



论文

8-(3-或 4-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素的合成、晶体结构、抑菌活性、抗氧化活性及其与牛血清白蛋白的相互作用

杨树平^{①*}, 韩立军^②, 潘燕^{③④}, 王大奇^⑤, 周亚男^①, 张凡^①

① 淮海工学院化学工程学院, 连云港 222005

② 淮海工学院数理学院, 连云港 222005

③ 北京大学医学部基础医学院药理系, 北京 100191

④ 北京大学国家天然仿生药物重点实验室, 北京 100191

⑤ 聊城大学化学工程学院, 聊城 252059

*通讯作者, E-mail: spyang69320@yahoo.cn

收稿日期: 2012-09-04; 接受日期: 2012-12-05; 网络版发表日期: 2013-02-19

doi: 10.1360/032012-433

摘要 设计并合成了两个新的氟代香豆素化合物 8-(3-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素(**3a**)和 8-(4-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素(**3b**), 其结构通过元素分析、IR 和 ¹H NMR 进行了表征, 通过 X-射线单晶衍射测定了化合物 **3b** 的晶体结构, 单晶结构分析表明, 化合物 **3b** 的晶体属于单斜晶系。体外抑菌试验结果显示, 目标化合物对大肠杆菌(*E. coli*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)和金色葡萄球菌(*S. aureus*)有不同程度的抑制作用; 体外抗氧化实验显示, 目标化合物对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)和二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)均有良好的清除能力; 运用荧光光谱法研究了不同温度下目标化合物与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 结果表明, 目标化合物对 BSA 的荧光猝灭均属于静态猝灭, 相关热力学参数表明, 化合物 **3a**($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $\Delta G < 0$)与 BSA 二者之间主要以氢键或范德华力相结合, 化合物 **3b**($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$)与 BSA 二者之间主要靠疏水作用力相结合; 依据 Förster's 非辐射能量转移理论, 求得 BSA 与化合物 **3a** 和化合物 **3b** 间的距离(*r*)分别为 2.53 和 2.65 nm, 说明两个化合物与 BSA 之间可能发生了非辐射能量转移。

关键词8-(3-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素
8-(4-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素
晶体结构
抑菌活性
抗氧化活性
牛血清白蛋白

1 引言

活性氧自由基(ROS)在生物体衰老与疾病、正常的免疫代谢、细胞信号传导等过程中都起着重要的作用。机体内过剩的自由基会使正常细胞和组织遭到氧化性损伤^[1, 2], 从而引起机体许多功能障碍及各种疾病的发生, 如癌症、心脑血管疾病、阿尔茨海默病

(Alzheimer's disease)和帕金森病(Parkinson's disease)、糖尿病及辐射损伤等^[3~5]。因此有效地抑制和清除人体内的自由基, 促进人类健康和延长人类寿命, 提高人们的生活质量, 是一项有意义的研究工作。抗氧化活性成分能够清除体内自由基, 起到保护机体的作用, 寻找和开发能够清除氧自由基的抗氧化物质已成为当今生物、医学、化学、药学等领域的重要研究

课题.

大多数药物在体内的储存和运输是通过药物与血浆中的血清白蛋白键合形成药物-蛋白复合物而完成的^[6]. 药物与血浆中的血清白蛋白的键合会影响药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄^[7, 8], 研究药物与血清白蛋白的键合, 有利于从分子水平上进一步认识药物小分子与生物大分子的作用规律, 对生物医药领域的发展有重要的实际意义. 荧光猝灭法是研究药物与血清白蛋白相互作用的一个重要的方法, 该方法操作简单而且灵敏度高^[9], 香豆素小分子与血清白蛋白相互作用研究已有报道^[10, 11].

香豆素类化合物是一类广泛存在于自然界中的内酯类化合物, 具有抗肿瘤、抗菌、抗 HIV 病毒、抗氧化、抑制乙酰胆碱酯酶等多方面的生物活性^[12-16], 香豆素化合物丰富多样的生物活性因母核上取代基的不同而各异, 且与取代基在环上的位置密切相关, 将氟原子引入到有机化合物分子中会导致化合物的生物活性发生显著的改变^[17-19]. 天然香豆素类化合物的脂溶性较差, 不易通过生物膜, 使其应用受到很大限制, 但如果在其母核上接上含氟化学基团, 由于氟原子半径小, 它所形成的 C-F 键的键能要比 C-H 键的键能大, 不仅能明显增加香豆素类化合物的稳定性和生物活性, 同时还可提高香豆素类化合物的脂溶性和疏水性, 使其在生物体内较易吸收和更快地传输. 近年来, 氟代香豆素衍生物的研究逐渐引起人们的重视, 一些具有抗肿瘤、抗氧化、细胞毒化及神经保护等生物活性的氟代香豆素衍生物陆续报道^[20-23], 因此, 开展对氟代香豆素化合物的合成及其生物活性研究已成为一项有重要意义的工作.

本文以 7-羟基-4-甲基香豆素为原料, 通过酯化及 Fries 重排反应成功地将氟引入到香豆素分子中, 得到两个未见报道的 8-氟代苯甲酰香豆素衍生物(图 1), 并通过元素分析、IR、¹H NMR 对其结构进行了表征, 用 X-射线单晶衍射技术对化合物 **3b** 晶体结构进行测试与分析; 并通过牛津杯法初步测试了它们的抑菌活性; 用邻苯三酚自氧化法和 DPPH·法测试了它们的抗氧化能力; 运用荧光光谱法研究了两个化合物与 BSA 的相互作用, 同时, 计算了 BSA 与两个化合物之间的结合常数(K_a)、结合位点数(n)、结合距离(r)、热力学参数焓变(ΔH)、熵值的改变(ΔS)和自由能改变(ΔG), 据此判断了 BSA 与化合物之间相互作用类型及作用强弱. 本研究作为氟代香豆素类

化合物的进一步研究提供了一些具有理论和应用价值的信息, 也为香豆素类化合物在医药学、生物工程、染料及光学材料等领域的发展和应用提供了重要的基础理论依据.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

Perkin-Elmer 2400 型元素分析仪(美国 Perkin-Elmer 公司); 核磁共振氢谱采用 Varian Inova-400 型超导核磁共振仪(DMSO-*d*₆ 作溶剂)测定; WGH-30/6 型红外光谱仪(天津市港东科技发展有限公司); UV-Vis 2550 型紫外光谱仪(日本 Shimadzu 公司); RF-5301PC 型荧光光谱仪(日本 Shimadzu 公司); pH-25 型酸度计(上海精科雷磁仪器厂); X-4 显微熔点仪(数显, 上海万衡精密仪器有限公司, 温度未经校正); Bruker-SMART-1000 单晶衍射仪(德国 Bruker 公司).

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均由淮海工学院海洋学院微生物实验室提供; 营养肉汤培养基、营养琼脂培养基(上海华美生物公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 生化试剂, 上海化学试剂采购供应站试剂厂); 牛血清白蛋白(BSA, 生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司, 相对分子量以 67000 计); 二苯代苦味肼基自由基(DPPH·, 上海阿拉丁试剂有

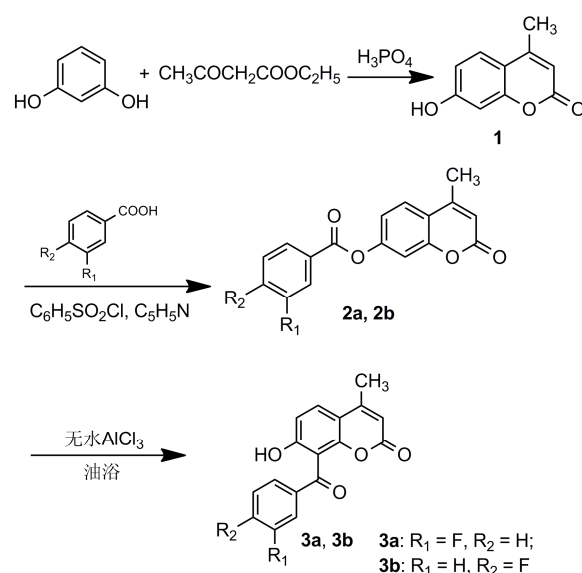


图 1 8-(3-或 4-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素的合成

限公司); 1,10-邻菲罗啉、邻苯三酚、双氧水(H_2O_2)、七水硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、间苯二酚、乙酰乙酸乙酯、3-氟苯甲酸、4-氟苯甲酸、苯磺酰氯、无水三氯化铝(均为分析纯, 国药集团上海化学试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯, 使用前未经进一步纯化; 实验用水为二次蒸馏水。

牛血清白蛋白(BSA)溶液配制: 以 0.05 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液($\text{pH } 7.4 \pm 0.1$, 内含 $\text{NaCl } 0.15 \text{ mol L}^{-1}$, 以维持溶液离子强度)为溶剂, 配制浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ BSA 标准溶液备用(5°C 保存, 不超过五天)。

2.2 标题化合物的合成

标题化合物的合成过程如图 1 所示。

2.2.1 7-羟基-4-甲基香豆素(1)的合成

参照文献[24]方法制备, 化合物 **1** 为淡黄色固体, 产率 95%, 熔点 $188\sim 191^\circ\text{C}$ (文献值 $188\sim 192^\circ\text{C}$, 产率 96%); $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ 计算值: C 88.18, H 4.58; 实测值: C 88.49, H 4.53。

2.2.2 7-(3-氟苯甲酰氧基)-4-甲基香豆素(2a)和 7-(4-氟苯甲酰氧基)-4-甲基香豆素(2b)的合成

在装有恒压滴液漏斗、氯化钙干燥管和温度计的 250 mL 的三口烧瓶中, 加入 3-氟苯甲酸或 4-氟苯甲酸(2.80 g, 20 mmol)、吡啶 15 mL, 置于 10°C 冷水浴中, 滴加苯磺酰氯(3.5 mL, 27 mmol), 滴毕, 室温搅拌反应 30 min, 再置于 10°C 冷水浴中, 滴加含有化合物 **1** (3.52 g, 20 mmol) 的吡啶溶液, 滴毕, 继续室温搅拌反应 24 h, 将反应物倒入冰水中, 抽滤, 用水充分洗涤滤饼, 干燥得粗品, 粗品用乙醇重结晶得白色絮状固体。

化合物 **2a**: 产率 90%, 熔点 $175\sim 178^\circ\text{C}$; IR(KBr 压片) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3420, 1722, 1703, 1577, 1280, 1259, 1130; $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_4$ 计算值: C 65.87, H 7.56; 实测值: C 65.48, H 7.59。

化合物 **2b**: 产率 92%, 熔点 $166\sim 168^\circ\text{C}$; IR(KBr 压片) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1739, 1640, 1561, 1256, 1248, 1120, 1017; $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_4$ 计算值: C 65.87, H 7.56; 实测值: C 65.39, H 7.33。

2.2.3 7-羟基-8-(3-氟苯甲酰基)-4-甲基香豆素(3a)和 7-羟基-8-(4-氟苯甲酰基)-4-甲基香豆素(3b)的制备

将化合物 **2a** 或化合物 **2b** 与无水三氯化铝按摩尔

比 1 : 3 投料比, 置于附有氯化钙干燥管的圆底烧瓶中, 在 $200\sim 210^\circ\text{C}$ 油浴中加热反应 2 h, 冷至室温, 加入 20 mL 质量浓度为 10% 的盐酸溶液, 在恒温水浴锅上加热 1 h, 冷至室温, 抽滤, 用水洗涤滤饼, 干燥得粗品。将粗品置于 50 mL 乙醇中加热至 70°C , 然后趁热抽滤, 残渣用乙醇-氯仿(2 : 1)重结晶, 得化合物 **3a** 和 **3b**。

化合物 **3a**: 白色无定形粉末, 熔点 $226\sim 228^\circ\text{C}$, 产率 65%。元素分析, $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_4 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 计算值: C 68.46, H 3.72; 实测值: C 68.75, H 3.66; IR(KBr 压片, $\nu(\text{cm}^{-1})$): 3286, 1737, 1705, 1679, 1581, 1310, 1259, 1062; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.43 (3H, s, 4- CH_3), 6.09 (1H, s, 3-H), 7.03 (1H, d, $J = 9.03 \text{ Hz}$, 6-H), 7.27~7.46 (4H, m, Ph-H), 7.73 (1H, d, $J = 9.04 \text{ Hz}$, 5-H), 10.82 (1H, s, 7-OH)。

化合物 **3b**: 白色块状晶体(可用于 X-单晶衍射), 熔点 $244\sim 248^\circ\text{C}$, 收率 61%。元素分析, $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FO}_4$ 计算值: C 68.46, H 3.72; 实测值: C 68.19, H 3.62; IR(KBr 压片) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3322, 1703, 1676, 1599, 1568, 1311, 1241, 1062; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.29 (3H, s, 4- CH_3), 4.88 (1H, s, 7-OH), 6.192 (1H, s, 3-H), 6.975 (1H, d, 6-H), 7.27~7.71 (4H, m, Ph-H), 7.822 (1H, d, 5-H)。

2.3 化合物 3b 的晶体结构测定

选取一粒尺寸大小为 $(0.25 \times 20.20 \times 0.10) \text{ mm}^3$ 的单晶, 置于 Bruker-SMART-CCD-1000 单晶衍射仪上, 采用单色 $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) 辐射, 在 298 K 下, 以 φ - ω 方式扫描, 在 $1.74 \leq \theta \leq 25.0^\circ$ 范围内共收集到衍射点 8462 个, 其中独立衍射点 2991 个 ($R_{\text{int}} = 0.0796$), 强度大于二倍平均背景强度 [$I > 2\sigma(I)$] 的衍射点 1310 个, 全部 2991 个独立衍射点被用于结构精修, 采用直接法解结构, 对全部非氢原子进行了各向异性的精修。氢原子采用几何加氢法得到, 并且使用刚性模型处理; 结构分析表明, 该晶体属于单斜晶系, $P2_1/c$ 空间群, 晶胞参数: $a = 1.33771(15) \text{ nm}$, $b = 0.75521(10) \text{ nm}$, $c = 1.93917(17) \text{ nm}$, $\beta = 118.996(6)^\circ$, $V = 1.7135(3) \text{ nm}^3$, $Z = 4$, $D_c = 1.334 \text{ g cm}^{-3}$, $F(000) = 720$, $\mu = 0.103 \text{ mm}^{-1}$, $R_1 = 0.0623$, $wR_2 = 0.1518$ [$I > 2\sigma(I)$], $S = 1.037$ 。最终差值电子云图中最大残余正峰和最大残余负峰分别为 $\Delta\rho_{\text{max}} = 210 \text{ e nm}^{-3}$ 和 $\Delta\rho_{\text{min}} = -249 \text{ e nm}^{-3}$ 。晶体结构解析和精修采用 SHELXS-97 和 SHELXL-97 程序完成^[25], 晶体结构做图采用 Diamond 软件^[26], CCDC: 817707。

2.4 抗氧化活性试验

2.4.1 化合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

采用碱性条件下邻苯三酚的自氧化体系^[27]. 在 10 mL 具塞试管中, 分别加入 4.5 mL 0.05 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)和不同体积的 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 样品溶液, 摇匀, 置于 25°C 水浴中预热 30 min, 加入 25°C 预热过的 1 mL 3 mmol L^{-1} 邻苯三酚溶液, 混匀后于 25°C 水浴中反应 5 min, 加入 1 mL 8 mol L^{-1} 的盐酸终止反应, 用蒸馏水定容, 立即在 318 nm 处测定吸光度(A_i), 空白对照组(A_0)以相同体积的蒸馏水代替样品, 对应浓度样品的吸光度(A_j)为参照溶液, 平行测定三次, 按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

2.4.2 化合物对 DPPH· 的清除作用

在 10 mL 具塞试管中, 分别加入 0.8 mg L^{-1} DPPH-无水乙醇溶液 1.0 mL 和不同体积的 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 样品溶液, 乙醇定容, 摇匀, 暗室条件下反应 30 min 后于 518 nm 处测定吸光度(A_i)^[28]. 以乙醇代替试样测得的吸光度(A_0), 对应浓度样品的吸光度(A_j)为参照溶液, 平行测定三次, 按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

2.5 抑菌试验

2.5.1 培养基扩散法

采用牛津杯法^[29]测试了化合物对大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抗菌能力大小, 结果以抑菌圈直径大小(mm)表示. 首先将受试菌均匀地涂在普通琼脂培养基[m(牛肉膏):m(蛋白胨):m(氯化钠):m(琼脂) = 1:2:1:4, pH 7.0~7.5]的平板上, 将已灭菌的直径为 8 μm 的牛津杯放入培养基平板上, 再将浓度为 $5 \times 10^3 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 100 mL 待测药液(DMF 为溶剂)放入平板之上的牛津杯中, 37°C 培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径大小, 每个实验平行三次, 数据取平均值.

2.5.2 营养肉汤稀释法

将不同浓度的抗菌剂混合溶解于 100 mL 营养肉汤培养基中, 然后接种受试菌液, 置 37°C 培养箱,

培养 48 h 后, 进行活菌计数, 确定最终的最小抑菌浓度(MIC)^[30].

2.6 化合物与 BSA 的作用

2.6.1 牛血清白蛋白(BSA)溶液配制

以 0.05 mol L^{-1} Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4 ± 0.1 , 内含 NaCl 0.15 mol L^{-1} , 以维持溶液离子强度)为溶剂, 配制浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 的 BSA 标准溶液备用(5°C 保存, 不超过五天).

2.6.2 荧光光谱测定

移取 3.0 mL 的 BSA 储备液于 1 cm 石英比色池中, 以微量注射器逐次加入浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 的化合物溶液 3 μL , 累加体积小于 30 μL , 反应时间为 5 min. 选择激发波长 λ_{ex} 为 285 nm, 狭缝宽度 10 nm, 记录扫描 285~600 nm 范围内的荧光光谱, 利用温度控制器控温, 测定三种温度(296 K、303 K、312 K)下体系的荧光强度, 所得的实验数据用于结合常数等的计算.

3 结果与讨论

3.1 光谱表征

由红外图谱可知, 化合物 **3a** 和 **3b** 的 O-H 键的伸缩振动吸收峰分别出现在 3286 和 3322 cm^{-1} 区域, 化合物 **3a** 由于 O-H...O 的氢键缔合作用, O-H 键的伸缩振动吸收峰出现的波数明显低于化合物 **3b**, 且峰较宽; 化合物 **3a** 和 **3b** 的 C=O 键(内酯环)、C=O 键(苯甲酰基)的伸缩振动吸收峰分别出现在 1704、1679 和 1703、1676 cm^{-1} 区域, 化合物 **3a** 和 **3b** 的 C-F 键的伸缩振动吸收峰分别出现在 1259 和 1241 cm^{-1} 区域^[31]. 由 ^1H NMR 数据可知, 化合物 **3a** 和 **3b** 的酚羟基质子信号(δ 值)分别出现在 10.868 和 4.877 处, 由于化合物 **3a** 分子间的氢键作用, 其质子信号出现在低场, δ 值明显大于化合物 **3b**^[32].

3.2 化合物 **3b** 的晶体结构描述

化合物 **3b** 晶体结构的不对称单元中包含一个化合物分子和一个结晶乙醇分子(图 2), 香豆素母核 [O(1)-O(3)/C(1)-C(9)] 是平面的, 其最小二乘平面的平均误差是 0.00233 nm, 与 8-位苯环 [C(12)-C(17)] 之

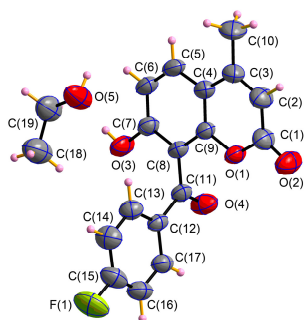


图2 化合物 **3b** 晶体结构的不对称单元

间的二面角是 $83.7(1)^\circ$, 化合物的几何键长、键角是正常的。

在化合物 **3b** 的晶体结构中, 成对出现的 $C=O\cdots\pi$ ^[33~34] 和 $\pi\cdots\pi$ 相互作用连接分子产生一维的分子链。吡喃环原子 O(2) 对着环 O(2)/C(1)–C(4)/C(9) 的质心 Cg(1)#1 (对称坐标: #1. $1-x, -y, -z$, 下同), 反过来, O(2)#1 对着环质心 Cg(1), 这样的一对相互作用把两个倒反联系的分子连接到一起, 其中 O(2) 与环质心 Cg(1)#1 的距离 $O(2)\cdots Cg(1)\#1 = 0.3386(4)$ nm, $C(1)=O(2)\cdots Cg(1)\#1 = 102.7(3)^\circ$; 同时, 8-位苯环 C(12)–C(17) 的质心 Cg(2) 对着倒反位置的环质心 Cg(2)#2 (对称坐标: #2. $2-x, -y, -z$, 下同), 这个 $\pi\cdots\pi$ 相互作用把一般位置的分子与另一个相邻对称位置的分子连接到一起, 其中环质心的距离 $Cg(2)\cdots Cg(2)\#2 = 0.3831(3)$ nm, 两个环面是平行的, 质心连线与环面法线的夹角是 28.56° , 通过连续倒反和平移操作形成一维的 $[1\ 0\ 0]$ 链 (图 3)。

相邻的分子之间由乙醇氧原子 O(5) 作为氢键受体和给体的两个 $O-H\cdots O$ 氢键连接产生一个 $[0\ 0\ 1]$ 链

(图 4 和表 1)。 $[1\ 0\ 0]$ 和 $[0\ 0\ 1]$ 链的结合产生一个 $[0\ 1\ 0]$ 的二维结构, 相邻的二维结构之间不存在 $O-H\cdots O$ 氢键, $C=O\cdots\pi$ 相互作用和更短距离的 $\pi\cdots\pi$ 堆积作用。

3.3 抗氧化活性

用邻苯三酚的自氧化法和 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基捕获法 (DPPH·) 初步测试了目标化合物的抗氧化活性, 结果显示, 两个化合物对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和 DPPH· 有不同程度的清除作用。由表 2 可知, 当底物样品浓度达 $2.5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 化合物 **3a** 和 **3b** 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力分别是 45.92% 和 50.30%, 化合物 **3a** 和 **3b** 对 DPPH· 的清除能力分别是 37.42% 和 42.96%。由此可知, 两个化合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力略强于对 DPPH· 的清除能力, 而且在同一测试浓度条件下, 化合物 **3b** 对两种自由基 ($O_2^{\cdot-}$ 、DPPH·) 的清除能力都略强于化合物 **3a** 的清除能力。两个化合物均显示良好的抗氧化能力, 这对寻找新型、高效、低毒的香豆素类药物具有重要意义。

3.4 抗菌活性

根据《消毒技术规范》中对抑菌作用的判断^[35], 抑菌圈直径大于 20 mm 表示具有强抑菌效果, 抑菌圈在 10~20 mm 为中等抑菌, 抑菌圈 < 10 mm 为弱抑菌。由表 3 可以看出, 当测试浓度为 $5 \times 10^3\ \mu\text{mol L}^{-1}$

表1 化合物 **3b** 的氢键键长(nm)及键角($^\circ$)

D–H $\cdots$ A	<i>d</i> (D–H)	<i>d</i> (H $\cdots$ A)	<i>d</i> (D $\cdots$ A)	$\angle$ (DHA)
O(3)–H(3) $\cdots$ O(5)	0.082	0.180	0.2619(4)	175.4
O(5)–H(5A) $\cdots$ O(2)#3	0.082	0.194	0.2736(5)	162.2

对称坐标: #3 $x, -y + 1/2, z + 1/2$

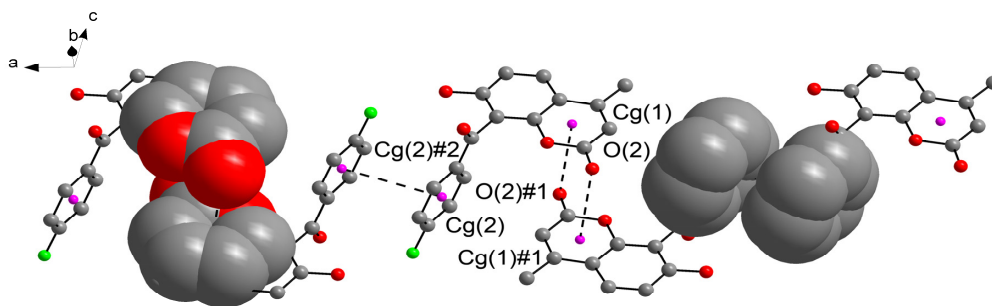


图3 $C=O\cdots\pi$ 和 $\pi\cdots\pi$ 相互作用 (包含空间填充方式) 连结的 $[1\ 0\ 0]$ 链。为了图形的清楚, 省略了氢原子 (对称坐标: #1. $1-x, -y, -z$; #2. $2-x, -y, -z$)

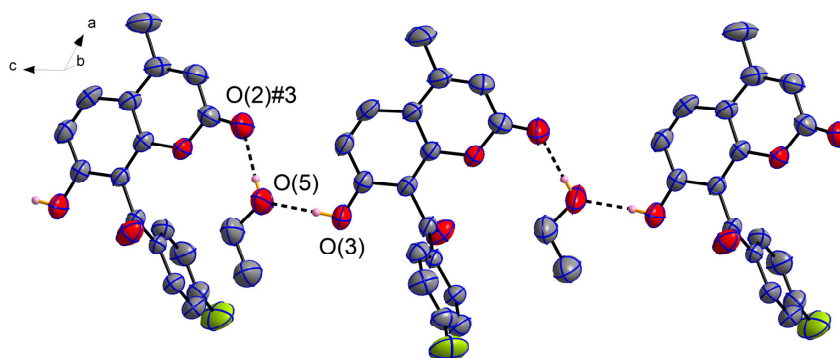


图 4 O-H...O 氢键连接的[0 0 1]链. 为了图形的清楚, 省略了氢原子(对称坐标: #3 x , $-y+1/2$, $z+1/2$)

表 2 目标化合物的抗氧化活性测试

化合物	对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率(%)	对 DPPH $\cdot$ 清除率(%)
3a	45.92	37.42
3b	50.30	42.96

样品浓度 $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$

时, 目标化合物对大肠杆菌(*E. coli*)、金色葡萄球菌(*S. aureus*) 和枯草杆菌(*B. subtilis*)均具有中等程度的抑制作用, 属于广谱抗菌剂; 化合物 **3a** 对三种受试菌抑制能力强弱顺序为: 枯草芽孢杆菌 > 金色葡萄球菌 > 大肠杆菌, 而化合物 **3b** 对三种受试菌的抑制作用无明显差异; 化合物 **3b** 对三种受试菌的抑制作用略强于化合物 **3a**, 最小抑菌浓度(MIC)均 $\leq 100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5 化合物与 BSA 的相互作用

3.5.1 BSA 的荧光猝灭光谱和猝灭机理

牛血清白蛋白(BSA)是较强的荧光分子, 在激发波长为 285 nm 时, BSA 在 346 nm 附近有很强的荧光发射峰, 当随着猝灭剂的浓度逐步增加, BSA 的发射峰值强度逐渐降低时, 表示猝灭剂引起 BSA 的荧光猝灭^[36]. 由图 5 可知, 293 K 时在 BSA 浓度固定不变条件下, 随着目标化合物的浓度逐步增加, BSA 的荧光强度逐渐降低, 且峰形和峰位没有变化, 说明目标化合物与 BSA 之间发生了相互作用从而引起 BSA 荧光猝灭, 而在同样激发波长下, 目标化合物在 300~500 nm 范围内无荧光发射峰, 表明对 BSA 的荧光无

干扰. 同时, 在 303 和 312 K 时化合物与 BSA 的荧光光谱猝灭与 293 K 时相似, 最大荧光发射峰的位置未变, 表明 BSA 的构象不随温度的变化而变化, 在所测温度范围内不需要考虑 BSA 构象的变化.

荧光猝灭可分为动态猝灭或静态猝灭, 静态猝灭常数随温度的升高而下降. 为了证实两个化合物对 BSA 猝灭特性, 首先把此过程按动态猝灭, 即用 Stern-Volmer 方程^[37]处理:

$$F_0 / F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

式(1)中, F_0 为猝灭剂不存在时荧光体的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K_q 为双分子猝灭过程猝灭速率常数, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, τ_0 为猝灭剂不存在时荧光体的荧光平均寿命, 约为 10^{-8} s ^[38], K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数. 以 $F_0 / F - 1$ 对化合物的浓度 $[Q]$ 作图, 得到不同温度下目标化合物对 BSA 的 Stern-Volmer 猝灭曲线(图 5). 从图 5 可以看出, Stern-Volmer 曲线具有良好的线性关系; 随着温度升高曲线斜率逐渐降低, 初步表明两个化合物与 BSA 形成了复合物而导致荧光猝灭, 荧光猝灭效应归于静态猝灭机制. 由曲线的斜率可以算出两个化合物的 K_{sv} 值, 进而可得到化合物的猝灭速率常数 K_q ($K_q = K_{sv} / \tau_0$), 结果见表 4. 不同温度条件下的猝灭速率常数 K_q 远大于最大扩散碰撞猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[39], 由此可进一步证明两个化合物对 BSA 的猝灭过程是分子之间结合形成了化合物-BSA 基态复合物所引起的静态猝灭, 而不是因分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭^[40].

表 3 目标化合物的抑菌圈直径及最小抑菌浓度(MIC)

化合物	浓度 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	抑菌圈直径(mm)			MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
3a	5×10^3	15	17	19	100	< 100	< 100
3b	5×10^3	18	20	19	< 100	< 100	100

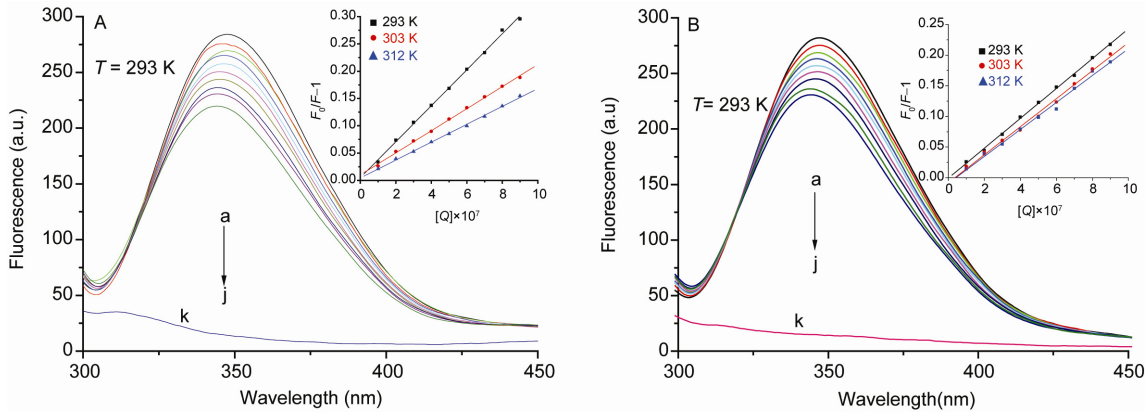


图 5 在 293 K 时, 化合物 3a(A)和 3b(B)对 BSA 的荧光猝灭光谱图(pH 7.4, Tris-HCl 缓冲液, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 285 \text{ nm}/346 \text{ nm}$). 其中, $c_{3a(a\sim j)} = c_{3b(a\sim j)} = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $c_{3a(k)} = c_{3b(k)} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{\text{BSA}} = 0$. (A, B)内插图分别显示的是 293, 303 和 312 K 时, 化合物 3a 和化合物 3b 对 BSA 猝灭的 Stern-Volmer 拟合曲线

3.5.2 化合物与 BSA 的结合位点数 n 和结合常数 K_a

在静态猝灭作用中, BSA 分子荧光强度与化合物浓度之间关系符合如下公式^[41, 42]:

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式(2)中, n 为化合物与 BSA 的结合位点数, K_a 为化合物与 BSA 的结合常数, 以 $\lg[(F_0 - F) / F]$ 对 $\lg[Q]$ 作双对数曲线(图 6), 由直线的截距和斜率求得不同温度下两个化合物与 BSA 的结合常数和结合位点数. 由表 4 可看出, 化合物 3a 的结合常数 K_a 和结合位点数 n 随着温度的升高而减小, 在 293 K 时 K_a 值在 10^5 数量级以上, 而在 303 和 312 K 时, K_a 值降为 10^4 数量级以上, 表明在实验温度范围内, 化合物 3a 与 BSA 结合能力随着温度的升高而变弱; 而化合物 3b 结合常数 K_a 和结合位点数 n 随着温度的升高而增大, 在 293 和 303 K 时, K_a 值在 10^5 数量级以上, 而在 312 K 时, K_a 值高达 10^6 数量级以上, 表明在实验温度范围内, 化合物 3b 与 BSA 有很强的结合力. 两个化合物的结合位点数接近 1, 表明在实验浓度及实验温度范围内, 两个化合物与蛋白质以接近 1:1 的比例结合形成复合物.

3.5.3 热力学参数确定作用力类型的判定

猝灭剂和 BSA 等生物大分子间的结合力主要有疏水作用力、氢键、范德华力和静电引力等, 不同的猝灭剂与 BSA 结合力的类型是不同的. Ross 等^[43]根据大量的实验结果, 总结出判断小分子(猝灭剂)与生物大分子(BSA)结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律, 即 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 表示小分子与生物大分子之间主要以疏水作用力相结合; $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 表示小分子与生物大分子之间主要以氢键或范德华力相结合; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 表示小分子与生物大分子之间主要以静电引力相结合.

热力学参数焓变(ΔH)可通过 Van't Hoff 曲线斜率计算(图 6), 当温度相差不是很大时, 可以把焓变 ΔH 看成一个常数, ΔG 通过 $\Delta G = -RT \ln K_a$ 计算, ΔS 通过 $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ 计算.

由表 4 可知, 化合物 3a 的 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 表明化合物 3a 与 BSA 之间主要以氢键或范德华力相结合; 而化合物 3b 的 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 表明化合物 3b 与 BSA 之间的主要作用力是疏水力; 从热力学角度来看, 反应的 $\Delta G < 0$, 说明化合物 3a 和 3b 与 BSA 之间的结合反应能够自发地进行.

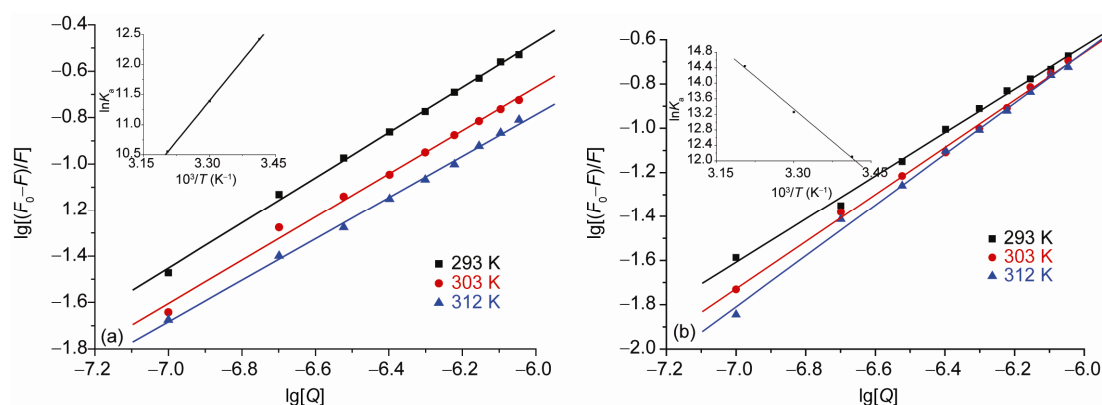


图 6 化合物 **3a**(a)和化合物 **3b**(b)对 BSA 荧光猝灭的双对数曲线. (a, b)内插图分别显示的是化合物 **3a** 和化合物 **3b** 与 BSA 相互作用的 Van't Hoff 拟合曲线

表 4 不同温度下目标化合物对 BSA 的猝灭常数、结合常数、结合位点及相互作用的热力学参数

Compound	<i>T</i> (K)	<i>K_q</i> (L mol ⁻¹ S ⁻¹)	<i>K_a</i>	<i>n</i>	Δ <i>H</i> (kJ mol ⁻¹)	Δ <i>S</i> (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Δ <i>G</i> (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
3a	293 K	3.292 × 10 ¹³	24.7993 × 10 ⁴	0.981(3)	-74.73	-151.77	-30.26
	303 K	2.043 × 10 ¹³	8.83649 × 10 ⁴	1.007 (8)		-151.91	-28.70
	312 K	1.637 × 10 ¹³	3.8316 × 10 ⁴	1.040 (6)		-151.76	-27.38
3b	293 K	2.434 × 10 ¹³	18.1426 × 10 ⁴	0.856 (7)	92.93	417.85	-29.50
	303 K	2.284 × 10 ¹³	57.0545 × 10 ⁴	0.799 (5)		416.93	-33.40
	312 K	2.196 × 10 ¹³	186.5477 × 10 ⁴	0.712(5)		417.92	-37.46

从两个化合物分子的立体结构或构象角度考虑,可能是由于 F 取代的位置不同,化合物 **3b** 分子可能更易进入到蛋白质螺旋链内部,然后其疏水性基团苯环与 BSA 内部的疏水性残基相互作用;而化合物 **3a** 分子由于难以进入到蛋白质螺旋链内部,只能与 BSA 分子以范德华力或者与蛋白质表面亲水性残基以氢键相结合. 因此化合物 **3a** 与 BSA 之间主要以氢键或范德华力相结合,化合物 **3b** 与 BSA 之间主要靠疏水作用力相结合.

3.5.4 给体(BSA)-受体(化合物)间的结合距离

根据 Förster 非辐射能量转移理论^[44],当给体(BSA)能够发射荧光,其荧光发射光谱与受体(化合物)的紫外吸收光谱有一定程度重叠,并且给体-受体间最大距离不超过 7 nm 时,将会发生非辐射能量转移现象,导致荧光猝灭. 给体-受体间能量转移效率 *E* 与给体-受体间距离 *r* 及能量转移距离 *R*₀(转移效率为 50%时的临界距离)存在如下关系:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/(R_0^6 + r^6) \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (4)$$

式(4)中, *K*² 为偶极空间取向因子,可取受体和给体各项随机分布的取向因子平均值 2/3; *N* 为介质的折

射指数,一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336; *Φ* 为给体的荧光量子产率,取 BSA 中色氨酸的量子产率 0.118^[45]; *J* 为给体的荧光发射光谱与受体的紫外吸收光谱重叠积分,可表示为

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (5)$$

式(5)中, *F*(λ) 为荧光给体(BSA)在波长 λ 处的荧光强度, *ε*(λ) 为受体在波长 λ 处的摩尔消光系数. 图 7 显示了在 280~440 nm 范围内化合物的紫外吸收光谱(a)与 BSA 的荧光发射光谱(f),将重叠部分分割成极小的矩形求面积,根据公式(5)分别求得化合物 **3a** 的重叠积分 *J* = 6.759555 × 10⁻¹⁵ cm³ mol⁻¹ L⁻¹, *R*₀ = 2.29 nm, 能量转移效率 *E* = 0.3555, 化合物与 BSA 上色氨酸残基间的距离 *r* = 2.53 nm; 化合物 **3b** 的重叠积分 *J* = 7.9559286 × 10⁻¹⁵ cm³ mol⁻¹ L⁻¹, *R*₀ = 2.36 nm, 能量转移效率 *E* = 0.3334, 化合物与 BSA 上色氨酸残基间的距离 *r* = 2.65 nm. 结合距离 *r* 都小于 7 nm^[46], 且 0.5*R*₀ < *r* < 1.5*R*₀, 表明两个化合物与 BSA 分子间可能发生了非辐射能量转移,两个化合物对 BSA 的猝灭是通过能量转移机制使蛋白质荧光发生静态猝灭.

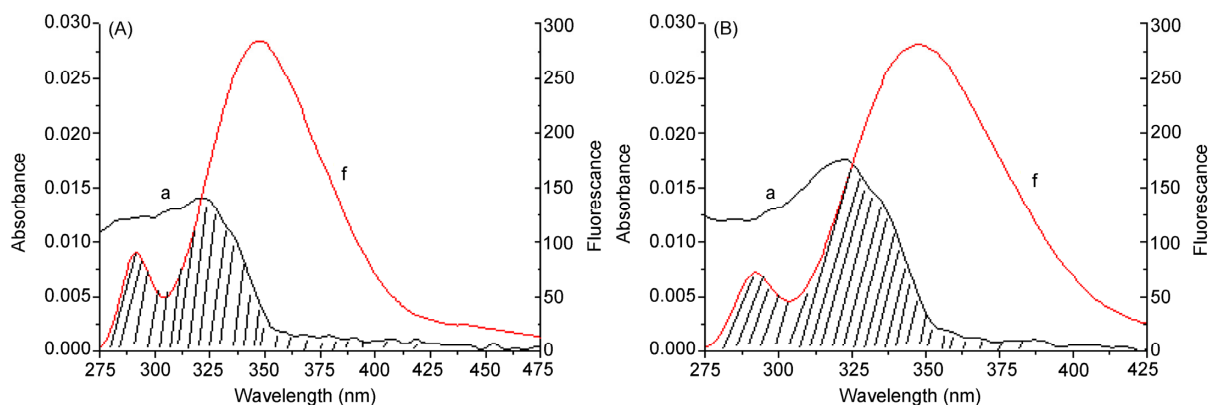


图 7 293 K 下, 化合物 **3a**(A)和化合物 **3b**(B)的紫外吸收光谱(a)与 BSA 荧光发射光谱(f)重叠谱图($c_{\text{compound}} = c_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)

4 结论

合成了两个新的 8-氟代苯甲酰基香豆素衍生物, 培养并获得了 8-(4-氟苯甲酰基)-7-羟基-4-甲基香豆素(**3b**)的晶体, 用 X-射线单晶衍射测定了其晶体结构, 化合物 **3b** 属于单斜晶系 $P2_1/c$ 空间群, 其晶体结构的不对称单元中包含了一个化合物分子和一个结晶乙醇分子, 香豆素母核平面与苯环之间的两面角为 $83.7(1)^\circ$; 抑菌试验显示, 目标化合物对大肠杆菌(*E. coli*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)和金色葡萄球菌(*S. aureus*) 均有中等程度的抑制作用, 化合物 **3b** 抑菌作用略微强于化合物 **3a**, 最小抑菌浓度(MIC)均 $\leq 100 \mu\text{mol L}^{-1}$; 抗氧化活性试验显示, 目标化合物对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和 DPPH $\cdot$ 有良好的清除能力,

化合物 **3b** 对两种自由基的清除能力略强于化合物 **3a**. 运用荧光光谱法研究了化合物与 BSA 的相互作用, 结果表明, 两个化合物对 BSA 的荧光猝灭是形成基态复合物所引起的静态猝灭, 结合常数(K_a)表明目标化合物与蛋白质之间以较强的结合力形成了复合物, 并且结合距离(r)小于 7 nm, 表明化合物与蛋白质间发生了非辐射能量转移; 化合物 **3a**($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $\Delta G < 0$)与 BSA 之间主要以氢键或范德华力相结合, 化合物 **3b**($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$)与 BSA 之间主要靠疏水作用力相结合, 且两个化合物与 BSA 之间的结合反应是自发进行的. 本实验结果为氟代香豆素类化合物在药物、生物工程领域研究提供了一定的理论依据.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(30901815)资助, 特此致谢.

参考文献

- 1 Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47–95
- 2 Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 2001, 54: 176–186
- 3 Horton AA, Fairhurst S, Bus JS. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 1987, 18: 27–79
- 4 McIntosh LJ, Trush MA, Troncoso JC. Increased susceptibility of Alzheimer's disease temporal cortex to oxygen free radical-mediated processes. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 183–190
- 5 Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7915–7922
- 6 Liu XH, Xi PX, Chen FJ, Xu ZH, Zeng ZZ. Spectroscopic studies on binding of 1-phenyl-3-(coumarin-6-yl)sulfonylurea to bovine serum albumin. *J Photochem Photobiol B: Bio*, 2008, 92: 98–102
- 7 Wang N, Ye L, Yan FF, Xu R. Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin. *Iner J Pharm*, 2008, 35: 55–60
- 8 Hu YJ, Liu Y, Pi ZB, Qu SS. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 6609–6614
- 9 Wang YQ, Zhang HM, Zhou, QH. Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 2100–2105

- 10 刘雪锋, 夏咏梅, 方云, 邹鲁, 刘玲玲. 三种香豆素类中药小分子与牛血清白蛋白的相互作用. 化学学报, 2004, 62: 1484–1490
- 11 Liu JQ, Tian JN, He WY, Xie JP, Hu Z, Chen XG. Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35: 671–677
- 12 Riveiro ME, Moglioni A, Vazquez R, Gomez V, Facorro G, Piehl L, de Celis RE, Shayo C, Davio C. Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 2665–2675
- 13 Manojkumar P, Ravi TK, Gopalakrishnan S. Antioxidant and antibacterial studies of arylazopyrazoles and arylhydrazonopyrazolones containing coumarin moiety. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 4690–4694
- 14 Thaisrivongs S, Tomich PK, Watenpaugh KD, Chong KT, Howe WJ, Yang CP, Strohbach JW, Turner ST, Mcgrath JP. Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic Inhibitors. *J Med Chem*, 1994, 37: 3200–3204
- 15 Torres R, Faini F, Modak B, Urbina F, Labbé C, Guerrero J. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*, 2006, 67: 984–987
- 16 Rollinger JM, Hornick A, Langer T, Stuppner H, Prast H. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J Med Chem*, 2004, 47: 6248–6254
- 17 Kirk KL. Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. *J Fluor Chem*, 2006, 127: 1013–1029
- 18 Clairefond P, Bouzard D, Ledoussal B, Coroneos E, Bazile S, Moreau N. DNA-gyrase inhibition and antibacterial activity of fluoro-quinolones: Influence of the position of the fluorine(s). *Bioorg Med Chem Lett*, 1992, 2: 643–646
- 19 Karthikeyan MS, Holla BSM, Kumari NS. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorinecontaining hydroxy pyrazolines. *Eur J Med Chem*, 2007, 42: 30–36
- 20 于琛. 氟代香豆素的合成与抗肿瘤活性研究. 海峡药学, 2012, 24: 265–267
- 21 Manojkumar P, Kochupappyravi T, Subbuchettiar G. Synthesis of coumarin heterocyclic derivatives with antioxidant activity and *in vitro* cytotoxic activity against tumour cells. *Acta Pharm*, 2009, 59: 159–170
- 22 Hewawasam P, Fan W, Knipe F, Moon SL, Boissard CG, Gribkoff VK, Starrett Jr JE. The synthesis and structure-activity relationships of 4-aryl-3-aminoquinolin-2-ones: A new class of calcium-dependent, large conductance, potassium (maxi-K) channel openers targeted for post-stroke neuroprotection. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 1779–1782
- 23 Kalkhambkar RG, Kulkarni GM, Kamanavalli CM, Premkumar N, Asdaq SMB, Sun CM. Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. *Eur J Med Chem*, 2008, 43: 2178–2188
- 24 何明华, 林家逊. 胆通的合成工艺. 华西药杂志, 2001, 16: 155
- 25 Sheldrick GM. A short history of *SHELX*. *Acta Cryst A*, 2008, 64: 112–122
- 26 Brandenburg K. Diamond. Bonn: Crystal Impact GbR. 1999
- 27 王光荣, 李熙灿, 曾和平. (*E*)-*N*-芳基-3-[2-(8-羟基喹啉基)-乙基]咪唑的合成、抗氧化活性及促进鼠骨髓间质干细胞增殖的研究. 化学学报, 2009, 67: 974–982
- 28 Raj HG, Parmar VS, Jain SC, Goel S, Himanshu P, Malhotra S, Singh A, Olsenc CE, Wengel J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-methyl coumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6: 833–839
- 29 刘恭植. 微生物学和微生物学检验. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 100
- 30 夏庆春, 沈智慧, 何其庄, 许东芳, 彭子飞, 邵超英. 稀土、钼酸、糠醛缩水杨酰肼三元配合物的合成、表征及生物活性的研究. 化学学报, 2009, 67: 1843–1850
- 31 Al-Shihry SS. Synthesis of substituted stilbenes via the Knoevenagel condensation. *Molecules*, 2004, 9: 658–665
- 32 洪山海. 光谱解析法在有机化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1981: 135–170
- 33 Santos-Contreras RJ, Martínez-Martínez FJ, García-Báez EV, Padilla-Martínez II, Peraza AL, Höpfl H. Carbonyl-carbonyl, carbonyl- π and carbonyl-halogen dipolar interactions as the directing motifs of the supra-molecular structure of ethyl 6-chloro-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate and ethyl 6-bromo-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate. *Acta Cryst*, 2007, C63: o239–o242
- 34 Wan CQ, Chen XD, Mak TCW. Supramolecular frameworks assembled via intermolecular lone pair-aromatic interaction between carbonyl and pyridyl groups. *Cryst Eng Comm*, 2008, 10: 475–478
- 35 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范, 2002, 92
- 36 易平贵, 商志才, 俞庆森, 邵爽, 林瑞森. 丝裂霉素 C 与牛血清蛋白结合作用的研究. 化学学报, 2000, 58: 1649–1653
- 37 Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ed. New York: Springer, 2006
- 38 Lakowicz J R, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*, 1973, 12: 4161–4170
- 39 Hu YJ, Liu Y, Zhang LX, Zhao RM, Qu SS. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching. *J Mol Struct*, 2005, 750: 174–178
- 40 余庆涛, 毕志明, 李萍, 肖莹. 异鼠李素-3- β -D-葡萄糖苷、异槲皮苷与牛血清白蛋白相互作用的研究. 中国药杂志, 2008, 43: 68–70
- 41 Zhang GW, Chen XX, Guo JB, Wang JJ. Study on the interaction of hesperidin or icariin with lysozyme by fluorescence spectroscopy. *J Mol Struct*, 2009, 921(1-3): 346–351

- 42 赵锦, 王志, 吴秋华, 杨秀敏, 王春, 胡彦学. 应用荧光光谱法和紫外光谱法研究士的宁与牛血清白蛋白的相互作用. *药学报*, 2006, 41: 666–670
- 43 Ross DP, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096–3102
- 44 Förster T, Sinanoglu O. *Modern Quantum Chemistry*. New York: Academic Press, 1966: 93–137
- 45 Kasai S, Horie T, Mizuma T, Awazu S. Fluorescence energy transfer study of the relationship between the lone tryptophan residue and drug binding sites in human serum albumin. *J Pharm Sci*, 1987, 76: 387–392
- 46 Hu YJ, Liu Y, Wang JB, Xiao HX, Qu S. Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36: 915–919

Synthesis, crystal structure, antibacterial activity, antioxidation activity and interaction with bovine serum albumin of 8-(3/4-fluorobenzoyl)-7-hydroxy-4-methylcoumarin

YANG ShuPing^{1*}, HAN LiJun², PAN Yan^{3,4}, WANG DaQi⁵, ZHOU YaNan¹, ZHANG Fan¹

1 School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

2 School of Mathematics and Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

3 Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

4 State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China

5 School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

*Corresponding author (email: spyang69320@yahoo.cn)

Abstract: Two novel coumarin derivatives, 8-(3-fluorobenzoyl)-7-hydroxy-4-methylcoumarin (**3a**) and 8-(4-fluorobenzoyl)-7-hydroxy-4-methylcoumarin (**3b**), were synthesized by Fries rearrangement. Their structures were identified by IR, ¹H NMR and elemental analysis, and the crystal structure of compound **3b** was determined by single crystal X-ray diffraction. The crystal of compound **3b** belongs to monoclinic system. Their antibacterial activities were evaluated by the method of Oxford Cup, and the results indicated that the target compounds possess the activity for the inhibiting growth of *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus*. Their antioxidation capacities were investigated by the superoxide anion (O₂^{•-}) and DPPH[•] scavenging methods, and the results showed that the title compounds have good radical-scavenging capacities. The interactions of the title compounds with bovine serum albumin (BSA) were investigated by fluorescence spectroscopy at different temperatures, the results indicated that the title compounds cause the fluorescence quenching of BSA through a static quenching procedure. The binding constants (*K*_a) and the number of binding sites (*n*) between the title compounds and BSA were calculated by applying the double logarithmic curve equation at different temperatures, and the corresponding thermodynamic parameters enthalpy change (ΔH), entropy change (ΔS), Gibbs free energy change (ΔG), between the title compounds and BSA were also obtained according to the van't Hoff equation. The interaction between the compound **3a** ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, $\Delta G < 0$) and BSA is driven mainly by hydrogen bond force or van der Waals force, whereas the interaction between the compound **3b** ($\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$) and BSA is driven mainly by hydrophobic force. The binding average distance *r* between the donor (BSA) and acceptor (compound **3a** and **3b**) were obtained to be respectively 2.53 nm and 2.65 nm based on the Föster's theory, which indicated the energy transfer could occur from BSA to the title compounds with high probability.

Keywords: 8-(3-fluorobenzoyl)-7-hydroxy-4-methylcoumarin, 8-(4-fluorobenzoyl)-7-hydroxy-4-methylcoumarin, crystal structure, antibacterial activity, antioxidation activity, bovine serum albumin (BSA)