

C) エクストレルート/Sep-Pak[®] C₁₈法：2. 1で得た残留物を*n*-ヘキサン6 mlに溶解し、そのうち3 mlをExtrelut[®]-3に負荷し、直ちに溶媒を吸引除去した。Sep-Pak[®] C₁₈を接続し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mlで農薬を溶出し、溶出液を減圧乾固した。残渣をアセトン/*n*-ヘキサン混液(15:85)1 mlに溶解し、試料液とした。

2. 3 カラム精製

2. 2で得た試料液を予めアセトン/*n*-ヘキサン混液(15:85)10 mlで洗浄したSep-Pak[®] Silicaに負荷し、同液2 mlで洗い込んだ後、同液10 mlで溶出した。溶出液を減圧乾固した後、ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン混液(15:85)1 mlに溶解し、予めジエチルエーテル/*n*-ヘキサン混液(15:85)10 mlで洗浄したSep-Pak[®] フロリジルに負荷し、同液2 mlで洗い込んだ後、同液18 mlで溶出した。続けてアセトン/*n*-ヘキサン混液(15:85)15 mlで溶出した。各溶出液を減圧乾固し、*n*-ヘキサン2 mlに溶解してGC用試験溶液とした。

2. 4 定量

定量は各農薬の各成分のピーク面積の和を用いて行った(ただし、ピレトリンはPyrethrin Iの面積)。

2. 5 農薬の添加回収実験

試料20 gをブレンダーカップに計り取り、水40 mlを加えて2時間膨潤させた後、農薬標準A混液またはB混液100 μlを添加し、30分放置後、2. 1, 2, 3に従って操作し、得られた試験溶液をGCで測定し、回収率を求めた。

3. 超臨界流体抽出法

3. 1 試験溶液の調製法

粉碎し均一化した試料5 gを抽出管に充填し、SFE装置に装着した。20分間抽出を行い、ガスの排出口に直結したExtrelut[®] 3で抽出物を捕集した。Extrelut[®] 3を取り外して、排出口及びExtrelut[®] 3の内壁をアセトン約2 mlで洗い込み、洗液をExtrelut[®] 3に負荷し、アスピレーターでアセトンを除去した後、Extrelut[®] 3にSep-pak[®] C₁₈を連結し、ヘキサン法をアセトニトリル20 mlで溶出した。

3. 2 カラム精製

3. 1 で得た溶出液を減圧乾固した後、残留物を15%エーテル含有ヘキサン (E/H) 20 ml に溶解し、Sep-pak[®] フロリジルに負荷し、溶出液を捕集した。次いで50%E/H及び50%アセトン含有ヘキサン (A/H) 20 ml で溶出し、それぞれの溶出面分を分取した。各溶出面分を減圧乾固し、残留物をイソプロパノール1 ml に溶解し、HPLC用試験溶液とした。脂質含量の高いとうもろこしでは、Extr elut[®] 3 + Sep-pak[®] C₁₈による脱脂操作の後に、GPC装置での脱脂操作を追加し、Sep-pak[®] フロリジル以下の行程を同様に行った。

3. 3 定量

定量は農薬のピーク面積を用いて行った。

3. 4 農薬の添加回収実験

試料5 gにC混液またはD混液50 μ lを別々に加え、30分放置した後、2. 1, 2に従って操作し、得られた試験溶液をHPLCで測定し回収率を求めた。

4. 操作条件

4. 1 GPC条件

カラム：Phenomenex社製Envirosep-ABCTM (21.2 mm i.d. \times 350 mm), ガードカラム (21.2 mm i.d. \times 60 mm), 移動相：酢酸エチル/シクロヘキサン (1:1), 流速：5 ml/min, モーター波長： λ 254 nm (UV), 注入量：2000 μ l, 分取画分：65-95 ml (13-19分)

4. 2 GC条件

カラム：島津製作所 (株) 製、CBP5 (0.2 mm i.d. \times 25 m, 膜厚0.25 μ m), キャリアガス：He (入口圧186 kPa), メイクアップガス：N₂ 80 kPa, 検出器：ECD, 温度：カラム 60 $^{\circ}$ C (2分) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (20分), 注入口 250 $^{\circ}$ C, 検出器 300 $^{\circ}$ C, 注入方法：スプリットレス, 注入量：2 μ l

4. 3 SFE条件

抽出超臨界流体 (CO₂) 流量：4.9 ml/min, モディファイヤー (アセトン) 流量：0.1 ml/min, 圧力：300 kg/cm², 抽出管温度：40 $^{\circ}$ C, 捕集部温度：75 $^{\circ}$ C, 抽出時間：20分

4. 4 H P L C 条件

カラム : Waters社製、Symmetry[®] C₁₈/3.5 μm (4.6 mm i.d. X 15 cm), カラム温度 : 40℃, 流速 : 1.5 ml/min, 検出器 : UV (230 nm), FL (Ex 285 nm, Em 315 nm), 移動相 : A) 0.01 mol/L KH₂PO₄・アセトニトリル (70:30), B) H₂O・アセトニトリル (20:80), 注入量 : 20 μl

タイムプログラム : 0 min) A-100%, B-0%,
25 min) A-0%, B-100%,
43 min) A-0%, B-100%,
44 min) A-100%, B-0%,
50 min) stop

実験結果及び考察

1. 溶媒抽出法

1. 1 農薬の挙動

10種ピレスロイド系農薬のGPC溶出パターンをTable 1に示した。いずれの農薬も70-90 mlの画分に定量的に溶出した。

10種ピレスロイド系農薬を*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配した場合の挙動をTable 2に示した。ピレトリン及びペルメトリンは1回の分配ではアセトニトリル層への抽出率が64.4-68.9%と不十分であったが、分配を3回行うことによりほぼ完全にアセトニトリル層へ移行した。

エクストレルート/Sep-Pak[®] C₁₈法による10種ピレスロイド系農薬の回収率をTable 3に示した。いずれの農薬も94.4%以上が回収された。

Table 1, 2, 3

以上の結果よりGPC, *n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法, エクストレルート/Sep-Pak[®] C₁₈法のいずれも農薬の回収には問題がないことが示された。

1. 2 脂質の挙動

サラダ油2 gを酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1)混液に溶解して4 mlに調製した試験液, 及び玄米20 g及び大豆10 gをそれぞれ方法2. 1に従って調製し、2. 2. Aに従って酢酸エチル/シクロヘキサン(1:1)混液4 mlに溶解した試験液をGPCに注入した場合の脂質の溶出パターン(重量で測定)をFig. 1に、脂質除去率をTable 4に示した。

Fig. 1, Table 4

サラダ油, 玄米, 大豆はいずれも溶出液量60-65 mlで最も脂質が多く溶出した。さらに、65-95 mlを分取した場合の脂質除去率はそれぞれ51.0%, 62.1%, 77.4%であった(Table 4)。

玄米や大豆で70-90 mlの画分(農薬標準液の溶出位置)を分取した場合の各農薬の回収率は、65-95 mlを分取した場合に比べてフルバリネート, シハロトリンが約20%低い値を示した。そこでより高い回収率を得るために、分取区間を65-95 mlに設定した。

サラダ油2 gを*n*-ヘキサンに溶解して20 mlに調製した試験液, 及び玄米20 g及び大豆10 gをそれぞれ方法2. 1. に従って調製し、2. 2. Bに従って*n*-ヘキサンに20 mlに溶解した試験液を*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配した場合の各画分への脂質の分布率(重量で測定)をTable 5に示した。

Table 5

サラダ油及び大豆では脂質の96.4%, 89.4%が*n*-ヘキサン画分に留まった。一方、玄米では*n*-ヘキサン画分に留まった脂質は61.6%であった。

遊離脂肪酸は*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配時にアセトニトリル層へ移行する性質がある。従って、玄米中の脂質の32%がアセトニトリル層に移行したのは玄米試料中の遊離脂肪酸のためと考えられた。

サラダ油3 gを*n*-ヘキサンに溶解して6 mlに調製した試験液, 及び玄米20 g

及び大豆10 gをそれぞれ方法2. 1に従って調製し、2. 2. Cに従って*n*-ヘキサン6 mlに溶解した試験液をExtrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法により*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル溶液で溶出した場合の脂質の除去率（重量で測定）をTable 6に示した。

Table 6

脂質除去率はサラダ油及び大豆で98.1%，玄米で73.8%であった。玄米で脂質除去率が低いのは玄米試料中の遊離脂肪酸のためと考えられる。

以上のことより、ピレスロイド系農薬分析時における脂質除去の効率はExtrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法が最良く、*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法がこれに次ぎ、GPCは本条件下ではあまり良くないと考えられた。

GPCは他の2法に比べて自動化が可能で便利な方法である。しかし、ピレスロイド系農薬は一般に分子量が高いため、GPCでの溶出は他種の農薬に比べて早く、脂質の溶出位置と一部重なる傾向がある。一方、有機塩素系、カーバメート系、有機リン系等のより低分子量の農薬ではGPCでの溶出がより遅くなり、分取する画分を遅く設定することにより脂質除去の効率は高くなると考えられる。

1. 3 農薬の添加回収試験

玄米に10種ピレスロイド系農薬0.2-0.4 ppmを添加し、GPC、*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法、Extrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法の3法で脱脂を行った場合の添加回収率をTable 7に示した。

Table 7

Extrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法での結果が最もばらつきが少なく回収率はピレトリンで61.5%，他の農薬で84.0-96.3%であった。*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法での回収率はピレトリンで62.5%，他の農薬で80.1-100%であった。一方、

GPCでの回収率はピレトリンで75.9%, 他の農薬で72.2-130%であり, ばらつきも大きかった。これは脂質除去が他の2法に比べて不完全であることと関連があると考えられる。またガスクロマトグラム上での妨害はピレトリンでは大きかったが(負荷した農薬の約12-20%), その他の農薬ではおおむね負荷した農薬の3%以下であり, 3法による顕著な差は認められなかった。

脂質除去の効率の面からは*n*-ヘキサン/アセトニトリル分配法, Extrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法の2法がよいと考えられたが, Extrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法の方が操作性の面からより簡便である。

従って, 穀類及び豆類中のピレスロイド系農薬の分析時における脱脂法としてはExtrelut[®]/Sep-Pak[®] C₁₈法が最も適していると考えられる。

2. 超臨界流体抽出法

2.1 SFE条件の検討

モディファイア: SFEは穀類等の低水分試料からの農薬の抽出にしばしば使用される¹⁰⁾。一般的に抽出圧力が、高い方が抽出効率はよい¹¹⁾ため、この装置の常用圧力範囲の上限である300 kg/cm²とし、抽出管温度は高すぎると抽出効率が下がるため¹²⁾40℃とした。モディファイアの量を多くしすぎると、通常の溶媒抽出と変わりなくなり、超臨界流体の特性、すなわち、拡散性の良さ、残存溶媒の少なさなどを大きく損なう可能性がある。そのため、モディファイアの濃度は、総流量の2%とし、エタノール又はアセトンを用い、農薬標準A混液の回収率に対するモディファイアの違いによる影響について検討した。

Table 8

使用したSFE装置の出口は、減圧してCO₂をキャピラリーから吹き出すようになり、モディファイアにエタノールを使用して、くり返し抽出を行うと、キャピラリー部分に抽出物が詰まり、装置の圧力制御が不能となることがあった。両モディファイアを比較すると、添加回収率に大差なく、また、ルーチン化するためには、くり返し抽出の必要が生じるため、キャピラリーの詰まるお

それのない、アセトンを用いるのが妥当であると判断し、以下は、モディファイアとしてアセトンを用いることにした。なお、抽出時間は20分で十分であった。

試料量：使用したSFE装置の抽出容器には1、10、50 mL用が市販されている。1 mL用と10 mL用は、HPLCのステンレスカラムと同様の構造を有し、50mL用は、カップ状の耐圧容器に上部から超臨界流体を吹き付け、あふれた超臨界流体が上部の出口から抜ける構造になっている。1 mL用では、残留農薬試験として十分な量の試料を充填することができない。10mL用は、粉碎した穀類約7 gを充填できる。これらの抽出容器は、必要に応じて複数個を直列に接続して使用することができる。

10 mL用 1 本に5g、10 mL用 2 本直列に10g、50 mL用 1 本に20gの玄米を充填した場合の、農薬の添加回収率を比較した。

Table 9

10gあるいは20gでは測定妨害物が、クリーンアップで十分に取り除けないため、測定不能の農薬があった。また、20gの場合には、抽出容器の構造上、超臨界流体が滞留しやすいため、抽出物が抽出容器中に残留し、低い抽出効率であった。従って、以下の実験には10mL用抽出容器に5gの試料を充填して抽出を行った。

2. 2 脱脂法の検討

SFE装置の改良：SFE装置にはCO₂ガスの吹き出し口にC₁₈カートリッジカラムを連結して農薬等を捕集する方法もある¹³⁾が、本装置では、高い噴出圧のためにカートリッジカラムが脱落又は破損し、捕集できなかった。そのため、適度にガスが抜けるExtrelut[®] 3を吹き出し口に連結し(Fig 2)、抽出物の捕集を行った。これによって、3. 1 試験溶液の調整法に示した脱脂操作を溶媒の留去操作なしに行う事ができ、操作時間を短縮することができた。また、米と小麦については良好に脱脂を行えた。

Fig 2

抽出脂質量の比較：SFEとアセトニトリル又はアセトンを用いる溶媒抽出法による小麦からの抽出物量、すなわち広義の脂質量を比較し、Table 10に示した。脂質量は、SFEではアセトンを用いる告示法の約2/3であり、アセトニトリル抽出法¹⁴⁾と同等であった。従って、SFEは野菜のように水分含量の高い試料に対しては脱水等の前処理が必要となる^{15, 16, 17)}が、穀類のように水分含量の低い試料に対しては簡易に抽出でき、しかも抽出脂質が少ないなど有用な抽出法であることを認めた。

Table 10

GPCによる脱脂法の併用：とうもろこしは脂質含量が高いため、追加の脱脂法を検討した。SFEによる脂質抽出量、Extrelut[®] + Sep-Pak[®] C18による除去率、GPCによる除去率を、とうもろこしと小麦で比較した結果をTable 11に示した。

Table 11

とうもろこしの抽出脂質量は小麦の約4.4倍であった。Extrelut[®] + Sep-Pak[®] C18を通すとその75%が除去されたが、約8 mg/gが残存した。GPCにより、さらに約半量が除去でき、残存量は小麦をExtrelut[®] + Sep-Pak[®] C18処理した場合と同程度となった。従って、とうもろこし等脂質含量の高い試料はGPCによる脱脂行程を追加する必要がある。

2. 3 農薬の添加回収試験

3. 1 試験溶液の調製法で得たSFEによる試験液には妨害成分が含まれるため、そのままHPLCに注入することはできない。従って、試験液を濃縮後Sep-pak フロリジルに負荷し、15%E/H、50%E/H及び50%A/Hで溶出し、各画分に

ついてHPLCで測定した。

HPLCには逆相系のODSセミマイクロカラムを使用し、濃度勾配溶出を行った。18種農薬をA及びBグループに分け、UV並びにFL同時検出したときのHPLCクロマトグラムをFig. 3に示した。また、内部標準には実試料からの検出頻度が低いと考えられるパラチオンを用いた。

Fig. 3

玄米、小麦及びとうもろこしにA又はB農薬標準混液を0.2～0.6ppm添加して、本法に従って操作し、各農薬の回収率を求め、Table 12, 13, 14に示した。

Table 12, 13, 14

いずれの作物でもイマゾスルフロン、エチオフェンカルブ及びテクロフタラムは全く回収されず、ジクロメジン、トリフルミゾール、テクロフタラムイミドはやや回収率が低かったが、これらはフロリジルカートリッジカラムからの溶出挙動に起因している。シリカゲルカートリッジカラムを用いれば、これら農薬は溶出されたが、妨害ピークを効果的に除去できなかった。小麦中のテブフェノジド及びピラゾキシフェンは妨害ピークと重なった。総体的に小麦の方が玄米よりも妨害ピークが多くみられた。とうもろこしは、GPCの操作を加えたため、妨害ピークが少なかったが、トリフルミゾール代謝物の回収率がやや低かった。その他の農薬については各作物とも良好な回収率が得られた。

文献

- 1) 残留農薬迅速分析法開発検討委員会：食品衛生研究，45(9)，31-49 (1995)，47(5)，27-41(1997)，47(6)，27-41(1997)。
- 2) 農薬残留分析法研究班編：“最新農薬の残留分析法” p. 1-719 (1995)中央法規出版。

- 3) 農薬環境保全対策研究会編：“農薬登録保留基準残留農薬基準ハンドブック－作物・水質残留の分析法－” p.1-1239 (1995)化学工業日報社。
- 4) Ault, J. A., Spurgeon, T. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 284-289 (1984).
- 5) Daft, J., Hopper, M., Hensley, D., Sisk, R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 992-994 (1990).
- 6) Patterson, J. R.: *ibid.*, 74, 1016-1018 (1991).
- 7) Armishaw, P., Millar, G.: J. AOAC Int., 76, 1317-1322 (1993).
- 8) Di Muccio, A., Ausili, A., Vergori, L., Camoni, I., Dommarco, R., Gambetti, L.: Analyst, 115, 67-1169 (1990).
- 9) 斉藤勲, 大島晴美, 山田貞治, 川村典久, 早川順子: 愛知衛所報, 43, 17-21 (1993).
- 10) Skopec, Z.V., Clark R., Harvey, P.M. A., Wells, R. J.: J. Chromatogr. Sci. 31, 445-449 (1993).
- 11) King, J. W., Hopper, M. L., Luchtefeld, R. G., Taylor, S. L., Orton, W. I.: J. AOAC Int. 76, 857-864(1993).
- 12) McNally, M. E.: J. AOAC Int. 79, 380-387(1996).
- 13) Goli, D. M., Locke, M. A., Zablotowicz, R. M.: J. Agri. Food Chem. 45, 1244-1250(1997)
- 14) 糸山智子、関口幸弘、鯉口 智、平原嘉親、大田光恵、木村実加、三好智子、成田美加子、長谷川眞住、宮田昌弘、鎌倉和政、前田憲二、山名孝善、外海泰秀: 食衛誌. 36, 516-524(1995).
- 15) Valverde-Garcia, A., Fernandez-Alba, A. R.: J. AOAC Int. 78, 867-873(1995).
- 16) Valverde-Garcia, A., Fernandez-Alba, A. R., Contreras, M., Aguera, A.: J. Agri. Food Chem. 44, 1780-1784(1996).
- 17) Saka, M., Iijima, K., Odanaka, Y., Kato, Y.: J. Pesticide Sci., 23, 414-418(1998).)

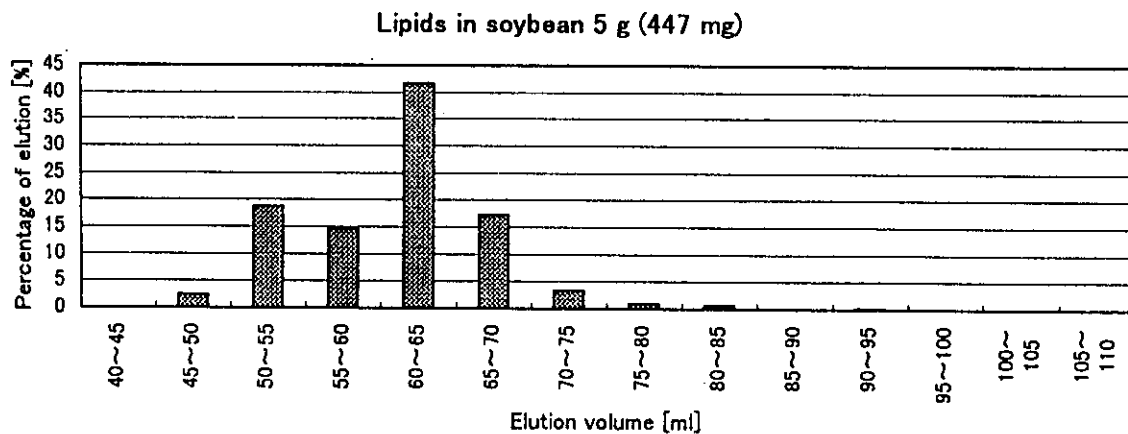
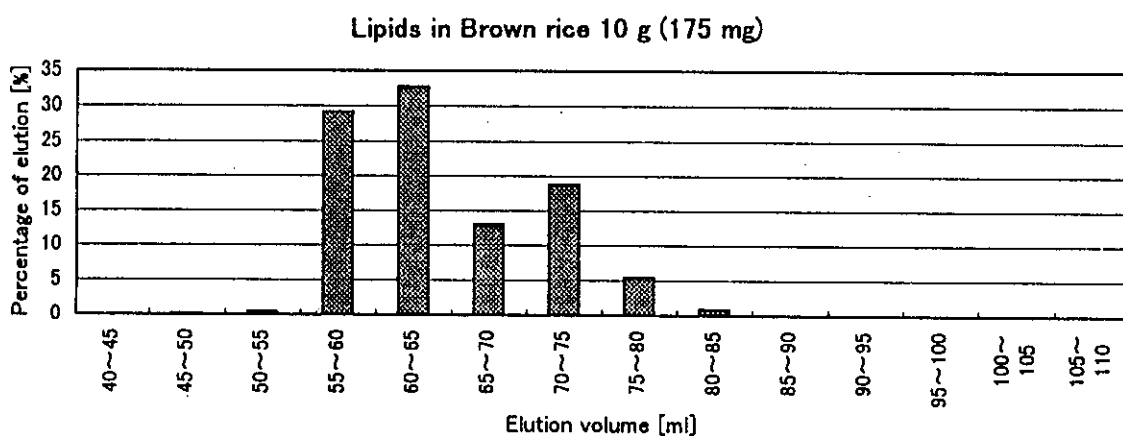
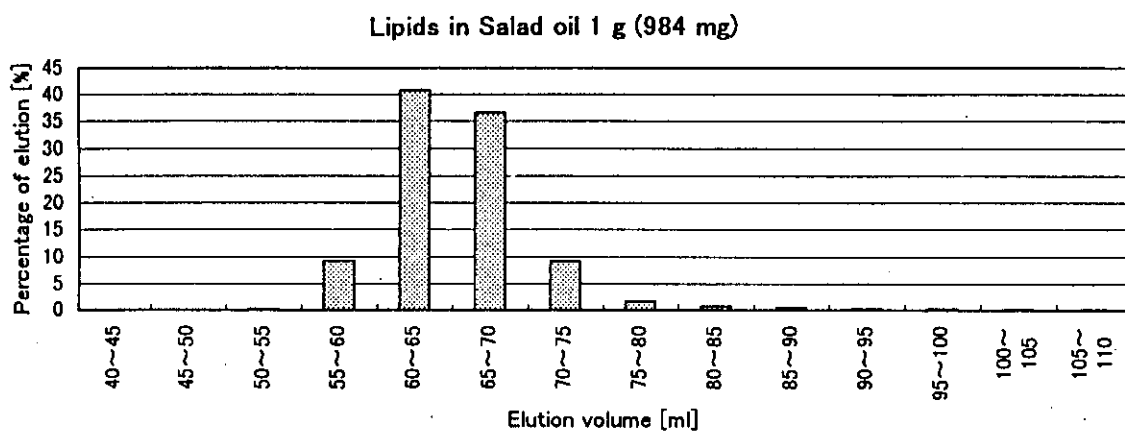


Fig. 1. Elution patterns of lipids by GPC
 Horizontal line indicates the elution volume and vertical line indicates percentage of the eluted lipids at each fraction.
 Experimental method and conditions for GPC are described in the text.

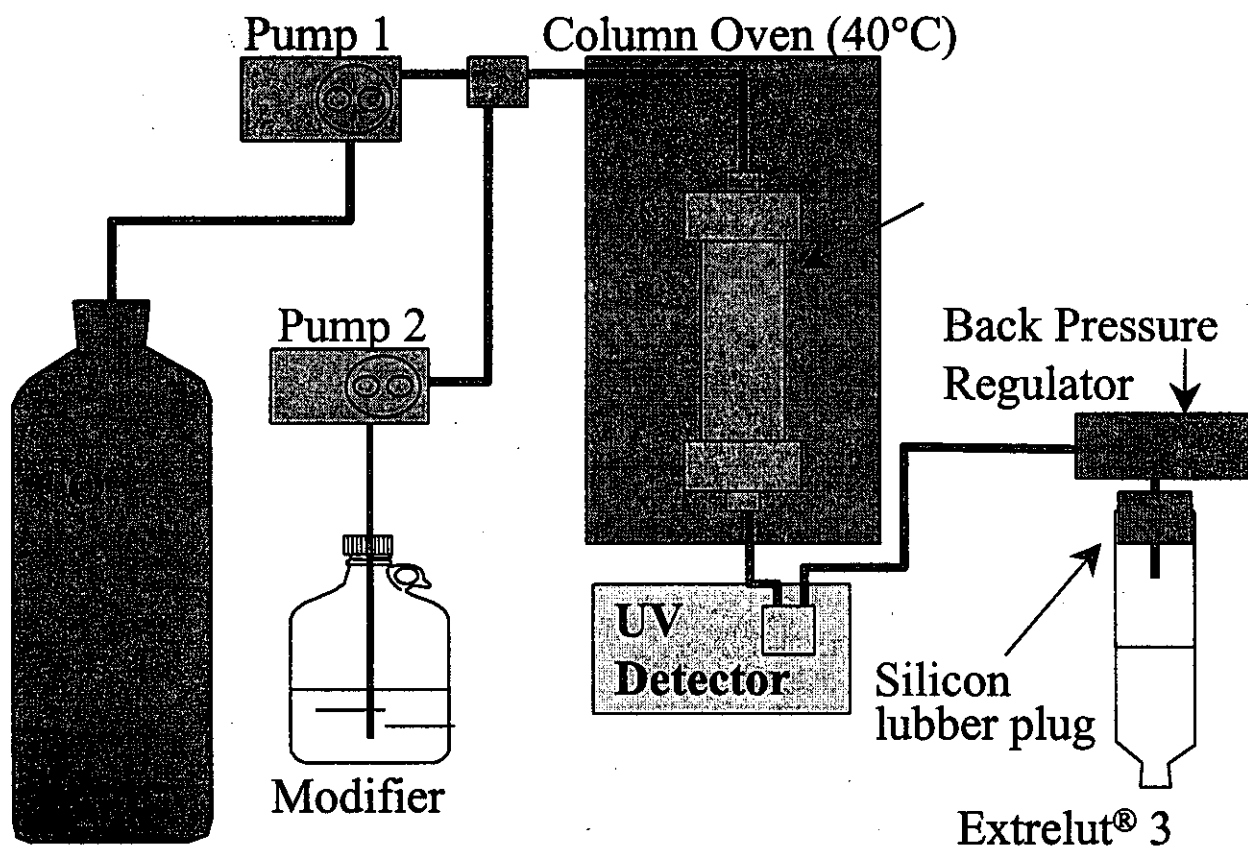


Fig.2. SFE Instrument

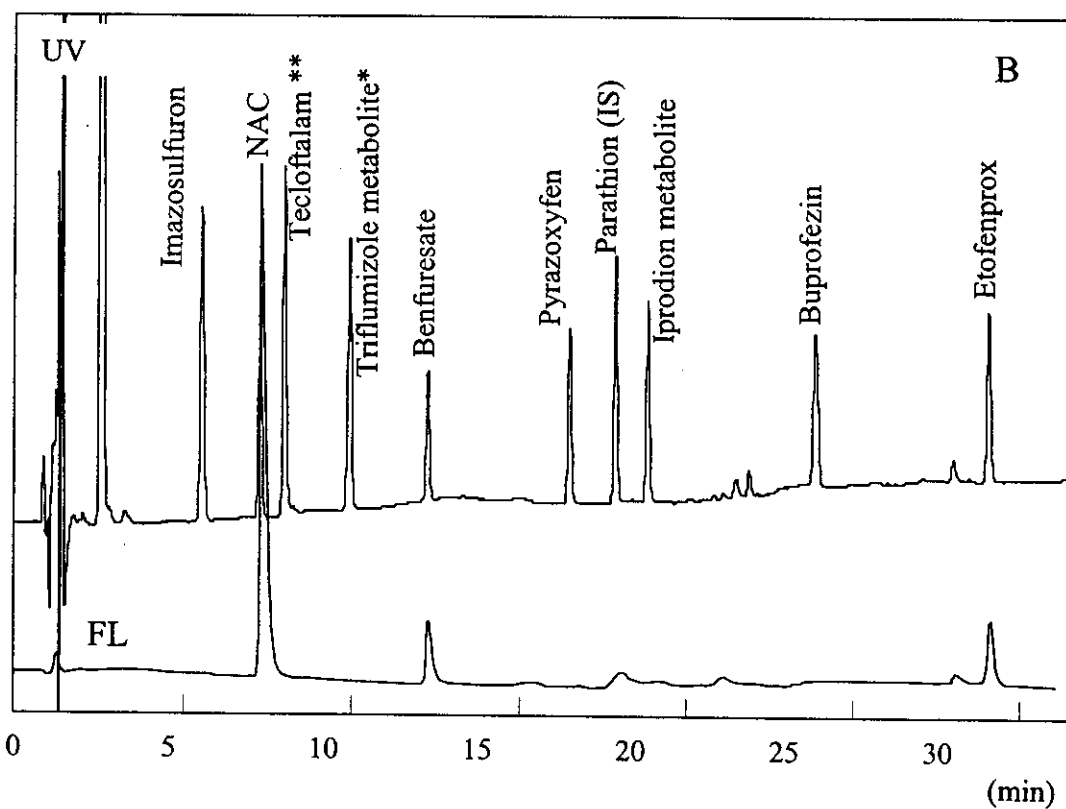
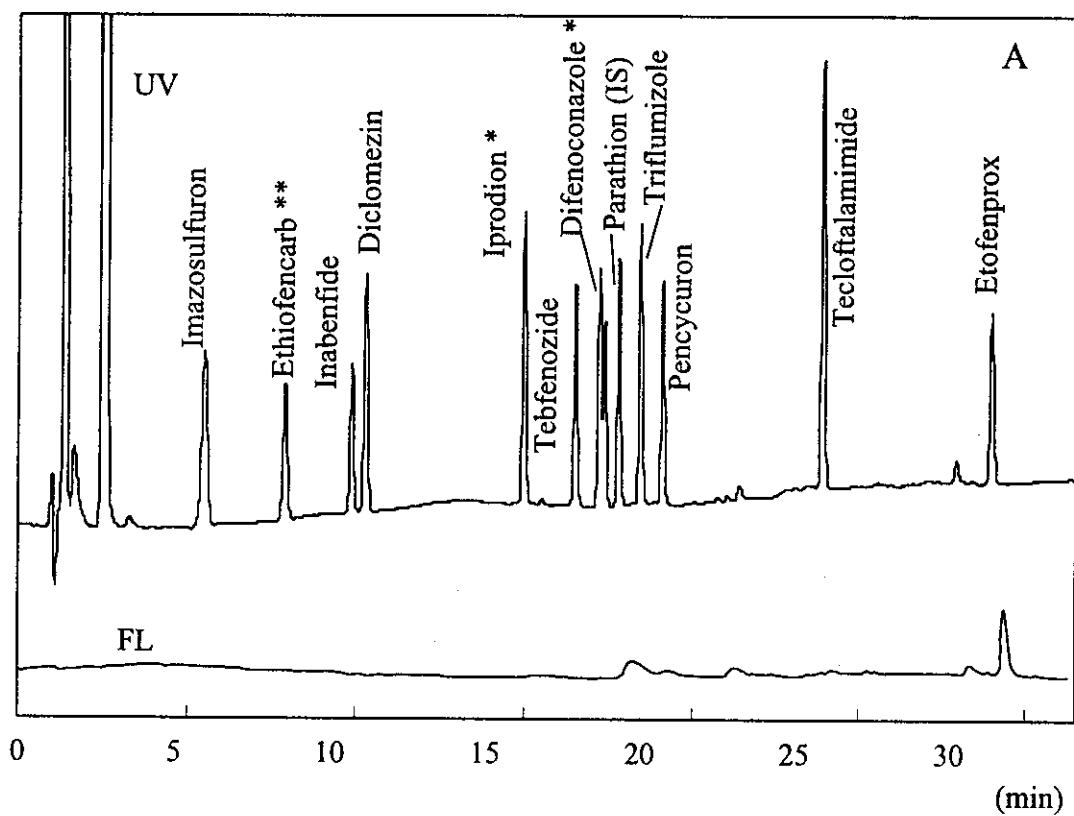


Fig.3. HPLC Chromatograms for Pesticide Standard Mixture A and B
 UV: 230 nm, FL: Ex 285 nm, Em 315 nm
 Concentration of pesticides: 1 $\mu\text{g/ml}$ (*2 $\mu\text{g/ml}$, **3 $\mu\text{g/ml}$)

Table 1. Elution patterns of 10 Pyrethroid Pesticides by GPC

Pesticide	Spiked amount [μ g]	Elution volume [ml]						Recovery [%]
		65-70	70-75	75-80	80-85	85-90	90-95	Total
Pyrethrins	2.0	ND	ND	76.0 \pm 4.6	25.1 \pm 4.3	ND	ND	101.1 \pm 1.6
Cyhalothrin	1.0	ND	87.8 \pm 3.4	9.2 \pm 0.8	0.3 \pm 0.3	ND	ND	97.3 \pm 3.8
Permethrin	1.0	ND	ND	ND	37.8 \pm 3.4	62.7 \pm 5.5	ND	100.5 \pm 0.7
Cypermethrin	1.0	ND	ND	53.6 \pm 1.7	46.1 \pm 2.2	ND	ND	99.7 \pm 0.5
Fluvalinate	1.0	ND	100	ND	ND	ND	ND	100.0 \pm 0.0
Deltamethrin	1.0	ND	ND	0.3 \pm 0.3	98.7 \pm 1.8	ND	ND	99.0 \pm 1.4
Cyfluthrin	1.0	ND	ND	99.8 \pm 0.3	ND	ND	ND	99.8 \pm 0.3
Flucythrinate	1.0	ND	76.7 \pm 1.6	18.4 \pm 0.1	ND	ND	ND	98.1 \pm 1.8
Fenvalerate	1.0	ND	ND	49.4 \pm 5.0	45.6 \pm 0.2	ND	ND	95.1 \pm 5.0
Tralomethrin	1.0	ND	ND	ND	38.7 \pm 2.8	59.0 \pm 0.6	ND	97.6 \pm 3.4

Recovery of pesticide at each fraction is expressed as means \pm SD for 3 trials.
Conditions for GPC are described in the text.

Table 2. Partitions of 10 Pyrethroid Pesticides between *n*-Hexane and Acetonitrile

Pesticide	Spiked amounts [μ g]	Partition of Lipids [%]				Total
		Acetonitrile layer (1)	Acetonitrile layer (2)	Acetonitrile layer (3)	<i>n</i> -Hexane layer	
Pyrethrins	2	64.4 \pm 3.3	22.9 \pm 2.0	4.1 \pm 0.8	1.4 \pm 0.9	92.8 \pm 3.4
Cyhalothrin	1	90.4 \pm 0.2	10.0 \pm 2.0	0.5 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	101.0 \pm 2.4
Permethrin	1	68.9 \pm 2.4	25.4 \pm 1.2	8.0 \pm 0.6	4.5 \pm 0.5	106.7 \pm 4.3
Cypermethrin	1	90.0 \pm 5.1	9.7 \pm 1.3	0.5 \pm 0.2	ND	100.3 \pm 3.7
Fluvalinate	1	97.8 \pm 3.5	8.1 \pm 2.2	ND	ND	105.9 \pm 2.2
Deltamethrin	1	92.9 \pm 3.2	9.9 \pm 1.8	0.8 \pm 0.3	ND	103.6 \pm 1.9
Cyfluthrin	1	99.7 \pm 2.5	4.7 \pm 2.0	0.3 \pm 0.0	ND	104.7 \pm 3.0
Flucythrinate	1	101.5 \pm 1.3	3.8 \pm 2.1	0.5 \pm 0.1	ND	105.8 \pm 3.5
Fenvalerate	1	99.5 \pm 2.2	5.5 \pm 1.3	0.5 \pm 0.0	ND	105.5 \pm 3.3
Tralomethrin	1	98.7 \pm 1.8	4.8 \pm 1.6	0.5 \pm 0.1	ND	104.0 \pm 2.5

Partition of pesticide at each fraction is expressed as means \pm SD for 3 trials.
Method for *n*-hexane/acetonitrile partition and ECD-GC condition are described in the text.

Table 3. Recoveries of 10 Pyrethroid Pesticides by Extrelut-3/Sep-Pak[®] C18 Method

Pesticide	Spiked amount [μ g]	Recovery [%]
Pyrethrins	2	104.6 \pm 8.9
Cyhalothrin	1	100.9 \pm 3.7
Permethrin	1	99.9 \pm 2.6
Cypermethrin	1	102.9 \pm 2.6
Fluvalinate	1	99.4 \pm 3.2
Deltamethrin	1	99.6 \pm 2.3
Cyfluthrin	1	97.4 \pm 5.5
Flucythrinate	1	103.0 \pm 1.3
Fenvalerate	1	97.3 \pm 4.1
Tralomethrin	1	94.4 \pm 3.4

Recoveries of pesticides from the Extrelut-3/Sep-Pak[®] C18 column are expressed as means \pm SD for 3 trials.

Extrelut-3/Sep-Pak[®] C18 method is described in the text.

Table 4. Removal of Lipids by GPC

Substance	Sample [g]	Lipids [mg]	Removal of lipids [%]
Salad oil	1	984	51
Brown rice	10	175	62.1
Soybean	5	447	77.4

GPC method is described in the text.

Fractions of 65-95 ml were collected and the amount of lipids in each fraction was measured by weight.

Data are means of 3 trials.

Table 5. Partitions of Lipids between *n*-Hexane and Acetonitrile

Substance	Sample [g]	Lipids [mg]	Partition of Lipids [%]			
			Acetonitrile layer (1)	Acetonitrile layer (2)	Acetonitrile layer (3)	<i>n</i> -Hexane layer
Salad oil	2	2000	1.6	1.1	0.9	96.4
Brown rice	20	286	19.7	11.6	7.2	61.6
Soybean	10	942	5.9	2.8	1.8	89.4

Data are means for 3 trials.

Table 6. Removal of Lipids by Extrelut-3/Sep-pak[®] C18 Method

Substance	Sample [g]	Lipids [mg]	Removal of Lipids [%]
Salad oil	1.5	1482	98.4
Brown rice	10	130	73.8
Soybean	5	481	98.4

Extrelut-3/Sep-pak[®] C18 method is described in the text.
Data are means for 3 trials.

Table 7. Comparison of 3 Methods for the Recoveries of 10 Pyrethroid Pesticides in Brown Rice

Pesticide	Fortified level [ppm]	Recovery [%]		
		GPC	n-Hexane/acetonitrile partition method	Extrelut-3/Sep-Pak [®] C18 method
Pyrethrins	0.4	75.9±2.7	62.5±5.3	61.5±1.1
Cyhalothrin	0.2	83.4±1.3	95.2±2.4	91.1±3.4
Permethrin	0.2	72.2±0.3	86.4±1.8	95.9±6.2
Cypermethrin	0.2	81.5±1.6	90.6±8.7	84.0±4.3
Fluvalinate	0.2	130±13.7	100±4.1	90.2±3.9
Deltamethrin	0.2	103±2.1	88.2±2.4	88.8±4.6
Cyfluthrin	0.2	92.8±4.1	83.9±6.9	94.4±7.5
Flucythrinate	0.2	89.3±3.8	81.4±8.2	92.9±8.0
Fenvalerate	0.2	112±6.4	80.1±5.2	96.3±5.2
Tralomethrin	0.2	105±8.4	80.3±4.8	88.8±3.6

Data are expressed as means ± SD for 3 trials.

Table 8. Effect of the two SFE Modifiers on Recovery of Pesticide from Rice

Pesticides	Recovery ^{a)} (% , mean \pm SD)	
	Ethanol	Acetone
Inabنفide	87.8 \pm 2.1	80.8 \pm 4.8
Diclomezine	60.0 \pm 4.6	53.0 \pm 3.5
Iprodion*	91.3 \pm 6.2	92.6 \pm 8.1
Tebfenozide	51.2 \pm 6.4	100.6 \pm 9.4
Difenoconazole*	74.1 \pm 11.9	89.9 \pm 7.5
Triflumizole	67.8 \pm 3.4	77.9 \pm 4.6
Pencycuron	59.9 \pm 6.2	104.0 \pm 7.4
Tecloftalamimide	52.8 \pm 5.7	66.2 \pm 11.6
Etufenprox	85.2 \pm 5.5	99.7 \pm 5.5

SFE condition: pressure, 300 kg/cm²; temperature, 40°C; concentration of modifiers: 2%, amount of pesticide spiked: 0.2 ppm (*0.4 ppm)

a) The values are means of three determinations.

Table 9. Effect of Sample Size on Recovery of Pesticides from Rice

Pesticides	Sample Size		
	5 g	10 g	20 g
Inabنفide	80.8	89.0	29.9
Diclomezine	53.0	51.4	29.9
Iprodion*	92.6	87.9	76.7
Tebfenozide	100.6	----	----
Difenoconazole*	89.9	96.6	82.7
Triflumizole	77.9	----	0.0
Pencycuron	104.0	----	----
Tecloftalamimide	66.2	57.2	47.6
Etufenprox	99.7	99.5	71.3

The bars mean immeasurable by HPLC. SFE condition: pressure, 300 kg/cm²; temperature, 40°C; modifier, 2% acetone, amount of pesticide spiked: 0.2 ppm (*0.4 ppm)

Table 10. Comparison among Three Extraction Methods for Lipids in Wheat

Methods	Extractable Substance
	(mg / g)
1 SFE	7.43
2 Acetonitrile	7.82
3 H ₂ O+Acetone	12.04

Method 1: Take 5g of wheat and extract by SFE instrument. Method 2: Take 10g of wheat and extract with 50ml \times 2 of acetonitrile. Method 3: Take 10g of wheat, add 20ml of water, stand for 2hrs, extract with 100ml and 50ml of acetone, and after condense re-extract with 100ml and 50ml of hexane.

Table 11. Extract from Wheat and Corn by SFE, and Removal of Lipids by Extrelut®3+Sep-pak®C18 and GPC

Procedure	Wheat		Corn	
	mg/g	Removal rate (%)	mg/g	Removal rate (%)
①After SFE*	7.43	0.0	32.53	0.0
②After Extrelut 3 + C18	3.41	54.1	7.92	75.7
③After GPC**	1.30	82.5	3.74	88.5

Each procedure from ① to ③ was practiced step by step. *Direct collection by glass test tube. **GPC fraction of 70~140 ml was collected.

Table 12. Recoveries of A and B Group of Pesticide from Rice

Pesticides	Recovery ^{a)} (% , mean ± SD)			
	Three fractions from Sep-Pak® Florisil			
	①15%E/H	②50%E/H	③50%A/H	Total
A group				
Imazosulfuron	0.0	0.0	0.0	0.0±0.0
Ethiofencarb**	0.0	0.0	0.0	0.0±0.0
Inabenfide	0.0	6.6	74.2	80.8±4.8
Diclomezine	0.0	0.0	53.0	53.0±3.5
Iprodion*	0.0	81.3	11.3	92.6±8.1
Tebfenozide	0.0	29.8	70.8	100.6±9.4
Difenoconazole*	0.0	0.0	89.9	89.9±7.5
Triflumizole	0.0	0.0	77.9	77.9±4.6
Pencycuron	0.0	104.0	0.0	104.0±7.4
Tecloftalamimide	4.9	61.3	0.0	66.2±11.6
Etofenprox	94.1	5.7	0.0	99.7±5.5
B group				
NAC	0.0	79.9	3.3	83.2±2.8
Tecloftalam**	0.0	0.0	0.0	0.0±0.0
Triflumizole metabolite*	0.0	0.0	82.3	82.3±6.8
Benfuresate	17.0	71.0	4.2	92.2±10.9
Pyrazoxyfen	0.0	46.4	49.4	95.8±11.8
Iprodion metabolite	0.0	83.8	3.9	87.7±3.5
Buprofezin	22.1	72.8	0.0	94.9±11.7

E: ether, H: hexane, A: acetone, fraction volume: 20 ml, amount of pesticide spiked: 0.2 ppm (*0.4 ppm, **0.6 ppm)

a) The values are means of three determinations.

Table 13. Recoveries of Pesticide A and B Group from Wheat

Pesticide added	Recovery ^{a)} (% , mean \pm SD)			
	Three fractions from Sep-Pak [®] Florisil			
	①15%E/H	②50%E/H	③50%A/H	Total
A group				
Imazosulfuron	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Ethiofencarb**	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Inabenfide	0.0	0.0	60.1	60.1 \pm 5.3
Diclomezine	0.0	2.2	45.8	48.0 \pm 2.2
Iprodion*	0.0	42.9	66.0	108.9 \pm 5.7
Tebfenozide	0.0	17.2	-----	-----
Difenoconazole*	0.0	0.0	102.2	102.2 \pm 4.2
Triflumizole	0.0	6.8	60.9	94.7 \pm 16.7
Pencycuron	0.0	86.2	0.0	86.2 \pm 29.2
Tecloftalamimide	0.0	84.9	0.0	84.9 \pm 3.6
Etofenprox	102.0	2.8	0.0	104.8 \pm 1.5
B group				
NAC	0.0	76.6	5.4	82.0 \pm 6.9
Tecloftalam**	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Triflumizole metabolite*	0.0	0.0	89.3	89.3 \pm 1.5
Benfuresate	0.0	72.9	0.0	72.9 \pm 6.1
Pyrazoxyfen	0.0	19.3	-----	-----
Iprodion metabolite	0.0	80.8	0.0	80.8 \pm 4.1
Buprofezin	0.0	77.0	0.0	77.0 \pm 3.2

The bars mean immeasurable by HPLC. E: ether, H: hexane, A: acetone, fraction volume: 20 ml; amount of pesticide spiked: 0.2 ppm (*0.4 ppm, **0.6 ppm)

a) The values are means of three determinations.

Table 14. Recoveries of Pesticide A and B Group from Corn

Pesticides	Recovery ^{a)} (% , mean \pm SD)			
	Three fractions from Sep-Pak [®] Florisil			
	①15%E/H	②50%E/H	③50%A/H	Total
A group				
Imazosulfuron	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Ethiofencarb**	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Inabenfide	0.0	0.0	86.5	86.5 \pm 0.0
Diclomezine	0.0	0.0	48.9	48.9 \pm 1.8
Iprodion*	0.0	27.9	58.0	85.9 \pm 4.6
Tebfenozide	0.0	15.5	77.1	92.6 \pm 0.1
Difenoconazole*	0.0	0.0	90.2	90.2 \pm 3.9
Triflumizole	0.0	8.8	89.0	97.8 \pm 18.5
Pencycuron	0.0	110.2	0.0	110.2 \pm 6.0
Tecloftalamimide	0.0	85.3	0.0	85.3 \pm 3.0
Etofenprox	101.4	0.0	0.0	101.4 \pm 2.1
B group				
NAC	0.0	41.4	0.0	41.4 \pm 27.6
Tecloftalam**	0.0	0.0	0.0	0.0 \pm 0.0
Triflumizole metabolite*	0.0	0.0	59.0	59.0 \pm 8.6
Benfuresate	0.0	65.5	0.0	65.5 \pm 8.7
Pyrazoxyfen	0.0	0.0	104.3	104.3 \pm 11.5
Iprodion metabolite	0.0	92.5	0.0	92.5 \pm 18.4
Buprofezin	0.0	76.3	0.0	76.3 \pm 9.6

The bars mean immeasurable by HPLC. E: ether, H: hexane, A: acetone, fraction volume: 20 ml, amount of pesticide spiked: 0.2 ppm (*0.4 ppm, **0.6 ppm)

a) The values are means of three determinations.