超臨界抽出法を用いた魚介類中の有機塩素系農薬の分析

宇野 誠一^{1)*}, 小山 次朗²⁾, 田中 博之¹⁾, 山田 久¹⁾, 白石 寛明³⁾

¹⁾瀬戸内海区水産研究所 (〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5)

²⁾鹿児島大学水産学部海洋資源環境研究センター (〒890-0056 鹿児島県鹿児島市下荒田4-50-20)

³⁾国立環境研究所 (〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2)

*三菱化学安全科学研究所鹿児島研究所 (〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14番地)

[平成15年1月27日受理]

Analysis of Organochlorine Pesticides in Fish and Shellfish using Supercritical Fluid Extraction

Seiichi UNO^{1)*}, Jiro KOYAMA²⁾, Hiroyuki TANAKA¹⁾, Hisashi YAMADA¹⁾ and Hiroaki SHIRAISHI³⁾

¹⁾National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea
(2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452)

²⁾Faculty of Fisheries, Kagoshima University
(4-50-20 Shimoarata, Kagoshima 890-0056)

³⁾National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053)

*Mitsubishi Chemical Safety Institute
(14 Sunayama, Hasaki, Kashima, Ibaraki 314-0255)

[Received January 27, 2003]

Summary

Supercritical fluid extraction (SFE) was optimized for the application to the extraction of several organochlorine pesticides in aquatic biological samples. SFE required 2 ml/min for supercritical fluid carbon dioxide flow rate, 0.70 g/ml for density (50 °C for temperature and 151 bar for pressure), and 7 % methanol for modifier. The extraction was completed for 40 min. After SFE, it was possible to be analyzed with GC/MS after clean-up with Florisil, packed in Pasteur pipette. From the comparison with ultrasonic extraction and SFE to mussels which were exposed to organochlorine pesticides, SFE seems to be applicable for the analysis of these pesticides in aquatic biological samples.

Key words: supercritical fluid extraction, organochlorine pesticide, aquatic biological sample, GC/MS

1. はじめに

我が国では DDT, HCH 類等の有機塩素系農薬はその使用が禁止されて30年近く経過するが、これらは半減期

が長く、脂溶性が高いために現在も水生生物から検出され続けている。またこれらの農薬の使用規制後、低毒性で速やかに分解する農薬が次々と開発されたが、これらの農薬にも生物蓄積性の高いものが存在する¹⁾。

従来、生物中に蓄積された化学物質を測定するための前処理法として、多量の有機溶媒を使用するソックスレー抽出法や超音波抽出法などが用いられてきた。これらの抽出法は煩雑なクリーンアップ等を必要とし、機器分析までにかなりの時間を要した。また使用する有機溶媒には人体に有害なものも多く、多量の廃液が生じることも問題点として上げられてきた²⁾。

超臨界抽出法 (Supercritical Fluid Extraction, 以下、SFE と省略) は最近10年で飛躍的に使用例が増加した^{3,4)}。SFE の抽出溶媒としては超臨界状態が得やすい、無毒、安価、化学的に不活性であるという利点から一般的に二酸化炭素が用いられる。これまで数多くの化学物質、媒体に対して SFE は試みられているものの、いまだに確固たる抽出条件は確立されていないのが現状である。また対象とされる試料も泥や堆積物、吸着剤などが多い^{5,6)}。生物試料を対象とした例は魚筋肉⁵⁻⁷⁾、貝類^{8,9)}、カニ^{5,10,11)}、鶏肉⁷⁾、牛肉¹²⁾、鳥の腸管膜¹²⁾、人間の脂質、血清や乳^{10,13)} 等があるが、その適用例は他の試料と比べるとかなり少ない。これは生物試料を用いて抽出した後に、脂質等夾雑物を除くための煩雑なクリーンアップが必要となってくるためと考えられる。また対象物質も PCB が大半を占め、様々な構造を持つ複数の農薬等を対象とした例は少ない。

本研究では DDT とその代謝物 (*p,p'*-DDT, DDE, DDD), HCH 類 (α , β , γ , δ の各異性体) に加え、現在も水田除草剤として使用されているが生物蓄積性が高い数種の含塩素農薬 (チオベンカーブ、ブタクロール、オキサジアゾン、CNP (現在は使用禁止)) を対象として、魚介類中に蓄積されたこれらの農薬を抽出する際の SFE の最適条件を検討した。一般に抽出効率を調べる際には添加回収実験が行われることが多いが、実環境試料を用いた際にはその結果が反映しないことも多い。そこで添加試料を用いた検討と併せて、実際に農薬を実験室内で暴露したムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) を試料として、SFE と超音波抽出法の結果を比較し、SFE の実用性も検討した。

2. 実験方法

(1) 試料

SFE の最適条件を検討するためにマダイ可食部に対象物質を添加したものを用いた。可食部をフードカッターでホモジナイズし、各対象物質の添加濃度が $1 \mu\text{g/g}$ となるように添加して、密封して冷蔵庫内で一晩放置した。

また SFE と超音波抽出法の抽出効率の比較のために用いたムラサキイガイは中央水産研究所横須賀庁舎内の水路で採集し、実験室内で対象物質を経過濃縮させたものを用いた。ムラサキイガイを2つの60ℓ水槽にそれぞ

れ50個体ずつ収容し、砂及び活性炭で濾過した海水で5日間馴致させた後、止水式水槽内で48時間の暴露を行った。暴露は、対象物質を溶解したアセトン溶液を飼育海水に添加してガラス水槽内で行った。各農薬の水中濃度は高濃度区で $5 \mu\text{g/l}$ 、低濃度暴露区は 100ng/l に設定した。暴露終了後、直ちに軟体部をホモジナイズした。

添加試料のマダイ筋肉部、暴露試料のムラサキイガイ軟体部はホモジナイズした後、それぞれ48時間凍結乾燥を行い、粉碎したものを抽出のための試料とした。

(2) 分析法

本研究で用いた抽出装置 (HP7680, Hewlett Packard) は、超臨界二酸化炭素により抽出された抽出物を固相吸着トラップに保持させ、抽出終了後、吸着トラップに有機溶媒を流すことにより抽出物をバイアル瓶に回収する構造になっており、抽出から抽出物の回収までの操作が自動化されている。抽出は湿重量換算で 2 g 相当量の抽出試料を抽出装置付属のステンレス製抽出管 (容量 7 ml) に収容し、抽出中に試料が抽出管外に流出するのを防ぐために管内両端に石英ウールを詰め、さらにねじ蓋をして行った。固相吸着トラップにはフロリジルトラップを用いた。

抽出時の恒温槽温度は 50°C に設定し、抽出溶媒は高純度二酸化炭素を用いた。抽出前に超臨界二酸化炭素を抽出管内の試料細部に浸透させるために、5分間二酸化炭素の流れを止めた状態にした (Static time)。抽出は40分間行い、抽出後、トラップに吸着させた抽出物をヘキサン 3 ml 、アセトン 3 ml の順で流して溶出させた。トラップに流す溶媒種及び量は、吸着させた対象物質が90%以上回収できることをあらかじめ確認した上で設定した。またモディファイアー (抽出助剤) 使用時にはこれを液体クロマトグラフィー用のポンプ (HP1050, Hewlett Packard) により超臨界二酸化炭素に混合した。

抽出後、ヘキサン及びアセトン抽出物を合わせ、溶媒をヘキサンに置換して窒素ガスにより 1 ml まで濃縮した。クリーンアップは 400°C で1昼夜加熱した後、含水率3%に調整したフロリジルをパスツールピペットに充填したものを用いた。最初にカラムにヘキサン 5 ml を流して洗浄及びコンディショニングを行った。その後、抽出物を含むヘキサン溶液をカラムに負荷し、5%アセトン-ヘキサン混合溶液、7%アセトン-ヘキサン混合溶液をそれぞれ 10 ml 流して目的物質を溶出した。この溶出液に内部標準物質としてナフタレン- d_8 、アントラセン- d_{10} 、ピレン- d_{10} 、クリセン- d_{12} 各 100ng/ml を含むヘキサン溶液 1 ml を添加し、窒素ガスにより 1 ml まで濃縮して質量分析装置付ガスクロマトグラフィー (GC/MS) により目的物質を定量した。GC/MS はガスクロマトグラフィーに HP5890 (Hewlett Packard)、質量分析装置 HP5972 (Hewlett Packard) が付属したものの、カ

ラムはDB-5 (30m × 0.25mm id., 膜厚0.25 μm, J & W Scientific) を用い、オートインジェクター (HP7973, Hewlett Packard) により試料を注入した。

(3) 試薬

ヘキサン, アセトン, メタノール, ジエチルエーテル, フロリジルは和光純薬株式会社のものを用いた。*p,p'*-DDT, DDE, DDD 及び, α , β , γ , δ の各 HCH 異性体はジーエルサイエンス株式会社, チオベンカーブ, ブタクロール, オキサジアゾン, CNP は和光純薬株式会社のものを用いた。ナフタレン- d_8 , アントラセン- d_{10} , ビレン- d_{10} , クリセン- d_{12} は和光純薬のものを用いた。

3. 結果と考察

3. 1 抽出条件の最適化

SFE の抽出効率を作用する条件は抽出圧力 (抽出密度), 二酸化炭素流量, 抽出時間, モディファイアーの有無等があげられる。Hawthorne ら¹⁰⁾は SFE を用いた抽出の最適条件を設定する際, どのような順序で検討を行えば良いかを述べている。本研究では基本的に彼らの順序に沿って以下のような検討を行った。以下の (1) から (4) の検討はマダイ添加試料を用いて行った。なお, (1) から (3) の検討を行った際に抽出効率の標準偏差が10%を超える結果となり, 主に β -HCH, CNP 及び DDT に見られた。これはこれらの物質の GC/MS 測定時の感度が安定しないことがあり, そのことが起因したと考えられた。

(1) 超臨界二酸化炭素流量

超臨界二酸化炭素流量と抽出効率との関係を調べた。ここではモディファイアーは用いずに二酸化炭素のみで圧力0.70g/mlの条件下で抽出し, 二酸化炭素流量を1, 2, 3 mL/min にそれぞれ設定して抽出効率を比較した

(Table 1)。その結果, 1 mL/min では対象とした農薬はほとんど抽出されなかった。しかし2, 及び3 mL/min 二酸化炭素を流すことによりほぼ60%の回収率が得られ, これらの両流量間での抽出効率には大きな違いは認められなかった。Hawthorne ら¹⁰⁾によると高濃度の目的物質が試料中で弱く吸着している状態のときは超臨界二酸化炭素流量の増加に伴い抽出量が増加するが, 目的物質が試料に強く吸着し, かつ低濃度である状態では超臨界二酸化炭素流量は抽出量に影響しないとしている。本研究で行った検討では, 1) 用いた試料が対象物質を添加したものであること, 2) 添加濃度が高いこと, から二酸化炭素流量が抽出量に影響を与える結果となったと考えられた。そこで, 二酸化炭素流量を2 mL/min とし, 実際に有機塩素系農薬を実験室内でイガイに暴露した試料を用いて最適条件下でSFEを行ったときに, 良好な抽出効率を得ることができるかどうか確認した。

(2) 抽出密度

抽出密度も抽出効率に大きな影響を与える要因である。抽出密度は温度と圧力の変化によりその大きさが変化するが, 本研究では恒温槽温度を50℃に固定して行ったために, 抽出圧力のみを変化させて抽出密度を変化させた。抽出密度をそれぞれ0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75 及び0.80g/mL (それぞれの抽出圧力は115, 123, 134, 151, 176及び214bar) に設定したときに対象物質の抽出効率がどのように変化するかを調べた (Table 2)。本検討でもモディファイアーは使用しなかった。その結果, 各農薬の抽出効率は密度に依存する傾向はほとんど認められず, オキサジアゾン, CNP, DDT を除いて60~70%程度であった。さらに CNP は46~52%, DDT は37~46%と低い抽出効率しか得られなかった。オキサジアゾンは対象農薬の中では73~77%と良好な結果を示した。上記

Table 1 Change of extraction efficiencies for organochlorine pesticides with flow of carbon dioxide (n=3)

	Flow of carbon dioxide					
	1 mL/min		2 mL/min		3 mL/min	
	Mean	SD ^{*1}	Mean	SD	Mean	SD
α -BHC	2	1	65	6	61	1
β -BHC	ND ^{*2}	--	64	7	60	0
γ -BHC	1	1	63	6	59	2
δ -BHC	1	1	53	6	52	1
Thiobencarb	2	1	67	3	65	1
Butachlor	2	1	56	8	58	2
DDE	1	1	77	3	72	2
Oxadiazon	2	1	69	3	66	1
DDD	2	2	73	6	72	3
CNP	0	0	43	5	44	1
DDT	1	1	68	4	67	3

Order: %

*1: Standard deviation

*2: Not detected

の結果を踏まえ、抽出密度を0.70g/mlに設定して、Table 2の抽出量がどの程度の時間で抽出されているのかを調べたところ、20分間で全抽出量の99%が抽出されていた。このことから対象物質に対する超臨界二酸化炭素の溶解力が不足しているために十分な抽出効率が得られないのではないかと考えられた。Nerín ら¹⁰⁾はイチゴから11種類の有機塩素系農薬と有機リン系農薬をSFEにより抽出することを試みたが、これらの農薬に対して超臨界二酸化炭素のみで抽出するのは不可能だとしている。農薬は種々多様な構造を持つために、同時抽出を行う場合、超臨界二酸化炭素のみで抽出しようとしてもその溶解力に限界があり、十分な抽出効率が得られないものがあるのではないかと考えられた。

(3) モディファイアー

SFEは二酸化炭素自体が無極性であるために極性のある物質を抽出する際には、その溶解力にある程度の限界がある。そのためにSFEの抽出力を増加させるためにしばしばモディファイアーとして有機溶媒を微量に添加する方法が用いられる。本研究でも対象とした農薬が超臨界二酸化炭素のみでの抽出では良好な抽出効率が得られないことからモディファイアーの適用を検討した。本研

究で用いた装置のように吸着トラップから抽出物を回収する場合、超臨界二酸化炭素のみでの抽出時には吸着トラップの部分を冷却すると回収率が良いことが知られている^{2,5)}。しかし、モディファイアーを用いた際にはトラップを冷却すると、吸着トラップからモディファイアー自身が目的物質を溶出してしまう可能性が高い¹⁰⁾。Bøwadat ら⁹⁾によるとPCBsをSFEにより抽出して吸着トラップを用いて抽出する場合、モディファイアーとして用いる溶媒の沸点以上にトラップ温度を設定すると良好な回収率が得られると報告している。そこでこの報文を参考にしてトラップ温度をモディファイアーの沸点付近に設定し、モディファイアーの使用を検討することにした。モディファイアーとして検討したのはSFEでは広く用いられているメタノール（沸点64.5℃）、アセトン（沸点56.5℃）及び水（Milli-Q, 沸点100℃）である。検討した各モディファイアーの超臨界二酸化炭素に対する混合量は1%, 7%として比較を行った。それぞれの抽出時のフロリジルトラップ温度はメタノール使用時65℃、アセトン使用時は57℃、水使用時は101℃とした。その結果をTable 3に示した。水はメタノール、アセトンと比較すると7%混合時に多少回収率が低くなった。

Table 2 Extraction efficiencies of organochlorine pesticides with change for extraction density (n=3)

	0.55		0.6		0.65		0.7		0.75		0.8	
	Mean	SD ^{*1}	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
α-BHC	58	2	61	3	61	1	62	1	65	4	62	3
β-BHC	62	4	65	6	66	2	67	4	67	5	65	5
γ-BHC	61	2	62	4	64	2	64	5	65	3	64	3
δ-BHC	56	2	57	7	61	4	61	4	62	5	62	3
Thiobencarl	64	3	61	3	60	1	61	2	64	2	61	1
Butachlor	63	8	67	8	64	9	64	4	67	8	63	5
DDE	71	4	70	4	69	3	69	2	68	2	67	3
Oxadiazone	77	3	77	3	74	3	76	2	77	1	73	2
DDD	70	4	72	2	72	2	74	3	76	3	75	1
CNP	46	9	50	11	51	12	55	8	50	11	52	8
DDT	38	5	43	7	40	4	46	5	40	20	37	5

Order: %

*1: Standard deviation

Table 3 Extraction efficiencies of organochlorine pesticides by supercritical fluid extraction with modifier (n=4)

	Methanol				Acetone				Milli-Q			
	1%		7%		1%		7%		1%		7%	
	Mean	SD ^{*1}	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
α-HCH	78	3	88	11	81	4	83	5	89	4	75	7
β-HCH	71	16	81	9	63	10	77	15	82	17	85	20
γ-HCH	82	3	90	4	75	3	86	6	95	5	82	5
δ-HCH	78	2	86	2	62	1	73	1	77	5	71	6
Thiobencarb	97	6	105	4	84	6	82	3	96	2	85	2
Butachlor	87	5	81	5	78	2	77	3	83	9	76	3
DDE	99	6	96	3	93	3	85	5	91	2	82	5
Oxadiazon	111	4	107	8	96	6	88	3	88	3	83	4
DDD	96	5	94	4	85	4	85	2	83	6	74	5
CNP	85	1	94	8	78	3	88	4	87	2	77	7
DDT	83	6	85	7	102	5	115	6	103	8	89	11

Order: %

*1: Standard deviation

これは水の生体試料に含まれる脂質中への浸透が他の溶媒よりも劣るためではないかと考えられた。Nemoto¹⁷⁾らは88種類の農薬をセライトに吸着させてSFEを試みたが、モディファイアーとしてもっとも有効だったのは水だったとしている。おそらく水をモディファイアーとして用いたときに、今回我々が対象とした生物試料とセライトへの抽出溶媒の浸透性はかなり異なるのではないかと考えられる。さらに水を用いたことにより抽出中に機器の配管中で抽出物がつまってしまう、圧力が異常に上昇してしまうというトラブルが多発したために、水はモディファイアーとして適さないと判断した。アセトンについては1%用いたときと比較すると β -及び δ -HCH類、CNP、DDTがアセトン量を7%にしたときに回収率は10%程度向上した。しかし、その他の農薬類についてはアセトンの混合量が増加してもさほど抽出効率が向上することはなかった。また、メタノールをモディファイアーとして用いたときの回収率はアセトン混合時よりも全体的に回収率が良好であった。またモディファイアーとして7%を混合したときの回収率が若干良くなる傾向にあった。

各モディファイアーの沸点以上に固相吸着トラップ温度を設定すると上記の通り良好な結果が得られたが、トラップ温度を-20℃に保持してメタノール、アセトンモディファイアーとして用いると各物質は吸着トラップにほとんど保持されず、当初懸念されたように対象物質はほとんど回収することはできなかった。この結果、今回対象とした農薬類に対してもトラップ温度を沸点以上に設定するのは有効であると考えられた。

(4) クリーンアップ

抽出後のクリーンアップはSFEで抽出を行った後、今

回用いたようなパスツールピペットにフロリジルを詰めた簡易なカラムでGC/MS測定時に十分定量可能なクロマトグラムが得られた。

生体試料を用いて抽出を行う際に、抽出管の出口側にアルミナ、あるいは他の吸着剤を数g詰めて抽出と同時にクリーンアップを行う方法が過去に報告されている^{2,5,7,10,11)}、本研究でも超臨界抽出時にアルミナを用いたクリーンアップ法を試みてその効果を調べた。アルミナ量を1g, 2g, 3gを用いてそれぞれの回収率を比較した。その結果、アルミナ1g使用時は α -HCH, δ -HCH, チオベンカーブ, ブタクロール, オキサジアゾンの各物質で回収率の低下が見られた (Table 4)。特にブタクロールはアルミナを用いないときと比較すると回収率が1/3程度になってしまった。他の物質についても10~50%程度の回収率の低下が確認された。さらに2gのアルミナを用いた時にはDDE, DDT以外の全ての物質でかなり回収率が低下した。ブタクロールは全く回収できなかった。これは3g使用時にも同様であった。このアルミナを用いたクリーンアップを行っただけのものをGC/MSで測定すると筋肉試料ならば十分に定量は可能であったことから、生体由来の夾雑物はかなり除去されていると考えられた。しかし、パスツールピペットに詰めたフロリジルカラムと比較するとその能力は劣っており、クロマトグラム上のベースラインがフロリジルカラムで処理したときのものよりも乱れる傾向にあった。また、アルミナ使用時の回収率には、ときにばらつきが大きくなる傾向が見られたが、これは抽出時に抽出管内で抽出試料とアルミナが動いてしまい、対象物質のアルミナへの吸着量が安定しなかったためではないかと考えられた。

Table 4 Extraction efficiencies of organochlorine pesticides by supercritical fluid extraction with alumina clean-up

	Amount of Alumina					
	1 g		2 g		3 g	
	Mean	SD ^{*1}	Mean	SD	Mean	SD
α -HCH	71	6	56	2	45	11
β -HCH	90	9	75	3	73	11
γ -HCH	79	6	65	8	55	12
δ -HCH	43	7	47	9	26	21
Thiobencarb	62	5	56	3	21	35
Butachlor	28	21	ND ^{*2}	--	0	0
DDE	82	7	80	5	80	6
Oxadiazon	62	4	62	6	23	39
DDD	85	5	77	3	72	9
CNP	74	13	54	8	56	14
DDT	88	18	84	4	80	16

Order: %

*1: Standard deviation

*2: Not detected

Ling ら¹⁸⁾は二枚貝の *Meretrix lusoria*, *Crassostrea gigas*, *Corbicula maximum* 中から15種類の有機塩素系農薬と11種類の有機リン系農薬を超臨界抽出する際に、フロリジル, C₁₈, シリカゲル, アルミナを用いて抽出と同時にクリーンアップを試みたが、フロリジル以外はクリーンアップが上手くいかなかったとしている。本研究でも魚筋肉試料に対してフロリジルを抽出管に詰め、抽出と同時にクリーンアップを試みたが、アルミナと比較すると夾雑物を除去する能力は低く、機器分析を行うためにはさらなるクリーンアップが必要であった。

3. 2 SFE と溶媒抽出法との比較

従来抽出効率を調べる際には添加回収実験が広く用いられてきた。しかし、添加試料は測定対象物質が実際の環境試料中の存在形態とは異なっている可能性があり、実際の試料から目的物質を抽出した際に得られる測定値が期待されたような結果にならないことがしばしばあった。本研究でも上記のように添加試料を用いてSFEの最適条件を探ってきたが、実環境試料でも適用可能であるかどうかを調べるために、対象とした有機塩素系農薬を経鰓暴露したムラサキイガイを実試料として用い、従来広く用いられてきた超音波抽出法の結果と比較した (Figure 1)。超音波抽出時には試料を約2 g 使用し、溶媒30mlにより15分間の抽出を2回行った。2回の抽出液を合わせ、溶媒をヘキサンに置換して、窒素気流下で1 mlまで濃縮した。濃縮後のクリーンアップは超臨界抽出後、使用したフロリジルカラムと同様の操作により行った。抽出時の溶媒はアセトン-ヘキサン混合溶液 (1:1, v/v) とジエチルエーテル単独とを用いてそれぞれの結果を比較してみたがほとんどの対象物質でアセトン-ヘキサン混合溶液で抽出した結果の方が良好であった。

SFE と超音波抽出法の結果を比較すると両者の結果は比較的良く一致していた。低濃度暴露区イガイ中の γ -HCH は、溶媒抽出を行った結果と比較するとSFEで抽出したものの方が1.5倍程度高い濃度で検出されていた。これに対してブタクロールのSFEによる抽出量は超音波抽出の3分の1程度しか抽出されていなかった。高濃度で暴露した試料については溶媒抽出と比較するとブタクロール以外の対象物質でSFEの抽出効率が高かった。しかし、ブタクロールは低濃度暴露試料と同様に抽出効率が溶媒抽出よりも劣っていたことから、ブタクロールに関してはこれまで検討してきた方法ではSFEによる抽出は適していないと考えられる。しかし、その他の物質についてはSFEによる抽出が十分可能であることが明らかになった。

(A)

(B)

Fig. 1 Comparison of extraction efficiencies between supercritical fluid extraction and organic solvent extraction, using mussel exposed to organochlorine pesticides

(A) and (B) represent the concentrations for organochlorine pesticides in mussel exposed by high and low concentrations, respectively. The black area denotes the concentration by the mixture of acetone and hexane; oblique hatching, by diethyl ether; and blank area, by SFE.

まとめ

本研究で行った検討の結果、Static timeを5分間、抽出時間を40分間、超臨界二酸化炭素の流量を2 ml/min、抽出密度を0.70g/ml (恒温槽温度50℃, 抽出圧力151bar) に設定し、モディファイアーとしてメタノールを超臨界二酸化炭素に対して7%相当量混合した際に、対象とした有機塩素系農薬の抽出効率がほぼ80%前後であった。抽出時間に関しては10分程度ではほぼ全量が抽出されると

考えられたが、今回は化学物質が様々な形態で取り込まれていることが想定される実際の環境試料を用いることを前提に行ったために、抽出完了に時間がかかるのではないかと考えて40分とした。また、今回対象とした有機塩素系農薬の抽出に対してはモディファイアーの使用が必ず必要であることが判明した。また抽出した対象物質をトラップする際にはモディファイアーの沸点以上にトラップ温度を設定する方法が非常に有効であった。クリーンアップに関してはバスツールピペットに3%含水フロリジルを充填したものにより、十分にGC/MSによる測定が可能であった。また、実際に対象農薬を暴露したムラサキイガイ試料を用いて超音波抽出法とSFEによる抽出量の比較を行った結果、SFEは実際の環境試料中の農薬類を抽出するのに十分有効な手段であると判断された。

SFEは抽出時にごく少量しか有機溶媒を用いない上にその抽出も短時間に完了する、溶媒抽出と比較してもその抽出力は優れている、という点で従来の溶媒抽出法と比較すると優れているといえる。しかし、二酸化炭素自身が無極性であるためにモディファイアーを用いたとしても極性の高い物質を抽出しようとする回収率が低くなるなど全ての物質を対象として行える方法ではない。また試料に水分が含まれていると超臨界二酸化炭素の試料への浸透が妨げられるために試料を凍結乾燥することは必須である。この凍結乾燥時に揮発性の高い物質は大きく損失される可能性が高い。さらに我が国では抽出時の圧力が規制されており、本研究で用いた抽出機はこの規制に合わせて作られていることから、圧力は約215bar程度までしか上げることができない。海外の報告ではこれよりもずっと高い圧力下で抽出が行われている例が数多く見られ、高圧下で抽出を行った場合、低圧力下で抽出を行うよりも抽出効率が良いとしている報告が多い。このような問題はあるものの、本研究で示したように抽出可能な物質に対してはその有用性は大きい。今後SFEの有用性が広く知られ、実用例がより増えることが望まれる。

要 旨

本研究では水生生物試料中の有機塩素系農薬抽出時に超臨界抽出法(SFE)を適用する際の最適条件がマダイ筋肉添加試料を用いて検討された。その結果、抽出温度50℃の状態下で、超臨界二酸化炭素2 ml/minの流速、密度0.70g/ml(圧力151bar)で超臨界二酸化炭素に対して7%のメタノールをモディファイアーとして加えて40分間抽出したときに良好な抽出効率が得られた。抽出後、機器分析までの前処理はバスツールピペットにフロリジルを詰めてクリーンアップを行う程度で十分にGC/MSによる定量が可能であった。

SFEの有用性を確認するために実際に有機塩素系農薬をムラサキイガイに暴露し、その試料を超音波抽出法と超臨界抽出法で抽出した結果を比較したところ、超臨界抽出法は超音波抽出法と同等かそれ以上の抽出力があることが明らかになった。

文 献

- 1) Uno, S., Shiraiishi, H., Hatakeyama, S. and Otsuki, A.: Uptake and depuration kinetics and BCFs of several pesticides in three species of shellfish (*Corbicula leana*, *Corbicula japonica*, and *Cipangopludina chinensis*): comparison between field and laboratory experiment. *Aquat. Toxicol.* **39**, 23-43 (1997)
- 2) Hale, R.C. and Gaylor, M.O.: Determination of PCBs in fish tissues using supercritical fluid extraction. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1043-1047 (1995)
- 3) Chester, T.L., Pinkston, J.D. and Raynie, D.E.: Supercritical fluid chromatography and extraction. *Anal. Chem.* **70**, 301R-319R (1998)
- 4) Smith, R.M.: Supercritical fluid separation science – the dreams, the reality, and the future. *J. Chromatogr. A.* **856**, 83-115 (1999)
- 5) Johansen, H.R., Becher, G. and Greibrokk, T.: Determination of PCBs in biological samples using on-line SFE-GC. Fresenius'. *J. Anal. Chem.* **344**, 486-491 (1992)
- 6) Bøwadt, S., Johansson, B., Fruekilde, P., Hansen, M., Zilli, D., Larsen, B. and de Boer, J.: Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls from lyophilized fish tissue. *J. Chromatogr. A.* **675**, 189-204 (1994)
- 7) Hale, R.C., Gaylor, M.O., Thames, J.F. and Smith, C.L., Mothershead II, R.F.: Robustness of supercritical fluid extraction (SFE) in environmental studies: analysis of chlorinated pollutants in tissues from the osprey (*Pandion haliaetus*) and several fish species. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **64**, 11-19 (1996)
- 8) Ling, Y.C. and Teng, H.C.: Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in mussels. *J. Chromatogr. A.* **790**, 153-160 (1997)
- 9) Schantz, M.M., Bøwadt, S., Benner Jr., B.A., Wise, S.A. and Hawthorne, S.B.: Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials.

- J. Chromatogr. A.* **816**, 213-220 (1998)
- 10) Johansen, H.R., Becher, G. and Greibrokk, T.: Determination of planar PCBs by combining on-line SFE-HPLC and GC-ECD or GC/MS. *Anal. Chem.* **66**, 4068-4073 (1994)
 - 11) Ali, M.Y. and Cole, R.B.: SFE plus C₁₈ lipid cleanup method for selective extraction and GC/MS quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in biological tissues. *Anal. Chem.* **70**, 3242-3248 (1998)
 - 12) Voorhees, K.J., Gharaibeh, A.A. and Murugaverl, B.: Integrated SFE/SFC/MS system for the analysis of pesticides in animal tissues. *J. Agric. Food. Chem.* **46**, 2353-2359 (1998)
 - 13) van Bavel, B., Dahl, P., Karlsson, L., Hardell, L., Rappe, C. and Lindstn, G.: Supercritical fluid extraction of PCBs from human adipose tissue for HRGC/LRMS analysis. *Chemosphere.* **30**, 1229-1236 (1995)
 - 14) Hawthorne, S.B., Miller, D.J., Burford, M.D., Langenfeld, J.J., Eckert-Tilotta, S. and Louie, P.K.: Factors controlling quantitative supercritical fluid extraction of environmental samples. *J. Chromatogr.* **642**, 301-317 (1993)
 - 15) Hawthorne, S.B., Galy, A., Schmitt, V.O. and Miller, D.J.: Effect of SFE flow rate on extraction rates: classifying sample extraction behavior. *Anal. Chem.* **67**, 2723-2732 (1995)
 - 16) Nern, C., Batlle, R. and Cacho, J.: Determination of pesticides in high-water-content samples by off-line supercritical fluid extraction-gas chromatography electron-capture detection. *J. Chromatogr. A.* **795**, 117-124 (1998)
 - 17) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M. and Saito, Y.: Effect of extraction conditions and modifiers on the supercritical fluid extraction of 88 pesticides. *J. Chromatogr. Sci.* **35**, 467-477 (1997)
 - 18) Ling, Y.C., Teng, H.C. and Cartwright, C.: Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr. A.* **835**, 145-157 (1999)