

抗小麦赤霉病抗生素 861-A 结构的质谱测定

卞则樑* 张文信 贺玉珍 柴文刚

方一苇 王光辉 谢光华 李立扑

(中国科学院化学研究所, 北京)

金同铭 李香玲

(中国农业科学院原子能研究所, 北京)

抗生素 861-A 是玫瑰皮黄链霉菌淡色变种 (*Streptomyces roseolutaceus* var. *pallidus*) 产生的抗生素复合物的主要组份, 有广谱抗菌活性, 对小麦赤霉病有良好的防治效果。

以快原子轰击质谱和色谱-质谱联用为主, 结合各种化学和波谱方法, 对 861-A 及其降解产物进行结构分析, 证明了 861-A 与链丝菌素 F 同质, 为链丝菌素 F 的化学结构提供了进一步的证据。

关键词 抗生素 861-A; 玫瑰皮黄链霉菌淡色变种; 链丝菌素 F; 快原子轰击质谱

链丝菌素类中最早的一个化合物 Streptothricin F 虽然早在 1942 年就为 Waksman 和 Woodruff^[1] 所发现, 直到 1961 年, Van Tamelen 等人才提出了它的初步结构^[2]。此后, 又报道了穗霉素 A (Racemomycin A)、谷津霉素 A (Yazumycin A) 和抗生素 S-15-1-A 等, 虽来源于不同菌株但它们具有相似的理化性质和化学结构^[3-5]。然而, 直到 1982 年人们还在通过新的实验方法对其化学结构进行修正^[6]。

中国农科院从广西土壤中分离到的玫瑰皮黄链霉菌淡色变种 (*Streptomyces roseolutaceus* var. *pallidus*)^[7], 其发酵液经提取精制获得的 861-A 是该抗生素复合物的主要组份, 具有广谱抗菌活性。大面积作物防病药剂试验表明, 对小麦赤霉病防效达 80—97%。前文^[8]已报道了它的发酵、提取和纯化过程以及部份理化性质, 本文以快原子轰击质谱和色谱——质谱联用为主, 结合化学降解、衍生和波谱分析, 证明它与链丝菌素 F (Streptothricin F) 具

有相同的结构。同时也为链丝菌素 F 的结构提供了进一步的证据。

材料和方法

(一) 抗生素样品

抗生素 861-A 是玫瑰皮黄链霉菌淡色变种的发酵产物, 经分离、纯化而得^[9]。

参考化合物——链丝菌素 F 为日本大坂大学 Kusumoto 教授所赠, 系日本 Takeda Chemical Industries 生产的分析纯标样。

(二) 实验设备和方法

1. 861-A 的分子量和化学式的测定: 在国内产 KYKY-ZHP-5A 质谱仪上以甘油为底物, 氦原子枪 6Kev 动能作低分辨(分辨率为 1000)快原子轰击质谱 (FAB-MS), 测其分子量; 在英国 AEI MS-50 质谱仪上, 以甘油为底物, 以棉子糖 (C₁₈H₃₂O₁₆) 的质子化分子离子峰 505.1766 为参考峰, 作高分辨峰匹配 (分辨率为 5000) 测得

本文于 1987 年 12 月 2 日收到。

* 通讯联系人。

致谢: 生物物理所吴家振高级工程师、化学所金顺子副研究员帮助测定核磁共振和红外光谱, 在此一并致谢!

其化学式。

2. 861-A 的化学降解及其降解产物分子量和化学式的测定: 将 5mg 样品置于 2.5ml 反应瓶中, 加入 2ml 6mol/L HCl, 充氮, 密封, 120℃ 水解 12h。水解产物的分子量测定方法同上。以蔗糖 ($C_{12}H_{22}O_{11}$)、L-赖氨酸 ($C_6H_{12}O_2N_2$) 和二聚甘油 ($C_8H_{16}O_5$) 的质子化分子离子峰作参考峰, 进行高分辨峰匹配测定水解产物化学式的方法也同 1。

3. 降解产物的化学衍生及其衍生产物的结构测定: 以 3 mol/L HCl 的丁醇溶液为丁酯化试剂, 以 25% 三氟醋酸酐 (TFAA) 为三氟乙酰化试剂, 将 5mg 水解产物置于 2.5ml 反应瓶内, 加入 1ml 3mol/L 的 HCl 丁醇溶液, 充氮, 密封, 100℃ 加热 15 min, 冷却, 真空抽干。然后再向反应瓶内加入约 1 ml 25% 的 TFAA, 充氮, 密封, 150℃ 加热 10min。至此, 水解产物已酯化和酰化。衍生产物的质谱测定法同 1。

(三) 861-A 的水解产物的分析

在 Hitachi 835-50 型氨基酸分析仪上, 用强酸性离子交换树脂作分离材料, 以 1 mol/L 柠檬酸钠作缓冲液进行组份分析; 在 Hitachi 650 型高压液相色谱仪上, 以阳离子 YSG-SO₃H⁺ 为柱材料, 以 pH 5.2 的柠檬酸-氯化钠-柠檬酸钠水溶液淋洗进行组成测定。

(四) 红外光谱、核磁氢谱及薄层层析

861-A 和参考物链丝菌素 F 的红外光谱在西德 Bruker Co. IFS 113 V FT-IR 上测定; 核磁氢谱在美国 Varian-XL-400 超导核磁共振谱仪 (400 MHz, 溶剂 D₂O) 上测定; 薄层层析展开剂的配比为: H₂O-CH₃OH-n-C₄H₉OH-50% NH₄OH, 8:5:2:0.5 v/v。

结果和讨论

1. 低、高分辨 FAB-MS 测得 861-A 的分子量为 502, 精确质量数为 502.2471, 由此算出其化学式为 C₉H₁₄O₅N₂ (测试相对误差为 5 ppm), 分子不饱和度为 7。其降解产物及其衍生物提供的结构信息如下: 降解产物的分子量分别为 349、188、146、179 和 161 (图 1)。其精确质量数和化学

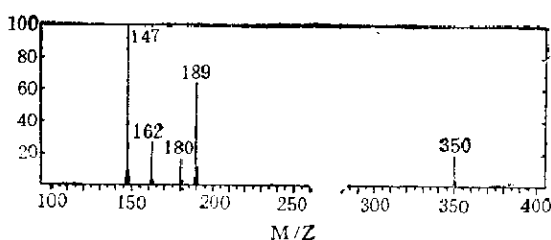


图 1 861-A 水解产物的 FAB-MS 谱

Fig. 1 FAB-MS spectrum of the hydrolysates of 861-A

式分别为 C₁₂H₂₃O₇N (349.1602, 误差 1.5 ppm), C₆H₁₂O₅N₂ (188.0908, 误差 0.1 ppm), C₆H₁₄O₂N₂ (146.1054, 误差 0.1 ppm), C₈H₁₃O₃N (179.0796, 误差 1.4 ppm) 和 C₆H₁₁O₄N (161.0689, 误差 1.3 ppm)^[8,9]。

降解产物经丁酯化和三氟乙酰化之后, FAB-MS 测得三个分子量为 981、552 和 394 的峰, 它们分别是分子量为 349、188 和 146 降解产物的衍生物, 即: 349+

$(C_4H_9-H) + 6 \times (CF_3C(=O)-H) = 981$, 这证明了分子量为 349 (C₁₂H₂₃O₇N₂) 的降解产物有一个酸羟基和六个可被衍生的胺基或醇羟基;

188 + (C₄H₉-H) + 3 × $(CF_3C(=O)-H) = 552$, 证明了分子量为 188 (C₆H₁₂O₅N₂) 的降解产物有一个酸羟基和三个可被衍生的胺基或醇羟基; 146 +

$(C_4H_9-H) + 2 \times (CF_3C(=O)-H) = 394$, 证明了分子量为 146 (C₆H₁₄O₂N₂) 的降解产物有一个酸羟基和二胺基或醇羟基。

为了进一步对水解产物进行结构分析, 将其丁酯化和七氟丁酰化后做色谱-质谱 (GC/MS) 联用分析, 出现一个色谱峰, 从其相应的质谱图 (图 2) 上可以确定该水解产物为 L-β-赖氨酸的丁酯化和七氟丁酰化产物 (分子量为 594)。

由上述实验提供的 861-A 的分子量、化学式和水解产物的元素组成及其之一的

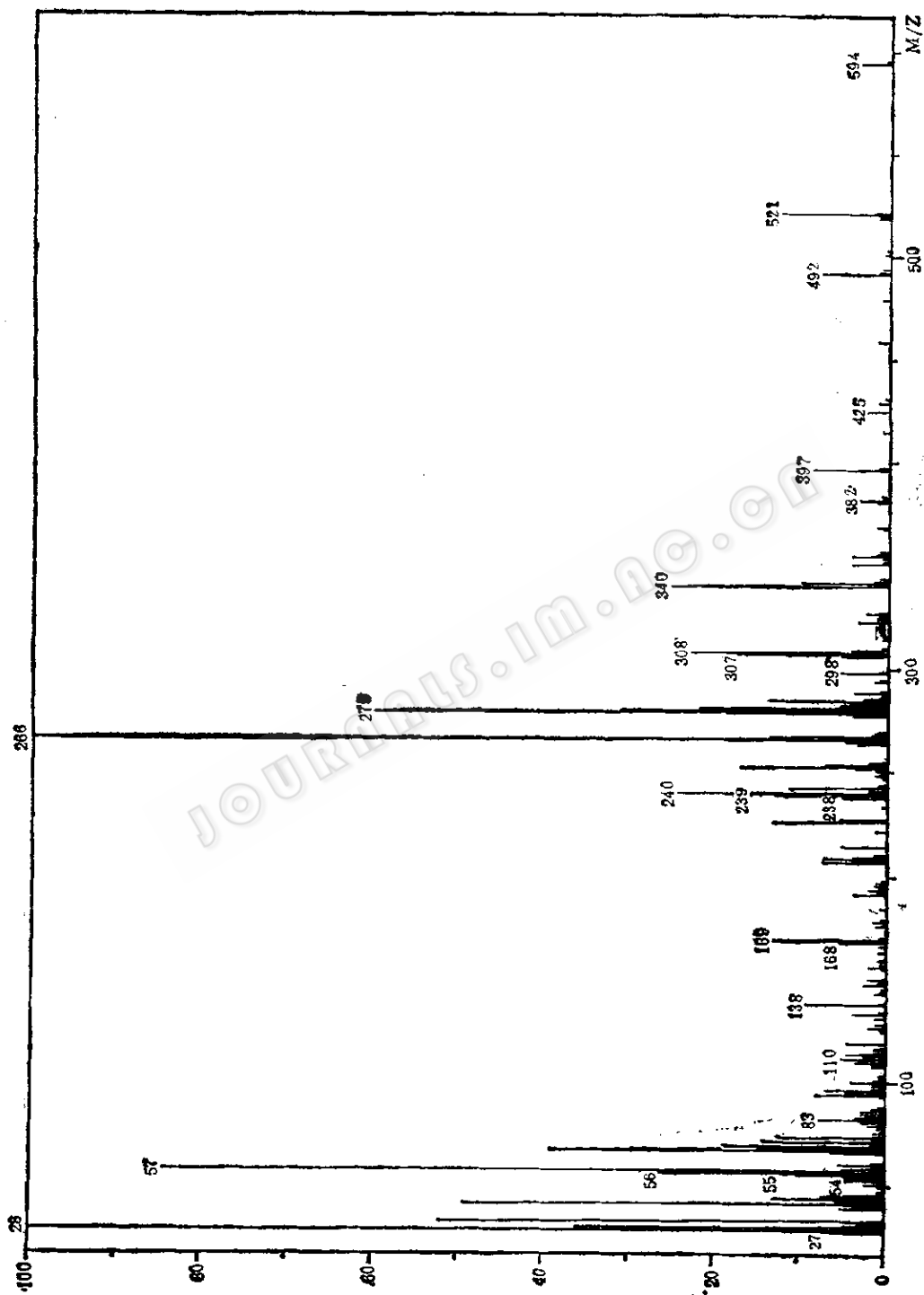


图2 861-A 水解产物之一—— β -赖氨酸的丁酯化和七氟丁酯化产物的质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of one of 861-A's hydrolyses—— β -lysine with butyl esterification and heptafluorobutylation

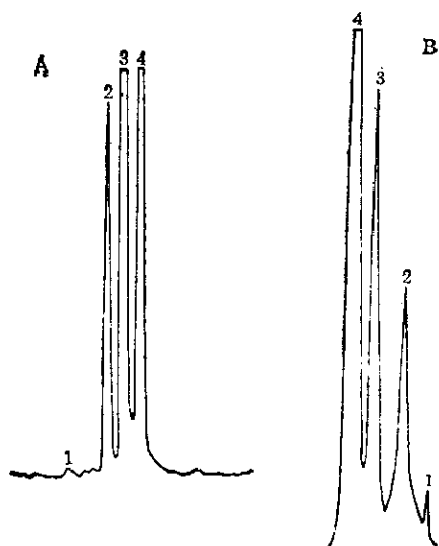


图3 861-A 水解产物的氨基酸分析 (A) 和 HPLC 图 (B)

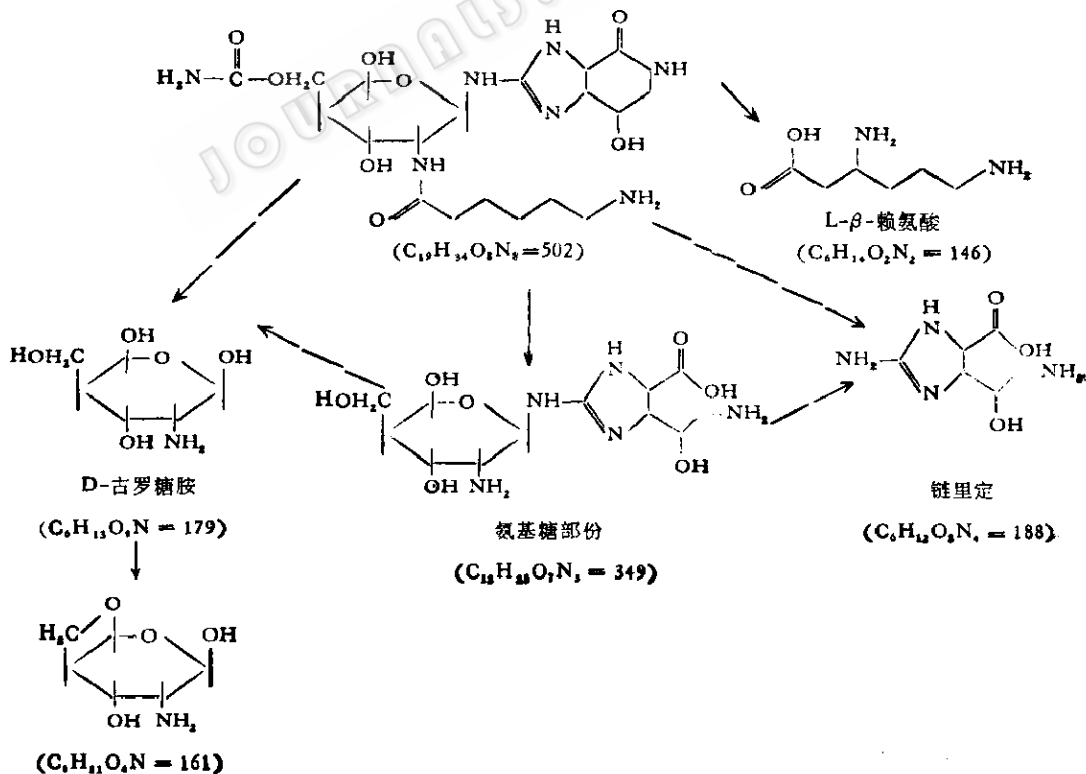
1. 氨基糖部份; 2. 链里定; 3. β -赖氨酸; 4. 氨
Fig. 3 Amino acid analysis and HPLC profile of the hydrolysates of antibiotic 861-A

1. Amino sugar moiety; 2. Streptolidine;
3. β -lysine; 4. Ammonia

确切结构,对照有关文献提供的信息^[10],可以认为 861-A 为链丝菌素结构。

2. 为了验证由质谱推断的 861-A 的分子结构及其水解产物结构,分别用氨基酸分析仪和高压液相色谱对水解产物进行了分析,各得到四个峰,如图 3 所示。

这些结果同 Egorov H. E. 等人^[11]以及 Tanizama, H. 等人^[12]报道的结果一致,即链丝菌素 F 的水解产物: 峰 1 为氨基糖部份,峰 2 为链里定,峰 3 为 β -赖氨酸,峰 4 为氨。为了确证质谱鉴定的 861-A 同链丝菌素 F 的同一性,对两者的波谱行为作对比,结果如图 4、图 5、图 6 所示。它们的薄层层析 R_f 值也相同,进一步证明了两者的-致性,即 861-A 是由一分子古罗糖胺以 N-甙键同一分子链里定并以酰胺键同一分子 L- β -赖氨酸相连在一起的链丝菌素类化合物。它的水解产物的形成如下:



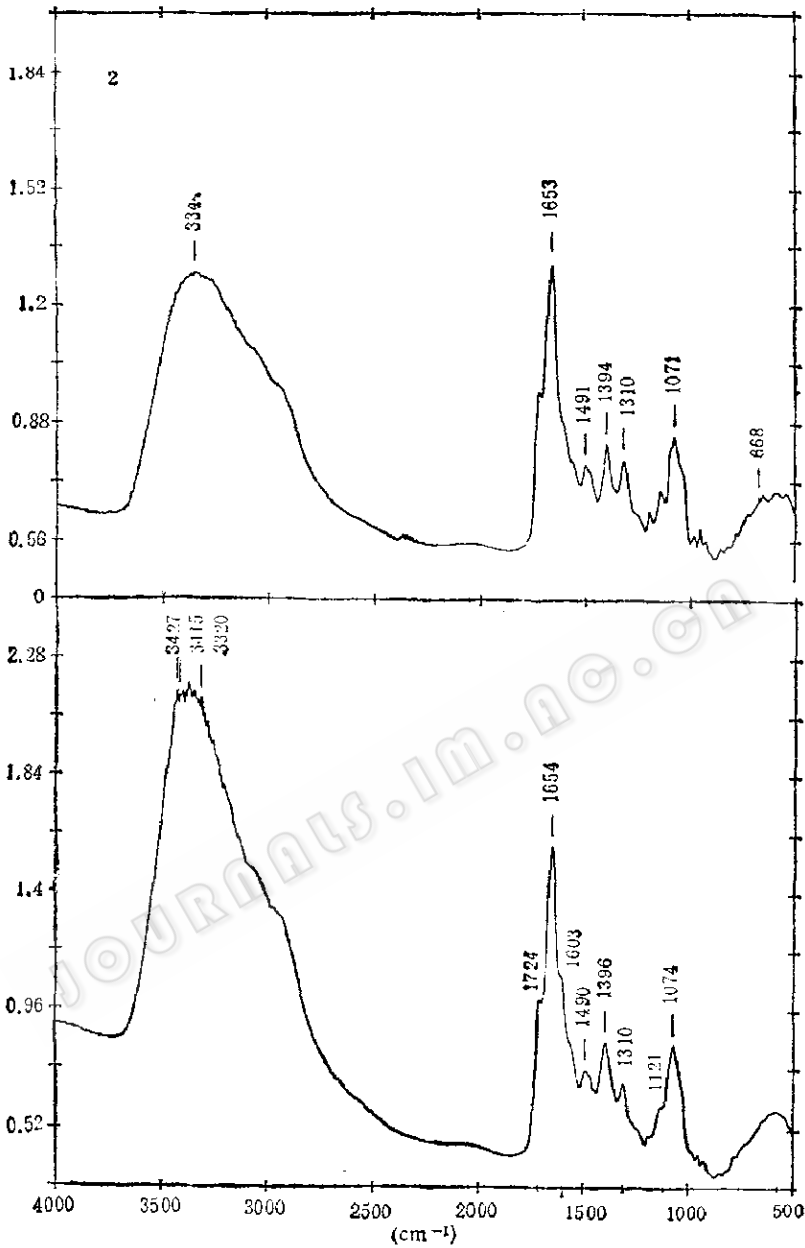


图4 861-A (1) 同参考物链丝菌素 F (2) 的红外光谱比较

Fig. 4 The comparison in IR spectrum of 861-A (1) with that of reference compound Streptothricin F (2)

降解产物酯化和酰化后,其中 L- β -赖氨酸的衍生物蒸汽压大为提高,可用 GC/MS 测得其电子轰击质谱图,确定了它的结构。D-古罗糖胺可能由于成双环而不易衍生和汽化,而链丝菌素酯化、酰化产物的

汽化温度可能仍高于色谱柱温,致使该组分不能出色谱峰。

3. 玫瑰皮黄链霉菌灰色变种所产生的抗生素 861 不同于其它菌株产生的链丝菌素类化合物,如链丝菌素、谷氨酰胺、抗生素

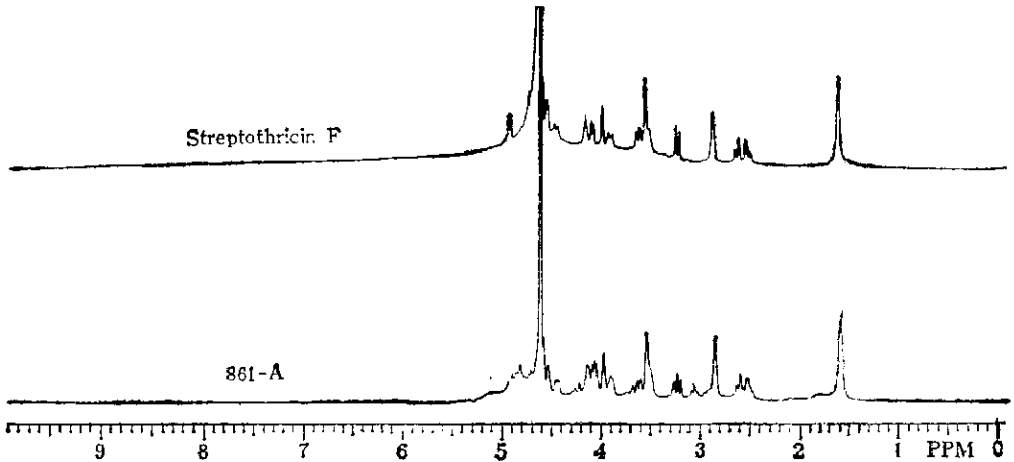


图5 861-A 同参考物链丝菌素F的核磁共振谱比较

Fig. 5 The comparison in ^1H NMR spectrum of 861-A with that of reference compound Streptothricin F

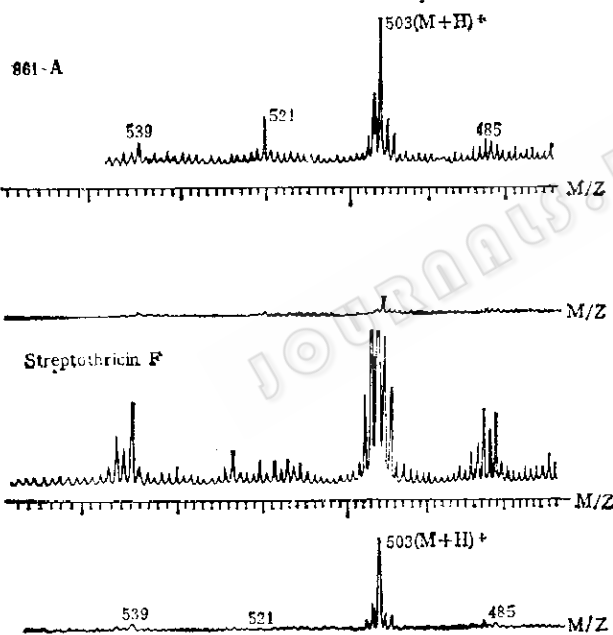


图6 861-A 同参考物链丝菌素F的 FAB-MS 比较

Fig. 6 The comparison in FAB mass spectrum of 861-A with that of reference compound Streptothricin F

S-15 等, 这些抗生素是一些同系物的混合物, 彼此间的差别在于所含 L- β -赖氨酸的数量不同^[2-5]。由前文^[8]的分离、纯化及本文的结构测定表明, 861 虽然也表现为一

个同系物的混合物, 然而, 相互之间的差别在于分子量相差 18 个质量单位。考察分离、纯化流程和 861-A 水解产物的形成机理, 发现玫瑰皮黄链霉菌淡色变种产生的抗生素 861 可能是一个纯化合物。而 861-B 和 861-C 可能是在分离过程中用 1mol/L 盐酸洗脱分离柱时, 将少量 861-A 部分水解而形成的, 即水解打开了链里定上的酰胺键, 接上了一个水分子, 形成了比 861-A 大 18 个质量单位的另一个成份。这种新菌株产生的抗生素是一个纯化合物, 这在理论上和应用上都是十分有趣的。

参 考 文 献

- [1] Waksman, S. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49: 207—209, 1942.
- [2] Van Tamelen, E. E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 83: 4295—4296, 1961.
- [3] Taniyama, H. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 19: 1627, 1971.
- [4] Taniyama, H. et al.: *J. Antib.*, 24: 390, 1971.
- [5] Kawamura, T. et al.: *ibid.*, 29: 844, 1976.
- [6] Kusumoto, S. et al.: *ibid.*, 35: 925, 1982.
- [7] 林永年等, *微生物学报*, 24(4): 399—400, 1984.
- [8] 金同铭等: *微生物学报*, 29(4): 317—319, 1989.
- [9] Van Tamelen, E. E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*,

- 78: 4817, 1956.
[10] Carter, H. E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 83: 4287, 1961.

- [11] Khoklov, A. S. et al.: *J. Antib.*, 25: 501, 1972.
[12] Egorov, H. E. et al.: *J. Chromatog.*, 19: 214, 1965.

STRUCTURE IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC 861-A USED FOR WHEAT SCAB CONTROL

Bian Zeliang* Zhang Wenxin He Yuzhen Chai Wengang Fang Yiwei
Wang Guanghui Xie Guanghua Li Lipu

(Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing)

Jin Tongming Li Xiangling

(Institute of Atomic Energy, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Antibiotic 861-A is a major component of antibiotic 861 complex produced by *Streptomyces roseolutes* var. *pallidus*, which exhibits a broad antibacterial spectrum and the prevention of wheat scab—one of the major wheat disease in China.

The chemical structures of 861-A and its hydrolysates have been identified with FAB-MS and GC/MS as well as comparison in spectroscopic characteristics of IR, ¹H NMR, FAB-MS and TLC of 861-A with that of re-

ference compound Streptothricin F. It is demonstrated that antibiotic 861-A and Streptothricin F are identical. An additional testimony has been offered for the structure of Streptothricin F.

Key words

Antibiotic 861-A; *Streptomyces roseolutes* var. *pallidus*; Streptothricin F; FAB mass spectrum