

第114回学術講演会 2018年11月15日

アイスティサイエンス 技術セミナー

『ホクレン法+STQ法による ジチオカルバメート分析法の紹介』

『固相誘導体化法を用いた オンラインSPE-GC-MSシステムの紹介』



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

紹介



第41回農薬残留分析研究会， 2018年10月11~12日，長崎市

『ジチオカルバメート迅速スクリーニング法の開発』

○安藤 孝¹、小西賢治²、市来弥生¹、佐々野僚一²、今井沙紀³、
杉立久仁代⁴、穴沢秀峰⁴、坂 真智子⁵、関口博史³、石渡 智³

¹(一社)食の安全分析センター、²(株)アイスティサイエンス、³ホクレン農業協同組合連合会、
⁴アジレント・テクノロジー(株)、⁵(一財)残留農薬研究所

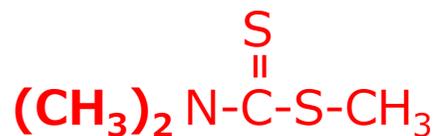
■ホクレン+STQ-GC法

ホクレンが開発したジチオカルバメート系農薬迅速分析法^{1),2),3)} (以下、ホクレン法) による試料溶媒中でメチル化しQuEChERS法を基に溶媒転溶を行うことを特徴とした迅速な抽出誘導体化法と自動前処理装置によるSTQ-GC-B2法の精製を組み合わせることでGC-MSMSで測定した。

【参考文献】

- 1) 石渡智、関口博史：農産物中ジチオカーバメート系農薬の迅速分析法の検討、第110回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2015)
- 2) 石渡智、関口博史：農産物中ジチオカーバメート系農薬の迅速分析法の検討(第二報)、第111回日本食品衛生学会、講演要旨集、p.63 (2016)
- 3) S.Ishiwata,S.Imai:Simplified Method for the Determination of Dithiocarbamates in Agricultural Products by LC-MS/MS,12th European Pesticide Residue Workshop, Programme & Book of Abstracts,p.130-131 (2018)

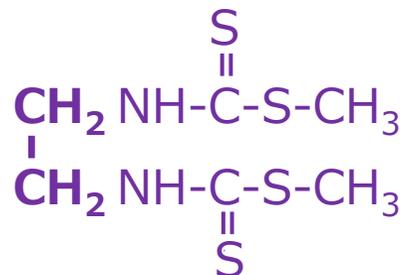
測定物質



ジメチル

ジチオカルバミン酸メチル

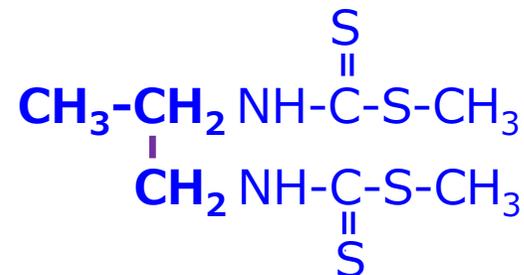
DMDC



エチレン

ビス ジチオカルバミン酸メチル

EBDC

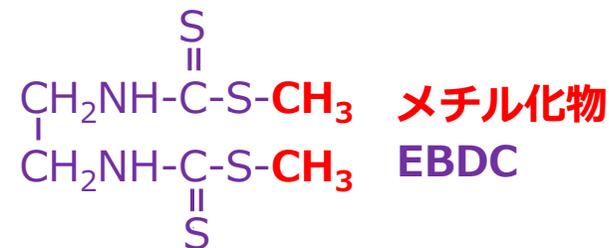
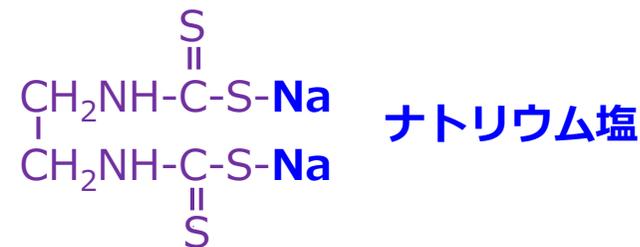
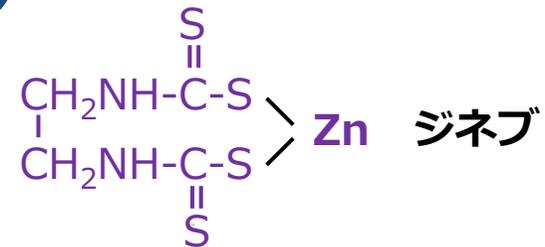
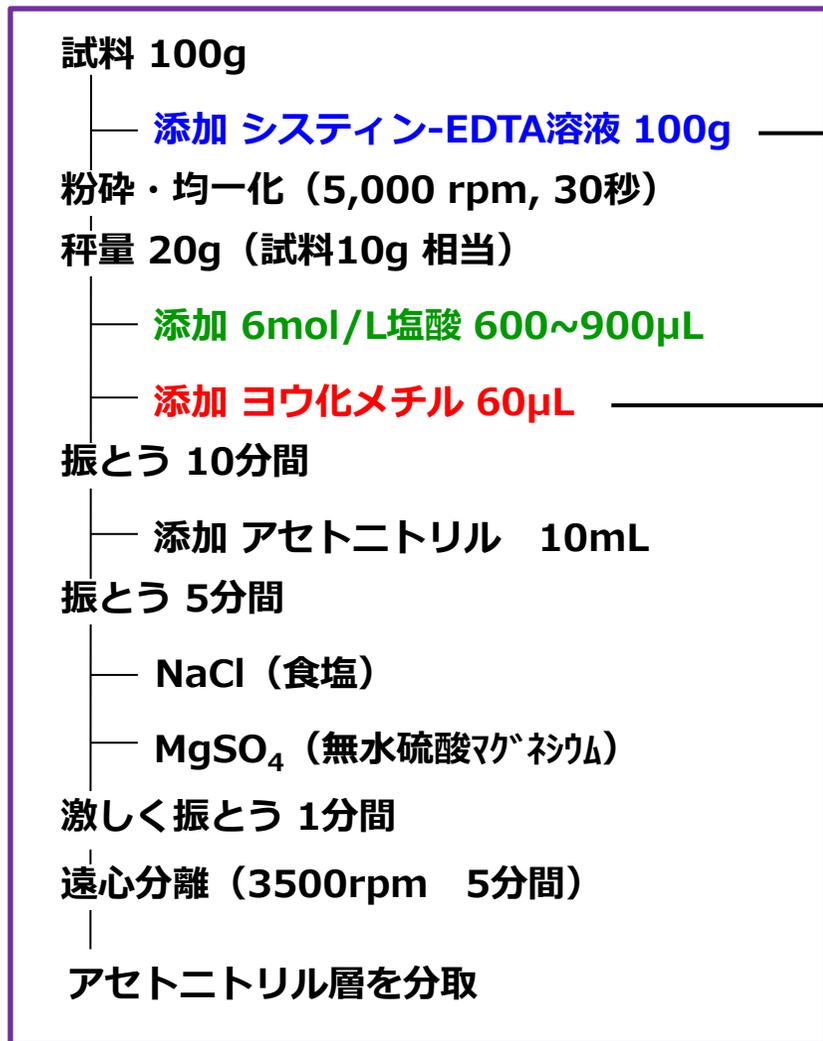


プロピレン

ビス ジチオカルバミン酸メチル

PBDC

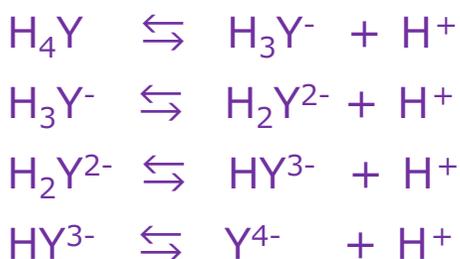
抽出誘導体化（ホクレン法）



EDTA (エチレンジアミン四酢酸)

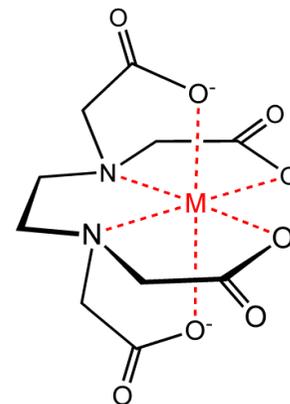


EDTAは4塩基性の弱酸で白色粉末で、水、アルコールに溶けにくい。



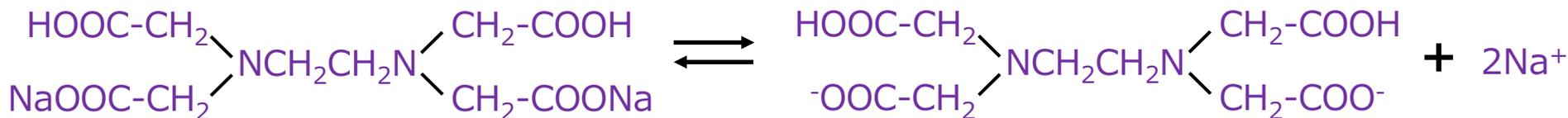
EDTAのpK値	
pK ₁	2.0
pK ₂	2.67
pK ₃	6.16
pK ₄	10.26

EDTAはアルカリ金属を除く多くの金属イオンと非常に安定な錯塩をつくる性質がある。
そのEDTA錯塩は水によく溶ける。

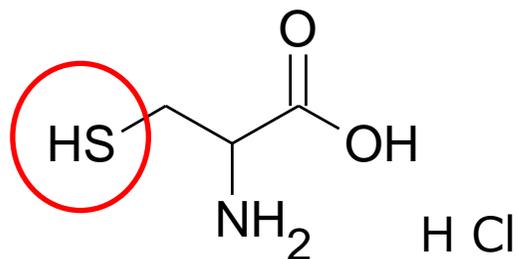


●エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物

EDTA/2Na/2H/2H₂Oは白色粉末で、非潮解性、水に溶けやすい。



L-システイン塩酸塩



(pH調整?、安定剤?、保護剤?)

Cysteine	システイン
$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$	MW=121.16 $\text{pK}_1=1.92$ $\text{pK}_2=10.70$ $\text{pK}_3=8.37$ $\text{pI}=5.07$

残留農薬分析用自動前処理装置



なぜST-L400が必要なの？

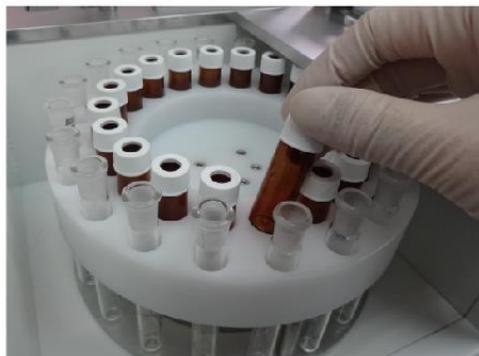
～残留農薬分析における課題とST-L400の解決法～

簡単、セットしてボタンを押すだけ！

→ST-L400ならタッチパネルで前処理法を選択するだけ。



①サンプルバイアル
と試験管をセット



②固相カートリッジ
Smart-SPE をセット



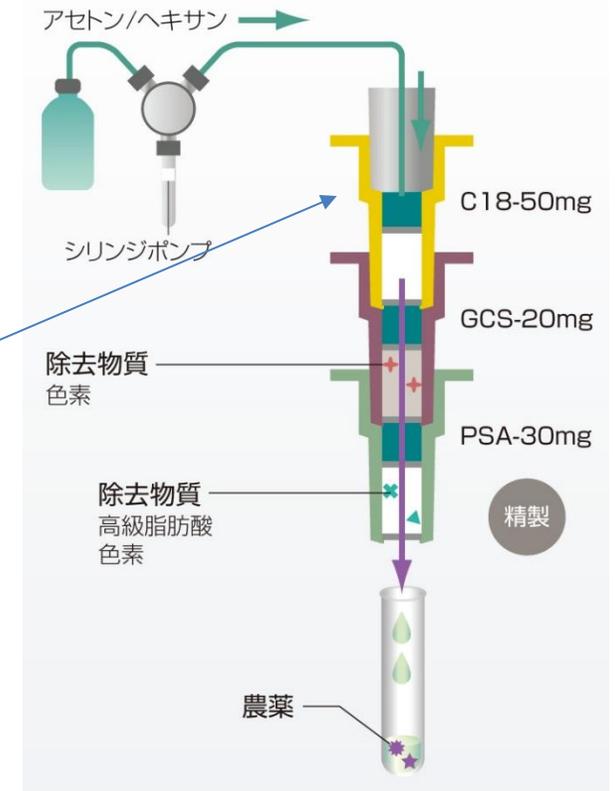
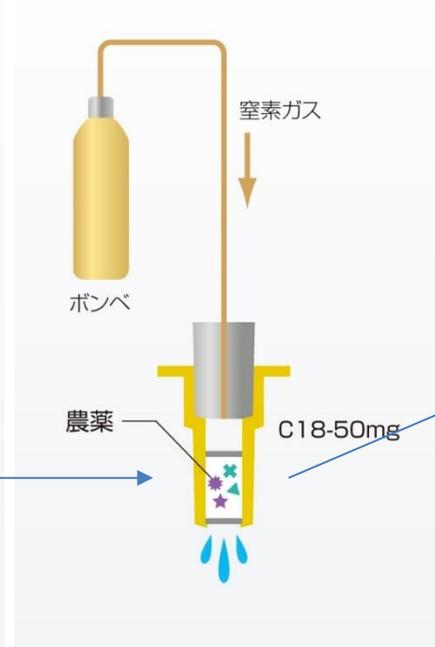
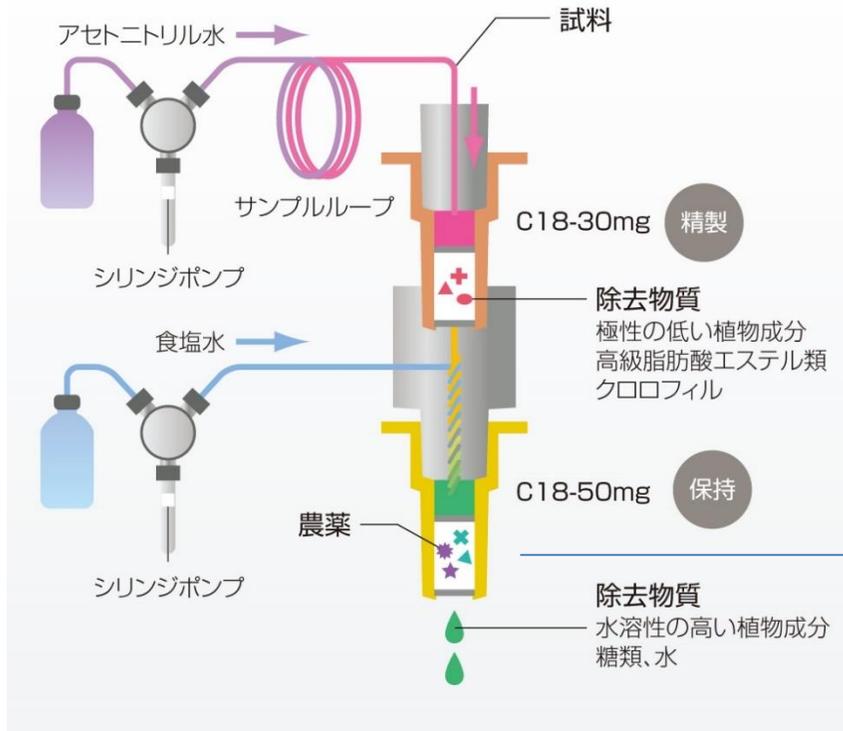
③タッチパネル
で簡単入力運転



**YES
YOU
CAN!**



自動前処理装置によるSTQ-GC-B法



ST-L400精製工程と検討

4mLバイアルにアセトニトリル抽出液

自動処理

分取・負荷[通液] 抽出液0.5mL

Smart-SPE C18-50 mg : 精製

無極性夾雑除去

通液 アセトニトリル-水 (9/1) 0.4mL

流出液

混合・通液 10%塩化ナトリウム水溶液 8mL

Smart-SPE C18-50 mg : 保持

極性夾雑物除去

窒素ガスで乾燥：3分間

連結 Smart-SPE GCK-20/PSA-30 : 精製

脂肪酸類除去
フラボノイド類除去

溶出 アセトン・ヘキサン (3/7) 1mL

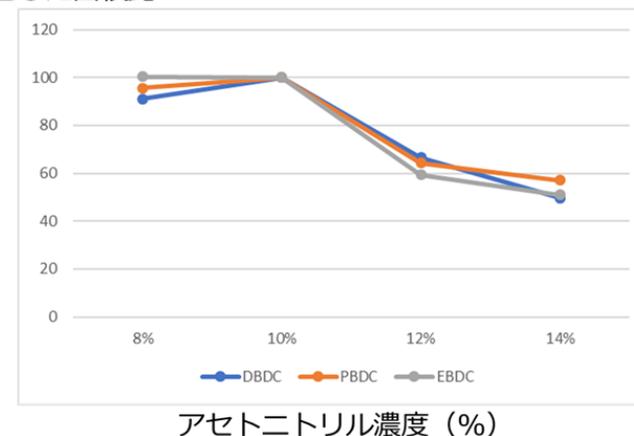
添加 0.1% PEG200 + 1ppmフェナントレン-d体 /アセトン 20μL

定容 (1 mL, アセトン/ヘキサンで調製)

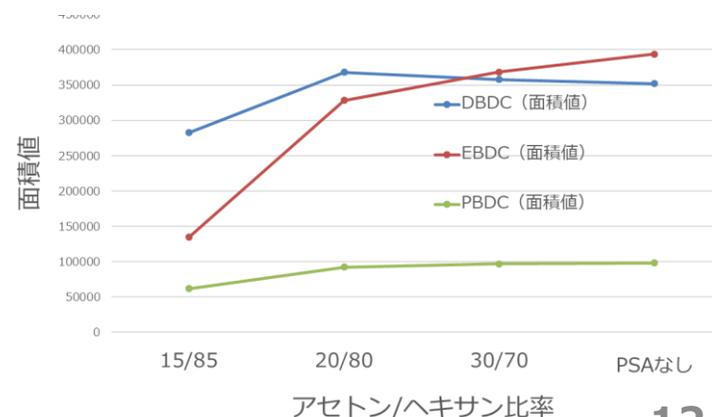
GC-MS/MS測定 (2μL大量注入) or GC-MS測定 (25μL大量注入)

■ 検討1 C18ミニカラムによる保持工程

10%のピーク面積値を
100とした面積比



■ 検討2 GCK/PSAミニカラムによる精製工程

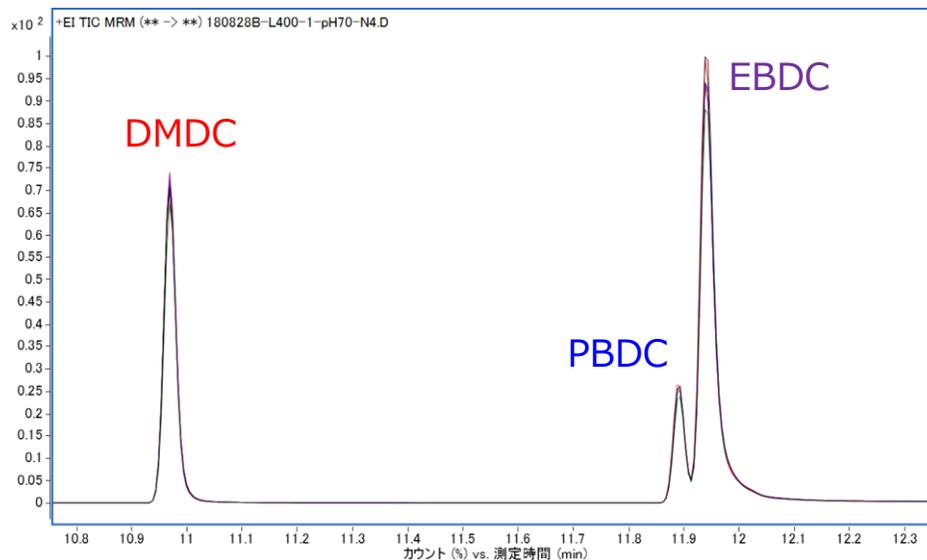


再現性について：スタンダード

「ホクレン誘導体化抽出 + STQ精製 + GCMSMS測定」によるスタンダードの再現性

表 MRMによるピーク面積値

サンプル検体	DBDC	PBDC	EBDC
1	614,630	221,636	1,048,247
2	616,254	226,288	1,031,410
3	592,812	201,846	957,213
4	631,927	220,221	993,403
5	649,973	223,092	1,010,333
6	643,589	222,654	998,897
<i>A ve.</i>	<i>624,864</i>	<i>219,290</i>	<i>1,006,584</i>
RSD, %	3.4	4.0	3.2



TICによるクロマトグラム重描き (n = 6)

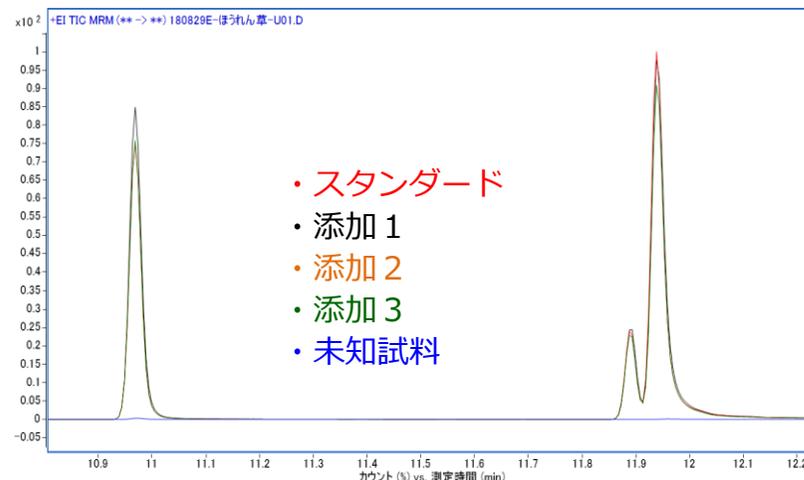
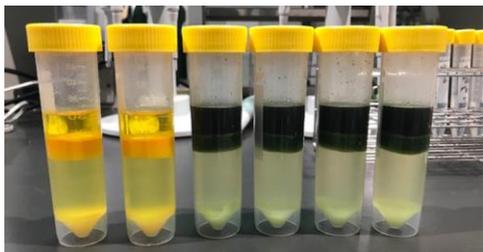
添加回収試験の結果

■ほうれん草 (n=3, ピーク面積値)

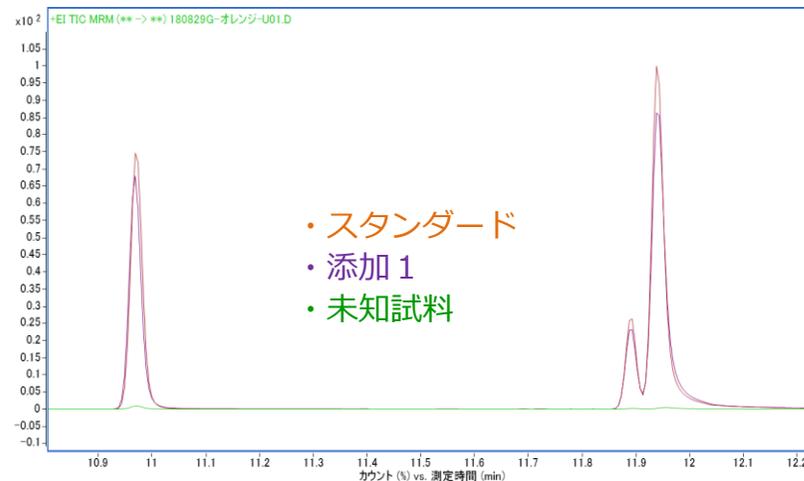
サンプル検体	DBDC	PBDC	EBDC
ST	595,724	199,627	908,739
添加 1	680,577	188,638	902,465
添加 2	598,796	182,159	877,214
添加 3	604,245	177,507	809,690
<i>Ave.</i>	<i>627,873</i>	<i>182,768</i>	<i>863,123</i>
RSD, %	7.3	3.1	5.6
回収率, %	105	92	95

■オレンジ (n=1, ピーク面積値)

サンプル検体	DBDC	PBDC	EBDC
ST	595,724	199,627	908,739
添加 1	646,826	213,771	939,190
回収率, %	109	107	103



TICによるクロマトグラム重描き



TICによるクロマトグラム重描き

固相誘導体化法を用いた オンラインSPE-GC-MSシステムについて

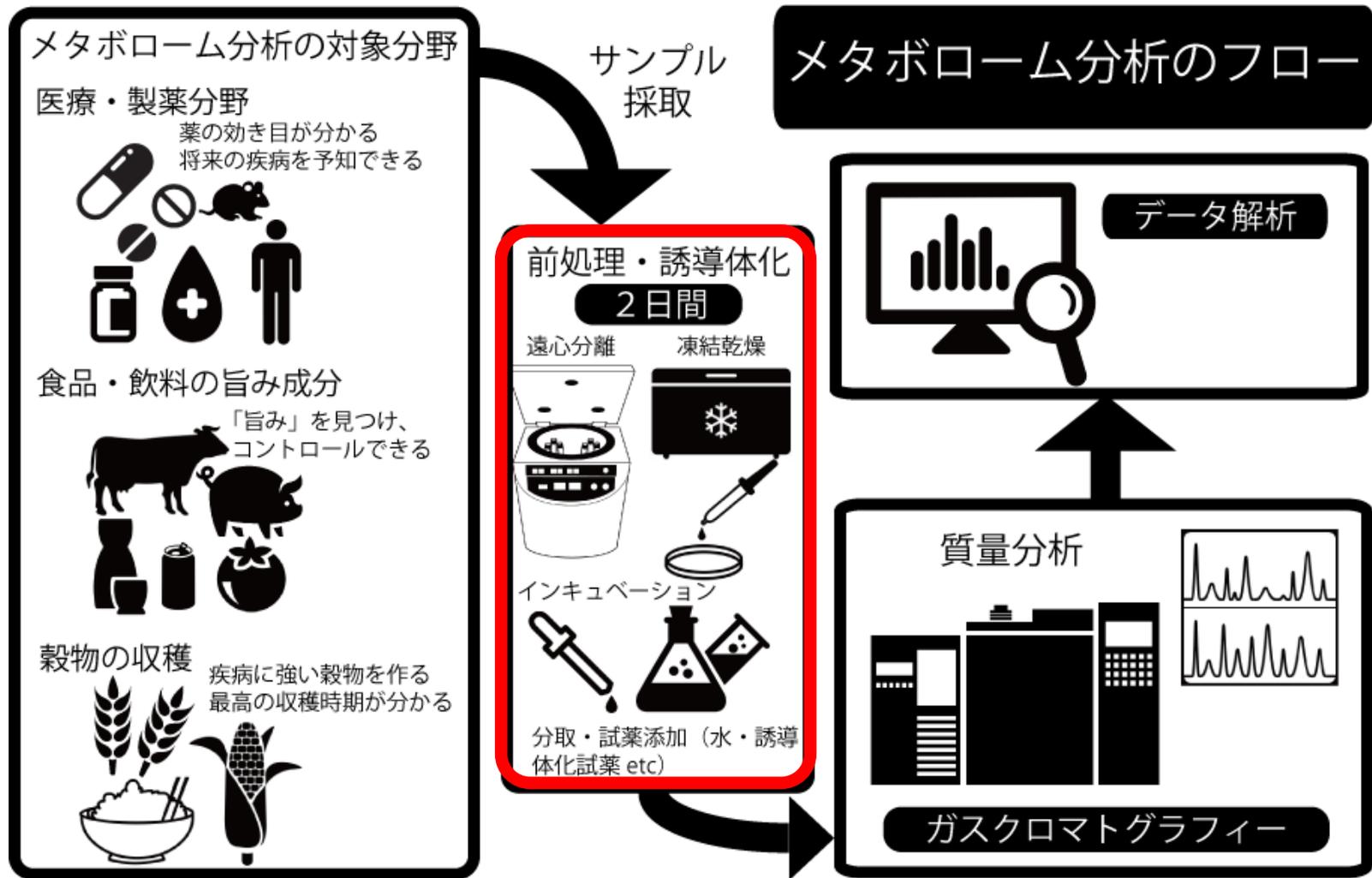


株式会社アイスティサイエンス

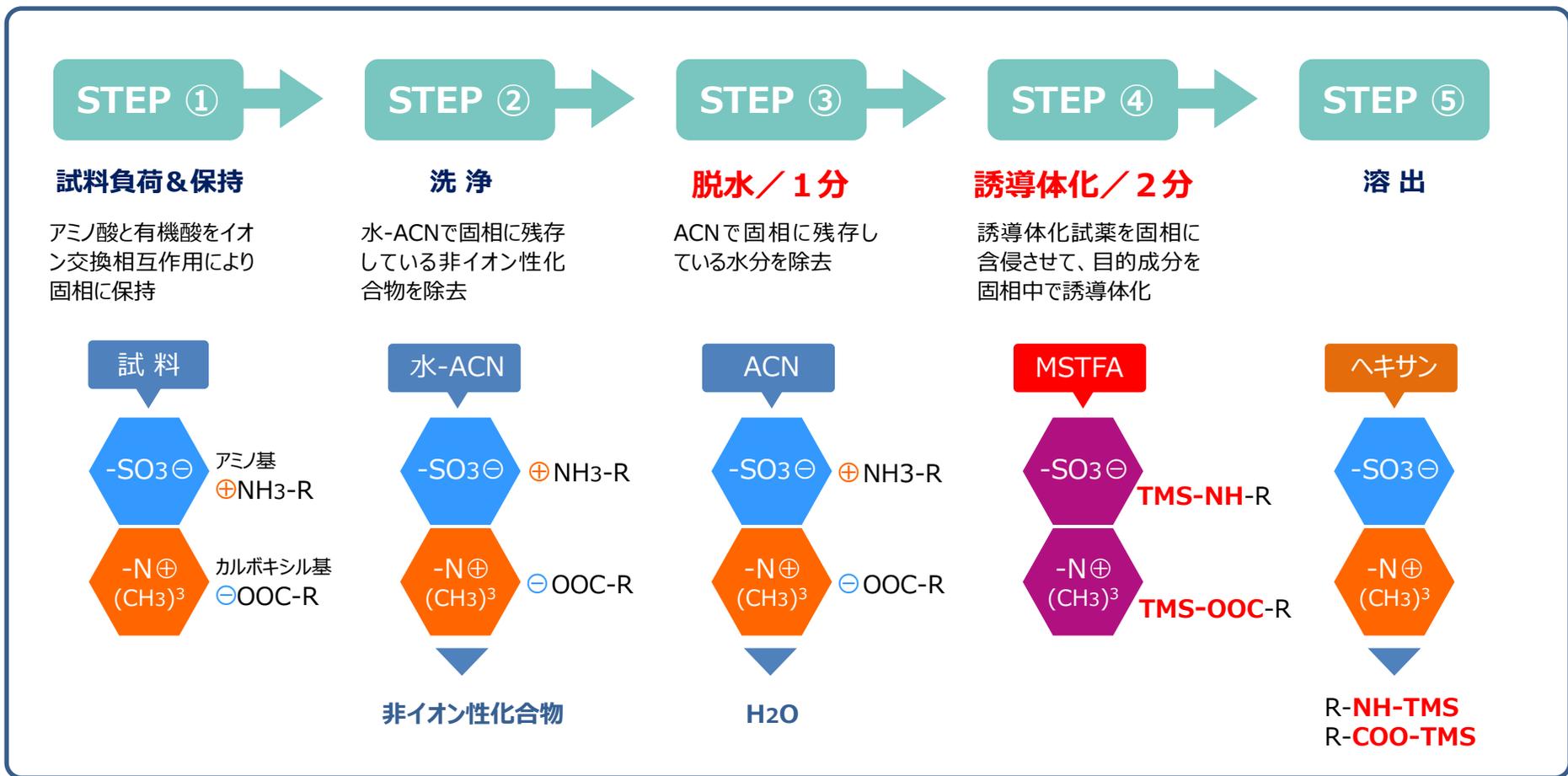
Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

メタボロミクスの現状



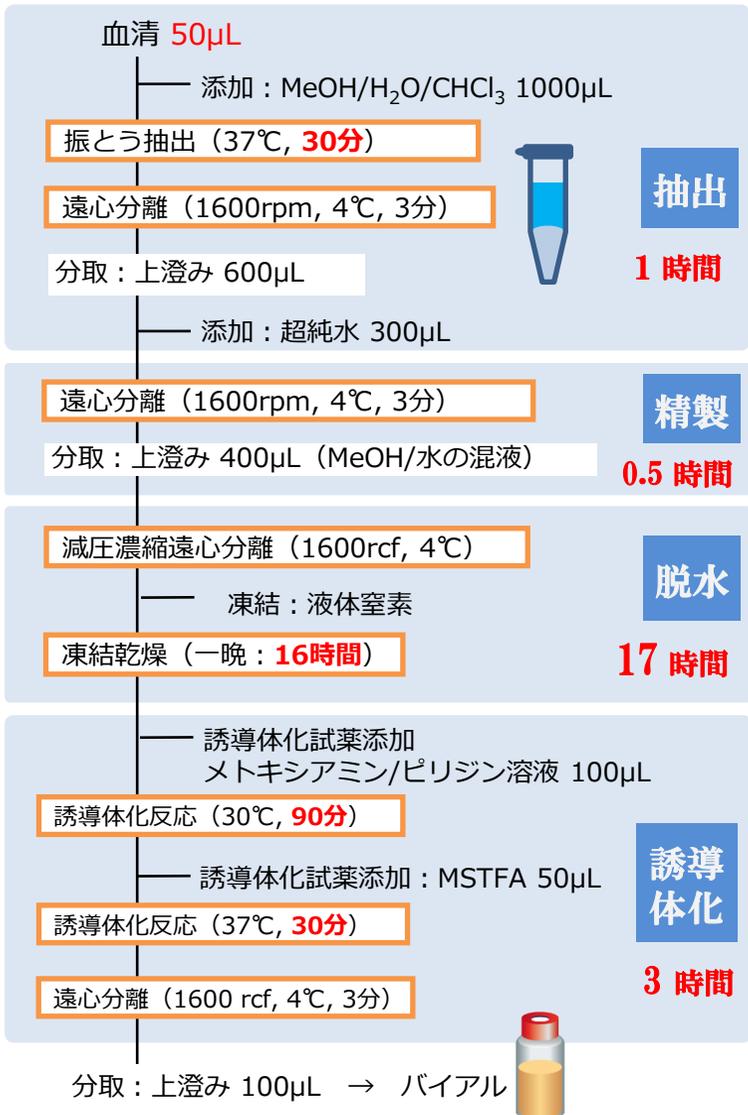
固相誘導体化法



特許登録：(株)アイスティサイエンス

従来法と本法の前処理比較

■ 従来法

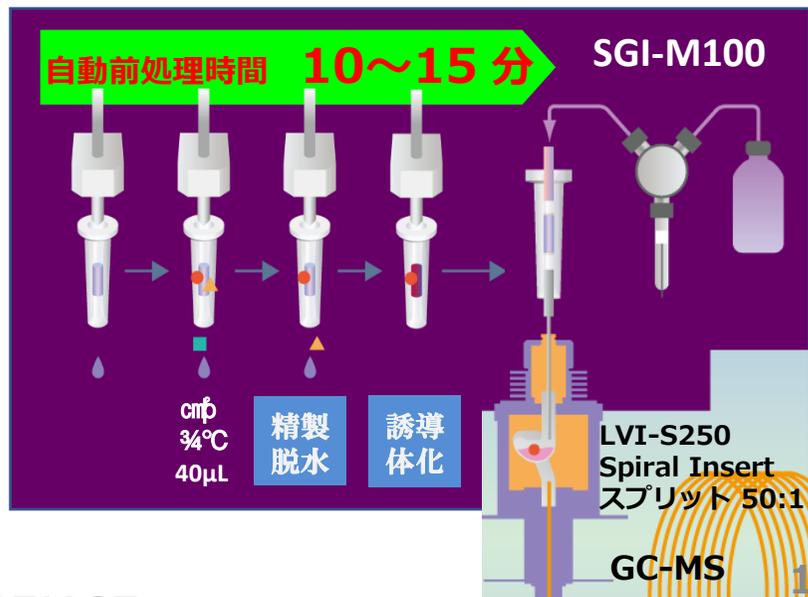


測定 : GC/MS : 注入1µL (スプリット 25:1)

■ 本法



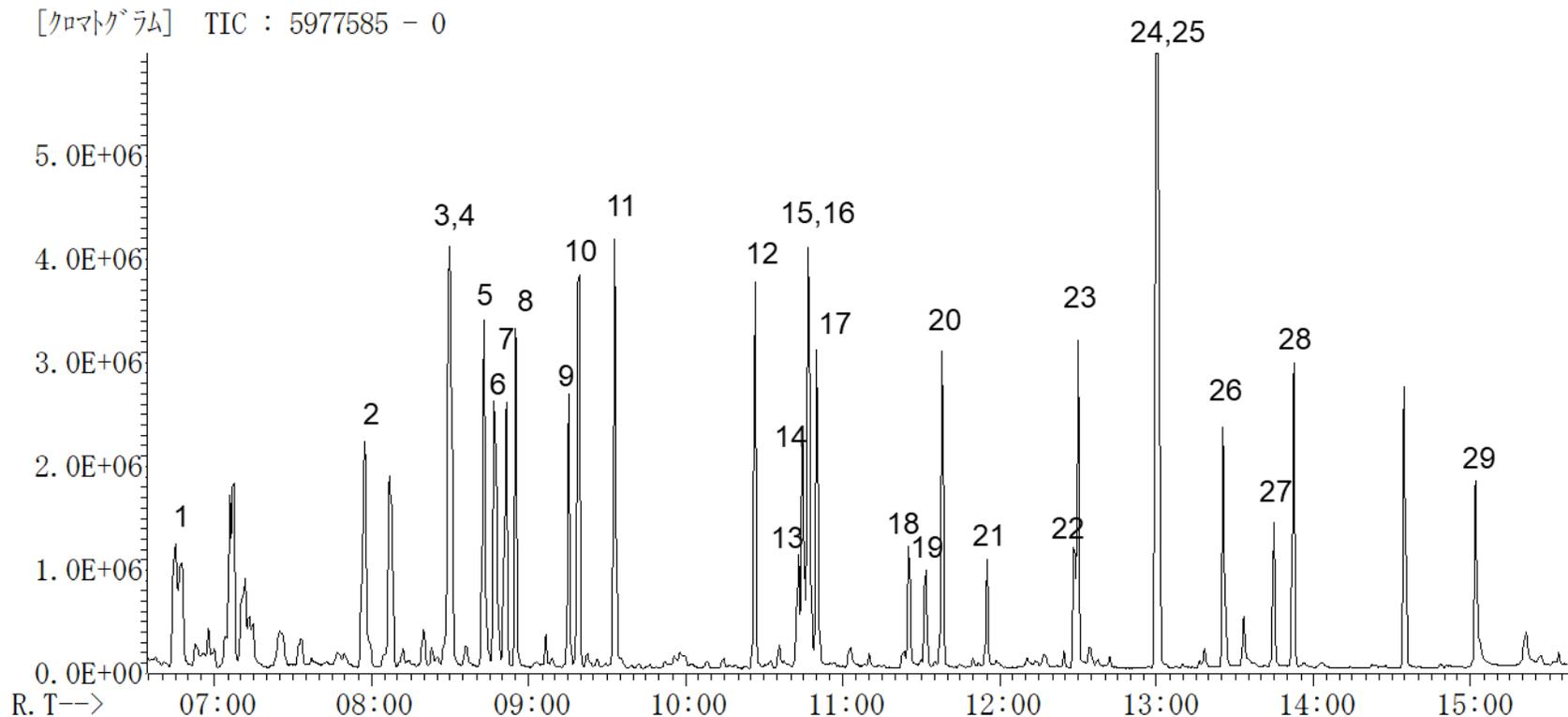
オンライン固相誘導体化SPE-GC-MS



SPE-GC-MS system



本法による標準溶液のSCANトータルイオンクロマトグラム



- | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| 1. Alanine-2TMS | 6. Proline-2TMS | 11. Threonine-3TMS | 16. Cytosine-2TMS | 21. Asparagine-3TMS | 26. Adenine-2TMS |
| 2. Valine-2TMS | 7. Glycine-3TMS | 12. Malic acid-3TMS | 17. Aminobutyric acid-3TMS | 22. Putrescine-4TMS | 27. Lysine-4TMS |
| 3. Phosphate-3TMS | 8. Succinic acid-2TMS | 13. Aspartic acid-3TMS | 18. Ketoglutaric acid-3TMS | 23. Aconitic acid-3TMS | 28. Tyrosine-3TMS |
| 4. Leucine-2TMS | 9. Fumaric acid-2TMS | 14. Methionine-2TMS | 19. Glutamic acid-3TMS | 24. Citric acid-4TMS | 29. Guanine-3TMS |
| 5. Isoleucine-2TMS | 10. Serine-3TMS | 15. Proline-oxo-2TMS | 20. Phenylalanine-2TMS | 25. Ornithine-4TMS | |

Fig. 3. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method.

* 標準溶液バイアル中濃度 : 0.01nmol/μL

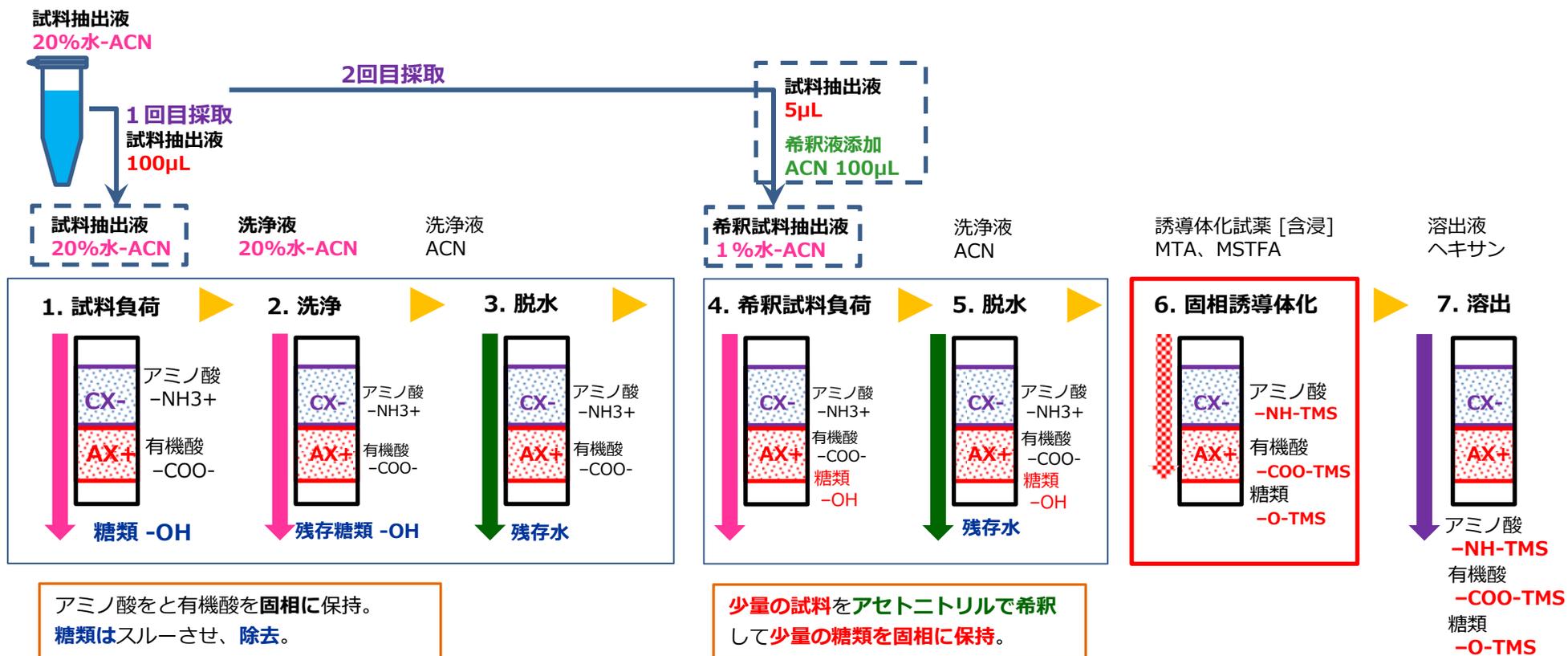
本法による標準溶液の再現性

Table 1. Reproducibility of peak area with standard solution using SPE-GC-MS system.

No.	Compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Ave.	RSD, %
1	Alanine-2TM S	2,780,202	2,814,678	2,805,838	2,570,446	2,663,543	2,676,876	2,632,581	2,692,127	2,718,118	2,706,045	3.0
2	Valine-2TM S	3,231,804	3,290,271	3,270,689	2,966,049	3,107,653	3,132,760	3,054,963	3,085,131	3,160,769	3,144,454	3.4
3	Phosphate (3:1)-3TM S	1,980,261	1,945,488	1,842,146	1,762,489	1,746,163	1,658,840	1,585,771	1,679,471	1,991,253	1,799,098	8.3
4	Norleucine-2TM S	3,860,754	3,995,800	3,961,145	3,572,341	3,750,253	3,798,730	3,712,869	3,729,371	3,834,508	3,801,752	3.4
5	Isoleucine-2TM S	3,166,213	3,281,486	3,263,756	2,942,720	3,112,611	3,105,804	3,057,182	3,062,330	3,129,208	3,124,590	3.4
6	Proline-2TM S	3,326,569	3,445,278	3,452,215	3,055,493	3,264,503	3,272,235	3,230,054	3,247,932	3,297,886	3,288,018	3.6
7	Glycine-3TM S	2,170,649	2,352,541	2,219,378	2,118,024	2,229,077	2,288,729	2,328,562	2,291,359	2,432,007	2,270,036	4.3
8	Succinic acid-2TM S	3,020,526	3,101,538	3,047,906	2,891,328	2,874,284	2,677,718	2,840,826	2,917,558	3,180,044	2,950,192	5.2
9	Fumaric acid-2TM S	1,768,634	1,813,725	1,790,816	1,626,601	1,697,384	1,608,388	1,635,905	1,710,549	1,825,272	1,719,697	4.9
10	Serine-3TM S	2,012,774	2,110,285	2,078,505	1,857,176	1,969,420	1,978,512	1,918,379	1,950,455	1,968,792	1,982,700	3.9
11	Threonine-3TM S	1,040,407	1,085,291	1,075,400	963,085	1,019,290	1,028,004	988,509	997,181	1,024,209	1,024,597	3.8
12	Malic acid-3TM S	485,209	496,725	505,695	464,603	471,484	446,942	451,563	459,884	497,251	475,484	4.5
13	Aspartic acid-3TM S	527,945	521,172	605,941	439,870	548,152	689,805	622,430	590,812	358,848	544,997	18.3
14	Methionine-2TM S	1,317,135	1,376,552	1,320,877	1,165,099	1,233,662	1,299,449	1,267,142	1,274,606	1,279,034	1,281,506	4.6
15	Proline-oxo-2TM S	1,972,283	2,178,513	2,188,232	2,213,001	2,171,464	2,218,260	2,414,150	2,348,929	2,386,591	2,232,380	6.1
16	Cytosine-2TM S	1,164,055	1,199,619	1,211,399	1,081,564	1,154,429	1,179,900	1,130,354	1,140,346	1,191,227	1,161,433	3.5
17	Am inobutyric acid-3TM S	1,903,218	2,080,359	1,832,270	1,718,333	1,911,954	1,983,878	1,952,195	1,884,295	2,036,145	1,922,516	5.6
18	Ketoglutaric acid-3TM S	179,954	187,293	167,292	138,034	169,160	156,600	151,045	147,256	178,112	163,861	10.1
19	Glutam ic acid-3TM S	486,088	482,193	528,880	375,004	494,429	585,775	510,207	483,426	320,272	474,030	16.8
20	Phenylalanine-2TM S	1,553,897	1,642,952	1,616,874	1,422,103	1,528,499	1,564,042	1,507,985	1,508,373	1,520,941	1,540,630	4.2
21	Asparagine-3TM S	264,587	293,568	269,785	215,342	260,091	264,791	258,735	249,746	263,337	259,998	7.9
22	Putrescine-4TM S	1,097,163	1,143,662	1,022,892	1,069,833	1,140,680	1,218,672	1,113,605	1,075,243	1,130,409	1,112,462	5.0
23	Aconitic acid-3TM S	1,068,411	1,095,208	1,085,018	973,865	1,026,875	1,009,638	1,007,640	1,025,144	1,085,668	1,041,941	4.1
24	Citric acid-4TM S	2,509,279	2,585,329	2,551,370	2,326,885	2,437,909	2,410,546	2,372,287	2,395,838	2,470,814	2,451,140	3.5
25	Omithine-4TM S	948,801	1,074,181	928,962	889,675	963,445	1,025,487	1,049,537	1,005,050	1,047,923	992,562	6.3
26	Adenine-2TM S	1,791,455	1,859,990	1,930,628	1,670,688	1,831,552	1,839,583	1,690,694	1,722,793	1,876,276	1,801,518	5.0
27	Lysine-4TM S	438,332	487,673	411,966	389,263	423,849	469,263	485,851	449,843	475,516	447,951	7.8
28	Tyrosine-3TM S	2,290,304	2,415,910	2,339,399	2,070,195	2,220,032	2,300,204	2,231,995	2,184,577	2,239,834	2,254,717	4.4
29	Guanine-3TM S	1,276,608	1,325,553	1,372,469	1,201,496	1,273,918	1,292,009	1,214,782	1,217,067	1,316,201	1,276,678	4.5

* 標準溶液バイアル中濃度 : 0.01nmol/ μ L

2段階試料分取法：構想



第1回目の試料負荷では糖類は固相に保持させず、アミノ酸と有機酸を固相に保持させておき、第2回目の試料負荷では先の試料量の1/20以下にして先の固相に糖類を保持させ、アセトニトリルで洗浄することで脱水を行い、アミノ酸と有機酸と糖質が固相に保持された状態で誘導体化試薬を固相に添加含浸させて誘導体化し、その後、一斉にヘキサンで溶出した。

混合標準溶液によるトータルイオンクロマトグラム

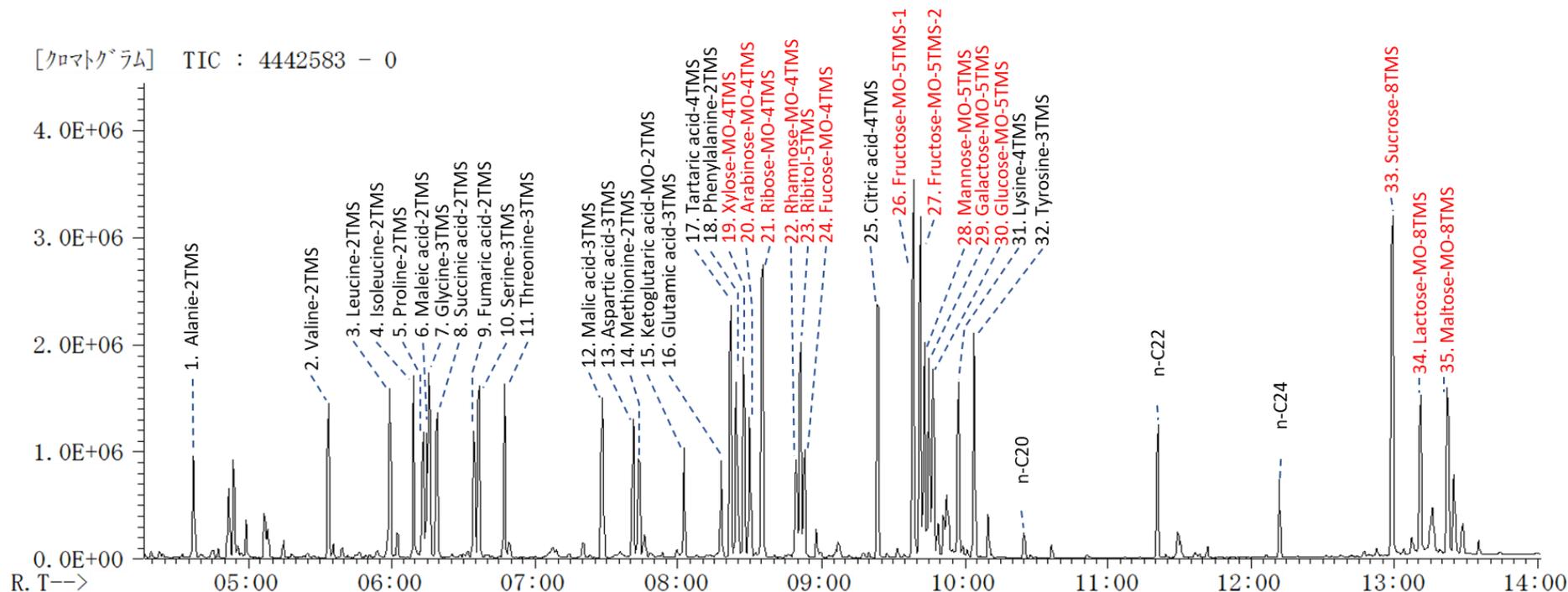


Fig. 2. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

* Concentration of **amino acids and organic acids** standard solution is 0.02nmol/μL

* Concentration of **sugars** standard solution is 0.2nmol/μL

野菜ジュースのトータルイオンクロマトグラム

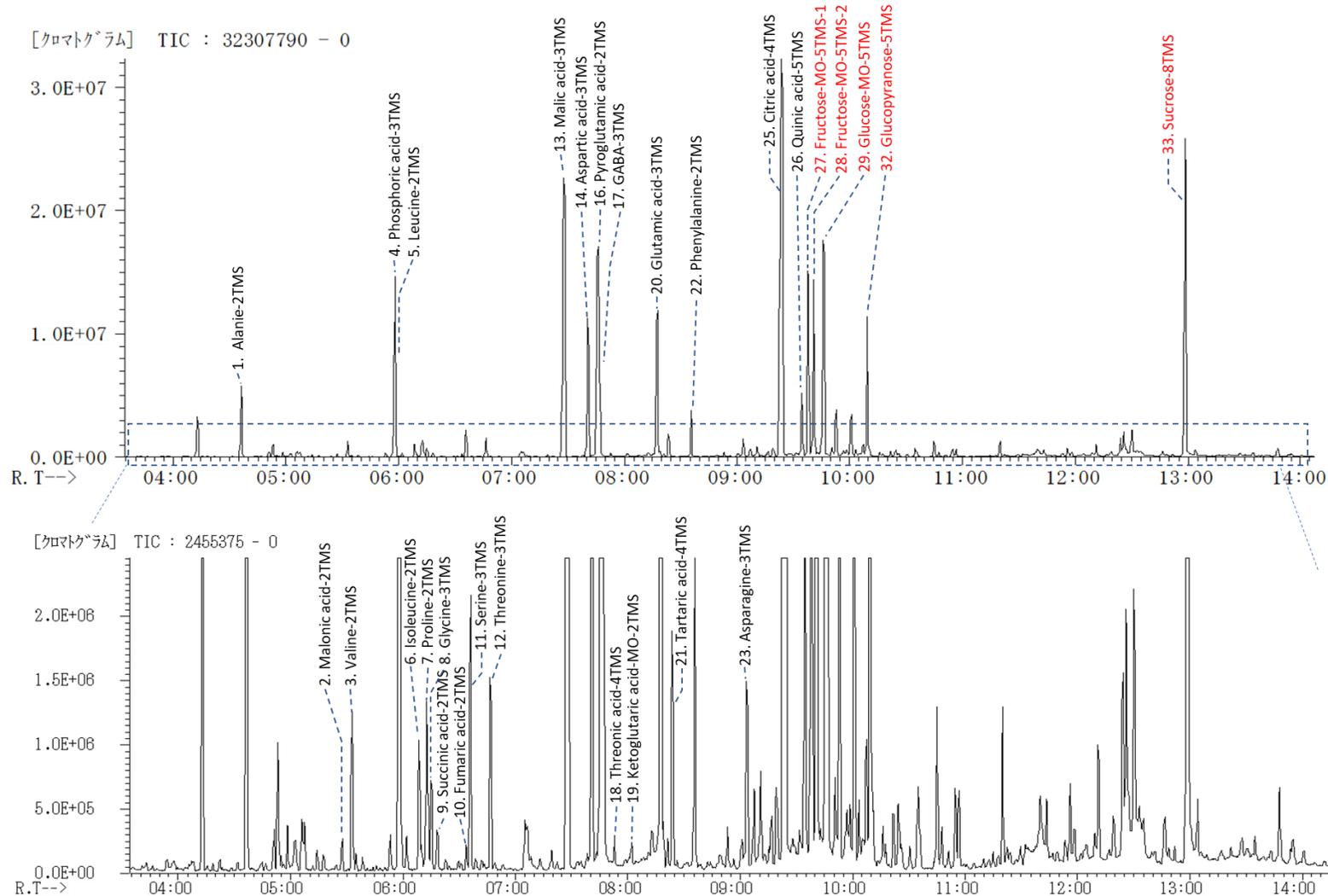
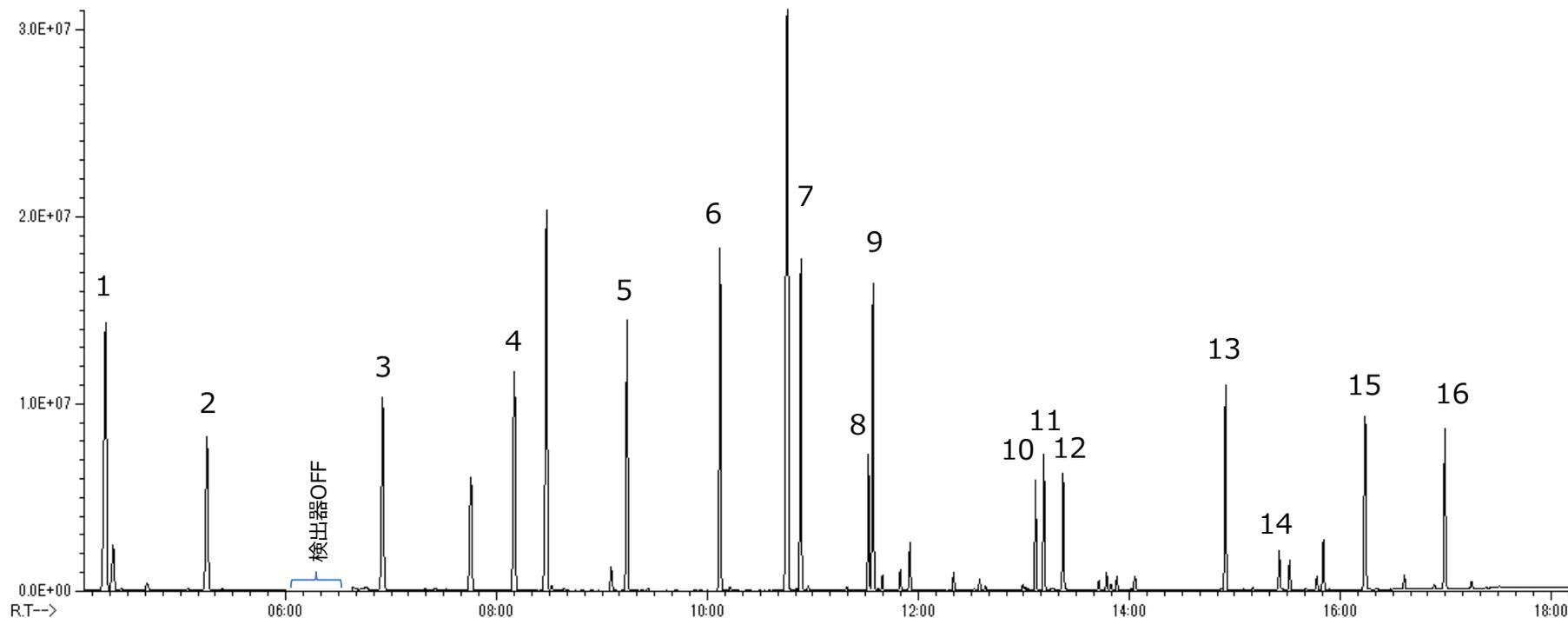


Fig. 4. The SCAN total ion chromatogram of the Vegetable juice using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

本法によるスタンダードのSCANトータルイオンクロマトグラム

有機酸系（短鎖脂肪酸、ジカルボン酸類）誘導体化試薬：MTBSTFA

[クロマトグラム] TIC: 31036800 - 0



- 1. Methanoic acid-tBDMS
- 2. Ethanoic acid-tBDMS
- 3. Propanoic acid-tBDMS
- 4. Butanoic acid-tBDMS
- 5. Pentanoic acid-tBDMS
- 6. Hexanoic acid-tBDMS

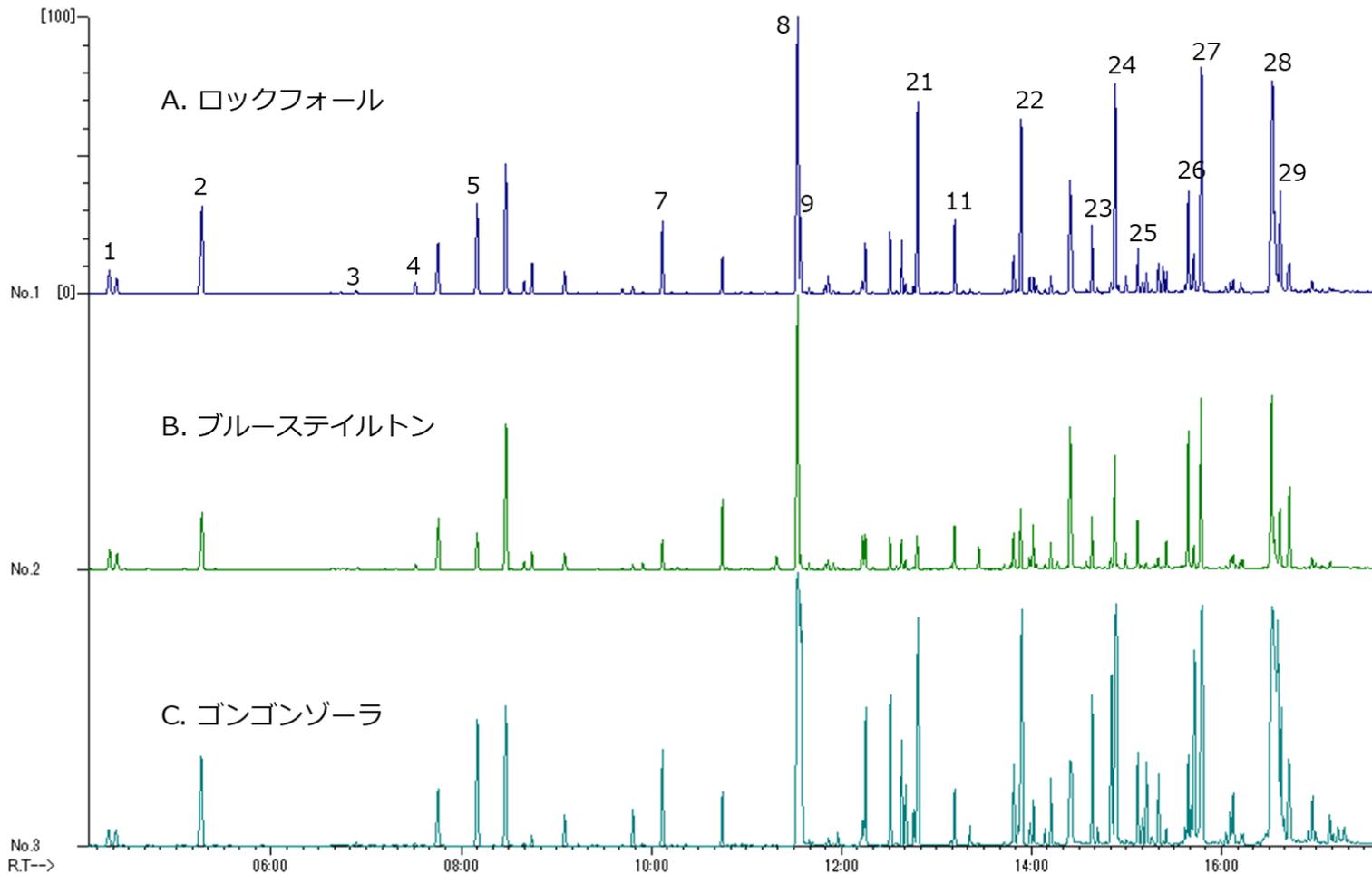
- 7. Heptanoic acid-tBDMS
- 8. Lactic acid-2tBDMS
- 9. Octanoic acid-tBDMS
- 10. Maleic acid-2tBDMS
- 11. Succinic acid-2tBDMS
- 12. Fumaric acid-2tBDMS

- 13. Malic acid-3tBDMS
- 14. a-Ketoglutaric acid-3tBDMS
- 15. Tartaric acid-4tBDMS
- 16. Citric acid-4tBDMS

ブルーチーズ3種のSCANトータルイオンクロマトグラム比較

有機酸系（短鎖脂肪酸、ジカルボン酸類）誘導体化試薬：MTBSTFA

【クロマトグラム】 TIC Y軸：相対値(%)



試料：ブルーチーズ3種



C B A

- 1 Methanoic acid-tBDMS
- 2 Ethanoic acid-tBDMS
- 3 Propanoic acid-tBDMS
- 4 Butanoic acid-tBDMS
- 5 Pentanoic acid-tBDMS
- 7 Heptanoic acid-tBDMS
- 8 Lactic acid-2tBDMS
- 9 Octanoic acid-tBDMS
- 11 Succinic acid-2tBDMS
- 21 Decanoic acid-tBDMS
- 22 Dodecanic acid-tBDMS
- 24 Tetradecanoic acid-tBDMS
- 25 Aspartic acid-3tBDMS
- 26 Glutamic acid-3tBDMS
- 27 Hexadecanoic acid-tBDMS
- 28 cis-9-Octadecenoic acid
- 29 Stearic acid-tBDMS