



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116082425 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 17

(21) 申请号	202310075537.3	C07H 1/06 (2006.01)
(22) 申请日	2023.02.07	(56) 对比文件
(65) 同一申请的已公布的文献号		CN 104059117 A, 2014.09.24
申请公布号	CN 116082425 A	CN 111171096 A, 2020.05.19
(43) 申请公布日	2023.05.09	审查员 郭丽娜
(73) 专利权人	陕西麦可罗生物科技有限公司	
地址	715599 陕西省渭南市蒲城县高新技术产业开发区	
(72) 发明人	张楠 潘忠成 杨宏勃 李皓瑜 高波	
(74) 专利代理机构	北京五月天专利商标代理有限公司 11294	
专利代理师	单淑梅	
(51) Int. Cl.	C07H 17/08 (2006.01)	权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称
一种高纯度多杀霉素A、D标准品及其制备方法

(57) 摘要
本发明涉及一种高纯度多杀霉素A、D标准品及其制备方法,多杀霉素母药经甲醇结晶后,经过高效液相色谱制备,分离得到纯度≥90%的多杀霉素A、多杀霉素D。本发明可应用于目前企业生产中的多杀霉素质量检测,填补了目前多杀霉素A、D对照品的空白的技术问题,极大降低了多杀霉素的质量控制成本,有效的解决了多杀霉素质量参差不齐的现象,有利于增强生物农药企业的可持续发展。

1. 一种多杀霉素A、D标准品的制备方法,其特征在于,多杀霉素母药经甲醇结晶后,经过高效液相色谱制备,再进行减压浓缩、冻干,得到纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素A、纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素D;包括以下工艺步骤:

1) 结晶:称取多杀霉素原药进行溶解,静置,过滤,除去不溶物;再于4℃环境静置,至多杀霉素结晶析出,离心过滤,除去溶剂,得到多杀霉素A、多杀霉素D混合样;

2) 高效液相色谱制备:高效液相色谱条件如下

流动相:甲醇:0.5%氨水溶液=95:5~90:10;

色谱柱:内装反相C18,5 μ m,20*250mm~50*250mm填料;

流速:10~15ml/min;波长245nm;上样体积1ml~5ml;

根据色谱峰进行收集,得到纯度 $\geq 90\%$ 多杀霉素A、多杀霉素D溶液;

3) 减压浓缩,冻干:将步骤2)得到的溶液减压浓缩,冻干,得到纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素A、纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素D白色粉末。

一种高纯度多杀霉素A、D标准品及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于农用抗生素提纯技术领域,具体涉及一种高纯度多杀霉素A、D标准品及其制备方法,尤其是涉及所述的多杀霉素A、D标准品制备的高效液相制备色谱条件。

背景技术

[0002] 多杀霉素又名多杀菌素,是在多刺甘蔗多孢菌发酵液中提取的一种大环内酯类无公害高效生物杀虫剂。产生多杀菌素的亲本菌株土壤放线菌多刺甘蔗多孢菌最初分离自加勒比的一个废弃的酿酒厂。美国陶氏益农公司(现为陶氏农业科学公司)的研究者发现该菌可以生产杀虫活性非常高的化合物,实用化的产品是Spinosyn A和Spinosyn D的混合物,故称为Spinosad。

[0003] 多杀霉素的作用方式新颖可以持续激活靶标昆虫乙酰胆碱烟碱型受体,但是其结合位点不同于烟碱和吡虫啉。多杀霉素也可以影响GABA受体,但是作用机制不清。目前还不知道是否与其他类型的杀虫剂有交叉抗性。这些化合物可以引起靶标植食性昆虫如毛虫、潜叶虫、蓟马、和食叶性甲虫迅速死亡,尽管管理部门强烈要求在抗性未出现时使用,该化合物的中度残留活性降低了抗性和群发生的可能性。当以12-150g/hm应用时,未发现有药害。

[0004] 经文献查询,多杀霉素分离提纯制备工艺多为重结晶法或柱层析法,但是多杀霉素为多杀霉素A、多杀霉素D的混合物,即使经过多次分离提纯制备,依然无法将多杀霉素A、多杀霉素D分离开。而我们实际质量检测过程中,需要对多杀霉素A、多杀霉素D单独定量定性分析,这就需要分离制备出单独的多杀霉素A、多杀霉素D标准品用于检测。而本发明在基于高纯度多杀霉素原药的基础上,进一步利用重结晶工艺,得到高纯度的原药制品,再进一步通过高压制备液相进行分离纯化,得到纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素A、多杀霉素D标准品。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供一种高纯度多杀霉素A、D标准品及其制备方法,多杀霉素母药经甲醇结晶后,经过高效液相色谱制备,分离得到纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素A、多杀霉素D。本发明可应用于目前企业生产中的多杀霉素质量检测,填补了目前多杀霉素A、D对照品的空白的技术问题,极大降低了多杀霉素的质量控制成本,有效的解决了多杀霉素质量参差不齐的现象,有利于增强生物农药企业的可持续发展。

[0006] 为了实现发明目的,本发明采用如下技术方案:一种高纯度多杀霉素A、D标准品的制备方法,多杀霉素母药经甲醇结晶后,经过高效液相色谱制备,再进行减压浓缩、冻干,得到纯度 $\geq 90\%$ 的多杀霉素A、多杀霉素D。

[0007] 更为具体的,所述的制备方法包括以下工艺步骤:

[0008] 1) 结晶:称取多杀霉素原药进行溶解,静置,过滤,除去不溶物;再于低温环境静置,至多杀霉素结晶析出,离心过滤,除去溶剂,得到多杀霉素A、多杀霉素D混合样;

[0009] 2) 高效液相色谱制备:高效液相色谱条件如下

- [0010] 流动相:甲醇,氨水溶液;
- [0011] 色谱柱:内装反相C18填料;
- [0012] 流速:10~15ml/min;波长245nm;上样体积1ml~5ml;
- [0013] 根据色谱峰进行收集,得到纯度 $\geq 90\%$ 多杀霉素A、多杀霉素D溶液;
- [0014] 3) 减压浓缩,冻干:将2) 溶液减压浓缩,冻干,得到纯度 $\geq 90\%$ 多杀霉素A、多杀霉素D白色粉末。
- [0015] 在本发明的优选的实施方式中,步骤2) 中,制备流动相为甲醇和0.5%的氨水溶液,甲醇和氨水溶液的体积比为95:5~90:10。
- [0016] 在本发明的优选的实施方式中,步骤2) 中,制备柱填料为内装反相C18,5 μ m,20*250mm~50*250mm填料;
- [0017] 在本发明的优选的实施方式中,步骤2) 中,流速10~12ml/min。
- [0018] 在本发明的优选的实施方式中,步骤2) 中,上样体积1~3ml。
- [0019] 在本发明的优选的实施方式中,步骤2) 中,高效液相色谱条件如下:
- [0020] 流动相:甲醇:0.5%氨水溶液=95:5;
- [0021] 色谱柱:内装反相C18,5 μ m,20*250mm填料;
- [0022] 流速:10ml/min;波长245nm;上样体积1ml。
- [0023] 本发明还保护上述制备方法制备得到的多杀霉素A、多杀霉素D标准品,其纯度 $\geq 90\%$ 。
- [0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:
- [0025] 1) 多杀霉素分离提纯制备工艺多为重结晶法或柱层析法,但是多杀霉素为多杀霉素A、多杀霉素D的混合物,即使经过多次分离提纯制备,依然无法将多杀霉素A、多杀霉素D分离开。而在实际质量检测过程中,需要对多杀霉素A、多杀霉素D单独定量定性分析,这就需要分离制备出单独的多杀霉素A、多杀霉素D标准品用于检测。本发明采用高效液相色谱制备的方法,通过研究高效液相色谱制备条件,分离纯化得到纯度较高的多杀霉素A、多杀霉素D单品,可实现多杀霉素A、多杀霉素D的有效分离。且流动相采用的甲醇、少量氨水均可在后续减压浓缩的过程中除去,不会引入其他杂质,确保样品纯净。
- [0026] 2) 本发明的方法可应用于目前企业生产中多杀霉素的质量检测,填补了目前多杀霉素标准品的空白,极大的降低了多杀霉素的质量控制成本,有效的解决了多杀霉素A、D同时定性定量分析难题,有利于生物农药企业的可持续发展。

附图说明

- [0027] 下面结合附图做进一步说明。
- [0028] 图1为实施例1制备得到的多杀霉素A标准品液相色谱图。
- [0029] 图2为实施例1制备得到的多杀霉素D标准品液相色谱图。

具体实施方式

- [0030] 下面结合实施例用于说明本发明作进一步详细的描述
- [0031] 实施例1:
- [0032] 1) 结晶:称取多杀霉素原药10g于100ml烧杯中,用100ml甲醇进行超声溶解,静置

1h,过滤,除去不溶物。置于冰箱中(4℃),静置24h,多杀霉素结晶析出,离心过滤,除去溶剂,得到多杀霉素A、多杀霉素D混合样;

[0033] 2) 高效液相色谱制备:流动相为:甲醇:0.5%氨水溶液=95:5;色谱柱:内装反相C18,5 μ m,20*250mm填料;流速:10ml/min;波长245nm;上样体积1ml。根据色谱峰进行收集,得到多杀霉素A、多杀霉素D溶液;

[0034] 3) 减压浓缩,冻干:将1)溶液减压浓缩,冻干,得到纯度为92%多杀霉素A、纯度为93%多杀霉素D白色粉末。

[0035] 实施例2:

[0036] 1) 结晶:称取多杀霉素原药10g于100ml烧杯中,用100ml甲醇进行超声溶解,静置1h,过滤,除去不溶物。置于冰箱中(4℃),静置24h,多杀霉素结晶析出,离心过滤,除去溶剂,得到多杀霉素A、多杀霉素D混合样;

[0037] 2) 高效液相色谱制备:流动相为:甲醇:0.5%氨水溶液=92:8;色谱柱:内装反相C18,5 μ m,20*250mm填料;流速:12ml/min;波长245nm;上样体积1ml。根据色谱峰进行收集,得到多杀霉素A、多杀霉素D溶液;

[0038] 3) 减压浓缩,冻干:将1)溶液减压浓缩,冻干,得到纯度为91%多杀霉素A、纯度为93%多杀霉素D白色粉末。

[0039] 实施例3:

[0040] 1) 结晶:称取多杀霉素原药10g于100ml烧杯中,用100ml甲醇进行超声溶解,静置1h,过滤,除去不溶物。置于冰箱中(4℃),静置24h,多杀霉素结晶析出,离心过滤,除去溶剂,得到多杀霉素A、多杀霉素D混合样;

[0041] 2) 高效液相色谱制备:流动相为:甲醇:0.5%氨水溶液=90:10;色谱柱:内装反相C18,5 μ m,20*250mm填料;流速:10ml/min;波长245nm;上样体积3ml。根据色谱峰进行收集,得到多杀霉素A、多杀霉素D溶液;

[0042] 3) 减压浓缩,冻干:将1)溶液减压浓缩,冻干,得到纯度为90%多杀霉素A、纯度为91%多杀霉素D白色粉末。

[0043] 以上内容是结合具体/优选的实施方案对本发明做的进一步说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。在不脱离本发明构思的前提下,对这些已描述的实施方案做出的若干替代或变型,都应当视为属于本发明的保护范围。

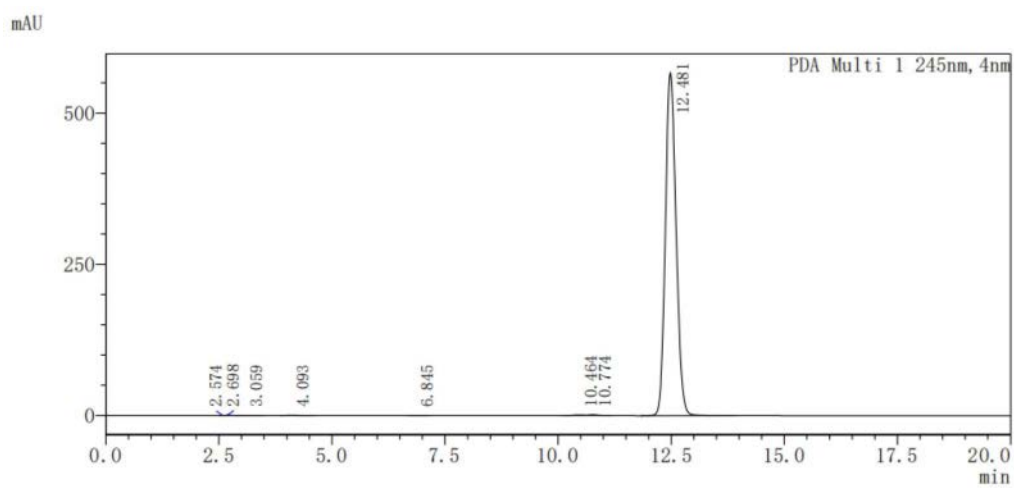


图1

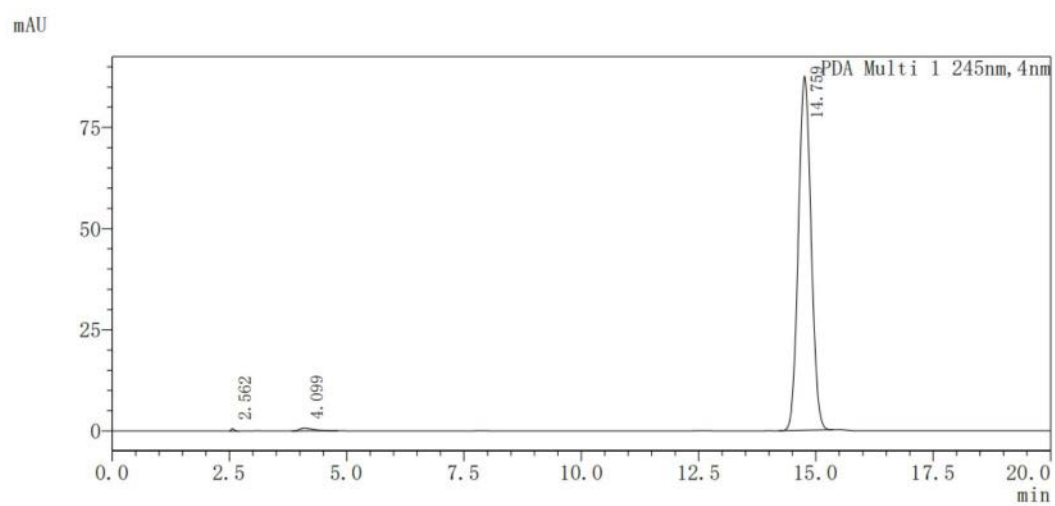


图2