

固相抽出の可能性とその自動化技術

—シリーズ 1/5：残留農薬分析 STQ法と自動前処理装置—

松尾 俊介, 佐々野 僚一

1 はじめに

理化学分析において、各種クロマトグラフや質量分析計による測定の前に「試料の前処理」が必要となる場合が多い。前処理は、試料を測定に適する状態にする作業・工程を指し、粉碎や抽出、精製、誘導体化などが挙げられる。前処理の効果としては、測定感度や再現性の向上、定量データの信頼性の向上、測定装置の汚染軽減、測定時間の短縮、測定機器の選択肢の拡大などの様々なメリットが挙げられる。試料や分析対象成分の特性によりその手法は無限に存在するといっても過言ではない。近年、測定機器の感度やスループットが格段に向上し、それに伴い様々な分野で前処理の効率化も進んでいる。現在、そして今後の前処理に求められるのは、操作の簡易・迅速・コンパクト化そして自動化である。前処理の簡易化が進んでいることで、その存在が軽視されるかと言えばそのようなことはなく、測定機器メーカーがこれまで以上に注視するなど、むしろ重要性が増し共同での技術開発も進んでいる。つまり、測定機器と前処

理技術の進化は切っても切れない関係と言える。前処理技術の開発には、手法そのものの開発と、その自動化も含まれる。

アイスティサイエンス（以下、当社）はその両方を得意としており、主な分野は残留農薬や、水質、食品成分、メタボローム、におい等の分析である。また、技術的には固相抽出を軸に、特許を取得しつつ新技術を開発し、自動化やコンパクト化、測定機器のオプションデバイスを開発し、ユニークな装置、技術と評価を得ている。

本稿では、残留農薬分析における前処理技術の進化とその自動化について紹介する。

2 残留農薬分析の状況の変化

当社が最も得意かつ最初に開発した技術が食品中の残留農薬分析における前処理の省力化と自動化で、その手法はSTQ法（図1）と呼び、国内だけでも約100機関の導入実績がある。導入が拡大したきっかけは厚生労働省によるポジティブリスト制度の施行（2006年）と妥



図1 STQ法の概要

(QuEChERS 参考改良抽出, Smart-SPE, マニュアルキット, 自動前処理装置 ST-L400)

当性評価ガイドラインの通知（2005年）であった。

制度施行以前は、各農薬に残留基準を定める、いわゆるネガティブリスト制度と呼ばれる状況だった。試験法についても、各農薬もしくは数成分のグループごとに公定法が存在していた。その頃、農薬の残留や混入などが問題となるケースが社会的にも注目を集めていたが、検査対象となる食品の種類が多岐にわたることや基準が定められていない農薬に対応するため、ポジティブリスト制度が導入された。基準が定められていない農薬については一律基準（0.01 ppm）が適用されることになった。それに伴い、生産や流通、販売者は扱う食品中の残留農薬濃度がその一律基準濃度を超えないことを遵守する必要があり、数百成分という農薬残留の有無の確認が必要となった。そこで、残留農薬を分析する側も一斉分析への対応を迫られるようになった。

妥当性評価ガイドラインについては、概要は「公定法以外の試験法でも当該ガイドラインに則って評価すればそれと同等とみなす」という内容の通知であった。これは独自法だけではなく公定法を導入する場合でも、その妥当性の評価が必要とされており、生産者や流通者、食品メーカーも当ガイドラインを参考とする傾向にあった。

ポジティブリスト制度施行に伴い、検体数の増加や、生産者組合や消費者団体などでの残農分析の新規立上げが増加する中で、設備や経験を要する公定法に代わる手法が求められる状況となっていった。

3 STQ法

数百成分を対象とする一斉分析において、操作性、精製度そして分析対象成分数のバランスが重要となる。より多くの成分を対象としつつ、十分な精製が行われることが理想いえる。ただし、精製度と対象成分数は矛盾の関係にあり、精製度を高めると対象成分の幅も狭めることにつながる。しかし、精製が不十分となれば、測定妨害物質により得られた定量値の信頼性が低下し誤定量の可能性がでてくる。また、精製が不十分な試料液が測定装置を汚染し、メンテナンス頻度の増加や装置寿命にも影響する。そこで、当社が考案したのが「STQ法」である。

当社は、ポジティブリスト制度や妥当性評価ガイドラインが通知される以前より一斉分析法の簡易化を発表・提案していた。また、当時欧州などで広まりつつあった QuEChERS 法の溶媒抽出・塩析工程をいち早く取り入れ、精製には固相カラムカートリッジを組み合わせた STQ 法を確立させ、その自動化も実現した。ちなみに、STQ 法の名前は、「Solid phase extraction Technique with QuEChERS method」の各頭文字をとった造語である。

STQ 法の特徴は、簡単な操作性と高い精製効果を両立していることも挙げられる。例えば、10 検体の処理

は午前中に完結できる。

抽出工程の概要は、50 mL のプラスチックチューブに試料を分取し、溶媒（アセトニトリル）を投入後ホモジナイズ、その後、塩析と pH 調整剤を投入し振とう後、遠心分離を行うというシンプルな操作となっている。

精製工程は、検体数などに応じて手操作による前処理キットと自動前処理装置を選択できる。いずれも、当社独自開発の固相カートリッジ「Smart-SPE」を使用する。前処理キットは専用の試験管ラックで、抽出液の負荷や通液等の多段工程も一気通貫で操作ができる。Smart-SPE は、充填剤量が従来一般的だった 500~1000 mg のものと比較して 10~50 mg と小さく、使用溶媒も公定法に比べ数十分の一なので溶媒コストや廃液も削減できる。

主に使用する固相の種類は C18（逆相）と PSA（陰イオン交換+順相）だが、通液の際、精製効果を高めつつ農薬回収率が良好となるように極性や pH を最適化し試験設計している。

STQ 法と QuEChERS 法の最大の違いは精製工程にある。QuEChERS 法では固相をバルク（粉）のまま使用し、抽出液と混合し振とう精製を行う。これは分散固相抽出と呼ばれ、固相の粒子と抽出液が接触することにより相互で分配が起これ、固相に夾雑物が吸着される作用を利用している。利点としては固相費用が安く操作も簡単ということが挙げられるが、一方、夾雑物が抽出液に残存すること、農薬も一部吸着される可能性が懸念される。

STQ 法でも採用しているカートリッジを使用した固相抽出では、カラム状の固相に抽出液を通液させることでクロマトグラフィー作用を最大限に生かすことができ、夾雑成分と農薬成分を分画・分離することができる。固相カートリッジはバルクに比べ価格が高いが、先述した精製によるメリットを考慮すると固相カートリッジを選択する価値が十分にあると考えている。

Smart-SPE の形状はストレート型で容易に連結が可能で、各食品に特有の夾雑物に対して固相追加も気軽にできる（図 2, 3）。

固相カートリッジを使用した精製法は、公定法をはじめ他の試験法にも採用されているが、それらと STQ 法の違いは、特に C18 における通液工程に「水」が使えるか否かにある。測定機器に GC/MS を使用する場合、水の注入を避ける必要があるため、他の試験法では、固相に通す液は有機溶媒のみとしているのが一般的である。ただ、この手法では夾雑成分も固相カラムから溶出してしまう傾向にある。C18 の逆相相互作用は、通液溶媒の極性が高くなるほど低極性成分の吸着力が強くなる。つまり、通液の際に水の比率が高いほど脂溶性夾雑物の吸着強化が可能で、目的によっては農薬を保持させ、高極性夾雑物を通過除去することにも使用できる。



固相種	相互作用	吸着除去物質例
C18 PBX (ポリマー系)	逆相	脂質, クロロフィル, トリグリセリドなど
PSA	陰イオン交換 順相	脂肪酸など
SAX	陰イオン交換	脂肪酸など
シリカゲル	順相	カフェインなど
グラファイト カーボン	平面構造	フラボノイドなど

図2 固相カートリッジ Smart-SPE と特性

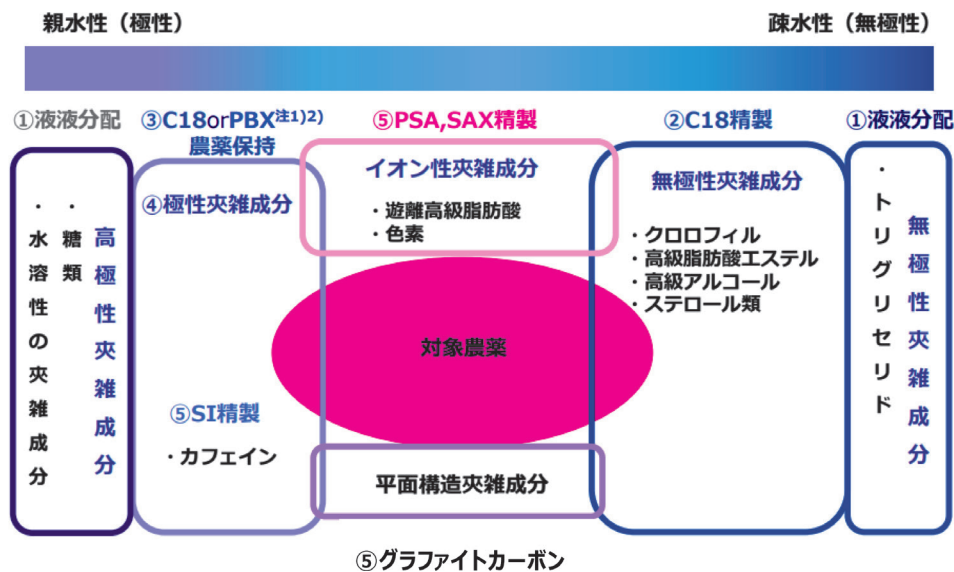


図3 固相相互作用と精製除去物質の概念

STQ法では、これらの両方の効果を取り入れることで高精製を実現している。

STQ法で水が使える理由は Smart-SPE の小ささとストレート構造にある。液体や気体もスムーズに固相内を通過する構造とすることで、約3分という短時間に固相を通気乾燥することができ、GC/MS 対象農薬の精製にも C18 の精製効果を最大限に生かしている。

このように、精製効果の高いことで加工食品やスパイス、香辛料などの難試料にも対応可能としている。また、従来一般的に採用されてきたグラファイトカーボンカラムを一部の試料以外では使用しないことで、溶出液として必要なトルエンの使用も極力回避でき、労働安全面でも評価を得ている。

また、使用器具も少なく洗浄器具も試験管やシリンジのみで、エポレーターによる溶媒濃縮工程もないことも業務全体の労力軽減に貢献している。

近年、解析ソフトの技術も進歩し、データベースを使用した半定量の導入検討も耳にすることが増えている。半定量ソフトとは、あらかじめ登録されている農薬のフ

ラグメントやリテンションタイム、検量線などの情報をもとに、測定ごとに添加している保持指標 (RI: リテンションタイムインデックス) を用いて補正・定量を行う。この手法は、標準品が不要となることから自主検査を目的に注目されている。ただし、便利でランニングコストも軽減できるメリットはあるが、誤判定や誤定量に注意が必要となる。データベースを使用する半定量では、ソフトウェアに訂正・定量任せるということになり、リテンションタイムとフラグメントの精度に依存するので、クロマトグラムがきれいなほど望ましい。つまり測定液がきれいであれば誤判定や誤定量を防げることになる。このように半定量にも精製度の高い STQ法は相性が良いと考える。

4 自動前処理装置 ST-L400

前処理の省力化に最も有効なのが自動化である。STQ法ユーザーの約半数が自動化装置を導入している。使用する固相がカートリッジなので、その形状によりノズルの装着や固相の連結が可能であり、分散固相抽出で

GC-MS対象

LC-MS/MS対象

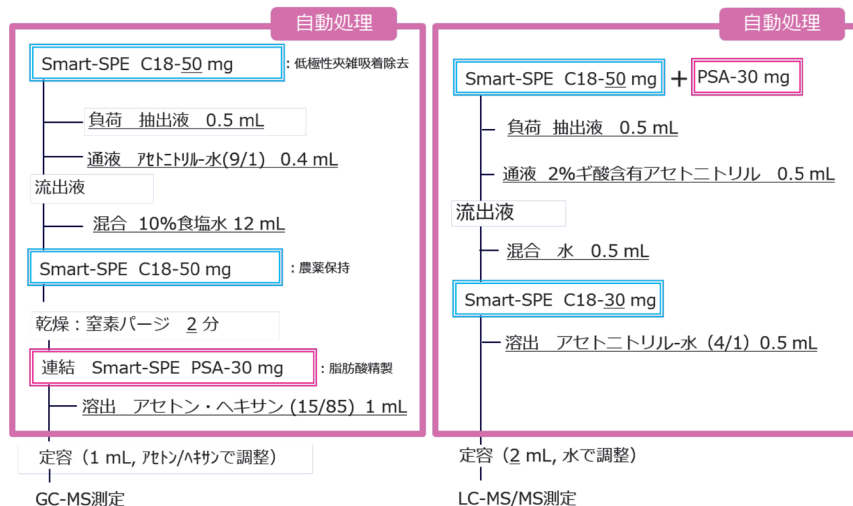


図4 自動前処理(精製)工程

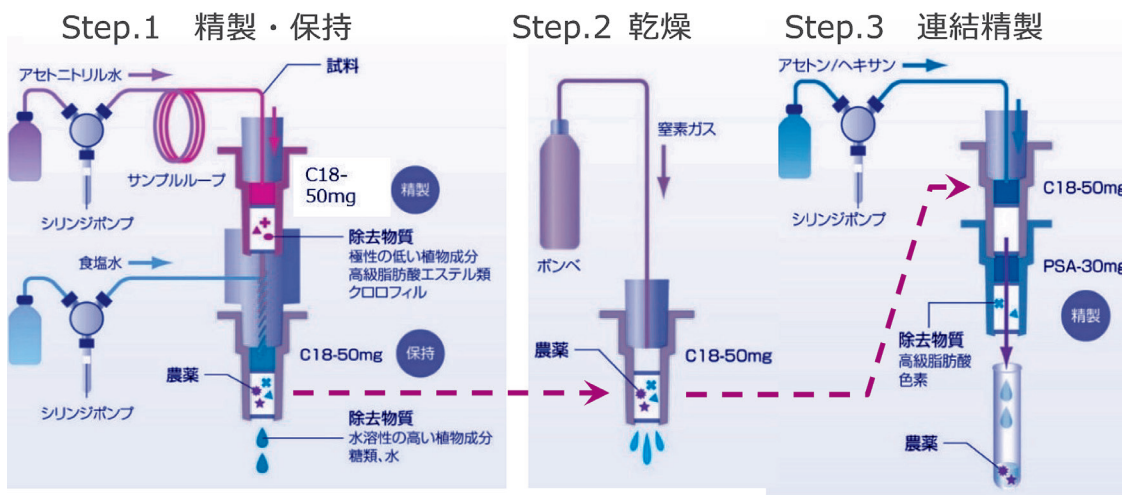


図5 自動前処理例(GC/MS対象試験工程, 固相の脱着と再連結)

は難しい自動化を実現した。残留農薬用前処理装置「ST-L400」は、先に述べた簡易操作で得られた抽出液を試料バイアルに入れ、当該装置にセットするだけで、STQ法の多段精製が自動で完結する(図4)。自動工程は、固相コンディショニング→試料液の分取→固相へ負荷→通液・精製→固相の乾燥→溶出→流路洗浄の全工程に及ぶ。工程中では複数の固相を使用しての連結や脱着機能も有している(図5)。装置にはタブレットPCが搭載されており、ソフトウェアもシンプルで直感的に操作できる。つまり、専門的な知識や技術が未熟な新任のオペレータでも即戦力となる。このように、自動化の効果は作業の省力化だけではなく、これまで大きな負担であった業務の引継ぎなど技術の継承の負担減にも効果が大きい。

5 GC用大量注入装置 LVI-S250

手操作または自動前処理に共通して、溶媒濃縮工程がないことが省力化に大きく寄与しているが、測定液が希

釈状態となり、測定装置の感度に頼ることになる。

そこで当社はGC用大量注入口(図6)を開発しSTQ法と合わせて提案を進めた。当該注入口を使用すると、従来の数十倍(最大200, 通常25~50 μL)の注入が可能となり十分な感度を確保できる。通常の微量注入(1~2 μL)で用いられるスプリット/スプリットレス注入口では、注入口内部の高温状況で気化した溶媒とともに試料がキャピラリーカラムに導入される。ライナー容積やカラム、質量分析計への影響を考慮し、2 μL程度までが適量とされている。

大量注入の場合その溶媒がそのままキャピラリーカラムへ導入されることを回避する必要がある。LVI-S250は、当社独自のスパイラルライナー(通称:胃袋型ライナー)を使用することで克服している。当該ライナーは、内部に液体を保持できる構造を有している。注入の際に、溶媒沸点付近の比較的低温にて液体状態で溶媒を保持し、気化した溶媒をベントラインから排出している。つまり、ライナー内で溶媒を濃縮している。その

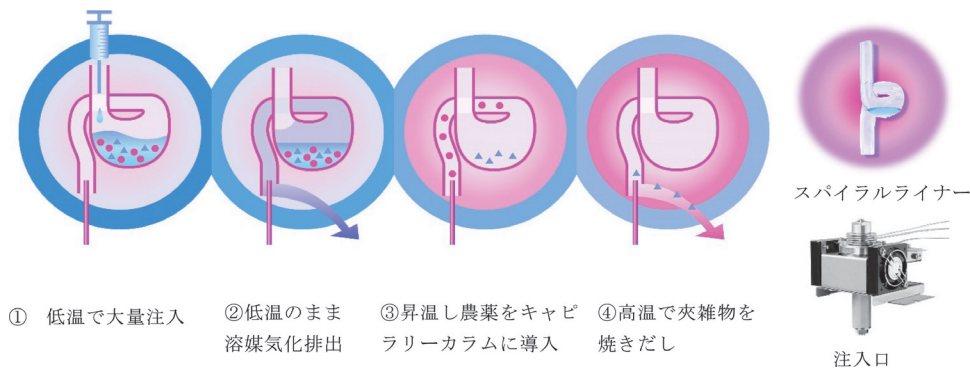


図6 GC用大量注入口と注入工程

後、昇温し農薬を気化させスプリットレス状態でキャピラリーカラムに導入する。最後に、再びスプリット状態とし高温で焼きだしが可能で、高沸点夾雑物のキャピラリーカラムへの導入を回避できる。これにより、得られるクロマトグラムの信頼性の向上や、カラム交換頻度の低減などの効果がある。

現在、トリプル四重極型のGC/MSが普及し選択性が向上し見た目の感度が上昇したが、スキャン測定でのフラグメント確認の際の感度確保や、難試料対応のための試料分取量減量に伴う高感度測定に導入は続いている。また、近年のヘリウム不足による代替ガスへの変更の際の低下の対応としての問い合わせも増えている。

6 個別分析法への応用

数百成分がSTQ法で分析できる一方、一部の農薬がその特性から、一斉分析では対象とできないものが存在する。これについてはSTQ法に限ることではないが、これらは、比較的实际に農場で使用されている農薬に該当する傾向にある。つまり、散布されている特に分析したい農薬が一斉試験に該当しない例が少なくない。当社は、これら個別に分析する必要がある成分についても省力・自動化法を発表・提案している。主な例に、除草剤有効成分の代表といってもいいグリホサートとグルホシネートがある。近年は、その代謝物も含めた分析法とその自動化検討も進めている。その他では、ジチオカルバメート系、ネオニコチノイド系、動物用医薬品、カビ毒など、農薬以外にも拡大している。

7 ドライアイス予冷式凍結粉碎装置

前処理に用いる試料の状態は、最終的に得られる定量値に大きく影響を及ぼすが、農薬分析でも例外ではない。試験に使用する試料の部位や細かさが定量値の偏りやばらつきに影響する。つまり、試料の代表性が確保されかつ、均一により細かく粉碎することが信頼性の高いデータを得るために必要となる。

当社では先述のように、試験のコンパクト化や自動化を提案しているが、試料採取量の減量を伴うことが多



内釜方式による二層式断熱構造
逆回転の「みね打ち」効果により強力に粉碎！

図7 凍結粉碎装置フレステントと粉碎試料

い。そこで、均一性を向上させる手法として「ドライアイス予冷式凍結粉碎」を提案し、その粉碎装置フレステント(図7)を考案、販売を始めた。当技術を用いると試料の水分含有を保ったまま凍結状態でパウダー状まで微粉碎が可能となる。また、パウダー状のまま凍凍保管が可能で、再試験の際など従来のようにブロック状に凍結させた試料の長時間の再解凍の必要がなく、保管試料をそのまま用いることができる。

装置の特徴は、ドライアイスを使用するために最適化した内釜方式の二重断熱構造と、凍結した試料を強力に粉碎する逆回転による“みね打ち”機能である。

8 まとめ

当社は残留農薬分析法を提案するにあたって、テーマを「簡単・はやい・安い」だけではなく、「高精製・自動化」と「安定分析の持続」としている。

これまで、多岐にわたる食品や、様々な固相についての実験を行い、また、多くのユーザー導入の実績やその後の運用についても多く経験を蓄積してきた。実験データや当社およびユーザーによる学会発表資料も隠すことなく公開している。

残農分析の試験法変更や立上げの相談、導入前の実験も受けており、導入後のフォローも重要と考えている。

当社およびその技術が、今後も様々な分野の分析、研究への貢献につながることを願っている。

文 献

- 1) M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck : *J. AOAC Int.*, **86**, 412 (2003).
- 2) M. Okihashi, Y. Kitagawa, H. Obana, Y. Tanaka, Y. Yamagishi, K. Sugitate, K. Saito, M. Kubota, M. Kanai : *Food*, **1**, 101 (2007).
- 3) 佐々野僚一, 谷澤春奈 : 第 95 回食品衛生学会学術講演会要旨集 (2008).
- 4) 谷澤春奈, 佐々野僚一, 大関由利子 : 第 95 回食品衛生学会学術講演会要旨集 (2008).
- 5) 佐々野僚一, 小西賢治, 栢木春奈, 斎藤 勲 : 第 106 回食品衛生学会学術講演会要旨集 (2013).



松尾俊介 (Shunsuke MATSUO)
株式会社アイスティサイエンス (〒 351-0033 埼玉県朝霞市浜崎 1-1-31-610).
《趣味》テニス, 温泉巡り.
E-mail : matsuo@aisti.co.jp



佐々野僚一 (Ryoichi SASANO)
株式会社アイスティサイエンス (〒 640-8390 和歌山市有本 18-3). 《現在の研究テーマ》理化学分析における前処理の自動化. 《趣味》テニス.
E-mail : sasano@aisti.co.jp

会社ホームページ URL :

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

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象 : 以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情報など

報など

新規性 : 本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません. 新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません. また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません.

お問い合わせ先 :

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会
[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]