抑菌型 Fischer 卡宾类一氧化碳缓释分子

周玲玲^a 周亚青^a 唐艳丽^a 杨科武^b 张雷^c 高玲香^a
 张国防^a 高子伟^{*,a} 张伟强^{*,a}

(^a 陕西师范大学化学化工学院 西安 710062)

(^b 西北大学材料与化学科学学院 西安 710069)

(^c 解放军第二医科大学上海长征医院 上海 200000)

摘要 过渡金属羰基化合物类一氧化碳释放分子(CORMs)的设计是当下无机化学、生物医学、材料化学等多学科交叉的热点。针对现有先导结构传输效率低、水溶性差的关键问题,发展了一类离子型 Fischer 卡宾类 CORM 先导结构 $[(CO)_5ML]^-$ 的化合物 Fc-CORMs, 其中五羰基卡宾阴离子单元可水解缓释一氧化碳, 季铵盐阳离子有效调节 CORM 水溶性。肌红蛋白测试表明, 每分子 Fc-CORM 可以在体外生理环境下至少缓释两分子 CO。动力学分析显示, Fc-CORM 释放速度取决于中心金属的种类, Fc-CORM-Mo (**2a~2e**) 释放速度大于 Fc-CORM-Cr (**1a~1e**), 且远大于 Fc-CORM-W (**3a~3e**)。抗菌实验发现, 中速释放分子 **1b** 可有效抑制大肠杆菌, 其 MIC 为 30 $\mu\text{mol/L}$ 。对于具有耐药性的细菌, Fc-CORM-Mo (**2b**) 和 Fc-CORM-W (**3b**) 表现出一定抗菌活性。机理研究证明, Fc-CORMs 的抗菌活性取决于其释放 CO 的速度。

关键词 一氧化碳释放分子; Fischer 卡宾; 季铵盐; 耐药细菌

Antibacterial Fischer Carbenoid CO-Releasing Molecules

Zhou, Lingling^a Zhou, Yaqing^a Tang, Yanli^a Yang, Kewu^a Zhang, Lei^a
 Gao, Lingxiang^a Zhang, Guofang^a Gao, Ziwei^{*,a} Zhang, Weiqiang^{*,a}

(^a Key Laboratory of Applied Surface and Colloid Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering,
 Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

(^b College of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069)

(^c Shang Hai Chang Zheng Hospital, The People's Liberation Army Second Medical University, Shanghai 200000)

Abstract CO releasing molecules (CORMs) of transition metal carbonyl complexes are emerging as a new interdisciplinary advance of inorganic chemistry, biological medicine and materials chemistry. In this paper, new ionic Fischer carbene carbonyl complexes were devised, in which Cr, Mo and W metals as metallic center carried five CO whilst the quaternary ammonium finely tuned the water solubility of Fc-CORMs. The myoglobin assays showed that one Fc-CORM released at least two molecules of carbon monoxide in well-controlled fashion under physiological conditions. The structure-releasing correlation revealed that the central metal was the key factor governing their carbon monoxide release behavior. The CO release rate of Fc-CORM-Mo (**2a~2e**) is quicker than Fc-CORM-Cr (**1a~1e**), much faster than Fc-CORM-W (**3a~3e**). The antibacterial activity test found that Fc-CORM (**1b**) with medium CO release rate effectively inhibited the growth and survival of *Escherichia coli*, with an minimal inhibitory concentration (MIC) value of 30 $\mu\text{mol/L}$. As for drug-resistant bacteria, Fc-CORM (**2a~2e**) and Fc-CORM (**3a~3e**) showed bactericidal activity. Mechanism study indicated that the antibacterial activity relied on the CO release rate of Fc-CORMs.

Keywords CO releasing molecules; Fischer carbene; quaternary ammonium salt; drug-resistant bacteria

* E-mail: zwgao@snnu.edu.cn; zwwq@snnu.edu.cn

Received March 16, 2016; revised May 9, 2016; published online July 7, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21371112), the Fundamental Doctoral Fund of Ministry of Education (No. 20120202120005), the Fundamental Funds Research for the Central Universities (No. GK201501005) and the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province (No. 2012JM2006).

国家自然科学基金(No. 21371112)、教育部博士点新教师基金(No. 20120202120005)、中央高校基金(No. GK201501005)和陕西省自然科学基金(No. 2012JM2006)资助项目。

一氧化碳(Carbon monoxide, CO)是一类重要气体信使分子, 它可强烈结合呼吸氧化酶和球蛋白, 抑制微生物呼吸作用^[1,2]. 近期研究发现, CO 是金色葡萄球菌呼吸链的有效抑制剂^[3]; 同时, CO 可增强宿主防御对于大肠杆菌的吞噬作用. CO 还能够促进细胞内氢氧根自由基产生, 大量活性氧物种的富集会造造成细胞 DNA 的损伤, 有效阻止其繁殖生长^[4]. 食品工业中, 含 CO 的包装气可有效抑制有害菌的生长, 防止冷鲜肉类腐败, 延长存储期^[5]. 在微生物体系内, CO 可自由穿越各类生物膜, 与多种含过渡金属靶点结合^[6], 可同时作用于病变组织和良性组织. 气体 CO 难以靶向生物靶点定量传输, 无法临床应用, 其医学治疗研究受到极大限制^[7,8]. 使用过渡金属羰基化合物作为一氧化碳释放分子(CO releasing molecule, CORM), 有望在生物靶点区域富集 CO, 从而实现其生物功能^[9]. 近年来, 研究 CORM 的抑菌活性与杀菌机制是 CO 微生物学的研究热点^[10].

设计具有缓释 CO 功能的羰基金属化合物是实现 CO 杀菌的有效途径之一(图 1). 商品化 CORM-3 稳定性较差, 易被传输溶剂分解, 在水相快速水解释放 CO. Saraiva 等研究发现, 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-2 可杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌; Mann 和 Motterlini 等^[11]发展了一类氨基酸螯合羰基氯化钌的水溶性释放分子 CORM-3. 对于常见的革兰氏阴性大肠杆菌, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-3 有效降低其存活率, 而金黄色葡萄球菌对 CORM-3 表现出轻微的耐药性; ALF021 含有五个配位羰基, 其 M—CO 键容易断裂快速解离出 CO, 由于在水相中释放 CO 过快, 因此其 CO 的生物利用率不高, 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时对金黄色葡萄球菌表现出明显抑菌作用^[12]. 肌红蛋白免疫实验表明, ALF062 和 CORM-371 可在体外生理环境下缓释 CO. 抑菌实验表明, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ALF062 可明显抑制大肠杆菌, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CORM-371 可明显抑制铜绿假单胞菌的生长^[13]. 调控 CORM 的缓释动力学是提高 CO 生物利用率、增强一氧化碳释放分子杀菌活性的关键. 我们前期工作研究表明, 非羰基键的离去是羰基金属缓释 CO 的决速步骤^[14].

为了有效调控离子型 $[\text{M}(\text{CO})_5\text{L}]^-$ 的一氧化碳释放速率, 本文发展了一类离子型 Fischer 卡宾羰基金属化

图 1 抗菌型一氧化碳释放分子先导结构 CORMs

Figure 1 CORMs of transition-metal possessing antibacterial activities

合物(FC-CORM), 其中五羰基卡宾铬阴离子单元可水解缓释一氧化碳, 而季铵盐阳离子可有效调节 CORM 水溶性. 肌红蛋白免疫试验发现, 选择合适金属可有效控制 CO 缓释速率: Mo 系列(2a~2e) > Cr 系列(1a~1e) > W 系列(3a~3e). 抗菌实验发现, 此类 CORM 对于大肠杆菌具有明显抑制作用. 中速 Cr 类 FC-CORM 表现出最佳的抑菌活性, 30 $\mu\text{mol/L}$ 即可 100% 杀死大肠杆菌, 而缓释 W 类 FC-CORM 对耐药大肠杆菌表现出明显抑菌活性. 对照试验显示, 失活释放分子(i-CORM)几乎没有抑菌功能, 该结果直接证明 FC-CORM 的杀菌活性来自其释放的 CO.

1 结果与讨论

1.1 卡宾羰基金属一氧化碳释放分子 1a~3e 的合成与表征

$[\text{M}(\text{CO})_5\text{L}]^-$ 先导结构的 CORM 药物层含有 5 个配位羰基, 药物层的非羰基配体 L 可有效调节整个分子的水溶性和 CO 释放, 是一类具有治疗前景的 CORM 先导化合物结构. 第六族过渡金属 $[\text{M}(\text{CO})_5]$ ($\text{M} = \text{Cr}, \text{Mo}, \text{W}$) 可与 Fischer 卡宾 $[\text{C}(=\text{XR}')\text{R}]$ ($\text{X} = \text{O}, \text{N}$) 形成 18 电子稳定过渡金属羰基化合物. 前期研究工作发现, 选择 N, O 作为 β -杂原子可调节孤对电子对于缺电子卡宾碳中心的离域, 可改善 $[\text{M}(\text{CO})_5]$ 单元的水相 CO 释放性能. 然而, 中性 CORM 水溶性差, 极大限制了此类 CORM 的 CO 治疗研究^[15]. 在五羰基金属 Fischer 卡宾类化合物的

图式 1 离子型 Fischer 卡宾一氧化碳释放分子的合成路线

Scheme 1 The preparation of ionic Fischer carbene CO-releasing molecules

合成实验中,我们发现五烷基乙酰基合 M 与阴离子卡宾存在互变异构,季铵盐可稳定该卡宾阴离子结构.基于此,本文以六烷基铬、六烷基钼、六烷基钨为原料,在低温下以甲基锂亲核取代配位的羰基,进而经历复分解反应制备了三类共十五个水溶性 Fischer 卡宾季铵盐 **1a~3e** (Scheme 1). 化合物为稳定黄色固体,波谱分析与元素分析表明其结构与预测符合. 红外光谱中, **1a~1e** 的特征羰基吸收出现在 2027~2032 和 1875~1900 cm^{-1} 区域, **2a~2e** 的特征羰基吸收在 2043~2050 和 1893~1912 cm^{-1} 区域, **3a~3e** 的羰基特征吸收则出现在 2043~2047 和 1895~1904 cm^{-1} 附近. 这些 M-CO 的特征吸收均高于其中性同类物,说明卡宾阴离子向中心金属提供更多电子,进而增加金属 d 电子向 CO 的 π^* 轨道的反馈程度,有效提高了金属与 CO 之间的配位作用. 核磁显示,此类化合物甲基的特征峰出现在 δ 2.40 左右,季铵盐也显示出相应特征峰. 在溶液状态, Fc-CORM 较为稳定,因此,我们采用高分辨 ESI-MS 测定其分子离子峰及相关脱羰形成的碎片. 以化合物 **1c** 为例,其羰基金属卡宾阴离子峰为 m/z 234.9331,其脱去羰基的碎片分别为: m/z 206.9378 ($\text{M}^- - \text{CO}$), 178.9434 ($\text{M}^- - 2\text{CO}$), 150.9481 ($\text{M}^- - 3\text{CO}$), 122.9538 ($\text{M}^- - 4\text{CO}$), 与计算值相符.

一氧化碳是难溶于水的气体小分子,与金属配位形成的羰基化合物大多难以在水相体系溶解. 提高过渡金属羰基化合物 CORM 的水溶性是其生物治疗的关键,采用离子型金属羰基配位结构,可有效增强相应释放分子的水溶性^[16]. 为了考察相对分子质量、中心金属、季铵盐结构等分子特征对 Fc-CORM 水溶性的影响,我们采用视差法^[17]测定了此类卡宾化合物的水溶性. 文献报道, CORM 在较低低浓度下 (<5 mg/mL) 即表现出明显 CO 的生理和药理作用. 因此,我们测试 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 mg Fc-CORM 在 1 mL 纯水溶液的溶解性. 通过观察 Fc-CORM 水溶液的澄清透明、浑浊、沉淀溶解状态判断其溶解性^[18]. 由表 1 可知,第六族金属羰基类 Fc-CORM 具有较好的亲水性. 季铵盐阳离子的烷基链可直接影响了整个分子的亲水性. C_4 的四甲基铵为阳离子形成的化合物 **1a**, **2a**, **3a** 可溶于水. 实验还发现,随着碳链的增加, Fc-CORM 的水溶性下降,其中含 C_8 的四乙基 CORM 的水溶性大于含 C_{10} 的三甲基苄基 CORM, 而含 C_{16} 的四丁基 CORM 的溶解性最差. 中心金属也会影响 Fc-CORM 的水溶性. 对比三甲基苄基的 Fc-CORM 的水溶性发现,其溶解性为 Cr 系列大于 Mo 和 W 系列,这可能与分子量变化有关.

1.2 体外生理环境下 Fc-CORM 的一氧化碳释放研究

肌红蛋白免疫法是测试过渡金属羰基化合物缓释

表 1 Fc-CORM **1a~3e** 的水溶性
Table 1 Water solubility of Fc-CORM **1a~3e**

M	(CH ₃) ₄	(C ₂ H ₅) ₄	(C ₄ H ₉) ₄	(CH ₃) ₃ , C ₇ H ₇	(C ₂ H ₅) ₃ , C ₇ H ₇
Cr	溶解	溶解	微溶	溶解	溶解
Mo	溶解	溶解	微溶	微溶	微溶
W	溶解	溶解	微溶	微溶	微溶

一氧化碳的重要方法. 使用紫外光谱仪通过跟踪 500~600 nm 区域脱氧肌红蛋白向碳氧肌红蛋白的转化,可测量 Fc-CORM 缓释 CO 的速率. 我们选取含 50 $\mu\text{mol/L}$ 的肌红蛋白 PBS (Phosphate-buffered saline) 溶液, 分别加入 60, 40 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 **1a~3e**, 考察此类 Fc-CORM 的 CO 释放效率和速度. 在体外生理环境下 (PBS, pH = 7.4, 37.8 $^{\circ}\text{C}$), $[\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4]^- [\text{Cr}(\text{C}\{\text{OCH}_3\}\text{CH}_3)(\text{CO})_5]$ (**1c**) 可有效水解释放一氧化碳, 图 2 为脱氧肌红蛋白 (Mb) 转化为碳氧肌红蛋白 (MbCO) 的紫外光谱叠加及相应动力学曲线.

图 2(a) 呈现了 **1c** (60 $\mu\text{mol/L}$) 转化 Mb (Myoglobin) (45 $\mu\text{mol/L}$) 的全过程, 其中五个清晰的等吸光点 (504, 510, 550, 570, 585 nm) 表明整个释放过程未经历其他中间体. 整个 CO 释放过程中, 肌红蛋白稳定存在, Fc-CORM 的水解释放未导致肌红蛋白降解, 表明此类释放分子生物相容性较好. Fc-CORM 的中心金属携带了五个配位羰基, 理论上一分子 Fc-CORM 可释放五个一氧化碳.

为了全面评价 Fc-CORM 释放 CO 的能力, 分别采用浓度 60, 40 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 **1c** 进行 CO 释释放试验. 图 2(b) 列出了相应 CO 释放动力学曲线. 可以看出, 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 **1c** 仅用 2500 s 即可释放 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 CO, 进而迅速饱和肌红蛋白溶液. 当 **1c** 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, CO 释放速度率略有下降, 2500 s 时 MbCO 的浓度为 35 $\mu\text{mol/L}$, 说明第二分子 CO 释放较慢. 试验结果表明, **1c** 需要 4000 s 才能饱和 Mb 溶液. 理论上, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 **1c** 携带了 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CO, 若所有配位羰基解离则可转化所有 45 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mb. 然而, 20 $\mu\text{mol/L}$ **1c** 经历 8000 s 的 CO 释过程, 共转化了 33 $\mu\text{mol/L}$ 的 MbCO. 由此可判断, 一分子的 Fc-CORM 可快速水解释放两分子 CO, 而剩余三个配位羰基在体外生理环境下较稳定.

为了全面考察 Fc-CORM 的释放性能与其配位结构之间的关系, 我们总结了三类共十五个阴离子型 Fc-CORM 的 CO 释放半衰期 (图 3). 实验数据表明, Cr 系列化合物 **1a~1e** 的释放速率适中, 其半衰期在 $t_{1/2, 60 \mu\text{mol/L}}$ 和 $t_{1/2, 40 \mu\text{mol/L}}$ 为 500 和 1282 s, 而慢于其中性同类物, $\text{Cr}(\text{C}\{\text{OCH}_3\}\text{CH}_3)(\text{CO})_5$ ($t_{1/2, 60 \mu\text{mol/L}}$ 和 $t_{1/2, 40 \mu\text{mol/L}}$ 分为 215 和 231 s). 有趣的是, Mo 系列化合物 **2a~2e** 释放 CO 的速率很快, 其中 **2d** 的 $t_{1/2, 60 \mu\text{mol/L}}$ 和 $t_{1/2, 40 \mu\text{mol/L}}$ 分为 266 和 394 s, 快于同类中性 Fc-CORM, Mo(=

图 2 (a) **1c** 释放时 Mb 的紫外光谱和 (b) **1c** 的 CO 释放动力学曲线

Figure 2 (a) UV spectrum of Mb/MbCO in presence of **1c** (60 $\mu\text{mol/L}$), and (b) CO release kinetics of **1c**

$\text{C}\{\text{OCH}_3\}\text{CH}_3(\text{CO})_5$ ($t_{1/2,60 \mu\text{mol/L}}$ 和 $t_{1/2,40 \mu\text{mol/L}}$ 分为 585 和 591 s)^[14]. W 系列化合物 **3a~3e** 的水相降解释放缓慢, 其半衰期要远大于 Cr 系列(**1a~1e**)和 Mo 系列(**2a~2e**) Fc-CORM. 我们还注意到, Fc-CORM 的缓释速率也与其所含季铵盐的类型有关. 对比 **2a~2e** 的 CO 释放半衰期, 不难发现, 水溶性更好的 **2a** 和 **2b** 释放速度相近, 略快于 **2c**. 而对于中速 Fc-CORM (**1a~1e**)而言, 季铵盐的差别没有显著影响相关释放分子的释放速度.

1.3 Fc-CORM 的抑菌活性研究

传统有机抗生素分子的抗菌靶点相对单一, 很难杀灭各类新出现的耐药性细菌^[19,20]. CORM 是一类具有应用前景的多靶点抗菌有机金属分子, 它不仅提供一氧化碳药物源, 还联合过渡金属中心、有机金属片段和抗菌有机单元的生物毒性, 协同作用全面抑制耐药菌的生长繁殖^[21~23]. 寻找可高效释放 CO 的先导结构, 研究 CO 抗菌活性与缓释机制, 是发展抗耐药菌 CORM 的科学基础. 基于此, 研究了 Fc-CORM 对于常见革兰氏阴性菌和几类临床耐药菌的抑菌活性, 初步考察了 CO 释放速率与 Fc-CORM 抗菌活性之间的关系.

图 3 (a) Fc-CORM-Cr (**1a~1e**), (b) Fc-CORM-Mo (**2a~2e**) 和 (c) Fc-CORM-W (**3a~3e**) 系列化合物释放半衰期柱状图

Figure 3 $T_{1/2}$ of CO releasing of (a) Fc-CORM-Cr (**1a~1e**), (b) Fc-CORM-Mo (**2a~2e**) and (c) Fc-CORM-W (**3a~3e**)

抗菌实验选取普通革兰氏阴性菌大肠杆菌评价了 Fc-CORM 中 **3b** 的生物活性. 图 4(a)为 **3b** 存在下, 13 h 后微生物生长的情况. 可以看出, 当 **3b** 浓度低于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, Fc-CORM 对细菌生长几乎没有影响; 当 **3b** 浓度增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 培养皿内未明显观察到细菌群里. 为了计算 Fc-CORM 的最小抑菌浓度(MIC), 将菌落形成单位(CFU)减少比率与 **3b** 的浓度进行作图(图 4b), 可看出随 **3b** 浓度的增加菌落数目明显减少, 其

MIC 为 $80\ \mu\text{mol/L}$.

图 4 (a) **3b** ($50\sim 100\ \mu\text{mol/L}$) 作用于 *E. coli* 的杀菌变化图和 (b) **3b** 的杀菌曲线

Figure 4 (a) Effects of **3b** ($50\sim 100\ \mu\text{mol/L}$) on *E. coli* viability and (b) concentration-killing curve of **3b**

Fc-CORM-Mo 为快速释放分子, 实验表明其抑菌活性较高. $40\ \mu\text{mol/L}$ 的 **2b** 即可杀灭 90% 的细菌, 杀菌曲线(图 5)显示其 MIC 为 $60\ \mu\text{mol/L}$. 值得注意的是, **1b** 的杀菌效果明显, $5\ \mu\text{mol/L}$ 即表现出抑菌作用, $10\ \mu\text{mol/L}$ 可杀灭 80% 微生物. 化合物 **1b** 的抗菌活性曲线见图 6, 其中 Cr (**1b**) 的最小抑菌浓度(MIC)为 $30\ \mu\text{mol/L}$, 对大肠杆菌的抑制活性远高于 CORM-3 ($\text{MIC}=400\ \mu\text{mol/L}$).

为了对比不同中心金属 Fc-CORM 的抗菌活性, 我们测试了全部 15 个 Fc-CORM ($50\ \mu\text{mol/L}$) 对于大肠杆菌的活性(图 7). 实验结果显示, 中心金属为铬的 Fc-CORM (**1a**~**1e**) 均可全部杀灭细菌; 中心金属为钼的 Fc-CORM 也表现出不错的抗菌活性, 其中 **2a** 和 **2b** 的活性略低于 **2c**~**2e**, 后者的杀菌率达到 100%. 中心金属为钨的 Fc-CORM (**3a**~**3e**) 抗菌活性较低, **3c** 的杀菌效果最好, 抑制率为 30%. 肌红蛋白 CO 释放实验显示, Cr (**1b**) 具有适中的 CO 释放速率, Mo (**2b**) 的释放速率过快, 而 W (**3b**) 太慢. 由此可看出, Cr (**1b**) 中速释放出的 CO 可有效发挥杀菌作用. 快速释放分子 Mo (**2b**) 的杀菌活性反而却有所降低. 这可能是由于其释放 CO 速率过快, 大量自由 CO 没有与微生物有效作用, 而以

图 5 **2b** 的杀菌曲线

Figure 5 Concentration-killing curve of **2b**

图 6 **1b** 的杀菌曲线

Figure 6 Concentration-killing curve of **1b**

图 7 Fc-CORM-Cr (**1a**~**1e**), Fc-CORM-Mo (**2a**~**2e**) 和 Fc-CORM-W (**3a**~**3e**) ($50\ \mu\text{mol/L}$) 的杀菌浓度

Figure 7 Bactericide rate of Fc-CORM-Cr (**1a**~**1e**), Fc-CORM-Mo (**2a**~**2e**) and Fc-CORM-W (**3a**~**3e**) ($50\ \mu\text{mol/L}$)

气体形式离开细菌培养体系. W (**3b**) 的 CO 释放速率过慢, 没能达到 CO 抗菌活性所需的必要浓度. 综上不难

看出, 调控 CORM 的释放动力学是提高 CORM 抗菌活性的有效策略.

为了进一步研究 Fc-CORM 的抗菌机制, 我们考察了不含配位羰基的失活一氧化碳释放分子(i-CORM)的生物活性. 选取同种季铵盐不同中心金属的三种 Fc-CORM (**1b**、**2b** 和 **3b**), 分别用 DMSO 配成 50 $\mu\text{mol/L}$ 的样品溶液, 一份直接测其抗菌活性, 结果作为对照组. 另一份在室温下(25 $^{\circ}\text{C}$)放置一周, 红外检测 CORM 的 DMSO 溶液, 待 CORM 的配位羰基充分分解离. 取此样品作为 i-CORM, 以大肠杆菌为实验菌种, 测其抗菌活性. 图 8 对比了 CORM 和 i-CORM 的抑菌活性. 可以看出, 不含羰基的 i-CORM (**1a'**, **1b'** 和 **1c'**)几乎没有抗菌活性. 此实验结果证明, 季铵盐正离子, 过渡金属铬、钼和钨均不具备杀菌功能. 也就是说, Fc-CORM 所释放的 CO 是关键杀菌药物源.

图 8 CO-RM 与失活 CORM, i-CORM 的抑菌活性
Figure 8 Bactericide rate of **1b**, **2b**, **3b** and the i-CORMs

最后, 我们采用试管二倍稀释法, 考察了 **1b**, **2b** 和 **3b** 对于含 β -内酰胺酶的耐药性细菌(金色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌和肺炎克雷伯菌)的生物活性^[24]. 由表 2 可以看出, **1b** 并没有表现出明显的抑菌效果, 而 **2b** 在 128 $\mu\text{mol/L}$ 可有效抑制全部四种耐药菌繁殖. 有趣的是, **3b** 的释放速度最慢, 其对于大肠杆菌的 MIC 仅为 64 $\mu\text{mol/L}$, 同时还可有效杀灭枯草杆菌和肺炎克雷伯菌.

2 结论

本文报道了一类新型 Fischer 卡宾类一氧化碳释放分子. 实验结果发现, 阴离子卡宾结构可有效调节 $[\text{M}(\text{CO})_5]$ 的 CO 缓释动力学. Fc-CORM 的水溶性可通过季铵盐的亲疏水性调节. 四甲基、四乙基稳定的 Fc-CORM 具有较好的水溶性. 肌红蛋白实验显示, 含铬 Fc-CORM 具有适中的 CO 缓释速率($t_{1/2}$, 60 $\mu\text{mol/L}$ 和 $t_{1/2}$, 40 $\mu\text{mol/L}$ 为 500 和 1282 s). 在体外生理环境下, 每分子

表 2 Fc-CORM 对于耐药性细菌的抑制作用

Table 2 Inhibition Effect of Fc-CORM on Drug-resistant bacteria

种类	MIC($\mu\text{g/mL}$)		
	Cr (1b)	Mo (2b)	W (3b)
金色葡萄球菌	n.d. ^a	128	n.d.
大肠杆菌	n.d.	128	64
枯草杆菌	n.d.	128	128
肺炎克雷伯菌	n.d.	128	128

^a n.d. = not detected.

Fc-CORM 释放至少两个 CO. 抗菌实验发现, Fc-CORM 的生物活性与其 CO 释放速度有关. 对于革兰氏阴性菌大肠杆菌, 中速释放分子 **1a**~**1e** 的 MIC 为 30 $\mu\text{mol/L}$; 而对于具有耐药性的大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、枯草杆菌, Fc-CORM-Mo (**2a**~**2c**)和 Fc-CORM-W (**3a**~**3c**)表现出一定的抗菌活性. 机理研究证明, Fc-CORM 的生物活性来源于其释放的 CO, 而 CO 释放速度是其抗菌活性的关键影响因素.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

恒温磁力搅拌器(S25-2, 上海司乐仪器有限公司), 傅立叶变换红外光谱仪(EQUINX55, 德国布鲁克公司), 核磁共振谱仪(德国布鲁克公司). 六羰基铬, 六羰基钼, 六羰基钨(GR, 北京鸿睿天维科技有限责任公司), 甲基锂(1.6 mol/L 乙醚溶液, 阿拉丁试剂有限公司), 四甲基氯化铵, 四乙基溴化铵, 四丁基溴化铵, 苄基三甲基溴化铵, 苄基三乙基溴化铵(AR, 阿拉丁试剂有限公司), 二甲亚砜, 四氢呋喃(THF, AR, 国药集团化学试剂有限公司, 无水无氧处理).

3.2 实验方法

3.2.1 合成方法

以 $[\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4][\text{Cr}(\text{C}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3)(\text{CO})_5]$ (**1c**)的合成为例: 称取 1.1 g (5 mmol/L)六羰基铬加入装有磁子的反应管, 采用真空线操作技术抽真空充氮气三次, 用双头针转移入 80 mL 干燥 THF. 干冰丙酮浴冷却至 -78°C , 向其加入 3.1 mL CH_3Li 溶液(1.6 mol/L), 控制滴加速度, 保持反应温度. 溶液由淡黄色逐渐加深直至深红色, 红外检测反应液, 保持温度直至原料全部消耗. 撤去干冰浴, 自然升温至室温, 迅速加入四丁基溴化铵(5 mmol/L, 1.62 g)的水溶液, 过滤淡黄色粉末粗产品. 用 THF 溶解, 硅藻土过滤, 加入超纯水沉淀, 过滤, 真空干燥, 得到固体产物 **1c** (1.56 g, 65%). m.p. $90\sim 91^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.26 (br, 8H), 2.39 (s, 3H), 1.67 (br, 8H), 1.46 (q, $J=6$ Hz, 8H), 1.03 (t, $J=4$ Hz, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 211.3 (CO), 58.9

(CH₂), 53.1 (CH₃), 23.9 (CH₂), 19.7 (CH₂), 13.5 (CH₃); IR (KBr) ν : 2032 (m), 1900 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 234.93 (M⁻), 206.94 (M⁻-CO), 178.94 (M⁻-2CO), 150.95 (M⁻-3CO), 122.95 (M⁻-4CO).

[(CO)₅Cr=C(O)CH₃][N(CH₃)₄] (**1a**): 合成方法同化合物 **1c**, 得淡黄色粉末(159 mg, 26%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.45 (s, 12H), 2.46 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.51 (CO), 67.97 (=CH₃), 25.61 (CH₃); IR (KBr) ν : 2032 (w), 1880 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 262.85 (M⁻+Na), 234.95 (M⁻), 206.96 (M⁻-CO), 178.96 (M⁻-2CO), 150.96 (M⁻-3CO).

[(CO)₅Cr=C(O)CH₃][N(C₂H₅)₄] (**1b**): 合成方法同化合物 **1c**, 得淡黄色有金属光泽粉末(500 mg, 69%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.32 (q, 8H), 2.38~2.17 (m, 3H), 1.37 (br, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.49 (CO), 53.19 (CH₂), 52.66 (=CH₃), 7.48 (CH₃); IR (KBr) ν : 2028 (w), 1889 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 262.85 (M⁻+23), 234.95 (M⁻), 206.96 (M⁻-CO), 178.96 (M⁻-2CO), 150.96 (M⁻-3CO).

[(CO)₅Cr=C(O)CH₃][N(CH₃)₃(C₇H₇)] (**1d**): 合成方法同化合物 **1c**, 得亮黄色粉末(300 mg, 77%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.52 (m, 5H), 4.65 (s, 2H), 3.25 (s, 9H), 2.44 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.48 (CO), 132.74 (Ph), 131.42 (Ph), 129.65 (Ph), 126.57 (Ph), 70.50 (CH₂), 53.56 (CH₃), 53.18 (=CH₃); IR (KBr) ν : 2032 (w), 1892 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 234.95 ([M]⁻), 150.96 (M⁻-3CO).

[(CO)₅Cr=C(O)CH₃][N(C₂H₅)₃(C₇H₇)] (**1e**): 合成方法同化合物 **1c**, 得亮黄色粉末(768 mg, 90%). m.p. 59~60 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.52 (br, 5H), 4.47 (br, 2H), 3.31 (br, 6H), 2.40 (s, 3H), 1.50 (br, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.51 (CO), 132.20 (Ph), 131.30 (Ph), 129.85 (Ph), 126.25 (Ph), 61.30 (CH₂), 53.30 (CH₂), 52.85 (=CH₃), 8.02 (CH₃); IR (KBr) ν : 2032 (w), 1875 (s) cm⁻¹; MS/ESI(-) m/z : 370.86 [M-2CO]⁻; MS m/z : 234.95 (M⁻), 206.95 (M⁻-CO), 178.95 (M⁻-2CO), 150.96 (M⁻-3CO).

[(CO)₅Mo=C(O)CH₃][N(CH₃)₄] (**2a**): 合成方法同化合物 **1c**, 淡黄色粉末(269 mg, 38%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.73 (s, 3H), 1.84 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 201.0 (CO), 67.95 (=CH₃), 25.57 (CH₃); IR (KBr) ν : 2050 (w), 1907 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 304.81 ([M]⁻+Na).

[(CO)₅Mo=C(O)CH₃][N(C₂H₅)₄] (**2b**): 合成方法同化合物 **1c**, 淡黄色有金属光泽粉末 (1.1356 g, 78%). ¹H

NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.36 (q, J =8 Hz, 8H), 2.34 (s, 3H), 1.38 (t, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.63 (CO), 200.98 (CO), 55.56 (CH₂), 52.73 (=CH₃), 7.75 (CH₃); IR (KBr) ν : 2045 (w), 1893 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 434.81 (M+Na).

[(CO)₅Mo=C(O)CH₃][N(C₄H₉)₄] (**2c**): 合成方法同化合物 **1c**, 黄色粉末(900 mg, 86.3%). m.p. 55~56 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.25 (t, J =6 Hz, 8H), 2.33 (s, 3H), 1.63~1.71 (m, 8H), 1.44~1.45 (m, 8H), 1.02 (t, J =4 Hz, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.88 (CO), 200.99 (CO), 58.96 (CH₂), 55.58 (=CH₃), 24.02 (CH₂), 19.72 (CH₂), 13.62 (CH₃); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1913 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 280.91 (M⁻), 252.91 (M⁻-CO), 224.92 (M⁻-2CO), 196.92 (M⁻-3CO).

[(CO)₅Mo=C(O)CH₃][N(CH₃)₃(C₇H₇)] (**2d**): 合成方法同化合物 **1c**, 深黄粉末(1.0192 g, 59.4%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.27~7.51 (m, 5H), 4.79 (s, 2H), 3.32 (s, 9H), 2.38 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.64 (CO), 200.98 (CO), 132.92 (Ph), 131.13 (Ph), 129.42 (Ph), 127.06 (Ph), 69.78 (CH₂), 55.96 (CH₃), 52.95 (=CH₃); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1901 (s) cm⁻¹; MS m/z : 430.79 (M), 402.80 (M-CO), 374.80 (M-2CO).

[(CO)₅Mo=C(O)CH₃][N(C₂H₅)₃(C₇H₇)] (**2e**): 合成方法同化合物 **1c**, 深黄粉末(1.36 g, 72%). m.p. 64~65 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.49 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.32 (q, 6H), 2.31 (s, 3H), 1.48 (t, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.78 (CO), 200.99 (CO), 132.24 (Ph), 131.17 (Ph), 129.75 (Ph), 126.52 (Ph), 61.24 (CH₂), 55.72 (CH₂), 52.9 (=CH₃), 8.2 (CH₃); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1901 (s) cm⁻¹; MS m/z : 283.27 (M⁻+2), 252.91 (M⁻-CO), 224.92 (M⁻-2CO), 196.92 (M⁻-3CO).

[(CO)₅W=C(O)CH₃][N(CH₃)₄] (**3a**): 合成方法同化合物 **1c**, 淡黄粉末(250 mg, 57%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.43 (s, 12H), 2.44 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 203.66 (CO), 191.17 (CO), 58.24 (=CH₃), 56.49 (CH₃), 56.46 (CH₃), 56.42 (CH₃); IR (KBr) ν : 2048 (w), 1900 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 366.96 (M⁻), 338.96 (M⁻-CO), 310.96 (M⁻-2CO), 282.97 (M⁻-3CO).

[(CO)₅W=C(O)CH₃][N(C₂H₅)₄] (**3b**): 合成方法同化合物 **1c**, 淡黄色粉末(382 mg, 38%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.32~3.37 (q, 8H, J =8 Hz), 2.41 (s, 3H), 1.40 (t, 12H, J =4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 208.78 (CO), 203.71 (CO), 57.95 (=CH₃), 52.69 (CH₂), 52.66 (CH₂), 52.63 (CH₂), 7.52 (CH₃); IR (KBr) ν : 2046 (w), 1895 (vs) cm⁻¹; MS m/z : 366.94 (M⁻), 338.95 (M⁻-

CO), 310.96 ($M^- - 2CO$).

$[(CO)_5W = C(O)CH_3][N(C_4H_9)_4]$ (**3c**): 合成方法同化合物 **1c**, 黄色粉末(480 mg, 72%). m.p. 66~67 °C; 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ : 3.25 (t, 8H, $J=6$ Hz), 2.40 (s, 3H), 1.62~1.72 (m, 8H), 1.42~1.51 (m, 8H), 1.03 (s, 12H, $J=6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 203.93 (CO), 191.11 (CO), 58.96 (CH_2), 57.98 ($=CH_3$), 23.96 (CH_2), 19.71 (CH_2), 13.58 (CH_3); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1895 (vs) cm^{-1} ; MS m/z : 366.95 (M^-), 338.96 ($M^- - CO$), 310.96 ($M^- - 2CO$), 282.97 ($M^- - 3CO$).

$[(CO)_5W = C(O)CH_3][N(CH_3)_3(C_7H_7)]$ (**3d**): 合成方法同化合物 **1c**, 黄色粉末(240 mg, 47%). 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ : 7.49~7.55 (m, 5H), 4.74 (s, 2H), 3.30 (s, 9H), 2.45 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 203.82 (CO), 191.30 (CO), 133.00 (Ph), 131.53 (Ph), 129.77 (Ph), 126.92 (Ph), 70.3 (CH_2), 58.5 ($=CH_3$), 53.32 (CH_3), 53.32 (CH_3), 53.29 (CH_3), 53.25 (CH_3); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1904 (vs) cm^{-1} ; MS m/z : 366.95 (M^-), 340.96 ($M^- - CO$), 310.96 ($M^- - 2CO$), 282.97 ($M^- - 3CO$).

$[(CO)_5W = C(O)CH_3][N(C_2H_5)_3(C_7H_7)]$ (**3e**): 合成方法同化合物 **1c**, 亮黄色粉末(343 mg, 61%). m.p. 62~63 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.42~7.25 (m, 5H), 4.47 (s, 2H), 3.29 (q, 6H, $J=8$ Hz), 2.37 (s, 3H), 1.47 (t, 9H, $J=8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 208.95 (CO), 203.86 (CO), 132.14 (Ph), 131.31 (Ph), 129.84 (Ph), 126.21 (Ph), 61.21 (CH_2), 58.12 ($=CH_3$), 52.87 (CH_3), 8.0 (CH_3); IR (KBr) ν : 2043 (w), 1898 (s) cm^{-1} ; MS m/z : 366.94 (M^-), 338.95 ($M^- - CO$), 310.95 ($M^- - 2CO$), 284.96 ($M^- - 3CO$).

3.2.2 肌红蛋白法测试 CO 释放

使用容量瓶, 将 5 mg 马心肌红蛋白溶解于 5 mL 磷酸缓冲液(PBS), 配置为母液. 取 1 mL 母液加入半微量比色皿中, 加入少量连二亚硫酸钠将其还原为脱氧肌红蛋白(deoxy-Mb), 记录为 Mb 的紫外吸收光谱. 然后, 向上述溶液通入 CO, 即可获得饱和碳氧肌红蛋白(Mb-CO)溶液, 记录为 Mb-CO 的紫外光谱. 使用 DMSO 配制 Fc-CORM 母液. 然后得到不同浓度梯度的 Fc-CORM 溶液, 取 5 μ L 配好的溶液加入蛋白溶液中, 充分混合后, 滴加 1~2 滴矿物油以防止蛋白氧化. 将此溶液置于 37.8 °C 样品仓中, 计时开始扫描溶液的紫外吸收. 直至紫外吸收曲线不再变化, 停止记录数据.

3.2.3 细菌涂布平板法测定杀菌活性

挑取大肠杆菌的单克隆菌落分别置于 5 mL LB 液体培养基中, 160 r/min、37 °C 摇床振荡培养 13 h, 得到活化的菌液. 取活化菌液离心, 用 0.9% NaCl 溶液试管

二倍稀释法测定最小抑菌浓度(MIC). 洗细菌三次, 再用 0.9% NaCl 溶液悬浮细菌, 稀释至 $OD_{600nm}=1.0$. 用移液枪移取 100 μ L 菌液、400 μ L 灭菌生理盐水, 再分别加入 5 μ L 不同浓度的阴离子卡宾一氧化碳释放分子溶液, 混匀, 避光作用 1 h, 然后将此溶液用 PBS 稀释 30000 倍, 吸取 100 μ L 逐滴滴于固体培养基上, 用涂布棒涂布均匀, 37 °C 培养 13 h 后, 计数, 计算杀菌率. 每种不同浓度的阴离子型卡宾化合物溶液对两种细菌均平行做 3 组试验, 同时做空白对照, 结果取平均值.

使用 DMSO 配制浓度为 1280 μ g/mL 的 Fc-CORM 母液待用; 再配制浓度为 25 g/L 的 MH 肉汤培养基, 配制抗菌实验所涉及的细菌菌液, 调节其 OD 值约等于 1; 为梯度稀释过的菌液进行接种抗菌药物, 然后在 37 °C 的普通空气孵化箱中培养 12~16 h, 最后做空白对照, 观察稀释管的清亮程度, 确定受测试细菌的 MIC.

辅助材料(Supporting Information) 所有化合物的 1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱、一氧化碳动力学测试曲线和细菌抗菌实验数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Garcia-Gallego, S.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 9712.
- [2] Schatzschneider, U. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172, 1638.
- [3] Tavares, A. F. N.; Nobre, L. S.; Saraiva, L. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, 336, 1.
- [4] Tavares, A. F. N.; Teixeira, M.; Romaão, C. C.; Seixas, J. D.; Nobre, L. S.; Saraiva, L. M. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 26708.
- [5] Books, J. C.; Alvarado, M.; Stephens, T. P.; Kellermeier, J. D.; Titor, A. W.; Miller, M. F.; Brashears, M. M. *J. Food Proteins* **2008**, 71, 93.
- [6] Patra, M.; Gasser, G.; Wenzel, M.; Merz, K.; Bandow, J. E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 3295.
- [7] Foresti, R.; Bani-Hani, M. G.; Motterlini, R. *Intensive Care Med.* **2008**, 34, 649.
- [8] Sandra, G. G.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 9712.
- [9] Romaão, C. C.; Blättler, W. A.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3571.
- [10] Wareham, L. K.; Poole, R. K.; Mariana, T. T. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 18999.
- [11] Clark, J. E.; Naughton, P.; Shurey, S.; Green, C. J.; Johnson, T. R.; Mann, B. E.; Foresti, R.; Motterlini, R. *Circ. Res.* **2003**, 93, e2.
- [12] Nobre, L. S.; Seixas, J. D.; Romaão, C. C.; Saraiva, L. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 4303.
- [13] Desmard, M.; Foresti, R.; Boczkowski, J.; Motterlini, R.; Sawle, P. *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, 16, 153.
- [14] Zhang, W.-Q.; Atkin, A. J.; Thatcher, R. J.; Whitwood, A. C.; Fairlamb, I. J. S.; Lynam, J. M. *Dalton Trans.* **2009**, 4351.
- [15] Zhang, W.-Q.; Whitwood, A. C.; Fairlamb, I. J. S.; Lynam, J. M. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 8941.
- [16] Rimmer, R. D.; Richter, H.; Ford, P. C. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 1180.

- [17] Heldt, J. M.; Nathalie, F. D.; Salmain, M.; Vessires, A.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4775.
- [18] Seixas, J. D.; Coelho, A. C.; Romo, C. C. *Dalton Trans.* **2015**, 44, 5058.
- [19] Crespy, D.; Landfester, K.; Schubert, U. S.; Schiller, A. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6651.
- [20] Furci, L. M.; Lopes, P.; Eakanunkul, S.; Zhong, S. J.; MacKerell, A. D.; Wilks, A. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3804.
- [21] Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G. *J. Organomet. Chem.* **1979**, 168, 59.
- [22] Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G. *J. Organomet. Chem.* **1976**, 122, C49.
- [23] Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G. *J. Organomet. Chem.* **1975**, 85, C23.
- [24] Andrews, J. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 48, 5.

(Zhao, X.)