

阿扎霉素 B (Azalomycin B) 研究进展

严淑玲 黄为一*

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)

摘要: 介绍阿扎霉素 B 的生物学来源, 研究历史, 主要理化性质和结构确定。同时阐述了阿扎霉素 B 的生物合成途径, 构效关系, 生物学特性和应用前景。

关键词: 阿扎霉素 B, 结构, 特性, 应用

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0103-05

1959 年, 意大利的 Arcamone 等从生孢链霉菌 (*Streptomyces melanosporus*) 中首次分离得到阿扎霉素 B, 命名为 Elaiophylin^[1]。随后在其它种的链霉菌中也相继发现, 分别定名为 Azalomycin B (Mamoru Arai 等, 1960 年)^[2], Antibiotic 225E (Khlebarova, 1972)^[3], Salbomycin (Hoechst Patent, 1982)。但由于其结构新颖, 化学稳定性差, 直到 1981 年, 通过波谱分析^[4], 物化分析^[5], 化学降解, 才推导出化学结构式, 并得到 X-晶体衍射分析的有力支持。在结构确定后, 相关文献中多应用 Azalomycin B 和 Elaiophylin 两个名称, 以 Elaiophylin 较多见。但在 1984 年我国公布的抗生素名词中, 只有阿扎霉素 B (Azalomycin B), 没有使用 Elaiophylin, 所以在本文中采用阿扎霉素 B (Azalomycin B)。

阿扎霉素 B 是一个具有 C_2 -对称性的十六元环大环双内酯抗生素, 与 Leucanicidin,

* 联系人

收稿日期: 2001-09-20, 修回日期: 2001-12-18

Hygrolidin, L-155, 175, L-681, 110, Bafilomycin, Avermectins 都属于十六元环不饱和内酯化合物, 与 Pyrenophorin, Vermiculiculin 和 Conglolutin 都属于其 C_2 -对称性的大环内酯化合物, 分子式 $C_{34}H_{88}O_{18}$, 相对分子质量 1025, 结构式如图 1 所示。

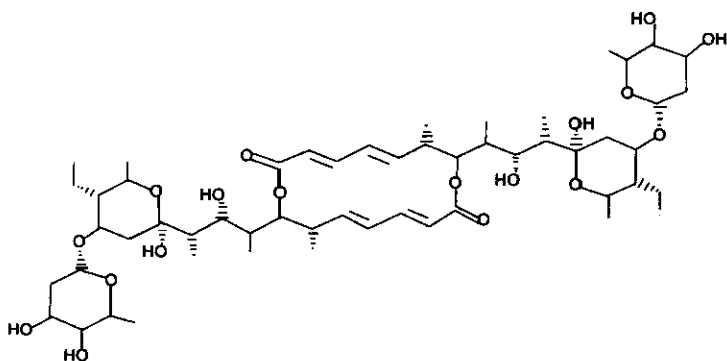


图 1 阿扎霉素 B 结构图

1 理化性质

纯净的阿扎霉素 B 为白色针状或雪花状结晶。在空气中较易失去溶剂而呈无定形粉末。熔点 $178^{\circ}\text{C} \sim 183^{\circ}\text{C}$ [2], 也有报道 $210^{\circ}\text{C} \sim 212^{\circ}\text{C}$, 因熔点即为分解点, 熔点的高低随加热速度而改变。旋光性 $[\alpha]_D^{25} = -46.90^{\circ}$ ($C=0.83$, CHCl_3) [4], $[\alpha]_D^{25} = -48^{\circ}$ ($C=1$ 甲醇) [2]。在纯溶剂中, 溶解度小, 溶于甲醇、氯仿、乙醇、乙酸乙酯, 微溶于丙酮, 不溶于苯、醚、水, 较易溶于混合溶剂: 含水甲醇, 甲醇-乙酸乙酯, 甲醇-苯等。

元素组成: C: 62.66%, H: 8.57%, O: 28.51%, 无 N, S, X, $\text{CH}_3\text{O}-$; 紫外吸收: (UV) $\lambda_{\text{max}} = 252\text{nm}$, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 620$ (甲醇); 红外光谱: 主要吸收峰 $3450, 1700, 1645, 1620\text{cm}^{-1}$; 稳定性: 在中性较稳定, 100°C , 5min 可保持活力, pH2.0, pH10 减少活力 10% ~ 20%。

显色反应: Tollens 反应呈黑褐色; Fehling 反应呈绿色; 可使 KMnO_4 溶液褪色; Molish、蒽酮、三氯化铁反应阴性。

2 发酵及提取

该抗生素产生菌都是链霉菌, 报道有生孢链霉菌 (*S. melanosporus*) [1], 吸水链霉菌 (*S. hygroscopicus*) [2,6], 白色链霉菌 (*S. albus*) [3], 紫黑链霉菌 (*S. violaceoniger*) [4], 假轮枝链霉菌 [7], 小小链霉菌 (*S. parvullus*) [8]。目前, 产量最高的发酵方法是以小小链霉菌作为发酵菌种, 最高发酵产量为 2000mg/L 。

Mamoru Arai 以吸水链霉菌作发酵菌种, 对不同碳、氮源进行比较, 得出采用 1% 葡萄糖作碳源, 2% 豆粉或干酵母作氮源进行发酵, 阿扎霉素 B 产量最高。Tishkov S. 等发现, 初始磷酸盐浓度强烈影响抗生素产量, 植物油和 $\text{C}_{16}\text{-C}_{18}$ 脂肪酸钠盐降低抗生素产量。这个结果可用脂肪酸与该抗生素相似的前体合成途径得到解释。而吐温 80 和油酸甲酯降低尼日利亚菌素产量从而提高阿扎霉素 B 的产量, 可能是引起有分支途径酶的活性变化, 这是一个很特别的现象。在不同链霉菌发酵产物中, 该抗生素主要存在于菌丝体内。

3 结构确定

在早期的文献中,将分子式定为 $(C_6H_{10}O_2)_n$ 和 $C_{27}H_{44}O_9$, 并对其紫外、红外、 1H -NMR 谱进行了研究,但由于该分子结构的复杂性和特殊性,及科学发展的局限性,在首次发现的二十几年后,结构才得以阐明。

(1) 波谱分析:紫外光谱 252nm 的吸收峰表明了共轭系统的存在,与红外光谱中双键区域的吸收 1700, 1645, $1620cm^{-1}$ 相一致。但全氢化衍生物在 $1720cm^{-1}$ 有吸收,表明分子中有酯和内酯的存在,与山梨酸及其同系物相似,初步推测分子中有 $\alpha\beta\gamma\delta$ -不饱和和内酯的存在。在图谱中,低磁场区 7-5ppm (化学位移单位) 的共振峰也佐证了该不饱和和酯系统的存在,其偶合常数在 10-15,说明分子中双键呈反式构型。 ^{13}C -NMR 图谱有 27 个区域的吸收,与 $C_{27}H_{44}O_9$ 的相一致。120-145ppm 的四个烯键原子信号与 UV, IR, 1H -NMR 中推测的 $\alpha\beta\gamma\delta$ -不饱和和内酯相一致。161.2ppm 的信号为共轭系统中酯键原子的信号。

由于该抗生素有许多羟基,对热不稳定,不能得到分子离子峰,但质谱图中的碎片峰高于 $C_{27}H_{44}O_9$ 的相对分子质量 512, 达 800 以上。其相对分子质量应大于 512。由于 ^{13}C -NMR 显示了 27 个碳原子的信号,分子只能加倍为 $C_{54}H_{88}O_{18}$ 。即由两个完全的部分组成,与 Arcamone 推测的 $(C_6H_{10}O_2)_n$ $n=9$ 时的值相近。相对分子质量 1025.24 与气压法测定的 1036 及其早期 X-晶体衍射得到的数据 1032 相一致。随着质谱技术的发展,以 3-硝基苄醇做基质,采用 FAB-MS,观测到 MNa^+ , 1048, 相对分子质量 1025.3, 从而用质谱法确定了该抗生素的相对分子质量。

(2) X-晶体衍射分析:早期推测相对分子质量为 1032。1981 年, Katarina 等重新进行 X-晶体衍射分析。在甲醇中得到单斜晶,相对分子质量 1025, $a=9.927$, $b=10.105$, $c=31.183A$, $\beta=93.20^\circ$, 空间群 $P2_1$, 分子的空间结构是由化学上相等的两部分以两重旋转轴对称排列,如图 2 所示。后来, Steven V. Ley 通过 X-晶体衍射进一步研究其构象,确定分子中各键的键角,并确定了分子内氢键系统的存在,同时也得到 noe 核磁图谱的证实。分子中 1 位碳基与 9' 位碳相连的羟基之间, 9' - 位羟基氧原子与 11' 位碳原子相连的羟基之间形成氢键。

(3) 化学降解:通过浓 HNO_3 氧化,只测到乙酸、丙酸。全氢化的化合物同样处理,得到 2-甲基庚二酸,推测出分子中 $O-C-CH(CH_3)-CH=CH-COO-$ 的存在。通过无机酸催化的甲酸分解得到双脱氧己糖甲基糖苷的端基异构体,并通过 Webbstest 过氧化实验,与可能异构体的标准品进行熔点、红外、纸层析、薄层层析、旋光性的比较,最终确定了 2, 6-二脱氧岩藻糖组分。

4 生物合成

阿扎霉素 B 的生物合成包括聚酮生物合成和糖组分的生物合成。采用培养基中加入稳定同位素 ^{13}C 标记的化合物的方法。加入不同 ^{13}C 标记前体后,对抗生素进行 ^{13}C -NMR 分析,结果表明阿扎霉素 B 的碳骨架由 8 个乙酸盐, 6 个丙酸盐和两个丁酸盐通过聚酮途径合成, 3 个甲基 (C17-C19) 来自于丙酸盐, 1' 位碳原子直接来源于葡萄糖。

对于阿扎霉素 B 生物合成的研究有利于改善发酵条件,提高发酵产量。在研究中

还发现,培养基中加入高浓度的丁酸盐时,抗生素产量明显偏低。虽然丁酸盐是抗生素合成的前体物质,但它可以通过乙酰 CoA 由脂肪合成途径合成。丁酸盐也可能构成脂肪合成的反馈抑制,而脂肪合成与抗生素的聚酮合成的途径相似,也就阻碍了抗生素的合成。

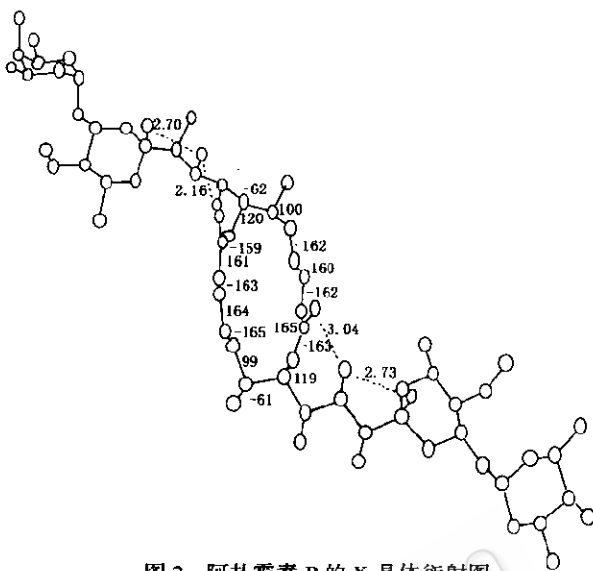


图2 阿扎霉素 B 的 X-晶体衍射图

5 构效关系研究^[9]

文献中有大量报道,涉及到半缩醛羟基,糖组分和不饱和键的修饰,主要研究

结果如下:(1)半缩醛环上 11, 11' 双甲基化,抗菌活性降低 50%。(2)11, 11' 双甲基化加氢还原的衍生物有抗菌活性,而母体化合物加氢还原衍生物都没有活性。(3)大多数糖上羟基的四酰基衍生物丧失抗菌活性,仅有四-丁酰衍生物残有部分活性。一个酰基取代有部分抗菌活性,其它多酰基取代衍生物均无抗菌活性。(4)不对称去掉一个糖苷的产物有部分抗菌活性,但对称性的将双侧糖组分均去掉则无活性。

6 生物特性及其应用前景

6.1 具有典型大环内酯抗生素的抗菌的典型特征 对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、白喉棒状杆菌、破伤风芽孢杆菌有抑制作用。100 μ g/mL 不抑制大肠杆菌、白色假丝酵母、啤酒酵母、黑曲霉、星形发癣霉,但我们在实验中发现其对某些植物的病原真菌如水稻腐霉菌、一串红小菌核菌有较强的抑制作用,推测其原因为其化学结构处于大环内酯和多烯内酯抗生素之间。

6.2 抗寄生虫作用 与处于抗寄生虫药研究热点的阿氟霉素均属于不饱和十六元环大环内酯类抗生素,赫司特公司已证实其良好的治疗线虫感染等的作用。

寄生于家禽家畜的线虫分布广泛,感染普遍,特别是草原畜牧地区家畜几乎没有一头不被线虫感染,对家畜的危害十分严重。感染后上皮细胞脱落,严重时可导致小羊羔的死亡。在一些牧区羊群中严重流行,感染率达 70% ~ 80% 以上,羊毛产量明显降低。轻度感染的羊只羊毛减少量也达 40%。捻转血矛线虫的侵染部位与蛇形毛圆线虫相似,常以其虫体口前端刺入胃黏膜,引起损伤,造成真胃炎和出血,成虫寄生后分泌毒素,干扰造血功能、消化液分泌、胃肠蠕动和体内碳水化合物代谢,呈世界性分布。阿扎霉素 B 作为治疗羊羔线虫的新方法,与化学药剂相比,安全性高,治疗效果好,易降解,对环境污染小。人的感染见于埃及、印度、阿美尼亚、爪哇、大洋州的高地,美国新奥尔良等地。

6.3 作为瘤胃动物增长促进剂 在瘤胃中由于微生物发酵作用, 饲料中碳水化合物的降解途径一般为: 多糖经单糖分解为丙酮酸盐, 丙酮酸盐分解为丙酸或乙酸, 乙酸可进一步形成甲烷或丁酸。发酵产生丙酸是较为有利的, 饲料的利用率一般以瘤胃中产生的丙酸量的高低来衡量。

自从发现聚醚类抗生素 (Polyether Antibiotics) 如拉莎里菌素 (Lasalocid) 和莫能霉素 (Monensin) 能增加瘤胃中丙酸含量降低乙酸和正丁酸含量, 提高饲料利用率, 牛类饲养的成本大大降低。1990 年, 在聚醚类抗生素发现及研究中作出杰出贡献的 J. Westley, Chao - Ming Liu 等设计了瘤胃模型筛选反刍动物生长促进剂, 通过比较挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acid) 比值 $C_3/C_2 + n - C_4$, 得到一能显著提高瘤胃中丙酸盐含量的微生物代谢产物, 确定为阿扎霉素 B^[10]。

体外实验表明在阿扎霉素 B 大于 10mg/L 浓度时, 对丙酸产量提高, 乙酸、正丁酸下降的效率高于拉莎里菌素和抗生素 X-14873A (二者均为聚醚类抗生素)。活体研究表明 1mg/kg 天饲喂, 拉莎里菌素平均增长 VFA 比例为 250%, 阿扎霉素平均增长为 186%。但聚醚类抗生素普遍具有高毒性以及低的选择性。研究结果证明阿扎霉素 B 能有效提高瘤胃中丙酸产量, 是一种有发展前景的牛类生长促进剂。

6.4 用于免疫抑制剂 阿扎霉素 B 在结构上与大环内酯类免疫抑制剂 Cancanamycins, Leucanidicin, Hygrolidin 有相似性, 而且, 1996 年, 朝鲜的 Lee, Sang-Yong 等人利用免疫抑制剂筛选模型筛选到阿扎霉素 B, 其表现出对胃癌细胞的毒性, 表现中等的细胞毒作用和较强的 NO 合成的抑制作用。强烈抑制脂多糖介导的 B 细胞的敏化和由 NO 刺激鼠脾淋巴细胞的激增。说明阿扎霉素 B 和单甲基阿扎霉素 B 将成为强免疫抑制剂^[11]。

6.5 用于研究 ATPase 的类型 ATPase 一般分为 3 种类型。F-type: 利用电化学梯度合成 ATP; V-type: 水解 ATP 形成质子梯度; P-type: 在反应中 ATP γ -磷酸基团与酶分子中 Asp 残基结合, 形成共价结合的磷酸-酶中间复合物。在确定 ATP 酶的类型时最好应用专一性的酶抑制剂。Bafilomycin 可专一性抑制 V-type, Cancanamycin 既可抑制 V-type, 也可抑制 p-type, 阿扎霉素 B 只抑制 P-type, 且主要抑制 $H^+ - K^+ - ATPase$ ^[12]。Zsuzsa Beleznay 等利用阿扎霉素 B 等专一性抑制剂研究了红细胞膜上 ATP-依赖的氨基酸磷脂转运和 Mg^{2+} -ATPase 活性的相关性。推测氨基酸磷脂转移酶是 P-type Mg^{2+} -ATPase 或者至少这个酶构成了转运过程的一部分。阿扎霉素 B 作为 P-type ATPase 或者至少这个酶构成了转运过程的一部分。阿扎霉素 B 作为 P-typease 专一抑制剂可以用来判断 ATPase 的类型, 研究 ATPase 的作用机制。

目前, 对于阿扎霉素 B 的研究还处于较初级的阶段, 未能形成系统研究。该抗生素在国际上尚未形成工业化产品, 在国内未见报道。就抗菌作用而言, 由于溶解性差, 只能抑制 G⁺ 细菌, 母体化合物有待于进一步改造, 可望进入临床应用。而且其抗菌作用以外的生物活性已经引起了广泛的注意, 其新颖的化学结构也吸引着众多化学工作者将其作为合成、半合成研究的材料。对于阿扎霉素 B 的进一步研究, 正适应了现代研究人员对非典型大环内酯抗生素及抗生素抗菌功能以外的治疗作用的研究, 在畜牧业、农业、医学科研上有着广阔的发展前景。

(下转第 56 页)

参 考 文 献

- [1] Arcamone F, Bertazzoli C, Ghione M, *et al.* Microbial, 1959, 7: 207.
- [2] Mamoru A. J Antibiotics, 1960, 13: 46 ~ 51.
- [3] Klebarobva E I, Georgiera-Borisova K, Sheikova G N *et al.* Farmatiya(Sofia), 1972, 22: 3.
- [4] Fiedler H P, Wvrner W, Ner H Z. J Antibiotics, 1981, 34: 1107 ~ 1118.
- [5] Mamoru A. J Antibiotics, 1960, 13A: 51 ~ 56.
- [6] 严淑玲, 黄为一, 武济民. 中国抗生素杂志, 2001, 26(3): 161 ~ 164.
- [7] 崔承彬, 王 浩, 周培瑾. 中国抗生素杂志, 2001, 26(3): 165 ~ 170.
- [8] Susanne G, Peter H, Wolfgcug R J. Antibiotics, 1990, 43: 639 ~ 647.
- [9] Hummann P, Kretzschmar G, Kretzschmar G. J Antibiotics, 1991, 43(11): 1434 ~ 1440.
- [10] Chao-Miay L, Westley J. J Antibiotics, 1993, 46(2): 350 ~ 352.
- [11] Lee S Y, Kim H S, Kim Y H, *et al.* J Microbiol Biotechnol, 1197, 7(4): 272 ~ 277, C. A. 127: 314424Z.
- [12] Yasutaro H, Kimio K, Hideo K K. Jap J Pharmacol, 1991, 55: 783.