

IMI 及其微生物转化产物 5-hydroxy IMI 的 HPLC 分析

戴亦军,葛峰,陈婷,袁生

(南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 研究了烟碱类杀虫剂 IMI 及其微生物转化产物 5-hydroxy IMI 的反相高效液相色谱分析方法。采用 Zorbox OSD 反相柱,水和乙腈(75:25 v/v)为流动相,流速为 1 mL/min,检测波长为 269 nm,IMI 和 5-hydroxy IMI 得到较优分离。在 0.5 ~ 50 mg/L 的浓度范围内,两种物质的色谱峰面积和浓度之间呈线性关系,IMI 和 5-hydroxy IMI 的标准工作曲线分别为 $y = 112.23x - 1.7775$ 和 $y = 98.039x - 17.508$,相关系数为 0.9999 和 0.9997。转化产物的样品中 IMI 和 5-hydroxy IMI 添加的回收率分别为 99.3% 和 97.4%。

[关键词] 吡虫啉,5-羟基吡虫啉,微生物转化,HPLC 分析

[中图分类号] Q939.97, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)04-0083-03

HPLC Analysis of IMI and Its Microbial Transformation Product 5-Hydroxy IMI

Dai Yijun, Ge Feng, Chen Ting, Yuan Sheng

(School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract The neonicotinoid insecticide IMI and its microbial transformation product 5-hydroxy IMI were analyzed with reverse phase HPLC instrument. These two compounds were perfectly separated by using of Zorbox OSD reverse phase column, eluted with mobile phase containing 75% water and 25% acetonitrile (v/v), at flow rate of 1 mL/min and monitored at 269 nm. Within the range of 0.5 ~ 50 mg/L of concentration, the relationship between the area of peak and concentration was linear; the standard linearity curves of IMI and 5-hydroxy IMI were $y = 112.23x - 1.7775$ and $y = 98.039x - 17.508$ respectively; the relative coefficients were 0.9999 and 0.9997 respectively; the recovery coefficients in the biotransformation samples added with the known amount of IMI and 5-hydroxy IMI were 99.3% and 97.4% respectively.

Key words imidacloprid, 5-hydroxy imidacloprid, microbial transformation, HPLC analysis

吡虫啉(Imidacloprid, IMI)是拜尔公司开发的一种新型高效内吸烟碱类杀虫剂,其化学名称为 1-(6-氯-3-吡啶甲基)-N-硝基-咪唑啉-2-亚胺^[1]。目前,IMI 已经在 120 多个国家登记并在 140 多种作物上使用^[2]。Nauen 等人报道 IMI 的植物代谢产物之一 olefin IMI(图 1)对白飞虱的杀虫活性是 IMI 的 10 倍^[3],对桃蚜与棉蚜的杀虫活性是 IMI 的 16 倍^[4]。由于 olefin IMI 在光照下不稳定,而其前体 5-hydroxy IMI 稳定并可在酸性条件下转变为 olefin IMI^[4]。本实验室采用微生物转化法将 IMI 转化成 5-hydroxy IMI,5-hydroxy IMI 作为先导化合物用于合成 olefin IMI 以及其他新农药品种,而开展这方面的工作必需建立合适的检测方法。目前,国内外没有 IMI 的代谢产物的 HPLC 分析方法的公开文献报道,本试验对 5-hydroxy IMI 和 IMI 的分析方法进行研究,建立了简便、准确和快速的 HPLC 分析方法。

收稿日期:2005-04-14.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目专题(2004BA308A22-12),江苏省高校自然科学基金资助项目(04KJB180071).

作者简介:戴亦军,1972—,讲师,博士研究生,主要从事微生物转化的教学与研究。E-mail: daiyijun90@yahoo.com.cn

通讯联系人:袁生,1956—,教授,博士生导师,主要从事微生物生长代谢调控和酶工程研究。E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

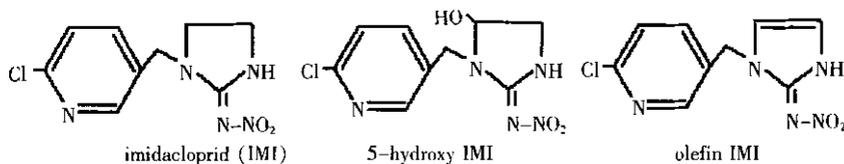


图1 IMI及其代谢物的结构

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

HP 1100 型高效液相色谱仪(Agilent, Germany)配有脱气器(G1322A)、四元泵(G1311A)、可调波长紫外检测器(G1314A)、手动进样器(7725i)和色谱工作站(Chemstation)等;3K30 型离心机(Sigma 公司);HD-930 型全温控摇床(博莱特仪器厂);Unico-2802s 型紫外分光光度计(Unico 公司)。

1.1.2 试剂

乙腈和甲醇为 E. Merck(Germany)产品,5-hydroxy IMI 为本实验室采用微生物转化法制备,样品经质谱、核磁共振、元素分析和单晶 X-射线衍射分析确认为 5-hydroxy IMI, HPLC 纯度为 98%;IMI 由江苏省农药研究所提供,纯度为 97%。

1.2 色谱柱和流动相

色谱柱为 Agilent Zobax OSD 柱(250×4.6 μm),进样体积为 20 μL,柱温为室温;流动相:A:经 0.22 μm 微孔过滤膜过滤的双蒸水,加入 0.1%(v/v)色谱级乙酸,B:色谱级乙腈,加入 0.1%(v/v)色谱级乙酸,流速为 1 mL/min。

1.3 标准溶液的配制

精确称取 5-hydroxy IMI 和 IMI 样品 50.0 mg,加热溶于磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)中,冷却后用磷酸盐缓冲液定容至 1 000 mL,将母液稀释至系列浓度。根据不同浓度及其对应的峰面积,利用化学工作站计算出工作曲线。

1.4 培养和转化

菌种为 *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.178.8。培养和转化方法参照陆伟宏等人方法^[5]。

2 结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 最佳检测波长的选择

用 Unico-2802s 分光光度计,分别将 IMI 和 5-hydroxy IMI 的标准溶液在 190~400 nm 范围内扫描,两者在 269 nm 处有最大吸收(图 2),因此选择 269 nm 作为检测波长。

2.1.2 流动相的选择

本实验曾选择了多种流动相,发现当用甲醇和水作为流动相时,出峰时间较慢,且分离效率不好,而用乙腈和水时,色谱峰分离较好。改变流动相中乙腈的比例时,随着乙腈比例增加,IMI 和 5-hydroxy IMI 的保留时间减少,以乙腈-水的体积比为 25:75 的条件下,色谱分离结果最好,5-hydroxy IMI 和 IMI 的峰能完全分开。在上述色谱条件下,测得 5-hydroxy IMI 和 IMI 的保留时间分别为 5.7 和 9.0 min。

2.2 标准校正曲线

分别取不同浓度的标准 5-hydroxy IMI 和 IMI 溶液进行色谱分析,在上述色谱条件下,以峰面积为纵坐标(y),浓度为横坐标(x)得出线性回归方程和相关系数,结果见图 3。在 0.5~50 mg/L 浓度范围内,5-

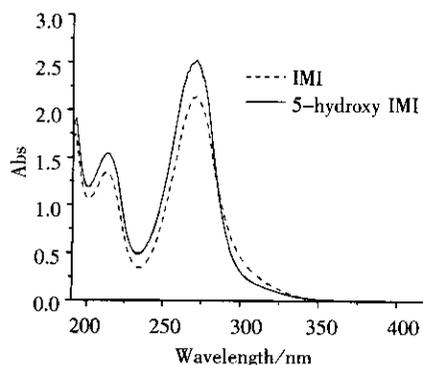


图2 IMI和5-hydroxy IMI全波长扫描光谱图

hydroxy IMI 和 IMI 的标准校正曲线线性关系良好,相关系数分别为 0.999 7 和 0.999 8。以二倍噪音峰面积计算两者的最低检测限为 0.001 5 mg/L。

2.3 重现性和回收率试验

取相同浓度的 5-hydroxy IMI 和 IMI,每种进样 6 次,测得保留时间与峰面积的相对偏差结果见表 1。

表 1 RSD 标准品的重现性/%

标准品	保留时间	峰面积
5-hydroxyl IMI	0.1	1.0
IMI	0.2	1.5

将样品溶液中加入已知量标准品,经过相同处理,在前述色谱条件下进行测定,结果见表 2。IMI 和 5-hydroxy IMI 的回收率分别为 99.3 ± 0.8 和 97.4 ± 0.9 。

表 2 样品的回收率试验($n=4$)

组分	加入量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量	回收率/%	RSD 的质量分数/%
5-hydroxyl IMI	25.00	24.36 ± 0.23	97.4 ± 0.9	0.9
IMI	25.00	24.83 ± 0.21	99.3 ± 0.8	0.8

2.4 IMI 微生物转化产物溶液的色谱分离

在 HPLC 线性分析范围内,依据转化产物的浓度将转化液作适当稀释,在选定条件下进行色谱分析,转化液的 HPLC 分析结果见图 4,产物峰出现在 5.7 min 的位置,这与 5-hydroxy IMI 标准品的保留时间一致,证明产物为 5-hydroxy IMI。底物峰出现在 9.0 min 与 IMI 标准品的保留时间一致,而菌体对照在 5.7 min 和 9.0 min 均未出峰。在此色谱条件下进行定量检测, *S. maltophilia* CGMCC 1.178 8 菌株转化 IMI 为 5-hydroxy IMI 的效率可达到 40% 以上。为利用 IMI 合成 5-hydroxy IMI,并结合化学合成的方法获得更高活性的 olefin IMI 以及以 5-hydroxy IMI 为先导化合物合成新农药奠定了坚实基础。

在此色谱条件下进行定量检测, *S. maltophilia* CGMCC 1.178 8 菌株转化 IMI 为 5-hydroxy IMI 的效率可达到 40% 以上。为利用 IMI 合成 5-hydroxy IMI,并结合化学合成的方法获得更高活性的 olefin IMI 以及以 5-hydroxy IMI 为先导化合物合成新农药奠定了坚实基础。

3 小结

本方法采用国内外广泛使用的 Agilent HP 1100 系列高效液相色谱仪,建立了分离 IMI 及其微生物转化产物 5-hydroxy IMI 的方法。采用乙腈和水为流动相,5-hydroxy IMI 和 IMI 得到了较好地分离,洗脱峰形好,不产生拖尾现象。样品的重现性好,转化液中 IMI 和 5-hydroxy IMI 的添加回收率分别为 99.3% 和 97.4%。因而该方法具有分离效果好、快速、简便和准确的特点,对于研究 IMI 的环境代谢以及创制新农药具有较强的借鉴意义。

[参考文献]

- [1] Caroline C. Imidacloprid[J]. Journal of Pesticide Reform, 2001, 21(1):15—21.
- [2] Krohn J, Hellpointner E. Environmental fate of imidacloprid[J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2002, 55(special edition):3—26.
- [3] Nauen R, Rechmann U, Armbrorst S, et al. Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants[J]. Pestic Sci, 1999, 55(2):265—271.
- [4] Nauen R, Tietjen K, Wagner K, et al. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae)[J]. Pestic Sci, 1998, 52(1):53—57.
- [5] 陆伟宏,徐莉,戴亦军,等.一株烟酸羟基化转化菌株的筛选和鉴定[J].微生物学报, 2005, 45(1):6—9.

[责任编辑:孙德泉]

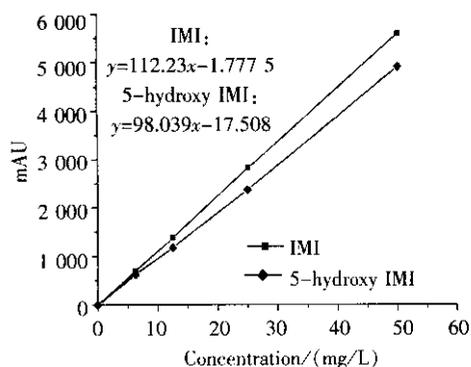
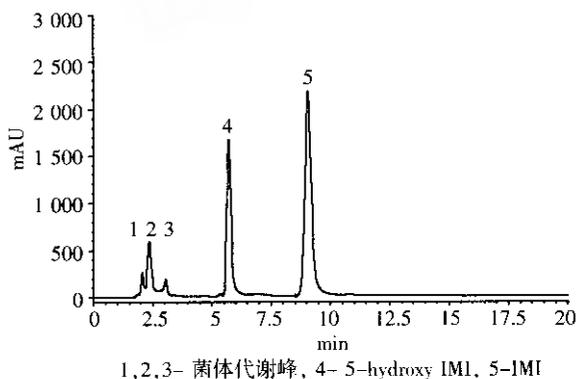


图 3 5-hydroxy IMI 和 IMI 的标准曲线



1, 2, 3—菌体代谢峰, 4—5-hydroxy IMI, 5—IMI
图 4 IMI 微生物转化产物 HPLC 图