

· 研究简报 ·

流动相添加剂法与手性固定相法对己唑醇 光学异构体的拆分

杨 丽¹, 江树人¹, 廖 勇², 王 鹏¹, 田 芹¹, 周志强^{1*}

(1 中国农业大学 应用化学系, 北京 100094; 2 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘 要: 分别采用 β -环糊精作为手性流动相添加剂的反相高效液相色谱法和涂敷型纤维素-三(3, 5-二甲苯基氨基甲酸酯)正相高效液相色谱手性固定相法拆分了农药己唑醇。结果表明, 己唑醇对映异构体在以上两种方法下都完全达到基线分离。考察了影响容量因子、选择性系数和分离度的各种因素。

关键词: 高效液相色谱; 手性固定相; 手性流动相添加剂; 己唑醇; 对映体拆分

中图分类号: O 657. 72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2004) 02-0090-03

Chiral Separation of Hexaconazole by Reversed Phase HPLC with β -Cyclodextrin as a Mobile Phase and Normal Phase HPLC with CDM PC as Chiral Stationary Phase

YANG Li¹, JIANG Shu-ren¹, LIAO Yong², WANG Peng¹, TIAN Qin¹, ZHOU Zhi-qiang^{1*}

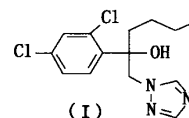
(1 Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract: Chiral separation of hexaconazole enantiomers was realized by reversed phase HPLC with β -cyclodextrin as a mobile phase and normal phase HPLC with CDM PC as chiral stationary phase. With reversed phase HPLC, the effect of the content of β -CD, pH of mobile phase and organic modifier on the chiral separation was studied. And the effect of 2-propanol concentration on the retention and resolution of CDM PC was investigated also. The results show that excellent enantioseparation can be achieved for hexaconazole by these two methods under the optimal conditions.

Key words: HPLC; chiral stationary phase; chiral mobile phase additive; hexaconazole; enantiomers separation

己唑醇(I)属三唑类杀菌剂,其化学名称为(RS)-2-(2,4-二氯苯基)-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)-2-己醇,具有高效、低毒、广谱和内吸活性,对真菌引起的病害具有防护和铲除作用。该药市售品为外消旋体,但其杀菌效果R(-)体优于S(+)体。如当药剂浓度为10 μ g/mL,处理72 h时,R(-)体对



番茄早疫病菌 *A. lternaria solani* 和苹果轮斑病菌 *A. mali* 的抑菌率是S(+)体的2倍^[1]。因此建立快

收稿日期: 2003-10-24; 修回日期: 2004-02-07

作者简介: 杨丽(1971-),女,重庆市人,博士研究生,研究方向为手性化合物的拆分和农药残留分析

*联系电话: 010-62892937; E-mail: zqzhou@mail.cau.edu.cn

速、灵敏、分离性能好的己唑醇对映体拆分及测定方法对于深入研究药物的作用机理, 开发生产 $R(-)$ 体单一产品及生产厂家进行质量控制都具有重要意义。

手性流动相添加剂法是高效液相色谱法 (HPLC) 手性分析的一种重要方法, 其特点是拆分光学对映异构体不需以手性试剂衍生, 也不需价格昂贵的手性柱, 而是将手性试剂添加到流动相中, 用普通的正相或反相柱分离。由于方法简单、有效, 已引起了广泛的注意^[2, 3]。

迄今为止, 关于己唑醇对映体拆分的相关报道不多, 主要使用的方法为手性固定相法。杨丽萍^[1]及 Spitzer 等^[4]曾用 Chiralcel OD 手性柱、正相高效液相色谱法对己唑醇进行过拆分。但用手性流动相添加剂法对该药进行拆分尚未见报道。

作者选用适于对许多中等大小分子对映体进行分离的 β -环糊精 (β -CD)^[5] 为流动相添加剂, 在 C_8 反相柱上对其进行了拆分研究。考察了容量因子 (k')、选择性系数 (α) 和分离度 (R_s) 的各种影响因素。此外, 用自制的纤维素-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯) (CDMPC) 固定相正相 HPLC 对己唑醇进行了手性拆分研究, 考察了异丙醇含量对 k' 、 α 和 R_s 的影响。并对两种方法的拆分效果进行了对比。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC (配有可调紫外检测器, 四元泵, 10 μ L 进样器); Agilent 化学工作站。 C_8 反相柱 [北京分析仪器厂制造, 250 mm $\times$ 4.6 mm (id)]。己唑醇外消旋体 (盐城利民化工厂产品); β -CD (北京奥博星生物技术有限公司产品); 乙腈 (色谱纯)、正己烷、异丙醇 (分析纯) (天津市康科德有限公司产品); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 (分析纯) (北京化学试剂公司产品)。

1.2 β -CD 手性流动相添加剂法

1.2.1 pH 值对己唑醇对映异构体拆分的影响 磷酸缓冲液的配制: 配 1 mol/L 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶液各 500 mL, 按 pH = 5.8、6.4、7.0、7.4、8.0 分别取相应体积配制。

流动相构成为 β -CD 水溶液 (7 mmol/L) + 磷酸缓冲液 (20 mmol/L) + 乙腈 + 三乙胺 = 50 : 30 : 20 : 0.1 (体积比)。所配流动相均经 0.45 μ m 滤膜抽滤, 再经超声波除气。

1.2.2 β -CD 浓度对己唑醇对映异构体拆分的影响

配制不同浓度的 β -CD (3.5、7.0、10.5、14.0 和 17.5 mmol/L) 水溶液。流动相构成为 β -CD 水溶液 + 磷酸缓冲液 (20 mmol/L) + 乙腈 + 三乙胺 = 50 : 30 : 20 : 0.1 (体积比)。所配流动相 pH 值均为 7.4, 经 0.45 μ m 滤膜抽滤, 再经超声波除气。

1.2.3 色谱参数及条件 色谱参数: 先流出对映体的容量因子 $k'_1 = (t_1 - t_0)/t_0$; 后流出对映体的容量因子 $k'_2 = (t_2 - t_0)/t_0$; 选择性系数 $\alpha = k'_2/k'_1$; 分离度 $R_s = 2(t_2 - t_1)/(W_1 + W_2)$ 。其中 t_1 、 t_2 分别为第一个洗脱峰与第二个洗脱峰的保留时间, t_0 为死时间, W_1 、 W_2 分别为第一个洗脱峰与第二个洗脱峰的基线峰宽。

色谱条件: 采用 C_8 反相柱, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μ L, 检测波长为 220 nm。色谱操作在室温 25°C 下进行, 用 NH_4NO_3 测定死时间, 柱子为 C_8 反相柱。

1.3 手性固定相方法

1.3.1 手性色谱柱的制备 CDMPC 的合成及氨基涂敷固定相的制备参见文献[6]方法, 用匀浆法在 37 MPa 压力下将固定相填充入不锈钢柱 [150 mm $\times$ 4.6 mm (id)] 中。

1.3.2 色谱参数及条件 采用自制涂敷型 CDMPC 柱, 色谱参数、流速、进样量、检测波长及色谱操作温度同 1.2.3。用 1, 3, 5-三叔丁基苯测定死时间, 以一定比例正己烷、异丙醇为流动相。

2 结果与讨论

2.1 β -CD 手性流动相添加剂法

2.1.1 pH 值对己唑醇对映异构体拆分的影响 在 pH 值为 5.8 至 7.4 范围内, 随 pH 值增大, α 、 R_s 也随之增大, 在 pH 值为 7.4 时两个参数均达到最大值 (见表 1)。己唑醇的反相色谱图 (图 1) 也显示, 在 β -CD 浓度为 7.0 mmol/L、pH 值 7.4 条件下, 可以取得最佳分离效果。

2.1.2 β -CD 浓度对己唑醇对映异构体拆分的影响 结果 (表 2) 表明, pH 值 7.4 条件下, 当 β -CD 浓度为 7.0 mmol/L 时, α 、 R_s 均达到最高值。此后, 随着 β -CD 浓度增大, 两参数值下降。当 β -CD 浓度大于 17.5 mmol/L 时, 由于溶解度的限制, 会影响其在流动相中的溶解, 使流动相变浑浊。

2.2 手性固定相法对己唑醇拆分的研究

由结果 (见表 3) 可知, 随着流动相中异丙醇含量的增加, k 随之减小。异丙醇的体积分数由 1% 增加到 50% 时, 外消旋己唑醇均能达到十分理想的拆

分。当异丙醇体积分数为 2% 时, α 和 R_s 最大 (见图 2)。

Table 1 The effect of pH on the separation of hexaconazole enantiomers^{*}

pH	k_1'	k_2'	α	R_s
8.0	1.986	3.016	1.519	7.033
7.4	1.911	3.282	1.718	8.027
7.0	1.900	3.233	1.701	7.853
6.4	1.906	3.170	1.663	7.766
5.8	1.952	3.053	1.565	6.759

^{*} The Concentration of β -CD is 7 mmol/L.

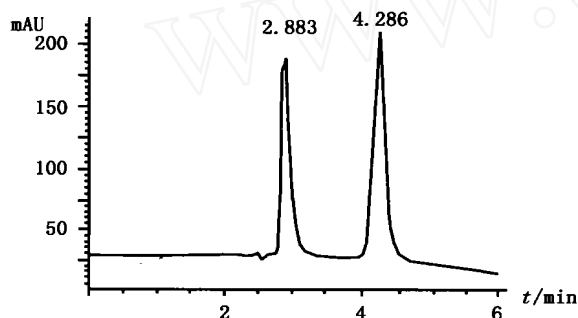


Fig 1 The chromatogram of hexaconazole enantiomers on the reversed-phase column (mobile phase: pH=7.4, β -CD 7 mmol/L)

Table 2 The effect of concentration of β -CD on the separation of hexaconazole enantiomers

Concentration of β -CD / mmol $\cdot$ L ⁻¹	k_1'	k_2'	α	R_s
3.5	2.068	3.617	1.75	9.248
7.0	1.939	3.497	1.804	9.359
10.5	2.001	3.540	1.769	8.518
14.0	2.025	3.553	1.755	8.329
17.5	2.103	3.588	1.706	7.557

Table 3 Retention and separation results under different mobile phase composition for hexaconazole enantiomers

Mobile phase n -hexane + 2-propanol (V/V)	k_1'	k_2'	α	R_s
99:1	45.60	78.93	1.73	7.34
98:2	28.56	51.76	1.81	8.98
90:10	6.33	9.88	1.56	5.86
80:20	3.80	5.33	1.40	4.12
60:40	2.51	3.16	1.26	2.37
50:50	2.43	2.94	1.21	1.86

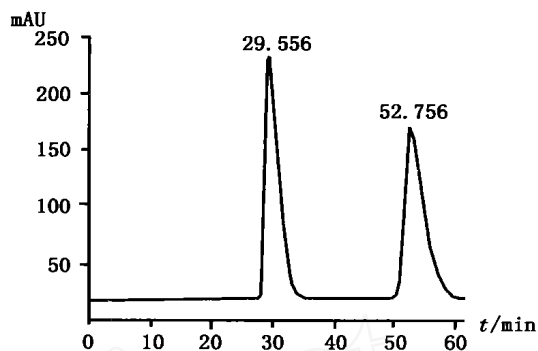


Fig 2 The chromatogram of hexaconazole enantiomers on the CDM PC-CSP mobile phase: n -hexane + 2-propanol (98:2 in volume ratio)

2.3 手性流动相添加剂法与手性固定相法比较

用此两种方法拆分己唑醇均可达到基线分离, 拆分良好。手性流动相添加剂法的优点是保留时间较短, 拆分速度快, 在普通廉价的 C_8 色谱柱上就可实现拆分, 但缺点是在流动相体系中有盐, 易析出; 而手性固定相法的优点是在流动相体系中没有盐, 操作相对更简便, 但缺点是手性柱的价格比较昂贵。

参考文献

- [1] YANG Liping (杨丽萍), LI Shu-zheng (李树正), LI Yu-chang (李煜昶), et al. 三种三唑类杀菌剂对映体生物活性的研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学学报), 2002, 4(2): 67-70.
- [2] Healy L O, Murrihy J P, Tan A, et al. Enantiomeric separation of R,S -naproxen by conventional and nano-liquid chromatography with methyl- β -cyclodextrin as a mobile phase additive[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 924: 459-464.
- [3] Hassan Y, Aboul-Enein, Imran A. Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies [M]. Marcel Dekker, Inc, 2003. 338.
- [4] Spitzer T, Yashina E, Okamoto Y. Enantiomer separation of fungicidal triazolyl alcohols by normal phase HPLC on polysaccharide-based chiral stationary phases [J]. *Chirality*, 1999, 11: 195-200.
- [5] YAO Tongwei (姚彤伟), ZENG Su (曾苏), DING Haiqing (丁海青). 环糊精类手性流动相添加剂及其在药物分析中的应用[J]. *Chin J Chromatography* (色谱), 1996, 14(2): 106-110.
- [6] ZHOU Zhi-qiang (周志强), QIU Jing (邱静), JIANG Shu-ren (江树人), et al. 涂敷纤维素类手性固定相对甲霜灵中间体的高效液相色谱拆分[J]. *J Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2003, 22(1): 89-91.

(责任编辑: 唐 静)