

新狼毒素B的抑菌活性构效关系研究

冉晓娅, 周乐, 张武岗, 杨明利, 吴联

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以新狼毒素B为原料,以硼氢化钠为还原剂,以溴乙酸为羧基甲基醚化试剂,分别合成出2种羧基还原产物F₁和F₁₋₀及2种羧基甲基醚化产物B₁和B₂。选择金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌、大肠杆菌和沙门氏菌为供试菌,采用药敏纸片法对新狼毒素B及其4种衍生物进行了抑菌活性测定。结果表明,与新狼毒素B相比,F₁对所有供试菌的抑菌活性有一定程度增加,F₁₋₀的抑菌活性有微小减弱,B₁和B₂对5种菌的抑菌活性均明显减弱。初步说明新狼毒素B分子中的7,7',4',4''4个酚羟基中的2个为主要活性基团,且不同活性基团对新狼毒素B的抑菌活性的选择性影响很大;羧基不是新狼毒素B的主要活性基团。

[关键词] 抑菌活性;结构修饰;新狼毒素B;构效关系

[中图分类号] S481⁺.9;O656.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0083-04

新狼毒素B(neochajasmine B,以下简称n-B,化学结构如图1)是一种存在于瑞香狼毒根中的天然C3/C3双黄酮化合物^[1],作者等^[2-4]曾报道该化合物对多种植物病原菌和动物病原菌具有良好的抑菌活性,是一种理想的天然广谱抗菌物质。为了进一步了解n-B的抑菌活性构效关系,特别是抑菌活性基团,本研究选择性地对其分子中的羧基和羟基进行了化学修饰,通过测定n-B及其修饰物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)等5种动物病原菌的体外抑菌活性,分析和评价了n-B中羧基和羟基对其抑菌活性的影响。

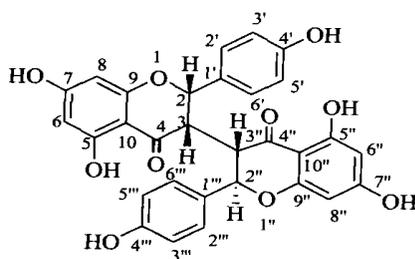


图1 新狼毒素B的化学结构

Fig 1 Chemical structure of neochajasmine B

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器 303型电热恒温培养箱;立式压力蒸汽灭菌器LS-B50;SW-CJ-1BC洁净操作台;WFH-203三用紫外分析仪(上海精科实业有限公

司);DHG-9075A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);EB-280型电子天平(上海物理光学仪器厂);SP2100UV(754)型紫外可见分光光度计;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);BC-R201B旋转蒸发器(上海贝凯生物化工设备有限公司);XT-4双目显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 溴乙酸(化学纯)、硼氢化钠、甲醇、丙酮、氯仿、醋酸、乙醇和乙酸乙酯均为分析纯;柱层析硅胶,薄层层析硅胶GF₂₅₄(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(Walman公司);牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、磷酸二氢钾。

1.1.3 样品 n-B由作者从瑞香狼毒根中分离得到,纯度(HPLC)98%;抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的参照药品分别为青霉素钠(I, penicillin Na)(华北制药股份有限公司)和头孢曲松钠(II, Ceftriaxone Sodium)(齐鲁制药有限公司)。

1.1.4 菌种 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、乳房链球菌(*S. uberis*)、停乳链球菌(*S. dysagalactiae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌(*Salmonella*),均由西北农林科技大学家畜生殖内分泌研究室从患有乳腺炎的奶牛乳腺中分离并保存。用前将保存菌种接种于营养肉汤中,37℃下培养18~20h备用。

1.2 方法

1.2.1 n-B羧基还原产物F₁和F₁₋₀的合成 向50

收稿日期 2005-10-27

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30571402)

作者简介 冉晓娅(1981-),女,新疆石河子人,在读硕士,主要从事天然产物化学研究。

通讯作者 周乐(1965-),男,陕西蒲城人,教授,主要从事天然产物化学研究。E-mail: betterz1@163.com



mL 锥形瓶中依次加入 0.53 g (1 mmol) n-B 和 10 mL 无水乙醇, 室温搅拌至全溶。然后将 0.039 3 g (1 mmol) NaBH_4 分批加入, 全部加完后室温下避光反应, 24 h 后补加 0.019 3 g (0.5 mmol) NaBH_4 再反应 24 h, 薄层层析跟踪检测(展开剂: 氯仿-丙酮-醋酸按体积比 6:4:0.154 混合)至反应完全。减压蒸除溶剂, 向残留物中加水 50 mL, 用 0.3 mol/L HCl 调 pH 为 3~4, 乙酸乙酯萃取(50 mL \times 3), 合并有机相, 蒸馏水洗涤 3 次, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤后浓缩至干, 得粗品 0.54 g。

用少量乙酸乙酯溶解上述粗品, 上硅胶柱分离, 氯仿-丙酮(体积比为 7:3)混和溶剂洗脱, 分步收集, 每管 7~9 mL。以 n-B 作对照对各管进行 TLC 分析, 相同物质合并后浓缩至干, 主要得 F_1 和 F_{1-0} 2 个粗品。 F_1 和 F_{1-0} 再分别经反复硅胶柱层析及 Sephadex LH-20 柱层析, 得 0.4 g F_1 (mp 224~225) 和 15 mg F_{1-0} (mp 188~189)。

1.2.2 n-B 单羧甲基取代产物 B_1 和 B_2 的合成 向 250 mL 茄形瓶中依次加入 5.4 g (0.01 mol) n-B, 50 mL 无水乙醇和 1.53 g (0.011 mol) 溴乙酸, 室温搅拌下逐滴加入 0.033 mol 乙醇钠溶液, 85 °C 水浴中回流 8 h。以 n-B 作对照, 薄层层析跟踪检测(展开剂: 氯仿-丙酮-醋酸按体积比 6:4:0.154 混合)至反应完全。减压蒸除溶剂, 向残留物中加水 100 mL, 用 0.3 mol/L HCl 调 pH 为 2~3, 乙酸乙酯萃取(60 mL \times 3), 合并有机相, 蒸馏水洗 3 次, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤后浓缩至干, 得粗品 6.01 g。

取 2 g 粗品, 用少量乙酸乙酯溶解, 上硅胶柱分离, 依次用氯仿-甲醇(体积比为 7:1) 氯仿-甲醇(体积比为 5:1) 甲醇洗脱, 分得 B_1 , B_2 粗品及其他大极性混和组分(待分), B_1 和 B_2 分别反复上硅胶柱及 Sephadex LH-20 柱纯化, 得 0.1 g B_1 (mp 210~211) 和 0.22 g B_2 (mp 208~209)。

1.2.3 F_1 , F_{1-0} , B_1 和 B_2 的紫外光谱测定 将 F_1 , F_{1-0} , B_1 和 B_2 分别溶于无水乙醇中配成适宜浓度, 用紫外可见分光光度计分别测定 200~400 nm 波长处的吸光度, 以波长为横坐标, 吸光度为纵坐标分别绘制 F_1 , F_{1-0} , B_1 和 B_2 的紫外吸收光谱。

1.2.4 抑菌活性测定 (1) 培养基 普通琼脂培养

基和营养肉汤培养基, 均按文献[5]的方法制备。

(2) 药敏纸片的制备。选用优质滤纸用打孔器制成直径 6 mm 的圆形纸片, 121 °C 高压灭菌 30 min, 再经 160 °C 烘干, 置于干燥器中备用。(3) 试样溶液的制备。将各试样分别用丙酮溶解配成 5 mg/mL 的混合液, 然后用丙酮依次对其进行对倍稀释, 分别得 5, 2.5, 1.25 和 0.625 mg/mL 4 个浓度的样品溶液。以丙酮液作空白对照。(4) 菌悬液的制备。将活化后的金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌、沙门氏菌和大肠杆菌分别接种于斜面培养基上, 置 37 °C 恒温箱中培养 18~20 h, 用营养肉汤稀释斜面培养基中的菌种, 使菌液浓度达到 10^6 /mL。(5) 体外抑菌试验。取制备好的纸片分别放入不同浓度的试样溶液中, 浸泡 3 h 后 40 °C 烘干。将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌分别均匀涂抹在普通琼脂培养基上, 再将制备好的药敏纸片分别顺次贴于平板四角, 空白对照贴于平板中央, 然后置于 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h, 测定抑菌圈直径。每种浓度设 3 个重复, 以 3 个重复的平均值为最终结果。以青霉素钠作为革兰氏阳性菌的参照, 以头孢曲松钠作为革兰氏阴性菌的参照。

2 结果与分析

2.1 n-B 及 F_1 , F_{1-0} , B_1 和 B_2 的紫外分析

由表 1 可看出, 5 个化合物的 UV 在 210~225 nm 及 276~301 nm 段均各存在一个最大吸收, 但各个化合物的最大吸收值存在明显差异。根据二氢黄酮类的紫外吸收规律可知, 276~301 nm 的吸收峰是由 A 环产生的带 II^[6]。若 A 环中的羰基 C 被还原成饱和 C, 则带 II 发生紫移^[7]。比较 n-B 及 F_1 , F_{1-0} 的带 II 可知, F_{1-0} 的带 II (276 nm) 明显小于 n-B (299 nm), 而 F_1 的带 II (297 nm) 与 n-B 的基本一致, 这说明 F_{1-0} 为双羰基还原产物, 而 F_1 应该是单羰基还原产物。同样, 比较 n-B 与 B_1 , B_2 的 λ_{max} 可知, 三者的带 II 吸收基本一致, 这表明三者具有相同的 A 环骨架结构; 但三者 210~225 nm 段的 λ_{max} 存在一定差异, 这说明 B_1 和 B_2 是由 n-B 分子中的不同酚羟基发生羧甲基化所形成的产物。

表 1 新狼毒素 B 及其 4 种衍生物的最大吸收波长

Table 1 λ_{max} of neochamaejasmine B and its four derivatives

化合物 Compounds	n-B	F_1	F_{1-0}	B_1	B_2
$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	219, 299	217, 223 (sh), 297	211, 276	210, 301	225, 297

2.2 n-B 及 F₁, F₁₋₀, B₁ 和 B₂ 的抑菌活性

抑菌圈直径大于6mm (药敏纸片直径) 表示供试液有抑菌作用。抑菌圈直径越大, 抑菌活性越强^[5]。表2显示, 与n-B相比, F₁除对乳房链球菌(*S. uberis*)的抑菌活性有轻微下降外, 对其他4种供试菌的抑菌活性均有不同程度增加; 相反, F₁₋₀对所有供试菌的抑菌活性均有轻微减弱。由于三者的抑菌活性差异不是很大, 因此可以说明n-B分子的羰基并非主要抑菌活性基团。

比较n-B与B₁, B₂的抑菌活性可以看出, B₁和B₂

的抑菌谱均较n-B变窄, 且二者对金黄色葡萄球菌均无抑菌活性, 其中B₁对2种革兰氏阴性菌也无抑菌作用, B₂则仅对革兰氏阴性菌大肠杆菌有活性。由于B₁和B₂是n-B上不同羟基被羧甲基化后的产物, 因此上述结果说明, n-B分子中不同位置的羟基与其抑菌活性的选择性有密切关系, 其中与抗金黄色葡萄球菌和抗沙门氏菌活性有重要关系的酚羟基至少有2个, 而这2个酚羟基与n-B的抗乳房链球菌和停乳链球菌活性无关或关系不大, 其中有一个酚羟基是决定n-B抗大肠杆菌的活性基团。

表2 新狼毒素B及其4种衍生物的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of neochamaejasmin B and its four derivatives

化合物 Compound	浓度/ (mg · mL ⁻¹) Concentration	抑菌活性(抑菌圈直径)/mm Antibacterial activity (diameter of inhibition zone)				
		金色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	停乳链球菌 <i>S. dysagalactiae</i>	沙门氏菌 <i>Samonellal</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
n-B	5 000	12.3	10.7	9.7	12.1	11.0
	2 500	11.0	9.0	9.0	10.3	9.7
	1.250	9.7	8.0	8.0	8.5	8.3
	0.625	7.0	7.5	7.3	7.8	7.5
F ₁	5 000	13.7	8.2	10.7	13.1	12.5
	2 500	12.0	7.5	9.3	11.0	10.7
	1.250	10.3	6.8	8.3	9.6	8.2
	0.625	8.9	6.1	8.3	8.1	7.7
F ₁₋₀	5 000	8.7	9.0	10.0	12.0	10.2
	2 500	8.0	8.3	9.0	9.5	9.4
	1.250	7.0	7.5	8.5	8.0	8.0
	0.625	-	-	-	7.7	6.8
B ₁	5 000	-	10.0	8.5	-	-
	2 500	-	9.0	8.2	-	-
	1.250	-	8.5	7.1	-	-
	0.625	-	-	-	-	-
B ₂	5 000	-	9.3	9.7	-	9.5
	2 500	-	8.3	8.0	-	8.6
	1.250	-	7.3	7.9	-	7.5
	0.625	-	-	-	-	-
I	5 000	47.6	30.3	28.5	-	-
	2 500	42.0	29.6	25.0	-	-
	1.250	38.6	21.6	20.0	-	-
	0.625	32.6	15.0	18.0	-	-
II	5 000	25.3	9.0	-	31.3	40.0
	2 500	22.6	8.6	-	28.6	37.5
	1.250	20.0	8.6	-	28.3	32.5
	0.625	17.6	-	-	26.6	29
CK	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示平均值约等于6mm。Note:“-”means equal to 6mm.

比较n-B及其4种衍生物与青霉素钠(I)对3种革兰氏阳性菌的抑菌活性, 其抑菌活性大小次序为: I > F₁ > n-B > F₁₋₀ > B₁ > B₂。同理, 与头孢曲松钠(II)比较, 可知n-B及其4种衍生物对2种革兰氏阴性菌的抑菌活性大小次序为: II > F₁ > n-B > F₁₋₀ > B₂ > B₁。其中, n-B及F₁对革兰氏阳性菌的抑菌活

性约为青霉素钠的1/4, 对革兰氏阴性菌的抑菌活性约为头孢曲松钠的1/3。但从表1可以看出, n-B的抗菌谱明显广于头孢曲松钠和青霉素钠。

3 讨论

大量研究^[8]表明, 很多黄酮类化合物对许多微

生物都具有程度不等的抑菌活性,但是关于C3/C3双二氢黄酮类的抑菌活性及其构效关系研究一直属于空白。对黄酮类化合物的构效关系的研究多集中在抗氧化活性方面,近年来有关其抑菌活性构效关系研究的报道逐渐增多。构效关系研究的重要成果之一就是证明黄酮芳环上的酚羟基是其主要活性基团,不同位置的羟基对活性的贡献不同,活性羟基经甲基化后导致母体化合物活性显著降低甚至消失^[9-10],这与本试验的结果一致。

n-B 分子中共有 6 个酚羟基,其中 5-OH 和 5'-OH 的酸性最弱^[6],加之在B₁和B₂的合成中,溴乙酸和n-B 的物质的量之比为 1:1,可以推测B₁和B₂可能是由 7,7',4',4'' 4 个酚羟基中的某一个发生羧

甲醚化的产物,也就是说本研究所考察的羟基主要是 7,7',4',4'' 4 个酚羟基经亲核取代得到的。在F₁和F₂的合成中,n-B 与NaBH₄ 的物质的量之比为 1:1.5,这个比例低于n-B 双羰基还原理论上所需要的比例(1:2),因此可以预测实际得到的单羰基还原产物(F₁)应远多于双羰基还原产物(F₁₋₀),这与2:1的分析结果一致。

本研究只是比较笼统地表明了n-B 中的 7,7',4',4'' 4 个酚羟基与其抑菌活性的关系,要搞清楚每个具体羟基的抑菌谱及其与抑菌活性的关系,还需要进一步对每一个具体羟基进行选择性的封闭和抑菌活性试验,这一工作目前正在进行中。

[参考文献]

- [1] Niva M, Tatematsu H, Liu G Q, et al Isolation and structures of two new C-3/C-3'-biflavanones neochamaejasmine A and neochamaejasmine B [J]. Chemistry Letters, 1984, 148(4): 539-542
- [2] 秦宝福,周乐,苗芳,等 瑞香狼毒根的抑菌活性研究(I) [J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 1977-1980
- [3] 周乐,元超,秦宝福,等 瑞香狼毒根的抑菌活性成分研究(II) [J]. 西北植物学报, 2004, 24(12): 2346-2349
- [4] 张武岗,李定刚,宋毓明,等 新狼毒素B及其衍生物的抑菌活性研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(11): 66-69
- [5] 李健强,李六金 兽医微生物学实验实习指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [6] 肖崇厚 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 276, 297
- [7] 张雯杰,刘玉清,李兴从,等 云南“生态茶”的化学成分[J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 204-208
- [8] Alcaraz L E, Blanco O N, Puig F Tomas, et al Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. Theor Biol, 2000, 205: 231-240
- [9] XU Zhi-hong, QN Guo-wei, LI Xiao-yu, et al New biflavanones and bioactive compounds from *Stellera chamaejasme* L [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2001, 36(9): 668-671.
- [10] Martini N D, Katerere D R P, Eloff J N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) [J]. Ethnopharmacology, 2004, 93: 207-212

Study on structure modification of neochamaejasmine B and relationship of structure-antibacterial activity

RAN Xiao-ya, ZHOU Le, ZHANG Wu-gang, YANG Ming-li, WU Lian

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: Compounds F₁, F₁₋₀, B₁ and B₂ were obtained from neochamaejasmine B by using NaBH₄ as the reductant and BrCH₂COOH as the carboxymethyl etherification reagent respectively. The antibacterial activity of neochamaejasmine B and its four derivatives, were tested with dish diffusion of Neo-Sensitab *in vitro* against *S. aureus*, *S. uberis*, *S. dysagalactiae*, *S. monellii* and *E. coli*. The results showed that the antibacterial activity against all bacteria tested was slightly higher than that of neochamaejasmine B, but that of F₁₋₀ was slightly lower, and that of B₁ and B₂ dropped obviously. The above mentioned explained that two of 7,7',4',4'' four hydroxyl groups of neochamaejasmine B were the main active group, and that different active group had great effect on the selectivity of antibacterial activity of neochamaejasmine B and carbonyl group was not the main active group.

Key words: antibacterial activity; structure modification; neochamaejasmine B; structure-activity relationship