

# Design and Synthesis of N-Hydroxymethyl Amide-Based Antimicrobial Agents

Lingjiao Zhang, Zhongtian Gao, Guangnan Ou\*

College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen Fujian  
Email: 742330753@qq.com, 291998488@qq.com, gnou@jmu.edu.cn

Received: Nov. 13<sup>th</sup>, 2019; accepted: Nov. 26<sup>th</sup>, 2019; published: Dec. 3<sup>rd</sup>, 2019

---

## Abstract

N-hydroxymethyl formamide (HOF) was synthesized by reaction of formamide with formaldehyde in the presence of sodium hydroxide. HOF was tested against the Gram (+) bacteria *Bacillus subtilis* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. HOF was active against the above bacteria and yeast, showing great potential as a new antimicrobial agent, since it was more active than formamide. After incubation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in HOF for 24 h, leakage of DNA from the cell was determined, indicating the considerable damage of cytoplasmic membrane. In the case of bacteria *Bacillus subtilis*, however, leakage of DNA from the cell was not observed.

## Keywords

Antimicrobial Agent, N-Hydroxymethyl Amide, Design, Bacteria, Fungi

---

# N-羟甲基酰胺类亲水抗菌剂的设计与合成

张玲娇, 高忠添, 欧光南\*

集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门  
Email: 742330753@qq.com, 291998488@qq.com, gnou@jmu.edu.cn

收稿日期: 2019年11月13日; 录用日期: 2019年11月26日; 发布日期: 2019年12月3日

---

## 摘要

设计并合成了N-羟甲基甲酰胺(HOF)亲水抗菌剂, 研究了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在含N-羟甲基甲酰胺的培养基中的培养特性, 并进行了抑菌实验和核酸释放

---

\*通讯作者。

实验。结果表明, HOF能抑制枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌的生长, 有显著的抗菌作用, 且HOF浓度越高, 抗菌效果越强。在同样条件下, HOF对枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌的抑菌作用强于甲酰胺。HOF对枯草芽孢杆菌细胞膜和细胞壁影响不大, 但对啤酒酵母菌细胞壁和细胞膜有很强的破坏作用, 导致细胞内核酸的外泄。

## 关键词

抗菌剂, N-羟甲基酰胺, 设计, 细菌, 真菌

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

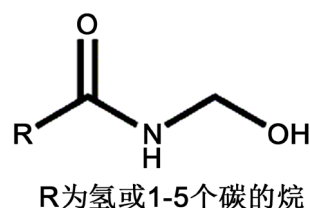
## 1. 引言

各种各样的致病微生物在自然界分布非常广泛, 并在一定条件下生长、繁殖, 不仅会引起各种材料的分解、变质和腐败, 还威胁着人类的健康。目前, 除了严格规范抗菌药物的使用, 避免细菌过快地产生耐药性, 还迫切需要开发一些新型的抗菌药物。抗菌剂中, 有机抗菌剂杀菌力强、种类多, 但其缺点是毒性大、水溶性较差等。有机抗菌剂中, 酰胺类化合物是抗菌剂市场中增长最快的一类。现有的酰胺类抗菌剂的分子结构特征是: 含有酰胺键; 酰基端连有芳环及或氢键受体; 氨基端连有芳环且在芳氨基的邻位有一个辅助基团[1] [2]。上述酰胺类抗菌剂分子结构复杂, 合成路线长, 难溶于水。文献报道, 药物如果在尿中溶解度小, 易出现结晶而阻塞肾小管或输尿管上端。当发现结晶尿时, 若不及时处理, 可发展为血尿、蛋白尿、尿痛等; 重者可致尿闭或尿毒症[3]。

而应用最早和最普遍的有机抗菌剂是甲醛, 它是醛类抗菌剂的一种[4]。低浓度的甲醛为抑菌剂, 高浓度可作为灭菌剂, 其杀菌谱广, 对细菌繁殖体及细菌芽胞以及病毒等均有杀灭作用。但甲醛具有强烈的刺激性气味, 特别是对眼睛和鼻粘膜造成严重影响。此外, 醛类在贮存和使用过程中易氧化, 导致抗菌活性降低[5]。

为设计新药物, 磺胺药是一个很有启迪意义的例子。对氨基苯磺胺(简称磺胺)早在 1908 年就已合成, 但当时仅作为偶氮染料的中间体, 而未用于医疗方面。在 1932 年 Mietzsch 和 Klarcr 首次合成含有磺胺结构的红色偶氮染料, 命名为百浪多息(Prontosil)。百浪多息在动物体内具有抑菌作用, 而在试管中不能抑菌, 说明百浪多息本身无抑菌作用。后来实验证明, 百浪多息在动物体内经代谢释放出磺胺, 磺胺才是百浪多息抑菌作用的基本结构[6]。随后各国科学家以磺胺为母体, 合成了大量衍生物, 找到了很多优良的磺胺药, 使当时许多细菌性感染, 如肺炎、脑膜炎都有了特效的治疗药物, 是医疗史上的一个重大进展[7]。当磺胺分子中氨基的一个氢原子替换为其他基团, 可获得一系列不吸收的衍生物, 如酞磺胺噻唑、琥珀磺胺噻唑等。这些磺胺药在消化道内不溶解, 但在通过消化道的过程中可被分解, 释放出具有游离氨基的磺胺而发挥抗菌作用, 用于治疗肠道感染[3]。

本研究受百浪多息经动物体内经代谢释放出有效抑菌成分启发, 以酰胺为母体结构, 引入潜在的醛基——羟甲基, 设计出一类新型抗菌剂: N-羟甲基酰胺类亲水抗菌剂(图 1)。作者猜测该抗菌剂在病菌细胞内被酶分解成酰胺和甲醛, 既起酰胺类抗菌剂和醛类抗菌剂作用, 又克服市售酰胺类抗菌剂水溶性差、醛类抗菌剂易氧化的缺点, 可望成为一类环境友好的亲水低毒抗菌剂。



**Figure 1.** Design of N-hydroxymethyl amide-based antimicrobial agents  
**图 1.** N-羟甲基酰胺类抗菌剂设计

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

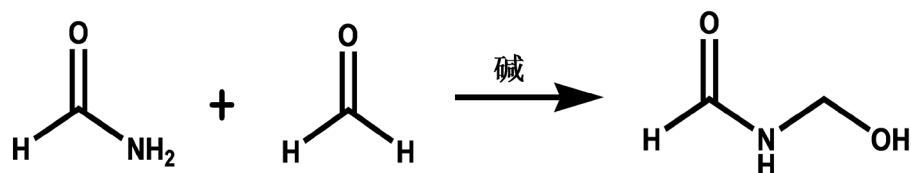
试剂：甲醛、甲酰胺、三氯乙酸、NaOH 为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。胰蛋白胨、酵母浸膏、麦芽膏粉为生化试剂购自广东环凯微生物科技有限公司。琼脂条购自福建泉州市泉港化工厂。新洁尔灭(苯扎溴铵)(江西草珊瑚消毒用品有限公司)。

供试菌种：枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以上菌种均由集美大学微生物实验室提供。

仪器：NMR 仪(Bruker AV400, Bruker 公司), UV-Vis 分光光度计(UV5200, 上海元析仪器有限公司), 恒温培养箱(MJ-160B-II 型, 上海跃进医疗器械厂), 恒温培养摇床(HWY-2112, 厦门德维科技有限公司)。

### 2.2. N-羟甲基甲酰胺的合成

甲酰胺与甲醛在碱催化剂催化下反应制得 N-羟甲基甲酰胺(HOF)，反应式如图 2：



**Figure 2.** Synthesis of HOF  
**图 2.** HOF 的合成反应

HOF 的合成按文献[8]方法合成，略作修改。具体如下：

1) 在 250 mL 圆底烧瓶中，加入甲酰胺 20 mL (0.5 mol)，碱催化剂 NaOH 0.12 g 和水 25 mL，搅拌溶解，调节 pH 为 9 左右，用冰水冷却至 5℃ 以下。

2) 缓慢滴加 37% 甲醛溶液 44 mL (0.55 mol)。滴加过程中，反应放热，继续用冰水浴维持反应温度在 10℃ 以下。滴加完毕后，缓慢升温至室温，搅拌反应 24 h。反应期间控制 pH 持在 9 左右。

3) HOF 的纯化：将反应所得的 HOF 加入到混合阴、阳离子交换树脂中，搅拌 30 min，抽滤，滤液旋转蒸发除去水分和未反应的甲醛，再于 60℃ 真空干燥 10 h 得到 HOF。

### 2.3. 在含 N-羟甲基甲酰胺的培养基中的培养特性研究

分别配制含 HOF 的培养基(枯草芽孢杆菌培养用 LB 培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母浸膏 5.0 g，NaCl 10.0 g，水和 HOF 总量为 1000 mL，调节 pH 至 6.8~7.0。啤酒酵母培养用麦芽汁培养基：麦芽膏粉 130 g，琼脂 20 g，水和 HOF 总量为 1000 mL，自然 pH。)。分别取 4 mL 上述培养基装入 10 mL 小三角锥瓶中，每个浓度装三瓶，于 121℃ 高压灭菌 20 min。分别吸取新制的菌悬液 0.04 mL 接种到每个小三角锥瓶中，

将菌液混合均匀(细菌终浓度约为 105 CFU/mL, 真菌终浓度约为 104 CFU/mL)。接种后, 分别取出每个浓度梯度的小三角锥瓶 1 瓶, 与空白做好标记后置于 4℃ 冰箱中; 其余 2 个小三角锥瓶作为平行样置于 30℃ 摇床中培养 48 h。定时用紫外分光光度计测定培养液在 600 nm 的吸光度(A600), 与接种后未培养的培养液及对照组的 A600 做比较。

## 2.4. 抑菌实验

配制 LB 固体培养基, 置于高压蒸汽灭菌锅 121℃ 灭菌 20 min, 待培养基冷却至 45℃ 左右, 迅速倒入约 15 mL 培养基于无菌培养皿中, 轻轻摇动培养皿, 然后平置于台面冷却凝固待用。分别吸取 0.1 mL 的枯草芽孢杆菌菌悬液加入到上述平板, 用无菌玻璃涂布棒涂布均匀。用镊子将无菌牛津杯(外径为 8 mm, 内径为 6 mm)垂直放于平板标记位置上, 轻轻加压, 使其与培养基接触无空隙, 在杯中加入 200 μL 配好的一定浓度的抑菌液, 平放于 4℃ 冰箱 2 h 后, 取出置于 30℃ 培养箱中培养 18 h, 记录抑菌圈大小。

## 2.5. 核酸释放实验

为研究 HOF 对细胞膜的影响, 参考文献[9]方法进行了核酸释放实验, 具体如下:

1) 将培养 14 h 左右的菌液, 分别取 4 mL 装于无菌离心管, 在 5000 r/min, 常温离心 10 min, 弃去上清, 加入 2 mL 无菌生理盐水, 将细胞吹散, 再次离心, 洗去残余的培养液, 收集菌体。

2) 分别往离心管中加入 9 mL HOF 和无菌生理盐水, 反复吹吸, 使菌体分散, 分别分装成 3 管。定时取出 3 mL 菌液, 离心, 取上清, 测量在 260 nm 的吸光度(A260)。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. N-羟甲基甲酰胺的合成

产物的核磁共振谱于室温录谱, NMR 化学位移以四甲基硅烷(TMS)为内标, 结果如下:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.145 (s, 1H, HCO-), 4.810~4.825 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>-);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 166.101, 70.736, 64.867。分析结果表明, 所得产物即为目标产物(图 3)。

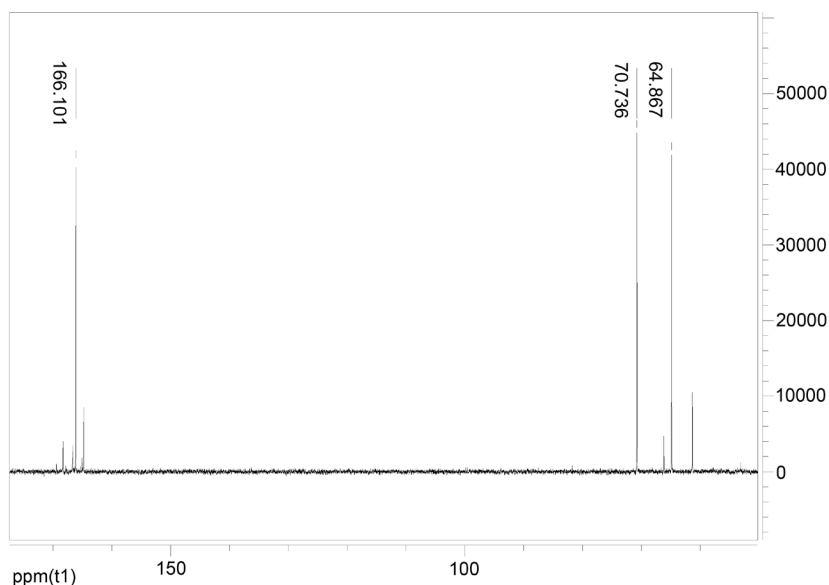


Figure 3.  $^{13}\text{C}$  NMR of HOF  
图 3. HOF 的  $^{13}\text{C}$  NMR

### 3.2. 细菌在含 N-羟甲基甲酰胺的培养基中的培养特性

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一类好氧型、内生抗逆孢子的杆状细菌,在极端的条件下,还可以诱导产生抗逆性很强的内源孢子,表现出强抗热、抗化学药物和抗辐射特性[10]。本论文所采用的枯草芽孢杆菌为革兰氏阳性菌,研究 HOF 对其生长和发酵的影响。枯草芽孢杆菌在含 HOF 溶液的培养基中的培养 48 h 结果见表 1。

**Table 1.** The effect of HOF on the growth curve of *Bacillus subtilis*  
**表 1.** HOF 对枯草芽孢杆菌生长的影响

HOF 浓度/%	A <sub>600</sub>			
	接种未培养	实验 1	实验 2	平均值
15	0.035	0.050	0.045	0.048
10	0.036	0.038	0.035	0.036
5	0.040	0.040	0.042	0.041
1	0.037	0.041	0.036	0.038
0.5	0.035	0.035	0.036	0.036
0	0.040	1.954	1.964	1.959

由表 1 可见, HOF 对枯草芽孢杆菌有显著的抗菌作用。一般认为有机抗菌剂的作用机理可归纳以下 3 个方面:一是作用于细胞壁和细胞膜系统;二是作用于生化反应酶或其他活性物质;三是作用于遗传物质或遗传微粒结构[11]。一般认为有机抗菌剂通过渗透和扩散作用,进入细胞内部,使蛋白质变性并导致酶失活,从而达到杀死细菌细胞的作用。可是,我们先前的非水相酶研究发现, HOF 作为溶剂,脂肪酶溶于其中表现出很高的酯交换活性,属于生物相容溶剂,不会引起蛋白质变性[8]。因此有理由推测 HOF 的抑菌机制为:进入细胞内部后, HOF 在酶作用下,分解成甲酰胺和甲醛,既起酰胺类抗菌剂作用,又起醛类抗菌剂作用,从而表现出高的抑菌活性。此外,枯草芽孢杆菌虽然具有很强的胞外分泌蛋白酶的能力,但蛋白酶的分泌发生在细菌生长周期的对数晚期[10],因而 HOF 的抗菌剂作用不大可能是由于胞外酶作用下分解所致。

酵母对有机物具有一定的耐性,郑晓冬等对 10 株酵母进行了有机溶剂耐受试验结果发现啤酒酵母比其他酵母抗非极性溶剂的能力更强[12]。因此,本实验所用菌种为啤酒酵母菌,研究 HOF 对其生长的影响。啤酒酵母菌在含 HOF 溶液的培养基中的培养 48 h 结果见表 2。

**Table 2.** The effect of HOF on the growth curve of *Saccharomyces cerevisiae*  
**表 2.** HOF 对啤酒酵母菌生长的影响

HOF 浓度/%	A <sub>600</sub>		
	接种未培养	24 h	48 h
5	0.174	0.155	0.153
3	0.168	0.156	0.159
1	0.163	0.162	0.165
0.8	0.158	1.563	1.806
0.5	0.158	1.843	2.228
0.3	0.158	1.938	2.091
0	0.163	2.021	2.216

由表 2 可见, HOF 对啤酒酵母菌也有显著的抗菌作用。HOF 对啤酒酵母菌的最低抑菌浓度介于 0.8%~1% 之间。

### 3.3. N-羟甲基甲酰胺的抑菌实验

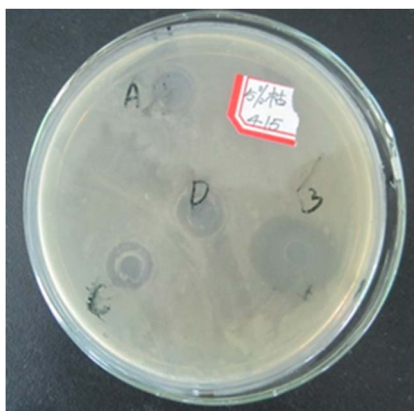
用牛津杯法研究了 HOF 对枯草芽孢杆菌的抑菌作用, 结果列于表 3。

**Table 3.** The antibacterial activity of HOF

**表 3.** HOF 抑菌活性

HOF 浓度/ %	抑菌圈直径/mm		
	实验 1	实验 2	平均值
2.5	15	12	13.5
5	15	15	15.0
10	25	26	25.5
20	43	39	41.0
40	50	49	49.5
100	60	63	62.5

由表 3 可见, HOF 对枯草芽孢杆菌有显著的抗菌作用, 且 HOF 浓度越高, 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果越强, 形成的抑菌圈越大。在同样条件下, 5%甲酰胺溶液(A)的抑菌圈平均直径为有 10.5 mm, 常规消毒用的浓度 0.25%新洁尔灭(C)的抑菌圈平均直径只有 10.0 mm, 比 HOF(B)的抑菌圈平均直径 15.0 小(图 4)。我们还进行了 HOF 对啤酒酵母菌的抑菌实验, 结果表明 HOF 对啤酒酵母菌的抑菌作用也强于甲酰胺。可见, HOF 有较强的抗菌作用, 可望成为新型抗菌剂。



**Figure 4.** Bacteriostatic diameters to bacteria *Bacillus subtilis*

**图 4.** 不同抗菌剂对枯草芽孢杆菌的抑菌圈

### 3.4. 核酸释放实验

病菌细胞壁和细胞膜被破坏后, 细胞内核酸的泄露会使细胞外溶液核酸浓度发生变化, 在紫外分光光度计的检测下, 可以观察到吸光值的变化。枯草芽孢杆菌实验表明, 随着时间的增长, HOF 和对照组的吸光值变化不大, 说明实验过程中, 枯草芽孢杆菌维持原有的细胞通透性, 可见, HOF 对枯草芽孢杆菌的抑菌机制不是作用于细胞壁和细胞膜系统。啤酒酵母菌实验结果见表 4。

**Table 4.** The effect of HOF on DNA relief of *Saccharomyces cerevisiae*  
**表 4.** HOF 对酵母菌细胞核酸释放量的影响

试验品	A <sub>260</sub>			
	0 h	2 h	24 h	24 h 破壁
蒸馏水	0.604	0.819	0.971	2.814
生理盐水	0.503	0.716	0.908	2.229
HOF	0.416	0.858	1.704	2.023

由表 4 可见, 随着时间的增长, 对照组的吸光值略有增加, 而 HOF 实验组的吸光值上升很快, 说明 HOF 对真菌细胞壁和细胞膜有强破坏作用。因为超声波的物理剪切力和空化作用在短时间内破坏啤酒酵母的细胞结构, 促使核酸有效的溶出, 我们进行了超声波破壁实验。结合超声波破壁实验数据, 不难发现, 啤酒酵母菌在蒸馏水和生理盐水中作用 24 h 后, 其吸光值变化不大, 但是经超声波破壁后, 吸光值增大了 3 倍左右。可见, 啤酒酵母菌在蒸馏水和生理盐水中作用 24 h 后, 其细胞壁和细胞膜系统还是完整的。对照超声波破壁数据, 可以发现啤酒酵母菌在 HOF 中作用 24 h 后, 其细胞壁和细胞膜系统基本上遭到破坏, 这可能是 HOF 对啤酒酵母菌抑菌作用机制之一。

#### 4. 结论

设计并合成了 N-羟甲基酰胺亲水抗菌剂, HOF 能抑制枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌的生长, 有显著的抗菌作用, 且 HOF 浓度越高, 抗菌效果越强。在同样条件下, HOF 对枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌的抑菌作用强于甲酰胺。啤酒酵母菌在 HOF 中作用 24 h 后, 其细胞壁和细胞膜系统基本上遭到破坏, 这可能是 HOF 对啤酒酵母菌抑菌作用机制之一。HOF 对枯草芽孢杆菌细胞膜和细胞壁影响不大, 其抗菌作用可能是由于 HOF 在病菌细胞内被酶分解成酰胺和甲醛, 起酰胺类抗菌剂和醛类抗菌剂作用, 该机制还有待后续实验进一步验证。N-羟甲基酰胺类亲水抗菌剂克服了市售酰胺类抗菌剂水溶性差、醛类抗菌剂易氧化的缺点, 可望成为一类环境友好的亲水低毒抗菌剂。

#### 基金项目

本工作得到福建省自然科学基金(2017J01635)资助, 特此致谢。

#### 参考文献

- [1] 王宏宇, 张肖肖, 高续恒, 等. 二芳胺基咪喃甲酰胺类化合物的合成设计及抗菌活性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2017, 54(4): 845-850.
- [2] 薛伟, 熊壮, 郑玉国, 等. 新型含苯并噻唑基双酰胺衍生物的合成及其抗菌活性[J]. 合成化学, 2012, 20(4): 411-415.
- [3] 浙江医科大学. 抗菌素和磺胺药的临床应用[M]. 杭州: 浙江人民出版社, 1976: 102-112.
- [4] Sommerville, D. (1904) Experiments on the Disinfection of Bacillus Typhosus with Sanitas, Formalin, and Carbolic Acid. *British Medical Journal*, **2**, 15-16. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2270.15>
- [5] Rubbo, S.D., Gardner, J.F. and Webb, R.L. (1967) Biocidal Activities of Glutaraldehyde and Related Compounds. *The Journal of Applied Bacteriology*, **30**, 78-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1967.tb00277.x>
- [6] Finkelstein, R. and Birkeland, J.M. (1938) The Mode of Action of Sulfanilamide and Prontosil. *Science*, **87**, 441-442. <https://doi.org/10.1126/science.87.2263.441>
- [7] 钱倩, 张梅芳. 新磺胺药与甲氧苄氨嘧啶药理实验研究和临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 1-2.
- [8] Ou, G.N., He, B.Y. and Yuan, Y.Z. (2012) Design of Biosolvents through Hydroxyl Functionalization of Compounds with High Dielectric Constant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**, 1472-1479.

<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9541-y>

- [9] 高伟, 田黎, 周俊英, 等. 海洋芽孢杆菌(*Bacillus marinus*) B-9987 菌株抑制病原真菌机理[J]. 微生物学报, 2009, 49(11): 1494-1501.
- [10] 沈卫锋, 牛宝龙, 翁宏飏, 等. 枯草芽孢杆菌作为外源基因表达系统的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(4): 234-238.
- [11] 夏金兰, 王春, 刘新星. 抗菌剂及其抗菌机理[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2004, 35(1): 31-38.
- [12] 郑晓冬, 梅乐和, 方哲红, 等. 酵母对有机溶剂耐性的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(6): 28-31.