

# 对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性的定量构效关系探讨

邱松山, 姜翠翠, 周如金, 王登菊

(广东石油化工学院环境与生物工程学院, 广东茂名 525000)

**摘要:** 基于定量结构-活性关系(QSAR)研究对羟基苯甲酸酯类化合物性质具有重要意义。本文采用量子化学密度泛函理论(DFT)和逐步回归分析法研究了具有抗菌活性的11种对羟基苯甲酸酯类化合物的定量构效关系。在B3LYP/6-31G\*水平上计算了对羟基苯甲酸酯类化合物的相关量子化学参数,得到在最稳定构型下分子结构参数,通过多元逐步回归分析筛选出对羟基苯甲酸酯类化合物影响抗大肠杆菌活性的主要因素并建立定量构效关系方程,采用留一法分析模型的稳定性及预测能力。结果表明对羟基苯甲酸酯类化合物抗大肠杆菌活性与最低空轨道能量( $E_{LUMO}$ )及偶极距( $\mu$ )呈正相关关系, QSAR模型表明化合物的最低空轨道能量、偶极距和极化率是影响对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性的主要因素,  $E_{LUMO}$ 和 $\mu$ 越大,抗菌活性越大,所得QSAR模型对该类化合物抗菌活性有较好的预测效果。

**关键词:** 对羟基苯甲酸酯类化合物; 抗菌活性; 定量构效关系; 密度泛函理论

文章编号: 1673-9078(2014)6-98-102

## A QSAR Study on Antibacterial Activity of P-hydroxybenzoate Esters

QIU Song-shan, JIANG Cui-cui, ZHOU Ru-jin, WANG Deng-ju

(College of Environmental and Biotechnology Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China)

**Abstract:** The molecular structures of eleven kinds of p-hydroxybenzoate esters were optimized by using density functional theory (DFT) B3LYP method of quantum chemistry, and the quantitative structure-activity relationship (QSAR) of these compounds was studied. Stepwise multiple linear regression was used to select the descriptors and to generate the best prediction model that relates the structural features to inhibitory activity. The results suggested that  $E_{LUMO}$  and  $\mu$  had positive correlation on the activities of p-hydroxybenzoate esters, with correlation coefficient of 0.9910. The results showed that the lowest unoccupied molecular orbit  $E_{LUMO}$  and the increase of dipole moment  $\mu$  were the main independent factors contributing to the antifungal activity of the compounds. The antifungal activity increased with the increase of  $E_{LUMO}$  and  $\mu$ . The obtained QSAR model could provide theory reference to design p-hydroxybenzoate esters with stronger antibacterial activity.

**Key words:** p-hydroxybenzoate esters; antibacterial activity; structure-activity relationship

对羟基苯甲酸酯类化合物被广泛用于食品、饮料、化妆品、医药等许多方面,也可作为杀菌剂、有机溶剂及有机合成的中间体<sup>[1]</sup>,仅在化妆品行业全国每年的需求量就达50 t以上,其中对羟基苯甲酸乙酯、丙酯也是世界上用量较大的防腐剂,具有高效、低毒、易配伍等优点。对羟基苯甲酸酯类除对真菌有效外,由于它具有酚羟基结构而有杀菌活性,抗细菌性能比苯甲酸、山梨酸都强,并且对羟基苯甲酸酯类化合物的防腐效果不易随pH值的变化而变化。目前,工业

收稿日期: 2014-01-16

基金项目: 广东省高等学校高层次人才项目(911043); 茂名市科技计划项目(2011003); 广东省部产学研结合项目(2011B090400005)

作者简介: 邱松山(1978-),男,博士,讲师,研究方向: 食品加工与贮藏

通讯作者: 周如金(1965-),男,博士,教授,研究方向: 生物化工

上商品化应用的尼泊金酯类防腐剂从甲酯到辛酯,烃基碳链越大,菌体对酯的吸附量越大,对细菌的抑制作用也越好,毒性则与烷基链长成反比<sup>[2]</sup>。对羟基苯甲酸酯庚酯作为含酒精饮料的防腐剂具有用量小、防腐效果好、毒性小等优点。一般都是将几种酯混合在一起使用,不仅可以提高溶解度,还由于相互之间存在协同作用,防腐效果更好。对羟基苯甲酸酯类化合物中的一些短链酯(如甲酯、乙酯、丙酯与丁酯等)在国内应用比较普遍,而长链酯(如庚酯、辛酯、壬酯等)应用较少。

目前,定量结构-活性相关(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)研究发展迅速, QSAR研究从物质的结构出发,结合实验数据建立起化合物结构与活性/性质之间的二维或多维函数关系<sup>[3-4]</sup>,揭

示分子结构与其活性间的量变关系,宁正祥等<sup>[5]</sup>通过对苯甲酸、肉桂酸和苯甲醛进行 QSAR 研究,发现正辛醇-水分配系数能对这些物质的抗李斯特菌进行表征,所建立的方程拟合度较好。Karthikeyan 等<sup>[6]</sup>对添加剂的分子结构及抗菌活性间的定量关系进行了分析,初步探讨了分子结构与抗菌机理间的构效关系。于辉等<sup>[7]</sup>利用量子化学计算软件中的 DFT (密度泛函理论)法,在 B3LYP 水平下对山梨酸分子进行结构优化和频率计算,得到其 Mulliken 布局和前线分子轨道能量,所得 QSAR 方程具有较高的拟合度,回归性显著,预测能力强。王登菊等<sup>[8]</sup>测定了 12 种酯类化合物的定量结构色谱保留关系 (QSRR),初步分析了色谱保留机理。随着计算技术和量子理论的发展及计算机硬件性能的提高,量子化学的密度泛函理论在 QSAR 中的应用越来越广泛<sup>[9]</sup>,在 QSAR 模型中引入量子化学参数可增加对模型的解释,本文采用量子化学密度泛函理论 (DFT) 和逐步回归分析法对对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性的定量构效关系进行研究,在 B3LYP/6-31G\*水平上对其分子和相应的基团进行计算,运用量子化学 DFT 理论建立对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性相关的 QSAR 模型,得到在最稳定构型下分子结构参数与对羟基苯甲酸酯类化合物抗大肠杆菌活性间的构效关系,为预测结构相似化合物的抗菌活性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

722 型可见分光光度,上海精密科学仪器有限公司;LS-B50L-I 压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州净化设备有限公司;LRH-250 恒温培养箱,郑州南北仪器设备有限公司;PHS-3C 精密 pH 计,上海雷磁仪器厂。

牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂粉等为生化试剂;葡萄糖,氢氧化钠,乙醇等为分析纯试剂,所用水为去离子水,灭菌后使用。

### 1.2 抗菌活性测定

供试菌种:大肠杆菌 (*Echerichia coli* ATCC 8739):由广东石油化工学院生物教研室提供,接种至营养肉汤培养基,并在 37 °C 恒温培养至波长 560 nm 吸光度约 0.4,菌体数量约为  $10^5 \sim 10^6$  个/mL 的菌悬液供试。

培养基:牛肉膏 0.4 g/L,葡萄糖 1 g/L,蛋白胨 1 g/L,氯化钠 0.5 g/L,琼脂 1.5 g/L,加热溶于水使其

完全溶解,调 pH 至 7.2~7.5,121 °C 下灭菌 30 min,待用。

供试的 13 种对羟基苯甲酸酯类化合物如表 1 所示,对羟基苯甲酸酯类化合物先溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中,在强光下清澈透明即完全溶解,倍比稀释,加入到稀释好的菌悬液中,使之最终浓度为 1.0 g/L 溶液。

表 1 对羟基苯甲酸酯类化合物一览表

Table 1 Samples of p-hydroxybenzoate esters

No.	被测物	缩写	生产厂家
1	对羟基苯甲酸甲酯	M-p-HB	科密欧①
2	对羟基苯甲酸乙酯	E-p-HB	汕头西陇②
3	对羟基苯甲酸丙酯	P-p-HB	科密欧①
4	对羟基苯甲酸异丙酯	IP-p-HB	梯希爱⑤
5	对羟基苯甲酸丁酯	B-p-HB	科密欧①
6	对羟基苯甲酸异丁酯	IB-p-HB	进口④,下
7	对羟基苯甲酸正戊酯	A-p-HB	进口
8	对羟基苯甲酸异戊酯	IA-p-HB	进口
9	对羟基苯甲酸庚酯	H-p-HB	进口
10	对羟基苯甲酸正辛酯	O-p-HB	进口
11	对羟基苯甲酸异辛酯	IO-p-HB	进口
12	对羟基苯甲酸正壬酯	N-p-HB	进口
13	对羟基苯甲酸苄酯	Be-p-HB	进口

注:化合物纯度均 $\geq 99\%$ ;①天津市科密欧化学试剂有限公司,②汕头市西陇化工厂有限公司,③梯希爱化成工业发展有限公司,④进口试剂购于 Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.

抗菌半衰期  $t_{1/2}$ :按照参考文献<sup>[10]</sup>的方法测定,以对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌半衰期对数 ( $\log t_{1/2}$ ) 形式表示抗菌活性。

采用 Gaussian 09 量子化学程序包<sup>[11]</sup>中的密度泛函 B3LYP 方法,在 6-31G\*基组下优化 13 种对羟基苯甲酸酯类化合物的几何构型,并进行频率分析确认。为了检验模型的预测能力主,从 13 种化合物中抽取 2 个化合物作为检验样本,以其余的 11 种化合物作为训练样本进行定量构效关系研究。对羟基苯甲酸酯类化合物的抑菌活性主要是分子态起作用,且其分子内的羟基已经酯化,不再电离,因此选取主要反映分子整体特征结构的 7 个量子化学参数研究对羟基苯甲酸酯类化合物与受体之间的相互作用,如选取最高占据轨道能量  $E_{HOMO}$ 、最低空轨道能量  $E_{LUMO}$  及两者的绝对差值作为表征分子间相互作用的参数,选取衡量分子整体极性弱强的偶极矩( $\mu$ )、总能量  $E_T$ 、平均分子极化率 ( $p$ )、零点能 (ZPE) 等参数,算出各种量化参数,几何构型优化均收敛,经频率分析证实无虚频。对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌半衰期及其量子化学参数

见表2所示。

表2 B3LYP/6-31G\*下对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌活性及其量子化学参数

Table 2 The antibacterial activity of p-hydroxybenzoate esters and the quantum chemical parameters at the B3LYP/6-31G\*level

化合物	Log t <sub>1/2</sub>	ZPE/(kJ/mol)	E <sub>HOMO</sub> /eV	E <sub>LUMO</sub> /eV	ΔE/eV	E <sub>T</sub> /hartree	p	μ/D
M-p-HB	1.880	387.830	-0.24503	-0.05006	0.19497	-586.37	132.012	1.1489
E-p-HB	1.973	462.143	-0.24388	-0.04860	0.19532	-584.692	130.379	1.1643
P-p-HB	2.245	537.032	-0.24360	-0.0482	0.1954	-504.005	119.539	1.2516
IP-p-HB	2.193	535.235	-0.24325	-0.04748	0.19577	-506.019	120.335	1.2441
B-p-HB	1.789	611.274	-0.24343	-0.04798	0.19545	-653.319	149.936	1.1227
IB-p-HB	1.462	610.642	-0.24388	-0.04838	0.1955	-753.322	176.814	1.0980
A-p-HB	1.537	686.271	-0.24333	-0.04789	0.19544	-713.634	172.194	1.0770
IA-p-HB	1.447	685.585	-0.24342	-0.04795	0.19547	-812.635	178.229	1.0266
H-p-HB	1.447	836.017	-0.24327	-0.04777	0.1955	-812.262	178.578	1.0296
O-p-HB	1.599	911.180	-0.24324	-0.04772	0.19552	-748.578	174.759	1.0897
IO-p-HB	1.491	910.223	-0.2433	-0.04780	0.19550	-810.577	179.75	1.0991

## 2 结果与讨论

### 2.1 参数选择和相关性分析

选取11种对羟基苯甲酸酯类化合物的log t<sub>1/2</sub>作为活性参数，应用SPSS软件相关分析化合物的抗菌活性log t<sub>1/2</sub>与量化计算得到的各个参数进行相关分析，见表3所示。

表3 对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌活性与量化指数的相关系数

Table 3 The correlation coefficients of p-hydroxybenzoate esters at the B3LYP/6-31G\*level

R	E <sub>T</sub>	ZPE	E <sub>HOMO</sub>	E <sub>LUMO</sub>	ΔE	μ	p
Log t <sub>1/2</sub>	0.974	-0.827	-0.146	-0.186	-0.058	0.956	-0.977

由表3可以看出，对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性与E<sub>T</sub>、E<sub>LUMO</sub>、E<sub>HOMO</sub>、μ、p、ZPE等的相关系数较大，与p成负相关，与偶极矩(μ)、总能量E<sub>T</sub>成正相关。

### 2.2 建立 QSAR 模型

应用SPSS软件统计程序，在95%置信区间内，通过逐步回归分析抗菌活性log t<sub>1/2</sub>和各量化参数，获得抗菌活性log t<sub>1/2</sub>和各量化参数之间的最佳相关方程。

$$\log t_{1/2} = 56.465 E_{LUMO} + 0.987\mu - 0.009p + 4.817$$

$$R = 0.996, R^2 = 0.991, R_a^2 = 0.988, F = 266.539, n = 11,$$

Sig.<0.000。

由该QSAR方程可知，所研究的对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌活性log t<sub>1/2</sub>与其结构参数E<sub>LUMO</sub>、μ、p之间存在着较高的线性关系。E<sub>LUMO</sub>和μ越大，log t<sub>1/2</sub>也越大，相关系数R=0.996，表明该模型能较好的预测对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌活性。

### 2.3 分子电性对活性的影响

研究表明化合物的抗菌活性很大程度上受分子前线轨道能量的影响<sup>[12-13]</sup>，分子前线轨道理论指出反应物的HOMO和LUMO之间的相互作用形成了过渡态，E<sub>HOMO</sub>和E<sub>LUMO</sub>是自由基反应进行的原动力，两者的能级差值反映了电子从HOMO向LUMO跃迁所需能量，E<sub>LUMO</sub>表示分子被亲核试剂进攻的难易程度，表明前线轨道对防腐剂抑菌活性有着十分重要的影响<sup>[14]</sup>，E<sub>HOMO</sub>能量越高、E<sub>LUMO</sub>能量越低，则前线轨道能差越小，抑菌活性越高；分子的极性(偶极矩)对化合物的很多理化性质也有较大影响，偶极矩越大，分子的极性越强。对羟基苯甲酸酯类物质的防腐机理主要是通过破坏微生物的细胞膜使细胞内的蛋白质变性，并抑制细胞的呼吸酶系和电子传递酶系的活性，在整个过程中，电子转移起着比较重要的作用。化合物中体现强抗菌活性的反应活性中心需具备一个结构条件，即由电子容纳中心和电子供给中心组成的电子中继系统，如醛基、羧基和醇基等。负电中心原子(醇基氧或醛基氧原子)在亲核反应中供给电子的能力越高，正电中心原子(醇基碳或羧基碳原子)在亲电反应中容纳电子的能力越高，则化合物的抑菌活性越强<sup>[3]</sup>。由所建立的QSAR方程可知对羟基苯甲酸酯类化合物的抗菌活性与分子的偶极矩和E<sub>LUMO</sub>呈正相关性，结果提示在对羟基苯甲酸酯类物质的骨架引入极性供电子基对分子发挥抗菌作用是有利的，这为更具抗菌活性新化合物的设计提供依据。

### 2.4 QSAR 模型的检验

模型的优劣可根据统计学原理考察模型所选变量

之间的相关性反映, 图1和图2列出所检验对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性 $\log t_{1/2}$ 理论值与实验值的散点图及残差值。由图1、图2可知化合物 $\log t_{1/2}$ 理论值与实验值的相关性良好, 且其残差值以0为中心, 呈正态分布, 其变化范围为-2.0~2.0。

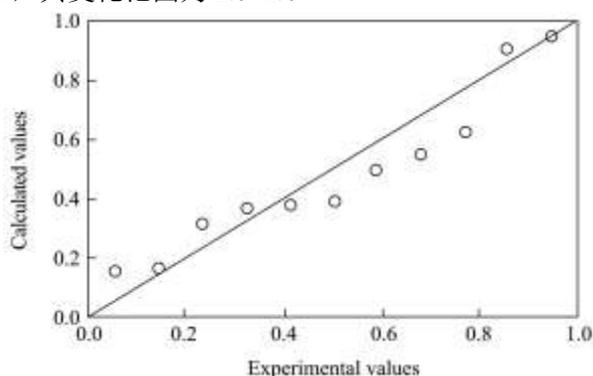


图1  $\log t_{1/2}$ 理论值与实验值的散点图

Fig.1 The scatter graph of experimental and calculated at the B3LYP/6-31G\*level

此外用方差膨胀因子(varianceinflation factors, VIF)<sup>[17]</sup>评价 QSAR 模型中各自变量的共线性, 结构参数 ELUMO、 $\mu$ 、 $p$  的平均 VIF 为 3.495, 表明样本自

表4 根据模型计算所得数据和残差表

Table 4 The residuals of QSAR model at the B3LYP method

Compounds	ELUMO/eV	$\mu$ /D	$p$	calculated	experimented	residuals
N-p-HB	-0.04770	1.1699	203.892	1.443	1.565	0.122
Be-p-HB	-0.04966	1.2605	174.276	1.689	1.462	-0.227

### 3 结论

3.1 在 B3LYP/6-31G\*水平上对具有抗菌活性的对羟基苯甲酸酯类化合物进行构型优化, 通过逐步多元回归分析, 筛选了影响抗大肠杆菌活性的主要参数, 建立对羟基苯甲酸酯类化合物抗大肠杆菌活性的 QSAR 方程:

$$\log t_{1/2} = 56.465 E_{LUMO} + 0.987\mu - 0.009p + 4.817$$

$$R^2 = 0.991, R_{adj}^2 = 0.988$$

3.2 对羟基苯甲酸酯类化合物抗大肠杆菌活性  $\log t_{1/2}$  与其结构参数 ELUMO、 $\mu$ 、 $p$  之间存在着较高的线性关系, ELUMO 和  $\mu$  越大,  $\log t_{1/2}$  也越大, 对该方程进行模型预测表明对羟基苯甲酸酯类化合物抗菌活性  $\log t_{1/2}$  理论值与实验值的相关性良好, 且其残差值以 0 为中心呈正态分布, 所得 QSAR 模型对该类化合物抗菌活性有较好的预测效果。

### 参考文献

[1] 陈建文, 厉华明, 周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法[J]. 中国酿造, 2008, 8: 4-5

变量共线性不高, 对回归模型结果的稳定性和可靠性影响较小, 相关参数的选取可靠。

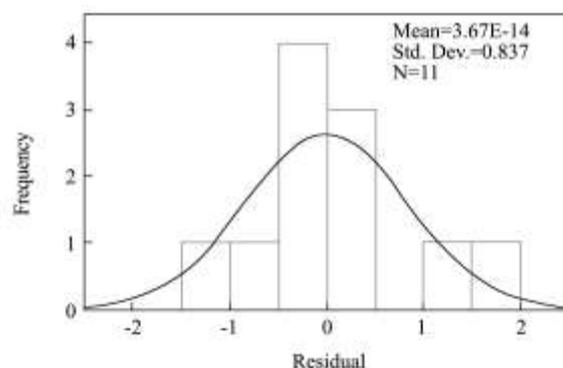


图2 对羟基苯甲酸酯类化合物  $\log t_{1/2}$  残差分布

Fig.2 Plot of residual values at the B3LYP/6-31G\*level

### 2.5 QSAR 模型的外部预测

选取所测 11 种以外的 2 种对羟基苯甲酸酯类化合物用于预测 QSAR 模型的外部,  $\log t_{1/2}$  测定方法与建模所测化合物方法相同, 分析计算值和测定值的残差, 如表 4 所示, 结果计算值与测定值基本符合。

CHEN Jian-wen, LI Hua-ming, ZHOU Rong-rong. Utilization and detection method of P-hydroxybenzoate in food-stuff [J]. China brewing, 2008, (8): 4-5

[2] 吴刚, 赵珊红, 吴俭俭, 等. 基于超高效液相色谱串联质谱法的纺织品中 7 种尼泊金酯类防腐剂测定[J]. 纺织学报, 2012, 33(1): 96-101

WU Gang, ZHAO Shan-hong, WU Jian-jian, et al. Determination of 7 nipagin esters in textiles by ultrahigh performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry [J]. Journal of textile research, 2012, 33(1): 96-101

[3] ALFONSO P G, ALIUSKA M H, FRANCISCO G R, et al. QSAR models to predict mutagenicity of acrylates, methacrylates and  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl compounds [J]. Dental materials, 2010, 26(5): 397-415

[4] YANG C, SHAO Y, ZHI X, et al. Semisynthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of some cholesterol-based hydrazone derivatives as insecticidal agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(17): 4806-4812

[5] 宁正祥, 谭龙飞, 张德聪, 等.  $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰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

- NING Zheng-xiang, TAN Long-fei, ZHANG De-cong, et al. Correlation between molecular structure and antibacterial activity of ethylenedi carboxylic acids and esters [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 1996, 13(1): 38-42
- [6] KARTHIKEYAN K, SIVAKUMAR P M, DOBLE M, et al. Synthesis, antibacterial activity evaluation and QSAR studies of novel dispiropyrolidines [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45(8): 3446-3452
- [7] 于辉. 食品防腐剂抑菌性能的量子化学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 104-108
- YU H. Quantum chemistry investigation into antimicrobial activity of food preservatives [J]. Food science, 2009, 30(2): 104-108
- [8] 王登菊, 郎春燕, 周如金, 等. 尼泊金酯色谱保留值与分子连接性指数定量关系研究[J]. 化学世界, 2012, 3: 139-142
- WANG Deng-ju, LANG Chun-yan, ZHOU Ru-jin, et al. Study on the quantitative relationship between chromatographic retention time and molecular connectivity index of parabens [J]. Chemical world, 2012, (3): 139-142
- [9] CLEITON A N, MATHEUS P F. aug-MIA-QSAR modeling of antimicrobial activities and design of multi-target anilide derivatives [J]. J Microbiol Methods, 2013, 94(3): 217-220
- [10] 周如金, 曾霞, 黄敏, 等. 含 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基结构化合物的定量结构-活性关系研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 128-132
- ZHOU Ru-jin, ZENG Xia, HUANG Min, et al. Study on quantitative structure-activity relationship of preservatives containing  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group [J]. Food Science, 2008, 29(8): 128-132
- [11] FRISCH M J, TRUCKS G W, SCHLEGEL H B, et al. Gaussian09, Revision B.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
- [12] GISSI A, NICOLOTTI O, CAROTTI A, et al. Integration of QSAR models for bioconcentration suitable for reach [J]. Sci. Total Environ., 2013, 456(1): 325-332
- [13] RIHAM F, GEORGE, NASSER S M, et al. Design, synthesis and QSAR studies of dispiroindole derivatives as new antiproliferative agents [J]. Eur. J. Med. Chem., 2013, 68(10): 339-351
- [14] MAREI G I K, RASOUL M A A, ABDELGALEIL S A M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012, 103(1): 56-61