

· 研究论文 ·

# 敌草胺对映体的高效液相色谱分离 及手性拆分热力学研究

周 瑛<sup>1,2</sup>, 张世浩<sup>2</sup>, 刘维屏<sup>1,3\*</sup>, 陈易晖<sup>2</sup>, 叶 丽<sup>2</sup>

(1. 浙江大学 环境科学研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江工业大学 化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310032;  
3. 浙江工业大学 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032)

**摘 要:**利用直链淀粉三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(AD-RH柱)和纤维素三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(OD-RH柱),以乙腈-水为流动相,对敌草胺对映体进行了直接手性拆分研究。考察了流动相组成、流速、柱温等对敌草胺对映体的色谱保留和分离的影响,并对敌草胺对映体与固定相之间的色谱保留和分离的热力学机理进行了讨论。结果表明,在流速为0.5 mL/min、乙腈-水为50:50(体积比)、柱温在10~35℃条件下,AD-RH和OD-RH柱的 $H^0$ 值分别为-1160.79和-673.40 J/mol,即AD-RH柱的拆分能力优于OD-RH柱,二者都能实现基线分离。

**关键词:**高效液相色谱;手性固定相;敌草胺;对映体拆分

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1008-7303(2006)03-0260-05

## Enantioresolution and Study of Thermodynamical Property of Napropamide by High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Ying<sup>1,2</sup>, ZHANG Shi-hao<sup>2</sup>, LIU Wei-ping<sup>1,3\*</sup>, CHEN Yi-hui<sup>2</sup>, YE Li<sup>2</sup>

(1. Institute of Environmental Science P. O. X, 3041, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China;

3. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**Abstract:** The enantiomer of napropamide was resolved under reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) using Chiralcel AD-RH and Chiralcel OD-RH with acetonitrile-water as a mobile phase. The effects of the content of acetonitrile in mobile phase, flow-rate and temperature on the chiral separation of napropamide were studied. The chiral separation mechanism of napropamide enantiomer on the CSPs was analysed by the thermodynamical parameters. The results showed that the  $H^0$  of AD-RH and OD-RH chiral column were -1160.79 J/mol and -673.40 J/mol respectively, namely the stereoselectivity of Chiralcel AD-RH was better than Chiralcel OD-RH and good enantiomeric separations were achieved with both CSPs under the experiment of flow-rate 0.5 mL/min, acetonitrile-water 50:50 in volume and temperature 10~35℃.

收稿日期:2006-03-17;修回日期:2006-05-31.

作者简介:周瑛(1965-),女,在职博士研究生,副教授,从事分析化学与环境污染化学研究.通讯地址:浙江工业大学化工与材料学院,杭州310032.联系电话:0571-88320961;E-mail:yingzhou@zjut.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30270767);国家杰出青年科学基金资助项目(No.20225721).

**Key words:** high performance liquid chromatography; chiral stationary phase; napropamide; enantiomeric resolution

敌草胺 (napropamide), 化学名称 *N,N*-二乙基-2-(萘氧基)丙酰胺, 存在一对对映异构体 (见图 1), 它是一种酰胺类选择性苗前土壤处理除草剂, 其作用机制主要是抑制发芽种子中蛋白质的合成<sup>[1,2]</sup>。

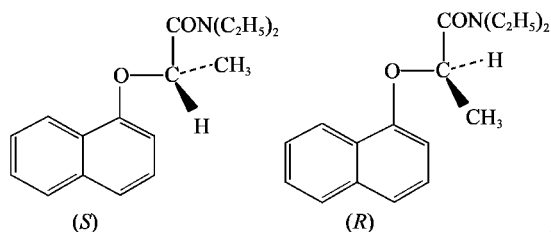


Fig. 1 Structure of napropamide

目前, 高效液相色谱 (HPLC) 是拆分手性农药的主要手段<sup>[3-5]</sup>。已报道有关敌草胺对映体拆分的有优先结晶法<sup>[6]</sup>、毛细管电泳法<sup>[7,8]</sup>、利用刷型手性固定相 *W helk-O1* 柱<sup>[9]</sup>、利用 *Chirex* 柱<sup>[10]</sup> 和其他 HPLC 手性固定相进行分离的方法<sup>[11]</sup>。就固定相 HPLC 法而言, 刷型固定相与被测对映体的作用机理不同于多糖类固定相与被测对映体的作用机理。刷型手性固定相法中被分离的溶质大部分需要引入芳基等手性识别所需要的基团进行衍生化, 这是其不足之处; 多糖类手性固定相主要是极性基团的对映体通过氢键与氨基甲酸酯相互作用<sup>[12]</sup>。敌草胺分子中的氮能与固定相中的氨基甲酸酯作用形成较强的氢键, 因此, 利用多糖类手性固定相直链淀粉三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) (AD-RH 柱) 和纤维素三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) (OD-RH 柱) 对敌草胺对映异构体应该可以实现手性拆分。但相关的手性拆分实验及其热力学研究尚未见报道。作者利用 AD-RH 柱和 OD-RH 柱, 以乙腈-水为流动相, 对敌草胺对映体进行了直接手性拆分, 考察了流动相组成、流速、柱温等对色谱保留和分离情况的影响, 以及色谱参数反映在热力学函数上的情况<sup>[13-15]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 药剂和试剂

乙腈 (色谱纯, 浙江临海浙东试剂厂); 甲醇 (色谱纯, 上海陆都化学试剂厂); 纯净水 (杭州娃

哈哈集团, 过 0.45 μm 水膜); 98% 的敌草胺原药 (江苏快达农化股份有限公司)。

### 1.2 色谱条件及色谱参数计算

日本岛津 10ACP 全自动进样高效液相色谱仪, 双泵 (LC-10ADVP), 自动进样器 (SL-10ADVP), 控制器 (SCL-10AVP), 二极管阵列检测器 (SPD-M10AVP), 恒温柱箱 (CTO-10AVP), 脱气机 (DGU-14A); 色谱柱: *Chiralcel AD* 手性色谱柱 [0.46 cm (i.d.) × 15 cm, *Chiralcel*, *Daicel Chemical Industry, Ltd.*], *Chiralcel OD* 手性色谱柱 [0.46 cm (i.d.) × 15 cm, *Chiralcel*, *Daicel Chemical Industry, Ltd.*]

色谱柱死体积  $t_0$  用甲醇溶液测定, 第一个洗脱峰的容量因子  $k_1 = (t_1 - t_0) / t_0$ , 第二个洗脱峰的容量因子  $k_2 = (t_2 - t_0) / t_0$ , 分离因子  $\alpha = k_2 / k_1$ , 分离度  $R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ 。其中  $t_1$  和  $t_2$  分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰的保留时间;  $W_1$  和  $W_2$  分别是第一个洗脱峰和第二个洗脱峰之基线峰宽。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相中乙腈含量和流速对敌草胺拆分的影响

表 1 和表 2 分别为流动相中乙腈含量和流速变化对敌草胺对映体在 AD-RH 柱和 OD-RH 柱上手性拆分的影响。从表 1 可以看出, 随着流动相中极性较强组份乙腈含量的增大, 容量因子  $k_2$  和  $k_1$  同比减小, 结果对二者的影响不大, 这与传统 HPLC 的作用机理类似; 但随着乙腈含量的增加, 二者的  $R_s$  呈下降趋势。这是因为当流动相中乙腈浓度降低时, 固定相的主要识别位——氢键<sup>[12]</sup> (乙腈与敌草胺上氮形成极强氢键) 作用位被释放, 致使溶质与固定相的吸附/解吸速率变慢<sup>[16]</sup>, 从而导致色谱峰变宽,  $R_s$  降低。

从表 2 看, 流速变化对敌草胺对映体在两根手性柱上的基本无影响, 这是由于  $k_2$  和  $k_1$  基本没有发生变化的缘故;  $t_0$  随流动相流速的增加而减小。

由图 2 可见, 敌草胺对映体在供试手性分离柱上都能实现基线分离。在 AD-RH 柱上拆分的

和  $R_s$  均大于在 OD-RH 柱上的拆分, 即 AD-RH 柱的拆分能力强于 OD-RH 柱。其手性识别能力不同的原因可能是由于葡萄糖单元构象不同, 结构有序性存在差异。AD-RH 柱和 OD-RH 柱的固定

相都是由 D 葡萄糖单元构成, 但前者因 D 葡萄糖单元在位上存在一个螺旋结构而致使其结构更有序。

Table 1 Effect of the mobile phase composition on the chiral resolution of napropamide\*

Acetonitrile (V/V)	Water (V/V)	Chiralcel AD-RH				Chiralcel OD-RH			
		$k_1$	$k_2$	a	$R_s$	$k_1$	$k_2$	a	$R_s$
40	60	5.98	6.92	1.16	2.19	9.73	10.66	1.10	2.06
45	55	3.43	3.96	1.16	1.91	5.42	5.95	1.10	1.86
50	50	2.17	2.51	1.16	1.63	3.38	3.71	1.10	1.65
55	45	1.46	1.69	1.16	1.39	2.27	2.50	1.10	1.43

\* Temperature: 24 °C; Flow rate: 0.5 mL/min; SPD-M10AVP detector: 212 nm.

Table 2 Effect of the flow rate of the mobile phase on the chiral resolution of napropamide\*

Flow rate (mL/min)	Chiralcel AD-RH				Chiralcel OD-RH			
	$k_1$	$k_2$	a	$R_s$	$k_1$	$k_2$	a	$R_s$
0.3	3.47	4.00	1.16	2.13	5.45	5.98	1.10	2.01
0.5	3.43	3.96	1.16	1.19	5.42	5.95	1.10	1.86
0.7	3.50	4.04	1.16	1.74	5.48	6.00	1.10	1.69

\* Temperature: 24 °C; Mobile phase: acetonitrile-water = 45:55 (V/V); SPD-M10AVP detector: 212 nm.

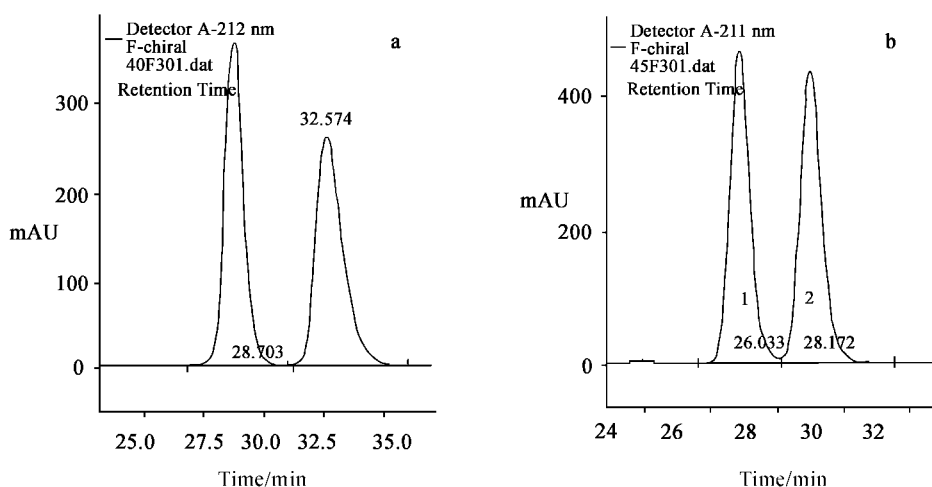


Fig. 2 Chromatograms of napropamide under chiralcel AD-RH (a) and OD-RH (b) column

a. Chiralcel AD-RH [ amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral column (ADMPC)-CSP column, 150 mm  $\times$  4.6 mm ]; Acetonitrile-water = 40:60 (V/V); Flow rate: 0.5 mL/min; Temperature: 25 °C; SPD-M10AVP detector: 212 nm.

b. Chiralcel OD-RH [ cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral column (CDMPC)-CSP column, 150 mm  $\times$  4.6 mm ]; Acetonitrile-water = 45:55 (V/V); Flow rate: 0.5 mL/min; Temperature: 25 °C; SPD-M10AVP detector: 211 nm.

## 2.2 温度对敌草胺对映体拆分的影响及其手性拆分热力学研究

温度的影响见表 3。样品在固定相中的保留能力随温度升高而减弱。根据范特霍夫 (Van 't Hoff) 规则和阿累尼乌斯 (Arrhenius) 方程<sup>[17]</sup>, 温度

上升后反应速率增加, 一般每上升 10 °C, 反应速率大约为原来的 2~4 倍。反应速率增大后, 有利于加快溶质与固定相的吸附/解吸过程, 表现在色谱参数上即为温度升高,  $t_R$  缩短, 相应的  $k'$  和  $a$  也减小。

Table 3 Effects of temperature on the chiral resolution of napropamide<sup>a</sup>

Temperature /	Chiralcel AD-RH			Chiralcel OD-RH		
	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	a	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	a
10	3.96	4.66	1.18	5.75	6.47	1.13
15	3.78	4.42	1.17	5.62	6.31	1.12
20	3.60	4.18	1.16	5.50	6.14	1.12
25	3.42	3.94	1.15	5.38	5.98	1.11
30	3.24	3.70	1.14	5.26	5.82	1.11
35	3.06	3.46	1.13	5.14	5.66	1.10

<sup>a</sup> Flow rate: 0.5 mL/min; Mobile phase: acetonitrile-water = 50:50 (V/V); SPD M10AVP detector: 212 nm.

为了揭示手性识别过程分子间作用力随温度变化的情况,色谱参数在热力学函数上<sup>[16, 18, 19-23]</sup>的反映如下:

$$\ln k = -H^0/RT + S^0/R + \ln \emptyset$$

$$\ln a = -G^0/RT = -H^0/RT + S^0/R$$

其中,  $k$  为样品保留因子,  $a$  为对映体分离因子,  $\emptyset$  为流动相乙腈水(体积比)值(此  $\emptyset$  值为 1, 即  $\ln \emptyset = 0$ ),  $H^0$  和  $S^0$  为对映体在固定相与流动相间分配的焓变和熵变,  $H^0$  和  $S^0$  分别为二个对映体焓变和熵变之差。

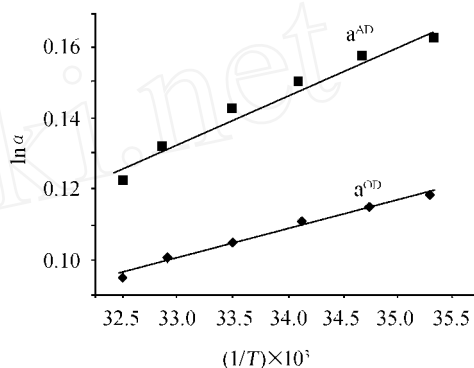
若一对对映体和固定相之间的相互作用机理在所研究的温度范围内不发生变化,则这对对映体在此温度范围内的  $a$  或  $k$  的自然对数  $\ln a$  或  $\ln k$  对温度倒数  $1/T$  作图都呈直线,斜率分别为  $-H^0/R$  和  $-H^0/R$ 。由此可计算出对映体的焓变之差  $H^0$  和熵变之差  $S^0$ 。由于焓熵相互抵消的性质而存在一个转折温度点  $T_{iso}$ <sup>[24]</sup>, 即  $G^0 = 0$ ,  $T_{iso} = H^0/S^0$ 。此时,对映体分离将不可能发生。

实验表明,敌草胺对映体的  $\ln$  对  $1/T$  作图均成线性(见图 3),经计算,在 10~35 内,  $H_0$  和  $S_0$  均为负值(见表 4),说明其手性拆分过程受焓控制。

Table 4 Thermodynamic data obtained for the chiral separation of napropamide

Factor	AD-RH	OD-RH
$r^2$	0.99	0.99
$H_0/(J/mol)$	-1160.79	-673.40
$S_0/(J/mol)$	-2.73	-1.159
$T_{iso}/(K)$	425.70	581.00

当待分离的敌草胺对映体与 AD-RH 或 OD-RH 手性柱中的手性固定相形成可逆的短寿命的过渡态络合物时,生成的过渡态具有非对映异构

Fig. 3  $\ln a$  versus  $1/T$  for the separation of napropamide

Other chromatographic conditions are same as in Fig. 2.

关系,与过渡态非对映异构体一样,具有不同的能焓( $H^0$ ),致使两个对映体反应速度有差别<sup>[25]</sup>。表现在宏观上就是生成这种络合物的能焓越大,敌草胺的两个对映体在 AD-RH 柱或 OD-RH 柱手性固定相上的保留越强,这使得两个对映体与手性固定相之间的色谱保留时间产生差异,从而使对映体得以拆分,一般在  $H^0$  值大于  $-500 J/mol$  时,能基本实现对映体的基线分离。同时,  $S^0$  表示敌草胺的两个对映体与固定相之间的作用产生的熵变<sup>[24]</sup>,即混乱度变化,熵变越大则说明固定相分子结构的有序性及固定相分子内的空穴利用得越充分。实验数据表明,AD-RH 柱上的  $H^0$  ( $-1160.79 J/mol$ ) 大于 OD-RH 柱上的  $H^0$  ( $-673.40 J/mol$ ), AD-RH 柱的  $S^0$  ( $-2.73 J/mol$ ) 大于 OD-RH 的  $S^0$  ( $-1.16 J/mol$ ),因此,敌草胺对映体在这两根手性柱上都能得到较好的拆分,而且 AD-RH 柱的拆分能力大于 OD-RH 柱。通过比较敌草胺对映体在两根手性柱上拆分的  $T_{iso}$  值,可以初步推断,  $T_{iso}$  值越小越有利于对映体的分离。

从表 5  $\ln k$  对  $1/T$  方程看,敌草胺对映体在 AD-RH 柱固定相与流动相间分配的焓变 ( $R$  倍方

程斜率)大于在 OD-RH 柱上的,说明敌草胺在 AD-RH 手性固定相上的吸附力大于在 OD-RH 柱上的吸附力<sup>[26]</sup>。

Table 5 The equation of  $\ln k$  versus  $1/T$  for napropamide

$\ln k$	Equation	$R^2$ value
$k_2^{OD}$	$\ln k_2^{OD} = 470.27/T + 0.2097$	0.9954
$k_1^{OD}$	$\ln k_1^{OD} = 388.37/T + 0.3797$	0.9948
$k_2^{AD}$	$\ln k_2^{AD} = 1042.8/T - 2.1319$	0.9904
$k_1^{AD}$	$\ln k_1^{AD} = 897.56/T - 1.7847$	0.9924

## 参考文献:

- [1] CHEN Guo-hai(陈国海), MA Li-xin(马立新), HAO Jia(郝佳). 50% 敌草胺可湿性粉剂登记药效试验 [J]. Forest Science and Technology (林业实用技术), 2002, (8): 47-48.
- [2] Murillo Pulgarín J A, García Bemejo L F. Determination of napropamide in technical formulations, soil and vegetable samples by sensitised fluorescence: validation of the method [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 491(1): 37-45.
- [3] YANG Liping(杨丽萍), LI Shu-zheng(李树正), LI Yuchang(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.
- [4] QIU Jing(邱静), LI Li(李莉), ZHOU Zhi-qiang(周志强), et al 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]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2004, 6(2): 84-86.
- [5] YANG Li(杨丽), JIANG Shu-ren(江树人), LAO Yong(廖勇), et al 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 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2004, 6(2): 90-92.
- [6] SHI Jian(史坚). Optical resolution of enantiomer by preferential crystallization [J]. Acta Agriculturae Shanghai(上海农业学报), 1995, 11(3): 79-80.
- [7] Desiderio C, Polcaro C M, Fanali S. Stereoselective analysis of herbicides by capillary electrophoresis using sulfobutyl ether beta-cyclodextrin as chiral selector [J]. Electrophoresis, 1997, 18(2): 227-304.
- [8] Gerald G, Martin G S. Chiral separation principles in capillary electrophoresis [J]. J Chromatography A, 1997, 792: 179-225.
- [9] Pirkle W H, Lee W, Welch C J. Chromatographic separation of the enantiomers of 2-aryloxypropionic acids, esters and amides [J]. Enantiomer, 1997, 2(6): 423-431.
- [10] Lee W Y, Salvador J M. Environmental applications of chiral high performance liquid chromatography [A]. Proceedings of the Conference on Hazardous Waste Research [C]. Denver, 2000. 36-45.
- [11] Armstrong D W, Reid III G L, Hilton M L, et al Relevance of enantiomeric separations in environmental science [J]. Environmental Pollution, 1993, 79(1): 51-58.
- [12] HUANG Jun-ming(黄君珉), CHEN Hui(陈慧), WANG Qin-sun(王琴孙). 液相色谱手性识别机理的研究进展 [J]. Chemistry(化学通报), 2001, (9): w 01086.
- [13] HAN Xiao-qian(韩小茜), WEN Xiao-Guang(温晓光), GUAN Yong-hong(管永红), et al 流动相组成及温度对 4 种 1, 2, 4-三唑类农药对映体手性拆分的影响 [J]. Chin J Appl Chem(应用化学), 2004, 21(2): 140-143.
- [14] WENG Wen(翁文), YAO Bi-xia(姚碧霞), LIU Feng(刘锋), et al 流动相组成对酒石酸衍生固定相手性拆分热力学函数的影响 [J]. Chin J Appl Chem(应用化学), 2005, (7): 800-803.
- [15] Okamoto M. Reversal of elution order during the chiral separation in high performance liquid chromatography [J]. J Pharm and Biomed Anal, 2002, 27(3-4): 401-407.
- [16] O'Brien T, Crocker L, Thompson R, et al Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose [J]. Anal Chem, 1997, 69: 1999-2007.
- [17] SONG Shimo(宋世谟), WANG Zheng-lie(王正烈), LI Wen-bin(李文斌). Physical Chemistry(物理化学)(修订版) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 1999. 263-264.
- [18] Smith R J, Taylor D R, Wilkins S M. Temperature dependence of chiral discrimination in supercritical fluid chromatography and high performance liquid chromatography [J]. J Chromatography A, 1995, 697: 591-596.
- [19] Schurig V. Practice and theory of enantioselective complexation gas chromatography [J]. J Chromatography A, 2002, 965(1-2): 315-356.
- [20] Yarabe H H, Billiot E, Wamer IM. Enantiomeric separations by use of polymeric surfactant electrokinetic chromatography [J]. J Chromatography A, 2000, 875: 179-206.
- [21] Guillaume Y C, Peyrin E, Berthelot A. Chromatographic study of magnesium and calcium binding to immobilized human serum albumin [J]. J Chromatography B, 1999, 728: 167-174.
- [22] Guillaume Y C, Robert J F, Guinard C. Role of the water as a surface tension modifier for the retention of a series of dansylamino acids on a -CD stationary phase [J]. Talanta, 2001, 55: 263-269.
- [23] Peyrin E, Guillaume Y C, Morin N, et al Retention behavior of D, L-dansylamino acids on a human serum albumin chiral stationary phase: effect of a mobile phase modifier [J]. Chromatography A, 1998, 808: 113-120.
- [24] HOU Jing-guo(侯经国), MEN Xiao-rong(孟晓荣), HE Tian-xi(何天稀), et al 农药甲霜灵对映体的高效液相色谱分离及手性拆分热力学研究 [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2003, (3): 307-310.
- [25] YOU Tian-ba(尤田耙). Modern Research Methods for Chiral Compound(手性化合物的现代研究方法) [M]. Hefei(合肥): China Science and Technology Press(中国科学技术出版社), 1993. 30-31.
- [26] CHEN Li-ren(陈立仁), JIANG Sheng-xiang(蒋生祥), LIU Xia(刘霞), et al High Performance Liquid Chromatographic Basic and Practice(高效液相色谱基础与实践) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2001. 7-9.

(Ed. JIN S H)