

医药与日化原料

油酸和十二烷二酸的氨基酸酯合成及其抗菌性

张鉴伟^{1,2}, 卢江¹

(1. 中山大学 化学学院, 广东 广州 510000; 2. 西陇科学股份有限公司, 广东 汕头 515000)

摘要: 以 L-丙氨酸乙酯盐酸盐、甘氨酸乙酯盐酸盐、L-蛋氨酸甲酯盐酸盐、L-亮氨酸乙酯盐酸盐和 L-酪氨酸甲酯盐酸盐在 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 的作用下分别与油酸进行反应, 生成了 5 种油酸的氨基酸衍生物; 将 L-丙氨酸乙酯盐酸盐和甘氨酸乙酯盐酸盐分别与十二烷二酸进行反应, 生成了两种十二烷二酸的氨基酸衍生物, 7 种产物的收率均 $\geq 75\%$ 。利用 FTIR、TGA、¹HNMR 和 LC-MS 对产物进行了表征, 测试了产物的水油分散性, 考察了产物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌性。结果表明, 所合成的脂肪酰氨基酸酯均能在水油体系中分散, 且具有较强的生物抗菌性, 其中, 0.01 mg 油酸酰亮氨酸乙酯能有效地抑制金黄色葡萄球菌 (菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.4×10^7 CFU/mL), 而相同质量油酸酰酪氨酸甲酯则能抑制大肠杆菌 (菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.8×10^7 CFU/mL)。

关键词: 脂肪酸; 氨基酸; 油酸酰氨基酸酯; 十二烷二酸酰氨基酸酯; 水油分散性; 抗菌性; 日化原料
中图分类号: TQ421 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 02-0330-07

Synthesis and antibacterial activities of amino acid esters from oleic acid and dodecanedioic acid

ZHANG Jianwei^{1,2}, LU Jiang¹

(1. School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong, China; 2. Xilong Scientific Co., Ltd., Shantou 515000, Guangdong, China)

Abstract: Five types of oleic acid derivatives were produced by reaction of oleic acid with L-alanine ethyl ester hydrochloride, glycine ethyl ester hydrochloride, L-methionine methyl ester hydrochloride, L-leucine ethyl ester hydrochloride and L-tyrosine methyl ester hydrochloride, respectively, in presence of 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride and 1-hydroxybenzotriazole. In addition, two types of dodecanedioic acid derivatives were also synthesized *via* reactions of dodecanedioic acid with L-alanine ethyl ester hydrochloride and glycine ethyl ester hydrochloride, respectively. It was found that the yields of all seven products were higher than or equal 75%. The structures of the products obtained were then characterized by FTIR, TGA, ¹HNMR and LC-MS, followed by evaluations on the dispersibilities and the antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed that these fatty acid acyl amino acid esters exhibited good dispersity in both aqueous and organic phases, and obvious antimicrobial activities. Oleoyl leucine ethyl ester (0.01 mg) could effectively inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* (the number of bacteria was decreased from 2.0×10^9 CFU/mL to 1.4×10^7 CFU/mL), while oleoyl tyrosine methyl ester with the same mass showed significant growth inhibition effect on *Escherichia coli* (the number of bacteria was decreased from 2.0×10^9 CFU/mL to 1.8×10^7 CFU/mL).

Key words: fatty acid; amino acid; oleoyl amino acid ester; dodecyl diacid amino acid ester; water oil dispersion; antibacterial activity; cosmetic materials

生物抗菌剂在人类历史的发展进程中起着至关重要的作用, 与人类的生产生活息息相关。近 10 年

来, 越来越多的研究聚焦于生物抗菌剂在食品^[1]、化妆品^[2]、涂料^[3-4]和个人护理品行业^[5-6]中的应用。

由于细胞结构和组成的多样性, 同一种抗菌剂对不同微生物的效果存在显著差异。并且抗菌剂的滥用或误用可能危害人类健康, 导致细菌具有抗药性, 破坏生态平衡。因此, 开发新型、环境友好的抗菌剂成为当前亟待解决的关键问题。

目前, 常见的抗菌添加剂主要包括季铵盐^[7]、双胍以及有机酚类^[8]。NAKATA等^[9]考察了溴化十六烷基三甲铵(CTAB)对大肠杆菌的影响, 结果发现, 其能够诱导细胞内超氧化物增多, 从而影响细胞正常生长, 实现抑菌的效果。KIM等^[10]将海藻酸钠与3-三甲氧基硅丙基十八烷基二甲基氯化铵进行反应, 合成了一种复合铵盐, 并测试了其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌和腐霉菌等细菌和真菌的抑制作用, 结果表明, 复合产物对这几种菌的抑菌性极强, 在20 min内完全抑制了细菌的正常生长。然而, 通过生物毒性分析, 季铵盐分解后的产物对人体有害^[11-12], 限制了其在食品或日化行业中的应用。另外, 这类合成抗菌添加剂的抗菌性容易受高温影响, 抑菌效果不稳定。DIZMAN等^[13]通过对1,4-二氮杂二环[2.2.2]辛烷三乙烯二胺进行TGA分析, 发现其在100 °C以上开始分解, 并在150 °C完全分解。天然脂肪酸具有可生物降解性和低毒性, 是一种理想的生物抗菌剂原料^[14-19]。DESBOIS等^[20]的研究表明, 天然脂肪酸可穿透细胞膜, 引起细胞内代谢紊乱和营养物质流失, 并且脂肪酸的碳链长度及不饱和度均不同程度地影响其生物抗菌性。然而, 天然脂肪酸的亲水基团较少, 水溶性相对较差, 难以添加在水性溶液中使用。另外, 其分子结构本身不具备其他抗菌性基团(如酰胺结构、酚羟基等), 因此其抗菌效果不佳, 需要对其进行改性。最常见的改性方法是通过脂肪酸与氨基酸进行酰胺化反应来合成脂肪酰氨基酸。月桂酰-L-精氨酸乙酯(LAE)是一种脂肪酰氨基酸, 作为抗菌剂的典型代表, 其主要活性组分为月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐, 具有广谱抗菌性, 能抑制大部分食源性致病菌。尽管如此, LAE也存在一些缺陷, 如当浓度较高时, 其会带有苦味, 且其为阳离子型表面活性剂, 可能与食品中(如果胶等)带负电荷的组分发生离子反应, 从而形成沉淀, 导致抗菌性显著降低^[21-22]。尽管已有的抗菌剂种类繁多, 但仍存在许多问题, 如生物毒性较大^[11-12]、热稳定性较差^[13]、油溶性或水溶性较差^[20]、易与其他组分结合产生沉淀等问题。

本文以绿色环保的脂肪酸(油酸和十二烷二酸)和氨基酸(L-丙氨酸乙酯盐酸盐、甘氨酸乙酯盐酸盐、L-蛋氨酸甲酯盐酸盐、L-亮氨酸乙酯盐酸盐和

L-酪氨酸甲酯盐酸盐)为主要原料来合成脂肪酰氨基酸酯, 并以1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)为脱水剂和1-羟基苯并三唑(HOBt)为酰胺缩合剂进行反应, 将高沸点的油脂引入氨基酸体系, 提高其热稳定性; 同时, 脂肪酸的亲油基团和氨基酸的亲水基团将赋予产物良好的水油两亲性; 此外, 产物通过一步法合成, 避免了离子反应的影响, 提高了其稳定性。对所合成产物进行表征和性能测试, 旨在提供性能优异的表面活性剂。

1 实验部分

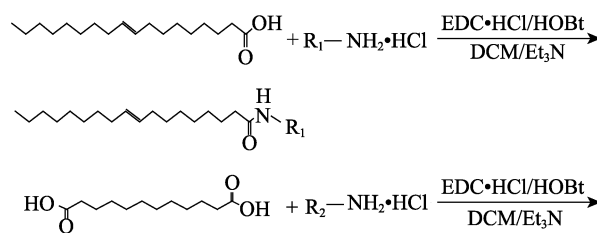
1.1 试剂与仪器

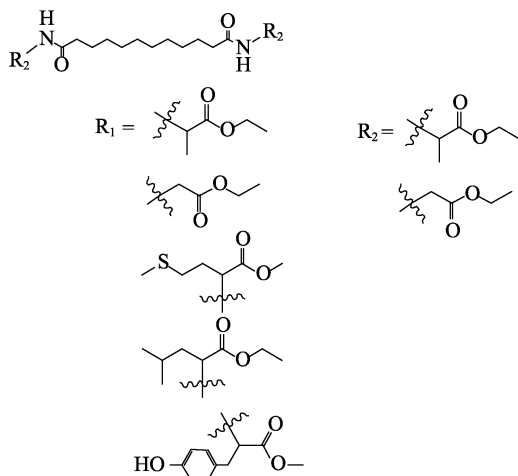
油酸(AR)、十二烷二酸(质量分数99%)、L-丙氨酸乙酯盐酸盐(质量分数98.5%)、甘氨酸乙酯盐酸盐(质量分数99%)、L-蛋氨酸甲酯盐酸盐(质量分数98%)、L-亮氨酸乙酯盐酸盐(质量分数98%)、L-酪氨酸甲酯盐酸盐(质量分数98%)、HOBt(质量分数97%)、EDC·HCl(质量分数98.5%)、三乙胺(Et₃N, AR)、二氯甲烷(DCM, AR), 上海麦克林生化科技有限公司; 月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(质量分数96%), 广州宏程生物科技有限公司; 金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003、大肠杆菌CMCC(B)44102, 上海鲁微科技有限公司。

Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; Avance III 400 MHz 核磁共振波谱仪, 德国 Burkert 公司; nanoAcquity UPLC 纳升级超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; LTQ XL 质谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; TGA2 热重分析仪, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Litesizer100 动态光散射粒度仪, 奥地利 Anton Paar 公司; UV-2700 紫外-可见光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司。

1.2 脂肪酰氨基酸酯的合成

L-丙氨酸乙酯盐酸盐、甘氨酸乙酯盐酸盐、L-蛋氨酸甲酯盐酸盐、L-亮氨酸乙酯盐酸盐和 L-酪氨酸甲酯盐酸盐在 EDC·HCl/HOBt 的作用下分别与油酸进行反应, 生成了 5 种油酸的氨基酸衍生物; 另外, L-丙氨酸乙酯盐酸盐和甘氨酸乙酯盐酸盐分别与十二烷二酸进行反应, 生成了 2 种十二烷二酰氨基酸酯, 合成路线如下所示。





参照文献[23]方法, 并进行了部分改动。以油酸酰丙氨酸乙酯的合成为例, 具体步骤为: 将 L-丙氨酸乙酯盐酸盐 (2.304 g, 15 mmol)、油酸 (4.237 g, 15 mmol)、HOBT (2.297 g, 17 mmol)、EDC·HCl (3.259 g, 17 mmol) 完全溶解于装有 DCM (80 mL) 的圆底烧瓶中。在冰浴 (0 °C) 下搅拌均匀后, 向混合物中缓慢滴加三乙胺 (4.047 g, 40 mmol), 反应 10 min 后, 撤去冰浴, 自然升温至室温, 搅拌 17 h。反应结束后, 将混合液倒入分液漏斗中, 用蒸馏水 (50 mL×2) 和乙酸乙酯 (100 mL×4) 萃取, 最后用饱和食盐水 (50 mL) 冲洗, 回收有机相, 用无水硫酸钠干燥, 旋蒸除去有机溶剂后得到粗产品。粗产品通过 250 目的硅胶色谱柱进行分离提纯, 采用的洗脱剂为 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 5 : 1$ 的混合液, 旋蒸除去有机溶剂后得到油酸酰丙氨酸乙酯。其余油酸酰氨基酸酯的制备方法同上, 只需改变加入的氨基酸酯种类。当以十二烷二酸作为脂肪酸时, 将脂肪酸、氨基酸酯、EDC·HCl、HOBT 物质的量比由 15 : 15 : 17 : 17 改为 7.5 : 15 : 17 : 17, 其余不变。

油酸酰丙氨酸乙酯: 浅黄色油状液体, 收率 84%, 初始热分解温度为 283.3 °C。FTIR (ν/cm^{-1}): 3258 (N—H), 1740 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$), 1625 (NH—C=O)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 5.37 (dt, $J = 11.5$ 、5.7 Hz, 2H, C=CH), 4.60 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, N—CH), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, COO—CH₂), 2.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, C=C—CH₂), 2.04 (dq, $J = 13.4$ 、6.8 Hz, 2H, N—CO—CH₂), 1.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, N—CO—C—CH₂), 1.41 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, N—C—CH₃), 1.34~1.16 (m, 22H, CH₂), 0.89 (td, $J = 6.7$ 、3.7 Hz, 3H, CH₃)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 381.69; 计算值 381.32。

油酸酰甘氨酸乙酯: 浅黄色油状液体, 收率 85%, 初始热分解温度: 301.9 °C。FTIR (ν/cm^{-1}): 3250 (N—H), 1735 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$), 1625 (NH—

C=O)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 5.35 (dt, $J = 11.5$ 、5.7 Hz, 2H, C=CH), 4.22 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, N—CH), 4.03 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O—CH₂), 2.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, C=C—CH₂), 2.03 (dq, $J = 13.4$ 、6.8 Hz, 2H, N—CO—CH₂), 1.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, N—CO—C—CH₂), 1.33~1.23 (m, 22H, CH₂), 0.89 (td, $J = 6.7$ 、3.7 Hz, 3H, CH₃)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 368.31; 计算值 367.71。

油酸酰蛋氨酸甲酯: 黄色油状液体, 收率 85%, 初始热分解温度为 324.9 °C。FTIR (ν/cm^{-1}): 3250 (N—H), 1735 ($\text{CH}_3\text{O—C=O}$), 1625 (NH—C=O), 1330 (S—CH₃)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 5.37 (tt, $J = 11.4$ 、5.2 Hz, 2H, C=CH), 4.75 (td, $J = 7.4$ 、5.1 Hz, 1H, N—CH), 3.78 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, O—CH₃), 2.80 (q, $J = 7.3$ 、6.4 Hz, 2H, S—CH₂), 2.58~2.46 (m, 2H, S—C—CH₂), 2.29~2.12 (m, 3H, S—CH₃), 2.14~1.93 (m, 6H, CO—CH₂, C=C—CH), 1.44 (s, 2H, CO—C—CH₂), 1.42~1.24 (m, 18H, CH₂), 0.90 (td, $J = 6.7$ 、3.7 Hz, 3H, CH₃)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 428.31; 计算值 427.49。

油酸酰亮氨酸乙酯: 浅黄色油状液体, 收率 82%, 初始热分解温度为 283.6 °C。FTIR (ν/cm^{-1}): 3255 (N—H), 1744 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$), 1625 (NH—C=O)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 5.37 (tt, $J = 11.3$ 、5.3 Hz, 2H, C=CH), 4.65 (td, $J = 8.6$ 、4.6 Hz, 1H, N—CH), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O—CH₂), 2.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, C=C—CH₂), 2.04 (dq, $J = 15.2$ 、6.4、5.5 Hz, 4H, CO—CH₂), 1.65 (ddt, $J = 11.2$ 、8.0、4.7 Hz, 2H, N—C—CH₂), 1.44 (s, 1H, N—C—CH), 1.30 (dt, $J = 11.5$ 、4.5 Hz, 2H, O—C—CH₃、CH₂), 0.93 (ddd, $J = 28.7$ 、6.5、3.5 Hz, 9H, CH₃)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 424.37; 计算值 423.65。

油酸酰酪氨酸甲酯: 浅黄色油状液体, 收率 82%, 初始热分解温度为 307.7 °C。FTIR (ν/cm^{-1}): 3400 (Ar—OH), 3260 (N—H), 1740 ($\text{CH}_3\text{O—C=O}$), 1625 (NH—C=O), 830 (Ar—H)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 6.94 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Ar—H), 6.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar—H), 5.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar—OH), 5.37 (tt, $J = 11.6$ 、5.2 Hz, 2H, C=CH), 4.89 (dt, $J = 8.2$ 、6.0 Hz, 1H, N—CH), 3.75 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, O—CH₃), 2.20 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, C=C—CH₂), 2.14~1.95 (m, 2H, CO—CH₂), 1.44 (s, 2H, CO—C—CH₂), 1.43~1.24 (m, 18H, CH₂), 0.90 (dt, $J = 7.0$ 、3.3 Hz, 3H, CH₃)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 460.69; 计算值 459.33。

十二烷二酸酰丙氨酸乙酯: 白色固体粉末, 收率 79%, 初始热分解温度为 308.8 °C。FTIR (ν/cm^{-1}):

3250 (N—H), 1755, 1733 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$), 1650, 1640 (NH—C=O)。 $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 4.61 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, N—CH), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, O—CH₂), 2.23 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CO—CH₂), 1.64 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, CO—C—CH₂), 1.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.31 (q, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 14H, CH₂)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 429.60; 计算值 428.29。

十二烷二酸酰甘氨酸乙酯: 白色固体粉末, 收率 75%, 初始热分解温度为 319.5 °C。FTIR (v/cm^{-1}): 3250 (N—H), 1755, 1733 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$), 1650, 1640 (NH—C=O)。 $^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 4.24 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, N—CH), 4.06 (d, $J = 4.9$ Hz, 4H, O—CH₂), 2.26 (dd, $J = 9.1, 6.2$ Hz, 4H, CO—CH₂), 1.67 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H, CO—C—CH₂), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 16H, CH₂)。ESIMS, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值 401.26; 计算值 400.26。

1.3 表征方法及性能测试

1.3.1 FTIR 测试

使用傅里叶变换红外光谱仪进行衰减全反射分析, 扫描次数设为 64 次, 波数为 4000~500 cm^{-1} , 分辨率设为 2 cm^{-1} 。

1.3.2 $^1\text{HNMR}$ 测试

使用核磁共振波谱仪对样品进行 $^1\text{HNMR}$ 测试, 以氘代氯仿 (CDCl_3) 为溶剂, 扫描温度为 25 °C, 采用软件 MestReNova 对谱图进行处理。

1.3.3 LC-MS 测试

使用纳升级超高效液相色谱仪, 配备 UPLC BEH C18 色谱柱 (1 mm×50 mm×1.7 μm), 程序洗脱设置为: 0~2 min 保持洗脱剂为 $V(\text{去离子水}): V(\text{乙腈})=4:6$; 2~10 min 线性提高乙腈比例至 $V(\text{去离子水}): V(\text{乙腈})=1:9$; 35 min 时洗脱剂调回初始比例。溶剂中添加甲酸 (体积分数 0.1%), 流速设为 60 $\mu\text{L}/\text{min}$, 柱温设为 45 °C。色谱柱尾端连接质谱仪, 其操作设定为正离子模式, 毛细管电压设为 3 kV, 锥孔电压为 40 kV。

1.3.4 热稳定性测试

使用热重分析仪, 样品约 20 mg, 从 25 °C 加热至 600 °C, 加热速率为 10 °C/min, 使用氮气作为保护气, 流速为 20 mL/min; 使用空气作为反应气, 流速为 10 mL/min。

1.3.5 水油分散性测试

将约 1 g 样品充分溶于 5 mL 丙酮中, 向体系中加入 100 mL 蒸馏水, 振荡后混合液呈现为乳白色液体。使用动态光散射粒度仪进行粒径分布测试, 考察样品的水油分散性。

1.3.6 生物抗菌性测试

先取 100 μL 待测菌液 (质量浓度为 2×10^4 mg/L) 混于 900 μL 的磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中, 再分别取 10、25、50、100、150、200 μL 上述溶液, 用生理盐水稀释得到质量浓度为 100、250、500、1000、2000 和 4000 mg/L 的菌液溶液, 在 37 °C 的摇床培养箱 (100 r/min) 中放置 24 h。用紫外-可见分光光度计分别测量上述菌液溶液在 600 nm 处的吸光度 (OD_{600} 值), 绘制菌液质量浓度与吸光度的标准曲线。随后将 7 种待测样品分别混入质量浓度为 1000 mg/L 的菌液溶液中 (另外配制), 37 °C 下恒温 2 h 后测量其 OD_{600} 值。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酰氨基酸酯的结构表征

油酸酰丙氨酸乙酯和油酸酰甘氨酸乙酯均在 1625 cm^{-1} 处有一明显的尖峰, 此为酰胺键上羰基 (—NH—C=O) 的特征吸收峰, 在 1740、1735 cm^{-1} 出现氨基酸乙酯键上羰基 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—C=O}$) 的特征吸收峰。十二烷二酸酰氨基酸酯中酰胺羰基显示为双峰 (1650 与 1640 cm^{-1}), 而氨基酸乙酯键上羰基也呈现为双峰 (1755 与 1733 cm^{-1}), 表明十二烷二酸的两个羧基均与氨基酸乙酯盐酸盐发生了酰胺化反应, 分子结构中含两个酰胺基团, 与质谱分析的结果一致。油酸酰酪氨酸甲酯在 3400 cm^{-1} 有一较大的宽峰, 归属于酚羟基的伸缩振动, 830 cm^{-1} 处则为苯环 C—H 键的面外弯曲振动吸收峰。

通过 $^1\text{HNMR}$ 进一步确认产物的分子结构。酰胺键的邻位氢 (CH—C=O) 和酯基的亚甲基氢 (O—CH₂CH₃) 均在 $^1\text{HNMR}$ 谱图中出现化学位移, 表明脂肪酰氨基酸酯成功合成。油酸酰酪氨酸甲酯区别于其他 6 种产物的特征峰为苯环上的两对氢 (δ 6.76 和 6.94) 及酚羟基 (δ 5.99)。

2.2 脂肪酰氨基酸酯的热稳定性

为了探究产物的热稳定性, 对 7 种产物进行了热重分析, 并与商业化产品月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐进行对比。所合成脂肪酰氨基酸酯的最大降温速率出现在 350 °C 左右。其中, 油酸酰亮氨酸乙酯的分解温度相对较低, 热稳定性最差, 而油酸酰酪氨酸甲酯则具有最佳的热稳定性, 这可能是其芳香环的分子结构导致的。另外, 与月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐的初始热分解温度 (248.7 °C) 相比, 所合成产物均具有更高的初始热分解温度, 热稳定性相对较优。

2.3 脂肪酰氨基酸酯的水油分散性

为了探究产物在水性或油性基底中的适用性, 进行了水油分散性测试, 结果见图 1。

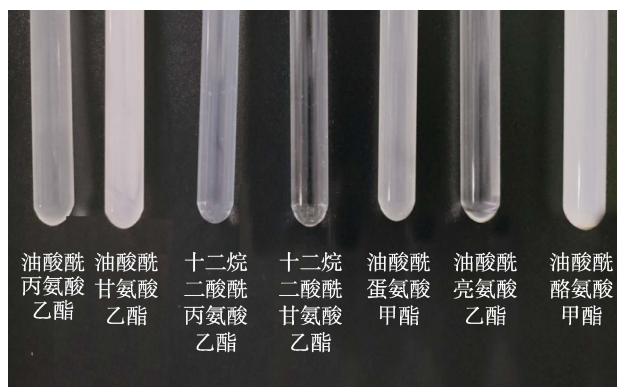


图 1 脂肪酰氨基酸酯在油水体系中的分散性
Fig. 1 Dispersion of fatty acid acyl amino acid esters in oil-water system

如图 1 所示, 7 种产物在丙酮和水的混合体系中呈现出不同程度微乳化, 放置 48 h 后未分层。后续选择了其中两种水油混合液进行了动态光散射的粒

径分析。结果表明, 油酸酰丙氨酸乙酯的水油乳液平均粒径为 307.9 nm, 而油酸酰甘氨酸乙酯混合液中乳液的平均直径为 117.1 nm。与油酸酰丙氨酸乙酯相比, 油酸酰甘氨酸乙酯的氨基酸链端亲水性更强, 因此, 其乳液粒径相对较小。

合成的脂肪酰氨基酸酯和月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐的亲水亲油平衡值 (HLB 值) 如表 1 所示。根据 HLB 值的差异, 将产物分为 3 类: 第一类偏向亲油, 其 HLB 值介于 0~3, 可用作消泡剂; 第二类呈油水中性, HLB 值介于 3~6, 可用作 W/O 型乳化剂; 第三类偏向亲水, HLB 值介于 7~9, 可用作润湿剂。由表 1 可知, 十二烷二酸的两种氨基酸酯的 HLB 值与月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐类似, 皆属于第三类。脂肪酰氨基酸酯在水中能均匀分散, 且在有机溶剂中也有较好的溶解性。因此, 合成产物的应用范围较广, 可兼容地用作水性涂料或油性涂料中的抗菌添加剂。

表 1 脂肪酰氨基酸酯的 HLB 值
Table 1 HLB values of fatty acyl amino acid esters

| | 油酸酰丙氨酸乙酯 | 油酸酰甘氨酸乙酯 | 油酸酰蛋氨酸甲酯 | 油酸酰亮氨酸乙酯 | 油酸酰酪氨酸甲酯 | 十二烷二酸酰丙氨酸乙酯 | 十二烷二酸酰甘氨酸乙酯 | 月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐 |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| HLB 值 | 2.75 | 2.14 | 4.50 | 4.37 | 5.41 | 7.81 | 7.20 | 7.47 |

注: HLB 值由经验公式 $HLB = 7 + 11.7lg(M_w/M_o)$ 获得, M_w 和 M_o 分别为表面活性剂分子中亲水基团和亲油基团的相对分子质量。

2.4 脂肪酰氨基酸酯的生物抗菌性

首先测量不同质量浓度菌液的 OD_{600} 值, 绘制标准曲线, 再通过平板菌落计数法计算不同菌液质量浓度下的菌数, 从而得到 OD_{600} 值与菌数的相关性。

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在不同菌液质量浓度下对应的 OD_{600} 值如表 2 所示。由表 2 可知, 随着菌液质量浓度的升高, 相应的 OD_{600} 值也逐渐升

高, 而菌数与 OD_{600} 值呈正相关性。使用表 2 的数据进行拟合得到式 (1) 和 (2), 分别为金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的菌液质量浓度与 OD_{600} 值之间的相关性。

$$y = 7150.5x^2 + 7259.8x + 87.1 \quad (R^2 = 0.9963) \quad (1)$$

$$y = 23090x^2 + 4492.1x + 87.2 \quad (R^2 = 0.9958) \quad (2)$$

式中: y 为菌液质量浓度, mg/L; x 为菌液的 OD_{600} 值。

表 2 不同质量浓度菌液的 OD_{600} 值及相对应的菌数
Table 2 OD_{600} value and bacterial count of bacterial solutions with different concentrations

| 菌液质量浓度/(mg/L) | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 | 4000 |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 菌数/(CFU/mL) | 1.0×10^7 | 2.5×10^7 | 5.0×10^7 | 1.0×10^8 | 2.0×10^8 | 4.0×10^8 |
| 菌液 OD_{600} 值 | 金黄色葡萄球菌 | 0.002 | 0.028 | 0.061 | 0.094 | 0.388 |
| | 大肠杆菌 | 0.009 | 0.019 | 0.088 | 0.112 | 0.326 |

将 7 种待测样品分别溶于生理盐水中, 配制质量浓度为 1000 mg/L 的溶液, 分别取 10 μ L 加入到未稀释的菌液中 (菌数为 2.0×10^9 CFU/mL) 进行恒温培养, 并测量样品加入前后的 OD_{600} 值, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 油酸类的氨基酸酯对金黄色葡萄球菌的生长具有明显的抑制效果, 其中油酸酰丙氨酸乙酯、油酸酰甘氨酸乙酯和油酸酰亮氨酸乙酯 3 种组分的抑菌性较强, 0.01 mg 组分加入菌液后,

菌数从 2.0×10^9 CFU/mL 分别降低至 1.8×10^7 、 1.9×10^7 和 1.4×10^7 CFU/mL。这 3 种产物对金黄色葡萄球菌抑制性接近于阳性对照组的月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐 (由 2.0×10^9 CFU/mL 降低至 1.2×10^7 CFU/mL)。两种十二烷二酸酰氨基酸酯的抑菌效果不如油酸的氨基酸衍生物, 可能因为二酸衍生物的分子结构两端均为亲水的氨基酸基团, 较难穿透细胞壁中的油膜层, 无法进入细胞内起作用, 因而其抑菌效果相对较差。

为了全面测试待测组分的抑菌性, 另外选取了大肠杆菌(革兰氏阴性菌)作为测试菌种。由表 3 结果可知, 合成产物虽对大肠杆菌表现出一定的抑菌能力, 但抑菌性弱于其对金黄色葡萄球菌的效果。其中, 0.01 mg 油酸酰酪氨酸甲酯具有最强的抑菌性(菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.8×10^7 CFU/mL), 与月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐效果相当(菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 2.4×10^7 CFU/mL), 而其他 6 种产物的抑菌效果较弱可能是细菌的细胞结构差异导致的。RODRIGUEZ 等^[24]曾通过细胞壁结构的影响来探究

月桂酸精氨酸乙酯盐酸盐分别对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性区别, 发现细胞壁在抗菌剂影响下的破损程度不同导致最终抗菌效果的差异。金黄色葡萄球菌仅有单层细胞壁, 且细胞壁的组成包括肽聚糖、磷酸酯和多糖等。而大肠杆菌则为多层细胞壁结构, 且不含磷酸酯与多糖, 抑菌组分难以进入细胞内进行反应, 而油酸酰酪氨酸甲酯上带有的酚羟基结构有利于其对细胞壁的渗透作用^[25]。因此增强了其对大肠杆菌的抗菌性, 使其菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.8×10^7 CFU/mL。

表 3 脂肪酰氨基酸酯加入后菌液的 OD₆₀₀ 值及菌数
Table 3 OD₆₀₀ value and bacterial count of bacterial solution after adding fatty acyl amino acid esters

| | 空白 对照组 | 油酸酰丙 氨酸乙酯 | 油酸酰甘 氨酸乙酯 | 油酸酰蛋 氨酸甲酯 | 油酸酰亮 氨酸乙酯 | 油酸酰酪 氨酸甲酯 | 十二烷二酸酰 丙氨酸乙酯 | 十二烷二酸酰 甘氨酸乙酯 | 月桂酰精氨酸 乙酯盐酸盐 |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 金黄色葡萄球 菌 OD ₆₀₀ 值 | 1.251 | 0.013 | 0.014 | 0.021 | 0.008 | 0.023 | 0.045 | 0.041 | 0.005 |
| 金黄色葡萄球菌 菌数/(CFU/mL) | 2.0×10^9 | 1.8×10^7 | 1.9×10^7 | 2.4×10^7 | 1.4×10^7 | 2.6×10^7 | 4.2×10^7 | 3.9×10^7 | 1.2×10^7 |
| 大肠杆菌 OD ₆₀₀ 值 | 0.975 | 0.089 | 0.101 | 0.096 | 0.085 | 0.020 | 0.155 | 0.111 | 0.029 |
| 大肠杆菌菌数/ (CFU/mL) | 2.0×10^9 | 6.7×10^7 | 7.7×10^7 | 7.3×10^7 | 6.3×10^7 | 1.8×10^7 | 1.3×10^8 | 1.0×10^8 | 2.4×10^7 |

3 结论

通过 EDC·HCl/HOBt 催化的酰胺反应成功合成了 7 种脂肪酰氨基酸酯, 收率均 >75%。所合成的脂肪酰氨基酸酯的初始热分解温度均高于商业化产品月桂酸精氨酸乙酯盐酸盐, 热稳定性相对较优。所合成产物为油性, 但同时可在水中分散, 这种两亲性使它们可兼容地用作水性或油性涂料的添加剂。7 种脂肪酰氨基酸酯均能有效地抑制金黄色葡萄球菌的生长, 在 0.01 mg 油酸酰亮氨酸乙酯的作用下菌数可由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.4×10^7 CFU/mL。油酸酰酪氨酸甲酯因酚羟基的作用, 对大肠杆菌有较强的抑制性, 0.01 mg 该物质即可使其菌数由 2.0×10^9 CFU/mL 降至 1.8×10^7 CFU/mL, 而其余产物对大肠杆菌的抗菌性相对较弱。所合成的脂肪酰氨基酸酯由于具有较优的热稳定性和水油兼容性, 在涂料及日化品的抑菌上具有广泛的应用前景。其合成原料绿色环保, 在食品和日化行业的抑菌上具有应用前景。

参考文献:

- [1] SONG X J (宋雪健), ZHANG D J (张东杰), WANG H J (王洪江), *et al.* Application and research progress of natamycin in food[J]. Storage and Process (保鲜与加工), 2017, 17(5): 129-135.
- [2] WANG J C (王建超), YI G B (易国斌). Preparation and application of nano silver cosmetic antibacterial agent[J]. Applied Chemical Industry (应用化工), 2018, 47(10): 2094-2102.
- [3] ARROYO B J, BEZERRA A C, OLIVEIRA L L, *et al.* Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.)[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125566-125586.
- [4] GIBBONS E N, WINDER C, BARRON E, *et al.* Layer by layer antimicrobial coatings based on nafion, lysozyme, and chitosan[J]. Nanomaterials, 2019, 9(11): 1563-1574.
- [5] AMARAL L F B, MORIEL P, FOGLIO M A, *et al.* Caryocar brasiliense supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14(1): 73-80.
- [6] TAN J H, KUANG H X, WANG C C, *et al.* Human exposure and health risk assessment of an increasingly used antibacterial alternative in personal care products: Chloroxylenol[J]. Science of the Total Environment, 2021, 786: 147524-147535.
- [7] DING H (丁慧), JIANG Y J (姜亚洁), WANG Y K (王亚魁), *et al.* Synthesis and properties of Gemini quaternary ammonium salts containing organic counter ions[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(1): 114-120.
- [8] WU Q (吴淇), ZOU L H (邹亮华), HU X Y (胡学一), *et al.* synthesis of cannabinoid derivatives and their antioxidation and antimicrobial properties[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(3): 584-591.
- [9] NAKATA K, TSUCHIDO T, MATSUMURA Y. Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in *Escherichia coli* cells[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 110: 568-579.
- [10] KIM Y S, KIM H W, LEE S H, *et al.* Preparation of alginate-quaternary ammonium complex beads and evaluation of their antimicrobial activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41: 36-41.
- [11] NAGAMUNE H, MAEDA T, OHKURA K, *et al.* Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells[J]. Toxicology in Vitro, 2000, 14: 139-147.
- [12] HUANG C L, MIR G M, YE H J Z. Comparative distribution, excretion and metabolism of ¹⁴C-labeled quaternary ammonium salt of perphenazine in rats[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1970,

- 59(7): 976-979.
- [13] DIZMAN B, ELASRI M O, MATHIAS L J. Synthesis and antimicrobial activities of new water soluble bis-quaternary ammonium methacrylate polymers[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 94: 635-642.
- [14] YANG Q L (杨巧丽). Study on fatty acid composition, antibacterial and antioxidant test of crude extract of Eucalyptus leaves[D]. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology (中南林业科技大学), 2013.
- [15] KITAHARA T, KOYAMA N, MATSUDA J, *et al.* Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(9): 1321-1326.
- [16] LIU M (刘敏). Study on extraction, content determination and antibacterial activity of fatty acids from cereal worm[D]. Dalian: Liaoning Normal University (辽宁师范大学), 2017.
- [17] ZHANG H, ZHANG L, PENG L J, *et al.* Quantitative structure-activity relationships of antimicrobial fatty acids and derivatives against *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2012, 13(2): 83-93.
- [18] ISMAIL A, KTARI L, BEN R R Y, *et al.* Antimicrobial fatty acids from green alga *Ulva rigida* (Chlorophyta)[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 1-12.
- [19] WU Y (吴颖), LIU Q (刘晴), TANG W (唐文), *et al.* Application of *Salvia miltiorrhiza* oil and dandelion extract in cosmetics industry[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(3): 562-568.
- [20] DESBOIS A P, SMITH V J. Antibacterial free fatty acid: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85: 1629-1642.
- [21] MA Q M, DAVIDSON P M, ZHONG Q X. Nanoemulsions of thymol and eugenol co-emulsified by lauric arginate and lecithin[J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 167-173.
- [22] MA Q M, DAVIDSON P M, ZHONG Q X. Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166: 77-84.
- [23] WEI Q Y, JIANG H, ZHANG J X, *et al.* Synthesis of *N*-hydroxycinnamoylamino acid ester analogues and their free radical scavenging and antioxidative activities[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, 21(8): 1905-1911.
- [24] RODRIGUEZ E, SEGUER J, ROCABAYERA X, *et al.* Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, *N*-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96: 903-912.
- [25] NGO H, WAGNER K, YAN Z C, *et al.* Synthesis and anti-*Listeria* properties of odorless hybrid bio-based *n*-phenolic vegetable branched-chain fatty acids[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2019, 96(10): 1093-1101.

(上接第 329 页)

- [12] CHARLES M A, FANSKA R, SCHMID F G, *et al.* Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release[J]. *Science*, 1973, 179(4073): 569-571.
- [13] BLOXHAM D P, KLAIPONGPAN A. The involvement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the translational control of protein synthesis[J]. *The International journal of Biochemistry*, 1979, 10(1): 1-5.
- [14] HANSSON V, SKÅLHEGG B S, TASKÉN K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 73(1/2): 81-92.
- [15] YAN K, GAO L N, CUI Y L, *et al.* The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 13(5): 3715-3723.
- [16] GAO Z Y, LEI W I, LEE L T O. The role of neuropeptide-stimulated cAMP-EPACs signalling in cancer cells[J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 311.
- [17] JENS K, STEPHEN K, FRANK S, *et al.* Bioactivatable derivatives of 8-substituted cAMP-analogues[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1997, 7(7): 945-948.
- [18] WU Q, WANG L, YU H J, *et al.* Organization of glucose-responsive systems and their properties[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(12): 7855-7875.
- [19] WU S S, HUANG X, DU X Z. Glucose- and pH-responsive controlled release of cargo from protein-gated carbohydrate-functionalized mesoporous silica nanocontainers[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(21): 5580-5584.
- [20] BAPAT A P, ROY D, SUMERLIN B S. Dynamic-covalent macromolecular stars with boronic ester linkages[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(49): 19832-19838.
- [21] SLOWING I I, TREWYN B G, LIN V S Y. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(28): 8845-8849.
- [22] YANG J, TU J, LAMERS G E M, *et al.* Membrane fusion mediated intracellular delivery of lipid bilayer coated mesoporous silica nanoparticles[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(20): 1700759.
- [23] CAI Y (蔡悦), ZHENG S Y (郑斯尹), HU Y (胡艳), *et al.* Preparation and adsorption behavior of mesoporous silica MCM-41 derived from organo-silicone waste residue[J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society (硅酸盐学报)*, 2021, 49(7): 1412-1419.
- [24] CHEN H S (陈和生), SUN Z Y (孙振亚), SHAO J C (邵景昌). Investigate on FTIR spectroscopy for eight different sources of SiO₂[J]. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society (硅酸盐通报)*, 2011, 30(4): 934-937.
- [25] YUAN L (袁丽). Preparation of stimuli-responsive nanomaterials and their application in controlled drug delivery[D]. Shanghai: Fudan University (复旦大学), 2013.
- [26] PHILLIPS M D, JAMES T D. Boronic acid based modular fluorescent sensors for glucose[J]. *Journal of Fluorescence*, 2004, 14(5): 549-559.
- [27] SPRINGSTEEN G, WANG B H. A detailed examination of boronic acid-diol complexation[J]. *Tetrahedron*, 2002, 58(26): 5291-5300.
- [28] ZHAO Y N, TREWYN B G, SLOWING I I, *et al.* Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(24): 8398-8400.
- [29] FANG H, KAUR G, WANG B H. Progress in boronic acid-based fluorescent glucose sensors[J]. *Journal of Fluorescence*, 2004, 14(5): 481-489.
- [30] DAIJRO S, KAZUNORI K, YOSHIYUKI K, *et al.* A self-regulated insulin delivery system using boronic acid gel[J]. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 1994, 5(3): 311-314.
- [31] ZHENG Y Z (郑亚珍). Investigation on nano mesoporous silica based glucose-responsive insulin delivery system[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University (郑州大学), 2018.
- [32] MATSUMOTO A, IKEDA S, HARADA A, *et al.* Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(5): 1410-1416.
- [33] SUCKALE J, SOLIMENA M. Pancreas islets in metabolic signaling-focus on the beta-cell[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2008, 13(18): 7156-7171.
- [34] RADU D R, LAI C Y, JEFTINIJA K, *et al.* A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(41): 13216-13217.