

地表水と飲料水中の非誘導体化グリホサート およびその他の極性農薬の測定

逆相クロマトグラフィーとタンデム質量分析

著者

Jean-Francois Roy,
Jarod N. Grossman, and
Tarun Anumol
Agilent Technologies, Inc.

概要

地表水と飲料水中に 1 L あたりナノグラム (ng/L) レベルで存在するグリホサートやその他の高極性農薬を正確に定量することは、これらの化合物が極性を持つことにより、困難であることがわかっています。この研究では、液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析 (LC/TQ) を用いた、シンプルながらも効果的なメソッドについて説明します。このメソッドには、ルーチン分析用の誘導体化が必要ない迅速で効果的なサンプル前処理、堅牢な逆相クロマトグラフィー、および非常に高感度の質量分析検出が含まれています。

主なメリット

- 飲料水でのメソッド検出限界 (MDL)：グリホサートで 10 ng/L (ppt)。
- サンプル希釈なし：このメソッドは、水溶性サンプルの大注入量に対応できます。
- 一般的な酸性 LC/MS 移動相：専用の LC/TQ システムは必要ありません。

はじめに

グリホサートは、農業および住宅分野で広く使用されている広域スペクトルの合成除草剤です。グルホシネートは植物により天然に生成されますが、産業規模でも合成して生産されます。いずれも、植物中の細菌、土壌、水により、それぞれアミノメチルホスホン酸 (AMPA) と 3-(メチルホスフィニコ)プロピオン酸 (MPPA) に分解されます。地表水と飲料水中にサブ $\mu\text{g/L}$ レベルで存在するこれらの化合物とその他の極性農薬 (2-ヒドロキシエチルホスホン酸 (HEPA)、N-アセチルグルホシネート (NAG)、エテホン、およびホセチル) の正確な定量は困難であることがわかっており、克服すべき主な課題が2つあります。

最初の課題はこれらの農薬 (図 1) の極性に起因するもので、従来の逆相クロマトグラフィーカラムではサンプル前処理と保持が複雑になります。長年にわたり、多数のアプローチが提案され開発されてきました。これらは、正確な定量-サンプル前処理とクロマトグラフィーに対してこの2つの非常に重要なステップを調整しています。¹しかし、既存の大半のメソッドは、長い時間のかかる低スループットのアプローチを基本にしており、広範囲なサンプル前処理や、ルーチン環境においてそれを実施できる専門家レベルの分析者が必要になります。

もう1つの課題は、HPLC 流路における微量金属元素の高極性農薬の親和性に起因するもので、これによりピークテーリングが発生します。²微量金属元素は、流路内の複数の構成要素 (移動相、ガラス製容器、ステンレス (SST) チューブなど) に存在しており、最後まで完全に除去するのが困難です。HPLC システムに微量金属元素を含む場合に複数のアプローチが用いられており (不活性化、キレート化、高 pH 移動相の使用など)、その効果はシステムによって異なります。

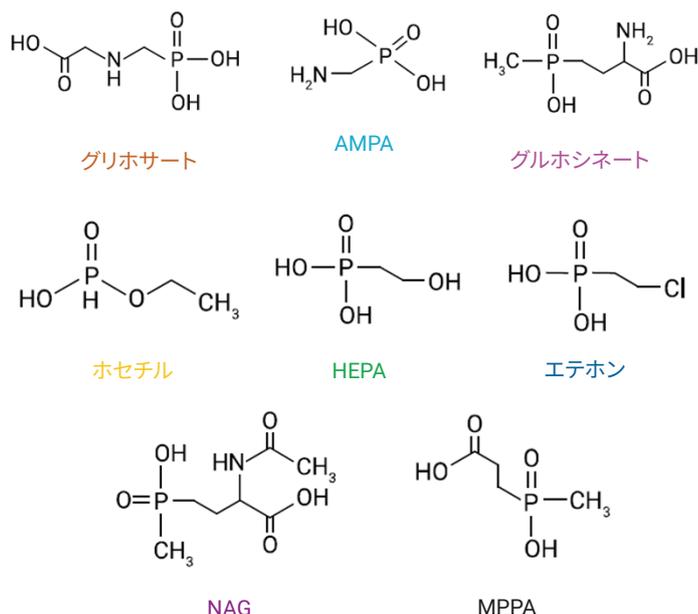


図 1. 分析対象物の構造

この研究では、これら2つの課題を克服するシンプルながらも効果的な手法を示し、ルーチン分析の迅速なサンプル前処理、堅牢な逆相クロマトグラフィー、高感度の質量分析検出に包括的に対応します。

実験方法

材料および試薬

- **グリホサート**: Sigma-Aldrich (p/n 45521-250MG)
- **AMPA**: Sigma-Aldrich (p/n 324817-250MG)
- **グルホシネートアンモニウム**: Sigma-Aldrich (p/n 45520-100MG)
- **ホセチルアルミニウム**: Toronto Research Chemicals Inc (p/n F727450)
- **HEPA**: Toronto Research Chemicals Inc (p/n H939650)
- **エテホン**: Toronto Research Chemicals Inc (p/n C366175)

- **NAG**: Toronto Research Chemicals Inc (p/n A178235)
- **MPPA**: Sigma-Aldrich (p/n 31264-100MG)
- **ギ酸**: アジレント・テクノロジー (p/n G2453-85060)
- **メタノール**: アジレント・テクノロジー (p/n 5191-4497)
- **Agilent InfinityLab ピークシャープナー (不活性化添加剤)**: (アジレント・テクノロジー p/n 5191-4506)

サンプル前処理

- 地表水サンプルを 15 mL ポリプロピレン (PP) チューブに採取しました。その後、チューブを 5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。約 1.5 mL の各上澄みを Agilent 0.2 μm ポリエーテルスルホン (PES) フィルタ (p/n 5190-5096) を備えたプラスチックシリンジにロードし、1.5 mL PP チューブにろ過しました。
- 飲料水サンプルを Agilent 0.2 μm PES フィルタ (p/n 5190-5096) を備えたプラスチックシリンジに直接採取し、1.5 mL PP チューブにろ過しました。

次に、999 µL の各原液をピペットで 2 mL HPLC バイアルに移して、1 µL の濃度の高いギ酸で酸性化し、最終濃度 0.1 % のギ酸を作成しました。その後、各バイアルにキャップをして軽くボルテックスしました。

標準溶液の前処理

AMPA、グリホサート、グルホシネート、MPPA、HEPA、NAG、ホセチル、およびエテホンの各原液を、10 mL の超純（タイプ 1）水に 10 mg の各標準を希釈することにより、15 mL ポリプロピレンチューブで前処理しました。

表 1. 段階希釈アプローチに従ったマトリックス適合キャリブレーションの前処理

キャリブレーションレベル	農業濃度 (µg/L)
13	10
12	5
11	2.5
10	1
9	0.75
8	0.5
7	0.25
6	0.1
5	0.075
4	0.05
3	0.025
2	0.01
1	0.005

検量線を、酸性化（0.1 % ギ酸）地表水または酸性化飲料水でマトリックス適合しました。サンプル前処理のセクションで説明したように、ブランクマトリックスを十分な量で前処理しました。次に、このブランクマトリックスを使用して、1 µL の 8 種類の各農業原液を 992 µL ブランクマトリックスと混合し、共通農業原液（1,000 µg/L）を 1.5 mL PP チューブで前処理しました。その後、共通原液 100 µg/L を同じブランクマトリックスにおいて追加で作成してから、段階希釈アプローチに従って 0.005 ~ 10 µg/L の範囲の 13 段階のキャリブレーションを作成しました。各ラボの QA/QC 要件に応じて検量点数を減らすことができます。

分析条件

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、トレイ冷却オプションを搭載
- Agilent 1290 Infinity II 一体型カラムコンパートメント (G7116B)

表 2. UHPLC 条件

UHPLC メソッドパラメータ			
分析時間	8 分		
再平衡化時間	12 分		
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm (p/n 693775-942)		
移動相 A	0.1 % ギ酸 + 5 µM Agilent InfinityLab ピークシャープナー（不活性化添加剤）超純水溶液		
移動相 B	0.1 % ギ酸メタノール溶液		
注入量	25 µL		
ニードル洗浄	フラッシュポートで 0.1 % ギ酸メタノール溶液により 3 秒間		
マルチサンブラ温度	4 °C		
カラム温度	40 °C		
流量	0.35 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	% 移動相 A	% 移動相 B
	0	99.9	0.1
	1.5	99.9	0.1
	2	80	20
	4	60	40
	4.1	0	100
	8	0	100

表 3. 質量分析のパラメータ

Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS				
取り込みモード	ダイナミック MRM (dMRM)			
イオン源	Agilent Jet Stream ESI			
極性	ポジティブ (+) またはネガティブ (-)			
キャピラリー電圧	3,000 V (+)、3,500 V (-)			
ドライガス流量	11 L/min			
ドライガス温度	220 °C			
ネブライザ圧力	30 psi			
シースガス温度	300 °C			
シースガス流量	11 L/min			
ノズル電圧	1,500 V (+)、800 V (-)			
Q1 および Q2 分解能	ユニット (0.7 amu)、オートチューンにより最適化			
デルタ EMV	0 V			
MRM トランジション	化合物	定量イオン	確認イオン 1	確認イオン 2
	AMPA	112 → 30 (+)	110 → 79 (-)	110 → 63 (-)
	グルホシネート	182 → 56 (+)	182 → 136 (+)	
	グリホサート	170 → 88 (+)	170 → 60 (+)	170 → 42 (+)
	HEPA	125 → 79 (-)	127 → 81 (+)	127 → 109 (+)
	MPPA	153 → 79 (+)	153 → 135 (+)	
	NAG	224 → 56 (+)	224 → 164 (+)	224 → 136 (+)
	エテホン	145 → 63 (+)	145 → 91 (+)	143 → 107 (-)
ホセチル	109 → 81 (-)	111 → 83 (+)	111 → 65 (+)	

結果と考察

分析ケミストは、3つの柱であるサンプル前処理、クロマトグラフィー、質量分析を、非常に低い検出レベルを達成するように最適に調整する必要があります。この調整は、グリホサートのような極性農薬に対しては常に課題になっていました。長年にわたり多数のアプローチが提案されてきましたが、このアプリケーションノートで示すメソッドは、3つの柱の間で良好な流れを実現しています。

最初に、このメソッドを使用して、水溶性の原材料を希釈しないか、または最小限に希釈することにより、検出限界をより低くできます。大量の原材料の長時間処理を避けることで、人件費と消耗品のコスト削減が可能になると同時に、スループット能力を向上できます。誘導体化も必要ないため、環境に有害な溶媒を使用する機会が減り、時間が短縮され、実施がより簡単になります。

2番目に、水溶性のマトリックスには、Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムが最適です。このカラムは結合相ケミストリを用いて開発されました。この相は、シリカ表面に正電荷を加えた後、C18官能基を結合して作成されているため、高極性のイオン

性分子に対する高い保持能力を発揮します。これにより、水性移動相条件とサンプルに全面的に対応するカラムとなっています。さらに、この両立性によりピーク形状を損なわずに大量の水溶性サンプルを注入することもできます。また、最も一般的な LC/MS 条件 (0.1% ギ酸) の1つを使用することにより専用のシステムは不要になり、長時間の洗浄およびコンディショニングを実施しなくても、同一の LC/MS システムにおいて、あるアプリケーションから別のアプリケーションに簡単に移行できます。ここで重要なことは、これらの条件により大部分の農薬でポジティブモードのトランジションも使用できるため、感度が向上することです。

3番目に、UHPLC 流路中に存在する可能性があり、リン酸含有化合物のピーク形状に悪影響を及ぼす微量金属元素については、次の2つの方法で対応します。

- 移動相システムに 5 μM InfinityLab ピークシャープナー (不活性化添加剤) (図 3) を導入することにより、一定の微量金属元素キレートを作成します。これは、ポジティブおよびネガティブモードのイオン化に悪影響を及ぼすことなく、質量分析計のイオン経路にも蓄積しません。

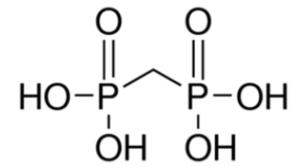


図 3. Agilent InfinityLab ピークシャープナー (不活性化添加剤) 中の主要な原材料の構造

- サンプルの導入点から質量分析計への流路内に存在する大半のステンレス (SST) を排除します。マルチサンプルのインジェクションバルブとカラム注入口の間にある標準の SST チューブを、PEEK ライナ付きチューブ (p/n G5667-81005) に交換します。このチューブを、ポリマー製フェラルを使用している Agilent クイックターンフィッティング (p/n 5067-5966) により、インジェクションバルブとカラムの両方に接続しました。

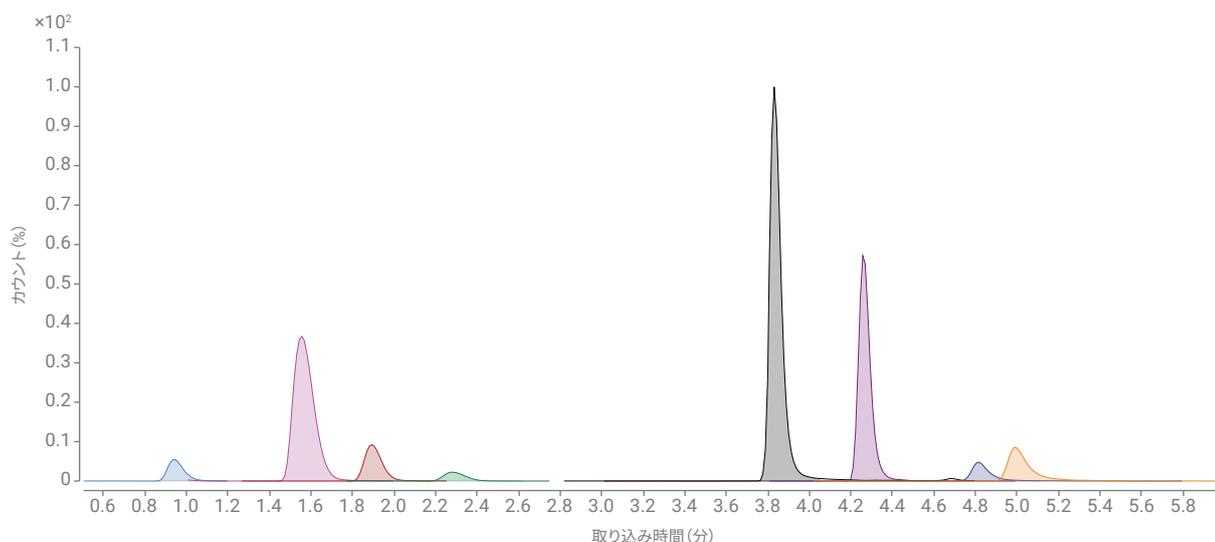


図 2. 10 μg/L における 8 種類の農薬の代表的なクロマトグラム。リテンションタイムは次のとおりです。AMPA = 0.95 分、グリホサート = 1.6 分、グリホサート = 1.9 分、HEPA = 2.3 分、MPPA = 3.8 分、NAG = 4.3 分、エテホン = 4.8 分、ホセチル = 5.0 分

最後に、Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システムを使用することにより、同一ダイナミック MRM ウィンドウ内の同一化合物に対して、ポジティブおよびネガティブの極性信号を取り込むことができるようになります。特定の化合物は、マトリックスに応じて、ポジティブまたはネガティブ極性で良好な感度（よ

り高い信号またはより低いノイズ）を示すことがあるため、これは定量に対する汎用的なアプローチになります。また高感度の 6470 は、グリホサートのメソッド検出限界（MDL）の算出値からわかるように、低 ng/L (ppt) 範囲においても、再現性の高いピーク面積を実現します。

カナダ都市ネットワークのモントリオールの飲料水、およびセントローレンス川（モントリオール、カナダ）で採取した地表水から得られた分析結果の主要な部分を表 4 に示します。

表 4. キャリブレーション結果 (各キャリブレーションを 3 回注入)

化合物	曲線タイプ	飲用水			河川水		
		直線性範囲 (ng/L)	キャリブレーションレベル数	R ²	直線性範囲 (ng/L)	キャリブレーションレベル数	R ²
AMPA	直線	100 ~ 10,000	8	0.9993	100 ~ 10,000	8	0.9993
グルホシネート	二次曲線	25 ~ 10,000	11	0.9998	25 ~ 10,000	11	0.9998
グリホサート	直線	25 ~ 10,000	11	0.9995	25 ~ 10,000	11	0.9997
HEPA	直線	50 ~ 10,000	10	0.9995	50 ~ 10,000	10	0.9994
MPPA	直線	50 ~ 10,000	10	0.9991	50 ~ 10,000	10	0.9986
NAG	直線	10 ~ 10,000	12	0.9986	10 ~ 10,000	12	0.9984
エテホン	直線	25 ~ 10,000	11	0.9990	25 ~ 10,000	10	0.9989
ホセチル	直線	10 ~ 10,000	12	0.9996	10 ~ 10,000	11	0.9996

検量線と直線性範囲

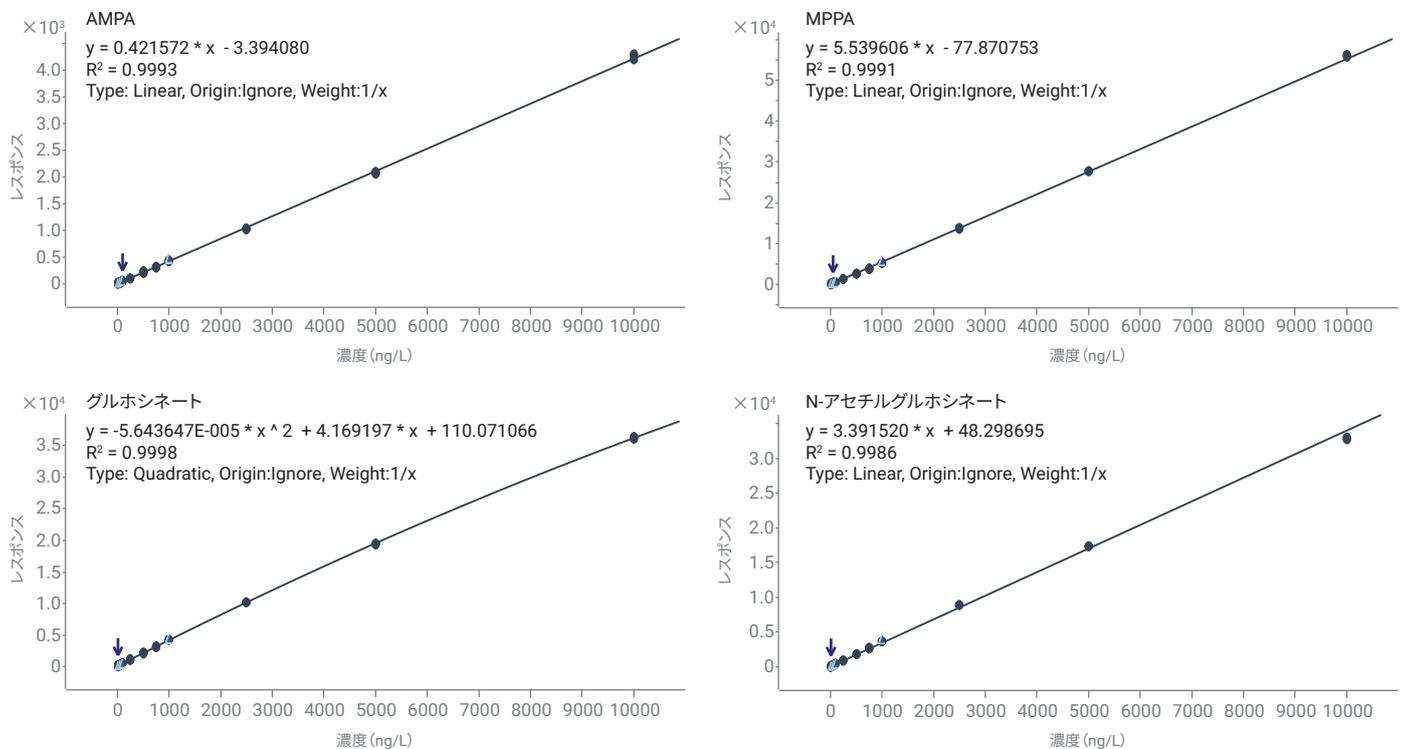


図 4. 各農薬の代表的な検量線 (次のページに続く)

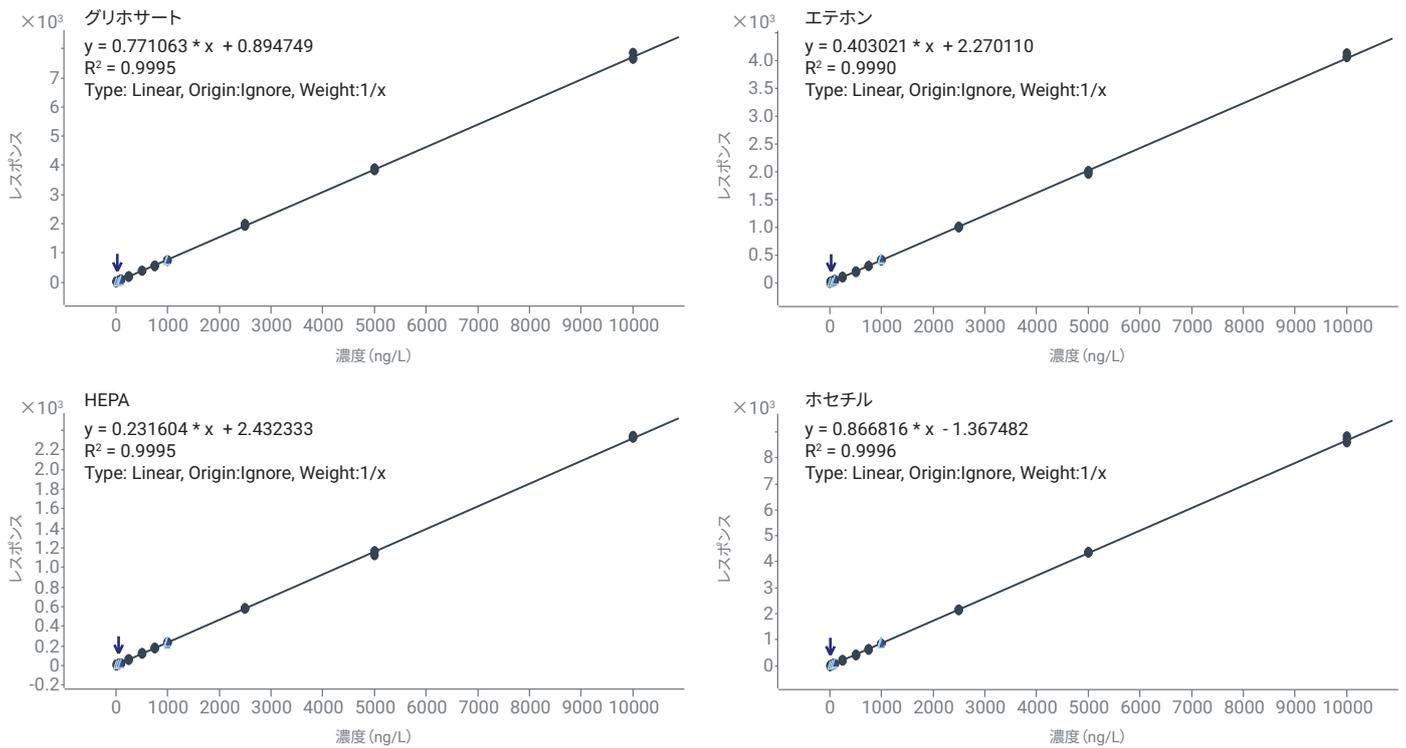


図 4. 各農薬の代表的な検量線(前のページからの続き)

定量下限での精度とクロマトグラム

表 5. キャリブレーション結果(各キャリブレータを3回注入)

化合物	飲用水		河川水	
	LOQ (ng/L)	LOQ での精度 (3回の繰り返し分析の平均)	LOQ (ng/L)	LOQ での精度 (3回の繰り返し分析の平均)
AMPA	100	102.9 %	100	87.6 %
グルホシネート	25	107.2 %	25	85.6 %
グリホサート	25	96.8 %	25	108.6 %
HEPA	50	110.9 %	50	105.8 %
MPPA	50	120.3 %	50	118.9 %
NAG	10	82.6 %	10	93.4 %
エテホン	25	92.5 %	50	121.7 %
ホセチル	10	108.9 %	25	96.6 %

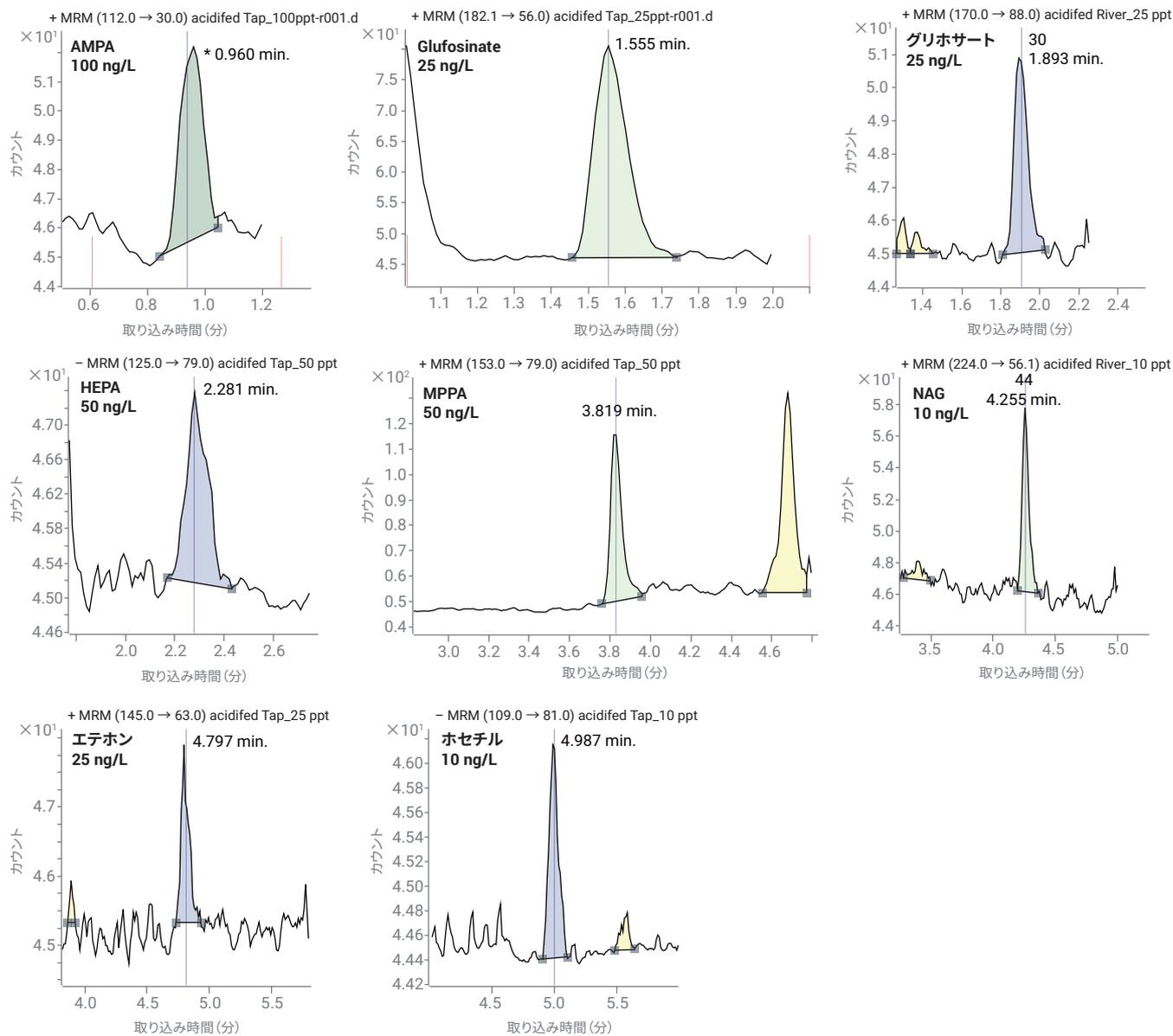


図 5. それぞれの LOQ での各農薬の代表的なクロマトグラム

グリホサート MDL

MDL の算出は、一連の繰り返し注入での再現性の統計情報に基づいて実施し、オンカラム濃度を決定しています。ここでは、99 % の信頼度で算出され、EPA ガイドラインに従って、サンプルがベースラインノイズから明確かつ高い再現性で区別されます。³グリホサート MDL は、4 日間にわたり 4 種類の異なるロットの 4 種類の異なるカラムで 4 種類の異なる 10 ng/L キャリブレーションを使用して、次の式で算出しました。

$$MDL = (\text{オンカラム濃度}) \times (\%RSD/100) \times (t\text{-統計量})$$

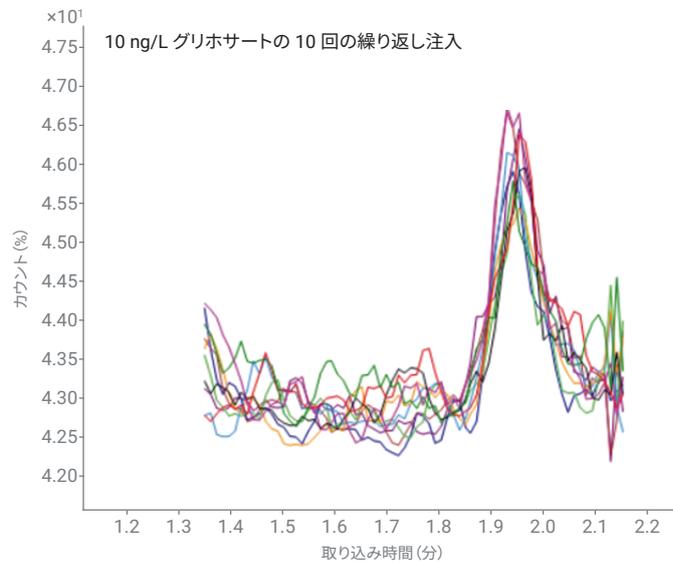


図 6. 10 ng/L におけるグリホサートキャリブレーションの繰り返し注入の 10 回の重ね表示

表 6. グリホサートの MDL 算出値

		ユーザー入力注入ユニット				
		1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	
		ユーザー入力サンプル量 (濃度またはオンカラム量)				
		10	10	10	10	
		ユーザー入力レスポンス (マニュアル積分なし)				
最低 推奨	繰り返し分析 1	13	15	20	11	
	繰り返し分析 2	19	30	15	12	
	繰り返し分析 3	15	26	25	10	
	繰り返し分析 4	17	14	16	15	
	繰り返し分析 5	16	20	18	11	
	繰り返し分析 6	16	13	11	15	
	繰り返し分析 7	29	25	10	12	
	繰り返し分析 8	23	15	10	11	
	繰り返し分析 9	14	22	14	7	
	繰り返し分析 10	21	17	16	9	
		算出パラメータ				
		%RSD (CV)	26.7 %	29.7 %	30.5 %	21.7 %
		臨界 t-値 (t)	2.821	2.821	2.821	2.821
		MDL (ng/L)	7.5	8.4	8.6	6.1

結論

このアプリケーションノートで説明したワークフローは、地表水と飲料水中の非誘導体化グリホサートおよびその他の7種類の極性農薬の分析において、サンプル前処理、クロマトグラフィー、および質量分析を適切に調整したアジレントのソリューションを示しています。

移動相に Agilent InfinityLab ピークシャープナー（不活性化添加剤）を追加し、マルチサンプルとカラム間で PEEK ライナ付きチューブを使用することにより、流路内に存在する可能性があり、極性化合物のピークテーリングを引き起こす微量金属元素を最小限に抑えました。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムは、新しい逆相充填剤を使用しています。これは、水性抽出物の大注入量に対する耐性があり、酸性条件においてピーク形状を損なわずに、これらの極性化合物を良好に保持します。

Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システムは、高い感度、再現性、直線性を実現しており、地表水と飲料水中の分析困難な成分の定量分析に最適です。

謝辞

この研究に対して重要な助言をくださったアジレントの Theresa Sosienski、Dorothy Yang、Jordy Hsiao、および Anne Mack に感謝いたします。

参考文献

1. Zweigenbaum, J.; Lucas, D.; Cali, A. Direct Analysis of Glyphosate, AMPA, and Other Polar Pesticides in Food. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0796EN, **2019**.
2. Hsiao, J. J. *et al.* Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Analytical Chemistry* **2018**, *90*(15), 9457–9464.
3. US EPA, Procedures for Detection and Quantitation – Documents. <https://www.epa.gov/cwa-methods/procedures-detection-and-quantitation-documents>

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, January 13, 2021
5994-2986JAJP
DE44208.613275463