

链霉菌 72 产生的二个代谢产物

张海澜 叶蕴芬 张从心 宰翠宝

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

本文报道从一株属于吸水类群放线菌的链霉菌 72 (*Streptomyces* sp. No. 72) 发酵液中, 分离到二个抗菌物质。其中一个抗真菌, 经各种理化数据鉴别确定为放线酚 (Actiphenol) 抗肿瘤活性筛选结果表明它对实验动物肿瘤有一定抑制作用。另一个具有抗细菌作用, 亦经各种理化数据测定鉴定为苯乙酰胺。

我们在寻找具有生物活性, 特别是具有抗肿瘤活性的新型微生物代谢产物时, 发现从海南岛土壤中分得到的一株吸水链霉菌 72, 发酵培养后的液体具有明显的抗革兰氏阳性细菌, 分枝杆菌和真菌的作用。将它的粗提物进行抗肿瘤活性筛选时, 表明它含有抑制肿瘤细胞生长的成分。粗提物用多种溶剂系统进行薄层层析试验, 用生物方法显影, 碘蒸气显色和荧光显影发现在单一的甲醇和乙醇溶剂中出现有二个 R_f 值极为近似的斑点, 其中一个抗真菌而另一个抗细菌。

活性成份的分离与提纯

发酵滤液用溶剂萃取法提取。所得粗品用硅胶柱干柱层析。先后用石油醚, 氯仿和氯仿-甲醇液洗脱, 从柱上首先流出抗真菌组份, 浓缩, 加石油醚得黄色粉末, 用甲醇结晶得白色针状结晶 (72-1), 得率约为 1%。紧接在 72-1 组分之后, 尚有一个抗细菌的组分, 浓缩至干, 在乙醇中结晶即为 72-2。72-2 的产量仅约是 72-1 的十分之一。

活性成分的理化性质及鉴定

产物 72-1 系白色针状结晶, 熔点 205°C , 微溶于甲醇、乙醇、乙酯等溶剂, 不溶于水和石油醚。与三氯化铁反应呈暗绿

色, 说明分子中含有酚性羟基。能溶解于碱性水溶液, 溶解后的溶液呈黄色, 但中和后, 立即重新析出白色针状结晶。它的分子式经元素分析和质谱测得的分子离子峰推定为 $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ 。紫外光谱 $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$: 262(4.11) 和 345(3.44) 毫微米, 说明分子中具有苯核和共轭羰基等发色团。红外光谱进一步表明含芳香环 ($1535, 1565 \text{ 厘米}^{-1}$) 共轭羰基 (1640 厘米^{-1}), 酰胺基 (1700 厘米^{-1}) 和芳香羟基 (3520 厘米^{-1})。核磁共振谱 (见图 1), 显示出有二个芳香甲基 $\delta 1.86, \delta 1.90$ (均为单峰), 二个间位芳香质子 $\delta 6.96, 7.1$ (双峰, $J = 3$ 赫), 酰胺质子 $\delta 9.38$ (宽峰) 及 $\text{C}-\text{H}, \text{C}-\text{CH}_2$ 质子信号 $\delta 2.12-2.46$ (多峰), $\delta 2.6, 2.66$ (双峰) 及 $\delta 2.8-2.96$ (多峰)。

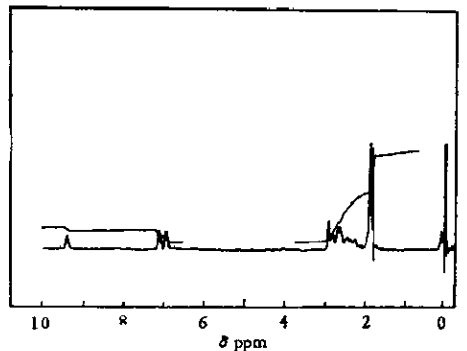


图 1 产物 72-1 核磁共振谱

本文于 1980 年 5 月 24 日收到。

表 1 产物 72-1 与放线酮理化性质的比较

	熔点 m. p.	比旋度 $[\alpha]_D$	元素分析	紫外吸收光谱 $\lambda_{max}(\log \epsilon)$	红外光谱	呈色反应	抗菌特性
放线酮	199—200°	$[\alpha]_D = 0$ (C1.89, 四氢呋喃) $[\alpha]_D^{25} = +5.06^\circ$ (C 0.4, 二甲基甲酰胺)	C 65.57 H 6.33 N 5.10 C ₁₅ H ₁₇ NO ₄	264(4.11) 354(3.65)	功能团的 指纹区都 分别相同	三氯化铁 反应呈阳 性 碱水中变 黄	抗真菌
产物 72-1	205°	$[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ (C 0.8, 二甲基甲酰胺)	C 65.18 65.27 H 6.19 6.24 N 5.03	262(4.11) 345(3.44)		同上	抗真菌

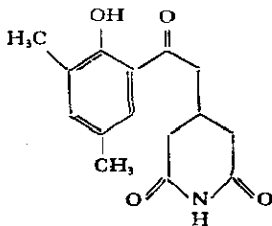


图 2 产物 72-1 的结构式

从以上理化数据我们推导它的结构式可能与文献 [1] 上报道的放线酮相一致 (见图 2)。进一步核对二者的理化数据^[1-4]亦完全相符 (见表 1)。因此可以认为产物 72-1 即抗生素放线酮。

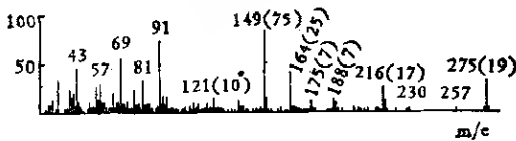


图 3 产物 72-1 质谱

上述产物 72-1 具有抗纹枯菌 (*Pellicularia sasakii shirai wei*) 赭色青霉 (*Penicillium avellenum*) 等作用。艾氏腹水癌半体内抗瘤试验表明它具有抑制实验动物肿瘤作用。

产物 72-2 为白色薄片状结晶, 熔点 152°C 溶于甲醇、乙醇及丙酮, 微溶于氯仿。难溶于乙醚和四氯化碳等。元素分析和质谱测出的分子离子峰 ($M^+m/e135$), 推定

分子式为 C_8H_9NO , 紫外光谱 λ_{max} 262 毫微米附近有一组五重峰, 表明有苯核存在。红外光谱亦表明分子中有芳香环 ($1495, 1520 \text{ 厘米}^{-1}$), 另外还有羰基 ($1640-1620 \text{ 厘米}^{-1}$) 和胺基 ($3185, 3370 \text{ 厘米}^{-1}$)。从核磁共振谱看出分子中有和苯核相连接的 CH_2 的质子峰 $\delta 3.5$ (单峰), 5 个芳香质子峰 $\delta 7.0$ (多峰) 以及胺基的二个质子峰 $\delta 7-8$ (宽峰)。根据此推定为苯乙酰胺 (Phenacetamide) 理化数据亦与文献报道的一致 (见图 4)。

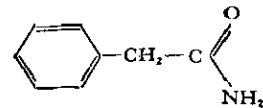


图 4 产物 72-2 的结构式

此物质尚未见抗生素和微生物产物中有过报道, 它经抗菌试验, 具有抗阳性细菌和分枝杆菌的作用。

实 验 部 分

熔点均未经校正, 红外光谱用溴化钾压片测定, 核磁共振谱用 100 兆周测定, 溶剂为三氟乙酸, 四甲基硅醚为内标。质谱直接进样电压为 70 eV, 由中国科学院有机化学研究所测试。薄板层析吸附剂用硅胶 G (青岛海洋化工厂出品), 干柱层析用

硅胶经 1N 盐酸处理过, 颗粒度为 320 目以下。

(一) 提取与分离

发酵培养基组成(%)为: 葡萄糖 3, 淀粉 1, 黄豆粉 2, 水解蛋白 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, MgSO_4 0.05, CaCO_3 0.6, 自然 pH, 28°C 发酵 72 小时。发酵液由本室车间提供, 发酵液板框过滤, 滤液活性用枯草杆菌检定。具有抗菌活性的滤液用三分之一体积的乙酸乙酯提取二次, 取乙酯层, 减压浓缩至糖浆状, 加大量石油醚沉淀得到淡黄色的粉末。

纯化时, 硅胶层析柱干装, 将上述粉末溶于氯仿与少量硅胶拌匀吹干置于层析柱顶。先用石油醚洗脱, 待流出的石油醚无色后改用氯仿洗脱, 分步收集。用薄板层析检测, 先收集到抗纹枯菌的产物 72-1。蒸干, 加甲醇加热溶解放置析出结晶。甲醇重结晶, 得白色针状结晶, 熔点为 205°C。100 升发酵液约得 1 克结晶。

1. 产物 72-1

[分析] $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

计算值 C 65.45; H 6.18; N 5.10

实测值 C 65.18, 65.17; H 6.19, 6.24; N 5.03, 5.03 $[\alpha]_D^{20}$

(C 0.8, 二甲基甲酰胺)

紫外光谱: $\lambda_{\text{max}}^{262}$ 和 345 毫微米

红外光谱(KBr): 1535—1565, 1640, 1700, 3520 厘米^{-1}

核磁共振: 见图 1

质谱 (m/e):

275(19) (M^+)

257($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$)

230($\text{M}^+ - \text{CO}_2$)

216(17)($\text{M}^+ - \text{CO}_2 - \text{NH}$)

164(25)($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2$)

149(75)($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_8\text{NO}_2$)

126($\text{M}^+ - 149$)

121(10)($\text{M}^+ - 164$)

(见图 3)

2. 产物 72-2

硅胶干柱层析。分离纯化时, 待抗纹枯菌的流分收集完毕后, 改用枯草杆菌作检测。洗脱溶剂仍用氯仿或氯仿-甲醇 (10:1), 收集另一个抗细菌流分, 浓缩至干, 加乙醇结晶, 在甲醇或含水甲醇中重结晶, 即得白色片状结晶。熔点 152°C, 收率约为 72-1 的十分之一。

[分析] $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$

计算值 C 71.10 H 6.71 N 10.23

实验值 C 71.39, 71.69 H 7.02, 6.97 N 9.54

紫外光谱: $\lambda_{\text{max}}^{262}$ 毫微米

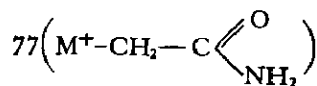
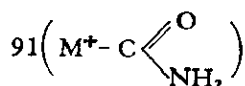
红外光谱(KBr): 1495, 1520, 1640—1620, 3185, 3370 厘米^{-1}

核磁共振谱: δ 3.5 (2H, 单峰)

δ 7.0 (5H, 多峰)

δ 7—8 (2H, 宽峰)

质谱: (m/e) 135(M^+)



(二) 72-2 的抗菌作用

用液体双倍连续稀释法测定, 培养基: 细菌用牛肉培养液, 酵母用沙保氏培养基, 分枝杆菌用肉膏蛋白胨培养基加 1% 甘油。除分枝杆菌在 28°C 培养 72 小时外, 其它均 37°C 培养 18—20 小时。结果对枯草杆菌 6633 (*Bacillus subtilis* 6633) 分枝杆菌 607 (*Mycobacterium* 607) 大肠 50 (*Escherichia coli* 50) 的最低抑菌浓度为 25—50 微克/毫升, 对金黄色葡萄球菌 209 P (*Staphylococcus aureus* 209P) 和几株耐

药金黄色葡萄球菌 369, 938, 849。清酒酵母 (*Saccharomyces sake*) 及绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等的最低抑菌浓度为 50—100 微克/毫升。

讨 论

从吸水链霉菌的发酵液中分得二个代谢产物, 一个虽为已知的放线酚, 但文献上报道的放线酚由稍白链霉菌 (*S. albulus*), 粉末链霉菌 (*S. Pulveraceus*)^[5] 和诺尔斯氏链霉菌 (*S. noursei*) 产生^[6]。吸水放线菌类群中已报道产生近 20 种抗生素^[7]。但未见产生放线酚的报道, 因此本工作的结果又一次证明了链霉菌异种可产生相同抗生素的结论。而文献报道的放线酚往往和生源相近的放线酮 (Cycloheximide) 类抗生素^[5] 或和抗真菌作用近似的多烯类抗生

素, 如制霉菌素 (Nystatin) 等同时产生。本工作所用的吸水链霉菌 72 却产生一个抗细菌和分枝杆菌的苯乙酸酰胺, 它是苯乙酸的衍生物, 由天然来源并具有抗菌活性, 均未见报道。

参 考 文 献

- [1] Highet, Von. R. J. and V. Prelog: *Helv. Chim. Acta.*, **42**: 1523—6, 1959.
- [2] Rao, K. V. and W. P. Cullen: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 1127, 1960.
- [3] Rao, K. V.: *J. Org. Chem.*, **25**: 661, 1960.
- [4] Johnson, F.: *ibid.*, **27**: 3658—60, 1962.
- [5] Mizuno, K. and M. Sasai: 武田研究所年报 (日), **21**: 114, 1962. (C. A. 58: 13037b).
- [6] Vondracek, M. and Z. Vanek: *Chem. and Ind. No. 40*, 1686—7, 1964.
- [7] 中国科学院微生物研究所: 《链霉菌鉴定手册》, 科学出版社, 1975 年。

TWO ANTIMICROBIAL METABOLITES PRODUCED BY *STREPTOMYCES* SP. NO. 72

Zhang Hailan Ye Yufen Zhang Congxin Zai Cuibao
(Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai)

Two antimicrobial metabolites have been isolated from the cultures of *Streptomyces* sp. No. 72 of Hydroscopicus group. Both structures were identified by spectral analyses as actiphenol and phenacetamide respectively. The former

is active against fungi and possess inhibitory effect on Ehrlich ascites carcinoma cell in Vitro. And the latter is slightly active against bacteria and mycobacteria. It has not been found among antibiotics and microbial metabolites.