

## MaxPeak™ Premier カラムおよび体系的スクリーニングアプローチを用いた構造的に類似したトリアジン系除草剤の迅速 RPLC 分析法の開発

---

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

---

### 要約

トリアジン系除草剤は一般に、作物管理で外来植物種を駆除するために使用されます。これらの除草剤は、高濃度で長期間使用することにより、光合成サイクルを破壊して植物を枯死させるとともに、土壌や地下水を汚染する可能性があります。したがって、汚染を最小限に抑えてモニターするために、これらの除草剤のモニタリングが重要になります。これらの分析種をモニターするには、サンプルの頑健な分析を確保するのに十分な性能を備えた適切な分析法が必要です。

本研究では、体系的スクリーニングプロトコルを使用して、構造的に類似した 7 種のトリアジン系除草剤の混合物の分析法を開発しました。最終的な分析法条件は、2 日間にわたるわずか 11 時間の開発および最適化によって実現しました。最終的な分析法条件では、XBridge™ Premier BEH C<sub>18</sub> カラムと塩基性添加剤を含有するアセトニトリル移動相を使用しました。UV 検出と MS 検出のいずれにおいても、7 種の分析種すべてについて良好な分離および検出が得られ、以後の分析や定量などの作業に使用できるサンプルが得られました。

### アプリケーションのメリット

- XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムを用いた 7 種の分析種のベースライン分離
- 構造的に類似した化合物の混合物の分析法開発を 11 時間に短縮

- 体系的なスクリーニングプロトコルにより、プロセスが合理化され、判断を下す場面が減る

---

## はじめに

除草剤や殺虫剤の使用がここ数年で一般的になっています。最近ようやく、環境規制が変更され、一部の殺虫剤や除草剤の使用をモニタリングしたり、禁止するようになりました。これらの薬剤を使用することにはいくつかのメリットがありますが、これらの化合物はしばしば土壌や地下水を汚染し、環境に大きな影響を及ぼします。これらの化合物が地下水や土壌に入ると、食物連鎖に入って、野生生物を死に至らしめる場合があります。殺虫剤や除草剤は、環境に対する影響があるため、使用状況のモニタリングが厳しく管理されています。そのため、化合物を分離して検出するための適切な分析法が必要になります。逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）を使用した分析法開発は、特にトリアジン系除草剤のような特定の種類の化合物に関して一つの道筋となります。

トリアジン系除草剤は、光合成プロセスを破壊させ細胞死を引き起こすことにより、外来植物を駆除します。最も一般的なトリアジン系除草剤はアトラジンです。この除草剤は、雑草を効果的に枯死させるだけでなく、土壌や地下水に浸出して、水生生態系に影響を及ぼす可能性があることが示されています<sup>1</sup>。プロパジンやシマジンなどの他のトリアジン系除草剤も、水生生物に対する影響を判定するためのモニタリングプログラムに含まれています<sup>2</sup>。引用文献に示されているように、RPLCは、十分な分離が得られる限り、これらの化合物のモニタリングに使用される一般的な分析法です。質量分析（MS）も一般的であり、対象分析種が完全に分離できる場合、MSシグナルが改善されるメリットを受けます。

トリアジン系除草剤を保持および検出する分析法の作成は、十分に実証された体系的スクリーニングプロトコルを使用することで非常にシンプルになります<sup>3-6</sup>。この体系的スクリーニングでは、段階的分析アプローチを使用しています。分析者はまず高 pH と低 pH で保持力を評価してから、pH を一定に保ちます。次に、カラムと移動相のスクリーニングを行い、固定相と移動相の最適な組み合わせを選択します。最後に、必要に応じて分析法の最適化を行います。このアプローチを使用することで、最小限の意思決定で分析法を迅速に開発できます。

使いやすい体系的スクリーニングプロトコルと、MaxPeak High-Performance Surfaces（HPS）テクノロジーを採用した MaxPeak Premier カラムを組み合わせることで、分析者は、分離における疑念を払拭することができます。MaxPeak Premier カラムは、カラムを含むシステムの金属表面と対象分析種との二次的相互作用を低減するように特別に設計されています。このテクノロジーにより、金属表面と対象化合物の間のイオン性相互作用が特異的に低減し、さまざまな分析種クラスにおいて、全体的な分離の質が向上することが示されています<sup>7-10</sup>。今回紹介する研究では、MaxPeak Premier カラムを使用して 7 種のトリアジン系除草剤の混合物に体系的スクリーニングプロトコルを適用することで、可能な限り正確なデータが確実に得られることを示しています。

---

## 実験方法

### サンプルの説明

開始濃度がそれぞれ 100 µg/mL のトリアジン系除草剤の単一混合物（製品番号：CRM48392）を Sigma Aldrich から購入しました。標準試料は水で 1：10 希釈して注入しました。サンプルの最終組成は、最終濃度 10 µg/mL の各除草剤を含む 90：10 水：メタノールでした。

### LC 条件

LC システム：	オプションの溶媒選択バルブ付きのクオータナリー溶媒マネージャー（QSM）、サンプルマネージャーフロースルーニードル（SM-FTN）、カラムマネージャー、カラムマネージャー Aux、PDA 検出器、QDa 質量検出器を搭載した ACQUITY UPLC™ H-Class Plus システム
検出：	UV @ 220 nm（特に記載されていない限り） MS フルスキャンおよび SIR をピークトラッキングに使用
カラム：	カラムはすべて 2.1 × 50 mm で、粒子径は 2.5 µm XBridge Premier BEH C <sub>18</sub> （製品番号：186009827） XSelect™ Premier CSH Phenyl-Hexyl（製品番号：186009879） XBridge Premier BEH Shield RP18（製品番号：186009914） Atlantis Premier BEH C <sub>18</sub> AX（製品番号：186009390）
カラム温度：	30 °C
サンプル温度：	10 °C

注入量:	1.0 $\mu$ L
流速:	0.7 mL/分
移動相 A:	Milli-Q 水
移動相 B:	アセトニトリル
移動相 C:	メタノール
グラジエント条件:	一貫した添加剤濃度を保つために、グラジエント全体にわたって 5% D で一定に維持しました。4.90 分かけて 5 ~ 95% B/C の直線的グラジエント。95% B/C で 0.82 分間ホールド。5% B/C の開始条件に戻り、1.6 分間ホールド。合計実行時間: 7.37 分。最適化されたグラジエントの詳細が図のキャプションに示されています。

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower™ 3 Feature Release 4
------------------	------------------------------

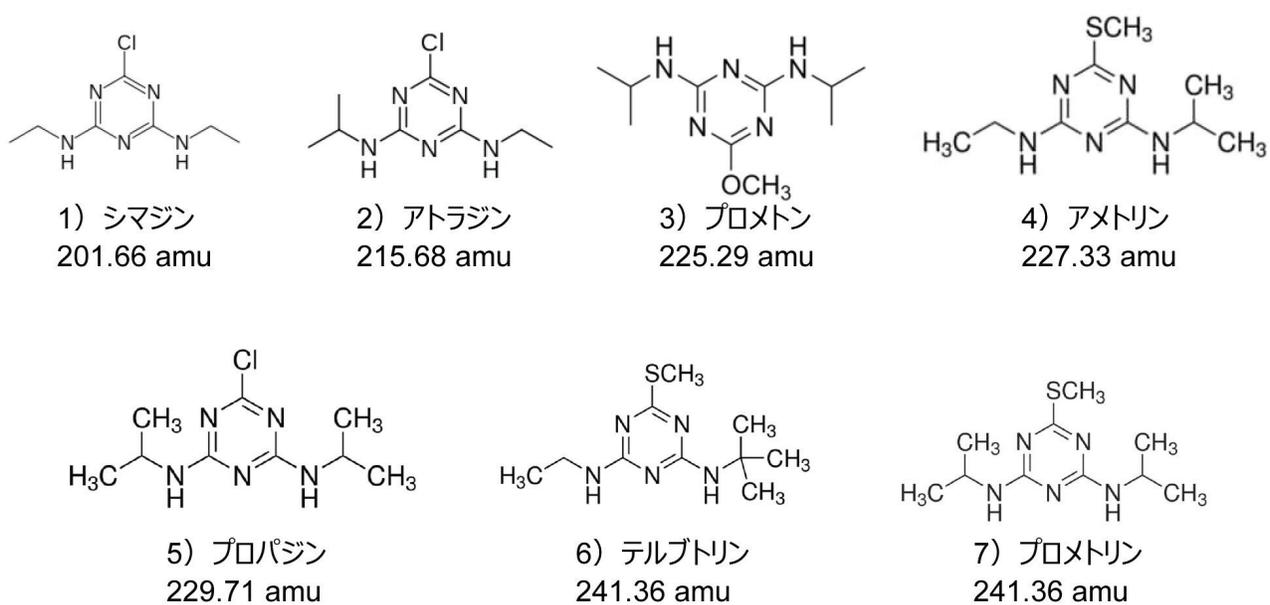


図 1. サンプル混合物中に存在する分析種の化学構造。同重体化合物であるテルブトリン (6) とプロメトリン (7) に注意してください。

## 結果および考察

以前の研究で概説したように、分析法開発の体系的スクリーニングプロトコルは、移動相の pH が分離に及ぼす影響を評価することから始まります<sup>6-10</sup>。この作業は、XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムのような高 pH に適合する固定相を使用して行います。このカラムでは、高 pH で溶解しにくいハイブリッドシリカベース粒子が採用されています。標準的なスクリーニング用の 5 ~ 95% アセトニトリルのグラジエントを、それぞれ低 pH および高 pH の添加剤であるギ酸および水酸化アンモニウムとともに使用しています。データを分析した後、結果を検討してどの添加剤が最も保持力が強いかを判定します。図 2 に、体系的スクリーニングプロトコルの最初のステップで得られた 2 つのクロマトグラムを示します。

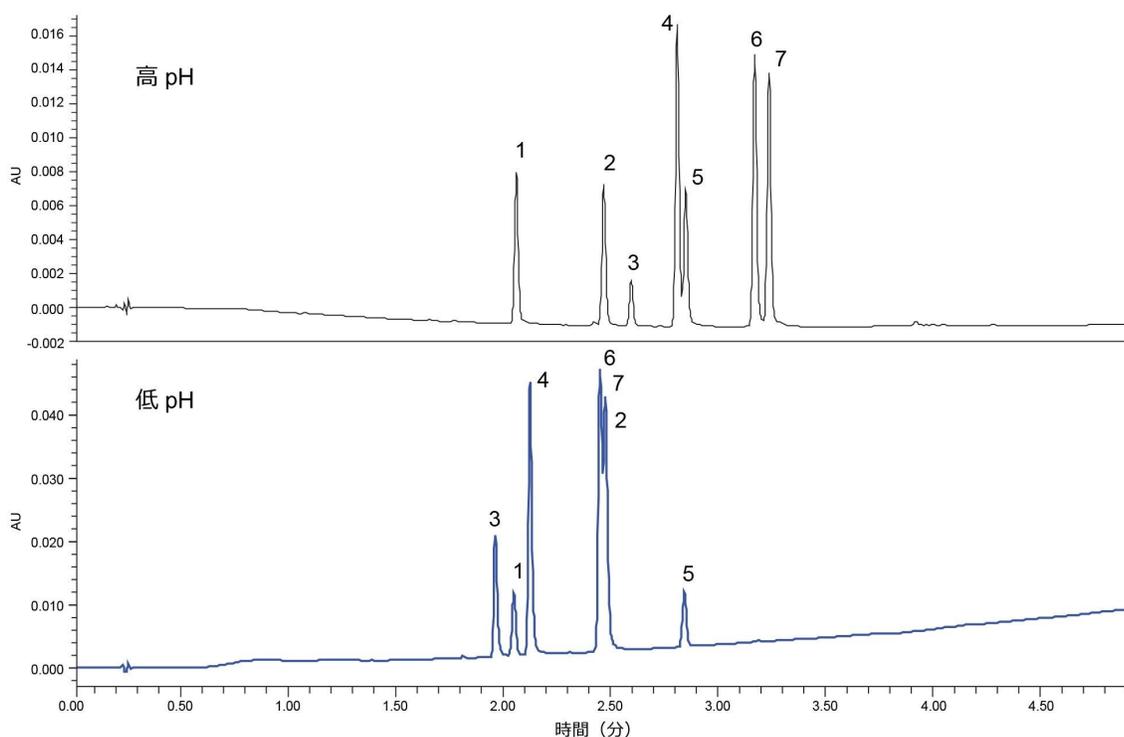


図 2. XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラム、254 nm での UV 検出を使用した迅速 pH スカウティングの結果。成分 ID は、図 1 にリストされています。

いずれの添加剤でも良好な保持が見られ、最初の化合物はグラジエントのほぼ半分である 2 分のマークの前後に溶出しています。ただし、高 pH の方が全体的に良好な保持が見られ、溶出範囲が 2 ~ 3.5 分であったのに対して、低 pH での溶出範囲は約 2 ~ 3 分です。高 pH 添加剤の高い保持力により、このステップが必要な場合に、分析法を最適化できる可能性が高まります。さらに、このステップにより、問題の分析種と、それらが高 pH および低 pH でどのように挙動するかをよりよく理解できます。2 つの実験の間で同様の保持が示されたピーク 5 のプロパジンを除き、すべての化合物において、低 pH では保持が弱くなります。

これらのプローブについて、高 pH で全体として最適な保持が得られるため、この添加剤を今後の実験において固定します。このことは、次のステップである固定相および有機溶媒のスクリーニングに大きな影響を及ぼします。高 pH を選択したため、使用する固定相は、高 pH で安定な固定相、つまりハイブリッドベース粒子である必要があります。これにより、使用できる結合ケミストリーの選択肢が多少制限されます。幸いなことに、高 pH でもカラム選択性を最大化する選択肢があります。本研究では、2 番目のステップで XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムを試験し、XSelect Premier CSH Phenyl-Hexyl カラム、XBridge Premier BEH Shield RP18 カラム、そして最後に Atlantis Premier BEH C<sub>18</sub>-AX カラムを試験します。これらのカラムすべてに、結合リガンドが異なるハイブリッドベース粒子が使用されて

いることで、選択性の上でのメリットが得られると考えられます。フェニルヘキシル固定相は、メタノールを使用した場合に二次的な  $\pi$ - $\pi$  相互作用が得られる可能性があるため、芳香環を含む化合物の分析に最適です。Shield RP18 固定相では、同様の直鎖状リガンドが使用されていますが、極性基が内包されており（この場合カルバメート基）、特にアセトニトリルの割合が低い場合に化合物の保持および分離に影響が出ることがあります。最後に、C<sub>18</sub>-AX 固定相は、イオン交換（IEX）官能基を含むカバー率が中程度の C<sub>18</sub> です。IEX 基は極性分析種を保持するように設計されていますが、それでもこれが酸性以外のプローブの分離に影響を及ぼす可能性があります。図 3 に、メタノールを強溶媒として使用して得られた 4 種類の固定相でのトリアジン系除草剤の分離を示します。

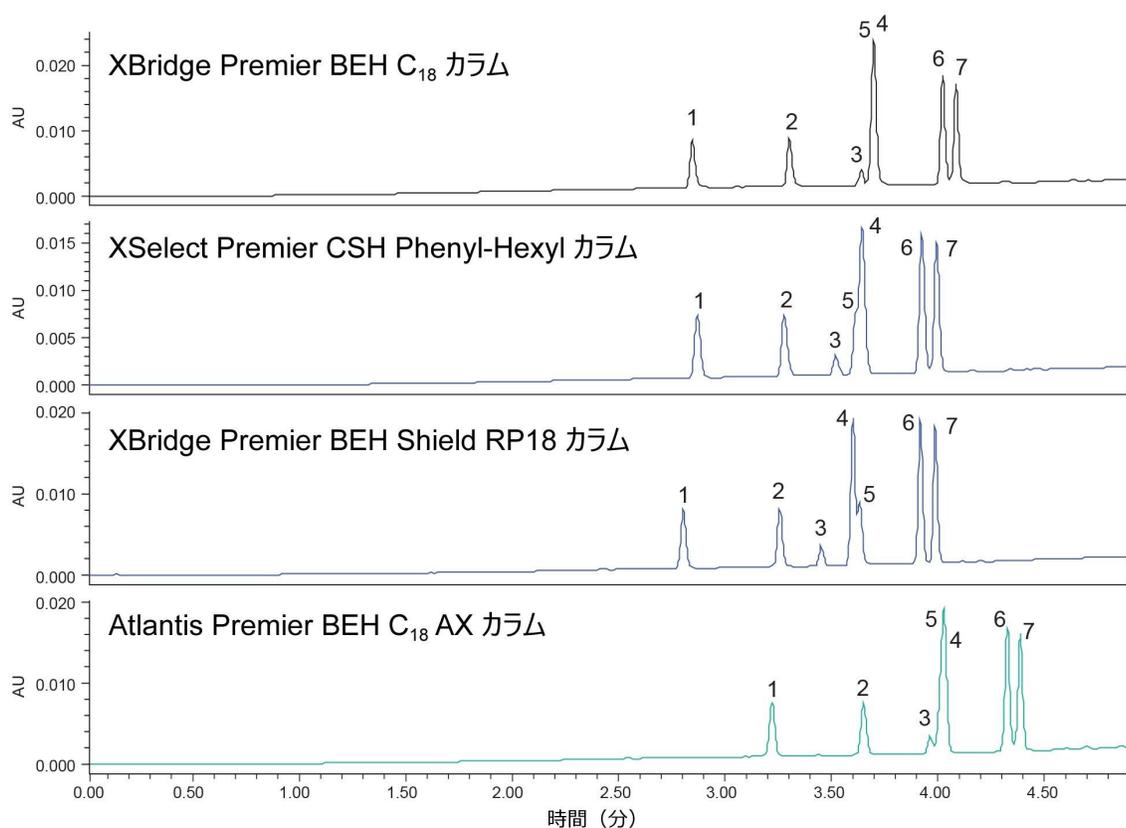


図 3. メタノールを用いたカラムおよび溶媒のスクリーニングのクロマトグラム（UV 波長 254 nm）。成分 ID は、図 1 にリストされています。

選択したカラムはいずれも、存在する 7 成分を完全に分離することはできませんでした。成分 4 と 5（それぞれアメトリンとプロパジン）は、これらの条件下で分離することが非常に困難であり、4 種類の固定相すべてで共溶出しました。さらに、C<sub>18</sub>-AX 固定相では、成分 3 が部分的にこのペアと共溶出しています。これらの分離を見て気付くことの 1 つは、アメトリン（4）とプロパジン（5）の溶出順序です。3 種類の固定相でプロパジンが最初に溶出しますが、

Shield RP18 固定相ではこれが異なります。このカラムでは、プロパジン<sup>®</sup>のピークはアメトリンの後に溶出しています。これは、結合リガンド中のカルバメート基の存在によるものである可能性が高いと考えられます。結局これらの実験のいずれでも、分析法の最適化に使用できる良好な分離が得られませんでした。図 4 に、同じカラムとアセトニトリル移動相を使用した、同じ化合物の混合物の分離を示します。

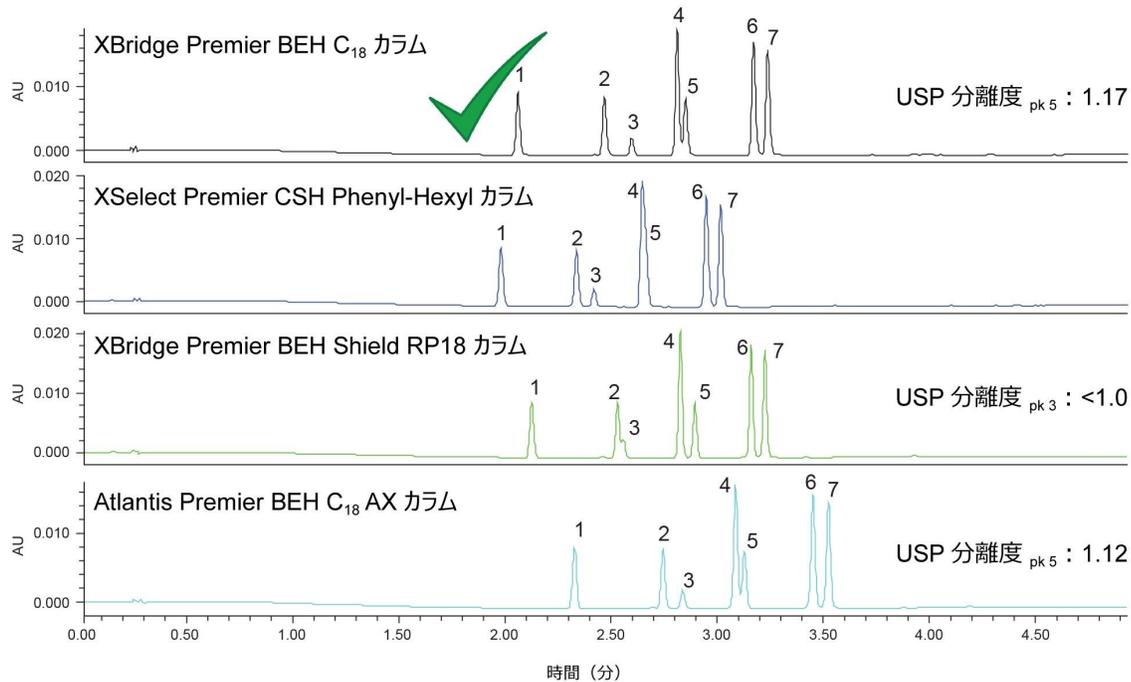


図 4. アセトニトリルを用いたカラムおよび溶媒のスクリーニングのクロマトグラム (UV 波長 254 nm)。成分 ID は、図 1 にリストされています。

成分 4 と 5 は依然として、アセトニトリルを使用したいくつかの固定相で共溶出していました。一方、C<sub>18</sub> と C<sub>18</sub>-AX の 2 つの固定相では、これらの化合物が部分的に分離されていました。Shield RP18 固定相においては、このペアが完全に分離されていますが、成分 2 と 3 (それぞれアトラジンとプロメトン) が分離できませんでした。これら 2 つは他の固定相では十分に分離されていました。

これらのクロマトグラムを適切な条件のセットについて検討すると、フェニルヘキシル固定相では成分 4 と 5 の間の分離が不良であるため、この固定相は除外できます。残りの 3 条件のセットには、それぞれ長所と短所があります。残りの 3 条件で、各クリティカルペアについて、共溶出するペアの USP 分離度を検討すると、Shield RP18 カラムが次に除外されます。ピーク 3 の USP 分離度が 1.0 未満なので、このカラムで分析法を最適化することは困難です。C<sub>18</sub> 固定相と C<sub>18</sub>-AX 固定相での分離は非常に似ており、ピーク 5 の USP 分離度はそれぞれ 1.17 および 1.12 です。純粋に客観

的な立場から見ると、最適化にとって最善の分離は XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムで得られます。一方、Atlantis Premier BEH C<sub>18</sub>-AX も最適化に適している場合があります。本研究では、分析法の最適化に C<sub>18</sub> 固定相を使用しました。

分析法の最適化には、グラジエントの傾き、開始時および終了時における移動相中の有機溶媒の比率、カラム温度、カラム寸法や粒子サイズの調整が含まれますが、これらに限定されません。本研究で行った最初のステップは、分析法の開始時の有機溶媒の比率を増やすと同時に、グラジエントを浅くすることでした。これを 2 ステップで行いました。まず、最初のピークの溶出時間に基づいて、有機溶媒のおおよその比率を算出しました。このケースでは、使用したスクリーニンググラジエントでは、最初のピークであるシマジンが約 40% 有機で溶出しています。最適化ステップでは、開始時の比率を 35% にして、最初のピークの適切な保持を確保しました。そこから、グラジエントを最初の 3.0% 有機/カラム容量 (V<sub>c</sub>) から浅くしていきました。2 種類のグラジエントの傾きを試験し、ピーク 5 の USP 分離度をモニターしました。図 5 に、この最適化ステップで得られた分離を示します。

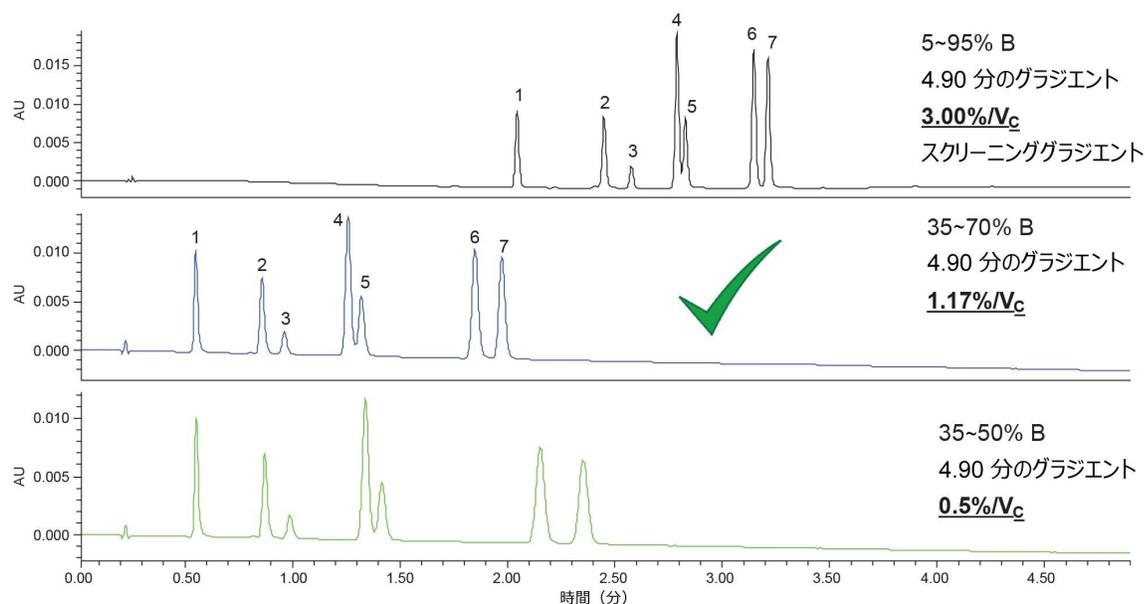


図 5. 254 nm でのグラジエントの傾き調整の最適化。成分 ID は、図 1 にリストされています。

図 5 の中央のクロマトグラムは最適化の最初の試行を示しており、グラジエントの傾きを 3.0%/V<sub>c</sub> から 1.17%/V<sub>c</sub> に減らしています。ピーク 5 の USP 分離度が 1.17 から 1.31 とやや向上しました。グラジエントの傾きを小さくすることで分離を改善する追加の試みを、グラジエントの傾き 0.5%/V<sub>c</sub> を採用した分析法を使用して行いました。しかし、この分離では、1.17%/V<sub>c</sub> での結果と同等の USP 分離度であり、十分に有意な分離の改善は見られませんでした。1.17%/V<sub>c</sub> という傾きにおいて、元と比較して分離が向上しており、0.5%/V<sub>c</sub> での結果と比較してピーク幅が狭かったため、こ

の傾きを選択してさらなる最適化を行いました。最適化の次のステップは、カラム温度の調整でした。今回のケースでは、温度を 40 °C に調整し、1.17%/V<sub>c</sub> グラジエントメソッドを使用して、30 °C で得られた結果と比較しました (図 6)。

## カラム温度の調整 (254 nm)

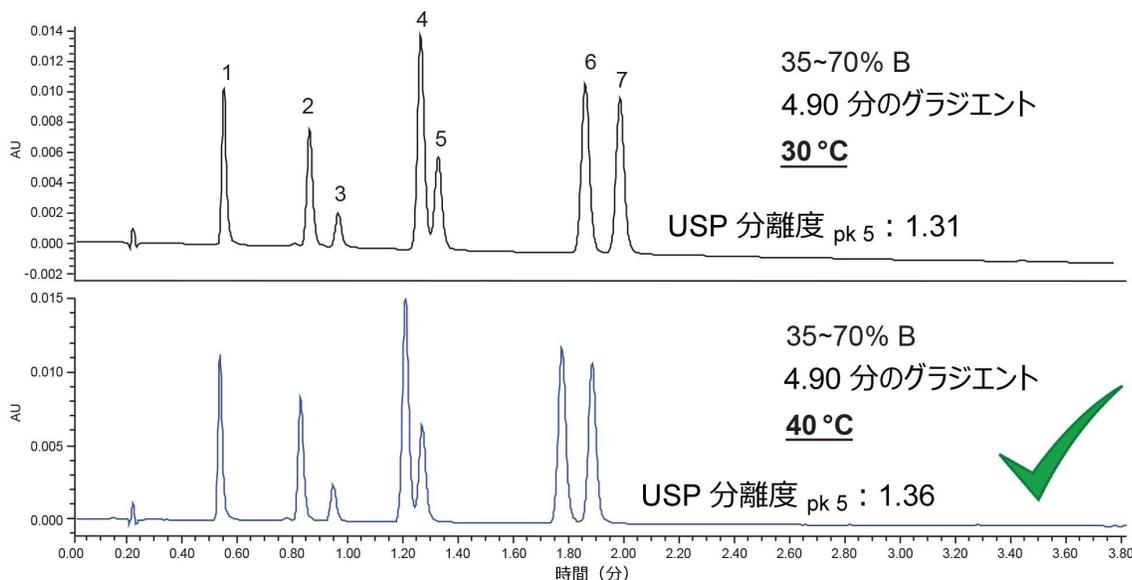


図 6. 254 nm でのカラム温度の最適化。成分 ID は、図 1 にリストされています。

カラム温度を上げると、分離効率がわずかに改善し、USP 分離度が 1.31 (30 °C で) から 1.36 (40 °C で) になりました。客観的には、この改善は先に進める際のメリットとして活用できますが、カラム温度がこれらの化合物の分離に主要な役割を果たしているとは思われません。分離を改善するための最後の手段は、カラム長を長くすることでした。これにより、カラムの効率 (一般に理論段数または長さ/粒子径比 (L/dp) と呼ばれる) が 2 倍になり、全体的な分離能が向上します。50 mm の 2.5 μm 粒子カラム (L/dp 20,000) から、100 mm の 2.5 μm 粒子カラム (L/dp 40,000) に移行することで、アメトリンとプロパジンのクリティカルペアが完全に分離されると考えられます。図 7 に、100 mm カラムで適切にスケールしたグラジエントを使用した、2 種類のカラムでのこの混合物の分離を示します。

## 220 nm での 100 mm カラムへの移行

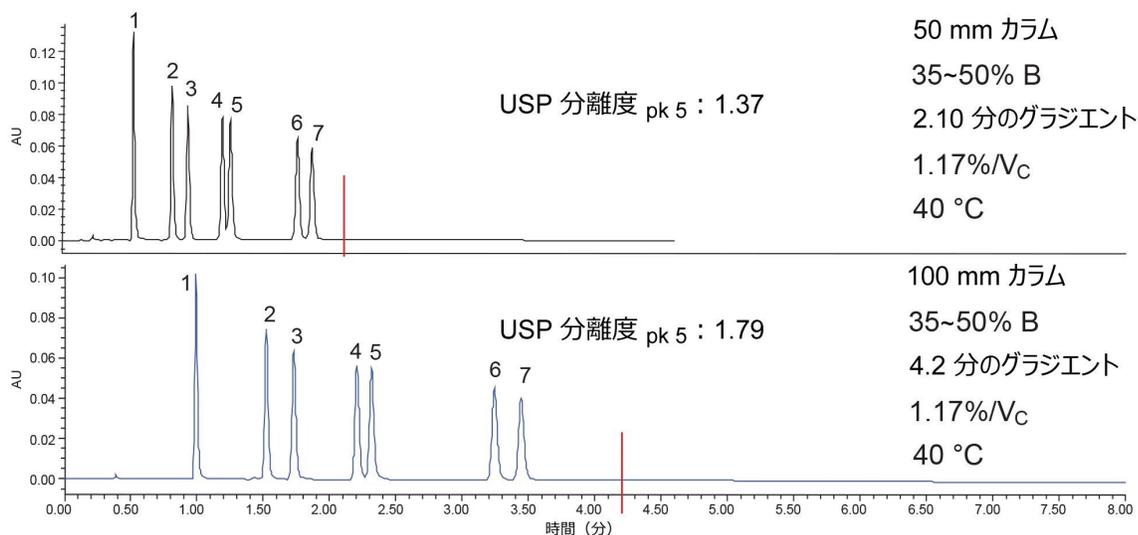


図 7. 2.5  $\mu\text{m}$  粒子を使用した 50 mm および 100 mm の XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムでのトリアジン系除草剤の分離。最終的なグラジエント条件には、2.1 分 (50 mm) または 4.2 分 (100 mm) で 35 ~ 50% B を使用しました。最適化で使用したのと同じグラジエントの傾き (1.17%/V<sub>C</sub>) とカラム温度 (40 °C) を使用しました。検出は 220 nm で行いました。サイクル時間を短縮するためにグラジエントを調整しました。赤色の線はグラジエントの終了を示します。成分 ID は、図 1 にリストされています。

カラムをスケールアップする前に、分析法を 35 ~ 50% B に短縮してサイクル時間を改善しました。分析法の短縮中も、最適化したグラジエントの傾き 1.17%/V<sub>C</sub> およびカラム温度 40 °C を維持しました。純粋に時間節約の目的で、またグラジエントの傾きを変更していないため、グラジエントの終了点を 50% B に調整しましたが、分析法の性能に影響はありませんでした。この短縮した分析法を 100 mm カラムにスケールアップすることで、すべての成分を完全に分離でき、最も低い USP 分離度 1.79 が得られました。これでこの分析法開発作業は完了と考えられ、サンプル分析や分析法バリデーション実験に使用できる可能性があります。体系的スクリーニングプロトコルを使用することにより、最適化を含めてわずか 11 時間 (2 日間) の実行時間でこの分析法が作成されました。体系的スクリーニングプロトコルのスピードと頑健な MaxPeak Premier カラムを組み合わせることで、信頼性の高い結果を日々安心して、迅速に得ることができます。

## 結論

トリアジン系除草剤は、作物管理の一環として、外来植物種の駆除に広く使用されています。これらの化合物を使用すると、土壌や地下水の汚染につながり、水系生態系に悪影響を及ぼす可能性があります。そのため、使用される地域では、これらの化合物のモニタリングが重要です。化合物をベースライン分離できることが、これらの分析種を効果的にモニターするのに重要です。ハイエンドの質量分析では、質量によって化合物を区別できる場合がありますが、ベースライン分離を得ることで、潜在的なイオン化抑制やイオン化増強が最小限に抑えられ、装置からより良好な結果が得られます。

分析法開発への段階的アプローチによりプロセスが簡素化するため、分析法開発がより迅速になり、初心者のユーザーでもプロセスを利用しやすくなります。段階的アプローチの一例は、このアプリケーションノートで概説した体系的スクリーニングプロトコルです。合理化したプロセスにより、7種のトリアジン系除草剤のための分析法を、最適化を含めて2日間で得ることができました。このケースでは、2日間にわたる11時間の装置稼働時間で分析法を作成することができました。これをMaxPeak Premier カラムと組み合わせることで、分離における多くの疑念を払拭できます。MaxPeak Premier カラムでは、分析種とカラムの金属表面の間で起こり得る二次的相互作用が軽減されます。ルーチンの分析法開発ワークフローの一環としてこれらのカラムを使用することで、有害な二次的相互作用についての心配が無用になり、最良の結果のみが確実に得られるようになります。

---

## 参考文献

1. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of Atrazine in Aquatic Ecosystems. *Environmental International* 483–495 2001.
2. Pan X, Xu L, He Z, Wan Y. Occurrence, fate, Seasonal Variability, and Risk Assessment of Twelve Triazine Herbicides and Eight Related Derivatives in Source, Treated, and Tap Water of Wuhan, Central China. *Chemosphere*.2023.
3. Maziarz M, McCarthy S, Wrona M. Improving Effectiveness in Method Development by Using a Systematic Screening Protocol. Waters Application Note. [720005026](#).2014.
4. Berthelette KD, Nguyen JM, Turner, J. Method Development of Ten Antibiotic Compounds Using a Systematic Screening Protocol on an ACQUITY ARC with UV and QDa Detection. Waters Application Note. [720007352](#).2021.
5. Berthelette KD, Turner JE, Walter TH, Haynes K. Using a Systematic Screening Protocol and MaxPeak HPS Technology to Develop a UHPLC Method for the Analysis of Deferoxamine and its Forced Degradation Products. Waters Application note. [720007834](#). 2022.

6. Hong P, McConville P. A Complete Solution to Perform a Systematic Screening Protocol for LC Method Development. Waters White Paper. [720005268](#) <  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>> .2018.
7. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.* 93 5773–5781 2021.
8. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette KD, Boissel C, Delano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplement*, June 28–34 2022.
9. Layton C, Rainville P. Advantages of Using MaxPeak HPS Technology for the Analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. Waters Application note [720007531](#). 2022.
10. Alkhateeb F, Rainville P. Batch-to-Batch Robustness of MaxPeak Premier Columns for the Analysis of Dexamethasone Phosphate and Related Compounds. Waters Application note [720007350](#). 2021.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower クロマトグラフィードータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007923JA、2023年7月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)