

苯并噻二唑标样的制备及 Bion 50% WG 含量分析

范志金¹, 艾应伟², 陈建宇¹, 王海英¹, 刘凤丽¹, 鲍丽丽¹, 石祖贵¹

(1. 南开大学元素有机化学研究所 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;

2. 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610065)

摘要:从 Bion 50% WG 中提取有效成分制备了苯并噻二唑(BTH)标样,其结构经¹H NMR 谱、IR、元素分析和 HPLC/MS 的验证.利用制备的标样建立了 Bion 50% WG 的 HPLC 分析方法,用 250 mm × 4.6 mm 不锈钢 ODS 5 μ m 球型硅胶填料色谱柱,甲醇(含 0.6%的冰醋酸)/水(含 0.6%的冰醋酸) = 85/15(V/V)为流动相,1.0 mL·min⁻¹的流速和 254 nm 的检测波长能较好地分离 BTH 与样本中的杂质.方法的平均添加回收率为 99.91%,Bion 50% WG 的平均含量为 49.47%,变异系数为 0.30%,线性相关系数平方(r^2)为 0.999 0.

关键词:植物诱导抗病激活剂;系统获得抗病性;苯并噻二唑;高效液相色谱

中图分类号:0626.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8395(2005)05-0608-03

植物通过外源化学物质的激活可以诱导植物的免疫系统,使植物产生对后继病原菌的入侵产生广谱和持久抗病性,这就是系统获得抗病性,能诱导植物产生系统获得抗病性的化学物质就是植物诱导抗病激活剂,它将是今后农药发展的主要方向之一^[1].已知的植物诱导抗病激活剂主要有内源的乙烯(Et)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和一氧化氮(NO),外源的苯并噻二唑(BTH)、DL- β -氨基丁酸(BABA)、2,6-二氯异烟酸(INA)及其衍生物、N-氰甲基-2-氯异烟酰胺(NCI)、烯丙异噻唑(probenazole)、2,2-二氯-3,3-二甲基环丙羧酯(DDCC)、水杨酸甲酯(MeJA)衍生物、茉莉酸甲酯(MeJA)和磷酸盐(K_2HPO_4)等^[1~4].其中,BTH是商品化最成功的植物诱导抗病激活剂,可诱导植物对细菌、真菌和病毒等产生广谱的抗性^[1].BTH中文通用名称:活化酯;英文通用名称:acibenzolar-S-methyl;IUPAC名称:S-甲基苯并[1,2,3]噻二唑-7-硫代羧酸酯^[5].由于植物诱导抗病激活剂本身及其代谢产物对病菌无杀菌或抑菌作用或仅有很低的杀菌或抑菌作用,但能诱发植物自身的免疫系统抵御病害的侵袭,其作用机制完全突破了传统杀菌剂的作用机制,传统杀菌剂的研究方法不适合此类研究.因此,建立该类药剂生物活性筛选和评估体系、田间药效及混用效果的评价方法十分重要,作者已建立了从离体到活体以及诱导活性在内的生物测定筛选体系及生理生化指标的验证体系^[6].合成了部分 BTH 的衍生物,有些化合物显示出较好的诱导烟草抗烟草花叶

病毒(TMV)的活性^[7,8].本文旨在制备 BTH 的标样,以建立 Bion 50% WG 的分析方法,为该药施药剂量的确定及其在植物体内代谢降解的研究奠定基础,为新农药的创制提供技术基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试药剂 Bion 50% WG,质量纯度 50%,先正达公司产品;甲醇,光谱纯,天津市康科德科技有限公司;乙腈,光谱纯,天津市康科德科技有限公司;水,双重蒸后使用;硅胶 G254、乙酸乙酯和石油醚以及甲酸等其他试剂均为国产分析纯.

1.1.2 供试仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,配备紫外检测器及工作站;Yanaco CHN CORDER MT-3 型自动元素分析仪;BRUKER ACP-200 型核磁共振仪,TMS 为内标;NICOLET 5DX 型红外光谱仪;Yanaco MP-500 型熔点仪,温度计未经校正;Thermo Finnigan 液质联机(HPLC/MS/MS),Surveyor HPLC 配备 Diamonsil C₁₈,4.6 mm × 250 mm 不锈钢色谱柱和 LCQ Advantage 质谱仪,配备 ESI 离子源.电子天平 Sartorius,精度为 0.000 2 g.

1.2 试验方法

1.2.1 BTH 标样的制备和结构鉴定 将 2.0 g Bion 50% WG 加入 15 mL 二氯甲烷中,经超声波震荡提取后过滤,沉淀用二氯甲烷洗涤 3 次,每次 5 mL,合并滤液,35 ~ 40 °C 真空减压脱溶后,以石油醚:乙酸乙酯 = 8:2(V/V)经硅胶柱层析得产品,用乙腈重结晶得标样,然后测定熔点,进行元素分析和

收稿日期:2004-04-08

基金项目:国家重点基础研究发展计划基金(973 计划)(2003CB114406)和国家自然科学基金(30270883)资助项目

作者简介:范志金(1968-),男,教授

¹H NMR谱及 IR 分析.

1.2.2 BTH 标样的 HPLC/MS 分析 将 BTH 用乙腈配成约 20 μg·mL⁻¹溶液,进样进行 HPLC/MS 分析.

液相色谱条件为:色谱仪:Survyer 高效液相色谱;流动相:CH₃OH:H₂O:HCOOH=86:24:0.1 (V/V);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:18℃;检测波长:254 nm;进样量:20 μL.

质谱条件为:离子源:电喷雾源(ESI);峭气流量:50 L·min⁻¹;辅气流量:10 L·min⁻¹;毛细管温度:275℃;毛细管电压:4.49 V;质量范围:100~500 g.

1.2.3 BTH 标样的配制 准确称取 25 mg BTH 标样(精确到 0.000 1 g)于 25 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,再配制成 800,400,200,100,50 μg·mL⁻¹ 的浓度梯度,待 HPLC 测定后以峰面积对浓度制作标准曲线.

1.2.4 BTH 样本的 HPLC 分析 准确称取 12.5 mg Bion 50% WG(精确到 0.000 1 g)于 25 mL 容量瓶中,加入乙腈,超声波溶解样本,过微孔滤膜后待 HPLC 测定,以峰面积定量,外标法计算样本浓度.

同样条件下在 12.5 mg Bion 50% WG 样本中添加 5 mg 标样,溶解并定溶于 25 mL 容量瓶中,HPLC 测定添加后样本中 BTH 的浓度,计算样本的添加回收率,确定方法的准确度和精密度.

1.2.5 BTH 含量的 HPLC 测定条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱,250 mm×4.6 mm;柱温:40℃;流动相:甲醇(含 0.6%的冰醋酸)/水(含 0.6%的冰醋酸)=85/15 (V/V);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:254 nm.

2 结果与讨论

2.1 BTH 标样的制备和结构鉴定 将 BTH 50% 制剂用二氯甲烷提取后,以石油醚:乙酸乙酯=8:2 (V/V)经硅胶柱层析,再经乙腈重结晶可以得到纯度很高的 BTH 标准样品.提纯后的标样的有关理化参数和结构鉴定的数据见表 1.由表 1 可见,标样的有效成分元素分析测定值与计算值十分接近,在允许的误差范围内;¹H NMR 谱中 H 原子的数目和化学位移与其化学结构完全一致;IR 特征峰显示有苯环和噻二唑环的骨架以及羰基的存在.

表 1 苯并噻二唑标样的定性鉴定数据
Table 1 Identification data of Acibenzolar-S-methyl standard

外观	化学式	熔点/℃	产量/%	元素分析(测定值/理论值)			δ (CDCl ₃)	IR/cm ⁻¹ (KBr)
				C	H	N		
棕色晶体	C ₈ H ₆ N ₂ OS ₂	133~134	96.47	45.58/45.70	2.89/2.88	13.36/13.32	2.90(s,3H,SCH ₃);7.75(t, 1H,Ph-H);8.36(d,1H,Ph-H);8.80(d,1H,Ph-H)	3 057.8,2 928.1,1 644.1,1 550.2, 1 404.2,1 292.8,1 241.0,1 174.8, 1 075.8,1 048.6,891.3,800.0, 787.2,726.2

HPLC/MS 分析仅出现一个组分紫外吸收峰,其保留时间为 6.7 min;该组分的 M+1 的 m/z 为 210.8(其分子量为:210.27),该质谱信息所在的峰是基峰.

2.2 BTH 分析方法的线性范围 HPLC/MS 在线紫外扫描分析表明,BTH 有 4 个紫外吸收峰值,分别在 227.0、252.0、289.0 和 324.0 nm,最大吸收峰在 252.0 nm 处,为此本研究选择常用的 254 nm 为检测波长.将 BTH 稀释成一定浓度梯度,在上述色谱条件下进样测定,其保留时间为:6.34±0.01 min.以峰面积定量,BTH 在 50~800 mg·L⁻¹浓度范围内线性相关性很好,相关系数平方值为

$r^2 = 0.999\ 0,$

回归方程为

$y = 27.45x + 470.65.$

2.3 Bion 50% WG 分析方法的精密度 对 5 份不

同 Bion 样本的测定结果(表 2)表明,同一条件下的测定结果之间的差异很小,方法的精密度高,标准偏差为:0.15%,变异系数为:0.30%,Bion 50% WG 的平均含量为:49.47%.

表 2 BTH 测定方法的精密度
Table 2 Precision of analytical method for Acibenzolar-S-methyl

样品编号	1	2	3	4	5
样品含量	49.54	49.48	49.23	49.39	49.69
平均值	49.47				
标准偏差	0.15				
变异系数	0.30				

2.4 添加回收率的测定 在已知含量的 Bion 50% WG 样本 12.5 mg 中加入 5 mg BTH 标样,在同样条件下进行 4 次重复测定,测得样本的回收率在 99.19%~100.64%之间(表 3),平均添加回收率为 99.91%.

表 3 BTH 测定方法的准确度
Table 3 Accuracy of analytical method for Acibenzolar-S-methyl

重复序号	1	2	3	4
添加量/mg	5.34	5.47	4.95	4.68
回收值/mg	5.31	5.49	4.91	4.71
回收率/%	99.44	100.37	99.19	100.64
平均值/%			99.91	
标准偏差/%			0.61	
变异系数/%			0.61	

3 结语

利用 Bion 50% WG 提取的 BTH 标样经熔点、¹H NMR谱、IR 和元素分析确定其化学结构为 S-甲基苯并[1,2,3]噻二唑-7-硫代羧酸酯,该结果得到了 HPLC/MS 分析结果的确证,有效成分测定的分子量与理论值一致.本文建立的 Bion 50% WG 的反相 HPLC 分析方法可将有效成分和杂质进行有效的分离,分析方法的精密度好,准确度高,是 Bion 50% WG 中 BTH 含量分析的有效测定方法.

参考文献

[1] 范志金,刘秀峰,刘凤丽,等. 植物诱导抗病激活剂诱导抗病研究进展[J]. 植物保护学报,2005,32(1):87~92.
[2] Fofana B, Benhamou N, McNally D J, et al. Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway [J]. Phytopathology,2005,95:114~123.
[3] Mitchell A F, Walters D R. Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection[J]. Pest Managmet Science,2004,60:126~134.
[4] Sommergruber K H. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens[J]. Biochemical Society Transactions,2002,30(6):930~935.
[5] 范志金,刘秀峰,艾应伟,等. 植物激活剂苯并噻二唑(BTH)[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2004,27(4):410~413.
[6] 刘凤丽. 苯并噻二唑衍生物的合成及诱导抗病活性研究[D]. 天津:南开大学,2005.
[7] 范志金,刘凤丽,刘秀峰,等. 苯并噻二唑衍生物及其合成方法和诱导抗病活性的筛选[P]. 中国专利:200510013111.7, 2005-01-19.
[8] 范志金,刘凤丽,刘秀峰,等. 新型苯并噻二唑衍生物及其合成方法和诱导烟草抗烟草花叶病毒的活性[P]. 中国专利: 200510014378.8,2005-07-05.

Preparation of BTH Standard and HPLC Analysis of Bion 50% WG

FAN Zhi-jin¹, AI Ying-wei², CHEN Jian-yu¹, WANG Hai-ying¹,
LIU Feng-li¹, BAO Li-li¹, SHI Zu-gui¹

(1. Institute of Elemento Organic Chemistry, State Key Laboratory of Elemento Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071;
2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan)

Abstract:The analytical standard of benzothiadiazole (BTH) is prepared from Bion 50% WG, and its structure is determined by elemental analysis, ¹H NMR, IR and HPLC/MS. The method of HPLC analysis of Bion 50% WG is established by the prepared standard. Under the condition of 250 mm×4.6 mm stainless ODS 5 μm column, 1.0 mL·min⁻¹ of methanol (containing 0.6% of CH₃COOH)/ water (containing 0.6% of CH₃COOH) as mobile phase, 254 nm UV as determination wave length, BTH can be separated from impurity in Bion 50% WG effectively. The average recovery and coefficient of variation of this method are 99.91% and 0.30% respectively, the square of linear correlation coefficient *r*² is 0.999 0, the average concentration of Bion 50% WG is 49.47%.

Key words:Plant activator; Systematic acquired resistance; Benzothia diazole; High performance liquid chromatography

(编辑 余 毅)