[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

化合物同定のためのUV及びMS検出器を用いた農薬製剤のサンプルプロファイリング

Marian Twohig and Michael O'Leary
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 農薬製剤中の低濃度成分において UV 以上の感度の実現
- PDA 検出器と併せて MS 検出を用いることでピーク同定における信頼性を向上
- 有効成分及び低濃度成分中における類似構造体が一回の分析で同定可能

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY® QDa ™ 検出器

ACQUITY UPLC フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器

Empower® 3 CDS ソフトウェア

キーワード

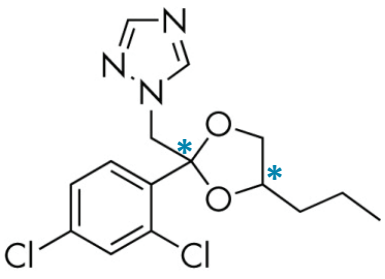
キラル農薬、ジアステレオマー、農薬製剤、不純物同定、サンプルプロファイリング、プロピコナゾール、トリアゾール殺菌剤

はじめに

農薬を使用することで、作物への被害を減らし、高品質な食糧を豊富に供給することが可能になります。[1] 農薬業界では、効果的な製品を一貫して農家に供給するために農薬製品の品質管理が重要です。[2] さらに製剤中の全ての化合物 (不純物及び分解生成物を含む) に加えて有効成分の検出・特性評価・定量が、製品開発、品質管理及び登録申請を行う上では必要です。UV 検出と MS 検出器を組み合わせて用いることで、一回の分析でサンプルに関する追加情報を得ることができ、メソッドの特異性及び選択性が向上します。

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に接続可能であり、UV 検出器から得られた結果を補完し、検出の選択性を向上させることのできる新しい MS 検出器です。選択性が向上したことにより、サンプル中の低濃度化合物の検出や同定が可能になります。また、MS データを UV と結びつけることで一回の分析で得られる信頼性が向上し、より幅広く分析を行うことができるようになります。

本アプリケーションノートでは、市販の農薬製剤の濃縮物について、光学検出器と MS 検出器を組み合わせた詳細な分析結果を紹介しています。トリアゾール系殺菌剤であるプロピコナゾールは図 1 の構造式に示すように 2 つのキラル中心をもちます。一般的にトリアゾール系殺菌剤は広範囲の作物被害に対し有用なため、農薬に分類されます。[3]



Propiconazole

図 1. プロピコナゾールの構造式
アスタリスクは立体中心

実験方法

UPLC 条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class

カラム：　ACQUITY UPLC BEH C_{18}
2.1 × 150 mm、1.7 µm

カラム温度：50 ℃

注入量：　3 µL

流速：　0.6 mL/min

移動相 A：　10 mM ギ酸アンモニウム水溶液

移動相 B：　アセトニトリル

グラジエントテーブル：

時間 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.60	70	30	6
10.0	0.60	30	70	6
11.0	0.60	10	90	6
12.0	0.60	10	90	6
12.1	0.60	70	30	1

表1. 製剤の分析に用いたUPLCグラジエントメソッド

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：0.8 kV

脱溶媒温度：　500 ℃

ソース温度：　150 ℃

コーン電圧：　7 V

サンプリングレート：5 Hz

MS スキャン範囲：　100 から 1000 *m/z*

PDA 条件

検出器：ACQUITY UPLC PDA

波長：　210 から 400 nm

サンプリングレート：20 Hz

クロマトグラフィーデータの取得には
Empower3 FR2 を用いました

試料調製

市販の農薬製剤を 1 g 秤量し、アセトニトリル / 水＝ 50/50 の溶媒を 9 mL 添加しました。得られたサンプルを 10 分間超音波で溶解し、分析前に 0.2 µm のPVDF フィルターを用いてろ過しました。プロピコナゾールの標準溶液は、アセトニトリル / 水＝ 50/50 を用いて調製しました。

結果および考察

220 nm の UV クロマトグラムにおいて、プロピコナゾール標準品及び製剤中に含まれるプロピコナゾールを比較した結果を図 2 に示しています。ACQUTY UPLC H-Class システムを用いてプロピコナゾールの分離を行ったところ保持時間（tR）7.45 分（ピーク 3）と 7.54 分（ピーク 4）にピークが検出されました。検出されたピークはプロピコナゾールのジアステレオマーだと考えられます。プロピコナゾールの保持時間は製剤中に含まれるものと一致しています。製剤の UV クロマトグラムでは、保持時間 6.23 分と 6.43 分（ピーク 1 及びピーク 2）に 2 つの小さなピークが検出されています。UV を用いて測定を行った際に、ピーク 1 及びピーク 2 の%面積はそれぞれ 1.2 及び 0.8% でした。

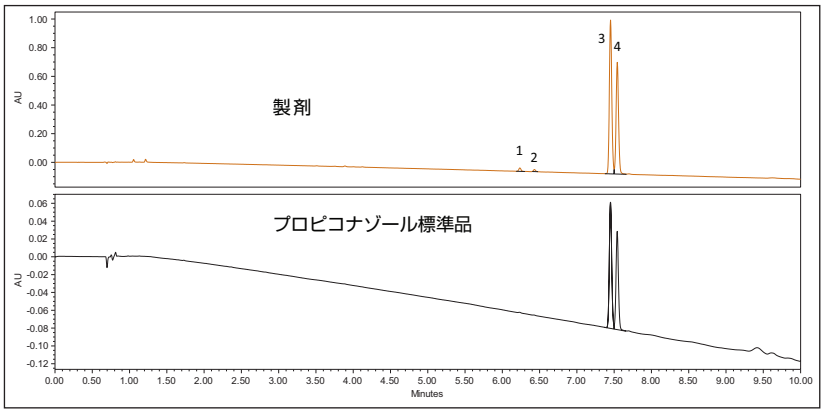


図 2. ACQUITY UPLC PDA 検出器の 220 nm におけるプロピコナゾール製剤およびプロピコナゾール標準品の UV クロマトグラム

UV 検出器と同時にデータを取得した ACQUITY QDa 検出器のトータルイオンクロマトグラム（TIC）を図 3 に示しました。 $[M+H]^+$ としてイオン化され、*m/z* 342 のプロピコナゾールのジアステレオマーが検出されました。

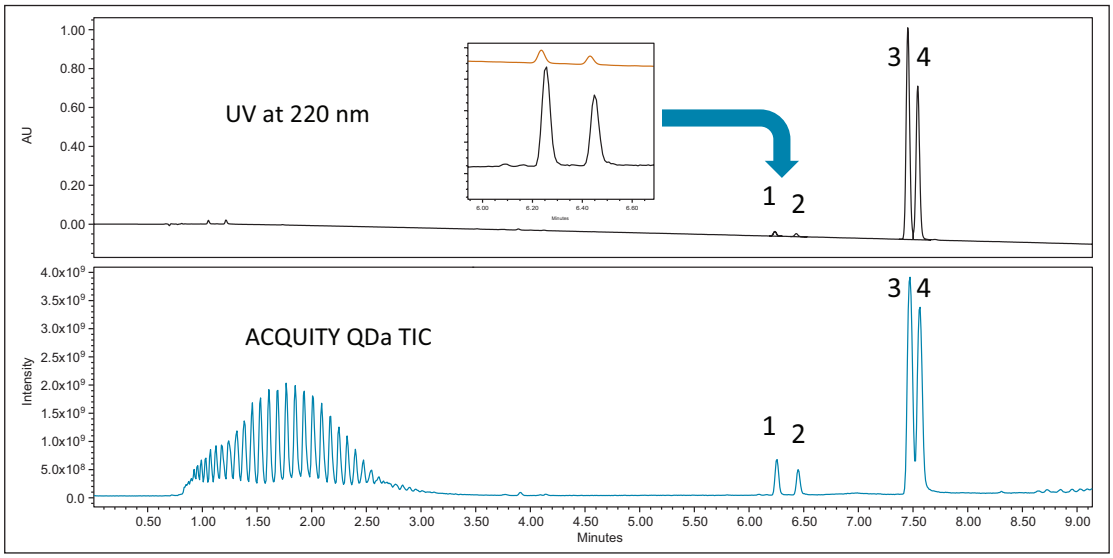


図 3. ACQUITY UPLC PDA 検出器の 220 nm における UV クロマトグラム及び同時取得した ACQUITY QDa 検出器のマスクロマトグラム

UV クロマトグラムに比べ、マスクロマトグラムの方が全ての化合物においてシグナルが増大しています。これは、MS 検出器を用いて低濃度化合物が検出できる可能性が向上したことを示しています（図 3）。図 4 に示したように、TIC よりも抽出イオンクロマトグラム（XIC）を用いることでさらに検出限界が改善し、化合物同定における信頼性が高くなります。UV 検出できない構造の化合物については、マスクロマトグラムを用いることで検出可能であり、さらに UV 検出と合わせることで、サンプル情報を広く得ることができます。TIC クロマトグラム中で、0.8 ～ 3.0 分に検出しているピークは溶出順に *m/z* が 44 ずつ増加したものです。それらは、有効成分を製剤に溶解させるために用いられた界面活性剤だと考えられます。

Empower3 ソフトウェアの質量分析ウィンドウでは、取得したスペクトルを解析し、全検出器のクロマトグラムピークを表示させることができます。検出されたピークのスペクトルはクロマトグラム上に溶出順に表示されます。質量分析ウィンドウを図 4 に示しています。

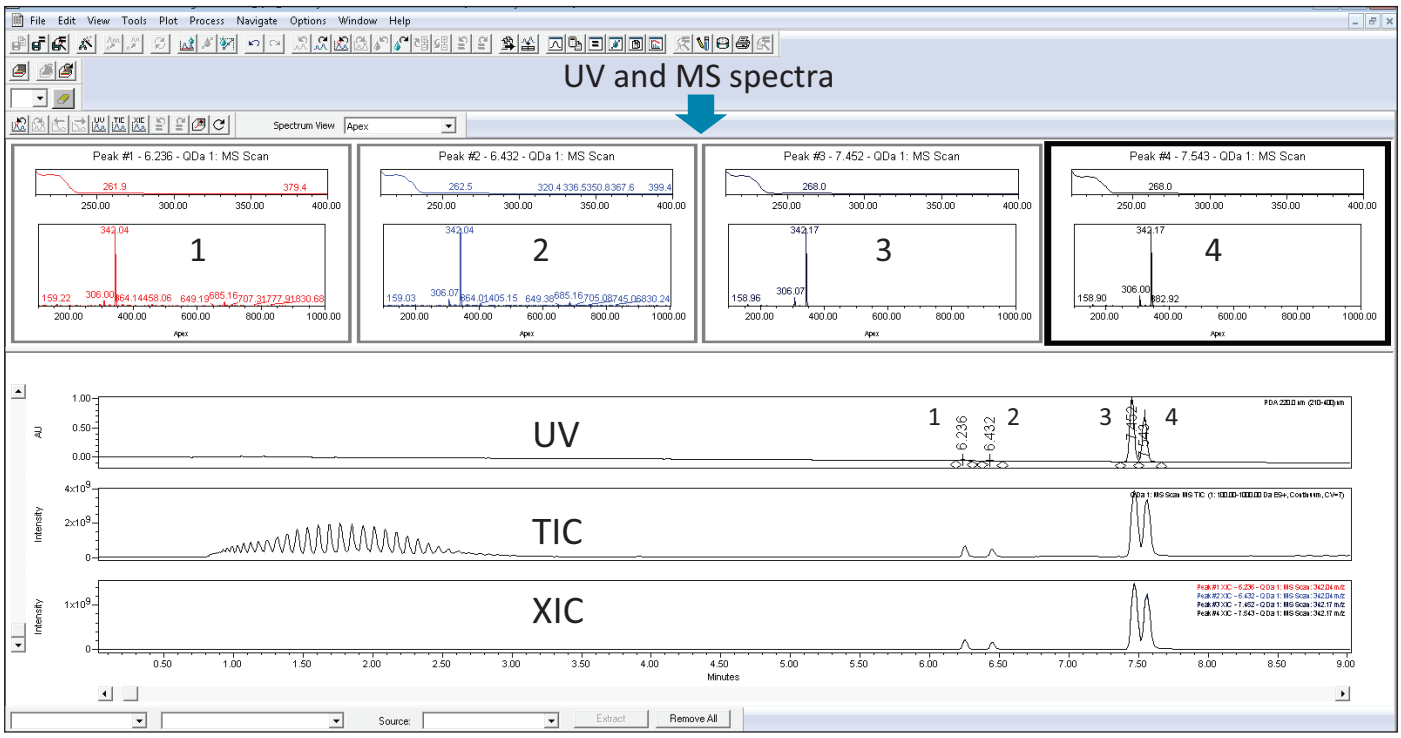


図 4. UV クロマトグラム、マスクロマトグラム及び抽出イオンクロマトグラム (XIC) を 1 画面に表示した Empower ソフトウェアの質量分析ウィンドウ

質量分析ウィンドウに表示されているデータは、有効成分プロピコナゾールと、ピーク 1 およびピーク 2 の関連性を示しています。プロピコナゾールのスペクトルと比較した場合、ピーク 1 及びピーク 2 の最大吸収波長は同様の 220 nm ですが、第二吸収波長については明らかにシフトしています。ピーク 1 及びピーク 2 のマススペクトルについてはどちらも *m/z* 342 であり、有効成分と同じです。さらに同位体パターンは二塩素化合物の典型的なものであり、プロピコナゾールと同様です。1 回の分析において、有効成分と同じ質量及び同位体パターンをもつ未知化合物を同定しました。MS 検出器を用いることで、構造情報が得られ、化合物の検出及び同定における信頼性を向上させます。ピーク 1、ピーク 2 及びプロピコナゾールの各ジアステレオマーの UV 及びマススペクトルを図 5 に示しています。

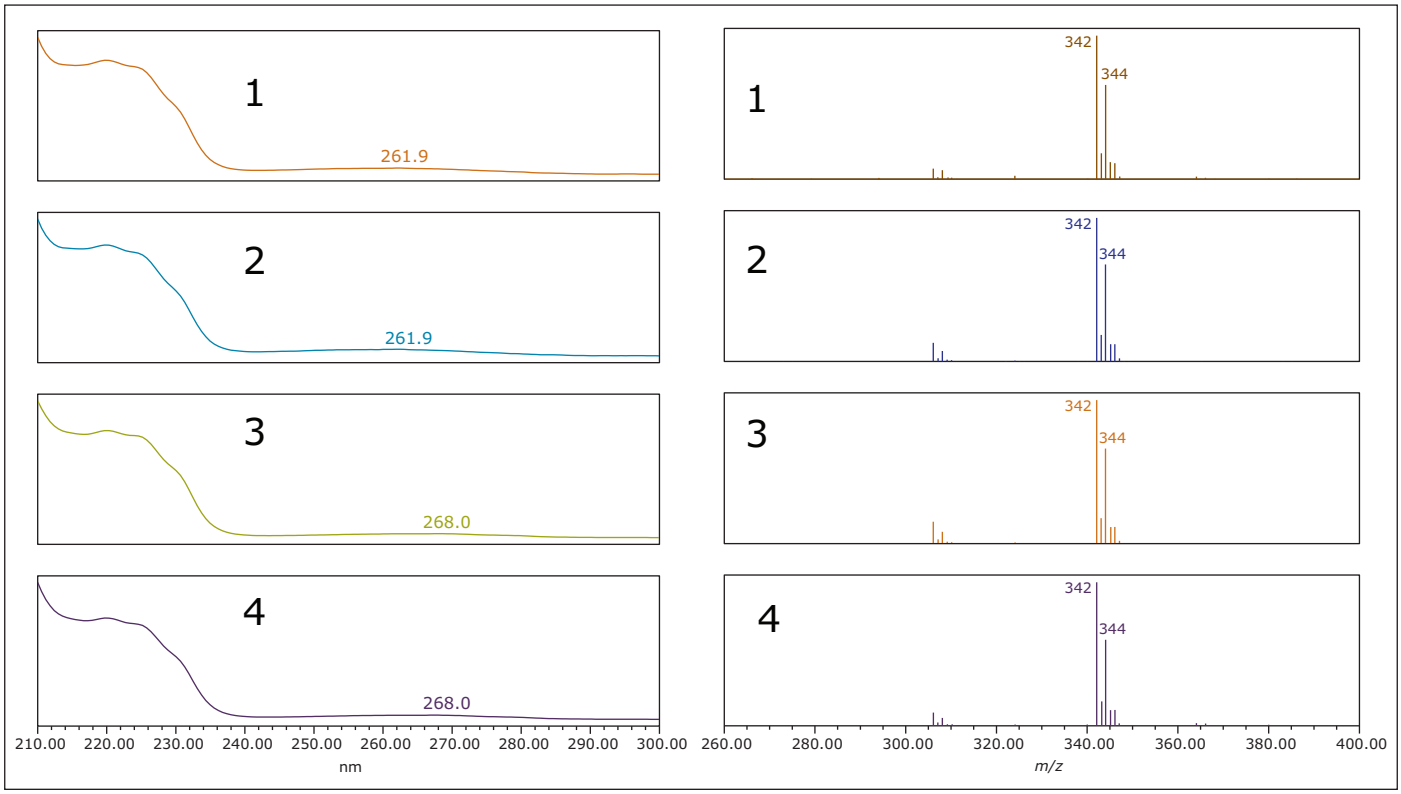


図 5. 製剤中のピーク 1 およびピーク 2、プロピコナゾールのジアステレオマーのピーク 3 及びピーク 4

結論

PDA 検出器と併せて ACQUITY QDa 検出器を用いることで農薬製剤中の低濃度成分の検出における信頼性が向上します。今回の化合物は、光学的および構造上の特徴により製剤中の有効成分であるプロピコナゾールと同定されました。不活性成分については UV では検出されず、ACQUITY QDa 検出器においてのみ検出されました。

Empower の質量分析ウィンドウではすべての検出器のクロマトグラム及びスペクトルを 1 画面で表示できます。1 画面でデータレビューや解析を容易に行うことができます。

相補的な技術として、MS 検出器を追加することで、化合物の検出及び同定の信頼性が向上します。PDA 検出器と同様の親しみやすさをもつ ACQUITY QDa 検出器は、従来選択性の低い検出器を用いていたラボで、ルーチン分析の中で質量検出を行うという費用対効果のある方法を提供することが可能です。

参考文献

1. E M Ulrich, C N Morrison, M R Goldsmith, W T Foreman. Chiral Pesticides: Identification, Description and Environmental Implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* (2012) 217: 1-74.
2. Quality Control of Pesticide Products. Prepared by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. (2009) http://wwwpub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1612_web.pdf
3. L Toribo, M J del Noza, J L Bernal, J J Jimenez, C Alonso. Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography. *J Chrom A.* (2004) 1046: 249-253.

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、UPLC、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。QDa 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4月 720004824JA 04A (SU)