ノート

HPLC による茶中のアゾキシストロビンの定量

(平成 13 年 2 月 19 日受理)

長 南 隆 夫*

Determination of Azoxystrobin in Tea by HPLC

Takao CHONAN

(Hokkaido Institute of Public Health: Nishi 12-chome, Kita 19-jo, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan)

A determination method has been developed for azoxystrobin in tea by HPLC.

Azoxystrobin was extracted from a sample with acetone, and the extract was passed through an alumina column to remove tannin. The eluate was concentrated to *ca.* 25 mL and passed through a Sep-Pak Vac tC18 to remove pigments. The eluate was cleaned-up by using liquid-liquid partition, and Florisil and silica-gel columns. The HPLC analysis for azoxystrobin was carried out on a C18 column with acetonitrile-water (9 : 11) as the mobile phase, with ultraviolet detection at 260 nm.

The recovery of azoxystrobin fortified at the level of 0.4 $\mu\text{g/g}$ was 90.2% and the limit of determination was 0.2 $\mu\text{g/g}$.

(Received February 19, 2001)

Key words: アゾキシストロビン azoxystrobin; 茶 tea; タンニン tannin; アルミナカラム alumina column; セップバックバック tC18 Sep-Pak Vac tC18; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

アゾキシストロビン (AS) は、平成 10 年 4 月に登録されたメトキシアクリレート系殺菌剤で稲、小麦、果樹、野菜などに広く使用され、茶には摘採 14 日前まで 3 回にわたり使用が認められている¹⁾。

抹茶以外の茶の残留農薬分析では、茶を熱水で抽出して、その浸出液中の農薬を分析する方法が従来用いられてきた。しかし、平成 10 年より新規登録農薬の残留分析法は、抹茶と同様に茶を有機溶媒で直接抽出する方法に改められた。茶中の AS の分析法には、すでに環境省告示分析法 (環境省法)²⁾があり、この方法も有機溶媒で抽出する方法を採用している。そこで、環境省法を追試したところ AS の回収率は 40% 以下と低く、この原因の一つとしてタンニン除去操作が含まれていないことが推察された。従来より、茶の残留農薬分析では、液-液分配時のエマルジョンを防止して回収率を高めるため酢酸鉛を用いるタンニン除去法³⁾が広く用いられてきた。このタンニン除去法は広範囲の農薬に対応できる有用な方法であるが、廃液処理の問題点が指摘されている。

そこで、今回タンニンの除去にアルミナカラムを用いる茶中の AS の分析法を検討したところ、良好な結果が得ら

れたので報告する。

実験方法

1. 試 料

石狩市内の食品販売店で購入した煎茶を用いた。

2. 試 薬

標準品：林純薬工業(株)製のアゾキシストロビン標準品 (純度 99%) を用いた。

標準原液：アゾキシストロビン標準品 10.0 mg をアセトニトリルに溶解して 50 mL とした。

標準溶液：標準原液をアゾキシストロビンの含量が 0.2~2.0 $\mu\text{g/mL}$ となるようにアセトニトリル-水 (9 : 11) で希釈して調製した。

有機溶媒及びその他の試薬：有機溶媒はいずれも和光純薬工業(株)製残留農薬試験用アセトン、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、アセトニトリルを用いた。セップバックバック tC18 (充てん剤量 5 g, C18 カラム) は Waters 社製を用いた。アルミナ (塩基性) は Merck 社製 Aluminium oxide 90 (活性度 I)、フロリジルは Floridin 社製 Florisil PR、シリカゲルは Merck 社製 Kieselgel 60 を用いた。その他の試薬は市販特級品を、水は脱イオン水を用いた。

C18 カラム：アスピレーターで吸引しながら、あらかじめアセトン 30 mL、水 10 mL で順次洗浄後、使用した。

* 北海道立衛生研究所：〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目

再使用時には、アセトン 60 mL、水 10 mL で順次洗浄後、使用した。

アルミナカラム：アルミナ 10 g をガラス管（内径 19 mm、長さ 300 mm）に乾式法で充てんした。

フロリジルカラム：130℃ で 12 時間以上活性化したフロリジル 5 g を *n*-ヘキサンを用いてガラス管（内径 19 mm、長さ 300 mm）に湿式法で充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層した。

シリカゲルカラム：130℃ で 12 時間以上活性化したシリカゲル 5 g を *n*-ヘキサンを用いてガラス管（内径 19 mm、長さ 300 mm）に湿式法で充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：（株）日立製作所製高速液体クロマトグラフ L-7000 シリーズを用いた。

4. 試験溶液の調製

試料 5.00 g をホモジナイザーカップにひょう取し、水 20 mL を加え、2 時間放置した。これにアセトン 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、同様の操作を繰り返して、ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL とした。ろ液 100 mL（茶 2.50 g 相当）をアルミナカラムへ注入し、次いでアセトン 30 mL をカラムへ注入し、流出液を合わせ、リン酸 1 mL を加えて 40℃ の水浴上で約 25 mL に減圧濃縮した。

この濃縮液を C18 カラムへ注入し、流出液を採った。次いで、上記の減圧濃縮器のナス型フラスコにアセトン 9 mL を加え、残留物を溶かした後、水 6 mL を加えて混和し、C18 カラムへ注入する操作を 2 回繰り返し、流出液を上記の流出液と合わせた。これを、300 mL の分液漏斗に移し、酢酸エチル-*n*-ヘキサン（1:1）100 mL、10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、5 分間振とうした。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン層を分取後、水層に酢酸エチル-*n*-ヘキサン（1:1）50 mL を加え、同様の操作を繰り返した。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、40℃ の水浴上で酢酸エチル及び *n*-ヘキサンを減圧下で除去した。

この残留物にアセトン 3 mL を加えて溶かし、*n*-ヘキサン 7 mL を加えて混和後、フロリジルカラムへ注入し、アセトン-*n*-ヘキサン（3:7）100 mL で溶出し、流出液を合わせ、40℃ の水浴上でアセトン及び *n*-ヘキサンを減圧下で除去した。この残留物に酢酸エチル 3 mL を加えて溶かし、*n*-ヘキサン 7 mL を加えて混和後、シリカゲルカラムへ注入した。酢酸エチル-*n*-ヘキサン（3:7）100 mL をカラムへ注入して洗浄した後、酢酸エチル-*n*-ヘキサン（1:1）100 mL をカラムへ注入し、流出液を採り、40℃ の水浴上で酢酸エチル及び *n*-ヘキサンを減圧下で除去した。この残留物にアセトニトリル-水（9:11）2 mL を加えて溶かし、試験溶液とした。

5. HPLC の条件

カラム：Symmetry C18 (4.6 mm i.d.×150 mm)

移動相：アセトニトリル-水（9:11）

流速：0.7 mL/min

カラム温度：40℃

検出：260 nm

注入量：20 µL

結果及び考察

1. 試験溶液の調製方法の検討

茶に水を加えて膨潤させた後アセトンで抽出し、抽出液を濃縮後、液-液分配を行ったところエマルジョンが認められた。そこで、エマルジョンの原因物質とされるタンニンの除去法について検討した。茶タンニンの主成分は没食子酸とカテキンである⁴⁾ことが知られている。著者らは、食品中の残留物質の分析において、障害となる酸性物質の除去にアルミナカラムが有効である^{5), 6)}ことをすでに報告した。そこで今回アルミナカラムを用いるタンニン除去法を試みた。検討したアルミナは Merck 社製アルミナ（塩基性及び中性）、Woelm 社製アルミナ（塩基性）の 3 種で、乾式法でそれぞれのカラムを調製した。これらのカラムに茶抽出液を注入して、得られた流出液を以降の操作に供したところ、いずれも液-液分配時にエマルジョンは認められず、この方法はエマルジョンの防止に有用であることが判明した。エマルジョン防止効果については、検討したアルミナ間でほとんど差が認められなかったが、2 層に分離する速度が最も速かった Merck 社製アルミナ（塩基性）を用いることとした。アルミナカラムで精製した抽出液には濃縮時の突沸が認められず、濃縮操作は容易であった。

この方法は、酸性農薬の残留分析法には適用が困難と考えられるが、それ以外の農薬には適用できる可能性があり、今後の検討が望まれる。

次に、色素の除去法について検討した。環境省法では、C18 シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムを用いる色素除去法を採用しているが、この方法は C18 シリカゲルミニカラムへの試料注入時に目詰まりがおこり、操作が容易でないなどの問題点が認められた。また、農産物の色素の除去法としてゲル浸透クロマトグラフィー⁷⁾を用いる方法が報告されているが、この方法は使用する有機溶媒量が多いため、本報では C18 カラムを用いて少量の有機溶媒で色素を除去する方法を検討した。アルミナカラムで精製した抽出液を約 25 mL に濃縮（このときのアセトン濃度は約 60%）後、C18 カラムへ注入したところ、大部分の緑黄色色素はカラムに保持され、AS はカラムから流出した。この方法は操作が簡便で色素除去率が高いため、実用的な色素除去法と考えられた。なお、濃縮に用いるナス型フラスコ（容量：300 mL）は、あらかじめ器壁に容量 25 mL の印をつけ、濃縮液の量がこの印とほぼ一致するように濃縮した。また、抽出液を過度に

Fig. 1. Chromatograms of azoxystrobin
(A) Standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$)
(B) Extract of tea

濃縮すると不溶物が生じて C18 カラムへ注入したとき目詰まりを起こすので、濃縮には注意が必要であった。C18 カラムはアセトン 60 mL で洗浄することにより、4 回までは再使用が可能であった。

タンニン及び緑黄色色素を除去した試料液を実験方法 4. 試験溶液の調製 に記した液-液分配、フロリジルカラム及びシリカゲルカラムで精製して試験溶液を調製した。カラムは、一定の再現性を得るため活性化したフロリジル及びシリカゲルを用いて調製した。妨害ピークの認められないクロマトグラムを得るためには、フロリジルカラム及びシリカゲルカラムによる精製が必要で、一方のカラムだけでは良好な結果が得られなかった。試験溶液のクロマトグラムは、Fig. 1 に示すとおりである。

2. HPLC 条件の検討

逆相系のカラム Symmetry C18 に、移動相としてアセトニトリル-水 (9:11) を用いて、AS 標準溶液を 260 nm で分析したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

この条件における AS の検量線は 0.2~2.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で原点を通る良好な直線性を示した。

3. 添加回収率及び定量下限値

茶に AS を添加 (添加量 0.4 $\mu\text{g/g}$) して、本法の回収率を求めた。回収率は 90.2% (CV 2.3%, $n=3$) と良好な結果が得られた。

なお、本法の定量下限値は 0.2 $\mu\text{g/g}$ であり、登録保留

基準値 (10 ppm) の 1/50 を定量できた。

結 語

タンニンの除去にアルミナカラムを用いる茶中の AS の残留分析法を検討した。試料に水を加えて膨潤させた後、アセトンで抽出し、抽出液をアルミナカラムへ注入した。流出液をアセトン濃度が約 60% となるように減圧濃縮し、C18 カラムへ注入した。流出液に塩化ナトリウム溶液を加え、酢酸エチル-*n*-ヘキサン (1:1) で抽出後、フロリジルカラム及びシリカゲルカラムで精製して試験溶液を調製した。試験溶液を紫外検出器付き HPLC で分析した。

試験溶液のクロマトグラム上に妨害ピークは認められず、添加回収率は 90.2% であった。

本法は液-液分配時のエマルジョンが認められず、登録保留基準値に対応できることから茶中の AS の実用的な残留分析法と考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省農薬検査所監修 “農薬適用一覧表 1999” 東京、日本植物防疫協会、1999, p. 558.
- 2) 環境庁告示第 38 号 (1999) “作物残留に係わる農薬登録保留基準を改正する件” 平成 11 年 8 月 24 日.
- 3) Onoda, Y., Imamura, M., Utility of basic lead acetate for analysis of pesticides residues in tea infusion. *Nihon Noyaku Gakkaishi (J. Pesticide Science)*, **5**, 101-105 (1980).
- 4) Fujino, Y., “Shokuhin Kagaku Gairon”, Tokyo, Shokabou, 1970, p. 110-111.
- 5) Hori, Y., Chonan, T., Nishizawa, M., Rapid determination of diethylene glycol in wine by gas chromatography using alumina column clean-up. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **27**, 187-189 (1986).
- 6) Chonan, T., Nishimura, K., Hiramatsu, Y., Rapid determination of residues of five kinds of veterinary drugs in livestock products by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 326-329 (2000).
- 7) Ogawa, M., Sakai, T., Ohkuma, K., Matsumoto, T., Hiramatsu, Y., Rapid determination of multiple pesticide residues in agricultural products by GPC clean-up and GC/MS-SIM. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 48-61 (1997).