

STQ 法の基礎概論および  
個別分析について

株式会社アイスティサイエンス



# STQ法の基礎概論および 個別分析について

株式会社 アイスティサイエンス  
技術営業部 小西賢治

AISTI SCIENCE



## 目次

- ① STQ法の概要
- ② STQ法における技能試験の結果報告
- ③ 個別分析法のご紹介

AISTI SCIENCE

## STQ法とは？

Solid phase extraction

Technique with

QuEChERS method

### ◆ 前処理方法

抽出  
QuEChERS法

+

精製（手動 or 自動化）  
固相抽出法

QuEChERS法と固相抽出法を組み合わせることで  
**迅速さ**と**高い精製効果**の両立を可能とした。

## 抽出フロー

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)

— アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

— 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

MgSO<sub>4</sub> (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0.5~1mL  
GC前処理法へ

分取1mL  
LC前処理法へ

抽出



① 細切



② フードプロセッサ



③ ホモジナイズ



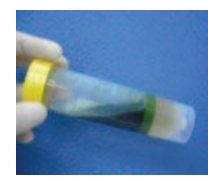
④ 各試薬を計量  
スプーンで添加



⑤ 手で振とう



⑤ 遠心分離

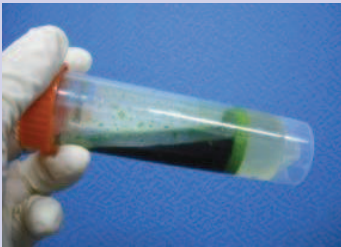


⑥ 遠心分離後

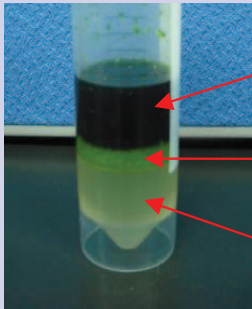
# QuEChERS法の抽出工程のメリット

- 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・分液口不要
- 遠心分離により、ろ過の時間を大幅削減、また複数検体同時に可能

**遠心分離後**



横にしても混ざらない!!  
エマルジョンができない。  
脂肪も分離できる。



**アセトニトリル層**  
● 農薬

**試料層**

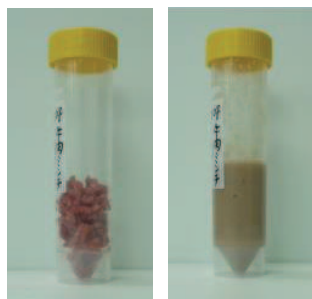
**水層（除去部）**  
● 水・糖類  
● 水溶性の夾雑物

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。

# 遠心分離による精製効果

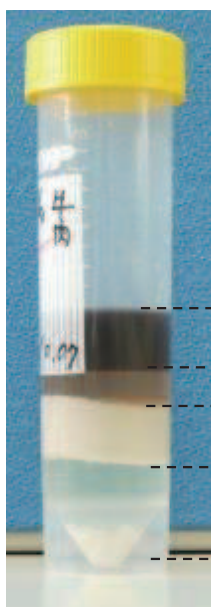


牛肉ミンチ

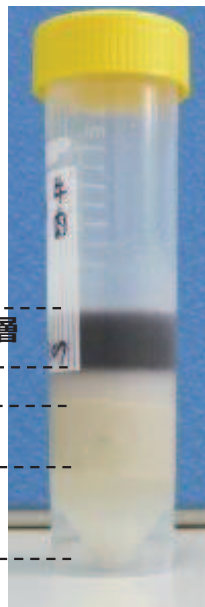


① 試料採取

② ホモジナイズ後



③ 遠心分離後



④ 冷凍後

アセトン層

脂肪層

試料層

水層

**【物性】**

**アセトン**  
比重：0.79  
融点：-94℃

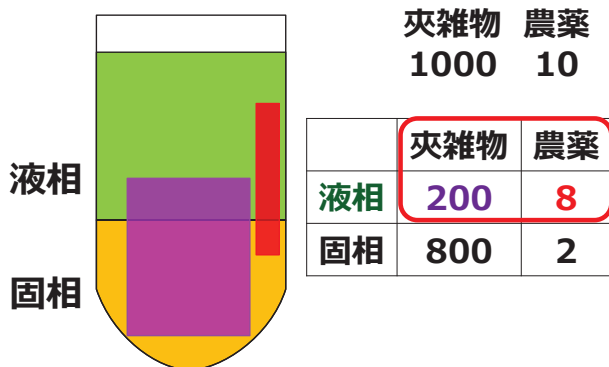
**脂肪酸**  
パルミチン酸  
比重：0.85  
融点：63℃  
オレイン酸  
比重：0.89  
融点：13℃

➤ 遠心分離によりアセトン層の下に脂肪層が分離され、この工程で大部分の脂肪を取り除くことができました。

# QuEChERS法とSTQ法の違い

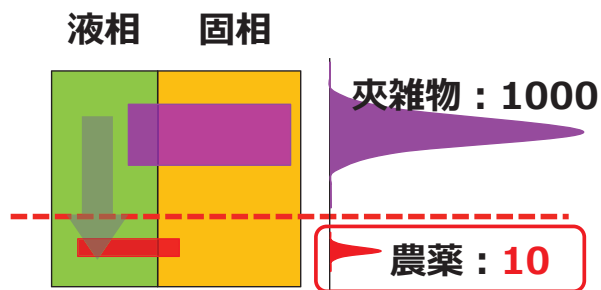
## ・ QuEChERS法

### 分配型-固相抽出法 (分散SPE)



## ・ STQ法

### 分配分離型-固相抽出法 (固相カートリッジ)



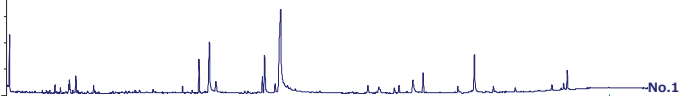
分散SPEは分配のみによる精製だが、固相カートリッジは分配に**分離機能**が加わるため夾雑物から農薬を効率よく精製することができる。

# STQ-GCA法とQuEChERS法の比較

## ● 固相ミニカラム精製とバッチ精製の比較 (ほうれん草)

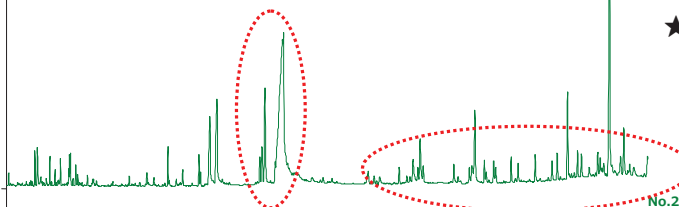
★固相ミニカラム精製 (分配・分離)

**STQ-GC A法**  
(C18→グラファイトカーボン+PSA)



★バッチ精製 (固相充填剤と成分との脱着)

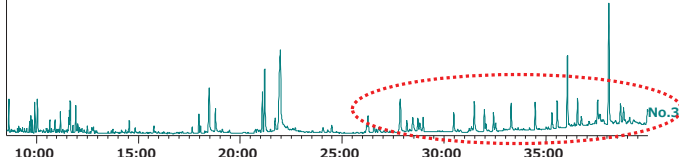
QuChERS法  
(グラファイトカーボン+PSA+MgSO4)



高沸点の夾雑成分の除去不十分・・・

★バッチ精製 (固相充填剤と成分との脱着)

QuChERS法  
(グラファイトカーボン+PSA+C18+MgSO4)



10:00 15:00 20:00 25:00 30:00 35:00

# STQ-GC-A法の前処理フロー

分取 1 mL (試料 1g相当)

Smart-SPE C18-50 mg : 精製

— 洗液 アセトニトリル 0.2mL

流出液

— 添加 トルエン 0.4mL

無水硫酸Mg 0.3g

Smart-SPE GCS-20mg/PSA-30mg : 精製

流出液

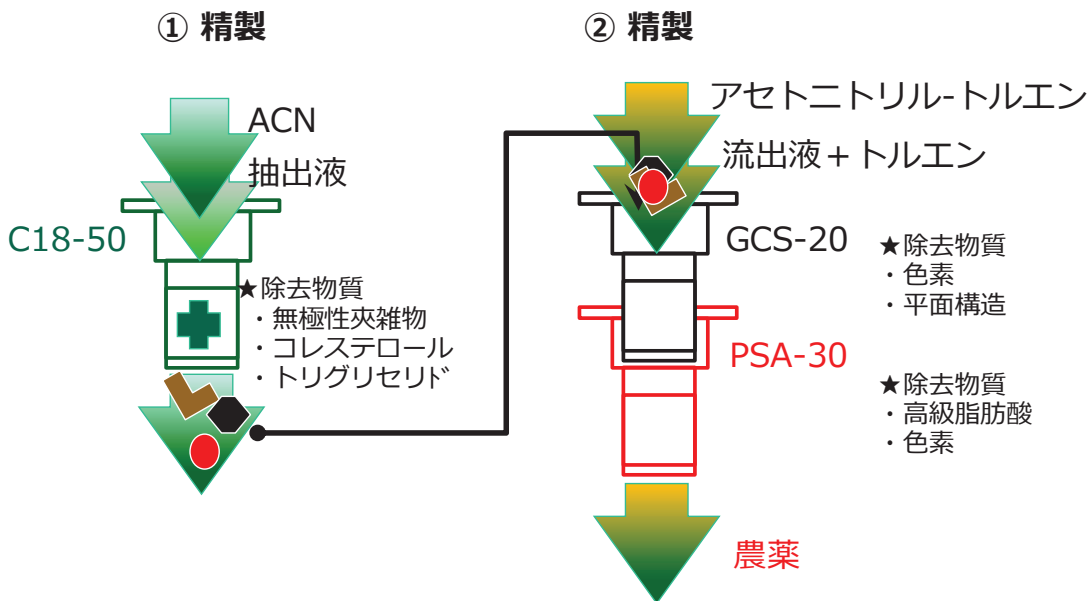
溶出 アセトニトリル-トルエン(3/1) 0.6mL

定容 (2 mL, アセトニトリル-トルエンで調製)

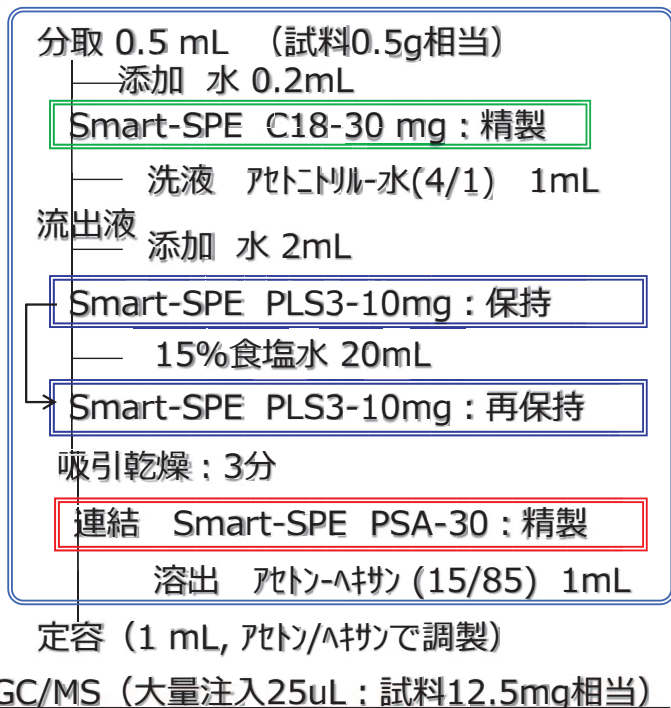
GC/MS (大量注入20uL ; 試料10mg相当)

- ☞ C18ミニカラムで無極性の夾雑物を除去
- ☞ 流出液にトルエンを加えることで通知法と同じアセトニトリルとトルエンの混液状態にする。
- ☞ 流出液にトルエンを加えることで流出液中の水分を無水硫酸Mgに吸水させやすくする。
- ☞ 通知法と同じ精製工程でありながら、減圧濃縮工程がない迅速な前処理法

# STQ-A法による精製工程



# STQ-GC-B1法の前処理フロー

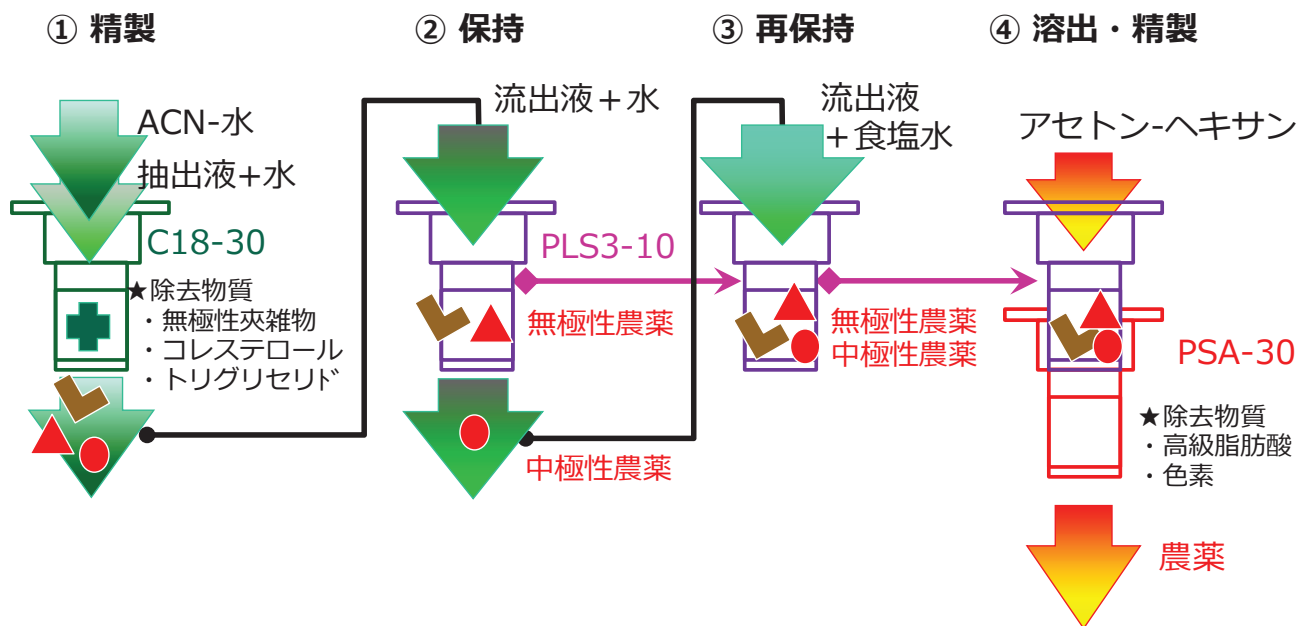


👉 水を添加することで、C18ミニカラムでの精製効果を高めている。

👉 2段階保持により、無極性と極性の農薬を保持。

👉 アセトンの比率を調整することで最適な精製効果を得ることができる。

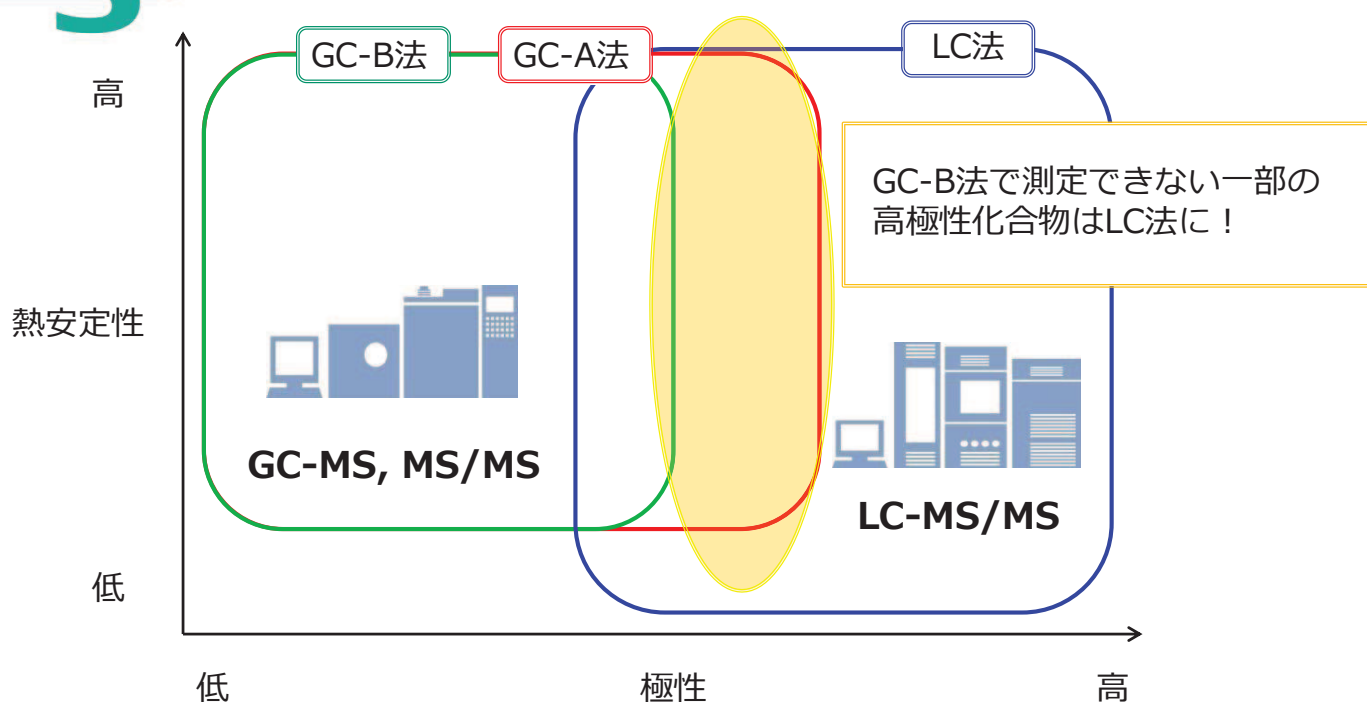
# STQ-B法による精製工程



# GC-A法とGC-B法のポイント

- **通知法のミニチュアバージョン**
- **メタミドホスやアセフェートなどの高極性農薬も分析可能**
- **精製処理時間は4検体で約10分**
- **エバポレーターや窒素ガスパージによる濃縮操作なし**
- **精製カラムの追加や溶媒の変更が可能**
- **精製効果が高く、加工食品にも対応**
- **精製処理時間は4検体で約20分**
- **エバポレーターや窒素ガスパージによる濃縮操作なし**
- ◆ **メタミドホスやアセフェートなどの高極性農薬は分析不可**

# STQ法測定対象成分について





# STQ-LC法の前処理フロー

分取 1mL (試料 1 g 相当)

Smart SPE C18-30mg + PSA-30mg

— 溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL  
\* 酸性農薬が無い場合、メタノール 1mL

流出液

— 水 0.5mL

Smart SPE C18-50mg

— 洗液 メタノール-水 (4/1) 1mL

定容 (4 mL, 水で調製)

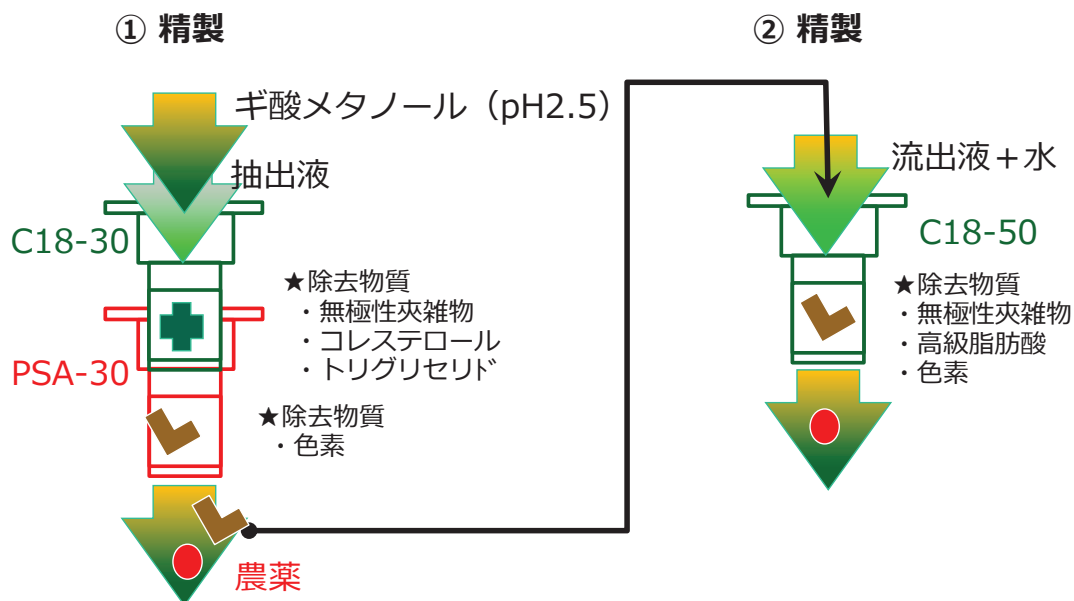
LC/MS/MS

☞ C18ミニカラムによる精製を2回行っている。

☞ 酸性農薬も同時に前処理している。

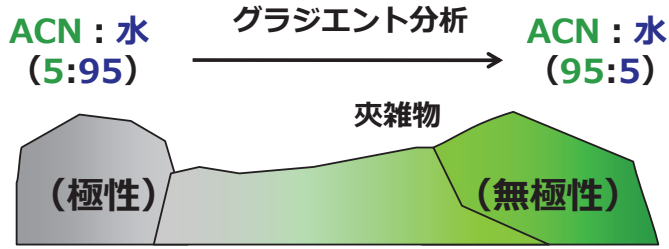
☞ 最後のC18-50ミニカラムではメタノール-水 (4/1) で溶出している。

# STQ-LC法による精製工程

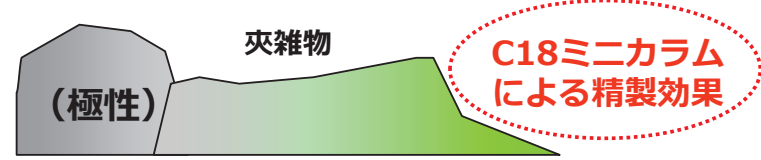


# 固相C18の精製によるLCカラムへの効果

## □ 固相C18を用いない場合



## □ 固相C18による精製の場合



ACN : 水 (4:1)

LCで使用されている分離カラムは「ODS」で、固相C18と同じ充填剤。

予め固相C18で精製することでLCカラムの負荷を防ぐ。

メリット

- HPLCカラムの劣化を防ぐ
- ピーク形状の維持
- 分析時間の短縮

## ② STQ法における技能試験の結果報告

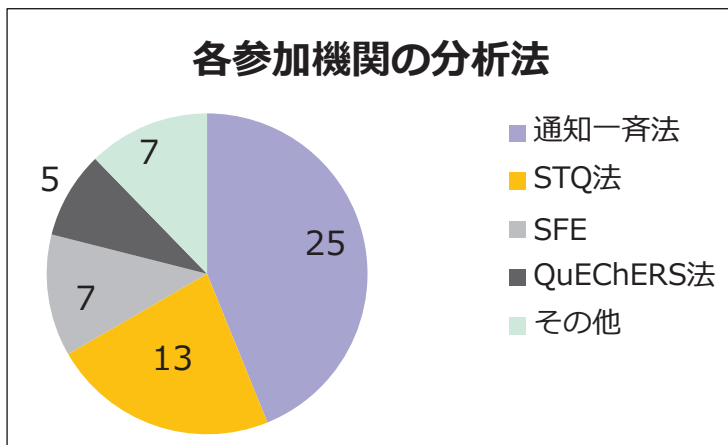
主催：独立行政法人 産業技術総合研究所

試料：玄米粉末

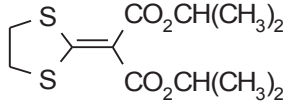
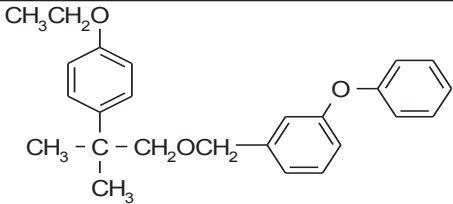
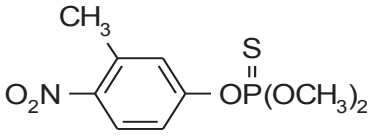
方法：任意

期間：2013年5月～7月

参加：57機関



分析対象成分	イソプロチオラン エトフェンプロックス フェニトロチオン
分析試料	玄米粉末
分析方法	STQ GC-B法
内部精度管理	添加回収試験
注入量	25uL (大量注入法)

		
イソプロチオラン	エトフェンプロックス	フェニトロチオン
LogPow=3.3(25℃)	LogPow=7.05(25℃)	LogPow=3.43(25℃)

## STQ-GCB法の各抽出法との組み合わせ

抽出法	現行法	前処理内標法	20mL法	2段階抽出定容法	通知法
前処理法	STQ法	STQ-I法	STQ-20法	STQW法	ST法
内容	QuEChERS法の抽出法	前処理前添加内標による補正	アセトニトリル20mLで抽出	2段階抽出し20mLに定容	通知法の抽出法
分取前定容	無	無	無	有	有
分取量	0.5mL	0.5mL	1mL	1mL	1mL
注入量	25uL	25uL	25uL	25uL	50uL
絶対量 (感度)	12.5mg	12.5mg	12.5mg	12.5mg	10mg

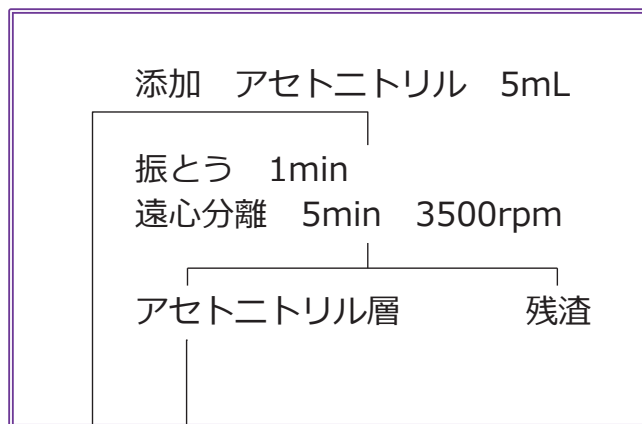
今回の技能試験では2段階抽出定容法で15mLに定容した。



## 抽出フロー（2段階抽出定容法）

玄米粉末 5g  
| 添加 水 10mL (膨潤 15分)  
| 添加 アセトニトリル 10mL  
|  
| ホモジナイズ 1min  
| 塩化Na 1g  
| クエン酸3Na・2H<sub>2</sub>O 1g  
| クエン酸2Na・1.5H<sub>2</sub>O 0.5g  
| 硫酸Mg (無水) 4g  
|  
| 振とう 1min  
| 遠心分離 5min 3500rpm  
|  
| アセトニトリル層 残渣 (試料層・水層)  
|  
| 定容 15mL

### 繰り返し抽出



AISTi SCIENCE



## 精製フロー（GC-B法）

抽出液 1.5mL  
| 添加 水 0.5mL  
|  
| 分取 1mL  
| 固相 C18-30  
| 添加 10%食塩水 20mL  
|  
| 固相 C18-50  
| 乾燥 3min  
| 固相 PSA-40  
| 溶出 アセトン-ハキソ (15/85) 1mL  
|  
| 添加 0.1%PEG300/1ppm7イナトリン-d10 20uL  
| 定容 1mL アセトン-ハキソ (15/85)

自動化

連結

全自動固相抽出装置ST-L300



AISTi SCIENCE

# 玄米中成分表（試料100g当り）



## 玄米の成分（100g中）

水分	15.5g
タンパク質	6.8g
脂質	2.7g
炭水化物	73.8g
灰分	1.2g
廃棄率	0%

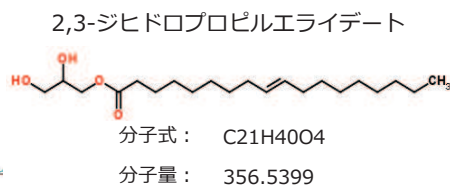
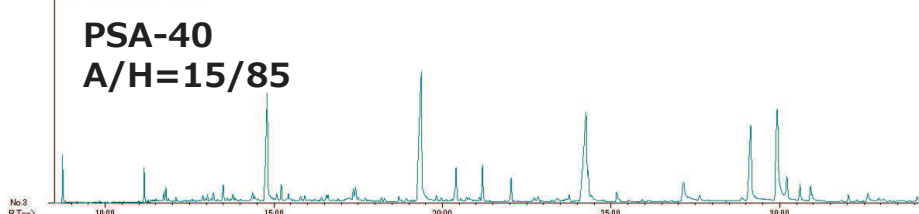
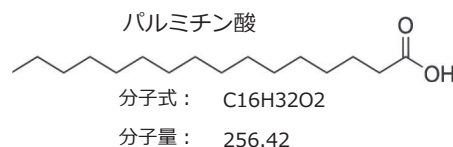
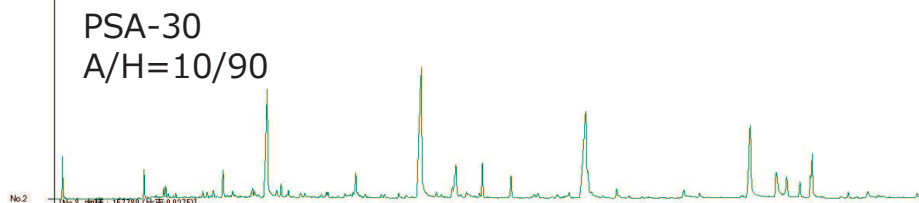
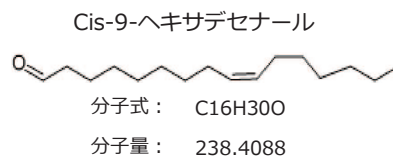
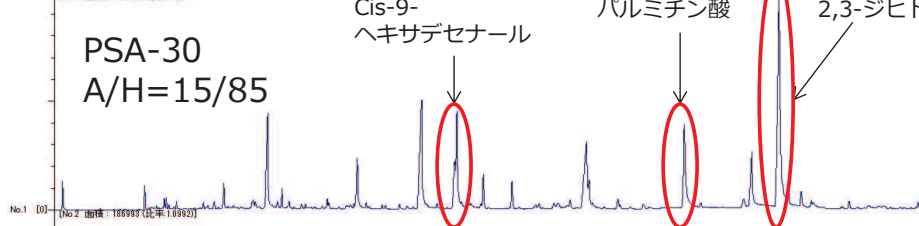
試料中水分が10gになるように水を添加  
5g中水分量=5g\*15.5g/100g=0.78g

10g-0.78g≒10g添加

文部科学省 食品成分データベース  
<http://fooddb.jp/>

# PSAと溶出溶媒による回収率

07070707 T01 Y001 100 (面積計算範囲: 9707 - 9722)



# PSAと溶出溶媒による回収率(PSA-30)

化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率				下 (アセトン含有率)			
	50/50	30/70	20/80	15/85	10/90	5/95	0/100	
	50%	30%	20%	15%	10%	5%	0%	
Etofenprox	95.6	89.6	85.5	85.9	81.9	77.6	77.6	
Fenitrothion	110.1	103.6	97.7	93.6	94.4	92.8	45.8	
Isoprothiolane	100.5	95.7	91.2	91.8	91.0	84.0	2.8	

# 多段階添加による精度管理

サンプリング

← 添加①

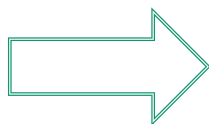
溶媒抽出

← 添加②

固相精製

← 添加③

測定



添加① 農薬混合標準液A

添加② 農薬混合標準液B

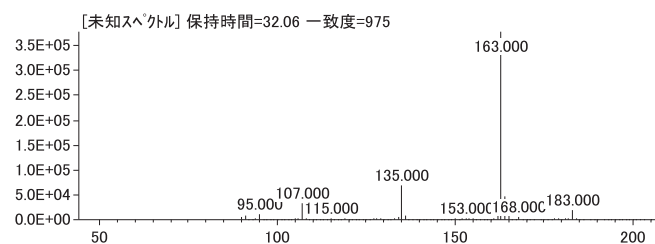
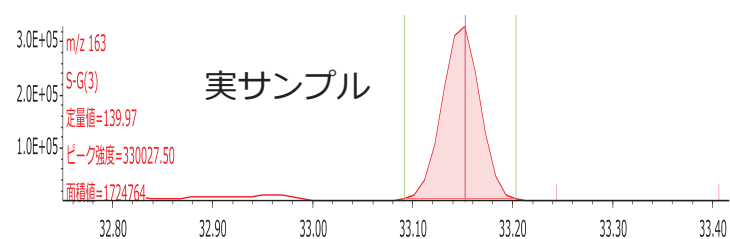
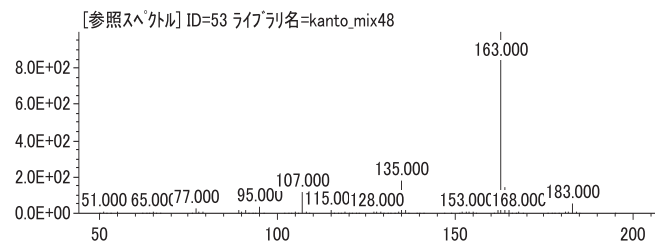
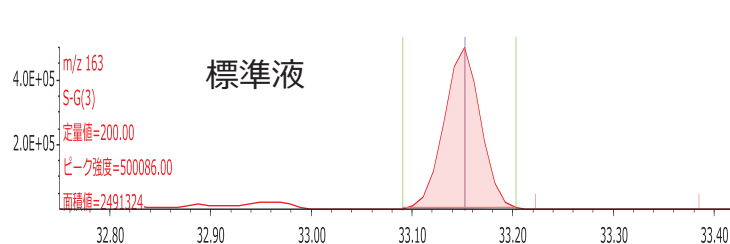
添加③ フェナントレン-d10

※農薬混合標準液A、Bには今回測定対象の3成分が含まれない

操作ごとの農薬のロスを調査することが可能！



## ピークとスペクトル (エトフェンブロックス)



AiSTI SCIENCE



## アイスティの報告値およびZスコア

	報告値 (mg/kg)	Zスコア (参加機関全体)	Zスコア (NMIJ付与値)
イソプロチオラン	0.885	-0.16	-0.77
エトフェンブロックス	0.133	0.05	-0.30
フェニトロチオン	0.151	-0.10	-0.21

3成分とも  $|Z| \leq 2$  であり、良好な結果を示した。  
また、報告値の分布も通知試験法とほぼ同等の結果を示していた。

AiSTI SCIENCE

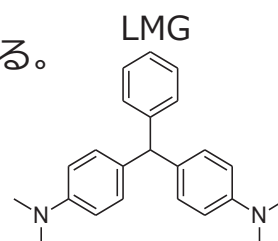
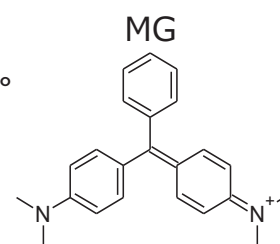
## ③ 個別分析法のご紹介

- ・ マラカイトグリーン分析法
- ・ グリホサート、グルホシネート分析法

## マラカイトグリーン分析法

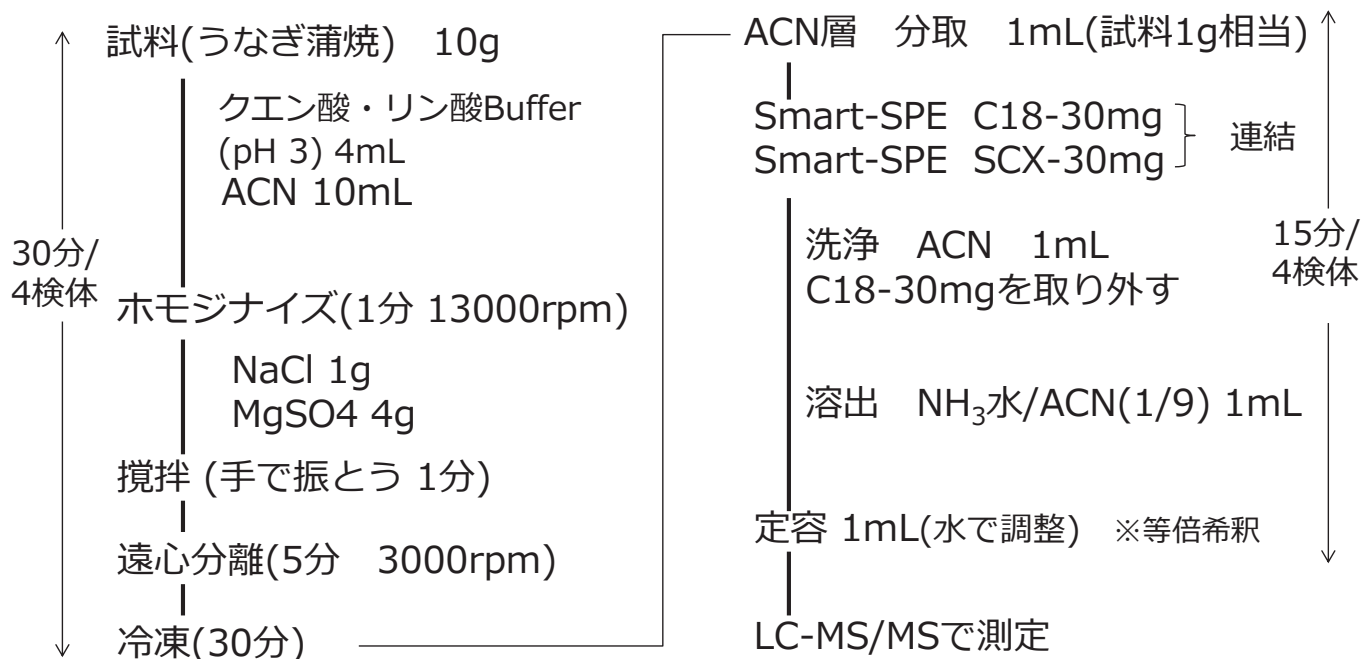
マラカイトグリーン(以下MG)は水カビなどの治療薬として観賞魚に用いられるが、食用の養殖魚への使用は禁止されている。

- ・ MGは光分解性があり、迅速な分析法が求められている。
- ・ 酸化還元反応により、MG⇌ロイコマラカイトグリーン(以下LMG)の代謝が起こるとされている。
- ・ MGは食品衛生法の規格基準で不検出であり、定量限界はMG・LMGともに**0.002ppm**(=2ppb)とされている。
- ・ 2005年8月に中国産のウナギから検出され、そのほか輸入養殖魚からも検出が相次いだ。

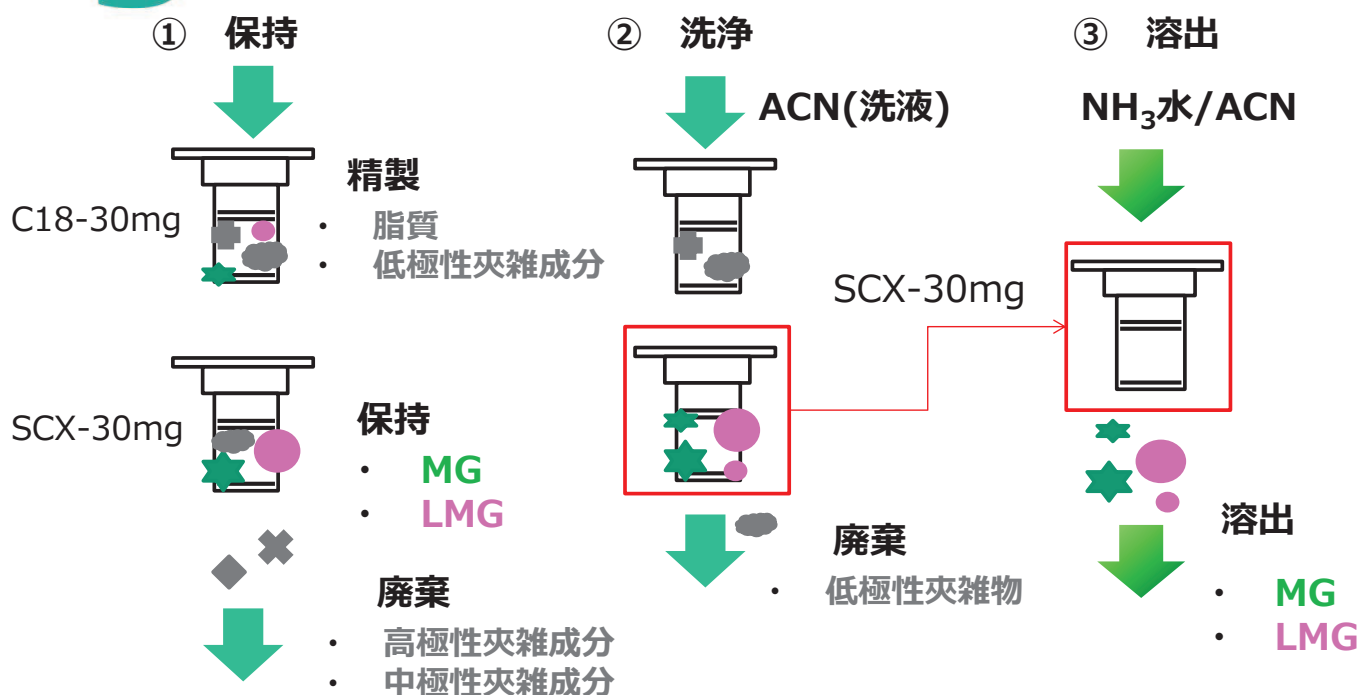




## 前処理フロー



## 精製イメージ



## 添加回収試験の結果(うなぎ蒲焼 n=5)

手分析 試料中100ppb	添加① (%)	添加② (%)	添加③ (%)	添加④ (%)	添加⑤ (%)	平均 回収率 (%)	RSD (%)	前処理後 添加回収率 (%)
MG	93.0	94.2	95.3	79.5	86.6	89.7	7.4	-
LMG	73.5	76.2	78.8	68.9	69.1	73.3	5.9	-

手分析 試料中 2ppb	添加① (%)	添加② (%)	添加③ (%)	添加④ (%)	添加⑤ (%)	平均 回収率 (%)	RSD (%)	前処理後 添加回収率 (%)
MG	101.0	113.5	101.5	95.5	102.0	102.7	6.4	100.0
LMG	89.0	79.0	88.0	75.5	76.0	81.5	8.0	109.0

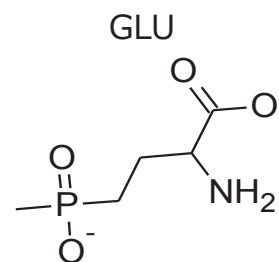
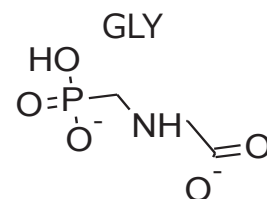
自動化装置 試料中2ppb	添加① (%)	添加② (%)	添加③ (%)	添加④ (%)	添加⑤ (%)	平均 回収率 (%)	RSD (%)	前処理後 添加回収率 (%)
MG	102.5	103.0	92.5	98.5	94.0	98.1	4.9	107.0
LMG	83.0	80.5	103.5	95.0	81.5	88.7	11.4	113.0

AiSTI SCIENCE

## グリホサート、グルホシネート分析法

グリホサート (GLY) およびグルホシネート (GLU) は使用頻度の高い農薬として広く利用されている。

- ・ 極性が高く一斉分析には不向きであり、厚生労働省より個別分析法が通知されている。
- ・ 既存の分析法は誘導体化や、強酸性陽イオン交換カラムの作成など手順が煩雑である。



## 前処理フロー（抽出工程：手分析）

抽出

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)  
 — メタノール-水 (1/1) 30mL  
 振とう 10min  
 遠心分離 10min  
 — 上澄み — 残渣  
 — メタノール-水 (1/1) で50mLに定容



①細切



②フードプロセッサー



③秤量



④振とう



③遠心分離



④定容

## 前処理フロー（精製工程：自動化）

抽出液1mL

水1mLと混合

分取1mL

HLBi3-20

SCX-30

PSA-50

HLBとSCXを取り外す

PSA-50

— 洗浄 メタノール-水 (1/1) 1mL

流出液は捨てる

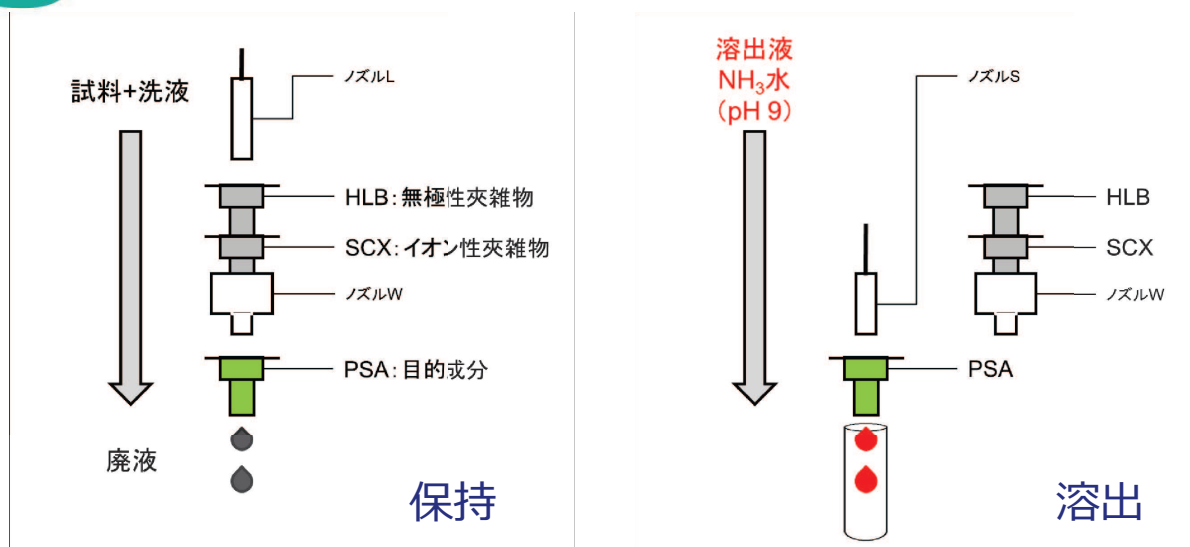
— 溶出 1.4%NH3水(pH9) 1mL

自動化

1mLにメスアップ

LC-MS/MSTで測定

## 精製イメージ



RC (Remove and Connecting) モードを利用することで、固相ミニカラムの脱着が容易に行える。

## LC内配管のリン酸コーティング

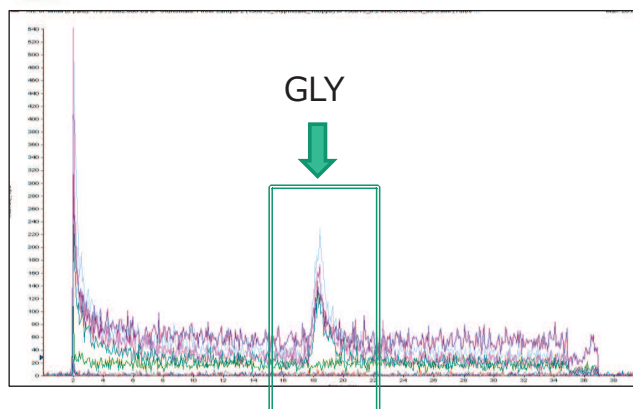
### リン酸コーティング

プローブとエレクトロードを引き抜いた状態で、  
2%のリン酸を0.05mL/minで12時間通液する。  
(不揮発性のリン酸をMS部に導入しないため)

※石渡氏 (ホクレン) の資料より。

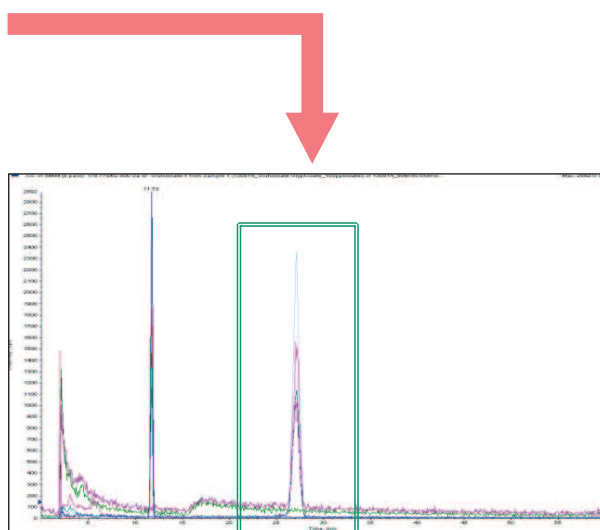
弊社で分析している他の成分への影響は見られなかった。

# LC内配管のリン酸コーティング



GLYのリン酸基がLC内で吸着

リン酸コーティング



## 結果

n=3で測定

	リンゴ			玄米		
	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	RSD (%)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	RSD (%)
グリホサート	0.2	87.1	7.1	0.1	76.5	8.1
グルホシネート	0.2	83.6	9.5	0.3	98.0	3.4

	いんげん豆			ほうれん草		
	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	RSD (%)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	RSD (%)
グリホサート	2	75.7	3.5	0.5	99.7	9.6
グルホシネート	0.05	119.1	9.6	0.2	98.8	10.6

試料中添加濃度は各作物の基準値に準拠