

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00237

## 三唑农药的手性拆分及对映体的转化

李朝阳<sup>\*1</sup> 张艳川<sup>2</sup> 李巧玲<sup>2</sup> 王未肖<sup>1</sup> 李景印<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (河北科技大学理学院应化系, 石家庄 050018)

<sup>2</sup> (河北科技大学生物工程学院, 石家庄 050018)

**摘要** 利用 Chiralcel OJ-H 和 Chiralcel OD-H 手性柱对烯唑醇、三唑酮和三唑醇的手性拆分进行了研究, 进一步测定了烯唑醇和三唑酮对映体的旋光性质, 据此确定了两种农药对映体的绝对构型, 在此基础上结合三唑酮转化为三唑醇的还原实验确定了三唑醇 4 个对映异构体的绝对构型。考察了几种三唑农药在有机溶剂和缓冲溶液中的手性稳定性, 其中三唑酮在甲醇、乙醇和水中存在明显的对映体转化行为, 而烯唑醇和三唑醇则是手性稳定的, 升高温度及碱性环境会加快三唑酮的对映体转化。

**关键词** 三唑农药; 手性拆分; 对映体转化; 旋光; 绝对构型

### 1 引言

目前使用的农药中手性农药占相当比例, 手性农药的农药活性往往只存在于一个或少数几个对映体上, 只含高活性对映体的光学纯活性农药的开发和使用是手性农药发展的一个趋势<sup>[1]</sup>。值得注意的是, 有些手性农药在特定条件下会发生对映体转化, 即消旋化, 如菊酯农药一般有 2 个或 3 个手性中心。研究表明, 在甲醇和水中某些菊酯的手性碳会发生消旋化<sup>[2, 3]</sup>。由于很多农药剂型在复配中要使用有机溶剂和水, 农药在喷洒后也会进入水体, 对光学纯农药而言, 这种对映体转化会产生低效或无效对映体, 同时对映体转化也使得手性农药的环境行为和生态效应变得复杂。手性农药种类繁多, 目前除了菊酯有少量对映体转化的研究报道外, 其他的手性农药仍有待进行相关内容的深入考察。本研究对几种典型的手性三唑农药进行了液相色谱拆分, 确定了对映体的绝对构型, 并在此基础上考察了几种三唑农药的对映体转化行为。有关三唑农药的手性拆分虽有一些报道<sup>[4-7]</sup>, 但很少确定其绝对构型, 本研究有助于三唑农药不同对映体的准确检测及在对映体水平上进一步考察其生物活性和环境行为。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

LC-20AB 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 配置 SPD-20A 紫外检测器和 LC-solution 色谱工作站; P1030 数字式旋光仪 (日本 JASCO 公司); SPX-250B 生化培养箱 (上海贺德实验设备有限公司)。正己烷、异丙醇等有机溶剂均为分析纯 (天津大茂化学试剂厂), 二次蒸馏后过 0.45 μm 有机膜; 去离子水为二次蒸馏水; 其他试剂均为分析纯 (天津科密欧化学试剂公司)。烯唑醇 (98%)、三唑酮 (98%) 和三唑醇 (98.6%) 购自上海农药研究所; 三唑醇 A (99%) 由德国 Dr. Ehrenstorfer 公司提供; 三唑醇 B (99%) 购自江苏剑牌化工有限公司。三唑酮用正己烷溶解, 烯唑醇和三唑醇用正己烷/异丙醇 (3/1, V/V) 溶解, 配制成 1.0 g/L 储备溶液, 工作溶液由储备液稀释得到。

#### 2.2 色谱柱和色谱条件

硅胶柱 (250 mm × 4.6 mm, i.d., 大连伊利特色谱技术公司); Chiralcel OJ-H 和 Chiralcel OD-H 手性柱 (250 mm × 4.6 mm, i.d., 日本 Daicel 公司)。色谱流动相为正己烷/异丙醇, 所有色谱分离均在 25℃ 进行, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 225 nm, 进样量 20 μL。

#### 2.3 三唑农药单一对映体的制备和旋光测定

配制 10.0 g/L 的三唑农药, 在手性柱上进行手性分离, 根据检测器信号在流出液端口收集二对映体,

2009-07-25 收稿; 2009-10-10 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20707005) 及教育部留学回国人员科研启动基金 (No. 教外司留 [2009]1001 号) 资助项目

\* E-mail: lizy666@yahoo.com.cn

氮气吹干后得各对映体标准品,定容后进行旋光和对映体转化实验,手性测定表明制备的单一对映体纯度均大于 99%。旋光测定中,对映体浓度为 3.0 g/L,旋光度均大于 0.04°(旋光仪最小检出值为 0.0001)。

#### 2.4 有机溶剂中的对映体转化实验

移取适量单一对映体溶液于 10 mL 的具塞试管中,氮气吹干后分别加入 8.0 mL 的甲醇、乙醇、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯和二氯甲烷,使其浓度为 1.0 mg/L,放入培养箱中恒温避光培养,分时间段取 1.0 mL,吹干用正己烷(三唑酮)或正己烷/异丙醇(3:1, V/V, 烯唑醇和三唑醇)定容,烯唑醇和三唑酮直接用手性柱进行检测。三唑醇 A 和 B 需先在硅胶柱上进行检测,确定有无非对映体的相互转化,再用手性柱检测,确定对映体间是否转化。

#### 2.5 缓冲溶液中的对映体转化实验

称量不同比例的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,加入去离子水配制 pH 为 6.4 和 8.5 的缓冲溶液。移取适量单一对映体溶液于 100 mL 锥形瓶中,氮气吹干后加入 100.0 mL 缓冲溶液,使其浓度为 1.0 mg/L,放入培养箱中恒温避光培养,分时间段取 10.0 mL,用二氯甲烷萃取二次,每次 10.0 mL,过无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  小柱后合并,吹干定容后用手性柱及硅胶柱进行检测。

#### 2.6 三唑酮还原为三唑醇实验<sup>[8]</sup>

还原实验均在冷冻冰箱内进行,反应温度  $-20^\circ\text{C}$ 。1.0 mg  $\text{NaBH}_4$  溶于 1.0 mL 乙醇中,2.0 mg  $\text{CaCl}_2$  溶于 0.5 mL 乙醇中,二溶液混合,缓慢加入 5.0 mg 三唑酮 R(或 S)体,反应 1 h,滴加 6.0 mol/L  $\text{HCl}$  调至酸性,将乙醇吹走后加入 8.0 mL  $\text{NaHCO}_3$  饱和溶液至碱性,用二氯甲烷萃取 2 次,每次 10.0 mL,合并后过无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  小柱,吹干定容后用硅胶柱和手性柱检测生成的三唑醇。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 三唑农药的手性拆分

烯唑醇和三唑酮均含有一个手性中心,存在两个对映体,2 种化合物的手性拆分已有较多报道<sup>[4-6]</sup>,在 Chiralcel OJ-H 和 Chiralcel OD-H 柱上均可得到很好的对映体分离。三唑醇有两个手性中心,4 个对映体,其中结构为 1*R*, 2*S* 与 1*S*, 2*R* 的一对对映体具有较高的杀菌活性,称三唑醇 A;另一对结构为 1*R*, 2*R* 与 1*S*, 2*S* 的一对对映体称三唑醇 B。工业品三唑醇中 A 和 B 的比例为 4:1。三唑醇 A 和 B 在非手性硅胶柱上很容易分离,但在两根手性柱上,直接拆分三唑醇的 4 个对映体,均只能给出 3 个峰。进一步对三唑醇 A 和 B 分别进行手性分离,结果显示,在 OJ-H 柱上均可很好的拆分,而 OD-H 柱仅对三唑醇 A 有较好分离,三唑醇 B 只能得到部分拆分。董丰收等<sup>[7]</sup>曾报道在 ChiralPak AS 手性柱上可实现三唑醇 4 个异构体的完全拆分。对本实验使用的两根手性柱,显然,必须结合硅胶柱进行分步拆分,才能实现 4 个异构体的完全分离。

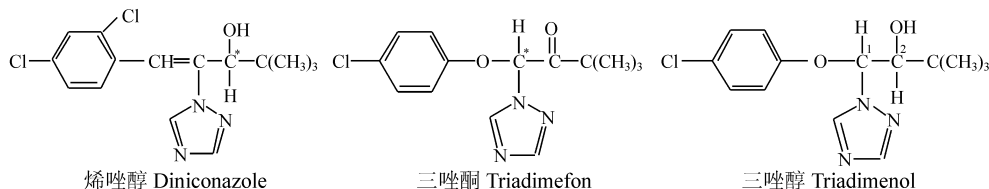


图 1 三唑农药的结构式

Fig 1 Chemical structures of triazole pesticides

由于三唑农药的活性与对映体的绝对构型密切相关,因此确定对映体的绝对构型是必要的。有文献报道烯唑醇和三唑酮的(-)对映体均为 *R* 构型,(+)对映体为 *S* 构型<sup>[4,9]</sup>,因此通过旋光性质即可确定其构型。旋光测定表明,烯唑醇在两根手性柱上均为(-)对映体即 *R* 体先出峰,该结论与文献[4]对烯唑醇的拆分结果一致。三唑酮在两根手性柱上出峰顺序则相反,在 OD-H 柱上 *S*-(+)对映体先出峰,在 OJ-H 柱上则为 *R*-(-)对映体先出峰。三唑醇含有 4 个对映体,通过三唑酮到三唑醇的还原实验确定了 4 个异构体的绝对构型。还原实验中,三唑醇的 1 手性碳构型与母体三唑酮一致,2 手性碳由三唑酮的羰基还原得到。对 *R*-三唑酮,还原产物为 1*R*, 2*S* 三唑醇和 1*R*, 2*R* 三唑醇,为一对非对映异

构体,在硅胶柱上即可分离。在硅胶柱上进一步收集制备二异构体,再用 OJ-H 手性柱上检测,即可确定 1*R*, 2*S*三唑醇和 1*R*, 2*R*三唑醇相应的色谱峰。对 *S*三唑酮,还原产物为 1*S*, 2*S*三唑醇和 1*S*, 2*R*三唑醇,仍为一对非对映异构体,按上述步骤即可确定二对映体相应的色谱峰,最终结果见图 2、图 3 和表 1。

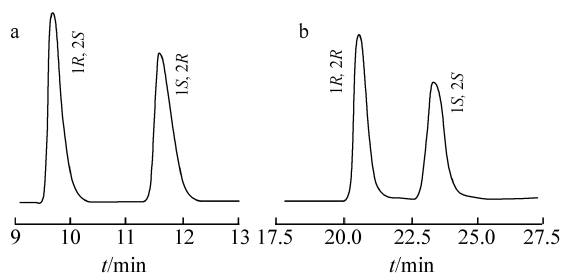


图 2 三唑醇 A (a)和三唑醇 B (b)在 Chiralcel OJ-H 手性柱上的拆分

Fig 2 Chiral separation of triadimenol A (a) and triadimenol B (b) on Chiralcel OJ-H column

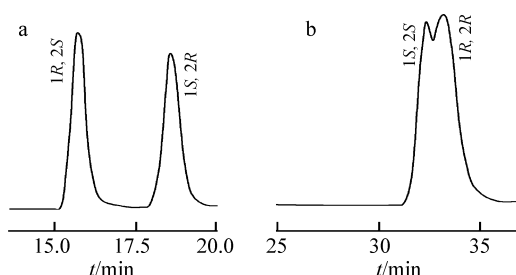


图 3 三唑醇 A (a)和三唑醇 B (b)在 Chiralcel OD-H 手性柱上的拆分

Fig 3 Chiral separation of triadimenol A (a) and triadimenol B (b) on Chiralcel OD-H column

表 1 三唑农药在 Chiralcel OJ-H 和 Chiralcel OD-H 手性柱上的拆分

Table 1 Chiral separation of triazole pesticides on Chiralcel OJ-H and Chiralcel OD-H columns

化合物 Compounds	Chiralcel OJ-H				Chiralcel OD-H					
	流动相 * Mobile phase (V/V)	$k_1$	$k_2$	出峰顺序 Elution order	流动相 * Mobile phase (V/V)	$k_1$	$k_2$	出峰顺序 Elution order		
烯唑醇 Diniconazole	100:3	3.189	3.647	1.144	<i>R</i> (-)/ <i>S</i> (+)	100:5	2.780	3.333	1.199	<i>R</i> (-)/ <i>S</i> (+)
三唑酮 Triadimefon	100:5	4.049	4.755	1.175	<i>R</i> (-)/ <i>S</i> (+)	100:5	1.611	2.046	1.270	<i>S</i> (+)/ <i>R</i> (-)
三唑醇 A Triadimenol A	100:5	1.879	2.592	1.380	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> (+)/ 1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> (-)	100:3	129.3	153.1	1.184	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> (+)/ 1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> (-)
三唑醇 B Triadimenol B	100:3	5.061	5.895	1.165	1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> (+)/ 1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> (-)	100:2	44.24	45.59	1.031	1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> (-)/ 1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> (+)

\*: 流动相为正己烷/异丙醇 (The mobile phase is *n*-hexane/isopropanol)。

### 3.2 三唑酮在有机溶剂中的对映体转化

在 4 d 时间内,在常温下,几种三唑农药在实验的有机溶剂(甲醇、乙醇、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯和二氯甲烷)中均没有发生明显降解,同时烯唑醇和三唑醇 A、B 也没有发生对映体转化,然而三唑酮在甲醇和乙醇中却有快速的对映体转化,而在其他溶剂中基本没有发生对映体转化,在 25 时 *S*三唑酮转化为 *R*三唑酮的示意图见图 4。由图 4 可看出三唑酮在甲醇的转化明显快于在乙醇中。值得注意的是,在测定时间段异丙醇中几乎没有转化,该结果与菊酯的消旋化特点相类似<sup>[2, 3]</sup>。三唑酮的对映体转化可按一级动力学  $R \xrightleftharpoons{k} S$  进行拟合,其转化方程为  $[S] = 0.5[S_0](1 + e^{-kt})$ <sup>[2]</sup>,公式中: $S$  表示在时间为  $t$  时,所培养对映体的浓度; $S_0$  表示所培养对映体的初始浓度; $k$  表示转化的速率常数。本研究中根据公式模拟的相关因子均高于 0.97,温度为 25 时,三唑酮在甲醇和乙醇中对映体转化的  $k$  值分别为  $1.45 \text{ d}^{-1}$  和  $0.27 \text{ d}^{-1}$ ,在甲醇中的速率约是在乙醇中的 5.5 倍。

三唑酮在溶剂中的对映体转化明显受温度的影响,本实验进一步测定了温度 20 时三唑酮在甲醇中的对映体转化,其  $k$  值为  $1.08 \text{ d}^{-1}$ ,小于 25 时的  $1.45 \text{ d}^{-1}$ ,表明温度越高,转化速率越快。此外,本

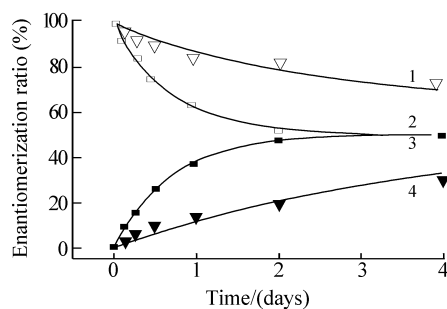


图 4 *S*三唑酮在甲醇和乙醇中的对映体转化

Fig 4 Enantiomerization of *S*-triadimefon to *R*-triadimefon in methanol and ethanol

1. *S*三唑酮在乙醇中的转化曲线 (Enantiomerization of *S*-(+)-triadimefon in ethanol);
2. *S*三唑酮在甲醇中的转化曲线 (Enantiomerization of *S*-(+)-triadimefon in methanol);
3. *R*三唑酮在甲醇中的生成曲线 (Formation of *R*-(-)-triadimefon in methanol);
4. *R*三唑酮在乙醇中的生成曲线 (Formation of *R*-(-)-triadimefon in ethanol)。

实验对 2,6-三唑酮还原为三唑醇的实验控制在  $-20^{\circ}\text{C}$  进行,在此温度下,未发现三唑酮在乙醇中存在对映体转化现象。

### 3.3 三唑酮在缓冲水溶液中的对映体转化

三唑酮在 pH 6.4 和 8.5 的两种缓冲溶液中也存在明显的对映体转化,而且这种转化与 pH 值密切相关。温度为  $25^{\circ}\text{C}$  时,测定的转化速率常数分别为  $0.67\text{ d}^{-1}$  和  $12.91\text{ d}^{-1}$ ; pH 8.5 的转化速率明显快于 pH 6.4 的转化速率。由此可以推测碱性条件更有利于三唑酮对映体的转化。

### 3.4 三唑酮的对映体转化机制

对映体转化(消旋化)不仅存在于手性农药,很多手性药物也有消旋化的相关报道<sup>[10]</sup>,发生消旋化一般可归结为手性碳相连的氢具有一定的酸性,在质子型溶剂(如甲醇和水)中,酸性氢与溶剂的活泼质子发生交换,从而产生消旋化<sup>[2,3]</sup>,而在碱性环境下,酸性氢的交换速度大大加快,使得消旋化更加容易。

手性农药种类繁多,研究表明,除了菊酯农药,三唑酮在甲醇和乙醇、尤其是水中也存在明显的对映体转化作用,烯唑醇和三唑醇手性稳定。本研究对考察相关手性农药的环境行为及评估其环境风险性具有一定的意义。

## References

- 1 JIANG Mu-Geng(蒋木庚), YANG Hong(杨红), YANG Chun-Long(杨春龙), WANG Ming-Hua(王鸣华), SHAN Gui-Guan(单桂冠), SHAN Ya-Ping(单雅萍), LIU Yi-Ping(刘益平). *World Pestic* (世界农药), **2001**, 23(4): 14~16
- 2 Liu W P, Qin S J, Gan J Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(10): 3814~3820
- 3 Qin S J, Gan J Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55(14): 5734~5739
- 4 Wang Q X, Liu J, Zhou Z Q, Cao A C, Wang X Q, Zhu W T, Dang Z H. *Chirality*, **2009**, 21(7): 699~703
- 5 Shapovalova E N, Shpigun O A, Nesterova L M, Belov M Y. *J. Anal. Chem.*, **2004**, 59(5): 255~259
- 6 Zhou Y, Li L, Lin K D, Zhu X P, Liu W P. *Chirality*, **2009**, 21(4): 421~427
- 7 DONG Feng-Shou(董丰收), LIU Xin-Gang(刘新刚), CAO Qiao(曹巧), ZHENG Yong-Quan(郑永权), LI Chong-Jiu(李重九). *Environ. Chem.* (环境化学), **2008**, 27(6): 810~813
- 8 Deas A H B, Clark T, Garter G A. *Pestic. Sci.*, **1984**, 15(1): 63~70
- 9 Deas A H B, Garter G A, Clark T, Clifford D R, James C S. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1986**, 26(1): 10~21
- 10 Krupcik J, Oswald P, Mjek P, Sandra P, Armstrong D W. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000(1-2): 779~800

## Chiral Separation and Enantimerization of Triazole Pesticides

LI Zhao-Yang<sup>\*1</sup>, ZHANG Yan-Chuan<sup>2</sup>, LI Qiao-Ling<sup>2</sup>, WANG Wei-Xiao<sup>1</sup>, LI Jing-Yin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (College of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

<sup>2</sup> (College of Bioscience & Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

**Abstract** The chiral separation of three triazole pesticides, i.e. diniconazole, triadimefon and triadimenol was studied on a Chiralcel OJ-H and a Chiralcel OD-H HPLC chiral columns. The optical rotation quality of diniconazole and triadimefon enantiomers was measured and the absolute configurations of individual enantiomers were further concluded. On this basis, the absolute configurations of the four triadimenol stereoisomers were deduced via the reductive experiment of triadimefon to triadimenol. Furthermore, the chiral stability of the three triazole pesticides in organic solvents and buffer solutions was investigated. The results showed the obvious enantimerization was observed as for triadimefon in methanol, ethanol and water, whereas diniconazole and triadimefon were chiral stable in organic solvents and water. The enantimerization of triadimefon would be accelerated at higher temperature and in alkaline media.

**Keywords** Triazole pesticides; Chiral separation; Enantimerization; Optical rotation; Absolute configuration

(Received 25 July 2009; accepted 10 October 2009)