

文章编号: 1004-1656(2011)03-0273-05

## 高效液相色谱法拆分硅氟唑对映体

刘一平<sup>1</sup> 李晓刚<sup>1\*</sup> 胡昌弟<sup>1,2</sup> 张 盈<sup>1</sup> 柏连阳<sup>1,3</sup> 高必达<sup>1</sup> 黄可龙<sup>4</sup>

1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院 湖南 长沙 410128;
2. 湖南省农药检定所 湖南 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 湖南 长沙 410083)

**摘要:** 在纤维素-三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) (Chiralcel OD-H) 手性柱上对硅氟唑对映体的分离进行了研究。考察了流动相中改性剂的种类和浓度、流速以及柱温对分离效果的影响, 并对手性拆分机制进行了讨论。实验结果表明: 5 种醇改性剂中, 异丙醇的改性效果最佳, 当异丙醇含量为 2% 时, 分离度 ( $R_s$ ) 达最大值 10.19; 在  $0.4 \sim 1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速条件下, 分离度 ( $R_s$ ) 随着流速的增大而逐渐减小; 在  $15^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$  的温度变化范围内, 分离因子 ( $\alpha$ ) 随温度的升高而呈降低趋势。在柱温为  $25^\circ\text{C}$ ,  $V_{(\text{正己烷})} : V_{(\text{异丙醇})} = 85:15$  为流动相, 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下, 硅氟唑对映体能达到基线分离, 分离因子 ( $\alpha$ ) 和分离度 ( $R_s$ ) 分别为 1.69 和 5.31。

**关键词:** 手性分离; 硅氟唑; 对映体; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72 文献标识码: A

## Enantiomeric separation of simeconazole enantiomers by high performance liquid chromatography

LIU Yi-ping<sup>1</sup>, LI Xiao-gang<sup>1\*</sup>, HU Chang-di<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>,  
BAI Lian-yang<sup>1,3</sup>, Gao Bi-da<sup>1</sup>, HUANG Ke-long<sup>4</sup>

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, China;
4. Institute of Functionalized Materials & Chemistry, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract:** Enantiomeric separation of simeconazole enantiomers by high performance liquid chromatography (HPLC) with the coating-type cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase (Chiralcel OD-H column) were studied, the enantioselectivity separation mechanism has also been discussed. The effects of chromatographic conditions such as the mobile phase composition including the concentration and type of the alcohol modifiers in mobile phase, flow rate, column temperature on enantiomers separation were considered. The data indicated that isopropanol had a better modified effect than other alcohol modifiers, and two enantiomers was best separated with the resolution ( $R_s$ ) of 10.19 by 2% isopropanol in mobile phase. The resolution ( $R_s$ ) of simeconazole was decreased with the flow rate increased in the range of  $0.4 \sim 1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The effect of temperature on chiral separation was investigated, it was found that higher column temperature resulted in a lower selectivity factor

收稿日期: 2010-07-31; 修回日期: 2010-11-11

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

联系人简介: 李晓刚(1970-), 男, 教授, 主要从事农药低毒化应用技术及环境行为研究。Email: xfcylxg@yahoo.com.cn

( $\alpha$ ) for simeconazole in the temperature range of 15°C–35°C. A baseline separation of the enantiomers was obtained with a mobile phase of n-hexane/isopropanol( 85:15 by vol) at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup> under 25 °C, the selectivity factor( $\alpha$ ) and resolution ( $R_s$ ) was 1.69 and 5.31 respectively.

**Key words:** chiral separation; simeconazole; enantiomers; high performance liquid chromatography

硅氟唑(simeconazole),化学名称为(R,S)-2-(4-氟苯基)-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-3-三甲基硅丙烷-2-醇,是日本三共公司开发的含硅三唑类杀菌剂(见图1),是一种新型麦角甾醇生物合成抑制剂,因其作用迅速、治疗能力高和内吸活性强等特点而被产业化。硅氟唑分子中具有一个手性碳,具有一对对映异构体<sup>[1-4]</sup>,因此,建立硅氟唑对映体的手性拆分方法对开发生产单一对映体产品和制定相关质量控制标准具有重要意义。

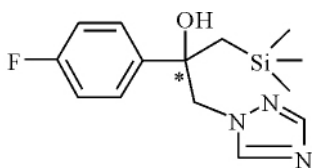


图1 硅氟唑结构图

Fig 1 The chemical structure of simeconazole

近年来,手性固定相(CSPs)高效液相色谱法(HPLC)直接拆分手性化合物发展迅速<sup>[5-8]</sup>。目前关于硅氟唑对映体在直链淀粉手性固定相上的拆分已有研究报道<sup>[9]</sup>。作者利用OD-H柱对硅氟唑外消旋体进行了拆分,考察了流动相中醇类改性剂种类和浓度,以及流速、温度对分离结果的影响,优化了色谱条件,并对硅氟唑在手性固定相上保留和分离的热力学机理进行了讨论,从而为进一步研究硅氟唑对映体的生物活性差异及在环境中的选择性归趋提供了依据。

## 1 实验部分

### 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-resolution色谱工作站;Chiralcel涂敷型OD-H手性

柱(填料为CDMPC手性固定相,250mm×4.6mm,5 $\mu$ m,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 $\mu$ m滤膜过滤和超声波脱气后使用。外消旋手性农药硅氟唑(纯度97%,湖南省农药检定所提供);样品溶液以正己烷-异丙醇(体积比为98:2)配制。

### 1.2 色谱条件

测定温度25°C(除温度影响实验外);流动相: $V_{(正己烷)}:V_{(异丙醇)}=85:15$ (流动相中异丙醇的比例实验和不同醇改性剂实验除外);除考察流速对分离的影响外,其它流速设置均为1.0mL·min<sup>-1</sup>;检测波长为254nm;进样量为20 $\mu$ L。

### 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( $\alpha$ )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

以正己烷/异丙醇为流动相,通过改变流动相中两者的比例,考察了流动相比例对硅氟唑对映体保留和分离的影响(见表1),结果表明,随着流动相中异丙醇含量的增加,流动相的洗脱能力增强,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( $k$ )和分离度( $R_s$ )逐渐减小,表明硅氟唑与固定相之间的主要作用是氢键相互作用。在2%~20%的醇改性范围内,当异丙醇含量为2%时,硅氟唑对映体在固定相中的分离效果最好,分离度达最大值10.19。图2为20%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硅氟唑手性拆分的影响

Table 1 Influence of isopropanol concentration on the enantiomeric separation of simeconazole

$V_{\text{hexane}} : V_{\text{isopropanol}}$	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$
98:2	15.46	25.89	1.68	10.19
95:5	5.71	9.60	1.68	7.53
90:10	2.51	4.24	1.69	6.28
85:15	1.53	2.58	1.69	5.31
80:20	1.07	1.82	1.70	4.67

Note: column temperature: 25°C, flow rate: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>

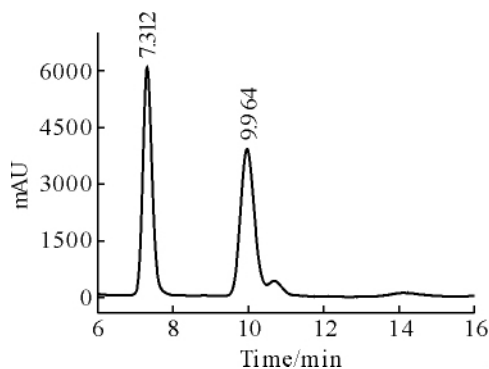


图2 硅氟唑手性拆分色谱图

Figure 2 Chromatogram of the chiral separation of simeconazole

chromatography condition: mobile phase :hexane/iso-propanol = 80:20; flow rate: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; column temperature: 25°C

## 2.2 不同的醇改性剂对手性分离的影响

相同体积的不同醇类改性剂,其对分离效果的影响也不同<sup>[10]</sup>。本实验分别以乙醇、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 15:85),对硅氟唑对映体进行拆分(见表2),其分离因子( $\alpha$ )的变化顺序为:异丙醇 > 异丁醇 > 丙醇 > 丁醇 = 乙醇。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,但实验结果显示:丙醇的极性要强于丁醇,异丙醇的极性也强于异丁醇,但丙醇和异丙醇的分离因子却分别大于丁醇和异丁醇;而且,影响拆分效果的因素除了流动相中醇的极性外,还有醇分子的空间立体位阻作用,当改性剂由正醇改为相应的异醇时,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位点的竞争减弱,保

留增强,因此,当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、容量因子及分离因子都比用正醇时大<sup>[11-13]</sup>。在5种醇中,使用异丙醇作改性剂时对映体在固定相上的保留最强,分离效果最好,分离因子和分离度分别达到1.69和5.31。

表2 不同醇改性剂对硅氟唑对映体手性拆分的影响

Table 2 Influence of different alcohol modifiers on the enantiomeric separation of simeconazole

Alcoholic modifiers	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$
Ethanol(乙醇)	0.74	1.14	1.54	3.99
n-Propanol(丙醇)	0.96	1.54	1.60	3.95
Iso-propanol(异丙醇)	1.53	2.58	1.69	5.31
n-Butanol(丁醇)	1.21	1.86	1.54	3.99
Iso-butanol(异丁醇)	1.46	2.37	1.62	3.92

Note:  $V_{\text{hexane}} : V_{\text{alcoholic modifier}} = 85:15$ ; Column temperature: 25°C, flow rate: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>

## 2.3 流速对硅氟唑手性分离的影响

表3列出了 $V_{(\text{正己烷})} : V_{(\text{异丙醇})} = 85:15$ 的流动相条件下,流速的改变对硅氟唑对映体保留和分离的影响(见表3)。结果显示,流动相流速对对映体的拆分也有一定的影响,随着流动相流速的增加,对映体被洗脱的速度加快,对映体与固定相的作用时间减小,分离度( $R_s$ )也相应地逐渐下降,分离效果逐渐降低;但分离因子( $\alpha$ )几乎不变,说明两个对映体在手性固定相上的相对保留值是一定的,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<sup>[14]</sup>。

表3 流速对硅氟唑对映体手性拆分的影响

Table 3 The effect of flow rate on the chiral resolution of simeconazole

Flow rate/mL · min <sup>-1</sup>	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$
0.4	1.58	2.75	1.74	7.76
0.6	1.59	2.77	1.74	6.67
0.8	1.57	2.73	1.74	5.90
1.0	1.54	2.68	1.73	5.36
1.1	1.55	2.68	1.73	5.12

Note:  $V_{\text{hexane}} : V_{\text{isopropanol}} = 85:15$ ; column temperature: 25°C

## 2.4 温度对硅氟唑手性分离的影响

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<sup>[15,16]</sup>。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( $\alpha$ )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间的作用,其洗脱顺序也可能因此而发生转变<sup>[17]</sup>。不同温度对硅氟唑手性拆分的影响见表4。结果表明,温度由15℃上升到35℃,硅氟唑在手性固定相中的保留减弱,容量因子减小,分离因子也由1.71降到1.63;而分离度由5.00上升到5.49,可能是由于在低温条件下对映体的保留较强,峰脱尾严重,峰宽变大,而使分离度变小。不同温度条件下硅氟唑对映体的分离如图3所示。

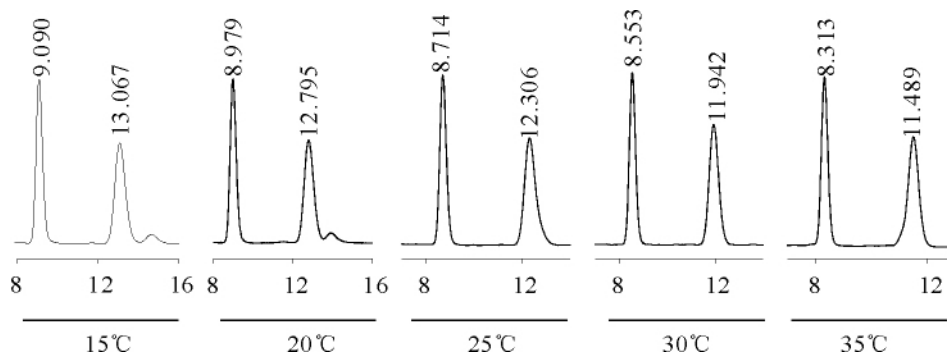


图3 不同柱温条件下硅氟唑分离色谱图

Figure 3 Chromatograms of simeconazole at different column temperatures

mobile phase:  $V_{\text{hexane}}:V_{\text{isopropanol}} = 85:15$ ; flow rate:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

## 2.5 分离机制

手性化合物与手性固定相间的作用力通常用“三点作用”原理<sup>[18]</sup>来描述:偶极-偶极作用、氢键作用、 $\pi$ - $\pi$ 电子相互作用,此外,还与分子间的范德华力、包合作用等有关<sup>[19,20]</sup>。由此,本文初步认为硅氟唑对映体在CDMPC手性固定相上的分离机理为:在正相色谱条件下,由于硅氟唑分子中的羟基、氟原子可分别与固定相中的羰基和氨基形成氢键作用,并与流动相中的醇羟基和固定相羰基间的氢键作用相竞争,当流动相中的醇的浓度增加时,对映体与固定相间的氢键作用减小,被分析物在固定相上的保留减弱,流动相洗脱能力增强,对映体的分离效果减小。另外,硅氟唑对映体和手性固定相芳环间的 $\pi$ - $\pi$ 相互作用以及对映体

表4 温度对硅氟唑对映体手性拆分的影响

Table 4 The effect of temperature on the chiral resolution of simeconazole

Column temperature/°C	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$
15	1.58	2.71	1.71	5.00
20	1.56	2.64	1.70	5.11
25	1.53	2.57	1.68	5.19
30	1.51	2.50	1.66	5.47
35	1.46	2.40	1.63	5.49

Note:  $V_{\text{hexane}}:V_{\text{isopropanol}} = 85:15$ , flow rate:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

分子插入固定相的螺旋型空穴的立体配合作用也是手性拆分作用之一<sup>[21]</sup>。

## 3 结论

在正相Chiralcel OD-H手性柱中,用不同的醇作改性剂,硅氟唑对映体能获得良好拆分,适当降低流速和温度有利于对映体的分离。综合考虑色谱峰峰型、保留时间、柱压及分离效果等几种因素,在柱温为25℃,  $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{异丙醇}} = 85:15$ 为流动相,流速为1.0ml/min、进样量20 $\mu$ L、波长为254nm的色谱条件下,硅氟唑对映体能获得满意的基线分离效果,分离因子( $\alpha$ )和分离度( $R_s$ )分别为1.69和5.31。

## 参考文献:

- [1] Tsuda M, Itoh H, Kato S. Systemic activity of simeconazole and its derivatives in plants [J]. *Pest Management Science*, 2004, 60(9): 881-886.  
 [2] 冯化成. 新颖杀菌剂硅氟唑(simeconazole) [J]. 世界

农药, 2004, 26(3): 47-48.

- [3] 高菊芳, 陶黎明. 硅氟唑及其它类固醇去甲基化抑制剂类杀菌剂的内吸活性比较 [J]. 世界农药, 2005, 27(4): 42-47.

- [4] Tsuda M, Sasahara M, Ohara T, et al. Optimal application timing of simeconazole granules for control of rice kernel smut and false smut [J]. *J Gen Plant Pathol*, 2006, 72: 301-304.
- [5] Yashima E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation [J]. *Journal of Chromatography A* 2001 906(1-2): 105-125.
- [6] Okamoto Y, Ikai T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers [J]. *Chem Soc Rev*, 2008, 37(12): 2593-2608.
- [7] Okamoto Y, Yashima E. Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers [J]. *Angew. Chem. Int. Ed* 1998 37(8): 1020-1043.
- [8] Okamoto Y. Chiral Polymers for Resolution of Enantiomers [J]. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2009, 47(7): 1731-1739.
- [9] 董丰收, 曹巧, 郑永权, 等. 硅氟唑对映体在直链淀粉手性固定相上 HPLC 上的拆分 [J]. *应用化学*, 2008, 25(10): 1237-1239.
- [10] 杨猛, 谢生明, 袁黎明, 等. 高效液相色谱中乙基纤维素手性固定相研究 [J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(7): 935-938.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Zhou Ying, Li Ling, Liu Weiping, et al. Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography [J]. *Chirality* 2009 21(4): 421-427.
- [16] 易健明, 索会峰, 唐课文, 等. 立体选择性萃取分离反式 DV 菊酸对映体 [J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(10): 1274-1278.
- [17] Persson B A, Andersson S. Unusual effects of separation conditions on chiral separations [J]. *Journal of Chromatography A* 2001 906(1-2): 195-203.
- [18] 段煜, 杜宗良, 李瑞霞, 等. 含极性基团的硅质高效液相色谱固定相 [J]. *化学研究与应用*, 2004, 16(2): 155-159.
- [19] Wang Peng, Jiang Shuren, Zhou Zhiqiang, et al. Effect of alcohols and temperature on the direct chiral resolution of fipronil, isocarbophos and carfentrazone-ethyl [J]. *Biomedical Chromatography*, 2005, 19(6): 454-458.
- [20] 张美, 谢生明, 袁黎明, 等. 高效液相色谱的 4 种商品手性柱对 38 种手性化合物的拆分研究 [J]. *分析化学*, 2010, 38(2): 181-186.
- [21] 侯世聪, 王敏, 周志强, 等. 涂敷型手性固定相的制备及氯氟草醚乙酯对映体的高效液相色谱分离 [J]. *色谱*. 2002, 20(6): 537-539.

(责任编辑 李方)