

## 農作物中残留農薬一斉分析におけるアセトニトリルによる抽出効率の評価と検討

○小西賢治、土居恵子、栢木春奈、佐々野僚一（株式会社アイスティサイエンス）

### 【はじめに】

食の安心・安全を求める声が高まる中、食品中の残留農薬分析においてはより多くの農薬を効率よく早く正確に分析することが求められている。著者らは抽出操作に QuEChER 法<sup>1)2)</sup>、精製操作に固相カートリッジ法を用いて迅速一斉分析法 STQ 法を開発・評価している。

QuEChERS 法は多成分迅速一斉分析法として 2003 年に発表されて以降、現在ヨーロッパでは Official Method として採用されており、日本でも様々な分析機関で検討されている<sup>3)4)5)</sup>。

QuEChERS 法の特徴として試料 10g（穀物等の場合は試料 5g+水 10mL）に対してアセトニトリル 10mL を加え、遠心分離による液液分配後、定容せずに試験液としている。しかし試料によって遠心分離後に得られる抽出液の量が異なっている（図 1）。そこで本研究では試料中の残存アセトニトリルが与える影響について評価・検討を行った。ただし、本来の QuEChERS 法は前処理添加内標を用いており、残存アセトニトリルの液量は定量性に影響を与えないということを補足しておく。

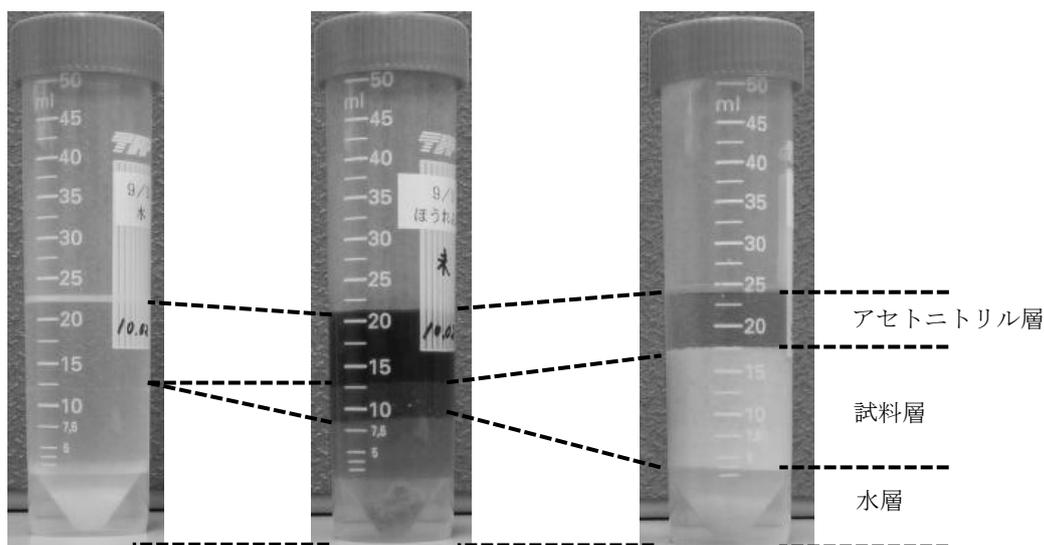


図 1 試料ごとの各層の比較（左から水、ほうれん草、大豆）

### 【実験方法】

#### 1. 試料

ほうれん草、大豆

ほうれん草はフードプロセッサーを用いて細断後、10g を秤量し試料中濃度 0.05ppm となるように農薬を添加し 30 分放置したものを試料とした。大豆はミルを用いて粉碎後、5g 秤量し試料中濃度 0.1ppm となるように農薬を添加し 30 分放置した後、水 10mL を加えて膨潤させたものを試料とした。

## 2. 対象農薬

GC/MS 対象農薬 57 成分および、ダイアジノン、フェニトロチオン、クロロピリホス、EPN、フェンバレーートの 5 成分の安定同位元素標識体 (D 標識体) を測定した。

## 3. 試薬及び標準品

農薬標準品：GC/MS 対象農薬混合標準品 22 (関東化学) を用い、安定同位元素標識体として PL 農薬サロゲート混合標準溶液 I (10 種類混合) (林純薬工業) を使用した。

その他試薬：食塩、クエン酸 3Na<sub>2</sub> 水和物、クエン酸水素 2Na<sub>1.5</sub> 水和物 (関東化学) 無水硫酸マグネシウム (和光純薬)

固相：Smart-SPE C18-30mg、Smart-SPE PLS3-10mg、  
Smart-SPE PSA-30mg(アイスティサイエンス)

## 4. 装置および測定条件

GC 注入口：大量注入口装置 LVI-S200(アイスティサイエンス)

注入口温度：70°C(0.3min)-120°C/min-240°C(0min)-50°C/min-290°C(38min)

注入量：25μL

GC：6890N(Agilent)、MS：JMS-Q1000GC(JEOL)

カラム：BPX5 0.25mm i.d.×30m, 膜厚0.25μm(SGE)

カラム温度：60°C(4min)-20°C/min-160°C-5°C/min-220°C-3°C/min-235°C-7°C/min-310°C(8min)

キャリアガス：コンスタントフロー 1.2mL/min

スプリット流量：150mL/min(0.25min)-0mL(4min)-30mL/min

## 5. 実験方法

試料 10 g (大豆は 5g+水 10mL) を 50mL 遠沈管に量りとりアセトニトリル 10mL を添加した。ジェネレーターを用いてホモジナイズした。塩化ナトリウム 1g、クエン酸 3Na・2 水和物 1g、クエン酸水素 2Na・1.5 水和物 0.5g、無水硫酸 Mg 4g を加えて 1 分間振とうし、遠心分離を行った。上澄みを試験液として 0.5g 分取し、水 0.2mL を添加して固相 C18-30mg に通した。固相 C18-30mg をアセトニトリル - 水 (4 : 1) 1mL で洗浄し、先の液と合わせた。得られた液に水 2mL を添加し、固相 PLS3-10mg に通した。流出液に 15% 食塩水 20mL を添加して先ほど使用した固相 PLS3-10mg に再添加し、流出液は捨てた。固相 PLS3-10mg を 3 分間吸引乾燥させた。固相 PLS3-10mg 下に固相 PSA-30mg を連結しアセトン-ヘキサン (15 : 85) 1mL で溶出させた。0.1% PEG300+1ppm フェナントレン-D 体/アセトン 20uL 添加して 1mL に定容し試験液とした。GC-MS に 25uL 注入し、測定を行った。

## 【評価検討】 (図 2)

### A. 通知法による抽出<sup>6)7)</sup> (精製は下記フローの通り行った。)

大豆 10g に水 20mL を添加し、アセトニトリル 50mL 添加した。ジェネレーターでホモジナイズし、吸引ろ過を行った。残渣にアセトニトリル 20mL を追加し、再度吸引ろ過を行った。得られた抽出液を 100mL に定容した。抽出液 1mL を分取し固相による精製を行い、GC-MS に 50uL 注入し、測定を行った。①秤量後、②定容後、③測定直前 (精製後) に試料中濃度 0.1ppm となるように農薬を添加し、添加回収試験を行った。

### B. QuEChERS 法を元に抽出液量を 20mL に変化させた場合

QuEChERS 法を元に抽出溶媒量のみを変化させて実験を行った。大豆 5g に水 10mL を添加し、アセトニトリル 20mL で抽出を行った。抽出液 1mL を分取し固相による精製を行い、GC-MS に 25uL 注入し、測定を行った。①秤量直後、②遠心分離後、③測定直前 (精製後) に試料中濃度 0.1ppm となるように農薬を添加し、添加回収試験を行った。

### C. QuEChERS 法を元に 2 段階抽出を行い 20mL に定容した場合

大豆およびほうれん草で QuEChERS 法を元にアセトニトリル 10mL で抽出を行い、残渣にアセトニトリルを大豆 13mL、ほうれん草 11.5mL 追加して再度抽出を行い、得られた抽出液を合わせて 20mL に定容した。抽出液 1mL 分取し固相による精製を行い、GC-MS に 25uL 注入し、測定を行った。①秤量後、②定容後、③測定直前 (精製後) に試料中濃度 0.1ppm となるように農薬を添加し、添加回収試験を行った。

### D. 前処理添加内標による補正<sup>8)</sup>

大豆 5g を水 10mL で膨潤させた試料にアセトニトリル 10mL で添加を行った。抽出液 0.5mL を分取し固相による精製を行い、GC-MS に 25uL 注入し、測定を行った。秤量後に試料中濃度 0.1ppm となるように農薬および内標 (以下、前処理添加内標) を添加し、添加回収試験を行った。添加した 5 種の安定同位元素標識体の内、今回の手法で最も安定であると思われるダイアジノン (D 標識体) を用いて前処理添加内標による補正を行ったが、補正に用いる前処理添加内標の検討は必要であると思われる。

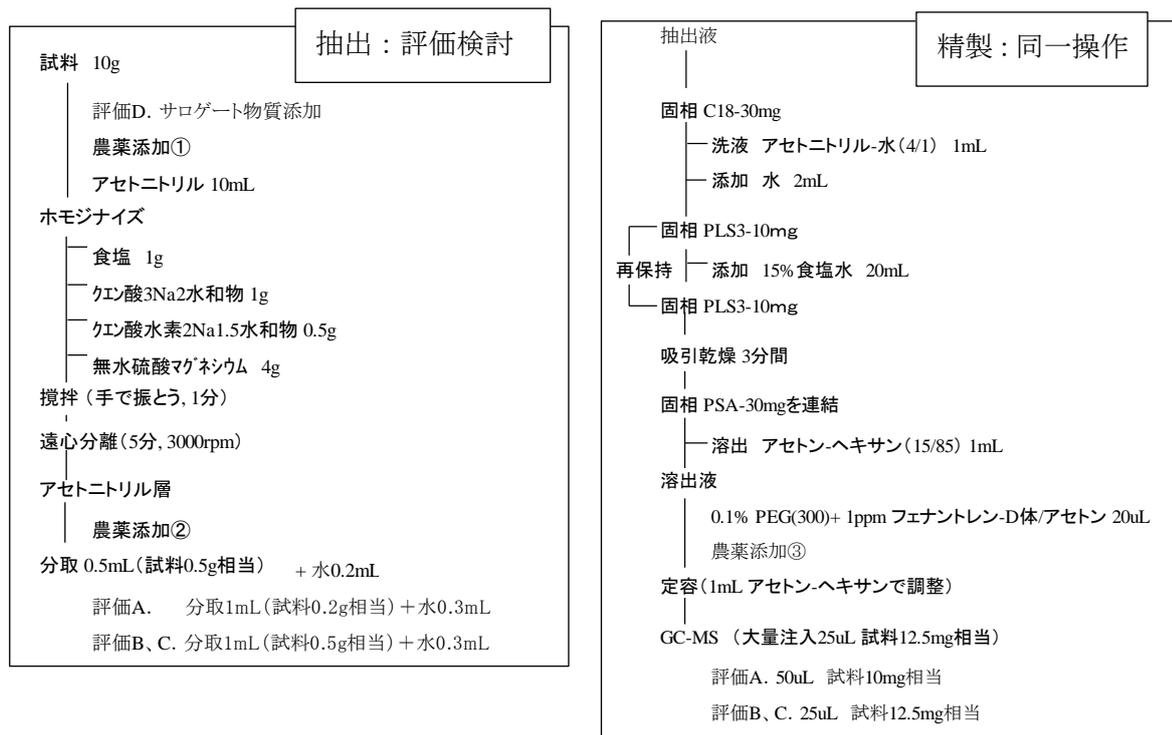


図 2 前処理フロー

### 【理論値による抽出効率の計算】

QuEChERS 法は試料 10g に対してアセトニトリル 10mL で抽出を行っている。しかし、遠心分離後に得られる抽出液量は作物によって異なり、ほうれん草では 8.5mL、大豆では 7mL の抽出液が得られる。残りのアセトニトリルは試料層に含まれると考えられ、得られた抽出液と試料層中のアセトニトリルは均一化されているものとする。QuEChERS 法の回収率が 100%、70%、50%、30%それぞれの場合について、①QuEChERS 法、②通知法による抽出を行ったもの、③QuEChERS 法を元にアセトニトリル 20mL で抽出操作を行ったもの、④QuEChERS 法を元に 2 段階抽出を行い 20mL に定容したもの、Nernst の分配法則（式 1）を用いて抽出効率を算出した。また抽出効率のみを比較するため精製での損失は無いものとする。（回収率=分配効率として計算を行った。）

$$\begin{aligned}
 \text{分配係数 } K(\text{一定}) &= \frac{\text{上澄み中の濃度}}{\text{試料層ACN中の濃度}} \\
 &= \frac{\frac{\text{抽出液中の量}}{\text{抽出液の量}}}{\frac{\text{試料層} + \text{ACN中の農薬量}}{\text{添加液量} - \text{抽出液量}}}
 \end{aligned}$$

式 1 Nernst の分配法則

QuEChRES抽出 (0.5mL分取)	通知法抽出 (1mL分取)	ACN20mL抽出 (1mL分取)	再抽出後定容 (1mL分取)
100.0	98.0	100.0	94.4
70.0	92.0	82.4	81.7
50.0	83.1	66.7	67.5
30.0	66.1	46.2	47.1

表 1 各抽出操作による抽出効率（理論値）

QuEChRES 法による抽出操作と比較すると、アセトニトリル 20mL で抽出したもの、さらに通知法による抽出操作の方が、農薬の回収率（=抽出効率）がより向上することが分かる（表 1）。特に QuEChERS 法で低回収率の成分ほどその傾向が顕著に表れると考えられる。しかし、QuEChERS 法は抽出に塩析効果を用いており、その点を考慮に入れずに計算を行ったため、実際の挙動とは異なる可能性がある。

また、前処理添加内標を用いることで、上記の抽出操作、および精製操作による損失を補正することができる。前処理添加内標として使用する物質は農薬と同様の挙動を示すことが望ましいため、各成分の安定同位元素標識体が最も適している。しかし、全成分に前処理添加内標を用いることは容易でないため、補正するための前処理添加内標の選別も必要であると考えられる。

## 【結果と考察】

### 1. QuEChERS 法による遠心分離後の抽出液量

QuEChERS 法では試料によって遠心分離後の抽出液量が異なっていた。ほうれん草ではアセトニトリル層が 8.5mL 得られたのに対し、大豆ではアセトニトリル層が 7mL 得られたことから、抽出液の一部が試料層に残存していると考えられる。添加アセトニトリル量を 10mL から 20mL へ増加させた場合でも、試料層への抽出液残存量に変化は見られなかった。

また抽出液を分取し、再度アセトニトリルを添加後、振とう及び遠心分離を行った結果、追加した量のアセトニトリルがほぼ全量得られた。このことから、試料層への抽出液残存量は一定であると考えられる。

### 2. QuEChERS 法による添加回収試験

ほうれん草および大豆を用いて QuEChERS 法による抽出後、固相で精製した。①秤量直後、②遠心分離後、③測定直前（精製後）に試料中濃度 0.05ppm（ほうれん草）、0.1ppm（大豆）となるように農薬を添加し、添加回収試験を行った。回収率分布を以下に示した（図 3）。ほうれん草では成分の多くが 80~100% で良好な回収率を得られた。大豆では 70~80% の回収率だったものが多く、次いで 50~70% の範囲、特に 65% 以上の回収率の物が多かった。

そこで、大豆の方が抽出操作による回収率の変化が大きいと考え、大豆を用いて抽出操作の評価、検討を行った。

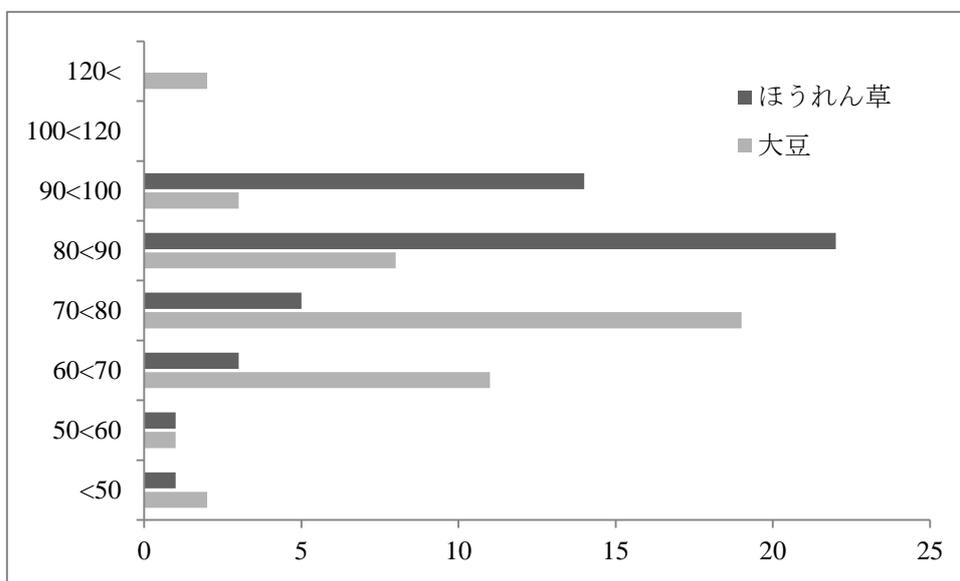


図 3 QuEChERS 抽出による回収率一覧

### 3. 各操作による添加回収試験結果

A. 通知法による抽出

B. QuEChERS 法を元に抽出液量を 20mL に変化させた場合

C. QuEChERS 法を元に 2 段階抽出を行い 20mL に定容した場合

D. 前処理添加内標による補正 (QuEChERS 法による抽出)

A、B、C それぞれの回収率分布を以下に示す (図 4)。また、参考までに通常の QuEChERS 法を抽出操作に用いた際の結果も示す。D. 前処理添加内標による補正を行ったものが最も回収率が良く、次いで A. 通知法による抽出、B. 20mL 抽出、C. 20mL 定容という結果が得られた。また、いずれの場合も QuEChERS 法による抽出と比較すると全体的に回収率が向上した。これは前述の理論値による回収率 (=抽出効率) と同様の傾向が見られた。

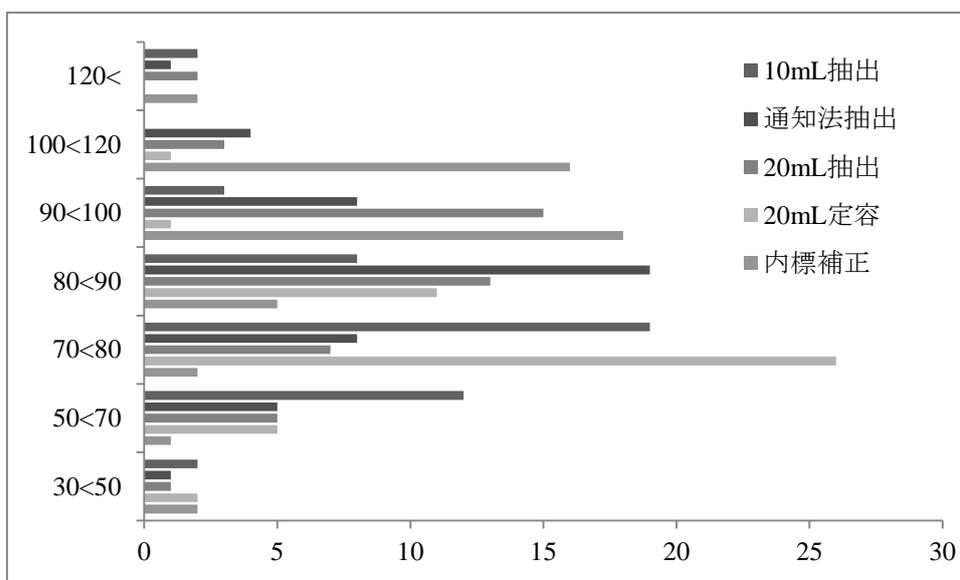


図 4 各抽出法による回収率分布 (大豆)

## 【まとめ】

試料としてほうれん草、大豆を用いて STQ 法で添加回収試験を行った（表 2）。ほうれん草では、ほとんどの農薬について回収率が 70%を超える良好な結果が得られた。大豆についても多くの農薬で 70%以上という回収率が得られ、妥当性評価の要項を満たしている。70%以下の成分についてもほとんどの回収率が 50%以上であったため、スクリーニング試験として十分な精度を持っていると考えられる。ほうれん草に比べ大豆の方が遠心分離後に得られる抽出液量が少なく、また回収率も低い傾向にあった。

そこで、大豆を用いて QuEChERS 法による抽出、通知法による抽出、QuEChERS 法を元に抽出溶媒量を 20mL に変化させたもの、QuEChERS 法を元に 2 段階抽出を行い 20mL に定容したもの、前処理添加内標による補正を行ったものについて添加回収試験を行い、回収率を算出して比較した（図 4）（表 2）。従来の STQ 法（QuEChERS 抽出）で回収率が 50%以上 70%未満の成分について注目すると、抽出工程を変化させることで、回収率が向上する成分があり、これは前述の理論値と同様の傾向が見られたと考えられる。分析機関が求める精度と迅速さのバランスで抽出工程を選択できればよいのではないかと考える。

また抽出工程を変化させずとも、前処理添加内標を用いることで操作のばらつきを補正し正確な分析値が得られ、結果として全体の回収率を向上させることができた。前処理添加内標を用いる成分については今後、さらに検討が必要であると考ええる。

## 【参考文献】

- 1) QuEChERS.com (<http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=1&nav2o=0&nav3o=0>)
- 2) Michelangelo Anastassides et al., *JAOAC Int.*, 86, 412-431 (2003)
- 3) M. Okihashi, Y. Kitagawa, et al., *J Pesticide Sci.*, 30, 368-377 (2005)
- 4) M. Okihashi, Y. Kitagawa, et al., *Food* 1, 101-110 (2007)
- 5) 永井雄太郎ら、第 30 回農薬残留分析研究会講演要旨集、102-114
- 6) 厚生労働省 HP GC/MS による農薬等の一斉試験法（農作物）  
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/3-001.html>)
- 7) 石井里枝ら、埼玉衛研所報 第 43 号、36-49 (2009)
- 8) 上野英二、食衛誌, Vol.49, No.5, J309-J313 (2008)

化合物名	ほうれん草		大豆				
	QuEChERS 抽出	20mL定容	QuEChERS 抽出	20mL抽出	20mL定容	通知法抽出	内標補正
	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)
Acrinathrin	98.5	112.8	128.5	127.9	94.5	107.8	112.6
Benfuresate	83.7	84.1	78.1	94.2	82.7	91.8	107.9
Cadusafos	90.2	86.8	80.3	96.1	81.5	93.1	104.1
Chlorobenzilate	91.3	87.3	79.8	91.0	76.9	90.3	94.2
Chlorpropham	95.9	92.0	86.5	105.9	84.8	100.9	104.8
Chlorpyrifos	89.7	90.9	79.0	89.1	79.9	84.7	89.9
Cyfluthrin-2	95.6	98.0	93.5	99.5	83.8	92.2	107.8
Cyfluthrin-3	91.0	91.9	86.7	91.4	74.2	85.5	104.3
Cyfluthrin-4	82.4	71.9	78.0	78.6	64.4	82.4	90.3
Cyproconazole-1	82.1	77.1	75.0	88.5	78.0	85.4	103.9
Cyproconazole-2	83.0	79.3	72.1	89.6	77.0	81.4	104.1
Diazinone	83.6	90.0	76.2	86.0	82.3	88.6	100.3
Difenoconazole-1	89.5	85.6	78.9	79.3	74.4	78.2	94.9
Edifenphos	89.6	93.6	77.3	86.0	76.8	74.9	96.7
EPN	99.6	98.5	95.7	119.7	87.8	118.2	108.2
EPTC	78.1	79.1	69.3	90.7	72.9	79.5	94.5
Esprocarb	90.6	98.2	78.8	88.4	80.2	87.4	90.8
Etrimfos	83.6	87.7	75.0	85.7	77.5	86.1	96.3
Fenitrothion	89.2	94.8	84.4	95.8	85.9	104.6	109.7
Fenobucarb	82.0	77.0	78.2	99.8	80.1	86.2	101.9
Fenthion	55.1	79.4	62.7	61.6	61.4	68.3	66.2
Fenvalerate-1	88.8	96.8	77.2	79.5	75.8	77.4	90.9
Fenvalerate-2	84.9	83.7	73.4	72.8	70.1	79.6	92.3
Fosthiazate-1	73.7	75.7	73.6	99.1	76.2	83.6	97.1
Fosthiazate-2	71.4	71.0	71.7	98.0	72.6	81.4	96.9
Halfenprox	79.9	81.2	54.6	57.0	61.6	51.9	71.5
Iprodione	89.6	104.1	124.1	137.1	115.6	140.2	124.3
Mepronil	93.0	91.0	67.6	87.8	85.0	99.9	120.6
Myclobutanil	82.2	83.3	81.0	95.6	77.4	84.7	107.0
p,p'-DDD	90.9	92.1	69.9	76.3	73.7	74.7	81.8
Parathion	89.8	93.3	86.1	95.4	79.9	93.1	105.1
Parathion-methyl	91.6	94.8	90.0	104.6	84.9	98.5	115.3
Pendimethalin	94.0	89.2	76.6	88.2	75.0	84.5	91.3
Permethrin-cis	87.8	84.2	62.6	61.2	64.7	57.2	77.9
Permethrin-trans	95.4	93.1	68.0	66.9	67.5	64.0	80.3
Phenthoate	86.9	85.7	68.9	74.9	76.4	89.7	113.8
Pirimicarb	35.1	30.3	35.2	58.5	32.1	63.2	41.7
Prothiophos	88.8	92.9	65.7	75.5	72.5	71.2	82.1
Pyraclofos	89.4	83.0	85.2	89.2	73.8	88.2	90.5
Pyrifenox-1	63.2	69.9	67.4	90.1	71.8	86.6	92.0
Pyrifenox-2	66.9	76.1	66.7	90.2	73.4	89.2	93.4
Pyriproxyfen	93.6	89.2	79.5	88.2	76.1	85.5	91.2
Silafluofen	61.0	63.0	41.5	40.9	44.5	34.0	49.4
Tebuconazole	79.5	79.1	69.9	83.7	73.5	82.5	99.1
Tebufenpyrad	89.6	79.6	71.8	80.8	71.5	79.6	83.4
Thiobencarb	89.2	91.5	84.0	96.3	79.1	90.5	92.0

表2 各手法による添加回収試験結果一覧 (ほうれん草、大豆)