

多杀菌素及其光照降解产物分析

杨成对, 宋莉晖

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 采用五级质谱研究了多杀菌素的质谱断裂规律, 应用串联质谱选择反应检测技术考察了光照条件下多杀菌素的降解程度, 利用液相色谱-质谱联用手段分析了多杀菌素降解产物, 并推断了主要降解产物的结构. 结果表明, 多杀菌素 17 碳上的福乐糖胺容易失去, 三氧甲基鼠李糖很稳定; 多杀菌素浓度随紫外光照射时间的增加而降低, 在照射 484 min 后, 降解率达到 70% 左右, 形成 11 种降解产物, 这些降解产物是多杀菌素 A 或 D 经氧化、还原及水解等反应形成.

关键词 多杀菌素; 液相色谱-质谱; 光照; 降解

中图分类号 O657.63

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)11-2056-04

多杀菌素(Spinosad), 又名刺多糖, 是由放线菌刺多糖孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)经有氧发酵后产生的胞内次级代谢产物^[1]. 多杀菌素为新型大环内酯, 由 21 碳四元环内酯上接 2 个脱氧糖(三氧甲基鼠李糖和福乐糖胺)组成, 包括 6 种组分^[2], 最具活性的是多杀菌素 A 和多杀菌素 D. 多杀菌素是抗生素类杀虫剂, 兼具生物农药的安全性和化学合成农药的速效性, 其制剂商品名为菜喜、赐诺杀、催杀. 多杀菌素具有低毒、低残留、对昆虫天敌安全和自然分解快等优点^[3], 因此适合应用于无公害蔬菜和水果的生产. 多杀菌素已经在美国、欧洲推广使用, 在国内已使用由美国进口的产品.

本文采用光照法考察了多杀菌素的降解程度, 并参照多杀菌素的质谱断裂规律推断了多杀菌素的可能降解产物, 目的是为进一步了解多杀菌素的环境归宿及毒性提供依据.

1 实验部分

1.1 材料和仪器

多杀菌素为质量分数 2.5% 的悬浮液制剂(商品名菜喜, 美国陶氏益农公司生产), 用高纯水稀释后用于降解实验; 其它化学试剂均为分析纯或色谱纯.

液相色谱-质谱联用仪(LTQ 型, 美国 Thermo Electron), 配置电喷雾电离源(ESI)、四元液相泵和自动进样器. N₂ 气为雾化气, He 气为碰撞气, 电离源电压 5 kV, 离子传输管电压 24 V, 温度 275 °C, 管透镜电压 200 V.

1.2 光照降解

将多杀菌素溶液置于磁力搅拌器上, 边搅拌边用紫外灯(8 W)照射.

1.3 多级质谱和残留物的定量检测

采用正离子全扫描模式, 采集质量范围为 50 ~ 2000. 通过优化电压参数, 先获得样品的一级质谱, 然后通过施加碰撞能量获得二级质谱, 再选定二级质谱中丰度最大的离子施加碰撞能量后获得三级质谱. 四级和五级质谱也依此方法获得.

采用质谱的选择反应监测模式(SRM), 对多杀菌素 A 监测离子对 m/z 754 > 501 和 m/z 754 > 613, 对多杀菌素 D 监测离子对 m/z 768 > 515 和 m/z 768 > 627. 液相色谱柱 ODS-3 C₁₈ (50 mm × 3.1 mm, 3 μm i. d.), 流动相为甲醇, 流速 300 μL/min.

1.4 液相色谱-质谱分析

C_{18} 液相色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm i. d.), 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 梯度变化为体积分数 50% 的甲醇, 20 min; 至 100% 甲醇, 保持 10 min, 流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL . 质谱检测采用正离子全扫描模式, 同时应用数据依赖方式获得二级和三级质谱.

2 结果与讨论

2.1 多级质谱检测

多杀菌素在一级质谱检测中形成准分子离子 $[M + H]^+$ 及钠加合离子 $[M + Na]^+$. $[M + H]^+$ 离子在碰撞能量作用下因易碎裂而难以获得高丰度子离子, 而 $[M + Na]^+$ 离子能形成稳定的子离子, 且可形成多级子离子, 其子离子亦为钠加合离子. 多杀菌素 D 与多杀菌素 A 的差异在于 C6 上的基团, 多杀菌素 D 上连接的是甲基, 而多杀菌素 A 上连接的是氢. 比较多杀菌素 A 与多杀菌素 D 的质谱检测结果(表 1)可以发现, 无论是母离子还是子离子, 多杀菌素 D 均比多杀菌素 A 大, 这说明 C6 上的基团是不易断裂的. 分子中最易断裂的部分是 C17 上失去福乐糖胺, 而 C9 上的三氧甲基鼠李糖很难失去. 多杀菌素的质谱裂解规律示于图 1.

Table 1 MS^s of spinosad A and D

Compound	$[M + Na]^+$, m/z	MS ² , m/z	MS ³ , m/z	MS ⁴ , m/z	MS ⁵ , m/z
Spinosad A	754	613, 501, 595	501, 595	483, 439, 313	439, 483
Spinosad D	768	627, 515, 609	515	497, 453, 327	453

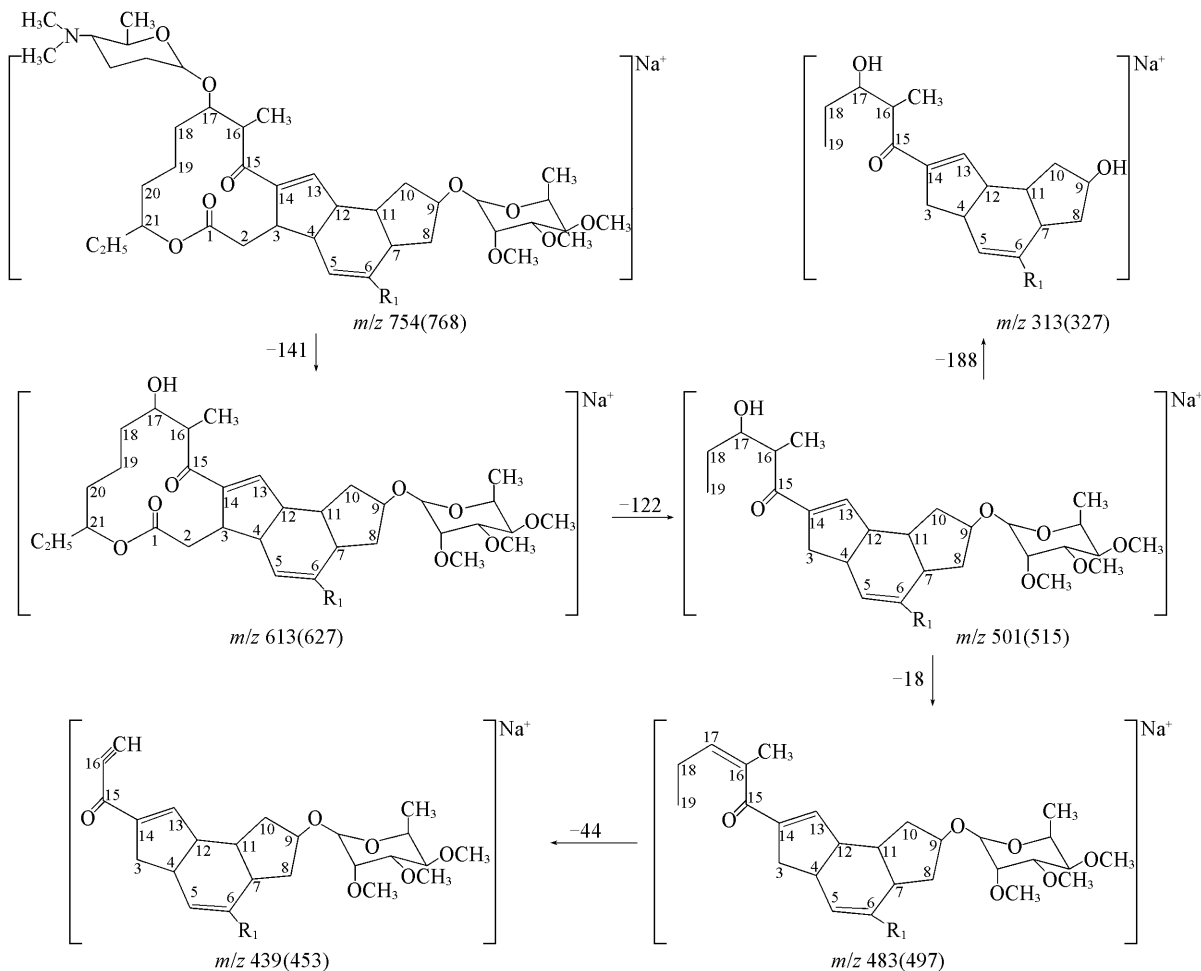


Fig. 1 Mass spectrum fragments of spinosad

2.2 光照降解

多杀菌素在环境中会快速降解^[4], 光照降解是其主要降解途径之一^[5]. 本文考察了多杀菌素在紫

外光作用下的降解情况.

2.2.1 残留物的测定方法 采用液相色谱-串联质谱的选择反应监测(SRM)技术,选择监测多杀菌素 A 的母离子 m/z 754 及其对应的子离子 m/z 501, 613; 多杀菌素 D 的母离子 m/z 768 及其对应的子离子 m/z 515, 627. 以离子流峰面积定量,依据线性方程计算多杀菌素浓度.

多杀菌素 A 的线性方程为 $Y = 39653.9 + 114.7X$ ($R^2 = 0.9996$), 定量检出限为 $10.0 \mu\text{g/L}$, 线性范围为 $10.0 \sim 100000 \mu\text{g/L}$; 多杀菌素 D 的线性方程为 $Y = 7908.0 + 176.3X$ ($R^2 = 0.9976$), 定量检出限为 $2.3 \mu\text{g/L}$, 线性范围为 $2.3 \sim 23000 \mu\text{g/L}$; 其中 X 为离子流峰面积, Y 为多杀菌素浓度.

2.2.2 光照时间对降解的影响 多杀菌素 A 和多杀菌素 D 的浓度随照射时间变化示于图 2. 在光照初期降解迅速, 在前 25 min, 多杀菌素 A 降解速率大于 10 mg/min , 多杀菌素 D 降解速率大于 1.5 mg/min , 此时的降解率分别为多杀菌素 A: 22%, 多杀菌素 D: 12%. 之后降解逐渐趋于平缓, 在 26 ~ 270 min 之间, 多杀菌素 A 的降解速率为 $2.7 \sim 5.1 \text{ mg/min}$, 多杀菌素 D 的降解速率为 $0.6 \sim 0.8 \text{ mg/min}$, 270 min 时降解速率分别为多杀菌素 A: 67%, 多杀菌素 D: 56%. 至 484 min 时, 降解率分别为多杀菌素 A: 70%, 多杀菌素 D: 60%. 结果表明, 多杀菌素是易于降解且降解快速的化合物.

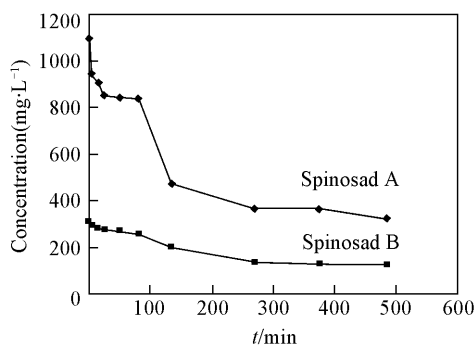


Fig. 2 Results of UV degradation of spinosad

2.2.3 降解产物推断 采用 LC-MSⁿ 方法对光照前后的多杀菌素溶液进行了分析, 其总离子流色谱图示于图 3. 由图 3 可见, 随着光照时间的增加, 降解产物的种类和浓度均有所增加. 降解前样品中含有

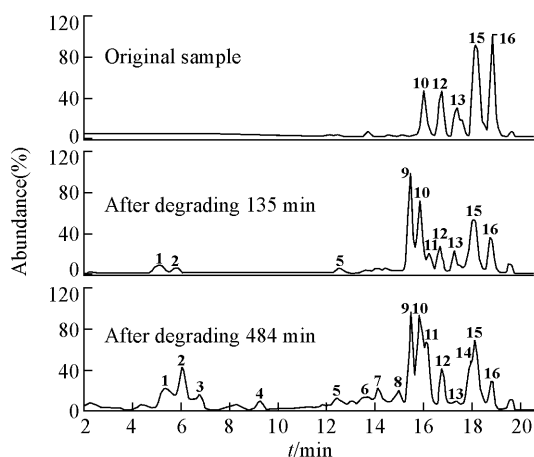


Fig. 3 Total ion chromatogram of samples

5 种多杀菌素组分, 其中峰 15 为多杀菌素 A, 峰 16 为多杀菌素 D, 是样品的主要活性组分; 样品经紫外光照射 135 min 后检测到 10 个组分, 其中峰 1, 2, 5, 9 和 11 为降解产物; 继续对样品进行光照, 在 484 min 后, 样品中的组分增加到 16 个, 其中降解产物为 11 个. 本文着重分析了其中含量较高的 4 种降解产物峰 2, 7, 9 和 11, 它们的质谱检测结果示于表 2.

由一级质谱 ($[M + Na]^+$) 推断这 4 种产物的分子量分别为 797, 592, 749, 763. 参照质谱中的氮规则及多杀菌素的分子结构, 可以确定峰 7 是福乐糖胺断裂后形成的产物, 峰 2, 9 和 11 分子中仍然含有福乐糖胺片段. 由它们的二级和三级质谱可以推断峰 2 是多杀菌素 D 福乐糖胺上的甲基及内酯环上的甲基、乙基被氧化成了甲氧基、乙氧基, 六元环上双键被还原成单键形成的; 峰 7 是多杀菌素 A 上的福乐糖胺水解^[6]、五元环上双键被还原成单键形成的; 峰 9 是多杀菌素 A 福乐糖胺上的甲基被氧化成甲氧基, 五元环上 C13—C14 双键被还原形成^[6]; 峰 11 是多杀菌素 A 福乐糖胺上的甲基被氧化成羧基及五元环上 C13—C14 双键被还原形成的. 4 种降解产物的结构示于图 4.

Table 2 MS³ of degrading products 2, 7, 9, 11

Compound	$[M + Na]^+$, m/z	MS ² , m/z	MS ³ , m/z
Degrading product 2	820	663, 601, 645	477, 601, 645
Degrading product 7	615	503, 484, 597	315, 459
Degrading product 9	772	597, 615, 727	409, 392, 553
Degrading product 11	786	615, 597, 754	503, 485, 597

2.3 结 论

多杀菌素在光照下快速降解, 降解率可达 70%. 降解过程中发生氧化、还原和水解等反应, 形成多种降解产物. 降解产物的活性及毒性有待进一步研究.

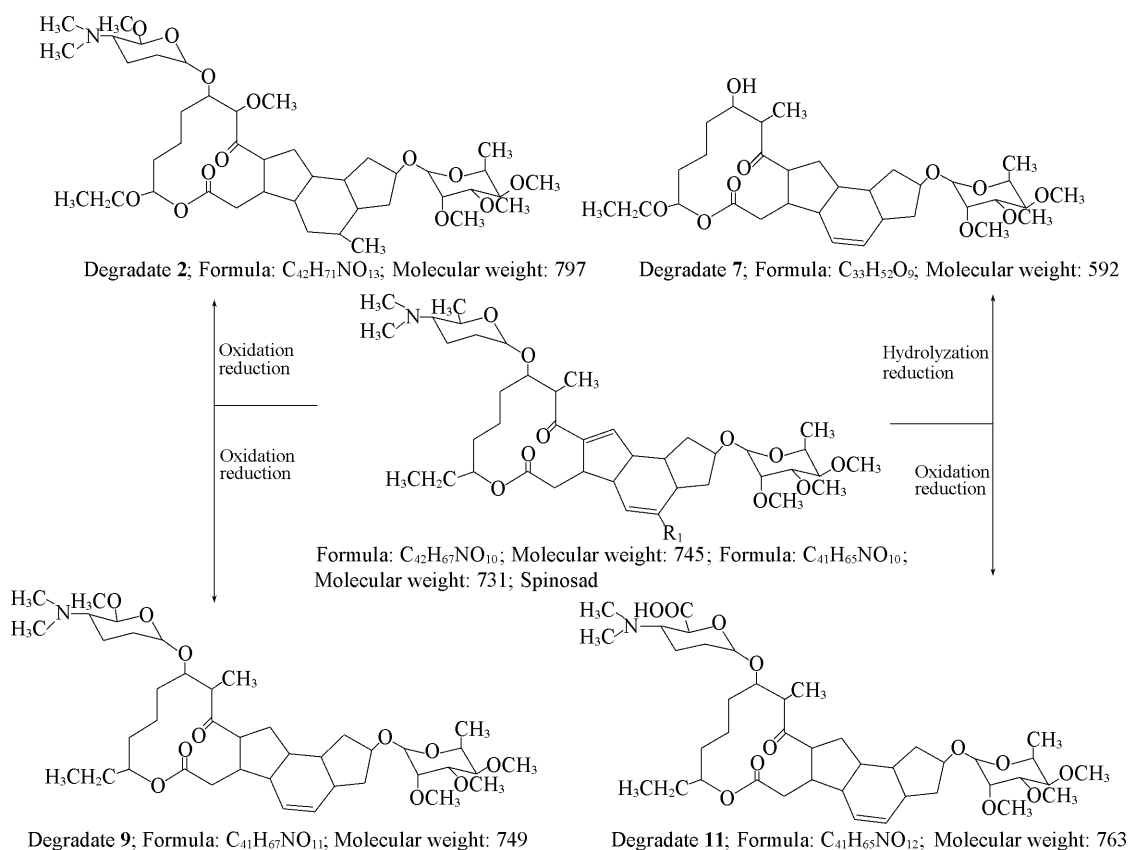


Fig. 4 Structures of degradate of spinosad

参 考 文 献

- [1] Manoj K. Nayak, Gregory J. Daglish, Valerie S. Byrne. Journal of Stored Products Research[J], 2005, (41): 455—467
- [2] SU Jian-Ya(苏建亚), SHEN Jin-Liang(沈晋良). China Biotechnology(中国生物工程杂志)[J], 2003, 23(5): 55—59, 73
- [3] LI Da(李姐), WANG Qing-Min(汪清民), HUANG Run-Qiu(黄润秋). Chinese Journal of Pesticide Science(农药学报)[J], 2003, 5(2): 2
- [4] Thompson D. G, Harris B. J., Lanteigne L. J., *et al.*. J. Agr. Food Chem. [J], 2002, 50(4): 790—795
- [5] DU Shun-Tang(杜顺堂), ZHU Ming-Jun(朱明军), LIANG Shi-Zhong(梁世中). Chinese Journal of Pesticides(农药)[J], 2005, 44(10): 441—451
- [6] Cleveland C. B., Bormett G. A., Saunders D. G., *et al.*. J. Agr. Food Chem. [J], 2002, 50(11): 3244—3256

Analyses of Spinosad and Its Degradates from Light Irradiation

YANG Cheng-Dui*, SONG Li-Hui

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract In this paper we report 5-stage mass spectrum fragmentations of spinosad A and D. Degrading rate of spinosad under ultraviolet light irradiation was also investigated with selection reaction monitoring (SRM) mode. Degradates of spinosad were analyzed with liquid chromatography coupling with mass spectrometry, and the chemical structures of main degradates were also assigned. It can be concluded that (1) forosamine on 17-carbon can be easily lost, but difficult for rhamnose sugar; (2) spinosad concentration decreased when irradiation time increased, degrading rate was up to about 70% for irradiating 484 min, and 11 degradates were produced. These degradates were products of the oxidation, reduction, and hydrolytic reactions.

Keywords Spinosad; Liquid chromatography-mass spectrometry; Light irradiation; Degradation

(Ed.: H, J, Z)