

研究简报 ·

壳低聚糖十二烷基苯磺酸盐的制备及活性

张红星^{1,2} 袁会珠^{2*} 谭天伟¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 以壳低聚糖和十二烷基苯磺酸为原料, 反应合成了一种壳低聚糖的盐, 通过 ¹H-NMR、FT-IR 和 UV 光谱对产物进行了分析表征, 并测定了产物对 3 种植物病原真菌的抑制作用。结果表明, 产物是以盐的形式存在, 对植物病原真菌具有较好的抑制作用, 其 EC₅₀ 均远小于壳低聚糖。

关键词: 壳低聚糖; 十二烷基苯磺酸; 合成; 活性

中图分类号: O621.3

壳低聚糖是近年来国内外研究较多的一种寡聚糖, 在精细化工、生物医药、保健食品和农林畜牧等领域都具有广泛的用途^[1-3]。在农业领域内, 大多数研究者都认为壳低聚糖诱导了植株体内的生理变化, 或影响植株体内的防御酶活性变化^[4-5], 或改变植株光合作用率^[6], 或影响植株体内产生的单萜和倍半萜烯类挥发物^[7]等。壳低聚糖对植物病原真菌也有一定的直接抑制作用^[8], 但往往需要较高的浓度。笔者试图为改善壳低聚糖的生物活性开辟一种新的途径, 使得壳低聚糖既具有诱导保护作用, 又对植物病原真菌具有较好的直接抑制作用。这就要求目标衍生物既要保留壳低聚糖的诱导作用活性基团, 又要拥有对植物病原真菌具有直接抑制作用的活性基团。因此, 目标衍生物应该是一种壳低聚糖的盐。由于壳低聚糖的分子结构中含有可接受质子的基团 ($-NH_2$), 所以在理论上它能与某些酸发生成盐反应。本文选用对植物病原真菌具有抑制作用的十二烷基苯磺酸与壳低聚糖进行反应。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

壳低聚糖 (COS), 十二烷基苯磺酸 (LAS), 市售分析纯; 以 50% 多菌灵 WP (江苏省新沂农药有限公

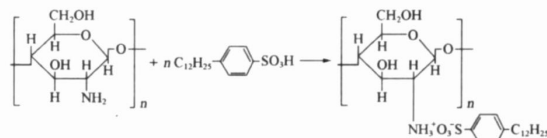
司) 为对照药剂。

黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea pers.*)、黄瓜立枯病菌 (*Rhizoctonia solani Kuhn*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum Schl.*), 均为中国农业科学院植物保护研究所农药使用技术组保存菌种。

Unity-200 MHz 非超导核磁谱仪, 美国 Varian 公司; IR-435 型傅里叶红外光谱仪, 日本岛津公司; UV-2100 分光光度计, 北京莱伯泰科有限公司。

1.2 壳低聚糖十二烷基苯磺酸盐的合成

称取 2 g 十二烷基苯磺酸, 加入盛有 20 mL 无水乙醇的烧杯中, 室温下搅拌, 使其充分溶解后, 加入过量壳低聚糖。将盛放反应液的烧杯置于恒温电热套上, 温度保持在 50 °C, 持续搅拌加热, 直到烧杯中剩余壳低聚糖再无明显溶解时, 停止加热。将烧杯中液体抽滤, 除去不溶解的物质。过滤后的液体用旋转蒸发器减压浓缩至剩余物质再无明显减少为止, 浓缩后的产物置于真空干燥箱中干燥, 在装有变色硅胶的干燥器中保存。产物为黑褐色膏状黏稠物质, 可溶于水、乙醇、三氯甲烷、二甲基亚砜等。反应方程式为



1.3 毒力实验

采用离体含毒介质法, 以蒸馏水为溶剂, 对每种植物病原真菌, 每个处理药剂设 5 个浓度级, 另外设 1 个无药处理为空白对照, 每个浓度设 3 个重复。待培养基凝固后, 在无菌条件下, 用接种针将预先用直径为 0.5 cm 的打孔器打好的菌饼放置在含药培

收稿日期: 2006-06-26

基金项目: 国家“973”计划 (2003CB114400); 中国石化集团科技开发部合作项目; 国家自然科学基金 (201010)

第一作者: 男, 1979 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: yuanhuizhu@mail.china.com

培养基上,菌丝一面向下。每个培养皿中央放一个菌饼,盖好并标记,置于培养箱中(23 ± 0.5),恒温培养。待空白对照菌落直径超过 5 cm 但未长至全皿时,采用十字交叉法测量菌落直径,与对照相比较按照下面的公式计算出抑制率

$$\text{生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

将生长抑制率转换成机率值(Y)、药剂浓度转换成对数值(X),作回归直线,求出毒力回归方程($Y = a + bX$)和线性相关系数(R^2),计算出 $Y = 5$ 时的 X 的反对数值,即为药剂对病菌在抑制率为 50% 时的浓度,也即有效中浓度,记作 EC_{50} , mg/L。

2 结果与讨论

2.1 壳低聚糖十二烷基苯磺酸盐的合成

图 1 是本实验中壳低聚糖和十二烷基苯磺酸反应的产物(L-C)的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。在产物的核磁测定过程中,用 TMS 作为内标,氘代二甲基亚砜作为溶剂。分析图 1 可知,A 区属于十二烷基苯磺酸的芳香基单元峰,B 区属于十二烷基苯磺酸的十二烷基长链的峰。C 区属于壳低聚糖糖单元峰。D 区的馒头状峰是产物的特征峰。说明壳低聚糖和十二烷基苯磺酸是以盐的形式结合。

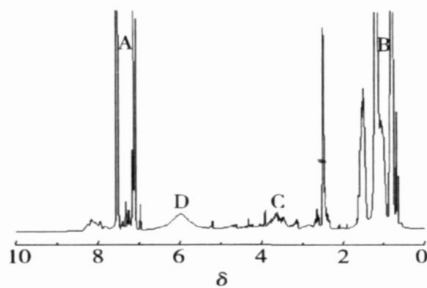


图 1 L-C 的核磁谱图

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L-C

图 2 是产物以三氯甲烷为溶剂,用液膜法绘出的红外光谱图。对图 2 进行分析可知,当壳低聚糖的氨基形成 $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_3^+$ 的伸缩带加上 $\text{O}-\text{H}$ 的吸收带会在 3500 cm^{-1} 和 2300 cm^{-1} 之间的区域有一宽而强的吸收峰。 $-\text{NH}_2$ 的变角振动峰出现在 1597 cm^{-1} 附近,而 $-\text{NH}_3^+$ 的对称变角振动峰出现在 1500 cm^{-1} 附近,此吸收峰较弱,可能是壳低聚糖在反应中过量,导致氨基只是部分质子化的原因。 800 cm^{-1} 和 900 cm^{-1} 之间的吸收峰为 $-\text{NH}_2$ 的振动吸收, 700 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 之间为糖单元环的呼吸

振动特征吸收。红外光谱分析显示,壳低聚糖与十二烷基苯磺酸是发生了成盐反应。

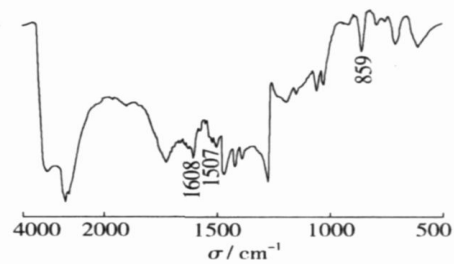


图 2 L-C 的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectrum of L-C

图 3 是壳低聚糖、十二烷基苯磺酸以及它们反应的产物以蒸馏水为溶剂的紫外可见光谱图。在紫外光谱图中,因壳低聚糖分子内无共轭双键,所以在可见和紫外光光谱范围内无明显吸收。由图可知,由于十二烷基苯磺酸的分子中含有芳香基团,它的吸收峰十分明显。产物和十二烷基苯磺酸的吸收光谱图基本一致,说明壳低聚糖和十二烷基苯磺酸的作用是以盐的形式结合,没有新的基团生成。

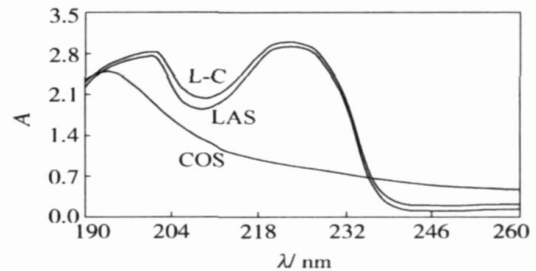


图 3 COS, LAS 及 L-C 的紫外光谱图

Fig. 3 UV spectra of COS, LAS and L-C

本实验中,单独将壳低聚糖置于无水乙醇中,温度保持在 50°C ,持续搅拌加热,壳低聚糖未见明显减少,说明壳低聚糖难溶于乙醇,这与魏新林^[9]等的研究相符合。结合实验现象,说明壳低聚糖与十二烷基苯磺酸的确发生了反应。再经 $^1\text{H-NMR}$ 、FT-IR 和 UV 等的谱图分析,验证了壳低聚糖和十二烷基苯磺酸发生的是成盐反应。

2.2 生物活性

实验研究了合成产物对 3 种植物病原真菌的室内毒力作用。结果表明,在实验浓度范围内,供试药剂对被测菌种均有显著的抑制作用,它们对被测菌种的抑制作用随着药剂浓度的升高而升高。对所得数据处理后,计算所得的毒力作用结果见表 1。

表 1 COS、LAS、L-C 和多菌灵对 3 种植物病原真菌的抑制毒力

Table 1 Suppressive toxicity of COS, LAS, L-C and carbendazol on three phytopathogens

供试药剂	供试菌种	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ / (mg/L)
L-C	黄瓜灰霉病菌	$y = 1.7714x + 2.4706$	0.9876	26.786
	黄瓜立枯病菌	$y = 2.5800x + 1.1664$	0.9529	30.612
	棉花枯萎病菌	$y = 2.2169x + 1.2753$	0.9586	47.878
LAS	黄瓜灰霉病菌	$y = 1.8259x + 2.2002$	0.9963	34.149
	黄瓜立枯病菌	$y = 2.6215x + 0.9943$	0.9738	33.730
	棉花枯萎病菌	$y = 2.4021x + 0.6937$	0.9407	62.047
COS	黄瓜灰霉病菌	$y = 1.9317x - 1.3471$	0.9836	1930.895
	黄瓜立枯病菌	$y = 1.3851x + 0.6056$	0.9624	1488.068
	棉花枯萎病菌	$y = 0.9477x + 1.2353$	0.9982	9385.548
多菌灵	黄瓜灰霉病菌	$y = 2.1298x + 6.6501$	0.8441	0.168
	黄瓜立枯病菌	$y = 2.0182x + 5.2919$	0.9446	0.717
	棉花枯萎病菌	$y = 1.6633x + 4.9867$	0.9826	1.019

从 EC₅₀ 比较可以看出,对于同一种植物病原真菌,壳低聚糖的十二烷基苯磺酸盐远小于壳低聚糖,相差达数 10 倍,甚至 100 倍以上;对于不同的植物病原真菌,壳低聚糖的十二烷基苯磺酸盐对黄瓜灰霉病的 EC₅₀ 最小。结果表明,壳低聚糖的十二烷基苯磺酸盐对植物病原真菌的生物活性十分显著的好于壳低聚糖,更加接近于对照药剂的生物活性。

参考文献:

- [1] MUZZARELLI R A A, PETER M G. Chitin and chitosan [M]. Lancaster, PA: Technomic Publishing, 1997.
- [2] PICART C, SCHNEIDER A, ETIENNE O, et al. Controlled degradability of polysaccharide multilayer films *in vitro* and *in vivo*[J]. *Advanced Functional Materials*, 2005, 15 (11): 1771 - 1780.
- [3] KUROIWA T, ICHIKAWA S, SATO S, et al. Physiological activities and efficient production processes of chitosan oligosaccharides [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 2005, 52 (7): 285 - 296.
- [4] WAJAHATULLAH K, BALAKRISHNAN P, DONALD L S. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(8): 859 - 863.
- [5] YUSUPOVA Z R, AKHMETOVA I E, Khairullin KHAIRULLIN R M, et al. The effect of chitooligosaccharides on hydrogen peroxide production and anionic peroxidase activity in wheat coleoptiles[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2005, 52(2): 209 - 212.
- [6] WAJAHATULLAH K, BALAKRISHNAN P, DONALD L S. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean [J]. *Photosynthetica*, 2002, 40(4): 621 - 624.
- [7] OBARA N, HASEGAWA M. Induced volatiles in elicitor-treated and rice blast fungus-inoculated rice leaves[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66 (12): 2549 - 2559.
- [8] 刘晓宇, 刘志恒, 吕淑霞. 壳寡糖对植物病原真菌的抑制作用[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(2): 225.
- [9] 魏新林, 夏文水. 甲壳低聚糖的理化性质研究[J]. *日用化学工业*, 2004, 34(3): 164 - 166.

Synthesis and toxicity testing on phytopathogens of the dodecylbenzenesulfonic salt of chitooligosaccharide

ZHANG HongXing^{1,2} YUAN HuiZhu² TAN TianWei¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Institute of Plant Protection, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: A derivative of chitooligosaccharide (COS) has been synthesized through the reaction of COS and dodecylbenzenesulfonic acid (LAS). The product (L-C) was characterized by ¹H-NMR, FT-IR and UV spectroscopy, and its toxicity on three phytopathogens was also tested. The results demonstrated that the product salt, has a satisfactory inhibition effect on the phytopathogens, with EC₅₀ values for the three phytopathogens far lower than those with COS itself.

Key words: chitooligosaccharide; dodecylbenzenesulfonic acid; synthesis; activity