

## 4) 超臨界流体抽出を用いる玄米及び土壌中イソチアニル分析法の開発

吉田 達雄 山本 理世 飛野 敏明 村川 弘

### 要 旨

超臨界流体抽出を用いることにより、公定法が示されていない新規登録農薬イソチアニルを簡易迅速に分析する方法を開発した。農薬を強く吸着する土壌分析については、モディファイアとして、メタノールを用いることにより、十分な抽出効果が得られた。添加回収試験を行った結果、0.01 mg kg<sup>-1</sup>添加濃度において玄米:97.0%, 土壌:95.2%, 0.05 mg kg<sup>-1</sup>添加濃度において玄米:99.3%, 土壌:95.1%となり良好な値が得られた。本分析法は、農薬の簡易迅速分析法として、農作物の安全安心確保に寄与するものと期待される。

**キーワード：イソチアニル，超臨界流体抽出，GC/MS，玄米，土壌**

#### はじめに

イソチアニル (3,4-dichloro-2'-cyano-1,2-thiazole-5-carboxanilide) は、2010年に新規に国内登録され、水稻に対して使用登録された農薬である。農薬の種類については、病原菌への直接的な抗菌作用を示さず、宿主植物に全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) を与えることで病害の発生を防除する「植物病害抵抗性誘導剤」に分類され、水稻の主要病害であるいもち病、白葉枯病及び広範囲の主要害虫に効果を示す。また、低薬量処理で長期間防除効果を持続し、非標的生物に対する影響も少ないことから、環境負荷の少ない薬剤として期待されている農薬である。現在、日本以外においては韓国に使用登録があり、今後、稲作の盛んな国、地域へ使用登録が拡大していくものと考えられる。

農薬を適正に使用するためには、農薬を散布対象とする農作物や土壌への農薬残留量を測定する必要がある。そのため分析法が求められる。しかし、イソチアニルについては、まだ国内で登録されてから期間が短いため、現在、厚生労働省通知試験法が示されていない。また、分析法に関する報告もほとんど見あたらないため、農作物及び土壌中のイソチアニル残留量を分析する目安となる方法がない。近年、様々な農薬を

迅速に分析する方法の一つとして、超臨界流体抽出法 (Supercritical Fluid Extraction, 以下 SFE という。) が注目されている。SFE は、高い浸透性と有機溶媒に近い溶解性を有する超臨界状態の流体を使用して、抽出を行う方法で、作物中の農薬分析<sup>1,2)</sup>や土壌中のダイオキシン類分析<sup>3)</sup>に適用した研究報告がある。また筆者らの研究室においても、SFE を用いた作物中の農薬<sup>4)</sup>及び土壌中の残留性有機塩素系農薬<sup>5)</sup>分析法の開発を行ってきた。この分析法では、多様な種類の農作物や農薬吸着の強い土壌中の農薬を良好に抽出することができる。

農作物中の残留農薬を分析することは、残留農薬の過剰摂取による健康被害を未然に防ぐことを可能とし、食の安全安心に大きく寄与する。さらに、土壌中の残留農薬を分析することは、農薬の土壌中環境動態を把握することを可能とし、環境動態研究分野への寄与も考えられる。そこで、今回、分析法が確立していないイソチアニルについて、SFE を用いて、玄米及び土壌中のイソチアニル残留量を分析する方法の開発を行った。

## 実験方法

### 1 試料の調製

イソチアニル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) はアセトンを用いて溶解し、標準原液  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  を調製した。これらを適宜、アセトンで希釈して標準溶液とした。

玄米及び土壌試料については、イソチアニルが過去に使用されていないことを確認した試料を用いた。玄米試料は、フードミルで粉碎後、 $425 \mu\text{m}$  の標準ふるいに通した。土壌試料の Texture は Loam, Carbon は 7.4%, Soil pH は 6.2 のものを用いた。土壌試料は、金属製のヘラで砕き、時々攪拌しながら 5 日間静置して風乾した。これをふるいにかけて  $2 \text{ mm}$  以下に調製した。これらに低濃度として  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$ 、高濃度として  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  となるようにイソチアニル標準品溶液をそれぞれ添加し、試験用試料とした。

### 2 SFE

SFE 装置は SFX1220 (Teledyne ISCO, Lincoln, NE) を用い、 $10 \text{ mL}$  容抽出容器を使用した。抽出溶媒は二酸化炭素とし、オーブン温度は  $40^\circ\text{C}$ 、圧力は  $2000 \text{ psi}$  に設定した。また、リストラクター温度は  $60^\circ\text{C}$ 、スタティック及びダイナミック抽出時間はそれぞれ  $15 \text{ min}$ 、ダイナミック流量は  $2 \text{ mL min}^{-1}$  とした。分析操作

について Fig. 1 に示した。試料  $2 \text{ g}$  に、あらかじめフードカッターを用いて細粉した吸湿剤 (CHEM TUBE-HYDROMATRIX, Agilent, Santa Clara, CA)  $2.7 \text{ g}$  を加え混和した後、抽出容器に充填した。さらに、土壌については、試料容器にモディファイアとしてメタノールを  $0.5 \text{ mL}$  加え、上記の条件で超臨界流体抽出を行った。抽出物をアセトン  $20 \text{ mL}$  で捕集した後、エバポレーターで濃縮し、窒素気流下で乾固した。これを玄米については、アセトニトリル飽和ヘキサン  $5 \text{ mL}$  に溶解して抽出液とし、さらに 3 に示した精製操作を行った。一方、土壌については、乾固したものをアセトン  $1 \text{ mL}$  に溶解し、これを測定用試験溶液とした。

### 3 玄米試料精製操作

2 で得られた玄米抽出液にヘキサン飽和アセトニトリル  $10 \text{ mL}$  を加え、 $2 \text{ min}$  振とうした。アセトニトリル層を採取し、ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル  $10 \text{ mL}$  を加え、振とうした後、アセトニトリル層を採取した。この操作を再度繰り返し、アセトニトリル層  $30 \text{ mL}$  を併せて、エバポレーターで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。これにアセトン/ヘキサン (3:1) 混液  $2 \text{ mL}$  を加えて溶解し、抽出液とした。得られた抽出液をアセトン/ヘキサン (3:1) 混液  $15 \text{ mL}$  でコンディショニングを行った SAX/PSA ミニカラム

#### [Brown rice]

##### Homogenized sample 2 g

- mix with pulverized moisture absorbent  $2.7 \text{ g}$
- set in SFE cartridge

##### SFE

- $2000 \text{ psi}$ ,  $40^\circ\text{C}$ , static time  $15 \text{ min}$ , dynamic time  $15 \text{ min}$
- trap acetone  $20 \text{ mL}$
- concentrate
- dry up with  $\text{N}_2$  stream

##### Residue

- *n*-hexane (saturated with acetonitrile)  $5 \text{ mL}$
  - acetonitrile (saturated with *n*-hexane)  $10 \text{ mL}$
  - shake  $2 \text{ min}$
- }  $\times 3$

##### Acetonitrile layer

- concentrate
- dry up with  $\text{N}_2$  stream

##### Residue

- acetone-hexane (3:1,v/v)  $2 \text{ mL}$

##### Minicolumn (SAX/PSA) cleanup

- prewash with acetone-hexane (3:1,v/v)  $15 \text{ mL}$
- elute with acetone-hexane (3:1,v/v)  $18 \text{ mL}$

##### Elute

- concentration
- dry up with  $\text{N}_2$  stream
- acetone  $1 \text{ mL}$

##### GC-MS

#### [Soil]

##### Sieved sample 2 g

- mix with pulverized moisture absorbent  $2.7 \text{ g}$
- set in SFE cartridge
- methanol  $0.5 \text{ mL}$

##### SFE

- $2000 \text{ psi}$ ,  $40^\circ\text{C}$ , static time  $15 \text{ min}$ , dynamic time  $15 \text{ min}$
- trap acetone  $20 \text{ mL}$
- concentrate
- dry up with  $\text{N}_2$  stream

##### Residue

- acetone  $1 \text{ mL}$

##### GC-MS

Fig. 1 Treatments of brown rice and soil samples for GC/MS analysis.

(500 mg / 500 mg / 20 ml, InertSep SAX/PSA, GL Sciences, Tokyo, Japan) に負荷した。このカラムに同混液を 18 ml 加えて溶出し、エバポレーターで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。これにアセトン 1 ml を正確に加えて溶解し、測定用試験溶液とした。なお、検量線は、それぞれ無添加試料抽出液を使用してマトリックス一致標準溶液を用いて作成した。

#### 4 GC/MS 測定

試験溶液はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS, Agilent7890/5975C, Agilent) を用いて定量した。カラムは Agilent 社製 HP-5MS (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ) を用いた。注入口温度は 250°C に設定し、注入方法はパルスドスプリットレス法により行った。オープン温度は 80°C で 2 min 保持し、毎分 30°C で 180°C まで昇温した後、10 min 保持した。さらに毎分 2°C で 200°C まで昇温し、それから毎分 3°C で 280°C まで昇温を行い 10 min 保持した。イオン化法は電子衝撃イオン

化 (EI) 法で、イオン源温度は 230°C, MS 四重極温度は 150°C とした。定量は選択イオンモード (selected ion monitoring, SIM) を用いた。定量  $m/z$  は 297, 定性  $m/z$  は 180 とした。

#### 結果及び考察

##### 1 測定条件

玄米及び土壌中イソチアニルの検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 2~600  $\mu\text{g l}^{-1}$  (試料中濃度 1~300  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) の範囲で良好な直線性 ( $R^2 > 0.999$ ) が得られた。

Brown Rice : Peak abundance

$$= 959 \text{ isotianil } (\mu\text{g L}^{-1}) - 4571, R^2 = 0.999 \quad (1)$$

Soil : Peak abundance

$$= 1126 \text{ isotianil } (\mu\text{g L}^{-1}) - 5885, R^2 = 0.999 \quad (2)$$

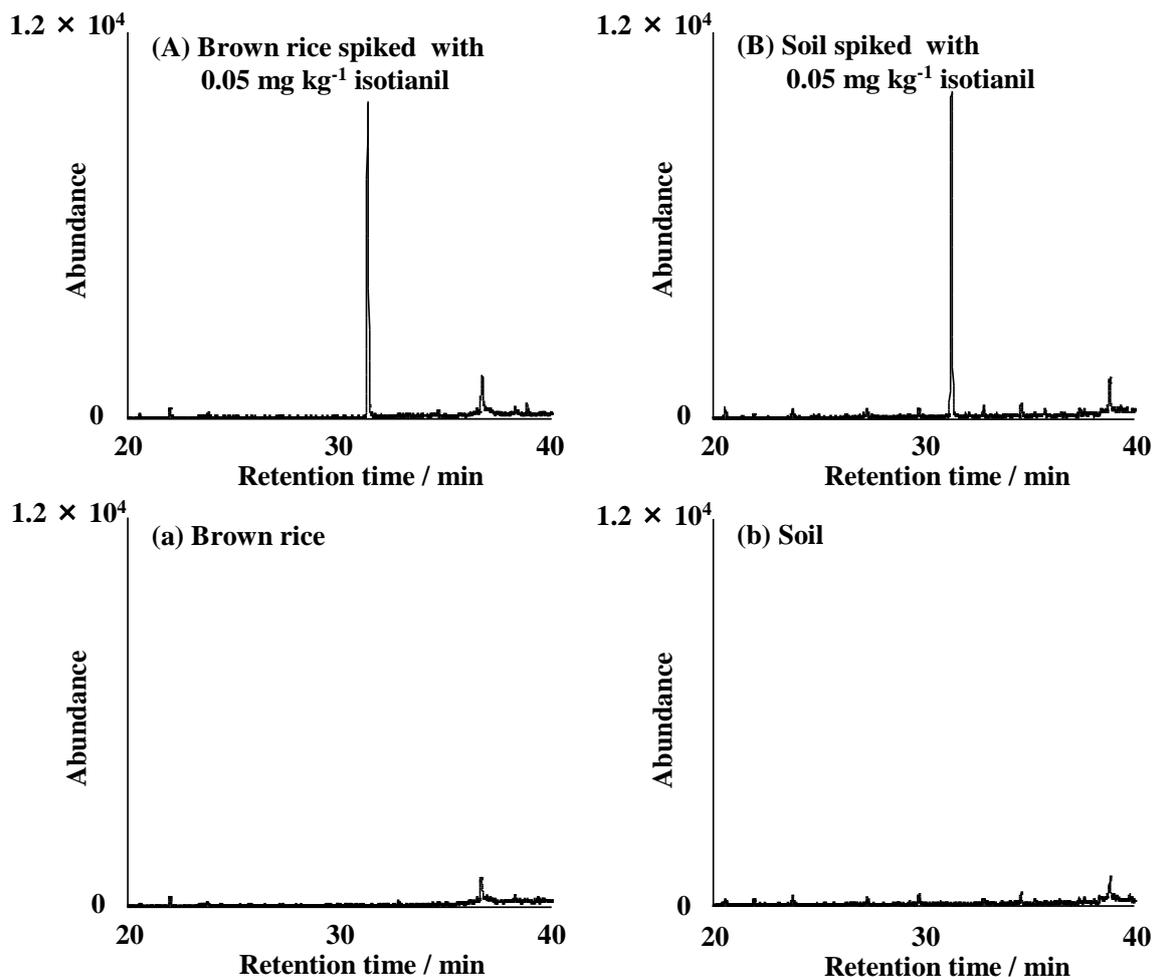


Fig. 2 Chromatograms (SIM,  $m/z$  297) obtained for extracts from brown rice with (A) and without (a) spiking of  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  of isotianil, and from soil with (B) and without (b)  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  of isotianil.

本条件の測定により得られたクロマトグラム例を Fig. 2 に示した。玄米においても、多量に含有される脂質の除去が十分に行われ、良好なクロマトグラムが得られた。Signal to noise ratio ( $S/N$ )から求めた検出限界 (LOD,  $S/N=3$ ) は、玄米で  $0.39 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、土壌では  $0.91 \mu\text{g kg}^{-1}$  となり、定量限界 (LOQ,  $S/N=10$ ) は、玄米で  $1.30 \mu\text{g kg}^{-1}$ 、土壌では  $3.03 \mu\text{g kg}^{-1}$  となった。この定量限界では、食品衛生法残留農薬基準におけるイソチアニルの玄米に対する残留基準 ( $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) の 100 分の 1 程度の濃度が測定可能である。よって、この定量限界は玄米及び土壌中イソチアニルの測定に十分な濃度であると考えられる。

## 2 抽出圧力検討

超臨界流体 (Supercritical Fluid) は、気体や液体を加熱加圧し、気液の界面を消滅させることにより作成される。この流体を用いて、試料中の目的物を抽出する方法が SFE である。SFE では、一定温度で圧力を高くすると流体の密度が増加し、溶解度が大きくなる。そのため、抽出圧力の変化は、抽出効率へ影響を及ぼすが、抽出圧力の過剰な増加は、SFE 抽出効率を低下させる報告<sup>6)</sup>もある。そこで、最初に玄米及び土壌中のイソチアニルに対して、最も良好な抽出効率が得られる抽出圧力について、検討を行った。超臨界二酸化炭素の臨界圧力は 1070 psi である。そこで、超臨界状態を形成させるため、設定する抽出圧力は 1070 psi 以上とし、検討圧力は、1500, 2000, 2500 及び 3000 psi とした。

それぞれの抽出圧力において抽出を行った標準品添加回収結果を Fig. 3 (玄米試料, 土壌試料) に示した。玄米及び土壌試料のどちらについても、回収結果は同様の傾向を示した。1500 psi での抽出では、回収率が低く、2000 psi に圧力を上げると回収結果が最も大きくなり、さらに 2500 psi, 3000 psi へと抽出圧力を上げていくにつれて、なだらかな回収率減少が見られた。抽出圧力の増加は、抽出効率を増加させるが、過剰の増加は超臨界流体の拡散係数 (diffusion coefficient) の低下を引き起こし、抽出効率が低下する<sup>6)</sup>。今回、イソチアニルに対する超臨界流体抽出については、2000 psi の抽出条件下において、最も良好な抽出効率が得られることが示された。玄米試料においては、2000 psi の抽出圧力において、回収率が 98.0% と良好な値が得られたため、この圧力を玄米試料分析の抽出圧力とした。一方、土壌試料においては、回収率が最も良好であった 2000 psi の抽出圧力においても、回収率は

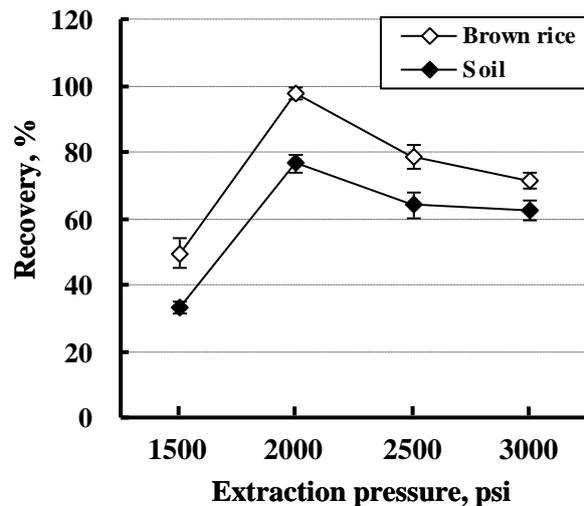


Fig. 3 Effect of SFE pressure for brown rice and soil samples spiked with isotianil.

76.7% であり、十分な回収率は得られなかった。これは、土壌中に含まれる有機炭素成分にイソチアニルが強く吸着しているため、玄米試料と異なり、二酸化炭素のみの超臨界流体抽出では、十分な抽出効果が得られなかったためと考えられる。そこで、超臨界流体の抽出効率を上げることを目的として、モディファイア添加の検討を行った。

## 3 土壌抽出におけるモディファイアの検討

土壌分析においては、農薬成分に対して十分に抽出効率が得られない場合があることが報告されおり<sup>5)</sup>、これは、土壌中に含まれる有機炭素成分に農薬成分が強く吸着するためと考えられている。SFE において、抽出効率を上げる方法として、有機溶媒をモディファイアとして試料に添加する方法がある<sup>7-9)</sup>。無極性である二酸化炭素に極性を有するモディファイアを添加することにより、超臨界流体状態の二酸化炭素が、極性を有することになり、抽出効率が上がることが知られている。今回、土壌試料抽出では、回収率が最も良好であった抽出圧力 2000 psi においても、十分な回収率が得られなかったため、抽出効率を上げることを目的として、モディファイア添加の検討を行った。検討を行ったモディファイアの種類としては、超臨界流体の極性を変化させ、SFE の抽出効率を上げる極性溶媒として酢酸エチル、アセトン及びメタノールを選択した。モディファイアの添加方法については直接試料へ添加する方法とし、土壌試料を抽出容器へ充填した後、モディファイアを抽出容器中へ直接添加した。モディ

**Table 1** Effect of modifiers on extractions from the isotianil spiked soil

	Log Pow <sup>a</sup>	isotianil concentration/ mg kg <sup>-1</sup>	Recovery Average and RSD/% (n = 3)	
Without	—	0.05	76.7	3.5
Ethyl acetate	0.73	0.05	66.7	5.1
Acetone	-0.24	0.05	89.1	6.0
Methanol	-0.82	0.05	98.1	3.9

a. Octanol – water partition coefficient

**Table 2** Recoveries of isotianil from brown rice and soil

Compound	Sample	Concentration/ mg kg <sup>-1</sup>	Recovery		LOD / $\mu\text{g kg}^{-1}$ (S/N=3)	LOQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$ (S/N=10)
			Average and RSD/ % (n = 6)			
isotianil	Brown rice	0.01	97.0	2.8	0.39	1.30
		0.05	99.3	2.8		
	Soil	0.01	95.2	1.8	0.91	3.03
		0.05	95.1	2.6		

ファイア効果は、有機溶媒含有が 5%の時に良好になるという報告<sup>7)</sup>があるため、有機溶媒の添加量については、容器 (10 ml 容量) に対して 0.5 ml とした。モディファイアの種類による回収率の変化について、Table 1 に示した。モディファイアとして添加した溶媒の極性に比例して、土壌中のイソチアニル抽出効率の上昇が見られた (酢酸エチル: logPow 0.73, アセトン: logPow -0.24, メタノール: logPow -0.82)。Koineck らは、土壌中農薬成分 5 種に対して、異なる有機溶媒のモディファイア効果を比較した結果、メタノールが最も良好な抽出効率を示したことを報告<sup>7)</sup>しており、今回、イソチアニルについても同様の結果が得られた。無添加と比較して、酢酸エチルは添加による抽出効率上昇効果がなく、アセトンは 10% 程度、メタノールは 20% 程度の上昇効果が見られた。その結果、メタノールの添加は、抽出効率が 98.1% となり 100% に近い値となった。そこで、土壌中イソチアニル分析においては、最も良好な抽出効率を示したメタノールをモディファイアとして用いることとした。

#### 4 玄米及び土壌添加回収試験結果

MS 分析においては、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の過程でイオンサプレッションやイオンエンハンスメントなどマトリックス効果を引き起こし、定量値に影響を与えることがある<sup>10~12)</sup>。SFE による GC/MS 測定においても、玄米及び土壌試料について、約 10% のイオンエンハンスメントが見られた。そこで、試料の定量については、玄米、土壌そ

れぞれの無添加試料から調製したマトリックスマッチ標準溶液を用いて行った。玄米及び土壌について行った標準品添加回収試験結果を Table 2 に示した。添加濃度は低濃度として 0.01 mg kg<sup>-1</sup> 及び高濃度として 0.05 mg kg<sup>-1</sup> の 2 濃度により、試行回数 6 回で実施した。0.01 mg kg<sup>-1</sup> 添加における回収率は玄米: 97.0% (相対標準偏差 2.8%)、土壌: 95.2% (相対標準偏差 1.8%) となった。0.05 mg kg<sup>-1</sup> 添加における回収率は玄米: 99.3% (相対標準偏差 2.8%)、土壌: 95.1% (相対標準偏差 2.6%) となった。低濃度 (0.01 mg kg<sup>-1</sup>) から高濃度 (0.05 mg kg<sup>-1</sup>) まで添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての試料について良好な回収率が得られた。6 日間の Inter-day RSD は、玄米で 5.4%、土壌で 5.6% となり、玄米及び土壌の分析において、日間変動は小さいものであった。

#### 5 土壌中の水分含有量が SFE 抽出効率に与える影響

また、土壌中の農薬などの有機化合物分析では、土壌中の水分の影響により、SFE 抽出効率に変化し、土壌中からの回収率が変化してしまう事例が報告されている<sup>13)</sup>。土壌中の水がモディファイアとして働くと同時に、超臨界流体の抽出効果を不活化化する働きも示すため<sup>13)</sup>、過剰な水分含有は抽出効率の低下を引き起こす。そこで、今回開発した分析法についても、対象とする土壌の水分含有量が異なる時に、十分な抽出効率を得られるかを調べた。風乾土壌に蒸留水を添加し、水分含有量の異なる土壌を作成した。この土壌に対して添加回収試験を行い、回収率を求めた結果を Fig. 4

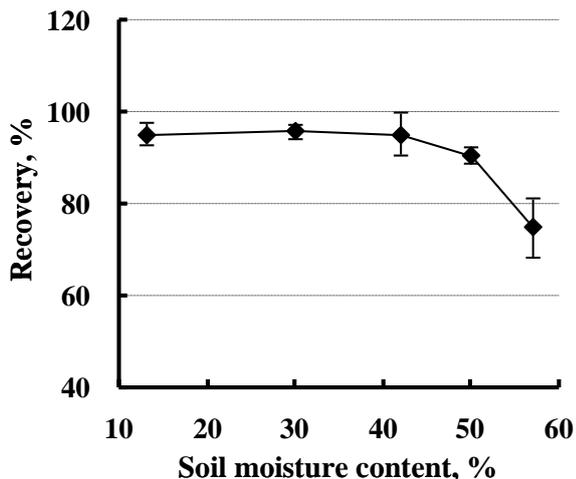


Fig. 4 Effect of soil moisture on SFE for isotianil-spiked soil

に示した。水分含有量 13%の土壌は、風乾した状態の土壌である。水分含有量 13~50%の状態では、土壌中に残留したイソチアニルに対して、回収率が 90%以上となり、十分な抽出効率が得られている。一方、50%を越えた水分含有量においては、抽出効率の低下が見られたが、この土壌の飽和水分含有量は 50%程度であり、自然環境中に存在する土壌では、50%を越えることはないと考えられる。本分析法では、試料を超臨界流体抽出容器中に充填する際に吸湿剤を合わせて充填するので、抽出容器中の水分割合が低下し、試料に含まれる水分が抽出効率に与える影響を低下させていると考えられる。以上のことから、本分析法は、土壌が自然環境中で水分を含有するどのような状態においても、適用可能であると考えられる。

#### まとめ

新規に国内登録された農薬イソチアニルについて、SFE を用いた土壌及び玄米中当該農薬の分析法を確立した。玄米については、二酸化炭素のみの SFE により十分な抽出が得られたが、土壌分析では十分な抽出効率が得られなかった。そこで、モディファイア添加の検討を行った結果、試料 2 g に対して直接メタノール 0.5 ml を添加することにより、十分な抽出効果が得られた。確立した分析法により添加回収試験を行った結果、良好な値が得られた。さらに、この分析法は土壌中の水分含有量には影響されず、風乾状態から水飽和状態の範囲の土壌においても十分な回収率が得られた。今回、検討に用いた土壌は、有機炭素含有量が 7.4% と高く、農薬成分を強く吸着する土壌である。この土

壤において、SFE により良好な抽出結果が得られたことから、他の土壌種においても、本分析法は十分に適用可能であると考えられる。また、SFE は抽出時間が 30 min であり迅速分析が可能であり、また、抽出に二酸化炭素を用いるため、有機溶媒の使用が少なく、環境への負荷も少ない。さらに、有機溶媒を用いた振とう抽出やソックスレー抽出などと比較して、操作も簡便である。今後、イソチアニル同様、公定法が通知される前に、農業現場で使用される農薬や、土壌吸着の大きな農薬が新規開発されることが想定される。今回、開発した分析法は、これら新規農薬に対しても、抽出条件を最適化することにより簡易迅速分析法として適用される可能性を有しており、農作物の安全安心確保や新規農薬開発に対して大きく寄与するものと期待される。

#### 文献

- 1) M. Saka, K. Iijima, Y. Odanaka, Y. Kato : *J.Pestic.Sci.*, **23**, 414-418(1998).
- 2) 根本了 : 農薬学会誌, **32**, 328-333(2007).
- 3) 宮脇崇, 川嶋文人, 本田克久 : 分析化学, **52**, 989-995(2003).
- 4) 村川弘, 吉田達雄, 吉元秀和, 飛野敏明 : 熊本県保健環境科学研究所報, **37**, 29-35(2007).
- 5) 吉田達雄, 村川弘, 福島孝平, 吉元秀和, 飛野敏明 : 分析化学, **58**, 931-935(2009).
- 6) V. Librando, O. Hutzinger, G. Tringali, M. Aresta : *Chemosphere*, **54**, 1189-1197(2004).
- 7) A. Koinecke, R. Kreuzig, M. Bahadir : *J. Chromatog. A*, **786**, 155-161(1997).
- 8) M.L. Jeong, D.J. Chesney : *J. Supercrit. Fluids*, **16**, 33-42(1999).
- 9) J.R. Forero-Mendieta, H.I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso, J.A. Guerrero-Dallors : *J. Supercrit. Fluids*, **68**, 64-70(2012).
- 10) 小林裕子 : 分析化学, **58**, 985-997(2009).
- 11) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto, T. Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).
- 12) T. Yoshida, H. Murakawa, K. Toda : *J.Pestic.Sci.*, **38**, 27-32(2013).
- 13) L. Spack, C. Alvarez, J.M.F. Martins, J. Tarradellas : *J. Contam. Hydrol.*, **33**, 171-185(1998).