

色谱技术在农药手性拆分中的应用

范瑞芳

(华南师范大学生命科学学院 生物工程系 广州 510631)

摘 要 随着人们对环境的重视, 农药的手性拆分得到越来越多的重视。本文综述了高效液相色谱、气相色谱、高效毛细管电泳、模拟移动床色谱技术在农药手性拆分中的应用及发展状况, 并指出了各方法的优点及农药手性拆分的发展方向。

关键词 农药 高效液相色谱 气相色谱 高效毛细管电泳 模拟移动床色谱 手性拆分

Application of Enantiomeric Separation by Chromatography Technology in Pesticide

Fan Ruifang

(Department of Bioengineering, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract To investigate the difference in biological activity of individual enantiomers, they should be purified by isolating from the racemate or by stereoselective synthesis. In this paper, enantiomeric separations of pesticide by chromatography technology are summarized. The merits of these methods and the research direction of enantiomeric separation of pesticide are also reviewed.

Key words Pesticide, High performance liquid chromatography, Gas chromatography, High performance capillary electrophoresis, Simulated moving bed chromatography, Chiral separation

大量研究表明, 生命活动与生物分子的手性密切相关。其中包括氨基酸、DNA、酶、抗体和性激素、各种药物等。环境中使用的农药绝大多数都具有位置或光学异构体, 而且同一农药的不同对映体通常也具有不同的药效和毒性。在许多情况下, 其中一个异构体对目标生物体无药效, 或者对非目标生物体毒性较大, 而且它们被生物代谢和降解的过程也存在手性差异。已有研究表明, 精甲霜灵(metalaxyl-M)的 R 体较外消旋体具有更高的杀菌活性、更快的土壤降解速度等特点, 有利于减少施药次数, 增长施药周期, 并增加了对使用者的安全性及与环境的相容性^[1]。对喹禾灵的作用方式研究表明, APP 和 CHD 类除草剂被植物吸收水解成酸后发挥除草活性在作物的分生组织上起作用, 但 S(+)和 R(+)对映体的活性显著不同, R(+)体的活性甚至比 S(+)高 1000 多倍^[2]。

目前约有 25%的农用化学品具有手性中心, 而它们都以外消旋体的形式出售和使用, 这给环境带来了不必要的污染。在一些国家如丹麦和荷兰, 已制定法规计划在未来的几年内削减 50%的农药消费量^[3]。为了监控农药生产中的立体选择性合成过程, 评价商品化手性农药的手性纯

范瑞芳 女, 31 岁, 博士生, 从事色谱分析工作。E-mail: tgxb@jnu.edu.cn

2004-02-23 收稿, 2004-07-15 接受

度,了解环境中农药不同对映体的降解状况,以及认识手性农药的环境手性识别的差异,研究手性拆分方法十分重要。

由于对映体之间在物理化学性质方面的差异很小,所以拆分是一项十分艰难的工作。然而单一活性体减小了农药向自然界的投入,提高了经济效益。因此手性农药成为近二十年来增长最快的农药品系之一。同时,手性农药和相关的手性拆分技术成为各大制药公司竞相开发的新产品与新技术^[4]。

近年来,对各种手性药物的拆分报道逐渐成为热点。其中,使用较多的是色谱分析技术,特别是高效毛细管电泳技术(HPCE)在这一领域显示出其独特的优势^[5]。但对农药手性拆分起步较晚。本文综述了农药的色谱手性拆分技术,并对其前景进行了展望。

1 气相色谱(GC)

由于气相色谱适用于挥发性强、热稳定的物质,因此一些弱极性的亲油性化合物的拆分,常应用 GC 的形式,如拟除虫菊酯类^[6~7]、有机磷化合物^[8,9]、 α -6-氯环己烯(α -CH)、氯丹等有机氯化物^[10~13]。Oehme 等^[11]以 OV-1701 柱涂渍叔丁基-二甲基硅烷化 β -CD(TBDMS- β -CD),并用 MS 鉴定了 TBDMS- β -CD 的性质,分析了多代有机氯化物对映体。结果表明,有机氯化物对 TBDMS- β -CD 的变化特别敏感。手性剂的比例不同即可使顺、反氯丹的洗脱顺序改变。手性剂制作批次不同、毛细管的不同(自制、商品化)均会对洗脱顺序产生影响。Vetter^[12]在此基础上深入讨论了纯 TBDMS- β -CD(99%)与任意硅烷化 TBDMS- β -CD 的手性固定相(CSPs)对拆分的影响。实验显示,相对于纯 TBDMS- β -CD,在任意硅烷化 TBDMS- β -CD 的柱子上,芳香族化合物保留时间短,而脂肪族化合物保留时间长。任意硅烷化 TBDMS- β -CD 可拆分 24 种对映体(其中 16 种是基线分离),而纯 TBDMS- β -CD 只能拆分 6 种物质,并且纯度越高,手性拆分能力越小。他认为任意硅烷化 TBDMS- β -CD 中的一种和多种副产物对拆分起了重要的作用。

在我国也开展了 GC 的手性农药拆分工作^[6~7]。赵春霞等^[6]采用不同改性的 β -CD 对二氯菊酸甲酯(PI)的对映体拆分进行了研究,并测定了部分热力学数据,发现 2,6-*O*-二戊基-3-*O*-乙酰基- β -CD 对 PI 的拆分效果最好。并且不同固定相对 PI 有相同或相似的机理。

2 高效液相色谱(HPLC)

为了区分单一对映体间生物活性的差异,需要通过选择性手性合成法或运用分离方法将单一对映体从外消旋体中分离纯化。由于 HPLC 载液量大,可用于对映体间的制备分离^[14~20]。Champion Jr 等^[15]以多糖类手性柱拆分了五种有机氯对映体。当己酮为流动相,CHIRALCELOD 柱可以拆分顺反氯丹和七氯;当甲醇为流动相时,CHIRALCELAD 柱可以拆分七氯的代谢物和环氧七氯;当己酮-2-丙醇为流动相时,CHIRALCEL OJ 柱可以拆分 α -HCH,并且在相同的条件下,使用制备柱得到大约 250mg α -HCH 的单一对映体。HPLC 也可用于农药及其代谢物的痕量分析。Hutta^[14]使用 C-18 柱转换技术和 1mL 样品容量,进样 0.05mg/L,在 230nm 处成功检测到了杀菌剂环氧唑醇单一对映体。这一方法亦可用于甲醇的土壤提取物,可以检出混在 10 种常见农药中的 0.2mg/kg 的环氧唑醇单一对映体。

HPLC 手性拆分成功的关键是手性固定相(CSP),其中效果较好的是多糖类 CSP,包括纤维

素^[21-24]和淀粉,如改性环糊精^[16]。周志强^[21,22]、侯经国^[23]以正己烷为流动相,添加一定比例的异丙醇作为改性剂,在纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)手性固定相上,实现了对己唑醇光学异构体和农药甲霜灵的 HPLC 直接拆分,研究了流动相中异丙醇的比例对分离效果的影响,优化了色谱拆分条件,进行了机理的初步探讨。高如瑜等^[25]用 HPLC,在 Pirkle 类型手性柱上拆分了菊酯类农药甲氰菊酯,氟胺氰菊酯的光学异构体。通过分子对接(Docking)方法得到手性固定相与对映体形成的非对映体络合物的稳定构象,认为手性固定相中主要是 R-萘基部分起着识别作用。Jaus^[16]以 7-(2,3,6-三氧-甲基)- β -CD(PM- β -CD)为 CSP,分离了多氯代对映体。对于 DDD 及 DDT 等化合物,不同批次及纯度的 CSP 表现出不同手性拆分能力,纯 PM- β -CD 效果最好。

GC 和 HPLC 的联用技术比较成熟,可以选择性分离鉴定分析物,这是这两种技术优于 HPCE 的地方。但拆分范围广,效果良好的手性柱制备困难,且易污染,实验成本高,限制了 GC 和 HPLC 在手性拆分上的应用。

3 毛细管电泳(CE)

HPCE 具有分离效率高、分离模式多、手性样品和试剂消耗量少,操作简单和分析速度快等特点,是一类特别适于手性分离研究的技术^[5]。手性拆分最初多集中在与人有关的药物上,最近几年来由于人类对环境的关注,关于农药手性拆分的报道也逐渐多起来^[26]。早在 1993 年, Nielsen^[27]已报道了在乙酸盐缓冲溶液中利用添加环糊精的 CZE 技术分离了 7 种手性和非手性的苯氧酸类除草剂及其位置异构体,并采用该法成功地检测了实际样品中农药的手性纯度。Zerbinati 等^[28]用 α -、 β -、 γ -CD 及其衍生物对 2,4-滴氯酸和(\pm)-2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸的外消旋体进行了拆分。结果表明,相对于 α -、 β -、 γ -CD 及其衍生物碳酸乙酯- β -CD 对受试物拆分效果最好。作者用分子模型理论解释了包合常数不同带来的分离效果的差异。Schmitt 等^[29]用 MEKC 模式对 3 种不同类别的农药(有机磷,滴滴涕,甲酯类芳香酸)进行了分离研究。结果表明,用 β -CD、丙羟基- β -CD、 γ -CD 可分离马拉硫磷、育畜灵和氯亚磷,用 γ -CD 和少量乙腈改性剂可很好地分离 6 种同类滴滴涕(DDT),滴滴涕(DDD),滴滴伊(DDE)以及这一系列对映体的手性各组分。Miura^[30]对苯氧酸类除草剂进行了分析,10mmol/L 的 2,3-DM- α -CD 可高效分离七种苯氧酸类除草剂旋光异构体,5mmol/L α -CD 可分离九种苯氧酸类除草剂位置异构体,但无手性拆分效果。使用 5mmol/L α -CD 和 10mmol/L 的 2,3-DM- α -CD 的混合手性剂亦不能同时将这九种除草剂旋光异构体和位置异构体分离,但 2,4-D 和 2,4-CPA 可被 2.5mmol/L α -CD 和 2.5mmol/L 的 2,3-DM- α -CD 完全拆分。

在 CE 的手性拆分中,除了将其用于实际工作中考察手性农药的环境行为,如研究除草剂的手性降解行为^[31]之外,人们还一直在不断寻找高效拆分效果的新型手性剂^[26]。环糊精、冠醚、大环抗生素、蛋白质都曾被用于药物的手性拆分,其中使用最多的是环糊精类(CDs)手性剂,尤以阴离子型的 CDs 效果最好。

鉴于紫外分光光度计(UV)检测器在低波长区灵敏度低,重现性差。人们尝试将毛细管电泳仪与其它一些检测器联用,如激光诱导荧光(LIF)^[32],质谱(MS)^[33-35]。由于 CE-MS 的高灵敏度、高选择性及可以获知分子结构信息,显示出诱人的发展前景^[33]。1995 年, Lamoree 等^[34]以 DM-

β -CD 为手性剂,毛细管区带电泳-电喷雾质谱(CZE-ESI-MS)方式拆分了 ropivacaine。Nielen^[35]报道在未加任何添加剂、pH4.8 的醋酸铵缓冲溶液中,以 CZE-ESI-MS 方式分离了苯氧酸类除草剂。Otsuka 等^[33]在 pH4.8, 50mmol/L 的醋酸铵缓冲溶液添加 20mmol/L 的 TM- β -CD,使用负离子化的甲醇-水-甲酸屏蔽液,以 MS 作检测器成功拆分三种除草剂的对映体。CE-MS 作为常规方法,与 GC-MS 和 HPLC-MS 相比,灵敏度低,对缓冲液限制多,接口方法尚不成熟。在新的世纪里,随着一些潜在的难点,特别是接口技术得到进一步的改善,该项技术具有很强的生命力。

在我国,毛细管电泳拆分手性药品的报道较多。随着人们对生存环境的重视及毛细管电泳手性拆分工作的进展,人们开始注意到毛细管电泳在农药手性拆分上的优势。游静等^[36]采用带电的磺丁基- β -CD 拆分了杀鼠灵和水胺硫磷对映体。

尽管 CE 重复性差,灵敏度低,在制备方面与 HPLC 无法相比,但仍可预计毛细管电泳拆分手性农药将会受到越来越多的人重视。工作发展方向有如下几个方面:(1)研制新型的手性选择剂,这是手性拆分的基础;(2)发展新型、高灵敏度的检测方法和联用技术,如 CE-MS、CE-LIF 等,这将拓宽毛细管电泳的应用范围,可快速完成众多复杂成分的分离和结构鉴定,这一点对研究手性农药的降解行为至关重要;(3)采用固相微萃取(SPME)、膜提取分离、超临界流体萃取、超声提取、液液萃取等方法进行痕量代谢中间物前处理,改善 CE 的灵敏度。

4 模拟移动床色谱技术(SMBC)

模拟移动床色谱(Simulated Moving Bed Chromatography,简称 SMBC)技术是模拟移动床技术与色谱分离技术的组合,是连续色谱的一种,属吸附分离技术。它是一系列色谱柱的串联,通过进样口与出样口定期变更,模仿填料的逆流。模拟移动床色谱由许多较短的色谱柱首尾相连而成。选择适当的进样位置和分离后两组分的采出位置,按适当的切换时间,将各个位置沿着流动相的运动方向,向下一个柱子推进,如此循环,就模拟出了固定相和流动相间的相对移动。

模拟床色谱技术既保持了液相色谱的优点,又克服了它不能连续操作的弱点,流动相可以循环使用,降低了成本,保护了环境。

在制药工业中,CE、GC、HPLC 法不适于手性药物工业上的大规模拆分。与手性药物化学分离和酶法拆分相比,SMBC 有着低成本和周期短的特点。因而,在手性药物大规模拆分领域中,SMBC 已经获得了广泛的接受^[37~41]。张曾子^[42],Schulte 等^[43]对 SMBC 技术在手性拆分上的应用有详细的综述。

5 前景与展望

由于不同色谱技术在分析分离方面的优势不同,他们在农药的手性拆分上将会相互补充。由于 GC 及 HPLC 的检测极限优于 HPCE 检测器的联用技术商品化程度高,所以 GC 及 HPLC、SMBC 在农药的手性拆分仍将发挥重要作用。并且 HPLC、SMBC 的制备功能是 HPCE 所不及的。

但 HPCE 分离模式多样,几乎可以分离除挥发性和难溶化合物以外的任何分子,这一点是其他分析技术不具备的,对广大分析工作者具有极大的吸引力。随着社会的发展,HPCE 技术的日趋完善,CE 有望在手性农药拆分上起愈来愈大的作用。

参考文献

- [1] Leadbitter. WO: 9601559, 1997.
- [2] Desiderio, C M Polearo, J Padiglioni. J. Chromatogr. A, 1997, 781:503~513.
- [3] D Pimentel (Editor). Techniques for Reducing Pesticide Use. Wiley. Chichester 1997.
- [4] 郑卓. 精细与专用化学品, 2001, 23:3~6.
- [5] M Fillet, Ph Hubert, J Crommen. J. Chromatogr. A, 2000, 875:123~134.
- [6] 赵春霞, 王清海, 周良模 等. 分析化学, 2000, 28:172~175.
- [7] 史雪岩, 王敏, 郭红超 等. 分析化学, 2002, 30:1293~1297.
- [8] J R Smith, J J Schlager. J. High Resolut. Chromatogr., 1996, 19(3):151~157.
- [9] N Ôi, M Horiba, H Kitahara. Agric. Biol. Chem., 1979, 43:24~30.
- [10] G Koske, G Leupold, D AngerhÖfer et al. Chemosphere, 1999, 39:683~688.
- [11] M Oehme, L Miiller, H Karlsson. J. Chromatogr. A, 1997, 755:275~285.
- [12] W Vetter, U Klobes, B Luckas. J. Chromatogr. A, 1999, 846:375~381.
- [13] F Sánchez-Rasero, M B Matallo, E Romero et al. J. Chromatogr. A, 1998, 799:355~360.
- [14] M Hutta, I Rybár, M Chalányová. J. Chromatogr. A, 2002, 959:143~152.
- [15] W L Champion Jr., J Lee, A W Garrison et al. J. Chromatogr. A, 2004, 1024:55~62.
- [16] A Jaus, M Oehme. J. Chromatogr. A, 2001, 905:59~67.
- [17] V Schurig, S Negura, S Mayer et al. J. Chromatogr. A, 1996, 755:299~307.
- [18] J J Ellington, J J Evans, K B Prickett et al. J. Chromatogr. A, 2001, 928:145~154.
- [19] P Padiglioni, C M Polcaro, S Marchese et al. J. Chromatogr. A, 1996, 756:119~127.
- [20] F García Sánchez, A Navas Diaz, A Garía Pareja. J. Chromatogr. A, 1996, 754:97~102.
- [21] 周志强, 王鹏, 王敏 等. 化学通报, 2003, 11:767~769.
- [22] 侯士聪, 王敏, 乔振 等. 应用化学, 2003, 20(5):505~507.
- [23] 侯经国, 孟晓荣, 何天稀 等. 分析化学, 2003, 31(3):307~310.
- [24] 侯士聪, 王敏, 周志强 等. 农药学报, 2002, 4(4):71~74.
- [25] 高如瑜, 祝凌燕, 陈志远. 农药, 1998, 37(24):22~24.
- [26] G Gübitz, M G Schmid. J. Chromatogr. A, 1997, 792:179~225.
- [27] M W F Nielsen. J. Chromatogr. A, 1993, 637:81~90.
- [28] O Zerbinati, F Trotta, C Giovannoli et al. J. Chromatogr. A, 1998, 810:193~200.
- [29] P Schmitt, A W Garrison, D Freitag et al. J. Chromatogr. A, 1997, 792:419~429.
- [30] M Miura, Y Terashita, K Funazo et al. J. Chromatogr. A, 1999, 846:359~367.
- [31] A W Garrison, P Schmitt, A kettrup. J. Chromatogr. A, 1994, 688:317~327.
- [32] S L Zhao, Y Z Feng, M H Leblanc et al. J. Chromatogr. B, 2001, 762:97~101.
- [33] K Otsuka, C J Smith, J Grainger et al. J. Chromatogr. A, 1998, 817:75~81.
- [34] M H Lamoree, A F H. Sprang, U R Tjaden et al. J. Chromatogr. A, 1996, 742:235~242.
- [35] M W F Nielsen. J. Chromatogr. A, 1995, 712:269~284.
- [36] 游静, 陆豪杰, 欧庆瑜 等. 分析测试学报, 2001, 20(3): 59~61.
- [37] B Thome, C F Ivory. J. Chromatogr. A, 2002, 953:263~277.
- [38] G Zenoni, M Pedferri, M Mazzotti. J. Chromatogr. A, 2000, 888:73~83.
- [39] H Lorenz, P Sheehan, A S Morgenstern et al. J. Chromatogr. A, 2001, 908:201~214.
- [40] Z Y Zhang, M Mazzotti, M Morbidelli. J. Chromatogr. A, 2003, 989:95~108.
- [41] B Thome, C F Ivory. J. Chromatogr. A, 2002, 953:263~277.
- [42] 张曾子, 姚平经, 邹汉法 等. 分析测试学报, 2000, 19(5):80~84.
- [43] M Schulte, J Strube. J. Chromatogr. A, 2001, 906:399~416.