

文 献

- 1) Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V., Nikolov, Y. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals—A review. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **32**, 237–243 (2008).
- 2) Jin, M. C., Cai, M. Q., Chen, X. H. Simultaneous measurement of indandione-type rodenticides in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 294–300 (2009).
- 3) Palazoglu, M. G., Tor, E. R., Holstege, D. M., Galey, F. D. Multiresidue analysis of nine anticoagulant rodenticides in serum. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4260–4266 (1998).
- 4) Chen, X. H., Cai, M. Q., OuYang, X. K., Jin, M. C. Ion chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous confirmation and determination of indandione rodenticides in serum. *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 1217–1226 (2009).
- 5) Chen, X. H., Cai, M. Q., Jin, M. C. Analysis and confirmation of rodenticide pindone in human plasma by IC-ESI-IT-MS. *Chromatographia*, **70**, 1201–1206 (2009).
- 6) Vudathala, D., Cummings, M., Murphy, L. Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method. *J. Anal. Toxicol.*, **34**, 273–279 (2010).
- 7) Jin, M. C., Chen, X. H., Ye, M. L., Zhu, Y. Analysis of indandione anticoagulant rodenticides in animal liver by eluent generator reagent free ion chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1213**, 77–82 (2008).
- 8) Marek, L. J., Koskinen, W. C. Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 571–576 (2007).
- 9) Saito, S., Nemoto, S., Matsuda, R. Determination of pindone in agricultural products by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **52**, 237–243 (2011).

LC-MS/MS による緑茶中の残留農薬一斉試験法

(2012年4月6日受付)

(2012年5月31日受理)

齊藤静夏、根本 了、松田りえ子

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

Multiresidue method for determination of pesticides in green tea by LC-MS/MS

(Received April 6, 2012)

(Accepted May 31, 2012)

Shizuka Saito, Satoru Nemoto, Rieko Matsuda

Division of Foods, National Institute of Health Sciences

Abstract

A multiresidue method for the determination of pesticides in green tea was developed by modification of Japanese official method. In this method, a sample was allowed to swell in water before extraction with acetonitrile. After the removal of water by salting-out, the crude extract was passed through an ODS mini-column, and then purified by a tandemized graphitized carbon/primary secondary amine (PSA) mini-column and graphitized carbon mini-column, prior to the determination by LC-MS/MS. The recoveries of 135 compounds from fortified green tea after a spike at maximum residue levels (MRLs) set by Japan, were in the ranged from 70 to 106%, except for 15 compounds, and the relative standard deviations were within the required analytical performance criteria for pesticide residues in Japan. The limits of quantitation (LOQs) of all the tested compounds were below MRLs set by Japan.

Keywords: 農薬、緑茶、一斉試験法、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計
pesticide, green tea, multiresidue method, LC-MS/MS

I 緒言

II 実験方法

茶を対象とした LC-MS/MS による残留農薬の一斉試験法として、厚生労働省より「LC-MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」¹⁾ (以下、通知法) が通知されている。通知法は、Fillion J. らによって報告された野菜・果実を対象とした多成分分析法²⁾をベースに開発された試験法であり、酸性農薬を除く幅広い農薬に適用可能な方法とされている。しかし、茶のような夾雑成分の非常に多い食品に対しては精製が不十分であり、LC-MS および LC-MS/MS 測定において、試料マトリックスによるイオン化阻害を受けやすいことや、装置が著しく汚染して感度低下を生じやすい等の問題点があるため、試験法の改良が望まれている。そこで本研究では、通知法を改良し、緑茶を対象としてミニカラム精製および LC-MS/MS による残留農薬の一斉試験法を検討したので報告する。

1. 試料

市販の緑茶(製茶)を遠心粉碎機で粉碎して均一化し、425 μm の標準網ふるいに通したものをを用いた。

2. 試薬・試液

有機溶媒および試薬は、関東化学(株)または和光純薬工業(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。ケイソウ土は、和光純薬工業(株)製のセライト 545 を用いた。試験溶液の調製で用いた水は、超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。LC-MS/MS の移動相溶媒は、関東化学(株)製の LC-MS 用蒸留水およびメタノールを用いた。

各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)および和光純薬工業(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、アセトニトリル 10 mL に溶解して調製した。検量線作成用および添

加回収試験用の混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して調製した。

リン酸緩衝液 (0.5 mol/L, pH7.0) は、以下の通りに調製した。リン酸水素二カリウム (K₂HPO₄) 52.7 g およびリン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

3. 精製ミニカラム

グラファイトカーボンミニカラムは、ジーエルサイエンス (株) 製 InertSep GC (充てん量 500 mg) を用いた。

グラファイトカーボン/PSA (エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル) 積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス (株) 製の InertSep GC/PSA (充てん量 500 mg/500 mg)、InertSep GC/PSA (充てん量 1000 mg/500 mg) および InertSep GC/PSA (充てん量 1000 mg/1000 mg) を用いた。なお、添加回収試験は InertSep GC/PSA (充てん量 500 mg/500 mg) を用いて行った。

グラファイトカーボン/NH₂ (アミノプロピルシリル化シリカゲル) 積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep GC/NH₂ (充てん量 500 mg/500 mg) を用いた。

ODS (オクタデシルシリル化シリカゲル) ミニカラムは、Agilent 社製の Mega Bond Elut C18 (充てん量 1000 mg) を用いた。

4. 装置

LC-MS/MS は、Waters 社製の液体クロマトグラフ Alliance 2695 および同社製質量分析計 Micromass Quattro Premier を使用した。遠心粉碎機は Retsch 社製 ZM200、ホモジナイザーは Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を用いた。蒸留水精製装置は、藤原製作所 (株) 製の超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW を用いた。pH メーターは、(株) 堀場製作所製 F-52 を用いた。

5. LC-MS/MS 測定条件

1) LC 条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス社製)、ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm、長さ 10 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス社製)、カラム温度: 40℃、注入量: 5 μL、移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) および 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)、移動相流速: 0.20 mL/min、グラジエント条件: 0 分 (A:B = 85:15) → 1 分 (A:B = 60:40) → 3.5 分 (A:B = 60:40) → 6 分 (A:B = 50:50) → 8 分 (A:B = 45:55) → 17.5 分 (A:B = 5:95) → 33 分 (A:B = 5:95) → 33.1 分 (A:B = 0:100) → 43 分 (A:B = 0:100) → 43.1 分 (A:B = 85:15) → 55 分 (A:B = 85:15)、保持時間: 表 1 に示した。

表 1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果

化合物	イオン化モード	保持時間 (分)	定量イオン		定性イオン		基準値 (ppm)	添加濃度 (mg/kg)	添加回収試験 グループ ^{a)}	真度 (%)	併行精度 (%)
			プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)					
アクリナトリン	ESI (+)	24.4	559.1	207.9	559.1	181.0	10	10	B	79	3
アザメチホス	ESI (+)	14.4	325.0	182.9	325.0	111.8	0.01	0.01	A	90	9
アシベンゾラル-S-メチル	ESI (+)	20.4	211.0	135.9	211.0	91.0	0.01	0.01	A	106	3
アジンホスメチル	ESI (+)	19.1	318.2	132.2	318.2	160.2	0.01	0.01	A	81	14
アセタミプリド	ESI (+)	10.8	223.1	125.9	223.1	90.0	30	30	B	83	4
アゾキシストロビン	ESI (+)	19.4	404.1	372.1	404.1	329.0	10	10	B	93	2
アトラジン	ESI (+)	17.6	216.1	174.0	216.1	95.9	0.1	0.1	A	74	3
アニロホス	ESI (+)	21.6	368.0	198.8	368.0	124.8	0.01	0.01	A	94	6
アベルメクチン Bla	ESI (+)	25.0	890.5	305.1	890.5	567.1	0.02	0.02	A	62	13
アラマイト	ESI (+)	23.4	352.1	191.0	352.1	57.3	0.1	0.1	A	86	4
アルジカルブ	ESI (+)	13.5	207.9	115.5	207.9	88.5	0.05	0.05	A	81	6
アルドキシカルブ	ESI (+)	7.2	239.9	147.7	239.9	85.5	0.01	0.01	A	80	12
イソキサチオン	ESI (+)	22.1	314.1	104.8	314.1	96.8	5	5	B	86	3
イソキサフルトール	ESI (+)	18.0	360.0	250.9	360.0	219.9	0.01	0.01	A	52	12
イプロバリカルブ	ESI (+)	20.5	321.2	118.9	321.2	203.0	0.01	0.01	A	91	7
イマザリル	ESI (+)	21.7	297.0	158.9	297.0	69.0	0.1	0.1	A	74	6
イミダクロプリド	ESI (+)	9.8	255.9	208.8	255.9	174.8	10	10	B	86	4
イミベンコナゾール	ESI (+)	23.0	413.0	124.8	413.0	126.8	15	15	B	81	8
インダノファン	ESI (+)	21.0	341.2	187.0	341.2	175.0	0.01	0.01	A	73	13
インドキシカルブ	ESI (+)	22.5	527.9	202.8	527.9	149.7	0.01	0.01	A	103	8
エチオン	ESI (+)	23.4	385.0	198.8	385.0	142.8	0.3	0.3	A	75	3
エチプロロール	ESI (-)	18.7	395.0	330.7	395.0	249.9	10	10	B	90	4
エトキサゾール	ESI (+)	24.0	360.2	140.9	360.2	303.9	10	10	B	81	4
エトフェンブロックス	ESI (+)	26.2	394.2	177.0	394.2	106.9	10	10	B	81	3
エポキシコナゾール	ESI (+)	20.8	330.0	120.9	330.0	101.0	0.01	0.01	A	77	9
オキサジクロメホン	ESI (+)	23.2	376.2	190.0	376.2	161.0	0.01	0.01	A	87	7
オキサミル	ESI (+)	7.6	237.3	90.3	237.3	72.3	0.01	0.01	A	70	12
オキシカルボキシ	ESI (+)	11.9	268.3	175.1	268.3	147.1	0.01	0.01	A	20	13
カルバリル	ESI (+)	16.5	201.8	144.7	201.8	126.6	1	1	A	73	6
カルプロバミド	ESI (+)	21.7	334.1	138.9	334.1	102.8	0.01	0.01	A	84	4
カルボフラン	ESI (+)	15.6	221.8	164.8	221.8	122.6	0.2	0.2	A	85	4

表1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果 (つづき)

化合物	イオン化モード	保持時間(分)	定量イオン		定性イオン		基準値(ppm)	添加濃度(mg/kg)	添加回収試験グループ ^{a)}	真度(%)	併行精度(%)
			プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)					
キザロホップエチル	ESI(+)	23.3	373.1	298.9	373.1	91.0	0.01	0.01	A	86	5
キナルホス	ESI(+)	21.5	299.1	162.9	299.1	146.9	0.1	0.1	A	87	3
クミルロン	ESI(+)	20.2	303.2	185.0	303.2	124.8	0.01	0.01	A	91	11
クレソキシムメチル	ESI(+)	21.3	314.2	205.9	314.2	115.8	20	20	B	88	5
クロキントセットメキシル	ESI(+)	23.6	336.1	237.9	336.1	191.7	0.01	0.01	A	81	5
クロチアニジン	ESI(+)	10.0	249.9	168.7	249.9	131.5	50	50	B	85	1
クロフェンテジン	ESI(+)	22.9	302.9	137.6	302.9	101.5	20	20	B	90	3
クロマフェノジド	ESI(+)	20.6	395.3	175.0	395.3	90.8	20	20	B	91	3
クロメプロップ	ESI(+)	23.4	324.1	119.8	324.1	202.9	0.01	0.01	A	81	15
クロリダゾン	ESI(+)	11.4	222.2	104.2	222.2	92.2	0.01	0.01	A	45	15
クロールピリホス	ESI(+)	23.8	351.9	96.9	351.9	199.8	10	10	B	80	4
クロールピリホスメチル	ESI(+)	22.5	323.9	124.8	323.9	291.7	0.1	0.1	A	81	8
クロールフルアズロン	ESI(+)	24.3	539.9	382.8	539.9	157.9	10	10	B	86	4
ククロクスロン	ESI(+)	20.3	291.0	163.8	291.0	71.5	0.1	0.1	A	84	9
シアゾファミド	ESI(+)	20.9	325.0	107.8	325.0	216.9	0.01	0.01	A	85	12
ジウロン	ESI(+)	18.1	232.8	71.5	232.8	159.6	1	1	A	80	6
シクロプロトリン	ESI(+)	24.2	499.2	180.9	499.2	229.0	0.5	0.5	A	64	10
ジフェノコナゾール	ESI(+)	22.2	406.0	250.9	406.0	187.8	10	10	B	86	4
シフルフェナミド	ESI(+)	22.1	413.0	202.9	413.0	294.9	0.01	0.01	A	74	6
ジフルベンズロン	ESI(+)	21.1	311.0	157.7	311.0	140.6	20	20	B	89	4
シプロジニル	ESI(+)	22.4	226.0	92.5	226.0	107.5	0.01	0.01	A	80	7
シメコナゾール	ESI(+)	20.4	294.2	69.8	294.2	72.8	10	10	B	90	2
ジメチリモール	ESI(+)	17.3	210.1	71.0	210.1	98.0	0.01	0.01	A	64	14
ジメトモルフ(E, Z)	ESI(+)	19.4, 19.8	388.0	301.0	388.0	164.7	0.01	0.01	A	87	6
スピノシン A	ESI(+)	26.4	732.5	141.8	732.5	97.8	2	2	B	82	5
スピノシン D	ESI(+)	27.2	746.5	141.8	746.5	97.9	2	2	B	79	5
スピロメシフェン	ESI(+)	23.7	388.2	273.0	388.2	255.0	30	30	B	76	2
ダイアジノン	ESI(+)	21.9	305.2	169.0	305.2	152.9	0.1	0.1	A	85	2
ダイアレート	ESI(+)	23.0	270.0	86.0	270.0	108.8	0.1	0.1	A	86	9
ダイムロン	ESI(+)	20.1	269.2	150.9	269.2	90.8	0.01	0.01	A	95	6
チアクロプリド	ESI(+)	12.4	252.8	125.5	252.8	89.5	30	30	A	90	2
チアベンダゾール	ESI(+)	15.1	201.8	174.7	201.8	130.6	0.1	0.1	A	31	16
チアマトキサム	ESI(+)	8.2	291.9	210.7	291.9	180.6	15	15	B	66	2
テトラクロルピリホス	ESI(+)	21.3	367.0	127.1	367.0	206.0	0.01	0.01	A	87	14
テトラコナゾール	ESI(+)	20.0	372.0	158.8	372.0	70.0	20	20	B	87	5
テブコナゾール	ESI(+)	20.9	308.2	70.0	308.2	124.8	25	25	B	86	6
テブチウロン	ESI(+)	15.9	229.3	172.2	229.3	116.2	0.02	0.02	A	69	5
テブフェノジド	ESI(+)	21.2	353.2	132.9	353.2	297.0	25	25	B	92	4
テフルベンズロン	ESI(+)	23.6	380.8	157.7	380.8	140.6	20	20	B	88	5
トリアジメノール	ESI(+)	19.6	296.2	70.0	296.2	98.9	20	20	B	88	6
トリアジメホン	ESI(+)	19.6	294.1	69.1	294.1	196.9	1	1	A	85	2
トリチコナゾール	ESI(+)	20.6	318.1	70.0	318.1	124.9	0.01	0.01	A	73	12
トリデモルフ	ESI(+)	27.7, 28.9	298.3	130.0	298.3	57.2	20	20	B	73	5
トリフルミゾール	ESI(-)	22.4	344.0	275.9	344.0	300.9	15	15	B	83	6
トリフルムロン	ESI(+)	20.4	358.9	155.7	358.9	138.6	0.02	0.02	A	90	5
トリフロキシストロビン	ESI(+)	22.4	409.1	185.9	409.1	144.9	5	5	B	85	2
ナブプロアニリド	ESI(+)	21.4	292.1	171.0	292.1	119.9	0.01	0.01	A	84	12
ニテンピラム	ESI(+)	7.2	271.1	125.8	271.1	129.7	10	10	B	45	6
ノバルロン	ESI(+)	22.7	492.8	157.7	492.8	140.6	0.01	0.01	A	85	15
ハルフェンプロックス	ESI(+)	26.7	496.1	183.0	496.1	460.7	10	10	B	82	4
ピラクロストロビン	ESI(+)	22.3	388.0	193.9	388.0	163.0	0.01	0.01	A	83	13
ピラゾホス	ESI(+)	22.2	374.1	221.9	374.1	193.9	0.1	0.1	A	87	1
ピラゾリネート	ESI(+)	22.5	438.9	91.0	438.9	172.8	0.02	0.02	A	34	15
ピリダベン	ESI(+)	24.7	365.1	147.0	365.1	308.9	10	10	B	84	2
ピリフタリド	ESI(+)	19.4	319.1	139.0	319.1	82.9	0.01	0.01	A	92	7
ピリプロキシフェン	ESI(+)	23.7	322.1	95.9	322.1	184.9	15	15	B	85	2
ピリミカーブ	ESI(+)	17.6	239.2	72.0	239.2	182.0	0.01	0.01	A	81	9
ピリミジフェン	ESI(+)	24.2	378.1	184.0	378.1	150.1	5	5	B	85	3
フェノキサプロップエチル	ESI(+)	23.1	362.0	287.9	362.0	118.9	0.01	0.01	A	75	12
フェノキシカルブ	ESI(+)	21.3	302.1	88.0	302.1	115.9	0.05	0.05	A	81	5
フェノブカルブ	ESI(+)	19.0	208.3	95.2	208.3	152.1	0.5	0.5	A	87	5
フェリムゾン(E, Z)	ESI(+)	19.9, 20.2	255.2	91.0	255.2	131.9	0.01	0.01	A	88	7
フェンアミドン	ESI(+)	19.5	312.0	236.0	312.0	91.5	0.01	0.01	A	93	11
フェンピロキシメート(E)	ESI(+)	25.0	422.1	366.1	422.1	214.9	10	10	B	92	4
フェンピロキシメート(Z)	ESI(+)	23.9	422.1	366.1	422.1	214.9	10	10	B	87	3
フェンブコナゾール	ESI(+)	20.3	337.1	70.0	337.1	124.8	10	10	B	88	3
フェンプロバトリン	ESI(+)	24.0	350.2	124.9	350.2	97.0	25	25	B	85	2

表 1. 検討農薬の保持時間、測定イオンおよび添加回収試験結果 (つづき)

化合物	イオン化モード	保持時間 (分)	定量イオン		定性イオン		基準値 (ppm)	添加濃度 (mg/kg)	添加回収試験グループ ^{a)}	真度 (%)	併行精度 (%)
			プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)					
フェンメディファム	ESI (+)	18.6	318.2	168.0	318.2	136.0	0.01	0.01	A	62	7
ブタフェナシル	ESI (+)	20.4	492.1	331.0	492.1	349.0	0.01	0.01	A	88	12
ブプロフェジン	ESI (+)	23.2	306.2	200.9	306.2	115.9	20	20	B	82	4
フラチオカルブ	ESI (+)	23.3	383.2	194.8	383.2	252.0	0.1	0.1	A	70	9
フラメトピル	ESI (+)	17.6	334.0	156.9	334.0	290.0	0.1	0.1	A	84	5
フルフェナセット	ESI (+)	20.6	364.0	151.9	364.0	193.9	0.01	0.01	A	86	5
フルフェノクスロン	ESI (+)	23.9	489.0	157.9	489.0	140.9	15	15	B	88	4
フルリドン	ESI (+)	19.2	330.0	309.8	330.0	259.0	0.01	0.01	A	90	5
プロクロラズ	ESI (+)	21.7	376.0	307.8	376.0	70.0	0.1	0.1	A	79	2
プロバキザホップ	ESI (+)	23.5	444.0	99.9	444.0	70.0	0.01	0.01	A	83	5
プロバルギット	ESI (+)	23.7	368.2	231.0	368.2	175.0	5	5	B	86	3
プロビコナゾール	ESI (+)	21.3	342.1	158.8	342.1	69.1	0.1	0.1	A	80	2
プロフェノホス	ESI (+)	22.8	374.9	304.7	374.9	346.7	1	1	A	85	1
プロボキスル	ESI (+)	14.9	210.1	110.9	210.1	167.9	0.1	0.1	A	85	1
ヘキサフルムロン	ESI (-)	22.7	459.2	438.9	459.2	175.1	15	15	B	94	5
ヘキシチアゾクス	ESI (+)	24.0	353.1	227.9	353.1	167.8	35	35	B	88	3
ベンシクロン	ESI (+)	22.4	329.2	124.8	329.2	88.9	0.01	0.01	A	85	8
ベンゾフェナップ	ESI (+)	23.2	431.2	104.9	431.2	118.8	0.01	0.01	A	80	14
ベンダイオカルブ	ESI (+)	15.6	223.9	166.8	223.9	108.5	0.01	0.01	A	79	10
ベントキサゾン	ESI (+)	23.3	354.2	286.2	354.2	185.9	0.01	0.01	A	61	12
ホサロン	ESI (+)	21.7	368.0	181.8	368.0	110.8	2	2	B	84	7
ボスカリド	ESI (+)	19.5	343.0	307.1	343.0	271.1	0.01	0.01	A	70	9
マラチオン	ESI (+)	19.6	331.1	126.8	331.1	98.8	0.5	0.5	A	88	4
ミクロプタニル	ESI (+)	19.4	289.2	70.1	289.2	124.8	20	20	B	88	3
メソミル	ESI (+)	8.3	162.8	105.5	162.8	87.5	20	20	B	77	3
メタベンズチアズロン	ESI (+)	18.0	222.0	165.0	222.0	149.9	0.01	0.01	A	75	6
メタミドホス	ESI (+)	3.8	141.9	94.0	141.9	124.8	5	5	B	39	11
メチオカルブ	ESI (+)	19.5	226.3	169.4	226.3	121.4	0.01	0.01	A	86	14
メチダチオン	ESI (+)	18.3	303.0	144.8	303.0	84.9	1	1	A	86	3
メトキシフェノジド	ESI (+)	20.1	369.2	148.9	369.2	90.8	20	20	B	94	2
メバニピリム	ESI (+)	21.3	224.1	106.0	224.1	77.1	0.01	0.01	A	85	14
モノクロトホス	ESI (+)	8.3	224.1	192.8	224.1	126.8	0.1	0.1	A	43	3
モノリニユロン	ESI (+)	17.0	214.8	125.9	214.8	147.9	0.05	0.05	A	87	5
ラクトフェン	ESI (+)	23.2	479.0	343.9	479.0	222.9	0.01	0.01	A	88	12
リニユロン	ESI (+)	19.5	248.8	159.9	248.8	181.9	0.02	0.02	A	90	8
ルフェヌロン	ESI (-)	23.6	508.9	326.0	508.9	175.0	10	10	B	87	5
XMC	ESI (+)	16.4	180.1	122.9	180.1	107.8	10	10	B	86	2

^{a)} A: 試料 0.25 g 相当 /mL、B: 試料 0.005 g 相当 /mL

2) MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI (+)) およびネガティブモード (ESI (-))、測定モード: SRM (selected reaction monitoring)、キャピラリー電圧: 3 kV、ソース温度: 120°C、コーンガス流量: 50 L/h (N₂)、脱溶媒温度: 400°C、脱溶媒ガス流量: 800 L/h (N₂)、コリジョンガス流量: $\pm 3.1 \times 10^{-3}$ mbar (Ar)、測定イオン (m/z): 表 1 に示した。

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法の概略を図 1 に示した。

1) 抽出

試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容し、抽出液とした。

抽出液 20 mL (試料 1 g 相当) を採り、塩化ナトリウム 10 g およびリン酸緩衝液 (0.5 mol/L、pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とうした。これを毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い、分離したアセトニトリル層を分取した。

ODS ミニカラム (1000 mg) にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素气流により溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル 3 mL を加え、約 1 分間超音波処理して溶解後、トルエン 1 mL を加えてよく混合した。

2) 精製

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) およびグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にアセトニトリル/トルエン (3:1) を各 10 mL 注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し、1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄した) を注入した。全溶出液を 40°C 以

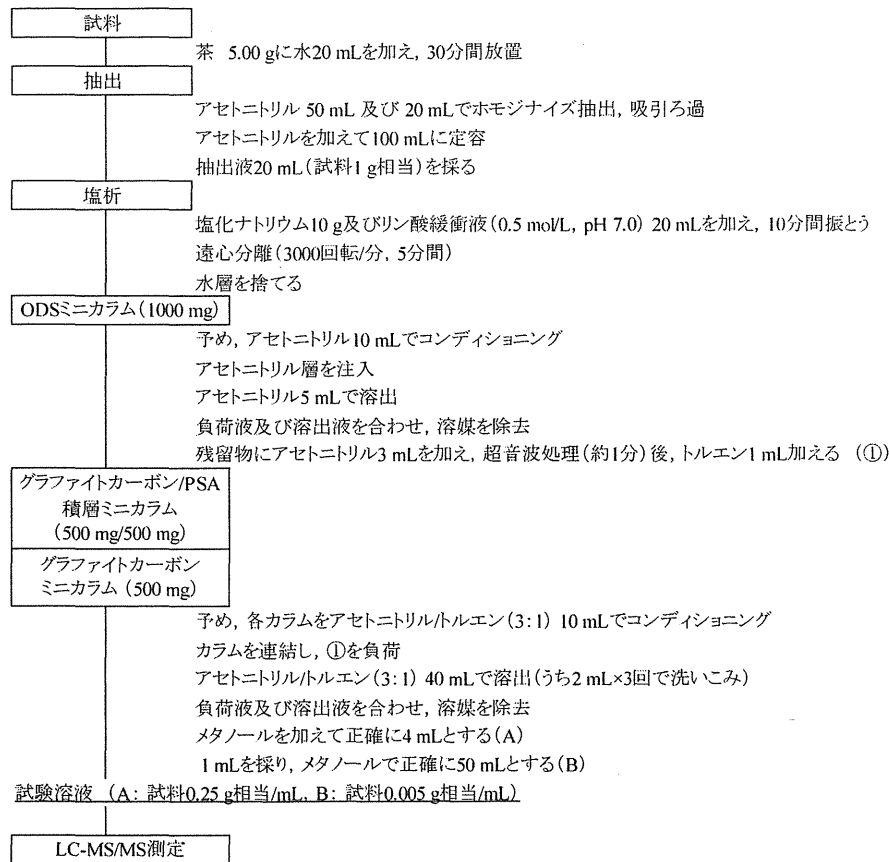


図1. 試験溶液調製方法の概要

下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノール4 mLに溶解したものを試験溶液(試料0.25 g相当/mL)とした。

7. 添加回収試験

基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。添加回収試験は、基準値が1 ppm以下の農薬(グループA)と1 ppmを超える農薬(グループB)の2つのグループに分け、それぞれについて行った。グループBの添加回収試験においては、6項で得られた溶液1 mLを採り、メタノールで正確に50 mLとしたものを試験溶液(試料0.005 g相当/mL)とした。なお、抽出操作は農薬の混合標準溶液0.5 mLを添加後、30分経過してから開始した。

8. 定量

添加回収試験における回収率12.5、25、50、75、100および150%相当濃度の標準溶液をメタノールで調製し、それぞれ5 μ LをLC-MS/MSに注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。試験溶液5 μ LをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。

9. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液(農薬の残留していないブランク試料を用い、本法に従って調製した試験溶液)100 μ Lをバイアル

に採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を添加回収試験における回収率100%相当濃度の溶媒標準溶液(溶媒で調製した標準溶液)100 μ Lに溶解してマトリックス標準溶液とした。マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液を交互に各2回測定し、溶媒標準溶液のピーク面積の平均値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の平均値の比を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。

III 結果および考察

1. 測定条件の検討

LC-MS/MS測定は、通知法¹⁾に示された条件で行った。なお、カラムの洗浄が不十分な場合、特に保持時間が長い化合物では直前に測定した試料マトリックスのキャリアオーバーにより面積低下などを起こす場合があることから、保持時間が最も長いトリデモルフが溶出した後、B液(5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液)100%で10分間のカラム洗浄を行った。

2. 試験溶液調製方法の検討

1) 抽出および塩析

抽出および塩析は通知法に従って行った。なお、塩析においてエマルジョンが生じた場合は、毎分3000回転で5分間

遠心分離を行った。

塩析における各農薬の回収率を検討した結果、ニテンピラム(64%) およびメタミドホス(42%)を除き、80%以上の回収率が得られた。ニテンピラムおよびメタミドホスの $\log P_{ow}$ は、それぞれ-0.66(25°C)³⁾ および-0.8(20°C)⁴⁾であり、いずれも極性が高いため、一部が水層へ移行したことが低回収率の原因と推察された。

2) カラム精製

(1) ODS ミニカラムによる精製

通知法¹⁾の「穀類、豆類および種実類の方法」では、低極性成分を除去するため、「果実および野菜の方法」にODSミニカラム精製が追加されている。茶の場合においてもODSミニカラムによる精製が有効であるかを検討した。茶のアセトニトリル抽出液を塩析後、得られたアセトニトリル層をODSミニカラム(1000 mg)に負荷したところ、黄色色素はカラムから溶出されたが、緑色色素はカラムに保持され、除去することができた。また、ODSミニカラムからの各農薬の回収率を検討した。通知法では、塩析後のアセトニトリル層を負荷した後、アセトニトリル2 mLで溶出することとされているが、検討した農薬の多くが2~5 mLの画分にも溶出が見られた(最大で16%:ハルフェンプロックス)ことから、アセトニトリル5 mLで溶出することとした。

(2) グラファイトカーボンミニカラムおよび陰イオン交換ミニカラムによる精製

通知法¹⁾ではグラファイトカーボン/ NH_2 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)による精製を採用しているが、色素等の夾雑成分の除去効果をグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)と比較したところ、グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラムの除去効果の方が高かったことから、本研究ではグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラムを用いた精製を検討した。

検討にあたって、ODSミニカラム精製後の溶出液を濃縮して得られた残留物をアセトニトリル/トルエン(3:1)2 mLで溶解しようとしたところ、残留物が濃縮容器表面に強く付着して回収することができなかった。緑茶は夾雑成分が非常に多く、特に大量に含まれるタンニン等の高極性の夾雑成分のアセトニトリル/トルエン(3:1)への溶解性が低いことが原因と推察された。そこで、アセトニトリル3 mLを加えて超音波処理を約1分間行った後、トルエン1 mLを加えてミニカラムへ

負荷することとした。アセトニトリルを加えて超音波処理することにより残留物は均一に分散した。その後、トルエンを加えることにより高極性の夾雑成分が析出したが、濃縮容器からの回収は可能であり、析出物によるミニカラムの目詰まり等の問題はなかった。

ミニカラム精製における色素の挙動を表2に示した。(a)グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)による精製のみでは、黄色色素を除去することはできなかった。また、充てん量の多い(b)グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(1000mg/500mg)および(c)グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(1000 mg/1000 mg)についても検討したが、いずれも黄色色素が溶出した。

そこで、黄色色素を除去するため、連結カラムでの精製を検討した。(d)グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)の下にグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)を連結したカラムおよび(e)グラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)の下にグラファイトカーボンミニカラム(500 mg)を連結したカラムを検討したところ、いずれも黄色色素はカラムに保持され、ほぼ無色の溶液が得られた。一方、(f)グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)の下にグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)を連結したカラムでは、アセトニトリル/トルエン(3:1)14 mL(うち4 mLで負荷)以上で黄色色素がカラムから溶出した。3種類の緑茶を用いて検討を行ったが、同様の結果が得られ、黄色色素の除去にはグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム(500 mg/500 mg)の下にグラファイトカーボンミニカラム(500 mg)を連結することが良いことが判明した。充填量の多い(b)や(c)よりも、連結カラム(d)や(e)を用いた方が色素の除去効果が高い理由は不明であるが、本研究では表2の(e)の条件を用いて精製を行うこととした。

条件(e)を用いて各農薬のカラムから溶出挙動について検討した結果、検討した農薬の多くはアセトニトリル/トルエン(3:1)24 mL(うち4 mLで負荷)で溶出した。しかし、クロルフルアズロンやピリジジフェン等の一部の農薬は24~44 mLの画分にも溶出が見られたことから、アセトニトリル/トルエン(3:1)44 mL(うち4 mLで負荷)で溶出することとした。

ODSミニカラム、およびグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムで精製

表2. ミニカラム精製における色素の挙動

ミニカラム		アセトニトリル/トルエン(3:1)			
		0-14 mL (負荷4 mL)	14-24 mL	24-34 mL	34-44 mL
上	下				
(a) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	—	黄色	黄色	—	—
(b) InertSep GC/PSA (1000 mg/500 mg, 6 mL)	—	無色	黄色	—	—
(c) InertSep GC/PSA (1000 mg/1000 mg, 12 mL)	—	薄黄色	薄黄色	無色	無色
(d) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	無色	無色	無色	無色
(e) InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	InertSep GC (500 mg, 6 mL)	無色	無色	無色	無色
(f) InertSep GC (500 mg, 6 mL)	InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg, 6 mL)	無色	黄色	—	—

—: 未実施

することにより、ほぼ無色の試験溶液が得られた。

3. 添加回収試験

市販の緑茶を用いて、135化合物を対象に基準値濃度 (0.01 ppm ~ 50 ppm) で5併行の添加回収試験を行った。添加濃度が10 ppmを超えるような高濃度での添加回収試験では、試料0.25 g相当/mLの試験溶液をLC-MS/MSに注入すると検出器においてイオンが飽和すると推測された。また、添加濃度が大幅に異なる化合物の添加回収試験を同時に行うことにより、化合物同士の干渉等の予期しない問題が発生することも考えられた。そこで本研究では、基準値が1 ppm以下の農薬(グループA)と1 ppmを超える農薬(グループB)の2つのグループに分けて添加回収試験を行った。グループBの添加回収試験においては、試験溶液(試料0.25 g相当/mL)を50倍希釈(試料0.005 g相当/mL)してLC-MS/MS測定を行った。

検討した135化合物のうち、真度(回収率)の目標値(70~120%)および併行精度(相対標準偏差、RSD)の目標値(0.001 ppm < 添加濃度 ≤ 0.01 ppm : 25%未満、0.01 ppm < 添加濃度 ≤ 0.1 ppm : 15%未満、添加濃度 > 0.1 ppm : 10%未満)⁵⁾を満たした化合物は120化合物であった(表1)。目標値を満たさなかった15化合物のうち、オキシカルボキシン、チアベンダゾールおよびピラゾリネートはグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラム精製、メタミドホスおよびニテンピラムは塩析での損失が、低回収率の主な原因と考えられた。また、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めたところ、目標値を満たさなかった15化合物中、グループAの7化合物(オキシカルボキシン、クロリダゾン、ジメチリモール、アベルメクチン B1a、テブチウロン、モノクロトホスおよびシクロプロトリン)が0.80未満となり、試料マトリックスによるイオン化阻害が低回収率の原因の一つであると推察された。試験溶液を50倍希釈してLC-MS/MS測定を行ったグループBの化合物は、マトリックスによる大きな影響は認められなかった。ブランク試験溶液を測定した結果、検討した135化合物いずれも、定量を妨害するピークの面積は添加試料から得られたピークの面積の1/10未満であり、選択性に問題はなかった。ブランク試験溶液(試料0.25 g相当/mL)を用いて試料中0.01 ppm相当のマトリックス標準溶液(0.0025 μg/mL)を調製し、S/N比を求めた結果、検討したすべての化合物でS/N ≥ 10であった。

IV 結論

厚生労働省通知の「LC-MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」¹⁾を改良し、緑茶を対象としてLC-MS/MSによる残留農薬の一斉試験法を開発した。本法は試料を水で膨潤した後、アセトニトリル抽出および塩析による水層分離を行い、ODSミニカラムおよびグラファイトカーボン/PSA積層ミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムで精製して、LC-MS/MSで定量および確認する方法である。ODS

ミニカラムおよび連結カラムで精製することにより、色素等の夾雑成分を効果的に除去でき、ほぼ無色の試験溶液が得られた。基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った結果、検討した135化合物中120化合物が真度および併行精度の目標値を満たした。また、検討したすべての化合物において選択性および定量感度に問題はなかったことから、本法は緑茶の食品衛生法の規格基準への適合性を判断するための試験法として適用可能であると考えられた。

本研究は「平成23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係る分析法開発事業」により実施した。

V 文献

- 1) 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11月29日、食安発第1129002号。
- 2) Fillion, J., Sauve, F., Selwyn, J.: Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, **83**, 698-713 (2000).
- 3) Tomlin, C. ed., "The Pesticide Manual", Fifteenth ed., BCPC Publications, 2009, p. 817-818.
- 4) Tomlin, C. ed., "The Pesticide Manual", Fifteenth ed., BCPC Publications, 2009, p. 752-753.
- 5) 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等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」平成19年11月15日、食安発第1115001号(平成22年12月24日一部改正、食安発1224第1号)。

Original Paper

Multi-Residue Analysis of Pesticides in Agricultural Products by Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry

(Received July 30, 2012)

Shizuka SAITO*, Satoru NEMOTO and Rieko MATSUDA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

The applicability of liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF-MS) for determining pesticide residues in agricultural products was investigated. TOF-MS conditions for monitoring target ions, together with their fragment ions, were carefully optimized. The developed LC-TOF-MS method was evaluated for 154 pesticides in soybean and spinach by using matrix-matched standards. No significant matrix effect was observed for most of the tested pesticides at a concentration level of 0.01 mg/kg, where the limits of quantification were less than 0.01 mg/kg for 145 of the 154 pesticides ($S/N > 10$). In addition, no significant interference was observed in the chromatograms of the blank extracts. These results indicate that LC-TOF-MS determination may become a powerful tool for multi-residue analysis of pesticides in agricultural products.

Key words: liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF-MS); pesticide residue; agricultural product; multi-residue analysis

Introduction

In 2006, Japan introduced a "positive list system" for the regulation of residual agricultural chemicals (*i.e.*, pesticides, feed additives, and veterinary drugs) in foods. The system prohibits the distribution of foods containing agricultural chemicals above their maximum residue limits (MRLs) or, if the MRL has not been established, a uniform limit of 0.01 mg/kg. So far, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan has set MRLs for approximately 820 agricultural chemicals. Therefore, there is an urgent need for a rapid and reliable multi-residue method for the determination of hundreds of agricultural chemicals in complex food matrices.

The use of liquid or gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS or GC-MS/MS) in the selective reaction monitoring (SRM) mode has become the dominant technique in pesticide residue analysis, achieving both high sensitivity and selectivity. The technique is, however, limited in the number of compounds that can be monitored in a single run, and it only provides information on the target compounds, and neglects non-target or unknown compounds.

Recently, time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) techniques such as LC-TOF-MS¹⁻⁶⁾ and GC-TOF-MS^{7, 8)}, have been applied to pesticide residue analysis in foods. The main advantage of the TOF-MS method is that there is theoretically no limitation in the number of compounds that can be analyzed simultaneously^{1), 9)}. Moreover, there is no need to optimize monitor ions,

cone voltages, or collision energies for each target compound separately, as is necessary for quadrupole tandem mass spectrometry in the SRM mode. Further, since full scan spectra are recorded, non-target or unknown compounds can be monitored simultaneously with the target compounds. On the other hand, in TOF-MS measurement, MS parameters do need to be optimized to cover a wide range of target compounds.

In this study, an LC-TOF-MS method for multi-residue analysis of pesticides in agricultural products was carefully optimized and evaluated for 154 pesticides in soybean and spinach by using matrix-matched standards. The results show the potential of LC-TOF-MS for determining pesticide residues in agricultural products.

Materials and Methods

1. Chemicals and reagents

Pesticide residue analysis grade acetonitrile and toluene, and LC-MS grade methanol and water were purchased from Kanto Chemical Co. (Japan). Pesticide residue analysis grade anhydrous sodium sulfate and sodium chloride, and JIS special grade ammonium acetate, dipotassium hydrogenphosphate and potassium dihydrogenphosphate were from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan). Water used for preparing the test solutions was purified with a distillation apparatus NZJ-2DSYW (Fujiwara Scientific Co., Japan). Leucine-enkephalin for the lock-mass internal calibration was purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

Phosphate buffer (0.5 mol/L, pH 7.0) was prepared as follows: dipotassium hydrogen phosphate (52.7 g) and potassium dihydrogen phosphate (30.2 g) were dissolved

* shizsaito@nihs.go.jp

in 500 mL of water, and adjusted to pH 7.0 by adding either 1 mol/L sodium hydroxide or 1 mol/L hydrochloric acid, and the final volume of the solution was made up to 1 L with water.

A total of 10 pesticide standards were used for optimization of the TOF-MS parameters. Azoxystrobin, MCPA, propoxycarbazone sodium, and iodosulfuron methyl sodium were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany); methomyl and acifluorfen, from Riedel-de Haën (Germany); hexythiazox, from Kanto Chemical Co.; simeconazole and 2,4-D, from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; and abamectin (avermectin B1a/avermectin B1b (92.3 : 6.9)), from Hayashi Pure Chemical Industries (Japan). Individual stock solutions (1 mg/mL) of the analytical standards were prepared in either acetonitrile or methanol, depending on their solubility. Working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with methanol.

The pesticide standard mixtures (PL2005 pesticide LC/MS Mix4–10, Table 1) were purchased from Hayashi Pure Chemical Industries, and were used for optimizing the LC-TOF-MS method.

2. Samples

Food samples were purchased from a market in Tokyo (Japan). Spinach was chopped using a food processor (Grindomix GM200, Retsch GmbH, Germany), and soybean was ground into small particles and passed through a 425 μm pore-size standard sieve using a centrifugal mill (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch GmbH).

3. Sample preparation

Test solutions of spinach and soybean were prepared via Japanese official method "Multiresidue Method I for Agricultural Chemicals by LC-MS (Agricultural Products)" (Shoku-An No. 1129002, November 29, 2005), except for a change in final volume, as follows: For spinach, a 20.0 g sample was weighed in a 250-mL glass tube. For soybean, a 10.0 g sample was weighed, and allowed to swell in 20 mL of water for 30 min. Both samples were then extracted with 50 mL of acetonitrile by using a homogenizer (PT 10–35 GT, Kinematica, Switzerland). The homogenate was filtered under vacuum through a pad of Celite (Celite 545, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), and the residue was re-homogenized with 20 mL of acetonitrile and filtered. The volume of the combined extract was made up to 100 mL with acetonitrile. A 20-mL aliquot of the extract was added to a 100-mL separating funnel containing 10 g of sodium chloride and 20 mL of phosphate buffer (0.5 mol/L, pH 7.0), and the funnel was shaken vigorously for 10 min. The acetonitrile layer was loaded on an ODS column (Mega Bond Elut C18, 1,000 mg, Agilent Technologies, USA) preconditioned with 10 mL acetonitrile, and eluted with an additional 2 mL of acetonitrile. The combined eluate was concentrated to approximately 2 mL with a rotary evaporator below 40°C, and evaporated to dryness under a stream of nitrogen.

The residue was subsequently re-dissolved in 2 mL of acetonitrile–toluene (3 : 1), loaded on a tandem graphite carbon/aminopropylsilanized silica gel column (InertSep GC/NH₂, 500 mg/500 mg, GL Sciences, Japan) preconditioned with 10 mL of acetonitrile–toluene (3 : 1), and eluted with an additional 20 mL of acetonitrile–toluene (3 : 1). The combined eluate was concentrated to approximately 2 mL with a rotary evaporator below 40°C, then evaporated to dryness under a stream of nitrogen, and the residue was redissolved in methanol (4 mL for spinach, and 2 mL for soybean).

4. LC-TOF-MS determination

4.1 LC conditions

LC-TOF-MS determinations were carried out using an Ultra-Performance LC system ACQUITY UPLC and time-of-flight mass spectrometer LCT Premier (Waters, USA). Chromatographic separation was performed on an ODS column (ACQUITY UPLC BEH C18, 100 mm \times 2.1 mm, i.d.: 1.7 μm , Waters) by gradient elution with 10 mmol/L ammonium formate (A) and methanol (B). The gradient used for evaluation of matrix effects was as follows: 0 min (A : B=95 : 5) \rightarrow 10 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 15 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 15.1 min (A : B=0 : 100) \rightarrow 25 min (A : B=0 : 100). The flow rate was set at 0.30 mL/min at a column temperature of 40°C. The injection volume was 3 μL .

4.2 MS conditions for optimization of TOF-MS parameters

The following MS conditions were used for optimization of the TOF-MS parameters: ionization mode: electrospray ionization positive mode (ESI(+)) or negative mode (ESI(-)); source temperature: 120°C; desolvation temperature: 350°C; desolvation gas: 600 L/hr (N₂); cone gas: 50 L/hr (N₂); scan range: m/z 50–1,000; W mode (>10,000 full width at half maximum (FWHM), ESI(+) m/z 556.2771, ESI(-) m/z 554.2615); lock mass: leucine-enkephalin (0.2 $\mu\text{g/mL}$, methanol–water (1 : 1)).

4.3 MS conditions for optimization of LC-TOF-MS method

Optimization of the LC-TOF-MS method was performed using capillary and cone voltages of 3,000 V and 25 V, respectively. The aperture 1 voltage was set at 5, 20, and 40 V. Monitor ions for quantification are shown in Table 1.

5. Evaluation of matrix effects

Matrix-matched standards were prepared as follows: blank extract solutions of 100 μL were evaporated to dryness under a stream of nitrogen, and the residue was re-dissolved in 100 μL of standard mixture (0.01 or 0.1 $\mu\text{g/mL}$) in methanol. The matrix effect was evaluated by comparing the peak areas of matrix-matched standards to those of standards in methanol. Dimethomorph, ferimzone, tralkoxydim, and tridemorph were quantified by summation of the peak areas of the isomers.

Table 1. Elemental compositions, retention times, calculated exact masses, matrix effects, and LOQs of the studied pesticides

Compound	Elemental composition ^{a)}	Retention time (min)	Type of ion	Calculated exact mass	Matrix effect ^{b)}				LOQ (mg/kg) ^{e)}	
					Soybean		Spinach		Soybean	Spinach
					0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)	0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)		
Acibenzolar- <i>S</i> -methyl	C ₈ H ₆ N ₂ O ₅ S ₂	8.3	[M+H] ⁺	211.0000	1.11	— ^c	1.09	— ^c	0.07	0.02
Acifluorfen	C ₁₄ H ₇ ClF ₃ NO ₅	8.0	[M-H] ⁻	359.9887	1.07	0.99	1.05	1.09	0.002	0.003
Aldicarb	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	5.9	[M+NH ₄] ⁺	208.1120	0.99	1.00	0.90	0.96	0.006	0.008
Aldoxycarb	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	3.3	[M+NH ₄] ⁺	240.1018	1.02	1.08	1.00	0.99	0.005	0.003
Anilofos	C ₁₃ H ₁₉ ClNO ₃ PS ₂	9.4	[M+H] ⁺	368.0311	1.07	1.01	0.95	1.11	0.002	0.001
Aramite	C ₁₅ H ₂₃ ClO ₄ S	10.3	[M+NH ₄] ⁺	352.1349	0.93	0.98	1.04	0.98	0.005	0.002
Avermectin B1a	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	11.1	[M+NH ₄] ⁺	890.5266	0.89	— ^c	0.98	— ^c	0.02	0.02
Azafenidin	C ₁₅ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₂	7.7	[M+H] ⁺	338.0463	1.00	0.95	0.92	1.02	0.003	0.003
Azamethiphos	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS	6.5	[M+H] ⁺	324.9815	0.82	0.53	0.83	0.94	0.004	0.002
Azimsulfuron	C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₆ S	4.6	[M+H] ⁺	425.1104	0.98	0.94	0.97	0.94	0.002	0.003
Azinphos-methyl	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	8.0	[M+NH ₄] ⁺	335.0401	1.02	1.07	0.93	1.01	0.002	0.002
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₆	8.2	[M+H] ⁺	404.1246	1.03	0.98	0.97	1.03	0.001	0.001
Bendiocarb	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	6.7	[M+NH ₄] ⁺	241.1188	0.99	1.01	0.90	0.99	0.005	0.002
Bensulfuron-methyl	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	6.7	[M+H] ⁺	411.0974	1.00	0.95	0.89	0.95	0.002	0.001
Benzofenap	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	10.0	[M+H] ⁺	431.0929	0.99	0.87	0.97	1.06	0.003	0.002
Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	8.4	[M+H] ⁺	343.0405	1.02	0.97	1.02	0.95	0.005	0.003
Bromoxynil	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	4.9	[M-H] ⁻	275.8483	1.05	0.98	0.93	1.18	0.002	0.002
Butafenacil	C ₂₀ H ₁₈ ClF ₃ N ₂ O ₆	8.8	[M+NH ₄] ⁺	492.1149	1.02	0.98	0.98	0.84	0.002	0.001
Carbaryl	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	7.1	[M+NH ₄] ⁺	219.1134	1.01	1.04	0.92	0.95	0.003	0.002
Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	6.7	[M+H] ⁺	222.1130	1.01	1.02	0.90	0.99	0.008	0.01
Carpropamid	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₃ NO	9.4	[M+H] ⁺	334.0532	1.04	0.95	1.04	0.64	0.006	0.002
Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	5.1	[M+H] ⁺	222.0434	0.98	1.01	0.98	0.97	0.001	0.001
Chlorimuron-ethyl	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₄ O ₆ S	6.3	[M+H] ⁺	415.0479	1.00	0.97	0.90	0.98	0.002	0.001
4-Chlorophenoxyacetic acid	C ₈ H ₇ ClO ₃	4.9	[M-H] ⁻	185.0005	1.05	— ^c	0.90	— ^c	0.02	0.02
Chloroxuron	C ₁₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	8.8	[M+H] ⁺	291.0900	1.02	0.99	1.00	0.91	0.001	0.001
Chlorsulfuron	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ O ₄ S	4.9	[M+H] ⁺	358.0377	1.01	0.82	0.96	0.91	0.003	0.002
Chromafenozide	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₃	8.8	[M+H] ⁺	395.2335	1.04	0.96	1.00	1.01	0.001	0.003
Cinosulfuron	C ₁₅ H ₁₉ N ₆ O ₇ S	4.7	[M+H] ⁺	414.1083	1.00	0.98	1.00	1.00	0.001	0.001
Clodinafop	C ₁₄ H ₁₁ ClFNO ₄	7.2	[M+H] ⁺	312.0439	1.08	0.90	0.95	0.96	0.006	0.005
Clofentezine	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄	9.6	[M+H] ⁺	303.0204	1.01	0.93	1.05	0.65	0.007	0.003
Clomeprop	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ NO ₂	10.2	[M+H] ⁺	324.0558	0.98	0.97	0.83	0.98	0.004	0.002
Cloprop	C ₉ H ₉ ClO ₃	5.5	[M-H] ⁻	199.0162	1.13	1.12	0.95	1.19	0.009	0.009
Cloquintocet-mexyl	C ₁₈ H ₂₂ ClNO ₃	10.3	[M+H] ⁺	336.1366	1.08	1.05	0.98	0.96	0.001	0.001
Cloransulam-methyl	C ₁₅ H ₁₃ ClFN ₅ O ₆ S	6.5	[M+H] ⁺	430.0388	1.03	1.01	0.91	0.73	0.003	0.004
Clothianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₃ S	4.6	[M-H] ⁻	248.0009	0.99	0.90	1.02	1.13	0.002	0.002
Cumyluron	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O	8.7	[M+H] ⁺	303.1264	1.03	0.92	0.97	1.00	0.001	0.001
Cyazofamid	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S	9.0	[M+H] ⁺	325.0526	0.94	0.92	1.00	0.97	0.006	0.002
Cyclanilide	C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃	7.3	[M-H] ⁻	271.9881	1.10	0.96	1.03	1.19	0.001	0.001
Cycloate	C ₁₁ H ₂₁ NOS	9.9	[M+H] ⁺	216.1422	1.01	0.99	1.19	0.96	0.007	0.002
Cycloprothrin	C ₂₆ H ₂₁ Cl ₂ NO ₄	10.7	[M+NH ₄] ⁺	499.1191	0.89	0.83	1.03	0.84	0.004	0.003
Cyclosulfamuron	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₆ S	7.2	[M+H] ⁺	422.1134	1.03	0.98	0.93	1.00	0.001	0.001
Cyflufenamid	C ₂₀ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₂	9.6	[M+H] ⁺	413.1288	1.02	0.89	1.02	1.01	0.001	0.001
Cyprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	9.4	[M+H] ⁺	226.1344	1.08	1.05	0.95	0.97	0.001	0.003
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	6.2	[M-H] ⁻	218.9616	1.06	1.03	0.96	1.05	0.008	0.008
Daimuron	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O	8.6	[M+H] ⁺	269.1654	0.99	0.96	0.97	1.02	0.002	0.001
Di-allate	C ₁₀ H ₁₇ Cl ₂ NOS	10.0	[M+H] ⁺	270.0486	0.96	0.89	1.07	0.74	0.008	0.01
Dichlorprop	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃	6.9	[M-H] ⁻	232.9772	1.07	0.92	1.06	1.30	0.005	0.005
Dicloromezine	C ₁₁ H ₈ Cl ₂ N ₂ O	9.2	[M+H] ⁺	255.0092	0.99	0.85	1.02	1.08	0.005	0.003
Diclosulam	C ₁₃ H ₁₀ Cl ₂ FN ₅ O ₃ S	6.7	[M+H] ⁺	405.9944	1.10	1.04	0.97	1.00	0.01	0.002
Diflubenzuron	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	9.1	[M+H] ⁺	311.0399	1.05	1.14	0.98	0.80	0.005	0.003
Dimethirimol	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	7.4	[M+H] ⁺	210.1606	1.06	1.01	0.90	0.99	0.004	0.001
Dimethomorph	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	8.3	[M+H] ⁺	388.1316	1.03	0.94	0.97	1.04	0.004	0.005
Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	7.8	[M+H] ⁺	233.0248	0.99	0.97	0.90	1.00	0.004	0.001
Epoxiconazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	9.0	[M+H] ⁺	330.0809	1.03	0.97	0.96	0.97	0.001	0.001
Ethametsulfuron-methyl	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O ₆ S	5.4	[M+H] ⁺	411.1087	0.97	0.97	0.91	0.99	0.001	0.001
Ethoxysulfuron	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	6.6	[M+H] ⁺	399.0974	1.01	0.99	0.90	0.98	0.001	0.001
Fenamidon	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	8.3	[M+H] ⁺	312.1171	1.01	0.95	0.96	0.98	0.001	0.001
Fenhexamid	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	8.8	[M+H] ⁺	302.0715	0.97	1.01	1.00	1.04	0.002	0.002

Table 1. Continued

Compound	Elemental composition ^{a)}	Retention time (min)	Type of ion	Calculated exact mass	Matrix effect ^{b)}				LOQ (mg/kg) ^{e)}	
					Soybean		Spinach		Soybean	Spinach
					0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)	0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)		
Fenobucarb	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	8.2	[M+NH ₄] ⁺	225.1603	0.96	1.10	0.98	0.99	0.003	0.003
Fenoxaprop-ethyl	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	10.1	[M+H] ⁺	362.0795	0.98	0.97	1.00	0.99	0.003	0.002
Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	9.2	[M+H] ⁺	302.1392	1.03	0.99	0.99	1.01	0.003	0.003
(E)-Fenpyroximate	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	10.7	[M+H] ⁺	422.2080	0.96	0.97	0.95	1.06	0.001	0.001
(Z)-Fenpyroximate	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	10.3	[M+H] ⁺	422.2080	1.03	0.99	0.95	0.97	0.001	0.001
Ferimzone	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	8.3	[M+H] ⁺	255.1610	0.99	0.99	0.96	1.00	0.002	0.001
Flazasulfuron	C ₁₃ H ₁₂ F ₃ N ₅ O ₅ S	5.0	[M+H] ⁺	408.0590	0.96	0.90	0.92	0.89	0.001	0.001
Florasulam	C ₁₂ H ₈ F ₃ N ₅ O ₅ S	4.8	[M+NH ₄] ⁺	377.0644	1.06	0.92	0.99	0.91	0.003	0.002
Fluazifop	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄	7.2	[M+H] ⁺	328.0797	1.06	0.97	0.95	0.98	0.002	0.002
Flufenoxuron	C ₁₄ H ₁₃ F ₃ N ₃ O ₂ S	8.9	[M+H] ⁺	364.0743	1.02	1.01	0.98	0.95	0.001	0.001
Flufenoxuron	C ₂₁ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₃	10.6	[M-H] ⁻	487.0284	1.07	1.04	— ^d	— ^d	0.002	— ^d
Flumetsulam	C ₁₂ H ₉ F ₂ N ₅ O ₂ S	3.7	[M+H] ⁺	326.0523	0.97	0.97	1.01	0.95	0.003	0.003
Fluridone	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ NO	8.0	[M+H] ⁺	330.1106	1.02	1.03	0.91	0.99	0.001	0.001
Fluroxypyr	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	4.2	[M-H] ⁻	252.9583	1.01	— ^c	0.85	— ^c	0.08	0.04
Fomesafen	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₆ S	8.0	[M+NH ₄] ⁺	456.0244	1.00	0.91	0.98	1.02	0.004	0.008
Foramsulfuron	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₇ S	4.7	[M+H] ⁺	453.1192	0.97	0.92	0.98	0.85	0.002	0.002
Forchlorfenuron	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O	7.7	[M+H] ⁺	248.0591	1.02	0.93	0.85	1.01	0.002	0.002
Furametpyr	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₂	7.5	[M+H] ⁺	334.1322	1.05	1.01	0.90	0.98	0.001	0.001
Furathiocarb	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S	10.1	[M+H] ⁺	383.1641	1.00	1.03	0.99	0.99	0.001	0.001
Gibberellic acid	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	4.3	[M-H] ⁻	345.1338	0.96	— ^c	0.82	— ^c	0.09	0.08
Halosulfuron-methyl	C ₁₃ H ₁₅ ClN ₆ O ₇ S	6.0	[M+H] ⁺	435.0490	0.99	0.95	0.88	0.94	0.001	0.001
Haloxyfop	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	8.2	[M+H] ⁺	362.0407	1.10	0.98	1.00	1.22	0.007	0.005
Hexaflumuron	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ F ₆ N ₂ O ₃	9.9	[M-H] ⁻	458.9738	1.10	0.92	1.01	1.10	0.001	0.001
Hexythiazox	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	10.5	[M+H] ⁺	353.1091	0.90	0.88	0.84	0.90	0.003	0.002
Imazalil	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	9.4	[M+H] ⁺	297.0561	1.07	1.01	0.99	0.99	0.001	0.001
Imazaquin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃	4.8	[M+H] ⁺	312.1348	1.00	1.00	1.01	0.96	0.001	0.001
Imazosulfuron	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₆ O ₅ S	5.1	[M+H] ⁺	413.0435	0.97	0.93	0.85	0.96	0.001	0.001
Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	4.6	[M+H] ⁺	256.0601	0.99	0.80	1.01	0.83	0.003	0.002
Indanofan	C ₂₀ H ₁₇ ClO ₃	9.0	[M+H] ⁺	341.0944	0.97	— ^c	1.03	— ^c	0.06	0.04
Indoxacarb	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	9.8	[M+H] ⁺	528.0785	0.95	0.83	1.16	1.02	0.005	0.003
Iodosulfuron-methyl	C ₁₄ H ₁₄ IN ₅ O ₆ S	6.0	[M+H] ⁺	507.9788	0.94	0.93	0.86	0.96	0.002	0.003
Ioxynil	C ₇ H ₃ L ₂ NO	6.0	[M-H] ⁻	369.8226	1.02	0.96	0.98	1.18	0.001	0.001
Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	8.8	[M+H] ⁺	321.2178	1.04	1.00	1.00	1.05	0.001	0.002
Isoxaflutole	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄ S	7.7	[M-H] ⁻	358.0361	1.12	0.82	1.10	0.93	0.004	0.004
Lactofen	C ₁₉ H ₁₅ ClF ₃ NO ₇	10.2	[M+NH ₄] ⁺	479.0833	0.98	0.92	1.03	1.04	0.002	0.002
Linuron	C ₈ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	8.3	[M+H] ⁺	249.0198	1.15	0.93	1.04	1.06	0.005	0.005
Lufenuron	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₃ N ₂ O ₃	10.3	[M-H] ⁻	508.9706	1.10	1.05	1.03	1.20	0.001	0.001
MCPA	C ₉ H ₉ ClO ₃	6.2	[M-H] ⁻	199.0162	1.07	0.98	0.96	1.16	0.007	0.007
MCPB	C ₁₁ H ₁₃ ClO ₃	7.5	[M-H] ⁻	227.0475	1.19	— ^c	1.12	— ^c	0.07	0.03
Mecoprop	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	6.8	[M-H] ⁻	213.0318	1.06	0.84	1.02	1.09	0.009	0.008
Mepanipyrim	C ₁₄ H ₁₃ N ₃	8.8	[M+H] ⁺	224.1188	1.06	1.01	0.95	0.99	0.001	0.002
Mesosulfuron-methyl	C ₁₇ H ₂₁ N ₆ O ₉ S ₂	5.0	[M+H] ⁺	504.0859	0.92	0.94	0.82	0.57	0.002	0.001
Methabenzthiazuron	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ OS	7.5	[M+H] ⁺	222.0701	1.05	1.01	0.90	1.07	0.004	0.004
Methiocarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	8.4	[M+NH ₄] ⁺	243.1167	1.01	0.97	0.95	1.05	0.005	0.005
Methomyl	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	3.7	[M+H] ⁺	163.0541	1.00	1.05	1.00	0.98	0.005	0.005
Methoxyfenozide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	8.6	[M+H] ⁺	369.2178	1.02	0.92	0.98	1.00	0.001	0.003
Metosulam	C ₁₄ H ₁₃ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	6.2	[M+H] ⁺	418.0144	1.03	0.96	0.88	0.97	0.002	0.001
Metsulfuron-methyl	C ₁₄ H ₁₅ N ₆ O ₆ S	4.4	[M+H] ⁺	382.0821	1.00	0.81	0.96	0.71	0.001	0.002
Monolinuron	C ₉ H ₁₁ ClN ₃ O ₂	7.2	[M+H] ⁺	215.0587	0.89	1.03	0.91	0.95	0.005	0.003
1-Naphthylacetic acid	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	5.4	[M+NH ₄] ⁺	204.1025	0.92	0.73	0.89	0.70	0.006	0.006
Naproanilide	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂	9.1	[M+H] ⁺	292.1338	1.01	0.89	0.99	0.95	0.002	0.004
Naptalam	C ₁₈ H ₁₃ NO ₃	5.9	[M+H] ⁺	292.0974	0.97	0.97	0.89	0.91	0.004	0.004
Novaluron	C ₁₇ H ₉ ClF ₃ N ₂ O ₄	9.9	[M-H] ⁻	491.0045	1.06	0.92	1.08	1.16	0.001	0.001
Oryzalin	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	9.0	[M-H] ⁻	345.0869	1.14	1.00	1.04	1.13	0.007	0.001
Oxamyl	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	3.4	[M+NH ₄] ⁺	237.1021	1.03	1.06	1.04	0.95	0.009	0.008
Oxaziclomefone	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	10.1	[M+H] ⁺	376.0871	1.02	1.00	1.00	0.96	0.001	0.001
Oxycarboxin	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃ S	5.4	[M+NH ₄] ⁺	285.0909	1.01	0.91	0.87	0.97	0.001	0.001
Pencycuron	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O	9.7	[M+H] ⁺	329.1421	1.05	0.94	0.96	1.01	0.002	0.001
Penoxsulam	C ₁₆ H ₁₄ F ₅ N ₅ O ₅ S	6.3	[M+H] ⁺	484.0714	1.02	1.00	0.95	0.96	0.001	0.001

Table 1. Continued

Compound	Elemental composition ^{a)}	Retention time (min)	Type of ion	Calculated exact mass	Matrix effect ^{b)}				LOQ (mg/kg) ^{c)}	
					Soybean		Spinach		Soybean	Spinach
					0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)	0.1 (µg/mL)	0.01 (µg/mL)		
Pentoxazone	C ₁₇ H ₁₇ ClFNO ₄	10.1	[M+NH ₄] ⁺	371.1174	0.91	— ^c	0.92	— ^c	0.07	0.08
Phenmedipham	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	8.0	[M+NH ₄] ⁺	318.1454	1.09	1.07	0.97	1.00	0.002	0.002
Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	7.4	[M+H] ⁺	239.1508	1.05	0.91	0.90	0.98	0.003	0.001
Primisulfuron-methyl	C ₁₅ H ₁₂ F ₄ N ₄ O ₇ S	7.2	[M-H] ⁻	467.0285	1.18	1.05	1.05	1.29	0.001	0.001
Propaquizafop	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	10.2	[M+H] ⁺	444.1326	1.02	1.02	0.98	0.96	0.001	0.001
Propoxycarbazon	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	5.3	[M+NH ₄] ⁺	416.1240	1.03	0.83	0.81	0.48	0.001	0.001
Prosulfuron	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₄ S	6.8	[M+H] ⁺	420.0953	1.00	0.96	0.87	0.96	0.001	0.001
Pyraclostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	9.5	[M+H] ⁺	388.1064	1.08	1.07	0.98	0.99	0.001	0.001
Pyrazolynate	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₄ S	9.7	[M+H] ⁺	439.0286	0.92	0.70	0.90	0.85	0.005	0.003
Pyrazosulfuron-ethyl	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₇ S	5.7	[M+H] ⁺	415.1036	0.94	0.86	0.87	1.00	0.002	0.001
Pyriftalid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	8.0	[M+H] ⁺	319.0753	1.04	1.00	0.95	1.02	0.001	0.001
Quizalofop-ethyl	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	10.1	[M+H] ⁺	373.0955	0.96	0.97	0.99	1.01	0.003	0.003
Silafluofen	C ₂₅ H ₂₉ FO ₂ Si	11.9	[M+NH ₄] ⁺	426.2265	0.84	1.02	1.04	1.02	0.005	0.003
Simeconazole	C ₁₄ H ₂₀ FN ₃ OSi	8.9	[M+H] ⁺	294.1438	1.01	1.00	0.94	1.06	0.001	0.001
Spinosyn A	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	11.2	[M+H] ⁺	732.4687	0.86	0.87	0.84	0.83	0.004	0.005
Spinosyn D	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀	11.4	[M+H] ⁺	746.4843	0.99	0.80	0.88	0.99	0.004	0.006
Sulfentrazone	C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ F ₂ N ₄ O ₃ S	6.6	[M+NH ₄] ⁺	404.0162	1.03	1.04	0.92	1.28	0.002	0.002
Sulfosulfuron	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O ₇ S ₂	5.1	[M+H] ⁺	471.0757	1.07	0.93	0.93	1.02	0.007	0.005
Tebufenozide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	9.2	[M+H] ⁺	353.2229	1.03	1.07	1.00	1.04	0.001	0.001
Tebuthiuron	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	6.9	[M+H] ⁺	229.1123	1.01	0.99	0.87	0.95	0.001	0.002
Teflubenzuron	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	10.4	[M-H] ⁻	378.9664	1.07	0.83	1.10	1.11	0.002	0.001
Tetrachlorvinphos	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	9.2	[M+NH ₄] ⁺	383.9307	1.04	1.03	0.93	1.01	0.002	0.002
Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	6.1	[M+H] ⁺	202.0439	1.00	1.00	0.88	1.02	0.001	0.001
Thiacloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	5.5	[M+H] ⁺	253.0315	1.00	0.99	0.92	0.96	0.003	0.002
Thiamethoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	3.9	[M+NH ₄] ⁺	309.0537	1.00	1.02	1.00	0.88	0.002	0.002
Thidiazuron	C ₉ H ₈ N ₄ OS	6.7	[M-H] ⁻	219.0341	1.01	0.90	1.02	1.33	0.001	0.001
Thifensulfuron-methyl	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₆ S ₂	4.4	[M+H] ⁺	388.0386	1.01	0.92	0.97	0.95	0.001	0.001
Thiodicarb	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	7.2	[M+H] ⁺	355.0568	1.07	0.93	0.92	0.99	0.002	0.005
Tralkoxydim	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	7.6	[M-H] ⁻	328.1913	1.10	0.89	1.05	0.97	0.007	0.007
Triasulfuron	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S	5.2	[M+H] ⁺	402.0639	0.94	0.83	0.63	0.57	0.001	0.001
Tribenuron-methyl	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₆ S	5.0	[M+H] ⁺	396.0978	1.06	1.14	0.88	0.98	0.002	0.001
Triclopyr	C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃	6.6	[M-H] ⁻	253.9179	1.07	— ^c	1.05	— ^c	0.02	0.02
Tridemorph	C ₁₉ H ₃₉ NO	11.8	[M+H] ⁺	298.3110	0.98	1.02	1.01	0.98	0.004	0.004
Trifloxysulfuron	C ₁₄ H ₁₄ F ₃ N ₅ O ₆ S	5.3	[M+H] ⁺	438.0695	1.00	0.95	0.84	0.87	0.001	0.001
Triflumuron	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	9.6	[M-H] ⁻	357.0254	1.13	0.95	1.14	1.19	0.001	0.001
Triflusulfuron-methyl	C ₁₇ H ₁₉ F ₃ N ₆ O ₆ S	7.0	[M+H] ⁺	493.1117	1.03	1.00	0.90	0.92	0.001	0.001
Triticonazole	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O	8.9	[M+H] ⁺	318.1373	1.00	0.98	0.95	1.04	0.002	0.002

^{a)} Elemental composition of the neutral molecule.

^{b)} Peak area ratio of matrix-matched standard to that of standard in pure solvent.

^{c)} Not determined. Signal-to-noise ratio (*S/N*) < 10.

^{d)} Found in blank sample.

^{e)} Limits of quantification (LOQs) were calculated as the analyte concentration that gave *S/N*=10 in a matrix-matched standard.

Results and Discussions

1. Optimization of TOF-MS parameters for quantifications

Since pesticides display a wide variety of structures and molecular weights, it can be speculated that the optimum TOF-MS parameters such as cone voltage and capillary voltage, differ for each pesticide. Because the full spectrum is recorded at all times, however, it is difficult to set these parameters for each pesticide separately, and that is why it is necessary to determine the optimum MS parameters covering a broad range of pesticides. Therefore, in this study, the three MS param-

eters of capillary voltage, cone voltage, and aperture 1 voltage, were optimized by flow injection analyses of 10 representative pesticides (5 pesticides for ESI(+)) and 5 pesticides for ESI(-)) using 10 mmol/L ammonium formate-methanol (1:1) as a mobile phase (flow rate 0.05 mL/min, injection volume 3 µL). The selected pesticides ranged from relatively low molecular weight (MW) to high MW, i.e., methomyl (MW=162), simeconazole (MW=293), hexythiazox (MW=353), azoxystrobin (MW=403), and avermectin B1a (MW=873) for ESI(+) mode, and MCPA (MW=201), 2,4-D (MW=221), acifluorfen (MW=362), propoxycarbazon (MW=398), and iodosulfuron methyl (MW=507) for ESI(-) mode. First, the effect

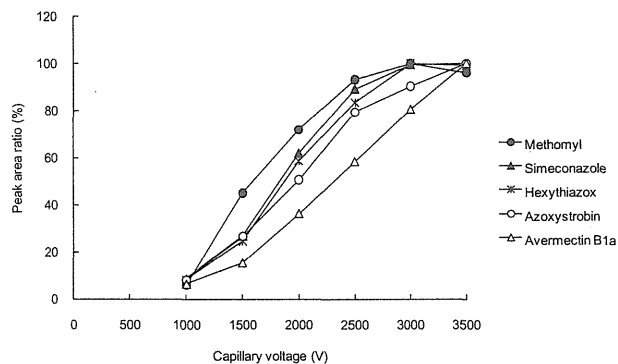


Fig. 1. Effect of capillary voltage on peak areas of methomyl, simeconazole, hexythiazox, azoxystrobin, and avermectin B1a

Cone voltage 25 V, aperture 1 voltage 5 V.

The maximum peak area obtained by varying the capillary voltage was taken as 100%.

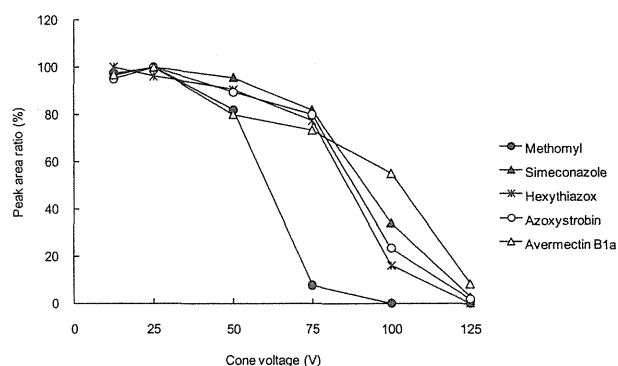


Fig. 2. Effect of cone voltage on peak areas of methomyl, simeconazole, hexythiazox, azoxystrobin, and avermectin B1a

Capillary voltage 3000 V, aperture 1 voltage 5 V.

The maximum peak area obtained by varying the cone voltage was taken as 100%.

of capillary voltage on peak areas was examined by varying the capillary voltage from 1,000 to 3,500 V. The cone voltages were set at 25 and 50 V, while aperture 1 voltages were 5 and 15 V. The results showed that an increase in capillary voltage from 1,000 to 3,000 V led to an increase in the relative peak areas of the tested pesticides, with a maximum at 3,000–3,500 V in both ESI(+) and ESI(−) modes (Fig. 1). Therefore, a capillary voltage of 3,000 V was applied in further experiments.

Subsequently, the effect of cone voltage on the peak areas was investigated in the range of 12.5 to 125 V, while the aperture 1 voltage was set at 5 and 15 V. The maximum peak area of the tested pesticides was obtained at a cone voltage between 12.5–25 V in ESI(+) mode (Fig. 2), and between 12.5–50 V in ESI(−) mode. A cone voltage of 25 V was therefore considered to be optimal.

Finally, the effect of aperture 1 voltage on the peak areas was investigated by varying the aperture 1 voltage from 5 to 60 V (the capillary and cone voltages were fixed at 3,000 and 25 V, respectively). In ESI(+) mode,

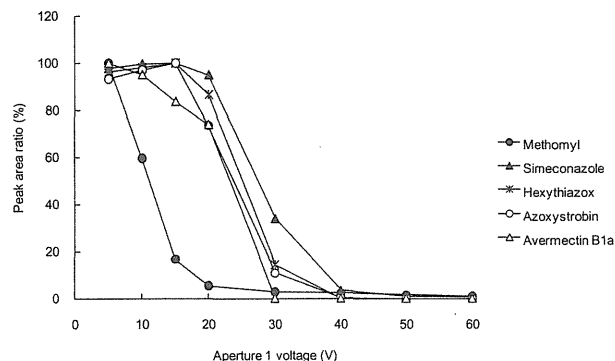


Fig. 3. Effect of aperture 1 voltage on peak areas of methomyl, simeconazole, hexythiazox, azoxystrobin, and avermectin B1a

Capillary voltage 3,000 V, cone voltage 25 V.

The maximum peak area obtained by varying the aperture 1 voltage was taken as 100%.

the results showed that the peak areas of the tested pesticides were highest at an aperture 1 voltage of 5–15 V, and decreased at higher voltages (Fig. 3). In the case of methomyl, the peak area significantly decreased above 10 V due to fragmentation. In ESI(−) mode, the peak areas were highest at an aperture 1 voltage of 5–10 V, and decreased above 30 V. Because a high aperture 1 voltage causes fragmentation leading to a decrease in peak areas, an aperture 1 voltage of 5 V was chosen for quantification for both ionization modes.

2. Optimization of TOF-MS parameters for monitoring fragment ions

LC-TOF-MS with high resolution can differentiate between co-eluting compounds based on the combination of accurate mass and retention time information. In complex food matrices, however, it is possible to find co-eluting compounds whose mass is similar to that of the target compounds for a given retention time. To establish a reliable LC-TOF-MS method, therefore, additional information is required to confirm the identity of the compound. Compounds containing chlorine, bromine, or sulfur can be differentiated by their isotopic profile, whereas for molecules that do not contain such isotopes, additional structural information can be obtained from in-source collision-induced dissociation (CID) fragmentation, which can be induced by setting a high aperture 1 voltage. The aperture 1 voltage was thus optimized for the monitoring of fragment ions using the same set of 10 pesticides as used for optimization of TOF-MS parameters for quantifications. In case of methomyl, the precursor ion $[M+H]^+$ was observed at an aperture 1 voltage of 5 V, whereas two fragment ions, $[C_3H_8NOS]^+$ (calculated mass (calcd.) 106.0327) and $[C_3H_6NS]^+$ (calcd. 88.0221), were observed at 15 V, along with $[M+H]^+$ (Fig. 4). The peak areas of both fragment ions were highest at an aperture 1 voltage of 15–20 V (Fig. 5). In the case of acifluorfen, $[M-H]^-$ and its isotopic ion ($[C_{14}H_6^{37}ClF_3NO_5]^-$, calcd. 361.9857) were observed at an aperture 1 voltage of 5 V, while two fragment ions, $[C_{13}H_6ClF_3NO_3]^-$ (calcd.

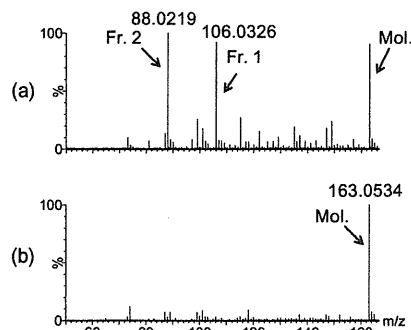


Fig. 4. Mass spectra of methomyl at (a) a high aperture 1 voltage of 15 V and (b) low aperture 1 voltage of 5 V

Mol.: $[M+H]^+$, Fr.1: $[C_3H_8NOS]^+$, Fr.2: $[C_3H_6NS]^+$.

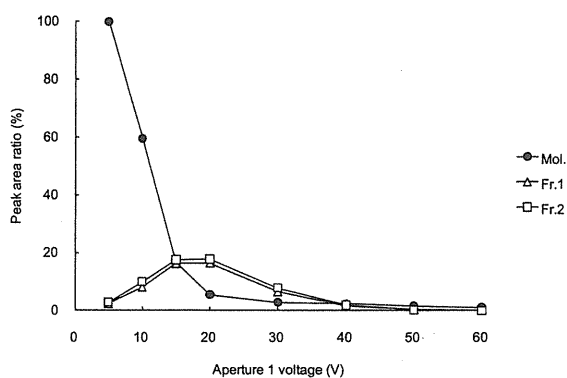


Fig. 5. Effect of the aperture 1 voltage on peak areas of methomyl and its fragment ions

Mol.: $[M+H]^+$, Fr.1: $[C_3H_8NOS]^+$, Fr.2: $[C_3H_6NS]^+$. The peak area of Mol. at an aperture 1 voltage of 5 V was taken as 100%.

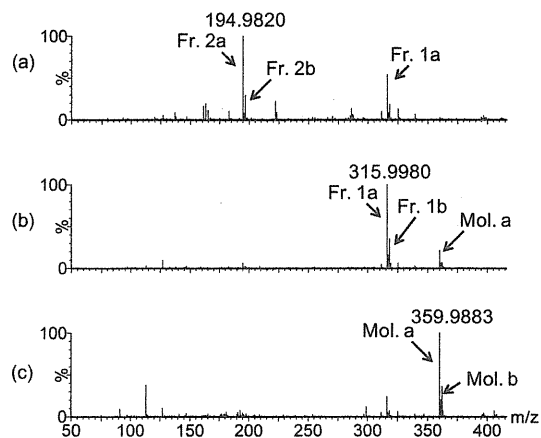


Fig. 6. Mass spectra of acifluorfen at aperture 1 voltages of (a) 50 V, (b) 20 V, and (c) 5 V

Mol.a: $[M-H]^-$, Mol.b: $[C_{14}H_6^{37}ClF_3NO_5]^-$, Fr.1a: $[C_{13}H_6ClF_3NO_3]^-$, Fr.1b: $[C_{13}H_6^{37}ClF_3NO_3]^-$, Fr.2a: $[C_7H_3ClF_3O]^-$, Fr.2b: $[C_7H_3^{37}ClF_3O]^-$.

315.9988) and $[C_7H_3ClF_3O]^-$ (calcd. 194.9825), and their isotopic ions were observed at voltages of 20 V and 50 V (Fig. 6). The maximum peak areas of the two fragment ions, $[C_{13}H_6ClF_3NO_3]^-$ and $[C_7H_3ClF_3O]^-$, were found at

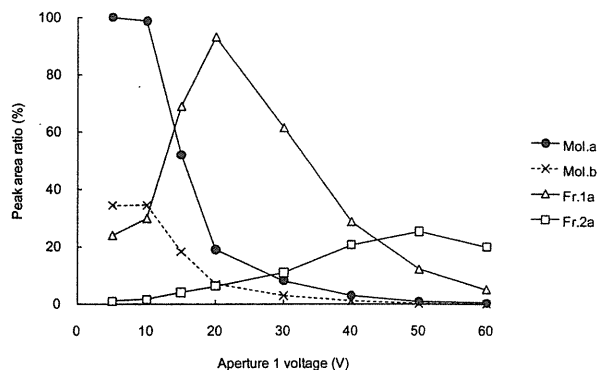


Fig. 7. Effect of the aperture 1 voltage on peak areas of acifluorfen, its isotopic ion, and fragment ions

Mol.a: $[M-H]^-$, Mol.b: $[C_{14}H_6^{37}ClF_3NO_5]^-$, Fr.1a: $[C_{13}H_6ClF_3NO_3]^-$, Fr.2a: $[C_7H_3ClF_3O]^-$.

The peak area of Mol.a at aperture 1 voltage of 5 V was taken as 100%.

20 and 50 V, respectively (Fig. 7). The maximum peak areas of the fragment ions of the other eight pesticides were also found at aperture 1 voltages from 20–50 V. Based on these results, 5 V was considered to be the optimal aperture 1 voltage for quantification, while 20 and 40 V were chosen for confirmation *via* CID fragmentation.

3. Optimization of LC-TOF-MS method

The LC-TOF-MS method was optimized by analyzing a standard mixture of 154 pesticides (0.1 μ g/mL) (for a list of pesticides, see Table 1) in both ESI(+) and ESI(-) modes, using an ODS column with 10 mmol/L ammonium formate and methanol as a mobile phase. The peaks with highest signal-to-noise (*S/N*) ratios among the observed ions, (*i.e.*, $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, and $[M-H]^-$), were selected for quantification. As a result, 128 pesticides out of 154 tested pesticides were quantified in ESI(+) mode, and 26 pesticides in ESI(-) mode. Mass accuracy was within ± 5 ppm for all the tested pesticides in both ESI(+) and ESI(-) modes.

Matrix effects, *i.e.*, the ion suppression or enhancement caused by co-eluting matrices, frequently occur in LC-MS when using ESI mode. However, they can be reduced or eliminated by optimization of LC methods, sample cleanup, or by changing the type of ionization. Therefore, in this study, the LC conditions for chromatographic separation were optimized.

The maximum pressures at flow rates of 0.2, 0.3, and 0.4 mL/min were approximately 7,500, 10,700, and 13,600 psi, respectively (column temperature 40°C). Although the LC instrument used can be operated at a maximum of 15,000 psi, the flow rate in this study was set at 0.3 mL/min, since it is known that the pressure may increase in the presence of matrices.

The matrix effects with two gradient conditions, *i.e.*, gradient method (a) [0 min (A : B=95 : 5) \rightarrow 10 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 15 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 15.1 min (A : B=0 : 100) \rightarrow 25 min (A : B=0 : 100)], and gradient method (b)

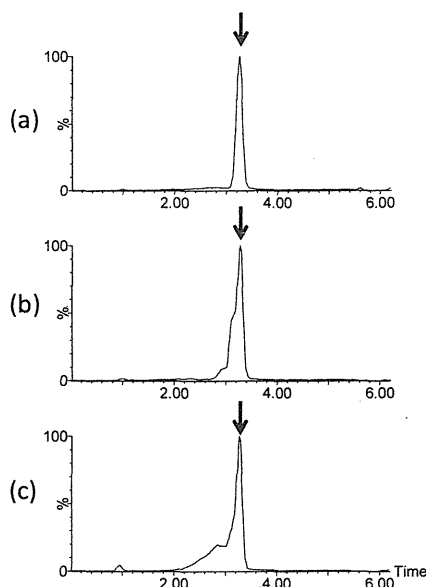


Fig. 8. Comparison of peak shapes of aldoxycarb with injection volume (a) 3 μL , (b) 5 μL , and (c) 7 μL

Concentration 0.1 $\mu\text{g/mL}$, m/z 240.1018, mass window 20 mDa.

[0 min (A : B=95 : 5) \rightarrow 5 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 10 min (A : B=5 : 95) \rightarrow 10.1 min (A : B=0 : 100) \rightarrow 20 min (A : B=0 : 100)], were evaluated by comparing the peak areas of a matrix-matched standard of soybean (0.1 $\mu\text{g/mL}$) with the peak areas of the standards in pure solvent (0.1 $\mu\text{g/mL}$). Using gradient method (a), the peak area ratios of all of the tested pesticides were in the range of 0.82 to 1.15, and no significant matrix effect was observed. On the other hand, using the shorter gradient method (b), the peak area ratios of 3 pesticides (azame-thiphos, pyrazolynate, and pyrazosulfuron ethyl) were lower than 0.80 while that for acibenzolar-*S*-methyl was above 1.20, suggesting that gradient method (b) was more likely to cause matrix effects than gradient method (a). Therefore, gradient method (a) was chosen for the separation.

To optimize LC-TOF-MS conditions, attention was also paid to the injection solvent and its volume. Taking into account the solubility of hydrophobic target pesticides or co-extracts, we chose methanol as the injection solvent. Since methanol is less polar solvent than the initial mobile phase, it may cause peak broadening of polar pesticides at high injection volumes. A comparison of the peak shapes of aldoxycarb at 3, 5, and 7 μL injection volumes showed that a good peak shape was observed only at 3 μL injection volume (Fig. 8). Based on this result, 3 μL was used as the injection volume.

4. Setting mass windows

Although setting of a narrow mass window for extracting chromatograms leads to a reduction of the chemical noise, and thus increases selectivity, it may also remove target compounds from the chromatogram, and this is especially relevant for low intensity ions. To select the optimal mass window, the standard mixture of 154 pes-

ticides (0.1 $\mu\text{g/mL}$) was analyzed 5 times and the relative standard deviations (RSD) of the peak areas were compared for mass windows of 5, 10, and 20 mDa. The use of mass windows of 10 or 20 mDa led to RSDs below 9% for the peak areas of all of the tested pesticides, whereas the peak area RSD of 6 pesticides was over 10% using a 5 mDa mass window. A mass window of 20 mDa was, therefore, used for quantification.

5. Matrix effects, LOQ, and selectivity

To evaluate the matrix effect in the optimized LC-TOF-MS method, matrix-matched standards were prepared from the soybean and spinach extracts, and the peak areas of the matrix-matched standards were compared with those of the standards in pure solvent. In addition, based on an S/N ratio of 10, the limits of quantification (LOQs) were estimated by LC-TOF-MS analysis of the matrix-matched standards. Since S/N ratios depend on the mass window used for extracting chromatograms, the LOQs were calculated by setting the mass window of 20 mDa, which was also used for quantification.

At a concentration level of 0.1 mg/kg, the ratios of the peak areas of matrix-matched standards to that of standards in pure solvent were within the range of 0.80 to 1.20 for spinach and soybean, except for triasulfuron and flufenoxuron in spinach. No significant matrix effect was thus observed for most of the tested pesticides (Table 1). In the case of triasulfuron in the spinach extract, the peak area ratio was 0.63, indicating ion suppression due to co-eluting matrices in the sample solution.

The chromatogram of the blank spinach extract showed a peak at the same retention time as flufenoxuron. The mass spectrum at an aperture 1 voltage of 5 V showed two signals at m/z 487.0282 and m/z 489.0249, whose accurate mass matched well with the precursor ion of flufenoxuron (calcd. 487.0284) as well as with its isotopic ion $[\text{C}_{21}\text{H}_{10}^{37}\text{ClF}_6\text{N}_2\text{O}_3]^-$ (calcd. 489.0255) (mass accuracy was -0.4 and -1.2 ppm, respectively). In addition, the mass spectrum at an aperture 1 voltage of 40 V showed a signal at m/z 156.0257, corresponding to the characteristic fragment ion of flufenoxuron $[\text{C}_7\text{H}_4\text{F}_2\text{NO}]^-$ (calcd. 156.0261) (mass accuracy -2.6 ppm), which lends further support to the presence of flufenoxuron in the blank spinach extract. Its concentration in spinach was 0.6 mg/kg, which is well below the Japanese MRL (10 mg/kg). These results demonstrate the utility of obtaining fragmentation information by in-source CID.

At a concentration level of 0.01 mg/kg, out of the 154 pesticides analyzed, 145 showed peak areas of $S/N > 10$ in either ESI(+) or ESI(-) mode (Table 1). In addition, the ratios of the peak areas of matrix-matched standards to those of the standards in pure solvent were within the range of 0.80 to 1.20 for most of the tested pesticides (soybean extract: 142 pesticides, spinach extract: 130 pesticides). Furthermore, no significant interfering peak was observed in the chromatogram of the blank extracts, indicating high selectivity of the method. Together, the results indicate that, although further

studies are warranted, the LC-TOF-MS multi-residue method can be successfully applied to the determination of pesticides in foods at concentration levels as low as 0.01 mg/kg, which is the uniform limit for agricultural chemicals in Japan.

Conclusion

In this study, LC-TOF-MS conditions were carefully optimized and applied to the LC-TOF-MS determination of pesticide residues in agricultural products. For most of the tested pesticides, no significant matrix effect was observed at a concentration level of 0.01 mg/kg, while LOQs were mostly less than 0.01 mg/kg. In contrast to LC-MS/MS, LC-TOF-MS enables monitoring a large number of compounds within one run, and can be used for identifying both non-target and unknown compounds based on accurate mass. Thus, the improved sensitivity and resolution of TOF-MS instruments make the LC-TOF-MS method a potentially efficient tool for multi-residue analysis of pesticides in foods.

This work was supported by Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

References

- 1) Mezcuca, M., Malato, O., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R. Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**, 913–929 (2009).
- 2) Lacina, O., Urbanova, J., Poustka, J., Hajslova, J. Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 648–659 (2010).
- 3) Ferrer, I., Thurman, E. M. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1175**, 24–37 (2007).
- 4) Ferrer, I., García-Reyes, J. F., Mezcuca, M., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1082**, 81–90 (2005).
- 5) Meng, C. K., Zweigenbaum, J., Furst, P., Blanke, E. Finding and confirming nontargeted pesticides using GC/MS, LC/quadrupole-time-of-flight MS, and databases. *J. AOAC Int.*, **93**, 703–711 (2010).
- 6) Stolker, A. A. M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J. J. P., Peters, R. J. B., van Rhijn, J. A., Nielen, M. W. F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC/TOF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 2309–2322 (2008).
- 7) Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J., Keely, B. J. Quantification and screening of pesticide residues in food by gas chromatography-exact mass time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1166**, 152–162 (2007).
- 8) Cajka, T., Hajslova, J. Gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: Advantages and limitations. *J. Chromatogr. A*, **1058**, 251–261 (2004).
- 9) García-Reyes, J. F., Hernando, M. D., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A. R. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *Trends Anal. Chem.*, **26**, 828–841 (2007).

