

· 研究论文 ·

苦皮藤素在水体中的稳定性及水解产物结构研究

刘 伟^{1,2}, 姬志勤¹, 魏少鹏¹, 吴文君^{*1}

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省农药管理检定所, 西安 710003)

摘 要:采用高效液相色谱及高效液相色谱-电喷雾多级质谱技术(HPLC-ESI/MS/MS),研究了植物源杀虫活性成分苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28 及 NW 53 在不同水体中的稳定性及苦皮藤素 V 在碱性水体中的水解产物。54℃ ±1℃ 贮存 24 h,在 pH 值为 4 的水体中,苦皮藤素 V、苦皮藤素 I 及 NW 53 比较稳定,而 NW 28 稳定性较差,其水解率依次为 5.03%、4.15%、6.60% 及 19.75%;在 pH 为 7 的水体中,苦皮藤素 V 比较稳定,水解率为 6.43%,苦皮藤素 I、NW 28 及 NW 53 稳定性较差,水解率分别为 12.5%、12.3% 及 50.55%;在 pH 为 10 的水体中,苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28 及 NW 53 极易水解,水解率依次为 71.53%、84.55%、77.68% 及 99.30%。苦皮藤素 V 在碱性水体中的主要水解产物为一系列在其 C-1、C-2、C-8 及 C-9 位发生酯键水解而形成的 3 羟基、4 羟基或 5 羟基的二氢沉香呋喃多元酯。

关键词:苦皮藤素;稳定性;水解产物;高效液相色谱-电喷雾多级质谱

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.03.009

中图分类号: S482.39; O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)02-0335-06

Studies on the Stability of Celangulins in Water and the Structures of the Hydrolysates

LIU Wei^{1,2}, JI Zhi-qin¹, WEI Shao-peng¹, WU Wen-jun^{*1}

(1. Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;

2. Institute for the Control of Agrochemicals, Xi'an 710003, China)

Abstract: The stability of the botanical insecticidal components Celangulin V, Celangulin I, NW 28 and NW 53 in three buffer solutions with different pH values at 54℃ ±1℃ for 24h was studied by high performance liquid chromatography. Celangulin V, Celangulin I and NW 53 were more stable in pH 4 buffer solution, while NW 28 was less stable, the hydrolysis rates of them were 5.03%, 4.15%, 6.60% and 19.75%, respectively. The stability of four tested compounds in pH 7 buffer solution exhibited similar trend with that of above mentioned, and their hydrolysis rates were 6.43%, 12.50%, 12.03% and 50.55%, respectively. Whereas in pH 10 buffer solution, all tested components were hydrolyzed easily, and their hydrolysis rates were 71.53%, 84.55%, 77.68% and 99.30%, respectively. The hydrolysates of Celangulin V were also investigated by means of HPLC-ESI/MS/MS. The results showed that the main hydrolysates were produced from the break of various ester bonds substituted at C-1, C-2, C-8 and C-9 of the β -dihydroagrofuran sesquiterpene skeleton, in which the structures of five compounds were deduced by their MS/MS spectra.

收稿日期: 2009-03-25; 修回日期: 2009-05-29.

作者简介:刘伟(1977-),男,河南淮滨人,博士研究生,从事农药质量、残留的检测与管理工作,联系电话: 029-87310136; E-mail: liuweib7310136@126.com; *通讯作者(Author for correspondence):吴文君(1945-),男,四川洪雅人,教授,博士生导师,主要从事农药学研究. 联系电话: 029-87093987; E-mail: wuwenjun_1@163.com

Key words celangulins; stability; hydrolysates; HPLC-ESI/MS/MS

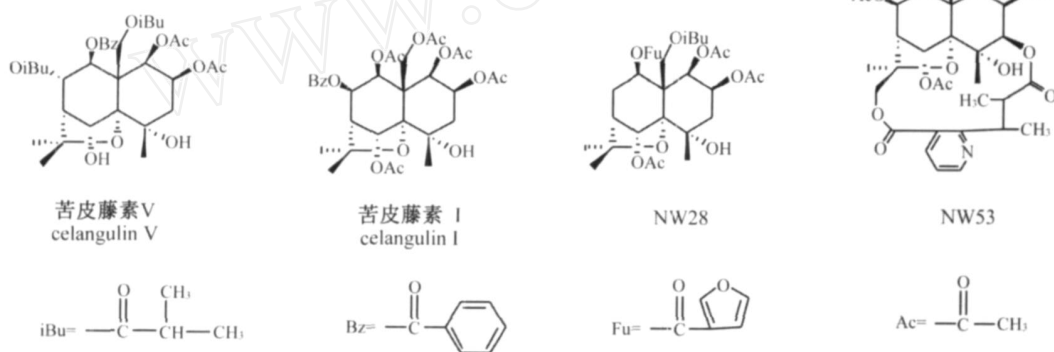
苦皮藤 *Celastrus angulatus* 是我国著名的杀虫植物^[1],其杀虫有效成分苦皮藤素为一系列二氢沉香呋喃多元醇(酯)类化合物^[2~5]。笔者等以苦皮藤提取物为原料,已研制成功 0.2%苦皮藤素乳油,并于 2000 年获农药临时登记,投入批量生产,产生了一定的经济效益和环境生态效益。虽然苦皮藤素本身对非靶标生物及环境相当安全^[6,7],但由于其乳油中含有占制剂质量分数约 70%的甲苯,对环境不安全,因此最好是将苦皮藤提取物加工成微乳剂或水乳剂。水基化制剂的一个重要问题是有效成分在水体中的稳定性^[8]。鉴于苦皮藤素在含水介质中的稳定性尚未见文献报道,笔者选择苦皮藤素 V 及其他 3 个具有不同结构特点的

活性成分,研究了其在不同 pH 水体中的水解速率,并采用高效液相色谱-电喷雾多级质谱(HPLC-ESI/MS/MS)技术对苦皮藤素 V 的碱性水解产物结构进行了初步研究,以期对苦皮藤素水基化制剂的剂型加工及质量指标制定提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 化合物 苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28、NW 53,其结构式如下所示,化合物纯度均在 98%以上,由西北农林科技大学农药研究所自苦皮藤根皮中分离得到。



1.1.2 缓冲液 pH 为 4 的乙酸乙酸钠 (0.2 mol/L), pH 为 7 的磷酸氢二钠 磷酸二氢钠 (0.2 mol/L), pH 为 10 的甘氨酸氢氧化钠 (0.2 mol/L)。配制方法参见文献[9]。

1.1.3 仪器和试剂 Finnigan LCQ Advantage MAX 液质联用仪,具二极管阵列检测器,电喷雾离子源和离子阱质量分析器; Hypersil GOLD C₁₈ 反相色谱柱;甲醇、乙腈为色谱纯,美国 Tedia 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 供试化合物在不同 pH 水体中的水解速率测定 称取苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28 及 NW 53 各 10.0 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL (各组份的质量浓度均为 400 μg/mL),即为苦皮藤素混合标准溶液。取该混合标准溶液 40 μL 置于 4 mL 具塞离心管中,分别加入 3.96 mL pH 值为 4、7、10 的缓冲液,密封后浸入 54℃ ± 1℃ 水浴

中,热贮一定时间后采用高效液相色谱-紫外光谱法对各化合物进行定性、定量分析,计算各化合物的水解率。

液相色谱条件: Hypersil GOLD C₁₈ 反相色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm),流动相:乙腈:水 = 62:38 (体积比),流速 0.2 mL/min,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。

1.2.2 苦皮藤素 V 的水解产物研究 取 400 μg/mL 的苦皮藤素 V 甲醇溶液 40 μL 置于具塞离心管中,加入 3.96 mL pH 为 10 的缓冲液,密封后浸入 54℃ ± 1℃ 水浴中热贮 24 h,对其水解产物进行 HPLC-ESI/MS/MS 定性分析。色谱条件同 1.2.1 节。

质谱分析条件:离子化方式 (ESI, 正离子模式);二级质谱数据采集采用 data-dependent 模式,源内诱导碰撞能量 35%,离子宽度 2.0;电离电压 4.5 kV;鞘气流速 45 arb,辅助气流速 10 arb;离子

传输管温度 350℃。

2 结果与分析

2.1 分析方法的建立

2.1.1 线性关系 准确配制浓度为 20、10、5、2.5、1.25及 0.625 $\mu\text{g/mL}$ 的苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28及 NW 53混合标准溶液,按前述色谱条件进行测定,考察峰面积与进样量之间的线性关系。混合标样溶液浓度为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 时的典型色谱图见图 1。4个化合物在该浓度范围内均有良好的线性关系,其线性方程依次为 $Y = 26\,715x + 870.73$, $r = 0.998\,7$; $Y = 19\,493x + 2\,471.2$, $r = 0.999\,3$; $Y = 6\,023.7x + 992.16$, $r = 0.998\,0$; $Y = 18\,790x + 1\,629.5$, $r = 0.997\,4$ 。

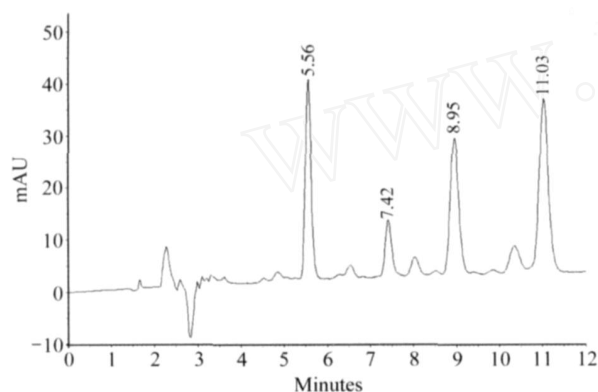


图 1 混合标样的色谱图

Fig 1 Chromatogram of the mixed standards
苦皮藤素 I celangulin I (RT=5.56 min), NW 53 (RT=7.42 min),
NW 28 (RT=8.95 min), 苦皮藤素 V celangulin V (RT=11.03 min)

2.1.2 方法的准确性、精密度和灵敏度 在添加水平分别为 0.4和 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,苦皮藤素 V、苦皮藤素 I、NW 28及 NW 53在不同 pH 体系中的平均回收率分别为 98.5%~103.0%、99.8%~102.0%、99.3%~102.5%和 99.0%~101.2%,相对标准偏差 (RSD, $n=5$) 分别为 2.8%~5.6%、2.9%~4.6%、1.8%~3.4%和 2.6%~5.2%。以添加回收中各化合物的峰面积信噪比 ≥ 3 为检测限,则各化合物的检测限均为 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 。表明所建立的 HPLC 方法可满足不同水体中 4个苦皮藤素化合物含量分析的要求。

2.2 苦皮藤素化合物在不同 pH 值水体中的稳定性

在 pH 为 4的酸性水体中,于 54℃ $\pm 1^\circ\text{C}$ 贮存

24 h,苦皮藤素 V、苦皮藤素 I及 NW 53均比较稳定,其水解率依次为 5.03%、4.15%和 6.60%,而 NW 28的稳定性较差,水解率为 19.25%。

在 pH 为 7的中性水体中,于 54℃ $\pm 1^\circ\text{C}$ 贮存 24 h,苦皮藤素 V 的水解率为 6.43%,苦皮藤素 I 及 NW 28的水解率分别为 12.50%和 12.03%,而 NW 53稳定性很差,水解率高达 50.55%。

在 pH 为 10的碱性水体中,于 54℃ $\pm 1^\circ\text{C}$ 贮存 24 h,4个化合物均发生了很大程度的水解,其水解动态曲线见图 2。其中 NW 53稳定性最差,2 h 的水解率即达到 96.43%,苦皮藤素 V 最为稳定,但 24 h 的水解率也达 65.05%。

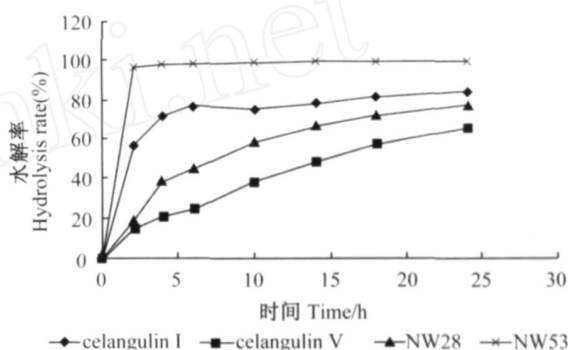


图 2 四个苦皮藤素类化合物在 pH 为 10 的水体中的水解动态曲线

Fig 2 Hydrolysis dynamics of four celangulins
in pH 10 buffer solution

2.3 HPLC-ESI/MS/MS 方法研究苦皮藤素 V 的水解产物 苦皮藤的主要有效成分为苦皮藤素类化合物,而其中又以苦皮藤素 V 含量较高,活性最好,为此笔者选择苦皮藤素 V 为代表来研究苦皮藤素类化合物在水体中的水解产物分布及其结构。鉴于苦皮藤素 V 在 pH 4和 pH 7条件下水解率较低,而在 pH 10条件下水解率较高,因此重点研究了碱性条件下苦皮藤素 V 的水解产物。苦皮藤素 V 在 pH 为 10的缓冲溶液中水解 24 h 后进行液质联用分析,其紫外光谱色谱图 (a) 和质谱总离子流图 (b) 见图 3。紫外光谱色谱图中保留时间 (RT) 为 11.05 min 的色谱峰为苦皮藤素 V, RT 在 2.00~7.00 min 之间的色谱峰为水解产物,由于酯键水解后导致极性增大,因此保留时间均明显小于苦皮藤素 V。通过对 MS 以及 MS/MS 的数据进行分析,可以对各产物的结构进行初步推测。

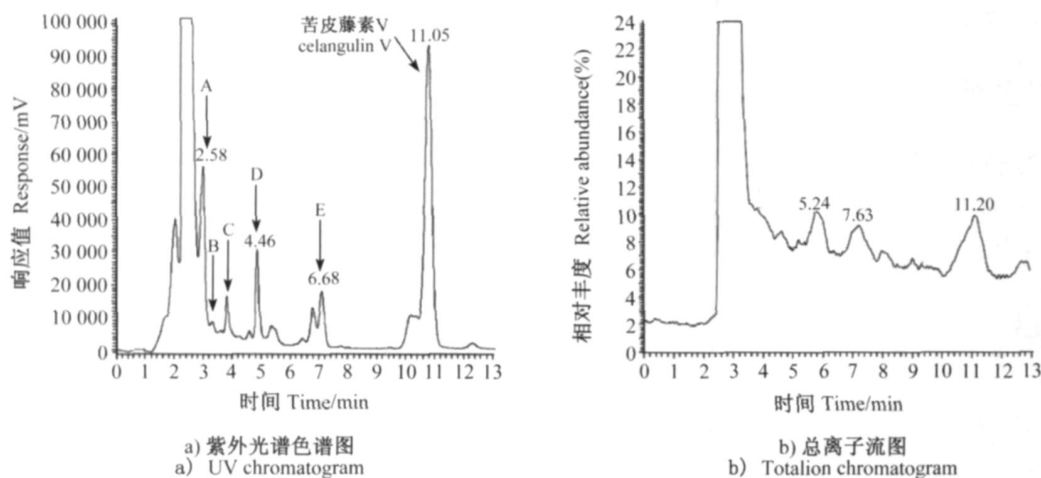


图 3 苦皮藤素 V 在碱性条件下水解的液-质联用分析谱图

Fig 3 Chromatograms analyzed by HPLC-UV-ESI-MS/MS of celangulin V in pH 10 buffer solution

苦皮藤素 V 为二氢沉香呋喃骨架的多元酯类化合物, C1 和 C2 的羟基质子被乙酰基取代, C8 和 C13 的羟基质子被异丁酰基取代, C9 的羟基质子被苯甲酰基取代, 在一级质谱图中可观察到的准分子离子峰主要为 $[M + Na]^+$, m/z 685。质谱总离子流图中, 从 RT 为 2.00~3.42 min 的馏分质谱图中可以观察到的准分子离子峰有 m/z 539 (A)、531 (B) 以及 497 (C); 从 RT 为 4.40~5.40 min 的馏分质谱图中可以观察到的准分子离子峰为 m/z 601 (D); RT 为 6.37 和 6.68 的馏分质谱图中可以观察到的准分子离子峰为 m/z 643 (E)。

水解产物 C 的准分子离子峰 $[M + Na]^+$ 为 m/z 497, 比苦皮藤素 V 的准分子离子峰 $[M + Na]^+$ m/z 685 小 188 Da, 推测其可能是该分子脱去一分子苯甲酰基 (-104 Da) 和两分子乙酰基 (-42 Da $\times$ 2) 后的水解产物。以水解产物 C 的加钠准分子离子峰 (m/z 497) 为母离子进行 MS/MS 分析, 在 35% 能量的轰击下所产生的 CID 谱图见图 4。从中可以看出, 其产生的子离子主要有: m/z 449、413 和 409。 m/z 409 比母离子小 88 Da, 对应于分子中脱去一分子异丁酰基 (-70 Da) 和一分子水 (-18 Da)。 m/z 449 离子的形成机理比较复杂, 推测其可能经历了如图 5 所示的一个重排过程, 4 位叔羟基质子化后脱去一分子水 (-18 Da)。C1-C2 键断裂形成两个醛基, C2 位再发生中性丢失脱去一分子甲醛, 形成了图 5 所示的 m/z 449 离子, 该片段中再脱去两分子的水, 又产生 m/z 413 离子。至此, 该化合物二级质谱图中的主要离子

均得以合理的解释, 从而推测水解产物 C 的结构应该是: 8 α , 13-二异丁酰氧基-1 β , 2 β , 4 α , 6 α , 9 β -五羟基- β -二氢沉香呋喃。

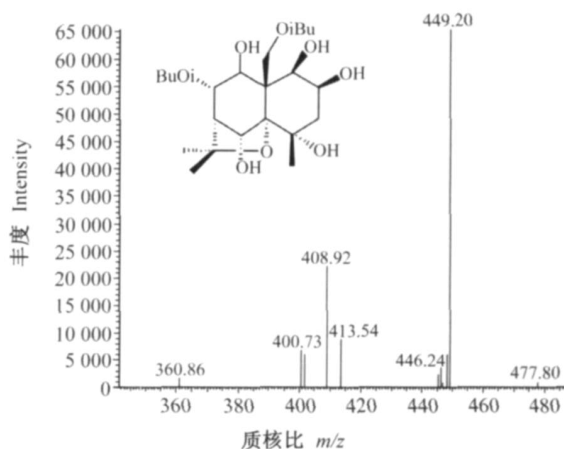


图 4 水解产物 C 的碰撞诱导裂解质谱图

Fig 4 Collision induced disoociation (CID) spectrum of hydrolysate C

根据同样的方法, 初步推测水解产物 A、B、D 及 E 的结构式如图 6 所示。

3 讨论

本研究的目的是掌握杀虫植物苦皮藤主要有效成分苦皮藤素 V 及类似化合物在水体中的水解动态, 为苦皮藤素水基制剂的研发及其质量标准的制定提供依据。水基制剂中, 有效成分的稳定性是主要的质量指标。目前我国农药制剂热贮稳定性是检测制剂在 54 $^{\circ}\text{C}$ $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存 14 d 后

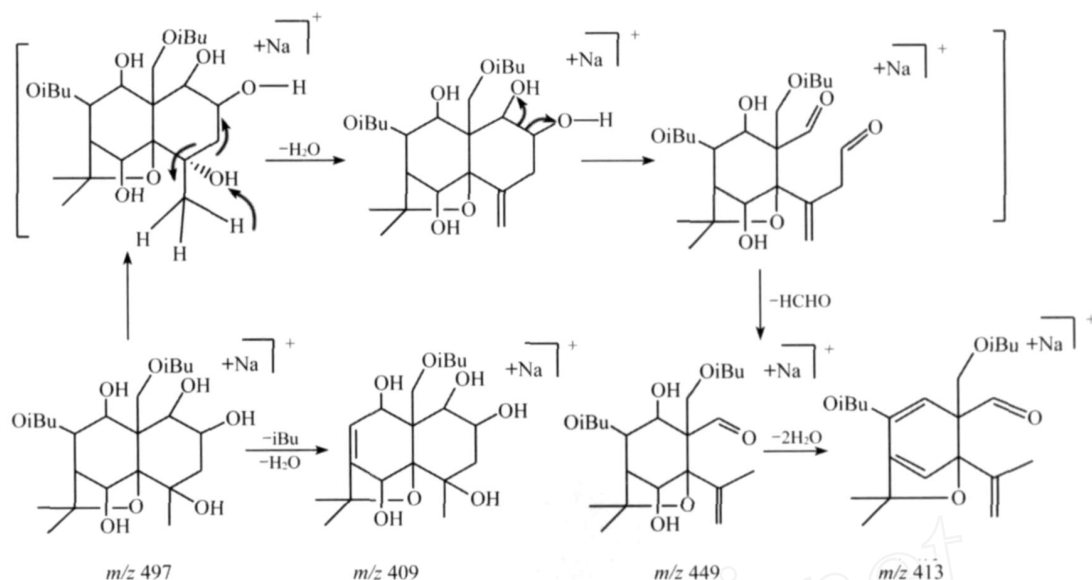


图5 水解产物 C 的特征碎片形成机制

Fig. 5 Proposed pathway of the characteristic fragments of hydrolysate C

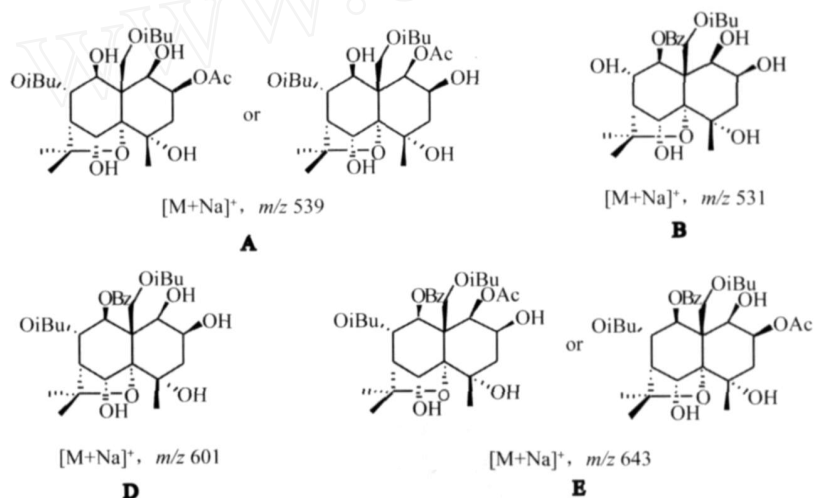


图6 水解产物 A、B、D、E 的结构式

Fig. 6 Structures of the hydrolysate A, B, D, E

有效成分的分解率^[9],因此,本研究中,其水解温度均设为 54℃ ± 1℃。

比较苦皮藤素 V 及其他 3 个类似物在水体中的稳定性,可以看出苦皮藤素 V 是最稳定的。这一特性可能和苦皮藤素 V 分子中 C-6 位羟基未被酯化有关。有研究资料表明,由于 C-6 位独特的空间结构,在碱性介质中 C-6 位酯键最易受攻击而断裂^[10]。目前已从苦皮藤根皮提取物中分离鉴定出近 60 个二氢沉香呋喃多元醇(酯)类化合物,大多数都有一定的杀虫活性。本研究选用的 4 个

化合物涵盖了苦皮藤提取物中 4 种结构类型。在以粗提物加工的制剂中,虽然苦皮藤素 V 是“主成分”,但其他类似化合物亦有生物活性。4 个化合物在水体中的水解动态表明,苦皮藤素 V 和其他 3 个化合物在 pH 为 4 和 pH 为 7 的水体中的稳定性仍有较大差别。在 pH 为 4 的水体中, NW 28 的水解率为 19.25%;在 pH 为 7 的水体中, NW 53 的 24 h 水解率为 50.55%。因此,若要将苦皮藤提取物加工成微乳剂或水乳剂,必须将其 pH 值严格控制在 5~6 左右,以保证其主要活性成分的稳定性

符合我国农药登记规定的质量指标。

采用 MS 及 MS/MS 对苦皮藤素 V 碱性水解后 5 个主要产物的结构进行分析,发现水解产物都是由 1~3 个酯键的局部水解而形成的,而且水解均发生在 C-1、C-2、C-8 或 C-9 位,未发现 C-13 酯键的水解,也没有发现 7 羟基(全水解)的水解产物。笔者采用同样的方法分析了苦皮藤素 V 在 54℃ ± 1℃ 下保温 14 d 的水解产物,也未检测到 7-羟基水解产物,其原因尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] HUANG Rui-lun (黄瑞纶). Insecticidal Pharmacy (杀虫药剂学) [M]. Beijing (北京): Financial & Economic Publishing House (财政经济出版社), 1956: 539-540.
- [2] WU Wen-jun (吴文君). From Natural Products to the Development of New Pesticides—Principles & Methods (从天然产物到新农药创制——原理·方法) [M]. Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2006: 242-291.
- [3] GAO J M, WU W J, ZHANG J W, et al The Dihydro- β -agarofuran Sesquiterpenoids [J]. Nat Prod Rep, 2007, 24: 1153-1189.
- [4] WANG M A, WU W J, ZHU J B, et al Two New Insecticidal Sesquiterpene Polyol Esters from *Celastrus angulatus* [J]. Nat Prod Res, 2006, 20: 653-658.
- [5] WU Wen-jun (吴文君), LIU Hui-xia (刘惠霞), ZHU Jing-bo (朱靖博). 杀虫天然产物苦皮藤 II, III, IV 的结构鉴定 [J]. Pesticides (农药), 1993, 3: 8-10.
- [6] QI Zhi-jun (祁志军), HU Zhao-nong (胡兆农), SHI Chun-xi (时春喜), et al 0.2% 苦皮藤素乳油对非靶标生物的影响 [J]. J Northwest Sci-tech Univ Agric Forest (Nat Sci Ed) (西北农林科技大学学报, 自然科学版), 2004, 32 (3): 73-76.
- [7] QI Zhi-jun (祁志军), JI Zhi-qin (姬志勤), QIN Bao-fu (秦宝福), et al 0.2% 苦皮藤素乳油在土壤中的吸附与降解 [J]. J Northwest Sci-tech Univ Agric Forest (Nat Sci Ed) (西北农林科技大学学报, 自然科学版), 2004, 32 (2): 31-34.
- [8] LIU Bu-lin (刘步林). Techniques of Pesticides Formulation, Second Edition (农药剂型加工技术, 第二版) [M]. Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2001: 409.
- [9] ZHANG Long-xiang (张龙翔). Biochemical Experimental Methods and Techniques, Second Edition (生化实验方法和技术, 第二版) [M]. Beijing (北京): High Education Press (高等教育出版社), 1997: 461-465.
- [10] TU Y Q, WU D G, ZHOU J, et al Bioactive Sesquiterpene Polyol Esters from *Euonymus bungeanus* [J]. J Nat Prod, 1990, 53 (3): 603-608.

(Ed TANG J)

欢迎订阅 2010年《农药市场信息》

本刊特色: 权威·专业·丰富·实用

《农药市场信息》杂志是由中国农药工业协会主办的国内创刊最早的一份报道科技、经济、市场动态及农药应用知识等内容的大型农药(农资)专业类综合信息刊物。自 1986 年创刊以来,一直深受广大读者喜爱和欢迎,已成为农药生产企业、科研院所以及经营推广部门从事农药生产、科研开发、开拓市场的必备资料,也是农药(农资)行业中影响最大、发行量最多的刊物之一。本刊为《中国知识资源总库》和《中国期刊全文数据库》全文收录期刊。

本刊主要内容:重点宣传国家的政策法规;报道科技、经济、市场动态;反映农药行业热点及难点;评述农药行业现状及前景;探讨营销新理念、新模式;推广新产品、新技术、新成果;传播实用农业技术以及农作物病虫害防治的新经验、新方法;介绍农药知识及加工使用知识等;发布产品供求信息等。

本刊主要栏目有:开卷寄语、要闻快报、经贸动态、农药管理、本期专稿、焦点关注、热点时评、高端对话、农药论坛、营销策略、市场纵横、世界农药、科技与产品、专利技术、农药应用、植保资讯、病虫预报、咨询服务、休闲茶座、小资料等。

本刊自办发行,半月刊,全年 24 期,大 16 开本,约 80 页(含广告),从 2010 年开始本刊改为全铜版纸彩色印刷。本刊订阅费按两种标准执行:农药生产企业、科研院所、大专院校、大中型农资经销商为 300 元/年;农技植保部门、基层农资零售商、广大农民等按 200 元/年的优惠标准订阅。

本刊已成为国内外著名农药企业进行广告宣传的首选媒体,欢迎新老客户广告惠顾!

地 址:江苏南通市姚港路 35 号《农药市场信息》编辑部

联系人:顾旭东 杨友情

邮 编:226006

电 话:0513-83511907(兼传真); 83558239; 13706298456

E-mail: nyxx@info.net.cn