

## 茶葉中の *N*-メチルカルバメート系農薬の分析

青柳陽子\*, 佐藤寛\*, 山田洋子\*, 天川映子\*,  
安田和男\*\*, 永山敏廣\*

### Determination of *N*-methylcarbamate pesticides in green tea leaves

Yoko AOYAGI\*, Hiroshi SATO\*, Yoko YAMADA\*, Eiko AMAKAWA\*,  
Kazuo YASUDA\*\* and Toshihiro NAGAYAMA\*

**Keywords** : *N*-メチルカルバメート系農薬 *N*-methylcarbamate pesticides, アセトニトリル抽出 extraction with acetonitrile, 茶葉 green tea leaves, 浸出液 infusion, ミニカラム mini column, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

### はじめに

近年、茶葉はその有効成分による抗酸化作用が注目されている。このため飲用のみならず食べるお茶としても市場に出回っている。一方、消費者の食品中残留農薬への関心は高く、高濃度に残留しているのではないかとの懸念が指摘されている。しかし、茶葉中の残留農薬に関するデータ<sup>1-3)</sup>は極めて少ないのが実状である。また、多摩地区は茶の産地を控えており、地場産農産物の安全性を確保する上でも、茶葉中の農薬について残留実態を把握することが重要である。分析法については厚生労働省からの通知法(公定法)<sup>4-5)</sup>では茶を抹茶と抹茶以外に分け、抹茶以外はほとんどの試験法で浸出液を分析することになっている。しかし茶の残留農薬の実態を把握するためには茶葉を、また摂取の面からは浸出液とこれら両方を調べる必要がある。そこで茶葉及びその浸出液に関して、簡便な多成分一斉分析法を検討することにした。今回は *N*-メチルカルバメート系農薬(以下 NMC とする)について報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

平成 16 年 4 月～12 月の間に当所広域監視課より搬入された煎茶 5 試料(静岡県産 3, 福岡県産 1, 東京都多摩地区産 1)及び東京都内の小売店で購入した煎茶 1 試料(三重県産)計 6 試料を用いた。

#### 2. 測定対象農薬

NMC としてカルボフラン、イソプロカルブ、カルバリ

ル、メチオカルブ、アルジカルブ、ベンダイオカルブ、エチオフェンカルブ、フェノブカルブ及びピリミカーブの 9 農薬を対象とした。

#### 3. 試薬及び試液

1) 標準品 和光純薬工業(株)製、関東化学(株)製、または林純薬(株)製の残留農薬試験用標準品を用いた。

2) 標準原液 標準品をそれぞれ精秤し、GC/MS 用にはアセトン/*n*-ヘキサン(1:1)、HPLC 用にはアセトニトリルを加えて溶解し、1,000 µg/ml に調製した。

3) 混合標準溶液 GC/MS 用は標準原液を適宜混合した後アセトン/*n*-ヘキサン(1:1)で希釈して調製した。HPLC 用は A,B の 2 グループに分け、A はカルボフラン、イソプロカルブ、カルバリル、メチオカルブ、B はアルジカルブ、ベンダイオカルブ、エチオフェンカルブ、フェノブカルブの各標準原液を混合し、アセトニトリルで希釈して調製した。

4) HPLC 用ピリミカーブ標準溶液 ピリミカーブ標準原液をアセトニトリルで希釈し調製した。

5) アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン及び無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 残留農薬分析用を用いた。

6) ミニカラム C18 カートリッジ : C18 cartridge Sep pac Vac 6 cc (1 g) 及びシリカゲルカートリッジ : Silica cartridge Sep pak Vac 12 cc (2 g)、いずれもウォーターズ社製を用いた。

7) セルロース末 カラム用フナセル II フナコシ(株)

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

\*\* 東京都健康安全研究センター食品化学部 160-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\*\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

#### 4. 装置及び測定条件

1) GC/MS Finnigan MAT 社製 TRACKER, カラム: HP-5 MS 0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚: 0.1 μm, カラム温度: 40°C (2 min) → 10°C/min → 280°C (4 min) → 10°C/min → 290°C (2 min), 注入口温度: 250°C, インターフェース温度: 260°C, イオン源温度: 250°C

2) HPLC 島津製作所製 LC10 カルバメート分析システム, カラム: Showdex CARB-413 (4.6 mm i.d. × 150 mm), ラインフィルター: Showdex RSpac CARB-LF (4.6 mm i.d. × 10 mm), 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 50°C, 移動相: アセトニトリル/水 (37 : 63), 検出器: カルボフラン等 8 種 Ex 340 nm, Em 445 nm, ピリミカーブ Ex 312 nm, Em 382 nm, 加水分解液: 0.05 mol/L 水酸化ナトリウム溶液, 流速: 0.4 mL/min, 発蛍光液: 0.1% メルカプトエタノール含有 0.05 % *o*-フタルアルデヒド溶液, 流速: 0.4 mL/min, 反応温度: 100°C

#### 5. 試験溶液の調製

1) 茶葉 試料 5 g をホモジナイザーカップに秤取し, 水 20 mL を加え, 1 時間膨潤した。これにアセトニトリル 100 mL を加え, 3 分間ホモジナイズ後, NaCl 10 g を加え再びホモジナイズした。得られた有機層を冷却遠心分離 (5°C, 3,000 rpm, 5 分) し, 上澄液約 30 mL をあらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした C18 ミニカラムに負荷し, はじめの 3 mL を捨て, 溶出液を得た。溶出液に無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g を加え, 約 1 分間手で激しく振った後 15 分間放置して脱水した。得られた上澄液 20 mL を取り 40°C 以下で減圧濃縮した後, 窒素気流により乾固した。残留物にアセトン/*n*-ヘキサン (15:85) 3 mL を加え超音波を約 10 秒かけ溶解した後, 上部に無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g を積層し, あらかじめアセトン/*n*-ヘキサン (1:1) 10 mL, 同 (15:85) 20 mL で順次コンディショニングしたシリカゲルミニカラムに負荷した。NMC の溶出を促進するためにカラム上部の無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を細いガラス棒でかき混ぜながら再度残留物にアセトン/*n*-ヘキサン (15:85) 3 mL を加え, 同操作を 3 回繰り返した後, アセトン/*n*-ヘキサン (15:85) 45 mL で溶出した。溶出液を突沸に注意しつつ約 35°C で減圧濃縮した。室温まで冷却後, 残留物をアセトン/*n*-ヘキサン (1:1) 1 mL に溶解し試験溶液とした。これより 0.2 mL を取り, 通風乾固後, アセトニトリルに溶解して HPLC 用試験溶液とした。残りは GC/MS 用試験溶液とした。

2) 浸出液 試料 5 g に沸騰水を 300 mL 加え 5 分放置後, あらかじめろ紙上にセルロース末を約 1 cm の厚さに敷いた桐山ルートで直ちに吸引ろ過し, ろ液を冷却した。得られた浸出液 100 mL をホモジナイザーカップにとり消泡剤 1 滴とアセトニトリル 100 mL を加え 5 分間攪拌した後, NaCl 30 g を加え再度攪拌した。得られた有機層を冷却遠心分離 (5°C, 3,000 rpm, 5 分) し, 上澄液を茶葉同様アセトニトリル 10 mL でコンディショニングした C18 ミニカラムに負荷し溶出液を得た。溶出液を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により脱水後,

溶出液 60 mL をとり 40°C 以下で減圧濃縮し, 窒素気流により乾固した。以下茶葉同様にシリカゲルミニカラムで精製し試験溶液を得た。

#### 6. 添加回収試験

茶葉 5 g に対し各農薬が 5 μg となるように添加し, 本法に従い操作した。試験は茶葉と浸出液それぞれについて実施した。

### 結果及び考察

#### 1. 試料前処理法の検討

1) 抽出法の検討 公定法では抹茶以外の茶の NMC を分析する場合, 熱湯で抽出した浸出液について試験を行うが, この方法では水に溶けにくい農薬の残留実態が把握できない。このため茶葉からの直接抽出法と, 浸出液からの抽出法を併せて検討することにした。抽出溶媒は広範囲の物質を溶解し, 塩析により水相と分離することが可能であるアセトニトリル<sup>6)</sup>を使用することにした。

2) 試験溶液の精製 公定法は浸出液の場合, タンニン等の影響によるエマルジョンの形成を防ぐために酢酸鉛を用いている。一方, 環境への負荷の大きい酢酸鉛の使用を避けるために, 種々のミニカラムでの精製が検討<sup>7-12)</sup>されている。今回大藤ら<sup>9)</sup>が有機リン系等農薬の分析の際, 茶の浸出液の精製に用いた C18 及びシリカゲルのミニカラム 2 種の併用を試みた。標準溶液をシリカゲルミニカラムに負荷し, 回収した結果を表 1 に示した。回収率は 81.3-107%, CV は 1.7-4.7% で, アセトン/*n*-ヘキサン (15:85) 45 mL で十分回収できることがわかった。そこで 2 種のミニカラムを実試料に適用したところ, エマルジョンの形成もなく, 分析することが出来た。また HPLC 及び GC/MS いずれの場合もクロマトグラム上に妨害となるピークはなかった。

表 1. シリカゲルミニカラムにおける NMC の回収率

	n=3	
	回収率 (%)	CV (%)
carbofuran	105	2.8
isoprocarb	100	4.2
carbaryl	107	1.9
methiocarb	105	1.9
pirimicarb	95.5	1.7
aldicarb	83.1	2.1
bendiocarb	96.2	3.9
ethiofencarb	81.3	4.7
fenobucarb	95.1	3.3

#### 2. 添加回収試験

結果を表 2 に示した。なお HPLC で 9 種の標準品は若干ピークが近接しているため, 2 グループに分けて行った。茶葉における回収率は HPLC では 78.8-109% (CV: 0.3-21.7), GC/MS では 77.7-109% (CV: 1.6-13.3%) であった。

表2. 茶葉及び浸出液における添加回収率

	茶葉				浸出液			
	HPLC		GC/MS		HPLC		GC/MS	
	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
carbofuran	109	10.8	109	6.9	86.2	6.8	94.8	12.5
isoprocarb	92.9	4.8	101	12.2	96.0	4.0	116	8.5
carbaryl	103	9.7	102	4.3	80.3	6.8	86.2	9.2
methiocarb	78.8	8.6	78.8	6.1	88.5	2.9	103	10.6
pirimicarb	106	12.3	103	13.3	95.4	7.9	75.8	4.8
aldicarb	95.1	0.3	83.4	2.3	64.6	2.7	54.8	1.4
bendiocarb	83.4	4.0	77.7	8.1	111	1.5	91.7	1.8
ethiofencarb	83.0	21.7	100	6.2	93.5	3.9	89.7	1.0
fenobucarb	98.5	4.1	92.5	1.6	111	4.0	100	4.0

浸出液の場合はHPLCでは64.6-111% (CV : 1.5-7.9%), GC/MSでは54.8-116% (CV:1.0-12.5%)であり, 2法とも概ね良好な結果であった. 茶葉についてはあまり差が見られなかったが, 浸出液においてはいずれのNMCについてもHPLCは回収率が60%以上であり, CVが10%以下であることからGC/MSに比べて精度が高いことがわかった. 以上の結果から茶葉中のNMCは茶葉あるいは浸出液いずれもGC/MSとHPLCを併用して行い, 定量値はHPLCにより求めることとした.

図1に茶葉に標準品を添加した時のBグループ4種の農薬のHPLCクロマトグラムを示した.

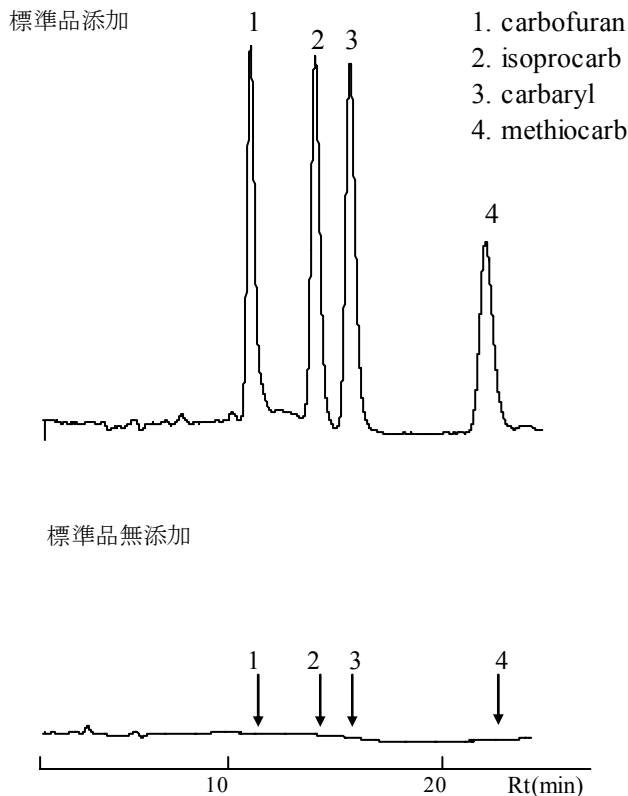


図1. 茶葉のHPLCクロマトグラム

### 3. 検出限界

本法における検出限界は茶葉及び浸出液について, いずれの場合も茶葉中濃度として0.05 µg/gであった.

### 4. 実試料への適用

6試料について本法を用い分析した結果, NMCはいずれの試料からも検出されなかった.

### まとめ

茶葉及び浸出液のNMC9種の分析法を検討したところ

1. アセトニトリルで抽出後, C18とシリカゲルの2種のミニカラムを用い精製した結果, GC/MS及びHPLCにおいていずれも妨害がなく良好なクロマトグラムが得られた.
2. 本法における添加回収率は茶葉ではHPLC 56.1-98.5% (CV : 4.0-21.7%), GC/MS 51.3-101% (CV : 1.6-17.0%), 浸出液ではHPLC 64.4-111% (CV : 1.5-7.9%), GC/MS 54.8-116% (CV : 1.0-12.5%)であった. 定量値はHPLCで求めることとし, GC/MSを併用することにより高精度に測定できた.
3. 本法により煎茶6試料を分析した結果, いずれの試料においても, 茶葉及び浸出液中にNMCは検出されなかった.

以上の結果より, 本法は茶葉及び浸出液中のNMCの分析に使用できると考える.

### 文献

- 1) 茶谷祐行, 八島哲, 棟久美佐子, 他: 京都府保環研年報, **44**, 54-57, 1999.
- 2) 八島哲, 茶谷祐行, 棟久美佐子, 他: 京都府保環研年報, **45**, 72-75, 2000.
- 3) 小川隆男, 茶谷祐行, 丸山美奈子, 他: 京都府保環研年報, **46**, 78-81, 2001.
- 4) 厚生省告示第199号, 食品, 添加物等の規格基準の一部改正について, 平成6年6月9日.
- 5) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 残留農薬編,

- 163-173, 2003, 日本食品衛生協会, 東京.
- 6) 青柳陽子, 佐藤寛, 天川映子, 他: 東京衛研年報, **52**, 92-96, 2001.
- 7) 丸山美奈子, 黒崎裕人, 富永泰子, 他: 第 28 回衛生化学技術協議会年会講演集, 32-33, 1991.
- 8) 上村慎子, 高橋真, 内野美乃里, 他: 静岡県環境衛生科学研究所報告, **40**, 35-38, 1997.
- 9) 大藤升美, 茶谷祐行, 北野隆一, 他: 京都府保環研年報, **43**, 16-19, 1998.
- 10) 新宅隆志, 原弘幸, 苗床義孝, 他: 農林水産消費技術センター調査研究報告, **23**, 93-103, 1999.
- 11) 西田政司, 畑野和弘: 福岡市保環研年報, **28**, 160-164, 2003.
- 12) 長南隆夫: 食衛誌, **42**, 249-251, 2001.