

使用制备型SFC分离市售杀菌剂制剂中的痕量杂质用于结构解析

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

应用优势

- 超临界流体色谱(SFC)速度快、效率高, 并且因为溶剂消耗量少, 非常环保。
- 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。
- ACQUITY UPC²®系统可提高对映体与非对映体之间的分离度, 缩短分析时间。

沃特世解决方案

[ACQUITY® UltraPerformance Convergence](#)

[Chromatography System™\(UPC²®\)](#)

[SFC 80q制备型系统](#)

[Prep 100q SFC系统](#)

[2489紫外可见光\(UV/Vis\)检测器](#)

[2998 PDA检测器](#)

[ACQUITY UPC² BEH色谱柱](#)

[ACQUITY UPC² Trefoil™ AMY1色谱柱](#)

[Viridis® SFC色谱柱](#)

[MassLynx®软件](#)

[SQ检测器2](#)

关键词

农药, SFC, 杀虫剂, 手性纯化, 对映体, 丙环唑, 三唑类杀菌剂, 杂质鉴别, 痕量杂质, NMR, 结构表征

简介

由于合成产品中的痕量杂质可与人类最终用户发生相互作用并且可能具有不良的环境归趋, 各政府机构(如FDA和EPA)均对它们实施了监管。因此, 杂质分离及其结构鉴定便成为了制药、农药、食品和消费品等行业的研究重点。完整的化学鉴定需要使用高分辨率质谱(HRMS)对已分离的化合物进行结构解析。然而, 仅依靠MS通常不足以明确鉴定出化合物, 尤其是当化合物中存在异构体时。我们通常需要利用纯化步骤分离出纯的化合物, 然后采用核磁共振波谱法做进一步研究。

在本应用纪要中, 我们介绍了如何使用制备型超临界流体色谱执行对痕量杂质进行完全结构解析的工作流程, 达到分离痕量杂质的目的。我们以市售的丙环唑杀菌剂制剂为样品来展示该工作流程¹。丙环唑可能存在若干立体异构体结构。本研究使用的丙环唑产品含有异构体(图1)和浓度约为1%的相关痕量杂质(图2)。部分丙环唑杂质已在此前进行了结构鉴定²。本文介绍的基于SFC的工作流程是一种通用的杂质分离技术, 具有速度快、效率高、干燥和周转时间短, 以及溶剂消耗量少、环保等许多优势³。

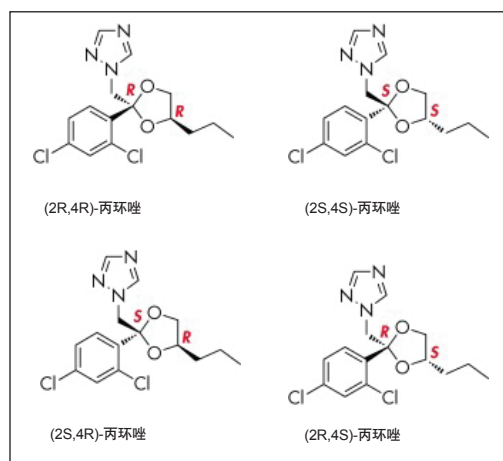


图1.丙环唑立体异构体的结构。

实验

样品制备

使用二氯甲烷 (DCM) 和5%的碳酸氢钠溶液 (NaHCO₃), 通过液液萃取法从含有1.55%丙环唑及其痕量杂质的市售制剂中提取出代表性样品。

分析型色谱和制备型色谱的条件

(见表1)

质谱检测条件为: 采用沃特世SQD2, ESI模式, 扫描范围200~700 Da, 毛细管电压3 kV, 锥孔电压30 V, 离子源温度150 °C, 脱溶剂气温度450 °C, 提取 342 Da, (M+H)⁺处的离子。

NMR方法

在欧道明大学(弗吉尼亚州诺福克)的COSMIC实验室采用 Bruker Avance III核磁共振谱仪在400 MHz条件下采集¹H ¹³C和2D核磁共振谱。根据2D COSY谱(二维相关谱)中的化学位移、分裂模式、峰积分、耦合常数、耦合模式以及在碳重数的HSQC谱(异核单量子相干谱)中观察到的碳-质子单键耦合相关性进行匹配。在2D NOESY谱(二维核欧佛豪瑟效应频谱)中观察到了三唑化合物的碳11和碳14的质子与碳6的质子之间的NOE(核欧佛豪瑟效应)。在1D NOE谱中观察到了同样的NOE信号, 并且ACQUITY UPC² BEH色谱柱的杂质峰1具有三唑化合物质子的选择性辐射。在杂质峰2中没有观察到同样的NOE信号。

	非手性UPC ² 分析	手性UPC ² 分析	非手性SFC 80 Prep	手性SFC 100 Prep
分离模式	等度	等度	等度	等度
色谱柱	甲醇 6%甲醇的CO ₂ 溶液	ACQUITY UPC ² Trefoil AMY1 3.0 x 150 mm, 2.5 μm	沃特世Viridis BEH 19 x 150 mm	Chiralpak IC或AD-H 30 x 150 mm
助溶剂/方法条件	甲醇 6%甲醇的CO ₂ 溶液	2-丙醇/乙醇 10% iPrOH/EtOH的CO ₂ 溶液	甲醇 5%甲醇的CO ₂ 溶液	甲醇 IC:18%甲醇的CO ₂ 溶液 AD-H:6%甲醇的CO ₂
ABPR	120 bar	137 bar	120 bar	120 bar
流速	1.5 mL/min	2.0 mL/min	70 mL/min	100 mL/min
UV检测	222 nm	222 nm	222 nm	222 nm
柱温	40 °C	45 °C	40 °C	40 °C

表1.分析型UPC²和制备型色谱条件汇总。SFC 80q制备型系统和Prep 100q SFC系统的使用基于本研究所用色谱柱的尺寸。

结果与讨论

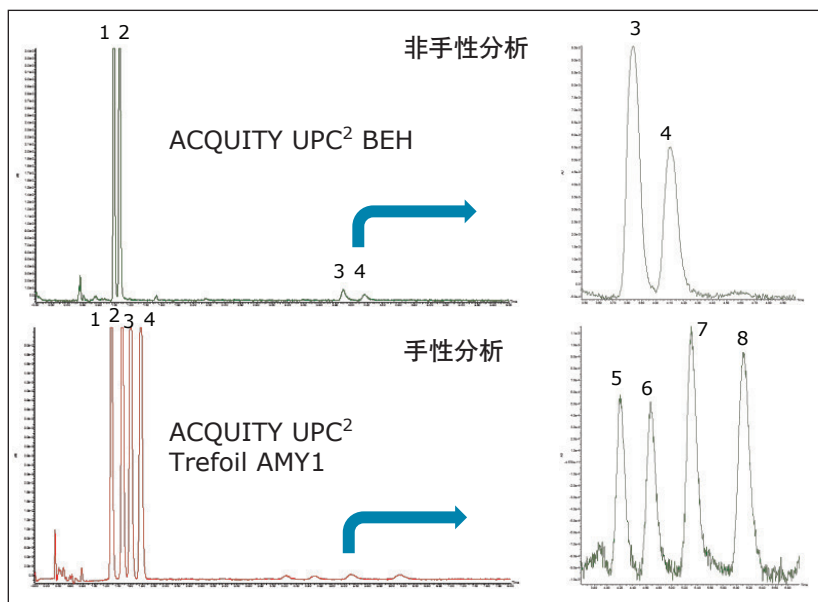


图2. 使用ACQUITY UPC² BEH色谱柱对农药制剂样品中的丙环唑进行非手性UPC²分析, 得到了两个丙环唑峰和两个杂质峰(高痕量)。低痕量: 使用ACQUITY UPC² Trefoil AMY1 色谱柱进行非手性分析, 得到四个丙环唑峰和四个痕量杂质峰。

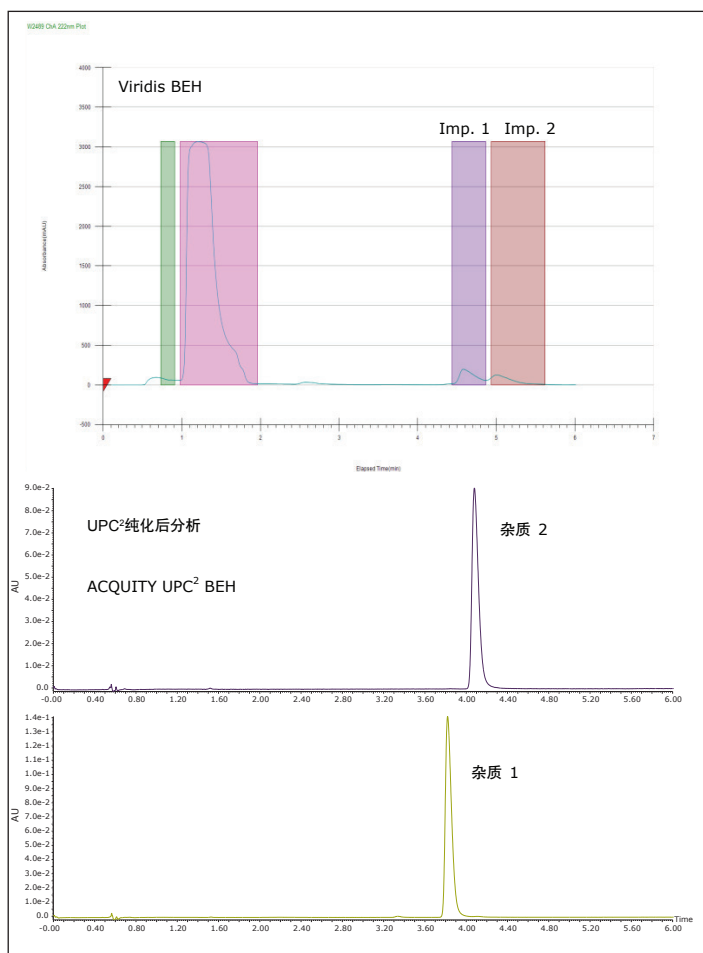


图3. 使用内径为19 mm的Viridis BEH色谱柱对痕量杂质峰进行制备型收集(高痕量)。使用UPC²分析两个批次的SFC 80q制备所得的两个杂质峰, 结果表明收集到的每种杂质馏分的纯度均>98%(低痕量)。

市售杀菌剂制剂(150 mL)中含有浓度为1.55%的活性成分丙环唑, 将该制剂悬浮于5% NaHCO₃ 溶液中, 然后采用DCM进行三次萃取。将混合的提取物用硫酸钠(Na₂SO₄)干燥, 过滤, 然后浓缩。4.5 g粗提取物中除了含有预期含量为2.3 g的活性成分(AI)之外, 还包括各种表面活性剂等其它非活性成分。然后使用UPC²分析这些粗提取物。在非手性和手性模式下(图2)均观察到了占原始的1.55%标称活性成分总量1%以下的痕量杂质。

然后开发将分离扩大到制备型色谱的方法。使用配备内径为19 mm的Viridis BEH色谱柱的SFC 80q制备型系统执行非手性制备型色谱分离。分析结果显示, 两个杂质峰的纯度为98%(图3)。

我们收集了足量的纯净化合物用于痕量杂质的完全结构匹配, 以及用于每个峰的进一步手性分离, 以得到其单一对映体。MS分析确证了这两个分离的杂质峰之间以及它们与主要化合物之间互为同量异位关系, 这表明它们的确是结构异构体。

^1H 、 ^{13}C 、2D和NOE NMR实验结果表明，这两种杂质与丙环唑的区别在于其三唑基团与二氧戊环上的亚甲基的氮接合点不同(图4)。NMR的对称性清楚地显示出了该结果。丙环唑的三唑基团中连接亚甲基的N原子邻近旁边的N原子，为不对称结构，而在杂质中，连接亚甲基的N原子两边各有一个C原子，使得三唑基团具有对称性，且NMR谱图更简单。顺式和反式异构体的确定依据为：在2D NOESY NMR实验和1D NOE谱中，如果异构体的碳11和碳14上的质子与碳6上的质子之间存在强烈的NOE效应，那么该异构体为顺式结构；如果在NMR谱图中没有观察到相同的NOE效应，则该异构体为反式结构。

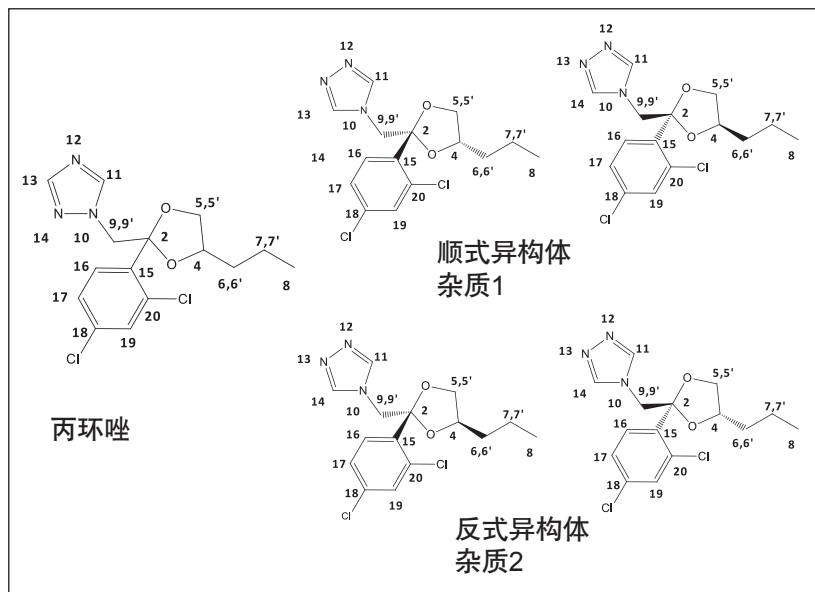


图4. 丙环唑的结构(左)以及丙环唑杂质的结构(右上图为顺式异构体，即图3中的杂质1；右下图为反式异构体，即图3中的杂质2)。请注意，母丙环唑三唑环上连接其它基团的氮原子不同。

完成两个可通过手性色谱法进行分离的杂质峰的完全结构匹配之后，我们接下来将探讨如何对顺式和反式异构体进行制备型分离(图5)。尽管使用小粒径手性色谱柱时，仅通过一次运行即可完成四种异构体的分析型分离，但在本例中，为了放大至制备型分离，需要使用两种不同的色谱柱填料来分离不同的对映体。顺式异构体使用IC色谱柱进行分离，而反式异构体需要使用AD-H色谱柱进行分离。结果成功分离得到了四种可能的杂质立体异构体，且均为纯净形式。

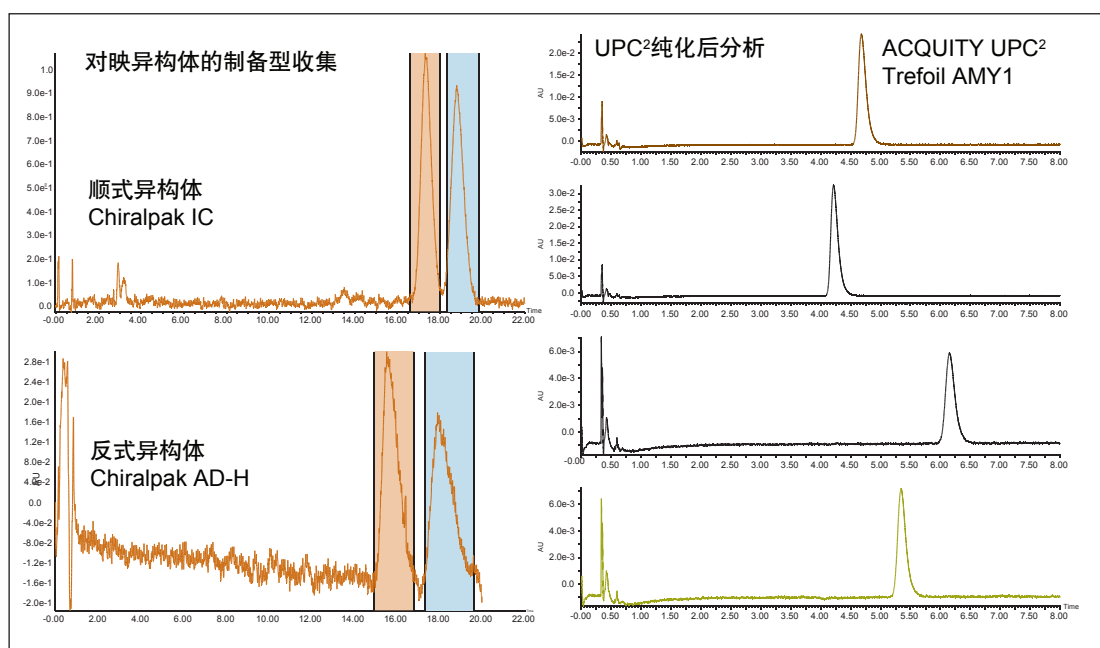


图5. 使用Prep 100q SFC系统在Chiralpak IC色谱柱上进行顺式对映异构体的制备型收集，以及在Chiralpak AD-H色谱柱上进行反式对映异构体的制备型收集(左)。UPC²手性分析表明，全部四种可能的杂质立体异构体都成功完成了制备型分离，并且均为纯对映体形式，其纯度>98%(右)。

使用UPC²进行的手性分析表明每种异构体的对映体纯度>98%。顺式异构体包括2R, 4S和2S, 4R异构体, 而反式异构体包括2R, 4R和2S, 4S异构体。尽管分析每种立体异构体的绝对构型不在本研究的范围之内, 但是事实上这些分离出的杂质确实与之前的研究中发现的结构相同²。分离得到纯净且足量的所有四种杂质立体异构体, 有助于我们将机理功能和毒性与每种单一的杂质种类进行明确的匹配。这种能力可增加我们关于产品混合物成分的效率和安全方面的知识贮备。

结论

使用手性和非手性色谱柱填料对实际产品混合物进行ACQUITY UPC²分析的方法不仅适用于杂质分析, 还可用于开发最终可放大至制备型分离的分离方法。

使用制备型SFC可有效分离出结构解析和其它研究所需样品量中的痕量杂质(在本研究中, 杂质含量为占1.55%的制剂活性成分的1%以下)。

可获得分离杂质的原始结构, 便于进行HRMS、1D和2D NMR光谱学研究, 从而实现这些痕量杂质的完全结构解析。

初始分离得到的杂质可通过高效的手性固定相制备型SFC进一步分离出它们的对映体。

所有分离杂质的匹配结构与此前的文献中的信息一致²。

致谢

在此特别感谢欧道明大学(弗吉尼亚州诺福克)的核磁共振波谱学专家James E. Hall的学术贡献。

参考文献

1. G von Reet, J Heeres, and L Wals Janssen. *Ger Pat.* 2:551–560, 1976.
2. R Glaser, I Adin, D Ovidia, 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 Chemistry*, (6) 3:145–156, 1995.
3. R Chen. Mass-directed preparative SFC: An orthogonal toll with reduced liquid solvent usage for high throughput purification. [Waters application note no. 720003772en](#). October 2010.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

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

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年4月 720005347ZH 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 - 6765 3588
香港: 852 - 2964 1800

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