

精製効果が高く、溶媒の減圧留去中の突沸を防いだ GC-MS による茶中の残留農薬の多成分分析法

谷川元一・西川 学

Multiresidue Analysis of Pesticides in Tea using GC-MS with High Purification Effects and a Method of Boiling up Prevention in Solvent Evaporation

Motokazu TANIGAWA, Manabu NISHIKAWA

Summary

Multiresidue analysis of pesticides in tea was conducted using GC-MS with high purification effects. A method of boiling up prevention during evaporation of solvents was investigated. Using acetonitrile, pesticides were extracted from tea swollen with 10 ml of water and 1 g of Zinc acetate. The acetonitrile extract was evaporated. When fine powders appeared on the upper surface of the extract, decompression was stopped, and 30 ml of water was added. Then the extract was re-evaporated to remove acetonitrile. The pesticide solution was first applied to a C₁₈ mini column and eluted with ethyl acetate. Then it was applied to a GCB-NH₂ mini column and eluted with 50% acetone/n-hexane. Pesticide concentrations were measured using GC-MS with scan mode. Recovery at the 0.2 µg/g level from the tea was 75.9~117.2%. The detection limits were 0.01 µg/g. All 23 tea products from Nara prefecture were below thresholds for pesticide residue. Their safety was confirmed.

Key Words: Tea, Multiresidue analysis of pesticides, Prevention of boiling up in evaporation of solvent

緒言

近年、健康に対する関心の高まりから、茶の持つ抗酸化や抗がん、血圧上昇抑制、抗ウイルス等の機能性に注目が集まっており^{1),2)}、茶は飲用だけでなく食用としても消費されている。これにともない茶の分析は、茶葉から温湯等によって「お茶」にして抽出する方法から、乾燥食品として水を加えて膨潤させ有機溶媒によって抽出する方法が用いられるようになった。

一方、2008年5月の食品衛生法改正によってポジティブリスト制度が導入され、それまで残留基準のなかった農薬には、一律基準(0.01 ppm)が設定された。このため、多種類の農薬を短時間に効率よく高感度に分析することが求められ、厚生労働省通知による一斉分析法³⁾や QuEChERS 法²⁾などが茶にも適応された。しかし、これらの方法は溶媒抽出後に減圧留去しないため、茶の場合、含まれる多量の夾雑物を十分に精製することができず、目的とする農薬の定性と定量が同時に可能な GC-MS の Scan では測定できないことが多い。これに対し、従来の溶媒抽出後に減圧留去する個別分析法⁴⁾は、精製効果は高いも

の、茶では減圧留去中に抽出液が突沸してエバポレーター中に吹き出すことが多々あり、分析を行う上で大きな問題となっている。

今回、茶における残留農薬の多成分分析法で、高い精製効果を得るために溶媒抽出後に減圧留去を行い、かつ、減圧留去中の突沸を防ぐ方法について検討したので報告する。

材料および方法

1. 試料

宇陀農業改良普及センター(現・東部農林振興事務所農林普及課)を通じて奈良県内の23生産者の茶を入手し、岩谷産業社製 Millser IFM-180G で粉碎したものを供した。

2. 試薬

1) 農薬標準品

第1表に示す27農薬の標準品は、和光純薬工業および関東化学、Dr. Ehrenstorfer GmbH 社製の残留農薬試験用を用いた。

第1表 GC-MSにおける保持時間およびモニターイオンと、添加回収率 (n=4)

Table 1 Retention Time and Monitor Ion in GC-MS, and Recoveries (n=4) at the 0.4 µg/g Level

	保持時間(分)	定量イオン	定性イオン	回収率(%)	RSD(%)
XMC	10:47	122	107	97.8	4.8
BPMC	11:35	121	150	92.1	3.5
トリフルミゾール代謝物	13:46	167	201	94.9	8.2
MEP	15:57	125	277	103.1	2.8
クロロピリホス	16:38	197	199	88.5	3.1
トリアジメホン	16:46	208	181	96.1	3.6
ピリフェノックス-E ^{*1}	17:26	262	264	93.8	5.3
ヘキシチアゾクス	17:33	155	227	117.2	8.1
PAP	17:33	135	93	95.1	2.9
トリアジメノール① ^{*2}	17:42	122	168	99.7	2.9
DMTP	17:49	145	85	97.3	3.7
トリアジメノール② ^{*2}	17:52	122	168	96.2	2.7
トリフルミゾール	17:57	278	206	75.9	6.7
ピリフェノックス-Z ^{*1}	18:06	187	173	93.4	3.8
マイクロブタニル	18:45	179	150	87.8	4.5
プロフェジン	19:05	105	190	88.6	4.2
クロロフェナピル	19:18	247	59	92.5	5.2
BPPS	20:33	173	201	95.3	4.7
PMP	20:48	160	161	83.0	6.7
フェンプロパトリン	21:08	125	120	85.7	4.4
テブフェンピラド	21:15	171	276	90.8	3.9
テトラジホン	21:19	159	227	83.0	3.1
シハロトリン① ^{*3}	21:33	181	141	86.0	5.2
シハロトリン② ^{*3}	21:45	181	141	93.8	7.4
アクリナトリン	21:53	181	289	77.1	5.8
ペルメトリン	22:12	183	163	77.5	5.8
ピリダベン	22:19	147	148	84.2	5.4
フルシトリネート① ^{*4}	22:58	199	157	89.7	5.2
エトフェンプロックス	23:04	163	135	90.5	5.2
フルシトリネート② ^{*4}	23:07	199	157	87.8	5.6
フルバリネート	23:46	250	181	89.1	6.1
ジフェノコナゾール	23:56	265	323	92.9	8.3

*1 は E 体と Z 体の異性体があり、それぞれ別に残留濃度を求めた。

*2, *3, *4 はそれぞれ 2 つのピークが得られたので、それぞれ別に残留濃度を求めた。

2) 農薬混合標準溶液

各農薬標準品をそれぞれアセトンに溶解し、100 µg ~ 200 µg/ml の標準原液を調製した。各標準原液を 50 ml 容メスフラスコに取り、アセトンで定容して、2 µg/ml 混合標準溶液を作成した。

3) その他の試薬

関東化学社製の特級を用いた。

4) ミニカラム

C₁₈ ミニカラムは Barian 社製 Mega Bond Elut 6 ml (1 g) を、グラファイトカーボン/アミノプロピル積層ミニカラム (以下、GCB-NH₂ ミニカラムと略す) は SUPELCO 社製 ENVI-Carb/LC-NH₂ Tubes 6 ml (500 mg/500 mg) を用いた。

3. 装置および測定条件

振とう機：タイテック製 SR-II，エバポレーター：東京理化機械製 NE-1，アスピレーター：東京理化機械製 A-3S，電子天秤：エー・アンド・ディ製

ER-180A. 超音波洗浄器：BRANSON 製 2510 J-DTH.

GC-MS の条件は次のとおり。GC：Agilent 製 6890 GC, MSD：日本電子製 JMS-Automat 15 II，カラム：SGE 製 BPX5 (0.25 mm 内径×30 m, 膜厚 0.25 µm)，キャリアーガス：He，ガス流量：1 ml/min (定流量モード)，カラム温度：100°C (1 min) →8°C/min→180°C (0 min) →5°C/min→280°C (0 min) →20°C/min→320°C (20 min)，注入口温度：250°C，注入量：2 µl，注入法：スプリットレス，インターフェース温度：250°C，イオン源温度：230°C，フィラメント電流：300 µA，イオン化電圧：70 eV，検出器 Photomat 電圧：700 V，イオン化法：EI，スキャンレンジ：m/z 50-500 (SCAN time: 400 ms)，第1表に農薬成分の定量イオンおよび定性イオンを示した。

4. 抽出溶媒およびジクロロメタンによって転溶される画分の重量

抽出溶媒として、アセトニトリルおよびアセトン、

メタノールを用いて次の 1)~2)の操作を行い、それぞれ、アセトニトリル画分、アセトン画分、メタノール画分としてその重量を求めた。さらに、試料の膨潤時に酢酸亜鉛 1 g を添加したものについても、同じ操作を行った。

1)抽出

試料 5 g を 300 ml 容三角フラスコに取り、水 20 ml を加え、ときどき振とうしながら 30 分間放置し、膨潤させた。これに抽出溶媒 100 ml を添加し、30 分間振とうした後、内径 9.5 cm の桐山漏斗を用いて濾過した。さらに、残さに抽出溶媒 50 ml を添加して洗浄した後、濾過した。

2)ジクロロメタンによって転溶される画分の重量

得られた濾液を合わせて 500 ml 容ナス型フラスコに移し、40℃で抽出溶媒を減圧留去した。残液を 200 ml 容分液ロートに移し、飽和食塩水 20 ml とジクロロメタン 50 ml を加え、30 分間振とうした。放置後、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、予め秤量済みの 300 ml 容ナス型フラスコに取った。水層にさらにジクロロメタン 50 ml を加え、先と同様の操作を繰り返した。合わせたジクロロメタン層を 40℃で減圧留去し、空気で乾固させた。これを電子天秤で秤量し、ナス型フラスコの重量を引くことで、ジクロロメタンによって転溶される抽出溶媒の画分の重量を求めた。

5. 精製

1)C₁₈ミニカラムによる固相抽出法

2 µg/ml 混合標準溶液 1 ml を 300 ml 容ナス型フラスコに取り、キーパーとして 2% ジエチレングリコール 200 µl を加え、ナス型フラスコを手で回転させながらアセトンを自然留去した。残留物に水 10 ml を加えて超音波洗浄器で攪拌した後、あらかじめアセトニトリル 10 ml と水 10 ml でコンディショニングした C₁₈ ミニカラムに負荷した後、遠心処理 (3,000 rpm, 10 分間) によってミニカラムを脱水した。洗浄溶媒としてアセトニトリルと水の混液を用い、アセトニトリルの濃度を 0~50% まで段階的に変えて、各混液を順次 10 ml ずつ流下した。これを 300 ml 容ナス型フラスコに取り、「4. 2)」に準じた操作を行い、空気で乾固させた後、2 ml アセトンに溶解して、GC-MS で測定した。

2)GCB-NH₂ミニカラムによる精製

混合標準液 2 ml を 300 ml 容ナス型フラスコに取り、2% ジエチレングリコール 200 µl を加え、C₁₈ ミ

ニカラムと同様にしてアセトンを留去し、n-ヘキサン 2 ml に溶解した後、あらかじめ n-ヘキサン 10 ml でコンディショニングした GCB-NH₂ ミニカラムに負荷した。洗浄溶媒としてアセトンと n-ヘキサンの混液を用い、アセトンの濃度を 0~100% まで段階的に変えて、各混液を順次 10 ml ずつ流下した。溶出液に 2% ジエチレングリコール 200 µl を加えて 40℃で減圧留去し、空気で乾固させた後、2 ml アセトンに溶解して、GC-MS で測定した。

6. 添加回収試験

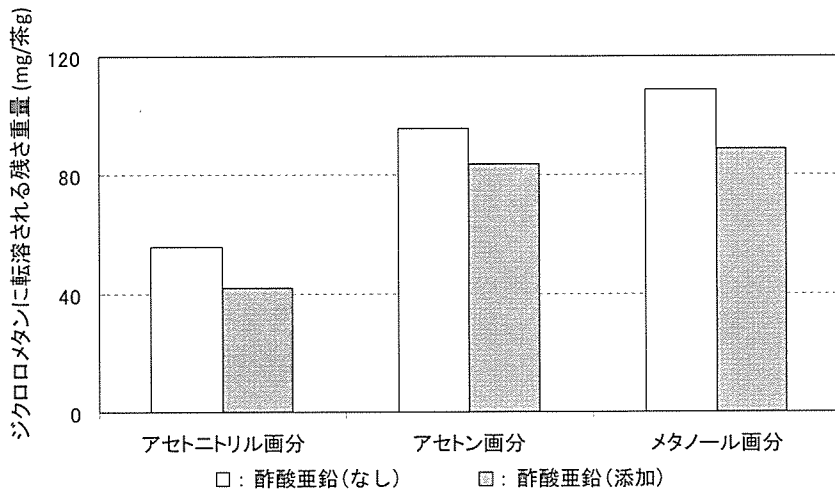
あらかじめ第 1 表に示す農薬が含有されていないことを確認しておいた試料を用い、試料中の農薬濃度が 0.4 µg/g になるように混合標準溶液を添加し、第 2 図の方法に従って回収試験を実施した。

結果及び考察

1. 抽出溶媒

茶は葉緑素やタンニン、カフェインなど夾雑物を多く含むため、抽出溶媒の選択は、後に続く精製操作の煩雑さに大きく影響する。そこでまず、その検討を行った。抽出溶媒として、脂質の抽出の少ないアセトニトリルおよび抽出力が強く最も多く多用されているアセトン、色素の抽出が少ないメタノール⁴⁾を用い、ジクロロメタンによる液々分配によって転溶される重量を第 1 図に示した。アセトニトリル画分はアセトン画分の約 2/3、メタノール画分の約 1/2 以下となり、抽出にはアセトニトリルが有利であることが分かった。

次に、膨潤時に酢酸亜鉛を添加したときの重量も第 1 図に示した。タンニン除去には一般的に酢酸鉛が用いられるが、環境への負荷が大きいため、今回は酢酸亜鉛を用いた⁸⁾。全ての画分で酢酸亜鉛によって重量が減少したが、アセトニトリル画分がアセトンおよびメタノール画分の約 1/2 以下となったので、茶での抽出溶媒としてアセトニトリルを用いることにした。なお、アセトニトリルを用いた場合、酢酸亜鉛による重量の減少は少なかったが、「3. -1)」で述べる C₁₈ ミニカラムに負荷するとき、酢酸亜鉛を添加しないとカラム上部に沈殿物が付着してカラムが詰まることから、酢酸亜鉛の添加は必要であった。また、濾過するとき、内径 6.5 cm の桐山漏斗を用いた場合、同様に濾紙が詰まったので、内径 9 cm のも



第1図 溶媒によってジクロロメタンに転溶される茶の残さ重量

Fig. 1 Weight of Residue Extracted from Tea with Dichloromethane and Solvents

試料2g

- 水10 ml, 酢酸亜鉛1gを加え, ときどき振とうしながら30分間放置
- アセトニトリル(40 ml+20 ml)を加えて, 30分間振とう
- 桐山漏斗(内径9.5 cm)を用いて濾過
- 濾液を500 ml容ナス型フラスコに移し, 40°Cで減圧留去
- 抽出液の表面に細かい粒子が析出してきたら, 直ちに減圧留去を停止して大気圧に戻し, 水30 mlを加えた後, 減圧留去を再開

C₁₈ミニカラム(1g)

- 予めアセトニトリル10 mlと水10 mlでコンディショニング
- 試料液を負荷
- 20%アセトニトリル/水10 mlで洗浄
- 3,000 rpmで10分間遠心し, 脱水
- 酢酸エチル5 ml×3でナス型フラスコの器壁をよく洗ってミニカラムに移し, 溶出
- 無水硫酸ナトリウムで脱水
- 40°Cで減圧留去し, 空気で乾固
- 残留物を50%アセトン/n-ヘキサン溶液5 mlに溶解

GCB-NH₂ミニカラム(500 mg/500 mg)

- 予め50%アセトン/n-ヘキサン溶液10 mlでコンディショニング
- 試料液を負荷
- 50%アセトン/n-ヘキサン溶液15 mlで溶出
- 40°Cで減圧留去し, 空気で乾固
- 残留物をアセトン2 mlに溶解

GC-MS

第2図 茶中の残留農薬抽出精製法

Fig. 2 Method of Pesticide Extraction and Purification of Tea.

のを用いた。

2. 減圧蒸留

本研究に先立つ 24 試料の調査で、有機溶媒で抽出した後に減圧留去する方法を用いたところ、ほとんどの試料で突沸し、ドロップキャッチャー内の洗い戻しあるいは操作のやり直しが必要であった。突沸の防止策として、沸騰石を入れる、水浴の温度を下げる、大型のナス型フラスコを使用する等の方法が紹介されているが⁴⁾、実際に試したところ、茶ではほとんど効果はなかった。

減圧留去の過程を観察したところ、抽出液からアセトニトリルの大部分が留去して、エバポレーターのドロップキャッチャー内が水滴で曇る前に、突沸することが分かった。さらに観察すると、突沸する直前、抽出液の表面に細かい粒子が現れた。このため、突沸する原因は、アセトニトリルの大部分が留去することで抽出液中に溶け込んでいた内容物が不溶化するとともに、アセトニトリルによる水の共沸で水溶性の内容物が濃縮されたため、抽出液の粘性が高くなり、急激に沸騰するためと考えられた。

そこで、抽出液の表面に細かい粒子が現れたら、直ちに減圧を止めて大気圧に戻し、抽出液に水 30 ml を添加して減圧留去を再開したところ、突沸を防ぐことができた。一方、減圧を止めて大気圧に戻すだけ、あるいは添加する水の量を 10~20 ml にした場合には、減圧留去を再開すると、突沸を防ぐことができなかつた。また、抽出開始時に水 40 ml (当初の 10 ml + 追加の 30 ml の合計) を添加した場合にも、突沸を防ぐことができなかった。これらのことから、突沸の防止に有効であるのは、大気圧に戻すことと、水の添加によって試料液の水温を室温近くまで下げることで、減圧留去が緩やかに再開されるためであると推察された。

本法によって減圧留去したところ、入手した 23 試料のうち、突沸したのは皆無であった。

3. 精製

1) C₁₈ ミニカラム

予備実験から、C₁₈ ミニカラムが液々分配および珪藻土カラムよりも精製効果が高いという結果が得られたので、C₁₈ ミニカラムによる固相抽出法について検討した。まず、C₁₈ ミニカラムの洗浄溶媒として、アセトニトリルと水の混液を用い、アセトニトリルの濃度を 0~50% まで変えたところ、各農薬の溶出が

見られなかったのは 20% までであった。C₁₈ は逆相クロマトグラフィーであり、20% アセトニトリル/水で溶出される農薬も存在するが⁷⁾、今回検討した農薬にはなかった。

次に、溶出溶媒として酢酸エチル 5 ml を 3 回加えた。一般的に、溶出溶媒にはアセトニトリルやメタノールがよく用いられるが⁷⁾、これらの溶媒は親水性が高く、無水硫酸ナトリウムでは脱水できないため、追加の脱水操作を必要とすることが多い。また、溶出時の注意点として、農薬の混合標準溶液を入れたナス型フラスコの器壁を酢酸エチルで丁寧に洗い、ミニカラムに移すことが必要であった。この操作が不十分であると、第 1 表に示すシハロトリンからフルバリネートまでの農薬で回収率が低下した。これは試料の茶でも同様であった。

2) GCB-NH₂ ミニカラム

多成分分析方法には、農作物由来の色素除去効果が高いカーボングラファイトと、精製効果を高めるためにアミノプロピルシリル化シリカゲルとの積層 (GCB-NH₂) ミニカラムが多く用いられている^{2), 5), 9), 10)}。通常、本カラムから多種多様な農薬を溶出させるには、溶出力の強いトルエンが用いられるが、その反面、精製効果が低い⁷⁾、沸点が高いため減圧蒸留に時間がかかる、労働安全上好ましくないなどの問題点がある。そこで、今回は、溶出溶媒としてアセトンと n-ヘキサン混液による溶出を検討した。アセトンの濃度を 0~100% まで変えたところ、50% の濃度で今回検討した 27 農薬はほぼ 100% 回収された。

4. 分析操作

「1.」~「3.」の結果から、茶における残留農薬の多成分分析法を第 2 図に記した。

5. 添加回収試験および検出限界

添加回収試験の結果を第 1 表に示した。27 農薬の添加回収率は 75.9~117.2% で、厚生労働省の GLP 基準である 70~120% を満足した。また、RSD (%) 値は 2.7~8.3% で、回収率、再現性ともに良好であった。また、検出限界は 0.01 µg/ml であった。なお、本法によって分析した結果、入手した 23 生産者の茶は全て基準値以下であり、県内産茶の安全性が確認できた。

摘要

茶での残留農薬分析法で、精製効果が高く、かつ、溶媒の減圧留去中に発生する突沸を防ぐ方法を開発した。それは、試料 2g に水 10 ml と酢酸亜鉛 1g 加えて膨潤させた後、抽出溶媒としてアセトニトリルを用い、減圧留去中、抽出液面に細かい粒子が現れたら直ちに大気圧に戻し、水 30 ml を添加した後、減圧留去を再開し、C₁₈ ミニカラムに添加後、酢酸エチルで溶出、次いで GCB-NH₂ ミニカラムに添加後、50% アセトン/n-ヘキサンで溶出し、GC-MS の Scan モードで測定する方法である。27 農薬の添加回収率は 75.9 ~ 117.2%，RSD (%) 値は 2.7 ~ 8.3% で、回収率、再現性ともに良好であった。また、検出限界は 0.01 µg/ml であった。県内産 23 の茶の残留農薬について調査したところ、全ての試料で残留農薬は基準値以下であり、県内産茶の安全性が確認された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、茶の入手にご協力いただいた東部農林振興事務所農林普及課の瀬川賢正課長ならびに、実験に尽力いただいた谷本（現 杉村）琴世氏、中（現 松谷）郁子氏、清水（現 中村）由加子氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. 伊勢村 護・藤森 進. 2004. 緑茶パワーと健康のサイエンス. アイケイコーポレーション
2. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnaheer, F.J. Schenck. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce: Journal of AOAC International. 86(2): 412-431
3. 村松 敬一郎（編集）・伊勢村 護（編集）・山本万里（編集）・小国 伊太郎（編集）・杉山 公男（編集）. 2002. 茶の機能—生体機能の新たな可能性. 学会出版センター
4. 日本農薬学会環境委員会. 2005. 残留農薬分析 知っておきたい問答あれこれ 改訂 2 版 2005. 日本農薬学会
5. 農林水産消費技術センター. GC/MS・LC/MS による農薬等の一斉試験法
http://www.famic.go.jp/technical_information/food_contaminants_analysis/a12.pdf
6. 農薬残留分析法研究班, 2006, 最新農薬の残留分析法【改訂版】. 中央法規出版(株)
7. 農薬残留分析法研究班, 2006, 最新農薬の残留分析法【改訂版】別冊. 中央法規出版(株)
8. 食品衛生検査指針委員会. 2003. 食品衛生検査指針 残留農薬編 厚生労働省監修. (社) 日本食品衛生協会
9. 食品に残留する農薬. 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験方法について. 食安発第 0714001 号. 平成 18 年 7 月 14 日. 厚生労働省 医薬食品局食品安全部長通知
10. 鈴木昭彦・川田好徳・金成徹・味戸一宏・赤城理恵・竹村悦子・斎藤和男. 2006. GC/MS 残留農薬一斉分析法における農産物別の分析項目の検討. 福島県衛生研究所年報. 24 : 51-55