UDC 615.779.931-011

15. 谷山兵三^{*1}, 三好文彦^{*2}, 景山公子^{*3}: 放線菌抗生物質の化学的研究 (第 11 報^{*4})

Racemomycin その 8 Racemomycin A, B, C について

Hyozo Taniyama, Fumihiko Miyoshi, and Kimiko Kageyama: Chemical Studies on Antibiotics produced by Actinomycetes. XI. Racemomycin. (8). On Racemomycin A, B, and C.

(Pharmaceutical Faculty, University of Nagasaki,^{*1} Faculty of Pharmacy, Kinki University,^{*2} and Mukogawa Women's University^{*3})

Separation and purification of Racemomycin complex, produced by a mutant strain of *Streptomyces racemochromogenus* SUGAI, SHINOBU et OTANI, was reported earlier but reexaminations were made on some insufficient points. It was found that the sulfates of Racemomycin A, B, and C can be separated and purified by column chromatography using cellulose powder. Racemomycin A, B, and C have β -lysine and reseinone as the constituent component of their molecule and are assumed to be chemically similar antibiotics but they show difference in their biological activity. It was assumed that Racemomycin-A is an antibiotic with strong antibacterial activity and without acute toxicity or delayed toxicity. All racemomycins A, B, and C are labile to acid and alkalis, and require great care in their preservation.

(Received March 31, 1961)

前報^{*4}において *Streptomyces racemochromogenus* SUGAI, SHINOBU et OTANI¹⁾ によつて產生される racemomycin O の推定構造式を提出した。このものは streptothricin 系に属する塩基性水溶性抗生物質で毒性および遷延性毒性がなく、この種の抗生物質群において特異な存在である。しかるにその変異株^{2,3)} によつて產生される racemomycin A (229-A), B (229-B), C (229-C) の混合物、すなわち racemomycin complex は他の streptothricin 系抗生物質と同じく毒性および遷延性毒性を有している。

著者等は racemomycin O との関連性を明らかにし、さらに racemomycin A, B, C の化学構造を解明するために、この研究を進めた。この際に興味ある問題は、その毒性の有無は如何なる化学構造上の差異によつて生ずるものであるかを知ることである。しかし racemomycin A, B, C のいずれもが毒性を有するのではなく、そのうちの 1 成分または 2 成分のみが毒性を有する場合、その分離精製を完全に行ない得れば racemomycin O と同様の毒性のない成分が発見される可能性も予想される。既報^{2,4)} においても一応の分離精製が試みられていたのではあるが、その方法は後述のように完全なものでなく毒性の問題は未解決のままであつた。そこでこの問題の解決と racemomycin A, B, C の構造研究のために分離精製法を再検討した結果、セルロースパウダーを用いたカラムクロマトグラフィーによつて racemomycin A, B, C の大量分離に成功し、今後の研究遂行の基礎を確立すると共に毒性の問題にも推論を出し得ることができた。

既報の分離法によれば racemomycin A⁴⁾ は沈殿法で塩の溶解度の差を利用し希薄水溶液として分離されたが、結晶または粉末としては得られず、racemomycin C²⁾ はイオン交換クロマトグラフィーで得られた racemomycin B との混合物をペーパークロマトグラフィー (PPC) にかかけ、分離した Rf 値の部分より水で浸出し微量の C を *p*-(*p*-hydroxyphenylazo) benzenesulfonate として得られたに過ぎなかつた。また racemomycin B²⁾ はイオン交換クロマトグラフィーでやや多量分離する方法が発見されているが、この方法で分離された racemo-

*1 Showa-machi, Nagasaki.

*2 Kowakae, Fuse, Osaka-fu.

*3 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo-ken.

*4 Part X: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 8, 578(1960).

1) K. Kashii, K. Minoura, T. Toki, T. Sugai, S. Otani: J. Antibiotics (Japan) Ser. B 11, 277(1958).

2) 谷山, 竹村: 本誌 77, 1210(1957).

3) T. Sugai: J. Antibiotics (Japan) Ser. B. 9, 170(1956).

4) 竹村: 近畿大学薬学部紀要 2, 15(1958).

mycin B にはなお微量の不純物が PPC によつて認められる. そこで racemomycin O の推定構造が決定された現在, racemomycin A, B, C をその関連性において研究を進めるためには, より多量の racemomycin A, B, C を純粋に分離精製することが必要となつた. そこで種々の分離方法を再検討したところセルロースパウダーによるカラムクロマトグラフィー⁵⁾ により同時に多量の racemomycin A, B, C が純粋に収率よく分離できることがわかつた (Table I).

Table I. Column Chromatography of Racemomycin
Complex 160 g. on Powdered Cellulose

Fraction No.	Weight (g.)	Papergram assay	Fraction No.	Weight (g.)	Papergram assay
2~17		compd. f	85~93	6	Racemomycin C, B
18~31	9	compd. f, Racemomycin A	94~125	41	Racemomycin B
32~61	47	Racemomycin A	126~143	21	Racemomycin B, compd. g, h
62~74	17	Racemomycin A, C	144~157		compd. g, h
75~84	10	Racemomycin C	158~175		compd. h, i

展開溶媒として $\text{PrOH} \cdot \text{pyridine} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 : 10 : 3 : 12) を用い, 各フラクションの成分確認には同じ展開剤による円形 PPC によつた. その結果は Fig. 1 のようで, 図の A, B, C のエンヒドリン陽性帯がそれぞれ racemomycin A, B, C であることは既報²⁾ の PPC によつて確認された. 同じフラクションは集めてエーテル処理の後, 凍結乾燥, 再結晶を行なえば racemomycin A, B, C は無色微細硫酸塩結晶として得ることができる. なお racemomycin complex には図に示されているような compound f, g, h, i などの弱少成分ないし不純物と思われるものが少量含まれていることがわかつた.

Fig. 1.
Circular Paper Chromatography

- A : Racemomycin A
- B : Racemomycin B
- C : Racemomycin C
- f : Compound f
- g : Compound g
- h : Compound h
- i : Compound i

このようにして得た racemomycin A, B, C 硫酸塩の融点, 元素分析値, 旋光度は実験の部に示す. IR スペクトルは Fig. 2 のようで, IR には A, B, C いずれも末端以外に吸収はなかつた. Biuret, Elson-Morgan, Molish, Ninhydrin 反応にはいずれも陽性, FeCl_3 , HgCl_2 , Benedict 反応にはいずれも陰性であつた. 酸およびアルカリに対して不安定で, 室温で希酢酸によつても徐々に分解する. racemomycin A, B, C 硫酸塩をそれぞれ水に溶解して円形ペーパークロマトグラフィーにかけた結果は Fig. 3 (a) 図に示されるが, この水溶液に

5) M. I. Horowitz, C. P. Schaffner : Anal. Chem. 30, 1616(1958).

Fig. 2. Infrared Absorption Spectra of Racemomycin A Sulfate (—), Racemomycin B Sulfate (---), and Racemomycin C Sulfate (- - -) (Nujol mull)

Fig. 3.

- (a) Racemomycin A, B, C 硫酸塩水溶液 (b) (a) に 10% H_2SO_4 1 滴を加えて直ちに展開
 (c) (b) を 3 日放置 (d) (b) を 5 日放置
 A: Racemomycin A B: Racemomycin B C: Racemomycin C
 AH: Racemomycinic A acid BH: Racemomycinic B acid CH: Racemomycinic C acid

10% H_2SO_4 1 滴を加えて直ちにペーパーにかけると (b) 図のようにすでに分解が認められる。この液を室温で放置すると時間と共に分解反応の進行が認められる、3 日後には racemomycin A, B, C とそれぞれの分解生成物 (racemomycinic A acid, B acid, C acid と名づける) のニンヒドリン発色の強さはほぼ等しくなり ((c) 図), なお放置すれば 5 日目には明らかに racemomycin A, B, C の発色の強さよりも racemomycinic A acid, B acid, C acid の方が強くなる ((d) 図)。なかでも racemomycin A は最も不安定で分解しやすく、保存中すでに racemomycinic A acid が微量生成する。これを防止するためには安定剤として痕跡のピリジンを混入させ水酸化ナトリウムのデシケーター中に保存する必要がある。ここにおいて問題となるのは racemomycin B と racemomycinic A acid の円形 PPC 上の Rf 値が同一であり、他の PPC でもその Rf 値に差異が認められないことから、この両者は同一物質ではないかと思われた。しかし racemomycin B が希酸で racemomycinic B acid に容易に変化するに反して racemomycinic A acid は同一の条件で全く変化せず、この両者は明らかに異なる物質であることが証明された。この問題に関しては次報で詳述する。racemomycin complex の培養液からの精製において酸、アルカリ処理を行なっている点より考え、racemomycin B 硫酸塩として現在分離された物質も完全に単一物質ではなく当然少量の racemomycinic A acid が混入していることが考えられ、racemomycin B の精製はなお問題を残しているといわねばならない。

racemomycin B²⁾ および O⁶⁾ を 6N HCl で加熱加水分解すれば roseonine および β -lysine が得られているが、racemomycin A および C から同様の条件で roseonine および β -lysine が分解物として生成することを PPC によって確認した。

6) S. Takemura: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 8, 154(1960).

Table II. Antibacterial Activities of Racemomycin A, B, and C, and Compound f, g, and h (Minimum inhibitory concentration (γ /cc.))

	Racemo- mycin A	Racemo- mycin B	Racemo- mycin C	Compound		
				f	gh	h
<i>Aerobacter aerogenes</i> IAM 1102	6.25	3.13	6.25	>1000	50	100
<i>Bacillus mycoides</i>	100.0	25.0	50.0	>1000	50	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.25	0.08	0.31	500	2.5	2.5
<i>E. coli</i> IAM 1253	25.0	12.5	25.0	>1000	100.0	100.0
<i>M. pyogenes</i> var. <i>albus</i> 1200A	1.25	0.08	0.31	500	0.63	0.63
<i>M. pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 209P	5.0	0.78	3.13	1000	3.1	6.3
<i>Mycobacterium phlei</i> SEKIGUCHI	1.25	6.25	25.0	1000	12.5	12.5
<i>Mycobacterium</i> 607	1.25	3.13	12.5	1000	12.5	12.5
<i>Sarcina lutea</i>	5.0	0.39	0.78	500	3.1	3.1
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	>100.0	250.0	250.0	>1000	>1000	>1000

Table III. LD₅₀ in Mouse (mg./kg. i.v. inj.)

Time after injection	24 hr.	7 day	14 day
Racemomycin A	357	353	347
Racemomycin B	117	58	52
Racemomycin C	220	177	170
Racemomycin Complex	127	107	—

以上のように racemomycin A, B, C は化学的に互に類似した物質であろうと思われるが、その生物学的作用特に毒性試験においては著明な差がある。抗菌試験の結果は Table II のようにグラム陽性陰性菌に対していずれも強い抗菌力を示している。毒性試験の結果は Table III のように racemomycin B および C は毒性および遷延性毒性が著明であるのに反して、racemomycin A は急性毒性も遷延性毒性もなく racemomycin O と同様、この種の抗生物質群において特異な存在であることがわかった。前述の racemomycin complex 中に毒性のない成分が存在するかも知れないという予想は的中したのであるが、この結果から大胆に推論をおよぼすならば他の streptothricin 系抗生物質群においてもその分離精製法を再検討すれば、毒性のない物質も発見できるのではないと思われる。

また、racemomycin O と A とは生物学的活性においてよく似ているが、種々の物理的、化学的性質および現在続行中の分解研究の結果は両者の間に明らかな差異があることを示している。

実 験 の 部

Racemomycin complex の精製 培養母液を H_3PO_4 で pH 4.0 にした後母液を NaOH で pH 7.0 にし再び母液を Amberlite IRC 50 (Na 型) で処理、 $\text{N NH}_4\text{OH}$ で溶出して得た溶液を $\frac{1}{10}$ 量まで濃縮。 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:1) で pH 2.0 にし活性炭処理、母液を Amberlite IR 45 で pH 6.0 にした後、 -40° で凍結乾燥すると淡褐色乃至淡黄色の精製 racemomycin complex 粉末を得。

Racemomycin A, B, C 硫酸塩の分離精製 ガラス製カラム (内径 12 cm, 長さ 170 cm, 下端にコックをもつ) に Whatman cellulose powder 4.5 kg をつめ、その上部に精製 racemomycin complex 160 g を水 180 cc に溶解しセルロースパウダー 200 g とよく混和後、 P_2O_5 デンケーターで乾燥して作った試料をつめる。カラム上端に分液漏斗をつけ展開溶媒 $\text{PrOH} \cdot \text{pyridine} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15:10:3:12) を滴下して展開流出させクロマトグラフィーを行なう。展開液の流出速度は 650 cc/hr, 各フラクションは 500 cc ずつ捕集する。各フラクション含有物の確認はつぎに述べる円形 PPC によつて行なう (Fig. 1)。このクロマトグラフィーに要した展開溶媒の総量は約 90 L であった。同一成分のフラクションを集め分液漏斗で等量の Et_2O と振盪した後、分離する水層を凍結乾燥する。収量は Table I に示す。ここに得た racemomycin A, B, C の各 H_2SO_4 塩をさらに精製するには少量の水に溶解、活性炭処理の後 MeOH を加えて析出する無色結晶を母液から再結晶を 2 回繰り返して精製 racemomycin A, B, C の各 H_2SO_4 塩無色微細結晶を得。racemomycin A H_2SO_4 塩: mp 213~214°(decomp). $[\alpha]_D^{25} -34.8^\circ$ ($c=4.8$, H_2O). Anal. Found C 34.86, H 6.26, N 15.72, S 7.12. racemomycin B H_2SO_4 塩: mp 214~215°(decomp). $[\alpha]_D^{25} -57^\circ$ ($c=0.51$, H_2O). Anal. Found C

35.62, H 6.58, S 7.27. racemomycin C H_2SO_4 塩: mp 213~214°(decomp). $[\alpha]_D^{25} -41^\circ$ ($c=0.60$, H_2O). Anal. Found C 36.40, H 6.35, N 15.87, S 7.65.

円形ペーパークロマトグラフィー 直径 23 cm の円形濾紙 (東洋濾紙 No. 50) の中心に直径 3 cm の同心円をえがき, その円周上に試料を塗布. さらに中心に直径 0.5 cm の穴をあけ, その穴に濾紙を円筒状にまいたものを挿入する. これを直径約 25 cm のデンケーター中で展開剤 $\text{PrOH} \cdot \text{pyridine} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15:10:3:12) で展開させる. 展開後, 風乾しニンヒドリンで発色. Rf 値は動揺しやすい故, 必ず対照の試料を同時に展開する.

Racemomycin A, B, C 硫酸塩の室温希酸分解 racemomycin A, B, C H_2SO_4 塩をそれぞれ 5 mg を 0.5 cc に溶解し円形 PPC にかける. つぎに 10% H_2SO_4 1滴をこの H_2SO_4 塩水溶液にそれぞれ滴加し, 直ちに再び円形 PPC にかける. 以後室温に放置し分解反応の進行状態を円形 PPC によつて検する (Fig. 3).

Racemomycin A, C 硫酸塩の加水分解 racemomycin A および C H_2SO_4 塩 15 mg をそれぞれ 6N HCl 1 cc と水浴上約 30 hr 加熱. 減圧蒸留して得た残留物を 3 種の展開剤で PPC にかき β -lysine および roseonine の存在を確認した.

抗菌試験 racemomycin A, B, C H_2SO_4 塩はそれぞれ蒸留水で 20,000 γ /cc に, compound f, gh, h は 5000 γ /cc に溶解後無菌濾過し, 各種段階の希釈液を作る. *Mycobacterium* 607 および *Mycobacterium phlei* SEKIGUCHI は Dubos 培地を用い 5 日間, その他の試験菌は heart infusion broth を用い 24 hr, 37° で培養後判定した.

毒性試験 dd 系 (♀), 体重 18 g $\pm$ 1.0 g のハツカネズミを 1 群 6 匹使用し, 注射用無菌蒸留水を用い 0.5 cc/mouse を静注 (注射速度 5 sec), 14 日間観察を行なう. LD₅₀ の計算法は Behrens-Kaerber 法による.

本研究に終始御鞭撻賜わつた京都大学 上尾庄次郎教授に感謝します. また培養その他に御援助を下さつた明治製菓株式会社製薬部の諸氏, 元素分析および IR スペクトルの測定を願つた大阪大学 福田講師, 大日本製薬株式会社中央研究所の方々に深謝します.

長崎大学薬学部, 近畿大学薬学部, 武庫川女子大学

UDC 547.567:546.171.5

16. 秋田 正: 有機化合物とヒドラジンの反応 (第11報^{*1})

キノン化合物とヒドラジンヒドラーの反応

Tadashi Akita: Reaction of Organic Compounds with Hydrazine. XI.

Reaction of Quinone Compounds with Hydrazine Hydrate.

(Faculty of Pharmacy, University of Tokushima^{*2})

Reductive action of hydrazine hydrate on quinones was examined and systematic reduction was carried out on 16 kinds of various substituted quinones by which the corresponding hydroxyl compounds were obtained in a good yield. This reduction did not cause any side reaction even in quinones with functional groups and hydrazine hydrate was found to be a mild agent, better suited than the existing reducing agents.

(Received September 11, 1961)

著者は前報¹⁾までに, ニトロ化合物, アゾ化合物, スルホニルクロライド類のヒドラジンヒドラーによる還元について検討した結果, 種々の興味ある知見を得たが, 今回はキノン類に対してヒドラジンヒドラーがいかなる還元作用を呈するかを検討した.

従来 phenylhydrazine により, ベンゾキノン, ナフトキノン, チモキノンなどはそれぞれ対応するヒドロキ

*1 第10報: 徳大薬研 9, 11 (1960)

*2 Sho-machi, Tokushima.

1) 久保田, 秋田: 本誌 81, 522 (1961).

2) Giacalone: Gazz. chim. ital. 58, 410 (Beilstein E II 6, 832).

3) Purgotti: Ibid. 24, 1584 (Beilstein 6, 851).