

新吩嗪化合物 K₃-Ye 的分离和结构鉴定

陈文平 吴剑波

(中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术研究所,北京 100050)

提要 自一株基因工程链霉菌 K₃ 的发酵液中分离得到一吩嗪类新化合物,经光谱数据(UV, IR, ¹HNMR, ¹³CNMR, DEPT)分析,确定其结构为 1-吩嗪氧基乙酸甲酯,代号 K₃-Ye。经初步测定它有较强的抗核苷转运活性。

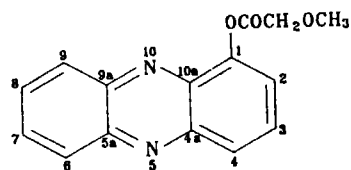
关键词 1-吩嗪氧基乙酸甲酯;抗核苷转运

DNA 重组技术在链霉菌中的迅速发展和应用为寻找新抗生素开辟了一个新方向^(1,2),本所基因工程室将丁酰苷菌素产生菌 *Bacillus circulans* 的 α -羟基- γ -氨基丁酸酰化酶基因通过适当载体转入卡那霉素产生菌 *S. Kanamyceticus* 中,产生了基因工程菌株 K₃。为了寻找新的抗生素,我们对 K₃ 发酵液中脂溶性成分进行了较为深入的研究。

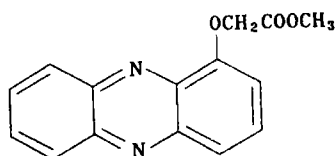
K₃ 发酵液经离心后上清液用乙酸乙酯提取,提取物经葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析,再经两次制备性薄层层析分离得到 K₃-Ye。根据理化性质、光谱数据以及模型化合物的对照分析,确定 K₃-Ye 为一吩嗪类新化合物,即 1-吩嗪氧基乙酸甲酯。初步生物活性筛选表明它有较强的抗核苷转运活性,这也是吩嗪类化合物^(3,4)中第一个被报道有抗核苷转运活性⁽⁵⁾。K₃-Ye 的独特侧链及其活性为此类化合物的化学改造提供了线索。本文主要报道它的分离和结构测定。

K₃-Ye 为黄色无定形粉末,溶于氯仿、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等溶剂,不溶于水及非极性溶剂。UV 吸收:159.6, 257.8 和 362.8 nm。IR 吸收:1623, 1520, 1480, 1435, 1348, 1138, 850, 820, 760 和 740 cm⁻¹等都呈现吩嗪类化合物的特征吸收⁽⁶⁾。EI-MS 有 m/z 179, 180 的碎片峰(吩嗪母核分子量 180),¹³CNMR 显示 12 个芳香碳,而且它们的化学位移与 1-羟基吩嗪的文献数据⁽⁷⁾极相近。至此可以证实 K₃-Ye 有吩嗪母核。从¹HNMR 中可以观察到 7 个芳香氢,且没有一个呈单峰,说明此化合物为 1-位单取代的吩嗪。¹³CNMR 中低场芳香碳 153.3(C)及高场芳香碳 108.4(CH),说明取代基对 1 位的强去屏蔽作用及对邻位的屏蔽作用,¹HNMR 中高场芳氢 δ 7.0 也说明了这一点。因此吩嗪母核于 1 位与杂原子直接相连。

IR 谱中 1738 cm⁻¹的吸收及¹³CNMR 中 δ 168.9 的信号说明酯羰基存在。¹HNMR 中 δ 3.85 (3H, s)及¹³CNMR 中 δ 52.41(CH₃)的信号说明甲氧基的存在。从¹HNMR 中观察到还有一个较低场的 CH₂ 存在。其¹HNMR 信号 δ 5.08(2H, s),¹³CNMR 信号 δ 66.40(CH₂)说明 CH₂ 与杂原子及其它吸电子基团相连。EM-MS 在 m/z 268 显示分子离子峰,从中减去已知结构片段:吩嗪核(179),羰基(28),甲氧基(31),及 CH₂(14),计算得出与吩嗪核相连的杂原子为氧。根据以上推知的四个结构片段,有以下两种可能结构:

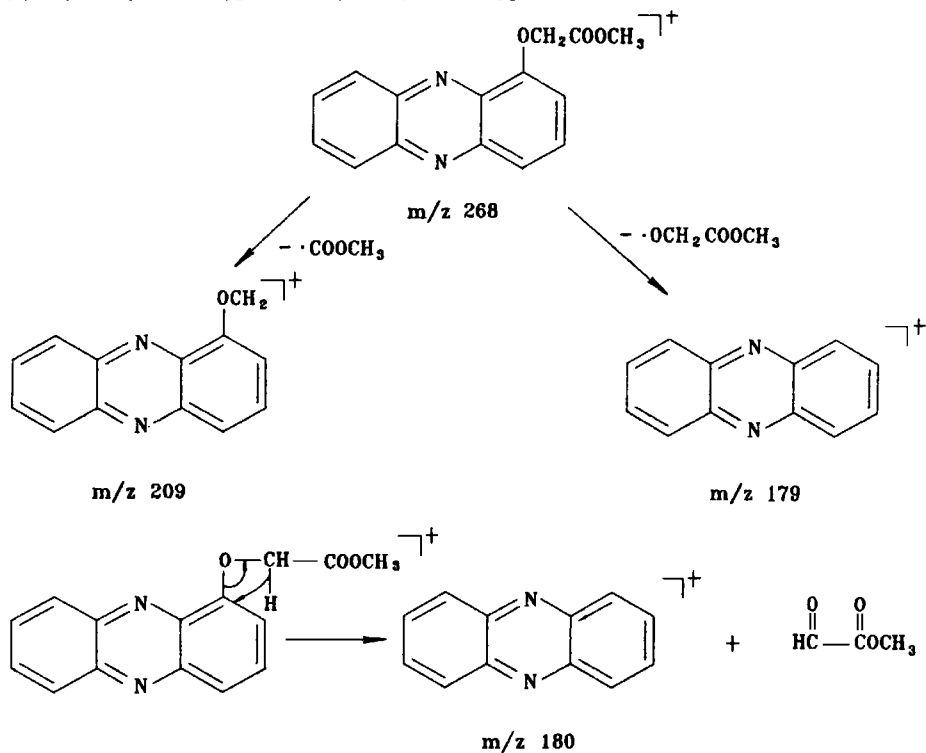
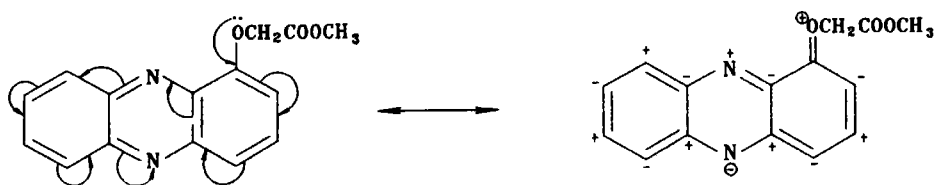


I



II

从质谱裂解方式(见图 1)可以证明 K_3 -Ye 的结构为 II, 即 1-吩嗪氧基乙酸甲酯。其分子式为 $C_{15}H_{12}N_2O_3$, 与元素分析结果相符。它的 NMR 数据归属见表 1。其中 6, 9 位及 7, 8 位氢的归属是根据取代基的共轭效应引起芳核上电子密度改变而推定的, 其共振式见图 2。9 位较 6 位缺电子, 因此 8.41 ppm(1H, m) 指定为 9 位 H, 8.24 ppm(1H, m) 指定为 6 位 H。同理 7 位较 8 位缺电子, 因而 7 位 H 在 7.87 ppm 而 6 位 H 在 7.84 ppm。

Fig 1 EI-MS fragments of K_3 -Ye.Fig 2 Resonance structure of K_3 -Ye.

Tab 1 NMR data of K₃-Ye and 1-hydroxyphenazine

Assignment	1-Hydroxyphenazine	K ₃ -Ye	
	δ C(ppm)	δ C(ppm)	δ H(ppm)
1	151.9(C)*	153.35(C)	
2	109.0(CH)	108.45(CH)	7.01(1H,d,J=7.5 Hz)
3	130.8a(CH)	131.00(CH)	7.73(1H,dd,J=9, 7.5 Hz)
4	120.1(CH)	122.92(CH)	7.91(1H,J=9 Hz)
4a	144.3(C)	144.28(C)	
5a	144.0b(C)	142.43(C)	
6	130.45a(CH)	130.29(CH)	8.24(1H,m)
7	129.25(CH)	129.40(CH)	7.87(1H,m)
8	129.85(CH)	129.96(CH)	7.84(1H,m)
9	131.85a(CH)	130.37(CH)	8.41(1H,m)
9a	141.55b(C)	143.63(C)	
10a	135.15(C)	136.78(C)	
OCH ₂		66.40(CH ₂)	5.08(2H,s)
C=O		168.91(C)	
OCH ₃		52.41(CH ₃)	3.85(3H,s)

a, b: The assignments of data labeled by a or b are exchangeable.

* : The numbers of hydrogen atoms on the carbon atoms are measured by DEPT technique.

实 验 部 分

UV 用 Shimadzu UV-2201 仪测定。IR 用 Shimadzu IR-435 仪测定。NMR 用 JNM-GX400 仪测定,溶剂为 CDCl₃,内标为 TMS。质谱仪 MAT-711。元素分析仪 Carloerba-1106。高效液相色谱仪 Waters 590,色谱柱 Waters 10 C₁₈(4.5×250 mm)。硅胶薄层层析:分析板为 Merck 产 Kieselgel 60 F₂₅₄,制备板用青岛产 GF₂₅₄ 10~40 μ 硅胶涂布。葡聚糖凝胶 LH-20 为进口分装品。K₃ 菌种由本所基因工程室提供。

提取分离

K₃ 发酵液经离心后的上清液在 pH 4 条件下,用乙酸乙酯提取,提取物进行 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱,收集黄色色带流份,再用苯—丙酮 5:2 的展开剂进行两次制备性薄层层析,得到了 K₃-Ye。TLC 检查,在苯—丙酮 5:2 及氯仿—甲醇 13:1 两个系统中均为单一斑点。HPLC 检查,流速 1 ml/min,流动相 80% 甲醇(水),检测波长 257 nm,K₃-Ye 呈现单一峰,保留时间 t_R=4.46 min。

鉴定

K₃-Ye 为黄色无定形粉末,分子式 C₁₅H₁₂N₂O₃,元素分析:计算值%: C 67.16, H 4.48, N 10.45; 测定值%: C 67.10, H 4.51, N 10.46。UV_{max}^{MeOH} nm: 195.6, 257.8 和 362.8。IR(KBr) cm⁻¹: 1738(C=O), 1623, 1520(C=C), 1480, 1435, 1348, 1208(C—O—C), 1138, 1110, 850, 820, 760, 740。EI-MS m/z 268(M⁺), 209(M⁺—COOCH₃), 180(M⁺—OHCCOOCH₃), 179(M⁺—OCH₂COOCH₃), 167, 152, 102。¹H、¹³CNMR 见表 1。

活性测定

用细胞测定 K₃-Ye 的核苷转运抑制活性,当 K₃-Ye 的浓度为 100 μg/ml, 20 μg/ml 和 10 μg/ml 时的核苷转运抑制率分别为 100%, 98% 和 97%。

致谢 发酵工作由本所刘伯英副主任技师协助完成,活性测定得到了本所粟俭博士的帮助。日本大鵬制药株式会社测定了部分光谱。

参 考 文 献

- 1 Hopwood DA, et al. Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature* 1985; **314** : 642.
- 2 James B, et al. New antibiotics from genetically engineered actinomycetes. *J Antibiot* 1987; **40** : 1115.
- 3 Tunac JB, et al. PD116, 152, A novel phenazine antitumor antibiotic. *Ibid* 1986; **39** : 192.
- 4 Keiichi t, et al. DC-86-M, A novel antitumor antibiotic. *Ibid* 1986; **39** : 624.
- 5 Evans JS, et al. Antitumer and hyperglycemic activity of strptozotocin (NSC-37917) and its cofacter, U-15774. *Cancer chemother Rep.* 1965; **48** : 1.
- 6 Berdy J, et al. *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*. Vol V, CRC Press, Inc. , Florida, 1981.
- 7 Edoerhark B and Ulrich H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts of substituted phenazines. *J Org Chem* 1976; **41** : 2104.

ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF NEW PHENAZINE COMPOUND K₃-Ye

WP Chen and JB Wu

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical
College Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT A phenazine compound K₃-Ye, an inhibitor of nucleoside transport, was isolated from the fermentation broth of a genetic-engineering streptomyces K₃. Its structure was elucidated based on spectral data and elemental analysis.

Key words Methyl 1-phenazinoxy-acetate; Inhibitor of nucleoside transport