

報 文

ELISA 法による茶葉中のクロロタロニルの残留分析

畠山 えり子*, 梶田 弘子, 菅原 隆志, 高橋 悟

岩手県環境保健研究センター

(平成 20 年 2 月 4 日受付, 平成 20 年 7 月 17 日受理)

Determination of chlorothalonil residues in raw tea and green tea leaves
by an enzyme-linked immunosorbent assay

Eriko HATAKEYAMA*, Hiroko KAJITA, Takashi SUGAWARA, and Satoru TAKAHASHI

*Research Institute for Environmental Sciences and Public Health of Iwate Prefecture,
1-36-1 Iiokashinden, Morioka 020-0852, Japan*

A simple, rapid method to determine residues of chlorothalonil in green tea leaves was developed using a commercial chlorothalonil kit based on ELISA. Chlorothalonil in green tea leaves was measured using the chlorothalonil kit after being extracted by methanol or boiling in water and diluted with 10% methanol. Because the extracts of green tea leaves caused significant interference in the assay, a refinement method was examined. One ml of the extract from green tea leaves boiled in water or extracted with methanol was added to Oasis HLB (60 mg) and purified with 2 ml of 80% methanol. After that, chlorothalonil on the HLB was extracted with 2 ml of 100% methanol. It was suggested from the experiment that the component that was removed by column refinement was catechin, being the cause of interference with the chlorothalonil kit. As the results, average recoveries from the chlorothalonil-spiked green tea leaves were 86-113%, and the coefficients of variation were below 10% in most cases. The coefficient of correlation between the ELISA and GC/MS methods was 0.99. Analysis equivalent to GC became possible using ELISA, and we revealed that catechin is the main factor interfering with ELISA analysis, and established a refining process. It was confirmed that the methanol treatment method for HLB was useful for the rapid analysis of chlorothalonil residues in green tea leaves. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: ELISA kit, chlorothalonil, green tea, matrix interference, catechin.

1. 緒 言

近年, 茶葉はその有効成分による機能性が注目され, 飲用のみならず食べるお茶としても重用されている。一方, 消費者の食品中の残留農薬への関心は高く, 茶においても高濃度に残留しているのではとの懸念が指摘されており, 茶に残留する農薬の濃度レベルの把握が課題となっている。分析法については, 厚生労働省からの通知法¹⁾において茶

を抹茶と抹茶以外に分けた分析法が示されており, 抹茶以外の茶ではほとんどの農薬が熱湯抽出法による個別分析法となっている。しかしながら, この方法による場合, 茶に大量に含まれるカテキン類やクロロフィル等の夾雑物質を除去するための煩雑な精製操作が必要となり, 検査に多大な労力と時間を要している。

有機塩素系殺菌剤クロロタロニルは茶の栽培において炭そ病予防のために用いられ, 摘採 10 日前までの使用が認められている。本剤は水に溶けにくいいため雨による流出も少なく, また, 酸, アルカリ, 熱, 紫外線にも安定で農産物への残留性が高いことから, 農産物中の残留農薬検査での

* 〒 020-0852 盛岡市飯岡新田 1-36-1
E-mail:eri-hatake@pref.iwate.jp
© Pesticide Science Society of Japan

検出頻度が高い農薬でもある。茶のクロロクロニルの残留基準は、食品衛生法の規格基準によって規定され、抹茶以外の茶では熱湯抽出法により検査する方法となっている。しかし、この方法による場合、水に溶けにくい農薬は浸出され難い²⁾ことが指摘されており、茶葉の残留実態を把握するためには、溶媒抽出法による方法についても調べる必要があると考えられる。本研究では、機器分析法と較べて前処理操作をほとんど必要せず、迅速・簡便かつ廉価な測定法として注目されている ELISA 法について、市販のクロロクロニルキットを用い、溶媒抽出法および熱湯抽出法の 2 つの抽出法を用いた測定法について検討を行った。

2. 実験方法

2.1. 試料

原料茶葉（生茶葉）および市販の緑茶（緑茶）を用いた。

2.2. 試薬類

有機溶媒等：有機溶媒は関東化学製の残留農薬分析用、水はミリポア製のミリ Q 水、その他の試薬は関東化学製の特級を用いた。

農薬標準品：関東化学製の残留農薬試験用農薬標準品を用い、メタノール（ELISA 法）または *n*-ヘキサン（GC/MS 法）に溶解して 100 µg/ml 標準原液とし、さらに 10% メタノール溶液（ELISA 法）、*n*-ヘキサン（GC/MS 法）で適宜希釈した。

カテキン類標準品：和光純薬製の生化学用カテキン混合物（緑茶由来、含有率 85% 以上）をメタノールに溶解し 1000 µg/ml 標準原液とし、50% メタノールで適宜希釈した。

固相：Waters 社製のジビニルベンゼン *N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB, 60 mg）は、あらかじめメタノールおよび 80% メタノール各 1 ml でコンデショニングした後使用した。

2.3. ELISA キット

堀場製作所製のクロロクロニルキット（スマートアッセイシリーズ）を用いた。

2.4. 装置および測定条件

2.4.1. ELISA 法

吸光光度計：堀場製作所製 Smart Reader MPR-01、遠心分離機：トミー製 LX-140 を用いた。なお、ELISA 法の測定条件は、キットに示された方法に従った。

2.4.2. GC/MS 法

装置：GC Agilent 製 HP6890, MS Agilent 製 HP5973 inert, 分析用カラム Agilent DB-XLB（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.10 µm）を用いた。

測定条件：カラム温度 80°C (1 min)–(30°C/min)–180°C–

(5°C/min)–250°C–(10°C/min)–310°C (5.5 min) の昇温として、注入口温度は 230°C, インターフェース温度は 290°C, キャリアガス（ヘリウム）, 注入方法はスプリットレス, 注入量は 2 µl, 測定モードは SIM (m/z 266) で行った。

2.4.3. 茶カテキン類の定量

装置：LC Agilent 製 1100, 分析用カラム SHISEIDO 製 SUPERIOREX ODS（内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 µm）を用いた。

測定条件：移動相メタノール–水（10/90）→30 min（50/50）, カラム温度 40°C, 流量 1 ml/min, 注入量 10 µl, 検出器 UV230 nm を用いた。

2.5. ELISA 法による試験溶液の調製

2.5.1. 溶媒抽出法

生茶葉 50 g に水 45 ml および 50% リン酸 5 ml 加え、フードプロセッサを用いて細切均一化した後、その 2.0 g（茶葉として 1.0 g 相当）をポリプロピレン遠心管に採取した。これに、水 1 ml およびメタノール 10 ml 加え、30 分間振とう抽出した後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を 10 ml 容メスフラスコに移し、水を加えて 10 ml に定容した液 1 ml を、あらかじめメタノール 1 ml, 80% メタノール 1 ml でコンデショニングした Oasis HLB ミニカラム（60 mg）に負荷した。その後、80% メタノール 2 ml でカラムを洗浄し、洗浄液等を捨てたのち、メタノール 2 ml で溶出した。この溶出液にメタノール 0.5 ml および水を加えて 25 ml に定容した液を ELISA 用試験溶液とした。なお、緑茶は粉碎した試料 1.0 g に水 2 ml, 50% リン酸 0.1 ml およびメタノール 10 ml 加えて 15 分間放置したのち、生茶葉と同様に操作して試験溶液を調製した。

2.5.2. 熱湯抽出法

緑茶 1.0 g に沸騰水 50 ml 加えて 5 分間放置した後、吸引ろ過し、冷却後メタノール 5 ml, 50% リン酸 0.1 ml 加えて 50 ml に定容した。その液 1 ml を、あらかじめメタノール 1 ml, 10% メタノール 1 ml でコンデショニングした Oasis HLB ミニカラム（60 mg）に負荷した。その後、80% メタノール 2 ml でカラムを洗浄し、洗浄液等を捨てたのち、メタノール 2 ml で溶出し、水を加えて 20 ml に定容した液を ELISA 用試験溶液とした。

2.6. GC/MS 法による試験溶液の調製

2.6.1. 溶媒抽出法

溶媒抽出法は通知法¹⁾に示された抹茶の分析法により調製した。

2.6.2. 熱湯抽出法

熱湯抽出法は通知法¹⁾に示された抹茶以外の茶の分析法により調製した。

2.7. クロロタロニルキットにおける茶成分の影響調査

あらかじめ GC/MS 法によりクロロタロニルが残留していないことを確認した生茶葉および緑茶を用いて調製したメタノール抽出液を適宜 10% メタノールで希釈して ELISA 用試験溶液とした。はじめに、先に調製した茶のメタノール抽出希釈液にクロロタロニル標準品を添加する方法で作製した添加検量線と 10% メタノール液を用いて作成した標準検量線との乖離状況を比較した。次に、茶成分の影響によるクロロタロニル擬陽性反応を調べるため、クロロタロニル無添加の吸光度からもとめた $B/B_0\%$ 値（各試験溶液の吸光度/陰性コントロールの吸光度 $\times 100$ ）が検出下限付近の 80% を超えない希釈率を求めるとともに、ELISA 法による測定においてマトリックスの影響を最も受けやすい低濃度域（0.15 ng/g）での測定を行い、回収率を比較した。

2.8. 妨害除去方法の検討

クロロタロニルキットでの妨害物質を取り除く手段として Oasis HLB (60 mg) による前処理方法について検討した。はじめに、クロロタロニル標準溶液のメタノール濃度を 10~100% に変化させて、Oasis HLB ミニカラムでのクロロタロニルの保持および溶出試験を行った。次に、生茶葉の抽出液 1 ml を Oasis HLB ミニカラムに負荷後、洗浄液のメタノール濃度を各々 10~70% の条件で洗浄したのち、メタノールで溶出し、希釈調製した各試験溶液（250 倍希釈相当）にクロロタロニルを 0.15 ng/g 相当添加して測定する方法で、妨害物質の除去効果を確認した。

2.9. 溶出液中のカテキン類の定量

Oasis HLB ミニカラム精製において、洗浄液のメタノール濃度によって、溶出液中のカテキン類の濃度が、どの程度減少しているか試験を行った。カテキン類の定量は高速液体クロマトグラフィー（UV 法）を用い、緑茶中の主要カテキン類であるエピカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンおよびエピガロカテキンガレートについて、カテキン混合物（緑茶由来）標準品の面積比から求めた。

2.10. カテキン混合物標準品による妨害の確認

カテキン類が妨害の要因であることを確認するため、次の試験を行った。すなわち、0.15 ng/g クロロタロニル含有 10% メタノール溶液に緑茶由来カテキン混合物（標準品）を 10~2000 $\mu\text{g/g}$ の濃度範囲で添加して測定し、カテキン混合物濃度と吸光度低下の関係性を調べた。

2.11. 添加回収試験

生茶葉では溶媒抽出法、緑茶では熱湯抽出法により、確立した前処理条件に基づき添加回収試験を行った。添加濃度はそれぞれの方法における検出下限濃度および基準値

の約 1/10 濃度とし、クロロタロニル標準品の添加時期は、溶媒抽出法においては抽出前、熱湯抽出法においては抽出後とした。

2.12. ELISA 法と GC/MS 法との相関性試験

確立した ELISA 測定条件を用い、既知濃度を添加する方法で ELISA 法と GC/MS 法の比較試験を行った。なお、抽出法は生茶葉では溶媒抽出法、緑茶では熱湯抽出法の条件を用いた。添加濃度は生茶葉が 0.0375 $\mu\text{g/g}$ から 1.5 $\mu\text{g/g}$ 、緑茶が 0.15 $\mu\text{g/g}$ から 1.5 $\mu\text{g/g}$ の範囲とした。

2.13. 実態調査

市販の緑茶 10 検体を対象に熱湯抽出法により、ELISA 法および GC/MS 法によるクロロタロニルの残留実態調査を行った。

3. 結果および考察

3.1. 茶成分によるクロロタロニルキットでの妨害

通常、ELISA 法による農作物中の残留農薬測定においては、抽出溶媒はメタノールを用い、抽出液に水を加えメタノール濃度を 10% に調整した希釈液を測定に供する。しかし、作物によっては測定での妨害が指摘³⁻⁹⁾されており、作物成分による測定への影響の確認が必要である。茶葉のメタノール抽出液を 250 倍に希釈して作成した添加検量線と 10% メタノール液を用いて作成した標準検量線を Fig. 1 に示した。添加検量線の吸光度は低濃度域で最も大きく抑制されており、検量線の傾きはほとんど 0 に近い値を示した。この結果、茶の抽出液が混在するとクロロタロニルの抗体との反応性が変化することが明らかとなり、茶に由来する成分の影響が考えられた。このような夾雑成分による

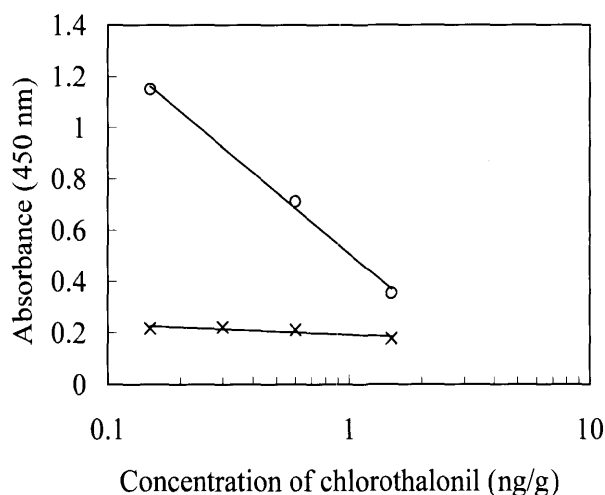


Fig. 1. Influence of green tea leaf matrix on the standard curve for chlorothalonil. ELISA standard curves of chlorothalonil in 10% methanol in the absence (○), and in the presence (×) of methanol extract of raw tea leaves are shown. The methanol extract was prepared by diluting the original extract with 10% methanol by 250-fold, into which specified amount of chlorothalonil was add.

Table 1. Effect of dilution factors of methanol extracts from the leaves of raw tea and green tea on B/B₀ values (%) in the analysis using ELISA kit for chlorothalonil

Dilution factor ^{a)}	B/B ₀ (%) ^{b)}	
	Raw tea leaves	Green tea leaves
250-fold	16.2	6.7
500-fold	24.8	9.1
1,000-fold	39.6	16.4
2,000-fold	65.9	20.5
3,000-fold	94.6	26.8
5,000-fold	— ^{c)}	32

^{a)} Sample solution was diluted with 10% methanol. ^{b)} B/B₀ (%) = B/B₀ × 100. B₀: Absorbance of 10% methanol. B: Absorbance of diluted methanol extract of raw tea and green tea leaves with 10% methanol. ^{c)} Not measured.

ELISA への影響は、抽出液をさらに希釈することで反応性の改善が期待できると考えられたため、希釈による方法で影響を回避することを試みた。ブランク値の吸光度から B/B₀% 値（各試験溶液の吸光度/陰性コントロールの吸光度 × 100）を求めた結果を Table 1 に示した。希釈率を上げることで B/B₀% 値は徐々に改善される傾向を示したが、生茶葉では 2000 倍、緑茶では 5000 倍に希釈しても、ブランク値が検出下限値を超える偽陽性反応を生じることがわかった。また、最も影響を受けやすい低濃度域（0.15 ng/g）での測定値も過大な値を示した（Table 2）。

3.2. 茶成分による ELISA 法での妨害とその除去方法の検討

先の試験の結果、希釈のみの操作で妨害を除去することは困難であったことから、ミニカラムを用いた精製法につ

Table 2. Effect of dilution factors of methanol extracts from the leaves of raw tea and green tea on spike recovery in the analysis using ELISA kit for chlorothalonil

Dilution factor	Spike recovery (%) ^{a)}	
	Raw tea leaves	Green tea leaves
250-fold	1360	— ^{b)}
1,000-fold	850	1400
2,000-fold	440	900
5,000-fold	180	610

^{a)} Chlorothalonil (0.15 ppb) was added to the methanol extract of the raw tea and green tea leaves diluted 250-, 1,000-, 2,000-, 5,000-fold by 10% methanol, followed by chlorothalonil kit measurement. ^{b)} Outside measurement range.

Table 3. Improvement of spike recovery by increasing the methanol concentration in the washing liquid for the pretreatment of methanol extracts from raw tea leaves with Oasis HLB column

Methanol concentration	Spike recovery (%) ^{a)}
No processing ^{b)}	1,359
10% MeOH	818
60% MeOH	247
70% MeOH	126

^{a)} methanol extract from tea leaves was treated with Oasis HLB column, and chlorothalonil (0.15 ppb) was added to the eluate to be quantified using the ELISA kit. ^{b)} Methanol extraction liquid of raw green tea leaves was diluted 250-fold using 10% methanol.

いて検討した。ミニカラムはクロロタロニルのオクタノール/水分分配係数が 4.38 と低極性であることに着目して、幅広い極性の物質を保持しつつ洗浄により比較的水溶性の高い物質が除去できるジビニルベンゼン *N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB, 60 mg）を用いた。はじめに、クロロタロニル標準溶液のメタノール濃度を 10~100% に変化させて、Oasis HLB ミニカラムによるクロロタロニルの保持および溶出試験を行った。その結果、クロロタロニルはメタノール濃度 90% までは Oasis HLB ミニカラムに保持され、100% メタノールで溶出することがわかった。次に、生茶葉の抽出液（メタノール濃度は約 80%）1 ml を Oasis HLB ミニカラムに負荷後、洗浄液のメタノール濃度を各々 10~70% の条件で洗浄したのち、メタノールで溶出し、希釈調製した試験溶液（250 倍希釈相当）にそれぞれクロロタロニルを 0.15 ng/g 相当添加して測定した結果を Table 3 に示した。添加量に対する実測値の割合は洗浄液のメタノール濃度依存的に改善され、70% メタノールで洗浄した場合、ほぼ影響を回避できることが確認できた。

3.3. 洗浄液のメタノール濃度によるカテキン類の除去

洗浄水のメタノール濃度を変えて調製した ELISA 用試験溶液中のカテキン類を定量した結果を Table 4 に示した。カテキン類の除去率（洗浄しない場合 0%）は洗浄水のメタノール濃度依存的に高まり、70% メタノールでは除去率 93% とほとんどのカテキン類を除くことができた。

3.4. カテキン混合物標準品による妨害の確認

0.15 ng/g クロロタロニル含有 10% メタノール溶液に緑茶由来カテキン混合物（標準品）を 10~2000 μg/g の濃度範囲で添加して測定した結果を Fig. 2 に示した。試験溶液の吸光度はカテキン混合物濃度に依存して指数関数的に減少し、

Table 4. Effect of methanol concentration in the washing liquid in Oasis column pretreatment on the removal of catechins in the extract of green tea leaves

Methanol concentration	Amount of catechins in test solution for ELISA ($\mu\text{g/g}$)					Catechin removal factor (%) ^{e)}
	EGC ^{a)}	EGCg ^{b)}	EC ^{c)}	Ecg ^{d)}	Total	
No processing ^{f)}	25	384	36	82	528	0
10% MeOH	3	96	4	24	127	76
60% MeOH	0	70	1	22	94	82
70% MeOH	0	26	0	11	37	93

^{a)} epigallocatechin. ^{b)} epigallocatechin gallate. ^{c)} epicatechin. ^{d)} epicatechin gallate. ^{e)} (Total amount of catechins with no processing - Total amount of catechins by each methanol concentration) / (Total amount of catechins with no processing) \times 100. ^{f)} no Oasis HLB treatment.

競合 ELISA に典型的な濃度反応曲線を示していた。このことは、カテキン類がクロロタロニルキットでの妨害の要因であると示唆された。次に、カテキン類の存在と他の夾雑物質の影響を調べるため、生茶葉のメタノール抽出液を用いて次の試験を行った。すなわち、Oasis HLB ミニカラム精製によりカテキン類の影響を排除したのち、処理前と同程度のカテキン混合物標準品を添加する方法でカテキン類の影響を確認した。その結果、カテキン混合物標準品の添加により吸光度の低下が見られ、その回収率は約 600% であった。生茶葉でのミニカラム精製をしない場合の回収率が約 1300% であったことから茶成分によるクロロタロニルキットでの妨害の要因としてはミニカラム精製により排除されるカテキン類以外の物質も示唆された。

3.5. 添加回収試験

確立した前処理方法を用いて作成した生茶葉の添加検量線の例を Fig. 3 に示した。標準検量線との乖離が改善され、茶成分による測定への影響を回避できることがわかった。なお、本処理法により妨害を完全に回避できる希釈倍率は、

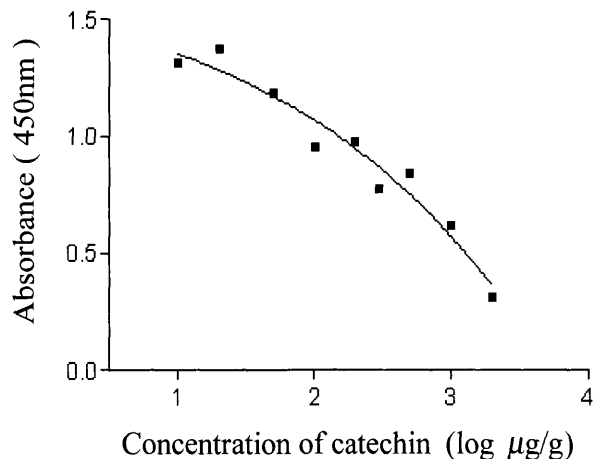


Fig. 2. Influence of the catechin concentration on the chlorothalonil kit.

生茶葉で 250 倍、緑茶で 1000 倍であった。次に、生茶葉および緑茶を対象に確立した前処理条件に基づき、既知濃度添加する方法で添加回収試験を行った結果を Table 5 に示した。各試料に対する平均回収率は 86% から 113% の範囲、変動係数もおおむね 10% 以内であり、残留農薬検査における精度管理指標（回収率が 70% から 120% の範囲、変動係数 20% 以下）を満たしていた。本法を用いた場合のクロロタロニルの検出下限は生茶葉で $0.04 \mu\text{g/g}$ 、市販の緑茶で $0.15 \mu\text{g/g}$ であり、茶の残留基準 $10 \mu\text{g/g}$ に対して十分な感度で測定が可能であった。

3.6. ELISA 法と GC/MS 法との相関性試験

生茶葉を用いた溶媒抽出法による相関性試験のおよび緑茶を用いた熱湯抽出法による相関性試験の結果を Fig. 4 に示した。溶媒抽出法では相関係数 0.996、傾き 1.01、熱湯抽出法では相関係数 0.989、傾き 1.19 といずれの抽出条件においても、非常に高い相関関係が認められ、ELISA 法に

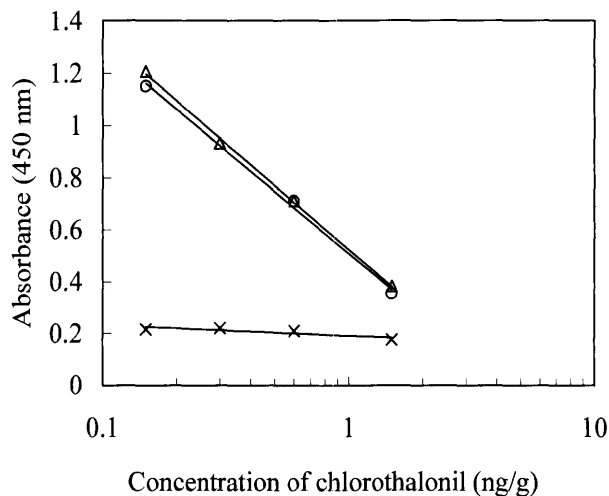


Fig. 3. ELISA standard curves of chlorothalonil in methanol diluted in 10% methanol (○), raw green tea leaf methanol extract without purification (×), raw green tea leaf extract purified using HLB (Δ).

Table 5. Recovery of chlorothalonil added to the leaves of raw tea and green tea in the analysis using ELISA kit

Sample	Spike level ($\mu\text{g/g}$)	Extraction method	Recovery (% , n=3)	CV (%)
Raw tea leaves	0.0375	Solvent extraction	86.0	8.1
	0.9		93.3	8.7
Green tea leaves	0.15	Hot water extraction	113.3	10.2
	0.9		89.0	10.2
	1.5		99.9	6.5

においても GC/MS 法と同等の測定が可能であることが確認できた。

3.7. 実態調査

市販の緑茶 10 検体を対象に熱湯抽出法による ELISA 法と GC/MS 法によるクロロタロニルの残留実態調査を行った。全ての検体において ELISA 法および GC/MS 法とも検出下限値未満であった。なお、ELISA 法による検出下限は $0.15 \mu\text{g/g}$ 、GC/MS 法による検出下限は $0.05 \mu\text{g/g}$ であった。また、ELISA 法の前処理時間は 10 検体でも 30 分程度と GC/MS 法の前処理時間 10 時間に比べて極めて迅速であった。

要 約

ELISA 法に基づく市販のクロロタロニルキットを用い、茶葉中のクロロタロニル迅速分析法を検討した。クロロタロニルキットでは、茶の成分による妨害が顕著であったため、精製方法について検討した結果、茶葉のメタノール抽

出液あるいは熱湯抽出液 1 ml を Oasis HLB (60 mg) ミニカラムに負荷し、80% メタノール 2 ml を用いて洗浄したのちメタノール 2 ml で溶出する方法を確立した。本ミニカラムにより除去した主要な成分はカテキン類で、クロロタロニルキットによる測定での妨害の原因物質であることが実験から示唆された。本条件を用いて添加回収試験を行った結果、平均回収率 86~113%、変動係数おおむね 10% 以下であった。また、GC/MS 法との相関性試験においても、相関係数 0.99、傾きもおおむね 1 に近い良好な結果が得られ、ELISA 法においても GC 法と同等の測定が可能になった。本法を用いた場合の精製に要する時間は 10 検体で 30 分程度と GC/MS 法での前処理時間 10 時間に比べて極めて迅速であった。これらの結果から、本法は、茶葉中のクロロタロニル残留迅速分析法として有用であると考えられる。

謝 辞

本論文の作成にあたり、貴重なご意見をいただいた(株)堀場製作所三宅司郎博士に深謝いたします。

文 献

- 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知第 012400 号 (平成 17 年 1 月 24 日付)。
- 永山敏廣, 真木俊夫, 観 公子, 飯田真美, 田村行弘, 二島太郎: 農薬誌 14, 39-45 (1989)。
- 津村ゆかり, 外海康秀, 中村優美子, 宮田昌弘, 鎌倉和政, 橋端直樹, 岩田邦彦, 伊藤澄夫, 皆葉清美, 沖 賢憲, 児玉光男, 伊藤誉志男: 食衛誌 33, 458-466 (1992)。
- 三宅司郎, 石井康雄: 植物防疫 54, 148-152 (2000)。
- 平成 11 年度厚生科学研究: 食品中の残留農薬検査超迅速化に関する研究報告書, 67-76 (2000)。
- E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo and M. Ueji: *Anal. Chim. Acta* 512, 45-51 (2004)。
- 畠山えり子, 梶田弘子, 菅原隆志, 小向隆志, 中野亜弓, 築地邦晃: 岩手県環境保健研究センター年報 4, 90-94 (2004)。
- S. Wang, J. Zhang, Z. Yang, J. Wang and Y. Zhang: *J. Agric. Food Chem.* 53, 7377-7384 (2005)。
- 天野昭子, 矢野秀治: 農薬誌 31, 425-430 (2006)。

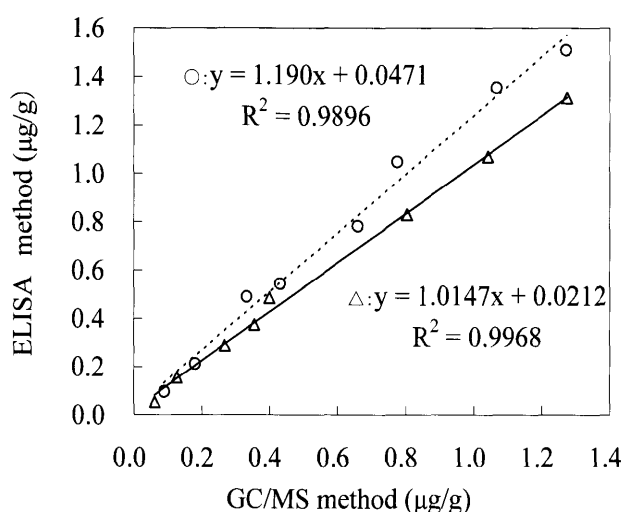


Fig. 4. Correlation between the estimated concentrations of chlorothalonil in the spiked green tea analyzed by the established ELISA method and the reference GC/MS method in solvent extraction (Δ) and hot water extraction (\circ).