



メタミドホスを含む農薬の 迅速前処理法

—迅速・簡便を目指して—

谷澤春奈 内田滋 佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス
as@aisti.co.jp



AiSTI SCIENCE

救急救命における農薬分析の現状と課題

● 現状

- 前処理に時間を要し、原因物質の判定に時間がかかる
- 何が入っているかが不明な状態で、数成分分析用の検査キットでは、原因物質の同定が困難

● 課題

- テロ対策や自殺未遂者への迅速な対応
- 前処理の迅速・簡便化
- 幅広い対象サンプル、多種の原因物質への対応



高精度な迅速前処理法が必要！！

前処理の迅速化への検討事項

- QuEChERS法を用いた抽出工程の効率化
 - 抽出時に液液分配(塩析・脱水)を同時に行う
 - 酸性・中性・塩基性農薬の同時抽出
 - 使い捨て容器の使用(ガラス器具の不使用・衛生的)
 - 遠心分離機により多数検体を同時処理
- 固相ミニカラムによる精製
 - 固相ミニカラム精製(分配・分離)により精製効果を高める
 - 使用溶媒の少量化
- 濃縮操作の省略
 - エバポレーター(濃縮操作)の不使用

前処理（抽出工程：GC&LC）

抽出工程

★分析時間：10分／1検体

試料 10g

アセトニトリル 10 mL

ホモジナイズ（必要に応じて）

NaCl(食塩) 1g

クエン酸3Na2水和物 1g

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

MgSO₄(無水硫酸マグネシウム) 4g

攪拌(手で振とう 1分間)

遠心分離(3000rpm 5分間)

アセトニトリル層

分取：0.5mL
GC法へ

分取：1mL
LC法へ



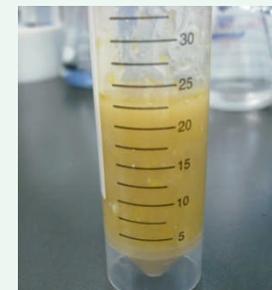
① 試料(模擬吐しゃ物)



② 各試薬秤量後添加



③ 手で振とう



④ 振とう後



⑤ 遠心分離



⑥ 遠心分離後

QuEChERS法の抽出工程のメリット

抽出工程

試料 10g

アセトニトリル 10 mL

ホモジナイズ（必要に応じて）

NaCl(食塩) 1g

クエン酸3Na2水和物 1g

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

MgSO₄(無水硫酸マグネシウム) 4g

攪拌(手で振とう 1分間)

遠心分離(3000rpm 5分間)

アセトニトリル層

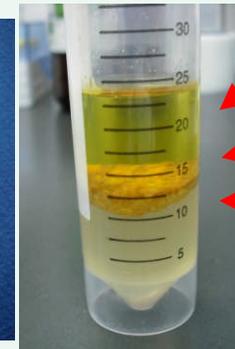
分取:0.5mL
GC法へ

分取:1mL
LC法へ

- 塩析と脱水(液液分配)を抽出時に同時にできる
- クエン酸塩により酸性・中性・塩基性農薬を同時にアセトニトリル層へ移行できる
- 使い捨て容器の使用により、ガラス器具・分液ロート不要



逆さにしても混ざらない!!



アセトニトリル層

●農薬

試料層

水層(除去部)

●水・糖類

●水溶性の夾雑物

塩析効果により農薬をアセトニトリル層へ移行させ、水溶性成分や水を除去する。

GC前処理フロー

精製工程

★分析時間：5分/1検体

アセトニリル層分取 0.5mL (試料 0.5 g 相当)

C18-50mg

洗液 アセトニリル 0.5mL

流出液

トルエン 0.3mL

GCS-20mg/PSA-30mg

洗液 トルエン・アセトニリル(1/3) 0.6mL

添加 フェナントレン-d + 1%PEG300 4uL

定容(2 mL)

GC/MS(大量注入20uL:試料5mg相当)

- エバポレーターでの濃縮操作がなし！
- 抽出後の精製は1検体わずか5分！



①分取 0.5mL



②C18に通液



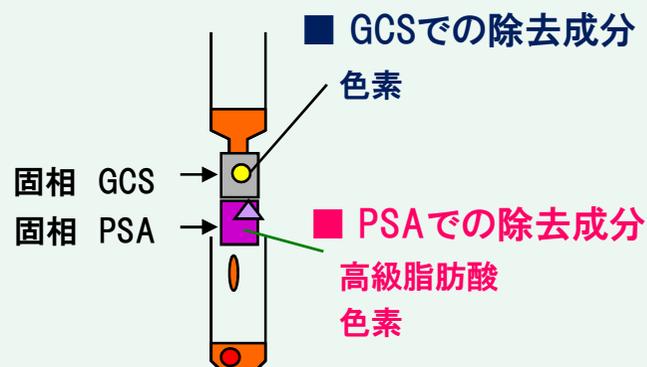
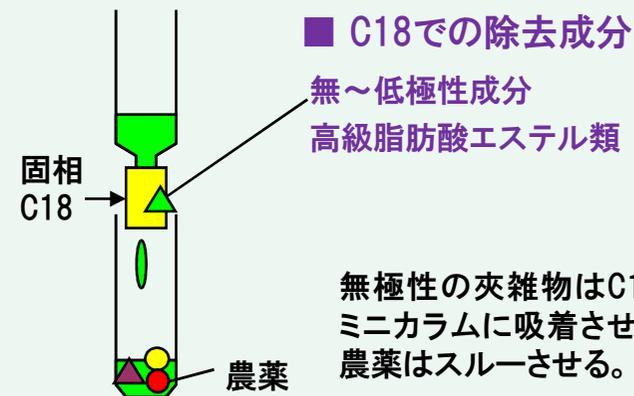
③トルエン添加



④GCS+PSAに通液



⑤最終試験液



GCSで色素を吸着し、PSAで脂肪酸や色素等を吸着し、農薬はスルーさせる。

LC前処理フロー

精製工程 ★分析時間：5分/1検体

分取 1mL (試料 1 g 相当)

C18-30mg+PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有メタノール
(pH2.5) 1mL

流出液

水 0.5mL

C18-50mg

洗液 80%メタノール 1mL

定容(4 mL, 水で調製)

LC/MS/MS

- エバポレーターでの濃縮操作がなし！
- 抽出後の精製は1検体わずか5分！



- C18での除去成分
 - 色素(クロロフィル)
 - 低極性の夾雑物
- PSAでの除去成分
 - 色素
 - 高級脂肪酸

C18で低極性の夾雑物を除去し、PSAで脂肪酸や色素等をし、農薬はスルーさせる。ギ酸メタノールにより、PSAにトラップされた酸性化合物をPSAから溶出する。



★LC分析カラム(ODS)の保護

- C18ミニカラム(2回目)
 - 低極性の夾雑物

C18でさらに低極性の夾雑物を除去し、農薬はスルーさせる。

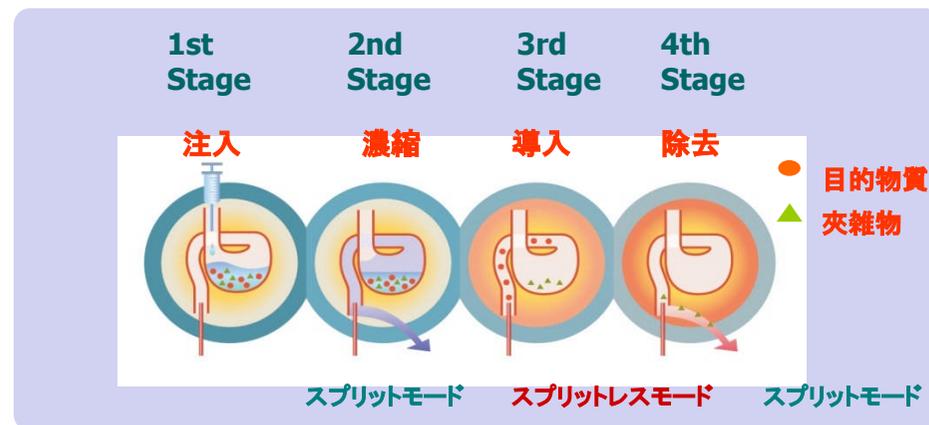
前処理で使用した器具



- 50mL用遠沈管 1本
- 注射器 2本
- メス試験管 1本
- SAIKA-SPE 3種類
(固相ミニカートリッジ)
- 1.5mL用バイアル

GC/MS測定条件

PTV Injector	LVI-S200 (AiSTI Science); Stomach Insert	 <p>胃袋型インサート</p> <p>従来のインサート</p>
Injector Temp.	90°C-120°C/min-240°C(1min)-50°C/min-270°C(30min)	
Auto Sampler	Agilent 7683; 50 µL Syringe	
Injection Volume	25 µL	
GC/MS	JMS-Q1000GC (JEOL)	
Pre-column	Deactivated silica capillary tube, 0.25mm × 0.3m	
Column	ENV-5MS, 0.25mm i.d. × 30m, df: 0.25µm	
Column Oven Temp.	60°C(4min)-20°C/min-160°C-5°C/min-220°C-3°C/min-235°C-7°C/min-310°C(8min)	
Inlet Mode	Solvent Vent Mode	
Vent Flow	150 mL/min	
Vent Press	70 kPa	
Vent End Time	0.42 min	
Purge Flow	50 mL/min	
Purge Time	4 min	
Gas Saver Flow	20 mL/min	
Gas Saver Time	6 min	
Detector Temp.	280°C	
MS Method	SCAN; 50 - 450 m/z, SIM	



LC/MS/MS測定条件

装置	MS : 3200Q TRAP [®] system (Applied Biosystems) LC : Prominence (SIMADZU)
分析カラム	Waters Atlantis [®] T3(ODS) T3 2.0*150mm 3.0 μm
移動相	A : 0.5mM酢酸アンモニウム水溶液 B : 0.5mM酢酸アンモニウム含有メタノール
グラジエント条件	B conc. (%) ; メソッド①②共通 20% (0-1min) → 100% (1-17min) → 100% (17-23min) → 20% (23-30min)
分析時間	メソッド①30分 (Positive+), メソッド②30分 (Negative-)
流速	0.2mL/min
注入量	5 μL
イオン化モード	ESI Positive/Negative
イオンスプレー電圧	5500V/-4500V
イオンソース温度	350°C
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

対象農薬

*いずれも関東化学社製

ポジティブリスト制 GC/MS対象農薬

ポジティブリスト制 LC/MS対象農薬 (22のみGC/MS対象)

製品名	農薬数	濃度	製品名	農薬数	濃度
農薬混合標準液 22	50種	10ppm	農薬混合標準液 44	37種	10ppm
	(アセフェート、メタミドホスは50ppm)				
農薬混合標準液 31	85種	10ppm	農薬混合標準液 45	19種	10ppm
農薬混合標準液 34	46種	10ppm	農薬混合標準液 53 (未発売)	29種	10ppm
農薬混合標準液 48	61種	10ppm	農薬混合標準液 54 (未発売)	32種	10ppm
農薬混合標準液 51 (未発売)	26種	10ppm	農薬混合標準液 22	内2種	10ppm
農薬混合標準液 1111	13種	10ppm	(アセフェート、メタミドホス)		
			有機リン系農薬 19種 追加		

合計 281種

合計 138種

分析結果(冷凍ギョーザ)

n=5

Pesticides	RT (min)	添加平均回収率(%)	RSD(%)	Spike回収率(%)
Methamidophos	3.5	69	2	81
Acephate	4.2	83	3	92

*LC/MS/MS測定

■回収率分布 (138成分一斉分析:有機リン系農薬含む)

試料中濃度	0.1ppm
回収率(%)	成分数
ND, 0-50	3
50-70	15
70-120	118
120-	2
合計	138 成分

●極性の高い農薬であるメタミドホス・アセフェートの回収率はほぼ70%以上、RSD(%)も5%未満と共に良好であった。

●今回の前処理法(約15分)を用いて、有機リン系農薬を含む138成分一斉分析において、118成分が70~120%の良好な回収率が得られた。



Positive測定

冷凍ギョーザ添加回収試験結果

n=5

Sample Name	RT (min)	添加平均回収率(%)	RSD(%)	spike回収率(%)	Sample Name	RT (min)	添加平均回収率(%)	RSD(%)	spike回収率(%)
Methamidophos	3.5	69	2	81	Haloxyfop	15.3	91	11	86
Acephate	4.2	83	3	92	Isoxaflutole	15.3	97	5	97
Aldoxycarb	6.3	91	6	87	Diuron	15.5	85	3	78
Oxamyl	6.7	90	19	89	Forchlorfenuron	15.5	98	6	95
Flumetsulam	7.2	83	8	78	Parathion-methyl	15.6	56	82	97
Methomyl	7.6	100	7	96	Phenmedipham	15.7	90	4	89
Thiamethoxam	7.9	87	3	98	Azinphos-methyl	15.8	92	7	91
Imazaquin	9.3	80	6	108	Fluridon	15.9	99	3	103
Imidacloprid	9.5	97	8	92	Pyrifthalid	16.1	88	5	93
Clothianidin	9.7	80	13	74	Azoxystrobin	16.1	93	4	90
Chloridazon	10.8	78	1	76	Fenobucarb	16.2	86	3	87
Oxycarboxin	11.3	90	4	83	Linuron	16.3	79	10	95
Thiacloprid	11.5	88	5	85	Fenitrothion	16.3	79	52	157
Aldicarb	12.4	96	12	114	Methiocarb	16.4	87	1	90
Cloransulam-methyl	12.6	100	13	115	Fenamidone	16.4	89	6	89
Dichlosulam	12.9	76	8	82	Acibenzolar-S-methyl	16.5	80	11	92
Thiabendazole	12.9	80	4	89	Boscalid	16.5	81	7	82
Azamethiphos	13.4	93	8	90	Tralkoxydim	16.6	92	6	91
Thidiazuron	13.7	82	6	94	Ferimzone EandZ	16.7	94	1	92
Bendiocarb	13.7	93	3	91	Thiometon	16.7	95	30	114
Carbofuran	13.8	93	3	86	Methoxyfenozide	16.8	92	3	91
Fosthiazate	14.2	95	4	93	Dymuron	16.9	92	1	97
Carbaryl	14.2	87	4	90	Cumyruon	17.0	79	9	91
Tebuthiuron	14.2	89	3	91	Chlorxuron	17.0	84	5	84
Thiodicarb	14.6	78	7	99	Phenthoate	17.2	92	6	96
Monolinuron	14.6	85	6	87	Butafenacil	17.2	81	12	72
Methabenzthiazuron	15.1	84	3	96	Parathion-ethyl (Parathion)	17.2	110	21	98
Primicarb	15.1	89	2	98	Chromafenozide	17.3	44	6	44
Dimethirimol	15.1	90	3	97	Iprovalicarb	17.3	56	6	55
Furametpyr	15.2	93	5	98	Mepanipyrim	17.3	60	7	66



Positive測定

冷凍ギョーザ添加回収試験結果つづき

n=5

Sample Name	RT (min)	添加平均回収率(%)	RSD(%)	spike回収率(%)	Sample Name	RT (min)	添加平均回収率(%)	RSD(%)	spike回収率(%)
Flufenacet	17.3	83	5	85	Hexaflumuron	18.7	81	12	104
Simeconazole	17.3	94	5	90	Novaluron	18.8	87	3	87
Triticonazole	17.4	177	6	187	Di-allate	19.0	77	12	86
Fenthion	17.4	109	8	128	Cycloate	19.0	78	8	104
Cyazofamid	17.5	94	8	94	Benzofenap	19.1	92	2	97
Indanofan	17.5	98	3	105	Chlorpyrifos	19.2	67	7	87
Epoxiconazole	17.5	170	5	166	Lactofen	19.2	84	8	94
Edifenphos	17.5	75	4	82	Oxaziclomefone	19.2	85	3	102
Etrimfos	17.5	91	3	93	Fenoxaprop-ethyl	19.2	101	7	112
Naproanilide	17.6	89	5	88	Pentoxazone	19.2	111	18	102
Fenoxycarb	17.6	95	4	98	Clomeprop	19.4	72	6	82
Diflubenzuron	17.6	98	16	91	Lufenuron	19.4	79	7	76
Diazinon	17.7	89	4	94	Propaquizafop	19.4	87	3	91
Iprodione	17.7	71	22	94	Teflubenzuron	19.4	88	16	84
Tebufenozide	17.7	92	5	96	Aramite	19.4	91	5	102
Tetrachlorvinphos	17.8	87	5	95	Furathiocarb	19.4	92	3	95
Pyraclufos	17.8	85	4	94	Cloquintocet-mexyl	19.5	82	5	90
Imazalil	18.1	93	10	95	Flufenoxuron	19.7	74	9	89
Anilofos	18.1	113	4	110	Hexythiazox	19.8	57	4	78
EPN	18.1	79	20	90	Prothiofos	20.0	66	20	151
Carpropamide	18.2	74	5	72	Fenpyroximate E or Z	20.2	56	6	75
Cyprodinil	18.2	80	6	93	MilbemectinA3Na	20.8	58	7	67
Cadusafos	18.3	83	3	90	Abamectin	20.8	80	9	82
Triflumuron	18.3	85	4	91	MilbemectinA3	20.8	86	7	157
Pyraclostrobin	18.3	87	2	91	MilbemectinA4	21.1	62	16	94
Cyflufenamide	18.3	93	5	91	MilbemectinA4Na	21.1	88	14	111
Clofentezine	18.5	68	3	82	Spinosyn A	21.5	61	19	92
Indoxacarb	18.5	100	3	116	Spinosyn D	21.8	53	37	100
Pencycuron	18.6	85	4	94	Silafluofen	21.9	9	16	90
Pyrazolynate	18.6	86	4	96	Tridemorph	22.0	47	50	98

冷凍ギョーザ添加回収試験結果

■ Negative測定

n=5

Sample Name	RT (min)	添加平均回収率 (%)	RSD(%)	spike回収率(%)
Fluroxypyr	8.2	70	7	86
4-CPA	9.2	68	3	83
Bromoxynil	10.1	90	4	99
Cloprop	10.6	84	6	85
Naphthaleneacetic acid	10.7	68	10	73
Ioxynil	12.0	84	1	94
Triclopyr	12.5	77	6	79
MCPP	12.9	89	4	96
Dichlorprop 1	13.0	82	3	88
Dichlorprop 2	13.1	78	9	80
Thidiazuron	13.7	84	4	87
Acifluorfen	14.7	82	8	79
Fomesafen	14.8	103	4	101
MCPB	14.9	91	5	90
Tralkoxydim(Isomer1 and2)	16.6	83	4	98
Methoxyfenozone	16.9	98	2	97
Oryzalin	17.3	75	6	76
Naproanilide	17.6	94	1	100

回収率

0~50%未満

50~70%

70~120%

120%以上

有機リン系農薬
(追加分)



まとめ

- 前処理が15分(抽出10分+精製5分)で終了し、迅速な前処理を確立できた。
- 全て使い捨ての器具が使用できるため、簡便かつ衛生的であった。
- 前処理にて精製を行うことにより、定性が正確にかつ迅速に行えることがわかった。
- 多種多様な状況に対応が求められる救急救命や危機管理の場面において、迅速かつ幅広いサンプルに対応できる本手法が有用であると考えます。