·综　述·

单环β-内酰胺抗生素

南京药学院抗菌素研究室　林建伟*　顾觉奋

前　言

自从发现青霉素以来，β-内酰胺类抗生素已经引起人们广泛的兴趣。这是因为这类抗生素一方面能抑制细菌细胞壁肽的合成，而有最佳的选择毒性；另一方面母核6-APA和7-ACA具有多方面用途，可制成许多抗耐药性和广谱的抗生素。

单环β-内酰胺类抗生素，它属于β-内酰胺类，但与青霉素和头孢菌素之间既有相似处，又有不同点。从结构上（图1）即可看出它的独特之处。其实，类似这种结构的抗生素早在1976年就有人报道了一种（Nocardicin A），当时并没有人注意存在有这类单环抗生素。直到1981年，美国施贵宝公司从细菌中发现了一类β-内酰胺抗生素后，它才引起了人们的兴趣，并由Sykes等命名为"monobactams"，即单环β-内酰胺类[1]。这类抗生素是微生物的次级代谢产物，通过发酵可大量生产。据报道，在国外已开始投入市场，如美国已将它引入抗生素生产的重点项目，预计八十年代末将对它投资2亿美元，而青霉素和头孢菌素类也只不过是4亿美元。

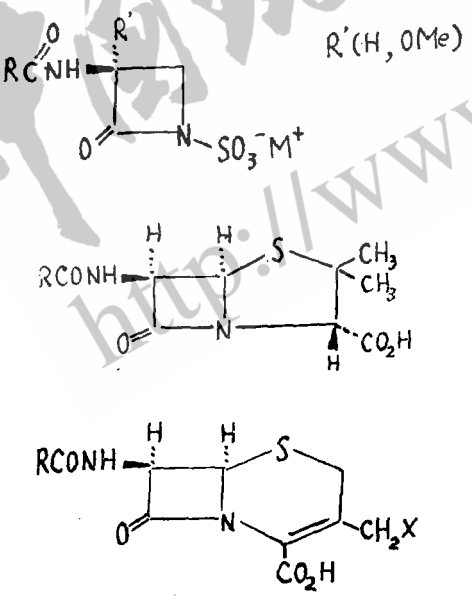
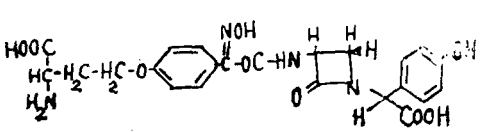


图1

为什么单环β-内酰胺抗生素有如此之前景呢？首先，这类抗生素和青霉素、头孢菌素一样，都具有很好的抗菌活性，如抗大肠杆菌、肠球菌、肺炎杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌等的感染；其次，是具有青霉素、头孢菌素同样的低毒性；再者，就是它对β-内酰胺酶的稳定性，因甲氧基化的单环β-内酰胺不易水解；另外，也许是人们最感兴趣的是抗绿脓杆菌感染。因绿脓杆菌是很棘手的细菌，非常顽固，而单环β-内酰胺抗生素对它的作用意味着这类抗生素在治疗疾病中具有重要意义。

本文仅对这类天然来源的单环β-内酰胺抗生素的产生菌、发酵、理化性质、生物活性以及分离纯化作一叙述。

诺卡杀菌素 A　(Nocardicin A)[2]



* 八一年级毕业生。

【产生菌】诺卡氏菌(Nocardia uniformis subsp tsuyamanensis)其菌落特征为气生菌丝网状交织，孢子呈短棒状，表面光滑。不同琼脂上其特征不同，例如：

在察氏琼脂上：生长丰富，无气生菌丝，基内菌丝为橙黄色，无可溶性色素。

在葡萄糖天冬素琼脂上：生长丰富，无气生菌丝，基内菌丝为黄色至奶黄色，无可溶性色素。

酵母麦芽汁琼脂上：生长中等，无气生菌丝，基内菌丝棕灰色，皱。

【发　酵】培养基组成：甘氨酸3%、棉籽粉2%、酵母粉2%、$KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 2.18%、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.43%、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5%；取20升装入30升发酵罐中接种，于30℃通气量20l/min、搅拌300rpm，发酵4天。

【分　离】发酵液过滤后用活性炭吸附，以丙酮-水-25%氨水(100:100:1)溶液洗脱，减压浓缩，用阳离子交换树脂调pH至3.0，除去沉淀，通过Duolite A-6(HAC型)交换柱，水-吡啶-醋酸(100:10:1)溶液洗脱，减压浓缩，调pH至2.5，收集沉淀，悬浮于水中调pH至7.5。通过阴离子树脂交换柱(DEAE-Sephadex A-25，(1型)，0.5%氨水洗脱，调至pH2.5，得到粗晶，用活性炭处理，重结晶获无色针状晶体。

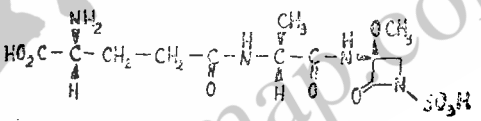
【理化性质】无色结晶，溶于碱溶液，微溶于甲醇，不溶于氯仿，乙酸乙脂和乙醚，187℃变成棕色，214～216℃分解。旋光度$[\alpha]_D^{25}-135°$。紫外吸收：在1/15M的磷酸盐缓冲液中，于220nm处有一肩，272nm处有吸收峰，在0.1N NaOH溶液中，于244nm处有最大吸收。283nm处有吸收峰。IR：3450、3250、3200、2700-2500、1725、1655、1605、1590、1510、1395、1260、1240、1210、1175、1045、930、840、720cm^{-1}。

薄层层析：(纤维素板)

溶剂系统	Rf值
水饱和正丁醇	0.02
70%丙醇	0.21
丁醇-醋酸-水(4:1:2)	0.34

【生物学特性】具有中等程度抗菌活性，广谱，对革兰氏阴性菌包括变形杆菌、绿脓杆菌有抑制作用。毒性低，实验动物各种给药途径的LD50＞2g/kg。

磺酰胺菌素(Sulfazecin)和异磺酰胺菌素(Isosulfazecin)



最早发现由细菌产生的单环β-内酰抗生素是两个差向异构Sulfazecin和Isosulfazecin[3]。

【产生菌】磺酰胺菌素的产生菌是嗜酸假单孢菌(P. acidophila) G-6302菌株；异磺酰胺菌素的产生菌是中嗜酸假单孢菌(P. mesoacidophila)。SB-72310菌株，两菌均好氧，过氧化氢酶阴性，氧化酶阳性，积累多聚β-羟基丁酸。在碱性pH下产生菌生长很差，如G-6302在pH＞8.3时不能生长；SB-72310则在pH＞8.9不能生长。

【发　酵】将3%甘氨酸、0.1%谷氨酸，0.1%$Na_2S_2O_3$，0.5%胨，内浸膏和NaCl配制成培养基，取1200升到2000升发酵罐中，20℃搅拌，通气发酵3天。

【分　离】发酵液过滤，酸化，上活性炭柱，7%异丁醇洗脱，活性部分通过Dowex-1(Cl^-)树脂柱，0.1%NaCl溶液洗脱，脱盐，冻干获粗粉，以Sephadex DEAE A-25

树脂柱层析等提纯，再甲醇—水溶液结晶得精品。

【理化性质】 异磺酰胺菌素与磺酰胺菌素是差向异构体，除旋光度[前者$[\alpha]_D^{25}+4.5°$(C=1.01，H_2O)，后者$[\alpha]_D^{25}+82°$(C=1.0，H_2O)]不同外，理化性质均相同。二者均为白色针状物；紫外为末端吸收；IR(max cm^{-1})：1780、1660、1538、1265、1245、1220、1038、625；易溶于水，溶于二甲基亚砜，微溶于甲醇[4]。

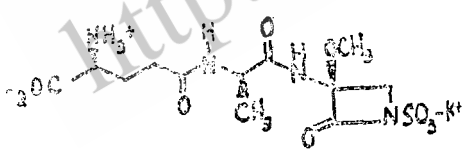
薄层层析

	溶剂系统	Rf
纤维素	正丙醇-H_2O (4:1)	0.17
	正丙醇-乙腈-水 (1:1:1)	0.77
	正丙醇-乙醇-水 (5:2:3)	0.48
	正丁醇-乙酸-水 (2:1:1)	0.72
DEAE纤维素	0.05M pB (pH6.8)	0.72

【生物学特性】 磺酰胺菌素为广谱抗生素，其中抗革兰氏阳性菌较弱。异磺酰胺菌素抗G^+、G^-活性均弱。前者抗小鼠E. Coli感染的ED_{50}为6.95mg/kg。实验证明，两者毒性很低。

SQ 26445[5]

目前最常见的细菌来源的单环β-内酰胺抗生素是SQ 26445。结构式为：



【产生菌】 葡糖杆菌(Gluconobacter)或醋杆菌(Acetobacter)，系革兰氏阴性杆菌，培养特征为细胞色素氧化酶阴性，聚积多聚β-羟基丁酸，过氧化氢酶和柠檬酸盐及苏利糖水解阳性；在葡萄糖麦芽汁琼脂中PH为4.5生长良好；在葡萄糖酵母浸膏碳酸钙琼脂上菌落周围透明，视为酸性产物。

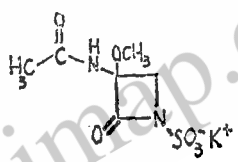
【发酵】 用380l发酵罐，加入250l培养基(0.5%酵母浸膏，1.0%葡萄糖，蒸馏水)于25℃搅拌，充分通气发酵18—24小时。

【分离】 发酵液用离子交换、活性炭，反相层析等联合进行提纯[6]。

【生物特性】 与磺酰胺菌素基本相同，抗革兰氏阴性菌活性强，抗革兰氏阳性菌活性较弱，见附表。

SQ 26180[6-7]

这是结构最简单的单环β-内酰胺抗生素(如下图)，已有人用它作为中间体来合成其它较复杂的抗生素。



【产生菌】 紫色杆菌(Chromobacterium Violoceum)是需氧G-杆菌，有鞭毛，能运动。肉汁琼脂上菌落产生紫色色素，加上色氨酸或酵母浸膏均使色素产物增加，嗜温，在15—37℃菌落生长良好，4℃以下37℃以上则不生长。强烈水解酪蛋白，七叶苷水解阴性。利用葡萄糖、果糖和乳糖，不利用L-阿拉伯糖。

【发酵】 在含有250升培养基的380升发酵罐中，25℃下搅拌，通气，发酵18—24小时。培养基组成：0.25%酵母浸膏，3.0%葡萄糖，1.0%N-Z胺A、自来水。

【分离】 发酵液通过离子对提取，浓缩，再经分配层析、离子交换层析、体积排斥层析和反相层析等将SQ 26180提纯。操作步骤如下：

发酵液(经过滤)

1. 离子配对提取(Ion-Pair extraction)滤液用含季铵盐的二氯甲烷提取，再用含碘化钠的水反抽提。
2. Sephadex G-10 层析(甲醇-H_2O 1:1)。
3. Watman DE52离子交换层析(pH5, PBS洗脱)。
4. Sephadex LH-20层析(H_2O洗脱)。
5. Diaion HP20 AG层析(H_2O洗脱)。
6. 用Dowex 50(K^+)转化成K^+盐。

↓

SQ26180 结晶(钾盐)。

【理化性质】 呈酸性，其熔点为194℃，$[\alpha]_D^{21}+94°$(C1, H_2O)；IR (KBr)：1766, 1673, 1522, 1265, 1051, 636cm^{-1}[7]。

【生物学特性】 抗菌谱很广，抗菌作用较弱，但对革兰氏阴性菌特别是绿脓杆菌有较强抗菌活性，其最低抑菌浓度(MIC)见附表。对β-内酰胺酶较稳定。如对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、或 TEM-2 的β-内酰胺酶结合不是进行型的。透析可使酶——抑制剂复合物可逆转变，即 26180 是此酶的可逆竞争抑制剂[7]。

EM 5400 (SQ26700, SQ26823、SQ26875、SQ26970、SQ26812)

这是一组由放射土壤杆菌(Agrobacterium radiobacter)产生的单环β-内酰胺抗生素。结构如图2[8]。

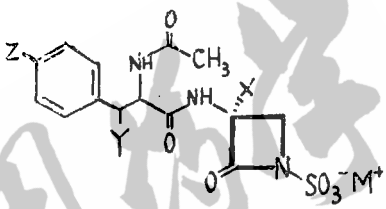


图 2

	X	Y	Z	M
SQ26823	OCH_3	H	H	Na
SQ26875	OCH_3	H	OH	K
SQ26700	H	H	OH	K
SQ26970	OCH_3	OH	$OSO_3^-Na^+$	Na
SQ26812	OCH_3	$OSO_3^-Na^+$	$OSO_3^-Na^+$	Na

EM5400的理化性质归纳如表[9]

元素分析 (%)	SQ 26700		SQ 26823		SQ 26875		SQ 26970		SQ 26812	
	实验值	计算值	实验值	计算值	实验值	计算值	实验值	计算值	实验值	计算值
C	40.89	41.07	43.85	44.22	32.99	41.00	32.17	33.28	28.63	28.00
H	4.08	3.94	4.62	4.46	3.61	4.13	3.43	3.16	2.90	2.51
N	10.21	10.64	10.08	10.31	7.53	9.56	8.05	7.76	6.88	6.53
S	7.81	7.83	7.82	7.87	7.10	7.29	11.88	11.84	14.97	14.95
Na	—	—	5.8	5.64	—	—	9.29	8.49	10.6	10.72
K	9.36	9.55	—	—	16.69	8.90	—	—	—	—
$[\alpha]_D^{21}$ (H_2O)	-15.9° (C, 1)		+12.3° (C, 1)		+12.1° (C, 0.77)		+5.5° (C, 1)		-17.8° (C, 1)	
UV(nm) H_2O E%	223, 276		251, 258 264, 267		222, 275		260, 266 273		260	
IR (cm^{-1}) [KBr]	3350, 1761 1654, 1515 1238, 1045 639		3334, 1764 1654, 1519 1243, 1044 634		3320, 1771 1655, 1515 1245, 1047 631		3380, 1765 1645, 1515 1240, 1048 866, 629		3470, 1756 1647, 1501 1228, 1040 837, 616 578	
TLC硅胶*	Rf = 0.35		Rf = 0.41		Rf = 0.50		Rf = 0.25		Rf = 0.17	

http://www.chinmap.com

【产生菌】 好氧革兰氏阴性杆菌，以周生鞭化运动，最适生长温度25—30℃，细胞色素氧化酶试验阳性。由乳糖产生酮乳糖，在含有刚果红的甘露醇酵母浸膏琼脂上生长，吸收染料，无萤光。

【发　酵】 用1.0%葡萄糖，0.5%酵母浸膏配制的250l培养基溶液，在380升的发酵罐中于25℃搅拌，通气发酵40～45小时。

【分　离】 发酵液酸化，离心去菌体，上清液用二氯甲烷（含有0.05M二甲基十六烷基苄基氯化铵）提取，提取液浓缩，以NaSCN水溶液及提取，减压浓缩，Sephadex G-10层析，分离粗成分（即SQ26182先洗脱出来，后为SQ26970，最后为SQ26832，SQ26875、SQ26700的混合物），再通过离子交换，及Diaion HP-20层析进一步提纯，分别得到SQ26823、SQ26875、SQ26700纯品[9]。表中TLC硅胶*——正丁醇：水：醋酸(3:1:1)，37℃。

【生物学特性】 这组抗生素具有广谱抗菌活性（见附表）。其抗菌作用弱，主要抗革兰氏阳性菌。试验了本组抗生素与各种β-内酰胺酶的相互关系。一般来说，β-内酰胺酶不水解含有甲氧基化的单环β-内酰胺抗生素。例外的是，抗生素SQ26823由于在苯丙氨酰侧链上无极性基团，且不具有β-内酰胺酶所能识别的底物特性，而对这类酶很不稳定。抗生素SQ26700也是如此。

SQ28332

【产生菌】 Flexibacter sp. SC 12，681，为G^-细长棒状杆菌，运动形式是滑动。细胞内含有一种橙黄色色素，溶于已烷和乙醇（$SbCl_2$试验推测为类胡萝卜素），产生菌是氧化。过氧化氢酶阳性，H_2S阳性；几丁质酶和纤维素酶阴性；麦里（Marine）琼脂上不生长。

【发　酵】 先将琼脂斜面培养的表层菌落挑一接种环转移到500毫升的锥形瓶中，每瓶装灭菌的培养液100毫升，成分：酵母膏0.5%，蒸馏水配制。于摇床上以300rpm转速，25℃，培养24hr；然后将1.0%(V/V)的培养液接种到一个75升的发酵罐中，加入50升上述相同酵母浸膏培养基，在25℃，以200rpm的搅拌速度和50l/min的空气流发酵24hr。

【分　离】

发酵滤液

1. 离子配对提取（用0.05M二甲基十六烷基苄基氯化铵的二氯甲烷液提取）。
2. 反抽提（以1M的NaSCN水溶液反抽提）
3. Darco活性炭脱盐，用吡啶：水(1:1)洗脱。
4. 纤维素粉层析CH_3CN:H_2O(4:1～1:1)梯度洗脱。
5. MCl凝胶CHP20P层析，H_2O-甲醇梯度洗脱。
6. Biokad AG 1-X_2(OAc^-)层析，0.2—2.0M吡啶一醋酸梯度洗脱。
7. 纤维素粉层析，CH_3CN-H_2O梯度洗脱(9:1～1:1)

↓

SQ28332

【理化性质】 水溶性，强酸性；硅胶层析Rf值为0.3（展开剂为乙酸乙酯：正丁醇：醋酸：水（1:1:1:1），颜色反应：在Rydon-Smith和Na-Periodat-$AgNO_3$阳性；茚三酮呈阴性；旋光度$[\alpha]_D^{25}$ - 9.5°(C0.21，H_2O)；分子量548，结构如图3；UV仅有末端吸收；IR(KBr)：有1760，1715，1650，1250。1030cm^{-1}。

【生物学活性】 具有较弱的抗菌活性，被KIβ-内酰胺酶轻度水解，对P-99，TEM-2 β-内酰胺酶稳定。其MIC见附表。

SQ28502，SQ28503

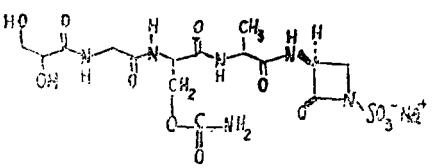


图 3

【产生菌】 两个抗生素均由 Flexibacter sp产生，该菌特点前已叙述。另外，它能以葡萄糖，阿拉伯糖和半乳糖为唯一碳源，不利用甘油，木糖、果糖和乳糖。七叶苷(Aesculin)和酪朊水解阳性；尿激酶阴性。

【发　酵】 与抗生素SQ28332同，不同的是培养基成分为2.0%燕麦粉，2.0%蕃茄浆，蒸馏水，pH7，发酵22—24小时。

【分离纯化】

发酵滤沪(pH 3)

1. Dowex 50 WX_2 (H^+)吸附，2M氯化钠:异丙醇:醋酸(700:300:1)洗脱。
2. EtoAc 提取。
3. CHP20P (75—150μ) 层析，pH 3 的 H_2O-CH_3CN 梯度洗脱。
4. SP-Sephadex G-25 (Na^+) 层析，pH 3 的 0—0.5M NaCl 梯度洗脱。
5. CHP20P (70—150μ) 层析，pH 3，0—30% CH_3OH-CH_3CN (1:2)梯度洗脱。
6. Sephadex G-25 层析，1% AcOH 洗脱。
7. CHP20P (37—75μ)层析，0—20% CH_3OH-CH_3CN (4:1) 的 0.05M 磷酸钠溶液(pH 2.3)梯度洗脱。

↓脱盐　　↓脱盐

↓SQ28502　　↓SQ28503

【鉴别特性】 SQ28502 和 SQ28503 在 OPTI-OPC_{12} (Fluka) 反相层析板上，通过 CH_3CN:CH_3OH:1% AcOH (5:1:14) 展开，分别得到各自的 Rf 值，0.65 和 0.55；它们与 Rydon，Folin，茚三酮和菲醌试剂反应呈阳性；被酸水解。电泳迁移率如表所示，说明 SQ28502 和 SQ28503 不具强酸特性。质谱：SQ28502 发色团峰值在 m/Z1463 $(M+H)^+$ 和 m/Z1485 $(M+Na)^+$；SQ28503则为m/Z1447 $(M+H)^+$ 和 m/Z1469 $(M+Na)^+$。SQ28502 和 SQ28503 分子量分别为 1462 和1446。

说明：在 Whatman Grade 2 纸上，12 V/m，1hr；迁移率相对于 $V_{B_{12}}$ (0.00) 和硝基苯磺酸盐(1.00)。

SQ28502和SQ28503在不同溶液中的迁移率

电　解　液	pH	迁移率	
		SQ_{28502}	SQ28503
HCOOH:CH_3COOH:H_2O (1:3:36)	2.0	−0.30	−0.20
0.05M NaH_2PO_4	4.5	−0.15	−0.10
0.05M Na_3PO_4	7.0	0.00	0.00
0.05M Na_2CO_3-$NaHCO_3$	9.2	+0.15	+0.15

【生物学活性】 SQ28502 和 SQ28503 具有弱的抗菌活性。最低抑菌浓度(MIC)见附表中。对β-内酰胺酶比较稳定，是 P-99 β-内酰胺酶的不可逆抑制剂；对KI和TEM-2的广谱β-内酰胺酶无明显亲和力。

结束语

以上所列举的都是天然来源的单环β-内酰胺抗生素，它们共同的性质是对β-内酰胺酶稳定，抗绿脓杆菌感染，抗革兰氏阳性菌一般较弱等。这些性质使它们象青霉素和头孢菌素那样引起了人们的注意，但由于从微生物来源有很大限制，人们开始对它们进行人工合成。美国施贵宝公司已合成了许多具代表性的有：SQ26776，SQ26524，SQ26522，SQ26560，SQ81393，SQ81387 和 SQ26559

等[1]，其中最突出的是SQ26776（1982年由Sykes等人工合成），该抗生素具有特定的抗需氧革兰氏阴性菌活性，包括抗绿脓杆菌；对β-内酰胺酶非常稳定。另外，抗菌活性相当于或高于第三代头孢菌素，并与革兰氏阴性菌特有的结合蛋白作用。目前，这个抗生素研究得最详细，如构效关系[13]，体外抗菌活性[14]，交叉反应[16]，与其它单环β-内酰胺抗生素的关系[16]，药代动力学[17,18,19]，免疫学[20]等，而且目前已投入市场。

附表：天然来源的单环β-内酰胺类抗生素的抗菌活性

试验菌	MIC (μg/ml) 琼脂稀释法									
	Nacardicin[2]	SQ 26180[11]	SQ 26445[5]	SQ 26823	SQ 26875	SQ 26700	SQ 26970	SQ 26812	SQ 28332	SQ 28502	SQ 28503
金黄色葡萄球菌1276	>800	50	>100	12.5	25	25	>100	>100	12.5	>100	50
无乳链球菌9237	200	12.5	50	25	50	12.5	>100	>100	6.3	25	6.3
大肠杆菌8294	100	100	50	>50	>100	>100	>100	>100	>50	100	25
大肠杆菌10857	—	>100	100	>50	100	>100	>100	>100	50	25	6.3
普通变形杆菌9416	3.13	>100	25	>50	>100	>100	>100	>100	>50	>100	>100
粘质沙雷氏杆菌9783	—	25	25	>50	>100	>100	>100	>100	>50	>100	>100
绿脓杆菌9545	400	3.1	50	>50	50	>100	>100	>100	>50	>100	>100

参考文献

[1] Koster, W. H. et al: Chemistry and Biology of β-lactam antibiotics Vol. 3. 339, 1982

[2] Aoki, H. et al: J. Antibiotics 29(5): 492—500, 1976

[3] Asai, M. et al: J. Antibiotics 34(6): 621, 1981

[4] Imada, A. et al: Nature 289: 590—591, 1981

[5] Sykes, R. B. et al: Nature 291: 489—491, 1981

[6] Wells, J. S. et al: J. Antibiotics 35(2): 184—188, 1982

[7] Parker, W. L. et al: J. Antibiotics 35(2): 189—195, 1982

[8] Wells, J. S. et al: J. Antibiotics 35(3): 295—299, 1982

[9] Wells, J. S. et al: J. Antibiotics 35(3): 300—305, 1982

[10] Singh, P.D. et al: J. Antiboictis 36(10): 1245—1247, 1983

[11] Cooper, R. et al: J. Antibiotics 36(10): 1252—1257, 1983

[12] Sykes, R. B. et al: Antimicrob. Ag. Chemother, 21(1), 1982

[13] Breuer, H. et al: J. Antibiotics 8 Supple 21—28, 1981

[14] Aakinson, N. F. et al: Antimicrob. Ag. Chemother, 25(2), 212, 1984

[15] Andrew, S. et al: J. Infect. Dis. 149(1): 16—22, 1984

[16] Sykes, R. B. et al: Antimicrob. Ag. Chemother. 22, 414, 1982

[17] Swabb, E. A. et al: Antimicrob. Ag. Chemother. 24: 394—400, 1983

[18] Swabb, E. A. et al: Antimicrob. Ag. Chemother. 21(6): 944, 1982

[19] Swabb, E. A. et al: Antimicrob. Ag. Chemother. 23(1): 125, 1983

[20] Stutman, H. R. et al: Antimicrob. Ag. Chemother. 25(1): 93—97, 1984