

争光霉素的研究

II. 争光霉素的分离、纯化、理化性质及鉴定

张瑞 许鸿章 娄志贤 顾慧儿 张广善

(中国医学科学院抗菌素研究所,北京)

抗肿瘤抗菌素争光霉素是由轮枝链霉菌平阳变种 (*S. verticillus* var. *pingyangensis* n. var.) 产生的一组糖肽类抗菌素,是由十余种组份组成的蓝色复合物,分子中整合有铜,水溶液呈碱性。可用阳离子交换树脂从发酵液中提取,经氧化铝柱层析纯化并通过 CM-Sephadex-C-25 梯度柱层析分离。争光霉素的红外光谱和官能团反应表明它是糖肽类抗菌素。它的紫外光谱、旋光光谱、核磁共振谱及甲醇解产物的气相层析谱以及其他理化性质表明它属于 Bleomycin-Phleomycin 族^[1-4],并和文献报道的 Bleomycin 相同,而不同于该族的其他抗菌素。争光霉素复合物中的主要组份为 A₂, B₂, 它们分别和 Bleomycin A₂, B₂ 相同。

争光霉素于 1971 年投产并用于临床。本文主要报道争光霉素的分离、纯化、理化性质以及它和已知抗菌素的鉴别。

争光霉素的提取、纯化和分离

发酵液加 1% 草酸处理,过滤后滤液调 pH 至 4.6,用非球型阳离子交换树脂 490 (H⁺ 型) 进行吸附,以稀盐酸解吸,碱性树脂中和。洗脱液通过大孔吸附树脂 GDX-104 柱,活性组份吸附在柱上,先用水展洗除去无机盐,再用 10—20% 的酸性丙酮(内含 0.01N HCl) 洗脱,洗脱液冷冻干燥得粗制品。粗品溶于 80% 甲醇中,通过中性氧化铝干柱,并用 80% 甲醇展洗,洗脱液用三倍量丙酮沉淀得蓝色粉末。此蓝色粉末溶于少量水中加到 CM-Sephadex-C-25 (NH₄⁺ 型) 柱上,用 0.05—1.0M 甲酸铵进行线形梯度洗脱,分开争光霉素中的各组份。梯度洗脱液的总体积为 CM-Sephadex-C-25 体积的 10 倍。洗脱液分份收集并在 292 毫微米测定光密度,以收集管数

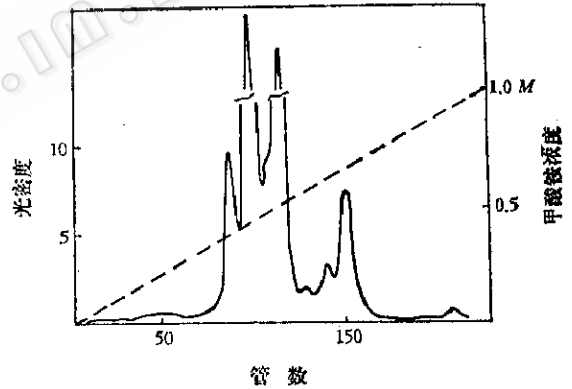


图 1 争光霉素的 CM-Sephadex-C-25 柱层析线形梯度洗脱曲线

作横坐标,光密度作纵坐标作图,可得线形梯度洗脱曲线(图 1)。合并洗脱峰,并通过 GDX-104 柱层析脱盐浓缩,冷冻干燥后可得单组份蓝色粉末。此粉末在酸性甲醇 (pH2.0) 中用二苯磺卡贝松脱铜,过滤,滤液加三倍量丙酮沉淀,沉淀物溶于水中,通过 GDX-104 柱层析除去微量二苯磺卡

本文于 1978 年 11 月 23 日收到。

贝松, 用 20% 酸性丙酮(内含 0.01N HCl)洗脱, 冷冻干燥, 可得单组份的白色粉末。用此方法我们首先分离得到复合物中占比例最大的两个组份, 分别称为争光霉素 A₂ 和 B₂。

争光霉素的理化性质及鉴定

天然产生的争光霉素是由十余种组份组成的蓝色复合物, 分子中螯合有铜, 去铜之后变为白色并能重新螯合铜而恢复为

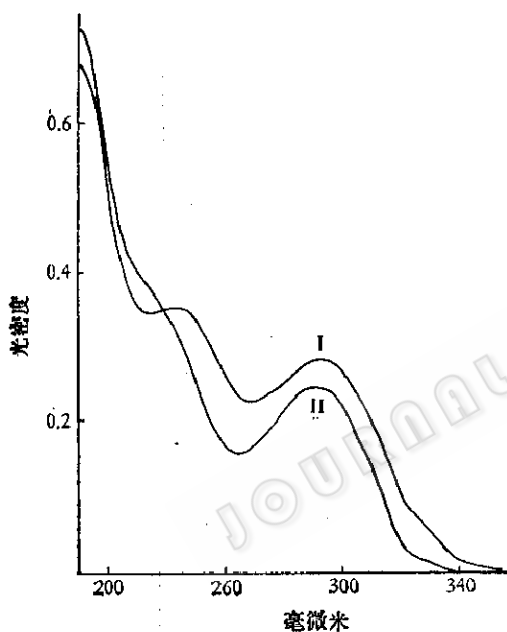


图 2 争光霉素的紫外吸收光谱(H₂O)

I. 含铜品 II. 去铜品

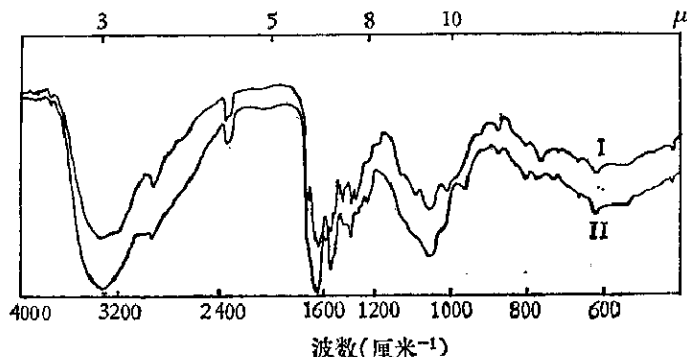


图 3 争光霉素 A₂ 的红外吸收光谱(KBr)

I. 含铜品 II. 去铜品

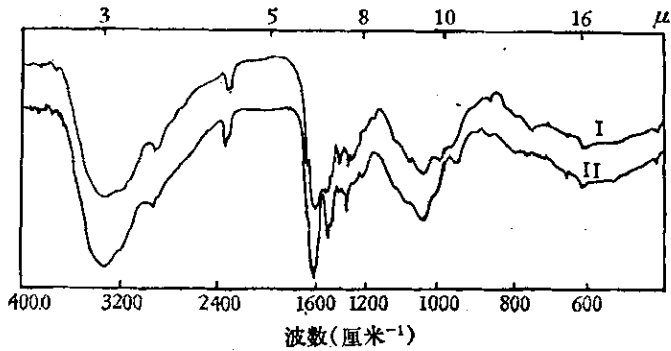
蓝色。蓝色复合物无一定熔点, 水溶液在 pH2.0—9.0, 常温条件下, 24 小时内活性无显著变化。易溶于水和甲醇, 微溶于乙醇, 在丙酮、乙酸乙酯和乙醚中皆不溶解。把 CM-Sephadex-C-25 梯度柱层析得到的各个高峰管用 10% NH₄Cl 溶剂系统进行上行纸层析, 可将争光霉素分为两族, R_f > 0.8 称为 A 族, R_f < 0.8 称为 B 族。A、B 两族对 Molisch、Anthrone 反应皆呈阳性; B 族对坂口反应呈阳性, A 族呈阴性; 复合物对茚三酮反应呈阳性, 但 A₂、B₂ 皆呈阴性。争光霉素各组份含铜品的紫外吸收光谱基本相同, 在 243—245 毫微米和 292—295 毫微米有两个最大吸收峰, 这两个峰的比值(243—245 毫微米/292—295 毫微米)为 1.1—1.3(图 2), 去铜后 243—245 毫微米峰变为肩。争光霉素 A₂(含铜)的 $E_{243}^{1\%}$ 为 112.7; B₂(含铜)的 $E_{243}^{1\%}$ 为 116.2。争光霉素复合物以及争光霉素 A₂、B₂ 的红外吸收光谱基本相同。在 3200—3400 厘米⁻¹ (OH/NH), 1720 厘米⁻¹ ($-\text{C}=\text{O}$), 1650 厘米⁻¹ 和 1550 厘米⁻¹ ($-\text{C}=\text{O}$),

以及 1050 厘米⁻¹ (OH) 有吸收峰(图 3,

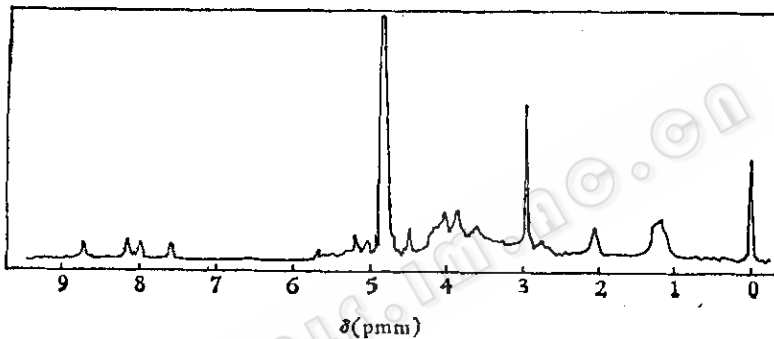
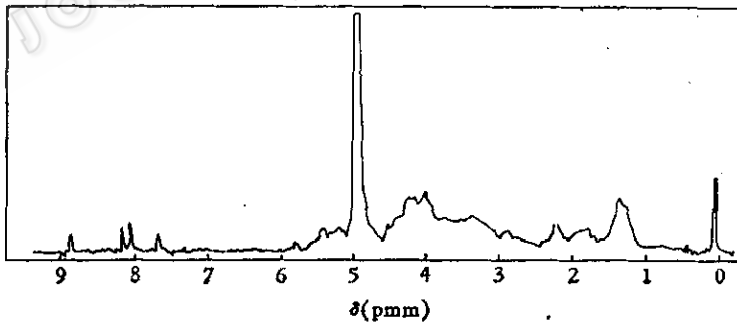
4)。从它们的红外光谱和它们对 Molisch、Anthrone 试剂的阳性反应表明分子中有糖

体和肽链的存在, 属于糖肽类抗菌素。争光霉素 A₂、B₂ 的去铜品的质子核磁共振谱(60 兆周, D₂O)在 δ7—10ppm 间有四个芳香质子峰, 而且争光霉素 A₂ 的去铜品在 δ3.0ppm 左右具有明显的硫甲基峰(图 5, 6)。

争光霉素的一系列理化性质, 以及紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振谱的测定结

图4 争光霉素 B₂ 的红外吸收光谱 (KBr)

I. 含铜品 II. 去铜品

图5 争光霉素 A₂ 的核磁共振谱(D₂O, 60 兆周)图6 争光霉素 B₂ 的核磁共振谱(D₂O, 60 兆周)

果皆表明它应属于已知的抗肿瘤抗菌素 Bleomycin-Phleomycin 族, 并和 Bleomycin 十分相似, 而不同于 Phleomycin。我们把争光霉素 A₂、B₂ 和 Bleomycin A₂、B₂¹⁾ 分别进行了比较。实验证明, 在进行 CM-Sephadex-C-25 梯度柱层析时, 争光霉素 A₂、B₂ 分

别与 Bleomycin A₂、B₂ 的洗脱峰位置相同。在同样条件下分别进行混合样品分析, 彼此不能分离。争光霉素 A₂、B₂ 与 Bleomycin A₂、B₂ 在 MeOH:10% NH₄OAc:

1) Bleomycin A₂、B₂ 样品系从 Bleomycin 商品中分离得到。

10% $\text{NH}_3 = 10:9:1$; $\text{PrOH}:\text{Pyridine}:\text{HAc}:\text{H}_2\text{O} = 15:10:3:12$ 和 $\text{MeOH}:10\% \text{NH}_4\text{OAc} = 1:1$ 三个系统中进行硅胶 G 薄层层析, 分别具有相同的 R_f 值。它们还具有相同的旋光光谱(图 7), 都在 610—620 毫微米有正 Cotton 效应, 去铜之后 Cotton 效应消失。争光霉素 A_2 和 Bleomycin A_2 水解

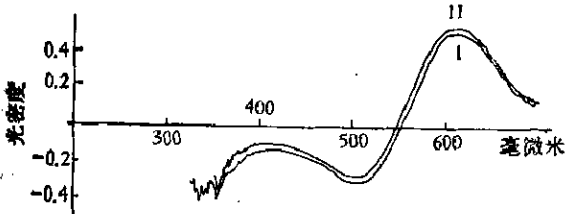


图 7 争光霉素 A_2 和 Bleomycin A_2 的旋光光谱 (H_2O)
I. 争光霉素 A_2 (含铜品) II. Bleomycin A_2 (含铜品)

产物 (6N HCl, 封管, 105°C 24 小时) 的分析指出, 它们在 $\text{BuOH}:\text{HAc}:\text{H}_2\text{O} = 4:1:1$ 系统中进行硅胶薄层层析的图谱相同。它们的氨基酸自动分析图谱也相同。我们分别把争光霉素 A_2 和 Bleomycin 商品同大孔磺酸型树脂 $61 \times 12 (\text{H}^+ \text{型})$ 在无水甲醇中回流 20 小时进行甲醇解, 滤去树脂甲醇液浓缩至干, 检出其中含有的糖体, 将其在干燥吡啶中用 TMCS 和 HMDS 进行硅烷化, 并作气相层析分析 (柱 0.5×200 厘米; 固定相 SE-30/Chromorob W; 载体为氮; 39 毫升/分; 130°—220°C; 升温速度 5°C/分), 结果表明它们的甲醇解产

物的硅烷化衍生物的气相层析谱完全相同(图 8)。说明争光霉素和 Bleomycin 分子中的糖体都是由 L-guloze 和 3-O-Carbamoyl-D-mannoze 所组成^[5]。以上性质表明, 争光霉素和 Bleomycin 具有相同的肽链组成和相同的糖体组成。因此我们确认争光霉素和 Bleomycin 相同, 而且争光霉素的主要组份争光霉素 A_2 、 B_2 和 Bleomycin 的主要组份 Bleomycin A_2 、 B_2 相同。

讨 论

Bleomycin-Phleomycin 族抗菌素由于它们的抗肿瘤作用而引起人们的重视。迄今已报道的属于这一族的抗菌素有: Bleomycin, Phleomycin, Zorbamycin, Zorbamycin B, Zorbamycin C^[6], YA-56-X, YA-56-Y,^[7] 抗菌素 -1588, Victomycin,^[8] Platomycin A 和 B^[9], 以及 Tallysomycin A 和 B^[10,11]。其中 Bleomycin, Phleomycin 都是由十余种组份组成的复合物, 各组份的结构均已阐明^[5,12,13]。它们的结构包括主核和侧链两部份, 主核由糖体和肽链所组成。Bleomycin 各组份与 Phleomycin 各组份的差别除了它们的侧链不相同外, 它们主核的差别仅仅在于 Phleomycin 主核中的含硫发色团 Thiazole 环上的双键之一被饱和, 并因此导致它们具有不同类型的紫外光谱和核磁共振谱。上述这些抗菌素的紫外吸收光谱都在 240—245 毫微米和 290—295 毫微米有两个最大吸收峰, 但由于含硫发色团的不同两峰比值有别。根据紫外吸收光谱两峰的比值可以分为两组, 一组称为 Bleomycin 型, 其中有 Zorbamycin B, Victomycin, Platomycin A 和 B 以及 Tallysomycin A 和 B 两峰的比值在 1.1—1.4 之间。另

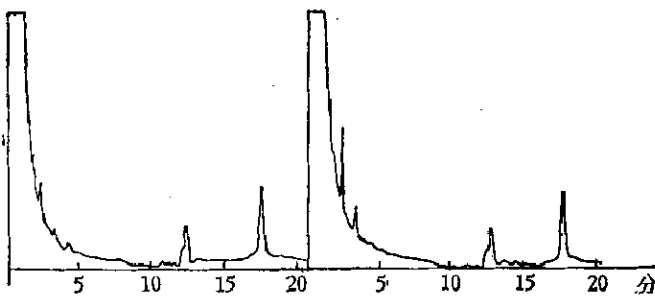


图 8 争光霉素 A_2 和 Bleomycin 的甲醇解产物硅烷化衍生物的气相层析图谱
左: 争光霉素 A_2 右: Bleomycin

一组称为 Phleomycin 型,其中有 Zorbamycin, Zorbamycin C, YA-56-X (已证明和 Zorbamycin 相同)^[14], YA-56-Y, 抗菌素-1588 等。两峰比值都在 2.7—3.0 之间。Bleomycin 组内的抗菌素它们的核磁共振谱在 $\delta 7-10\text{ppm}$ 之间有四个芳香质子峰,这是由 Thiazole 环上的两个芳香质子和 Lmidazole 环上的两个芳香质子所引起。而 Phleomycin 组内的抗菌素由于 Thiazole 环上的双键之一被饱和与之相应的质子失去芳香性,因此在核磁共振谱上在 $\delta 7-10\text{ppm}$ 之间只有三个芳香质子峰。争光霉素紫外吸收光谱和核磁共振谱表明,它具有 Bleomycin 型的含硫发色团,而明显区别于 Phleomycin 组的抗菌素。

在 Bleomycin 组中 Zorbamycin B 是 Zorbamycin 复合物中的次要组份,它的薄层层析的 Rf 值与 Bleomycin 差别显著^[6,10]。Platomycin A、B, Victomycin, Tallysomycin A、B 都是孢囊链霉菌所产生。它们和 Bleomycin 的主要差别在于肽链的氨基酸组成不同,而且彼此各异。而争光霉素的水解产物薄层层析和氨基酸自动分析谱表明和 Bleomycin 具有相同的氨基酸组成。因此

争光霉素和 Victomycin, Platomycin A、B, Tallysomycin A、B, 以及 Zorbamycin B 皆不相同唯与 Bleomycin 不能区别。争光霉素中的主要组份争光霉素 A₂、B₂ 和 Bleomycin 中的主要组份 Bleomycin A₂、B₂ 的对照分析表明两者分别一致,因此我们认为争光霉素和 Bleomycin 是相同的。

参 考 文 献

- [1] 赵仪英等:微生物学报,19(4),361—364,1979.
- [2] Maeda, K. et al.: *J. Antibiotics*, **9A**: 82, 1956.
- [3] Umezawa, H. et al.: *Ibid.*, **19A**: 200, 1966.
- [4] Umezawa, H. et al.: *Ibid.*, **19A**: 210, 1966.
- [5] Umezawa, H.: *Pure and Appl. Chem.*, **28**: 655, 1971.
- [6] Argoudelis, A. D. et al.: *J. Antibiotics*, **24**: 543, 1971.
- [7] Iton, Y. et al.: *Ibid.*, **24**: 727, 1971.
- [8] Takasawa, S. et al.: *J. Antibiotics*, **28**: 366, 1975.
- [9] Takasawa, S. et al.: *Ibid.*, **28**: 622, 1975.
- [10] Kawaguchi, H. et al.: *Ibid.*, **30**: 779, 1977.
- [11] Konishi, M. et al.: *Ibid.*, **30**: 789, 1977.
- [12] Takita, T. et al.: *Ibid.*, **25**: 755, 1972.
- [13] Fujii, A. T. et al.: *Ibid.*, **26**: 398, 1973.
- [14] Ohashi, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 2277, 1973.

STUDIES ON ZHENGGUANGMYCINS

II. ISOLATION, PURIFICATION, PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION

Zhang Rui Xu Hong-zhang Lou Zhi-xian
Gu Hui-er Zhang Guan-shan

*(Department of Antibiotics, Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)*

The Zhengguangmycins, a complex of glycopeptide type antitumor antibiotics is produced by *Str. verticillus* var. *pingyangensis* n. var. This paper deals with the isolation, purification, physico-chemical properties and identification.

Two major components namely Zhengguangmycins A₂ and B₂ were isolated from the complex and identified to be Bleomycin A₂ and B₂ respectively on the basis of their physicochemical properties.