

反相色谱条件下三唑类手性农药对映异构体的拆分

田 芹² 任丽萍³ 吕春光¹ 周志强^{*1}

¹ (中国农业大学理学院应用化学系, 北京 100094) ² (国家地质实验测试中心, 北京 100037)

³ (中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘 要 采用自制的纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(CDMPC-CSP)和直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(ADMPC-CSP),在反相色谱条件下成功地拆分了己唑醇、烯唑醇、烯效唑、粉唑醇、三唑酮和戊唑醇对映异构体。考察了固定相类型、不同比例的甲醇/水或乙腈/水做流动相、柱温等因素对三唑类手性农药拆分的影响,优化了色谱分离的条件。结果表明:两种固定相都有很强的拆分能力。在优化的色谱条件下,己唑醇和烯唑醇在这两种固定相上都能被分离;三唑酮只能在 CDMPC-CSP 上分离;粉唑醇、戊唑醇、烯效唑只能在 ADMPC-CSP 上分离。流动相中水的含量增加会使对映体的保留增强,分离的可能性增大。在 0~40℃ 研究温度范围内,容量因子 k' 随温度的升高而减少,除烯效唑与戊唑醇外,其它手性农药的选择因子 α 也随温度的升高而减少,而分离度 R_s 随温度变化没有明显的规律,最好的分离度不都出现在低温。对映体流出顺序用圆二色检测器测定。

关键词 三唑类手性农药; 手性拆分; 反相色谱; 手性固定相

1 引言

近年来,随着手性技术的发展,有关光学活性农药的研究已成为农药化学领域的热门课题。在已商品化的农药中,约有 26% 的农药具有手性中心,其中大部分都是以外消旋体的形式出售和使用^[1]。将外消旋的手性农药施加于生物体时,对映体之间的差异不仅表现在生物活性上,还表现在对生物体的毒性、体内的吸收、转移、代谢以及消除等方面。因此建立高分离度、高灵敏度的手性农药拆分和测定方法具有重要的意义。常用的手性分离方法有高效液相色谱法、气相色谱法、分子烙印和毛细管电泳法等^[2],其中高效液相色谱手性固定相法是重要的一种。在众多的手性固定相中,多糖(常用纤维素和淀粉)衍生物 CSPs 显示出拆分能力强、适用范围广等优点^[3]。己唑醇、烯唑醇、烯效唑、粉唑醇、三唑酮和戊唑醇等均属于三唑类农药,是一类重要的广谱杀菌剂,化学结构式见图 1。有关其对映体的拆分方法主要有气相色谱法^[4]、毛细管电泳法^[5]、手性流动相添加剂法^[6]、手性固定相法^[7,8]和多糖类手性固定相法^[9,10]等。而多糖类手性固定相高效液相色谱法主要在正相条件下对三唑类农药进行拆分。本研究利用自制的纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(CDMPC-CSP)和直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(ADMPC-CSP),在反相色谱条件下,以甲醇/水或乙腈/水为流动相,在高效液相色谱仪上实现了己唑醇、烯唑醇、烯效唑、粉唑醇、三唑酮和戊唑醇对映体的拆分。比较了固定相、流动相、温度对手性拆分的影响,同时利用圆二色检测器测定了对映体的流出顺序。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司),配二极管阵列检测器;JASCO 2000 高效液相色谱仪(日本 JASCO 公司),配圆二色检测器;液相色谱装柱机(北京福思源机械加工部);AT-930 制冷、加热两用色谱柱温箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。3,5-二甲基苯基异氰酸酯(Merck 公司);直链淀粉球(Sigma 公司);微粒硅胶(中国科学院兰州化物所);球形,粒度 5~7 μm ,比表面积 110 m^2/g ,平均孔径

2009-09-10 收稿;2009-12-29 接受

本文系自然科学基金(Na 20777093)资助项目

* E-mail: zqzhou@cau.edu.cn

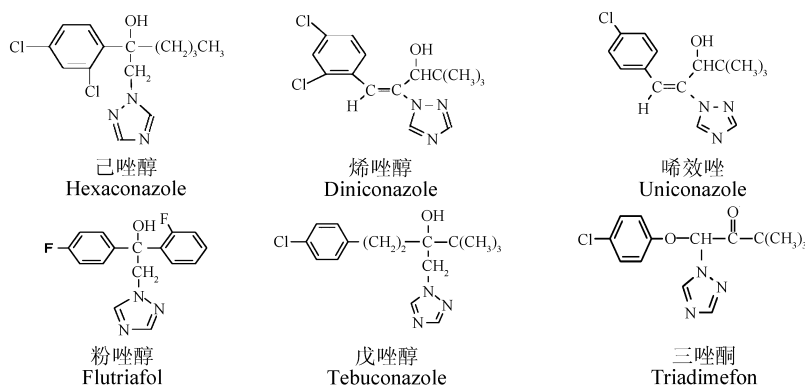


图 1 6种三唑类手性农药的结构式

Fig 1 Structures of chiral pesticides

6 7 mm;微晶纤维素(上海试剂四厂);3氨基丙基三乙氧基硅烷(KH-550,辽宁盖县化工厂)。所用试剂均为分析纯,流动相重蒸后使用。6种三唑类手性农药由中国农业大学农药残留分析组提供。

2.2 手性固定相的合成

参照文献[11, 12]的方法合成手性固定相 CDMPC和 ADMPC,于 37 MPa压力下装入不锈钢柱。

2.3 色谱条件

色谱柱:CDMPC-CSP (250 mm ×4.6 mm),ADMPC-CSP(150 mm ×4.6 mm);流动相为甲醇-水或乙腈-水;流速为 0.8 mL/min(CDMPC)和 0.5 mL/min(ADMPC);进样量 10 μL,检测波长 230 nm。容量因子(k)、选择因子(α)和分离度(R_s)分别按公式 $k = (t - t_0) / t_0$, $\alpha = k_2 / k_1$, $R_s = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$ 计算。

3 结果与讨论

3.1 不同固定相及流动相组成对对映体拆分的影响

在 CDMPC-CSP和 ADMPC-CSP上以甲醇-水或乙腈-水为流动相对三唑类农药己唑醇、烯唑醇、烯效唑、粉唑醇、戊唑醇和三唑酮对映异构体进行了直接的手性拆分。在优化的色谱条件下,己唑醇、烯唑醇和三唑酮在 CDMPC上分离度分别达 1.72, 1.31和 1.55;己唑醇、烯唑醇、粉唑醇、烯效唑和戊唑醇在 ADMPC上分离度分别达到 1.28, 2.75, 1.05, 2.41和 1.30,典型色谱图见图 2。在同一种固定相、不同的流动相对样品的保留、立体选择性也不同。如在 ADMPC-CSP上,烯唑醇和粉唑醇只能在甲醇-水作流动相下拆开,己唑醇则只能在乙腈-水作流动相下拆开。甲醇既是质子的受体也是供体;乙腈只是质子的受体。这说明氢键不一定是反相条件下拆分的主要作用力。随着流动相中水含量的增加,分离的可能性增大,但考虑到柱子的寿命和柱效,本实验中水分含量对于甲醇和乙腈分别达 40%和 60%。本研究组曾报道在正相色谱条件下,戊唑醇和三唑酮可以在 CDMPC上拆分^[9]。氢键、 π - π 、偶极-偶极作用

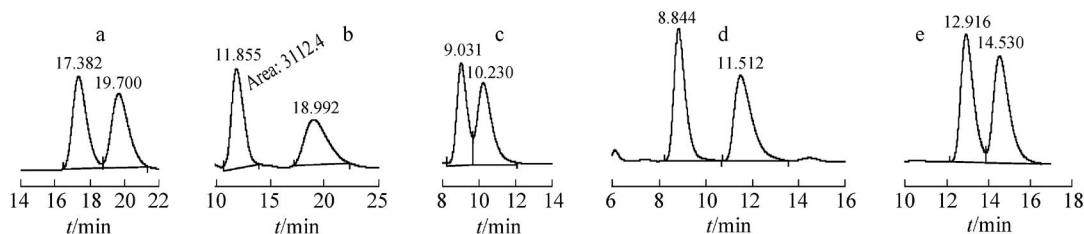


图 2 三唑类手性农药在 ADMPC-CSP上反相条件下的拆分色谱图

Fig 2 Chromatograms showing the enantiomeric separation of triazole chiral pesticides

a 己唑醇(Hexaconazole), 乙腈/水(ACN/water) 45/55, V/V; b 烯唑醇(Diniconazole), 甲醇/水(Methanol/water), 80/20, V/V; c 粉唑醇(Flutriafol), 甲醇/水(Methanol/water) 70/30, V/V; d 烯效唑(Uniconazole), 乙腈/水(ACN/water) 60/40, V/V; e 戊唑醇(Tebuconazole), 乙腈/水(ACN/water), 50/50, V/V; 室温(Room temperature); 流速(Flow rate) 0.5 mL/min。

通常被认为是多糖类固定相在正相色谱条件下拆分的有效作用力^[13];而在反相条件下,强极性流动相更容易与 CSP形成强的氢键作用,从而减弱了溶质分子与 CSP的氢键作用,这将可能使分析物在固定相的螺旋型手性空穴中的包容作用和“立体适应性”(Steric fit)、疏水作用、 π - π 、偶极-偶极相互作用成为手性识别的关键因素。

3 2 温度对对映体拆分的影响

在 0~40 范围内,考察了温度对三唑类手性农药对映体拆分的影响。结果表明,所研究的手性农药对映体的容量因子 k 随着温度的升高而减小;选择因子 α 没有一致的规律;不同农药的最佳分离度出现在不同的温度,而不是都出现在低温。温度对手性对映体容量因子 k 、选择因子 α 的影响可以用下式表示^[14,15]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \text{ 和 } \ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^\circ}{R}$$

通过测定不同温度下的容量因子 k 和手性选择因子 α ,以 $\ln k$ 和 $\ln \alpha$ 分别对 $1/T$ 作图,各自可以得到一条直线。通过考察温度对手性分离的影响,可以计算出手性分离过程中的热力学参数,从而对手性分离过程有更加深入的了解。除了烯效唑的选择因子的自然对数与绝对温度的倒数在甲醇作改性剂时在 ADMPC上不呈线性关系(图 3),其它手性农药的 van t Hoff曲线都具有线性,计算得到的热力学参数见表 1。戊唑醇在甲醇作改性剂时,在 ADMPC上的手性拆分主要受熵控制,而在乙腈作改性剂时主要受焓控制;其它农药(除烯效唑)手性拆分主要受焓控制。

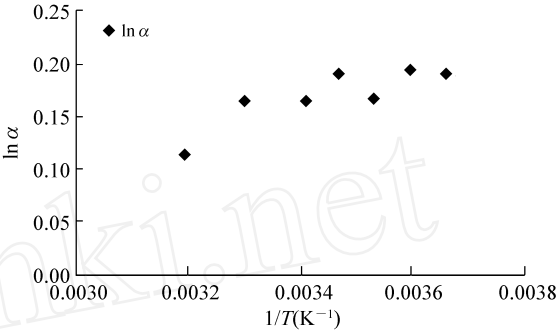


图 3 烯效唑在 ADMPC-CSP上甲醇-水(80/20, V/V)作流动相下 $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 的关系图

Fig 3 Plot of $\ln \alpha$ vs $1/T$ of uniconazole in methanol/water (80/20, V/V) on amylose (tris-3, 5 dimethyl-phenylcarbamate) (ADMPC-CSP)

表 1 0~40 范围内,手性农药对映体的 Van t Hoff方程和 $\Delta \Delta H^\circ$ 、 $\Delta \Delta S^\circ$
Table 1 Van t Hoff equations and $\Delta \Delta H^\circ$ 、 $\Delta \Delta S^\circ$ of chiral pesticides(0~40)

化合物 Compound	流动相 * Mobile phase	CDMPC-CSP			ADMPC-CSP		
		线性方程 Linear equation	$\Delta \Delta H^\circ$ / (kJ/mol)	$\Delta \Delta S^\circ$ / (J/(mol·K))	线性方程 Linear equation	$\Delta \Delta H^\circ$ / (kJ/mol)	$\Delta \Delta S^\circ$ / (J/(mol·K))
己唑醇 Hexaconazole	a(75/25)	$\ln \alpha = 73.07/T - 0.1329$ ($R^2 = 0.9772$)	-0.61	-1.10	-	-	-
	b(50/50)	$\ln \alpha = 29.525/T + 0.0146$ ($R^2 = 0.9761$)	-0.25	0.12	$\ln \alpha = 257.06/T - 0.7265$ ($R^2 = 0.9974$)	-2.14	-6.04
烯唑醇 Diniconazole	a(CDMPC: 75/25 ADMPC: 95/5)	$\ln \alpha = 117.38/T - 0.2951$ ($R^2 = 0.9646$)	-0.98	-2.45	$\ln \alpha = 396.71/T - 0.9255$ ($R^2 = 0.9746$)	-3.30	-7.69
	b(50/50)	$\ln \alpha = 24.913/T - 0.0054$ ($R^2 = 0.9788$)	-0.21	-0.04	-	-	-
烯效唑 Uniconazole	b(60/40)	-	-	-	$\ln \alpha = 636.7/T - 1.76$ ($R^2 = 0.9937$)	-5.29	-14.6
戊唑醇 Tebuconazole	a(75/25)	-	-	-	$\ln \alpha = -224.01/T + 0.817$ ($R^2 = 0.9024$)	1.86	6.79
	b(60/40)	-	-	-	$\ln \alpha = 94.678/T - 0.1752$ ($R^2 = 0.9956$)	-0.79	-1.46
粉唑醇 Flutriafol	a(75/25)	-	-	-	$\ln \alpha = 264.25/T - 0.7343$ ($R^2 = 0.9936$)	-2.20	-6.10
三唑酮 Triadimefon	a(80/20)	$\ln \alpha = 186.07/T - 0.4554$ ($R^2 = 0.9625$)	-1.55	-3.78	-	-	-
	b(50/50)	$\ln \alpha = 59.24/T - 0.0904$ ($R^2 = 0.9805$)	-0.49	-0.75	-	-	-

* 流动相: a 甲醇-水 (Methanol/water); b 乙腈-水 (ACN/water); CDMPC: Cellulose (tris-3, 5-dimethyl-phenylcarbamate); ADMPC: Amylose (tris-3, 5-dimethyl-phenylcarbamate)。

3 3 对映体的流出顺序

近年来,高效液相色谱圆二色检测器已成为手性化合物分析的有力工具^[16,17]。本研究利用高效液相色谱圆二色检测器测定了对映体流出顺序(见表 2),3种三唑类手性农药在 CDMPC-CSP上,2种流动相条



件下,同一波长下的流出顺序一致;而在 ADMPC-CSP 上,烯效唑与烯唑醇的出峰顺序相反,其它手性农药出峰顺序一致。产生这种现象的原因尚不清楚,一般认为是流动相成分的改变导致了手性空腔的立体环境发生变化所致^[18,19]。

表 2 三唑类手性农药在 CDMPC-CSP 和 ADMPC-CSP 上反相条件下对映体流出顺序

化合物 Compound	检测波长 λ (nm)	CDMPC-CSP			ADMPC-CSP		
		流动相 Mobile phases		流出顺序 Elution orders	流动相 Mobile phases		流出顺序 Elution orders
		Methanol/water (V/V)	ACN/water (V/V)		Methanol/water (V/V)	ACN/water (V/V)	
己唑醇 Hexaconazole	230	70/30	50/50	+ / -	-	50/50	- / +
烯唑醇 Diniconazole	240	70/30	50/50	- / +	80/20	70/30	- / + + / -
粉唑醇 Flutriafol	230	-	-	-	70/30	-	- / +
戊唑醇 Tebuconazole	230	-	-	-	75/25	50/50	+ / -
烯效唑 Uniconazole	240	-	-	-	75/25	60/40	- / + + / -
三唑酮 Triadimefon	230	80/20	50/50	- / +	-	-	-

(+): 所出峰为正的圆二色信号 (Positive signal by circular dichroism detector); (-): 所出峰为负的圆二色信号 (Negative signal by circular dichroism detector)。

References

1 Williams A. *Pestic Sci*, **1996**, 46(1): 3 ~ 9

2 Yashima E. *J. Chromatogr A*, **2001**, 906(1): 105 ~ 125

3 Okamoto Y, Kaida Y. *J. Chromatogr A*, **1994**, 666(1-2): 403 ~ 419

4 Clark T, Deas A H B. *J. Chromatogr*, **1985**, 329: 181 ~ 185

5 Wu Y S, Lee H K, Li S F. *J. Chromatogr A*, **2001**, 912(1): 171 ~ 179

6 YANG Li(杨 丽), LIAO Yong(廖 勇), ZHOU Zhi-Qiang(周志强), JIANG Shu-Ren(江树人), WANG Peng(王 鹏). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2004**, 23(5): 133 ~ 135

7 LI Chao-Yang(李朝阳), ZHANG Yan-Chuan(张艳川), LI Qiao-Ling(李巧玲), WANG Wei-Xiao(王未肖), LI Jing-Yin(李景印). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(2): 237 ~ 240

8 Yang G S, Gao R Y, Wang Q S. *Chinese Journal of Chemistry*, **1997**, 15(6): 528 ~ 533

9 WANG Peng(王 鹏), JIANG Shu-Ren(江树人), ZHANG Hong-Jun(张宏军), ZHOU Zhi-Qiang(周志强). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32(5): 625 ~ 627

10 Yang L, Liao Y, Wang P, Bi C L, Zhou Z Q, Jiang S R. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, **2004**, 27(18): 2935 ~ 2944

11 Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. *J. Chromatogr*, **1986**, 363(2): 173 ~ 186

12 ZHOU Zhi-Qiang(周志强), WANG Peng(王 鹏), JIANG Shu-Ren(江树人), WANG Min(王 敏). *Chinese J. Chromatogr* (色谱), **2003**, 21(1): 44 ~ 45

13 Tachibana K, Ohnishi A. *J. Chromatogr A*, **2001**, 906(1-2): 127 ~ 154

14 Smith R J, Taylor D R, Wilkins S M. *J. Chromatogr*, **1995**, 697(1-2): 591 ~ 596

15 O'Brien T, Crocker L, Thompson R, Thompson K, Tama P H, Conlon D A, Feibush B, Moeder C, Grinberg N, Bicker G. *Anal. Chem.*, **1997**, 69(11): 1999 ~ 2007

16 TIAN Qin(田 芹), BI Cheng-Lu(毕承路), REN Li-Ping(任丽萍), WANG Li-Ping(汪丽萍), ZHOU Zhi-Qiang(周志强). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(3): 427 ~ 432

17 Wang P, Jiang S R, Liu D H, Zhang H J, Zhou Z Q. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(5): 1577 ~ 1583

18 Okamoto M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 27(3-4): 401 ~ 407

19 Wang T. *J. Chromatogr A*, **2003**, 1015(1-2): 99 ~ 110

Chiral Resolution of Eight Triazole Pesticides by High Performance Liquid Chromatography Under Reversed Phase Conditions

TAN Qin², REN Li-Ping³, LU Chun-Guang¹, ZHOU Zhi-Qiang^{*1}

¹ (Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

² (National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037)

³ (College Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The chiral resolutions of the racemic pesticides, hexaconazole, diniconazole, uniconazole, flutriafol, tebuconazole and triadimefon were successfully carried out using cellulose (tris-3, 5-dimethyl-phenylcarbamate) (CDMPC) and amylose (tris-3, 5-dimethyl-phenyl-carbamate, ADMPC) as chiral stationary phases by high performance liquid chromatography under reversed phase conditions. The influences of the chiral stationary phases (CSPs), methanol/water or acetonitrile/water of the different ratios as the mobile phases and temperature on chiral resolutions were investigated and the chromatographic conditions were optimized. The results showed that the two CSPs exhibited high chiral recognition ability in reversed-phase HPLC and methanol, acetonitrile and water content in mobile phases affected the enantiomeric resolutions and retentions. Hexaconazole and diniconazole were separated on both CSPs. Triadimefon was separated only on the CDMPC-CSP. Uniconazole, flutriafol and tebuconazole were separated only on the ADMPC-CSPs. The retention factors (k) and selectivity factor (α) for the enantiomers of most investigated pesticides decreased with the increase of temperature except for those of tebuconazole and uniconazole in methanol/water. Better resolutions were not always at low temperature. The elution orders of the eluting enantiomers were determined by a circular dichroism (CD) detector.

Keywords Triazole chiral pesticides; Chiral resolution; Reversed phase chromatography; Chiral stationary phase

(Received 10 September 2009; accepted 29 December 2009)

《色谱分析概论》(第二版)

该书为再版的《色谱技术丛书》之一。该书对色谱的各个分支做了简要地阐述,概论性地介绍了色谱的基本知识、仪器概况和方法要点,在气相色谱、液相色谱和毛细管电泳方面做了较多的论述。该书在第一版的基础上,增加了“色谱定性与定量分析”和“制备色谱”两章。该书可供实验室从事物理或化学检测人员使用,也可供高等院校与分析化学相关专业师生参考。

该书由傅若农 编著,化学工业出版社出版,定价 38.00 元。