

# TLC-MSの50年

## 薄層クロマトグラフィーと質量分析法の接続及び HPLC との相補的利用による新たな展望 - ハチミツ検査における実証例

Michael Schulz, Head of Instrumental Analytics R&D | Michaela Oberle, Scientist, Instrumental Analytics R&D  
Markus Burholt, Scientist Instrumental Analytics R&D | Anita Piper, Scientist Instrumental Analytics R&D  
Monika Bäumle, Global Product Manager Thin Layer Chromatography, Analytix@merckgroup.com

※本アプリケーションノートは、Analytix Reporter Special Edition Food & Beverage "50 years of TLC-MS" 2022;78-82 (MK\_BR5425EN)を抜粋して日本語訳したものです。



### はじめに

薄層クロマトグラフィー (TLC) および高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) は、複雑なサンプル前処理や高額な装置を必要とせず、便利で迅速かつ効率的な分離技術として知られています。1枚のプレートで多数のサンプルを並行分析できるため、サンプルあたりの分析コスト低減と時間短縮が可能です。TLCは複雑なマトリックスに影響されにくく、HPLCの結果のクロスチェックや相補的な方法開発など、既存のルーチン分析法のオプションとして活用できます。

TLCでは、誘導体化試薬の適用による分析物の可視化や、UVをはじめとした他の検出方法との組み合わせなど、様々な検出手法を利用できます。1969年には、R.E. Kaiser教授が初めてTLCと質量分析(MS)の接続について報告しました<sup>1</sup>。その報告では、TLCのスポットを加熱し、質量分析計のインレット(入口)前のガス流中に脱離させました。今では数多くの文献により十分に裏付けられた結果が報告され、現在そして将来のTLCの発展に大きく貢献しています<sup>2</sup>。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、幅広い複雑なサンプルの迅速かつ高効率な分析のための確立された分析技術です。TLCと対照的に、HPLCはマトリックスが多いサンプルによる問題(圧力上昇やカラムインレットでのマトリックス化合物の蓄積によるカラム詰まりなど)に悩まされることがあります。さらに、不適切なグラジエント条件下での繰り返しによるサンプル注入にゴーストピークが検出される可能性もあります。

TLCとHPLCを接続利用すると、2つのクロマトグラフィーの長所を組み合わせることができます。TLCは複雑なマトリックスの影響を受けにくいことからサンプル前処理が容易または不要になり、HPLCはTLCの重なったバンドを効率よく分離して優れたピークの分離を可能にし、TLC-MSと比較して感度が向上します。2つの異なる相選択性を組み合わせることで、TLC-HPLC-MSは強力な2D-LC(二次元LC)法となります。

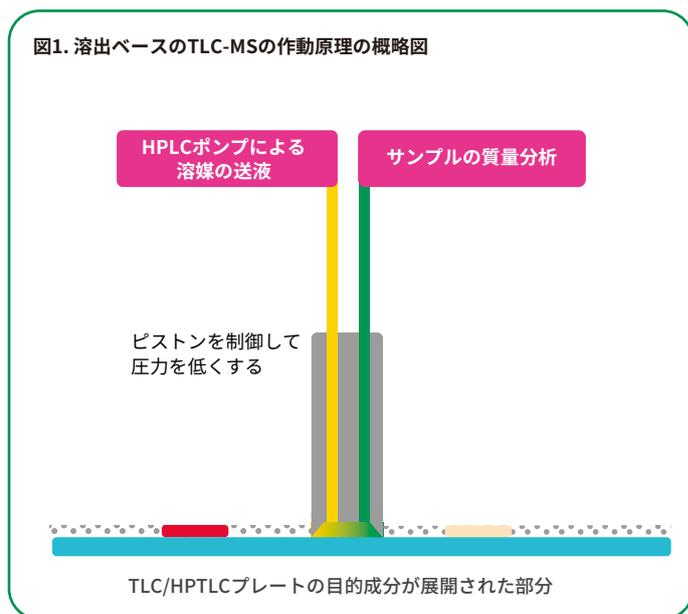
本アプリケーションノートでは、薄層クロマトグラフィーと質量分析法の組み合わせ(TLC-MS)、およびTLC-MSと高速液体クロマトグラフィーの組み合わせ(TLC-HPLC-MS)について、ハチミツ中のネオニコチノイド系農薬の検出を例として説明します。

### TLC-MS接続技術

TLCを質量分析法と直接接続する技術は、溶出ベースと脱離ベースの技術に分けられます<sup>2</sup>。

溶出ベースのアプローチでは、TLC-MSインターフェースを利用して、シリカプレートから溶媒で分析物を溶解し、液相で質量分析計に移送します(図1)。

図1. 溶出ベースのTLC-MSの作動原理の概略図



脱離ベースの技術は、TLC 表面から分析物を気化させ、気相で MS に移送します。気化技術には、ガスビーム、イオン衝撃、MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) または DART (リアルタイム直接分析) などがあります。

どのアプローチもオフラインで行われ、TLC 分離が終了してプレートが乾燥した後に実施されます。MS へのサンプル移送は迅速で、通常 1 分未満で完了します。

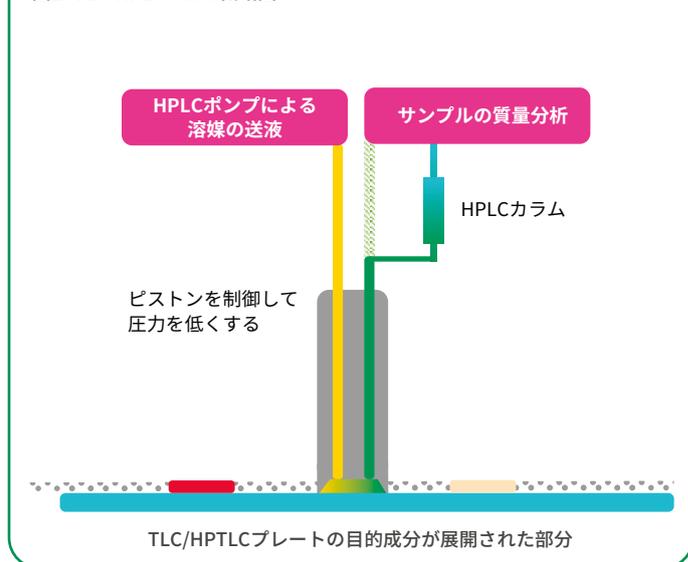
## TLC-MS の特徴と利点

- サンプル前処理は主に TLC プレート上で行われる
- 目的のスポットやバンドを直接 MS で分析 - 迅速な結果
- クロマトグラフィーは MS への注入とは別に実施される - 移動相選択における高い柔軟性
- MS グレードのプレートにより、高分解能の分離と高感度かつ信頼性の高い MS 検出を実現

## TLC-MS と HPLC-MS の接続

柔軟な機器設定により、直接溶出ベースの TLC-MS と TLC-HPLC-MS 測定が可能です (図2)。全ワークフローの概略図は図3に示しました。スポットをプレートから溶出し、詳細な分析のために HPLC カラムに移送できます。ここで TLC は、サンプル前処理または 2D-LC の第一次元として機能します。

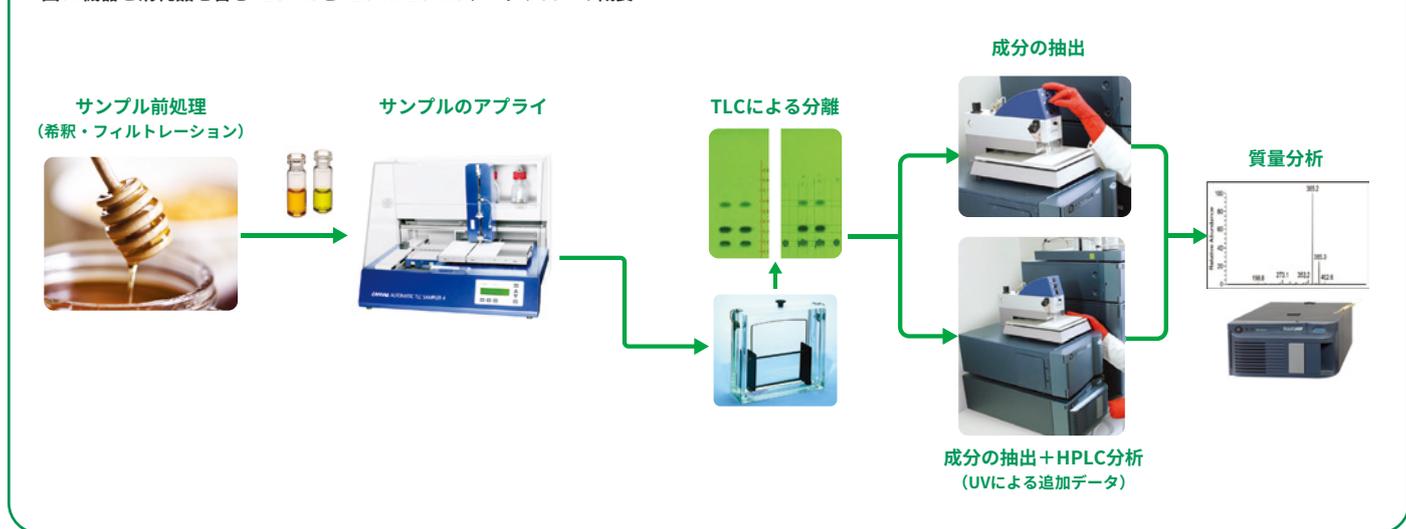
図2. TLC-HPLC-MS の概略図



## TLC-HPLC-MS の特徴と利点

- TLC は複雑なマトリックスの影響を受けにくいいため、複雑なサンプル前処理なしでの分析が可能
- 1 枚の TLC プレートで多検体を分析できることや、視覚的にスポットを判別するための多様な染色試薬のオプションがあることによるスクリーニングやメソッド開発の可能性
- TLC プレート上で重なっているバンド (分離されていない化合物) は HPLC の高い分離力で分離可能
- TLC-HPLC-MS は TLC-MS と比べて感度が向上

図3. 機器と消耗品を含む TLC-MS と TLC-HPLC-MS ワークフローの概要



## ハチミツ中のネオニコチノイド

高効果的なネオニコチノイド系農薬は、ミツバチの健康への悪影響に関して議論されています。(EU) No. 485/2013 は、クロチアニジン、イミダクロプリド、チアメトキサムを含む種子処理剤を使用した種子の使用と販売を禁止しています。2018年4月、ヨーロッパ連合(EU)はこれらの化合物の屋外使用を全面的に禁止しました((EU) 2018/783-785)。食品および飼料製品で認可されているネオニコチノイドのEUにおける残留農薬基準(MRL)は、アセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリドが50 ng/g、クロチアニジンとチアメトキサムが10 ng/gです<sup>3</sup>。

ハチミツは天然由来で、最も頻りに検査される食品の一つです。高い粘性と高い糖分含有量のため、ハチミツは非常に複雑なマトリックスを持ちます。

## 方法

すべてのTLC分析は、HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> MSグレードプレートを使用して実施しました。

ネオニコチノイド標準溶液(NSS)1および2は、それぞれ0.2 mg/mLおよび1 ng/mLの7種類の農薬(ニテンピラム、ジノテフラン、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド)をアセトンに溶解して調製しました。

サンプル前処理は、1gのハチミツを10 mLの水/アセトン1/1 (v/v)で希釈して行いました。サンプルはCAMAG ATS4を使用してバンド状(バンド幅2.5 mm)に塗布しました。

TLCの展開は2段階で行われ、アセトニトリルとアセトニトリル/メタノール3/1 (v/v)を移動相として使用しました。展開時間は1分と3分でした。表1はすべてのアプライしたトラックと分析物の $hR_f$ 値\*の概要を示しています。

表1. HPLCの条件

HPLCカラム	Purospher® STAR RP-18 endcapped (2 µm) Hibar™ HR 100-2.1 (製品番号 1.50648)		
移動相	A) 0.1% ギ酸含有水 B) 0.1% ギ酸含有アセトニトリル		
グラジエント	時間(分)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	3	90	10
	5	70	30
	12	60	40
	12.4	100	0
	15.6	100	0
流量	0.25 mL/分		
カラム温度	室温		
MSモード	ESI (+)		
TLCスポットの溶出	100% 水、流量 0.25 mL/分		

\* $hR_f$ 値は $R_f$ 値に100を乗じた値

TLC-MSおよびTLC-HPLC-MS実験は、CAMAG TLC-MS Interface 2とWaters ACQUITY® UPLC H-Class Bio SystemおよびACQUITY® QDa検出器を組み合わせた溶出ベースのアプローチで実施しました。

## 結果と考察

### ハチミツ中のネオニコチノイドの分析

合計で、5つの異なるサンプルの33トラックをTLCプレートにアプライしました。

- NSS 1 (各ネオニコチノイド 0.2 mg/mL)
- NSS 2 (各ネオニコチノイド 1 ng/mL)
- ハチミツサンプル(各ネオニコチノイド 1 mg/g を添加)
- ハチミツサンプル(各ネオニコチノイド 10 ng/g を添加)
- 無添加ハチミツサンプル

表2は、すべてのアプライしたトラックと目的成分の $hR_f$ 値の概要を示しています。

図4Aは、UV光(254 nm)照射下で展開されたTLCプレートを示しています。添加ハチミツサンプル中のネオニコチノイドは、 $hR_f = 70$  (ニテンピラム)および $hR_f = 93$  (ジノテフラン、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド)で視認できます。強いマトリックスの影響を可視化するために、プレートはアニスアルデヒド硫酸試薬で染色されました(図4B)。長く暗いスミア領域はサンプルの高い糖分含有量に起因します。さらに、アミノ基を持つ化合物を可視化するためにニンヒドリン染色を行いました(図4C)。

TLC展開後、溶出ベースのTLC-MSを使用して $hR_f = 70$ の領域を溶出し、その後のシングル四重極MS検出によってニテンピラムとして同定しました(図6A)。

添加ハチミツサンプルのTLC分離から生じる $hR_f = 93$ の領域(6つの分析物から成る)を、プレートから溶出してHPLCカラムに移送しました。クロマトグラムは、2つの添加サンプルと1つの無添加ハチミツサンプルについてUV検出を使用して得られました(図5および表3)。さらに、MS検出を利用して6つのネオニコチノイドを同定しました(図6B~Gのスペクトル参照)。

TLC-HPLC-MSにより、10 ng/gレベルで添加されたハチミツサンプル中のすべてのネオニコチノイドを検出することができました。MSによって再現性よく(複数のTLCトラック)示されたように、無添加ハチミツには、EUの基準(MRL) 50 ng/g未達のレベルでアセタミプリドとチアクロプリドが含まれていました。

このアプローチによる正確な定量のためには、さらなる研究が必要です。

表2. TLCデータ:トラック番号とアプライしたサンプル、アプライ量、 $hR_f$ 値

トラック	成分	アプライ量 ( $\mu\text{L}$ )	$hR_f$
1, 12, 23	ネオニコチノイド標準溶液 1 (各0.2 mg/mL)	0.5 $\mu\text{L}$	
3, 14, 25		0.8 $\mu\text{L}$	
4, 15, 26	ネオニコチノイド標準溶液 2 (各1 ng/mL)	1.0 $\mu\text{L}$	70:
5, 16, 27		1.2 $\mu\text{L}$	ニテンピラム
2, 13, 24	ハチミツサンプル (各ネオニコチノイド 1 mg/gを添加)	1.0 $\mu\text{L}$	93:
9, 20, 31			ジノテフラン、
10, 21, 32	ハチミツサンプル (各ネオニコチノイド 10 ng/gを添加)	1.0 $\mu\text{L}$	チアメトキサム、
11, 22, 33			クロチアニジン、
6, 17, 28			イミダクロプリド、
7, 18, 29	無添加ハチミツサンプル	1.0 $\mu\text{L}$	アセタミプリド、
8, 19, 30			チアクロプリド

表3. 添加ハチミツサンプル中のネオニコチノイドのHPLC保持時間。 $hR_f = 93$ のTLCバンドのスポットを溶出してHPLCで分析

ピーク	成分	保持時間(分)
1	ジノテフラン	6.6
2	チアメトキサム	7.6
3	クロチアニジン	8.1
4	イミダクロプリド	8.4
5	アセタミプリド	8.8
6	チアクロプリド	10.1

図4. A) UV光 (254 nm) 下でのネオニコチノイドの可視化。B) アニスアルデヒド硫酸で染色後のマトリックス化合物の可視化 (白色光)。C) ニンヒドリン染色によるアミノ基含有マトリックス化合物の可視化 (白色光)。

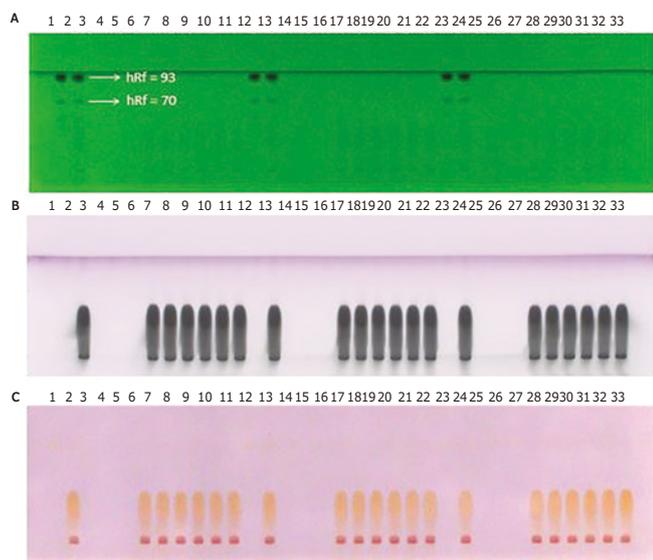
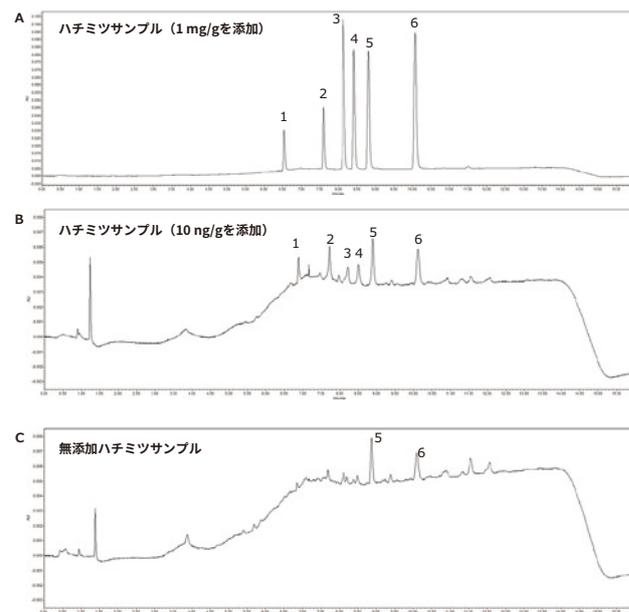


図5.  $hR_f = 93$ のTLCバンドのスポットを溶出してHPLC分析した添加および無添加ハチミツサンプルのHPLCクロマトグラム。A: 1 mg/g添加ハチミツサンプル。B: 10 ng/g添加ハチミツサンプル。C: 無添加ハチミツサンプル。ピークID: 1 ジノテフラン、2 チアメトキサム、3 クロチアニジン、4 イミダクロプリド、5 アセタミプリド、6 チアクロプリド。



## 薄層クロマトグラフィー 総合カタログ

<https://bit.ly/4leegTJ>



## 基本解説 & アプリケーション TLCマニュアル

<https://bit.ly/4hVX7eJ>

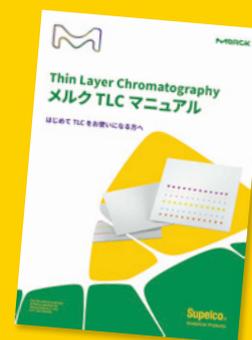
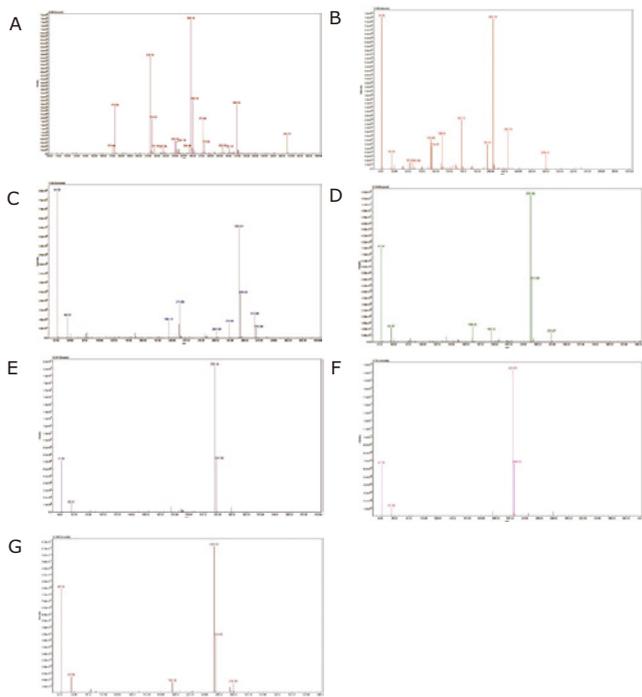


図6. 農薬を添加したハチミツの分析。7つのネオニコチノイドの質量スペクトル。hR<sub>i</sub> = 70のTLCバンドをTLC-MSで分析(A: ニテンピラム)、およびhR<sub>i</sub> = 93のTLCバンドをTLC-HPLC-MSで分析(B: ジノテフラン, C: チアメトキサム, D: クロチアジン, E: イミダクロプリド, F: アセタミプリド, G: チアクロプリド)した。



## 結論

複雑で困難な食品マトリックス中の異なる成分の分析例を、魅力的かつ柔軟な方法として TLC-MS と TLC-HPLC-MS を使用して解説しました。これらの手法では、時間と手間のかかるサンプル前処理なしに、目的分析物を容易に分離し検出することができます。

柔軟な機器設定により、一つのセットアップで相補的なクロマトグラフィー法として溶出ベースの TLC-MS と TLC-HPLC-MS 測定の組み合わせが可能になります。この組み合わせの妥当性は、7種類のネオニコチノイド系農薬の分析によって実証されました。添加および無添加ハチミツサンプルを分析し、無添加ハチミツサンプルでは、EU の基準 (MRL) 50 ng/g 未満のレベルでアセタミプリドとチアクロプリドが検出されました。

33トラック (21 のハチミツサンプルと 11 の標準溶液) のアプリケーションによって、TLC のスクリーニングおよびメソッド開発能力が示されました。ハチミツサンプルの強いマトリックスの影響はアニスアルデヒド硫酸による染色で可視化され、アミノ基含有化合物に対するニンヒドリン染色で、選択的検出による追加情報を得ることができました。

用途が広い TLC-HPLC-MS の組み合わせは、複雑なマトリックスの影響を受けにくく、多検体の並行分析が可能、誘導体化等の検出の柔軟性という TLC の強みと HPLC の高い分離力を組み合わせることで、特にマトリックスが多い複雑なサンプルの分析のための新しいアプローチを可能にします。

## 使用製品

製品概要	製品番号
HPTLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> MS-grade, 20 x 10 cm	1.00934
Purospher® STAR RP-18 encapped (2 µm) Hibar® HR 100-2.1, 100 x 2.1 mm	1.50648
Millex® Syringe Filter, Fluoropore™ PTFE, Hydrophobic, Non-sterile, 0.45 µm pore size, 25 mm diameter	SLFH025
<b>溶媒・試薬</b>	
Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®	1.06007
Acetonitril gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®	1.00030
Water for chromatography (LC-MS Grade) LiChrosolv®	1.15333
Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv®	1.00029
Formic acid 98 % - 100 % for LC-MS LiChropur®	5.33002
<b>標準物質</b>	
Nitenpyram PESTANAL®, 100 mg	46077
Dinotefuran PESTANAL®, 100 mg	32499
Thiamethoxam PESTANAL®, 100 mg	37924
Clothianidin PESTANAL®, 100 mg	33589
Imadacloprid PESTANAL®, 100 mg	37894
Acetamiprid PESTANAL®, 100 mg	33674
Thiacloprid PESTANAL®, 100 mg	37905

## 関連製品

製品概要	製品番号
HPTLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> MS-grade, 20 x 10 cm glass plates	1.00934
HPTLC RP-18 F <sub>254</sub> MS-grade, 20 x 10 cm glass plates	1.51161
HPTLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> MS-grade for MALDI, 5 x 7.5 cm aluminum foils	1.51160
TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> MS-grade, 20 x 10 cm glass plates	1.00933
TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> MS-grade, 5 x 7.5 cm aluminum foils	1.51022
TLC RP-18 F <sub>254</sub> MS-grade, 5 x 7.5 cm aluminum foils	1.51015

### 【販売取扱について】

製品番号またはカタログ番号を青で表記している製品の取り扱いにはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。

### 【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】

<メルク製品> TEL : 03-4531-1140 Email : jpts@merckgroup.com

<シグマ製品> TEL : 03-6756-8245 Email : jpts@merckgroup.com

## 参考文献

- Chem. Br. 5 (1969) 54. R. Kaiser
- Trends Anal. Chem. Vol. 29 (2010), Issue 10, 1157-1171. G. Morlock, W. Schwack
- Science Vol. 358 (2017), Issue 6359, 109-111. E.A.D. Mitchell, B. Mulhauser, M. Mulot, A. Mutabazi, G. Glauser, A. Aebi



メルクライフサイエンス公式 SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格 (税別) です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2025年4月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Supelco are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

## メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチソリューションズ事業部

〒106-0041 東京都港区麻布台1-3-1 麻布台ヒルズ 森JPタワー 26階

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.com/asp](http://www.merckmillipore.com/asp)

E-mail: [jpts@merckgroup.com](mailto:jpts@merckgroup.com) Tel: 03-4531-1140

AAM320-2504-PDF-M