

壳聚糖喹诺酮类衍生物的制备及生物活性研究

计雨婷^{1,2}, 王林卿^{1,2}, 陈秋红¹, 董方¹, 孙明志³, 唐红霞³, 郭占勇^{1*}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 烟台富慧农业科技有 限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 喹诺酮类抗生素是一类新合成的抗菌药, 其母核结构上的游离羧基可为多种反应提供位点。通过对羧基修饰, 接枝壳聚糖, 得到一系列喹诺酮壳聚糖类衍生物和酰化衍生物。利用红外光谱、核磁共振氢谱及氟谱对衍生物进行结构表征, 并对合成的衍生物进行抑菌活性分析和细胞毒性检测。结果表明, 相较于壳聚糖, 所合成的壳聚糖喹诺酮类衍生物的抑菌活性显著提升。其中, 环丙沙星壳聚糖盐与原料环丙沙星抑菌效果相近, 对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)为 $0.122\ 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最小杀菌浓度(MBC)为 $0.122\ 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 $0.488\ 3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MBC 为 $1.953\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时, 相较于喹诺酮, 所合成的壳聚糖喹诺酮类衍生物的细胞毒性明显降低。除喹诺酮壳聚糖类衍生物在最大测试浓度($1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)下处理的细胞存活率低于 80%, 其他测试浓度下所有衍生物均表现出低细胞毒或无毒。因此, 壳聚糖结构的引入, 在降低喹诺酮细胞毒性的同时, 可使衍生物保持较高的抑菌活性, 壳聚糖喹诺酮类衍生物的合成对于喹诺酮类抗生素的后续研究开发及临床应用具有重要的理论意义与应用价值。

关键词: 壳聚糖衍生物; 喹诺酮; 抑菌活性; 细胞毒性

中图分类号: P745 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2024)11-0000-00

DOI: 10.11759/hyqx20240201001

抗生素(Antibiotic)是微生物的次级代谢产物, 根据其结构特点分为 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、大环内酯类、四环素类等^[1]。喹诺酮类抗生素(基本结构如图 1a)属合成类抗菌药, 发展至今已有 4 代。目前临床常用的为第 3 代和第 4 代, 即 3 位取代基为羧基、4 位酮羰基、6 位氟原子的氟喹诺酮类抗生素(基本结构如图 1b), 代表药物主要为左氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、加替沙星、莫西沙星等。喹诺酮母核结构中几乎所有位置都可以用各种取代基进行修饰, 1、5、7、8 位上可发生一些化学变化^[2], 从而产生具有不同理化性质、药代动力学和药理学的化合物。其中, 3 位游离羧基可为阴阳离子交换、酰化反应、酯化反应等反应提供活性位点。

喹诺酮类抗生素(Quinolones)抗菌谱广、抗菌效果强, 主要用于治疗尿路感染、眼科感染、胃肠道感染、皮肤和软组织感染等^[5]。随着喹诺酮药物活性范围的扩大及药代动力学的改善, 该类药 物逐渐成为处方最多的抗生素之一。然而, 喹诺酮抗生素的不当使用甚至滥用会造成一定毒性。研究表明, 喹诺酮药

物能渗透胎盘, 引起幼年动物关节病变^[3]; 喹诺酮类抗生素对兔腱细胞系表现出较强的毒性^[4]; 部分喹诺酮具有心脏毒性、肾毒性、神经系统毒性等^[5]。由于喹诺酮类抗生素对环境健康与安全影响, 开发新型喹诺酮类衍生物对于喹诺酮类抗生素的后续研究开发及临床应用具有重要的理论意义与应用价值。

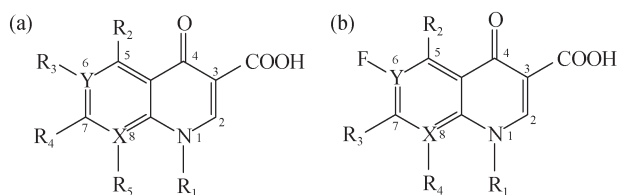


图 1 喹诺酮及氟喹诺酮类抗生素的基本结构

Fig. 1 Basic structures of quinolone and fluoro-quinolone drugs

收稿日期: 2024-02-01; 修回日期: 2024-04-08

基金项目: 2022 年度山东省中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2022007) [Foundation: 2022 Central Guiding Local Science and Technology Development Fund Project in Shandong Province, No. YDZX2022007]

作者简介: 计雨婷(1998—), 女, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 研究方向为海岸带生物资源化学与应用, E-mail: ytji@yic.ac.cn; 郭占勇(1978—), 通信作者, 男, 研究方向为海岸带生物资源化学与应用, E-mail: zyguo@yic.ac.cn

壳聚糖(chitosan, CS)是甲壳素的脱乙酰化产物,是自然界唯一的天然碱性多糖^[6-8],是由氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1, 4 糖苷键连接而成的聚合物。壳聚糖特殊的化学结构赋予了其独特的生物活性,如生物相容性^[9]、成膜性^[10]、吸附性^[11]、无毒性、抑菌活性^[12]、抗氧化活性^[13]、吸湿保湿活性等^[14]。凭借其优良性质,壳聚糖在生物医学、药物递送等方面被广泛应用^[15],在医药、农业、环境修复和纺织等领域占有重要地位。然而,壳

聚糖在水及有机溶剂中溶解性较差,极大地限制其应用和发展。为了解决这一问题,通常采用物理、化学和生物手段对壳聚糖进行改性。化学改性是一种常用方式,采用化学改性手段对壳聚糖进行衍生化修饰得到相应衍生物,可以提高壳聚糖的活性及溶解性^[16-18]。基于此,本文采用化学手段对壳聚糖结构中的氨基进行修饰,将喹诺酮结构接枝无毒的壳聚糖,以期得到低毒、高抑菌活性的衍生物。具体合成路线如图 2 所示。

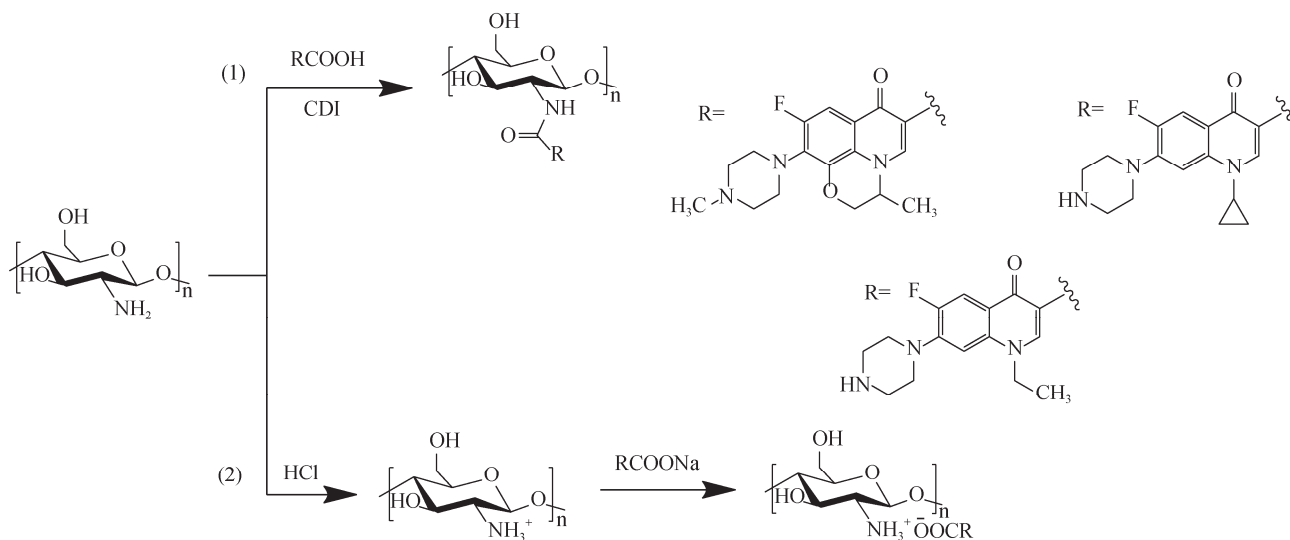


图 2 壳聚糖喹诺酮类衍生物的合成路线

Fig. 2 Scheme for the synthesis of quinolone-modified chitosan derivatives

1 实验部分

1.1 药品与试剂

壳聚糖(课题组降解得到,相对分子质量为 8 000 Da,脱乙酰度为 90%),左氧氟沙星水合物(LEV,纯度 98%)、环丙沙星(CIP,纯度 90%)及诺氟沙星(NOR,纯度 99%)购自上海源叶生物科技有限公司, N, N'-羰基二咪唑(CDI,分析纯)购自上海麦克林生化科技有限公司,氢氧化钠(分析纯)、盐酸(分析纯)、二甲亚砜(DMSO,分析纯)、无水乙醇(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司,大肠杆菌(CICC 23657)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)购自北京启迪利泰科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

DF-101S 型恒温水浴锅,郑州长城科工贸有限公司; MF-D105 型集热式磁力恒温搅拌器,郑州长城科工贸有限公司; Nicolet iS50 傅立叶变换红外光谱仪,美国赛默飞世尔科技公司; Burker 核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克拜厄斯宾有限公司; 冷冻干燥机,北

京博医康实验仪器有限公司; 酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司。

1.3 壳聚糖喹诺酮衍生物的合成

1.3.1 喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的制备

分别取 12.5 mmol 左氧氟沙星、环丙沙星及诺氟沙星固体,加入 12.5 mmol CDI 及 100 mL DMSO,水浴 60 °C 使固体溶解,活化 12 h。活化结束后,分别向烧瓶中加入 6.25 mmol 壳聚糖继续反应 12 h。反应结束,利用过量无水乙醇对溶液进行沉淀并洗涤、抽滤,最后经索式提取 48 h,在 -50 °C 下冷冻干燥 24 h 后即可得产物左氧氟沙星酰化壳聚糖衍生物(CS-LEV)、环丙沙星酰化壳聚糖衍生物(CS-CIP)及诺氟沙星酰化壳聚糖衍生物(CS-NOR)。

1.3.2 喹诺酮壳聚糖盐衍生物的制备

取 6.25 mmol 壳聚糖溶于 10 mL 去离子水,并向其中加入 6 mL 1 mol·L⁻¹ HCl,制备壳聚糖盐酸盐溶液,备用。另分别取 19.5 mmol 左氧氟沙星、环丙沙星及诺氟沙星固体于 30 mL 去离子水,并向其中加

入 19.5 mmol NaOH 使其溶解,待完全溶解后缓慢滴加至壳聚糖盐酸盐溶液中,室温下避光搅拌 12 h。反应结束后,将反应液转移至 100 g·mol⁻¹(截留分子量)透析袋中透析 48 h,在-50 °C 下冷冻干燥 48 h 后即可得产物左氧氟沙星壳聚糖盐(CSLEV)、环丙沙星壳聚糖盐(CSCIP)及诺氟沙星壳聚糖盐(CSNOR)。

1.4 红外光谱检测

室温下,采用 Nicolet iS50 傅立叶变换红外光谱仪进行分析:将待测化合物与 KBr 按照 1:100 质量比混合压片,在波数 4 000~400 cm⁻¹ 范围内进行扫描。

1.5 核磁共振氢谱检测

室温下,采用 Bruker AVIII-500 波谱仪进行 ¹H NMR 实验:将 15 mg 样品溶于 0.6 mL D₂O 或 DMSO-d₆,经过 0.22 μm 过滤器过滤后,转移至核磁管中进一步分析。

1.6 核磁共振氟谱检测

室温下,采用 Bruker AVIII-500 波谱仪进行 ¹⁹F NMR 实验:将 10 mg 产物及 2 mg 邻氟苯甲酸(内标物)溶于 0.6 mL DMSO-d₆,转移至核磁管中进一步分析。

1.7 取代度计算

通过核磁共振氟谱中样品信号和内标物信号峰面积比值,按下式计算取代度(Degree of substitution, *D_s*):

$$DS(\%) = \frac{(A_s / n_s) \times m_r}{(A_r / n_r) \times m_s} \times 100, \quad (1)$$

其中, *A_s* 为样品的信号峰面积, *n_s* 为样品的氟原子数, *m_r* 为内标物的质量, *A_r* 为内标物的信号峰面积, *n_r* 为内标物的氟原子数, *m_s* 为样品的质量。

1.8 抑菌活性测定

本文以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为供试菌种,测定壳聚糖喹诺酮类衍生物的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。抑菌实验测定参照 GB/T 40672-2021 方法^[19]并进行适当调整,具体操作如下:

(1)将供试菌种接种于液体培养基中,并在 37 °C、110 r/min 摇床中培养 18 h,菌液备用。

(2)样品灭菌后利用无菌水配成 16 mg·mL⁻¹ 的样本储备液。取 96 孔板,向第 1 列中分别加入 200 μL 样本储备液,并向其余孔中加入 100 μL 无菌水,采用梯度稀释法对样品溶液进行稀释。最后向每孔中加入 100 μL 对数生长期的菌液,控制样品的最终浓

度为 8×10³, 4×10³, 2×10³, 1×10³, 5×10², 2.5×10², 1.25×10², 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.976 6, 0.488 3, 0.244 1, 0.122 1, 0.061 04, 0.030 52, 0.015 26 μg·mL⁻¹。

(3)将 96 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。与空白对照组相比,若样品组明显无菌落呈清亮状态,该孔所对应的浓度即为该样品的 MIC。待 MIC 观察结束,吸取 96 孔板中细菌未生长的混合溶液 100 μL 于固体培养基上并涂布均匀,继续培养 24 h,若培养基上无明显菌落生长,该孔中溶液所对应的浓度即为该样品的 MBC,每个样品重复实验 3 次。

1.9 细胞毒性测定

本实验选取小鼠成纤维细胞系(L929)作为供试细胞株,利用 MTT 法测定 L929 细胞毒性,细胞毒性测定参照 AGYIN 等人^[20]、FAN 等人^[21]方法并进行适当调整。

将 L929 细胞复苏并传代培养后,取 100 μL 细胞液于 96 孔板中。待孔中细胞密度达 10⁵ 个/孔,取 100 μL 不同浓度样品(1 000 μg·mL⁻¹、500 μg·mL⁻¹、250 μg·mL⁻¹、125 μg·mL⁻¹、62.5 μg·mL⁻¹)加入 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。24 h 后弃去培养基,向每孔中加入 100 μL MTT 溶液(浓度为 0.5 mg·mL⁻¹),继续培养 4 h 后弃去 MTT 溶液,向每孔中加入 150 μL DMSO,震荡均匀后于波长 490 nm 处测量吸光度。实验空白组仅含完全培养基和 MTT 试剂,对照组中仅含 MTT 试剂和细胞,细胞存活率(Cell Viability, *C_v*)的计算公式如下:

$$Cv(\%) = \left(\frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100, \quad (2)$$

其中, *A_s* 为待测样品组的吸光度, *A_c* 为对照组的吸光度, *A_b* 为空白组的吸光度。

2 结果与分析

2.1 红外光谱分析

2.1.1 喹诺酮酰化壳聚糖衍生物红外光谱分析

图 3 是壳聚糖及喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的红外谱图。壳聚糖的光谱中,在 890 cm⁻¹ 附近出现了糖环内及糖环外 C-O-C 的弯曲振动峰,在 1 070 cm⁻¹ 附近出现了 C-O-C 的伸缩振动峰,1 030 cm⁻¹ 附近出现的吸收峰与壳聚糖 C3 位的-OH 伸缩振动有关,1 580 cm⁻¹ 处吸收峰与-NH₂ 的弯曲振动有关。当壳聚糖与喹诺酮类抗生素发生酰化反应后,壳聚糖结构中 1 580 cm⁻¹ 处的-NH₂ 吸收峰消失,出现了 1 660 cm⁻¹ 处新合成的酰胺键吸收峰^[22]。此外,在 1 620 cm⁻¹ 附近还出现了喹诺酮类抗生素结构中羰基

的伸缩振动峰, $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰与喹诺酮结构中 C-F 的伸缩振动有关^[23-24]。所有的喹诺酮壳聚糖盐衍生物在 $700\sim 900\ \text{cm}^{-1}$ 指纹区均出现了新的特征吸收峰, 与喹诺酮结构中苯环的 C-H 弯曲振动有关, 由此可以初步证明喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的成功制备。

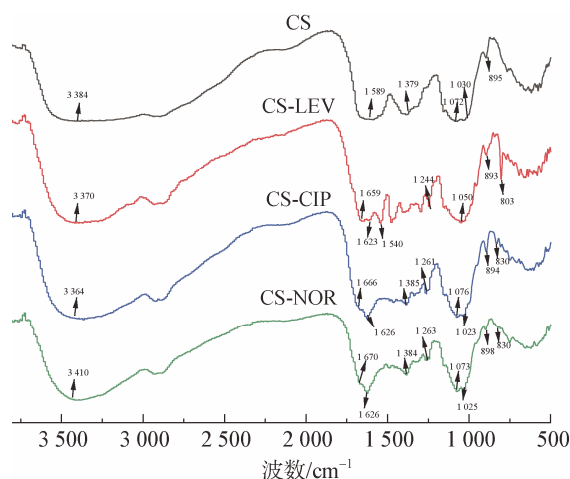


图3 壳聚糖及喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的红外谱图
Fig. 3 FT-IR spectra of chitosan and its derivatives

注: CS: 壳聚糖; CS-LEV: 左氧氟沙星酰化壳聚糖; CS-CIP: 环丙沙星酰化壳聚糖; CS-NOR: 诺氟沙星酰化壳聚糖

2.1.2 喹诺酮壳聚糖盐衍生物红外光谱分析

图4是壳聚糖及喹诺酮壳聚糖盐衍生物的红外谱图。与壳聚糖相比, 壳聚糖与喹诺酮阴阳离子结合后, 衍生物在 $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$ 出现的特征吸收峰与喹诺酮类抗生素结构中羰基的伸缩振动有关, $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰与喹诺酮类抗生素结构中 C-F 的伸缩振动有关^[23-24]。所有的喹诺酮壳聚糖盐衍生物在 $700\sim 900\ \text{cm}^{-1}$ 指纹区均出现了新的特征吸收峰, 可以归属为苯环的 C-H 弯曲振动特征吸收峰, 由此可以初步证明喹诺酮壳聚糖盐衍生物的成功制备。

2.2 核磁共振氢谱分析

2.2.1 喹诺酮酰化壳聚糖衍生物核磁共振氢谱分析

为进一步验证喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的成功合成, 测定了壳聚糖及衍生物的核磁共振氢谱, 结果如图5所示。其中, $\delta = 4.79$ 处代表溶剂 D_2O 的特征峰, $\delta = 2.5$ 处代表溶剂 DMSO-d_6 的特征峰, 壳聚糖各质子峰可归属如下: Ha: $\delta = 4.61$, Hb: $\delta = 3.08$, Hc-Hf: $\delta = 3.21\sim 4.08$ 。壳聚糖与喹诺酮类抗生素发生酰化反应后, 各衍生物在低场区 $\delta = 9.0$ 附近出现喹诺酮结构中吡啶环 2 位氢质子峰, 喹诺酮类抗生素结构中苯环 1 位氢质子峰的化学位移在 $\delta = 7.5\sim 8.0$

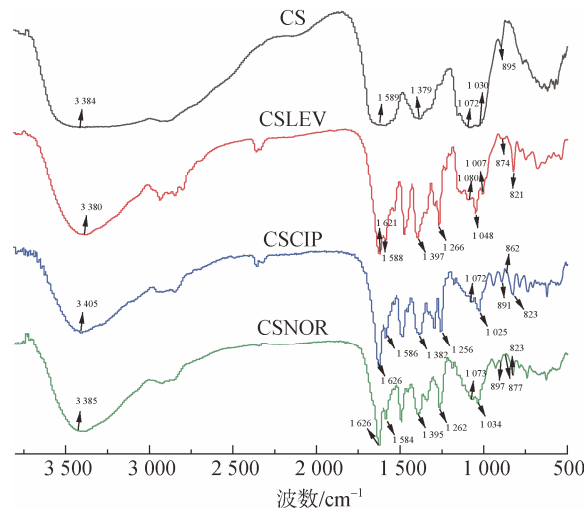


图4 壳聚糖及喹诺酮壳聚糖盐衍生物的红外谱图
Fig. 4 FT-IR spectra of chitosan and its derivatives

注: CS: 壳聚糖; CSLEV: 左氧氟沙星壳聚糖盐; CSCIP: 环丙沙星壳聚糖盐; CSNOR: 诺氟沙星壳聚糖盐

范围内, 哌嗪环上各氢质子峰出现在化学位移 $\delta = 2.0\sim 3.0$ 范围内。衍生物 CS-LEV 在 $\delta = 1.0\sim 2.0$ 范围出现左氧氟沙星结构中的甲基氢质子峰, 吗啉环上 3 位、5 位氢质子峰出现在 $\delta = 4.5$ 附近; 衍生物 CS-CIP 在 $\delta = 1.0\sim 1.5$ 范围内出现环丙基的各氢质子峰; 衍生物 CS-NOR 在 $\delta = 1.4$ 附近出现甲基的氢质子峰, 各衍生物的氢质子峰具体归属如图所示, 由此可以证明喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的成功合成^[25-27]。

2.2.2 喹诺酮壳聚糖盐衍生物核磁共振氢谱分析

为进一步验证喹诺酮壳聚糖盐衍生物的成功合成, 测定了壳聚糖及衍生物的核磁共振氢谱, 结果如图6所示。其中, $\delta = 4.79$ 处代表溶剂 D_2O 的特征峰, 壳聚糖各质子峰可归属如下: Ha: $\delta = 4.61$, Hb: $\delta = 3.08$, Hc-Hf: $\delta = 3.21\sim 4.08$ 。壳聚糖与喹诺酮类抗生素阴阳离子结合后, 在低场区 $\delta = 8.0\sim 8.5$ 范围内出现喹诺酮类抗生素结构中吡啶环 2 位氢质子峰, 喹诺酮类抗生素结构中苯环 1 位氢质子峰的化学位移在 $\delta = 7.0\sim 8.0$ 范围内, 哌嗪环上各氢质子峰出现在化学位移 $\delta = 2.0\sim 3.5$ 范围内。衍生物 CSLEV 在 $\delta = 1.0\sim 2.5$ 范围出现左氧氟沙星结构中的甲基氢质子峰, 吗啉环上 3 位、5 位氢质子峰出现在 $\delta = 4.5$ 附近; 衍生物 CSCIP 在 $\delta = 0.9\sim 1.5$ 范围内出现环丙基 5 位和 6 位氢质子峰, 4 位氢质子峰出现在 $\delta = 4.3$; 衍生物 CSNOR 在 $\delta = 1.0$ 附近出现甲基的氢质子峰。各衍生物的氢质子峰具体归属如图所示, 由此可以证明喹诺酮壳聚糖盐衍生物的成功合成^[25-27]。

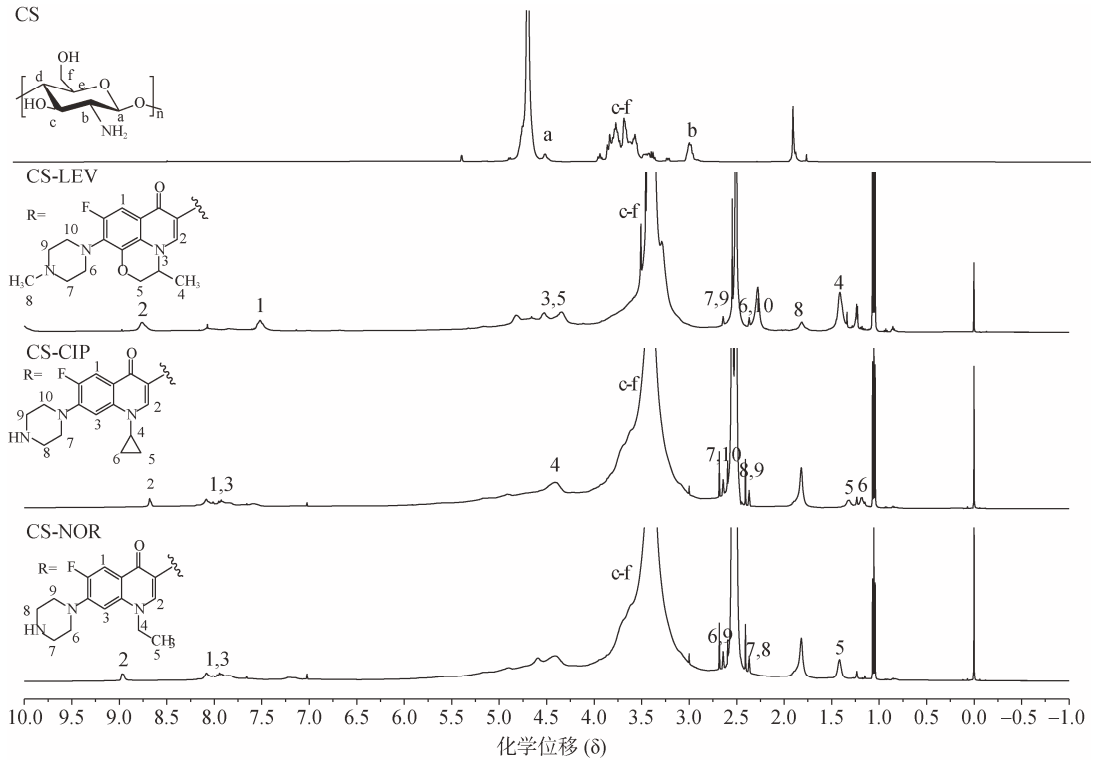


图 5 壳聚糖及喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的核磁共振氢谱

Fig. 5 ^1H NMR spectra of chitosan and its derivatives

注: CS: 壳聚糖; CS-LEV: 左氧氟沙星酰化壳聚糖; CS-CIP: 环丙沙星酰化壳聚糖; CS-NOR: 诺氟沙星酰化壳聚糖

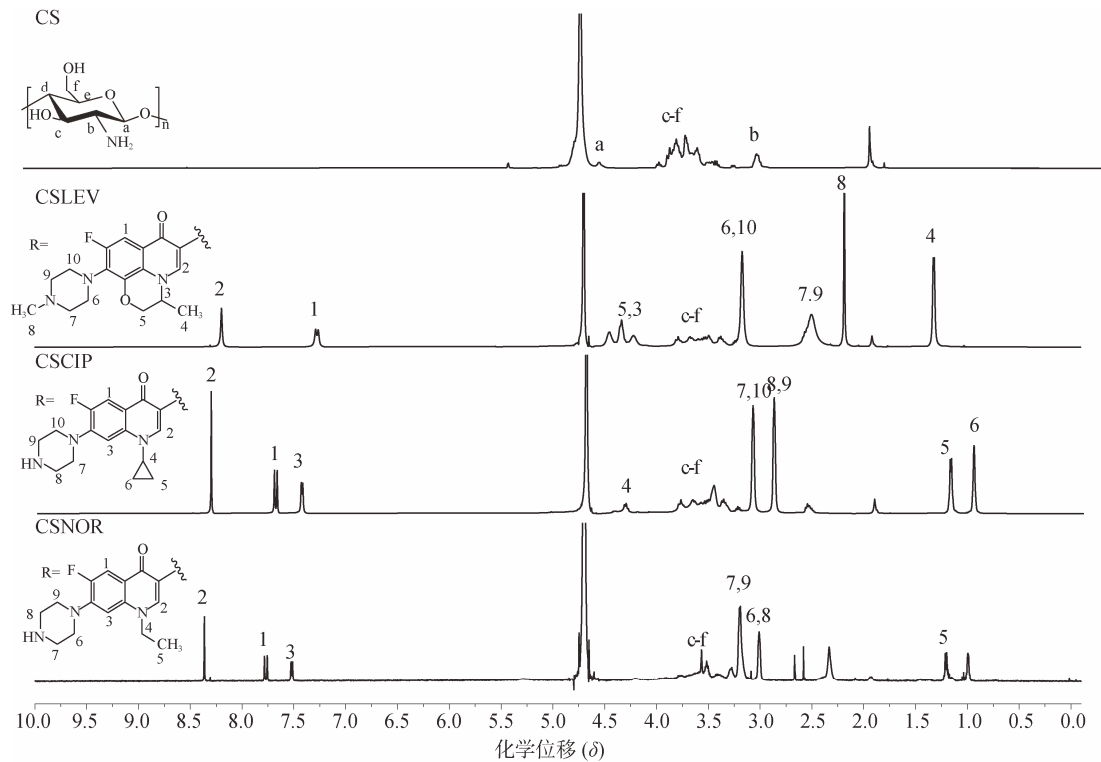


图 6 壳聚糖及喹诺酮壳聚糖盐衍生物的核磁共振氢谱

Fig. 6 ^1H NMR spectra of chitosan and its derivatives

注: CS: 壳聚糖; CSLEV: 左氧氟沙星壳聚糖盐; CSCIP: 环丙沙星壳聚糖盐; CSNOR: 诺氟沙星壳聚糖盐

2.3 核磁共振氟谱分析

2.3.1 喹诺酮酰化壳聚糖衍生物核磁共振氟谱分析

喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的核磁共振氟谱如图 7 所示。其中，内标物邻氟苯甲酸结构中氟原子的特

征吸收峰出现在 $\delta = -111$ 附近；CS-LEV 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -122.48$ ；CS-CIP 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -121.86$ ；CS-NOR 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -121.68$ [28-29]。

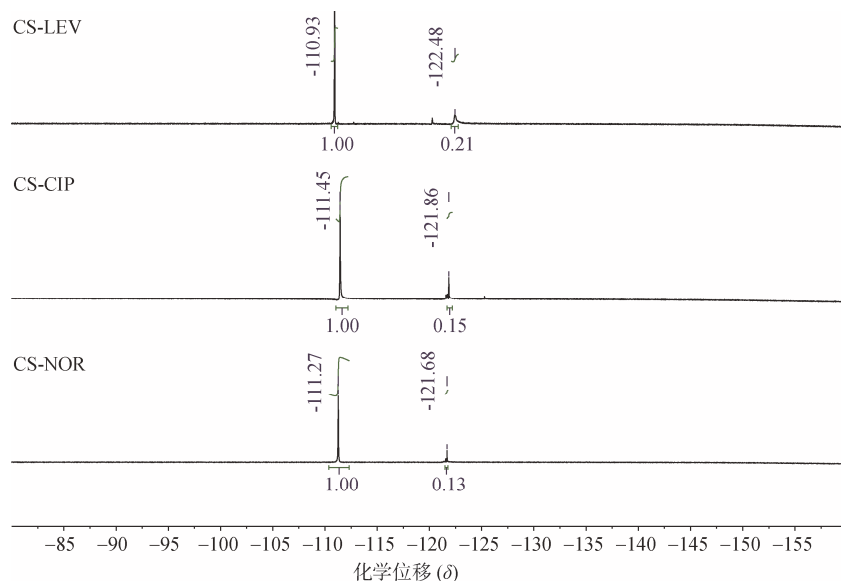


图 7 喹诺酮酰化壳聚糖衍生物的核磁共振氟谱

Fig. 7 ¹⁹F NMR spectra of chitosan derivatives

注：CS-LEV：左氧氟沙星酰化壳聚糖；CS-CIP：环丙沙星酰化壳聚糖；CS-NOR：诺氟沙星酰化壳聚糖

2.3.2 喹诺酮壳聚糖盐衍生物核磁共振氟谱分析

喹诺酮壳聚糖盐衍生物核磁共振氟谱如图 8 所示。其中，内标物邻氟苯甲酸结构中氟原子的特征吸收

峰出现在 $\delta = -116$ 附近；CSLEV 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -121.55$ ；CSCIP 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -124.60$ ；CSNOR 的氟原子特征峰出现在 $\delta = -124.31$ [28-29]。

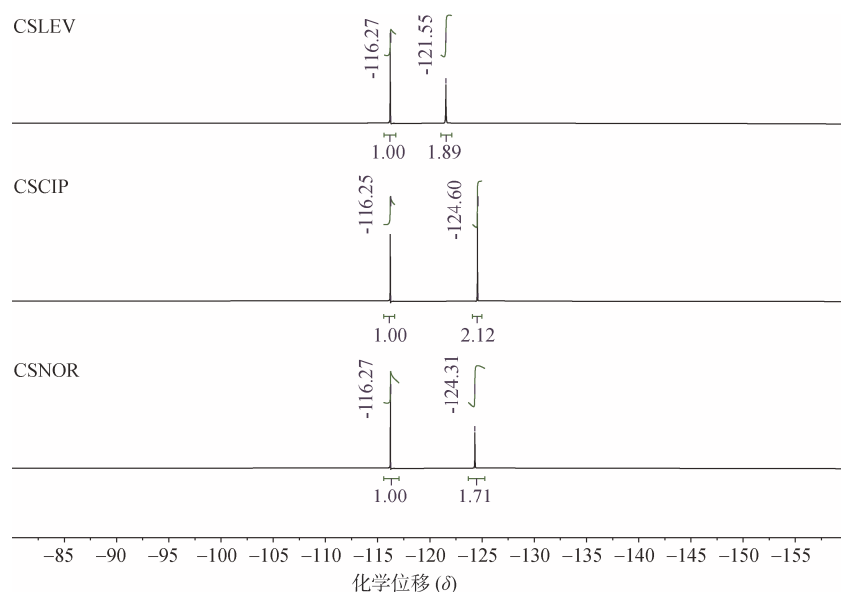


图 8 喹诺酮壳聚糖盐衍生物的核磁共振氟谱

Fig. 8 ¹⁹F NMR spectra of chitosan derivatives

注：CSLEV：左氧氟沙星壳聚糖盐；CSCIP：环丙沙星壳聚糖盐；CSNOR：诺氟沙星壳聚糖盐

2.4 取代度(DS)分析

本实验制得的壳聚糖喹诺酮类衍生物取代度如表 1 所示。结果表明, 同类化合物的取代度相近。酰化产物 CS-LEV、CS-CIP、CS-NOR 取代度低, 分别为 4.91%、2.50%、2.31%; 离子交换产物 CSLEV、CSCIP、CSNOR 取代度较高, 分别为 36.29%、36.66%、29.39%。

表 1 壳聚糖喹诺酮类衍生物取代度(Ds)

Tab. 1 D_s of chitosan derivatives modified with quinolones

样品	m _r /mg	m _s /mg	D _s /%
CS-LEV	2.50	10.70	4.91
CS-CIP	2.60	15.60	2.50
CS-NOR	2.40	13.50	2.31
CSLEV	2.40	12.50	36.29
CSCIP	2.30	13.30	36.66
CSNOR	2.20	12.80	29.39

注: CS-LEV: 左氧氟沙星酰化壳聚糖, CS-CIP: 环丙沙星酰化壳聚糖, CS-NOR: 诺氟沙星酰化壳聚糖, CSLEV: 左氧氟沙星壳聚糖盐, CSCIP: 环丙沙星壳聚糖盐, CSNOR: 诺氟沙星壳聚糖盐

2.5 抑菌活性分析

壳聚糖、喹诺酮及壳聚糖喹诺酮类衍生物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性如表 2 所示。

表 2 壳聚糖、喹诺酮及壳聚糖喹诺酮类衍生物的抑菌活性

Tab. 2 Antibacterial activity of chitosan, quinolones, and chitosan derivatives modified with quinolones

样品	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	最小杀菌浓度/(μg·mL ⁻¹)	最小抑菌浓度/(μg·mL ⁻¹)	最小抑菌浓度/(μg·mL ⁻¹)	最小杀菌浓度/(μg·mL ⁻¹)
CS	>8 000	>8 000	>8 000	>8 000
LEV	0.0610 4	0.0610 4	0.244 1	0.488 3
CIP	0.0305 2	0.0610 4	0.244 1	0.976 6
NOR	0.122 1	0.122 1	0.976 6	1.953
CS-LEV	3.906	7.813	7.813	15.63
CS-CIP	1.953	1.953	7.813	15.63
CS-NOR	15.63	15.63	62.50	125.0
CSLEV	0.244 1	0.244 1	0.488 3	0.976 6
CSCIP	0.122 1	0.122 1	0.488 3	1.953
CSNOR	0.488 3	0.976 6	1.953	3.906

注: CS: 壳聚糖, LEV: 左氧氟沙星, CIP: 环丙沙星, NOR: 诺氟沙星, CS-LEV: 左氧氟沙星酰化壳聚糖, CS-CIP: 环丙沙星酰化壳聚糖, CS-NOR: 诺氟沙星酰化壳聚糖, CSLEV: 左氧氟沙星壳聚糖盐, CSCIP: 环丙沙星壳聚糖盐, CSNOR: 诺氟沙星壳聚糖盐

3 结果与讨论

喹诺酮结构中, 1 位氮原子、3 位羧基、4 位酮羰基、6 位氟原子的引入可提升药物抑菌活性。喹诺酮的 3 位羧基和 4 位酮羰基以原核生物 DNA 回旋酶为

实验结果表明, 壳聚糖对两类细菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)均大于 8 000 μg·mL⁻¹。与壳聚糖原料相比, 壳聚糖喹诺酮类衍生物的抑菌活性明显提高。两个系列产物相比, 喹诺酮壳聚糖盐衍生物(CSLEV、CSCIP、CSNOR)的抑菌活性较高。其中, 环丙沙星壳聚糖盐衍生物与环丙沙星抑菌效果相似, 对大肠杆菌的 MIC 为 0.122 1 μg·mL⁻¹, MBC 为 0.122 1 μg·mL⁻¹, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.488 3 μg·mL⁻¹, MBC 为 1.953 μg·mL⁻¹。

2.6 细胞毒性分析

壳聚糖、喹诺酮及壳聚糖喹诺酮类衍生物的细胞毒性如图 9 所示。实验结果表明, 壳聚糖对细胞表现出无毒或低毒。与喹诺酮原料相比, 壳聚糖喹诺酮类衍生物处理的细胞存活率明显提升, 细胞毒性明显下降。两个系列产物中, 喹诺酮酰化壳聚糖类衍生物(CS-LEV, CS-CIP, CS-NOR)的细胞毒性较低, 在所有测试浓度下处理的细胞存活率均大于 80%, 表现为低细胞毒性或无毒。而喹诺酮壳聚糖盐衍生物(CSLEV, CSCIP, CSNOR)除最大测试浓度以外, 其他测试浓度下处理的细胞存活率均大于 80%, 表现为低细胞毒性或无毒, 相较于喹诺酮原料细胞毒性降低。

作用靶点, 通过抑制 DNA 回旋酶和拓扑异构酶抑制 DNA 的合成, 从而发挥抑菌和杀菌作用^[30]。这是喹诺酮具有抑菌活性的原因, 也是壳聚糖喹诺酮类衍生物具有抑菌活性的原因。然而, 研究表明多种喹诺酮药物与药物不良反应有关, 严重的甚至危及生命。

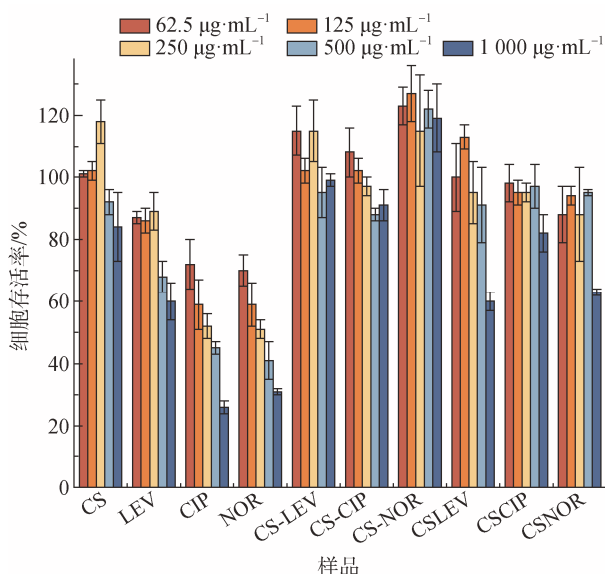


图9 壳聚糖、喹诺酮及壳聚糖喹诺酮类衍生物的细胞毒性
Fig. 9 Cytotoxicity of chitosan, quinolones, and chitosan derivatives modified with quinolones

注: CS: 壳聚糖, LEV: 左氧氟沙星, CIP: 环丙沙星, NOR: 诺氟沙星, CS-LEV: 左氧氟沙星酰化壳聚糖, CS-CIP: 环丙沙星酰化壳聚糖, CS-NOR: 诺氟沙星酰化壳聚糖, CSLEV: 左氧氟沙星壳聚糖盐, CSCIP: 环丙沙星壳聚糖盐, CSNOR: 诺氟沙星壳聚糖盐

包括左氧氟沙星在内的 12 种喹诺酮类药物会诱导斑马鱼心脏发育畸形^[31], 这可能与喹诺酮药物结构中的哌嗪环或 7 位甲基化有关; 另有研究表明左氧氟沙星和环丙沙星对兔腱细胞系具有严重的毒副作用, 这可能与细胞氧化应激后基因表达有关。壳聚糖是一种无毒的天然阳离子多糖, 具有良好的生物相容性, 在医药和农业领域具有广泛的应用前景。但壳聚糖的低溶解度和低生物活性, 限制了其在实际工业中的进一步应用。因此本文将喹诺酮类抗生素通过不同方式接枝壳聚糖, 从而使衍生物在细胞毒性降低的同时维持高抑菌活性。

本文选取左氧氟沙星、环丙沙星及诺氟沙星三类结构中含有羧基的喹诺酮类抗生素, 与壳聚糖通过阴阳离子交换、酰化反应进行接枝, 合成了 2 个系列、6 个壳聚糖喹诺酮类衍生物。通过傅立叶变换红外光谱、核磁共振氢谱及氟谱表征化合物的结构; 通过肉汤稀释法检测化合物的抑菌活性、MTT 法检测化合物的细胞毒性。实验表明, 合成的化合物抑菌活性显著高于壳聚糖, 喹诺酮壳聚糖盐衍生物的抑菌活性高于酰化反应产物。其中, 环丙沙星壳聚糖盐(CSCIP)的抑菌活性与环丙沙星相近。同时, 除部分样品在最大测试浓度下细胞存活率低于 80%, 其他

样品在各测试浓度下均表现为低毒或无毒。所有样品的细胞毒性相较于喹诺酮原料均明显降低。因此, 本文为延长喹诺酮类药物的临床使用时间提供了实验依据, 对喹诺酮药物后续的开发利用具有重要的理论意义和价值。

4 结论

本文基于阴阳离子结合和酰化反应原理, 将喹诺酮类抗生素经离子键和酰胺键接枝于壳聚糖分子链, 制备得到 6 种壳聚糖喹诺酮类衍生物。活性实验结果表明, 壳聚糖喹诺酮类衍生物抑菌活性相较于壳聚糖原料显著提高, 细胞毒性相较于喹诺酮类抗生素明显降低。其中, 喹诺酮壳聚糖盐衍生物的抑菌活性与喹诺酮类抗生素原料接近, 且细胞毒性相较于喹诺酮类抗生素明显下降, 在大部分测试浓度下表现出低细胞毒性或无毒性。

参考文献:

- [1] 许军, 严琳. 药物化学[M]. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 54-100.
- [2] DHIMAN P, ARORA N, THANIKACHALAM P V, et al. Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 92: 103291.
- [3] GIAMARELLOU H, KOLOKYTHAS E, PETRIKKOS G, et al. Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women[J]. *American Journal of Medicine*, 1989, 87(5A): 49-51.
- [4] POUZAUD F, BERNARD-BEAUBOIS K, THEVENIN M, et al. *In vitro* discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: Involvement of oxidative stress[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004, 308(1): 394-402.
- [5] 杨宝峰. 药理学 [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 395-400.
- [6] 谭文强. 基于“Click”反应的壳聚糖衍生物的制备及生物活性研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2018: 3.
TAN Wenqiang. Preparation of chitosan derivatives based on “click” reaction and their bioactivities[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Science, 2018: 3.
- [7] TAN H L, MA R, LIN C C, et al. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(1): 1854-1869.
- [8] GUARESTI O, GARCÍA-ASTRAIN C, PALOMARES T,

- et al. Synthesis and characterization of a biocompatible chitosan-based hydrogel cross-linked via 'click' chemistry for controlled drug release[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 1-9.
- [9] DEVI N, DUTTA J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 1897-1904.
- [10] ADIMCILAR V, KALAYCIOGLU Z, AKIN-EVINGUR G, et al. Comparative physical, antioxidant, and antimicrobial properties of films prepared by dissolving chitosan in bioactive vinegar varieties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 124735.
- [11] FAN M, Hu Q L. Superadsorption of LiOH solution on chitosan as a new type of solvent for chitosan by freezing/blasting[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(1): 430-435.
- [12] LI J H, ZHUANG S L. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives[J]. *European Polymer Journal*, 2020, 138: 109984.
- [13] 吴迪, 邹清河, 刘辉等. 羧甲基壳聚糖体外抗氧化作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(19): 1573-1576.
WU Di, ZOU Qinghe, LIU Hui, et al. Study on the antioxidant activity *in vitro* of carboxymethyl chitosan[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2013, 33(19): 1573-1576.
- [14] 宓英其. 不同阴离子化 2-羟丙基三甲基铵类壳聚糖的制备、活性及性能研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2019: 3.
MI Yingqi. Preparation, bioactivity and property of different anionic 2-hydroxypropyl trimethylammonium chitosan[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Science, 2019: 3.
- [15] THIRUPATHI K, RAORANE C J, RAMKUMAR V, et al. Update on chitosan-based hydrogels: preparation, characterization, and its antimicrobial and antibiofilm applications[J]. *Gels*, 2023, 9(1): 35.
- [16] 张晶晶. 壳聚糖脲类衍生物的制备及生物活性研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2020: 17.
ZHANG Jingjing. Preparation and bioactivities of chitosan derivatives bearing urea groups[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Science, 2020: 17.
- [17] OYERVIDES-MUÑOZ E, POLLET E, ULRICH G, et al. Original method for synthesis of chitosan-based antimicrobial agent by quaternary ammonium grafting[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 1922-1932.
- [18] BAZARGAN G, FISCHER S A, GUNLYCKE D. Effect of structure and hydration level on water diffusion in chitosan membranes[J]. *Macromolecular Theory and Simulations*, 2021, 30(4): 2000064.
- [19] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 临床实验室检验 抗菌剂敏感试验脱水 MH 琼脂和肉汤可接受批标准 GB/T 40672-2021[S]. 北京: 国家药监局, 2021.
- [20] AGYIN J K, SANTHAMMA B, NAIR H B, et al. BU-32: a novel proteasome inhibitor for breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2009, 11(5): R74.
- [21] FAN Z F, Wang Y D, Yang M L, et al. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities[J]. *Food Chemistry*, 2020, 318: 126512.
- [22] 吴风. 针对肿瘤标志物检测的多肽/聚集诱导发光共价探针在限域空间内的聚集行为研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2022: 119.
WU Feng. Aggregation behavior of peptide-conjugated aggregation-induced luminescent probes in confined space for sensing to tumor marker[D]. Wuhan: China University of Geoscience, 2022: 119.
- [23] 蔡婉玲. 绿色合成磁性纳米 Fe₃O₄ 及其复合材料在抗生素缓释中的应用[D]. 福州: 福建师范大学, 2021: 42.
CAI Wanling. The application of green synthesized magnetic nano-Fe₃O₄ and its composites for antibiotic releasing[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2021: 42.
- [24] SAGDINC S, BAYARI S. Spectroscopic studies on the interaction of ofloxacin with metals[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2004, 691(1/3): 107-113.
- [25] LI Y F, Zhou J H, Gu J X, et al. Enhanced antibacterial activity of levofloxacin/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex: *In vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2022, 215: 112514.
- [26] BABAILOV S P, ZAPOLOTSKY E N. ¹H and ¹⁹F NMR study of the processes of dissociation of complexes Tm³⁺ and Ho³⁺ with ciprofloxacin[J]. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2021, 245: 109776.
- [27] 李进霞. 黄芩有效活性成分与环糊精超分子体系的作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2009: 72-73.
LI Jinxia. Study on the interaction between the active component Scutellaria and Supramolecular cyclodextrins[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2009: 72-73.
- [28] 白洁. 核磁共振氟谱和气相色谱质谱联用技术在药品质量控制中的应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2019: 18.
BAI Jie. Application of ¹⁹F nuclear magnetic resonance and gas chromatography mass spectrometry in the quality control of drugs[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2019: 18.
- [29] FARDELLA G, BARBETTI P, CHIAPPINI I, et al. Quantitative analysis of fluoroquinolones by ¹H NMR and ¹⁹F NMR spectroscopy[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, 121(1): 123-127.
- [30] GADALI K E, MERIEM R, MANSOURI A E, et al. Synthesis, structural characterization and antibacterial activity

evaluation of novel quinolone-1, 2, 3-triazole-benzimidazole hybrids[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2023, 1282: 135179.

[31] HAN Y, Ma Y Y, Yao S C, et al. *In vivo* and *in silico*

evaluations of survival and cardiac developmental toxicity of quinolone antibiotics in zebrafish embryos (*Danio rerio*)[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 277: 116779.

Synthesis and biological activities of quinolone-modified chitosan derivatives

JI Yuting^{1, 2}, WANG Linqing^{1, 2}, CHEN Qihong¹, DONG Fang¹, SUN Mingzhi³, TANG Hongxia³, GUO Zhanyong¹

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yantai Fuhui Agricultural Technology Co., Ltd, Yantai 264003, China)

Received: Feb. 1, 2024

Key words: chitosan derivatives; quinolones; antibacterial activity; cytotoxicity

Abstract: Quinolones are synthetic antimicrobial agents with free carboxyl groups that can participate in multiple reactions. Herein, derivatives of quinolone-grafted chitosan were synthesized and characterized by FT-IR, ¹H NMR, and ¹⁹F NMR. The antibacterial and cytotoxic activities of the chitosan derivatives were ascertained. The antibacterial activities of the chitosan derivatives (CS-LEV, CS-CIP, CS-NOR, CSLEV, CSCIP, and CSNOR) considerably improved. Specifically, the MIC and MBC of CSCIP against *E. coli* and *S. aureus* were 0.1221, 0.4883, 0.1221, and 1.953 μg·mL⁻¹, respectively. This result indicated that the potency of CSCIP was similar to that of ciprofloxacin. Moreover, the cytotoxicity of the chitosan quinolone derivatives markedly diminished. Specifically, except for the influence of CSLEV, CSCIP, and CSNOR at the maximum tested concentration (1, 000 μg·mL⁻¹) on cell viability, which was <80%, all derivatives were low- or nonpoisonous. In conclusion, the addition of chitosan reduced cytotoxicity while maintaining the high antibacterial activity of chitosan derivatives. The preparation of chitosan quinolone derivatives for subsequent development and clinical research has crucial theoretical significance and application value.

(本文编辑: 杨 悦)