

第334回GC研究会特別講演会（2014年12月12日）

「安全・安心な生活と豊かな文化を支えるガスクロマトグラフィー」

QuEChERS法（クエッチャーズ法）を用いたGCによる食品中の残留農薬の分析

Restek Corporation

北見 秀明



Copyrights: Restek Corporation

RESTEK

Innovative Chromatography Products

www.restek¹om

目次

- Restekの簡単なお紹介
- QuEChERS法について
- GCによる分析について



Copyrights: Restek Corporation

弊社の概要

Restek Corporation

レステックコーポレーション

- 本社 ペンシルベニア州
ベルフォント
- 創業 1985年
- 従業員数 300名
- 従業員持株制度 (ESOP) 100%
- 代表取締役 : Bryan Wolcott
- 設立者 : Paul Silvis



Copyrights: Restek Corporation

RESTEK

Innovative Chromatography Products

www.restek.com **3**

弊社の主力製品 (QuEChERS : RESTEK Q-sep)



GC カラム

HPLC/UHPLC カラム



LC アクセサリ



リークディテクター
フローメーター



GC アクセサリ

その他の消耗品

Copyrights: Restek Corporation

目次

- Restekの簡単なお紹介
- QuEChERS法について
- GCによる分析について



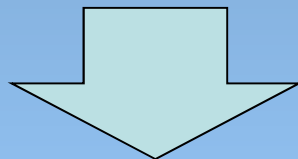
Copyrights: Restek Corporation

背景

平成18年5月（2006. 5.）

食品中に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度

残留基準がある農薬等
約250種から約800種へと拡大



より迅速で、より簡易的な

試料の前処理法と多成分同時分析法の必要性が高まる。
（ふるい分け＝スクリーニング検査）

食品に残留する農薬等の試験方法（厚生労働省の通知）2014. 10. 現在
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/>

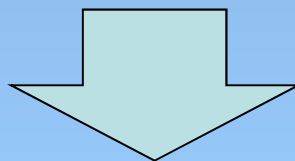
Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS法（クエッチャーズ法）“catchers” “キャッチャーズ”

Quick（迅速），**Easy**（簡単），**Cheap**（安価），
Effective（効率的），**Rugged**（高い耐久性），**Safe**（安全）

2003年に発表（オリジナル）

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck,
J. AOAC International, 86(2), 421-431 (2003)



試料の前処理法（QuEChERS法）
多成分同時分析法（GC-MS又はLC-MS/MSなど）

Copyrights: Restek Corporation

海外の公定分析法

2008年に発表（EU法：European EN 15662）

Foods of Plant Origin-Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and / or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction / Partitioning and Clean up by Dispersive SPE -QuEChERS method.

2007年に発表（AOAC法）

Pesticide Residues in Foods by Acetonitril Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

更なる改良法，試料の適用範囲の拡大が求められていて，その検討も国内外でなされている。

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERSの概略フロー

オリジナル (2003年)

試料10 g

↓

ACN : 10 mL

↓ 振とう1分

無水硫酸Mg : 4 g

塩化Na : 1 g

↓ 振とう1分

ISTD : 50 μ L添加

↓ 振とう30秒

↓ 遠心分離5分

固相抽出 (分散式)

EU法 (EN 15662) (2008年)

試料10 g

↓

ACN : 10 mL

ISTD : 100 μ L添加

↓ 振とう1分

無水硫酸Mg : 4 g

塩化Na : 1 g

クエン酸3Na : 1 g

クエン酸2Na : 0.5 g

↓ 振とう1分

↓ 遠心分離5分

固相抽出 (分散式)

AOAC法 (2007年)

試料15 g

↓

1%酢酸含有ACN : 15 mL

無水硫酸Mg : 6 g

無水酢酸Na : 1.5 g

ISTD 75 μ L添加

↓ 振とう1分

↓ 遠心分離1分

固相抽出 (分散式)

Copyrights: Restek Corporation

従来法とQuEChERS法の概略フローとその利点

従来法 (約60分/検体)

試料20 g



ACN : 45 mL



抽出



塩析 (ACNで100 mL
に定容する)



脱水



固相カラム精製

分析時間の短縮
(約3分の1)

溶媒量の削減
(約10分の1)

QuEChERS法 (約20分/検体)

試料10 g



ACN : 10 mL



**抽出・塩析・脱水
を同時に行う**



固相抽出 (精製)
(分散式)

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS（前処理操作の概略） Fig. 1～3

RESTEK Q-sep（レステック キューセップ）



Fig. 1 試料をホモジナイズする。

Fig. 2 試料を10 g, 50 mLチューブに分取する。

さらにアセトニトリルを10 mL加え、1分間激しく振とうする。

Fig. 3 試薬を振り混ぜる。（**試薬の秤量を必要としない＝検査キット**）

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS（前処理操作の概略） Fig. 4～6

RESTEK Q-sep（レステック キューセップ）



Fig. 4 抽出塩が入ったパッケージを開封する.

Fig. 5 抽出塩をチューブ内に加える.

Fig. 6 抽出塩をできるだけ全量加える.

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS（前処理操作の概略） Fig. 7～9

RESTEK Q-sep（レステック キューセップ）

Figure 7 Vortex or shake vigorously by hand for 1 minute.



Figure 8



Figure 9



Fig. 7 1分間激しく振とうし，内部標準物質（IS）を添加して，さらに30秒激しく振とうする。

Fig. 8 遠心分離（3000～3500 rpm）をする。

Fig. 9 上澄み液をdSPEチューブに分取する。

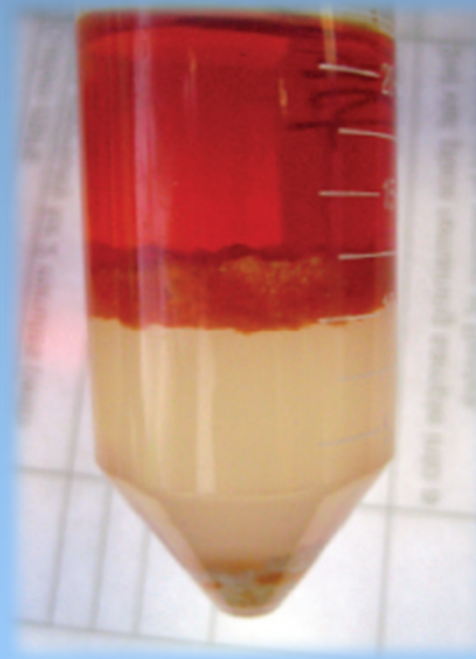
Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS法（試料の状態）

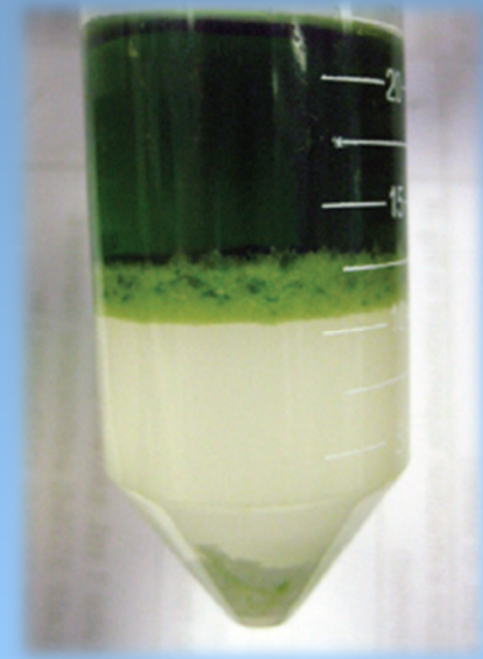
RESTEK Q-sep（遠心分離後， Fig. 8の後）



ホウレンソウ



赤とうがらし



キュウリ

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS（前処理操作の概略） Fig. 10～12

RESTEK Q-sep（レステック キューセップ）



Fig. 10 上澄み液を精製用充填剤が入ったdSPEチューブに分取した後に，1分間激しく振とうする.

Fig. 11 遠心分離（3000～3500 rpm）をする.

Fig. 12 上澄み液をバイアルに分取した後，機器分析（GC又はLCなど）を行う.

Copyrights: Restek Corporation

QuEChERS法の選択 (RESTEK Q-sep)

		AOAC法	EU法 (EN 15662)
<p>一般的な野菜・果物 セロリ, レタス, キュウリ, メロン</p> 		<p>Q-sep Q250 2 mL, 100-pk. Q-sep Q350 15 mL, 50-pk.</p>	<p>Q-sep Q210 2 mL, 100-pk. Q-sep Q370 15 mL, 50-pk.</p>
<p>脂質・ろう質を含む 野菜・果物 アボガド, ナッツ, 種, 乳製品, シリアル</p> 		<p>Q-sep Q251 2 mL, 100-pk. Q-sep Q351 15 mL, 50-pk.</p>	
<p>色素を含む野菜・果物 イチゴ, サツマイモ, トマト</p> 		<p>Q-sep Q352 15 mL, 50-pk.</p>	<p>Q-sep Q212 2 mL, 100-pk. Q-sep Q371 15 mL, 50-pk.</p>
<p>色素を多く含む野菜・果物 赤トウガラシ, ホウレンソウ, ブルーベリー</p> 		<p>Q-sep Q252 2 mL, 100-pk.</p>	<p>Q-sep Q213 2 mL, 100-pk. Q-sep Q372 15 mL, 50-pk.</p>

注) その他の改良法も取り揃えています。

Copyrights: Restek Corporation

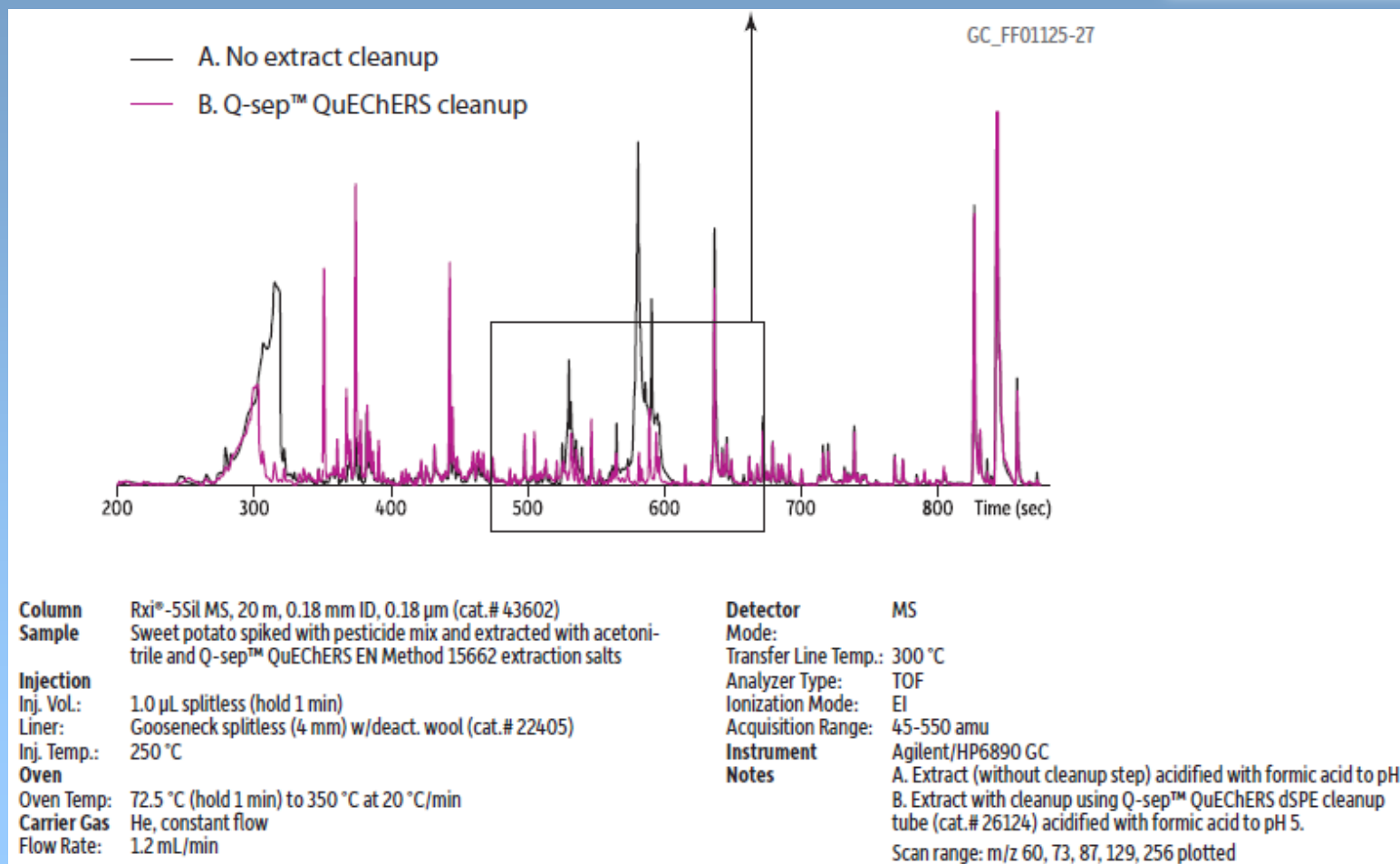
目次

- Restekの簡単なお紹介
- QuEChERS法について
- GCによる分析について



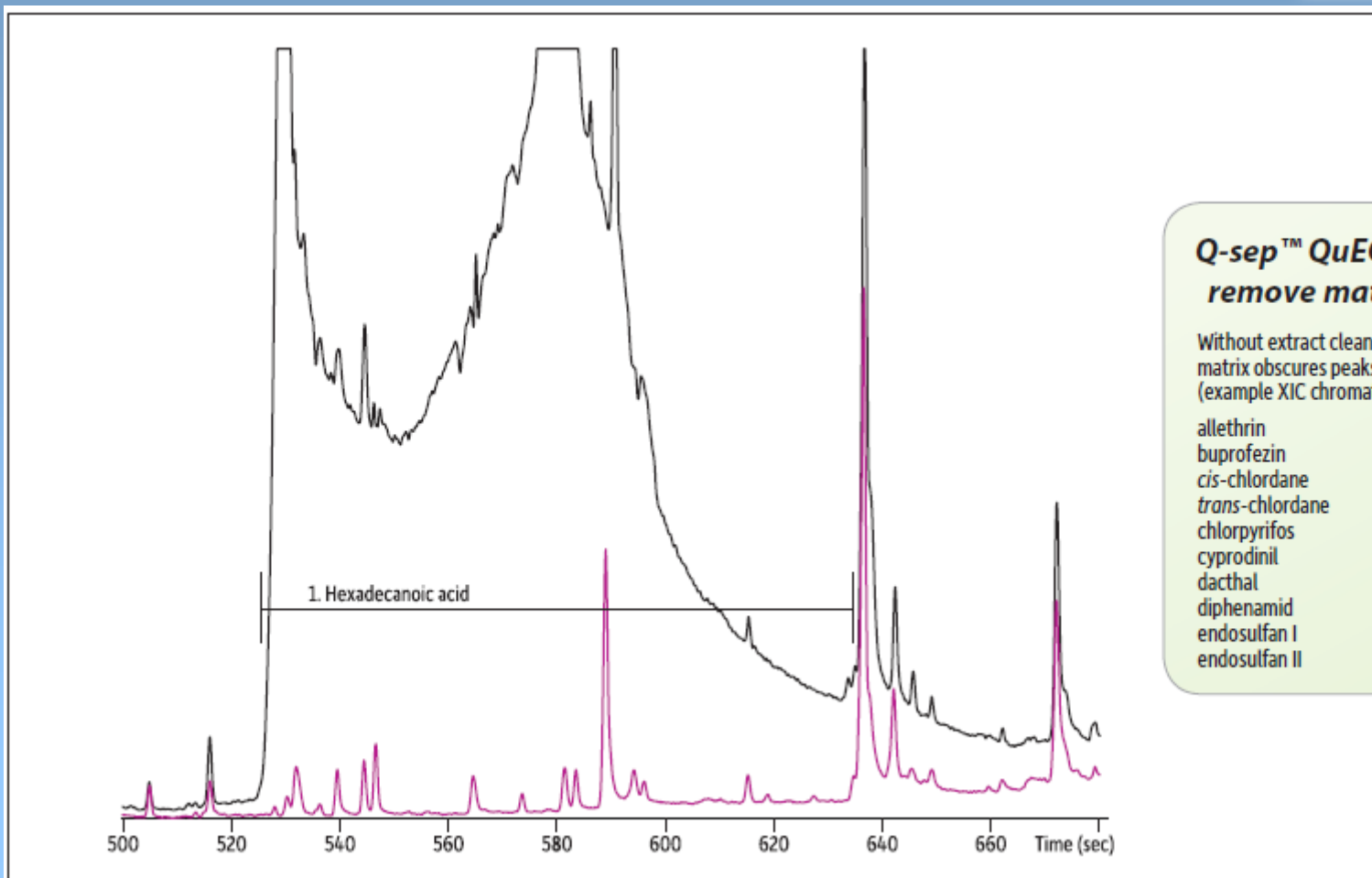
Copyrights: Restek Corporation

サツマイモ (Sweet Potato)



Copyrights: Restek Corporation

サツマイモ (Sweet Potato)



Q-sep™ QuEChERS tubes easily remove matrix interferences.

Without extract cleanup, hexadecanoic acid from the matrix obscures peaks for all the following pesticides. (example XIC chromatogram = endosulfan I)

allethrin	fenthion
buprofezin	metolachlor
cis-chlordane	myclobutanil
trans-chlordane	oxyfluorfen
chlorpyrifos	pendimethalin
cyprodinil	pentachlorothioanisole
dacthal	pirimiphos methyl
diphenamid	triadimefon
endosulfan I	triadimenol
endosulfan II	

Copyrights: Restek Corporation

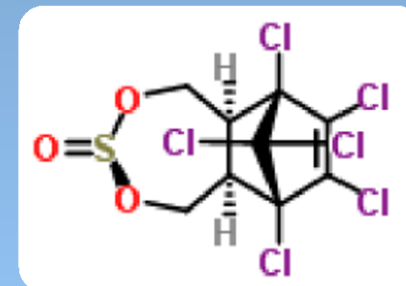
パルミチン酸 (palmitic acid)



IUPAC系統名：ヘキサデカン酸 (hexadecanoic acid)

融点63°C, 沸点351°C, 白色固体, 水に不溶, エーテル, ベンゼンには可溶, エタノールには難溶

エンドスルファン (Endosulfan)



化審法の第一種特定化学物質 (農薬類)

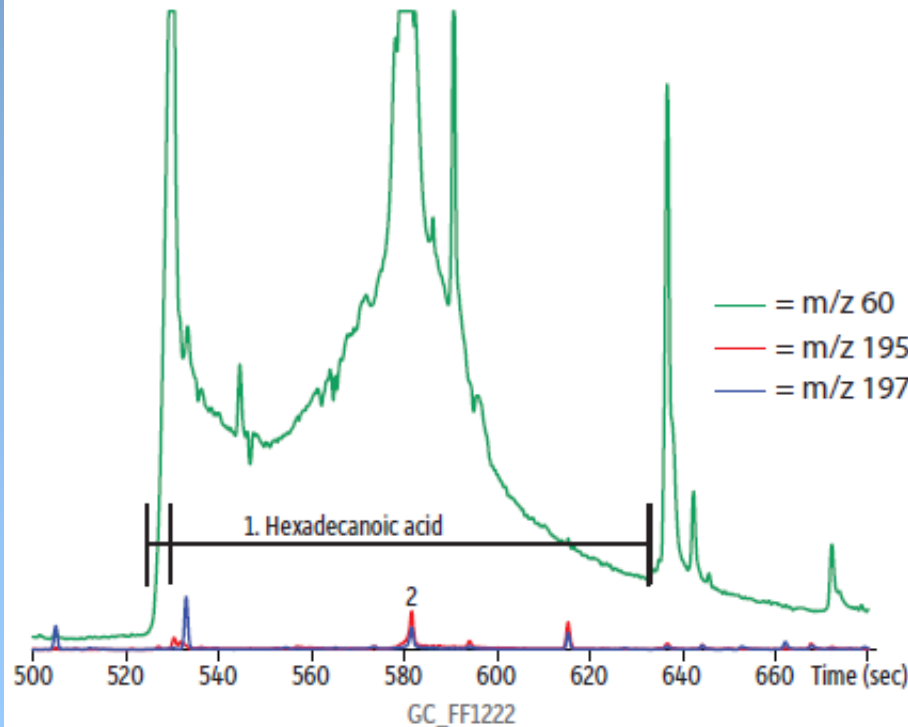
融点106°C, 沸点106°C, 黒褐色固体, 水に不溶, 芳香有機溶剤に可溶, エンドリン (Endrin) と類似

Copyrights: Restek Corporation

サツマイモ (Sweet Potato)



Without cleanup, matrix masks Endosulfan I.



Peak List
1. Hexadecanoic acid
2. Endosulfan I

Column: Rxi®-5Sil MS, 20 m, 0.18 mm ID, 0.18 µm (cat.# 43602)
Sample: sweet potato spiked with pesticide mix, extracted with acetonitrile and Q-sep™ QuEChERS EN Method 15662 extraction salts, then acidified with formic acid to pH 5
Inj.: 1.0 µL splitless (hold 1 min.), 4 mm single gooseneck liner with w/wool (cat.# 22405)
Inj. temp.: 250°C
Carrier gas: helium, constant flow
Flow rate: 1.2 mL/min.
Oven temp.: 72.5°C (hold 1 min.) to 350°C @ 20°C/min.
Det: TOFMS
Transfer line temp.: 225°C
Scan range: 45-550 amu, m/z 60, 195, 197 plotted
Ionization: EI
Instrument: Agilent 6890, LECO Pegasus III

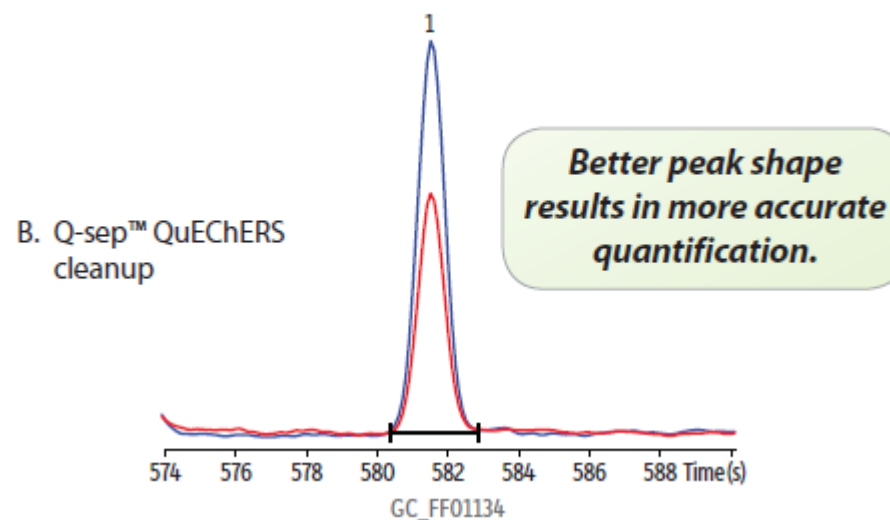
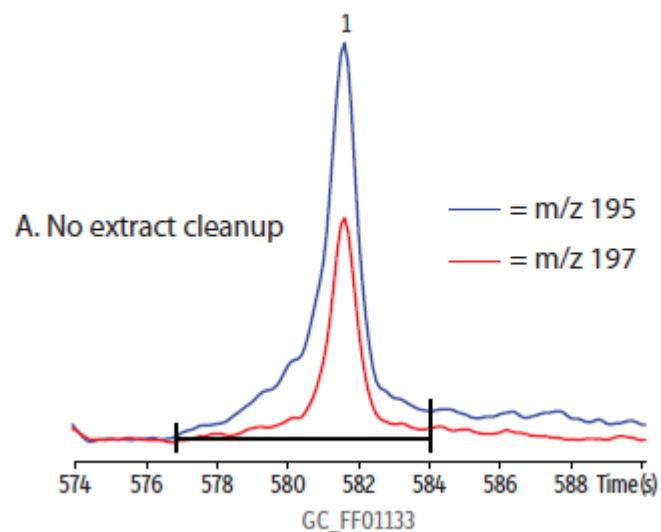
Copyrights: Restek Corporation

サツマイモ (Sweet Potato)



QuEChERS dSPE cleanup improves quantification and identification.

Peak Integration (extracted ion chromatograms)

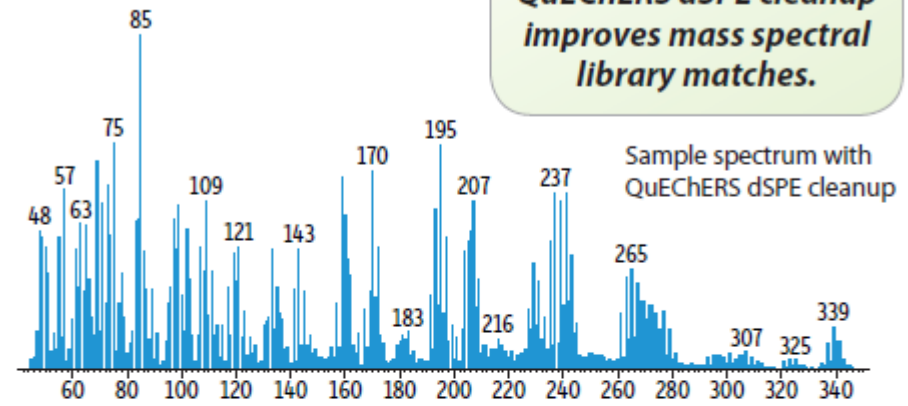
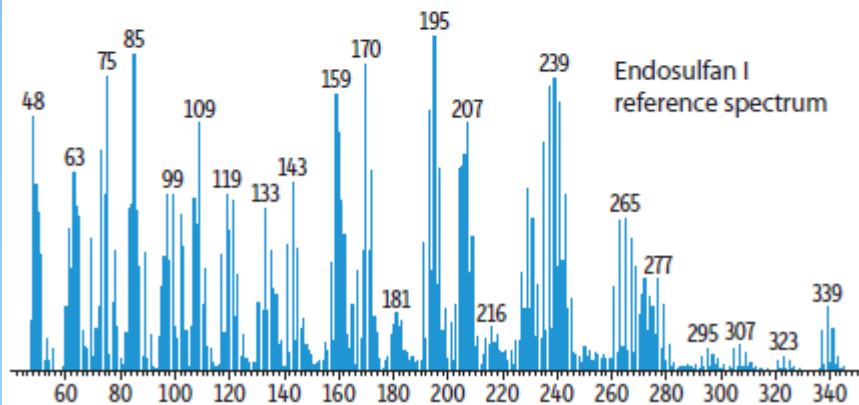
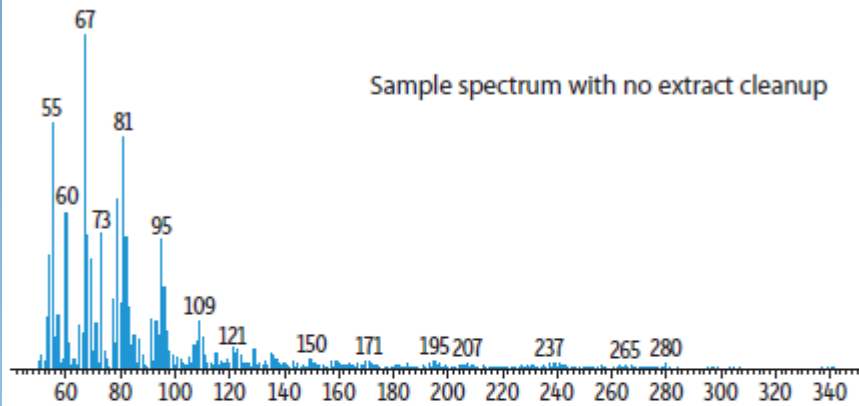


Copyrights: Restek Corporation

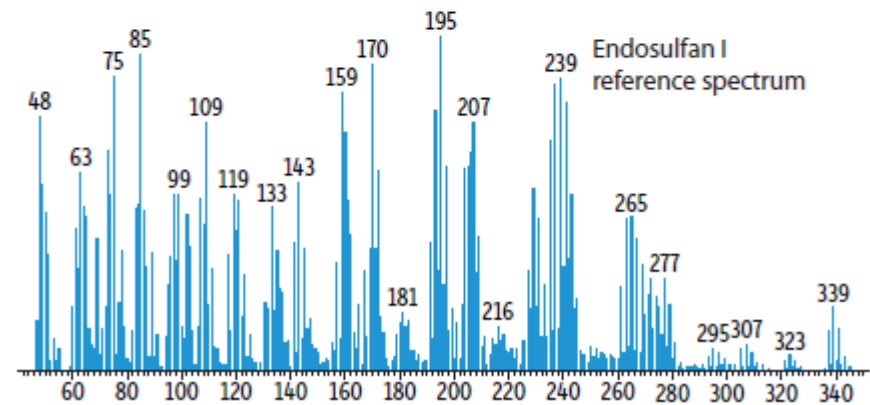
サツマイモ (Sweet Potato)



Spectral Identification



QuEChERS dSPE cleanup improves mass spectral library matches.



Copyrights: Restek Corporation

イチゴ (Strawberry)



添加回収率について (前処理条件)

Table I QuEChERS extraction and cleanup procedure for pesticides from strawberries.

Sample preparation and extraction

Sample:	10g of strawberries were homogenized and placed in a 50mL PTFE centrifuge tube (cat.# 26227)
Solvent:	10mL of acetonitrile were added to homogenate Shake for 1 minute, until uniform
Salts:	4.0g MgSO ₄ (powder or granular) 1.0g NaCl 1.0g trisodium citrate dihydrate 0.5g disodium hydrogencitrate sesquihydrate] (cat.# 26213) Salts were added and vigorously shaken for 1 minute. Sample was centrifuged and the supernatant removed for cleanup. Pesticides standards (200ng/mL) were spiked in at this point.

Sample extract cleanup

QuEChERS tubes:	1mL of supernatant from the previous step was placed into several 2mL polypropylene centrifuge tubes, each containing one of the following adsorbent mixes: A. 50mg PSA + 150mg MgSO ₄ (cat.# 26124) B. 50mg PSA + 150mg MgSO ₄ + 50mg C18 (cat.# 26125) C. 50mg PSA + 150mg MgSO ₄ + 50mg GCB (cat.# 26123)
Cleanup:	Samples were shaken with the adsorbents for 30 seconds (carbon for 2 minutes), then centrifuged to produce a clear supernatant for GC/MS analysis.
Internal standard:	Pentachloronitrobenzene in a formic acid solution, pH 5.
	PSA—primary and secondary amine exchange material. GCB—graphitized carbon black

Copyrights: Restek Corporation

イチゴ (Strawberry)

添加回収率について (分析条件)



Table II Instrument conditions.

Column:	Rtx [®] -CLPesticides2, 20m, 0.18mm ID, 0.14 μ m (cat.# 42302)
Sample:	custom pesticide mix, 200 μ g/mL each pesticide, internal standards: 8140-8141 ISTD, 1000 μ g/mL (cat.# 32279), 508.1 ISTD 100 μ g/mL (cat.# 32091), triphenylphosphate 1000 μ g/mL (cat.# 32281)
Inj.:	1.0 μ L splitless (hold 1 min.)
Inj. temp.:	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas:	helium
Flow rate:	constant linear velocity @ 40cm/sec
Oven temp.:	40 $^{\circ}$ C (hold 1 min.) to 320 $^{\circ}$ C @ 12 $^{\circ}$ C/min.
Det:	Shimadzu GCMS-QP2010 Plus
Transfer line temp.:	300 $^{\circ}$ C
Ionization:	Electron ionization
Mode:	Selected ion monitoring



Copyrights: Restek Corporation

精製用固相充てん剤の種類

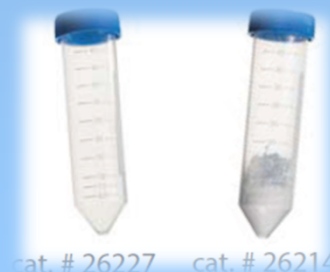


MgSO₄（硫酸マグネシウム）：水分の除去（脱水）

PSA（第1級・第2級アミン）：糖，脂肪酸，有機酸，色素等の除去

C18（オクタデシルシリカ：ODS）：疎水性の夾雑物の除去

GCB（グラファイトカーボン）：色素，ステロール等の夾雑物の除去



Copyrights: Restek Corporation

イチゴ (Strawberry)



添加回収率 (%) について

Table III Pesticide percent recoveries in strawberry extracts treated with C18 or GCB dSPE, relative to PSA only.

Rt (min.)	pesticide	CAS Number	action/use	classification	C18*	GCB**
9.50	dichlorvos	62-73-7	insecticide	organophosphorus	111	116
9.67	methamidophos	10265-92-6	insecticide	organophosphorus	105	107
11.75	mevinphos	7786-34-7	insecticide	organophosphorus	112	130
12.02	<i>o</i> -phenylphenol	90-43-7	fungicide	unclassified	106	97
12.14	acephate	30560-19-1	insecticide	organophosphorus	128	147
13.89	omethoate	1113-02-6	insecticide	organophosphorus	120	119
14.74	diazinon	333-41-5	insecticide	organophosphorus	108	127
14.98	dimethoate	60-51-5	insecticide	organophosphorus	124	151
15.69	chlorothalonil	1897-45-6	fungicide	organochlorine	125	13
15.86	vinclozolin	50471-44-8	fungicide	organochlorine	102	98
16.21	metalaxyl	57837-19-1	fungicide	organonitrogen	105	117
16.28	carbaryl	63-25-2	insecticide	carbamate	114	111
16.60	malathion	121-75-5	insecticide	organophosphorus	124	160
16.67	dichlofluanid	1085-98-9	fungicide	organohalogen	122	103
17.51	thiabendazole	148-79-8	fungicide	organonitrogen	88	14
17.70	captan	133-06-2	fungicide	organochlorine	88	91
17.76	folpet	133-07-3	fungicide	organochlorine	108	63

Copyrights: Restek Corporation

イチゴ (Strawberry)



添加回収率 (%) について

Table III Pesticide percent recoveries in strawberry extracts treated with C18 or GCB dSPE, relative to PSA only.

Rt (min.)	pesticide	CAS Number	action/use	classification	C18*	GCB**
18.23	imazalil	35554-44-0	fungicide	organonitrogen	115	95
18.39	endrin	72-20-8	insecticide	organochlorine	104	101
18.62	myclobutanil	88671-89-0	fungicide	organonitrogen	119	114
19.07	4,4-DDT	50-29-3	insecticide	organochlorine	102	95
19.22	fenhexamid	126833-17-8	fungicide	organochlorine	118	77
19.40	propargite 1	2312-35-8	acaricide	organosulfur	110	95
19.43	propargite 2	2312-35-8	acaricide	organosulfur	121	114
19.75	bifenthrin	82657-04-3	insecticide	pyrethroid	106	81
20.04	dicofol	115-32-2	acaricide	organochlorine	98	54
20.05	iprodione	36734-19-7	fungicide	organonitrogen	118	90
20.21	fenpropathrin	39515-41-8	insecticide	pyrethroid	113	96
21.32	<i>cis</i> -permethrin	52645-53-1	insecticide	pyrethroid	106	65
21.47	<i>trans</i> -permethrin	51877-74-8	insecticide	pyrethroid	109	71
23.74	deltamethrin	52918-63-5	insecticide	pyrethroid	97	52

*50mg PSA, 50mg C18, **50mg PSA, 50mg GCB

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{RRF C18 or GCB}}{\text{RRF PSA}} \times 100$$

Copyrights: Restek Corporation

第334回GC研究会特別講演会（2014年12月12日）

「安全・安心な生活と豊かな文化を支えるガスクロマトグラフィー」

ご清聴ありがとうございました

ご問い合わせは以下のメールアドレスまで

restekjapan@restek.com

URL: www.restek.com



Copyrights: Restek Corporation