fungi	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		FIC index	Effect	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		FIC index	Effect
	Fluconazole	11a			Fluconazole	13c		
<i>C. albicans</i>	0.25	4	0.250	synergistic	0.25	32	0.375	synergistic
<i>S. cerevisiae</i>	0.25	8	0.250	synergistic	0.5	64	0.500	synergistic
<i>A. fumigatus</i>	16	8	0.250	synergistic	16	32	0.250	synergistic

酯、烷基二溴化物、1*H*-1, 2, 3-苯并三唑及其他所需试剂均为市售分析纯; 邻二苄溴、间二苄溴、对二苄溴: 自制 (制备方法参考文献<sup>[44]</sup>); 氟康唑: 富阳金伯士化工有限公司; 氯霉素: 四川泰华堂制药有限公司; 牛肉膏、蛋白胨、RMPI 1640 (Gibco BRL)、吗啡、丙磺酸、琼脂、葡萄糖、酵母浸膏等: 北京奥博星生物技术有限公司。

### 1.3 体外抗微生物活性测试用细菌和真菌

体外抗微生物活性测试的细菌包括 4 株革兰阳性菌: 金葡萄菌 ATCC 25923、耐甲氧西林金葡萄菌 N 315、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 和藤黄微球菌 ATCC 4698; 4 株革兰阴性菌: 大肠杆菌 ATCC 25922、变形杆菌 ATCC 6896、伤寒沙门菌 ATCC 9484 和痢疾志贺菌 ATCC 49550; 3 株真菌: 白色念珠菌 ATCC 76615、酿酒酵母菌 ATCC 9763 和对氟康唑不敏感的烟曲霉菌 ATCC 96918 由西南大学药学院和中国人民解放军第三军医大学提供。

## 2 香豆素类化合物 9~13 的合成及结构表征

### 2.1 7-羟基-4-甲基香豆素 (7-hydroxy-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (9)

在装有回流冷凝管的 150 mL 单颈瓶中依次加入间苯二酚 (11.0 g, 100 mmol)、乙酰乙酸乙酯 (13.6 g, 100 mmol) 和草酸 (5.2 g, 50 mmol), 80 °C 搅拌 8 h 至反应完全 (TLC 跟踪反应, 展开剂: 石油醚-乙酸乙酯,  $v/v=2:1$ ), 冷却至室温, 反应物倒入冰水中搅拌 10 min, 析出淡黄色固体, 静置抽滤。固体用水洗涤, 再用乙醇重结晶, 烘干得白色固体 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) 15.4 g, 产率 95%; 熔点 192~193 °C (CAS 号: 90-33-5; 文献<sup>[39]</sup>熔点: 184~185 °C); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.47~13.41 (br, 1H, coumarin-OH), 7.51 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 6.90~6.88 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.15 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 2.37 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>)。

### 2.2 香豆素烷基溴化物 10a~11e

**2.2.1 7-(2-溴代乙氧基)-4-甲基香豆素 (7-(2-bromoethoxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (10a)** 将 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、1, 2-二溴乙烷 (2.2 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 及丙酮 (50 mL) 加入到装有回流冷凝管的 100 mL 单颈瓶中, 加热回流。搅拌 5 h 后反应完全 (TLC 跟踪反应, 展开剂: 石油醚-氯仿,  $v/v=1:1$ )。冷却至室温, 减压蒸馏回收丙酮, 水溶解反应体系中的固体, 二氯甲烷 (50 mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩, 硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-石油醚,  $v/v=$

1:1), 得白色固体 7-(2-溴代乙氧基)-4-甲基香豆素 (10a) 2.4 g, 产率 84%; 熔点 107~108 °C (文献<sup>[33]</sup>值: 106~108 °C)。

**2.2.2 7-(3-溴代丙氧基)-4-甲基香豆素 (7-(3-bromopropoxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (10b)** 化合物 10b 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、1, 3-二溴丙烷 (2.4 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 及丙酮 (50 mL)。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 乙酸乙酯-石油醚,  $v/v=1:4$ ), 得白色固体 7-(3-溴代丙氧基)-4-甲基香豆素 (10b) 2.6 g, 产率 85%; 熔点 83~84 °C (文献<sup>[33]</sup>值: 83~84 °C)。

**2.2.3 7-(4-溴代丁氧基)-4-甲基香豆素 (7-(4-bromobutoxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (10c)** 化合物 10c 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、1, 4-二溴丁烷 (2.6 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 以及丙酮 (50 mL)。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 乙酸乙酯-石油醚,  $v/v=1:4$ ), 得白色固体 7-(4-溴代丁氧基)-4-甲基香豆素 (10c) 2.7 g, 产率 86%; 熔点 66~67 °C (文献<sup>[33]</sup>值: 66~67 °C)。

**2.2.4 7-(5-溴代戊氧基)-4-甲基香豆素 (7-(5-bromopentyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (10d)** 化合物 10d 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、1, 5-二溴戊烷 (2.7 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 以及丙酮 (50 mL)。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 乙酸乙酯-石油醚,  $v/v=1:4$ ), 得白色固体 7-(5-溴代戊氧基)-4-甲基香豆素 (10d) 2.70 g, 产率 83%; 熔点 67~68 °C (文献<sup>[33]</sup>值: 67~68 °C)。

**2.2.5 7-(6-溴代己氧基)-4-甲基香豆素 (7-(6-bromohexyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (10e)** 化合物 10e 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、1, 6-二溴己烷 (2.9 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 及丙酮 (50 mL)。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 乙酸乙酯-石油醚,  $v/v=1:4$ ), 得白色固体 7-(6-溴代己氧基)-4-甲基香豆素 (10e) 2.9 g, 产率 84%; 熔点 56~57 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 088, 3 058 (Ar-H), 2 937, 2 952, 2 865 (CH<sub>2</sub>), 1 712 (C=O), 1 627, 1 579, 1 521 (aromatic frame), 1 465, 1 378, 1 364, 1 100, 1 010, 994, 875, 841, 767, 721, 631 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.50 (d,  $J=6.0$  Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 6.80~6.77 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.16 (s, 1H, coumarin 3-*H*),

4.71 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H coumarin-OCH<sub>2</sub>), 3.54 (t,  $J = 4.02$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 2.35 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>), 2.12~2.09 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.87~1.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 1.58~1.53 (m, 4H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); ESI-MS  $m/z$ : 341 [M+2+H]<sup>+</sup> (<sup>81</sup>Br), 339 [M+H]<sup>+</sup> (<sup>79</sup>Br); Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>3</sub>: C 55.65, H 5.65; Found: C 55.69, H 5.60.

### 2.3 香豆素烷基苯并三唑 11a~11e

**2.3.1 7-(2-(1H-苯并三唑-1-基)乙氧基)-4-甲基香豆素 (7-(2-(1H-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one) (11a)** 在 100 mL 单颈瓶中加入 1H-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL, 加热至 50 °C 搅拌 1 h, 停止加热, 待体系冷却至室温, 再加入 7-(2-溴代乙氧基)-4-甲基香豆素 (10a) 1.4 g (5 mmol), 室温下继续搅拌 9 h 后反应完全 (TLC 跟踪反应, 展开剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ )。减压蒸馏回收乙腈, 水溶解反应体系中的固体, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL×3) 萃取 3 次, 合并有机相, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩, 硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(2-(1H-苯并三唑-1-基)乙氧基)-4-甲基香豆素 (11a) 1.3 g, 产率 79%; 熔点 185~186 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 093, 3 045 (Ar-H), 2 955, 2 926, 2 879 (CH<sub>2</sub>), 1 714 (C=O), 1 619, 1 573, 1 511 (aromatic frame), 1 396, 1 319, 1 300, 1 296, 1 150, 1 006, 990, 940, 870, 827, 786, 712 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.86~7.84 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-H), 7.49 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H, coumarin 5-H), 7.42~7.39 (m, 2H, benzotriazole 5, 6-H), 6.82~6.79 (m, 2H, coumarin 6, 8-H), 6.14 (s, 1H, coumarin 3-H), 5.15 (t,  $J = 3.2$  Hz, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.73 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.38 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 344 [M+Na]<sup>+</sup>, 322 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 67.28, H 4.71, N 13.08; Found: C 67.35, H 4.70, N 13.04.

**2.3.2 7-(3-(1H-苯并三唑-1-基)丙氧基)-4-甲基香豆素 (7-(3-(1H-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)propoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one) (11b)** 化合物 11b 的合成参照化合物 11a 的制备方法, 起始原料为 7-(3-溴代丙氧基)-4-甲基香豆素 (10b) (1.5 g, 5 mmol)、1H-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 以及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(3-(1H-苯并三唑-1-基)丙氧基)-4-甲基香豆素 (11b) 1.3 g, 产率 82%; 熔点 170~171 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 087, 3 065, 3 057 (Ar-H), 2 942, 2 921, 2 854 (CH<sub>2</sub>), 1 720 (C=O),

1 615, 1 510, 1 471 (aromatic frame), 1 388, 1 346, 1 328, 1 268, 1 173, 1 110, 991, 940, 873, 810, 771, 744 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.88~7.85 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-H), 7.48 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, coumarin 5-H), 7.41~7.38 (m, 2H, benzotriazole 5, 6-H), 6.83~6.78 (m, 2H, coumarin 6, 8-H), 6.14 (s, 1H, coumarin 3-H), 4.98 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.11 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.69~2.61 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.40 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 358 [M+Na]<sup>+</sup>, 336 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 68.05, H 5.11, N 12.53; Found: C 68.01, H 5.11, N 12.58.

**2.3.3 7-(4-(1H-苯并三唑-1-基)丁氧基)-4-甲基香豆素 (7-(4-(1H-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)butoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one) (11c)** 化合物 11c 的合成参照化合物 11a 的制备方法, 起始原料为 7-(4-溴代丁氧基)-4-甲基香豆素 (10c) (1.6 g, 5 mmol)、1H-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 以及乙腈 (30 mL)。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(4-(1H-苯并三唑-1-基)丁氧基)-4-甲基香豆素 (11c) 1.4 g, 产率 83%; 熔点 134~135 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 092, 3 051 (Ar-H), 2 964, 2 945, 2 883 (CH<sub>2</sub>), 1 723 (C=O), 1 610, 1 566, 1 510 (aromatic frame), 1 442, 1 417, 1 390, 1 328, 1 266, 1 160, 1 011, 978, 960, 917, 884, 802, 723 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.89~7.87 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-H), 7.50 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, coumarin 5-H), 7.40~7.37 (m, 2H, benzotriazole 5, 6-H), 6.83~6.77 (m, 2H, coumarin 6, 8-H), 6.13 (s, 1H, coumarin 3-H), 4.84 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.05 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>), 2.37~2.33 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.91~1.86 (m, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 372 [M+Na]<sup>+</sup>, 350 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 68.75, H 5.48, N 12.03; Found: C 68.70, H 5.51, N 12.04.

**2.3.4 7-(5-(1H-苯并三唑-1-基)戊氧基)-4-甲基香豆素 (7-(5-(1H-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)pentoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one) (11d)** 化合物 11d 的合成按照化合物 11a 的制备方法, 起始原料为 7-(5-溴代戊氧基)-4-甲基香豆素 (10d) (1.6 g, 5 mmol)、1H-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体化合物 7-(5-(1H-苯并三唑-1-基)戊氧基)-4-甲基香豆素 (11d) 1.5 g, 产率: 82%; 熔点 121~123 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 094, 3 041

(Ar-H), 2 955, 2 941, 2 894 (CH<sub>2</sub>), 1 711 (C=O), 1 619, 1 576, 1 464 (aromatic frame), 1 440, 1 409, 1 389, 1 301, 1 349, 1 288, 1 166, 1 011, 995, 953, 875, 832, 772, 710 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.99~7.96 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-*H*), 7.49 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.41~7.38 (m, 2H, benzotriazole 5, 6-*H*), 6.81~6.77 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.13 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 4.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.01 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.38 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>), 2.15~2.10 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.87~1.82 (m, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.58~1.56 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); ESI-MS *m/z*: 386 [M+Na]<sup>+</sup>, 364 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 69.41, H 5.82, N 11.56; Found: C 69.37, H 5.83, N 11.61。

**2.3.5 7-(6-(1*H*-苯并三唑-1-基)己氧基)-4-甲基香豆素 (7-(6-(1*H*-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)hexyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (11e)** 化合物 11e 的合成按照化合物 11a 的制备方法, 起始原料为 7-(6-溴代己氧基)-4-甲基香豆素 (10e) (1.7 g, 5 mmol)、1*H*-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮, *v/v* = 3 : 1), 得白色固体 7-(6-(1*H*-苯并三唑-1-基)己氧基)-4-甲基香豆素 (11e) 1.5 g, 产率 80%; 熔点 111~112 °C; IR (KBr) *v*: 3 089, 3 062, 3 048 (Ar-H), 2 940, 2 959, 2 760 (CH<sub>2</sub>), 1 709 (C=O), 1 614, 1 564, 1 510 (aromatic frame), 1 444, 1 390, 1 367, 1 256, 1 106, 1 018, 984, 950, 884, 820, 797, 747, 699, 625 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.01~7.98 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-*H*), 7.50 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.43~7.41 (m, 2H, benzotriazole 5, 6-*H*), 6.81~6.76 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.15 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 4.73 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.01 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.36 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>), 2.15~2.10 (m, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.87~1.82 (m, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.58~1.56 (m, 4H, coumarin-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, benzotriazole-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); ESI-MS *m/z*: 408 [M+Na]<sup>+</sup>, 386 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 70.01, H 6.14, N 11.13; Found: C 70.09, H 6.11, N 11.11。

## 2.4 香豆素芳基溴化物 12a~12c

**2.4.1 7-(2-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (7-(2-(bromomethyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (12a)** 化合物 12a 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g,

10 mmol)、邻二苄溴 (3.1 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 以及丙酮 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-石油醚, *v/v* = 3 : 2), 得白色固体 7-(2-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (12a) 2.92 g, 产率 81%; 132~133 °C; IR (KBr) *v*: 3 109, 3 055 (Ar-H), 2 967, 2 881, 2 780 (CH<sub>2</sub>), 1 713 (C=O), 1 655, 1 581, 1 500 (aromatic frame), 1 461, 1 405, 1 362, 1 250, 1 180, 1 200, 963, 889, 765, 741, 723, 710 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.39~7.31 (m, 4H, Ar 3, 4, 5, 6-*H*), 6.89~6.85 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.15 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 4.89 (s, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.22 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>Br), 2.41 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z*: 361 [M+2+H]<sup>+</sup> (<sup>81</sup>Br), 359 [M+H]<sup>+</sup> (<sup>79</sup>Br); Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>3</sub>: C 60.18, H 4.21; Found: C 60.08, H 4.24。

**2.4.2 7-(3-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (7-(3-(bromomethyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (12b)** 化合物 12b 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料为 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、间二苄溴 (3.1 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 以及丙酮 50 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-石油醚, *v/v* = 3 : 2), 得白色固体 7-(3-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (12b) 2.92 g, 产率 80%; 熔点 127~129 °C; IR (KBr) *v*: 3 091, 3 068 (Ar-H), 2 980, 2 931, 2 792 (CH<sub>2</sub>), 1 715 (C=O), 1 626, 1 578, 1 547 (aromatic frame), 1 434, 1 411, 1 332, 1 265, 1 154, 1 013, 956, 884, 780 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.46~7.29 (m, 4H, Ar 2, 4, 5, 6-*H*), 6.87~6.82 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.14 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 4.88 (s, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 4.11 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS *m/z*: 361[M+2+H]<sup>+</sup> (<sup>81</sup>Br), 359 [M+H]<sup>+</sup> (<sup>79</sup>Br); Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>3</sub>: C 60.18, H 4.21; Found: C 60.06, H 4.21。

**2.4.3 7-(4-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (7-(4-(bromomethyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (12c)** 化合物 12c 的合成参照化合物 10a 的制备方法, 起始原料 7-羟基-4-甲基香豆素 (9) (1.6 g, 10 mmol)、对二苄溴 (3.1 g, 12 mmol)、碳酸钾 (2.1 g, 15 mmol) 以及丙酮 50 mL, 经硅胶柱色谱析纯化 (洗脱剂: 氯仿-石油醚, *v/v* = 3 : 2), 得白色固体 7-(4-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (12c) 2.92 g, 产率 79%; 熔点 117~118 °C (文献<sup>[33]</sup>值: 117~118 °C)。

## 2.5 香豆素芳基苯并三唑 13a~13c

**2.5.1 7-(2-(1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-**

#### 4-甲基香豆素 (7-(2-((1*H*-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)-methyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (13a)

化合物 **13a** 的合成参照化合物 **11a** 的制备方法, 起始原料 7-(2-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**12a**) (1.8 g, 5 mmol)、1*H*-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(2-((1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**13a**) 1.6 g, 产率 81%; 熔点 154~155 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 103, 3 064 (Ar-H), 2 958, 2 926, 2 886 (CH<sub>2</sub>), 1 722 (C=O), 1 612, 1 507 (aromatic frame), 1 441, 1 424, 1 389, 1 371, 1 262, 1 222, 1 143, 1 000, 983, 963, 809, 753, 730 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.03~7.96 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-*H*), 7.51 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.44~7.41 (m, 6H, Ar 3, 4, 5, 6-*H*, benzotriazole 5, 6-*H*), 6.88~6.86 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.16 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 5.48 (s, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 5.16 (s, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.40 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 420 [M+Na]<sup>+</sup>, 398 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 72.53, H 4.82, N 10.57; Found: C 72.62, H 4.81, N 10.53。

#### 2.5.2 7-(3-((1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (7-(3-((1*H*-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-yl)-methyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (13b)

化合物 **13b** 的合成按照化合物 **11a** 的制备方法, 起始原料为 7-(3-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**12b**) (1.8 g, 5 mmol)、1*H*-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(3-((1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**13b**) 1.6 g, 产率 83%; 熔点 158~159 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 107, 3 078, 3 057 (Ar-H), 2 978, 2 913, 2 789 (CH<sub>2</sub>), 1 716 (C=O), 1 617, 1 552, 1 504 (aromatic frame), 1 423, 1 400, 1 334, 1 267, 1 154, 1 031, 1 001, 945, 828, 811, 764 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.01~7.98 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-*H*), 7.51 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.45~7.39 (m, 6H, Ar 3, 4, 5, 6-*H*, benzotriazole 5, 6-*H*), 6.88~6.84 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.15 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 5.44 (s, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 5.13 (s, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.39 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 420 [M+Na]<sup>+</sup>, 398 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 72.53, H 4.82, N 10.57; Found: C 72.47, H 4.77, N 10.62。

#### 2.5.3 7-(4-((1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (7-(4-((1*H*-benzo[d][1, 2, 3]triazol-1-

#### yl)-methyl)benzyloxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one) (13c)

化合物 **13c** 的合成按照化合物 **11a** 的制备方法, 起始原料为 7-(4-(溴甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**12c**) (1.8 g, 5 mmol)、1*H*-1, 2, 3-苯并三唑 (0.7 g, 6 mmol)、碳酸钾 (1.1 g, 8 mmol) 及乙腈 30 mL。经硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂: 氯仿-丙酮,  $v/v = 3 : 1$ ), 得白色固体 7-(4-((1*H*-苯并三唑-1-基)甲基)苯甲氧基)-4-甲基香豆素 (**13c**) 1.6 g, 产率 80%; 熔点 151~152 °C; IR (KBr)  $\nu$ : 3 099, 3 039 (Ar-H), 2 980, 2 931, 2 792 (CH<sub>2</sub>), 1 711 (C=O), 1 611, 1 540, 1 505 (aromatic frame), 1 445, 1 410, 1 399, 1 322, 1 275, 1 186, 1 023, 985, 942, 884, 842, 771 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.02~7.99 (m, 2H, benzotriazole 4, 7-*H*), 7.52 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, coumarin 5-*H*), 7.47~7.41 (m, 6H, Ar 3, 4, 5, 6-*H*, benzotriazole 5, 6-*H*), 6.87~6.85 (m, 2H, coumarin 6, 8-*H*), 6.14 (s, 1H, coumarin 3-*H*), 5.48 (s, 2H, coumarin-OCH<sub>2</sub>), 5.15 (s, 2H, benzotriazole-CH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 3H, coumarin-CH<sub>3</sub>); ESI-MS  $m/z$ : 420 [M+Na]<sup>+</sup>, 398 [M+H]<sup>+</sup>; Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C 72.53, H 4.82, N 10.57; Found: C 72.39, H 4.79, N 10.62。

### 3 体外抗微生物活性研究

#### 3.1 香豆素类化合物体外抗细菌活性测试

香豆素类化合物 **9~13** 的体外抗菌活性测试采用的是美国临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 推荐的倍比稀释药敏法。香豆素类化合物和参考药物均用 DMSO 溶解配制成母液, 采用倍比稀释法使得药物浓度依次为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 和 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。为了排除溶剂 DMSO 对体外抗菌活性测试的影响, DMSO 含量低于 1%。此外 96 孔板 12 号孔作为阳性对照不加药。临床上广泛使用的氯霉素作为参考药物。用最小抑制浓度 (MIC,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 来表征化合物抗细菌能力的强弱。

#### 3.2 香豆素类化合物体外抗真菌活性测试

香豆素类化合物 **9~13** 的体外抗真菌活性测试采用倍比稀释法, 药物浓度依次为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 和 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

上述抗细菌、抗真菌实验均平行操作 3 次, 能重复的 MIC 值准确记录; 偏差较大组, 重新进行测试直到符合要求为止。抗微生物活性结果见表 2。

#### 3.3 香豆素苯并三唑与氯霉素联用抗细菌活性研究

根据所测得的香豆素苯并三唑 **11a** 和 **13c** 以及氯霉素对测试细菌的 MIC 值, 依据 NCCLS 规定的抗微生物活性测试标准, 采用棋盘法 (香豆素苯并三唑与氯霉素浓度为单独用药时 MIC 的 1/8、1/4、1/2、1

和 2 倍)<sup>[45]</sup>测定香豆素苯并三唑 **11a** 或 **13c** 与氟康唑联用时抑制细菌生长能力。联合抑菌效果用 FIC (fractional inhibitory concentration) 指数来考核。测试结果见表 3。

### 3.4 香豆素苯并三唑与氟康唑联用抗真菌活性研究

依据所测的香豆素苯并三唑 **11a** 和 **13c** 及氟康唑对测试真菌的 MIC 值, 采用棋盘法测定香豆素苯并三唑与氟康唑合用时抗真菌活性。测试结果见表 4。

FIC 指数 = 联合用药后香豆素苯并三唑 MIC/联合用药前香豆素苯并三唑 MIC + 联合用药后参照药物的 MIC/联合用药前参照药物的 MIC (FIC 指数:  $\leq 1$  两者为协同作用;  $1 \sim 2$  为无关;  $> 2$  为拮抗作用)。

## References

- [1] Abraham K, Wöhrlein F, Lindtner O, et al. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54: 228–239.
- [2] Wagner BD. The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems [J]. *Molecules*, 2009, 14: 210–237.
- [3] Dong B, Ma T, Zhang T, et al. Anti-HIV-1 activity and structure-activity relationship of pyranocoumarin analogs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 35–38.
- [4] Borges F, Roleira F, Milhazes N, et al. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 887–916.
- [5] Yuan Y, Zhou CH, Liu Q, et al. New synthetic antibacterial agents [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2007, 16: 343–350.
- [6] Wang Y, Zhou CH. Recent advances in the researches of triazole compounds as medicinal drugs [J]. *Sci Sin B (中国科学 B: 化学)*, 2011, 41 (in press).
- [7] Mi JL, Zhou CH, Bai X. Advances in triazole antimicrobial agents [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2007, 32: 587–593.
- [8] Zhou CH, Zhang FF, Gan LL, et al. Review on supermolecules as chemical drugs [J]. *Sci Sin B (中国科学 B: 化学)*, 2009, 39: 208–252.
- [9] Zhou CH, Gan LL, Zhang YY, et al. Review on supermolecules as chemical drugs [J]. *Sci China B: Chem*, 2009, 52: 415–458.
- [10] Welte T, Pletz MW. Antimicrobial treatment of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: current and future options [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36: 391–400.
- [11] Zhu CX, Gao PH, Jiang YY. Advances in the study of *Candida albicans* gene mutation on azole drug resistance [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 821–826.
- [12] Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents [J]. *Chem Rev*, 2005, 105: 559–592.
- [13] Drlica K, Hiasa H, Kerns R, et al. Quinolones: action and resistance updated [J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9: 981–998.
- [14] Hamdi N, Saoud M, Romerosa A, et al. Synthesis, spectroscopic and antibacterial investigations of new hydroxy ethers and heterocyclic coumarin derivatives [J]. *J Heterocycl Chem*, 2008, 45: 1835–1842.
- [15] Ronad PM, Noolvi MN, Sapkal S, et al. Synthesis and antimicrobial activity of 7-(2-substituted phenylthiazolidinyl)-benzopyran-2-one derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 85–89.
- [16] Ajani OO, Nwinyi OC. Microwave-assisted synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 3-{3-(*S*-aryl and *S*-heteroaromatic)acryloyl}-2*H*-chromen-2-one derivatives [J]. *J Heterocycl Chem*, 2010, 47: 179–187.
- [17] Keri RS, Hosamani KM, Reddy HS, et al. Synthesis, *in-vitro* antimicrobial and cytotoxic studies of novel azetidinone derivatives [J]. *Arch Pharm*, 2010, 343: 237–247.
- [18] Manojkumar P, Ravi TK, Gopalakrishnan S. Antioxidant and antibacterial studies of arylazopyrazoles and arylhydrazonopyrazolones containing coumarin moiety [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 4690–4694.
- [19] Raghu M, Nagaraj A, Reddy CS. Synthesis and *in vitro* study of novel bis-[3-(2-arylmethylideneimino-1, 3-thiazol-4-yl)-4-hydroxy-2*H*-chromen-2-one-6-yl] methane and bis-[3-(2-arylidenehydrazo-1, 3-thiazol-4-yl)-4-hydroxy-2*H*-chromen-2-one-6-yl] methane as potential antimicrobial agents [J]. *J Heterocycl Chem*, 2009, 46: 261–267.
- [20] Fu J, Yang Y, Zhang XW, et al. Discovery of 1*H*-benzo[*d*][1, 2, 3]triazol-1-yl 3, 4, 5-trimethoxybenzoate as a potential antiproliferative agent by inhibiting histone deacetylase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 8457–8462.
- [21] Hergert LY, Nieto MJ, Becerra MC, et al. Synthesis of *N*-benzenesulfonylbenzotriazole derivatives, and evaluation of their antimicrobial activity [J]. *Lett Drug Des Discov*, 2008, 5: 313–318.
- [22] Wan J, Yan X, Ma CP, et al. Synthesis, structure characterization, and biological evaluation of some new 1, 2, 3-benzotriazole derivatives [J]. *Med Chem Res*, 2010, 19: 970–983.
- [23] Patel PD, Patel MR, Kocsis B, et al. Design, synthesis and determination of antifungal activity of 5(6)-substituted

- benzotriazoles [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45: 2214–2222.
- [24] Wang XL, Wan K, Zhou CH. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1, 2, 3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45: 4631–4639.
- [25] Wan K, Zhou CH. Synthesis of novel halobenzyloxy and alkoxy 1, 2, 4-triazoles and evaluation for their antifungal and antibacterial activities [J]. Bull Korean Chem Soc, 2010, 31: 2003–2010.
- [26] Fang B, Zhou CH, Rao XC. Synthesis and biological activities of novel amine-derived bis-azoles as potential antibacterial and antifungal agents [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45: 4388–4398.
- [27] Zhou CH, Fang B, Gan LL. Benzyl chloride tertiary amine double azole antimicrobial compounds, preparation and medical use thereof: CN, 101323594 [P]. 2008-12-17.
- [28] Zhou CH, Luo Y. Triadimefon and triadimenol compounds having antimicrobial activity, salts, synthetic methods and uses thereof: CN, 101323600 [P]. 2010-08-25.
- [29] Zhou CH, Mi JL, Wu J, et al. Triazole onium compound with antimicrobial activity, preparation method and medical use: CN, 101391985 [P]. 2009-03-25.
- [30] Zhou CH, Mi JL. Fluorine triazole ethers derivatives and salt with antimicrobial activity, preparation method and medical use: CN, 101391986 [P]. 2009-03-25.
- [31] Zhou CH, Yu KG, Meng JP, et al. Dibenzimidazole and onium compound thereof, preparation method and medical use thereof: CN, 101397276 [P]. 2009-04-01.
- [32] Zhou CH, Wu J, Jin L, et al. Triazoles compounds with antimicrobial activity and preparation method and pharmaceutical use thereof: CN, 101445488 [P]. 2009-06-03.
- [33] Zhou CH, Shi Y. Coumarin azole compounds having antimicrobial activity, synthetic methods and medical use thereof: CN, 200910191097.8 [P]. 2009-10-10.
- [34] Shi Y, Zhou CH. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21: 956–960.
- [35] Zhang FF, Gan LL, Zhou CH. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of some carbazole derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 1881–1884.
- [36] Luo Y, Lu YH, Gan LL, et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of novel 1, 2, 4-triazolium derivatives [J]. Arch Pharm, 2009, 342: 386–393.
- [37] Rosato A, Piarulli M, Corbo F, et al. *In vitro* synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils [J]. Curr Med Chem, 2010, 17: 3289–3295.
- [38] Demchok JP, Meletiadis J, Roilides E, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis of triple combinations of caspofungin and voriconazole or ravuconazole with sub-inhibitory concentrations of amphotericin B against *Aspergillus spp* [J]. Mycoses, 2010, 3: 239–245.
- [39] Riveiro ME, Moglioni A, Ramiro Vazquez R, et al. Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 2665–2675.
- [40] Dilek M, Kezer F. Synthesis of poly(aryl ether) dendritic structures based on calix[4]arenes [J]. J Macromol Sci Pure Appl Chem, 2009, 46: 591–596.
- [41] Katritzky AR, Rachwal S. Synthesis of heterocycles mediated by benzotriazole. 1. Monocyclic systems [J]. Chem Rev, 2010, 110: 1564–1610.
- [42] Jin L, Zhou CH. 4-[3-(2*H*-Benzotriazol-2-yl)propoxy]-3-methoxybenzaldehyde [J]. Acta Crystallogr E, 2010, E66: O1264–U168.
- [43] Jin L. Design, Synthesis and Biological Activities of Novel Chalcone-based Azoles and Their Quantitative Structure-activity Relationship (QSAR) Study (新型查尔酮唑类化合物的设计合成及其生物活性与定量构效关系研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [44] Nag OK, Nayak RR, Lim CS, et al. Two-photon absorption properties of cationic 1, 4-bis(styryl)benzene derivative and its inclusion complexes with cyclodextrins [J]. J Phys Chem B, 2010, 114: 9684–9690.
- [45] Kitahara T, Aoyama Y, Hirakata Y, et al. *In vitro* activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27: 51–57.