

食品中残留農薬分析における固相抽出法を用いた自動前処理装置の開発

株式会社アイステイサイエンス ○谷澤春奈, 佐々野僚一

【目的】食品中の残留農薬分析においてはポジティブリスト制度の導入以降、多種多様な食品と大幅に増加した農薬数に迅速に対応すべく、効果的かつ効率的な手法が求められている。演者らは、抽出操作に「QuEChERS法」、精製操作に「固相抽出法」を用いることで濃縮操作がなく、同時に精製効果も高めた迅速一斉分析法¹⁾の検討を行ってきた。今回さらなる効率化を目指し、抽出操作以降の前処理操作の自動化の開発を行ったので報告する。

【方法】1. 自動前処理装置：STQ-L200，固相カートリッジ：SAIKA-SPE (アイステイサイエンス社製)

試料 10g
| アセトニトリル 10mL
ホモジナイズ
| 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
| 無水硫酸マグネシウム 4g
攪拌 (手で振とう, 1分)
遠心分離 (5分, 3000rpm)
| アセトニトリル層を50%アセトニトリル水で倍希釈
抽出液 (75%アセトニトリル試験溶液)

《自動前処理装置》

分取 1mL (試料0.5g相当)
| 固相 C18- 50mg (精製)
| 洗液 80% アセトニトリル水 1mL
下液
| 食塩水20mLを加え希釈
固相 PBC- 20mg (保持)
乾燥 (Heガス 1分)
| 連結固相 PSA- 30mg (精製)
| 溶出 アセトン/ヘキサン(3/7) 1mL
溶出液
| 添加 フェナントレン体+PEG(300)
| アセトン/ヘキサン(3/7)で1mLに定容

GC/MS 大量注入 (25 μ L: 試料12.5mg相当)

Scheme 1. 試験溶液の調製法

2. 対象農薬：ポジティブリスト制度GC/MS対象268種 (農薬混合標準液22, 31, 34, 48, 51, 関東化学社製)，添加濃度：試料中0.01ppm

3. 測定条件

PTV Injector	LVI-S200 (AiSTI Science) ; Stomach Insert
Injector Temp.	70°C-120°C/min-240°C-50°C/min-290°C (38min)
Solvent Purge Time	0.3 min
Auto Sampler	CombiPAL; 50 μ L Syringe
Injection Volume	25 μ L
GC	Agilent 6890N
Column	ENV-5MS, 0.25mm i.d. *30m, df; 0.25mm
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 (8.3min)
MS	JMS-Q1000GC (JEOL)
MS Method	SCAN; 70 - 400 m/z (8:30min ~ 30:50min) SIM (30:50min ~ 40:00min)

【結果と考察】1. 抽出と精製：抽出操作はQuEChERS法を参考に行い、得られた抽出液を希釈し75%アセトニトリル試験液を作製後、自動前処理装置にセットし精製操作は自動化装置で行った。精製はC18とPSAを用いて行い、C18による精製と同時にその流出液に別ラインから食塩水を混合させ希釈し、PBC (ポリマー系コンビネーションカラム) に農薬を保持した。精製と農薬の保持を同時に行うことで大幅な時間短縮につながり、分取後、12分/検体での処理が可能になった。また加圧式で固相を用いることにより、固相内部まで確実に溶液を浸透させることができ、高い精製効果が得られた。

2. 添加回収試験：ほうれん草を用いて試料中0.01ppmでの添加回収試験 (n=5)を行った結果、206成分 (約75%) /274成分中が70~120%の回収率が得られ、再現性は250成分 (約91%) /274成分中が10%未満とかなり良好であり、自動化の長所である再現性の向上が確認できた。

1) 佐々野ら, 第94回学術講演会要旨p.33



食品中残留農薬分析における固相抽出法 を用いた自動前処理装置の開発

株式会社アイスティサイエンス
○谷澤春奈 佐々野僚一

AiSTI SCIENCE

目的

■食品中残留農薬分析の前処理工程の自動化

①抽出操作以降の前処理工程の自動化

抽出はQuEChERS法を参考に効率化を図る

固相抽出を用いた濃縮操作ゼロの前処理操作を自動化

②加圧式による固相抽出の精製効果

③添加回収試験による装置の評価

対象農薬

ポジティブリスト制 GC/MS対象農薬

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	31	85種	10ppm
農薬混合標準液	34	46種	10ppm
農薬混合標準液	48	61種	10ppm
農薬混合標準液	51	26種	10ppm
合計		268種	

*いずれも関東化学社製

前処理フロー

◎前処理フロー 抽出

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

MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

撈拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

アセトニトリル層を50%ACN水で倍希釈

↓
抽出液 (75%ACN水試験溶液)

→ 《自動前処理装置》

分取 1 mL (試料 0.5 g 相当)

└ 固相 C18-30 mg : 精製

└ 洗液 80%ACN水 1mL

流出液

└ 5%食塩水 20mL

└ 固相 PBC-20 mg : 保持

└ 乾燥 (Heガス 1分)

└ 連結固相 PSA-30 mg : 精製

└ 溶出 アセトニトリル (3/7) 1mL

溶出液

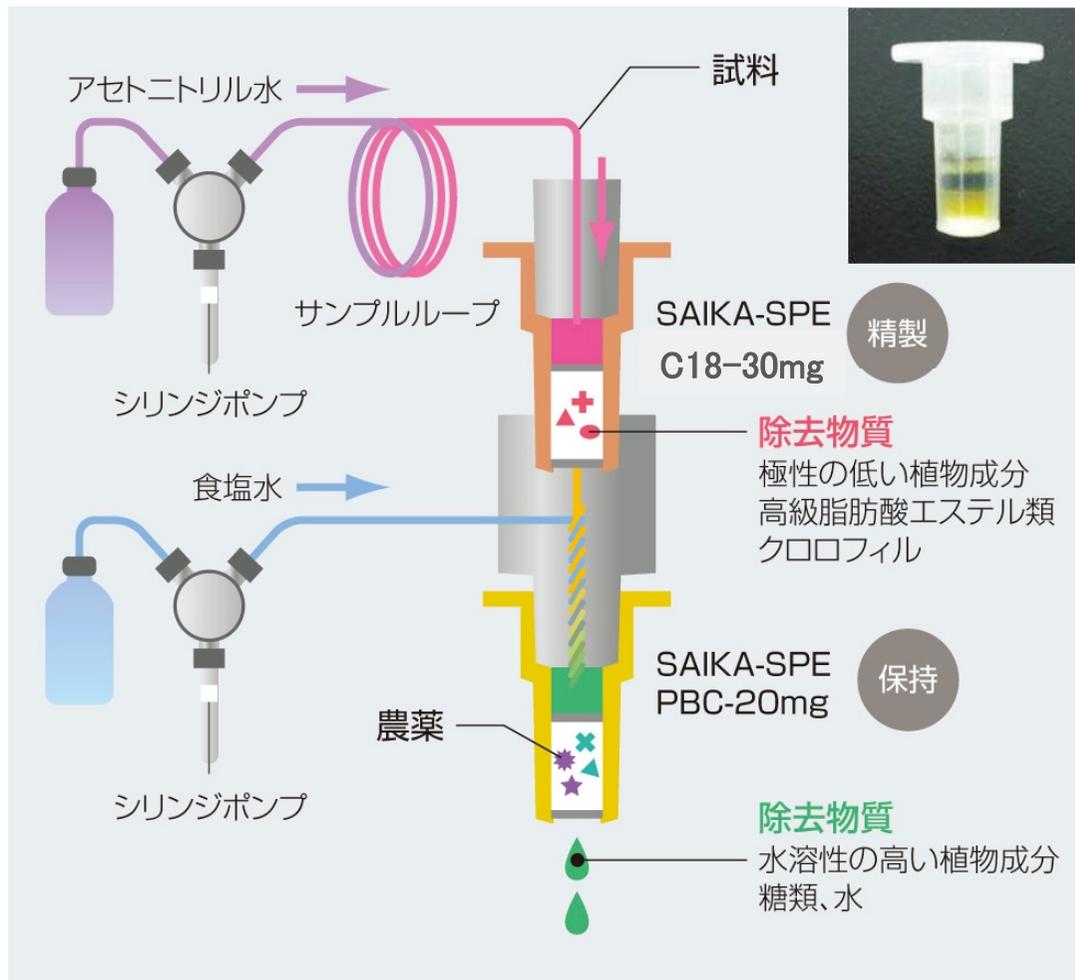
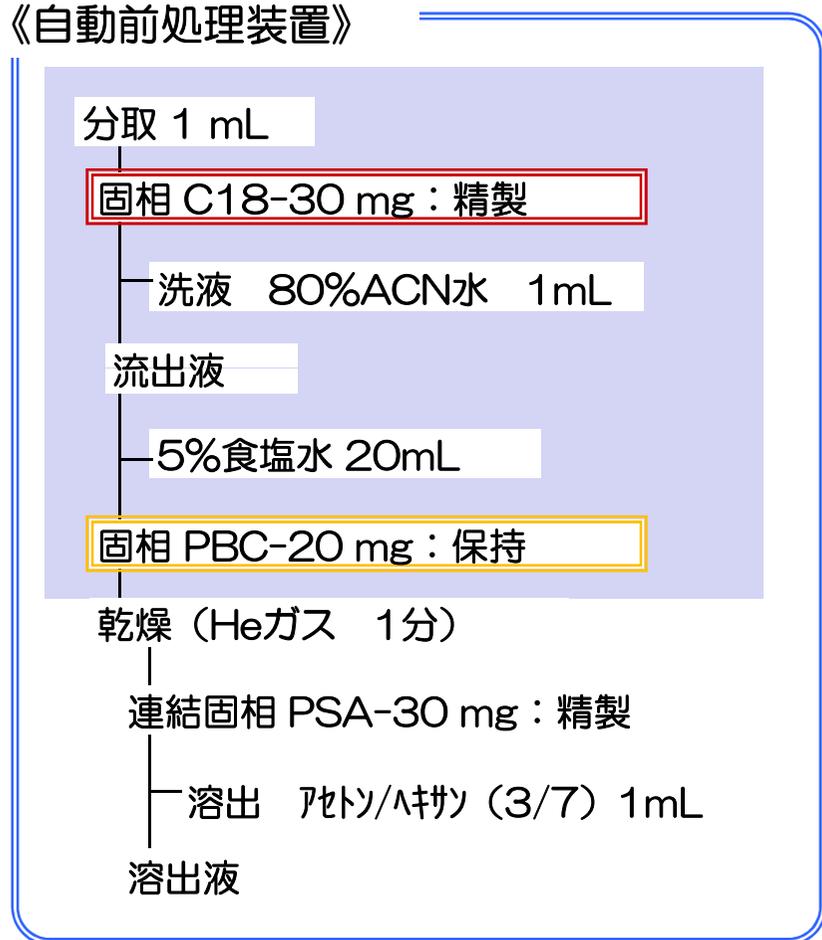
└ 10ppmフェイカトリッド + 1%PEG(300)/アセトニトリル 2uL

定容 (1 mL, アセトニトリル (3/7) で調製)

GC/MS (大量注入25 μL : 試料12.5 mg相当)

工程①精製・保持

《自動前処理装置》



工程②乾燥

《自動前処理装置》

分取 1 mL (試料 0.5 g 相当)

固相 C18-30 mg : 精製

洗液 80%ACN水 1mL

流出液

5%食塩水 20mL

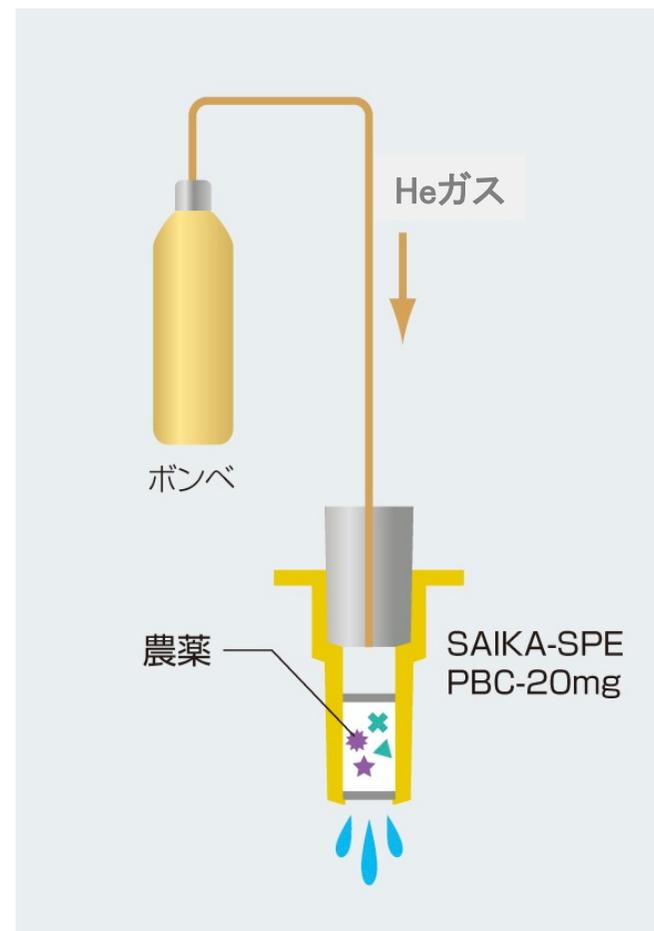
固相 PBC-20 mg : 保持

乾燥 (Heガス 1分)

連結固相 PSA-30 mg : 精製

溶出 70%メタノール (3/7) 1mL

溶出液



工程③精製

《自動前処理装置》

分取 1 mL (試料 0.5 g 相当)

固相 C18-30 mg : 精製

洗液 80%ACN水 1mL

流出液

5%食塩水 20mL

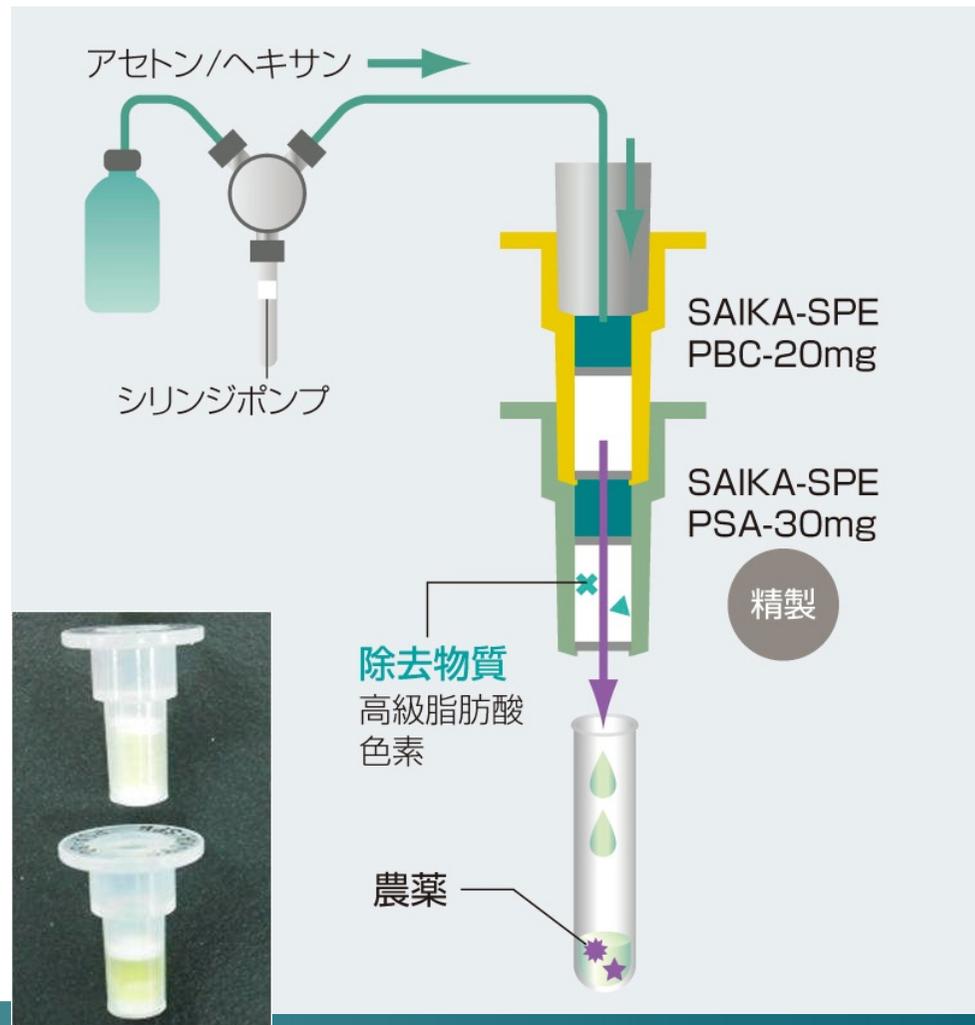
固相 PBC-20 mg : 保持

乾燥 (Heガス 1分)

連結固相 PSA-30 mg : 精製

溶出 アセトン/ヘキサン (3/7) 1mL

溶出液



自動前処理装置の1サイクル

①固相セット

C18-30 mg (上) PBC-20 mg (下)



②コンディショニング (C18+PBC)

アセトン/ヘキサン (3/7) 2mL
 |
 アセトン 2mL
 |
 80%アセトニトリル水 2mL



③固相抽出

C18-30 mg : 精製 PBC-20 mg : 保持

サンプルロード 1mL
 |
 80%アセトニトリル水 1mL
 |
 5%食塩水 20mL と混合
 |
 PBCをHeガスで乾燥 (1分)



④コンディショニング (PSA)

アセトン 2mL
 |
 アセトン/ヘキサン (3/7) 2mL

⑤溶出

PBC-20 mg : 溶出
 |
 連結固相 PSA-30 mg : 精製
 |
 アセトン/ヘキサン (3/7) 1mL
 |
 溶出液

⑥ノズル洗浄

アセトン 3mL × 2回
 |
 80%アセトニトリル水 3mL

★1サイクル (1検体処理時間) 12分

測定条件

自動前処理装置

使用溶媒

STQ-L200 (AiSTI Science)

アセトン

アセトン:ヘキサン (3:7)

アセトニトリル:水 (80:20)

水

食塩水(5%)

乾燥ガス

ヘリウム (圧力 0.6MPa)



GC/MS

PTV Injector

LVI-S200 (AiSTI Science) ; Stomach Insert

Injector Temp.

70°C-120°C/min-240°C-50°C/min-290°C (38min)

Solvent Purge Time

0.3 min

Auto Samplor

CombiPAL; 50 µL Syringe (AMR)

Injection Volume

25 µL

GC

Agilent 6890N

Column

ENV-5MS, 0.25mm i.d. × 30m, df; 0.25mm

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 (8.3min)

MS

JMS-Q1000GC (JEOL)

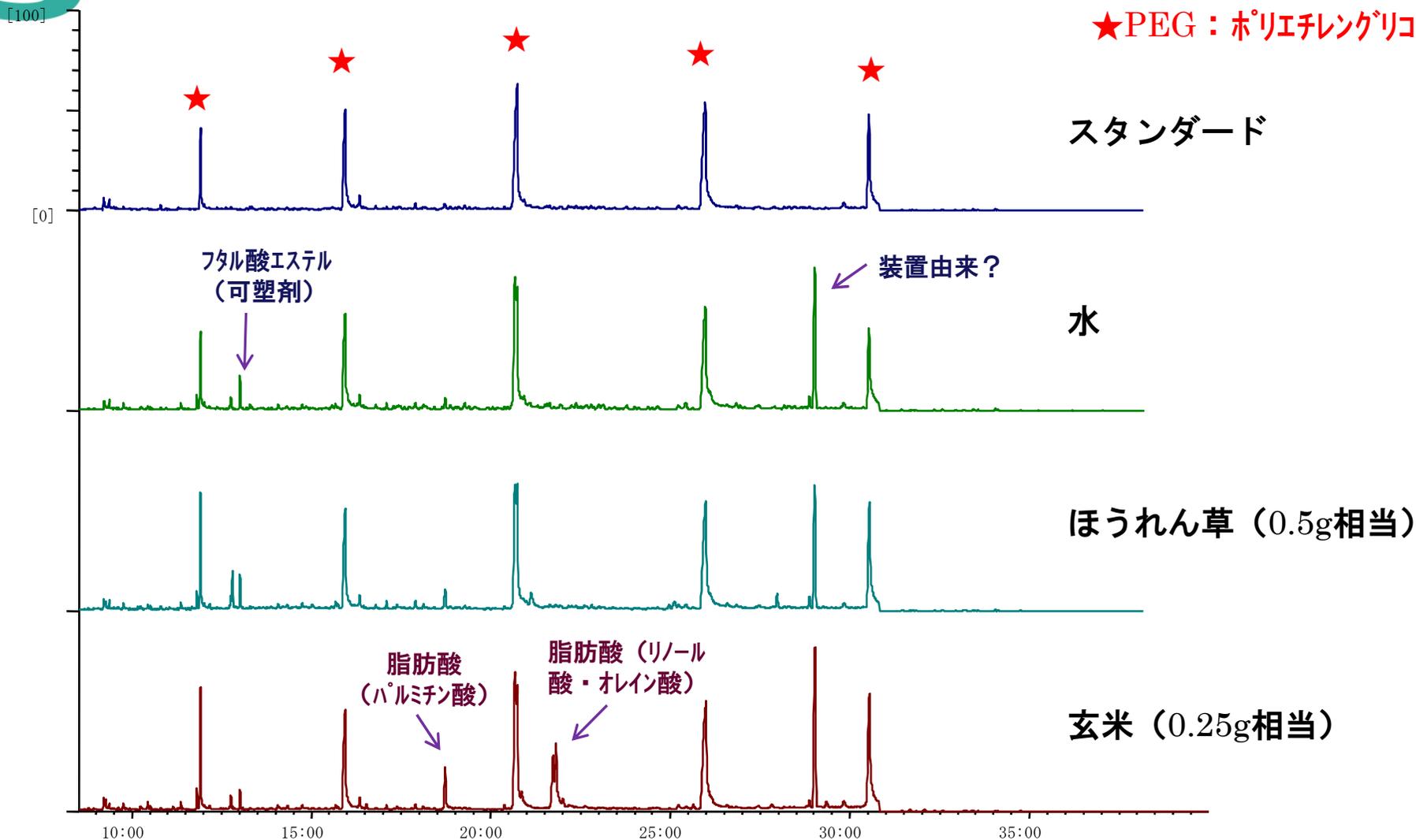
MS Method

SCAN; 70 - 400 m/z (8:30min~30:50min)

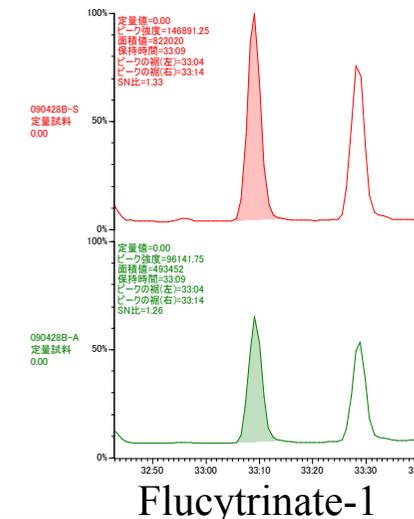
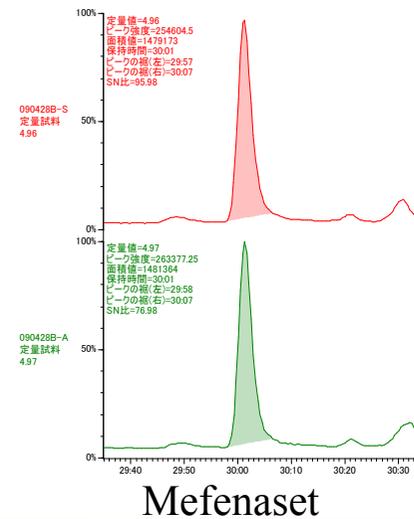
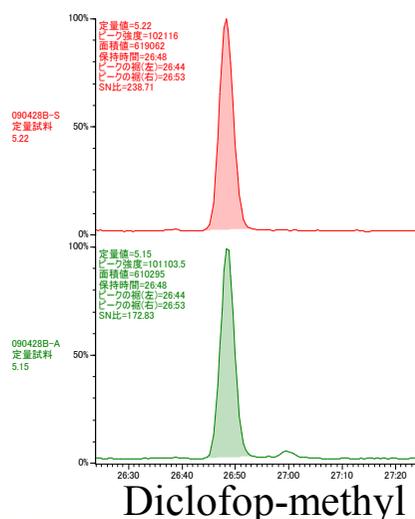
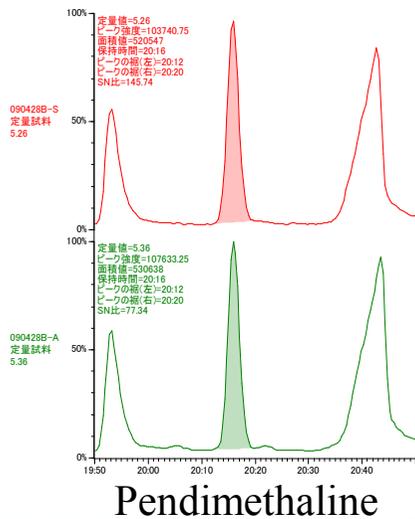
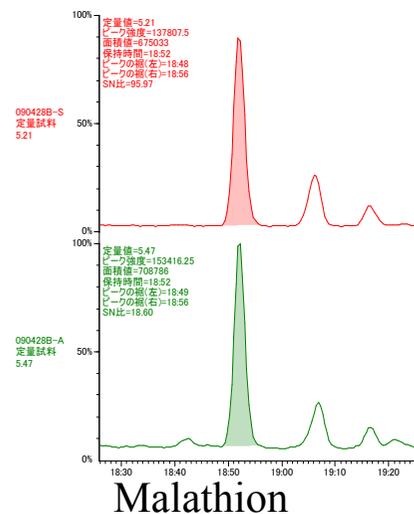
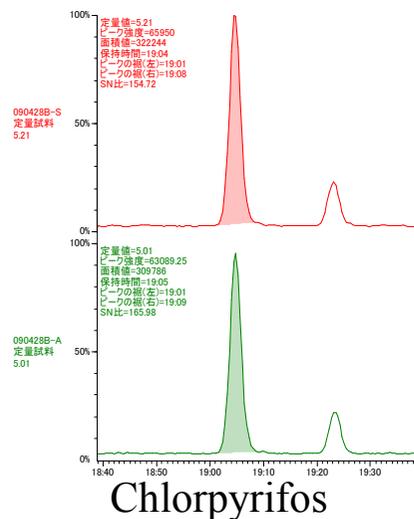
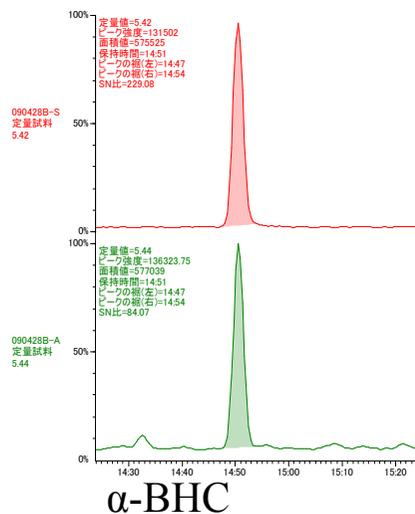
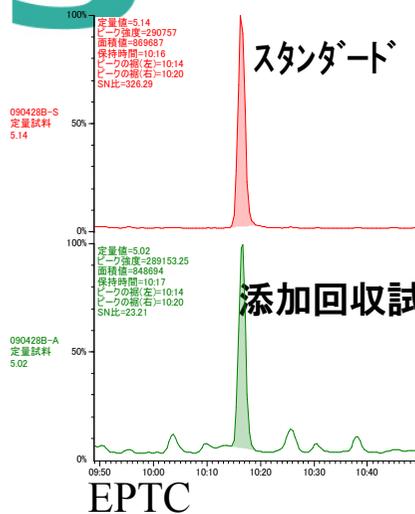
SIM (30:50min~40:00min)

GC/MS SCANクロマトグラム

★PEG：ポリエチレングリコール300



定量イオンクロマトグラム (試料中0.01ppm)



ほうれん草添加回収試験①

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
1 1-Naphthylacetamide	18	8	105	26 BHC-delta	102	8	109
2 3-Hydroxycarbofuran	42	6	109	27 BHC-gamma	90	2	101
3 Acephate	0	0	113	28 BifenoX	104	5	118
4 Acetamipride	2	33	102	29 Bifenthrin	46	7	101
5 Acetochlor	83	4	99	30 Bitertanol-1	132	6	170
6 Acrinathrin	46	16	96	31 Bitertanol-2	97	5	109
7 Alachlor	87	3	102	32 Bromacil	32	8	103
8 Allethrin-1,2	121	10	132	33 Bromobutide	86	3	100
9 Allethrin-3,4	92	3	99	34 Bromofos-methyl	85	4	101
10 Ametryn	63	8	103	35 Bromophos-ethyl	72	6	104
11 Anikofos	93	4	99	36 Bromopropylate	96	3	110
12 Aramite-1	55	8	105	37 Buprimate	96	2	104
13 Aramite-2	94	7	112	38 Buprofezin	90	2	102
14 Aramite-3	99	4	99	39 Busan(TCMTB)	42	19	69
15 Aramite-4	102	4	112	40 Butachlor	93	2	102
16 Atrazine	48	10	105	41 Butamifos	107	5	112
17 Azaconazole	67	9	105	42 Butylate	96	2	106
18 Azinphos-Methyl	91	3	102	43 Cadusafos	104	2	117
19 Benalaxyl	99	3	108	44 Cafenstrolc	110	11	110
20 Bendiocarb	48	8	110	45 Captafol	145	10	142
21 Benfuralin	91	5	113	46 Captan	30	11	71
22 Benfuresate	89	4	102	47 Carbaril	72	7	105
23 Benoxacor	86	4	103	48 Carbofuran	40	5	110
24 BHC-alpha	95	2	105	49 Carboxin	332	8	643
25 BHC-beta	90	2	101	50 Carfentrazone-ethyl	101	1	110

ほうれん草添加回収試験②

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
51 Chlorbenside	78	7	114	76 Cypermethrin-2	94	6	131
52 Chlorbufam	91	5	109	77 Cypermethrin-3	81	6	124
53 Chlorethoxyphos	94	5	108	78 Cypermethrin-4	112	4	151
54 Chlorfenapyr	382	4	409	79 Cyproconazole-1	79	7	103
55 Chlorfenson	111	2	123	80 Cyproconazole-2	77	4	101
56 Chlorfenvinphos-E	98	5	106	81 DCPA	94	2	104
57 Chlorfenvinphos-Z	94	3	104	82 DDD-p,p'+DDT-o,p'	76	6	107
58 Chlorobenzilate	99	2	106	83 DDE-p,p'	57	7	106
59 Chloroneb	89	2	102	84 DEF(tribuphos)	86	5	105
60 Chlorpropham	104	2	118	85 Deltamethrin	42	13	84
61 Chlorpyrifos	89	4	101	86 Demeton-S-methyl	48	10	212
62 Chlorpyrifos-methyl	95	3	107	87 Diallate-1	97	1	109
63 Chlozolinate	94	2	103	88 Diallate-2	99	3	112
64 Cinidon-ethyl	102	3	118	89 Diazinon	93	2	103
65 Clomazone	81	7	109	90 Dichlofenthion	90	3	107
66 Cyanazine	41	8	103	91 Dichlofluanid	0	0	39
67 Cyanophos	90	3	100	92 Dichlorobenzophenone-4,4'	91	3	103
68 Cyfluthrin-1	110	9	151	93 Dichlorvos	18	5	93
69 Cyfluthrin-2	68	15	114	94 Diclocymet-1	90	2	99
70 Cyfluthrin-3	54	31	91	95 Diclocymet-2	88	7	101
71 Cyfluthrin-4	89	4	139	96 Diclofop-methyl	93	3	102
72 Cyhalofop-butyl	96	2	105	97 Dickloran	87	3	110
73 Cyhalothrin-1	59	10	106	98 Dicrotophos	0	0	97
74 Cyhalothrin-2	55	9	101	99 Diethofencarb	88	4	107
75 Cypermethrin-1	60	7	110	100 Difenoconazole-1	95	4	104

ほうれん草添加回収試験③

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
101 Difenoconazole-2	106	9	123	126 Etofenprox	60	6	108
102 Diflufenican	97	2	105	127 Etozazole	86	4	104
103 Dimepiperate	94	3	102	128 Etrimphos	93	2	103
104 Dimethametryn	87	4	105	129 Fenamidone	98	2	109
105 Dimethenamid	72	6	103	130 Fenamiphos	109	5	126
106 Dimethipin	74	3	92	131 Fenarimol	89	5	104
107 Dimethoate	8	25	101	132 Fenbuconazole	90	4	102
108 Dimethylvinphos	90	2	102	133 Fenchlorphos	90	3	106
109 Dioxathion	101	6	118	134 Fenitrothion	102	6	106
110 Diphenamide	73	6	101	135 Fenobucarb	71	6	96
111 Disulfoton	154	6	200	136 Fenothiocarb	97	2	104
112 Disulfoton-sulfone	88	7	102	137 Fenoxanil	88	3	100
113 Edifenphos	94	3	101	138 Fenpropathrin	67	6	107
114 Endosulfan-alpha	82	3	97	139 Fenpropemorph	75	8	108
115 Endosulfan-beta	113	4	122	140 Fensulfothion	78	7	104
116 Endosulfan-sulphate	110	5	119	141 Fenthion	108	2	119
117 EPN	101	6	112	142 Fenvalerate-1	51	9	100
118 Epoxiconazole	95	5	106	143 Fenvalerate-2	59	8	113
119 EPTC	88	4	103	144 Fipronil	93	4	103
120 Esprocarb	94	3	104	145 Flamprop-methyl	95	3	106
121 Ethalfuralin	100	4	115	146 Fluacrypyrim	95	1	107
122 Ethiofencarb	355	12	930	147 Flucythrinate-1	58	9	104
123 Ethion	89	5	105	148 Flucythrinate-2	68	8	113
124 Ethofumesate	100	2	110	149 Fludioxonil	92	4	117
125 Ethoprophos	84	5	101	150 Flufenpyl-ethyl	97	1	105

ほうれん草添加回収試験④

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
151 Flumiclorac-pentyl	102	5	116	176 Isoprocarbe	55	3	101
152 Flumioxazin	98	4	114	177 Isoprothiolane	92	3	99
153 Fluquinconazole	92	3	105	178 Isoxathion	125	3	126
154 Fluridone	91	4	105	179 Isoxathion-ox	97	4	104
155 Flusilazole	97	2	103	180 Kresoxim-methyl	93	2	101
156 Fluthiacet-methyl	109	5	126	181 Lenacil	46	9	100
157 Flutolanil	95	3	102	182 Malathion	96	3	104
158 Flutriafol	66	7	98	183 Mecarbam	89	1	91
159 Fluvalinate-1	51	14	105	184 Mefenacet	94	3	105
160 Fluvalinate-2	47	11	99	185 Mefenpyr-diethyl	96	3	104
161 Formothion	72	4	114	186 Mepronil	105	2	114
162 Fosmet	95	4	104	187 Metalaxyl	48	11	112
163 Fosthiazate-1	62	7	123	188 Methamidophos	0	0	95
164 Fosthiazate-2	63	8	116	189 Methidathion	89	2	101
165 Halfenprox	42	8	111	190 Methiocarb	90	6	103
166 Hexaconazol	92	3	103	191 Methoprene-1	105	12	117
167 Hexazinone	18	7	100	192 Methoxychlor	72	5	90
168 Imazametha-benznthyl-ester	34	8	116	193 Methyl-parathion	114	3	109
169 Imibenconazole	89	8	106	194 Metolachlor	87	2	104
170 Imibenconazole-脱ベンジル体	166	6	174	195 Metominostrobin-E	77	4	101
171 Iprobenfos	91	4	104	196 Metominostrobin-Z	67	6	103
172 Iprodione	4467	3	4633	197 Mevinphos	16	39	120
173 Isazophos	92	3	100	198 Monocrotophos	0	0	108
174 Isofenphos	101	2	107	199 Myclobutanil	92	4	105
175 Isofenphos-oxon	81	6	104	200 Napropamide	93	2	102

ほうれん草添加回収試験⑤

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
201 Nitrothal-isopropyl	98	4	112	226 Pretilachlor	95	2	101
202 Norflurazon	72	6	100	227 Procymidone	93	3	102
203 Oryzalin	ND	ND	ND	228 Profenofos	103	3	110
204 Oxadiazone	101	2	105	229 Prohydrojasmon-1	96	3	104
205 Oxadixyl	33	8	104	230 Prohydrojasmon-2	244	5	301
206 Oxyfluorfen	99	4	110	231 Prometryn	77	6	104
207 Paclobutrazol	90	10	107	232 Propachlor	57	9	107
208 Parathion	100	5	109	233 Propanil	85	9	108
209 Penconazole	92	4	102	234 Propaphos	114	3	126
210 Pendimethalin	94	5	112	235 Propargite(BPPS)-1	89	3	106
211 Permethrin-cis	61	8	123	236 Propargite(BPPS)-2	90	4	103
212 Permethrin-trans	63	8	116	237 Propazine	70	7	109
213 Perthane	64	6	104	238 Propiconazole-1	104	4	111
214 Phenothrin1	58	8	107	239 Propiconazole-2	101	3	105
215 Phenothrin2	54	8	108	240 Propoxur	32	9	107
216 Phenthoate	95	3	101	241 Propyzamide	86	2	102
217 Phorate	111	2	134	242 Prothiofos	67	6	106
218 Phosalone	100	3	108	243 Pyraclofos	99	3	103
219 Phosphamidon	22	8	103	244 Pyraflufen-ethyl	97	2	101
220 Phthalide	92	2	104	245 Pyrazophos	96	3	106
221 Picolinafen	93	3	107	246 Pyributicarb	97	4	116
222 Piperonyl-butoxide	96	2	101	247 Pyridaben	78	5	111
223 Piperophos	102	2	112	248 Pyridafenthion	106	4	115
224 Pirimicarb	23	6	102	249 PyrifenoX-E	84	6	101
225 Pirimiphos-methyl	99	1	108	250 PyrifenoX-Z	83	7	98

ほうれん草添加回収試験⑥

試料中濃度0.01ppm (n=5)

農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率	農薬名	回収率	RSD	Spike 回収率
251 Pyrimethanil	72	4	100	276 Terbutryn	83	5	107
252 Pyrimidifen	94	3	105	277 Tetrachlorvinphos	94	2	103
253 Pyriminobac-methyl-E	82	5	103	278 Tetraconazole	96	3	104
254 Pyriminobac-methyl-Z	87	5	102	279 Tetradifon	88	3	99
255 Pyriproxyfen	85	3	100	280 Thenykhlor	96	3	104
256 Pyroquilon	21	5	97	281 Thifluzamide	93	2	102
257 Quinalphos	95	3	103	282 Thiobencarb	97	2	105
258 Quinoclamine	63	9	115	283 Thiometon	158	4	212
259 Quinomethionate	106	20	107	284 Toklofos-methyl	96	2	105
260 Quinoxifen	88	4	105	285 Tolfenpyrad	88	3	101
261 Quintozen	87	4	106	286 Triadimefon	91	3	108
262 Resmethrin-1	53	6	104	287 Triadimenol-1	104	5	125
263 Resmethrin-2	48	9	106	288 Triadimenol-2	85	6	105
264 Silafluofen	41	3	111	289 Triallate	88	3	105
265 Simazine	32	10	110	290 Triazophos	106	3	116
266 Simetryn	48	8	107	291 Tricyclazole	0	0	103
267 Spirodiclofen	75	7	97	292 Trifloxystrobin	107	1	116
268 Spiroxamin-1	73	10	119	293 Trifluralin	92	5	113
269 Spiroxamin-2	77	8	121	294 Uniconazole	91	3	106
270 Tebuconazole	92	4	104	295 Vinclozoline	96	2	104
271 Tebufenpyrad	96	2	104	296 XMC	56	10	114
272 Tecnazene	94	4	110	297 Zoxamide	89	5	103
273 Tefluthrine	59	7	102				
274 Terbacil	31	8	106				
275 Terbufos	111	3	131				

回収率

0~50%未満

50~70%

70~120%

120%以上



回収率 & 再現性(RSD%)分布

試料中濃度 0.01ppm:一律基準

回収率(%)	ND, 0-50	50-70	70-120	120-	合計
ほうれん草	40	32	213	12	297
RSD10%未満(n=5)	21	27	208	9	265 (89%)

(単位:成分)

まとめ

- 抽出操作に『QuEChERS法』、精製操作に『固相抽出法』を用いた濃縮操作なしの迅速な前処理方法を確立したことで、抽出操作以降の前処理工程の自動化という、さらなる効率化&迅速化が図れ、処理時間12分/検体の自動化が可能になった。
- 固相カートリッジを加圧式で用いることにより、固相内部まで確実に溶液を浸透させることができ、高い精製効果が得られた。
- ほうれん草を用いて試料中濃度0.01ppmで添加回収試験(n=5)を行った結果、297成分中、213成分が70%~120%の良好な回収率が得られた。回収率50%未満の低回収率だった農薬については、食塩水の濃度や混合部の検討で改善を図りたい。
- 再現性(n=5)は、297成分中265成分(89%)がRSD10%未満とかなり良好な結果が得られ、自動化の長所である再現性の向上が確認できた。
- 前処理の自動化により、Total使用溶媒量が約25mL/検体とかなりの省溶媒化が図れ、また洗浄器具も試験管のみとランニングコストの低減が図れた。