

茶葉中の農薬の同時分析法

西田政司¹・畑野和広²

Simultaneous Determination Method of Pesticides in Leaf of Tea

Seiji NISHIDA and Kazuhiro HATANO

Summary

A method for the multiresidue analysis of pesticides in leaf of tea by GC-FPD, NPD and ECD using Envi-Carb/NH₂ and FLO cartridge cleanup was developed. Pesticides were extracted from samples with acetonitrile. FeSO₄ was added in the extract and stood for 3hr. at 50 °C in order to remove tannin. Organophosphorous pesticides were not cleaned up, and were directly determined by GC-FPD. Organonitrogen pesticides were cleaned up on Envi-Carb/NH₂ cartridge, and were determined by GC-NPD. Organochlorine pesticides and pyresroids were cleaned up on Envi-Carb/NH₂ and FLO cartridge, and were determined by GC-ECD. Recoveries of the 61 pesticides added to leaf of tea at 0.01 ~ 0.2 µg/g were 0 ~ 291%. Acetamiprid could not be recovered and fenpropathrin could not be determined by this method. Nine samples were analyzed by this method. Bifenthrin(0.04ppm), chlorfenapyr(0.05 ~ 0.78ppm), chlorpyrifos(0.01 ~ 0.03ppm), fenpropathrin(0.10 ~ 0.14ppm), fluvalinate(0.05ppm) and prothiofos(0.01 ~ 0.04ppm) were detected.

Key Words : Envi-Carb/NH₂ カートリッジカラム Envi-Carb/NH₂ cartridge, フロリジルカートリッジ FLO cartridge, 農薬 pesticide, 茶葉 leaf of tea, ガスクロマトグラフィー GC

はじめに

平成 15 年 4 月現在, 食品衛生法では茶には 80 農薬に残留基準が設けられている。それらのほとんどの農薬の抽出は茶葉の 60 倍の熱湯で抽出する熱湯抽出法である。

しかし, 平成 10 年度以降に基準が設定された検査法は一部溶媒抽出法に変わっている^{1,2)}。また極性農薬のアセフェートの抽出法は茶葉を熱湯抽出した後, 大量の無水硫酸ナトリウムを加えてホモジナイズして抽出する方法である³⁾。

従来の熱湯抽出ではピレスロイド系農薬などでは回収率が低い⁴⁾のに比べ溶媒抽出法での回収率は高い。

そこで, 今回は茶に残留基準がある農薬のうち 59 農薬について, アセトニトリルで茶葉から抽出した抽出物を Envi-NH₂ 及び FLO カートリッジカラムで精製し, GC-FPD, NPD, ECD で系統分析する迅速分析法について検討したので, その結果を報告する。また市販茶葉 9

検体について農薬の残留実態を調査したので併せて報告する。

実験方法

1. 試薬

農薬標準原液: 和光純薬工業(株), 林純薬工業(株), Dr. Ehrenstorfer GmbH社, Riedel de Haen製残留農薬分析用標準試薬10~20mgをアセトン, トルエン又はアセトニトリル10~20mLに溶解し, 1000mg/L標準原液を調製した。

FPD用混合標準溶液: ジクロロボス, メタミドホス, トリクロロホン, アセフェート, ダイアジノン, ピリミホスメチル, クロルピリホス, パラチオンメチル, フェニトロチオン, プロチオホス, パラチオン, ピラクロホス, EPN各1mg/Lとなるよう調製した。

NPD用混合標準溶液A: フェノブカルブ5mg/L, トリフルミゾール代謝物, トリフルミゾール, ミクロブタニル, エトキサゾール, ビリダベン, ジクロフルアニド, ジフェノコナゾール各10mg/Lとなるよう調製した。

1. 福岡市保健環境研究所 福岡市中央区地行浜 2-1-34
(現所属: 福岡市下水道局水質管理課)

2. 福岡市保健環境研究所 福岡市中央区地行浜 2-1-34

NPD用混合標準溶液B：イプロジオン代謝物，トリフルラリン，カルバリル，テトラコナゾール，クロルフェナピル，プロピコナゾール，アセタミプリド，クロフェンテジン各10mg/L，イプロジオン20mg/Lとなるよう調製した。

ECD用混合標準溶液A： γ -BHC，クロロタロニル，ディルドリン，op`-DDT，pp`-DDD，エンドリン各1.0mg/L，ピリフェノックスZ，ピリフェノックスE，ジコホール，ピフェントリン，アクリナトリン，シフルトリン，フルシトリネート，フルバリネート，デルタメトリン各5.0mg/Lとなるよう調製した。

ECD用混合標準溶液B： γ -BHC， δ -BHC， ϵ -BHC，アルドリン，ジクロフルアニド，op`-DDE，pp`-DDE，op`-DDD，pp`-DDT1.0mg/L，フェンプロパトリン，シハロトリン，ペルメトリン，ハルフェンプロックス，シペルメトリン，フェンバレレート，トラロメトリン各5.0mg/Lとなるよう調製した。

ポリエチレングリコール(PEG)原液：PEG200(和光一級)及び400(和光一級)各1gをアセトン100mlに溶解し，原液とした。

FPD用PEG-アセトン溶液：原液5mlをアセトンで100mlに希釈した。

NPD用PEG-アセトン溶液：FPD用PEG-アセトン溶液10mlをアセトンで100mlに希釈した。

ECD用PEG-ヘキサン溶液：FPD用PEG-アセトン溶液1mlをヘキサンの100mlに希釈した。

その他の試薬：ヘキサン，アセトン，アセトニトリル，酢酸エチル，ジエチルエーテル，トルエン，無水硫酸ナトリウムは市販の残留農薬分析用を使用した。

Envi-Carb/NH₂カートリッジカラム：SPELCO，Envi-Carb(500mg)/NH₂(500mg)，3mL Tubeを使用した。

FL0カートリッジカラム：WATERS Sep-Pak Florisil (1g)，Cartridgesを使用した。

2. GC及びGC/MS測定条件

1) 定量・定性試験

GC-FPD：HEWLETT PACKARD 5890 SERIES，カラム：RESTEK OPesticide(0.32mm i.d.×30m，膜厚0.5µm)，カラム温度：600(3分) 40/分 1407/分 280(10分)，注入温度：190，検出器温度：2300，ガス流量：定流量 40cm/秒(60)，注入量：3.0µL，注入方法：スプリットレス

GC-NPD：AGILENT TECHNOLOGIES 6890N，カラム：RESTEK Rtx-CLPesticides(0.32mm i.d.×30m，膜厚0.25µm)，カラム温度：60(2分) 20/分 1607/分 300(5分)，注入温度：220，検出器

温度：300，ガス流量：定流量 2.3mL/分(60)，注入量：3.0µL，注入方法：スプリットレス

GC-ECD：HEWLETT PACKARD 5890 SERIES，カラム：RESTEK Rtx-50(0.25mm i.d.×30m，膜厚-0.1µm)，カラム温度：100(1.5分) 20/分 1707/分 280(10分)，注入温度：230，検出器温度：300，ガス流量：定流量 40cm/秒(100)，注入量：2.0µL，注入方法：スプリットレス

2) 確認試験(GC/MS)

GC：島津 GC17A，カラム：DB-5MS(0.25mm×30m，0.25µm)，カラム温度：100(2分) 10/分 280(10分)，注入温度：250，注入量：2.0µL，ガス流量：He 1mL/min，パージオンタイム：2min

MS：日本電子 Automass system，インターフェース温度：250，イオン源温度：250，イオン化電圧：70eV，イオン化電流：300µA

3. 検体

1) 添加回収用検体

市販の茶葉(煎茶)を用いた。

2) 残留実態調査用検体

平成15年2月から3月に福岡市内で市販された国産番茶1検体，煎茶6検体，玉露1検体，台湾産煎茶1検体を用いた。

結果及び考察

1. 抽出方法

茶葉10gを300mL遠沈管に採り，アセトニトリル70mLを加え，一夜放置後10分間振とうし，200mL分液ロートに5Aろ紙でろ過し，残渣をアセトニトリル10mLで3回洗い込み，アセトニトリルを合わせ濃縮乾燥後，6%エーテル-ヘキサン10mLに溶解し抽出液とした。

2. 精製方法

1)で得られた抽出液をGC-FPD，NPD，ECDで測定したが，何れも茶葉由来の妨害ピークの影響が大きく，更に精製を行う必要があった。

1) 有機リン系農薬

抽出液1mLを分取し，風乾後FPD用PEGアセトン溶液で1mLに定容し，GC-FPD用検液とし，有機リン系の13農薬を測定した。

しかし、Fig.1.(a)に示すように茶葉ではクロルピリホス付近に妨害ピークがあり、試料によっては定量が困難なものがあった。

そこで、抽出液 1mL を FLO カートリッジカラムに負荷して妨害の除去効果を試みた。20%アセトン/ヘキサン 20mL で溶出した場合、妨害ピークは除去できなかったが、15%アセトン/ヘキサン 20mL では Fig.1.(b)に示すように妨害ピークは除去された。しかし、測定対象の 13 農薬のうち、メタミドホス、トリクロロホン、アセフェートの 3 農薬は回収されなかった。

したがって、抽出液で 13 農薬を測定し、クロルピリホスの定量ができなかった場合のみ、抽出液 1mL をあらかじめ 15%アセトン/ヘキサン 10mL で調整した FLO カートリッジカラムに負荷し、15%アセトン/ヘキサン 20mL で溶出、濃縮・乾固し、FPD 用 PEG アセトン溶液で 1mL に定容しクロルピリホスを測定することにした。

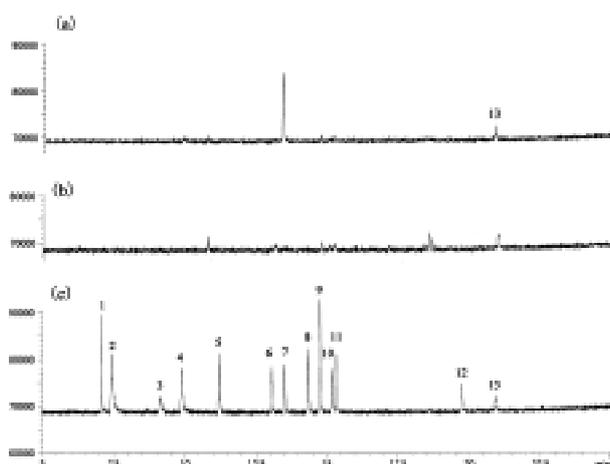


Fig.1 Gas chromatograms of (a)tea extract ,(b)tea extract , cleaned up by FLO cartridge column and (c)GC-FPD standard mixture(0.01mg/L)

2) 有機窒素系農薬

柴田らの報告⁵⁾に準じて抽出液の精製は Envi-Carb/NH₂カートリッジカラムにより行うことにしたが、茶葉の場合、乾燥して水分が除去され、茶葉の成分が濃縮された状態になっているため、カラムへの負荷量を少なくする必要があった。

そこでまず、タンニンを除去するために 1.のろ紙 5A でのろ過後のアセトニトリル溶液に硫酸第一鉄 1g を加え、50℃水浴中に 3 時間放置後、0.45 μm ディスパーザブルフィルターでろ過し、濃縮・乾固後 6%エーテル-ヘキサン 10mL に溶解した。うち 1mL を分取し、20%

アセトン/ヘキサン 10mL で調整した FLO カートリッジカラムに負荷し、20%アセトン/ヘキサン 20mL で溶出後、濃縮・乾固し、25%トルエン/アセトニトリル 1mL で溶解した。これをあらかじめ 25%トルエン/アセトニトリル 20mL で調整した Envi-Carb/NH₂カートリッジカラムに負荷し、25%トルエン/アセトニトリル 20mL で溶出し、濃縮・乾固後アセトン 1mL に溶解し、精製溶液とした。

精製溶液の 0.8mL を分取し、風乾後、NPD 用 PEG-アセトン溶液で 0.8mL に定容し、GC-NPD 用検液とした。

Fig.2 に茶葉、GC-NPD 用混合標準溶液 A(0.05 ~ 0.1mg/L) 及び GC-NPD 用混合標準溶液 B(0.1 ~ 0.2mg/L)の GC クロマトグラムを示す。

保持時間 15 分近くに成分由来の大きなピークがあるが、測定対象の 16 農薬の定量の妨害にはならなかった。

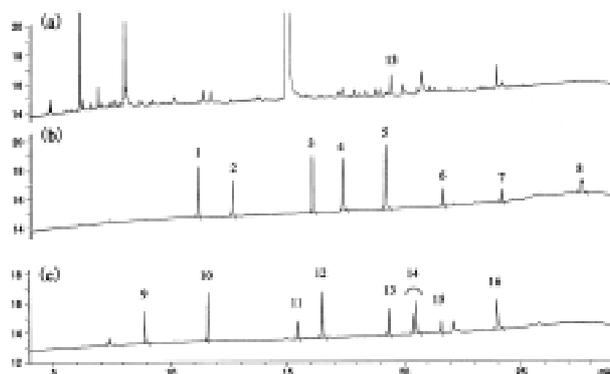


Fig.2 Gas chromatograms of (a)tea extract ,(b)GC-NPD standard mixture A(0.05 ~ 0.1mg/L) and (c)GC-NPD standard mixture B(0.1 ~ 0.2mg/L)

3) 有機塩素系及びピレスロイド系農薬

精製溶液の残りの 0.2mL をあらかじめ 15%エーテル/ヘキサン 10mL で調整した FLO カートリッジカラムに負荷し、15%エーテル/ヘキサン 20mL で溶出し第 1 画分とし、更に 10%アセトン/ヘキサン 20mL で溶出して第 2 画分とした。各画分を濃縮・乾固し、ECD 用 PEG-ヘキサン溶液で 1mL に定容し、GC-ECD 用検液とした。

Fig.3 に茶葉の画分 1、画分 2、GC-ECD 用混合標準溶液 A(0.002 ~ 0.02mg/L)及び GC-ECD 用混合標準溶液 B(0.002 ~ 0.01mg/L)の GC クロマトグラムを示す。

Fig.3 の画分 1 及び 2 の保持時間 11 分及び 17.4 分近くのピークはフタル酸エステルで Sep-Pak からの溶出が大きく、エンドリン、フェンプロパトリンはその妨害を受けたため、今回添加した 0.05ppm レベルではフェンプロパトリンは測定できなかった。

第 1、第 2 画分ともに GC-FPD や NPD のクロマトグラムに比べ妨害ピークが多く、本法は GC-ECD の精製が不十分であるため、精製法、検査法を見直す必要があ

ると考えている。

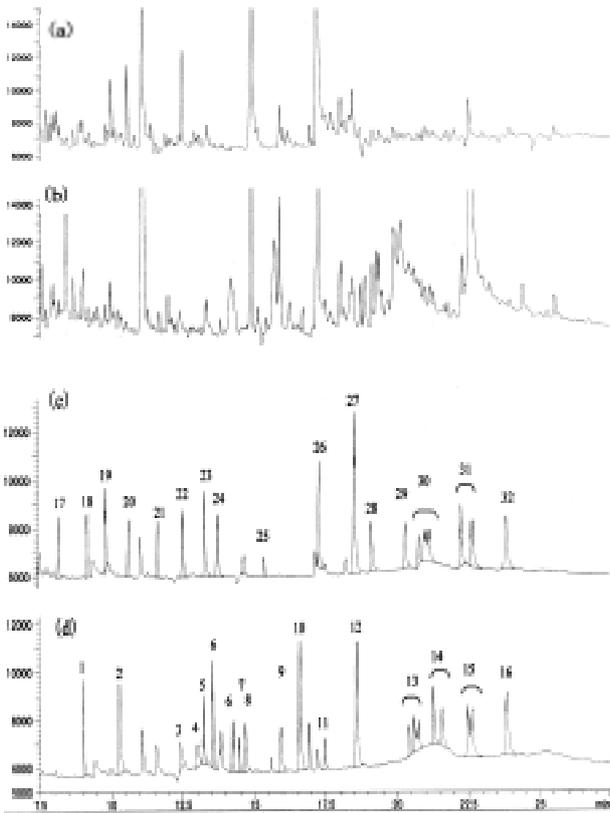


Fig.3 Gas chromatograms of (a)tea extract fract.1 , (b)tea extract fract.2 , (c)GC-ECD standard mixture B(0.002 ~ 0.01mg/L) and (d)GC-ECD standard mixture A (0.002 ~ 0.02mg/L)

3. 農産物での妨害ピークの有無と回収率

1)有機リン系農薬

茶葉 10g に FPD 用混合標準溶液 0.1mL を添加して、回収率を求めると共に妨害ピークの有無を確認した。

Table 1 に各農薬の回収率(n=3)を示した。

Table 1 Recoveries of 13 Organophosphorus Pesticides spiked into Leaf of Tea (n=3)

No.	Pesticides	Spiking level (μg/g)	Recovery (%)
1	Dichlorvos	0.01	67
2	Methamidophos	0.01	50
3	Trichlorfon	0.01	73
4	Acephate	0.01	61
5	Diazinon	0.01	81
6	Pirimiphos-methyl	0.01	87
7	Chlorpyrifos	0.01	85
8	Parathion-methyl	0.01	85
9	Fenitrothion	0.01	88
10	Prothiofos	0.01	90
11	Parathion	0.01	79
12	Pyraclufos	0.01	90
13	EPN	0.01	86

極性の高いアセフェート、メタミドホスの回収率はそれぞれ 50%、61%で低かった。これは茶葉中の水分に両農薬がつかまってアセトニトリルに抽出されにくかったものと思われる。FLO カートリッジで精製が必要であったクロルピリホスをはじめ、その他の 11 農薬の回収率は 67 ~ 90%で良好に回収された。

2) 有機窒素系農薬

茶葉 10g に NPD 用混合標準溶液 0.1mL を添加して、回収率を求めると共に妨害ピークの有無を確認した。

Table 2 に各農薬の回収率(n=3)を示した。

Table 2 Recoveries of 16 Organonitrogen Pesticides spiked into Leaf of Tea (n=3)

St. No.	Pesticides	Spiking level (μg/g)	Recovery (%)
1	Fenobucarb	0.05	104
2	Triflumizol metabolite	0.1	102
3	Dichlofluanid	0.1	86
A 4	Triflumizole	0.1	78
5	Miclobutanil	0.1	79
6	Etoxazol	0.1	109
7	Pyridaben	0.1	95
8	Difenoconazole	0.1	77
9	Iprodione metabolite	0.1	87
10	Trifluralin	0.1	80
11	Carbaryl	0.1	82
B 12	Tetraconazole	0.1	82
13	Chlorfenapyr	0.1	115
14	Propiconazole	0.1	91
15	Iprodione	0.2	88
16	Acetamiprid	0.1	0

アセタミプリドは FLO カートリッジカラムで精製する際に 20%アセトン/ヘキサンで溶出しなかったため、本法では回収しなかった。その他の 15 農薬は 80 ~ 115%と良好に回収した。

3)有機塩素系及びピレスロイド系農薬

茶葉 10g に ECD 用混合標準溶液 0.1mL を添加して、回収率を求めると共に妨害ピークの有無を確認した。

Table 3 に各農薬の回収率(n=3)を示した。

op⁻-DDT 及び pp⁻-DDT は標準液での分解率が試験用液での分解率より大きいため、pp⁻-DDE は妨害ピークの影響を受けて回収率が見かけ上大きくなったものと思われる。

逆にジコホール、エンドリン、op⁻-DDE は妨害ピークの肩にかかったため回収率が見かけ上小さくなった。

ピラゾキシフェンは本法では回収率が安定しなかった。

その他の 25 農薬は 62 ~ 116%で良好に回収された。

先に述べた 7 農薬については定量又は定性に問題があるため、精製を検討する必要がある。

Table 3 Recoveries of 21 Organochloride and 11 Pyrethroid Pesticides spiked into Leaf of Tea (n=3)

St. No.	Pesticides	Spiking level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)		
			Fruct.1	Fruct.2	Total
1	-BHC	0.01	97	0	97
2	Chlorothalonil	0.01	0	69	69
3	PyrifenoX Z type	0.05	0	55	55
4	PyrifenoX E type	0.05	0	73	73
5	Captafol	0.1	0	73	73
6	Dieldrin	0.01	116	0	116
7	op`-DDT	0.01	291	0	291
A 8	pp`-DDD	0.01	111	0	111
9	Dicofol	0.05	62	0	62
10	Bifenthrin	0.05	87	0	87
11	Endrin	0.01	41	0	41
12	Acrinathrin	0.05	95	0	95
13	Cyfluthrin	0.05	62	0	62
14	Flucythrinate	0.05	65	0	65
15	Fluvalinate	0.05	84	0	84
16	Deltamethrin	0.05	78	0	78
17	-BHC	0.01	64	0	64
18	-BHC	0.01	87	0	87
19	-BHC	0.01	98	0	98
20	Aldrin	0.01	92	0	92
21	Dichlofluanid	0.01	14	53	67
22	op`-DDE	0.01	49	0	49
23	pp`-DDE	0.01	144	0	144
B 24	op`-DDD	0.01	92	0	92
25	pp`-DDT	0.01	169	0	169
26	Fenpropathrin	0.05	99	0	99
27	Cyhalothrin	0.05	112	0	112
28	Permethrin	0.05	116	0	116
29	Halfenprox	0.05	107	0	107
30	Cypermethrin	0.05	92	0	92
31	Fenvalerate	0.05	105	0	105
32	Tralomethrin	0.05	86	0	86

4. 市販茶葉中の農薬の残留実態調査

今回検討した検査法で市販の9検体の茶葉中の農薬の残留実態を調査した。

調査結果を Table 4 に示す。

Table 4 Result of Determination of Pesticides in Leaf of Tea

No.	Sample	Producing District	Detected Pesticids	Concentration (ppm)
1	Coarse tea	Yame	Chlorfenapyr	0.27
2	Green tea	Yame	Prothiophos	0.01
			Chlorfenapyr	0.78
			Fluvalinate	0.05
3	Green tea	Unknown	Chlorfenapyr	0.16
			Fenpropathrin	0.10
4	Green tea	Yame	Chlorfenapyr	0.06
5	Green tea	Unknown	Chlorpyrifos	0.03
			Chlorfenapyr	0.59
			Fenpropathrin	0.14
			Bifenthrin	0.04
6	Green tea	Yame	Chlorfenapyr	0.69
			Fenpropathrin	0.14
7	Green tea	Ureshino	Chlorfenapyr	0.05
8	High-quality green tea	Yame	Chlorfenapyr	0.09
9		Taiwan	Chlorpyrifos	0.01

検査した9検体の茶葉から6種類の農薬が検出された。検出した農薬はGC/MSで確認した。

最も多く検出されたのは、国産茶葉からは8検体全てからクロルフェナピルが0.05 ~ 0.78ppmの範囲で検出され、濃度も最も高かった。フェンプロパトリンは0.10 ~ 0.14ppmの範囲で3検体から検出された。その他にプロチオホスが2検体から0.01及び0.03ppm、クロルピリホスが0.03ppm、フルバリネートが0.04ppm、ピフエントリンが0.04ppmで各1検体から検出された。

台湾産茶葉からはクロルピリホスが0.01ppm検出された。

青果物と比べると検出率が非常に高いこと、検出農薬が複数のものが多いことが特徴的である。これは茶の製品が1生産者のものではなく、複数の生産者あるいは複数の生産地のものが混合されるために起こるものと推察された。また今回検出された農薬の濃度は茶の残留基準値と比較すると遙かに低濃度であった。

ま と め

今回、茶葉中の残留農薬が青果物や穀類・豆類で行った迅速分析法で測定できるか検討したが、有機リン系農薬はクロルピリホス付近の妨害を除去するためにFLOカートリッジカラムによる精製を行う必要があった。また有機窒素、有機塩素、ピレスロイド系農薬の場合はEnvi-Carb/NH₂カートリッジカラムで精製する前にFLOカートリッジカラムで精製し、しかもEnvi-Carb/NH₂カートリッジカラムへの負荷量を減らす必要があった。

それでもいくつかの有機塩素、ピレスロイド系農薬は妨害を受けるため、精製法を根本的に検討し直す必要があると考えている。

文 献

- 1) 厚生省告示第56号, (2001)
- 2) 厚生省告示第258号, (2001)
- 3) 厚生省告示第200号, (1993)
- 4) 上路雅子, 永山敏廣: 食品安全性セミナー3, 残留農薬, 中央法規出版, 東京, (2002)
- 5) 柴田吉有, 小山真由美, 佐藤ひとみ, 中尾和子, 津田麻弓, 園田正則, 田中文隆: 食衛誌, 39, 241 ~ 250, (1998)