农药学学报 2016, 18(3): 299-303
Chinese Journal of Pesticide Science http://www.nyxxb.com.cn

·研究论文· **DOI**: 10.16801/j.issn.1008-7303.2016.0039

多杀菌素 B 的半合成制备方法

赖 青[1], 欧晓明[2], 裴 晖[2], 刘苏友[1], 马大友[*,1]

(1. 中南大学 药学院，长沙 410013；2. 湖南化工研究院，长沙 410007)

摘 要：多杀菌素 B 具有很好的杀虫活性，但其天然含量很低，不易获得。作者以单质碘、乙酸钠和氢氧化钠为反应试剂，甲醇为溶剂，通过对反应条件优化，成功地将多杀菌素 A 中福乐糖胺氮原子上的 1 个甲基脱去，建立了一条以来源丰富的多杀菌素 A 为原料，简便、高效合成多杀菌素 B 的方法，多杀菌素 B 收率高达 81%，为其开发应用及衍生研究奠定了基础。多杀菌素 B 的结构经 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 HRESI-MS 表征。

关键词: 多杀菌素 B; 多杀菌素 A; 多杀菌素; 合成; 条件优化

中图分类号：S482.39 **文献标志码：**A **文章编号：**1008-7303(2016)03-0299-05

Semisynthesis of spinosyn B

LAI Qing[1], OU Xiaoming[2], PEI Hui[2], LIU Suyou[1], MA Dayou[*,1]

(1. *School of Pharmaceutical Sicences of Central South University, Changsha* 410013, *China*;
2. *Hunan Research Institute of Chemical Industry, Changsha* 410007, *China*)

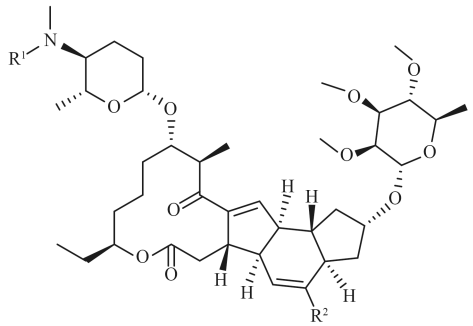
Abstract: Spinosyn B bears very potent insecticidal acitivity. However, it is difficult to obtain because of its low concentration in natural. In this paper, spinosyn B was successfully synthesized from spinosyn A, the major component in spinosad, utilizing iodine, sodium acetate and sodium hydroxide as reagents and methanol as the solvent. After optimization, the yield has been improved to 81%. The structure of spinosyn B was confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and HRESI-MS.

Keywords: spinosyn B; spinosyn A; spinosad; synthesis; optimization

多杀菌素 (spinosad) 是由陶氏益农公司开发的一种无公害高效生物杀虫剂，是刺糖多胞菌 *Saccharopolyspora spinosa* 发酵液中提取的一种能够同时激活烟碱型乙酰胆碱受体和 *γ*-氨基丁酸受体的大环内酯类化合物，能有效控制鳞翅目、双翅目和缨翅目害虫，同时对鞘翅目、直翅目、膜翅目、等翅目、蚤目、革翅目和啮虫目的某些特定种类的害虫也有一定的毒杀作用[1-4]。商品化的多杀菌素主要活性成分为多杀菌素 A 和多杀菌素 D (图式 1)，分别占多杀菌素总含量的 85% 及 15% 左右[5]。多杀菌素 B (图式 1) 在结构上比多杀菌素 A 少一个 *N*-甲基，其显示了比多杀菌素 A 更好的杀虫活性，如，多杀菌素 B 对烟青虫 *Heliothis virescens* 的半数致死浓度 (LC_{50} 值) 为 0.4 mg/L，与多杀菌素 A 的 (0.3 mg/L) 相当，但其对棉蚜 *Aphis gossypii* 和红蜘蛛 *Tetranychus urticae* 的 LC_{50} 值分别为 11 和 0.9 mg/L，明显优于多杀菌素 A (LC_{50} 值分别为 42~88 和 5.3 mg/L[6-7])。另外，

收稿日期：2016-02-25；**录用日期：**2016-03-31.
基金项目：“十二五”国家科技支撑计划资助项目 (2011BAE06B04-12)；国家自然科学基金资助项目 (21472247).
作者简介：赖青，男，硕士研究生，**E-mail：**laiqing1991@163.com；*马大友，通信作者(Author for correspondence)，副教授，从事药物分子设计合成及结构与活性关系研究及有机合成方法研究，**E-mail：**madayou@csu.edu.cn

由于多杀菌素 B 含有一个仲胺，可以较容易地通过与卤代烷的亲核取代反应得到多种结构新颖的半合成多杀菌素衍生物，有利于进一步开发结构新颖的高活性杀虫剂。由于在天然发酵得到的多杀菌素中多杀菌素 B 的含量极少，难以大量获得，因此多杀菌素 B 的化学法制备具有一定的应用开发价值及研究意义。笔者通过研究发现并建立了一条以多杀菌素 A 为原料，高效制备多杀菌素 B 的方法，其合成路线见图式 2。



Spinosyn A: $R^1 = CH_3$, $R^2 = H$
Spinosyn B: $R^1 = H$, $R^2 = H$
Spinosyn D: $R^1 = CH_3$, $R^2 = CH_3$

图式 1 多杀菌素 A、多杀菌素 B 和多杀菌素 D 的化学结构

Scheme 1 Chemical structure of spinosyn A, spinosyn B and spinosyn D

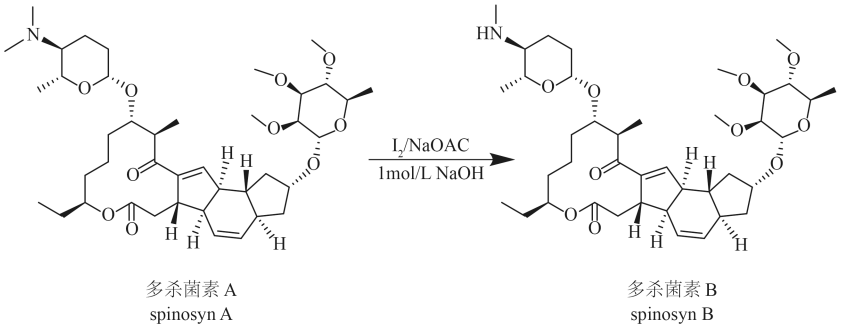
1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker DRX 型核磁共振仪 (400 MHz,以 $CDCl_3$ 为溶剂，TMS 为内标)；Trace 2000 Polaris Q 型质谱仪。多杀菌素 (spinosad，美国陶氏益农公司)，通过甲醇重结晶得到多杀菌素 A[8-9]；其余所用试剂均为分析或化学纯。

1.2 多杀菌素 B 的合成

在 500 mL 茄型瓶中，先加入 5.00 g (6.83 mmol) 多杀菌素 A 和 200 mL 甲醇，再将 1.12 g (13.66 mmol) 乙酸钠溶于 1 mL 水中并加入反应体系，最后加入 6.94 g 单质碘 (27.32 mmol)，于 70 ℃ 下搅拌回流反应 12 h。反应过程中用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液保持反应液 pH = 8~9。旋转蒸发除去甲醇，加入 100 mL 饱和硫代硫酸钠溶液，用乙酸乙酯 (3 × 100 mL) 萃取，合并有机相，用无水硫酸钠干燥 4 h。减压旋转蒸发脱去溶剂后经硅胶 (200 ~300 目) 柱层析 [洗脱剂：V(乙酸乙酯) : V(甲醇) : V(三乙胺) = 10 : 1 : 0.1] 纯化得淡黄色固体多杀菌素 B[10-11] 3.96 g，收率 81%。m.p. 81~89 ℃；^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)，δ : 6.78 (s, 1 H), 5.89 (d, J = 9.8 Hz,1 H), 5.81 (d, J = 9.8 Hz, 1 H), 4.89~4.84 (m, 1 H), 4.73~4.64 (m, 1 H), 4.53~4.47 (m, 1 H), 4.36~4.29 (m, 1 H), 3.69~3.62 (m, 1 H), 3.59~3.55 (m, 4 H), 3.53~3.45 (m, 10 H), 3.35~3.26 (m, 1 H), 3.17~3.09 (m, 2 H), 3.06~2.99 (m, 1 H), 2.92~2.84 (m, 1 H), 2.51 (s, 3 H), 2.45~2.32 (m, 3 H), 2.31~2.23 (m, 1 H), 2.23~2.12 (m, 2 H), 2.02~1.90 (m, 2 H), 1.83~1.71 (m, 1 H), 1.62~1.40 (m, 9 H), 1.35 (d, J = 6.1 Hz, 4 H), 1.29 (d, J = 6.2 Hz, 3 H), 1.19 (d, J = 6.7 Hz, 4 H), 0.98~0.88 (m, 1 H), 0.83 (t, J = 7.4 Hz, 3 H)；^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)，δ : 202.76, 172.56, 147.57, 144.08, 129.33, 128.78, 103.12, 95.40, 82.24, 81.01, 80.85, 77.68, 76.05, 74.45, 67.91, 60.95, 60.59, 59.01, 57.70, 49.42, 47.58, 46.02, 41.50, 41.15, 37.36, 36.26, 34.29, 34.19, 33.11, 30.42, 30.11, 28.37, 27.35, 21.50, 19.04, 17.79, 16.24, 9.37；HRESI-MS：$C_{40}H_{63}NO_{10}$ $[M+H]^+$，计算值 718.453 02，测定值 718.452 39。



图式 2 多杀菌素 A 脱甲基制备多杀菌素 B 的反应

Scheme 2 Demethylation of spinosyn A for the preparation of spinosyn B

2 结果与讨论

多杀菌素 A 是农药多杀菌素的主要成分，来源丰富，只需将其叔胺氮原子上的甲基脱去一个即可得到多杀菌素 B，是合成多杀菌素 B 较为理想的原料来源。常见的叔胺脱 *N*-甲基的方法有：1) 酸回流，如硫酸和氢卤酸。但硫酸作为脱甲基试剂，反应活性较低[12]；氢卤酸与乙酸溶液共热脱甲基是较为常用的方法[13]。2) Lewis 酸，如卤化硼、卤化铝等。常用的有 BBr_3，其脱甲基反应条件温和，温度一般为 –80 ~ –20 ℃[14]。3) Me_3SiI 作为脱甲基试剂反应温和，不影响醛基和酯基[15]。4) Von Braun 反应[16]。利用三级胺和溴化氰反应，然后水解得到二级胺，但由于溴化氰的剧毒性使得该反应的应用受到限制[17]。5) 一种较为温和的方法是利用氯甲酸的酯 (如氯甲酸乙酯、氯甲酸苄酯) 与三级胺反应后醇解得到二级胺，反应活性一般为：苄基＞甲基＞其他烷基[18]。6) H_2 和 Pd/C 也常用来脱甲基[19]，但在尝试用 H_2 和 Pd/C 制备多杀菌素 B 时，发现其反应条件较为严苛，且收率不高。Liu 等发现，利用单质碘可以较方便地脱去红霉素衍生物叔胺 *N* 上的一个甲基[20]，笔者以该方法为基础，通过条件优化，研究了多杀菌素 A 脱 *N*-甲基制备多杀菌素 B 的反应。

2.1 多杀菌素 B 合成方法优化

在 50 mL 茄型瓶中依次加入 100 mg (0.14 mmol) 多杀菌素 A 及 10 mL 不同溶剂，将 22.97 mg (0.28 mmol) 乙酸钠溶于 100 μL 水中并加入反应体系，最后加入不同量的单质碘，搅拌下于不同温度下反应，TLC 监测产物浓度变化确定反应时间。反应过程中使用或不用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液，保持反应液 pH = 8~9。反应完毕旋转蒸发除去溶剂，加入 50 mL 饱和硫代硫酸钠溶液，用乙酸乙酯 (3 × 50 mL) 萃取，合并有机相，用无水硫酸钠干燥 4 h。减压旋转蒸发脱去溶剂后经硅胶 (200~300 目) 柱层析 [洗脱剂：*V* (乙酸乙酯) : *V* (甲醇) : *V* (三乙胺) = 10 : 1 : 0.1] 纯化得淡黄色固体多杀菌素 B。

表 1 为合成多杀菌素 B 的各种反应条件，各组反应中多杀菌素 A 的用量均为 100 mg (0.14 mmol)，乙酸钠用量均为 22.97 mg (0.28 mmol)，溶剂用量

表 1 合成多杀菌素 B 的反应条件优化

Table 1 Optimization of the reaction for the synthesis of spinosyn B

序号 No.	乙酸钠 CH_3COONa/mmol	碘 I_2/mmol	溶剂 Solvent	pH	温度 Temperature/℃	时间 Time/h	收率 Yield/%
1	0.28	0.56	甲醇 Methanol	5~6	室温 r.t.	24	62
2	0.28	0.56	甲醇 Methanol	8~9	室温 r.t.	24	78
3	0.28	0.14	甲醇 Methanol	8~9	室温 r.t.	24	42
4	0.28	0.28	甲醇 Methanol	8~9	室温 r.t.	24	61
5	0.28	0.56	甲醇 Methanol	8~9	室温 r.t	24	79
6	0.28	0.84	甲醇 Methanol	8~9	室温 r.t.	24	80
7	0.28	0.56	乙醇 Ethanol	8~9	室温 r.t	24	69
8	0.28	0.56	乙腈 Acetonitrile	8~9	室温 r.t.	24	31
9	0.28	0.56	丙酮 Acetone	8~9	室温 r.t.	24	43
10	0.28	0.56	四氢呋喃 Tetrahydrofuran	8~9	室温 r.t.	24	0
11	0.28	0.56	甲醇 Methanol	8~9	45	12	76
12	0.28	0.56	甲醇 Methanol	8~9	70	12	80

均为 10 mL。首先考查了反应液 pH 值对反应进程的影响 (No.1 ~ No.2)：No.1 中并未调节反应体系的 pH，反应液 pH = 5~6，反应体系始终为棕色；在 No.2 中，用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节反应体系 pH = 8~9，反应液颜色逐渐变淡，产率明显高于 No.1，推测反应过程中体系保持 pH = 8~9 可避免产生氢碘酸，有利于反应的进行。随后考查了单质碘的用量对反应的影响 (No.3 ~ No.6)：No.3 中碘的用量为 0.14 mmol，No.4 中碘的用量为 0.28 mmol，两者反应液颜色在 2 h 之内均相继褪去变为无色，TLC 监测产物浓度不再随时间变化；No.5 和 No.6 中碘过量较多，分别为 0.56 及 0.84 mmol，两者反应体系始终保持棕色，且 TLC 监测显示产物浓度在 24 h 之内持续增加，24 h 之后浓度不再变化，No.5 和 No.6 收率相近，表明 0.56 mmol 的碘已经足够反应进行完全。

确定用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节反应液 pH = 8~9 的必要性及单质碘的用量之后，考察了不同反应溶剂对反应进程的影响 (No.7~No.10)：发现用乙醇 (No.7)、乙腈 (No.8) 和丙酮 (No.9) 作溶剂时，反应进行 5 h 后均开始出现不同程度的混浊，且有固体物质析出粘于瓶壁上，TLC 监测显示在 No.7~No.9 反应中均产生了一个极性比多杀菌素 A 小的杂质点，而用甲醇为溶剂时并未观察到该杂质点的生成；用四氢呋喃 (No.10) 为溶剂时反应并未发生。最后，在 45 ℃ (No.11) 和 70 ℃ (No.12) 下分别进行反应，TLC 监测显示产物的浓度以较快速率增加，且 12 h 后产物的浓度不再变化，结果表明，升高温度能显著加快反应速度，减少反应时间。

综上所述，合成多杀菌素 B 的最佳反应条件为：n(多杀菌素A) : n(乙酸钠) : n(单质碘) = 1 : 2 : 4，以甲醇为溶剂，70 ℃ 下回流反应 12 h，反应过程中用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节反应液 pH = 8~9，收率 80%。

2.2 多杀菌素 B 的放大制备

按照上述小量反应优化得到的最佳反应条件进行了放大制备，成功地将 5.00 g (6.83 mmol) 多杀菌素 A 转化并得到 3.96 g 多杀菌素 B，收率高达 81%。

3 结论

本文报道的多杀菌素 B 合成方法以来源丰富的多杀菌素 A 为原料，用简单易得的乙酸钠、单质碘、1 mol/L 的氢氧化钠溶液和甲醇为试剂，具有反应操作简便、反应时间短、产率高、适合大量制备的优点，为多杀菌素 B 的开发应用奠定了基础。后期工作中，还将通过亲核取代反应在多杀菌素 B 的仲胺氮原子上引入各种取代基团，进一步设计合成具有较好杀虫活性的新型多杀菌素衍生物。

参考文献(Reference):

[1] 姚瑛, 李涛, 李敏, 等. 生物农药多杀菌素应用研究进展[J]. 精细化工中间体, 2013, 43(6): 13-16.
YAO Y, LI T, LI M, et al. Research progress on application of biopesticide spinosad[J]. Fine Chem Intermed, 2013, 43(6): 13-16.

[2] 蔡恒, 王燕, 万红贵, 等. 刺糖多孢菌生产多杀菌素的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(2): 124-129.
CAI H, WANG Y, WAN H G, et al. Research progress of spinosad produced by *Saccharopolyspora spinosa*[J]. China Biotechnol, 2011, 31(2): 124-129.

[3] SPARKS T C, ANZEVENO P B, MARTYNOW J G, et al. The application of artificial neural networks to the identification of new spinosoids with improved biological activity toward larvae of *Heliothis virescens*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2000, 67(3): 187-197.

[4] THOMPSON G D, DUTTON R, SPARKS T C. Spinosad-a case study: an example from a natural products discovery programme[J]. Pest Manage Sci, 2000, 56(8): 696-702.

[5] WANG D, WANG Y M, LIU H Y, et al. Lethal and sublethal effects of spinosad on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. J Econ Entomol, 2013, 106(4): 1825-1831.

[6] SPARKS T C, THOMPSON G D, KIRST H A, et al. Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae[J]. J Econ Entomol, 1998, 91(6): 1277-1283.

[7] SPARKS T C, CROUSE G D, DRIPPS J E, et al. Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram[J]. J Comput-Aided Mol Des, 2008, 22(6-7): 393-401.

[8] 梅刚, 刘苏友, 马大友, 等. 多杀菌素 A 的纯化方法研究[J]. 精细化工中间体, 2013, 43(4): 14-16.
MEI G, LIU S Y, MA D Y, et al. Study on purification of spinosad A from spinosad API[J]. Fine Chem Intermed, 2013, 43(4): 14-16.

[9] 夏燕春, 王超, 吴江磊, 等. 多杀菌素分离纯化工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 95-101.
XIA Y C, WANG C, WU J L, et al. Extraction and purification of spinosad[J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2014, 29(3): 95-101.

[10] GRAUPNER P R, MARTYNOW J, ANZEVENO P B. Spinosyn G: proof of structure by semisynthesis[J]. J Org Chem, 2005, 70(6): 2154-2160.

[11] LEWER P, HAHN D R, KARR L L, et al. Discovery of the butenyl-spinosyn insecticides: novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(12): 4185-4196.

[12] BLAND D E, LOGAN A F. The properties of syringyl, guaiacyl and *p*-hydroxyphenyl artificial lignins[J]. Biochem J, 1965, 95(2): 515-520.

[13] LI G G, PATEL D, HRUBY V J. An efficient procedure for the demethylation of aryl-methyl ethers in optically pure unusual amino-acids[J]. Tetrah Lett, 1993, 34(34): 5393-5396.

[14] 蔡孟深, 曹小冬. 碳苷研究 Ⅴ. 用 Grignard 试剂合成取代苯酚中酚羟基的保护及脱保护[J]. 化学学报, 1988, 46(9): 887-894.
CAI M S, CAO X D. Studies on C-Glycosides Ⅴ. Protection and deprotection of phenolic hydroxy group in the synthesis of substituted phenols by Grignard reagents[J]. Acta Chim Sinica, 1988, 46(9): 887-894.

[15] JUNG M E, LYSTER M A. Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ether hydrolysis[J]. J Org Chem, 1977, 42(23): 3761-3764.

[16] PRADAL A, EVANO G. A vinylic Rosenmund-von Braun reaction: practical synthesis of acrylonitriles[J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(80): 11907-11910.

[17] NGUYEN T, WICKI M A, SNIECKUS V. Combined directed ortho metalation/cross-coupling strategies: synthesis of the tetracyclic A/B/C/D ring core of the antitumor agent camptothecin[J]. J Org Chem, 2004, 69(23): 7816-7821.

[18] OLOFSON R A, MARTZ J T, SENET J P, et al. A new reagent for the selective, high-yield *n*-dealkylation of teritary amines: improved syntheses of naltrexone and nalbuphine[J]. J Org Chem, 1984, 49(11): 2081-2082.

[19] LE BIHAN G, RONDU F, PELÉ-TOUNIAN A, et al. Design and synthesis of imidazoline derivatives active on glucose homeostasis in a rat model of type II diabetes. 2. Syntheses and biological activities of 1,4-dialkyl-, 1,4-dibenzyl, and 1-benzyl-4-alkyl-2-(4',5'-dihydro-1'*H*-imidazol-2'-yl)piperazines and isosteric analogues of imidazoline[J]. J Med Chem, 1999, 42(9): 1587-1603.

[20] LIU Y Q, LI Y, CHEN Y, et al. 9-Dihydroerythromycins as non-antibiotic motilin receptor agonists[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(19): 5658-5661.

(责任编辑: 金淑惠)