

短 報

茶浸出液中の残留農薬分析における酢酸鉛処理の効用

小野田恭久, 今村 昌子

静岡県茶業試験場
(昭和54年7月21日受理)Utility of Basic Lead Acetate Treatment for Analysis of
Pesticides Residues in Tea Infusion

Yasuhisa ONODA and Masako IMAMURA

Shizuoka Tea Experiment Station, Kikugawa, Shizuoka 439, Japan

The procedures on the residual analysis of pesticides, DMTP (methidathion), isoxathion, methomyl, PAP (phenthoate), phosalone and TPN (chlorothalonil) were simplified by some modifications. Basic lead acetate solutions added to tea infusion to precipitate polyphenols and saponins as lead complexes. These lead complexes were filtered through a filter paper piled with some celite, and washed with 50 ml of acetone and then 100 ml of *n*-hexane. In case of methomyl, the remnant was washed with 50 ml of ethanol.

From the resulting aqueous layer, chemicals except methomyl were extracted with *n*-hexane and cleaned up by column chromatography. In Florisil column chromatography, the first eluate with ether containing 50% of *n*-hexane contained isoxathion, and the next eluate with ether containing 50% of benzene contained DMTP and phosalone. PAP and TPN were eluted with *n*-hexane containing 20% of ether in silica-gel column chromatography. Methomyl was extracted with ethyl acetate from solution alkalinized with sodium hydroxide and superheated for over 30 min.

The recovery ranged between 87 and 100% in DMTP, isoxathion, PAP, phosalone and TPN, and 86% in methomyl.

Using 6 g of the tea sample, the lower limits of detection of each chemical were 0.003 ppm (TPN), 0.03 ppm (methomyl, PAP), 0.04 ppm (DMTP) and 0.05 ppm (isoxathion, phosalone) in the obtained tea infusion each 360 ml of which had been subjected to the analysis.

結 言

現在、食品中の各種農薬の残留分析は多くの場合環境庁が告示した方法（以下告示法という）により行なわれている。しかし、対象となる食品、作物が含有する特殊成分あるいは、その量の多少によりそれらの分析に告示法の直接適用が困難な場合が少なくない。

茶葉はタンニンに代表されるポリフェノール類を多量に含み、それらが分析障害となる可能性が非常に大きい。茶浸出液から農薬を抽出するさい、茶浸出液と抽出

溶媒の間にエマルジョンが生成し、これが長時間静置しても消滅しない等の問題が起きている。

そこで、茶の糖類定量法に採用されている¹⁾塩基性酢酸鉛液を用いる除タンニン操作を、茶浸出液に添加したDMTP、イソキサチオン、メソミル、PAP、ホサロン、TPNの分離操作に適用した。この結果、溶媒による分離抽出が良好となり、回収率が向上したばかりでなく、メソミル以外の農薬は同時抽出精製が可能となるなど、茶の農薬分析法が簡易、迅速化されたので報告する。

実験方法

1. 試薬および装置

1) 塩基性酢酸鉛液

試薬特級の中性酢酸鉛と酸化鉛を 43 : 13 の割合にとり、水で 30 分間煮沸溶解し、飽和溶液とし、残留農薬試験用 *n*-ヘキサンで洗浄したもの。

2) フロリジル

フロリジル社製, 60~80 メッシュ

3) シリカゲル

ワコーゲル C-200

4) 農薬標準品

DMTP, イソキサチオン, メチルチオアセトヒドロキシマート, PAP, ホサロン, TPN とともに純度 98% 以上, 和光純薬(株)製, メソミルはクミアイ化学(株)より提供。

5) その他の試薬

残留農薬試験用試薬または試薬特級。

6) ガスクロマトグラフ

柳本製作所製 G-80 型 [FPD], 同 G-1800 型 [ECD (^{63}Ni)].

2. 分析操作

1) 農薬添加試料の調製

茶浸出液への農薬標準品の添加は, メソミルの場合は水溶液, DMTP, イソキサチオン, PAP, ホサロン, TPN についてはアセトン溶液を作成して添加した。

2) 環境庁告示法

官報に記載されている方法によった²⁻⁶⁾。

3) 改良分析法

i) メソミル定量法⁷⁾

茶 9 g に熱湯 540 ml を加え 5 分間放置する。得られた茶浸出液の 360 ml に塩基性酢酸鉛液 5 ml を加え, ふり混ぜたのち 5 分間静置し, ポリフェノール類を沈殿させる。漏斗上にセライト 545 を 10 g 程度敷いた濾紙を用いて吸引濾過し, 漏斗上の残渣をエタノール 50 ml を用いて洗い, 濾液に合する。全濾液中の過剰の鉛を 10 N 硫酸 5 ml の添加により沈殿させ, 濾過除去する。この濾液を 10 N 水酸化ナトリウム溶液添加によりアルカリ性とし, 湯浴中 90°C で 30 分以上の加熱を行なう。冷却後, この溶液を 1 l 分液漏斗に移し, 酢酸エチル 250 ml を加え, 5 分間振とうし, 酢酸エチル層を分取する。さらに水層に酢酸エチル 250 ml を加え, 5 分間振とうし, 酢酸エチル層を分取する。全酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウムを加え, 30 分間脱水した後, 40°C 以下でトリエチルアミン 1 ml を添加して減圧濃縮を行な

い, 約 1 ml とする。これを窒素ガスを用い乾固し, 酢酸エチルの一定量 (2~4 ml) に溶解し, 試験液とし, FPD (Sf)-GC により定量する。

ii) DMTP, イソキサチオン, PAP, ホサロン, TPN 定量法

① 茶浸出液からの分離抽出

茶浸出液について, メソミルの場合と同様に塩基性酢酸鉛による処理を行ない吸引濾過する。このとき, 漏斗上の残渣は, まず水 20 ml で洗い, ついでアセトン 50 ml *n*-ヘキサン 100 ml の順で洗い濾液に合する。全濾液を 1 l 分液漏斗に移し, 5 分間振とうしヘキサン層を分取する。さらに水層に *n*-ヘキサン 100 ml を加え, 同様の操作後ヘキサン層を分取し, 全ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水する。これを 40°C 以下で 1 ml 程度まで減圧濃縮し, 窒素ガスによる乾固の後, *n*-ヘキサン 5 ml を加え溶解し, 抽出液とする。

② カラムクロマトグラフィーによる精製

A) フロリジルカラムクロマトグラフィー

フロリジル 5 g を *n*-ヘキサンを用いてクロマト管 (内径 1.5 cm, 長さ 30 cm) に充てんする。このとき, フロリジルの下部に 1 cm, 上部に 2 cm 程度無水硫酸ナトリウムを充てんする。これに前述の抽出液を *n*-ヘキサンを用いて流し込む。第 1 溶出液として 50% エチルエーテル・*n*-ヘキサン 100 ml を, 第 2 溶出液として 50% エチルエーテル・ベンゼン 100 ml を用いて溶出し, それぞれの溶出液を 40°C 以下で 1 ml 程度まで減圧濃縮し, 窒素ガスを用いて乾固した後, *n*-ヘキサンの一定量 (2~4 ml) で溶解し, 試験液とする。

このとき, 第 1 溶出による試験液中に PAP, イソキサチオン, ホサロンが得られ, 第 2 溶出による試験液中には DMTP のみを得られる。

B) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲル 5 g をフロリジルの場合と同様の操作でクロマト管に充てんする。これに前述の操作で得た抽出液を *n*-ヘキサンを用いて流し込む。溶出液として 20% エチルエーテル・*n*-ヘキサン 100 ml を用いる。得られた溶出液を 40°C 以下で 1 ml 程度まで減圧濃縮し, 窒素ガスにより乾固した後, *n*-ヘキサンの一定量 (2~4 ml) で溶解し試験液とする。この試験液中に PAP と TPN が得られる。

なお, カラムクロマトグラフィーによる各農薬の分離精製法を Table 1 にまとめた。

4) ガスクロマトグラフィーの操作条件

各農薬に対するガスクロマトグラフィーの操作条件は Table 2 にまとめた。

Table 1 Clean up procedures of some pesticides by column chromatography.

Eluting method		Support	
Solution	Volume (ml)	Florisol (5 g)	Silica-gel (5 g)
20% ether-hexane	100	PAP	PAP TPN
50% ether-hexane	100	PAP <u>Isoxathion</u>	Isoxathion PAP
			Phosalone TPN
50% ether-benzene	100	DMTP Isoxathion	DMTP Phosalone
		<u>Phosalone</u>	
{ 50% ether-hexane (1st)	100		
{ 50% ether-benzene (2nd)	100	<u>DMTP</u>	DMTP

Elution efficiency of each pesticide was almost 100%.

The underlines showed the most suitable conditions for each pesticide.

Table 2 Operating conditions of gas-chromatography for some pesticides.

Condition	DMTP	Isoxathion	Methomyl	PAP	Phosalone	TPN
Column (glass)	75 cm-3 mm	75 cm-3 mm	75 cm-3 mm	75 cm-3 mm	75 cm-3 mm	100 cm-3 mm
Packing	10% XE-60	1.5% OV-17	10% FFAP	15% SE-30	1.5% OV-17	5% DC-200
Support (60-80 mesh)	GC-Q	GC-Q	GC-Q	Chromosorb-W (AW)	GC-Q	Chromosorb-W (AW)
Carrier gas (N ₂ ml/min)	50	65	35	50	65	40
Column temp.	230°C	228°C	170°C	220°C	250°C	175°C
Injection temp.	275°C	250°C	190°C	250°C	300°C	270°C
Detector temp.	300°C	300°C	250°C	300°C	350°C	270°C
Detector	FPD-Pf	FPD-Pf	FPD-Sf	FPD-Pf	FPD-Pf	ECD
Retention time (min)	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	4.0

Flow rates of hydrogen and air were adjusted to the most suitable conditions of each detector response.

5) 検量線の作成

メソミル（分析対象物はメチルチオアセトヒドロキシマート）は、標準品を酢酸エチルに、他の農薬は *n*-ヘキサンに溶解し、0.01~2 ppm の標準溶液を作成する。ただし、TPN については、0.0005~1 ppm 溶液とする。この標準溶液の 4 μ l を前記条件のガスクロマトグラフに注入し測定する。いずれもピーク高による絶対検量線法を用いた。メソミルの場合、ピーク高の平方根をとると検量線は直線となった。

実験結果および考察

1. メソミル

Table 4 から明らかなように、改良法のメソミルの回収率は告示法に比較し、格段と勝れていた。

これは、告示法において、クロロホルム 50 ml, 2 回の抽出では、水溶性であるメソミルのクロロホルム層への転溶が不十分であることと、クロロホルムと茶浸出液を混合振とうするさいにエマルジョンが生成し、両層の

分離が不完全になること等が、回収率を低下させている原因と考えられる。このエマルジョンの生成は、主として茶浸出液に含まれているポリフェノール類によるものと考えられた。

2. DMTP, イソキサチオン, PAP, ホサロン, TPN

Table 4 の結果で明らかなように、告示法による回収試験でも TPN をはじめ、各農薬とも高い回収率が得られ、同法が不適とは考えられなかった。しかし、茶浸出液と抽出溶媒の混合振とう時に多量のエマルジョンが生成し、分離が不十分となり、分取のさいに多量の水分が混入し、その脱水に多量の無水硫酸ナトリウムを必要とし、処理操作に長時間を要すること。イソキサチオンの場合は、抽出溶媒の *n*-ヘキサン量が 50 ml と少量のため、生成するエマルジョンにより分離が非常に悪く、分取も 2/3 以上が水分となり、このような状態では溶媒抽出の効果があげられないこと。DMTP とホサロンの場合は、測定のさいガスクロマトグラム上で妨害ピークと重なりを生じ、測定誤差を招くおそれがあるなど、告示

Table 3 Lower limits of detection of some pesticides in tea infusion.

Pesticide	Sample volume (ml)	Lower limit of detection (ppm)
Methomyl	360	0.03
DMTP	360	0.04
Isoxathion	360	0.05
PAP	360	0.03
Phosalone	360	0.05
TPN	360	0.003

法には多くの問題点が認められた。

これに対し、改良法ではエマルジョンの生成は認められず、茶浸出液と抽出溶媒の分離が完全となり、脱水も少量の無水硫酸ナトリウムで容易に行なわれ、妨害ピークも除去でき、回収率も向上するなど、告示法にみられる問題点はほとんど解決された。

しかし、TPN 分析の場合、酢酸鉛処理により生じた沈殿物の濾過操作で、残渣中に TPN の大部分が残存しており、これは *n*-ヘキサン 100 ml の洗浄では溶出が不十分であったが、アセトン 50 ml による洗浄操作を加えたところ、完全に溶出することができた。

こうして同時抽出された5種類の農薬の分離を、カラムクロマトグラフィーで行なったが、フロリジルおよび

シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーでは、Table 1 に示したように、その溶出液の組成を変えることにより、各農薬の精製が良好に行なわれた。

フロリジルを用いた場合、TPN の溶出にはアセトンが必要であるが、このとき、吸着された色素も同時に溶出され、ガスクロマトグラム上で妨害ピークが現われるため不適當であったが、イソキサチオン、ホサロン等の農薬については Table 1 の溶出液による精製で無色透明の試験液を得ることができた。

また、DMTP の精製の場合、50% エーテル・ベンゼンで 100% の溶出は可能であるが、ガスクロマトグラム上に妨害ピークが現われる。これらの妨害成分は、DMTP 吸着カラムを 50% エーテル・ヘキサンで洗浄することにより完全に溶出除去できるので、この操作後に DMTP を溶出するのがよいと判断した。

PAP と TPN の分離精製には、シリカゲルを用いた 20% エーテル・ヘキサン溶出のほうが、ガスクロマトグラム上の妨害ピークも少なく適していたが、他の農薬については、試験液が透明ではあるが薄黄色となるため、必要なとき以外は避けたほうが無難であると思われる。

塩基性酢酸鉛による除タンニン操作は、アセトン等による直接抽出液においても好結果を得ており（メソミル、ホサロン）、広範囲に活用できるものと思われる。

Table 4 Recoveries of some pesticides from tea infusion.

Pesticide	Method	Added amount(μ g)	Recovery (%)	Remark
Methomyl	E.A.	2.2	<10	Concentrated solution contained precipitation
		4.4	<10	
	Proposed	4.4	86.7	Concentrated solution was clear pale green
DMTP	E.A.	2.08	97.0	Emulsification was heavy
	Proposed	1.94	100	
Isoxathion	E.A.	2.2	difficult	Separation was difficult because of emulsification
	Proposed	2.2	100	
PAP	E.A.	3.14	74.0	Emulsification was heavy
		6.28	78.8	
	Proposed	2.0	90.0	
		3.14	98.0	
Phosalone	E.A.	2.4	82.3	Measurement was difficult because of interfering peaks
	Proposed	2.4	96.6	
TPN	E.A.	0.168	70.5	Emulsification was heavy
	Proposed	0.168	87.8	
		3.34	92.0	

Tea infusion volume was 360 ml.

E.A.: the method notified by Environmental Agency.

要 約

茶浸出液中の残留農薬分析操作に、塩基性酢酸鉛による除タンニン操作を加え、各農薬の抽出法を検討し、以下のような結果を得た。

1) 茶浸出液と抽出溶媒間のエマルジョンの生成が抑制され、分離が良好となり、脱水操作も短時間に行なうことができ、告示法に比べ高回収率を得ることができた。

また、このとき大部分の色素類も同時に除去され、ガスクロマトグラム上の夾雑ピークの数も減少するなど、茶浸出液中の残留農薬分析において、塩基性酢酸鉛による除タンニン操作はきわめて有効な手段であった。

2) メソミルの抽出溶媒は酢酸エチルがよく、告示法の操作を省略できた。

3) 告示法では、DMTP、イソキサチオン、PAP、ホサロン、TPN で抽出精製法がすべて異なっているが、本試験の結果、同一溶媒による同時抽出が可能となり、操作の省略や抽出溶媒の種類を少なくすることができるなど、分析試料の調整法が簡便となった。

本試験を行なうに当たり、有益なご助言を賜った農林水産省農産園芸局植物防疫課 石井康雄氏（元 農林水産省農薬検査所）、農林水産省茶業試験場 竹尾忠一博士に厚くお礼申しあげる。

また、メソミル純品を提供していただいたクミアイ化学工業株式会社に深く感謝する。

引 用 文 献

- 1) 岩浅 潔・中島末秋・中川致之：茶技研 **44**, 44-47 (1972)
- 2) 官報 第 14503 号, DMTP, メソミル試験法 (1975 年 5 月 10 日)
- 3) 官報 第 14978 号, イソキサチオン試験法 (1976 年 12 月 10 日)
- 4) 官報 第 14310 号, PAP 試験法 (1974 年 9 月 9 日)
- 5) 官報 第 14746 号, ホサロン試験法 (1976 年 3 月 4 日)
- 6) 官報 号外第 15 号, TPN 試験法 (1974 年 3 月 19 日)
- 7) 小野田恭久・今村昌子：茶研報 **48**, 40-45 (1978)