

采用ACQUITY UPC²进行甲霜灵对映体分离及 应用Investigator SFC系统进行小规模纯化

John McCauley, Jaci Runco和Marian Twohig
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- ACQUITY UPC²®系统可提高对映体与非对映体的分离度，缩短分析时间，从而提高样品通量，缩短分析方法开发时间。
- Investigator SFC系统用途广泛、经济高效，适用于实验室的常规手性分析和小规模纯化。
- 针对小规模手性纯化的典型流程，从方法开发、方法优化、比例放大到纯化后分析的所有步骤均可快速完成。
- 对于因为严格的任务期限和预算限制而压力与日俱增的行业来说，该工作流程是其提高分析效率的理想之选。

沃特世解决方案

[ACQUITY®超高效合相色谱
\(UltraPerformance Convergence
Chromatography System™, UPC²®\)](#)

[ACQUITY UPLC®光电二极管阵列\(PDA\)
检测器](#)

[Investigator SFC系统](#)

[Analytical-2-Prep柱温箱](#)

[2998光电二极管阵列\(PDA\)检测器](#)

[ChromScope™软件](#)

关键词

SFC、手性农药、手性纯化、小规模纯化、对映体、甲霜灵、农药

简介

农药公司对于杀虫剂单一对映体的功效极为关注。因为只有确定了农药产品的最佳应用比率，并且对其进行了适当的代谢和毒理学评价之后，它们的应用优势才能完全体现出来。然而，要研究单一异构体的作用，首先必须分离对映体。必要的制备分离技术对于我们研究手性杀虫剂单一异构体的立体选择性来说至关重要，因为我们需要采用这些技术来分离得到单一的立体异构体。

虽然传统的分离方法主要采用液相色谱(LC)，但是近年来人们也逐渐开始采用超临界流体色谱(SFC)来代替正相LC，将手性纯化从半制备级别放大至千克级。由于超临界流体具有高扩散性和低粘度，SFC可实现比正相HPLC快三至八倍的分离速度，从而显著提升工作效率。与正相LC相比，SFC还具有独特的选择性，有机溶剂消耗量更少、废液产生量更低、采集体积更小以及纯化后干燥时间更短等优点。因此总的来说，SFC是一种更加经济高效且环境友好的制备型色谱技术。

SFC纯化方法开发的第一步是开发优化固定相和流动相的分析方法。采用Waters® ACQUITY UPC²系统可快速完成该步骤，接下来即可使用Investigator SFC系统对开发的方进行放大，用于后续的制备纯化。

面对严格的任务期限和预算限制，农药公司研发和推出新产品的压力与日剧增，这一结合了SFC技术优势的全新工作流程无疑是理想之选。甲霜灵是一种苯基酰胺类杀菌剂，其化学结构中有一个手性中心(图1)，它的杀菌活性主要来自于R对映体¹。在此应用纪要中，我们采用ACQUITY UPC²系统对甲霜灵进行手性分离，然后采用Investigator SFC系统将该方法放大为半制备级别的纯化。

实验

分析色谱条件

分析系统: ACQUITY UPC²
 色谱柱: Chiralpak IA-3,
 4.6 x 150 mm, 3 μ m
 流速: 3.5 mL/min

流动相

组成: 含4% 2-丙醇的CO₂
 ABPR: 2000 psi/138 bar
 柱温: 55 °C
 检测器: ACQUITY UPLC PDA
 UV检测: 215 nm

制备色谱条件

制备系统: Investigator SFC
 色谱柱: Chiralpak IA,
 10 x 150 mm, 5 μ m
 流速: 12 mL/min
 流动相组成: 含8% 2-丙醇的CO₂
 ABPR: 1600 psi/110 bar
 柱温: 30 °C
 检测器: 2998 PDA
 UV检测: 215 nm

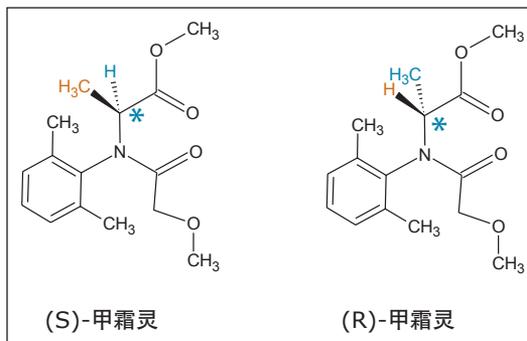


图1. 甲霜灵对映异构体的结构。星号代表立体中心。

仪器

在配备PDA检测器的ACQUITY UPC²系统上采用215 nm的波长进行分析, 在Investigator SFC系统上进行半制备纯化。系统组成如下: 流体输送模块(FDM)、自动反压调节器(ABPR)、Alias自动进样器、10端口Analytical-2-Prep柱温箱、2998 PDA检测器、补充泵、六位馏分收集模块。此系统由ChromScope软件控制。

样品制备

外消旋(R, S)-甲霜灵标准品购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)。用甲醇分别配制1 mg/mL和20 mg/mL的标准品溶液用于分析进样和制备进样。

分析色谱法

分析分离采用Chiralpak IA-3(4.6 x 150 mm, 3 μ m)色谱柱。

结果与讨论

SFC纯化的第一步通常是对多个手性固定相和流动相进行梯度筛选。确定了对样品对映选择性最高的色谱柱条件和溶剂条件之后，需要将梯度方法转换为等度分离法。ACQUITY UPC²系统具有多色谱柱切换功能，提供四种共溶剂选择。采用这种技术可缩短分析时间，从而快速完成方法开发过程。采用IA-3色谱柱分离对映体获得了最高的分离度(图2)。因此我们选择了该色谱柱来进行后续的实验。

为了在制备型SFC上进行重迭进样以提高分析效率，我们必须采用等度分离条件。开发适当的等度方法时，我们需要认真考虑分离度和运行时间这两个会影响总体分析效率且互为竞争关系的因素。一般来说，共溶剂百分比越大，运行时间越短，但分离度也越低。此外，大体积进样也会影响制备色谱法的分离度。要建立成功的等度方法，我们往往需要通过实验确定合适的运行时间与分离度，使二者达到平衡。对于本实验，含4%共溶剂的等度洗脱液更适合分析级分析。

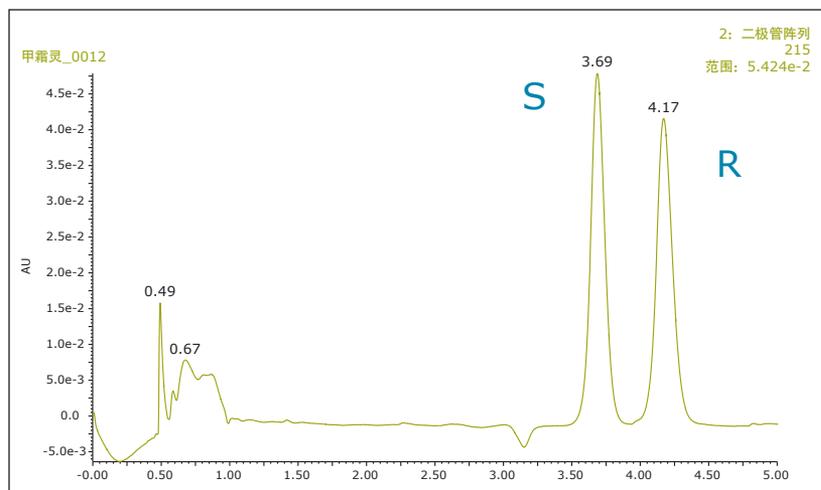


图2. 采用IA-3色谱柱的UPC² PDA提取波长色谱图(215 nm)。

放大

分析级分析与半制备级分析的参数差异主要来自于所用色谱柱颗粒的粒径不同 (3 μm 和 5 μm)，以及所用系统 (UPC²和Investigator系统) 的系统体积不同。我们根据这些差异对运行参数进行了相应调整，从而确定合适的分离度、上样量以及运行次数。

我们采用10-mm I.D. x 150 mm的IA色谱柱进行了上样量研究，以确定制备分析运行的最大上样量，实验结果如图3所示。我们采用的进样体积为20 μL 、40 μL 和80 μL 。上样体积为80 μL 时，甲霜灵对映体仍能获得良好的分离效果。因此，该方法的单次最大有效上样量为80 μL 或1.60 mg(换算为质量)。

重迭进样能够在不影响色谱效率的前提下提高分析效率。图4展示了(R,S)-甲霜灵(20 mg/mL)五次重迭进样的SFC色谱图，每次进样80 μL 浓度为20 mg/mL的外消旋溶液。五次重迭进样共耗时20分钟，纯化得到了8 mg对映体(每种对映体4 mg)。溶剂总用量为20 min x 8% x 12 mL/min = 约19 mL。由于色谱分析条件为等度条件，我们在前一次进样的色谱分析尚未完全结束时即进行下一次进样，这样就使得前一次进样的最后一个峰与随后进样洗脱出的第一个峰邻近。此外，大体积进样也会影响制备色谱法的分离度。通过上述连续进样法所得的色谱图中，色谱峰排布紧凑，充分说明该方法能够极大节省分析时间和溶剂。ChromScope软件可对进样和收集间隔进行管理，从而有效地预测和收集馏分。

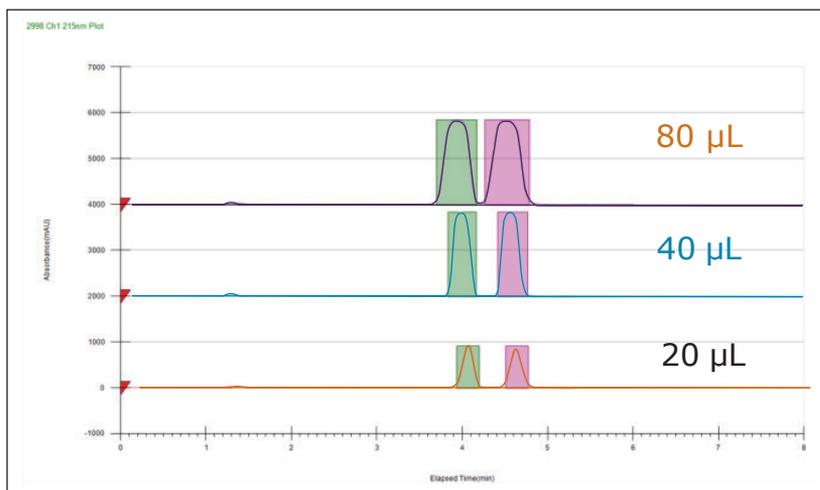


图3. (R,S)-甲霜灵的SFC色谱图，采用10-mm I.D. IA色谱柱，进样体积分别为20 μL 、40 μL 和80 μL ，样品浓度为20 mg/mL。

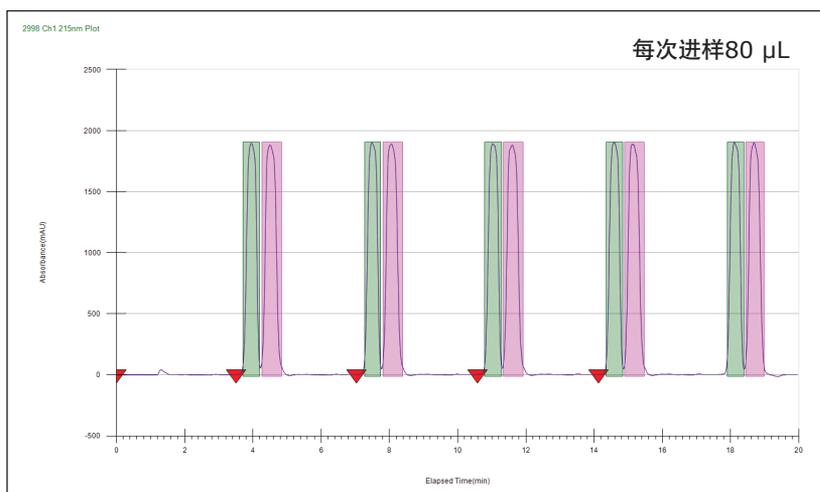


图4. (R,S)-甲霜灵样品五次重迭进样的SFC色谱图。阴影区域代表收集到的馏分，红色三角形是进样标记。

我们采用UPC²等度分析法分析收集到的两种馏分，以确认样品纯化结果，所得的色谱图如图5所示。两种馏分的纯度均>99%。然后采用市售甲霜灵-M((R)异构体)标准品来确认其绝对构型。

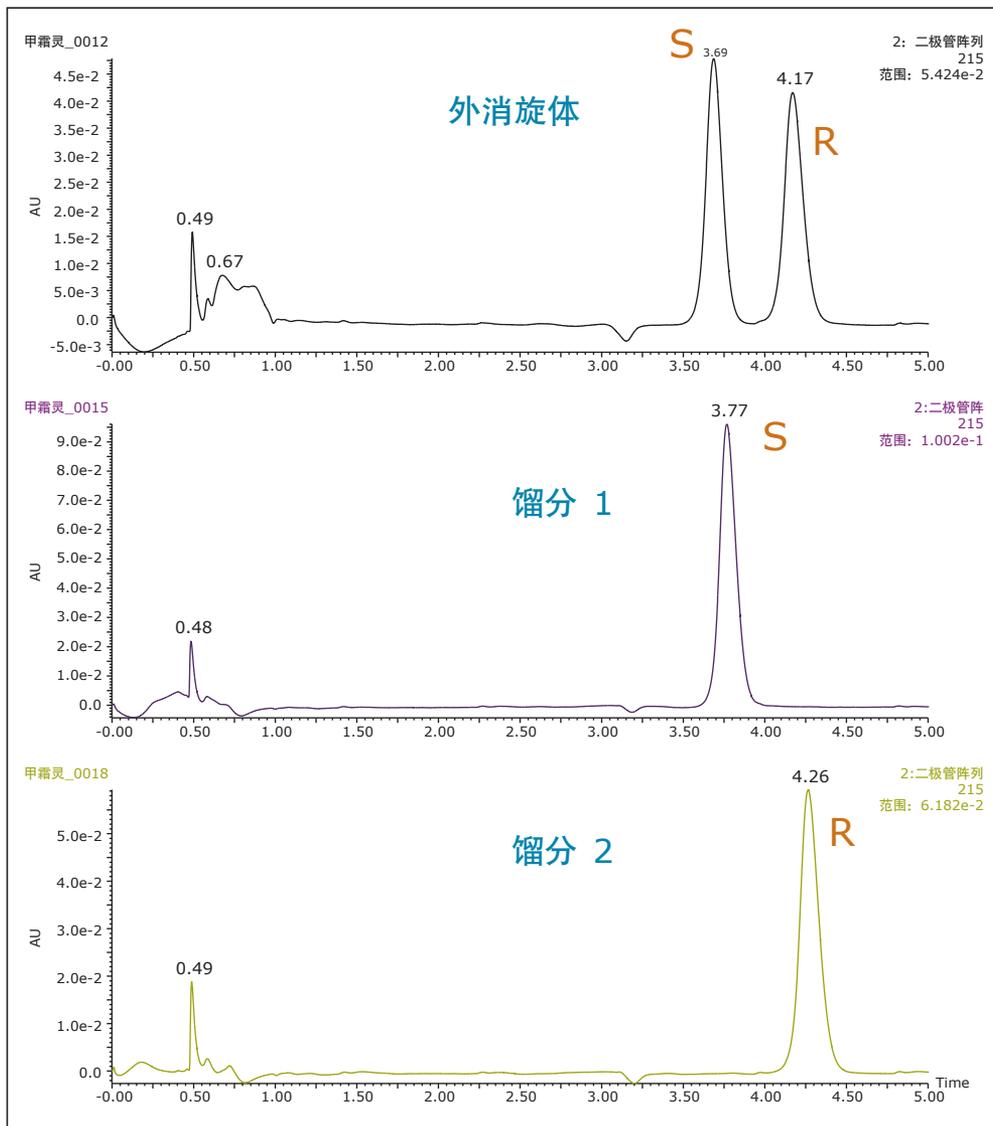


图5. 所收集馏分的分析级SFC色谱图，对映体纯度>99%。

结论

我们将外消旋甲霜灵作为模型化合物，采用Investigator SFC系统对其进行了分析，实验结果表明，该系统可实现单个平台上的手性分离和纯化，是应对此类分析挑战的强大分析工具。采用ACQUITY UPC²系统进行的手性筛选可快速确定用于分离R-和S-甲霜灵的最佳色谱柱。此外，我们还开发出了一种等度方法充分发挥重迭进样的优势，且该方法还能在维持分离度，保持合理运行次数以及最大上样量等合理原则的前提下轻松进行放大。采用SFC技术的重迭进样可实现24 mg/h的纯化效率，获得高纯度的甲霜灵对映体馏分，而其有机溶剂消耗量远低于传统LC纯化的有机溶剂消耗量。采用更长的重迭进样系列还可获得更多的纯化产物。通过结合UPC²与Investigator SFC系统，我们成功验证了将SFC应用于手性筛选、方法开发、放大以及采用重迭进样的小规模纯化制备时的完整工作流程，可完全满足人们日益增长的手性分离需求。该工作流程溶剂消耗量更少、干燥时间更短，可显著提高实验室分析通量，同时降低单个样品的处理成本²。

参考文献

1. Zadra C, Marucchini C, Zazzerini A. Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower plants (*Helianthus annuus*), *J Agric Food Chem.* 50(19): 5373–5377, 2002.
2. Chen, R. Mass-directed preparative SFC: An orthogonal toll with reduced liquid solvent usage for high throughput purification. Waters Application Note ([p/n 720003772en](#)) 2010.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPC², UPC², ACQUITY UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。ChromScope和UltraPerformance Convergence Chromatography是沃特世公司的商标。所有其它商标均为其各自所有者的资产。

©2015年 沃特世公司。印制于中国。2015年2月 720005312ZH 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