Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

采用UNIFI和UPLC-ToF-MS^{E}表征杀菌剂粉唑醇中的杂质

Marian Twohig, Michael O'Leary, Peter Lee和John McCauley
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- 工业级粉唑醇中结构相关化合物的综合表征方法。
- 快速色谱分离，同时提供最大分离度。
- 同时采集母离子和子离子的精确质量数信息，提高了化合物确认结果的可靠性。

沃特世解决方案

采用UNIFI®的筛选平台解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class系统

ACQUITY UPLC光电二极管阵列(PDA)检测器

Xevo® G2-XS QTof质谱仪

CORTECS®色谱柱

关键词

杂质鉴别、杀虫剂、杂质、
农药、杀虫剂、合成

简介

杂质的分析、鉴别和定量在杀虫剂研发和生产的各个阶段都发挥着重要作用，是农作物保护产品注册要达到的基本要求。对农药产品中的杂质进行监控，是为了确保产品的安全性和合规性。我们必须对工业级活性物质中含量等于或大于0.1%的杂质进行结构鉴定，才能充分了解配制产品的总体安全性[1]。尤其是毒理学意义上的杂质，我们需要特别关注。

在农药产品开发过程中，我们可能需要评价不同的合成路径，而每条路径都会产生不同的杂质。因此我们必须以鉴别(或解析)超过阈值标准的相关杂质为目的，对合成路径进行充分的考察。此类分析研究通常结合使用LC-MS与其它可提供结构信息的技术(如核磁共振波谱法)。采用了飞行时间(Tof)技术的现代高灵敏度精确质量数仪器能够实现极快的采集速率，同时大幅度简化了杂质数据捕获和分析的过程。高采集速率使得质谱分析可与超高效液相色谱(UPLC®)联用，由此大大方便了复杂样品的分析。此外，沃特世的Q-Tof™专利技术能够同时采集高碰撞能量(CE)和低碰撞能量数据，又称"MS^E"[2]，因此仅通过单次进样即可捕获和解析母离子和子离子数据。由于所采集的数据具有极高的质量精度，因此可以获得无论是完整分子离子(如M+H$^+$)还是有助于结构解析的重要组成碎片离子的元素组成，从而帮助结构的解析。

实验

实验仪器

样品制备

使用甲醇配制粉唑醇的储液(1 mg/mL)。

UPLC条件

UPLC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	CORTECS C_{18} 2.1 x 100 mm, 1.6 µm
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	0.1%甲酸乙腈溶液
流速:	0.6 mL/min
柱温:	50 °C
进样体积:	1 µL
梯度:	流动相B在10 min内从10%升至90%，然后返回初始条件

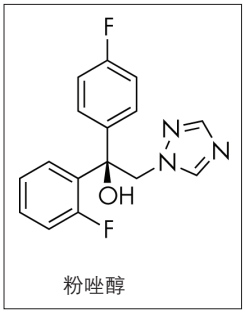
PDA条件

检测器:	ACQUITY UPLC PDA
波长:	210~400 nm
采样速率:	20 Hz

MS条件

MS系统:	Xevo G2-XS QTof
电离模式:	ESI+
分析模式:	MS^E分离度模式
毛细管电压:	1.0 kV
锥孔电压:	25 V
脱溶剂气温度:	450 °C
离子源温度:	150 °C
锥孔气流速:	50 L/h
脱溶剂气流速:	900 L/h
MS^E低碰撞能(CE):	4 eV
MS^E高碰撞能(CE)梯度:	15~30 eV
MS扫描范围:	50~950 m/z
扫描时间:	0.15 s

在本应用纪要中，我们将Waters® ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo G2-XS QTof和ACQUITY UPLC PDA检测器联用，用于分析工业级粉唑醇材料。如图1所示，粉唑醇是一种三唑类杀菌剂，广泛用于治疗谷类作物疾病[3]。我们采用了使用UNIFIT的筛查平台解决方案来筛查样品、加快发现感兴趣的未知组分以及确证活性成分(AI)的存在。通过使用UNIFI的数据评估工具，我们可轻松看到未知组分之间的关系，并以此为根据推断杂质和粉唑醇之间的关系。杂质表征的MS数据随后可用于进一步优化合成策略。



粉唑醇

图1. 粉唑醇的结构。

结果与讨论

采用CORTECS C_{18}色谱柱进行的UPLC分离实现了最大的组分分离度。在220 nm处，紫外检测器检测到了三个小色谱峰(峰1–3)和粉唑醇(峰4)，如图2所示。PDA检测到峰1–3相对于AI的面积%都超过了>0.1%的阈值。使用质谱检测器进行杂质结构的初步解析。

UNIFI查看窗口的组分汇总表中列出了候选未知化合物(图3)和已鉴别出的组分。

系统将自动提取各候选化合物的母离子和子离子MS^E数据，且这些数据可在谱图窗口里中同时查看(图3)。若存在母离子加合物，系统将自动为其赋值。当特定结构存在时，UNIFI还可进行碎片匹配，将可能的结构智能分配给高CE碎片。

粉唑醇的鉴定结果以提取离子色谱图(XIC)表示，其中包括化合物名称、保留时间(t_R)、mol文件和碎片离子等具体信息，这些信息是之前杀菌剂分析中生成并录入UNIFI科学数据库的。该功能有助于用户在数据采集前就建立分析方法(图4)。UNIFI科学数据库可存储化合物结构信息以及单独数据条目的相关初始保留信息。用户可将母体化合物和目标杂质的数据存储在数据库中，以备日后搜寻和检索。

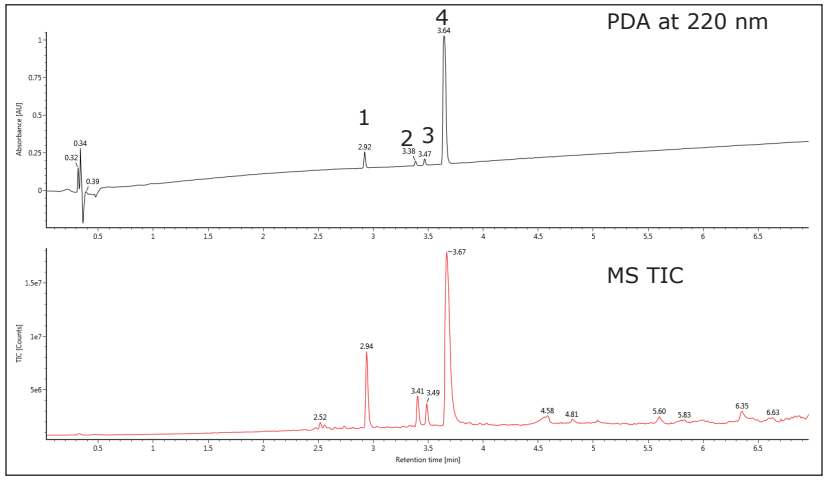


图2. 220 nm处的PDA色谱图(上)，展示了粉唑醇(峰4)和其它三种低含量组分(峰1–3)。下方展示的是MS总离子色谱图(TIC)。

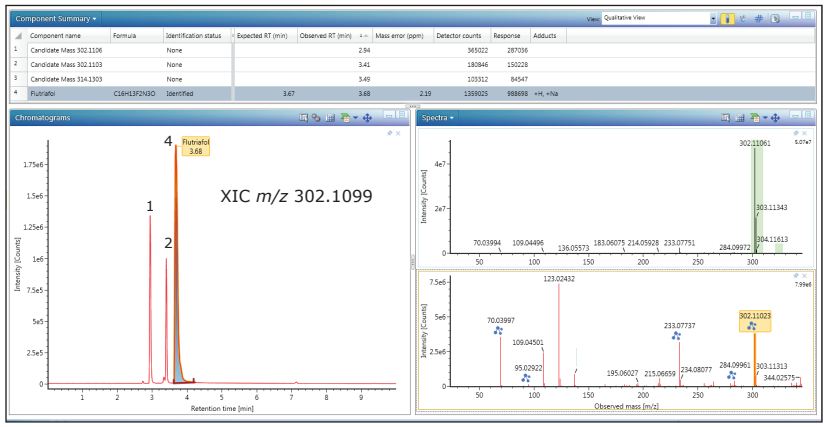


图3. UNIFI查看窗口展示了组分汇总表、已鉴别出的粉唑醇(m/z 302.1099)及其同量组分1和2的提取离子色谱图(XIC)。同时还展示了粉唑醇的MS^E碎片和完整母离子质谱信息。

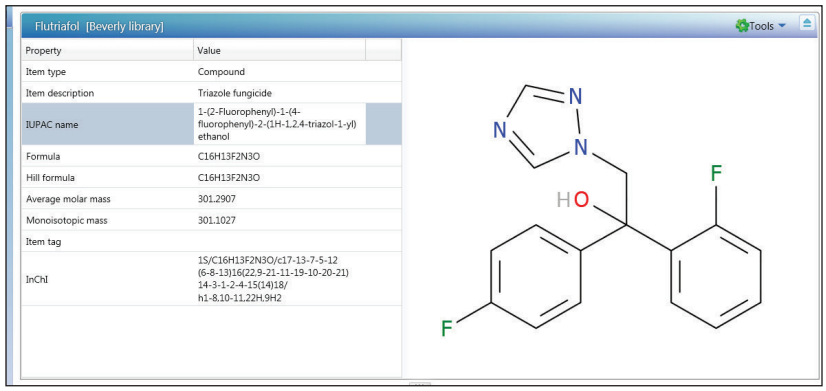


图4. 粉唑醇的UNIFI科学数据库条目。

图2中的峰1和峰2分别在2.94 min和3.41 min时被洗脱出来。系统自动提取了这两个组分的XIC，因为这两个峰的m/z均在处理方法(图3)中设定的粉唑醇(3 ppm)目标质量数容差范围内。

只需从组分汇总表中选定任一候选化合物，我们就可用包含全套结构解析工具的UNIFI解析工具包来分析候选化合物。解析工具包可对母离子和碎片离子进行更加透彻地分析。这些工具包括ChemSpider搜索(www.chemspider.com英国皇家化学学会)、同位素建模以及元素组成工具等。此外还包括利用质量缺损、共有碎片离子和中性丢失发现相关离子的工具。

结构解析工具分析结果表明，组分1和组分2都具有与粉唑醇相同的元素组成，即$C_{16}H_{13}F_2N_3O$(图5)。此外，高能MS^E数据表明，这些组分具有与AI所含比例不同的共有碎片离子(图3)。高能子离子数据与完整的母离子数据同时采集，提高了鉴定结果的可靠性。

根据这些观察结果，组分1和组分2可能是AI的异构体。

利用UNIFI的共有碎片搜索功能，可高效地从数据中提取出具有共同结构特征的成分。选定组分1图谱中的主要碎片离子，包括由三唑环生成的特征碎片m/z 70.0399和m/z 109.0450，使用共有碎片搜索功能，我们在tR 3.49 min处看到了一个额外的色谱峰，如图6所示。

接下来采用相同的方法，分析组分汇总表中m/z为314.1303的组分(峰3)，经测定，该未知

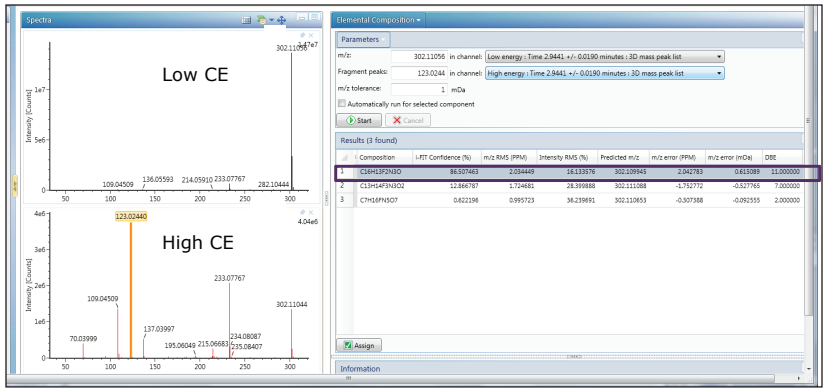


图5. 采用解析工具确定候选化合物m/z 302.1106(在紫色方框里突出显示)的元素组成$C_{16}H_{13}F_2N_3O$。此截屏的左侧显示的是母离子谱图(上)和子离子谱图(下)。

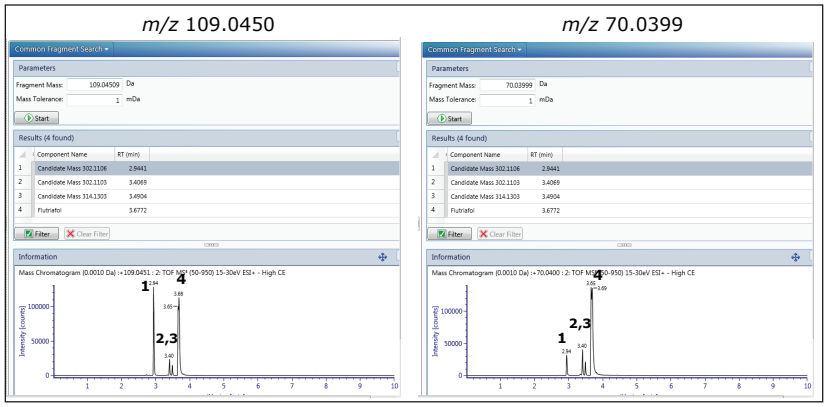


图6. m/z 109.0450和70.0399共有碎片离子的搜索结果，该方法可用于从具有共同结构特征的组分中高效地搜索工业级粉唑醇。

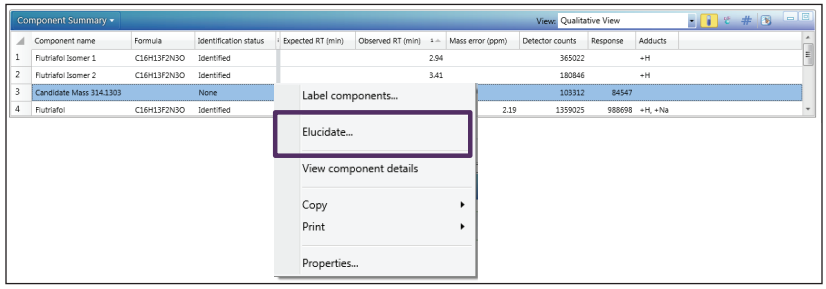


图7. 将未知质量m/z 314.1303发送到解析工具包进行进一步分析。

化合物的元素组成是$C_{17}H_{16}FN_3O_2$。共同碎片搜索结果表明，该成分具有与粉唑醇相同的结构特点。我们采用集成在解析工具包中的ChemSpider搜索功能对组分3的元素组成进行搜索。

由于该结构无法同时分配到所有碎片(包括共有碎片离子)，该结构匹配结果不合适。因此，我们采用了另一种匹配方法获得组分3结构，即结合单个碎片离子的元素组成以及碎片离子的MS/MS确认结果，运用合成路径的相关知识，将其与粉唑醇碎片离子的元素组成相比较。接下来则使用所得的匹配结果为子离子分配可能的结构(图8)。

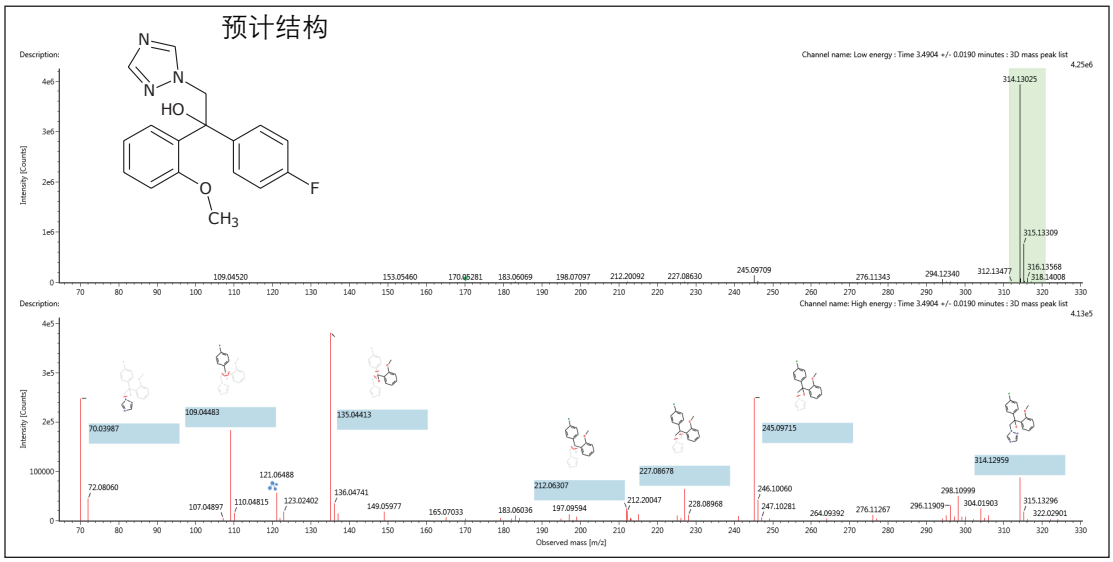


图8. 组分3的建议结构、MS^{E}完整母离子以及带有经UNIFI碎片匹配功能分配结构的碎片离子图谱。

根据基本结构建议(插图所示)，我们采用UNIFI碎片匹配工具进行进一步的碎片匹配。如果要绝对确证结构，就需要放大表征的级别，采用合适的技术(如核磁共振波谱法)继续追踪已表征的分离物。

用户可将包括所有已知信息(保留时间、已知碎片等)的组分信息添加至UNIFI科学数据库中，以便在进一步的合成中对其进行追踪。

结论

在化学合成过程中，起始产物、中间体或反应副产物的残留都有可能导致最终的工业级材料中含有杂质，因此组分鉴别有助于优化合成工艺。我们采用PDA检测器在220 nm处检测到了工业级粉唑醇里存在的微量组分。接下来我们采用与ToF MS^E联用的UPLC以及UNIFI筛查平台解决方案对未知组分进行了表征。经过一系列分析，其中两种组分被初步鉴定为活性成分的异构体，同时我们对第三种未知组分进行了研究。通过UNIFI的解析工具包，我们发现该未知组分具有与粉唑醇相同的结构特征。最后，我们根据各碎片的元素组成，运用合成路径的相关知识，并对比活性成分的结构，初步确定了*m/z*为314.1303的未知组分结构，且这一结构与我们现有的所有数据匹配。后续杂质分离研究中可采用其他合适手段对这些杂质结构进行进一步确证。

参考文献

1. Commission Regulation (EU) No 544/2011. (2011) [cited February 13, 2015]. Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:155:0001:0066:EN:PDF
2. An overview of the principles of MS^E, The engine that drives MS performance. *Waters White Paper*, p/n 720004036en. October, 2011.
3. Chang, M, Kim, TH, Kim, HD. Stereoselective synthesis of flutriafol. Tetrahedron: *Asymmetry*. 19: 1503–1507, 2008.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UPLC, Xevo, CORTECS, UNIFI和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。Q-Tof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 720005308ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
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