

简报

用发酵法标记 ^{35}S -洁霉素和 ^{35}S -氯洁霉素

刘正洁 刘伯里 金昱泰

(北京师范大学化学系放射研究室)

洁霉素和氯洁霉素是由华北制药厂和北京制药工业研究所共同研制成功的新抗菌素^[1,2]。同国外由美国生产的 Lincomycin 和 Clindamycin 相似^[3-6]。

洁霉素用于治疗敏感细菌引起的感染,其独特疗效在于治疗凝固酶阳性葡萄球菌所引起的慢性骨髓炎。氯洁霉素是洁霉素的衍生物,其抗菌能力比洁霉素高4—8倍。它们的结构式分别为 I、II。

为了对这两种新的抗菌素进行药理鉴定,用同位素示踪法是简便可靠的。国外曾有有用 ^{35}S 标记 Lincomycin 的报道^[7,8],但没有提供具体的标记方法。本文提出了用生物发酵法标记 ^{35}S -洁霉素的方法。

由于洁霉素是链丝菌属的一

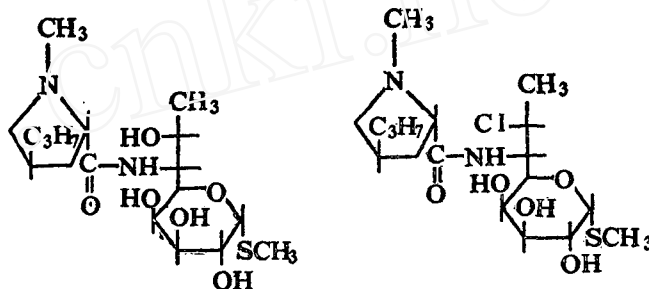
种代谢产物,用生物发酵法制备洁霉素时,细菌需从发酵培养基中吸收硫酸铵作为营养物。大量的实验证明,发酵培养基中硫酸铵的含量对效价有很大的影响,经由对发酵培养基成份的分析表明,硫酸铵是洁霉素分子中硫元素的主要来源。因此,我们采用生物发酵法,向含有硫酸铵的发酵培养基中加入 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$,生物合成 ^{35}S -洁霉素,然后通过化学合成法由 ^{35}S -洁霉素制备 ^{35}S -氯洁霉素。

现将 ^{35}S -洁霉素的生物合成、提取、以及 ^{35}S -氯洁霉素的制备简述如下。

一、 ^{35}S -洁霉素的生物合成与提取

1. 生物合成 将接种好了的450毫升发酵培养基(内无硫酸铵),在无菌室内加入经消毒处理、含有15毫居里 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 与40毫克 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的水溶液约4毫升,在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 下震荡约140小时,这时培养基的 pH 由发酵前的7.0—7.2增加到8.5—9.0。

2. 分离纯化 从发酵培养基中提取洁霉素是基于洁霉素碱易溶于丁醇、二氯甲烷、丙酮等有机溶剂,而以在正丁醇中的溶解度最大;洁霉素盐酸盐则极易溶于水,所以只要适当地调 pH 值,并分别用正丁醇和水进行萃取与反萃取,就可分离提纯洁霉素。其方法是:



1980年1月8日收到。

首先用10N H₂SO₄ 将发酵液酸化到 pH=2.5—3.0, 加热到40—50℃, 过滤除去菌丝, 并取滤液进行效价鉴定。

滤液用少量的活性炭脱色, 过滤后, 用2N NaOH 调 pH 至10.0—10.5, 每次用滤液体积三分之一的正丁醇萃取三次, 合并正丁醇, 减压浓缩 20—40 倍。再用 6N HCl 调 pH 至 1.8—2.0, 用蒸馏水反萃取 4 次, 每次水量为正丁醇体积的三分之一。(用水反萃取后可能改变有机相的 pH 值, 需要再调至1.8—2.0) 合并水相得到第一次水提取液。按此条件和方法再重复操作一次, 得到第二次水提取液。减压浓缩到0.5—1.0毫升, 加入10倍量的丙酮, 冷却析出结晶, 得到白色的 ³⁵S-洁霉素盐酸盐结晶约250毫克。

3. 鉴定 用纸层层析法进行鉴定, 其条件是:

层析纸: 新华一号。展开剂: 正丁醇: 水 = 86:14 (V/V)。检菌剂: 八叠球菌。点样量: 1—3 微克。

将 ³⁵S-洁霉素与洁霉素标准品分别点样, 在同一条件下层析, 生物显影, 并测定其放射性强度, 所得结果如图 1 所示。

所得产品 ³⁵S-洁霉素盐酸盐的放射性比度为 2.3~2.8毫居里/毫克分子。

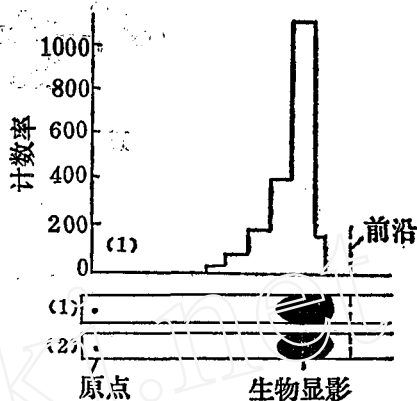
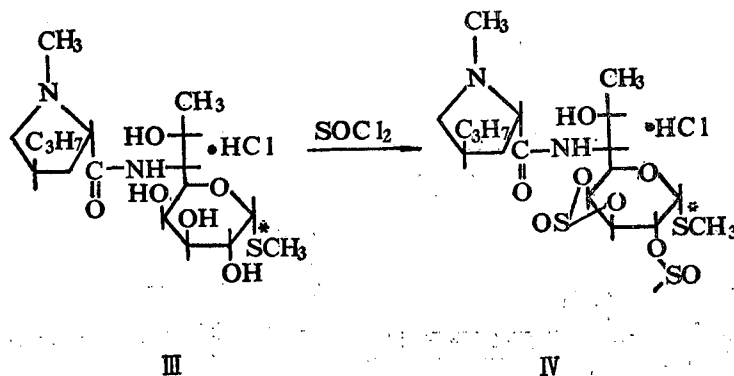


图 1 ³⁵S-洁霉素的纸层析
(1) ³⁵S-洁霉素; (2) 洁霉素。

二、³⁵S-氯洁霉素的制备

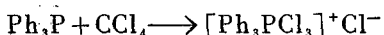
1. 制备

(1) 将150毫克 ³⁵S-洁霉素盐酸盐(下式Ⅲ)放入三口瓶内, 于冰浴上加入无水乙腈 3—4 毫升, 搅拌呈悬浮状态, 再滴入0.15毫升二氯亚砶。在不超过 5℃ 的条件下, 缓慢滴加 0.25 毫升二乙胺, (C₂H₅)₂NH + HCl → (C₂H₅)₂NH·HCl。由于这是一个放热反应, 所以必需控制滴加的速度。加完后除去冰浴。

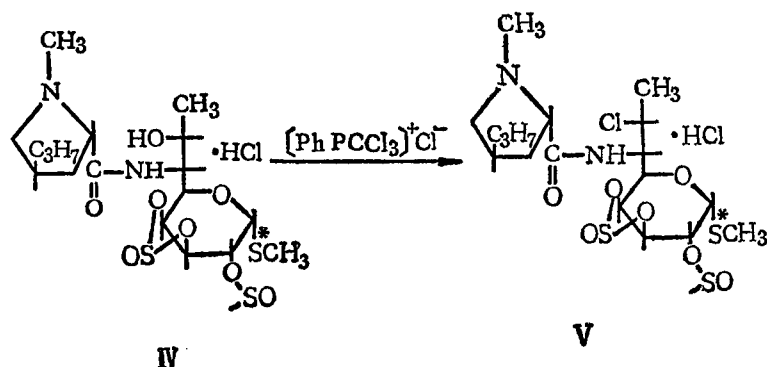


(S*表示³⁵S标记)

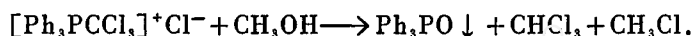
(2) 将预先配制好的三苯基磷 (0.8克) 的四氯化碳 (3—4 毫升) 溶液



倒入三口瓶内，接上带有干燥管的冷凝管，在60℃下加热搅拌回流一小时。反应正常时，反应液呈透明状态。

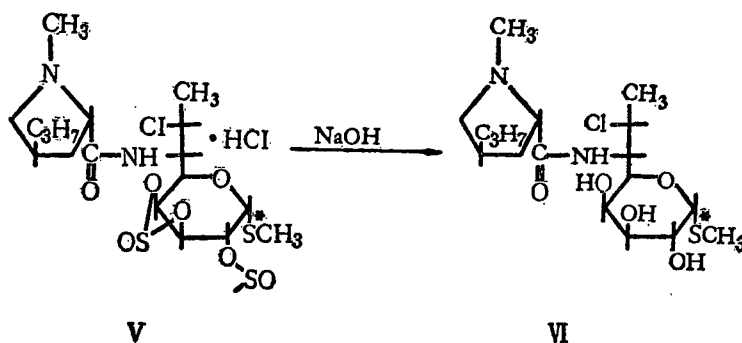


反应结束后，加入1毫升甲醇，再搅拌10分钟，以除去过量的三苯基磷，使其变成氧化物：

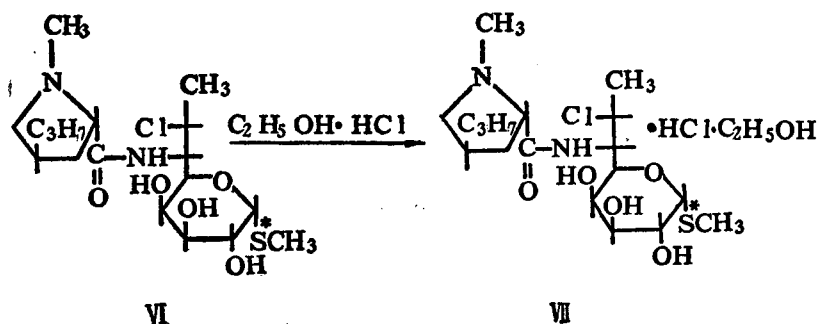


将此反应液在50—60℃的水浴上减压蒸干，残渣用15毫升水振荡，使糖浆状物溶解。这时 Ph_3PO 呈白色沉淀。为降低其溶解度，在冰浴上放置片刻，过滤弃去沉淀。

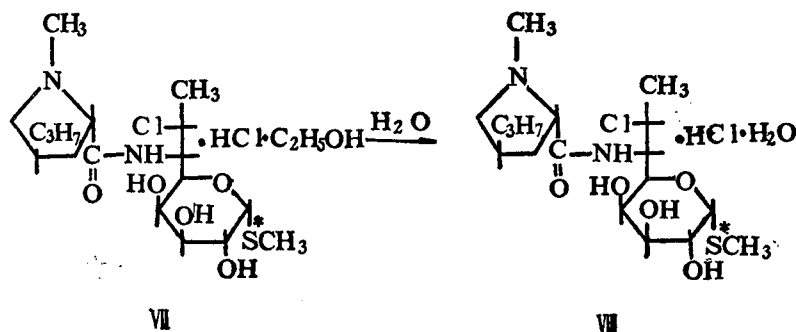
(3) 滤液用40—50%的 NaOH 调 $\text{pH} \approx 11$ 。这时，析出白色沉淀(VI)。由于氯洁霉素在水中的溶解度很小，而在二氯甲烷、三氯甲烷等溶剂中的溶解度却很大，所以用二氯甲烷萃取三次，每次用二氯甲烷约6毫升，合并有机相，用无水硫酸镁干燥脱水2小时直至溶液清澈透明，然后在50—60℃水浴上减压蒸干。



(4) 将残渣溶于3毫升无水乙醇中，如需要，可以加热。用饱和的盐酸乙醇调 $\text{pH} \approx 1$ ，即析出微小晶体。于冰箱内放置3小时，过滤得到 ^{35}S -氯洁霉素乙醇溶剂化物(VII)。



(5) 将乙醇溶剂化物溶于水:丙酮=1:3的混合溶剂中,在加热搅拌下加入预热到50℃的丙酮约10毫升,继续搅拌即出现白色晶体。经过滤就得³⁵S-氯洁霉素盐酸盐水合物晶体(VII)。



2. 鉴定 用薄层层析法进行鉴定。其条件为:

Al₂O₃ 干粉制板。展开剂: 甲醇:三氯甲烷=1:6。显色剂: 碘化铯钾。

R_f 为0.5—0.6, 与标准氯洁霉素一致。³⁵S-氯洁霉素的比放射性与³⁵S-洁霉素的比放射性相同。由³⁵S-洁霉素制备³⁵S-氯洁霉素的化学产额约为70%。

这两种标记化合物均用于动物的体内分布及代谢实验^[1], 为洁霉素与氯洁霉素的药理鉴定提供了可靠数据。

在生物发酵合成³⁵S-洁霉素及其效价鉴定等工作中, 北京制药工业研究所和河北制药厂曾给予大力协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 华北制药厂研究所, 北京制药工业研究所内部资料, 1975年。
- [2] 华北制药厂研究所, 北京医药工业, 4, 6 (1976)。
- [3] D. J. Mason et al., Antimicrobial agents and Chemotherapy-1962, Proceedings of the Second Interscience Conference, p. 554, American Society for Microbiology, 1963.
- [4] R. R. Herr et al., *ibid*, p. 560 (1963)。
- [5] E. Sanders M. D., Med. Clin. N. Am., 54 (5), 1295 (1970)。
- [6] S. Oppenheimer et al., Am. J. Med. Sci., 256, 314 (1968)。
- [7] D. J. Mason et al., J. Antibiot., Int. J., 22 (6), 289 (1969)。
- [8] H. Hoeksema et al., *ibid.*, 22 (7), 341 (1969)。
- [9] 生物系肿瘤组, 北京师范大学学报 (自然科学版), 1, 61 (1976)。

(英文摘要见第190页, See p. 190 for abstract)

(上接第159页, Continued from page 159)

The extraction equilibrium constants (K_{ex}) for Na⁺, Rb⁺, Cs⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ce³⁺ have been determined at 30 °C. The K_{ex} sequences of the monovalent and bivalent metal ions are Rb⁺>Cs⁺>Na⁺, Sr²⁺>Ca²⁺ respectively. ²²Na-¹³⁷Cs, ⁴⁵Ca-⁹⁰Sr and ¹⁴⁴Ce-⁹⁰Sr-⁹⁰Y can be effectively separated by extraction chromatography with dibenzo-18-crown-6.

LABELING OF LINCOMYCIN AND CLINDAMYCIN WITH S-35

LIU ZHENGHAO LIU BOLI JIN YUTAI

(Division of Radiochemistry, Beijing Normal University, Beijing)

ABSTRACT

Lincomycin and Clindamycin are two new antibiotics studied successfully in China. In this paper, ^{35}S -labelled products— ^{35}S -Lincomycin and ^{35}S -Clindamycin were made by biosynthetic and semichemical synthetic methods. They were subjected to trials in pharmacology studies. Owing to the fact that Lincomycin is a metabolite of streptomycetes when it is prepared by the fermentation method, the microbes will pick up $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from the fermentation culture as a nutriment. Hence $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ was added to the fermentation culture-medium via biosynthetic method to obtain ^{35}S -Lincomycin. Then ^{35}S -Clindamycin was prepared by semichemical synthetic method from ^{35}S -Lincomycin.

After the purification of the semiproduct, it was esterified by sulfinyl chloride and chlorinated by carbon tetrachloride solution of triphenyl phosphine and then hydrolyzed with sodium hydroxide, and extracted by dichloromethane. Finally, the product was obtained by acidification with hydrochloric acid; the specific activity of both ^{35}S -Lincomycin and ^{35}S -Clindamycin being 2.3—2.8 mCi/mM, the activity percentage of recovery from the initial to ^{35}S -Lincomycin being 8%, the chemical yield from ^{35}S -Lincomycin to Clindamycin being 70%. The R_f value of ^{35}S -Lincomycin checked very well with the single spot of biologically standard unlabelled Lincomycin.

质子激发 X 射线分析测定 患白血病小白鼠脏器中痕量元素

汪芳林 马鑫培

(中国科学院原子能研究所)

刘承斌 赵启仁 叶章程

(中国医学科学院放射医学研究所)

应用质子激发 X 射线分析的方法对急性淋巴细胞白血病小白鼠肝脏和脾脏中痕量元素的变化进行了研究。给出了实验组和对照组小白鼠肝脏和脾脏中 K, Ca, Ti, Fe, Cu, Zn 和

1979年10月24日收到。