

## ACQUITY UPC<sup>2</sup> 配备UV检测器的手性农药对映体和非对映体分离解决方案

Marian Twohig<sup>1</sup>、Andrew 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，本方案提高了对映体和非对映体之间的分离度，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。
- 对映体和/或非对映体比率测量的可靠性和可重复性确保了应用正确率。

### 沃特世解决方案

ACQUITY® UltraPerformance

Convergence Chromatography System™ (UPC<sup>2</sup>)

ACQUITY UPLC®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，手性分离，手性拆分，异丙甲草胺，甲霜灵，苯醚甲环唑

### 简介

因为对映体在手性环境中发生不同的反应，所以开发手性化合物分离分析方法对于许多研究领域而言都非常重要。生化反应可能具有立体或对映选择性，当一种对映体在生化反应中产生预期效应（称为优性异构体）时，另一种对映体可能对靶点的效应较弱或完全无效。据估计，当今市场上30%的农药具有光学异构体，并且有报道指出中国所用的农药有40%为手性农药<sup>1,2</sup>。对单个对映体的效应的认识可能有助于显著降低农药应用总量，因此对映选择性的研究对农用化工制造业意义重大。为了提高人们对对映选择性的认识，所采用的分析方法需要能够在短时间范围内实现可靠且可重现的分离。超临界流体色谱（SFC）被认为是一种有效的手性分离技术，与常规的高效液相色谱（HPLC）相比，它具有许多优势<sup>3,4</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。新型农药的结构越来越复杂，这意味着在一个分子中很可能有多个手性中心<sup>5,6,7</sup>，需要使用高效的技术才能成功分离。

在本应用纪要中，我们展示了三种农药的对映体和/或非对映体分离：甲霜灵-M（苯基酰胺类杀菌剂），S-异丙甲草胺（乙酰苯胺类除草剂）和苯醚甲环唑（三唑类杀菌剂）。甲霜灵具有一个手性中心，而异丙甲草胺和苯醚甲环唑具有两个手性中心。它们的结构如图1至3所示。使用Waters®超高效合相色谱系统（UltraPerformance Convergence Chromatography System, UPC<sup>2</sup>）进行分离。合相色谱是针对液相色谱的一种补充性分离技术，具有正交选择性，以超临界CO<sub>2</sub>作为主要流动相。

## 实验

### 仪器

本方法使用ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统进行分离，单波长光电二极管阵列（PDA）检测器。使用Empower 3软件进行色谱数据处理。

### 样品制备

农药标准品由先正达公司提供，与异丙醇共溶备用。

### 方法条件

#### 甲霜灵-M

分离模式：梯度  
色谱柱：Chiralpak IA-3  
4.6 × 150 mm, 3 μm  
共溶剂：异丙醇  
ABPR：2000 psi/138 bar  
流速：4.0 mL/min  
UV检测：215 nm  
柱温：55 °C  
进样体积：1 μL

#### 苯醚甲环唑

分离模式：等度  
色谱柱：Chiralcel OD-3  
4.6 × 150 mm, 3 μm  
共溶剂：异丙醇/1-丁醇（70/30）  
ABPR：2000 psi/138 bar  
流速：2.0 mL/min  
UV检测：235 nm  
柱温：35 °C  
进样体积：2 μL

#### S-异丙甲草胺

分离模式：梯度  
色谱柱：Chiralpak IA-3  
4.6 × 150 mm, 3 μm  
共溶剂：异丙醇  
ABPR：2000 psi/138 bar  
流速：2.5 mL/min  
UV检测：220 nm  
柱温：35 °C  
进样体积：2 μL

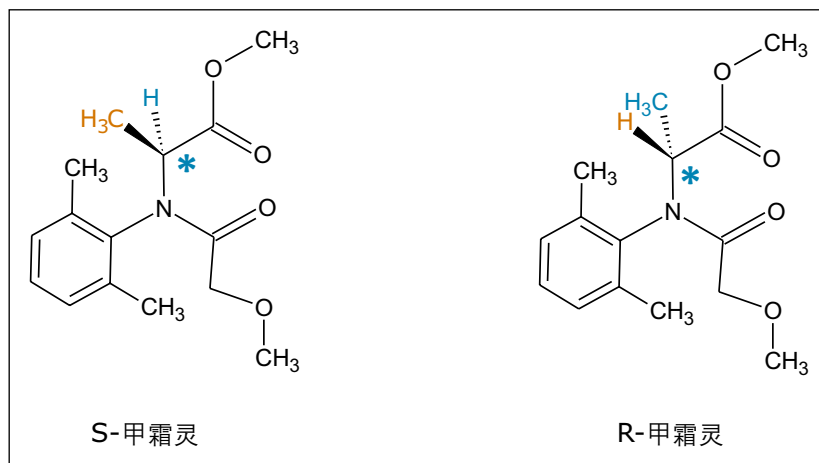


图1. 甲霜灵的两对映体的结构。星号代表立体中心。

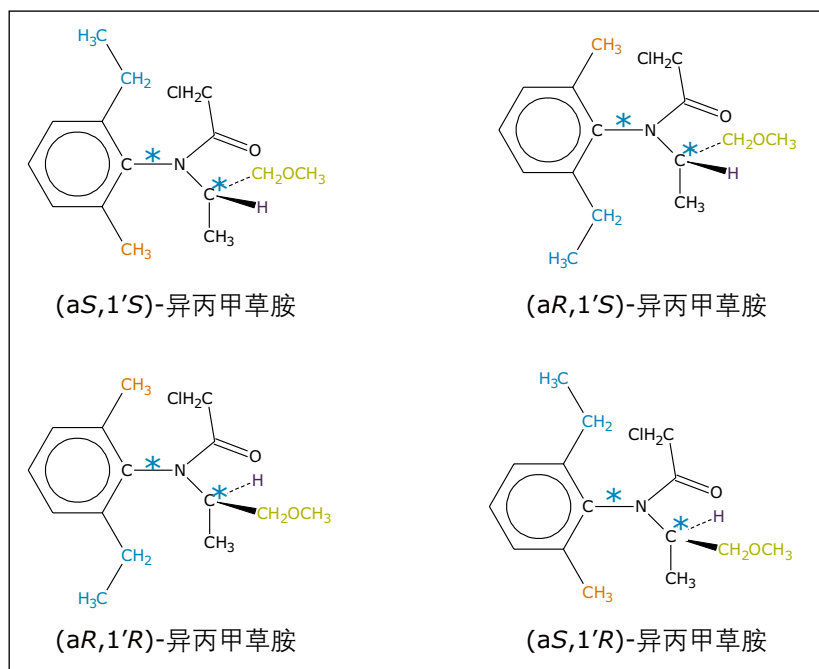


图2. 异丙甲草胺的四种立体异构体的结构。星号代表立体中心。

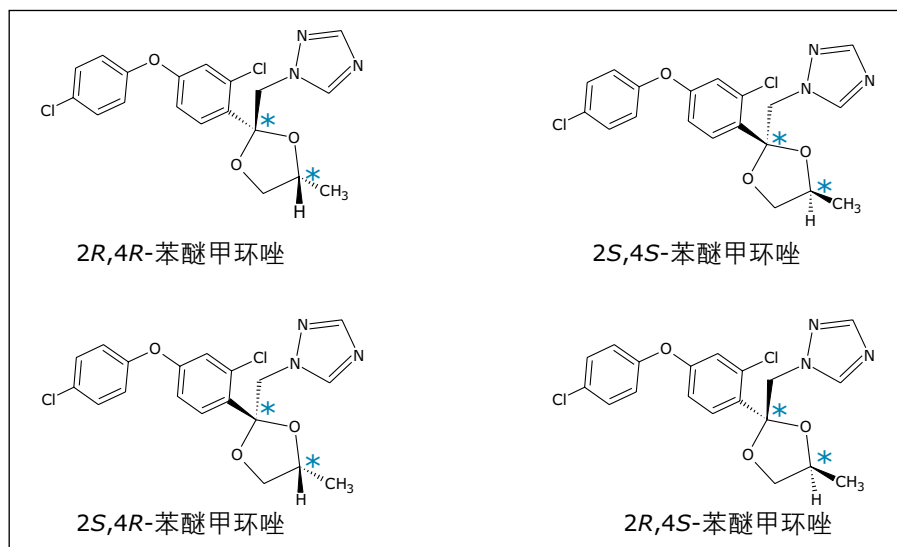


图3. 苯醚甲环唑的四种立体异构体的结构。星号代表立体中心。

结果与讨论

在通用筛选梯度条件下，采用多种手性柱和共溶剂开始对农药标准品进行方法开发。采用这种技术可缩短分析时间，从而可快速完成筛选步骤。然后对共溶剂和色谱柱的组合进行优化，以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>8</sup>。我们还对梯度和等度分离进行了评估；二者均能使各种化合物的立体异构体得到成功分离。此处报告的分​​离显示出最佳分离度 ( $R_s$ )。甲霜灵的外消旋混合物标准品和具有生物活性的R-对映体<sup>9</sup> 甲霜灵-M的优化分离如图4所示。

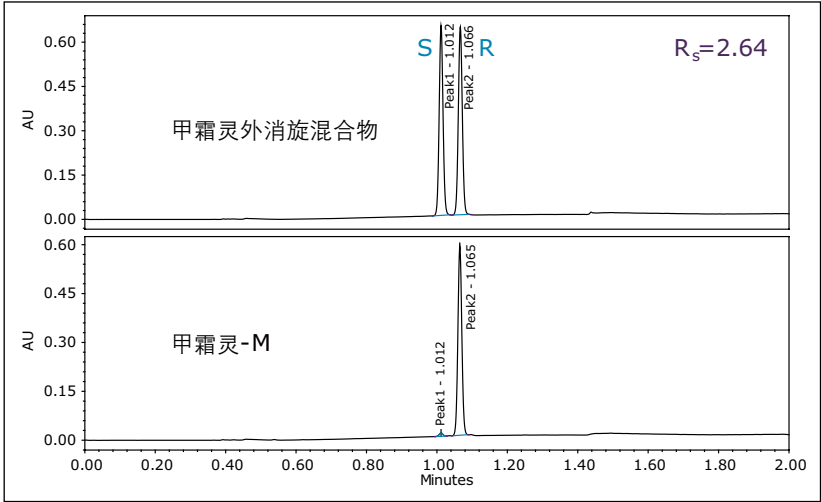


图4. 甲霜灵外消旋混合物的S和R对映体以及甲霜灵-M标准品在215 nm处的ACQUITY UPC<sup>2</sup> UV 色谱图。

S和R对映体之间的 $R_s$ 为2.64（表1）。在2009年发表的一篇文献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，该文献中对手性农药的对映选择性分离进行了全面研究。据报道，在不到15 min的时间内洗脱的两种对映体的 $R_s$ 为1.94<sup>10,11</sup>。

	$R_{S1,2}$	$R_{S2,3}$	$R_{S3,4}$
甲霜灵-M	2.64	—	—
S-异丙甲草胺	2.36	1.74	1.62
苯醚甲环唑	3.50	1.50	2.05

表1. 甲霜灵-M、S-异丙甲草胺和苯醚甲环唑的立体异构体分离度。

据报道，异丙甲草胺中95%的除草活性来自S型对映体<sup>12,13</sup>。异丙甲草胺的所有四种立体异构体的分离如图5所示，峰3和4之间出现最Rs值1.62（表1）。2009年发表的文章中还报道称，采用正相分离技术和己烷/二乙醚（91/9）可实现异丙甲草胺立体异构体的基线分离。该文章中的谱图显示所有四种立体异构体在20-30 min之间洗脱<sup>10,14</sup>。本文所报道的ACQUITY UPC<sup>2</sup>方法可显著缩短甲霜灵和异丙甲草胺的分析时间。此外，无需使用有潜在危险的溶剂。

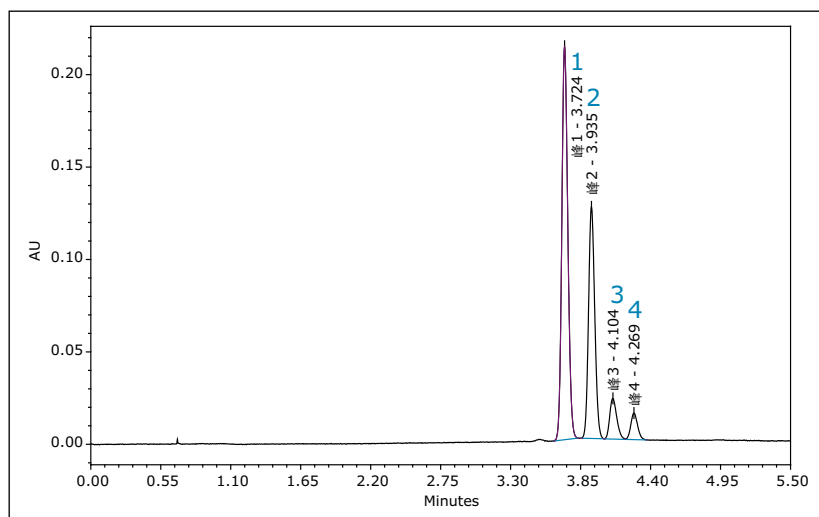


图5. S-异丙甲草胺标准品的各组S和R对映体经等度洗脱得到的在220 nm处的ACQUITY UPC<sup>2</sup> UV色谱图。

苯醚甲环唑外消旋混合物的立体异构体分离如图6所示。峰2和3之间出现最R<sub>s</sub>值1.5。在前文提及的文章中报道了采用己烷/乙醇（90/10）对苯醚甲环唑的立体异构体进行正相分离，四种立体异构体在30-55 min之间发生分离。按照所报道的方法，峰1，2或峰2，3之间未达到基线分离（R<sub>s</sub>>1.5）<sup>10,15</sup>。

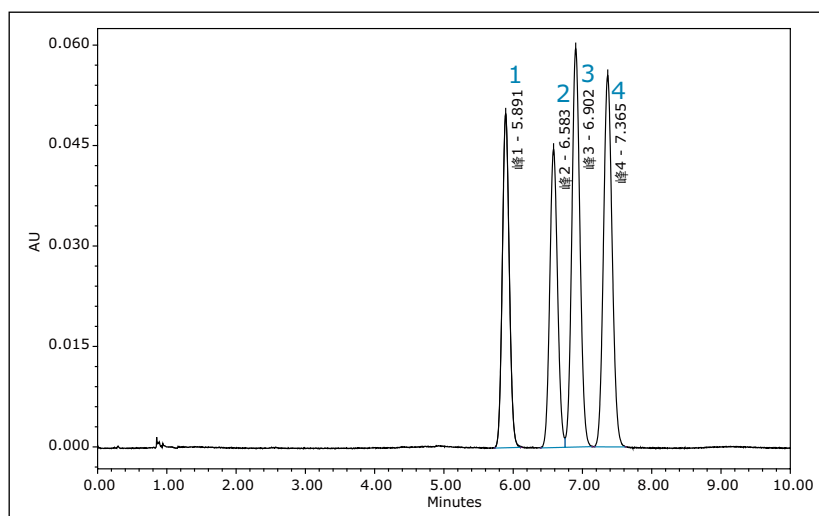


图6. 苯醚甲环唑的立体异构体经等度洗脱得到的在235 nm处的ACQUITY UPC<sup>2</sup> UV色谱图。

经优化的ACQUITY 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，两种对映体在1 min内洗脱（图4）；S-异丙甲草胺的所有四种立体异构体在4.5 min内洗脱（图5）。采用等度洗脱，四种苯醚甲环唑立体异构体在8 min内实现分离（图6），比文献中报道的某些正相方法快6倍。各种化合物的所有立体异构体的保留时间、峰面积、峰面积%和峰高的重现性数据（n=6）的RSD%低于或等于1.22（表2-4）。

甲霜灵-M RSD% (n=6)				
	Rt	峰面积	峰面积%	峰高
S	0.04	1.18	1.10	0.77
R	0.03	0.61	0.03	0.66

表2. 甲霜灵-M的六次平行进样的RSD%。

S-异丙甲草胺 RSD% (n=6)				
	Rt	峰面积	峰面积%	峰高
峰1	0.11	0.22	0.09	0.77
峰2	0.11	0.19	0.09	0.22
峰3	0.07	0.33	0.27	0.29
峰4	0.08	1.20	1.22	0.36

表3. S-异丙甲草胺的六次平行进样的RSD%。

苯醚甲环唑 RSD% (n=6)				
	Rt	峰面积	峰面积%	峰高
峰1	0.06	0.35	0.13	0.34
峰2	0.37	0.50	0.24	0.47
峰3	0.44	0.26	0.08	0.45
峰4	0.41	0.23	0.12	0.44

表4. 苯醚甲环唑的六次平行进样的RSD%。



## 结论

在本应用纪要中，我们展示了利用ACQUITY UPC<sup>2</sup>进行的手性农药分析。与传统的正相分离相比，ACQUITY UPC<sup>2</sup>可实现高效分离，能够显著增加样品通量<sup>10</sup>，缩短了从色谱柱和共溶剂的筛选阶段到形成最终优化方法所需的方法开发时间。本文中介绍的方法使用超临界CO<sub>2</sub>作为主要流动相，异丙醇作为主要的有机改性剂。对于使用大量具有潜在危险的溶剂的需求降低，从而削减了与溶剂弃置处理相关的成本。所得的RSD%与利用UPLC®/UV方法所得的RSD%相当。

一直以来，由于在分离手性化合物方面存在困难，使得对于对映选择性毒性和环境的研究面临着严峻挑战。现在，我们可以通过更快速的分析方法来分离手性化合物，这也意味着我们能更迅速地获得有关立体选择性行为的关键信息。

## 参考文献

1. Sekhon BS. Chiral pesticides. J. Pestic. Sci. 2009; 34(1):1-12.
2. Liu WP. Pesticide Environmental Chemistry. Chemical Industry Press, Beijing, China. 2006; 341-343.
3. 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 October; 49:739-743.
4. 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.
5. Cantrell CL, Dayan FE, O'Duke S. Natural Products As Sources for New Pesticides. J. Nat. Prod. 2012; 75(6):1231-1242.
6. Mann RS, Kaufman PE. Natural product pesticides: Their development, delivery and use against insect vectors. Mini-reviews in Organic Chemistry, 2012; 9:185-202.
7. Ulrich EM, Morrison CN, Goldsmith MR, Foreman WT. Chiral Pesticides: Identification, Description and Environmental Implications. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer U.S. 2012; 217: 1-74.
8. McCauley JP, Subbarao L, and Chen R. [Enantiomeric and Diastereomeric Separations of Pyrethroids Using UPC<sup>2</sup>](#). Waters Application Note APNT134717217. 2012, December.
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. 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.
11. 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.
12. 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.
13. O'Connell PJ, Harms CT, Allen JRF. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. Crop Protection. 1998; 17(3): 207-212.
14. 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.
15. Zhou Y, Li L, Lin K, Zhu X, Liu W. Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography. Chirality. 2009; 21:421-427.

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, UPLC, UPC<sup>2</sup>, Empower和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。UltraPerformance Convergence Chromatography是沃特世公司的商标。其他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5月 720004657ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司  
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 6555  
成都：028-6554 5999  
香港：852-2964 1800

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

