報 文

長鎖疎水基と陰イオン交換基を併せ持つ多官能型固相抽出剤の開発と野菜中のアセフェート簡易迅速分析への適用

(平成 21 年 10 月 16 日受理)

塚本友康^{†,1} 清水 愛¹ 山本 敦¹
小玉修嗣² 上茶谷 若³ 井上嘉則³

Development of a Novel Multi-functional Adsorbent Bearing with Long-Chain Hydrophobic and Anion Exchange Groups for the Simple and Rapid Determination of Residual Acephate in Vegetables

Tomoyasu TSUKAMOTO^{†,1}, Megumi SHIMIZU¹, Atsushi YAMAMOTO¹,
Shuji KODAMA², Waka KAMICHATANI³ and Yoshinori INOUE³¹ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University: 1200 Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi 487-8501, Japan;² Toyama Institute of Health: 17-1 Nakataikoyama, Imizu-shi, Toyama 939-0363, Japan;³ Nippon Filcon Co., Ltd.: 2220 Ohmaru, Inagi-shi, Tokyo 206-8577, Japan;[†] Corresponding author

A novel multi-functional adsorbent (RP-SAX adsorbent) bearing hydrophobic and anion exchange groups was synthesized for the simple and rapid determination of residual acephate (AP) in vegetables. Macroporous base resin was obtained by suspension copolymerization with glycidyl methacrylate, stearyl methacrylate and glycerin dimethacrylate, and then ethyldimethylamine was introduced at glycidyl groups on the base resin. The adsorbent was packed into a syringe-type tube and used for extraction of AP. AP in the vegetable extract was quantitatively entrapped on the adsorbent and was completely eluted with 3 mL of 30 mmol/L trisodium phosphate in 50% (v/v) methanol solution. The eluate was directly injected into an HPLC-UV detection system with a reverse-phased column. The recoveries of 5 mg/L AP spiked in vegetable extraction samples ranged from 77% to 100%.

(Received October 16, 2009)

Key words: 残留農薬 pesticide residue; アセフェート acephate; 多官能型吸着剤 multi-functional adsorbent; 固相抽出 solid phase extraction; 野菜 vegetable

1. はじめに

有機リン系化合物は、殺虫剤として世界中で広く使用されている農薬である。殺虫剤としての作用機構はアセチルコリンエステラーゼ活性の阻害である¹⁾。2007 年末の中国製冷凍餃子事件で話題となったメタミドホス (MP) は毒性の高い (ADI=0.004 mg/kg/day)*¹ 有機リン系農薬であり、わが国では登録はされておらず使用は禁止されている。MP のヒトへの毒性を和らげるため、アセチル化され

たものがアセフェート (AP, ADI=0.03 mg/kg/day)*² であり、わが国でも広く普及している。AP は昆虫や植物の体内で素早く代謝されて MP となるため、MP としてその薬効を発揮するともいわれているが、哺乳類での代謝に関しては未知の部分が多い²⁾。

現在、残留農薬の分析法は GC/MS や LC/MS を用いた多成分一斉法が主流となっているが、AP のような高親水性の有機リン系農薬は、一斉分析が困難であり^{3)~5)}、わが国では個別分析法が公示されている⁶⁾。しかし、公示法は多量の有機溶媒を必要とし、さらに操作も濃縮、再溶解を必要とするなど煩雑である。

そのため、AP を迅速に分析する方法が検討されてきた。それらは、高速溶媒抽出法⁷⁾ や超臨界流体抽出法⁸⁾ の

[†] 連絡先¹ 中部大学応用生物学研究科: 〒487-8501 愛知県春日井市松本町 1200² 富山県衛生研究所: 〒939-0363 富山県射水市中太閤山 17-1³ 日本フィルコン株式会社開発マーケティング部: 〒206-8577 東京都稲城市大丸 2220*¹ http://www.who.int/ipcs/food/jmpr/summary_2004.pdf*² http://www.who.int/ipcs/food/jmpr/summaries/summary_2006.pdf

ほか、フロリジルやシリカゲル⁹⁾、活性炭¹⁰⁾、オクタデシル基(C18)結合シリカゲル¹¹⁾などを使用した固相抽出法(SPE)も検討されてきた。しかし、いずれの溶媒抽出法や固相抽出法においても高親水性農薬であるAPの回収率や再現性の低さが課題となっている¹²⁾。

Yanらは、PSA(primary and secondary amine)を充填したSPEカートリッジと活性炭を用いることで、高い回収率で前処理が可能であることを報告している¹³⁾が、この方法では溶出に多量の溶媒を必要とするため、濃縮が困難であり、微量定量への適用には難がある。

APはリン酸に基づく親水性部分と疎水性部分を併せ持つ化合物で、リン酸アミドの窒素上の水素は、カルボニル基に隣接するため $pK_a=8.5$ と活性である¹⁴⁾。また、APのオクタノール-水分配比($\log P_{ow}$)は -0.85 、水への溶解度は 818 g/L^{*3} であり、水溶性の高い化合物でもある。したがって、疎水性相互作用だけに依存した固相抽出機構ではAPを高度に捕捉することは不可能であり、陰イオン交換相互作用を加味する必要がある。疎水基と陰イオン交換基とを併せ持つ固相抽出剤としては、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体をクロロメチル化後、三級アミンを反応させて強陰イオン交換基を導入したものが開発¹⁵⁾されており、この技術を利用したSPEカートリッジが市販されている。この固相抽出剤は、疎水性相互作用と陰イオン交換相互作用が明確に発現するとされ、環境水中の抗菌剤¹⁶⁾、魚内臓中の薬剤¹⁷⁾、ヒト細胞中の薬物やその代謝物¹⁸⁾などの分析において優れた精製能を発揮している。しかしながら、この固相抽出剤の陰イオン交換基は疎水場に結合されているうえ、ブチル基を有する官能基であるため、高水溶性化合物に対しては明確なイオン交換相互作用を示すことが難しいものと推定される。

そこでわれわれは、APをはじめとする高水溶性化合物の捕捉特性を向上させるため、親水性基材にC18基と第四級アンモニウム基とを併せ持つ新規な逆相陰イオン交換(RP-SAX)-型固相抽出剤を開発した。本研究では、新規RP-SAX型固相抽出剤の野菜中APの前処理への適用性を評価するとともに、同様の特性をもつ市販固相抽出剤との比較検討も行った。

2. 実験

2.1 試薬

基材樹脂の懸濁重合に使用した試薬は、特記するもの以外はすべて和光純薬工業(株)製のものをを用いた。疎水基を有するモノマーとしてステアリルメタクリレート(SMA、東京化成工業(株)製)を、陰イオン交換基導入モノマーとしてグリシジルメタクリレート(GMA)を、また架橋モノマーとしてグリセリンジメタクリレート(GDMA)を使用した。細孔形成のための希釈剤としては酢酸ブチル(試薬特級)と1-ドデカノール(試薬一級)を用い、重合開始

剤として2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)(試薬特級)を用いた。水相の分散媒としてはポリビニルアルコール(PVA, $n=500$)を用い、分散助剤としてドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(DBS-Na、東京化成工業(株)製)を使用した。陰イオン交換基導入試薬として、*N,N*-ジメチルエチルアミン(EP、東京化成工業(株)製)を用いた。

測定対象であるAPは、和光純薬工業(株)製のAP標準品を用い、純水で $1,000\text{ mg/L}$ に調製したものを保存用原液とし、用時希釈して使用した。HPLC用アセトニトリルはメルク製を用いた。純水は(株)東レ製超純水製造装置LV408から得られたものを使用した。なお、本項に表記した以外の試薬はすべて和光純薬工業(株)製の試薬特級を用いた。

2.2 HPLCおよび使用機器

HPLCにはGLサイエンス社製のEZ Chrom Eliteで制御されたGL7400シリーズを使用した。HPLCシステムは、GL7410ポンプ、GL7430カラムオーブン、GL7450紫外可視光検出器により構成されている。分離カラムには、Shodex RSpak DE-613(昭和電工(株)製、 $6.0\text{ mm i.d.} \times 150\text{ mm}$ 、粒径 $6\text{ }\mu\text{m}$)を用いた。移動相には1%リン酸-アセトニトリル(95+5)を用い、流速 1 mL/min で送液した。カラム温度は 40°C とした。試料注入量は $10\text{ }\mu\text{L}$ とし、検出は 215 nm で行った。

合成には、スリーワンモーター(HEIDON社製)、恒温水槽(Yamato社製)、恒温振盪機(Yamato社製)を使用した。

2.3 RP-SAX型固相抽出剤の合成

本研究のRP-SAX型固相抽出剤の合成プロトコルをFig. 1に示す。

基材樹脂は、GMA、GDMAおよびSMAの懸濁重合により得た。GMA 15 g 、GDMA 20 g 、SMA 15 g 、酢酸ブチル 25 g および1-ドデカノール 25 g の混合溶液に2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)を 0.5 g 加えて溶解させた。その混合溶液(油相)を、1% DBS-Na水溶液 0.1 mL を添加した0.05% PVA水溶液 400 mL に加え、1 Lセパラブルフラスコに移し、Fig. 2に示した装置に取り付けた。攪拌用にスリーワンモーターを用い、 350 rpm で約15分攪拌した後、粒径をルーペによって確認し、目的の粒子径になるように分散した。その後、攪拌しながら加温を開始し、 80°C で7時間反応させて基材樹脂の重合を行った。温度コントロールには恒温水槽を使用した。反応の際は、セパラブルフラスコ内の懸濁液温度が $80 \pm 2^\circ\text{C}$ になるように温度管理を行った。また、反応熱が生じ急激に温度が上がることもあるため、加温開始から1時間半はこまめに温度管理した。重合後の懸濁液を1 Lの純水中に入れて希釈分散後、固形分をろ取し、純水、メタノール、酢酸エチルの順で十分に洗浄し、乾燥した。乾燥後、標準篩を用いて分級を行い、粒径 $53 \sim 106\text{ }\mu\text{m}$ の基材樹脂を得た。

得られた基材樹脂のグリシジル基に*N,N*-ジメチルエチ

*3 <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.3jsp>

Fig. 1. Synthesis of RP-SAX resin

GMA (glycidyl methacrylate), GDMA (glycerin dimethacrylate), SMA (stearyl methacrylate), PVA (polyvinyl alcohol)

Fig. 2. Overview of the suspension polymerization

ルアミンを反応させ、第四級アンモニウム基を導入した。栓付 200 mL 三角フラスコに基材樹脂 10 g をメタノール 40 mL に分散させ、ジメチルエチルアミン 5 mL 加えた後、恒温振とう機を用いて 40°C で 15 時間、振とうさせながら反応を行った。反応後、固形分をろ取り、70% (v/v) メタノールで十分に洗浄した後、メタノールに置換して乾燥させ、疎水基と陰イオン交換基を併せ持つ RP-SAX 型固相抽出剤を得た。1 回の合成における収量は約 20 g であった。

2.4 陰イオン交換容量の測定

得られた RP-SAX 型固相抽出剤の陰イオン交換容量は、逆滴定法によって測定した。得られた RP-SAX 型固相抽出剤を 0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液中に分散して対イオンを交換後、純水で中性になるまで洗浄し、メタノールに置換して 40°C で 12 時間デシケーター型真空乾燥機を用いて乾燥させた。乾燥させた RP-SAX 型固相抽出剤 0.3 g 精秤し、0.5 mmol/L 塩酸 5 mL 加え、ろ過した。ろ液にフェノールフタレイン指示薬を加え、0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて滴定し、得られた滴定値および空試験値から、(1) 式により陰イオン交換容量を求めた。

陰イオン交換容量 (meq/g)

$$= \frac{0.5(\text{mol/L}) \times (\text{空試験値}(\text{mL}) - \text{滴定量}(\text{mL}))}{\text{固相抽出剤量}(\text{g})} \quad (1)$$

2.5 実試料の予備処理

本研究に用いた野菜類（トマト、ハクサイおよびキュウリ）は細切した後、その 10 g を秤量し、それと同量の 40% (v/v) メタノールを加えた後、ミキサーでホモジナイズし、遠心分離 (2,800 rpm, 40 min) を行った。遠心分離後の上澄みを 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。野菜抽出液を用いた添加回収試験においては、この試験溶液に 5 mg/L となるように AP を添加したものを添加回収試験用の試験溶液とした。

2.6 AP の固相抽出 (SPE)

2.3 により得られた RP-SAX 型固相抽出剤は、公称 3 mL のシリンジ型 SPE 用エンブティカートリッジ (Varian BondElute Reservoir) に 1 g を充填し、SPE カートリッジとした。各溶液は、20 mL シリンジを用い、加圧しながら約 2 mL/min の速度で流した。コンディ

ショニングは、純水、メタノール、純水、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液、純水、メタノール、純水の順に行い、各 10 mL ずつ通液して行った。コンディショニング後、AP 標準品溶液もしくは、実試料溶液を 10 mL 負荷し、AP を RP-SAX 型固相抽出剤に捕捉させた後、50% (v/v) メタノールあるいはメタノール 5 mL で洗浄した。捕捉させた AP の溶出は、50% (v/v) メタノールを含むリン酸二ナトリウムもしくは、50% (v/v) メタノールを含むリン酸三ナトリウム溶液を用い、溶出液を 3 mL ずつ分取し、分取溶出液中の AP を HPLC で測定した。また、市販の RP-SAX 型固相抽出剤として Waters 社製 Oasis MAX SPE カートリッジを分解した後、上記 3 mL のシリンジ型 SPE 用エンブティカートリッジに 1 g を充填した。Bio-Rad 製陰イオン交換樹脂 AG1-X8 も、同様のシリンジ型 SPE 用エンブティカートリッジに 1 g を充填した。それらを用いて、AP の捕捉・回収に関して、本研究の RP-SAX 型固相抽出剤との比較検討を行った。

3. 結果と考察

3.1 RP-SAX 型固相抽出剤の特性

逆滴定により求めた本研究の RP-SAX 型固相抽出剤の陰イオン交換容量は 0.66 meq/g であった。仕込量から計算した基材樹脂中の GMA 含有量は 2.11 mmol/g であるため、陰イオン交換基の導入量、すなわち *N,N*-ジメチルエチルアミンの反応率は 31.3% であった。この値は数字的には高い値ではないが、すべての GMA が基材樹脂の表面に存在するわけではなく、樹脂骨格内にも取り込まれているため、必ずしも重合に使用した GMA のグリンジル基がすべて反応可能な状態で存在しているわけではない。したがって、この反応率は妥当な値であると考えられた。

次に、本 RP-SAX 型固相抽出剤を充填した SPE カートリッジを用いて AP の捕捉特性を調べた。試料には、純水で 5 mg/L に希釈した AP 標準溶液を用い、10 mL を SPE カートリッジに負荷した。実試料の固相抽出においては、被検試料中の夾雑物も RP-SAX 型固相抽出剤に捕捉されると考えられるため、試料負荷後に洗浄が必要となる。ここでは、疎水性夾雑物の洗浄を想定し、50% (v/v) メタノールおよびメタノール 5 mL を洗浄液として試験を行った。試料溶液 (AP 標準溶液) の SPE カートリッジ通過液および 2 種の洗浄液を採取し、各溶液中の AP の存在を HPLC により測定した。その結果、通過液および 2 種の洗浄液中には AP は検出されず、本 RP-SAX 型固相抽出剤に確実に捕捉されていることが判明した。

本 RP-SAX 型固相抽出剤への AP の捕捉は、AP の構造から考えると、陰イオン交換相互作用が優先され、疎水性相互作用が補助的に作用しているものと推定される。メタノールを含む洗浄液中に AP が検出されなかったことから、この推定どおり、陰イオン交換相互作用が AP の捕捉に大きく寄与しているものと判断した。したがって、本

RP-SAX 型固相抽出剤からの AP の溶出には、塩あるいは緩衝液を含む溶液が必要となる。

そこで、溶出液として 50% (v/v) メタノールを含むリン酸二ナトリウムもしくは 50% (v/v) メタノールを含むリン酸三ナトリウム溶液を用い、塩濃度を変化させて SPE カートリッジからの AP の溶出量を測定した。50 mmol/L 以下のリン酸二ナトリウム溶液を用いた場合には、低濃度では AP は速やかに溶出されなかったため、100 mmol/L まで濃度を上げて溶出を試みた。その結果、50% (v/v) メタノール-100 mmol/L リン酸二ナトリウム溶液を用いれば 3 mL で AP を溶出できることが分かった。一方、リン酸三ナトリウムを用いた場合には、50% (v/v) メタノール-30 mmol/L リン酸三ナトリウム溶液 3 mL で AP を 100% 回収することができた。この結果から、MS への適用も視野に入れ AP の溶出条件を、塩濃度の低い 50% (v/v) メタノール-30 mmol/L リン酸三ナトリウム溶液 3 mL とすることとした。

3.2 HPLC 分析

本研究の HPLC 測定条件において、AP は約 7 分に検出され、繰り返し再現性は良好であった。AP 標準溶液を用いて検量線を作成したところ、1~20 mg/L 範囲で作成した検量線は、 $R^2=0.9996$ と良好な直線性を示した。本測定条件における AP の検出限界 ($S/N=3$) は、AP 標準品では 0.2 mg/L であった。

3.3 野菜抽出液中 AP 分析への適用

トマト、ハクサイおよびキュウリを試料として、残留 AP の測定を行った。それぞれの予備処理溶液 10 mL を SPE カートリッジに負荷し、50% (v/v) メタノール 5 mL で洗浄後、50% (v/v) メタノール-30 mmol/L リン酸三ナトリウム溶液 3 mL で溶出した。その結果、今回用いた野菜抽出液からは AP は検出されなかった。夾雑物の影響により十分な捕捉ができない可能性もあると考え、添加回収実験を行った。

各野菜の予備処理溶液に AP を 5 mg/L になるように添加し、その 10 mL を固相抽出カートリッジに負荷した。その後、50% (v/v) メタノール 5 mL で洗浄した。夾雑物による捕捉性の低下を確認するため、各試料溶液の SPE カートリッジ通過液および 50% (v/v) メタノール洗浄液を分取し、HPLC で AP の測定を行ったが、すべての分取液からは AP は検出されなかった。

AP の溶出には、前述のとおり、50% (v/v) メタノール-30 mmol/L リン酸三ナトリウム溶液を用い、3 mL×3 回で溶出を行った。AP は最初の溶出液 3 mL 中に検出され、以降の溶出液中には検出されなかった。トマトおよびキュウリでは AP と夾雑成分との分離が十分であったが、ハクサイにおいては AP と夾雑成分との重なりが生じたが、AP の定量には影響なかった。Fig. 3 に、各野菜抽出液のクロマトグラムを示す。これら野菜抽出液からの AP の添加回収率は 77~100% であった。

Fig. 3. UV chromatograms of vegetable extracts without (B) and with spiked acephate at 5 mg/L (A)

Column, RSpak DE613, 150×6 mm i.d., 6 μ m. Flow rate, 1 mL/min. Injection volume, 10 μ L. Mobile phase, 1% phosphoric acid-acetonitrile (95+5). Detection, 215 nm

Fig. 4. Elution profiles of acephate in tomato extract from various SPE cartridges

Eluent: 50% (v/v) methanol-30 mmol/L trisodium phosphate

Fig. 5. Retention models of acephate on our RP-SAX (A) and a commercially available multi-functional SPE cartridge (B)

3.4 市販陰イオン交換型固相抽出剤との比較

前述のように、本研究の RP-SAX 型固相抽出剤で野菜中 AP を夾雑物の影響を受けずに明確に捕捉させることが可能であった。本 RP-SAX 型固相抽出剤は、親水性基材に陰イオン交換基と長鎖疎水基を併せ持つ構造を有するように設計したため、明確なイオン交換相互作用を発現したものと推定された。そこで、市販の RP-SAX 型固相抽出剤および陰イオン交換樹脂を比較対照として、AP の保持特性比較を行った。

市販 RP-SAX 型固相抽出剤としてはジビニルベンゼンと *N*-ビニルピロリドンとの共重合体に第四級アンモニウム基を導入された Oasis MAX、陰イオン交換樹脂としてはポリスチレンゲルに第四級アンモニウム基が導入された AG1-X8 を選択し、SPE 用エンブティカートリッジに充填して、SPE カートリッジとした。試料には、トマトを予備処理した溶液に AP を 5 mg/L になるように添加したものをを用い、その 10 mL を固相抽出カートリッジに負荷した。これら SPE カートリッジの洗浄および捕捉された AP の溶出は、それぞれ 50% (v/v) メタノール-純水 5 mL および 50% (v/v) メタノール-30 mmol/L リン酸三ナトリウム溶液 3 mL×4 で行った。各 SPE カートリッジからの AP の溶出挙動を Fig. 4 に示す。

今回合成した RP-SAX 型固相抽出剤と AG 1-X8 において、トマト試料中から AP は、定量的に回収が可能であった。しかし、AG1-X8 では AP の溶出に高イオン強度の溶出液を必要としたこと、およびクロマトグラム上での夾雑物の影響が大きく、定量が不十分であるという難点があった。一方、多官能型固相抽出剤である Oasis MAX における AP 回収率は、標準溶液では定量的であったが、野菜抽出液からでは 50% 以下であった。おそらく、負荷液や洗浄液中に溶出したものと思われるが、HPLC では夾雑物の影響で確認できなかった。これらの結果は、AP の捕捉にはイオン交換基だけでも十分であるが、夾雑成分の除去には疎水性官能基が必要であることを示唆している。しかもその疎水基は、固定相表面に存在するだけでは不十分である。イオン交換相互作用は陽陰両イオンが直接

会合しているのではなく、被検イオン種は電気二重層モデルにおける Gouy-Chapmann (拡散) 層を対イオンとして漂っているだけである¹⁹⁾。特に、本 RP-SAX 固相抽出剤では樹脂表面の水和層が Stern 層と重なり、疎水基を有機溶媒の存在する拡散層まで伸ばすことで、AP のような疎水性と陰イオン性を併せ持つ化合物を選択的に捕捉したのであろう。この概念を Fig. 5 にまとめた。

以上のとおり、市販されている固相カートリッジに比べ、われわれが合成した長鎖疎水基と陰イオン交換基を併せ持つ多官能型固相抽出剤は、AP に対して効率の良い精製が可能であった。本 RP-SAX 型固相抽出剤は、AP に限らず、陰イオン性の高親水性化合物の捕捉に有用であると考えられる。現在前処理が煩雑な農薬において、必要に応じた固相抽出剤を設計・合成して使用することは、効果的な前処理法のひとつになりうることを示唆された。

引用文献

- 1) Mahajna, M., Quistad, G. B., Casida, J. E. Acephate insecticide toxicity: Safety conferred by inhibition of the bioactivating carboxamidase by the metabolite methamidophos. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 64-69 (1997).
- 2) Chang, A., Montesano, M. A., Barr, D., Thomas, J., Geller, R. Urinary elimination kinetics of acephate and its metabolite, methamidophos, in urine after acute ingestion. *J. Med. Toxicol.*, **5**, 68-72 (2009).
- 3) Tseng, S., Lin, Y., Lee, H., Su, S., Chou, S., Hwang, D. A multiresidue method for determining 136 pesticides and metabolites in fruits and vegetables: Application of macroporous diatomaceous earth column. *J. Food Drug Anal.*, **15**, 316-324 (2007).
- 4) Fillion, J., Sauv, F., Selwyn, J. multiresidue Method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection *J. AOAC. Int.*, **83**, 698-713 (2000).
- 5) Satoh, M., Shimokawa, S., Sakaguchi M. A simple extraction and cleanup method for multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *J. Pesticide Sci.*, **26**, 253-256 (2001).

- 6) 厚生労働省告示 第0315001号, 平成18年3月15日 (2006).
- 7) Obana, H., Kikuchi, K., Okihashi, M., Hori S. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst*, **122**, 217–220 (1997).
- 8) Eller, K. I., Lehotay, S. J. Evaluation of hydromatrix and magnesium sulfate drying agents for supercritical fluid extraction of multiple pesticides in produce. *Analyst*, **122**, 429–435 (1997).
- 9) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. Multiresidue analysis of organophosphorus pesticides in vegetable and fruits using dual-column GC-FPD, -NPD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (in Japanese), **42**, 385–393 (2001).
- 10) Hayama, T., Yoshida, H., Todoroki, K., Nohta, H., Yamaguchi, M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 2203–2210 (2008).
- 11) Kurosawa, A., Saito, T., Oyamada, N. Determination of acephate in water by solid-phase extraction/gas chromatography. *Eiseikagaku* (in Japanese), **38**, 554–559 (1992).
- 12) Yamaguchi, Y. Recent trends in multiresidue methods for analyzing pesticides in agricultural products. *Seikatsu Eisei* (in Japanese), **48**, 71–76 (2004).
- 13) He, Y., Liu, Y. H. Assessment of primary and secondary amine adsorbents and elution solvents with or without graphitized carbon for the SPE clean-up of food extracts in pesticide residue. *Chromatographia*, **65**, 581–590 (2007).
- 14) Singh, A. K., White, T., Spassova, D., Jiang, Y. Physico-chemical, molecular-orbital and electronic properties of acephate and methamidophos. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **119**, 107–117 (1998).
- 15) Lee, Jeng, Jong, O'gara, John, E. Japan Kokai Tokkyo Koho, 2002-517574 (June 18, 2002).
- 16) Benito-Peña, E., Partal-Rodera, A. I., León-González, M. E., Moreno-Bondi, M. C. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Anal. Chim. Acta*, **556**, 415–422 (2006).
- 17) Chu, S., Metcalfe, C. D. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1163**, 112–118 (2007).
- 18) Fountain, K. J., Yin, Z., Diehl, D. M. Simultaneous analysis of morphine-related compounds in plasma using mixed-mode solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **32**, 2319–2326 (2009).
- 19) 玉虫伶太著. 電気化学. 東京, 東京化学同人, 1967, p. 171–188.