

反丁烯二酸单苄酯的合成及抑菌活性研究

陈素艳^{1,2}, 欧光南¹, 周常义¹

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361005 2. 厦门大学化学与化学工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以顺 烯二酸酐和苯甲醇为原料, 经过单酯化和异构化两步得到反 烯二酸单苄酯, 并考察异构温度、异构时间、异构剂用量对产率的影响. 结果表明反 烯二酸单苄酯最佳工艺条件为: 顺 烯二酸酐: 苯甲醇为 1:1 (摩尔比)、反应温度为 90 ℃、时间为 20 min, 异构温度为 90 ℃、异构时间为 2 h, 异构剂无水三氯化铝为 0.7 g (顺 烯二酸酐 9.2 wt%), 产率为 65.5%. FT/IR 和 NMR 表征结果表明, 反 烯二酸单苄酯的结构与理论预测一致; 生物学活性实验证实该化合物对细菌、真菌具有显著的抑菌杀菌作用, 有望开发成为新型抑菌剂.

关键词: 反 烯二酸单苄酯; 合成; 抑菌活性

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-7821(2010)02-0115-05

Synthesis and antimicrobial activity of mono-benzyl fumarate

CHEN Su-yan^{1,2}, OU Guang-nan¹, ZHOU Chang-yi¹

(1. Department of Biological Engineering, Jinji University, Xiamen, Fujian 361021, China;

2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract The mono-benzyl fumarate was synthesized by two-step esterification and isomerization. The results showed that the optimum conditions for mono-benzyl fumarate were molar ratio of maleic anhydride to benzyl alcohol 1:1, reaction temperature 90 ℃, reaction time 20 minutes and then isomerized in the presence of 0.7 g aluminum chloride anhydrous for 2 h at 90 ℃ with the yield of 65.5%. FT/IR and NMR showed that all the characterization data were consistent with the expected compositions and structures. Antimicrobial activity against bacteria, fungus were studied. The result showed that mono-benzyl fumarate had strong antibacterial activity and could be used as antimicrobial sterilization.

Key words mono-benzyl fumarate; synthesis; antimicrobial activity

人们在生活中发现, 物品在使用和存放过程中容易沾污并滋生大量的细菌、真菌等有害微生物, 从而成为疾病的重要传播源, 危害着人类的身体健康. 因此, 抑菌剂在工业、农业、服务等领域得到了充分的重视^[1]. 反丁烯二酸及其酯类是美国 FDA 正式批准的食品添加剂. 国内, 宁正祥等^[2-4]对反丁烯二酸酯类做了不少的工作, 他们发现 α , β -不饱和羰基结构是抑菌剂表现活性的有效功能性结构. 本文以顺丁烯二酸酐和苯甲醇为原料, 经过单酯化和异构化两步得到具有 α , β -不饱和羰基结构的反丁烯二酸单苄酯, 并利用 NMR、FT/IR 等方法对其结构进行表征. 经生物学活性实验证实该化合物具有显著的抑菌杀菌作用, 可用于制备新的抑菌杀菌药物.

收稿日期: 2009-03-10

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目 (2006J0262); 厦门市科技项目 (3502Z20073027)

作者简介: 陈素艳 (1971-), 女, 福建漳州人, 集美大学生物工程学院高级实验师.

欧光南 (1965-), 男, 广西藤县人, 集美大学生物工程学院副教授.

周常义 (1971-), 女, 福建永春人, 集美大学生物工程学院副教授.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂: 顺丁烯二酸酐、氯化钠、葡萄糖 (AR, 中国医药集团上海化学试剂公司); 苯甲醇、无水氯化铝、碳酸氢钠、石油醚、浓盐酸 (AR, 广东汕头市西陇化工厂); 甲苯 (AR, 天津市化学试剂三厂); 二氯甲烷 (AR, 汕头市达濠精细化学品公司); 牛肉膏、蛋白胨 (生化试剂, 广东环凯微生物科技有限公司)。

仪器: 电磁加热搅拌器 (JB-90-2 上海跃华医疗器械厂)、数字熔点仪 (WRS-1B, 上海精密科学仪器有限公司)、NMR 谱仪 (Bmker AV400 瑞士 Bmker 公司)、红外光谱仪 (FT/IR-480P 大连华洋科学仪器有限公司)、手提式压力蒸汽灭菌器 (YXQ-SG46-280A, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、恒温培养摇床 (HWY-111, 上海智诚分析仪器制造有限公司)、可见分光光度计 (723 PC, 上海欣茂仪器有限公司)。

供试菌种: 大肠杆菌 (*Escherichae coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、青霉 (*Penicillium*)、根霉 (*Rhizopus sp.*)、曲霉 (*Aspregillus*)、根啤酒酵母 (*Saccharomyces cerwisiae*) 由集美大学微生物实验室提供。

试验用培养基: 按文献 [5] 配置营养肉汤培养基 (供细菌培养用) 和沙保劳氏培养基 (供霉菌和酵母培养用)。

1.2 实验方法

1.2.1 反 烯二酸单苄酯的合成及步骤

将 5.39 g 顺丁烯二酸酐, 5.17 mL 的苯甲醇溶液加入到圆底烧瓶中。放入转子, 然后固定在铁架台上, 并接上回流、除水装置, 于 90 °C 反应 20 min。加入异构剂无水三氯化铝 0.5 g。90 °C 异构化 2 h。冷却至室温后加入 10% (w/w) 的 NaHCO₃ 水溶液。滤去不溶物后, 用石油醚萃取, 加浓盐酸调节 pH 至 3。析出物过滤, 洗涤, 干燥后得白色晶体^[6-7], 熔点 117.0 °C - 117.7 °C, 与文献 [7] 熔点 120.98 °C 有所差别。

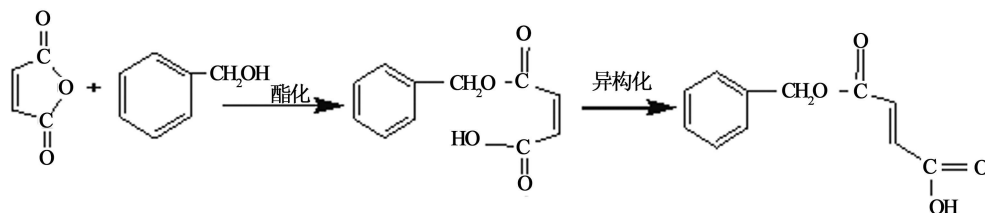


图 1 反丁烯二酸单苄酯的合成路线

Fig 1 Synthetic route of mono-benzyl fumarate

1.2.2 反 烯二酸单苄酯的合成条件优化

对于酸酐与醇的酯化反应来说, 效率和产率较高, 无须考虑使用催化剂。故在单因素条件实验的基础上, 以投料比 1:1 (酸酐: 醇), 酯化时间为 20 min。选取异构温度、异构时间、异构剂用量 3 个主要因素考察异构条件对产率的影响, 按 L₉⁽³⁴⁾ 正交试验进行设计。

1.2.3 反 烯二酸单苄酯抑菌活性研究方法

采用平板法^[8]和比浊法^[8]进行简单的生物学活性实验。

2 结果与讨论:

2.1 反 烯二酸单苄酯的合成及条件优化

根据极差分析结果可见, 各因素的影响次序为: B > A > C, 即在实验条件范围内, 异构时间对产率影响最大, 极差为 23.1; 异构的温度

表 1 正交实验分析表

Tab 1 Result of orthogonal experiment

序号	A 反应温度	B 异构时间	C 异构剂量	产率
	/°C	/h	/g	
1	80	1	0.3	13.6
2	80	2	0.5	42.2
3	80	3	0.7	39.6
4	90	1	0.5	50.3
5	90	2	0.7	61.5
6	90	3	0.3	30.1
7	100	1	0.7	15.4
8	100	2	0.3	44.8
9	100	3	0.5	30.5
均值 ^(iv)	31.8	26.4	29.5	
均值 ^(v)	47.3	49.5	41.0	
均值 ^(vi)	30.2	33.4	38.8	
极差	17.1	23.1	11.5	

次之, 极差为 17.1; 异构剂的用量对产率的影响最小, 极差为 11.5。根据正交实验结果分析, 合成反丁烯二酸单苄酯的适宜工艺条件为: $A_2B_2C_3$, 即反应物顺丁烯二酸酐: 苯甲醇 (摩尔比 1:1), 90°C 反应 20 min 实现单酯化后, 加入 0.5 g 无水三氯化铝于 90°C 异构化反应 2 h。在此条件下, 所得到的产率为 65.5%, 高于文献 [7] 产率值 52.72%。

2.2 合成产物的表征

2.2.1 反丁烯二酸单苄酯的红外谱图分析

反丁烯二酸单酯的红外光谱图在 1700 cm^{-1} 左右具有两个 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$ 的特征峰, 一个是酯基 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—OR}$ 中 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$, 另一个是羧基 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—OH}$ 中 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$ 。其吸收波数分别约为 1720 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} 。产物的红外光谱图见图 2 特征吸收数据列于表 2 中。从产物的红外光谱图和特征吸收可判断产物为酯, 而且羰基与双键共轭, 即含有 $\alpha\beta$ -不饱和羰基结构, 根据各个特征吸收峰以及与反丁烯二酸、苯甲醇的红外标准图进行的比较, 可以判定此物质即为反丁烯二酸单苄酯。

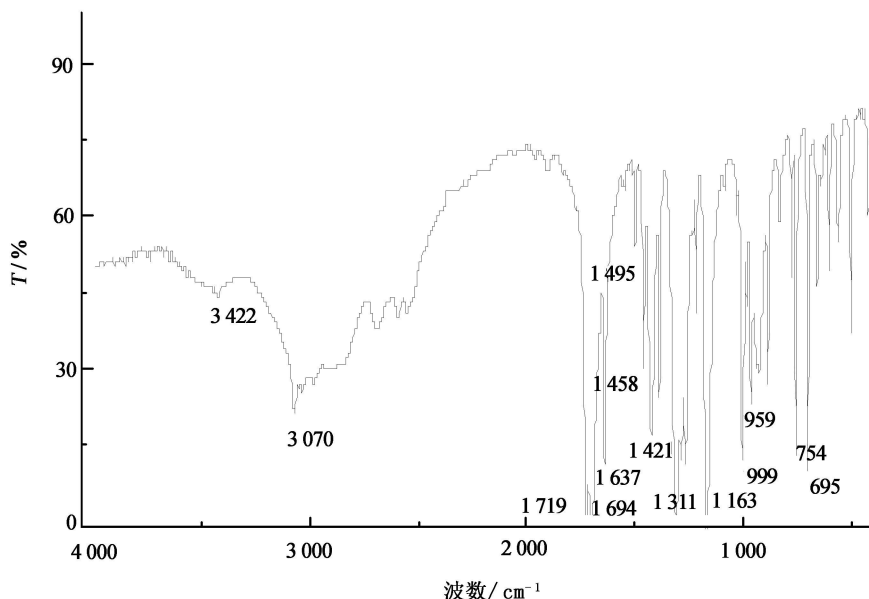


图 2 反丁烯二酸单苄酯的 FT/IR 谱图

Fig 2 FT/IR of mono-benzyl fumarate


表 2 反丁烯二酸单苄酯红外光谱数据

Tab 2 FT/IR absorption of mono-benzyl fumarate

数据 / cm^{-1}	3422	3070	1719	1694	1637	1495	1458
可能官能团	-COOH 中 O-H 伸缩振动	C=C 中 C-H 伸缩振动	酯中 C=O	-COOH 中 C=O 伸缩振动	C=C (反式共轭) 伸缩振动	芳烃中 C=C 骨架伸缩振动	CH ₂ 变形振动
数据 / cm^{-1}	1421	1311	1163	999	959	754	695
可能官能团	羧基中 O-H 变形振动	羧基中 C-O 伸缩振动	酯中 C-O-C 伸缩振动	C=C 中 C-H 的变形振动	羧基中 O-H 面外变形振动	芳烃中 C-H 变形振动	芳烃中 C-H 单取代

2.2.2 反 烯二酸单苄酯的 ^1H NMR 表征

^1H NMR 可提供化学位移、峰面积积分值、自旋分裂数等方面的数据, 根据这些数据可对有机化合物的结构进行鉴定. 化学位移可说明 H 核所处的化学环境, 与 H 核周围的电子云密度有关, 电子云密度越大, 化学位移值越小, 积分面积比例于该峰所属的质子数目, 自旋分裂数提供了邻近的其他 H 核的配置情况^[9].

从 ^1H NMR 谱(见图 3)的峰面积的积分值看, 此产物上有 9 个 H 原子, δ_1 为  上 5 个 H 的化学位移值, δ_2

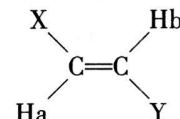

为反丁烯二酸母体的不对称结构()上 H 的位移值, δ_3 为 $-\text{CH}_2$ 上 H 的位移值, 谱图数据见

表 3. 由图 3 和表 3 可见, 反丁烯二酸单苄酯的氢原子数与结构预测相同. ^{13}C NMR 中, 碳原子的数目与结构预测相同, 且化学位移也与结构预测相近. 图谱的杂峰低, 说明得到的反丁烯二酸单苄酯纯度高.

表 3 反丁烯二酸单苄酯 ^1H NMR 谱数据
Tab 3 ^1H NMR data of m-ono-benzyl fumarate

化学位移值	峰面积积分值	峰分裂数	H 归属的基团
$\delta_1 = 7.358 - 7.279$	5.02	多重	
$\delta_2 = 6.888 - 7.001$	1.98	4	$\text{CH} = \text{CH}$
$\delta_3 = 5.250$	2.03	1	$-\text{CH}_2$

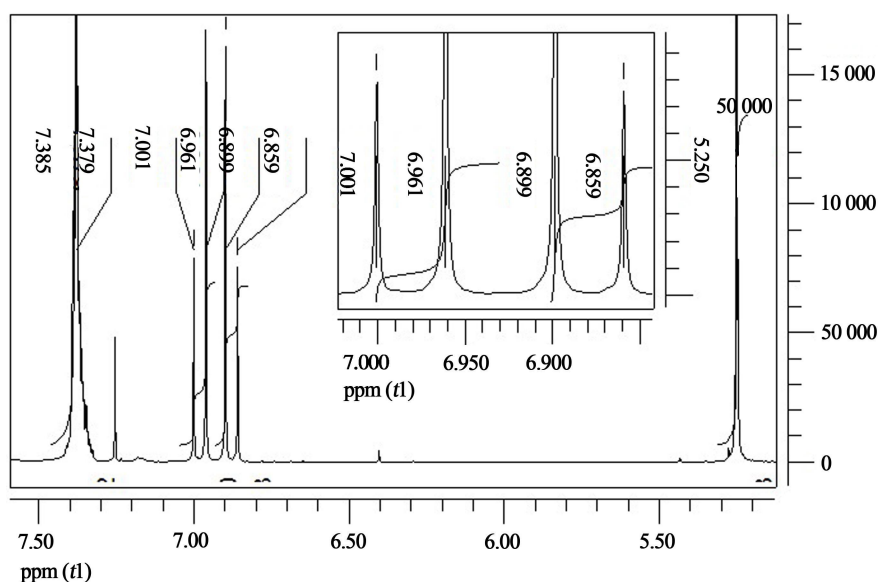


图 3 反丁烯二酸单苄酯的 ^1H NMR 谱

Fig 3 ^1H NMR spectra of MPMF

2.3 反 烯二酸单苄酯抑菌活性

2.3.1 细菌

本研究中, 选择了大肠杆菌(革兰氏阴性菌)、金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)作为供试菌种, 从而可了解反丁烯二酸单苄酯对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌抑菌作用的差别, 实验结果见表 4. 由表 4 可见, 反丁烯二酸单苄酯对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)的最低抑菌浓度 MIC 为 1.6 g/L, 但从相同浓度的抑菌率来看, 其对金黄色葡萄球菌的抑菌率比大肠杆菌的抑菌率高, 这说明反丁烯二酸单苄酯的抑菌作用与细胞壁的结构有关, 抑菌剂的作用机理是通过其疏水性结合到细胞膜上, 扰乱细胞膜

的结构,但细胞壁的结构会影响抑菌剂的渗透性,从而影响其对细胞膜的作用.革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞膜结构没有差别,但细胞壁的结构不同,革兰氏阳性菌主要是肽聚糖组成的单层壁,革兰氏阴性菌为肽聚糖层和外壁层构成的双层,外壁层为脂多糖,可阻挡外来大分子物质,从而使抑菌剂的抑菌效果降低.从本实验的结果看,反丁烯二酸单苄酯对革兰氏阳性菌的抑菌作用强于对革兰氏阴性菌的作用.

2.3.2 真菌

采用平板涂布法,以霉菌和酵母为供试菌测定反丁烯二酸单苄酯的抑菌能力.表 5 中结果表明反丁烯二酸单苄酯等对真菌的最低抑菌浓度,其中,反丁烯二酸单苄酯对青霉的抑菌效果最好, MIC 值为 0.4 g/L,对根霉、曲霉、毛霉、酵母的抑菌效果也较好,优于常用的防腐抗菌剂反丁烯二酸单甲酯和山梨酸.

表 4 反丁烯二酸单苄酯对细菌的最低抑菌浓度

Tab 4 MIC value of mono-benzyl fumarate on bacteria

反丁烯二酸单苄酯 /(g·L ⁻¹)	抑菌率 /%	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
0.5	4.4	46.7
1.0	18.9	53.1
1.2	29.5	85.5
1.6	96.4	98.4
2.0	98.3	99.1

表 5 不同抑菌剂对真菌的抑制作用

Tab 5 MIC value of different antimicrobial on fungus growth

抑菌剂	抑菌剂的 MIC/(g·L ⁻¹)				
	根霉	青霉	曲霉	毛霉	啤酒酵母
反丁烯二酸单苄酯	0.8	0.4	0.8	1.0	1.0
反丁烯二酸单甲酯	0.8	0.5	1.0	2.0	0.6
山梨酸	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0

3 结论

合成反丁烯二酸单苄酯的适宜工艺条件为反应物顺丁烯二酸酐:苯甲醇(摩尔比 1:1),90℃反应 20 min 实现单酯化,然后加入 0.7 g 无水三氯化铝作为异构化催化剂,90℃异构化反应 2 h 得到的产物反丁烯二酸单苄酯为白色晶体,熔点 117.0-117.7℃,不易溶于水,可溶于三氯甲烷和 N,N-二甲基甲酰胺, FT-IR, NMR 表征结果说明反应所得到的化合物为反丁烯二酸单苄酯且纯度高.采用平板法和比浊法初步进行生物学活性实验,结果表明反丁烯二酸单苄酯对细菌、霉菌、酵母等有较好的抑菌活性,具有广谱抗菌性.

参考文献:

- [1] 万素英,李琳,王慧君.食品防腐与食品防腐剂[M].北京:中国轻工业出版社,2002
- [2] 宁正祥,高建华.食品防腐剂的抗菌机理及构效关系[J].广州食品工业科技,1997,13(3):1-4
- [3] 宁正祥,谭龙飞,张德聪,等.α,β-不饱和羧基化合物的分子结构特性与抗菌活性间的关系[J].应用化学,1996,13(1):38-42
- [4] 袁海涛,丙汉明,宁正祥.尼泊金酯类和富马酸酯类抑菌效果的研究[J].食品科技,2001(5):43-44
- [5] 刘慧.食品微生物实验指导[M].哈尔滨:东北农业大学出版社,1993
- [6] 郑超,王萍,张宏志.富马酸单甲酯制备工艺的改进[J].化学世界,2004(4):207-208
- [7] 黄艳,战宇,宁正祥.新型防腐剂富马酸单苄酯的合成[J].食品工业科技,2007,28(8):203-204
- [8] 陈素艳,宋凌生,周常义,等.新型水溶性抑菌剂咪唑季铵型反丁烯二酸单辛酯的合成及其抑菌活性研究[J].漳州师范学院学报:自然科学版,2008(2):78-82
- [9] 唐恢同.有机化合物的光谱鉴定[M].北京:北京大学出版社,1992:251-260

(责任编辑:金甦)