

残留農薬分析機器の最近の進歩

—LC-MSの発展を中心に—

農林水産省農業環境技術研究所 ^{いし}石 ^{ざか}坂 ^ま真 ^{すみ}澄

はじめに

現在、農薬の高性能化に伴う構造の複雑化や環境問題への注目により、免疫化学測定法などの簡易・高感度な分析法や多成分一斉分析などの高速・高効率な分析法の開発が進められている。そのような中で注目されている技術の一つが、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と質量分析計 (MS) をオンラインで接続した LC-MS である。近年、開発・上市される新しい農薬には、熱に不安定でガスクロマトグラフ (GC) による分析の困難なものも現れ、HPLC が用いられることも多くなっている。しかし、高活性・低薬量の農薬に対して UV 検出器は感度や選択性の点で十分ではなく、より高感度な分析法が求められていた。

本稿では、高速・高感度・高選択性を有し、近年急速に普及しつつある LC-MS について概説する。

I 質量分析装置

質量分析装置は、①試料導入部、②イオン化部、③質量分析部の三つの部分よりできており、これらの組み合わせにより多種多様な質量分析装置が作られている。これらの中で最も重要なのがイオン化部であり、近年の LC-MS の発展は液体イオン化法の発展と言ってもよいものである。はじめに現在 LC-MS に用いられるイオン化法と質量分析計について述べる。

1 イオン化法

(1) パーティクル・ビーム (particle beam; PB) 法

質量分析におけるイオン化法には非常に多くの方法がある。GC-MS で通常使われるイオン化法は EI (electron ionization: 電子イオン化) 法であり、質量スペクトル・ライブラリも EI 法によるものである。PB 法は、LC 溶出液をヘリウムガスで微小液滴として噴霧し、溶媒を加熱気化、排除し、溶質微粒子ビームをイオン化室に導入し EI 法などでイオン化する手法である。すなわち、PB 法とは液体から連続的に溶質を取り出す方法を

示し、イオン化法としては EI 法ということになる。

PB 法の特徴は、EI 法によるスペクトルが得られるので、市販あるいは自社で構築した質量スペクトルのライブラリが利用できることである。一方、欠点は EI 法であるため分子イオンが必ずしも観測できず、また、順相などの揮発性の溶媒系しか利用できないことである。高感度を必要とする定量分析にはあまり用いられない。

(2) 大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) 法

大気圧化学イオン化法は、高電圧を印可した針電極に、大気圧下で細管から溶液を加熱・噴霧するものである。針電極先端でコロナ放電により溶媒をイオン化し、分子イオン反応により溶質イオンを生成する。溶媒を反応ガスとして利用した化学イオン化法 (chemical ionization; CI) である。1 ml/min といった従来の HPLC 分析法にも適用できる安定なイオン化法として普及し、中～低極性の低分子の分析に用いられる。APCI はソフトイオン化法で分子関連イオンが観測される。しかし、加熱などによりフラグメントイオンも生じやすい。

(3) エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法

エレクトロスプレーイオン化法は、大気圧下、高電圧を印可した細管から電解質溶液を噴霧することによりイオンを得る手法である。イオン化の過程はまだ完全に解明されていないが、次のように考えられている。高電圧に印可された細管先端では溶液の電荷分離が起こり、分析管側の対向電極に向かって引き延ばされる。液柱は断裂して (印可する電荷によって) 正または負に強く帯電した液滴となる。液滴は同符号に帯電しているため反発し、融合することなく溶媒の蒸発と自発的な分裂 (小滴の射出) を繰り返し電荷が濃縮されていく。そして小滴が小さくなると液滴から直接イオンが離脱する (「イオン蒸発」という)。流速は数 $\mu\text{l}/\text{min}$ までである。細管と同軸に窒素ガスや空気を流し噴霧を促進する方法はイオンスプレーといわれ、数 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速に対応する。さらに加熱した窒素ガスや空気を吹き付けて溶媒の気化を促進することにより、1 ml/min の流速にも対応する。近年日立製作所により開発・実用化されたソニックスプレーイオン化法は、音速の窒素ガス流を用いた

噴霧により微少帯電液滴を生成しイオンを得る手法である。イオンの生成過程は類似しているが、電圧を印可することがなく、よりソフトなイオン化法といわれる。

ESI法の本質は、電場により正負イオンを分離し、同符号イオンが凝集した液体表面を液滴としてはぎ取りイオンを蒸発させる、ということである。したがって、エレクトロスプレーという用語は厳密にはイオン化法を示す語ではない。また各メーカーが自社製品に独自の名称を付けているため混乱が生じやすいので注意が必要である。

質量分析におけるイオン化法としてのエレクトロスプレー法が実用化したのは1980年代のことである。このイオン化法が目目されたのは、タンパク質の多価イオンが得られることが報告されたことによる。質量スペクトルの横軸は分子量が単位ではなく m/z が単位である。これは“イオンの質量数を電荷数で割った値”を示している。多価イオンが得られるということは、分子量が数万のタンパク質を測定範囲が狭い四重極質量分析計でも測定できるということ、急速に利用が広がった。その後高流速への対応などにより製薬分野において代謝分析に広く用いられるようになった。しかし、環境分析において用いられるようになったのは最近のことである。

エレクトロスプレーイオン化の特徴はソフトなイオン化ということである。通常は $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ などの分子量関連イオンが基準ピークとして現れる。その原理からもわかるように極性を有する物質に適しているが、物質により感度（イオン化効率）には著しい差がある。水を含む逆相系のLC分析に適しており、100%有機溶媒には不適である。

APCIとESIは大気圧イオン化（API）法と総称される。両インターフェースは構造が類似し、またインターフェース内は「大気圧」なので真空を破らずに脱着できることから、現在市販されているLC-MS装置では両者を簡単に交換あるいは切り替えられる。

LC-MSで用いられるイオン化法としては、他に1980年代に普及したサーモスプレーイオン化（thermospray ionization; TSP）法やFrit-FAB（fast atom bombardment; 高速原子衝撃イオン化）法などがある。しかし現在はAPI法がLC-MSで最も広く利用されるイオン化法となっている。

2 質量分析計部

質量分析計はその名のとおり“質量を分析する”装置であり、様々な手法が考案されてきた。近年、長い歴史を持ちながらも十分な性能が得られなかった方式の質量分析計が技術の発達により性能が向上し注目を浴びるよ

うになってきた。また、二台の質量分析計を連結したタンデム型質量分析計もLC-MSでの利用が広がりつつある。

現在市販されている質量分析計の主なものとしては、①二重収束型、②四重極型、③イオントラップ型、④飛行時間型、⑤フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（FT-ICR）型などがある（表-1）。

タンデム型質量分析装置としては、二重収束型—二重収束型や四重極型—四重極型などの同一タイプを組み合わせた装置と、二重収束型—四重極型、四重極型—飛行時間型、などの異なるタイプを組み合わせたハイブリッド型の装置がある。またイオントラップ型やFT-ICR型といった装置は単独で多段のMS/MSが可能である。

現在これらのすべてのタイプでLC-MSが可能である。しかし、これらの中で現在残留分析を目的として主に用いられるのは、シングルおよびタンデムの四重極質量分析計である。これは、比較的低真空で作動するので、API法との親和性が良いことや定量時の直線性の範囲が広いことなどによる。イオントラップ型や飛行時間型は感度や分解能で優れた点を持つが、定量直線性が狭いなどの問題が指摘されている。しかし、今後は利用も増えるものと思われる。

さて、薬物動態研究には四重極タンデム型質量分析計がLC-MSとして繁用される。この装置は、イオン化室—分析管（Q1）—衝突室（Q2）—分析管（Q3）—検出器、という配置の構造を持ち、二つの分析管は独立に動作させることができる。そして、表-2に示したような6とおりの測定モードを持つ。これらの測定モードはそれぞれ薬物動態研究に有用であるが、ここでは定量に用いられるSRM測定について説明する。

通常のシングル四重極型の場合、定量はSIMモードで行う。これは目的とするイオンだけが分析管を通過できるように設定する。選択性を得るとともに、検出時間を長く取り感度を得るためである。それに対し、タンデム四重極型ではSRMモードで定量を行う。SRMとはQ1で目的とするイオン（多くの場合分子量関連イオン）のみを選択し、次のQ2でアルゴンや窒素などのガスに衝突させフラグメンテーションを起こさせ（衝突誘起解離（collision-induced dissociation; CID））、生じた特定のフラグメントイオンをQ3で選択、検出する方法である。SRM測定では、分子で選択しさらにフラグメントで選択するので極めて高い選択性とS/Nが得られる。そして、ESIのようなソフトイオン化法の場合、EI法のように多数のフラグメントが生ずることなく、分子量関連イオンが主なイオンとして生成するので高い感度が得

表-1 主な質量分析計の特徴

①二重収束型質量分析計(Double-focusing mass spectrometer)
扇形磁場と扇形電場の組み合わせにより速度収束と方向収束を行い、磁場を走査することにより質量スペクトルを得る。高分解能測定が可能(組成式の決定, 高選択性定量)。m/z 範囲は加速電圧により異なるが数千~1万程度。広い定量直線性。高真空が必要。比較的大型, 高価。
②四重極型質量分析計(Quadrupole mass spectrometer ; QMS)
双曲線断面を持つ平行な4本の電極に直流と高周波交流を印可し、順次通過できるイオンを変化させ質量スペクトルを得る。高分解能測定は不可。m/z 範囲は最大4,000程度。高速走査。広い定量直線性。低真空で作動。小型, 安価。
③イオントラップ(交流トラップ)型質量分析計(Ion trap mass spectrometer ; ITMS)
三次元双曲面電極内に一定時間イオンを貯蔵一順次放出を繰り返すことにより質量スペクトルを得る。高分解能測定は不可。m/z 範囲は最大2,000程度。高感度スペクトル測定。狭い定量直線性。低真空で作動。比較的小型, 安価。単独で多段プロダクトイオンキャンが可能。
④飛行時間型質量分析計(Time-of-flight mass spectrometer ; TOF-MS)
イオン・パルスを真空の管中を飛行させ、検出器に到達する時間により質量スペクトルを得る。高分解能測定可能。m/z 範囲はオンライン測定で~10,000程度、オフラインでは無制限。高速走査。狭い定量直線性。機種によりポストソース分解によるプロダクトイオンスペクトルが得られる。
⑤フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計(Fourier-transform ion cyclotronresonance mass spectrometer ; FT-ICR-MS)
磁場中にトラップしサイクロトロン運動するイオンにより検出電極に発生する誘導電流の周波数から質量スペクトルを得る。超高分解能測定が可能(組成式の決定)。m/z 範囲は最大20,000程度。高感度スペクトル測定。質量範囲の広い装置では超伝導磁石, 高真空が必要。大型, 高価。単独で多段プロダクトイオンキャンが可能。現在は定量には用いられない。

表-2 四重極タンデム型質量分析計の測定モード

測定モード	Q1 設定	Q3 設定	特長・用途
Q1 scan	走査	—	スペクトル測定(分子量決定等)
Selected ion monitoring (SIM)	質量固定	—	特定物質の定量
Product ion scan	質量固定	走査	衝突誘起解離(CID)スペクトル測定(構造解析等)(Q1=分子関連イオン)
Precursor ion scan	走査	質量固定	共通部分構造を持つ物質(代謝物等)の探索(Q3=フラグメントイオン)
Neutral-loss scan	走査	走査	共通官能基等を持つ物質(代謝物等)の探索(Q1-Q3=中性脱離基質量)
Selected reaction monitoring (SRM) (Multiple reaction monitoring (MRM))	質量固定	質量固定	特定物質の高選択・高感度定量(Q1=分子関連イオン等, Q2=フラグメントイオンに設定)

られる。

II 農業残留分析への応用

LC-MSの新しいイオン化法が開発されると、残留分析への応用が試みられた。しかし、ルーチンの分析法となったのは1 ml/min程度の流速に対応するAPIインターフェースを備えたLC-MS装置が市販されるようになったこと2~3年のことである。前述のように、API法のうち低分子の分析には最初APCI法が注目されたが、残留分析への応用例はそれほど多く発表されていない。尿中のアラクロール、メトラクロールとおのこの

代謝物(DRISKELL, 1996, DRISKELL and HILL, 1997)の分析や、SHIMAMURA (1998)らによる22種の農業についての固相抽出とLC-APCI/MSを組み合わせた水の多成分分析法などが報告されている。

現在、最も有力であると考えられているのはESI法である。すでにimidazolinone系除草剤(STOUT, S. J. et al., 1996), sulfonyleurea系除草剤(MAREK, L. J. and KOSKINEN, W. C., 1996), sulfonyleurea, imidazolinone, sulfonamide系除草剤(RODRIGUEZ and ORESCAN, 1998), N-methylcalbamate系殺虫剤(VOLMER, and HUI, 1998)などの報告がある。また昨年の第9回国際農業化学会議

Bensulfuron-methyl

MW=410.4, C₁₆H₁₈N₄O₇S

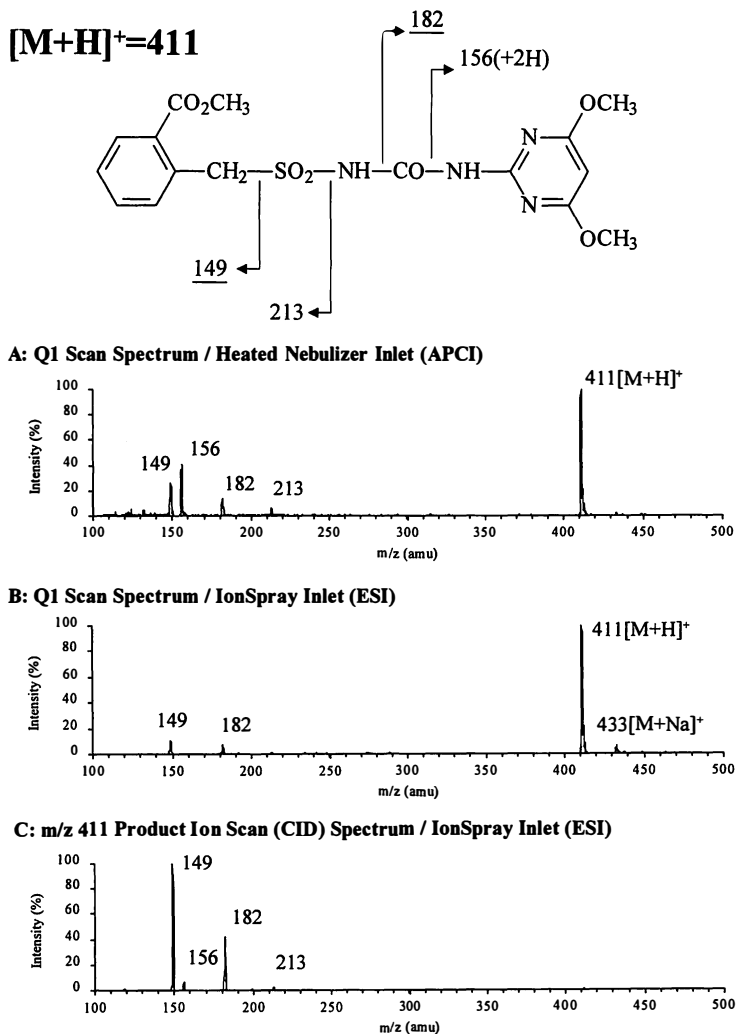


図-1 ベンスルフロンメチルの API 法による質量スペクトル (A: APCI, B: ESI, C: ESI/CID spectrum of m/z 411)

の要旨を見ると、セッション7A-「Advances in Analytical Methodology & Detection Technique」において、LC-MS関係の報告が13題あり、その多くはESI法を用いていた。

筆者らも、1995年からAPIインターフェースを備えた四重極タンデム型装置の有効性について検討を行ってきた。最初に Sulfonylurea 系除草剤を対象とし、ESIにより測定を行った。ベンスルフロンメチルの場合、装置設定を最適化することにより [M+H]⁺ イオンが主

イオンとして観測され、フラグメントイオンは少なかった。一方、APCI法の場合も同様のイオンが観測されたが、フラグメントイオンはやや多かった(図-1; 石坂・高木, 1997)。定量を目的とする場合、フラグメントイオンは少ないほうが感度がよい。ESI法をイオン化法としてSRM測定による定量法の開発を行った。ベンスルフロンメチルの場合 [M+H]⁺=m/z 411を前駆イオンとして、CIDにより生じた生成イオン m/z=149により定量を行った。標準品溶液では、10 μl 注入で0.01~

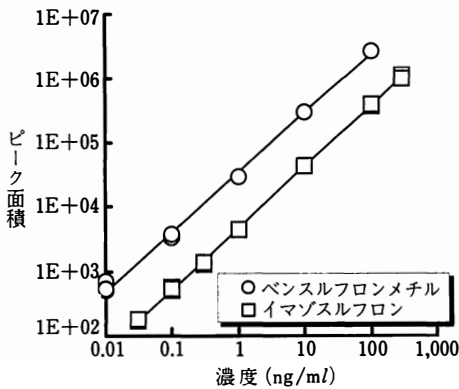


図-2 水田用 Sulfonylurea 系除草剤の HPLC-ESI/MS/MS による定量範囲

100 ng/ml (ppb) の濃度範囲で直線性が得られた (図-2)。前述のように SRM 測定は極めて高い選択性と感度を持つので、田面水や河川水などの試料の場合は抽出操作を行うことなく、汙過と遠心により不溶物を除去するだけで十分な感度で定量することが可能であった。土壌の場合は有機溶媒抽出を行った後、固相抽出による精製を行う。この試料を UV 検出器で分析した場合は多数のピークが見られるが、SRM 測定ではその高い選択性によりベンスルフロンエチルのピークのみが検出された (ISHIZAKA et al., 1996, 石坂ら, 1998 a)。

筆者らは、昨年より他の農薬についても API 法の有効性について検討を行っている (石坂ら, 1998 b)。これはイオン化法の項でも触れたが、特に ESI 法は物質や溶媒により感度が大きく異なるからである。今後は API 法による LC-MS を用いた分析報告が増えてくるものと思われるが、筆者らも各農薬についての API 法の適否とスペクトル・データの蓄積・整理を行ってゆく予定である。

最後にスペクトル・ライブラリについて触れておく。EI 法ではスペクトル・ライブラリが市販されていて、コンピュータにより簡単に検索することができる。しかし、API 法ではスペクトルライブラリは市販されていない。これは、API が大気圧下で起こるため、装置の

設定によってインターフェース内での CID が異なるためである。現状では GC-MS で行われているような市販ライブラリの検索はできないことに注意する必要がある。

おわりに

駆け足で LC-MS の現状について見てきた。10 年ほど前には、質量分析計といえば大型で高価な二重収束型の装置と小型で比較的安価な四重収束型の装置であった。しかし、現在では前述のように様々な形式の装置が販売されており、目的により選択する時代になっている。また、毎年のように新しい装置も開発されている。質量分析の世界は今、1 年前に出版された本の内容も古くなってしまおうという激しい進歩の中にある。今回は取り上げられなかったが、抗生物質農薬の定量やタンデム MS の様々な利用法、タンパク質、多糖、DNA などの構造解析・機能解析への応用など、質量分析には多様な活用方法がある。

本解説により、LC-MS をはじめとする新しい質量分析技術に多くの研究者や技術者の方が興味を持っていただければ幸いである。

引用文献

- 1) DRISKELL, W. J. et al. (1996) : Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 853~859.
- 2) ——— and R. H. HILL (1997) : ibid. 58: 929~933.
- 3) ISHIZAKA, M. et al. (1996) : Japan-USA Pesticide Residue Workshop Proceeding, 68~72.
- 4) 石坂眞澄・高木和広 (1997) : 第 20 回農薬残留分析研究会講演資料集, 136~137.
- 5) ———ら (1998 a) : 日本農薬学会第 23 回大会講演要旨集, p. 136.
- 6) ———ら (1998 b) : 第 21 回農薬残留分析研究会講演資料集, 86~95.
- 7) MAREK, L. J. and W. C. KOSKINEN (1996) : J. Agric Food Chem. 44: 3878~3881.
- 8) RODRIGUEZ, M. and D. B. ORESCAN (1998) : Anal. Chem. 70: 2710~2717.
- 9) SHIMAMURA, Y. et al. (1998) : J. Pesticide Sci. 23: 241~249.
- 10) STOUT, S. J. et al. (1996) : J. Agric Food Chem. 44: 2182~2186.
- 11) VOLMER, D. A. and J. P. M. HUI (1998) : Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35: 1~7.