[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY UPC²システムおよびACQUITY QDa検出器を用いた、農薬製剤のキラルおよびアキラルのプロファイリング

Marian Twohig,[1] Michael O'Leary,[1] John P. McCauley,[2] and Rui Chen[2]
[1] Waters Corporation, Milford, MA, USA
[2] Waters Corporation, New Castle, DE, USA

アプリケーションのメリット

- キラルおよびアキラルのメソッド開発とサンプル分析が同一のシステムで可能
- 順相分析と比較し、エナンチオマーおよびジアステレオマー分離の向上と分析時間の短縮が可能で高いスループットを実現
- エナンチオマーもしくはジアステレオマー比測定において、信頼性と再現性のある分析が可能
- 製剤成分の構造に関連する化合物の検出およびキラル分離

ウォーターズのソリューション

ACQUITY® UltraPerformance Convergence Chromatography™ システム（UPC²®）

ACQUITY UPLC®
フォトダイオードアレイ（PDA）検出器

ACQUITY® QDa® 検出器

ACQUITY UPC²® BEH カラム

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア

キーワード

キラル農薬、UPC²、エナンチオマー、ジアステレオマー、キラル分離、キラル分割、プロピコナゾール、トリアゾール、殺菌剤、SFC、超臨界流体クロマトグラフィー、QDa

はじめに

新しい農薬製剤の開発に関連する研究は、対象の生物に対して有効性が高い作用を、これまでより少ない散布量でもたらすことができる製品設計に集中しています。[1] 今日、市場にある農薬の 30% に光学異性体が含まれていると推定されています。[2,3] ただし、求められる活性は、多くの場合光学異性体混合物中の単一のエナンチオマーから得られます。[4] このため、重要なのは製剤のキラル有効成分のエナンチオマー純度を評価することです。[1,5] さらに、製剤中の他の成分の検出、特性解析、および定量が、製品登録をサポートするために必要です。

アミロースやセルロースといった多糖類を固定相に用いるキラル固定相（CSPs）における液体クロマトグラフィー（LC）がキラル分離に使用される最も一般的な方法です。[6-9] 最近では CSPs にかわり、[10-11] 超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）を選択するケースも増えています。高拡散性と低粘性という超臨界流体の特徴により、短時間でのキラル分離を効率的に行うことが可能です。例えばプロピコナゾール（構造は図 1 に示す）のようなトリアゾール系殺菌剤が広範囲の作物被害に有効である理由から広く用いられています。プロピコナゾールのジアステレオマーの分離に要する時間は HPLC を用いた場合 34-50 分です。[1,6-8] SFC を用いた場合にはプロピコナゾールについて同等の分離が実現でき、分析時間は 10 分にまで短縮可能です。[11]

超高性能コンバージェンスクロマトグラフィー（UPC²）は粒子径 2 µm 以下のカラムおよび超臨界 CO_2 を用いて、UPLC のパフォーマンス上のメリットを SFC へ適用しています。[12,13] UPC² は逆相 LC と同様の分離ではなく異なる分離モードを提供する直交性の技術であり、複雑な分離を解決できます。

本アプリケーションではトリアゾール含有の農薬製剤について UPC² および UV と MS 検出器の組み合わせで行った分析について紹介します。ウォーターズの ACQUITY QDa 検出器は既存の液体クロマトグラフィーシステムを組み合わせて用いることで感度を向上し、UV 検出器の結果を補完する新しい MS 検出器です。MS データと UV データと組み合わせて用いることで、一回の分析における信頼性が向上し、幅広い化合物の構造決定が可能になります。

実験方法

システム

セパレーションにはウォーターズ ACQUITY UPC^2 システムを用い、検出は ACQUITY UPC^2 PDA 検出器および ACQUITY QDa 検出器のポジティブイオンエレクトロスプレー質量分析（MS）モードを用いました。データ取得および解析は Empower 3 FR2 ソフトウェアを用いて行いました。

サンプル準備

農薬標準試料はアセトニトリル / 水＝ 50/50 溶液を用いて調製しました。一般的に用いられる農薬製剤を 2 g 秤量し、8 mL のアセトニトリル / 水＝ 50/50 溶液を添加しました。この溶液を 10 分間超音波で溶解し、0.2 µm の PVDF フィルターでろ過し注入溶液としました。

UPC^2 条件

アキラル分離

分離モード：グラジエント

カラム： ACQUITY UPC^2 BEH 3.0 × 100 mm、1.7 µm

共溶媒（B）：メタノール

ABPR： 1990 psi / 137 bar

流速： 1.5 mL / 分

検出波長： 220 nm

カラム温度：35℃

注入量： 0.5 µL

アキラルな農薬製剤 A に用いたグラジエント条件：
0 分 3% B、4 分 30% B、6 分 30% B
初期条件に戻る

キラル分離

分離モード：グラジエント

カラム： Amylose Chiral 3.0 × 150 mm、2.5 µm

共溶媒（B）： 2- プロパノール / エタノール＝ 50/50

ABPR： 1990 psi/137 bar

流速： 2.0 mL 分

検出波長： 220 nm

注入量： 1 µL

MS 条件

MS システム： ACQUITY QDa 検出器

イオン化モード： ESI+

キャピラリー電圧： 0.8kV

コーン電圧： 10V

脱溶媒ガス： 600 ℃

イオン源温度： 150 ℃

MS スキャン範囲： 100-600 m/z

サンプリングレート：5 Hz

メイクアップ溶媒： 0.1%アンモニア水溶液含有メタノール / 水＝ 98/2 0.3 mL/min

PDA条件

検出器： ACQUITY UPC^2 PDA

取り込み波長： 210-400 nm

サンプリングレート：20 Hz

製剤サンプルについては最初に粒子径 2 µm 以下の固定相を用いてアキラル分離を行い、次に、粒子径 2.5 µm のキラル CSP カラムによりキラル分離を行いました。有効成分（AI）に含まれる少量の異性体を同定しました。キラル分離を行うことで少量の異性体と AI は類似したキラリティーを有することが分かりました。

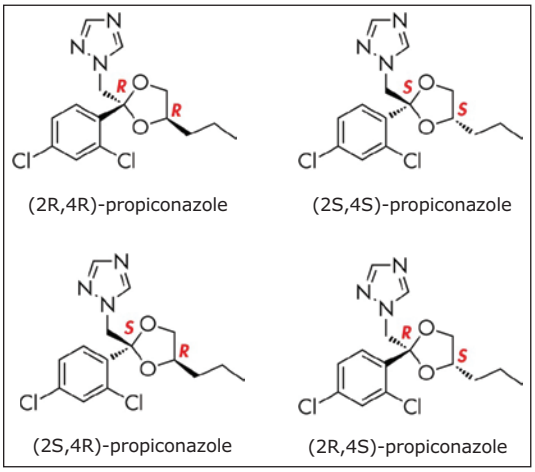

図 1. プロピコナゾール立体異性体の構造式

結果および考察

図 2 にプロピコナゾール標準溶液（下段参照）および製剤サンプル（上段参照）について ACQUITY UPC^2 BEH カラムを用いて得られたクロマトグラムを示しています。製剤サンプルにおけるピーク 1 および 2 の保持時間はプロピコナゾールの標準溶液と一致しています。これら 2 つのピークはプロピコナゾールのジアステレオマーと考えられます。しかしながら 2 つの小さなピーク（ピーク 3 および 4）は製剤サンプルのみ検出され、保持時間は 2.22 分と 2.26 分です。

ピーク 3 及び 4 の UV スペクトルはピーク 1 および 2 と類似しており（図 2）、構造が類似していることを示しています。さらに 4 つのピークのベースピークは *m/z* = 342 であり、塩素を含む化合物の同位体パターンを有しています。この *m/z* はプロトン付加したプロピコナゾールと一致します。

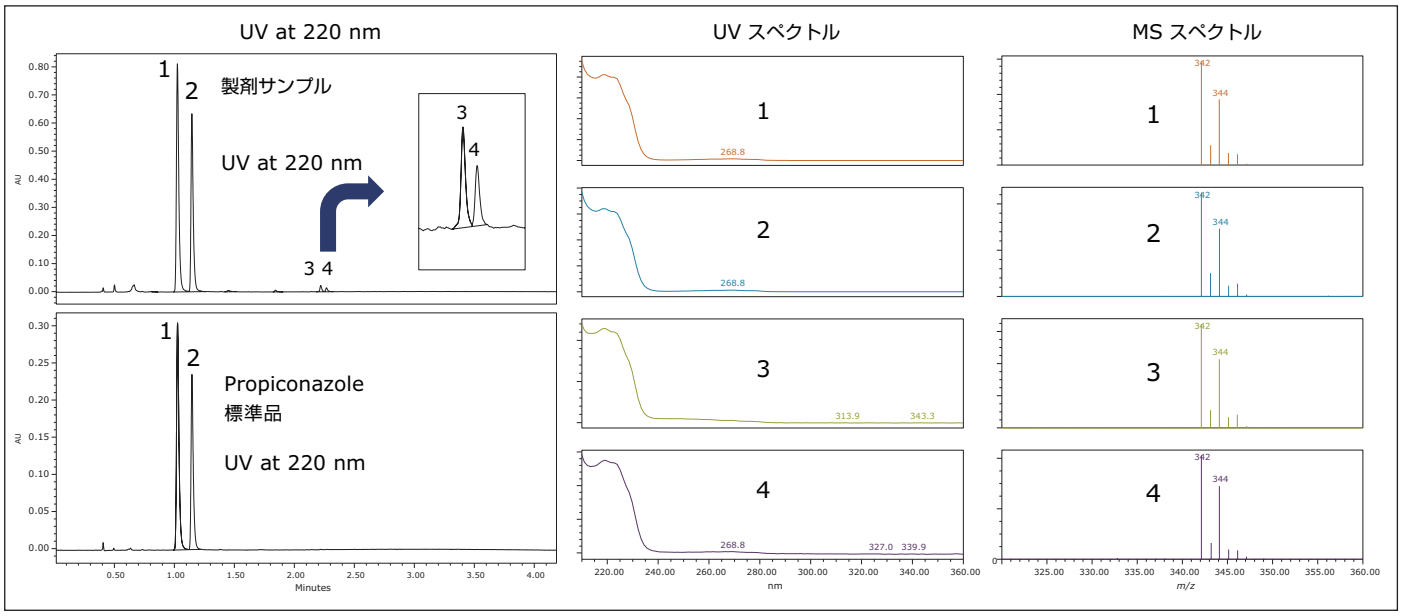

図 2. ACQUITY UPC^2 BEH カラムを用いたプロピコナゾール含有の製剤サンプル及びプロピコナゾール標準品のアキラル分離の 220 nm における ACQUITY UPC^2 UV クロマトグラム。ピーク 1-4 の UV 及び MS スペクトルも示している。

ACQUITY UPC^2 システムはカラムスイッチング機能があり、共溶媒については 4 種類まで選択可能なためアキラルおよびキラルのメソッド開発を効率的に実現し、サンプル分析についても同じシステムで行うことが可能です。メソッド開発についてはこれらの技術を用いることにより分析時間を短縮し迅速に行うことができます。

図 3 に ACQUITY UPC^2 システムを用いて、プロピコナゾール標準溶液および製剤サンプルについてアミロースキラルカラムを用いてグラジエント分離を行ったクロマトグラムを示します。図 2 ではプロピコナゾールから 2 つのジアステレオマーが検出されましたが、図 3 では 4 つのピーク（ピーク 1-4）が検出されています。興味深いことに、図 2 で 2 つの小さなピークについてもさらに 4 本に分離し（ピーク 5-8）、プロピコナゾールおよび微少成分についても類似したキラリティーを有することを示しています。

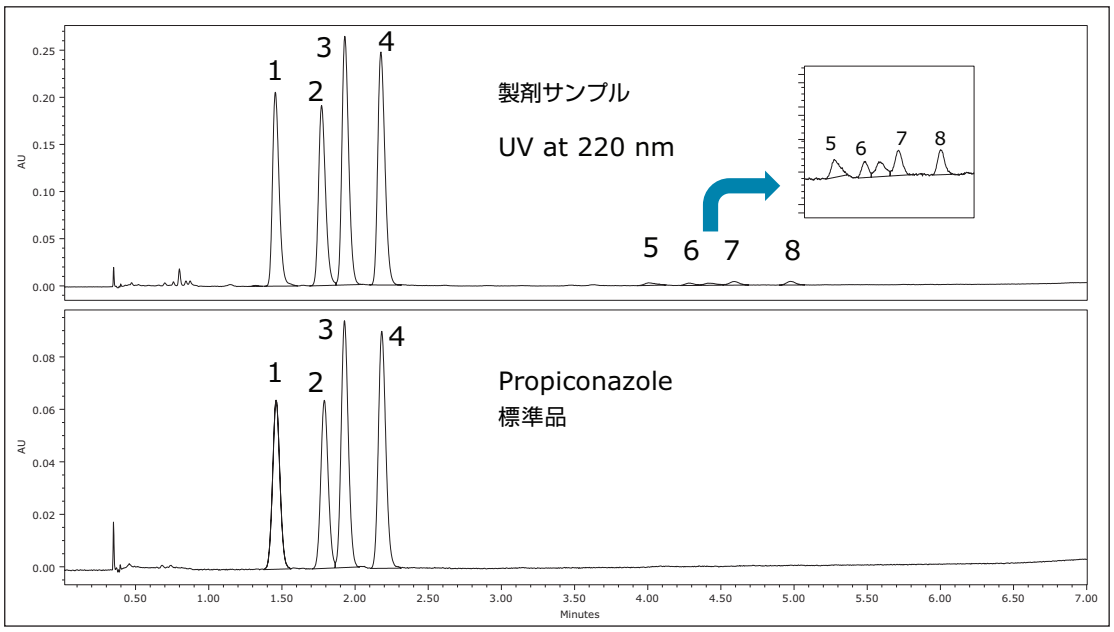

図 3. アミロースキラルカラムを用いたプロピコナゾール立体異性体および製剤サンプル中に含まれる未知のキラル化合物の分離を示した 220 nm の ACQUITY UPC^2 UV クロマトグラム。プロピコナゾール標準溶液も示している。

製剤サンプルデータの解析は Empower ソフトウェアを用い、8 本のピークについて UV および各 MS スペクトルを質量解析ウィンドウに示しています（図 4 および 5）。Empower 3 ソフトウェアの質量解析ウィンドウは選択したスペクトルと共にすべての検出器のクロマトグラフィーピークを 1 つの画面に表示可能です。検出されたピークのスペクトルは溶出順にクロマトグラムの上に表示されます。

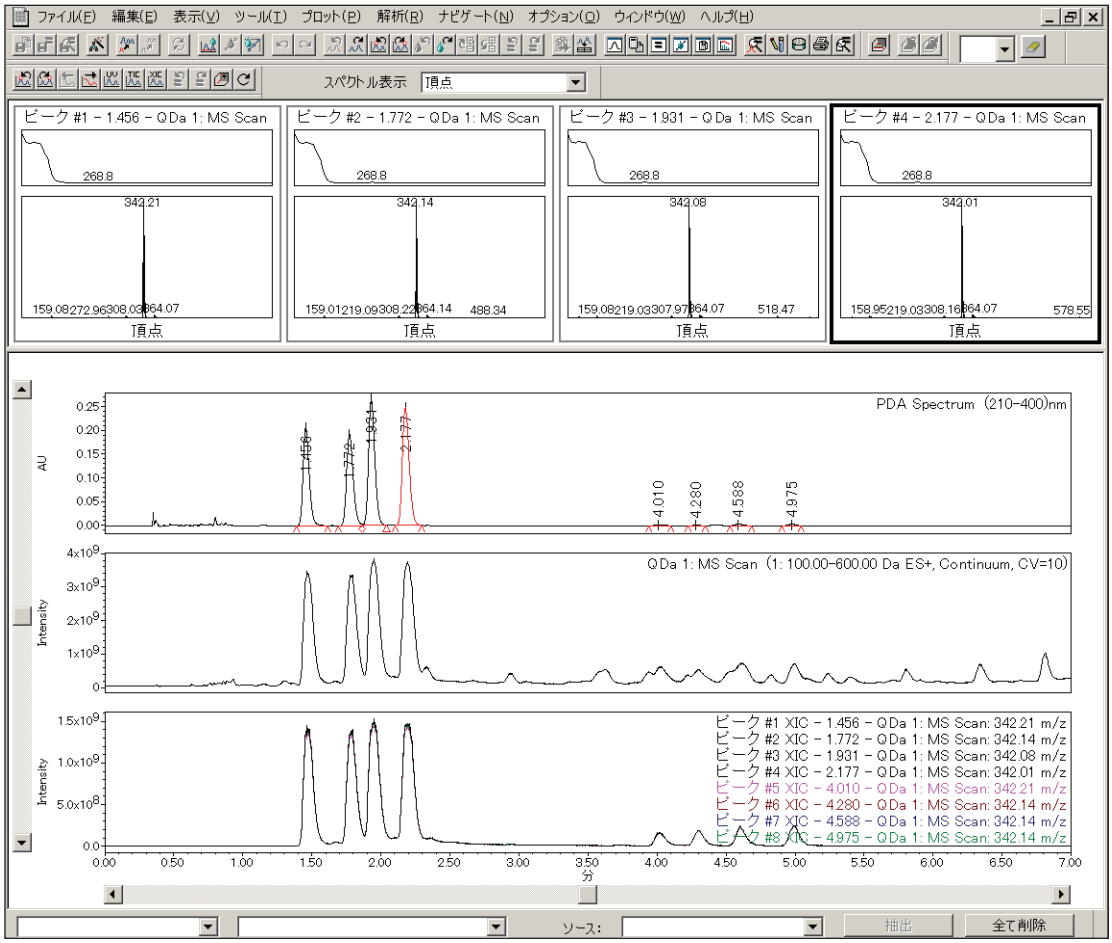

図 4. Empower ソフトウェアの質量解析ウィンドウにより UV および MS スペクトル、また UV およびマスクロマトグラム、抽出イオンクロマトグラム（XIC）を 1 つの画面に示しています。

製剤サンプルの UV クロマトグラムおよび MS トータルイオンクロマトグラム（TIC）と抽出イオンクロマトグラムにより確認された同位体ピークには明確な違いが見られました（図 5）。キラル農薬のエナンチオマー純度を測定するために用いられる UV 検出を組み合わせた MS 検出器を用いることで、感度および選択性が向上します。

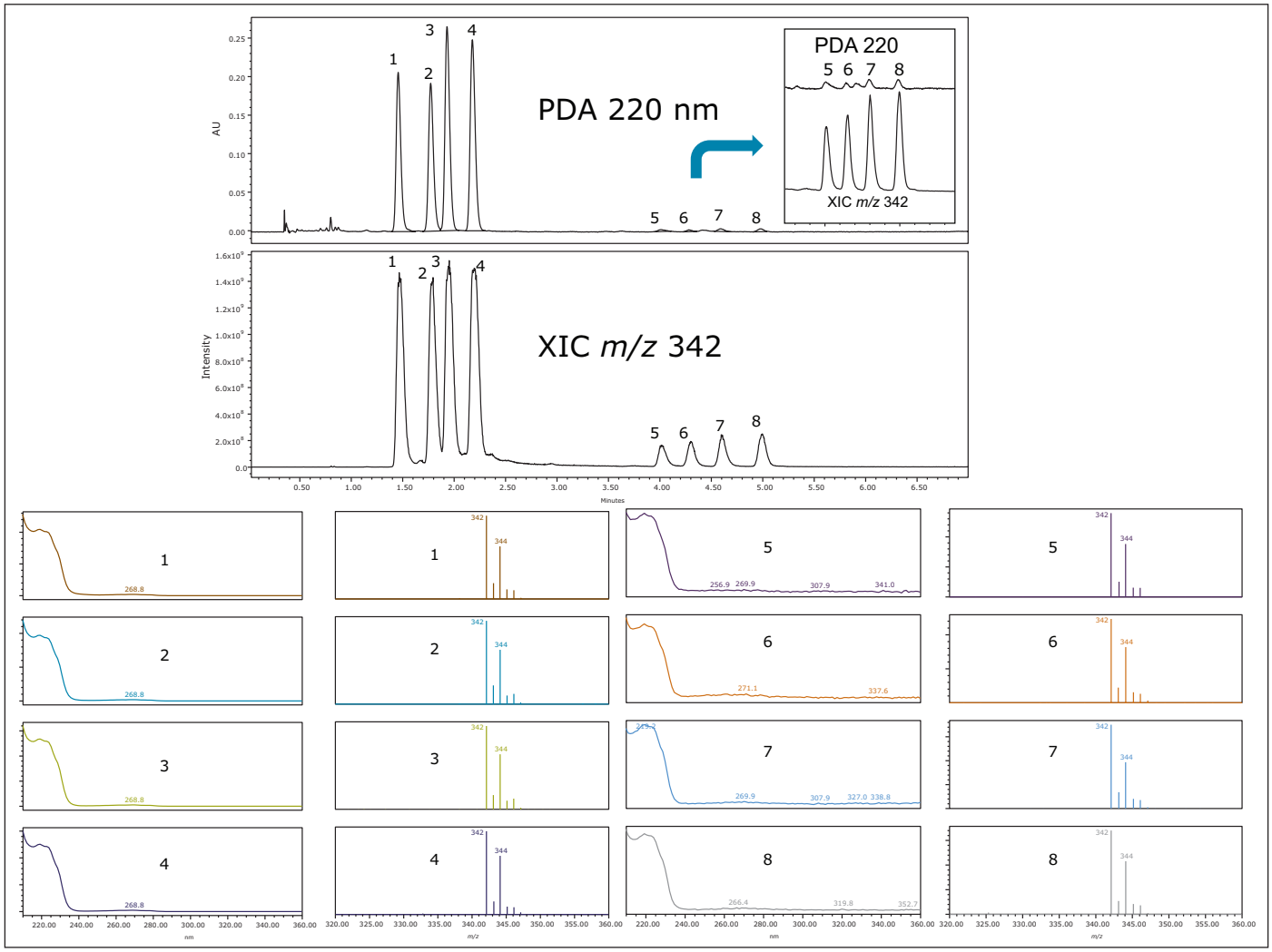

図 5. アミロースキラルカラムを用いたプロピコナゾール立体異性体のキラル分離および製剤サンプルに含まれる未知キラル化合物を示した 220nm の ACQUITY UPC² UV クロマトグラム。m/z=342 の XIC および UV、MS スペクトルもそれぞれ示した。

これらの結果より、微少成分はプロピコナゾールの位置異性体であると考えられます。プロピコナゾールの位置異性体は Glaser らにより見出されたトリアゾール環の窒素一つから由来する位置異性体です。[14] より確実に同定するためこの化合物を分離する追加検討を現在行っています。

結論

本検討ではアキラルな農薬製剤の評価を行い、UV および MS 検出器を用い構造的に類似している活性成分プロピコナゾールの微少成分を検出しています。この微少成分は同じ *m/z* を有し、活性成分トリアゾール殺菌剤と同様の同位体パターンを示しました。続いて製剤中のプロピコナゾールのキラル分離について、MS 及び UV 検出器を同時に取得することで微少成分の考えうる立体異性体のさまざまなスペクトル情報を得ることができます。

MS 検出器は化合物の検出を補完することに加え、化合物同定における信頼性を向上します。ACQUITY QDa 検出器は従来の選択性という点で不十分だった検出器を用いるルーチン分析を行うラボにとって費用対効果を向上させます。

ACQUITY UPC^2 システムはキラルおよびアキラルカラムを MS 分析に適合する 4 種類の共溶媒を検討できるよう、カラムスイッチング機能を有しています。キラルおよびアキラルなメソッド開発を同じシステムで行うことが可能です。これらのメソッドでは初期移動相として超臨界二酸化炭素を用います。順相分析と比較して潜在的に危険な溶媒の使用量の削減が可能になります。その結果溶媒の廃液処理の費用も削減でき、コスト削減につながります。

ACQUITY UPC^2 システムは効率的な分離を可能にし、従来の順相分析に比べサンプルのスループットを向上させます。[1,6-8] UPC^2 を用いることでプロピコナゾールのジアステレオマーの分離が 3 分以内で可能になり、文献に記載されていた順相分析より少なくとも 10 倍早くなります。

エナンチオ選択的性質の研究は、キラル化合物の分割の難しさという課題に挑戦しています。キラル化合物を解決するために、より高速な分析方法を持つことのメリットは、それらの立体選択的行動に関連する重要な情報を迅速に取得でき、ラボの生産性を向上させます。

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 Guillarme. 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 Ortwine, J Pease, DE Schmidt Jr Victorino. The evaluation of 25 chiral stationary phases and the utilization of sub-2.0 µm 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 constituational isomer, and a ditriazole analogue. *Structural Chem.* 6, 3: 145-156, 1995.

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 富山

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、Empower、UPC^2、UPLC、ACQUITY UPC^2、QDa および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。UltraPerformance Convergence Chromatography 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。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年10月 720004977JA PDF