

質量分析機器の進歩と農薬残留分析

(財) 残留農薬研究所 化学部 小田中芳次

1. はじめに

農薬残留分析では、「農薬取締法に基づく農薬登録のための残留試験」と「食品衛生法に係わる食品の残留検査」の大きく2つの分野がある。前者は農薬登録に係わる農作物、土壌、水における残留性の評価を、後者は食品中に含まれる残留農薬 (MRL) の監視をそれぞれ主な目的としている。各々試験ガイドラインや検査基準が定められており、それらは時代とともにおおむね厳しい方向に改正されてきている。特にこの数年間の動きは慌しく、無登録農薬や輸入農産物の残留農薬の問題を受け、農薬取締法および食品衛生法の大幅改正が行われた。このため、農薬残留分析の分野では、マイナー作物登録などの規制強化の件やポジティブリスト制度の導入に伴う分析技術の問題等々に対して精力的に対応しているところである。

一口に農薬の残留分析といっても、対象とする農薬の中身は全有機化合物に匹敵する。分子量は100~1,000程度だが、水溶性 (強極性) ~脂溶性 (無極性)、酸性~塩基性のものまで、多種多様な農薬化合物を相手にする必要がある。これまでは、登録保留基準と残留基準が設定されている350品目程度の農薬を相手にすればよかったが、ポジティブリスト制度への移行に伴って、一挙に約600もの農薬を相手にしなければならなくなった。また、分析試料については、

代表的な農作物だけでも130種程あり、地域特産の農作物や香辛料等の原料を含めると多種多様で膨大な数の試料を対象にすることになった。

一方、残留基準値は、以前にも増して頻繁に追加変更が行われ、これに伴って農薬等の分析法も随時更新されるので、分析者はこれらの動きを細大洩らさず把握して、常に最新の基準値と試験法 (分析法) を用意しておく必要に迫られている。

農薬の分析は、抽出、精製、定量に大別されるが、抽出に関しては、現在でも伝統的な溶媒抽出法が主流である。精製では、市販のカートリッジカラム (ミニカラム等) の利用によって、簡便・迅速・多検体処理が可能となり、分析時間の短縮が図られた。特に、多孔性ケイソウ土カラム、オクタデシルシリル化シリカゲル (C₁₈)、グラファイトカーボン (GCB)、シリカゲルやフッロリジルの各ミニカラムなどは当然のごとく使用されるようになり、分析者が自ら作成していた充填カラム (オープンカラム) はほとんど姿を消してしまった。定量に関しては、これまでどおり、ガスクロマトグラフ (GC) および高速液体クロマトグラフ (HPLC) が必須の装置として汎用されているが、検出器の種類は徐々にではあるが着実に増えている。特に、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS(/MS)) は、ポジティブリスト制度に対応する一斉分析法の

測定機器に指定されたことなどから、近年、積極的に利用され始めている。

分析結果については、単に正確に出せばよいというわけではない。分析結果を導き出すに当たっては、精度管理の基準を満たしていること、できればQA/QCや技能試験等が実施されていることが望ましい。すなわち、分析結果を客観的に確認できるような組織体制下で実施され、また、トレーサブルであることが必須条件となってきた。

農業残留分析の分野では、常に高度な分析技術や分析機器を基礎的・先端的分野から導入することで、技術革新を図り、時代の要請に応えてきている。振り返ると、GCではキャピラリーカラムの導入が、精製ではミニカラムなどのカートリッジカラムの導入が、それぞれターニングポイントであったと思われる。測定機器では、この数年間の特徴としてLC/MS (/MS) の導入・普及であり、定量感度が飛躍的に向上したことなどから、分析操作の大幅な短縮が実現され、これまでの分析内容を一変させるほどの変革期が到来した感がある。

このように農業残留分析の技術は、法的規制、分析技術や分析機器の進歩、精度管理の要求事項、等々に影響を受けながら発展してきているが、本稿では、質量分析機器を利用した農業残留分析の技術的側面に焦点を絞り、過去30年ほどの変遷もまじえて、その発展と現状ならびに問題点やその対策等について述べることにする。

2. 質量分析装置

農業の多くは、ガスクロマトグラフ (GC) や高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて検出や定量を行なうことが可能であるが、これらの装置については、この30年間に飛躍的な進歩が

見られる。特に、検出器として質量分析計 (MS) を装備したガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS) や高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS) は目覚ましい発展を遂げている。1970年代では、質量分析装置といえば、GC/MS ぐらいで、主な用途は定性や確認であった。定量したい場合は、わざわざイオンを連続的に補足する装置 (Multiple Ion Detector : MID など) をオプションとして付ける必要があった。定性と定量の機能が一体化した装置が導入されたのは70年代末ごろからと思われる。一方、LC/MS は80年代に導入されたが、当初は、液体試料を一旦完全に乾燥させた後でイオン化させる方式 (ムービングベルトやパーティクルビーム) が採用されており、主な用途はやはり定性や確認用であった。その後、大気圧イオン化方式の装置が開発され、感度や定量性に優れていることが確認され、飛躍的に利用が高まり、現在に至っている。

2-1. ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS)

2-1-1. カラム

1970年代は、充填剤を詰めたガラスカラムが主体であり、MS用の充填剤の種類もそれほど多くはなかった。液相は一般に熱に不安定なので、使用している間に気化等により消失し、分離性能の低下やイオン源やセパレーターを汚染する原因となった。当然、カラムの寿命は短く、クロマトグラムの再現性も不十分であった。ヒューズドシリカキャピラリーカラムの導入により、充填カラムの欠点はほぼ完全に克服され、セパレーターを装備する必要もなくなった。また、誘導体化しなければ測定することができなかったような化合物 (メチルカーバメート系農薬等) でも直接測定が可能となり、分析対象農薬の適

用範囲も広がる効果をもたらした。

2-1-2. イオン化法と質量分析部

GC/MSのイオン化法には、電子衝撃型 (EI) や化学イオン化 (CI) があり、前者は定量用に、後者は確認用に使用されるケースが多く見られる。もちろん、それぞれ逆の目的で使用するケースも見られる。質量分析部としては、四重極型 (Q-MS) が主流であり、イオントラップ型 (IT-MS)、タンデム四重極型 (Q-MS/MS)、磁場型 (Sector-MS) など使用されている。これら質量分析部の機構や特性については、2-2-3を参照されたい。

2-1-3. 問題点 (マトリックス効果)

1970年代では、バックドカラムを装備した装置が主体で、しかも主な用途は定性用であったので、マトリックス効果の問題はほとんど認識されていなかった。80年代以降、キャピラリーカラムの普及とともにスプリット・スプリットレス注入口を装備したGC/MSが導入され、しかも、分析対象農薬として比較的熱に不安定な農薬についても適用が拡大されたことなどもあり、この現象が顕著に見られるようになった。

GC/MSに限らず、GCの最大の欠点は、注入口で熱分解の可能性があることである。GCで測定可能な農薬の大部分は比較的熱に安定であるが、不安定な農薬は注入口で熱分解を受ける。この場合、試料マトリックスを含む試験溶液を測定した場合、標準溶液に比べて、熱分解が緩和されることがあり、結果として回収率が100%を大幅に上回る現象が見られることがある。この現象を「マトリックス効果」と呼んでいる。回収率が100%を大きく下回る場合についても、同様に「マトリックス効果」と呼んでいるケースがあるが、これは単に精製が不十分なだけなので、これを「マトリックス効果」に含めるには

若干異論がある。

マトリックス効果の原因として、熱分解だけでなく、注入口での吸着も要因として上げられる。現象としては、熱分解の場合と同様に、試料マトリックスによって注入口における吸着が、標準溶液の場合よりも、抑制されるためと考えられている。

マトリックス効果を防止する方法には、①標準溶液にジエチレングリコールのような擬似マトリックスを加える方法、②試料マトリックスを含む標準溶液を用いて検量線を作成する方法 (マトリックス検量線)、③分析成分の同位体化合物を内部標準物質として試験溶液に添加して回収率補正する方法などがある。なお、測定時には必ず試料マトリックスを含む試験溶液を用いて起爆注入を数回実施し、注入口を十分にコンディショニングしておくことは必須事項である。

2-2. 高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS)

2-2-1. カラム

農薬の残留分析では、分子量や溶解性の点から、一般にODSカラムに代表される逆相系カラムが広く使用されている。その他、順相系カラムやイオン交換系カラム、また、光学異性体分離用のキラルカラムなども使用されている。LC/MSでは、イオン源への試料導入量に制限があり、また選択性が高いので夾雑物との分離も厳密に行う必要がないことなどから、カラムは通常のものよりも細く短いのが特徴である。最近、超微粒子で高耐圧性の充填剤が開発され、分離、ピーク形状、流速とも従来のものを大幅に凌ぐ高性能なカラム (LC装置と一体化) が供給されている。

2-2-2. イオン化法

LC/MSのイオン化法には、フィールドイオン化 (FI, FD)、高速イオン・原子衝撃 (SIMS, FAB)、大気圧イオン化 (API)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) などがあるが、農薬残留分析では定量性の優れたAPIの1方式といっても過言ではない。その中には、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、大気圧化学イオン化 (APCI)、大気圧光イオン化 (APPI) などがある。いずれもソフトイオン化なので、フラグメンテーションは起こりにくく、一般には、 $[M+H]^+$ 又は $[M-H]^-$ のいわゆる擬分子イオンを生じる。以下、これらイオン化法の原理、移動相、農薬の適性について述べる。

イオン化法の原理

ESI：試験溶液を強い電場を帯びた細管に導入し、スプレー状に放出することにより、液滴を過剰に帯電させ、乾燥ガス (N_2) による溶媒蒸発と液滴の微小化、液滴の自発的な分裂 (イオン蒸発) を経て、気相にイオンを生成させる方法である。すなわち、溶液中のイオン性物質を気相に取り出すイメージである。高感度化のためには、移動相のpHの最適化 (酸性物質はpKaより1~2高く、塩基性物質はpKaより1~2低く設定)、揮発性電解質の添加によりイオン性官能基を持たない中性化合物のイオン化促進、などの方法がある。

APCI：試験溶液をネブライザーによる液滴の微細小化、ヒーターによる液滴の霧化、コロナ放電による溶媒のイオン化、気相化学反応による分析成分のイオン化を経て、気相にイオンを生成させる方法である。イオン化のメカニズムとしては、GC/MSにおける化学イオン化 (CI) と類似している。ESIと比較して、気相中に存在する分子状の化合物が直接化学イオン化され

るので、Na付加イオンが出にくい特徴がある。APCIではプロトン化されやすい溶媒を選択する必要があるため、アセトニトリル系よりもメタノール系を使用する。

APPI：コロナ放電の代わりにクリプトンランプの光 (UV) によりイオン化する方法である。通常の移動相溶媒はイオン化されないためバックグラウンドが低いのが特徴である。

移動相

移動相は基本的に揮発性である必要がある。溶解性の点では極性溶媒 (アセトニトリル、メタノール、水) を用いる必要がある。pH調整のためには、ギ酸、酢酸、アンモニア水が使用される。また、感度の安定化および分離性能向上のためには、ギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムが使用される。これらは、アンモニウム付加イオンの生成を促進し、Na付加イオンの生成を抑制する効果がある。なお、電解質濃度が高くなると、電解質イオンと農薬との間で気相イオンへの転換に競合が生じるため、一種のイオン抑制が起こり、感度は低下する。逆に、電解質濃度を下げると感度は高まるが、試料マトリックスの影響を受けやすくなり、感度変動が大きくなる。

分析対象農薬の適性

農薬の極性が高~中程度の場合はESIが有効で、低~中程度の場合はAPCIを、さらに低い場合はAPPIが適しているといわれている。分子内にNやOが含まれている化合物はイオン化される可能性は高いが、CとHだけからなる非極性化合物やナフチル基などを有する芳香族化合物は (APPIを除いて) イオン化され難い。また、プロトン親和力の大きいアミノ基、アミド、カルボニルを有する農薬は正イオンモードでの測定が、プロトン親和力が小さいカルボキシル基や

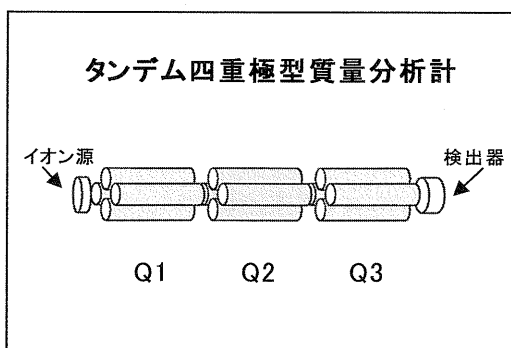
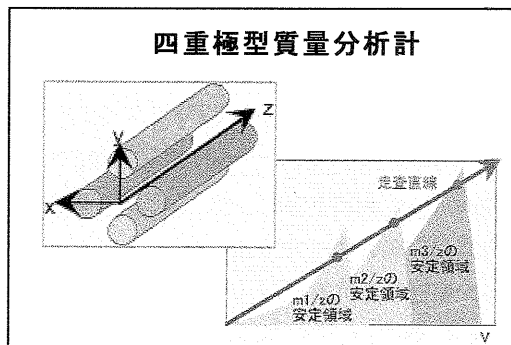
ヒドロキシル基を有する農薬は負イオンモードでの測定が適しているといわれている。

2-2-3. 質量分析部

質量分析部には、四重極型 (Q-MS)、イオントラップ型 (IT-MS)、タンデム四重極型 (Q-MS/MS)、飛行時間型 (TOF-MS)、磁場型又は二重収束型 (Sector-MS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン型 (FT-MS)、複合型又はハイブリッド型 (Q-TOF, IT-TOF, Q-MS/MS-IT) などがあるが、農薬残留分析の分野では、汎用型として Q-MS, IT-MS, Q-MS/MS, また、最近では TOF-MS の利用が見られる。以下、これら質量分析部の原理と特徴などについて述べる。

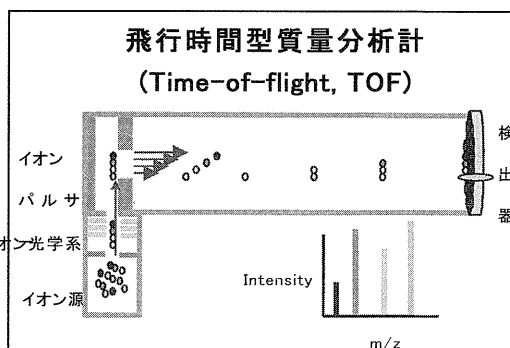
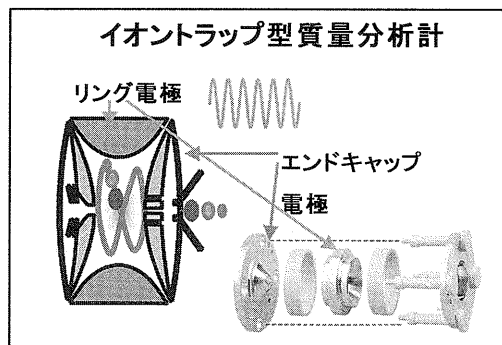
四重極型：イオンを四重極の中に連続的に通しながら高周波電位と直流電位を与えると、特定の m/z を持つイオンのみが通過できることを

質量分析部の模式図



利用している。四重極の印加電圧を制御することでイオン (質量: マス) を通過 (フィルター) させるので、マスフィルターとも呼ばれる。小型装置を作りやすく、操作やパラメータ設定がシンプルである。また、スキャンスピードが速く、真空度が比較的低くても機能するため、ESI や APCI に適した質量分析部である。定量は Selected Ion Monitoring (SIM) 法で行われる。

イオントラップ型：ドーナツ型のリング電極の穴の上下に半球状のエンドキャップ電極を押し込めた内部にイオンを導き (トラップ)、高周波交流電圧の変化にしたがって高周波電界から飛び出すイオンを検出する。MS/MS, MSⁿ によってイオンごとに各種フラグメントが得られるので、構造解析に有効である。定量は SIM や Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法で行われる。なお、ダイナミックレンジがやや狭い欠



(Agilent Technologies社提供資料)

点がある。

タンデム四重極型：通常、複数の四重極分析部を備え、MS/MS測定が可能な装置をこのようにいう。1つ目でプレカーサーイオンを選択し、2つ目（通常、コリジョンセルといわれる部分で、必ずしも四重極が使われていない）で不活性ガス（通常、アルゴンガス）と衝突させフラグメンテーションを起こさせ、3つ目でプロダクトイオンを選択する。特定のプレカーサーイオンとプロダクトイオンを選択する、いわゆる2段階フィルターによる検出方式なので、選択性が高く、高感度測定が可能である。試料マトリックスによる妨害ピークを回避する点においても有効である。なお、Na付加イオンはフラグメンテーションを起こさないで、MS/MS測定には用いることが出来ない。したがって、生成防止の対策が必要である。定量はMRM法で行われる。

飛行時間型：イオンをフライトチューブの中に飛ばし、イオンの飛行時間（質量の軽いものほど遠くに飛ばされ、飛行時間が長いことになる。）を正確に測定することで、精密質量が計算できる。このため、組成式の推定や化合物同定が容易である。また、常にフルスペクトルを採取する方式であることから、測定後、ターゲットイオンを変えて再解析することができる。したがって、分析対象農薬が未確定の場合や同時に多数の農薬化合物を測定するのに最適の検出器といえる。機種にもよるが、検出感度は、タンデム四重極ほど高くない。定量は高分解能マスクロマトグラム（HR-MC）法で行われる。

2-2-4. 問題点（イオン化抑制、イオン化促進、付加イオン、感度変動）

LC/MS(/MS)の利用は利点ばかりでなく、注意

しなければならない問題点もある。以下、その問題点と対策等について述べる。

イオン化抑制：試料マトリックスの影響により、イオン化が抑制される現象をいう。確認法としては、マトリックス標準品と通常の標準品を交互に注入して比較する方法がある。対策としては、クロマト溶出条件の変更、イオン化モードの変更（正から負に）、イオン化方式の変更（ESIからAPCIやAPPIに）、追加精製や試験溶液の希釈、などの方法がある。

イオン化促進：GC/MSのマトリックス効果と同様に、LC/MSでも回収率が100%を大幅に上回る現象が見られる。試料マトリックスの影響により、イオン化が促進されるための現象と思われるが、現在のところそのメカニズムの詳細については明らかにされていない。確認法および対策は、イオン化抑制の場合と同様である。

付加イオン：アルカリ金属との付加イオンは結合が強く、フラグメンテーションを起こさないで、MS/MS測定を行うことができない。対策としては、移動相にギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムの添加、アルカリ金属の少ない高純度試薬や溶媒の使用、イオン取込み電圧の下方修正、細管やイオン源の洗浄、ESIからAPCIへの変更などがある。

感度変動：LC/MS(/MS)は、高感度測定が可能であるが、その分だけ感度変動も大きい検出器といえる。原因としては、イオン源・細管の目詰まりによるスプレー形状や霧化形状の変化、イオン化室の汚れによるイオンの吸着、試料マトリックスによるイオン化阻害やイオン化促進、移動相中のイオン濃度の変動などが考えられる。対策としては、マトリックスの多い試料の注入禁止、イオン化室内の洗浄、キャピラリー全体と先端部の洗浄、一定イオン濃度の維持、など

がある。また、正イオンモード測定を継続すると帯電が一方向に増幅されるので、時々、負イオンモード測定をダミーとして入れておくのも効果がある。装置が高感度になればなるほど、標準溶液や測定液中の農薬はより低濃度に調製されることになるので、容器による吸着の問題にも注意する必要がある。

3. LC/MSの適用例

汎用型のGCやHPLCを用いた作物残留分析では、抽出後、通常2段階か、それ以上の精製工程が必要であるが、LC/MS(/MS)を用いることにより、精製や誘導体化の操作を削減することができ、分析時間の大幅な短縮が可能となった。農薬登録のための作物残留試験における適応例として、ベンフラカルブとエマメクチン安息香酸塩の例を示す。

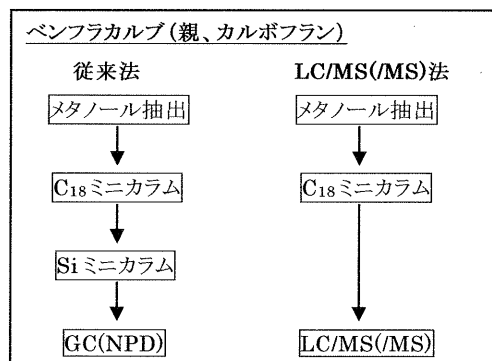
LC/MS(/MS)は、ポジティブリスト対応の測定機器に指定されたことなどから、食品衛生法に係わる食品の残留検査の分野でも、急速に普及

してきている。厚生労働省の発表では、平成16年度で検討した74農薬のうち、回収率の中央値が70~120%であった農薬は65品目であった。平成17年度は約130農薬について追加検討が行なわれており、検討結果は平成18年5月中に公表される予定になっている。最終的には、150種以上の農薬が一斉分析法（Ⅰ及びⅡ）で測定可能になるものと思われる。

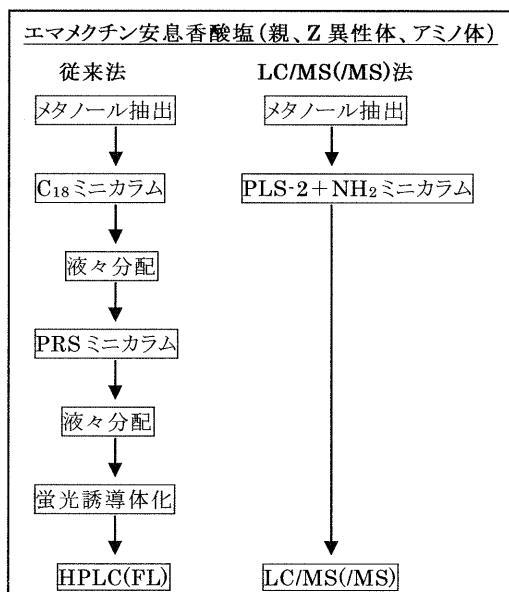
過去2年間（2004年、2005年）に、農薬残留分析研究会や食品衛生学会に発表された報告では、Q-MS、IT-MS、Q-MS/MS、TOF-MSなどの装置を用いて、100品目前後の農薬について一斉分析法の検討が行なわれており、相当数の農薬は作物残留分析に適用可能であることを示している。

4. 質量分析機器の適用限界

適用の限界：試験法をGC/MSやLC/MSを用いて簡便な方法に変更する場合は、分析対象成分を取り損なうことのないよう注意が必要である。



残留試験におけるその他のLC/MS適用農薬
 グアニジン、バリダマイシン、カルボスルファン、フルバリネート、フェンピロキシメート、チアメトキサム、イマズスルフロン、MCPB、アゾキシストロビン、ピリフタリド、エチプロール、クロメプロップ
 この他、未登録の新規化合物も多数ある。



これは、LC/MSやGC/MSに限ったことではないが、従来の分析法を簡便化する場合、精製操作はどれだけ省略しても構わないが、加水分解操作や変換反応を伴う操作は、分析対象成分が関与している可能性があるため、省略する場合には注意が必要である。

検出方法の限界：分析対象成分が、質量数の異なる複数の集合体や類似する多数の天然成分から構成されている場合は、現状のSIMやMRMのように特定の質量数を捉えて定量する方式では限界があるので注意が必要である。

5. おわりに

ポジティブリスト制度に対応する一斉分析法では、測定機器としてGC/MSやLC/MSが使用されている。質量分析装置は、一度に多数の農薬を同時に測定できる非常に便利な機器であるが、そこには様々な落とし穴があることも認識しておく必要がある。分析値は機器がはじき出してくれるが、最終的にその結果が正しいものかどうかを判断するのは分析者自身であり、分析対象化合物の数が増加した今ほど、分析者には豊富な経験と知識に裏付けられた冷静な判断力が求められる。一方、測定機器自体についても、試料マトリックスの問題などへの対応や、分析者の判断を支援するような対策も必要なことであろう。

ポジティブリスト制度に移行した時点では、600種もの農薬を対象として、しかも一律基準

(0.01ppm) 又はそれよりも低い基準値の評価に耐え得るような分析法を、十分に精査した試験法として日常的に使用することはほとんど不可能に近いと思われる。公示された試験法は、農薬と食品との組み合わせ次第では適用可能なケースもありうるが、全ての農薬と食品について適用することは、現状の分析技術では極めて困難と思われる。ポジティブリスト制度は全ての農薬の検査を義務づける制度ではないので、何百種もの農薬を闇雲に分析するのではなく、農薬の出荷量や使用実態などの情報から優先順位を付けて、分析対象農薬を十分に絞り込んで検査することが現実的かつ効率的な対処法といえる。

残留基準値を定め、その基準値を監視する方法は合理的であるが、膨大な数の農薬と無数の農作物を常時監視することは、現実的には不可能であるし、コスト的にも無理がある。少なくとも国内農作物に関しては、生産段階で農薬の使用方法が適正であれば、残留基準を超えないような仕組みになっている。この仕組みの信頼性が高まれば、残留農薬の分析はあくまでも補助的なものであり、残留農薬を常時監視する必要性も薄れるはずである。

農薬残留分析の30年間を振り返ると、当時は想像すらできなかった分析技術や定量機器が現在では当然のごとくに普及している。現在課題となっている技術的問題についても、杞憂に過ぎなかったといえる日がそう遠くない時期に到来することを期待したい。