

去甲基金霉素及去甲基四环素的分离与鉴别

王文翔 张家美 彭国标 常庆芳* 吴 铨

(中国医学科学院药物研究所, 北京) (华北制药厂, 石家庄) (北京药品生物制品检定所, 北京)

诱变处理金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 38, 得到突变株 38-2-14, 产生 38-2-14 A 和 B 两种抗菌素。经理化性质的鉴别, 认为 A 成份与去甲基金霉素是同一物质, B 成份为去甲基四环素。

许菊彦等^[1]和程惠芳等^[2]将产生四环素的菌株金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 38, 用诱发突变的方法获得产生去甲基金霉素和少量去甲基四环素的突变株 38-2-14。本文报告该菌株所产生抗菌素 38-2-14 A 和 38-2-14 B 的分离与鉴别。

分离与精制

分离方法^[3,4]是将发酵液用草酸调节至 pH 1.5—2.0, 搅拌半小时后过滤, 滤液用 5N 氢氧化钠调至 pH 9.0—9.5, 加入 $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ 体积的正丁醇提取。分出丁醇液, 并用 2N 盐酸调至 pH 1.8—2.0, 经薄膜浓缩, 再加入 2% 活性炭脱色。丁醇脱色液用 2N 氢氧化钠中和至 pH 6.5—7.0, 立即析出抗菌素 38-2-14 A、B 二成份的混合沉淀。每克沉淀物加入 2 毫升甲醇, 并加入少量浓盐酸调至 pH 1.5—2.0 使之溶解, 甲醇液再用浓盐酸将 pH 调至约 0.5, 置于 45—50℃ 水浴中加热, 析出 A、B 混合物的黄色针状盐酸盐结晶。

将盐酸盐混合物溶于水饱和之正丁醇内, 用配布层析法进行分离。将盐酸处理过的硅藻土作为支持剂, 硅藻土与用正丁醇-氯仿 (4:1) 饱和之 0.01N 盐酸溶液混匀后装入层析柱内, 以 0.01N 盐酸饱和之正丁醇-氯仿 (4:1) 溶液为流动相, 流出液

分段收集。从纸层析结果说明 A 成份先从柱中流出, 后面流出的为 B 成份。

将 A 成份流出液减压浓缩至干, 用甲醇-盐酸法^[3]或水-盐酸法^[5]精制得黄色针状或棒状盐酸盐结晶 (图 1)。

将 A 成份盐酸盐加入蒸馏水中, 用固体碳酸钠将水溶液调至约 pH 9, 使之溶解, 再用 2N 盐酸将 pH 调至 5.5, 析出结晶, 离心后经少量蒸馏水洗涤, 得黄绿色六角形游离碱结晶。

将 B 成份流出液于室温放置过夜, 析出游离碱结晶, 于甲醇中重结晶, 得淡黄色针状游离碱结晶 (图 2)。

理化性质和抗微生物性质

理化性质 抗菌素 38-2-14 组份鉴定用圆型纸层析, 溶剂系统以 0.1M 乙二胺四醋酸钠作为固定相, 流动相为氯仿-吡啶 (100:1)。展层后用荧光显迹或用枯草杆菌生物显影, 结果见表 1。

所有样品在 R_f 值 ~ 0.1 处皆有一小荧光点或抑菌圈, 系差向异构体所致。抗菌素 38-2-14 A 的 R_f 值和去甲基金霉素相同, 抗菌素 38-2-14 B 的 R_f 值小于四环素。

* 该同志现在河北化工学院。
本文 1974 年 5 月 13 日收到。



图1 抗菌素 38-2-14A 盐酸盐结晶

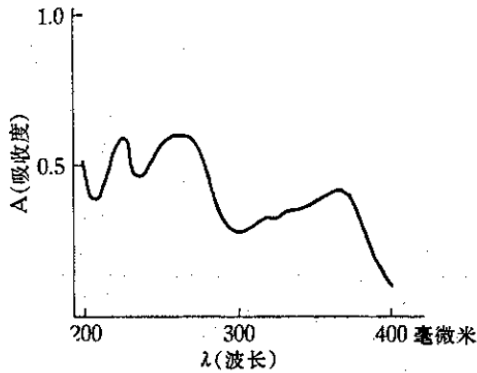


图3 抗菌素 38-2-14A 盐酸盐的紫外吸收光谱
(16.6 微克/毫升, 0.1N 硫酸)

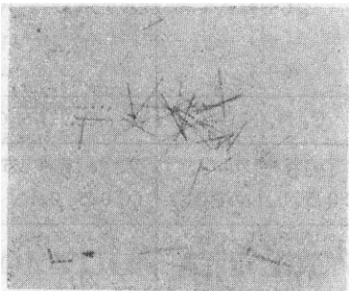


图2 抗菌素 38-2-14B 游离碱结晶

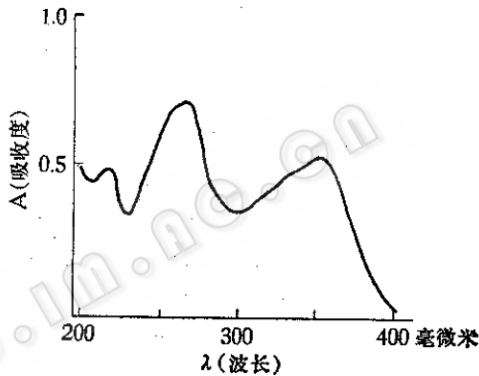


图5 抗菌素38-2-14B 游离碱的紫外吸收光谱
(16.6 微克/毫升, 0.1N 硫酸)

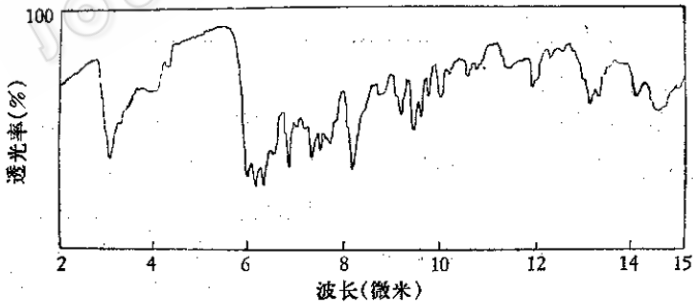


图4 抗菌素 38-2-14A 盐酸盐的红外吸收光谱 (KBr 片)

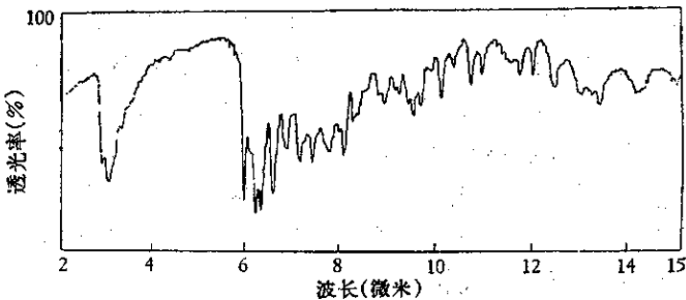


图6 抗菌素 38-2-14B 游离碱的红外吸收光谱 (KBr 片)

表 1 纸层析 R_f 值的比较

抗 菌 素 名 称	R_f 值
抗菌素 38-2-14 A	0.52
抗菌素 38-2-14 B	0.29
去甲基金霉素*	0.52
金霉素**	0.70
四环素**	0.40

* 北京药品生物制品检定所将美国商品“Ledermycin”进行精制所得样品。

** 北京药品生物制品检定所提供的标准品。

抗菌素 38-2-14 A、B 二成份与去甲基金霉素、去甲基四环素理化性质的比较,结果见表 2。

抗菌素 38-2-14 A 的盐酸盐溶于水、甲醇,微溶于乙醇,难溶于其它有机溶剂中。将 A 成份之 1.1N 盐酸溶液置于 80℃ 水浴中加热 15 分钟,抗菌活性下降 1%。资料报道^[4]去甲基金霉素于 1N 硫酸中, 100℃ 加热 15 分钟,抗菌活性下降 2%。

表 2 理化性质的比较

	抗菌素 38-2-14 A	去甲基金霉素 ^[4,6]	抗菌素 38-2-14 B	去甲基四环素 ^[4,6]
熔点(游离碱)	170—173℃(分解)	170—175℃(分解)	172—176℃(分解)	170—177℃(分解)
高锰酸钾褪色	(+)	(+)	(+)	
浓硫酸反应	(+)	(+)	(+)	
硫酸-甲醛反应	(+)	(+)	(+)	
分子式	$C_{21}H_{21}N_2O_8Cl$	$C_{21}H_{21}N_2O_8Cl$	$C_{21}H_{21}N_2O_8$	$C_{21}H_{21}N_2O_8$
比旋度	$[\alpha]_D^{25} - 268^\circ$ (C 0.5, 0.1N 硫酸)	$[\alpha]_D^{25} - 258^\circ$ (C 0.5, 0.1N 硫酸)	$[\alpha]_D^{25} - 260^\circ$ (C 0.5, 0.1N 硫酸)	$[\alpha]_D^{25} - 259^\circ$ (C 0.5, 0.1N 硫酸)
紫外吸收光谱	$\lambda_{max}^{0.1N H_2SO_4}$ $E_{1\%}^{1cm}$ 226 354 265 366 365 252	$\lambda_{max}^{0.1N H_2SO_4}$ $E_{1\%}^{1cm}$ 227 357 268 362 368 249	$\lambda_{max}^{0.1N H_2SO_4}$ $E_{1\%}^{1cm}$ 217 312 264 408 353 306	$\lambda_{max}^{0.1N H_2SO_4}$ $E_{1\%}^{1cm}$ 217 293 264 395 353 292
红外吸收光谱	两者基本相同		两者基本相同	

抗菌素 38-2-14 A 在酸性溶液中,对热的稳定性与去甲基金霉素相似。

元素分析,按 $C_{21}H_{21}N_2O_8Cl \cdot HCl \cdot 2H_2O$ 计算。

理论值%: C46.94; H4.68; N5.22; Cl 13.19。

实验值%: C47.19, 47.26; H5.02, 4.75; N5.18, 5.02; Cl12.93, 13.18。

抗菌素 38-2-14 A 纸层析的 R_f 值与去甲基金霉素相同,元素分析结果与理论值接近,熔点、功能基反应、紫外吸收光谱(图3)、红外吸收光谱(图4)和去甲基金霉素报道的资料一致。将去甲基金霉素样品和抗菌素 38-2-14 A 进行紫外吸收光谱和红外吸收光谱的测定得到基本相同的结

果。

抗菌素 38-2-14 B 的游离碱溶于低级醇,微溶于水,难溶于其它有机溶剂中。将 B 成份之 1.1N 盐酸溶液置于 80℃ 水浴中加热 30 分钟,抗菌活性下降 31%。资料报道^[4]去甲基四环素之 1N 盐酸溶液于 100℃ 加热 6 分钟,抗菌活性下降 33%。在酸性溶液中抗菌素 38-2-14 B 对热稳定性较差与去甲基四环素相似。

元素分析,按 $C_{21}H_{22}N_2O_8 \cdot 3H_2O$ 计算。

理论值: C52.50; H5.87; N5.83。

实验值: C52.80, 52.86; H5.88, 6.05; N5.96, 6.17; 不含 Cl。

抗菌素 38-2-14 B 的元素分析值接近于理论值,熔点、紫外吸收光谱(图5)和红

外吸收光谱(图 6) 与去甲基四环素报道的资料一致。

抗菌素 38-2-14A、B 的抗微生物作用, 用液体稀释法测定抗菌谱, 结果见表 3。抗菌素 38-2-14 A、B 二成份对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌均表现良好的抗菌作用。

表 3 抗菌素 38-2-14A 和 38-2-14B 的抗菌谱

试 验 菌	38-2-14A 的最低抑 菌浓度(微 克/毫升)	38-2-14B 的最低抑 菌浓度(微 克/毫升)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	<0.19	<0.19
<i>Staphylococcus albus</i> 7	6.25	25
<i>Streptococcus hemolyticus</i> BA12	50	>100
<i>Escherichia coli</i> 1515	0.78	0.78
<i>Bacillus cereus</i> 756	<0.19	<0.19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11	0.78	1.56
<i>Proteus vulgaris</i> 9	12.5	50

结 论

从 *Streptomyces aureofaciens* 38-2-14 变株的发酵液中分离出抗菌素 38-2-14 A、B 两种结晶, 根据它们的理化性质证明 A 成份与去甲基金霉素为同一物质, B 成份和去甲基四环素相同。

参 考 资 料

- [1] 许菊彦、姚天爵、李焕葵: 微生物学报, 14(1): 66, 1974。
- [2] 程惠芳、李焕葵: 微生物学报, 14(1): 70, 1974。
- [3] Periman, D. and Heuser, L. J.: US Pat. 3,028,311 Apr. 3, 1962.
- [4] McCormick, J. R. D. et al.: US Pat. 2,878,289 Mar. 17, 1959.
- [5] Orioni, V. E. and Winterbottom, R.: US Pat. 3,023,239 Feb. 27, 1962.
- [6] McCormick, J. R. D. et al.: J. Am. Chem. Soc., 79:4561—4563, 1957.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DEMETHYLCHLORTE- TRACYCLINE AND DEMETHYLTETRACYCLINE

WANG WEN-HSIANG, CHANG CHIA-MEI

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science, Peking)

P'ENG KUO-PIAO, CH'ANG CH'ING-FANG

(North China Pharmaceutical Industry, Shihchiachuang)

WU CHUAN

(Control Institute of Pharmaceuticals and Biologicals, Peking)

Antibiotics 38-2-14A and B have been isolated from *Streptomyces aureofaciens* 38-2-14 which was a mutant derived from *Streptomyces aureofaciens* 38 pro-

ducing tetracycline. Antibiotic 38-2-14A was identified as demethylechlortetracycline, while 38-2-14B has been found to be identical with demethyltetracycline.