

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ŠTÚDIUM MOŽNOSTÍ PRENOSU A ON-LINE CHIRÁLNEJ SEPARÁCIE VYBRANÝCH PESTICÍDOV METÓDOU HPLC S POUŽITÍM TECHNIKY PREPÍNANIA KOLÓN

MÁRIA CHALÁNYOVÁ^a a IVANA
PETRÁNOVÁ^b

^a Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina
CH-2, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, ^b Výskumný ústav
vodného hospodárstva, Nábřežie arm. gen. L. Svobodu 5,
812 49 Bratislava
chalanyova@fns.uniba.sk

Došlo 13.5.15, prijaté 2.9.15.

Kľúčové slová: on-line prenos, chirálna HPLC separácia,
pesticídy, prepínanie kolón

Úvod

V posledných desaťročiach 20. storočia začal vzrastať záujem verejnosti o zlepšenie životných podmienok. Aplikácia narastajúcich objemov pesticídov vzbudzuje obavy zo znečistenia poľnohospodárskej pôdy, ale i ostatných zložiek životného prostredia, čo môže potenciálne ohroziť zdravie človeka¹. Používanie pesticídov v poľnohospodárstve je nevyhnutnosťou pre zabezpečenie dostatočného množstva poľnohospodárskych produktov na obživu populácie². V porovnaní s farmaceutickým priemyslom³ sa v poľnohospodárstve až s časovým odstupom začala používať generácia chirálnych pesticídov. V súčasnej dobe viac ako 25 % komerčne dostupných pesticídov je chirálnych⁴. Chiralita ovplyvňuje biologickú aktivitu⁵, a tým aj toxicitu enantiomérov. Chirálné pesticídy sa v minulosti aplikovali ako racemické zmesi⁶, v ktorých obvykle iba jeden enantióm je biologicky aktívny a ostatné enantioméry sa prejavovali ako nečistota. Použitie enantiomérov obohatených alebo enantiomérov čistých agrochemikálií, ktoré sú nositeľom biologickej aktivity, má za následok menšie zaťaženie životného prostredia, pretože sa aplikujú v dávkach jednotiek až stoviek gramov na hektár pôdy (1000× nižšie dávky ako klasické pesticídy). Systematický výskum biologickej aktivity enantiomérov sa stáva pravidlom pre racemické agrochemikálie⁷. Študované pesticídy patria do skupiny fungicídov a insekticídov.

Epoxikonazol je triazolový širokospektrálny preventívny a liečivý fungicíd, ktorý má dve chirálne centrá, ale jeho štandard je komerčne dostupný len s jedným enantiomérnym párom. Používa sa proti rastlinným patogénom v obilninách, cukrovej repe a arašidoch. Toxický je hlavne pre vodné organizmy¹⁷. Permetrín je insekticíd, ktorý patrí do skupiny syntetických pyreteroidov. Používa sa na ochranu bavlny, pšenice, obilia, zeleniny a ovocia. Molekula obsahuje dva chirálne uhliky, a tvorí štyri enantioméry. Permetrín sa silno viaže na organickú časť pôdy¹⁸. V minulosti sa predpokladalo, že pyreteroidy sú málo toxické pre cicavce. Zo systematického štúdia ich vlastností vyplynulo, že dlhodobé vystavenie ľudského organizmu ale i vdýchnutie pyreteroidov môže spôsobiť nežiaduce zdravotné problémy.

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia HPLC je široko používaná vo viacrozmerých separáciách⁹. Väčšina publikácií sa zaoberá analýzou enantiomérového zloženia účinnej látky. Separácia chirálnych analytov zo zložitých matric na nízkych koncentračných úrovniach závisí od rôznorodosti ich fyzikálno-chemických vlastností a je komplexným analytickým problémom^{7,8}. V takomto prípade sa vzorka pred analytickou koncovkou podrobuje úprave. Pre separáciu analytov z komplexných matric treba použiť účinné úpravné techniky v spojení s vysoko citlivými analytickými metódami. Off-line úpravou vzorky pred achirálnou resp. chirálnou HPLC separáciou analytov s použitím veľkoobjemového dávkovania sa zaoberajú práce^{10–12}. On-line (priame) spojenie zariadenia na úpravu vzorky so separačným a detekčným systémom má niekoľko výhod. V tomto režime je možné preniesť 100 % vzorky do analytického systému, čo minimalizuje manipuláciu so vzorkou a jej straty. Tento prístup bol použitý v prácach^{13–15}. Na izoláciu analytu z tuhej matrice, zakoncentrovanie na vhodnej stacionárnej fáze a následnú separáciu sa využíva technika prepínania kolón (column-switching). On-line separáciou analytov z komplexných matric obvykle predchádza modelové štúdium separácie štandardov analytov technikou column-switching, čo je predmetom predloženej práce.

Cieľom práce je:

- získanie poznatkov o sorpčnej kapacite achirálnych stacionárnych fáz pre študované analyty,
- optimalizácia separácie analytov na chirálnej stacionárnej fáze Chiradex,
- štúdium možnosti on-line prenosu štandardov analytov na achirálnu stacionárnu fázu a chirálna separácia s použitím techniky prepínania kolón.

Získané poznatky zo štúdia možnosti on-line prenosu štandardov z achirálny na chirálnu kolónu budú slúžiť pre vývoj on-line izolácie a RP-HPLC-UV/VIS metódy pre chirálnu separáciu vybraných pesticídov z tuhých vzoriek (pôd) s hmotnosťou cca 0,2 g založenej na prietokovej extrakcii analytov s využitím techniky prepínania kolón.

Experimentálna časť

Chemikálie

Štandardy analyzovaných látok

Epoxikonazol: [(*R,S*)-3-(2-chlorofenyl)-2-(4-florfenyl)-2-[1*H*-1,2,4-triazol-1-yl] metyl] oxirán], čistota 95,5%, (Riedel-de Haën, Nemecko),

Permetrín: [3-fenoxybenzyl(1*RS*)-*cis*, *trans*-3-(2,2-dichlórvinyl)-2,2-dimetylcyklopropánkarboxylát], čistota 97,3 %, (*trans* 75,5 %, *cis* 21,8 %) (Riedel-de Haën, Nemecko),

Metanol: gradient grade (99,9 %, Merck, Darmstadt, Nemecko),

Ultračistá H₂O: čistiaci systém Labconco (Water, Pro-PS, Labconco, Cansas City, USA).

Zásobné roztoky štandardov boli pripravené v 100% metanole gradient grade. Ostatné roztoky štandardov boli pripravené riedením zásobných roztokov.

Prístroje

Kvapalinový chromatograf Lichrograph (Merck – HITACHI, Darmstadt, Nemecko) pozostáva z pumpy A Intelligent Pump L-6200 (Merck, Darmstadt, Nemecko); UV-VIS detektoru Model L-4250 (Merck, Darmstadt, Nemecko); Mixer Hitachi, Ltd. Tokyo, Japonsko; dvojcestného šesťstupového dávkovacího ventilu Rheodyne 7125 (Cotati, California, USA); dvojcestného šesťstupového dávkovacího ventilu Rheodyne 7010 (Cotati, Califor-

nia, USA); pumpy B Model 302 s manometrickým modulom Model 802C (Gilson, Francúzsko).

Kolóny

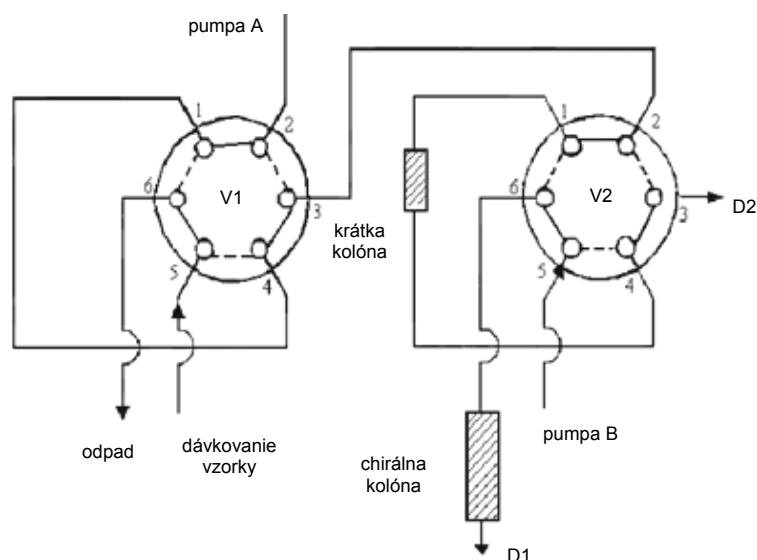
Chirálna kolóna Chiradex, 250 × 4 mm, 5 μm častice (Merck, Darmstadt, Nemecko); Sklenené kolóny 30 × 3 mm Separon SGX C 18, Separon SGX RPS, Separon SGX NH₂, Separon SGX CN (Tessek, Praha, ČR). Sklenená kolóna 30 × 3 mm plnená za sucha Silasorbom Fenyl s 10 μm časticami (Lachema, Brno, ČR).

Namerané údaje boli vyhodnotené programom CSW verzia 1.0, s 20bitovým integračným Sigma Delta A/D prevodníkom, DataApex s. r. o., Praha, ČR.

Schematické znázornenie HPLC zariadenia s on-line zakoncentrovaním analytu na achirálnu kolónu s vymytím analytu na chirálnu kolónu technikou spätného toku (back-flush) je na obr. 1.

Výsledky a diskusia

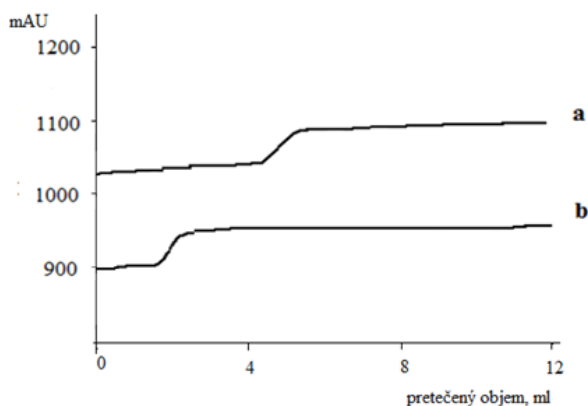
V prípade, že na chirálnu separáciu analytu z komplexnej matrice chceme využiť off-line, resp. on-line prietokovú izoláciu analytu z tuhej matrice so zakoncentrovaním na achirálnu stacionárnu fázu a chirálnu separáciu analytov s použitím techniky prepínania kolón, je nevyhnutné získať poznatky o sorpčnej kapacite použitej achirálnu stacionárnu fázu pre štandardy študovaných analytov a o optimálnom zložení použitého činidla potrebného na prenos analytu na achirálnu stacionárnu fázu, jeho prietoku a objemu.



Obr. 1. Schematické znázornenie HPLC zariadenia pre zakoncentrovanie analytov na krátkej achirálnu kolónu s vymytím analytu technikou spätného toku a separáciou na chirálnu stacionárnu fázu; Obsluha column-switching: 1. Ventil V1 – LOAD plnenie dávkovacej slučky; Ventil V2 – LOAD premývanie chirálnej kolóny mobilnou fázou pumpou B; 2. Ventil V1 – INJECT dávkovanie analytu na krátku kolónu; Po pretečení definovaného objemu desorpčného činidla cez achirálnu kolónu, Pumpa A – STOP, Ventil V1 do polohy LOAD; Ventil V2 – INJECT vymytie analytu spätným tokom na chirálnu kolónu; D1 – UV detektor za chirálnu kolónu; D2 – UV detektor za achirálnu kolónu – meranie objemu eluátu

Meranie prierazových objemov analytov a sorpčná kapacita sorbentu

Sklenená kolóna s rozmerom 30×3 mm plnená tuhým sorbentom po premytí organickým rozpúšťadlom s vysokou elučnou silou (metanolom) bola kondicionovaná 5 ml 2% metanolu. Na kolónu boli aplikované roztoky epoxikonazolu resp. permetrínu s koncentráciou $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ s obsahom metanolu v rozmedzí 50–80 % (cit.²⁰). Z nameraných prierazových kriviek boli odčítané prierazové objemy analytov. Prierazový objem zodpovedá objemu resp. množstvu analytu, ktoré je možné na danom sorbente zakonzentrovat'. Jeho hodnota sa určuje v 10 % výšky signálu analytu. Z hodnôt prierazových objemov boli vypočítané sorpčné kapacity sorbentov, čo je množstvo analytu v gramoch, ktoré sa zakonzentruje na 1 g sorbentu. Zo sorpčných závislostí vyplynulo, že najväčšiu kapacitu z pomedzi študovaných sorbentov Separon SGX C18, SGX RPS, Separon NH_2 , Separon SGX CN a Silasorb Fenyl má Silasorb Fenyl. Tento sorbent bol použitý na zachytenie epoxikonazolu i permetrínu pred on-line chirálnou separáciou, ktorých prierazové krivky z roztoku metanol:voda, (70:30, v/v) sú na obr. 2.



Obr. 2. Prierazové krivky študovaných analytov z roztoku 70% metanolu na sorbente Silasorb Fenyl; prierazová krivka a) permetrín, b) epoxikonazol, prietok $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, UV detekcia 230 nm

Tabuľka I

Závislosť retenčného faktora k' a rozlíšenia R_s od % obsahu metanolu (MeOH) v mobilnej fáze metanol:voda pre enantioméry epoxikonazolu e1,e2 na kolóne Chiradex

MeOH %	e1	e2	e1,e2
	k_1'	k_2'	R_s
50	1,82	2,15	1,2
53	1,37	1,64	1,14
55	1,16	1,4	1,15
60	0,58	0,72	0,93
65	0,43	0,53	0,82
70	0,25	0,32	0,59

Separácia analytov na chirálnej stacionárnej fáze Chiradex v RP-HPLC móde

Chiradex patrí do skupiny chirálnych stacionárnych fáz, ktoré sa používajú v reverznofázovom móde¹⁶. Jedným z parametrov, od ktorých enantioselektivita stacionárnej fázy závisí, je použitie typu organického modifikátora, pričom polarita rozpúšťadiel pre Chiradex klesá v poradí metanol, etanol a acetonitril. Enantioselektivitu je možné ovplyvniť použitím zmeny pH mobilnej fázy resp. zmenou teploty pri separácii. Z literárneho prehľadu vyplýva, že tento typ stacionárnej fázy bol na separáciu chirálnych látok použitý len v obmedzenom počte prác^{21–30}. V snahe získať informácie o chromatografickom správaní sa epoxikonazolu a permetrínu na Chiradexe bola uskutočnená séria meraní závislosti elučného času od zloženia mobilnej fázy metanol:voda v rôznych objemových pomeroch. Pre analyty bol vypočítaný retenčný faktor k' , a rozlíšenie R_s enantiomérov. Výsledky experimentálnych meraní retenčných charakteristík pre epoxikonazol a permetrín sú zhrnuté v tab. I a II.

Z nameraných dát v tab. I vyplýva, že najvyššia hodnota rozlíšenia enantiomérov štandardu epoxikonazolu 1,48 bola dosiahnutá v mobilnej fáze metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

Z tab. II vyplýva, že v mobilnej fáze metanol:voda (60:40, v/v) rozlíšenie dvojice enantiomérov permetrínu p1 a p2 má hodnotu 1,52, ale retenčný čas enantioméru p4 je 75 min. V mobilnej fáze metanol:voda (70:30, v/v), je retenčný čas enantioméru p4 pri prietoku mobilnej fázy $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ 16,5 min a rozlíšenie enantiomérov p1–p2 má hodnotu 1,2 (obr. 3). Z tohoto dôvodu pri on-line chirálnej separácii enantiomérov epoxikonazolu bola použitá mobilná fáza metanol:voda (70:30, v/v).

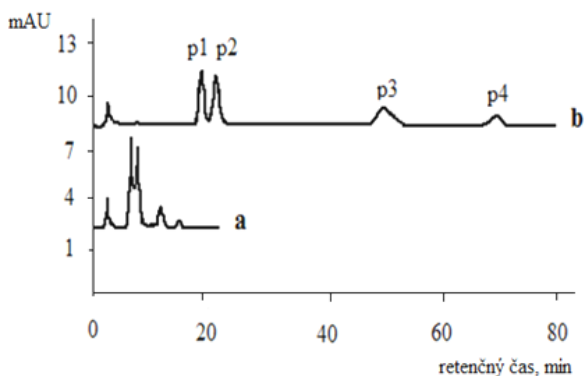
Separácia technikou prepínania achirálny a chirálnej kolóny

Spájanie dvoch alebo viacerých kolón cez prepínací ventil sa nazýva technika prepínania kolón. Kolóny môžu byť rovnakého alebo rôzneho typu. Cieľom použitia takéhoto systému je selektívny prenos frakcií z kolóny na kolónu¹⁹. V práci použité zariadenie je na obr. 1.

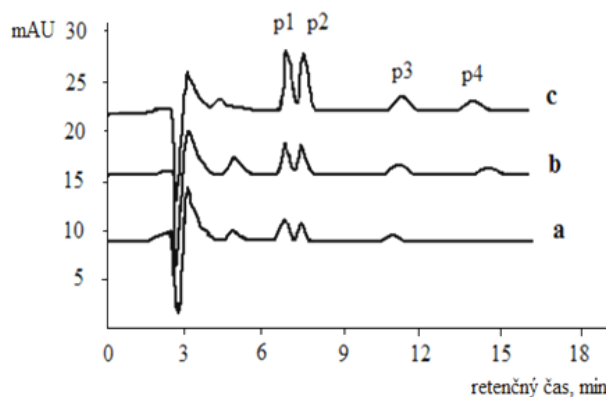
Tabuľka II

Závislosť retenčného faktora k' a rozlíšenia R_s od % obsahu metanolu (MeOH) v mobilnej fáze metanol:voda pre enantioméry permetrínu p1–p4 na kolóne Chiradex

MeOH %	p1	p2	p3	p4	p1,p2	p2,p3	p3,p4
	k_1'	k_1'	k_1'	k_1'	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$R_{3,4}$
60	6,52	7,48	18,9	28,04	1,52	6,46	13,39
70	1,7	1,96	3,64	4,85	1,23	3,94	2,2



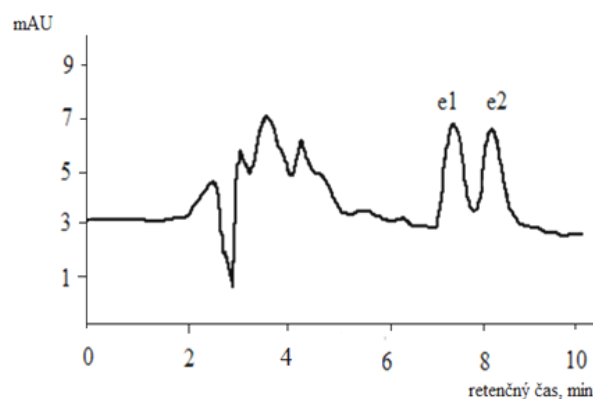
Obr. 3. Chromatografické záznamy separácie permetrínu na enantioméry p1–p4; v závislosti od zloženia mobilnej fázy na Chiradexe; experimentálne podmienky: mobilná fáza metanol:voda a) (70:30, v/v); b) (60:40, v/v); prietok 1 ml min⁻¹; UV detekcia 230 nm



Obr. 4. Chromatografické záznamy on-line separácie permetrínu na enantioméry p1–p4 vymytím spätným tokom z achirálny na chirálnu kolónu od koncentrácie analytu; experimentálne podmienky: achirálna kolóna Silasorb Fenyl (30 × 3 mm I.D., 5 µm) chirálna kolóna Chiradex (250 × 4 mm, I.D., 5 µm); mobilná fáza metanol:voda (70:30, v/v); prietok 1 ml min⁻¹; UV detekcia 230 nm; a) 1 µg ml⁻¹, b) 5 µg ml⁻¹, c) 10 µg ml⁻¹

On-line prenos a chirálna separácia epoxikonazolu a permetrínu na kolóne Chiradex po vymytí analytu technikou back-flush

0,02 ml epoxikonazolu resp. permetrínu bolo prenosených na achirálnu kolónu so sorbentom Silasorb Fenyl. Bolo testované zloženie a objem činidla, ktoré je potrebné na prenos analytu z dávkovacej slučky na kolónu Silasorb Fenyl. Z testovania signálu analytu od objemu pretečeného činidla metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom 0,5 ml min⁻¹ cez achirálnu kolónu v rozmedzí objemov 1,5–3,0 ml vyplynulo, že optimálny objem sú 2,0 ml. Po pretečení 2,0 ml činidla metanol:voda (50:50, v/v) bol tok z pumpy A zastavený. Otočením ventilu V2 došlo k vymytiu zadržaného analytu spätným tokom z pumpy B na kolónu Chiradex, kde prebehla chirálna separácia epoxikonazolu resp. permetrínu na enantioméry. Na chirálnu separáciu permetrínu na enantioméry p1–p4 bola použitá mobilná fáza metanol:voda (70:30, v/v) s prietokom 1,0 ml min⁻¹. Chromatografické záznamy on-line chirálnej separácie permetrínu pre koncentračné úrovne 10; 5 a 1 µg ml⁻¹ sú na obr. 4. Z tohoto obrázku je možné odhadnúť minimálnu koncentráciu analytu vo vzorke, aby bola možná identifikácia všetkých štyroch enantiomérov permetrínu. Rozlí-



Obr. 5. Chromatografický záznam on-line separácie epoxikonazolu na enantioméry e1 a e2 vymytím spätným tokom z achirálny na chirálnu kolónu; experimentálne podmienky: vymytie analytu z achirálny kolóny Silasorb Fenyl (30 × 3 mm I.D., 5 µm) na Chiradex (250 × 4 mm I.D., 5 µm); mobilná fáza metanol:voda (50:50, v/v), prietok 0,5 ml min⁻¹; UV detekcia 230 nm

šení enantiomérů permetrinu p1–p2 má hodnotu 1,2 a p3–p4 má hodnotu 2,2.

Pre separáciu enantiomérů epoxikonazolu na e1 a e2 je vhodné zloženie mobilnej fázy metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom 0,5 ml min⁻¹. Rozlíšenie enantiomérů epoxikonazolu e1–e2 má hodnotu 1,48. Chromatografický záznam chirálnej separácie epoxikonazolu po on-line zadržaní na kolóne Silasorb Fenyl je na obr. 5.

Záver

V práci sú riešené tri čiastkové úlohy:

Z prízorových závislostí a z následne vypočítanej sorpčnej kapacity pre epoxikonazol a permetrin na rôznych typoch stacionárnych fáz vyplynulo, že pre ich zadržanie pred on-line chirálnou separáciou je vhodný sorbent Silasorb Fenyl.

Z optimalizácie zloženia mobilnej fázy pre chirálnu separáciu analytov na kolóne Chiradex vyplynulo, že pre epoxikonazol je vhodné zloženie mobilnej fázy metanol:voda (50:50, v/v) s prietokom 0,5 ml min⁻¹ a pre permetrin metanol:voda (70:30, v/v) s prietokom 1 ml min⁻¹.

Pri on-line prenose epoxikonazolu resp. permetrinu na achirálnu stacionárnu fázu Silasorb Fenyl s následnou chirálnou separáciou analytov na Chiradex vyplynulo, že rozlíšenie enantiomérů epoxikonazolu e1–e2 má hodnotu 1,48. Rozlíšenie enantiomérů permetrinu p1–p2 má hodnotu 1,2 a enantiomérů p3–p4 má hodnotu 2,2.

Práca vznikla za finančnej podpory projektu VEGA 1/0897/15.

LITERATÚRA

- Li Y., Dong F., Liu X., Xu J., Han Y., Zheng Y.: *J. Hazard. Mater.* 265, 115 (2014).
- Abu-Qare A.W., Duncan H. J.: *Chemosphere* 48, 744 (2002).
- Ye J., Wu J., Liu W.: *Trends Anal. Chem.* 28, 1148 (2009).
- Wang P., Liu D., Jiang S., Gu X., Zhou Z.: *Chirality* 19, 114 (2007).
- Bicker W., Lämmerhofer M., Lindner W.: *J. Chromatogr. A* 1035, 37 (2004).
- Li Y., Dong F., Liu X., Xu J., Chen X., Han Y., Liang X., Zheng Y.: *J. Hazard. Mater.* 250, 9 (2013).
- Pérez-Fernández V., García M. Á., Marina M. L.: *J. Chromatogr. A* 1217, 968 (2010).
- Ali I., Aboul-Enein H.Y., Gaitonde V.D., Singh P., Rawat M. S. M.: *Chromatographia* 70, 223 (2009).
- Rogatsky E., Braaten K., Cruikshank G., Jayatillake H., Zheng B., Stein D. T.: *J. Chromatogr. A* 1216, 7721 (2009).
- Chalányová M., Paulechová M., Hutta M.: *J. Sep. Sci.* 29, 2149 (2006).
- Chalányová M., Procházková I., Hutta M.: *Chem. Listy* 107, 164 (2013).
- Hutta M., Rybár I., Chalányová M.: *J. Chromatogr. A* 959, 143 (2002).
- Húšková R., Kirchner M., Matisová E.: *Chem. Listy* 101, 1020 (2007).
- Hennion M. C.: *Analysis* 26, 131 (1998).
- Chalányová M., Hutta M., Pagáč M.: *J. Sep. Sci.* 33, 134 (2010).
- <http://www.chem.agilent.com>, stiahnute 2.9.2015.
- Bertelsen J. R., De Neergaard E., Smedegaard-Petersen V.: *Plant Pathol.* 50, 190 (2001).
- Oudou H. C., Hansen H. C. B.: *Chemosphere* 49, 1285 (2002).
- Ramsteiner K. A.: *J. Chromatogr.* 456, 3 (1988).
- Mamrošová M.: *Diplomová práca*. Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 2004.
- Pellati F., Benvenuti S., Melegari M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 839 (2005).
- Pellati F., Benvenuti S.: *J. Chromatogr. A* 1161, 71 (2007).
- Cabrera K., Lubda D.: *J. Chromatogr. A* 666, 433 (1994).
- Grewe C., Menge S., Griehl C.: *J. Chromatogr. A* 1166, 97 (2007).
- Bhushan R., Gupta D.: *J. Chromatogr. B* 837, 133 (2006).
- Burmester A., Jastorff B.: *J. Chromatogr. A* 749, 25 (1996).
- Guerra P., Eljarrat E., Barceló D.: *J. Chromatogr. A* 1203, 81 (2008).
- Brunnenberg M., Kovár K.-A.: *J. Chromatogr. B* 751, 9 (2001).
- Shishovská M., Trajkovská V.: *Chirality* 22, 527 (2010).
- Lemr K., Ševčík J., Friedecký D., Jonáková A., Jirovský D.: *Chemica* 38, 41 (1999).

M. Chalányová^a and I. Petránová^b (^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, ^b Water Research Institute, Bratislava): **HPLC Study of On-line Transfer and Chiral Separation Options for Selected Pesticides using Column Switching Techniques**

The work deals with finding a suitable achiral stationary phase for preconcentration of pesticides epoxiconazole and permethrin. The break-through curves were measured for the studied analytes on several stationary phases. Sorption capacity of the sorbents showed that Silasorb Phenyl is suitable for the preconcentration of epoxiconazole and permethrin.

HPLC separation conditions in reverse-phase mode of analytes were optimized on the chiral stationary phase ChiraDex. For on-line transfer of epoxiconazol and permethrin on achiral column Silasorb Phenyl and following back-flush washout on chiral stationary phase ChiraDex column-switching technique has been used. The resolution of epoxiconazol enantiomers e1–e2 is 1.48; permethrin enantiomers p1–p2 is 1.2; and permethrin enantiomers p3–p4 is 2.2.