ノート

LC-MS/MSを用いた迅速で簡便な飲料中の残留農薬
一斉分析法の実用化に向けての検討

(平成24年3月21日受理)

福井直樹* 高取 聡 北川陽子 起橋雅浩 小阪田正和
中辻直人 中山裕紀子 柿本 葉 尾花裕孝Application of a Rapid and Simple Multi-Residue Method for Determination of
Pesticide Residues in Drinking Water and Beverages Using Liquid
Chromatography-Tandem Mass SpectrometryNaoki FUKUI, Satoshi TAKATORI, Yoko KITAGAWA, Masahiro OKIHASHI,
Masakazu OSAKADA, Naoto NAKATSUJI, Yukiko NAKAYAMA,
You KAKIMOTO and Hirotaka OBANAOsaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan;

* Corresponding author

A rapid and simple multi-residue method for determination of pesticides has been applied to drinking water and beverages. To a disposable polypropylene tube containing 10.0 g sample, 20 mL acetonitrile was added and the mixture was shaken vigorously for 1 min to extract pesticides. Then, 1 g sodium chloride and 4 g magnesium sulfate anhydrous were added, followed by vigorous shaking for 1 min and centrifugation to obtain the organic phase. The organic phase was processed with a graphite carbon black/PSA solid phase column. After concentration and reconstitution with 25% methanol containing aqueous solution, the test solution was analyzed with LC-MS/MS. Recovery tests of 91 pesticides fortified (0.02 µg/g) in 35 kinds of drinking water and beverages were conducted. The decline of recoveries in alcoholic beverages is considered to be due to the increase of organic phase volume owing to ethanol included in the alcoholic beverages. A simulation study was carried out with simulated alcoholic beverages, which consisted of 50% grape juice, with various amounts of ethanol and water, to examine pesticides recoveries and volume of the organic phase. The results suggested this method would be applicable both to alcoholic beverages containing less than 10% ethanol and to alcoholic beverages containing over 10% ethanol after dilution with water to below 10% ethanol prior to the addition of acetonitrile. A sample could be processed and analyzed by LC-MS/MS within 2 h. Thus, this method should be useful for monitoring and screening pesticide residues in drinking water and various beverages.

(Received March 21, 2012)

Key words: ノンアルコール飲料 nonalcoholic beverage; アルコール飲料 alcoholic beverage; 残留農薬 pesticide residue; 一斉分析法 multi-residue method; 液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法 LC-MS/MS; 模擬アルコール飲料 simulated alcoholic beverage

緒 言

2007年12月から2008年初頭に発生した高濃度の有機リン系農薬が混入された中国製輸入冷凍餃子の事案を契機に加工食品中の残留農薬分析法の開発が強く求められるようになった。加工食品は、原料が多岐に及ぶため、画一的な検査手法を用いることが困難である。このため食品成分

の特性に着目した個別の分析法の構築が必要である。筆者らは、加工食品中の脂質、塩分、糖分などの食品成分ならびに固形状、液状物などの物性に着目し、迅速かつ簡便な分析法を系統立てて構築することを目的として、最初に脂質含有量の多い加工食品を対象としたスクリーニング分析法を構築した^{1)~3)}。

飲料に関しては、ワインや一部の果汁飲料を対象とした残留農薬一斉分析法が報告されている^{4)~13)}が、多岐にわたる飲料を網羅的に検証した報告はない。また、エタノー

* 連絡先 fukui@iph.pref.osaka.jp
大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69

Sample 10.0 g in 50 mL PP tube
 Add 20 mL of acetonitrile
 Shake (1 min)
 Add 1 g of NaCl and 4 g of MgSO₄
 Shake (1 min) and centrifuge (10 min)
 Acetonitrile layer 8.0 mL (equivalent to 4.0 g sample)
 Load on GCB/PSA column conditioned with 30 mL acetonitrile-toluene (3+1)
 Elute with 30 mL acetonitrile-toluene (3+1)
 Collect loading and eluting fractions in a round-bottomed flask
 Evaporate and reconstitute in 2 mL methanol
 Dilute to 4 times of the volume with water
 Test solution for LC-MS/MS

Scheme 1. Flow chart of the method

ルを含む模擬アルコール飲料を用いてエタノールが農薬の分析に与える影響を検証した事例も見当たらない。今回、著者らは飲料全般を対象とした迅速かつ簡便な残留農薬一斉分析法の実用化を目的として、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safety) 法に準拠した方法¹⁴⁾により、35種類の飲料を用いて検証し、スクリーニング分析法としての適用性を確認した。さらに、前処理操作におけるエタノールの挙動について明らかにするため、ぶどう果汁にエタノールを加えた模擬アルコール飲料を用いて検証を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬

標準品は、和光純薬工業(株)(大阪)、関東化学(株)(東京)、林純薬工業(株)(大阪)、Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) および Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) の残留農薬分析用標準品もしくはその同等品を用いた。各農薬標準品を1,000 µg/mLになるようアセトンまたはメタノールで溶解し農薬標準原液とした。農薬混合標準溶液は、各農薬標準原液を混合し5または1 µg/mLになるようアセトンで調製した。これをメタノールで適宜希釈して、検量線用標準溶液(2~20 ng/mL)を作製した。アセトニトリル、アセトン、ヘキサン、トルエン、メタノールおよびエタノールは、残留農薬分析用(和光純薬工業)を用いた。無水硫酸マグネシウムは、特級(和光純薬工業)を用いた。ギ酸は、HPLC用(和光純薬工業)を用いた。グラファイトカーボン/PSA積層カラムカートリッジ(GCB/PSAミニカラム)は、ENVI-CarbII/PSA (500/500 mg; SUPELCO, Bellefonte, PA)を用いた。

2. 試料

試料は大阪府および兵庫県内の小売店より購入した。

3. 機器

遠心分離器およびローター: himac SCR20B および R12A5 (日立)。LC-MS/MS: LC, 1100Series (Agilent); MS/MS, API3000 (AB SCIEX)。振とう装置: キュートミキサー CM-1000 (東京理化)

4. 測定条件

4.1 HPLC条件

分析カラム: Ascentis C18, 2.1×100 mm, 3 µm (SUPELCO), カラム温度: 40℃, 移動相: (A) 0.1% ギ酸水溶液, (B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液, グラジエント条件: (B) 20→95% (12 min, リニア)→95% (8 min, 保持), 流速: 200 µL/min, 注入量: 5 µL

4.2 MS条件

評価対象には当該分析条件で高感度に検出できる91農薬を選定した (Table 1)。なお、MRM条件は既報に準じた¹⁵⁾。

5. 実験操作

スキーム1に操作法の概要を示した。試料10.0 gをポリプロピレン (PP) 製チューブ (50 mL) に採取し、農薬混合標準溶液を所定濃度となるよう0.2 mL添加した。静置 (30分間) 後に、アセトニトリル20 mLを添加し、振とう装置で1分間振とうした。次に、塩析・脱水するため、塩化ナトリウム1 gおよび無水硫酸マグネシウム4 gを添加し、直ちに1分間振とうした。遠心分離 (3,000 rpm; 10分間) 後、有機相8.0 mL (試料4.0 g相当とみなす) をアセトニトリル-トルエン混液 (3:1) 30 mLでコンディショニングしたGCB/PSAミニカラムに負荷し、アセトニトリル-トルエン混液 (3:1) 30 mLで溶出した。この負荷液および溶出液を100 mLナス型フラスコに捕集し、40℃以下で減圧濃縮した。この濃縮液を窒素気流下で乾固後、メタノールで2.0 mLに定容し、これを水で4倍希釈してLC-MS/MS分析用試験液 (1 mL当たり試料0.5 g相当量) とした。

6. 35種類の飲料を対象とした添加回収試験

国内で流通する35種類の飲料を対象とした。ノンアルコール飲料として、天然水、緑茶、麦茶、紅茶、ウーロン茶、りんごジュース、オレンジジュース、トマトジュース、果汁入り野菜ジュース、炭酸飲料、スポーツドリンク、乳酸菌飲料、ブラックコーヒー、黒酢ドリンク、牛乳、豆乳、ココア飲料、しょうが湯、栄養ドリンク、甘酒、ノンアルコールビールの21種類を選定した。アルコール飲料として、ビール、リキュール、赤ワイン、梅酒、純米酒、紹興酒、焼酎 (2種)、ブランデー、ウイスキー

キー（3種）、ラム酒、ウォッカの14種類を選定した。アルコール度数が10%以上のアルコール飲料は、原液のまま前処理する方法（直接法）と、水で希釈（2, 5, 10倍のいずれかの倍率）し前処理する方法（希釈法）との双方で添加回収試験を行った。各試料の添加濃度は20 ng/gとして、本法に従って操作し、平均回収率と相対標準偏差（RSD）を求めた（ $n=3$ ）。

7. 模擬アルコール飲料の調製および添加回収試験

模擬アルコール飲料は、100%濃縮還元ぶどう果汁飲料50 mLにエタノールを各液量（0, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 25 および40 mLの8種類）加えた後、精製水で100 mLになるよう調製した。添加濃度は20 ng/gとして、本法に従って操作し、平均回収率とRSDを求めた（ $n=3$ ）。また、塩析・脱水後に回収された有機相の体積をメスシリンダーで測定した。

8. アルコール飲料を用いた直接法と希釈法の比較

直接法および希釈法の双方で添加回収試験を行って比較した。試料は、アルコール度数の異なる2種類の赤ワイン（11および14.5%）、2種類の白ワイン（13および14%）およびブランデー（37%）を用いた。各試料の添加濃度は40 ng/gとして、本法に従って操作し、添加回収率とRSDを求めた（ $n=5$ ）。直接法は、試料10.0 g採取後に前処理した。一方、希釈法は水により2倍希釈および4倍希釈で行った。試験液は0.25 g/mL（1 mL当たり試料0.25 g相当量）になるよう調製し、LC-MS/MSでの定量に供した。

9. 添加回収試験の結果判定基準

それぞれの添加回収試験において、平均回収率が70%以上120%以下かつRSD20%以下を良好と判定した。

結果および考察

1. 定量下限

分析対象農薬のLC-MS/MS上の定量下限（IQL: instru-

Fig. 1. Correlation between number of pesticides and alcohol concentration in 14 kinds of drinks

Each plot indicates the number of pesticides exhibiting acceptable recovery (70–120%) and RSD (0–20%) from 14 kinds of drinks.

ment quantification limit; シグナル・ノイズ比 >10 で規定)は、0.1–2.0 ng/mLであった。本法は試験液を0.5 g/mL（1 mL当たり試料0.5 g相当量）で定量を行い、分析法の定量下限は農薬一律に10 ng/gとした。

2. 35種類の飲料に対する添加回収試験

飲料ごとの回収率およびRSDをTable 1に示した。エタノール濃度10%を超えるアルコール飲料は、希釈法による結果のみを示した。ノンアルコール飲料については72–91項目で良好と判定された。しかしながら、脂質含有量の多い牛乳（脂質4 g/100 mL）および豆乳（脂質3.4 g/100 mL）は、良好と判定された項目数がそれぞれ49および51と少なかった。原因として、脂質の影響が推

Fig. 2. Addition of alcohol to grape juice affected pesticide analysis ($n=3$)

Pesticides classified “acceptable pesticide” showed satisfactory recovery (70–120%) and RSD (0–20%). The revised value of recovery was calculated by multiplying with the coefficient “ C_r ”: $C_r = V/20$, where V is the volume of the organic phase.

A: □, number of “acceptable pesticides” among 91 pesticides; ■, number of “acceptable pesticides” using revised values, among 91 pesticides

B: ○, mean recovery of 83 pesticides that were “acceptable pesticide” for grape juice; ●, revised mean recovery of 83 pesticides classified as “acceptable pesticide” in grape juice; +, volume of organic phase

Table 1. Continued

Pesticide	Nonalcoholic beverage															
	Mineral water		Green tea		Barley tea		Black tea		Oolong tea		Apple juice		Orange juice		Tomato juice	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Imazalil	85	1	89	3	87	2	94	5	85	21	100	2	89	13	94	5
Imibenconazole	90	5	97	4	90	8	97	3	87	5	95	12	86	1	92	3
Indanofan	97	7	93	4	97	7	91	4	83	12	95	9	84	2	94	3
Iprovalcarb	96	1	102	4	89	1	105	6	86	9	95	4	90	10	98	12
Isoprocarb	99	19	94	2	83	37	83	7	60	45	71	22	91	18	84	10
Isoprotiolane	83	7	93	4	92	9	96	3	82	12	93	1	81	11	94	5
Isoxathion	88	1	97	1	90	1	94	4	86	12	92	2	96	3	92	1
Lufenuron	89	8	89	10	64	8	88	9	80	10	90	12	93	7	94	4
Mefenacet	89	1	96	1	98	3	96	3	81	14	99	2	89	3	98	3
Mepanipyrim	96	7	92	4	88	6	93	4	81	8	93	3	93	3	87	8
Metaxyl	72	7	99	3	70	37	102	4	74	30	87	27	83	24	70	44
Methabenzthiazuron	84	23	98	1	119	22	96	2	74	25	99	8	94	20	102	6
Methomyl	93	2	88	2	87	2	95	5	98	5	95	4	90	9	75	6
Metolcarb	81	5	89	3	85	5	82	8	77	38	91	9	85	2	89	5
Monocrotophos	93	4	94	3	88	4	90	4	90	4	100	2	79	4	83	2
Napropamide	92	4	103	1	94	2	105	3	91	10	96	9	82	3	94	3
Omethoate	94	2	87	5	85	11	88	6	79	5	99	3	67	15	72	7
Oxamyl	93	2	89	15	76	10	84	11	87	5	94	6	98	1	89	18
Paclobutrazol	90	8	92	2	82	5	93	1	78	16	97	5	89	1	98	7
Penconazole	90	4	98	2	93	5	99	4	92	6	98	6	91	1	91	1
Pencycuron	89	0	98	1	91	3	98	1	90	7	98	3	93	6	96	2
Pentoxazone	100	7	90	9	73	27	104	9	93	8	87	11	90	9	74	6
Phoxim	88	8	93	2	83	4	90	3	84	6	93	1	85	4	79	2
Prirnicarb	91	4	91	2	87	4	85	3	86	4	97	7	87	2	86	2
Pretilachlor	89	2	96	1	88	2	99	1	90	6	96	2	94	0	95	4
Prochloraz	89	2	97	6	90	4	98	3	89	4	97	7	92	1	95	5
Propamocarb	79	0	76	2	77	5	72	3	75	2	78	6	68	4	75	4
Propoxur	83	13	96	3	91	10	94	8	53	59	62	21	96	45	51	29
Propyzamide	93	13	107	3	104	8	106	1	86	17	102	2	85	7	94	7
Pyriproxyfen	87	2	92	4	84	4	92	2	86	6	89	5	93	2	92	1
Pyroquilon	83	2	98	5	94	9	94	4	67	39	126	23	85	29	133	29
Quinoclamine	96	8	103	1	94	20	113	11	82	20	82	24	92	15	88	7
Quizalofop-ethyl	91	4	95	1	87	1	96	2	91	7	95	6	93	2	91	6
Tebuconazole	88	2	100	1	88	3	95	6	91	11	100	2	90	2	101	7
Tebuconazole	96	5	95	2	88	5	92	4	95	12	94	8	88	9	93	4
Tebuconazole	89	5	98	5	92	3	98	3	94	5	91	4	91	6	93	3
Tebuconazole	92	3	101	4	100	12	99	6	86	4	95	4	90	8	94	9
Tebuconazole	92	11	96	5	96	8	98	2	86	15	97	4	91	3	92	3
Thiencloprid	88	4	92	5	92	7	94	2	91	4	98	4	95	3	92	8
Thiencloprid	88	4	92	5	92	7	94	2	85	4	101	24	93	12	118	39
Triadimefon	88	7	94	1	88	12	93	4	80	15	93	4	91	4	95	2
Triadimefon	90	5	96	6	95	1	96	5	84	15	94	7	87	2	96	9
Tri-allate	80	3	83	7	84	11	70	22	76	8	73	7	80	7	80	3
Trichlorazole	65	10	103	8	78	12	97	9	88	6	83	11	80	4	79	7
Trifluralin	95	2	95	3	84	8	94	3	91	5	99	6	89	6	94	5
Frequency ^{b)}	84		91		82		90		72		78		84		82	

Table 1. Continued

Pesticide	Nonalcoholic beverage										Alcoholic beverage														
	Coffee		Vinegar beverage		Milk		Soybean milk		Cocoa		Ginger beverage ^{e)}		Nutritional supplement beverage		Amazake		Nonalcoholic beer		Draft beer (alc. 5%)		Liqueur (alc. 6%)		Red wine (alc. 14%)		
	Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		2 times dilution		
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	
Acetamidrid	85	5	93	8	95	3	80	20	89	14	95	12	94	5	107	2	85	11	109	4	97	6	81	4	
Acetochlor	93	7	97	4	79	4	105	10	95	12	100	6	NC ^{d)}	NC ^{d)}	85	7	97	12	61	16	96	13	118	9	
Alachlor	98	8	108	14	99	17	122	7	85	7	98	7	97	5	105	12	89	14	68	10	87	22	77	5	
Allethrin	87	12	97	3	55	39	90	22	87	15	99	6	81	8	100	5	97	19	86	6	90	6	91	8	
Atrazine	89	8	96	0	71	16	102	4	83	28	96	21	86	32	90	2	88	0	88	6	89	4	71	8	
Azoxystrobin	85	19	96	2	81	7	148	4	85	6	90	3	88	15	97	3	103	5	31	203	100	2	92	7	
Benfuresate	65	58	88	5	107	43	206	18	95	6	66	4	91	16	102	4	105	13	91	10	95	5	88	17	
Bensulide	101	12	91	1	76	17	121	13	99	7	105	10	102	6	103	7	97	11	65	11	87	34	106	13	
Bitertanol	81	2	91	6	88	14	102	6	92	4	98	1	92	2	76	14	96	6	63	7	75	20	95	6	
Bromobutide	92	11	93	4	82	13	118	4	102	2	96	5	93	8	94	2	93	2	59	33	85	19	94	3	
Bupirimate	93	9	98	3	79	4	162	3	93	9	98	4	85	15	97	4	89	2	92	7	92	8	105	1	
Buprofezin	81	2	90	3	63	41	88	17	83	7	92	5	95	3	88	5	97	4	87	6	89	2	91	6	
Cafenstrole	96	11	96	7	72	9	115	10	98	14	110	20	96	10	95	7	91	15	105	8	84	39	72	14	
Carbaryl	78	7	92	4	51	18	50	19	52	32	107	6	88	16	100	14	83	7	119	3	103	7	65	19	
Carbofuran	84	1	92	6	88	3	84	2	59	41	133	13	110	36	96	3	92	3	96	7	91	5	76	2	
Carfentrazone-ethyl	99	10	91	3	20	12	10	44	98	9	97	1	78	6	112	44	73	15	135	12	131	11	59	40	
Chlorpropham	91	17	96	6	51	2	96	1	107	6	92	7	99	11	93	6	92	10	82	3	73	41	98	5	
Clomeprop	90	10	94	4	53	43	78	13	65	7	90	9	87	8	95	6	96	12	80	2	89	11	85	9	
Cumyluron	95	11	105	3	89	7	147	3	114	6	95	4	95	9	97	3	92	2	94	0	79	40	100	4	
Cyanazine	85	0	91	2	94	6	93	3	86	14	95	4	96	6	96	2	92	2	86	5	92	8	67	15	
Cyflufenamid	85	2	89	8	63	36	96	9	85	1	90	7	87	5	78	20	102	5	66	7	80	23	86	2	
Cyhalofop-butyl	83	22	85	33	54	16	86	7	85	11	84	24	77	17	68	13	100	14	71	34	62	29	81	15	
Daimuron	95	11	99	2	84	8	141	4	93	8	93	2	89	11	90	3	95	3	94	5	82	29	91	2	
Diethofencarb	87	15	90	2	59	47	101	3	99	14	82	15	94	27	97	1	91	5	94	5	91	3	86	7	
Difenoconazole	84	2	95	2	71	17	95	10	92	8	90	5	92	2	68	4	92	5	69	9	65	7	89	3	
Diffubenzuron	84	8	94	7	74	24	108	9	91	4	94	3	92	6	100	3	91	3	47	5	83	30	93	3	
Diflufenican	81	3	93	6	63	41	90	20	92	4	93	4	86	5	73	7	90	6	71	8	70	0	86	6	
Dimepiperate	83	4	85	9	71	17	93	3	90	6	96	2	90	8	85	4	92	2	85	3	83	5	72	4	
Dimethametryn	88	10	95	3	83	12	112	3	83	1	93	7	98	4	90	3	93	3	88	3	89	3	91	3	
Dimethoate	73	4	90	5	95	4	90	1	79	4	99	3	92	7	98	2	89	2	97	2	92	6	73	12	
Dimethomorph	83	18	96	1	71	15	163	2	98	8	96	16	88	3	103	6	100	5	98	1	98	2	118	7	
Diphenamid	84	12	89	4	115	8	125	2	86	20	77	16	89	4	91	2	97	0	90	7	91	3	76	2	
Espirocarb	85	3	84	3	52	34	79	13	80	11	88	5	86	6	88	2	88	2	80	4	80	8	74	5	
Ethiofencarb	59	27	83	5	57	22	83	6	46	26	115	36	127	4	89	3	90	4	90	5	71	2	68	5	
Ethofumesate	83	25	103	3	86	16	180	13	94	11	50	15	84	14	79	6	84	12	90	2	94	2	104	2	
Fenarimol	86	14	97	3	81	5	129	6	113	8	108	4	104	5	105	7	101	4	85	22	78	42	120	4	
Fenbuconazole	90	10	99	1	83	14	132	7	101	2	102	6	96	8	93	4	93	3	60	26	77	30	96	6	
Fenobucarb	79	21	86	4	71	36	118	6	100	11	69	5	81	5	91	1	82	6	87	9	82	6	89	6	
Fenoxaprop-ethyl	85	4	88	5	64	33	80	20	93	7	94	2	91	2	99	2	94	4	94	5	89	4	74	7	
Fenoxycarb	85	10	91	6	75	29	118	5	91	3	92	6	88	8	95	7	91	7	54	6	80	33	98	7	
Fenpropiimorph	76	15	94	4	60	42	73	27	40	15	53	19	76	57	93	4	91	4	83	3	84	7	68	9	
Flufenoxuron	77	3	71	19	60	44	86	53	94	9	88	1	90	5	81	9	88	6	76	6	84	5	71	5	
Flusilazole	82	10	92	2	86	14	124	7	104	4	95	4	92	1	96	4	91	6	4	51	12	76	39	101	1
Furathiocarb	86	2	91	3	68	31	87	9	91	6	96	3	90	4	92	1	95	6	94	5	92	1	81	5	
Hexaconazole	83	3	91	2	86	6	100	4	95	0	99	4	99	4	74	10	90	3	65	5	73	22	100	3	
Hexaflumuron	80	6	94	19	52	56	85	46	97	10	88	12	92	19	78	6	90	11	79	8	67	20	75	6	

Table 1. Continued

Pesticide	Nonalcoholic beverage												Alcoholic beverage											
	Coffee		Vinegar beverage		Milk		Soybean milk		Cocoa		Ginger beverage ^{c)}		Nutritional supplement beverage		Amazake		Nonalcoholic beer		Draft beer (alc. 5%)		Liqueur (alc. 6%)		Red wine (alc. 14%)	
	Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		Without dilution		2 times dilution	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Imazalil	86	7	95	5	92	8	96	11	75	16	99	2	92	5	95	7	87	8	91	4	97	1	78	2
Imibenconazole	83	7	88	3	61	53	86	34	107	7	94	4	79	8	97	2	86	2	87	6	85	8	80	1
Indanofan	99	7	97	7	76	13	123	9	98	0	89	2	91	17	91	9	96	1	57	38	73	39	91	11
Iprovalicarb	97	8	95	1	86	12	124	4	93	11	98	3	91	5	114	3	89	4	69	28	74	49	92	10
Isoprocarb	90	3	87	2	92	34	155	5	91	9	73	43	112	12	93	5	83	11	86	5	77	9	74	8
Isoprothiolane	92	12	95	2	107	15	175	1	94	10	90	5	89	15	98	6	97	4	93	4	96	4	106	3
Isoxathion	91	4	90	5	65	33	102	13	92	3	94	5	91	3	78	16	90	6	56	8	71	24	83	5
Lufenuron	78	4	80	14	50	45	61	57	93	15	76	9	91	12	83	10	97	3	78	6	97	13	74	4
Mefenacet	92	16	97	3	78	7	141	2	98	5	99	5	96	8	97	1	92	5	91	2	84	24	101	3
Mepanipyrim	86	20	94	4	75	26	136	1	103	3	88	5	83	5	95	2	96	6	78	18	84	21	91	2
Metaxyl	86	22	92	4	63	28	121	1	73	36	94	16	73	15	92	4	88	2	92	7	89	10	78	7
Methabenzthiazuron	71	42	94	3	59	36	95	3	102	22	80	19	76	13	97	2	90	2	89	4	92	4	80	1
Methomyl	76	0	86	3	81	8	82	6	87	8	93	2	94	6	92	3	95	8	93	4	92	6	79	6
Metolcarb	73	2	81	1	84	9	80	4	92	13	88	5	84	6	93	11	79	14	89	4	75	9	77	8
Monocrotophos	85	2	90	3	88	8	88	4	87	2	95	5	95	5	94	4	91	4	96	2	90	2	57	8
Napropamide	93	15	93	4	86	7	127	7	97	4	95	8	99	7	98	4	94	3	65	35	83	24	102	3
Omethoate	55	5	82	6	54	18	51	14	56	11	90	9	86	3	91	6	85	6	91	9	94	6	71	18
Oxamyl	73	11	83	10	47	21	44	20	70	7	91	14	102	2	94	9	68	14	121	13	107	11	63	17
Paclobutrazol	85	17	95	3	81	13	141	3	105	8	98	0	102	1	94	5	93	4	89	2	89	2	101	1
Penconazole	83	9	88	2	84	9	111	2	93	4	93	3	91	12	99	1	93	5	63	8	87	16	100	3
Pencycuron	92	3	95	1	63	31	93	9	87	4	96	7	89	4	63	6	89	2	64	5	68	8	89	3
Pentoxazone	79	15	82	17	39	18	61	48	91	4	91	5	103	7	205	35	103	22	222	17	175	26	62	22
Phoxim	74	9	86	7	72	40	70	18	91	4	85	6	80	2	147	41	91	15	103	15	110	14	64	21
Pirimicarb	69	2	84	2	92	2	90	1	76	6	96	6	85	4	92	3	78	5	85	1	88	4	66	4
Pretilachlor	92	2	95	3	80	18	100	6	92	6	96	3	94	7	88	3	98	6	85	6	84	9	87	3
Prochloraz	83	13	91	3	80	9	112	8	95	3	98	2	94	6	98	7	88	2	48	9	81	25	87	4
Propamocarb	48	8	56	6	83	4	77	2	70	6	80	9	77	4	69	2	76	4	52	7	41	7	40	3
Propoxur	78	16	83	9	78	19	80	8	79	30	88	15	55	23	96	2	86	2	95	4	90	4	75	2
Propyzamide	93	9	101	8	98	9	152	7	110	9	97	9	96	5	86	2	101	5	84	4	78	22	92	5
Pyriproxyfen	83	3	89	5	57	48	81	37	93	0	90	2	86	5	83	1	89	1	72	3	79	5	76	4
Pyroquillon	82	1	90	1	94	2	92	7	90	5	132	37	171	13	89	5	96	9	86	1	85	6	82	6
Quinoclamine	77	12	79	5	99	9	86	9	80	11	90	9	NC ^{d)}	NC ^{d)}	109	18	85	7	103	15	86	16	66	39
Quizalofop-ethyl	88	5	92	1	55	30	73	18	87	7	92	4	92	4	98	1	98	2	94	4	94	4	77	3
Tebuconazole	89	10	93	4	86	7	110	1	89	1	93	3	86	4	99	4	90	7	91	5	102	7	85	7
Tebuconazole	83	7	92	4	87	9	105	10	99	4	99	7	95	5	93	4	90	7	54	6	85	33	99	3
Tebuconazole	79	7	85	4	63	40	87	17	87	2	NC ^{d)}	NC ^{d)}	90	2	97	4	84	3	85	3	85	6	88	8
Tebuconazole	73	12	97	9	50	48	68	26	79	5	87	9	98	1	106	12	88	18	95	9	106	3	93	4
Thenylchlor	95	11	102	3	81	28	137	6	104	5	91	12	91	2	95	9	93	3	74	35	89	22	111	5
Thiactoprid	85	1	90	2	99	5	92	5	88	4	96	8	92	8	97	5	94	4	98	1	111	7	77	8
Thiobencarb	84	6	90	3	62	25	78	6	87	10	91	4	90	3	67	8	91	3	71	7	60	1	77	6
Triadimefon	89	17	99	5	72	3	130	6	103	3	94	5	94	2	96	1	96	5	92	6	78	35	116	8
Triadimenol	90	17	95	3	95	4	135	2	96	5	94	5	90	7	97	5	93	6	81	17	76	36	109	3
Tri-allate	74	3	80	6	47	43	72	19	84	9	71	2	76	8	83	6	76	10	55	6	57	10	60	5
Trichlamide	88	7	90	17	66	19	92	13	84	8	76	9	83	3	57	5	91	8	59	5	68	19	95	6
Triflumizole	83	5	89	3	59	26	56	29	86	7	94	4	96	7	124	20	97	11	173	11	127	18	68	23
Frequency ^{b)}	81		89		49		51		81		80		82		81		89		60		55		76	

Table 1. Continued

Pesticide	Alcoholic beverage															
	Plum liquor (alc. 13~14%)		Sake ^{e)} (alc. 15%)		Chinese rice wine (alc. 16%)		Shochu 1 ^{f)} (alc. 25%)		Shochu 2 ^{g)} (alc. 25%)		Brandy (alc. 37%)		Whiskey 1 (alc. 37%)		Whiskey 2 (alc. 43%)	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Imazalil	92	9	79	3	87	4	81	1	84	7	79	6	85	6	81	0
Imibenconazole	77	7	75	10	76	9	74	6	75	5	75	6	77	2	69	4
Indanofan	99	7	114	5	88	9	81	7	81	11	80	5	85	8	76	9
Iprovalicarb	103	10	96	2	99	5	82	6	83	7	81	11	82	6	72	2
Isoprocarb	82	3	74	5	74	2	56	19	60	6	58	6	60	2	45	11
Isoprothiolane	111	3	102	6	97	4	87	4	85	5	84	4	83	3	83	4
Isosathion	83	7	77	3	90	3	84	3	83	8	80	10	81	5	71	2
Lufenuron	90	2	69	2	75	14	45	24	40	10	40	36	52	25	26	33
Mefenacet	106	5	99	5	97	2	91	3	88	3	92	2	88	6	89	5
Mepanipyrim	115	8	95	5	83	4	83	4	82	2	86	13	87	3	80	8
Metaxyl	85	3	83	3	87	1	83	4	87	2	79	4	86	5	77	1
Methabenzthiazuron	91	4	85	11	73	4	86	4	90	5	84	5	87	1	76	1
Methomyl	92	7	79	6	69	3	80	5	81	9	82	8	79	4	76	3
Metolcarb	80	9	69	7	62	1	47	24	52	9	49	10	54	3	40	12
Monocrotophos	70	12	60	4	58	3	72	18	68	20	75	7	66	5	72	8
Napropamide	115	9	108	2	92	3	90	3	88	4	87	7	88	1	78	2
Omethoate	83	9	56	8	49	4	64	32	47	35	59	10	40	25	61	13
Oxamyl	103	6	48	40	30	5	86	7	64	16	82	17	62	26	78	3
Paclobutrazol	112	4	103	3	94	3	89	4	88	3	88	5	85	2	89	4
Penconazole	108	6	101	3	92	3	87	2	92	4	85	2	86	3	84	1
Pencycuron	94	7	91	4	93	2	89	3	86	3	81	1	85	2	80	3
Pentoxazone	82	22	38	47	17	42	80	33	48	72	66	6	42	21	53	38
Phoxim	83	11	45	35	37	1	79	16	66	31	64	16	65	18	57	8
Pirimicarb	40	3	57	6	50	1	79	9	73	6	74	7	74	3	64	5
Pretilachlor	94	7	90	1	92	1	82	5	80	4	85	7	81	5	80	2
Prochloraz	110	1	99	4	84	5	86	2	85	3	87	2	83	3	82	4
Propamocarb	29	9	38	4	30	1	31	25	35	10	29	13	27	12	22	24
Propoxur	73	1	74	11	67	2	72	19	72	6	72	10	72	9	60	9
Propyzamide	96	5	91	8	91	1	84	3	86	3	85	5	81	3	73	7
Pyriproxyfen	68	7	58	5	79	5	76	6	75	1	70	10	75	2	62	8
Pyroquilon	78	10	78	9	84	2	68	19	69	3	72	1	75	2	68	3
Quinoclamine	72	8	91	35	82	7	71	36	81	39	89	8	88	11	92	3
Quizalofop-ethyl	83	6	67	9	68	4	84	2	78	10	80	3	78	4	81	2
Tebufenozide	95	7	86	3	90	2	89	3	87	2	89	5	86	4	86	2
Tebuconazole	114	11	110	5	93	6	81	3	94	2	90	12	87	11	83	2
Tebuflufenpyrad	87	4	80	8	88	3	78	2	83	8	81	4	76	3	77	4
Teflubenzuron	89	8	76	13	81	1	73	15	63	8	67	10	69	6	70	10
Thenylchlor	117	7	113	0	98	4	91	6	90	3	92	7	90	5	84	1
Thiachlorid	85	9	78	8	77	3	89	3	84	5	84	6	85	13	91	2
Thiobencarb	76	6	73	2	84	1	72	13	71	2	71	4	74	3	62	5
Triadimefon	130	3	116	6	99	6	89	5	88	5	91	7	85	2	82	3
Triadimenol	119	6	110	6	92	3	87	2	87	1	90	5	87	1	88	2
Tri-allate	57	15	48	7	75	2	45	34	52	22	46	14	44	5	34	3
Trichlamide	92	17	79	7	76	14	65	21	63	27	82	18	72	7	76	4
Triflumizole	87	9	48	37	36	8	80	13	67	26	66	14	61	17	70	6
Frequency ^{b)}	81		68		73		74		65		71		69		62	
															57	

^{a)} 50% vegetable (carrot, pumpkin, etc.) and 50% fruit (apple, lemon, etc.) juice ^{b)} The number of pesticides with acceptable recovery (70–120%) and RSD (0–20%) ^{c)} Hot water with grated ginger and sugar ^{d)} Not calculated because of matrix interference ^{e)} Fermented with rice and yeast only ^{f)} Made from barley, sugar cane and corn ^{g)} Made from barley

Table 2. Comparison of recovery test results with and without dilution of sample

		Red wine		White wine		Brandy
		Wine 1 ^{a)}	Wine 2 ^{b)}	Wine 1 ^{c)}	Wine 2 ^{d)}	
Ethanol concentration (%)		11	14.5	13	14	37
Number of acceptable pesticides ^{e)}	Without dilution	87	79	84	88	55
	2 times dilution	88	85	86	90	75
	4 times dilution	— ^{f)}	— ^{f)}	— ^{f)}	— ^{f)}	83
Mean recovery of 91 pesticides	Without dilution	87	77	79	83	71
	2 times dilution	90	83	83	86	82
	4 times dilution	— ^{f)}	— ^{f)}	— ^{f)}	— ^{f)}	86

^{a)} Made in Japan ^{b)} Made in Bulgaria ^{c)} Made in USA ^{d)} Made in Japan

^{e)} Recovery (70–120%); RSD (0–20%) ($n=5$) ^{f)} No data

察され、精製にはC18カラムあるいはアセトニトリル–ヘキサン分配などの脂質除去操作が必要と考えられた。

一方、アルコール飲料では、直接法による場合、良好と判定された項目数が1~70となり、Fig. 1に示したようにアルコール度数の増加に伴って、良好と判定された項目数は減少する傾向が認められた。特にアルコール度数が30%以上のブランデー、ウイスキー、ラム酒およびウォッカで回収率が低下したため、良好と判定された項目数の減少が顕著であった。希釈法による場合、回収率の低下が抑制され、良好と判定された項目数が50~81となった。原料成分に相違があるものの、飲料中のエタノールが直接法による分析に影響を与えることが推察された。

3. 模擬アルコール飲料を用いた検証

アルコール以外の原料成分の影響を除去するため、所定量のぶどう果汁飲料にエタノールを添加した模擬アルコール飲料（アルコール度数0~40% (v/v)）を用いて直接法で添加回収試験を行った。各濃度における良好な項目数についてはFig. 2Aに示した。模擬アルコール飲料のエタノール濃度と評価対象とした91農薬について、良好と判定された項目数はエタノール濃度0~25%の範囲で80あり顕著な減少は認められなかったが、エタノール濃度40%で57に減少した（Fig. 2A）。この結果は、14種類のアルコール飲料の添加回収試験において、アルコール度数37%のウイスキーおよびブランデーで良好と判定された農薬数が34および17と著しく減少したことに一致した。

ぶどう果汁で良好と判定された83項目の回収率の平均値をFig. 2Bに示した。エタノール濃度の増加に伴って91%から71%に低減した。

また、塩析・脱水操作後に回収された有機相について各濃度における体積をFig. 2Bに示した。エタノール濃度の増加に伴って増加し、調製したエタノールの濃度範囲（0~40%）で、エタノール濃度（ x ; %）と有機相の体積（ y ; mL）に近似的に一次相関（ $y=0.127x+20.2$; $R^2>0.99$ ）が成立した。その結果、有機相の体積の増加は、回収された農薬濃度が低下するため、回収率の低減につながる。そこで有機相の体積の増加を考慮し、最終的に得られた回収率に補正係数（回収した有機相の体積（mL）を20（mL）で除し

た値）を乗じて補正した。この補正により、模擬アルコール飲料の回収率はぶどう果汁で回収率が良好と判断された83項目でエタノール濃度にかかわらず、ほぼ90%以上に上昇し（Fig. 2B）、さらに評価対象とした91農薬中78~82項目の回収率が良好と判定された（Fig. 2A）。

これらのことから、アルコール飲料での低回収率の原因は、農薬の抽出効率の低下によるものではなく、塩析・脱水後の増加した有機相の体積を考慮せず、固相カラムに負荷する有機相8 mLを試料4 gとみなしたことにあると考えられた。また、エタノール濃度がおおむね10%未満であれば回収率の低減が数%以内であることが示唆された。

4. 試料の希釈による効果の検証

アルコール飲料の分析で、直接法により原液のまま前処理する方法を適用した場合、エタノール濃度の増加が回収率を低減させることが認められた。アルコール飲料の分析に際しては、本法の迅速性や簡便性の利点を考慮し、あらかじめ試料を希釈し前処理することで良好な分析結果が得られると考えた。そこで試料の希釈による効果についてアルコール飲料を用いて希釈法と直接法による結果を比較した。ワインおよびウイスキーにおける良好な項目数についてTable 2に示した。ワインはアルコール度数が最大15%程度であり、2倍に希釈した。アルコール度数が37%のブランデーは、2倍および4倍に希釈した。試料の希釈による効果が認められ、特にアルコール度数の高いブランデーにおいて、良好と判定された項目数は希釈しない場合で55項目、2倍希釈で75項目、4倍希釈で83項目と希釈率の増加に伴って増加し顕著に効果が確認された。評価対象とした91農薬の平均回収率も希釈に伴って71%から86%に改善が認められた。これらの結果から、アルコール飲料を分析する際には、おおむねエタノール濃度が10%未満になるよう、あらかじめ水で希釈することでノンアルコール飲料と同等の分析ができることが推定された。Table 1で示したアルコール飲料の希釈法による結果からその実用性が確認できた。

結 論

アルコール飲料を含めて多様な飲料に適用できる迅速で

簡便な残留農薬一斉分析法の実用化に向けての検討を行った。検討した21種類のノンアルコール飲料について、牛乳および豆乳を除き91農薬中72～91項目で適用可能であった。牛乳および豆乳の前処理には脂質除去操作が必要であると考えられた。アルコール飲料について、試料に含まれるエタノールの影響は、その濃度が10%未満になるよう水で希釈することで回収率が改善できることを定量的に立証した。現在、本法のGC-MS/MSによって分析できる農薬について適用性を検証している。本法により、1試料を約2時間で定量することができ、通常の残留農薬モニタリングのみならず健康危機発生時における迅速かつ簡便なスクリーニング分析法として活用することが可能と期待できる。

なお、本研究の要旨は、第47回全国衛生化学技術協議会年会（2010年11月、神戸市）において発表した。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究C）による助成を受け実施された。

文 献

- 1) Okamoto, Y., Takatori, S., Kitagawa, Y., Okihashi, M., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Tanaka, Y., Obana, H. Determination of pesticides in Chinese dumplings using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 10–15 (2009).
- 2) Kitagawa, Y., Okihashi, M., Takatori, S., Okamoto, Y., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Obana, H. Multi-residue method for determination of pesticide residues in processed foods by GC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 198–207 (2009).
- 3) Kitagawa, Y., Okihashi, M., Takatori, S., Okamoto, Y., Fukui, N., Murata, H., Sumimoto, T., Obana, H. Multi-residue method for determination of pesticide residues in processed foods by GC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 243–252 (2009).
- 4) Saito, Y., Yamamoto, A., Kodama, S., Ohto, M., Ohura, T., Matsunaga, A. Rapid determination of pesticide residues in wines by GC-ECD with large-volume injection system. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 321–325 (2000).
- 5) Prieto, A., Ettiene, G., Medina, D., Buscema, I., Gonzalez, G., Araujo, L. Analysing organophosphorus pesticides in wines using graphitized carbon black extraction cartridges. *Food Addit. Contam.*, **16**, 57–61 (1999).
- 6) Carpinteiro, I., Ramil, M., Rodríguez, I., Cela, R. Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 7484–7492 (2010).
- 7) González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6033–6042 (2009).
- 8) Jiang, Y., Li, X., Xu, J., Pan, C., Zhang, J., Niu, W. Multiresidue method for the determination of 77 pesticides in wine using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, **26**, 859–866 (2009).
- 9) Correia, M., Delerue-Matos, C., Alves, A. A. Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *J. Chromatogr. A*, **889**, 59–67 (2000).
- 10) Hyötyläinen, T., Luthje, K., Rautiainen-Rämä, M., Riekkola, M.-L. Determination of pesticides in red wines with on-line coupled microporous membrane liquid-liquid extraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1056**, 267–271 (2004).
- 11) Pang, G.-F., Fan, C.-L., Liu, Y.-M., Cao, Y.-Z., Zhang, J.-J., Fu, B.-L., Li, X.-M., Li, Z.-Y., Wu, Y.-P. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, **23**, 777–810 (2006).
- 12) Kobayashi, M., Otsuka, K., Tamura, Y., Tomizawa, S., Kamijo, K., Iwakoshi, K., Sato, C., Nagayama, T., Takano, I. Study on rapid analysis method of pesticide contamination in processed foods by GC-MS and GC-FPD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **52**, 226–236 (2011).
- 13) Urruty, L., Montury, M. Influence of ethanol on pesticide extraction in aqueous solutions by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3871–3877 (1996).
- 14) Okihashi, M., Kitagawa, Y., Akutsu, K., Obana, H., Tanaka, Y. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. *J. Pesticide Sci.*, **30**, 368–377 (2005).
- 15) 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).