LC-MS/MS による河川水中農薬分析におけるマトリックス効果

四ノ宮美保*

埼玉県立大学保健医療福祉学部 (〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820)

*研究実施時の所属: 環境省環境調査研修所 (〒359-0042 埼玉県所沢市並木3-3)

[平成28年4月14日受付, 平成28年10月16日受理]

Matrix Effects Observed during the Analysis of Pesticides in River Water by LC-MS/MS

Miho SHINOMIYA*

School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University

(820 San-nomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540)

*National Environmental Research and Training Institute, Ministry of the Environment

(3-3 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-0042)

[Received April 14, 2016; Accepted October 16, 2016]

Summary

Matrix effect is one of the major problems in quantitative analysis of organic compounds in environmental sample. The aim of this study was to determine the matrix effect in the analysis of 42 pesticides in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with two kinds of approaches. One approach was a conventional way to compare pesticide responses between the pesticide-spiked solution of river water sample and the pesticide standard solution. The other was using a chromatographic profile of a pesticides constantly added to a postcolumn eluate of river sample (PCI method). The matrix-effects were varied among the pesticides. Almost no ion suppression was observed for the ions of metalaxyl, cafenstrole and isoxathion. On the other hand, the ionization efficiencies of some other pesticides added by PCI were varied with the retention times of river water components. Ion suppression in the analysis of the pesticides was examined with river water samples collected at 7 of sampling sites. Because the matrix components were varied among the sites, it is difficult to prepare a "matrix-matched standard" which eliminates the matrix-effects. A method for diluting sample solution was examined to reduce the ion suppression. The suppression between 30 and 50% could be reduced to below 10% by 5-fold dilution of water sample, and for the suppression above 50%, the sample dilution was not effective to reduce the suppression. A sample clean-up method with solid phase extraction (SPE) was examined in two different pHs to reduce the matrix-effects. The ion suppression in water sample of non-adjusted pH (pH around 9) was smaller than that in the sample adjusted pH3. Then, in the case of measuring non-acidic pesticides, better results can be expected with smaller matrices from water sample of non-adjusted pH.

Key words: LC-MS/MS, pesticides, river water, matrix effect

1. はじめに

医薬品とその代謝物, 残留農薬あるいは環境汚染有機化学物質などの微量分析において, 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS 法) が主要な機器分析法として用いられるようになってきた。特に, 高選択性かつ高感度である高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の普及により, 環境分析の分野においても LC-MS/MS を用いた環境化学物質の分析法開発に関する論文は年々増加しており, また国内の様々な公定法に LC/MS 法が採用されている¹⁻⁴⁾。しかしながら, LC/MS 法におけるマトリックス効果は「定量分析におけるアキレス腱」と言われており⁵⁾, この十数年間に生体や食品中の微量分析分野においてマトリックス効果の

現象, 原因及び対策に関する多くの研究が行われてきた⁶⁻⁸⁾。また, 河川水や排水試料における環境汚染物質分析に関するマトリックス効果の研究も近年報告されている^{9,10)}。一方では, マトリックス効果の評価を, 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた分析方法のパリテーション項目に入れるべきであるとの報告もあり¹¹⁾, 現在では分析法開発に関わる多くの論文においてマトリックス効果の評価が実施されている¹²⁻¹⁴⁾。

IUPAC によると, マトリックス効果は「The combined effect of all components of the sample other than the analyte on the measurement of the quantity」と定義されており¹⁵⁾, LC/MS 法では共溶出する試料由来成分によってイオン化の抑制や促進が観測される。そのため, 定量分析において誤った定量値を与える, 検出・定

量下限値を上昇させるなどの問題を引き起こす。マトリックス効果への対処方法としては、①マトリックスの量を減少させる方法（試料液のクリーンアップ、試料液の希釈¹⁶⁾・注入量の減少など）、②マトリックス効果を減少させる（エレクトロスプレーイオン化法（ESI法）から大気圧化学イオン化法（APCI法）への変更^{17,18)}、ESI法による positive モードから negative モードへの変更⁹⁾、及び移動相（溶離液）等液体クロマトグラフ（LC）条件の最適化による干渉成分との分離など）、③マトリックス効果を相殺する方法（安定同位体標識化合物を使用した内標準法¹⁹⁻²¹⁾、マトリックスマッチング法²²⁾、標準添加法²³⁾やエコピーク法²⁴⁾など）が挙げられる。

このうち、①の試料液のクリーンアップや②の LC 条件の変更などによる改善法は、多成分一斉分析では物理化学的性質の異なる種々の成分を分析の対象としているために、適切な条件を検討することが難しい等の問題点が挙げられる。最近では、2次元クロマトグラフィーを用いる方法も報告されているが²⁵⁾、通常の装置よりも初期の設置と運用にコストがかかることなどから、まだ公的なモニタリング法には採用されていない。一方、実務的に最も簡便かつ迅速な方法として、①の試料液の希釈・注入量の減少などが頻繁に使用されており、食品中の残留農薬の分析例としてどの程度の希釈が必要であるかを検討した報告がある¹⁶⁾。ただし、質量分析計に導入される対象物質の絶対量が減少するため、測定方法の検出・定量下限値が上昇する問題が残る。

食品中の残留農薬の分析においては、③のマトリックスマッチング法が対処方法の一つとして広く使用されている²²⁾。測定試料と同一のマトリックスを含む溶液を用いて作成した検量線で定量する方法であるが、測定対象の食品の種類により、イオン化に影響を与える夾雑成分が異なるため、その検量線の傾きも違ってくる。したがって、食品の種類ごとに検量線を作成する必要がある、時間や手間、費用がかかる。また、環境試料においては同じ媒体（土壌、表層河川水、底質等）であっても採取場所や時季によってマトリックスの構成成分が様々であること、測定対象成分を含まないブランク試料を得にくいことなどの問題がある。

安定同位体標識化合物を使用した内標準法は、安定同位体標識化合物を前処理前あるいは LC-MS での測定試料液に添加して測定を行い、安定同位体標識化合物に対する測定対象物質の濃度比を横軸に、縦軸に安定同位体標識化合物に対する測定対象物質の測定対象物質のピーク面積比をとった検量線を使用して定量値を得る方法である。この方法では、測定対象物質と共溶出する安定同位体標識化合物がマトリックス効果を測定対象物質と同程度に受けるため、適切な補正方法の1つとして使用されている¹⁹⁻²¹⁾。しかし、市販されている安定同位体標識化合物の種類が少ないこと、その価格が高額であることなどから適用には限界がある。特に、多成分一斉分析においては、全ての対象物質について安定同位体標識化合物を入手することは困難であるため、数種の安定同位体標識化合物あるいは対象物質と保持時間がほぼ同一の物質や構造の類似した物質を用いて、複数の測定対象物質の補正を行うことが多いが、わずかな保持時間の違いによって、共溶出するマトリックス成分の種類や量が異なることがあり、適切な補正ができない場合がある。同じ③の標準添加法は、金属分析などで汎用されている方法であるが、1試料当たり4点以上の測定を行わなくてはならないこと、補外法であるために精密性が低いことや検量線が一次関数（直線）になる範囲でしか適用できないなどの問題がある。また、エコピーク法は試料注入の後、適切な時間を空けて濃度既知の標準液を注入して補正を行う方法であるが、試料由来の測定対象物質と後から注入した標準液由来の測定対象物質の保持時間が異なるために、マトリックス成分の影響を同等に受けない場合もあり正確な補正が常にできるとは限

らない。

一方で、③の手法の一つとしてポストカラムインフュージョン法（PCI法）がマトリックス効果の評価や補正法として利用されている²⁶⁻³⁰⁾。この手法による評価は、分離カラムからの溶出液に外部シリンジポンプを用いて一定流量で分析対象物質の標準液を合わせ、質量分析計のイオン源に導入しそのイオン強度を試料抽出液と溶媒の注入で比較することによる。通常法（試料抽出液と測定試料液調製用溶媒それぞれに測定対象の標準液を添加して測定を行い、面積値を比較する方法、一般には1濃度で比較）やマトリックスマッチング法（評価では検量線の傾きを比較）では、測定対象物質と同じ保持時間の共溶出物のみの影響しか評価できないが、PCI法では物質のイオン化に対して、全クロマトグラフ領域で溶出されるマトリックス成分の影響を評価でき、物質のイオン化の影響の受け易さや前処理でのクリーンアップ効果の比較に利用されている。マトリックスの影響に対する補正では、適切な参照物質をシリンジポンプからインフュージョンして、得られた参照物質のイオン強度の変化からマトリックス効果の度合いを保持時間に応じて求め、測定対象物質の定量値を補正する。1回の測定でマトリックス効果補正用のデータと定量用データを得ることができる利点がある。しかし、測定対象物質と参照物質でマトリックスからの影響を受ける度合いが一致していることが前提であり、一致しないと算出した補正值は誤差が大きくなってしまう。

上記のような種々の対処法がある中で、②マトリックス効果を減少させる、及び③マトリックス効果を相殺する方法でも、イオン化抑制が起きている場合、検出・定量下限値の上昇の問題は解決できないため、評価すべき濃度の観点からの制約も多い。

著者はこれまでにゴルフ場で使用される42農薬の液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC/MS/MS法）での河川水試料中の多成分一斉分析に際し、添加回収試験を行い、一部の農薬において精製水試料での回収率は確保できるものの、実試料では70%未満の回収率しか得られず、その原因がマトリックス成分によるイオン化抑制であることを報告した³¹⁾。そこで、本研究では、LC/MS/MS法による河川水中農薬の多成分一斉分析におけるマトリックス効果の適切な対処法を見出すことを目指し、マトリックス効果の特性を明らかにすることを目的とした。特に、(i) 河川水の夾雑成分はどの保持時間範囲まで影響を与えているのか、またどのような物質がマトリックスの影響を受け易いのか、(ii) 安定同位体標識化合物を使用した内標準法では、限られた費用と供給可能物質の中で、どのような物質を内部標準物質として選択すればいいのか、(iii) マトリックスマッチング法は河川表層水について適用可能であるのか、(iv) 希釈による方法を採用する場合、どの程度の希釈が必要か、(v) 他にマトリックス削減のための簡易的な手法はないか、などについて42種の農薬を用いて検討を行った。

2. 方法

2.1 試薬等

対象農薬として、ゴルフ場で使用される農薬の水質汚濁の防止に係る暫定指導指針別添 II 1法に示されている LC-MS/MS 測定対象物質のうちフェニトロチオンを除く42種を選択した。各対象農薬の標準品は Dr. Ehrenstorfer GmbH、和光純薬工業、関東化学及び林純薬から購入したものをメタノールに溶解して500あるいは200 µg/mL の標準原液を作成し、必要に応じてメタノールあるいはメタノール-精製水（1:1, v/v）で希釈して、測定条件の検討及び PCI 法によるマトリックス効果の検討に用いた。PCI 法用には、11 種農薬混合標準液（クロチアニジン、カフェンストロール脱カルバ

モイル体, シマジン, メタラキシル, ポスカリド, カフェンストロール, テブフェノジド, テブコナゾール, イソキサチオン, ジフェノコナゾール各50 ng/mL, メコプロップ65 ng/mL, メタノール溶液)を調製した。通常法によるマトリックス効果の検討及び添加回収試験では, 関東化学から購入した農薬混合標準液 (各10 µg/mL) をメタノール-精製水 (1:1, v/v) で適宜希釈して使用した。アセトニトリル及びメタノールはLC/MS用 (関東化学製) を, 1 mol/L 酢酸アンモニウムは和光純薬工業製を使用した。精製水は日本ミリポア製 Elix10-MilliQ gradient 超純水製造システムにて精製したものを使用した。固相抽出用カートリッジは Waters 社 Oasis® HLB Plus LP (225 mg) を用いた。

2. 2 試料採取及び試料の前処理

河川表層水は, 埼玉県所沢市東川及び東京都清瀬市柳瀬川等において2012年から2013年にかけて採取した (Site 1~8)。試料水は1 L ガラス製褐色瓶に移した後, 前処理に供するまで4℃にて保存した。試料の前処理はゴルフ場排水における農薬の分析方法³¹⁾に若干の変更を加えた方法を採用した³¹⁾。Fig. 1に示したように, 試料200 mLに1 mol/L 塩酸を加えてpH3に調整後, ジクロロメタン, アセトン, メタノール及び精製水でコンディショニングした固相カートリッジ Oasis® HLB plus LPに通水した。通水は, Waters 社製 SEP-PAK® コンセントレータを使用し, 流速10 mL/minで行った。固相カートリッジは10 mLの精製水で洗浄後, 遠心分離 (3000 rpm, 10 min) 及び窒素ガス通過により水分を除去後, アセトン5 mL及びジクロロメタン2 mLにより溶出を行った。溶出液は窒素気流下にてほぼ乾固の状態まで濃縮した後, 2 mLのメタノール-精製水 (1:1, v/v) に再溶解し, この溶液を試料抽出液として後の実験に使用した。

2. 3 分析装置及び測定条件

液体クロマトグラフは SHIMADZU 製 Prominence (LC20 series) を, タンデム質量分析計としては Thermoscientific 製 TSQ Quantum Access MAX を使用した。分離カラムは化学物質評価研究機構 (CERI) 製の L-column 2 ODS (2.1 mm × 100 mm, 3 µm) を使用し, 移動相は A 液: 2 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液, B 液: メタノールを使用し, カラム温度40℃, 流量0.20 mL/min, 注入量7 µLにて測定を行った。なお, グラジエント条件は以下のとおり実施した。初期条件20% Bから3分間で60% Bに, 続く7分間で65% Bに, さらに5分間で90% Bにそれぞれ直線的に比率を上げたのち, 90% Bで5分間保持してから, 初期条件に戻して次の測

定のためにカラムの平衡化を行った。

イオン化法は ESI 法で, Spray voltage: 3.5 kV (positive モード) 及び -2.5 kV (negative モード), Capillary temperature: 150℃, Vaporizer temperature: 400℃, Sheath gas pressure: 50, Aux. gas pressure: 15, Ion sweep gas pressure: 0, Collision gas pressure: 1 mbar の条件で測定を行った。検出は Selected Reaction Monitoring (SRM) 法により実施し, Cycle time は1秒に設定した。測定に使用した各農薬のイオンランジション, チューブレングスオフセット電圧及びコリジョンエネルギーは Table 1に示した。分析装置の制御, データ採取及び解析は Xcalibur (Thermoscientific 社製) を使用した。

2. 4 マトリックス効果の評価 I (通常法)

評価手法として Matuszewski らの方法⁹⁾を用い, 500 µL の試料抽出液及びメタノール-精製水 (1:1, v/v) に10 µL の標準液 (各500 ng/mL) をそれぞれ添加し, 各試料液 (最終濃度9.8 ng/mL) を作成した。「2.3分析装置及び測定条件」に従って LC-MS/MS による SRM 測定を行い, 得られた各対象物質の応答値 (面積値) から以下の (1) 式を用いてマトリックス効果を算出した。なお, 測定は3回行い, マトリックス効果の算出には平均値を用いた。

$$\text{マトリックス効果 ME (\%)} = (\text{Ab} - \text{As}) / \text{Aa} \times 100 \quad (1)$$

ここで,

Aa = (メタノール-精製水 + 標準液) を測定した時の測定対象物質の面積値

Ab = (試料抽出液 + 標準液) を測定した時の測定対象物質の面積値

As = (試料抽出液) を測定した時の測定対象物質の面積値

2. 5 マトリックス効果の評価 II (ポストカラムインフュージョン法: PCI 法)

方法の概要を Fig. 2に示した。まず, 7 µL のメタノール-精製水 (1:1, v/v) を LC に注入し, 2.4に示した LC 条件のとおり溶出を行った。同時にインフュージョン用11種農薬混合標準液を, マイクロシリンジポンプ MSPE-1 (アズワン製) を用いて 5 µL/min の一定速度で流し, T 字ジョイントを介してカラムからの溶出液と合わせて, ESI インターフェースに導入した。SRM 測定は, Table 1における定量用ランジションのみを用い, シグナル強度 (*SI_i*) は1.5秒ごとに取り込む設定とした。次に, メタノール-精製水 (1:1, v/v) の代わりに河川水試料の抽出液を LC に注入し, 同様にシグナル強度 (*SI_{ie}*) のデータを得た。一方で, 試料抽出液とメタノール-精製水に含有する測定対象物質の影響を取り除くため, 11種農薬混合標準液の代わりにメタノールをシリンジポンプから導入して測定を行い, 得られたイオン強度データ (*SI_{is}*: メタノール-精製水注入及び *SI_{ie}*: 試料抽出液注入) をバックグラウンドとしてそれぞれ差し引いた。計算は, 各測定から得られたシグナル強度 (*SI_i*) データをテキストファイルに変換後, Excel により Stahnke らの方法³⁰⁾を参考にして, 以下の式 (2) に従って実施した。ただし, スムージング処理は実施しなかった。なお, 測定はそれぞれ3回行い, マトリックス効果の算出には平均値を使用した。

$$\begin{aligned} \text{マトリックス効果 PCI-ME (\%)} \\ = \{ (SI_{ie} - SI_{is}) / (SI_{is} - SI_{is}) \} \times 100 \end{aligned} \quad (2)$$

ここで,

SI_{is}: メタノール-精製水を注入 + 農薬混合標準液をインフュージョンした場合のイオン強度

Fig. 1 Sample preparation scheme of a sample containing matrices from river water

Table 1 The LC-MS/MS conditions for the target pesticides

Pesticide	Polarity	Retention time (min)	Q transition ^a	TL offset V ^b (V)	CE ^c (eV)	q transition ^d	TL offset V ^b (V)	CE ^c (eV)
Thiamethoxam	Positive	4.63	292.0 > 211.1	89	12	292.0 > 181.1	89	23
Imidacloprid	Positive	5.37	256.0 > 209.1	101	15	256.0 > 175.2	101	19
Clothianidin	Positive	5.47	249.9 > 169.1	104	13	249.9 > 132.1	104	15
Acetamiorid	Positive	5.79	223.0 > 126.2	97	22	223.0 > 90.3	97	34
Flazasulfuron	Positive	6.13	408.0 > 182.0	95	19	408.0 > 139.0	95	38
Halosulfuron-methyl	Positive	6.82	435.0 > 182.0	91	20	435.0 > 139.1	91	43
Cafenstrole metabolite	Negative	7.05	250.1 > 186.2	101	20	250.1 > 131.0	101	20
Simazine	Positive	7.43	202.1 > 132.0	78	21	202.1 > 124.0	78	20
Ethoxysulfuron	Positive	7.47	399.0 > 261.1	88	16	399.0 > 218.1	88	26
Triclopyr	Negative	7.83	253.8 > 196.0	75	15	255.8 > 198.0	75	15
Mecoprop (MCP)	Negative	8.15	213.0 > 141.0	75	18	215.0 > 143.0	75	18
Metalaxyl	Positive	8.67	280.1 > 220.2	98	13	280.1 > 248.2	98	8
Cyclosulfamuron	Positive	8.88	422.1 > 261.1	97	16	422.1 > 218.1	97	28
Azoxystrobin	Positive	10.01	404.0 > 372.0	85	14	404.0 > 183.0	85	37
Siduron	Positive	10.46 ^e	233.1 > 137.1	93	16	233.1 > 94.2	93	19
Boscalid	Positive	10.93	342.9 > 307.0	108	17	342.9 > 271.1	108	29
Flutolanil	Positive	11.44	324.0 > 262.0	96	18	324.0 > 242.0	96	26
Isoprothiolane	Positive	11.58	291.0 > 231.0	89	12	291.0 > 189.0	89	22
Mepronil	Positive	11.58	270.2 > 228.0	86	18	270.2 > 119.0	86	21
Propyzamide	Positive	11.66	256.0 > 190.0	85	16	256.0 > 173.0	85	24
Cafenstrole	Positive	12.05	351.1 > 100.3	92	11	351.1 > 72.3	92	33
Cyproconazole	Positive	12.60 ^e	292.0 > 70.3	96	19	292.0 > 125.2	96	31
Triflumizole metabolite	Positive	13.24	295.0 > 215.0	102	21	295.0 > 196.0	102	18
Simeconazole	Positive	13.36	294.1 > 70.3	97	19	294.1 > 135.3	97	18
Tetraconazole	Positive	13.59	372.0 > 159.1	104	28	372.0 > 70.3	104	22
Thifluzamide	Negative	14.22	526.8 > 166.0	89	22	526.8 > 124.9	89	48
Iprodione	Negative	14.33	328.0 > 243.0	72	13	330.0 > 245.0	72	13
Tebufozide	Negative	14.65	351.2 > 149.0	123	23	351.2 > 104.9	123	36
Bensulide	Negative	14.78	396.0 > 213.0	102	14	396.0 > 111.0	102	42
Tebuconazole	Positive	15.31	308.1 > 70.3	96	21	308.1 > 125.1	96	30
Propiconazole	Positive	15.68 ^e	342.0 > 159.0	95	29	344.0 > 161.0	95	29
Diazinon	Positive	15.71	305.0 > 169.0	90	22	305.0 > 153.0	90	22
Butamifos	Positive	16.15	333.1 > 180.0	94	10	333.1 > 152.0	94	17
Isoxathion	Positive	16.20	314.0 > 105.0	92	18	314.0 > 258.0	92	12
Pencycuron	Positive	16.39	329.0 > 125.0	93	26	329.0 > 218.0	93	16
Difenoconazole	Positive	16.54 ^e	406.0 > 251.0	105	24	406.0 > 337.0	105	15
Terbucarb	Positive	16.71	278.0 > 166.0	87	14	278.0 > 109.0	87	24
Dithiopyr	Positive	17.06	402.0 > 354.1	110	16	402.0 > 272.0	110	29
Triflumizole	Positive	17.07	346.0 > 278.0	86	5	346.0 > 73.3	86	16
Oxaziclomefone	Positive	17.33	376.0 > 190.1	103	14	376.0 > 161.1	103	27
Pyributycarb	Positive	18.03	331.1 > 181.1	82	15	331.1 > 190.2	82	16
Pendimethalin	Positive	18.35	282.0 > 212.0	88	11	282.0 > 194.0	88	20

^a Quantification transition^b Tube Lens Offset voltage^c Collision energy^d Confirmation transition^e Top of higher peak

Fig. 2 Scheme of the postcolumn infusion (PCI) experiment

SFis: メタノール-精製水を注入+メタノールをインフュージョンした場合のイオン強度

SLie: 試料抽出液を注入+農薬混合標準液をインフュージョンした場合のイオン強度

SFie: 試料抽出液を注入+メタノールをインフュージョンした場合のイオン強度

3. 結果及び考察

3. 1 ポストカラムインフュージョン法 (PCI 法) によるマトリックス効果の評価

本研究では、LC-MS/MS による河川水中の農薬分析におけるマトリックス効果を通常法と PCI 法の 2 種の方法を用いて評価した。PCI 法を使用したマトリックス効果の評価方法は、共溶出物のみの影響しか評価できなかった通常法とは異なり、物質のイオン化に対して、全測定領域で溶出されるマトリックスの影響を評価することができる。第 1 セットとして、リファレンスである試料液調製用溶媒を LC 側から注入して測定を行った。農薬混合標準液は一定の流速で導入しているが、LC でのグラジエント溶離により、溶離液の組成が変化するため、メタノール比率の増加に伴いイオン化効率が上昇した (Fig. 3 (a))。第 2 セットでは試料抽出液 (Site 3, 2013 年 5 月採水) を分離カラムに注入して SRM クロマトグラムを取得した (Fig. 3 (b))。得られたそれぞれのクロマトグラムは一致しておらず、試料抽出液に含まれるマトリックス成分によりイオン化が影響を受けていることが示された。

Fig. 3 の下段には、式 (2) に従って各 SRM クロマトグラムから算出したクロチアニジンのマトリックス効果プロファイルを示している。ホールドアップタイムに近い 1.8 分から 2.5 分にかけて 20 ~ 50% 程度のイオン化抑制が認められた後、4 分から 9 分にかけて約 6 分を極小値とした幅広い範囲での 20 ~ 40% 程度のイオン化抑制が認められた。同じ移動相条件を使用した通常法ではクロチアニジンは 5.5 分に溶出してくるため、この時間でのマトリックスの影響しか評価できないが、PCI 法の結果から、比較的広い保持時間範囲でクロチアニジンのイオン化を抑制する成分が溶出しており、わずかなグラジエント条件の変更などではマトリックス効果を回避できないことが確認された。

3. 2 PCI 法と通常法による農薬別のマトリックス効果の評価

Fig. 4 にはクロチアニジン、シマジン、ボスカリド及びテブコナゾールに対するマトリックス効果について、通常法と PCI 法による評価を示した。今回使用した 2013 年 5 月 Site 3 にて採水した河川水試料では、PCI 法によって評価を行った 4 種すべての農薬においてほぼ同一のマトリックス効果プロファイルを示していた。一方、通常法では、クロチアニジンと比べて、ボスカリドやテブコナゾールはイオン化抑制の度合いが小さいが、これは農薬の保持時間によるマトリックス由来の共溶出成分の違いによるものであり、農薬のマトリックスの影響の受け易さに依存しているものでないことが判明した。

Fig. 4 (A) に示したように、4 種の農薬は保持時間 1.6 分において急激なイオン化抑制を受けたのち、保持時間 6 分近辺をピークと

Fig. 3 SRM chromatographic profiles of clothianidin constantly added to the postcolumn elute (PCI analysis, shown in Fig. 2) of a river water sample (Site 3)

(a) the SRM chromatographic profile of 50% methanol-water
(b) the SRM chromatographic profile of a river water sample

した強いイオン化抑制を 4 分から 11 分の間に、また 16 分をピークとした弱いイオン化抑制を受けていた。そこで、どのようなマトリックス成分がイオン化抑制に関与しているのかを調べるため、試料抽出液を LC に注入して PDA 検出器を用いて吸光度を測定すると共に、ESI 法による positive 及び negative モードでのスキャン測定を行った。得られたそれぞれのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。吸光度 (波長: 270 ~ 600 nm, (A)), 正イオン強度 (m/z : 80 ~ 1000, (B)) 及び負イオン強度 (m/z : 80 ~ 1000, (C)) において、保持時間 1.8 分にピークが認められた後、6 分あるいは 6.4 分に緩やかな高いピークが見られ、再度保持時間 14 ~ 18 分の付近でわずかな強度上昇が見られた。このようなクロマトグラムの形状は Fig. 4 (A) における 4 種農薬のマトリックス効果プロファイルを上下反転させたものと類似しており、今回吸光度と正負のイオン強度を上昇させたマトリックス成分が各農薬のイオン化抑制を引き起こしていることが確認されたが、物質の同定には至らなかった。

一方、Fig. 6 (A) には positive モードで測定したメトラキシル、カフェンストロール、イソキサチオン、ジフェノコナゾール及び比較のためのテブコナゾール、negative モードで測定したメコプロップ、カフェンストロール脱カルバモイル体 (代謝産物) 及びテブフェノジドのマトリックス効果プロファイルを示している。ジフェノコナゾールはテブコナゾールと同程度にイオン化抑制を受けていたが、メトラキシル、カフェンストロール及びイソキサチオンは全クロマトグラム範囲でほとんどイオン化に関し影響を受けていなかった。LC/MS 法においては、通常ガスクロマトグラフィー質量分析法で装置の感度変動やサロゲート内標準物質の回収率算出に使用されるシリジンスパイクは添加されない。しかし、これらイオン化抑制を受けにくい物質の安定同位体標識化合物は、河川水中農薬の LC/MS 法において有効なシリジンスパイクとして使用できる可能性がある。

Fig. 4 Matrix effects for clothianidin, simazine, boscalid and tebuconazole in river water at Site 3 (May, 2013) (A) matrix effect profiles of four pesticides calculated from the SRM chromatograms in the PCI measurement (B) relative responses of the pesticides in river water sample to those in 50% methanol-water depicted in those retention times

一般的に、**negative** モードでのイオン化はマトリックス効果を受けにくいと報告されている⁹⁾。そこで、メコプロップ、カフェンストロール脱カルバモイル体及びテブフェノジドの **negative** モードでのイオン化についてマトリックスの影響の差を検討した。今回の河川水試料においては、メコプロップは全領域においてほとんどイオン化抑制を受けていないものの、カフェンストロール脱カルバモイル体は **positive** モードで測定したテブコナゾールと同程度のイオン化抑制を受けていた。また、テブフェノジドにおいてもカフェンストロール脱カルバモイル体よりも若干弱いながらもイオン化抑制を受けていたことから、**negative** モードでの測定においてもイオン化抑制を受ける化合物があり、その度合いは **positive** モードでの測定と同様に化合物によって異なることが明らかとなった。一方で、両モードで検出可能な物質であるチフルザミドとハロスルフロメチルについて、測定モードによるイオン化抑制を比較したところ、**negative** モードの方がイオン化抑制を受けておらず、このモードでの測定が効果的であることが判明した。しかし、**negative** モードでのイオン強度は弱く、検出・定量下限値を考慮すると測定モードの切り替えは有効ではないことが確認された (data not shown)。

Bonfiglio らは生体試料を対象とした有機化合物の分析において、マトリックス効果は物質の性質に依存しており、カフェインなどの

Fig. 5 Chromatograms of UV-Vis absorbance and total ions in ESI of a river water sample (Site 3)

(A) UV-Vis (wavelength: 270–600 nm), (B) total positive ions (m/z : 80–1000), (C) total negative ions (m/z : 80–1000)

親水性物質ほど影響を受けやすい傾向があると報告している²⁷⁾。今回、PCI 法にて農薬の種類によるマトリックス効果の比較を行ったが、比較的疎水性の高いテブコナゾール ($\log Pow = 3.7^{32)}$ やジフェノコナゾール ($\log Pow = 4.4^{32}$) もイオン化抑制を顕著に受けており、物質の極性だけでなく、構造も大きく関与していることが示唆された。今回使用した農薬においては、テブコナゾールのようなトリアゾール環の1位の窒素原子にメチレンが結合した共通部分を有するトリアゾール系殺菌剤のイオン化抑制が顕著に認められた。また、他にイオン化抑制を受けやすい農薬イミダクロプリド、クロチアニジン、シマジン等ではピリジン環、チアゾール環あるいはトリアジン環を有し、環内窒素の α -位に塩素原子が結合した共通構造を有していた (Fig. 7)。しかし、これらの共通部分にある窒素原子のプロトン化がマトリックス成分により抑制を受けるかどうかは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

上記の結果から、LC/MS 法における物質のイオン化抑制の度合いは、物質のイオン化の影響の受け易さと共溶出するマトリックス成分の2つの因子により決定されることが確認された。マトリックス効果の低減のために使用される安定同位体標識化合物を使用した内標準法では、全ての測定対象物質の安定同位体標識化合物を使用することが定量値の正確性の観点からは理想である。しかし、特に多成分一斉分析の場合、予算や供給の問題で制限が生じ、いくつかの安定同位体標識化合物で複数の測定対象物質を補正することになる。このような場合、使用する内部標準物質、その内部標準物質で補正を行う測定物質の組み合わせの選定に際しては、各物質の保持時間だけでなく、イオン化の影響の受け易さ等の性質を検証し、選定をしなければならない。例えば、テブコナゾールの補正には、安定同位体標識したジフェノコナゾールは内標準物質として使用可能

Fig. 6 Chromatographic profiles of pesticides constantly added to the postcolumn eluate (PCI analysis) of river water samples

(A) the profiles of 8 pesticides added to the eluate of a river water sample (Site 3)

(B) the profiles of clothianidin added to the eluates of 3 river water samples

Fig. 7 Chemical structures of the pesticides of which ionization were strongly suppressed in river water analysis

であるが、安定同位体標識したイソキサチオンは使用することはできないと考えられる。

3. 3 試料採取地点及び採取時季の比較

マトリックス効果の対処方法として食品分析においては、マトリックスマッチング法が一般的に使用されている²²⁾。また、河川水などの環境試料においても適用例³³⁾がある。今回、河川水試料中の

42農薬の定量分析におけるマトリックスマッチング法の適用の可否について検討するため、採取場所や時季の異なる試料を用い、マトリックス効果を比較した。

Fig. 8 (A) には2013年5月に採水した Site 1から7までの河川水試料を用いた通常法での結果を示している。Site 3の200 m 程度上流の河川脇には牛舎があり、降雨時には排水が一部河川水に流れ込んでいた。Site 6は下水処理場放流口の直下であり、また Site 7のある河川には生活排水がそのまま排出されていた。イオン化を抑制するマトリックス成分の保持時間はどの河川水でも類似しているものの、Site 4及び5では他の採水地点と比べてマトリックス効果は小さく、Site 3, 6及び7の試料は、強いマトリックス効果を示した。例えば、クロチアニジンは Site 4及び5では20～25%のイオン化抑制が見られたが、Site 3, 6及び7の試料では52～64%のイオン化抑制が認められた。

PCI法での Site 3, 5及び7の試料抽出液によるクロチアニジンのマトリックス効果を Fig. 6 (B) に示している。測定時間全体のマトリックス効果を各試料採取地点で比較すると、保持時間10分程度までは Site 7>Site 3>Site 5の順にイオン化抑制を受けており、それ以降はほぼ同等あるいは Site 3≧ Site 7>Site 5の傾向が見られた。この結果は、通常法において、保持時間5.5分のクロチアニジンのイオン化抑制の度合いが、Site 7>Site 3>Site 5であり、保持時間15.31及び16.54分のテブコナゾールやジフェノコナゾールのイオン化抑制が Site 3>Site 7>Site 5の順になっていたことと一致していた。

表層河川水でも場所や採水時季によりマトリックスの構成成分に多様性があるため、マトリックス効果の対処方法としてマトリックスマッチング法を適用することは困難であることが確認された。今回同一日に採取した試料においてもクロチアニジンなどのマトリックスの影響を受けやすい農薬に関しては、採水地点によってイオン

また、Fig. 8 (B) には Site 2 において2012年7月、2013年3月、5月及び7月に採水した試料でのマトリックス効果を示している。イオン化抑制を受けやすいクロチアニジン、アセタミプリド、シマジンなどにおいては、採水時季によってイオン化抑制の度合いが異なっており、時季によりイオン化に影響を与えるマトリックス成分に違いのあることが確認された。

3. 4. 1 希釈による影響

Stahnke らは食品試料について、農薬分析でのマトリックス効果における抽出液の希釈の影響を詳細に検討しており¹⁶⁾、マトリック

一般的に、環境試料中の有機汚染物質の定量分析では、添加回収試験における回収率の許容範囲は70～120%であり、サロゲート法ではサロゲート物質の回収率が50～120%であることが適用されている。アセタミプリド等のイオン化抑制が約30～50%の農薬では、前処理過程での物質の回収量自体にもよるが、5倍希釈すればこの回収率許容範囲を満足できる。一方、クロチアニジンのように60%以上のイオン化抑制を受けている物質においては、許容できる回収率範囲を満たすには20倍程度の希釈が必要となる。ただし、希釈法の適用の可否や希釈率の決定には要求される検出感度を考慮しなければならない。要求感度によっては希釈法や安定同位体標識化合物による内標準法のそれぞれ単独では回収率の確保は困難となり、両手法の併用やクリーンアップによるマトリックス成分の除去を検討しなければならないこととなる。

逆相系充填剤の固相カートリッジを用いて水質試料から固相抽出を行う際、測定対象物質に酸性物質が含まれている場合は、試料液を酸性にして物質を非解離状態で通水すると回収率が上昇する。今回の測定対象農薬には、フラザスルフロン ($\text{pK}_a=4.37^{32})$ やメコプロップ ($\text{pK}_a=3.78^{32})$ などの酸性農薬が含まれているため、固相抽出では、試料液を pH3 に調整後通水を行った。一方、LC/MS/MS 法による河川水試料中の有機汚染物質の定量分析では、フミン酸が測定物質のイオン化を抑制すること、さらに逆相系充填剤を用いた固相抽出操作において、pH7 の中性条件下で試料水を通水すると pH3 等の酸性条件下よりも試料抽出液に含まれるフミン酸量が少なくなり、イオン化抑制は減少することが報告されている³⁴⁻³⁸⁾。そこで、固相抽出操作時における試料液の pH 調整 (pH3) の有無によるマトリックス効果を比較した。Fig. 10 には 2013 年 7 月に Site 3 で

Fig. 9 Matrix effects in different dilution factors of sample solution (at Site 7 in May, 2013). Non-dilution: □, 5-fold dilution: ▨, 20-fold dilution: ▩, 100-fold dilution: ■

Fig. 10 Matrix effects in two different pH of sample water (at Site 3 on May, 2013). pH3 (□), and unadjusted (■: pH9)

採取した河川水試料 (pH 無調整の場合, pH9) での結果を示している。イプロジオンを除くすべての農薬において、イオン化抑制は試料水を pH3に調整しなかった場合が調整を行った場合よりも低くなった。ただし、クロチアニジンは pH 無調整の条件でも20%を超えるイオン化抑制を受けており、クロチアニジンと共溶出するマトリックス成分は十分には減少していないことが確認された。なお、イプロジオンにおいては、河川水試料から添加量の約4割に相当する農薬が検出されており、pH3に調整した試料でイオン強度比が100%を超えたのは、測定値のバラツキのためであると推測される。また、イプロジオンは弱塩基性条件下で分解されやすい農薬である (pH9, 25℃での半減期: 27.2分)³²⁾。試料水を pH3に調整すると、前処理中イプロジオンは分解されずに残存し、試料抽出液に持ち込まれるが、無調整 (pH9) の測定では、前処理中に分解されてしまい、試料抽出液には残存していなかった。このため、無調整の場合は、バラツキもなく、他の農薬と同等のイオン化抑制の値を示したと考えられる。

試料液の pH 調整の違いによる42農薬の添加回収率を比較するため、上記のマトリックス効果の比較で使用した試料と同一の河川水試料を用いて添加回収試験を行った。Table 2に示したように、クロチアニジンやシマジンなどでは試料を pH3に調整したよりも無調整の方が、高い回収率を示した。一方、酸性農薬であるフラザスルフロンやエトキシスルフロンなどの6農薬とカフェンストロール脱カルバモイル体では、pH 無調整の方がより低い回収率を示し、ほとんど回収されないことがわかった。またイプロジオンは前述のとおり弱塩基性条件下では分解されるため、pH3に調整しない場合は40%程度の低い回収率となった。試料水の pH を酸性に調整せずに固相抽出操作を行う方法はマトリックス効果を抑える方法として有効であるが、酸性物質や中性及び塩基性条件下で分解されやすい物質には適用できないことを考慮しなければならない。

Table 2 Recovery of the pesticides from river water (Site3, July 2013) adjusted to pH3 and not adjusted (pH9)

Pesticide	pH3		Unadjusted (pH9)		Pesticide	pH3		Unadjusted (pH9)	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Thiamethoxam	84.7	2.4	93.0	2.6	Cyproconazole	82.7	2.3	96.1	1.3
Imidacloprid	77.5	2.0	89.3	2.9	Triflumizole metabolite	98.1	4.2	101.2	3.3
Clothianidin	61.1	3.3	80.3	2.4	Simeconazole	83.7	1.8	95.9	1.8
Acetamiorid	75.8	0.7	88.2	3.3	Tetraconazole	82.1	1.2	94.4	3.5
Flazasulfuron	76.8	1.8	1.7	1.3	Thifluzamide	95.4	0.6	99.6	2.9
Halosulfuron-methyl	76.9	1.8	0.5	7.6	Iprodione	93.1	6.9	38.5	80.4
Cafenstrole metabolite	66.0	0.4	5.5	33.4	Tebuconazole	97.6	2.3	101.0	3.6
Simazine	67.9	3.8	95.0	4.7	Bensulide	92.8	0.6	98.5	2.7
Ethoxysulfuron	89.5	0.8	ND	-	Tebuconazole	87.3	2.8	98.1	3.4
Triclopyr	101.5	2.5	4.3	8.5	Propiconazole	79.9	0.5	94.5	1.8
Mecoprop (MCPP)	105.1	2.6	2.5	8.4	Diazinon	89.2	0.7	93.3	3.9
Metalaxyl	94.5	0.8	95.7	3.3	Butamifos	91.7	1.4	92.8	2.2
Cyclosulfamuron	95.5	0.8	ND	-	Isoxathion	92.5	2.2	94.9	2.5
Azoxystrobin	97.6	1.7	100.4	1.1	Pencycuron	92.0	1.4	96.4	1.3
Siduron	102.1	3.7	99.8	3.6	Difenoconazole	70.9	1.7	90.2	0.9
Boscalid	85.6	3.9	95.6	0.6	Terbucarb	94.7	0.6	92.2	3.1
Flutolanil	93.8	2.6	96.6	1.1	Dithiopyr	73.5	4.0	79.0	10.8
Isoprothiolane	102.4	0.5	100.3	2.1	Triflumizole	78.6	4.1	79.5	2.4
Mepronil	98.0	1.4	100.4	1.4	Oxaziclonofone	91.0	1.0	91.9	1.1
Propyzamide	96.2	2.4	98.0	2.1	Pyributycarb	84.0	1.6	87.9	1.1
Cafenstrole	98.1	2.6	97.1	4.0	Pendimethalin	79.2	1.3	79.6	4.2

*Concentration of pesticides : 0.1 μg/L each, n = 3

Italic numbers: < 70%

要 約

LC-MS/MS による環境試料中の有機化合物の定量分析ではマトリックス効果への対処が重要課題となっている。そこで本研究では、LC-MS/MS による河川水中農薬の多成分一斉分析におけるマトリックス効果の特性を明らかにし、各種対処法の適用条件を検討した。PCI 法は、分離条件を変更した場合の農薬のマトリックス効果の変化を推察することができ、その変化は農薬によって大きく異なることがわかった。採取場所や時季の異なる試料ではマトリックス効果の度合いが異なること、また希釈法について検討したところ、30～50%のイオン化抑制を示す試料液は5倍希釈することにより10%未満の抑制にできることが確認された。さらに試料水の固相抽出操作を非酸性下で行うとイオン化抑制は減少し、添加回収試験も良好な結果が得られたが、非酸性下で固相に保持されないあるいは分解される農薬には適用できないことがわかった。以上から、安定同位体標識化合物による内標準法では、内部標準物質の選択の際には物質の保持時間とマトリックス効果の受け易さの検討が必要であること、河川水試料へのマトリックスマッチング法の適用は困難であること、また試料水の固相抽出時での pH は対象物質に応じた調整が重要であること等が示唆された。

文 献

- 1) ゴルフ場で使用される農薬の水質汚濁の防止に係る暫定指導指針（平成2年5月24日環水土第77号 最終改正平成25年6月18日環水土第1306181号）別添、92-98（2013）
- 2) 水質管理目標設定項目の検査方法（平成15年10月10日健水発第1010001号 最終改正平成28年3月30日）厚生労働省健康局水道課、85-106（2016）
- 3) 水質汚濁に係る環境基準について（昭和46年12月28日環境庁告示第59号 最終改正 平成26年11月17日環境省告示126号）付表12
- 4) 食品の残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（平成17年1月24日食安基発第0124001号 最終改正平成28年4月4日生食発0404第5号）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 別添
- 5) Taylor, P.J.: Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.*, **38**, 328-334 (2005)
- 6) Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. and Chavez-Eng, C.M.: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.*, **75**, 3019-3030 (2003)
- 7) Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D. and Gennaro, M.C.: Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3929-3937 (2010)
- 8) Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G. and Cappiello, A.: An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 491-509 (2011)
- 9) Marin, J.M., Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., López, F.J. and Hernández, F.: Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1410-1420 (2009)
- 10) Zhou, J.L. and Kang, Y.: Matrix effect in high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of antibiotics in environmental water samples. *J. Sep. Sci.*, **36**, 564-571 (2013)
- 11) Rogatsky, E. and Stein, D.: Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: New parameters for validation of method development. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1757-1759 (2005)
- 12) Shinomiya, M.: Determination of pesticides originating from golf courses by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **93**, 858-871 (2013)
- 13) Al-Qaim, F.F., Abdullah M.P., Othman M.R., Latip, J. and Zakaria, Z.: Multi-residue analytical methodology-based liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in surface water and effluents from sewage treatment plants and hospitals. *J. Chromatogr. A*, **1345**, 139-153 (2014)
- 14) Jank, L., Hoff, R.B., da Costa, F.J. and Pizzolato, T.M.: Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **94**, 1013-1037 (2014)
- 15) Guilbault, G.G. and Hjelm, M.: Nomenclature for automated and mechanized analysis. *Pure & Appl. Chem.*, **61**, 1657-1664 (1989)
- 16) Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G. and Alder, L.: Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Anal. Chem.*, **84**, 1474-1482 (2012)
- 17) Schuhmacher, J., Zimmer, D., Tesche, F. and Pickard, V.: Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: Practical approaches to their elimination. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1950-1957 (2003)
- 18) Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., Ng, K. and Korfmacher, W.A.: Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: Application to drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 97-103 (2003)
- 19) Köck-Schulmeyer, M., Olmos, M., López de Alda, M. and Barceló, D.: Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1305**, 176-187 (2013)
- 20) 成宮正倫, 中田典秀, 小西千絵, 宝輪 勲, 田中宏明: 代替サロゲートを用いた環境試料中医薬品類の分析, 第19回環境化学討論会講演要旨集, 534-535 (2010)
- 21) Vanderford, B.J. and Snyder, S.A.: Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 7312-7320 (2006)
- 22) Lehotay, S.J., de Kok, A., Hiemstra, M. and van Bondegraven, P.: Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC int.*, **88**, 595-614 (2005)
- 23) Garcia-Rodríguez, A., Sagristà, E., Matamoros, V., Fontàs, C., Hidalgo, M. and Salvadó, V.: Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using a standard addition method

- approach. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **94**, 1199–1209 (2014)
- 24) Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Poustka, J. and Begany, P.: Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J. Chromatogr. A*, **973**, 13–26 (2002)
 - 25) Kittlaus, S., Kempe, G. and Speer, K.: Evaluation of matrix effects in different multipesticide residue analysis methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, including an automated two-dimensional cleanup approach. *J. Sep. Sci.*, **36**, 2185–2195 (2013)
 - 26) Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempe, G. and Speer, K.: Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 8399–8410 (2011)
 - 27) Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V. and Merkle, K.: The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 1175–1185 (1999)
 - 28) Dams, R., Huestis, M.A., Lambert, W.E. and Murphy, C.M.: Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 1290–1294 (2003)
 - 29) Choi, B.K., Gusev, A.I. and Hercules, D.M.: Postcolumn introduction of an internal standard for quantitative LC-MS analysis. *Anal. Chem.*, **71**, 4107–4110 (1999)
 - 30) Stahnke, H., Reemtsma, T. and Alder, L.: Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multi-residue analysis with LC-MS/MS. *Anal. Chem.*, **81**, 2185–2192 (2009)
 - 31) 四ノ宮美保, 岩切良次, 渡辺靖二: LC-MS/MS による河川水中ゴルフ場農薬の一斉分析, 第21回環境化学討論会講演要旨集, 763–764 (2012)
 - 32) “The Pesticide Manual 15th Edition”, Edited by Tomlin, C.D.S., (BCPC Congress), Hampshire, UK (2009).
 - 33) Dujaković, N., Grujić, S., Radisić, M., Vasišević, T. and Lausević, M.: Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **678**, 63–72 (2010)
 - 34) Steen, R.J.C.A., Higenboom, A.C., Leonards, P.E.G., Peerboom, R.A.L., Cofino, W.P. and Brinkman, U.A.Th.: Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **857**, 157–166 (1999)
 - 35) Ohlenbusch, G., Zwiener, C., Meckenstock, R.U. and Frimmel, F.H.: Identification and quantification of polar naphthalene derivatives in contaminated groundwater of a former gas plant site by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **967**, 201–207 (2002)
 - 36) Nödler, K., Licha, T., Bester, K. and Sauter, M.: Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminations in aqueous samples. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6511–6521 (2010)
 - 37) Herrero, P., Borrull, F., Pocurull, E. and Marcé, R.M.: Efficient tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide contaminants in environmental water samples. *J. Chromatogr. A*, **1309**, 22–32 (2013)
 - 38) Pichon, V., Cau Dit Coumes, C., Chen, L., Guenu, S. and Henion, M.-C.: Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. *J. Chromatogr. A*, **737**, 25–33 (1996)