

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
Other pesticide (41)										
Acetamiprid*	-		-		-		nd		nd	
Amitraz	17	14	nd		nd		nd		4	200
Benalaxyl	98	4	107	11	109	1	87	2	100	10
Benfuresate	101	1	107	2	98	9	76	9	95	14
Bitertanol	105	4	104	3	108	10	89	2	101	8
Chinomethionat	106	3	106	4	90	4	108	1	102	8
Cyproconazole	-		-		-		77	1	77	
Dichlofluanid*	106	5	109	3	101	2	78	7	98	14
2,4-Dichloroaniline*	81	7	113	4	97	3	92	3	96	14
Difenoconazole*	111	2	112	3	108	8	92	5	106	8
Dimethipin	77	1	90	7	85	0	78	2	83	8
Fenarimol	100	5	99	4	97	8	91	4	97	4
Flusilazole	92	3	99	1	104	3	85	2	95	9
Flutolanil	107	4	119	1	117	3	94	3	109	11
Imibenconazole*	71	6	59	7	72	12	50	1	63	16
Imibenconazole metabolite*	97	4	79	11	84	3	30	2	73	41
Iprodione*	102	5	104	2	112	1	83	2	100	12
Iprodione metabolite*	128	4	125	4	119	4	117	3	122	4
Lenacil	30	25	14	18	67	8	12	8	31	82
Mefenacet	109	6	108	3	112	7	78	6	102	16
Mepronil	108	6	110	7	113	5	90	3	105	10
Methoprene	107	5	102	5	101	1	102	2	103	3
Metolachlor	-		-		-		101	1	101	
Metribuzin	103	4	87	3	77	1	66	6	83	19
Myclobutanil*	91	7	99	1	98	2	84	2	93	8
Paclobutrazol	89	4	94	2	92	5	86	4	90	4
Pendimethalin	125	5	132	1	123	3	115	3	124	6
Pretilachlor	105	3	108	1	116	2	96	1	106	8
Propiconazole	95	3	102	2	109	3	85	1	98	10
Pyridaben*	104	5	112	2	109	4	100	3	106	5
(E)-Pyrifenoxy*	96	2	93	3	101	4	93	0	96	4
(Z)-Pyrifenoxy*	94	3	99	3	94	1	92	1	95	3
Pyrimidifen	-		-		-		88	3	88	
Pynproxifen	-		-		-		91	1	91	
Silafluofen*	-		-		-		92	1	92	
Tebuconazole	-		-		-		79	5	79	
Tebuconazole*	113	5	112	3	115	5	112	3	113	1
Thenylchlor	110	4	112	1	118	2	84	2	106	14
Triadimefon	103	1	99	6	97	3	99	1	99	2
Triadimenol	103	4	93	3	96	2	98	1	97	5
Tricyclazole	nd		nd		nd		nd		nd	

* 残留基準が設定されている農薬。

ゴシック体はSFE法の条件検討に使用した農薬。

-:未実施, nd:不検出

表3 SFE法の添加回収実験のまとめ

回収率	緑 茶	ウーロン茶	紅 茶	抹 茶
>120%	9(6)	8(5)	6(3)	2(1)
120-70%	101(40)	100(40)	105(43)	113(44)
>50%, <70%	1(0)	3(1)	1(0)	5(2)
<50%	5(1)	5(1)	4(1)	8(4)
合 計	116(47)	116(47)	116(47)	128(51)

数字は農薬数、()内は茶に残留基準が設定されている農薬数。

表4 SFE法の添加回収実験で問題のあった農薬のまとめ

(a) 低回収率(<50%)の農薬

OP: acephate* [nd-38%], methamidophos [nd-30%]

OT: acetamiprid* [nd], tricyclazole [nd], amitraz [nd-17%], lenacil [12-67%]

(b) やや低回収率(>50%, <70%)の農薬

OC: captan [63-72%]

OP: vamidothion [62-89%]

OT: imibenconazole* [50-72%]

(c) 回収率が120%を越えた農薬

PY: halfenprox* [107-127%]

OP: azinphos-methyl [97-135%], butamifos [103-152%], EPN* [103-133%],
parathion* [107-126%], parathion-methyl* [66-126%], pyraclofos* [121-135%]

OT: iprodion metabolite* [117-128%], pendimethalin [115-132%]

OC:有機塩素系農薬, PY:ピレスロイド系農薬, OP:有機リン系農薬, OT:その他.

* 茶に残留基準が設定されている農薬.

nd: 不検出

[]内は回収率.

表5 緑茶の添加回収実験におけるSFE法と溶媒抽出法の比較

Pesticide	SFE法			溶媒抽出法			残留基準 ($\mu\text{g/g}$)
	Recovery, %		LOD	Recovery, %		LOD	
	Mean	RSD	(ng/g)	Mean	RSD	(ng/g)	
Organochlorine pesticide (16)							
Aldrin*	89	1	2	75	7	5	nd
α -BHC*	95	3	2	91	3	3	0.2
β -BHC*	83	4	2	88	2	4	0.2
γ -BHC*	93	3	2	87	4	4	0.2
δ -BHC*	83	4	2	92	3	4	0.2
Captafol*	105	4	23	33	17	31	nd
Captan	70	10	10	7	38	30	
Chlorobenzilate	104	3	1	106	0	2	
<i>p,p'</i> -DDD*	90	1	1	82	1	2	0.2
<i>p,p'</i> -DDE*	88	3	1	71	4	2	0.2
<i>o,p'</i> -DDT*	85	4	1	80	4	2	0.2
<i>p,p'</i> -DDT*	95	5	1	88	5	3	0.2
Dieldrin*	91	2	4	92	2	10	nd
Endrin*	99	4	3	99	2	9	nd
Heptachlor	92	3	1	83	5	2	
Heptachlor epoxide	91	3	1	89	1	2	
Pyrethroid pesticide (10)							
Cyfluthrin*	116	2	27	114	3	72	20
Cyhalothrin*	105	3	3	109	2	9	15
Cypermethrin*	106	2	21	104	7	59	20
Deltamethrin*	112	0	16	107	3	46	10
Fenvalerate*	109	2	15	102	8	31	1.0
Flucythrinate*	113	3	5	119	3	15	20
Fluvalinate*	112	2	4	97	2	8	10
Halfenprox*	127	5	2	71	8	6	10
Permethrin*	113	2	2	108	4	4	20
Tefluthrin	99	2	0.5	87	2	1	
Carbamate pesticide (13)							
Aldicarb	115	11	24	107	12	37	
Bendiocarb	103	5	2	103	3	3	
Carbaryl*	97	5	1	103	3	2	1.0
Chlorpropham	106	4	4	112	1	13	
Diethofencarb	107	4	5	103	3	20	
Esprocarb	98	1	1	98	2	3	
Ethiofencarb*	71	11	5	92	7	10	30
Fenobucarb*	102	1	1	102	4	6	0.5
Isoprocarb	100	2	1	97	3	2	
Methiocarb	101	3	1	99	2	3	
Pirimicarb	100	3	1	2	2	3	
Propoxur	101	6	1	101	2	2	
Thiobencarb	100	2	1	106	1	3	
Organophosphorus pesticide (43)							
Acephate*	38	17	18	nd		8	10
Azinphos-ethyl	113	6	7	135	7	10	
Azinphos-methyl	134	2	13	130	3	14	
Bromophos-ethyl	101	2	1	122	6	3	
Butamifos	132	5	2	108	8	5	
Cadusafos	118	2	4	118	3	7	
(E)-Chlorfenvinphos	109	3	1	110	1	3	
(Z)-Chlorfenvinphos	101	3	1	106	4	3	
Chlorpyrifos*	101	1	1	102	10	3	3.0
Chlorpyrifos-methyl	101	2	0.4	110	4	1	
Diazinon*	97	2	2	102	2	7	0.1
Dichlorvos*	110	4	11	78	6	8	0.1
Dimethoate	93	8	8	101	4	9	
(Z)-Dimethylvinphos	101	4	1	93	4	1	
Dioxabenzofos	114	5	1	108	1	2	
Disulfoton	93	4	1	84	7	3	
Edifenphos	119	4	2	119	4	5	

LOD(limits of detection, 検出限界), nd:不検出, * 残留基準が設定されている農薬

表5 緑茶の添加回収実験におけるSFE法と溶媒抽出法の比較(続き)

Pesticide	SFE法			溶媒抽出法			残留基準 ($\mu\text{g/g}$)
	Recovery, %		LOD	Recovery, %		LOD	
	Mean	RSD	(ng/g)	Mean	RSD	(ng/g)	
Organophosphorus pesticide (cont.)							
EPN*	130	4	4	133	3	11	0.1
Ethion	99	3	1	112	0	3	
Ethoprophos	120	4	2	120	3	4	
Etrimfos	99	2	0.4	92	3	1	
Fenitrothion*	116	6	2	104	2	4	0.2
Fensulfothion	110	6	2	108	1	5	
Fenthion	96	2	0.5	89	1	1	
Fosthiazate	108	4	25	112	2	67	
Isofenphos	117	5	3	98	3	4	
Isofenphos oxon	75	5	6	86	4	17	
Malathion	106	3	2	94	4	6	
Methamidophos	30	19	29	nd		28	
Methidathion	108	5	1	111	2	3	
Parathion*	126	6	2	115	2	5	0.3
Parathion-methyl*	126	5	3	107	4	5	0.2
Phenthoate	104	5	1	104	2	3	
Phosalone	113	2	2	122	5	4	
Phosmet	116	3	1	115	3	2	
Pirimiphos-methyl*	99	4	1	96	2	1	10
Prothiofos*	101	4	1	96	6	3	5.0
Pyraclofos*	135	4	3	151	3	5	5
Quinalphos	105	3	3	99	2	5	
Terbufos	103	3	1	99	4	1	
Thiometon	93	2	1	82	7	2	
Tolclofos-methyl	95	1	0.3	91	2	1	
Vamidothion	63	9	19	24	9	23	
Other pesticide (34)							
Amitraz	17	14	4	nd		9	
Benalaxyl	98	4	1	102	2	3	
Benfuresate	101	1	2	110	5	13	
Bitertanol	105	4	2	122	2	5	
Chinomethionat	106	3	4	5	20	4	
Dichlofluanid*	106	5	3	27	3	12	5.0
2,4-Dichloroaniline*	81	7	1	71	10	1	20
Difenoconazole*	111	2	6	118	0	8	10
Dimethipin	77	1	8	64	4	11	
Fenarimol	100	5	5	107	2	13	
Flusilazole	92	3	1	90	2	1	
Flutolanil	107	4	1	112	4	2	
Imibenconazole*	71	6	17	84	0	20	20
Imibenconazole metabolite*	97	4	16	105	2	35	20
Iprodione*	102	5	6	98	4	15	20
Iprodione metabolite*	128	4	185	125	8	329	20
Lenacil	30	25	2	110	1	4	
Mefenacet	109	6	3	116	4	7	
Mepronil	108	6	4	104	6	12	
Methoprene	107	5	9	114	5	19	
Metribuzin	103	4	1	27	6	9	
Myclobutanil*	91	7	2	90	4	5	20
Paclbutrazol	89	4	1	90	2	4	
Pendimethalin	125	5	1	118	1	4	
Pretilachlor	105	3	1	107	0	6	
Propiconazole	95	3	3	107	3	8	
Pyridaben*	104	5	3	118	1	10	10
(E)-Pyrifenox*	96	2	2	44	3	4	5.0
(Z)-Pyrifenox*	94	3	1	46	6	4	5.0
Tebufenpyrad*	113	5	1	118	1	6	2
Thenylchlor	110	4	2	113	3	12	
Triadimefon	103	1	3	99	4	11	
Triadimenol	103	4	2	105	3	6	
Tricyclazole	nd		10	34	5	31	

LOD(limits of detection, 検出限界), nd: 不検出, * 残留基準が設定されている農薬

表6 緑茶の添加回収実験におけるSFE法と溶媒抽出法の比較のまとめ

回収率	SFE法	溶媒抽出法
>120%	9(6)	8(3)
120-70%	101(40)	94(39)
>50%, <70%	1(0)	1(0)
<50%	5(1)	13(5)
合計	116(47)	116(47)

数字は農薬数。()内は茶に残留基準のある農薬数。

表7 緑茶の添加回収実験で問題のあった農薬のSFE法と溶媒抽出法比較のまとめ

(a) 低回収率(<50%)の農薬

1) 両方法とも

OP: acephate* [38, nd], methamidophos [30, nd]

OT: amitraz [17, nd], tricyclazole [nd, 34]

2) SFE法のみ

OT: lenacil [30, 110]

3) 溶媒抽出法のみ

OC: captan [70, 7], captafol* [105, 33]

CA: pirimicarb [100, 2]

OP: vamidothion [63, 24]

OT: chinomethionat [106, 5], dichlofluanid* [106, 27], metribuzin [103, 27],

(E)-pyrifenox* [96, 44], (Z)-pyrifenox* [94, 46]

(b) やや低回収率(>50%, <70%)の農薬

1) SFE法のみ

OP: vamidothion [63, 24]

2) 溶媒抽出法のみ

OT: dimethipin [77, 64]

(c) 回収率が120%を越えた農薬

1) 両方法とも

OP: EPN* [130, 133], azinphos-methyl [134, 130], pyraclofos* [135, 151]

OT: iprodione metabolite* [128, 125]

2) SFE法のみ

PY: halfenprox* [127, 71]

OP: parathion* [126, 115], parathion-methyl* [126, 107], butamifos [132, 108]

OT: pendimethalin [125, 118]

3) 溶媒抽出法のみ

OP: bromophos-ethyl [101, 122], phosalone [113, 122], azinphos-ethyl [113, 135]

OT: bitertanol [105, 122]

OC:有機塩素系農薬, PY:ピレスロイド系農薬, OP:有機リン系農薬, OT:その他。

* 茶に残留基準が設定されている農薬。

nd: 不検出

[]内は左側がSFE法の回収率, 右側が溶媒抽出法の回収率。

表8 SFE法と溶媒抽出法の測定値の比較

Sample	Pesticides	Concentration (ng/g), n=3			
		SFE		Solvent extraction	
		Mean	RSD ^{*1}	Mean	RSD
Green tea No.1	<i>Pyrethroid</i>				
	Fenvalerate	70	5	63	7
	Fluvalinate	17	7	16	19
	Halfenprox	22	4	13	6
	<i>Organophosphate</i>				
	Chlorpyrifos	170	4	176	14
	EPN	26	10	27	8
	Ethion*	22	0	24	7
	Fenitrothion	70	7	75	11
	Pirimiphos-methyl	6	1	7	4
	Prothiofos	280	1	284	13
	Pyraclofos	29	8	38	23
	<i>Carbamate</i>				
	Fenobucarb	5	7	15	22
	<i>Other</i>				
	Difenoconazole	31	3	40	21
Myclobutanil	24	4	51	16	
Pyridaben	28	3	29	5	
Green tea No.2	<i>Pyrethroid</i>				
	Cypermethrin	157	6	159	13
	Fenvalerate	249	11	252	10
	Flucythrinate	54	2	51	13
	Fluvalinate	19	10	17	20
	<i>Organophosphate</i>				
	Chlorpyrifos	51	7	51	2
	EPN	66	7	70	9
	Phosalone*	143	4	165	4
	Prothiofos	84	6	78	10
	Pyraclofos	17	5	20	8
<i>Other</i>					
Difenoconazole	16	4	19	5	
Green tea No.3	<i>Pyrethroid</i>				
	Halfenprox	273	3	170	6
	<i>Organophosphate</i>				
	Chlorpyrifos	66	6	73	3
	EPN	39	3	38	5
	Ethion*	139	4	145	2
	Prothiofos	371	5	346	4
	Pyraclofos	227	8	262	4
	<i>Other</i>				
	Difenoconazole	75	4	89	1
Pyridaben	533	7	516	9	

^{*1} RSD, relative standard deviation.

* 残留基準のない農薬

表8 SFE法と溶媒抽出法の測定値の比較 (続き)

Sample	Pesticides	Concentration (ng/g), n=3			
		SFE		Solvent extraction	
		Mean	RSD ^{*1}	Mean	RSD
Green tea No.4	<i>Pyrethroid</i>				
	Fluvalinate	251	3	218	3
	<i>Organophosphate</i>				
	Ethion*	18	2	20	5
	Prothiofos	17	6	17	3
	Pyraclufos	220	4	326	7
	<i>Carbamate</i>				
	Fenobucarb	35	3	93	4
	<i>Other</i>				
	2,4-Dichloroaniline	3	1	31	12
	Imibenconazole	212	7	263	8
	Imibenconazole metabolite	98	8	202	8
Myclobutanil	46	5	109	12	
Green tea No.5	<i>Pyrethroid</i>				
	Cyhalothrin	80	4	80	5
	Fluvalinate	601	4	557	9
	<i>Organophosphate</i>				
	Prothiofos	29	5	31	7
<i>Other</i>					
Tebufenpyrad	14	6	15	8	
Oolong tea No.1	<i>Organochlorine</i>				
	<i>p,p'</i> -DDD	13	7	12	7
	<i>p,p'</i> -DDE	28	2	28	4
	<i>o,p'</i> -DDT	40	5	39	8
	<i>p,p'</i> -DDT	45	1	42	3
	<i>Pyrethroid</i>				
Fenvalerate	836	1	778	26	
Oolong tea No.2	<i>Organochlorine</i>				
	Chlorobenzilate*	12	5	19	4
	<i>Pyrethroid</i>				
	Cypermethrin	137	5	137	1
	Permethrin	832	6	812	2
<i>Organophosphate</i>					
Ethion*	75	6	91	8	

*1 RSD, relative standard deviation.

*残留基準のない農薬

表9 農薬別のSFE法と溶媒抽出法の比較

No.	Pesticides	Solubility in water (mg/l)	n	Ratios ^{*1}		Recovery (%)	
				Mean	SD ^{*2}	SFE ^{*3}	Solvent ^{*4}
1	Fenobucarb	610	2	0.37	0.02	102	102
2	Myclobutanil	142	2	0.45	0.04	91	90
3	Pyraclofos	33	4	0.79	0.09	135	151
4	Fenitrothion	28	1	0.93		116	104
5	Chlorobenzilate*	10	1	0.63		104	106
6	Pirimiphos-methyl	5	1	0.84		99	96
7	Difenoconazole	3.3	3	0.83	0.05	111	118
8	EPN	3.11	3	0.98	0.05	130	133
9	Tebufenpyrad	2.8	1	0.89		113	118
10	Phosalone*	2.6	1	0.87		113	122
11	Prothiofos	1.7	5	1.01	0.06	101	96
12	Imibenconazole	1.7	1	0.80		71	84
13	Ethion*	1.1	4	0.90	0.06	99	112
14	Chlorpyrifos	0.6	3	0.96	0.06	101	102
15	Flucythrinate	0.5	1	1.07		113	119
16	Permethrin	0.2	1	1.02		113	108
17	Cypermethrin	0.11	2	1.00	0.01	106	104
18	<i>p,p'</i> -DDD	0.06	1	1.09		90	82
19	<i>o,p'</i> -DDT	0.056	1	1.02		85	80
20	Fenvalerate	0.044	3	1.05	0.06	109	102
21	Pyridaben	0.012	2	1.01	0.04	104	118
22	<i>p,p'</i> -DDE	0.01	1	1.01		88	71
23	Fluvalinate	0.005	4	1.12	0.03	112	97
24	<i>p,p'</i> -DDT	0.004	1	1.08		95	88
25	Cyhalothrin	0.003	1	1.00		105	109
26	Halfenprox	0.00005	2	1.66	0.07	127	71
27	2,4-Dichloroaniline	-	1	0.10		81	71
28	Imibenconazole metabolite	-	1	0.49		97	105

^{*1} Ratios = (Results of SFE method)/(Results of solvent extraction method); ^{*2} SD, standard deviation; ^{*3} SFE, SFE method;

^{*4} Solvent, solvent extraction method.

* 残留基準値のない農薬

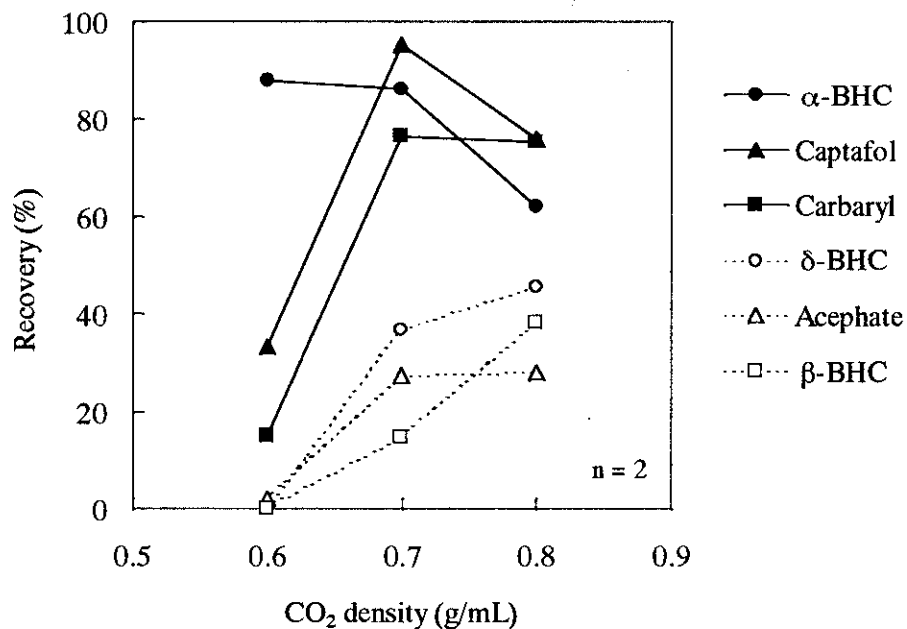


図1 CO₂密度の影響

SFE 条件 : extraction temp. = 40 °C, CO₂ flow rate = 2 mL/min,
3 min static extraction, 20 min dynamic extraction

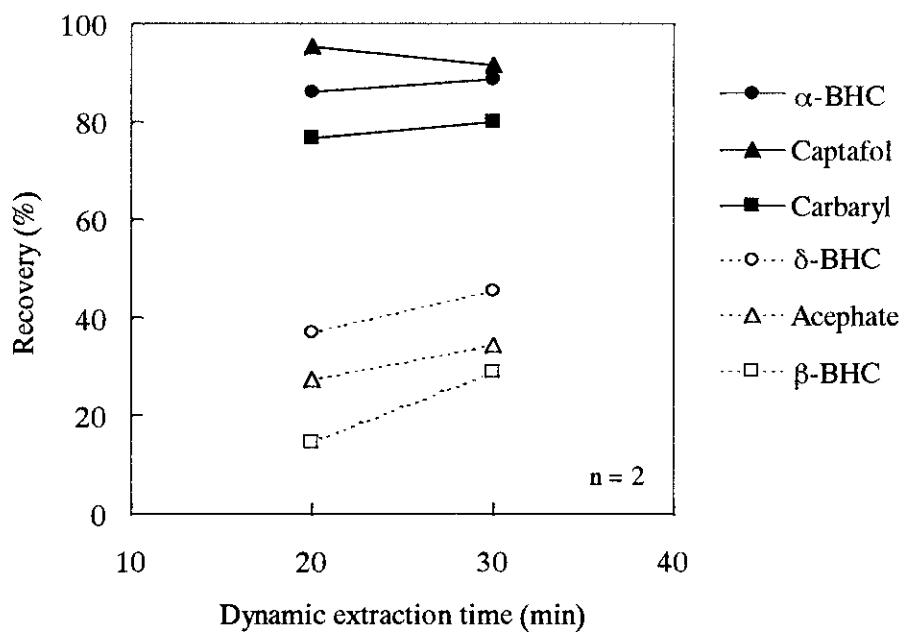


図2 抽出時間の影響

SFE 条件 : CO₂ density = 0.7 g/mL, extraction temp. = 40 °C,
CO₂ flow rate = 2 mL/min, 3 min static extraction

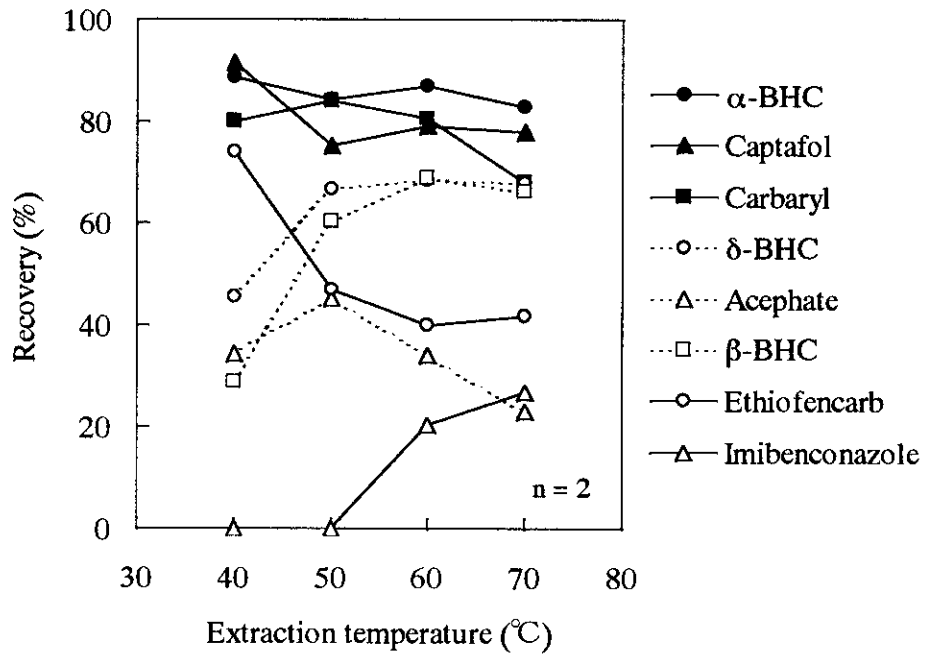


図3 抽出温度の影響

SFE 条件 : CO₂ density = 0.7 g/mL, CO₂ flow rate = 2 mL/min,
3 min static extraction, 30 min dynamic extraction

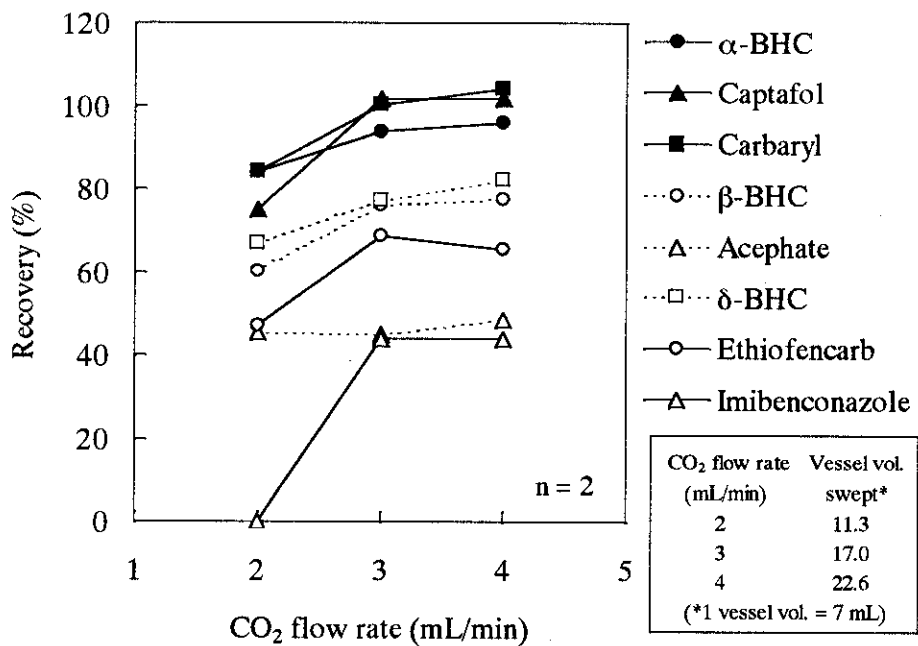


図4 CO₂流速の影響

SFE 条件 : CO₂ density = 0.7 g/mL, Extraction temp. = 50 °C,
3 min static extraction, 30 min dynamic extraction

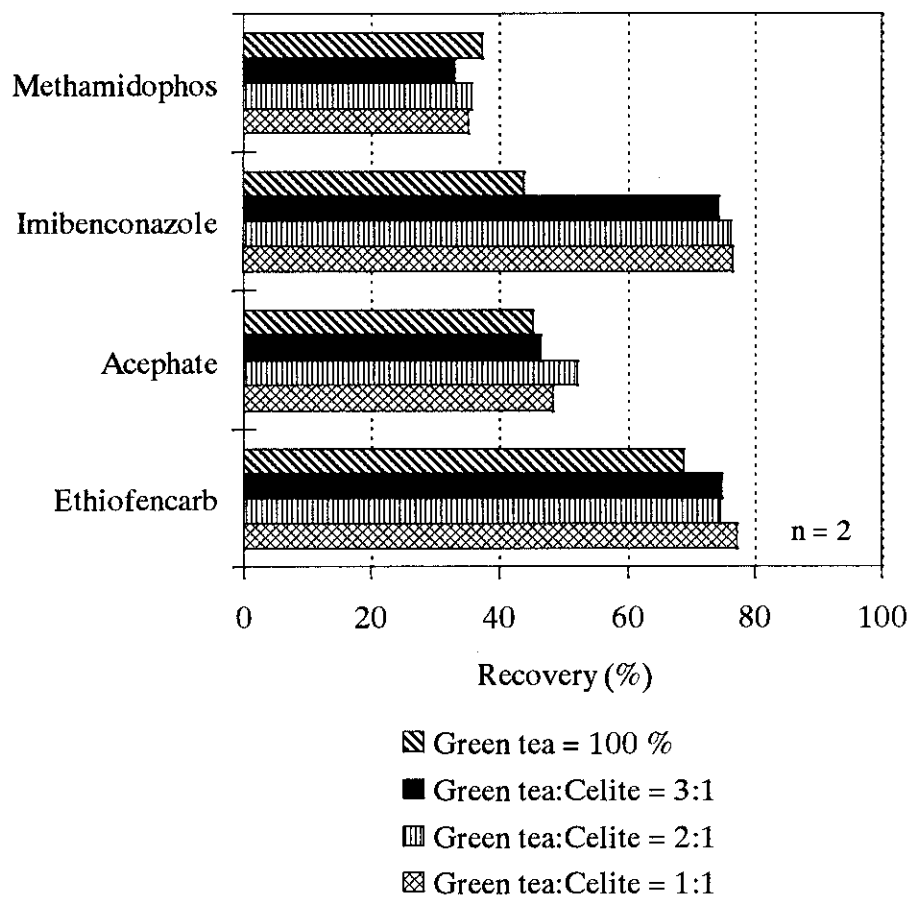


図5 セライトとの混合の影響

SFE 条件 : CO₂ density = 0.7 g/mL, Extraction temp. = 50 °C,
 3 mL/min CO₂ flow, 3 min static extraction, 30 min dynamic extraction

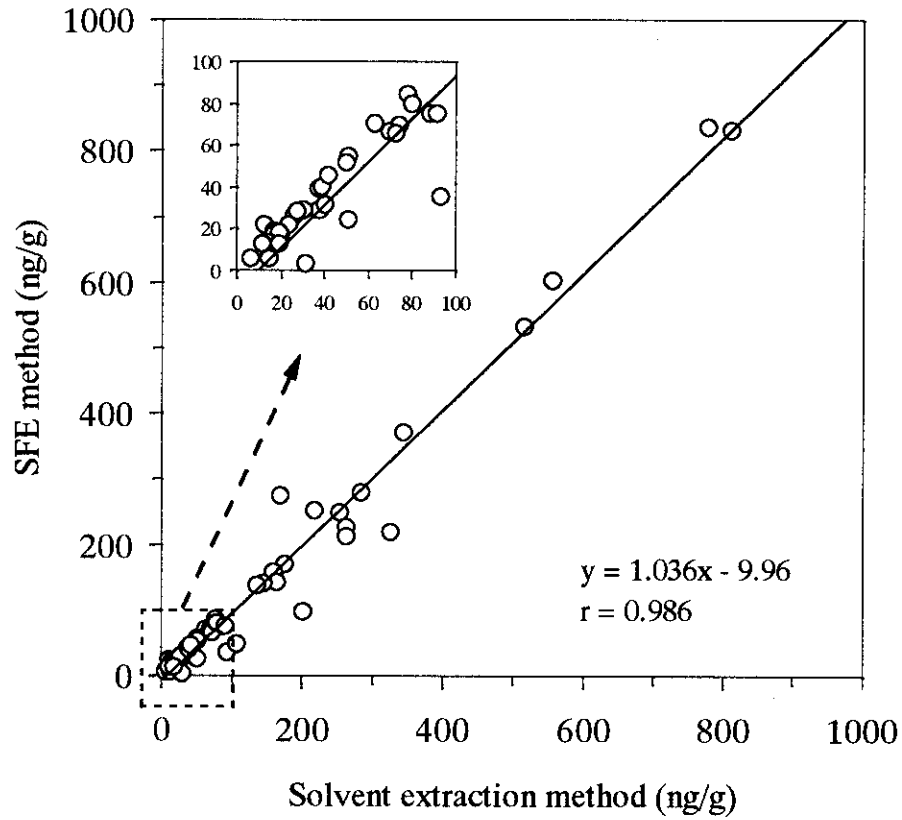


図6 SFE法と溶媒抽出法の測定値の比較

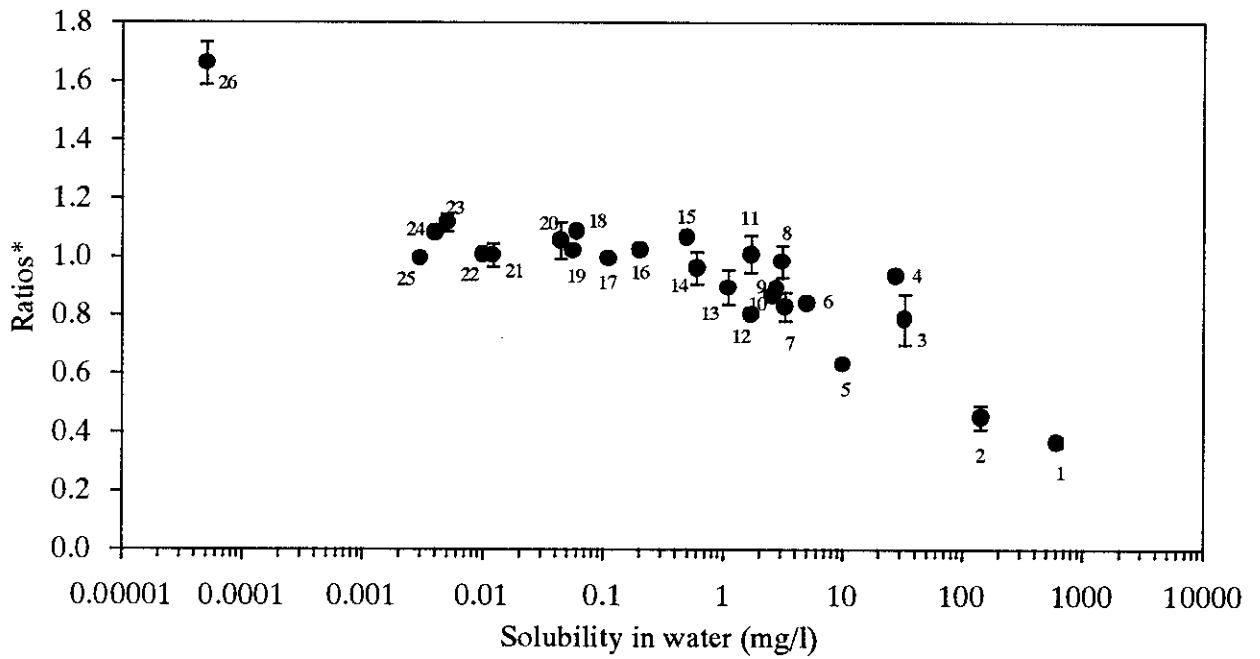


図7 溶媒抽出法の測定値に対するSFE法の測定値の比と農薬の水溶解度との関係

* Ratios = (SFE法の測定値) / (溶媒抽出法の測定値), 番号は表9の農薬の番号に対応.

分担研究報告書

超臨界流体抽出、HPLC による一斉分析法に関する研究

分担研究者 外海 泰秀

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、HPLCによる一斉分析法に関する研究

分担研究者 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

研究要旨

超臨界流体抽出(SFE)法を用いて抽出し、Bond Elut C₁₈, Sep-Pak Florisil, Bond Elut PSA で抽出物を精製した後、HPLC で定性・定量する多種農薬の簡便で迅速な多成分一斉分析法について検討した。

本報では SFE で回収率が低いと言われている水分含量の高い野菜・果実などの青果物を対象作物とし、吸水剤を加えて添加回収実験を行った。その結果、一部の農薬を除いてほぼ良好な回収率を得たが、作物によっては変動の大きいものもみられた。全農薬を同時に分析するには、保持時間が接近しており解析が困難であったため、5 群に分けて検討した。本法を 27 農薬に適用したところ、概ね良好な結果が得られ、本法の妥当性を確認できた。しかし、一部の農薬については試料由来の妨害ピークと重なり、確認困難なものもあった。

A. 研究目的

食品衛生法に基づく最大残留基準値(MRL)は、各農薬について農作物ごとに設定されておりこれと同時に分析法が告示されている。基準設定された農薬数及び農作物数の増加に対応し、輸入時の検査及び地方公共団体等における食品衛生監視業務を効率的に行うため、告示分析法とは別に多数の農薬を一括して迅速に分析できる試験法の開発が進められてきた。

平成6年から9年度において残留農薬迅速分析法検討委員会が検討した結果を、平成7年及び9年度に残留農薬迅速分析法として公表し、平成9年度分は課長通知された。

昨年度はより迅速且つ簡便にガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)による残留農薬の一斉分析を行うことを目的として、従来法に改良を加え超迅速分析化に関する調査研究を行った。

一方、通常の有機溶媒抽出法では、分析操作が煩雑であると共に多量の溶媒を必要とし分析上の廃液が人体や環境に与える影響が懸念されている。そのため本法ではそのような問題をふまえて、安全で少量の溶媒で済む迅速且つ簡便な超臨界流体抽出(SFE)法¹⁾を用いた。また、近年では残留農薬分析は安全性や環境へ配慮して易分解性の農薬が増加しており、このような農

薬では GC 等で分析するには誘導体化を行うなどの操作が必要で煩雑である^{2, 3)}。そのため新規登録される農薬には HPLC 法で測定するものが増加する傾向にあり、また新しく食品衛生法に基づく残留基準値が設定された農薬のうち HPLC 法で測定するものも増加している^{4~7)}。そこで、本法では分析時間の短縮と使用有機溶媒の減量、また確認試験あるいは将来の高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)の導入を考慮して HPLC 装置のセミマイクロ化を行い、系統的な確認法を確立することを目的として SFE とフォトダイオードアレイ検出器付 HPLC による農薬のスクリーニング法を検討した。

SFE は、含水率の低い土壌や穀物等に対して農薬の抽出が容易であり、有用な抽出法であると報告されているが、含水率の高い野菜や果物では農薬が充分抽出されず、また SFE 装置に様々な問題を引き起こすため、青果物の適用に際しては試料を脱水するための様々な工夫が報告されている^{8~11)}。その中でも最も吸水性が高いといわれているのが吸水性ポリマーである。

含水率の低い穀類からの SFE 抽出について著者らは既に報告している^{12~14)}ので、本研究では対象作物を青果物にしぼり前処理としてこの吸水性ポリマーを用いて試料中から水分を取

り除いた後、SFE 抽出、ミニカラムによる精製及びセミマイクロ化 HPLC 法で検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

市販のきゅうり、りんご、だいこん、バナナ、じゃがいも、なす、にんじん、茶、オレンジ、ほうれん草を用いた。

2. 試験機関

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所

3. 試薬及び材料

1) 農薬標準品

和光純薬工業(株)または林純薬工業(株)の残留農薬試験用標準品を用いた。

2) 農薬標準原液

各農薬標準品をアセトニトリル(溶解しにくい場合のみ、アセトンまたはメタノール)で 1 mg/mL に調製し、-20 °C で保存した。

3) 農薬標準混液

各農薬標準原液をとり、アセトニトリルで各群 10 µg/mL に調製し、-20 °C で保存した。

農薬標準 A 混液：チアベンダゾール(TBZ)、カルバリル、イマザリル、イプロジオン、ヘキサフルムロン、クロルフルアズロン、エトフェンプロックス

農薬標準 B 混液：イミベンコナゾール代謝物、フラメトピル、ベンフレセート、ピラゾキシフェン、イプロジオン代謝物、ヘキシチアゾックス、シラフルオフエン

農薬標準 C 混液：TBZ、メタベンズチアズロン、イナベンフィド、マイクロブタニル、エトベンザニド、ペンシクロン、ブプロフェジン

農薬標準 D 混液：ダイムロン、テブフェノジド、クロフェンテジン、フルフェノクスロン

農薬標準 E 混液：TBZ、ジフルベンズロン、トリフルミゾール、フェンピロキシメート

4) 各種有機溶媒

和光純薬工業(株)の残留農薬分析用及び HPLC 用を使用した。

5) 吸水性ポリマー

荒川化学工業(株)の Arasorb S310 を使用した。

6) 固相抽出ミニカラム

Bond Elut C₁₈(1 g, Varian 社製)、Extrelut NT(2.5

g, Merck 社製)、Sep-Pak Florisil (690 mg, Waters 社製)、Bond Elut PSA (500 mg, Varian 社製) を使用した。

4. 装置

1) SFE 装置

日本分光(株)製、Super-201 型

2) 高速液体クロマトグラフ

Hewlett Packard 社製、1100 series

5. 測定条件

1) SFE

抽出超臨界流体(CO₂)流量：4.9 mL/min.

モデイファイア(アセトン)流量：0.1 mL/min

圧力：300 kg/cm² 抽出管温度：40 °C

捕集部温度：75 °C 抽出時間：40 分

2) HPLC

カラム：Wakosil II-3C18RS(2 mm × 150 mm)

温度：50 °C, 流速：0.2 mL/min

検出器：UV (230 nm)、注入量：10 µL

移動相：A: H₂O B: CH₃CN

タイムプログラム 0min. A: 80% B: 20%

10min. A: 40% B: 60%

20min. A: 30% B: 70%

22 ~ 30min. A: 0% B: 100%

6. 分析操作法

1) 試料溶液調製法

試料 5 g を細切して均一化した後、Celite 1 g と吸水性ポリマー 1 g を順に加えて混ぜ合わせ、少量の Celite を再度加え、完全に顆粒状になるまでよく混和した。これを抽出管に充てんし、SFE 装置に装着して 40 分間抽出を行った。抽出物は捕集部に直結した Extrelut NT と Bond Elut C₁₈ を積層したガラス管で捕集した。ガラス管を取り外し、排出口及びガラス管の内壁をまず少量のアセトニトリルで洗いこみ、その後アセトニトリル 40 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残渣を n-hexane 2 mL に溶解し直列につないだ Sep-Pak Florisil と Bond Elut PSA に負荷した。n-hexane で洗浄後、15 % ether/n-hexane 20 mL, 15 % acetone/n-hexane 20 mL, 次いで 50 % acetone/n-hexane 20 mL で順次溶出し、それぞれの溶出画分を分取した。各溶出画分を減圧乾固し、残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解し、試験溶液とした。これらの分析操作法を Scheme 1 に示した。

2) 添加回収試験

試料に 0.5 ppm になるように添加回収試験用農薬標準混液を添加し、以降、試料溶液調製法に従って操作した。

3) 定性・定量

定性はピークの保持時間で行った。定量は各試験溶液 10 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、230 nm におけるピーク面積において絶対検量線法で行った。

4) 確認試験

添加回収試験などの際に、フォトダイオードアレイ検出器を用いて吸収スペクトルも同時に測定し、妨害ピークと農薬ピークとを判別した。

C. 研究結果及び考察

1. 対象農薬の選定について

前述の農薬のうちカルバリル、ベンフレセート、ピラゾキシフェン、イナベンフィド、マイクロブタニル、クロフェンテジンは公定法では GC 法を採用しており、それ以外は HPLC 法となっている。前述の農薬以外に HPLC で測定されている農薬、GC では測定困難な農薬であるピリデート、テクロフタラム、テクロフタラム代謝物、トリクラミド、シモキサニル、ジクロメジン、フルスルファミド、シロマジン、クロリムロンエチル、メトスルフロンメチルについても検討したが、本 HPLC 条件においてシロマジンは保持時間が短いために溶媒ピークと重なり、クロリムロンエチル、メトスルフロンメチル、フルスルファミドについてはリーディングが顕著なために測定困難であった。また、その他農薬については Table 1 に示したように本研究で使用した Sep-Pak Florisil 及び Bond Elut PSA のどちらかにおいて標準溶液での回収率が 50 % に満たなかったため、今回の研究では削除した。よって 27 農薬について検討を行うこととした。

2. HPLC 条件の検討

カラムは 27 農薬及びその代謝物の同時分析と使用溶媒量の削減のために逆相系の ODS セミマイクロカラムを使用した。また、ピークの高分離性と測定時間の短縮を期待して粒径 3.5 μ m のものを使用した。なお、グラジエント溶出法ですべてを一斉に分析するには保持時間が接

近しており、解析が困難であったため A から E の 5 群に分けて測定した。27 農薬 (A ~ E 群 : 1 μ g/mL 溶液) の HPLC クロマトグラムを Fig.1 に示した。

移動相の組成については今後の高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) の導入の必要性を考慮して、繁用されるリン酸塩は用いずアセトニトリル-水系を用いた。この条件では前述の検討事項でも述べたように、測定困難な農薬があった。そこで、酢酸あるいは酢酸ナトリウム溶液も検討したところ、フルスルファミドについてはリーディングが改善されたもののベースラインのドリフトが大きいため、すなわちバックグラウンドがあがってしまうことから、感度低下の懸念があった。イオンペア試薬やトリフルオロ酢酸を添加した場合についても検討したが、同様の結果であった。その他問題のある農薬についてはいずれも改善されなかった。そこで本研究ではこれら農薬は対象から削除することにした。

測定波長について 254 及び 230 nm について検討したところ、254 nm では妨害ピークの影響を軽減することはできたが、ヘキシチアゾックス、ブプロフェジン、シラフルオフエン、エトフェンブロックス等は感度が低下した。そこで本法では農薬に対してより感度の高い 230 nm に設定した。また TBZ、イマザリル及びイミベンコナゾール代謝物は 230 nm でも Fig.1 に示したように他の農薬と比較すると感度は低かった。

3. 固相抽出ミニカラムによる精製の検討

SFE から抽出物を Bond Elut C₁₈ で捕集した後、イオン交換型カートリッジの Bond Elut PSA、SAX、NH₂ 及び Sep-Pak Florisil、Silica による精製を検討した。33 農薬についての回収率を Table 1 に示し、これらの結果からカートリッジとして回収率及び精製効果の最も高かった Sep-Pak Florisil と Bond Elut PSA を直列に連結して用いることにした。

なお、Florisil に関しては保存状態やロットによって再現性が十分に得られない場合があり、注意が必要であった。

本法では、妨害ピークの分散を目的として n-hexane で洗浄後、15 % ether/n-hexane, 15 %

acetone/n-hexane, 次いで 50 % acetone/n-hexane の各 20mL で順次溶出し、3 画分として捕集することを検討した。27 農薬について Sep-Pak Florisil と Bond Elut PSA からの溶出パターンを Table 2 に示した。また、溶出溶媒量は 10 mL では溶出しきれない農薬があったので各画分を 20 mL 溶出としたところ、71.7%以上の回収率を得た。

4. SFE 条件の検討

一般的に抽出圧力が高く、また抽出温度は 40 °C前後で最も抽出効率は上がるが、一方で試料由来の妨害物も抽出されやすくなる。そこで、妨害物の影響を最小限にでき、なおかつ農薬が最も効率的に抽出される抽出圧力と抽出温度について実際に検出例のある農薬を中心に検討した。その結果、妨害ピークは抽出圧力が下がるほど減少したが、Table 3 に示したように同時に農薬の回収率も低下した。特にクロフェンテジンについては顕著であった。よって抽出圧力・温度はそれぞれ 300 kg/cm², 40 °Cに設定した。

また、抽出物の捕集方法についても検討した。直接ミニカラムの Bond Elut C₁₈ を抽出口に装着する方法も検討したが、本装置ではミニカラム内のフィルターが凍結し、高い噴出圧のためにミニカラムが脱落、破損する場合があった。そこで C₁₈ をガラス管に詰め直し、さらに捕集剤として Extrelut NT を積層して抽出物を捕集した。

5. 農薬の添加回収実験について

SFE を使用するにあたり、今回のように青果物を扱う場合、試料中の水分をいかに除去するかが回収率に大きく影響し問題であった。そこで従来の細切均一化した試料に Celite と吸水性ポリマーを加えて混和する方法に加え、最後にもう一度少量の Celite を混ぜ合わせたところ、試料をより顆粒状にすることができた。その結果、抽出管に詰めやすくなり繰り返し測定での値のばらつきも押さえられ、回収率も向上した。抽出管への詰め方の違いによる 27 農薬の回収率の比較を Table 4 に示した。

上述の方法できゅうり、じゃがいも、りんご、だいこん、バナナに農薬標準混液 A,B,C,D 及び E を 0.5ppm 添加したときの各農薬の回収率を求め、Table 5 に示した。

大多数の農薬は Florisil+PSA からの溶出を 3 画分にするることによって定量が容易になり、概ね良好な値が得られた。しかし、水溶性の高い TBZ とイマザリルは全般的に回収率が低かった。特に TBZ はばらつきが大きかったので、A、C 及び E グループにも添加しばらつきの補正を試みたが、各グループ及び各試料間で変動が大きかった。クロフェンテジンも同様に回収率が低く、大根では妨害ピークと重なって測定困難であった。各農作物の無添加及び B 群添加したときの HPLC クロマトグラムを Fig.2 ~ 6 に示した。

また、上記以外の青果物としてほうれん草、茶、オレンジ、なす、たまねぎ及びにんじんに、ついて、本法により調製した試験溶液の HPLC クロマトグラムを解析したところ、なす以外の作物はいずれも 15 % acetone/n-hexane 20 mL 画分に多数の妨害ピークが出現した。たまねぎを例に挙げて 27 農薬(A ~ E 群添加)のクロマトグラムと比較したところ、Fig. 7,8 に示したように試料由来の妨害ピークと重なり分析困難であった。一方、なすについては Fig.9 に示したように充分本法が適用可能であることが示唆された。

6. HPLC による農薬の検出限界

標準溶液の 230 nm におけるクロマトグラムの S/N 比(S/N=3)から計算した各農薬の検出限界は、カルバリルの 0.005 ppm から TBZ の 0.01 ppm であった。今回対象作物とした青果物をはじめ、大半の作物で基準値レベル以下の検出が可能と考えられる。

本法では平成 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関しても作物由来の妨害が対象農薬と重ならないければ、本法が適用できるものと考えられる。

D. 結論

青果物を対象として、SFE で抽出し、Sep-Pak Florisil と Bond Elut PSA で精製し、フォトダイオードアレイ検出器付 HPLC で定性及び定量する告示農薬の迅速一斉分析法を開発した。きゅうり、じゃがいも、りんご、だいこん、及びバナナからの添加回収実験では一部農薬を除いて

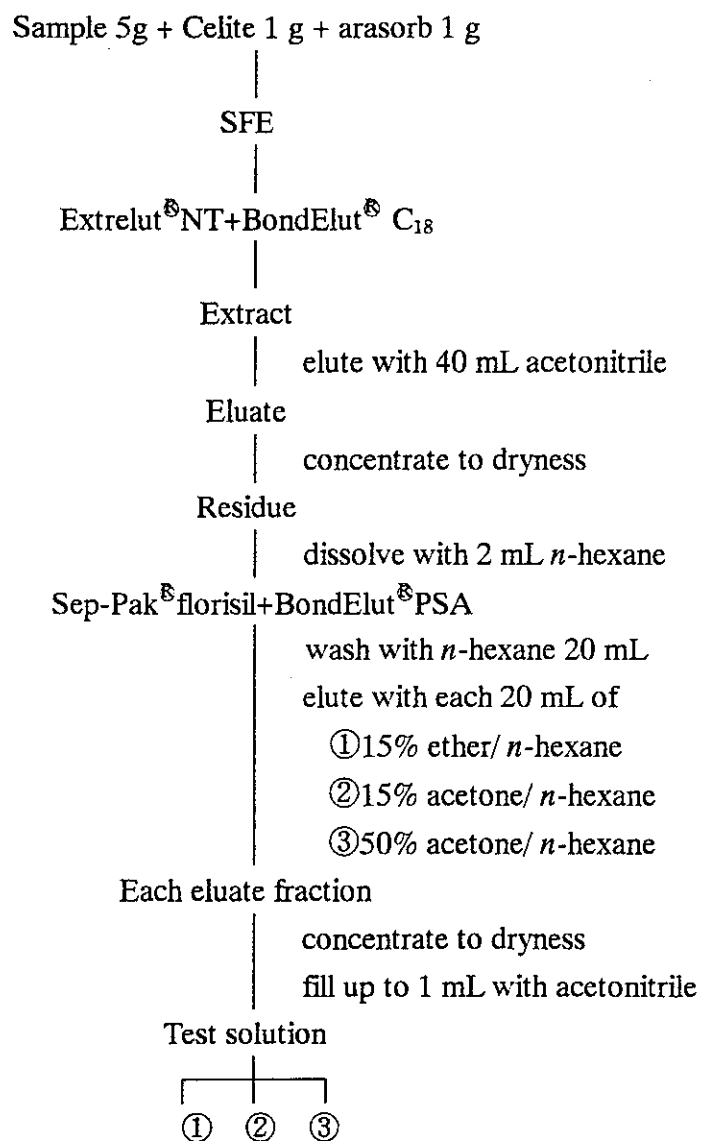
良好な結果が得られ、本法の妥当性を確認できた。しかし、一部農薬や野菜については試料由来の妨害ピークと重なるため測定困難なものがあり、またばらつきの大きなものも見られた。これは分析の超迅速化を優先して精製を必要最小限に簡略したためである。また、回収率の低い農薬については農薬自身の性質が大きく影響しているものと考えられる。

本法では、農薬の感度の問題から測定波長を 230 nm に設定したために妨害ピークが多く出現し解析困難な農薬もあったが、溶出を 3 画分に分散させることである程度回避できた。今後は LC/MS を導入し、ピークの確認をより一層確実にする必要があると考えられる。一方で農薬を 5 群に分類したこともあり実試料では 3 検体、添加回収実験では 1 試料につき 15 検体を測定することになり分析時間が長くなるが、オートサンプラーを使用することで対処できると考えられる。

本法の検出限界は 0.005 ~ 0.01 ppm であった。今回検討した 27 農薬の残留基準値と照合すると基準値レベル以下の検出が十分可能であった。

【参考文献】

1. 工藤憲一：月刊フードケミカル 2 月号別冊 (1996)
2. Valverde, G. et al.: J. AOAC. Int. 78(3), 867-873 (1995)
3. Julie, F. et al.: J. AOAC. Int. 78(5), 1252-1265 (1995)
4. 外海泰秀、津村ゆかり、中村優美子、柴田正：食衛誌. 39(1), 13-25(1998)
5. 土屋 鍛、前田憲二、関口幸弘、平原嘉親、渡辺芳則、外海泰秀：国立医薬品食品衛生研究所報告第 116 号別冊(1998)
6. Chao, H. et al.: J. Agric. Food. Chem.39, 718-723 (1991)
7. Di Muccio, A. et al.: J.chromatogr.A,833(1)61-65 (1999)
8. Steven, J. et al.: J. AOAC. Int. 78(3), 821-830 (1995)
9. Machiko, S. et al.: J. Pesticide. Sci.23, 414-418 (1998)
10. Tekel, J. et al.: J. Chromatogr. A, 754(1-2), 397-410 (1996)
11. Eller, K. et al.: Analyst 122(5), 429-435(1997)
12. 吉井公彦、外海泰秀、津村ゆかり、中村優美子、柴田 正：食衛誌. 39(3), 184-191(1998)
13. 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：食衛誌. 40(1), 68-74(1999)
14. Kimihiko, Y. et al.: J. AOAC. Int. 82(5) 1239-1245(1999)



Scheme 1. Procedure for the preparation of test solution

Table 1. Recoveries of 33 Pesticides from 5 cartridge columns

Group NO.	Pesticide	Recovery(%) [*]				
		PSA	Florisil	Silica	SAX	NH ₂
A	1 Thiabendazole	91.2	78.5	101.5	69.4	31.0**
	2 Carbaryl	93.8	94.6	99.9	95.9	63.0
	3 Imazaryl	87.4	86.5	64.9	71.0	60.0
	4 Iprodione	107.1	92.6	98.7	56.7	54.8
	5 Hexaflumuron	105.6	95.5	100.3	94.5	96.1
	6 Chlorfluazuon	93.4	89.6	100.7	101.7	103.0
	7 Ethofenprox	94.3	94.8	98.8	92.5	92.8
B	8 Imibenconazole Metabolite	107.4	90.9	92.5	103.3	99.0
	9 Furametypyr	94.2	97.1	96.6	99.3	89.3
	10 Benfuresate	91.6	91.2	98.1	97.5	98.1
	11 Pyrazoxyfen	89.1	92.1	95.7	98.8	82.8
	12 Iprodione Metabolite	95.4	97.4	100.6	100.3	19.3
	13 Hexythiazox	82.1	88.1	72.1	89.0	88.3
	14 Silafluofen	91.2	96.9	95.8	94.7	89.9
C	15 Methabenzthiazuron	98.7	96.3	17.6	102.1	98.8
	16 Inabenfide	102.4	86.7	91.7	46.9	82.3
	17 Myclobutanil	104.1	71.0	48.5	0.0	82.1
	18 Ethobenzanid	100.8	102.6	99.1	119.9	101.5
	19 Pencycuron	91.8	93.6	98.9	98.3	90.7
	20 Buprofezin	93.2	88.3	90.7	94.6	97.3
D	21 Dymron	93.0	94.7	94.8	89.8	96.9
	22 Tebufenozide	92.2	96.7	97.7	97.3	93.7
	23 Clofentezine	89.3	102.7	94.4	85.5	90.0
	24 Flufenoxuron	91.7	95.7	102.4	99.4	96.8
E	25 Diflubenzuron	101.7	87.9	100.3	98.8	96.3
	26 Triflumizole	83.8	93.3	90.5	100.6	90.0
	27 Fenpyroximate	99.0	100.3	102.4	100.7	23.9
Others	Pyridate	42.1	90.8	89.4	64.0	7.1
	Tecloftalam	95.6	36.7	0.0	23.4	0.0
	Tecloftalam Metabolite	20.8	94.8	95.5	97.3	10.0
	Trichlamide	90.8	43.7	89.1	94.4	92.8
	Cymoxanil	89.5	31.1	0.0	32.4	38.9
	Diclomezine	91.5	39.8	92.1	91.5	89.4

* Recovery was total amount from following each fraction, 15% ether/*n*-hexane, 15% acetone/*n*-hexane and 50% acetone/*n*-hexane 20mL, respectively.

** The recovery under 50 % was covered meshes.