

2019年2月28日－3月1日
STQ法を考える会（和歌山市）

STQ法の解説とその応用



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

本日の内容

- 1, STQ法の概要
- 2, 予冷式ドライアイス凍結粉碎
- 3, 抽出
- 4, 精製
 - (1)改良のポイント マニュアル法の場合
 - (2)改良のポイント 全自動固相抽出装置の場合
- 5, STQ法の客観的評価
- 6, STQ法の応用
 - (1)ジチオカルバメート系農薬
 - (2)動物用医薬品(サルファ剤・キノロン剤)

1, STQ法の概要

STQ法の概要

STQ法とは？

Solid phase extraction

Technique with

QuEChERS method

◆ 前処理方法

抽出
QuEChERS法を参考

+

精製（手動 or 自動化）
固相カートリッジ

QuEChERS法と固相カートリッジ精製を組み合わせることで
操作性と**高精製**の両立を可能とした。

固相カートリッジ精製の必要性

精製のメリット

- ・きれいな試料液が得られる
 - ・測定装置負担軽減
- ①測定装置メンテナンス頻度減
 - ②マトリクス効果軽減
(サプレッションや異常高回収率)
 - ③リテンションタイムのずれ軽減
 - ④妨害ピークや妨害スペクトルが減り
解析効率向上
 - ⑤純度の高いピークにより誤検出防止

精製の課題

固相コスト
操作が煩雑
引継ぎ労力

良いデータを得つつ分析の省力・効率化を実現するには
工程全体のバランスがカギ

測定機器と試験操作のバランス

残留農薬一斉分析

測定機器	GC HPLC	中感度MS	高感度MS	超高感度MS
測定濃度	ppb~ppm	数ppb~	0.1ppb~	0.1ppb以下
試験法例	個別法	GC,HPLC or MS一斉法	MS一斉法	MS一斉法
前処理操作	煩雑	煩雑	中	簡易精製・希釈

STQ法で簡易化！

STQ法の概要



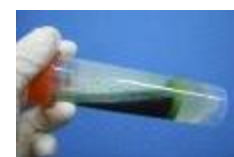
QuEChERS抽出



①検体細切、凍結粉碎



②抽出、振とう塩析

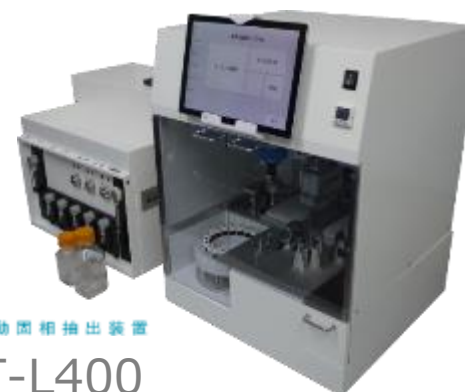


③遠心分離

STQマニュアル精製キット



全自動固相抽出装置



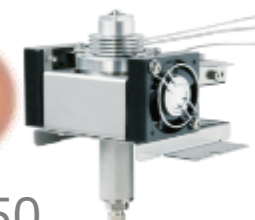
全自動固相抽出装置
ST-L400
For Smart-SPE AUTOMATION

精製

Smart-SPE
Solid Phase Extraction

測定

GC-MS(/MS) + 大量注入
LC-MS/MS測定
AISTI SCIENCE



LVI-S250

特徴：簡単精製10~20分
様々な食品にも対応可能
溶媒使用量は数mL

固相ミニカートリッジ
Smart-SPE
 Solid Phase Extraction



GC-B法

C18精製



ポリマー系逆相またはC18保持



PSA精製

前処理キット or 自動装置



- ・精製度高
- ・加工食品や畜水産物にも対応可
- ・15分

LC法

C18+PSA精製



C18精製

前処理キット or 自動装置



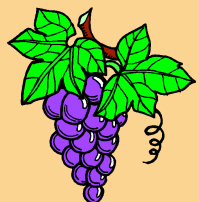
- ・10分
- ・簡単
- ・通知一斉Ⅰ・Ⅱ法を同時に対象可

2,予冷式ドライアイス凍結粉碎 ～メリットいろいろ～

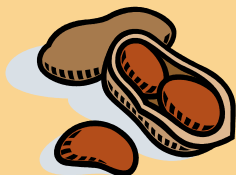
凍結粉碎のメリット~その1~

さらさらパウダーで均一化、パウダーのまま保管

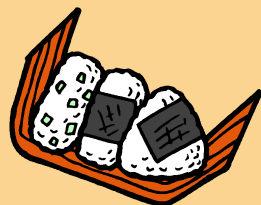
困った例



汁と皮が分離



粘性を帯びる



団子状に変化



筋が絡まる

ドライアイスと粉碎



パウダー状に



コツがあります
失敗や事故防止のために
まずはお問い合わせください

粉碎例



ブドウ
水分と果皮が分離



ゴマ
粘性を帯びる



鶏肉
筋が絡まる

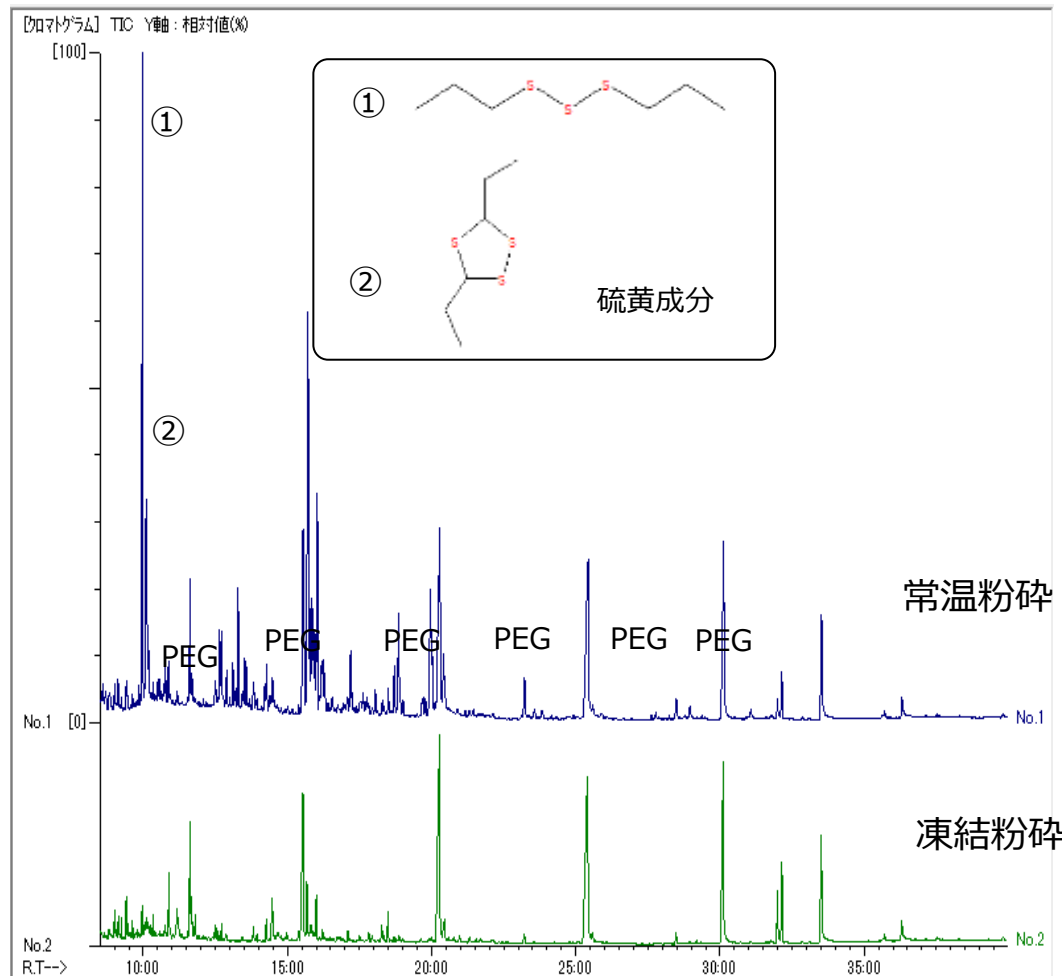


弁当
団子状に変化



凍結粉碎のメリット～その 2～

粉碎時に悪さをする酵素活性の抑制



酵素活性による悪さの例

交雑成分の発生、上昇（ネギ類）

農薬の分解（クロロタロニルなど）

硫黄成分の発生抑制

図. タマネギを常温粉碎または凍結粉碎しSTQ法にて分析した時のそれぞれのSCANクロマトグラム

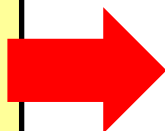
3,抽出

～画期的な抽出QuEChERS～

QuEChERS法とは

QuEChERS :

- **Quick** (迅速)
- **Easy** (簡便)
- **Cheap** (安価)
- **Effective** (効率的)
- **Rugged** (頑強)
- **Safe** (安全)



- 6検体>30分
- ガラス器具不使用
- 多検体同時処理
- 1検体>1米ドル
- 少量の有機溶媒
- 塩析と脱水（液液分配）が同時
- 広範囲の農薬に対応
- サンプル間のキャリーオーバーがおきない

※Original、AOAC、ENの方法がありSTQ法はEN法を参考にしています。

STQ法の抽出・塩析

QuEChERS法抽出工程のメリット



塩析効果により農薬をアセトニトリル層へ移行させ、水溶性成分を除去

①アセトニトリル層：農薬

②試料層

③水層(除去部)：糖等の水溶性の夾雑成分

- 塩析と脱水（液液分配）を抽出時に同時にできる
- くえん酸塩により酸性・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
- 使い捨て容器の仕様により分液ロートなどのガラス器具不要



50 mL遠沈管（PP製）※使い捨て

← 試料 10 g（穀類 5 g、その他難試料 1~2 g）注1)

← 標準溶液添加（添加回収試験実施の場合） 注2)

← 試料の含水が 80%未満の場合、水適量添加 注3)

※穀類等は必要に応じ15分膨潤

← アセトニトリル 10 mL（抽出溶媒）

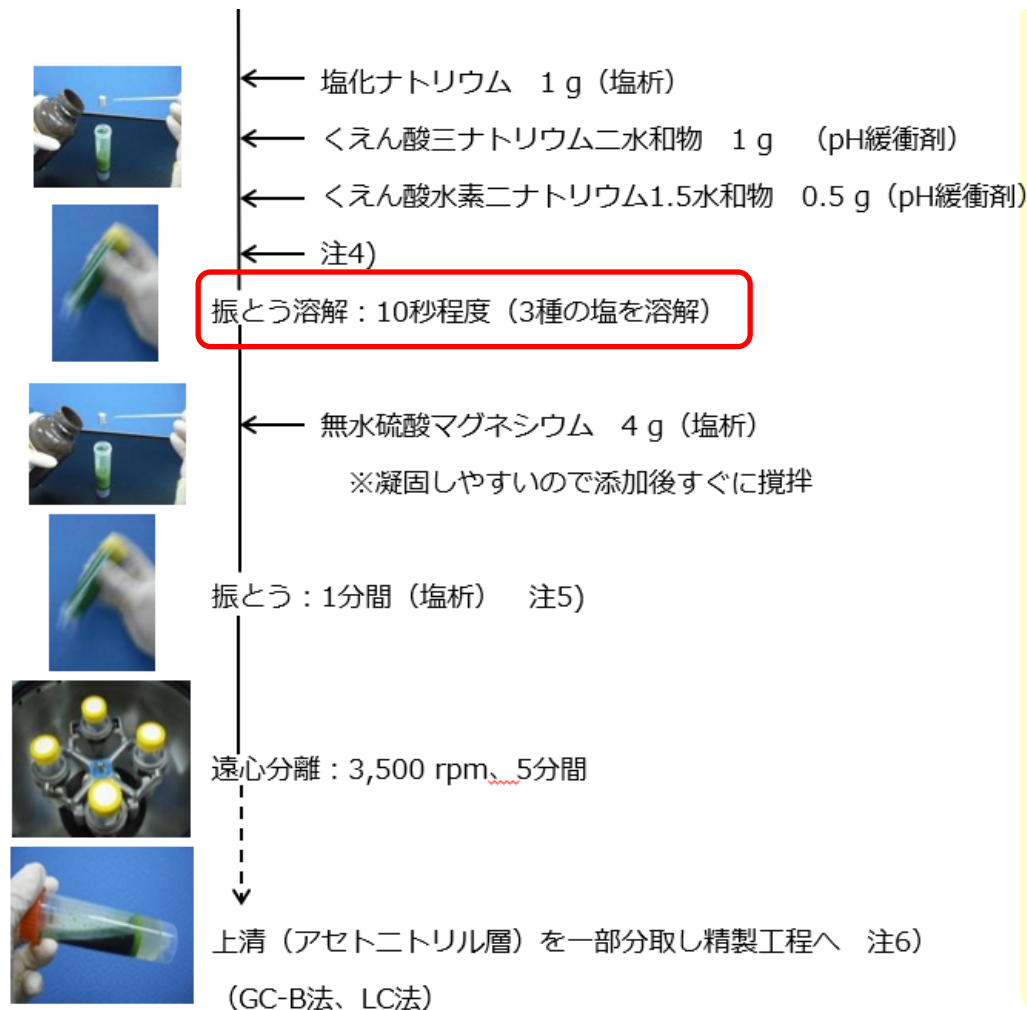
ホモジナイズ：13,000 rpm、1 分間（抽出）

留意点

注1)茶、香辛料等の難試料は試料を減量。
測定感度に注意。

注2)添加溶液は試料に対し1/20以下に
抑える。
アセトニトリルに溶解しない溶媒は
避ける。添加後30分程度放置を推奨。

STQ法の抽出・塩析



注3)水添加量は試料水分と合わせて水が10 gとなるように。

添加する際は、試料全体に十分に浸透させる。

注4)大豆など遠心分離後に試料層が厚く上清が少ない場合は、セラミックホモジナイザーを2個を投入。

注5)手操作を推奨。

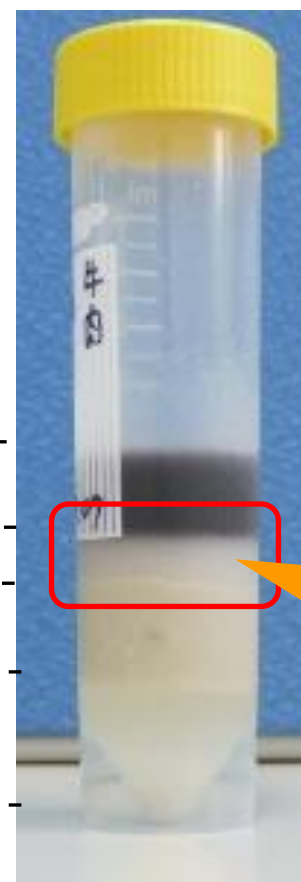
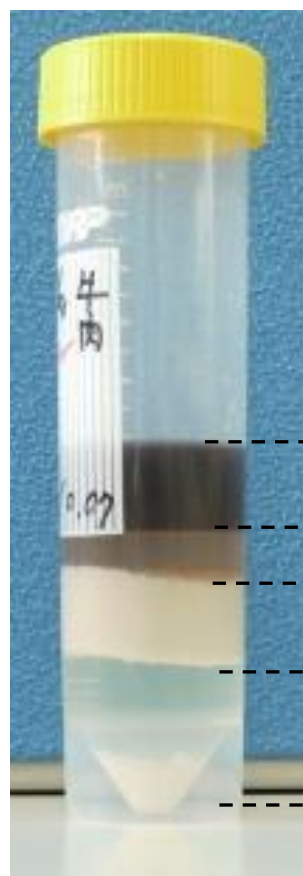
振とう機を使用する場合は、チューブ内で試料が攪拌されていることを確認。

注6)試料層が薄い場合は傾けた際に、層が崩れる場合があるのでピペット等で上清を分取。

畜水産物への応用



牛ひき肉



脂肪層が
固まった！

大部分の
脂肪を除去

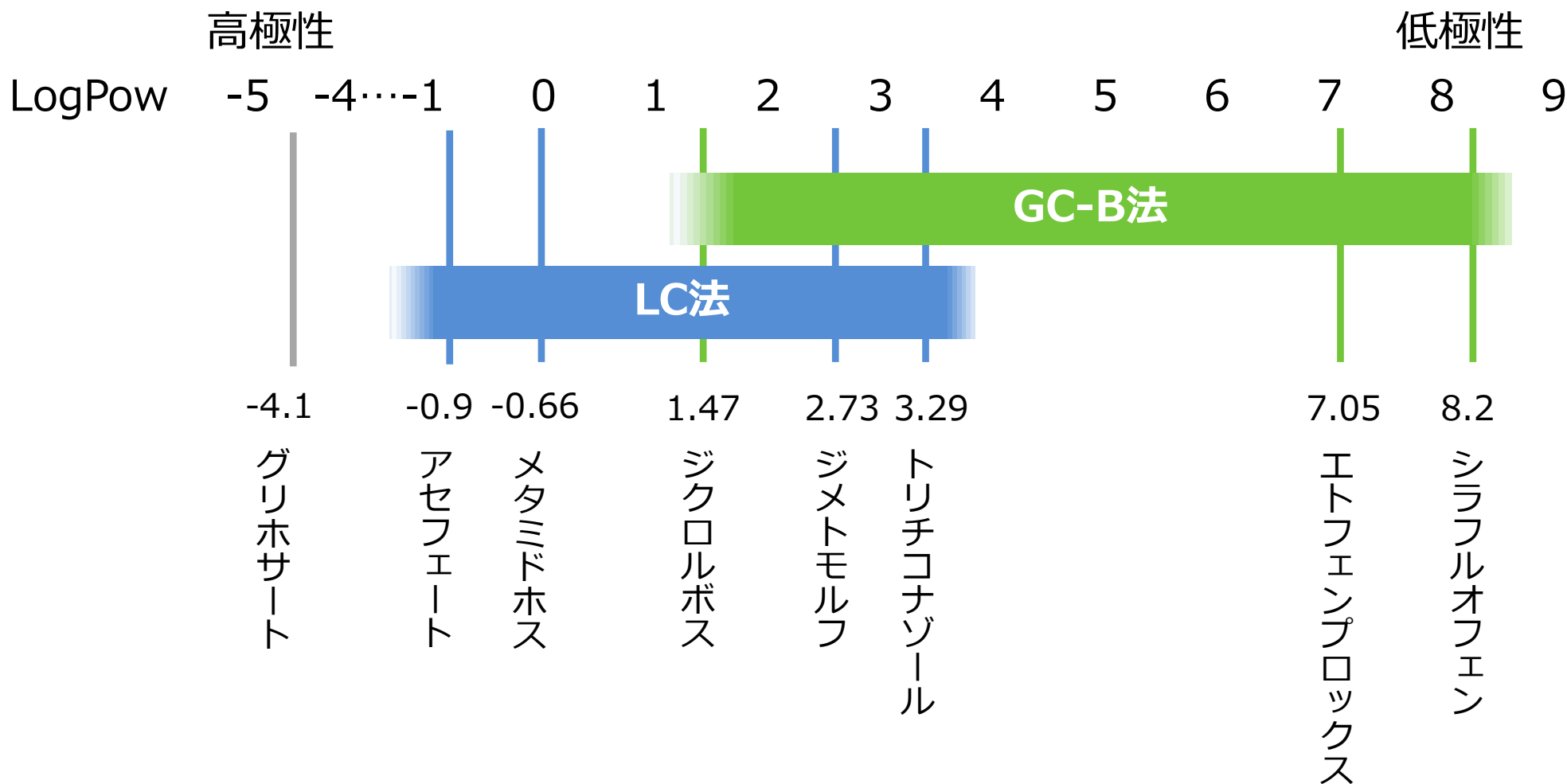
4, 精製

改良のポイント ～マニュアルの場合～

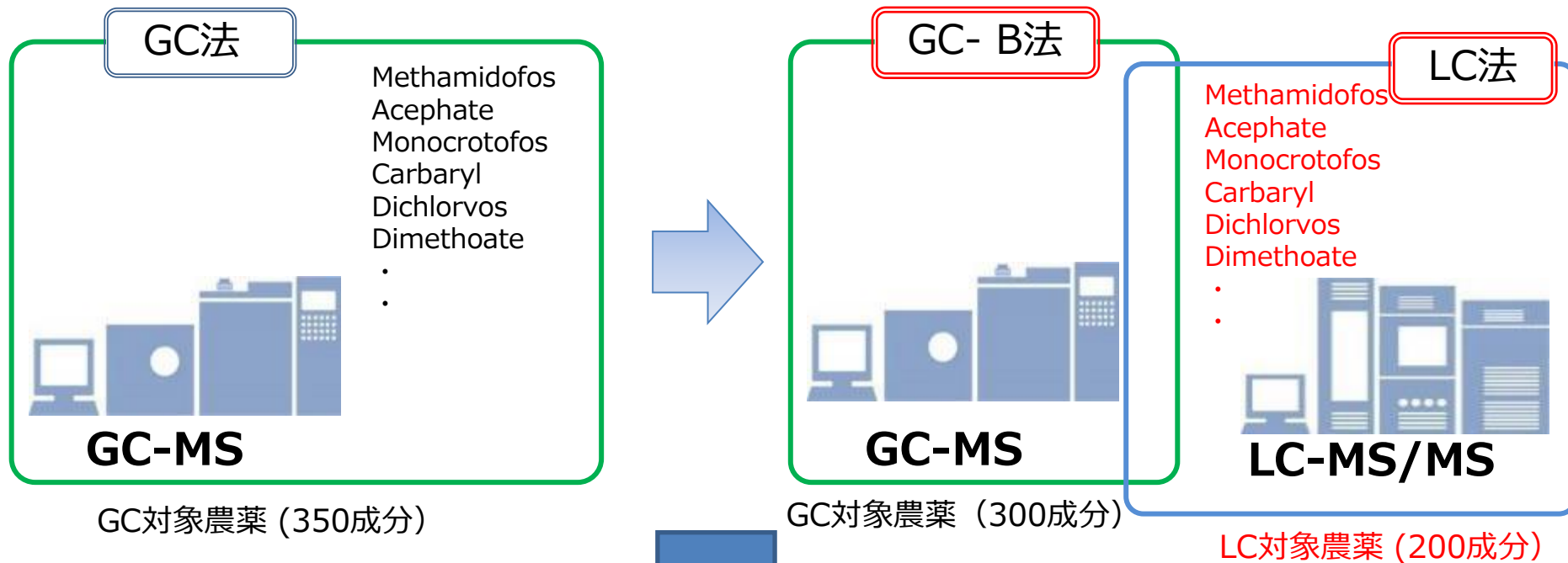


でもその前に・・・

GC法とLC法の対象農薬範囲 (オクタノール/水分配係数 LogPow)



STQ法の精製について



高極性農薬はLC-MS/MSへ

高極性農薬をLC-MS/MSで測定することで、最適な前処理条件で分析が可能となる！

GC-B法の変遷

本題に戻って・・・

工程概要

抽出液

水で希釈

C18 : 無・低極性夾雑物精製

通液 アセトニトリル-水

流出液に水を混合

ポリマー系逆相固相

: 低極性農薬保持

流出液に**NaCl水溶液**を混合

ポリマー系逆相固相

: 中極性農薬再保持

吸引通気乾燥 : 3分

ポリマー系逆相固相

PSA : 脂肪酸等精製

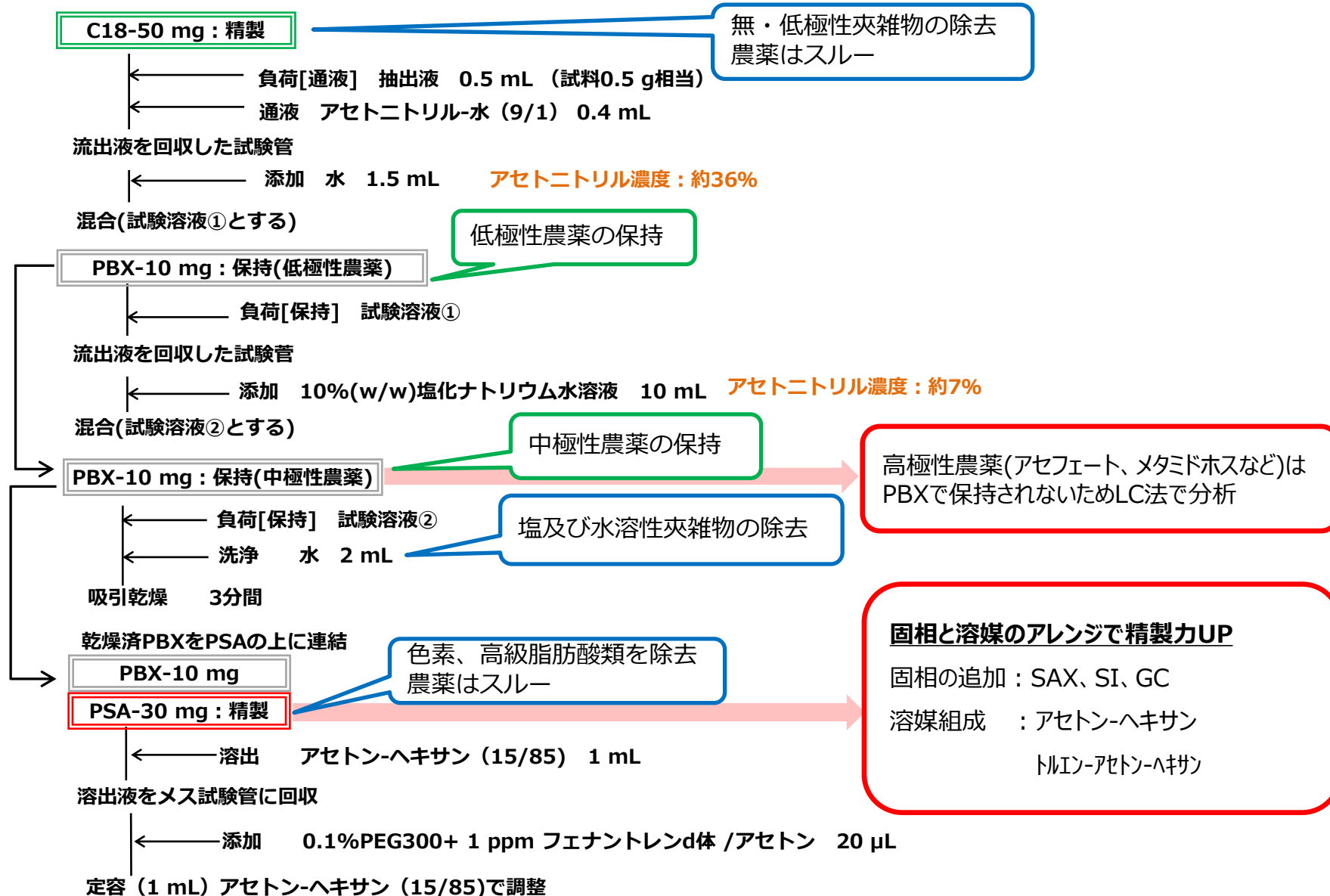
溶出 アセトン-ヘキサン混液

定容 (1 mL, アセトン/ヘキサンで調整)

GC-B法	2007年頃	2012年頃	2018年2月頃	2018年10月
分取抽出液量	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL
抽出液水希釈	0.2mL	0.2mL	なし	なし
C18充填量	30mg	30mg	50mg	50mg
C18通液溶媒 (AN/水比率)	4/1_1mL	4/1_1mL	9/1_0.4mL	9/1_0.4mL
通液後水添加量	2mL	2mL	1.5mL	1.5mL
ポリマー系逆相固相	PLS3-20	PLS3-10	HLBi5-20	PBX-10
NaCl水溶液	15%_20mL	15%_20mL	10%_10mL	10%_10mL
NaCl水溶液通液後 の水洗浄	なし	なし	2mL	2mL
PSA	30mg	30mg	30mg	30mg
最終溶出溶媒 (AT/HX比率)	3/7_1mL	15/85_1mL	15/85_1mL	15/85_1mL

GC-B法 (マニュアル)

現行法(改良版)



LC法 (マニュアル)

従来法

抽出液 1mL (試料 1 g 相当)

C18-30mg + PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有メタノール
1mL酸性農薬非対象の場合ギ酸混合不要

溶出液回収

添加 : 水 0.5mL 混合

C18-50mg

溶出 : メタノール-水 (8/2) 1mL

定容 (4 mL, 水で調整)

LC-MS/MS測定

現行法(改良版)

抽出液 0.5 mL (試料 0.5 g 相当)

C18-50mg + PSA-30mg

コンディショニング

PSA : ACN-水 (8/2) 2mL

C18+PSA アセトニトリル 2mL

通液 : 2%ギ酸含有アセトニトリル 0.5mL

* 酸性農薬非対象の場合ギ酸混合不要

流出液回収

添加 : 水 0.5mL 混合

C18-30mg

溶出 : アセトニトリル-水 (8/2) 0.5 mL

定容 (2 mL, 水で調整)

LC-MS/MS測定

参考：GC-A法（マニュアル）

精製フロー

分取 1 mL （試料 1g相当）

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

GCK-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-トルエンで調整）

GC-MS測定（20μL大量注入）

10分/1件検体

通知のミニチュア版

極性農薬も対象

濃縮なし



4, 精製

改良のポイント
～全自動固相抽出装置ST-L400の場合～

全自動固相抽出装置



全自動固相抽出装置

ST-L400
For Smart-SPE AUTOMATION

- タッチパネルによる直感的な簡単操作
- 20検体連続自動処理
(異なるメソッドも自動切り替え)
- 多段精製の自動処理
(固相コンデショニング、夾雑精製、農薬保持、
固相乾燥、固相脱着、溶出)
- 迅速農薬分析法【STQ法】各手法搭載
- 自由にメソッドを作成
- シーケンスやログをファイルとして保管

GC-B法（自動）

従来法

事前に50%アセトニトリルで2倍希釈

自動
処理

1mL 分取

C18-30 mg

通液 アセトニトリル-水(8/2) 1mL

流出液

混合 10%食塩水 20mL

C18-50 mg

乾燥：窒素パージ 3分

C18をPSAの上に連結

C18-50 mg

PSA-30 mg

溶出 アセトン-ヘキサン (15/85) 1mL

定容 (1 mL, アセトン-ヘキサンで調整)

GC-MS測定 (25μL大量注入、PEG共注入)

現行法(改良版)

希釈不要

自動
処理

0.5mL 分取

C18-50 mg

通液 アセトニトリル-水(9/1) 0.4 mL

流出液

混合 10%食塩水 12mL

C18-50 mg

乾燥：窒素パージ 2分

C18をPSAの上に連結

C18-50 mg

PSA-30 mg

溶出 アセトン-ヘキサン (15/85) 1mL

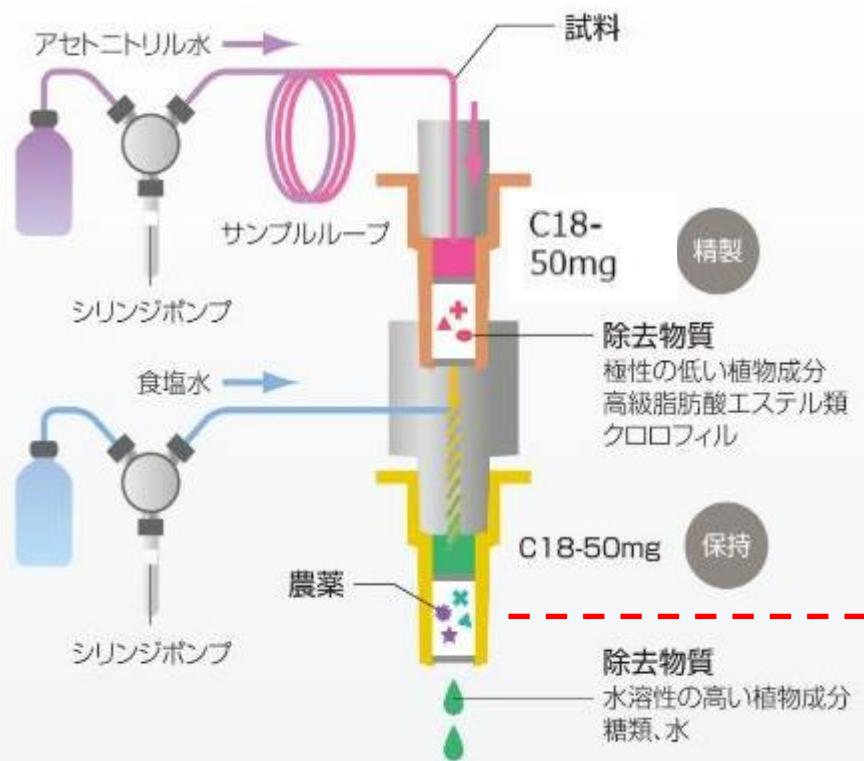
定容 (1 mL, アセトン-ヘキサンで調整)

GC-MS測定 (25μL大量注入、PEG共注入)

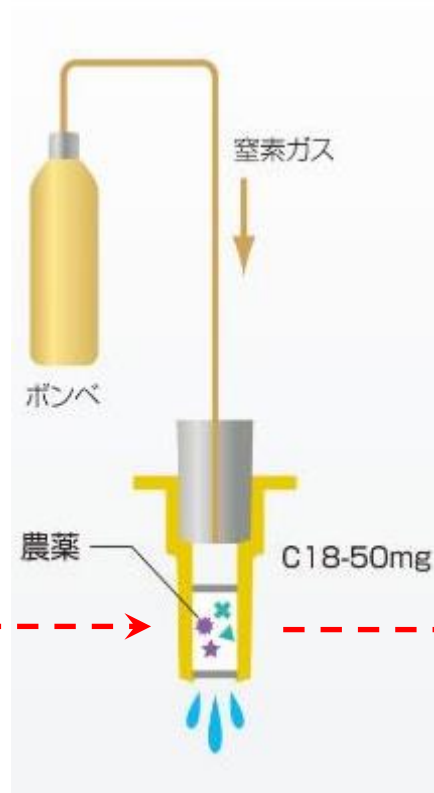
固相のコンディショニングから
ノズル洗浄まで自動処理！

GC-B法：工程（自動）

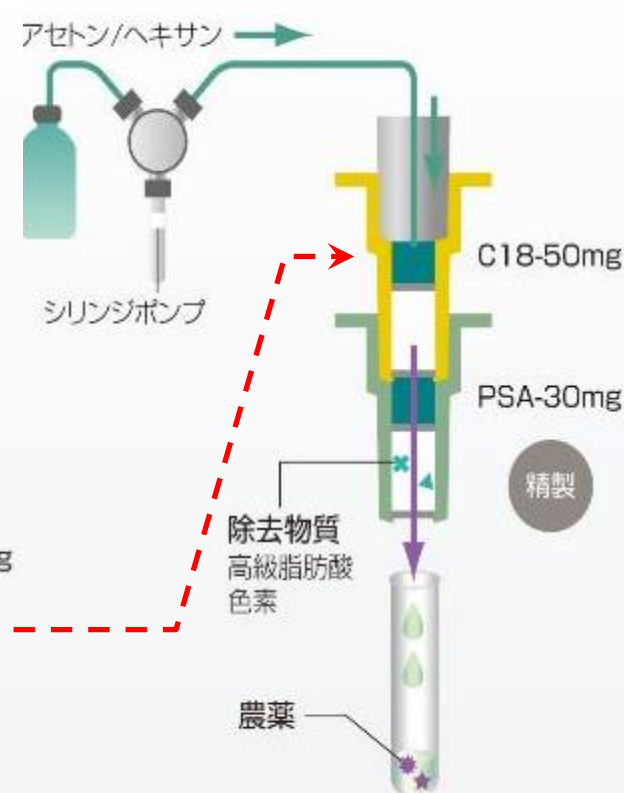
Step. 1 精製・保持



Step. 2 乾燥



Step. 3 連結精製



LC法（自動）

従来法

抽出液 1mL（試料 1 g 相当）

C18-30mg + PSA-30mg

— 注入 0.4%ギ酸含有メタノール
1mL 酸性農薬非対象の場合ギ酸混合不要

流出液

— 水 0.5mL 混合

C18-50mg

— 溶出メタノール-水（8/2）1mL

定容（4 mL, 水で調整）

LC-MS/MS測定

自動
処理

現行法(改良版)

自動
処理

抽出液 0.5 mL（試料 0.5 g 相当）

C18-50mg + PSA-30mg

コンディショニング

PSA : ACN-水（8/2）2mL

C18+PSA アセトニトリル 2mL

— 注入 2%ギ酸含有アセトニトリル 0.5mL
* 酸性農薬非対象の場合ギ酸混合不要

流出液

— 水 0.5 mL 混合

C18-30mg

— 溶出 アセトニトリル-水（4/1）0.5 mL

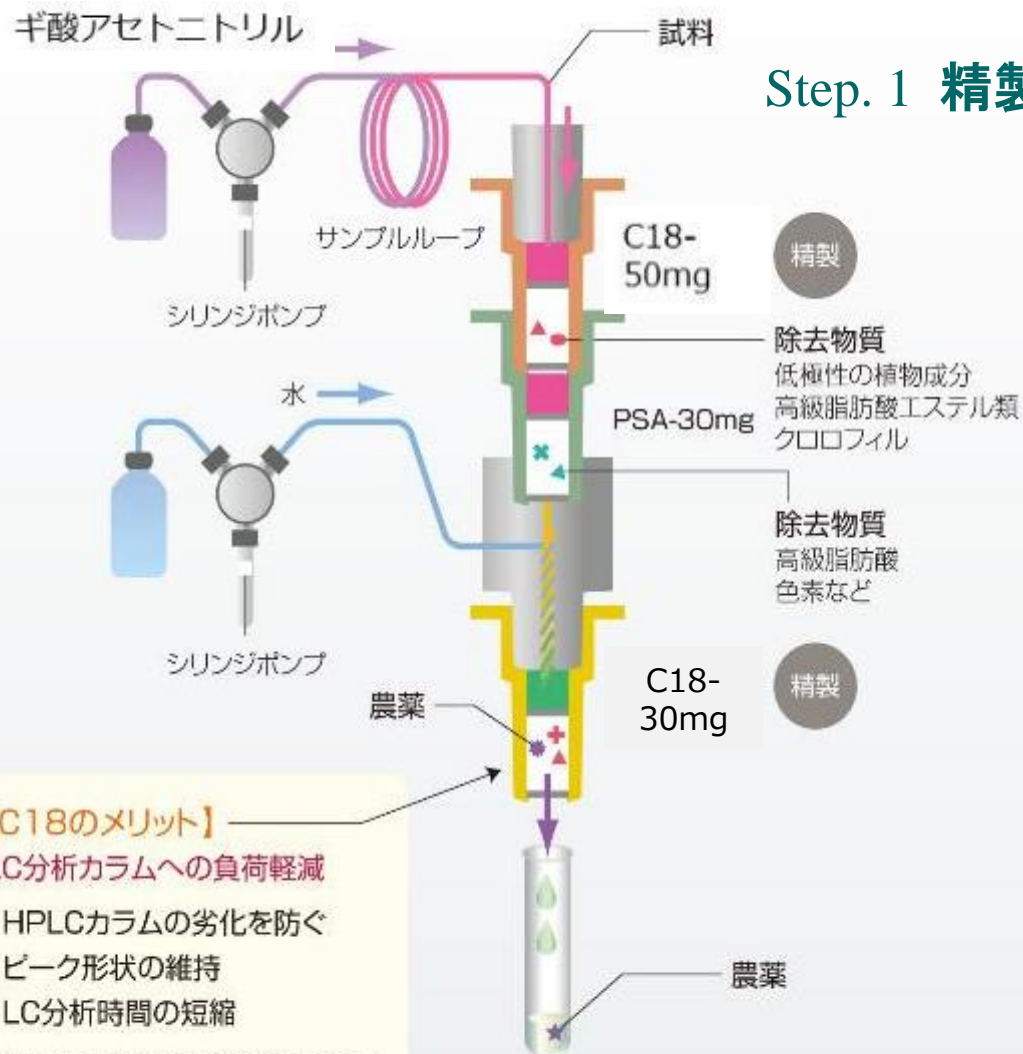
定容（2 mL, 水で調整）

LC-MS/MS測定

固相のコンディショニングから
ノズル洗浄まで自動処理！

LC法：工程（自動）

Step. 1 精製



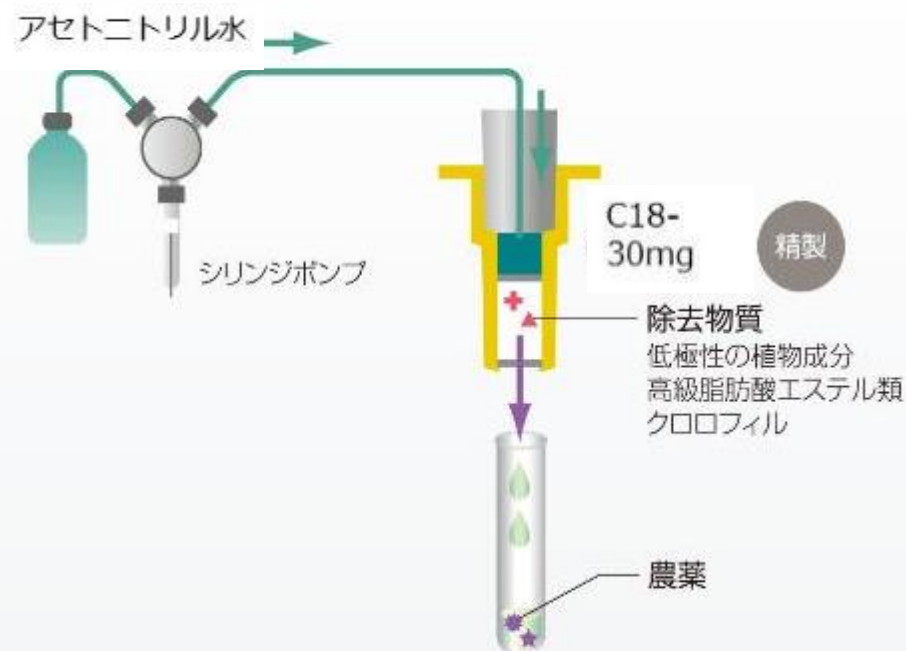
【C18のメリット】

LC分析カラムへの負荷軽減

- ・ HPLCカラムの劣化を防ぐ
- ・ ピーク形状の維持
- ・ LC分析時間の短縮

C18ミニカラムを前処理で使用することで、LC/MS/MSの分析カラム(ODS)への負担を軽減できます。

Step. 2 溶出



STQ法のアプリケーション

<http://www.aisti.co.jp/appli/>

①アプリケーションノートをクリック



HOME > アプリケーションノート



②画面下へ



③自動・手動アプリケーション

PDF	
新GC-B法(自動) 緑茶	新LC法(手動)
新GC-B法(手動) はつれん豆	玄米
小松菜	大豆
冷凍お好み焼き	甘藷
大豆	
甘藷	

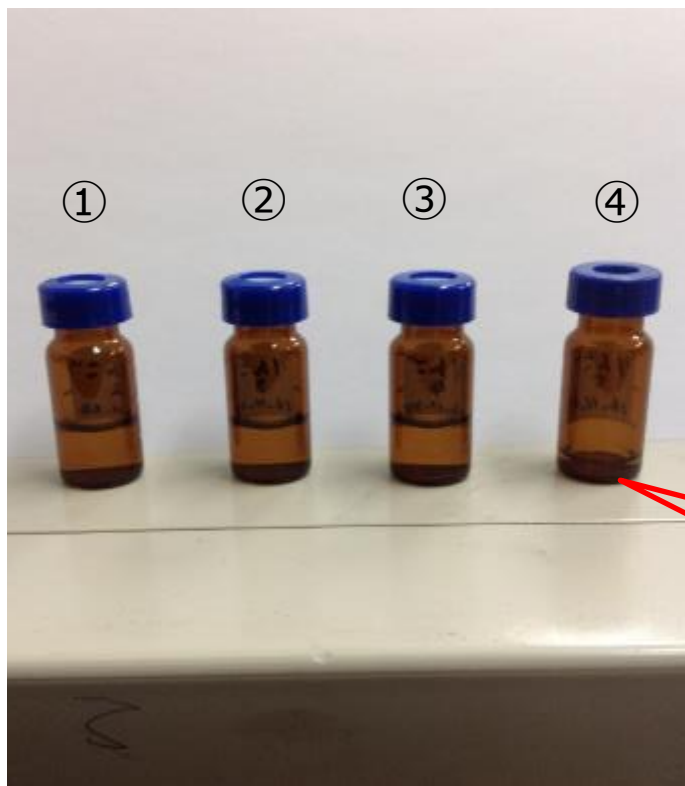
ここで一息・・・

**分析結果がおかしかったこと
ありませんか？**



ケース① 測定バイアルキャップの密閉性がよくなかった

併行試験の再現性が悪い



フェナントレンd体の面積値

	①	②	③	④
Phenanthrene-d10	298190	315763	295668	357435

サンプル液が濃縮されたためフェナントレンd体の面積値が大きい

翌日液面を確認したところ溶媒が揮発しており液面が下がっていた

ケース② 抽出液(アセトリル)に添加用標準溶液が溶解しきれなかった

抽出液(アセトリル)にヘキサンを含む標準溶液を添加するとヘキサンが分離し添加回収試験結果が悪化(低回収率)する

アセトン溶媒に対する各溶媒の比率(%)

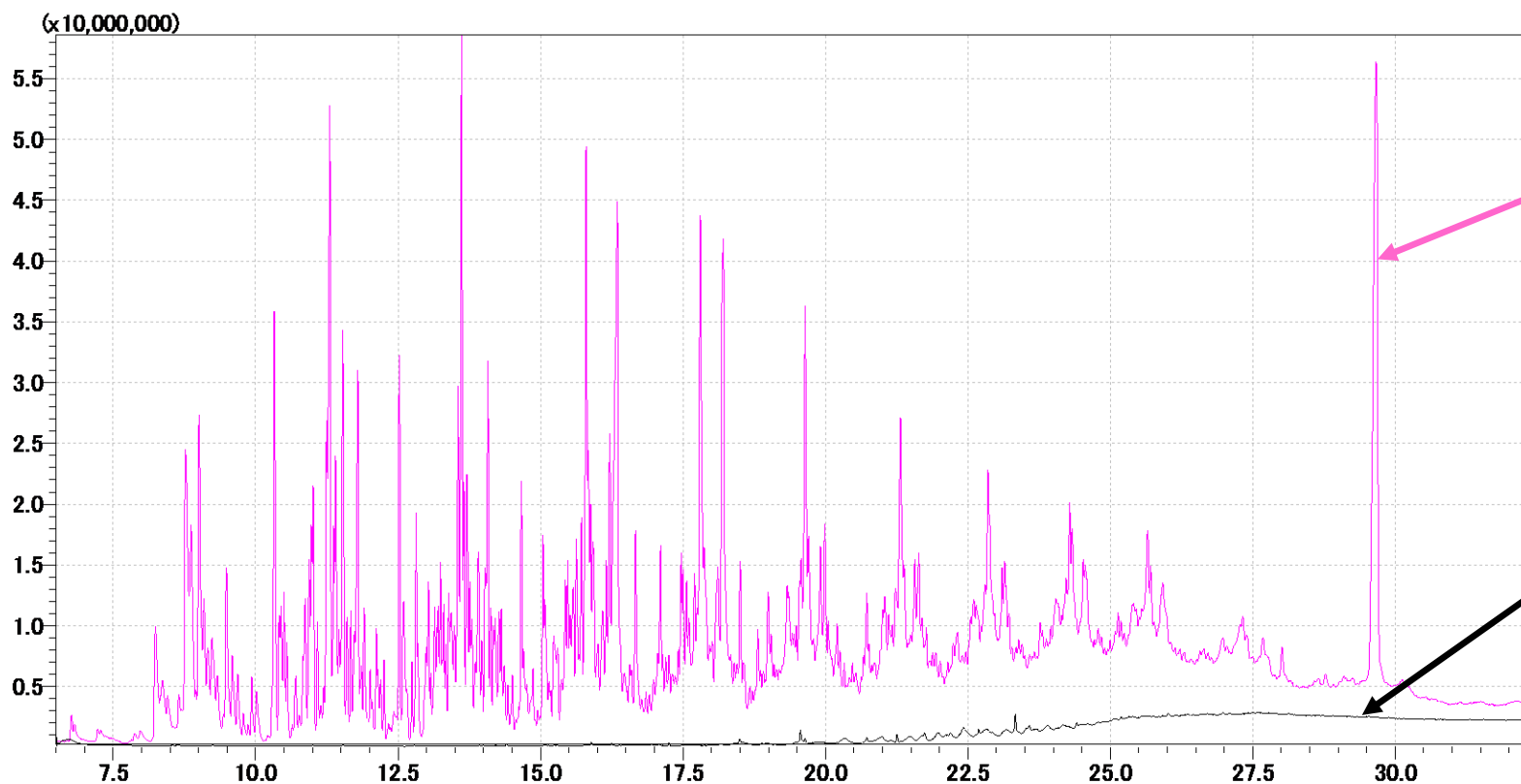
項目	標準溶液の溶媒組成		
	アセトン	アセトン/ヘキサン (15/85)	ヘキサン
ジクロロベンズ	100	40	45
ジフェニル	100	65	51
プロパノール	100	56	61
デメトン-S-メチル (メチルジメトン)	100	18	24
テフルリン	100	55	44
プロチオホス	100	64	50
メミノストロビン-(Z)	100	46	55
ビフェントリン	100	57	45
ヘルメリン-1	100	65	50
ヘルメリン-2	100	71	56
エトフェンプロックス	100	70	55
シラフルオフェン	100	60	48

ケース③ サンプル液 (有機溶媒※)をPPチューブで 調製・保管した

容器から夾雑物が溶出し、クロマトグラム上に夾雑ピークが出現した

※トルエン・アセトン・ヘキサン=5/15/80

SCANクロマトグラム



PPチューブ



ガラス容器

ケース④ 標準溶液調製時のpHの影響 (LC)

検量線用標準溶液を酸性溶液で希釈しないと酸性農薬の感度が低下する

LC標準溶液調製方法

2ppm/アトニル

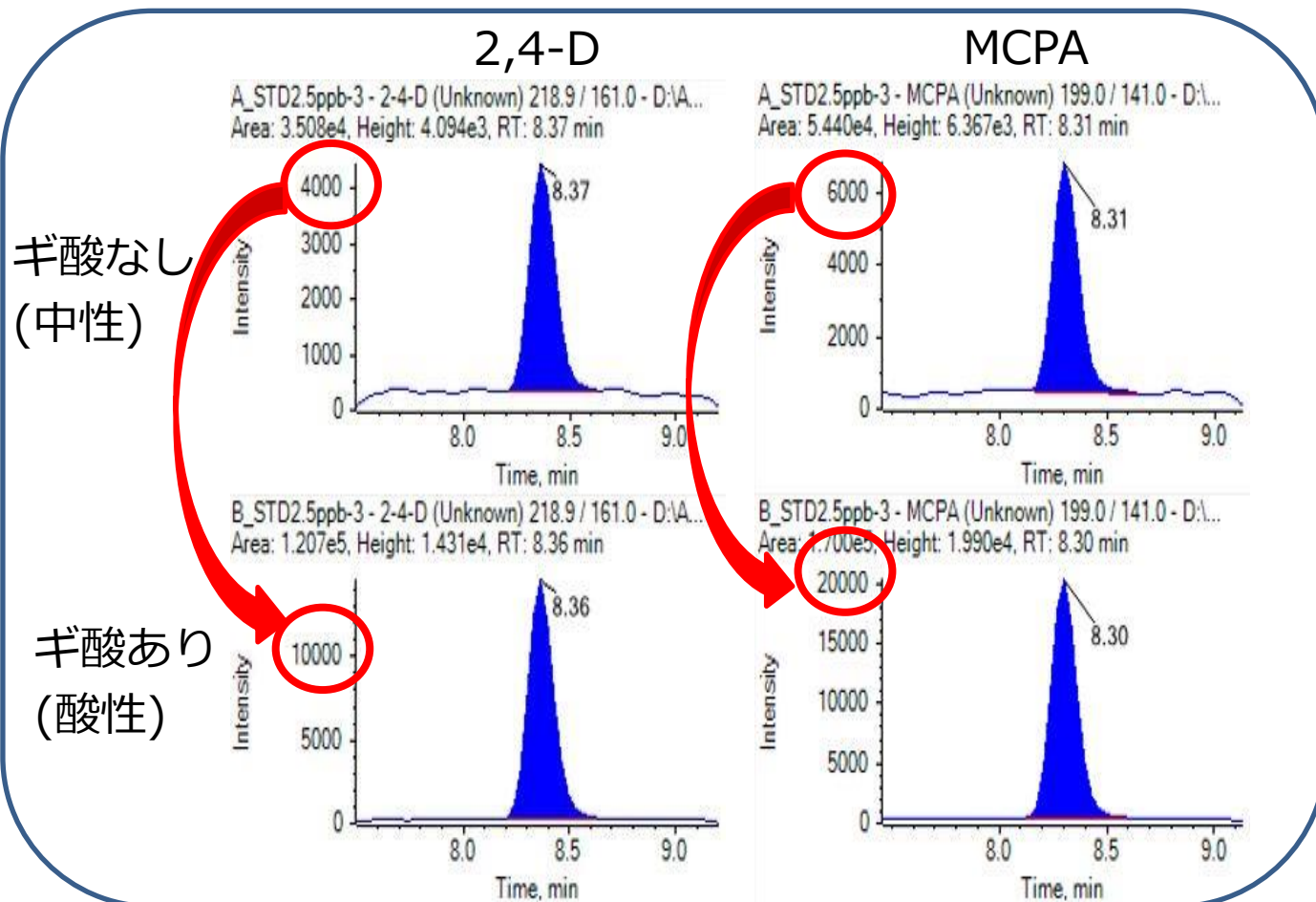
~~アトニル~~
が酸入り混合溶媒
で希釈

ここ！

0.1ppm

が酸入り
混合溶媒で希釈

2.5ppb



5, STQ法の客観的評価

当社参加技能試験結果

主催：産業技術総合研究所

参加時期	試料	結果 (参加機関の分析結果から 算出したZスコア)
2012年	大豆	$ z \leq 2.0$
2013年	玄米	$ z \leq 2.0$
2014年	玄麦	$ z \leq 2.0$
2015年	玄米	$ z \leq 2.0$
2016年	大豆	$ z \leq 2.0$
2017年	玄米	$ z \leq 2.0$
2018年	玄麦	$ z \leq 2.0$

2018年は参加38機関中、16機関（42%）がSTQ法で参加

STQ法での参加機関数が最多！（次いで通知法）

STQ法ユーザー様のISO17025認定拡大

2017年度 認定取得されました！

大手食品メーカー 様
全自動固相抽出装置 + GC用大量注入装置、一斉分析

2016年以前の認定

JA鹿児島経済連・食品総合研究所様（2016年）
全自動固相抽出装置 + GC用大量注入装置
大手食品メーカー様：手動STQ-LC法（2014年）

STQ法は認定取得可能です！

6, STQ法の応用

(1) ジチオカルバメート系農薬

農薬残留分析研究会

ポスター発表
最優秀賞

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

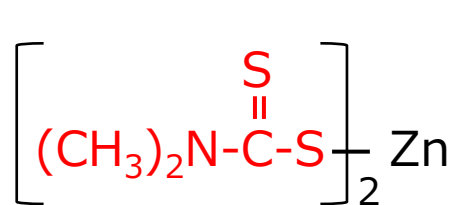
■ホクレン+STQ-GC法

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。

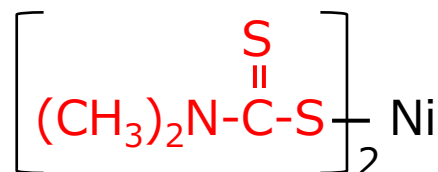
【参考文献】

- 1) 石渡智、関口博史：農産物中ジチオカル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：農産物中ジチオカル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)

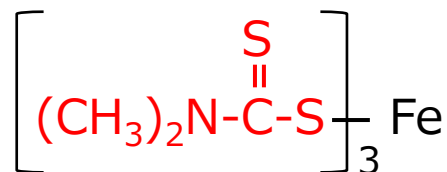
ジチオカルバメート系農薬（殺菌剤）



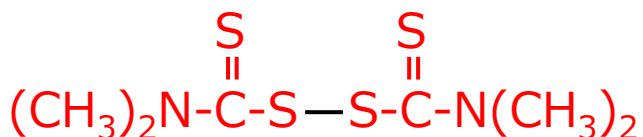
ジラム



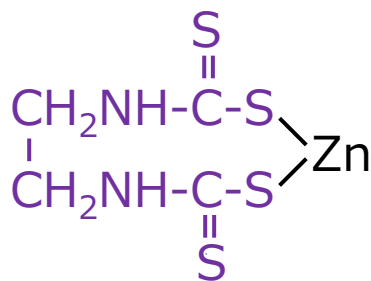
ニッケルビス



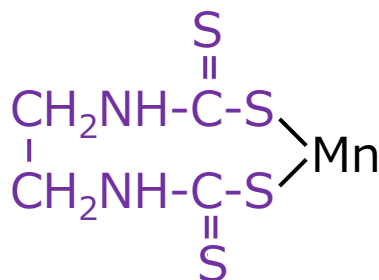
フェルバム



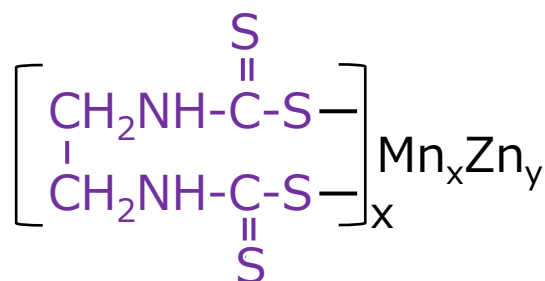
チラム



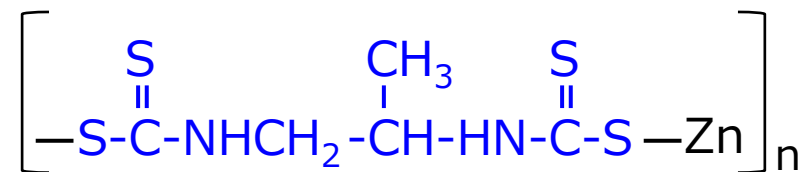
ジネブ



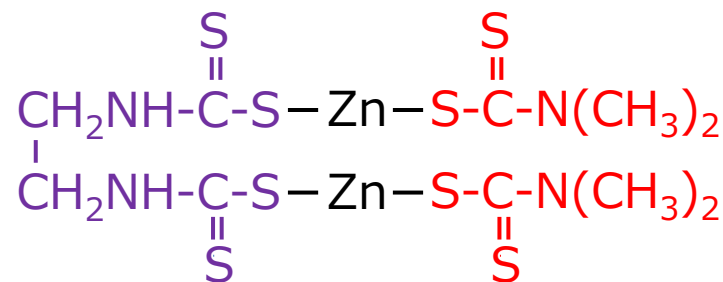
マンネブ



マンコゼブ

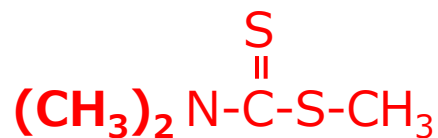


プロピネブ



ポリカーバメート

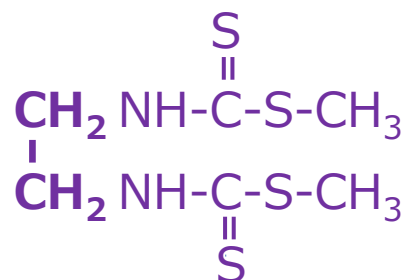
測定物質



ジメチル

ジチオカルバミン酸メチル

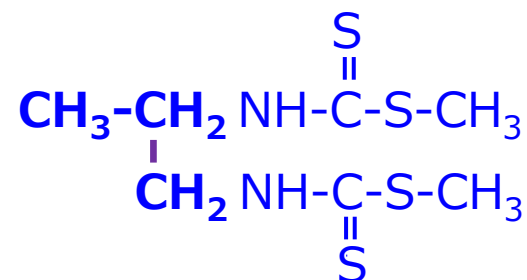
DMDC



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

通知法

例)果実及び野菜の場合

ホクレン+STQ-GC- B法

粉碎
— シス테인-EDTA溶液 添加
秤量

シス테인-EDTA溶液抽出及びジクロロメタン洗淨

ホモジナイズ
遠心分離

多孔性ケイソウ土カラム精製及びメチル化

pH調整
定容
ケイソウ土カラム負荷・溶出
濃縮

中性アルミナミニカラム精製

中性アルミナミニカラム負荷・溶出
濃縮

GC-MS測定

QuEChERS抽出
+
メチル化

STQ-GC-B法

抽出誘導体化（ホクレン法）

試料 100g

添加 シスチン-EDTA溶液 100g

粉碎・均一化 (5,000 rpm, 30秒)

秤量 20g (試料10g 相当)

添加 6mol/L塩酸 600~900μL

添加 ヨウ化メチル 60μL

振とう 10分間

添加 アセトニトリル 10mL

振とう 5分間

塩化ナトリウム

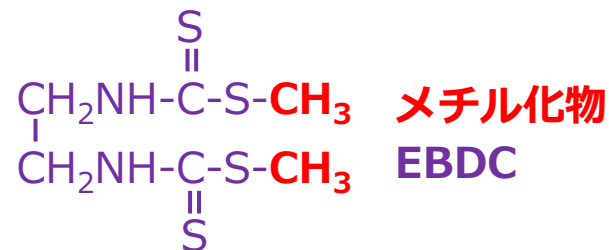
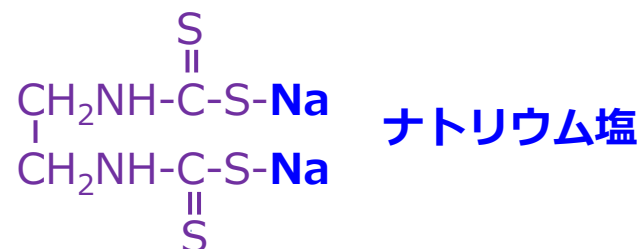
無水硫酸マグネシウム

激しく振とう 1分間

遠心分離 (3500rpm 5分間)

アセトニトリル層を分取

ジチオカルバメートの分析で
重要なのがEDTA

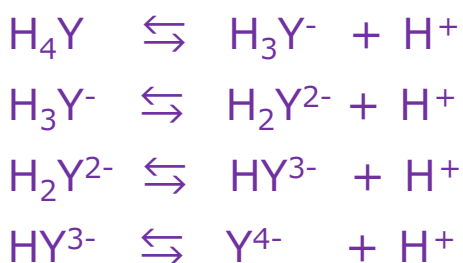


EDTA（エチレンジアミン四酢酸）

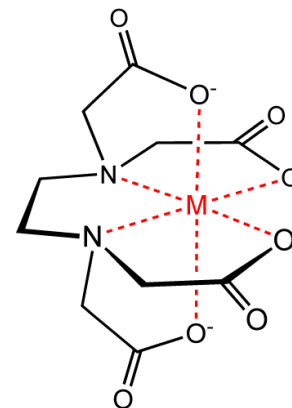


EDTAは4塩基性の弱酸で白色粉末で、水、アルコールに溶けにくい。

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。

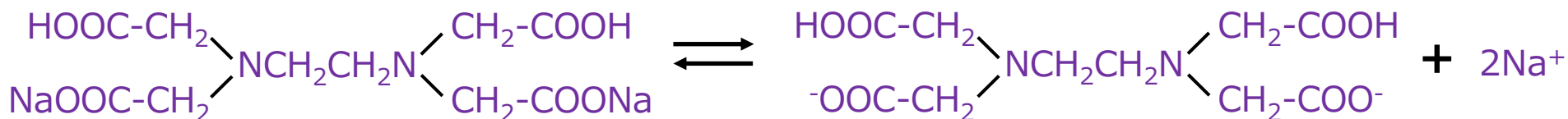


EDTAのpK値	
pK ₁	2.0
pK ₂	2.67
pK ₃	6.16
pK ₄	10.26

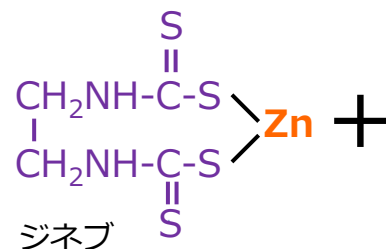


●エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物

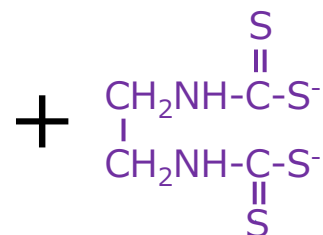
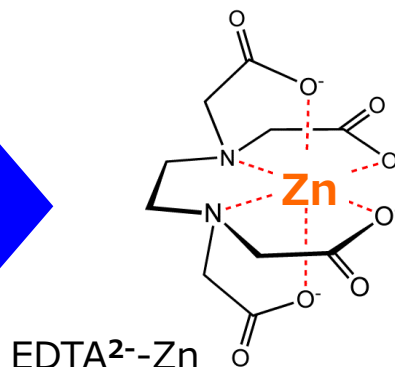
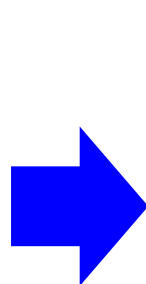
EDTA/2Na/2H/2H₂Oは白色粉末で、非潮解性、水に溶けやすい。



メモ



水にも有機溶媒にも溶けない。



水に溶ける！

安定度定数K

【キレート】複数の配位座を持つ配位子（多座配位子）による金属イオンへの結合

キレートとはハサミを意味するギリシャ語

金属イオンが有機試薬で包み込まれたような形になり、その状態からカニがハサミで餌を捕らえた格好に似ているため、キレート化合物と呼ぶ。



金属イオン	LogK
Mg ²⁺	8.7
Ni ²⁺	18.6
Zn ²⁺	16.5
Fe ³⁺	25.1

ZnのpHによる変化

pH	LogK
12	16.5
10	16.0
8	14.2
6	11.8
4	8.0
2	3.0

【pHとの関係】

pHが低くなりH⁺の濃度が高くなると、EDTAと結合していた金属イオンM⁺がH⁺によって押し出され、EDTA錯塩の解離が起こる。

溶液のpHが次第に高くなると金属イオンは水酸化物となって沈殿してくる傾向があり、pHの上昇に従って生成した水酸化物の安定度がEDTA錯塩の安定度より高くなってくると、EDTA錯塩は分解して金属の水酸化物が沈殿する。

■ EDTA錯塩が安定なのは一定のpH領域に限られており、そのpH領域は金属イオンの種類によって異なる。

参考文献：上野景平：“EDTAの使い方”，分析化学，8巻，p207-214（1959）

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

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

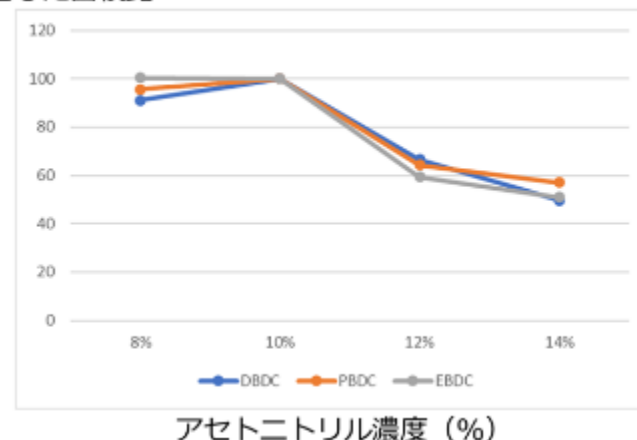
添加 0.1% PEG200 + 1ppmフェナントレン-d体
/アセトン 20μL

定容 (1 mL, アセトン/ヘキサンで調製)

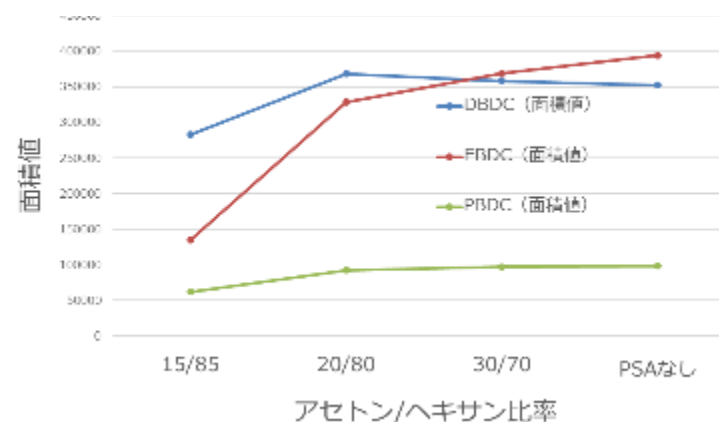
GC-MS/MS測定 (2μL大量注入) or GC-MS測定 (25μL大量注入)

■ 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

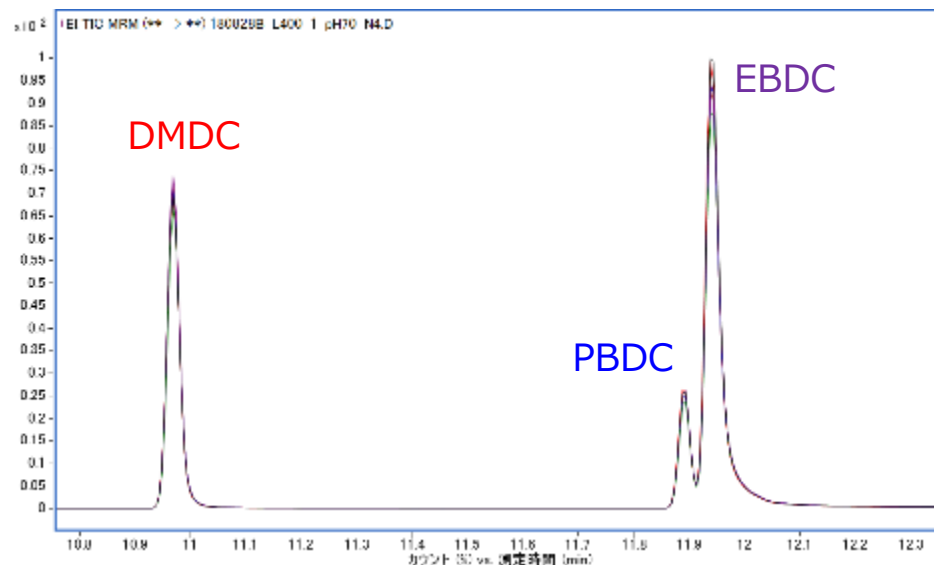


再現性について：スタンダード

「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
Ave.	624,864	219,290	1,006,584
RSD, %	3.4	4.0	3.2



TICによるクロマトグラム重描き (n = 6)

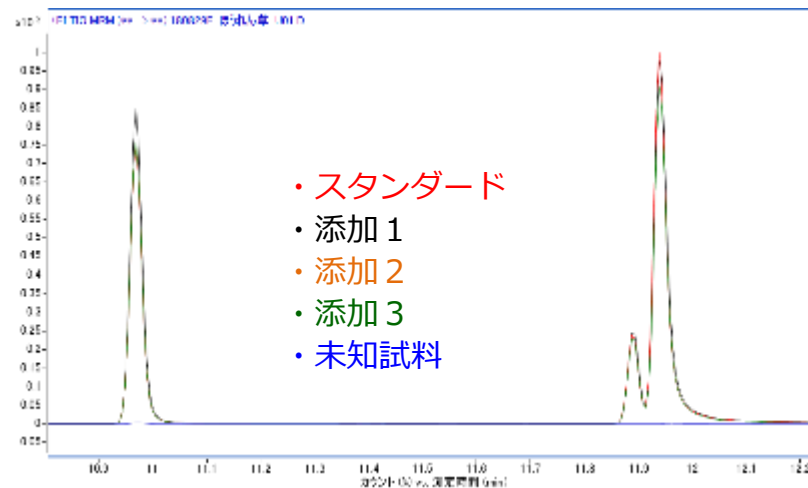
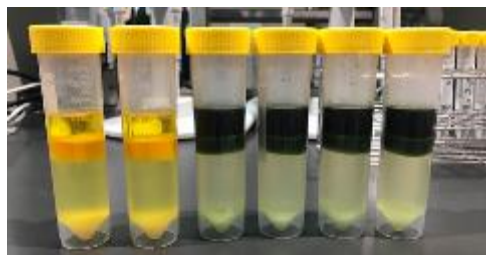
添加回収試験の結果

■ほうれん草 (n=3, ピーク面積値)

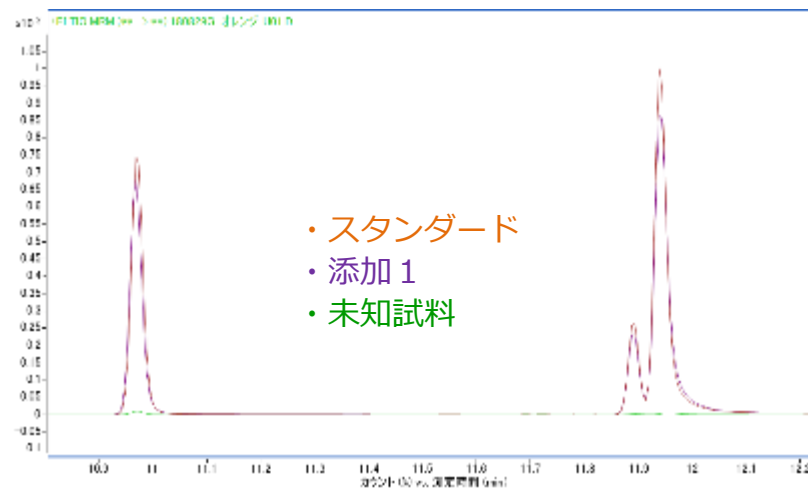
サンプル検体	DBDC	PBDC	EBDC
ST	595,724	199,627	908,739
添加 1	680,577	188,638	902,465
添加 2	598,796	182,159	877,214
添加 3	604,245	177,507	809,690
Ave.	627,873	182,768	863,123
RSD, %	7.3	3.1	5.6
回収率, %	105	92	95

■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

検討中フロー

秤量

凍結粉碎試料10g + シス테인-EDTA溶液10g

pH調整 (pH7)

— 添加 6mol/L塩酸 700~900μL

メチル化

— 添加 ヨウ化メチル 60μL

手で激しく振とう

添加しただけだとヨウ化メチルが分離
これが均一になってから振とう10分間



振とう 10分間

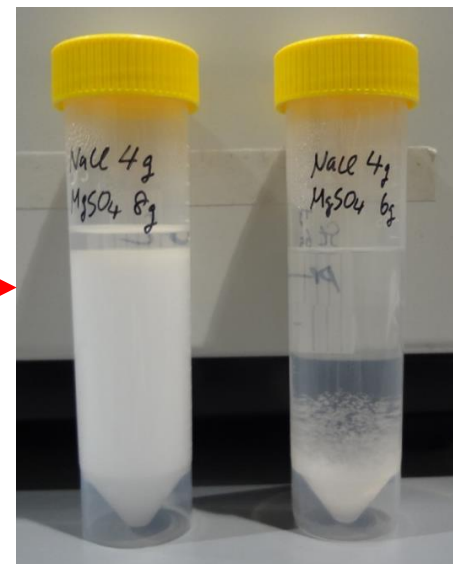
— 添加 アセトニトリル 10mL

振とう 5分間

— 塩化ナトリウム 4g

— 無水硫酸マグネシウム 6g

塩の量による塩析状況の違い



激しく振とう 1分間

遠心分離 (3,500rpm 5分間)

アセトニトリル層を分取

塩化ナトリウム 4g
無水硫酸マグネシウム 8g

4g
6g

ところが・・・

標準溶液に結晶状のものが見られる!?



標準溶液を完全に溶かすには・・・

- 標準原液濃度100ppmでは完全に溶けていない？
→20ppmすれば完全に溶ける？

確認中

●

●

6, STQ法の応用

(2) 動物用医薬品(サルファ剤・キノロン剤)

日本食品衛生学会学術講演会



第114回日本食品衛生学会学術講演会, 2018年11月15~16日, 広島市

『STQ法とLC/MS/MSを組み合わせた食肉中の動物 用医薬品高速一斉分析(前処理編)』

○島三記絵¹⁾、朝野夏世²⁾、宇野由紀²⁾、佐々野僚一¹⁾

1) 株式会社アイスティサイエンス、2) 株式会社島津製作所

■概要

サルファ剤をアセトニトリル(中性)で、キノロン剤をギ酸アセトニトリル(酸性)で抽出し抽出液を合算することでこれらを同時に前処理することができた。全自動固相抽出装置の使用により1検体の精製時間が約10分であり、かつ1分析18分の高速LCMSMSメソッドの測定と合わせて「迅速・簡便・高精度」化を図った。

【参考文献】

1)小西ら,第108回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集,p.47(2014)

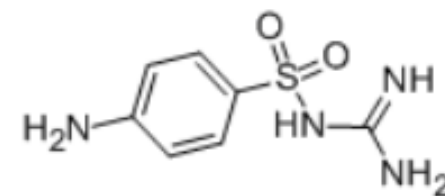
2)小林ら,第112回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集,p.58(2016)

3)T.Nakajima et al., Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. Shokuhin eEiseigaku Zasshi.2012;53(5):243-53.

対象成分

サルファ剤(葉酸拮抗剤含む)：27成分

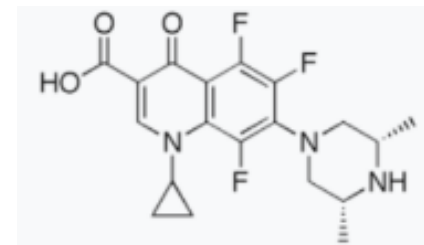
ベンゼンスホンアミド基を基本骨格に持つ化合物



例：Sulfaguanidine

キノロン剤：14成分

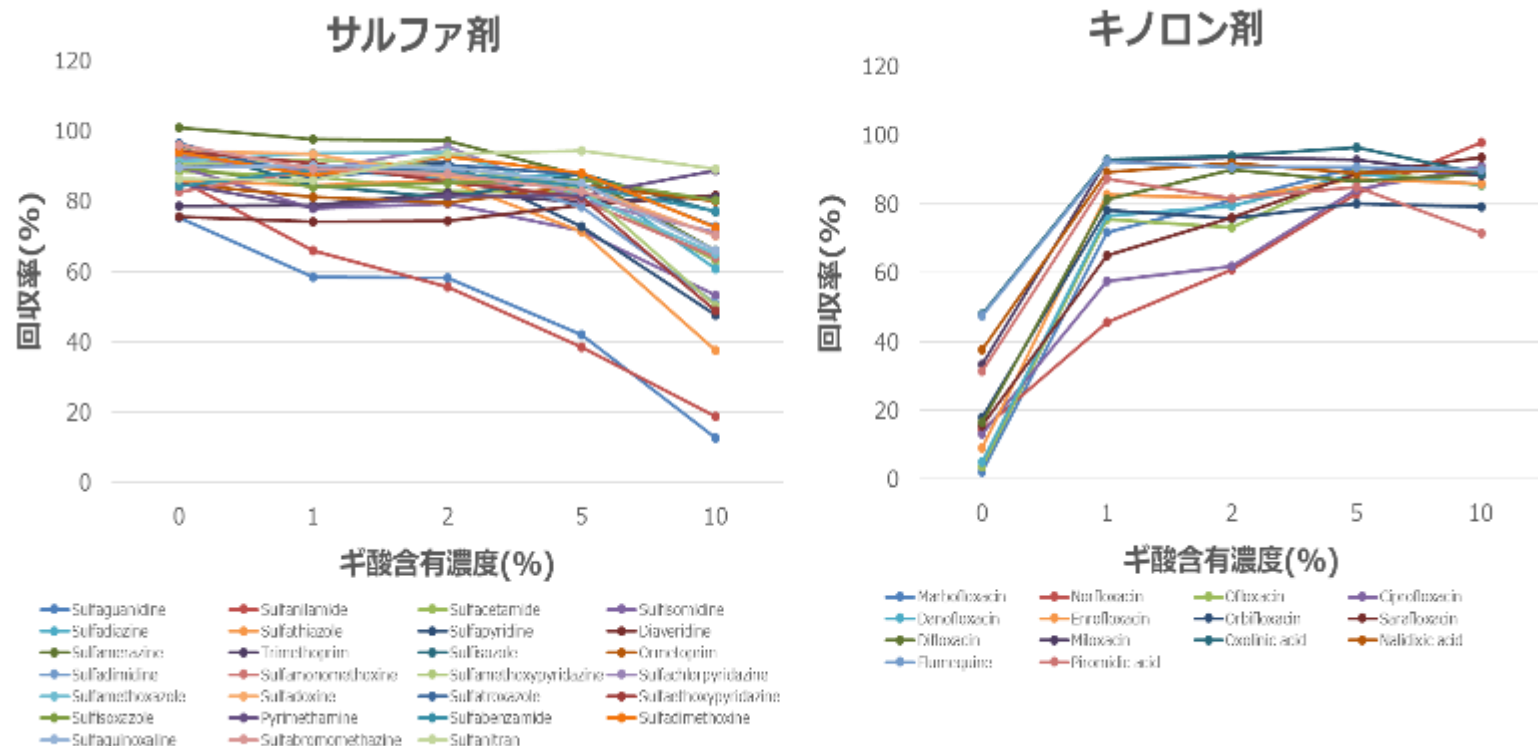
キノリン骨格の1か所をカルボニル基で置き換えた構造を持つ化合物



例：Orbifloxacin

前処理 ～抽出～

アセトニトリル(中性)で抽出するとキノロン剤が低回収率となり、ギ酸濃度を高くするとサルファ剤の回収率が低下し、キノロン剤では向上する傾向がみられた。

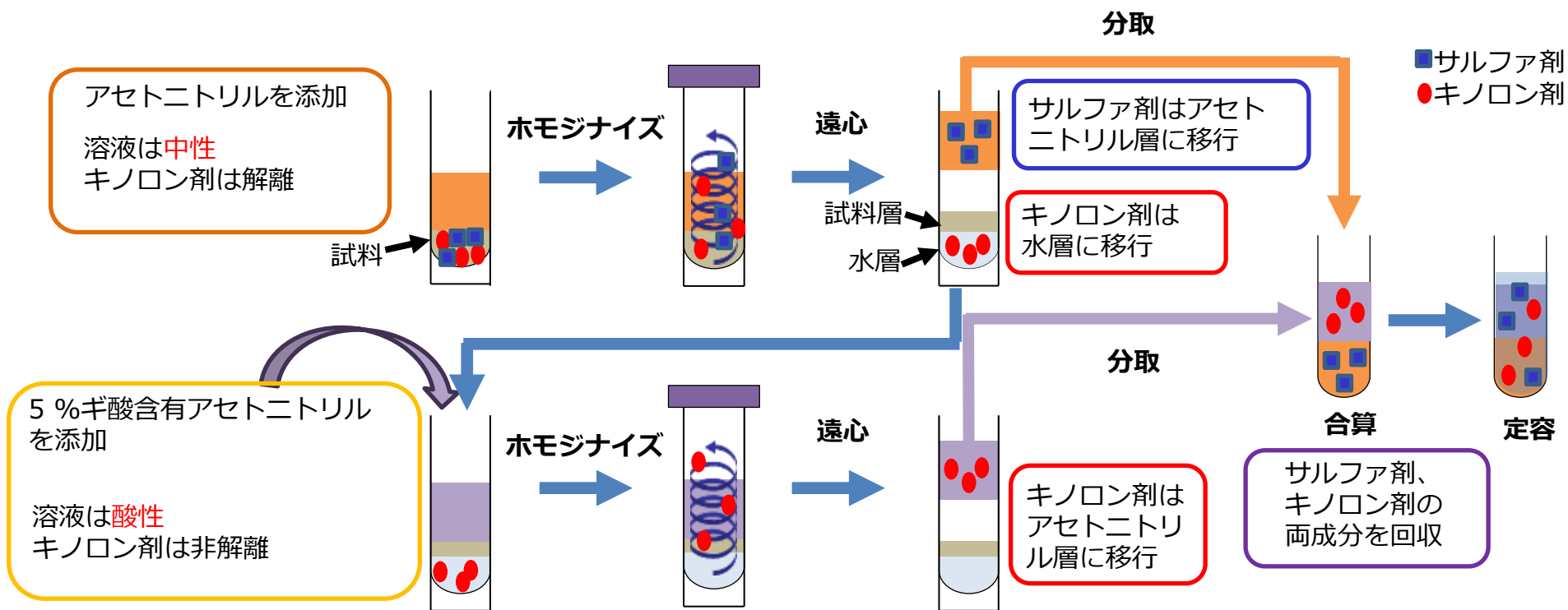


抽出時のギ酸濃度の違いによる回収率の比較(鶏ささみ)

前処理 ～抽出～

繰り返し抽出定容法

アセトニトリルでサルファ剤をギ酸含有アセトニトリルでキノロン剤をアセトニトリル層に移行させ、それらを合算することで定量精度を確保



前処理 ～抽出～

凍結粉碎

試料 5 g

添加 水 (水分調整)

添加 アセトニトリル 10 mL

ホモジナイズ (13,000 rpm、1分間)

添加 塩化ナトリウム 0.5 g
無水硫酸マグネシウム 2 g

振とう (液液分配)

遠心分離 (3,500 rpm、5分間)

残さ (試料層・水層)

アセトニトリル層①

①②合算

定容 20 mL (アセトニトリルで調整)

抽出液のpHを一定にするためクエン酸Naは添加せず

塩の量が多いと試料層とアセトニトリル層がうまく形成されない



NaCl 1 g
MgSO₄ 4 g



NaCl 0.5 g
MgSO₄ 2 g

添加 5 %ギ酸含有アセトニトリル 10 mL

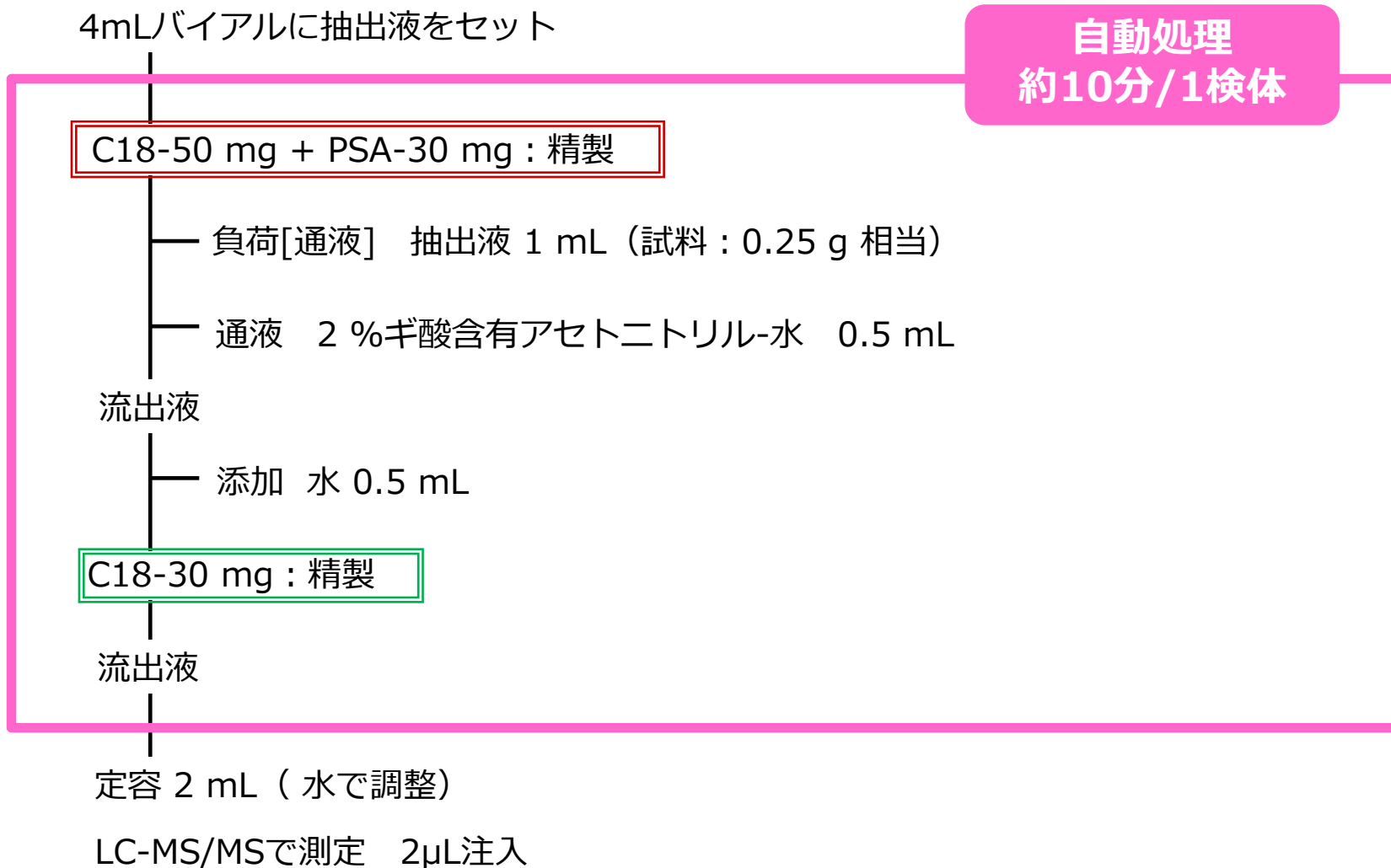
ホモジナイズ (13,000 rpm、1分間)

遠心分離 (3,500 rpm、5分間)

残さ (試料層・水層)

アセトニトリル層②

前処理 ～精製～



【測定装置】

UHPLC(Nexera X2)及びLCMS-8045 (島津製作所製)

【LC条件】

分析カラム : Restek Raptor™ Biphenyl(2.1 mmI.D. × 100 mmL., 2.7 μm)

移動相 A液 : 0.1 %ギ酸+0.5 mmolギ酸アンモニウム-水

B液 : 0.1 %ギ酸-メタノール

流速 : 0.4 mL/min

グラジエント : B.Conc 2 % (0 min) → 100 % (12.5-14.5 min) → 2 % (14.6-17.5 min)

分析時間 : 18分

注入量 : 2 μL (+40 μL水)

カラム温度 : 40 °C

【MS条件】

イオン化モード : ESI positive and negative

ネブライザーガス流量 : 3 L/min

ドライイングガス流量 : 10 L/min

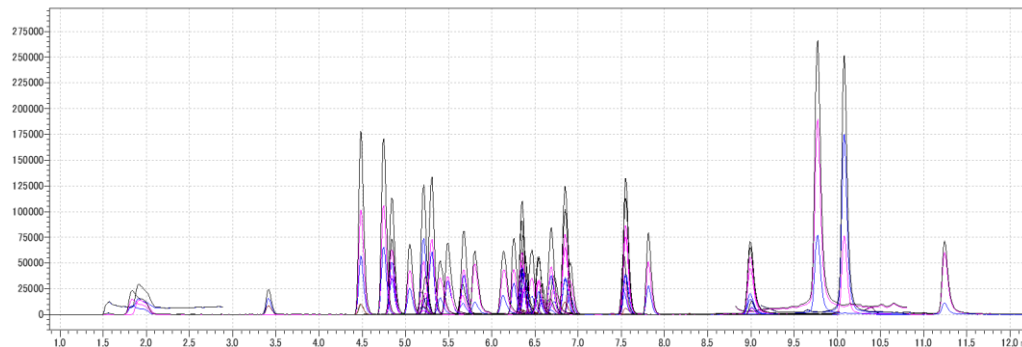
ヒーティングガス流量 : 10 L/min

インターフェース温度 : 350 °C

DL温度 : 150 °C

ヒートブロック温度 : 300 °C

測定モード : MRM



添加回収試験結果

サルファ剤及び葉酸拮抗剤

添加濃度: 試料中0.01 ppm (n=5)

	鶏ささみ		豚ヒレ肉		牛ヒレ肉	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
1 Sulfaguanidine	54	3.0	59	3.4	43	1.9
2 Sulfanilamide	36	5.9	46	4.7	25	5.1
3 Sulfacetamide	91	2.3	92	5.6	88	3.5
4 Sulfisomidine	84	3.7	86	2.5	81	3.7
5 Sulfadiazine	96	3.8	90	5.5	89	2.5
6 Sulfathiazole	95	2.8	86	2.7	88	5.5
7 Sulfapyridine	87	5.6	89	3.7	86	3.5
8 Diaveridine	87	4.1	90	3.9	85	2.0
9 Sulfamerazine	90	4.9	91	4.7	88	4.7
10 Trimethoprim	87	4.3	88	5.1	88	3.6
11 Sulfisozole	96	5.9	90	4.7	88	2.5
12 Ormetoprim	93	2.8	89	4.2	87	2.0
13 Sulfadimidine	95	5.0	89	7.1	94	6.4
14 Sulfamonomethoxine	92	5.0	96	4.1	81	1.5
15 Sulfamethoxypyridazine	97	5.4	90	4.8	93	1.9
16 Sulfachlorpyridazine	94	5.2	89	2.8	93	5.7
17 Sulfamethoxazole	98	6.4	90	2.2	86	1.6
18 Sulfadoxine	89	5.3	94	2.7	83	2.2
19 Sulfatroxazole	92	3.9	98	4.6	96	5.5
20 Sulfaethoxypyridazine	94	3.8	92	2.9	86	2.6
21 Sulfisoxazole	100	6.0	99	4.1	91	4.2
22 Pyrimethamine	88	3.1	84	4.9	85	6.3
23 Sulfabenzamide	93	2.6	86	3.0	86	2.7
24 Sulfadimethoxine	92	3.5	89	2.9	84	1.7
25 Sulfaquinoxaline	91	3.1	90	3.9	98	2.8
26 Sulfabromomethazine	97	7.5	86	5.1	85	2.1
27 Sulfanitran	97	23.9	103	22.8	91	23.7

添加回収試験結果

キノロン剤

添加濃度：試料中0.01 ppm (n=5)

	鶏ささみ		豚ヒレ肉		牛ヒレ肉	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
1 Marbofloxacin	83	4.4	84	3.9	84	5.3
2 Norfloxacin	74	5.9	80	3.1	85	6.2
3 Ofloxacin	83	3.2	79	4.4	92	2.3
4 Ciprofloxacin	79	4.9	88	9.2	83	6.1
5 Danofloxacin	87	4.4	86	4.1	95	3.3
6 Enrofloxacin	87	6.3	89	1.7	92	5.5
7 Orbifloxacin	73	8.0	73	4.5	78	3.6
8 Sarafloxacin	76	5.5	84	10.8	70	8.8
9 Difloxacin	82	7.2	77	4.8	87	3.9
10 Miloxacin	97	2.9	91	3.4	96	2.7
11 Oxolinic acid	99	3.2	92	3.2	94	2.7
12 Nalidixic acid	95	4.9	87	3.2	88	4.4
13 Flumequine	102	5.4	95	0.8	94	5.3
14 Piromidic acid	84	4.5	72	4.0	74	3.1

ご清聴ありがとうございました

当社ホームページにて情報多数公開

<http://www.aisti.co.jp/appli/>

株式会社アイスティサイエンス

TEL : 073-475-0033 (本社)
048-424-8384 (東日本営業所)

FAX : 073-497-5011 (全国共通)

E-mail : as@aisti.co.jp

ホームページ : <http://www.aisti.co.jp/>