

D-氨基葡萄糖 Schiff 碱及其金属配合物的抗菌活性*

冯 英 刘 义 谢昌礼 屈松生 乐芝凤 冯长建 沈昊宇 张香才
(武汉大学化学系, 武汉 430072) (华中师范大学化学系, 武汉 430070)

关键词: 微量热学, D-氨基葡萄糖 Schiff 碱, 产气杆菌, 抗菌活性

近年来, 氨基酸类 Schiff 碱及其金属配合物一直是人们感兴趣的研究课题. 现在的研究主要集中在这类 Schiff 碱及其金属配合物的抗炎、抗菌及抗癌等方面的生物活性上. 本工作是在华中师范大学配位化学所组合成的 D-氨基葡萄糖 Schiff 碱及其金属配合物的基础上, 采用微量热的方法对其进行抗菌活性研究.

1 实验部份

1.1 材料与方法

1.1.1 材料与仪器

产气杆菌 (Chester CMCC(B)45102) 由华中师范大学生物系提供.

培养基: 肉汤蛋白胨培养基, 成份 (1000 mL 蒸馏水中): 牛肉膏 5 g; NaCl 5 g; 蛋白胨 10 g, pH = 7.2, 120 °C 高温灭菌 30 分钟备用.

Schiff 碱金属配合物由华中师范大学化学系配位化学组合成, 其结构如图 1 所示^[1].

Zn(AC)₂, Cu(AC)₂ 均为 A.R. 级.

微热量计采用瑞典 LKB 公司生产的 2277 生物活性监测系统, 热功率最小检测极限为 0.12 μ W, 基线漂移为 0.2 μ W/24 h, 该仪器的热稳定性好, 热量计温度稳定在 30.23 °C.

记录仪采用 LKB-2210 记录仪 (1000 mV 量程); 蠕动泵采用 LKB-2132 蠕动泵. 有关仪器的结构, 原理及操作详见文献^[2,3].

1.1.2 方法

本实验采用停流法^[3]. 测定前对管道和流动池进行清洗, 清洗消毒完毕待得到稳定基线后用蠕动泵以 50 mL·h⁻¹ 的流速将 Schiff 碱金属配合物与产气杆菌的混合溶液泵入热量计中, 当样品液充满流动池时 (约 0.6 mL) 停泵, 仪器自动跟踪记录流动池内细菌生长的热谱曲线, 即 $P \sim t$ 曲线. 当记录笔返回基线以后, 实验即结束. 实验的基本操作框图见文献^[2].

Schiff 碱及其金属配合物、Zn(AC)₂、Cu(AC)₂ 均用蒸馏水按一定的浓度配成溶液 (现配现做), 待细菌接种在培养基中以后 (接种量为: 1.5×10^6 cells/mL) 加入菌液中, 然后泵入流动池中进行监测.

1995-11-13 收到初稿, 1996-03-18 收到修改稿. 联系人: 屈松生. * 国家自然科学基金资助项目

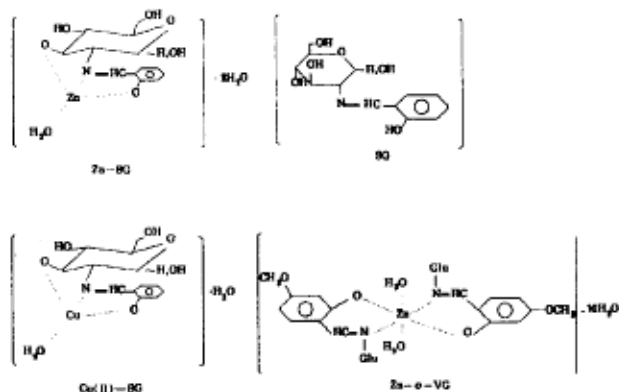


图 1 Schiff 碱及其金属配合物的结构

Fig.1 The structures of schiff base and its complexes

Note: SG: 水杨醛氨基葡萄糖 Schiff 碱 (salicylal glucosamine Schiff bases);

o-VG: 邻香草醛氨基葡萄糖 Schiff 碱 (o-vanillin glucosamine Schiff bases)

2 结果与讨论

2.1 实验结果

图 2 是产气杆菌在 30.23 °C, pH = 7.2, 无氧条件下的生长曲线.

由于细菌在对数生长阶段服从关系式^[4]:

$$\ln P_t = \ln P_0 + kt$$

P_0, P_t 分别是细菌在对数生长的初始点和 t 时的热功率; k 为细菌对数生长阶段的生长速率常数.

根据生长曲线上 $P_t \sim t$ 值, 进行线性拟合得到产气杆菌生长速率常数 k , 由 $G = (\ln 2)/k$ (G : 传代时间, 生物学上的一个经典参数) 得到不同条件下细菌的传代时间 G , 其结果如表 1 所示.

同样条件下测定了产气杆菌分别在一系列 Schiff 碱及其金属配合物和两种金属离子作用下的生长曲线. 发现其生长曲线的形状基本上与对照组图 2 相同, 但是随着加入物质浓度的增加, 其生长代谢过程的停滞期增长, 整个生长代谢过程的时间增长, 生长代谢峰向后移, 第一峰降低, 第二峰逐渐消失. 与对照组相同的处理方法, 得到结果如表 1 所示.

定义: 生长抑制率 I 为:

$$I\% = (k_1 - k_2)/k_1$$

式中 k_1 为对照组的生长速率常数, k_2 为产气杆菌受到抑制时的生长速率常数. 根据表 1 中所得 k 值计算了产气杆菌在不同物质以及同一物质不同浓度下的生长抑制率, 如表 1 所示.

表 1 30.23 °C 产气杆菌在不同物质抑制下的各种参数

Table 1 Parameters of Aerobacter aerogenes with substances at 303 K

substance	$c/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	k/min^{-1}	G/min	t/h	$I/\%$	$I_{C50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	R
—	0	0.02929	23.66	1.92	0		0.99933
Zn-SG	50	0.02758	25.13	2.00	5.8		0.99864
	100	0.02268	30.56	2.17	22.6		0.99360
	150	0.01800	38.51	2.67	38.5	242	0.99965
	200	0.02134	32.48	2.25	27.1		0.99935
	250	0.01324	52.35	9.20	54.8		0.99926
	300	0.0	—	—	100		
Zn- <i>o</i> -VG	50	0.02428	28.55	2.50	17.1		0.99948
	100	0.02248	30.84	3.00	23.2		0.99974
	150	0.01885	36.77	4.25	35.6		0.99957
	200	0.01761	39.36	4.92	39.9	287	0.99965
	250	0.01707	40.61	5.25	41.7		0.99991
	300	0.01345	51.54	7.50	54.1		0.99931
	350	0.009238	75.03	10.80	68.5		0.99280
SG	50	0.02508	27.64	2.50	14.4		0.99823
	100	0.02471	28.05	2.67	15.6		0.99912
	150	0.01992	34.80	2.83	32.0		0.99966
	200	0.01831	37.86	3.17	37.5		0.99790
	250	0.01757	39.45	4.70	40.0	320	0.99922
	300	0.01560	44.43	5.00	46.7		0.99918
	350	0.01323	52.39	7.20	54.8		0.99878
	400	0.009594	72.25	8.30	67.2		0.99833
	450	0.006756	102.46	10.25	76.9		0.99861
Cu(II)-SG	50	0.02726	25.43	2.58	6.9		0.99953
	100	0.02614	26.52	2.92	10.8		0.99915
	150	0.02609	26.57	3.08	10.9		0.99839
	200	0.02668	25.98	3.12	8.9		0.99617
	250	0.02614	26.52	3.30	10.8		0.99995
	300	0.02643	26.22	3.17	9.8		0.99708
Zn(AC) ₂	10	0.02620	26.46	2.93	10.5		0.99980
	30	0.02593	26.73	3.67	11.5		0.99963
	50	0.02310	30.01	3.70	21.1	80	0.99994
	100	0.00902	76.84	11.5	69.2		0.99790
	120	0.0	—	—	100		
Cu(AC) ₂	10	0.02456	28.22	3.2	16.1		0.99959
	50	0.02261	30.66	3.2	22.8		0.99803
	100	0.02614	26.52	3.3	10.8		0.99945
	150	0.02583	26.83	3.4	11.8	268	0.99964
	220	0.02348	29.52	3.7	19.8		0.99918
	250	0.01945	35.64	4.3	33.6		0.99947
	300	0.005968	116.14	7.3	79.6		0.99748

c : concentration of the substance; t : the retarding time; I : the ratio of inhibition; I_{C50} : half inhibitory concentration of drug; R : correlation coefficient

以 $I\%$ (生长抑制率) 对浓度 c 作图得到 $I\% \sim c$ 关系如图 3 所示. 根据图 3 求得 I_{C50} (抑制率为 50% 时药物的浓度) 如表 1 所示. I_{C50} 可用于衡量细菌对药物的敏感性, I_{C50} 越小,

表明细菌对药物越敏感, 药物的抑制作用越大.

2.2 讨论

1) 将对照组与实验组的细胞生长曲线进行比较, 发现: 产气杆菌在四种 Schiff 碱金属配合物的作用下, 其生长的停滞期 t 均增长, 曲线的第一峰向后移, 变得平缓, 传代时间 G 增长, k 值均小于对照组的值, 说明这四种 Schiff 碱金属配合物均对产气杆菌有不同程度的抑制, 其抑制程度的大小以及抑制程度随浓度变化的情况随配合物的不同而不同. 除 $\text{Cu}(\text{II})\text{-SG}$ 以外, 抑制率基本上随浓度增加呈上升趋势.

2) 在四种 Schiff 碱金属配合物中, Zn-SG 对产气杆菌的抑制作用最强, 随浓度的增大抑制作用增大, k 减小, I 增大, 但在 $c = 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时出现抑制作用减少, 浓度大于 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制作用又增大, 当浓度为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时已能完全抑制产气杆菌的生长. 其半抑制量为: $242 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

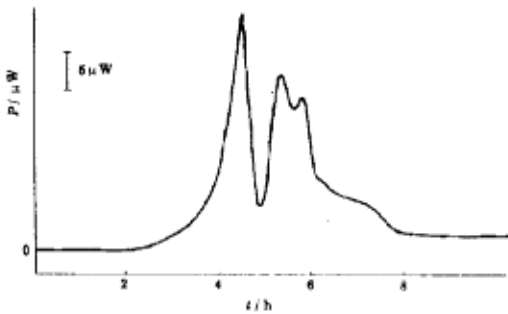


图 2 303 K 产气杆菌生长热谱图
Fig.2 The power time-curve of *Aerobacter aerogenes* at 303 K

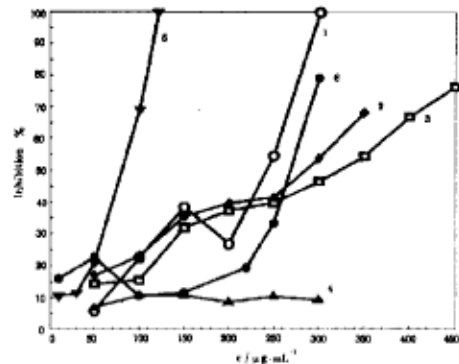


图 3 浓度与生长抑制率的关系
Fig.3 The relationship between the concentration and the inhibition
1) Zn-SG 2) Zn-OVG 3) SG 4) $\text{Cu}(\text{II})\text{-SG}$
5) $\text{Zn}(\text{AC})_2$ 6) $\text{Cu}(\text{AC})_2$

3) Zn-o-VG , SG 对产气杆菌抑制作用随浓度的变化趋势基本相同, Zn-o-VG 的抑制作用大于 SG , 其半抑制量分别是: $287, 320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4) $\text{Cu}(\text{II})\text{-SG}$ 对产气杆菌的抑制较小, 值得注意的是在 $50 \sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内其抑制作用与浓度无关. 我们在其它系列的 Schiff 碱类配合物中也发现了类似的现象^[5].

5) $\text{Zn}(\text{AC})_2$ 对产气杆菌表现出强的毒性, 在浓度为 $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时就可完全抑制其生长, 其半抑制量仅为: $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 而 $\text{Cu}(\text{AC})_2$ 的作用相对弱些, 半抑制量为: $268 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

6) 金属离子 Cu^{2+} (半抑制量为: $268 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 配体 SG (半抑制量为: $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均对产气杆菌有一定的抑制作用, 而两者结合形成配合物 $\text{Cu}(\text{II})\text{-SG}$ 以后, 对产气杆菌的毒性降低, 且比原来的任何一种物质均低, 表现出对产气杆菌无明显的抑制.

配合物 Zn-SG , Zn-o-VG 抗菌活性低于 Zn^{2+} 而大于配体 SG .

以上说明 Schiff 碱类化合物的生物活性与金属离子的配位作用有关. 金属离子的抗菌活性一般较强而配体较弱, 结合的配合物能减弱金属离子的毒性, 而提高配体的抗菌活性. 如 SG , o-VG 与 Zn^{2+} 配位后其抗菌活性增强, 或者是抗菌活性低于原来的配体和金属离子, 如 SG 与 Cu^{2+} 配位以后其抗菌活性减弱.

7) Zn-SG, Cu(II)-SG 属金属离子不同, 配体相同的配合物, 半抑制量的大小反映了金属离子之间的差别. Zn^{2+} 对产气杆菌的毒性强于 Cu^{2+} , 反映在配合物中 Zn-SG 的抗菌活性强于 Cu(II)-SG.

8) Zn-SG 与 Zn-*o*-VG 配合物其金属离子相同, 配体不同, 其配体的主要差别是 -*o*-VG 比 SG 配体多了一个甲氧基, 从半抑制量大小可看出由于甲氧基的引入使得金属离子锌配合物对产气杆菌的毒性减少, 反映了配合物在结构上的差别.

综上, 所研究的几种 *D*-氨基葡萄糖 Schiff 碱及其金属配合物的抗菌活性大小为: Zn-SG > Zn-*o*-VG > SG > Cu(II)-SG.

参 考 文 献

- 1 冯长建, 华中师范大学硕士学位论文, 1995 年 7 月
- 2 Xie Changli, Tang Houkuan, Song Zhauhua, et al, *Thermochimica Acta*, **1988**, **123**:33
- 3 谢昌礼, 徐桂端, 屈松生等. 物理化学学报, **1986**, **2**(4): 363
- 4 Hall D O, Hawkins H E. Laboratory Manual of Cell Biology, The English Universities Press, London, 1975, Chapter 11
- 5 Feng Ying, Liu Yi, Xie Changli, et al, *Thermochimica Acta* (已接收)

Studies on the Antibacterium Effect of *D*-glucosamine Schiff Base and Its Metal Complexes

Feng Ying Liu Yi Xie Changli Qu Songsheng
(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Yue Zhifeng Feng Changjian Shen Haoyu Zhang Xangcai
(Department of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430070)

Abstract The effects of *D*-glucosamine schiff base and its metal complexes on the growth of *Aerobacter aerogenes* were investigated by the microcalorimetry. Among the substances tested, Zn-SG was shown to be the most bacteriostasic, followed by Zn-*o*-VG and SG (with the I_{C50} of 242, 287 and 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). Cu(II)-SG showed less inhibitory effect on *Aerobacter aerogenes* over the concentration rang of 50 ~ 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Keywords: Microcalorimetry, *Aerobacter aerogenes*, Schiff base metal complexes, Bacteriostasis