

“769” 抗菌素的分离和鉴定研究

高荣先 金逸芬 袁许生 杨石璋 司明 曾广然

(华北制药厂抗菌素所)

(吉林省农科院植保所)

“769” 抗菌素产生菌是吉林省农科院植保所1971年从公主岭的土壤中分离得到的一株放线菌(不吸水链霉菌公主岭新变种 *Streptomyces ahyg roseopicus gomgzhulin-gensis* M. Var. Ruen et zhang)。1977—1981年在全国16个省区累计2000多万亩面积利用玉米种子固体培养料和工业产品进行防治试验示范,对种子传染的禾谷类黑穗病和水稻恶苗病的防治效果稳定在95%以上,认为是一个很有希望的代秉农抗新品种^[1,2]。

为了确定“769”抗菌素的有效成份,我们进行了分离和鉴定研究,发现其为多种组分的混合物,初步肯定其中含有制霉菌素,异放线酮,奈良霉素—B,脱水放线酮及苯甲酸5种有效组分,其他组分的分离工作尚待进行。

实 验 部 分

一、粗品的制备

为了从不同角度进行考察获取有效组分,我们采用溶媒提取和树脂吸附等两个不同步骤提取“769”干料(玉米种子固体培养料和工业原粉的统称)浸泡液。

(一)树脂法

将“769”玉米种子固体培养料以1:6(W/V)自来水浸泡24小时,用纱布过滤,取其滤液,以2N HCl调至pH4.5,过滤除去蛋白,将所得清液用2N NaOH调至pH7.0,通入钠型122树脂柱进行吸附,树脂饱和后用蒸馏水洗涤,然后用20%丙酮溶液洗脱。洗脱液为棕红色,将其真空薄膜浓缩,浓缩液用氧化铝脱色。脱色液橙红色,经减压浓缩后上DEAE—Dextran Gel A—25柱,用0.02M NaAc—HAC缓冲液洗脱,收集浅黄色有活性部分(以高粱散黑穗病菌作为检查)①,再上葡聚糖凝胶G—10柱脱盐,将有活性洗脱液减压浓缩进行冷冻干燥,得到白色粗品I。

(二)溶媒法:

1. 将“769”工业原粉以1:6(W/V)自来水浸泡24小时,倾出上部清液,用2N HCl调至pH3.5,加1/3(V/V)醋酸乙酯进行萃取。萃取液用少量蒸馏水洗涤,再加无水Na₂SO₄脱水,然后减压浓缩。浓缩液呈棕色粘状物,用甲醇溶解,拌于干纤维素后上纤维素柱,以二氯甲烷作为装柱溶剂和展层洗脱溶剂,收集有活性部分减压浓缩,得到黄色粘状物为粗品II。

2. “769”玉米种子固体培养料用70%乙醇或含水丙酮提取,减压浓缩得黄色沉淀。将沉淀物用水洗涤除去水溶性杂质及放线酮类物质,再用醋酸乙酯、丙酮洗涤除去色素及大部分水分,干燥后得黄色粉末为粗品III。

二、分离与鉴定

从上述粗品 I、粗品 II 和粗品 III 分离到 5 个有效组分，编号为 769-A、B、C、D、E，分离过程如下。

(一) 粗品 I $\xrightarrow{\text{蒸馏水溶解, 2NHCl 调至 pH 3.5}}$ 酸性水溶液 $\xrightarrow{\text{醋酸乙酯提取多次}}$ 提取液

$\xrightarrow{\text{减压浓缩}}$ 粘稠物 $\xrightarrow{\text{醋酸乙酯-石油醚 结晶}}$

母液—母液自然存放，挥发溶剂，析出透明结晶 (769-A) (见图 1)

白色结晶—两次重结晶 \rightarrow 白色结晶 (769-B) (见图 1)

表 1 769-A 与异放线酮化常数的比较

		769-A	异放线酮
分子量		281 (质谱法, 见图 12)	281
元素分析 (%)	C	64.03	64.03
	H	8.24	8.24
	C ₁₅ H ₂₈ O ₄ N	5.09	4.98
熔点 (°C)		99—100	98—100 ⁽⁴³⁾
比旋度		$[\alpha]_D^{25} + 28.3^\circ$ (C=0.3, MeOH)	$[\alpha]_D^{24} + 26.1^\circ$ (C=2, MeOH) ⁽⁴³⁾ $[\alpha]_D^{26} + 45^\circ$ (C=2, MeOH) ⁽⁴⁴⁾
紫外光谱		末端吸收 (见图 2)	末端吸收
红外光谱		1000—1100 cm ⁻¹ 有异放线酮的特征吸收群峰 (见图 3)	$\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm ⁻¹ 1040, 1020, 1000 ⁽⁴⁵⁾

表 2 769-C 与脱水放线酮化常数的比较

		769-C	脱水放线酮
分子量		263 (质谱法, 见图 13)	263
元素分析 (%)	C	67.93	68.41
	H	7.93	8.04
	C ₁₈ H ₂₁ O ₃ N	5.50	5.32
熔点 (°C)		135—136	134—135 ⁽⁴⁴⁾
紫外光谱		$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 241 nm (ϵ 8091), 见图 6	$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 240 nm (ϵ 8710) ⁽⁴⁴⁾
红外光谱		(见图 7)	$\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm ⁻¹ 13195, 3090 1720, 1686, 1672, 1622 ⁽⁴⁴⁾

由表 1 结果来看, 769-A 与异放线酮相似。769-B Fearon-Mitchell 反应呈兰色, Resorcinol-HCl 反应呈亮黄色, 氧肟酸-三氯化铁反应呈紫红色。熔点为 108—109°C。其红外光谱在 1000—1100 cm^{-1} 区域有奈良霉素-B 的特征吸收峰群^{6,7} (见图 5)。其紫外光谱 $\lambda_{\text{EtoH max}}$ 292.5nm (I g ϵ 1.52^{6,7}) (见图 4)。性质与奈良霉素-B 基本一致。

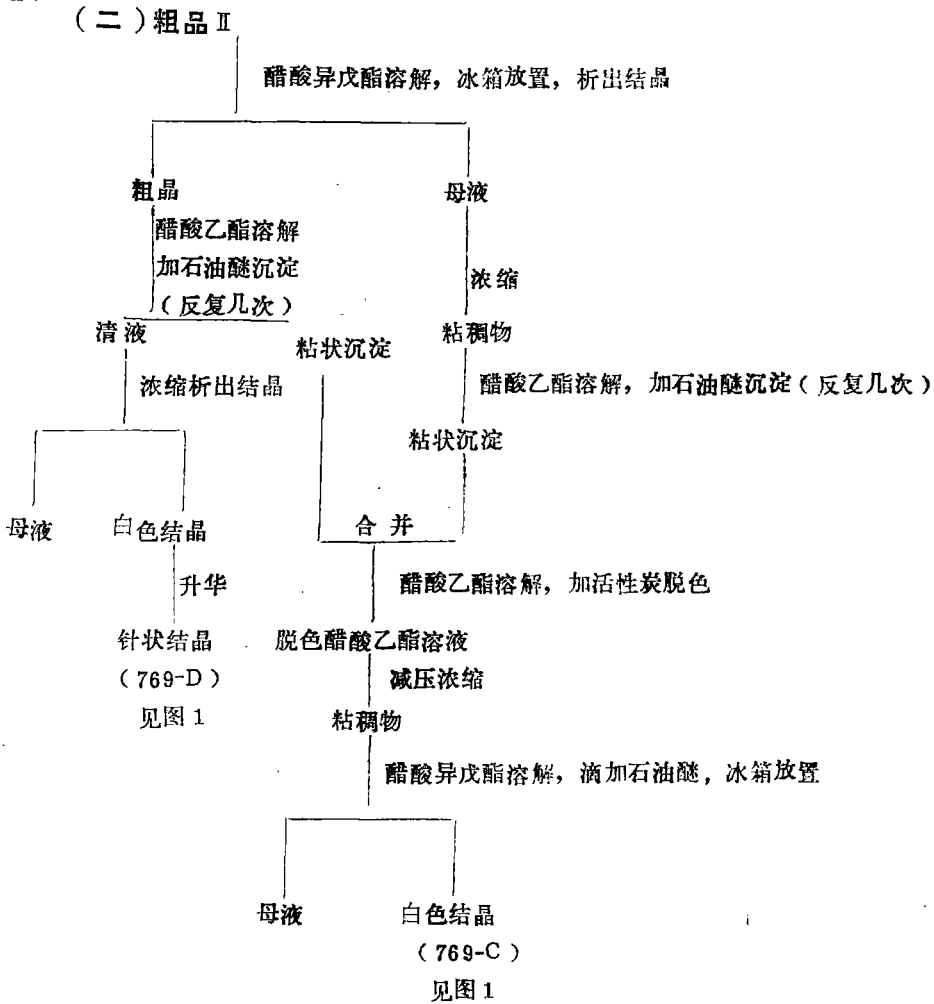


表 3 769-D 与苯甲酸物化常数的比较

		769-	苯甲酸
分子量		122 (质谱法, 见图 14)	122
元素分析 (%)			
C	实验值	88.54	计算值 88.84
H	实验值	4.90	计算值 4.95
熔点 (°C)		129 (100°C 升华)	122.4 (100°C 升华)
紫外光谱		见图 8	
红外光谱		见图 9	

由表2结果来看, 769-C与脱水放线酮相似。由表3结果来看, 769-D与苯甲酸相似。

(三) 将粗品Ⅲ在4) — 5) °C溶于70%乙醇, 在室温条件下过滤, 除去不溶物, 减压浓缩除去部分溶剂, 即可析出淡黄色晶形粉末(769-E)。

所得769-E物理化学性质与制霉菌素相似。

1. 纸层析Rf值: 769-E和制霉菌素分别用以下4个溶剂系统作展层剂, 进行纸层分离, 二者Rf值相似⁽⁸⁾, 见表4。I. 水饱和之丁醇; II. 丁醇: 醋酸: 水 = 2: 1:

表4 769-E与制霉菌素低层析Rf值的比较

溶剂系统	I	II	III	IV
769-E	0.51	0.82	0.71	0.77
制霉菌素	0.50	0.85	0.71	0.79

I; III. 丁醇: 吡啶: 水 = 1: 0.6: 1; IV. 5) %丙酮。用高粱散黑穗病菌的孢子显迹。

2. 化学反应: 769-E和制霉菌素同样对三氯化铁、Millon、Fehling、2·4-二硝基苯肼、缩二脲、Ehrlich、茚三酮、Sakaguchi试剂呈阴性反应; 对Molisch、

Tollen、Schiff试剂呈阳性反应; 使高锰酸钾溶液和溴的四氯化碳溶液褪色, 遇浓硫酸呈兰紫色, 遇FeCl₃-K₃Fe(CN)₆呈深兰色⁽⁸⁾, 见表5。

表5 769-E与制霉菌素化学反应的比较

试剂	769-E	制霉菌素
Molisch	+	+
Tollens	+	+
Fehling	-	-
Schiff	+	+
2·4-二硝基苯肼	-	-
FeCl ₃	-	-
缩二脲	-	-
Ehrlich	-	-
Millon	-	-
FeCl ₃ -K ₃ Fe(CN) ₆	兰色	兰色
茚三酮	-	-
溴的四氯化碳溶液	褪色	褪色
Sakaguchi	-	-
浓硫酸	兰紫色	兰紫色
高锰酸钾	褪色	褪色

3. 紫外光谱: 769-E有3个一组的多烯类发色团特有之吸收峰, 291.5nm、304.4nm、318.6nm (EtoH), 3个紫外吸收峰与制霉菌素一致。制霉菌素3个吸收峰分别为: 292nm、305nm、321nm (EtoH)⁽⁸⁾, 见图10。

4. 红外光谱: 769-E的红外光谱与制霉菌素相似⁽⁸⁾见图11。

5. 比旋度: 769-E石甲醇中的比旋度为-13.5°, 与马誉徵主编的《抗菌素》一书所载制霉菌素比旋度为-10°(甲醇)相似⁽⁹⁾。

从以上分析, 认为769-E属于制霉菌素类物质。

另外, 用紫外光谱法证明, 玉米楂子固体培养料的水浸泡液中也含有769-E, 其含量约为70%乙醇浸泡液的1/5

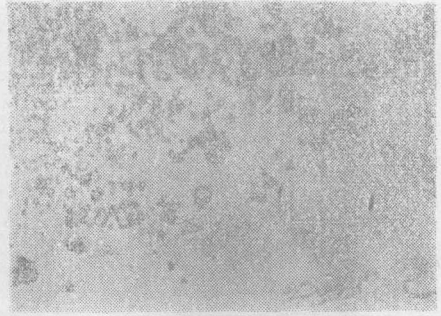
(70%乙醇浸泡液, 每克干料可浸出769-E3700r, 水浸液, 每克干料可浸出683r)。工业原粉的70%乙醇浸泡液和水浸泡液中也均含769-E, 其含量较玉米楂子浸泡液要低。

讨 论

“769”抗菌素是一个防治效果良好的代赅农抗新品种。实验证明, 它是一个多组分



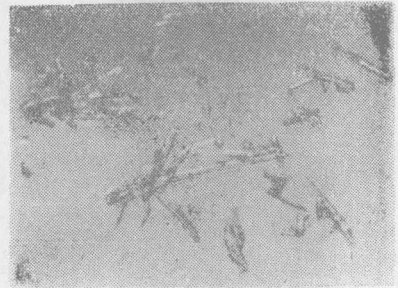
769-A



769-B



769-C



769-D

图1 769-A、B、C、D晶形照

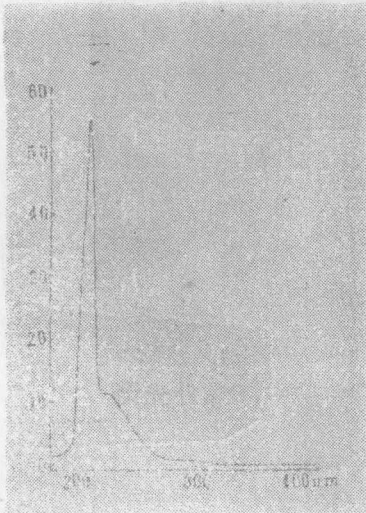


图2 769-A紫外光谱

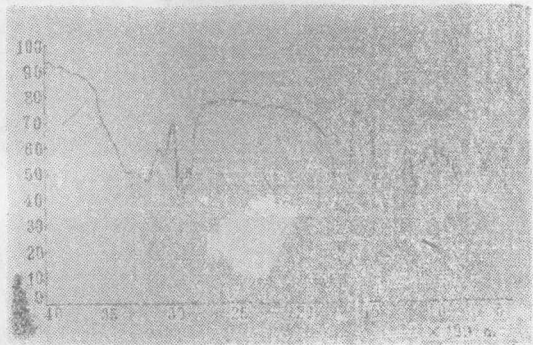


图3 769-A红外光谱

的混合物，含有制霉菌素、异放线酮、奈良霉素-B，脱水放线酮和苯甲酸等5个有效组分。此外，“769”抗菌素还有其他有效组分，有待研究。

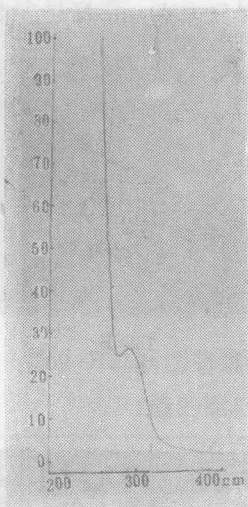


图4 769-B紫外光谱

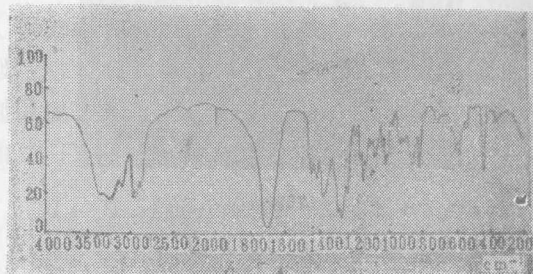


图5 769-B红外光谱

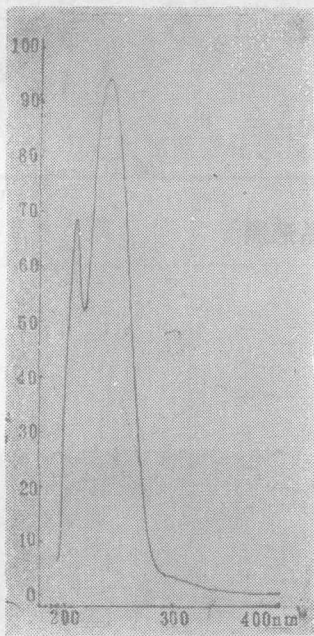


图6 769-C紫外光谱

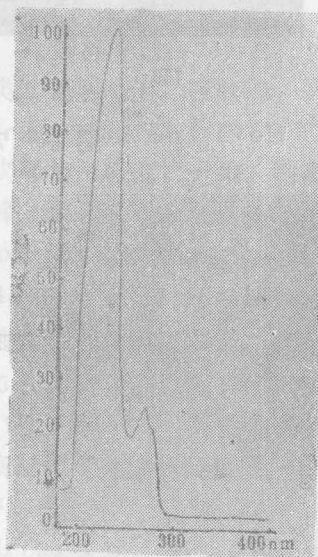


图8 769-D紫外光谱

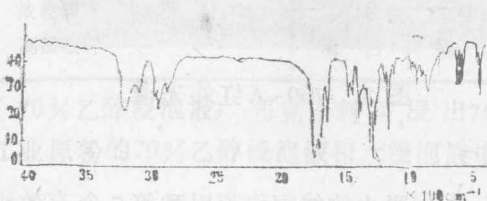


图7 769-C红外光谱

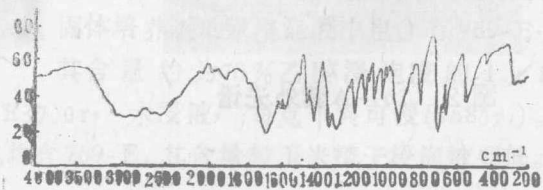


图9 769-D红外光谱

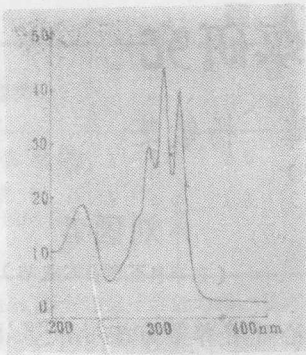


图10 769-E紫外光谱

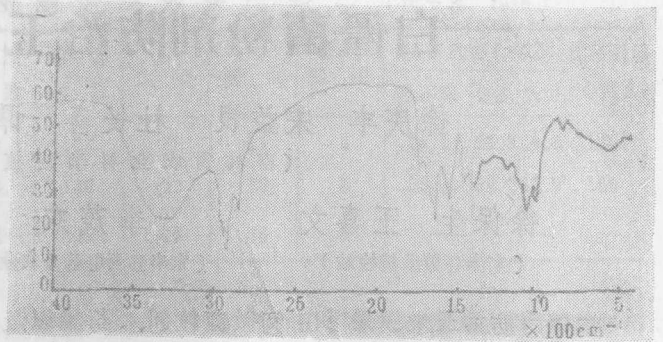


图11 769-E红外光谱

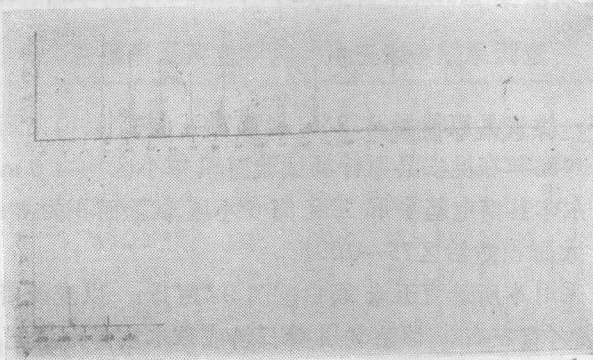


图12 769-A质谱

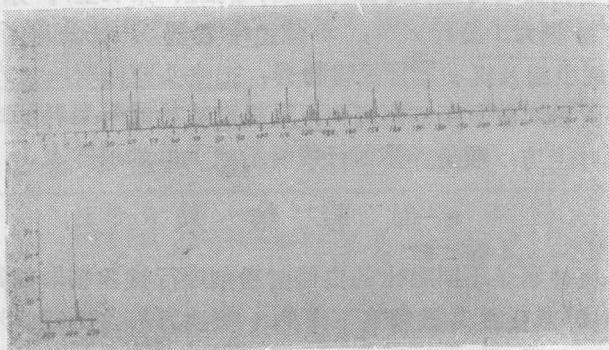


图13 769-C质谱

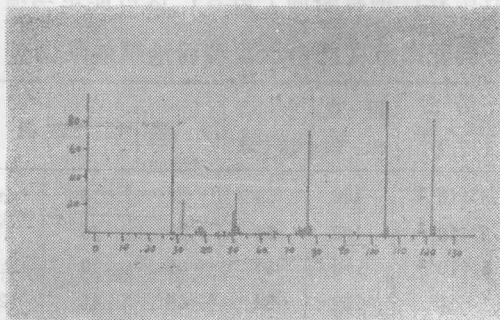


图14 769-D质谱

总结及讨论

应用白僵菌防治玉米螟工作经历三个阶段。最先是采取撒颗粒剂方法，虽然防效十分明显，但较为费工，农民不愿接受。以后研制出封垛方法，省工、省药，消灭玉米螟越冬幼虫，从而使防治面积迅速扩大。但此法在螟害发生较重的地区还不能全部解决螟害问题。以后又提出了玉米心叶培养白僵菌防治玉米螟方法，保证了治螟工作的推行。应用白僵菌喷粉防治玉米螟方法解决了上述工效低的矛盾，特别是采用机动式喷粉器工效高，防效好。一台机动喷粉器每小时可喷白僵菌粉60亩，一天按6小时计算可防治180亩，但人工撒施白僵菌颗粒剂一天只能防治6亩，玉米心叶培养一天可防15亩。机动喷粉器喷施白僵菌粉比上述两种方法提高工效达30和12倍，同时还大大地降低防治费用（表5）。

表5

不同施菌方法的工效和费用比较

施菌方式	防治面积(亩/天)	提高工效	防治费用(元/亩)	降低费用(%)
机动喷粉器	180	30倍	0.45	62.2
玉米心叶培养	15	2.5倍	0.25	78.9
手撒颗粒剂	6	—	1.19	—

采用机动喷粉器喷粉工效高，可适时抓住防治有利时机，提高防治效果。投工量少，避免了农忙季节争工的矛盾。

白僵菌喷粉治螟方法在国内是一项新技术，它为今后治螟工作的机械化开辟了光明的前景，特别是在东北地多人少，玉米种植面积大的情况下，必将得到迅速的发展。但是，应当指出，目前土法生产的白僵菌粉剂质量低，分散性差，应用中尚需对用填充料，手续比较麻烦，不适应大面积推广的要求，还应研究制剂的标准化，确定剂型。这为工业化生产白僵菌提出了新的课题。

参 考 文 献

- [1] 徐庆丰等：《昆虫学报》，1973，16(2)：203—205。
- [2] 吉林省白僵菌封垛协作组：《昆虫学报》，1977，20(3)：269—275。
- [3] 徐庆丰等：《吉林农业科学》，1987，4：25—27。

(上接第43页)

参 考 文 献

- [1] 吉林省农科院植保所：农抗“769”工业液体发酵不同剂型，用量及防病效果(单行本)，1981。
- [2] 吉林省农科院植保所、延边农药厂：农抗“769”中间试验研究报告(单行本)，1981。
- [3] Collectecl paprson Amtibiotics Section XV 1976, 251—303.
- [4] 《全国第二次抗菌素学术会议论文集》，1985，第四册，37—40。
- [5] Okuda, T. et al.: Chem. Pharm. Bull. 1963, 11.: 730—736.
- [6] Collectecl papers on Amtibiotics, Section VI 1972, 59.
- [7] Ibid, Secion I 1971 288.
- [8] 蔡润生等：中国南方土壤分离的三种放线菌产生的多烯类抗菌素，《药理学报》，1980年，第八卷，第一期，48—50。
- [9] 马誉徵主编：《抗菌素》，1965年，人民卫生出版社。