



杨晓云, 江腾辉, 黄其亮, 等. 印楝素水解动力学研究及水解产物结构解析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 41-47.

印楝素水解动力学研究及水解产物结构解析

杨晓云¹, 江腾辉², 黄其亮³, 徐汉虹¹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室/华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 广东省农业有害生物预警防控中心, 广东 广州 510500; 3 广东省环境保护职业技术学校, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】系统研究印楝素在水溶液中的水解。【方法】硅胶柱层析法和半制备液相色谱法分离纯化 w 为 44.56% 的印楝素原药中的印楝素 A, 采用核磁共振仪和高效液相色谱定性、定量测定分离得到的印楝素 A, 建立一种检测水样中印楝素残留的高效液相色谱方法。【结果】核磁共振仪和高效液相色谱测得印楝素 A 的质量分数分别为 90.37% 和 91.82%。当印楝素添加水平为 0.1、1.0 和 5.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 水样中印楝素的平均回收率为 92.53% ~ 94.12%, 变异系数为 0.35% ~ 0.84%, 最小检测质量浓度为 0.012 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。印楝素在 pH 4.0 ~ 6.0 的缓冲溶液中稳定, 当 pH 大于 8.0 时, 印楝素降解加快, 降解半衰期从 pH 8.0 的 14.856 h 降到 pH 10.0 的 0.033 h。在 pH 6.0 的缓冲溶液中, 25、35、45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下印楝素的降解半衰期分别为 24.68、13.69 和 2.36 d, 而在 pH 7.0 的缓冲溶液中印楝素的降解半衰期分别为 9.35、6.51 和 0.94 d。在 pH 2.0 的缓冲溶液中分离纯化水解产物得到印楝素 A 内酯衍生物。【结论】印楝素在碱性环境下极不稳定, 而在弱酸性环境中比较稳定。温度对印楝素的降解影响很大, 随着温度的升高印楝素降解加快。

关键词: 印楝素; 残留; 水解动力学; 水解产物; 硅胶柱层析法; 高效液相色谱; 核磁共振

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2017)04-0041-07

Study on hydrolysis kinetics of azadirachtin and structure analysis of hydrolysate

YANG Xiaoyun¹, JIANG Tenghui², HUANG Qiliang³, XU Hanhong¹

(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Agricultural Pest Prevention and Control Center of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China; 3 Guangdong Vocational and Technological School of Environmental Protection, Guangzhou 510655, China)

Abstract:【Objective】To study hydrolysis of azadirachtin in water systematically.【Method】Azadirachtin A from the 44.56% azadirachtin TC was isolated and purified by silica column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC). The chemical structure and content of isolated azadirachtin A were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and HPLC. A method for determining azadirachtin residue in water by HPLC was established.【Result】The mass fractions of azadirachtin A were 90.37% and 91.82% detected by NMR and HPLC respectively. When azadirachtin was added with the concentrations of 0.1, 1.0 and 5.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, the average recovery rates of azadirachtin from water samples ranged from 92.53% to 94.12%, the variation coefficients ranged from 0.35% to 0.84%, and the minimum detection limit was 0.012 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Azadirachtin was stable in

收稿日期: 2017-03-01 优先出版时间: 2017-06-21

优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170621.1924.014.html>

作者简介: 杨晓云 (1966—), 男, 苗族, 副教授, 博士, E-mail: xyxyxy@scau.edu.cn; 通信作者: 徐汉虹 (1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: hxxu@csau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (20377015)

buffer solutions with pH varying from 4.0 to 6.0. When pH was above 8.0, hydrolysis of azadirachtin was accelerated, and the degradation half-life was 14.856 h at pH 8.0 and declined to 0.033 h at pH 10.0. The degradation half-lives of azadirachtin in buffer solutions at pH 6.0 were 24.68, 13.69 and 2.36 d under 25, 35 and 45 °C temperature respectively, while were 9.35, 6.51 and 0.94 d at pH 7.0. A lactone derivative of azadirachtin was obtained by isolating and purifying hydrolysate in buffer solution at pH 2.0. 【Conclusion】Azadirachtin is extremely unstable in alkaline environment while relatively stable in weak acid environment. Temperature has a great effect on the degradation of azadirachtin and the degradation accelerates as temperature increases.

Key words: azadirachtin; residue; hydrolysis kinetics; hydrolysate; silica column chromatography; HPLC; nuclear magnetic resonance

印楝 *Azadirachta indica* 植株中发现的以印楝素为主的 400 余种杀虫活性物质,可防治 10 目 400 余种农林、仓库和卫生害虫^[1-3]。农药的水解是农药的一个主要环境化学行为,包括农药在水环境中的微生物降解、化学降解和光降解,它是评价农药在水体中残留特性的重要指标,其降解速率受农药的性质与水环境条件等制约,而水解只是影响农药含量的一个因素,其他因素如农药的施用量、稀释程度、吸附、生物富集等也影响农药在水环境中的存在状况^[4-5]。影响农药水解的因素很多,如反应介质溶剂化能力的变化将影响农药、中间体或产物的水解反应;离子强度和有机溶剂量的改变将影响到溶剂化的能力^[6],并且因此改变水解速率。此外还可能存在普通酸、碱和沉积物及痕量金属催化的特殊介质效应^[7-9]。有研究从水分含量、能量和温度的角度进行了农药降解试验^[10-12]。印楝素的稳定性是田间使用时面临的首要问题^[13]。关于印楝素的检测,已有许多相关研究报道^[14-17],本文研究 pH、温度以及不同水质对印楝素水解的影响,拟建立一种检测水样中印楝素残留的高效液相色谱方法,并对印楝素在 pH 2.0 的缓冲溶液中的水解产物进行分离、纯化、鉴定,以期对印楝素的科学使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用珠江水采集于珠江中山大学江段;稻田水采集于华南农业大学试验田;地表水采集于火炉山森林公园;水库水采集于龙洞霄鸡坳水库;湖水采集于华南农业大学校内人工湖;纯水为实验室自制。试验所用缓冲溶液配方参考文献[18]: 1) pH 1.0: 0.2 mol · L⁻¹ 的 HCl 47.5 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KCl 25 mL; 2) pH 2.0: 0.2 mol · L⁻¹ 的 HCl 5.3 mL + 0.2

mol · L⁻¹ 的 KCl 25 mL; 3) pH 3.0: 0.2 mol · L⁻¹ 的 HCl 10.2 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KHC₈H₄O₄ 25 mL; 4) pH 4.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 0.4 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KHC₈H₄O₄ 25 mL; 5) pH 5.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 23.9 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KCl 25 mL; 6) pH 6.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 5.7 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KH₂PO₄ 25 mL; 7) pH 7.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 29.6 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KH₂PO₄ 25 mL; 8) pH 8.0: 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 46.8 mL + 0.2 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ 25 mL; 9) pH 9.0: 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 21.3 mL + 0.2 mol · L⁻¹ (H₃BO₃ + KCl) 25 mL; 10) pH 10.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 43.9 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 (H₃BO₃ + KCl) 25 mL; 11) pH 11.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 5.1 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 25 mL; 12) pH 12.0: 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 26.9 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 25 mL; 13) pH 13.0: 0.2 mol · L⁻¹ 的 NaOH 66 mL + 0.2 mol · L⁻¹ 的 KCl 25 mL,以上溶液均加蒸馏水定容至 100 mL。

1.2 方法

1.2.1 水样理化性质检测 玻璃电极法测定 pH、紫外分光光度法测定总氮含量、钼酸铵分光光度法测定总磷含量、重铬酸盐法测定化学需氧量、酚二磺酸分光光度法测定硝酸盐氮含量、纳氏试剂比色法测定氨氮含量。

1.2.2 印楝素及印楝素降解产物柱层析分离 确定洗脱系统:根据待分离物质在 GF₂₅₄ 板上的分离效果确定洗脱系统和梯度。装柱:将起始洗脱剂溶液 V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3:7 加入硅胶,充分搅拌以排出气泡,一次性加入固定好的层析柱中,打开下部活塞,使溶剂缓缓流出,同时轻轻敲打柱体(注意保持柱面平整)以排出气泡,将流出的洗脱剂加回柱

顶部反复冲洗柱中硅胶,直到硅胶面不再下降为止。柱层析硅胶与分离样品的质量比为 15 ~ 20。拌样:样品溶于少量的丙酮溶剂中,滴入硅胶中(200 ~ 300 目),边滴边搅拌,等丙酮完全挥发后,用研磨棒将样品碾匀。上样:将拌好样品的硅胶通过漏斗加入到层析柱的上端,用少量石油醚清洗研钵、漏斗和柱壁上的样品,等样品沉降形成均匀的薄层后,再加入约 1 cm 的无水硫酸钠或石英砂,然后加入流动相洗脱。洗脱:分别选用正己烷、乙酸乙酯不同体积配比的混合液作为洗脱液。定量接取馏分并蒸干。TLC 点样:收集的不同样品用毛细管吸取少量的样品溶液,点于薄层层析板底端约 1cm 处,各样点成一条直线,与板底线平行。展开剂的高度低于样品线。TLC 展开剂为 V(乙酸乙酯):V(正己烷) = 2:1,随配随用,乙酸乙酯与正己烷的比例随展开效果的不同而变化。待溶剂线展至层析板顶端未至硅胶边缘时,取出层析板,自然晾干,放入充满碘蒸气的碘缸中显色。对收集的组分进行 TLC 检测,将只出现 1 个点的组分根据比移值(R_f)是否相同进行合并。

1.2.3 印楝素水解产物的分离鉴定 准确称取 0.2 g 印楝素溶于 100 mL pH 为 2.0 的缓冲液中(加少量甲醇以提高印楝素的溶解度)。然后将该反应液置于 70 ℃ 的水浴锅中,于 4 h 后进行萃取、浓缩,硅胶柱层析分离。

1.2.4 印楝素及印楝素降解产物的结构鉴定 核磁共振氢谱(^1H NMR)、核磁共振碳谱(^{13}C NMR)用 Bruker Avance-600 型超导核磁共振仪测定,以氘代三氯甲烷(CDCl_3)为溶剂,以四甲基硅烷(TMS)为内标。

1.2.5 印楝素残留分析前样品处理 取 50 mL 已过滤水样(pH 6.8)于 250 mL 分液漏斗中,用二氯甲烷萃取 3 次,用量分别为 30、20 和 20 mL,静置分层,萃取液经无水硫酸钠脱水滤入 250 mL 的圆底烧瓶中,在 40 ℃ 条件下减压浓缩到 1 mL 左右,用甲醇定容到 3 mL,待测。水样中印楝素残留直接采用二氯甲烷进行萃取^[19]。

1.2.6 色谱检测条件 定量检测采用外标法。色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(5 μm),250 mm × 4.6 mm,流动相为 V(乙腈):V(水) = 40:60,流速为 1 mL · min⁻¹,紫外检测波长为 217 nm,进样量为 10 μL 。在上述检测条件下印楝素的保留时间为 9.80 min。

1.2.7 不同 pH 条件下的水解 取洁净且已灭菌的 20 mL 具塞刻度试管,分为 13 组,每组 30 个。准确移取 0.5 mg · mL⁻¹的印楝素丙酮溶液 2 mL 于具塞

刻度试管中,待溶剂挥发近干时,分别加入适量的 pH 为 1.0 ~ 13.0 的缓冲液至 20 mL 刻度处,振荡使之混和均匀,使印楝素的初始质量浓度为 50 mg · L⁻¹,密封后置于(25 ± 1) ℃ 恒温箱中降解(黑暗避光),每处理 3 个重复。

在加药当日(0 d)和加药后 1、3、5、7、9、15、20、25、30 d 取样测定 pH 为 2.0 ~ 7.0 的缓冲溶液中印楝素的残留量;而 pH 1.0 和 pH 为 8.0 ~ 13.0 的缓冲溶液在加药后 0、2、4、6、8、10 h 取样测定印楝素的残留量。

1.2.8 不同温度条件下的水解 取洁净且已灭菌的具塞刻度试管,分为 6 组,每组 24 个。准确移取 0.5 mg · mL⁻¹的印楝素丙酮溶液 2 mL 于具塞刻度试管中,待溶剂挥发近干时,分别加入适量的 pH 7.0 的缓冲溶液至 20 mL 刻度处,振荡使之混和均匀,使印楝素的初始质量浓度为 50 mg · L⁻¹,密封后分别置于(25 ± 1)、(35 ± 1)、(45 ± 1) ℃ 的恒温环境中降解(黑暗避光),每处理 3 个重复。在加药当日(0 d)和加药后 1、3、5、7、9、15、20、25、30 d 取样测定印楝素的残留量。

1.2.9 在实际水样中的水解 取洁净且已灭菌的具塞刻度试管,分为 5 组,每组 30 个。准确移取 0.5 mg · mL⁻¹的印楝素丙酮溶液 2 mL 于具塞刻度试管中,待溶剂挥发近干时分别加入适量的 pH 为 1.0 ~ 10.0 的缓冲液以及 5 种环境天然水样作为试验对象,使样品中印楝素的初始质量分别为 0.5、1.0、5.0 mg · L⁻¹,加入适量的 NaCl,用二氯甲烷萃取、回收,计算添加回收率。相同处理后使印楝素的初始质量浓度为 50 mg · L⁻¹,密封后置于(25 ± 1) ℃ 恒温箱中降解(黑暗避光),每处理 3 个重复。在加药当日(0 d)和加药后 1、3、5、7、9、15、20、25、30 d 取样测定印楝素的残留量。

将印楝素在 5 种天然水体中的降解半衰期与各水体性质如 pH、总氮含量、总磷含量、化学需氧量、硝酸盐氮含量和氨氮含量进行单因子线性回归分析,分析影响印楝素降解的显著理化因素。

1.3 数据处理

根据所测峰面积,计算样本中农药的残留量(R),公式如下:

$$R = \frac{S_2 \times \rho \times V_1 \times V}{S_1 \times V_2 \times m},$$

式中, ρ 为标准溶液质量浓度,mg · L⁻¹; S_1 为注入标准溶液的峰面积, S_2 为注入样品溶液的峰面积, V 为样品溶液最终定容体积, mL; V_1 为标准溶液进样体积,

μL ; V_2 为样品溶液进样体积, μL ; m 为称样质量, g 。

试验数据采用 DPS 软件分析, 麦夸特法将水解试验数据拟合一级动力学方程得光解速率常数(k)。

2 结果与分析

2.1 印楝素的分离纯化及结构鉴定

2.1.1 硅胶柱层析分离纯化 对 w 为 44.56% 的印楝素原药进行大柱初步分离并经 TLC 鉴定, 对比印楝素原药、印楝素原药中纯度较高的馏分 A 和印楝素标准品 HPLC 法得到的色谱图(图 1a~1c), 根据保留时间, 发现该馏分 A(图 1b)与印楝素标准品谱图吻合, 进而对馏分再经硅胶柱层析, 以石油醚+乙酸乙酯洗脱, 经 HPLC 分析(图 1d), 与标准谱图 1c 比较, 分析、计算得到印楝素的质量分数为 90.37%。

2.1.2 印楝素结构鉴定 经 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 分析, 其值与文献基本一致^[20], 证实该晶体为印楝素, 其核磁共振谱的化学位移 ^{13}C NMR 与文献值的比较见表 1, 印楝素结构式见图 2。

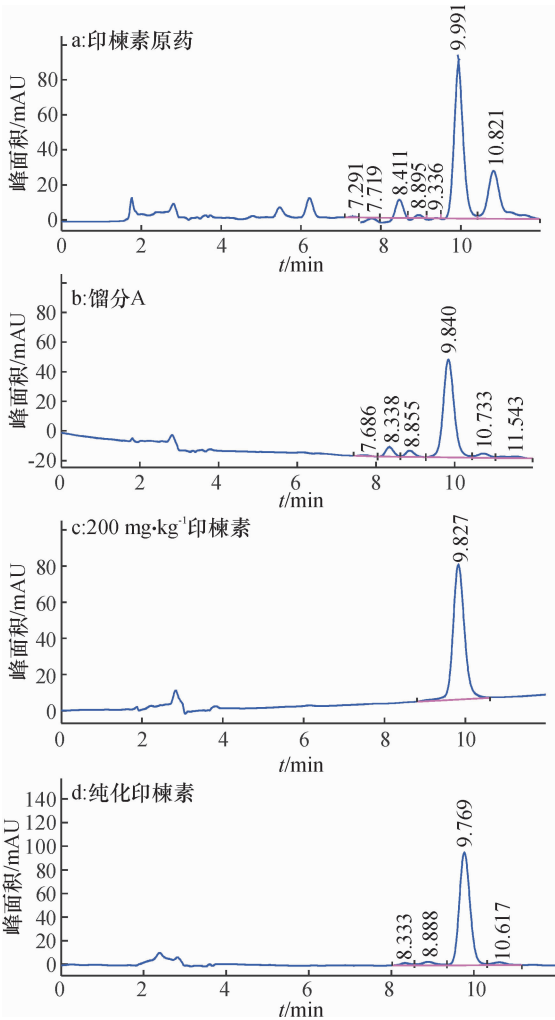


图 1 高效液相色谱图

Fig.1 High efficiency liquid chromatography
<http://xuebao.scau.edu.cn>

表 1 印楝素的核磁共振谱数据¹³C NMR

Tab.1 ¹³C NMR data of azadirachtin ×10⁻⁶

碳原子 编号	化学位移		碳原子 编号	化学位移	
	文献值 ^[20]	实测值		文献值 ^[20]	实测值
C-1	70.7	70.6	C-19	69.1	69.0
C-2	29.8	29.7	C-20	83.6	83.4
C-3	67.1	67.0	C-21	107.5	107.6
C-4	45.6	45.6	C-22	108.8	108.7
C-5	37.1	36.9	C-23	147.0	146.8
C-6	74.5	74.3	C-28	73.0	72.9
C-7	76.5	76.5	C-29	166.2	166.3
C-8	50.4	50.3	C-30	18.4	18.5
C-9	44.9	44.7	3-C=O	173.3	173.5
C-10	52.6	52.5	CH ₃	21.4	21.4
C-11	104.2	104.2	29-OCH ₃	52.7	52.8
C-12	169.5	169.8	12-OCH ₃	53.1	53.2
C-13	70.1	70.1	0-Tig;		
C-14	68.6	68.8	C-1'	171.8	171.9
C-15	73.9	74.0	C-2'	128.8	128.6
C-16	25.1	25.0	C-3'	137.5	137.9
C-17	48.7	48.7	C-4'	14.2	14.3
C-18	20.8	21.0	C-5'	11.9	11.9

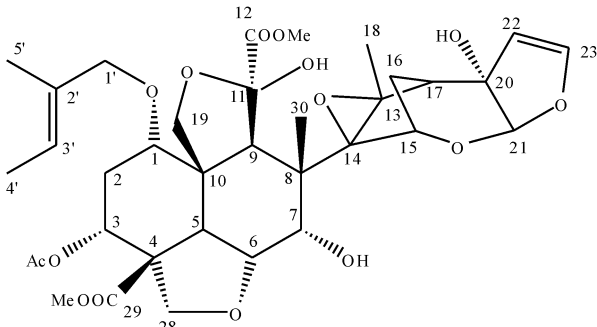


图 2 印楝素的化学结构式

Fig.2 Chemical structural formula of azadirachtin

2.2 降解产物的分离鉴定

通过研究印楝素在纯净水中水解过程的液相色谱图, 发现印楝素在水解后出现了多个水解产物峰, 印楝素水解产物经萃取、浓缩后, 样品经硅胶柱层析分离纯化, 得到一种纯度较高的印楝素 A 内脂衍生物, 经 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 分析, 其结构见图 3, 其 ^1H NMR 谱见图 4a, ^{13}C NMR 谱见图 4b。

2.3 印楝素的水化学降解

2.3.1 印楝素在水体中的添加回收试验 pH 为 1.0 和 pH 为 8.0~10.0 的缓冲溶液中的添加回收率比较低, 少于 80%, 因为印楝素在碱性和偏酸性的条件下不稳定, 容易降解, 而 pH 大于 11.0 时, 难以回收到印楝素。其他情况下添加回收率为 82.49%~94.31%, 变异系数最大为 2.88%, 符合残留检测条件。

2.3.2 印楝素的降解试验 印楝素在 pH 2.0 ~ 7.0 的缓冲溶液中的降解趋势见图 5,采用麦夸特法将试验数据用动力学方程拟合,结果见表 2。可以看出印楝素在 pH 4.0、5.0、6.0 的缓冲溶液中比较稳定,半衰期分别为 22.87、36.33 和 24.68 d。

印楝素在 pH 8.0 ~ 10.0 和 pH 1.0 的缓冲溶液中的降解趋势见图 6,采用麦夸特法将试验数据用动力学方程拟合(表 2)。从图 6 和表 2 可以看出印楝素在 pH 1.0 和碱性条件下降解很快,在 pH 为 1.0、8.0、9.0 和 10.0 缓冲溶液中降解的半衰期分别为 0.10、0.62、0.10 和 0.03 d,而在 pH 大于 11.0 的缓

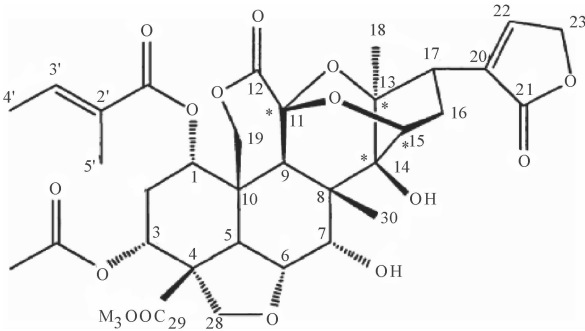


图3 印楝素水解产物印楝素 A 内酯衍生物的化学结构式
Fig.3 Structure of azadirachtin A lactone derivative of azadirachtin hydrolysate

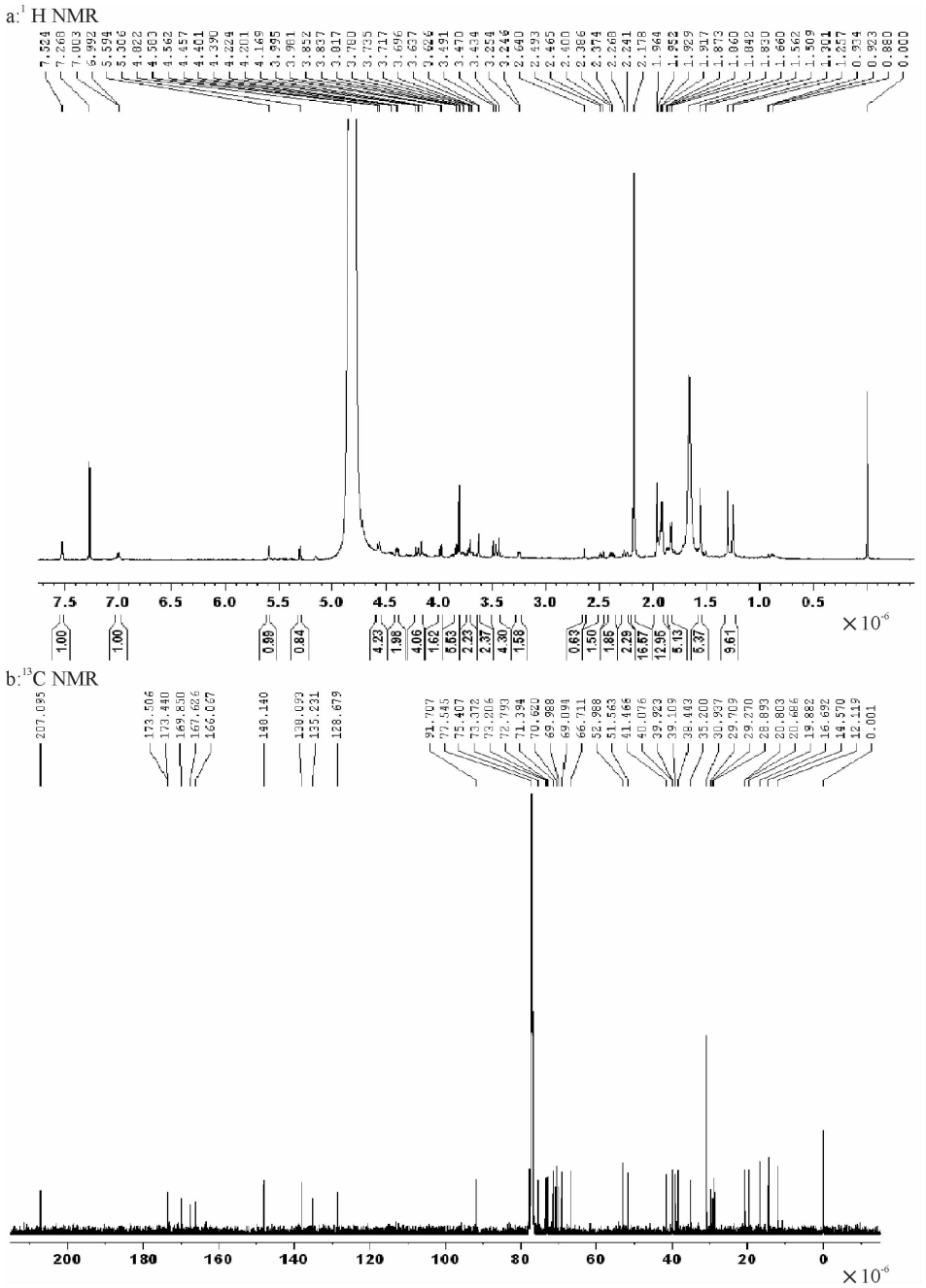


图4 印楝素内脂衍生物的¹H NMR 和¹³C NMR 图谱
Fig.4 ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of azadirachtin derivatives

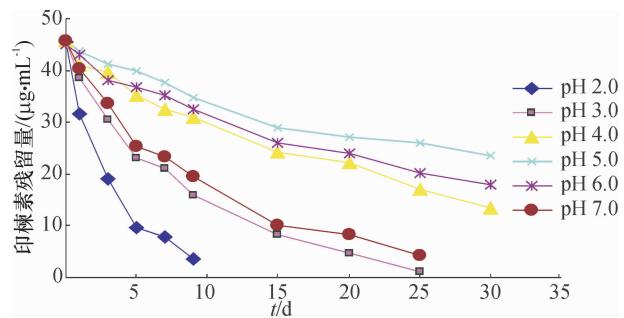


图 5 印楝素的降解曲线

Fig. 5 Degradation curves of azadirachtin

冲液中的半衰期小于 10 min。

由表 2 可以看出,印楝素在 pH 4.0 ~ 6.0 的缓冲溶液中比较稳定,而当 pH 大于 8.0 时,印楝素降解速率显著加快,降解半衰期从 pH 8.0 的 0.62 d 降到 pH 10.0 的 0.03 d,而 pH 大于 11.0 时则难以检测到印楝素的残留,印楝素在 pH 小于 3.0 的缓冲溶液中的半衰期下降的趋势小于 pH 大于 8.0 的下降趋势。总之,印楝素在碱性环境下不稳定,而在弱酸性环境中比较稳定。

表 2 印楝素的动力学分析

Tab. 2 Kinetic analysis of azadirachtin

pH	动力学方程	相关系数(<i>r</i>)	半衰期/d
1.0	$C_t = 44.31e^{-0.300\ 0t}$	0.999 8	0.10
2.0	$C_t = 42.57e^{-0.233\ 0t}$	0.997 6	2.98
3.0	$C_t = 44.61e^{-0.079\ 8t}$	0.997 4	8.68
4.0	$C_t = 44.03e^{-0.030\ 3t}$	0.994 8	22.87
5.0	$C_t = 44.85e^{-0.019\ 1t}$	0.991 2	36.33
6.0	$C_t = 44.36e^{-0.028\ 1t}$	0.997 6	24.68
7.0	$C_t = 43.04e^{-0.074\ 1t}$	0.997 7	9.35
8.0	$C_t = 43.73e^{-0.026\ 7t}$	0.975 4	0.62
9.0	$C_t = 45.16e^{-0.289\ 0t}$	0.998 8	0.10
10.0	$C_t = 44.99e^{-0.877\ 0t}$	0.999 9	0.03

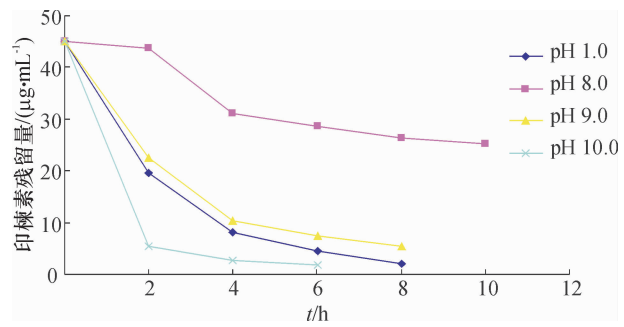


图 6 印楝素在 pH 1.0、8.0、9.0、10.0 缓冲溶液中的降解曲线

Fig. 6 Degradation curves of azadirachtin in buffer solutions at pH 1.0, 8.0, 9.0 and 10.0

2.3.3 温度对印楝素水解速率的影响 印楝素在模拟天然水体中不同温度下的降解趋势见图 7,采用麦夸特法将试验数据用动力学方程拟合,结果见表 3。从表 3 可以看出,温度对印楝素在模拟天然水体中的降解影响很大,在 pH 6.0 的缓冲溶液中,25、35 和 45 ℃ 下的降解半衰期分别为 24.68、13.69 和 2.36 d,而在 pH 7.0 的缓冲溶液中分别为 9.35、6.51 和 0.94 d,可见,当温度高于 35 ℃ 时,印楝素的降解速率明显加快,也可以看出,水体的 pH 对印楝素的降解也有很大的影响。

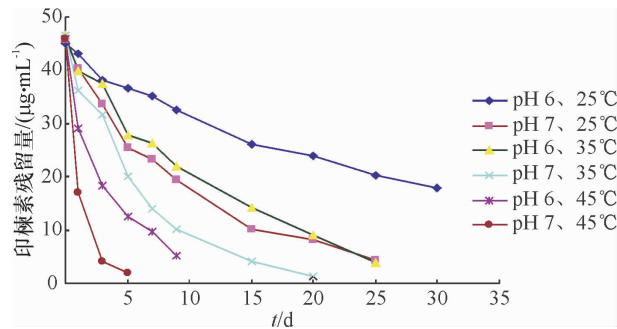


图 7 印楝素在模拟天然水体不同温度下的降解曲线

Fig. 7 Degradation curves of azadirachtin in simulated natural water at different temperatures

表 3 印楝素在模拟天然水体不同温度下的降解动力学方程

Tab. 3 Degradation kinetic equations of azadirachtin in simulated natural water at different temperatures

pH	$\theta/^\circ\text{C}$	动力学方程	相关系数(<i>r</i>)	半衰期/d
6.0	25	$C_t = 44.36e^{-0.028\ 1t}$	0.997 6	24.68
	35	$C_t = 45.08e^{-0.050\ 6t}$	0.994 3	13.69
	45	$C_t = 47.63e^{-0.294\ 0t}$	0.992 4	2.36
7.0	25	$C_t = 43.04e^{-0.074\ 1t}$	0.997 7	9.35
	35	$C_t = 45.57e^{-0.106\ 0t}$	0.994 5	6.51
	45	$C_t = 45.98e^{-0.737\ 0t}$	0.999 9	0.94

2.3.4 印楝素在天然水体中的水解动力学 印楝素在天然水体中的降解结果见表 4。从表 4 可以看出,印楝素在水库水中的降解半衰期最长,为 37.06 d,在湖水中的半衰期最短,为 6.43 d,在地表水和稻田水中降解的半衰期相差不大,分别为 15.90 和 14.91 d,在珠江水中的降解半衰期相对较小,为 12.19 d。将印楝素在水体中降解的半衰期与水体理化性质进行单因子线性回归分析(表 5),从表 5 可以看出印楝素在水体中的降解与 pH 表现出良好的相关性,相关系数为 0.995 9,而与总氮含量、总磷含量、化学需氧量、硝酸盐氮含量和氨氮含量的相关性很差。

表4 印楝素在天然水体中的降解动力学方程

Tab.4 Degradation kinetic equations of azadirachtin in natural water

水体	动力学方程	相关系数(<i>r</i>)	半衰期/d
珠江水	$C_t = 46.76e^{-0.056\ 9t}$	0.997 4	12.19
稻田水	$C_t = 45.98e^{-0.046\ 5t}$	0.989 7	14.91
地表水	$C_t = 45.72e^{-0.043\ 6t}$	0.996 6	15.90
湖水	$C_t = 44.79e^{-0.108\ 0t}$	0.994 2	6.43
水库水	$C_t = 44.96e^{-0.018\ 0t}$	0.995 0	37.06

表5 印楝素降解半衰期与水体理化性质的相关性分析

Tab.5 Analysis of the correlation between the degradation half-life of azadirachtin and physical/chemical properties of water

理化性质	回归方程 ¹⁾	相关系数(<i>r</i>)
pH	$y = 183.570 - 23.537\ 0x$	0.995 9
总磷含量	$y = 20.995 - 11.123\ 0x$	0.285 5
总氮含量	$y = 27.190 - 2.367\ 8x$	0.498 0
化学需氧量	$y = 18.449 - 0.009\ 3x$	0.044 7
硝酸盐氮含量	$y = 20.352 - 2.726\ 1x$	0.376 8
氨氮含量	$y = 16.873 + 0.890\ 6x$	0.319 1

1)*y* 为印楝素半衰期,*x* 为对应的理化性质。

3 结论

印楝素在不同温度下的水解试验表明,温度对其降解影响较大,在 pH 6.0 的缓冲溶液中,25、35 和 45 ℃ 下的降解半衰期分别为 24.68、13.69 和 2.36 d,而在 pH 7.0 的缓冲溶液中分别为 9.35、6.51、0.94 d,可见,当温度高于 35 ℃ 时,印楝素 A 的降解速率明显加快,所以在印楝素的储存过程中,要尽量避免高温。在研究印楝素水解产物时发现,HPLC 色谱图上显示有多个水解产物峰,但只分离到 1 种纯度较高的产物,通过硅胶柱层析对印楝素的水解产物进行了分离及结构鉴定,确定分离的水解产物为印楝素 A 内酯衍生物。其他的水解产物有待进一步的分离和结构鉴定。本研究通过硅胶柱层析对 *w* 为 44.56% 的印楝素原药进行分离纯化,可以得到 *w* 为 90% 以上的印楝素原药。水解试验表明,印楝素在弱酸性环境中比较稳定,而碱性环境下极不稳定。印楝素在天然水体中的降解受 pH 影响显著,而与总氮含量、总磷含量、化学需氧量、硝酸盐氮和氨氮含量等因子的相关性不明显。

印楝素水解产物的结构表征、合成及其在环境中的归宿与生态毒理效应还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 荣晓东,徐汉虹,赵善欢. 植物性杀虫剂印楝的研究进展[J]. 农药学报,2000(2): 9-14.

[2] 谭卫红,宋湛谦. 天然植物杀虫剂印楝素的研究进展[J]. 华南热带农业大学学报,2004,10(1): 23-29.

[3] 赵淑英,王秋,罗万春. 印楝植物农药的研究进展[J]. 济南大学学报,2004,18(2): 145-149.

[4] 张宗炳,樊德方,钱传范,等. 杀虫药剂环境毒理学[M]. 北京:中国农业出版社,1989: 25-89.

[5] 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京:中国环境科学出版社,1999: 78-83.

[6] WEI J, FURRER G, SCHULIN R. Kinetics of carbosulfan degradation in the aqueous phase in the presence of a cosolvent[J]. J Environ Qual, 2000, 29(5): 1481-1487.

[7] 王连生. 有机污染化学[M]. 北京:科学出版社,1990: 208-255.

[8] SARMAH A K, KOOKANA R S, DUFFY M J, et al. Hydrolysis of triasulfuron, metsulfuron-methyl and chlorsulfuron in alkaline soil and aqueous solutions[J]. Pest Manag Sci, 2000, 56(5): 463-471.

[9] WET J, FURRIE G, KAUFMANN S, et al. Influence of clay minerals on the hydrolysis of carbamate pesticides[J]. Environ Sci Technol, 2001, 35(11): 2226-2232.

[10] 韩丙军,何书海,林靖凌,等. 温度影响印楝素 A 及同系物降解动力学研究[J]. 现代农药,2007(6): 30-34.

[11] 韩丙军,陈丽霞,黄华平,等. 印楝素 A 降解动力学研究[J]. 热带作物学报,2008(1): 97-101.

[12] 严亚丽,陈丽霞,彭黎旭. 水分影响印楝素及同系物降解动力学研究[J]. 热带农业科学,2009(5): 30-32.

[13] 徐勇,郭鑫宇,项盛,等. 植物源杀虫剂印楝素研究开发及应用进展[J]. 现代农药,2014(5): 31-37.

[14] 罗应兰,刘宏程. 超声波固相萃取-高效液相色谱法同时测定茶叶中印楝素及类似物残留量[J]. 农药,2016(12): 915-917.

[15] 周颖,安莹,燕传勇,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中印楝素 A 和 B 的残留量[J]. 理化检验,2016,52(11): 1292-1296.

[16] GAI M N, ÁLVAREZ C, VENEGAS R, et al. An HPLC method for determination of azadirachtin residues in bovine muscle[J]. J Chromatogr Sci, 2011, 49(4): 327-331.

[17] POZO O J, MARIN J M, SANCHO J V, et al. Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 992(1/2): 133-140.

[18] 杨克武,莫汉宏,安凤春,等. 有机化合物水解的研究方法[J]. 环境化学,1994,13(3): 206-209.

[19] 樊德方. 农药残留分析与检测[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982: 8-26.

[20] SHAUN J, DAVID E. Supercritical fluid extraction of oil and triterpenoids from neem seeds[J]. Phytochem Analysis, 1997, 8(5): 228-232.

【责任编辑 霍欢】