

抗代谢抗菌素的研究

II. L-4-氧代赖氨酸的分离及化学结构

包琴珠 张海澜 徐少华 胡玉麟 刘树勋 叶蕴芬

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

从我国土壤中分离到的玫瑰绿褐链霉菌新种 (*Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.) 经深层发酵, 用离子交换剂提取法从发酵液中分离得到一个抗真菌的成分。经对它本身及多种衍生物进行化学、光谱 (红外、核磁、质谱) 分析与合成, 证明其结构为已知的 2-氨基-3-(β -氨基乙氧基) 丙酸即 L-4-氧代赖氨酸。

前文^[1]报道由玫瑰绿褐链霉菌新种 (*Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.) 产生的抗菌素 I-677, 在肿瘤筛选中发现对多种实验动物肿瘤 (肉瘤-180、艾氏腹水癌皮下型、肉瘤-37、黑色素瘤 MT、脑瘤-22) 均有较明显的抑制作用^[2]。在动物肝炎研究中, 对四氯化碳引起小白鼠中毒性肝损伤有保护作用^[3]。临床治疗 200 余例慢性肝炎患者有显著改善肝功能的效果^[4]。本文报道 I-677 的分离及化学结构。

实验部分

(一) I-677 单盐酸盐的制备

产生菌以黄豆饼粉、葡萄糖、油粉为主的培养基, 在 28℃, 深层发酵 96 小时, 发酵液加草酸至 pH 4.0 左右, 过滤, 滤液用氢氧化钠溶液调至 pH 6.7—7.0, 通过强酸性阳离子 (树脂 732-NH₄⁺型) 柱, 用水清洗柱后, 用 0.1—1.0 N 的 NH₄OH 洗脱, 洗脱液减压浓缩至稠粘状, 加水反复浓缩脱氨, 加水溶解, 用 6 N HCl 调至 pH 5.0—6.0 用活性炭脱色, 减压浓缩至稠粘状, 加 2—3 倍甲醇, 摇匀后放置, 即析出白色针状结晶, 收率可达 60% 以上。此结晶与茚三酮呈蓝紫色反应, 在酸性缓冲液中电泳移向阴极, 与赖氨酸有相同泳距, 属碱性氨基酸。

得到的单盐酸盐可经结晶纯化。即称取 10 克单盐酸盐加蒸馏水 4.5 毫升溶解, 加甲醇 20 毫升振摇片刻放置, 即析出白色细针状结晶, 过滤, 甲醇洗涤后, 再用少量乙醚洗涤, 抽干, 于 60℃ 真空干燥, 得 9 克结晶。m.p. 221—222℃ (分解)。

1. [分析]: C₅H₁₂N₂O₃ · HCl (184.5)。
2. 计算值 (%): C 32.52; H 7.10; N 15.13; Cl 19.21。
3. 实测值 (%): C 32.86; H 7.26; N 15.51; Cl 19.23。
4. 红外光谱 (厘米⁻¹): $\nu_{\text{NH}_2}^{\text{KBr}}$ 3060—2880, 1620 (NH₃⁺), 1590—1420 (COO⁻), 1130—1095 (-O-)。
5. $[\alpha]_D^{25}$: + 5.06 (C7.31, 0.27 NHCl) +

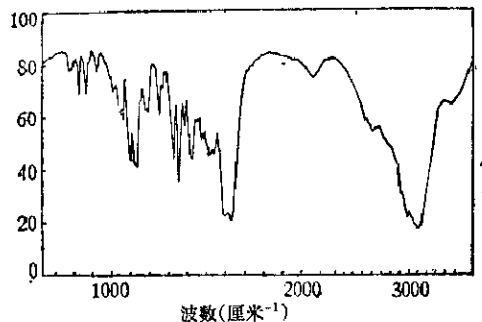


图1 L-4-氧代赖氨酸单盐酸盐的红外光谱(KBr压片)

本文于 1979 年 10 月 30 日收到。

+2.62 (C2.1, H₂O)

6. 旋光谱: 225毫微米, $[\phi] = +1,582^\circ$
(0.1NHCl)

(二) 双盐酸盐的制备

取单盐酸盐 5 克加蒸馏水 2.5 毫升, 加 6 NHCl 调至 pH 3.5~4.5 左右, 加甲醇 3-4 倍, 振摇, 即析出白色针状结晶, 过滤, 甲醇洗涤, 抽干, 真空干燥。

取上述得到双盐酸盐样品滴加蒸馏水使溶解, 加甲醇与乙醇重结晶一次, 用甲醇、乙醚洗涤、抽干、于 78℃ 真空干燥, 得白色细针状结晶, m. p. 159~160℃。

1. [分析]: C₅H₁₂N₂O₃ · 2HCl (221.092)。
2. 计算值(%) C27.16; H6.39; N12.67; Cl32.08。
3. 实测值(%) C27.38; H6.17; N12.43; Cl31.79。

(三) 游离碱的制备

取单盐酸盐样品溶于水, 通过强酸型阳离子树脂(732-NH₄⁺型)柱交换, 用水洗柱后, 用 0.4 N NH₄OH 洗脱, 洗脱液减压浓缩至近干, 放置冷却, 即有白色针状结晶析出, 过滤, 用少量冷甲醇洗涤, 再用乙醇-甲醇(1:9)洗涤, 最后用乙醚洗涤, 抽干, 于真空干燥器中干燥, 再于 60℃ 真空干燥, 即得游离碱, m. p. 84~85℃(分解)。

1. [分析]: C₅H₁₂N₂O₃ · H₂O (166.8)。
2. 计算值(%): C 36.14; H 8.49; N 16.86。
3. 实测值(%): C 36.55; H 8.45; N 17.05。

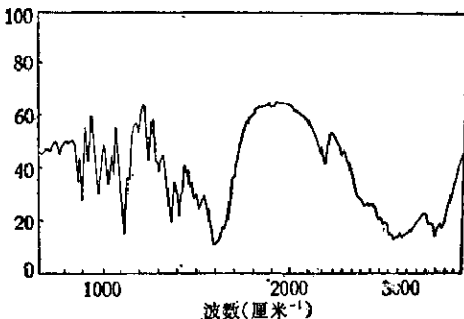


图2 L-4-氧代赖氨酸游离碱的红外光谱(KBr 压片)

4. 红外光谱(厘米⁻¹):

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3440~3355(NH₂), 3100~2620, 1650 (NH₃⁺), 1610~1590, 1410 (COO⁻), 1120 (-O-).

5. 质谱 (m/e): 149(MH⁺),

131, 129, 119, 111, 106, 103, 89, 74, 44.

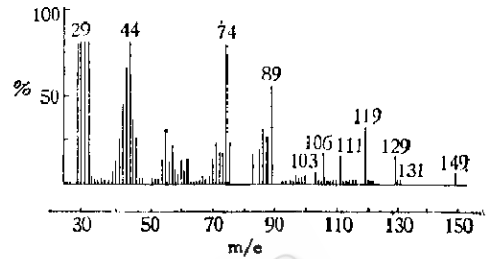
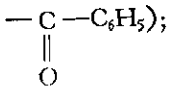


图3 L-4-氧代赖氨酸游离碱的质谱

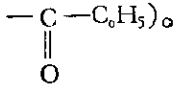
(四) 苯甲酰化化合物的制备

取游离碱 0.5 克, 溶于 12 毫升蒸馏水中, 加 1 N NaOH 4.5 毫升, NaHCO₃ 2.2 克, 苯甲酰氯 2 毫升, 振摇 1 小时, 再加 1 N NaOH 2 毫升, 反应 2 小时, 用 6 NHCl 酸化, 析出结晶滤集, 用水充分洗涤, 再用少量甲醇、丙酮洗涤, 最后用乙醚洗涤, 抽干, 于 60℃ 真空干燥。m. p. 174~175℃。

1. [分析]: C₁₉H₂₀N₂O₅ (356.37)。
2. 计算值(%): C64.03; H5.66; N7.86。
3. 实测值(%): C 64.13; H 5.91; N 8.05。
4. 核磁共振谱: δ : (CF₃COOH, 100 兆赫, 二甲基二硅醚为标准)。
3.52(4H, 多连峰, -CH₂-CH₂-);
3.80(2H, 二连峰, -O-CH₂-);
4.78(1H, 多连峰, α -CH);
8.08(1H, 多连峰,
-NH-C(=O)-C₆H₅);
7.38(1H, 二连峰,
-NH-C(=O)-C₆H₅);
7.12(5 H, 多连峰,



6.94(5 H, 多连峰,



(五) 乙酰化化合物的制备

取游离碱 0.5 克加甲醇 12 毫升, 醋酐 4 毫升, 25°C 反应 4 小时, 反复减压蒸馏去除多余试剂, 于放有粒状氢氧化钠的干燥器中真空干燥至恒重。

质谱(m/e): 232(MH⁺), 215, 201, 187, 173, 162, 144, 128, 116, 104.

(六) 甲醚化化合物的制备

取游离碱 0.5 克加甲醇 10 毫升, 加重氮甲烷乙醚溶液, 于 10°C 放置 20 小时, 减压蒸馏除溶剂, 于氯化钙干燥器中干燥至恒重。

质谱(m/e): 163(MH⁺), 162(M⁺), 148, 133, 120, 116, 103, 102, 88, 74.

根据单、双盐酸盐, 游离碱和苯甲酰衍生物的元素分析及质谱分析, 确定分子式为 C₅H₁₂N₂O₃.

结果与讨论

I-677 单盐酸盐红外光谱分析(见图 1), 游离碱红外光谱分析(见图 2), 都具有氨基酸类的典型氨基、羧基吸收带。此外还有醚键强特征吸收带。游离碱的质谱(见图 3), 分子离子峰 m/e 149 (MH⁺), 主要碎片分别具有 m/e 131 (M⁺-NH₂),

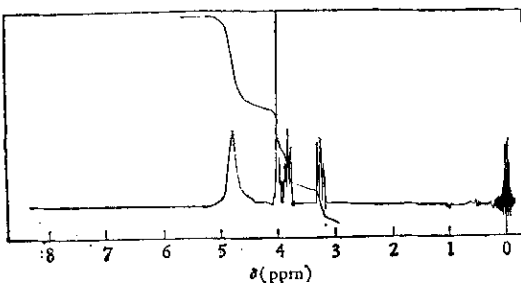
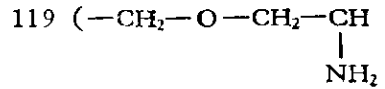
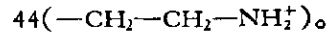
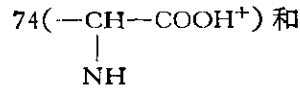
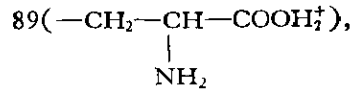


图 4 L-4-氧代赖氨酸单盐酸盐的核磁共振谱 (100 兆赫, 溶剂为 D₂O)



—COOH⁺),



此外还进行了甲酯, N-乙酰甲酯与苯甲酰甲酯化化合物的质谱分析。

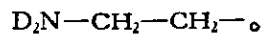
在重水中游离碱的核磁共振谱(图 4) 显示三组峰

δ 3.25(2H, 三连峰, J = 5 赫),

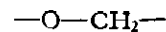
δ 3.80(2H, 三连峰, J = 5 赫), 和

δ 3.96(3H, 多连峰),

前二组峰为互相偶合的 A₂X₂ 系统, 分别为受氧原子与氮原子的负屏蔽效应而移向低磁场的次甲基信号, 即功能团



δ 3.96 的三个质子信号应为 α-亚甲基质子与同样受氧原子影响的 β 次甲基质子



的信号。综上所述该化合物结构式为:

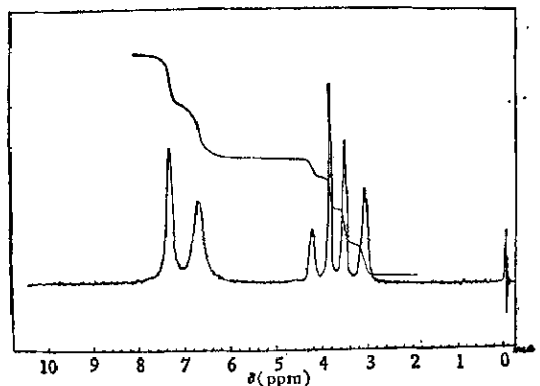
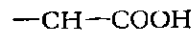
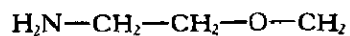


图 5 L-4-氧代赖氨酸单盐酸盐的核磁共振谱 (100 兆赫, 溶剂为 CF₃COOH)

即 α -氨基-3 (β -氨基乙氧基)丙酸即 4-氧代赖氨酸。

在三氟乙酸中单盐酸盐的核磁共振谱(图 5)亦符合上述分析 $\delta 6.62(3\text{H}, \text{单峰})$, $\delta 7.24(3\text{H}, \text{单峰})$ 为与三氟乙酸成胺盐的 NH_3^+ 的质子信号, $\delta 4.25(1\text{H}, \text{多连峰})$ 为 α 质子的信号, 因与 $-\text{CH}_2$, $-\text{NH}_3^+$ 偶合而呈多连峰, $\delta 3.82(2\text{H}, \text{二连峰})$ 为 β 次甲基质子信号, $\delta 3.5(2\text{H}, \text{三连峰}, J=5\text{赫})$ 为 δ 次甲基质子信号, $\delta 3.1(2\text{H}, \text{多连峰}, J=5\text{赫})$ 为 ϵ 次甲基质子的信号, 它除与 δ 次甲基质子偶合外并与末端的一 NH_3^+ 质子偶合, 因而呈多连峰。并经双照射去偶法亦证实其归属。同时, 苯甲酰化化合物的核磁共振谱分析也与上述结果一致。

I-677 在 0.1 N 盐酸中的旋光谱显示正 Cotton 效应, 表明其绝对构型为 L-型^[5]。

按照 Tesser 等^[6] 的方法, 合成得到的

DL-4-氧代赖氨酸经元素分析及红外光谱, 核磁共振分析均与天然得到的 I-677 相符合。1967 年 Stapley 等^[7] 曾报道从链霉菌 (*Streptomyces chartreasis* MA-2856) 和红色产色链霉菌 (*Streptomyces erythrochromogenes* MA-2872) 的培养液中分离到 L-4-氧代赖氨酸。

参 考 文 献

- [1] 张鸿龙等: 微生物学报, 19(2): 126, 1979 年。
- [2] 乐秀芳等: 科学通报, 1979 年第一期, 第 47 页。
- [3] 李晓玉等: 生物化学与生物物理学报, 11(2): 151, 1979 年。
- [4] 上海市肝炎防治研究协作组临床组: 新医学, 1980 年第二期, 第 93 页。
- [5] Dirks, I.P. et al.: *Rec. Trav. Chim.*, 83: 522, 1964.
- [6] Tesser, G.I. et al.: *Rec. Trav. Chim.*, 78: 404, 1959.
- [7] Stapley, E. O. et al.: *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 401, 1967.

STUDIES ON THE ANTIMETABOLITE ANTIBIOTICS

II. ISOLATION AND CHEMICAL STRUCTURE DETERMINATION OF L-4-OXALYSINE

Bao Qinzhu Zhang Hailan Xu Shaohua Hu Yulin Liu Shuxun
Ye Yunfen

(Shanghai Institute of Materia, Medica Academia Sinica)

I-677 is a microbial antimetabolite amino acid, produced by *Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp. It is water soluble, colorless. It exhibits activities against five kinds of animal transplant tumors including Sarcoma-180. In clinical trials I-677 showed good effect in lowering the SGPT level of the patients suffering from

chronic hepatitis, which is a new physiological effect so far has not been reported.

On the basis of chemical and spectroscopic studies (IR, MS, NMR, ORD), and chemical synthesis, I-677 was identified as a 2-amino-3-(β -amino-ethoxy) propionic acid, L-4-oxalysine.