2024年8月30日版

残留農薬分析
動物用医薬品分析
カビ毒分析

STQ法ガイドブック2024

Solid Phase Extraction **T**echnique with **Q**uEChERS method

株式会社 アイスティサイエンス

はじめに：アイスティサイエンスとSTQ法について

STQ法：**S**olid Phase Extraction **T**echnique with **Q**uEChERS method

アイスティサイエンスは残留農薬分析においてSTQ法を提案し、「簡単・速い・安い」だけではなく**「高精製・自動化」**と**「安定分析の持続」**をテーマとしています。

・STQ法は国内約100か所の導入実績（一部工程の採用も含む）

・提案開始より約10年の実績による安定運用

・STQ法ユーザーの内、半数が前処理装置をご導入され自動化を実現

・主な導入先：農水省、地方衛生研究所、保健所、登録検査機関、受託検査機関、食品飲料メーカー、農業団体、生協、食品輸入商社、大学など

・当社およびユーザー様による学会発表や論文投稿多数

・ISO17025認定も複数あり
認定書試験法欄に「STQ」の文言記載実績も

・某技能試験で最も多い参加率の手法（次いで厚労省通知一斉試験法）

・AOACに論文掲載

・個別分析法への応用も提案

目次

1，　STQ法の概要　・・・7

2，　試料の調製　予冷式ドライアイス凍結粉砕法　・・・9

3，　抽出　・・・13

【参考】一斉試験法(通知試験法)抽出手順例　・・・19

4，　精製　・・・29

1）概要　・・・30

2）全自動固相抽出装置による精製　・・・35

（1）STQ-GC-B法(自動)　・・・36

（2）STQ-GC-B法の精製　・・・38

（3）STQ-LC法(自動)　・・・46

（4）STQ-LC法の精製　・・・48

3）手動法による精製　・・・49

（1）STQ-GC-B法(手動)　・・・50

（2）STQ-LC法(手動)　・・・52

5，　STQ法の応用例　・・・55

1）残留農薬

（1）STQ-GC-B法アレンジ法

①大豆　・・・56

②アルコール飲料　・・・57

③オリーブオイル　・・・58

④畜水産物(脂質の多い試料)　・・・59

（2）個別分析法

①グリホサート・グルホシネート　・・・60

②ジチオカルバメート系農薬　・・・64

③TPN・キャプタン・カプタホール・ホルペット　・・・68

④ネオニコチノイド　・・・70

目次

2）動物用医薬品

（1）一斉分析 ・・・74

（2）マラカイトグリーン ・・・76

3）カビ毒　アフラトキシン ・・・78

4）その他　メラミン ・・・80

5）【参考】STQ-GC-A法 ・・・82

6，異常回収率の原因と対策 ・・・85

1）異常回収率 ・・・86

2）多段階添加回収試験 ・・・87

3）精製後添加の異常回収率 ・・・88

4）GC-MS測定におけるマトリックス効果 ・・・90

5）抽出工程での損失 ・・・94

6）精製工程での損失 ・・・96

7，補足資料-1　固相抽出の基礎 ・・・97

1）固相カートリッジの基本的な使い方 ・・・98

2）Smart-SPEの種類 ・・・99

3）主な固相カートリッジの使い方 ・・・100

(1)無極性カラム　C18 ・・・100

(2)イオン交換カラム ・・・106

(3)グラファイトカーボンカラム ・・・116

8，補足資料-2　GC-MSの検量線 ・・・119

1）検量線の作成方法 ・・・120

2）定量方法の種類 ・・・123

9，製品紹介 ・・・125

1）全自動固相抽出装置　ST-L400 ・・・126

2）GC用大量注入口装置　LVI-S250 ・・・127

目次

10,　製品カタログ　・・・129
凍結粉砕キット　・・・130
抽出操作　・・・131
全自動固相抽出装置　・・・132
STQ法　前処理キット　・・・132
精製操作　・・・133
固相カートリッジ　・・・134

ガイドブック中の下記マークは弊社HPの掲載の有無を示しています。本ガイドブックと合わせてご活用ください。

試料ごとの豊富なアプリケーションノート

日本食品衛生学会・農薬残留分析研究会など学会で発表した資料

アイスティサイエンス独自の技術　(登録なしでご覧いただけます)

凍結粉砕や抽出や精製などのポイントをビデオで説明

※お断り
- 本ガイドブックで紹介する分析法は一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。またSTQ法は日々改良しており、予告なく変更する場合があります。予めご了承ください。
- 本ガイドブックではわかりやすさ重視するため一部科学的でない表現や誇張した表現をしている場合がありますがご了承ください。

1，　STQ法の概要

STQ法の概要

STQ法：Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS method

○ STQ法は、操作性と高精製を両立した残留農薬分析法です。

残留農薬分析、特に多成分を一斉に対象とする場合は、操作性と精製のバランスが重要となります。例えば、簡便でも精製が不足していると測定装置の汚染や誤定量につながります。一方、精製に重きを置き過ぎると、煩雑さが増し時間も要することになります。STQ法は、抽出・精製・測定・解析のトータルバランスを考慮し設計されています。

抽出はQuEChERS法を参考とし、精製には固相カートリッジを使用しています。QuEChERS法は、欧州ではEN法、米国ではAOACに掲載されている国際的にも標準的な分析方法として広まっていますが、精製にバルク固相（粉状固相）で分散精製を行っているため、精製度の低さが心配との声が多く聞かれます。そこで、STQ法では操作性のよいQuEChERS法の抽出法のみを参考とし、精製には固相カートリッジを採用しています。

また固相カートリッジは数十mgという少量充填のSmart-SPEを開発しました。その他の機能として、ストレート構造による通液・通気がスムーズで、簡単に連結可能な性能を持っています。

精製操作は、独自の試験管ラック（前処理キット）で操作性を追求した手動法と、全自動固相抽出装置（ST-L400）による自動法をご提案し、状況に応じてお選びいただけます。

STQ法のもう一つの特徴として、溶媒濃縮を行わないことによる省力化があります。ただ、これにより、測定装置の感度が必要となります。そこで、GC-MS測定においては、大量注入装置LVI-S250による高感度測定を提案しております。

2,　試料の調製
予冷式ドライアイス凍結粉砕法

2,予冷式ドライアイス凍結粉砕法

概要

○残留農薬分析は試料の均一性が重要です。

食品分析に共通する重要事項の一つに「試料の均一性」があげられます。残留農薬分析も例外ではありません。食品に残留している農薬が偏在または点在している場合、均一性の悪さは定量性の悪さに直結します。同じ試料を分取しても、分析のたびに定量値が異なると基準値判定が難しくなります。例えば、果実などを通常粉砕した場合、果皮と果汁が分離し均一な試料の分取が困難な場合があります。また農薬は物性により、残留しやすい部位が異なることからも均一化が必要です。

近年分析装置の高感度化に伴い、分析試料の少量化が進んでおり試料均一化の重要性が増しています。そこで、アイスティサイエンスは「予冷式ドライアイス凍結粉砕法」を提案しています。この手法を用いることで、試料が粉末となり均一性が増します。その他にも低温粉砕により試料中の酵素活性を抑制できるというメリットがあります。酵素は食品を切断した瞬間に断面で活性化し、夾雑成分を発生させたり農薬を分解するという分析への悪影響があります。夾雑成分の例として、ネギ類における硫黄化合物があげられます。

均一性が増すと、分析に用いる試料の減量も可能となり、分析のコンパクト化、省力化にもつながります。

凍結粉砕と凍結乾燥の違い

■凍結粉砕：試料中の水分も含めて凍結→粉砕(低温脆性を利用)します。

急速冷凍 → **水分は残したまま** → 粉砕

■凍結乾燥：試料を凍結しそこから減圧乾燥させます。

急速冷凍 → **水分昇華(真空乾燥)** → 粉砕

予冷式ドライアイス凍結粉砕のメリット

■パウダー状にまで粉砕可能なため**均一性が向上**

■すじや繊維質が多い試料も**パウダー状に粉砕**

■パウダー状のため**試料採取が容易**

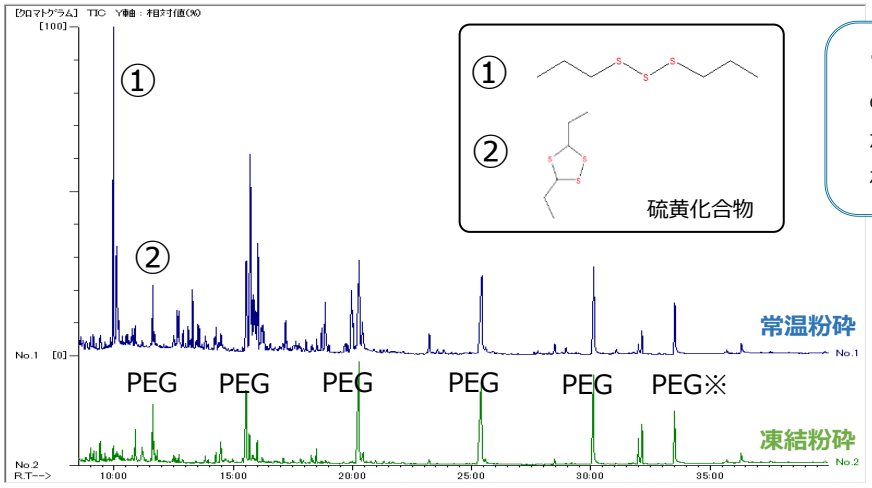
■均一性に伴う**分析のコンパクト化及び省力化**

■ドライアイスによるかさ増しで**少量試料の粉砕も可能**

■水分と固形物が均一化された状態のため、**秤量誤差が低減**

■凍結により**酵素活性を抑制**し、夾雑成分の増加を抑えることにより、キャプタン、クロロタロニルなどの**農薬の分解を抑制**

【凍結粉砕による酵素の活性抑制】



常温粉砕に比べドライアイス凍結粉砕の方が妨害ピーク（特に硫黄化合物）が小さく、バックグラウンドも抑えられる傾向があります。

※PEG：ポリエチレングリコール
疑似マトリックス
(p.92参照)

タマネギを常温粉砕または凍結粉砕しSTQ法にて分析した時のそれぞれのクロマトグラム（TIC）

【粉砕試料の冷凍保管】

常温粉砕した試料を冷凍保管した場合、試料全体が塊となって凍結されます。再分析するときは解凍してから秤量しますがその際試料の水分と固形物が分離してしまい秤量誤差が懸念されます。

一方凍結粉砕の場合は凍結粉末状のまま冷凍保管することができるので再分析する際も試料が均一化された状態で秤量することができます。

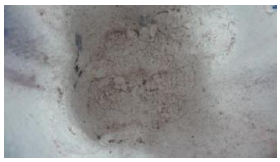
粉砕例

【ブドウの常温粉砕と凍結粉砕の比較】

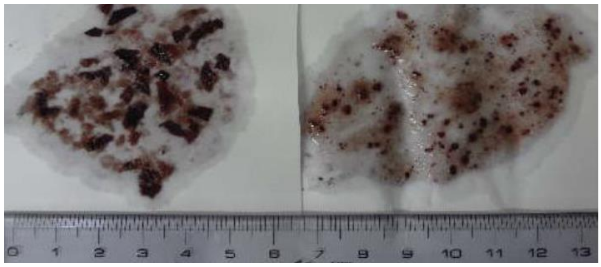
常温粉砕では果皮と果肉の硬さが異なるので果皮が細かく粉砕できません。一方凍結粉砕では果皮もパウダー状に粉砕されるため試料が均一になります。

常温粉砕

凍結粉砕



常温粉砕　凍結粉砕



ブドウ果皮の粉砕方法の比較

常温粉砕では大きな果皮が残っていますが、凍結粉砕では細かく粉砕されています。

【その他の試料】

凍結粉砕をすることで試料が均一化され、常温粉砕での問題点が解決されます。

試料	常温粉砕の問題点	常温粉砕	凍結粉砕
キュウリ	粉砕後水分と固形物に分離しやすく秤量するときは試料をよくかき混ぜて均一化させながら採取する必要があります。		
パイナップル	表皮と果肉の粉砕度合が異なり秤量するときは試料をよくかき混ぜて均一化させながら採取する必要があります。		
ささみ	団子状になり混和性が悪いためかき混ぜて均一化させながら試料を採取する必要があります。		
ゴマ	粉砕時の発熱により試料から油が出てくるためペースト状からそぼろ状になり、試料を均一の採取するのが難しくなります。		

参考文献：佐々野ら,「少量試料サンプリングのためのドライアイス凍結粉砕の検討」,第106日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.115

2,予冷式ドライアイス凍結粉砕法

手順

ほうれんそうの場合

① 試料は重量を量り予め5cm幅にカットしておく。

② 板状またはペレット状のドライアイスの場合は予め粉砕（パウダー状）しておく。

③ ①のカットした試料を予冷容器(ビニール袋)に均等になるように入れる。

④ ③の試料に試料と**同量のドライアイス**を上から均等に振りかけて加え、**約３分間**放置する。

⑤ ④の試料とドライアイスを予冷容器(ビニール袋)ごと振り、試料全体を凍結させて予冷する。

⑥ 粉砕機にドライアイス**100 g**を入れ15秒程粉砕しながら容器を冷却する。（粉砕機の予冷）

⑦ ⑤の予冷した試料と残存ドライアイスを⑥のドライアイスが入っている粉砕機に入れて、試料を凍結粉砕する。

留意点

- **注意：ドライアイスは急激に昇華するため、ふた等にガス排気穴が必要です。危険ですので密閉容器での操作はお控え願います。**

- 試料、粉砕機、薬さじ(試料秤量時使用のものを含む)はドライアイスで十分冷却します。
  常温のまま使用すると試料がシャーベット状になって器具に付着し操作性が悪化します。

- ドライアイスが揮発したかどうかの目安
  - ・試料温度が-20℃程度になっている
    (ドライアイスは-79℃で気化します)
  - ・重量変化がない
  - ・体積変化がない

工程概要

試料細切

試料の予冷（試料とパウダー状ドライアイスを混合）

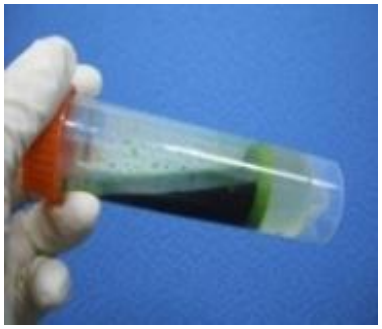
予冷した試料とドライアイスを粉砕

ドライアイスが昇華後も試料はパウダー状のまま

※凍結粉砕については「予冷式ドライアイス凍結粉砕法ガイドブック(http://www.aisti.co.jp/wp/wp-content/uploads/2022/10/touketsuguidebook.pdf」もご参照ください。

参考文献：佐々野ら,「少量試料サンプリングのためのドライアイス凍結粉砕の検討」,第106日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.115

3， 抽出



3,抽出

概要

STQ法の抽出はQuEChERS法を参考とした抽出法です。この方法では簡便・迅速に多成分の農薬を抽出することができます。

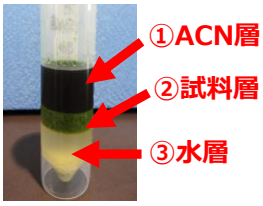
【QuEChERS法抽出のメリット】

- **抽出時に液液分配と塩析を同時にできる**
- **クエン酸塩によりpHの緩衝作用を利用できる**
- **使い捨て容器を使用するため分液ロートなどガラス器具が不要**

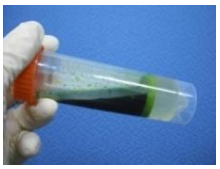
抽出のポイント

液液分配と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します。

①ACN層：農薬
②試料層
③水層(除去部)：糖等の水溶性の夾雑成分

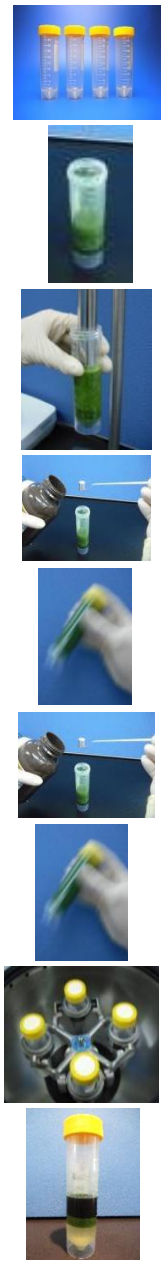


遠心分離後


試料層が厚い場合は傾けても混ざりません。

抽出フロー

※用語　ACN：アセトニトリル
NaCl：塩化ナトリウム
$MgSO_4$(無水)：無水硫酸マグネシウム



試料採取 10 g ・・・❶

- 添加 標準溶液(添加回収試験の場合) ・・・❷
- 添加 水 (10－試料の含水量) mL ・・・❸
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g ・・・❹
- ・・・❺

振とう溶解 10秒 ・・・❻

- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう 1分 ・・・❼

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層)

↓

分取して精製工程へ ・・・❽

抽出フロー解説・留意点

❶ 穀類 ・ 豆類 5 g　その他難試料 1～2 g
茶、香辛料等の難試料は試料を減量します。その場合は希釈倍率が高くなるため測定感度にもご注意願います。

❷ 添加溶液は試料量の1/20以下になるようにします。また標準溶液の溶媒はACNに溶解するものをご使用ください。
添加後は30分程度放置することを推奨します(p.15(2)参照)。

❸ 試料の水分含量が80%未満の場合は水を添加します。水添加には2つの目的があります。
①液液分配時の水分量を調整する。
試料の水分含量と合わせて10 g相当となるように添加します。
②溶媒を試料に浸透させ農薬を抽出しやすくする。
乾燥試料では水添加後試料全体に水を十分に浸透、膨潤させるため約15分放置します。
水添加の詳細はp.15(1)をご覧ください。

❹ 4種類の塩を以下の目的で添加します。
①NaCl：塩析効果
②クエン酸3Na2水和物
③クエン酸水素2Na1.5水和物
} 緩衝作用(pH調整)
④$MgSO_4$(無水)：塩析効果
タンパク質変性により試料層を形成していると考えられます。

❺ 大豆など遠心分離後に試料層が厚く上層が少なくなる場合は、セラミックホモジナイザーを2個入れて振とうします(p.56参照)。

❻ NaClとクエン酸2種を十分溶解してから$MgSO_4$(無水)を添加します。溶解が不十分だと緩衝作用が不十分になったり$MgSO_4$(無水)が固まって正しい分配ができない場合があります。

❼ 激しく振とうし混和させるため手操作を推奨します。振とう機を使用する場合は、チューブ内で試料が撹拌されていることをご確認願います。

❽ 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層を分取します。

補足・参考資料

(1)水添加

試料の水分含量が80%未満の場合は水を添加します。水添加には2つの目的があります。

①液液分配時の水分量を調整する。

水は試料中の水分量も含め約10 gになるように調整します。これはあとで添加する塩類が水10 mLに対する量に設定しているためです。(液液分配での塩析効果で塩が飽和になるように添加します。)

従って試料の含水比率が小さいもの(水分含量80 %未満)については試料秤量後に水を添加する必要があります注1)。各試料の水添加例については下記「水添加量の目安」をご覧ください。また試料中の水分量は「日本食品成分表(書籍)」や文部科学省のWebサイト（食品成分データベースhttps://fooddb.mext.go.jp/index.pl）が参考となります。

②溶媒を試料に浸透させ農薬を抽出しやすくする。

穀類、豆類、茶など乾燥した試料では抽出溶媒が組織内に浸透しにくいため、予め水で試料を膨潤させることで溶媒が組織内に浸透しやすくなり、農薬が抽出されやすくなります注2)。

水添加量の目安

試料	水分（%）	試料秤量（g）	添加水量（mL）	備考
果実・野菜	＞80	10	0	
例)ほうれんそう	92.4	10	0	
果実・野菜	25~80	10	X	X=10 g－試料10 g中の水分量
例)えだまめ	71.7	10	3	
穀類・豆類	15未満	5	10	
例)玄米	15未満	5	10	
抹茶	15未満	1～2	10	夾雑が多いため試料減量
香辛料	15未満	1～2	10	夾雑が多いため試料減量
オリーブオイル	15未満	1～2	10	抽出時、油に分配するため試料減量
はちみつ	15未満	5	10	
ドライフルーツ注3)	40未満	5	X	X=5 mL＋(5 g－試料5 g中の水分量)
例)乾燥いちご	15.4	5	9.23	5 mL+(5 g－5 g×15.4/100)=9.23 mL

注1) 水添加後は薬さじで混合するか、またはPPチューブに蓋をして振とうし、試料とよく混合させます。試料が完全に湿っていることをご確認願います。

注2) 穀類・豆類・茶など乾燥試料は水添加・混合後約15分放置し、試料を膨潤させます。

注3) 水は粉砕時に添加することもできます。その場合、秤量は試料の重量が5 gになるよう秤量します。

(2)標準溶液の添加

抽出溶媒がアセトニトリルのため添加用標準溶液もこれに溶解する溶媒である必要があり、アセトニトリルやアセトンをお勧めします。ヘキサンなど溶解しにくいものは、抽出溶媒と分離し回収率が悪化する原因となります。また添加する溶液量は試料の1/20以下をお勧めします。溶媒の体積が増えると抽出液が希釈され定量値に影響を与えます。

【標準溶液添加時の注意点】

①添加する標準溶液はできるだけ少量にとどめ、試料量の1/20以下になるようにする。

②標準溶液を添加後はよく混和し、30分程度放置した後に抽出操作を行う。

③添加する標準溶液はできるだけヘキサン溶媒を含まないようにする。

参考文献：1)日本農薬学会「残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ」　改訂4版　2018
2)坂ら,「玄米および小麦試料の残留農薬分析における抽出時の水浸漬効果」,日本農薬学会誌 31 (4),pp.431-434(2006)

(3)pH調整

柑橘類(レモン)などpH3未満の酸性試料では、抽出前に5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH6～7程度に調整が必要な場合があります。酸性試料ではホモジナイズ後に添加する2種類のクエン酸ナトリウムによる緩衝作用の効果が得られない場合があるためです。

【pH調整手順の概略】

pH調整用試料の秤量 → pH調整 → 添加量の確定 → 試験用試料の秤量 → 農薬添加(添加回収試験の場合) → pH調整

【pH調整方法】

①5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液作製：水酸化ナトリウム20 gを超純水100 mLに溶解する。
※作製量は適宜調整願います。
②試験する試料とは別にpH調整用の試料を用意する。
③5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を100 μLずつ添加する。その都度薬さじで試料とよく混合し、pH試験紙でpHを確認する。
④ pH6～7になるまで③を繰り返えし、 5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液の必要量を決める。
⑤試験用の試料を秤量後、農薬を添加しよく混合する(添加回収試験の場合)。
※農薬とアルカリ溶液が直接接触すると農薬が分解する可能性があるためです。
⑥⑤に④の量の5 mol/L水酸化ナトリウムを添加してよく混合してから試験を開始する。

(4)抽出法のアレンジ

試料によっては抽出法をアレンジすることにより抽出効率や定量性を高めることができます。大豆などで効果が見られます。

①15mL抽出法

抽出時のアセトニトリル量を15mLに増やすことで抽出効率を高めることができます。

試料採取 10 g（穀類5 g）
- (添加 水 10 mL 穀類の場合)
- 添加 ACN **15** mL　**ACN添加量を増加**

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分
- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 15秒
- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

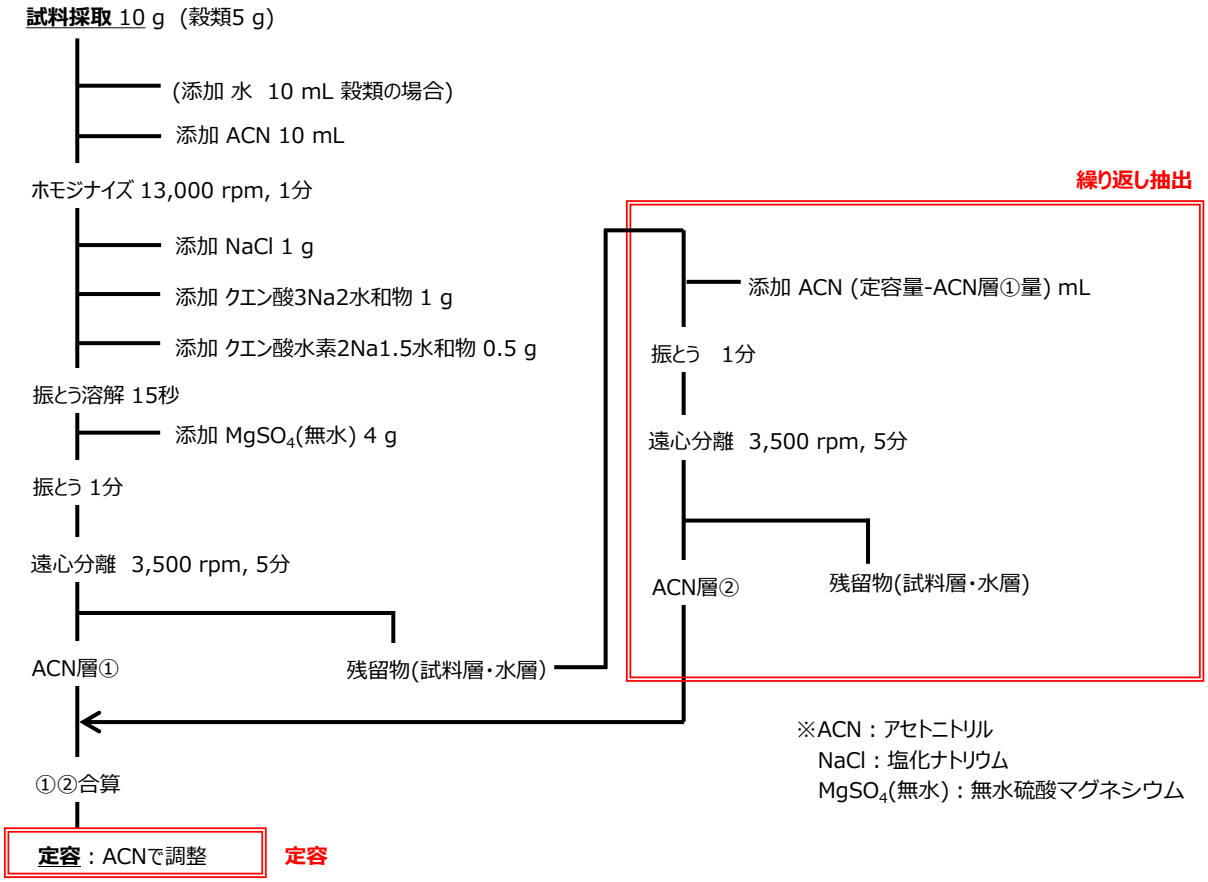
ACN層

※ACN：アセトニトリル
NaCl：塩化ナトリウム
$MgSO_4$(無水)：無水硫酸マグネシウム

②繰り返し抽出定容法

抽出を2回繰り返して得られた抽出液を合算・定容することで抽出効率とともに定量性も高めることができます。

【操作手順】
抽出塩析→遠心分離→アセトニトリル層をメスフラスコに分取（アセトニトリル層①）→残留物にアセトニトリル再添加→振とう抽出→遠心分離→アセトニトリル層②→アセトニトリル層①に合わせ定容



参考文献：
1)http://www.quechers.com
2)Masahiro Okihashi, Food 1 (2007) pp.101-110
3)佐々野ら，「作物中残留農薬の 迅速一斉分析法-GC/MS編-」,第94回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集p.33, B-7
4)谷澤ら，「LC/MS/MSを用い た残留農薬の多成分迅速一斉分析法の 検討」,第95回日本食品衛生学会学術講演会講 演要旨集 p.39, A-21
5)佐々野ら，「GC/MS大量注入を 用いた食品中残留農薬の迅速一斉分析 法の評価」,第95回日本食品衛生学会学術講演会講 演要旨集 p.40, A-22
6)Michelangelo Anastassiades et al., J. AOAC Int., 86, pp.412-431(2003)
7)佐々野ら，「STQ法における繰り返し抽出定容法の検討」,第105回日本食品衛生学会学術講演会講 演要旨集
8)小西ら，「STQ法(残留農薬一斉分析法)における抽出溶媒量の検討,第113回日本食品衛生学会学術講演会講 演要旨集 p.51, A-17

一斉試験法(通知試験法)
抽出手順例

【該当試験法】

GC/MSによる農薬等の一斉試験法 (農産物)

LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)

LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ (農産物)

3,抽出 【参考】一斉試験法(通知試験法)抽出手順例 (202403 ver.)

1,抽出フロー

抽出フロー

試料秤量　　果実、野菜　　：20.0g
　　穀類、豆類及び種実類：10.0g
　　茶及びホップ　　：5.00g

(←水　20mL　※穀類、豆類及び種実類、茶及びホップの場合)

(水を添加した場合30分間放置
※ GC/MSによる農薬等の一斉試験法、
LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱでは15分間放置)

← アセトニトリル 50mL

↓

ホモジナイズ 1min：1 回目

↓

吸引ろ過：1 回目 → 残留物

↓

ろ液①

残留物 ← アセトニトリル 20mL

↓

ホモジナイズ 1min：2 回目

↓

吸引ろ過：2回目

↓

ろ液② → 混合

↓

定容：100 mL　アセトニトリルで調整

2,使用する器具・試薬

使用する器具・試薬

【吸引ろ過】

・吸引鍾
・漏斗(ブフナー型)
・三角フラスコ等(廃液受け・適切な容量のもの)
・100mL短型メスフラスコ(抽出液受け)
・ろ紙(5A)
・吸引ポンプ(コックがあれば便利)
　アスピレーターでも可
・薬さじ
・セライトNo.545(富士フィルム和光純薬)
・水

※写真は一例です。

吸引ポンプとコック

【抽出】

・ジェネレーターなどホモジナイズ抽出する装置
・容器　使い捨て容器でも可
・ピンセット
・メスシリンダー
・50 mL遠沈管(1本：溶媒入れ)
・アセトニトリル
・駒込ピペット

ジェネレーター

50mL遠沈管

＜容器の例＞
①ホモジナイザーカップ
②アズワン アイボーイ PP広口びん 250mL
③AGCテクノグラス・IWAKI 遠沈管 100mL　2355-100シリーズ
※②③は使い捨て容器

3,準備

(1) 吸引ろ過の準備

①吸引鍾の中に廃液受け用の三角フラスコ等を入れ、上に漏斗とろ紙(5 A)をセットする。

②吸引しながら少量の水を注ぎろ紙を漏斗に密着させる。
(流出液は廃棄)

③漏斗にセライトを適量（④で厚さ1cm程度になる量）入れる。

④水（セライトが完全に浸る程度）を加えた後、吸引する。
（流出液は廃棄）
※水を加えた後、吸引するとセライトが平らになる。

⑤吸引が終わったら吸引鍾の中の三角フラスコ等を100mLメスフラスコに交換する。

(2) 抽出溶媒の準備

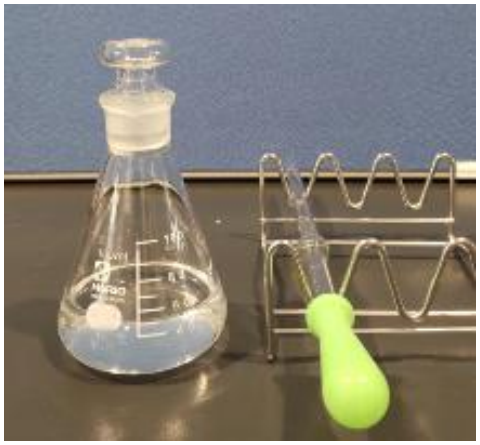
各工程で使用する下記①～③の溶媒はすべて100mLメスフラスコに回収する。

① 1 回目の抽出溶媒：アセトニトリル　50mL

② 2 回目の抽出溶媒：アセトニトリル　20mL

1 回目抽出後の刃の洗浄および 2 回目の抽出溶媒として使用

③器具洗い込み溶媒：アセトニトリル　適宜



4,抽出・吸引ろ過

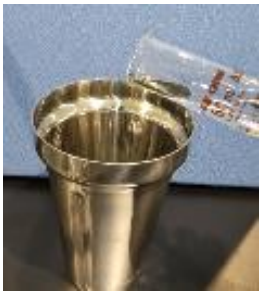
【果実・野菜の場合】

(1) 試料秤量と抽出溶媒の添加

①試料を容器に秤量する。

果実、野菜：20.0g

②１回目の抽出溶媒アセトニトリル50mLを容器に入れる。



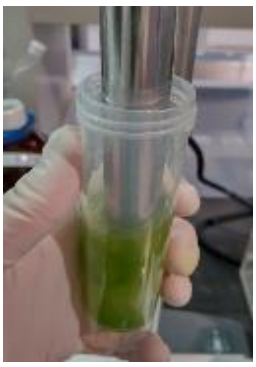
(2) 抽出・ホモジナイズ・・・１回目

①約10,000rpmで１分間ホモジナイズする。

②（必要に応じて）ピンセットで刃の間の試料を回収する。

③アセトニトリル20mLを遠沈管に入れホモジナイザーの刃を洗浄する。

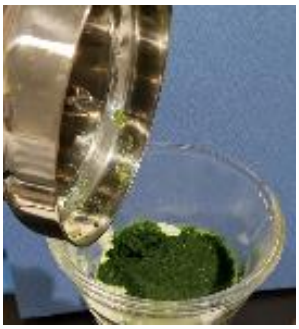
※洗浄後のアセトニトリルは2回目の抽出溶媒として使用するので
捨てない。



(3) 吸引ろ過・・・１回目

①ホモジナイズした試料と抽出液を漏斗に流し込み吸引ろ過する。

※試料によっては泡立ってメスフラスコから吹きこぼれる場合があるので注意する。
泡立った場合は速やかに吸引を停止し、しばらく静置後に再開する。コックがついている場合はコックの開閉でも調整可能。



②セライトの上の残留物を薬さじで容器に回収する。

※このときできるだけセライトが入らないようにする。

③薬さじに付着した試料も（ピンセット等を用いて）容器に回収する。

(4) 抽出・ホモジナイズ・・・2回目

①１回目の吸引ろ過(4,(3)②③)で残留物を回収した容器に、１回目抽出後の刃を洗浄した洗液（4,(2)③）を入れる (赤枠)。

4,(2)③１回目の抽出・ホモジナイズで刃を洗浄した洗液

4,(3)②③で残留物を回収した容器

※空になった遠沈管はこのあと4,(4)④で使用するので捨てない

②約10,000rpmで１分間ホモジナイズする。

③（必要に応じて）ピンセットで刃に付着している試料を回収する。

④空になった4,(4)①の遠沈管にアセトニトリル約10mLを入れ、２回目抽出後の刃(4,(4)③)を洗浄する (赤枠)。

遠沈管にアセトニトリル約10mLを入れる

4,(4)①の遠沈管

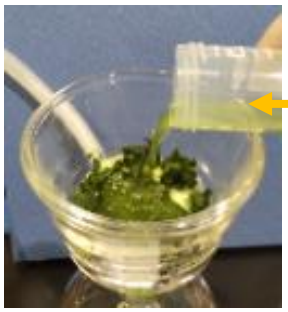
２回目抽出後の刃を洗浄

※この洗浄液は4,(5)②で吸引ろ過するので捨てない

(5) 吸引ろ過・・・2回目

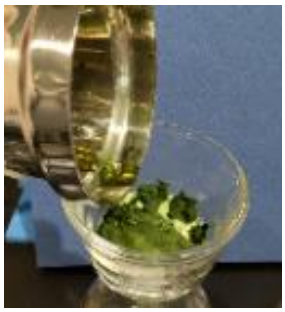
①ホモジナイズした試料と抽出液を漏斗に流し込み吸引ろ過する。

②遠沈管の刃の洗浄液(4,(4)④)も漏斗に流し込み吸引ろ過する。

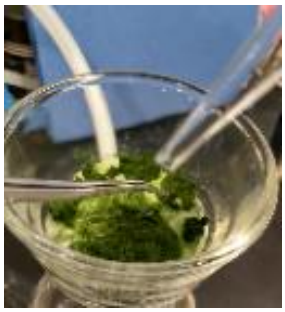


③少量のアセトニトリルで使用した器具（容器、ピンセット、漏斗などの内側）を洗いこみ、洗液を吸引ろ過する。

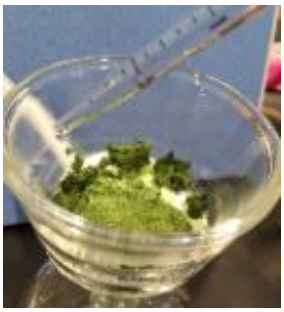
※ろ液が100mLを超えないようにメスフラスコ内の液量を見ながら行う。



容器



ピンセット
(使用した場合)



漏斗

吸引ろ過が終わった状態
(写真は茶色だが実際は緑色)

(6) 定容

アセトニトリルで100mLに定容する。

※吸引ろ過が終わった直後は溶液の温度が下がっているため、常温に戻ってからアセトニトリルで定容する。

参考文献：
1)厚生労働省：一斉試験法(通知試験法) https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html
2)志田(齋藤)ら, 「GC-MS/MSを用いた残留農薬一斉試験法の簡便化の検討～通知一斉試験法の精製方法の改良～」,第119回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集p.84, P-14

4,　精製

1）概要

2）全自動固相抽出装置による精製

（1）STQ-GC-B法

（2）STQ-GC-B法の精製

（3）STQ-LC法

（4）STQ-LC法の精製

3）手動法による精製

（1）STQ-GC-B法

（2）STQ-LC法

1）概要

4,1)概要

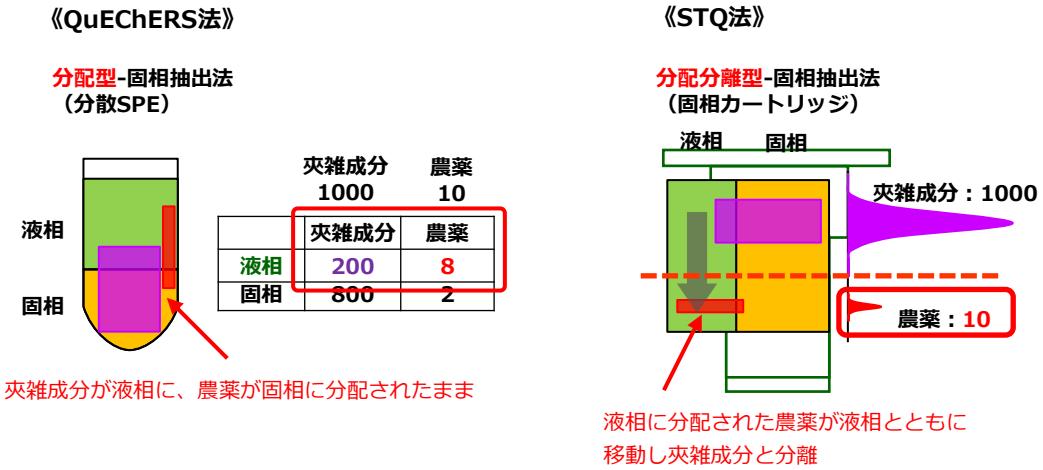
精製の概要

固相抽出による精製には固相を粉状のまま使用する「バルク固相」と「固相カートリッジ」として使用する方法があります。これらは固相と試料の相互作用の原理が異なるため精製効果にも違いが見られます。STQ法ではより精製効果の高い「固相カートリッジ」を使用します。

（1）分散SPEと固相カートリッジの精製効果の違い

同じ固相(充填剤)でも粉状のままバルク固相として使用する分散SPEと、固相カートリッジとして使用する場合では精製効果が異なります。分散SPEでは、固相の粒子と液相中の化合物（農薬や夾雑成分）の接触により、その親和性に応じて固相あるいは液相に「分配」されますが農薬と夾雑成分は分離されません。一方、固相カートリッジではカラム性能が得られ、固相と液相の相互作用が最大限に活かされ**分画・分離**が可能となり農薬と夾雑成分が分離されます。測定での分離カラムと同様の理論です。

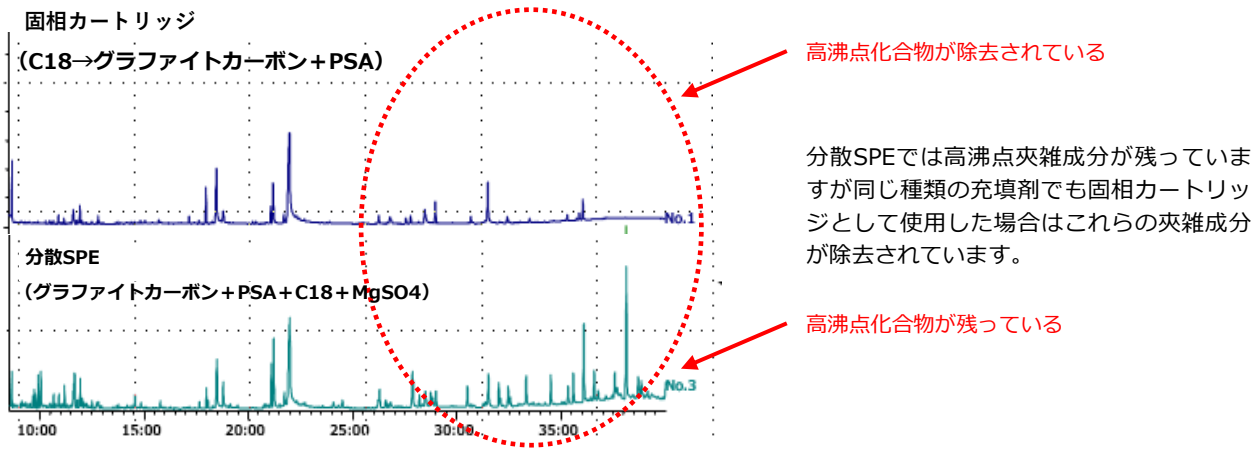
分配型-固相抽出法と分配分離型-固相抽出法のイメージ



試料中に農薬が10、夾雑成分が1000あると仮定します。それを分散SPEで振とうにより分配すると分配後の液相にも夾雑成分が分配されており、固相にも農薬が一部分配されています。従ってこの液相を測定すると200の夾雑成分が存在し、農薬は10のうち2が固相に分配されたため8しか回収されないことになります。

一方固相カートリッジでは夾雑成分は通液により固相と液相の間で分配されながら固相をゆっくり進み、農薬は固相と液相の間で分配されながら液相とともに移動するため、農薬が固相から溶出したところで通液を止めることで農薬と夾雑成分が分離され、溶出液には農薬が10回収されます。

【実試料における精製効果の比較例】



ほうれんそうにおける分散SPEと固相カートリッジの違い

(2)STQ法の特長

固相カートリッジを用いたSTQ法の精製操作は、全自動固相抽出装置（ST-L400）による自動法と、独自の試験管ラック（前処理キット）で操作性を追求した手動法をご提案しており状況に応じてお選びいただけます。

精製には「GC-B法」と「LC法」があり、対象農薬により精製法を分けています。これによりGC法の場合は高極性夾雑成分を、LC法の場合は低極性夾雑成分を除去することができるためより精製効果を高めることができます。

両方法とも充填量が数十mgと少ない固相カートリッジ「Smart-SPE」を用いて精製を行います。またSTQ法では省力化のためエバポレーターによる濃縮操作はありません。そのため前処理後の試料は希釈されていますが、GC-MS測定においてはGC用大量注入口装置LVI-S250を使用し、大量注入を行うことで感度を確保しています。

全自動固相抽出装置 ST-L400

前処理キット

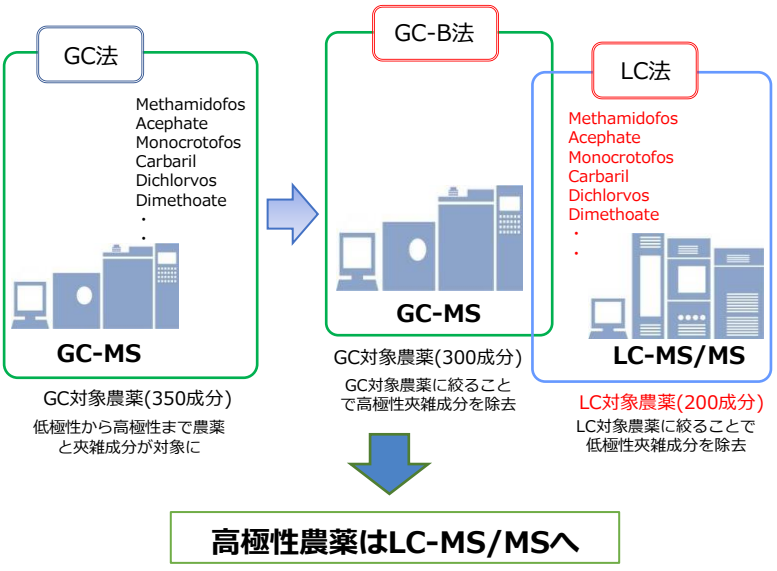
GC-B法

- 精製効果が高く加工食品にも対応
- 精製固相の追加や溶出溶媒の変更が可能
- アセフェート、メタミドホスなどの高極性農薬は対象外(LC法で対応)
- 操作時間は約30分/4検体
  (コンディショニング等準備時間は除く)

※「【参考】STQ-GC-A法」はp.82をご覧ください。

LC法

- 通知一斉試験法Ⅰ法・Ⅱ法の同時分析が可能
  ※Ⅱ法は酸性農薬対象
- 操作時間は約15分/4検体
  (コンディショニング等準備時間は除く)



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！

(3)STQ法で使用する主な固相

GC-B法			LC法		
固相	目的	対象試料	固相	目的	対象試料
C18-50	無極性夾雑物の除去	すべて	C18-50	無極性夾雑物の除去	すべて
C18-50(自動)	目的物質の保持	すべて			
PBX-10(手動)注1)					
PSA-30	有機酸等イオン性夾雑物の除去	すべて	C18-30	無極性夾雑物の除去	すべて
GCK-20注2)	平面構造夾雑物の除去	色素を多く含む試料、柑橘類など			
SI-30	カフェインの除去	茶などカフェインを多く含む試料	PSA-30	有機酸等イオン性夾雑物の除去	すべて
SAX-30	脂肪酸の除去	穀類など脂肪酸を多く含む試料			

注1)PBX：ポリマー系表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤

注2)本ガイドブックで紹介しているグラファイトカーボンにはGCKとGCSがあります。これらは製品名称の違いであり、使用目的及び性能は同等です。現在はGCKの販売となっております。

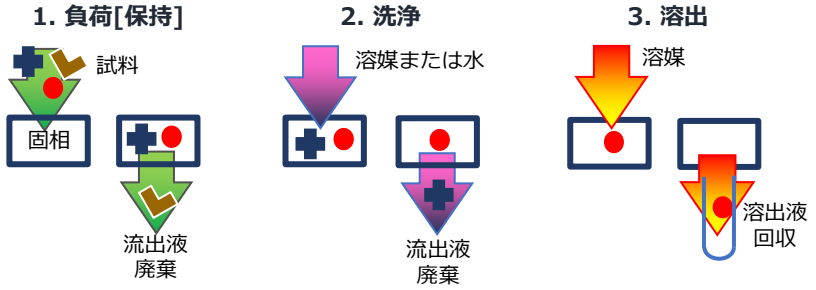
4,1)概要

用語の定義

本ガイドブックでは精製フローにおける用語を以下のように定めています。ご了承ください。

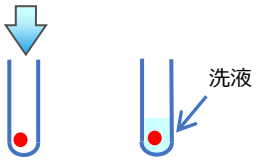
- **負荷[通液]：** 試料溶液中の夾雑成分を固相に保持させ、目的物質は固相から流出させる。流出液は回収する。
- **負荷[保持]：** 試料溶液中の目的物質を固相に保持させ、夾雑成分は固相から流出させる。流出液は廃棄する。
- **通液　：** 溶媒を固相に通液し負荷[通液]で固相に残った目的物質を流出させる。流出液は回収する。
- **洗浄　：** 溶媒または水を固相に通液し、夾雑成分を固相から流出させる。流出液は廃棄する。
- **溶出　：** 溶媒を固相に通液し、固相に保持していた目的物質を溶出させる。溶出液は回収する。

■目的物質を固相に保持させ、夾雑成分を洗浄後、目的物質を溶出する場合

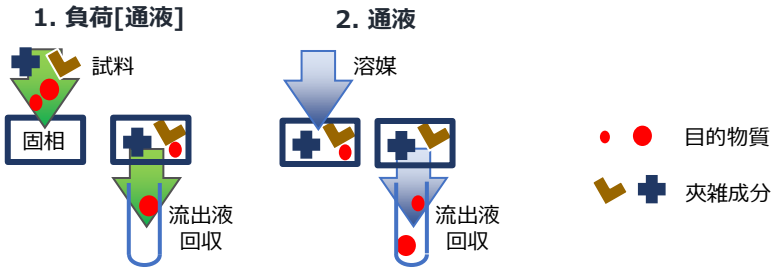


●洗液：

試料溶液が入っていた試験管を溶媒などで洗い込んだ溶液。



■夾雑成分を固相に保持させ、目的物質を回収する場合



その他、以下の略号を使用しています。

- **ACN：** アセトニトリル
- **NaCl：** 塩化ナトリウム
- **$MgSO_4$(無水）：** 無水硫酸マグネシウム
- **PEG：** ポリエチレングリコール

4,1)概要

STQ法で使用する試薬の調製方法

（1）GC-B法

●10%（w/w）塩化ナトリウム水溶液：塩化ナトリウム50 gを超純水に溶解し500 mLとする。

●アセトニトリル-水（9/1）混液：アセトニトリルと水を体積比9:1で混合

●アセトン-ヘキサン (15/85)混液：アセトンとヘキサンを体積比15:85で混合

●0.1%ポリエチレングリコール300（PEG300）＋1 ppmフェナントレンd体/アセトン：

①PEG300を1 g、1000 ppmフェナントレンd体/アセトン溶液1 mLを100 mLメスフラスコに分取し、アセトンで100 mLに定容

②①をアセトンで10倍希釈

（2）LC法

●2%ギ酸含有アセトニトリル　(用時調製)：ギ酸2 mLをアセトニトリルに溶解し100 mLしたもの。

●アセトニトリル-水（8/2）混液：アセトニトリルと水を体積比8:2で混合

（3）LC法検量線作成用混合溶媒（用時調製）

● アセトニトリル、2%ギ酸含有アセトニトリル、アセトニトリル-水（8/2）、水を体積比で1:1:1:1で混合したもの

※酸性農薬が分析対象外の場合は2%ギ酸含有アセトニトリルではなくアセトニトリルを使用します。

※LC-MS/MS測定では測定液組成が感度やピーク形状に影響するため標準液はサンプルと同じ組成液での調製を推奨しています。

（4）標準溶液調製方法

※検量線用混合標準溶液濃度は一例です。状況により適宜変更可能です。

«GC用»

●混合標準溶液　2 ppm（抽出前添加用）

<標準原液が20 ppmの場合>

10 mLのメスフラスコに各標準原液を1 mLずつ採取し、**アセトン**注1)で10 mLに定容する。

●混合標準溶液　0.1 ppm（検量線作成用中間溶液・用時調製)

1 mLのメス試験管に上記混合標準溶液2 ppmを50 μL採取し、アセトンで1 mLに定容する。

●各濃度の検量線用混合標準溶液(用時調製)

<2.5 ppb>

2 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppm/アセトンを50 μL、0.1%PEG300＋1 ppmフェナントレンd体/アセトンを40 μL採取し、アセトン-ヘキサン混液注2)で2 mLに定容する。

<5 ppb>

1 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppm/アセトンを50 μL、0.1%PEG300＋1 ppmフェナントレンd体/アセトンを20 μL採取し、アセトン-ヘキサン混液で1 mLに定容する。

<7.5 ppb>

1 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppm/アセトンを75 μL、0.1%PEG300＋1 ppmフェナントレンd体/アセトンを20 μL採取し、アセトン-ヘキサン混液で1 mLに定容する。

注1）抽出前添加用混合標準溶液は、抽出溶媒（アセトニトリル）に溶解する溶媒を用いて希釈します。
例：ヘキサンが多く含まれると抽出溶媒（アセトニトリル）と分離し、低極性農薬が回収されにくくなります。

注2）溶媒（アセトン-ヘキサン）は前処理の最終試験溶液と同じ溶媒を使用します。

«LC用»

●混合標準溶液　2 ppm（抽出前添加用）

<標準原液が20 ppmの場合>

10 mLのメスフラスコに各標準原液を1 mLずつ採取し、**アセトニトリル**注3)で10 mLに定容する。

●混合標準溶液　0.1 ppm（検量線作成用・用時調製)

1 mLのメス試験管に上記混合標準溶液2 ppmを50 μL採取し、LC法標準溶液希釈液注4)で1 mLに定容する。

●各濃度の検量線用混合標準溶液(用時調製)

<1.25 ppb>

2 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppmを25 μL採取し、検量線作成用混合溶媒注4)で2 mLに定容する。

<2.5 ppb>

2 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppmを50 μL採取し、検量線作成用混合溶媒注4)で2 mLに定容する。

<3.75 ppb>

2 mLのメス試験管に混合標準溶液0.1 ppmを75 μL採取し、検量線作成用混合溶媒注4)で2 mLに定容する。

注3）抽出前添加用混合標準溶液は、抽出溶媒（アセトニトリル）に溶解する溶媒を用いて希釈します。

注4）前処理の最終試験溶液と同じ溶媒を使用します。
調製方法は上記「(3)LC法検量線作成用混合溶媒」をご覧ください。

2）全自動固相抽出装置による精製

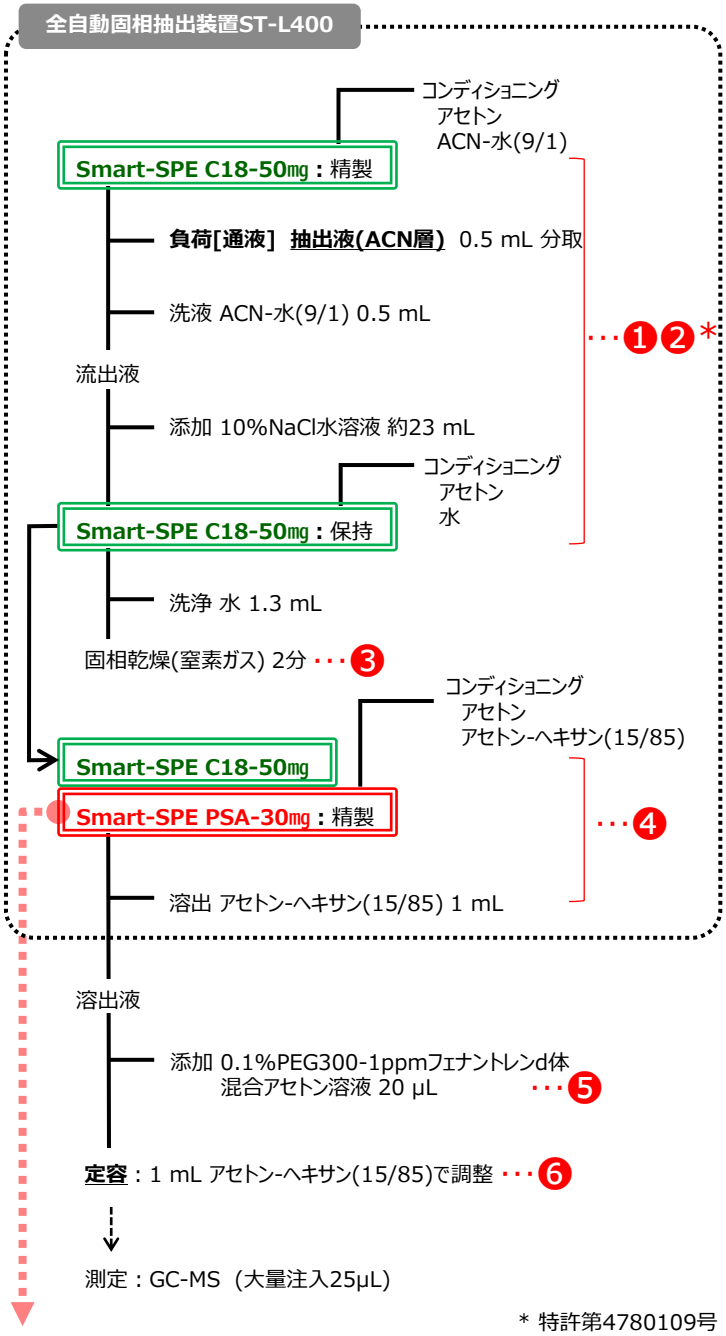
全自動固相抽出装置 ST-L400

4,2)(1) STQ- GC-B法 (自動)

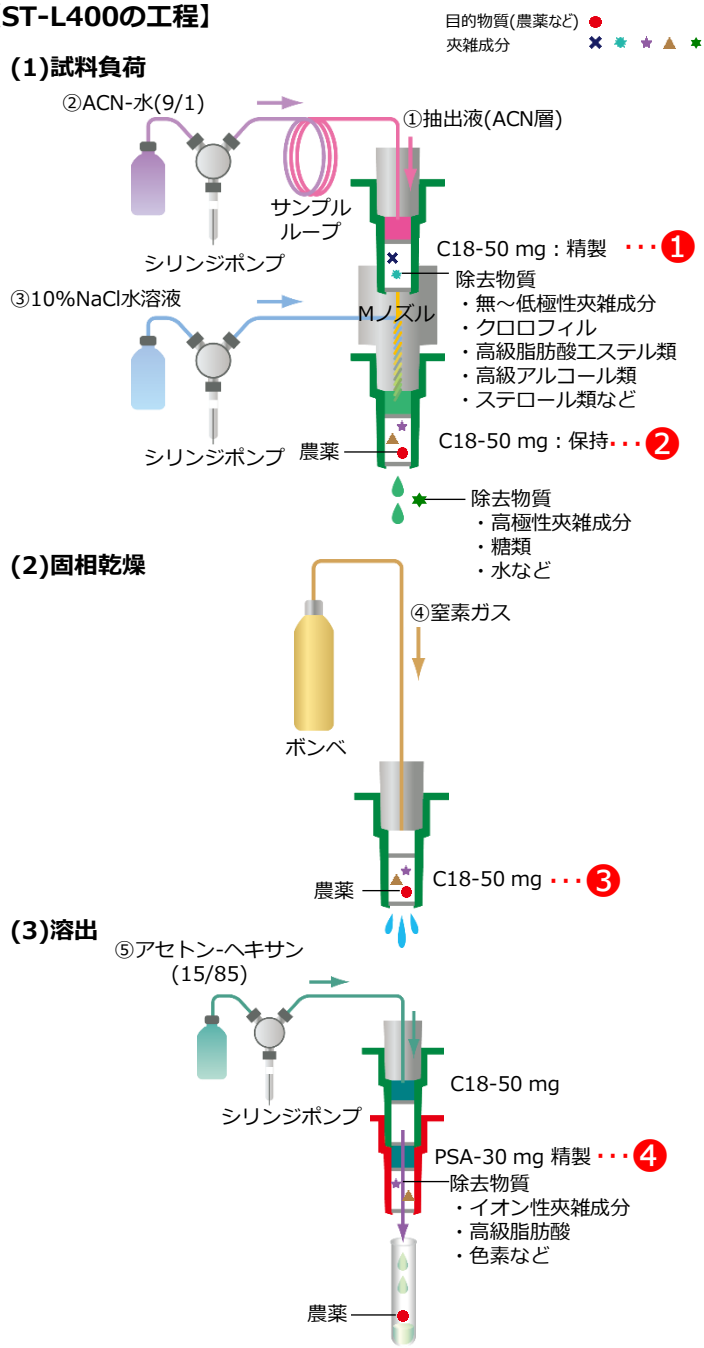
GC対象農薬を全自動固相抽出装置(ST-L400)を使用して精製します。

前処理のポイント
①エバポレーターによる濃縮操作なし
②精製固相の追加と溶出溶媒の変更が可能
③1検体の処理時間約15分

精製フロー



＊ 特許第4780109号



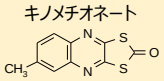
精製固相の追加

B法では試料に含まれる夾雑成分に応じて精製固相を追加したり溶出溶媒を変更することができます。

ただし、固相を追加して精製効果が向上すると一部農薬の回収率が低下する可能性があります。目的物質の回収率は事前にご確認願います。

- 脂肪酸が多い試料の場合(例：古い玄米)
  SAX-30 mg＋PSA-30 mg 溶出 アセトン-ヘキサン（15/85）1 mL
  ※アセトン比を下げることで精製効果は高まりますが、農薬によっては十分に回収されない場合があります。
- カフェインが多い試料の場合(例：茶)
  SI-30 mg＋PSA-30 mg 溶出 アセトン-ヘキサン（20/80）1 mL ※SI=シリカゲル
  ※アセトン比を20%以下にすることでカフェインの除去効果が高まります。
- 色素やフラボノイドが多い試料の場合(例：柑橘類)
  GCK-20 mg＋PSA-30 mg 溶出 トルエン-アセトン-ヘキサン（5/10/85）1 mL
  ※GCK＝グラファイトカーボン
  ※トルエンを使用してもキノメチオネートのように回収率が低い平面構造の農薬がありますのでご注意願います。

キノメチオネート



4,2)(1)STQ-GC-B法 (自動) (202405 ver.)

前処理フロー解説・留意点

❶ (1)試料負荷
負荷した試料(抽出液)はC18-50mg(上)に無~低極性夾雑成分が保持され目的物質である農薬は通過します。

❷ C18-50mg(上)からの流出液に10%NaCl水溶液を添加し、ACNの濃度が低くなった状態(約4%)でC18-50mg(下)に通液します。C18-50mg(下)では農薬がC18-50mgに保持され高極性夾雑成分はそのまま通過して除去されます。
このとき高極性農薬のアセフェートやメタミドホスはC18-50mgに保持されませんのでLC法で対応します。

❸ (2)固相乾燥
C18-50mgに残った水分を窒素乾燥により除去し、溶出液に水が混入しないようにします。

❹ (3)溶出
C18-50mgから保持した農薬を溶出します。そのときC18-50mgの下にPSA等の固相を連結することで高級脂肪酸や色素などのイオン性夾雑成分を除去します。
溶出時には夾雑成分の種類に応じて固相を追加したり溶出溶媒を変更することでより精製効果を高めることができます。(p.36「精製固相の追加」、pp.38-44参照)

❺ これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。
※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

❻ 標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

※極性・無極性といった表現は相対的なものです。

測定条件

条件例1

PTV 注入口　LVI-S250(AiSTI Science)

インサート	スパイラル（胃袋型）インサート
注入口温度	70℃(0.16 min)-120 ℃/min-240 ℃-50 ℃/min-290 ℃(26 min)

GC　Nexis GC-2030 (島津製作所)

注入モード	LVI-S250 大量注入法　スプリット
制御モード	カラム流量
カラム流量	1.2 mL/min
線速度	40 cm/s
パージ流量	3.0 mL/min
スプリット比	50
スプリットレス時間	4 min
カラム	VF-5ms, 0.25 mm i.d. X 30 m, df;0.25 μm
オーブン温度	60℃(4 min)-25 ℃/min-125 ℃ -10 ℃/min-310 ℃(8 min)
インターフェース温度	290 ℃

MS GCMS-TQ8040 NX(島津製作所)

イオン源温度	260 ℃
測定モード	MRM

条件例2

PTV 注入口　LVI-S250(AiSTI Science)

インサート	スパイラル（胃袋型）インサート
注入口温度	70 ℃(0.27 min)-120 ℃/min-240 ℃-50 ℃/min-290℃(40 min)

GC　7890B (Agilent Technologies)

注入方式	LVI-S250 溶媒ベントモード
ベント圧力	70 kPa
ベントフロー	150 mL/min
ベント時間	0.27min
パージ時間	4 min
パージフロー	50mL/min
カラム流量	コンスタントフロー, 1.1 mL/min
カラム	VF-5ms, 0.25 mm i.d. X 30 m, df;0.25 μm
オーブン温度	60 ℃(4 min)-25 ℃/min-150 ℃-3 ℃/min-200 ℃-8 ℃/min-310 ℃(5 min)
MSDトランスファーライン温度	290 ℃

MS　Agilent 7000C (Agilent Technologies)

イオン源温度	280 ℃
測定モード	MRM

自動前処理装置による
アプリケーションデータはこちらから

自動前処理装置の動画はこちらから
（Youtube）

4,2)(2) STQ- GC-B法の精製

STQ-GC-B法における夾雑成分除去の概念

【GC-B法の概要】

試料秤量
ホモジナイズ
振とう
遠心分離
ACN層
Smart-SPE C18：精製
Smart-SPE C18orPBX注1)2)：保持
流出液廃棄
固相乾燥(吸引)
Smart-SPE C18orPBX
Smart-SPE GCKorSAXorSI：精製
Smart-SPE PSA：精製
定容

①液液分配：
無~低極性物質は上層（アセトニトリル層）に、塩類・糖類などの高極性成分は下層（水層）に移行し、それぞれを分離します。
※トリグリセリドなど無極性夾雑成分は油層として分離することができます。

②C18精製：
油やクロロフィル（緑色）などの無～低極性成分をC18に保持し除去します。

③C18orPBXに農薬を保持：
通液させる溶媒の極性を高めることで、固相に農薬を保持します。

④極性成分の除去：
高極性夾雑成分はC18orPBXに保持されず除去されます。

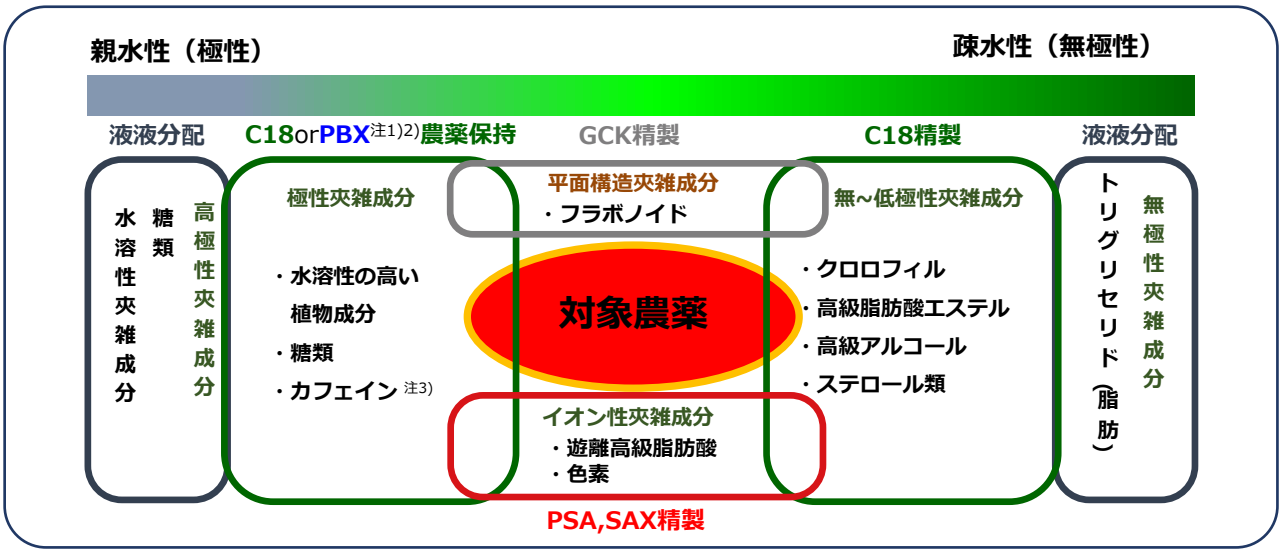
⑤精製：
通常はPSAにより高級脂肪酸などイオン性夾雑成分を吸着除去します。試料によりPSAのみで除去できない場合は夾雑成分に応じて最適な固相を追加します。
GCK：平面構造夾雑成分の除去
SAX：陰イオン夾雑成分の除去
SI　：カフェインの除去
PSA（追加）：陰イオン夾雑成分の除去

注1) PBX：ポリマー系表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤
注2) 全自動固相抽出装置使用の場合はC18を、手動の場合はPBXを使用します。

C18とPBXの使い分け

上記フローの③におけるC18とPBXの使用目的は同じでどちらも農薬の保持になります。この工程では約12 mLの液を通液しますが水の比率が高いためシリカ系のC18に手動で通液すると圧力がかかり操作性が落ちます。そこでポリマー系のPBXを用いて操作性を高めています。

【夾雑成分の除去の概念図】



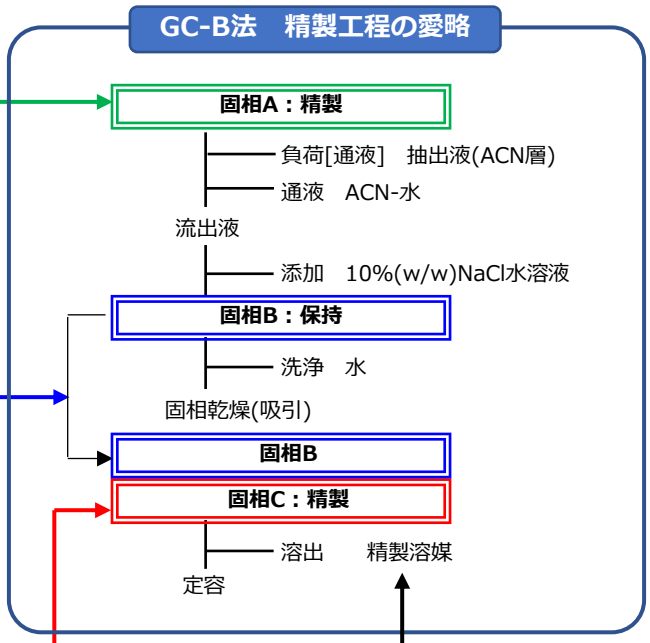
注1)PBX：ポリマー系表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤
注2)全自動固相抽出装置使用の場合はC18を、手動の場合はPBXを使用します。
注3)自動化ではC18にほとんど保持されず流出して除去されます。

4,2)(2)STQ-GC-B法の精製

GC-B法の精製について

GC-B法では試料に含まれている夾雑成分に応じて、精製固相を追加したり通液溶媒を変更することにより精製効果を高めることができます。詳細はp.38「4,2)(2)STQ-GC-B法の精製」をご覧ください。

ただし、固相を追加して精製効果が向上すると一部農薬の回収率が低下する可能性があります。目的物質の回収率は事前にご確認されますようお願いします。



【試料別の精製の例】

試料	固相A	固相B	固相C	精製溶媒	コメント
穀類・豆類・果実・野菜	C18-50	C18-50	PSA	アセトン-ヘキサン（15/85）	基本フロー
しょうが、大葉、香辛料、加工食品など	C18-50	C18-50	PSA	アセトン-ヘキサン（10/90）	
				アセトン-ヘキサン（5/95）	極性農薬の回収率が低下する可能性あり
柑橘類、色素の多い試料	C18-50	C18-50	GCK+PSA	トルエン-アセトン-ヘキサン（5/10/85）	平面構造の農薬を対象とする場合
				アセトン-ヘキサン（15/85）	平面構造の農薬を対象としない場合
			SAX+PSA	アセトン-ヘキサン（15/85）	
緑茶などカフェインを多く含む試料	C18-50	C18-50	GCK+SI+PSA	トルエン-アセトン-ヘキサン（5/20/75）	平面構造の農薬を対象とする場合
				アセトン-ヘキサン（20/80）	平面構造の農薬を対象としない場合
手動の場合	同上	PBX-10[注1)注2)]	同上	同上	

注1) PBX：ポリマー系表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤
注2) 全自動固相抽出装置使用の場合はC18を、手動の場合はPBXを使用します。

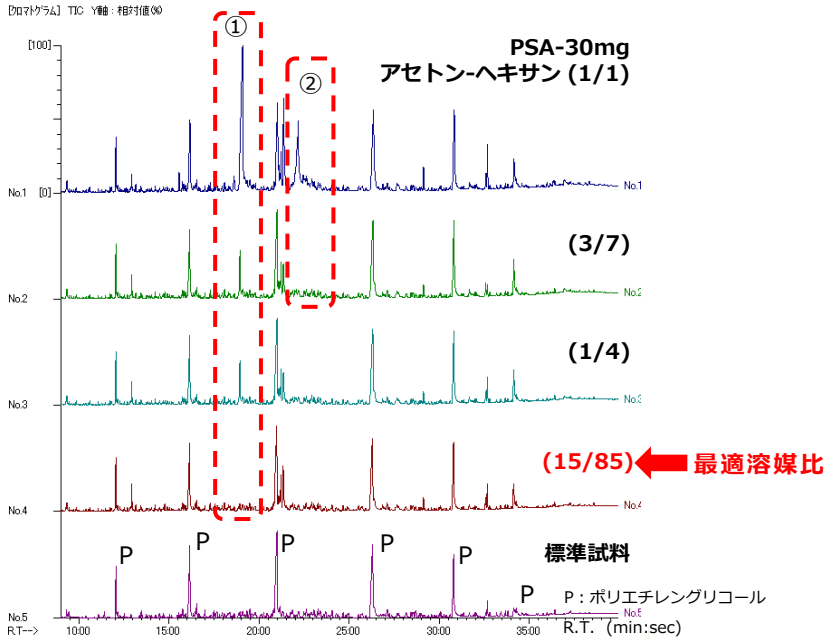
弊社ではWebサイト(http://www.aisti.co.jp/appli/)に「残留農薬基礎データ」として一部の農薬について精製固相と精製溶媒の種類による回収率を掲載していますのでこちらもご覧ください。なおこれらのデータは一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。回収率は事前にご確認されますようお願いします。

固相と溶出溶媒による精製効果

精製に使用する固相と溶出溶媒の種類及び比率により精製効果は異なります。ここでは固相と溶出溶媒の組合せによる精製効果の比較をご紹介します。但し、これらの組合せにより農薬の回収率も変動しますのでご注意願います。

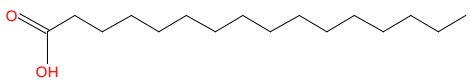
PSAと溶出溶媒による精製効果

PSAは陰イオン交換と極性の相互作用を併せ持つ固相です。溶出溶媒のアセトン-ヘキサンの比率により精製効果が異なります。下図はほうれん草の例です。アセトンの比率を下げることでPSAによる脂肪酸の除去効果が高くなります。但しアセトン-ヘキサンの比率により農薬の回収率が変動する場合がありますのでご注意願います(下記「PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)」参照)。

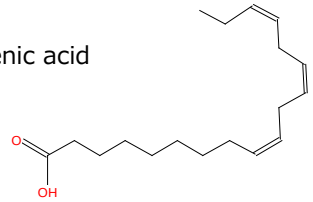


PSA
-Si-$CH_2CH_2CH_2NHCH_2CH_2NH_2$
N-プロピルエチレンジアミン
一次相互作用：極性・陰イオン交換

① Hexadecanoic acid



② Linolenic acid



ほうれん草におけるPSAと溶出溶媒（アセトン-ヘキサン）によるSCANトータルイオンクロマトグラムの比較

PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)

試料：ほうれんそう
添加濃度：試料中0.05ppm(抽出後添加)

番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	下(アセトン含有率) (5/95) 5%	(0/100) 0%
121	Etofenprox	95.6	89.6	85.5	85.9	81.6	77.6	77.6
122	Etoxazole	94.3	89.2	85.2	85.1	81.4	74.9	59.2
123	Etrimfos	99.7	94.0	87.1	89.9	90.8	83.0	81.7
124	Fenamidone	98.6	95.6	90.6	92.0	92.2	63.9	0.0
125	Fenamiphos	110.3	102.5	97.0	94.9	92.3	46.8	0.9
126	Fenarimol	95.3	93.5	89.8	91.8	87.6	46.3	0.8
127	Fenbuconazole	105.1	100.9	95.1	95.2	84.7	13.8	0.6
128	Fenchlorphos	93.6	88.2	83.2	84.0	82.9	79.7	76.4
129	Fenitrothion	110.1	103.6	97.7	93.6	94.4	92.8	45.8
130	Fenobucarb	102.4	100.2	94.1	94.5	97.5	88.7	0.5
131	Fenothiocarb	97.3	95.1	90.3	91.4	89.7	82.8	47.5
132	Fenoxanil	101.6	95.7	91.5	92.1	91.1	84.3	0.6
133	Fenpropathrin	92.3	84.8	81.3	81.9	79.2	74.0	71.7
134	Fenpropemorph	97.6	91.9	86.5	86.6	87.0	79.6	40.0
135	Fensulfothion	116.7	105.2	98.0	97.2	94.9	52.3	1.2
136	Fenthion	106.0	99.2	92.9	95.8	95.5	89.3	77.3
137	Fenvalerate-1	89.1	89.9	86.1	88.0	84.2	80.4	59.2
138	Fenvalerate-2	117.3	96.9	90.0	86.9	81.9	74.3	53.0
139	FIPRONIL	62.4	88.3	84.6	88.8	89.0	44.5	0.0
140	Flamprop-methyl	101.6	95.2	90.3	93.8	93.4	89.0	2.9
141	Fluacrypyrim	102.4	95.6	90.6	93.1	88.7	82.1	27.9
142	Flucythrinate-1	97.8	94.1	88.9	89.4	85.3	79.5	17.7
143	Flucythrinate-2	103.7	97.2	92.0	90.8	85.6	79.2	13.2
144	Fludioxonil	93.1	84.9	79.4	82.1	85.0	77.1	54.6
145	Flufenpyl-ethyl	109.8	100.1	94.6	94.9	94.0	85.2	17.0
146	Flumiclorac-pentyl	115.6	110.5	104.9	102.0	94.9	86.1	4.6
147	Flumioxazin	119.2	111.9	108.0	106.4	101.6	74.8	0.0
148	Fluquinaconazole	101.8	98.2	93.1	94.0	92.0	80.6	0.2
149	Fluridone	106.8	100.7	95.9	86.3	40.5	0.6	0.1
150	Flusilazole	101.1	96.2	91.9	94.4	93.1	72.8	0.4

番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	下(アセトン含有率) (5/95) 5%	(0/100) 0%
151	Fluthiacet-methyl	150.4	141.7	125.1	117.6	105.0	87.3	0.0
152	Flutolanil	104.5	96.7	92.4	93.8	92.8	61.1	1.9
153	Flutriafol	90.7	94.8	85.8	79.5	54.7	6.0	0.2
154	Fluvalinate-1	95.3	93.8	88.4	88.4	83.9	78.5	27.8
155	Fluvalinate-2	99.2	94.7	89.2	89.3	86.1	80.3	29.3
156	Formothion	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
157	Fosthiazate-1	76.9	84.4	73.3	76.0	75.8	55.2	3.5
158	Fosthiazate-2	78.8	86.6	75.2	78.3	78.4	59.4	2.1
159	Halfenprox	95.6	89.1	82.9	83.5	79.0	74.5	74.0
160	Hexaconazole	101.1	97.6	93.8	92.8	89.1	43.2	0.3
161	Hexazinone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
162	Imazamethabenz methy	33.9	43.4	33.4	33.2	32.0	6.2	0.7
163	Imibenconazole	148.4	134.1	119.2	116.4	92.8	41.0	0.0
164	Imibenconazole-des-b	14.0	16.4	12.3	9.7	4.6	0.1	0.3
165	Iprobenfos	101.5	96.0	90.1	90.9	90.1	82.4	12.9
166	Iprodione	104.5	102.0	95.5	96.4	93.2	82.8	1.0
167	Isazophos	96.4	94.3	87.9	90.0	90.7	82.5	72.7
168	Isofenphos	102.5	93.6	88.8	91.0	87.9	82.5	66.2
169	Isofenphos P=O	111.1	101.4	95.7	93.6	93.0	76.9	0.3
170	Isoprocarbe	75.8	84.7	74.8	77.8	81.5	64.4	0.3
171	Isoprothiolane	100.5	95.7	91.2	91.8	91.0	84.0	2.8
172	Isoxathion	93.5	84.7	78.6	81.9	79.0	72.6	39.5
173	Isoxathion-ox	97.0	93.3	89.8	85.8	83.1	72.5	2.5
174	Kresoxim-methyl	99.5	93.6	87.7	90.1	86.8	79.0	47.7
175	Lenacil	44.8	57.9	46.2	48.6	39.8	4.0	0.1
176	Malathion	107.2	101.1	94.5	94.2	91.3	85.9	39.4
177	Mecarbam	97.7	93.1	87.2	91.1	90.3	82.3	49.1
178	Mefenacet	103.8	98.0	91.4	92.3	89.5	81.1	0.0
179	Mefenpyr-diethyl	101.9	96.9	92.8	95.4	91.4	81.2	35.8
180	Mepronil	119.3	108.5	100.7	96.8	99.6	86.2	4.4

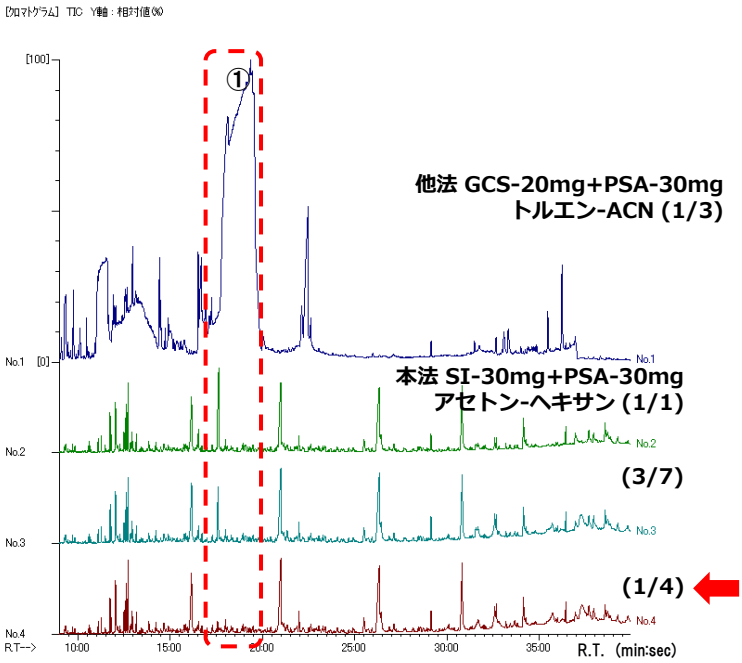
回収率の全データはHPの「食品中残留農薬分析における固相抽出法を用いた自動前処理装置の開発-第3法-」をご覧ください(http://www.aisti.co.jp/common/pdf/ss10001p.pdf)。なおこれらのデータは一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。回収率は事前にご確認されますようお願いします。

参考文献：佐々野ら,「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-第3報-」,第100日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.52

4,2)(2)STQ-GC-B法の精製

シリカゲル（SI）と溶出溶媒による精製効果

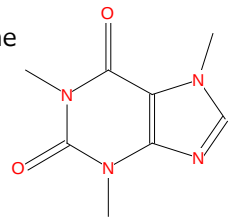
SIはカフェインなど極性夾雑成分を除去します。下図は抹茶の例です。GCS(グラファイトカーボン)で除去できなかったカフェインがSIでは除去できています。さらにアセトンの比率を下げることでSIによるカフェインの除去効果が高くなります。但しアセトン-ヘキサンの比率により農薬の回収率が変動する場合がありますのでご注意願います(下記「SI＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)」参照)。

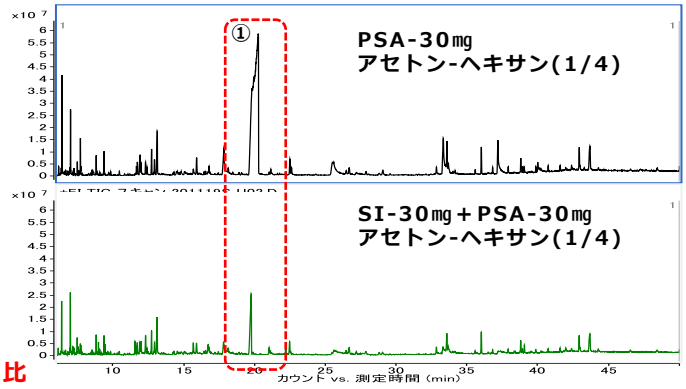


抹茶のSI＋PSAと溶出溶媒アセトン-ヘキサンによるSCANトータルイオンクロマトグラムの比較

SI
-Si-OH
活性シリカゲル
一次相互作用：極性

① Cafeine





緑茶におけるSIのカフェイン除去効果

SIを使用することで同じ溶媒比でもカフェインの除去効果が見られる

SI＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)

試料：抹茶
添加濃度：試料中0.05ppm(抽出後添加)

番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	下(アセトン含有率) (5/95) 5%	(0/100) 0%
121	Etofenprox	89.5	100.4	106.3	95.1	87.6	89.4	4.6
122	Etoxazole	91.0	98.4	101.0	89.9	82.4	85.6	0.0
123	Etrimfos	97.1	105.6	109.6	103.8	99.4	100.3	0.0
124	Fenamidone	102.9	113.8	117.2	112.8	96.9	5.8	0.0
125	Fenamiphos	101.4	114.1	98.5	46.9	1.1	0.1	0.0
126	Fenarimol	94.8	101.2	102.8	88.5	25.8	0.5	0.1
127	Fenbuconazole	109.1	111.0	35.9	3.4	1.5	0.7	0.1
128	Fenchlorphos	93.3	103.3	105.6	94.5	89.5	90.1	108.7
129	Fenitrothion	105.0	118.6	121.6	111.5	107.2	106.6	0.0
130	Fenobucarb	110.3	116.5	120.3	112.1	109.9	68.0	0.5
131	Fenothiocarb	94.8	101.9	104.5	100.2	95.6	93.9	0.2
132	Fenoxanil	94.7	107.7	109.4	106.0	99.2	22.8	0.4
133	Fenpropathrin	106.5	114.0	116.2	103.8	94.9	100.9	1.9
134	Fenpropemorph	97.6	104.5	105.7	102.7	95.7	89.9	0.2
135	Fensulfothion	107.7	109.8	30.6	4.3	1.6	1.4	0.0
136	Fenthion	99.0	108.9	109.2	101.6	96.2	97.2	0.5
137	Fenvalerate-1	90.1	99.2	104.0	91.0	85.2	88.7	0.2
138	Fenvalerate-2	99.9	100.2	102.1	88.7	80.7	86.0	0.0
139	FIPRONIL	91.7	95.7	94.4	97.1	79.0	0.5	0.1
140	Flamprop-methyl	98.7	107.5	108.7	104.9	99.5	34.9	0.2
141	Fluacrypyrim	102.7	111.7	115.4	108.0	101.0	89.3	0.2
142	Flucythrinate-1	99.5	109.5	113.7	101.1	90.3	90.9	0.0
143	Flucythrinate-2	100.8	111.3	114.6	101.2	91.0	88.4	1.5
144	Fludioxonil	89.9	95.6	96.4	90.5	85.7	86.1	1.1
145	Flufenpyl-ethyl	106.3	116.2	120.6	115.6	110.9	89.9	0.1
146	Flumiclorac-pentyl	114.5	130.4	134.9	126.5	113.5	87.6	0.0
147	Flumioxazin	118.6	131.4	131.5	115.7	32.1	0.0	0.0
148	Fluquinaconazole	100.8	112.4	113.5	107.9	56.0	0.2	0.1
149	Fluridone	101.8	109.9	70.6	9.7	0.1	0.1	0.0
150	Flusilazole	97.3	105.0	86.1	33.7	1.0	0.0	0.2

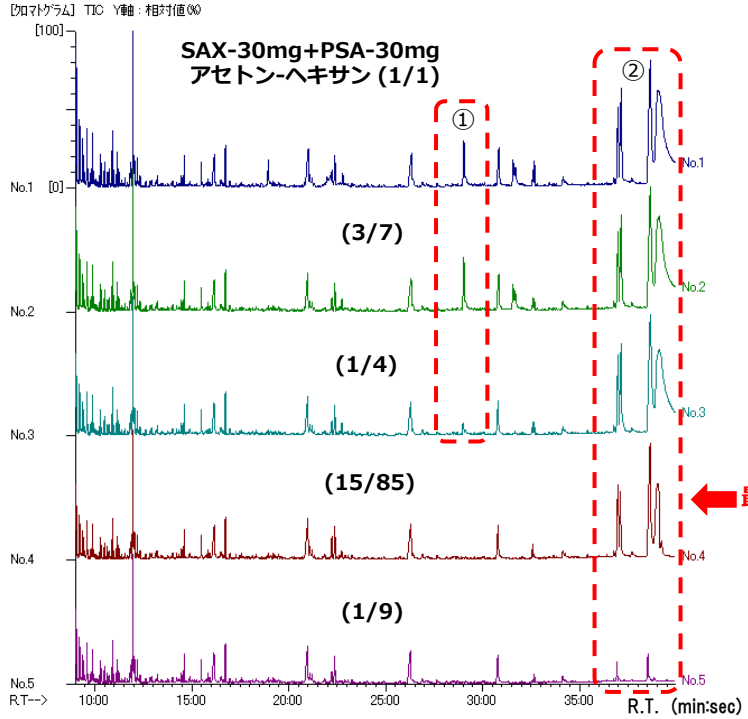
番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	下(アセトン含有率) (5/95) 5%	(0/100) 0%
151	Fluthiacet-methyl	146.0	164.7	160.5	154.2	98.5	0.4	0.3
152	Flutolanil	98.9	106.1	109.6	108.0	86.9	5.5	1.0
153	Flutriafol	95.7	87.4	22.2	1.3	0.1	0.0	0.0
154	Fluvalinate-1	97.9	108.8	111.6	99.2	90.1	92.4	0.0
155	Fluvalinate-2	97.4	109.1	112.9	99.9	90.8	93.4	0.0
156	Formothion	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
157	Fosthiazate-1	97.2	95.0	103.8	68.3	14.5	0.5	0.2
158	Fosthiazate-2	92.7	93.7	101.7	70.2	24.2	4.0	1.5
159	Halfenprox	195.9	220.4	228.2	210.4	185.8	187.4	124.3
160	Hexaconazole	101.5	108.7	100.0	57.9	5.3	0.8	0.3
161	Hexazinone	22.7	18.6	5.9	1.3	0.1	0.1	0.0
162	Imazamethabenz methy	43.3	41.2	49.5	25.9	4.8	1.4	0.2
163	Imibenconazole	141.3	154.8	114.8	44.1	1.0	1.0	2.8
164	Imibenconazole-des-b	20.4	8.9	1.4	0.7	0.2	0.5	0.7
165	Iprobenfos	102.1	111.5	114.2	110.7	106.1	59.8	0.0
166	Iprodione	105.0	117.4	121.1	114.9	106.0	17.6	0.0
167	Isazophos	98.7	105.3	108.2	104.1	98.3	96.0	0.0
168	Isofenphos	106.1	116.7	120.1	112.4	107.0	107.9	1.9
169	Isofenphos P=O	105.8	117.5	113.4	79.0	7.7	0.2	0.1
170	Isoprocarbe	100.4	98.3	108.1	83.3	94.2	46.2	0.3
171	Isoprothiolane	96.2	105.5	109.6	104.3	98.0	65.0	0.0
172	Isoxathion	93.8	108.0	111.9	103.3	95.0	89.5	0.6
173	Isoxathion-ox	93.8	109.8	114.8	105.9	74.2	13.2	0.6
174	Kresoxim-methyl	96.1	104.2	107.3	101.5	95.7	91.9	0.0
175	Lenacil	58.6	55.5	64.0	38.4	9.4	0.0	0.0
176	Malathion	100.0	109.8	113.5	107.5	103.3	99.4	0.5
177	Mecarbam	97.0	101.9	106.6	102.6	96.9	99.0	0.4
178	Mefenacet	103.4	114.9	118.3	112.6	100.2	5.4	0.0
179	Mefenpyr-diethyl	100.0	109.6	113.4	109.1	102.1	96.3	0.0
180	Mepronil	119.6	128.2	130.4	128.5	117.3	80.7	0.1

回収率の全データはHPの「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-第3法-」をご覧ください(http://www.aisti.co.jp/common/pdf/ss10001p.pdf)。なおこれらのデータは一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。回収率は事前にご確認されますようお願いします。

参考文献：佐々野ら,「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-第3報-」,第100日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.52

SAXと溶出溶媒による精製効果

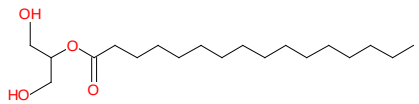
SAXは陰イオン夾雑成分を除去する一方でオレンジでは下図のように2-ヘキサデカノイルグリセロールやフラボノイド類の除去にも効果があります。アセトンの比率を下げることでSAXによる2-ヘキサデカノイルグリセロールやフラボノイド類の除去効果が高くなります。但しアセトン-ヘキサンの比率により農薬の回収率が変動する場合がありますのでご注意願います(下記「SAX＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)」参照)。



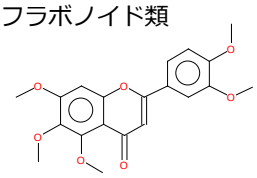
最適溶媒比

SAX
-Si-$CH_2CH_2CH_2N^{\oplus}$-$(CH_3)_3$
トリメチルアミノプロピル
一次相互作用：陰イオン交換

① 2-Hexadecanoyl glycerol



② フラボノイド類



オレンジにおけるSAX+PSAと溶出溶媒（アセトン-ヘキサン）によるSCANトータルイオンクロマトグラムの比較

SAX＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)

試料：オレンジ
添加濃度：試料中0.05ppm(抽出後添加)

番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	(5/95) 5%	下(アセトン含有率) (0/100) 0%
181	Metalaxyl	96.4	93.7	99.2	97.6	78.6	9.4	0.7
182	Methamidophos	18.8	14.4	10.7	8.7	9.5	7.0	1.9
183	Methidathion	96.5	93.5	99.0	103.8	95.1	67.1	0.1
184	Methiocarb	103.8	107.9	122.4	117.6	87.9	1.6	0.0
185	Methoprene-1	100.0	97.3	101.3	101.3	93.9	99.7	7.0
186	Methoprene-2	89.4	90.5	95.9	94.3	88.7	92.8	0.0
187	Methoxychlor	87.3	83.5	90.0	99.2	90.9	77.6	0.0
188	Metolachlor	107.4	103.4	110.8	109.5	101.8	105.8	0.0
189	Metominostrobin	113.3	107.8	112.5	110.2	54.0	0.5	0.4
190	Metominostrobin-z	104.1	98.5	102.5	87.0	17.6	0.0	0.1
191	Mevinphos	5.7	4.6	4.3	3.6	3.0	2.2	3.5
192	Monocrotophos	0.3	0.4	0.9	0.3	0.8	0.4	0.8
193	Myclobutanil	103.3	100.0	101.8	35.7	1.1	0.5	0.2
194	Napropamide	101.6	99.9	106.8	107.8	97.8	75.6	0.0
195	Nitrothal-isopropyl	101.4	99.3	107.8	105.2	97.3	103.7	0.0
196	Norflurazon	94.4	94.5	83.7	19.8	3.4	0.0	0.0
197	Oryzalin	0.7	3.4	0.4	1.7	0.1	0.1	1.8
198	Oxadiazone	100.9	98.3	103.1	102.9	95.9	100.2	0.5
199	Oxadixyl	28.0	26.1	22.3	8.6	6.8	4.1	0.0
200	Oxyfluorfene	107.1	100.8	109.2	107.9	96.9	94.8	0.0
201	p,p'-DDD	104.3	101.4	108.0	107.0	97.1	97.3	0.0
202	p,p'-DDE	93.7	90.6	96.2	94.9	88.0	93.4	112.0
203	Paclobutrazol	99.0	103.2	109.9	91.2	10.3	0.0	0.3
204	Parathion	109.5	103.1	112.4	109.9	103.2	103.8	0.3
205	Parathion-methyl	104.1	105.1	113.7	117.1	104.6	69.0	0.5
206	Penconazole	101.0	99.5	105.9	106.2	58.6	0.5	0.2
207	Pendimethalin	107.3	103.8	112.0	108.9	100.5	104.8	3.0
208	Permethrin-cis	108.2	105.1	108.0	101.9	90.0	95.1	1.6
209	Permethrin-trans	110.2	106.8	107.9	104.4	93.5	98.5	1.0
210	Perthane	102.4	98.2	103.3	101.1	93.2	97.3	0.0

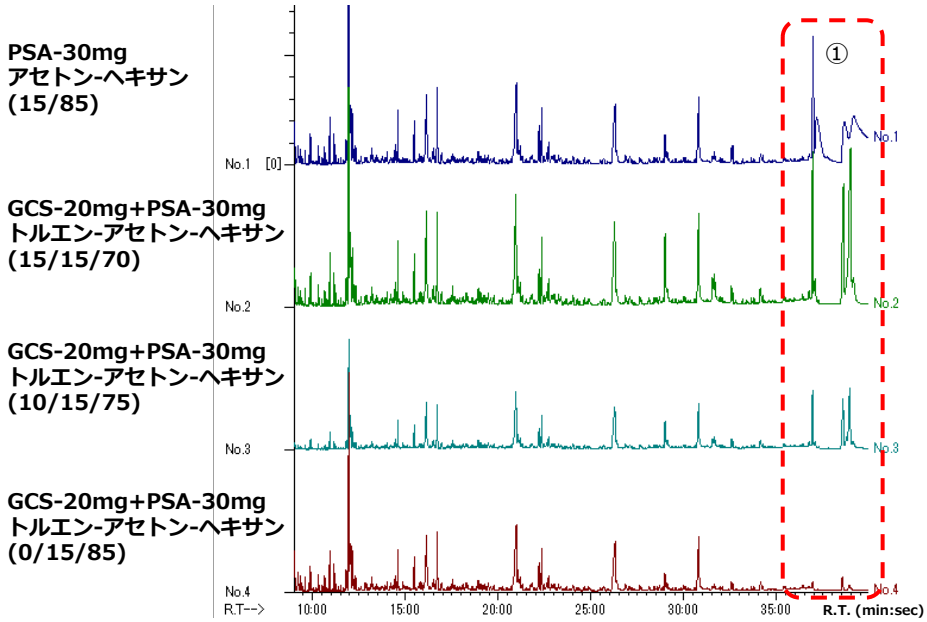
番号	化合物名	溶出溶媒 アセトン-ヘキサン比率 (50/50) 50%	(30/70) 30%	(20/80) 20%	(15/85) 15%	(10/90) 10%	(5/95) 5%	下(アセトン含有率) (0/100) 0%
211	Phenothrin-1	116.4	112.7	114.3	105.5	95.1	101.6	1.6
212	Phenothrin-2	110.9	107.4	111.4	106.4	98.1	104.0	1.5
213	Phenthoate	92.0	98.0	106.7	116.5	110.8	115.7	0.2
214	Phorate	128.4	124.5	131.9	123.4	115.3	116.0	5.1
215	Phosalone	112.1	113.2	121.9	124.0	103.9	24.1	0.1
216	Phosmet	99.8	104.9	111.7	121.9	73.5	2.1	0.0
217	Phosphamidon	45.9	43.0	43.2	27.0	2.6	0.1	0.0
218	Phthalide	98.2	97.5	104.7	104.6	95.7	95.0	0.2
219	Picolinafen	106.8	102.4	107.6	108.7	96.9	52.8	0.0
220	Piperonyl butoxide	104.0	101.4	107.0	106.5	98.8	102.7	0.0
221	Piperophos	111.9	110.1	114.8	115.3	102.5	87.3	0.0
222	Pirimicarb	29.4	27.3	28.2	22.6	17.7	21.1	1.8
223	Pirimiphos methyl	106.6	103.0	111.6	109.3	102.4	106.0	0.1
224	Pretilachlor	104.0	103.5	107.8	105.0	97.3	102.8	0.6
225	Procymidone	98.2	95.5	101.3	101.8	96.7	87.8	0.2
226	Profenofos	115.8	109.3	117.3	116.2	104.7	106.2	0.1
227	Prohydrojasmon-1	108.2	105.9	114.4	106.7	97.9	103.1	4.7
228	Prohydrojasmon-2	119.0	109.5	120.7	110.3	105.9	110.0	6.4
229	Prometryn	96.9	96.8	102.9	103.1	94.3	89.7	0.5
230	Propachlor	104.2	99.1	103.1	94.3	80.3	84.1	0.4
231	Propanil	99.8	96.5	101.6	89.8	13.5	8.5	0.5
232	Propaphos	107.5	104.8	111.6	113.5	103.0	55.5	2.2
233	Propargite(BPPS)	86.9	82.6	88.0	90.3	85.8	95.0	0.3
234	Propazine	97.2	97.1	100.9	101.2	93.5	75.0	0.1
235	Propiconazole-1	107.3	106.2	114.0	116.6	86.8	2.6	0.0
236	Propiconazole-2	100.1	98.0	105.2	107.0	90.4	16.0	0.0
237	Propoxur	32.0	28.4	28.1	21.7	8.5	0.0	0.0
238	Propyzamide	97.5	96.6	102.4	101.8	94.8	32.9	0.1
239	Prothiophos	99.3	94.8	101.8	99.3	92.3	98.8	26.4
240	Pyraclofos	121.0	120.8	127.8	127.3	100.2	22.7	0.0

回収率の全データはHPの「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-第3法-」をご覧ください(http://www.aisti.co.jp/common/pdf/ss10001p.pdf)。なおこれらのデータは一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。回収率は事前にご確認されますようお願いします。

参考文献：佐々野ら,「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-第3報-」,第100日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.52

グラファイトカーボン（GCS）と溶出溶媒による精製効果

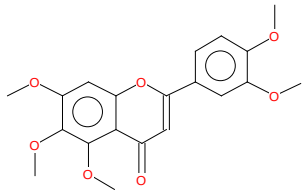
GCSは色素(クロロフィル)やフラボノイド類といった平面構造の夾雑成分を除去します。下図はオレンジの例です。PSAのみでは除去できなかったフラボノイド類の除去に効果があります。但し、平面構造の目的物質(農薬)も保持されるのでご注意願います。その場合は溶出溶媒にトルエンを使用します。トルエンの比率を下げることで精製効果は高くなります。対象農薬がアセトン-ヘキサンのみで溶出される場合はトルエンは不要です。トルエン-アセトン-ヘキサンの比率により農薬の回収率が変動する場合がありますのでご注意願います(下記「GCS＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)」参照)。



GCS
グラファイトカーボン
一次相互作用：平面構造、無極性

※GCSとGCKは製品名の違いであり、ともにグラファイトカーボンです。現在はGCKのみの販売となっております。

① フラボノイド類



オレンジにおけるGCS＋PSAと溶出溶媒（アセトン-ヘキサン）によるSCANトータルイオンクロマトグラムの比較

GCS＋PSAと溶出溶媒による回収率(抜粋)

試料：ほうれんそう
添加濃度：試料中0.05ppm(抽出後添加)

番号	化合物名	溶出溶媒 トルエン-アセトン-ヘキサン比率 (20/15/65) 20%	(15/15/70) 15%	(10/15/75) 10%	(0/15/85) 0%
91	Diclofop-methyl	97.7	95.2	97.2	93.8
92	Dicloran	80.4	83.8	53.4	18.4
93	Dicrotofos	LC	LC	LC	LC
94	Diethofencarb	88.2	86.0	84.9	74.8
95	Difenoconazole-1	98.1	96.7	100.7	91.4
96	Difenoconazole-2	102.4	98.9	101.0	97.7
97	Diflufenican	98.0	92.4	84.6	11.6
98	Dimepiperate	105.7	104.2	105.2	102.8
99	Dimethametryn	102.4	101.0	99.7	96.6
100	Dimethenamid	107.8	105.8	103.1	86.8
101	Dimethipin	LC	LC	LC	LC
102	Dimethoate	LC	LC	LC	LC
103	Dimethylvinphos-z	98.0	95.0	96.7	94.4
104	Dioxathion	115.4	109.2	111.7	110.5
105	Diphenamide	103.7	102.7	97.4	74.2
106	Disulfoton	118.4	117.8	113.5	109.3
107	Disulfoton sulfone	102.4	103.0	95.7	68.3
108	Edifenphos	106.2	101.8	103.8	104.9
109	Endosulfan	87.3	91.7	93.4	94.1
110	Endosulfan II	98.8	100.3	99.3	98.1
111	Endosulfan sulfate	106.3	107.0	104.7	108.0
112	EPN	112.2	98.4	112.1	103.8
113	Epoxiconazole	108.2	105.4	107.2	101.0
114	EPTC	121.7	187.7	45.0	49.6
115	Esprocarb	98.1	97.8	97.5	93.6
116	Ethalfluralin	111.0	112.5	100.3	98.7
117	Ethiofencarb	75.8	80.6	50.7	23.7
118	Ethion	106.5	105.1	108.8	104.6
119	Ethofumesate	101.7	99.9	100.1	91.4
120	Ethoprophos	117.7	113.6	99.4	91.4

番号	化合物名	溶出溶媒 トルエン-アセトン-ヘキサン比率 (20/15/65) 20%	(15/15/70) 15%	(10/15/75) 10%	(0/15/85) 0%
121	Etofenprox	92.1	92.7	94.9	91.3
122	Etoxazole	97.4	96.1	97.7	95.6
123	Etrimfos	105.5	103.7	101.1	94.8
124	Fenamidone	106.2	104.9	104.5	97.1
125	Fenamiphos	102.8	102.0	100.8	95.6
126	Fenarimol	103.0	101.7	104.0	98.5
127	Fenbuconazole	105.1	102.7	104.1	86.8
128	Fenchlorphos	95.4	95.9	99.4	95.8
129	Fenitrothion	105.8	104.6	105.8	100.8
130	Fenobucarb	110.9	107.0	98.7	76.4
131	Fenothiocarb	104.4	102.1	102.7	96.9
132	Fenoxanil	104.2	104.1	100.3	96.1
133	Fenpropathrin	97.6	94.9	97.4	94.3
134	Fenpropemorph	101.2	100.9	100.3	95.6
135	Fensulfothion	114.1	113.8	111.3	90.3
136	Fenthion	107.8	105.9	105.5	103.5
137	Fenvalerate-1	91.0	94.9	93.4	92.1
138	Fenvalerate-2	104.2	92.7	106.7	98.7
139	FIPRONIL	100.2	96.9	97.1	96.1
140	Flamprop-methyl	108.6	104.8	109.0	105.4
141	Fluacrypyrim	105.9	105.1	104.9	101.3
142	Flucythrinate-1	98.6	97.1	96.0	96.3
143	Flucythrinate-2	103.6	100.3	100.7	99.6
144	Fludioxonil	92.1	94.9	93.5	94.9
145	Flufenpyl-ethyl	108.4	106.5	105.6	99.3
146	Flumiclorac-pentyl	106.7	99.5	102.8	96.7
147	Flumioxazin	110.9	108.4	110.3	98.1
148	Fluquinaconazole	105.6	102.7	103.4	95.7
149	Fluridone	96.6	92.6	89.2	42.3
150	Flusilazole	104.9	103.6	104.3	100.7

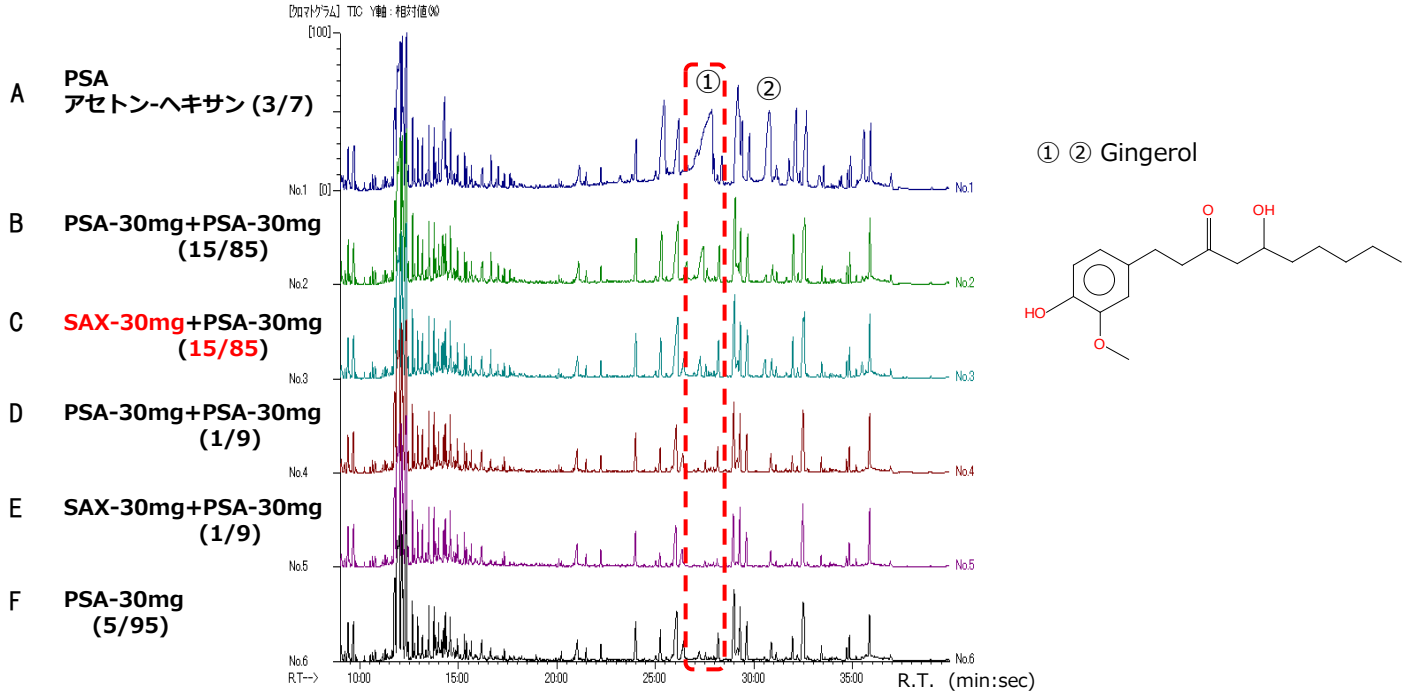
番号	化合物名	溶出溶媒 トルエン-アセトン-ヘキサン比率 (20/15/65) 20%	(15/15/70) 15%	(10/15/75) 10%	(0/15/85) 0%
151	Fluthiacet-methyl	101.2	97.8	99.2	53.4
152	Flutolanil	105.3	105.2	105.3	98.3
153	Flutriafol	95.4	97.3	84.0	49.4
154	Fluvalinate-1	92.0	87.3	93.4	93.5
155	Fluvalinate-2	91.3	87.9	93.9	94.0
156	Formothion	LC	LC	LC	LC
157	Fosthiazate-1	86.0	90.4	66.9	37.3
158	Fosthiazate-2	88.5	91.7	70.4	42.1
159	Halfenprox	90.3	91.4	95.6	92.5
160	Hexaconazole	106.1	105.5	107.0	102.5
161	Hexazinone	LC	LC	LC	LC
162	Imazamethabenz meth	39.6	41.1	25.3	13.3
163	Imibenconazole	103.0	91.3	87.4	23.0
164	Imibenconazole-des-	LC	LC	LC	LC
165	Iprobenfos	107.0	104.1	102.3	98.0
166	Iprodione	103.1	100.2	101.7	94.8
167	Isazophos	107.0	105.4	103.4	99.8
168	Isofenphos	101.8	100.5	101.7	98.4
169	Isofenphos P=O	107.6	105.8	105.4	97.6
170	Isoprocarbe	89.2	89.7	61.9	31.8
171	Isoprothiolane	109.3	105.3	106.3	101.6
172	Isoxathion	98.3	93.9	95.0	93.2
173	Isoxathion-ox	103.4	95.5	100.5	94.8
174	Kresoxim-methyl	105.4	103.1	103.2	100.0
175	Lenacil	59.1	63.9	40.8	22.3
176	Malathion	112.1	105.9	104.4	103.6
177	Mecarbam	105.5	101.2	102.1	97.9
178	Mefenacet	109.6	107.3	107.0	96.2
179	Mefenpyr-diethyl	111.2	106.4	108.3	102.7
180	Mepronil	112.1	108.5	108.4	99.8

回収率の全データはHPの「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-第3法-」をご覧ください(http://www.aisti.co.jp/common/pdf/ss10001p.pdf)。なおこれらのデータは一例であり必ずしも分析結果を保証するものではありません。回収率は事前にご確認されますようお願いします。

参考文献：佐々野ら,「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-第3報-」,第100日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.52

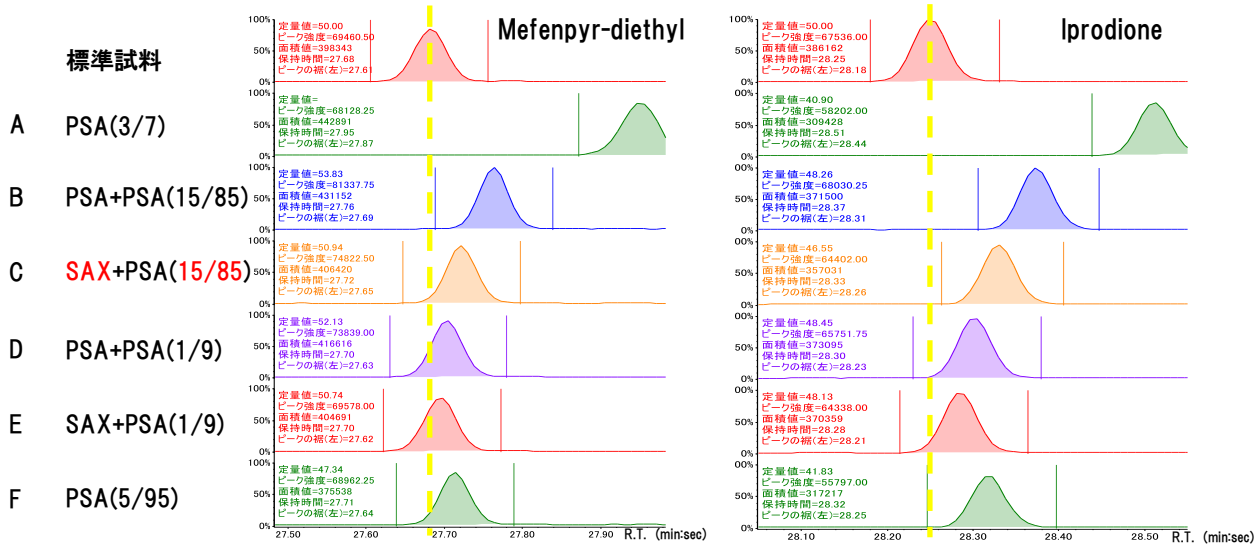
参考：しょうがにおける固相と溶出溶媒の精製効果

ここではしょうがにおける固相と溶出溶媒及び比率の違いによる精製効果の比較をご紹介します。下図は生姜でPSAまたはSAX+PSAの固相を用いた場合のトータルイオンクロマトグラム(TIC)の比較です。SAXを追加することや溶出溶媒のアセトンの比率を下げることで精製効果が高まります。但し使用する固相と溶出溶媒及び比率により農薬の回収率が変動する場合がありますのでご注意願います。



しょうがの各固相と溶出溶媒アセトン-ヘキサンによるSCANトータルイオンクロマトグラムの比較

精製効果はTICだけでなく、定量イオンクロマトグラムでも見られます。下図はしょうがにおけるメフェンピルジエチルとイプロジオンの定量イオンクロマトグラムです。精製が不十分な場合はピークが後ろにずれます(A)。またBとC、EとFではTICでは大きな違いは見られませんが定量イオンクロマトグラムではPSAのみのB及びFではピークが後ろにずれる傾向がみられることからSAXを使用した方が精製効果が高まることがわかります。



しょうがにおける各固相と溶出溶媒アセトン-ヘキサンによる定量イオンクロマトグラム比較

参考文献：佐々野ら,「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-第3報-」,第100日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.52

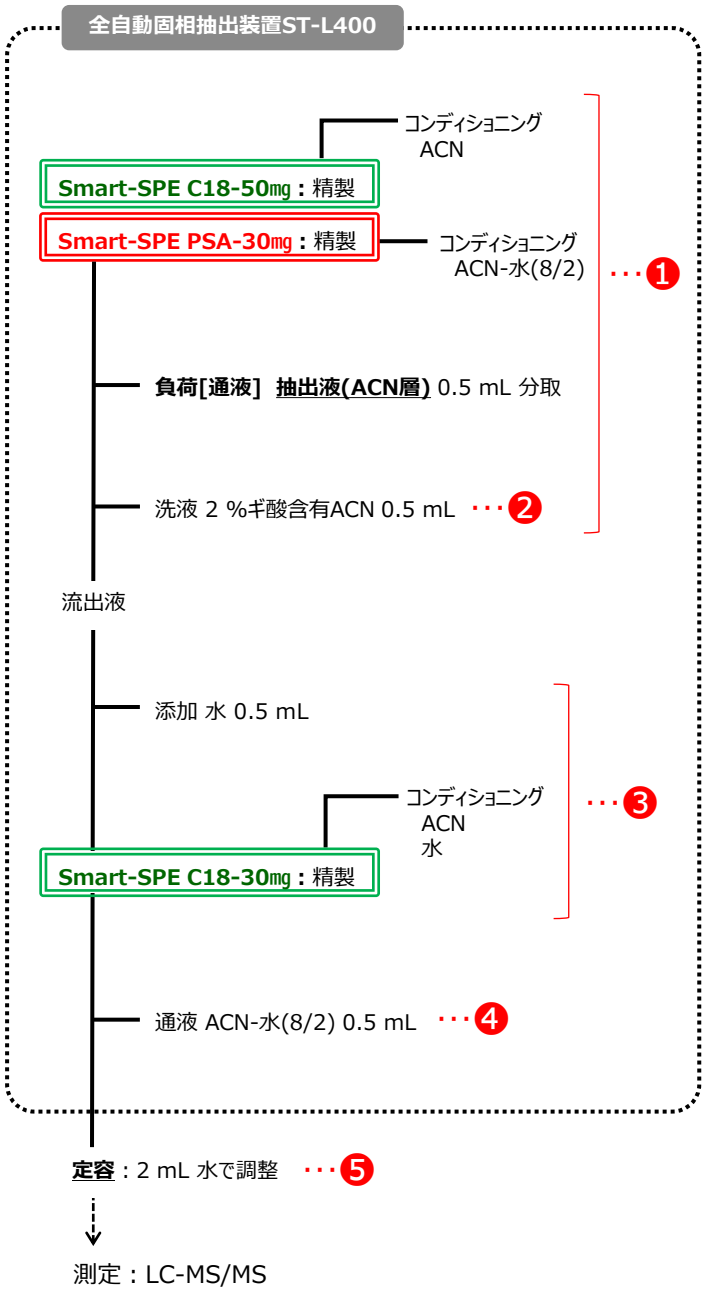
4,2)(3) STQ-LC法 (自動)

LC対象農薬を全自動固相抽出装置(ST-L400)を使用して精製します。

前処理のポイント

①エバポレーターによる濃縮操作なし
②通知一斉試験法Ⅰ法、Ⅱ法を同時分析
③1検体の処理時間約１０分

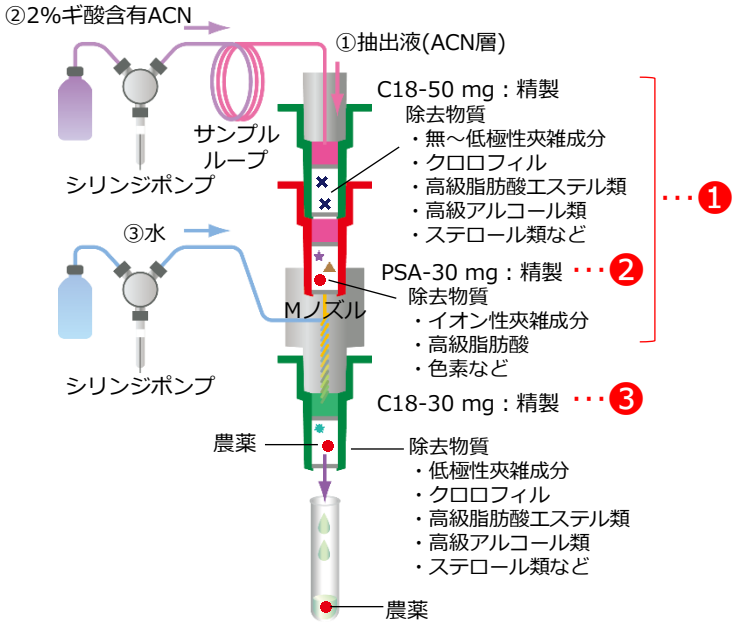
精製フロー



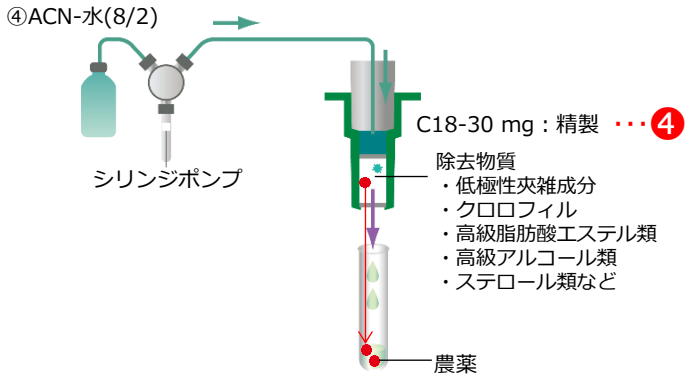
【ST-L400の工程】

目的物質(農薬など)
夾雑成分

(1)試料負荷



(2)通液



自動前処理装置による
アプリケーションデータはこちらから

自動前処理装置の動画はこちらから
（Youtube）

4,2)(3)STQ-LC法（自動）(201809 ver.)

前処理フロー解説・留意点

❶ (1)試料負荷
C18-50mgで油やクロロフィル（緑色）などの無～低極性夾雑成分、PSA-30mgで高級脂肪酸などのイオン性夾雑成分が吸着除去され、農薬は通過し試験管に回収されます。

このとき酸性農薬はPSAに保持されるため2%ギ酸含有ACNを流すことでPSAに保持されたそれらの農薬をPSAから溶出させます。(下記「2%ギ酸含有ACNとACNの回収率比較」参照)

❷ **酸性農薬を対象としない場合は、ギ酸は不要です。アセトニトリルのみを使用します。**
2%ギ酸含有アセトニトリルはギ酸が揮発し濃度が低下すると酸性農薬が溶出不十分になり回収率が低下するため**用時調製**します。

❸ C18-50mg＋PSA-30mgからの流出液に水を添加し、ACNの濃度を下げた状態(約70%)でC18-30mgに通液します。ACN濃度を下げてC18-30mgに通液することでC18-50mgでは除去できなかった低極性夾雑成分を除去します。
このように2個のC18を使用して無～低極性の夾雑成分を除去することでLC-MS/MSで使用する分析カラム(ODS)への負担を軽減します。詳細はp.48「4,2)(4)STQ-LC法の精製」をご覧ください。

❹ (2)通液
C18-30mgにACN-水(8/2)を通液することで一部ここに残っていた農薬を溶出します。

❺ LC-MS/MS測定では測定溶液の組成が感度やピーク形状に影響するため標準溶液はサンプルと同じ組成での測定をお勧めします。

※極性・無極性といった表現は相対的なものです。

測定条件例

LC UHPLC(Nexera X2) (島津製作所)

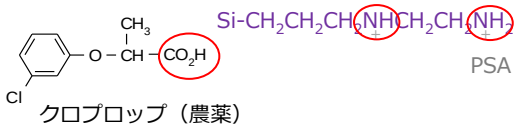
分析カラム	Shim-pack FC-ODS, 内径2.0 mm x 長さ150 mm，粒径3 μm
移動相	A液：0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B液：0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B Conc. 15%(0 min)-40%(1-3.5 min)- 50%(6 min)-55%(8 min)- 95%(17.5-30min)-15%(30.01-40 min)
カラム温度	40 ℃
注入量	2 μL(+40 μL水 共注入)

MS LCMS-8045 (島津製作所)

イオン化モード	ESI positive and negative

2%ギ酸含有ACNとACNの回収率比較(デコポン)

pKaが3～4付近で、官能基に-COOHをもつような酸性農薬は、中性状態では解離してマイナスに帯電しているため、プラスに帯電したPSAに保持されます。溶出の際には2%ギ酸ACNを用いて酸性状態にすることで酸性農薬を非解離にしてPSAから溶出します。一方ACNを用いた場合は酸性農薬は解離状態のままなのでPSAから溶出されず回収率が低下します。



クロプロップ（農薬）

農薬名	pKa	ギ酸アセトニトリル pH3 回収率（%）	アセトニトリル pH7 回収率（%）
Cloprop	-	80	15
Dichlorprop	3.00	77	24
Gibberellin	4.0	102	4
Imazaquin	3.8	78	9
MCPA	3.07	78	12
MCPB	4.84	84	17
Mecoprop	3.78	80	18
Naptalam	4.6	68	15

pp.106-115「7,3)(2)イオン交換カラム」も併せてご覧ください。

参考文献：谷澤ら,「LC/MS/MSを用いた作物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討」,第93日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.46
谷澤ら,「作物中残留農薬の迅速一斉分析法 –LC/MS/MS編– 」,第94日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.46

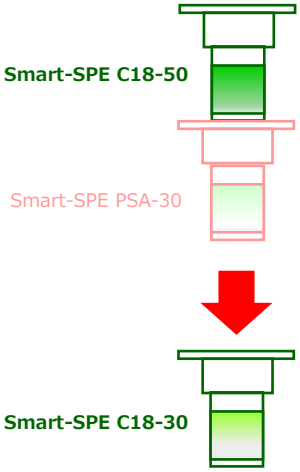
4,2)(4) STQ-LC 法の精製

C18精製におけるLC分析カラムの負担軽減

LCの測定カラムはODS(=C18)がよく使われています。一般的なグラジエント分析では1回のインジェクションの都度、最後に洗浄目的として一定時間溶媒比率を90%以上にし、無～低極性夾雑成分を分析カラムから溶出、除去する必要があります。

STQ-LC法では、これらの夾雑成分を除去することで、測定カラムにこれらの夾雑成分が入らないようにしています。これにより、洗浄時間が不要となり、測定時間の短縮を図ることができます。

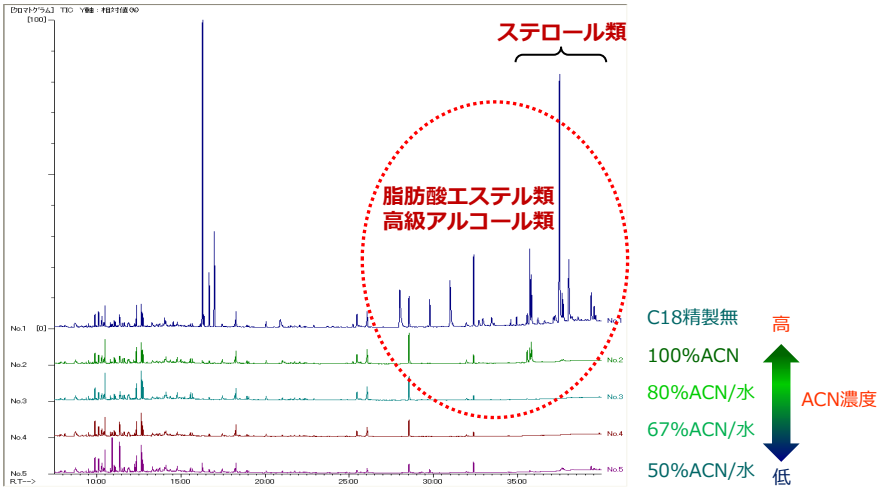
【2個のC18による無～低極性夾雑成分の除去】



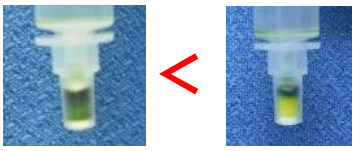
1つ目(C18-50)は抽出液(ACN)で通液し、無極性の夾雑成分が保持されます。

2つ目(C18-30)はACN-水(8/2)で通液するため溶液の極性が高くなります。そのため1つ目で保持されなかった無～低極性の夾雑成分が2つ目のC18に保持されるようになります。

試料：ほうれんそう



ＡＣＮ濃度による精製効果違い

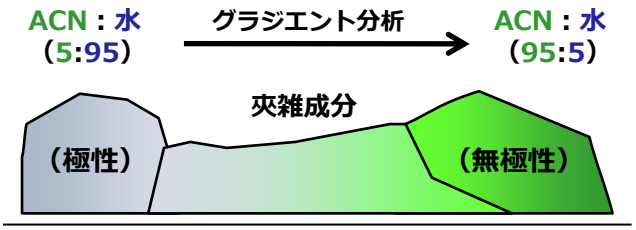


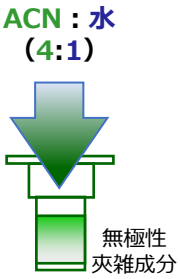
C18による除去成分

- 無～低極性夾雑成分
- クロロフィル
- 高級脂肪酸エステル類
- 高級アルコール類
- ステロール類など

【LC測定カラムにおける無極性夾雑成分除去のイメージ】

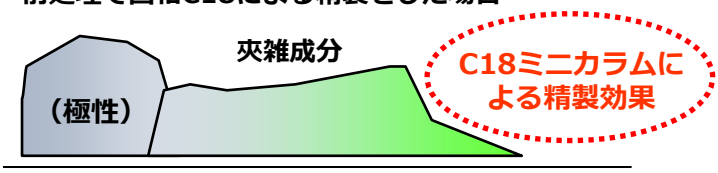
前処理で固相C18を用いない場合





LCで使用されている分離カラムは「ODS」で、固相C18と同じ充填剤なので、予め固相C18で精製することでLCカラムへの負荷を低減します。

前処理で固相C18による精製をした場合



メリット

- LCカラムの劣化を防ぐ
- ピーク形状の維持
- 分析時間の短縮

3）手動法による精製

STQ法前処理キット

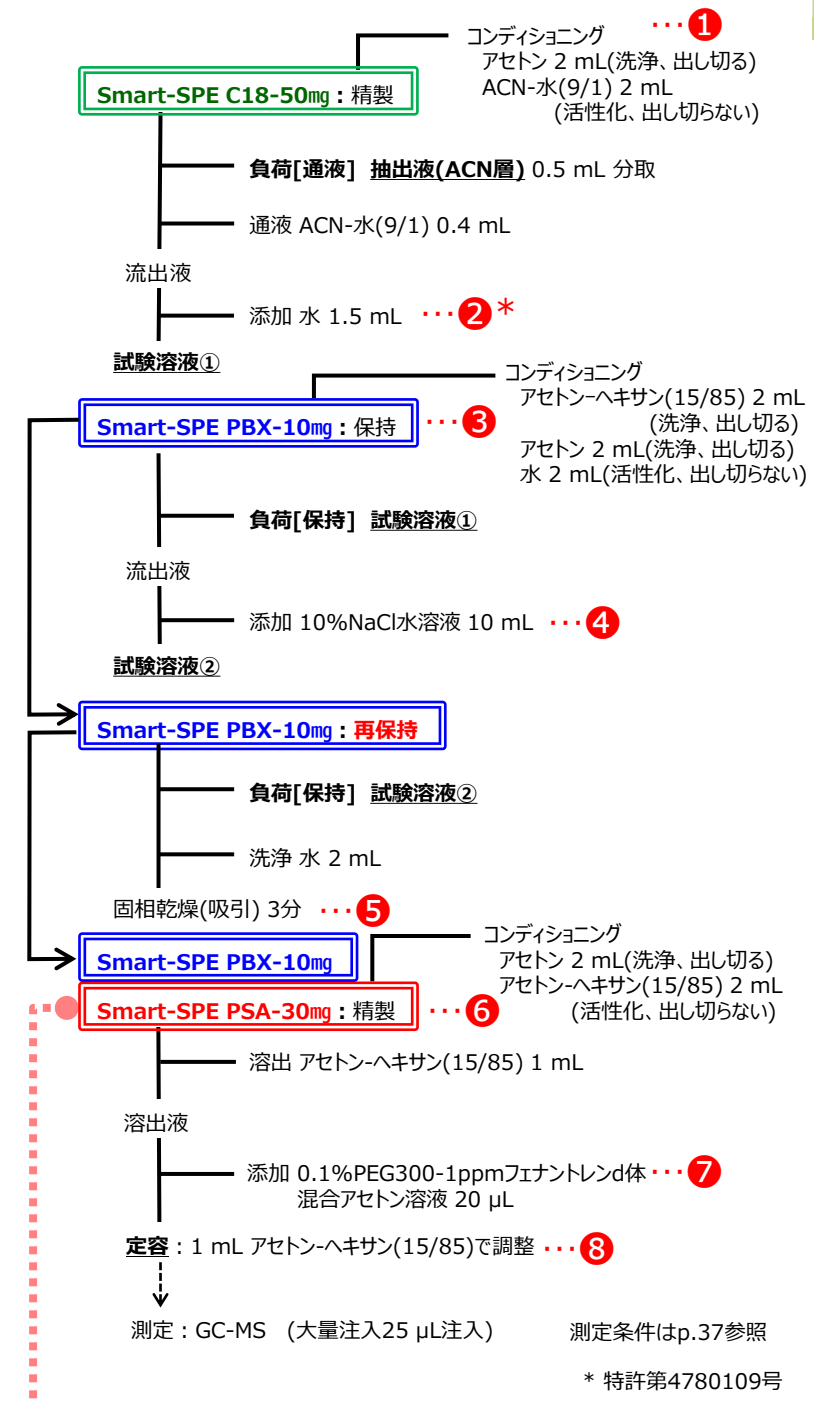
4,3)(1) STQ-GC-B法　(手動)

GC対象農薬を手動で精製します。農薬を保持する際には通液圧力を考慮しポリマー系のPBXを使用します。

前処理のポイント

①エバポレーターによる濃縮操作なし
②精製固相の追加と溶出溶媒の変更が可能
③操作時間は約30分/4検体
（コンディショニング等準備時間は除く）

前処理フロー



前処理フロー解説・留意点

❶ 固相活性化のコンディショニングについて
　シリカ系充填剤は、シリカ細孔が溶媒で十分満たされた状態を保つために固相活性化の溶液は出し切らずに少し残します。

❷ 流出液に水を添加しACN濃度を約35%に下げた試験溶液①をPBXに負荷します。この段階では低極性農薬がPBXに保持され、中～高極性農薬は流出し試験管に回収されます。

❸ PBXはポリマー系の表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤の固相です。手動での通液操作を円滑にするためにC18ではなくポリマー系を使用します(p.38、p.51参照)

❹ 流出液に10%NaCl水溶液を添加してACN濃度を約7%に下げ、且つ塩析効果を持たせた試験溶液②を試験溶液①を負荷したのと同じPBXに負荷します。それにより試験溶液①で保持できなかった中～高極性農薬を再保持させます。一度にACN濃度を下げると低極性農薬がリザーバー等に吸着するため2回にわけてACN濃度を変えて負荷します。
　このとき高極性農薬のアセフェートやメタミドホスはPBX-10mgに保持されませんのでLC法で対応します。

❺ PBX-10mgに残った水分が溶出液（GC-MS測定液）に混入しないように固相を乾燥(吸引)します。カートリッジやマニホールドに連結するためのアダプターに付着している水滴もふき取ります。

❻ PBX-10mgから保持した目的物質を溶出します。そのときPBX-10mgの下にPSA等の固相を連結することで高級脂肪酸などのイオン性夾雑成分を除去します。
　溶出時には夾雑成分の種類に応じて固相を追加したり溶出溶媒を変更することでより精製効果を高めることができます。(下記「精製固相の追加」、pp.38-44参照)

❼ これはGC-MSに大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更してします。※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

❽ 標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

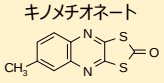
※極性・無極性といった表現は相対的なものです。

精製固相の追加

B法では試料に含まれる夾雑成分に応じて精製固相を追加したり溶出溶媒を変更することができます。
　ただし、固相を追加して精製効果が向上すると一部農薬の回収率が低下する可能性があります。目的物質の回収率は事前にご確認願います。

- 脂肪酸が多い試料の場合(例：古い玄米)
  SAX-30 mg＋PSA-30 mg　溶出　アセトン-ヘキサン（15/85）1 mL
  ※アセトン比を下げることで精製効果は高まりますが、農薬によっては十分に回収されない場合があります。
- カフェインが多い試料の場合(例：茶)
  SI-30 mg＋PSA-30 mg　溶出　アセトン-ヘキサン（20/80）1 mL　※SI=シリカゲル
  ※アセトン比を20%以下にすることでカフェインの除去効果が高まります。
- 色素やフラボノイドが多い試料の場合(例：柑橘類)
  GCK-20 mg＋PSA-30 mg　溶出　トルエン-アセトン-ヘキサン（5/10/85）1 mL
  ※GCK＝グラファイトカーボン
  ※トルエンを使用してもキノメチオネートのように回収率が低い平面構造の農薬がありますのでご注意願います。

キノメチオネート



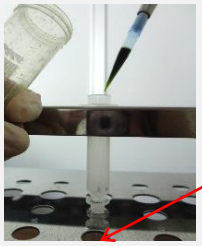
*特許第4780109号

4,3)(1)STQ-GC-B法 (手動) (201809 ver.)

操作方法の解説

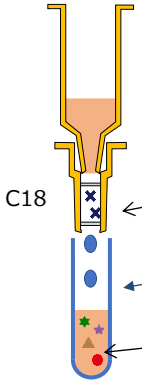
目的物質(農薬など) ●
夾雑成分 ✖ ★ ▲ ✸

① C18で精製



抽出液0.5 mLをC18へ負荷

流出液を試験管(小)に回収



C18で無～低極性の夾雑成分を除去して農薬はスルーさせます。

除去物質
・無～低極性夾雑成分
・クロロフィル
・高級脂肪酸エステル類
・高級アルコール類
・ステロール類など

②PBXへ農薬を保持（2段階保持）

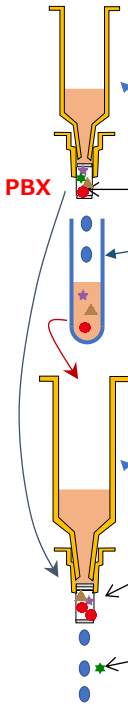
【保持1回目】
①の流出液に水を加えてACN濃度を約35%にしてPBXに通液

流出液を試験管(大)に回収

【保持2回目】
保持1回目の流出液にNaCl水溶液を加えてACN濃度を約7%とし再度PBXに通液する。

2回目の保持はリザーバー(大)に変更し、吸引マニホールドを使用

流出液は廃棄



【保持1回目】
試料を水で希釈後、PBXに通水し低極性農薬を保持させます。

低極性農薬を保持

【保持2回目】
流出液にNaCl水溶液を添加後、再びPBXに通液し、中～高極性農薬を再保持させます。

低極性～高極性まで幅広い農薬を同じカラムに保持

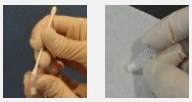
除去物質
・高極性夾雑成分
・糖類
・水など

B法ではアセフェートやメタミドホスなど高極性農薬はPBXに保持されませんのでLC法で対応します

PBX：ポリマー系の表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン親水性/疎水性バランス充填剤の固相で、ここでは農薬を保持させるために使用します。

③固相乾燥(吸引)

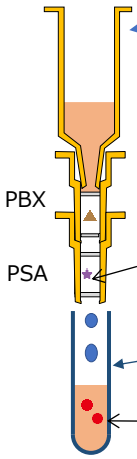
固相の中に水分が残っていると、溶出溶媒と分離し結果に影響を与える場合があるのでで吸引マニホールドで吸引し固相を乾燥する。



固相乾燥(吸引)前に固相やアダプタの水分をキムワイプや綿棒で取り除く。固相はリザーバーを外して固相乾燥(吸引)する。

④溶出＆PSAで精製

PBXの下にPSAを連結させ、アセトン-ヘキサン(15/85)　1 mLで溶出



ガラスリザーバー
アセトンによるリザーバーからの不純物の溶出を防ぐため

PSAでは高級脂肪酸や色素等を除去し、農薬はスルーさせます。

除去物質
・イオン性夾雑成分
・高級脂肪酸
・色素など

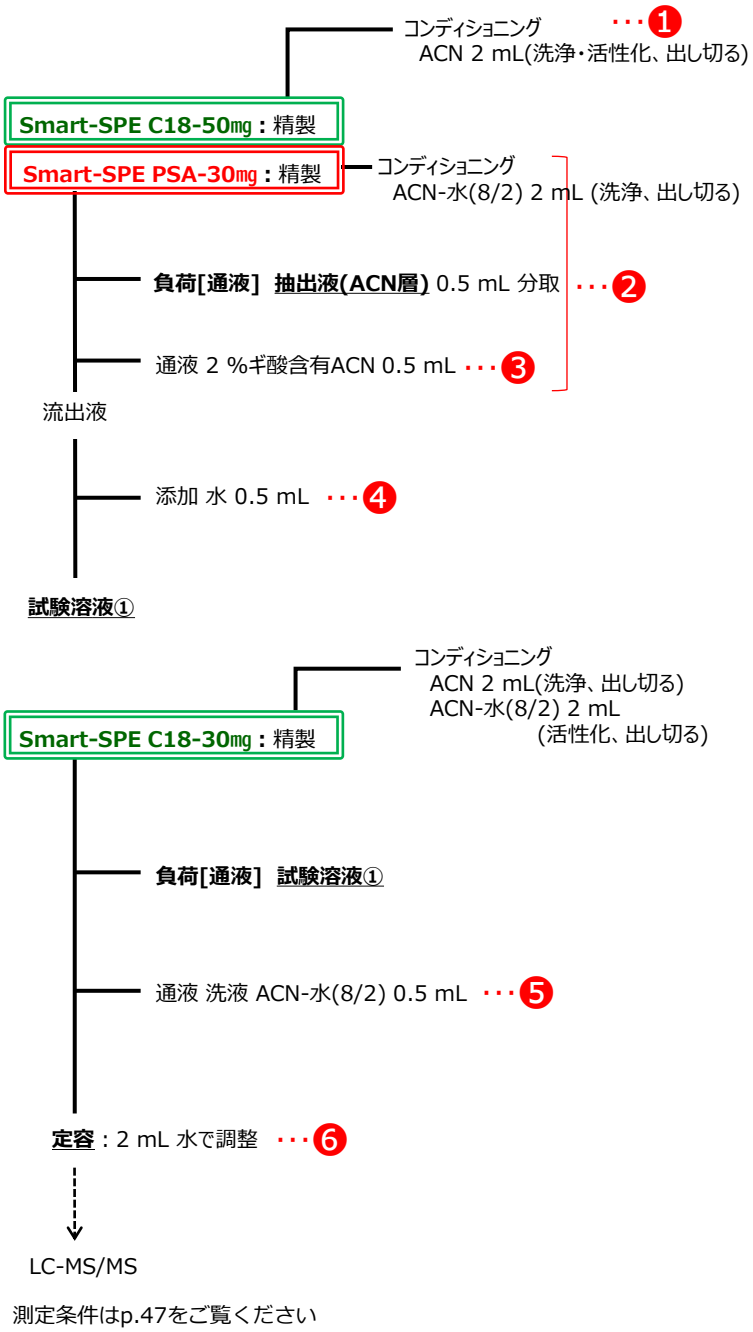
4,3)(2) STQ-LC法 (手動)

LC対象農薬を手動で精製します。

前処理のポイント

①エバポレーターによる濃縮操作なし
②通知一斉試験法Ⅰ法、Ⅱ法を同時分析
③操作時間は約１５分/４検体
(コンディショニング等準備時間は除く)

前処理フロー



前処理フロー解説・留意点

❶ 本来シリカ系充填剤の場合はシリカ細孔が溶媒で十分満たされた状態を保つために固相活性化の溶液は出し切らずに少し残しますが、メス試験管に回収した流出液が2 mLを超えないようにするため、ここでは固相活性化に用いた溶液を出し切ります。
コンディショニング後は固相が乾燥しないように速やかに溶液を負荷します。

❷ C18-50mgで油やクロロフィル（緑色）などの、無～低極性夾雑成分、PSA-30mgで高級脂肪酸などのイオン性夾雑成分が吸着除去され、農薬は通過し試験管に回収されます。

このとき酸性農薬はPSAに保持されるため2%ギ酸含有ACNを通液することでPSAから溶出させます。(p.53「2%ギ酸含有ACNとACNの回収率比較」参照)

❸ **酸性農薬を対象としない場合は、ギ酸は不要です。アセトニトリルのみを使用します。**
2%ギ酸含有アセトニトリルはギ酸が揮発し濃度が低下すると酸性農薬が溶出不十分になり回収率が低下するため**用時調製**します。

❹ C18-50mg＋PSA-30 mgからの流出液に水を添加し、ACNの濃度を下げた状態(約70%)でC18-30mgに通液します。 ACN濃度を下げてC18-30mgに通液することでC18-50mgでは除去できなかった低極性夾雑成分を除去します。
このように2個のC18を使用して無～低極性の夾雑成分を除去することでLC-MS/MSで使用する分析カラム(ODS)への負担を軽減します。詳細はp.48「4,2)(4)STQ-LC法の精製」をご覧ください。

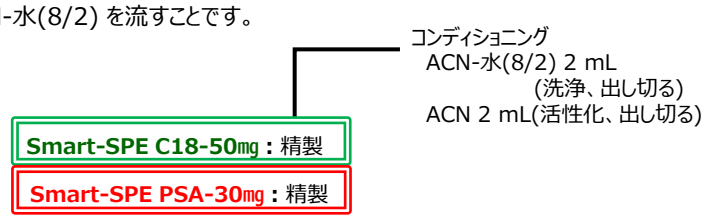
❺ 試験溶液①負荷後のC18-30mgにACN-水(8/2)を通液することで一部ここに残っていた農薬を溶出します。

❻ LC-MS/MS測定では測定溶液の組成が感度やピーク形状に影響するため標準溶液はサンプルと同じ組成での測定をお勧めします。

※極性・無極性といった表現は相対的なものです。

【コンディショニングについて】

手動法によるC18-50とPSAのコンディショニングは両者を連結し下記手順で行っても構いません。ポイントはPSAに先にACN-水(8/2) を流すことです。

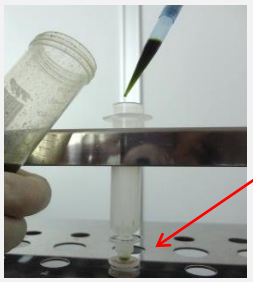


4,3)(2)STQ-LC法 (手動) (201809 ver.)

操作方法の解説

目的物質(農薬など) ●
夾雑成分 ✖ ✸ ★ ▲

①C18＋PSAで精製



抽出液0.5 mLをC18＋PSAへ負荷

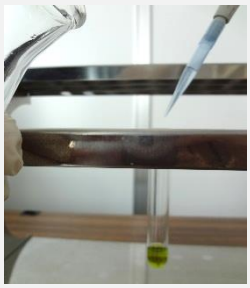
流出液を試験管(小)に回収

②C18＋PSAから農薬を溶出

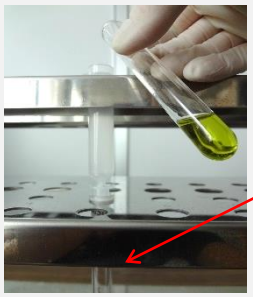
2%ギ酸ACNを
C18+PSAへ通液し、C18＋PSA
から農薬を溶出

流出液を試験管(小)に回収

③C18で再度精製



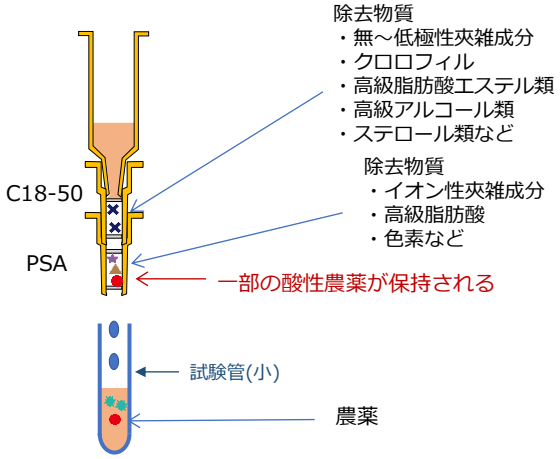
水を0.5 mL添加し、試料中の
溶媒濃度を約70%に下げる。



C18へ通液

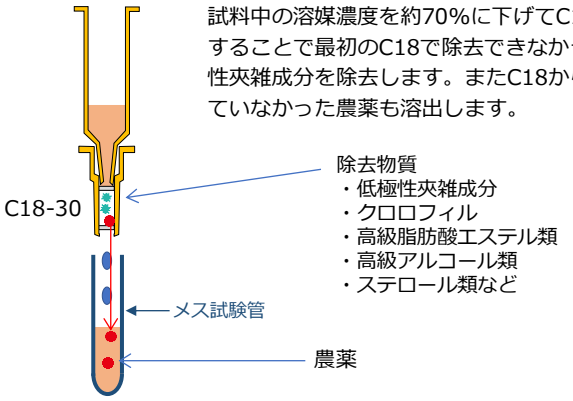
流出液をメス試験管に回収

C18で無～低極性の夾雑成分、PSAで脂肪酸などを除去し、農薬はスルーさせます。しかし、一部の酸性農薬はPSAに保持されます。



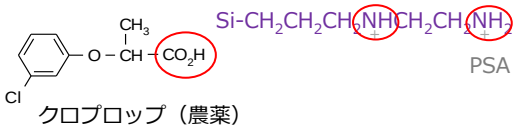
PSAに保持された酸性農薬は酸性の2%ギ酸含有ACNを通液することにより酸性農薬を非解離状態にし、PSAから溶出させます。（下図参照）

試料中の溶媒濃度を約70%に下げてC18に通液することで最初のC18で除去できなかった低極性夾雑成分を除去します。またC18から溶出していなかった農薬も溶出します。



2%ギ酸含有ACNとACNの回収率比較(デコポン)

pKaが3～4付近で、官能基に-COOHをもつような酸性農薬は、中性状態では解離してマイナスに帯電しているため、プラスに帯電したPSAに保持されます。溶出の際には2%ギ酸ACNを用いて酸性状態にすることで酸性農薬を非解離にしてPSAから溶出します。一方ACNを用いた場合は酸性農薬は解離状態のままなのでPSAから溶出されず回収率が低下します。



クロプロップ（農薬）

農薬名	pKa	ギ酸アセトニトリル pH3 回収率（%）	アセトニトリル pH7 回収率（%）
Cloprop	-	80	15
Dichlorprop	3.00	77	24
Gibberellin	4.0	102	4
Imazaquin	3.8	78	9
MCPA	3.07	78	12
MCPB	4.84	84	17
Mecoprop	3.78	80	18
Naptalam	4.6	68	15

pp.106-115「7,3)(2)イオン交換カラム」も併せてご覧ください。

参考文献：谷澤ら,「LC/MS/MSを用いた作物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討」,第93日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.46
谷澤ら,「作物中残留農薬の迅速一斉分析法　–LC/MS/MS編– 」,第94日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.46

5.　STQ法の応用例

1）残留農薬

（1）STQ-GC-B法アレンジ法

①大豆

②アルコール飲料

③オリーブオイル

④畜水産物(脂質の多い試料)

（2）個別分析法

①グリホサート・グルホシネート

②ジチオカルバメート系農薬

③TPN・キャプタン・カプタホール・ホルペット

④ネオニコチノイド

2）動物用医薬品

（1）一斉分析

（2）マラカイトグリーン

3）カビ毒　　アフラトキシン

4）その他　　メラミン

5）【参考】STQ-GC-A法

5,1)(1)①　大豆

大豆では遠心分離後のアセトニトリル層が少量になる場合があります。十分なアセトニトリル層を確保し、定量性と抽出効率を高めるために繰り返し抽出定容法を行います。

前処理のポイント

①セラミックホモジナイザーの使用
②振とう時間の延長
③遠心分離前の静置
④繰り返し抽出定容法

前処理フロー

試料採取 5 g
- 添加 水　10 mL ・・・❶
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分
- **セラミックホモジナイザー　2個** ・・・❷
- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 **15秒**
- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

激しく振とう 2分 ・・・❸

静置 5分 ・・・❹

遠心分離　3,500 rpm, 5分

ACN層①

繰り返し抽出
残留物(試料層・水層)
- 添加 ACN (定容量-ACN層①量) mL ・・・❺

振とう　1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

ACN層②

①②合算

定容：15 mL ACNで調整

抽出液(ACN層)

抽出液(ACN層) 1.5 mL 分取
- **添加 ACN 0.5 mL**

試験溶液 2 mL

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(9/1)
- **負荷[通液]　試験溶液** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(9/1) 0.4 mL

流出液
- 添加 10%NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg
Smart-SPE PSA-30mg：精製
- コンディショニング　アセトン　アセトン-ヘキサン(15/85)
- 溶出 アセトン-ヘキサン(15/85) 1 mL

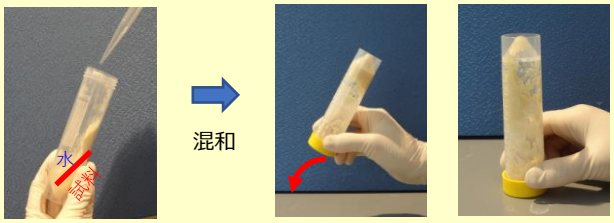
溶出液
- 添加 0.1%PEG300-1ppmフェナントレンd体混合アセトン溶液 20 μL ・・・❻

定容：1 mL アセトン-ヘキサン(15/85)で調整 ・・・❼

測定：GC-MS（25 μL大量注入）

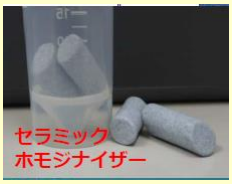
前処理フロー解説・留意点

❶　試料を斜めにして水を入れると混合しやすくなります。また水添加後は遠沈管を逆さにして遠沈管の底にあった試料を蓋側に落とし水とよく混合します。



試料を斜めにして水を入れる　　底の試料を逆さにして底の試料を落として混ぜる

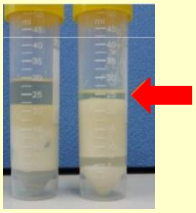
❷　試料と塩類がよく混合するようにセラミックホモジナイザーを2個入れます。



❸　大豆は混ざりにくいので2分間激しく振とうします。このとき試料が遠沈管内で動いていることをご確認願います。

❹　振とう後は発熱します。常温に戻るまで5分間そのまま放置してから遠心分離します。

❷❸❹の操作によりACN層を増やすことができます。



❺　本法では15 mLに定容しますので、例えばACN層①の量が6 mLの場合2回目の抽出にはACNを(15-6=9) mL添加します。

❻　これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。
※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

❼　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

参考文献：佐々野ら,「STQ法における繰り返し抽出定容法の検討」,第105回日本食品衛生学会学術講演会要旨集

5,1)(1)②　アルコール飲料

ワインや日本酒などにはアルコール(エタノール)が含まれています。通常通りアセトニトリル10 mLで抽出を行った場合、遠心後のアセトニトリル層にエタノールが移行することで10 mLを超え、希釈されてしまいます。そこで本法では繰り返し抽出定容法をご紹介します。

前処理のポイント	繰り返し抽出定容法

前処理フロー …❶

試料採取 10 g
- 添加 ACN 10 mL

混和
- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 10秒
- 添加 $MgSO_4$(無水)　4 g

振とう 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

ACN層①

繰り返し抽出 …❷
- 残留物(試料層・水層)
  - 添加 ACN(定容量- ACN層①量) mL
- 振とう　1分
- 遠心分離　3,500 rpm, 5分
- ACN層②

①②合算

定容：20 mL ACNで調整

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-30mg：精製 …❸
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(9/1)
- **負荷[通液]　抽出液(ACN層)** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(9/1) 0.4 mL

流出液
- 添加 10%NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg
Smart-SPE PSA-30mg：精製
- コンディショニング　アセトン　アセトン-ヘキサン(15/85)
- 溶出 アセトン-ヘキサン(15/85) 1 mL

溶出液
- 添加 0.1%PEG300-1ppmフェナントレンd体混合アセトン溶液 20 μL …❹

定容：1 mL アセトン-ヘキサン(15/85)で調整 …❺

↓

測定：GC-MS（25 μL大量注入）

前処理フロー解説・留意点

❶　アルコール飲料では直接固相に負荷して精製した場合、一部の低極性農薬が低回収率となります。これは試料の極性が高いため容器等に吸着した可能性が考えられます。そのためACN抽出を行いました。

日本酒における前処理の違いによる回収率の比較例

成分名	試料を直接固相に負荷 回収率(%)	繰り返し抽出定容法 回収率(%)	logPow
エトフェンプロックス	31	82	6.9
テフルトリン	37	84	6.4
プロチオホス	41	84	5.7

❷　ACN抽出を行ったところ試料に含まれるエタノールの影響により添加量の10 mLを超えてしまいます。そこで遠心分離後の残留物に再度ACNを添加し、繰り返し抽出を行い20 mLに定容します。

ACN層①

ACN層②

※ACN層①を分取した残りと2回目の抽出で添加した7.5 mLの合計

❸　アルコール飲料では低極性夾雑成分が少ないためC18-30 mgを使用します。

❹　これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。
　※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

❺　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

参考文献：島ら,「加工食品中残留農薬のSTQ法による分析適合性の検討」,第43回農薬残留分析研究会講演要旨集pp.173-182

5,1)(1)③　オリーブオイル

オリーブオイルは一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸を多く含む油脂であり、抽出・精製においてその除去が課題となります。本法では遠心分離及び冷凍、溶出溶媒比の変更によりオレイン酸を除去します。・・・❶

前処理のポイント

①抽出効率向上のため試料採量を少なくする
②遠心分離と冷凍により油層を分離
③アセトン比率を下げてPSAから溶出

前処理フロー

試料採取 2 g

- 添加 **ACN 10 mL**

手で振とう

- 添加 **水 10 mL**

手で振とう

- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 10秒

- 添加 $MgSO_4$(無水)　4 g

振とう 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

冷凍(-20℃,90分) ・・・❷

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(9/1)
- **負荷[通液]　抽出液(ACN層)** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(9/1) 0.4 mL

流出液

- 添加 10%(w/w)NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg
Smart-SPE PSA-30mg：精製
- コンディショニング　アセトン　**アセトン-ヘキサン(10/90)**
- 溶出 **アセトン-ヘキサン(10/90)** 1 mL・・・❸

溶出液

- 添加 0.1%PEG300-1ppmフェナントレンd体混合アセトン溶液 20 μL　・・・❹

定容：1 mL **アセトン-ヘキサン(10/90)**で調整・・・❺

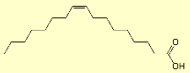
↓

GC-MS測定（25 μL大量注入）

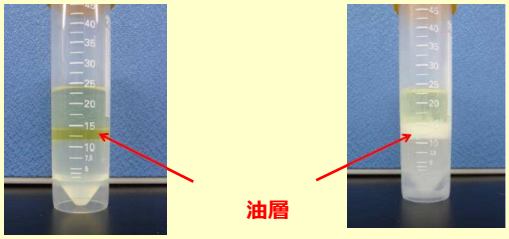
前処理フロー解説・留意点

❶　オレイン酸は動物性脂肪や植物油に多く含まれている一価の不飽和脂肪酸です。

オレイン酸



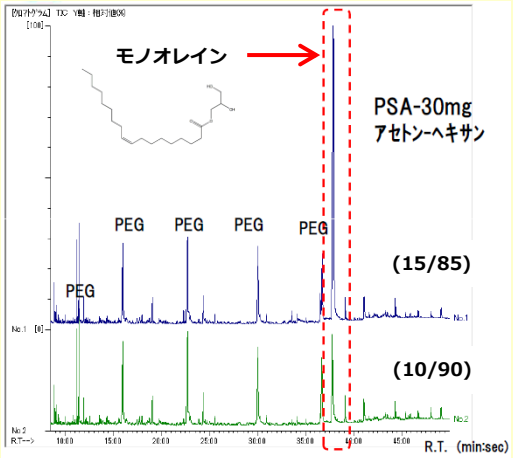
❷　遠心分離後、試料を冷凍することで油層が固まり、分離しやすくなります。



遠心分離後　　冷凍後

❸　アセトンの比率を下げることでPSAによるモノオレインの除去効果が高くなります。

PSAにおける溶出溶媒による精製効果の比較



❹　これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。
※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

❺　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

参考文献：佐々野ら,「自動前処理装置を用いたオリーブオイル中の残留農薬迅速一斉分析法の検討」,第104日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.98

5,1)(1)④　畜水産物(脂質の多い試料)

畜水産物など脂肪を多く含む試料ではアセトニトリルに脂肪が溶解しないためアセトンを用いて農薬の抽出を行います。また遠心分離により脂肪層を分離し、その後の冷凍固化によりその大部分を除去します。

前処理のポイント	①アセトンによる抽出 ②遠心分離・冷凍による脂肪の除去

前処理フロー

試料採取 10 g

- 添加 水(10-試料の含水量) mL ・・・❶
- **添加 アセトン** 10 mL ・・・❷

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 10秒

- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

冷凍(-20℃,60分) ・・・❸

抽出液(アセトン層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(9/1)
- **負荷[通液]　抽出液(アセトン層)** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(9/1) 0.4 mL

流出液

- 添加 10%(W/W)NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg
Smart-SPE PSA-30mg：精製
- コンディショニング　アセトン　**アセトン-ヘキサン(10/90)**
- 溶出 **アセトン-ヘキサン(10/90)** 1 mL

溶出液

- 添加 0.1%PEG300-1ppmフェナントレンd体 混合アセトン溶液 20 μL ・・・❹

定容：1 mL **アセトン-ヘキサン(10/90)**で調整 ・・・❺

↓

GC-MS測定（25 μL大量注入）

前処理フロー解説・留意点

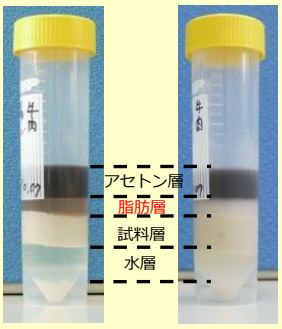
❶　試料の水分含量が80%未満の場合は水を添加します 。水は試料の水分と合わせて水が10 g相当となるように添加します(p.15(1)参照)。

❷　脂肪を多く含む畜水産物では脂肪を溶解しその中の農薬を抽出するために抽出溶媒にアセトンを使用します。
　下図は脂肪がアセトンに溶解することを確認するため牛脂をアセトンまたはアセトニトリルに溶解し比較したものです。牛脂にアセトンを添加すると全体が白濁して混和しますが、アセトニトリルでは遠沈管(PPチューブ)の表面に脂肪が付着して混和されません。

牛脂

左）アセトン　右）アセトニトリル
抽出溶媒を加えて振とうした牛脂

❸　遠心分離によりアセトン層と試料層の間に脂肪層が分離されます。それを冷凍することで脂肪を固化させ大部分の脂肪を取り除くことができます。



遠心分離後　冷凍後
牛肉　ミンチ

【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℃

❹　これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。

❺　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

参考文献：
1)根本了,「食品中残留農薬公示試験法の進歩」
　食品衛生学雑誌,*Vol.51, N0.6, pp.349-359 (2010)*
2)佐々野ら,「畜産物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討 －GC/MS編－」
　第101回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.31
3)谷澤ら,「畜産物中残留農薬の迅速一斉分析法の検討 －LC/MS/MS編－」
　第101回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.32
4)佐々野ら,「畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法の検討 －GC/MS編－」
　第102回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.42
5)小西ら,「畜水産物中の残留農薬の迅速一斉分析法の検討 －LC/MS/MS編－」
　第102回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.41

5,1)(2)①　グリホサート･グルホシネート

グリホサート、グルホシネートは非常に水溶性が高く水抽出を行います。そのため固相抽出の際に目詰まりが生じる場合があります。そこで本法では抽出時に除タンパクを行い固相抽出での操作性を向上させました。また測定には陰イオン交換分析カラムを用いることで前処理で誘導体化をせず操作を簡便にしています。

前処理フロー　通常試料

試料採取 1～10 g (野菜･果実 10 g、大豆 2 g) ･･･❶

添加 水 (25－試料の含水量) mL ･･･❷

振とう抽出 10分

添加 ACN 約25 mL･･･❸

★ 全量が50 mLになるように調整

振とう 1分

静置 5分 ･･･❹

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出上澄液

抽出上澄液 0.5 mL 分取

添加 水 1.5 mL ･･･❺

試験溶液 2 mL (抽出上澄液：水＝1:3)

全自動固相抽出装置ST-L400

コンディショニング
アセトン
メタノール-水(1/9)

Smart-SPE PBX-10mg：精製

Smart-SPE SCX-30mg：精製

Smart-SPE PSA-50mg：保持

負荷[保持]　**試験溶液** 1 mL 分取

洗浄 メタノール-水(1/9) 1.5 mL

Smart-SPE PSA-50mg

溶出 0.14%アンモニア水 0.9 mL

溶出液

添加 5%ギ酸-水 30 μL ･･･❻

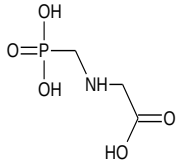
定容：1 mL 水で調整

測定：LC-MS/MS

化合物情報

【グリホサート】

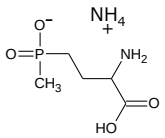
MF： C3H8NO5P
MW:169.1
LogPow： ＜-3.2(pH2-5，20℃)
pKa：5.77±0.03、
2.18±0.02(20±0.2℃)



【グルホシネート】

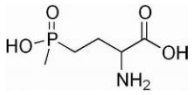
グルホシネートアンモニウム塩

MF： C5H15N2O4P
MW:198.2
LogPow： ＜0.1(pH7、22℃)



グルホシネート

MF： C5H12NO4P
MW:181.1
pKa：pKa1＜2、pKa2:2.9、pKa3:9.8



前処理フロー解説・留意点

❶ 大豆などタンパク質を多く含む試料は試料中のタンパク質量が1 g以下になるように採取量を調整します。(p.63参照)
小麦粉、食パン、小豆などデンプンを多く含む試料はp.61「デンプンを多く含む試料」をご覧ください。

❷ 試料の含水量と合わせて25mLになるように水を添加します。

❸ ACNを添加することにより、タンパク質を変性させ、遠心分離により沈殿させて除去します。

除タンパク後の試料
(ほうれんそう)

❹ タンパク質の変性を促すため必ず5分静置願います。

❺ 水を添加することでACNの比率を下げ、PBXへの低極性夾雑成分の吸着を促進させます。

❻ ギ酸水を添加し、溶出液のpHを中性～酸性にします。

測定条件

LC　UHPLC(Nexera X2) (島津製作所)

分析カラム	TSKgel SuperIC-AP, 4.6 mm I.D. x 7.5 cm
移動相	A液：0.1 mM ギ酸アンモニウム水溶液 B液：0.5 % ギ酸水溶液
流速	0.8 mL/min
グラジエント	B Conc. 5%(0.5 min)-98%(2-11 min)-5%(12-14 min)
カラム温度	40 ℃
注入量	5 μL

MS　LCMS-8045 (島津製作所)

イオン化モード： ESI positive

5,1)(2)①個別分析法　グリホサート・グルホシネート(202010ver.)

前処理のポイント
①アセトニトリルによる除タンパク
②誘導体化なし
③PSAとの相互作用による精製
④NaOHの添加（デンプンを含む試料の場合）

前処理フロー

※デンプンを多く含む試料

試料採取 1～2 g ・・・❶
- 添加 水 25 mL

手で振とう 1分
- **添加 1 mol/L NaOH水溶液 50 μL ・・・❷**

振とう抽出 10分
- 添加 ACN 約25 mL ・・・❸
- ★ 全量が50 mLになるように調整

振とう 1分

静置 5分 ・・・❹

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出上澄液

抽出上澄液 0.75 mL 分取
- 添加　水 2.25 mL ・・・❺

試験溶液 3 mL (抽出上澄液：水＝1:3)

全自動固相抽出装置ST-L400

- コンディショニング
  アセトン
  メタノール-水(1/9)
- Smart-SPE PBX-10mg：精製
- Smart-SPE SCX-30mg：精製
- Smart-SPE PSA-50mg：保持
- **負荷[保持]　試験溶液 2 mL** 分取 ・・・❻
- 洗浄 メタノール-水(1/9) 1.5 mL
- Smart-SPE PSA-50mg
- 溶出 0.14%アンモニア水 0.9 mL

溶出液
- 添加 5%ギ酸-水 30 μL ・・・❼

定容：1 mL 水で調整

LC-MS/MS

前処理フロー解説・留意点

❶ 小麦粉などデンプンを多く含む試料は試料中のデンプン量が1 g 以下になるように採取量を調整します。例えば小麦粉の場合は1 g、食パンの場合は2 g採取します(p.63参照)。

❷ NaOH水溶液を添加しアルカリ性にすることで農薬のデンプンへの吸着を防ぎます。

ACNを添加することにより、タンパク質を変性させ、遠心分離により沈殿させて除去します。

❹ タンパク質の変性を促すため必ず5分静置願います。

❺ 水を添加することでACNの比率を下げ、PBXへの低極性夾雑成分の吸着を促進させます。

試料採取量が1 gの場合は2 mL分取、2 gの場合は1 mL分取して固相に負荷します。

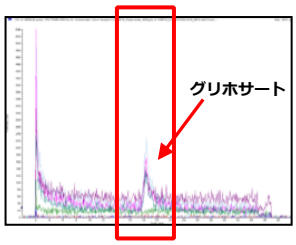
❼ ギ酸水を添加し、溶出液のpHを中性～酸性にします。

LC-MS/MSのリン酸コーティング

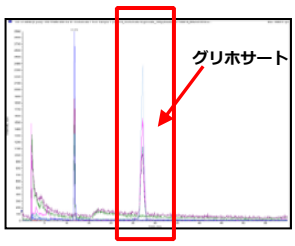
グリホサートのようなリン酸化合物の配管への吸着を抑制します。

カラムの代わりにユニオンを接続し、イオン化部からプローブとエレクトロードを引き抜いた状態で、プローブの先端まで２％リン酸を0.05 mL/minで12時間通液します。
弊社では約半年程度効果が持続することを確認しています。また他の農薬分析への影響は見られませんでした。

リン酸コーティングなし



リン酸コーティングあり



※装置によってはリン酸コーティングの必要がない場合もあります。まずはコーティングなしの状態でピーク形状をご確認願います。

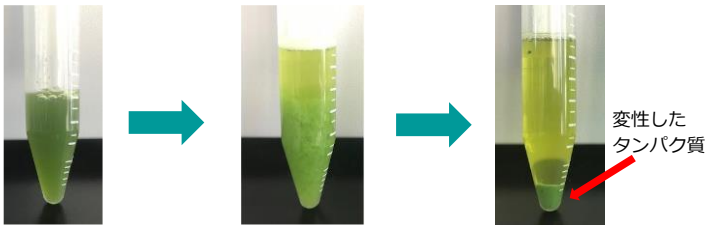
参考文献：石渡智　ホクレン農業協同組合連合会,「残留農薬モニタリング検査の取り組みと高感度LC/MS/MSの活用法の紹介」(2013)

5,1)(2)①個別分析法　グリホサート・グルホシネート(202010ver.)

タンパク質の除去効果

水抽出した抽出液に同量のアセトニトリルを添加して5分間静置したところ、変性したタンパク質が析出してきました。これを遠心分離したところ変性したタンパク質が沈殿しました。

タンパク質を変性させるため、アセトニトリルを添加してから5分間静置するのが重要です。



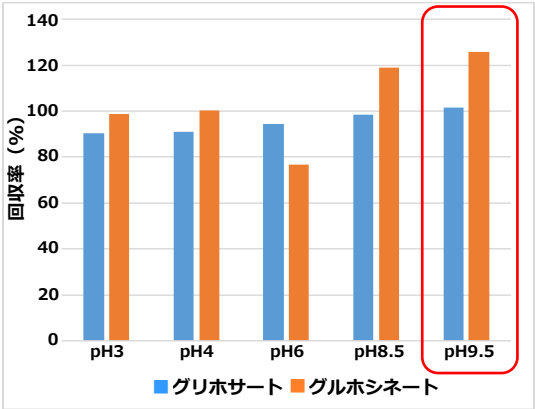
①水抽出液
3mL分取

②アセトニトリル3 mL
添加後５分間静置

③遠心分離後

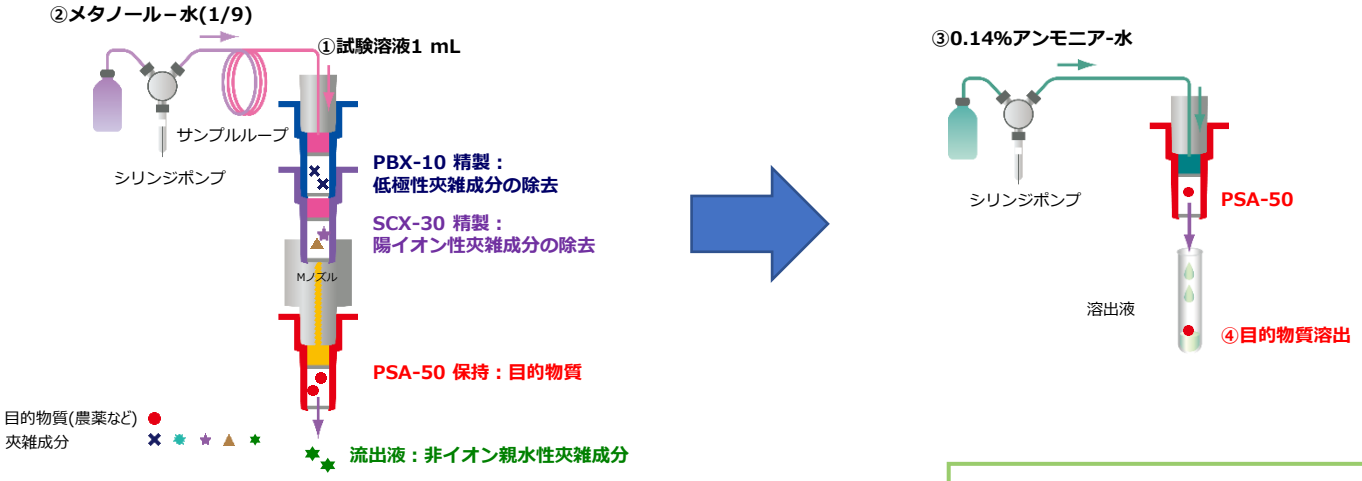
抽出時のｐＨ

小麦粉などデンプンを多く含む試料では抽出工程でpH調整をしない場合はグリホサートの回収率が低下します。抽出時に酸性(塩酸で調整)またはアルカリ性(NaOHで調整)にpHを調整したところアルカリ性での回収率が改善されました。

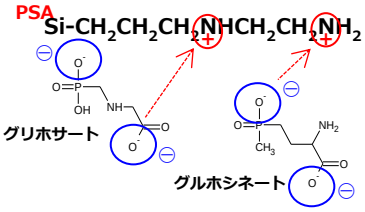


抽出時のpH調整と回収率の関係

精製のポイント

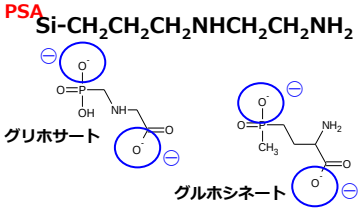


環境が中性の場合



環境が中性の場合、PSAはプラスに帯電しており、マイナスに帯電しているグリホサート、グルホシネートを保持します。

環境がアルカリ性の場合



環境がアルカリ性の場合、PSAは帯電していないため、マイナスに帯電しているグリホサート、グルホシネートはPSAから溶出されます。

①試料液1 mL負荷
PBX-10：低極性夾雑成分を除去します。
SCX-30：陽イオン性夾雑成分を除去します。
PSA-30：グリホサート・グルホシネートを保時します。

②メタノール-水(1/9)で固相を洗浄します。

③④0.14%アンモニア水による溶出
アルカリ性の0.14%アンモニア水によりPSAを非解離状態にしてグリホサート・グルホシネートをPSAから溶出します。

参考資料

(1) 大豆や小麦粉の前処理について

タンパク質を多く含む試料(例：大豆)やデンプンを多く含む試料(例：小麦粉)では抽出時にグリホサート、グルホシネートがそれらに吸着して回収率が低下することがあります。そこで試料の採取量を減らして前処理を行います。

さらに小麦粉のようにデンプンを多く含む場合は抽出工程でグリホサート、グルホシネートがデンプンへ分配され、抽出効率が低下すると考えられます。そこで抽出時にNaOH水溶液を添加してアルカリ性にすることでこれらが抽出液に分配されるようにします。

【対応前処理フロー】

分析時には試料の成分を調べてから分析法を選択します。

・タンパク質を多く含む試料(例：大豆)：前処理フロー：p.60 「通常試料」

・デンプンを多く含む試料(例：小麦粉)：前処理フロー：p.61「デンプンを多く含む試料」

【試料採取量の目安】

タンパク質を多く含む試料、デンプンを多く含む試料ともに試料中のタンパク質またはデンプン量が**1 g以下**になるように調整します。

抽出溶液中成分含有量の計算表

	ほうれん草	大豆	小麦粉	食パン	あずき
可食部100g中含有量, g					
水分	92.4	12.4	14.0	39.2	14.2
タンパク質	2.2	33.8	8.3	8.9	20.8
デンプン	0.0	0.6	72.7	38.9	41.7
脂質	0.4	19.7	1.5	4.1	2.0
抽出液中含有量, g					
試料採取量	10.0	2.0	1.0	2.0	2.0
水分	9.24	0.25	0.14	0.78	0.28
タンパク質	0.22	0.68	0.08	0.18	0.42
デンプン	0.00	0.01	0.73	0.78	0.83
脂質	0.04	0.39	0.02	0.08	0.04
添加する水の量, mL	16	25	25	24	25

日本食品標準成分表2015年版（七訂）から引用

(2) 穀類と豆類のタンパク質とデンプン量の比較

■**イネ科**作物の種子：**穀類**　　穀類（イネ科）では**デンプン**が多く含まれています。

食品名	食品成分量（可食部100g中の量：g）				生物の分類	
	水分	タンパク	デンプン	脂質	科	属
トウモロコシ	14	9	63	5	イネ科	トウモロコシ属
米(玄米)	15	7	70	3	イネ科	イネ属
小麦	12	11	56	3	イネ科	小麦属

■**マメ科**作物の種子：**豆類**　　豆類では**タンパク質**と**デンプン**が多く含まれていますが**大豆**と**落花生**は**デンプンを含んでいません**。

食品名	食品成分量（可食部100g中の量：g）				生物の分類	
	水分	タンパク	デンプン	脂質	科	属
大豆	12	34	1	20	マメ科	ダイズ属
あずき	14	21	42	2	マメ科	ササゲ属
いんげんまめ	15	22	35	2	マメ科	インゲンマメ属
ソラマメ	13	26	32	2	マメ科	ソラマメ属
エンドウ豆	13	22	37	2	マメ科	エンドウ属
落花生	6	25	4	47	マメ科	ラッカセイ属

参考文献：
1)小西ら　アイスティサイエンス，「グリホサートおよびグルホシネートの分析の自動化の検討」,第36回農薬残留分析研究会講演要旨集pp.119-124
2)石渡智　ホクレン農業協同組合連合会,「残留農薬モニタリング検査の取り組みと高感度LC/MS/MSの活用法の紹介」（2013）
3)天川映子　東京都健康安全研究センター，「食品中に混入されたグリホサートおよびグルホシネートの迅速分析」,東京都健康安全研究センター年報 *Ann.Rep.Tokyo Metr. Inst.P.H.*,57,pp.235-238,2006
4)永富康司　アサヒグループホールディングス株式会社，「グリホサートとグルホシネートおよび代謝物のLC/MS/MS一斉分析法の開発」,第35回農薬残留分析研究会講演要旨集pp.92-97
5)宮本紫織　愛媛県立衛生環境研究所，「LC/ICP/MSによる水道水中における有機リン系農薬の分析法の開発」,平成23年度愛媛衛研年報14，pp.10-14
6)佐々野ら　アイスティサイエンス，「グリホサートおよびグルホシネートの分析の自動化の検討－第2報－」,第42回農薬残留分析研究会講演要旨集pp.117-124

5,1)(2)②　ジチオカルバメート系農薬

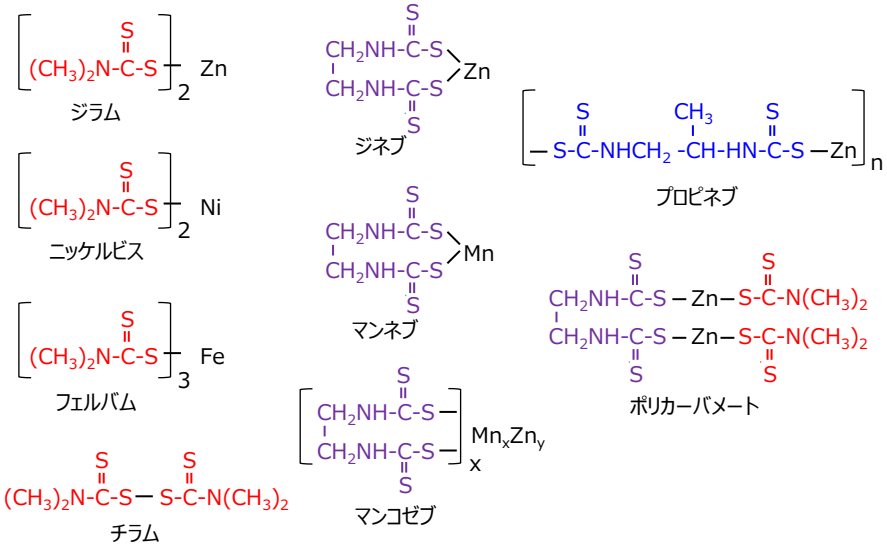
ジチオカルバメート系農薬は水にも有機溶媒にも溶けないため、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(EDTA)を用いたシステイン-エチレンジアミン四酢酸溶液(以下システイン-EDTA溶液)に溶解することでナトリウム塩の形にして水に溶けるようにして抽出します。その後ヨウ化メチルを用いてメチル化物を生成し有機溶媒に溶けるようにします。

しかし通知法におけるこれらの操作は煩雑なため本法ではホクレン農業協同組合連合会様が開発した迅速分析法をもとにGC-MSで測定するための精製工程を追加しました。

化合物情報

ジチオカルバメート系農薬からは3種類のメチル化物が生じます。

【ジチオカルバメート系農薬の種類】



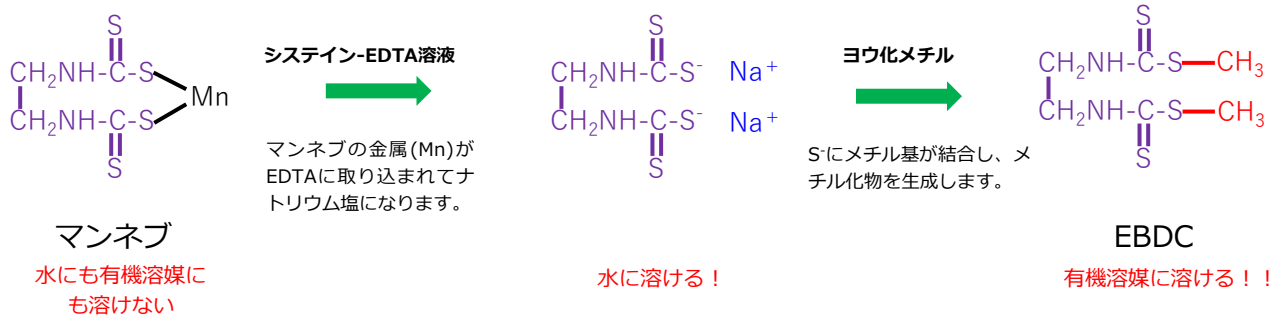
【メチル化物】

成分名	メチル化物
ジラム ニッケルビス (ジチオカルバメート) フェルバム チラム	DMDC
ジネブ マンネブ マンコゼブ	EBDC
プロピネブ	PBDC
ポリカーバメート	DMDC+EBDC

誘導体化の原理

マンネブの誘導体化の例を示します。

システイン-EDTA溶液で抽出することでマンネブ内の金属(Mn)がEDTAに取り込まれて水に溶けやすいナトリウム塩になります。続いてヨウ化メチルによりS⁻にメチル基が結合してメチル化物が生成されます。



5,1)(2)②個別分析法　ジチオカルバメート系農薬 (202010ver.)

前処理のポイント	①QuEChERS法を参考とした抽出 ②抽出時におけるメチル化 ③GC-B法の応用

前処理フロー

【粉砕】　試料 100 g ＋ システイン-EDTA溶液[1)]　100 g　・・・❶

試料採取 20 g (試料 10 g 相当)

- 添加 6mol/L塩酸[2)]　700 µL程度（pH6.5に調整）・・・❷

振とう 10秒

- 添加 ヨウ化メチル 60 µL　・・・❸

激しく振とう 30秒

振とう 10分

- 添加 ACN 10 mL

振とう抽出 5分

- 添加 NaCl 4 g

振とう溶解 10秒　・・・❹

- 添加 $MgSO_4$(無水) 6 g

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(8/2)
- **負荷[通液]　抽出液(ACN層)** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(8/2) 0.4 mL　・・・❺

流出液

- 添加 10%NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg

Smart-SPE PSA-30mg：精製　・・・❻
- コンディショニング　アセトン　アセトン-ヘキサン(3/7)
- 溶出 アセトン-ヘキサン(3/7) 1 mL・・・❼

溶出液

- 添加 0.1%PEG200-1ppmフェナントレンd体 混合アセトン溶液 20 µL・・・❽

定容：1 mL アセトン-ヘキサン(3/7)で調整・・・❾

測定：GC-MS　大量注入25µL

前処理フロー解説・留意点

❶　試料は同量のシステイン-EDTA溶液を添加して粉砕したものを使用します。

玄米など乾燥試料でシステイン-EDTA溶液を添加せずに粉砕した試料は、秤量後に試料の水分含量を合わせて10 g相当になるように水を添加します。その後システイン-EDTA溶液を10 g添加します。

水 約10 g(試料の水分含有量＋添加)＋システインEDTA溶液 10 g

❷　分析用とは別に試料を20 g秤量し、6 mol/L塩酸を700 µLを目安に添加してpH6.5に調整するのに必要な塩酸の量を決めます。その量を分析用試料に添加します。

EDTAが金属を取り込むのに適したｐHに調整します。

❸　ヨウ化メチルは添加しただけでは図1のようにシステイン-EDTA溶液と分離します。添加後は手で激しく振とうし(図2)、ヨウ化メチルを均一に分散させます。その後振とう機で振とうします。

図1

図2

❹　NaClを十分に溶解させてから$MgSO_4$(無水)を添加します。溶解が不十分な場合は$MgSO_4$(無水)の塩析効果が不十分になる場合があります。

❺　メチル化物が全量溶出する溶媒比としてACN-水(8/2)を流します。

❻　柑橘類の場合はPSAにGCK（グラファイトカーボン）を追加して使用します。GCKは柑橘類のフラボノイド類を除去します。

【柑橘類の場合】

コンディショニング
GCK(上)＋PSA(下)

溶出時
C18(上)＋GCK(中)＋PSA(下)

❼　メチル化物が全量溶出する溶媒比としてアセトン-ヘキサン(3/7)で溶出します。

❽　これは大量注入(25µL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。※フェナントレンd体は必須ではありません。またジチオカルバメートではPEG300とm/zと重なるため**PEG200**を使用します。

❾　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

1),2)の試薬調製方法はp.66をご覧ください。

試薬調製方法

1)システイン-EDTA溶液
(システイン-エチレンジアミン四酢酸溶液)
※1000 mL作製の場合

①Lシステイン塩酸塩一水和物50 gを約800 mLの水に溶かします。
②エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム水和物
(以下EDTA)50 gを入れます。
＊この状態ではEDTAは溶解しません。
＊EDTAの秤量には樹脂製のスプーンをご使用願います。
③水酸化ナトリウム(NaOH)約28 gを入れます。
＊水温が上がり始めます。
④EDTAが溶けたら12 mol/LNaOH※で約pH9.4まで調整します。
⑤溶液の温度が室温相当に下がるのを待ち、pH9.6に調整します。
＊溶液の温度が高いとpHが安定しないので室温に戻ってから
pH9.6に調整します。
⑦メスシリンダーに移して水で1000 mLにメスアップします。

※12 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(20 mLの場合)

約15 mLの水に水酸化ナトリウム4.8 gを添加し、よく攪拌した後20 mLに定容します。調製液はガラス以外の容器に入れます。調製の際は必ず水に水酸化ナトリウムを入れます。水酸化ナトリウムに水を入れると危険です。

2)6 mol/L 塩酸

35%塩酸と水を1:1で混合します。調製の際は必ず水に塩酸を入れます。塩酸に水を入れると発熱し危険です。

測定条件例

PTV 注入口　LVI-S250(AiSTI Science)

インサート	スパイラル（胃袋型）インサート
注入口温度	70℃(0.27min)-120℃/min-240℃-50℃/min-290℃(14min)

GC　7890B (Agilent Technologies)

注入法	スプリットレス
スプリットレス時間	4 min
スプリット流量	50 mL/min
ガス制御	コンスタントフロー, 1.1ml/min
カラム	VF-5ms, 0.25mm i.d. X 30m, df;0.25μm
オーブン温度	60℃(4min)-10℃/min-125℃-30℃/min-320℃(4min)
ｲﾝﾀｰﾌｪｰｽ温度	290℃

MS　Agilent 7000C (Agilent Technologies)

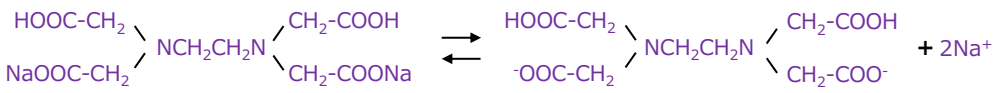
MS ﾒｿｯﾄﾞ	SCAN

参考資料

【EDTAとは】

EDTA ：エチレンジアミン四酢酸(**e**thylen**d**iamine**t**etra**a**cetic acid)

通常はジナトリウム塩である「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/ 2 Na/2H/2H2O)」のことを指します。



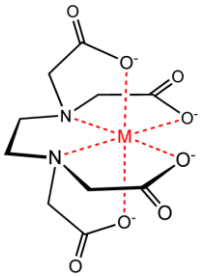
白色粉末で、非潮解性、水に溶けやすい

【ジチカルバメート農薬の抽出にEDTAを使う理由】

EDTAの性質

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り、そのEDTA錯塩は水によく溶けます。

このようにEDTAが金属を取り込んだ形を「錯体(キレート)」と言います。キレートとははさみを意味するギリシャ語です。金属イオンが有機試薬で包み込まれたような状態がカニがはさみでエサを捕らえた格好に似てるいるためこのように呼ばれます。



ジチカルバメートは**水にも有機溶媒にも溶けないため**EDTA溶液(正確にはシステイン-EDTA溶液)に溶かします。そうすることでEDTAがジチカルバメートの金属を取り込みジチオカルバメート系農薬が水に溶けるようになります。

水にも有機溶媒にも溶けない　　金属(Zn)が外れて水に溶ける！

このようにEDTAが金属を取り込むには最適なpH領域があり、ジチオカルバメート系農薬の場合はpH6.5となります。

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。

引用文献：上野景平:“EDTAの使い方”,分析化学, 8巻, pp.207-214（1959）

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(第二法)」,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 Profucts by LC/MS/MS」,12th European Pesticide Residue Workshop,Programme & Book of Abstracts,pp.130-131(2018)
4)安藤ら,「ジチオカルバメート迅速スクリーニング法の開発」,第41回農薬残留分析研究会講演要旨集pp.221～226

5,1)(2)③　TPN・キャプタン・カプタホール・ホルペット

TPN(クロロタロニル)、キャプタン、カプタホール、ホルペットは試料粉砕時に分解するため、通知個別法ではリン酸添加を、QuEChERS法では凍結状態[1),2)]で分解を防いでいます。またキャベツなど硫黄化合物の夾雑成分を含む試料では精製時のPSAがTPN消失の要因のとなる可能性も報告されています[3)]。本法ではこれらの状況を考慮した方法です。

前処理フロー

予冷式ドライアイス凍結粉砕 ・・・❶

↓

試料採取 10 g

- 添加 標準溶液(添加回収試験の場合) ・・・❷

(冷凍(-20℃, 30分)(添加回収試験の場合))・・・❸

- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 10秒

- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(9/1)
- **負荷[通液]　抽出液(ACN層)** 0.5 mL 分取
- 洗液 ACN-水(9/1) 0.4 mL

流出液

- 添加 10%(w/w)NaCl水溶液 約12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄 水 1 mL

固相乾燥(窒素ガス) 2分

Smart-SPE C18-50mg

Smart-SPE PSA-30mg or AXi3-20mg：精製 ・・・❹
- コンディショニング　アセトン　**アセトン-ヘキサン(1/3)**
- 溶出 **アセトン-ヘキサン(1/3)** 1 mL・・・❺

溶出液

・・・❻

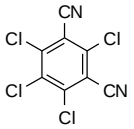
定容：1 mL **アセトン-ヘキサン(1/3)**で調整　・・・❼

↓

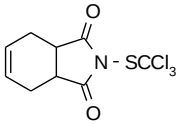
GC-MS測定（25 μL大量注入）

化合物情報

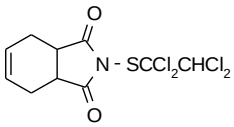
【TPN(Chlorothalonil)】
MF：C8Cl4N2
MW:265.9
LogPow：2.9(25℃)



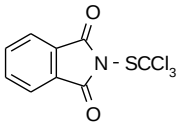
【キャプタン】
MF：C9H8Cl3NO2S
MW:300.6
LogPow：2.8(25℃)



【カプタホール】
MF：C10H9Cl4NO2S
MW:349.1
LogPow：3.8



【ホルペット】
MF：C9H4Cl3NO2S
MW:296.6
LogPow：3.1



前処理フロー解説・留意点

❶　凍結粉砕により試料の酵素活性化を抑制し、夾雑成分の増加を抑え、TPN等の分解を抑制します。

❷　**添加回収試験の場合、対象農薬の分解を防ぐため標準溶液は１%ギ酸含有混合標準溶液を添加します。**

❸　添加回収試験の場合、添加後は試料が室温に戻り、酵素が活性化しないよう-20℃で静置し、含浸します。

❹　キャベツやタマネギのように硫黄化合物の夾雑成分を含む試料ではPSAを使用した場合、TPNの回収率が低下します。そのような試料の場合はAXi3-20mgを使用することにより回収率が向上します(p.69参照)。

※AXi3-20mg：表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼンミックスモード強陰イオン交換充填剤

❺　対象農薬を溶出させるためアセトン-ヘキサン(1/3)を使用します。

❻　PEGを使用した場合、注入口で気化する温度が高くなり対象成分が分解する懸念があるため、本法ではPEGは使用しません(p.69参照)。

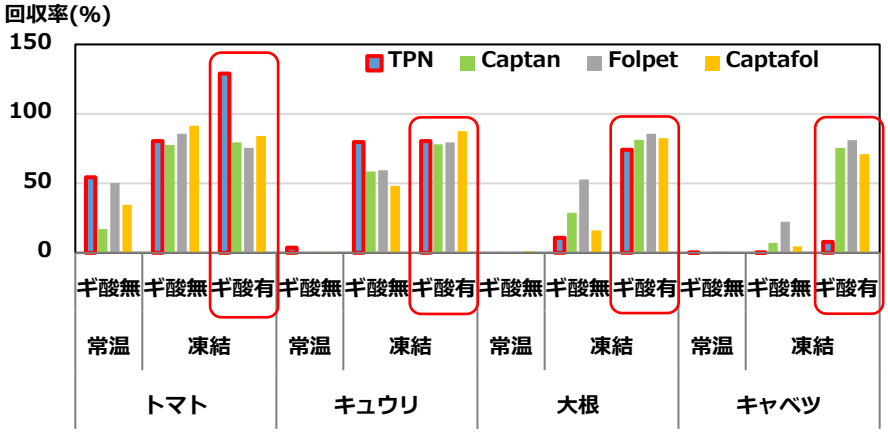
❼　標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

5,1)(2)③個別分析法　TPN・キャプタン・カプタホール・ホルペット（202012ver.）

前処理のポイント
①予冷式ドライアイス凍結粉砕
②キャベツ等硫黄化合物の夾雑成分を含む試料でのAXi3-20による精製
③アセトン-ヘキサン(1/3)による溶出
④ギ酸含有標準溶液の添加 (添加回収試験の場合)

常温粉砕と凍結粉砕

常温粉砕に対し、凍結粉砕した試料では回収率が向上する傾向がみられます。
また添加回収試験では「ギ酸含有混合標準溶液」を添加することでキャプタン、ホルペット、カプタホールの回収率が向上しました。TPNについては下の「PSAとAXの回収率」も併せてご覧ください。

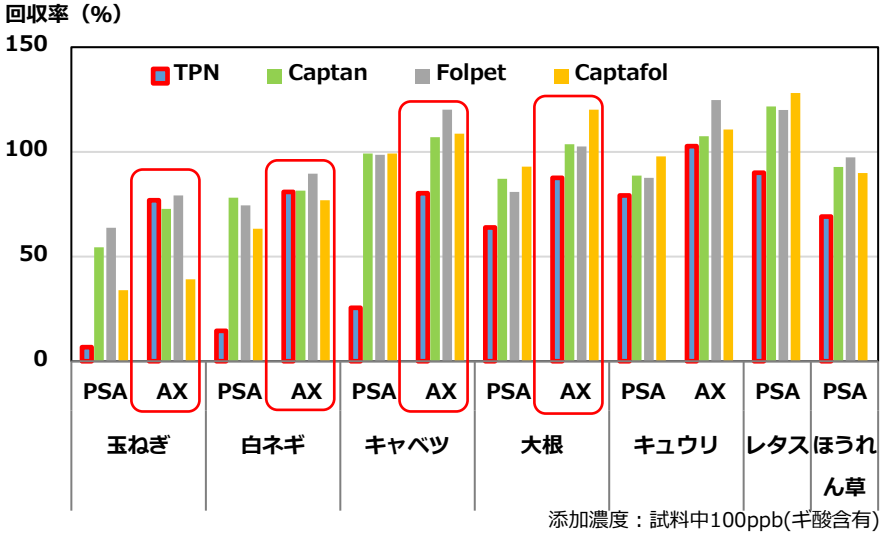


添加濃度：試料中100ppb
精製固相：PSA
溶出溶媒：アセトン-ヘキサン(1/3)

PSAとAXの回収率

タマネギなど特に硫黄化合物の夾雑成分を含む試料においてAX※(Smart-SPE AXi3-20mg)を使用することでTPNの回収率が向上しました。

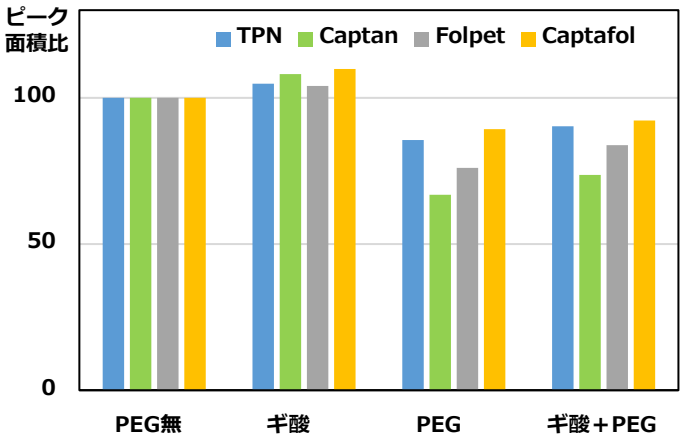
※AX：表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼンミックスモード強陰イオン交換充填剤



添加濃度：試料中100ppb(ギ酸含有)
試料：凍結粉砕試料
溶出溶媒：アセトン-ヘキサン(1/3)

疑似マトリックスPEGの影響

PEGを共注入した場合、ピーク面積値の減少が若干みられました。PEG共注入により、注入口で気化する温度が高くなるために分解することが懸念されますので本法ではPEGは使用していません。



混合標準溶液
・濃度：50ppb
・アセトン-ヘキサン（1/3）

共注入物質
・ギ酸：1%
・PEG：200ppm

注入口条件
・注入量：25 μL
・注入口温度
70℃-120℃/min-240℃
-50℃/min-280℃（26min）

参考文献：
1)M.Anastassiades; www.quechers.com
2)斎藤ら,「ドライアイス添加均質化操作を加えた食品中残留農薬一斉分析」,第98日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.49
3)永井雄太郎、「QuEChERSを見直してみよう」,日本農薬学会誌,37(4),pp.362-371(2012)
4)佐々野ら,「ドライアイス凍結粉砕法とSTQ法を用いたTPN、キャプタン、カプタホール、ホルペットの分析法の検討」,第114日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.34

5,1)(2)④ ネオニコチノイド

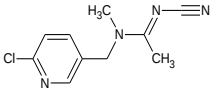
ネオニコチノイド農薬(殺虫剤)は各国で使用されていますが、ミツバチにおいて蜂群崩壊症候群の一因とされているため、近年ではEUなど諸外国で一部使用規制が進んでいます。しかし日本では使用規制がなされていないため分析の需要が多い農薬です。

ここではSTQ-LC法をネオニコチノイド系農薬に最適化した分析法を紹介します。

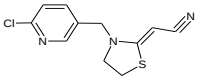
化合物情報

ネオニコチノイド系殺虫剤

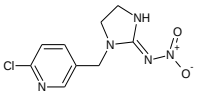
アセタミプリド
MF : C10H11ClN4
MW:222.7
LogPow : 0.8



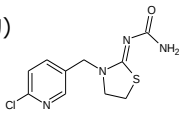
チアクロプリド
MF : C10H9ClN4S
MW:252.7
LogPow : 1.26



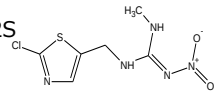
イミダクロプリド
MF : C9H10ClN5O2
MW:255.7
LogPow : 0.57



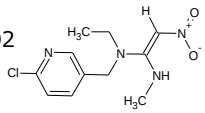
チアクロプリドアミド
(チアクロプリド代謝物)
MF : C10H11ClN4OS
MW:270.7
LogPow : -



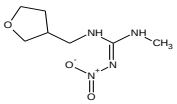
クロチアニジン
MF : C6H8ClN5O2S
MW:249.7
LogPow : 0.7



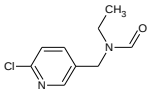
ニテンピラム
MF : C11H15ClN4O2
MW:270.7
LogPow : -0.64



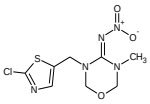
ジノテフラン
MF : C7H14N4O3
MW:202.2
LogPow : -0.55



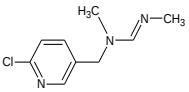
CPF
(ニテンピラム代謝物)
MF : C9H11ClN2O2
MW:198.7
LogPow : -



チアメトキサム
MF : C8H10ClN5O3S
MW:291.7
LogPow : -0.13

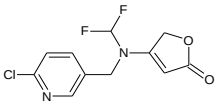


CPMF
(ニテンピラム代謝物)
MF : C10H14ClN3
MW:211.7
LogPow : -



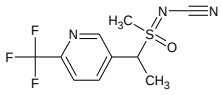
プテノライド系殺虫剤

フルピラジクロン
MF : C12H11ClF2N2O2
MW:288.7
LogPow : 1.2



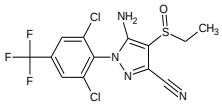
スルホキシミン系殺虫剤

スルホキサフロル
MF : C10H10F3N3OS
MW:277.3
LogPow : 0.8

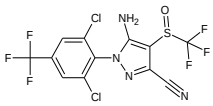


フェニルピラゾール系殺虫剤

エチプロール
MF : C13H9Cl2F3N4OS
MW:397.2
LogPow : 2.9



フィプロニル
MF : C12H4Cl2F6N4OS
MW:437.2
LogPow : 4.0



5,1)(2)④個別分析法　ネオニコチノイド (202012ver.)

前処理のポイント	①STQ-LC法の応用 ②Smart-SPE PBXを使用 ③アセトニトリル-水（2/1）による低極性夾雑成分の除去効果UP

前処理フロー　通常試料

試料採取 10 g ・・・❶

- 添加 水 (10−試料の含水量) mL ・・・❷
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g

振とう溶解 10秒

- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう　1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層) ・・・❸

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE PBX-20mg：精製 ・・・❹
コンディショニング ACN-水(2/1)

Smart-SPE PSA-30mg：精製
コンディショニング ACN-水(2/1)

- **負荷[精製]** **抽出液(ACN層)** 0.5 mL 分取
- 洗液　ACN-水(2/1) 0.5 mL ・・・❺

流出液

- 添加　水 0.5 mL

Smart-SPE PBX-20mg：精製
コンディショニング ACN-水(2/1) 水

- 通液　ACN-水(2/1) 0.5 mL ・・・❺

流出液

定容：2 mL 水で調整

前処理フロー解説・留意点

❶　穀類・豆類 5 g　その他難試料 1〜2 g

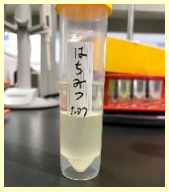
❷　試料の水分含量が80%未満の場合は水を添加します。水は試料の水分と合わせて水が10 g相当となるように添加します(p.15(1)参照)。

試料採取量と水添加量の例

分析試料	試料採取量 (g)	試料の水分含量 (%)	水添加量 (mL)
ハチミツ	5	17.6	10
玄米	5	14.9	10
大豆	5	12.4	10
ほうれん草	10	92.4	−

出典：日本食品標準成分表（2015年版（七訂）

❸　ハチミツは遠心分離後の試料層が薄く、アセトニトリル抽出液層と水層が混ざりやすいので注意が必要です。



❹　STQ-LC法ではC18を使用していますが、ネオニコチノイド系農薬ではポリマー系親水性/疎水線バランス充填剤であるPBXに変更します。それはC18では対象成分の一つであるCPMFがC18に吸着しその溶出に酸性溶媒が必要になるからです。酸性溶媒で溶出するとC18の下に連結したPSAで保持していたイオン性夾雑成分も一緒に溶出されてしまい精製効果が下がります。
CPMFはPBXには吸着されないため酸性溶媒での溶出が必要なく、PSAからイオン性夾雑成分を溶出することなく対象成分を回収することができます。

❺　PBXに通液するACN-水の比率はACNの比率が低いほど低極性夾雑成分の除去効果が高まります。ここでは対象成分が溶出されるACN比率にすることで低極性夾雑成分の除去効果を高めています。

5,1)(2)④個別分析法　ネオニコチノイド (202012ver.)

前処理のポイント

①STQ-LC法の応用
②Smart-SPE PBXを使用
③アセトニトリル-水（2/1）による低極性夾雑成分の除去効果UP
④固相負荷前の希釈によるカテキン類の除去

前処理フロー　茶

試料採取 2 g ・・・❶
- 添加 水 10 mL
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分
- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na･2H_2O 1 g
- 添加 クエン酸2Na･1.5H_2O 0.5 g

振とう溶解 10秒
- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層)

抽出液(ACN層) 1 mL 分取 ・・・❷
- 添加 水 9 mL

試験溶液 10 mL (抽出液：水＝1:9)

全自動固相抽出装置ST-L400

コンディショニング ACN-水(2/1)
Smart-SPE PBX-20mg：精製 ・・・❸
Smart-SPE PSA-30mg：精製
コンディショニング ACN-水(2/1)
- **負荷[精製]** **試験溶液** 0.5 mL 分取
- 洗液 **ACN-水(2/1)** 0.5 mL ・・・❹

流出液
- 添加 水 0.5 mL

コンディショニング ACN-水(2/1) 水
Smart-SPE PBX-20mg：精製
- 通液 **ACN-水(2/1)** 0.5 mL ・・・❹

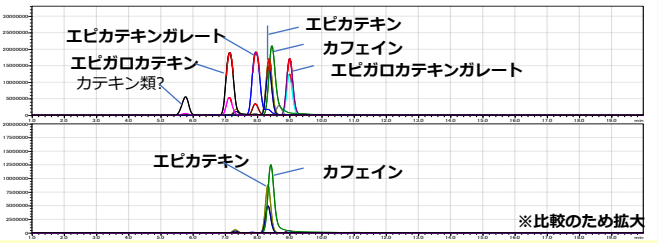
流出液

定容：2 mL 水で調整

前処理フロー解説・留意点

❶ 茶は難試料に相当するため採取量は2 gとします。

❷ マトリックスを低減するため固相負荷前に抽出液(ACN層)を水で10倍希釈します。これによりカテキン類を除去し、イオン化阻害を低減します。
※カフェインおよびエピカテキンは完全には除去できません。



茶抽出液のTICクロマトグラム比較
（上：試料0. 033 g相当, 下：試料0. 01 g相当）

❸ LC法ではC18を使用していますが、ネオニコチノイド系農薬ではポリマー系親水性/疎水線バランス充填剤であるPBXに変更します。それはC18では対象成分の一つであるCPMFが吸着しその溶出には酸性溶媒が必要になるからです。その際C18の下に連結したPSAに保持したイオン性夾雑成分も一緒に溶出されてしまいます。しかしCPMFはPBXには吸着されないため酸性溶媒での溶出も必要なく、その下に連結しているPSAに保持したイオン性夾雑成分を溶出することなく対象成分を回収することができます。

❹ PBXに通液するACN-水の比率はACNの比率が低いほど低極性夾雑成分の除去効果が高まります。ここでは対象成分が溶出されるACN比率にすることで低極性夾雑成分の除去効果を高めています。

測定条件

LC　UHPLC(Nexera X2)
分析カラム　：Shim-pack FC-ODS, 2 mm I.D. x 150 mm, 3μm
移動相　：A液：0.1% ギ酸+0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
B液：0.5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
流速　：0.2 mL/min
グラジエント：B Conc.　5%(0-1 min)-99%(15-20 min)-5%(20-30 min)
カラム温度　：40 ℃
注入量　：2 μL

MS　LCMS-8045
イオン化モード：ESI positive and negative

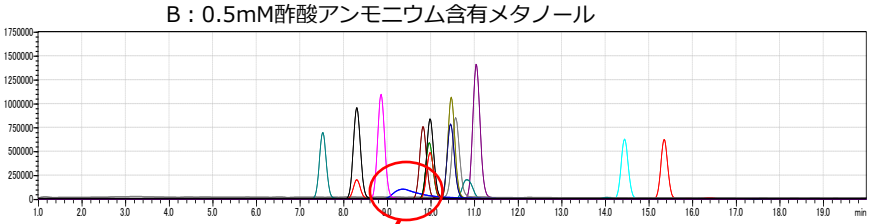
※検量線用標準溶液の調製
LC-MS/MS測定では測定溶液組成が感度やピーク形状に影響するため標準溶液はサンプルと同じ組成溶液での調製を推奨します。

5,1)(2)④個別分析法　ネオニコチノイド (202012ver.)

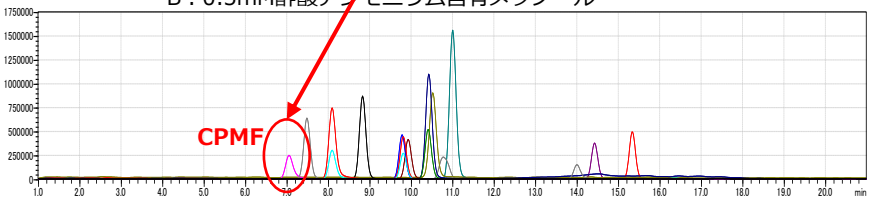
移動相のpH

ネオニコチノイド系農薬の測定には酸性の移動相を使用します。移動相にギ酸を添加することでCPMFのピーク形状が改善されます。また測定開始時（インジェクション時）の移動相組成をB液比率5%と溶媒比率を下げておくことで全ての成分で良好なピーク形状が得られます。

中性移動相　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



酸性移動相　A：**0.1%ギ酸**+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

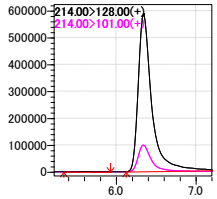


グラジエント：B Conc.**5%**(0-1 min)-99%(15-20 min)-5%(20-30 min)

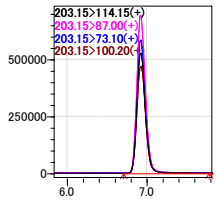
B.conc5%のクロマトグラム例

測定開始時の移動相組成をB Conc.5%にすることで保持時間の早い成分のピーク形状が改善されます。

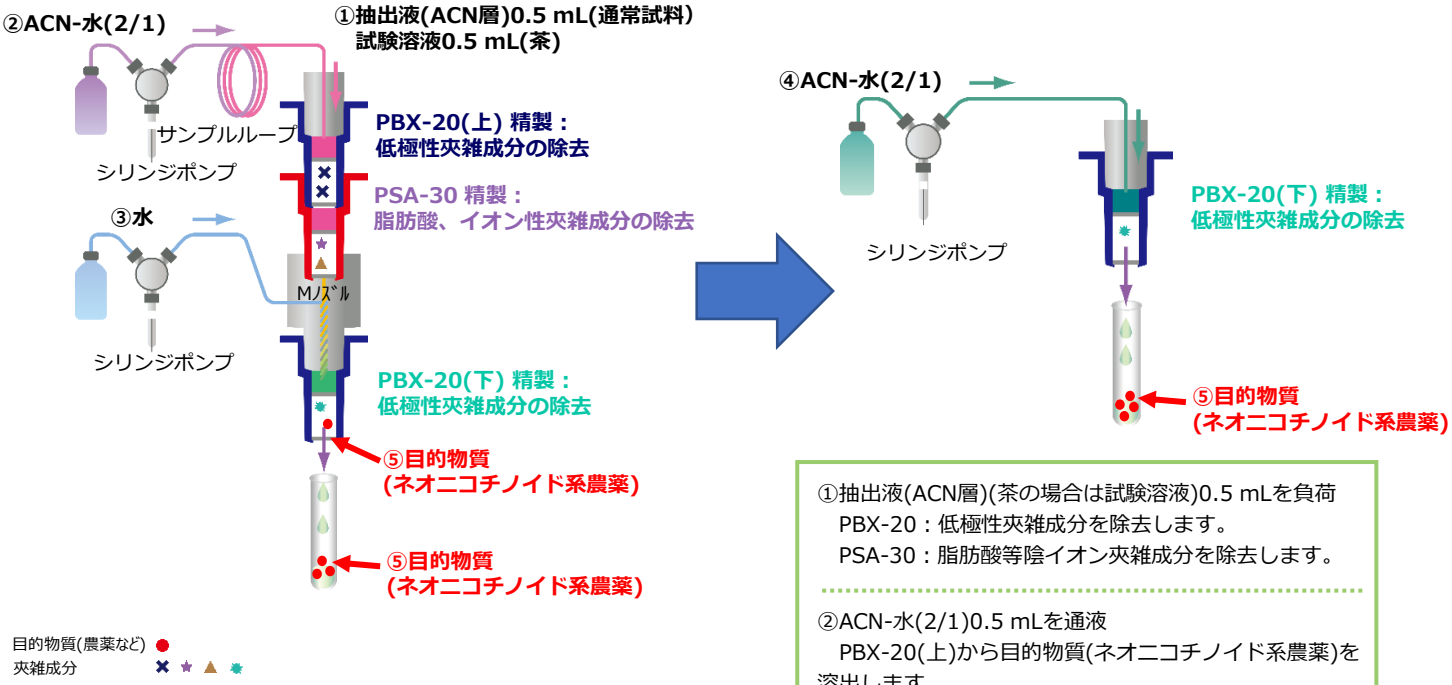
CPMF
(RT：6.2)



ジノテフラン
(RT：6.8)



精製のポイント



①抽出液(ACN層)(茶の場合は試験溶液)0.5 mLを負荷
PBX-20：低極性夾雑成分を除去します。
PSA-30：脂肪酸等陰イオン夾雑成分を除去します。

②ACN-水(2/1)0.5 mLを通液
PBX-20(上)から目的物質(ネオニコチノイド系農薬)を溶出します。

③水を添加
水添加により試料液のACN比率を下げてPBX-20に負荷することで①で除去できなかった低極性夾雑成分を除去します。

④⑤ ACN-水(2/1)0.5 mLを通液
②で回収されなかった目的物質(ネオニコチノイド系農薬)は試験管に回収します。PBX-20(下)から溶出します。

参考文献：
1)小西ら,「STQ法におけるハチミツ中ネオニコチノイド分析への応用」,第37回農薬残留分析研究会講演要旨集，pp.119-126
2) 佐々野ら,「少量試料サンプリングのためのドライアイス凍結粉砕の検討」,第106日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.115
3)平井ら,「QuECHERS法を用いた蜂蜜および玄米中ネオニコチノイド系農薬等の一斉分析法の検討」,福井県衛生環境研究センター年報第14巻，pp.32-39
4)小西ら,「STQ法を応用したネオニコチノイド分析法の検討」第43回農薬残留分析研究会講演要旨集，pp.163-172

5,2)(1) 動物用医薬品一斉分析

動物用医薬品には様々な物性の成分があり、それらを一斉分析するのは容易ではありません。本法ではアセトニトリル(中性)とギ酸アセトニトリル(酸性)の2種類の溶媒で繰り返し抽出を行い、その抽出液を合わせることで一斉分析(サルファ剤、キノロン剤、その他)を可能としています。
(対象成分の詳細:https://www.aisti.co.jp/common/pdf/as191001.pdf)

前処理フロー

試料採取 5 g
- 添加 水 (5－試料中水分量) mL
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分
- 添加 NaCl 0.5 g

振とう溶解 10秒
- 添加 $MgSO_4$(無水) 2 g

…❶

振とう 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

ACN層①

残留物(試料層･水層)
- 添加 5%ギ酸含有ACN 10 mL …❷

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

遠心分離　3,500 rpm, 5分

5%ギ酸含有ACN層②

①②合算

定容：20 mL ACNで調整

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

- Smart-SPE C18-50mg：精製 ← コンディショニング ACN
- Smart-SPE PSA-30mg：精製 ← コンディショニング ACN-水(8/2)
- **負荷[通液]** **抽出液(ACN層)** 1 mL 分取
- 洗液 2%ギ酸含有ACN-水(8/2) 0.5 mL …❸

流出液
- 添加 水 0.5 mL
- Smart-SPE C18-30mg：精製 ← コンディショニング ACN 水

定容：2 mL 水で調整

↓

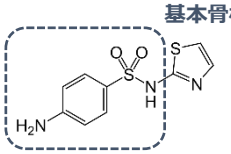
LC-MS/MS

化合物情報

【サルファ剤】
ベンゼンスルホンアミド基を基本骨格にもつ化合物
LogPow＜2の成分が多数

例)スルファチアゾール
MF：C9H9N3O2S2
MW:255.3
LogPow：0.1

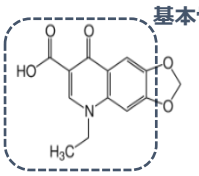
基本骨格



【キノロン剤】
4-キノロンを基本骨格にもつ化合物
LogPow＜2の成分が多数

例)オキソリン酸
MF：C13H11NO5
MW:261.2
LogPow：-0.2

基本骨格



前処理フロー解説・留意点

❶ ACN：水(試料中水分量含む)の比率を1:1→2:1に変更することでキノロン剤の回収率が向上しました。それに伴いNaCl及び$MgSO_4$(無水)の添加量を減らしています。また1回目の抽出は中性(ACN)、2回目の抽出は酸性(ギ酸含有ACN)状態を保つためクエン酸は添加しません。

❷ 1回目はACN(中性)、2回目はギ酸含有ACN(酸性)で繰り返し抽出を行います。

❸ 酸性のギ酸含有ACN-水を使用することでキノロン剤をPSAから溶出します。

測定条件例

LC　UHPLC(Nexera X2)
分析カラム　：YMC-Triart C18,
2.1 mm I.D. x 150 mmL.,3 μm
移動相　：A液：0.1 % ギ酸水溶液
B液：0.1 % ギ酸ACN溶液
流速　：0.2 mL/min
グラジエント：B Conc. 1%(0 min)-15%(1 min)-40%(6 min)-100%(10-15 min)-1%(15.01-18 min)
カラム温度　：40 ℃
注入量　：5 μL(+10 μL水 共注入)

MS　LCMS-8045
イオン化モード：ESI positive and negative

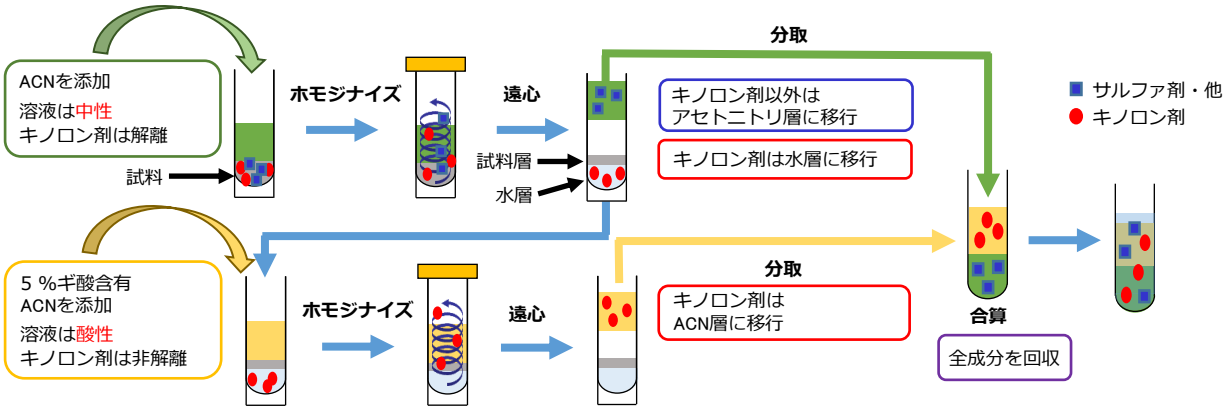
※検量線用標準溶液の調製
LC-MS/MS測定では測定溶液組成が感度やピーク形状に影響するため標準溶液はサンプルと同じ組成溶液での調製を推奨します。

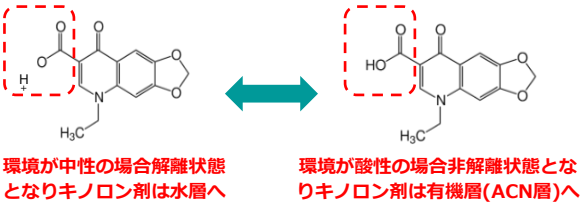
参考文献：1)小西ら,「STQ法を用いた動物用医薬品一斉分析への応用の検討」,第108回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.47
2)島ら,「STQ法とLC/MS/MSを組み合わせた食肉中の動物用医薬品高速一斉分析(前処理編)」,第114日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.124
3)島ら,「STQ法とLC/MS/MSを組み合わせた動物用医薬品高速一斉分析(第2報)」,第115日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.110

5,2)(1)動物用医薬品　一斉分析 (201809 ver.)

前処理のポイント	①アセトニトリル(中性)とギ酸アセトニトリル(酸性)による繰り返し抽出 ②繰り返し抽出液を合わせることによる一斉分析 ③繰り返し抽出液の混合定容

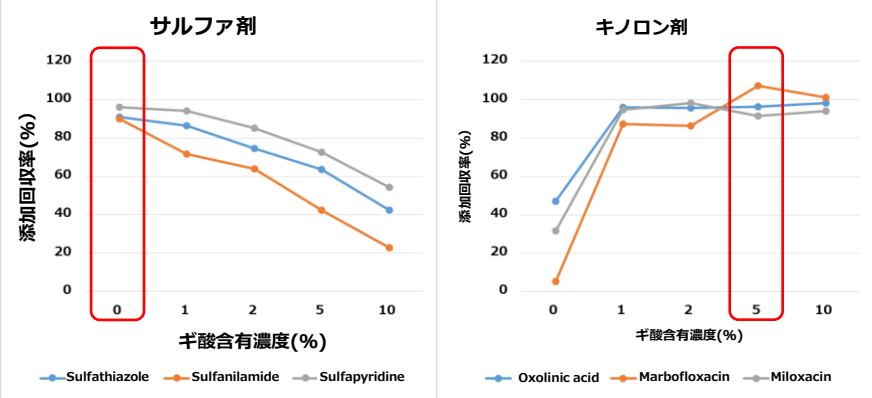
繰り返し抽出定容法





キノロン剤の解離・非解離状態
(例：オキソリン酸)

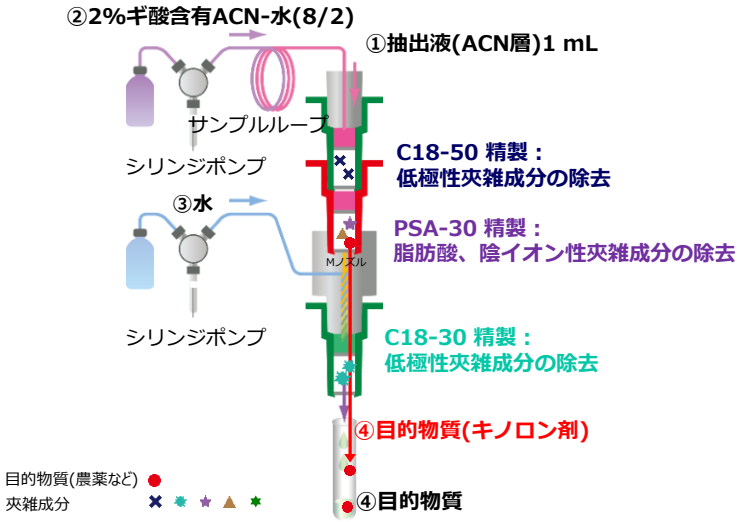
4-キノロンを基本骨格にもつ化合物でその骨格の中に-COOH基をもつため、環境が中性の場合は解離状態となり水層に移動します。環境が酸性の場合は非解離となり有機層(ACN層)に移動します。



抽出時のギ酸濃度の違いによる回収率の比較例(鶏ささみ)

サルファ剤ではギ酸を添加すると回収率が低下するためギ酸濃度０%を、キノロン剤では安定した回収率を得られるようギ酸濃度５%を選択しました。

精製のポイント



①抽出液(ACN層)1 mLを負荷
　C18-50：低極性夾雑成分を除去します。
　PSA-30：脂肪酸や陰イオン性夾雑成分を除去します。
　　キノロン剤は保持されると考えられます。

②2%ギ酸含有ACN-水(8/2)0.5 mLを通液
　酸性溶液を通液することでキノロン剤を非解離状態に保ちます。

③水を添加
　水添加により試料液のACN比率を下げてC18-30に負荷することで①で除去できなかった低極性夾雑成分を除去します。

④目的物質を試験管に回収します。

PSAについてはpp.106-115「7,3)(2)イオン交換カラム」も併せてご覧ください。

5,1)(2) マラカイトグリーン

マラカイトグリーンは水カビなどの治療薬として観賞魚に使用されますが、食用の養殖魚への使用は禁止されています。マラカイトグリーンは光分解性があり、分析には迅速性が求められます。

前処理フロー

試料採取 10 g

- 添加 クエン酸･リン酸緩衝液(pH3)[1] 4 mL
- 添加 ACN 10 mL

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分

- 添加 NaCl 1 g

振とう溶解 10秒

- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

…❶

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

冷凍(－20℃：60分) …❷

抽出液(ACN層)

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-30mg：精製

Smart-SPE SCX-30mg：保持

コンディショニング
アセトン
ACN

- **負荷[保持]** **抽出液(ACN層)** 1 mL 分取
- 洗浄 ACN 1 mL

Smart-SPE SCX-30mg

- 溶出 28%アンモニア水-ACN(1/9) 0.9 mL

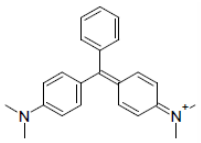
定容：1 mL 水で調整

測定：LC-MS/MS

化合物情報

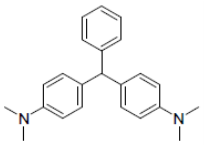
【マラカイトグリーン：MG】

MF：C23H25N2
MW:329.47
pKa:5.06
水に可溶



【ロイコマラカイトグリーン：LMG】

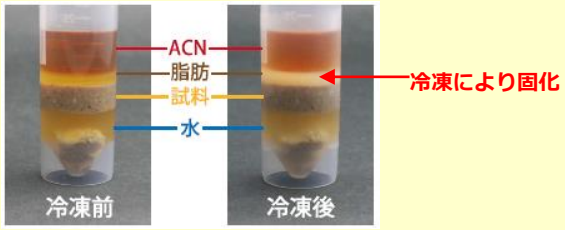
MF：C23H26N2
MW:330.48
pKa :5.46
水に可溶



前処理フロー解説・留意点

❶ クエン酸・リン酸緩衝液(pH3)で抽出するのでクエン酸は添加しません。

❷ 冷凍することで脂肪を固化し脱脂します。
（写真はうなぎ蒲焼）



1)クエン酸・リン酸緩衝液(pH3)調製方法

①クエン酸63 gを水に溶解し1 Lに定容します。
②リン酸二ナトリウム215 gを水に溶解し1 Lに定容します。
③①に②を加えpH3に調整します。

測定条件例

LC　Prominence (島津製作所)

分析カラム	Atlantis T3, 2.1 mm I.D. x 150 mml.,3μm
移動相	A液：0.1 %ギ酸水溶液 B液：アセトニトリル
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B Conc. 5%(0-3 min)-95%(10-15 min)-5%(15-20 min)
カラム温度	40 ℃
注入量	10 μL

MS　API3200 (エービー･サイエックス)

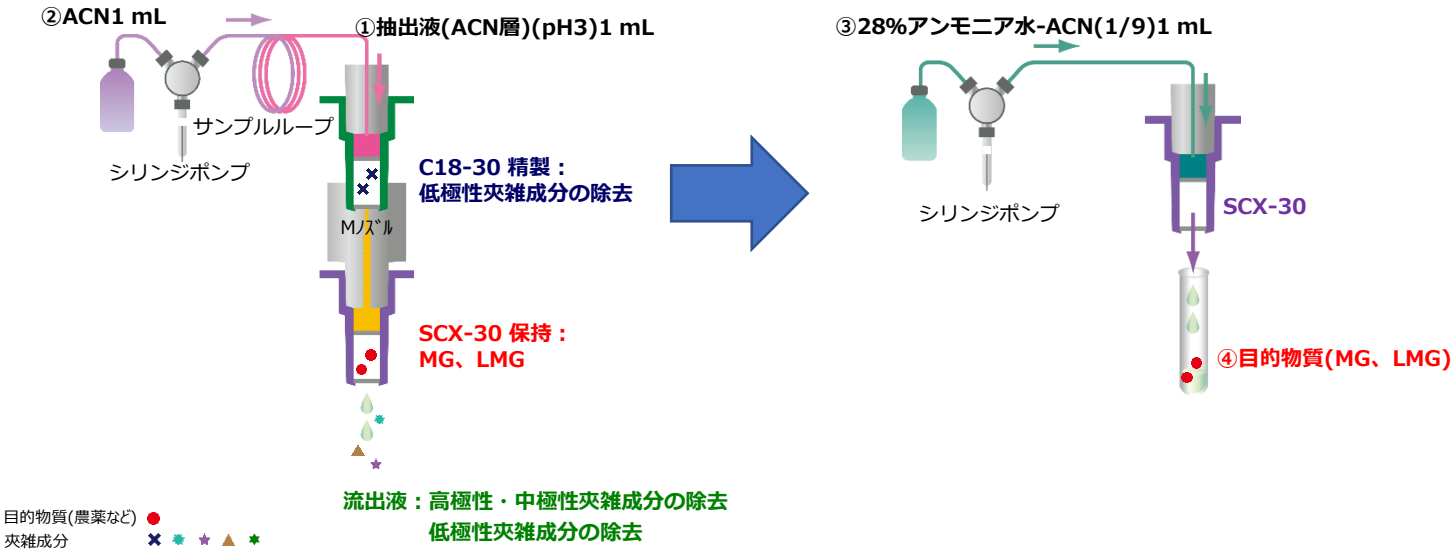
イオン化モード　ESI positive

参考文献： 小西ら,「LC/MS/MSを用いたうなぎ中マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの迅速分析法の検討」,第103食品衛生学会学術講演会要旨集p.45

5,2)(2)動物用医薬品　マラカイトグリーン (202010ver.)

前処理のポイント	①C18-30での低極性夾雑成分の除去 ②アンモニア水(アルカリ性)によるSCXからの溶出

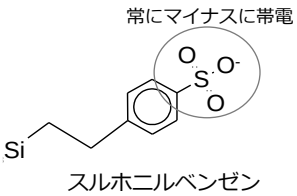
精製のポイント



SCX(Strong Cation Exchange)

作用：強陽イオン交換
pKa：-6.5

強イオン交換カラムはpHに関わらず常に帯電状態です。

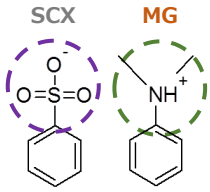


①抽出液(ACN層)(pH3)1 mLを負荷
　C18-30：低極性夾雑成分を除去します。
　SCX-30：MGとLMGは保持されます。
　　ACN層抽出は酸性のためMG,LMGは解離状態となりSCXに保持されます。
　このとき高極性及び中極性夾雑成分は流出液とともに除去されます。

②ACN1 mLを洗浄
　ACNは中性のためSCXに保持されたMG、LMGは保持されたままで低極性夾雑成分を洗浄により排出し除去します。

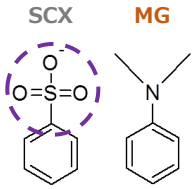
③④28%アンモニア水-ACN(1/9)による溶出
　アルカリ性の溶液で溶出することでMG、LMGは非解離状態となり、SCXから溶出されます。

環境が酸性の場合



環境が酸性の場合、MG、LMGはプラスに帯電し解離状態になり、SCXも帯電状態であるためMG、LMGはSCXに保持されます。

環境がアルカリ性の場合



環境がアルカリ性の場合、MG、LMGは帯電せず非解離状態になり、SCXから脱着して溶出されます。

SCXについてはpp.106-115「7,3)(2)イオン交換カラム」も併せてご覧ください。

5,3) アフラトキシン

アフラトキシン(以下AFs)とはアスペルギルス・フラバス(*Aspergillus flavus*：コウジカビの一種)などから生成されるカビ毒の総称で、中でもAFB1は天然物で最も強力な発がん性物質の一つとして知られています。厚生労働省の『総アフラトキシンの試験法』ではB1、B2、G1、G2が対象となっています。

前処理フロー

試料採取 50 g

- 添加 ACN-水(9/1) 200 mL

ホモジナイズ 8,000 rpm, 5分 ・・・❶

静置

抽出液

抽出液 5 mL 分取

- 添加 水 5 mL ・・・❷

遠心分離 3,500 rpm, 5分 ・・・❸

試験溶液 10 mL

全自動固相抽出装置ST-L400

Smart-SPE C18-50mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN-水(1/1)
- **負荷[通液]** **試験溶液** 1 mL 分取
- 洗液　ACN-水(1/1) 0.2 mL

流出液

- 添加　水 12 mL

Smart-SPE C18-50mg：保持
- コンディショニング　アセトン　水
- 洗浄　水 3 mL

固相乾燥(窒素ガス) 10秒 ・・・❹

Smart-SPE C18-50mg
Smart-SPE SCX-30mg：精製
Smart-SPE PSA-30mg：精製
- コンディショニング　アセトン　ACN
- 溶出 ACN 1 mL

定容：2 mL 水で調整

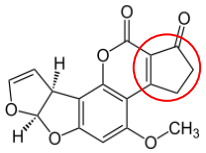
測定：LC-MS/MS

化合物情報

Bグループは五員環

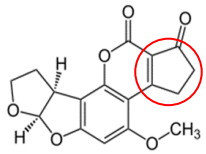
【アフラトキシンB1 (AF B1)】

MF：C17H12O6
MW:321.3
logPow：1.23(推定値)



【アフラトキシンB2 (AF B2)】

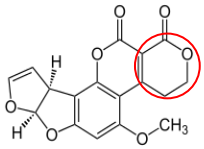
MF：C17H14O6
MW:314.3
logPow：1.45(推定値)



Gグループは六員環

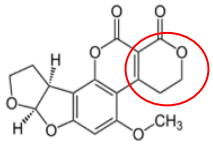
【アフラトキシンG1 (AF G1)】

MF：C17H12O7
MW:328.3
logPow：0.50(推定値)



【アフラトキシンG2】

MF：C17H14O7
MW:330.3
logPow：0.71(推定値)



前処理フロー解説・留意点

❶ 本法ではプロセスホモジナイザーを用いてホモジナイズしました。
アフラトキシンなどカビ毒汚染はロット内に局在化しているためサンプリングご誤差を低減する目的で試料の採取量を多くします。

プロセスホモジナイザー

❷ 水を添加し、ACN濃度を下げて(約45%ACN-水)C18に保持させます。

❸ 遠心分離により固形物を沈殿させます。

遠心分離後

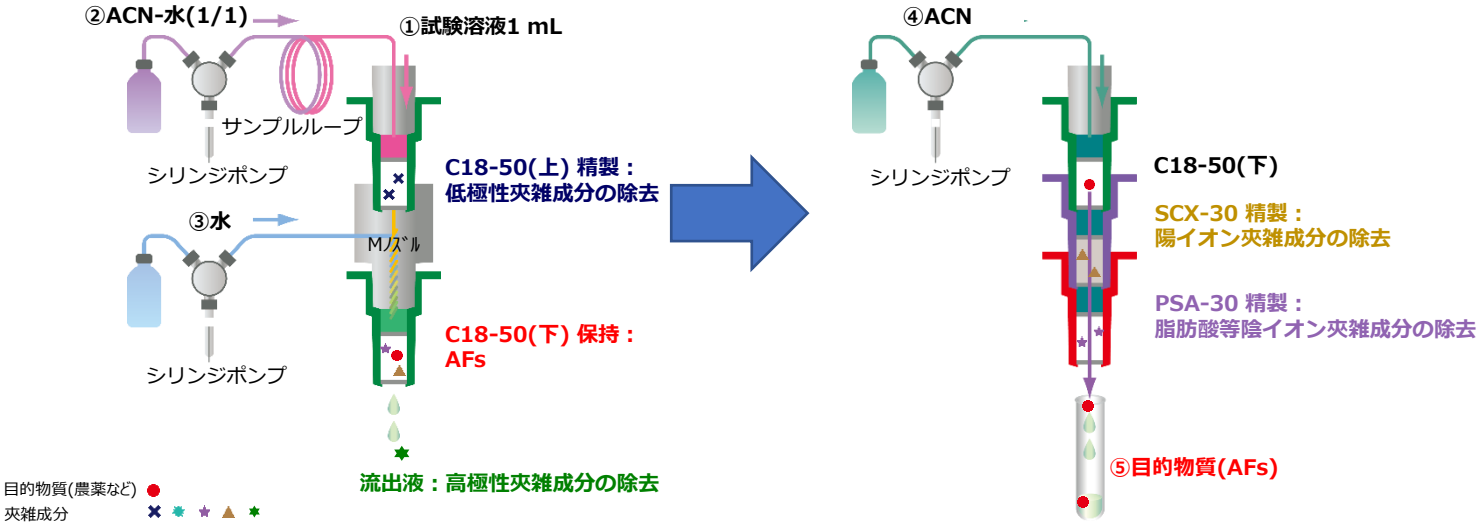
❹ ここでの窒素ガスは固相の乾燥目的ではなく、装置内で固相が移動する際に固相の先端から液滴が落ちるのを防ぐためなので10秒にしています。

5,3)カビ毒　アフラトキシン (202010 ver.)

前処理のポイント

①C18-50負荷[通液]による低極性夾雑成分の除去
②C18-50 [保持]による高極性夾雑成分の除去
③SCX-30、PSA-30によるイオン性夾雑成分の除去

精製のポイント



①試験溶液1 mLを負荷
C18-50(上)：ACN濃度約45%で負荷し、低極性夾雑成分を除去します。

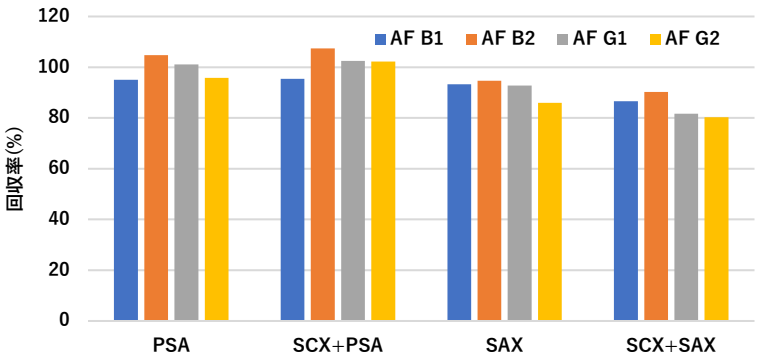
②ACN-水(1/1)0.2 mLを通液
C18-50(上)から目的物質(AFs)を溶出します。

③水を添加
水添加によりACN濃度を約4%にしてC18-50(下)に負荷します。ここで目的物質はC18-50(下)に保持され、高極性夾雑成分は流出し除去されます。

④⑤ACNによる溶出
C18-50の下にSCXとPSAを連結することでイオン性夾雑成分を除去しながら目的物質を溶出します。

精製固相の検討

イオン性夾雑成分の除去を目的として追加精製の固相を検討しました。その結果SCX+PSAで良好な回収率が得られました。



陽イオン交換、陰イオン交換カラムにおける回収率の比較
(アーモンド抽出液に標準溶液を添加して評価)

測定条件例

LC　UHPLC(Nexera X2) (島津製作所)

分析カラム	Shim-pack FC-ODS, 2.0 mm I.D. x 150 mmL.,3 μm
移動相	A液：10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B液：メタノール
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B Conc. 40%(0-2 min)-60%(10 min)-90%(12-14 min)-40%(14.1-15min)
カラム温度	40 ℃
注入量	10 μL

MS　LCMS-8045 (島津製作所)

イオン化モード　ESI positive

参考文献： 小西ら,「自動前処理装置によるアフラトキシン(B1,B2,G1,G2)分析法の開発」,第115食品衛生学会学術講演会要旨集p.142

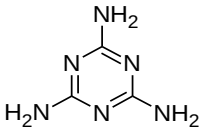
5,4) メラミン

メラミンは、主にメラミン樹脂の原料として使用されるほか、ラミネート、接着剤など様々な工業製品に利用されています。しかし、2007年に中国製ペットフード、2008年に中国製乳幼児用調製粉乳にメラミンが不正に混入され、メラミンが原因と思われる健康被害が多数報告されました。

化合物情報

【メラミン（2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン）】

MF：C3H6N6
MW:126.12
logPow：-1.37、-1.14
解離定数：5.00（25℃）、5.16（20℃）



前処理フロー

牛乳

試料採取 5 g
- 添加 ACN 10 mL ・・・❶

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出上澄液

抽出上澄液 1.5 mL 分取
- 添加 水 0.5 mL ・・・❷

試験溶液 2 mL

全自動固相抽出装置

- Smart-SPE C18-30mg：精製（コンディショニング：アセトン、ACN）
- Smart-SPE PSA-30mg：精製
  - **負荷[通液]** **試験溶液** 1 mL 分取
  - 洗液 ACN-水(1/1) 1 mL

流出液
- 添加 0.1 mol/L HCl 2 mL
- Smart-SPE SCX-30mg：保持（コンディショニング：アセトン、ACN）
- Smart-SPE SCX-30mg

固相乾燥(窒素ガス) 20秒
- 溶出 28%アンモニア水-メタノール(5/95) 0.9 mL

定容：1 mL メタノールで調整

分取 0.1 mL ・・・❸

定容：1 mL メタノールで調整

測定：LC-MS/MS

固形物(チョコレート、クッキーなど)

試料採取 5 g
- 添加 ACN-水(1/1) 25 mL

振とう 1分

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出上澄液

抽出上澄液 0.2 mL 分取
- 添加 ACN-水(1/1) 1.8 mL ・・・❸

試験溶液 2 mL

全自動固相抽出装置

- Smart-SPE C18-30mg：精製（コンディショニング：アセトン、ACN）
- Smart-SPE PSA-30mg：精製
  - **負荷[通液]** **試験溶液** 1 mL 分取
  - 洗液 ACN-水(1/1) 1 mL

流出液
- 添加 0.1 mol/L HCl 2 mL
- Smart-SPE SCX-30mg：保持（コンディショニング：アセトン、ACN）
- Smart-SPE SCX-30mg

固相乾燥(窒素ガス) 20秒
- 溶出 28%アンモニア水-メタノール(5/95) 0.9 mL

定容：1 mL メタノールで調整

測定：LC-MS/MS

5,4)その他　メラミン (201809ver.)

前処理のポイント

①アセトニトリル抽出による除タンパク(牛乳の場合)
②C18-30による低極性夾雑成分の除去
③SCX-30、PSA-30によるイオン性夾雑成分の除去

前処理フロー解説・留意点

❶ 牛乳では抽出溶媒をACN-水とした場合、遠心しても白濁するだけで分離しないため(写真左)、ACNに変更しました。

抽出溶媒をACNに変更することで、牛乳中のタンパク質が変性・凝固し、遠心分離による除タンパクが可能になりました(写真右)。

抽出溶媒
ACN-水

抽出溶媒
ACN

❷ 水を添加し、ACN濃度を下げてC18-30に負荷することで低極性夾雑成分を除去します。

❸ 測定濃度が検量線の直線性の範囲内に入るようにするため希釈します。本法の測定条件では0.1～10ppbの間で直線性が確認されました。

測定条件例

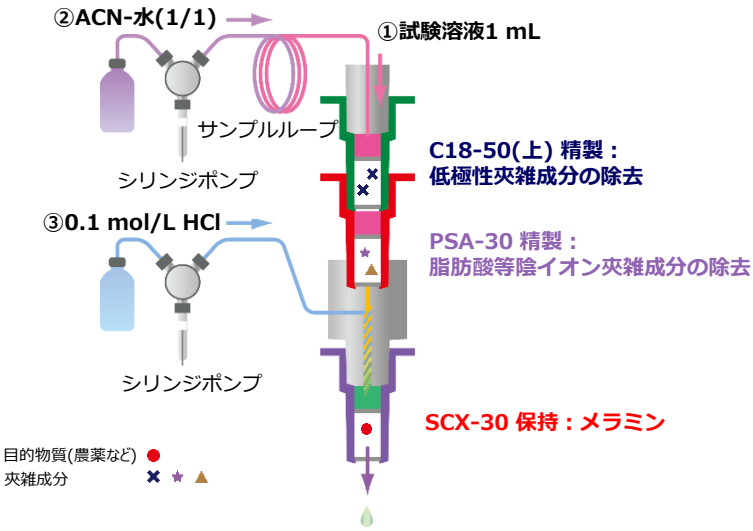
LC　Prominence (島津製作所)

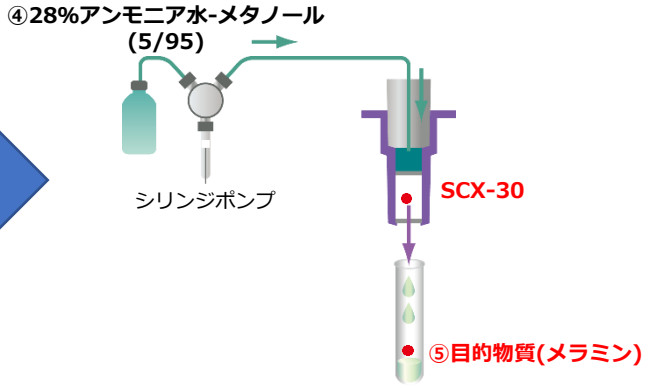
分析カラム	TSK-GEL AMIDE-80, 2.0 mm I.D. x 150 mml
移動相	A液：0.1 %ギ酸水+2mMギ酸アンモニウム水溶液 B液：ACN
流速	0.3 mL/min
グラジエント	B Conc. 95%(0 min)-90%(1 min)- 60%(2-4 min)-56%(6min)- 10%(7-12min)-90%(12.1-17min)
カラム温度	40℃
注入量	5 μL

MS　API3200 (エービー･サイエックス)

イオン化モード　ESI positive

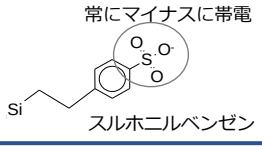
精製のポイント



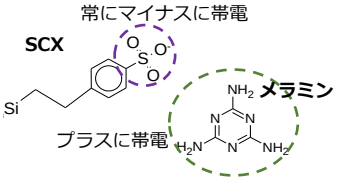


SCX(Strong Cation Exchange)

作用：強陽イオン交換
pKa：-6.5
強イオン交換カラムはpHに関わらず常に帯電状態です。

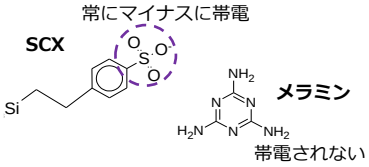


環境が酸性の場合



環境が酸性の場合、メラミンはプラスに帯電し、SCXも帯電状態であるためメラミンはSCXに保持されます。

環境がアルカリ性の場合



環境がアルカリ性の場合、メラミン帯電されないのでSCXから溶出されます。

①試験溶液1 mLを負荷
C18-50：低極性夾雑成分を除去します。

PSA-30：脂肪酸等陰イオン夾雑成分を除去します。

②ACN-水(1/1)1 mLを通液
C18-50から目的物質(メラミン)を溶出します。

③0.1 mol/L HClを添加
HClを添加して試験溶液を酸性にした状態でSCXに通液します。酸性条件下(pH＜3)ではメラミンはプラスに帯電するためSCXに保持されます。

④⑤28%アンモニア水-メタノールによる溶出
アルカリ性溶液を通液することでメラミンは帯電されずSCXから溶出されます。

SCXについてはpp.106-115「7,3)(2)イオン交換カラム」も併せてご覧ください。

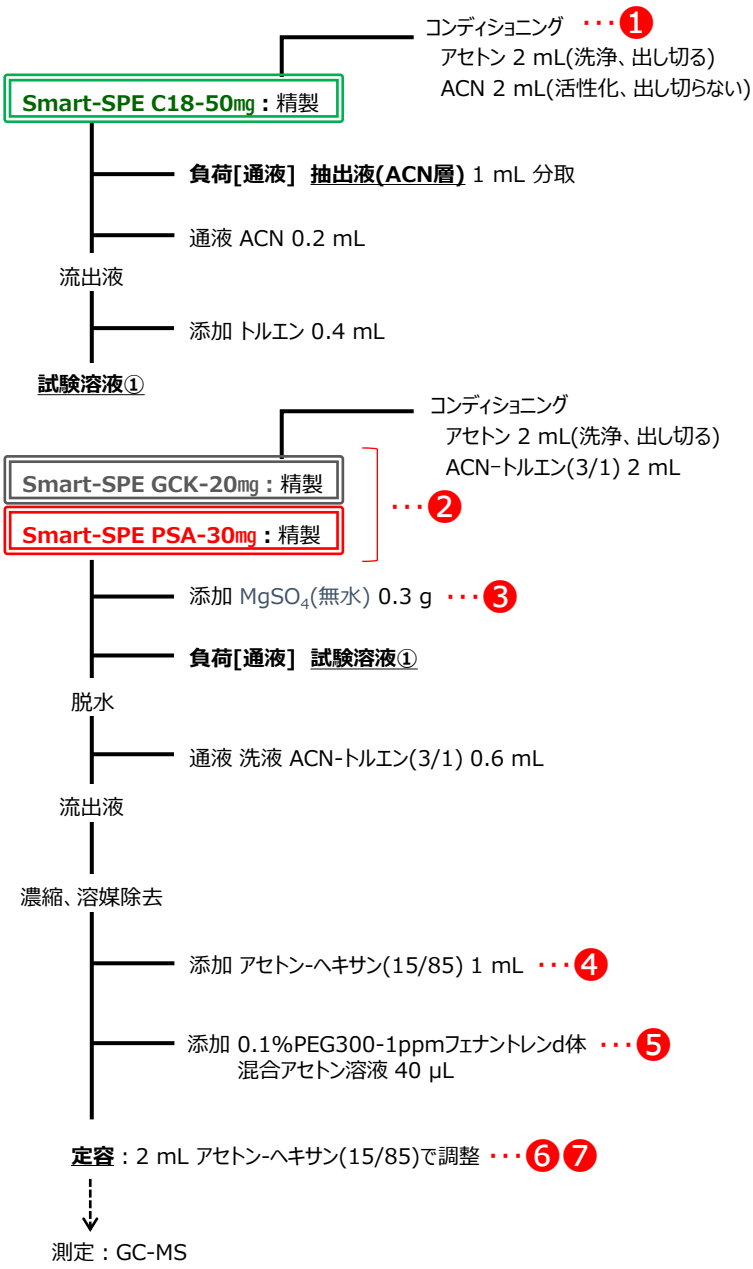
参考文献： 小西ら,「メラミン分析法の自動化の検討」,第107食品衛生学会学術講演会要旨集p.49

5,5) STQ-GC A法

STQ-GC A法は通知試験法（一斉試験法）をスケールダウンした方法になります。

比較的広い極性の農薬を対象とできますが、その分精製効果が不十分となる傾向があり、先に記載したGC-B法がお勧めですが、参考としての掲載となります。LC-MS/MSを保有していない場合、極性農薬の分析に有効です。

前処理フロー



前処理フロー解説・留意点

1. 固相活性化のコンディショニングについて
シリカ系充填剤の場合はシリカ細孔が溶媒で十分満たされた状態を保つために固相活性化の溶液は出し切らずに少し残します。

2. GCKを上に、PSAを下になるよう連結します。下に選択性の高い固相を用いることで精製効果を高めるようにします。

3. リザーバーに$MgSO_4$(無水)を入れ、そこに試験溶液①を負荷して試験溶液①の水分を脱水します。$MgSO_4$(無水)の量が少ないと脱水が不十分となり精製効果が低下します。

4. GC-MSで測定するためアセトン-ヘキサン混液に転溶します。

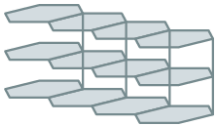
5. これは大量注入(25μL)する場合の添加量です。注入量が異なる場合はGCに注入するPEGの絶対量が500 ng、フェナントレンd体が0.5 ngになるように添加量を変更します。
※フェナントレンd体は測定時の感度変動確認のために添加しています。定量値補正には使用していないため添加は必須ではありません。

6. 標準溶液は試料溶液と同じ溶媒組成にすることを推奨します。

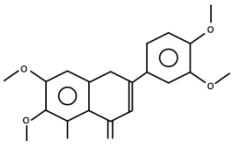
7. 定容量を変更して濃縮することも可能です。その場合はPEG及びフェナントレンd体の添加量が5になるように調製します。

GCK(グラファイトカーボン)の機能

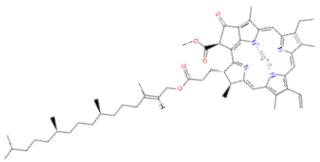
グラファイトカーボンは平面構造であるため、試料に含まれる平面構造をもったフラボノイド類やクロロフィル等の物質を吸着します。



グラファイト



フラボノイド類



クロロフィルa

グラファイトカーボンカラムについてはpp.116-117「7,3)(3)グラファイトカーボンカラム」も併せてご覧ください。

5,5)【参考】STQ-GC A法（201809 ver.）

前処理のポイント

比較的幅の広い極性に対応可能で、アセフェート、メタミドホス等の高極性農薬も分析可能だが、精製効果は不十分となる傾向。

操作方法の解説

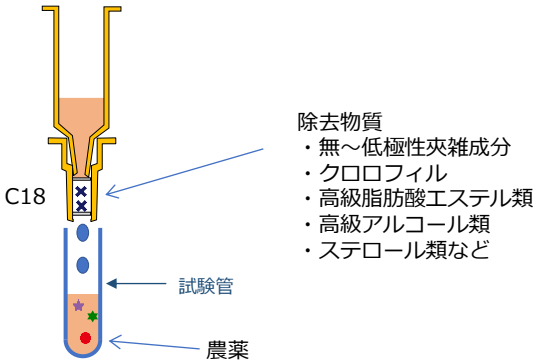
目的物質(農薬など) ●
夾雑成分 ✖ ★ ✸

① C18で精製

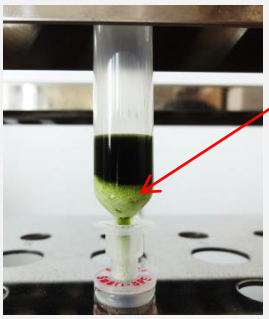
抽出液 1 mLをC18へ負荷。

流出液を試験管(小)に回収

C18で無～低極性の夾雑成分を除去して農薬はスルーさせます。



② 脱水＆GCK+PSAで精製

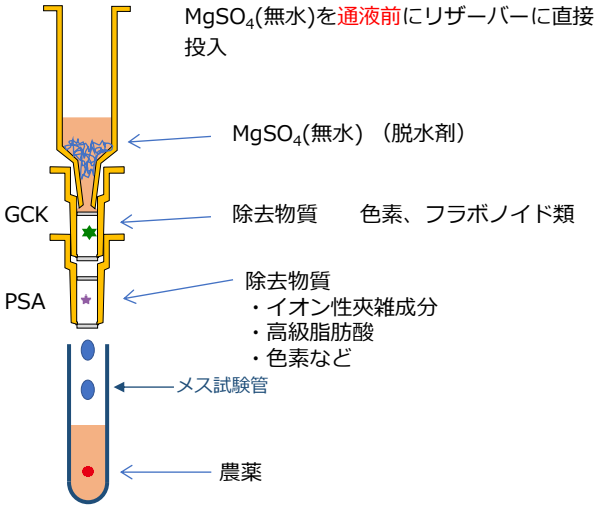


$MgSO_4$(無水) 0.3 g

リザーバーに$MgSO_4$(無水)を直接投入し矢印のように回転させて試料溶液と$MgSO_4$(無水)をよく攪拌する。

それにより試料溶液中のごく微量の水分を脱水しGCK＋PSAにおける精製効果をUPさせる。

GCKで色素など平面構造のもの、PSAで高級脂肪酸や色素などを除去し、農薬はスルーさせます。
ただしGCKでは平面構造をもった農薬もGCKに保持されるためACN-トルエンで溶出します。



6,　異常回収率の原因と対策

1）異常回収率

2）多段階添加回収試験

3）精製後添加の異常回収率

4）GC-MS測定におけるマトリックス効果

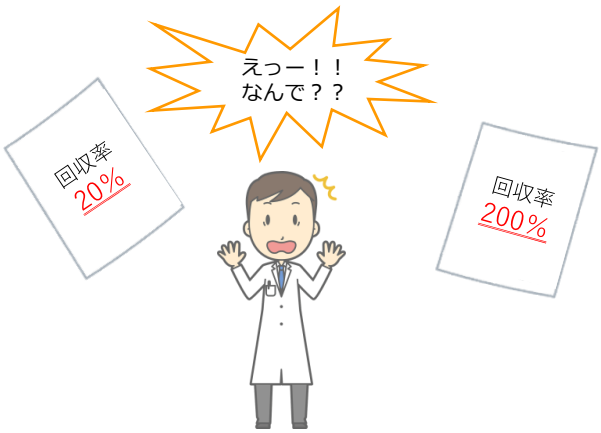
5）抽出工程での損失

6）精製工程での損失

6,1) 異常回収率

回収率が**20**%(低い)とか**200**%(異常に高い)になったことありませんか？

試験法の評価の一つとして添加回収試験があります。その添加回収率(以下回収率)が100%であれば工程での損失がなく試験法として問題ありません[注1)]。しかし回収率が20%と低かったり200%といったように異常に高くなったりしたことはありませんか？ここではこのような異常回収率[注2)]となった場合の原因と対策例を紹介します[注3)]。

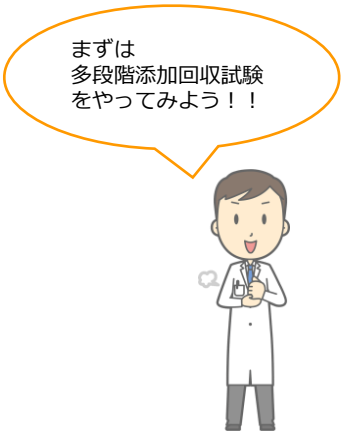


注1)厚生労働省の妥当性評価ガイドラインでは真度(回収率)の目標値は70～120%となっていますが本ガイドブックでは損失のない場合の回収率は便宜上100%とします。
注2)本ガイドブックでは低回収率と異常高回収率を合わせて「異常回収率」と表現します。
注3)測定機器の不具合は除きます。

【異常回収率改善の手順】

異常回収率になった場合はまず多段階添加回収試験を行いどの工程に原因があるかを調べます。次にその箇所に応じた対策を行い状況の改善をはかります。

異常回収率
↓
多段階添加回収試験
↓
原因箇所の特定
↓
対策
↓
改善



参考文献：厚生労働省：医薬食品局食品安全部発　第1115001号：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

6,2)多段階添加回収試験

(1)多段階添加回収試験とは

多段階添加回収試験とは前処理工程内の複数の段階で目的物質を添加し、その回収率の差から目的物質の挙動を推測する試験法です。本ガイドブックでは『抽出前』、『抽出後』、『精製後』の3段階で標準溶液を添加し、それぞれの段階の回収率を比較・評価する方法を提案しています。これによりどの工程に問題があったかを推測することができ、それに応じた対策を講じることで結果を改善することができます。

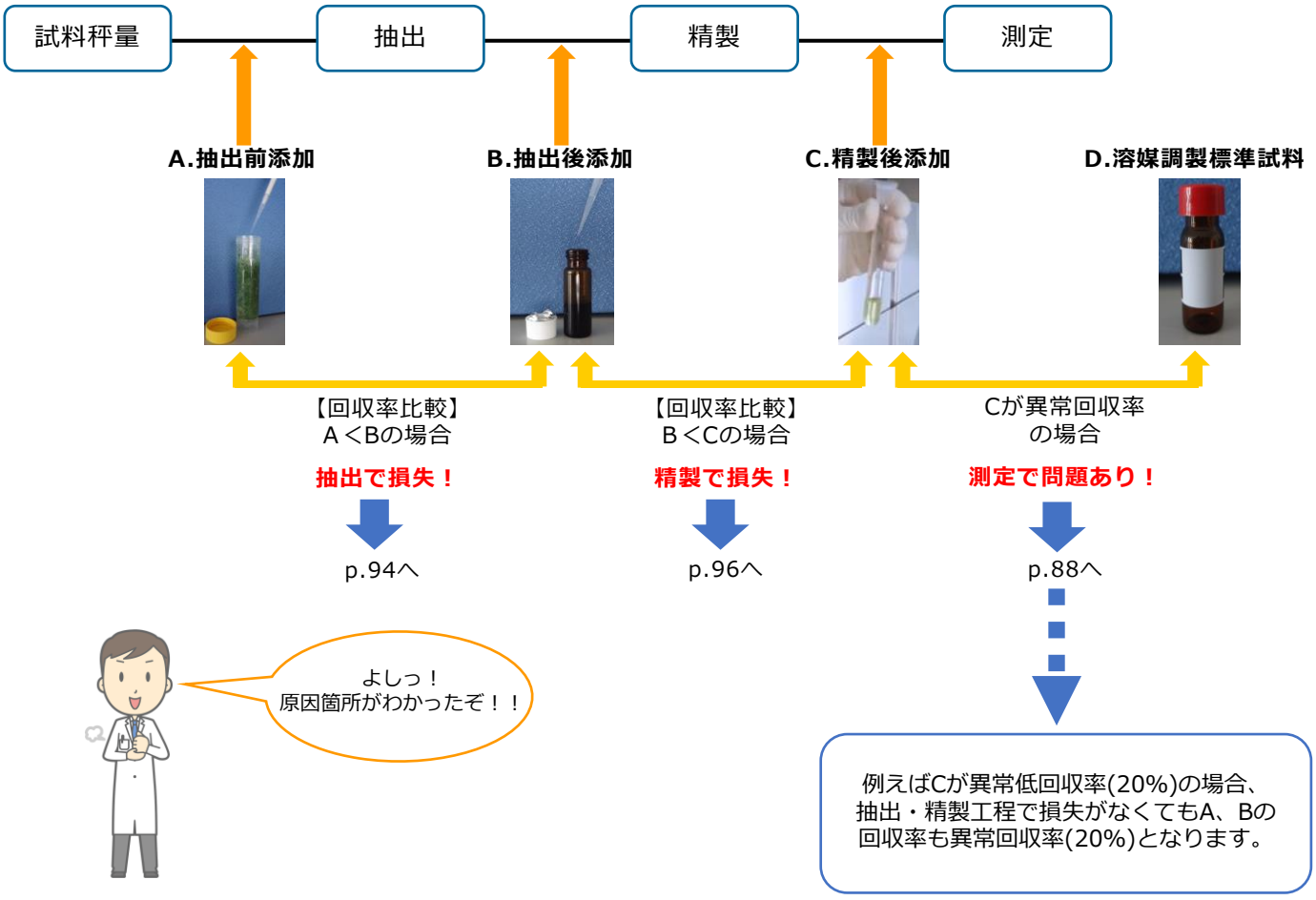
(2)多段階添加回収試験の手順

①下記A.、B.、C.の各段階で標準溶液を添加した試料とD.標準試料を調製し測定します。

A. 抽出前添加：いわゆる通常の添加回収試験で、試料秤量後に標準溶液を添加します。
B. 抽出後添加：固相抽出を行う前に抽出液に標準溶液を添加します。
C. 精製後添加：測定前に前処理が終わった試験溶液に標準溶液を添加します。
D. 溶媒調製標準試料：溶媒に溶解した標準溶液で検量線として使用します。

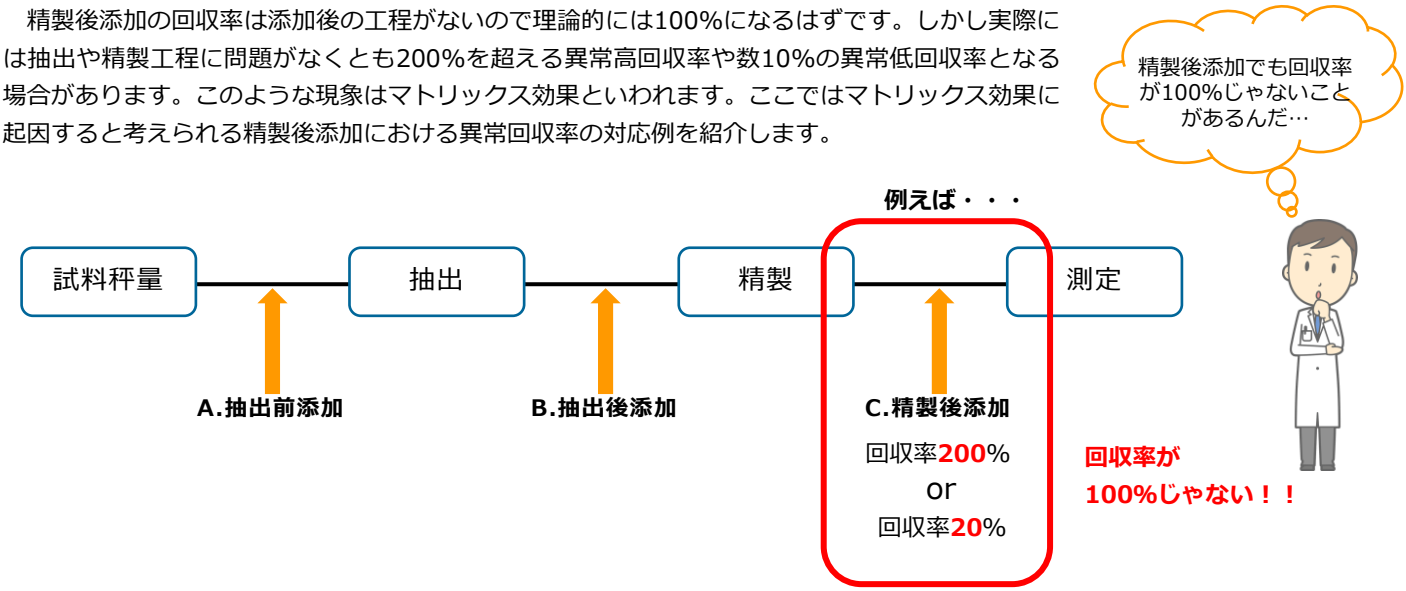
②D.標準試料を検量線としてA.抽出前添加、B.抽出後添加、C.精製後添加の回収率を求めます。

・AとBで回収率に差がある場合は抽出でのロスが考えられます。
・BとCで回収率に差がある場合は精製でのロスが考えられます。
・Cの回収率は理論的には100%になるはずですが200%や数10%など異常回収率になる場合は測定時のマトリックス(夾雑成分)による問題が考えられます。



6,3) 精製後添加の異常回収率

精製後添加の回収率は添加後の工程がないので理論的には100%になるはずです。しかし実際には抽出や精製工程に問題がなくとも200%を超える異常高回収率や数10%の異常低回収率となる場合があります。このような現象はマトリックス効果といわれます。ここではマトリックス効果に起因すると考えられる精製後添加における異常回収率の対応例を紹介します。



マトリックス効果とは

GC-MS、LC-MS/MS等の測定時にマトリックスにより目的成分のピーク形状、感度、保持時間が変動する現象のことです。精製後添加の回収率(マトリックスを含む添加試料/溶媒調製標準試料*100)で評価します。

(1)GC-MSにおける対策例

GC-MSでは200%を超えるような異常高回収率となる傾向が多く見られます。考えられる主な原因の一つは標準試料のGC-MSの活性点への吸着です。例えば検量線に使用する溶媒調製標準試料がGC-MSの活性点に吸着し、ピーク面積が減少すると添加試料面積への相対値が小さくなりその結果として異常高回収率になります。対策としては疑似マトリックス(PEG)の使用や起爆注入[注1)]により活性点をコーティングして標準試料が活性点に吸着しないようにします。疑似マトリックス(PEG)の使用ついてはp.91でさらに詳しく説明します。異常回収率のもう一つの原因はマトリックスが多いことによる測定への影響です。マトリックスの影響で注入時に農薬が分解する場合は低回収率となる場合もあります。以下に対策例と優先順位を記載します。

優先順位	考えられる原因	対策
1	標準試料が活性点に吸着され面積値が減少して相対的に回収率が高くなる	疑似マトリックス(PEG)の使用 「6,4)GC-MS測定におけるマトリックス効果(p.80)」参照
2	標準試料が活性点に吸着され面積値が減少して相対的に回収率が高くなる	起爆注入[注1)]の実施
3	装置に注入されるマトリックスが多く測定に影響を与える	精製後の最終試験溶液を希釈[注2)] (測定前に希釈:測定液のマトリックスを減らす)
4	固相に負荷するマトリックスが多く精製が不十分	抽出液の希釈[注2)] (固相負荷前に希釈:固相に負荷するマトリックスを減らす)
5	精製が不十分でマトリックスが十分に除去できていない	精製方法の変更 (固相や溶出溶媒の変更)
6	マトリックスが多く精製が不十分	採取量の減量 (抽出工程からマトリックスを減らす)

注1)起爆注入とはマトリックスを含む試料溶液を先に測定し、そのあとに溶媒(マトリックスなし)に溶解している標準試料を測することをいいます。最初に測定した試料のマトリックスによりGC-MSの活性点をコーティングし標準試料が活性点に吸着するのを抑制します。

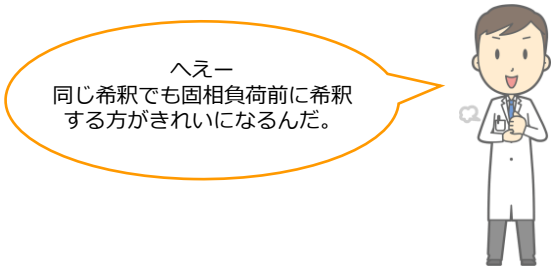
注2)同じ希釈倍率でも固相負荷前に抽出液を希釈する方が最終試験溶液を希釈するより精製効果は高くなります。

(2)LC-MS/MSにおける対策例

LC-MS/MSでは20%や50%といった異常**低**回収率となる傾向が多く見られます。このような現象はイオン化阻害(抑制)と呼ばれます。また異常高回収率を生じるイオン化促進という現象もあります。両者ともに装置に注入されるマトリックスが多い場合に生じます。以下に対策例と優先順位を記載します。装置に注入するマトリックスの量を低減するのが基本ですがそれでも改善しない場合はマトリックス検量線[注1)]を使用します。マトリックス検量線についてはp.123「8,2)定量方法の種類」をご覧ください。

優先順位	考えられる原因	対策
1	装置に注入されるマトリックスが多く測定に影響を与える	・精製後の最終試験溶液を希釈[注2)] (測定前に希釈:測定液のマトリックスを減らす) ・ 注入量を減らす
2	固相に負荷するマトリックスが多く精製が不十分	抽出液の希釈[注2)] (固相負荷前に希釈:固相に負荷するマトリックスを減らす)
3	精製が不十分でマトリックスが十分に除去できていない	精製方法の変更 (固相や溶出溶媒の変更)
4	マトリックスが多く精製が不十分	採取量の減量 (抽出工程からマトリックスを減らす)
5	マトリックスが多く、上記1～4でも改善しない	マトリックス検量線の使用

注1)マトリックス検量線とは試料ブランク測定液で希釈した標準物質を測定し作成した検量線です。試料溶液と標準試料のマトリックスの影響を相殺できます(p.123参照)。
注2)同じ希釈倍率でも固相負荷前に抽出液を希釈する方が最終試験溶液を希釈するより精製効果は高くなります。



参考文献：日本農薬学会「残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ」　改訂4版　2018

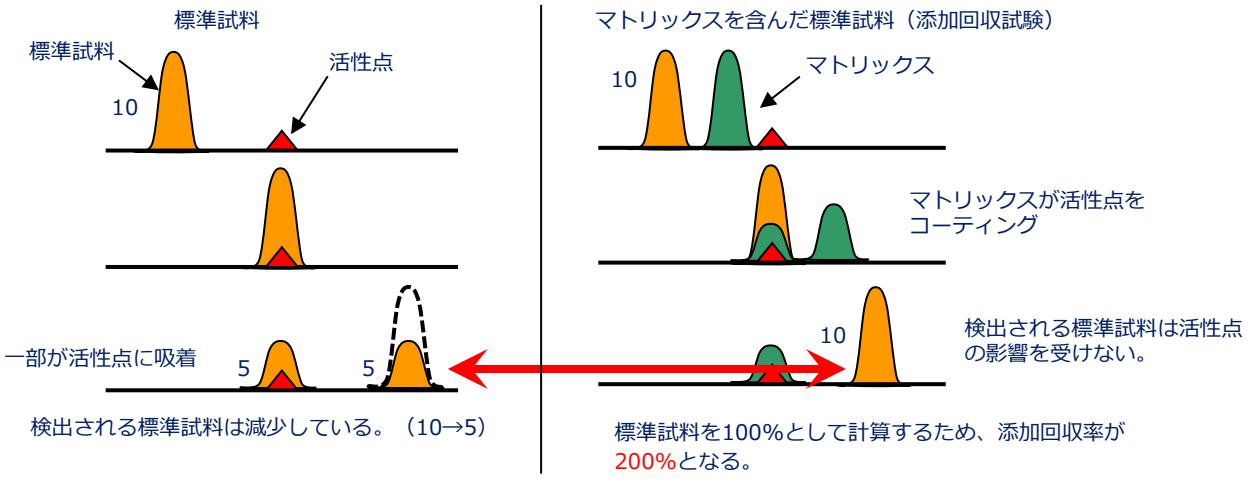
6,4) GC-MS測定におけるマトリックス効果

6,3)(1)で述べたようにGC-MS測定では200%など異常高回収率が生じる場合があります。その原因の一つとして標準試料のインサートやカラム、イオン源等に存在する活性（吸着）点への吸着があります。この現象はマトリックス効果と呼ばれます。ここではマトリックス効果の概要とその対策である疑似マトリックス(PEG)の使用について説明します。

(1) マトリックス効果の概要

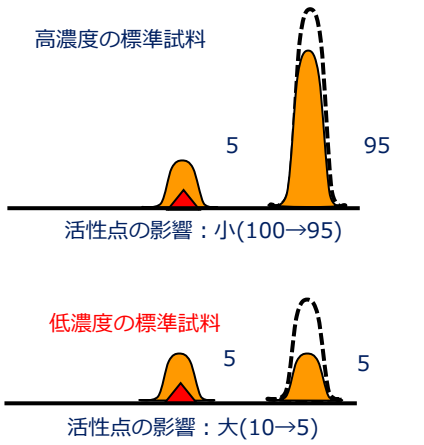
①異常高回収率を引き起こすマトリックス効果のイメージ

標準試料では活性点を通過する際、その一部が活性点に吸着されることで検出器までの到達量が減少します。しかし、マトリックスを含む試料では、マトリックスが活性点に吸着するため、添加した標準試料は活性点に吸着されず、減量せずに検出器まで到達します。その結果、減量した標準試料で添加回収率を算出することになり100%を超えるという状況となります。

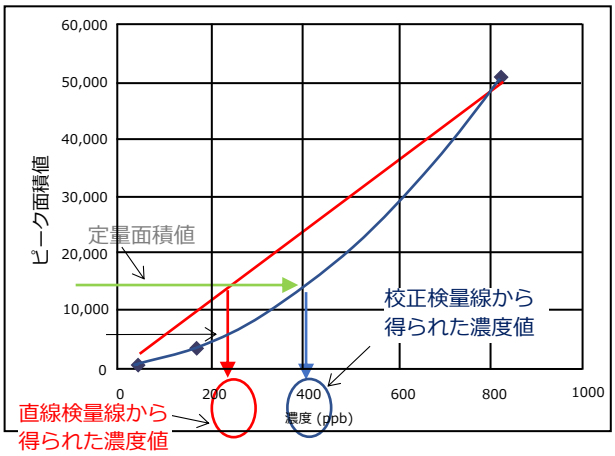


②検量線におけるマトリックス効果の影響

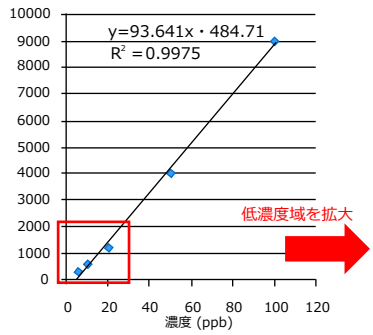
活性点に吸着する物質量は一定と考えられています。つまり、低濃度ほど吸着の影響が大きいことになり、検量線を作成した場合、二次曲線となります。二次曲線の検量線を無理やり直線としてしまうと定量値に大きな誤差が生じます。これでは、抽出、精製で本来良好な回収率が得られていたとしても、計算上で異常定量値となります。特に点数の少ない検量線では誤算出の可能性が高まります。

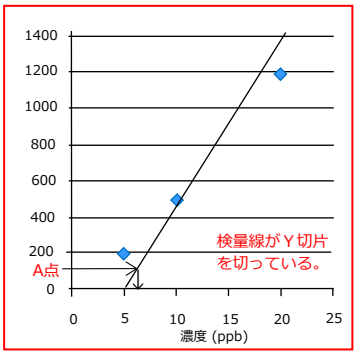


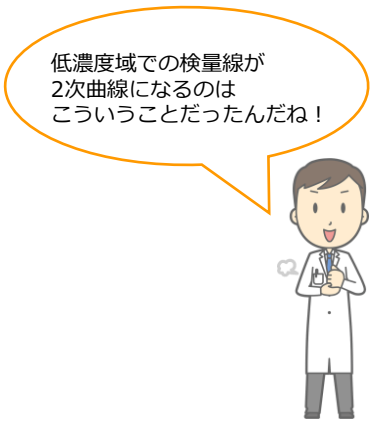
低濃度程、活性点の影響を受けやすくなる。



【実際の検量線の例】



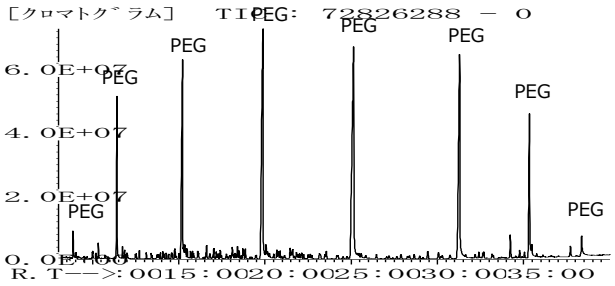




6,4)GC-MS測定におけるマトリックス効果

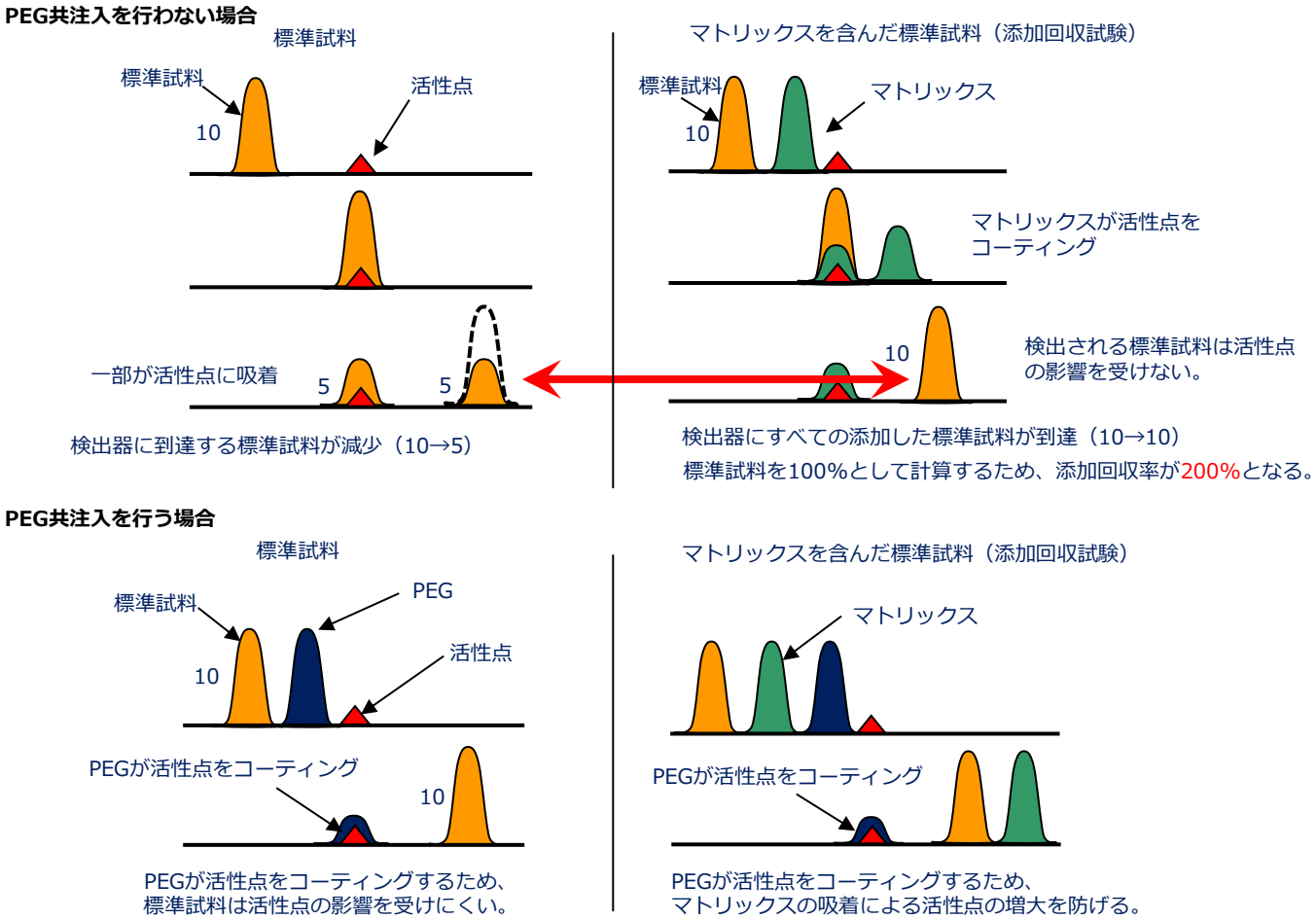
(2)対策　疑似マトリックス(PEG)の使用：PEG共注入法

　標準試料にポリエチレングリコール300(PEG)を添加することでPEGが疑似マトリックスとして活性点をコーティングし、標準試料の活性点への吸着を低減します。
　PEGはほとんどの農薬の保持時間をカバーしており、またそのフラグメントイオンは主に100以下のため目的物質(農薬)のマススペクトルと重なりにくいといった利点があります。



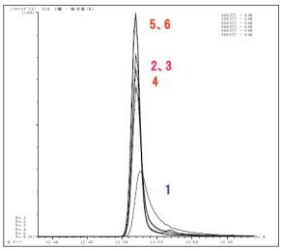
PEG300のTICクロマトグラム

①PEG使用による異常高回収率改善のイメージ



②参考：農薬標準溶液測定における問題点

　GC-MSで同濃度の単品の標準溶液と混合の標準溶液を測定した場合で面積値が異なる場合があります。これは単品の標準溶液の方がより活性点への吸着を起こしやすいためと考えられます。この場合も単品の標準溶液にPEGを添加し、共注入を行うことで農薬の活性点への吸着が低減され、より正確な定量値に近づけることができると考えられます。



クロルピリホスの単品標準混合溶液と混合標準溶液の比較

	測定条件	面積値
1	単品標準溶液(クロルピリホスのみ)	995,061
2	混合標準溶液32(クロルピリホス含む)	1,518,705
3	混合標準溶液34(クロルピリホス含まない)＋クロルピリホス	1,335,686
4	単品標準溶液(クロルピリホスのみ)＋PEG300	1,294,356
5	混合標準溶液32(クロルピリホス含む)＋PEG300	1,669,142
6	混合標準溶液34(クロルピリホス含まない)＋クロルピリホス＋PEG300	1,719,705

・1の面積値が最も小さくテーリングを起こしている。
・2と3の面積値はほぼ同じで1よりもピーク形状が改善し、面積値も増加した。
・PEG添加によりピーク形状が改善し、面積値も増加した(4,5,6)。

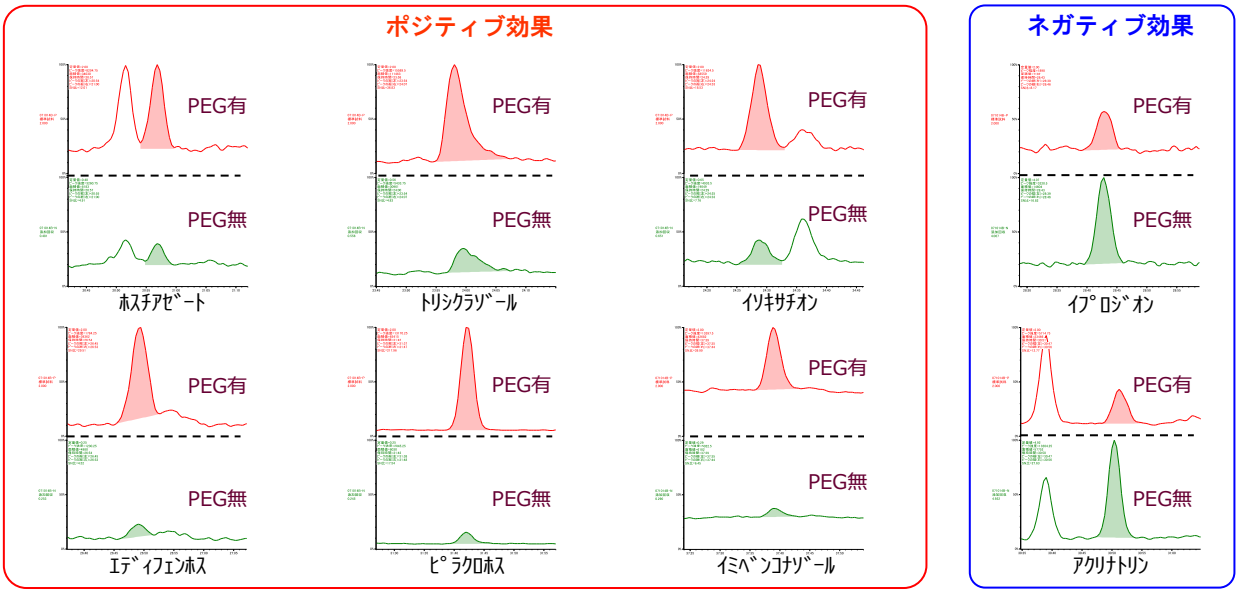
(3)PEG共注入による効果

標準試料だけでなく最終試験溶液(測定液)にもPEGを添加することでマトリックスによる活性点の増大をPEGのコーティングにより防ぐことができます。

PEG共注入メリット

- **マトリックスによる異常回収率の低減**
- **感度向上**　(一部の農薬ではネガティブ効果となります)
- **ピーク形状の改善**　(PEGが活性点をコーティングし目的物質が吸着されないため)
- **カラム劣化の防止**　(PEGが活性点をコーティングするためマトリックスが活性点に吸着せず汚れとして残らないため)
- **PEG共注入検量線法による検量線の直線性の向上**
  標準試料に疑似マトリックスとしてPEGを添加し検量線を作成する手法です。マトリックス検量線の問題点である試料に残留する農薬の影響を受けません。(p.123参照)

【PEG共注入によるクロマトグラムの比較例】



(4) PEG共注入の方法

共注入に使用するPEGは必ず**PEG300**を使用します。PEG400以上は高沸点のPEGが分離カラムに残る可能性があり、分離カラムの極性を変えてしまう恐れがあります。

PEGは**絶対量が500 ng**になるようにGCに注入します。500 ngより少ないと効果が薄く、多すぎると吸着を引き起こし悪影響が生じる可能性があります。注入量により測定液へ添加するPEGの濃度と量が異なりますのでご注意願います。

①PEG300の調製方法

a) 1 %(w/v)PEGアセトン溶液
PEG300を1g秤量しアセトンで100 mLに定容します。

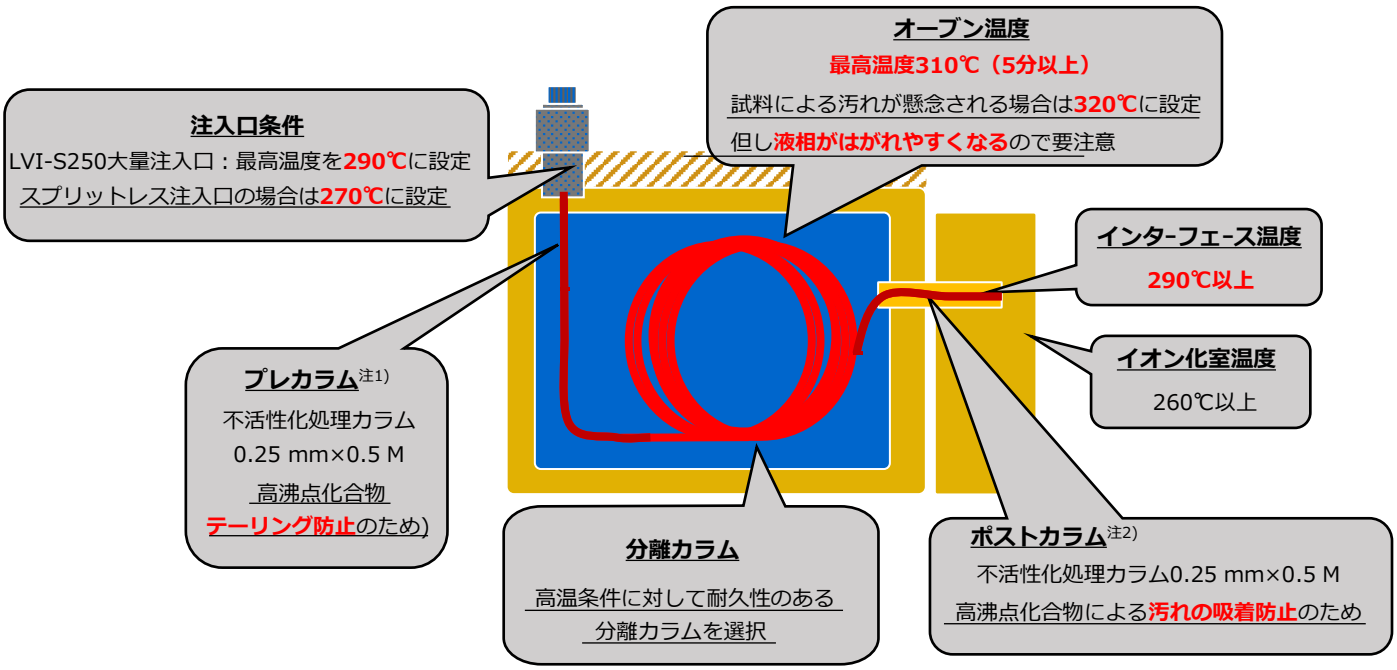
b)0.1%(w/v)PEGアセトン溶液
a) 1 %(w/v)PEGアセトン溶液を10倍希釈します。
10倍希釈の例： a) 1 %(w/v)PEGアセトン溶液1 mL分取し、アセトンで10 mLに定容

【PEGの添加例】

最終試験液の定容量	GCへの注入量	最終試験液へのPEGの添加濃度と添加量		
		濃度	添加量	注入絶対量
1 mL	1 μL	1 %(w/v)PEG	50 μL	500 ng
1 mL	2 μL	1 %(w/v)PEG	25 μL	500 ng
1 mL	25 μL (LVI大量注入)	0.1 %(w/v)PEG	20 μL	500 ng

②PEG300の使用上の注意点

- PEG**300**を使用する。
- GCに注入する絶対量を**500 ng**にする。
- LVI-S250使用の大量注入の場合は最高温度を**290℃**に、スプリットレス注入の場合は注入口温度を**270℃**に設定する。
- GCの昇温最高温度を**310℃5分以上保持**とし、高沸点のPEGを分離カラムに残さない。
- 最高使用温度の高いカラムを推奨
- GCのインターフェース温度を**290℃**に設定し、高沸点のPEGをインターフェースに残さない。



注1),2)【プレカラムとポストカラム】

❶プレカラム

大量注入口装置LVI-S250使用時は分離カラムの注入口側にプレカラムの装着を標準仕様としています。大量注入口ではインサートからカラムへの導入に時間がかかるためプレカラムを装着することで昇温開始前の分析カラムの先端に試料を濃縮させてから昇温を開始し分離が始まるようにします(試料がカラムに導入されるまでオーブンは初期温度のままに設定しておきます)。これによりピーク形状や高沸点化合物の感度を良好にします。

❷ポストカラム

STQ法では検出器側にポストカラムをつけることを推奨しています。インターフェース部分はカラムオーブン最高温度より低く設定されているため、インターフェース付近では高沸点化合物がカラム内に汚れとして吸着される可能性があるためポストカラムを装着することによりその汚れを防ぎます。ポストカラムはプレカラムと同じものをご使用できます。

❸分離カラムとの接続

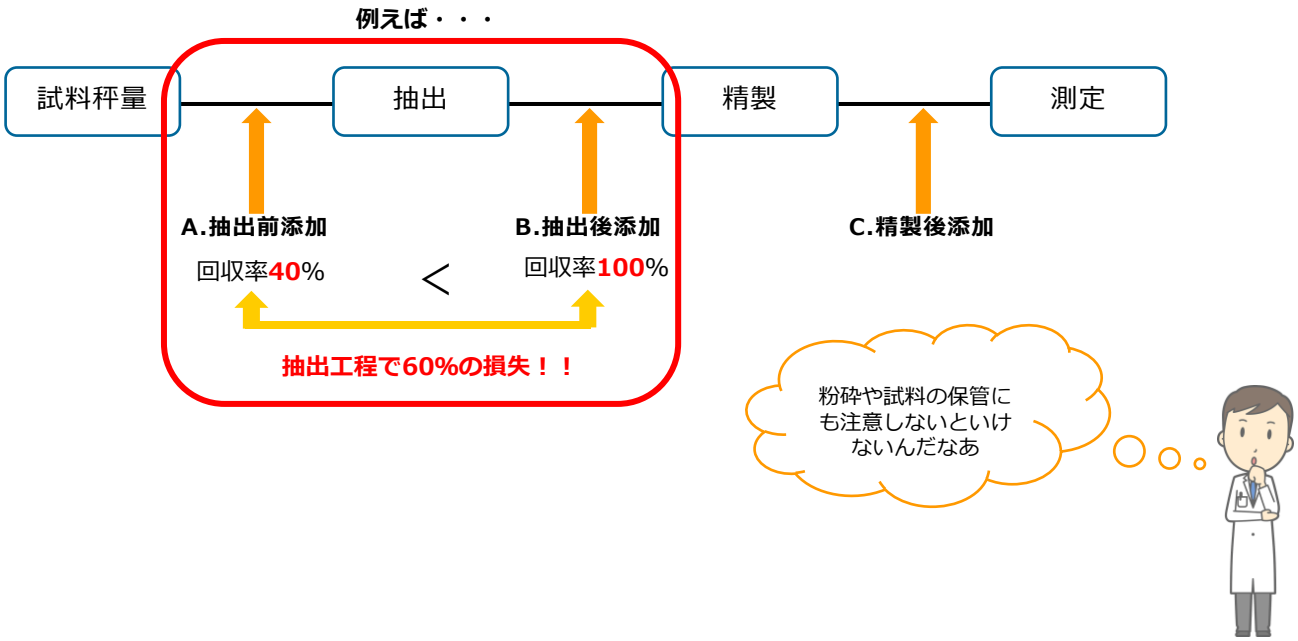
分離カラムとプレカラムとポストカラムの接続にはガラス製のプレスフィットコネクタを用います。

プレカラム及びポストカラム ※プレカラム/ポストカラム共に 約0.5 mにカットして使用します。	【ジーエルサイエンス製】 不活性シリカキャピラリーチューブ 内径0.250 mm 外径0.350 mm 長さ10 m （CatalogNo.1010-36322）
プレスフィットコネクタ	【アイスティサイエンス製】 プレスフィットⅠ型　0.25-0.25 mm 10個入り （型番：GB-5010-501）

参考文献：1)Tameo OKUMURA, Journal of Environmental Chemistry, N0.5(3), pp.575-583 (1995)
2)佐々野ら,「作物中残留農薬の迅速一斉分析法 －GC/MS編－」,第94回日本食品衛生学会学術講演会要旨集p.33
3)佐々野ら,「GC/MSを用いた食品中残留農薬分析における検量線に関する検討」,第31回農薬残留分析研究会要旨集pp.217-222

6,5)抽出工程での損失

抽出**前**添加の回収率が抽出**後**添加の回収率より低い場合は抽出工程での損失が考えられます。抽出前添加は試料秤量後に標準試料を添加しますが、用いる試料が変性していたり、粉砕時の酵素の影響などで添加した標準溶液が分解し回収率が低下する場合があります。そこで粉砕時における対策例もあわせて紹介します。



(1)粉砕(試料調製)における対策例

粉砕(試料調製)が回収率に影響を与える原因には①均一不足による偏りから生じる結果のばらつき、②粉砕時の分解、③吸着、④凍結・解凍の繰り返しによる試料の変性などが考えられます。凍結粉砕は試料の均一化、分解・変性を抑制するためこれらの対策として有用です。

凍結粉砕のメリットについてはp.10「2,予冷式ドライアイス凍結粉砕法」をご覧ください。

	原因		症状	対策例
①	均一不足	試料の偏り	ばらつき	凍結粉砕、ミル、超遠心粉砕、ふるいなど
②	分解	酵素 加水分解 熱分解	低回収率	酸・アルカリ添加、凍結粉砕、発熱防止、温度調整など
③	吸着	物性特性	低回収率	ガラスや金属への吸着防止剤添加など
④	凍結・解凍の繰り返し	変性	ばらつき 低回収率	凍結粉砕、小分け凍結保管

(2)抽出における対策

抽出工程では回収率に影響を与える原因として下記の①～⑦が考えられます。いずれの工程も重要ですがポイントは液液分配時の水と塩の比率(塩が飽和していること)と、塩類を十分に振とう溶解することです。特に⑥ではまず3種類の塩を添加し、十分に振とう溶解(⑦)してから$MgSO_4$(無水)を添加することで試薬の溶解不足を解決し、液液分配で塩の役割を発揮することができます。(p.14参照)

試料採取 10 g ①
- 添加 標準溶液(添加回収試験の場合) ②
- 添加 水 (10－試料の含水量) mL ③
- 添加 ACN 10 mL ④

ホモジナイズ 13,000 rpm, 1分 ⑤
- 添加 NaCl 1 g
- 添加 クエン酸3Na2水和物 1 g
- 添加 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5 g
- 添加 $MgSO_4$(無水) 4 g

⑥

振とう溶解 10秒 ⑦

振とう 1分 ⑦

遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出液(ACN層)

	原因		症状	対策例
①	採取量が少ない (1g採取など)	ばらつき	ばらつき	均一化
②	添加量が多い	希釈される(定量値に影響を与える)	低回収率	濃い濃度での少量添加
	溶媒にヘキサンが含まれている	抽出溶媒(ACN)と分離する	低回収率	溶媒変更
③	水添加後の膨潤時間が長い	農薬の分解	低回収率	時間調整
	水の添加量不足	溶媒との混和不十分 液液分配時の水と塩の比率が変わってしまう pH調整不十分	低回収率	水分含量の確認
④	抽出液量の不足	抽出力不足	低回収率	増量 複数回抽出 (p.16~17参照)
⑤	抽出方法	抽出力不足	低回収率	ホモジナイズ
⑥	試薬添加ミス	pH調整不十分 塩析効果不十分	低回収率	計量スプーンの使用
⑦	振とうが不十分	試薬溶解不足 pH調整不十分 塩析効果不十分	低回収率	MgSO4(無水)添加前後の振とうの強化

6,6)精製工程での損失　B.抽出後添加回収率＜C.精製後添加回収率

抽出**後**添加の回収率が精製後添加の回収率より低い場合は精製工程での損失が考えられます。

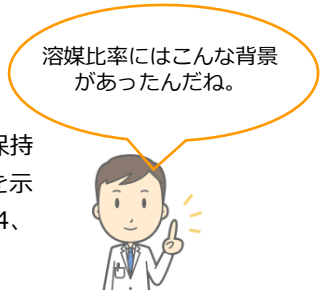
例えば・・・

(1)精製における対策例

精製工程で損失する原因としては農薬が固相に保持されていない、または固相から溶出していないことが考えられます。

原因	対応例
固相への保持が不十分	負荷溶液の溶媒の種類や比率を変更する 保持力の強い固相を使用する
固相からの溶出が不十分	溶出溶媒の種類や比率を変更する

(2)【参考】STQ法で使用する溶媒比率の精製効果



STQ法で使用する固相に通液する溶媒の比率による精製効果を下記に示します。農薬を効果的に保持または溶出させるには適切な溶媒比率があります。但し、農薬と性質の近い夾雑成分も同様の挙動を示すため農薬の回収率と精製効果のバランスを見ながら溶媒比率を設定する必要があります(pp.40-44、p.48参照)。

主な相互作用	主な用途	通液溶媒	溶媒比率による精製効果
無極性 例)C18	無・低極性夾雑の除去 クロロフィル コレステロールなど	ACN－水	・ACN比率が 低い→脂質除去効果大、低極性農薬の回収率が低下 (ｼﾗﾌﾙｵﾌｪﾝ、ｴﾄﾌｪﾝﾌﾟﾛｯｸｽ) 高い→低極性農薬回収向上、夾雑物の溶出の増加 (脂質、ｸﾛﾛﾌｨﾙの溶出)
無極性 例)C18 PBX	農薬保持	ACN－水	・ACN比率が 高い→極性農薬が溶出、固相に保持されない 低い→極性農薬は固相に保持される しかし有機溶媒の農薬が溶解している状態で水を添加して急激にACN比率を下げると低極性農薬がリザーバーなどに吸着し回収率が低下する
極性 陰イオン交換 例)PSA	脂肪酸除去 イオン性夾雑物除去	ｱｾﾄﾝ-ﾍｷｻﾝ混液	・アセトン比が 低い→高極性農薬の回収率低下　(ﾌﾙﾘﾄﾞﾝ、ﾌﾟﾛﾊﾟﾆｱﾙなど) 高い→脂肪酸溶出の可能性
		ギ酸含有ACN	・ギ酸濃度が 低い→酸性農薬の回収率が低下　(ｸﾛﾌﾟﾛｯﾌﾟ、ﾅﾌﾟﾀﾗﾑなど) 高い→酸性夾雑の溶出
平面構造 例)GCK	平面構造夾雑除去	ﾄﾙｴﾝ-ｱｾﾄﾝ-ﾍｷｻﾝ	・トルエン比が 低い→平面構造農薬の回収率低下 高い→平面構造夾雑物の溶出

7,　補足資料-1
固相抽出の基礎

1）固相カートリッジの基本的な使い方

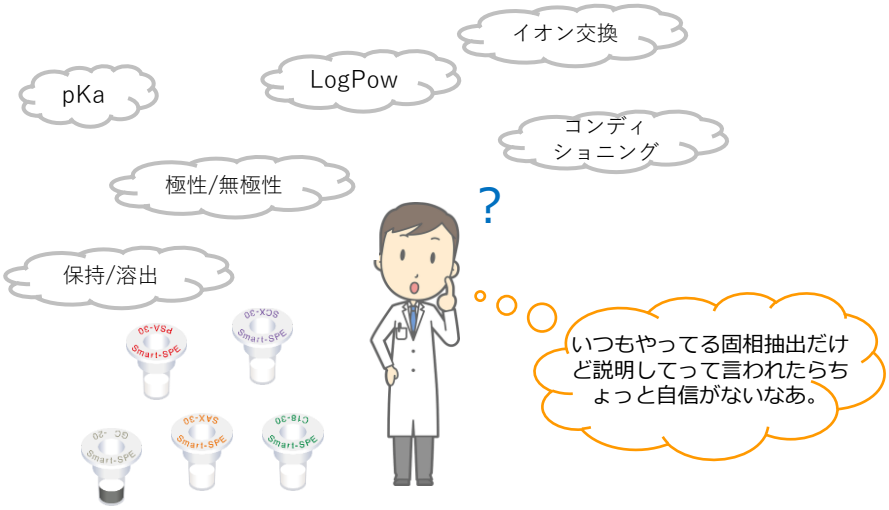
2）Smart-SPEの種類

3）主な固相カートリッジの使い方

（1）無極性カラム C18

（2）イオン交換カラム

（3）グラファイトカーボンカラム



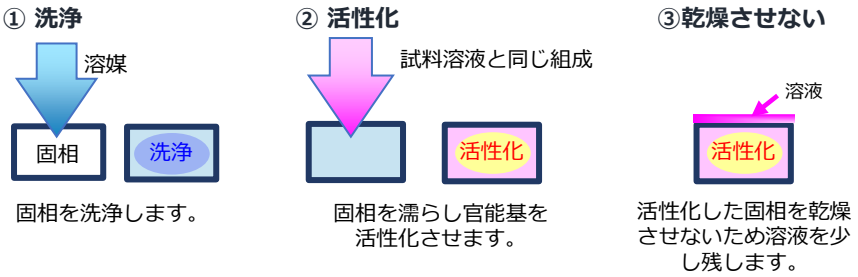
7,1）固相カートリッジの基本的な使い方

固相カートリッジはまずコンディショニングを行い充填剤の官能基を活性化させてから試料を負荷します。試料の負荷には「通過型」と「保持型」の使い方があります。

(1)コンディショニング

コンディショニングとは使用前の固相カートリッジに溶媒を通液して充填剤を濡らし官能基を活性化させることです。基本的な流れは溶媒を通液して固相を洗浄したあと試料溶液と同じ組成の溶媒を通液して固相を活性化させます。コンディショニング後は活性化状態を保つため通液した液を少し残し固相を乾燥させないようにします。

①溶媒を通液して固相を洗浄します。
②試料溶液と同じ組成のものを通液し活性化します。
③乾燥させないよう液を引ききらずに少し残します。



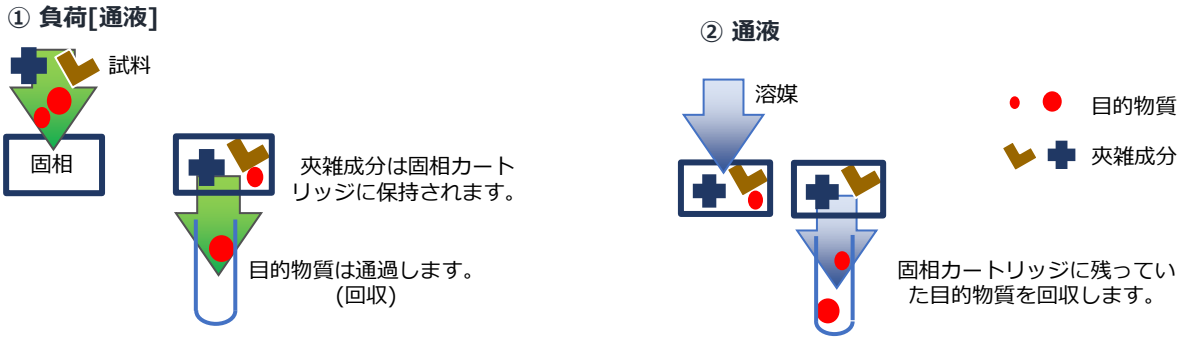
知っておこう！

C18などシリカゲル担体の固相では充填剤の細孔内部にある官能基を活性化させるため細孔内部まで液で満たす必要があります。しかし水はいきなり細孔内部まで入り込めないので最初に溶媒を流して細孔内部まで液を満たし官能基を活性化させます。

ポリマー系充填剤ではコンディショニングなしあるいは乾燥しても使用可能なものもあります。

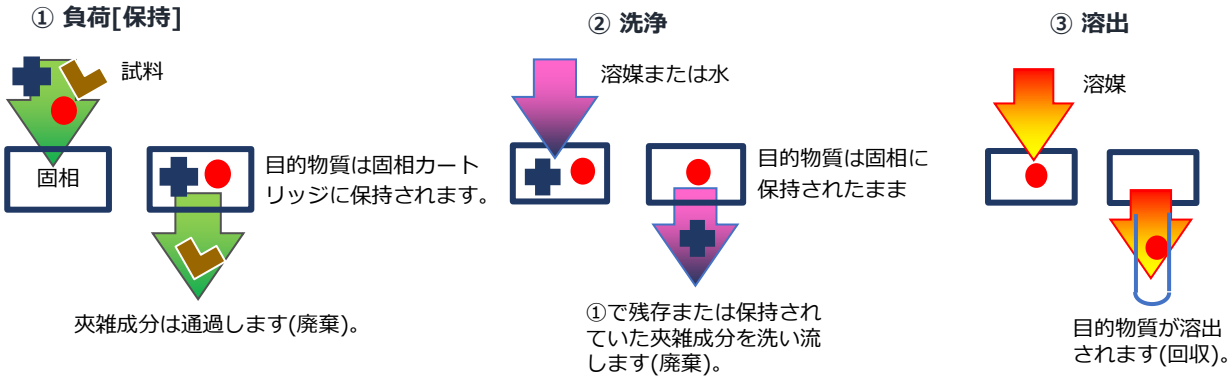
(2)試料負荷：通過型

①試料を負荷して夾雑成分を固相カートリッジに保持させ目的物質を通過させます。
②溶媒を通液して固相カートリッジに残っていた目的物質を回収します。



(3)試料負荷：保持型

①試料を負荷して目的物質を固相カートリッジに保持させ、夾雑成分を通過させます。
②保持させたあと溶媒や水を通液し、固相カートリッジを洗浄します。
　このとき目的物質は固相カートリッジに保持されたままで夾雑成分が通過します。
③溶媒を通液し、目的物質を固相カートリッジから溶出して回収します。
④保持型では目的物質を固相カートリッジで濃縮することができます。



7,2） Smart-SPEの種類

Smart-SPEシリーズには以下の種類があります。このうちSTQ法で使用する主な固相カートリッジについてその使い方をpp.100-117で説明します。

分類	名称	官能基	構造	一次相互作用	特徴
シリカ系	C18	オクタデシル	-Si-C_{18}-H_{37}	無極性	油脂などの低極性物質の除去（保持）
	SI	シリカゲル	-Si-OH	極性	カフェインの除去
	FL	フロリジル	ケイ酸マグネシウム O-Si=O Mg^{2+} O	極性	
	PSA	N-プロピルエチレンジアミン	-Si-$CH_2CH_2CH_2NH$-$CH_2CH_2NH_2$	極性・陰イオン交換、pKa10.1、10.9	脂肪酸など-COOH基をもつような酸性物質や極性物質の保持
	NH_2	アミノプロピル	-Si-$CH_2CH_2CH_2NH_3$	極性・陰イオン交換、pKa9.8	脂肪酸など-COOH基をもつような酸性物質や極性物質の保持
	SAX	トリメチルアミノプロピル	-Si-$CH_2CH_2CH_2N$-$(CH_3)_3^{\oplus}$	強陰イオン交換、pKaなし常に解離	脂肪酸など-COOH基をもつような酸性物質や極性物質の保持
	SCX	ベンゼンスルホニルプロピル	-Si-$CH_2CH_2CH_2$- ⬡-$SO_3^{\ominus}$	無極性・強陽イオン交換、pKa非常に低い	マラカイトグリーンなど-N+を持つような塩基性物質の保持に有効
カーボン系	GCK	グラファイトカーボン		平面構造	色素など平面構造の化合物の保持に有効
ポリマー系	PBX	表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼン 親水性/疎水性バランス充填剤		無極性+極性	極性～無極性までの幅広い化合物の保持に有効

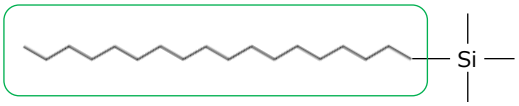
【参考資料：固相充填剤と有機溶媒の極性】

固相	極性	有機溶媒	分子式	水への溶解度	沸点（℃）
C18	低	n-ヘキサン	CH_3（$CH)_3$	0.013 g /L(20℃)	69
PBX		トルエン	$C_6H_5CH_3$	0.47 g /L（20℃）	111
		ベンゼン	C_6H_6	1.8 g /L（15℃）	80
		クロロホルム	CHC_{13}	8 g /L（20℃）	61
		ジクロロメタン	CHC_{12}	13 g /L（20℃）	40
		酢酸エチル	$CH_3COOC_2H_5$	83 g /L（20℃）	77
		アセトン	CH_3COCH_3	可溶	57
PSA		アセトニトリル	CH_3CN	可溶	82
NH_2		メタノール	CH_3OH	可溶	65
SI	高	水	H_2O	–	100

7,3)(1)無極性カラム　C18

この章ではわかりやすさを重視し科学的でない表現や誇張した表現をしている場合がありますがご了承ください。

無極性カラムの代表的なものにC18があります。C18はシリカゲル担体に官能基としてオクタデシル基(C18H37)がついた固相で、その炭素数の多さから疎水性が強く無極性相互作用を示します。



オクタデシル基
C18H37

①無極性相互作用とは

本題に入る前に・・・

極性、無極性とは水と油のどちらに溶けやすいかを表したものです。

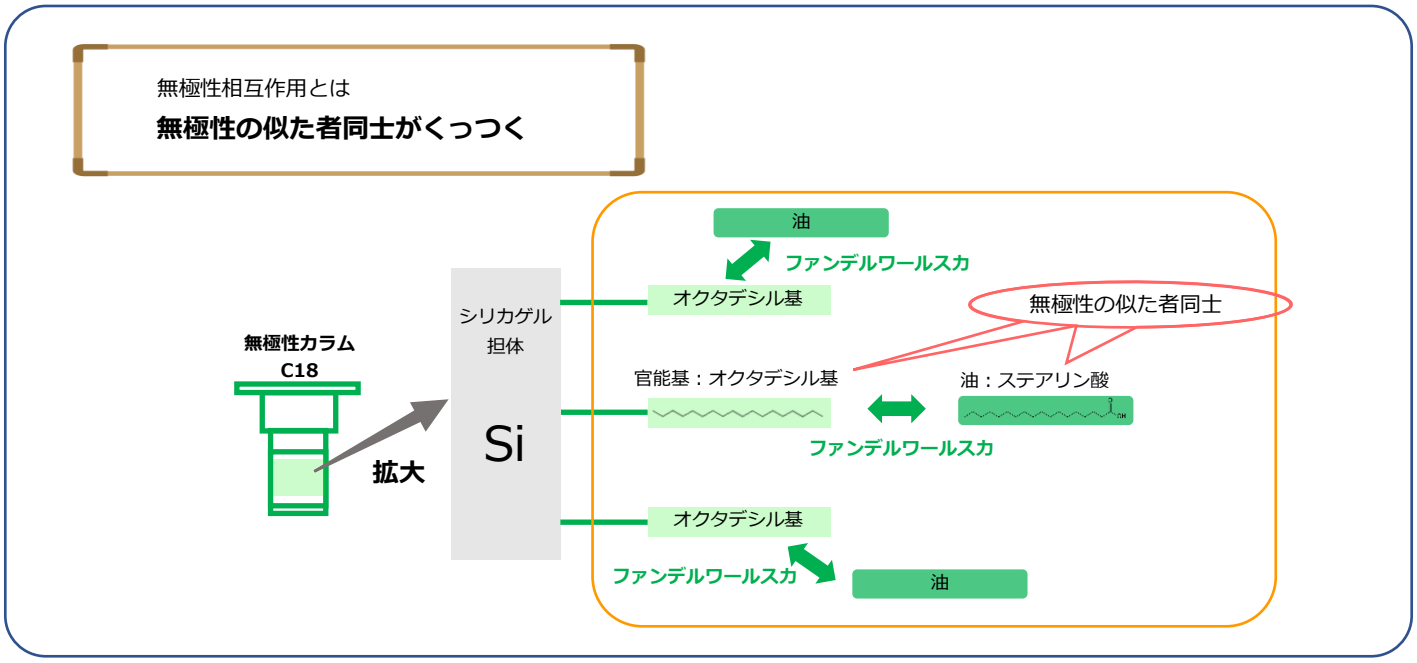
極性が低い	**無極性**	≒ 疎水性	・・・	油にしかとけない
	低極性		・・・	油に溶けやすい
	中極性		・・・	水、油のどちらにも溶ける
極性が高い	**高極性 (極性)**	≒ 親水性	・・・	水に溶けやすい (水にしか溶けない)

※わかりやすくするため誇張した表現にしています。

また物質の極性、無極性の程度を示すものとして疎水性の指標である「logPow」があります。logPowはC18を使用する上で重要な要素の一つです。詳細はp.103「7,3)(1)④無極性の指標　LogPow」をご覧ください。

無極性相互作用とは無極性の物質同士が分子間力の一つであるファンデルワールス力によって引き合うことです。C18の官能基であるオクタデシル基はC18H37と炭素数が多く無極性です。ここに油など無極性の物質がくると似た者同士が引き合い油がC18に保持されます。この作用は特に極性の高い環境下でその効力を発揮します。

無極性相互作用のイメージ



固相は目的物質及び夾雑成分のどちらとも相互作用しますが、ここではわかりやすくするため固相と目的物質との相互作用として説明しています。

②無極性カラム　C18の使い方

【負荷・保持】

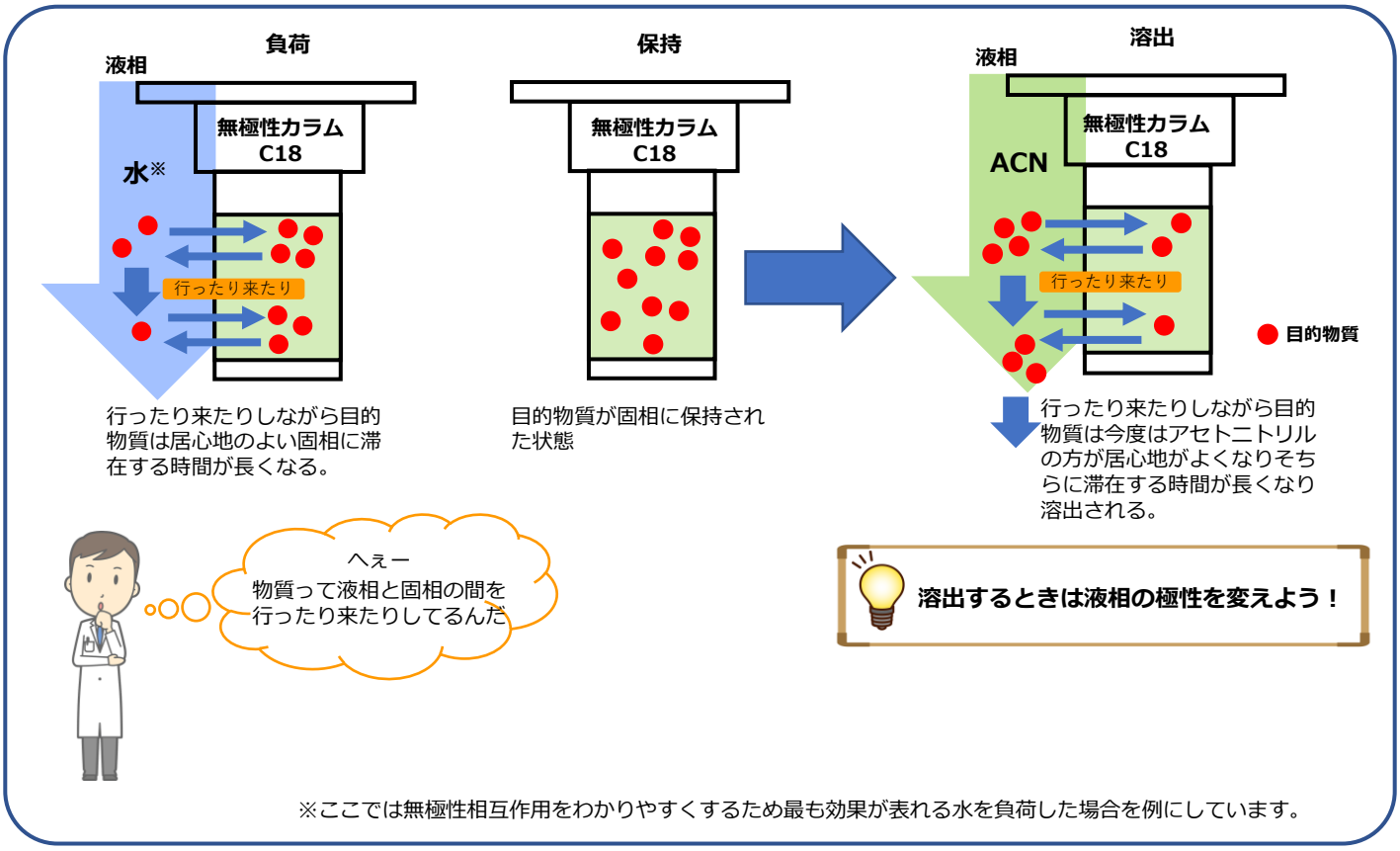
試料(下記イメージでは水)を負荷すると目的物質は液相と固相を行ったり来たりしながら固相と液相への存在比が一定の値に近づいていきます。これを分配といいます。行ったり来たりする中で目的物質は自分と似たC18と一緒にいる方が居心地がよいためC18での滞在時間が長くなります。一方液相に移動した目的物質は液相と性質が違うため居心地があまりよくなく滞在時間が短くなりまた固相と行ったり来たりして・・・というのを繰り返し目的物質は固相に保持されます。

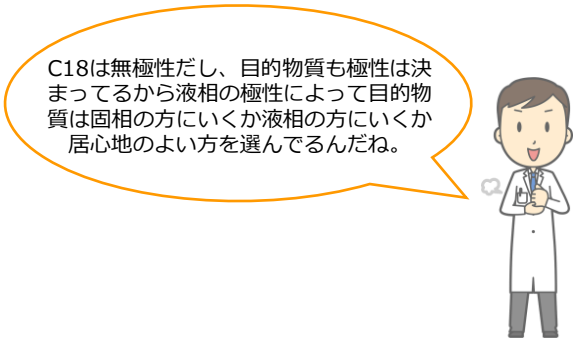
この工程は負荷する溶液の極性が高ければ高いほど効果的に行われます。液相の極性が高くなるほど無極性である目的物質は液相よりも固相の方が居心地がよく固相の滞在時間が長くなるからです。

【溶出】

固相にアセトニトリルを流すと保持されていた目的物質はまた固相と液相の間で行ったり来たりを繰り返します。今度は固相よりも液相の方が居心地がよいので液相での滞在時間が長くなり液相とともに移動して溶出されます。
このように無極性固相では液相の極性を変えることがポイントです。

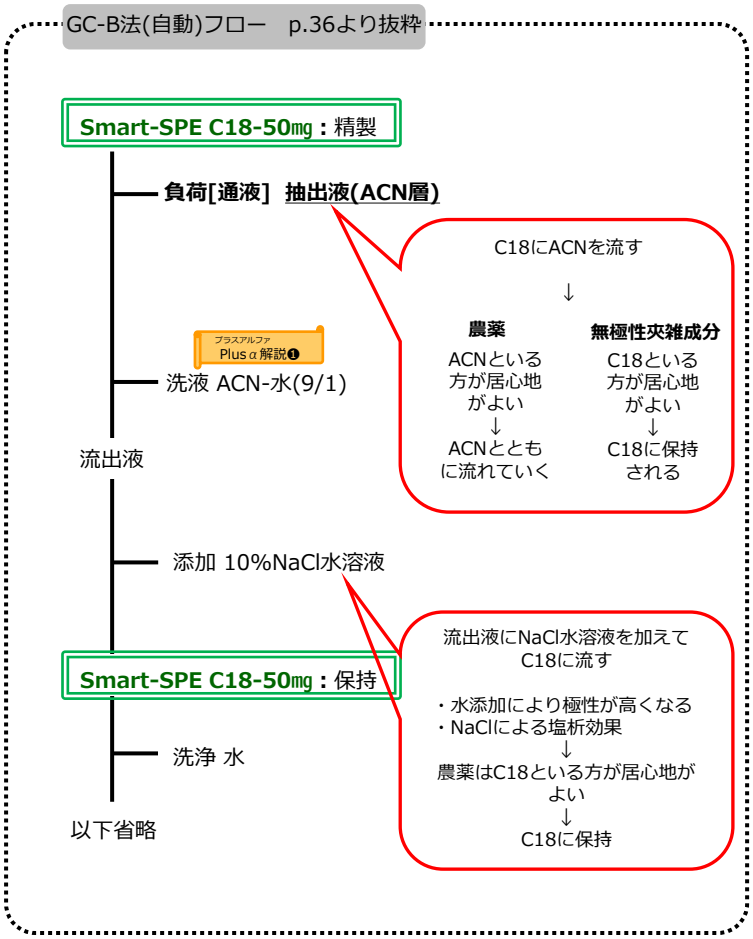
無極性カラム　C18の使い方のイメージ

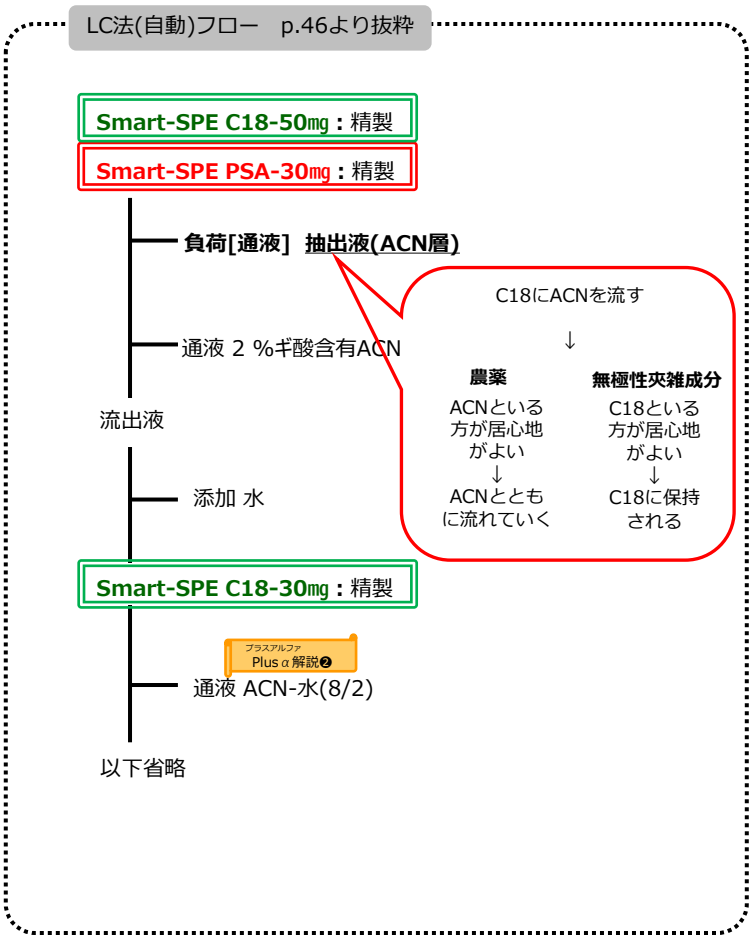




③ STQ法におけるC18の使い方

STQ-GC-B法とLC法におけるC18の使い方をみてみましょう。流す溶液の極性により目的物質を通過させたり保持させたりしています。

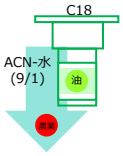




プラスアルファ Plusα解説❶

ACN-水(9/1)のように水が入るとACNに比べ液相の極性が少し高くなります。農薬は水が少し入ってもACN-水(9/1) の方が居心地がよいので液相と一緒に流れていきます。

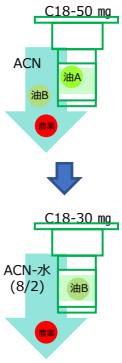
しかし油の中には液相がACNなら一緒にいて居心地がよいと思っていても10%水が入るとC18の方が居心地がよいと思うものがあります。このように水の比率を高くすることで少しでも多くの油をC18に保持して除去することができます。



プラスアルファ Plusα解説❷

解説①と同様にACN-水(8/2)の場合も水が入るので液相の極性が高くなります。農薬は水が入っていてもACN-水(8/2) の方が居心地がよいので液相と一緒に流れていきます。一方水の比率が高くなるとC18と一緒にいる方を好む夾雑成分が増えていきます。

油Aは先に使用したC18-50 mgで保持されましたが油Bはそのときは ACNと一緒にいる方が居心地がよかったのでACNとともに流れてきました。しかしACN-水(8/2)ではC18と一緒にいる方が居心地がよくなるためC18-30 mgに保持され除去することができます(p.38参照)。



④無極性の指標　LogPow

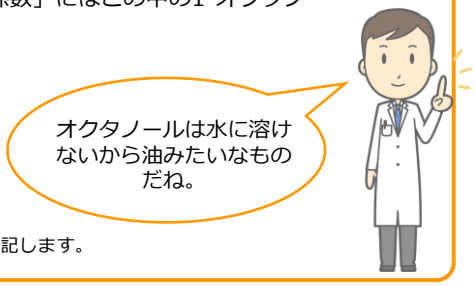
物質の疎水性を表す指標として「オクタノール/水分配係数　Pow」があります。固相抽出では目的物質、液相、固相の相対的な極性の関係により無極性相互作用の挙動が変わるためこの係数は重要な要素の一つです。

本題に入る前に・・・

オクタノールとは炭素数8の脂肪族一価アルコールの総称で、「オクタノール/水分配係数」にはこの中の1-オクタノールが利用されます。オクタノールはアルコールの仲間ですが水には溶けません。

【1-オクタノール】

MF：C8H18O
MW:130.2
水への溶解度：溶けない

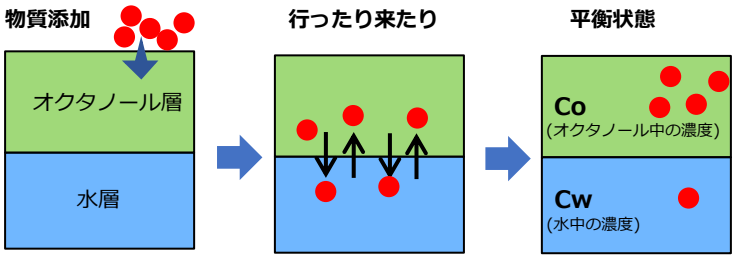


※以下便宜上1-オクタノールを「オクタノール」と表記します。

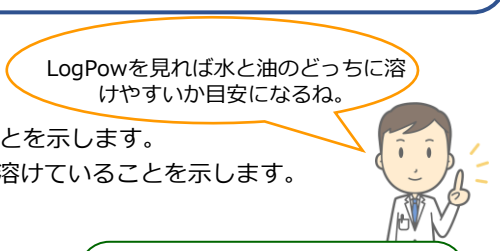
LogPowとは？

オクタノール/水分配係数(Octanol Water Partition Coefficient ：Pow)とはオクタノールと水の2つの溶媒層中にある物質を加えて平衡状態になったときのオクタノール層の濃度と水層の濃度比を表したものです。一般的には対数を用いて「LogPow」で表します。

$$\frac{\text{オクタノール中濃度(Co)}}{\text{水中濃度(Cw)}} = \text{Pow} \xrightarrow{\text{対数表記}} \text{LogPow} = \text{Log}_{10}\frac{\text{オクタノール中濃度(Co)}}{\text{水中濃度(Cw)}}$$



【LogPowの見方】



LogPowは値が大きいと水に溶けにくく、小さいと水に溶けやすいことを示します。
LogPowの値が「1」大きくなると水よりもオクタノールに10倍多く溶けていることを示します。

※極性の分類は目安です。

オクタノール中濃度が 1
水中濃度が10の場合
(水に多く溶けている)

$$\text{Pow} = \frac{\text{Co}}{\text{Cw}} = \frac{1}{10} = 10^{-1}$$

$$\text{LogPow} = \text{Log}_{10}10^{-1} = -1$$

高極性

オクタノール中濃度が1000
水中濃度が1の場合
(オクタノールに水の千倍溶けている)

$$\text{Pow} = \frac{\text{Co}}{\text{Cw}} = \frac{10^3}{1} = 10^3$$

$$\text{LogPow} = \text{Log}_{10}10^3 = 3$$

中極性

オクタノール中濃度が1000000
水中濃度が1の場合
(オクタノールに水の100万倍溶けている)

$$\text{Pow} = \frac{\text{Co}}{\text{Cw}} = \frac{10^6}{1} = 10^6$$

$$\text{LogPow} = \text{Log}_{10}10^6 = 6$$

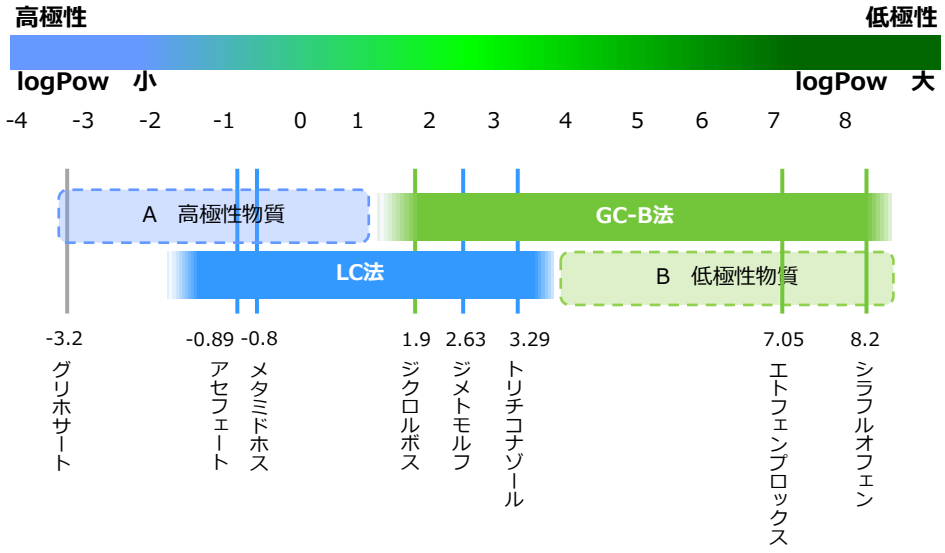
低極性

C18を使うときはLogPowを調べておこう!

【参考：農薬のLogPow】

下記に農薬のLogPowの一例を示します。STQ法では農薬の極性に応じてGCB法とLC法で対応しています。LogPowの大きい農薬は低極性で水に溶けにくいためGC-MSで測定することを前提にGC-B法で前処理します。一方LogPowの小さい農薬は水に溶けやすいためLC-MS/MSで測定することを前提にLC法で前処理します(p.32参照)。このようにLogPowに応じた前処理を行うことでGC-B法では下図のAの高極性物質を、LC法では下図Bの低極性物質を除去し、精製効果を高めることができます。

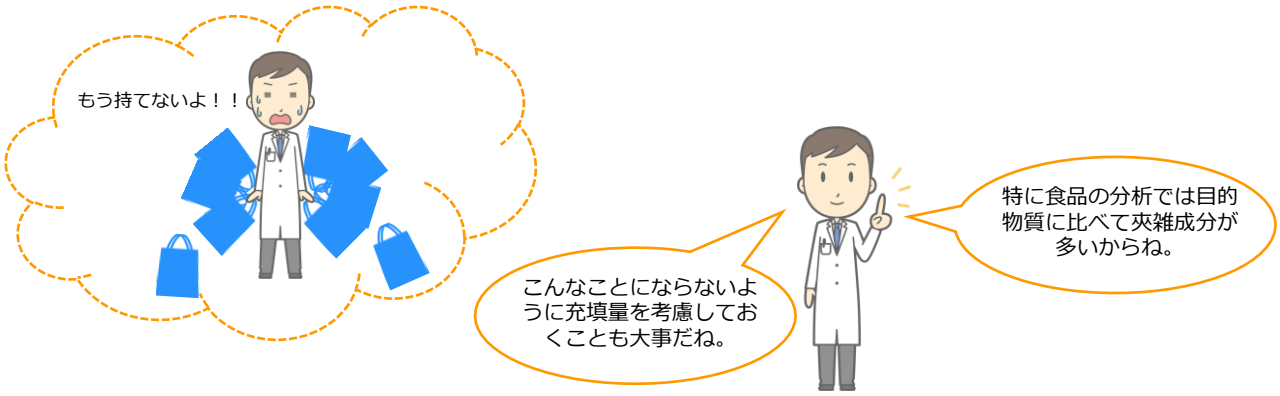
ちなみにグリホサートのようにLogPowが-3と小さいような農薬は非常に極性が高く一斉分析には不向きであり個別分析をする必要があります(p.60参照)。



⑤保持容量

固相には相互作用する物質の量を最大限に保持できる量「保持容量」があり、C18では固相重量の約５％とされています。適切な固相抽出を行うには保持容量を超えないように試料を負荷する必要があります。固相は目的物質と夾雑成分の区別はできないため夾雑成分の一部も保持される場合があります。夾雑成分が多い試料ではオーバーフローしないよう充填量を考慮することが大切です。

イオン交換カラムの保持容量についてはp.115をご覧ください。



7,3)(2)イオン交換カラム

この章ではわかりやすさを重視し科学的でない表現や誇張した表現をしている場合がありますがご了承ください。

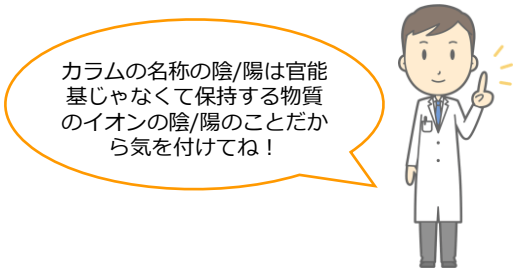
イオン交換カラムとはプラスまたはマイナスに帯電した官能基を持つ固相です。官能基の種類により陰イオン交換カラムと陽イオン交換カラムがあります。

プラスに帯電　≒　陽イオン
マイナスに帯電　≒　陰イオン
解離　≒　帯電　≒　イオン化

①イオン交換カラムの相互作用とは

イオン交換相互作用とは官能基のイオンが試料中の別のイオンに置き換わることですが、この章では帯電した官能基と試料中の帯電した物質が電気的な力で引き付け合うこととして説明します。

■陰イオン交換カラム：官能基がプラスに帯電していてマイナスに帯電した物質を保持する
■陽イオン交換カラム：官能基がマイナスに帯電していてプラスに帯電した物質を保持する



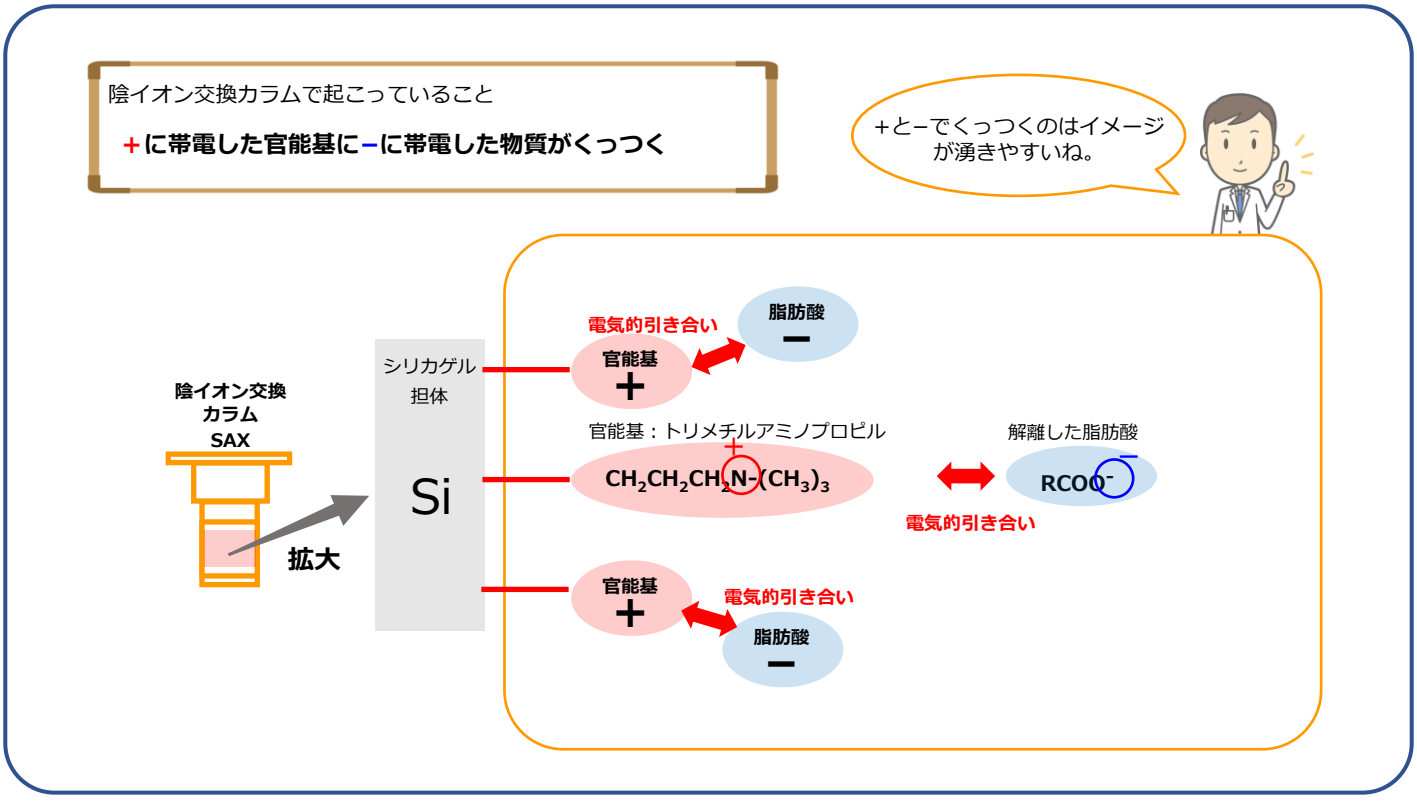
【陰イオン交換カラム】

陰イオン交換カラムにはプラスに帯電した官能基がついています。ここにマイナスに帯電した物質がくるとプラスとマイナスの電気的引き合いで固相に保持されます。

イメージを強陰イオン交換カラムであるSAX(Strong Anion Exchange)を例に説明します。

SAXの官能基であるトリメチルアミノプロピルには第四級アミンがありpHに左右されず常にプラスに帯電しています(p.108参照)。そこに脂肪酸のようにマイナスに帯電した物質がくると電気的に引き合い固相に保持されます。

陰イオン交換カラム(SAX)でのイメージ



【陽イオン交換カラム】

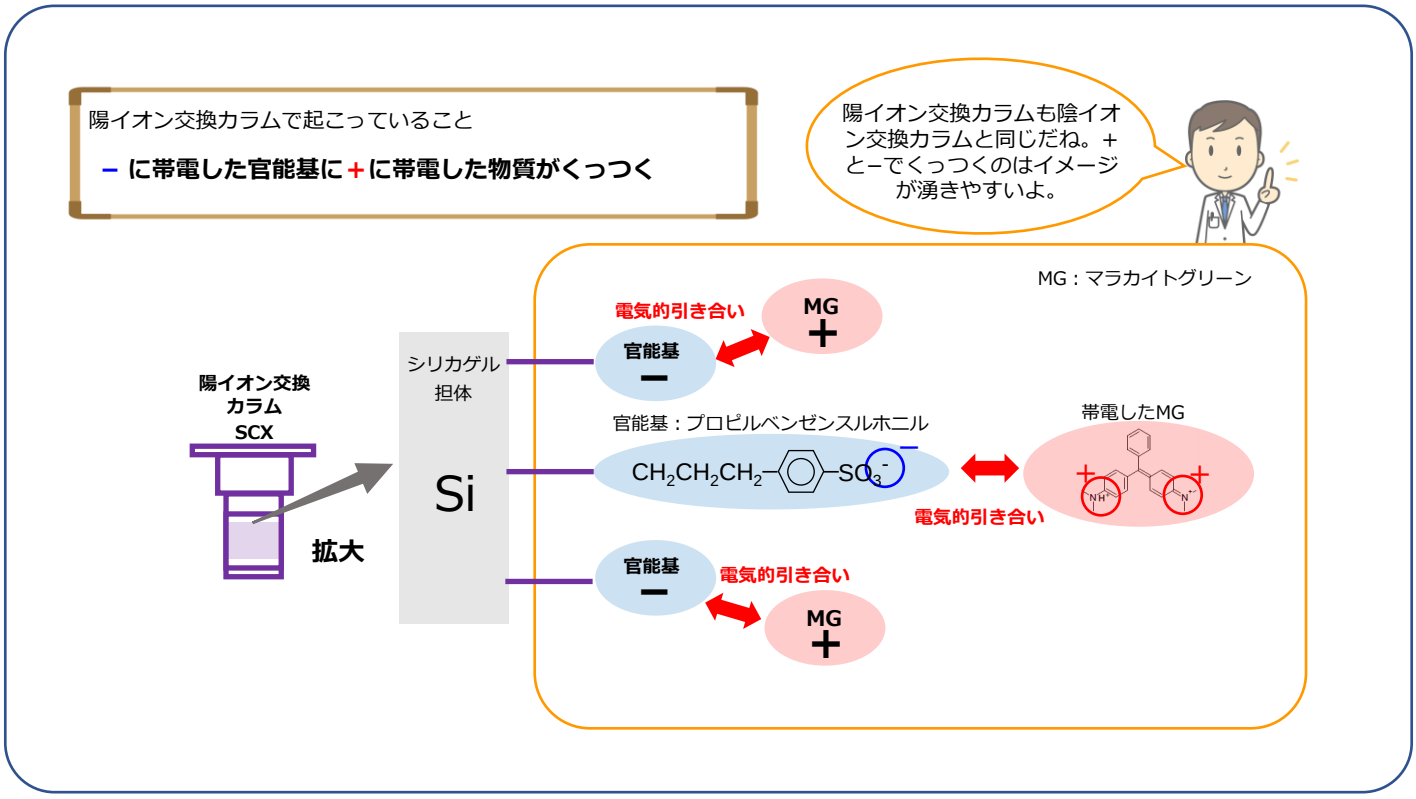
陽イオン交換カラムにはマイナスに帯電した官能基がついています。ここにプラスに帯電した物質がくるとプラスとマイナスの電気的引き合いで固相に保持されます。

イメージを陽イオン交換カラムであるSCX(Strong Cation Exchange) を例に説明します。

SCXの官能基であるプロピルベンゼンスルホニルには帯電したスルホ基(SO_3^-)がありこの部分がマイナスに帯電しています。そこにマラカイトグリーンのようなプラスに帯電した物質がくると電気的に引き合い固相に保持されます。

SCXには無極性相互作用もありますがここではイオン交換作用に着目して説明します。

陽イオン交換カラム(SCX)でのイメージ



②イオン交換カラムの使い方

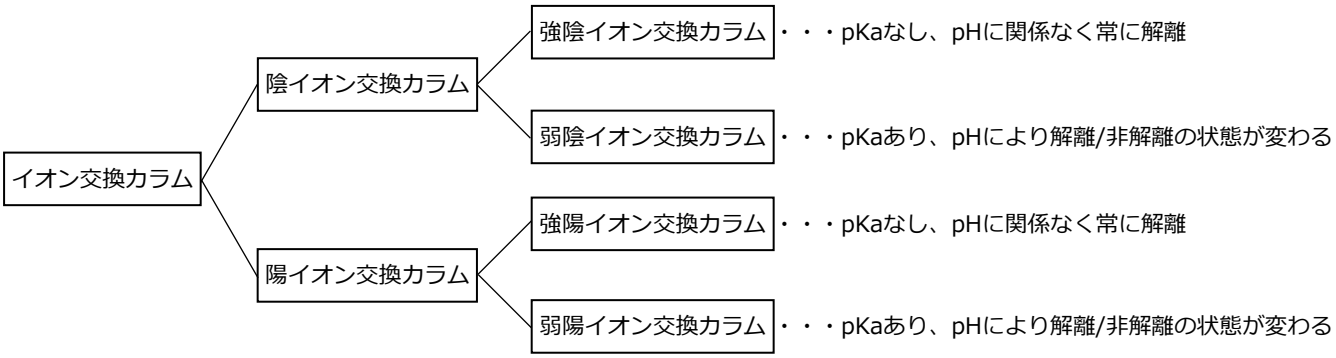
イオン交換カラムの相互作用が起こるためには先述したように固相の官能基と目的物質の両者が帯電している必要があります。

陰イオン交換カラム：固相はプラスに、目的物質をマイナスに帯電
陽イオン交換カラム：固相はマイナスに、目的物質をプラスに帯電

官能基や目的物質を帯電させるにはそれらのpKaに基づき通液する溶液のpHを調整する必要があります。pKaはイオン交換カラムを使用する際の重要な要素の一つです。詳細は以下の「本題に入る前に・・・①」とp.113「7,3)③解離の指標　酸解離常数Ka」をご覧ください。

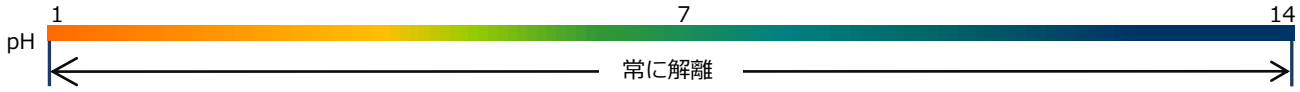
本題に入る前に・・・①

イオン交換カラムには陰イオン交換カラムと陽イオン交換カラムがあり、さらに官能基の種類により強イオン交換カラムと弱イオン交換カラムに分けられます。強イオン交換カラムはpKaがなくpHに関係なく常に解離しています。一方弱イオン交換カラムはpHによって解離/非解離の状態が変わります。

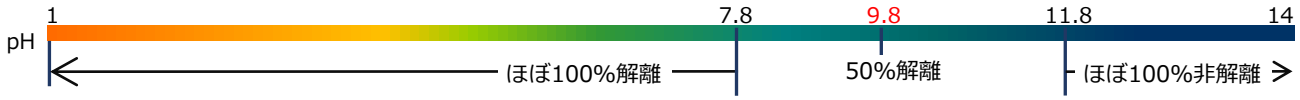


固相や目的物質が帯電する/しない(≒解離/非解離)は液相のpHに関係します。そこで重要になるのが「pKa」です。pKaは約半分が解離しているpHを示します(p.113参照)。
ここではまず固相の解離/非解離についてみてみましょう。

強イオン交換カラム　例)SAX、SCX



弱陰イオン交換カラム　例)NH2　pKa9.8　NH2の詳細はp.109「本題に入る前に・・・②」をご覧ください。

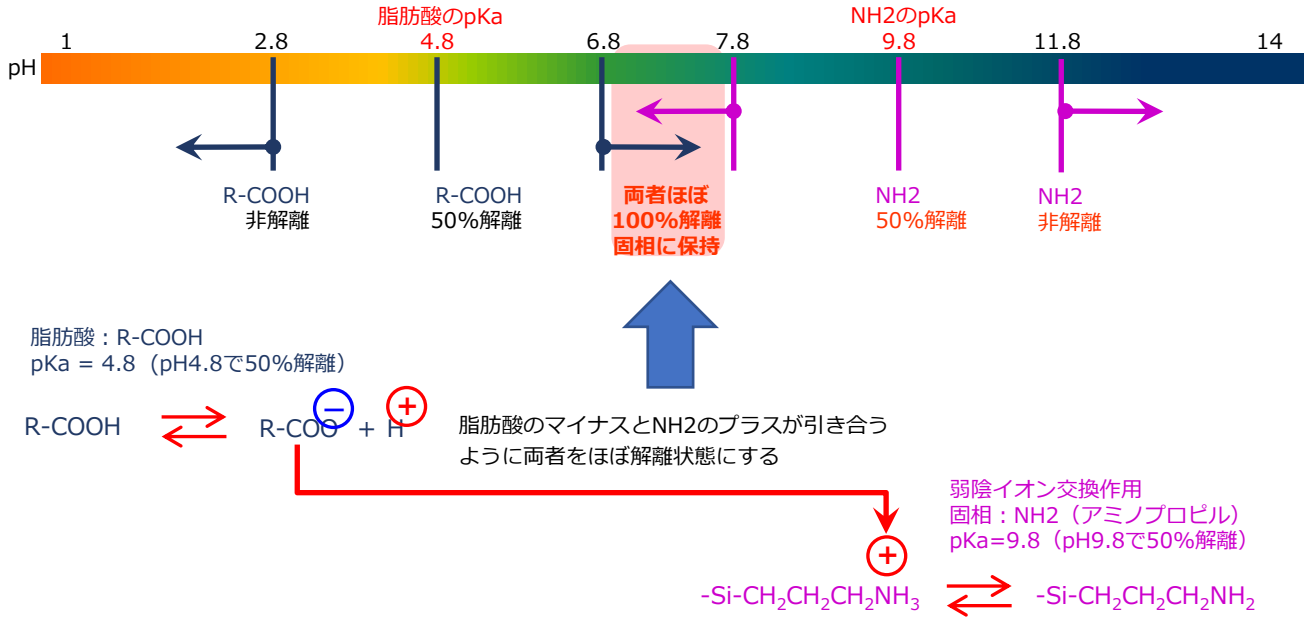


本題に入る前に・・・②

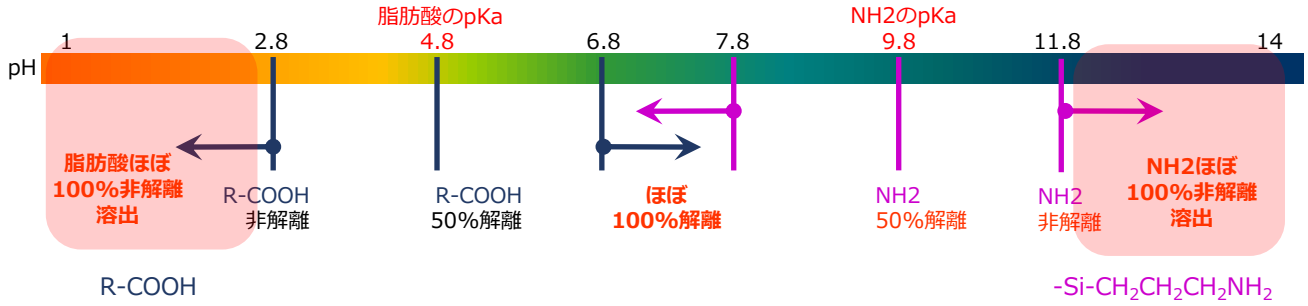
次に弱陰イオン交換カラムであるNH2(アミノプロピル)と脂肪酸(R-COOH)を例に固相と目的物質の解離/非解離の関係をみてみましょう。

NH2の官能基であるアミノプロピルのpKaは9.8でありpH9.8では約50%のアミノプロピルが解離しプラスに帯電しています。一方脂肪酸のpKaを4.8とするとpH4.8では約50%の脂肪酸が解離しマイナスに帯電しています。脂肪酸をNH2に保持させるには両者ともほぼ全てを解離状態にする必要があります。pKaの値からpHが「2」変更されるとほぼ解離またはほぼ非解離の状態になります(p.113参照)。

この例ではNH2のpKaは9.8ですからそこからpHを2低くし7.8にするとほぼ100%解離状態になります。脂肪酸のpKaは4.8ですからそこからpHを2高くし6.8になるとほぼ100%解離状態になります。つまり液相のpHを6.8～7.8に調整するとNH2も脂肪酸もほぼ100%解離した状態になり相互作用により脂肪酸がNH2に保持されます。



反対に液相のpHを2.8以下に調整すると脂肪酸は非解離状態になりNH2から溶出されます。また液相のpHを11.8以上に調整した場合はNH2が非解離状態になり脂肪酸は溶出されます。pKaをもつ弱イオン交換カラムの場合は目的物質または固相のどちらかを非解離状態にすることで目的物質を溶出します。



イオン交換カラムを使うときはpKaを調べておこう!

7,3)主な固相カートリッジの使い方

固相は目的物質及び夾雑成分のどちらとも相互作用しますが、ここではわかりやすくするため固相と目的物質との相互作用として説明しています。

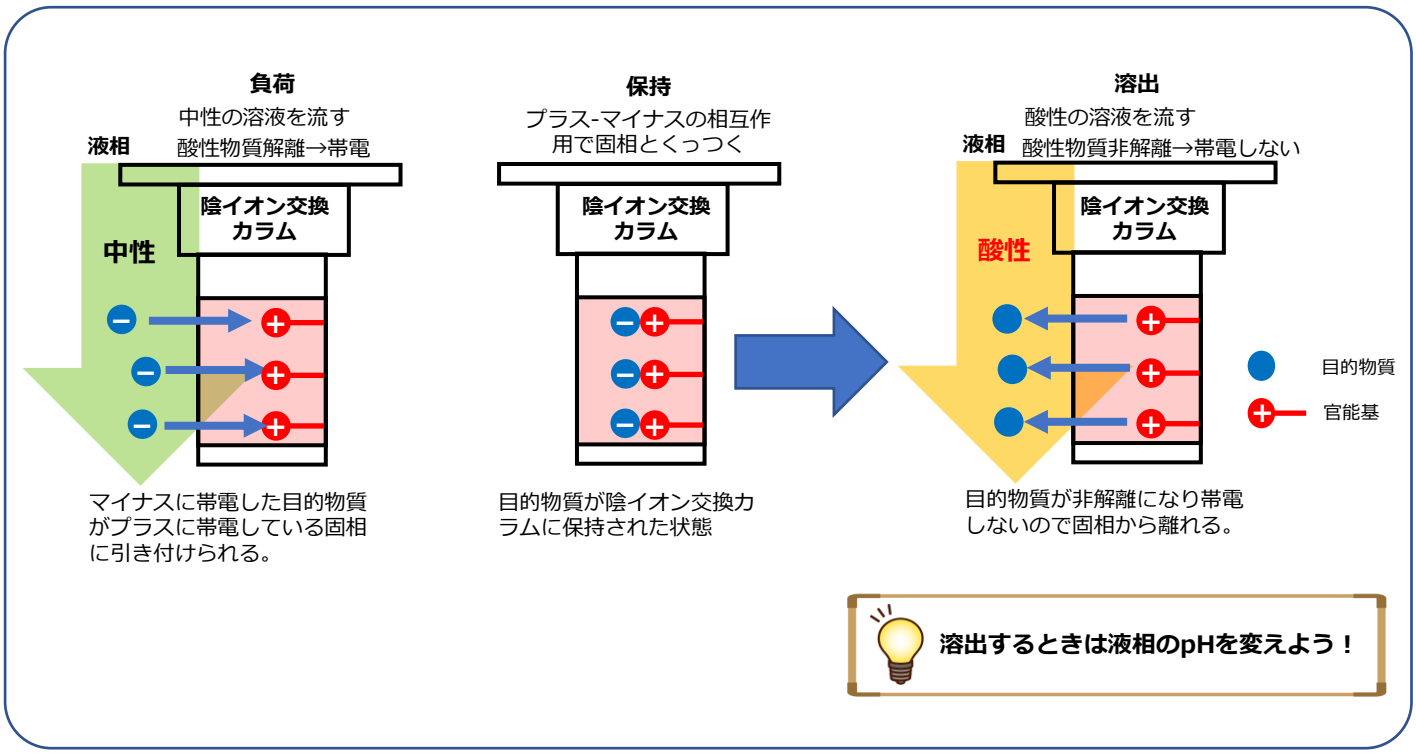
❶陰イオン交換カラム使い方

プラスに帯電している固相にマイナスに帯電させた目的物質を通液します。

【イメージ】

例えば目的物質を酸性物質とすると中性溶液中では解離してマイナスに帯電しています。この状態で負荷すると目的物質が固相に保持されます。次に酸性の溶液を通液すると酸性物質は非解離状態になり帯電しなくなるため固相から離れ溶出されます。イオン交換カラムではこのように液相のpHを変更することがポイントです。

陰イオン交換カラムの使い方のイメージ（目的物質が酸性物質の場合）



7,3)主な固相カートリッジの使い方

【STQ法における陰イオン交換カラムの使い方】

STQ-LC法における弱陰イオン交換カラムPSAの使い方をみてみましょう。流す溶液のpHを変更「することで目的物質を保持させたり溶出させたりしています。

<PSA(Primary-Secondary Amine)>

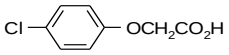
作用：弱陰イオン交換
pKa：10.1、10.9

※弱陰イオン交換カラムはpHにより帯電状態が変わります。LC法の条件では常に帯電状態です。

<酸性物質>

脂肪酸（夾雑成分）：pKa4.8　$R\text{-}COO^- + H^+$

4-CPA（農薬）：pKa3.56



LC法(自動)フロー　p.46より

Smart-SPE C18-50mg：精製

Smart-SPE PSA-30mg：精製

- 負荷[通液]　抽出液(ACN層)
- 洗液 2 %ギ酸含有ACN(pH2)

流出液

- 添加 水

Smart-SPE C18-30mg：精製

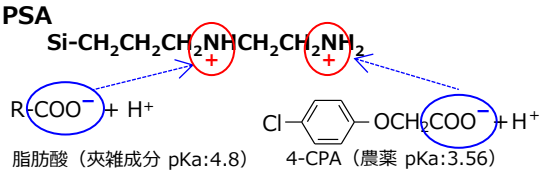
- 通液 ACN-水

定容

【保持】　PSAは主に脂肪酸除去目的で使用します。

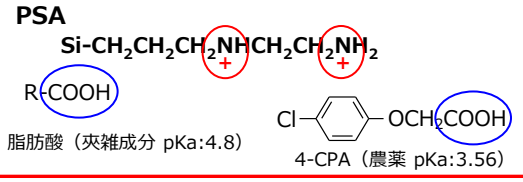
抽出液(中性:正確には若干酸性より)を流す
↓
脂肪酸は解離してマイナスに、PSAは解離してプラスに帯電
↓
脂肪酸はPSAに吸着(保持)

しかし4-CPAのような酸性農薬も同様に解離してPSAに保持されます。



【溶出】

酸性溶媒(2%ギ酸含有ACN)を流す
↓
4 -CPAは非解離になり帯電しなくなる
↓
4-CPAはPSAから溶出



【参考：グリホサート・グルホシネートにおけるPSAの使い方】

グリホサート・グルホシネート分析では溶出時にこれらの農薬を非解離にするのではなくPSAを非解離にしています。(p.62参照)。

グリホサート・グルホシネート(自動)フロー　p.60より

Smart-SPE PBX-10mg：精製

Smart-SPE SCX-30mg：精製

Smart-SPE PSA-50mg：保持

- 負荷[保持]　試験溶液
- 洗浄 メタノール-水(1/9)

Smart-SPE PSA-50mg

- 溶出 0.14%アンモニア水

溶出液

- 添加 5%ギ酸-水

定容

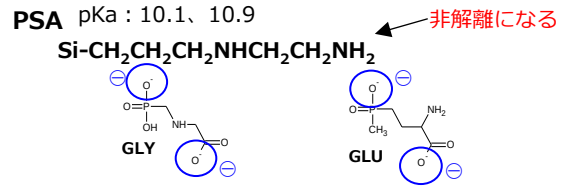
【保持】

GLY：グリホサート
GLU：グルホシネート

抽出液(中性)を流す
↓
GLY・GLUは解離してマイナスに、PSAは解離してプラスに帯電
↓
GLY・GLUはPSAに吸着(保持)

【溶出】

アルカリ性溶液(0.14%アンモニア水)を流す
↓
PSAは非解離になり帯電しなくなる
↓
GLY・GLUはPSAから溶出



❷陽イオン交換カラム使い方

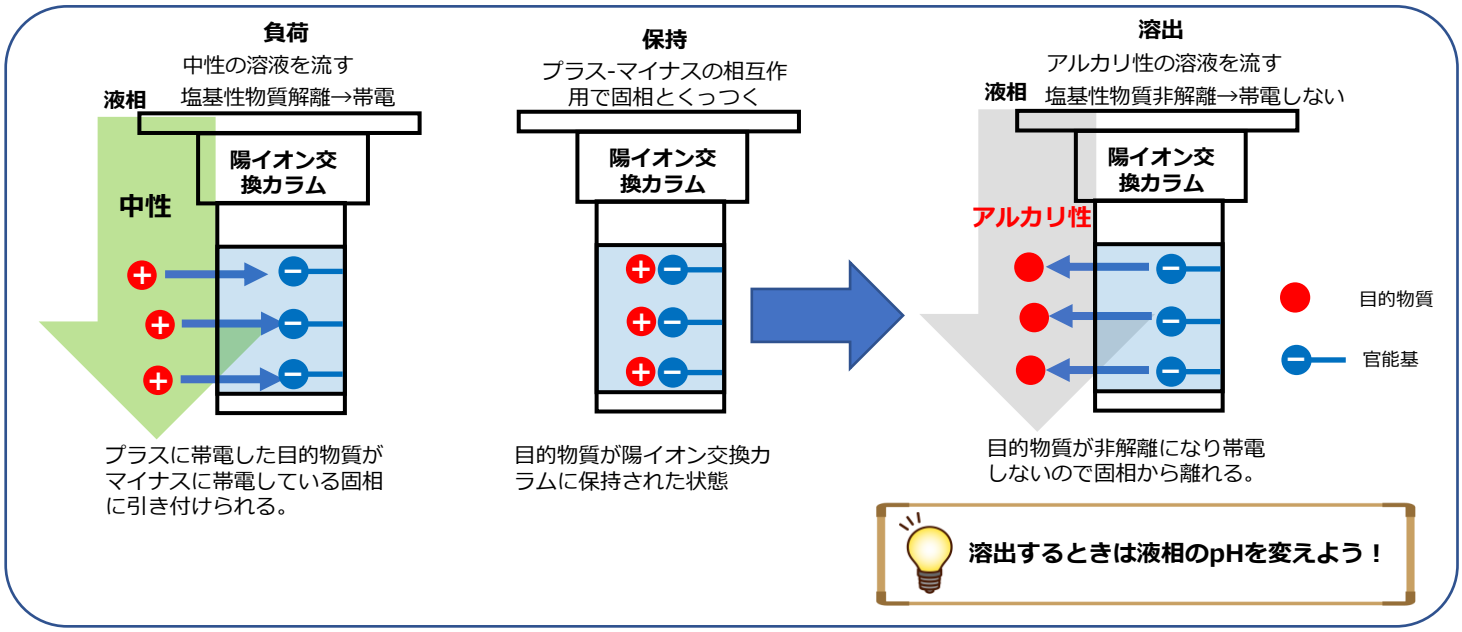
固相は目的物質及び夾雑成分のどちらとも相互作用しますが、ここではわかりやすくするため固相と目的物質との相互作用として説明しています。

マイナスに帯電している固相にプラスに帯電させた目的物質を通液します。

【イメージ】

例えば目的物質を塩基性物質とすると酸性溶液中では解離してプラスに帯電しています。この状態で負荷すると目的物質が固相に保持されます。次にアルカリ性の溶液を通液すると塩基性物質は非解離状態になり帯電しなくなるため固相から離れ溶出されます。陰イオン交換カラムのときと同様にこのように液相のpHを変更することがポイントです。

陽イオン交換カラムの使い方のイメージ (目的物質が塩基性物質の場合)



【STQ法における陽イオン交換カラムの使い方】

マラカイトグリーン分析法における強陽イオン交換カラムSCXの使い方をみてみましょう。流す液のpHを変更することで目的物質を保持させたり溶出させたりしています。

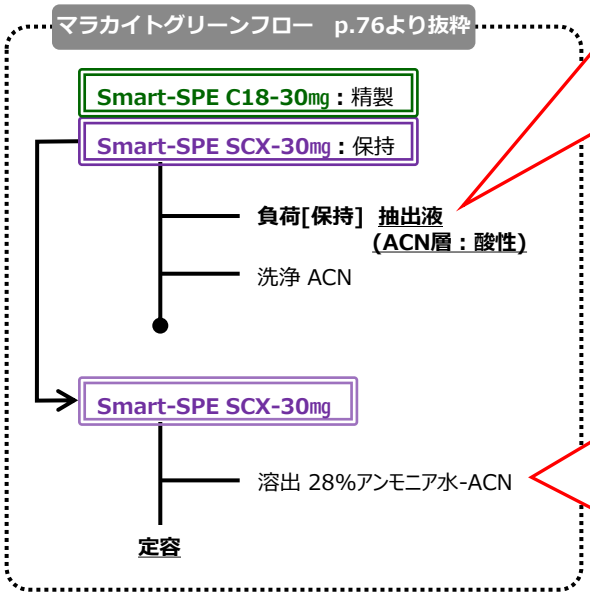
<SCX (Strong Cation Exchange)>

作用：強陽イオン交換
pKa：-6.5

※強イオン交換カラムはpHに関わらず常に帯電状態です。

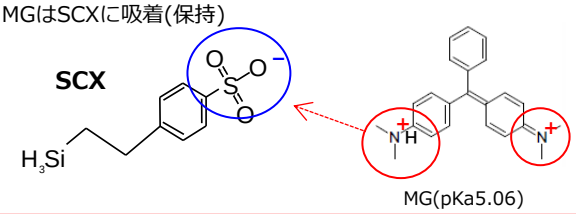
<塩基性物質>

マラカイトグリーン（以下MG）：pKa5.06



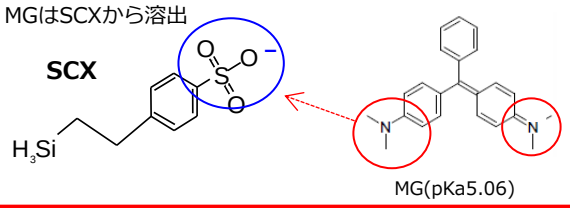
【保持】

抽出液(酸性)を流す
↓
MGは解離してプラスに、SCXは常に解離状態でマイナスに帯電
↓
MGはSCXに吸着(保持)



【溶出】

アルカリ性溶媒(28%アンモニア水-ACN)を流す
↓
MGは非解離になり帯電しなくなる
↓
MGはSCXから溶出



③解離の指標　酸解離常数Ka

酸の解離を表す指標として「酸解離常数　Ka」があります。一般的には対数を用いて「pKa」で表されます。イオン交換カラムを使用する上で解離状態は重要な要素の一つですので詳しくみていきましょう。

本題に入る前に・・・

❶酸には強酸と弱酸があり、解離の状態によって酸の強さが決まります。

【強酸】　水溶液中で完全に解離しています。

$$AH \longrightarrow A^- + H^+$$

AH：非解離状態の酸　A^-：解離状態　H^+：水素イオン

【弱酸】　水溶液中で解離しているものと非解離のものが存在し、常に行ったり来たりして平衡状態を保っています。

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$$

❷pHのおさらい

pHとは「水素イオン指数」のことで水素イオン濃度の逆数の対数で表わされます。

$$pH = -\mathrm{Log}_{10}[H^+]$$

pKaとは？

酸解離常数(Ka)とは酸の解離のしやすさを表したものです。
Kaは水溶液中で酸が解離して水素イオンを放出したときの水素イオン濃度[H＋]、解離状態の酸濃度[A-]、非解離状態の濃度[AH]を用いて下記の式で表され、一定条件下では常数となります。
Kaはそのままでは桁数が多くわかりにくいため一般的には対数を用いて「pKa」で表します。

酸解離常数 $Ka = \dfrac{[A^-][H^+]}{[AH]}$ 　**対数表記**　→　$pKa = -\mathrm{Log}_{10}Ka$

またpKaとpHは以下のような関係にあります。

$$Ka = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

両辺のLogをとります。

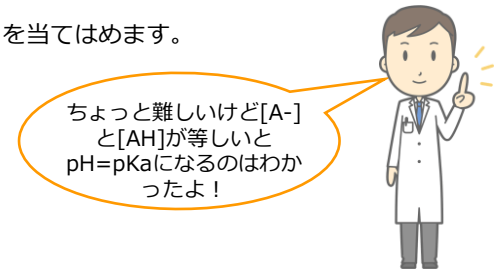
$$\mathrm{Log}_{10}\ Ka = \mathrm{Log}_{10}\frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

右辺を分けます。

$$\mathrm{Log}_{10}\ Ka = \mathrm{Log}_{10}[H^+] + \mathrm{Log}_{10}\frac{[A^-]}{[AH]}$$

これに $pKa = -\mathrm{Log}_{10}Ka$ と $pH = -\mathrm{Log}_{10}[H^+]$ を当てはめます。

$$\mathbf{pH = pKa + \boxed{\mathrm{Log}_{10}\frac{[A^-]}{[AH]}}}$$



ここで[A-]と[AH]が等しいとき[A-]/[AH]＝1でありLog_{10} [A-]/[AH]=0となります。つまりAHが50%解離している状態ではpH＝pKaとなります。

【pKaの見方】

❶pKaの値

pKaは値が小さいほど強い酸であることを示します。

pKaが小さい→Kaが大きい→$[A^-][H^+]$が大きい→解離しているものが多い→強い酸

$$\underset{\text{小さい}}{pKa} = -\log_{10}\underset{\text{大きい}}{Ka} = \log_{10}\frac{\overset{\text{大きい}}{[A^-][H^+]}}{[AH]}$$

❷解離/非解離の状態変化

pKaと同じpHでは約半分(50%)が解離している状態であることはp.108、p.113で説明しました。しかしpHが異なると解離の割合は変化します。 pHの値が1異なると解離しているものと非解離のものの割合が10倍変わります。2異なると100倍変わるためほぼ100%解離または非解離の状態にするにはpHの値をpKaから2以上変えることが必要です。

例えばある酸AHのpKaを4と仮定します。pH4ではAHは半分が解離しています。

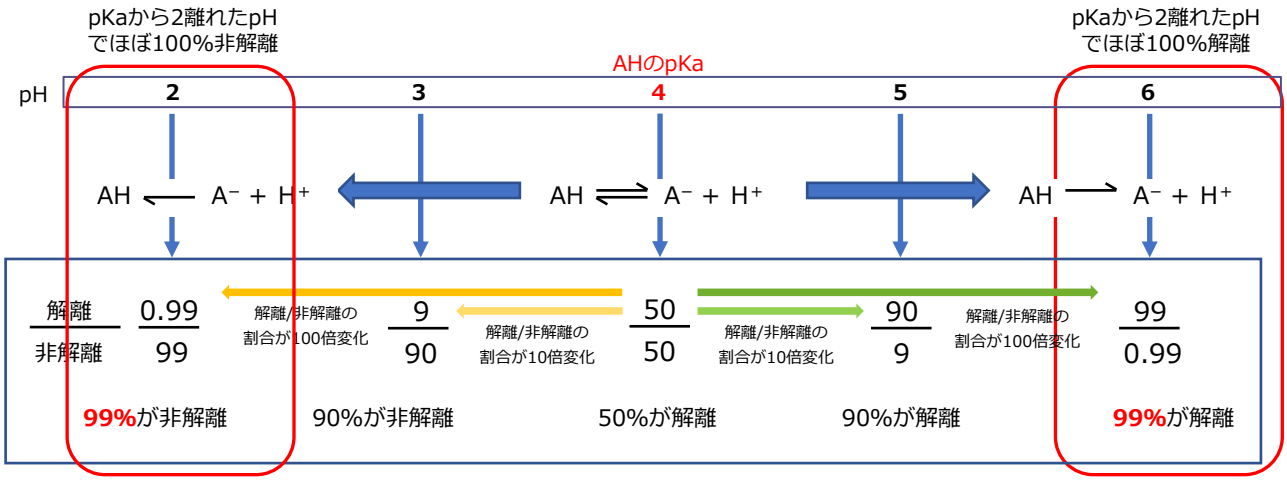
$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$$

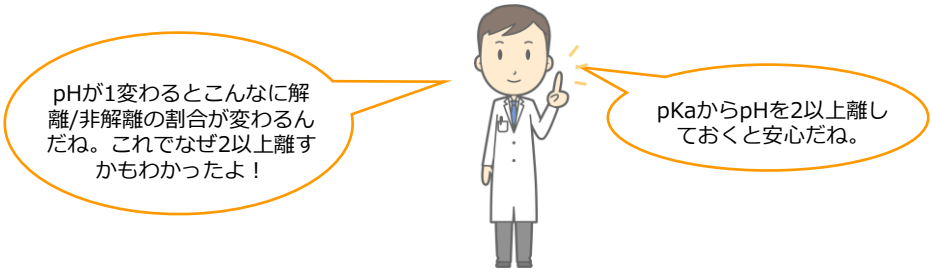
pHが6になるとH^+の濃度が少なくなるため平衡は右に動きAHが減って解離状態のA-とH^+ が増えます。

$$AH \longrightarrow A^- + H^+$$

一方pHが2になるとH^+の濃度が多くなるため平衡左に動きA-とH^+ が減って非解離状態のAHが増えます。

$$AH \longleftarrow A^- + H^+$$





④イオン交換カラムの保持容量

イオン交換カラムにも保持容量(p.105参照)がありイオン交換容量と固相の充填量から計算することができます。

イオン交換容量とは？

イオン交換容量とはイオン交換カラムの官能基のイオンが交換できる試料中の一価イオンの量のことですがここではイオン交換カラムが保持できるイオンの量として考えます。固相ではイオン交換容量は充填剤1gあたりのイオン交換容量として「meq/g」(meqの読み方：ミリ・イクイバレント、メック)で表されます。「meq/g」は固相の種類や製品ごとに決まっています。

イオン交換カラムに最大限保持できる理論値は以下のように計算することができます。

理論上保持できる最大量(mg) ＝ 分子量 × イオン交換容量(meq/g) × 充填量(g)

【計算例】

下記の場合の理論値を計算してみましょう。

・保持させたい物質の分子量：300
・イオン交換容量：0.8meq/g
・充填量：500mg

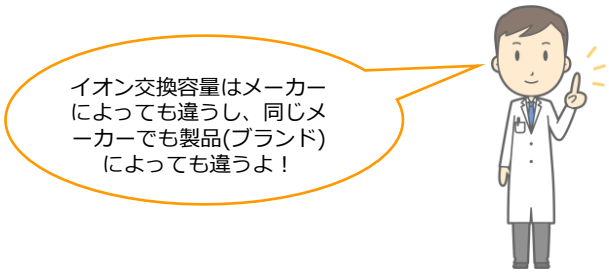
理論上保持できる最大量 (mg) ＝ 300 × 0.8(meq/g) × 0.5(g) ＝ **120** (mg)

このイオン交換カラムではこの物質を理論上最大120 mg保持することができます。

【補足】meqとは？

meq(milli equivalent：ミリ・イクイバレント)とは電解質の量を表す単位で下記の計算式で求められます。

meq ＝ 物質量(mmol) × イオンの価数



7,3)(3)グラファイトカーボンカラム※

この章ではわかりやすさを重視し科学的でない表現や誇張した表現をしている場合がありますがご了承ください。

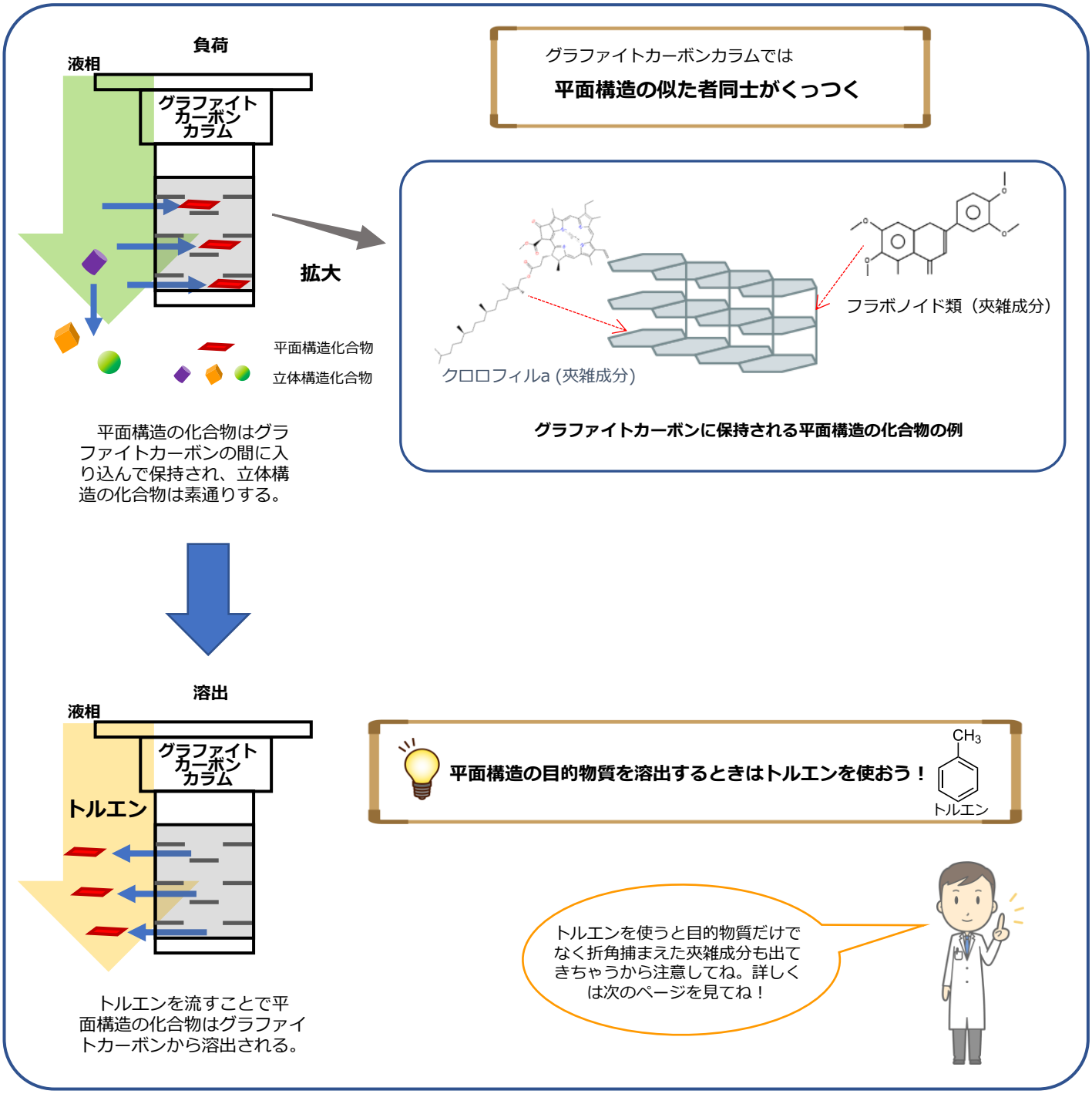
グラファイトカーボンカラムの充填剤は炭素が平面的に並んだ構造になっています。

※本ガイドブックで紹介しているグラファイトカーボンにはGCKとGCSがあります。これらは製品名称の違いであり、使用目的及び性能は同等です。現在はGCKのみの販売となっています。

①グラファイトカーボンカラムと平面構造物質の相互作用

グラファイトカーボンカラムでは同じく平面構造を持つ化合物がグラファイトカーボンの平面構造の中に入り込み吸着(保持)され、立体構造のものは素通りします。従って緑色野菜のクロロフィルや柑橘類のフラボノイド類などの平面構造の夾雑成分の除去に効果があります。ただし平面構造の目的物質も同様に吸着(保持)されるため注意が必要です。吸着された目的物質を溶出するにはトルエンを使用します。

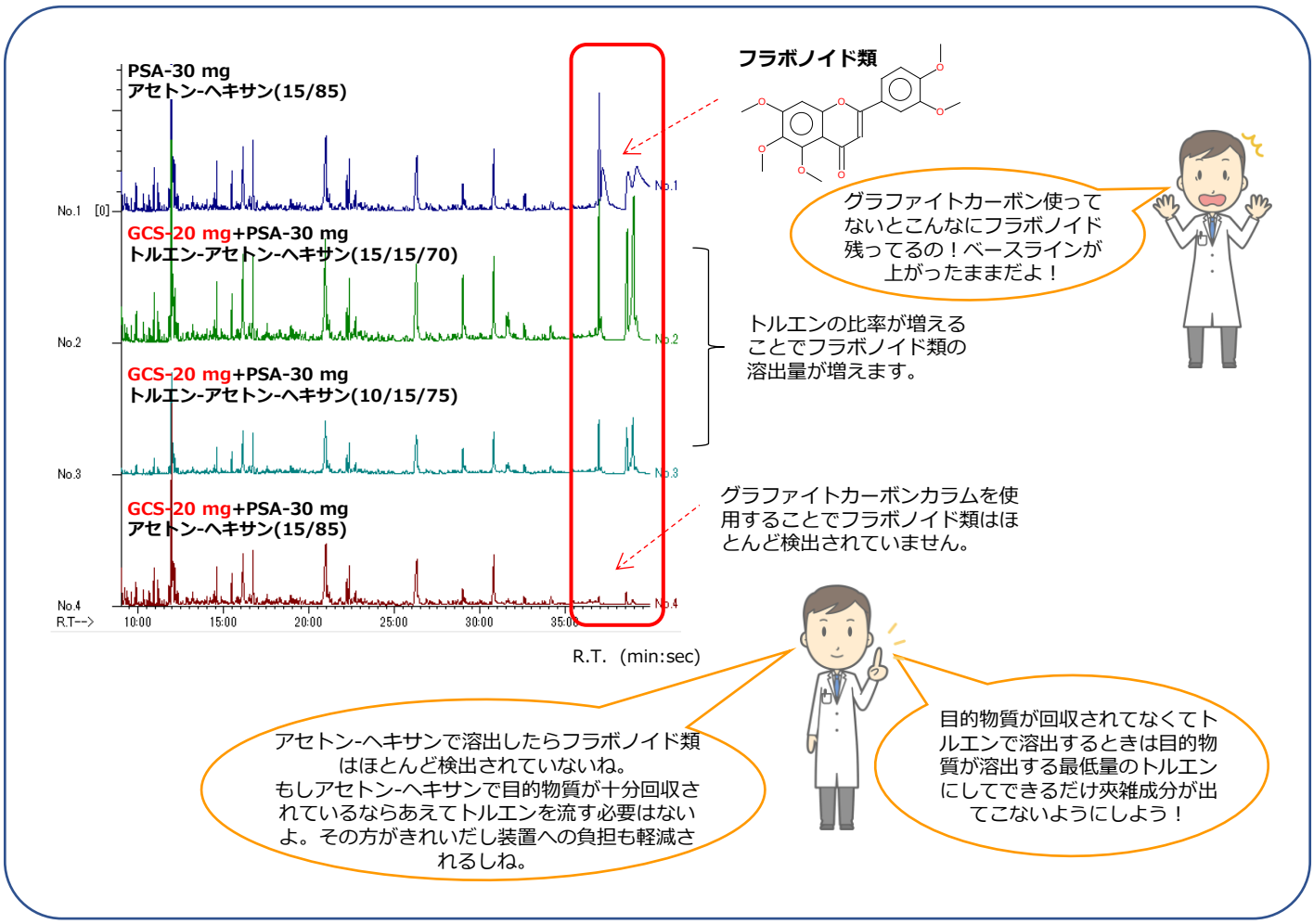
グラファイトカーボンカラムの使い方のイメージ



②グラファイトカーボンカラムの精製効果

下記はオレンジのGC-MSのSCANクロマトグラムです。グラファイトカーボンカラムを使用することでフラボノイド類が除去されていることがわかります。このとき平面構造の農薬もグラファイトカーボンカラムに保持されてしまいますのでこれらを溶出するにはトルエンを使用します。但しトルエンの比率が高くなると保持されていたフラボノイド類も溶出されてくるので精製効果が低くなります。トルエンを使用する場合はその比率を目的物質が回収できる必要最小量にするのがポイントです。

オレンジを用いたGC+PSAミニカートリッジと溶出溶媒によるSCANクロマトグラム比較



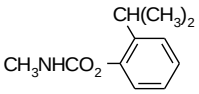
【参考：溶出溶媒比率による回収率の比較】

グラファイトカーボンカラムに保持された農薬はトルエンの比率を上げて溶出することで回収率も向上します。しかしその場合夾雑成分も溶出してきますので注意が必要です。

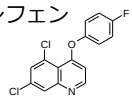
化合物名	溶出溶媒　トルエン-アセトン-ヘキサン比率			
	(20/15/65)	(15/15/70)	(10/15/75)	(0/15/85)
	トルエン比率			
	20%	15%	10%	0%
イソプロカルブ	89.2	89.7	61.9	31.8
キノキシフェン	94.2	93.0	95.9	59.5
シニドンエチル	100.2	92.9	88.2	37.7
プロパクロール	100.3	98.8	71.0	41.3
プロパニル	101.1	101.2	92.7	60.9

詳細は「残留農薬基礎データ　GCS+PSAミニカラムと溶出溶媒による回収率」参照
http://www.aisti.co.jp/common/pdf/kn1305.pdf

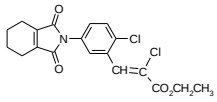
イソプロカルブ



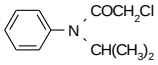
キノキシフェン



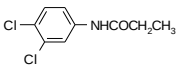
シニドンエチル



プロパクロール



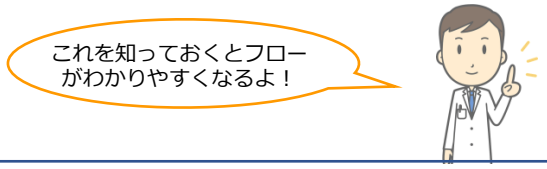
プロパニル



7,3)主な固相カートリッジの使い方

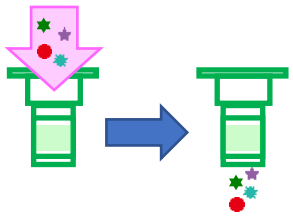
まとめ

【これだけ知っておこう！固相の使い方】

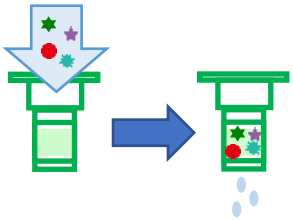


■C18　キーワード：LogPow、低極性、高極性

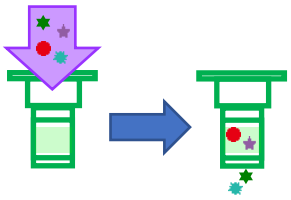
試料を溶媒100%で流すと
流出する※
※わかりやすくするため誇張した表現をしています。



試料を水100%で流すと
保持される※



試料を溶媒と水を混ぜて流すと
保持されるものと流出するものがある



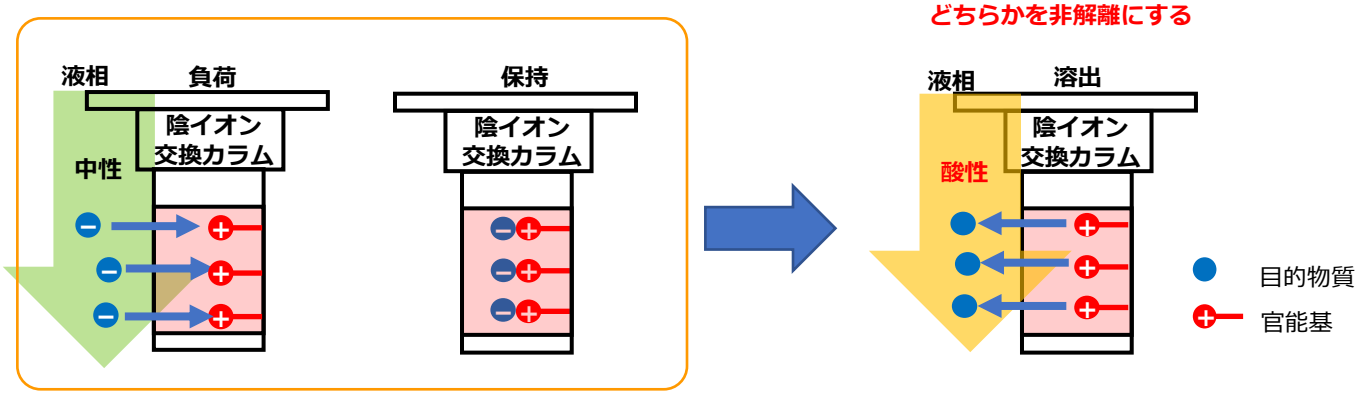
**溶媒と水の比率で農薬(または夾雑物)をC18
に保持させたり流出させたりする**

■イオン交換カラム　キーワード：ｐKa、解離・非解離

陰イオン交換カラムの場合

保持させるときは目的物質もカラムも**両方解離させる**

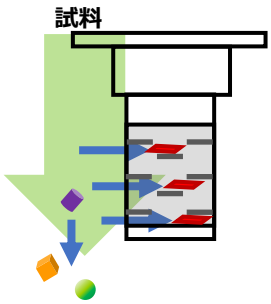
溶出させるときは目的物質またはカラムの
どちらかを非解離にする



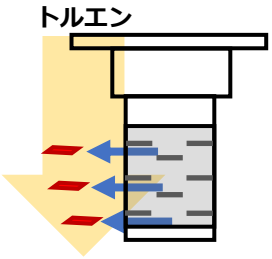
解離・非解離のカギを握るのはpH

■グラファイトカーボン　キーワード：平面構造、トルエン

平面構造のものが保持される



平面構造の農薬を溶出するときは
トルエンを使う

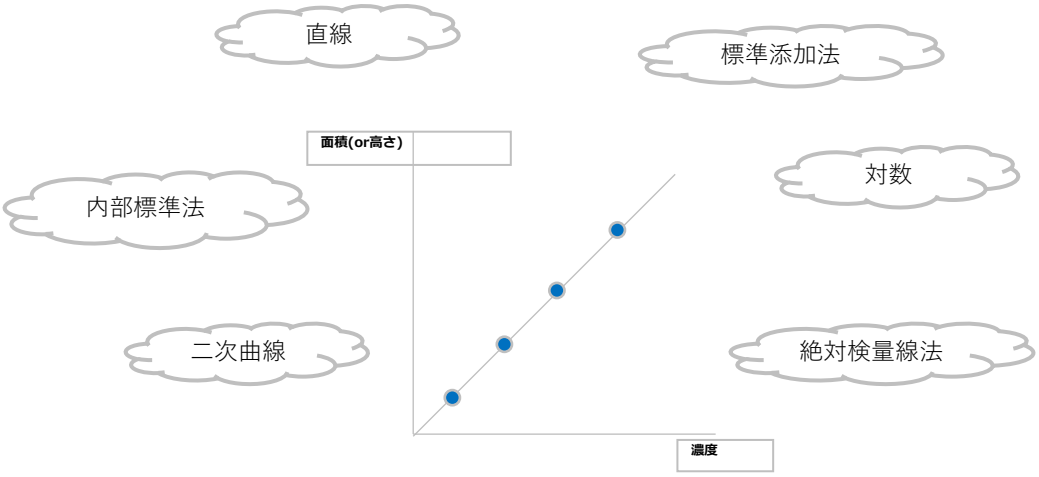


**トルエンは目的物質が溶出する最小量にする
(夾雑成分の溶出を低減するため)**

8,　補足資料-2
GC-MSの検量線

1）検量線の作成方法

2）定量方法の種類



8,1)検量線の作成方法

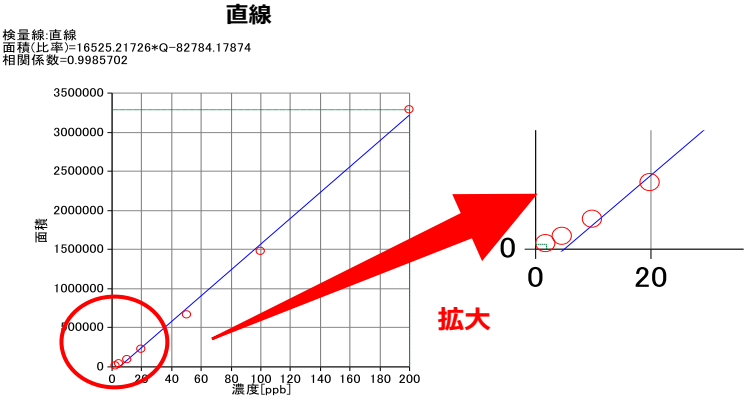
定量値を求めるのに重要な検量線ですがその作成方法や種類により定量値が大きく異なる場合があります。ここではより正確な定量値を導き出すためにGC-MS測定における検量線について説明します。

標準試料をGC-MSで測定する際、その一部が活性点に吸着され検出量が減少することがあります(p.90参照)。この現象は特に低濃度域で顕著であり、その結果検量線の直線性が乏しく、その検量線から算出された定量値は理論値と大きく異なります。その場合は検量線の作成方法 (線の引き方)を変更することでより正確な定量値を算出することができます。検量線の作成方法には直線、重み付き直線、二次曲線、対数などがあります。

(1)検量線の作成例

下図は農薬(ピリブチカルブ)の標準試料（7濃度)の測定データから作成した検量線です。
直線で作成した場合、低濃度域での実測値と検量線のずれが大きくなっており、定量値も理論値と大きく異なっています。

直線



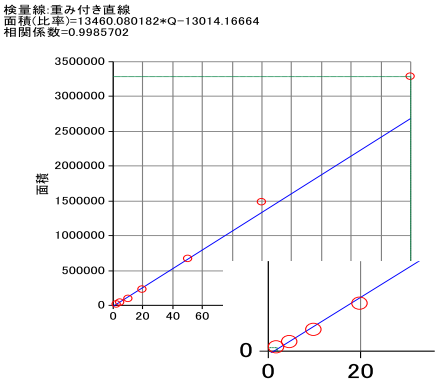
検量線からの定量値

濃度	定量値	(回収率%)
200ppb	203.81	101.9
100ppb	94.71	94.7
50ppb	45.37	90.7
20ppb	18.44	92.2
10ppb	10.99	109.9
5ppb	7.67	153.5
2ppb	6.02	301.0

理論値2ppbに対して定量値6ppb 3倍も増加！

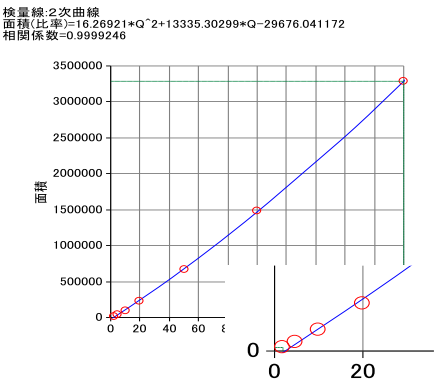
同じデータを重み付き直線、二次曲線、対数などで検量線を作成すると実測値と検量線のずれは直線の場合とは異なり、対数の場合は理論値との差が最も小さくなります。このように検量線の作成方法により定量値が異なりますので目的に応じた濃度域での検量線を作成し定量することが重要です。

重み付き直線



濃度	定量値	(回収率%)
200ppb	245.03	122.5
100ppb	111.09	111.1
50ppb	50.52	101.0
20ppb	17.46	87.3
10ppb	8.31	83.1
5ppb	4.24	84.7
2ppb	2.21	110.3

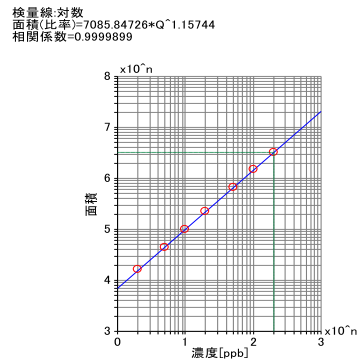
二次曲線



濃度	定量値	(回収率%)
200ppb	199.85	99.9
100ppb	100.95	100.9
50ppb	49.28	98.6
20ppb	18.46	92.3
10ppb	9.52	95.2
5ppb	5.49	109.8
2ppb	3.46	173.1

対数

一般財団法人残留農薬研究所坂様からのご助言



濃度	定量値	(回収率%)
200ppb	201.14	100.6
100ppb	101.13	101.1
50ppb	50.73	101.5
20ppb	19.61	98.0
10ppb	9.74	97.4
5ppb	4.84	96.9
2ppb	2.09	104.7

対数検量線への表記

＊JAあいち経済連永井様からのご助言

二次曲線で得られる式は

y=ax^2・・・式1

式1の両辺を対数変換すると

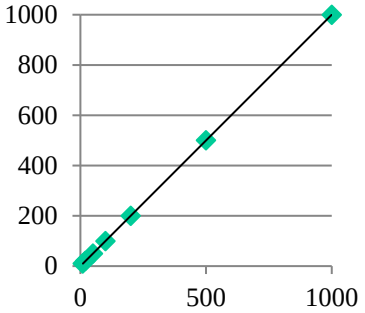
log(y)=log(a)+2log(x)・・・式2

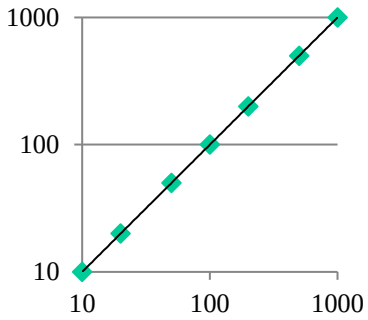
そこでlog(y)=Y、log(x)=X、log(a)=Aと置き換えると

Y=2X+A・・・式3

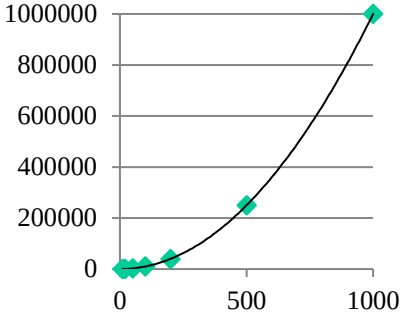
となり一次直線になります。

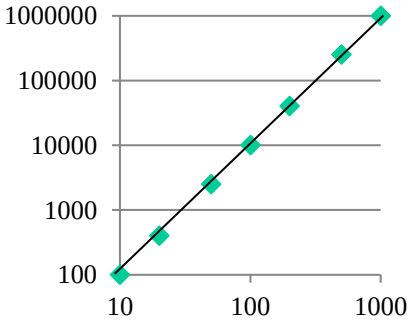
濃度	面積
10	10
20	20
50	50
100	100
200	200
500	500
1000	1,000





濃度	面積
10	100
20	400
50	2,500
100	10,000
200	40,000
500	250,000
1000	1,000,000





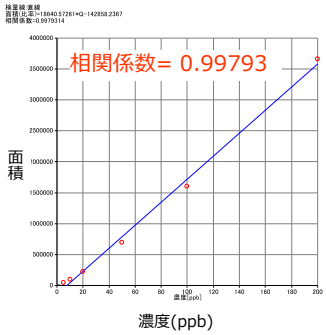
両対数検量線にすると
二次曲線も直線になる！

(2)実際のデータによる各検量線

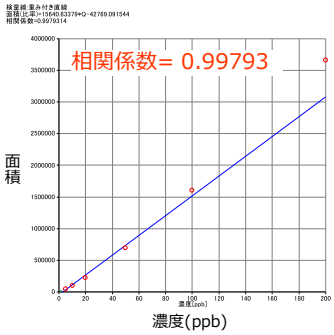
実際の測定データから異なる検量線を作成しました。対数検量線が最も良好な相関係数が得られます。

濃度(ppb)	5	10	20	50	100	200
面積A	42,917	95,921	219,287	694,737	1,602,024	3,664,586

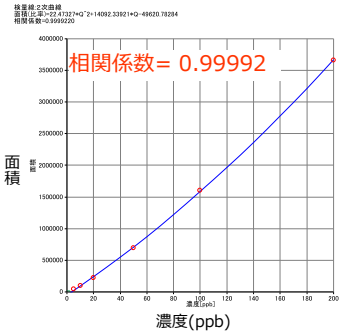
直線



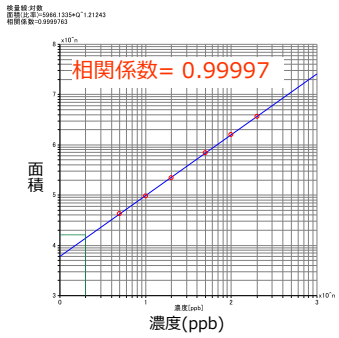
重み付き直線



二次曲線



対数

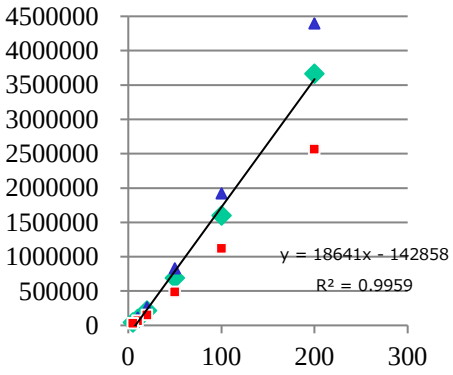


対数検量線の相関係数が一番良好！

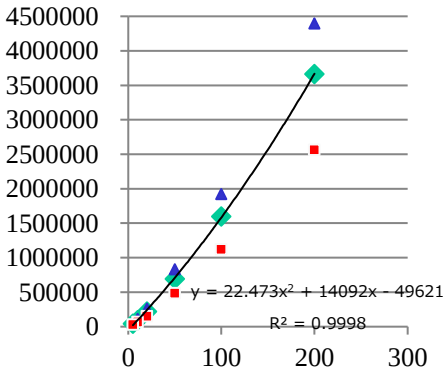
また対数検量線の場合、どの濃度においても面積Aに対して同じ比率での差で認識できます。

	濃度(ppb)		5	10	20	50	100	200
実測値	面積A	◆	42,917	95,921	219,287	694,737	1,602,024	3,664,586
計算値	A×1.2	▲	51,500	115,105	263,144	833,684	1,922,429	4,397,503
計算値	A×0.7	■	30,042	67,145	153,501	486,316	1,121,417	2,565,210

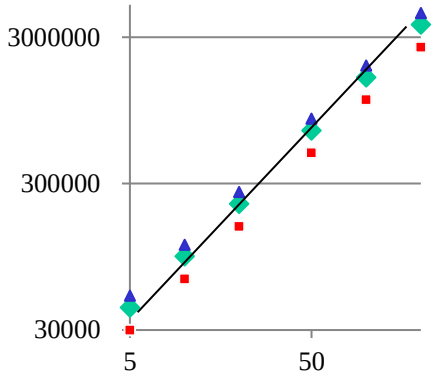
直線



二次曲線



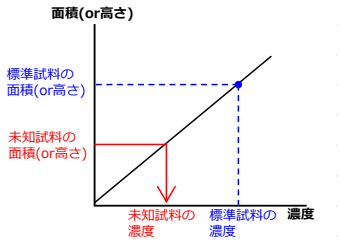
対数



8,2) 定量方法の種類

①絶対検量線法(外部標準法)

既知濃度の標準試料を測定して検量線を作成します。



②絶対検量線法-マトリックス検量線

標準物質をサンプルブランク測定液で希釈したものを測定し検量線を作成します。
マトリックスの影響を相殺して定量することができますが、試料に測定対象成分が含まれていないことが前提になります。またマトリックス検量線用に別途測定液を作製する必要があります。

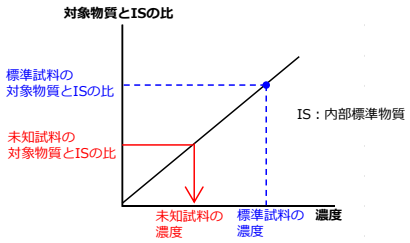
③絶対検量線法-PEG共注入検量線法(p.92参照)

標準試料に疑似マトリックスとしてポリエチレングリコール(PEG)を添加したものを測定し検量線を作成します。マトリックス検量線のように検液に測定対象成分が含まれる懸念はありません。また検量線用に検液を調製する必要もありません。

④内部標準法

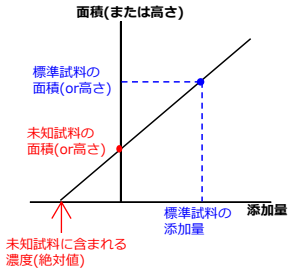
標準試料と試料に内部標準物質を添加したものを測定し、対象物質と内部標準物質の比から検量線を作成します。対象物質と内部標準物質の比を用いて検量線から未知試料の濃度を算出します。

測定対象物質と内部標準物質との物性の違いなどからその補正に関して問題視されることもありますが、前処理工程や測定による影響を相殺する手段として有効です。



⑤標準添加法

未知試料と未知試料に既知濃度の標準試料を添加したものを測定し、その差を利用して定量値を求めます。
「すべての検体について未知試料と添加試料を測定する必要がある」、「添加した標準試料の濃度よりも極端に高い濃度の農薬を検出した場合に誤差が大きくなり、正確な濃度が求められない」などの理由により採用が難しい面もありますが、マトリックスの影響を除去して測定する手段としては有用であると報告されています。



定量方法	絶対検量線	絶対検量線 マトリックス検量線	絶対検量線 PEG共注入検量線法	内部標準法	標準添加法
溶液	標準試料	マトリックス	標準試料 ＋PEG	標準試料or マトリックス	マトリックス
内部標準物質	無	無	無	有	無
検量線の軸	濃度 面積or高さ	濃度 面積or高さ	濃度 面積or高さ	濃度 対象物質と内部標準物質の比	添加量 面積or高さ

9,　製品紹介

1）全自動固相抽出装置　ST-L400

2）GC用大量注入口装置　LVI-S250

9,1)全自動固相抽出装置 ST-L400

(1)全自動固相抽出装置　ST-L400とは

固相抽出による精製操作に必要な「コンディショニング」、「試料負荷」、「洗浄」、「溶出」の工程をすべて自動で行う装置です。STQ法をはじめオリジナルの精製方法にも対応可能です。

全自動固相抽出装置 ST-L400

(2)自動化のメリット

時間の有効活用をはじめとし、ボタンひとつで誰でも同じ精製操作を行うことができるため分析者の人的ばらつきを抑制できる、装置内の操作による溶媒暴露も軽減などが挙げられます。

1. **時間の有効活用**
2. **引き継ぎ労力の軽減**
3. **人的ばらつきの縮小**
4. **労働衛生環境改善(溶媒暴露軽減等)**
5. **メソッドファイルの共有(遠隔ラボ間)**

(3)ST-L400の特徴

残留農薬一斉分析メソッドであるSTQ法（GC-B法3種、LC法）が搭載されているほか、オリジナルメソッドも作成可能です。最大20検体まで連続処理を行うことができ、その操作もタッチパネルにより簡単に行うことができます。

溶媒の使用量も少なく、ガラス器具もメス試験管1本のみのため分析後の片付けも時間短縮が図れます。

1. **残留農薬一斉分析メソッドSTQ法(GC-B法、LC法)の搭載**
2. **オリジナルメソッドの作成が可能**
3. **最大20検体の連続処理**
4. **容易なメンテナンス**
5. **タッチパネルによる操作の簡便化**
6. **使用ガラス器具はメス試験管1本のみ**

(4)ST-L400の操作手順

①専用のサンプルバイアルに抽出液を分取し、試験管とともにセットします。
②使用する固相カートリッジをセットします。
③必要な溶媒を配管にセットします。
④シーケンスを作成し、実行ボタンを押します。

①サンプルバイアルと試験管をセット

②固相カートリッジをセット

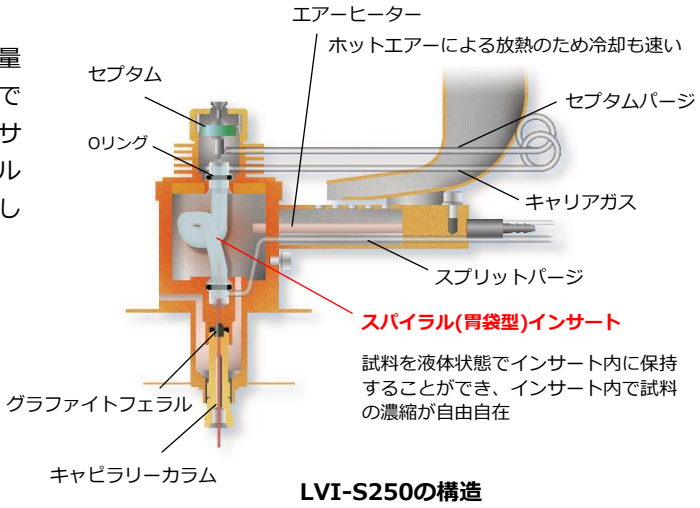
③溶媒を準備

④シーケンスの作成・実行

9,2)GC用大量注入口装置　LVI-S250

(1)GC用大量注入口装置　LVI-S250とは

LVI-S250はスパイラル(胃袋型)インサートを搭載したGC用大量注入口装置です。この独自のインサート形状により最大200 μLまで注入が可能となり感度向上を図ることができます。STQ法は少量サンプリングに始まりエバポレーターによる濃縮操作のないスケールダウンした前処理方法ですがLVI-S250を用いることで感度を確保しています。



LVI-S250の構造

(2)LVI-S250の特長

1. **大幅な感度向上による低濃度試料の高感度分析**
2. **試料の少量化や濃縮操作の省略による前処理の迅速化**
3. **試料を液体状態でインサートに保持し、ここで濃縮が可能**
4. **低温度でカラムに導入できるため熱に弱い物質にも対応可能**
5. **インサート内での誘導体化が可能**

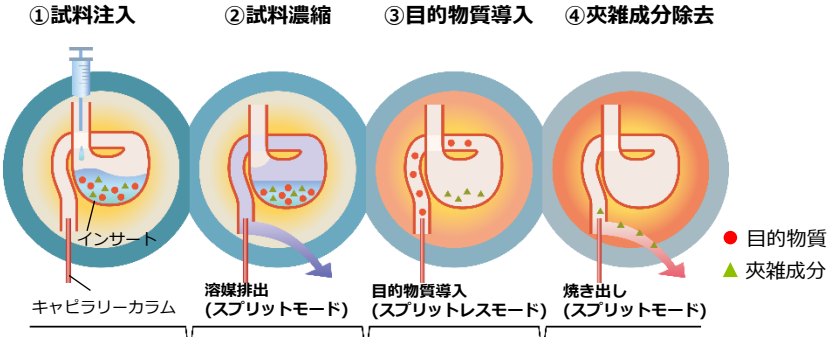
(3)LVI-S250の原理

①試料を注入し、液体状態のままスパイラルインサート内に保持します。このときインサート内で試料溶媒が突沸しないように注入口温度を試料溶媒の沸点より低めに設定しておきます。

②スプリットモードで揮発した溶媒を排出し、インサート内で試料を濃縮します。

③スプリットレスモードで注入口温度を上げ、目的物質を分離カラムに導入します。

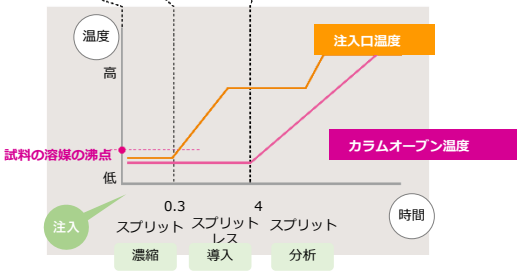
④スプリットモードでインサートを焼き出しします。



試料を注入して濃縮している間は注入口温度を溶媒の沸点より低い状態に設定します。濃縮後は注入温度を上げて目的物質をカラムに導入していきます。カラムオーブン温度は目的物質をカラムへ導入し終えるまで低い温度を維持します。これによりカラム先端部で目的物質を再濃縮させます。その後は通常の分析条件に従ってカラムオーブンの温度を上げていきます。

右はアセトン-ヘキサン(15/85)を25 μLの注入した場合の例です。注入から濃縮まで約0.3分※、カラムへの導入までに約4分かかります。

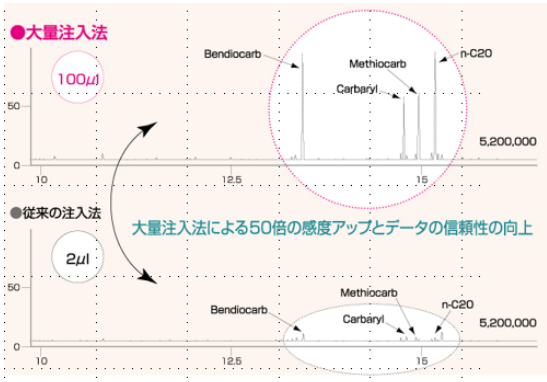
※GCの機種により異なる場合があります。



LVI-S250の原理と注入口及びGC条件の概念図

(4)注入量の違いによるクロマトグラムの比較

同じ試料を2 μL注入した場合と100 μL注入した場合のクロマトグラムの比較です。2 μL注入ではピークがノイズと重なり定性・定量が困難ですが100 μL注入では定性・定量が容易に行えます。このように微量分析において感度が足りない場合に大量注入を用いることで感度向上が図れ、データの信頼性も高くなります。



注入量の違いによるクロマトグラムの比較

10,　製品カタログ

凍結粉砕キット

抽出操作

全自動固相抽出装置

STQ法　前処理キット

精製操作

固相カートリッジ

※お断り

■製品の仕様・外観・構造等は、改善のため予告なく変更する場合があります。
■価格は2024年5月1日現在のもです。今後予告なく変更する場合があります。
予めご了承ください。

価格表
https://www.aisti.co.jp/price

■お見積り、お問合せはこちらからお願いします。

見積もり　お問合せ
https://www.aisti.co.jp/contact

凍結粉砕キット

凍結粉砕機 フレステント FST-4000

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SA-8010-004	凍結粉砕機 フレステント FST-4000（本体、容器、蓋、カッター）	式	1	248,000
SA-8010-006	凍結粉砕機　フレステントFST-4000用 容器	個	1	35,000
SA-8010-007	凍結粉砕機 フレステント FST-4000用 蓋	個	1	18,000
SA-8010-005	凍結粉砕機 フレステント FST-4000用 カッター	個	1	18,000
SA-8010-011	凍結粉砕機 フレステント FST-4000用 断熱マット(3個入り)	個	3	5,000
SA-8010-010	凍結粉砕機 フレステント FST-4000用 蓋パッキン(3個入り)	個	3	5,000

凍結粉砕機フレステント FST-4000
容器

凍結粉砕機フレステント FST-4000
蓋

凍結粉砕機フレステント FST-4000
カッター

凍結粉砕機フレステント FST-4000
断熱マット

凍結粉砕機フレステント FST-4000
蓋パッキン

ドライアイス凍結粉砕用備品（一式）

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SC-4010-151	ドライアイス凍結粉砕用備品（一式）	式	1	5,600
内訳	スコップ（ドライアイス用）	個	1	
	予冷容器	個	1	
	試料採取用スプーン	本	5	
	試料取り出し用スプーン	本	5	

スノー状ドライアイス製造装置

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SC-4010-101	スノー状ドライアイス製造装置	台	1	130,000

抽出操作

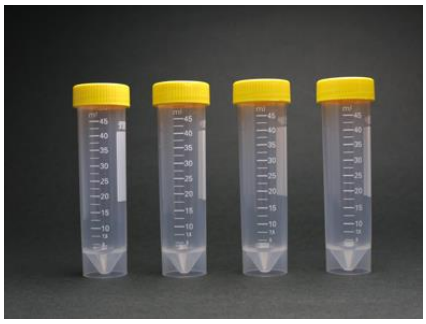
計量スプーン

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SB-7011-101	塩化ナトリウム(残農グレード)　1g用(関東)	本	1	7,800
SB-7011-102	塩化ナトリウム(残農グレード)　1g用(和光)	本	1	7,800
SB-7033-101	クエン酸3Na・2水和物　1g用(関東)	本	1	7,800
SB-7033-102	クエン酸3Na・2水和物　1g用(和光)	本	1	7,800
SB-7099-100	クエン酸水素2Na・1.5水和物　0.5g用(特注製品)	本	1	9,000
SB-7022-201	無水硫酸マグネシウム　2g用(関東)	本	1	7,800
SB-7022-402	無水硫酸マグネシウム　4g用(和光)	本	1	7,800
SB-7022-031	無水硫酸マグネシウム　0.3g用(関東)	本	1	7,800
SB-7000-941	QuEChERS法用 計量スプーン4本セット(関東) 【セット内容】塩化ナトリウム 1g、クエン酸3Na・2水和物 1g、クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g (特注製品)、無水硫酸マグネシウム 2g(2回計量)	式	4	25,800
SB-7000-942	QuEChERS法用 計量スプーン4本セット(和光) 【セット内容】塩化ナトリウム 1g、クエン酸3Na・2水和物 1g、クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g (特	式	4	25,800

抽出用ジェネレータセット（IKA製）

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SE-4010-030	抽出用ジェネレータセット（IKA製）	式	1	お問い合わせ下さい
SE-4010-025	ジェネレーター本体	台	1	お問い合わせ下さい
SE-4010-026	ジェネレータ用シャフト	本	1	お問い合わせ下さい
SE-4010-027	ジェネレータ用スタンド	台	1	お問い合わせ下さい
SE-4010-029	ジェネレータ用クランプ	個	1	お問い合わせ下さい

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SB-3010-009	遠沈管 PP製 50mL 100本入	袋	100	10,300



遠沈管 PP製 50mL 100本入

QuEChERS法用スプーン4本セット

全自動固相抽出装置

製品名	単位	入数	税抜定価
全自動固相抽出装置　ST-L400	式	1	8,900,000
L300・L400用スクリューバイアル(褐色・4mL)　100本入り	箱	100	5,500

STQ法　前処理キット

（税抜定価）

キット内容	単位	入数	STQ-GC A法 前処理キット	STQ-GC B法 前処理キット	STQ-LC法 前処理キット
			SS-5020-011	SS-5020-002	SS-5020-003
			¥148,300	¥182,700	¥159,600
遠沈管 PP製 50mL　100本入	袋	1	●	●	●
残留農薬分析用試験管ラック	台	1	●	●	●
押し出しポンプ（小・青）　4本入	パック	1	●	●	●
押し出しポンプ（中・緑）　4本入	パック	1	—	●	●
Smart-SPE用アダプタ　6個入	袋	2	●	●	●
固相カートリッジ脱着器	個	1	●	●	●
ディスポーザブルPPリザーバー（小）　50本入	袋	1	●	●	●
PPリザーバー（大）　20本入	袋	1	—	●	—
ガラス製リザーバー　10本入	袋	1	—	●	—
溶液押し出し器　20mL　10本入	袋	1	—	●	—
試験管（大）　10本入	袋	1	—	●	—
試験管（小）　100本入	袋	1	●	●	●
メス試験管 1&2mL 共栓付　10本入	袋	1	●	●	●

精製操作

残留農薬分析用試験管ラック

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-2010-005	残留農薬分析用試験管ラック	台	1	39,500	A&B&LC法

右下：押し出しポンプ（小・青）
左上：押し出しポンプ（中・緑）

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SB-4010-002	押し出しポンプ(小・青)　4本入	ﾊﾟｯｸ	4	11,300	A＆B＆LC法
SB-4010-004	押し出しポンプ(中・緑)　4本入	ﾊﾟｯｸ	4	11,300	A＆B＆LC法

固相カートリッジ脱着器

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-2030-005	固相カートリッジ脱着器	個	1	13,000	A&B&LC法

ディスポーザブルPPリザーバー（小）

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SB-6011-005	ディスポーザブルPPリザーバー（小）セット　500本入	袋	500	14,000	A&B&LC法
SB-3020-011	PPリザーバー(大)　20本入	袋	20	4,800	B法
SB-3020-015	ガラス製リザーバー　10本入	箱	10	10,000	B法
SB-3020-013	溶液押し出し器 20mL　10本入	袋	10	1,500	B法

PPリザーバー（大）

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SB-3010-003	試験管(大)　10本入	箱	10	13,200	B法
SB-3010-001	試験管(小)　100本入	箱	100	6,800	A&B&LC法
SB-3011-021	メス試験管 1&2mL 共栓付　10本入	袋	10	35,000	A&B＆LC法

ガラス製リザーバー

溶液押し出し器 20mL

試験管（大）

試験管（小）

メス試験管1mL&2mL共栓付

吸引マニホールドキット 20ポート

右上：Smart-SPE用アダプタ
真中：ストップコックPTFE

型番	製品名	単位	入数	税抜定価
SS-5110-002	吸引マニホールドキット 20ポート　キット内容	式	1	お問い合わせ下さい
SB-5110-002	吸引マニホールド本体 20ポート	式	1	お問い合わせ下さい
SB-5110-003	ストップコックPTFE　10個入	袋	2	お問い合わせ下さい
SA-2020-002	Smart-SPE用アダプタ　10個入	袋	2	12,000
SB-5110-004	ダイヤフラム真空ポンプ(スイッチ付)	台	1	48,000
SB-5110-005	吸引ろ過瓶	個	1	10,600
SB-5110-006	吸引ホース一式	式	1	7,300
SB-5110-007	廃液受け 20ポート	個	1	5,000

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-2020-003	Smart-SPE用アダプタ　6個入	袋	6	9,000	A＆B&LC法

固相カートリッジ

●シリカゲル系カラム

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-1110-030	Smart-SPE C18-30	箱	100	39,000	LC&MG法
SA-1110-050	Smart-SPE C18-50	箱	100	39,800	A&B&LC法
SA-1120-030	Smart-SPE PSA-30	箱	100	39,800	A&B&LC法
SA-1120-040	Smart-SPE PSA-40	箱	100	41,800	—
SA-1120-050	Smart-SPE PSA-50	箱	100	43,800	GS法
SA-1160-030	Smart-SPE SI-30	箱	100	39,800	B法
SA-1122-030	Smart-SPE SAX-30	箱	100	39,800	B法
SA-1122-050	Smart-SPE SAX-50	箱	100	41,800	—
SA-1121-030	Smart-SPE NH2-30	箱	100	39,800	B法
SA-1123-030	Smart-SPE SCX-30	箱	100	39,800	MG法＆GS法

●ポリマー系カラム

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-1260-010	Smart-SPE PBX-10	箱	100	39,800	B法＆GS法
SA-1260-020	Smart-SPE PBX-20	箱	100	45,000	ー

●その他

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-1351-020	Smart-SPE GCK-20	箱	100	39,800	A&B法

●3種セレクト

型番	製品名	単位	入数	税抜定価	備考
SA-1900-333	Smart-SPE 3種セレクト	箱	90	39,800	—

※3種×30個となります。ご希望の固相の種類をご指定願います。

固相カートリッジ

アイスティサイエンスホームページのご案内

- WWW.aisti.co.jp -

試料ごとの豊富なアプリケーションノート

日本食品衛生学会・農薬残留分析研究会など学会で発表した資料

アイスティサイエンス独自の技術を登録なしでご覧いただけます

凍結粉砕や抽出や精製などのポイントをビデオで説明

株式会社　アイスティサイエンス

【本社】
〒640-8390　和歌山県和歌山市有本18-3
TEL:073-475-0033　FAX：073-497-5011

【東日本営業所】
〒351-0033　埼玉県朝霞市浜崎1-1-31-610
TEL：048-424-8384　FAX:073-497-5011