

Application Note

島津アプリケーションノート No.2(食品)



Food

緑茶に残留している農薬の分析

岡村嘉之¹
Y.OKAMURA

山田恭子²
K.YAMADA

1.はじめに

“お茶”というと皆さんはどんな飲み物を想像されるでしょうか？日本人にとってはお茶といえば緑茶が一番に連想されるかもしれません。国や地域によっては紅茶やコーヒーが連想されるでしょう。

皆さんが楽しめる、どんなお茶も茶葉を洗ってから入れる方はいないと思います。ですから、お茶に農薬などのような有害物質が付着していたら？と不安になる方は多いです。

日本で栽培されている緑茶は、農家の方々の努力により非常に高品質です。

ですが害虫や病気に弱いため、茶葉を守るためには必要最低限の農薬散布は仕方が無いことであり、細心の注意の元で農薬が散布されています。

2.お茶中の残留農薬分析法

緑茶の残留農薬基準値は非常に厳しく、基準値は非常に多くの農薬に設定されています。残留農薬の分析には基準値が設定されている個々の農薬については個別試験法が示されていますが、食品中の残留農薬等ポジティブリスト制度施行後は一斉分析法が示され、約 300 農薬を一斉分析する方法が示されています。

この一斉分析試験法では分析装置として高速液体クロマトグラフ質量分析計(以下 LC-MS と略記)とガスクロマトグラフ質量分析(以下 GC-MS と略記)が用いられ、LC-MS は水に溶けやすく、熱に弱い農薬に用いられることが多く、GC-MS は熱に安定な農薬が対象になります。

残留農薬の分析では、試料の前処理が非常に重要です。食品はそのままの状態では LC-MS、GC-MS などの分析装置で検査できないからです。

分析対象の食品から検査対象となる農薬だけを溶液に溶かし、この溶液を分析します。この食品から農薬だけを取り出すことが前処理といわれる操作で、食品にはそれぞれの食品が持つ栄養成分などが多く含まれていて、前処理を行うと、農薬だけでなく栄養成分等も一緒に分析する溶液に移動します。栄養成分が多く移動した溶液から微量の農薬だけを検出するのは難しく、試験法に示された前処理には農薬だけを取り出す工夫が取り入れられています。それぞれの試験法では、農作物の種類毎に前処理方法が分か

れていて、穀物などの場合とか果実、野菜の場合というように細分化されています。

農薬個別の試験方法では茶だけの前処理方法が示されていて、多くの試験方法で茶葉から飲み物としての“お茶”にしてから処理を行う方法が示されています。「100℃の水 500mL に 5 分間放置」といった具合です。

ポジティブリスト制度の施行により、最も使用されることが多いと思われる一斉分析試験方法では、茶は乾燥食品という考え方で、野菜などの方法と比較して試料が 1/4 量となっていることと、試料に水を加え膨潤させる工程があることが違いです。乾燥食品は農薬の抽出効率を高めるため、水で膨潤させてから抽出操作に入ることが一般的です。

食品残留農薬分析で利用する試験方法は厚生労働省のホームページより閲覧することができます。

ポジティブリスト制度一斉分析法一例のフロー図を図1に示しました。この試験方法では得られる最終溶液の溶媒をアセトン/ヘキサン 1:1 溶液とすることで GC-MS で分析することができ、メタノールを用いることで LC-MS で分析することができます。この前処理方法では GC-MS で分析可能とされる農薬のうち約 300 農薬について作物中から取り出すことができることが確認されています。図 2 に 250 農薬標準溶液(0.5 μg/L) の GC-MS 分析による TIC クロマトグラムを示しました。表 1 に分析条件を示しました。

厚生労働省 URL

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/index.html>

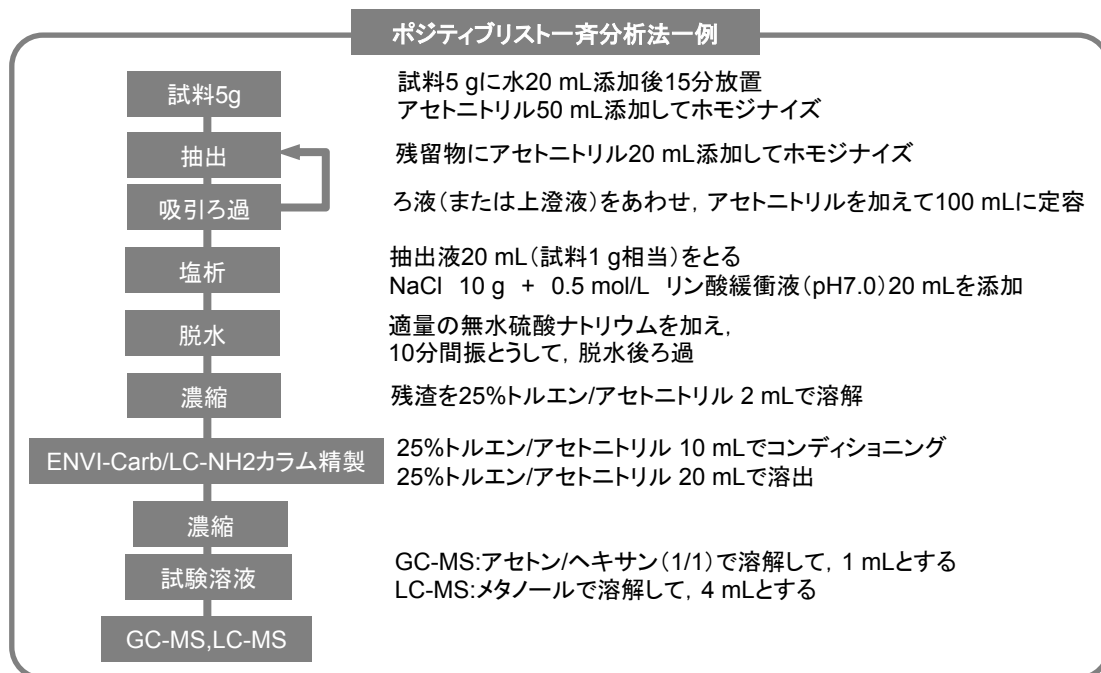


図1 ポジティブリスト一斉試験法フロー図

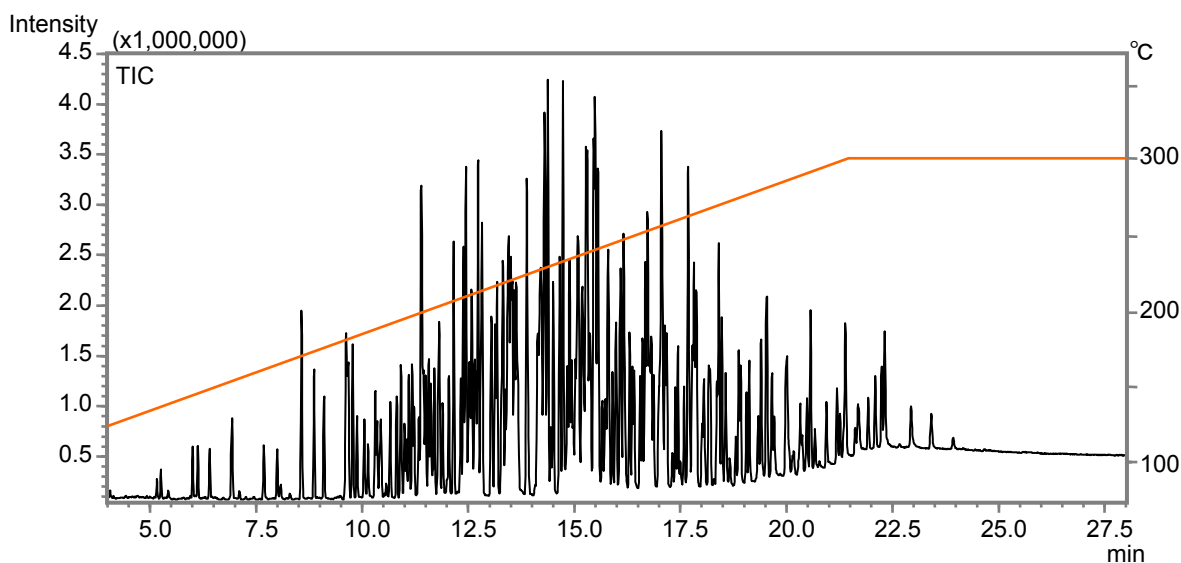


図2 GC-MSによる250農薬一斉分析結果

表1 GC-MS分析条件

GC-MS分析条件:島津製作所製GCMS-QP2010 Plus
 カラム:Rtx-5MS 30 m × 0.25 mmID, df=0.25 μm
 カラム温度:50 °C(1 min)→25 °C/min→125 °C→10 °C/min→300 °C(10 min)
 注入口温度:250 °C, 注入モード:高圧スプリットレス(250 kPa, 1.5 min), キャリアガス:He, 線速度一定モード(47.0 cm/sec)
 インタフェース温度:250 °C, イオン化法:EI, 測定方法:SCAN, 走査範囲:m/z 45~550, 注入量:1 μL

3.お茶の分析

市販の緑茶について GC-MS による農薬分析を行いました。ポジティブリスト制度 GC-MS 一斉分析法の前処理を行い、250 農薬について分析を行った結果、農薬は検出されませんでした。緑茶試料を測定した TIC クロマトグラムを図 3 に示しました。ここで、農薬が入っていたら本当に検出されるのか？ということを確認しました。実際に農薬が付着した、もしくは成長過程で農薬が取り込まれた試料を分析して確認することが理想ですが、そのような試料は入手できません。そこで、添加回収試験を行って確認しました。添加回収試験は試料のホモジナイズの段階で農薬の標準溶液を添加し、分析で添加した量が検出できるかどうかを確認する試験です。

この試験により回収率(%)を求め評価を行います。図 2 で TIC クロマトグラムを示した農薬混合標準品を緑茶試料に添加して、図 1 に示したポジティブリスト GC-MS 一斉分析法での添加回収試験を行いました。表 2 に回収率が 70%~120%と良好であった成分の結果を示しました。添加濃度は最終溶液が 100 μ g/L 溶液となるよう混合標準液を添加しました。

食品中の残留農薬分析で、前処理によって農薬だけを取り出すことは不可能です。その食品に含まれる栄養成分や色等も農薬と一緒に分析試料に移行します。図 3 に示したクロマトグラムでは農薬は検出され

なかったにも関わらず多くのピークが検出されました。保持時間 8~10 分にかけて溶出するカフェインは、含まれる量が多いためピーク幅が広くピーク強度が高く多くの農薬の検出を妨害します。カフェインは緑茶の他、紅茶やコーヒーなどでも多く含まれ、農薬と溶出挙動が類似するため前処理操作による除去が困難です。

図 4 にフロリジルカラムを用いたカフェイン低減の実施例を示しました。固相カートリッジの種類によってはカフェインは保持され、試料液から除くことができますが、カフェインと性質が似ている農薬も一緒にカートリッジに残ってしまいます。これらの農薬を取り出そうとすると、別途溶出操作が必要となってしまい、前処理の手間が多くなり、一つのお茶の分析で分析試料が 2 種類となって分析回数も増えてしまいます。簡略化されたカフェインの除去法の検討はお茶中の残留農薬分析において大きな課題と言えます。



GCMS-QP2010 Plusの外観

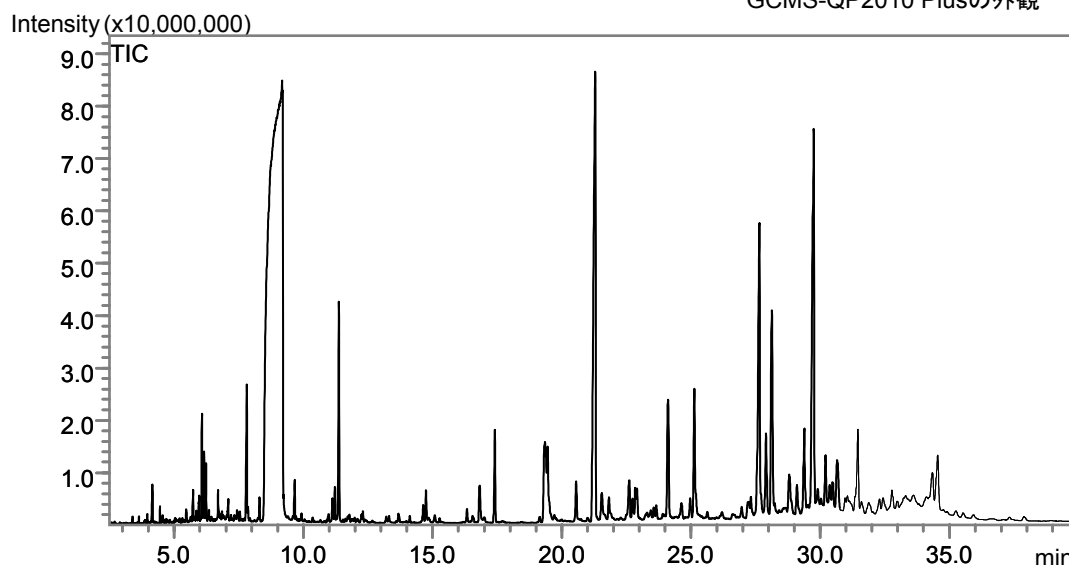


図3 お茶試料GC-MS測定クロマトグラム

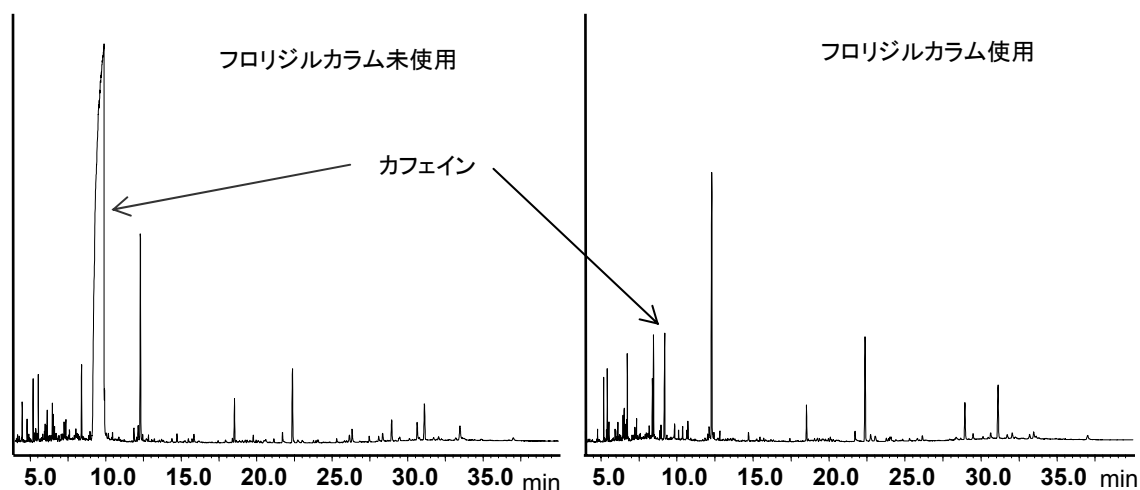


図4 フロリジルカラムによるカフェイン低減比較

表2 緑茶試料添加回収試験結果

成分名	回収率 (%)	成分名	回収率 (%)	成分名	回収率 (%)	成分名	回収率 (%)
EPTC	104	Vinclozolin	93	Fenamiphos	97	Thenylchlor	111
Mevinphos	86	Parathion-methyl	101	Flutolanil	114	Diflufenican	99
Etridiazole	102	Chlorpyrifos-methyl	98	Hexaconazole	113	Propaqrte	101
Chloroneb	97	Tolclofos-methyl	107	Imazalil	92	Piperonyl butoxide	102
XMC	106	Carbaryl	106	Isoprothiolane	105	Zoxamide	70
Fenobucarb	88	Alachlor	116	Profenofos	110	Mefenpyl-diethyl	101
Tecnazene	92	Heptachlor	75	Tribufos	114	Iprodione	114
Propoxur	93	Prometryn	100	Pretilachlor	109	Pyridaphenthion	110
Propachlor	100	Metalaxyl	86	Uniconazole P	102	Bifenthrin	105
Diphenylamine	103	Spiroxamin-2	89	p,p'-DDE	104	Bromopropylate	119
Ethoprophos	103	Terbutryn	114	Oxadiazon	113	Phosmet	93
Chloroprotham	103	Malathion	108	Dieldrin	86	EPN	92
Ethalfuralin	103	Thiobencarb	111	Oxyfluorfen	112	Tebufenpyrad	112
Trifluralin	113	Chlorpyrifos	109	Flamprop-methyl	82	Bifenox	112
Bendiocarb	92	Dithiofencarb	110	Myclobutanil	98	Anilofos	91
Benfluralin	111	Aldrin	92	Buprofezin	84	Phenothrin-2	102
Cadusafos	100	Metolachlor	95	Imibenconazole-debenzyl	70	Tetradifon	102
alpha-BHC	99	Fenpropimorph	98	Flusilazole	95	Phosalone	93
Hexachlorobenzene	96	Fenthion	104	Thifluzamide	106	Pyriproxyfen	96
Dicloran	103	(Z)-Dimethylvinphos	100	Bupirimate	88	Cyhalothrin-1	104
Dimethoate	90	Parathion	120	Kresoxim-methyl	101	Cyhalofop-butyl	100
Carbofuran	78	Triadimefon	110	Isoxathion	117	Mefenacet	90
Atrazine	72	Isofenphos oxon	111	Cyproconazole	92	Cyhalothrin-2	120
Propazine	79	Chlorthal-dimethyl	109	Chlorfenapyr	115	Fenarimol	95
beta-BHC	96	Nitrothal-isopropyl	106	Fenoxanil	115	Pvrazophos	105
gamma-BHC	96	Bromophos	98	Chlorobenzilate	106	Pyraclafos	90
Propetamphos	101	Fthalide	105	beta-Endosulfan	91	Fenoxaprop-ethyl	77
Terbufos	101	Diphenamid	91	Fensulfthion	94	Bitertanol-1	89
Cyanophos	111	Fosthiazate-2	99	(Z)-Pyrinobac-methyl	120	trans-Permethrin	109
Quintozene	110	E-Chlorfenvinphos	106	p,p'-DDD	107	Bitertanol-2	101
Pyroquilon	84	Dimethametryn	103	o,p'-DDT	104	cis-Permethrin	106
Pyrimethanil	93	Penconazole	100	Mepronil	106	Pyridaben	97
Diazinone	100	Heptachlor epoxide (A)	93	Fluacrypyrim	115	Cyfluthrin-1	93
Phosphamidon-1	73	Oxy-Chlordane	96	Triazophos	91	Cafenstrole	83
Prohydrojasmon-1	103	(Z)-Pyrifenoxy	102	Benalaxyl	99	Fenbuconazole	88
Tefluthrin	102	Heptachlor epoxide (B)	84	Edifenphos	87	Halfenprox	112
delta-BHC	103	alpha-Chlorfenvinphos	117	Quinoxifen	74	Flucythrinate-1	104
Triallate	109	Diclocymet-1	110	Propiconazole-1	104	Flucythrinate-2	99
Iprobenfos	111	Quinalphos	100	Trifloxystrobin	115	Fenvalerate-1	91
Pirimicarb	90	Phenthoate	102	Norflurazon	88	Fluvalinate-1	114
Benoxacor	107	Zoxamide deg.	106	Lenacil	90	Fenvalerate-2	108
Benfuresate	111	Procyimidone	100	Endosulfan sulfate	91	Fluvalinate-2	98
Dichlofenthion	96	trans-Chlordane	105	p,p'-DDT	109	Difenoconazole-1	87
Propanil	89	Methidathion	70	Propiconazole-2	95	Difenoconazole-2	88
Bromobutide	108	Diclocymet-2	105	(E)-Pyrinobac-methyl	103	Flumiclorac-pentyl	96
Spiroxamin-1	82	(E)-Pyrifenoxy	92	Tebuconazole	97	Tolfenpyrad	93
Acetochlor	102	Tetrachlorvinphos	105	Diclofop-methyl	115	Imibenconazole	91

4.GC-MSによるお茶中残留農薬のカフェイン除去検討

お茶中残留農薬の GC-MS による分析では多量のカフェインの存在は農薬検出を妨害するだけでなく、注入口インサートやカラムの汚染を引き起こします。また、カフェインに近い保持時間の農薬は保持時間の変動などを引き起こし、分析結果に影響を与える場合

があります。図 4 に示した固相カートリッジによる方法では手間がかかり、分析回数も増えてしまいます。ここではカフェインの物性による除去の方法を検討した結果をご報告します。

4.1 カフェイン除去検討内容

図 5 にカフェインの構造式を示しました。カフェインは極性溶媒に非常に高い溶解度を示すため、アセトンなどに多量に溶けます。また、溶液の温度が上がるとさらに多くの量が溶けます。

ポジティブリスト制度 GC-MS 一斉分析試験法では最終的にアセトンとヘキサン の 1:1 比率の溶液となります。アセトンは極性溶媒として知られ、ヘキサンは無極性溶媒として知られています。極性溶媒であるアセトンが溶液比率の半分となっていることから、この混合溶媒はカフェインを良く溶かす性質があると考えられます。そこで、アセトンを無くしてヘキサンだけを溶媒として使うこととしました。

さらに、溶液温度を下げることでカフェインが溶けに

くなくなると考え、分析する試料溶液を冷凍庫で冷却しました。冷凍庫で冷却する操作を以降「冷凍処理」としました。試料溶液を冷凍処理すると、析出物が溶液中を浮遊します(図 6)。この浮遊物を遠心分離により沈殿させ、上澄み液を分析することで、カフェイン除去の効果を高めました。この検討内容を緑茶試料にも適用して効果の確認を行いました。

検討した溶媒変更と冷凍処理の農薬回収率への影響を確認するため、ポジティブリスト GC-MS 一斉分析前処理を行った緑茶試料溶液に農薬を添加し、溶媒変更と冷凍処理を行い農薬回収率を求め影響を検討しました。

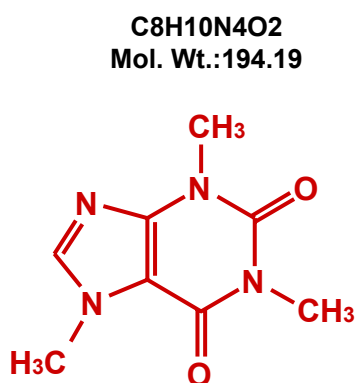


図5 カフェイン構造式

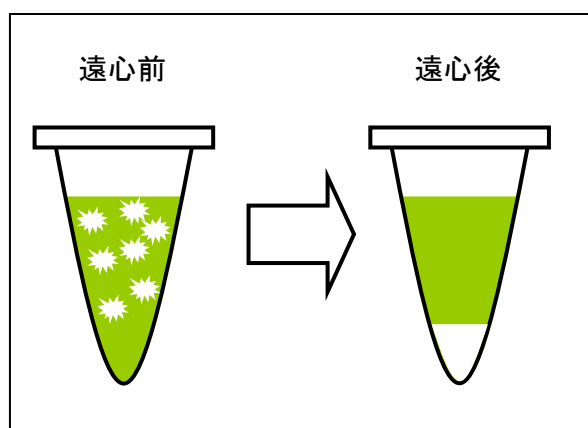


図6 遠心分離直前および直後のチップ内の様子(イメージ図)

4.2 カフェイン除去検討結果

カフェイン飽和ヘキサン溶液を調製し、冷凍処理によるカフェイン除去の効果を確認したクロマトグラムを図7に、カフェインピークの面積値比較を表3に示しま

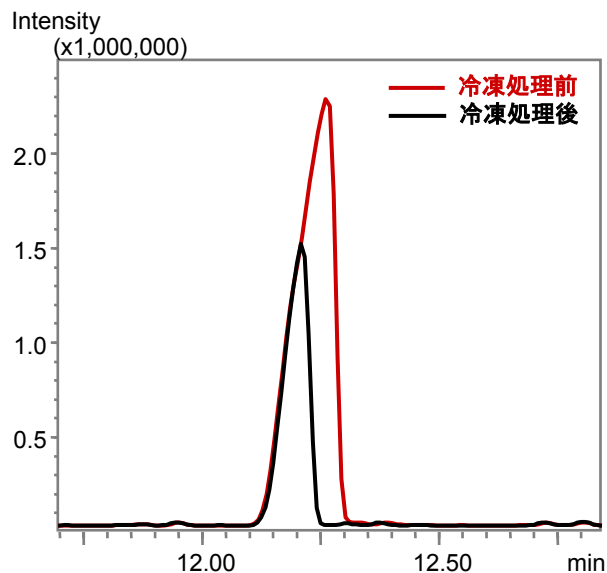


図7 冷凍処理効果

した。冷凍処理により、カフェインを 63.5%減少させることができました。

表3 冷凍処理前後カフェイン面積値比較

冷凍処理前	冷凍処理後	減少率(%)
5209488	1906330	63.5

冷凍処理を行うと、溶液中に浮遊物が析出します。この浮遊物を除くには遠心分離が有効と考えました。遠心分離を行う時間は長いほど良いと考えますが、遠心分離時間が長くなると液温が上昇してしまい、冷凍処理の効果が薄れてしまいます。冷凍処理後の析出物を沈殿させる際の遠心分離時間について検討した結果を図8に示しました。遠心分離では、回転数の

上昇と遠心分離を行うために最低 1 分は必要で、遠心分離時間の増大と共にカフェイン面積値も増大し、3 分以降は一定となります。3 分で冷凍処理の効果がなくなってしまうと考えられます。この結果から、遠心分離の時間は、最低限必要であると考えられる 1 分間としました。

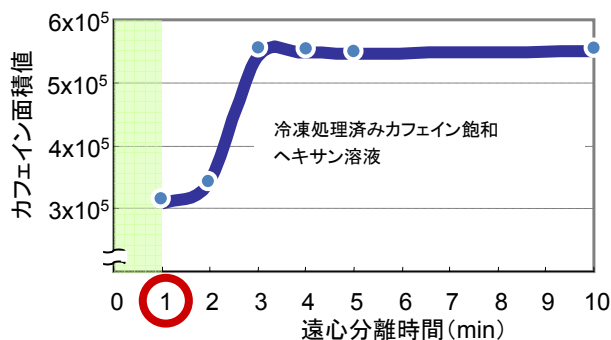


図8 遠心分離時間検討結果

4.3 カフェイン除去操作実試料への適用

検討したカフェイン除去処理をお茶試料に適用しました。市販の緑茶をポジティブリスト制度 GC-MS 一斉分析法に従って処理を行い、得られた最終溶液をヘキサンで溶媒置換し、冷凍処理(-20℃)、遠心分離(1分間)を行い、得られた上澄み液を GC-MS にて測定しました。図 9 にポジティブリスト一斉分析+カフェイン除去のフローチャートを示しました。

図 10 に冷凍処理等によるカフェイン除去処理前後の TIC クロマトグラムを示しました。除去処理前はカフェインピークがカラム負荷量を超えてブロードなピークとして検出されましたが、除去後はカラム負荷量範囲内でシャープなピークとなり多くのカフェインが除去できていることが確認できました。カフェイン除去操作の

安定性に関して、カフェイン除去操作後のカフェイン面積値の再現性を表 4 に示しました。冷凍処理によるカフェイン除去は良好な再現性で安定して行うことができると考えられます。

溶媒置換と冷凍処理によって、カフェインの除去が確認できましたが、検査対象の農薬は非常に多くの種類があり、性質も様々です。農薬によってはカフェインと一緒に除去されてしまうかもしれません。そこで、検討したカフェイン除去操作を対象として添加回収試験を行いました。ポジティブリスト一斉分析方法で処理した試験溶液に農薬混合標準品を添加し、この溶液についてカフェイン除去操作を行い、農薬の回収率を求めました。

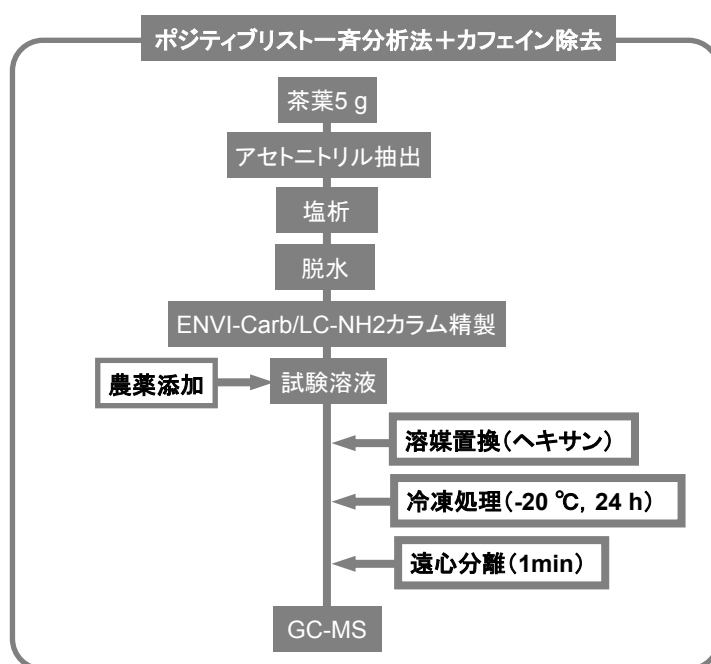


図9 ポジティブリスト一斉試験法+カフェイン除去フロー図

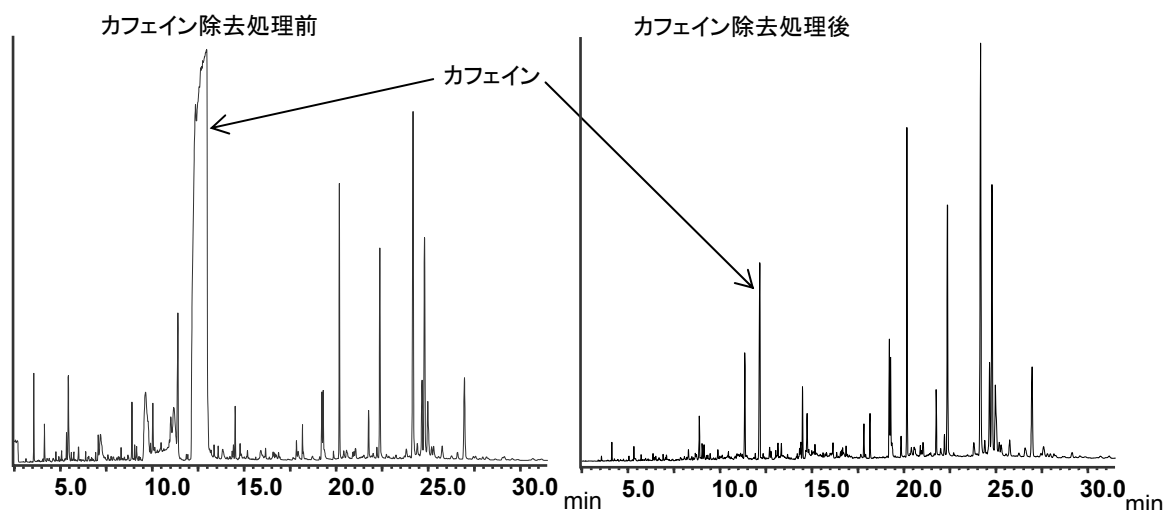


図10 冷凍処理カフェイン除去効果

表4 カフェイン除去効果再現性

	1	2	3	平均値	CV%
カフェイン面積値	4963206	5010227	4996268	4989900	0.48

図 11 にカフェイン除去処理での農薬添加回収試験結果を示しました。回収率は概ね良好な結果を得ることができ、ヘキサン転溶や冷凍処理により農薬が大きく除去されることが無いことが確認できました。

カフェイン除去処理ではカフェインピークだけでなく、その他の夾雑成分も除かれました。夾雑成分が除かれることにより、農薬成分のピーク形状への悪影響が軽減され、ピーク検出が改善されました。図 12 にピーク

検出が改善された例を示しました。

Mevinphos, Fosthiazate ではピーク手前のピークが無くなりピークが明確になりました。Propoxur では $m/z=152$ は $m/z=110$ とピーク形状が大きく異なりましたが、冷凍処理により改善されました。Carbofuran では他の成分ピークが重複していましたが、Carbofuran のみのピークとなりました。

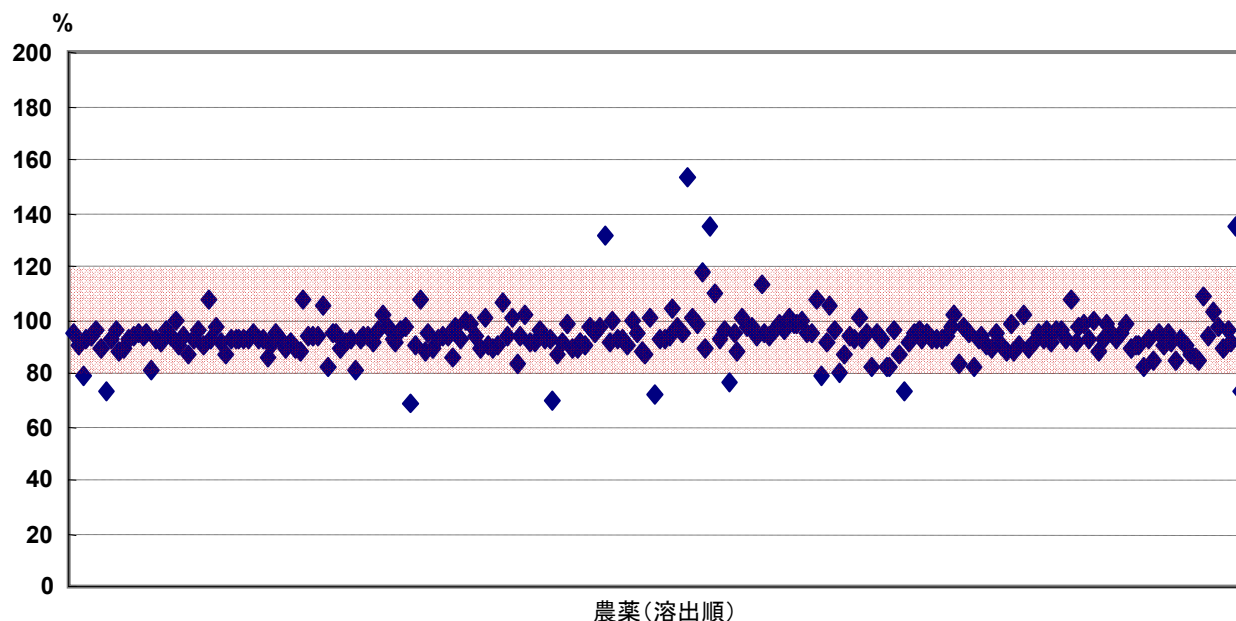


図11 カフェイン除去処理での農薬添加回収試験結果

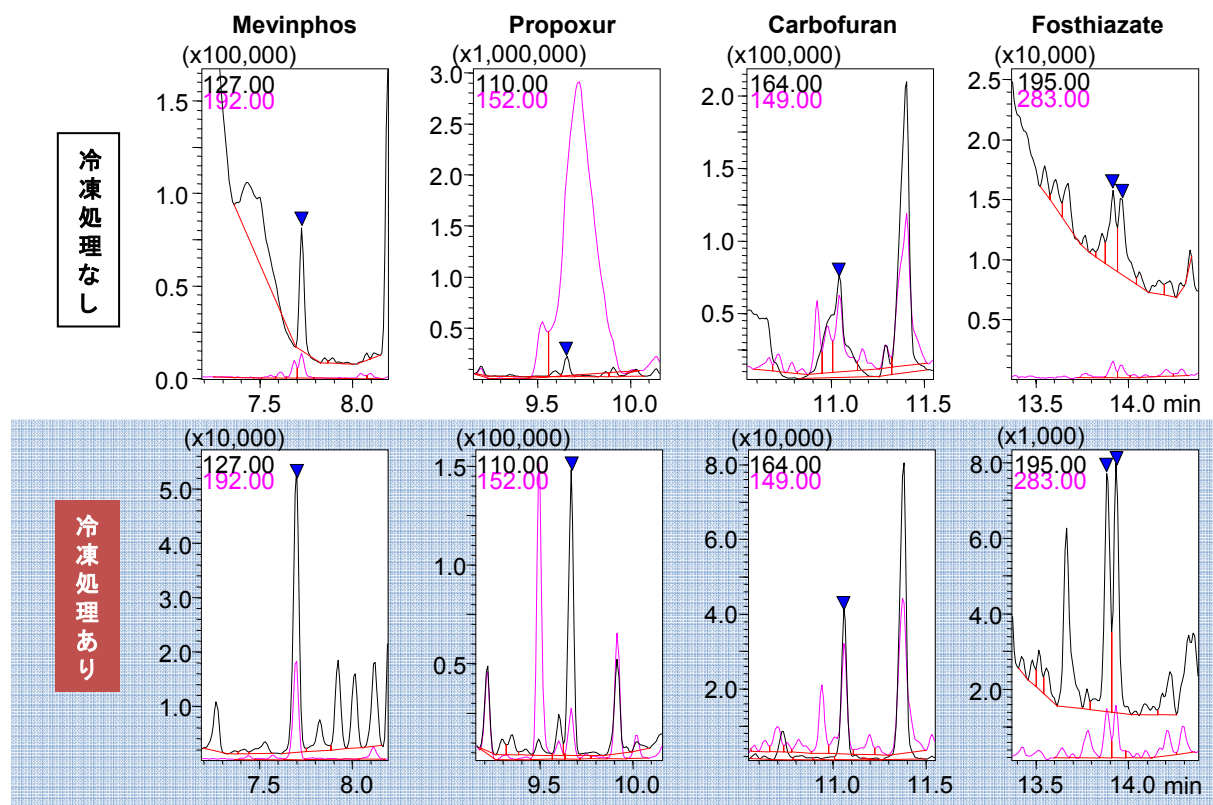


図12 カフェイン除去処理による効果の一例 (緑茶 0.1 ppm)

5.まとめ

今回のテクニカルレポートではお茶の残留農薬分析に注目し、ポジティブリスト GC-MS 一斉分析法によるお茶中残留農薬分析例をご紹介しました。ポジティブリスト GC-MS 一斉分析法においても、お茶中残留農薬分析は良好な結果を得ることができますが、お茶試料前処理溶液で多く残留するカフェインは、GC-MS による農薬分析において注入口やカラムの汚染や保

持時間変動の要因となったり、ピーク検出にも影響を与えます。このカフェインを除去する方法として、カフェインの物性を利用した溶媒変更と冷凍処理を行なうことで、効率よくカフェインを低減することができました。また、この除去処理による農薬回収率は良好で農薬を大きくロスすることなくカフェインを除去する方法を提案することができました。

* 本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 2009年7月