

鹿蹄素类化合物的抗菌定量构效关系研究

李剑勇, 张继瑜(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 中国农业科学院新兽药工程重点实验室, 兰州 730050)

摘要: 目的 研究鹿蹄素类化合物的抗菌定量构效关系。方法 以鹿蹄素为先导化合物, 采用聚类分析法, 合成了 12 个新氢醌化合物。选取金葡萄球菌 84184 为活性常数提取的致病菌。结果 所得 Hansch 法定量构效关系方程为: $\lg 1/\text{MIC}=0.035\ 0\ \pi-0.015\ 3\ \pi^2+0.178\ 4\ \sigma+0.002\ 0\ \text{MR}-1.621\ 3\ \text{I}+4.441\ 5$, $n=13$, $r=0.808\ 9$, $F=2.65(\alpha=0.05)$ 。以未经回归统计分析的异丙基氢醌进行验证, 发现该方程对化合物的活性预测有一定的参考意义。通过挑选作用显著的参数, 发现指示变量 I 与抗菌活性的 58% 相关, 从而提出: 氢醌类化合物是通过氧化还原的反应而显示其抗菌活性的作用机理。结论 本实验对进一步寻找更有效的鹿蹄素衍生物和阐明其作用机理, 提供了一定的线索和依据。

关键词: 鹿蹄素; 抗菌活性; 定量构效关系; Hansch 法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)10-0788-03

The Quantitative Structure-Activity Relationship of the Antibiotic Properties of Pyrolines

LI Jianyong, ZHANG Jiyu (Lanzhou Institute of Animal and Veterinary Pharmaceutics Science, Key Lab of New Animal Drug Project, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the quantitative structure-activity relationship of the antibiotic properties of a series of pyrolines. **METHODS** Pyroline was acted as a lead compound and new twelve hydroquinone compounds were synthesized. Combined with clinic practice, staphylococcus was selected as a pathogenic bacterium by which effective coefficients were measured. **RESULTS** It followed: Hansch QSAR equation was $\lg 1/\text{MIC}=0.035\ 0\ \pi-0.015\ 3\ \pi^2+0.178\ 4\ \sigma+0.002\ 0\ \text{MR}-1.621\ 3\ \text{I}+4.441\ 5$, $n=13$, $r=0.808\ 9$, $F=2.65(\alpha=0.05)$. When iso-propylhydroquinone were used to prove the equation, there were some certain effective significance for its equation forecasting compounds' activity. Through selecting significant action parameters, it was followed that there was 58% correlation between indicator variance (I) and antibacterial activity. Therefore, antibacterial mechanism of hydroquinones was carried out by oxidization and reduction reaction. **CONCLUSION** The experiment provides some certain clue and basis for finding farther effective pyrolines and explaining its action mechanism.

KEY WORDS: pyroline; antibiotic properties; quantitative structure-activity relationship(QSAR); Hansch

鹿蹄素(pyroline, 结构见图 1)是从鹿蹄草科植物鹿蹄草(*Pyrola calliantha* H.Andres)或普通鹿蹄草

(*Pyrola decorata* H.Andres)的干燥全草中分离提纯的氢醌类化合物, 即甲基氢醌^[1]。体外试验证明,

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(BRF060403); 甘肃省支撑计划项目(0804NKCA074)

作者简介: 李剑勇, 男, 博士, 研究员 Tel: (0931) 2115290 E-mail: lijy1971@163.com

鹿蹄素抗菌作用强,毒性较低,不易产生耐药性等,对金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、无乳链球菌等都有抑制作用^[2],临床试验对呼吸道、尿道、消化道感染及创口等有良好的疗效,对真菌及某些昆虫也有杀灭作用^[3]。笔者将其用于兽医临床,对奶牛临床乳房炎和致病菌引起的畜禽肠道感染性疾病取得了满意效果^[4-8]。为阐明鹿蹄素的作用机理和筛选出新型该类药物,本试验进行了鹿蹄素类化合物的抗菌活性定量构效关系研究。

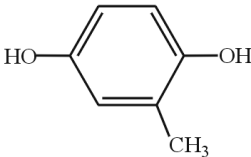


图1 鹿蹄素的结构

Fig 1 The structure of pyroline

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 甲基氢醌(代号 A,下同),甲氧基氢醌(B),氯代氢醌(C),溴代氢醌(D),三氟甲基氢醌(E),乙基氢醌(F),叔丁基氢醌(G),氢醌(H), (N-六氢吡啶基)亚甲基氢醌(I), [N-(N-甲基哌嗪基)]亚甲基氢醌(J), 2-[(4-乙酰氨基)苯磺酰联胺基]亚甲基氢醌(K), 2-[(4-氨基)苯磺酰联胺基]亚甲基氢醌(L), 2-乙酰基氢醌(M), 4-乙酰氧基-2-甲基苯酚(N), 4-苯甲酰氧基-2-甲基苯酚(O)均由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所化学药物室合成。

1.1.2 菌种 大肠杆菌 C₈₃₋₁、绿脓杆菌 10104、鸡白痢沙门氏菌 C₇₉₋₆、金色葡萄球菌 84184 均购自中国兽医药品监察所及中国药品生物制品检定所;无乳链球菌 2101 系采自兰州患临床型乳房炎的病例,经分离鉴定,琼脂斜面保存的地方菌株。

1.1.3 培养基 普通牛肉汤(自制)。

1.2 方法

1.2.1 抑菌试验 用分析天平精确称取 15 种鹿蹄素衍生物,水溶的以普通牛肉汤溶解,水不溶的加有机助溶剂溶解,以普通牛肉汤进行药物稀释,同时设空白对照。稀释前算好稀释度的总需量,分别盛于 100 mL 小瓶内,按 2 倍稀释为 1:5 000、1:250……1:30、1:0.15 共 16 个稀释度,每个稀释度装于 5 支 12 mm×100 mm 的试管内,每管 2 mL,然后分别加入 5 个菌株 20 h 培养物的 1 000 倍肉汤稀释液 0.5 mL,然后放入 37 °C 温箱中培养 24 h,取出判定结果。结果见表 1。

1.2.2 先母体化合物的选择 本研究最初选择的鹿蹄素衍生物先母体结构为苯酚,见图 2A, R₁、R₂ 为可变结构因子。在实验过程中,由于 R₁ 由羟基变为其它基因时,导致其活性丧失,故后来以氢醌作为母核,以 2 位取代其 R 为可变结构因子,见图 2B。

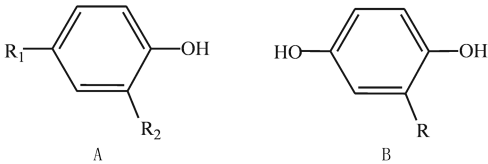


图2 苯酚类和氢醌类的结构

A-苯酚类; B-氢醌类

Fig 2 The structure of phenols and hydroquinones

A-phenols; B-hydroquinones

1.2.3 鹿蹄素衍生物 QSAR 活性常数的选择 根据表 1 中 15 种鹿蹄素衍生物对 5 种细菌的抑菌试验结果及临床用鹿蹄素主要治疗奶牛乳房炎的特点,选择其对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度作为生物活性常数引入构效关系的研究。

表1 15 种鹿蹄素衍生物的最小抑菌浓度(μg·mL⁻¹)

Tab 1 The results of minimum inhibitory bacteria concentration (MIC) of fifteen pyrolines (μg·mL⁻¹)

化合物	大肠杆菌	绿脓杆菌	鸡沙门氏菌	金葡萄球菌	无乳链球菌
A	625.0	312.5	156.2	19.5	9.8
B	156.0	625.0	312.5	39.0	4.9
C	156.3	19.5	2.45	4.9	4.9
D	78.1	2.4	2.45	0.3	9.8
E	625.0	78.1	4.9	4.9	39.0
F	625.0	78.1	4.9	4.9	39.0
G	625.0	78.1	19.5	9.5	19.5
H	2 500.0	312.5	19.5	19.5	156.3
I	5 000.0	321.5	39.0	4.9	2.4
J	5 000.0	5 000.0	78.0	78.0	9.5
K	625.0	125.0	625.0	625.0	19.5
L	1 250.0	5 000.0	312.5	625.0	625.0
M	1 250.0	5 000.0	312.5	625.0	156.0
N	2 500.0	2 500.0	1 250.0	1 250.0	78.0
O	5 000.0	5 000.0	2 500.0	2 500.0	1 250.0

1.2.4 Hansch 法 QSAR 分析的各个参数的计算 以氢醌为母核, 2 位为取代基 R, 计算取代基各个参数^[9], 结果见表 2。

2 结果与讨论

2.1 Hansch 法方程式的建立

应用 PSM(实用医学统计软件, 由兰州医学院提供)进行多元回归计算, 方差分析见表 3、4。结果如下: 对金黄色葡萄球菌, 参数依次为: π 、 π^2 、 σ 、MR、I。普通回归, $b^*(1)=0.0884$, $b(1)=0.0350$; $b^*(2)=-0.1957$, $b(2)=-0.0153$; $b^*(3)=0.0476$, $b(3)=0.1784$; $b^*(4)=0.0407$, $b(4)=0.0020$; $b^*(5)=-0.8236$, $b(5)=-1.6213$ 。a=4.4415, $r=0.8089$ 。b^{*}(M)为该参数的偏相关系数; b(M)为该参

数的系数; a 为常数。

表 2 13 种氢醌类化合物的取代基各个参数的计算结果

Tab 2 The calculated results of substituent parameters of 13 hydroquinones

化合物	R	π	σ	MR	I	$\lg(1/\text{MIC})_{\text{金葡萄菌}}$
A	CH ₃	0.56	-0.17	5.56	0	3.803
B	OCH ₃	-0.02	-0.27	7.78	1	3.523
C	Cl	0.71	0.23	6.03	0	4.469
D	Br	0.86	0.23	8.9	0	5.796
E	CF ₃	0.88	0.54	5.02	0	4.553
F	C ₂ H ₅	1.02	-0.15	10.3	0	4.450
G	C(CH ₃) ₃	1.98	-0.20	19.6	0	4.243
H	H	0	0	1.03	0	3.751
I	(C ₆ H ₁₃ N) ⁺	-4.24	0.12	31.56	0	4.625
J	(C ₆ H ₁₄ N ₂) ⁺	-6.52	0.12	35.40	0	3.454
K	C ₆ H ₁₂ N ₃ O ₃ S	-1.48	0.03	60.62	1	2.749
L	C ₇ H ₁₀ N ₃ O ₂ S	-2.01	0.03	50.47	1	2.694
M	COCH ₃	-0.55	0.50	11.18	1	2.386

注: R-取代基; π -疏水参数; σ -电性参数; MR-摩尔折射; I-指示变量; MIC-最小抑制金葡萄球菌的药物浓度

Note: R-substituent; π -hydrophobic parameter; σ -electric parameter; MR-mole refraction; I-indicator variance; MIC-minimum inhibitory concentration for staphylococcus

表 3 方差分析表

Tab 3 Analytical table of variance

SOURCES	SS	DF	MS	F
TOTAL	10.73	12		
U	7.02	5	1.40	2.65
Q	3.71	7	0.53	

回归方程为: $\lg 1/\text{MIC} = 0.035 0 \pi - 0.015 3 \pi^2 + 0.178 4 \sigma + 0.002 0 \text{MR} - 1.621 3 \text{I} + 4.441 5$, $n = 13$, $r = 0.808 9$, $F = 2.65$ ($\alpha = 0.05$) (1)

为挑选作用显著的参数, 用逐步回归分析法, 按 1% 信度水平, 求得: $b(5) = -0.767 7$, $b(5) = -1.511 3$, $a = 4.349 3$, $r = 0.767 7$ 。

表 4 方差分析表

Tab 4 Analytical table of variance

SOURCES	SS	DF	MS	F
TOTAL		12		
U	0.589 4	1	0.589 4	15.790
Q	0.410 6	11	0.037 3	

回归方程为: $\lg 1/\text{MIC} = -1.511 3 \text{I} + 4.349 3$, $n = 13$, $r = 0.766 3$, $F = 15.79$ ($\alpha = 0.01$) (2)

2.2 Hansch 法方程式与构效关系的分析

按式(1), 计算未经回归统计分析的异丙基氢醌的 $\lg 1/\text{MIC}$ 为 4.462, 实验值为 4.472 ($\text{MIC}: 4.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 从而可以认为其对化合物的预测有一定的参考意义。

方程中 MIC 是化合物对金葡萄球菌的最低抑制浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 按方程计算 π 的最佳值为 1.14; 由于 σ 、MR 在该方程中偏相关系数分别为 0.047 6

和 0.040 7, 因此它们对该方程的贡献不大, 但其影响趋势是它们越大越好; I 为 R 基团是否与邻位羟基形成氢键(形成者为 1, 不能形成者为 0)的指示变量, 由于其偏相关系数为 -0.823 6, 因此它对该方程的贡献起决定作用, 且其与活性成反向相关, 当 $\text{I} = 0$ 即没有氢键形成时, 其活性高。方程式(2)证明了上述的分析结果。

2.3 氢醌类化合物的抗菌作用机理

方程式(2)表明, 抗菌活性的 58% ($r^2 = 0.582 6$) 与指示变量 I 相关。因为指示变量 I 是化合物氧化还原反应的一种间接量度(有氢键形成时氧化还原弱, 无氢键形成时氧化还原强), 从而可以推论, 氢醌类化合物可能是通过氧化还原反应的机理而显示其抗菌活性的, 有利于进行氧化还原反应时, 其抗菌作用强, 反之亦然。

2.4 结论

本实验首次将指示变量 I 引进构效关系方程中并提出相应的作用机理, 对进一步寻找更有效的鹿蹄素衍生物和进一步阐明其作用机理, 提供了一定的线索和依据。

REFERENCES

- [1] ZHEN Z H, DONG Z H, SHE J. Modern Research and Application of Chinese Traditional Herbal Drugs (中药现代研究与应用) [M]. Vol. VI. Beijing: Xueyuan Press, 1988: 5844.
- [2] Dawn hospital' small team of Chinese traditional herbal drugs attached to Chinese traditional medical college in Shanghai. Antibacterial Constituent of Pyroline calliantha H. Andres— isolation, extraction and synthesis of Pyroline [J]. Chin Tradit Herbal Drags Commun (中草药通讯), 1976, 7(7): 2-4.
- [3] HUANG T K. Handbook of Constituent and Pharmacology of Usual Chinese Traditional Herbal Drugs (常用中草药成分与药理手册) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1998: 62.
- [4] LIANG J P, ZHANG J Y, ZHAO R C, et al. Pyroline synthesis and its application in veterinary clinical Practice [J]. Chin J Veterin Sci Tech (中国兽医科技), 1993, 23(12): 14-17.
- [5] ZHANG J Y, LIANG J P, XU Z Z, et al. Pyroline trials in curing intestinal disease of pigs [J]. J Chin Tradit Veterin Med (中兽医医药杂志), 1995, 14(2): 14-15.
- [6] ZHANG J Y, LIANG J P, XU Z Z, et al. Pyroline trials of pharmacy and pharmaceutical effect [J]. J Chin Tradit Veterin Med (中兽医医药杂志), 1995, 14(6): 41-42.
- [7] ZHANG J Y, LIANG J P, XU Z Z, et al. Pyroline trials in curing chick white diarrhea [J]. J Chin Tradit Veterin Med (中兽医医药杂志), 1997, 16(1): 13-15.
- [8] XU Z Z, YU J, LI J S, et al. Pyroline trials in curing clinic mastitis of milk cow [J]. J Chin Veterin Sci (中国兽医杂志), 1994, 20(9): 32.
- [9] GUO Z R. The views of pharmaceutical chemistry (药物化学总论) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1996: 107.

收稿日期: 2008-12-25