

Lasiodiplodin 溴代衍生物的制备及抗尖孢镰刀菌活性^{*}

杨瑞云¹, 李春远¹, 林永成¹, 彭光天¹, 周世宁²

(1 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

(2 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过 NBS 取代反应, 制备 lasiodiplodin 的溴代衍生物 12-14-dibromo-lasiodiplodin 并首次对其抗尖孢镰刀菌活性进行研究。Lasiodiplodin 和 12-14-dibromo-lasiodiplodin 对尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度分别为 100-12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。溴代衍生物的抑制活性比母体化合物显著增强。

关键词: lasiodiplodin; 12-14-dibromo-lasiodiplodin; NBS; 尖孢镰刀菌; 抑菌活性

中图分类号: Q936.0621.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 04-0130-03

分子内含有大内酯环的抗生素统称为大环内酯 (macrolide), 是一类具有重要应用价值的化合物^[1]。Lasiodiplodin 是十二元环的大环内酯化合物, 对绿色植物的生长具有抑制作用, 1971 年由 A. Hridge 等^[2]从 *Lasiodiplodia theobromae* 的代谢产物中分离得到。本研究小组在对湛江海藻内生真菌 No. ZZF36 的研究中, 发现该菌含有大量的 lasiodiplodin。这为广泛研究其药理活性, 制备衍生物, 研究构效关系提供了很好的物质基础。本文报道采用 NBS 对 lasiodiplodin 进行溴代反应, 得到新化合物 12-14-dibromo-lasiodiplodin (1) (图 1)。通过抑菌实验发现, 该化合物对尖孢镰刀菌具有较强抑制作用, 最小抑菌浓度值比 lasiodiplodin 提高了 7 倍。

是由尖孢镰刀菌引起的一种典型的维管束病害^[4], 轻则引起香蕉减产, 品质下降, 重则是世界香蕉生产的毁灭性灾害。香蕉作为我国南方的重要农产品之一, 却面临病害蔓延的威胁。但目前生产上用于防治此病的药物不多, 效果也不甚理想。化合物 1 的发现, 可能为防治香蕉枯萎病提供新的生物农药。

1 实验部分

1.1 实验仪器 90-I 型恒温磁力搅拌器 (上海精科实业有限公司), Mercury-Plus 300 (美国 VARIAN), LCQ DECA XP 液质联用仪 (美国 Thermo), ZAB HS 质谱仪 (英国 VG)。

1.2 实验原料 NBS (AR, 国药集团化学试剂有限公司), 过氧化苯甲酰 (AR, 广州化学试剂厂), 四氯化碳 (AR, 广州化学试剂二厂), 乙酸乙酯、石油醚、氯仿 (工业纯重蒸, 广州化学试剂厂), 硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂), lasiodiplodin (从真菌 No. ZZF36 中分离得到)。

1.3 供试菌株 真菌 No. ZZF36 为采自湛江的海藻中分离出的内生菌, 保藏在中山大学生命科学学院。种属未定。尖孢镰刀菌菌种自香蕉 (*Musa sp.*) 中分离得到, 本实验室保藏。

1.4 实验操作

(1) Lasiodiplodin 的分离。真菌 No. ZZF36 发酵培养 (培养基条件: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母膏 1 g/L, 海盐 2 g/L, pH=7.5) 100 L, 25℃静置生长 30 d 后收取菌体, 干燥, 共 300 g 菌体以 2 L 甲醇浸提 3 次, 得粗提物约 20 g。

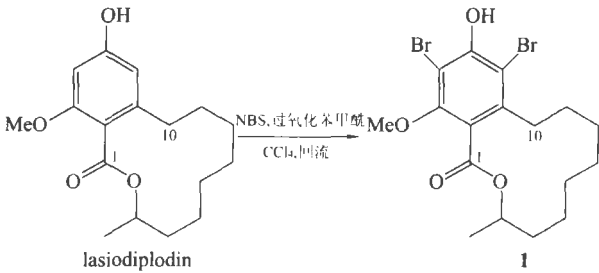


图 1 化合物 1 的制备
Fig 1 Preparation of compound 1

尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr.) 是一种世界性分布的重要的植物病原真菌, 寄主范围广泛, 可引起 100 多种植物维管束萎蔫的病害^[3]。香蕉枯萎病又称黄叶病、巴拿马病, 即

^{*} 收稿日期: 2005-11-22
基金项目: 国家 863 科技攻关计划资助项目 (2003AA624010); 广东省重大科技专项资助项目 (2003A3040501); 广东省自然科学基金重点基金资助项目 (021732)
作者简介: 杨瑞云 (1978 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

硅胶柱层析分离, 洗脱剂为乙酸乙酯-石油醚 (体积比为 3/7), 得到 lasiodiplodin 3 g。

Lasiodiplodin, $C_{17}H_{24}O_4$, 无色针状晶体; FAB-MS (m/z): 293 [$M+1$] $^+$ 。

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.19 (2H, s), 5.27 (1H, m), 3.69 (3H, s), 2.63 (1H, m), 2.58 (1H, m), 1.93 (2H, m), 1.62 (4H, m), 1.34 (3H, d, $J=6.5$ Hz), 1.56~1.28 (7H, overlap), 与文献 [2] 相符。

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.90 (C), 158.29 (C), 157.99 (C), 143.08 (C), 116.84 (C), 108.73 (CH), 97.26 (CH), 72.99 (CH), 55.99 (CH₃), 33.68 (CH₂), 30.75 (CH₂), 30.42 (CH₂), 26.71 (CH₂), 25.85 (CH₂), 24.48 (CH₂), 21.75 (CH₂), 19.92 (CH₃)。

(2) 化合物 1 的制备。准确称取 lasiodiplodin 29 mg (0.1 mmol), NBS 27 mg (0.15 mmol), 置于 10 mL 圆底烧瓶中。加入 CCl_4 3 mL 溶解反应物, 再加入过氧化苯甲酰 5 mg (0.02 mmol)。加热回流, 以 TLC 跟踪反应 (展开剂为氯仿), 约 12 h 后达到反应终点。反应产物用制备 TLC 进行分离 (展开剂为氯仿), 得到 15 mg 化合物 1。

化合物 1: $C_{17}H_{22}O_4Br_2$, 无色固体。LC-MS (m/z): 449.25 [$M-1$] $^-$ 。

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.28 (1H, m), 3.88 (3H, s), 2.82 (2H, m), 1.95 (1H, m), 1.71 (5H, m), 1.38 (3H, d, $J=6.6$ Hz), 1.45~1.28 (6H, overlap)。

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.77 (C), 154.31 (C), 151.29 (C), 140.12 (C), 124.83 (C), 108.40 (C), 102.90 (C), 73.82 (CH), 62.43 (CH₃), 33.23 (CH₂), 31.31 (CH₂), 27.13 (CH₂), 27.01 (CH₂), 26.17 (CH₂), 24.73 (CH₂), 21.77 (CH₂), 19.95 (CH₃)。

(3) 对尖孢镰刀菌最小抑菌浓度 (MIC) 的测定。采用液体二倍稀释法^[9], 分别准确称量 lasiodiplodin 和化合物 1, 用 DMSO 溶解配成 2 mg/mL 的母液。样品母液用无菌双蒸水作系列的二倍稀释, 按梯度依次配成 1 000 500 250 125 62.5 31.3 15.6 7.8 3.9 μ g/mL 的稀释液。

挑取一满环尖孢镰刀菌新鲜孢子于 Sabouraud 培养液 (葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, pH 值自然) 中, 剧烈振荡使孢子分散, 用无菌棉花过滤除菌丝, 于显微镜下计算孢子悬液中孢子浓度, 再用新鲜的 Sabouraud 培养液作适当稀释, 使孢子悬液浓度为 10^4 个/mL 左右。取无菌带盖试管, 每支试

管中加入 0.9 mL 菌悬液, 再加 0.1 mL 不同浓度的测试液, 另取一支加入 0.1 mL 灭菌双蒸水作为对照。28 $^{\circ}C$ 恒温箱中静置培养, 2 d 后记录生长情况, 以在对照管中出现明显的菌丝球而含测试样品试管培养液中无明显生长的菌丝体的最低样品浓度为对该菌的最小抑菌浓度。

2 结果与讨论

2.1 Lasiodiplodin 溴代物的制备 海洋内生真菌 No. ZZF36 从湛江采集的海藻中分离得到, 菌属尚未完全确定。其培养条件要求简单, lasiodiplodin 在菌体中含量较大, 应为该菌的重要组成成分之一。

Lasiodiplodin 溴代物是制备其它很多衍生物的比较理想的前体。以 NBS 为溴化剂, CCl_4 为溶剂, 过氧化苯甲酰作为引发剂进行溴化反应, 制备 lasiodiplodin 溴代物。该反应条件温和, 方法简便易行。其中一个关键之处是反应前, 所有的反应原料需经过彻底干燥, 以保证反应发生。反应过程中, 以 TLC 追踪反应进程, 当原料点消失, 可判断达到了反应终点。12, 14-dibromo lasiodiplodin (1) 为主要产物, 产率为 33.6%。

化合物 1 与 lasiodiplodin 的波谱数据相对照, 在 1H NMR 中, δ 6.19 处 2H 的单峰的消失, 说明 lasiodiplodin 苯环上的氢被溴完全取代, 而其他的结构无变化。

从 ^{13}C -NMR 中也可以看出, 原 lasiodiplodin 苯环上两个 CH 的位移 108.73 和 97.26 在反应后消失, 而多了 108.40 (C), 102.90 (C), 说明溴是取代在 12, 14 位的 C 上。最后结果从质谱得到证实。反应前 lasiodiplodin 的相对分子质量为 292, 反应后化合物 1 的相对分子质量为 450, 其同位素峰比例 $M:(M+2):(M+4)=1:2:1$, 这是分子含 2 个溴原子的特征, 也证明取代了两个溴原子。故化合物 1 应为 12, 14-dibromo lasiodiplodin。

2.2 抑菌实验结果 初筛的实验结果表明, 12, 14-dibromo lasiodiplodin 对尖孢镰刀菌的抑制活性明显比母体化合物 lasiodiplodin 强 (资料未列出), 该结论在最小抑菌浓度试验中得到进一步证实 (表 1): lasiodiplodin 为 100 μ g/mL, 12, 14-dibromo lasiodiplodin 为 12.5 μ g/mL。说明在苯环上发生了溴代反应之后, 与原化合物比较, 对尖孢镰刀菌的抑制作用提高了 7 倍, 得到了显著的增强。

对于大环内酯类抗生素, 尽管化学结构差异很大, 但抗菌机制十分相似, 其作用的位点都是 50S 核糖体。关键反应是阻断 50S 核糖体中肽酰转移酶

活性的功能,使供位上的肽酰 tRNA 不能与受位上的氨基酰 tRNA 结合,从而起到抑制蛋白质合成的作用^[9]。对于大环内酯 lasiodiplodin 除 3 位的 -CH₃外,十二元环上并无其他的取代基团。在并连的苯环上,有 -OCH₃ 和 -OH 两个取代基团。我们推测,苯环上的 -OH 为表现抑菌作用的活性基团。当苯环上的 H 被 Br 完全取代,对于尖孢镰刀菌的抑制作用得到大幅度的提高,说明 Br 可能是提高抑制作用的关键因素,是实现抑菌效果的重要活性基团。

表 1 lasiodiplodin 和 12-14-二溴代 lasiodiplodin 对尖孢镰刀菌的最小抑菌浓度

Tab. 1 MIC of lasiodiplodin and 12-14-dibromo lasiodiplodin for *Fusarium oxysporum*

c (μg·mL ⁻¹)	生长情况	
	lasiodiplodin	12-14-dibromo lasiodiplodin
200	-	-
100	-	-
50	+	-
25	+	-
12.5	+	-
6.25	+	+
3.13	+	+
1.56	+	+
0.78	+	+
0.39	+	+
0	+	+

在对 lasiodiplodin 的研究中,未见对尖孢镰刀菌抑制作用的报道。我们通过 NBS 取代反应,制备 lasiodiplodin 的溴代衍生物,其抗菌活性得到了显著的增强,为研究 lasiodiplodin 的生理活性与构

效关系提供了一条新思路。而溴代产物 12-14-dibromo lasiodiplodin 对尖孢镰刀菌具有较强的抑制作用,亦可考虑作为新型生物农药的先导化合物。对于 lasiodiplodin 的进一步衍生化和生理活性研究仍在进行之中。

3 结 论

发现湛江海藻内生真菌 No.ZZF36 含丰富的大环内酯 lasiodiplodin。抗菌试验显示, lasiodiplodin 有一定的抗尖孢镰刀菌活性。通过 NBS 取代反应,制备获得新衍生物 12-14-dibromo lasiodiplodin。它的抗菌活性比母体化合物增强 7 倍。由此表明,对 lasiodiplodin 的结构改造,有可能获得新型生物农药的先导化合物。

致谢:尖孢镰刀菌菌种由中山大学生命科学学院陈志仕博士惠赠。

参考文献:

[1] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 239.

[2] ALDRIDGE D C, GALT S G, ILES D, et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*[J]. J Chem Soc C, 1971: 1623.

[3] 王政逸, 李德葆. 尖孢镰刀菌的遗传多态性[J]. 植物病理学报, 2000, 30(3): 193.

[4] 林兰稳, 奚伟鹏, 黄赛. 香蕉镰刀菌枯萎病防治药剂的筛选[J]. 生态环境, 2003, 12(2): 182-183.

[5] 李安生, 吴绍熙. 体外抗菌药物敏感性实验的方法学进展[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 1997, 23(5): 265.

[6] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 113.

The Preparation of a Bromo-substitution Product of Lasiodiplodin and Its Antifungal Activities

YANG Ruiyun¹, LI Chunyuan¹, LIN Yongcheng¹, PENG Guangtian¹, ZHOU Shining²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract 12-14-Dibromo lasiodiplodin, a substitution product of lasiodiplodin, was prepared through the NBS method. The antifungal activity of lasiodiplodin and its substitution product were studied at first time. The MIC of lasiodiplodin and 12-14-dibromo lasiodiplodin to *Fusarium oxysporum* were 100 μg/mL and 12.5 μg/mL. The activity of the brominated lasiodiplodin was stronger than that of the parent compound.

Key words lasiodiplodin; 12-14-dibromo lasiodiplodin; NBS; *Fusarium oxysporum*; antifungal activities