



農作物中残留農薬一斉分析における アセトニトリル抽出液の評価と検討

○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

AiSTI SCIENCE

背景 | QuEChERS法による抽出

- ◆ STQ法は、抽出操作にQuEChERS法、精製操作に固相カートリッジ法を用いた独自の迅速一斉分析法である。
- ◆ QuEChERS法による抽出を行ったところ、作物によって得られる抽出液量（アセトニトリル層）が異なった。
- ◆ 試料中の残存アセトニトリルは作物によって異なる。
- ◆ 抽出液の一部が試料の隙間に入り込んでおり、試料層中の残存アセトニトリルと抽出液は均一化していると考えられる。

検討 | 発表概要

① 作物ごとの抽出液の比較

抽出：QuEChERS法

試料：ほうれん草、大豆

ほうれん草



水分量92%

大豆



水分量13%

② 添加回収試験による抽出法の検討

A：通知法抽出、B：QuEChERS抽出（20mL抽出）、

C：QuEChERS抽出（20mL定容※）、D：QuEChERS抽出（前処理前内標添加）

※10mLで抽出後、再抽出を行い定容

③ 残存アセトニトリル中の農薬残留量の調査

振り戻し試験による残存アセトニトリル中の農薬残留量の調査

測定成分 | 試薬等

<測定成分>

- ◆ GC-MS対象農薬 57成分
GC-MS対象農薬混合標準液22 (関東化学)
- ◆ 安定同位元素標識体 (D標識体) 5成分
PL農薬サロゲート混合標準溶液 I (林純薬工業)

<試薬等>

- ◆ 塩化Na、クエン酸3Na2水和物、クエン酸2Na1.5水和物 (関東化学)
- ◆ 無水硫酸Mg (和光純薬)
- ◆ Smart-SPE C18-30mg、Smart-SPE PLS3-10mg、
Smart-SPE PSA-30mg (アイスティサイエンス)

装置 | 測定条件

GC注入口：大量注入口装置LVI-200（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：25uL、50uL

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

カラム：BPX5 0.25mm i.d.×30m, 膜厚0.25um（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)-50mL/min(6min)-20mL/min

実験方法 | 抽出フロー

QuEChERS抽出

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)

— アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

— NaCl (食塩) 1g

クエン酸3Na2水和物 1g

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

撈拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

抽出液

この部分を変化させて
抽出操作による比較・検討
を行った。

実験方法 | 精製フロー

分取 0.5, 1.0 mL

— 添加 水

Smart-SPE C18-30 mg : 精製

— 洗液 アセトリル-水(4/1) 1mL

流出液

— 添加 水 2mL

Smart-SPE PLS3-10mg : 保持

— 15%食塩水 20mL

Smart-SPE PLS3-10mg : 再保持

吸引乾燥 : 3分

連結 Smart-SPE PSA-30mg : 精製

— 溶出 アセト-ハクソ (15/85) 1mL

溶出液

定容 (1 mL, アセト/ハクソで調製)

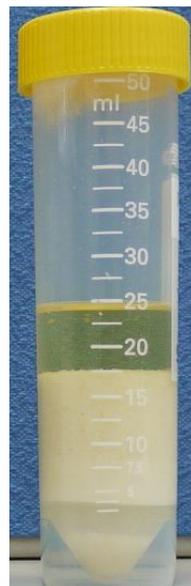
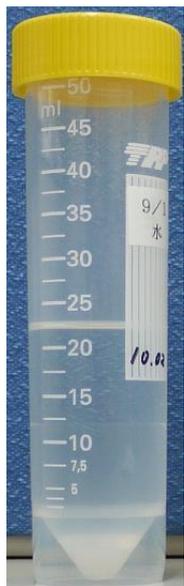
GC/MS (大量注入25 uL , 50 uL)

◆ 精製フローは同一

◆ GC-MSへの注入量は抽出法によって変更

検討① | 作物ごとの抽出液の比較

水 ほうれん草 大豆



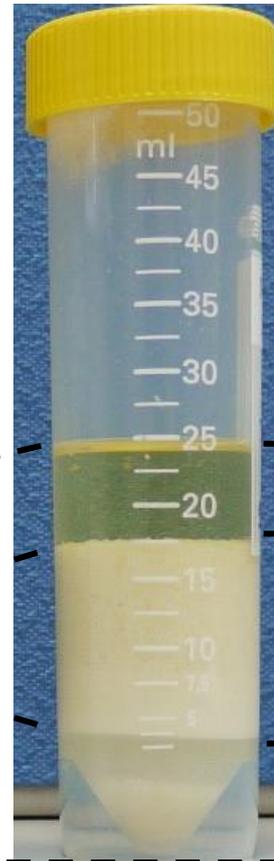
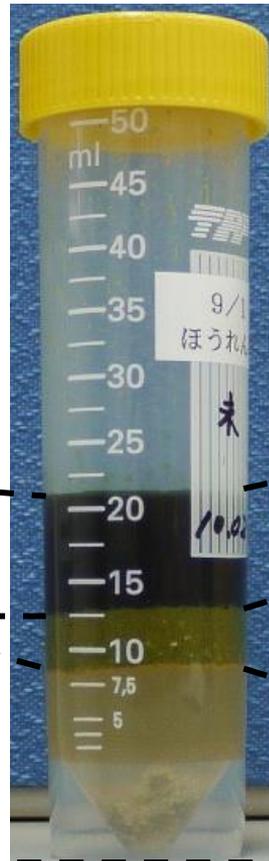
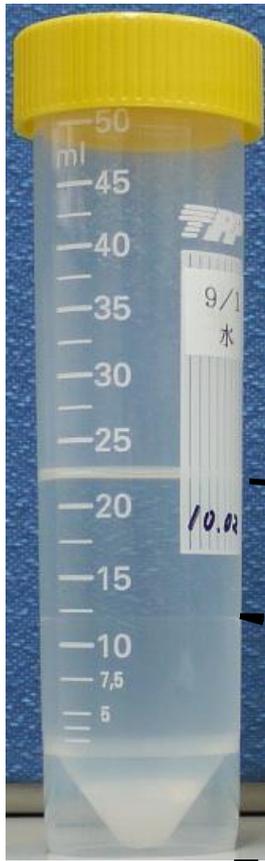
- ◆ 遠心分離後の抽出液量(アセトニトリル層) は試料によって異なる。
- ◆ ほうれん草抽出液は8.5mL程度
- ◆ 大豆抽出液は7mL程度
- ◆ 水試料の抽出液は10mL程度

検討① | 抽出液写真拡大

水

ほうれん草

大豆

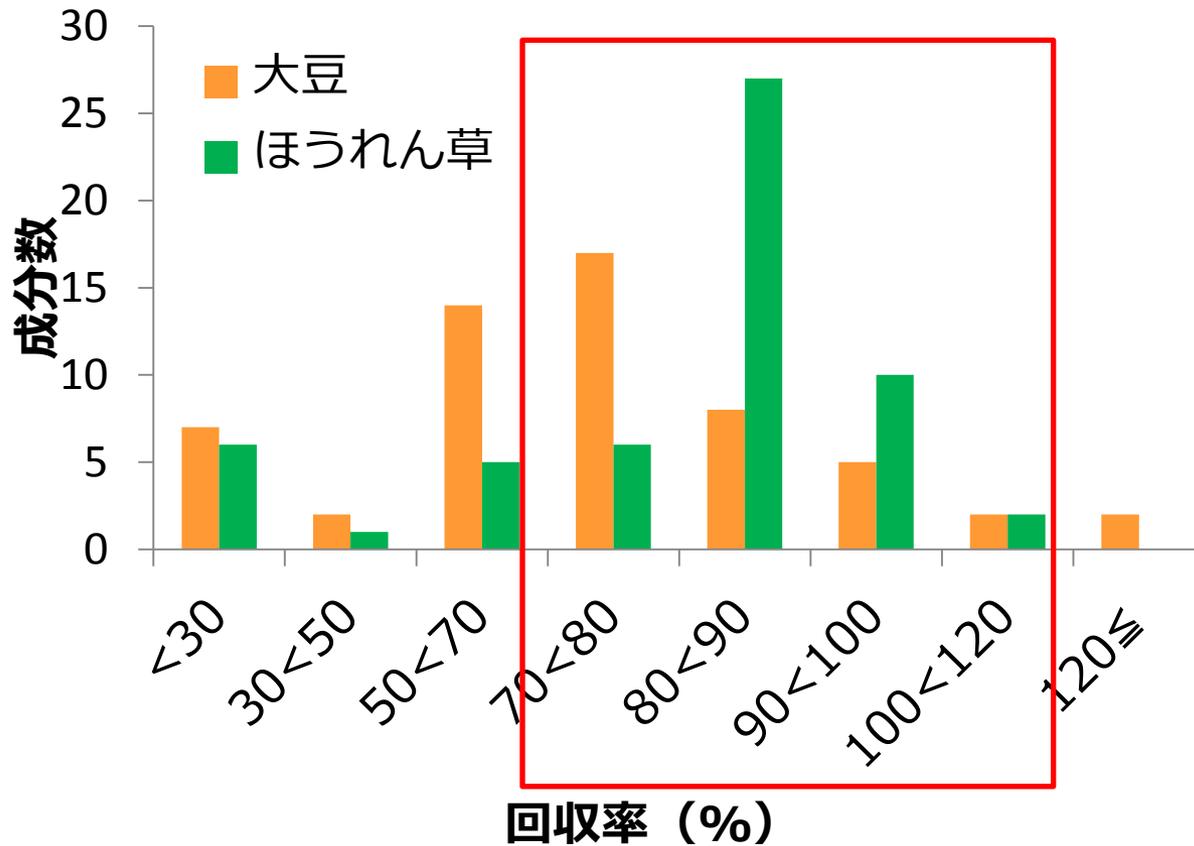


ACN層

試料層

水層

検討① | 添加回収試験



ほうれん草は
良好な結果



以降の検討は
大豆を使用

大豆、ほうれん草の添加回収試験の回収率分布

検討② | 添加回収試験における抽出法の検討

	試料量※1	抽出溶媒量	定容	分取	注入量	試料相当量
QuEChES法抽出	10g	10mL	無し	0.5mL	25uL	12.5mg
A.通知法抽出	20g	50mL + 20mL	100mL	1mL	50uL	10mg
B.QuEChERS法 (20mL抽出)	10g	20mL	無し	1mL	25uL	12.5mg
C.QuEChERS法※2 (20mL定容)	10g	10mL ×2	20mL	1mL	25uL	12.5mg
D.QuEChERS法 (内標補正)	10g	10mL	1 : 1	0.5mL	25uL	12.5mg

※1 大豆の場合試料5g+水10mL

※2 10mLで抽出後再抽出を行い定容

抽出法の検討のため、精製は同一の操作を行った。

検討② | 精製フロー

精製法

抽出法

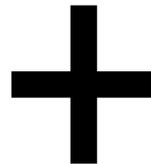
QuEChERS抽出

A : 通知法抽出

B : QuEChERS (20mL抽出)

C : QuEChERS (20mL定容)

D : QuEChERS (内標補正)



分取 0.5, 1.0 mL

— 添加 水

Smart-SPE C18-30 mg : 精製

— 洗液 アセトリル-水(4/1) 1mL

流出液

— 添加 水 2mL

Smart-SPE PLS3-10mg : 保持

— 15%食塩水 20mL

Smart-SPE PLS3-10mg : 再保持

吸引乾燥 : 3分

連結 Smart-SPE PSA-30mg : 精製

— 溶出 アeton-ハキソ (15/85) 1mL

溶出液

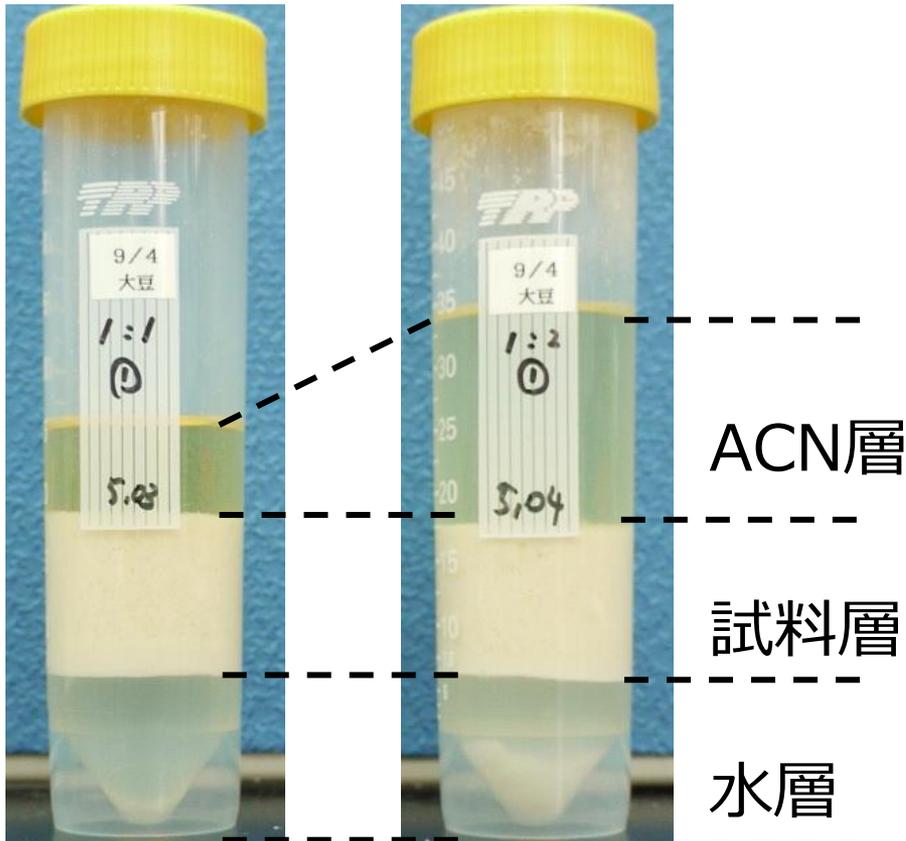
定容 (1 mL, アeton/ハキソで調製)

GC/MS (大量注入25, 50 uL)

検討② | 試料中ACN残存量 (大豆)

ACN10mL

ACN20mL

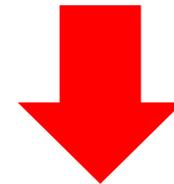


ACN量を20mLに増加

- ◆ 水層、試料層に変化なし
- ◆ 抽出液量はほぼ10mL増加

抽出液を取り出して再抽出

- ◆ 再添加量がほぼ全量得られる



残存アセトニトリル量は一定

検討② | 抽出効率

<Nernstの分配法則>

$$\text{分配係数}K = (\text{一定}) = \frac{\text{上澄み中の濃度}}{\text{試料層}ACN\text{中の濃度}}$$

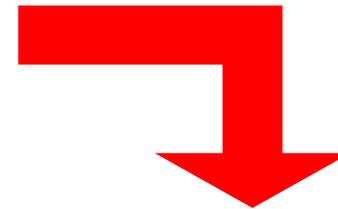
$$= \frac{\text{抽出液中の量}}{\text{抽出液の量}}$$

$$= \frac{\text{試料層} + ACN\text{中の農薬量}}{\text{添加液量} - \text{抽出液量}}$$

<仮定>

抽出効率 = 回収率

QuEChERS抽出を基準



QuEChERS抽出	A : 通知法抽出	B : 20mL抽出	C : 20mL定容
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

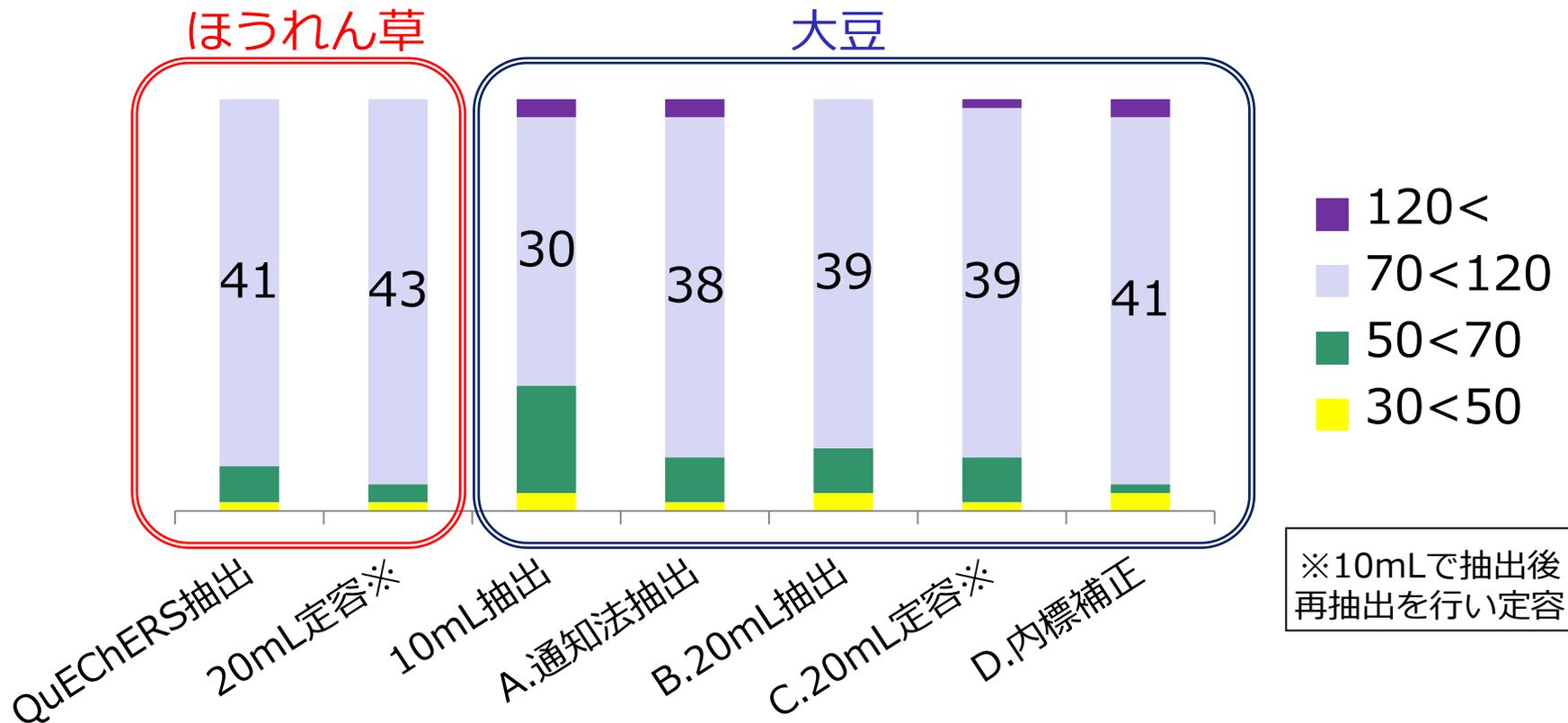
検討② | 添加回収試験

化合物名	ほうれん草		大豆				
	QuEChERS	20mL定容	QuEChERS	A	B	C	D
	抽出		抽出	通知法抽出	20mL抽出	20mL定容	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	107.8	127.9	94.5	112.6
Benfuresate	83.7	84.1	78.1	91.8	94.2	82.7	107.9
Cadusafos	90.2	86.8	80.3	93.1	96.1	81.5	104.1
Chlorobenzilate	91.3	87.3	79.8	90.3	91.0	76.9	94.2
Chlorpropham	95.9	92.0	86.5	100.9	105.9	84.8	104.8
Chlorpyrifos	89.7	90.9	79.0	84.7	89.1	79.9	89.9
Cyfluthrin-2	95.6	98.0	93.5	92.2	99.5	83.8	107.8
Cyfluthrin-3	91.0	91.9	86.7	85.5	91.4	74.2	104.3
Cyfluthrin-4	82.4	71.9	78.0	82.4	78.6	64.4	90.3
Cyproconazole-1	82.1	77.1	75.0	85.4	88.5	78.0	103.9
Cyproconazole-2	83.0	79.3	72.1	81.4	89.6	77.0	104.1
Diazinone	83.6	90.0	76.2	88.6	86.0	82.3	100.3
Difenoconazole-1	89.5	85.6	78.9	78.2	79.3	74.4	94.9
Edifenphos	89.6	93.6	77.3	74.9	86.0	76.8	96.7
EPN	99.6	98.5	95.7	118.2	119.7	87.8	108.2
EPTC	78.1	79.1	69.3	79.5	90.7	72.9	94.5
Esprocarb	90.6	98.2	78.8	87.4	88.4	80.2	90.8
Etrimfos	83.6	87.7	75.0	86.1	85.7	77.5	96.3
Fenitrothion	89.2	94.8	84.4	104.6	95.8	85.9	109.7
Fenobucarb	82.0	77.0	78.2	86.2	99.8	80.1	101.9
Fenthion	55.1	79.4	62.7	68.3	61.6	61.4	66.2
Fenvalerate-1	88.8	96.8	77.2	77.4	79.5	75.8	90.9
Fenvalerate-2	84.9	83.7	73.4	79.6	72.8	70.1	92.3

検討② | 添加回収試験

化合物名	ほうれん草		大豆				
	QuEChERS	20mL定容	QuEChERS	A	B	C	D
	抽出		抽出	通知法抽出	20mL抽出	20mL定容	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(%)
Fosthiazate-1	73.7	75.7	73.6	83.6	99.1	76.2	97.1
Fosthiazate-2	71.4	71.0	71.7	81.4	98.0	72.6	96.9
Halfenprox	79.9	81.2	54.6	51.9	57.0	61.6	71.5
Iprodione	89.6	104.1	124.1	140.2	137.1	115.6	124.3
Mepronil	93.0	91.0	67.6	99.9	87.8	85.0	120.6
Myclobutanil	82.2	83.3	81.0	84.7	95.6	77.4	107.0
p,p'-DDD	90.9	92.1	69.9	74.7	76.3	73.7	81.8
Parathion	89.8	93.3	86.1	93.1	95.4	79.9	105.1
Parathion-methyl	91.6	94.8	90.0	98.5	104.6	84.9	115.3
Pendimethalin	94.0	89.2	76.6	84.5	88.2	75.0	91.3
Permethrin-cis	87.8	84.2	62.6	57.2	61.2	64.7	77.9
Permethrin-trans	95.4	93.1	68.0	64.0	66.9	67.5	80.3
Phenthoate	86.9	85.7	68.9	89.7	74.9	76.4	113.8
Pirimicarb	35.1	30.3	35.2	63.2	58.5	32.1	41.7
Prothiophos	88.8	92.9	65.7	71.2	75.5	72.5	82.1
Pyraclofos	89.4	83.0	85.2	88.2	89.2	73.8	90.5
Pyrifenox-1	63.2	69.9	67.4	86.6	90.1	71.8	92.0
Pyrifenox-2	66.9	76.1	66.7	89.2	90.2	73.4	93.4
Pyriproxyfen	93.6	89.2	79.5	85.5	88.2	76.1	91.2
Silafluofen	61.0	63.0	41.5	34.0	40.9	44.5	49.4
Tebuconazole	79.5	79.1	69.9	82.5	83.7	73.5	99.1
Tebufenpyrad	89.6	79.6	71.8	79.6	80.8	71.5	83.4
Thiobencarb	89.2	91.5	84.0	90.5	96.3	79.1	92.0

検討② | 回収率分布



ほうれん草：ほとんど変化なし
大豆：回収率分布が改善した

検討③ | 残存アセトニトリル中の農薬残留量の調査



振り戻し試験で残存ACN中の農薬を回収することが可能であった。



実際に何mLで抽出を行うのが適切であるのか。

検討③ | 振り戻し試験 (大豆)

4回繰り返し

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)

農薬添加

アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

NaCl (食塩) 1g

クエン酸3Na2水和物 1g

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

アセトニトリル層

精製・測定

残渣

アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3000rpm 5分間)

アセトニトリル層

精製・測定

検討③ | 添加回収率 (大豆)

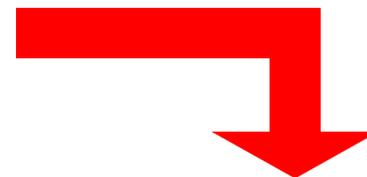
化合物名	抽出 回収率 (%)	振り戻し			
		1回目	2回目	3回目	4回目
		回収率 (%)	回収率 (%)	回収率 (%)	回収率 (%)
Acrinathrin	89.5	10.4	2.3	0.2	0.3
Benfuresate	86.9	12.0	2.2	0.3	0.2
Cadusafos	83.1	12.7	2.5	0.5	0.3
Chlorobenzilate	74.3	13.8	2.9	0.3	0.2
Chlorpropham	81.6	13.7	2.7	0.4	0.4
Chlorpyrifos	71.1	15.2	3.6	0.6	0.4
Cyfluthrin-2	86.7	12.8	1.6	0.5	0.1
Cyfluthrin-3	83.2	13.7	3.0	0.7	1.1
Cyfluthrin-4	71.2	11.5	2.6	0.4	0.5
Cyproconazole-1	82.1	8.1	0.7	0.0	0.0
Cyproconazole-2	81.4	8.8	1.1	0.0	0.1
Diazinone	79.3	11.8	3.0	0.7	0.5
Difenoconazole-1	70.4	7.3	1.0	0.1	0.0
Edifenphos	75.9	9.6	1.7	0.4	0.2
EPN	81.3	21.5	13.8	12.5	15.8
EPTC	83.6	16.5	10.5	2.2	4.7
Esprocarb	71.9	15.4	4.0	0.5	0.2
Etrimfos	75.1	12.1	2.6	0.4	0.2
Fenitrothion	84.8	9.9	1.6	0.4	0.8
Fenobucarb	81.3	12.1	2.2	0.3	0.1
Fenthion	50.4	4.4	1.0	0.3	0.5
Fenvalerate-1	72.8	14.7	4.3	1.1	1.1
Fenvalerate-2	72.7	14.4	3.4	0.4	0.4

試料中残存ACNに含まれる農薬が回収された。

残存ACN中の農薬残留量はQuEChERS法の回収率に影響を与えない。

検討③ | 添加回収率 (大豆)

化合物名	抽出 回収率 (%)	振り戻し			
		1回目	2回目	3回目	4回目
		回収率 (%)	回収率 (%)	回収率 (%)	回収率 (%)
Fosthiazate-1	76.3	10.1	1.9	0.6	0.2
Fosthiazate-2	74.6	9.6	1.9	0.4	0.7
Halfenprox	52.3	15.0	4.6	0.8	0.2
Iprodione	100.3	11.2	2.6	0.3	0.5
Mepronil	95.8	10.2	1.2	0.2	0.3
Myclobutanil	84.7	9.6	1.4	0.2	0.1
p,p'-DDD	64.1	16.5	4.4	0.7	0.2
Parathion	79.8	9.4	1.5	0.2	0.7
Parathion-methyl	91.0	9.8	1.6	0.0	0.0
Pendimethalin	67.3	13.0	3.2	0.5	0.2
Permethrin-cis	63.1	17.9	5.6	1.0	0.3
Permethrin-trans	64.5	16.7	4.3	0.4	0.4
Phenthoate	92.8	10.8	1.7	0.4	0.5
Pirimicarb	33.8	8.1	1.6	0.1	0.0
Prothiophos	64.2	18.6	5.6	0.9	0.1
Pyraclofos	72.1	11.6	2.2	0.3	0.1
Pyrifenoxy-1	74.4	11.5	2.0	0.3	0.2
Pyrifenoxy-2	74.0	12.7	2.4	0.4	0.2
Pyriproxyfen	72.4	15.6	3.8	0.5	0.2
Silafluofen	41.0	15.4	5.4	1.1	0.4
Tebuconazole	79.5	10.7	2.0	0.4	0.1
Tebufenpyrad	67.2	13.7	3.1	0.4	0.2
Thiobencarb	72.6	14.0	3.3	0.3	0.1



1度の振り戻し
(合計20mL) で充分

まとめ

- ◆ ほうれん草のように抽出液量が比較的多い作物については、良好な回収率を得られた。
- ◆ 大豆のように抽出液量が少ない作物については、アセトニトリル抽出液量が回収率に多少の影響があることが分かった。
- ◆ 大豆を用いて抽出法による回収率を比較した結果、アセトニトリル抽出液量の多い方が回収率が向上した。さらに調査を進めた結果、アセトニトリル抽出液量は20mLで十分な結果が得られた。
- ◆ 抽出工程を変化させずとも、前処理前に内標を添加して抽出率を補正し、良好な回収率分布を得ることができた。今後内標を使用することの是非についても検討を行っていきたい。