

◆ 研究与开发 ◆

7.5%多杀霉素悬浮剂的制备与分析

王娟¹, 张莎莎¹, 张保华¹, 李建忠¹, 梁生康², 孔祥平^{1*}

(1. 青岛农业大学 化学与药学院, 山东青岛 266109 2. 中国海洋大学 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东青岛 266100)

摘要:采用湿法研磨工艺, 单因素优选法结合正交试验优化7.5%多杀霉素悬浮剂的制备条件, 并采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法对热贮14 d产品进行质量检测。结果表明:以槐糖脂水溶液(200 mg/L)为分散介质, 悬浮剂最优制备条件为Well-301和Well-303(质量比2:1)用量6.0%, 黄原胶用量0.25%, 尿素用量4.5%, 研磨时间2.0 h。热贮后有效成分组成和质量分数均保持不变, 符合悬浮剂的要求。HPLC-MS法适用于多杀霉素类多组分混合物制剂的质量检测。

关键词:多杀霉素; 悬浮剂; 槐糖脂; 高效液相色谱-质谱; 制备

中图分类号:TQ 450.6; TQ 450.7 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2017.02.005

Preparation and Analysis of Spinosad 7.5% SC

WANG Juan¹, ZHANG Sha-sha¹, ZHANG Bao-hua¹, LI Jian-zhong¹, LIANG Sheng-kang², KONG Xiang-ping^{1*}

(1. College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China; 2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology of Ministry of Education, Ocean University of China, Shandong Qingdao 266100, China)

Abstract: The preparation conditions of spinosad 7.5% SC were optimized by single-factor test and orthogonal experiment using the wet grinding method. The stability of the product after heat storage for 14 d was determined by HPLC-MS. The results showed that the optimal preparation conditions were well-301 and well-303 (mass ratio 2:1) 6.0%, xanthan gum 0.25%, urea 4.5% and a milling time of 2.0 h with sophorolipids aqueous solution (200 mg/L) as the dispersing medium. The composition and content of the active ingredients in the obtained product unchanged after heat storage for 14 d, and the prepared product met the requirements of SC. The HPLC-MS method may be suitable for the quality detection of multi-component pesticide formulations such as the spinosad SC.

Key words: spinosad; SC; sophorolipid; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; preparation

在前文^[1]对多杀霉素悬浮剂(SC)的润湿分散剂进行筛选中发现, 分散剂Well-301和Well-303效果较好。表面活性剂复配常具有协同增效作用, 可以弥补单一表面活性剂性能上的缺陷, 减少表面活性剂的用量, 降低成本, 增加效能^[2]。Well-301和Well-303分别为聚羧酸盐类和有机磷酸酯类分散剂, 二者复配有望应用于多杀霉素SC, 但尚未见相

关报道。

本工作以粒径和稳定性为考察指标, 采用单因素实验确定Well-301和Well-303的复配比例, 并进一步通过正交试验优化7.5%多杀霉素悬浮剂的制备条件。在此基础上, 采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法对热贮14 d后的7.5%多杀霉素SC产品进行质量检测。

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 国家自然科学基金(31501682); 山东省自然科学基金(ZR2014EL012, ZR2014CM039); 青岛市应用基础研究计划项目(15-9-1-16-jch); 青岛农业大学高层次人才科研基金(6631115037); 青岛农业大学大学生科技创新基金

作者简介: 王娟(1980—)女, 山东省胶州市人, 博士, 主要从事控释材料、计算化学研究。E-mail: juaner80@163.com

通讯作者: 孔祥平(1977—)男, 山东省曲阜市人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事甲壳素化学和控释材料研究。E-mail: kxp2004@163.com

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

多杀霉素(90%) 美国陶氏益农公司 ;Well-301、Well-303, 福建南平威尔生化科技有限公司; 槐糖脂, 由中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室提供; 黄原胶(BR) ;甲醇、乙腈(色谱纯) 美国Merck公司 ;尿素(AR) 莱阳市康德化工有限公司 ;屈臣氏蒸馏水。

ISSMJ0.1-1型立式砂磨机, 沈阳化工研究院有限公司 ;B9300H型激光粒度分布仪, 丹东百特仪器有限公司 ;液相色谱-质谱联用系统 :Agilent 6460质谱仪配Agilent 1290液相色谱仪, Agilent EP C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) ;XW-80A微型涡旋混合仪, 上海沪西分析仪器厂 ;KQ5200DE数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司 ;TDL-4型低速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂 ;PV 215CD电子分析天平(精确至0.01 mg) 美国奥豪斯公司 ;DHG-9076A型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司 ;Eppendorf移液器(100 μL、1 mL)。

1.2 实验方法

1.2.1 润湿分散剂的选择

实验方法参见文献[1], 固定多杀霉素质量分数为2.5%, 分散剂用量为6.0%, 改变分散剂的种类, 以蒸馏水为分散介质, 研磨1.5 h, 锆珠($d=1.2$ mm)体积为制剂体积的2倍, 以热贮14 d后悬浮剂粒径为考察指标, 选择多杀霉素的单一分散剂。

1.2.2 多杀霉素SC的制备

固定多杀霉素质量分数为7.5%, 分散剂质量分数为6.0%, 改变分散剂Well-301和Well-303的配比, 以热贮14 d和冷贮14 d后悬浮剂的粒径、絮凝现象和析水率为考察指标, 确定Well-301和Well-303的配比。固定分散剂的配比, 以热贮14 d后悬浮剂的 D_{90} 值为考察指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化7.5%多杀霉素SC的研磨时间、润湿分散剂、增稠剂(黄原胶)和防冻剂(尿素)的用量, 具体因素、水平见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A(分散剂)/%	B(研磨时间)/h	C(黄原胶)/%	D(尿素)/%
1	4.0	1.0	0.20	4.0
2	6.0	1.5	0.25	4.5
3	8.0	2.0	0.30	5.0

1.2.3 多杀霉素SC产品分析

采用HPLC-MS法^[3-4]分析热贮14 d后7.5%多杀

霉素SC产品。色谱条件 流动相为乙腈水溶液, 进样量10 μL ;柱温25℃ ;检测波长250 nm ;流速0.3 mL/min 梯度洗脱程序 0~9 min, 10%~90%乙腈水溶液 ;9.01~12 min, 90%乙腈水溶液 ;12.01~15 min, 10%乙腈水溶液。质谱条件 :电喷雾正离子(ESI⁺)全扫描 ;干燥气温度350℃ ;干燥气流速10 L/min ;雾化气压力0.28 MPa ;扫描范围(m/z)600~900 ;扫描时间500 ms ;加速电压130 V。

将热贮14 d后的7.5%多杀霉素SC产品离心、干燥后, 称取10 mg样品(精确至0.01 mg), 用甲醇溶解、定容至10 mL容量瓶中, 0.2 μm滤膜过滤, 收集滤液。采用逐级稀释法, 将滤液用乙腈+水混合液(体积比3:7)稀释至1 000倍, 待测定。

2 结果与分析

2.1 润湿分散剂筛选结果

润湿分散剂对多杀霉素SC粒径的影响见表2。可以看出, 当分散剂为Well-301和Well-303时, 热贮[(54±2)℃]14 d后悬浮剂粒径(D_{50} 值<5 μm、 D_{90} 值<10 μm)符合悬浮剂的要求。Well-301和Well-303分别为聚羧酸盐类和有机磷酸酯类分散剂, 将二者复配以期获得更好的效果。

表2 单一润湿分散剂的筛选

润湿分散剂	D_{50} 值/μm	D_{90} 值/μm	跨距
D-425	6.73	16.17	2.13
SC-303	66.17	109.26	1.15
Well-301	3.55	8.31	1.99
Well-303	3.05	6.87	1.97

2.2 Well-301和Well-303配比确定

分散剂Well-301和Well-303对比对7.5%多杀霉素SC的影响见表3。可以看出, 由于未加黏度调节剂, 析水率均较高。以槐糖脂水溶液(200 mg/L)为分散介质多杀霉素SC的粒径大多小于以蒸馏水为介质的SC, 且析水率也相对较低。说明槐糖脂对多杀霉素产生了良好的助分散作用, 进一步证实了我们前期的研究结果^[1]。当Well-301与Well-303质量比为2:1时, 无论是以蒸馏水还是以槐糖脂水溶液为分散介质, 多杀霉素SC均无絮凝现象, 而且粒径均较小, 析水率相对较低。说明以该配比复配2种分散剂的协同作用强、效果好。以该配比复配时, 以槐糖脂水溶液为分散介质悬浮液的析水率远小于以蒸馏水为分散介质悬浮液析水率。因此, 7.5%多杀霉素SC以槐糖脂水溶液为分散介质, 分散剂Well-301与Well-303的质量比为2:1。

表 3 分散剂 Well-301 和 Well-303 的对比对 7.5%多杀霉素 SC 的影响

$m(\text{Well-301}) :$ $m(\text{Well-303})$	分散介质	热贮 $[(54 \pm 2)^\circ\text{C}]$ 14 d					冷贮 $[(0 \pm 2)^\circ\text{C}]$ 14 d				
		D_{50} 值/ μm	D_{90} 值/ μm	跨距	絮凝现象	析水率/%	D_{50} 值/ μm	D_{90} 值/ μm	跨距	絮凝现象	析水率/%
1 : 5	蒸馏水	3.58	9.64	2.35	有	94	2.30	6.62	2.67	有	90
	槐糖脂水溶液	3.06	9.38	2.88	有	89	2.30	5.36	2.06	有	80
1 : 2	蒸馏水	3.84	9.52	2.27	无	89	2.52	5.72	2.11	有	90
	槐糖脂水溶液	3.40	8.94	2.40	无	82	2.14	5.64	2.40	无	84
1 : 1	蒸馏水	2.74	8.27	2.74	无	77	2.44	5.43	2.06	无	80
	槐糖脂水溶液	2.77	7.69	2.56	无	70	2.29	5.04	2.04	无	78
2 : 1	蒸馏水	2.72	7.71	2.52	无	64	1.69	4.70	2.38	无	66
	槐糖脂水溶液	2.48	5.36	1.85	无	45	1.33	3.17	2.11	无	41
5 : 1	蒸馏水	3.59	8.38	2.00	有	77	2.15	4.85	2.11	有	72
	槐糖脂水溶液	2.68	5.78	1.92	无	61	1.78	3.89	1.97	有	63

2.3 多杀霉素SC配方及工艺确定

以槐糖脂水溶液为分散介质 ,固定分散剂 Well-301与 Well-303的质量比为2 : 1 ,正交试验结果见表4。

表 4 正交试验结果

试验号	因素				试验方案	D_{50} 值/ μm
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	$A_1B_1C_1D_1$	8.68
2	1	2	2	2	$A_1B_2C_2D_2$	6.59
3	1	3	3	3	$A_1B_3C_3D_3$	5.77
4	2	1	2	3	$A_2B_1C_2D_3$	6.00
5	2	2	3	1	$A_2B_2C_3D_1$	5.59
6	2	3	1	2	$A_2B_3C_1D_2$	5.08
7	3	1	3	2	$A_3B_1C_3D_2$	5.74
8	3	2	1	3	$A_3B_2C_2D_3$	5.65
9	3	3	2	1	$A_3B_3C_2D_1$	4.63
K_1	21.04	20.42	19.41	18.90		
K_2	16.67	17.83	17.22	17.41		
K_3	16.02	15.48	17.10	17.42		
R	5.02	4.94	2.31	1.49		

由表可以看出 :影响7.5%多杀霉素SC稳定性的主要因素为A(分散剂用量)和B(研磨时间) ,C(黄原胶用量)次之 ,D(尿素用量)影响最小 ,最佳组合为 $A_3B_3C_3D_2$ 。对于因素A , K_2 与 K_3 相差较小(相对于 K_1 与 K_2 的差值) ,说明分散剂用量从6.0%增加到8.0%对多杀霉素SC稳定性的影响较小 ,因而从降低制剂成本的角度考虑 ,因素A取 A_2 。根据因素B的 K 值可知 ,随着研磨时间的增加 ,多杀霉素SC的粒径逐渐减小 ,稳定性逐渐增强 ,研磨时间为2 h时 ,粒径已符合悬浮剂的要求 ,从节约能源的角度考虑 ,无需增加研磨时间 ,因素B取 B_3 。因素C为次要因素 ,其 K_2 和 K_3 相差较小 ,因素C可取 C_2 。因此 ,最优组合为 $A_2B_3C_2D_2$,即分散剂用量为6.0% ,黄原胶用量为0.25% ,尿素用量为4.5% ,研磨时间为2.0 h(锆珠体积为制剂体积的2

倍)。该方案制得的7.5%多杀霉素SC外观呈乳白色 ,热贮14 d后 D_{50} 值、 D_{90} 值、跨距和析水率分别为1.91 μm 、4.87 μm 、2.31和9% ,无沉淀和絮凝现象 ,分散性和倾倒性好 ,基本符合悬浮剂的要求。

2.4 产品分析

热贮14 d后7.5%多杀霉素SC产品的质谱图见图1。可以看出 ,准分子离子峰732.6和746.7对应的物质为产品的主要成分 ,分别为spinosyn A和spinosyn D^[3-4] ,说明热贮14 d后 ,产品的主要成分组成没变。

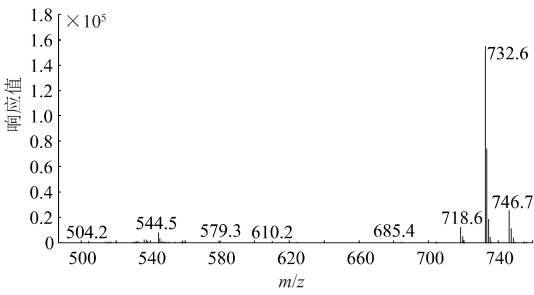


图 1 多杀霉素 SC 产品的质谱图

产品的高效液相色谱图见图2 ,峰1和峰2对应的物质为产品的主要成分 ,结合质谱图可知 ,峰1和峰2对应的物质分别为spinosyn A和spinosyn D ,按峰面积归一化法测得两者质量分数分别为77.8%和14.3% ,总质量分数为92.1%。由于忽略了质量分数很低 ,相对分子质量大于spinosyn D的成分 ,所以总质量分数略高于原药有效成分质量分数 (90%) ,说明有效成分没有发生降解 ,所制备悬浮剂合格。另外通过计算得出 ,有效成分中spinosyn A和spinosyn D分别占84.5%和15.5% ,与原药中spinosyn A和spinosyn D的表观比例(分别为85%和15%^[5-6])基本吻合 ,进一步说明产品有效成分质量分数没变 ,所制备悬浮剂合格。

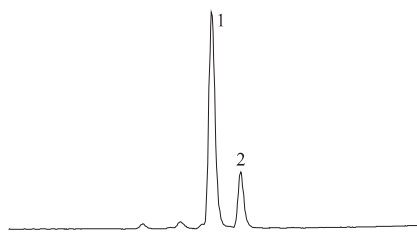


图 2 产品的高效液相色谱图

3 结论与讨论

以槐糖脂水溶液(200 mg/L)为分散介质,7.5%多杀霉素SC最佳制备条件为分散剂Well-301和Well-303(质量比2:1)用量6.0%,黄原胶0.25%,尿素4.5%,研磨时间2.0 h(铅珠体积为制剂体积的2倍)。所得产品外观呈乳白色(54 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 热贮14 d无沉淀和絮凝现象,产品粒径小,析水率低,分散性和倾倒性好,有效成分分解率低,符合悬浮剂的要求。

HPLC-MS分析法已广泛用于检测蔬菜、食品中多杀霉素的残留量^[3-4,7],但多杀霉素制剂的质量检测目前仍以高效液相色谱法为主^[8-9],HPLC-MS法应用较少。本研究采用HPLC-MS法对多杀霉素制剂进行了检测,利用MS灵敏度高、定性能力强的特点定性确定了产品的有效成分,利用HPLC分离多组分混合物高效和定量分析简便的特点定量确定了产品有效成分的质量分数,取得了良好的效果。随着HPLC-MS的普及,HPLC-MS法必将成为多杀霉素

类多组分混合物制剂质量检测的有效手段^[10]。

参考文献

- [1] 王娟,牛悦,张保华,等.槐糖脂为助剂的多杀霉素悬浮剂的润湿分散剂筛选[J].现代农药,2016,15(5):18-21.
- [2] 黄亚雄,张博,关策,等.阴离子、非离子表面活性剂的复配及在35%啮菌酯悬浮剂中的应用研究[J].现代农药,2016,15(3):15-19.
- [3] 孙敏,曹赵云,刘慧,等.PSA分散固相萃取和高效液相色谱-质谱法测定蔬菜中多杀霉素的残留[J].分析试验室,2010,29(8):70-74.
- [4] 张缙,杨黎忠,林立毅,等.高效液相色谱-串联质谱法测定食品中多杀霉素A和D的残留量[J].色谱,2011,29(7):637-642.
- [5] 吴霞.多杀菌素——害物综合治理的一个有力武器[J].世界农药,2005,27(6):21-24.
- [6] 华乃震.绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评[J].农药,2015,54(1):1-5.
- [7] 雷琪,于福利,王素琴,等.多杀霉素在花椰菜中的残留量分析与评价[J].农药,2016,55(5):374-376.
- [8] 王旭,于福利,雷琪,等.16%多杀·吡虫啉悬浮剂高效液相色谱分析方法研究[J].现代农药,2012,11(3):30-31,43.
- [9] 刘德坤,张翠,杨石有,等.多杀菌素·毒死蜱微球高效液相色谱分析[J].农药,2012,51(8):581-583.
- [10] 李姮,汪清民,黄润秋.多杀菌素的研究进展[J].农药学报,2003,5(2):1-12.

(责任编辑:顾林玲)

(上接第 16 页)

4 结果与讨论

本文简要阐述了三氟苯嘧啶的合成,并对其生物活性进行了研究。三氟苯嘧啶的制备以2-氨基吡啶和间三氟甲基苯乙酸为起始原料,经过6步反应制得,并通过核磁、质谱验证了其结构。此路线一步制得仲胺中间体,操作简便;以间三氟甲基苯乙酸制备取代丙二酸二甲酯,避免了偶联反应所需要的苛刻条件,条件温和、原料易得;取代丙二酸的制备,省去了引入大离去基团或者制备取代丙二酸二钾盐过程,简化反应步骤,适宜于实验室操作。对目标化合物进行的初步生物活性测定结果表明,该化合物对小菜蛾、黏虫和桃蚜均具有一定的防治效果,在100 mg/L剂量下对桃蚜的防效达到89.1%。本文对介离子类化合物的研究具有重要意义。

参考文献

- [1] Holyoke C W, Zhang W M, Pahutski T F, et al. Triflumezopyrim: Discovery and Optimization of a Mesoionic Insecticide for Rice [C] // Maiendisch P, Stevenson T M. Discovery and Synthesis of Crop Protection Products. Washington: DC Oxford University Press, 2015: 365-378.
- [2] Pahutski T F. Mesoionic Pyrido[1,2-a]pyrimidine Pesticides: WO, 2012092115 [P]. 2012-07-05.
- [3] Zhang W M, Annis G D. Malonic Acid Di-salts and a Method for Preparing Malonyl Dihalides: WO, 2013090547 [P]. 2013-06-20.
- [4] Zhang J Z, Ibrahim P N, Bremer R, et al. Compounds and Methods for Kinase Modulation, and Indications Therefor: WO, 2011057022 [P]. 2011-05-12.
- [5] Oliva A, De C G, Grams F, et al. Barbituric Acid Derivatives with Antimetastatic and Antitumor Activity: WO, 9858925 [P]. 1998-12-30.

(责任编辑:柏亚罗)