

杀 蚜 素 的 研 究

II. 杀蚜素 A 的分离和鉴别

陈传盈 黄文彩 林开江

钱玉英 王龙英 周伟强

(浙江农业科学院农业微生物研究所, 杭州)

浅灰链霉菌杭州变种 (*Streptomyces griseolus* var. *Hangzhouensis* n. var. Yan et Fang) 在淀粉培养基中发酵后, 菌丝体经 1N 氢氧化钠 (或丙酮) 浸泡, 醋酸乙酯萃取和硅胶柱层析, 可得微黄色蜡状物, 再用薄板层析精制, 即得杀蚜素 A 纯品。经紫外和红外吸收光谱及核磁共振谱分析, 发现其理化性质、生物学特性和化学结构与已知的杀粉蝶菌素 (Picricidin) 16 个同系物不同, 故可认为是一种新的抗生素。

杀蚜素是浅灰链霉菌杭州变种产生的胞内抗生素, 经多年田间试验表明, 杀蚜素对防治棉蚜、棉红蜘蛛、柑桔锈壁虱、苹果红蜘蛛等有较好的防治效果, 并对棉田天敌昆虫安全, 是一种有希望的杀虫剂。杀蚜素是多组分抗生素。本文报道杀蚜素的主要组分 A 的分离、提纯和理化性质鉴别。

材 料 与 方 法

(一) 材料

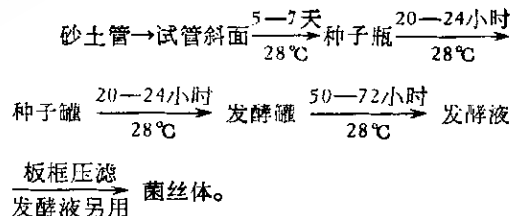
1. 培养基

(1) 孢子斜面培养基(%): KNO_3 0.1、 K_2HPO_4 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、 NaCl 0.5、 FeSO_4 0.001、麸皮 2.0、可溶性淀粉 2.0、琼脂 2.0、 pH 7.0—7.4。

(2) 种子培养基(%): 黄豆饼粉 (冷榨) 1.0、玉米粉 3.0、麸皮 1.0、 KNO_3 0.2、 CaCO_3 0.5。

(3) 发酵培养基(%): 玉米粉 5.0—7.0、麸皮 1.0、黄豆饼粉 1.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3、 KNO_3 0.2、 CaCO_3 0.5。

2. 发酵流程



用二龄家蚕幼虫或用红酵母测定活性。

(二) 提取和纯化

杀蚜素存在于菌丝体中。取一定量的菌丝体, 加入 2—3 倍菌丝体重量的 1N 氢氧化钠 (或丙酮) 溶液, 60°C 浸泡 4 小时, 氢氧化钠浸泡液 pH 调至 8.0—9.0, 用 1.5 倍于浸泡液体积的醋酸乙酯萃取。萃取液经适量的蒸馏水洗后, 用无水硫酸钠脱水, 然后减压浓缩, 得深褐色粘稠状粗品。

将粗品用少量苯溶解, 除去沉淀物, 然后用 60—100 目硅胶进行柱层析分离, 先用苯和苯: 醋酸乙酯 (100:1—3) 洗脱, 溶剂量为硅胶量的 5 倍,

本文于 1980 年 7 月 26 日收到。

上海农药研究所代作紫外、红外光谱分析。中国科学院上海药物研究所代做核磁共振谱, 并承袭丙永同志指导和分析核磁谱, 特此致谢。

再用苯:醋酸乙酯(100:5—8)洗下活性组分。活性部分合并浓缩,得微黄色蜡状杀蚜素 A。进一步纯化可用硅胶 GF-254 薄板层析,溶剂系统为氯仿:甲醇:苯=100:4:1。

结果与讨论

(一) 理化性质

杀蚜素 A 为微黄色蜡状物,易溶于丙酮、甲醇、乙醇、醋酸乙酯、正己烷等有机溶

剂,不溶于水,溶于 pH 12.0 以上的碱性水。

用 Доскоцилова 的八种溶剂进行纸层析,层析图谱见图 1。在 600 伏电压下,以醋酸、巴比妥溶液为介质,进行纸电泳 2 小时,杀蚜素 A 在原地不动。

杀蚜素 A 的紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振谱如图 2、图 3 和图 4 所示。

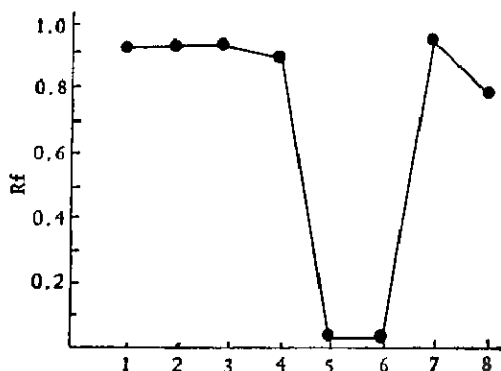


图 1 杀蚜素 A 的纸层析图谱

溶剂系统:

1. 用水饱和的正丁醇。
2. 水饱和正丁醇,内含 2% 对-甲苯磺酸。
3. 正丁醇:醋酸:水=2:1:1。
4. 水饱和正丁醇,内含 2% 六氢吡啶。
5. pH 7.0、0.5M 的磷酸缓冲液,用正丁醇饱和。
6. 正丁醇饱和的水,内含 2% 对-甲苯磺酸。
7. 苯:甲醇=4:1, 滤纸用 pH 7.0、0.5M 磷酸缓冲液处理。
8. 75% 甲醇、25% 水 (内含 3% 氯化钠), 滤纸用 5% 硫酸钠处理。

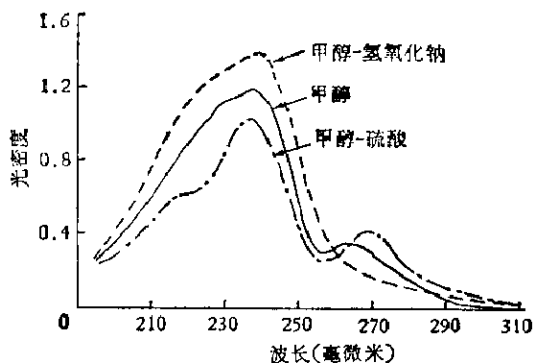


图 2 杀蚜素 A 的紫外吸收光谱

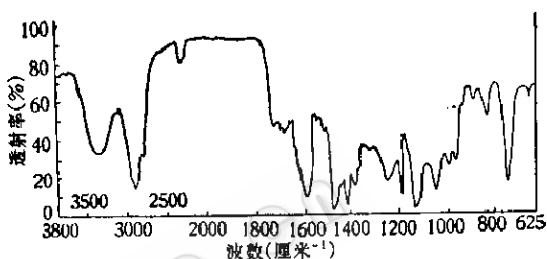


图 3 杀蚜素 A 的红外吸收光谱 (KBr 压片)

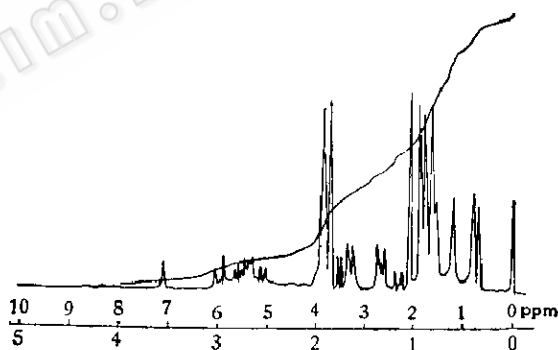


图 4 杀蚜素 A 的核磁共振谱
(JNM-Ts-100CdCl₂)

(二) 生物学特性

用常规杯碟法测定杀蚜素 A 对各种微生物的抗菌作用,结果如表 1 所示,对黑曲霉、黄曲霉、米曲霉、石膏发癣、粘红酵母等有很强的抑菌作用,最低抑菌浓度为 1.0 微克/毫升,并对桔黄青霉、枯草杆菌、巨大芽孢杆菌有一定的抑菌作用。

杀蚜素 A 7.0—15.0 ppm 喷雾对菜粉蝶 (*Pieris rapae* Linnacus)、粘虫 (*Lecania separata* Walker) 的二龄幼虫和棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover)、棉红蜘蛛 (*Tetranychus*

表 1 杀蚜素 A 和 Piericidin A、B 的抗菌谱

试 验 菌	最低抑菌浓度 (微克/毫升)		
	杀蚜素 A	P _A	P _B
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	50	> 200	> 200
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	100	100	100
巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	50		
耻垢分枝杆菌 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	100	> 200	> 200
粘红酵母 <i>Rhodotorula glutinis</i>	1		
白地霉 <i>Geotrichum candidum</i>	100		
热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i>		> 200	20
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	1		
烟曲霉 <i>A. fumigatus</i>	100	> 200	20
黄曲霉 <i>A. flavus</i>	1		
米曲霉 <i>A. oryzae</i>	1		
土曲霉 <i>A. terreus</i>	1	> 200	20
桔黄青霉 <i>Penicillium chrysogenum</i>	10		
石膏发癣 <i>Trichophyton asteroides</i>	1	20	20

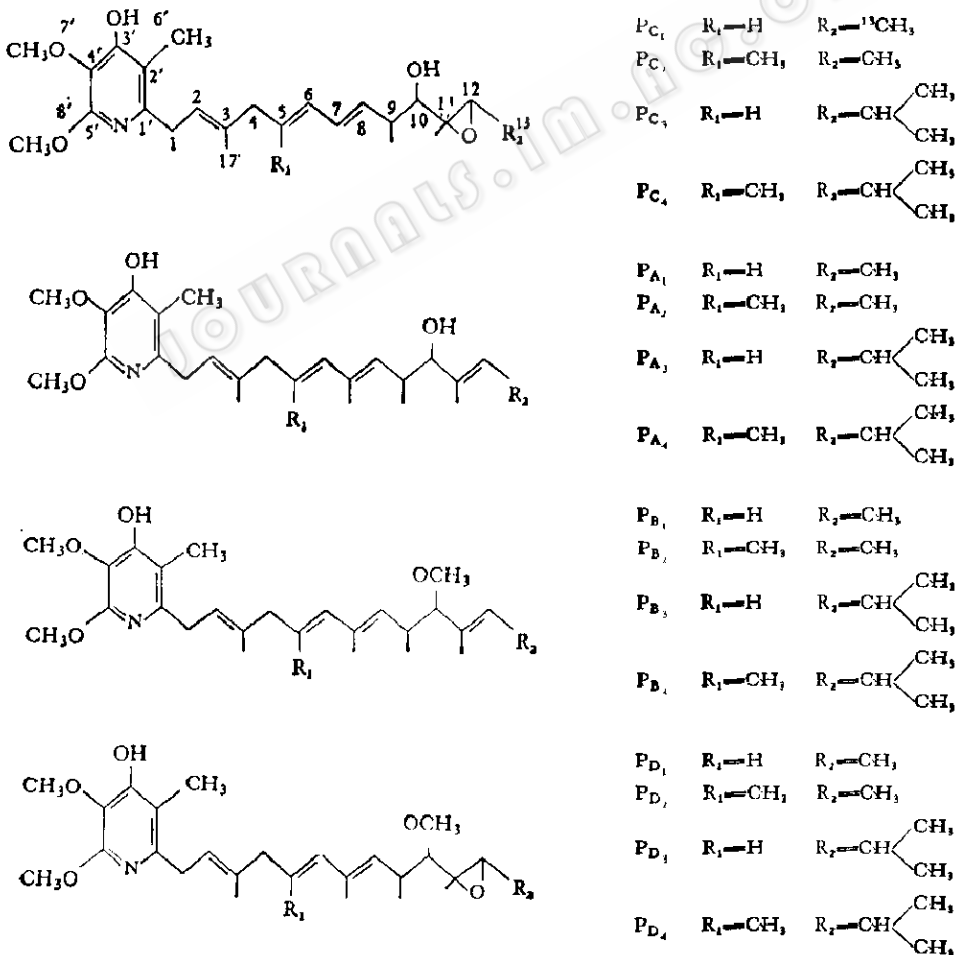


图 5 杀粉蝶菌素 16 同系物结构式

bimaculatus Harvey)、柑桔锈壁蝻 (*Phylloc-
opetes oleivorus* Ashmead)、苹果红蜘蛛 (*Pa-
nonychus ulmi* Koch)等有强烈触杀活性,同
时在 0.5 ppm 以下的低浓度对稻田 蚂蝗、
孑孓、红丝虫等也有极显著的毒力。但对
草蛉 (*Chrysopa* spp.)、七星瓢虫(*Coccirella
septempunctata*) 等天敌安全。大白鼠口服

LD50 为 68.0 毫克/公斤。

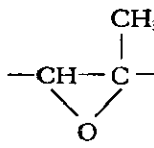
(三) 化学结构分析

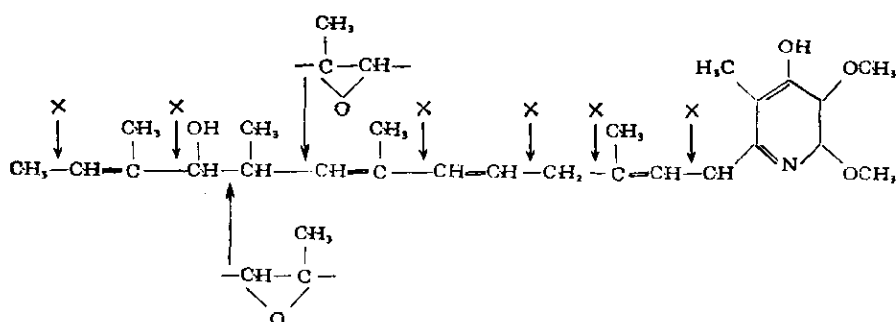
根据上述实验结果和对照目前有关文
献资料报道,杀蚜素 A 与日本报道的杀粉
蝶菌素 (Piericidin) 有较为相似的结构,但
又有不同 (见图 5, 表 2)。

表 2 杀蚜素 A 和杀粉蝶菌素各同系物的核磁共振谱质子化学位移值

质子位	杀蚜素 A	P _{A1}	P _{A2}	P _{B1}	P _{B2}	P _{C1}	P _{C2}	P _{D1}	P _{D2}
1	3.24 _(d)	3.30 _(d)	3.28 _(d)	3.28 _(d)	3.30 _(d)	3.26 _(d)	3.29 _(d)	3.30 _(d)	3.28 _(d)
2	5.40 _(t)	5.30 _(t)	5.35 _(t)	5.33 _(t)	5.32 _(t)	5.31 _(t)	5.32 _(t)	5.31 _(t)	5.33 _(t)
4	2.65 _(d)	2.73 _(d)	2.74 _(d)	2.72 _(d)	2.73 _(d)	2.70 _(d)	2.73 _(d)	2.47 _(d)	2.49 _(d)
5	5.46 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)	5.45 _(m)
6	5.95 _(d)	6.00 _(d)	6.02 _(d)	6.00 _(d)	6.00 _(d)	5.95 _(d)	6.00 _(d)	5.98 _(d)	6.00 _(d)
8	5.08 _(d)	5.12 _(d)	5.13 _(d)	5.13 _(d)	5.12 _(d)	5.15 _(d)	5.16 _(d)	5.16 _(d)	5.20 _(d)
9	2.52 _(m)	2.66 _(m)	2.65 _(m)	2.60 _(m)	2.60 _(m)	2.50 _(m)	2.51 _(m)	2.50 _(m)	2.50 _(m)
10	3.50 _(d)	3.53 _(d)	3.50 _(d)	3.05 _(d)	3.09 _(d)	2.80 _(d)	2.81 _(d)	2.72 _(d)	2.72 _(d)
12	5.03 _(q)	5.55 _(q)	5.15 _(d)	5.30 _(q)	5.12 _(d)	*2.40 _(q)	*2.38 _(d)	*2.40 _(q)	*2.32 _(d)
13	1.59 _(d)	1.57 _(d)	2.55 _(m)	1.64 _(d)	2.55 _(m)	**1.26 _(d)	*2.30 _(m)	**1.24 _(d)	**2.30 _(m)
14	1.63 _(s)	1.68 _(s)	1.71 _(s)	1.68 _(s)	1.66 _(s)	**1.20 _(s)	**1.24 _(s)	**1.14 _(d)	**1.17 _(s)
15	0.72 _(d)	0.76 _(d)	0.79 _(d)	0.74 _(d)	0.77 _(d)	0.86 _(d)	0.91 _(d)	0.87 _(d)	0.88 _(d)
16	1.49 _(s)	1.54	1.60 _(s)	1.50 _(s)	1.52 _(s)	1.70 _(s)	1.70 _(s)	1.68 _(s)	1.67 _(s)
17	1.68 _(s)	1.70	1.76 _(s)	1.72 _(s)	1.72 _(s)	1.70 _(s)	1.70 _(s)	1.73 _(s)	1.71 _(s)
18	—	—	0.90 _(d)	—	0.92 _(d)	—	0.95 _(d)	—	1.00 _(d)
19	—	—	0.95 _(d)	—	0.97 _(d)	—	1.07 _(d)	—	1.07 _(d)
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	3.03 _(s)	3.05 _(s)	—	—	3.45 _(s)	3.41 _(s)
6'	1.96 _(s)	2.00 _(s)	2.04 _(s)	2.04 _(s)	2.05 _(s)	2.01 _(s)	2.04 _(s)	2.04 _(s)	2.02 _(s)
7'	3.69 _(s)	3.78 _(s)	3.08 _(s)	3.84 _(s)	3.84 _(s)	3.78 _(s)	3.78 _(s)	3.80 _(s)	3.80 _(s)
8'	3.81 _(s)	3.85 _(s)	3.87 _(s)	3.90 _(s)	3.90 _(s)	3.86 _(s)	3.88 _(s)	3.89 _(s)	3.87 _(s)
	1.16 _(s)	* 和二者相比可知杀蚜素 A 的这个峰位与 P _{C1} 这个峰位相当。							
	*2.22 _(d)								

表 2 核磁共振谱质子 化学位移值表明,杀蚜素 A 明显不同于 P_{B1}、P_{A2} 等,而
与 P_{A1} 的核磁共振谱很相近,表明两者有
相似的结构,但杀蚜素 A 在 δ 1.16(s·3H)
尚有 C-CH₃ 峰,在 δ 2.22(d·1H) 有-CH
峰,说明两者又有不同。但是,这两个峰
位与 P_{C1} 的相应环氧结构峰位相一致,表
明杀蚜素 A 结构中除有 P_{A1} 结构外,尚有

—CH—C—
O
从分析核磁共振谱可以推断应在下图“↓”
所示的两个位置上,而不在其他部位,如
“×”所示位置,均与核磁不符,但究竟在何
位,尚待进一步证实。



此外, 杀蚜素 A 在生物学特性上和杀粉蝶菌素也不同(见表 1 等), 故可认为是一种新的抗生素。

参 考 文 献

[1] 陈传盈等: 微生物学报, 20(2): 113—115, 1980.

[2] 高桥信孝等: 最新の农药の開発と将来の展望, 日本工業技術联盟, 1975 年, 第 183—206 页。

[3] Shigeo Yoshida et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(5): 849—854, 1977.

[4] Shigeo Yoshida et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 41(5): 855—862, 1977.

[5] 高桥信孝: 公开特许公报, 特开昭 50-132183, 1975.

STUDIES ON APHICIDIN

II. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF APHICIDIN A

Chen Chuanying Huang Wencai Lin Kaijiang

Qian Yuying Wang Longying Zhou Weiqiang

(Institute of Agricultural Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou)

After fermentation of a starch medium by *Streptomyces griseolus* var. *Hangzhouensis* n. var., the filter cake of the fermented broth was subjected to 1N NaOH solution (or extracted with acetone, concentrated in vacuo), and then extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate extract was separated by silica gel column chromatography. A yellowish wax-like active substance was obtained when the eluted solution was evaporated to

dryness by a vacuum pump. The crude active substance was purified on thin layer chromatography in a solvent mixture and pure aphicidin A was obtained. Detailed analysis by UV absorption, IR absorption and NMR spectra of aphicidin A indicated that it was different from the 16 known analogues of piericidins in chemical structure and physical, chemical properties and bioactivity. It is, therefore, suggested to be a new antibiotic.