

STQ 法における繰り返し抽出定容法の検討

○佐々野僚一¹、小西賢治¹、高良浩司²、久野恵子²

¹ (株) アイスティサイエンス、² 和歌山県環境衛生研究センター

【目的】食品中残留農薬分析STQ法では、操作効率の良いQuEChERS法の抽出工程を取り入れて、その液液分配抽出液から分取して固相カートリッジによる精製を行っている。しかしながら、その抽出操作は一度だけであり、また、その抽出液をそのまま分取している。そこで、演者らは定量性と抽出効率を高めることを目的としてSTQ法における繰り返し抽出定容法の検討を行ったので報告する。

【方法】試料：ほうれん草、玄米、大豆。添加濃度：0.02ppm, 0.04ppm。固相：Smart-SPE、自動前処理装置：ST-L300、GC大量注入口装置：LVI-S200(AiSTI製)。GC/MS：Q1000GC(

JEOL製)、GC/MS/MS：7000B(Agilent製)。LC/MS/MS：Quattro UltimaPt(JASCO製)、API3200(AB SCIEX製)。

【結果と考察】繰り返し抽出定容法の工程をScheme 1に示す。本実験では定容量を10、15、20mLとして検討を行った。

1. 液量について：1回目の抽出操作で得られた抽出液量と2回目の抽出操作で目的の定容量に合うように追加したアセトニトリル量を表に示す。10mL定容では、ほうれん草や玄米

表 1回目の抽出液量と2回目に追加したアセトニトリル量

作物		ほうれん草・玄米	大豆
1回目抽出液量		9	5.5~6.5
2回目に追加したアセトニトリル量	定容量	10	4~3
	15	5	8.5~7.5
	20	10	13~12

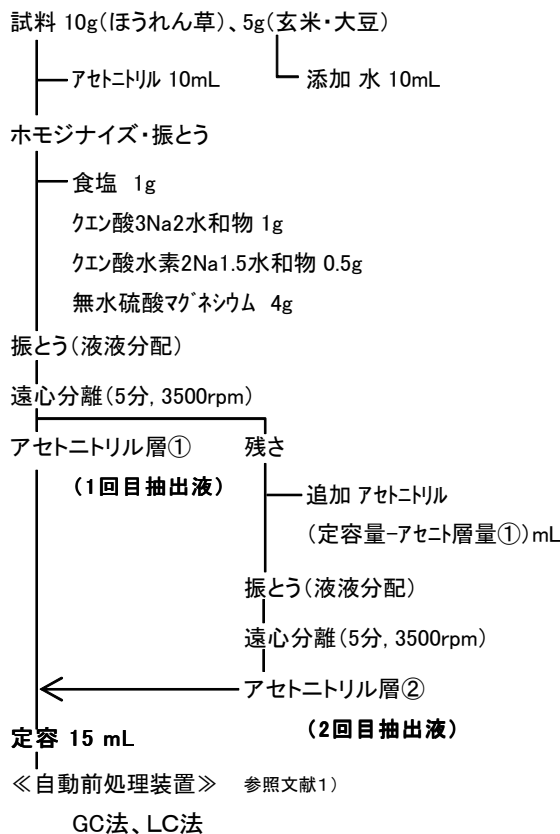
単位：mL

の場合追加したアセトニトリル量が1mLであり、2回目に抽出するための液量が少なかった。また20mL定容では、希釈率が上がるため、定量限界が懸念された。よって液量においては15mL定容が妥当であると判断した。

2. 回収率について：添加回収試験の結果は10mL, 15mL, 20mLのそれぞれの繰り返し抽出定容において、大きな差は見られなかった。試料別では、ほうれん草と玄米は平均で約90%の良好な回収率を得られた。大豆は平均で約70~85%の回収率であった。

STQ法において繰り返し抽出定容法を用いることでその定量性と抽出効率を高めることが可能となった。

1) 佐々野ら、日本食品衛生学会第100回学術講演会要旨集



Scheme 1. 抽出溶液の調製法



STQ法における繰り返し抽出定容法の検討

○ 佐々野僚一¹⁾ 小西賢治¹⁾ 高良浩司²⁾ 久野恵子²⁾

¹⁾ 株式会社アイスティサイエンス ²⁾ 和歌山県環境衛生研究センター

目的

S T Q法において定量性と抽出効率を高めることを目的として、**繰り返し抽出定容法**の検討を行った。

■ 繰り返し抽出定容法の検討

① 定容量の検討

- ・ 10 m L、15 m L、20 m Lのそれぞれの操作性と回収量の評価

② 繰り返し抽出回数

- ・ 1回目、2回目、3回目のそれぞれの回収量の評価

■ S T Q法における繰り返し抽出定容法の評価

① 添加回収試験による評価

② 外部精度管理用試料を用いた評価

前処理(抽出)

試料 10 g (ほうれん草)、5 g (玄米・大豆)

— アセトニトリル 10mL

— 添加水 10mL (膨潤)

ホモジナイズ・振とう

— 食塩 1g

クエン酸 3Na_2 水和物 1g

クエン酸水素 $2\text{Na}1.5$ 水和物 0.5g

無水硫酸マグネシウム 4g

振とう (液液分配)

遠心分離 (3500rpm 5分間)

①アセトニトリル層 残さ (試料層・水層)

繰り返し抽出

— 追加 アセトニトリル

(定容量 - ①アセトニトリル層量) mL

振とう (液液分配)

遠心分離 (3500rpm 5分間)

②アセトニトリル層 残さ (試料層・水層)

← 定容 15 mL (アセトニトリルで調整)

前処理(精製)

★ GC対象農薬

抽出液 1.5 mL + 水 0.5 mL

≪ 自動前処理装置 ≫

分取 1 mL (試料 : 0.5 g 相当)

Smart-SPE C18-30 mg : 精製

洗液 アセトリル-水 (4/1) 1mL

下液

混液 10%食塩水 20mL

Smart-SPE C18-50mg : 保持

乾燥 (窒素ガス)

連結 Smart-SPE PSA-30mg : 精製

溶出 アセト-ハクソ (15/85) 1mL

アセト-ハクソ + 0.1%PEG(300)/アセト 20uL

定容 1 mL (アセト-ハクソで調製)

GC/MS, GC-MS/MS (大量注入25 uL, 試料 : 12.5mg相当)



自動前処理装置 : ST-L300 (AiSTI SCIENCE)

★ LC対象農薬

≪ 自動前処理装置 ≫

分取 1.5 mL (試料 : 1 g 相当)

Smart-SPE C18-30 mg + PSA-30mg : 精製

洗液 メタノール 0.5mL

下液

混液 水 1 mL

Smart-SPE C18-50mg : 精製

洗液 メタノール-水 (4/1) 1mL

下液

定容 4 mL (水で調製)

LC-MS/MS (注入5 uL, 試料 : 1.25mg相当)

GC対象農薬測定条件

	GC/MS : アイスティサイエンス	GC-MS/MS : 和歌山県環衛研
PTV Injector	LVI-S200(AiSTI Science) ; Spiral Insert	
Injector Temp.	70°C (0.3) -120°C/min-240°C-50°C/min-290°C (38min, 33min)	
Solvent Purge Time	0.27 min (150mL/min)	
Auto Samplor	CombiPAL; 25 µL Syringe (AMR)	7693(Agilent)
Injection Volume	25 µL (1 injection)	
GC	Agilent 6890N	Agilent 7890A
Column	BPX5, 0.25mm i.d.x30m, df; 0.25µm	DB-5ms, 0.25mm i.d.x30m, df; 0.25µm
Column Oven Temp.	60°C (4min) -20°C/min-160°C-3°C/min-235°C-6°C/min-310°C (8min)	50°C (4min) -25°C/min-125°C-10°C/min-300°C(6min)-25°C/min-310°C (8.1min)
MS Interface Temp.	290°C	
MS	JMS-Q1000GC (JEOL)	7000B(Agilent)
MS Method	SCAN; 70 - 420 m/z	MRM

LC対象農薬測定条件

		LC-MS/MS: アイスティサイエンス	LC-MS/MS: 和歌山県環衛研
LC		Prominence(SIMADZU)	Alliance 2795(Waters)
Column		L-column2 ODS, 2.0mm×150mm, 3μm	Capcell Pak C18 MG3, 2.0mm×100mm, 3μm
		A: 0.5mM酢酸アンモニウム水溶液	A: 10mMギ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	B: 0.05%ギ酸含有メタノール
Flow		0.2mL/min	0.25mL/min
Inj. Volume		5 μL	5 μL
MS		API 3200 system (AB SCIEX)	Quattro Ultima Pt (Micromass)
Ion Mode		ESI Positive	ESI Positive
MS Method		MRM	MRM

定容量について(操作性)

1回目の抽出液量と2回目に追加したアセトニトリル量

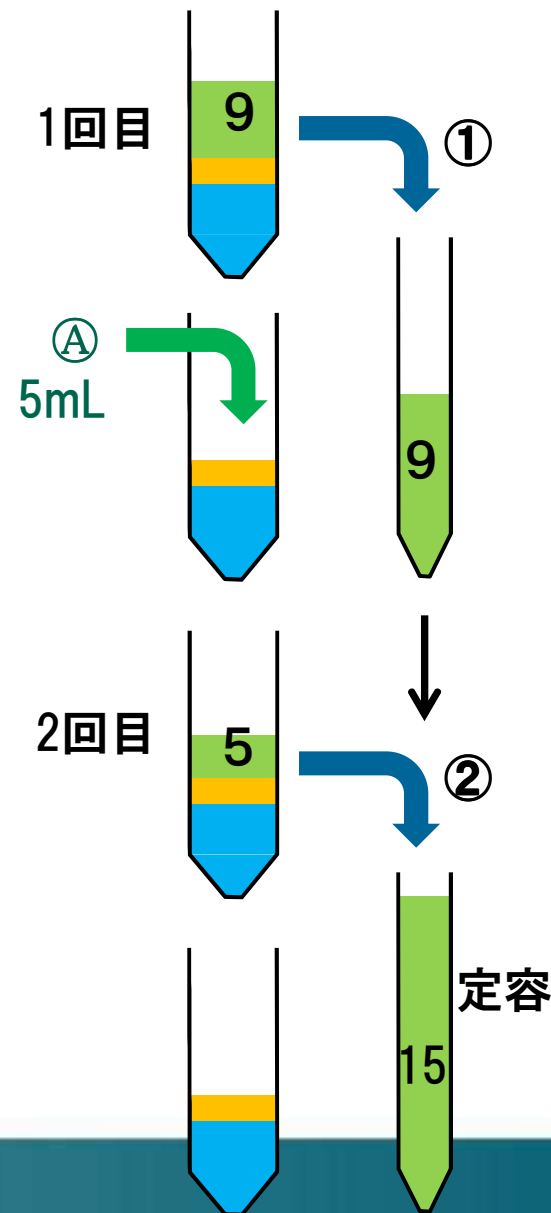
作物		ほうれん草・玄米	大豆
1回目抽出液量		9	5.5~6.5
2回目に追加したアセトニトリル量	定容量 10	1	4~3
	15	5	8.5~7.5
	20	10	13~12

単位:mL

①追加アセトニトリル量 = 定容量 - ①1回目抽出液量

- ◆ 10mL定容では2回目に抽出するときの液量が少ない。
- ◆ 20mL定容では希釈率が上がるため、定量限界が懸念される。
- ◆ **15mL定容が妥当であると判断。**

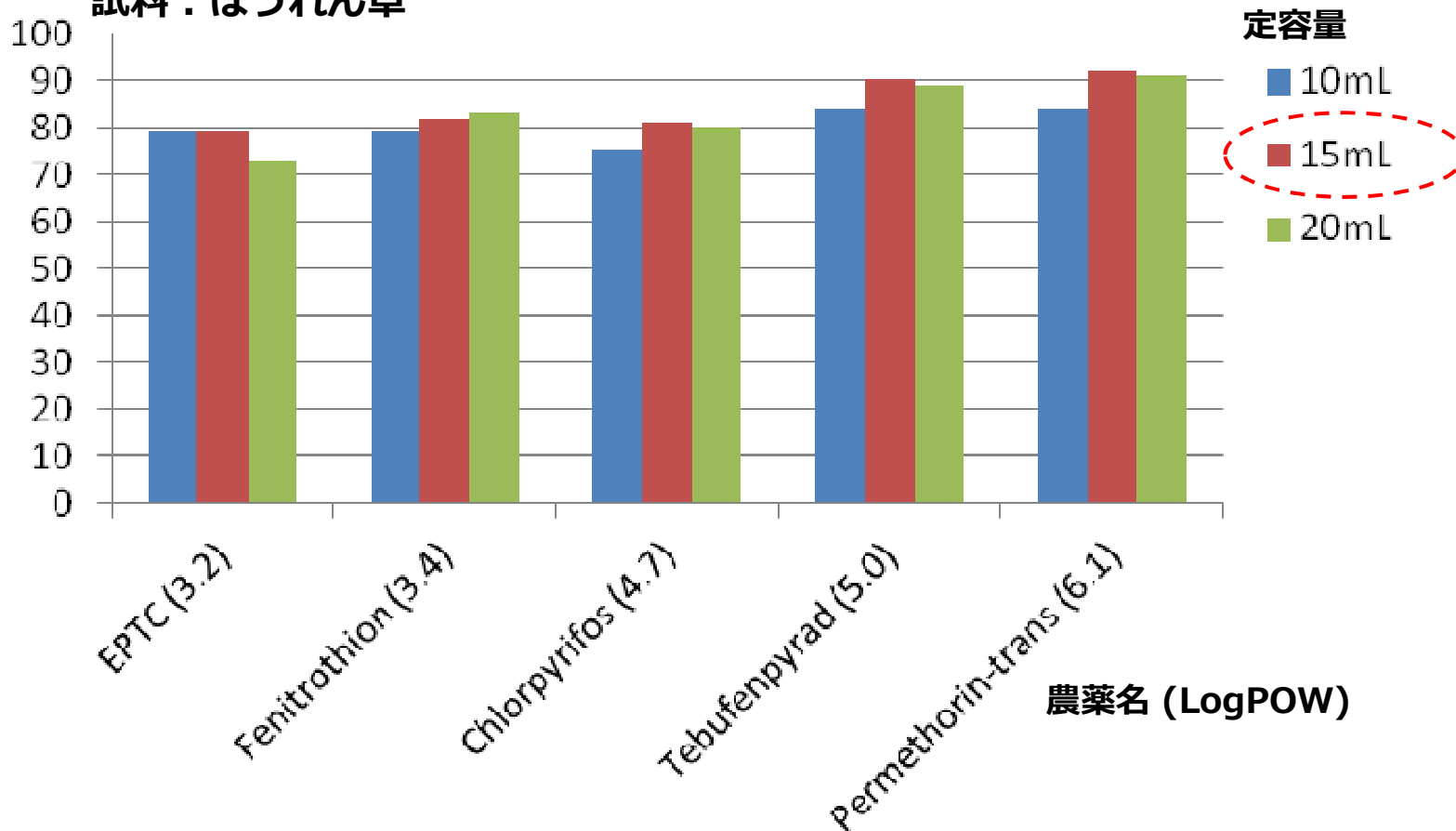
例) ほうれん草 15mL定容



定容量と回収量について

回収量(ng)

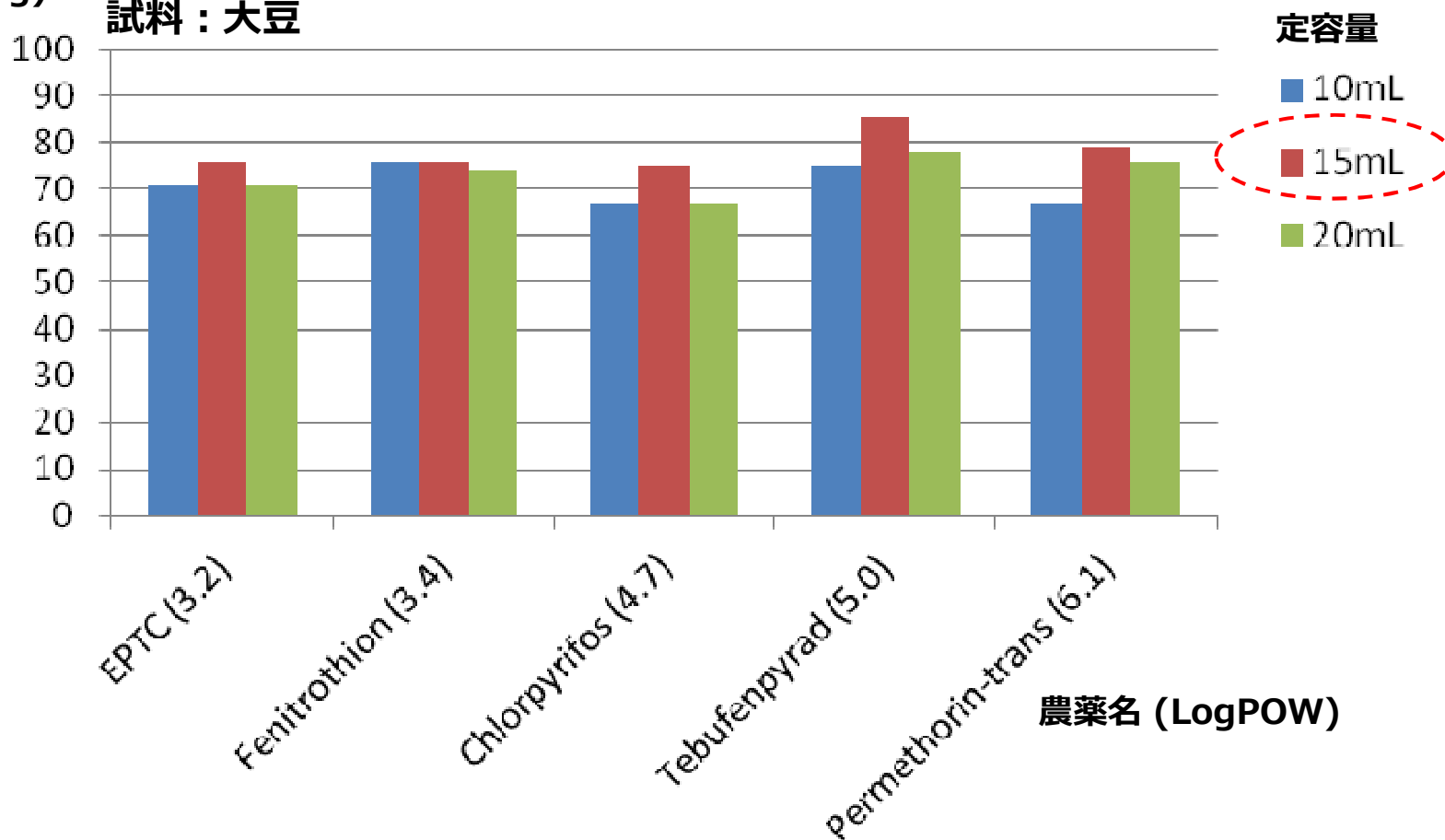
試料：ほうれん草



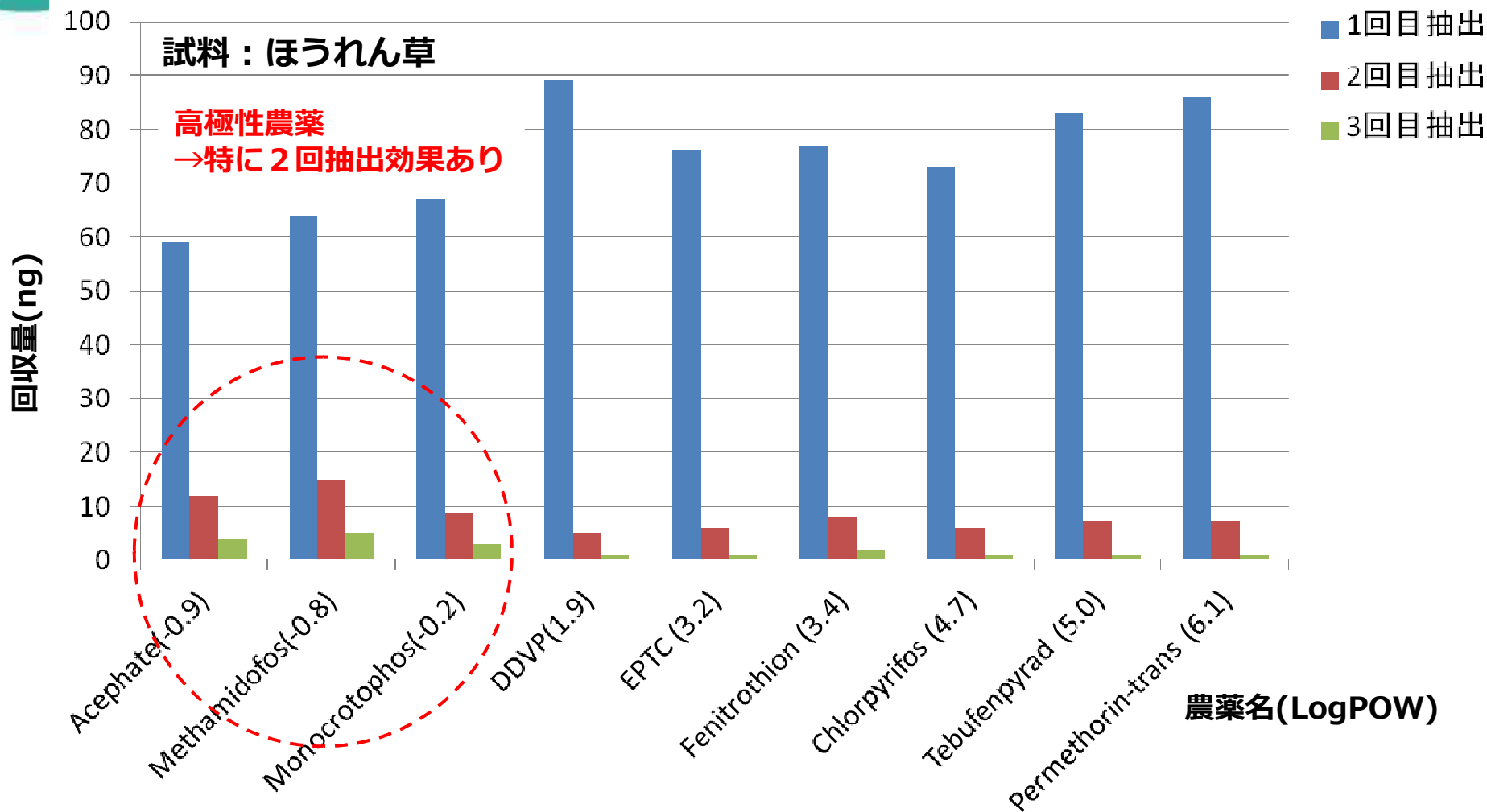
定容量と回収量について

回収量(ng)

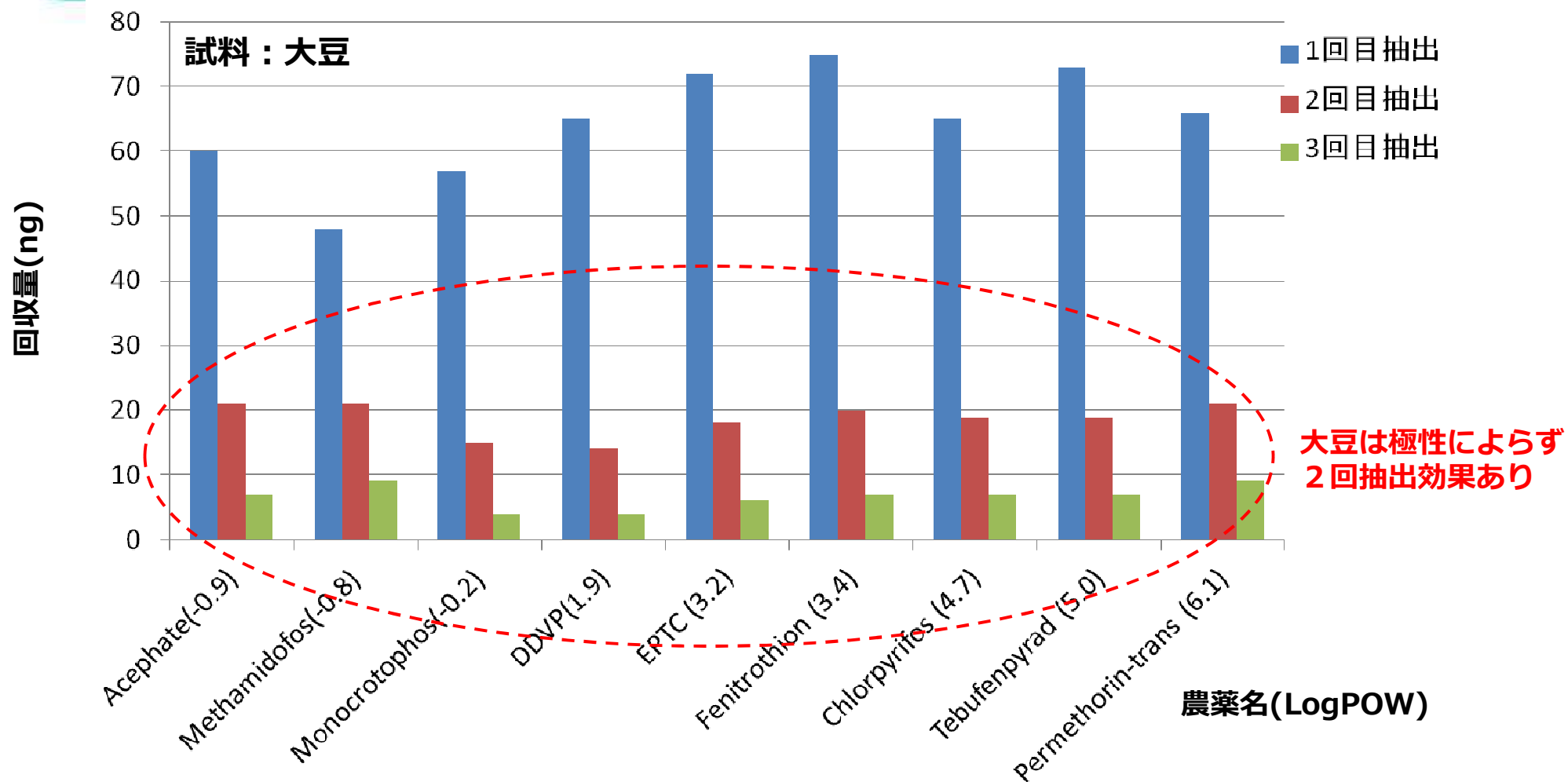
試料：大豆



抽出回数と回収量について



抽出回数と回収量について

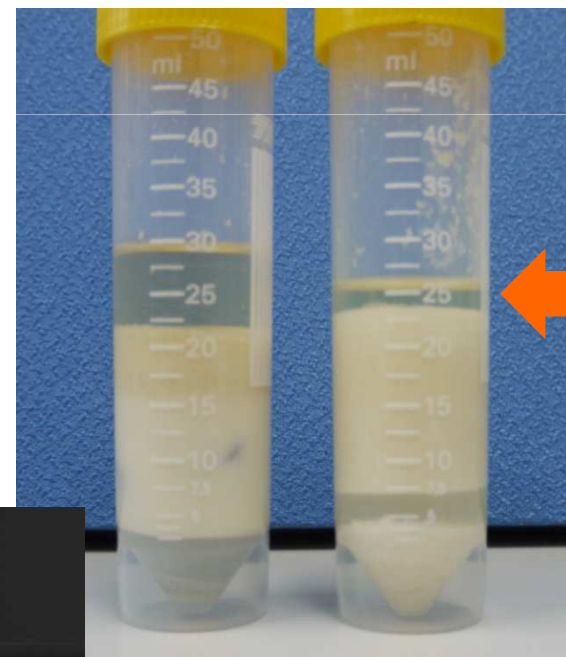


大豆のアセトニトリル層の量について

大豆 においては同じ試料でも操作の違いによりアセトニトリル層の量が異なる場合がある。

★アセトニトリル層の量を多くするためのコツ

1. **セラミックホモジナイザー**と食塩とクエン酸類を入れた後、**15秒間、振とう**する。
2. **無水硫酸マグネシウム**を入れ、**2分間、強く振とう**する。
3. **5分程放置**して、その後に遠心分離機にかける。



セラミック
ホモジナイザー

添加回収試験

添加回収率の分布表

(単位：成分数)

試料	ほうれん草		大豆		玄米
試料量	10g		5g		5g
添加濃度	0.02ppm		0.04ppm		0.04ppm
対象農薬	GC対象	LC対象	GC対象	LC対象	GC対象
回収率 (%以上 - %未満)					
120 -	2	3	1	1	20
70 - 120	222	35	219	40	203
50 - 70	5	11	8	9	4
30 - 50	1	2	2	1	3

* 2回繰り返し抽出の15mL定容

外部精度管理(定量結果)

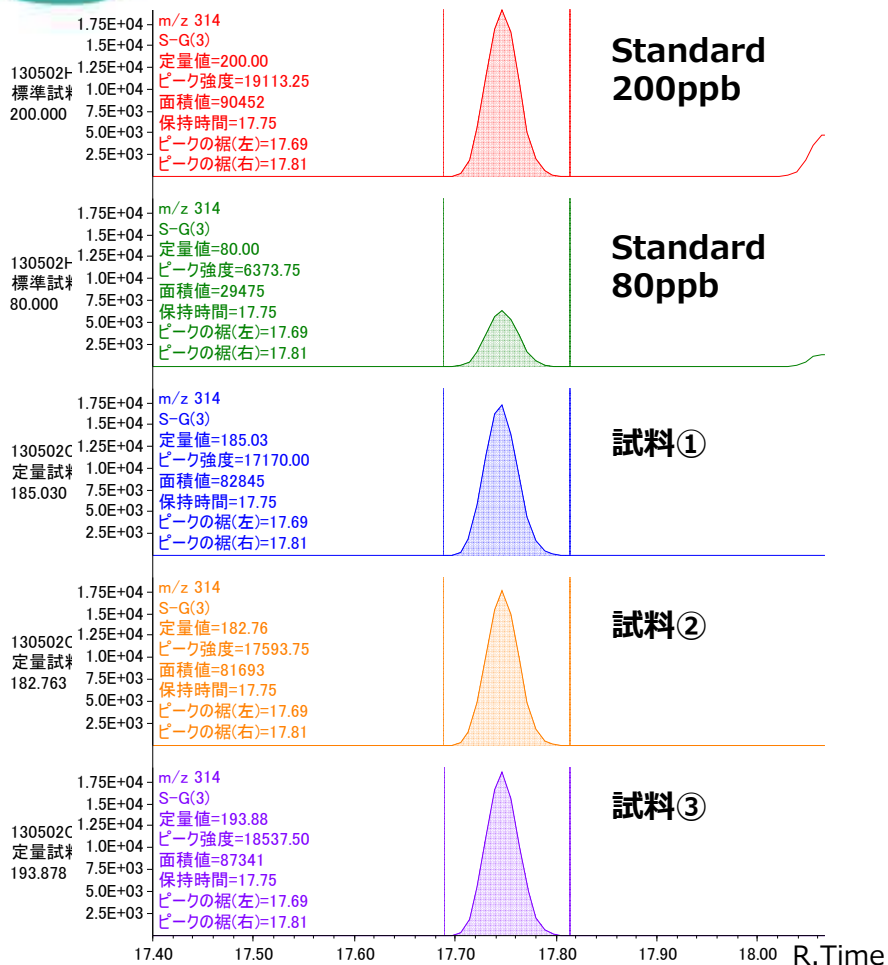
本法による外部精度管理用ほうれん草ペーストの分析結果

(単位 : $\mu\text{g/g}$)

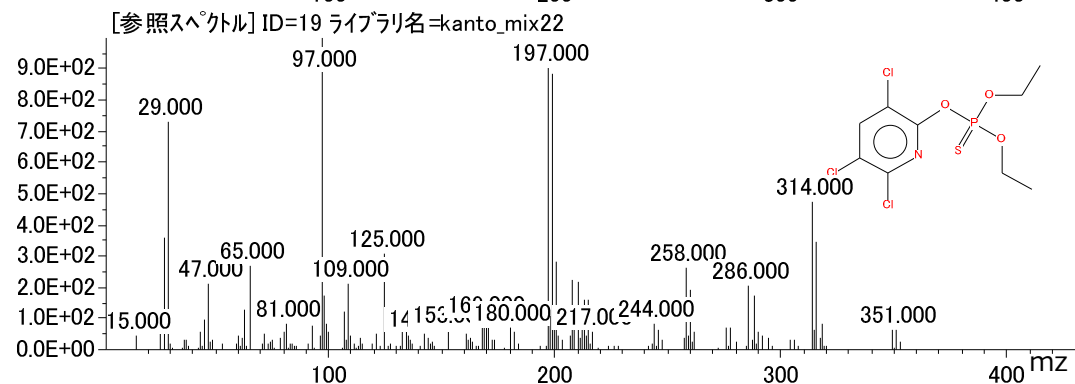
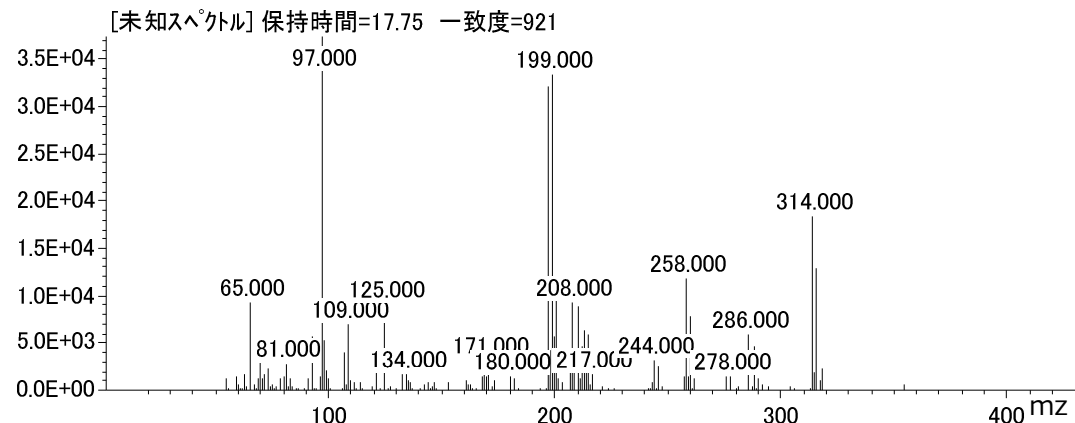
農薬名	報告値		アイスティサイエンス				和歌山県環衛研			
	平均	標準偏差 %	1	2	3	平均	1	2	3	平均
Chlorpyrifos	0.191	0.033	0.185	0.183	0.194	0.187	0.187	0.193	0.192	0.191
Flutoranil	1.12	0.138	1.08	1.01	1.01	1.03	1.02	1.05	1.09	1.06
Malathion	2.02	0.482	1.48	1.39	1.30	1.39	1.64	1.66	1.69	1.66

* 2回繰り返し抽出の15mL定容

外部精度管理(定量・定性結果)



Chlorpyrifosの定量イオンクロマトグラム比較



試料スペクトルとライブラリスペクトル比較

まとめ

- 定容量（10mL、15mL、20mL）について
 - ・それぞれの定容量で回収量に大きな差は見られなかったが、操作性等を考慮して**15mL定容**が最適であると判断した。
- 繰り返し抽出回数（1回目、2回目、3回目）について
 - ・ほうれん草においては1回目の抽出で大部分が回収されていたが、大豆においては2回目の抽出でも20%近くの回収があった。本法では操作性等も考慮して**2回の繰り返し抽出**が最適であると判断した。
- 添加回収試験および外部精度管理用試料による評価
 - ・ほうれん草、大豆、玄米において良好な回収率と再現性を得ることができた。
 - ・ChlorpyrifosおよびFlutlanilにおいて良好な測定結果を得ることができた。

S T Q法において**繰り返し抽出定容法**を用いることでその定量性と抽出効率を高めることが可能になった。