

抗菌素 104 的研究

II. 抗菌素 104-I 的分离和鉴别*

福建省微生物研究所 福州抗菌素厂
上海第一医学院药理学系

抗菌素 104 是由玫瑰绛红小单孢菌 (*Micromonospora roseopurpurea* n. sp.) 发酵产生。发酵液用醋酸乙酯提取, 经氧化铝柱层析和树脂脱色纯化, 在氯仿石油醚中得白色棒状结晶。主要成分为 104-I。熔点 112—115.5°C, 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ 为 -36° (C 0.4 乙醇), 分子量是 581 (质谱法), 分子式 $C_{31}H_{51}NO_9$, 具有碱性大环内酯类抗菌素的一般理化性质。经化学结构测定, 确定为 β -5-十六环内酯-D-1'-脱氧二甲氨基己糖苷, 与蔷薇霉素 (Rosamicin) 相同。

提取、纯化、结晶

一、提取

发酵滤液于 pH 9.0 用醋酸乙酯提取, 转溶于 pH 1.5 盐酸水。酸水提取液调至 pH 9.0, 复用醋酸乙酯提取。反复数次, 醋酸乙酯提取液减压浓缩至少量体积, 加 10 倍量石油醚沉淀为粗品。

粗品经薄层层析(吸附剂为硅胶 G; 溶媒系统为氯仿: 甲醇 = 4:1) 和化学显色 (10% H_2SO_4 甲醇喷布, 110°C 显色) 呈现黄褐色斑点, 其 Rf 值为 0.46、0.53、0.65、0.68 和 0.80, 主要是 0.68。用金黄色葡萄球菌 209 P 和八叠球菌作生物显影, 均有生物活力。

二、纯化及结晶

将粗品 104 溶于醋酸乙酯, 通过中性活性氧化铝柱, 用醋酸乙酯淋洗, 合并洗出液, 减压浓缩至少量体积, 再通过酸性活性氧化铝柱, 同样用醋酸乙酯淋洗, 合并洗出液, 减压浓缩至少量体积, 加石油醚沉淀,

过滤干燥得浅黄色粉末。将此粉末溶于少量甲醇, 用 6N H_2SO_4 调至 pH 6.0, 浓缩至干, 用少量蒸馏水溶解, 通过 201 × 4 树脂脱色, 蒸馏水淋洗, 合并洗出液, 用 NaOH 溶液调 pH 值至 9.0, 用醋酸乙酯提取, 提取液减压浓缩, 用石油醚沉淀得白色粉末, 从氯仿石油醚中得白色棒状结晶, 称抗菌素 104-I (图版 I-2)。

理化性质

104-I 为白色棒状结晶, 熔点为 112—115.5°C, 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ -36° (C 0.4 乙醇), 分子量为 581 (质谱法), 分子式 $C_{31}H_{51}NO_9$ 。

易溶于甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮、氯仿、醋酸乙酯、四氯化碳、乙醚、苯, 微溶于水, 不溶于环己烷、正己烷、石油醚, 在水中溶解度随温度增高而减少, 以 50—60°C 为最小。

104-I 能使溴水、高锰酸钾水溶液褪色, 浓硫酸反应呈红褐色, 淀粉-碘化钾试

* 承上海药物研究所、中国科学院上海有机化学研究所、上海医药工业研究院等单位协助, 特此致谢。
本文于 1975 年 4 月 23 日收到。

剂显蓝色, Molish、Fehling 与 Elson-Mogen 反应呈阳性, 三氯化铁、茚三酮、双缩脲和坂口氏反应均呈阴性。Fischbach-Levine 红霉素试验, 丙酮层橙色, 氯仿层微黄色。碳霉素试验黄色。

104-I 在 pH 4.4 醋酸盐缓冲液和 1/15 M pH 8.0 磷酸盐缓冲液进行纸上电泳结果为一碱性物质(表 1)。

表 1 抗菌素 104-I 纸上电泳

缓冲液	电泳时间(小时)	电压(伏特)/ 电流(毫安)	移动距离(厘米)
0.2 M pH 4.4 醋酸盐缓冲液	0.5	500/10	向负极移动 2.8
1/15 M pH 8.0 磷酸盐缓冲液	1	400/30	向负极移动 1.6

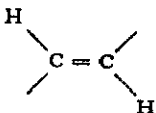
表 2 结果说明, 104-I 在 pH 4—8, 100°C 加热 30 分钟均较稳定。

化学结构分析

一、光谱分析

抗菌素 104-I 的紫外吸收光谱在 240 毫微米有一个强吸收峰(图 1), 显示有 α 、 β 不饱和羰基存在。其红外光谱在 1690 厘米⁻¹ 和 1620 厘米⁻¹ 均有吸收峰(图 2), 说明结构中有不饱和双键共轭羰基存在。

104-I 的核磁共振谱在四氯化碳作溶剂时 δ 6.45 ppm 处有一个单峰(图 3); 在丙酮作溶剂时 δ 6.20 及 δ 6.70 ppm ($J = 16\text{Hz}$) 出现 AB 型二旋系统四重峰(图 4), 并在红外光谱 982 厘米⁻¹ 处有一个强面外摇摆振动频率吸收峰, 示明该不饱和双键上氢质子应呈反式:



104-I 在醋酸介质中与碘化钾作用能释放出游离碘使淀粉指示剂显蓝色, 示有

表 2 104-I pH 和温度稳定性试验结果

pH	100°C 加热时间(分)	生物效价(微克/毫升) (八叠球菌显影)
2.2	0	250
	30	120
4.0	0	244
	30	231
6.0	0	225
	30	182
7.0	0	225
	30	195
8.0	0	238
	30	195
9.0	0	250
	30	128
10.0	0	231
	30	88

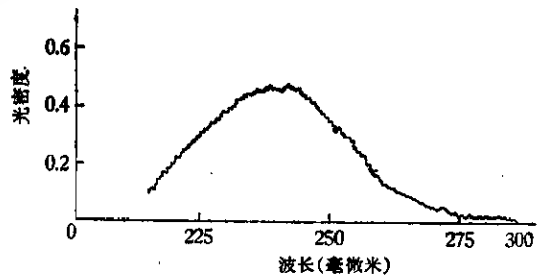


图 1 104-I 紫外吸收光谱(甲醇液)

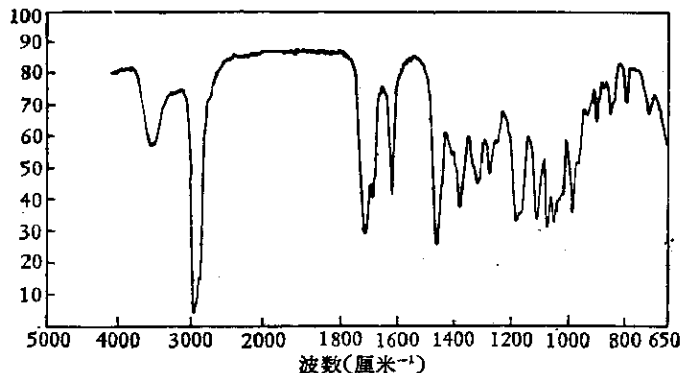
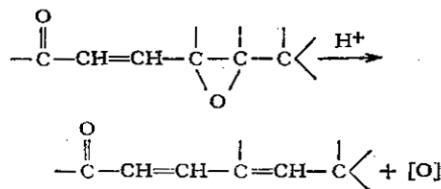


图 2 104-I 红外光谱(石蜡糊)

环氧基团存在, 104-I 与碘化钾作用后紫外光谱向长波移位, 原 240 毫微米吸收峰消失, 另于 287 毫微米 (甲醇液) 出现一个强吸收峰, 可能是由于相邻处另一个新共轭双键产生, 形成了 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 不饱和羰基, 此现象说明 104-I 分子中环氧基团是位于 α, β 不饱和羰基的相邻位置。



104-I 在红外光谱 2750 厘米⁻¹处有一个中等强度的吸收峰, 核磁共振 δ 9.7 ppm

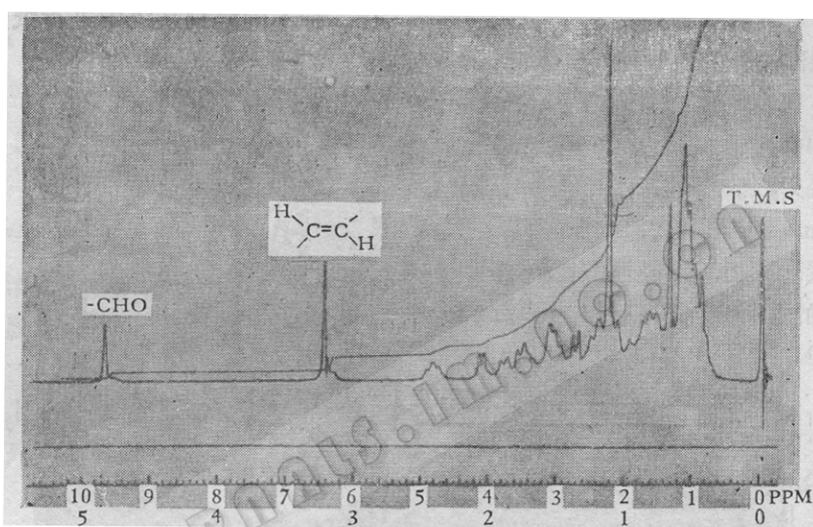


图3 104-I 核磁共振图谱 (CCl₄, T. M. S 内标 100 M Hz)

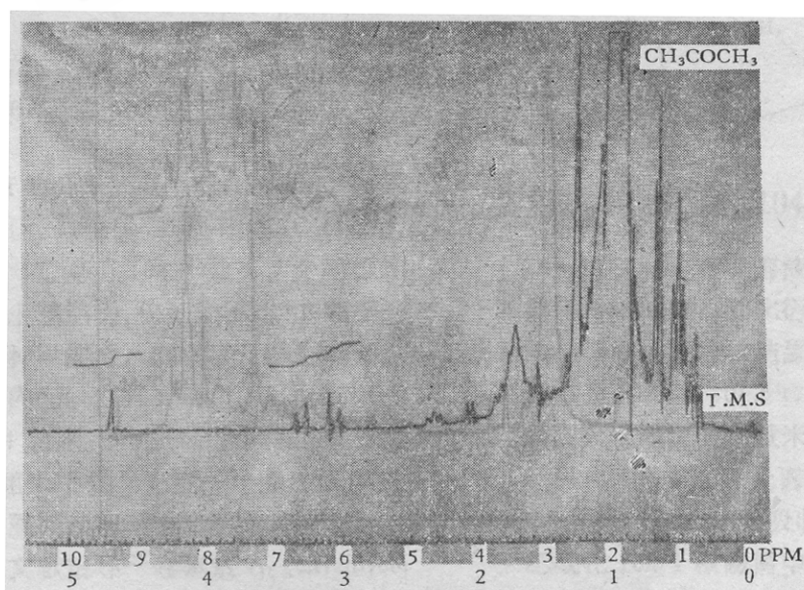


图4 104-I 核磁共振谱 (H₃COCH₃, T. M. S 内标 100 M Hz)

有一个单峰(图 3), 经 D_2O 交换后该峰并不消失(图 5), 示明有醛基存在。

红外光谱 3540 厘米^{-1} 、 1320 厘米^{-1} 处有二个吸收峰, 核磁共振图谱 $\delta 3.14\text{ ppm}$ 有单峰 (2H) (图 3), D_2O 交换后该峰消失(图 5), 示明了分子中存在 2 个游离羟基。2',3-二乙酰基 104-I 的核磁共振图谱中 H-3, H-2' 产生移位(图 6), 也示明了分子中存在二个游离羟基。

二、104-I 水解产物——脱氧二甲氨基己糖

将 104-I 溶于 95% 乙醇后用 6N 盐酸进行水解得一种白色结晶的碱性氨基己糖, 熔点为 $181.5\text{—}182.5^\circ\text{C}$ 与实验室制备的红霉素的脱氧二甲氨基己糖的熔点及文献报导的熔点均相同^[1] 混合熔点不下降。在二种不同溶剂系统中进行纸层析测得的

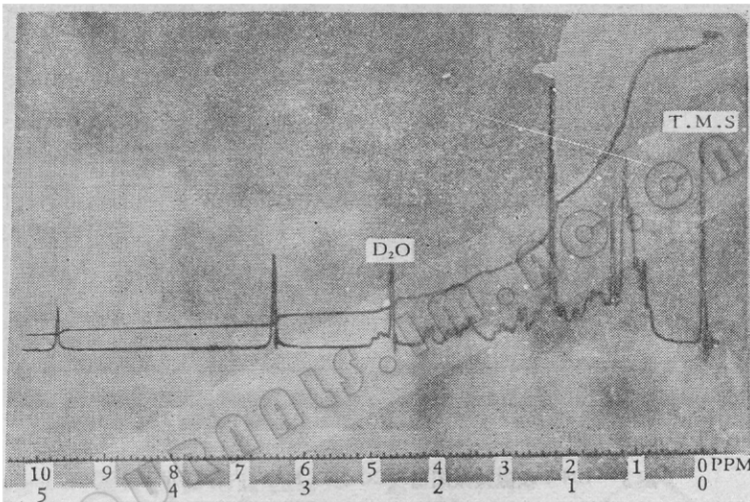


图 5 104-I 核磁共振图谱 (CCl_4 , D_2O T. M. S 内标 100 M Hz)

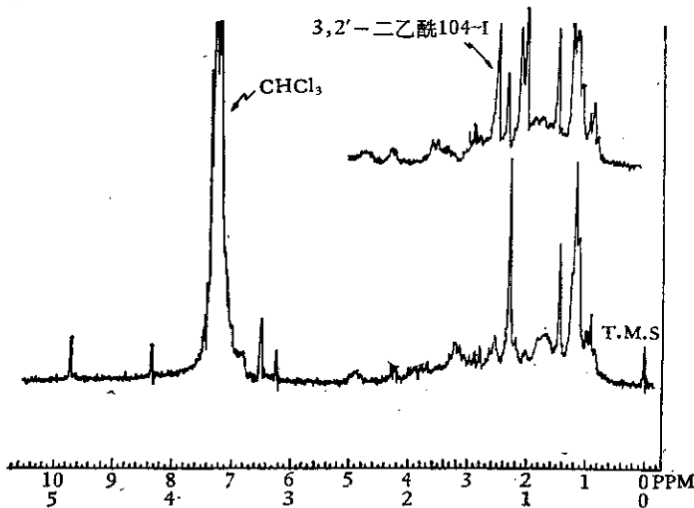
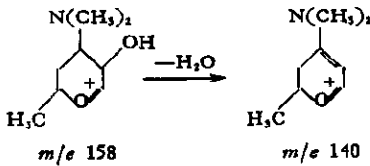
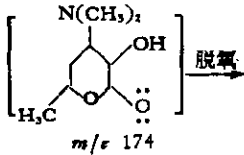


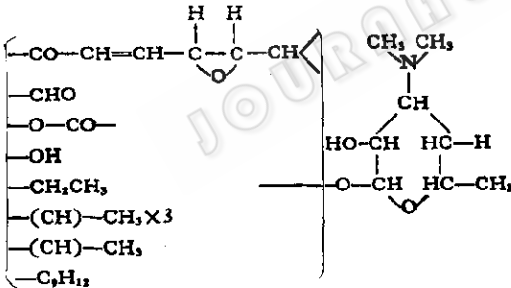
图 6 104-I 及乙酰化 104-I 的核磁共振图谱 ($CHCl_3$, T. M. S 内标 100M Hz)

Rf 值与红霉素的脱氧二甲氨基己糖的 Rf 值一致。此外, 从 104-I 质谱中也看到了脱氧二甲氨基己糖有关的裂解碎片离子峰 (图 7)。



上述诸实验数据说明了 104-I 结构中也是具有脱氧二甲氨基己糖 (Desosamine) 的组成。

综合上述诸实验进行结构分析, 104-I 应具有下列诸部分结构



104-I 的分子式是 $C_{31}H_{52}NO_8$, 如果是饱和的话, 31 个碳要有 64 个氢 (C_nH_{2n+2}), 现有 51 个氢, 说明 104-I 是有 7 个不饱和处。但按上述结构, 仅 6 个不饱和, 剩下一个只有一种可能性, 即 104-I 结构中必须有个环状内酯。红外光谱 1715 cm^{-1} (光栅为 1724 cm^{-1}) 处一个强羰基吸收峰, 另 1185 cm^{-1} 处又出现一个强羧酸酯的不对称伸展振动频率也说明此点。

根据文献报导^[1] 卷霉素 A_1 (cirramycin A_1) 的红外光谱和核磁共振谱中主要吸收

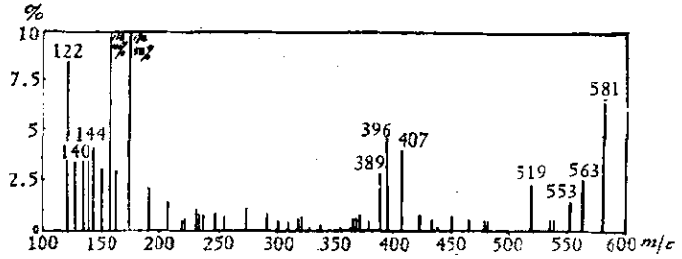
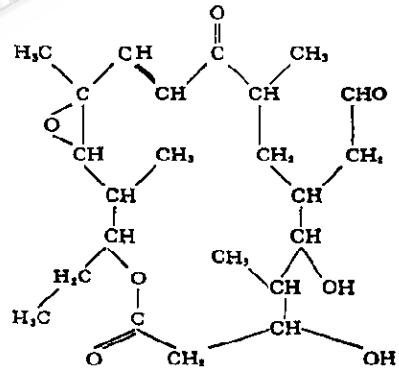


图 7 104-I 质谱

峰, 波形与 104-I 相比基本相同, 进一步对照了二者乙酰化衍生物质谱 (表 3), 证明了卷霉素 A_1 与 104-I 结构中应有相同的大环内酯, 二者所不同的仅是它们含糖部分, 卷霉素 A_1 是含有 Mycaminose, 而 104-I 含有脱氧二甲氨基己糖, 所以 104-I 应具有下列与卷霉素 A_1 相同的十六大环内酯。



三、2',3'-二乙酰 104-I 衍生物

104-I 在醋酐-吡啶溶液中于室温条件下制得 104-I 的二乙酰化衍生物, 用正己烷重结晶得白色颗粒状结晶。

熔点是 $103.5-106.5^\circ\text{C}$ 。紫外光谱中 λ_{max} 最高吸收峰 238 毫微米。

乙酰化 104-I 红外光谱中 5340 cm^{-1} 和 1320 cm^{-1} (图 8) 处吸收峰消失。

乙酰化 104-I 核磁共振谱中氢-2', 氢-3 移位, 说明 2', 3 位上二羟基乙酰化。

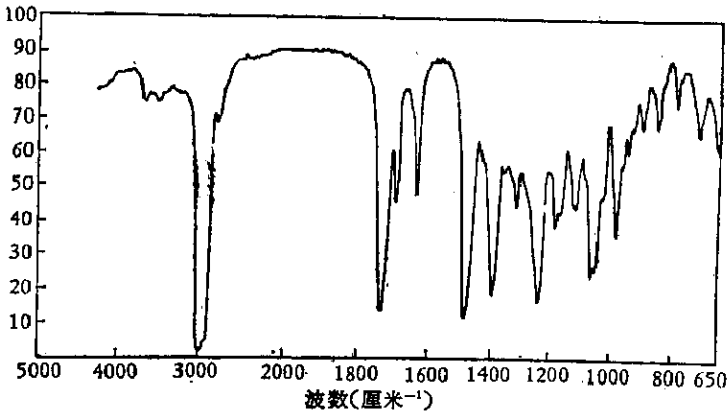
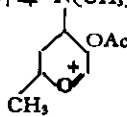


图8 乙酰化 104-I 红外光谱

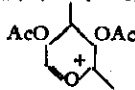
表 3 二乙酰 104-I 与三乙酰卷霉素 A₁ 质谱离子峰比较

抗菌素名称	分子离子峰 M ⁺ m/e	主要裂解碎片离子峰 m/e
二乙酰 104-I	665	637 (M ⁺ -CO); 605 (M ⁺ -CH ₃ COOH); 449 (M ⁺ -acetyl-desosaminosyl) 200*
三乙酰 卷霉素 A ₁	723	695 (M ⁺ -CO) 663 (M ⁺ -CH ₃ COOH) 449(M ⁺ -diacetylmycaminosyl) 253**

* 为 acetyl-desosaminosyl 部分裂片峰 N(CH₃)₂



** 为 diacetylmycaminosyl 部分裂片峰 N(CH₃)₂



四、脱氧二甲氨基己糖与苷元相接位置

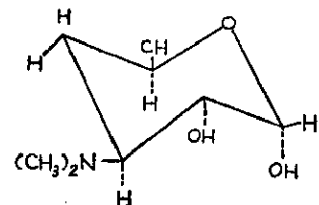
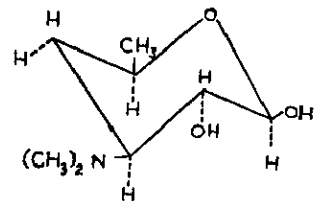
104-I 核磁共振谱在 $\delta 4.25\text{ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}-(\text{CH})-\text{O}-$) 处有一个二重峰, 双乙酰化后氢-2', 氢-3 产生移位, 而此 $\delta 4.25\text{ppm}$ 处核磁峰不变, 说明 104-I 中脱氧二甲氨基己糖是由 1' 位的羟基形成苷键。

按前结构分析, 苷元十六大环内酯的

3, 5 位上有二个羟基, 当 104-I 乙酰化后氢-3, 氢-2' 产生移位, 说明脱氧二甲氨基己糖不可能接于大环内酯的碳-3 位, 而只能接于碳-5 位。

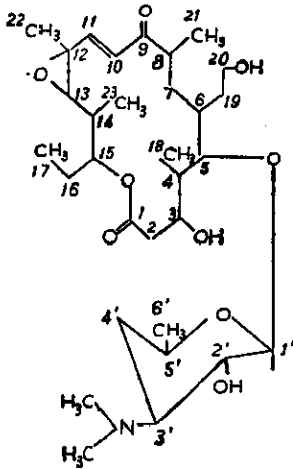
五、苷键的立体构型

从红霉素 A、B、C, 酒霉素, 新酒霉素, 竹桃霉素及苦霉素等大环内酯抗菌素中所得到的 3, 4, 6-三去氧-3-二甲氨基己糖, 已阐明构型是属于 D 系, 从这类脱氧二甲氨基己糖的立体化学结构的核磁共振研究中指出^[3], 脱氧二甲氨基己糖的 $J_{1a2a} = 7.8\text{Hz}$, $J_{1e2a} = 4.0\text{Hz}$, 1', 2'-二乙酰脱氧二甲氨基己糖的 $J_{1a2a} = 7.6\text{Hz}$ 。



(实线 = R 键, 虚线 = -C 键)

根据上述 104-I 在 4.25 ppm 处的二重峰在乙酰化前后偶合常数 J 均为 7 Hz, 说明 104-I 脱氧二甲氨基己糖中的氢-1 及氢-2 为 α 键, 104-I 苷键的构象应为 β 构型。



结论及其分析

抗菌素 104 是一个多组分抗菌素, 其主要有效成分为 104-I, 综合上述结构分析, 证明 104-I 为 β -5-十六环内酯-D-1'-脱氧二甲氨基己糖苷。化学结构式如左:

查阅近来的一些资料指出, 104-I 与蔷薇霉素 (Rosamicin)^[4] 结构相同, 而与结构类似的抗菌素 B-58941^[5] 的红外光谱不同, 说明与前者是同一物质, 与后者不同。

参 考 资 料

- [1] Flynn, E. H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76: 3121, 1954.
- [2] Koshiyama, H. et al.: *J. Antibiotics*, 22 (2): 61—70, 1969.
- [3] Tsukiura, H. et al.: *J. Antibiotics*, 22 (3): 89—105, 1969.
- [4] Wagman, G. H.: *International Center of Information on Antibiotics, Information Bulletin No. 11*, 150, 1973.
- [5] Tatsuoka, S.: *Ibid*, 152, 1973.

STUDIES ON ANTIBIOTIC 104

II. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC 104-I

FUJIAN INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

FUZHOU ANTIBIOTICS MANUFACTORY

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, SHANGHAI FIRST MEDICAL COLLEGE

By means of solvent extraction antibiotic 104 was isolated from the fermentation broth cultured with *Micromonospora roseopurpurea*. It was shown to belong to the macrolide group and found to be composed of several components. Antibiotic 104-I is the principal component identified.

Preparation of antibiotic 104 was purified by chromatography on an activated aluminium oxide column and decolorized with resin. The component, i.e., antibiotic 104-I, was crystallized in the

baton form from chloroform and petroleum ether. It has the molecular formula $C_{51}H_{81}NO_8$, M. W. 581 (mass spectrum), m. p. 112—115.5°C, specific rotation $[\alpha]^{33}_D - 36^\circ$ (C = 0.4, in ethanol). It possesses many of the general physico-chemical properties characteristic of the basic macrolide antibiotics. Chemical structure analysis shows that it is a β -5-16-macrocylic lactone-D-1'-desosamine. Therefore antibiotic 104-I is considered to be identical with Rosamicin reported.