

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05485

研究課題名(和文)高温高压水の活用による食品残留分析のグリーン化と迅速化

研究課題名(英文)Greening and speeding up food residue analysis using superheated water

研究代表者

鎗田 孝(Yarita, Takashi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：20358295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食品残留分析には有機溶媒が不可欠であるため、環境や分析者にリスクがあり、煩雑な操作が必要である。そこで、加圧下でおおよそ100℃以上に加熱した水を利用した超高温水抽出法(SWE)を開発し、残留農薬分析のグリーン化と迅速化を検討した。SWEの抽出効率は抽出温度が高くなるほど向上し、さらに、ダイナミックモード抽出によって農薬の分解を抑制することが可能であった。また、本法によって、1時間以内での前処理が可能になった。本法は、特に比較的高極性農薬のスクリーニングに有効である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は水だけを抽出媒体に利用したグリーンな新規抽出法を開発したものであり、食品分析化学分野において、分離法の新たな選択肢を提供したという学術的意義を有する。さらに、本法は多様な中～高極性有機化合物の抽出などにも適用可能であり、波及効果も大きい。

社会的には、本法が実用化されれば、残留農薬分析をはじめとした食品残留分析がグリーン化され、かつ低コスト化される。食品分析は多数の機関によって実施されており、その効果は大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：Organic solvents are essential in food residue analysis. However, it poses a risk to the environment and the health of the analysts, and requires complicated operations. In this study, superheated water extraction (SWE) has been developed by using pressurized hot water as the extraction medium, and applied to pesticide residue analysis. The extraction efficiency of SWE increased with increase in the extraction temperature. The dynamic extraction mode was useful to suppress degradation of the pesticides during extraction step. Furthermore, the developed SWE protocol shortened pretreatment process less than 1 h. The proposed method is particularly useful for screening of relatively high-polarity pesticides in food samples.

研究分野：食品科学、分析化学

キーワード：食品分析 残留農薬分析 超高温水 抽出

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国では多くの分析機関により農薬や自然毒等の食品残留分析がルーチン的に行われている。しかし、これらの残留分析には多量の有機溶媒が不可欠であるため、環境や分析者の健康にリスクを与える有機溶媒を取り扱える施設が必要複雑なクリーンアップ(抽出後に妨害成分を除去する操作)が必要ランニングコストが高い

等の問題点が指摘されてきた。このうち と は食品残留分析に長時間を要する原因であり、分析によって基準値を超えた食品が発見されても既に消費されてしまった事例が絶えないという、現在の食品残留分析が抱える社会的問題点の一因にもなっている。

このような理由から、多くの研究機関によって食品残留分析のグリーン化が検討されてきた。なかでも試料マトリックスから分析対象成分を分離する“抽出”は、使用する有機溶媒量が多く、かつ、操作に長時間を要することから、これらの解決を目指した様々な新規抽出法が提案されてきた。その中の一つである加圧流体抽出法は、使用する有機溶媒量を公定法の 1/20 程度に削減できる方法である。しかし、公定法と同じクリーンアップが必要であるため、必ずしも迅速な分析方法とはいえない。一方、二酸化炭素を使用した超臨界流体抽出法(SFE)は、原理的に有機溶媒を必要としないグリーンな抽出方法である。しかも、クリーンアップを省略して抽出物を機器分析に供することが可能であるため迅速でもある。ただし、超臨界二酸化炭素の極性が低いために比較的低極性残留物質の分析にしか適用できないという欠点がある。一方、有機溶媒の代替に常温常圧の水を用いた残留農薬の抽出法(水抽出法)が Watanabe らによって報告された。しかし、水は極めて高極性であるため、この方法によって抽出できる農薬はネオニコチノイド系等の高極性農薬に限られた。そのため、これらの抽出方法の欠点をカバーし、これらと相補的に使用することができるグリーンで迅速な食品残留物質抽出法の開発が求められていた。

研究代表者はこれまで、高温高压水を利用した高速液体クロマトグラフィー(超高温水クロマトグラフィー)の開発研究を続けてきた。この方法は、水を加圧下でおおよそ 100 以上に加熱するとメタノール等の有機溶媒と同程度までに有機化合物の溶解力が増加するという、水の性質に着目したものである。そして、この研究に取り組むなかで、このような高温高压水(以下超高温水という)を適用することにより、水抽出法では抽出できなかったより低極性の農薬の抽出が可能になり、さらに食品残留分析のグリーン化と迅速化が可能になると着想し、本研究を実施するに至った。

### 2. 研究の目的

前述の研究背景のもと、超高温水を抽出溶媒に利用した超高温水抽出法(Superheated Water Extraction, SWE)を開発し、食品残留物質の抽出法として適用することを本研究の目的とした。その際、分析対象とするモデル化合物には、食品残留物質のうち分析件数が最も多く、かつ、熱安定性も含めて多様な化学特性を持つ農薬を選んだ。さらに、SWE だけでなく、SWE によって得られる抽出物のクリーンアップを迅速化することも目的とした。

以上によって、食品残留分析をグリーン化するだけでなく、前処理操作に要する総時間を短縮することを本研究の目標とした。

### 3. 研究の方法

はじめに、本研究を実施するうえで必須の検討事項を挙げる。まず、解決すべき主要な検討課題として、SWE において超高温水の溶解力と分解力を如何に制御するか、が挙げられる。なぜなら、水は高温になるほど有機化合物に対する溶解力が増加する一方、イオン積が増加し、分解力が増すと考えられるためである。そのため、多様な化学特性を有する農薬をモデル化合物に用いて、超高温水の温度などが抽出効率に与える影響をあきらかにする必要があると思われた。そのうえで、熱に不安定な農薬と、高温でなければ抽出できない農薬を同時に抽出する方法を開発する必要があると考えられたためでもある。また、有機溶媒を使用する従来抽出法と本法では、使用する抽出溶媒の特性が大きく異なるために、従来法のクリーンアップが SWE でも最適か、も重要な検討課題と考えられた。SWE に適したクリーンアップ法を確立し適用することができれば、従来抽出法よりも前処理操作を簡略化し、迅速化できると考えられたためである。さらに、新規分析法を開発するうえでは、開発した分析法の正確さの確認、も不可避な検討事項であった。

以上の要検討事項に対処するために、次の研究計画に従って本研究を実施することにした。

- [1] SWE の温度依存性の解明  
一定温度での SWE によるモデル農薬の回収率を実験的に解明する。
- [2] 多段階加熱抽出法の適用  
抽出中に昇温プログラムを行うことにより、モデル農薬の回収率を向上させる。
- [3] クリーンアップの最適化

固相分散吸着剤を利用した簡易で迅速なクリーンアップ法を開発する。

[4] 分析法の妥当性確認

特に、新規分析法の“正確さ”を検証する。

4. 研究成果

(1) SWE 試作装置の試作

SWE には、抽出溶媒を静置させて抽出を行う“スタティックモード”と、抽出溶媒を通水させながら抽出を行う“ダイナミックモード”があり、本研究ではその両方を検討した。スタティック SWE にはダイオネクス社製高速溶媒抽出装置 ASE200(抽出管容量: 11 mL)を流用した。一方、ダイナミックモード用の市販装置はなかったため、既存の HPLC 装置や GC 装置を流用してダイナミックモード用 SWE 装置を試作した(図 1)。装置は、デガッサー(ジーエルサイエンス製 DG660B)、HPLC 用ポンプ(日本分光製 PU-2080)、切換えバルブ(レオダイン製 7000)、GC オープン(ジーエルサイエンス製 GC353)及び超臨界流体クロマトグラフ用背圧弁(日本分光製 880-81)より構成させた。野菜試料を封入した抽出管(HPLC 用空カラム: 6.0 mm i.d. x 100 mm)をオープン内の流路に接続し、切換えバルブを操作することで水を導入した。背圧弁の後にガラス瓶を置き、得られた抽出液を回収した。抽出管中に既知量の濃度を添加したろ紙を封入し、本試作装置によって抽出したところ、回収率は良好であることが確認された。



図 1 試作した SWE 装置。

(2) SWE の適用可能性の検討

スタティックモードの SWE において分析対象農薬の添加回収試験を行い、分析対象農薬のオクタノール/水分配係数( $\log P_{ow}$ )と回収率との関係を検討した。SWE は抽出温度: 100、抽出時間・回数: 5 分 x 1 回で行い、試料マトリックスにはキャベツを用いた。また、得られた抽出物のクリーンアップは一斉試験法に準じて行った。得られた回収率を図 2 に示す。なお、抽出過程のみにおける回収率を正確に評価するために、一斉試験法による添加回収試験を別途行い、その結果に対する SWE における添加回収試験の結果を相対値として示した。すなわち、クリーンアップ過程における回収率が補正された SWE の回収率といえる。

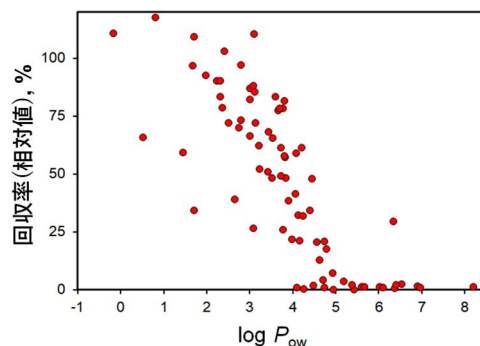


図 2 農薬の  $\log P_{ow}$  と回収率との関係。スタティックモード, 抽出温度: 100。

得られた結果から、本法は  $\log P_{ow}$  がおおむね 5 以下の比較的極性が高い農薬の抽出に有用であることが示唆された。このような農薬には、一般的に使用事例が多いリン系農薬やカーバメート系農薬等が含まれる。一方で、ピレスロイド系農薬のような比較的極性が低い農薬の回収率はおおむね 10%以下であり、本法による抽出は困難であると考えられた。しかし、これらの農薬は SFE の適用が可能であるため、本法と SFE を相補的に使用することによって解決が可能である。

(3) 抽出温度、抽出回数、抽出モードの影響

SWE による農薬の抽出効率を向上させるため、スタティックモード SWE における抽出温度(50、100、150)と回収率の関係を検討した。抽出時間・回数: 5 分 x 1 回においてキャベツマトリックスを用いた添加回収試験の結果を図 3 に示す。ほとんどの農薬は抽出温度が高いほど回収率は上昇し、分析対象とした 80 種類の農薬のうち、回収率が 80%以上だった農薬の数が最も多くなった。一方、回収率が 40%以下であった農薬の数も最も多く、150 において一部の農薬の回収率が低下することが示唆された。農薬ごとの回収率の変化の具体例として、代表的な有機リン系農薬の回収率の温度依存性を図 4 に示す。抽出温度を 100 から 150 に上昇させると、回収率が低下する農薬が多くみられた。そこで、超高温水クロマトグラフ装置を改造して超高温水による農薬の分解性評価装置

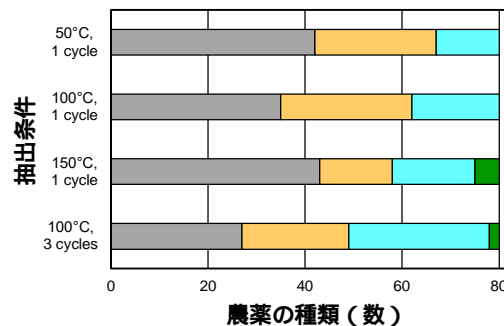


図 3 スタティックモード SWE による抽出温度、回数と回収率との関係。

を試作し、マトリックスがない状態での農薬の分解性を評価したところ、一部の農薬が超高温水中で分解されていることを確認した。

一方、抽出温度以外に抽出効率を向上させる他の方法として、抽出回数を増やすことも試みた。抽出温度:100において、5分間の静置抽出を3回繰り返した際の回収率を図3に示す。抽出回数を増加させることにより、抽出回数が1回では回収率が40~70%程度だった農薬の回収率が特に向上した。これより、抽出管内の水を置換することが回収率の改善に有効であると考えられた。

そこで、抽出管内の水を連続的に交換することが可能なダイナミックモードSWEを検討した。抽出時間:15分、超高温水流速:1 mL/分における抽出温度(50、100、150、200)と回収率の関係を図5に示す。スタティックモードSWEと比較して、回収率が80%以上の農薬の種類が増え、また、150におけるSWEにおいても、農薬の分解が抑制された。これより、ダイナミックモードの適用により、SWEが適用可能な農薬種がより多くなることが示された。

#### (4) 多段階加熱抽出法

一定温度条件での抽出では、高温になるほど低極性農薬の回収率は向上した一方で、一部の農薬が分解することが示された。そこで、温度を徐々に上昇させながら抽出を行うことが有効ではないかと考えた。昇温速度、抽出時間、超高温水流速を変えた5つのプログラム条件において添加回収試験を行った。その結果、いずれの条件においても農薬の分解を制御しながら比較的極性の低い農薬の回収率を向上させることができた。最もよい回収率が得られた条件(昇温速度と時間:50(5分)+10(分)200(10分)、超高温水流量:0.5 mL/分)における添加回収試験は、40%未満:19種、40%以上80%未満:19種、80%以上120%未満:37種、120%以上:3種であった。

#### (5) クリーンアップの最適化

SWE抽出物のクリーンアップを簡便化するために、QuEChERS法の適用を検討した。試料としてネギを用い、PSAを50 mgあるいは200 mg、GCBを50 mgあるいは200 mgにした4条件で行った。その結果、妥当的に回収された農薬数が最も多かったのはPSA50 mg、GCB50 mgの条件であった。以上によって開発した操作手順によって、クリーンアップに要する時間を30分以内にする事が可能になった。

#### (6) 実試料の分析

開発した抽出法によって実試料を分析した。試料にはフェニトロチオンが残留したキャベツを用いた。スタティックモードSWEと、公定法である一斉試験法による定量結果はそれぞれ $0.11 \pm 0.04$  mg/kg、 $0.12 \pm 0.01$  mg/kg(平均±標準偏差、 $n=4$ )であり、両法の分析値に有意差はなかった。

#### (7) 総括

加圧しておおよそ100以上に加熱した水(超高温水)を抽出溶媒に用いたSWEを開発し、食品残留農薬分析に適用した。本法の適用可能な農薬数は抽出温度が高くなるほど増加した。一方、農薬の分解を速成するためには、ダイナミックモードが有効であった。また、SWE抽出物のクリーンアップ法も開発し、従来法よりも短時間でのクリーンアップも可能にし、前処理に要する総時間を1時間以内にする事に成功した。さらに、フェニトロチオンを対象として、実分析試料への適用が可能であることも示した。

以上のように、本研究においてグリーンで迅速な残留農薬分析法としてSWEが有用であることが示された。今後、比較的高極性農薬のスクリーニングなど実試料分析への応用が期待される。

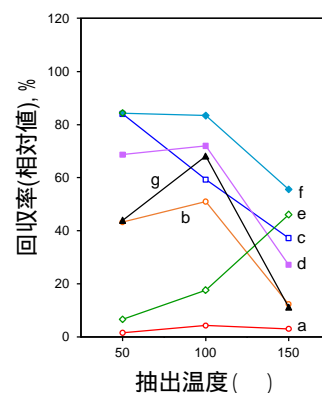


図4 代表的な有機リン系農薬の回収率の抽出温度依存性。

a, chlorpyrifos; b, diazinon; c, dichlorvos; d, (Z)-dimethylvinphos; e, EPN; f, ethoprophos; g, fenitrothion.

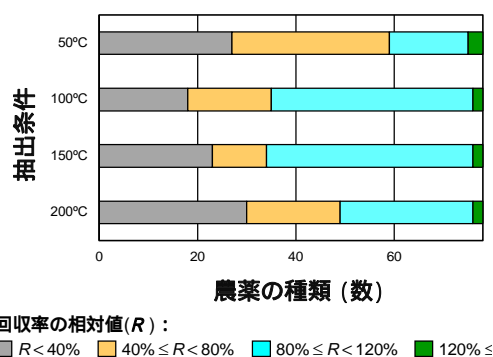


図5 ダイナミックSWEによる抽出温度と回収率の関係。

回収率の相対値(R):

■  $R < 40\%$  ■  $40\% \leq R < 80\%$  ■  $80\% \leq R < 120\%$  ■  $120\% \leq R$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yarita Takashi, Inagaki Shinsuke, Miyamoto Ayano, Yamazaki Taichi, Kawaguchi Migaku, Uchida Hajime, Takatsu Akiko, Suzuki Toshiyuki	4. 巻 298
2. 論文標題 Characterization of scallop midgut gland certified reference material for quantification of diarrhetic shellfish toxins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 125011 ~ 125011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.125011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yarita Takashi, Hasegawa Atsuhiko, Tada Hiroko	4. 巻 37
2. 論文標題 Applicability of Superheated Water Extraction for the Quantification of Pesticide Residues in Leafy Vegetables	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21N003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川敦彦、鎗田 孝
2. 発表標題 残留農薬分析におけるグリーン抽出溶媒としての超高温水の適用可能性
3. 学会等名 第24回 LC & LC/MS テクノプラザ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎗田孝、長谷川敦彦、多田寛子
2. 発表標題 食品農薬分析の抽出溶媒としての超高温水の基礎的検討
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田寛子、鎗田孝、長谷川敦彦
2. 発表標題 残留農薬分析の抽出溶媒としての超高温水の適用可能性
3. 学会等名 第16回茨城地区分析技術交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝
2. 発表標題 安定同位体標識内部標準を用いた残留農薬分析におけるマトリックス効果の影響
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹貴光、鎗田孝
2. 発表標題 国際基準に対応した認証標準物質の開発と技能試験の実施
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎗田孝、長谷川敦彦、多田寛子
2. 発表標題 超高温水を溶媒とした残留農薬の抽出における抽出モードの比較
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大竹 貴光  (Otake Takamitsu)  (60443173)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員   (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------