

## 使用配有UV检测器的超高效合相色谱(UPC<sup>2</sup>)对制剂中的手性农药进行对映体分离与分析

Marian Twohig<sup>1</sup>, Andy Aubin<sup>1</sup>, Michael O'Leary<sup>1</sup>, Tom DePhillipo<sup>2</sup>, Sherry C. Perine<sup>3</sup>, 和 David R. Stubbs<sup>3</sup>

<sup>1</sup>沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

<sup>2</sup>沃特世公司(美国特拉华州纽卡斯尔)

<sup>3</sup>先正达作物保护公司(美国北卡罗来纳州格林斯伯勒)

### 应用优势

- 与正相分离相比，提高了对映体和非对映体的分离度，缩短了分析时间，实现了更高的样品通量并减少了溶剂消耗。
- 对农药制剂中对映体和/或非对映体比率进行可靠且可重现的测量，确保准确测定出正确的应用比率。

### 沃特世解决方案

ACQUITY® 超高效合相色谱  
(UltraPerformance Convergence Chromatography™, UPC<sup>2</sup>®) 系统

ACQUITY光电二极管阵列  
(PDA) 检测器

Empower®3 软件

### 关键词

手性农药, UPC<sup>2</sup>, 对映体, 非对映体, 农药制剂, 手性分离, 异丙甲草胺, 甲霜灵, 合相色谱

### 简介

农用化学品可降低农作物损失，获取高质量食品并实现充足供应<sup>1</sup>。农用化学品制造业的生产目的是使用最少量的农药达到最有效的结果。据估计，现今市场上30%的农药具有光学异构体，并且有报道指出，在中国使用的农药超过40%为手性农药<sup>2,3</sup>。这些手性农药生化反应通常显示立体选择性或对映选择性，可能某种对映体对目标物种展现预期效应，而另一种对映体则效应较弱甚至完全无效。活性较弱的对映体可能不足以促进制剂的效能，但它可能对非靶标物种产生对映选择性的毒性作用。手性农药通常会配制成外消旋混合物或单一的生物活性异构体。为了确保正确的活性农药施用率，必须使用手性分离方法准确测定杀虫剂中立体异构体<sup>4,5</sup>。但由于立体异构体分离困难，手性化合物研究一直面临着严峻的挑战。应用最为广泛的分析技术是基于手性固定相的高效液相色谱(HPLC)分离<sup>3,6</sup>。超临界流体色谱(SFC)与常规HPLC相比具有许多优势，被认为是一种有效的手性分离技术<sup>7,8</sup>。利用超临界流体的特性可实现高效分离并缩短分析时间。合相色谱是以超临界CO<sub>2</sub>作为主要流动相、与液相色谱具有正交选择性的一种补充性分离技术。

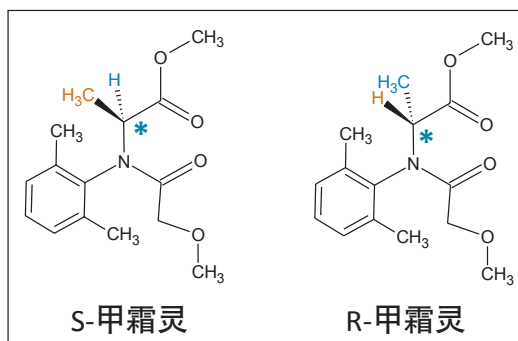


图1. 甲霜灵的对映体结构。星号代表手性中心。

## 实验

## 样品制备

对农药样品(制剂1和制剂2)进行称重, 分别用一定体积的己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯进行萃取考察。所得混合物超声处理后, 使用0.2  $\mu\text{m}$  PVDF微孔滤膜过滤至样品瓶中, 待分析。标准品溶液使用与样品相同稀释溶剂进行配制。

UPC<sup>2</sup>条件

系统: ACQUITY UPC<sup>2</sup>™, 配备  
PDA检测器  
数据管理: Empower 3软件

## 甲霜灵-M

分离模式: 梯度  
色谱柱: CHIRALPAK IA-3  
4.6 x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$   
共溶剂: 2-丙醇  
ABPR: 2000 psi/138 bar  
流速: 4.0 mL/min  
UV检测波长: 215 nm  
柱温: 55 °C  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$

## S-异丙甲草胺

分离模式: 梯度  
色谱柱: CHIRALPAK IA-3  
4.6 x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$   
共溶剂: 2-丙醇  
ABPR: 2000 psi/138 bar  
流速: 2.5 mL/min  
UV检测波长: 220 nm  
柱温: 35 °C  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$

本应用纪要介绍了甲霜灵-M(苯基酰胺类杀菌剂)和S-异丙甲草胺(乙酰苯胺类除草剂)两种农药的对映体和/或非对映体, 及其在水基配方杀虫剂中的分离与分析。甲霜灵(图1)具有一个手性中心, 其生物活性形式是R对映体<sup>9</sup>。异丙甲草胺(图2)具有两个手性中心, 95%的除草活性来自S对映体<sup>10,11</sup>。采用Waters® ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统进行分离。

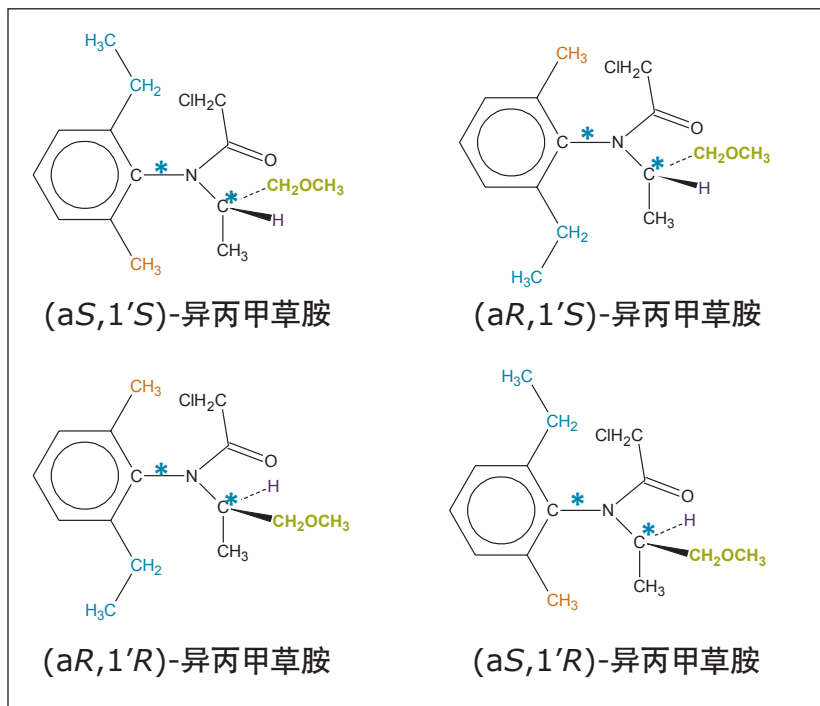


图2. 异丙甲草胺的四种立体异构体的结构。星号代表手性中心。

## 结果与讨论

使用农药标准品进行方法开发, 首先采用通用梯度条件考察不同色谱柱和共溶剂影响。由于超高效合相色谱技术大大缩短分析时间, 使得这一筛选步骤可快速完成。然后对共溶剂和色谱柱组合进行优化, 使每种化合物实现最佳分离。手性分离的选择性随不同的温度、压力和流速而显著改变<sup>12</sup>。图3和图4显示了甲霜灵-M和S-异丙甲草胺标准品的最优分离结果。

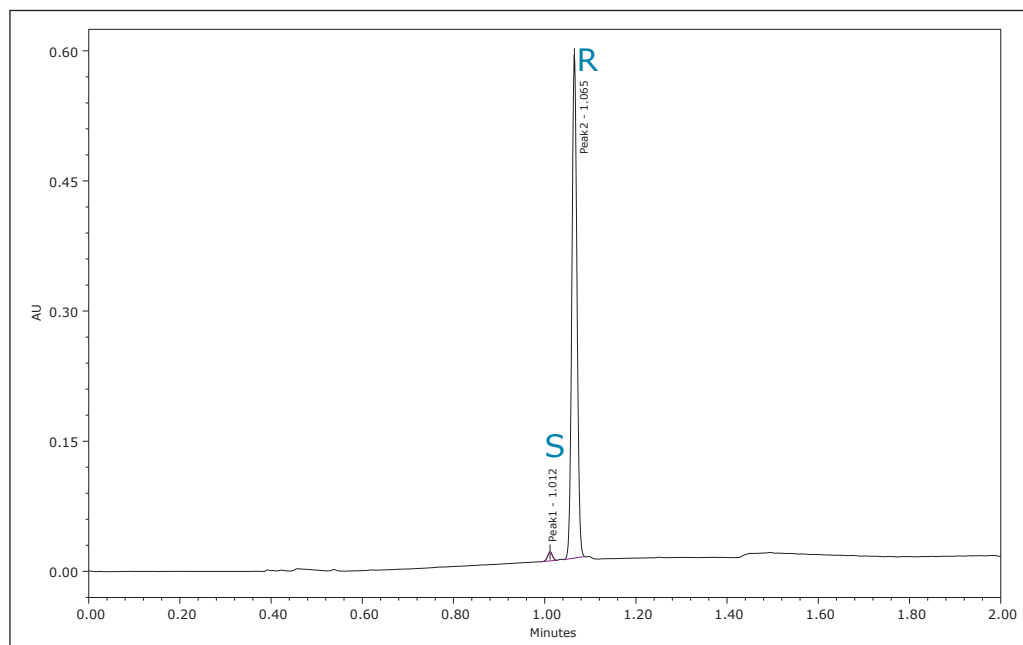


图3. 甲霜灵-M标准品的S和R对映体经梯度洗脱得到的215 nm处ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。

图4所示色谱图中的相对峰面积表明，异丙甲草胺的对映体分别为峰1、2(S)和3、4(R)。

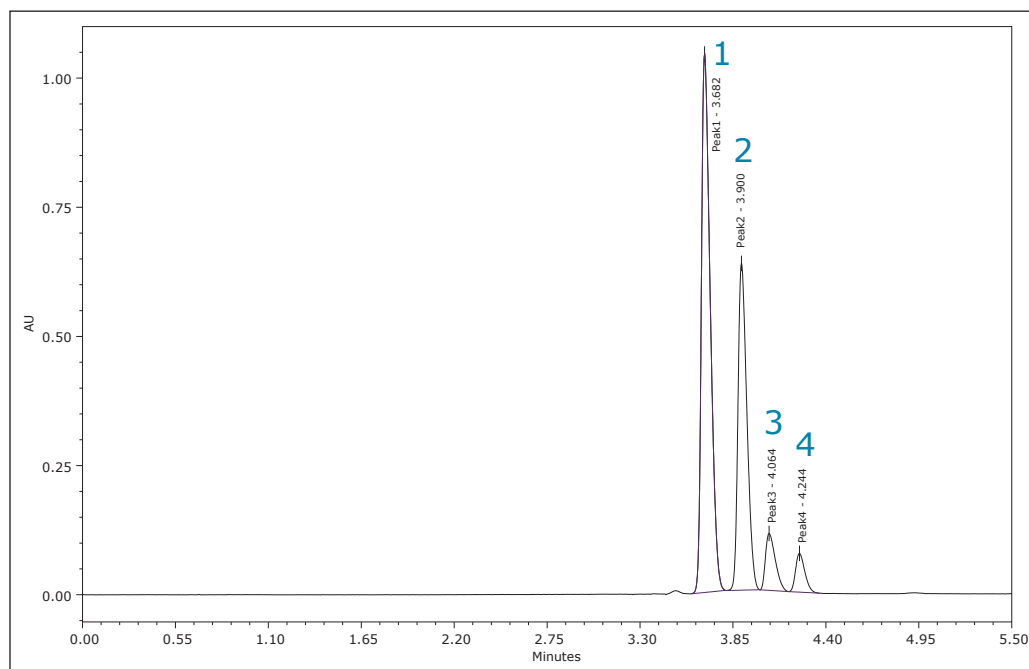


图4. S-异丙甲草胺标准品的对映体经梯度洗脱得到的220 nm处ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。

杀虫剂样品是水基农药，需要进行溶剂萃取，分别对己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯三种溶剂进行评估。己烷对两种制剂中极性较弱的组分选择性更强(图5和6)，因而将其用于进一步萃取。此次分析的目标是分离立体异构体，可靠且可重现地测定对映体/非对映体的比率。

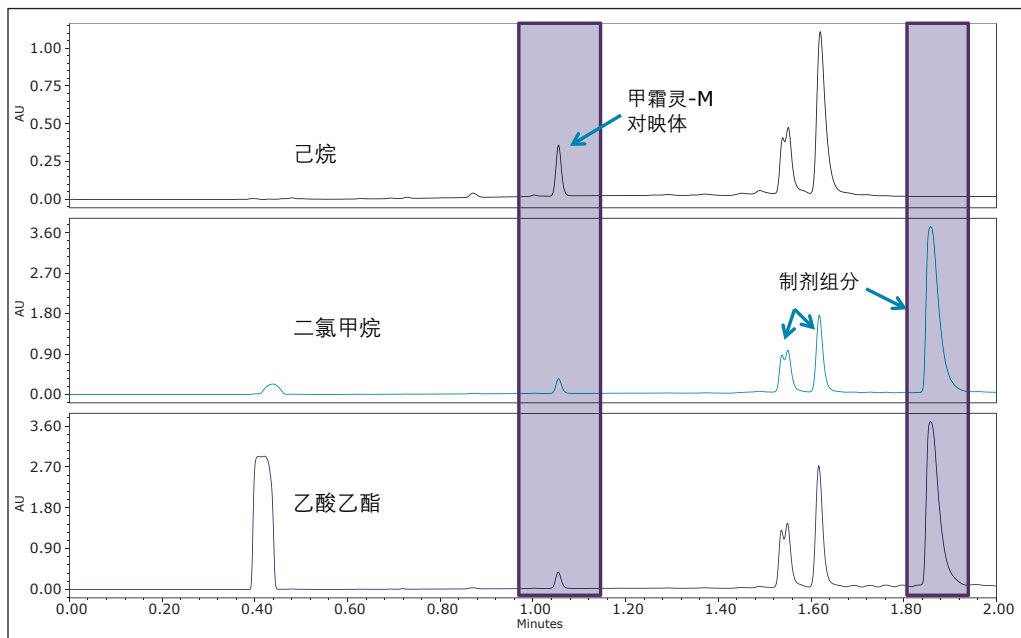


图5. 制剂1在215 nm处的ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。分别将己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯作为制剂中甲霜灵-M的萃取溶剂进行评估。

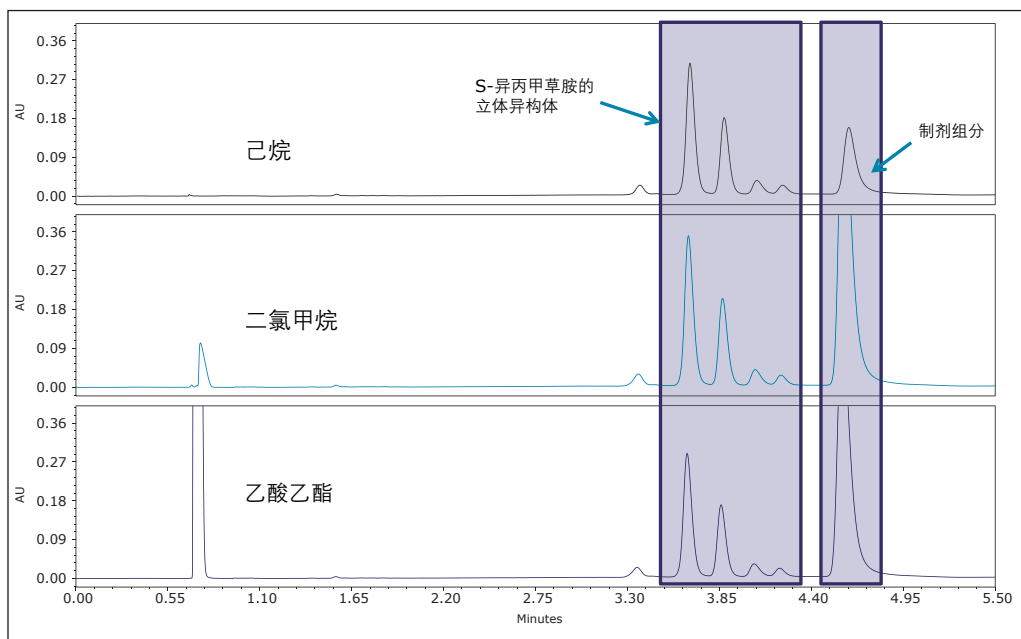


图6. 制剂2在220 nm处的ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。分别将己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯作为制剂中S-异丙甲草胺的萃取溶剂进行评估。

经优化的UPC<sup>2</sup>方法可增加样品通量，并提高对映体和非对映体的分离度。对于甲霜灵-M(图7)，两种对映体均在1 min内洗脱，分离度( $R_s$ )为2.47。在2009年发表的一篇文献对手性农药的对映选择性分离进行了全面研究，其中报道了一种采用己烷/乙醇(60/40)进行甲霜灵对映体分离的正相等度方法<sup>6,13</sup>，在5 min内洗脱的两种对映体的 $R_s$ 为1.94。

异丙甲草胺的四种立体异构体在4.5 min内洗脱(图8)，峰1和2之间的 $R_s$ 为2.31；峰2和3之间的 $R_s$ 为1.85；峰3和4之间的 $R_s$ 为1.48。2009年发表的文章中，采用己烷/二乙醚(91/9)为洗脱液的正相分离技术可实现异丙甲草胺标准品不同立体异构体的基线分离。该文献中的一张图片显示，所有四种立体异构体均在20到30 min之间洗脱<sup>56</sup>。

在两种UPC<sup>2</sup>方法中，甲霜灵-M和S-异丙甲草胺的立体异构体均与其它制剂组分充分分离，从而实现准确且可重现的对映体比率测定。两种甲霜灵-M对映体100次以上进样的峰面积百分比显示，R-甲霜灵RSD%为0.02，而低浓度S-甲霜灵为0.85(数据未显示)。

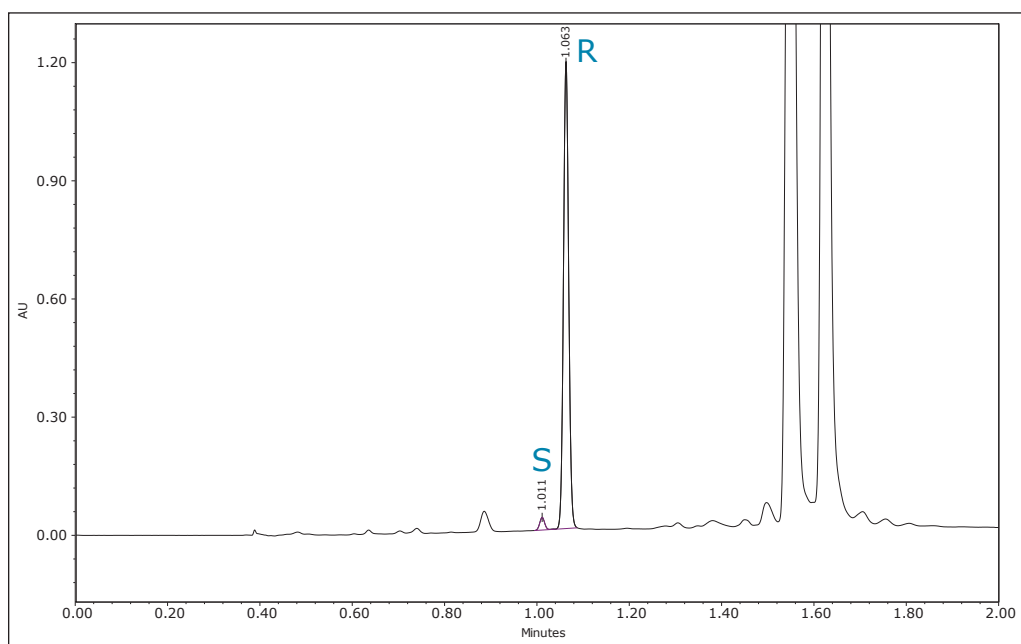


图7. 制剂1中215 nm处S和R甲霜灵梯度洗脱ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。



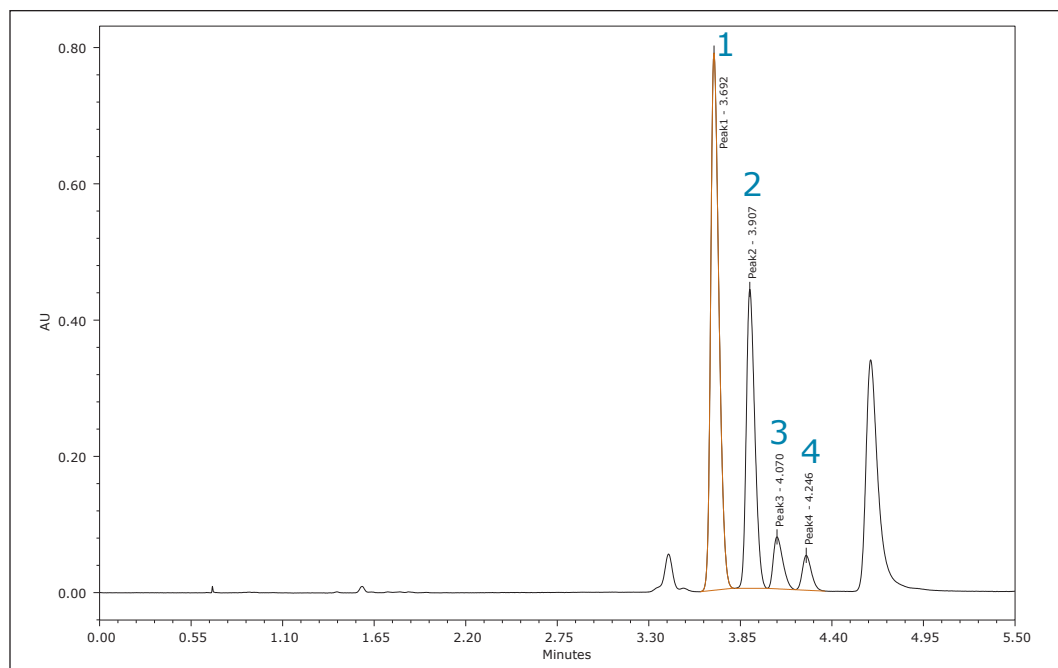


图8. 制剂2中异丙甲草胺立体异构体220 nm处梯度洗脱ACQUITY UPC<sup>2</sup>/UV色谱图。

每个化合物所有立体异构体的保留时间、峰面积、峰面积%和峰高重现性数据 (n=6) 的RSD%均低于或等于1.34。柱形图(图9)显示出S和R-甲霜灵对映体六次进样的平均峰面积和RSD%。虽然低浓度S-甲霜灵和活性R-甲霜灵的峰面积之间存在相对差，但其RSD%相当。

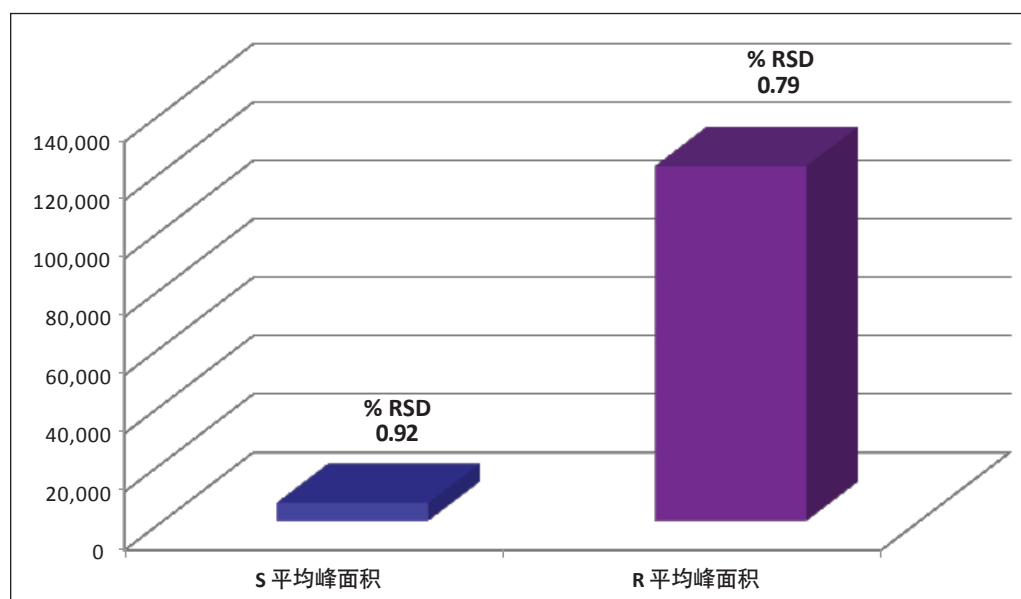


图9. S和R-甲霜灵的平均峰面积 (n=6) 和RSD%对比。

图10显示了异丙甲草胺四种立体异构体的平均峰面积 (n=6) 和RSD% (范围在0.55到1.34之间)。

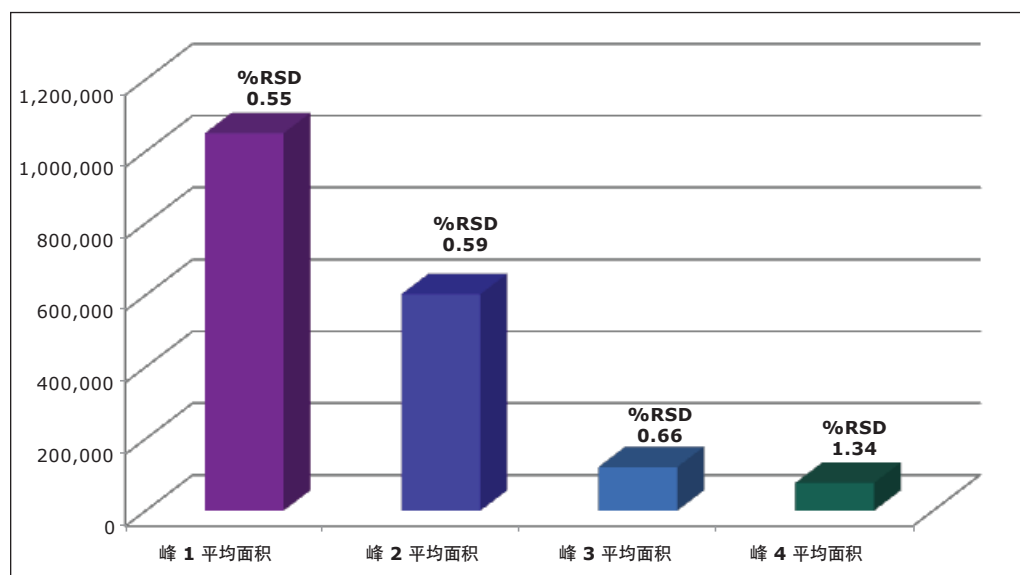


图10. S-异丙甲草胺不同立体异构体的平均峰面积和RSD%对比。

## 结论

采用UPC<sup>2</sup>可以实现高效分离,从而显著提高样品通量。本文介绍的方法使用超临界CO<sub>2</sub>作为主要流动相,并使用2-丙醇作为共溶剂。

本应用纪要展示了采用UPC<sup>2</sup>对水基配方中两种农药进行手性分析。利用UPC<sup>2</sup>方法精确测定了制剂中的对映体和/非对映体组成,这种方法比文献报道过的传统正相方法速度更快,可以实现更高的样品通量<sup>6</sup>。由于这种方法缩短了分析时间,因而开发具有可接受分离度的手性分离所需的时间也缩短了。峰面积、峰高、峰面积百分比和相对保留时间的RSD%与采用超高效液相色谱(UPLC<sup>®</sup>)/UV分析所得的RSD%相当。此外,对于类似传统正相手性分离中使用的大量具有潜在危险溶剂的需求降低,从而减少了废液的处理成本。

此前,由于难以在短时间内实现分离,使得对手性农药的研究困难重重。ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统能提供更快速的分析方法解决手性化合物分离难题,从而克服了这一挑战,通过更迅速地获得有关立体选择性行为的关键信息而提高实验室工作效率。

## 参考文献

1. Ulrich EM, Morrison CN, Goldsmith MR, Foreman WT. Chiral Pesticides: Identification, Description and Environmental Implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012; 217: 1-74.
2. Zhou YL, Lin KD, Zhu XP, Liu WP. *Chirality*. 2009; 21:421-427.
3. Sekhon BS. Chiral pesticides. *J Pestic Sci*. 2009; 34(1): 1-12.
4. Wang P, Jiang S, Liu D, Wang P, Zhou Z. Direct enantiomeric resolutions of chiral triazole pesticides by high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods*. 2005; 62: 219-230.
5. Polcaro CM, Berti A, Mannina L, Marra C, Sinibaldi M, Viel S. Chiral HPLC resolution of neutral pesticides. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2004; 27: 49-61.
6. Ye J, Wu J, Weiping L. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009; 28(10): 1148-1163.
7. Jin L, Gao W, Yang H, Lin C, Liu W. Enantiomeric resolution of five chiral pesticides on a chiralpak IB-H column by SFC. *J Chrom Sci*. 2011 Oct; 49: 739-743.
8. Toribo L, del Noza MJ, Bernal JL, Jimenez JJ, Alonso C. Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography. *J Chrom A*. 2004; 1046: 249-253.
9. Zadra C, Marucchini C, Zazzeini A. Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 5373-5377.
10. Poiger T, Muller MD, Buser HR. Verifying the chiral switch of the pesticide metolachlor on the basis of the enantiomer composition of the environmental residues. *Chimia*. 2002; 56: 300-303.
11. O'Connell PJ, Harms CT, Allen JRF. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection*. 1998; 17(3): 207-212.
12. McCauley JP, Subbarao L, Chen R. Enantiomeric and Diastereomeric Separations of Pyrethroids Using UPC<sup>2</sup>. Waters Application Note APNT134717217. 2012 December.
13. Saito K, Yato M, Ito T, Iwasaki Y, Ito R, Matsuki Y, Nakazawa H. Verification of the need for optical purity measurement of chiral pesticide standards as agricultural reference materials. *Accred Qual Assur*. 2008; 13: 373-379.

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、UPC<sup>2</sup>、ACQUITY、ACQUITY UPLC、Empower、UPLC 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。UltraPerformance Convergence Chromatography 和 ACQUITY UPC<sup>2</sup> 是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年 沃特世公司。印制于中国  
2013 年 6 月 720004744ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司  
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866  
上海: 021 - 6156 2666  
广州: 020 - 2829 5999  
成都: 028 - 6578 4990  
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676  
www.waters.com