

甲霜灵农药中甲霜灵对映体的分离测定

明永飞^{1,2}, 张红丽¹, 赵亮¹, 师彦平¹, 李永民^{1*}

¹(中科院兰州化学物理研究所甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000) ²(中科院研究所生院, 北京 110009)

摘要: 利用键合型纤维素-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)固定相高效液相色谱法直接拆分了甲霜灵对映异构体, 通过考察流动相中的改性剂(醇类、四氢呋喃、三氯甲烷)、流动相的流速对手性拆分的影响, 优化了色谱分离条件。结果表明, 键合型手性固定相对甲霜灵有很好的拆分效果, 在150mm的色谱柱上, 使用正己烷/异丙醇(80/20, v/v)流动相, 甲霜灵可以得到良好的分离。在优化的条件下, 建立了键合型手性柱上分离分析甲霜灵的方法, 对其线性范围、检测限、重现性以及回收率进行了考察, 结果表明该方法简单、灵敏、准确、可靠。

关键词: 键合; 手性固定相; 手性拆分; 测定; 甲霜灵

随着现代药物研究的发展, 提供高效低毒的光学纯药物已经成为药物研究的重要方向。由于手性药物对映体在药理学和毒理学上的不同, 分别对手性药物不同的对映体进行药理和毒理学的研究成为药物研发过程中必不可少的重要组成部分^[1,2], 因此对有关手性药物进行手性分离分析具有十分重要的意义。目前, 许多色谱和光谱法已经被用于药物对映体的分析, 在这些色谱分析法中, 高效液相色谱固定相法已经得到广泛的应用^[3-10]。

甲霜灵是一种优良的内吸性杀菌剂(化学结构见图1), 目前市场需求量巨大, 远远超过了其它类型的杀菌剂。现在市售的甲霜灵大多是它的外消旋体, 而研究表明, 甲霜灵的左旋体具有更高更强的杀菌作用, 右旋体相对左旋体来说杀菌性并不明显^[11]。有关甲霜灵对映体的高效液相色谱法的分离已有报道^[12-14], 但是, 在这些相关的分离研究中, 采用的固定相均为涂敷型的纤维素或淀粉手性固定相, 但是, 涂敷型的手性柱在使用四氢呋喃、三氯甲烷, 丙酮等一些有机溶剂作为流动相时, 会使纤维素衍生物溶胀和溶解, 破坏了它的空间结构而失去手性识别能力^[15], 这大大限制了该类手性柱的使用, 而键合型则克服了这一缺点。迄今为止, 有关甲霜灵在键合型纤维素手性固定相上的分离分析还未见报道。

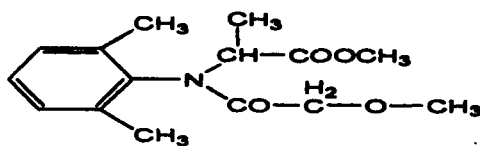


图1 甲霜灵的化学结构式

本文利用键合型纤维素-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)固定相液相色谱法对甲霜灵在键合型手性固定相的拆分进行了系统研究。考察了异丙醇的浓度、不同的醇类改性剂、四氢呋喃以及三氯甲烷对甲霜灵手性分离的影响。优化了甲霜灵的分离条件, 建立了甲霜灵农药中甲霜灵对映体的分离分析方法并用于甲霜灵农药中甲霜灵对映体含量的测定。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正己烷(天津化学试剂二厂)甲霜灵外消旋体(浙江禾木化学试剂公司); 四氢呋喃、三氯甲烷均为国产分析纯试剂。液相色谱系统由515 HPLC泵(Waters, USA); 2487型紫外可见波长检测器

本文系国家自然科学基金(No. 20375045)和中国科学院“西部之光”资助项目

(Waters, USA); SEPU3000色谱数据处理器(杭州谱惠公司); 7725手动进样阀(20 μ L) (Waters, USA) 组成。色谱柱为键合型纤维素-(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性柱(150mm \times 4.6mm i. d.)。

1.2 色谱条件

正己烷/异丙醇(80/20)为流动相, 进样20 μ L, 流速1.0mL/min, 230nm紫外检测室温条件下, 实现了甲霜灵对映体的手性拆分。色谱图见图2。

1.3 色谱计算

柱死体积(t_0)用1, 3, 5-三叔丁基苯测定, 分离因子(α)按 $\alpha = k_2' / k_1'$, 容量因子(k')按 $k_1' = (t_1 - t_0) / t_0$, $k_2' = (t_2 - t_0) / t_0$ 计算, 分离度 $R_s = 1.18 (t_2 - t_1) / [W_{(1/2)1} + W_{(1/2)2}]$, $W_{(1/2)1}$ 和 $W_{(1/2)2}$ 分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰之半峰宽。

1.4 样品的配制

准确称取甲霜灵对映体20mg, 利用流动相溶解于10mL的容量瓶中, 定容, 得到单一对映体的浓度为1mg/mL的原始标准溶液, 稀释得到其它浓度的标准液。

准确称取甲霜灵可湿粉剂20mg, 流动相溶解并定容于50mL容量瓶中, 过滤后备用。

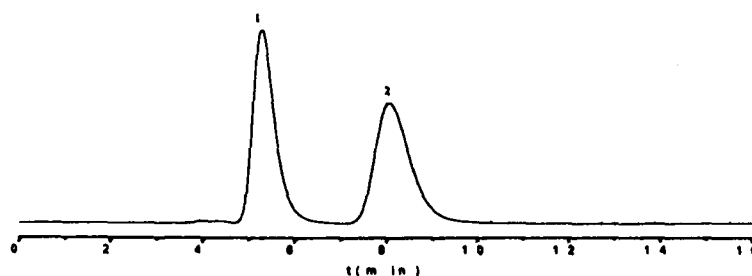


图2 甲霜灵对映体的色谱分离图

2 结果与讨论

2.1 甲霜灵对映体的手性拆分

利用键合型纤维素手性柱, 考察了流动相中醇的浓度以及不同的醇类改性剂对甲霜灵手性分离的影响。首先考察了5%~30%范围内流动相中异丙醇含量对分离的影响, 结果发现, 随着流动相中异丙醇含量的降低, 甲霜灵的保留因子相应增大, 分离因子也有一定程度的增加, 当异丙醇含量为20%时, 其分离因子为1.81, 甲霜灵对映体的分离度达到2.95, 尽管随着异丙醇含量的进一步减小, 甲霜灵对映体的分离度又有所增大, 但是其保留时间较长, 分离因子大于2.0, 分离的峰型较差, 因此实验中采用的异丙醇的含量为20%。

在确定醇类改性剂的浓度的基础上, 对不同的醇类改性剂对甲霜灵分离的影响进行了考察, 比较了乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇对其分离的影响, 结果见表1。随着醇类改性剂由乙醇到异丁醇的变化, 甲霜灵在手性柱上的保留增强, 容量因子变大, 这主要是由于醇类改性剂的极性和结构不同造成的。以乙醇和异丙醇为改性剂时, 甲霜灵均能在键合型手性柱上获得较好的分离, 但是考虑到分离因子和分离度, 实验中选择的醇类改性剂为异丙醇, 此时甲霜灵对映体的分离度为3.55。

表1 醇类改性剂对甲霜灵滞留作用与分离度的影响

parameters	Ethanol	1-Propanol	1-Butanol	2-Propanol	2-Butanol
k_1	1.35	1.46	1.92	2.59	2.60
k_2	2.31	3.30	5.29	4.86	5.37
α	1.70	2.27	2.75	1.88	2.06
R_s	2.65	4.00	4.93	3.55	3.56

2.2 四氢呋喃、三氯甲烷对手性中间体手性分离的影响

键合型手性固定相较涂敷型手性固定相的最大优点就是可以使用四氢呋喃、三氯甲烷, 丙酮等这类能够引起涂敷型多糖手性固定相溶胀和溶解, 破坏它的空间结构而失去手性识别能力的有机溶剂作为流动相添加剂, 这大大扩展了流动相的选择范围。通过考察四氢呋喃和三氯甲烷的加入对分离的影响发现, 当流动相为正己烷/异丙醇/四氢呋喃 (80/10/10), 甲霜灵对映体在键合型手性柱上的分离度仅为 1.48; 当利用三氯甲烷代替四氢呋喃时, 其分离度达到 2.68, 由此可见, 在利用三氯甲烷和四氢呋喃作为流动相添加剂均能实现甲霜灵对映体的分离, 三氯甲烷作为添加剂时对甲霜灵的分离效果好一些。考虑到方法的简便性, 实验中采用了正己烷/异丙醇 (80/20) 作为甲霜灵手性分离的流动相。

2.3 甲霜灵对映体分离方法的重现性

在优化的色谱条件下, 连续进样 6 次, 考察甲霜灵对映体迁移时间和峰面积的重现性, 结果发现, 甲霜灵对映体峰 1 (第一个洗脱峰) 峰 2 (第二个洗脱峰) 的保留时间相对标准偏差分别为 0.40% 和 0.67%; 峰面积的相对标准偏差分别为 0.91% 和 1.12%。

2.4 线性方程及检出限

以不同的甲霜灵对映体的浓度 X ($\mu\text{g/mL}$) 对峰面积 Y ($\mu\text{V}\cdot\text{S}$) 进行线性回归, 得到其线性回归方程。线性范围、相关系数以及检出限 ($S/N=3$) 见表 2。

2.5 回收率

利用标准加入法对方法, 向准确称量的五份 20mg25% 甲霜灵可湿性粉剂中分别加入 2mg 甲霜灵对映体, 重复样品的处理过程, 利用上述方法, 对配制的样品进行测量, 计算回收率。测得方法的回收率在 96%~102% 之间。

表 2 甲霜灵的线性回归方程、相关系数、线性范围及检测限

甲霜灵 metalaxyl	回归方程 Regression equation	相关 系数 R	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 Detection limit ($\mu\text{g/mL}$)
峰 1	$Y = -218822.24X + 28516.29$	0.9996	100-1.25	0.18
峰 2	$Y = 21678.84 X + 41549.58$	0.9992	100-1.25	0.23

2.6 甲霜灵可湿粉剂中对映体含量的测定

利用上述分析方法, 对甲霜灵可湿粉剂中的甲霜灵对映体的含量进行了测量, 色谱图见图 3, 结果表明, 在甲霜灵可湿粉剂中, 甲霜灵对映体的含量分别为 0.143g/g 和 0.145g/g, 甲霜灵的总含量为 28.8%。

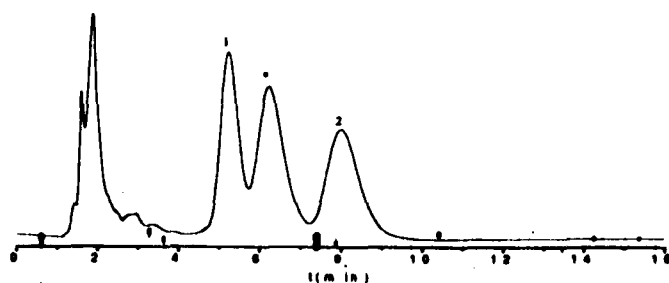


图 3 样品中甲霜灵对映体的色谱分离图

3 结论

由实验结果可以看出,利用键合型纤维素手性固定相对甲霜灵对映体进行手性拆分,在正己烷/异丙醇和正己烷/异丙醇/三氯甲烷体系中都可以获得令人满意的结果。建立的分离分析甲霜灵对映体的方法简单、灵敏、准确,可以用于甲霜灵农药中甲霜灵含量的测定。

参考文献:

- [1] A. Goodman-Gilman, L.S. Goodman, w. Rall, F. Murad (Eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McMillen publishing Co., NesYork, NY,1985.
- [2] FDA Policy s\Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, Washington, DC, May 1992
- [3] G Yang, Z. Li, D.Wang, E. Zhang, Y. Chen, *Chromatographia* 56 (2002) 515-518.
- [4] G Yang, H. Liu, H. Li, Y. Wang, Y. Chen, *Chromatographia*57 (2003) 245-248.
- [5] A.P. Zavitsanos, T. Alebic-Kolbah, *J. Chromatogr A* 794 (1998) 45-56.
- [6] F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr A* 906 (2001) 35-50.
- [7] E. Yashima, *J. Chromatogr A* 906 (2001) 105-125.
- [8] R. Herráez-Hernández, P. Camp, *Anal. Chimi Acta.* 434 (2001) 315-324.
- [9] B. Chankvetadze, N. Burjanadze, G. Blaschke, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 153-159.
- [10] M. Gilar, M. Uhrova, E. Tesarova, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 133-141.
- [11] 刘学东柴生勇, 鲁铭久 甲霜灵及其旋光体的合成进展, *农药*, 2000, 39 (12): 4-7
- [12] 侯经国,孟晓荣,何天福,邓华陵,毛学峰,韩小茜,高锦章. *分析化学*, 2003, (03)
- [13] 周志强, 邱静, 江树人 *分析测试学报* 2003/01
- [14] 韩小茜, 周志强, 柳春辉, *分析测试学报*, 2002, 21 (5): 40-42
- [15] Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. *J Am Chem Soc*, 1984, 106 (18): 5 357