

含苯并噻唑的硫脲嘧啶衍生物的合成及抗菌活性评价

崔朋雷^{a,b} 刘娜^a 陈华^{*,a} 李小六^{*,a}^(a) 河北大学化学与环境科学学院 河北省化学生物学重点实验室 保定 071002)^(b) 河北农业大学理学院 保定 071001)

摘要 2-氨基苯并噻唑衍生物和对氯甲基苯甲酰氯反应合成中间体 *N*-(苯并[*d*]噻唑-2-基)-4-(氯甲基)苯甲酰胺(**5**), 进一步与 4-氧代-6-苯基-2-硫代-1,2,3,4-四氢嘧啶-5-腈(**6**)反应, 合成了一系列未见报道的含苯并噻唑的硫脲嘧啶类化合物 **7**. 通过红外光谱、质谱、核磁共振谱和元素分析等方法对化合物进行了结构表征. 测试了化合物 **7** 对解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑菌活性. 24 h 抑菌试验结果显示, 部分化合物对供试的菌株具有较强的抑制活性.

关键词 硫脲嘧啶; 苯并噻唑; 抗菌活性

Synthesis and Antibacterial Activity Evaluation of the Thiouracil Derivatives Containing Benzothiazole

Cui, Penglei^{a,b} Liu, Na^a Chen, Hua^{*,a} Li, Xiaoliu^{*,a}^(a) Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)^(b) College of Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract A series of unreported thiouracil derivatives **7** containing a benzothiazole moiety were synthesized by the reaction of 4-oxo-6-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carbonitrile (**6**) with *N*-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-4-(chloromethyl)-benzamide (**5**), which was prepared from the amidation of 2-aminobenzothiazole and 4-(chloromethyl)benzoyl chloride. The newly synthesized compounds **7** were characterized by IR, MS, NMR, and element analysis. All the compounds were evaluated for their antibacterial activities against *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The results of the 24-hour antibacterial test showed that some compounds had good inhibitory activities against the three tested strains.

Keywords thiouracil; benzothiazole; antibacterial activity

随着抗生素在临床治疗上的广泛使用(甚至滥用), 产生了越来越严重的细菌耐药性问题, 这导致一些抗生素的疗效下降甚至失效, 一些非致病性细菌如变形杆菌、绿脓杆菌等成为致病菌, 甚至出现了对于大部分抗菌药物都不敏感的“超级细菌”^[1,2]. 细菌耐药性被世界卫生组织(WHO)看作是 21 世纪最大的公共卫生安全问题之一, 引起了广泛关注, 在这种情况下, 迫切需要开发新型的抗菌药物^[3].

Wang 等报道了硫脲嘧啶类化合物 **1**(图 1)具有较强的抗菌活性, 并进一步揭示了该类化合物作用于仅存在于细菌体内的 SecA 靶点^[4~7]. 最近, 我们和 Wang 课题组合作^[8,9], 通过优势药效团拼接, 对化合物 **1** 的结构进

行修饰改造, 保留原有的硫脲嘧啶结构, 引入具有抗菌活性的酰基硫脲或三氮唑并噻二唑基团, 得到了一系列新型的硫脲嘧啶类衍生物. 抑菌实验结果表明这些化合物也具有较强的抗菌活性及 SecA 抑制活性, 其结构中引入卤原子会增强抗菌活性, 如化合物 **2** 具有很强的抗菌活性^[8]. 苯并噻唑是由苯环和噻唑环稠合而成的一类非常重要的含氮杂环^[10,11], 具有内吸性高与毒性低的特点. 含该稠杂环的化合物具有广泛的生物活性, 如抗癌^[12]、消炎^[13]、抗菌^[14~18]等, 如 Suresh 等^[15]将嘧啶药效团引入到苯并噻唑结构中合成的系列含苯并噻唑的化合物, 具有较强的抗菌活性, 如化合物 **3** 对金黄色葡萄球菌与化脓性链球菌的最低抑菌浓度(MIC)可达到

* Corresponding author. E-mail: hua-todd@163.com

Received January 27, 2018; revised March 19, 2018; published online June 1, 2018.

Project supported by the Science and Technology Fund of Agricultural University of Hebei (No. LG20150503)

河北农业大学理工基金(No. LG20150503)资助项目.

12.5 $\mu\text{g/mL}$; Piet 课题组^[16]合成了一系列含吡唑基团的苯并噻唑类化合物, 也具有较强的抗菌活性, 如化合物 **4** 对金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度 (MIC 值) 为 3.30 $\mu\text{g/mL}$.

最近, 我们课题组在原有工作基础上继续对具有新型抗菌作用机制的化合物 **1** (图 1) 的结构进行修饰, 在其结构中引入苯并噻唑药效团, 得到 15 个未见报道的含苯并噻唑的硫脲嘧啶类化合物 **7**, 合成路线如 Scheme 1 所示. 测试了化合物 **7** 对于人体中重要的病原菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的抑制活性.

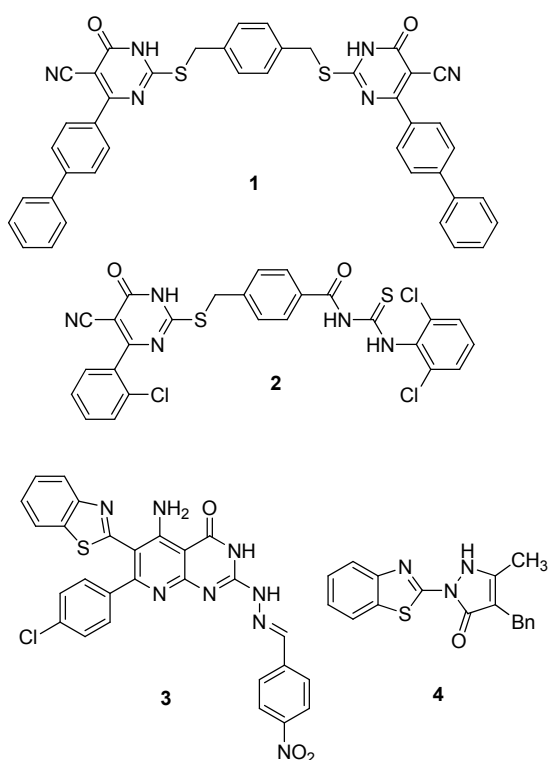
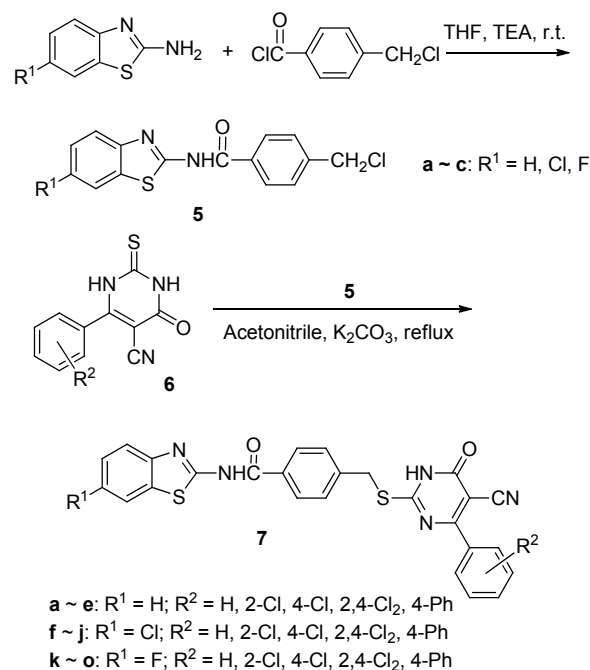


图 1 化合物 1~4 的结构
Figure 1 Structures of compounds 1~4

1 结果与讨论

1.1 合成与结构确定

在哌啶作用下, 芳香醛、硫脲、氰基乙酸乙酯三组分一锅法反应得到硫脲嘧啶中间体 **6**^[6], 收率为 50%~75%. 芳香醛苯环上取代基对产率影响较大, 如芳香醛苯环连有空间位阻较大的苯基 (即 4-Ph) 时产率较低. 2-氨基苯并噻唑衍生物与对氯甲基苯甲酰氯溶解在干燥的四氢呋喃中, 在室温条件下反应得到中间体 **5**, 这步反应过程中消除的氯化氢会使反应体系酸度增加, 使 2-氨基苯并噻唑衍生物中的氨基质子化, 降低其反应活



图式 1 化合物 7 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of compounds 7

性. 因此, 为了使反应顺利进行, 加入碱性物质 (如三乙胺) 做缚酸剂. 在碳酸钾作用下, 中间体 **5** 和 **6** 在乙腈中回流反应得到目标产物 **7**.

以化合物 **7a** 结构为例, 红外光谱中在 3394 cm^{-1} 附件出现 N—H 的伸缩振动吸收峰, 在 1645 与 1680 cm^{-1} 两处出现明显的 C=O 的伸缩振动吸收峰. 核磁共振谱图中化学位移 δ 4.38 处的单峰是硫原子和苯环之间的 CH_2 的质子信号峰, 其它为苯环上的质子信号峰.

1.2 抑菌活性评价

采用平板菌落计数法测试了新合成化合物的抗菌活性, 供试菌株包括: 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 诺氟沙星作为对照, 测试药品浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$, 结果见表 1. 试验结果显示, 大部分新合成的化合物对供试菌株具有较强的抑制活性, 在 24 h 抑菌试验中, 化合物 **7c**、**7j**、**7n** 表现出广谱的抗菌活性, 对解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑制率都达到 100%, 这明显高于对照诺氟沙星对这三种菌株的抑制率. 化合物 **7a**、**7f**、**7k**、**7m** 都对芽孢枯草杆菌具有很强的抑制活性, 其中 **7a** 和 **7f** 对该菌抑制率达到 100%, **7k** 和 **7m** 对该菌抑制率大于 99%; 这四个化合物对金黄色葡萄球菌也有较强的抑制活性, **7a** 和 **7f** 对其抑制率都在 90% 以上, **7k** 和 **7m** 对其抑制率都大于 83%. 构效关系分析发现化合物 **7** 中, 当 R^1 为 H 时, 对枯草芽孢杆菌都有很强的抑制活性 (如化

合物 **7a**、**7f**、**7k**); 当 R^2 为 4-Ph 时, 如化合物 **7e** 和 **7o** 对供试菌株抑制活性较差, 化合物 **7j** 则具有很强的抑制活性。

表 1 化合物 **7** 的抑菌活性(抑菌率/%, 25 $\mu\text{g/mL}$)

Table 1 Antibacterial activities of compounds **7** (Inhibitory rate/%, 25 $\mu\text{g/mL}$)

化合物	解淀粉芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	芽孢枯草杆菌
7a	53.6	90.0	100
7b	63.1	76.6	50.5
7c	100	100	100
7d	21.1	66.6	47.3
7e	0	36.6	26.5
7f	88.1	92.2	100
7g	47.3	66.8	29.7
7h	31.5	66.7	32.3
7i	31.5	73.3	38.9
7j	100	100	100
7k	84.2	83.3	99.7
7l	57.8	86.6	29.4
7m	63.1	86.6	99.4
7n	100	100	100
7o	42.1	0	46.5
Norfloxacin	84.1	78.4	89.3

随后, 进一步测试了抑菌活性最好的五个化合物(**7b**、**7c**、**7f**、**7j**、**7n**)对供试菌株的 MIC 值(结果见表 2)。结果显示, 除化合物 **7b** 抑制解淀粉芽孢杆菌和芽孢枯草杆菌的 MIC 值为 50 $\mu\text{g/mL}$ 外, 其它测试化合物对所测三种菌株的 MIC 值与对照品诺氟沙星相同, 都是 25 $\mu\text{g/mL}$ 。与化合物 **2** 的 MIC 值^[8]对照发现, 这五个化合物抑制金黄色葡萄球菌的 MIC 值均低于化合物 **2** 的数值, 这说明这些化合物对金黄色葡萄球菌具有更强的抑制活性, 这些化合物中除了化合物 **7b** 抑制芽孢枯草杆菌的 MIC 值与化合物 **2** 相同外, 其它化合物对该菌株的 MIC 值都低于化合物 **2** 的, 显示出较强的抑菌活性。

表 2 部分化合物的 MIC 值($\mu\text{g/mL}$)

Table 2 The MIC values of some compounds ($\mu\text{g/mL}$)

化合物	解淀粉芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	芽孢枯草杆菌
7b	50	25	50
7c	25	25	25
7f	25	25	25
7j	25	25	25
7n	25	25	25
2	25	50	50
Norfloxacin	25	25	25

2 结论

本文利用活性药效团拼接的原理, 对具有新的抗菌机理的化合物 **1** 结构进行修饰, 在其结构中引入了具有

较强抗菌作用的苯并噻唑基团, 合成了系列未见报道的含苯并噻唑的硫脲嘧啶类化合物 **7**。抑菌试验结果显示, 大部分新合成的化合物都具有很强的抑菌活性, 尤其是化合物 **7c**、**7j**、**7n** 对供试的解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌表现出很强的抑制活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-4 精密显微熔点测定仪(北京富凯仪器有限公司), 温度计未经校正; 北京瑞利公司生产 WQF510/520A 傅立叶变换红外光谱仪; BRUKER AC-P600 (600 MHz)型核磁共振仪, TMS 为内标; Agilent G6300 离子阱液相质谱联用仪; HERAEUS (CHON, rapid)型元素分析仪; 层析用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂。本文所用其他试剂均为分析纯, 无水试剂均按常规方法处理, 水为二次蒸馏水。

3.2 目标化合物 **7** 的合成

3.2.1 苯并噻唑中间体 **5** 的合成

在 100 mL 干燥烧瓶中加入 2 mmol 2-氨基苯并噻唑衍生物与 15 mL 干燥的四氢呋喃; 再取第二个 100 mL 干燥烧瓶, 加入 2.2 mmol 对氯甲基苯甲酰氯与 15 mL 干燥的四氢呋喃, 将该溶液缓慢滴加到第一个烧瓶中, 再加入 2 mL 三乙胺(作为缚酸剂), 产生大量固体, 室温反应, 反应结束后将反应液倒入盛有 150 mL 冷水的烧杯中, 产生大量固体, 过滤, 将固体干燥(105 $^{\circ}\text{C}$), 柱色谱纯化($V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=3:1\sim1:1$), 得到化合物 **5**。

N-(苯并[*d*]噻唑-2-基)-4-(氯甲基)苯甲酰胺(**5a**): 淡黄色固体, 产率 79.2%. m.p. 172.5~174.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.15 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 8.03 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.80 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.48 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.87 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 155.0, 139.2, 129.5, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 123.7, 121.7, 115.5, 45.2; MS (ESI) m/z : 302.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}$: C 59.50, H 3.66, N 9.25; found C 59.42, H 3.60, N 9.31.

N-(6-氯苯[*d*]并噻唑-2-基)-4-(氯甲基)苯甲酰胺(**5b**): 淡黄色固体, 产率 75.0%. m.p. 188.5~190.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.17 (s, 1H, ArH), 8.14 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.79 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 4.86 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 166.8, 142.4, 131.4, 129.5, 128.9, 128.8, 128.7, 126.5, 121.4, 45.2; MS (ESI) m/z : 338.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd

for $C_{15}H_{10}Cl_2N_2OS$: C 53.42, H 2.99, N 8.31; found C 53.45, H 2.92, N 8.35.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-(氯甲基)苯甲酰胺(**5c**): 淡黄色固体, 产率 76.5%. m.p. 179.5~181.6 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.11 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.74~7.77 (m, 1H, ArH), 7.58 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.54 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.82 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 166.8, 165.7, 165.2, 159.5, 157.9, 142.3, 129.5, 129.4, 129.3, 128.9, 128.8, 128.6, 114.3, 114.1, 108.2, 108.0, 45.2; MS (ESI) m/z : 320.7 ($[M+H]^+$). Anal. calcd for $C_{15}H_{10}ClFN_2OS$: C 56.17, H 3.14, N 8.73; found C 56.12, H 3.19, N 8.67.

3.2.2 硫脲嘧啶中间体 **6** 的合成

硫脲嘧啶中间体 **6** 根据文献[6]合成.

3.2.3 目标化合物 **7** 的合成

取 100 mL 干燥烧瓶, 加入 1 mmol 化合物 **5** 与 1 mmol 化合物 **6** 及 3 mmol K_2CO_3 , 再加入 25 mL 乙腈, 电磁搅拌, N_2 保护下回流反应, 薄层色谱(TLC)监测反应. 反应结束后, 旋蒸溶剂得粗品, 用水洗涤, 抽滤, 干燥, 柱色谱纯化($V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲醇}}=15:1\sim10:1$), 得化合物 **7**.

N-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-苯基-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7a**): 淡黄色固体, 产率 65.1%. m.p. 231.2~233.8 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.07 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 8.01 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.75~7.77 (m, 3H, ArH), 7.58 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.44~7.47 (m, 3H, ArH), 7.32 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.38 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 172.1, 171.3, 168.0, 145.6, 138.5, 132.3, 130.5, 129.9, 129.2, 129.0, 127.0, 124.4, 122.5, 121.1, 120.8, 34.3; IR (KBr) ν : 3394 (N—H), 1645, 1680 (2C=O), 2363 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 493.9 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{17}N_5O_2S_2$: C 63.01, H 3.46, N 14.13; found C 63.12, H 3.52, N 14.20.

N-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7b**): 淡黄色固体, 产率 60.6%. m.p. 238.2~241.3 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.04 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.98 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.40~7.41 (m, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, ArH), 7.35 (dd, $J=1.8$ Hz, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.29 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.31 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ :

171.2, 169.9, 169.2, 167.0, 162.2, 144.4, 137.2, 131.5, 130.9, 130.2, 130.0, 129.3, 129.0, 128.3, 127.0, 126.0, 123.4, 121.6, 120.1, 118.7, 35.7; MS (ESI) m/z : 528.2 ($[M-H]^+$); IR (KBr) ν : 3391 (N—H), 1636, 1682 (2C=O), 2365 (CN) cm^{-1} . Anal. calcd for $C_{26}H_{16}ClN_5O_2S_2$: C 58.92, H 3.04, N 13.21; found C 58.98, H 3.11, N 13.29.

N-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(4-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7c**): 淡黄色固体, 产率 61.1%. m.p. 236.4~239.1 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.01 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.64 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.47 (s, 2H, ArH), 7.46 (s, 2H, ArH), 7.33 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 4.30 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.4, 170.3, 165.7, 162.3, 148.6, 143.7, 136.3, 134.4, 131.7, 131.4, 129.9, 129.1, 128.8, 128.6, 128.3, 128.1, 125.7, 122.8, 121.4, 119.8, 119.7, 35.7; IR (KBr) ν : 3397 (N—H), 1632, 1677 (2C=O), 2361 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 528.1 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{16}ClN_5O_2S_2$: C 58.92, H 3.04, N 13.21; found C 59.02, H 3.09, N 13.28.

N-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2,4-二氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7d**): 淡黄色固体, 产率 57.2%. m.p. 224.5~226.2 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.02 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.95 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.89 (s, 1H, ArH), 7.72 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.67 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, ArH), 7.61 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.45 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, ArH), 7.36~7.39 (m, 1H, ArH), 7.26~7.28 (m, 1H, ArH), 4.27 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.3, 169.9, 169.0, 166.0, 162.2, 144.4, 136.1, 134.0, 132.1, 131.4, 129.0, 128.9, 128.8, 128.3, 127.3, 126.0, 123.5, 121.6, 118.5, 35.7; IR (KBr) ν : 3385 (N—H), 1635, 1682 (2C=O), 2364 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 562.6 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{15}Cl_2N_5O_2S_2$: C 55.32, H 2.68, N 12.41; found C 55.39, H 2.74, N 12.49.

N-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(1,1'-联苯-4-基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7e**): 淡黄色固体, 产率 49.6%. m.p. 245.5~248.2 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.08 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 8.01 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.89 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.78 (d, $J=8.4$ Hz, 3H, ArH), 7.77 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, ArH), 7.60 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.49 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.40 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.32 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 4.39 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR

(DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.5, 170.3, 165.8, 162.3, 148.7, 143.8, 136.4, 134.5, 131.7, 129.9, 129.1, 128.8, 128.4, 128.2, 125.7, 122.9, 121.4, 119.8, 119.8, 35.8; IR (KBr) ν : 3382 (N—H), 1631, 1684 (2C=O), 2361 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 569.8 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{32}H_{21}N_5O_2S_2$: C 67.23, H 3.70, N 12.25; found C 67.34, H 3.75, N 12.30.

N-(6-氯苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-苯基-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7f**): 淡黄色固体, 产率 62.3%. m.p. 235.2~238.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.13 (s, 1H, ArH), 8.04 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.74 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, $J=3.6$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.43~7.45 (m, 4H, ArH), 4.35 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.1, 170.3, 167.1, 144.9, 137.6, 133.2, 129.6, 129.0, 128.3, 128.0, 127.6, 126.4, 121.5, 121.3, 119.9, 33.3; IR (KBr) ν : 3386 (N—H), 1634, 1682 (2C=O), 2364 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 528.1 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{16}ClN_5O_2S_2$: C 58.92, H 3.04, N 13.21; found C 58.99, H 3.13, N 13.33.

N-(6-氯苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7g**): 淡黄色固体, 产率 53.6%. m.p. 230.2~233.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.16 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.58 (d, $J=7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.53 (s, 2H, ArH), 7.48 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 4.33 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.0, 167.0, 162.2, 144.8, 137.2, 130.9, 130.2, 130.0, 129.6, 129.3, 129.1, 129.1, 128.3, 127.0, 127.0, 126.4, 121.4, 35.7; IR (KBr) ν : 3389 (N—H), 1631, 1684 (2C=O), 2365 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 561.5 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{15}Cl_2N_5O_2S_2$: C 55.32, H 2.68, N 12.41; found C 55.41, H 2.73, N 12.49.

N-(6-氯苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(4-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7h**): 淡黄色固体, 产率 61.1%. m.p. 235.5~238.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.08 (s, 1H, ArH), 8.00 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.73 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.71 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.46~7.48 (m, 2H, ArH), 7.40~7.42 (m, 1H, ArH), 4.31 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.3, 170.1, 165.8, 165.7, 162.3, 159.6, 144.8, 136.3, 134.4, 133.2, 130.0, 129.9, 129.1, 129.0, 128.3, 128.1, 127.6, 126.4, 121.5, 121.3, 119.7, 35.7; IR (KBr) ν : 3392 (N—H),

1636, 1681 (2C=O), 2362 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 561.9 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{15}Cl_2N_5O_2S_2$: C 55.32, H 2.68; N 12.41; found C 55.38, H 2.74, N 12.49.

N-(6-氯苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2,4-二氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7i**): 淡黄色固体, 产率 52.6%. m.p. 230.2~233.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.15 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.77 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (s, 1H, ArH), 7.57 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.42 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 4.32 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.1, 170.3, 167.1, 165.8, 144.9, 137.6, 133.2, 129.6, 129.0, 128.3, 128.0, 127.6, 126.4, 121.5, 121.3, 119.9, 33.3; IR (KBr) ν : 3394 (N—H), 1632, 1685 (2C=O), 2365 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 596.6 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{14}Cl_3N_5O_2S_2$: C 52.14, H 2.36, N 11.69; found C 52.21, H 2.40, N 11.76.

N-(6-氯苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(1,1'-联苯-4-基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7j**): 淡黄色固体, 产率 46.5%. m.p. 241.5~243.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.12 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.85 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.74 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.70 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.46 (s, 1H, ArH), 7.45 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.37 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 4.36 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.2, 170.3, 166.4, 162.2, 144.9, 141.3, 139.3, 136.6, 133.2, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4, 127.8, 127.6, 126.7, 126.4, 126.3, 121.5, 121.3, 120.0, 35.7; IR (KBr) ν : 3396 (N—H), 1636, 1681 (2C=O), 2362 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 603.8 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{32}H_{20}ClN_5O_2S_2$: C 63.41, H 3.33, N 11.55; found C 63.52, H 3.38, N 11.61.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-苯基-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7k**): 淡黄色固体, 产率 58.3%. m.p. 226.7~229.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.05 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.90~7.93 (m, 1H, ArH), 7.75~7.78 (m, 1H, ArH), 7.73~7.74 (m, 2H, ArH), 7.58 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.45 (t, $J=3.0$ Hz, 3H, ArH), 7.28~7.31 (m, 1H, ArH), 4.36 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.1, 170.2, 167.0, 162.2, 158.9, 158.5, 157.8, 144.8, 137.6, 129.6, 128.9, 128.3, 128.0, 121.4, 120.0, 114.2 (d, $^2J_{\text{CF}}=24.3$ Hz), 108.1 (d, $^2J_{\text{CF}}=26.8$ Hz), 33.3; IR (KBr) ν : 3390 (N—H), 1631, 1685 (2C=O), 2365 (CN) cm^{-1} ; MS

(ESI) m/z : 511.9 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{16}F-N_5O_2S_2$: C 60.81, H 3.14, N 13.64; found C 60.93, H 3.23, N 13.52.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7l**): 淡黄色固体, 产率 51.8%. m.p. 215.3~217.6 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.05 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.78 (q, $J=4.8$ Hz, 1H, ArH), 7.58 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.53 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.42~7.44 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.29~7.31 (m, 1H, ArH), 4.32 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.1, 169.1, 167.0, 165.7, 162.2, 157.9, 144.7, 137.2, 130.9, 130.5, 130.2, 130.0, 129.3, 129.1, 129.0, 128.3, 127.0, 118.7, 114.1 (d, $^2J_{CF}=24.3$ Hz), 108.0 (d, $^2J_{CF}=27.0$ Hz), 35.7; IR (KBr) ν : 3393 (N—H), 1633, 1681 (2C=O), 2361 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 546.1 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{15}ClFN_5O_2S_2$: C 56.98, H 2.76, N 12.78; found C 57.08, H 2.81, N 12.85.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(4-氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7m**): 淡黄色固体, 产率 51.9%. m.p. 234.5~237.1 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.02 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.85~7.87 (m, 1H, ArH), 7.74 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, ArH), 7.71~7.72 (m, 1H, ArH), 7.53 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.49 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, ArH), 7.23~7.26 (m, 1H, ArH), 4.32 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.3, 170.2, 165.9, 165.7, 162.2, 157.8 (d, $^1J_{CF}=238.5$ Hz), 145.1, 144.6, 136.3, 134.4, 132.7, 129.9, 128.9, 128.3, 128.1, 126.6, 121.4, 121.3, 119.7, 114.0 (d, $^2J_{CF}=24.3$ Hz), 108.1 (d, $^2J_{CF}=26.3$ Hz), 33.4; IR (KBr) ν : 3390 (N—H), 1631, 1685 (2C=O), 2365 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 545.9 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{15}ClFN_5O_2S_2$: C 56.98, H 2.76, N 12.78; found C 57.08, H 2.80, N 12.85.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(2,4-二氯苯基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7n**): 淡黄色固体, 产率 54.9%. m.p. 237.5~239.1 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.05 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.93 (s, 1H, ArH), 7.77 (q, $J=4.2$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.26~7.30 (m, 1H, ArH), 4.31 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.3, 169.0, 166.0, 162.7, 160.6, 157.8 (d, $^1J_{CF}=238.0$ Hz), 155.0, 136.1, 134.0, 132.1, 131.4, 129.1, 129.0, 128.9, 128.7, 128.3, 127.3, 118.5, 114.2 (d, $^2J_{CF}=23.8$ Hz), 108.1 (d, $^2J_{CF}=26.5$ Hz),

35.7; IR (KBr) ν : 3390 (N—H), 1631, 1682 (2C=O), 2362 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 580.5 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{26}H_{14}Cl_2FN_5O_2S_2$: C 53.61, H 2.42, N 12.02; found C 53.69, H 2.47, N 12.09.

N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-4-[(5-氰基-6-氧代-4-(1,1'-联苯-4-基)-1,6-二氢嘧啶-2-基)硫基]甲基}苯甲酰胺(**7o**): 淡黄色固体, 产率 47.9%. m.p. 234.5~237.4 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.04 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.85 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.74 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.70 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.56 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.45 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, ArH), 7.35 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (m, 1H, ArH), 4.36 (s, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 171.2, 170.4, 166.4, 162.2, 157.8 (d, $^1J_{CF}=238.2$ Hz), 145.2, 145.1, 144.6, 141.3, 139.3, 136.6, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.7, 128.3, 127.8, 126.7, 126.3, 121.3, 120.0, 114.1 (d, $^2J_{CF}=23.3$ Hz), 108.1 (d, $^2J_{CF}=26.8$ Hz), 35.7; IR (KBr) ν : 3386 (N—H), 1634, 1685 (2C=O), 2364 (CN) cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 587.8 ($[M-H]^+$). Anal. calcd for $C_{32}H_{20}FN_5O_2S_2$: C 65.18, H 3.42, N 11.88; found C 65.29, H 3.47, N 11.95.

3.3 抗菌活性测试方法

3.3.1 细菌抑菌率测定(平板菌落计数法)

精确称取适量的供试药物, 用少量 DMSO 溶解后, 加入 NA 培养基中至终浓度 50 $\mu g/mL$, 混匀后倒至平板, 凝固后备用. 在超净工作台中, 取病原菌斜面一支, 加入 10 mL 无菌水, 用灭菌竹签轻轻刮取培养基表面的菌苔, 打散, 漩涡振荡器振荡均匀, 制成菌悬液. 取菌悬液 1 mL 加入到 9 mL 无菌水中, 震荡均匀制成 10^{-1} 稀释液. 再吸取 1 mL 10^{-1} 稀释液加入到 9 mL 无菌水中, 震荡均匀制成 10^{-2} 稀释液; 以此类推, 制备系列梯度菌悬液. 各吸取 10^{-6} 或 10^{-7} 梯度菌悬液 70 μL , 分别加入到药物平板和不加药的 NA 培养基平板(对照)上, 用灭菌三角刮涂布均匀, 做好标识, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h. 24 h 后, 进行菌落计数. 每组设置三次平行试验, 结果取三次试验的平均值.

$$\text{抑菌率} = (\text{对照组菌落数} - \text{药物平板菌落数}) / \text{对照组菌落数} \times 100\%$$

3.3.2 最低抑菌浓度的测定

设置诺氟沙星和不加药培养基对照. 称取适量的供试药物, 用少量 DMSO 溶解后, 加入营养琼脂(NA)培养基中至终浓度为 50、25、12.5、6.25、3、2 和 1 $\mu g/mL$, 混匀后倒至平板, 凝固后备用. 在超净台中, 取活化好的供试菌株斜面 1 支, 加入 5 mL 无菌水, 用灭菌竹签将

菌苔轻轻刮下,并将其打碎,震荡均匀,做成菌悬液.用移液枪吸取菌悬液 70 μL 于上述的不同梯度浓度的药物平板上,用已灭菌的三角刮涂匀(不同的菌换不同的三角刮,以防染菌),将涂布好的平皿置于恒温培养箱中,培养 24 h,观察菌的生长情况.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **5a~5c** 以及 **7a~7o** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Davies, J.; Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417.
- [2] Kumarasamy, K. K.; Toleman, M. A.; Walsh, T. R. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 597.
- [3] Guillemot, D. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 494.
- [4] Li, M. Y.; Huang, Y. J.; Tai, P. C.; Wang, B. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 839.
- [5] Chen, W. X.; Huang, Y. J.; Gundala, S. R.; Yang, H.; Li, M. Y.; Tai, P. C.; Wang, B. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1617.
- [6] Chaudhary, A. S.; Jin, J. S.; Chen, W. X.; Tai, P. C.; Wang, B. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 105.
- [7] Cui, J. M.; Jin, J. S.; Chaudhary, A. S.; Hsieh, Y. Zhang, H.; Dai, C. F.; Damara, K.; Chen, W. X.; Tai, P. C.; Wang, B. H. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 43.
- [8] Cui, P. L.; Li, X. L.; Zhu, M. Y.; Wang, B. H.; Liu, J.; Chen, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2234.
- [9] Cui, P. L.; Li, X. L.; Zhu, M. Y.; Wang, B. H.; Liu, J.; Chen, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 159.
- [10] Jiang, K.; Cao, L.; Hao, Z. F.; Chen, M. Y.; Chen, J. L.; Li, X.; Xiao, P.; Chen, L.; Wang, C. Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *37*, 2221(in Chinese).
(蒋凯, 曹梁, 郝志峰, 陈美燕, 程洁鑫, 李晓, 肖萍, 陈亮, 汪朝阳, 有机化学, **2017**, *37*, 2221.)
- [11] Zhang, Z. Y.; Li, W. J.; Ye, K. Q.; Zhang, H. Y. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 179 (in Chinese).
(张振宇, 李婉君, 叶开其, 张红雨, 化学学报, **2016**, *74*, 179.)
- [12] Moustafa, T. G.; Nadia, S. E. G.; Eman, R. E. B.; Mohamed, M. E. K.; Nanting, N. *Chin. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 380.
- [13] Abdou, W. M.; Barghash, R. F.; Sediek, A. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 362.
- [14] Yang, L. O.; Huang, Y. H.; Zhao, Y. W.; He, G.; Xie, Y. M.; Liu, J.; He, J.; Liu, B.; Wei, Y. Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3044.
- [15] Suresh, M.; Sridevi, G.; Nuthangi, S.; Palakodu, L.; Sreekanth, B. *J. Arabian J. Chem.* **2016**, *9*, 681.
- [16] Alessandro, S.; Kenneth, S.; Steven, D. J.; Bart, V.; Jef, R.; Jozef, A.; Piet, H. *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 253.
- [17] Mitra, R.; Mehdi, P.; Abolghasem, D.; Sattar, S. *Chem. Heterocycl. Comd.* **2015**, *51*, 918.
- [18] Priya, R. M.; Chhaganbhai, N. P. *Org. Med. Chem. Lett.* **2012**, *2*, 29.

(Zhao, X.)