Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPC²によるピレスロイド系農薬のエナンチオマーおよびジアステレオマーの分離

John P. McCauley, Lakshmi Subbarao, and Rui Chen
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- UPC²® によるピレスロイド系農薬の高速高分離分析は、ガスクロマトグラフィー（GC）や液体クロマトグラフィー（LC）と比較してスループットが高く、高い分離能を提供します。
- CO_2 は粘性が低いためカラムの連結が容易で、ピレスロイド系農薬の異性体分析に必要な高効率のキラル分離が可能になります。UPC² による分析は容易で、分析法開発に重要である時間も短縮できます。
- ACQUITY UPC²™ システムはシステムボリュームが小さいため、粒子径 5 µm のキラルカラムを使用しても、HPLC や従来の SFC と比較し、より効率良くピレスロイド系農薬のジアステレオマーを分離することができます。また、粒子径 5 µm のキラルカラムを使用することで、UPC² から分取精製へのスケールアップが容易になります。

ウォーターズソリューション

ACQUITY UPC² システム
PDA 検出器
Empower® 3 ソフトウェア

キーワード

エナンチオマー、ジアステレオマー、キラル、農薬、ピレスロイド剤、Convergence Chromatography、UPC²

はじめに

ピレスロイド剤は天然のピレトリン類に似た合成化合物です。これらは殺虫剤や防虫剤として農業や一般家庭で使用されます。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤や、ニコチン性アセチルコリン作動薬である有機リン系やカルバメート系のような他の一般的な殺虫剤と異なり、ピレスロイド剤は神経系のナトリウムチャネルに作用することで殺虫効果を発揮します。種による代謝率の違いにより、ピレスロイド系農薬の多くは虫に対して適度な選択性を持っているため、哺乳類にとって比較的安全に使用することが可能な農薬です。[1]

多くのピレスロイド系農薬は、図 1 に示すような複雑な不斉中心を持っています。それぞれの立体異性体は、大きく異なる生物的活性を有しています。さらに多くの殺虫剤の環境中での劣化は酵素的であり、かつ立体配置により異なります。このため、キラル農薬の異性体比率の迅速で信頼性のある正確な分析が生成物の処方だけでなく、個々の農薬異性体の薬動態学、代謝、環境中の分析における研究において重要となります。

従来のピレスロイド系農薬のキラル分離は、キラル固定相（CSPs）による HPLC 法やキャピラリー電気泳動法（CE）、ガスクロマトグラフィー法（GC）[1] などにより行われてきました。近年、超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）がこれらの分析に使用され、分離の改善や分析時間の短縮を可能にしています。本アプリケーションノートでは Waters® ACQUITY UPC² を使用して複雑な立体異性体を有する 4 種のピレスロイド系農薬におけるエナンチオマーとジアステレオマーの分析例をご紹介します。

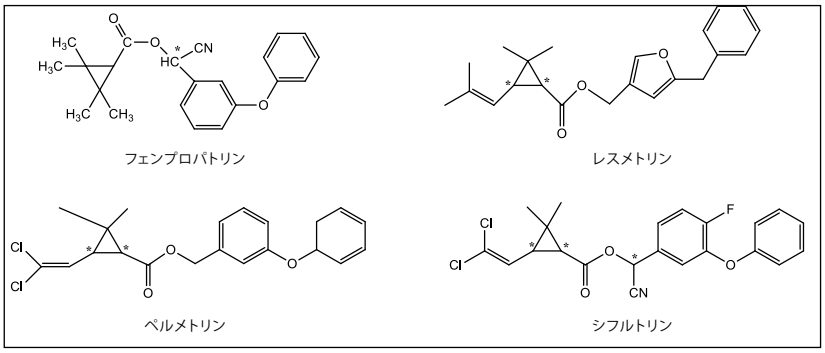

図 1. 使用したピレスロイド剤類の構造。＊キラルセンター（不斉中心）

実験方法

サンプル調整

農薬サンプルとして、図 1 に示す各化合物を Riedel-de Haën 社、Pestanal 社、Sigma 社と Fluka 社より入手しました。サンプルは、全てイソプロパノール (IPA) に溶解させ、分析に使用しました。

UPC²条件

システム： ACQUITY UPC²
検出器： PDA
カラム： CHRALCEL OJ-H (4.6 x 150 mm,5 µm)
CHIRALPAK IC (4.6 x 150 mm,5 µm)
(ダイセル社製)

データ解析

Empower3 ソフトウェア

他の主な分析条件は、各図の脚注に記載。

結果および考察

主なキラル分析の分析法開発は、固定相、共溶媒、添加剤のスクリーニングから始めます。フェンプロパトリンのスクリーニングの結果、より最適な条件としてカラムは OJ-H カラム、共溶媒はメタノールを選択しました。カラム温度を変えて分析したフェンプロパトリンの UPC² クロマトグラムを図 2 に示します。カラム温度の上昇により、超臨界流体 CO_2 の溶出力が減少し、保持時間が長くなります。これは、分析対象物と固定相のキラルセレクターとの相互作用がより大きくなることに起因し、結果としてより高い分離が得られます。温度は、アキラル SFC においても選択性を調節する第二のパラメーターであると認識されていますが、今回の分析例においてはキラル分離を劇的に変えることがわかりました。

さらに分離を改善するために他のパラメーターは変えずに流速を 1.5 mL/ 分に下げた結果、2 本のピークがベースライン分離 (Rs=1.67) し、図 3 に示すクロマトグラムが得られました。一般的に相互作用が保持に大きく関与する逆相 LC や順相 LC のアキラル分離に反して、SFC によるキラルクロマトグラフィーにおける保持は、分析対象物と固定相の複合的な相互作用に起因します。これらの相互作用は、流速、圧力、温度を含む一般的な実験パラメーターに依存します。従って、最大限の分離を得るためには、これらを体系的に検討することが重要です。

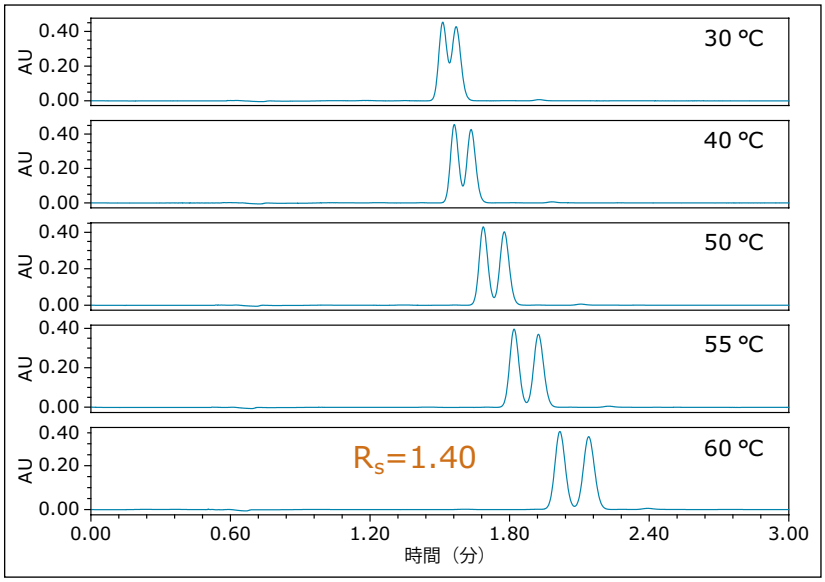

図 2. アイソクラティック (共溶媒 5%) 条件下で OJ-H (4.6 x 150 mm, 5 µm) カラムを用いて、異なる温度で分析したフェンプロパトリンの UPC² クロマトグラム。流速は 3 mL/ 分。出口圧力は 120 bar。共溶媒はメタノール。

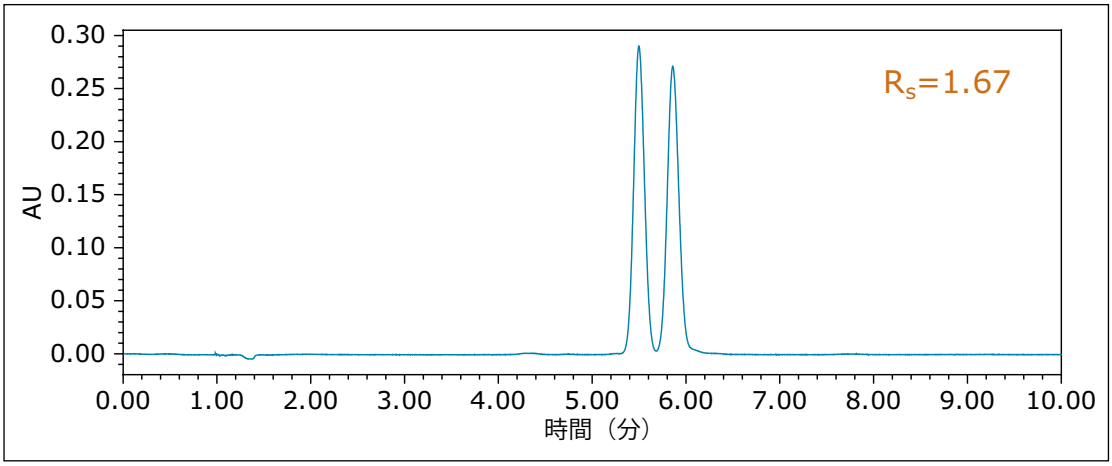

図 3. アイソクラティック（共溶媒 5%）条件下で OJ-H カラム（4.6 x 150 mm, 5 µm）を用いて、分析したフェンプロパトリンの UPC² クロマトグラム。流速は 1.5 mL/ 分。出口圧力は 120 bar。共溶媒はメタノール。カラム温度は 60 ℃。

図 4 は 2 つのキラルセンター（不斉中心）を持つピレスロイド系農薬の一種であるペルメトリンの UPC² による分離を示しています。OJ-H カラム（4.6 x 150 mm, 5 µm）を使用した分析において 4 つの異性体が 4 分以内に溶出し、ベースライン分離しました。分析時間に 100 分もかかる GC による分析では 4 つの異性体の内、3 つまでしか分離できず、[2] また、逆相 LC および順相 LC のどちらの分析においても、完全に分離することはできませんでした。[3]

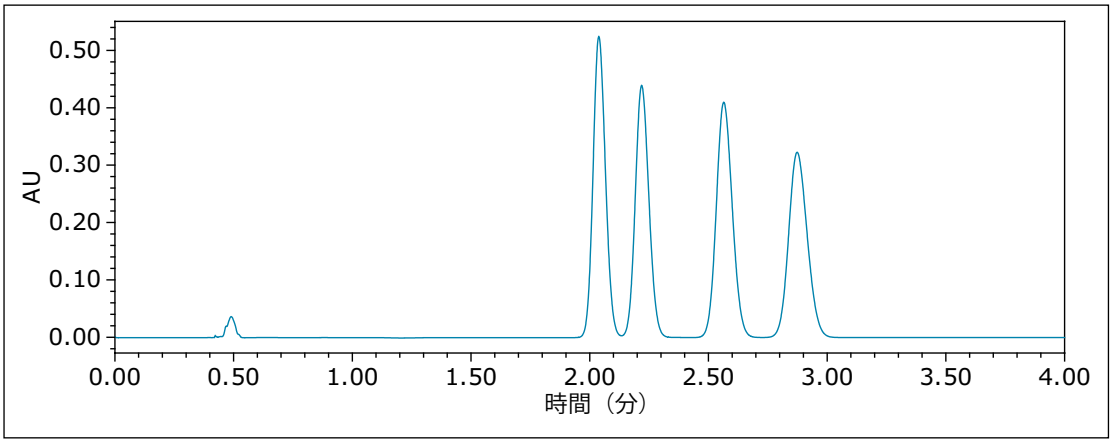

図 4. アイソクラティック（共溶媒 7%）条件下で OJ-H カラム（4.6 x 150 mm, 5 µm）を用いて、分析したペルメトリンの UPC² クロマトグラム。流速は 4 mL/ 分。出口圧力は 120 bar。共溶媒はイソプロパノール。カラム温度は 40 ℃。

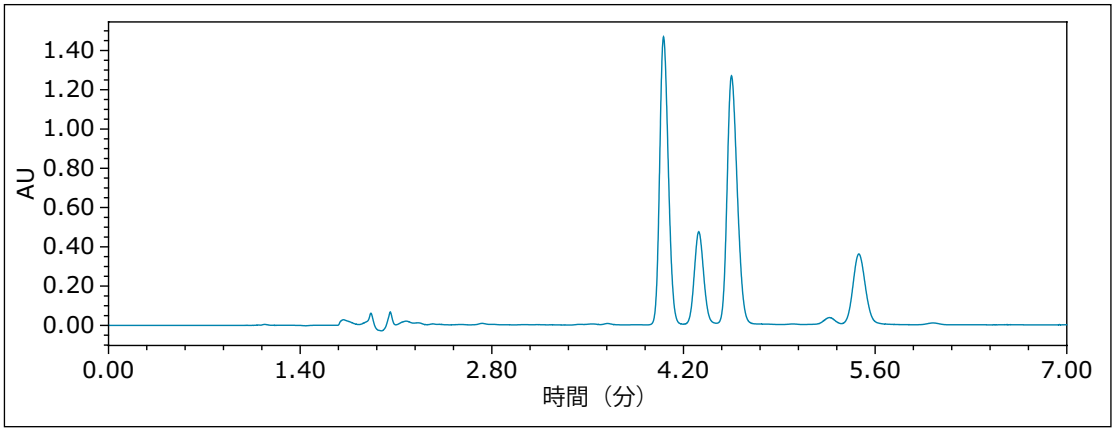

図 5. アイソクラティック（共溶媒 15%）条件下で 2 本の OJ-H カラム（4.6 x 150 mm, 5 µm）を直列に連結し、分析したレスメトリンの UPC² クロマトグラム。流速は 2 mL/ 分。出口圧力は 120 bar。共溶媒はイソプロパノール。カラム温度は 30 ℃。

2 つの不斉中心を持つ別のピレスロイド系農薬であるレスメトリンの UPC² による分離を図 5 に示しました。ペルメトリンとレスメトリンは類似構造であるにもかかわらず、レスメトリンの 4 つの異性体をベースライン分離するためには、2 本の OJ-H カラムを直列に連結し、流速を下げる必要がありました。クロマトグラフの分離改善において、カラム長を長くすることは最も基本的で容易な手段の一つです。カラムの選択性や保持力が分離の改善に不十分な場合、SFC の分離調整のためにカラムの連結が用いられます。[4-5] HPLC と比較して、SFC には次に述べるような特徴的な利点があります。一般的な SFC 条件下では、超臨界流体 CO_2 の粘性は、一般的に HPLC で使用される有機溶媒に比べ、10 ～ 100 倍低くなります。そのため、高いカラム効率を得るためにカラムを長くしても、背圧が上がりにくいため容易にカラムを連結することができます。

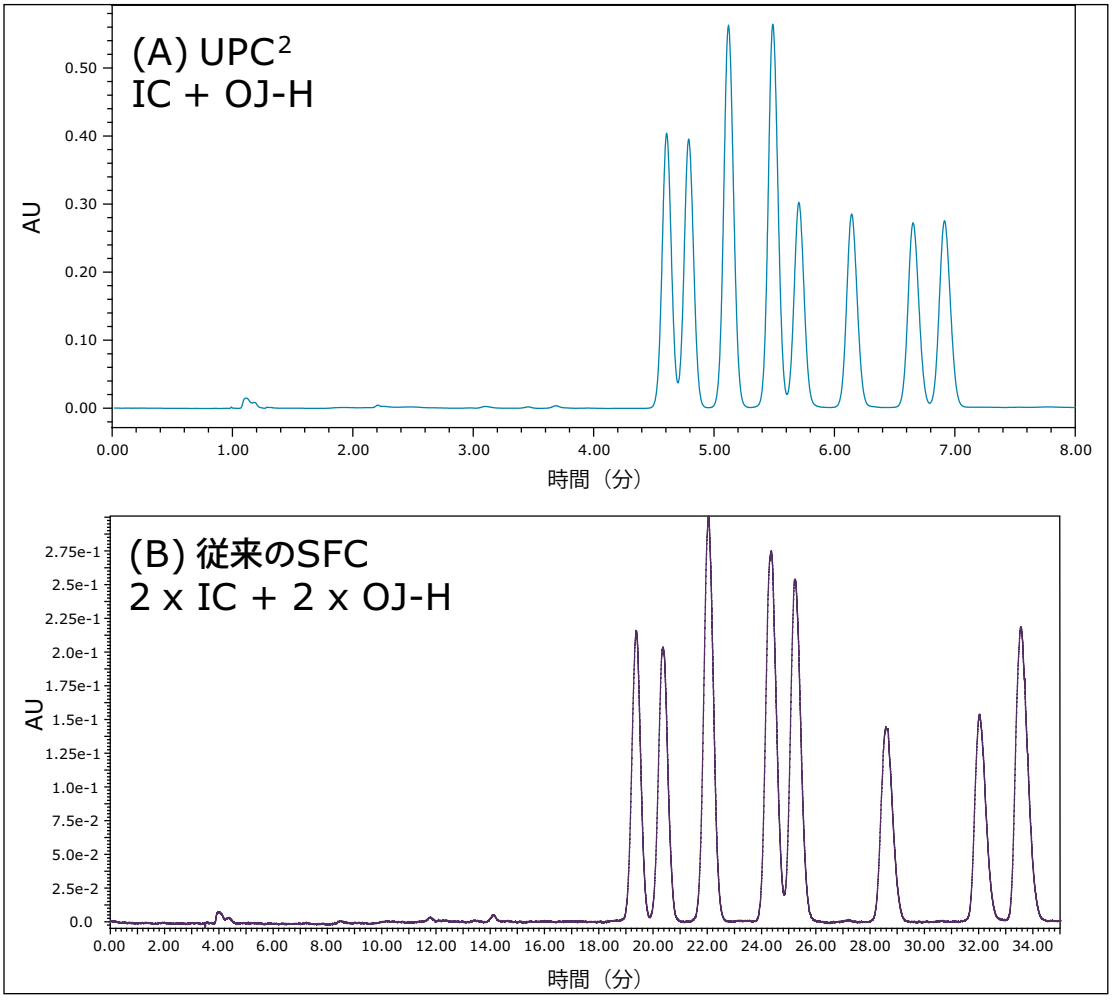

図 6. シフルトリンの UPC² および SFC のクロマトグラム。UPC² の分析では、共溶媒にイソプロパノールを使用し、流速は 3.5 mL/ 分、カラム温度は 50 ℃。出口圧力は 120 bar。グラジエントは 4.5% → 6%, 3 分間、その後 6% → 10%, 4 分間、さらに、10% で 1 分間ホールド。分析時間は 8 分。SFC クロマトグラムでは、共溶媒はイソプロパノールを使用し、流速は 3 mL/ 分、カラム温度は 45 ℃。出口圧力は 120 bar。グラジエントは始めの 0.5 分間 , 4% をホールドし、その後、4% → 6%, 29 分間、さらに 6% で 5 分間ホールド。分析時間は 35 分。

図 6 は UPC² と従来の SFC システムによる 3 つの不斉中心を持つピレスロイド系農薬であるシフルトリンのジアステレオマー分離を示しています。両システムでは類似した分離が得られました。UPC² システムにおいては、2 本のカラムの連結（総カラム長は 300 mm）のみですが、従来の SFC システムにおいては、総カラム長が 800 mm となる 4 本のカラムの連結が必要でした。UPC² はシステムボリュームが小さいため、ピーク拡散を低減することで、ピーク形状をよりシャープにし、高分離で分析時間も大幅に短縮しています（従来の SFC では 35 分かかっている分離が UPC² では 8 分）。シフルトリンの分離は、2 種類のカラムの連結をしています。異なるカラムケミストリーを連結することで、それぞれのカラムが異なる分離を提供するため、結果として 8 個の全ての異性体を同時分離することが可能です。この時のカラムの連結は、図 5 に示すようなカラム長の延長ではなく、異なる選択性を持つカラムの連結になります。

結論

本アプリケーションノートでは、UPC^2 を使用して複雑な立体異性体を有するピレスロイド系農薬のキラル分離を紹介しました。キラル分離の特徴として、希望する分離を得るためには温度や流速などのクロマトグラフパラメーターの検討を体系的に進めることが重要です。この結果で得られた分離は、カラム温度による影響を受けやすく、カラム温度の最適化が分析法開発において重要なステップとなっています。超臨界 CO_2 は粘性が低いため、ピレスロイド系農薬の異性体分離に要求される高効率なキラル分離のための同種または異種のカラムケミストリ間の連結を容易にします。最後に、UPC^2 はシステムボリュームが小さいため、従来の SFC と比べ、より高速で効率的なピレスロイド系農薬のジアステレオマーの分離を可能にします。

参考文献

1. Perez-Fernandez A, Garcia MA, Marina ML. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *J Chrom A*. 2010; 1217: 968-989.
2. Qin S, Budd R, Bondarenko S, Liu W, Gan J. Enantioselective Degradation and Chiral Stability of Pyrethroids in Soil and Sediment. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:5040.
3. Yan GS, Parrilla-Vazquez P, Garrido-Frenich A, Martinez-Vidal JL, Aboul-Enein HY. Chiral Separation of Several Pyrethroids on Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases Under Normal and Reversed Phase Modes. *J Liq Chromatogr Rel Technol*. 2004; 27: 1507.
4. Phinney KW, Sander LC, Wise SA. Coupled Achiral/Chiral Column Techniques in Subcritical Fluid Chromatography for the Separation of Chiral and Nonchiral Compounds. *Anal Chem*. 1998; 70: 2331-2335.
5. Barnhart WW, Gahm KH, Thomas S, Notari S, Semin D, Cheetham J. Supercritical fluid chromatography tandem-column method development in pharmaceutical sciences for a mixture of four stereoisomers. *J Sep Sci*. 2005; 28: 619–626.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、UPC^2 および Empower は Waters Corporation の登録商標です。
ACQUITY UPC^2 および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan.

2013年5月 720004530JA PDF