

使用ACQUITY UPC²系统和ACQUITY QDa检测器对农药制剂进行手性和非手性分析

Marian Twohig¹, Michael O'Leary¹, John P. McCauley²和Rui Chen²

¹沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德)

²沃特世公司 (美国特拉华州纽卡斯尔)

应用优势

- 可在同一套系统中进行手性和非手性方法开发及样品分析。
- 与正相分离相比，提高了对映体和非对映体之间的分离度，缩短了分析时间，从而实现了更高的样品通量。
- 实现对映体和/或非对映体比率的可靠、可重现测定。
- 可对结构相似的组分进行检测和手性分辨。

沃特世解决方案

ACQUITY® UltraPerformance Convergence Chromatography™ 系统 (UPC²®)

ACQUITY UPLC® 光电二极管阵列 (PDA) 检测器

ACQUITY QDa检测器

ACQUITY UPC²™ BEH色谱柱

Empower® 3色谱数据软件

关键词

手性农药，UPC²，对映体，非对映体，手性分离，手性拆分，丙环唑，三唑类杀菌剂，SFC，超临界流体色谱，QDa®

简介

新农药制剂的研发核心是针对靶生物设计出高效且具有特异性的措施，同时降低产品使用量¹。据估计，目前市场上30%的农药具有光学异构体^{2,3}。然而，光学异构体混合物中往往只有一种对映体具备所需活性⁴。因此，评估制剂中手性活性成分的对映体纯度至关重要^{1,5}。此外，制剂中其它组分的检测、鉴定和定量为产品注册提供了必不可少的支持。

在手性固定相 (CSPs) (例如直链淀粉和纤维素等多糖固定相) 上使用液相色谱 (LC) 一直是最常用的手性分离技术⁶⁻⁹。最近，CSP上的超临界流体色谱 (SFC) 越来越多地用于手性分离^{10,11}。利用超临界流体的特性，特别是高扩散性和低粘度，可以实现高效手性分离并缩短运行时间。以丙环唑等三唑类杀菌剂 (结构如图1所示) 为例，它们对农作物疾病具有广泛且强效的活性，因而是一类常用的农药。使用HPLC方法时，丙环唑非对映体分离时间在34到50分钟之间^{1,6-8}。采用SFC获得了类似的分离度，但是分析时间缩短至10分钟¹¹。

超高效合相色谱 (UPC²) 将UPLC® 的性能优势充分应用到SFC中，并且结合了超临界CO₂和亚2 µm颗粒色谱柱^{12,13}。UPC²作为反相LC的正交分析技术，可用于解决复杂的分离难题。

在本应用纪要中，我们介绍了利用UPC²结合UV和质谱检测器对含有三唑类农药制剂进行分析的方法。Waters® ACQUITY QDa检测器是一款创新型质谱检测器，它可以整合到现有的液相色谱配置中，在提高灵敏度的同时补充UV检测器的检测结果。

实验

仪器

所有分离都在一套配备ACQUITY UPC²光电二极管阵列 (PDA) 和正离子电喷雾质谱 (使用ACQUITY QDa检测器) 的Waters ACQUITY UPC²系统上进行。使用Empower 3 FR2软件进行数据采集和处理。

样品制备

农药确证标准品采用50:50乙腈/水配制而成。称取2克 (g) 市售农药制剂, 加入8 mL的50:50 (v/v) 乙腈/水。将所得混合物超声处理10 min, 并使用0.2 µm PVDF滤膜将样品通过注射式过滤器过滤到自动进样器样品瓶中, 准备进行样品分析。

UPC²条件

非手性分离

分离模式: 梯度
色谱柱: ACQUITY UPC² BEH,
3.0 × 100 mm, 1.7 µm
共溶剂 (B): 甲醇
ABPR: 1990 psi/137 bar
流速: 1.5 mL/min
UV检测: 220 nm
柱温: 35 °C
进样体积: 0.5 µL
制剂A非手性梯度条件:
0 min 3% B, 4 min 30% B, 6 min 30% B, 然后返回到初始条件。

手性分离

分离模式: 梯度
色谱柱: 直链淀粉手性柱,
3.0 × 150 mm, 2.5 µm
共溶剂 (B): 50:50 2-丙醇/乙醇
ABPR: 1990 psi/137 bar
流速: 2.0 mL/min
UV检测: 220 nm
进样体积: 1 µL

MS条件

MS系统: ACQUITY QDa检测器
电离模式: ESI+
毛细管电压: 0.8 kV
锥孔电压: 10 V
脱溶剂气温度: 600 °C
源温度: 150 °C
MS扫描范围: 100至600 m/z
采样速率: 5 Hz
补液溶剂: 含0.1%氢氧化铵的98:2
甲醇/水, 0.3 mL/min

PDA条件

检测器: ACQUITY UPC² PDA
波长范围: 210至400 nm
采样速率: 20 Hz

MS数据与UV响应结合后，分析人员可在单次分析运行中测定更多的分析物，同时可获得更可靠的结果。

首先，将制剂样品在亚2 μm 固定相上进行非手性分离，然后在2.5 μm 手性CSP上进行手性分离，鉴别出了活性成分（AI）的一个次要异构体。进一步的手性分析表明，次要异构体和AI具有相似的手性。

结果与讨论

MRM和全扫描MS技术概述

图2为使用ACQUITY UPC² BEH色谱柱得到的丙环唑标准品（下图）和制剂样品（上图）的ACQUITY UPC²色谱图。制剂样品中峰1和峰2的保留时间与丙环唑标准品一致。这两个峰对应的是丙环唑非对映体。然而值得注意的是，制剂中观察到了两个次要峰（峰3和4），保留时间（ t_R ）分别为2.22 min和2.26 min。

峰3和峰4的UV谱图与峰1和峰2的UV谱图类似（图2），说明它们的结构相似。此外，四个峰得到的质谱图相同，基峰为 m/z 342，并且具有二氯化物的同位素分布特征。质量数与质子化丙环唑匹配。

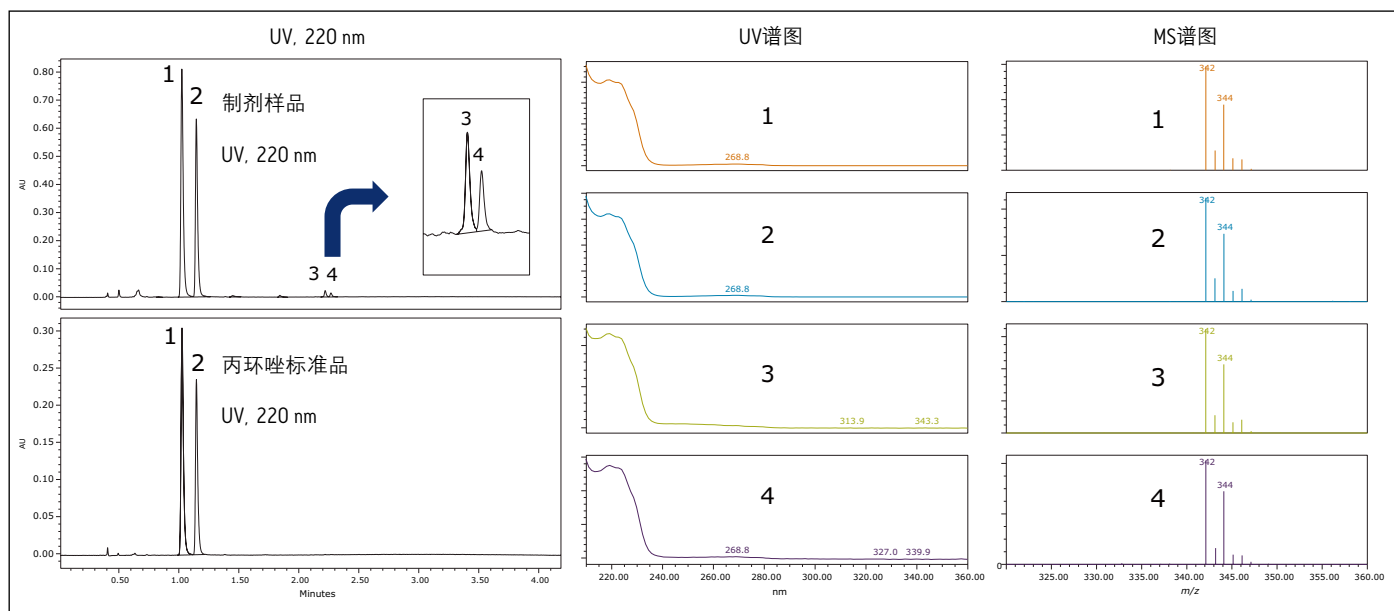
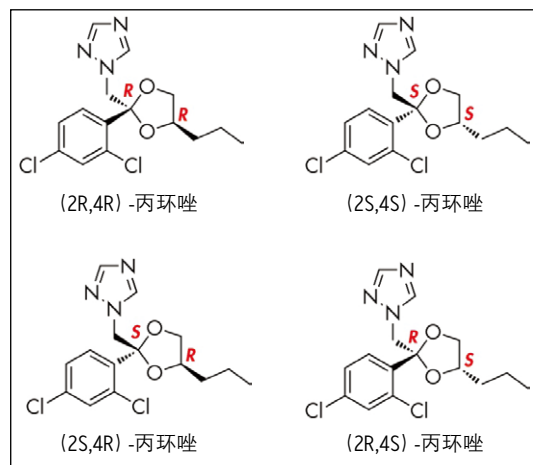


图2. 220 nm波长下使用ACQUITY UPC² BEH色谱柱对制剂样品和丙环唑标准品中的丙环唑进行ACQUITY UPC² UV非手性分离。图中还显示了峰1-4的UV和MS谱图。

ACQUITY UPC²系统具有多色谱柱转换功能，最多能提供四种共溶剂选择，因而可以便捷地在同一系统上进行手性和非手性方法开发及样品分析。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。

图3为使用梯度分离在直链淀粉手性色谱柱上得到的丙环唑标准品和制剂样品的ACQUITY UPC²色谱图。图2中观察到的两个丙环唑非对映体峰被分离成四个单独的峰（1-4）。值得关注的是，图2中的两个次要异构体峰也以类似方式被分离成四个单独的峰（5-8），说明丙环唑和次要组分具有相似的手性。

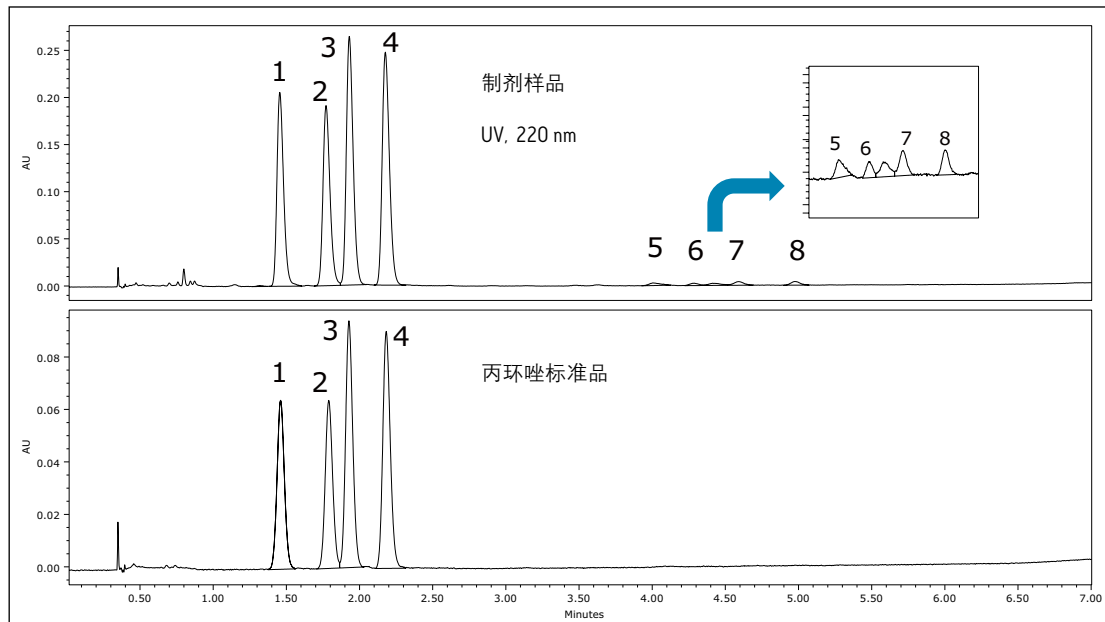


图3. 使用直链淀粉手性色谱柱对制剂样品中的丙环唑立体异构体和未知手性组分进行手性分离的220 nm处ACQUITY UPC² UV色谱图。图中还显示了丙环唑标准品。

Empower软件质谱分析窗口中的制剂样品数据分析显示，所有八个峰均有相似的UV谱图和相同的MS谱图（图4和5）。Empower 3软件的质谱分析窗口中特别提供了一个位置，用于将分析中所有检测器得到的色谱峰与其对应光谱相关联。检出峰的光谱经时间校准后将显示在色谱图上方的窗口中。

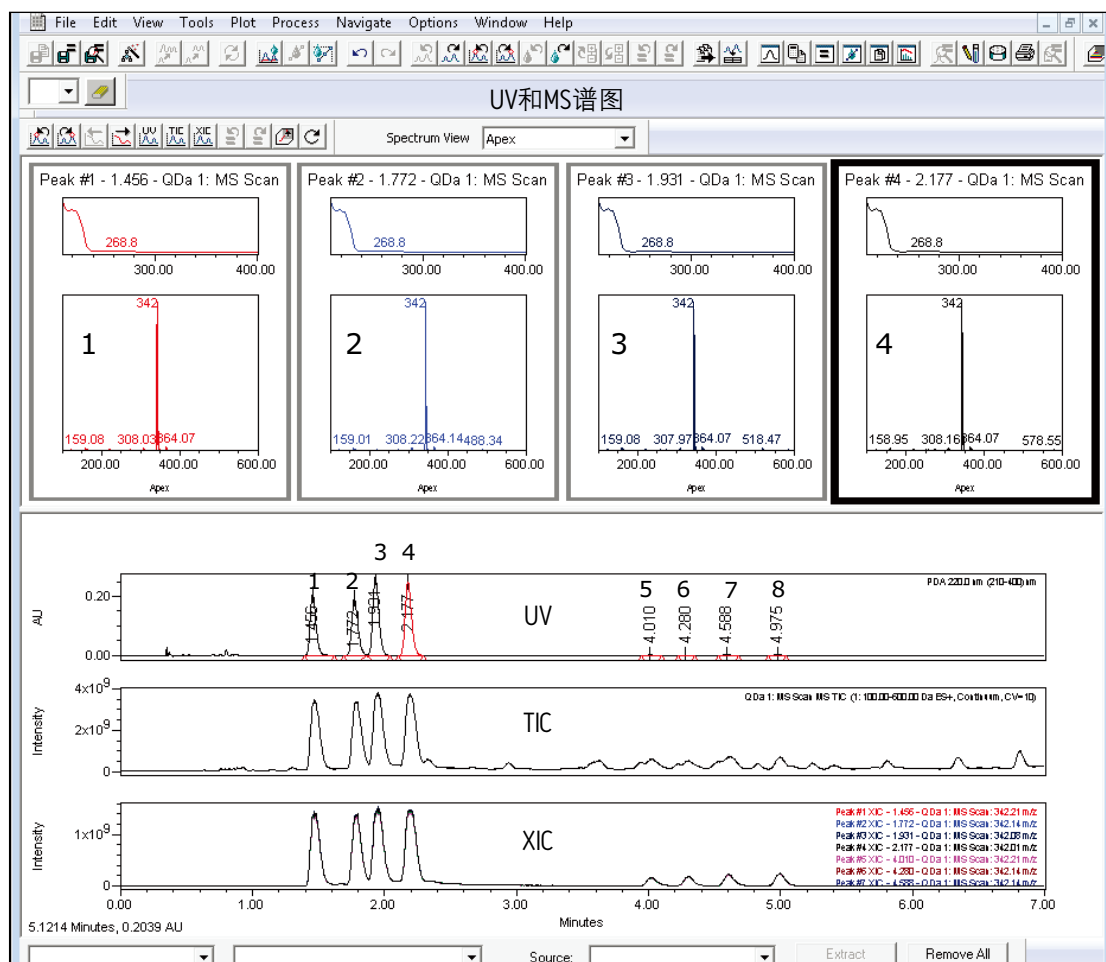


图4. 借助Empower软件的质谱分析窗口，可将UV和MS谱图，UV和质谱图，以及提取离子色谱图（XIC）同时显示在一个窗口中。

制剂样品的UV色谱图和MS总离子流色谱图（TIC）中显示的基质组分可以通过提取离子色谱图（图5）与目标异构体峰进行明确区分。通过将质谱检测与UV检测相结合来测定手性农药的对映体纯度，同时提高检测灵敏度和方法选择性。

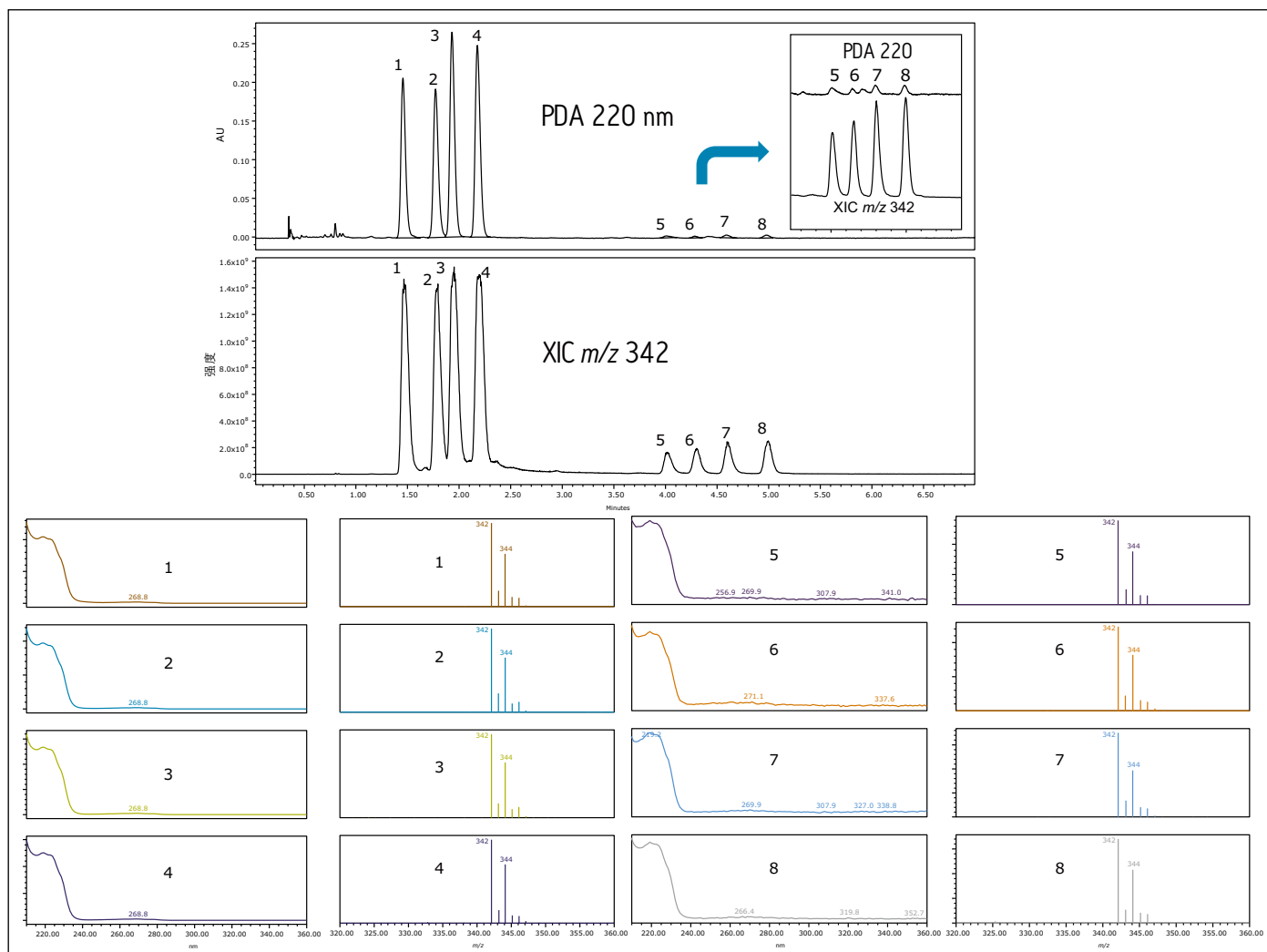


图5. 使用直链淀粉手性色谱柱对制剂样品中的丙环唑立体异构体和未知手性组分进行手性分离的220 nm处ACQUITY UPC² UV色谱图。图中还显示了m/z 342的XIC以及每个峰的UV和MS谱图。

通过观察结果，我们推测次要组分是丙环唑的一种区域异构体。Glaser等人对一种来自三唑环上一个氮原子的丙环唑区域异构体进行了表征¹⁴。目前正在通过进一步实验分离这种化合物以进行阳性鉴别。

结论

在本研究中，农药制品的非手性筛查结果显示，使用UV和质谱检测器检出的次要组分与AI丙环唑具有相似的结构特征。这些次要组分的 m/z 相同，并且其同位素分布与三唑类杀菌剂AI相同。接下来对制剂中的丙环唑进行手性分离，同时结合质谱和UV检测，得到了有价值的谱图信息，从而将次要组分表征为可能的立体异构体。

质谱检测的加入可作为一种补充性分析检测技术，用以提高化合物检测和识别的可靠性。ACQUITY QDa检测器提供了一种经济有效的手段，成功将质谱检测融入之前依赖于低选择性检测的常规实验室分析中。

ACQUITY UPC²系统具有多色谱柱转换功能，可使用手性和非手性两种色谱柱，并可选择四种兼容MS分析的共溶剂。手性和非手性方法开发及分析可在同一系统上进行。这些方法使用超临界CO₂作为主要流动相。与正相分离相比，大量使用具有潜在有害溶剂的需求降低，同时也削减了溶剂弃置处理产生的成本。

与传统的正相分离相比，ACQUITY UPC²系统可实现高效分离，增加样品通量^{1,6-8}。利用UPC²进行丙环唑的非对映体分离只需不到3分钟，比现有文献中的正相分离方法至少快10倍。

此前，由于手性化合物难以分离，对映选择性研究面临着严峻挑战。通过更快速的分析方法分离手性化合物的优势在于，我们能更迅速地获得有关立体选择性行为的关键信息，从而提高实验室工作效率。

参考文献

1. V Perez-Fernandez, M A Garcia, M L Marina. Chiral separation of agricultural fungicides. *J Chrom A*. 1218: 6561-6582, 2011.
2. B S Sekhon. Chiral pesticides. *J Pestic Sci*. 34,1: 1-12, 2009.
3. W P Liu. Pesticide Environmental Chemistry. Chemical Industry Press, Beijing, China. 341-343, 2006.
4. A Williams. Opportunities for chiral agrochemicals. *J Pestic Sci*. 46: 3-9, 1996.
5. EU Commission Regulation No 544/2011. (2011) [cited 2013 October 20]. Available from: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:155:0001:0066:EN:PDF>
6. H Zhang, M Quian, X Wang, X Wang, H Xu, Q Wang, M Wang. HPLC-MS/MS enantioseparation of triazole fungicides using polysaccharide based stationary phases. *J Sep Sci*. 35: 773-781, 2012.
7. Y Zhou, L Li, K Lin, X Zhu, W Liu. Enantiomer separation of triazole fungicides by high performance liquid chromatography. *Chirality*. 21: 421-427, 2009.
8. J Ye, J Wu, W Liu. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 28, 10: 1148-1163, 2009.
9. P Wang, S Jiang, D Liu, P Wang, Z Zhou. Direct enantiomeric resolutions of chiral triazole pesticides by high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods*. 62: 219-230, 2005.
10. L Jin, W Gao, H Yang, C Lin, W Liu. Enantiomeric resolution of five chiral pesticides on a chiralpak IB-H column by SFC. *J Chrom Sci*. 49: 739-743, 2011.
11. L Toribo, M J del Nozal, J L Bernal, J J Jimenez, C Alonso. Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography. *J. Chrom. A*. 1046: 249-253, 2004.
12. A Grand-Guillaume, J L Perrenoud, D Guillaume. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds. *J Chromatogr A*. 1266: 158, 2012.
13. C Hamman, W Mengling, I Aliagas, D F Ortwin, J Pease, DE Schmidt Jr Victorino. The evaluation of 25 chiral stationary phases and the utilization of sub-2.0 μ m coated polysaccharide chiral stationary phases via super critical fluid chromatography. *J Chrom A*. 1305: 310-319, 2013.
14. R Glaser, I Adin, D Ovadia, E Mendler, M Drouin. Solid-state structure determination and solution-state NMR characterization of the (2R,4R)/(2S,4S)- and (2R,4S)/(2S,4R)-diastereomers of the agricultural fungicide propiconazole, the (2R,4S)/(2S,4R)-symmetrical triazole constitutional isomer, and a ditriazole analogue. *Structural Chem*. 6, 3: 145-156, 1995.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, Empower, The Science of What's Possible, UPC²和UPLC是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC²和UltraPerformance Convergence Chromatography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。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。2014年3月 720004977ZH 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 6555
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