

19990649

平成 11 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. 超臨界流体抽出、HPLCによる一斉分析法に関する研究	33
3. LC/MSによる残留農薬試験法に関する研究	55
4. 農薬イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究	
(1) 免疫化学的測定法による植物成長調整剤イナベンフィドの分析 ..	65
(2) ピリミカーブ免疫化学的測定法の開発 (2)	77
(3) 残留農薬のイムノアッセイキットによる分析	83

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迅速化するために、残留農薬一斉分析法及び簡易分析法等の開発に関する4課題の分担研究を実施した。

(1) GC/MSで測定可能な128農薬を対象に、超臨界流体抽出(SFE)を用いた茶葉の一斉分析法を確立した。農薬残留試料を用いて溶媒抽出法の測定値との比較を行い、SFEの有用性を証明した。

(2) 27農薬を対象に、野菜・果実からSFEで抽出し、カートリッジカラムでクリーンアップ後、HPLCで測定する一斉分析法を開発した。

(3) キャピラリーカラムを用いたLC/MSで、N-メチルカルバメート系農薬の一斉分析法の基礎的検討を行った。

(4) 植物成長調整剤イナベンフィド及び殺虫剤ピリミカブの免疫化学的測定法(ELISA)の開発を行った。農産物での添加回収試験及び機器分析法との比較試験を実施し、両者による測定値に高い相関性を得た。更に、クロルピリホス及びアルジカルブの市販ELISAキットの有用性を検討した。

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

び定量、(4) 酵素免疫化学測定法(ELISA)、
の4課題について研究した。

B. 研究方法

分担研究1

乾燥野菜のモデルとして茶葉を用いてSFEによる128農薬の一斉分析法を開発した。一方、茶葉中農薬の有機溶媒抽出による一斉分析法を開発した。両分析法による添加回収試験及び農薬残留試料中の農薬測定結果の比較を行った。

分担研究2

基準値が設定されており、HPLCで測定可能で、フロリジル及びPSAカラムからの回収率が高かった27農薬を選択し、HPLCによる測定条件を検討した。野菜・果実からSFEで農薬を抽出するための試料前処理法、抽出及び捕集条件を最適化した。5作物について27農薬の添加回収試験を行った。

分担研究3

キャピラリーカラムを用いたLC/MSによるN-メチルカルバメート系農薬の一斉分析のために、良好な分離と分子イオン又は擬分子イオン

A. 研究目的

食品衛生法では現在199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、食の安全性確保に貢献している。しかし、多数の農薬を告示試験法で検査するには多大な労力と時間を要する。そこで、多数の農薬を同時分析できるように、また、簡便に検査が出来るように、告示試験法とは異なる手法を用いた迅速試験法を開発することを目的に研究を実施した。

本研究では、(1) 超臨界流体抽出(SFE)及びGC/MSによる一斉分析法、(2) SFE及びHPLCによる一斉分析法、(3) LC/MSによる定性及

を補足して、測定する条件を検討した。

分担研究 4

①イナベンフィドの直接競合 ELISA に対する玄米由来の夾雑物成分の影響を回避する方法を検討した。確立した ELISA 条件を用い、機器分析法 (GC-ECD 及び HPLC) との相関性を検討した。

②昨年度に基礎的な測定系を組み立てたピリミカーブの ELISA について、農産物での添加回収試験及び機器分析法との比較試験を実施した。

③競合 ELISA 法を利用した市販の残留農薬測定キットの中で、磁気ビーズタイプのクロロピリホスキットとマイクロウェルタイプのアルジカルブキットの有用性について検討した。

C. 研究結果

分担研究 1

茶葉の溶媒抽出液はクリーンアップが必要であったが、SFE抽出液はクロロフィルを含まず、クリーンアップが不要であった。SFEにより、試験溶液の調製時間は大幅に短縮され、操作も簡略化された。また、添加回収実験で低回収率となる農薬はSFEの方が少なかった。農薬残留試料を用いた比較試験の結果、SFEは大部分の農薬について溶媒抽出とほぼ同じ測定値を与え、実用性が示された。

分担研究 2

野菜・果実をSFEで抽出し、フロリジルとPSAカラムでクリーンアップし、3画分に分けてフォトダイオードアレイ検出器付きHPLCで定性及び定量する告示農薬の一斉分析法を開発した。27農薬、5作物について添加回収試験を行った結果、妨害ピークと重なる一部の農薬及び作物を除いて良好な結果が得られた。検出限界は0.005~0.01ppmで、残留基準値レベル以下の検出が可能であった。

分担研究 3

内径0.32mmのキャピラリーカラムを用いて、クロマトグラムのピーク幅を改善し、高感度に農薬を検出した。本カラムを用いることにより、注入した目的物質は全量がMSに導かれるため、定量性の向上が期待できた。

分担研究 4

①イナベンフィドの直接競合 ELISA において、0.1% (v/v) Tween 20 を添加することにより、玄米に由来する夾雑物成分の ELISA への影響を回避することが可能となった。更に、GC-ECD 及び HPLC による測定との相関性を検討した結果、非常に高い相関関係が認められた。

②ピリミカーブの野菜・果実に対する添加回収試験で、ELISAでは91~108%の良好な回収率が得られた。GC-NPD との比較試験では両方法の測定値間に非常に高い相関性が認められた。

③クロロピリホス市販キットは検出感度が高く、保存性及び再現性も良かったが、交差反応する農薬があり、精度にやや問題があった。アルジカルブキットは検出感度が高く、交差反応性を示す農薬が少ないことから、十分実用に供されることが示唆された。

D. 考察

分担研究 1

昨年度検討した穀類に加え、茶葉試料についてもSFEが抽出手段として有用であり、クリーンアップ操作が不要であることが証明されたので、さらに野菜・果実への適用を検討し、簡便且つ有効な抽出法として確立できるものと期待される。

分担研究 2

今年度は平成10年10月までに基準値が告示された農薬を対象としたが、その後に基準値が設定された農薬にも作物由来の妨害が重ならないければ、本法が適用できるものと考えられる。今後、LC/MSの導入を検討することによって定性精度の向上と試験溶液調製の省力化が期待される。

分担研究 3

キャピラリーカラムを用いたLC/MSによる一斉分析のN-メチルカルバメート系以外の農薬への適用や、農作物試料を用いた定性・定量について更に検討を加える必要がある。

分担研究 4

①今回確立した ELISA は検体処理所要時間が短く、操作も非常に簡便であることから、玄米中イナベンフィドのスクリーニング分析への応用が期待される。

②開発したピリミカーブの ELISA は野菜・果実類への適用に有用性が非常に高いと考えられ、スクリーニング分析への応用が期待される。

③アルジカルブキットは十分実用に供されることが示唆されたので、今後は、実際の農産物への適用を検討する必要がある。

E. 結論

残留農薬迅速分析法に関する下記の4課題の研究を実施した結果、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にとって有用な研究成果を得た。

1) 超臨界流体抽出(SFE)-GC/MS(SIM)による茶葉の一斉分析法

2) 超臨界流体抽出(SFE)-HPLCによる野菜、果実の一斉分析法

3) LC/MSによるN-メチルカーバメート系農薬の定性及び定量

4) 酵素免疫化学測定法(ELISA)

①ELISAによるイナベンフィドの分析

②ピリミカーブのELISAの開発

③市販ELISAキットの有用性の検討

上記の各研究をさらに発展させ、農作物試料への適用性を検証することによって、実用的な迅速試験法が確立できると考えられる。さらに、SFE及びELISAによって分析に使用する有機溶媒量が削減でき、労働衛生上及び環境保全上も好ましいと考えられる。

F. 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, 尾添充津子: 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-茶試料について-

日本食品衛生学会第74回学術講演会(1997.10)

(2)Nemoto, S., Sasaki, K. and Toyada, M.: Comparison of supercritical fluid extraction method and solvent extraction method for the analysis of pesticide residues in tea

a

2nd European Pesticide Residue Workshop (1998.5)

(3)根本 了: 残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用について

日本食品衛生学会第77回学術講演会(1999.5)

(4)津田祐理子、渡辺栄喜、加藤嘉代子、渡辺卓穂、中澤裕之、渡邊繁幸、堀田康司、伊東茂寿、湯浅洋二郎: 免疫化学測定法による植物成長調整剤イナベンフィドの分析、日本食品衛生学会第78回学術講演会(1999年10月、長野)

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
—茶試料について—

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)を用いた茶試料中の残留農薬の多成分分析法について検討した。試料をセライトと3:1で混合してSFEを行った後、クリーンアップなしでガスクロマトグラフ—質量分析計(GC-MS)で測定する簡便で迅速な分析法を確立した。試料に農薬を添加して、種々のSFE条件が回収率に与える影響について検討し最適な条件を求め茶試料に対するSFE法を開発した。更に、茶試料に対するSFE法の実用性を検証するために溶媒抽出法と比較試験を行った。溶媒抽出液は多量のクロロフィルを含むため多くのクリーンアップ操作が必要であったが、SFE抽出液はクロロフィルを含まず農薬とクロロフィルを分離して抽出することができ、クリーンアップも不要であった。試験溶液の調製時間はSFE法の場合1検体当たり約1時間であり、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。また、添加回収実験では両者はほぼ同じ回収率であったが、低回収率となる農薬はSFE法の方が少なかった。更に、実際の農薬残留試料を用いた比較試験を行った結果、SFE法は高極性の農薬に対しては低い測定値を与えるものの、大部分の農薬については溶媒抽出法とほぼ同じ測定値を与え実用性が示された。

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

我々は平成11年度の本研究事業報告でSFEが残留農薬分析の迅速化・省力化を図る上で有用な方法であることを穀類試料を用いて示した。次の段階として果実・野菜などへ適用範囲を広げる必要がある。野菜類にはクロロフィル含量が多いものがあり、これは多くの場合測定障害となる。溶媒抽出ではクロロフィルと農薬を分離抽出することは困難であるが、SFEは選択的抽出が可能であるためクロロフィルと農薬を分離抽出できる可能性がある。SFEは試料調製の問題から水分が多い試料には適しておらず、これまで主に乾燥試料に用いられてきた。果実・野菜類は水分含量が多く、直接SFEを行うことが困難である。そこでまず、クロロフィルとの分離抽出について検討するために、水分含量は低いクロロフィル含量の多い茶葉を用いてSFE法の開発を行った。一方、現在、抹茶以外の茶

の残留農薬分析は、食品衛生法では熱湯浸出液を分析する方法が用いられているが、近年、農薬登録時における作物残留分析法では茶と抹茶を区別せず溶媒抽出法に一本化された。また、最近では健康のために茶葉そのものを摂食するケースもあり、浸出液ではなく茶葉を分析する必要性がある。そこで、新たに溶媒抽出による多成分分析法も検討しSFE法との比較を行った。比較にあたっては、添加回収実験に加え実際の農薬残留試料を用いてSFE法と溶媒抽出法を比較した。

B. 研究方法

1. 試料

東京都内の小売店で購入した緑茶、ウーロン茶、紅茶及び抹茶を用いた。抹茶はそのまま、その他の茶は粉碎器(SCM-40A, 柴田科学器械工業(株)製)で粉碎して試料とした。

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、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。2-ブ
ロパノールは液体クロマトグラフ用(和光純薬工業
(株)製)を使用した。NaCl, 塩化アンモニウム及びリ
ン酸は和光純薬工業(株)製の特級試薬を使用した。
水はMilli-Q水(Millipore社製)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: 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(-30°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
を加えて10 µg/ml(アセフェート, アセタミプリド,
アルジカルブ, イプロジオン, イプロジオン代謝
物, メタミドフォス及びバミドチオンは50 µg/ml)の
濃度に調製し, 冷凍庫(-30°C)に保存した。

固相抽出カートリッジカラム: Varian社製 Bond
Elut® PSA (500 mg)を使用した。

ケイソウ土カラム: Varian社製のChem Elut® CE
1020を使用した。

凝固液: 塩化アンモニウム2 g及びリン酸4 mlに
水を加えて400 mlとした。

セライト: 和光純薬工業製のセライトNo.545を使
用した。

3. 装 置

SFE装置: Hewlett Packard社製 HP7680T

GC-MS: Hewlett Packard社製ガスクロマトグラフ
HP5890シリーズII型(オートサンプラーHP7673
付)及び同社製質量分析計HP5972型を使用した。

4. SFE操作条件

最終的なSFE条件を以下に示した。

CO₂密度: 0.70 g/ml, 抽出温度: 50°C, 圧力: 15
1 bar, CO₂流速: 3.0 ml/min, 平衡化時間: 3 mi
n, 抽出時間: 30 min, ノズル温度: 60°C, プリノズ
ルフィルター温度: 80±3°C(リボンヒーターを用い
て加熱), トラップ: 30-mm Hypersil octadecylsilan
e (ODS), トラップ温度: 40°C。トラップはMeCN 1.8
ml (1 ml/min, 40°C)で溶出しこれをSFE抽出液
とした。その後トラップはEtOAc:ヘキサン(1:1) 3
ml (1 ml/min, 55°C), 続いてMeCN 3 ml (1 ml/

min, 55°C)で洗浄及びコンディショニングを行っ
た。なお, Scheme 1にSFEの流れを示した。

5. GC-MS測定条件

GC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(3.5分)→25°C/分→310°C(9.6分), 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, 注入量: 2 µl(パルス
ドスプリットレス), 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(以後定流量モード, 1 ml/min), イオン
化電圧: 70 eV (EIモード), 測定モード: 選択イオ
ン検出(SIM: selected ion monitoring)モード(モ
ニターイオンは表1参照)及びSCANモード(スキャ
ン範囲: 50~550 amu), エレクトロンマルチプライ
ヤ電圧: 2800 V(SIMモード), 自動チューニングで
得られた値(SCANモード)

6. 試験溶液の調製

6-1. SFE法

試料とセライトを3:1(w/w)の割合でよく混合し,
これをSFE用の試料とした。抽出管(7 ml)に混合
試料4.0 g(茶葉3.0 g相当)を充填し, 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。得られたSFE抽
出液は窒素気流で溶媒を除去した後, 残留物にア
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 2に方法の概略を示した。

6-2. 溶媒抽出法

試料5.0 gを量り採り, 水20 mlを添加し1時間放
置したのち, アセトン100 mlを加え振とう機を用い
て5分間激しく振り混ぜ, セライトを1 cmの厚さに
敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸
引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り, アセトン 50
mlを加え振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた
のち, 上記と同様に操作してろ液をその減圧濃縮
器中に合わせ, 40°C以下で約20 mlに濃縮した。
これに塩化ナトリウム6 gを添加後, ケイソウ土カラ
ムに全量注入し10分間放置したのち, EtOAc 150

mlで上記の減圧濃縮器を洗い、その洗液をカラムに注入した。溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下で酢酸エチルを除去した。残留物にアセトン 50 mlを加えて溶かし、凝固液50 mlを加え時々穏やかに振り混ぜながら5分間放置し、ろ過前にセライト2 gを添加し、セライトを1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を500 mlの分液漏斗に移した。アセトン:凝固液(1:1) 50 mlを用いて上記の減圧濃縮器を洗い、その洗液でろ紙上の残渣を洗った。洗液を上記の分液漏斗に合わせた。水200 ml、塩化ナトリウム85 g及びEtOAc:ヘキサン(1:4)100 mlを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、有機層を300 mlの三角フラスコに移した。水層にEtOAc:ヘキサン(1:4)100 mlを加え、上記と同様に操作して、有機層を上記の三角フラスコに合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過した。次いでEtOAc 20 mlを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返した。両洗液を減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で溶媒を除去した。この残留物にアセトン:ヘキサン(1:1) 2 mlを加えて溶かし、あらかじめアセトン:ヘキサン(1:1) 10 mlで洗浄したPS Aカートリッジカラムに注入し、アセトン:ヘキサン(1:1) 20 mlで溶出した。溶出液を採り、40℃以下で溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mlを加えて溶かし、これを試験溶液とした。なお、Scheme 2に方法の概略を示した。

7. 添加回収実験

SFE法では、セライトとの混合試料4.0 g(茶葉3.0 g相当)をビーカーにとり、農薬標準混液40 µlを添加(試料中0.13 µg/gまたはアセフェート、アセタミプリド、アルジカルブ、イプロジオン、イプロジオン代謝物、メタミドフォス及びバミドチオンでは0.67 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。また、溶媒抽出法では、粉碎試料5.0 gをビーカーにとり、農薬標準混液80 µlを添加(試料中0.16 µg/gまたはアセフェート、アセタミプリド、アルジカルブ、イプロジオン、イプロジオン代謝物、メタミドフォス及びバミドチオンでは0.8 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。

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。検出限界(LOD: limit of detection)は、3つの無添加試料のベースラインノイズの平均の3倍のレスポンスを与える試料中の農薬の濃度として求めた。

9. 確認試験

農薬が検出された場合には同じ試験溶液をGC-MSに注入して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、試験溶液中の農薬の濃度が薄く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測定を行いフラグメントイオンの相対強度比を標準物質と比較して、3つ以上のイオンの強度比が一致した場合を確認と判断した。

C. 研究結果

1. SFE法の開発

茶試料に対するSFE法の開発にあたっては、表1中のゴチック体で示した農薬残留基準が設定されている47農薬を用いて、様々なSFE条件下で緑茶からの添加回収実験を行い最適な条件を求めた。また、使用したSFE装置では、茶葉を抽出した場合、ノズルの目詰まりを防ぐためのプリノズルフィルター上に抽出成分が析出して目詰まりを起こしたが、これはプリノズルフィルター部分をリボンヒーターで約80℃に加熱する改良を加えることによって防ぐことが可能であった(Scheme 1参照)。

1-1. CO₂密度の検討

CO₂密度の影響を検討するために、密度0.6, 0.7及び0.8 g/ml(40℃における圧力はそれぞれ97, 115及び164 bar)における緑茶からの農薬の回収率を求めた。図1にいくつかの農薬の結果を示した。0.6 g/mlでは全体的に回収率が低くβ-BHCやδ-BHCのように回収されない農薬が見られた。β-BHC, δ-BHC及びアセフェートなどいくつかの農薬は密度に依存して回収率が上昇したが、多くの農薬では0.7 g/mlで回収率が最大になり、0.8 g/mlではむしろ回収率が減少した。これは密度を上げると抽出効率は上がるが、高すぎるとトラップで保持しきれずに排出されてしまうためと思われる。これらの結果からCO₂密度は0.7 g/mlとした。0.

7 g/mlでは大部分の農薬は70%以上の回収率であったが、イミベンコナゾール、イミベンコナゾール代謝物(イミベンコナゾール脱ベンジル体)は全く回収されず、メタミドホス、アセフェート、 β -BHC、 δ -BHC及びジフェノコナゾールは50%未満の低回収率であったことから、続いて抽出時間について検討を行った。

1-2. 抽出時間の検討

抽出時間の影響を検討するために、抽出時間20分及び30分における緑茶からの農薬の回収率を求めた。図2にいくつかの農薬の結果を示した。大部分の農薬は抽出時間を30分としても回収率にはほとんど変化は見られなかった。また、 β -BHC、 δ -BHC、アセフェートなどでは回収率の増加は見られたもののその程度はわずかであった。このまま抽出時間を延長しても大きな改善は期待できず、また抽出に長時間を要することになるため、穀類の場合と同様に抽出時間は30分として、他のSFE条件を最適化することにより回収率の改善を図ることとし、次に抽出温度について検討した。

1-3. 抽出温度の検討

抽出温度の影響について検討するため、抽出温度40、50、60及び70°C(0.7 g/mlにおける圧力はそれぞれ115、151、187及び223 bar)における緑茶からの農薬の回収率を求めた。図3にいくつかの農薬の結果を示した。大部分の農薬は α -BHCなどのように温度による影響はあまり受けず検討した温度範囲でほぼ一定の回収率が得られた。しかし、 δ -BHC及び β -BHCは50°Cで回収率がそれぞれ1.5倍及び2倍程度上昇しそれ以後はほぼ一定の回収率となった。アセフェートは50°Cで回収率が上昇して最大になり60°C以上では減少した。一方、エチオフェンカルブは50°C以上では回収率の減少が見られた。以上の結果から、50°Cではエチオフェンカルブの回収率は減少したものの、 δ -BHC、 β -BHC及びアセフェートでは回収率の改善が認められたこと、また、60°C以上を用いてもこれらの農薬に対しては回収率の改善は期待できなかったことから抽出温度は50°Cを選択した。しかし、イミベンコナゾールは50°C以下では回収されなかったことから、これを改善するために更にCO₂の流速について検討した。

1-4. CO₂流速の検討

CO₂流速の影響について検討するため、CO₂流

速2、3及び4 ml/minにおける緑茶からの農薬の回収率を求めた。この場合には抽出時間を30分に固定したため、各流速で抽出管の容積のそれぞれ11.3、17.0及び22.6倍量の超臨界CO₂により試料が抽出されたことになる。図4にはいくつかの農薬の結果を示した。大部分の農薬は3 ml/minで回収率の上昇が見られたが、4 ml/minではそれ以上の上昇は見られずほぼ一定の回収率になった。特にイミベンコナゾールは、2 ml/minでは回収されなかったが、3 ml/min以上では約40%の回収率が得られた。以上の結果からCO₂流速は3 ml/minとした。3 ml/minではメタミドホス、アセフェート、イミベンコナゾール及びエチオフェンカルブを除き70%以上の回収率が得られた。

1-5. 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、セライトを用いたモディファイヤーの検討において効果の見られたりメタノール、エタノール及び2-プロパノールについて試料に直接添加する方法でその効果を検討した。その結果、穀類の場合と同様に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、モディファイヤーは添加しないこととした。

1-6. セライトとの混合の検討

SFEの抽出効率を上げるために、試料とセライトなどの分散剤を混合して表面積を増やすことが行われることがある²⁾。そこで、緑茶試料とセライトを3:1、2:1及び1:1の割合で混合して、農薬の回収率を求めた。図5にはこれまでの検討で低回収率だったメタミドホス、アセフェート、イミベンコナゾール及びエチオフェンカルブの結果を示した。その結果、アセフェート及びメタミドホスでは大きな変化は見られなかったが、エチオフェンカルブではわずかではあるが上昇が見られ70%以上の回収率となった。他の大部分の農薬についても同様にほとんど変化は見られないか、わずかな回収率の上昇しか見られなかった。一方、イミベンコナゾールでは混合しない場合回収率が44%であったのに対して、混合した場合には70%以上の回収率が得られた。セライトとの混合比率については、各比率間で回収率に大きな差は見られなかったことから、試料量をできるだけ多くするために、試料とセライ

トを3:1の比率で混合し、SFE用の抽出試料とすることとした。この場合には、アセフェート及びメタミドフォスの回収率はそれぞれ約45%及び約35%と低かったが、それ以外の検討に用いた農薬ではいずれも70%以上の回収率が得られた。

1-7. SFE抽出液のクリーンアップ

緑茶のSFE抽出液は黄色であったのに対し、SFE後の試料は緑色であった。このことから、クロロフィルは抽出されずに試料中に留まったままであり、SFEにより農薬とクロロフィルを分離して抽出することができたと考えられる。また、得られたSFE抽出液についてPSAカートリッジカラムを用いたクリーンアップも検討したが、クロマトグラム上で大きな差は見られなかったことからクリーンアップは行わないこととした。一般に、クロロフィルは農薬測定の際の障害となるため、クロロフィルを多く含む野菜などを分析する場合には、これを除くために多くのクリーンアップ操作が必要となる。今回、SFEにより農薬とクロロフィルを分離抽出できたことは、クリーンアップの省略が可能になり、分析の迅速化・省力化を図る上で大きな利点である。

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。検討には茶に基準値のある農薬のほかGC測定可能な農薬を加え、緑茶、ウーロン茶及び紅茶については116農薬(うち茶に残留基準のある農薬は47農薬)を用いて、抹茶については128農薬(うち茶に残留基準のある農薬は51農薬)を用いて添加回収実験を行った。その結果を表2に示した。また、表3にはSFE法の添加回収実験のまとめを示し、表4には添加回収実験で問題のあった農薬についてまとめて示した。その結果、回収率が良好(70~120%)であった農薬数は、緑茶が101農薬、ウーロン茶が100農薬、紅茶が105農薬、抹茶が113農薬であり、いずれの試料とも検討した農薬数の85%以上で良好な結果が得られた。相対標準偏差(RSD)も各試料とも概ね5%未満であり精度の良い結果が得られた。

一方、添加回収実験で問題のあった農薬のうちアセフェート、メタミドホス、トリシクラゾール、アミトラズ及びレナシルの5農薬は検討した4試料とも紅茶でのレナシルを除き回収率は50%未満と低く、また、抹茶では更にアセタミプリド、イミベンコナゾール代謝物及びカルバリルが50%未満の回収率とな

った。これらの農薬に対してはSFE法は適用困難と思われる。このほか、キャプタン、バミドチオン及びイミベンコナゾールの3農薬がやや低回収率であった。また、ハルフェンプロックス、アジンホスメチル、ブタミホス、EPN、パラチオン、パラチオンメチル、ピラクロホス、イプロジオン代謝物及びペンデイメタリンでは回収率が120%を超える値となった。このうちブタミホスが紅茶で153%となった以外はいずれも回収率は140%未満であり200%を超えるような極端に高い回収率を示した農薬はなかった。GCに注入した場合、試料溶液中のほうが有機溶媒中よりレスポンスが大きくなる現象、いわゆるマトリックス効果がいくつかの農薬について知られている^{3,4)}。今回の場合も100%を大きく越える農薬がみられたのはマトリックス効果によるものと思われる。添加回収実験の結果から、今回検討した農薬の中で残留基準のあるアセフェートとアセタミプリド及び抹茶のイミベンコナゾール代謝物とカルバリルはSFE法を適用するのは困難と思われる。

2. 溶媒抽出法の検討

SFE法と比較する目的で溶媒抽出法の検討を行った。茶試料に対する溶媒抽出を用いた多成分分析法としては厚生省通知「残留農薬迅速分析法の利用について」⁵⁾に示された方法がある。しかし、この方法を用いて茶を分析した場合にはGPCでのクロロフィルの除去が不十分であったため、得られた試験溶液ではGC-MS測定の際に繰り返し注入での感度低下が大きく測定困難であった。一方、告示試験法では抹茶は従来から溶媒抽出法が適用されてきたが、個別の農薬について試験法が定められており多成分分析法は示されていない。そこで、抹茶以外の茶も含む茶試料の溶媒抽出法として、抹茶のシフルトリンおよびフルバリネート告示試験法を一部変更して、凝固処理によるクリーンアップ法を用いた方法を設定した。主な変更点としては、①アセトン抽出後の液-液分配による転溶操作の代わりに、残留農薬迅速分析法で使用されているケムエルトによる固相抽出を用いた、②凝固処理後の水層からの転溶にヘキサンの代わりにEtOAc:ヘキサン(1:4)を用いた、③カラムクリーンアップにフロリジルの代わりにBond Elut® PSAを用いた点などである。SFE法と異なり溶媒抽出法ではクロロフィルも抽出されてくるため、これを除くために凝固処理などの多くのクリーンアップ操作が必要

であった。

3. SFE法と溶媒抽出法の比較

3-1. 添加回収実験の比較

SFE法と溶媒抽出法とを比較するために116農薬(有機塩素系農薬16,ピレスロイド系農薬10,カーバメート系農薬13,有機リン系農薬43,その他34:うち残留基準があるのは47農薬)を用いて緑茶からの添加回収実験を行い両方法の回収率を比較し表5にその結果を,また表6にはそのまとめを示した。その結果,回収率が良好(70~120%)であった農薬数はSFE法が101農薬であったのに対して;溶媒抽出法が94農薬とSFE法のほうが多かった。また,120%を越える農薬数及びやや低回収率の農薬(>50%,<70%)はSFE法と溶媒抽出法とでほぼ同数であったのに対して,低回収率(50%未満)の農薬数はそれぞれ5及び13農薬と溶媒抽出法の方が多かった。表7には回収率に問題のあった農薬のまとめを示した。両方法で低回収率(50%未満)だった農薬はアセフェート,メタミドホス,アミトラズ及びトリシクラゾールであった。このほか低回収率であったのは,SFE法ではレナシルのみであったが,溶媒抽出法ではキャプタン,カプタホール,ピリミカーブ,バミドチオン,キノメチオネート,ジクロフルアニド,メトリブジン,(E)-ピリフェノックス及び(Z)-ピリフェノックスの9農薬であった。低回収率となった農薬の中で残留基準のあるのは,SFE法ではアセフェートのみであったが,溶媒抽出法ではアセフェート,カプタホール,ジクロフルアニド,(E)-ピリフェノックス及び(Z)-ピリフェノックスであった。

低回収率になった原因としては,アセフェート及びメタミドホスは水溶解度がそれぞれ650000及び2000000 mg/lと特に極性が高いため,SFEでは抽出が不十分であり,溶媒抽出でも転溶操作の際に水層に残ったため低回収率になったものと思われる。キャプタン,カプタホール,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。溶媒抽出での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ことが原因である(SFE法ではPSAカラムクリーンアップを行っていない)。また,ピリミカーブは酸性条件下で塩を作り水溶性が高くなるため,凝固処理の際に水層に移行したため低回収率になったものと思われ

る。同様にピリフェノックスも酸性条件下で水層に移行するため凝固処理の際に水層に移行したものであるが,この農薬の場合には抽出中に酸化的脱メチル化を受けた可能性も低回収率の原因として考えられる。一方,回収率が120%を越えた農薬については,SFE法の添加回収実験の場合と同様にマトリックス効果が原因と思われる。どちらか一方の方法でのみ120%を越える農薬があるが,これは両分析方法で抽出されるマトリックスの違いによるものと思われる。このほかジクロロボスとハルフェンプロックスはいずれの方法でも回収率は70%以上あったものの方法間で回収率に大きな差が見られた。SFE法及び溶媒抽出法での回収率は,ジクロロボスではそれぞれ110%及び78%,ハルフェンプロックスではそれぞれ127%及び71%であり,いずれも溶媒抽出法のほうが低かった。これはジクロロボスは揮発性が高いため,濃縮操作が多い溶媒抽出法では濃縮中に揮散したためと思われる。また,ハルフェンプロックスについては,水溶解度が0.00005 mg/lと低いため凝固処理の過程で他の低極性物質とともに沈殿したためと推定される。添加回収実験の結果では,低回収率となる農薬は溶媒抽出法のほうがやや多かったが,それ以外の農薬については両方で大きな差はみられず,両分析法とも概ね70%以上の良好な回収が得られた。

今回の検討では,両分析方法ともSRDは概ね5%未満であり,精度の良い結果が得られた。また,LODは両分析方法とも残留基準の1桁ないし2桁以上低濃度まで測定可能であり十分な測定感度が得られたが,多くの農薬でSFE法のほうが2倍以上高感度であった。今回の検討では,SFE法が茶試料3gを用いて最終液量を2mlとしたのに対して,溶媒抽出法は茶試料5gを用いて最終液量を4mlとしたためSFE法の方が濃縮倍率が高くなったが,実際にはこの濃縮倍率の差以上にSFE法のほうが高感度であった。両分析法で得られた試験溶液の残留物量はSFE法が試料1g当たり0.7 mgであったのに対して,溶媒抽出法では2.2 mgと3倍以上の残留物があつた。このため溶媒抽出法ではGC-MSに注入されるマトリックスが多くなったためベースラインノイズが増加し,その結果LODが低くなったものと思われる。

3-2. 農薬残留試料での比較

茶試料に対するSFE法の実用性を検証するため

には、添加回収実験で比較するだけでは不十分であり、実際に農薬が残留している試料を用いて分析値を溶媒抽出法と比較することが重要である。そこで、緑茶5検体及びウーロン茶2検体中の残留農薬をSFE法と溶媒抽出法で求め両者の測定値を比較した。表8にその結果を示した。測定値のRSDの平均値はSFE法では4.9%であり精度の良い結果が得られた。一方、溶媒抽出法ではRSD=8.5%でありSFE法よりややばらつきの大い結果となった。次に、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て回帰分析を行った結果を図6に示した。その結果、相関係数(r)=0.986の良好な相関関係が得られた。更に、得られた回帰線の切片(a)及び傾斜(b)の95%信頼限界は、それぞれ $a = -9.96 \pm 10.78$ 及び $b = 1.036 \pm 0.048$ であった。このとき切片の0と傾斜の1はこの信頼限界内にあり、したがって、両分析法で求めた結果の間には系統的な差はないことが示された。

更に個々の農薬について分析法の比較をするため、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た結果を、検出された農薬毎にまとめて表9に示した。その結果、検出された農薬の大部分については両者の比は概ね1となり、両分析法はほぼ同じ測定値を与えることが示された。しかし、フェノブカルブ、ミクロブタニル、2,4-ジクロロアニリン及びイミベンコナゾール代謝物については比が0.5より小さくなり、SFE法が溶媒抽出法の半分より小さい値を与える結果となった。添加回収実験ではこれら4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。またこのことは、これらの農薬が添加試料と実際の農薬残留試料とでは挙動が異なることを示すものである。農薬が、添加試料と実際の農薬残留試料とで、抽出効率に差が見られることは溶媒抽出でも知られている⁹⁾が、SFEの場合には溶媒より抽出力が弱いためにこの現象がより顕著に現れたものと思われる。このことから、SFEを用いた分析法を開発するにあたっては添加回収実験の結果のみで評価せず、可能な限り実際の農薬残留試料を用いた検討も行う必要があると思われる。

ここで、比が小さくなった農薬は比較的極性が

高い農薬であったことから、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、溶解度が1 mg/lを越えた付近から溶解度に依存して比が減少し(すなわちSFEの測定値のほうが溶媒抽出法の測定値よりも小さくなり)始め、100 mg/l以上では比が0.5未満になった。このことから、SFEの抽出力は農薬の水溶解度に依存し、CO₂を超臨界流体として用いた場合には水溶解度が100 mg/lを越える農薬に対しては特に抽出効率が低下することがわかった。しかし、フェノブカルブ、ミクロブタニル、2,4-ジクロロアニリン及びイミベンコナゾール代謝物については、SFE法では測定値が低くなるが、このことを考慮しても残留基準値の1/10以下の濃度を測定可能であり、またRSDは5%前後と再現性の良い結果が得られているので、スクリーニング分析としては適用可能と思われる。一方、ハルフェンプロックスのみ、比が1.66と大きくなったが、これは先に述べたように両分析法で回収率に大きな差が見られたためと思われる。回収率を補正した場合の比は0.93であった。

以上の検討から、今回開発した茶試料のSFE法では水溶解度が100 mg/lまでの農薬については定量分析が可能であり、100~1000 mg/lの農薬についてはスクリーニング分析は可能と思われる。水溶解度が1000 mg/lを越える農薬にはSFE法を適用するのは困難と思われる。

D. 考察

1. SFE法の開発

緑茶の農薬添加試料を用いて、CO₂密度、抽出時間、抽出温度、CO₂流速などのSFE条件が回収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、今回の検討でも穀類の時と同様に必ずしも密度が高いほど回収率が高い結果とはならならず最適な点が存在した。これは恐らく高密度では抽出物が多くなるため、抽出物で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。また、モディファイヤーの添加も穀類の時と同様に添加することにより回収率はむしろ減少したため、モディファイヤーは使用しなかった。SFE条件以外で回収率を上げる方法として試料の調製法について検討したところ、茶試料とセライトを3:1で混合することによりイミベ

ンコナゾールの回収率が増加したため、セライトとの混合物をSFE用試料として用いることとした。

最適化したSFE条件を用いて、緑茶、ウーロン茶、紅茶及び抹茶からの添加回収実験を行ったところ大部分の農薬で70~120%の良好な回収率が得られた。SFE法で得られた試験溶液はクロロフィルを含まずクリーンアップなしでGC-MS測定が可能であった。

2. SFE法と溶媒抽出法の比較

確立した SFE 法と溶媒抽出法について、まず緑茶を用いた添加回収実験で比較した。その結果、両分析法とも回収率及び精度に関してほぼ同じ結果が得られたが、SFE法の方が低回収率となる農薬が少なかった。両分析方法とも検出限界は残留基準の1桁ないし2桁以上低濃度まで測定可能であり十分な測定感度が得られたが、SFE法のほうが2倍以上高感度であった。更に茶試料に対するSFE法の実用性を検証するために実際の農薬残留試料を用いて溶媒抽出法との比較を行った。その結果、両分析法で求めた測定値の回帰分析の結果、両者の間に系統的な差はないことが示された。更に、個々の農薬について分析法の比較を詳細に行った結果からも、大部分の農薬については両分析法はほぼ同じ測定値を与えた。しかし、水溶解度が1 mg/lを越える農薬については溶解度に依存してSFE法の抽出効率が低下することがわかった。今回開発した茶試料のSFE法では水溶解度が100 mg/lまでの農薬については定量分析が可能であり、100~1000 mg/lの農薬についてはスクリーニング分析には適用可能と思われるが、1000 mg/lを越える農薬にはSFE法を適用するのは困難と思われる。以上の結果から、添加回収実験では良好な回収率が得られても実際の農薬残留試料では測定値が低くなる農薬があったことから、SFE法を適用できるかどうか判断するには、添加回収実験のほか、農薬の水溶解度を考慮することが必要がある。

E. 結論

1. 茶試料をセライトと3:1で混合してSFEを行ったのち、GC-MS(SIM)で測定する迅速で簡便な多成分分析法を確立した。
2. 緑茶の溶媒抽出液は多量のクロロフィルを含むため多くのクリーンアップ操作が必要であったが、S

FE抽出液はクロロフィルを含まず農薬とクロロフィルを分離して抽出でき、クリーンアップなしでGC-MS測定が可能であった。

3. 緑茶、ウーロン茶、紅茶及び抹茶を用いた添加回収実験の結果、SFE法は大部分の農薬で70~120%の良好な回収率が得られた。また、RSDも概ね5%未満であり精度の良い結果が得られた。

4. 緑茶を用いた添加回収実験でSFE法と溶媒抽出法は回収率及び精度に関してほぼ同じ結果が得られたが、低回収率となる農薬はSFE法のほうが少なかった。

5. SFE法及び溶媒抽出法とも残留基準の1桁以上低濃度まで測定可能であり、十分な検出限界が得られたが、SFE法のほうが2倍以上高感度であった。

6. 実際の農薬残留試料を用いてSFE法と溶媒抽出法の測定値の比較を行ったところ、水溶解度が1000 mg/lを越える農薬についてはSFE法を適用するのは困難と思われる。しかし、水溶解度が100 mg/lまでの農薬についてはSFE法は溶媒抽出法とほぼ同じ測定値を与え定量分析が可能であり、水溶解度が100~1000 mg/lの農薬についてもスクリーニング分析は可能と思われることから、SFE法は茶の多成分分析法として有用な方法であると思われる。

7. SFE法の場合、試験溶液の調製時間は1検体当たり約1時間であり、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) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., and Saito, Y., *J. Chromatographic Science*, 35, 467-477 (1997).
- 2) Taylor, L.T., *Supercritical fluid extraction*, Wiley, New York, NY, 1996, p. 128.
- 3) Erney, D.R., Gillespie, A.M. and Gilvydis, D.M., *J. Chromatogr.*, 638, 57-63 (1993).
- 4) Erney, D.R. and Poole, C.F., *J. High Resolution Chromatogr.*, 16, 501-503 (1993).
- 5) 厚生省生活衛生局長通知, 衛化第43号, 平成9年4月8日
- 6) Burford, M. D., Hawthorne, S. B., and Mille

r, D. J., Anal. Chem., 65, 1497 (1993)

7) Camle, V., Tambut, M., and Caude, M., J. Chromatogr. A, 693, 101 (1995).

G. 研究発表

1. 学会発表

(1)根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武, 尾添充津子: 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—茶試料について—

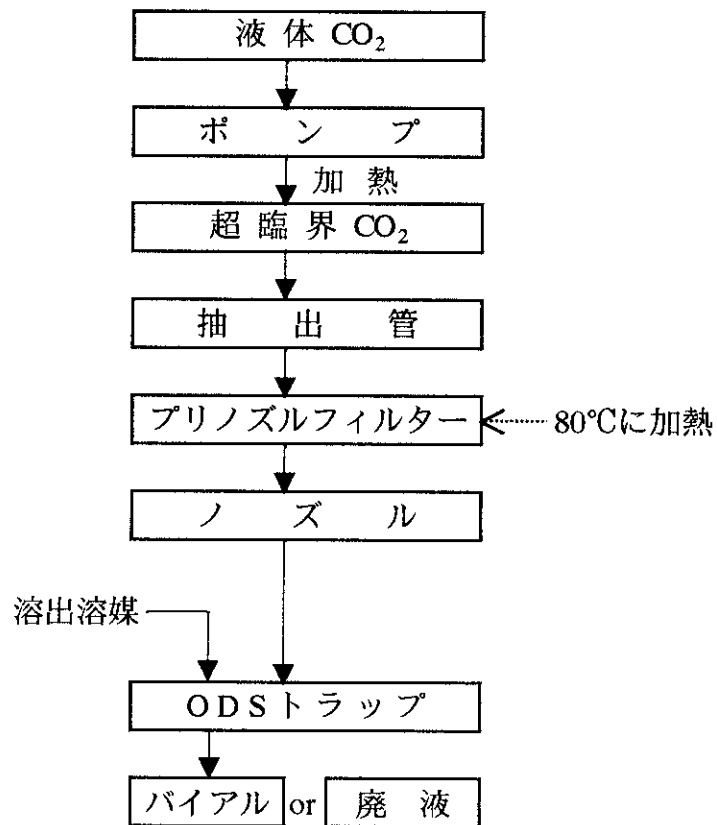
日本食品衛生学会第74回学術講演会(1997.10)

(2)Nemoto, S., Sasaki, K. and Toyada, M.: Comparison of supercritical fluid extraction method and solvent extraction method for the analysis of pesticide residues in tea

2nd European Pesticide Residue Workshop (1998.5)

(3)根本 了: 残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用について

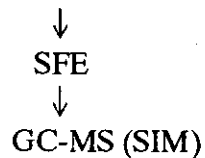
日本食品衛生学会第77回学術講演会(1999.5)



Scheme 1 超臨界流体抽出の流れ

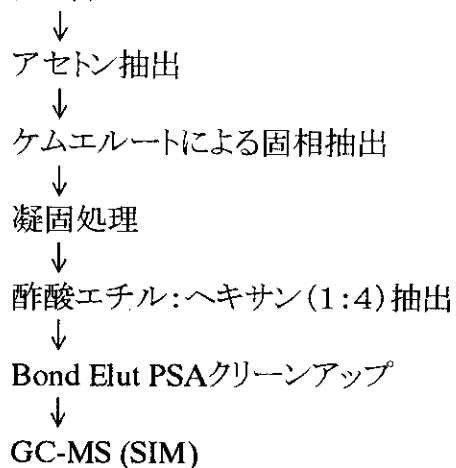
(a) SFE法

試料 : セライト(3:1)混合物



(b) 溶媒抽出法

試料



Scheme 2 茶試料のSFE法(a)及び溶媒抽出法(b)の概略

表1 農薬の保持時間(t_R)及び定量用マス(m/z)

Pesticide	t _R (min)	m/z (u)	Pesticide	t _R (min)	m/z (u)
Organochlorine pesticide (16)			Organophosphorus pesticide (continued)		
Aldrin*	14.67	260.8	Ethoprophos	11.03	157.9
α-BHC*	11.80	218.9	Etrimfos	12.98	292.0
β-BHC*	12.28	218.9	Fenitrothion*	14.24	277.0
γ-BHC*	12.47	218.9	Fensulfotthion	17.16	292.0
δ-BHC*	13.03	218.9	Fenthion	14.64	278.0
Captafol*	18.45	79.0	Fosthiazate	15.02	194.9
Captan	15.58	79.0	Isofenphos	15.36	213.0
Chlorobenzilate	17.13	250.9	Isofenphos oxon	14.71	120.0
p,p'-DDD*	17.31	235.0	Malaoxon	13.66	127.0
p,p'-DDE*	16.51	245.9	Malathion	14.39	173.1
o,p'-DDT*	17.37	235.0	Methamidophos	6.66	94.0
p,p'-DDT*	18.02	235.0	Methidathion	15.79	144.9
Dieldrin*	16.66	262.8	Parathion*	14.70	291.0
Endrin*	17.07	262.8	Parathion-methyl*	13.75	262.9
Heptachlor	13.95	271.7	Phenthoate	15.50	273.9
Heptachlor epoxide	15.42	352.8	Phosalone	19.54	181.9
Pyrethroid pesticide (12)			Phosmet	18.88	160.0
Acrinathrin*	19.98	181.0	Pirimiphos-methyl*	14.16	290.0
Cyfluthrin*	21.27	226.0	Prothiofos*	16.34	309.0
Cyhalothrin*	19.83	181.0	Pyraclofos*	20.34	360.0
Cypermethrin*	21.61	162.9	Quinalphos	15.52	146.0
Deltamethrin*	23.39	181.0	Terbufos	12.54	231.0
Etofenprox*	21.85	163.0	Thiometon	11.93	88.0
Fenvalerate*	22.47	167.0	Toiclofos-methyl	13.77	264.9
Flucythrinate*	21.68	199.0	Vamidothion	15.93	145.0
Fluvalinate*	22.66	250.0	Other pesticide (41)		
Halfenprox*	21.59	262.9	Acetamiprid*	18.76	152.0
Permethrin*	20.78	183.0	Amitraz	19.83	293.2
Tefluthrin	12.91	177.0	Benalaxyl	17.74	148.1
Carbamate pesticide (15)			Benfuresate	13.47	256.0
Aldicarb	3.74	115.0	Bitertanol	20.61	170.1
Bendiocarb	11.39	151.0	Chinomethionat	15.90	233.9
Butylate	8.74	146.0	Cyproconazole	16.93	222.0
Carbaryl*	13.87	144.0	Dichlofluamid*	14.38	123.0
Chlorpropham	11.25	126.9	2,4-Dichloroaniline*	7.78	160.9
Diethofencarb	14.56	124.0	Difenoconazole*	23.10	323.0
EPTC	7.97	86.0	Dimethipin	12.27	54.1
Esprocarb	14.41	222.1	Fenarimol	20.09	138.9
Ethiofencarb*	13.32	168.0	Flusilazole	16.60	233.0
Fenobucarb*	10.69	121.0	Flutolanil	16.24	173.0
Isoprocarb	9.92	121.0	Imibenconazole*	24.71	125.0
Methiocarb	14.26	168.0	Imibenconazole metabolite*	16.68	83.0
Pirimicarb	13.13	166.1	Iprodione*	18.71	313.9
Propoxur	10.71	110.0	Iprodione metabolite*	19.39	127.0
Thiobencarb	14.59	100.1	Lenacil	17.94	153.0
Organophosphorus pesticide (44)			Mefenacet	19.78	192.0
Acephate*	8.84	136.0	Mepronil	17.53	269.1
Azinphos-ethyl	20.21	160.0	Methoprene	15.66	73.1
Azinphos-methyl	19.64	160.0	Metolachlor	14.51	162.1
Bromophos-ethyl	15.78	358.9	Metribuzin	13.62	198.0
Butamifos	16.12	286.0	Myclobutanil*	16.57	179.0
Cadusafos	11.58	158.9	Paclobutrazol	15.97	236.0
(E)-Chlorfenvinphos	15.18	268.9	Pendimethalin	15.19	252.1
(Z)-Chlorfenvinphos	15.39	268.9	Pretilachlor	16.35	238.1
Chlorpyrifos*	14.54	313.9	Propiconazole	17.97	259.0
Chlorpyrifos-methyl	13.61	285.9	Pyridaben*	20.85	147.1
Diazinon*	12.64	179.1	(E)-Pyrifenox*	15.89	261.9
Dichlorvos*	6.78	109.0	(Z)-Pyrifenox*	15.38	261.9
Dimethoate	12.03	87.0	Pyrimidifen	22.26	184.0
(Z)-Dimethylvinphos	14.60	294.9	Pyriproxyfen	19.70	136.0
Dioxabenzofos	11.44	215.9	Silaflofen*	22.00	258.0
Disulfoton	12.89	88.0	Tebuconazole	18.28	125.0
Edifenphos	17.87	310.0	Tebufenpyrad*	19.15	333.1
EPN*	18.92	157.0	Thenylchlor	18.18	127.0
Ethion	17.30	230.9	Triadimefon	14.76	208.0
			Triadimenol	15.58	112.1
			Tricyclazole	16.45	188.9

* 残留基準が設定されている農薬。

ゴチック体はSFE法の条件検討に使用した農薬。

表2 SFE法の添加回収実験結果

Pesticide	Recovery, % (n = 3)									
	緑茶		ウーロン茶		紅茶		抹茶		Total	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Organochlorine pesticide (16)										
Aldrin*	89	1	91	4	86	9	96	3	91	5
α-BHC*	95	3	101	1	93	3	95	2	96	4
β-BHC*	83	4	82	2	79	2	83	6	82	3
γ-BHC*	93	3	94	3	85	4	89	3	90	5
δ-BHC*	83	4	88	2	80	2	84	4	84	4
Captafol*	105	4	109	3	95	8	94	4	101	7
Captan	70	10	63	28	72	3	65	8	67	6
Chlorobenzilate	104	3	106	0	103	2	96	2	102	5
p,p'-DDD*	90	1	94	1	84	5	91	4	90	5
p,p'-DDE*	88	3	93	1	85	6	91	3	89	4
o,p'-DDT*	85	4	95	1	81	7	85	3	86	7
p,p'-DDT*	95	5	103	1	77	7	95	1	93	12
Dieldrin*	91	2	93	4	91	10	92	5	92	1
Endrin*	99	4	95	4	92	4	93	1	95	3
Heptachlor	92	3	97	1	86	3	68	1	86	15
Heptachlor epoxide	91	3	92	3	88	6	87	3	89	3
Pyrethroid pesticide (12)										
Acrinathrin*	-	-	-	-	-	-	98	2	98	-
Cyfluthrin*	116	2	111	4	114	2	103	4	111	5
Cyhalothrin*	105	3	116	2	113	2	106	6	110	5
Cypermethrin*	106	2	103	5	113	4	101	1	106	5
Deltamethrin*	112	0	108	5	115	9	103	2	109	5
Etofenprox*	-	-	-	-	-	-	103	1	103	-
Fenvalerate*	109	2	95	2	108	3	99	2	103	7
Flucythrinate*	113	3	118	1	118	2	105	1	113	5
Fluvalinate*	112	2	116	2	114	4	106	5	112	4
Halfenprox*	127	5	121	1	124	4	106	3	120	8
Permethrin*	113	2	118	1	114	2	109	2	113	3
Tefluthrin	99	2	95	3	92	2	96	5	96	3
Carbamate pesticide (15)										
Aldicarb	115	11	112	5	90	2	145	4	116	20
Bendiocarb	103	5	105	1	105	2	90	0	101	7
Butylate	-	-	-	-	-	-	118	1	118	-
Carbaryl*	97	5	91	1	105	3	41	4	83	34
Chlorpropham	106	4	105	1	100	3	99	2	103	4
Diethofencarb	107	4	119	0	112	1	96	1	109	9
EPTC	-	-	-	-	-	-	109	1	109	-
Esprocarb	98	1	116	3	97	2	96	3	102	9
Ethiofencarb*	71	11	87	10	101	9	71	2	83	17
Fenobucarb*	102	1	105	4	95	2	99	3	100	4
Isoprocarb	100	2	101	3	91	1	87	0	95	7
Methiocarb	101	3	106	1	98	1	91	1	99	6
Pirimicarb	100	3	99	3	106	4	90	1	99	7
Propoxur	101	6	101	2	101	3	89	2	98	6
Thiobencarb	100	2	106	3	98	2	95	1	100	4

* 残留基準が設定されている農薬.

ゴチック体はSFE法の条件検討に使用した農薬.

-: 未実施, nd: 不検出

表2 SFE法の添加回収実験結果(続き)

Pesticide	Recovery, % (n = 3)									
	緑 茶		ウーロン茶		紅 茶		抹 茶		Total	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Organophosphorus pesticide (44)										
Accphate*	38	17	28	2	26	5	nd		23	70
Azinphos-ethyl	113	6	120	4	111	2	100	1	111	7
Azinphos-methyl	134	2	135	2	124	4	97	2	123	15
Bromophos-ethyl	101	2	115	3	113	1	96	2	106	8
Butamifos	132	5	135	7	152	4	103	1	131	16
Cadusafos	118	2	116	1	107	2	96	2	109	9
(E)-Chlorfenvinphos	109	3	109	1	114	3	97	2	107	7
(Z)-Chlorfenvinphos	101	3	106	2	107	1	95	1	102	5
Chlorpyrifos*	101	1	106	2	117	5	98	6	105	8
Chlorpyrifos-methyl	101	2	98	1	99	2	95	1	99	2
Diazinon*	97	2	95	0	100	1	101	4	98	3
Dichlorvos*	110	4	109	4	116	3	106	1	110	4
Dimethoate	93	8	106	1	100	4	86	4	96	9
(Z)-Dimethylvinphos	101	4	95	2	107	1	99	1	100	5
Dioxabenzofos	114	5	103	1	115	3	98	2	107	8
Disulfoton	93	4	101	6	92	7	94	3	95	4
Edifenphos	119	4	116	2	115	3	92	2	110	11
EPN*	130	4	133	2	124	5	103	2	123	11
Ethion	99	3	106	2	110	1	101	3	104	5
Ethoprophos	120	4	114	4	110	2	95	1	110	10
Etrimfos	99	2	101	1	96	2	95	2	98	3
Fenitrothion*	116	6	116	3	114	3	102	1	112	6
Fensulfothion	110	6	119	3	114	0	92	4	109	11
Fenthion	96	2	95	3	99	3	99	3	97	2
Fosthiazate	108	4	117	7	118	5	99	3	110	8
Isofenphos	117	5	94	5	104	2	96	3	103	10
Isofenphos oxon	75	5	78	5	75	7	77	0	76	2
Malaoxon	-		-		-		82	0	82	
Malathion	106	3	105	3	115	5	97	4	106	7
Methamidophos	30	19	19	3	25	9	nd		25	23
Methidathion	108	5	98	4	107	2	90	1	101	8
Parathion*	126	6	125	2	120	1	107	4	119	7
Parathion-methyl*	126	5	109	2	116	2	66	3	104	25
Phenthoate	104	5	103	0	107	2	98	2	103	4
Phosalone	113	2	110	3	112	2	99	4	109	6
Phosmet	116	3	118	2	119	2	93	3	112	11
Pirimiphos-methyl*	99	4	97	1	94	1	92	1	95	3
Prothiofos*	101	4	100	1	101	7	99	6	100	1
Pyralofos*	135	4	135	1	124	2	121	4	129	6
Quinalphos	105	3	107	2	106	1	99	1	104	3
Terbufos	103	3	108	1	101	1	98	3	102	4
Thiometon	93	2	95	5	91	4	94	2	93	2
Tolclofos-methyl	95	1	94	1	94	1	79	3	90	9
Vamidothion	63	9	62	3	71	5	89	4	71	18

* 残留基準が設定されている農薬。

ゴチック体はSFE法の条件検討に使用した農薬。

-: 未実施, nd: 不検出