

Table 3. Validation study criteria

Category	Both concentrations	0.01 µg/g		0.05 µg/g	
	Trueness (%)	Repeatability (RSD; %)	Within-run reproducibility (RSD; %)	Repeatability (RSD; %)	Within-run reproducibility (RSD; %)
AA* or A (Required criteria [#])	≤70~≤120	<25	<30	<15	<20
B	≤50~<70	<25	<30	<15	<20
C	<120~≤150	<25	<30	<15	<20
D		Not meeting criteria for categories AA, A, B, and C			

*: Categorized both "A" using two kinds of calibration curves.

[#]: Levels of trueness, repeatability and within-run reproducibility required in the method validation guideline by Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Table 4. Summary of number of pesticides categorized according to matrix effects

Sample	Category [#]	Standard solution [*]							
		A		b		c		d	
		PEG (-), VFJm (-)	IS correction ^{§§}	PEG (+), VFJm (-)	IS correction ^{§§}	PEG (-), VFJm (+)	IS correction ^{§§}	PEG (+), VFJm (+)	IS correction ^{§§}
		Absolute [§]	IS correction ^{§§}	Absolute [§]	IS correction ^{§§}	Absolute [§]	IS correction ^{§§}	Absolute [§]	IS correction ^{§§}
Potato	I	6	110	107	150	144	160	153	154
	II	0	44	0	0	20	3	8	7
	III	24	7	43	6	0	2	0	0
	IV	138	7	18	12	4	3	7	7
Spinach	I	27	93	38	125	51	121	100	133
	II	0	0	0	0	0	1	0	0
	III	54	30	80	22	58	26	55	28
	IV	87	45	50	21	59	20	13	7
Apple	I	0	82	47	144	143	162	166	166
	II	0	60	0	0	0	1	0	0
	III	12	10	86	9	23	4	1	1
	IV	156	16	35	15	2	1	1	1

[#]: Category I (70 ≤ AR ≤ 120 and RSD ≤ 20), Category II (50 ≤ AR < 70 and RSD ≤ 20), Category III (120 < AR ≤ 150 and RSD ≤ 20), Category IV (except I, II and III). AR is average of calculated values for peak area of test solution divided by that of standard solution.

^{*}: Standard solution a (PEG (-), VFJm (-)), Standard solution b (PEG (+), VFJm (-)), Standard solution c (PEG (-), VFJm (+)), Standard solution d (PEG (+), VFJm (+)).

[§]: Calculated using absolute peak areas.

^{§§}: Calculated after normalization of peak areas to internal standard (TPP).

結果および考察

1. マトリックス効果および制御の検討

いずれの食品においても、標準溶液に何も添加せず（標準溶液 a）、内標準による補正も行わない場合では、カテゴリ IV に分類される農薬が大部分を占めた（Table 4）。カテゴリ IV に分類された大半の農薬は、AR が 150% を超えており、模擬試験溶液 a におけるマトリックス効果が反映された結果と考えられた（Table S3-1~S3-3）。しかし、標準溶液 a に内標準による補正を行うことにより、カテゴリ I に分類される農薬数が大幅に増加した。これは内標準も模擬試験溶液において多くの農薬と同程度のマトリックス効果を受けていることを示している。カテゴリ II または III に分類される農薬の割合は、食品によって異なっていた。ばれいしょおよびりんごでは、カテゴリ II

が III を上回るが、ほうれんそうでは逆転していた（Table 4）。これは内標準と農薬の受けるマトリックス効果の強度の関係は、食品によって変動しやすいことを示しており、トリフェニルリン酸単独では多種類の農薬のマトリックス効果を補正することに限界があると考えられた。

標準溶液に PEG のみを添加し（標準溶液 b）、内標準による補正を行わない場合、標準溶液 a と比較してカテゴリ I に分類される農薬が増加するものの、全体ではカテゴリ III に分類される農薬が多く認められた（Table 4）。標準溶液に PEG を添加する場合、模擬試験溶液中にも PEG を添加（模擬試験溶液 β）する共注入法を採用している。共注入法では PEG の添加によって模擬試験溶液と標準溶液との間でのマトリックス効果を飽和させることで均衡を図るものと考えられる。しかし、カテゴリ III に分類される

農薬が多いのは、PEGのみを添加した状態の標準溶液bで観察されるマトリックス効果が、PEGおよび食品由来のマトリックスが共存する模擬試験溶液βで観察されるマトリックス効果よりも弱いことが原因であると考えられた。内標準による補正を行うことにより、全体的にマトリックス効果が補正されカテゴリIが増加するものの、効果の強弱の関係は変わらない結果であった。

標準溶液にVFJmのみを添加した場合(標準溶液c)、内標準による補正を行わなくても、ばれいしょおよびりんごでは、大半の農薬がカテゴリIに分類された(Table 4)。しかし、ほうれんそうではカテゴリIIIまたはIVに分類される農薬が多く、模擬試験溶液αで観察されるマトリックス効果との均衡が不十分であると考えられた。内標準による補正を行った場合、いずれの食品でもカテゴリIに分類される農薬は増加し、内標準による補正効果が認められた。

標準溶液にPEGおよびVFJmの双方を添加した場合(標準溶液d)、内標準による補正を行わなくても、いずれの食品も、100農薬以上がカテゴリIに分類された(Table 4)。りんごでは内標準による補正の有無に関係なく、166農薬がカテゴリIに分類された。内標準による補正を行った場合、ほうれんそうは133農薬がカテゴリIに分類された。ばれいしょでは、標準溶液cで内標準による補正を行った場合に劣るがカテゴリIに分類されたのは154農薬であった。多岐にわたる食品への適用を念頭にした汎用性の観点から、標準溶液dで内標準による補正を行うのが最適であると考えられた。これはVFJmに由来するマトリックス効果が、PEGに由来するマトリックス効果の及ばない範囲を補完したと解釈される。

これらの結果により、標準溶液dで内標準による補正を

行ったPEG-VFJm併用法を妥当性評価に用いることが最も合理的であると考えられた。

2. 妥当性評価

2.1 感度および選択性

機器の感度に基づく定量限界(IQL: instrumental quantification limit)は、既報¹⁾に準じてPEGおよびVFJmを添加した標準溶液(0.001~0.010 μg/mL)を5回分析し、検量線の傾きの平均値(Slope)およびシグナルノイズ比(S/N比)が10を超える最低濃度でのピーク面積値の標準偏差(σ)から次式($IQL=10\sigma/Slope$)により算出した(Table S1)。さらに、IQL付近の濃度の標準溶液を実際に分析してS/N比 ≥ 10 であることを確認した。なお、IQLが0.005 μg/mLを超える農薬は認められなかった。

また、ばれいしょ、ほうれんそうおよびりんごから得られた試験溶液を分析し、評価対象農薬に対してガイドラインに示された選択性の目標値を逸脱させる妨害成分は認められなかった。

2.2 真度および精度

マトリクスマッチング法およびPEG-VFJm併用法をそれぞれ用いた際の評価結果を示した(Table 5)。詳細はTable S4-1~S4-3に示した。

マトリクスマッチング法では、評価した168農薬のうち、ばれいしょで144、ほうれんそうで158、りんごで156が、0.010および0.050 μg/gの両添加濃度で目標値*1を満たした(Table 5; 評価A)。さらに、これらのうち、PEG-VFJm併用法においても目標値を満たした農薬数は、ばれいしょで129、ほうれんそうで140、りんごで149であった(評価AA)。これらの農薬数の割合は、マトリクスマッチング法で目標値を満たした農薬数に対して、それぞれ90%(ばれいしょ)、89%(ほうれんそう)および

Table 5. Summary of number of pesticides categorized according to validation results

Category [#]	Potato		Spinach		Apple	
	Calibration		Calibration		Calibration	
	Cal. 1* (Matrix-matched)	Cal. 2** (PEG-VFJm)	Cal. 1* (Matrix-matched)	Cal. 2** (PEG-VFJm)	Cal. 1* (Matrix-matched)	Cal. 2** (PEG-VFJm)
A (AA)	144 (129)	129	158 (140)	144	156 (149)	149
A	5	7	6	18	8	1
B	4	9	1	1	2	6
C	0	0	0	1	0	0
D	15	23	3	4	2	12

*: Category AA (satisfied trueness, repeatability and within-run reproducibility at both 0.010 and 0.050 μg/g using two kinds of calibration curves)

Category A (satisfied trueness, repeatability and within-run reproducibility at both 0.010 and 0.050 μg/g)

Category A (satisfied trueness, repeatability and within-run reproducibility at either 0.010 or 0.050 μg/g)

Category B (satisfied repeatability and within-run reproducibility at both 0.010 and 0.050 μg/g, except trueness ($\leq 50 < 70$))

Category C (satisfied repeatability and within-run reproducibility at both 0.010 and 0.050 μg/g, except trueness ($< 120 \leq 150$))

Category D (except category AA, A, A, B, and C)

*: Calculated from calibration curve made from matrix-matched standard solutions with PEG and TPP.

** : Calculated from calibration curve made from general matrix standard solutions with PEG, TPP and VFJm.

96% (りんご) であった。

ばれいしょでは、クロジナホッププロバルギルをはじめ、シハロホップブチル、ピラフルフェンエチル、フルフェンピルエチル、ジクロホップメチル、モリネート等の除草剤の回収率が低い結果であった (Table S4-1)。LC-MS/MSを用いた高取らの報告¹³⁾ のとおり、シハロホップブチルやモリネートは、ばれいしょ中で分解したことが真度の低い原因であると考えられた。クロジナホッププロバルギル、ジクロホップメチルもフェノキシプロピオン酸系除草剤であり、シハロホップブチル同様に分解したことがその原因と推察された。また、メトルカルブ、ペンダイオカルブ、ジメチピン、エチオフェンカルブ、ホサロン、シフルトリン、シベルメトリン、フルシトリネート、フェンバレレートおよびインドキサカルブのマトリックスマッチング法による真度は約60%以上を示したが、PEG-VFJm併用法では40%未満であった。これらは、マトリックス効果および制御について検討した標準溶液dの結果において、カテゴリIIまたはIVと判定された農薬に一致しARが低い値であった (Table S3-1)。すなわち、これら農薬はPEG-VFJm併用法を用いた場合、定量値が低く算定される傾向にあった。

ほうれんそうでは、両添加濃度で、マトリックスマッチング法およびPEG-VFJm併用法の双方において、シプロジニルの平均回収率がともに20%未満であった。また、マトリックスマッチング法の真度が100%を超過した農薬数は、添加濃度0.010 µg/gで2 (ペンダイオカルブおよびBHC (δ)) であり、添加濃度0.050 µg/gで1 (フルフェンピルエチル) であった (Table S4-2)。一方、PEG-VFJm併用法の真度が100%を超過した農薬数は、添加濃度0.010 µg/gで77、添加濃度0.050 µg/gで43あった。これらの農薬は、標準溶液dを用いたマトリックス効果の検討結果において、カテゴリIIIと判定された農薬とほぼ同一であった (Table S3-2)。すなわち、ほうれんそうでは、PEG-VFJm併用法を用いた場合、多くの農薬で目標値の範囲内ではあるが定量値が高く算定される傾向にあった。

りんごは、マトリックスマッチング法で目標値を満たした農薬数に対して、PEG-VFJm併用法でも目標値を満たした農薬数の割合 (96%) が、検討した3種類の食品の中で最も高かった。これは野菜果実ジュースの主要原料の1つがりんごであることに起因すると考えられた。

今回、マトリックスマッチング法と同時にPEG-VFJm併用法について、試験溶液を共有し妥当性評価を実施した。それぞれの評価において、ともに目標値を満たした農薬については、当該食品に関して、PEG-VFJm併用法を利用できると考えられた。検討した3種類の食品と評価対象168農薬の組み合わせにおいて、マトリックスマッチング法で目標値を満たした農薬数の89~96%が、PEG-VFJm併用法でも目標値を満たした。PEG-VFJm併用法は、マトリックスマッチング法に比較して、ガイドラインの目標値から逸脱する農薬数が増えるものの、多種類の食

品の分析に際して、その種類ごとにマトリックスマッチング標準溶液の調製が不要であり、迅速かつ合理的な分析が可能であることが示唆された。特にスクリーニング分析としての有用性が高いと考えられた。一方、食品によっては、マトリックスマッチング法とPEG-VFJm併用法の評価において、それぞれの真度が乖離した農薬が認められたことから、今後、さらに評価対象食品および農薬を拡充し、PEG-VFJm併用法の有用性について検証する予定である。

結 論

- GC-MS/MSを用いた野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価に際し、マトリックスマッチング標準溶液に代用可能で、かつ多種類に及ぶ食品の分析に共用できる汎用マトリックス添加標準溶液を用いた。
- 汎用マトリックス添加標準溶液として、PEG、市販の野菜果実ジュースから得た抽出液および内標準を活用した場合に最もマトリックスマッチング標準溶液に近いマトリックス効果の補正能力が認められた。
- 汎用マトリックス添加標準溶液を活用すれば、迅速で効率的な分析が実施可能であることが示唆された。

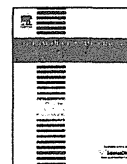
謝 辞

本研究の一部は、平成26年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) による助成を受け実施した研究の成果である。

文 献

- 1) Takatori, S., Yamamoto, H., Fukui, N., Yamaguchi, S., Kitagawa, Y., Kakimoto, Y., Osakada, M., Okihashi, M., Kajimura, K., Obana, H. Validation study on a rapid multi-residue method for determination of pesticide residues in vegetables and fruits by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 54, 237-249 (2013).
- 2) Anastassiades, M., Maštovská, K., Lehota, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J. Chromatogr. A*, 1015, 163-184 (2003).
- 3) Maštovská, K., Lehota, S. J., Anastassiades, M. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. *Anal. Chem.*, 77, 8129-8137 (2005).
- 4) Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Martín, G., Tadeo, J. L. Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. *Anal. Sci.*, 21, 1291-1296 (2005).
- 5) Kirchner, M., Hůšková, R., Matisová, E., Mocák, J. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *J. Chromatogr. A*, 1186, 271-280 (2008).
- 6) González-Rodríguez, R. M^a, Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. Determination of 23

- pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *J. Chromatogr. A*, **1196-1197**, 100-109 (2008).
- 7) 社団法人 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会. ガスクロ自由自在Q&A～準備・試料導入編～. 東京, 丸善, 2007, p. 133-135. (ISBN 978-4-621-07873-0)
 - 8) 石井里枝, 野崎なおみ, 大坂郁恵, 菊池好則, 長田淳子, 高橋邦彦, 戸谷和男, 松本隆二. 大容量注入GC-MSを用いた蓄水産食品中の残留農薬一斉分析法の開発と妥当性評価. *日本食品化学学会誌*, **18(2)**, 92-102 (2011).
 - 9) 畑野和広. キャピラリー・ガスクロマトグラフ/PEG共注入法の農産物中の有機リン系農薬同時定量法への適用. *福岡市保健環境研究所報*, **28**, 74-78 (2002).
 - 10) 山口博美, 西村一彦, 橋本 諭, 平間祐志. GPC及びGC-MSによる蓄水産食品中の有機塩素系農薬及びPCB分析法の検討. *北海道衛生研究所報*, **62**, 65-70 (2012).
 - 11) 濱田幸子, 大脇成義, 土田貴正, 松本洋亘, 鳥居南 豊, 野澤真里奈, 茶谷祐行. GC/MS/MSを用いた農産物中の残留農薬検査法の評価. *京都府保健環境研究所年報*, **57**, 64-68 (2012).
 - 12) Makabe, Y., Takahashi, H., Enomoto, T., Aikawa, T. Validation study on a multi-residue analysis of pesticides in agricultural products by using phosphoric acid treatment and GC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **55**, 188-192 (2014).
 - 13) Takatori, S., Okihashi, M., Okamoto, Y., Kitagawa, Y., Kakimoto, S., Murata, H., Sumimoto, T., Tanaka, Y. A rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in vegetables, fruits, and cereals using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J.AOAC Int.*, **91**, 871-883 (2008).



Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography–mass spectrometry using isotope-labeled internal standards



Takashi Yarita*, Yoshie Aoyagi, Takamitsu Otake

National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), AIST Tsukuba Central 3, Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8563, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2015

Received in revised form 27 March 2015

Accepted 27 March 2015

Available online 4 April 2015

Keywords:

Matrix effect

Isotope-dilution mass spectrometry

Deuterium-labeled internal standard

Pesticide

Matrix matching

Calibration curve

ABSTRACT

The impact of the matrix effect in GC–MS quantification of pesticides in food using the corresponding isotope-labeled internal standards was evaluated. A spike-and-recovery study of nine target pesticides was first conducted using paste samples of corn, green soybean, carrot, and pumpkin. The observed analytical values using isotope-labeled internal standards were more accurate for most target pesticides than that obtained using the external calibration method, but were still biased from the spiked concentrations when a matrix-free calibration solution was used for calibration. The respective calibration curves for each target pesticide were also prepared using matrix-free calibration solutions and matrix-matched calibration solutions with blank soybean extract. The intensity ratio of the peaks of most target pesticides to that of the corresponding isotope-labeled internal standards was influenced by the presence of the matrix in the calibration solution; therefore, the observed slope varied. The ratio was also influenced by the type of injection method (splitless or on-column). These results indicated that matrix-matching of the calibration solution is required for very accurate quantification, even if isotope-labeled internal standards were used for calibration.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Various pesticides are used to protect foods against pests and diseases [1]. However, high levels of residual pesticides in food may result in adverse effects on human health. Therefore, analysis of various residual pesticides in food is routinely performed worldwide, and ensuring the reliability of these results is crucial for controlling the risk associated with pesticide residues.

In general, analytical methods for determining the presence of pesticide residues in food require complex extraction of the target pesticides, multi-step clean-up of the extracts, and chromatographic analysis of the prepared sample solution [2–4]. In the last step, the observed detector response for the target pesticide may differ for the sample solution and a matrix-free calibration solution. Consequently, the observed analytical value may be biased from the “true” value due to the phenomenon termed the “matrix effect”. In GC–MS measurements, the sample matrix can cause an enhancement in the detector response by increasing transfer of the

target pesticide from the hot vaporizing injector. This may occur by (I) reduction of the thermal stress to labile compounds and (II) by masking active sites (such as silanols and metal ions) in the injector, column, and detector for the adsorption or decomposition of the target pesticide [5–9]. There are many strategies to eliminate this analytical bias: the most effective strategy is to use matrix-matched calibration solutions or analytical protectants [5].

An accurate analytical method must be utilized for characterization of certified reference materials (CRMs) or to determine the assigned values of proficiency testings (PTs) by measurement. Isotope-dilution mass spectrometry (IDMS) has been recognized as having the potential to be a primary method of measurement [10,11]. In this method, a known amount of an isotope-labeled congener of the target analyte, generally determined by weighing, is added to the sample prior to initiation of any pretreatment. After isotopic equilibration is achieved, the initial isotopic ratio between the target analyte and corresponding isotope-labeled congener does not change in principle during the following sample pretreatment and measurement processes. Consequently, accurate analytical results can be obtained by measuring the isotopic ratio of the resulting sample solution via mass spectrometry. Certain national metrology institutes (including our institute) have

* Corresponding author. Tel.: +81 29 861 9416; fax: +81 29 861 6866.

E-mail address: t-yarita@aist.go.jp (T. Yarita).

applied IDMS to the characterization of CRMs [12–17] and to provide assigned values of PTs [18–21] for analysis of pesticide residues in food.

In GC–MS quantification, the use of isotope-labeled congeners of the target analytes as the internal standard, including in the case of IDMS, is expected to offset the bias of the analytical results caused by matrix effects [22–25]. Ueno et al. [26] reported a spike-and-recovery study of 89 pesticides in vegetables and fruits by GC–MS after GPC and SPE cleanup. The ratios of the observed analytical concentrations to the spiked concentrations were remarkably good (94.6–108.6%) for the 14 target pesticides that were quantified using the isotope-labeled pesticides as internal standards. Furthermore, Yu and Xu [27] evaluated the matrix effect for 176 pesticides using on-line GPC–GC–MS, where different suppression effects were observed for chlorpyrifos and chlorpyrifos-*d*₁₀. This was because di-*n*-butyl phthalate co-dissolved in the sample solution was co-eluted with chlorpyrifos-*d*₁₀ but not with chlorpyrifos; thus, the intensity of only the chlorpyrifos-*d*₁₀ peak was significantly decreased. To the best of our knowledge, no comprehensive study concerning the matrix effect in GC–MS using isotope-labeled internal standards has been published for pesticide residue analysis, even though the trueness of the observed analytical results may be influenced by this effect.

The objective of the present study is to evaluate the impact of matrix effects on the quantification of pesticide residues in food via GC–MS using isotope-labeled internal standards. A spike-and-recovery study of nine target pesticides is conducted, demonstrating the adverse influence of matrix effects on the observed analytical values. By comparing the matrix-matched and matrix-free calibration solutions, we address the effectiveness of matrix matching of the calibration solution to achieve highly accurate quantification.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Nine pesticides, including 6-chloro-*N*²,*N*⁴-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (simazine), *O,O*-diethyl-*O*-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate (diazinon), *O,O*-dimethyl-*O*-4-nitro-*m*-tolyl phosphorothioate (fenitrothion), *S*-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl *O,O*-dimethyl phosphorodithioate (malathion), *O,O*-diethyl-*O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate (chlorpyrifos), *S*-4-chlorobenzyl diethyl(thiocarbamate) (thiobencarb), diisopropyl 1,3-dithiolan-2-ylidene malonate (isoprothiolane), *O,O*-diethyl *O*-5-phenyl-1,2-oxazol-3-yl phosphorothioate (isoxathion), and 2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether (etofenprox), were used as the target pesticides. High-purity standards of the target pesticides were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), except for thiobencarb that was obtained from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). High-purity standards of diazinon-*d*₁₀, fenitrothion-*d*₆, chlorpyrifos-*d*₁₀, isoprothiolane-*d*₄, isoxathion-*d*₁₀, and etofenprox-*d*₅ were obtained from Hayashi Pure Chemical Ind. (Osaka, Japan). High-purity standards of simazine-*d*₁₀, malathion-*d*₆, and thiobencarb-*d*₁₀ were obtained from CDN Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Canada). 2-Chloro-2',6'-diethyl-*N*-(methoxymethyl) acetanilide (alachlor), which was used as a syringe spike, was obtained from GL Sciences (Tokyo, Japan). Acetonitrile, acetone, toluene, and anhydrous sodium sulfate, all of which were of Pesticide Residue and PCB Analysis grade, were obtained from Kanto Chemical. Reagent grade sodium chloride, dipotassium hydrogenphosphate, and potassium dihydrogen phosphate were also obtained from Kanto Chemical. The water used for sample preparation was prepared with a

Millipore (San Jose, CA) Milli-Q Gradient system at an output of 18.2 MΩ cm.

Corn paste, green soybean paste, carrot paste, and pumpkin paste (used as the base materials) were kindly supplied by Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center (Hadano, Japan). These pastes were (or are intended to be) used for preparing PT samples in the External Quality Control for Food Hygiene [28].

2.2. Preparation of spike solution, syringe-spike solution, and calibration solutions

All solutions described below were prepared gravimetrically. High-purity standards of the target pesticides were individually dissolved with acetone. The pesticide mixture solution (62.5 mg/kg each) was then prepared by combining these solutions with addition of acetone. The high-purity standards of the isotope-labeled pesticides were also individually dissolved with acetone, and the isotope-labeled pesticide mixture solution (6.25 mg/kg each) was subsequently prepared by combining these solutions along with acetone. By combining the pesticide mixture solution and the isotope-labeled pesticide mixture solution, the spike solution was prepared so that the concentration of each target pesticide and isotope-labeled pesticide was 5.68 mg/kg. The syringe-spike solution (0.238 mg/kg) was prepared by dissolving alachlor in acetone. The calibration solution (Cal A) was then prepared by mixing the spike solution with the syringe-spike solution. The concentration of each target pesticide and isotope-labeled pesticide in this solution was 1.24 mg/kg, whereas the concentration of alachlor was 0.186 mg/kg. The other calibration solutions (Cals B1, B2, B3, B4, B5, and B6) were prepared by combining the pesticide mixture solution, the isotope-labeled pesticide mixture solution, and acetone. The concentration of the isotope-labeled pesticides in these solutions was constant at approximately 1.25 mg/kg, whereas that of the individual target pesticides ranged from 0.25 to 6.25 mg/kg.

2.3. Pretreatment of the sample

The pretreatment protocol applied in the present study is based on the Multiresidue Method for Agricultural Chemicals by GC/MS (Agricultural Products), which is a part of the Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food [2], and was partially modified. An outline of the employed protocol is as follows: the base material (5 g) was weighed, and the weighed spike solution (550 μL) was added to it. For corn paste or green soybean paste samples, water (20 mL) was added, and the sample was allowed to stand for 15 min. The sample was then homogenized with acetonitrile (50 mL) for 2 min using a Kinematica (Lucerne, Switzerland) Polytron PT 1200E homogenizer equipped with a PT-DA 12/2EC-E157 dispersing aggregate, and filtered with a cellulose filter (diameter: 60 mm; retentive particle size: 1 μm) obtained from Kiriya Glass Works (Tokyo, Japan). The residue on the filter was re-extracted with acetonitrile (20 mL) for 2 min and the pesticide-containing filtrates were combined. An approximately 40 mL aliquot of the crude extract was fractionated in a separatory funnel (the ratio of the fractionated portion was obtained gravimetrically), and shaken with sodium chloride (10 g) and 0.5 mol/L phosphate buffer solution (pH 7.0, 20 mL) for 10 min.

In the case of carrot paste or pumpkin paste samples, the obtained upper (acetonitrile) layer was dehydrated with anhydrous sodium sulfate (approximately 10 g). The extract was concentrated and dried using a rotary evaporator and a nitrogen gas stream, respectively; an acetonitrile/toluene mixture (3:1, v/v; 2 mL) was then added.

In the case of corn paste or green soybean paste samples, a series of the obtained upper (acetonitrile) layer and acetonitrile (2 mL)

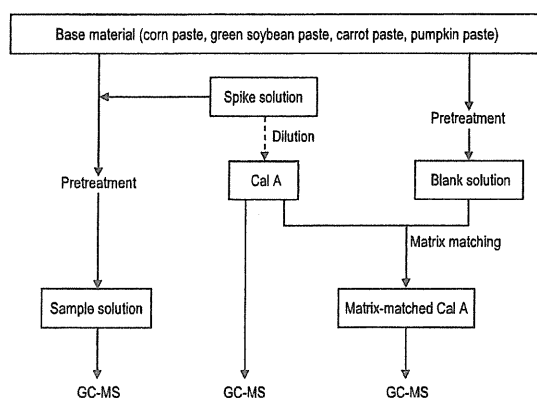


Fig. 1. Flow diagram of the spike-and-recovery assay.

was passed through an Agilent Technologies (Palo Alto, CA) Bond Elut C18 cartridge (1 g) that was conditioned in advance with acetonitrile (10 mL), and the entire volume of the eluate was collected. After dehydrating with anhydrous sodium sulfate (approximately 10 g), the extract was concentrated and dried as described above; an acetonitrile/toluene mixture (3:1, v/v; 2 mL) was then added.

The obtained extract was further purified using a Supelco (Bellefonte, PA) ENVI-Carb/LC-NH₂ cartridge (500 mg/500 mg) that was conditioned in advance with an acetonitrile/toluene mixture (3:1, v/v; 10 mL). An acetonitrile/toluene mixture (3:1, v/v; 20 mL) was then passed through the cartridge and the eluate was subsequently concentrated and dried as described above. The sample solution was prepared by dissolving the dried residue with the weighed syringe-spike solution (1.0 mL).

2.4. Matrix matching of the calibration solutions

The base material (5 g) was pretreated as described in Section 2.3, with the exception that the spike solution was not added. After concentration and drying of the purified extract using the ENVI-Carb/LC-NH₂ cartridge, the blank solution was obtained by dissolving the dried residue with acetone (1.0 mL). Matrix matching of the calibration solution was performed as follows: an approximately 0.2 mL portion of the prepared blank solution was re-dried using a nitrogen gas stream, and the dried residue was then dissolved with the same amount of the calibration solution.

2.5. GC-MS measurement

The target pesticides in the sample solution were quantified using an Agilent Technologies 7890A/5975C GC-MS system. An Agilent Technologies DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm) was used as the separation column. The splitless injection method was mainly utilized at 220 °C. The on-column injection method was also applied under oven track mode. For on-column injection, a deactivated fused silica capillary (1 m × 0.25 mm) obtained from Agilent Technologies was used as the retention gap. The other operating conditions for the GC system were set as follows: mobile phase: helium; flow rate: 1.0 mL/min; oven temperature: 50 °C for 1 min, 25 °C/min to 125 °C, 10 °C/min to 300 °C for 6.5 min; injection volume: 1 μL. The MS ionization conditions were set as follows: ionization: electron ionization; electron energy: 70 eV. MS data were mainly obtained in the selected ion monitoring (SIM) mode. The monitored ions (*m/z*) were as follows: simazine: 201; simazine-*d*₁₀: 211;

Table 1
Results of the spike-and-recovery study using corn paste as base material.*

Pesticide	Ratio of the observed analytical concentration to the spiked concentration (%)		Recovery yield of the isotope-labeled pesticide (%)
	Calibrated using matrix-matched Cal A	Calibrated using Cal A	
Simazine	99.7 ± 0.4	96.3 ± 0.4	84.3 ± 2.2
Diazinon	100.4 ± 0.6	97.5 ± 0.6	81.9 ± 2.0
Fenitrothion	99.6 ± 2.0	90.1 ± 1.8	82.2 ± 1.7
Malathion	99.9 ± 0.2	92.5 ± 0.2	84.5 ± 2.8
Chlorpyrifos	100.2 ± 0.1	99.5 ± 0.1	83.2 ± 2.4
Thiobencarb	100.3 ± 0.9	98.2 ± 0.9	83.7 ± 2.6
Isoprothiolane	100.1 ± 0.8	90.1 ± 0.7	84.8 ± 2.5
Isoxathion	99.9 ± 0.8	92.5 ± 0.7	83.0 ± 3.6
Etofenprox	99.3 ± 1.0	93.8 ± 0.9	84.1 ± 3.6

Spiked concentration of each target pesticide was 0.5 mg/kg.

* Mean ± S.D. (n = 4).

diazinon: 304; diazinon-*d*₁₀: 314; fenitrothion: 277; fenitrothion-*d*₆: 283; malathion: 158; malathion-*d*₆: 164; chlorpyrifos: 314; chlorpyrifos-*d*₁₀: 324; thiobencarb: 257; thiobencarb-*d*₁₀: 267; isoprothiolane: 162; isoprothiolane-*d*₄: 166; isoxathion: 313; isoxathion-*d*₁₀: 323; etofenprox: 163; etofenprox-*d*₅: 168; alachlor: 160. MS data by total ion monitoring (TIM) mode were also obtained by setting an *m/z* range of 50–550.

3. Results and discussion

3.1. Spike-and-recovery study

A spike-and-recovery study was first conducted to evaluate the impact of the matrix effect on the observed analytical values. The flow diagram of the protocol is presented in Fig. 1. Generally, in our spike-and-recovery studies, which are performed to evaluate the accuracy of analytical methods based on IDMS, a pesticide mixture solution and an isotope-labeled pesticide mixture solution are separately spiked onto a base material. To avoid analytical bias derived from adding these solutions, in the present study, the pesticide mixture solution and the isotope-labeled pesticide mixture solution were mixed in advance, and this prepared solution (spike solution) was spiked onto the base material. Furthermore, Cal A was prepared by mixing the spike solution with the syringe-spike solution. In addition, it was confirmed beforehand that none of the base materials contained any target pesticides. Thus, the ratio of the amount of the target pesticide to the corresponding isotope-labeled pesticide was generally constant for the sample solution, Cal A, and matrix-matched Cal A.

The results of the study using four different base materials are summarized in Tables 1–4. Here, the recovery yield of the isotope-labeled pesticide indicates how much of the isotope-labeled pesticide spiked onto the base material was recovered after the sample pretreatment. These values correspond to the recovery yield of the target pesticides obtained by the external calibration method in a conventional spike-and-recovery study. Each recovery yield was calculated using matrix-matched Cal A as the calibration solution, and the recovery yields were in the range of 76–93%; these results adequately satisfied the criterion (70–120%) of the Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Agricultural Chemical Residues in Food [29]. That is, the present spike-and-recovery study was carried out with the improved accuracy required for routine analysis of pesticide residues in food.

Table 2
Results of the spike-and-recovery study using green soybean paste as base material.*

Pesticide	Ratio of the observed analytical concentration to the spiked concentration (%)		Recovery yield of the isotope-labeled pesticide (%)
	Calibrated using matrix-matched Cal A	Calibrated using Cal A	
Simazine	99.8 ± 0.3	95.8 ± 0.6	87.9 ± 2.6
Diazinon	100.2 ± 0.7	96.2 ± 0.7	84.6 ± 1.3
Fenitrothion	99.5 ± 1.4	91.2 ± 1.1	83.8 ± 0.3
Malathion	99.7 ± 0.8	92.5 ± 0.7	88.2 ± 1.9
Chlorpyrifos	100.0 ± 0.2	100.5 ± 0.2	86.4 ± 1.8
Thiobencarb	99.5 ± 1.0	99.5 ± 0.2	86.5 ± 2.3
Isoprothiolane	102.8 ± 3.7	85.2 ± 2.8	87.3 ± 2.5
Isoxathion	100.7 ± 1.2	92.9 ± 1.2	87.0 ± 1.7
Etofenprox	99.8 ± 0.7	92.9 ± 0.3	89.4 ± 7.1

Spiked concentration of each target pesticide was 0.5 mg/kg.

* Mean ± S.D. (n = 4).

The ratios of the observed analytical concentration to the spiked concentration ($R_{N/S}$) are also summarized in Tables 1–4. These values were calculated from the GC–MS results using Eq. (1).

$$R_{N/S} = \frac{(A_{N,Sam}/A_{S,Sam})}{(A_{N,Cal}/A_{S,Cal})} \quad (1)$$

where $A_{N,Sam}$ is the peak area of the target pesticide (Native) in the sample solution, $A_{S,Sam}$ is the peak area of the isotope-labeled pesticide (Surrogate) in the sample solution, $A_{N,Cal}$ is the peak area of the target pesticide in the calibration solution, and $A_{S,Cal}$ is the peak area of the isotope-labeled pesticide in the calibration solution. For each target pesticide, two sets of results were, respectively, obtained using Cal A and matrix-matched Cal A as the calibration solution. In most cases, the observed results were closer to 100% than the corresponding recovery yield of the isotope-labeled pesticides. This was probably because the recovery yield of the target pesticides during the pretreatment process did not affect the analytical results when the isotope-labeled pesticides were used as the internal standard. Furthermore, the results obtained using matrix-matched Cal A were almost 100%. This result suggests that the initial isotopic ratio of each target pesticide to the corresponding isotope-labeled pesticide did not change for the duration of the analytical process. On the other hand, for a number of the target pesticides, the results obtained using Cal A had a negative bias from 100%. In particular, the results obtained for fenitrothion, isoprothiolane, and isoxathion were less than 90% for certain base materials. In all chromatograms of the sample solutions, no overlapped peaks were apparent for the target pesticides and the corresponding isotope-labeled pesticides.

Table 3
Results of the spike-and-recovery study using carrot paste as base material.*

Pesticide	Ratio of the observed analytical concentration to the spiked concentration (%)		Recovery yield of the isotope-labeled pesticide (%)
	Calibrated using matrix-matched Cal A	Calibrated using Cal A	
Simazine	100.3 ± 0.4	96.0 ± 0.3	88.5 ± 2.2
Diazinon	100.6 ± 0.2	97.8 ± 0.2	82.0 ± 2.4
Fenitrothion	99.7 ± 0.7	87.5 ± 0.6	88.1 ± 2.4
Malathion	99.3 ± 0.5	95.4 ± 0.4	87.4 ± 1.5
Chlorpyrifos	99.9 ± 0.1	99.7 ± 0.1	85.6 ± 1.7
Thiobencarb	100.4 ± 0.3	98.8 ± 0.3	86.9 ± 2.2
Isoprothiolane	99.9 ± 0.5	88.0 ± 0.5	89.3 ± 1.5
Isoxathion	100.8 ± 0.2	84.6 ± 0.2	92.9 ± 4.1
Etofenprox	101.2 ± 0.6	91.7 ± 0.6	88.7 ± 1.9

Spiked concentration of each target pesticide was 0.5 mg/kg.

* Mean ± S.D. (n = 4).

Table 4
Results of the spike-and-recovery study using pumpkin paste as base material.*

Pesticide	Ratio of the observed analytical concentration to the spiked concentration (%)		Recovery yield of the isotope-labeled pesticide (%)
	Calibrated using matrix-matched Cal A	Calibrated using Cal A	
Simazine	100.7 ± 0.7	95.6 ± 0.6	82.2 ± 2.5
Diazinon	100.8 ± 0.4	98.5 ± 0.4	79.4 ± 2.2
Fenitrothion	102.0 ± 1.0	92.8 ± 0.9	76.3 ± 2.8
Malathion	100.2 ± 0.4	94.3 ± 0.4	81.4 ± 2.7
Chlorpyrifos	100.3 ± 0.1	100.0 ± 0.1	81.5 ± 1.9
Thiobencarb	100.5 ± 0.4	99.0 ± 0.4	77.8 ± 2.1
Isoprothiolane	100.1 ± 0.2	89.9 ± 0.2	82.8 ± 2.7
Isoxathion	101.7 ± 1.5	96.1 ± 1.4	77.6 ± 3.7
Etofenprox	99.5 ± 0.7	94.4 ± 0.6	85.3 ± 3.7

Spiked concentration of each target pesticide was 0.5 mg/kg.

* Mean ± S.D. (n = 4).

Comparison of the peak shapes of the target pesticide and isotope-labeled pesticide indicated no considerable difference between the sample solution and Cal A (and matrix-matched Cal A). These results indicate that more accurate results were obtained when the matrix-matched calibration solution was used.

3.2. Calibration curve

The difference between the results obtained using two types of calibration solutions was evaluated in further detail by preparing calibration curves using the series: Cal B1, B2, B3, B4, B5, and B6, and also using the matrix-matched calibration solutions: Cal B1, B2, B3, B4, B5, and B6, as shown in Fig. 2. Each data point represents the mean value of three measurements, and the plots show good linearity ($R^2 > 0.999$) for each target pesticide. For all target pesticides, the value of the slope [(ratio of peak area of the target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide)/(ratio of amount of the target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide)] of the calibration curve obtained from the matrix-free calibration solutions was higher than that of the matrix-matched counterpart. Moreover, the value of the intercept was higher in the calibration curve of the matrix-matched calibration solutions. The ratios of the slopes of these calibration curves were calculated, and the results are shown in Table 5. As a general trend, the ratio was higher for the target pesticides for which the analytical results were significantly influenced by the type of calibration solutions. The shape and intensity of the peaks of the target pesticides and isotope-labeled pesticides obtained by analysis of Cal B4 and matrix-matched Cal B4 were compared, as shown in Fig. 3. Generally, serious adsorption of the target pesticides and isotope-labeled pesticides on the active sites in the GC system leads to

Table 5
Ratio of the slope of the calibration curve obtained using the matrix-free calibration solutions to that using the matrix-matched calibration solutions.

Pesticide	Ratio
Simazine	1.10
Diazinon	1.07
Fenitrothion	1.23
Malathion	1.10
Chlorpyrifos	1.03
Thiobencarb	1.03
Isoprothiolane	1.10
Isoxathion	1.15
Etofenprox	1.05

GC injection method: splitless.

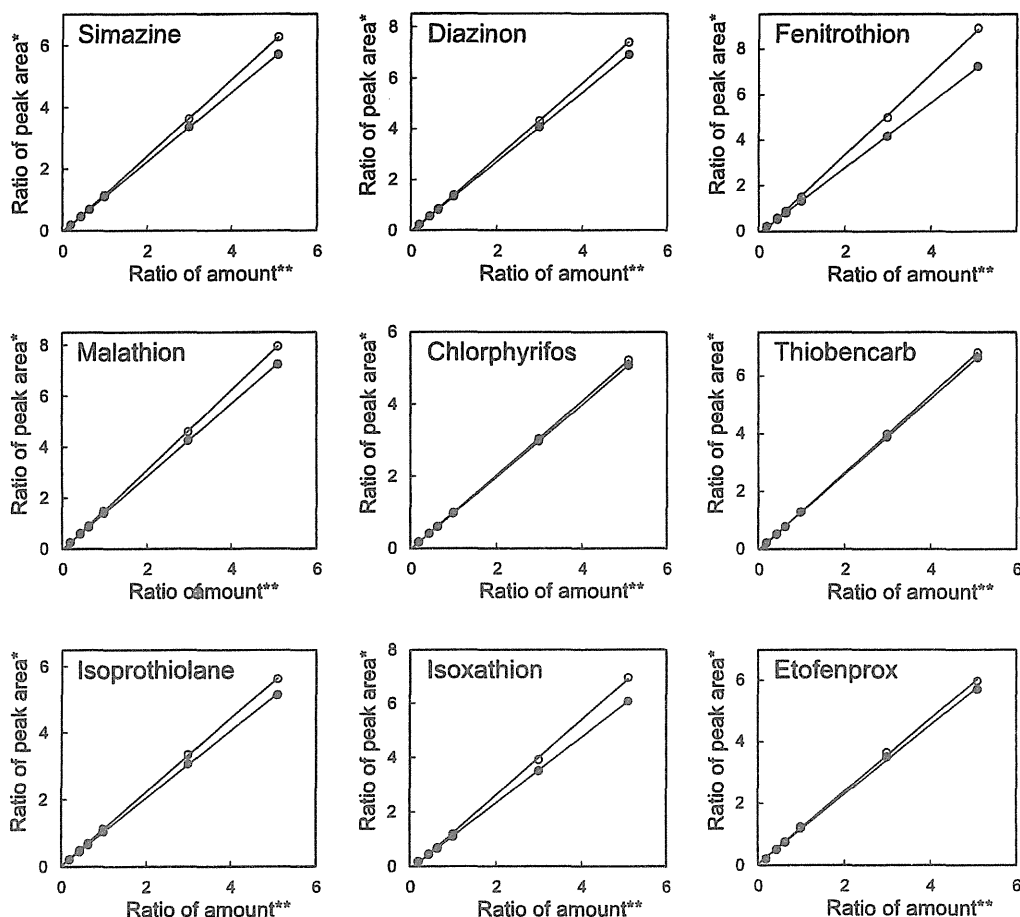


Fig. 2. Calibration curves of the target pesticides obtained from assay of the matrix-free calibration solution (○) and the matrix-matched calibration solution (●). Concentration of each isotope-labeled pesticide in calibration solutions: 1.25 mg/kg (approx.). GC injection method: splitless. *Ratio of the peak area of target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide. **Ratio of the amount of target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide.

peak-tailing; herein, the shapes of the peaks for these compounds in Cal B4 were almost the same as that in matrix-matched Cal B4. In the case of chlorpyrifos and thiobencarb, where the ratios of the slopes shown in Table 5 are almost unity, the intensities of the peaks of the target pesticide and isotope-labeled pesticide were respectively the same with the use of Cal B4 and matrix-matched Cal B4. However, in the case of fenitrothion and isoxathion, the intensity of the peak of the target pesticide and isotope-labeled pesticide in Cal B4 was lower than that in matrix-matched Cal B4. Moreover, the intensity of the peak of each isotope-labeled pesticide was relatively lower. In the case of isoprothiolane and diazinon, etc., the intensities of the peaks of the respective target pesticides were almost the same in these calibration solutions. Nevertheless, the intensities of the peaks of the isotope-labeled pesticides in Cal B4 were slightly lower than that in matrix-matched Cal B4. These results indicate that the ratio of the peak intensities of most target pesticides to that of the corresponding isotope-labeled pesticides was influenced by the presence of the matrix in the sample solution: this tendency might account for the difference in the slopes of the calibration curves shown in Fig. 2.

As shown in Fig. 3, each isotope-labeled pesticide eluted slightly earlier than the corresponding target pesticide. Therefore, these

compounds might experience different suppression/enhancement effects due to the sample matrix as a result of co-eluting at their own retention time [27]. Thus, GC-MS measurements of matrix-matched Cal B4 were also performed under TIM mode to survey overlapping peaks between the target and isotope-labeled pesticides. Based on retention time and mass-spectra library search, it was identified that malathion- d_6 overlapped with di-*n*-butyl phthalate. No overlaps were found between peaks of the sample matrix and the other target and isotope-labeled pesticides. A similar observation was made for four kinds of the sample solutions mentioned in the previous section that were measured using the same detection mode. These results suggest that the differences in the impact of the matrix effect on the target and isotope-labeled pesticides were not mainly due to the different suppression/enhancement effects in MS ionization.

3.3. Injection technique dependence

It has been recognized that the injection port is one of the major places where the matrix effect occurs [5,6]; moreover, the type of injection method significantly affects the extent of the effect [30,31]. Thus, the on-column injection method was applied instead

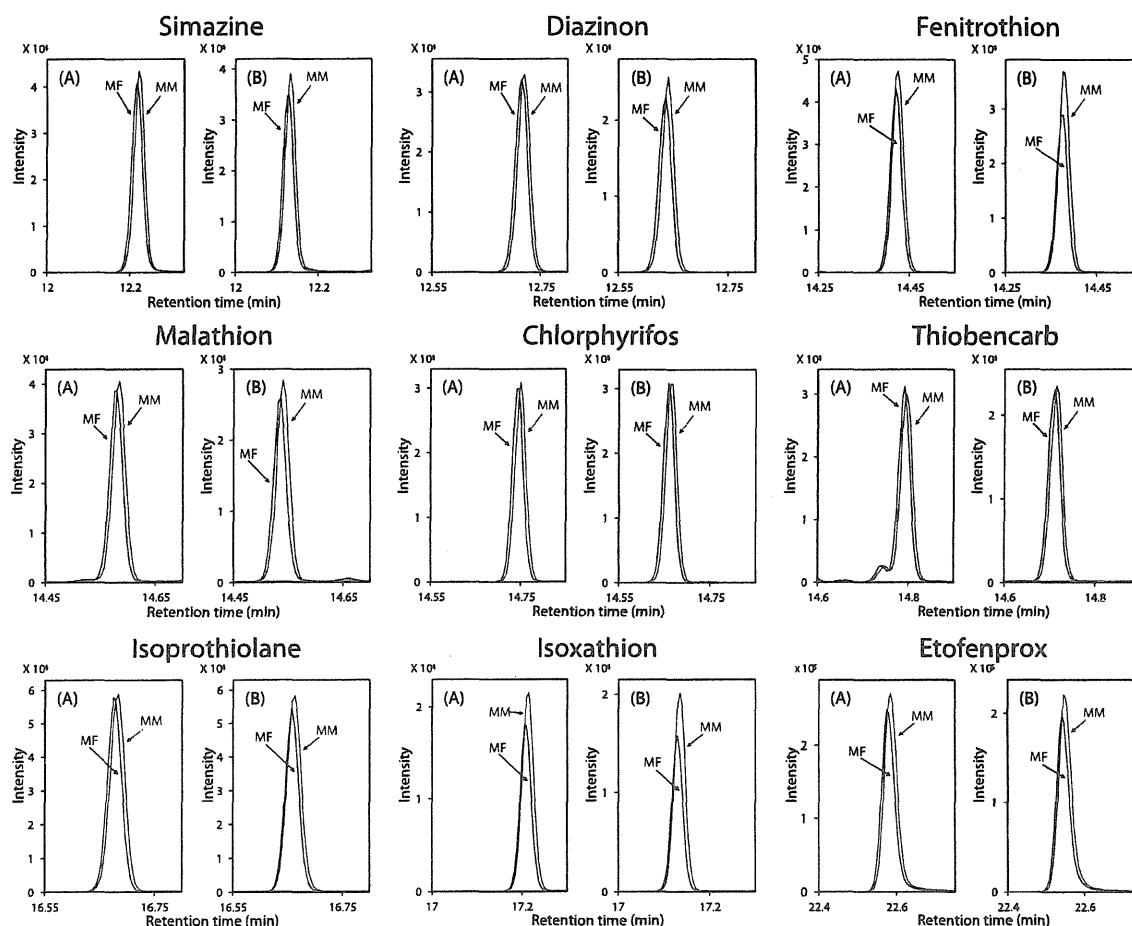


Fig. 3. Comparison of SIM chromatograms obtained from analysis of the matrix-free calibration solution (MF) and the matrix-matched calibration solution (MM). Chromatograms (A) and (B), respectively, show the peaks of the target pesticides and the corresponding isotope-labeled pesticides. Calibration solution used: Cal B4. GC injection method: splitless.

of the splitless injection method using the same GC–MS system. The same calibration solutions mentioned in the previous section were analyzed, where the peak shapes of the target and isotope-labeled pesticides appear a little poorer in comparison with those obtained using the splitless injection method. However, no overlap in peaks was observed with peaks of the sample matrix by the measurement under TIM mode. The calibration curves are shown in Fig. 4. For each target pesticide, the observed data for the series of individual calibration solutions showed good linearity ($R^2 \geq 0.999$). The ratio of the slope of the calibration curve obtained with the matrix-free calibration solutions to that obtained with the matrix-matched calibration solutions was calculated, as shown in Table 6. Compared with the data obtained using the splitless injection method (Table 5), the ratio was closer to unity for most target pesticides with the use of the on-column injection method. This means that the use of the on-column injection method can reduce the analytical bias in the determination of pesticide concentrations obtained using matrix-free calibration solutions, but does not eliminate it. It is considered that the ^{13}C -labeled internal standard is more suitable for accurate quantification because its physico-chemical properties and chromatographic behaviors are more similar to those of native target analyte in comparison with the deuterium-labeled internal

standard [32–34]. To the best of our knowledge, however, no ^{13}C -labeled pesticides targeted in the present study are commercially available.

The reason why and the point at which isotopic equilibration between the target and isotope (deuterium)-labeled pesticides is lost could not be confirmed in the present study. It may be a worthwhile challenge to attempt to elucidate this mechanism in order to

Table 6
Ratio of the slopes of the calibration curves* prepared by applying on-column injection method.

Pesticide	Ratio
Simazine	1.11
Diazinon	1.03
Fenitrothion	1.14
Malathion	1.05
Chlorpyrifos	1.04
Thiobencarb	1.02
Isoprothiolane	1.04
Isoxathion	1.08
Etofenprox	1.02

*The slope calculated from the results obtained with matrix-free calibration solutions to those obtained with the matrix-matched calibration solutions.

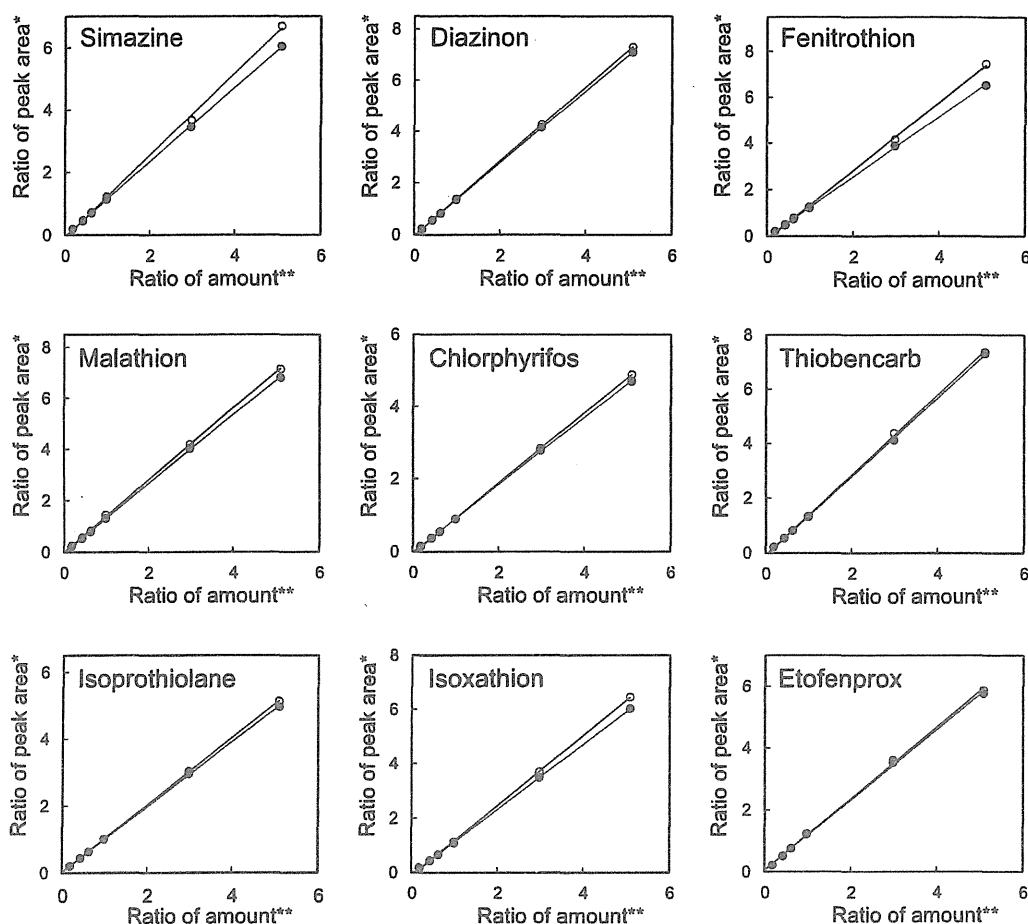


Fig. 4. Calibration curves of the target pesticides obtained from assay of the matrix-free calibration solution (○) and the matrix-matched calibration solution (●). Concentration of each isotope-labeled pesticide in calibration solutions: 1.25 mg/kg (approx.). GC injection method: on-column. *Ratio of the peak area of target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide. **Ratio of the amount of target pesticide to that of the corresponding isotope-labeled pesticide.

minimize the analytical bias during GC–MS quantification of pesticide residues using isotope-labeled internal standards.

4. Conclusion

The use of corresponding isotope-labeled internal standards in GC–MS quantification (including IDMS) of pesticides in food generally provided more accurate analytical values than achieved with the conventional external calibration method. However, most of these values were still biased from the true values when the matrix-free calibration solution was used for calibration. This discrepancy arises because the observed ratio of the peak intensity of the target pesticide to the corresponding isotope-labeled pesticide varied with the presence of the matrix in the calibration solution. Therefore, matrix-matching of the calibration solution is necessary for very accurate quantification, such as for characterization of CRMs or to determine the assigned values of PTs, even if isotope-labeled internal standards are used for calibration.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Takuho Watanabe and Ms. Noriko Takasaka of Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, for providing the base materials as well as valuable discussions. This work was supported by the Health and Labour Science Research Grant of the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

References

- [1] F.P. Carvalho, Agriculture, pesticides, food security and food safety, *Environ. Sci. Policy* 9 (2006) 685–692.
- [2] Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, *Annex of the Director Notice (Syoku-An No 124001) Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food, 2005 (Amendment in 2006)* (in Japanese).
- [3] L. Zhang, S. Liu, X. Cui, C. Pan, A. Zhang, F. Chen, A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 900–925.
- [4] P.Y. Omeroglu, D. Boyacioglu, Á. Ambrus, A. Karaali, S. Saner, An overview on steps of pesticide residue analysis and contribution of the individual steps to the measurement uncertainty, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 1469–1480.

- [5] C.F. Poole, Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 241–250.
- [6] M.M. Rahman, A.M.A. El-Aty, J.-H. Shim, Matrix enhancement effect: a blessing or a curse for gas chromatography? A review, *Anal. Chim. Acta* 801 (2013) 14–21.
- [7] D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, C.F. Poole, 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 (1993) 57–63.
- [8] J. Hajšlová, K. Holadová, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempný, Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 283–295.
- [9] K. Sugitate, H. Anazawa, S. Nakamura, N. Orikata, K. Mizukoshi, M. Nakamura, A. Toriba, K. Hayakawa, Decrease in the matrix effect of GC/MS by a gold-plated ion source, *J. Pestic. Soc.* 37 (2012) 148–155.
- [10] W. Richter, Primary methods of measurement in chemical analysis, *Accred. Qual. Assur.* 2 (1997) 354–359.
- [11] M.J.T. Milton, T.J. Quinn, Primary methods for the measurement of amount of substance, *Metrologia* 38 (2001) 289–296.
- [12] T. Otake, N. Itoh, Y. Aoyagi, M. Matsuo, N. Hanari, S. Otsuka, T. Yarita, Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8208–8212.
- [13] T. Otake, T. Yarita, Y. Aoyagi, Y. Kuroda, M. Numata, H. Iwata, K. Mizukoshi, M. Nakamura, M. Watai, H. Mitsuda, T. Fujikawa, H. Ota, Development of green onion and cabbage certified reference materials for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8568–8574.
- [14] T. Otake, T. Yarita, Y. Aoyagi, Y. Kuroda, M. Numata, H. Iwata, M. Watai, H. Mitsuda, T. Fujikawa, H. Ota, Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides, *Food. Chem.* 138 (2013) 1243–1249.
- [15] T. Yarita, T. Otake, Y. Aoyagi, Y. Kuroda, M. Numata, H. Iwata, M. Watai, H. Mitsuda, T. Fujikawa, H. Ota, Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis, *Talanta* 119 (2014) 255–261.
- [16] S. Ahn, B. Kim, E. Hwang, Stability monitoring of pesticide residues in a Chinese cabbage certified reference material, *Bull. Korean Chem. Soc.* 32 (2011) 1365–1367.
- [17] D.W.M. Sin, P.-k. Chan, S.T.C. Cheung, Y.-L. Wong, S.-k. Wong, C.-s. Mok, Y.-c. Wong, Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea, *Anal. Chim. Acta* 721 (2012) 110–114.
- [18] B. Kim, S. Ahn, Y. Mitani, Interlaboratory comparison for the determination of pesticide residues in Chinese cabbage, *Accred. Qual. Assur.* 16 (2011) 499–505.
- [19] D. Dayarathna, C. Thiriramma, A. Mubarak, L. Mackay, J. Rogerson, H. Tang, J. Feng, D.W.M. Sin, Y.-c. Wong, A multinational joint project on the evaluation of residual pesticide analysis in tea in the Asia Pacific region, *Food Res. Int.* 53 (2013) 931–937.
- [20] T. Yarita, T. Otake, Y. Aoyagi, T. Kuroiwa, M. Numata, A. Takatsu, Proficiency testing for determination of pesticide residues in soybean: comparison of assigned values from participants' results and isotope-dilution mass spectrometric determination, *Talanta* 132 (2015) 269–277.
- [21] T. Otake, T. Yarita, Y. Aoyagi, M. Numata, A. Takatsu, Evaluation of the performance of 57 Japanese participating laboratories by two types of z-scores in proficiency test for the quantification of pesticide residues in brown rice, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7337–7344.
- [22] A. Jahnke, L. Ahrens, R. Ebinghaus, U. Berger, J.L. Barber, C. Temme, An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 965–975.
- [23] B. Binici, M. Bilsel, M. Karakas, I. Koyuncu, A.C. Goren, An efficient GC-IDMS method for determination of PBDEs and PBB in plastic materials, *Talanta* 116 (2013) 417–426.
- [24] P.G. Wang, W. Zhou, Rapid determination of parabens in personal care products by stable isotope GC-MS/MS with dynamic selected reaction monitoring, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1781–1787.
- [25] D.A. Koch, K. Clark, D.M. Tessier, Quantification of pyrethroids in environmental samples using NCI-GC-MS with stable isotope analogue standards, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 2330–2339.
- [26] E. Ueno, H. Oshima, I. Saito, H. Matsumoto, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, 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 (2004) 1003–1015.
- [27] S. Yu, X.-M. Xu, Study of matrix-induced effects in multi-residue determination of pesticides by online gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 963–977.
- [28] T. Watanabe, Food precision seen from investigation results of external quality assessment, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 52 (2011) J315–J320 (in Japanese).
- [29] Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, Annex of the Director Notice (Syoku-An No 1224-1) Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Agricultural Chemical Residues in Food, 2010 (in Japanese).
- [30] D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, C.F. Poole, 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 (1993) 57–63.
- [31] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, M. Godula, K. Maštovská, Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73–86.
- [32] N. Itoh, M. Numata, Y. Aoyagi, T. Yarita, Effect of residues remaining in the injection liner of a gas chromatograph on the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons by isotope dilution mass spectrometry using deuterium-labeled internal standards, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 246–252.
- [33] T. Berg, D.H. Strand, ¹³C labelled internal standards—a solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9366–9374.
- [34] S. Lee, B. Kim, J. Kim, Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurements, *J. Chromatogr. A* 1277 (2013) 35–41.

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 27 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表

GC-MS(/MS)測定におけるマトリックス効果補正用添加物質の検討1

○北川陽子、吉光真人、高取聡、福井直樹、
小阪田正和、山口聡子、起橋雅浩、梶村計志、尾花裕孝
大阪府立公衆衛生研究所

【目的】食品中の残留農薬分析等で測定機器にGC-MS(/MS)を用いる場合、試験液中の夾雑物の影響で測定対象成分の強度が変化する現象があり、マトリックス効果と呼ばれている。これを補正する手段として、標準溶液に試料抽出液、あるいは類似の効果をもつ試料を添加する方法が用いられる。しかし、試料によって試験液中に含まれる夾雑物が異なるため、多種類の試料において等しく補正することは容易ではない。

本研究では、多種類の試料に適用可能かつ、多くの農薬の強度を補正することが可能となる標準溶液への添加物質について検討した。標準溶液に添加する擬似マトリックスとして、野菜果実ジュースから得たブランク試験液 (Vegetable-fruits juice matrix : VFJm) とポリエチレングリコール300 (PEG) を選択し、単独または同時に添加した場合の補正能力を検証したので報告する。

【方法】モデル食品として枝豆を選択した。枝豆から得たブランク試験液に88種類の農薬 (50 ng/mL) を添加し、模擬試験液 (試料換算濃度 : 1 g/mL相当) を調製した。模擬試験液を定量するための標準溶液として、A : 枝豆ブランク試験液添加 (マトリックスマッチド)、B : 無添加 (溶媒標準)、C : VFJm添加、D : PEG添加、E : VFJm+PEG添加をそれぞれ調製した。これらをGC-MS/MSで測定し、5種類の標準溶液 (A~E) を用い、絶対検量線法を適用して定量した。また、内部標準とし

て、50 ng/mLのトリフェニルリン酸を模擬試験液および各標準溶液に添加し、相対検量線法も併せて適用し、定量した。評価指標として、各定量値の添加濃度に対する百分率 (回収率) を算出し、回収率90%以上110%未満を「良好な結果」と判定した。

【結果および考察】絶対検量線法において、C (VFJm添加)、D (PEG添加)、E (VFJm+PEG添加) のいずれの標準溶液を用いた場合でも、マトリックス補正効果が認められた。良好な結果を示す農薬成分数は、A : 88、B : 0、C : 28、D : 14、E : 65となり、EがA (枝豆ブランク試験液添加) に準ずる高い補正効果を示した。この傾向は、相対検量線法においても同じであった。

以上の結果から、VFJmとPEGを添加した標準溶液Eはマトリックス効果に対する補正能力が高く、多種類の試料を分析する際に、これらを標準溶液に添加することは有用であると考えられた。さらに標準溶液Eの汎用性を検証するため、近畿地区地方衛生研究所6機関との共同研究を実施した。共同研究の結果については、次演題「GC-MS(/MS)測定におけるマトリックス効果補正用添加物質の検討2」にて報告する。

本研究は、厚生労働科学研究補助金「課題名 : 検査機関の信頼性確保に関する研究」により実施した。

GC-MS (/MS)測定におけるマトリックス効果補正用添加物質の検討 2 - 近畿地衛研 6 機関における共同研究結果 -

○吉光真人¹、北川陽子¹、高取聡¹、福井直樹¹、小阪田正和¹、山口聡子¹、起橋雅浩¹、梶村計志¹、尾花裕孝¹、伴埜行則²、中島涼³、角谷直哉⁴、山下浩一⁵、神藤正則⁶、高良浩司⁷

¹大阪府立公衆衛生研究所、²京都市衛生環境研究所、³神戸市環境保健研究所、⁴大阪市立環境科学研究所、⁵奈良県保健研究センター、⁶堺市衛生研究所、⁷和歌山県環境衛生研究センター

【目的】前演題「GC-MS (/MS)測定におけるマトリックス効果補正用添加物質の検討1」では、VFJmとPEGを添加した標準溶液が、マトリックスマッチド標準溶液に準ずる高い補正効果を示すことを報告した。

本研究では、近畿地区地方衛生研究所6機関との共同研究を実施し、前処理方法、GC-MS (/MS)の機種、注入法（試料換算濃度、注入量および試料負荷量）の異なる各機関において、VFJmおよびPEG添加標準溶液の汎用性を検証したので報告する。

【方法】モデル食品は、枝豆およびほうれん草の2種類とした。各機関のSOPに準じてモデル食品からブランク試験液を調製した。これに88種類の農薬を添加した模擬試験液を各機関のGC-MS (/MS)で測定した。各機関の前処理方法、GC-MS (/MS)測定における試験液試料換算濃度、注入量および試料負荷量は異なる（表）が、模擬試験液中の農薬成分およびトリフェニルリン酸（内部標準）の濃度は、試料1 gあたり50 ngに統一した。同様にPEG注入量も一分析あたり500 ngに統一した。前演題と同様に、添加した農薬成分を5種類の標準溶液（A：マトリックスマッチド、B：無添加（溶媒標準）、C：VFJm添加、D：PEG添加、E：VFJm+PEG添加）で絶対検量線法または相対検量線法を適用して定量した。評価指標は、各定量値の添加濃度に対する百分率（回収率）を算出し、回収率90%以上110%未満を「良好な結果」と判定した。

表 共同研究6機関の各種条件の比較

機 関	前処理 方法 ¹⁾	試験液試料 換算濃度 (g/mL)	注入量 (μL)	試料 負荷量 (mg/inj)
a	X	2	1	2
b	Y	1	2	2
c	X	10	2	20
d	Y	4	2	8
e	X	1	2	2
f	X	0.5	25	12.5

1) X：QuEChERS法に準じた抽出+固相精製

Y：厚労省GC-MS一斉分析法に準じた方法

【結果および考察】モデル食品の種類、前処理方法、GC-MS (/MS)の機種、注入法（試験液試料換算濃度、注入量および試料負荷量）に関わらず、A（マトリックスマッチド）に準ずる補正能力を示したのは、E（VFJm+PEG添加）であり、全ての機関において、良好な結果を示す農薬数の割合が高い傾向を示した。一方、CおよびDについてもマトリックス効果の補正能力が認められたが、機関間における補正効果の差が大きく、十分な補正効果が得られない機関がみられた。

以上の結果から、VFJmとPEGを添加した標準溶液Eの汎用性が認められ、多種類の試料を分析する際に、VFJmとPEGを標準溶液に用いることは有用であると考えられた。

本研究は、厚生労働科学研究補助金「課題名：検査機関の信頼性確保に関する研究」により実施した。

GC-MS/MS 測定における農薬群由来のマトリックス効果の検証 —溶媒標準溶液中の農薬数の違いによるピーク応答の変化—

○阿久津和彦、吉光真人、北川陽子、福井直樹、山口聡子、高取 聡、
梶村計志、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部）

【目的】 GC-MS(/MS)を用いる食品の残留農薬分析において、測定溶液中のマトリックスの違いによる偶発的なピーク応答の変化（マトリックス効果）は泣きどころの1つである。この問題に関連して、食品成分や疑似マトリックスによるマトリックスマッチングの有効性を検証した多くの報告がある。一方、共存農薬由来のマトリックス効果¹⁾について言及した報告は少なく、この現象については不明な点が多い。分析法の信頼性向上を図る上で、農薬由来のマトリックス効果を把握しておくことは有用である。そこで、まず単純な系として、農薬の溶媒標準溶液における単品と混合溶液（最大169種類）のピーク応答を比較した。

【方法】 概要 指標とする5種類の農薬の各単品溶液に他の農薬混合溶液（PL溶液）を段階的に添加した溶液を調製し、GC-MS/MS（Agilent 7890A/7000B）で測定を行い、ピーク面積および形状の変化を調べた。溶液中の農薬濃度は各50 ng/mLまたは500 ng/mLの2点とし、いずれも最終的な溶媒組成がアセトン/ヘキサン（1：1）となるように希釈調製した。なお、全ての測定溶液には4種類の内標準物質を農薬と同濃度（各50 ng/mLまたは500 ng/mL）になるように添加した。

試薬 指標とする農薬：オメトエート、テルブホス、マラチオン、プロシミドン、ベルメトリン；添加用農薬混合溶液（PL溶液）：和光純薬工業製PL-2-1、-3-3、-4-2、-5-1、-6-3；

内標準物質：トリフェニルリン酸、ナフタレン-d8、フェナントレン-d10、フルオランテン-d10

【結果・考察】 指標とした5種類の農薬のいずれも、PL溶液を添加したものでは、添加農薬数の増加に伴って同濃度の単品溶液よりピーク面積値が増大した。すなわち、PL溶液中の農薬群は全体として正のマトリックス効果を示し、溶媒標準溶液では農薬群由来のマトリックス効果が顕在化し得ることが確認された。これらマトリックス効果に対して内標準物質による補正を試みたところ、有効である場合と逆に誤差を拡大する場合があった。

高濃度の農薬残留検体の分析等で、試験液を高倍率希釈して測定することがある。その際、マトリックスマッチした標準溶液中のマトリックス量も同様に減少すると想定される。この場合、マトリックス量の減少に伴い「溶媒標準溶液」に近い現象がGC-MS(/MS)上で観測されると予想される。別の演題（吉光ら）は、このようなケースにおける農薬群由来のマトリックス効果の顕在化とその制御法の検討結果について報告する。

【謝辞】 本研究は、厚生労働科学研究補助金「課題名：検査機関の信頼性確保に関する研究」により実施した。

【参考文献】 1) *アイスティサイエンス「マトリックス効果による異常回収率の対策について」*
<http://www.aisti.co.jp/common/pdf/gt2010-102.pdf>

高濃度農薬検出試験液の測定時に問題となりうる現象について —GC-MS/MS測定における農薬群由来のマトリックス効果の顕在化—

○吉光真人、阿久津和彦、北川陽子、福井直樹、山口聡子、高取聡、梶村計志、尾花裕孝
(大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部)

【目的】 残留農薬検査では多成分一斉分析が普及し、多成分の混合標準溶液を定量に用いる。我々は本学会の口頭発表「GC-MS/MS測定における農薬群由来のマトリックス効果の検証」において、共存する166種の農薬成分(農薬群)により、標準溶液中の農薬成分の強度が増強される作用(農薬群由来のマトリックス効果)を受けることを実証した。この作用は、他のマトリックスの存在しない状態で最も顕在化すると予想される。また、検査時に多成分の混合標準溶液を用いる場合、残留農薬の過少定量の原因となる可能性が考えられた。一方、検量線範囲を大幅に超過するような高濃度残留農薬検出事例では、溶媒で試験液を希釈し、再度測定する対応が考えられる。本演題では、溶媒による希釈操作後の作物マトリックスが減少した模擬試験液を想定し、混合標準溶液中の農薬群の定量値への影響と、その回避方法について検証した。

【方法】 枝豆ペーストから得たブランク試験液に測定対象の3農薬(マラチオン、プロシミドン、フルシトリネート各2 ppm)を添加し、試験液Aとした。試験液Bは、Aを50%アセトン/ヘキサンで40倍希釈したもの、試験液C~EはBに種々のマトリックスを添加したものである。試験液組成については表に示した。各試験液のマトリックス組成に合わせて調製した標準溶液で検量線を作成し、試験液A~Eの3農薬を定量した。標準溶液の農薬数は、(a)測定対象の3農薬、(b)3農薬に農薬群として

表. 試験液組成

	A	B	C	D	E
農薬3成分濃度(ppm)	2	0.05	0.05	0.05	0.05
ブランク試験液濃度(g/mL)	1	0.025	1	0.025	0.025
VFJm濃度(g/mL)	0	0	0	1	0
PEG濃度(g/mL)	0	0	0	0	0.5

166農薬添加(計169農薬)の2種とし、Agilent 7890A/7000Bを用いて測定した。

【結果および考察】 試験液Aの測定対象3農薬を標準溶液a、bを用いて定量した結果、定量値は概ね2 ppm(1.9~2.1 ppm)となり、農薬群添加による定量値の差は認められなかった。試験液Bに対し、Aと同様に定量した結果、マラチオンは標準溶液bでaの約0.78倍、プロシミドンで約0.76倍、フルシトリネートで約0.88倍の定量値となった。すなわち、農薬群を含む標準溶液bを用いて定量すると定量値が低下し、農薬群による過少定量の傾向が示された。試験液BはAと比較してマトリックス成分の濃度が低く、農薬群由来のマトリックス効果が顕在化したと考えられた。試験液Bに種々のマトリックスを添加した試験液C~Eでは、標準溶液a、bによる定量値の差は概ね解消した。高濃度農薬を溶媒希釈し、混合標準溶液を用いて定量する際、野菜果実ジュースマトリックス(VFJm)やポリエチレングリコール300(PEG)を添加することで、農薬群による過少定量を回避できる可能性が示唆された。

本研究は、厚生労働科学研究補助金「課題名：検査機関の信頼性確保に関する研究」により実施した。

残留農薬分析における野菜果実ジュースのマトリックス効果の比較

○山口聡子、高取聡、吉光真人、阿久津和彦、北川陽子、
福井直樹、小阪田正和、梶村計志、尾花裕孝
(大阪府立公衆衛生研究所)

【目的】

残留農薬分析に GC-MS(/MS)を用いる場合、マトリックス効果の制御は重要である。マトリックス効果の制御法としては、農薬を含まない試験品と同じ食品から調製したブランク試験液をマトリックスとして標準溶液に添加する方法(マトリックスマッチング法)が最も有効である。しかし、多種類の食品を分析する場合、個別にブランク試験液を調製するのは煩雑である。多種類の食品の分析を効率的に行うためには、特定の食品に対象が限定されないマトリックス効果の制御法を確立しておく必要がある。

そこで我々は、市販の野菜果実ジュースから得たブランク試験液、ポリエチレングリコール 300 (PEG) および内部標準(トリフェニルリン酸; TPP)を活用し、多種類の食品の分析に適用可能な汎用マトリックス添加法を確立した¹⁾。本法は、市販の野菜果実ジュースを用いるため、一定の品質でブランク試験液を再調製できる。しかし、製造中止あるいは仕様変更により、その入手が困難になることも想定される。そこで市販の野菜果実ジュース類の代替性を検証するために、マトリックス効果を比較した。

【方法】

【ブランク試験液および試験液の調製】野菜果実ジュース(A~G)、野菜ジュース(HおよびI)および果実ジュース(JおよびK)は、大阪市内で購入した。その主要原材料の一例を表1に示した。

試験液の調製には、QuEChERS法を独自に改良し

表1 野菜果実ジュース類の一例

	野菜果実ジュース		野菜ジュース
	A	E	H
野菜汁(%)	50	60	100
果汁(%)	50	40	0
野菜/果実	30/5種類	21/3種類	30/0種類
主要原材料 (表記順)	にんじん	にんじん	トマト
	水菜	ピーマン	にんじん
	有色甘藷	ほうれん草	芽キャベツ
	りんご	りんご	ケール
	ぶどう	オレンジ	赤ピーマン
	レモン	レモン	ほうれん草

た方法を用いた。ジュース 10 g をアセトニトリルで抽出、塩析脱水後、ENVI-CarbII/PSA で精製した。減圧濃縮後、アセトン/ヘキサン溶液に再溶解した(ブランク試験液 A~K・試料換算 2 g/mL 相当)。次に、各ブランク試験液、農薬混合溶液(199成分・各 200 ng/mL) および TPP (200 ng/mL) を 2:1:1 の割合で混合し、試験液 A~K を調製した。

【マトリックス効果の比較】試験液 A~K を GC-MS/MS (7000B: Agilent) で各 6 回連続分析した。後半 4 回分の分析結果から各農薬の平均面積値を算出した。常用の野菜果実ジュース A で調製した試験液 A における各農薬の平均面積値を 100% とし、試験液 B~K における各農薬の平均面積比 (%) を算出した。

今回の評価指標として、平均面積比 85~115% を同等のマトリックス効果が得られる範囲と定義し、試験液 A と比較した。

【結果及び考察】

代表的な結果として試験液 E および H について、平均面積比の分布をヒストグラムで示した(図 1)。

試験液 E で平均面積比が 85~115%に入る農薬数は、199 成分中 195 であった。これは、試験液 E の調製に使用した野菜果実ジュース E の原材料が野菜果実ジュース A と類似するためと考えられた。

一方、試験液 H では平均面積比が 85~115%に入る農薬数は、199 成分中 48 であった。これは、試験液 H の調製に使用したのは野菜ジュースであり、野菜果実ジュース A から得られるマトリックスとの差が大きいためと考えられた。

次に、内部標準を活用し、各農薬の TPP に対する面積比で同様に比較した場合、相対面積比 85~115%に入る農薬数は、試験液 E および H で、それぞれ 187 および 154 であった (図 2)。内部標準による補正は、結果に差があった試験液 H で特に有効であった。

以上の結果から、野菜果実ジュースについて、類似の原材料の製品を選択すれば、同等のマトリックス効果が得られると考えられた。野菜ジュースについては、野菜果実ジュースと同等のマトリックス効果は得られなかった。また、内部標準による補正は有効であると考えられた。現在、他の製品についても解析を進めている。今後、最終的に PEG および TPP と併用した場合についても検討し、その代替性について検証を進める予定である。

【謝 辞】

本研究の一部は、厚生労働科学研究補助金「検査機関の信頼性確保に関する研究」により実施した。

【文 献】

- 1) 福井直樹ら：汎用マトリックス添加標準溶液を活用した野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価、食品衛生学雑誌、56 (4)、印刷中 (2015)

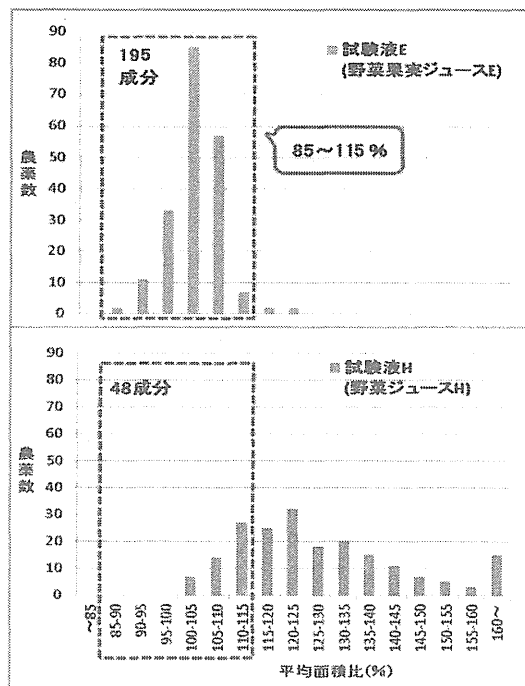


図 1 試験液 A に対する試験液 E および H の結果 (内標補正なし)

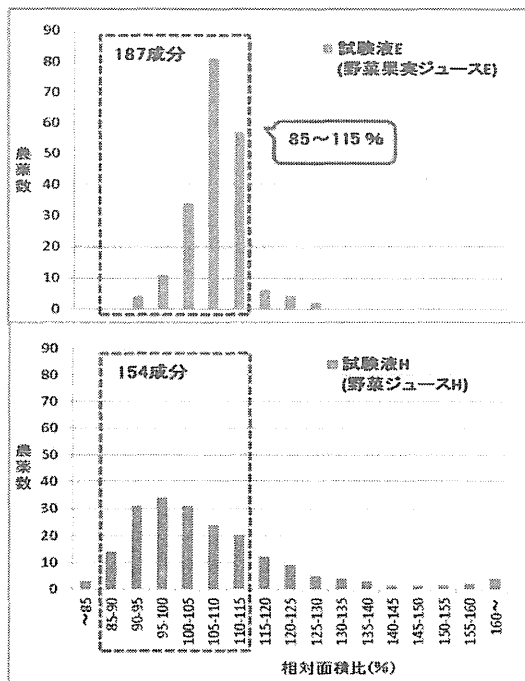


図 2 試験液 A に対する試験液 E および H の結果 (内標補正あり)

QuEChERS 法と一斉試験法による玄米中農薬の定量値の比較

○大竹貴光、鎗田孝
(国研) 産業技術総合研究所

【目的】食品中の残留農薬分析において、簡便かつ迅速に結果が得られるQuEChERS法は、世界的にも広く普及している。その妥当性は、添加回収試験で確認されている例が多いが、抽出過程を含めた評価のためには不十分な場合も考えられる。そこで本報告では、農薬が残留した玄米を試料とし、十分に妥当性確認された通知試験法（一斉試験法）で得られた定量値と比較することにより、QuEChERS法の評価を行った。

【方法】試料および対象農薬：玄米に適当量が残留するように農薬を散布し、原料として栽培した。これを凍結粉碎、乾燥、均質化した後、滅菌処理を行い、-30℃程度で遮光保管した。散布農薬は、エトフェンプロックス、フェニトロチオン、チアメトキサムを含む5種とした。分析法 (QuEChERS法)：水浸漬後、アセトニトリルを用いた振とう（手振り）により抽出を行った。得られた抽出液は、PSA、グラファイトカーボン、C18、MgSO₄を添加した分散固相抽出により精製した。分析法 (一斉試験法)：水浸漬後、アセトニトリルを用いたホモジナイズにより抽出を行った。得られた抽出液は、C18カラムおよびグラファイトカーボン/NH₂積層カラムにより精製した。測定法：ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) または液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いた同位体希釈質量分析法により行い、マトリックスマッチング法を用いた。

【結果と考察】QuEChERS法および一斉試験法によって得られた玄米中農薬の分析結果を、図に示す。本報告の対象農薬において、両方法の定量値に大きな差は見られなかった。これよりQuEChERS法は、玄米中に含まれていた対象農薬を、簡易的な抽出操作にもかかわらず、一斉試験法と同等に抽出できることが示された。GC/MS測定においては、QuEChERS法の試料でマトリックス効果の影響が特に大きかった。具体的には、標準液のマトリックスマッチングの有無により、定量値にエトフェンプロックスで13%、フェニトロチオンで22%の差が見られた。信頼性が高い定量値を得るためには、既往の研究と同様に、マトリックスマッチング法を含めた測定条件の検討も重要であることが示された。

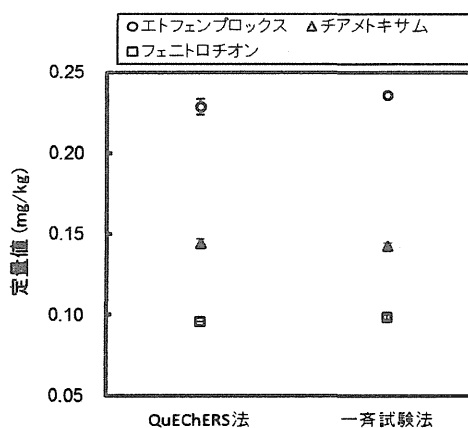


図 QuEChERS法と一斉試験法によって得られた玄米中農薬の定量値（各プロットは平均値、エラーバーは標準偏差を示す；QuEChERS法： $n=3$ ；一斉試験法： $n=4$ ）