

とんど差がなかったが、冷凍ギョウザではA法に比べB法での脂肪量がやや少ない結果となった。この原因の一つとして、冷凍ギョウザをB法で抽出したとき遠心分離後に沈殿物が再浮遊しやすく、ヘキサン層が回収しにくかったことが考えられる。この点を考慮すると、B法でもA法と大差な

く脂肪の抽出が可能であり、比較的脂溶性の高い農薬であっても問題なく液層に移行できると考えられた。

3.2 A法, B法による試験結果

8種類の農薬について、A法及びB法による添加回収試験を行った結果を表2に示した。

表2 冷凍ギョウザ及びレトルトカレーを用いた添加回収試験結果(A法,B法)

農薬名	GC/MS測定					LC/MS/MS測定						
	A法		B法			A法		B法				
	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響			
acephate	430.2	(10.70)	5.00	261.7	(7.54)	4.23	82.0	(5.14)	1.01	66.3	(3.28)	0.98
bendiocarb	112.3	(3.00)	1.22	111.8	(2.20)	1.23	87.9	(3.82)	1.00	89.6	(4.58)	1.03
carbaryl	102.9	(2.53)	1.05	106.7	(2.06)	1.16	84.3	(3.03)	1.00	90.2	(3.59)	1.00
edifenphos	157.2	(3.89)	1.69	174.5	(4.20)	2.03	74.4	(3.65)	0.93	81.4	(3.42)	0.91
malathion	148.8	(1.26)	1.66	164.5	(0.70)	1.80	83.5	(5.26)	0.99	88.6	(4.04)	0.99
methamidophos	112.4	(1.56)	1.05	121.6	(1.77)	1.72	80.6	(4.56)	0.96	62.5	(1.78)	1.02
pirimicarb	0.0	(-)	1.18	93.6	(5.32)	1.17	0.0	(-)	1.00	74.2	(7.24)	1.01
tolclofos-methyl	106.7	(0.75)	1.20	104.1	(2.55)	1.20	84.8	(7.04)	0.96	85.9	(2.12)	0.90

農薬名	GC/MS測定					LC/MS/MS測定						
	A法		B法			A法		B法				
	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響	回収率 (%)	(RSD%)	マトリックス影響			
acephate	159.0	(5.25)	1.94	456.0	(6.96)	7.13	97.4	(4.21)	1.00	72.6	(11.12)	0.96
bendiocarb	104.1	(4.92)	1.14	101.5	(3.50)	1.10	93.3	(2.95)	1.01	98.9	(2.29)	1.00
carbaryl	85.7	(10.15)	0.93	83.0	(2.49)	0.98	94.7	(1.84)	1.00	89.0	(2.37)	1.00
edifenphos	146.4	(1.95)	1.61	155.9	(2.63)	1.67	89.6	(0.43)	0.92	86.0	(2.00)	0.95
malathion	113.9	(2.51)	1.25	133.8	(6.15)	1.47	94.9	(4.10)	1.00	93.0	(5.67)	1.01
methamidophos	155.9	(4.27)	1.86	161.9	(1.52)	2.29	86.9	(3.50)	0.98	73.0	(11.41)	0.99
pirimicarb	0.0	(-)	1.08	83.1	(4.97)	0.97	0.0	(-)	1.01	83.5	(2.42)	0.99
tolclofos-methyl	94.6	(5.24)	1.07	90.7	(2.98)	1.02	91.1	(4.97)	1.01	89.4	(8.03)	1.04

(注) マトリックス影響=マトリックス標準のピーク面積/同一濃度の溶媒標準のピーク面積

A法では、冷凍ギョウザ、レトルトカレーともにピリミカルブの回収率が0%となった。原因を調べるため、C18に農薬混合標準液 (0.1 μg/mL) 1mLを負荷し、溶出条件を変えて溶出状況を調べたところ、ピリミカルブはアセトニトリルではC18から溶出しにくいことがわかった (図4)。A法ではC18への負荷液量が少ないためピリミカルブが回収できなかったのに対し、B法では負荷液量が25mLと多く、また抽出液に試料由来の水分が含まれていることもあってピリミカルブが回収できたと考えられる。

一方B法では、C18精製の際に、抽出液中の着色成分がミニカラム上部に留まらずに拡散、溶出されてしまった。これは、ミニカラムに負荷する抽出液量がA法に比べて多いことが原因と考えられた。B法でC18精製の効果を十分得るためには、ミニカラムへ負荷する抽出液の量を減らす必要があると考えられた。

GC/MSとLC/MS/MSによる測定結果を比較すると、GC/MSによる測定では、A法、B法とも回収率が100%を超える農薬が多かった。特に、アセフェートは回収率400%を超える場合もあった。また、アセフェートやメタミドホスは、標準溶液と試験溶液とで検出されたピークの保持時間がずれ、同様に支障があった。溶媒標準とマトリックス標準とを比較した場合も、ピーク面積の差や保持時間のずれが見られたことから、これらはいずれも試料マトリックスの影響によるものと考えられた。

LC/MS/MSによる測定では、B法の冷凍ギョウザでアセフェート及びメタミドホスの回収率が70%を若干下回ったほかは、概ね良好な結果が得られた。溶媒標準とマトリックス標準との測定結果にほとんど差はなく、試料マトリックスの影響はほとんどないと考えられた。

3.3 C法による試験結果

前述の結果からB法を一部変更したC法について、対象農薬を増やして検討した。C法では、試料の濃縮率をなるべ

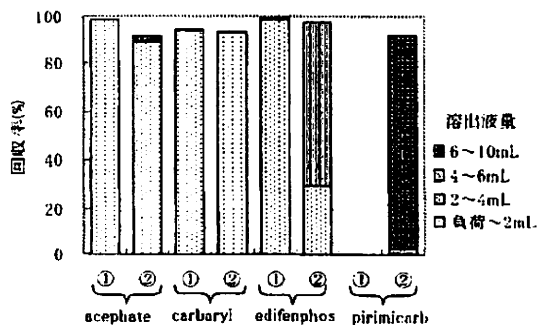


図4 C18からの各農薬の溶出 (①:アセトニトリル溶出 ②:アセトニトリル/水(8:2)溶出)

く変えずにC18への負荷液量を減らすために、試料量を20g、C18への負荷液量を5mLとした。C18からの溶出にはアセトニトリル/水(2:8)10mLを用いた。また、PSAのロットが変わるとアセフェートが十分溶出しなかったため、溶出に用いるアセトン/ヘキサン(1:1)の液量を20mLに変更した。

各農薬の添加回収試験結果を表3に示した。

GC/MSによる測定では回収率が100%を超える農薬が多くあり、定量できた47農薬のうち、冷凍ギョウザで19農薬、レトルトカレーで32農薬が回収率120%を超えた。溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス標準のピーク面積の比を求めると、多くの農薬で1倍を超えており、冷凍ギョウザで8農薬、レトルトカレーで11農薬が2倍を超えた。ホスメットは冷凍ギョウザ、レトルトカレーとも約5倍の差があった。このことから、試料マトリックスの影響で回収率が高めの値となるものが多いと考えられた。マトリックス標準で回収率を補正すると、回収率が120%を超えるものはなくなり、冷凍ギョウザで38農薬、レトルトカレーで37農薬が回収率70~120%の範囲となった。未知試料を分析する際は試料マトリックスの影響を十分考慮して定量を行う必要があると考えられる。ジクロロボスは回収率が低く、冷凍ギョウザ、レトルトカレーとも約30%の回収率となったが、これは濃縮操作時に揮散したものと考えられた。

LC/MS/MSによる測定では、定量できた43農薬のうち、冷凍ギョウザで40農薬、レトルトカレーで41農薬が回収率70~120%の範囲となった。溶媒標準とマトリックス標準を比較した場合に顕著な差は見られず、回収率をマトリックス標準で補正してもあまり影響なかった。エチオフェンカルブは冷凍ギョウザで、プロチオホス、テルブホスは冷凍ギョウザ及びレトルトカレーでともに、回収率が約60%となった。これらはGC/MSによる測定(マトリックス補正後)でも同様の結果となったが、原因は不明であり、今後さらに検討する必要がある。

ホスメットはLC/MS/MSによる測定中、標準液のピーク面積が変動することがあった。詳しく調べたところ、メタノール中で劣化することがわかった。10℃で保存した場合、0.025 µg/mLメタノール溶液のピーク面積が、調製から4時間後に約80%、16時間後に約50%まで低下した(図5)。今回の添加回収試験では、試験溶液の調製とほぼ同時に標準液を調製し、また、試験溶液と標準液を交互にLC/MS/MSで測定したため、試験溶液と標準液が同程度に劣化して、見かけ上良好な回収率となったと考えられる。ホスメットはGC/MS測定では試料マトリックスの影響が大きく、正確な測定は難しいと考えられるため、試験溶液をアセトニトリル等メタノール以外の溶媒で調製してLC/MS/MSで測定するなど、さらに検討が必要である。

なお、今回のLC/MS/MS測定における移動相の条件は、A法、B法検討時のものをそのまま使用したが、保持時間15分前後に多くの農薬が集中して検出されるため、C法で検

討した農薬に対応するには、あまり良好な条件ではなかった。移動相条件についてもさらに検討する必要があると考えられた。

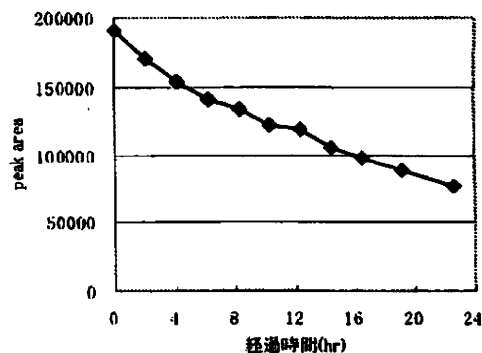


図5 phosmet(メタノール溶液)のピーク面積の変化

5 まとめ

加工食品中の残留農薬分析法について、冷凍ギョウザ及びレトルトカレーを用いて検討した。試料をアセトニトリル及びヘキサンで抽出し、C18及びPSAミニカラム精製を行う方法で、有機リン系農薬42種、カルバメート系農薬7種を対象に添加回収試験を行った。測定にはGC/MS及びLC/MS/MSを用いた。

その結果、有機リン系農薬38種、カルバメート系農薬6種について概ね良好に分析することが可能と考えられたが、GC/MSによる測定では試料マトリックスの影響に留意する必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡：食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について、平成20年3月7日
- 2) 大垣有紀，他：三重県保健環境研究所年報，10，25(2008)。
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成17年1月24日，食安発第0124001号
- 4) 吉岡直樹，秋山由美，辻正彦：兵庫県立健康環境科学研究所年報，1，165(2002)。

表3 希釈キョウガ及びレトリートカレールを用いた添加回収試験結果(C法)

農薬名	希釈キョウガ				レトリートカレール				GC/MS				LC/MS/MS				GC/MS				LC/MS/MS						
	回収率 (RSD%)		精正後回収率		回収率 (RSD%)		精正後回収率		回収率 (RSD%)		精正後回収率		回収率 (RSD%)		精正後回収率		回収率 (RSD%)		精正後回収率		回収率 (RSD%)		精正後回収率				
	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響	マトリックス影響				
acetate	122.2	(2.75)	1.74	70.4	77.2	(3.46)	1.09	70.7	119.1	(16.13)	1.82	65.4	88.0	(3.12)	1.00	87.7	94	0.2	183.9	142.8	0.003	208.1	115.4	0.002	224.1	108.9	0.0004
aldicarb	97.5	(5.15)	0.99	98.8	94.8	(3.63)	1.22	77.5	89.1	(2.64)	0.98	84.6	104.3	(1.82)	0.97	107.2	151	0.04	208.1	142.8	0.003	224.1	108.9	0.0004	224.1	108.9	0.0004
benfocarb	104.1	(2.73)	1.29	80.4	85.5	(4.23)	1.06	80.8	124.9	(6.74)	1.42	87.9	93.8	(2.01)	0.90	104.1	286	0.02	333.2	179.8	0.0003	333.2	179.8	0.0003	333.2	179.8	0.0003
buthioate	108.3	(4.51)	1.44	75.4	82.0	(3.83)	1.04	78.6	112.2	(4.46)	1.45	77.4	93.3	(2.67)	0.95	99.5	144	0.008	271.1	140.5	0.0004	271.1	140.5	0.0004	271.1	140.5	0.0004
carbaryl	87.1	(5.53)	0.93	93.8	91.1	(3.57)	1.12	81.1	85.7	(6.09)	0.87	98.2	104.6	(3.22)	0.98	105.8	269	0.03	359.1	166.6	0.003	359.1	166.6	0.003	359.1	166.6	0.003
chlorfenvinphos-E	114.2	(4.08)	1.34	85.2	88.4	(3.63)	1.03	86.2	128.8	(6.44)	1.45	85.2	90.0	(2.52)	0.98	100.0	269	0.02	359.1	166.6	0.003	359.1	166.6	0.003	359.1	166.6	0.003
chlorfenvinphos-Z	103.3	(4.16)	1.50	68.8	89.7	(4.11)	0.97	92.1	124.0	(3.71)	1.43	86.7	98.9	(2.39)	0.98	104.1	314	0.01	351.9	125.6	0.0005	351.9	125.6	0.0005	351.9	125.6	0.0005
chlorpyrifos	96.5	(8.49)	1.20	80.3	71.8	(2.11)	1.08	66.5	102.3	(4.84)	1.29	79.4	80.2	(3.44)	0.98	81.7	286	0.003	323.9	124.5	0.001	323.9	124.5	0.001	323.9	124.5	0.001
chlorpyrifos-methyl	111.9	(2.61)	1.40	79.7	89.8	(7.46)	1.12	80.4	118.7	(3.13)	1.48	80.1	90.7	(3.91)	0.89	101.6	243	0.01	244.0	101.4	0.03	244.0	101.4	0.03	244.0	101.4	0.03
cyazotophos	121.9	(3.41)	1.66	78.0	85.2	(2.44)	1.14	75.0	134.4	(1.70)	1.81	71.7	90.6	(1.82)	0.93	97.8	179	0.008	305.1	168.7	0.0002	305.1	168.7	0.0002	305.1	168.7	0.0002
diazinophos	103.0	(5.29)	1.39	74.1	85.3	(2.44)	1.14	75.0	104.8	(5.31)	1.40	75.0	90.6	(1.82)	0.93	97.8	185	0.006	220.3	108.9	0.01	220.3	108.9	0.01	220.3	108.9	0.01
dichlorvos	36.8	(12.78)	1.29	24.6	89.7	(1.39)	1.15	76.2	81.3	(6.28)	2.62	69.1	97.6	(8.30)	0.97	101.0	87	0.05	230.1	124.6	0.001	230.1	124.6	0.001	230.1	124.6	0.001
dimethoate	180.9	(1.51)	2.41	75.1	86.5	(8.87)	1.08	80.6	142.0	(3.09)	1.81	78.3	94.2	(3.97)	0.89	105.7	295	0.02	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003
dimethylvinphos-E	125.0	(2.81)	1.45	86.5	87.1	(8.87)	1.08	80.6	142.0	(3.09)	1.81	78.3	94.2	(3.97)	0.89	105.7	295	0.02	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003
dimethylvinphos-Z	102.7	(6.68)	1.35	75.9	82.7	(1.58)	1.06	76.3	137.2	(4.58)	1.45	94.9	90.5	(5.00)	0.92	99.0	295	0.02	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003	333.1	126.7	0.003
edifenphos	165.3	(4.26)	2.10	78.9	82.9	(2.72)	1.02	81.1	179.3	(7.42)	2.40	74.7	95.5	(1.16)	0.93	102.5	310	0.02	311.2	282.9	0.0005	311.2	282.9	0.0005	311.2	282.9	0.0005
EPN	124.3	(8.64)	1.47	84.5	92.1	(7.05)	1.00	92.6	136.3	(5.93)	1.62	84.3	93.3	(9.77)	1.05	88.5	167	0.03	226.1	106.7	0.0008	226.1	106.7	0.0008	226.1	106.7	0.0008
ethionfenarb	135.7	(12.44)	2.30	59.0	58.8	(10.15)	1.08	54.3	160.0	(2.44)	2.42	88.6	76.9	(8.10)	0.93	82.5	107	0.03	385.0	195.8	0.0003	385.0	195.8	0.0003	385.0	195.8	0.0003
ethion	128.2	(8.22)	1.74	73.7	82.3	(2.31)	1.03	79.7	134.8	(5.14)	1.85	73.0	93.1	(1.86)	0.88	105.4	231	0.008	243.1	130.6	0.002	243.1	130.6	0.002	243.1	130.6	0.002
ethionphos	117.3	(4.54)	1.38	85.2	84.8	(2.32)	1.04	81.4	123.7	(3.83)	1.42	86.9	90.9	(3.96)	0.89	102.3	158	0.01	293.1	124.6	0.0002	293.1	124.6	0.0002	293.1	124.6	0.0002
etrimfon	123.5	(4.72)	1.61	76.7	87.1	(1.77)	1.05	83.2	124.4	(6.78)	1.55	80.2	91.1	(1.27)	0.93	97.7	292	0.01	293.1	124.6	0.0002	293.1	124.6	0.0002	293.1	124.6	0.0002
fenitrothion	124.8	(5.38)	1.76	70.8	87.2	(1.77)	1.05	83.2	124.4	(6.78)	1.55	80.2	91.1	(1.27)	0.93	97.7	277	0.03	278.0	124.7	0.05	278.0	124.7	0.05	278.0	124.7	0.05
fenobucarb	116.5	(1.20)	1.31	90.6	92.5	(4.69)	1.14	81.3	131.1	(5.65)	1.38	95.1	99.3	(3.89)	0.95	104.1	292	0.01	208.2	94.6	0.0004	208.2	94.6	0.0004	208.2	94.6	0.0004
fensulfathion	149.4	(6.88)	1.71	87.1	93.4	(1.93)	1.12	83.2	153.8	(3.74)	2.01	76.5	99.1	(2.92)	0.98	101.5	191	0.004	309.1	156.7	0.001	309.1	156.7	0.001	309.1	156.7	0.001
fenthion	107.1	(5.65)	1.35	79.6	87.2	(2.63)	1.09	80.2	124.4	(2.89)	1.61	75.6	92.3	(6.70)	0.90	93.5	278	0.006	279.0	168.7	0.003	279.0	168.7	0.003	279.0	168.7	0.003
fosfosalate	143.1	(2.60)	1.83	78.2	95.2	(2.95)	1.15	82.6	170.7	(5.34)	2.14	79.7	102.2	(6.00)	0.97	104.9	195	0.08	284.1	103.5	0.001	284.1	103.5	0.001	284.1	103.5	0.001
isofenphos	117.0	(6.21)	1.51	77.5	85.3	(3.13)	1.07	79.4	130.9	(5.69)	1.61	81.5	94.8	(0.11)	0.92	103.2	255	0.04	346.2	244.9	0.0002	346.2	244.9	0.0002	346.2	244.9	0.0002
isofenphos-zaxon	111.7	(5.40)	1.65	67.8	90.6	(2.70)	1.08	83.8	164.3	(4.29)	1.99	82.8	94.6	(4.41)	0.91	103.4	229	0.02	330.2	200.8	0.001	330.2	200.8	0.001	330.2	200.8	0.001
malathion	117.8	(8.91)	1.78	66.2	89.2	(5.22)	1.12	79.6	135.3	(6.17)	1.61	83.8	99.6	(2.47)	0.96	104.1	173	0.03	331.2	98.6	0.0008	331.2	98.6	0.0008	331.2	98.6	0.0008
methamidophos	106.7	(0.78)	1.34	79.9	75.3	(4.42)	1.09	69.1	85.3	(17.29)	1.25	68.0	74.8	(10.19)	0.97	76.8	94	0.05	141.8	93.5	0.0009	141.8	93.5	0.0009	141.8	93.5	0.0009
methidathion	151.6	(5.15)	2.08	72.8	92.6	(3.14)	1.14	81.1	175.9	(7.95)	2.37	74.1	99.9	(3.62)	0.93	107.0	145	0.03	303.0	144.6	0.001	303.0	144.6	0.001	303.0	144.6	0.001
oxamyl	124.2	(3.39)	1.50	82.8	88.7	(3.19)	1.19	74.5	129.5	(4.65)	1.58	82.1	90.0	(4.83)	0.99	91.2	291	0.02	292.0	235.9	0.09	292.0	235.9	0.09	292.0	235.9	0.09
parathion-methyl	140.3	(3.46)	1.86	74.7	90.2	(2.12)	1.09	82.7	126.7	(5.53)	1.58	80.1	96.9	(2.79)	0.93	104.0	274	0.01	321.1	162.7	0.0006	321.1	162.7	0.0006	321.1	162.7	0.0006
phenthoate	106.7	(4.61)	1.36	78.4	90.2	(2.12)	1.09	82.7	126.7	(5.53)	1.58	80.1	96.9	(2.79)	0.93	104.0	260	0.01	261.0	198.8	0.006	261.0	198.8	0.006	261.0	198.8	0.006
phorate	90.3	(2.29)	1.47	67.4	71.9	(4.34)	0.95	75.8	112.3	(5.11)	1.43	78.4	81.5	(17.60)	1.03	79.3	182	0.02	368.1	181.8	0.0004	368.1	181.8	0.0004	368.1	181.8	0.0004
phosalone	220.9	(1.09)	2.54	80.7	91.4	(1.80)	1.08	85.0	139.9	(6.63)	2.71	71.6	99.0	(1.49)	0.90	100.4	160	0.02	318.0	159.7	0.001	318.0	159.7	0.001	318.0	159.7	0.001
phosmet	280.6	(6.24)	4.65	57.5	107.7	(7.66)	1.37	79.7	319.9	(6.16)	5.57	55.4	108.2	(15.34)	1.36	79.5	186	0.02	239.2	71.6	0.0002	239.2	71.6	0.0002	239.2	71.6	0.0002
pirimicarb	118.3	(2.53)	1.43	82.7	95.2	(5.48)	1.18	76.8	121.0	(4.02)	1.36	88.9	96.8	(4.76)	0.96	101.4	186	0.02	239.2	71.6	0.0002	239.2	71.6	0.0002	239.2	71.6	0.0002
pirimiphos-methyl	115.3	(0.79)	1.44	80.7	86.0	(0.24)	1.03	83.8	125.2	(3.88)	1.59	78.7	90.3	(2.79)	0.94	95.9	290	0.01	306.1	306.1	0.0002	306.1	306.1	0.0002	306.1	306.1	0.0002
prothiofos	11																										

報 文

LC-MS による農産物中デメトン-S-メチル, オキシデメトンメチル
およびデメトン-S-メチルスルホンの分析

(平成 20 年 10 月 23 日受理)

上野 英二^{1,*} 梶島 由佳¹ 大島 晴美¹ 大野 勉¹
根本 了² 米谷 民雄^{2,3}Analysis of Demeton-S-methyl, Oxydemeton-methyl and Demeton-S-methylsulfone
in Agricultural Products by LC-MSEiji UENO^{1,*}, Yuka KABASHIMA¹, Harumi OSHIMA¹, Tsutomu OHNO¹,
Satoru NEMOTO² and Tamio MAITANI^{2,3}¹Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6 Nagare, Tsuji-machi,
Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan;²National Institute of Health Science: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan;³ Present address: University of Shizuoka: 52-1 Yada, Suruga-ku,
Shizuoka 422-8526, Japan;

*Corresponding author

We studied the simultaneous determination of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl, and their oxide demeton-S-methylsulfone, in agricultural products by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). The sample homogenized with antioxidants L-ascorbic acid and butylhydroxytoluene was extracted with acetone. An aliquot of the crude extract was reextracted with ethyl acetate by using an EXTrelut[®] column. After hexane/acetonitrile partitioning lipid-rich samples such as cereals, the extract was cleaned up on a PSA column or tandem graphitized carbon/PSA column, and determined by ESI-SIM mode LC-MS. Average recoveries ($n=5$) of compounds from ten kinds of samples fortified at the analyte concentration of 0.05 $\mu\text{g/g}$ were from 73.8% to 102.5%, and the relative standard deviations were $\leq 5.7\%$.

(Received October 23, 2008)

Key words: デメトン-S-メチル demeton-S-methyl; オキシデメトンメチル oxydemeton-methyl; デメトン-S-メチルスルホン demeton-S-methylsulfone; 農産物 agricultural product; 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC-MS

緒 言

デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルは、浸透移行性の有機リン系殺虫剤であり、日本では農薬として登録されていない。デメトン-S-メチルは、1974年に登録が失効したメチルデメトンの成分として知られており^{1,2)}、急性毒性が高く、皮膚から吸収されやすいことから毒物劇物取締法により特定毒物に指定されている。その構造にチオエーテルを有し、植物体内でスルホキシド体のオキシデメトンメチル、次いでスルホン体のデメトン-S-メチ

ルスルホンに酸化される (Fig. 1)。また、オキシデメトンメチルは、 $\log P_{ow}$ が -0.74 (21°C) と水溶性が高く、強い吸着性があり、熱分解することから GC で測定することができない^{3,4)}。

従来、このような酸化されやすい有機リン系農薬の分析法として、農産物からアセトンで抽出し、ジクロロメタンに転溶後、ヘキサン/アセトニトリル分配により脱脂、次いで過マンガン酸カリウムを用いて本体およびスルホキシド体をスルホン体に一括変換し、ジクロロメタンで再抽出して GC-FPD など測定する方法 (以下、GC 法)^{4)~6)} が一般に用いられている。しかし、GC 法は、環境負荷の大きいジクロロメタンを多量に使用する。その上、デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルで添加回収試験を行ったところ、農産物によっては回収率が大きくばらつき

* 連絡先

¹ 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市中区北区辻町字流 7-6² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1³ 現所属: 静岡県立大学: 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

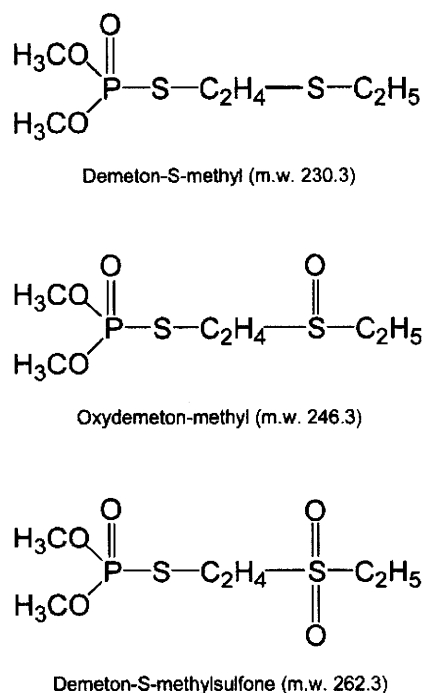


Fig. 1. Structures of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl and demeton-S-methylsulfone

やすいことが判明した。また、デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルは、食品衛生法によりそれぞれ残留基準値が設定されており、これらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホンを含む3成分を別々に定量できる分析法が望ましい。そこで今回、ジクロロメタンを使用することなく、分析上の問題点が多い3成分を精度良く定量可能とするために、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)を用いた同時分析法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は、市販の農産物(玄米, 大豆, ばれいしょ, ほうれんそう, キャベツ, トマト, りんご, いちご, オレンジおよび茶)を用いた。

2. 試薬および標準品

L-アスコルビン酸およびブチルヒドロキソトルエンは和光純薬工業(株)の特級品を用いた。その他の試薬は和光純薬工業(株)の残留農薬試験用またはLC-MS用を用いた。

デメトン-S-メチル, オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホン標準品は林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い, アセトニトリルに溶解して1 mg/mL 標準原液とし, メタノールで適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。また, 標準原液をそれぞれアセトンで希釈し, 添加回収試験用の標準溶液とした。

多孔性ケイソウ土カラムは Merck 社製 EXtrelut[®] NT

Table 1. Retention times, and monitor ions of 3 compounds obtained by ESI-SIM mode LC-MS

Compound	RT, min	Monitor ion, <i>m/z</i>	
		Target	Qualifier
Oxydemeton-methyl	7.49	247.0	169.0
Demeton-S-methylsulfone	7.80	263.1	265.1
Demeton-S-methyl	14.06	231.0	89.0

20 (20 mL 保持用) を用いた。PSA カラムは Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA(500 mg), グラファイトカーボン/PSA 連結カラムは Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA(500 mg) の手前に Supelco 社製 ENVI-Carb (1,000 mg) を連結したものをそれぞれアセトン 10 mL, 次いでヘキサソ 10 mL で洗浄して用いた。

3. 装置および条件

a 装置

試料細切装置: Retsch 社製 グラインドミキサー GM 200.

LC-MS 装置: (株)鳥津製作所製 LCMS-2010A システム。

b LC-MS 条件

カラム: (株)資生堂製 Capcell Pak C18 AQ (内径 2 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μm), カラム温度: 40°C, 移動相: A 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液, グラジエント条件: B%濃度 15→95%(16 min)→95%(25 min)→15%(25.01 min)→Stop(39 min), 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 3 μL.

イオン化法: ESI ポジティブ, キャピラリー電圧: 4.5 kV, ヒートブロック温度: 200°C, CDL 温度: 250°C, ネブライザーガス(窒素): 1.5 L/min, ドライングガス(窒素): 10 L/min, 測定モード: SIM, インターバル: 0.8 sec, 保持時間およびモニターイオンは Table 1 に示した。

4. 試験操作

a 細切均一化

必要により 2~3 cm 幅程度に切った試料 500 g に, 10%L-アスコルビン酸水溶液 90 g, 次いで 10%ブチルヒドロキソトルエンヘキサソ溶液 10 g を添加後, 細切均一化した。

b 抽出

細切試料 24 g (水分の少ない玄米, 大豆などは 12 g, 茶は 6 g) を量り採り, 玄米, 大豆などは水 12 mL, 茶は水 18 mL を加えて 30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズ抽出し, 3,000 回転/分で 5 分間遠心分離後, 上清を吸引ろ過した。残さはさらにアセトン 50 mL で抽出し, 吸引ろ過した。ろ液を合わせ, アセトンを加えて 200 mL に定容したのち, その 80 mL を 500 mL 容ナスフラスコに採り, 15 mL 以下まで減圧濃縮した。これに塩化ナトリウム 4 g を加えて振り混ぜた。

Table 2. Concentrations of 3 compounds in test solutions of agricultural products spiked with demeton-S-methyl without antioxidant

Sample	Concentration, $\mu\text{g/g}$ ($n=5$) ^{a)}			
	Demeton-S-methyl	Oxydemeton-methyl	Demeton-S-methylsulfone	Total as demeton-S-methyl
	Mean \pm SD ^{b)}	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Brown rice	0.041 \pm 0.003	0.003 \pm 0.001	nd	0.044 \pm 0.002
Soybean	0.031 \pm 0.001	0.010 \pm 0.000	nd	0.040 \pm 0.001
Potato	0.033 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	nd	0.037 \pm 0.001
Spinach	0.028 \pm 0.015	0.016 \pm 0.016	0.000 \pm 0.001	0.043 \pm 0.001
Cabbage	0.042 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	nd	0.046 \pm 0.001
Tomato	0.048 \pm 0.003	0.004 \pm 0.000	nd	0.051 \pm 0.003
Apple	0.023 \pm 0.005	0.023 \pm 0.006	nd	0.044 \pm 0.001
Strawberry	0.019 \pm 0.011	0.034 \pm 0.013	nd	0.051 \pm 0.002
Orange	0.041 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	nd	0.044 \pm 0.001
Tea	0.024 \pm 0.005	0.028 \pm 0.006	nd	0.050 \pm 0.003

"nd" not detected.

^{a)} Samples were spiked with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of demeton-S-methyl.

^{b)} SD=standard deviation.

のち、多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、15分間放置した。500 mL容ナスフラスコに酢酸エチル 150 mLを加えて洗い込み、これを上記のケイソウ土カラムに注入した。溶出液は、流速を4~5 mL/分に調整して300 mL容ナスフラスコに採り、約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。

c 脱脂

脂質の多い玄米、大豆は、残渣をヘキサン 30 mLに溶解し、100 mL容分液漏斗に移した。300 mL容ナスフラスコにヘキサン飽和アセトニトリル 30 mLを加えて洗い込み、これを上記の分液漏斗に移して5分間振とうし、静置後、アセトニトリル層を分取する操作を2回繰り返した。アセトニトリル層を合わせて約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。

d 精製

残さをアセトン-ヘキサン(1:1) 5 mLに溶解し、色素の少ない玄米、大豆、ばれいしょはPSAカラムに、それ以外はグラファイトカーボン/PSA連結カラムに負荷したのち、アセトン-ヘキサン(1:1) 10 mLで溶出した。溶出液を合わせて約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を留去した。この残渣をメタノールで4 mL(玄米、大豆などは2 mL、茶は1 mL)に定容して試験溶液(2 g試料/mL)とした。

e 定量

デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの0.02, 0.05, 0.10, 0.15および0.20 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液3 μL をLC-MSに注入して、ピーク面積法により絶対検量線を作成した。試験溶液についても同様に操作し、混合標準溶液で作成した絶対検量線を用いて、試料中のデメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの濃度をそれぞれ求めた。なお、デメトン-S-メチルおよびオキシデメトンメチルの定量には、次式を用いた。

デメトン-S-メチルとしての総濃度=デメトン-S-メチルの濃度+オキシデメトンメチルの濃度 \times 0.9350+デメトン-S-メチルスルホンの濃度 \times 0.8780。

オキシデメトンメチルとしての総濃度=オキシデメトンメチルの濃度+デメトン-S-メチルスルホンの濃度 \times 0.9390。

結果および考察

1. LC-MSによる定量

GC法において回収率がバラツキやすい主な原因として、デメトン-S-メチルスルホンもオキシデメトンメチルと同様にGC注入部に吸着して熱分解しやすく、マトリックス効果⁷⁾によるピーク強度の上昇もあって、GCの感度変動が大きいたことが考えられた。このためGC法は定量性の点で問題があると判断し、LC-MSを用いることにした。

厚生労働省通知のLC-MSによる農薬等の一斉試験法(以下、通知法)^{*)}に示されているLC条件を用いて検討した。その結果、デメトン-S-メチルは良好なピークが認められたが、極性の高いオキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンはカラムへの保持が弱く、カラムによっては固定相への吸着もあってピークが大きくテーリングした。そこで、吸着が少なく、かつ極性の高い成分を強く保持するカラムとしてCapcell Pak C18 AQを採用し、注入量を5 μL から3 μL に変更したところ、良好なピークが得られた(Fig. 2)。なお、試験溶液は移動相の組成とは異なるが、試料の溶解性および成分の安定性を考慮して通知法と同様にメタノール溶液とした。また、MS条件は、定量イオンとして3成分ともに[M+H]⁺を選択し(Table 1)、各イオンの強度などが最適になるように設定

^{*)} 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”平成17年1月24日、食安発第0124001号(2005)。

Table 3. Concentrations of 3 compounds in test solutions of agricultural products spiked with demeton-S-methyl with L-ascorbic acid and butylhydroxytoluene

Sample	Concentration, $\mu\text{g/g}$ ($n=5$) ^{a)}			
	Demeton-S-methyl	Oxydemeton-methyl	Demeton-S-methylsulfone	Total as demeton-S-methyl
	Mean \pm SD ^{b)}	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Brown rice	0.044 \pm 0.002	nd	nd	0.044 \pm 0.002
Soybean	0.041 \pm 0.001	0.001 \pm 0.000	nd	0.041 \pm 0.001
Potato	0.038 \pm 0.001	0.000 \pm 0.000	nd	0.038 \pm 0.001
Spinach	0.046 \pm 0.002	0.001 \pm 0.000	nd	0.048 \pm 0.002
Cabbage	0.047 \pm 0.001	0.000 \pm 0.000	nd	0.047 \pm 0.001
Tomato	0.048 \pm 0.003	0.000 \pm 0.000	nd	0.049 \pm 0.003
Apple	0.045 \pm 0.002	0.001 \pm 0.001	nd	0.046 \pm 0.001
Strawberry	0.048 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001	nd	0.048 \pm 0.001
Orange	0.045 \pm 0.001	nd	nd	0.045 \pm 0.001
Tea	0.047 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000	nd	0.048 \pm 0.001

"nd" not detected.

^{a)} Samples were spiked with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of demeton-S-methyl.

^{b)} SD=standard deviation.

した。検量線は、デメトン-S-メチルで0.02~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.06~1.5 ng)、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンで0.01~0.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.03~1.5 ng) の範囲で良好な直線性 ($r>0.999$) が得られた。

2. 抗酸化剤の添加

細切試料にデメトン-S-メチルの標準溶液 1 mL (試料中濃度 0.05 $\mu\text{g/g}$) を添加後、1時間放置したものについて操作し、試験溶液中の3成分の濃度を求めた。その結果、Table 2に示したようにデメトン-S-メチルとしての総濃度に変化はなかったが、ほうれんそうなど試料によってはデメトン-S-メチルの多くが操作中にオキシデメトンメチルに酸化されることが判明した。なお、オキシデメトンメチルのデメトン-S-メチルスルホンへの酸化はわずかであった。そこで、抗酸化剤として水溶性のL-アスコルビン酸および脂溶性のブチルヒドロキソトルエンを選択し、添加方法および量について検討した。試料 500 g に対して5~20% L-アスコルビン酸水溶液 90 g または5~20% ブチルヒドロキソトルエンヘキサン溶液 10 g を添加して細切均一化したものを用いたところ、それぞれ10% L-アスコルビン酸水溶液 90 g、10% ブチルヒドロキソトルエンヘキサン溶液 10 g の添加によりデメトン-S-メチルの酸化を抑制する効果が高かった。さらに、Table 3に示したように10% L-アスコルビン酸水溶液 90 g と10% ブチルヒドロキソトルエンヘキサン溶液 10 g を同時に添加して細切均一化する方法により、多くの試料でデメトン-S-メチルの酸化がほとんど抑制された。なお、本検討では酸化を抑制するために、実験方法に示したように溶媒の留去操作において純度の高い窒素を多用するとともに、試験溶液の調整までの操作を速やか(6時間以内)に行った。

3. 酢酸エチル転溶

糖類など水溶性の夾雑成分の除去および脱水のために、疎水性の溶媒に転溶する方法を検討した。10%塩化ナトリウムを含む水層 100 mL に対して、酢酸エチル 100 mL

Table 4. Recoveries of 3 compounds through each cleanup procedure

Compound	Recovery, % ^{a)}		
	EXTrelut column SPE	Hexane/ acetonitrile partitioning	Gra-PSA column SPE ^{b)}
Oxydemeton-methyl	95	102	93
Demeton-S-methylsulfone	97	101	96
Demeton-S-methyl	98	99	101

^{a)} Mean of 3 replicates.

^{b)} Tandem graphitized carbon-PSA column SPE: Each compound in 5 mL acetone-hexane (1:1) was loaded on the column, and eluted with 10 mL acetone-hexane (1:1).

で2回転溶したところ、デメトン-S-メチルでは90%程度の転溶率が得られたが、極性の高いオキシデメトンメチルで30%程度、デメトン-S-メチルスルホンでは50%程度の低い転溶率であった。そこで、多孔性ケイソウ土カラムを用いて転溶する方法⁸⁾に変更したところ、酢酸エチル 150 mL でいずれの成分も95%以上の良好な転溶率が得られた(Table 4)。なお、試料によっては多孔性ケイソウ土カラムから水分が溶出した。また、後述する精製カラムの過負荷による性能低下を防ぐために、多孔性ケイソウ土カラムへの試料負荷量を8g(水分の少ない玄米、大豆などは4g、茶は2g)相当とした。

4. 脱脂、精製

ヘキサ/アセトニトリル分配による脱脂法について検討した。ヘキサン層 30 mL に対して、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で2回転溶したところ、いずれの成分もほぼ100%の転溶率(Table 4)であったので、脂質の多い玄米、大豆に対してこの操作を追加した。

また、通知法に示されているグラファイトカーボン/ NH_2 (500 mg/500 mg) カラムおよび溶出液としてアセトニトリル-トルエン(3:1)を用いる精製法について検討し

た、その結果、ほうれんそう、茶では、グラファイトカーボン層から色素成分が溶出した。その上、これらの成分の影響により NH_2 層から脂肪酸などの夾雑成分が溶出し、試験溶液中に不溶物が認められた。そこで、脂肪酸などの保持容量が多い PSA (500 mg) カラムの手前に、原則としてグラファイトカーボン (1,000 mg) カラムを連結して用いる方法とした。溶出液は、カロテノイド色素や高極性成分の除去効果⁹⁾を考慮してアセトン-ヘキサン (1:1) を用いたところ、3成分は 10 mL で溶出した (Table 4)。なお、試験溶液を 0.2 μm フィルターでろ過したところ、オキシデメトンメチルの吸着と考えられる損失が認められたことから、この操作を省略した。

5. 添加回収試験

代表的な 10 種類の農産物の細切試料に、3 成分の標準溶液 1 mL (試料中濃度 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$) をそれぞれ添加後、1 時間放置したものについて回収率を求めた。その結果、Table 5 に示したように、73.8~102.5%の回収率、0.9~5.7%の相対標準偏差が得られ、本分析法の良好な定量性が確認された。また、SIM クロマトグラム上に農産物由来の妨害となるようなピークは見られなかった。島津 LCMS solution の解析ソフトウェアを用いて、S/N が 10 を与える定量限界値を求めたところ、デメトン-S-メチルで試料中濃度 0.008 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンで試料中濃度 0.004 $\mu\text{g}/\text{g}$ で

Table 5. Recoveries of 3 compounds from fortified agricultural products

Sample	Recovery, % ($n=5$) ^{a)}					
	Demeton-S-methyl		Oxydemeton-methyl		Demeton-S-methylsulfone	
	Mean	RSD ^{b)}	Mean	RSD	Mean	RSD
Brown rice	88.6	3.9	92.3	1.7	98.0	2.3
Soybean	83.0	1.9	80.2	2.8	90.9	2.1
Potato	76.9	1.9	77.2	2.0	80.1	4.6
Spinach	95.4	4.1	78.5	3.0	88.0	3.0
Cabbage	93.8	2.8	93.8	1.6	98.7	1.3
Tomato	97.4	5.9	94.3	2.1	80.5	0.9
Apple	92.7	2.9	87.6	4.5	96.8	2.3
Strawberry	96.9	2.0	98.9	2.0	94.6	1.8
Orange	90.4	2.0	82.2	2.7	94.5	3.0
Tea	97.0	2.3	73.8	5.7	102.5	2.8

^{a)} Samples were spiked with 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ of each compound.

^{b)} RSD=relative standard deviation.

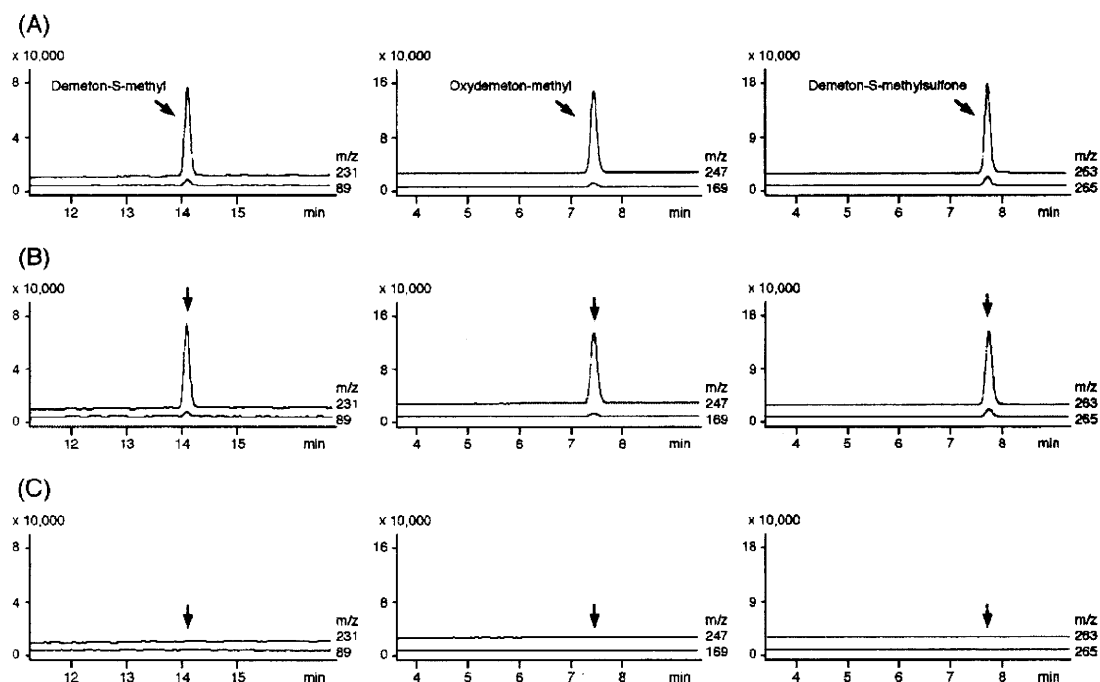


Fig. 2. SIM chromatograms of (A) standard solution of demeton-S-methyl, oxydemeton-methyl and demeton-S-methyl-sulfone (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (B) extract of brown rice spiked with 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ of each compound, (C) extract of blank brown rice.

あった。Fig. 2に3成分の標準溶液、標準品を添加した玄米の試験溶液および玄米のブランク試験溶液のSIMクロマトグラムを示した。

まとめ

農産物中のデメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびこれらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホン精度良く定量するための同時分析法を開発した。

1. LC-MSにより、極性が高く、吸着性を有するオキシデメトンメチルなど3成分を良好に分離して定量するシステムが構築できた。

2. 試料に2種類の抗酸化剤を添加する方法などを考案し、デメトン-S-メチルの酸化を大きく抑制することができた。

3. 多孔性ケイソウ土カラムを用いて溶媒転溶する方法などを採用することで、ジクロロメタンの使用を回避することができた。

4. 酢酸エチル転溶、ヘキサン/アセトニトリル分配およびグラファイトカーボン/PSA連結カラム精製などを組み合わせることで、夾雑成分を効率良く除去することができた。

謝辞 本研究は、平成19年度厚生労働省医薬食品局食品安全部残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入にかかわる分析法開発事業により実施したものである。ご指導いただきました残留農薬等分析法検討会の先生方に深謝いたします。また、本論文の作成にあたり、貴重なご意見をいただいた国立医薬品食品衛生研究所の松田りえ子氏に感謝いたします。

文献

- 1) 毒物劇物取締法研究会編. 新版毒物劇物取扱の手引. 東京, 時事通信社, 2006, p. 764-765. (ISBN 4-7887-0659-0)
- 2) Shibuya, S. Kawahata, Y. Kawahata, M. SHIBUYA INDEX (Index of Pesticides) 11th edition. Tokyo, Shibuya Index Research Group, 2006, p. 8.
- 3) Tomlin, C. D. S. The Pesticide Manual 14th edition. UK, British Crop Protection Council, 2006.
- 4) 後藤真康, 加藤誠哉. 残留農薬分析法. 東京, ソフトサイエンス社, 1980, p. 85-86.
- 5) 今月の農業編集室編. 改訂4版農薬登録保留基準ハンドブック 作物・水質残留基準と試験法. 東京, 化学工業日報社, 2003, p. 359-360. (ISBN 4-87326-405-7)
- 6) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法改訂版” 東京, 中央法規出版, 2006, p. 331-332. (ISBN 4-8058-2782-3)
- 7) Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M., Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr.*, **638**, 57-63 (1993).
- 8) 農薬残留分析法研究班編 “最新農薬の残留分析法改訂版別冊” 東京, 中央法規出版, 2006, p. 45-47. (ISBN 4-8058-2782-3)
- 9) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. *J. AOAC Int.*, **87**, 1003-1015 (2004).

加工食品を用いた農薬分析技能試験用試料調製の検討

(平成 22 年 5 月 28 日受理)

起橋雅浩* 小阪田正和 内田耕太郎 永吉晴奈
山口貴弘 柿本健作 中山裕紀子 尾花裕孝

Preparation of Samples for Proficiency Testing of Pesticide Residue Analysis in Processed Foods

Masahiro OKIHASHI*, Masakazu OSAKADA, Kotaro UCHIDA, Haruna NAGAYOSHI,
Takahiro YAMAGUCHI, Kensaku KAKIMOTO, Yukiko NAKAYAMA
and Hirotaka OBANA

Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025, Japan; * Corresponding author

To conduct proficiency testing for the analysis of pesticide residues in processed foods, fortified samples of retort curry and pancake were examined. In the case of retort curry, heating and mixing were necessary at the time of preparation to provide a homogenous analytical sample. A mixture of 4 carbamates and 11 organophosphorus pesticides was spiked and 14 of them showed consistent results in the samples. In the case of pancake, 10 kinds of pesticides were added to the pastry. The prepared pastry was then cooked. The relative concentrations of most of the pesticides in the pancake were not affected and all the pesticides showed consistent results in the samples. These results showed that the two tested samples were suitable for proficiency testing.

(Received May 28, 2010)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; 加工食品 processed food; 技能試験 proficiency testing; 添加試料 fortified sample

はじめに

平成 20 年初頭に冷凍餃子への農薬混入事件が発覚したため、冷凍餃子中の農薬分析が各地で行われ、当所においても分析を行った¹⁾。この事件によって消費者の加工食品に対する不安が喚起され、加工食品中の農薬分析が重要視されるようになった。加工食品にはさまざまなものがあり、生鮮食品で用いていた分析試験法で対応できない事例が予測される。事件後に示された事務連絡の「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について」では測定対象が有機リン系農薬に限定されているため、当所では加工食品中の農薬を対象とした一斉分析法の開発を行ってきた^{2), 3)}。このように分析法の整備が十分でないなか、加工食品中の農薬分析は実施されている。これらの分析値が科学的に妥当かを検証する上で、各分析機関での判断材料となることを期待して、技能試験を企画した。技能試験に用いられる分析試料には、均一性が要求される。これまで技能試験に用いられた試料は、油脂や飲料^{4), 5)}のような液体

か、野菜や果実を粉砕しペースト状にしたもの⁶⁾であった。これらは試料の物性が均質であり、流動性が高いため、分析試料の均一化が容易であると考えられる。しかし、加工食品が多種類の食材から構成される性質上、農薬を添加した試料の均一性を確保することが難しいと考えられた。そこでレトルトカレーとパンケーキの 2 種類の加工食品を用いて均一な試料調製方法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

大阪府内で購入したレトルトカレー、ホットケーキミックス、卵、牛乳を用いた。

2. 試薬

標準品: 各農薬標準品は、和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)、関東化学(株)、Dr. Ehrenstorfer 社および Riedel-Haën 社製(すべて残留農薬試験用)を用いた。溶液状態以外の農薬標準品は、アセトンで 1,000 µg/mL となるように溶解し、農薬標準原液を調製した。これらと溶液状態の農薬標準品を混合し、混合標準溶液 A (メタミド

* 連絡先 okihasi@iph.pref.osaka.jp

大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

ホス, アセフェート, ジメトエート, トルクロホスメチル, マラチオン, イソフェンホス, ジメチルピノホス-Z, エディフェンホス, ピラクロホス, フェノブカルブ, ベンダイオカルブ, ピリミカルブ, カルバリル; 以上 50 µg/mL, エトリムホス, エトプロホス; 以上 25 µg/mL アセトン溶液) および混合標準溶液 B (エスプロカルブ, クロルピリホス, ジェトフェンカルブ, ププロフェジン, クレソキシメチル, テブフェンピラド, フェナリモル, ビテルタノール, イミダクロプリド, テブフェノジド, クロルプロフェム, チオベンカルブ, トリアジメノール, フルトラニル, ミクロブタニル, オキサジキシル, レナシル, テニルクロール, アゾキシストロビン; 50 µg/mL アセトン溶液) を調製した. 混合標準溶液 C として林純薬工業(株)製オーダーメイド・農薬 10 成分混合標準溶液・添加用(クロルピリホス, ジェトフェンカルブ, クレソキシメチル, イミダクロプリド; 以上 120 µg/mL, エスプロカルブ, ビテルタノール; 以上 100 µg/mL, ププロフェジン, テブフェンピラド, フェナリモル, テブフェノジド; 以上 80 µg/mL アセトン溶液) および同・測定用(各 10 µg/mL アセトン溶液)を使用した.

グラファイトカーボンブラック (GCB)/PSA 積層カラム: SIGMA-ALDRICH 社製 ENVI™-CarbII/PSA (500/500 mg) を用いた.

3. 装置

攪拌機: ケンミックス・アイコー KM-800

フードプロセッサー: 東芝精米機 QS-7

ハンドミキサー: bamix M200

ガスクロマトグラフ質量分析計: (株)島津製作所製 GCMS-QP2010, Waters 社製 QuattroMicro GC

液体クロマトグラフ質量分析計: (株)島津製作所製 LCMS-2020

4. 試料調製方法

1) レトルトカレー試料の調製

水を入れた 20 L のステンレスバケツをガスコンロ上で 80°C 以上に加温し, レトルトカレーのバックを複数投入して 5 分間加温した. 加温されたレトルトカレーは, フードプロセッサーで約 500 g ずつ細切均一化した. これを上皿はかりに載せたステンレス容器(容量 8 L: 攪拌機付属品)へ移し, 4.0 kg を量り採った. ここへ混合標準溶液 A を 100 ng/g (一部は 50 ng/g) となるように 8 mL 添加して攪拌機で 5 分間以上混合した. この操作を 2 回行って添加試料を合計 8.0 kg 調製し, 1 つのステンレス容器中で保温しつつ杓子で攪拌混合した. 約 200 g ずつアルミ製シール袋 30 個に分包して -20°C で保存した.

2) 予備検討のパンケーキ試料の調製

2 L ビーカー中で市販のホットケーキミックス 200 g に対し, 卵 1 個 (M 寸約 50 g), 牛乳 150 mL を加え, 均一になるまでハンドミキサーで混合し, 生地を合計 800 g 調製した. これに混合標準溶液 B を 100 ng/g となるように 1.6 mL 添加し, さらに 5 分間攪拌した. 生地

は 160°C に設定したホットプレートで行い, 約 50 g ずつを杓子で採取し, 表裏を合計 3.5, 4.5, 5.5, 7, 10, 15, 30, 60 分間加熱調理した. 調製したパンケーキはワイヤーラック上で放冷し, フードプロセッサーで粉砕して分析した.

3) パンケーキ試料の調製

4-2) と同様の比率で生地を調製し, 合計 4.0 kg を攪拌機のスチンレス容器へ移した. これに混合標準溶液 C を 80~120 ng/g となるように 8 mL 添加し, 攪拌機で 5 分間攪拌した. 生地

5. 農薬分析方法

分析方法は既報に準じた^{1)~3)}. 試料を均一化した後, 50 mL コニカルチューブに 5 g を採取した. これに無水硫酸マグネシウム 3 g (レトルトカレーの場合は 6 g) および酢酸エチル 20 mL を加え, ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した. 遠心分離 (2,000×g, 5 分間) 後, 酢酸エチル層 8 mL をナス型フラスコに分取した. これをエバポレーターで濃縮し, 窒素気流下で乾固した. 残渣をヘキサン 10 mL に溶解させ, 別のコニカルチューブに移した. これにヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え分配抽出を行った. 遠心分離または静置後, アセトニトリル層を分取し, あらかじめアセトニトリル-トルエン (3:1) 30 mL を通液させた GCB/PSA 積層カラムに負荷した. 残ったヘキサン層に再度ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加えて分配抽出を行い, 得られたアセトニトリル層を同じカラムに負荷した. このカラムにさらにアセトニトリル-トルエン (3:1) 30 mL を加えて溶出し, すべての溶出液を同一のナス型フラスコに回収した. これをエバポレーターで濃縮してアセトンで 2 mL に定容し, イミダクロプリド, テブフェノジド以外を GC/MS で測定した (試料換算; 1.0 g/mL). イミダクロプリド, テブフェノジドについては, このうち 0.5 mL を分取して窒素気流下で乾固し, 0.5 mL のメタノールに溶解した後に 3 倍量の蒸留水で定容して LC/MS で測定した (試料換算; 0.25 g/mL).

6. 均一性評価方法

分包した容器のうち 6 個を無作為に選択し, 各容器から 2 部位を採取して, 合計 12 個の試料を分析した. この結果から一元配置分散分析によって容器間/容器内の分散比を算出し, 容器数 6, 併行数 2, 有意水準 5% に対する棄却限界値 (4.387) より小さい場合に, 試料が均一であると判定した.

7. 保存試験方法

1) レトルトカレー試料

試料調製後, 2 か月間 -20°C で保存した試料より, 1 個の容器を無作為に選択し, 併行数を 8 として試料を分析した. この結果を試料調製時の分析値と比較し, 残存率を求めた.

2) パンケーキ試料

調製した試料5gを15本のコニカルチューブに採取し、調製直後および1, 2, 4, 8週間-20°Cで保存した後、併行数を各3として分析した。この結果を試料調製直後の分析値と比較し、残存率を求めた。

結 果

1. レトルトカレー試料の調製

レトルトカレーへの添加農薬としては、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用のある有機リン系、カーバメート系の農薬を選択した。レトルトカレー試料は、凍結する際に脂質が分離し、試料の不均一化を招くことが予備検討時に

観察された。そのため、試料の均一性評価の際には、分包した各容器を湯煎で約60°Cに加温しつつハンドミキサーで攪拌してから採取した。調製したレトルトカレー試料の均一性評価を行った結果、カルバリルを除く14農薬の分析値からは試料が均一であると判定された。カルバリルに関しては分散比が棄却限界値を上回り、容器間での濃度の変動が併行条件で測定された濃度の変動に比べて大きかった。各農薬の平均濃度はエトリムホスで34 ng/g、エトプロホスで37 ng/g、それ以外は54~83 ng/g、変動係数は4~6%であった (Table 1)。また、保存試験の結果、アセフェート (127%) 以外の14農薬は残存率が96~108%であった。

Table 1. ANOVA results for the homogeneity test of curry samples

Pesticide	Spiked amount (ng/g)	Average (ng/g)	RSD (%)	F
Methamidophos	100	54	6	0.693
Acephate	100	61	6	1.326
Dimethoate	100	71	4	1.480
Toiclofos-methyl	100	78	4	1.093
Malathion	100	83	5	1.138
Isofenphos	100	83	4	1.023
Ethoprophos	50	37	5	0.884
Etrimfos	50	34	5	1.609
Dimethylvinphos	100	71	4	1.439
Edifenphos	100	73	5	4.385
Pyraclofos	100	79	5	3.349
Fenobucarb	100	78	5	1.925
Bendiocarb	100	67	6	2.615
Pirimicarb	100	75	4	1.021
Carbaryl	100	65	6	9.694

n=12

Table 2. Time course of pesticide concentration and weight of pancake

Baking time	3.5 min	4.5 min	5.5 min	7 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Weight ratio*	87%	87%	88%	85%	85%	80%	70%	60%
Pesticide	Conc (ng/g)							
Esprocarb	95	92	93	90	92	99	91	100
Chlorpyrifos	96	91	90	91	94	101	99	104
Diethofencarb	101	101	103	95	104	111	95	90
Buprofezin	96	90	90	83	89	101	95	104
Kresoxim-methyl	99	93	93	92	96	104	101	103
Tebuufenpyrad	120	104	107	98	94	113	100	103
Fenarimol	94	88	89	89	91	97	81	70
Bitertanol	91	88	87	85	87	94	71	79
Imidacloprid**	80	79	98	80	106	103	82	31
Tebufozide**	101	92	126	105	119	116	116	126
Chlorpropham	99	94	94	91	97	104	99	80
Thiobencarb	94	92	91	89	90	97	92	94
Triadimenol	94	95	99	91	99	103	83	60
Flutolanil	101	95	96	93	98	106	94	85
Myclobutanil	99	91	94	89	93	101	80	61
Oxadixyl	95	97	90	94	91	98	67	25
Lenacil	90	87	87	86	87	95	67	29
Thenylchlor	90	85	83	80	86	83	68	65
Azoxystrobin	110	100	105	103	97	107	82	65

* Relative weight against the pastry

** Determined by LC/MS

2. パンケーキ試料の調製

1) 予備検討

パンケーキの調理後重量は、加熱調理工程で水分の蒸発などがあり、調理前の生地重量に対して10~15%の減少が見られた。パンケーキ試料への添加は調理前に行い、分析値は調理後重量で換算した濃度とすることにした。そこで、混合標準溶液Bを添加した生地で調理時間を変えたパンケーキを調製し、重量の変化と農薬濃度分析値の変化を調査した(Table 2)。なお、添加農薬は、参加機関が通常の検査業務で分析している農薬を中心に選択した。その結果、調理時間の延長に伴って減少する農薬と、ほとんど変化しない農薬があった。このことから、調理による重量の減少と、試料中の農薬量の減少は基本的に比例関係にあり、加熱に弱い農薬は長時間の調理でより大きく減少する、ということが考えられた。そこで、加熱に弱い農薬への影響を無視できる4分間を調理時間とした。また、この各農薬の熱安定性とパンケーキマトリックス中のクロマトグラム強度を基に、試料に添加する10農薬を選択し、混合標準溶液Cを準備した。

2) 試料調製

調製したパンケーキ試料の均一性評価を行ったところ、10農薬すべての分析値から試料が均一であると判定された。各農薬の平均濃度は、63~76 ng/g (80 ng/g 添加)、89, 97 ng/g (100 ng/g 添加)、104~136 ng/g (120 ng/g 添加)、変動係数は全農薬を通じて6~16%であった(Table 3)。保存試験の結果、1~2週目では残存率が97~106%、4週目では89~96%、8週目では86~95%であった。

考 察

加工食品中の農薬分析は、中毒事件を契機に要望が増大し、それに応えるべく実施されている。これに対する技能試験を行うことは、その分析値の信頼性確保に大いに貢献すると思われる。この技能試験に用いる試料の検討には、原材料食品に準じた結果が予測されるため、加工度の低い食品や主成分が単一の食品は適していないと考えられた。そこで本研究では、動物性食品と植物性食品を含有するこ

と、また農薬添加後の均一性確保に有効と考えられる、流動性を有することを条件に、加工食品の選択を行った。なお、添加量は原材料由来の残留濃度を想定し、かつ測定が十分可能と思われる50~120 ng/gとした。

レトルトカレーは脂質、肉類、野菜類、そして多量の香辛料を含んでおり、夾雑物が多く測定への影響が大きかった。そのためか、均一性評価時の分析値が添加量よりも小さく、一般的な農薬分析法に求められている回収率の70~120%を満たさない農薬もあった。低回収率であった農薬については、分析法の性能が十分でなかったことが疑われる一方で、添加時に分解などによって試料中の真の濃度が添加量と乖離している可能性も考えられる。技能試験の結果は α スコアにより解析され、標的値には全機関の平均や過去の技能試験の結果、また均一性試験時の結果が用いられるのが一般的である。本研究で検討したレトルトカレーを試料とする場合には、どのような値を標的とするかを明確に定めるだけの科学的根拠がないため、技能試験結果の解析についても、より適切に各機関の技能を明らかにするための多角的な検討が必要と考えられた。また、試料の採取時に再均一化が必要なこともあり、当該試料を用いた技能試験は、参加機関にとって技術的にも難易度の高いものになると予想された。

次に、レトルトカレーで認められた、保存中に不均一化する問題点を克服すべく、調製時に流動性があり、その後固体化できる加工食品としてパンケーキを選択した。パンケーキは調理後に流動性を失い、試料を粉砕することで均一性の確保が容易であると考えられた。さらに、構成成分が小麦粉、牛乳、卵などで測定系への影響がレトルトカレーよりも小さく、添加量と分析値の乖離が少なくなると考えられた。一方でパンケーキは加熱調理するため、加熱が農薬へ及ぼす影響と、調理後の試料重量の減少による濃度変化が懸念された。しかし、数分の調理時間では農薬濃度に大きな変化は見られなかった。均一性評価時の分析値は添加量の79~113%であり、レトルトカレーよりも良好な回収率が得られた。しかし、保存試験においてはやや減少傾向が見られ、試験期間を短めに設定することが望ましいと考えられた。この原因は明らかではないが、粉砕し

Table 3. ANOVA results for the homogeneity test of pancake samples

Pesticide	Spiked amount (ng/g)	Average (ng/g)	RSD (%)	F
Esprocarb	100	97	6	0.296
Chlorpyrifos	120	136	9	1.083
Diethofencarb	120	130	16	0.100
Buprofezin	80	75	6	0.799
Kresoxim-methyl	120	111	13	0.032
Tebufofenpyrad	80	76	6	0.515
Fenarimol	80	63	9	0.168
Bitertanol	100	89	6	0.393
Imidacloprid*	120	104	9	0.257
Tebufofenozide*	80	64	14	0.240

* Determined by LC/MS

n=12

たパンケーキはレトルトカレーに比べて表面積が非常に大きく、冷凍保存中に何らかの影響を受けやすい可能性が推察された。

技能試験用試料に最低限求められることは、試料の均一性と一定期間の安定性である。本研究の結果、レトルトカレーもパンケーキもこの要件を満たしており、技能試験に用いることができると結論づけた。

加工食品は生鮮食品以外のすべてを指すため、数種類の試料で十分な技能試験が行えるとは到底考えられない。また、分析法も確立されていないために、仮に低回収率となっても要因分析が困難である。しかし、同一試料を用いた技能試験を共同で行い、分析結果を照合することは、分析技術の向上に大いに役立つと思われる。

謝 辞

本研究は平成 20, 21 年度厚生労働科学研究費補助金研究の「検査機関の信頼性確保に関する研究」(食品の安心・安全確保推進研究事業)により実施した。技能試験に参加していただいた岩手県、新潟県、愛知県、奈良県、神戸市、広島市、徳島県および北九州市の 8 地方衛生研究所の皆様へ感謝します。

文 献

- 1) Okamoto, Y., Takatori, S., Kitagawa, Y., Okihashi, M., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Tanaka, Y., Obana, H. Determination of pesticides in Chinese dumplings using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 10-15 (2009).
- 2) Kitagawa, Y., Okihashi, M., Takatori, S., Okamoto, Y., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Obana, H. Multi-residue method for determination of pesticide residues in processed foods by GC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 198-207 (2009).
- 3) Kitagawa, Y., Okihashi, M., Takatori, S., Okamoto, Y., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Obana, H. Multi-residue method for determination of pesticide residues in processed foods by GC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 243-252 (2009).
- 4) Miller, K. D., Milne P. Determination of low-level pesticide residues in soft drinks and sports drinks by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, **91**, 181-201 (2008).
- 5) Miller, K. D., Milne P. Determination of pesticide residues (>0.5 µg/L) in soft drinks and sports drinks by gas chromatography with mass spectrometry: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, **91**, 202-236 (2008).
- 6) Violante, F. G., Bastos, L. H., Cardoso, M. H., Rodrigues, J. M., Gouvea, A. V., Borges, C. N., Santos, P. R., Santos Dda. S., Goes, H. C., Souza, V., de Sao Jose, A., Bandeira, R. D., Cunha, V. Proficiency testing for the determination of pesticides in mango pulp: A view of the employed chromatographic techniques and the evaluation of laboratories' performance. *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 833-839 (2009).

Rapid and Easy Multiresidue Method for Determination of Pesticide Residues in Foods Using Gas or Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

Satoshi Takatori, Masahiro Okihashi, Yoko Kitagawa, Naoki Fukui,
You Kakimoto-Okamoto and Hirotaka Obana
*Osaka Prefectural Institute of Public Health
Japan*

1. Introduction

To obtain a high yield of food grains, many types of pesticides have been developed, which in turn has facilitated the prosperity of the human race and brought relief to farmers. After WWII, organophosphorus and organochlorine pesticides were extensively used worldwide. These early organophosphorus pesticides occasionally caused poisoning, while some organochlorine pesticides persisted in the environment. These facts served as a warning against an improvident use of pesticides and revealed that residual pesticides in crops should be monitored. Thus, national and local governments should monitor imported and regional foods as a policy. In Japan, all pesticides are regulated under a uniform limit (0.01 $\mu\text{g/g}$), except for a combination of foods and pesticides set under the maximum residue limits (MRLs) (Notification No. 497-499, November 29, 2005). This regulation does not require analysis of all the pesticides; however, it does necessitate pesticide residue analysis of commodities. Thus far, the chemical industry has developed more than 800 pesticides that belong to many classes such as insecticides, fungicides, nematocides, and herbicides. Each class has a different target point and physical properties and this diversity limits the coverage of a single analytical method. It is also impossible to monitor all the pesticides pertaining to one foodstuff using hundreds of methods. Thus, analytical institutes require fast and efficient multiresidue methods in order to maximize the coverage of their monitoring activities. For this reason, researchers have reported many multiresidue analytical methods (Cook, J., et al., 1999, Fillion, J., et al., 2000, Hirahara, Y., et al., 2006, Luke, M. A., et al., 1975, Ueno, E., et al., 2004). These methods were optimized to monitor multiple residues efficiently and are used routinely in quarantine stations and laboratories. Anastassiades et al. reported a rapid approach for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, named QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method in 2003 (Anastassiades, M., et al., 2003). The main focus of this report was to shorten the analytical process during extraction and cleanup without employing expensive instruments. The characteristic points of the method are as follows: (1) shaking extraction with acetonitrile in a disposable tube, (2) one step salting out and removal of water from the

acetonitrile using anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) and sodium chloride (NaCl), (3) purification with so called "dispersive-solid phase extraction" (dispersive-SPE), in which the extract is processed by shaking with primary secondary amine (PSA) silica gel and then centrifuged to separate the PSA before analysis. Compared to ordinary multiresidue methods, this method is a remarkably rapid and easy procedure. Other researchers have reported follow-up studies of this method (Lehotay, S. J., et al., 2005, Lehotay, S. J., et al., 2005, Schenck, F. J., et al., 2008, Wang, J.&Leung, D., 2009). We also examined the QuEChERS method and found that the characteristic points of the method (step (2)) are positive aspects; however, steps (1) and (3) are negative aspects due to the weak extraction potency (shaking) and the insufficient cleanup (dispersive-SPE). To overcome these negative aspects, we developed a new powerful extraction technique with a homogenizer and with an efficient cleanup with double-layered SPE (graphite carbon black (GCB) with PSA) on the basis of the QuEChERS method (Okihashi, M., et al., 2005, Okihashi, M., et al., 2007, Takatori, S., et al., 2008). We demonstrated that this method is applicable to the multiresidue analysis in agricultural products by the combination of analysis with gas chromatography equipped with (tandem) mass spectrometry (GC-MS or GC-MS/MS) and with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

For agricultural products, multiresidue methods applicable to the analysis of pesticides in processed foods are also required. In Japan (in 2007~08), serious organophosphorus pesticide poisoning occurred after people consumed dumplings imported from China. An organophosphorus pesticide, methamidophos, was detected from the leftover of the Chinese dumplings in concentrations of 3,200 ppm (Ito, T., 2009, Sumi, Y., et al., 2008). Furthermore, dichlorvos, parathion, and parathion-methyl were also detected in other packages of the Chinese dumplings. This incident necessitated the monitoring of pesticide residues in processed foods in Japan. Multiresidue methods for processed foods such as tomato purees and baby foods have been reported (Botitsi, H., et al., 2007, Cajka, T., et al., 2008, Gilbert-Lopez, B., et al., 2007, Sannino, A.&Bandini, M., 2005, 2005, Sannino, A., et al., 2003). However, the number of multiresidue methods that can be adapted for processed foods that contain high lipid ratios (more than 10% w/w) are relatively limited (Fenske, R. A., et al., 2002, Lehotay, S. J., et al., 2005, Sannino, A., et al., 1995, 1996). Lipids are a problematic component of processed foods during pesticide detection. We categorized processed foods into three categories: (i) a high lipid group (lipid content > 10% w/w), (ii) a low lipid group (lipid content \leq 10% w/w), and (iii) a non-lipid group. Chinese dumplings fall into the high lipid group. For this group, both the sufficient extraction of pesticides within the lipids and the removal of lipids before analysis are key aspects. The multiresidue method for agricultural products described above may be applicable to the low and non-lipid groups directly or with minor modifications such as adding water to samples prior to the extraction. As described above, the MRLs were set according to the combination of pesticides and the agricultural products. Except for some processed foods such as raisins and orange juice, the MRLs were not established for combinations of pesticides and processed foods; most of the pesticides detected in processed foods are regulated under the uniform limit (0.01 ppm/g). Thus, the uniform limit should be detectable using the multiresidue method for monitoring pesticides in processed foods. Here, we have developed a rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in processed foods that fall in the high lipid group. The method could detect around 300 pesticides at the level of 0.01 ppm/g (Kitagawa, Y., et al., 2009, 2009, Okamoto, Y., et al., 2009).

In this chapter, we describe rapid and easy multiresidue methods for the determination of pesticide residues in foods, including agricultural products (vegetables, fruits, and cereals) and processed foods, on the basis of our recent studies (Kitagawa, Y., et al., 2009, 2009, Okamoto, Y., et al., 2009, Okihashi, M., et al., 2007, Takatori, S., et al., 2008).

2. Outline of the methods

2.1 Method for agricultural products

We extracted agricultural products weighed in disposable tubes with acetonitrile using a homogenizer. To the tube, we added NaCl and MgSO₄, shook it vigorously, and then centrifuged it to remove the water layer and the precipitant. The acetonitrile phase was applied onto a SPE column for purification (removing chlorophyll and fatty acids). The eluate was concentrated *in vacuo* and then reconstituted in an appropriate solvent for GC-MS, GC-MS/MS, or LC-MS/MS analysis.

2.2 Method for processed foods (high lipid containing group, Chinese dumplings, French fries, etc.)

We extracted the pesticides in homogenized processed foods with ethyl acetate in the presence of MgSO₄. After centrifuging, an aliquot of extract was concentrated *in vacuo*. The remainder was dissolved in hexane and then an acetonitrile/hexane partition step was conducted to remove the lipids from the extract. After centrifuging, we applied the acetonitrile phase onto a SPE column for further purification (to remove chlorophyll and fatty acids). We concentrated the eluate *in vacuo* and then reconstituted it in an appropriate solvent for GC-MS, GC-MS/MS, or LC-MS/MS analysis.

3. Experimental

3.1 Chemicals

Pesticides used in this study were analytical grade obtained from Wako (Osaka, Japan), Kanto Chemical (Tokyo, Japan), Hayashi Pure Chemical (Osaka, Japan), Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Solvents and NaCl were pesticides analysis grade purchased from Wako. Anhydrous MgSO₄ was the highest grade obtained from Wako. Water was prepared by Millipore system (Millipore, Bedford, MA). Other chemicals used in this study were the highest grade commercially available.

3.2 Apparatus

A 50 mL polypropylene (PP) dispersal tube was purchased from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). A QS-7 conventional food processor (Toshiba, Tokyo, Japan) was used to comminute vegetable, fruit, cereal and processed foods samples. Polytron PT1200 high-speed homogenizer (KINEMATICA, Luzern, Switzerland) was used to blend sample and acetonitrile or ethyl acetate in the extraction step. A Hitachi Himac SCR 20B (Hitachi Koki, Tokyo, Japan) was utilized for centrifugation. Solvent evaporator, Iwaki REN-1000 rotary evaporators (Asahi Techno Glass, Chiba Japan), were used in this study. Double-layered cartridge column (6 mL) with 500 mg of GCB and 500mg of PSA and an octadecyl silica gel (C18) column (500 mg; 3mL) were obtained from SUPELCO (Bellefonte, PA).

3.3 Analytical systems

3.3.1 GC-MS

GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used in EI (electroionization) mode. The analytical column was the Rtx-5MS (0.25 mm x 30 m, 0.25 μ m; Restek, Bellefonte, PA). The analysis was performed on a selected ion monitoring (SIM) mode.

3.3.2 GC-MS/MS

Quattro Micro GC (Waters/Micromass, Manchester, UK) was used in EI mode. The analytical column was the DB-5 (0.25 mm x 30 m, 0.25 μ m, Agilent, Santa Clara, CA). The analysis was performed on a selected reaction monitoring (SRM) mode.

3.3.3 LC-MS/MS

The LC-MS/MS system was composed of an LC system (1100 series; Agilent) and an MS/MS (API3000; Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with electroionization spray interface. The analytical column was Ascentis C18, 2.1 x 100 mm, 3 μ m (SUPELCO). Eluents were 0.1% formic acid aqueous solution (A) and 0.1% formic acid containing methanol (B), in which the ratio was gradually changed as the analysis went on. The analysis was performed on an SRM mode.

The details of analytical conditions in 3.3.1~3 were omitted.

3.4 Procedure for sample preparation

3.4.1 Vegetables and fruits

We homogenized a sample (approximately 700~1,000 g) in a conventional food processor. To a 50 mL PP disposable tube containing a 10 g aliquot of the homogenized sample, we added 20 mL of acetonitrile and then homogenized it with a high-speed homogenizer for 1 min. Next, 4 g of MgSO₄ and 1 g of NaCl were added to the tube and it was shaken vigorously for a minute. After centrifugation, we applied 8.0 mL of the acetonitrile layer (equivalent to 4.0 g of the sample) onto a GCB/PSA, which was formerly conditioned with 30 mL of the elution solvent (acetonitrile-toluene, 3 + 1). We eluted the column with 30 mL of the elution solvent. All the eluate was concentrated *in vacuo*. For the GC-MS/MS analysis, the eluate was reconstituted in 4.0 mL of 10% acetone, containing hexane (the test solution, equivalent to 1.0 g/mL). This test solution is also applicable to the analysis via GC-MS. For the LC-MS/MS analysis, the eluate was reconstituted in 2.0 mL of methanol and then diluted four times with water before analysis (the test solution, equivalent to 0.5 g/mL) [Scheme I].

3.4.2 Cereals

We homogenized a sample (approximately 700~1,000 g) in a mill. To a 50 mL PP disposable tube containing a 5.0 g aliquot of the homogenized sample, 5.0 mL of water was added and stood for 30 min. Then, we added and homogenized 20 mL of acetonitrile with a high speed homogenizer for 1 min. We added 4 g MgSO₄ and 1 g NaCl to the tube and shook it vigorously for 1 min. After centrifugation, 10 mL of the acetonitrile layer (equivalent to 2.5 g of the sample) was applied onto a C18 column connecting above GCB/PSA, which was formerly conditioned with 10 mL acetonitrile and 30 mL of the elution solvent (acetonitrile-toluene, 3 + 1), respectively. We eluted the column with 10 mL acetonitrile. After removing the C18 column, the GCB/PSA column was eluted with the 30 mL of the elution solvent. The eluate was concentrated *in vacuo*. For the GC-MS/MS analysis, we reconstituted the

eluate in 2.5 mL of 10% acetone containing hexane (the test solution, equivalent to 1.0 g/mL). This test solution is also applicable to the analysis via GC-MS. For the LC-MS/MS analysis, we reconstituted the eluate in 1.25 mL of methanol and then diluted it four times with water to 5.0 mL before analysis (the test solution, equivalent to 0.5 g/mL) [Scheme II].
Sample (10 g) in a 50 mL PP disposal tube

- Add 20 mL of acetonitrile
- Homogenize (1 min)
- Add 4 g of MgSO₄ and 1 g of NaCl
- Shake (1 min) and centrifuge

Acetonitrile layer 8.0 mL (equivalent to 4.0 g sample)

- Load on a GCB/PSA column
- Elute with 30 mL acetonitrile-toluene (3+1)
- Collect loading and eluting fractions in a round bottom flask
- Evaporate and reconstituted in appropriate solvent

GC-MS/MS or LC-MS/MS analysis

Scheme I. Procedure of sample preparation for the determination of pesticides residues in agricultural products (for vegetables and fruits)

Sample (5.0 g) in a 50 mL PP disposal tube

- Add 5 mL of water and stand for 30 min
- Add 20 mL of acetonitrile
- Homogenize (1 min)
- Add 4 g of MgSO₄ and 1 g of NaCl
- Shake (1 min) and centrifuge

Acetonitrile layer 10.0 mL (equivalent to 2.5 g sample)

- Load on a C18 column connecting above a GCB/PSA column
- Elute with 10 mL of acetonitrile
- Remove the C18 column
- Elute with 30 mL acetonitrile-toluene (3+1)
- Collect loading and eluting fractions in a round bottom flask
- Evaporate and reconstituted in appropriate solvent

GC-MS/MS or LC-MS/MS analysis

Scheme II. Procedure of sample preparation for the determination of pesticides residues in agricultural products (for cereals)

3.4.3 Calibration curves and limits of quantification

For the GC-MS and GC-MS/MS analysis, we used the matrix-matched calibration curves to minimize the effects of the matrix in the test solution (Poole, C. F., 2007). The standard solutions for the matrix-matched calibration curves were prepared by mixing the serially diluted standard solutions with equivalent volumes of the doubly concentrated test solutions obtained from the same foods. We formerly determined that these foods did not contain the pesticide residues to be analyzed.

For LC-MS/MS analysis, we serially diluted the standard mixture solution with a 25% methanol aqueous solution. The limits of quantification (LOQ) of pesticides studied in this chapter were determined by LC-MS/MS and were found to be 0.01 ppm, except for flufenoxuron, lufenuron, pentoxazone, and propiconazole. The LOQs of these pesticides were 0.02 ppm.

3.4.4 Processed foods in high lipid group

We homogenized a whole sample in a distributed package (approximately 200~1,000 g) in a conventional food processor. To a 50 mL PP disposable tube containing a 5.0 g aliquot of the sample, 20 mL of ethyl acetate and 3 g of $MgSO_4$ were added to the tube and then homogenized with a high speed homogenizer for 1 min. After centrifugation, 8.0 mL of ethyl acetate supernatant (equivalent to 2.0 g of the sample) was evaporated in a round bottom flask at 40°C *in vacuo* and then dried under a nitrogen stream to remove ethyl acetate. To remove the lipid from the extract, the acetonitrile-hexane partition was conducted. Briefly, we reconstituted the extract in 10 mL hexane in a new 50 mL disposable PP tube. To the tube, we added 20 mL hexane-saturated acetonitrile and then shook it vigorously for 1 min. After centrifugation, we applied the acetonitrile layer onto the GCB/PSA, which was formerly conditioned with 30 mL of the elution solvent (acetonitrile-toluene, 3 + 1). To the remaining hexane layer in the PP tube, we added 20 mL hexane-saturated acetonitrile and then again shook it vigorously for 1 min. After centrifugation, the acetonitrile layer was applied onto the column. The column was eluted with 30 mL of elution solvent. The eluate was concentrated *in vacuo*. For GC-MS or GC-MS/MS analysis, the eluate was reconstituted in 2 mL of 10% acetone containing hexane (the test solution, equivalent to 1.0 g/mL). For LC-MS/MS analysis, we reconstituted the eluate in 2 mL of methanol (the test solution stock, equivalent to 1.0 g/mL) and then diluted it ten times with a 25% methanol aqueous solution before analysis [Scheme III].

4. Evaluation

4.1 Method for vegetables, fruits and cereals

4.1.1 Rapidity of the method

The merits of the method (saving time and solvent) are due to its simple procedure. The preparation time for the test solutions of the 12 samples was approximately 3~4.5 h for one chemist. More time for the chromatographic data analysis is necessary when increasing the number of analyzed pesticides in the method. Thus, the time saved from the sample preparation and the spare time from the chromatographic data analysis are important for the multiresidue analysis. This simple procedure would also be required to revise the method studying the applicability of new target pesticides in foods. Furthermore, this simple method does not require a long time to master the procedure and would also be effective in reducing the errors of the procedure. The ruggedness of the method derives from these points. The solvent and the amount of glassware used for the procedure are lesser than those used for the original method. Now, this method, which is used for routine monitoring of pesticides in our laboratory, would be more economic and safe than the ordinary methods.

4.1.2 Recovery tests

Recovery tests were conducted to examine the applicability of the method using GC-MS/MS (250 pesticides) and LC-MS/MS (99 pesticides). We defined an acceptable result as