

ЛИТЕРАТУРА

1. К а ш к и н П. Н. В кн.: Сборник научных трудов Ленинградск. научно-исслед. ин-та антибиотиков. Л., 1958, т. 1, с. 7. — 2. С о к о л о в Л. Б., А л е к с е е в а Л. Е. В кн.: Материалы 4-й конференции молодых ученых Ленинградск. научно-исслед. ин-та антибиотиков. Л., 1968, с. 47. — 3. С о к о л о в Л. Б., А л е к с е е в а Л. Е., К у л ь б а х В. О. В кн.: Материалы 7-го Международного симпозиума по химии природных соединений. Рига, 1970, с. 670. — 4. Б е л л а м и Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. М., 1963. — 5. В а й с б е р г е р А. (Ред.). Методы органической химии. М., 1967, т. 2. — 6. Р а о Ч. Н. Р. Электронные спектры в химии. М., 1964. — 7. Q u i l l i c c o A., C a r d a n i C., Gazz. chim. ital., 1953, v. 83, с. 1088.

Поступила 9/XI 1970 г.

STUDIES ON CHEMICAL STRUCTURE OF ASPERGIN, A METABOLITE OF ASPERGILLUS SP.

L. B. Sokolov, L. E. Alekseeva, V. O. Kulbakh, N. A. Kuznetsova, V. S. Nyn

Leningrad Institute for Antibiotics

Aspergin was isolated in pure form from an unidentified strain of Asp. sp. The antibiotic had antibacterial activity. On the basis of the physico-chemical properties, as well as ultraviolet, infrared, nuclear-magnetic resonance and mass-spectra of aspergin and the products of its chemical transformation, the structure of 2-isopentenyl-5-heptenyl-6-gentizinic aldehyde was proposed for the antibiotic.

УДК 615.33:582.824 (Hyperforinum)

АНТИБИОТИК ГИПЕРФОРИН ИЗ HYPERICUM PERFORATUM L.

А. И. Гуревич, В. Н. Добрынин, М. Н. Колосов, С. А. Поправко,
И. Д. Рябова, Б. К. Чернов, Н. А. Дербенцева, Б. Е. Айзенман,
А. Д. Гарагуля

Институт химии природных соединений АН СССР, Москва и Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Ацетоновый экстракт зверобоя обыкновенного, *Hypericum perforatum* L., применяется в медицине в качестве антибактериального препарата новоиманина [1, 2]. Изучая состав этого препарата, мы нашли, что он представляет собой сложную смесь веществ, главным активным компонентом которой является антибиотик, названный нами гиперфорин. Содержание гиперфорина в этой смеси колеблется от 10 до 20% и, по-видимому, зависит от места произрастания и времени сбора травы. При этом из свежесобранной травы ацетоном извлекается менее сложная смесь веществ.

Гиперфорин выделяли путем хроматографии на силикагеле марки «водная кремневая кислота» (активность III) с градиентным элюированием смесью бензол — петролейный эфир (от 1 : 5 до 1 : 2) в присутствии 0,06% ионола в качестве антиоксиданта. В отсутствие антиоксиданта гиперфорин под действием света и кислорода воздуха превращается в сложную смесь веществ, обладающих значительно меньшей антимикробной активностью.

Дальнейшую очистку антибиотика производили путем превращения его в кристаллический 3,5-динитробензоат действием 3,5-динитробензоилхлорида в пиридине. Выход 65—70%, т. пл. 121,5—123° (из спирта), $[\alpha]_D^{20} + 78^\circ$ (с 1 в спирту), $\lambda_{\text{макс}}^{\text{EtOH}}$ 230 нм (ϵ 27 000), $\nu_{\text{макс}}^{\text{CCl}_2\text{-CCl}_2}$ 1745, 1720, 1710, 1660, 1645—1628 cm^{-1} . Найдено: С — 69,2%, Н — 7,5%, N — 3,9%; М. в. 730 (здесь и далее молекулярный вес определен масс-спектрометрически). $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_9$. Вычислено: С — 69,0%, Н — 7,1%, N 3,8%; М. в. 730.

Гидролизом 3,5-динитробензоата 0,1 н. раствором КОН в 90% спирте получен с высоким выходом чистый гиперфорин, обладающий антибактериальной активностью (см. таблицу).

Гиперфорин кристаллизуется из гексана в виде тонких игл, т. пл. 79—80°, $[\alpha]_D^{18} + 41^\circ$ (с 5 в спирту). Найдено: С — 78,0%, Н — 9,8%;

М. в. 536. $C_{35}H_{52}O_4$. Вычислено: С — 78,3%, Н — 9,8%. М. в. 536. Его УФ спектр зависит от концентрации и величины рН раствора. Так, в спиртовом $6 \cdot 10^{-4}$ М растворе $\lambda_{\text{макс}} 278 \text{ нм}$ ($\epsilon 8200$); в спиртовом $6 \cdot 10^{-5}$ М растворе $\lambda_{\text{макс}} 298 \text{ нм}$ ($\epsilon 11 000$); в 0,05 н. спиртовом растворе НСl $\lambda_{\text{макс}} 278 \text{ нм}$ ($\epsilon 8400$); в 0,05 н. спиртовом растворе КОН $\lambda_{\text{макс}} 298 \text{ нм}$ ($\epsilon 12 000$).

Антимикробная активность гиперфорина

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация (в мкг/мл)	Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация (в мкг/мл)
Staphylococcus aureus 209P	0,1	Streptococcus faecalis	1
Sarcina lutea	0,1	Escherichia coli	400
Bacillus subtilis	0,2	Bacterium pyocyaneum	400
Bac. mesentericus	2	Proteus vulgaris	400
Bac. mycoides	0,2	Penicillium chrysogenum	400
Mycobacterium B ₅	1	Fusarium avenaceum	400
Mycobacterium phlei	20	Mucor plumbeum	400
Corynebacterium michiganese	1	Candida albicans	400
Caryophanon latum	1		

В ИК спектре гиперфорина (рис. 1) имеются полосы поглощения групп О—Н, С=О и С=C ($\nu_{\text{макс}} 3340, 1730, 1650, 1620, 1610 \text{ см}^{-1}$). Его ЯМР спектр (рис. 2) свидетельствует о наличии 4 олефиновых протонов ($\delta 5$ м. д.), 11 метильных групп, из которых 8 находятся при двойных связях ($\delta 1,57—1,78$ м. д.) и 3 связаны с насыщенными С-атомами ($\delta 0,96—1,14$ м. д.), и одного енольного гидроксила ($\delta 6,97$ м. д.).

Гиперфорин обладает слабыми кислотными свойствами, $pK_a 4,8$ (в 50% водном спирте) и при метилировании диазометаном дает монометильный

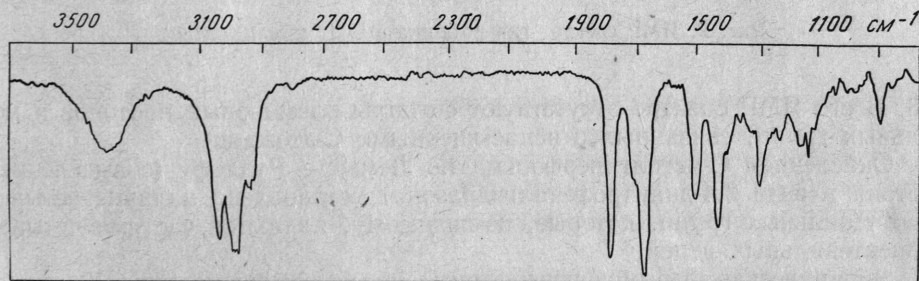


Рис. 1. ИК спектр 6% раствора гиперфорина в $Cl_2C=CCl_2$.

эфир, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{EtOH}} 269 \text{ нм}$ ($\epsilon 4000$). Найдено: М. в. 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Вычислено: М. в. 550. При взаимодействии с йодистым метилом в диметилсульфоксиде в присутствии NaN гиперфорин образует С-метильное производное, т. пл. $62—64^\circ$ (из спирта), $\lambda_{\text{макс}}^{\text{гексан}} 294, 303 \text{ нм}$ ($\epsilon 142, 138$). Найдено: С — 78,4%, Н — 9,8%, О — 11,6%. М. в. 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Вычислено: С — 78,5%, Н — 9,9%, О — 11,6%. М. в. 550. Ацетилирование гиперфорина уксусным ангидридом в пиридине приводит к моноацетату, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{EtOH}} 250 \text{ нм}$ ($\epsilon 10 000$). Найдено: М. в. 578. $C_{37}H_{54}O_5$. Вычислено: М. в. 578.

Характерные изменения УФ спектра гиперфорина в зависимости от рН и концентрации, гипсохромный сдвиг УФ поглощения при ацетилировании и образование О- и С-метильных производных свидетельствуют о наличии в молекуле антибиотика енолизованной 1,3-дикетонной группировки.

Восстановление гиперфорина избытком $LiAlH_4$ в эфире приводит к образованию тетрагидропроизводного, т. пл. $151—152^\circ$ (из смеси гексан —

этилацетат); в 0,05 н. спиртовом растворе HCl— $\lambda_{\text{макс}}$ 277 нм (ϵ 13 000); в 0,05 н. спиртовом растворе KOH— $\lambda_{\text{макс}}$ 303 нм (ϵ 21 000), $\nu_{\text{макс}}$ 3510, 3300—3200, 1720, 1590 см^{-1} . Найдено: М. в. 540. $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_4$. Вычислено: М. в. 540.

Тетрагидрогиперфорин содержит 3 активных атома водорода, обменивающихся с D_2O на дейтерий, а его УФ спектр свидетельствует об отсутствии изменений в хромофоре. Следовательно, это вещество является диокси-1,3-дикетоном, а в исходном антибиотике все 4 атома кислорода входят в состав карбонильных групп.

При гидрировании над Pd- или Pt-катализаторами гиперфорин поглощает 4 моля H_2 с образованием октагидропроизводного, также сохраняющего хромофорную группировку гиперфорина: в 0,05 н. спиртовом растворе HCl— $\lambda_{\text{макс}}$ 275 нм (ϵ 8000); в 0,05 н. спиртовом растворе KOH— $\lambda_{\text{макс}}$ 292—305 нм (ϵ 11 600). Найдено: М. в. 544. $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_4$. Вычислено: М. в. 544.

Октагидрогиперфорин легко образует 3,5-динитробензоат, т. пл. 120—121° (из спирта). Найдено: М. в. 738. $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_9\text{N}_2$. Вычислено: М. в.

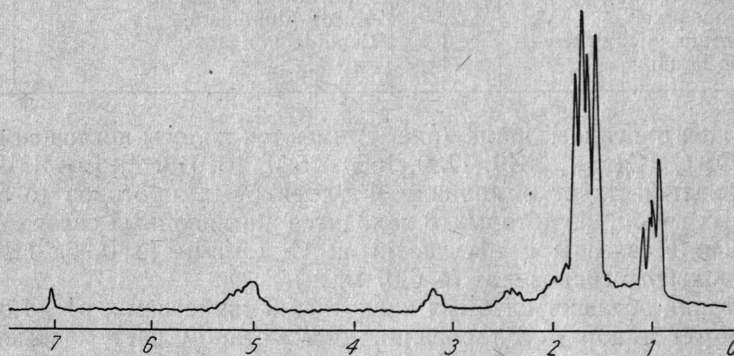


Рис. 2. ЯМР спектр гиперфорина в CCl_4 при 100 Мгц.

738. В его ЯМР спектре отсутствуют сигналы олефиновых протонов и метильных групп, связанных с ненасыщенными С-атомами.

Окислением С-метилгиперфорина по Лемье—Рудлофу (с выделением ацетона в виде 2,4-динитрофенилгидразона) установлено наличие четырех изобутенильных групп, которые, по-видимому, являются частями четырех изопентенильных цепей.

Эмпирическая формула гиперфорина указывает на наличие 10 инкрементов двойных связей или циклов. Поскольку 8 из них обусловлены двойными связями $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$, гиперфорин должен обладать бициклической структурой.

В ы в о д ы

1. Из *Nuregicum perforatum* L. выделен новый антибиотик — гиперфорин, определяющий антибактериальную активность препарата новоиманина.

2. Установлено, что гиперфорин представляет собой бициклический тетракетон $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_4$, содержащий 4 изопреноидные цепи.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дербенцева Н. А., Рабинович А. С., Зелепуха С. И. Доповіді АН Українськ. РСР, 1963, № 9, с. 1248.— 2. Новоиманин и его лечебные свойства. Киев, 1968.

Поступила 30/IX 1970 г.

HYPERFORIN, AN ANTIBIOTIC FROM HYPERICUM PERFORATUM L

A. I. Gurevich, V. N. Dobrynin, M. N. Kolosov, S. A. Popravko, I. D. Ryabova,
B. K. Chernov, N. A. Derbentseva, B. E. Aizenman, A. D. Garagulya

Institute for Chemistry of Natural Substances of the USSR Academy of Sciences, Moscow
and Institute for Microbiology and Virusology of the Ukrainian SSR Academy of Sciences

Hyperforin, a new antibiotic was isolated from *Hypericum perforatum* L. The antibiotic is the component of novoimanine, responsible for its activity. It was found that hyperforin was a bicyclic tetraketone $C_{35}H_{52}O_4$, containing 4 isoprenoid chains.

УДК 615.334.07

ВЛИЯНИЕ ПРИСУТСТВИЯ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА В ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕНИЦИЛЛИНАХ НА РЕЗУЛЬТАТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Е. Н. Дружинина, А. Е. Тебякина, Д. В. Суворкина

Лаборатория микробиологических методов исследования (зав.— проф. А. Е. Тебякина)
Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Москва

Источником бензилпенициллина в препаратах полусинтетических пенициллинов является недостаточно очищенная 6-АПК. При определении биологической активности метициллина методом диффузии в агар с тест-микробом Staph. aureus 209P было обнаружено, что препарат метициллина, содержащий бензилпенициллин в количестве 0,1—0,3%, может увеличивать биологическую активность метициллина на 10—25%. Увеличение биологической активности оксациллина более чем на 10% можно наблюдать при содержании бензилпенициллина в количестве 10—15 мкг в 1 мг препарата. Увеличение активности ампициллина не наблюдалось даже при содержании бензилпенициллина в количестве 1,2 вес.% в 1 мг препарата.

Таблиц 3. Библиография: 4 названия.

Как известно, для синтеза полусинтетических пенициллинов необходима 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК — ядро молекулы пенициллина), которая практически не обладает биологической активностью [1,2]. Однако выпускаемая в промышленном масштабе 6-АПК может содержать биологически активные вещества, которые определяются по стандартному препарату бензилпенициллина.

Наличие биологически активных веществ в некоторых партиях 6-АПК может быть обусловлено недостаточной степенью ее очистки от бензилпенициллина после ферментативного гидролиза последнего ацилазой.

Изучение содержания биологически активных веществ в 6-АПК было предпринято на основании того, что некоторые экспериментальные партии метициллина, полученные из различных партий 6-АПК, имели биологическую активность, на 12—20% превышающую теоретически возможную. Биологическая активность одной партии составила 1027 ед/мг, или 113,6% теоретически возможной величины для моногидрата натриевой соли метициллина (905 ед/мг), вторая партия — 1086 ед/мг, или 120%, и третья — 1004 ед/мг, или 111,8%.

Высокая биологическая активность метициллина при определении с тест-микробом Staph. aureus 209P может быть обусловлена присутствием в препарате другого пенициллина, к которому Staph. aureus 209P более чувствителен. Staph. aureus 209P примерно в 40 раз чувствительнее к бензилпенициллину, чем к метициллину, при определении методом серийных разведений в бульоне. Примерно то же соотношение сохраняется и при использовании метода диффузии в агар [3]. Следовательно, незначительные

ANTIBIOTIC HYPERFORIN FROM *Hypericum perforatum* L.

A. I. Gurevich, V. N. Dobrynin, M. N. Kolosov, S. A. Popavka, I. D. Ryabova, B. K. Chernov, N. A. Derbvntsvva, B. B. Aizenman, A. D. Garagulya

Institute of Chemistry of Natural Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow and
Institute of Microbiology and Virology Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

(Translation by Google Translate.)

Acetone extract of St. John's wort, *Hypericum perforatum* L., is used in medicine as an antibacterial drug "novoimanin" [1, 2]. Studying the composition of this drug, we found that it is a complex mixture of substances, the main active component of which is an antibiotic called hyperforin. The content of hyperforin in this mixture ranges from 10 to 20% and, apparently, depends on the place of growth and time of collection of grass. At the same time, a less complex mixture of substances is extracted from the freshly picked grass with acetone.

Hyperforin was isolated by chromatography on silica gel of the brand "aqueous cremic acid" (activity 111) with gradient elution a mixture of benzene - petroleum ether (from 1:5 to 1:2) in the presence of 0.06% ionol as an antioxidant. In the absence of an antioxidant, hyperforin under the influence of light and oxygen or air turns into a complex mixture of substances with significantly less antimicrobial activity.

Further purification of the antibiotic was carried out by conversion into crystalline 3,5-dinitrobenzoate by the action of 3,5-dinitrobenzoyl chloride in pyridine. Yield 65-70%, mp. 121.5–123° (from alcohol), $[\alpha]_D +78^\circ$ (c 1 in alcohol), $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 230 nm (ϵ 27,000), $\nu_{\max}^{\text{CCl}_2\text{CCl}_2}$ 1745, 1720, 1710, 1660, 1645–1628 cm^{-1} . Found: C — 69.2%, H — 7.5%, N — 3.9%; MW 730 (hereinafter, the molecular weight is determined by mass spectrometry), $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_9$. Calculated: C—69.0%, H—7.1%, N— 3.8%; MW 730.

By hydrolysis of 3,5-dinitrobenzoate 0.1 N KOH solution in 90% alcohol, pure hyperforin with antibacterial activity was obtained in high yield (see table).

Hyperforin crystallizes from hexane in the form of thin needles, m.p. 79–80°, $[\alpha]_D +410$ (c 5 in alcohol), Found: C — 78.3%, H — 9.8%. MW 536. Its UV spectrum depends on the concentration and pH of the solution. So, in alcohol $6 \cdot 10^{-4}$ M solution λ_{\max} 278 nm (ϵ 8200); in alcohol $6 \cdot 10^{-5}$ M solution λ_{\max} 298 nm (ϵ 11,000); at 0.05 N alcohol solution of HCl, λ_{\max} 278 nm (ϵ 8400); in 0.05 N KOH alcohol solution λ_{\max} 298 nm (ϵ 12,000).

Antimicrobial activity of hyperforin (table)

In the IR spectrum of hyperforin (Fig. 1) there are absorption bands of groups O—H, C=O and C=C (ν_{\max} 3340, 1730, 1650, 1620, 16100 cm^{-1}). Its NMR spectrum (Fig. 2) indicates the

presence of 4 olefin protons (δ 5 ppm), 11 methyl groups, of which 8 are double bonds (δ 1.57–1.78 ppm) and 3 are associated with saturated C atoms (δ 0.96–1.14 ppm), and one enol hydroxyl (δ 6.97 ppm).

Hyperforin has weak acidic properties, pK_a 4.8 (in 50% aqueous alcohol) and when methylated with diazomethane gives monomethyl ether, λ_{max} 269 nm (ϵ 4000). Found: MW 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Calculated, MW 550. In the reaction with methyl iodide in dimethyl sulfoxide in the presence of NaH, hyperforin forms a C-methyl derivative, mp 62–64° (from alcohol), λ_{max} , 294, 303 nm (ϵ 142, 138). Found: C — 78.4%, H — 9.8%, O — 11.6%. MW 550. $C_{36}H_{54}O_4$. Calculated: C — 78.5%, H — 9.9%, O — 11.6%. MW 550.

Acetylation of hyperforin with acetic anhydride in pyridine leads to monoacetate, λ_{max} 250 nm (ϵ 10,000). Found: MW 578. $C_{37}H_{54}O_5$. Calculated: MW 578. Characteristic changes in the UV spectrum of hyperforin depending on pH and concentration, hypsochromic shift of UV absorption during acetylation the formation of O- and C-methyl derivatives indicate the presence in the antibiotic molecule of the enolized 1,3-diketone group.

The recovery of hyperforin in excess of $LiAlH_4$ in ether leads to the formation of a tetrahydro derivative, mp 151–152° (from a mixture of hexane - ethyl acetate); in 0.05 N alcohol solution of HCl — λ_{max} 277 nm (ϵ 13 000); in 0.05 N KOH alcohol solution, λ_{max} 303 nm (ϵ 21 000), ν_{max} 3510, 3300–3200, 1720, 1590 cm^{-1} . Found: MW 540. $C_{25}H_{56}O_4$. Calculated: MW 540.

Tetrahydroperforin contains 3 active atoms of Hydrogen exchanged with D_2O for deuterium, and its UV spectrum indicates the absence of changes in chromophore. Therefore, this substance is dioxo-1,3-diketone, and in the initial antibiotic all 4 oxygen atoms are part of carbonyl groups.

When hydrogenated over Pd or Pt catalysts, hyperforin absorbs 4 moles of H_2 with the formation of an octahydro derivative, which also preserves the chromophore group of hyperforin: in 0.05 N alcohol solution of HCl — λ_{max} 275 nm (ϵ 8000); at 0.05 N KOH alcohol solution, λ_{max} 292–305 nm (ϵ 11600). Found: MW 544. $C_{35}H_{60}O_4$. Calculated: MW 544.

Octahydroperforin easily forms 3, 5-dinitrobenzoate, mp 120–121 ° (from alcohol). Found: MW 738. $C_{42}H_{62}O_9N_2$. Calculated: MW 738. In its NMR spectrum, there are no signals of olefin protons and methyl groups associated with unsaturated C-atoms.

Oxidation of C-methylhyperforin by Lemieux-Rudlof (with evolution of acetone in the form of 2,4-dinitrophenylhydrazone) revealed the presence of four isobutenyl groups, which appear to be parts of four isopentenyl chains.

The empirical formula of hyperforin indicates the presence of 10 increments of double bonds or cycles. Since 8 of them are due to double bonds $C=C$ and $C=O$, hyperforin must have a bicyclic structure.

Findings:

1. A new antibiotic, hyperforin, which determines the antibacterial activity of the drug novoimanin, has been isolated from *Hypericum perforatum* L.
2. It is established that hyperforin is a bicyclic tetraketone $C_{35}H_{52}O_4$ containing 4 isoprenoid chains.

Literature

1. Derbentseva N.A., Rabinovich A.S., Zelepukha S.I. *Dopovidi AN Ukraine RSR*, 1963, No. 9, p. 1248. — 2. *Novoimanin and its medicinal properties*. Kiev, 1968.