親水性相互作用クロマトグラフィーにおける極性農薬の保持挙動

四ノ宮美保, 岩切 良次

環境省環境調査研修所 (〒359-0042 埼玉県所沢市並木3-3)

[平成23年4月8日受付, 平成23年8月16日受理]

Retention Behavior of Polar Pesticides in Hydrophilic Interaction Chromatography

Miho SHINOMIYA and Ryoji IWAKIRI

National Environmental Research and Training Institute, Ministry of the Environment
(3-3 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-0042)

[Received April 8, 2011; Accepted August 16, 2011]

Summary

A comprehensive retention and selectivity characterization of five hydrophilic interaction chromatography (HILIC) stationary phases was performed with seven polar pesticides (acephate, methamidophos, asulam, mecoprop, triclopyr, dalapon and amitrole), in order to study the effect of surface chemistry and mobile phase composition on chromatographic behavior and ESI-MS response. Selectivity differences were compared for all columns operated in neutral condition. Additionally, the influence of mobile phase condition on retention behavior was studied for each column. In our results, an increase of the percentage of organic solvent in the mobile phase led to an increase of the retention factor and the number of theoretical plate for all analytes and all columns, whereas the significant differences in the effect of salt concentration were observed for different stationary phases. In addition, moderate differences in selectivity were observed on the same column operated at different pH, especially in acidic compounds. In general, higher column temperature led to weaker retention and, however, the decreasing rate of retention time depended on the characteristics of stationary phase and target compound. In some case, the retention increased with the temperature on HILIC column. The data from this study can be used to establish guidelines for rapid HILIC method development of polar compounds.

Key words: HILIC, polar pesticides, LC-MS/MS, mobile phase

1. はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)が医薬品分析, 食品分析, 環境分析などの様々な分野において親水性物質の分離手段として用いられるようになってきており, HILICを使用した分析法やその分離機構等に関する報告例は年々増加をしている¹⁻⁴⁾。HILICでは, 固定相として未修飾シリカゲルあるいはアミノ基などの極性基を結合させたシリカゲル等が使用され, 移動相としては有機溶媒比率が60%以上の緩衝液との混合溶液が用いられる。移動相と固定相の極性の大きさの関係から, HILICは広義の順相クロマトグラフィーに分類されることもあり, 保持の傾向も順相クロマトグラフィーと同じく, 疎水性物質の保持は弱く, 親水性物質がより強く保持をされる¹⁻³⁾。

有機化学物質の分析における高速液体クロマトグラフィーを用いた分離には, カラムの取り扱いが容易であり, かつ多様な物質に対しての適用例があるといった利点から, これまで逆相クロマトグラフィー(RPLC)が主に用いられてきた。RPLCでは, 保持の傾向は順相クロマトグラフィーとは逆になり, 親水性物質の保持は弱く, 疎水性物質が強く保持をされるため, 親水性物質のカラムへの保持

が困難であることがRPLCの大きな欠点である。従って, RPLCにおいて親水性物質を保持させるためには移動相の有機溶媒比率を下げる, イオンペア試薬を使用するなどの対応が必要になってくる⁵⁾。

一方で, 最近液体クロマトグラフの検出器として質量分析計を用いた液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)の適用が増加しており, 環境省や厚生労働省による種々のマニュアルにも分析手法として記載されるようになってきた⁶⁻⁸⁾。LC/MSにおいては主にイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法(ESI法)が汎用されているが, その際, 移動相中のアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒の比率が低いとイオン化効率が減少し, 感度が低下するといった問題がある⁹⁾。また, イオンペア試薬を使用すると測定対象物質の感度低下のみならず, 装置内に試薬が残存し, 後の測定においても他の測定対象物質の感度を下げる原因となり得るため, LC/MSにおいてはイオンペア試薬の添加は推奨されていない。このため, LC/MSによる親水性物質の分析には, RPLCに代わり, 徐々にHILICが適用されるようになってきており, 特にペプチド類, 糖類, 塩基性医薬品及びその代謝物など^{1,2,10)}の分析で多く使用されている。また, 環境化学の分野においても, アミトロール¹¹⁾, イミノクタジン¹²⁾, グリホサート¹³⁾, ジクワット¹⁴⁾, アセフェート¹⁵⁾

などの親水性農薬の HILIC カラムを使用した LC/MS による分析例が報告されている。

HILIC での物質の分離は、主に親水性の固定相表面に形成された水層と、有機溶媒比率が高く相対的に疎水性である移動相との間で物質が分配されることによって成り立っていると報告されている¹⁾。しかし、他にも固定相と対象物質間に生じる水素結合、双極子-双極子相互作用及び静電的相互作用も分離に関与しており、また分配とその他の相互作用の分離への寄与率が固定相の種類、測定対象物質及び移動相条件等により異なってくるため¹⁶⁾、分離メカニズムはさらに複雑になっている。これまで、HILIC における固定相の種類と移動相条件が測定対象物質の保持に与える影響を検討した報告^{4, 10, 13, 16-18)}はあるが、質量分析計 (MS) での感度に与える影響も同時に検討した例¹⁹⁾は少ない。さらに、農薬等の環境汚染物質を対象とした同様の報告例はほとんどないため、LC/MS による分析において HILIC での移動相条件を最適化するには、類似化合物の測定条件を参考にして、移動相への添加物 (緩衝液や酸、塩基など) の種類や濃度を試行錯誤的に変化させたり、固定相の異なるカラムを次々に検討していくといった手段を取ることが多く、測定対象物質や固定相及び移動相の物理化学的な性質を考慮に入れた方法はあまり採用されていない。

本研究では、HILIC における農薬分離の一般則を得ることを目的とし、アセフェート、メタミドホス、アシユラム、トリクロピル (遊離)、メコプロップ、ダラポン及びアミトロールの 7 種農薬について、市販されている 5 種の HILIC 系カラムにおける保持挙動について検討を行った。また、液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による分析法への適用を考え、移動相条件が MS の感度に与える影響についても合わせて検討したので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試薬等

対象農薬は Fig. 1 に示した。アセフェート及びメタミドホス溶液 (10 µg/mL、アセトニトリル溶液) 及びアミトロールは Dr.Ehrenstorfer GmbH 製のものを使用した。ダラポン、アシユラム、トリクロピル (遊離) 及びメコプロップは、関東化学から購入した標準品をアセトニトリルに溶解して用いた。アセトニトリル、

Fig. 1 Structures and characteristics²⁴⁾ of the studied pesticides

メタノール及びギ酸は LC/MS 用 (関東化学製) を、ギ酸アンモニウムは特級 (和光純薬製) を使用した。精製水は日本ミリポア製 Elix10-MilliQ gradient 超純水製造システムにて精製したものを使用した。ギ酸アンモニウム緩衝液は、目的濃度に調製したギ酸アンモニウム水溶液と同濃度のギ酸水溶液を pH メーター (HORIBA 製 pH meter F-52) で測定しながら、混合することによって作成した。ZIC-HILIC カラムは SeQuant 社製のものを Merck 社から購入した。Inertsil HILIC 及び Atlantis Silica HILIC カラムは、それぞれ GL サイエンス及び Waters 社から、TSK-GEL NH2-100 及び TSK-GEL Amide-80 は東ソー社から購入したものをを使用した。

2. 2 分析装置及び測定条件

液体クロマトグラフは Waters 製 Alliance 2695 を、タンデム質量分析計としては Micromass 製 Quattro micro API を使用した。カラム温度 30 °C、流量 0.10 mL/min (ZIC-HILIC) 及び 0.20 mL/min (その他のカラム)、注入量 5 µL にて測定を行った。移動相は A 液: ギ酸アンモニウム緩衝液、B 液: アセトニトリルとし、装置上で必要な比率に混合した。

イオン化法は ESI 法で、キャピラリー電圧: 1.5 kV あるいは -3.0 kV、イオン源温度: 120 °C、脱溶媒温度: 400 °C、脱溶媒ガス流量: 600 L/hr、コーンガス流量: 50 L/hr の条件で測定を行った。検出は Selected Reaction Monitoring (SRM) 法により実施し、各農薬に対応したイオントランジション及びコリジョンエネルギーは、インフュージョン分析にて最適化を行い、各農薬の MS/MS 条件は Table 1 に示した。分析装置の制御、データ採取及び解析は MassLynx4.1 (Micromass 製) を使用した。

保持時間は、それぞれの移動相を 30 カラムボリューム程度流して平衡化した後に 3 回測定を行い、その平均値で評価した。デッドボリューム時間 (t_0 : min) は、 $t_0 = 0.25 \times d^2 \times \pi \times e \times L/F$ 、カラム内径 d (cm)、カラム長さ L (cm)、流速 F (mL/min)、カラム空隙率 $e = 0.7$ から概算し、保持係数 k の計算にはこの t_0 を使用した。理論段数 (N) は半値幅法により、 $N = 5.54 \times (t_R/W_{0.5})^2$ 、保持時間 t_R (min)、半値幅 $W_{0.5}$ (min) から算出した。

Table 1 Tandem mass spectrometry transitions for the acquisition mode

Pesticide	Ionization mode	SRM transition	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
Acephate	ESI+	184.0 > 143.0	22	6
		184.0 > 49.0	22	18
Methamidophos	ESI+	142.0 > 94.0	24	12
		142.0 > 125.0	24	12
Asulam	ESI+	231.0 > 156.0	20	12
		231.0 > 64.9	20	44
Triclopyr	ESI-	253.8 > 195.8	16	10
		253.8 > 217.9	16	6
Mecoprop	ESI-	212.9 > 140.9	22	16
		214.9 > 142.8	22	16
Dalapon	ESI-	140.8 > 96.8	16	8
		140.8 > 104.9	16	8
Amitrole	ESI+	84.7 > 56.9	30	18
		84.7 > 46.7	30	14

3. 結果及び考察

3. 1 固定相の違いによる農薬の溶出パターン

HILIC での保持メカニズムは複雑であり、使用されるカラムの官能基の種類によってクロマトグラムの溶出パターンに変化が生じる。本検討のために選択した5種の異なる極性固定相を有する市販カラムを Table 2 に示してある。これらは全てシリカベースのカラムであるが、固定相の表面の化学的な性質は大きく異なっている。ZIC-HILIC カラムの固定相はシリカ表面に両性イオン性のスルホベタイン基が結合しており、Inertsil HILIC カラムはアルキルジオール基を保有している。Atlantis Silica カラムは無修飾のシリカを充填しており、NH2-100 カラムではアミノプロピル基を有し、Amide-80 カラムはシリカ表面に脂肪族の炭素鎖でカルバモイル基を結合させた充填剤を使用している。

移動相溶媒をアセトニトリル/20 mM ギ酸アンモニウム (pH6.3) (= 90/10 (v/v)) とした場合の5種の HILIC 系カラムにおける7種農薬のクロマトグラムを Fig. 2 に示している。NH2-100 カラムは他のカラムと異なった保持力を示し、アシュラム (ピーク #3)、メコプロップ (#4)、トリクロピル (#5) 及びダラポン (#6) といった酸性農薬は固定相に強く保持され、20 分以内に溶出してこなかった。NH2-100 カラムにおける充填剤の官能基であるアミノ基は、この実験条件下ではプロトン化し、正の電荷を有しているため、陰イオン交換基として働くことができる。一方、アシュラム、メコプロップ、トリクロピル及びダラポンの pKa は、それぞれ 4.68, 3.11, 3.94 及び 1.74 であり、この移動相条件下では主に脱プロトンして陰イオンになっているため、固定相との間に強いイオン交換相互作用が働いているものと考えられる。HILIC におけるアミノ基を有する固定相と酸性化合物のイオン交換相互作用の影響は Guo らによっても報告されている¹⁶⁾。また、ZIC-HILIC カラムでは、アシュラム及びダラポンの保持が強く、3 種のカラム (Inertsil HILIC, Atlantis Silica 及び Amide-80) とは溶出順序が異なっていたが、他の酸性農薬であるメコプロップとトリクロピルについてはこれら3種のカラムとほぼ同等の保持を示した。ZIC-HILIC カラムにおいても、修飾基であるスルホベタイン基の窒素が4級アミンとなっているため、正の電荷を有しているが、外側に位置するスルホン酸が陰イオンであるため、農薬のように比較的大きなサイズの陰イオンは4級アミンまで接近できず、イオン交換相互作用が

働きづらいことから、NH2-100 カラムとは異なった保持挙動を示したものと考えられる。

Atlantis Silica, Inertsil HILIC 及び Amide-80 カラムでは7種農薬は同じ順序で溶出してきたが、ピーク分離は Atlantis Silica カラムが最も良好であった。ただし、ピーク形状はややリーディングしていた。

NH2-100 以外のカラムにおいて、7種の農薬間での保持の強さを比較すると、アセフェート及びメタミドホスは保持係数が小さく、逆にアミトロールは最も保持係数が大きい結果となった。これらの農薬の pH7 における logPow はほぼ同程度であることから、logPow と保持係数の間に明確な相関関係は認められなかった。HILIC においては、容易に logPow からのみ溶出順位を推測することは難しく、親水性係数や定量的構造保持相関 (QSRR) モデルなど他の物理化学的なパラメーターを用いての保持時間予測の研究が行われている²⁰⁻²²⁾。

Positive mode

Negative mode

Table 2 Stationary phases of columns for the HILIC selectivity study

Column	Dimension (mm)	Diameter of particle (μm)	Structure
ZIC-HILIC	2.1 × 100	3.5	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CH}_2\text{—N—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—SO}_3^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Silica
Inertsil HILIC	2.1 × 150	5	Alkyl diol bonded on silica
Atlantis Silica HILIC (Atlantis Silica)	2.0 × 150	3	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{—Si—OH} \end{array}$
TSK-GEL NH2-100 (NH2-100)	2.1 × 150	3	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{—Si—R—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2 \end{array}$
TSK-GEL Amide-80 (Amide-80)	2.0 × 150	3	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \quad \text{R}_4 \\ \quad \\ \text{—O—Si—R}_3\text{—(CH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{—(CH}_2\text{CH}_2\text{)}_m\text{—C(=O)—NH}_2 \\ \\ \text{R}_1 \end{array}$

Fig. 2 Analysis of test compounds on different HILIC columns. Column temperature: 30 °C; Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution, pH 6.3 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min for ZIC-HILIC or 0.2 mL/min for others. 1: Acephate (1 ng/mL), 2: Methamidophos (25 ng/mL), 3: Asulam (10 ng/mL), 4: Mecoprop (20 ng/mL), 5: Triclopyr (60 ng/mL), 6: Dalapon (90 ng/mL), 7: Amitrole (65 ng/mL)

3. 2 農薬の保持時間及び分離に影響を与える因子

3. 2. 1 移動相におけるアセトニトリル/ギ酸アンモニウム緩衝液の比率が与える影響

RPLCにおける分離と同様、HILICの分離には水とアセトニトリルあるいはメタノールを移動相として使用するが、HILICの相互作用を発揮させるにはRPLCよりも高い有機溶媒比率(> 60%)が必要である。有機溶媒比率は最も保持に影響を与える因子であると考えられており、混和するギ酸アンモニウム緩衝液濃度を一定(20 mM)にして、アセトニトリルの比率を変化させることにより7種農薬の保持がどのような影響を受けるのか、5種類のカラムを用いて検討を行った。本検討において塩濃度を低く設定したのは、有機溶媒比率が高い(約95%)と移動相での塩の溶解度が低く、アセトニトリルと緩衝液を混和した際に塩が析出してしまう恐れがあること、また質量分析計で測定する場合、塩濃度が高いと感度の低下につながること^{9,23)}を考慮したためである。また今回アセトニトリルを有機溶媒として使用したのは、HILICではメタノールやイソプロパノールに比べて弱い溶出溶媒であるために対象物質の保持が強くなること、ピーク形状が良好となる例が多いことが理由である^{17,18)}。

Fig. 3に示したように、ZIC-HILICでは80%から95%の範囲で移動相のアセトニトリルの比率を増加させていくと、全ての対象農薬の保持時間は長くなった。この傾向はHILICでの典型的な保持挙動である。ただし、物質によりその保持時間の増加割合は異なり、溶出順位の逆転も認められた。例えば、アセトニトリルを90%か

Positive mode

Negative mode

Fig. 3 Effect of the organic solvent percentage on the retention time. Column: ZIC-HILIC; Column temperature: 30 °C; Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution, pH 6.3; Flow rate: 0.1 mL/min. 1: Acephate (1 ng/mL), 2: Methamidophos (25 ng/mL), 3: Asulam (10 ng/mL), 4: Mecoprop (20 ng/mL), 5: Triclopyr (60 ng/mL), 6: Dalapon (90 ng/mL), 7: Amitrole (65 ng/mL)

ら95%に上昇させた場合はアミトロール、メコプロップ、トリクロピル及びダラポンの保持時間の増加率が高く、メコプロップ、トリクロピル及びダラポンは95%アセトニトリルの条件においては、アシュラムよりも溶出が遅くなった。一方で、アセフェート及びメタミドホスはアセトニトリルの比率を上げてあまり保持の増加は認められなかった。他の4種のカラムにおいても、アセトニトリル比率の増加と共に全ての農薬において保持が強くなることが確認され、アセトニトリル比率が90%から95%の間で急激な保持係数の増加が認められた。

移動相中のアセトニトリル比率が分離に与える影響を評価するため、各物質由来のピークについて理論段数を算出した。Fig. 4に示したように、全体的にはアセトニトリル比率が高いほど理論段数も高くなり、分離の性能は良好となった。特に、トリクロピルとメコプロップにおいてはアセトニトリル比率が85%から90%に上昇すると、急激に理論段数が増加し、95%ではほぼ90%と同等の高い理論段数を示した。一方、ZIC-HILICカラムへの保持力の弱いアセフェートの理論段数は他の物質に比べて低く、アセトニトリル比率を上げてピーク幅の改善はほとんど認められなかった。また、他のHILICカラムにおいてもZIC-HILICと同様な傾向が見られた。

3. 2. 2 移動相におけるギ酸アンモニウム緩衝液濃度が与える影響

イオン性物質の分析を行う際、対象物質の溶出や良好なピーク形状を得るために移動相中に塩を添加することは重要である。また移動相中の緩衝液濃度が保持時間に与える影響を調べることは、HILICにおける測定対象物質の保持メカニズムを理解するための一手段であり、Guoらは緩衝液濃度の増加と共に保持時間が長くなるのは対象物質が固定相表面に形成された水層と疎水的な移動相間の分配メカニズムでカラムに保持されている証拠であると述べている¹⁶⁾。本検討では、NH2-100以外のカラムに関しては、移動相のアセトニトリル比率を90%に固定したまま、ギ酸アンモニウム緩衝液(pH6.3あるいはpH3.0)濃度を5, 10, 15及び20 mMと変えて保持時間を比較した。前述の通り、移動相における塩の溶解度の限界とLC-MSへの導入を考慮し、ギ酸アンモニウム緩衝液は20 mMを最高濃度とした。Fig. 5にZIC-HILICカラムにおいて緩衝液pHを6.3と3.0にした場合の結果を示している。pH6.3の条件下では

Fig. 4 Effect of acetonitrile percentage in mobile phase on number of theoretical plate (N). Column: ZIC-HILIC; Column temperature: 30 °C; Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution, pH 6.3; Flow rate: 0.1 mL/min

(Fig. 5 (A)), 4 種の酸性農薬は緩衝液濃度の増加とともに保持時間が長くなったが, アセフェート, メタミドホス及びアミトロールの保持時間は緩衝液濃度の影響を受けなかった。他のカラムのうち, Inertsil HILIC, Atlantis Silica 及び Amide-80 カラムにおいても同様の現象が認められた。この移動相 pH においては, 固定相上のシラノール基は脱プロトン化し, 負の電荷を持っているため, 陰イオンの状態にある農薬との間に静電的な反発が働いている。さらに, ZIC-HILIC カラムではスルホ基との間でも同様の反発が存在していると考えられる。緩衝液濃度の増加に伴い酸性農薬の保持力が増加したのは, イオン強度を上げることによってこの静電的な反発が弱まったことが原因であると推測される。また, Alpert は, 緩衝液濃度が上昇することで, HILIC カラムの固定相表面に形成された水

(A) pH6.3

(B) pH3.0

Fig. 5 Influence of the concentration of ammonium formate aqueous solution on the retention time in ZIC-HILIC. Mobile phase: ACN-ammonium formate aqueous solution (A) pH6.3 and (B) pH3.0 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min

層が厚くなり, 溶質が水層に分配されやすくなると報告しており, このような効果も否定できない。今回アセフェート他3種農薬の保持時間はイオン強度の影響は認められなかったが, 本検討では緩衝液濃度を 20 mM までに抑えたことによって影響を確認することができなかった可能性がある。

一方, pH3.0 の条件下では (Fig. 5 (B)), トリクロピル, メコプロップ及びダラボンの酸性農薬は緩衝液濃度の増加とともに保持時間が長くなったが, アシュラムの保持時間は緩衝液濃度の影響を受けなかった。アシュラムは pK_a が 4.68 であり, pH3.0 の条件下では陰イオンの比率が少ないため, 静電的な反発が小さく, イオン強度の影響を受けにくかったものと考えられる。また, アミトロールは pH3.0 では, 緩衝液濃度の増加と共に保持時間が短くなった。アミトロールは pH3.0 では, 共役酸の pK_a が 4.11 であることから陽イオンの状態であると考えられ, 保持には ZIC-HILIC 固定相上のスルホベタイン基上のスルホン酸とのイオン交換相互作用が関与していると推測される。従って, 緩衝液濃度の増加と共にイオン交換相互作用が弱まり, 保持力が減少したものと考えられる。

NH2-100 カラムでは, 90 %アセトニトリルの移動相条件下では 4 種の酸性農薬が 20 分以内に溶出してこなかったため, アセトニトリル 80 %の条件下で酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.3) の濃度を 20, 30 及び 40 mM と変えて検討を行った (Fig. 6)。4 種の酸性農薬は緩衝液濃度の増加とともに保持時間が短くなったが, アセフェート, メタミドホス及びアミトロールでは, 他のカラムと同様に緩衝液濃度の影響はほとんど見られなかった。このことから NH2-100 カラムにおいて, 酸性農薬の保持には主にイオン交換相互作用が寄与していることが示唆された。

緩衝液濃度が分離に与える影響について理論段数を指標として評価をしたところ, Table 3 に示したように, Inertsil HILIC カラムでは全ての農薬において緩衝液濃度の影響をほとんど受けなかった。一方, ZIC-HILIC カラムにおいては, アセフェート, メタミドホス, アシュラム, メコプロップ及びアミトロールは緩衝液濃度により理論段数は影響を受けなかったが, トリクロピルは 20 mM における理論段数が 10 mM の場合よりも 4 倍程度高く, 逆にダラボン

Fig. 6 Influence of the concentration of ammonium formate aqueous solution on the retention time in NH2-100 column. Mobile phase: ACN-ammonium formate aqueous solution pH6.3 (80:20 (v/v)); Flow rate: 0.2 mL/min

では緩衝液濃度が 20 mM になるとピーク幅が広がる結果となった。Atlantis Silica 及び Amide-80 カラムでは、ダラポンは緩衝液濃度が低い場合にピーク幅が広がる結果となったが、他のカラム及び農薬の組み合わせでは緩衝液濃度により分離性能に変化は認められなかった。

3. 2. 3 緩衝液 pH が与える影響

RPLC において、移動相の pH は移動相内での測定対象物質の解離状態に影響を与えるため、保持と選択性を制御する重要なファクターとなる。HILIC では、移動相の pH は測定対象物質の解離状態のみならず、充填剤の官能基の電荷状態にも影響を与えるため、保持や選択性にさらに大きな影響を与えるものと考えられる。本検討では、アセトニトリルと混和する前の緩衝液 pH を 3.0 から 6.3 の範囲で変化させることによって、移動相 pH が保持と分離に与える影響を調べた。ZIC-HILIC カラムにおける各農薬の保持係数に与える緩衝液 pH の影響を Fig. 7 に示した。アシュラム、トリクロピル、メコプロップ及びダラポンの酸性農薬は pH の上昇と共に保持時間が増加した。一方、塩基性農薬であるアミトロールは逆に pH 3.0 から 3.6 に変化させると保持時間が減少し、3.6 から高い pH ではほぼ一定の値を示した。今回検討に使用した酸性農薬はその pKa が 1.74 から 4.68 の領域にあるため、pH の上昇と共に解離割合が増加することで分子全体の親水性が大きくなり、保持時間が長くなったものと考えられる。反対に、塩基性のアミトロールは共役酸の pKa が 4.14 であるため、低い pH 領域ではイオン化しており、親水性が大きいため保持時間が長く、一方中性付近ではイオン化していないために、親水性は小さくなり、保持時間が短くなったと考えられる。また、この pH 領域では移動相中でイオン化しないアセフェート及びメタミドホスは pH の影響は全く受けず、一定の保持時間を示した。

Inertsil HILIC, Atlantis Silica 及び Amide-80 カラムにおいては、アシュラムを除く 6 種の農薬では、ZIC-HILIC カラムと同様の現象が見られた。一方、アシュラムの保持時間は Inertsil HILIC 及び Amide-80 カラムでは、ZIC-HILIC カラムと同様に pH の上昇と共に長くなったが、その割合は小さく、また Atlantis Silica カラムにおいては全く pH の影響を受けず、pH 3.0 から 6.3 の間でほぼ一定であった (Fig. 8)。

NH₂-100 カラムにおいては、前に述べた理由のため、アセトニトリル / 20 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (= 80 / 20 (v/v)) の条件下で検討を行った。アシュラムについては pH の減少と共に保持時間が短くなり、逆にメコプロップ、トリクロピル及びダラポンの

保持時間は増加していった (data not shown)。他の 3 種の農薬についてはほとんど pH の影響は受けなかった。アシュラム等の酸性農薬は移動相の pH が増加すると共に解離した陰イオンの比率が上昇し、NH₂-100 の官能基である R-NH₃⁺ とのイオン交換相互作用は酸性領域よりも中性領域で強くなると考えられる。しかし、今回メコプロップ、トリクロピル及びダラポンは酸性領域の方が強く保持されていた。これは緩衝液調製の際に、等濃度のギ酸アンモニウム水溶液とギ酸水溶液を混合する方法を採用しており、低い pH になるほどアンモニウムイオンの量が少なくなり、イオン強度が減少

Fig. 7 Influence of the pH value of ammonium formate aqueous solution on the retention factor (k) in ZIC-HILIC column. Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min

Fig. 8 Influence of the pH value of ammonium formate aqueous solution on the retention factor (k) of asulam. Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min for ZIC-HILIC or 0.2 mL/min for others

Table 3 Effect of concentration of ammonium formate aqueous solution in mobile phase on number of theoretical plate (N)

Pesticide	Number of theoretical plate (N)			
	ZIC-HILIC		Inertsil HILIC	
	10 mM	20 mM	10 mM	20 mM
Acephate	1600	1800	1200	1200
Methamidophos	1900	1900	1500	1500
Asulam	9100	10000	1400	1600
Triclopyr	2600	11000	2900	2600
Mecoprop	14000	15000	2500	3100
Dalapon	13000	7700	1600	2500
Amitrole	6700	5800	3400	3400

Mobile phase: ACN - ammonium formate aqueous solution, pH6.3 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min for ZIC-HILIC and 0.2 mL/min for Inertsil HILIC.

してしまったため、イオン強度の影響を受けやすい農薬については pH を下げると保持時間が上昇するといった結果になったものと推測される。

ギ酸アンモニウム緩衝液の pH が分離性能に与える影響もアセトニトリル比率や緩衝液濃度と同様に評価した。アセフェート、メタミドホス、アシュラム及びアミトロールに関しては、全てのカラムにおいて緩衝液 pH によって理論段数に変化は見られなかった。一方、pH3.0 の条件下で ZIC-HILIC、Amide-80 及び Atlantis Silica において酸性農薬の理論段数が低い結果となったが、pH3.7 から pH6.3 の領域では理論段数に大きな違いは見られなかった (data not shown)。

3. 2. 4 カラム温度が与える影響

カラム温度もまた HILIC での分離において極性物質の保持に影響を与える重要な因子である。そこで、カラム温度を 30℃ から 50℃ まで変化させ、各種カラムにおける農薬の保持時間を測定した。Fig. 9 は ZIC-HILIC カラムでの結果を示している。アミトロールとアシュラムにおいてはカラム温度を上昇させていくと保持時間が短くなったが、ダラポンは温度の上昇と共に保持時間は長くなる傾向にあり、30℃ と 50℃ ではアシュラムと溶出順位が逆転した。

Fig. 9 Influence of the column oven temperature on the retention time. ZIC-HILIC column. Mobile phase: ACN-20 mM ammonium formate aqueous solution, pH6.3 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min

Table 4 Retention factor ratios of target pesticides for each HILIC column

Pesticide	Retention factor ratio ($k_{50^\circ\text{C}}/k_{30^\circ\text{C}}$)				
	ZIC-HILIC	Inertsil HILIC	Atlantis Silica	Amide-80	NH2-100
Acephate	0.90	0.88	0.92	0.87	0.92
Methamidophos	0.94	0.92	0.94	0.92	0.93
Asulam	0.87	0.78	0.98	0.80	1.00
Triclopyr	0.94	0.75	1.03	0.91	1.46
Mecoprop	0.94	0.71	0.96	0.84	1.34
Dalapon	1.04	0.75	0.93	0.85	1.29
Amitrole	0.93	0.77	0.88	0.82	0.86

Mobile phase: ACN-20mM ammonium formate aqueous solution, pH6.3 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min for ZIC-HILIC or 0.2 mL/min for others.

他の4種農薬においては若干保持時間の減少傾向が見られたが、ほとんど温度の影響は受けなかった。

Table 4 には5種類のカラムにおける7種農薬の50℃と30℃での保持係数の比を示している。1未満の比率は50℃に比べて30℃での保持時間が長いことを表している。Atlantis Silica カラムに関しては、温度の上昇と共にアミトロールの保持係数は減少していたが、他の農薬についてはほとんど影響を受けなかった。Inertsil HILIC 及び Amide-80 においても同様の傾向を示し、全ての化合物において温度の上昇と共に保持係数が減少していたが、その減少率はトリクロピル、メコプロップ及びダラポンにおいて違いがあり、Inertsil HILIC の方が大きい結果となった。

正電荷を有する NH2-100 カラムにおいては、メコプロップ、トリクロピル及びダラポンは温度上昇と共に保持時間が長くなったが、他の4種はほとんど影響を受けなかった。HILIC においてアミノプロピル基を有する固定相とサリチル酸及びその誘導体(酸性物質)の間にはイオン交換相互作用が存在し、これらの物質の移動相から固定相への移動は吸熱過程であることが報告されており¹⁰⁾、上記3種の農薬についても同様の現象が見られた。一方、アシュラムは、NH2-100 カラムにおける緩衝液濃度、緩衝液 pH の保持時間に与える影響及びその保持強度から固定相とイオン交換相互作用をしていると推測されるが、カラム温度の上昇と共に保持時間が短くなることから、移動相から固定相への移動は他の酸性農薬のような吸熱過程ではない。上記の Guo らの報告はカルボキシル基を持つ酸性物質が対象となっており、またメコプロップ、トリクロピル及びダラポンもカルボキシル基を有している。一方、アシュラムはスルホアミド基を有する酸性農薬であり、この酸性物質の構造の差異が保持過程の熱力学的な違いの原因となったものと考えられる。

3. 3 LC/MS (ESI) の感度に影響を与える因子

3. 3. 1 アセトニトリル/ギ酸アンモニウム緩衝液の比率が与える影響

HILIC カラムの微量分析への適用は液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) の普及とともに増加しているが、これは移動相中の有機溶媒比率が高いために効率的に溶媒の蒸発が起こり、イオン化が促進されるために感度が上昇するといった利点を有しているからである¹⁶⁾。今回対象とした農薬においても同様の現象が認められ

Fig. 10 Effect of the organic solvent percentage in mobile phase on the relative area. Column: ZIC-HILIC. LC condition is described in Fig. 3

Table 5 MS response ratios for ZIC-HILIC. Ratios shown are for SRM peak areas

Pesticide	MS response ratio (pH3.0/pH6.3)	Ionization mode Positive or Negative
Acephate	1.28	Positive
Methamidophos	1.03	Positive
Asulam	1.04	Positive
Triclopyr	0.91	Negative
Mecoprop	0.92	Negative
Dalapon	1.15	Negative
Amitrole	1.36	Positive

Mobile phase: ACN-20mM ammonium formate aqueous solution, pH3.0 or pH6.3 (90:10 (v/v)); Flow rate: 0.1 mL/min.

るのか、移動相中のアセトニトリル比率を 80, 85 及び 90 % とした場合における各農薬のピーク面積値を比較した。Fig. 10 には、移動相をアセトニトリル / 20 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH6.3) とした場合の各農薬のピーク面積値をアセトニトリル比率 90 % の場合を 100 として表している。アセトニトリル比率の上昇とともに全ての農薬においてピーク面積値が増大しているが、その増加率はアミトロールにおいて特に大きく、一方、アセフェート及びメタミドホスでは比較的小さく、物質により違いが認められた。

3. 3. 2 緩衝液 pH が与える影響

移動相の pH が ESI 法における MS 感度に対してどのような影響を与えるかを検討した。Table 5 には、ZIC-HILIC カラムにおいて移動相に使用した緩衝液の pH を 3.0 と 6.3 にした場合の各農薬のピーク面積値の比を示している。ポジティブモードで測定しているアセフェート、メタミドホス、アシュラム及びアミトロールにおいては、pH3.0 における感度が高かった。特に、アミトロールは、pH3.0 では溶液状態で陽イオンの状態にあるため、イオン化しやすく、両 pH における感度差が大きく現れたものと考えられる。一方、ネガティブモードで測定しているメコプロップ及びトリクロピルについては、pH6.3 での感度が高く、ダラポンは pH3.0 で感度が高い結果となった。一般的に、ポジティブモードで測定する物質は pH を下げ、ネガティブモードで測定する物質については pH を上げると感度が上昇する⁹⁾。トリクロピル及びメコプロップは、pH3.0 の溶液中では解離しておらず分子状態で存在しているが、pH6.3 では解離し、既に陰イオンの状態にあるため感度が高いものと考えられる。しかし、ダラポンは、両 pH 領域において移動相中では陰イオンの状態にある。前述の通り、本検討で用いた緩衝液の調製には、等濃度のギ酸アンモニウム水溶液とギ酸水溶液を混合する方法をとっており、低い pH になるほどアンモニウムイオンの量が少なくなるため、イオン強度も低くなっていく。従って、ダラポンはイオン化の効率が塩濃度の影響を受けやすいため、pH を下げると感度が上昇するといった結果になったものと推測される。また、ダラポンのフローインジェクション分析においても同様の傾向が確認されたことから、保持時間やカラムからの溶出物によるイオン化抑制といったカラムを通したことによる影響ではないと考えられる。

4. まとめ

親水性農薬の HILIC での保持挙動と MS 感度について検討を行ったところ、移動相組成、農薬の物理化学的性質、HILIC カラム充填剤の特性によって、次のような傾向が認められた。(1) アセトニ

トリルの比率は保持時間及び理論段数を変化させる最も重要な因子であり、比率を増加させると、全ての物質の保持時間は長くなり、かつ理論段数が高くなる。また MS 感度もアセトニトリル比率の上昇と共に増加をする。(2) 酸性物質は、緩衝液濃度を増加させるとシラノール基との静電的反発が減少するため、保持時間が増加する。ただし、側鎖にアミノ基を有する NH2-100 カラムではイオン交換相互作用で保持されるため、緩衝液濃度を上げると保持時間は逆に短くなる。(3) 緩衝液の pH を変化させると、酸性及び塩基性物質は解離割合が増加する pH 領域において保持係数が大きくなる。(4) カラム温度を上昇させていくと、RPLC の場合と同様、一般的には保持時間が短くなるが、測定対象物質またはカラムに依存した保持機構の違い等によりその減少率は異なる。またイオン交換相互作用で保持されている場合に多くみられるように、温度上昇と共に保持時間が長くなることもある。

要 約

HILIC における極性農薬の保持挙動を明らかにするため、市販 HILIC 系カラムと 7 種の農薬を使用し、移動相条件が保持と分離に与える影響を検討した。また、LC-MS/MS での適用を考慮し、MS 感度に与える影響も調べた。アセトニトリルの比率は保持時間と理論段数を変化させる最も重要な因子であり、比率を増加させると、全てのカラムにおいて農薬の保持は強くなり、理論段数は高くなった。また MS 感度もアセトニトリル比率の上昇と共に増加した。酸性物質は、移動相中の緩衝液濃度を増加させると保持時間が長くなるが、NH2-100 カラムでは主にイオン交換相互作用により保持されるため、緩衝液濃度を上げると逆に保持時間は減少した。緩衝液の pH を変化させると、酸性及び塩基性物質は解離割合が大きな pH 領域で保持係数が増大した。カラム温度も保持に影響を与える重要な因子であり、一般的に温度を上げると保持時間が短くなるが、物質またはカラムに依存した保持機構の相違等によって保持の減少率は異なり、逆に保持時間が長くなることもあった。これらの結果は HILIC における農薬分離の最適化に適用できるものと考えられる。

文 献

- 1) Alpert, A.J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J.Chromatogr. A*, **499**, 177-196 (1990)
- 2) Hemström, P. and Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J.Sep.Sci.*, **29**, 1784-1821 (2006)
- 3) Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K. and Tanaka, N.: Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A*, **1184**, 474-503 (2008)
- 4) Hao, Z., Xiao, B. and Weng, N.: Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J.Sep.Sci.*, **31**, 1449-1464 (2008)
- 5) Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Dolan, J.W.: Ionic samples: Reversed-phase, Ion-pair, and ion-exchange chromatography. pp303-360, "Introduction to Modern Liquid Chromatography 3rd edition", A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- 6) ゴルフ場で使用される農薬の水質汚濁の防止に係る暫定指導指針 (平成2年5月24日環水土第77号 最終改正平成22年9月29日環水土発第100929001号) 別添, 92-98 (2010)
- 7) 有害大気汚染物質測定マニュアル (平成20年10月改訂) 環境省 水・大気環境局 大気環境課, 95-100 (2008)

- 8) 水質管理目標設定項目の検査方法 (平成15年10月10日健水発第1010001号 最終改正平成22年2月17日) 厚生労働省健康局水道課, 72-81 (2010)
- 9) Kostiainen, R. and Kauppila, T.J.: Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J.Chromatogr. A*, **1216**, 685-699 (2009)
- 10) Chirita, R., West, C., Finaru, A. and Elfakir, C.: Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis. *J.Chromatogr. A*, **1217**, 3091-3104 (2010)
- 11) 上堀美知子: LC/MS/MS による環境水中アミトロールの分析, 環境化学, **13**, 445-452 (2003)
- 12) Kawamoto, T., Yano, M. and Makihata, N.: Analytical method for determining iminotadine triacetate by LC/ESI/MS using hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Sci.*, **22**, 489-490 (2006)
- 13) Chirita, R., Chaimbault, P., Finaru, A. and Elfakir, C.: Performances comparées de différents supports polaires en vue de l'analyse d'herbicides organophosphorés par chromatographie d'interactions hydrophiles., *LC · GC en français*, **1**, 8-14 (2008)
- 14) 巻幡希子, 山崎富夫, 英保次郎: 安定同位体標識化合物を用いる固相抽出/親水性相互作用液体クロマトグラフィー/質量分析法による水試料中ジクワットの定量, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 579-585 (2007)
- 15) Hayama, T., Yoshida, H., Todoroki, K., Nohta, H. and Yamaguchi, M.: Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **22**, 2203-10 (2008)
- 16) Guo, Y. and Gaiki, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A*, **1074**, 71-80 (2005)
- 17) Li, R., Zhang, Y., Lee, C.C., Lu, R. and Huang, Y.: Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatographic method for determination of aromatic amines in environmental water. *J.Chromatogr. A*, **1217**, 1799-1805 (2010)
- 18) Liu, M., Chen, E.X., Ji, R. and Semin, D.: Stability-indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. *J.Chromatogr. A*, **1188**, 255-263 (2008)
- 19) Fountain, K. J., Xu, J., Diehl, D.M. and Morrison, D.: Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *J.Sep.Sci.*, **33**, 740-751 (2010)
- 20) 吉田達成: 親水性保持係数による HILIC 保持挙動の解析, *Chromatography*, **29**, 7-15 (2008)
- 21) Yanagida, A., Murao, H., Ohnishi-Kameyama, M., Yamakawa, Y., Shoji, A., Tagashira, M., Kanda, T., Shindo, H. and Shibusawa, Y.: Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr.A*, **1143**, 153-61 (2007)
- 22) Quiming, N.S., Denola, N.L., Saito, Y. and Jinno, K.: Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on unmodified silica phase in hydrophilic interaction chromatography. *Anal.Bioanal.Chem.*, **388**, 1693-1706 (2007)
- 23) Constantopoulos, T.L., Jackson, G.S. and Enke, C.G.: Effect of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 625-634 (1999)
- 24) PPDB (2009). The Pesticide Properties Database (PPDB) developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, funded by UK national sources and the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704)