

非誘導体化グリホサートの 逆相 LC/MS 分析

カラム、システムの不活性化を検証

著者

澤田 有司

栗原 絵里奈

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Poroshell CS-C18 は、粒子表面が正に荷電したシリカ系の HPLC カラムです。この特徴的な粒子によって LC/MS 分析に適した移動相（ギ酸添加）で広範囲の分析種を保持分離できます。また、有機リン酸系農薬のグリホサートは、HPLC および LC/MS で一般的に用いられる逆相カラムによる保持・分離が難しく、さらに金属吸着の影響も考慮する必要があります。このため、従来はグリホサートを誘導体化して逆相 LC/MS 分析する方法が利用されています。本アプリケーションノートでは、非誘導体化グリホサートを逆相 LC/MS 分析するために、Poroshell CS-C18 カラム（SUS およびメタルフリー仕様）、システム配管（SUS および BIO 仕様）、不活性化剤の移動相添加を検証しました。この結果、Poroshell CS-C18 カラムの接液面をメタルフリー化したカラム（PEEK-lined）、生体分子に対して不活性な BIO 仕様の配管（MP35N 製）、移動相への不活性化剤（ピークシャープナー）の添加が非誘導体化グリホサートの逆相 LC/MS 分析に有効であることがわかりました。

はじめに

本アプリケーションノートでは非誘導体化グリホサートを逆相 LC/MS 分析するために、以下の検討を行いました。分析に使用する逆相カラムは、LC/MS 分析に適した弱イオン強度の移動相（ギ酸添加）の利用ですぐれた試料負荷性能とピーク形状を示す Poroshell CS-C18 を利用しました。Poroshell CS-C18 は、粒子表面が正に荷電しているため、シリカ系カラムで見られる残存シラノールの影響を抑制することができます（図 1）。さらに、Poroshell CS-C18 では、接液面を PEEK 化したメタルフリー仕様のカラム（PEEK-lined）も利用できるため、リン酸を含む分析種と金属の相互作用を抑制できます。

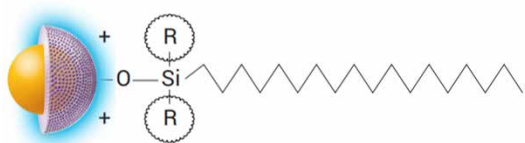


図 1. Poroshell CS-C18 の構造

グリホサートは有機リン酸系農薬です（図 2）。リン酸を含む分析種は、HPLC カラムと HPLC システムの金属 SUS と相互作用し、分析時の感度や精度が低下するため、これらの不活性化が必要です。カラムは、接液面を PEEK 化したメタルフリー仕様のカラム（PEEK-lined）を利用します。HPLC システムは既存の SUS 配管を生体分子に対して不活性な BIO 仕様の配管（MP35N 製）に変更することで、金属と分析種の相互作用を抑制します。さらに、移動相に不活性化剤（製品名：ピークシャープナー、化合物名：メドロン酸）を添加すれば金属製の HPLC カラム、HPLC システム配管を不活化できます。本アプリケーションノートでは、表 1 に示す 5 つの条件で有機リン酸系農薬のグリホサート、グルホシネート、Aminomethylphosphonic acid (AMPA) の測定を行いました。この結果、メタルフリー仕様の HPLC カラム、BIO 仕様の HPLC 配管、不活性化剤の添加が非誘導体化グリホサートの分析に有効であることがわかりました。

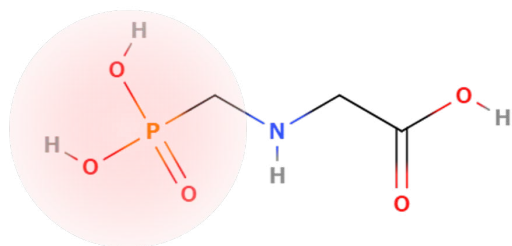


図 2. グリホサートの構造

表 1. 試験内容

試験番号	カラム配管	HPLC 配管	不活性化剤
1	メタルフリー	BIO 仕様	不使用
2	メタルフリー	SUS	不使用
3	SUS	SUS	不使用
4	SUS	SUS	添加
5	SUS	BIO 仕様	添加

SUS, stainless steel; メタルフリー, PEEK-lined カラム; BIO 仕様, MP35N 製配管; 不活性化剤, ピークシャープナー

システム

表 2. 装置構成

型番	装置名
G6470B	6470 トリプル四重極 LC/MS
G7167A	1290 Infinity II マルチサンブラ
G7120A	1290 Infinity II ハイスピードポンプ

実験方法

材料

標準品は関東化学から購入しました（グリホサート、製品コード 49828-19; AMPA、製品コード 49863-15; グルホシネレート、製品コード 49801-83）。移動相はアジレントの InfinityLab Ultra-Pure LC/MS 用溶媒を使用しました（超純水、P/N 5191-4498; メタノール、P/N 5191-4497）。サンプル測定には、アジレントの 2 mL バイアルとガラスインサートを使用しました（P/N 5182-0717：一体型セプタム付きポリプロピレンスクリューキャップ、青、PTFE/赤シリコンラバーセプタム、P/N 5188-6535：スクリューバイアル、2 mL、茶色、P/N 5181-8872：250 uL 不活性化ガラスインサート）。

試料調製

標準品は超純水で希釈し、0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 ng/mL (ppb) の濃度で各 5 回測定し、検量線を作成しました。

分析条件

表 3 の条件で LC/MS/MS 分析しました。

表 3. 分析条件

パラメータ	分析
HPLC カラム	Agilent InfinityLab Poroshell CS-C18, 2.1x100 mm, 2.7 μm (P/N 695775-942) メタルフリー仕様: Agilent InfinityLab Poroshell CS-C18, 2.1x100 mm, 2.7 μm, PEEK-lined (P/N 675775-942)
HPLC 配管: インジェクターからカラム	Quick Turn capillary stainless steel 0.12 x 500 mm (P/N 5500-1192) BIO仕様: Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 500 mm (P/N 5500-1598) 接続両端は、ゼロデットボリューム接続可能な Quick Turn fitting (P/N 5067-5966) で接続
移動相	移動相 A: 0.1 % ギ酸水溶液 移動相 A (不活性化剤使用): 0.1 % ギ酸水溶液+0.1 % ピークシャープナー (P/N 5191-3940, 25 mL; 5191-4506, 50 mL) 移動相 B: 0.1 % ギ酸メタノール溶液
流速	0.3 mL/分
グラジエント	%B: 0分, 1%; 1.5分, 1%; 2分, 20%; 3分, 40%; 4分, 90%; 6分, 90%; 6.1分, 1%; 10分, 1%.
注入量	20 μL
カラム温度	50 °C
MS 検出	イオンソース設定 乾燥ガス: 300 °C, 12 L/min シースガス: 250 °C, 11 L/min ネプライザ: 30 psi 極性: ポジティブ キャピラリー電圧: 3000 V ノズル電圧: 1500 V MRM 条件 AMPA プリカーサーイオン: 112 プロダクトイオン: 30 フラグメンター電圧: 60 V コリジョンエネルギー: 9 eV グリホサート プリカーサーイオン: 170 プロダクトイオン: 88 フラグメンター電圧: 60 V コリジョンエネルギー: 5 eV グルホシネート プリカーサーイオン: 182 プロダクトイオン: 56 フラグメンター電圧: 80 V コリジョンエネルギー: 13 eV

結果および考察

まず、標準品 (各 0.1 ng/mL の AMPA、グリホサート、グルホシネート) の LC/MS/MS 分析の結果を図 3 に示します。試験内容は表 1 を参照してください。最も良い結果は、メタルフリー仕様のカラム Poroshell CS-C18 PEEK-lined と BIO 仕様の配管 (MP35N 製) を利用した試験番号 1 でした。一方、SUS 仕様のカラムと配管を利用した試験番号 3 では、グリホサートが非検出でした。また、不活性化剤 (ピークシャープナー) を移動相に添加した試験番号 4 はグリホサートが検出できました。

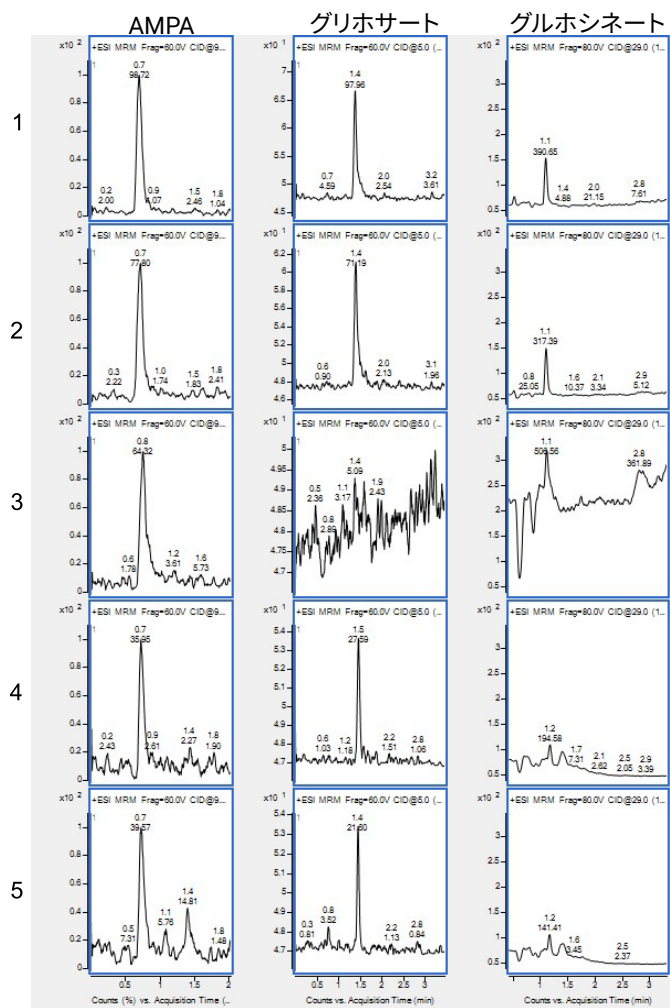


図 3. 標準品 (各 0.1 ng/mL) の MRM クロマトグラム (試験番号は表 1 参照)

次に、試験番号 1-5 の条件で検量線を作成し、直線性と再現性を確認しました (図 4)。こちらも、低濃度のクロマトグラム (図 3) と同様にメタルフリー仕様のカラム Poroshell CS-C18 PEEK-lined を使用した試験番号 1、2 で良好の結果が得られました。SUS 仕様のカラムでは、不活性化剤 (ピークシャープナー) の添加で顕著な改善が見られました (図 4 試験番号 3-5)。

AMPA グリホサート グルホシネート

結論

本アプリケーションノートでは、有機リン酸系農薬グリホサートの逆相 LC/MS 分析を検討しました。この結果から、メタルフリーカラム (Poroshell CS-C18, 2.1x100 mm, 2.7 μm, PEEK-lined) と生体分子に不活性な配管 (Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 500 mm) を利用すれば、非誘導体化グリホサートの逆相 LC/MS 分析が可能であることが示されました。また、SUS 仕様のカラムと HPLC 配管は、リン酸を含むグリホサートと顕著な相互作用を示すため、不活性化剤 (ピークシャープナー) の移動相添加が必要であることが示されました。さらに、Poroshell CS-C18 は、LC/MS 分析に適した弱イオン強度の移動相 (ギ酸添加) で良好な保持分離を示しました。

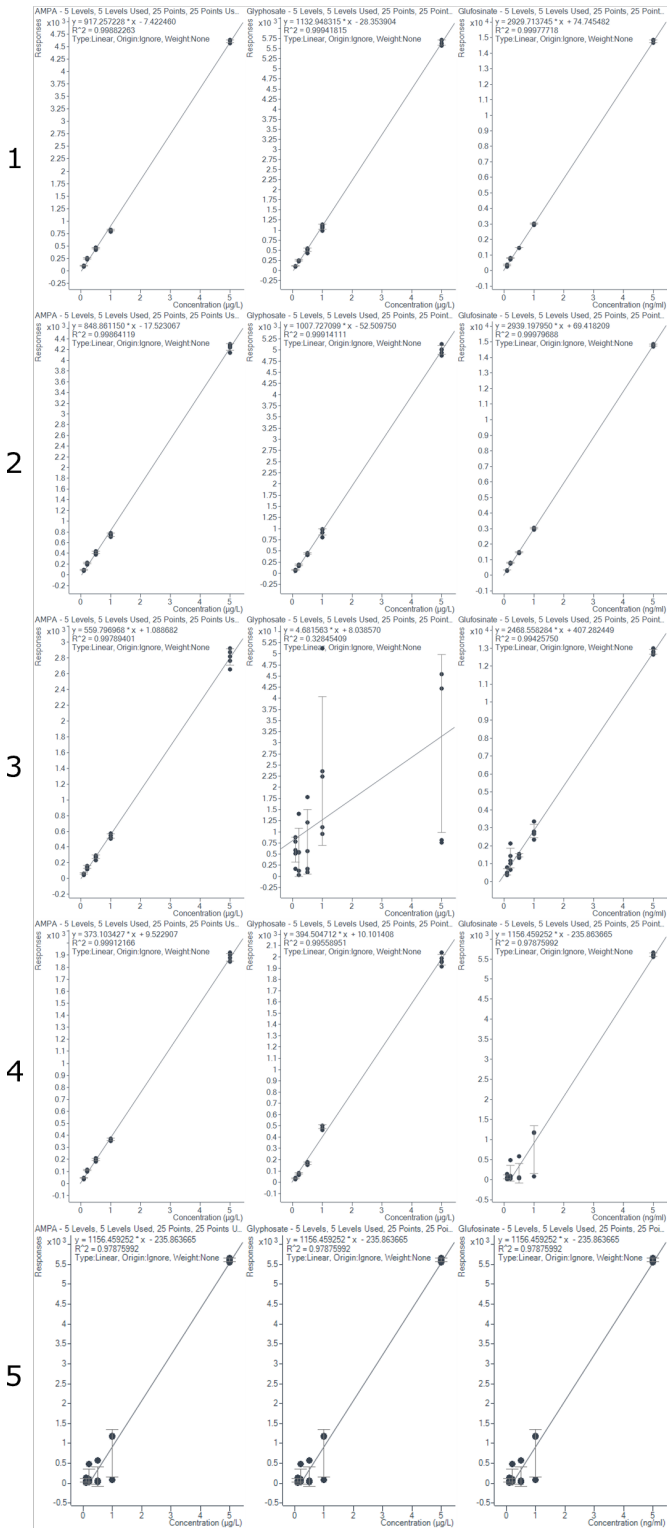


図 4. 試験番号 1-5 の検量線 (0.1-5 ng/mL、各濃度繰り返し 5 回測定)

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp
 カスタムコンタクトセンター
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE21564137
 アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2022
 Printed in Japan, October 27, 2022
 5994-5487JAJP