

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

A01N 31/16



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96120600.4

[43]公开日 1998年6月3日

[11] 公开号 CN 1183216A

[22]申请日 96.11.22

[71]申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101北京市朝阳区大屯路15号

共同申请人 北京世纪福尔得生物技术有限公司

[72]发明人 张志义 史鸿林 朱斌 赵国华

张红雨 赵红霞 杨红英

[74]专利代理机构 中科专利代理有限责任公司

代理人 严 舫

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 含竹红菌甲素的新型生物农药杀虫剂原药的制法

## [57]摘要

本发明是关于含竹红菌甲素(HA)的杀虫剂原药的生产方法。该原药可用于配制各种杀虫剂制剂。其生产方法包括：原料竹红菌的识别、粉碎制备、提取、固液分离、浓缩、二次固液分离，中间体的洗涤纯化、干燥及产品纯度分析和总回收率测定。用本发明含HA的生物农药杀虫剂原药配制成的《龙弗特》杀虫剂制剂，田间药效试验证明性能优越，是一种杀灭棉铃虫的强毒力、长效性、能保护天敌、无环境污染、对人畜无害的杀虫剂。

# 权利要求书

---

1. 一种新型生物农药杀虫剂的生产方法，其特征在于含竹红菌甲素的杀虫剂原药的生产工艺方法包括如下各步工序：（1）原料竹红菌体的粉碎制备，（2）提取过程，（3）固液分离包括提取物的滤棒过滤、沉淀过滤和板框过滤；（4）减压浓缩；（5）减压浓缩物的离心分离；（6）中间体洗涤纯化，包括两种洗涤方案：方案1是用石油醚洗涤，方案2是先用热水洗涤，后用煤油洗涤，以及（7）中间体干燥；其中所说的原料竹红菌体粉碎制备是用粉碎机粉碎、筛分，取粒度—20目（过筛）的级分100%；所说的提取过程，包括用溶剂丙酮在常温下以固液比=1:10—1:8浸泡6—12小时，用溶剂丙酮或醇类在提取罐中以固液比=1:10—1:6，在 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 提取4—1小时，提取2—3次；所说的固液分离可进行2—3次，有三种方法，其中对第一次提取物采用滤棒过滤，滤棒孔隙 $0.5 - 5 \mu\text{m}$ ，沉淀过滤要求提取液通过100目的双层沉降滤器，板框过滤要求提取液通过2#滤布（ $\phi = 0.5 \mu\text{m}$ ）；所说的减压浓缩，温度范围为 $50 - 60^\circ\text{C}$ ，排料固液比=1:2；浓缩物的固液分离是在 $> 1000\text{rpm}$ 的离心机中进行，过滤袋孔径为 $\phi = 0.5 \mu\text{m}$ ；所说的中间体洗涤纯化，其中方案1石油醚洗涤，是以固液比=1:6—1:10，搅拌罐的温度一般为 $40 - 50^\circ\text{C}$ ，可洗涤2—3次，每次洗涤后均进行固液分离，方案2是先用 $90^\circ\text{C}$ 热水洗涤，或用含表面活性剂（中性）5‰的热水洗涤，温度一般 $55 - 60^\circ\text{C}$ ，然后用煤油洗涤，固液比=1:6，温度 $40 - 50^\circ\text{C}$ ；所说的中间体干燥是在烘箱中进行，温度为 $55 - 62^\circ\text{C}$ ，干燥3—5小时，使其中水分含量 $< 5\%$ 。

2. 如权利要求1所述的农药杀虫剂的生产工艺方法，其特征在于提取所用的溶剂醇类为甲醇或乙醇。

3. 如权利要求1所述的农药杀虫剂的生产工艺方法，其特征在于中间体洗涤纯化方案热水洗涤，温度最佳为 $60^\circ\text{C}$ ，煤油洗涤的温度最佳为 $50^\circ\text{C}$ 。

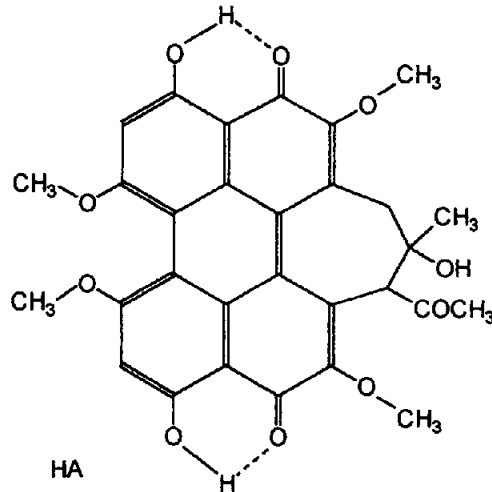
4. 如权利要求1所述的农药杀虫剂的生产工艺方法，其特征在于其最佳干燥温度为 $60^\circ\text{C}$ ，时间最好4小时。

# 说明书

## 含竹红菌甲素的新型生物农药杀虫剂原药的制法

本发明是关于新型农药的生产工艺，具体为含竹红菌甲素（HA）的杀虫剂原药生产方法。

已知天然产物竹红菌甲素的英文名称为“Hypocrellin A”，属于4，9-二羟基-3，10-萘醌衍生物，其分子式为 $C_{30}H_{26}O_{10}$ ，分子量546，结构式为下：



其标准品的理化性质为：红色晶体；无臭无味；纯度98%；熔点209—210℃；易溶于氯仿、丙酮、乙酸乙酯，溶于甲醇、乙醇，微溶于石油醚，几乎不溶于水，但制成胶束后可溶于水中；不易发生水解作用；在碱性环境中，可自敏光氧化，继之分解为各种分子碎片；定性谱图包括红外光谱、紫外光谱、质谱、核磁共振谱。

竹红菌甲素是从我国特有丰富天然资源天然微生物真菌竹红菌 [*hypocrella bambusae* (B. et Br.) sacc.] 中提取获得的天然化合物。民间曾用以其治疗胃痛和关节炎，现已发展为治疗皮肤顽症、抗艾滋病、抗肿瘤潜在的有效光敏药物。本发明继以往对HA的基础研究，首次将HA开发成防治棉铃虫的新型生物农药。经国内外文献检索查新，未见有关竹红菌甲素用作农药杀虫剂、杀菌剂的研究报道。

现在使用的化学农药久效磷和甲胺磷（高毒）及灭多威乳油等杀虫剂会污染环境、危害人畜安全，同时会杀死棉铃虫的天敌；现有市售生物农药苏云金杆菌悬浮剂（BT）和病毒杀虫剂，防治棉铃虫的药效不理想，尚在继续进行技术攻关，提高其毒力。本发明的含竹红菌甲素杀虫剂原药（HA ≥ 60%）和制剂《龙弗特》等，经动物试验结果，证明属于低毒级，实际上为微毒级，且无致突效应，对眼睛和皮肤均无刺激，施用不会造成环境污染；经三省五地、二年田间药效试验该药剂的防治棉铃虫的效果优于市售生物农药苏云金杆菌悬浮剂（BT），也优于久效磷和甲胺磷高毒化学农药（50 ml药剂/亩），虽略低于20%灭多威乳油（50 ml药剂/亩），但却为长效农药，且能保护天敌；其他优点包括：对棉花无药害，保顶芽和保铃率高，对杀不死的棉铃虫有滞育作用，对棉蚜还有抑制作用。原药和制剂在生产技术上已通过小试和中试，工艺路线简便可行。

本发明含竹红菌甲素的杀虫剂原药生产的原料竹红菌或竹黄菌，是盛产于我国滇西北，川西南，藏东南地区，野生资源丰富。竹红菌，属于子束菌纲、肉座菌科、亚肉座菌属，属于真菌。其性状为：子座肉质，干后软木质，褐红色，半球型，有孔口，直径1—2厘米；子束圆筒形，20—30×300—360微米，子束孢子8个，蠕虫形，有分隔，微黄色，右旋扭曲呈绳状，7.5—10×260—360微米，侧丝纤细，内部菌丝深褐色。

竹红菌寄主为箭竹，每年元月竹红菌子座开始形成，八月大量成熟，十月后掉落。因此，每年8，9，10月份采集为宜。因产地不同，HA含量变化不大，并且分别储存1—5年的不同产地的竹红菌，其HA含量亦在3.47—3.94%之间变化。

目前国内外对竹红菌甲素（HA）仅有结构性能的报道，而无作为农药杀虫剂、杀菌剂的报道，而且，有关竹红菌甲素（HA）的提取，只有实验室的片段简况，而从竹红菌中提取竹红菌甲素（HA）的分离方法，尚未见作为以生产为目的工业化生产的有关报导。

例如我国学者曾对其物理、化学性质、光物理、光化学、光生物特性及其作用机理进行了全面、系统的研究[蒋丽金，竹红菌素的结构、性质、光化学反应及反应机制（I，II），《科学通报》，第21期，第22期，

1990年]。通常实验室研究从竹红菌中提取竹红菌甲素、提取物的分离、纯化制备方法如下：

粉碎的竹红菌160g放在沙氏提取器中，用丙酮提取，将提取液抽干后得到的黏性固体置于盛有石油醚（60℃—90℃）的烧杯中，边加热边搅拌至沸腾、冷却、抽滤，上述操作重覆几次直到黏性固体转变成疏松状固体，再用苯—石油醚（60℃—90℃）重结晶，得3.5g竹红菌甲素粗品（HA）[引用文献：赵开弘、蒋丽金，有机化学，1989，9，P.252—254，研究简报]。缺点属小样处理，缺少具体工艺参数，照上述程序难于用在工业化生产HA。

本发明的目的是提供一种工业化生产含竹红菌甲素的杀虫剂的工艺方法，特别是含竹红菌甲素的杀虫剂制剂原药的生产工艺方法，使这种新型生物农药应用于农业生产，特别是用作杀灭棉铃虫的杀虫剂。

本发明，为生产新型生物农药含竹红菌甲素的杀虫剂的制剂，研制出了含HA的杀虫剂原药的生产工艺方法，并经小试与中试工厂试生产验证，证实该生产工艺简便可行。工艺技术内容，包括原料选用和质量指标，工艺步骤（工序），工艺参数，产品检验方法，产品使用效果及实例等。

本发明含竹红菌甲素的杀虫剂原药的生产工艺，包括如下顺序各步工序：1.原料竹红菌的识别，2.原料的粉碎制备，3.提取过程，4.固液分离，5.减压浓缩，6.第二次固液分离，7.中间体洗涤纯化，8.中间体干燥，9.产品纯度分析和总回收率测定。现对杀虫剂制剂《龙弗特》中间体（HA）生产工艺各步工序详细说明如下：

一、原料竹红菌的识别：根据竹红菌具褐红色遇碱后变绿等生化反应及具有扭曲呈绳状的8个蠕虫形孢子等形态特征，可准确识别生药。

二、原料粉碎制备：将自然存放干燥的竹红菌体，经用粉碎机粉碎后，用标准筛进行筛分，取粒度—20目（过筛）的级分100%，需防止“过粉碎”，即要求其中—180目者<5%。

### 三、提取过程

竹红菌甲素（HA）若作为传统中药的生产过程，一般是用水或乙醇提取。而本发明生物农药杀虫剂的原药生产，是用有机溶剂丙酮、氯仿、乙酸

乙酯及醇类提取，可优选丙酮为溶剂并且采用特殊的工艺与参数。丙酮提取工艺试验（小试与中试）可比性实例可参见最后附表。

1. 浸泡：本发明是将竹红菌体原料选用工业用丙酮在常温常压下在提取罐中进行浸泡。原料与溶剂的固液体积比（S : L）= 1 : 10 - 1 : 8，时间 < 12 小时，一般为 6 - 12 小时。

2. 提取：是用丙酮或醇类（包括甲醇和乙醇），优选丙酮为溶剂，提取 2 - 3 次。其固液比（S : L）= 1 : 10 - 1 : 6，提取时间 4 - 1 小时，温度保持  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 。选用两次或三次提取，是视前两次的提取率和溶剂消耗的经济可比性而定。

第一次，在提取罐中，以原料与丙酮的固液比 = 1 : 10，保持回流状态微沸约 4 小时，温度保持在  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 。观察液面出现微沸，冷凝器出现液流状回流为宜。

第二次，也在提取罐中提取。原料与丙酮的固液体积比（S : L）= 1 : 8，在  $50^\circ\text{C}$  左右或  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  保持微沸回流状态，从微沸回流状态算起经过 2 - 4 小时。

第三次：固液比（S : L）= 1 : 6，从微沸回流状态算起，经过 1 - 2 小时提取。

四、固液分离：经过两次或三次提取后，进行固液分离排渣。固液分离可利用三种方法。

1. 滤棒过滤，对第一次提取为使药渣继续完成提取可采用滤棒过滤，滤棒孔隙  $0.5 - 5 \mu\text{m}$ 。

2. 沉淀过滤，要求提取液通过 100 目的双层不锈钢网筛沉降过滤。

3. 板框过滤，要求提取液通过 2# 滤布（ $\phi = 0.5 \mu\text{m}$ ）。

五、减压浓缩：使固液分离后得到的提取液进入浓缩罐以减压回流状态浓缩，温度控制在  $50 - 60^\circ\text{C}$ ，最佳  $55^\circ\text{C}$ ，将其浓缩至膏状。排料固液比（S : L）= 1 : 2 或稍大。在提取液进入浓缩罐之前，可取样测定提取率。在减压浓缩的过程中回收溶剂。

六、固液分离：在提取液经过浓缩之后，需再次进行固液分离。固液分离是在  $> 1000 \text{ rpm}$  的离心机中进行，过滤袋孔径为  $\phi = 0.5 \mu\text{m}$ 。取其

固体物即为中间体，同时回收溶剂。

七、中间体洗涤：中间体洗涤即制浆洗涤、纯化。洗涤可采用两种方案：

1.石油醚（沸点 $60^{\circ}\text{C}-90^{\circ}\text{C}$ ）洗涤，一般在实验室采用此方案。洗涤的固液比（S:L）=1:6—1:10，可选用1:8。在加热搅拌罐中进行，温度是 $40-50^{\circ}\text{C}$ ，一般 $40-50^{\circ}\text{C}$ ，洗涤次数为2次—3次，每次洗涤后均在离心机中进行固液分离。

2.第二种洗涤方案，此方案是本发明根据实验结果提出的专用新的洗涤方案，具体分为两步：

（1）用 $90^{\circ}\text{C}$ 热水洗涤，固液比（S:L）=1:10或稍大，或用含表面活性剂（中性）5%的热水洗涤，温度约为 $60^{\circ}\text{C}$ ，以除去硬脂酸和硬脂酸酯杂质。

（2）煤油洗涤： $40^{\circ}\text{C}-50^{\circ}\text{C}$ ，最佳 $50^{\circ}\text{C}$ ，固液比（S:L）=1:6，以进一步除去硬脂酸酯杂质。

洗涤后以离心进行固液分离。本发明首次采用热水洗涤，以除去水可溶性的硬脂酸杂质，同时也首创用煤油洗涤以除去硬脂酸酯杂质，不仅效果好，而且可降低生产成本。

#### 八、中间体干燥

中间体干燥是在烘干箱中进行，温度控制在 $60^{\circ}\text{C}$ 最佳，一般为 $55-62^{\circ}\text{C}$ 。干燥时间约3—5小时，一般为4小时，使其中水分含量 $<5\%$ ，最后对产品称量包装。

#### 九、分析产品纯度及测定总回收率

一般要求杀虫剂原药产品中竹红菌甲素（HA）的含量 $\geq 60\%$ ；其余 $<40\%$ 的杂质主要是脂肪酸（为十六碳烯酸和十八碳烯酸）、脂肪酸甘油酯（三脂肪酸甘油酯），还有同属于4,9-二羟基-3,10-萘醌衍生物的竹红菌乙素（Hypocrellin B,简称HB,分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_9$ ,分子量528），这些杂质不影响HA的杀虫效果。

### 原药技术指标：

竹红菌甲素（H A）含量，%	≥ 6 0 %
水份含量	≤ 5 %
酸度（以H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 计）	0 . 1 %
热稳定性（5 0 ± 1 °C）1 4 天分解率	≤ 5 . 0 %
常温下自然光曝露 1 周分解率	≤ 5 . 0 %

鉴于H A是由天然微生物真菌竹红菌中提取获得的天然化合物，生产原药的质量控制标准H A含量≥ 6 0 %，其中杂质含量≤ 4 0 %。杂质化学成分较多，使用常规化学方法、气相色谱、液相色谱对H A分离、测定，干扰因素多，难于进行分析，采用薄层层析分离效果好，特别是能将主要干扰组分竹红菌乙素（H B）很好地分离开，并且其他主要杂质硬脂酸、硬脂酸酯、硬脂酸甘油酯，在4 6 4 nm无光吸收，用比色法均不影响对H A含量的准确测定。因此选择薄层层析—比色法是合适的选择。用此方法测定原药和制剂中H A含量，是方便准确的。

通过旋转薄层层析分离，可将红色色素H A和H B及脂肪酸、脂肪酸甘油酯分离开，除圆心红色色素（H A和H B）外，在紫外灯光照下，还能检测出二个重要荧光带，经质谱、红外、核磁，并与标准谱对照，确证它们分别是十六碳烯酸和十八碳烯酸及三脂肪酸甘油酯。由于它们在4 6 4 nm均无光吸收，故它们的存在不影响原药中H A含量的准确测定。测定乙醇提取液在4 6 4 nm的吸光度，通过计算可获得原药和制剂中H A含量。

试验方法的精确度：（1）精密度的测定（V%：3.36%；（2）准确度的测定平均回收率：95.95%；（3）线性范围：点样在1.97 μg-11.82 μg范围内与4 6 4 nm吸光度呈良好的直线关系。

#### 实施例 1

取竹红菌体原料在提取罐中用丙酮以固液体积比 = 1 : 1 0 在常温常压下浸泡 1 2 小时；然后用丙酮以固液比 = 1 : 1 0 于温度 5 0 ± 2 °C 提取红 4 小时，第二次以固液比 = 1 : 8 于 5 0 ± 2 °C 提取 1 小时；此后进行固液



分离，利用板框过滤器，使溶液通过2#滤布， $\phi = 0.5 \mu\text{m}$ ；随之对提取液进行减压浓缩，温度控制在 $55^{\circ}\text{C}$ 左右，使其浓缩成膏状；进行第二次固液分离（在离心机中）；中间体洗涤纯化采用两步：第一步用 $90^{\circ}\text{C}$ 的热水洗涤或用含表面活性剂5%的热水，温度约 $60^{\circ}\text{C}$ ，以除去硬脂酸杂质，第二步用煤油洗涤，温度 $55^{\circ}\text{C}$ ，固液比=1：6，以除去硬脂酸酯杂质，洗涤后进行离心分离；最后将中间体在烘箱中于 $60^{\circ}\text{C}$ 烘干4小时，得到原药产品，经测定其中HA含量为60%，原药技术指称符合上表范围。

#### 实施例2

按照实施例1的制法，不同点在于：提取是用甲醇；中间体洗涤是采用石油醚为洗涤剂，固液比=1：8，在加热搅拌罐中进行，温度保持 $50^{\circ}\text{C}$ 左右，洗涤3次，每次洗涤后均在离心机中进行固液分离。

#### 实施例3

原药的制法是按照实施例1，不同之处仅在于：用乙醇提二次。

#### 实施例4

原药的制法是按实施例1，不同之处仅在于中间体的洗涤方法与实施例2相同。

附表 丙酮提取工艺试验(小试与中试)可比性实例

次数	投料量	浸泡时间	第一次提取			第二次提取			原料中 纯品 %	投料含 纯品 %	提取液 量 L	提取液 浓度 $\times 10^{-2}M$	产率 %	总回收率 %
			溶剂 量 Kg	时间 Hr	温度 $^{\circ}C$	溶剂 量 Kg	时间 Hr	温度 $^{\circ}C$						
小 试	8	12	80	4	-50	80	4	-50	4	0.32	38	1.26	3.27	81.7
	7	12	70	4	-50	70	4	-50	4	0.28	22	1.70	2.96	74
	7	12	70	4	-50	70	2	-50	4	0.28	25	1.67	3.26	81.5
	7	12	70	4	-50	70	2	-50	4	0.28	28	1.87	4.12	103
	9	24	90	4	-73	90	2	-73	4	0.36	43	1.02	2.27	63
中 试	105	12	1050	2	-50	840	4	-50	4	4.20	850	6.45	3.11	74
	107	12	1070	2	-50	856	4	-50	4	4.28	860	6.50	3.03	71
	150	12	1500	2	-50	1200	4	-50	4	6.0	1080	8.19	4.08	68
	128	12	1280	2	-50	1024	4	-50	4	5.12	910	6.90	3.87	75
	104	12	1040	2	-50	832	4	-50	4	4.16	840	6.37	2.90	69
	103	12	1030	2	-50	824	4	-50	4	4.12	870	6.60	2.98	72.4

# HA中间体生产工艺流程图

