



使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统测定手性合成的异丙甲草胺的对映体过量

应用简报

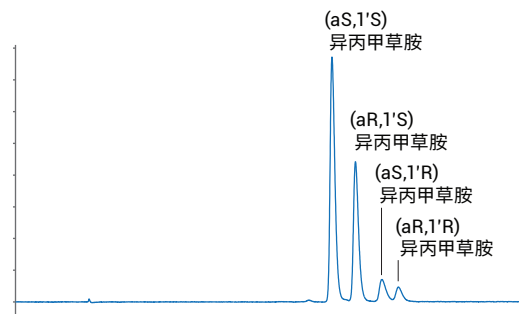
专用化学品

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了分离方法的开发，该方法用于分离来源于具有两个空间中心的化合物的四种立体异构体。使用 Agilent 1260 Infinity 分析型超临界流体色谱 (SFC) 系统与 Agilent ChemStation 方法筛选向导软件开发方法。采用所开发的方法比较由外消旋和立体选择性合成获得的立体异构体的比率。



Agilent Technologies

前言

在全球范围内，异丙甲草胺除草剂大量用于控制玉米及其他作物中的各种阔叶杂草。每年，其全球产量超过 30000 吨^{1,2}。异丙甲草胺具有一个位于不对称取代的碳原子处的立体中心和另一个手性轴。这种结构意味着异丙甲草胺存在四种立体异构体（图 1）。

生物活性主要取决于立体中心碳原子的构型。大约 95% 的生物活性来自两种 S-对映体，即 (aS,1'S) 和 (aR,1'S)，它们的区别在于手性轴上的空间排列不同³。因此，富含 S-对映体的异丙甲草胺制剂不仅可以保持所需的除草效果，还能减少向环境中引入该化合物。研究者们开展了大量工作，试图用 S-对映体的立体选择性合成代替外消旋合成。最终获得了一种解决方案，利用手性二茂铁基催化剂催化加氢反应（图 2）^{4,5}。该合成方法能够生产对映体过量值大约为 80% 的异丙甲草胺，且年产量可达 50000 吨以上。为测定对映体过量并由此确定手性合成成功与否，必须将所有四种立体异构体分离。这一分离已通过正相 HPLC 实现^{6,7}。利用 HPLC 方法，四种立体异构体在 20–30 分钟之间从色谱柱上洗脱下来，并且通常需要使用有害的正相溶剂。

本应用简报介绍了如何使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统开发用于分离异丙甲草胺的所有四种立体异构体的方法。所开发的方法能够分离这四种立体异构体，且分离时间远远短于使用正相 HPLC 条件时通常所需的分离时间。此外，SFC 方法无需使用有害溶剂。

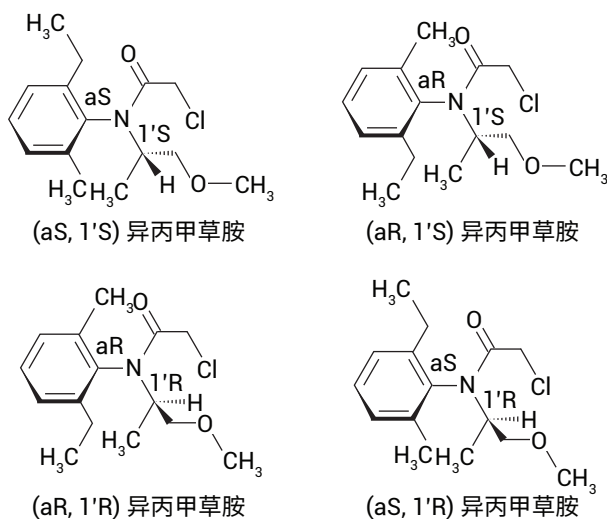


图 1. 农药异丙甲草胺的立体异构体。1'S-对映体具有生物活性，与手性轴上的空间排列无关

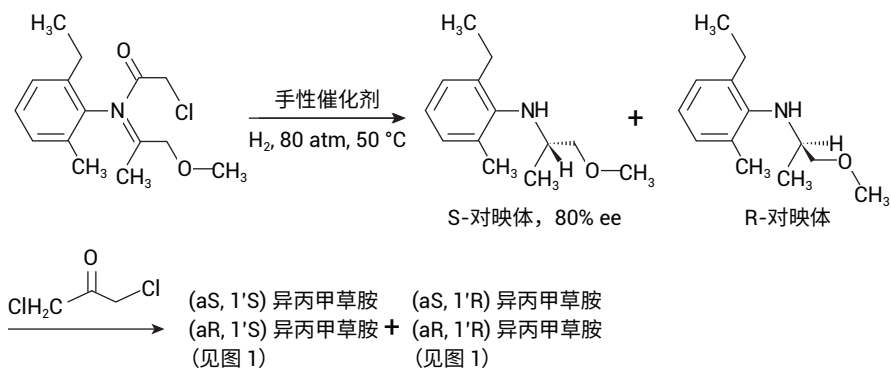


图 2. S-异丙甲草胺的立体选择性合成

实验部分

仪器

所有实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 上完成, 该系统包括:

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱, 配备阀驱动
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池

利用 SFC 系统进行自动化方法开发需要下列额外设备:

- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C), 配备阀驱动
- Agilent 1200 Infinity 系列 8 位/9 通 Quick-Change 快速更换阀, 2 个 (G4230A)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A), 配备 Agilent 1200 Infinity 系列 12 位/13 通 Quick-Change 快速更换阀 (G4235A)
- 方法开发毛细管工具包 (部件号 5067-1595)

仪器设置

为实现溶剂选择, 利用 OpenLAB CDS 中的“仪器配置”菜单将 SFC 二元泵与 12 位/13 通阀结合起来。溶剂在 OpenLAB CDS 的“泵设置”菜单中进行定义。为实现色谱柱选择, 利用 OpenLAB CDS 中的“仪器配置”菜单将两个柱温箱结合起来, 其中每个柱温箱配备一个 8 位/9 通阀。方法开发毛细管工具包支持采用最多八根色谱柱。在 OpenLAB CDS 的色谱柱数据库中输入色谱柱详细信息并在“柱温箱”菜单中进行配置。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 版本 C.01.06, 附带 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A02.04 版 (G2196AA)

SFC 方法

优化后最终方法的条件以粗体显示。

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇、乙醇和异丙醇
SFC 流速	3 mL/min
等度洗脱	2.5%、5%、10% 和 20% 改性剂
改性剂	甲醇
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	120 bar
柱温	35 °C
进样量	1 µL, 固定定量环, 定量环过量填充 10 倍, 用异丙醇在样品瓶中清洗进样针
检测	220 nm/带宽 4 nm, 参比 360 nm/带宽 100 nm, 数据采集速率 10 Hz

色谱柱

- Chiral Technologies, Chiralpak IA3, 4.6 × 250 mm, 3 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IB, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IC, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak ID, 4.6 × 250 mm, 5 µm

化学品

- 异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。实验采用溶于 5 mg/mL 异丙醇的溶液
- 所有溶剂均购自德国 Merck 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

结果与讨论

利用包含所有四种立体异构体的异丙甲草胺的外消旋混合物，对四种不同的手性柱和洗脱强度逐渐增加的三种有机改性剂（异丙醇、乙醇和甲醇）进行筛选。采用三种不同的等度条件进行初始筛选，其中有机改性剂分别为 5%、10% 和 20%。用三种不同的溶剂和三种不同的等度溶剂组成对一根色谱柱进行筛选耗时大约 90 分钟，其中包括溶剂更换和平衡时间。通过筛选过程发现，在 Chiralpak IA3 色谱柱上获得了最具前景的洗脱模式（如图 3 所示，未示出其他色谱柱的结果）。

在 Chiralpak IA3 色谱柱上进行筛选时，洗脱强度最高的甲醇未能分离四种立体异构体（图 3A）。使用洗脱强度较低的乙醇时，当乙醇含量为 10% 时，各种化合物开始分离。当乙醇含量为 5% 时，两对化合物得到分离，但是单个化合物未完全分离（图 3B）。采用洗脱强度最弱的洗脱溶剂异丙醇时，在异丙醇含量为 5% 的等度条件下，第一种化合物和最后一种化合物几乎获得了基线分离，并且第二种化合物和第三种化合物之间出现一个峰谷（图 3C）。使用这些起始条件完成了最终优化。最终方法采用异丙醇含量为 2.5% 的等度条件来分离四种立体异构体，四种化合物在 6.16 分钟至 7.44 分钟之间得到分离（图 4）。

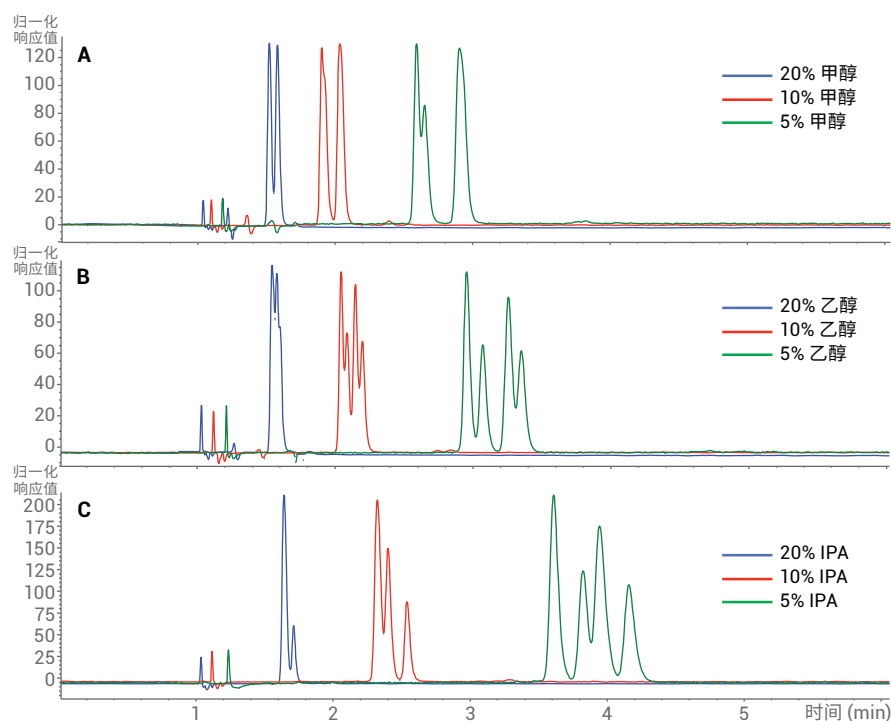


图 3. 采用 5%、10% 和 20% 的 A) 甲醇、B) 乙醇 和 C) 异丙醇 (IPA) 分离四种手性异丙甲草胺异构体。选择 5% IPA 的等度条件作为在 Chiralpak IA3 色谱柱上进行分离方法最终优化的起始点

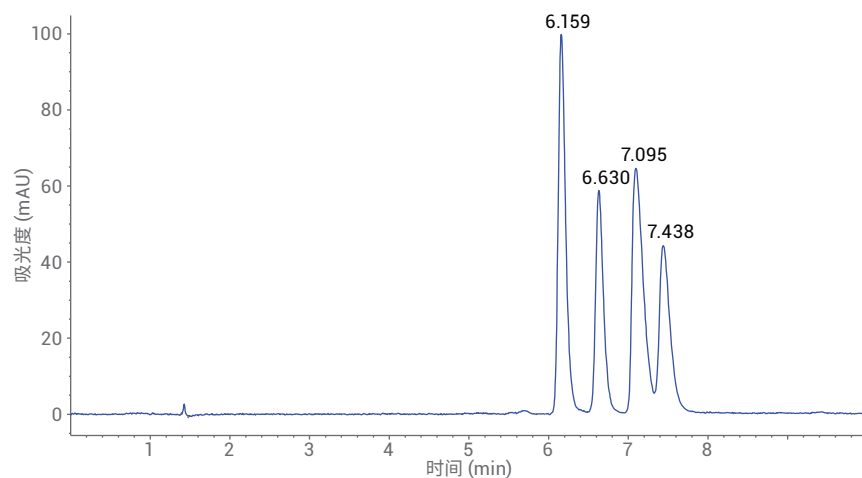


图 4. 在最终优化的方法中，采用 Chiralpak IA3 色谱柱和 2.5% 异丙醇等度条件，异丙甲草胺的四种立体异构体在 6.159 分钟至 7.438 分钟之间得到分离

采用这一优化的方法分析通过立体选择性合成获得的异丙甲草胺，结果表明该异丙甲草胺的 S-对映体过量 (图 5)。作为混合物中的主要化合物，对映体 (aS,1'S) 和 (aR,1'S) 分别在 6.18 分钟和 6.64 分钟处洗脱。作为微量成分，对映体 (aS,1'R) 和 (aR,1'R) 分别在 7.16 分钟和 7.48 分钟处洗脱。通过峰面积计算得出，S-对映体的对映体过量值约为 78% (表 1)。由外消旋异丙甲草胺样品获得的峰面积显示，S-对映体和 R-对映体的比率为 50%:50%，但是其中一种手性轴立体异构体 (aS 或 aR) 的含量更高 (表 1)。

将外消旋和立体选择性混合物进样分析 10 次得到的统计评估结果表明，立体选择性混合物的保留时间 RSD 通常低于 0.2% 并且峰面积 RSD 通常为 1% (表 1)。

结论

本应用简报介绍了农药化合物异丙甲草胺的手性分离方法开发，该化合物具有多个手性中心，因此，其具有两种以上的对映异构体。利用最终方法测定通过立体选择性合成获得的产品对映体过量值。所开发方法的分析时间为 10 分钟。相比之下，典型的正相 HPLC 方法需要至少 30 分钟。该 SFC 方法的分析速度比通常所用的正相方法快大约 3 倍。此外，与正相方法相比，SFC 无需使用正己烷等有害溶剂。获得的保留时间 RSD 值低于 0.2%，峰面积 RSD 值约为 1%。

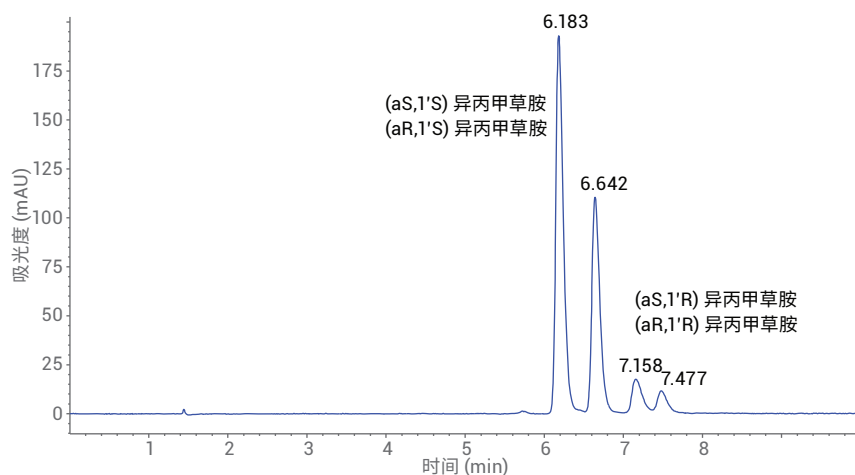


图 5. 通过立体选择性合成获得的异丙甲草胺的四种立体异构体的分离情况。主成分 S-对映体分别在 6.183 分钟和 6.642 分钟处洗脱。S-对映体的对映体过量值约为 78%

表 1. 通过外消旋和立体选择性合成获得的四种异丙甲草胺立体异构体的分离结果的统计评估，以及对映体组成的相对测定结果

	保留时间	外消旋合成			立体选择性合成		
		保留时间 RSD	峰面积 RSD	峰面积 %	保留时间 RSD	峰面积 RSD	峰面积 %
峰 1	6.183	0.25	1.06	30.77	0.20	0.90	55.35
峰 2	6.642	0.22	1.05	19.24	0.19	0.97	33.66
峰 3	7.158	0.16	1.06	30.08	0.18	1.93	6.70
峰 4	7.477	0.17	1.04	19.91	0.16	1.34	4.29

参考文献

1. O'Connell, P. J; Harms, C.T; Allen, J. R. F. Metolachlor, S-Metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection* **1998**, *17*(3), pp 207-212
2. Poiger, T; Müller, M. D; Buser, H.-R. Verifying the chiral switch of the pesticides Metolachlor on the basis of the enantiomer composition of environmental residues. *Chimia* **2002**, *56*, pp 300-303
3. Moser, H; Rihs, G; Sauter, H. Der Einfluss von atropisomerie und chiralem Zentrum auf die biologische Aktivität des Metolachlor. *Z. Naturforsch.* **1982**, *87B*, pp 451-462
4. Blaser, H; Spindler, F; *Chimia* **1997**, *51*, pp 297-299
5. Blaser, H; *et al. J. Organomet. Chem.* **2001**, *621*, pp 34-38
6. Polcaro, C. M; *et al. Chiral HPLC Resolution of neutral pesticides. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27*, pp 49-61
7. Ye, J; Wu, J; Liu, W. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*(10), pp 1148-1163

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017年10月15日，中国出版
5991-5618ZHCN



Agilent Technologies