

液相色谱手性拆分高效氯氟氰菊酯对映体

刘一平¹, 胡昌弟^{1,2}, 李晓刚¹, 孟锐¹, 高必达¹, 柏连阳^{1,3}, 黄可龙⁴

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院,长沙 410128; 2.湖南省农药检定所,长沙 410005; 3.湖南人文科技学院,
湖南 娄底 417000; 4.中南大学 功能材料与化学研究所,长沙 410083)

摘要:[方法]对映体分离是研究手性农药在环境中的选择性行为的重要前提之一,而高效液相色谱法是目前应用最为普遍的对映体分离和制备方法。对高效氯氟氰菊酯在纤维素-三-(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)(Chiralcel OD-H)手性柱上的分离进行了研究,考察了流动相组成、流速以及柱温对分离效果的影响,并对高效氯氟氰菊酯对映体与固定相之间保留和分离的热力学机理进行了讨论。[结果]分别以5种体积比均为15%的醇改性正己烷,分离因子(α)的变化顺序为异丁醇>异丙醇>正丁醇>正丙醇>乙醇,在0.4~1.1 mL/min的流速范围内,分离度(R_s)随着流速的增大而逐渐减小,柱温在15~35 范围内变化时,随着温度的升高分离因子(α)呈降低趋势,两对映体的 $\ln\alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系,手性拆分过程受焓的控制。[结论]在柱温为25 ,正己烷-异丙醇(体积比90:10)为流动相,流速1.0 mL/min时,高效氯氟氰菊酯对映体能达到基线分离,分离因子(α)和分离度(R_s)分别为1.55和4.07。

关键词:高效氯氟氰菊酯;手性拆分;对映体;高效液相色谱;热力学机理

中图分类号:TQ450.7 文献标志码:A 文章编号:1006-0413(2011)02-0105-04

Chiral Resolution of Lambda-cyhalothrin Enantiomers by HPLC

LIU Yi-ping¹, HU Chang-di^{1,2}, LI Xiao-gang¹, MENG Rui¹, GAO Bi-da¹, BAI Lian-yang^{1,3}, HUANG Ke-long⁴

(1.College of Bio-safety Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute for the Control of Agrochemicals of Hunan Province, Changsha 410005, China; 3.Hunan Institute of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, Hunan, China; 4.Institute of Functionalized Materials & Chemistry, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: [Methods] Enantiomer separation is one of the most important prerequisites for the investigation of environmental enantioselective behavior for chiral pesticides. In the present study, HPLC is one of the most popular techniques used for the separation and preparation of the enantiomers. Chiral separation of lambda-cyhalothrin (LCT) enantiomers using cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)chiral as stationary phase(Chiralcel OD-H column) on high-performance liquid chromatography (HPLC) were studied. The effects of chromatographic conditions such as the mobile phase composition, flow rate and column temperature on enantiomers separation were considered, the thermodynamical mechanism of enantioseparation has also been discussed. **[Results]** The effects of alcohol additives including ethanol, *n*-propanol, iso-propanol, *n*-butanol and iso-butanol with the volume of 15% in hexane on the resolution were investigated, the descending order was iso-butanol>iso-propanol> *n*-butanol> *n*-propanol>ethanol. The resolution of lambda-cyhalothrin decreased with the flow rate increased in the range of 0.4-1.1 mL/min. The effect of temperature on chiral separation was investigated, it was found that higher column temperature resulted in a lower selectivity factor for lambda-cyhalothrin in the temperature range of 15-35 °C, and the $\ln\alpha$ - $1/T$ plot for the enantiomers was linear, the enantioseparation was controlled by enthalpy. **[Conclusions]** A baseline separation of the enantiomers was obtained with a mobile phase of *n*-hexane/isopropanol(90:10, by vol) at a flow rate of 1.0 mL/min under 25 °C. The selectivity factor (α) and the resolution (R_s) were 1.55 and 4.07, respectively.

Key words: lambda-cyhalothrin; chiral resolution; enantiomers; HPLC; thermodynamical mechanism

目前商品化农药产品中大约有25%具有手性,但绝大多数仍以对映体混合物或外消旋体形式使用^[1]。在非手性环境中,手性农药对映体有相同的理化特性,但在生物体内对映体之间的比例、代谢和排泄、毒性却是不同的,有时甚至会表现出完全相反的活性^[2]。可见,通过非手性分析所得到的农药浓度所指示的可能与实际生态毒理学效应

并不相符。因此,对手性农药对映体进行分离并在对映体水平上研究其环境行为具有重要意义。近年来,手性固定相(CSPs)高效液相色谱法(HPLC)分离手性化合物发展迅速,大量用于高效液相色谱的手性固定相研制成功,并有超过100多种手性固定相已商业化,其中纤维素和直链淀粉衍生物CSPs因手性识别能力强、负载能力大等特点而

收稿日期:2010-06-28 修返日期:2010-09-16

基金项目:中国博士后基金(20090461007) 湖南省教育厅青年基金(08B035) 湖南省自然科学基金(07JJ3021)

作者简介:刘一平(1984—) 男(土家族) 湖南慈利人 硕士研究生,主要从事手性农药拆分及环境行为研究。E-mail: ypliu619@yahoo.com.cn。

通讯作者:李晓刚(1970—) 男 湖南岳阳人 教授,主要从事农药低毒化应用技术及环境行为研究。Tel: 0731-84617373, E-mail: xfcylxg@yahoo.com.cn。

广泛用于手性化合物对映体的分离及制备^[3-6]。

高效氯氟氰菊酯(lambda-cyhalothrin, LCT)为拟除虫菊酯类杀虫剂,由2个对映异构体组成^[7],其结构式见图1。

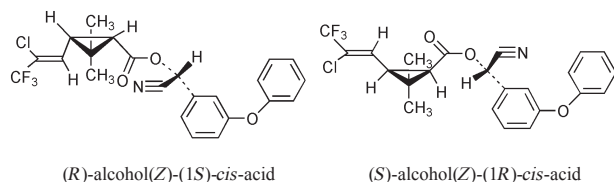


图1 高效氯氟氰菊酯对映体结构图

谢建荣等^[8]曾采用串联的Spherisorb Chiral 1和Chirose-bond C1两柱,以庚烷/氯仿作流动相对高效氯氟氰菊酯对映体进行了拆分,但保留时间过长,平均保留时间分别为38.2、42.5 min;XU等^[9]研究了LCT在4种不同的手性柱上的分离,通过优化条件能获得基线分离,但未对热力学行为进行讨论。本文在纤维素-三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相上直接拆分高效氯氟氰菊酯外消旋体,系统考察了醇改性剂种类、浓度、流速、柱温等因素对分离效果的影响,并对高效氯氟氰菊酯对映体在手性固定相上保留和分离的热力学机理进行了探讨,为进一步研究其对映体在环境中的选择性归趋及生物活性提供了可靠依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪,配置LC-20AT泵、SPD-20A紫外可见波长检测器、LC-solution色谱工作站;Chiralcel涂敷型OD-H手性柱(填料为CDMPCH手性固定相,250 mm × 4.6 mm 5 μm,日本Daicel公司)。

正己烷、正丙醇、异丙醇、正丁醇(色谱纯,J&K CHEMICA公司)乙醇和异丁醇(色谱纯 Alfa Aesar公司)所有流动相均经0.45 μm滤膜过滤和超声波脱气后使用。外消旋手性农药高效氯氟氰菊酯(纯度95% 湖南化工研究院提供)样品溶液以正己烷/异丙醇(体积比为99:1)配制。

1.2 色谱条件

测定温度25℃(除温度影响试验外);流动相为正己烷/异丙醇(体积比90:10,流动相中醇的比例试验、不同醇改性剂试验以及流速试验除外)除考察流速对分离的影响外,其他流速设置均为1.0 mL/min;检测波长为254 nm;进样量为20 μL。

1.3 色谱计算

色谱柱死时间(t_0)用1,3,5-三叔丁基苯测定。容量因子(k')按 $k'=(t_1-t_0)/t_0$,分离因子(α)按 $\alpha=k_2'/k_1'$ 和分离度(R_s)按 $R_s=2(t_2-t_1)/(w_1+w_2)$ 计算。

2 结果与讨论

2.1 流动相中异丙醇比例对手性分离的影响

正己烷/异丙醇体系是采用手性固定相法直接拆分对映体最常用的流动相。考察异丙醇含量对高效氯氟氰菊酯对映体保留和分离的影响(见表1),结果表明随流动相中异丙醇含量的增加,流动相洗脱能力增强,溶质与固定相的作用力减弱,在固定相中的保留减弱,容量因子(k')减小,分离因子(α)和分离度(R_s)也相应减小,在异丙醇含量为2%时,分离因子和分离度达最大值,分别为1.81和6.97。图2为10%异丙醇改性正己烷流动相的HPLC色谱分离图。

表1 流动相中异丙醇含量对高效氯氟氰菊酯手性拆分的影响

正己烷/异丙醇 (体积比)	参数			
	k_1'	k_2'	α	R_s
98:2	1.21	2.19	1.81	6.97
95:5	0.90	1.50	1.66	5.37
90:10	0.69	1.08	1.55	4.07
85:15	0.57	0.86	1.50	3.33
80:20	0.50	0.73	1.47	2.88

注:色谱条件:流动相V(正己烷):V(异丙醇)=90:10;流速1.0 mL/min;柱温25℃。

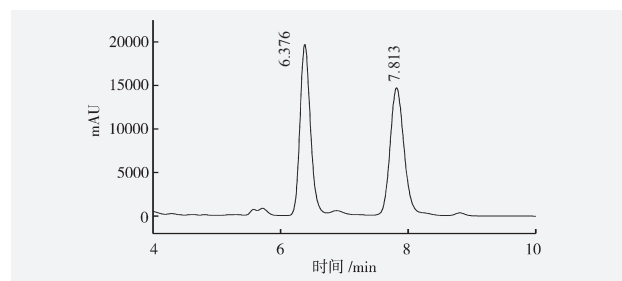


图2 高效氯氟氰菊酯手性拆分数谱图

2.2 不同的醇改性剂对手性分离的影响

一般认为流动相中醇的极性越强,醇分子和对映体分子同手性固定相的相互作用竞争越剧烈,对映体在手性固定相上的保留能力越弱,拆分效果越差。实验分别用乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇为改性剂和正己烷作流动相(体积比10:90),对高效氯氟氰菊酯对映体进行拆分,结果见表2。

表2 不同醇改性剂对高效氯氟氰菊酯对映体手性拆分的影响

正己烷/醇 (体积比90:10)	参数			
	k_1'	k_2'	α	R_s
乙醇	0.47	0.55	1.16	1.17
正丙醇	0.52	0.66	1.28	1.89
异丙醇	0.69	1.08	1.55	4.07
正丁醇	0.52	0.71	1.38	2.51
异丁醇	0.51	0.80	1.56	3.42

注:柱温25℃;流速1.0 mL/min。

结果显示:分离因子的变化顺序为异丁醇>异丙醇>正丁醇>正丙醇>乙醇。以正醇作流动相改性剂,从乙醇到正丁醇,分离因子随着醇极性的减小而增大,流动相中醇的极性越大,醇分子和对映体分别与手性固定相间的竞争越激烈,对映体在固定相上的停留时间就越短,拆分效果也就越差。醇作为极性成分的改性剂对手性化合物分离的影响不仅取决于极性,分子的空间结构则是另一个更重要的因素,改性剂分别为正丁醇、异丙醇、异丁醇时,由于醇的体积增大、空间位阻增大及极性减弱等因素导致醇与手性固定相上的吸附点的竞争减弱,保留增强;虽然异丁醇的极性要比异丙醇的极性弱,且异丁醇的分离因子稍高于异丙醇,但异丁醇的容量因子、分离度却低于异丙醇,因此在5种醇中,异丙醇作改性剂时的拆分效果最好^[10-11]。实验结果显示:用相同碳原子的正醇与异醇时,采用异醇时溶质的保留时间、分离因子及分离度都比用正醇时大^[12]。

2.3 流速对高效氯氟氰菊酯手性分离的影响

流速对分离效果也有一定的影响,由表3可知,随着流速的增加,对映体被洗脱的速度加快,使得对映体与固定相的作用时间缩短,分离度(R_s)相应减小,分离效果逐渐降低,但分离因子(α)并没有发生变化,说明流速并不是影响对映体分离的主要因素,而且低流速虽能提高分离度,但同时也会造成出峰时间延长和拖峰等不利影响^[13-14]。

表3 流速对高效氯氟氰菊酯对映体手性拆分的影响

流速/ (mL·min ⁻¹)	参数			
	k_1'	k_2'	α	R_s
0.4	0.59	0.86	1.45	4.22
0.6	0.59	0.85	1.45	3.74
0.8	0.58	0.83	1.45	3.35
1.0	0.58	0.84	1.45	3.04
1.1	0.58	0.84	1.45	2.92

注: $V_{(正己烷)}$ 、 $V_{(异丙醇)}$ =85 15,柱温25。

2.4 温度对高效氯氟氰菊酯手性分离的影响

高效液相色谱手性拆分过程中,柱温是另一个重要的影响因素^[15-16]。柱温的变化不仅影响对映体在固定相上的吸附、解吸速率,还影响容量因子(k')、分离因子(α)和分离度(R_s),甚至可能导致固定相构型的变化,进而影响到对映体与固定相的作用,洗脱顺序也可能因此而发生转变^[17]。不同温度对高效氯氟氰菊酯手性拆分的影响见表4,从表中可以看出:温度由15 上升到35 ,高效氯氟氰菊酯对映体与固定相间相互作用减弱,分离因子(α)由1.54降到1.46,分离度(R_s)从4.04降到3.50,可见高效氯氟氰菊酯在纤维素-三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相上的分离效果随着温度的升高而逐渐减小。

表4 温度对高效氯氟氰菊酯对映体手性拆分的影响

柱温/	参数			
	k_1'	k_2'	α	R_s
15	0.73	1.13	1.54	4.04
20	0.69	1.05	1.53	3.97
25	0.65	0.99	1.51	3.90
30	0.58	0.86	1.48	3.66
35	0.55	0.80	1.46	3.50

注: $V_{(正己烷)}$ 、 $V_{(异丙醇)}$ =90 10,流速1.0 mL/min。

Smith等^[18]报道了分离温度对手性拆分的影响可以用化合物保留因子、分离因子的自然对数与绝对温度倒数 $1/T$ 关系来描述,温度是另一个影响分离的参数。由Van't Hoff公式:

$$\ln k' = -H^0/RT + S^0/R + \ln \phi \quad (1)$$

H^0 、 S^0 分别为溶质在固定相和流动相间分配的焓变和熵变, ϕ 为色谱相比率(固定相和流动相体积比)。分别以 $\ln k_1'$ 、 $\ln k_2'$ 对绝对温度的倒数 $1/T$ 作图(见图3a),有良好的线性关系:

$$\ln k_1' = 1.5/T - 5.475 \quad (R^2 = 0.9934)$$

$$\ln k_2' = 1.76/T - 5.938 \quad (R^2 = 0.9896)$$

相关系数 R^2 均大于0.98,表明作为温度函数的保留机理在温度变化过程中仍然没有发生变化。以 $\ln \alpha$ 对绝对温度的倒数 $1/T$ 作图(见图3b),图示表明线性良好,相关系数 R^2 为0.9912,且 α 值随着温度的升高而减小。

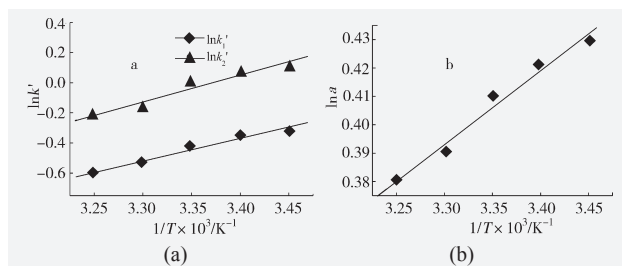


图3 高效氯氟氰菊酯拆分的 $\ln k_1'$ 、 $\ln k_2'$ 及 $\ln \alpha$ 对 $1/T$ 作图

两对映体间不同的作用导致手性识别作用可以用相互作用的自由能 $-(G_{R,S}^0 - G^0)$ 的差异来表示,其大小表明了R和S两对映体的分离能力,由Gibbs-Helmholtz公式:

$$-G_{R,S}^0 = RT \ln \alpha \quad (2)$$

$$-G_{R,S}^0 = -H_{R,S}^0 + T(S_{R,S}^0 - S^0) \quad (3)$$

由(2)、(3)得方程:

$$\ln \alpha = -G_{R,S}^0/RT = -H_{R,S}^0/R(1/T) + S_{R,S}^0/R \quad (4)$$

其中直线斜率为 $-H_{R,S}^0/R$,截距为 $S_{R,S}^0/R$ 。由于焓-熵的相互抵消性质而存在一个转折温度 T_{iso} ,此时 $-G_{R,S}^0 = 0$,即 $T_{iso} = -H_{R,S}^0/S_{R,S}^0$,在 T_{iso} 处,对映体的分离将不能发生^[19-20]。由此可计算出焓变及熵变等热力学数据(见表5),由表5可知: $T_{iso} = 559.92$ K,柱温在 T_{iso} 以

下,分离因子受焓控制并随温度的升高而降低,超过 T_{iso} 时,分离因子受熵控制,对映体的洗脱顺序将可能发生反转。由于对映体的 ${}_{R,S}H^{\theta}$ 和 ${}_{R,S}S^{\theta}$ 均为负值,说明其手性拆分在低温时受焓控制,在低温时能获得较好的分离^[21]后出峰异构体较前出峰异构体与固定相存在较强的相互作用,且与固定相形成络合物后分子总体变得更有序,温度升高分离因子下降^[22]。

表5 高效氯氟氰菊酯手性分离的热力学数据

热力学参数	数值
R^2	0.9912
${}_{R,S}H^{\theta}/R$	0.26
${}_{R,S}S^{\theta}/R$	-0.465
${}_{R,S}G^{\theta}/(J \cdot mol^{-1})$	1016.32
${}_{R,S}H^{\theta}/(J \cdot mol^{-1})$	-2164.64
${}_{R,S}S^{\theta}/(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	-3.866
T_{iso}/K	559.92

3 结论

在正相OD-H手性柱中,适当降低流动相中异丙醇的比例和流速有利于高效氯氟氰菊酯对映体的分离,在15~35 的温度变化范围内 $\ln k'$ 和 $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系,分离因子随着温度的升高而降低,对映体的拆分属于焓控过程。综合考虑色谱峰峰型、保留时间、柱压以及分离效果等几种因素,在正相Chiralcel OD-H手性柱中,以 $V_{(正己烷)}:V_{(异丙醇)}=90:10$ 为流动相,在柱温为25 ,流速为1.0 mL/min、波长为254 nm的色谱条件下,高效氯氟氰菊酯对映体能得到满意的分离效果。

参考文献:

- [1] LIU Wei-ping, GAN Jian-ying, SCHLENK D, *et al.* Enantioselectivity in Environmental Safety of Current Chiral Insecticides[J]. P NATL ACAD SCI USA(PNAS), 2005, 102(3): 701-706.
- [2] 刘维屏, 徐超, 周珊珊. 手性污染物与环境安全[J]. 环境化学, 2006, 25(3): 247-251.
- [3] YASHIMA E. Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for High-performance Liquid Chromatographic Enantioseparation[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 906(1/2): 105-125.
- [4] ABOUL ENEIN H Y. High-performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Drugs Containing Multiple Chiral Centers on Polysaccharide-type Chiral Stationary Phases[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 906(1/2): 185-193.
- [5] OKAMOTO Y, IKAI T. Chiral HPLC for Efficient Resolution of Enantiomers[J]. Chem Soc Rev, 2008, 37(12): 2593-2608.
- [6] OKAMOTO Y, YASHIMA E. Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers[J]. Angew Chem Int Ed, 1998, 37(8): 1020-1043.
- [7] HE L M, TROIANO J, WANG A, *et al.* Environmental Chemistry, Ecotoxicity, and Fate of Lambda-cyhalothrin[J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2008, 195: 71-91.
- [8] 谢建荣, SPARFEL D, ROSSET R. 成品杀虫剂氯氟氰菊酯手性

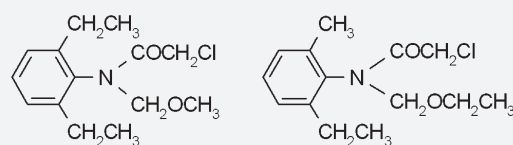
异构体的色谱分离分析[J]. 福建分析测试, 1998(4): 941-946.

- [9] XU Chao, WANG Jia-jia, LIU Wei-ping, *et al.* Separation and Aquatic Toxicity of Enantiomers of the Pyrethroid Insecticide Lambda-cyhalothrin[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(1): 174-181.
- [10] 明永飞, 赵亮, 李永民, 等. 戊唑醇对映体在新型纤维素键合手性固定相的拆分[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(2): 258-260.
- [11] 王鹏, 江树人, 周志强, 等. 醇改性剂对两种手性农药对映体拆分的影响[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 104-106.
- [12] 陈平, 韩小茜, 潘灿平, 等. 禾草灵对映异构体在高效液相色谱手性固定相上的拆分[J]. 分析测试学报, 2003, 22(3): 39-41.
- [13] 邱静, 李莉, 周志强, 等. 高效液相色谱法对氯氟吡氧乙酸1-甲基庚酯对映体的拆分[J]. 农药学报, 2004, 6(2): 84-86.
- [14] 胡建华, 姚华珍, 刘维屏, 等. 高效液相色谱法拆分手性农药及其热力学研究[J]. 农药, 2008, 47(8): 590-592.
- [15] ZHOU Ying, LI Ling, LIU Wei-ping, *et al.* Enantiomer Separation of Triazole Fungicides by High Performance Liquid Chromatography[J]. Chirality, 2009, 21(4): 421-427.
- [16] LIN Kun-de, XU Chao, LIU Wei-ping, *et al.* Enantiomeric Separation of Imidazolinone Herbicides Using Chiral High-Performance Liquid Chromatography[J]. Chirality, 2007, 19(3): 171-178.
- [17] ARNE PERSSON B, ANDERSSON S. Unusual Effects of Separation Conditions on Chiral Separations[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 906(1/2): 195-203.
- [18] SMITH R J, TAYLOR D R, WILKINS S M. Temperature Dependence of Chiral Discrimination in Supercritical Fluid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 697(1/2): 591-596.
- [19] 侯经国, 孟晓荣, 韩小茜, 等. 农药甲霜灵对映体的高效液相色谱分离及手性拆分热力学研究[J]. 分析化学, 2003, 31(3): 307-310.
- [20] 阎峰, 丛璐, 刘晓霞, 等. 乳氟禾草灵对映体分离及手性拆分热力学研究[J]. 农药, 2007, 46(9): 604-606.
- [21] 姚华珍, 胡建华, 刘维屏, 等. 高效液相色谱手性固定相法拆分O,O'-二甲基-1-(苯氧乙酰氧基)乙基膦酸酯和O,O'-二甲基-1-(4-甲基苯氧乙酰氧基)乙基膦酸酯对映体[J]. 农药, 2009, 48(1): 36-38, 57.
- [22] 翁文, 姚碧霞, 陈秀琴, 等. 液相色谱手性拆分机理的热力学方法研究[J]. 化学进展, 2006, 18(7/8): 1056-1064.

责任编辑: 李新

更正

2011年第1期《酰胺类除草剂与牛血清白蛋白的相互作用》一文中的106页甲草胺和乙草胺结构式应为:



甲草胺

乙草胺