

新狼毒素 B 抑菌活性构效关系的进一步研究

高媛¹, 刘国都¹, 杨健¹, 周乐¹, 孙伟²

(1 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西北大学 化学系, 陕西 西安 710069)

【摘要】【目的】进一步研究新狼毒素 B 的抑菌活性构效关系。【方法】以新狼毒素 B 为原料, 合成了 7"-甲氧基(A₂₋₁)、7, 7"-二甲氧基(E₃)和 7, 7", 4"-三甲氧基(E₁) 3 个新狼毒素 B 甲醚化产物及 4-亚甲基新狼毒素 B(D₃), 利用 ESI-MS、¹H NMR 和 ¹³C NMR 对其结构进行了表征。选择金黄色葡萄球菌(*S. aureas*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌(*Samonellal*)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】4 种修饰物对所有供试菌的抑菌活性均小于新狼毒素 B; 3 种甲醚化产物在质量浓度为 0.625~5 mg/mL 时, 对沙门氏菌没有抑菌活性; 对于其他 3 种供试菌, 各供试物的抑菌活性次序为新狼毒素 B≈D₃>A₂₋₁>E₃>E₁。【结论】新狼毒素 B 分子中, 7-OH 和 7"-OH 是其主要抑菌活性基团, 4'-OH 和 4"-OH 对抑菌活性的贡献较小, 4-羰基不是主要抑菌活性基团。

【关键词】 新狼毒素 B; 结构修饰; 抑菌活性

【中图分类号】 S481⁺.9; O654.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)05-0179-06

Further study on relationship between structure and antibacterial activity of neochamaejasmine B

GAO Yuan¹, LIU Guo-du¹, YANG Jian¹, ZHOU Le¹, SUN Wei²

(1 College of Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: 【Objective】It further studied the relationship between structure and antibacterial activity of neochamaejasmine B. 【Method】Four compounds, 7"-methoxy neochamaejasmine B (A₂₋₁), 7, 7"-dimethoxy neochamaejasmine B (E₃), 7, 7", 4"-trimethoxy neochamaejasmine B (E₁) and 4-methylene neochamaejasmine B (D₃) were prepared from neochamaejasmine B. Their structures were confirmed by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The antibacterial activity of neochamaejasmine B and its four derivatives were tested with dish diffusion of Neo-Sensitab *in vitro* against *S. aureas*, *S. agalactiae*, *E. coli* and *Samonellal*. 【Result】The results showed that the antibacterial activity of four derivatives against all bacteria tested was lower than that of neochamaejasmine B. The antibacterial activity of A₂₋₁, E₃ and E₁ against *Samonellal* disappeared at 0.625~5 mg/mL. But the order of the antibacterial activity of all compounds against other bacteria was n-B≈D₃>A₂₋₁>E₃>E₁. 【Conclusion】The above mentioned structure-activity relationship studies showed that 7-OH and 7"-OH of neochamaejasmine B were the main active groups, and that 4'-OH and 4"-OH had less contribution to its antibacterial activity, and that carbonyl group was not the main active group.

* [收稿日期] 2007-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571042)

[作者简介] 高媛(1982-), 女, 河南三门峡人, 在读硕士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: yuanyuan1250@163.com

[通讯作者] 周乐(1965-), 男, 陕西蒲城人, 教授, 博士生导师, 主要从事有机合成和天然产物化学研究。
E-mail: zhoulechem@yahoo.com.cn

Key words: neochamaejasmine B; structure modification; antibacterial activity

新狼毒素 B(neochamaejasmine B,以下简称 n-B)是 1984 年首先由日本学者 Niwa 等^[1-2]从瑞香科狼毒属植物瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)中发现的,它是由两分子 5,7,4'-三羟基二氢黄酮通过 C-3/C-3''连接而成的双二氢黄酮类化合物。有研究者曾采用活性跟踪法首次证明,新狼毒素 B 是瑞香狼毒根的主要抑菌活性成分之一^[3],该化合物对多种动植物病原菌具有抑菌活性强和抗菌谱宽的特点^[4-5],并对其抑菌活性构效关系也曾进行过初步研究^[6],结果表明,n-B 分子中的 7,7'',4'和 4''' 4 个酚

羟基中的 2 个为主要活性基团,羰基不是 n-B 的主要活性基团。为了更深入地了解 n-B 的抑菌活性构效关系,本研究在以前工作的基础上,设计并合成了 4 个新的 n-B 修饰物(图 1),通过测定 n-B 及其产物对金黄色葡萄球菌(*S. aureas*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌(*Samonellal*)等 4 种动物源病原菌的体外抑菌活性,研究了 n-B 中羰基和羟基对其抑菌活性的影响,以期将活性的衍生物开发成“安全、有效、稳定、可控”的一类中药。

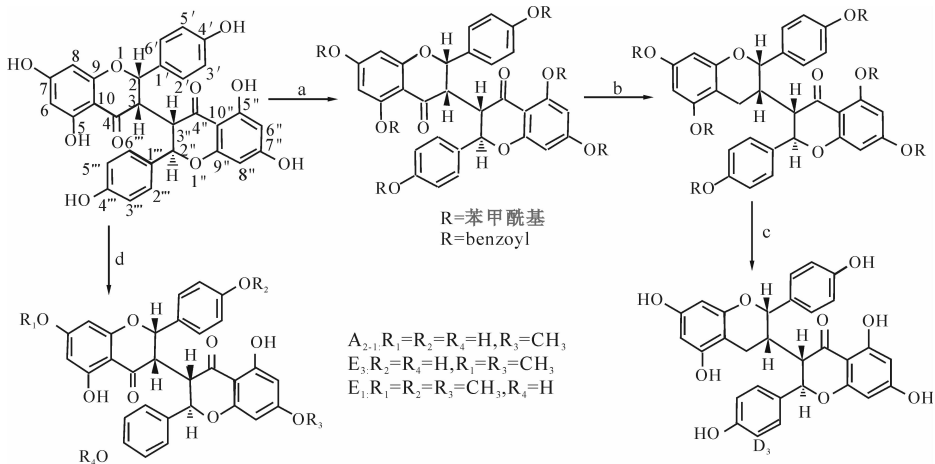


图 1 4 个 n-B 衍生物的反应式

a. 苯甲酰氯,4-二甲氨基吡啶,三乙胺,二氯甲烷;b. 硼氢化钠,四氢呋喃-水;c. 氢氧化钾,甲醇-四氢呋喃;d. 硫酸二甲酯,碳酸钾,丙酮

Fig. 1 Reaction equations of four derivatives

a. Benzoyl chloride,DMAP,triethylamine,CH₂Cl₂; b. NaBH₄, THF-H₂O; c. KOH,CH₃OH-THF; d. Me₂SO₄,K₂CO₃,acetone

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样 品 新狼毒素 B 由本课题组从瑞香狼毒根中分离得到,纯度(HPLC)≥98%;革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的参照抗菌药物分别为青霉素钠(I,penicillin Na,哈药集团制药总厂)和头孢曲松钠(II,Ceftriaxone Sodium,哈药集团制药总厂)。

1.1.2 菌 种 金黄色葡萄球菌(*S. aureas*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌(*Samonellal*),均由西北农林科技大学动物科技学院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 18~20 h 备用。

1.1.3 仪 器 电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;LDZX-40BI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;XT-4 双目显微熔点测定

仪,北京泰克仪器有限公司;Bruker DRX 500 核磁共振光谱仪(TMS 为内标);INOVA-400 核磁共振光谱仪;日本岛津 LCMS-2010 质谱仪等。

1.1.4 试 剂 硫酸二甲酯、硼氢化钠、三乙胺、丙酮、甲醇、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、碳酸钾、碳酸氢钠、四氢呋喃、苯甲酰氯、4-二甲氨基吡啶、氢氧化钾等,均为国产分析纯;柱层层析硅胶、薄层层析硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂);牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、磷酸二氢钾。

1.2 方 法

1.2.1 新狼毒素 B 甲醚化产物的合成 向装有搅拌子、温度计及回流冷凝管的 50 mL 三颈瓶中依次加入 0.532 g(0.982 mmol)n-B、0.25 g 碳酸钾、30 mL 丙酮,室温(25℃)下搅拌至全溶。然后将 0.9 mL(10 mmol)硫酸二甲酯逐滴加入到反应液中,室温下搅拌反应 24 h。向反应液中加入蒸馏水 15 mL,用 1 mol/L HCl 调 pH 至 3~4,50 mL 乙酸乙

酯萃取3次,无水 Na_2SO_4 干燥,滤液减压浓缩至干,得0.535 g粗品。用少量乙酸乙酯溶解后上硅胶柱层析分离,依次用氯仿-丙酮体积比分别为40:1,20:1和10:1的混合液洗脱,得到 A_{2-1} 、 E_1 和 E_3 3个组分。每组分再经反复硅胶柱层析,分别得43 mg A_{2-1} 、73 mg E_1 和90 mg E_3 。

1.2.2 新狼毒素B羰基还原产物的合成 向50 mL圆底烧瓶中依次加入0.536 g(0.989 mmol) n -B、1.4 mL三乙胺、0.245 g 4-二甲氨基吡啶、15 mL二氯甲烷、1.4 mL(10 mmol)苯甲酰氯,室温(15℃)搅拌26 h。反应液中加入15 mL乙酸乙酯,用1 mol/L HCl调pH至3~4,再用饱和 NaHCO_3 溶液中和,最后有机相用无水 Na_2SO_4 干燥,过滤浓缩至干,称重得粗品0.55 g。采用硅胶柱层析,依次用石油醚-丙酮体积比分别为20:3和10:3的混合液洗脱,TLC检测,合并收集 $R_f=0.698$ (展开剂为石油醚-丙酮(体积比2:1))的组分,减压蒸除溶剂,得40 mg六苯甲酰化产物。

向25 mL圆底烧瓶中依次加入40 mg六苯甲酰化产物、2 mL THF、1 mL H_2O 、10 mg NaBH_4 ,0℃下搅拌反应10 h,加入饱和的 NH_4Cl 水溶液终止反应,5 mL乙酸乙酯萃取3次,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤后浓缩至干,得35 mg淡红色粉末。然后向圆底烧瓶(25 mL)中依次加入2 mL甲醇、2 mL THF和3 mg KOH,室温(15℃)搅拌12 h后,减压蒸除溶剂,向残留物中加入5 mL饱和碳酸氢钠水溶液,10 mL乙酸乙酯萃取3次,蒸馏水洗涤3次,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤后浓缩至干,得30 mg棕色粉末。再经反复硅胶柱层析,以氯仿-甲醇(体积比为10:1)为洗脱剂,得20 mg D_3 。

1.2.3 新狼毒素B及其4种衍生物抑菌活性的测定 参考文献[7]的方法,选用金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、大肠杆菌和沙门氏菌测定 A_{2-1} 、 E_3 、 E_1 、 D_3 和 n -B的抑菌活性,以青霉素钠(Ⅰ)作为革兰氏阳性菌的参照,头孢曲松钠(Ⅱ)作为革兰氏阴性菌的参照,以丙酮液(CK)作为空白对照。

2 结果与分析

2.1 化合物 A_{2-1} 、 E_3 、 E_1 和 D_3 的结构鉴定

化合物 A_{2-1} :淡黄色粉末,m.p.178~180℃,正离子ESI-MS(m/z):557 $[\text{M}+\text{H}]^+$,分子量较 n -B增加了14,结合NMR上出现的甲氧基吸收峰 $[\delta_{\text{H}}$ 3.77(3H,s)和 δ_{C} 55.9]可以判断,化合物 A_{2-1} 为单甲醚化产物。二氢黄酮类化合物C-7或C-7'位碳成

醚后,与其相联的苯环碳信号将向低场移动,邻位碳信号向高场移动,同时使邻位的质子信号向低场移动^[8]。与 n -B的NMR文献值^[4]相比,化合物 A_{2-1} 的 $\delta_{\text{C}-7'}$ 向低场移动了0.66 ppm, $\delta_{\text{C}-6''}$ 和 $\delta_{\text{C}-8''}$ 向高场分别移动了1.25和1.57 ppm,而C-7及其邻位碳信号和邻位质子信号基本没有变化。由此确定,化合物 A_{2-1} 为7''-甲氧基新狼毒素B,即7''-甲氧基-7,4',4'',5,5''-五羟基-3,3''-双二氢黄酮。此外, A_{2-1} 的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR信号较 n -B少了很多,这主要是因为部分信号重叠所致。 ^1H NMR(500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm):2.51(2H,s,H-3,H-3''),3.77(3H,s, OCH_3 -7),4.81(2H,s,br,H-2,H-2''),5.78(1H,d, $J=1.8$ Hz,H-6),6.00(1H,d, $J=1.9$ Hz,H-8''),5.91(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-6''),6.10(1H,d, $J=2.1$ Hz,H-8),6.79(4H,dd, $J=8.1,1.9$ Hz,H-3',H-5',H-3'',H-5''),7.02(4H,dd, $J=8.3,2.0$ Hz,H-2',H-6',H-2'',H-6''),9.76(2H,s,br,HO-4',HO-4''),10.81(1H,s,br,HO-7),11.81(2H,s,HO-5,HO-5'')。 ^{13}C NMR(125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm):47.22(C-3,C-3''),55.90(OCH_3 -7''),80.49(C-2),80.74(C-2''),93.81(C-8''),95.02(C-8),95.12(C-6''),96.24(C-6),101.01(C-10),101.90(C-10''),115.48(C-3',C-5',C-3'',C-5''),126.44(C-1'),126.57(C-1''),129.48(C-2',C-6',C-2'',C-6''),158.33(C-4',C-4''),162.36(C-9),162.43(C-9''),163.14(C-5),163.44(C-5''),166.96(C-7),167.64(C-7''),194.71(C-4),195.41(C-4'')。

化合物 E_3 :淡黄色粉末,m.p.160~162℃,负离子ESI-MS(m/z):569 $[\text{M}-\text{H}]^-$,分子量较 n -B增加了28,结合NMR上出现的两组甲氧基吸收峰 $[\delta_{\text{H}}$ 3.82(3H,s), δ_{H} 3.90(3H,s), δ_{C} 56.26, δ_{C} 56.31]可以判断,化合物 E_3 为双甲醚化产物。与 n -B的 ^{13}C NMR文献值^[4]相比,化合物 E_3 的 $\delta_{\text{C}-7}$ 向低场移动了2.09 ppm, $\delta_{\text{C}-6}$ 和 $\delta_{\text{C}-8}$ 向高场分别移动了0.70和0.52 ppm,而 $\delta_{\text{C}-7'}$ 向低场移动了2.11 ppm, $\delta_{\text{C}-6''}$ 和 $\delta_{\text{C}-8''}$ 向高场分别移动了0.67和0.57 ppm。由此确定,化合物 E_3 为7,7''-二甲氧基新狼毒素B,即7,7''-二甲氧基-4',4'',5,5''-四羟基-3,3''-双二氢黄酮。 ^1H NMR(400 MHz, $\text{acetone}-d_6$) δ (ppm):3.20(1H,s,H-3),3.38(1H,m,H-3''),3.82(3H,s, OCH_3 -7),3.90(3H,s, OCH_3 -7''),5.16(1H,d, $J=8.8$ Hz,H-2''),5.79(1H,d, $J=4.8$ Hz,H-2),5.97(2H,d, $J=2.0$ Hz,H-6,H-6''),6.05(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-8''),6.18(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-8),6.76

(2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), 6.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'', H-5''), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', H-6'), 7.29 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'', H-6''), 8.59 (2H, s, br, HO-4', HO-4''), 11.63 (1H, s, br, HO-5''), 11.92 (1H, s, br, HO-5)。 ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 48.95 (C-3), 49.99 (C-3''), 56.26 (OCH₃-7), 56.31 (OCH₃-7''), 80.94 (C-2), 82.89 (C-2''), 94.56 (C-8), 94.81 (C-8''), 95.46 (C-6), 95.70 (C-6''), 104.21 (C-10), 105.34 (C-10''), 116.11 (C-3', C-5'), 116.37 (C-3'', C-5''), 128.23 (C-1'), 128.37 (C-1''), 128.43 (C-2', C-6'), 129.96 (C-2'', C-6''), 158.37 (C-4'), 158.70 (C-4''), 162.70 (C-9), 164.56 (C-9''), 164.74 (C-5), 165.02 (C-5''), 168.85 (C-7), 169.08 (C-7''), 196.47 (C-4), 198.65 (C-4'')。

化合物 E₁: 淡黄色粉末, m. p. 145~146 °C, 负离子 ESI-MS(m/z): 583[M-H]⁻, 分子量较 n-B 增加了 42, 结合 NMR 上出现的 3 组甲氧基吸收峰 [δ_{H} 3.83 (3H, s), δ_{H} 3.87 (3H, s), δ_{H} 3.88 (3H, s), δ_{C} 55.72, δ_{C} 56.32] 可以判断, 化合物 E₁ 为三甲醚化产物。与 n-B 的 NMR 文献值^[4]相比, 化合物 E₁ 的 $\delta_{\text{C-7}}$ 向低场移动了 2.35 ppm, $\delta_{\text{C-6}}$ 和 $\delta_{\text{C-8}}$ 向高场分别移动了 0.31 和 0.51 ppm, 而 $\delta_{\text{C-7'}}$ 向低场移动了 2.17 ppm, $\delta_{\text{C-6'}}$ 和 $\delta_{\text{C-8'}}$ 向高场分别移动了 0.50 和 0.81 ppm, 同时 $\delta_{\text{C-4'}}$ 和 $\delta_{\text{C-4''}}$ 向低场也分别移动了 1.8 和 3.66 ppm。由此推断, 化合物 E₁ 为 7, 7'', 4'-三甲氧基-4'', 5, 5''-三羟基-3, 3''-双二氢黄酮和 7, 7'', 4'''-三甲氧基-4'', 5, 5''-三羟基-3, 3''-双二氢黄酮的混合物; 同时从 ^{13}C NMR 上 C-4' 和 C-4''' 的信号强度比进一步推断, 化合物 7, 7'', 4'-三甲氧基-4'', 5, 5''-三羟基-3, 3''-双二氢黄酮和 7, 7'', 4'''-三甲氧基-4'', 5, 5''-三羟基-3, 3''-双二氢黄酮的质量比为 1 : 2。 ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 2.89 (2H, d, $J = 13.2$ Hz, H-3, H-3''), 3.83 (3H, s, OCH₃-7), 3.87 (3H, s, OCH₃-7''), 3.88 (3H, s, OCH₃-4'), 4.98 (2H, s, br, H-2, H-2''), 5.92 (2H, s, H-6, H-6''), 6.07 (2H, s, H-8, H-8''), 6.91 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 7.01 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 7.15 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'', H-5''), 7.25 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'', H-6''), 8.78 (1H, s, HO-4''), 11.94 (2H, s, HO-5, HO-5'')。 ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 48.36 (C-3), 48.63 (C-3''), 55.72 (OCH₃-4' 或 OCH₃-4''), 56.32 (OCH₃-7, OCH₃-7''), 81.97 (C-2), 82.03 (C-2''), 94.57 (C-8, C-

8''), 95.85 (C-6), 95.87 (C-6''), 103.06 (C-10), 103.14 (C-10''), 115.06 (C-3', C-5'), 116.50 (C-3'', C-5''), 128.46 (C-1'), 129.56 (C-1''), 130.65 (C-2', C-6'), 130.71 (C-2'', C-6''), 159.43 (C-4'), 161.59 (C-4''), 163.77 (C-9), 163.86 (C-9''), 164.79 (C-5), 165.05 (C-5''), 169.11 (C-7), 169.14 (C-7''), 196.75 (C-4), 196.82 (C-4'')。

化合物 D₃: 淡棕色粉末, m. p. 238~240 °C, 正离子 ESI-MS(m/z): 528[M+H]⁺, 分子量较 n-B 减少了 14, ^{13}C NMR 较 n-B 少了一个羰基信号, 仅有 δ_{C} 196.9 一个信号。DEPT 谱在 δ_{C} 55.4 显示 D₃ 分子中存在一个 CH₂, ^1H NMR 上新出现一个 CH₂ [δ_{H} 3.16 (2H, s, br)] 的信号。综合以上分析可知, 化合物 D₃ 为 n-B 的单羰基还原产物, 且羰基被直接还原成了 CH₂。对二氢黄酮而言, 当 4-羰基被还原为亚甲基后, $\delta_{\text{C-3}}$ 、 $\delta_{\text{C-5}}$ 、 $\delta_{\text{C-9}}$ 和 $\delta_{\text{C-10}}$ 将移向高场^[9]。与 n-B 的 NMR 文献值^[4]相比, 化合物 D₃ 的 $\delta_{\text{C-3}}$ 36.03、 $\delta_{\text{C-5}}$ 158.12、 $\delta_{\text{C-9}}$ 157.86 和 $\delta_{\text{C-10}}$ 100.84 分别较 n-B 的对应值向高场移动了 12.24, 6.17, 4.31 和 2.18 ppm, 由此可确定, D₃ 为 4-亚甲基新狼毒素 B。 ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 3.16 (2H, s, br, CH₂-4), 3.88 (1H, s, H-2), 5.61 (1H, s, H-2''), 5.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.95 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6''), 6.01 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8, H-8''), 6.71 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', H-5'), 6.86 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3'', H-5''), 6.98 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 7.31 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'', H-6''), 8.26 (2H, s, br, HO-4'', HO-4'), 8.52 (3H, s, br, HO-7, HO-7'', HO-5), 11.76 (1H, s, HO-5''), 11.90 (1H, s, HO-5)。 ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ (ppm): 36.03 (C-3), 49.93 (C-3''), 55.40 (CH₂-4), 78.05 (C-2), 79.20 (C-2''), 95.55 (C-8), 95.93 (C-8''), 96.14 (C-6), 96.62 (C-6''), 100.84 (C-10), 103.54 (C-10''), 116.17 (C-3', C-5', C-3'', C-5''), 127.87 (C-1', C-1''), 128.15 (C-2', C-6'), 128.73 (C-2'', C-6''), 156.53 (C-4'), 156.83 (C-4''), 157.86 (C-9), 157.89 (C-9''), 158.12 (C-5), 161.66 (C-5''), 164.73 (C-7), 167.54 (C-7'')。

2.2 n-B 及 A₂₋₁、E₁、E₃ 和 D₃ 的抑菌活性

抑菌圈直径大于 6 mm (药敏纸片直径) 表示有抑菌作用, 抑菌圈直径越大, 抑菌活性越强^[7]。

表 2 显示, 对于所有供试菌, 4 种衍生物的抑菌活性均小于新狼毒素 B。与 n-B 相比, 3 种甲醚化产物 A₂₋₁、E₃、E₁ 对金色葡萄球菌、无乳链球菌和大

肠杆菌 3 种供试菌的抑菌活性均有不同程度减弱,随着 3 种化合物 A₂₋₁、E₃ 和 E₁ 酚羟基甲醚化程度的增加,抑菌活性也依次降低,其中单甲醚化产物 A₂₋₁ 与 n-B 相比减少的程度,同双甲醚化产物 E₃ 与单甲醚化产物 A₂₋₁ 相比减少的程度基本相同,而 E₃ 和 E₁ 对 3 种供试菌的抑菌活性基本相同。3 种甲

醚化产物 A₂₋₁、E₃、E₁ 在本试验所设的 4 个质量浓度下,对沙门氏菌均无抑菌活性。结合抑菌活性及化合物的结构可以看出,n-B 分子中不同位置的酚羟基与其抑菌活性的选择性有密切关系,其中 7 或 7''位羟基是其主要抑菌活性基团,4 或 4''位羟基对抑菌活性的贡献较 7 或 7''位羟基大。

表 1 n-B 及其 4 种衍生物的抑菌活性
Table 1 Antibacterial activity of neochamaejasmine B and its four derivatives

化合物 Comp.	质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone			
		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	沙门氏菌 <i>Samonellal</i>
n-B	5.000	15.2	19.8	21.5	10.2
	2.500	14.8	19.1	14.2	9.4
	1.250	13.1	17.2	13.6	8.8
	0.625	9.9	16.0	11.7	8.5
A ₂₋₁	5.000	12.3	14.1	12.5	—
	2.500	10.9	11.8	11.5	—
	1.250	10.4	11.7	10.4	—
	0.625	9.9	10.6	9.0	—
E ₃	5.000	9.5	9.3	9.0	—
	2.500	9.4	8.5	8.5	—
	1.250	9.2	8.5	8.0	—
	0.625	9.0	—	8.0	—
E ₁	5.000	9.0	8.8	8.5	—
	2.500	8.3	8.0	8.5	—
	1.250	8.0	—	8.0	—
	0.625	8.0	—	—	—
D ₃	5.000	14.5	18.5	20.8	10.0
	2.500	14.0	18.0	13.9	8.7
	1.250	12.0	16.4	13.5	8.5
	0.625	10.1	13.1	10.9	8.1
I	5.000	49.7	50.4	19.6	—
	2.500	44.3	46.1	15.3	—
	1.250	37.9	39.9	13.9	—
	0.625	34.6	36.1	9.7	—
II	5.000	24.7	30.2	37.2	17.7
	2.500	23.2	28.0	34.3	11.5
	1.250	17.5	17.8	28.3	9.9
	0.625	16.3	15.8	28.0	9.0
CK	—	—	—	—	—

注:表中抑菌圈直径为 3 次试验的平均值;“—”表示无活性。
Note:The diameter of inhibition zone is the average value of three experiments.“—”means no activity.

与 n-B 相比,D₃ 对 4 种供试菌的抑菌活性均有轻微减弱,说明两者的抑菌活性差异较小,可知 n-B 的 2 个羰基中一个或全部不是主要抑菌活性基团。这一结果与冉晓娅等^[6]报道的初步研究结果相一致。

3 讨 论

有人曾对黄酮类化合物的抗氧化活性构效关系进行了研究,结果表明,黄酮母核上的酚羟基是其主要活性基团,酚羟基的甲基化或酰化将导致活性

降低^[10]。本研究所揭示的 n-B 抑菌构效关系与黄酮类化合物的抗氧化活性构效关系是一致的。这是否预示着黄酮类化合物的抑菌活性与其抗氧化活性有一定关系,或者说抑菌活性是否通过抗氧化途径来实施,有待进一步研究。

根据¹³C NMR 可以判断,E₁ 为 7,7'',4'-三甲氧基-4''',5,5''-三羟基-3,3''-双二氢黄酮和 7,7'',4'''-三甲氧基-4',5,5''-三羟基-3,3''-双二氢黄酮的混合物,后者的含量明显高于前者。由于两种产物互为同分异构体,极性几乎无差别,在 TLC 上 R_f 值完全相

同,这给二者的分离工作带来了极大困难。为此,笔者正在考虑采用制备高效液相色谱仪来分离纯化此类化合物。

D₃ 是 4-亚甲基新狼毒素 B,而 NaBH₄ 与六苯甲酰化新狼毒素 B 的物质的量之比约为 8:1,理论上应该得到双羰基还原产物,但本试验仅得到了 4 位还原为亚甲基的单羰基还原产物,这可能是由于以下两方面的原因:一是反应时间不够长,NaBH₄ 的量不够多,有文献^[9]报道,当用 NaBH₄ 还原以酯基保护的黄酮 4-羰基时,5 位的酯会同时发生脱保,由此产生的 5-OH 将消耗一定量的 NaBH₄;二是还原两个不同的羰基所遇到的空间位阻可能不同,这从获得的单一还原产物可以得到证实。为此,想要获得双羰基还原产物,有必要提高反应温度。

4 结 论

利用化学修饰法合成了 n-B 的 4 种衍生物 A₂₋₁、E₁、E₃ 和 D₃,并利用波谱法对其结构进行了表征。通过测定和评价各修饰物的抑菌活性,揭示了 n-B 分子中 7-OH 和 7"-OH 是其主要抑菌活性基团,4'-OH 和 4"-OH 对抑菌活性的贡献较小,4-羰基不是主要抑菌活性基团,这些研究结果为更深入地研究 n-B 的构效关系和结构改造提供了一定理论依据。

[参考文献]

- [1] Niwa 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] Niwa M, Liu G Q, Tatematsu H, et al. Chamaejasmine, a novel rearranged biflavanoid from *Stellera chamaejasme* L. [J]. Tetrahedron Lett, 1984, 25(34): 3735-3738.
- [3] 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.

Qin B F, Zhou L, Miao F, et al. Antifungal activity of root of *Stellera chamaejasme* L. (I) [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2003, 23(11): 1977-1980. (in Chinese)

- [4] 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.
Zhou L, Yuan C, Qin B F, et al. Study on the antifungal components in the root of *Stellera chamaejasme* L. (II) [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2004, 24(12): 2346-2349. (in Chinese)
- [5] 张武岗, 李定刚, 宋毓民, 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.
Zhang W G, Li D G, Song Y M, et al. Studies on the antibacterial activity of neochamaejasmine B and its derivatives [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(11): 66-69. (in Chinese)
- [6] 冉晓娅, 周 乐, 张武岗, 等. 新狼毒素 B 的抑菌活性构效关系研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(4): 83-86.
Ran X Y, Zhou L, Zhang W G, et al. Study on structure modification of neochamaejasmine B and relationship of structure-antibacterial activity [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2006, 34(4): 83-86. (in Chinese)
- [7] 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.
Li J Q, Li L J. Experiment instruction of veterinary microbiology [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology of China Press, 1998. (in Chinese)
- [8] Ibrahim A, Galal M, Ahmed M, et al. O-demethylation and sulfation of 7-methoxylated flavanones by *Cunninghamella elegans* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(2): 203-206.
- [9] Oyama K, Kondo T. Total synthesis of flavocommelin, a component of the blue supramolecular pigment from *Commelina communis*, on the basis of direct 6-C-glycosylation of flavan [J]. J Org Chem, 2004, 69: 5240-5246.
- [10] Farkas O, Jakus J, Heberger K. Quantitative structure-antioxidant activity relationships of flavonoid from ouratea species [J]. Braz J Med Biol Res, 2002, 35(7): 819-822.