

平成 10 年度 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

食品中残留農薬検査の超迅速化に関する調査研究
研 究 報 告 書

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

佐々木久美子

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所

外海 泰秀

東京都立衛生研究所 生活科学部

永山 敏廣

星薬科大学 薬品分析化学研究室

中澤 裕之

研究報告書内容

総括研究報告書

食品中残留農薬検査の超迅速化に関する調査研究	1
------------------------------	---

分担研究報告書

1. 超臨界流体抽出による一斉分析法に関する研究	5
2. GC/MSによる残留農薬試験法に関する研究	25
3. LC/MSによる残留農薬試験法に関する研究	67
4. 農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究 ...	87
(1) ELISAによる柑橘類中イマザリルの分析	87
(2) ピリミカーブの残留分析のための免疫化学的測定法の 開発	99
(3) 残留農薬の免疫アッセイキットによる分析	111

総括研究報告書

食品中残留農薬検査の超迅速化に関する調査研究

主任研究者 佐々木久美子

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

食品中残留農薬検査の超迅速化に関する調査研究

主任研究者 佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

農作物の残留農薬試験を効率化するために、残留農薬超迅速分析法に関する4課題の分担研究を実施した。

分担研究1では、超臨界流体抽出(SFE:Supercritical Fluid Extraction)条件を最適化し、SFEによる穀類中の残留農薬の一斉分析法を確立した。さらに、穀類試料に対するSFE法と従来の溶媒抽出法との比較を行い、検出された多くの農薬に対してSFE法が溶媒抽出法と同等の測定値を与えることを確認した。

分担研究2では、GC/MSによる農薬の多成分一斉分析法を検討した。アセトニトリル抽出液をゲル浸透クロマトグラフィー及びカートリッジカラムでクリーンアップ後、GC/MSで定性・定量する試験法について添加回収試験を実施して、問題点を明らかにするとともに、実用性のある解決策として対象作物毎にSIMプログラムを組むことを提案した。

分担研究3では、LC/MSによる食品中残留農薬の定性・定量法の確立を目指して、食品に残留した農薬の定性確認方法を検討し、定性条件の最適化を試みた。オキサミル、カルバリル及びメチオカルブについて標準品と当該農薬を残留した食品から得られた抽出試験液中の農薬のMSスペクトルを比較することにより、定性確認できることを明らかにした。

分担研究4では、(1)ELISAを用いた柑橘類中のイマザリル分析法を構築し、HPLC法との相関性を試験した。その結果、双方には、非常に高い相関が認められ、本法が日常分析法として高い有用性を有することが示唆された。(2)ピリミカーブについてELISA法の開発を行った。ヘテロログスなELISA測定系が、高感度化のための技術として有用な手法であることを例証するとともに、ピリミカーブの残留分析に応用可能なELISA法の基礎を構築した。(3)競合ELISA法のダイアゾンとアルジカルブの市販キットの有用性について検討した。

分担研究者

佐々木久美子 国立医薬品食品衛生研究所
食品部第一室長
外海泰秀 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 食品試験部長
永山敏廣 東京都立衛生研究所
生活科学部食品研究科主任研究員
中澤裕之 星薬科大学
薬品分析化学研究室 教授

毎年約20農薬が追加され、食の安全性確保に貢献している。しかし、多数の農薬について基準値への適合性を検査するには多大な労力と時間を要するため、生鮮食品が市場に流通する前に残留農薬検査を完了して、必要な行政措置をとることは困難な状況である。また、モニタリング検査においても検査項目を増やすことが困難な状況である。そこで、より迅速にかつ多数の農薬を検査できるよう、超迅速試験法を開発することを目的に研究を実施した。

A. 研究目的

食品衛生法による農作物中の残留農薬基準は179農薬に対して設定されているが、さらに

本研究では、1)超臨界流体抽出(SFE)を使用した試験溶液調製の自動化、2)従来の系

統分析法を改良した、GC/MSによる一斉分析法、3) LC/MSによる定性及び定量法の確立、4) 高価な分析機器を使用せずに、迅速、簡便に残留農薬を測定する方法として期待される免疫化学測定法、の4課題について研究した。

B. 研究方法

分担研究1

穀類試料における87農薬のSFE条件を最適化し、GC/MSで一斉分析する方法を検討した。さらに、各種農薬を含有した実試料について、SFE法と従来の有機溶媒抽出法とで128農薬を対象に分析して、分析値を比較した。

分担研究2

110農薬のGC/MSによる一斉分析法について6作物で添加回収試験を実施した。さらに、作物毎のGC/MS(SIM)測定プログラムを作成した。

分担研究3

オキサミル、カルバリル及びメチオカルブについてLC/MS測定条件の最適化を行い、標準品と当該農薬を残留した食品から得られた抽出試験液中の農薬のMSスペクトルを比較した。

分担研究4

(1)柑橘類中のイマザリルのELISA分析条件を検討し、柑橘に添加したイマザリルのELISAとHPLCによる分析値を比較した。(2)活性エステル法により、ピリミカーブハプテンと西洋ワサビペルオキシダーゼ(POD)を結合させ、酵素標識化ハプテンを作製した。固相化抗体量とPOD-ハプテン量の至適量を求めた。ハプテンの種類を変え、測定系の高感度化を試みた。直接競合ELISA法におけるpH及びメタノールの影響を検討した。ピリミカーブ及びその類縁化合物との交差反応性を比較検討した。(3)ダイアジノン及びアルジカルブ分析用市販キットの標準品を検定した。ダイアジノン用キットの有機リン系農薬に関しての交差反応性を

検討した。8作物にダイアジノンを添加して、キットによる分析を行った。

C. 研究結果

分担研究1

SFE条件を最適化し、SFEによる穀類中の残留農薬の一斉分析法を確立した。さらに、実試料から検出された多くの農薬に対してSFE法が溶媒抽出法と同等の測定値を与えることを確認した。

分担研究2

GC/MSによる農薬一斉分析法について添加回収試験を実施して、農薬の物性、分析操作及び測定に関連した問題点を明らかにした。解決策として対象作物毎のSIMプログラムを提案した。

分担研究3

LC/MSによる食品中残留農薬の定性条件の最適化を試みた。オキサミル、カルバリル及びメチオカルブが残留した食品から得られた抽出試験液についてこれらの農薬を定性確認することができた。

分担研究4

(1)柑橘類中のイマザリル分析に適用できるELISA分析条件を確立した。柑橘中イマザリルのELISAとHPLCによる測定値間には高い相関が認められた。(2)ピリミカーブのELISA分析について、ヘテロログスな測定系が高感度化のための有用な手法であることを例証し、ピリミカーブの残留分析に応用可能なELISA法の基礎を構築した。(3)ダイアジノン分析用キットのスクリーニング法としての有用性を確認した。

D. 考察

(1)SFEが抽出手段として有用であることが穀類試料について証明されたので、さらに広範囲の食品試料への適用について検討し、簡

便かつ有効な抽出法として確立する必要がある。また、SFEをHPLCで測定する農薬にも拡大して検討する必要がある。(2)GC/MSによる一斉分析の精度向上のために本研究成果が役立つと考えられる。(3)LC/MSについては実試料での定性確認法としての有用性が3農薬で証明されたことから、さらに広範囲の食品/農薬の定性、さらには定量に発展できると考えられる。(4)ELISAによる柑橘中のイマザリル分析の実用性及びピリミカープの残留分析への応用が可能な免疫化学的測定系の基盤が整ったことから、さらに実用性について検証することによってスクリーニング法としてのELISAの優位性が立証できるものと考えられる。

上記の各研究をさらに発展させることによって分析操作の効率化と分析対象農薬数の拡大が可能な新しい試験法が確立できると考えられる。さらに、分析現場における有機溶媒使用量が削減でき、労働衛生上及び環境保全上も好ましいと考えられる。

E. 結論

残留農薬超迅速分析法に関する下記の4課題の研究を実施し、残留農薬分析の迅速化、自動化、分析精度向上、スクリーニング分析等に有用な研究結果を得た。

- 1) 超臨界流体抽出(SFE)による分析法
- 2) GC/MSによる一斉分析法
- 3) LC/MSによる定性及び定量法
- 4) 免疫化学測定法

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光進, 外海泰秀, 土屋鍛, 木村実加, 関口幸弘:
超臨界流体抽出及びGC, HPLCによる穀類中残留農薬の多成分一斉分析法, 食品衛生学雑誌, 40, 68-74(1999)

2. 学会発表

(1)根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武, 斎藤行生: 農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—穀類試料について—日本食品衛生学会第72回学術講演会(1996.10)

(2) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., and Saito, Y.: Multiresidue Analysis of Pesticides in Grains by Supercritical Fluid Extraction and GC/MS(SIM Mode): 9th Annual California Pesticides Residue Workshop (1997.3.3-6)

(3)外海泰秀, 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: 超臨界流体抽出(SFE)-GC(GC/MS)による穀類中残留農薬の一斉分析法(2), 日本食品衛生学会第74回学術講演会(福岡, 1997.10)

(4)渡辺栄喜, 土井菜津子, 内木里香, 渡部和恵, 渡辺卓穂, 中澤裕之, 渡邊繁幸, 林昌郎, 湯浅洋二郎: ELISAによる柑橘類中イマザリル分析 日本食品衛生学会第76回学術講演会(新潟, 1998.11)

分担研究報告書

超臨界流体抽出による一斉分析法に関する研究

分担研究者 佐々木久美子

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

超臨界流体抽出による一斉分析法に関する研究

分担研究者 佐々木 久美子 国立医薬品食品衛生研究所食品部 第一室長

研究要旨

超臨界流体抽出(SFE:Supercritical Fluid Extraction)を用いた穀類中の残留農薬の一斉分析法を確立した。玄米に87農薬を添加して、各種SFE条件が抽出効率に与える影響について検討し最適な条件を選択した。メタノールなどのモディファイヤーの効果についても検討したが、添加により回収率がむしろ減少したためモディファイヤーは添加しない方がよいことがわかった。最適化したSFE条件を用いて、小麦、玄米、そば及びトウモロコシからの添加回収実験を行ったところ概ね80%以上の良好な回収率が得られた。また、試験溶液の調製時間は溶媒抽出法より大幅に短縮されかつ操作も簡略化された。更に、穀類試料に対するSFE法の実用性を検証するために従来の溶媒抽出法との比較を行った。比較は、128農薬（有機塩素系農薬16、ピレスロイド系農薬12、カーバメート系農薬15、有機リン系農薬43、その他42）を用いた添加回収実験のほか、実際の検体（玄米、小麦、大麦及びトウモロコシ）中の残留農薬をSFE法と溶媒抽出法で求め両者の測定値を比較した。その結果、極性の高い一部の農薬に対してはSFE法は低い測定値を与えるものの、検出された多くの農薬に対しては溶媒抽出法と同等の結果となったことから、SFE法は穀類中の残留農薬分析において実用性のある方法であると考えられる。

研究協力者

根本 了 国立医薬品食品衛生研究所食品部

A. 研究目的

現在179農薬に対して農作物中の残留農薬基準が設定されており、さらに毎年約20農薬の基準値が追加設定されることが予定されている。このような多くの農薬について、基準値への適合性を検査するには多大な労力と時間を要する。残留農薬の分析は以前は個別分析法が多かったが、これに対しては系統的分析法の導入によりまず迅速化が図られた。この系統的分析法では元素選択的検出器により化学構造毎に農薬を測定しているが、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)の使用により化学構造によらず多数の農薬を同時に測定することが可能になり、更に迅速化が進むことが予想される。機器測定の迅速化・効率化はGC-MSの導入によりあ

る程度達成できるが、これまでの溶媒抽出法に基づく分析方法では抽出・精製過程の迅速化は不十分であった。残留農薬分析の一層の迅速化・省力化を図るためには抽出・精製過程の迅速化が不可欠であり、そのための新技術の導入の検討が必要である。

一方、近年、溶媒抽出に代わる方法としてSFEが注目されてきた。SFEは液体より高い浸透性と気体より高い溶解力を有する超臨界状態の流体を抽出媒体に使用する新規な抽出手段である。従来の溶媒抽出法では、得られた抽出液のクリーンアップに多くの手間と時間を要するが、SFEは選択的に対象物質を抽出することが可能であるためクリーンアップは不要か大幅な簡略化が可能となる。従って、SFEを用いることにより分析時間の大幅な短縮が期待される。また、SFEは従来の溶媒を用いた抽出方法に比較して溶媒の使用量が非常に少なく、廃液処理

や従事者に対する安全性の問題が大きく改善されることが期待されるほか自動化が可能であるなどの利点がある。

そこで、残留農薬分析における抽出・精製過程の迅速化と省力化を図る目的で、SFEの残留農薬分析に対する応用について検討した。検討は、SFEがこれまで主に土壌などの固体試料に応用されてきたことを考慮して、まず穀類試料を用いて行った。検討に当たっては、添加回収実験に加え、実際の検体中の残留農薬を測定し、SFE法と従来の溶媒抽出法を比較し実用性を検証した。

B. 研究方法

1. 試料

輸入の小麦、大麦、トウモロコシ及び国産の玄米、ソバを用いた。試料は遠心粉碎器(日本精機製作所製)で0.25 mmのメッシュスクリーンを用いて粉碎した。

2. 試薬及び試液

試薬：n-ヘキサン(ヘキサン)、アセトニトリル(MeCN)、アセトン、ジエチルエーテル(エーテル)、シクロヘキサン、酢酸エチル(EtOAc)、メタノール、エタノール及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用試薬(和光純薬工業(株)製)を使用した。NaClは和光純薬工業(株)製の試薬特級を使用した。水はMilli-Q(Millipore社製)水を使用した。SFEでは純度99.999%の液化炭酸ガス(CO₂)を抽出用に、また純度99.99%のCO₂を冷却用に使用した。

農薬標準品：有機塩素系16農薬、有機リン系43農薬、ピレスロイド系12農薬、カーバメート系15農薬及びその他42農薬の合計128農薬について検討した。標準品は、いずれも林純薬工業(株)、和光純薬工業(株)またはRiedel-de Haën社製の残留農薬試験用試薬を用いた。表1に検討に用いた農薬を示した。

農薬標準原液：各農薬標準品をヘキサンで溶

解して(溶解しにくい場合にはできるだけ少量のアセトンで溶解後ヘキサンで希釈して)1 mg/mLの濃度に調製し、冷凍庫(-20°C)に保存した。

農薬標準混液：各農薬標準原液をとり、アセトンで10 µg/mL(アセフェート、アセタミプリド、アルジカルブ、カブタホール、イミベンコナゾール脱ベンジル体、イプロジオン、イプロジオン代謝物、メタミドホス及びバミドチオンは50 µg/mL)の濃度に調製し、冷凍庫(-20°C)に保存した。

固相抽出(SPE)カートリッジカラム：Varian社製 Bond Elut® PSA (500 mg)及びBond Elut® SAX(500 mg)、Waters社製のSep-Pak® Plus Silica(690 mg)、Sep-Pak® Plus Florisil(910 mg)、Sep-Pak® NH₂(500 mg)、Sep-Pak® CN (360 mg)、Sep-Pak® QMA(360 mg)及びSep-Pak® Diol (360 mg)を使用した。

ケイソウ土カラム：Varian社製のChem Elut® CE1020を使用した。

3. 装置

SFE装置：Hewlett Packard社製 HP7680T

ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard社製 HP5890 SERIES II (同社製、オートサンプラー-HP7673付)。

質量分析計：Hewlett Packard社製 HP5972

ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)：(株)島津製作所製の液体クロマトグラフ用ポンプ LC-6A、オートインジェクター-SIL-10A、UV検出器SPD-6 AV、フラクションコレクター-FRC-10A、記録計C-R2AX及びシステムコントローラー-SCL-10Aを使用した。

4. SFE操作条件

最終的なSFE条件を以下に示した。

試料量：4 g、CO₂密度：0.70 g/mL、抽出温度：40°C、圧力：115 bar(1668 psi)、CO₂流速：2.0 mL/min、平衡化時間：3 min、抽出時間：30 min、ノズル温度：45°C、トラップ：30-µm Hypersil octadecylsilane (ODS)、トラップ温度：

30°C, 抽出管容積: 7 mL. トラップはMeCN 1.8 mL (2 mL/min)で溶出し, これをSFE抽出液とした. 更にトラップは50% アセトン含有ヘキサン(A/H) 3.0 mL (2 mL/min), 続いてMeCN 3.0 mL (2 mL/min)で洗浄及びコンディショニングを行った.

5. GPC操作条件

分取用GPCカラム: Waters社製 Envirogel GPC Clean-Up カラム (内径19 mm, 長さ150 mmのカラムと内径19 mm, 長さ300 mmのカラムを連結して使用, EtOAc/シクロヘキサン(1:1)で充填), 移動相: EtOAc/シクロヘキサン(1:1), 流速: 5.0 mL/min, 注入量: 4.0 mL, 分取画分: 14~27分 (合計65 mL)

この条件で分取を開始するフルバリネート及び最後に溶出するトリシクラゾールの回収率はいずれも90%であった. なお, アクリナトリンは13~14分に約70%溶出するが, クリーンアップ効果を優先し分取の開始を14分とした. また, GPCカラムからの溶出はUV 254 nmでモニターした.

6. GC-MS測定条件

カラム: J&W Scientific社製のキャピラリーカラムDB-5MS (内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 µm), ガードカラム: J&W Scientific社製の不活性化キャピラリーカラム (内径0.25 mm, 長さ1 m), オープン温度: 50°C(1 min)-25°C/min-125°C-10°C/min-300°C(8.5 min), 注入口温度: 250°C, トランスファーライン温度: 310°C, キャリアーガス: ヘリウム, キャリアーガス圧力プログラム: 7.5 psi-99 psi/min-40 psi(0.1 min)-99 psi/min-7.5 psi (定流量モード, 1 mL/min), 注入量: 2 µL (スプリットレス), イオン化電圧: 70 eV (EIモード), 測定モード: 選択イオンモニタリング(SIM)モード (モニターイオンは表 1に示した.) 及びSCANモード (SCAN範囲: 50-550 amu)

7. 試験溶液の調製

7-1. SFE法

試料4 gを抽出管に充填し, SFE装置にセットして抽出した. この時, 抽出管の両端に試料の微粒子による目詰まりを防ぐために円形に切ったガラス繊維ろ紙 Whatman GF/F (Whatman社製)を置いた. また, モディファイヤーを添加する場合には抽出管内に直接添加した. 添加回収実験では, 試料4 gをビーカーにとり, 農薬標準混液40 µLを添加 (試料中0.1または0.5 µg/g)して室温で10分間放置して溶媒を揮散させてからよく混合したものを試料とした. 得られたSFE抽出液は窒素気流で溶媒を除去した後, 残留物を50% A/H 2 mLに溶解し, あらかじめ50% A/H 10 mLで洗浄したPSAカートリッジカラムに注入し, 50% A/H 20 mLで溶出した. 溶出液は溶媒を留去後, アセトン2 mLを加えて溶解しこれを試験溶液とした.

また, トウモロコシ及びソバ試料の場合には, PSAカラムのみではキャブタン, メトブレン及びトリアジメノールは妨害ピークのため定量困難であったため, これらを定量する場合には更にシリカゲルカラムを用いてクリーンアップを行った. 即ち, PSAカラムクリーンアップ後の試験溶液1 mLをとり溶媒を除去した後, 2% エーテル含有ヘキサン(E/H) 1 mLに溶解し, あらかじめ2% E/H 10 mLで洗浄したシリカゲルカートリッジカラムに注入し, まず2% E/H 15 mLで溶出しこの画分は捨て, 次に30% A/H 15 mLで溶出した. 溶出液は溶媒を留去後, アセトン 1 mLを加えて溶解しこれを試験溶液とした. なお, Scheme 1. に方法の概略を示した.

7-2. 溶媒抽出法

溶媒抽出法は, 厚生省通知「残留農薬迅速分析法の利用について」¹⁾に示された方法をもとに抽出溶媒をアセトンから35%含水MeCNに変更し, GPC後のカートリッジカラムによるクリーンアップにPSAを使用するなど一部変更して実

施した。即ち、試料10 gをとり35%含水MeCN 60 mLを加えて5分間振とう抽出後、吸引ろ過し、MeCN 30 mLでろ紙上の残さを洗浄した。抽出液を約20 mLに濃縮した後、NaCl 6 gを添加しよく攪拌後、全量をケイソウ土カラムに注入した。10分間放置後、EtOAc 150 mLで溶出し、溶出液の溶媒を留去した。この時水が残留した場合には、EtOAcを10 mLに加え、更に無水硫酸ナトリウムを適量加えて脱水した後、ろ過して無水硫酸ナトリウムを除き、容器及びろ紙上の残さをEtOAc 5mLで3回洗い込んだ後、溶媒を留去した。残留物をEtOAc/シクロヘキサン(1:1) 10 mLに溶解し、3000 rpmで5分間遠心分離した。上清4 mL(試料4 g相当)をGPCカラムに注入し、EtOAc/シクロヘキサン(1:1)で溶出した。GPC溶出液の溶媒を除去後、残留物を50% A/H 2 mLに溶解し、あらかじめ50% A/H 10 mLで洗浄したPS Aカートリッジカラムに注入し、50% A/H 20 mLで溶出した。溶出液の溶媒を留去後、アセトン2 mLを加えて溶解しこれを試験溶液とした。なお、Scheme 1. に方法の概略を示した。

8. 定性・定量

各試験溶液をGC-MSに注入しSIMモードで測定し、ピークの保持時間と面積から農薬を定性、定量した。定量は絶対検量線法で行った。

9. 確認試験

農薬が検出された場合にはSCAN測定を行い、標準品のマススペクトルと比較して確認を行った。また、濃度が低くSCAN測定ではマススペクトルが得られない場合には、1農薬につき5つのフラグメントイオンをモニターしてSIM測定を行い標準品と比較し、3つ以上のイオンの強度比が一致した場合に測定値を求めた。

C. 研究結果

1. SFE法の開発

SFE法の開発に当たっては、表2に記載の87農薬を玄米に添加して、様々なSFE条件下での

回収率を求めて最適な条件を検討した。

1-1. CO₂密度の検討

CO₂密度の影響を検討するために、密度0.3, 0.5, 0.7及び0.85 g/mL(40°Cにおける圧力はそれぞれ81, 91, 115及び211 bar)における玄米からの農薬の回収率を求めた。図1にはその代表的な結果を示した。大部分の農薬は0.3 g/mLでは回収されなかったが、多くの農薬は図1に示したヘプタクロールのように0.5 g/mL以上であるいはジメトエートのように0.7 g/mL以上でほぼ一定の回収率となった。フルバリネートの回収率は0.7 g/mLまで上昇した後0.85 g/mLでは減少した。この0.85 g/mLでの回収率の減少はこのほか多くの農薬でもみられた。0.85 g/mLでは回収率は上昇しないかむしろ減少する傾向がみられたため、CO₂密度は0.7 g/mLが適切と思われた。

1-2. 抽出温度の検討

抽出温度の影響について検討するため、40, 50, 60及び70°Cにおける玄米からの農薬の回収率について検討した。その結果、温度による大きな回収率の変化は見られなかったが、図2に示したヘプタクロール、ジメトエート及びフルバリネートなどのように60°Cから70°Cで回収率が減少する傾向がみられた。また、図2に示したようにキャプタン及びカプタホールでは、60°C以上で大きな減少が認められた。このように60°C及び70°Cでは回収率が減少する傾向があり、また、40°Cと50°Cでは回収率にほとんど差がなかったことから抽出温度は40°Cとした。

1-3. 試料量の検討

抽出に用いる試料量の検討を玄米2 g及び4 gを用いて実施した。なお、用いた抽出管(7 mL)では玄米試料は5 gをとることはできなかった。個々の農薬については、2 gと4 gで回収率に大きな差は見られなかったので、図3には各農薬群毎に回収率の平均値を示した。その結果4 g

でやや回収率が低くなる傾向が見られたが両者に大きな差は認められなかった。サンプリングの均一性を考慮した場合、試料量はできるだけ多いほうがばらつきが少なくなるので試料量は4 gを用いることとした。

1-4. 抽出時間の検討

抽出時間について、10~40分の範囲で検討した。なお、いずれの場合にも抽出の平衡時間は3分とした。大部分の農薬は図4に示したフェノバルブやパラチオンなどと同様に10から20分でほぼ一定の回収率となった。しかし、レナシルは10分では回収されず、30分以上でほぼ一定の回収率となった。この結果から抽出時間は30分とした。

1-5. トラップからの溶出条件の検討

SFEにより抽出された農薬は、ODSトラップで捕集される。このとき農薬以外の夾雑物も一緒に捕集されるが、トラップからの溶出条件を選ぶことにより農薬と妨害になる夾雑物を分けて溶出できる可能性がある。そのため、ODSトラップからの溶出に用いる溶媒の検討を行った。アセトンとMeCNについて検討したところ、アセトン 1.5 mLまたはMeCN 1.8 mLで農薬は完全にトラップから溶出された。次に、ODSトラップから農薬と一緒に溶出される夾雑物量について、アセトンとMeCNで比較した。即ち、玄米を用いてSFEを行い、トラップに捕集された抽出物をそれぞれアセトン及びMeCNで溶出し、それぞれの溶出物の重量を比較した。その結果、アセトンでは約25 mgであったのに対し、MeCNでは約4 mgとアセトンの場合の6分の1以下と少なく、MeCNのほうがクリーンアップ効果が期待された。このことから、農薬の溶出溶媒にはMeCNが適していると思われた。

次にトラップの洗浄溶媒について、アセトン、EtOAc及びヘキサンについて検討したところ、ヘキサンが最も速くトラップ内の夾雑物を溶出

し、アセトンとEtOAcは同程度であった。ヘキサンでは農薬の溶出に用いるMeCNとは混和しないので、トラップの洗浄には50% A/Hを用いることとした。なお、このときトラップ内の夾雑物は50% A/H 3 mLで溶出された。以上の結果から、トラップからの農薬の溶出にはMeCN 1.8 mLを用い、50% A/H 3 mLで洗浄したのち、MeCN 3 mLで次の抽出のためにコンディショニングすることとした。

1-6. SFE抽出液のクリーンアップ法の検討

穀類試料のSFE抽出液をそのまま測定したのでは、図5に示した小麦やトウモロコシの例のように、16分付近に大きなピークが認められ、定量が妨害された。そこで、カラムクリーンアップについて検討を行った。検討には2. 試薬及び試液に記載した各種SPEカートリッジカラムを用いた。その結果、PSA及びNH₂がクリーンアップ効果が高かったが、NH₂はキノメチオネートが全く回収されなかったのに対して、PSAは低回収率ながら20~30%回収されたことからPSAを選択した。PSAカラムを用いた場合、農薬は50% A/H 20 mLで溶出された。また、図5に示したようにPSAにより大きな妨害ピークを除くことができた。小麦及び玄米ではPSAのみで問題なく定量が可能だったが、トウモロコシでは15.5分付近にメトブレン、トリアジメノール及びキャプタンの定量を妨害するピークが認められた。この妨害ピークはそばでも観察された。そこで、この妨害ピークを除く方法について更に検討した結果、シリカゲルカラムを用いることにより妨害ピークと分離して定量する事が可能であった。図6にメトブレンの例を示した。PSAカラムクリーンアップのみではメトブレンの溶出位置に妨害ピークがみられたが、シリカゲルカラムを用いて2% E/H 15 mLで溶出することにより妨害ピークは溶出し、メトブレンは30% A/H 15 mLで溶出され良好に定量できた。

トリアジメノール及びキャプタンも同じ方法で定量可能であった。

1-7. モディファイヤーの検討

SFEでは抽出効率を上げるために、メタノールなどの溶媒をモディファイヤーとして流体あるいは試料に直接添加することが行われる。そこでモディファイヤーの効果について、メタノール、エタノール、MeCN、アセトン及びヘキサンについて検討した。これらの溶媒をそれぞれ0.2 mLずつ玄米試料に添加しSFEを行い回収率を求めた。その結果、いずれの溶媒を用いても回収率は添加しない場合と同じか、むしろ減少する傾向が見られたため、穀類試料のSFEにはこれらの溶媒のモディファイヤーは添加しないこととした。

1-8. 添加回収実験

確立したSFE法を用いて添加回収実験を行った。表2には玄米、小麦、トウモロコシ及びソバを用いてSFE法で87農薬について添加回収実験を行ったときの結果を示した。また、表3には回収率毎に農薬数を示した。その結果、メタミドホス、アセフェート、アミトラズ及びキノメチオネートが検討した4作物で回収率が50%未満であり、更にレナシルがトウモロコシ及びソバで50%未満であった。ただし、キノメチオネートの低回収率はPSAカラムからの回収率が低いため、PSAカラムクリーンアップを行わなければ90%以上の回収率であった。また、回収率が50~70%とやや低回収率だったのは小麦でのキャプタン、カプタホール、ジクロフルアニド、レナシル及びトウモロコシとソバでのジメトエートであった。検討した87農薬のうち約80農薬はいずれの作物でも70%以上（うち約75農薬は80%以上）の良好な回収率が得られた。

2. SFE法と溶媒抽出法の比較

2-1. 添加回収率の比較

従来の溶媒抽出法とSFE法を比較するために

128農薬を用いて小麦からの添加回収実験を行い両方法の回収率を比較し、表4にその結果を示した。また、表5には低回収率だった農薬についてまとめて示した。その結果、カプタホール、キャプタン、アミトラズ、キノメチオネート及びジクロフルアニドは両分析法で低回収率であった。カプタホール、キャプタン、アミトラズ及びジクロフルアニドは試料中あるいはGC測定の際に分解することが知られており、これが低回収率の原因と思われる。キノメチオネートの低回収率はPSAカラムクリーンアップにおける損失が原因である。SFE法のみで低回収率であったのは、アセフェート、メタミドホス、アセタミプリド及びトリシクラゾールの4農薬であった。これらの農薬の水溶解度はそれぞれ650000、2000000、4200及び1600 mg/Lで、特に極性の高い農薬であった。このような高極性の農薬に対してはSFEの抽出力は不十分であった。また、溶媒抽出法で低回収率であったのは、アクリナトリン、ブチレート、EPTC、エチオフエンカルブ、ジスルホトン、チオメトン及び2,4-ジクロロアニリンの7農薬であった。このうちアクリナトリンはGPCカラムでの分画による損失が原因である。ブチレート、EPTC及び2,4-ジクロロアニリンは、揮発性が高い農薬であるが、溶媒抽出法では溶媒の留去操作を繰り返し行うため低回収率になったものと考えられる。エチオフエンカルブ、ジスルホトン及びチオメトンは、GPC操作で回収率が減少することが知られておりこれは酸化分解が原因と思われる。そのほかの農薬ではややSFE法のほうが回収率が高い傾向がみられたものの両方で大きな差はみられず、両分析法とも概ね80%以上の良好な回収が得られた。

2-2. 農薬残留試料での比較

穀類試料に対するSFE法の実用性を検証する

ためには、添加回収実験で従来の溶媒抽出法と比較するだけでは不十分であるので、実際に農薬が残留している試料を用いて分析値を比較することが重要である。そこで、玄米、小麦、大麦及びトウモロコシ試料中の残留農薬をSFE法と溶媒抽出法で求め両者の測定値を比較した。表6にその結果を示した。両分析法の測定値の相対標準偏差(RSD)の平均値はSFE法で5.9%、溶媒抽出法で5.5%であり両者に大きな差は見られず、どちらも同程度の分析精度であった。また、個々の農薬について考察するため、SFE法の測定値を溶媒抽出法の測定値で割って両者の比を求め表7にその結果をまとめた。その結果、フェノバルブ及びカルバリルでは比が約0.4となり、SFE法のほうがやや低い測定値を示したが、スクリーニング分析として用いるには許容できる範囲と思われた。しかし、ジクロロボスは比が0.08となり、溶媒抽出法の1/10以下の低値を示した。添加回収実験ではこれら3農薬の回収率は、SFE法と溶媒抽出法とで大きな差は見られなかったことから、測定値が低かった原因を回収率から説明することはできなかった。これら低測定値を示した農薬は比較的極性が高い農薬であったので、農薬の水溶解度との関係に着目し、水溶解度に対して比をプロットした(図7)。その結果、農薬の水溶解度が100 mg/L付近から、溶解度に依存して溶媒抽出法よりSFE法のほうが測定値が低くなり、特に1000 mg/Lを越えるような水溶解度が高い農薬に対しては35%含水MeCNより抽出効率が劣ることが示された。添加回収実験と実際の農薬残留試料とでは、農薬の抽出効率に差が見られることは溶媒抽出法でも知られているが、SFEの場合にはこの現象がより顕著に現れたことが予想される。このことから、SFEを用いた分析法を開発する上で、添加回収実験の結果のみで分析法の性能を判断しないよう注意が必要と思われる。また、図8には溶媒抽出法で求めた

測定値に対してSFE法で求めた測定値をプロットし両者の相関関係を求めた。その結果、回帰直線の傾き及び切片はそれぞれ0.935及び-0.739で、相関係数(r)は0.989であった(ジクロロボスを除いた場合には傾き=0.933, 切片=1.315及び r=0.990)。

D. 考察

1. SFE法の開発

玄米に農薬を添加してCO₂密度、抽出温度、試料量、抽出時間などのSFE条件が抽出効率に与える影響について検討し最適な条件を選択した。一般にCO₂密度は高いほうがSFEの抽出力は上昇するとされているが、今回の検討では必ずしも密度が高いほど回収率が高い結果とはならなかった。恐らく密度が高い状態では抽出物量が多くなりそのためトラップが飽和され、農薬を保持しきれなくなったことが原因と考えられるが、詳細については不明である。これについては、装置のトラップ部分の構造と抽出物のトラップ効率に関する検討が今後必要であると思われる。

また、土壌試料などではモディファイヤーの添加によって極性の比較的高い農薬の回収率が上昇することが知られている²⁾が、玄米を用いた検討では、モディファイヤーとして溶媒を添加することにより回収率がむしろ減少した。結果的に穀類ではモディファイヤーを添加しなくても良好な回収率が得られたが、これは、土壌などと異なり穀類ではその含有成分がモディファイヤーとして作用しているためと思われる。SFEでは水が効果的なモディファイヤーとして働くことが報告されている³⁾ことから、玄米中の水分がモディファイヤーとして作用していることが考えられるが、そのほかの成分を含むメカニズムの詳細については不明で今後検討が必要と思われる。

最適化したSFE条件を用いて、玄米、小麦、

トウモロコシ及びそばからの添加回収実験を行ったところ大部分の農薬で概ね80%以上の良好な回収率が得られ、種類によらず穀類に対してSFE法は広く適用可能であると思われた。また、試験溶液の調製にかかる時間はSFE法は1検体約1.5時間で、溶媒抽出法の4～5時間より大幅に短縮された。また、SFEは選択的に抽出を行うことができるため、得られた抽出液は溶媒抽出法よりも夾雑物が少なくそのためクリーンアップも簡略化された。更にSFE法は自動化できるため分析法の迅速化・省力化に大きく寄与するものと思われる。

2. SFE法と溶媒抽出法の比較

穀類試料に対するSFE法の実用性を検証するために小麦を用いた添加回収実験及び実際の農薬残留試料を用いて、従来の溶媒抽出法との比較を行った。その結果、本研究で開発したSFE法は水溶解度が1000 mg/Lを越えるような極性の高い農薬に対しては抽出力が低く分析対象外とせざるを得ない。水溶解度が10～1000 mg/Lの農薬は境界領域の農薬であり、農薬や作物の種類によってばらつきが大きくなったり、測定値がやや低くなることがあるが、スクリーニング分析としては、十分使用可能であると思われる。そのほかの多くの農薬に対してはSFE法は溶媒抽出法と同等の測定値を与えた。以上の結果から、SFE法は穀類中の残留農薬分析におけるスクリーニングを目的とした一斉分析法として実用性のある方法であると思われる。また、この検討の過程で、SFE法では添加回収実験と実際の農薬残留試料とで結果に溶媒抽出法より大きな差が見られる場合があったので、可能な限り実際の農薬残留試料を用いてSFE法の適用範囲に関しては判断する必要があり、今後更にこれらの情報を蓄積する必要があると思われる。

E. 結論

穀類中の残留農薬をSFEで抽出し、GC-MS(SIM)で測定する、迅速な一斉分析法を確立した。SFE法は溶媒抽出法と比較して、水溶解度が1000 mg/Lを越える極性の高い農薬に対しては低い測定値を与え、対象から除外する必要があるが、それより水溶解度が低い農薬に対しては溶媒抽出法とほぼ同等の測定値を与えた。よって、SFE法は穀類試料中の残留農薬分析に対して実用可能な方法であると思われる。また、試験溶液の調製時間は溶媒抽出法より大幅に短縮されかつ操作も簡略化されるため、残留農薬分析の迅速化・省力化に大きく寄与するものと思われる。

F. 文献

- 1)厚生省生活衛生局長通知、衛化第43号、平成9年4月8日
- 2)Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., and Saito, Y. Effect of Extraction Conditions and Modifiers on the Supercritical Fluid Extraction of 88 Pesticides. *J. Chromatographic Science*, 35: 467-477 (1997)

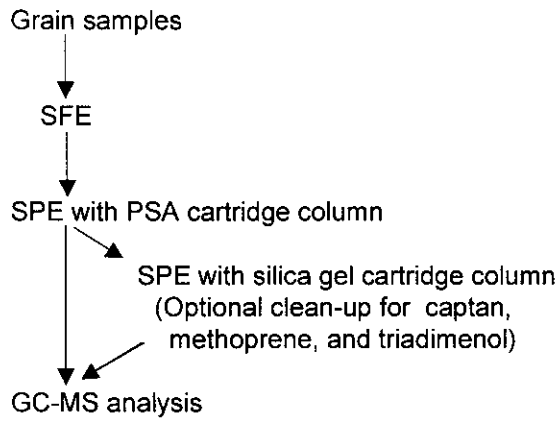
G. 研究発表

1. 論文発表

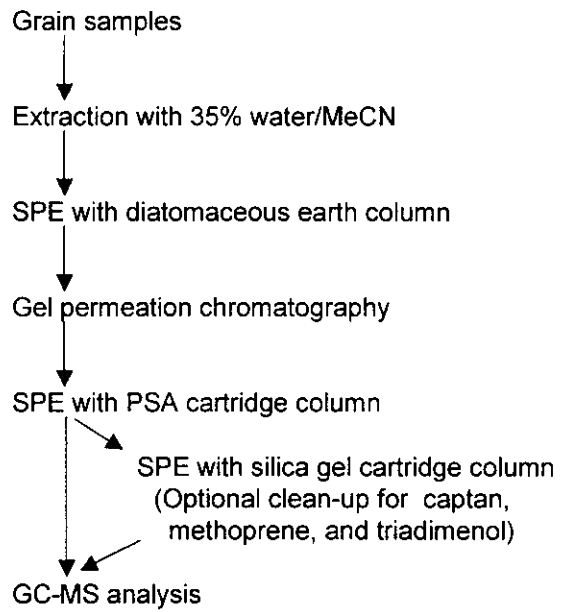
なし

2. 学会発表

- (1)根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武, 斎藤行生: 農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—穀類試料について—日本食品衛生学会第72回学術講演会(1996.10)
- (2) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., and Saito, Y.: Multiresidue Analysis of Pesticides in Grains by Supercritical Fluid Extraction and GC/MS(SIM Mode):9th Annual California Pesticides Residue Workshop(1997.3.3-6)



(a) SFE Method



(b) Solvent Extraction Method

Scheme 1. 穀類試料の分析法の概略

SPE: Solid phase extraction

表1. GC-MS (SIM)測定における農薬の保持時間(t_r)及びモニターイオン(m/z)

No.	Pesticides	t_r (min)	m/z	No.	Pesticides*	t_r (min)	m/z
Organochlorine (16)				Pyrethroid (12)			
1	Aldrin	14.67	262.8	1	Acrinathrin	19.98	181.0
2	α -BHC	11.80	182.9	2	Cyfluthrin-1	21.18	226.0
3	β -BHC	12.28	182.9		Cyfluthrin-2	21.27	226.0
4	δ -BHC	13.03	182.9		Cyfluthrin-3	21.33	226.0
5	γ -BHC	12.47	182.9		Cyfluthrin-4	21.37	226.0
6	Captafol	18.45	79.0	3	Cyhalothrin-1	19.65	197.0
7	Captan	15.58	79.0		Cyhalothrin-2	19.83	197.0
8	Chlorobenzilate	17.13	250.9	4	Cypermethrin-1	21.51	162.9
9	p,p' -DDD	17.31	235.0		Cypermethrin-2	21.61	162.9
10	p,p' -DDE	16.51	245.9		Cypermethrin-3	21.67	162.9
11	o,p' -DDT	17.37	235.0		Cypermethrin-4	21.70	162.9
12	p,p' -DDT	18.02	235.0	5	Deltamethrin-1	23.14	181.0
13	Dieldrin	16.66	262.8		Deltamethrin-2	23.39	181.0
14	Endrin	17.07	262.8	6	Ethofenprox	21.85	163.0
15	Heptachlor	13.95	271.7	7	Fenvalerate-1	22.47	167.0
16	Heptachlor epoxide	15.42	352.8		Fenvalerate-2	22.71	167.0
Carbamate (15)				8	Flucythrinate-1	21.68	199.0
1	Aldicarb	3.74	115.0		Flucythrinate-2	21.87	199.0
2	Bendiocarb	11.39	151.0	9	Fluvalinate-1	22.59	250.0
3	Butylate	8.74	146.0		Fluvalinate-2	22.66	250.0
4	Carbaryl	13.87	144.0	10	Halfenprox	21.59	262.9
5	Chlorpropham	11.25	213.0	11	Permethrin-1	20.66	183.0
6	Diethofencarb	14.56	151.0		Permethrin-2	20.78	183.0
7	EPTC	7.97	86.0	12	Tefluthrin	12.91	177.0
8	Esprocarb	14.41	222.1	Other (42)			
9	Ethiofencarb	13.32	107.0	1	Acetamidrid	18.76	152.0
10	Fenobucarb	10.69	121.0	2	Amitraz	19.83	293.2
11	Isoprocarb	9.92	121.0	3	Benalaxyl	17.74	148.1
12	Methiocarb	14.26	168.0	4	Benfuresate	13.47	163.0
13	Pirimicarb	13.13	166.1	5	Bitertanol-1	20.61	170.1
14	Propoxur	10.71	110.0		Bitertanol-2	20.71	170.1
15	Thiobencarb	14.59	100.1	6	Chinomethionat	15.90	233.9
Organophosphate (43)				7	Cyproconazole-1	16.90	222.0
1	Acephate	8.84	136.0		Cyproconazole-2	16.93	222.0
2	Azinphos-ethyl	20.21	160.0	8	Dichlofluanid	14.38	123.0
3	Azinphos-methyl	19.64	160.0	9	2,4-Dichloroaniline	7.78	160.9
4	Bromophos-ethyl	15.78	302.8	10	Difenoconazole-1	23.03	323.0
5	Butamifos	16.12	266.0		Difenoconazole-2	23.10	323.0
6	Cadusafos	11.58	158.9	11	Dimethipin	12.27	54.1
7	(E)-Chlorfenvinphos	15.18	266.9	12	Fenarimol	20.09	138.9
8	(Z)-Chlorfenvinphos	15.39	266.9	13	Flusilazole	16.60	233.0
9	Chlorpyrifos	14.54	198.9	14	Flutolanil	16.24	173.0
10	Chlorpyrifos-methyl	13.61	285.9	15	Fosthiazate-1	15.02	194.9
11	Diazinon	12.64	179.1		Fosthiazate-2	15.08	194.9
12	Dichlorvos	6.78	109.0	16	Imibenconazole	24.71	125.0
13	Dimethoate	12.03	87.0	17	Imibenconazole des benzyl type	16.68	83.0
14	(Z)-Dimethylvinphos	14.60	294.9	18	Iprodione	18.71	313.9
15	Dioxabenzofos	11.44	215.9	19	Iprodione metabolite	19.39	186.8
16	Disulfoton	12.89	88.0	20	Lenacil	17.94	153.0
17	Edifenphos	17.87	310.0	21	Mefenacet	19.78	192.0
18	EPN	18.92	157.0	22	Mepronil	17.53	119.1
19	Ethion	17.30	230.9	23	Methoprene	15.66	111.0
20	Ethoprophos	11.03	157.9	24	Metolachlor	14.51	162.1
21	Etrimfos	12.98	292.0	25	Metribuzin	13.62	198.0
22	Fenitrothion	14.24	277.0	26	Myclobutanil	16.57	179.0
23	Fensulfotthion	17.16	292.0	27	Pacllobutrazol	15.97	236.0
24	Fenthion	14.64	278.0	28	Pendimethalin	15.19	252.1
25	Isofenphos	15.36	213.0	29	Pretilachlor	16.35	238.1
26	Isofenphos oxon	14.71	228.9	30	Propiconazole-1	17.85	259.0
27	Malaoxon	13.66	127.0		Propiconazole-2	17.97	259.0
28	Malathion	14.39	173.1	31	Pyridaben	20.85	147.1
29	Methamidophos	6.66	94.0	32	(E)-Pyrifenoxy	15.89	261.9
30	Methidathion	15.79	144.9	33	(Z)-Pyrifenoxy	15.38	261.9
31	Parathion	14.70	291.0	34	Pyrimidifen	22.26	184.0
32	Parathion-methyl	13.75	262.9	35	Pyriproxyfen	19.70	136.0
33	Phenthoate	15.50	273.9	36	Silafluofen	22.00	258.0
34	Phosalone	19.54	181.9	37	Tebuconazole	18.28	125.0
35	Phosmet	18.88	160.0	38	Tebufenpyrad	19.15	333.1
36	Pirimiphos-methyl	14.16	290.0	39	Thenylchlor	18.18	127.0
37	Prothiofos	16.34	309.0	40	Triadimefon	14.76	57.1
38	Pyraclufos	20.34	360.0	41	Triadimenol	15.58	112.1
39	Quinalphos	15.52	146.0	42	Tricyclazole	16.45	188.9
40	Terbufos	12.54	231.0				
41	Thiometon	11.93	88.0				
42	Tolclofos-methyl	13.77	264.9				
43	Vamidothion	15.93	145.0				

*異性体が存在する農薬については保持時間順に農薬名の後に番号をつけて示した。

表2. SFE法の添加回収実験結果 (n = 3)

No.	Pesticide	Recovery (%)							
		Rice		Wheat		Corn		Buckwheat	
		Mean	RSD ¹	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Organochlorine (16)									
1	Aldrin	90.0	3.3	90.2	5.0	93.7	1.9	87.5	0.3
2	α -BHC	90.8	2.7	90.2	5.2	93.1	2.0	89.8	1.2
3	β -BHC	89.5	2.3	89.1	4.3	90.9	3.3	90.7	1.3
4	δ -BHC	88.9	3.2	90.6	5.3	94.3	1.7	94.4	2.5
5	γ -BHC	89.5	2.1	92.6	6.5	96.9	1.7	92.9	0.9
6	Captafol	74.3	2.0	64.8	6.1	85.6	6.8	77.5	6.7
7	Captan	78.7	3.3	55.7	6.3	73.0	4.6	91.0	0.5
8	Chlorobenzilate	90.4	2.9	94.9	6.0	101.0	4.9	102.5	1.3
9	p,p'-DDD	88.1	2.5	91.9	4.5	99.5	3.3	99.0	0.2
10	p,p'-DDE	90.6	2.3	93.1	5.9	98.8	2.3	94.5	0.6
11	o,p'-DDT	88.6	2.6	90.6	5.8	96.8	3.8	95.6	0.6
12	p,p'-DDT	93.4	3.1	93.8	4.5	98.3	3.5	95.9	1.1
13	Dieldrin	87.7	3.7	91.2	6.0	96.2	3.5	92.0	0.8
14	Endrin	90.3	3.9	92.5	6.2	95.0	3.6	100.3	0.6
15	Heptachlor	90.9	2.8	92.4	6.4	94.1	2.8	87.5	1.2
16	Heptachlor epoxide	88.3	3.6	89.9	6.4	93.9	2.7	88.6	1.1
Pyrethroid (8)									
2	Cyfluthrin	89.2	6.2	93.0	3.8	98.1	4.6	94.0	1.7
3	Cyhalothrin	93.4	5.3	97.5	3.1	97.7	3.7	97.1	0.5
4	Cypermethrin	90.8	2.6	91.4	3.0	83.2	0.8	91.6	5.2
5	Deltamethrin	84.2	2.1	89.0	2.7	93.9	3.4	90.8	2.5
7	Fenvalerate	90.9	1.7	89.9	2.3	94.9	3.7	97.3	1.9
8	Flucythrinate	88.4	3.5	88.2	2.3	91.6	3.7	95.1	2.9
9	Fluvalinate	87.7	2.1	85.3	1.8	89.8	1.9	88.1	2.4
11	Permethrin	100.1	5.2	93.2	1.9	100.8	2.3	96.6	1.7
Carbamate (11)									
2	Bendiocarb	92.0	1.0	89.7	5.9	91.1	3.3	89.7	0.9
5	Chlorpropham	92.1	1.8	92.9	5.4	97.4	4.3	92.1	0.6
6	Diethofencarb	89.2	1.3	93.3	6.8	101.6	6.3	98.6	1.1
8	Esprocarb	89.3	1.5	91.8	5.6	98.4	2.7	92.9	0.8
9	Ethiofencarb	91.1	2.1	93.0	5.4	95.2	4.2	75.8	4.1
10	Fenobucarb	94.6	2.3	91.9	5.8	92.1	4.1	89.8	1.9
11	Isoprocarb	91.2	2.0	90.4	6.0	90.9	3.6	87.5	3.3
12	Methiocarb	90.2	3.1	92.9	6.3	96.9	4.6	90.2	0.9
13	Pirimicarb	92.3	1.9	91.5	5.7	96.1	3.4	87.3	0.8
14	Propoxur	90.8	0.9	90.2	6.0	90.0	4.2	88.3	1.8
15	Thiobencarb	90.8	1.6	94.1	4.3	98.7	3.7	96.4	1.7
Organophosphate (33)									
1	Acephate	27.3	6.3	8.5	4.9	14.2	5.2	4.6	8.2
2	Azinphos-ethyl	91.4	6.6	96.9	3.4	102.7	4.3	101.1	1.2
3	Azinphos-methyl	98.3	9.6	102.6	4.3	105.1	5.1	97.0	1.6
4	Bromophos-ethyl	92.9	3.1	94.4	6.2	104.8	4.2	83.4	1.9
7	(E)-Chlorfenvinphos	90.5	1.5	93.7	6.0	98.6	7.2	95.9	1.0
8	(Z)-Chlorfenvinphos	83.7	3.1	85.0	6.5	97.9	6.0	94.4	0.9
9	Chlorpyrifos	92.1	3.8	94.7	6.1	101.4	3.4	92.6	0.9
10	Chlorpyrifos-methyl	91.1	1.7	93.5	5.9	96.8	3.1	90.8	0.8
11	Diazinon	96.2	3.8	97.6	2.9	101.6	1.7	91.4	1.2
12	Dichlorvos	79.9	4.1	74.1	10.3	87.1	1.7	79.3	4.9
13	Dimethoate	74.8	3.5	73.4	6.5	64.7	8.2	67.5	1.2
15	Dioxabenzofos	89.7	2.5	88.7	5.5	91.8	3.2	87.5	1.3
16	Disulfoton	90.4	1.0	91.4	5.8	97.8	3.6	83.3	2.1
17	Edifenphos	91.6	7.2	91.7	4.7	101.1	5.6	101.8	0.1
18	EPN	91.3	7.1	94.6	4.7	95.5	7.3	100.4	2.3
20	Ethoprophos	91.2	1.1	91.7	4.8	93.2	3.9	88.8	2.0
21	Etrimfos	91.1	2.6	93.3	5.1	97.9	2.6	90.3	1.0
22	Fenitrothion	89.2	3.3	91.9	6.9	96.8	6.2	92.1	1.3
23	Fensulfothion	97.3	5.6	100.4	6.1	95.8	6.0	104.8	2.8
24	Fenthion	89.1	2.8	90.1	5.8	97.9	3.9	86.5	0.6

表 2. (続き)

No.	Pesticide	Recovery (%)							
		Rice		Wheat		Corn		Buckwheat	
		Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
28	Malathion	92.5	1.6	96.3	7.7	110.4	4.0	98.4	0.6
29	Methamidophos	ND ²		ND		ND		ND	
30	Methidathion	90.8	2.7	92.9	5.8	104.3	2.7	100.7	1.6
31	Parathion	95.3	4.1	91.8	7.0	91.3	3.4	86.9	5.9
32	Parathion-methyl	88.5	1.0	91.5	6.1	98.6	2.3	91.2	1.2
33	Phenthoate	91.9	2.3	91.6	6.3	98.7	5.1	94.0	1.0
34	Phosalone	92.2	6.1	96.5	4.6	97.5	2.9	103.3	1.1
35	Phosmet	88.5	7.6	90.1	4.6	92.5	5.3	100.8	1.1
36	Pirimiphos-methyl	91.4	2.0	92.3	4.9	103.8	2.8	94.4	0.6
37	Prothiofos	93.6	3.8	95.7	5.4	101.0	3.3	96.4	0.6
39	Quinalphos	92.2	3.1	92.0	6.0	101.9	3.8	94.7	1.1
40	Terbufos	89.9	1.4	90.7	5.9	97.6	3.7	88.3	1.5
41	Thiometon	89.6	0.8	90.2	5.6	88.5	2.2	88.0	2.3
	Other (19)								
2	Amitraz	12.8	35.8	10.2	3.7	13.6	5.1	19.2	35.9
3	Benalaxyl	75.6	5.0	72.5	5.4	102.5	3.3	99.9	1.0
5	Bitertanol	119.1	2.5	113.4	1.6	97.2	4.5	109.6	3.8
6	Chinomethionat	36.5	6.7	38.8	8.9	41.2	6.5	44.6	2.0
8	Dichlofluanid	81.6	8.8	59.9	3.4	87.8	3.9	95.2	2.0
11	Dimethipin	77.0	0.9	74.7	6.4	74.5	3.8	74.2	1.0
14	Flutolanil	98.8	7.6	97.9	5.2	88.3	4.9	100.7	3.4
20	Lenacil	70.9	0.5	69.3	6.5	15.2	5.6	46.9	3.6
21	Mefenacet	94.5	4.7	100.8	4.2	96.7	3.3	94.0	1.2
22	Mepronil	93.0	5.4	96.2	4.1	100.5	5.1	100.8	1.3
23	Methoprene	96.4	1.2	105.6	3.2	91.3	3.1	101.8	5.6
25	Metribuzin	78.8	1.6	80.2	7.7	84.1	4.0	73.7	1.0
26	Myclobutanil	87.7	3.5	88.6	6.4	92.2	2.8	100.1	2.2
28	Pendimethalin	88.9	1.2	92.9	7.0	97.5	5.7	94.4	0.3
29	Pretilachlor	94.2	2.5	96.7	6.1	103.5	3.5	104.1	1.4
30	Propiconazole	97.1	5.2	93.2	3.5	96.8	4.8	102.0	4.1
31	Pyridaben	83.1	4.4	85.9	4.6	98.6	8.1	94.5	3.6
40	Triadimefon	93.2	2.5	90.3	6.2	100.1	3.5	90.7	0.7
41	Triadimenol	89.8	3.9	95.4	3.1	100.4	5.1	94.6	1.2

¹RSD, relative standard deviation; ²ND, not detected.

表 3. SFE 法の添加回収実験結果のまとめ

Recovery	Rice	Wheat	Corn	Buckwheat
>70%	83	79	81	81
50 - 70%	0	4	1	1
<50%	4	4	5	5

数字は農薬数を示す。

表4. SFE法と溶媒抽出法の小麦からの回収率の比較

No.	Pesticide	Recovery (%), n = 3				No.	Pesticide	Recovery (%), n = 3			
		SFE		Solvent extraction				SFE		Solvent extraction	
		Mean	RSD*	Mean	RSD			Mean	RSD	Mean	RSD
Organochlorine (16)					Organophosphate (cont.)						
1	Aldrin	96.9	3.1	75.4	1.5	21	Etrinfos	100.2	3.3	93.8	5.1
2	α -BHC	93.3	6.8	77.2	2.7	22	Fenitrothion	106.2	5.1	105.4	8.0
3	β -BHC	101.7	4.9	88.0	5.2	23	Fensulfthion	90.1	2.8	83.0	4.4
4	δ -BHC	93.5	2.8	93.0	3.4	24	Fenthion	102.4	4.0	85.6	8.3
5	γ -BHC	97.2	3.6	83.0	0.7	25	isofenphos	106.8	2.8	96.9	5.3
6	Captafol	9.9	92	23.3	12.7	26	Isofenphos oxon	101.8	5.4	102.8	7.3
7	Captan	19.8	26	18.9	13.6	27	Malaoxon	97.9	3.2	116.7	4.4
8	Chlorobenzilate	105.4	4.6	101.5	6.3	28	Malathion	99.6	3.4	101.2	9.2
9	p,p'-DDD	102.2	2.0	92.1	6.0	29	Methamidophos	17.4	8.0	90.9	3.0
10	p,p'-DDE	104.0	2.1	84.9	4.5	30	Methidathion	104.6	4.3	106.2	6.7
11	o,p'-DDT	101.9	1.7	87.1	4.4	31	Parathion	95.4	1.6	105.3	3.9
12	p,p'-DDT	105.3	5.0	91.1	5.1	32	Parathion-methyl	110.6	5.1	116.6	8.7
13	Dieldrin	100.3	0.7	88.5	2.6	33	Phenthoate	105.3	3.9	104.5	6.8
14	Endrin	106.2	2.9	96.4	4.0	34	Phosalone	97.7	2.8	88.4	5.1
15	Heptachlor	97.7	2.3	77.1	2.8	35	Phosmet	94.6	3.1	87.9	4.2
16	Heptachlor epoxide	98.2	1.3	88.0	3.6	36	Pirimiphos-methyl	104.6	3.3	96.3	4.3
Pyrethroid (12)					Other (42)						
1	Acrinathrin	87.4	5.3	18.6	3.6	37	Prothiofos	99.6	4.2	95.1	5.2
2	Cyfluthrin	91.3	1.1	86.6	5.4	38	Pyraclufos	96.9	3.2	96.7	6.1
3	Cyhalothrin	99.0	2.5	86.1	6.3	39	Quinalphos	104.6	3.7	96.7	6.2
4	Cypermethrin	87.3	1.7	87.5	1.1	40	Terbufos	98.7	3.4	69.2	7.9
5	Deltamethrin	83.9	8.8	88.3	4.1	41	Thiometon	92.8	4.2	50.4	13
6	Ethofenprox	94.2	1.3	85.7	3.3	42	Tolclofos-methyl	99.1	4.0	90.8	3.5
7	Fenvalerate	85.9	5.0	82.5	3.9	43	Vamidothion	64.9	4.3	68.3	16
8	Flucythrinate	85.4	1.0	84.1	3.2						
9	Fluvalinate	76.3	8.4	81.8	1.8	1	Acelamiprid	17.7	5.7	89.4	0.9
10	Haifenprox	98.0	2.4	83.7	5.1	2	Amitraz	14.1	16.3	22.3	91
11	Permethrin	95.6	1.6	91.7	5.1	3	Benalaxyl	100.0	1.1	90.7	8.2
12	Tefluthrin	100.5	2.4	87.9	3.2	4	Benfuresate	99.5	3.3	92.1	5.1
Carbamate (15)											
1	Aldicarb	80.6	6.3	72.2	12	5	Bitertanol	87.4	5.9	104.0	2.3
2	Bendiocarb	94.3	5.1	94.8	4.9	6	Chinomethionat	17.5	28.6	32.3	12
3	Butylate	110.7	3.2	32.0	19	7	Cyproconazole	98.0	3.8	96.7	6.8
4	Carbaryl	95.1	4.7	97.4	6.7	8	Dichlofluanid	25.7	16.5	25.5	3.4
5	Chlorpropham	98.2	3.7	89.2	5.8	9	2,4-Dichloroaniline	95.5	7.4	57.7	8.3
6	Diethofencarb	91.3	3.0	85.2	5.5	10	Difenoconazole	88.2	2.5	93.2	1.7
7	EPTC	111.4	3.3	28.9	8.8	11	Dimethipin	84.0	3.3	93.8	7.6
8	Esprocarb	100.2	3.1	92.3	3.6	12	Fenarimol	88.3	1.4	86.9	6.3
9	Ethiofencarb	95.1	5.7	18.2	21	13	Flusilazole	100.7	3.2	95.2	6.5
10	Fenobucarb	94.9	3.5	87.9	4.3	14	Flutolanil	106.7	4.4	100.4	8.9
11	Isoprocarb	90.3	2.8	82.2	2.3	15	Fosthiazate	98.2	2.2	98.6	7.0
12	Methiocarb	103.9	3.6	93.6	6.6	16	Imibenconazole	96.9	3.4	93.7	4.7
13	Pirimicarb	96.9	3.1	100.6	5.5	17	Imibenconazole des benzyl type	78.8	2.4	98.6	7.6
14	Propoxur	93.3	3.9	97.1	4.0	18	Iprodione	92.3	4.7	83.6	3.5
15	Thiobencarb	101.9	2.5	92.0	4.8	19	Iprodione metabolite	90.3	2.1	92.9	8.6
Organophosphate (43)											
1	Acephate	46.1	6.7	97.4	5.6	20	Lenacil	77.3	2.0	95.0	6.2
2	Azinphos-ethyl	94.8	2.9	87.9	5.4	21	Metenacet	91.0	1.9	90.7	5.0
3	Azinphos-methyl	99.6	2.6	105.0	4.6	22	Mepronil	99.8	4.0	94.0	9.0
4	Bromophos-ethyl	108.2	4.7	97.1	5.1	23	Methoprene	106.0	5.1	98.7	8.1
5	Butamifos	114.2	5.5	98.6	0.7	24	Metolachlor	106.3	3.1	99.7	6.5
6	Cadusafos	101.3	4.7	84.3	3.9	25	Metribuzin	78.8	1.3	91.6	4.4
7	(E)-Chlorfenvinphos	103.4	5.1	98.8	6.4	26	Myclobutanil	100.9	3.4	94.5	6.7
8	(Z)-Chlorfenvinphos	105.1	3.1	97.9	7.3	27	Paclobutrazol	102.5	4.2	96.4	7.6
9	Chlorpyrifos	98.4	4.8	92.7	4.9	28	Pendimethalin	104.5	3.0	98.5	6.9
10	Chlorpyrifos-methyl	98.3	2.0	106.6	2.9	29	Pretilachlor	112.9	2.6	98.4	7.2
11	Diazinon	100.1	3.2	96.7	7.5	30	Propiconazole	103.4	3.4	92.4	2.9
12	Dichlorvos	74.3	6.4	60.6	11	31	Pyridaben	98.3	0.9	86.9	3.9
13	Dimethoate	87.4	6.4	105.0	4.8	32	(E)-Pyrifenoxy	101.3	5.6	106.8	0.9
14	(Z)-Dimethylvinphos	105.9	4.3	104.3	7.0	33	(Z)-Pyrifenoxy	102.9	3.3	108.4	8.0
15	Dioxabenzofos	90.4	3.9	83.4	3.6	34	Pyrimidifen	88.8	0.2	85.1	2.8
16	Disulfoton	95.2	3.7	46.6	11	35	Pyriproxyfen	97.8	3.3	90.5	6.5
17	Edifenphos	102.3	2.8	94.2	3.3	36	Silafufen	91.3	2.1	75.3	5.5
18	EPN	99.6	1.2	89.0	5.3	37	Tebuconazole	93.8	3.0	88.0	3.8
19	Ethion	103.8	1.7	96.4	6.8	38	Tebuconazole	98.6	4.5	89.7	5.5
20	Ethoprophos	96.8	4.4	83.5	2.2	39	Thenylchlor	104.7	4.3	92.7	2.4
						40	Triadimefon	110.7	1.1	102.4	2.6
						41	Triadimenol	103.4	3.8	99.6	3.1
						42	Tricyclazole	10.8	8.9	100.8	6.0

* RSD, relative standard deviation.

表5. 小麦からの添加回収実験で低回収率の農薬

a) SFE法と溶媒抽出法の両方で低回収率の農薬

OC: captafol, captan
OT: amitraz, chinomethionat, dichlofluanid

b) SFE法で低回収の農薬

OP: acephate, methamidophos
OT: acetamiprid, tricyclazole

c) 溶媒抽出法で低回収率の農薬

PY: acrinathrin
CA: butylate, EPTC, ethiofencarb
OP: disulfoton, thiometon
OT: 2,4-dichloroaniline

OC = organochlorine; PY = pyrethroid; CA = carbamate;
OP = organophosphate; OT = other.