

一种新的农用抗生素——宁南霉素*

向固西 胡厚芝 陈家任 陈维新

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

吴林森

(四川抗菌素工业研究所 成都 610051)

摘要 诺尔斯链霉菌西昌变种 (*Streptomyces noursei* var. *xichangensis*) 发酵液, 经提取分离和冷冻干燥, 高效液相色谱纯化, 得化合物 $C_{16}H_{23}N_7O_8$, 经 UV、IR、NMR、MS 光谱分析和对水解产物的研究, 证明为胞嘧啶核苷型抗生素, 与谷氏菌素的结构差别仅在于谷氏菌素中的丝氨酸为 D 型, 而新分离的宁南霉素则是 L 型丝氨酸, 两者的生物活性差异显著。

关键词 新农用抗生素, 胞嘧啶核苷型, 宁南霉素, 化学结构

从诺尔斯链霉菌西昌变种 (*Streptomyces noursei* var. *xichangensis*)^[1] 的发酵液中分离出一种新抗生素, 它对革兰氏阴性和阳性细菌具抑制作用, 尤其对水稻白叶枯病, 小麦、黄瓜、豇豆、花卉白粉病的病原菌有良好的防治效果^[2,3], 是一种高效、低毒、低残留、无蓄积的农用抗生素新药, 定名为宁南霉素。本文报道其理化性质和化学结构。

1 材料和方法

1.1 发酵

1.1.1 菌种: 诺尔斯链霉菌西昌变种。

1.1.2 培养基:

孢子斜面培养基 (%): 可溶性淀粉 2, 蔗糖 1, 硝酸钾 1, 磷酸氢二钾 0.5, 硫酸镁 0.5, 氯化钠 0.5, 碳酸钙 0.5, 硫酸亚铁 0.01, 琼脂 2, 灭菌前 pH7.2~7.4。

种子培养基 (%): 玉米粉 2, 黄豆饼粉 3, 酵母粉 0.01, 磷酸氢二钾 0.01, 硫酸镁 0.0025, 氯化钠 0.02, 碳酸钙 0.03, 灭菌前 pH7.0。

发酵培养基 (%): 玉米粉 2, 花生饼粉 3.5, 酵母粉 0.05, 磷酸氢二钾 0.02, 硫酸镁 0.05, 氯化钠 0.3, 碳酸钙 0.5, 灭菌前 pH7.0。

1.1.3 发酵流程: 斜面孢子 $\xrightarrow{28^{\circ}\text{C 培养 5d}}$ 种子瓶 $\xrightarrow{28^{\circ}\text{C 振荡培养 40h}}$ 种子罐 $\xrightarrow{28^{\circ}\text{C 发酵 24h}}$ 发酵罐继续发酵 48h 达到发酵高峰。

1.2 提取分离

发酵液过滤, 滤液通过 732 NH_4^+ 型阳离子交换树脂吸附, 用蒸馏水洗去蛋白质, 再

* 本研究项目系国家“七五”攻关项目。

参加工作的作者还有四川抗菌素工业研究所蔡顺养、沈瑾志

本文于 1994 年 5 月 20 日收到。

用 0.3mol/L 氨水洗脱, 收集磷钨酸反应阳性部分, 浓缩至小体积, 浓缩液通过 D-110 大网树脂吸附层析, 用蒸馏水展层洗脱, 收集磷钨酸反应阳性流份, 冻干得白色冻干品。冻干品经中性氧化铝柱层析, 先用 10 倍体积的 75% 甲醇水溶液洗去(含谷氏菌素)后, 用 25% 甲醇水溶液洗脱, 收集磷钨酸反应阳性流份, 减压浓缩, 冻干得白色粉末, 此粉末再经高效液相色谱法纯化, 得纸层析检验为单一斑点的宁南霉素。

1.3 宁南霉素理化性质的测定

熔点: Kofler 显微熔点仪测定(未校正)。

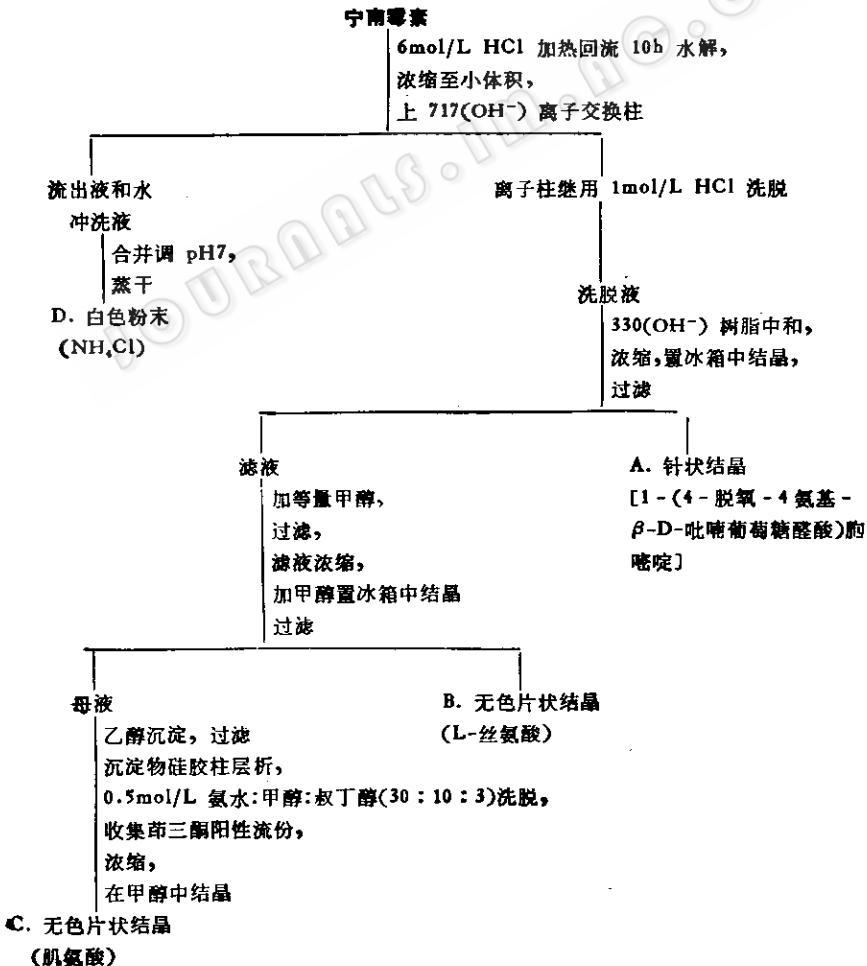
比旋度 $[\alpha]_D^{25}$: P-E240 旋光仪测定, 水为溶剂, $C = 1.0$, 5mol/L HCl 为溶剂。

溶解度试验: 在蒸馏水及 GR 级的甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、乙腈等有机溶剂中测试。

纸上电泳: 在 pH2~8 的磷酸缓冲液中进行。

纸层析: 新华一号中速滤纸, 上行法, 正丁醇: 冰醋酸: 水 (V:V:V = 2:2.5:1) 为展开剂; 茚三酮显色。

显色反应: 新配制的茚三酮试液, 双缩脲试液, 坂口试剂, 三氯化铁试液, 蒽酮试液,



α 萘酚试剂, 莫里希试剂, 斐林试剂, 配制方法按文献[4]。

稳定性试验: 将宁南霉素在 pH2~8 水溶液中煮沸 30min, 再测其生物活性; 水溶液在日光下照射 8h, 再测其活性; 发酵浓缩液存放二年测活性比较。

分子式测定: FDMS 和 FAB 质谱仪测得分子量 m/e 444($M+1$); 元素分析在意大利产快速微量分析仪上测得 C:42.2, H:5.79, N:21.71, $C_{16}H_{23}N_7O_8 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ 的计算值 C:42.48, H:5.57, N:21.67。

1.4 化学结构测定

紫外光谱: 岛津 240 紫外仪, 溶剂为 0.1mol/L HCl 和 0.1mol/L NaOH 水溶液分别测定, 以 λ_{max} [$E_{1cm}^{1\%}$] 绘图。

红外光谱: Nicolet MX-1E 红外仪, KBr 压片。

核磁共振: Bruker 200 兆核磁共振仪, 重水作溶剂, 四甲基硅为内标, 则 ^1H-NMR , $^1H-^1H \cdot COSY$ 二维谱, ^{13}C 宽带去偶谱, ^{13}C 偶合谱(门控去偶法), $^1H-^{13}C \cdot COSY$ 二维谱, $^{13}C-^1H \cdot COLOC$ 远程二维谱。

1.5 宁南霉素的活性测定

检定菌: 蜡样芽孢杆菌。

培养基: 蛋白胨 1.5g, 牛肉膏 1.5g, Na_2HPO_4 0.05g, 琼脂 18~20g, 水 1000ml, pH7.8~8.0。

采用杯碟法, 置 35°C 培养 16~18h, 测量抑菌圈直径, 查标准曲线, 用回归法计算出供试样品的效价。

1.6 宁南霉素的水解和降解物分离

2 结果和讨论

宁南霉素经高效液相色谱纯化所得为无色粉末, 熔点 195°C (分解), 比旋度 $[\alpha]_D^{25} + 38^\circ$, 易溶于水, 难溶于一般有机溶剂, 分子量 443, 分子式 $C_{16}H_{23}N_7O_8$, $UV\lambda_{max}$: 276nm (0.1mol/L HCl) 和 269nm (0.1 mol/L NaOH) (图 1), 与已知的谷氏菌素^[5]和庆丰霉素^[6]的文献值一致, 显示分子中含胞嘧啶核。宁南霉素的显色反应: 茚三酮试验和双缩脲试验均呈阳性, 而坂口、 $FeCl_3$ 、蒽酮、 α 萘酚、莫里希、斐林试验均呈阴性, 表明化合物属于肽, 不含酚或糖甙。宁南霉素的 IR 示有 OH 和 NH 基 ($3200 \sim 3447cm^{-1}$)、CONH 酰胺及双键 ($1660, 1610, 1528, 1498cm^{-1}$), 与谷氏菌素或庆丰霉素相似。宁南霉素在 pH2~8 的磷酸缓冲液纸上电泳时移向负极, 显示碱性, 也与上述抗生素一致。然而从活性测定结果(表 1)和纸层析 Rf 值对照(图 2), 表明宁南霉素的化学结构类似于谷氏菌素和庆丰霉素, 但不是同一物质。

宁南霉素的水解产物, 其一为无色针晶, 熔点 235°C (分解), 其苦味酸盐为黄色板状晶体, 熔点 235°C, 其盐酸盐为无色颗粒状晶体, 熔点 240°C (分解), A 的 FDMS 在 m/e 287 呈强峰 ($M+1$), 元素分析值 C:40.48, H:5.25, N:17.51, IR 示有 $>C=D$, $-NH_2$, $-OH$, 与谷氏菌素水解物^[7]的 1-(4-脱氧-4-氨基- β -D-吡喃葡萄糖醛酸) 胞嘧啶一致, $^{13}C-NMR$ (表 2), 进一步证实其结构 A。其二为无色片状结晶, 熔点 223°C (分

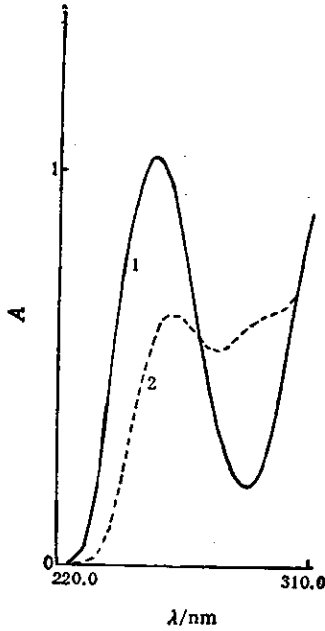


图 1 宁南霉素的紫外光谱

Fig. 1 UV absorption spectrum of Ningnanmycin 1. 0.1mol/L HCl; 2. 0.1mol/L NaOH

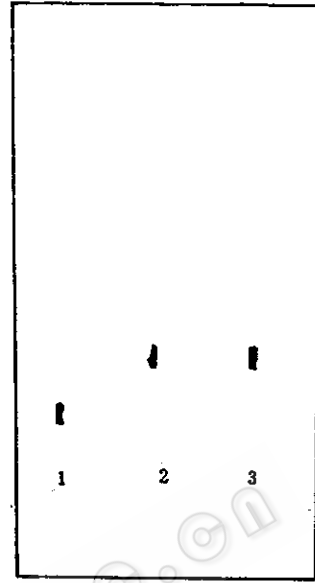


图 2 宁南霉素(1)与庆丰霉素(2)、谷氏菌素(3)的纸层析

Fig. 2 Paper chromatograms of ningnanmycin (1) and qingfengmycin (2), gougerotin (3)

表 1 宁南霉素、庆丰霉素、谷氏菌素的抗菌活性比较

Table 1 Antimicrobiol activity of ningnanmycin, qingfengmycin and gougerotin

植物病原菌 Plant pathogenic bacteria	抗菌活性 MIC ($\mu\text{g/ml}$) Antimicrobiol activity minimal inhibitory con.		
	宁南霉素 (16A-6I) Ningnanmycin	庆丰霉素 Qingfengmycin	谷氏菌素 Gougerotin
水稻稻瘟病菌 <i>Piricularia oryzae</i>	400	200	>500
水稻纹枯病菌 <i>Pellicularia gaskii</i>	50	400	
水稻小球菌核病菌 <i>Leptosphaeria salvinii</i>	25	200	
水稻白叶枯黄杆菌 <i>Xanthomonas oryzae</i>	6.25	100	

解), 茚三酮试验、吡啶酮试验均呈阳性, 高压液相色谱滞留时间与丝氨酸一致, 比旋度 $[\alpha]_D^{25} -10.65$ (H_2O , $C = 1$), $+12.50$ (5mol/L HCl , $C = 1$), 对照标准品 L-丝氨酸为 -7.15 (H_2O), $+12.99$ (5mol/L HCl), D-丝氨酸 $+3.77$ (H_2O), -7.47 (5mol/L HCl), IR 与 L-丝氨酸标准品一致(图 3)。其三为无色片晶, 熔点 208°C (分解), 茚三酮和吡啶酮试验均呈阳性, 游离态和盐酸盐的 IR 均与肌氨酸标准图谱一致。其四为无机盐, 易溶于水, 与奈斯勒试剂呈红棕色沉淀, 证明为 NH_4Cl 。据此, 宁南霉素属于胞嘧啶核苷肽型抗生素, 其氨基酸组成仅 L 型丝氨酸区别于谷氏菌素的 D 型丝氨酸。由宁南霉素的

表 2 1-(4-脱氧-4-氨基-β-D-吡喃葡萄糖醛酸)胞嘧啶的 ¹³C-NMR
(水解物 A 的 ¹³C-NMR)

Table 2 ¹³C-NMR of 1-(4-Deoxy-4-amino-β-D-pyranoglucuronic)-
cytosine (¹³C-NMR of hydrolyt A)

$\delta_c(\times 10^{-4})$	偶合峰形 (¹ J _{CH} Hz) Multiplify	归属 Assignment
52.1	D(150)	C _{1'} N-CH
70.3	D(150)	C _{2'} O-CH
71.9	强 D(150)	C _{3'} , C _{4'} O-CH
82.7	D(160)	C _{5'} O-CH
95.1	D(175)	C ₃ —CH C
143.8	D(170)	C ₄ —CH N
149.8	S	C ₂ C=O N N
158.2	Sd(^{2,3} J _{CH} 10)	C ₄
168.8	S	C ₁ —COOH

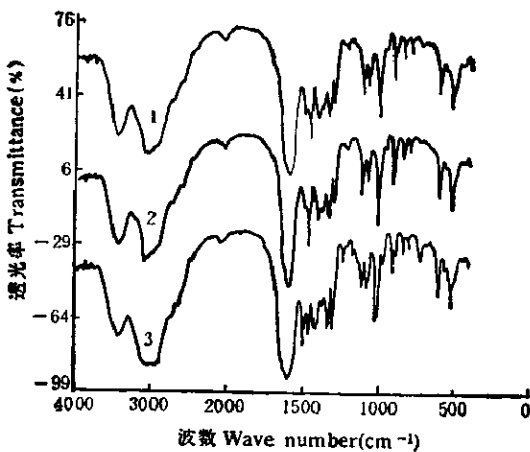
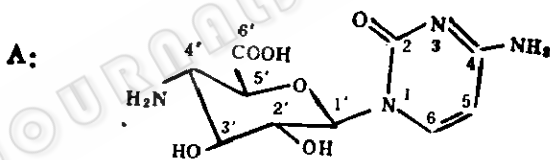


图 3 宁南霉素水解分离的丝氨酸(2)与标准 L-丝氨酸(1) D-丝氨酸(3)的 IR 对照
Fig. 3 Comparison of IR absorption spectra of isolated serine (2) from ningnamycin
hydrolyt B with standard L-serine (1) and D-serine (3)

$^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 以及 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 二维相关谱和 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 二维相关谱获得表 3 数据(表 3), 推定其结构为 B, 其中丝氨酸 C_2 质子位于 $\delta 4.58$ 的三重峰在氘代三氟乙酸中测

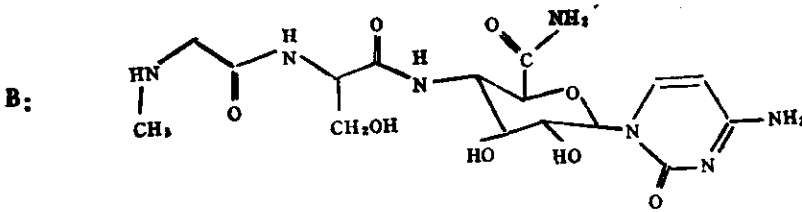


表 3 宁南霉素的 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$
Table 3 $^{13}\text{C-NMR}$ of $^1\text{H-NMR}$ of ningnanmycin

δ_{C} ($\times 10^{-4}$)	偶合峰形态 Amplify	$^1J_{\text{CH}}(\text{Hz})$	$^2,^3J_{\text{CH}}(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}}(\times 10^{-4})$ 及峰形	J_{HH} (Hz)	归 属 Assignment
173.7	S					肌氨酸酰基 sarcosine co
172.9	S					丝氨酸酰基 L-serine co
172.7	Sd		9.2			4-脱氧-4-氨基葡萄糖 6 位酰基 4.deoxy.4.amino. gluconvic co
166.7	Sd		9.3			胞嘧啶核 4 位碳 cytosine C_4
158.6	Sd		4.1			胞嘧啶核 2 位碳 cytosine C_2
142.7	D	183.1		7.82d	8	胞嘧啶核 6 位碳 cytosine C_6
98.0	D	175.5		6.15d	8	胞嘧啶核 5 位碳氢 cytosine C_5H
84.1	D	161.4		5.80d	10	氨基吡喃葡萄糖 1 位碳氢 amino pyranglucoconyl C_1H
76.8	Dd	151.0	6.2	4.22d	9	氨基吡喃葡萄糖 5 位碳氢 amino pyranglucoconyl C_5H
74.3	D	145.9		3.85m		氨基吡喃葡萄糖 2 位碳氢 amino pyranglucoconyl C_2H
72.2	D	146.5		3.85m		氨基吡喃葡萄糖 3 位碳氢 amino pyranglucoconyl C_3H
62.3	T	145.5		3.85m		丝氨酸 CH_2 semine CH_2
56.5	D	142.8		4.58t	6	丝氨酸 CH semine CH
54.3	D	144.8		4.15t	9	氨基吡喃葡萄糖 4 位碳氢 amino pyranglucoconyl C_4H
53.1	T	137.0		3.45s		肌氨酸 CH_2 sarcosine CH_2
35.2	Q	136.5		2.43s		肌氨酸 N- CH_2 sarcosine N- CH_2

注: S 和 s 单峰, D 和 d 二重峰, T 和 t 三重峰, Q 四重峰, m 多重峰, Sd 表示远距偶合二重峰的单峰, Dd 即远距偶合二重峰的二重峰。

定时其信号明显减弱, 与文献报道^[1]一致, 丝氨酸联结氨基葡萄糖 C_4 呈酰胺得到证实, 肌氨酸处于末端联结丝氨酸呈酰胺肽链, 可见宁南霉素与谷氏菌素的结构一致, 仅丝氨酸组成为光学异构体, 从而成为生物活性显著差异的新抗生素。

致谢 中国科学院成都生物研究所庄名扬同志曾参加谷氏菌素部分分离工作；德国波恩大学有机化学研究所 B. Breitmaier 教授代测各种核磁共振谱，并对此研究进行探讨，特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈昭蓉, 卢世珩, 向固西. 微生物学报, 1983, 24(4): 205~208.
- [2] 胡厚芝, 向固西, 易原惠, 等. 植物保护学报, 1987, 14(3): 191~196.
- [3] 朱建华, 胡厚芝, 向固西. 中国蔬菜, 1985, 3: 49~51.
- [4] 北京大学生物系化学教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1979.
- [5] Kanzaki T, Eiji H, Hikoichi Y *et al.* *J Antibiotics Ser A*, 1962, 15: 93~97.
- [6] 上海植物生理研究所微生物室农抗组. 微生物学报, 1975, 15(2): 101~109.
- [7] Iwasaki H. *Pharm J (Japan)*, 1962, 92(10): 1361~1365.
- [8] Lichtenthaler F W. *Tetrahedron Letters*. 1975, 9: 665~668.

A NEW AGRICULTURAL ANTIBIOTIC—NINGNANMYCIN

Xiang Guxi Hu Houzhi Chen Jiaren Chen Weixin
(Chengdu Biological Institute, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Wu Linsen

(Sichuan Institute of Antibiotics, Chengdu 610051)

Abstract A new antibiotic was isolated from fermentation broth of *Streptomyces noursei* var. *xichangensis* by cationic ion exchanger, macroporous weak cationic exchanger and neutral aluminium oxide column chromatographies and purified by high performance liquid chromatography. Its molecular weight was determined by FDMS as 444(M + 1). The formula $C_{16}H_{23}N_7O_8$ was based on the results of the elemental analysis. The structure was elucidated by means of UV-, IR-, 1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, 1HH -COSY-, ^{13}CH -COSY, ^{13}CH -COLOC-, and MS spectra to give B. However it does not identified with gougerotin or qinfengmycin, compared with their Rf value on paper chromatogram and biological activities. It shows intensive effect to *Xanthomonas campestris* pv., *Erysiphe graminis*, *Erysiphe cichoracearum*. From its hydrolyt it was isolated and identified as 1(4-amino-4-deoxy β -D-glucuronyl) cystosine, L-serine, sarcosine and NH₄Cl. Therefore, the new agricultural antibiotic Ningnanmycin belongs to a cystosine nucleotide antibiotic structural same as gougerotin but isomer to gougerotin, the latter is different by D-serine only.

Key words New agricultural antibiotic, Cystosine nucleotide type, Ningnanmycin, Chemical structure