

ウーロン茶葉中のインドキサカルブおよびフィプロニル試験法の検討

山口聡子*¹ 高取聡*¹ 北川陽子*¹ 福井直樹*¹
山本遥菜*¹ 梶村計志*¹ 尾花裕孝*²

ウーロン茶葉中に含まれるインドキサカルブおよびフィプロニルの試験法について、検討を行った。厚生労働省が通知する一斉試験法（通知一斉試験法）で得られる試験液は精製が不十分であると考えられたことから、3種類の精製カラムを併用する改良試験法を検討した。妥当性評価ガイドラインに従い、LC-MS/MS および GC-MS を用いた分析法の真度、併行精度および室内精度を算出した結果、共に目標値を満たした。特に改良試験法では、通知一斉試験法の試験液で残存していた色素およびカフェインが除去されており、結果の信頼性を高めるために有効であると考えられた。

キーワード：ウーロン茶、インドキサカルブ、フィプロニル、妥当性評価試験

Key words: oolong tea, indoxacarb, fipronil, method validation study

2012 年 11～12 月にわたり、中国産ウーロン茶葉から食品衛生法に定められる残留基準を超過するインドキサカルブ、フィプロニルが茶製造業者の自主検査により検出され、製品の回収が相次いだ。これらの事例から、食品衛生法に適合しない中国産ウーロン茶葉が国内に流通している可能性が示唆された。これまで経験のなかったこれらの検査を行うため、茶葉の試験法について検討を行った。

インドキサカルブは個別試験法がなく、またフィプロニルは茶葉に対する個別試験法が定められていないため、厚生労働省が通知する「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」（以下、通知一斉試験法）¹⁾の適用を試みた。その結果、試験液は黄色を呈しており、試料によっては白色沈殿物の生成が確認された。さらに農薬の残留基準値が低い（インドキサカルブ：0.01 µg/g、フィプロニル：0.002 µg/g）

ことから、分析機器の感度によっては通知一斉試験法を使用して残留基準への適合性を判定することが困難な場合も予測され、改良試験法の検討が必要と考えられた。

茶中の残留農薬一斉試験法の精製工程については、色素、カフェイン等の莢雑成分の多さから、複数の固相カラムを組み合わせた方法が検討されている²⁻⁶⁾。色素の除去では、グラファイトカーボン（GCB）/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）積層カラムの下部に GCB カラムを連結した精製法が有効であると報告されている⁵⁾。また、カフェインの除去にはシリカゲルカラムによる精製が有効であることが報告されている^{3,4)}。そこで、これらの精製工程を組み合わせたウーロン茶葉中のインドキサカルブおよびフィプロニルの試験法について検討した。

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

*2 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Determination of Indoxacarb and Fipronil in Oolong Tea Leaves

by Satoko YAMAGUCHI, Satoshi TAKATORI, Yoko KITAGAWA,
Naoki FUKUI, Haruna YAMAMOTO, Keiji KAJIMURA and Hirota
OBANA

方法

1. 試薬

インドキサカルブ MP 標準品（純度 99.0%）およびフィプロニル標準品（純度 98.0%）は和光純薬工業（株）製を用いた。各標準品を 1000 µg/mL にな

るようにアセトンで溶解し、標準原液とした。各標準原液を、インドキサカルブおよびフィプロニルの濃度比が 5:1 (インドキサカルブ : 100 µg/mL、フィプロニル : 20 µg/mL) になるように混合し、混合標準溶液とした。混合標準溶液は、GC-MS 分析用にはアセトン/n-ヘキサン (1:1) を用い、LC-MS/MS 分析用にはメタノールを用いて希釈した。アセトニトリル、アセトン、トルエン、n-ヘキサンおよびメタノールは、和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用を使用した。塩化ナトリウム (残留農薬試験用)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬試験用)、リン酸水素二カリウム (特級)、リン酸二水素カリウム (特級)、酢酸アンモニウム (特級) および LC/MS 用メタノールは、和光純薬工業 (株) 製を使用した。精製水の作成には Millipore 社製 Milli-Q システムを使用した。精製用カラムには、オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラム (ENVI-18、1000 mg、SUPELCO)、GCB/アミノプロピルシリル化シリカゲル (NH₂) 積層カラム (ENVI-Carb/NH₂、500/500 mg、SUPELCO)、GCB/PSA 積層カラム (ENVI-CarbII/PSA、500/500 mg、SUPELCO)、GCB カラム (ENVI-Carb、500 mg、SUPELCO) およびシリカゲルカラム (InertSep SI、1000 mg、ジーエルサイエンス (株) 製) を使用した。

リン酸緩衝液は、リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

2. 試料

試料はインドキサカルブおよびフィプロニルを含まないウーロン茶葉を大阪府内で入手した。

3. 器具および機器

ホモジナイザーは KINEMATICA 社製 Polytron PT10-35、遠心分離装置は日立工機 (株) 製 Himac CR20GIII を使用した。LC-MS/MS は LC 部分に (株) 島津製作所製 Nexera を備えた AB SCIEX 社製 4000QTRAP を使用した。GC-MS は Agilent 社製 5973 inert systems および Thermo Fisher Scientific 社製 Polaris-Q を使用した。

4. 分析条件

4.1 LC-MS/MS

[LC 部]

カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm; 2.1×100 mm; Waters 社製)、プレカラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 µm; 2.1×5 mm; Waters 社製)、移動相 (A) : 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、移動相 (B) : 0.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流速 : 200 µL/min、カラム温度 : 50°C、注入量 : 5 µL、グラジエント (B%) : 0min (35%) →7-16min (95%) →16-26min (35%)

[MS/MS 部]

イオン化モード : ESI、乾燥ガス温度 : 500°C、測定モード : MRM、イオン化電圧 : インドキサカルブ (+4000 V)、フィプロニル (-4500 V)、トランジションおよびコリジョンエネルギー : インドキサカルブ (*m/z* 528/203, 55 V)、フィプロニル (*m/z* -435/-330, -22 V)

4.2 GC-MS (NCI)

カラム : HP-5MSI (0.25 µm; 30 m×0.25 mm; Agilent 社製)、カラム温度 : 50°C (1 min) →25°C/min→125°C (0 min) →10°C/min→300°C (8.5 min)、注入口温度 : 250°C、トランスファーライン温度 : 250°C、注入量 : 1 µL (スプリットレス)、キャリアガス : ヘリウム (コンスタントフロー、1.0 mL/min)、MS イオン源温度 : 150°C、四重極温度 : 150°C、イオン化法 : 負化学イオン化法 (NCI)、反応ガス : メタン、分析モード : SIM、モニタリングイオン : インドキサカルブ (*m/z* 497)、フィプロニル (*m/z* 366)

4.3 GC-MS (EI-SCAN)

カラム : VF-5MS (0.25 µm; 30 m×0.25 mm; Agilent 社製)、カラム温度 : 60°C (1 min) →8°C/min→280°C (5 min)、注入口温度 : 250°C、トランスファーライン温度 : 280°C、注入量 : 1 µL (スプリットレス)、キャリアガス : ヘリウム (コンスタントフロー、1.5 mL/min)、MS イオン源温度 : 250°C、イオン化法 : EI、イオン化電圧 : 70 eV、分析モード : SCAN (*m/z* 45~550)

5. 試験液の調製

5.1 通知一斉試験法

[抽出、塩析および脱水]

通知一斉試験法¹⁾に準じて行った。試料 5.00 g を遠心管に正確に秤量し、精製水 20 mL を加えて 15 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、遠心分離 (3000 rpm ; 10 分間) し、上清をメスフラスコに回収した。遠心管内の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、ろ過した。得られたろ液と先の上清を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした (粗抽出液)。次に粗抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加えて 10 分間振とうした。30 分間静置した後、アセトニトリル層を抽出液とした。

[精製]

抽出液を通知に従って GCB/NH₂ 積層カラムで精製した。精製後の残留物をアセトン/n-ヘキサン (1 : 1) に溶かして、正確に 2 mL にしたものを GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) とした。なお、定量は GC-MS (NCI) で行った。また、LC-MS/MS 分析については、GC-MS 用試験液 0.2 mL を正確に採取して窒素気流下で乾固し、メタノール 0.3 mL および精製水 0.7 mL を正確に加えて LC-MS/MS 用試験液とした (試料 0.1 g/mL 相当)。

5.2 改良試験法

操作手順を図 1 に示した。

[抽出、塩析および脱水]

上記の通知一斉試験法と同様の操作により抽出液を得た。

[精製]

精製 1 : C18 カラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記で得られた抽出液全量を注入した後、アセトニトリル 5 mL で分液ろうとを洗浄して、併せてカラムに注入した。全溶出液を 40°C 以下で濃縮した。乾固する直前にアセトニトリル 3 mL を加えた後、超音波照射し、トルエン 1 mL を追加して不溶成分を溶解させた。

精製 2 : GCB/PSA 積層カラムおよび GCB カラムにアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL をそれぞれ注入し、流出液は捨てた。GCB/PSA 積層カラムの下部に GCB カラムを接続し、バキュームマニホールド

抽出

試料 5.00 g 採取
精製水 20 mL、15 分静置
アセトニトリル 50 mL、ホモジナイズ 1 分
遠心分離 (3000rpm、10 分)
アセトニトリル 20 mL、ホモジナイズ 1 分
アセトニトリル 100 mL 定容 (粗抽出液)

塩析・脱水

粗抽出液 20 mL 採取
塩化ナトリウム 10 g、リン酸緩衝液 20 mL
振とう 10 分、30 分静置、水層廃棄 (抽出液)

精製 1

C18 カラム (1000 mg)
アセトニトリル 5 mL
溶媒除去、アセトニトリル 3 mL、超音波 1 分、トルエン 1 mL

精製 2

GCB/PSA 積層カラム (500/500 mg) + GCB カラム (500 mg)
アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL
溶媒除去、アセトン 10 mL
溶媒除去、アセトン/ヘキサン (3:17) 5 mL
溶媒除去、アセトン/ヘキサン (3:17) 4 mL、超音波 1 分

精製 3

シリカゲルカラム (1000 mg)
アセトン/ヘキサン (3:17) 20 mL
溶媒除去
アセトン/ヘキサン (1:1) 2 mL 定容 (GC-MS 用試験液)
メタノール/水 (3:7) (LC-MS/MS 用試験液)

分析

図 1 改良試験法の手順

に設置した。精製 1 で得られた試験液全量を注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 40 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮し、次にアセトン/n-ヘキサン (3:17) 5 mL を加えて濃縮し、乾固する直前にアセトン/n-ヘキサン (3:17) 4 mL を加えて超音波照射し、不溶成分を溶解させた。

精製 3 : シリカゲルカラムにアセトン/n-ヘキサン (3:17) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。精製 2 で得られた試験液全量を注入した後、アセトン/n-ヘキサン (3:17) 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以

結果および考察

下で 1 mL 以下に濃縮した。窒素気流下で乾固し、正確にアセトン/n-ヘキサン (1:1) 2mL を加えて GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) とした。LC-MS/MS 用試験液も上記と同様に調製した。

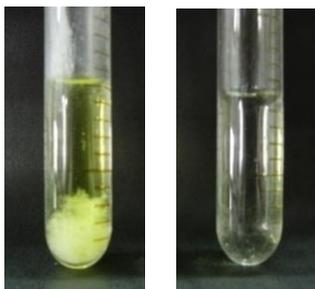
6. 検量線

LC-MS/MS 分析では、混合標準溶液を精製水で 10 倍に希釈したものを検量線に使用した。インドキサカルブおよびフィプロニルの検量線の範囲は、それぞれ 0.20~5.0 および 0.040~1.0 ng/mL とし、最低濃度においても S/N は 10 以上であることを確認した。

GC-MS 分析では、マトリックス添加標準溶液を使用した。マトリックス添加標準溶液は、インドキサカルブおよびフィプロニルが検出されないウーロン茶葉から調製した 1 g/mL 相当の試験液と混合標準溶液を 1:1 で混和した。インドキサカルブおよびフィプロニルの検量線の範囲は、それぞれ 1.0~10 および 0.20~2.0 ng/mL とし、最低濃度においても S/N は 10 以上であることを確認した。

7. 妥当性評価

妥当性評価は、基準値に相当するインドキサカルブおよびフィプロニルをそれぞれ 0.01 および 0.002 µg/g になるように試料に添加し、妥当性評価ガイドラインに示される枝分かれ試験を実施した。すなわち、5.00 g のウーロン茶葉にインドキサカルブおよびフィプロニルをそれぞれ 0.10 および 0.020 µg/mL 含む混合アセトン溶液を正確に 0.5 mL 添加し、30 分間放置してから抽出した。試験で得られたデータから真度、併行精度および室内精度を算出した。なお、枝分かれ試験は、通知一斉試験法で分析者 2 名によって併行数 2 で 3 日間実施し、改良試験法では、分析者 1 名によって、併行数 2 で 6 日間実施した。



(A) 通知一斉試験法 (B) 改良試験法

図 2 GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当)

1. 試験液の性状

通知一斉試験法で得られた GC-MS 用試験液には、莢雑成分が多く確認された。すなわち、試料 0.5 g/mL 相当になるようアセトン/n-ヘキサン (1:1) 溶液で調製した場合、上清は黄色を呈するとともに白色沈殿物が多く認められた (図 2A)。試料によっては、超音波照射を行っても沈殿物の溶解が困難なものもあったが、沈殿物が溶解し定量に支障がない場合、GC-MS 用には試料 0.5 g/mL 相当の試験液を用いた。LC-MS/MS 用試験液は、試料 0.1 g/mL 相当になるようにメタノールおよび水で調製した。当該試験液は薄い黄色で、白色沈殿物も認められなかった。

改良試験法で得られた GC-MS 用試験液 (試料 0.5 g/mL 相当) は、無色であり白色沈殿物も認められなかった (図 2B)。

色素の除去には GCB/PSA 積層カラムの下部に GCB カラムを追加する工程が有効であった。GCB/PSA 積層カラムのみでは、試験液に黄色色素が残存するが、当該色素は下部の GCB カラムで除去された。齊藤らは、色素除去効果は GCB カラムを GCB/PSA 積層カラムの下部に追加した場合に最も有効であると報告している⁵⁾。

上記の精製工程を経ても白色沈殿物は試験液に残存する。この除去にはシリカゲルカラムによるカフェイン除去工程が有効であった。改良試験法の試験液について、GC-MS (EI-SCAN) で分析したところ、カフェインに相当するピークが消失しており、その効果が確認された (図 3)。

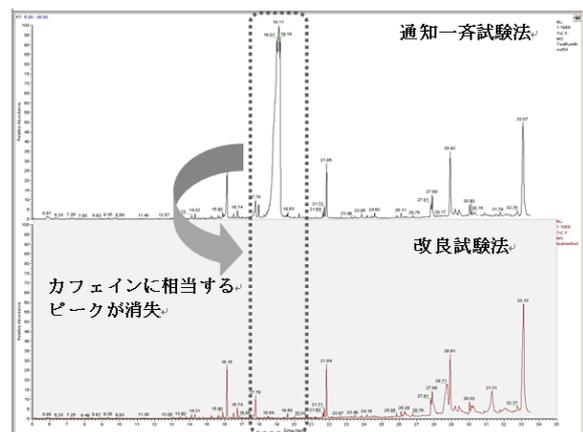


図 3 GC-MS (EI-SCAN) クロマトグラム

表1 妥当性評価結果

	通知一斉試験法				改良試験法			
	LC-MS/MS		GC-MS		LC-MS/MS		GC-MS	
	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル	インドキサカルブ	フィプロニル
真度(%)	80.4	86.9	81.9	84.1	82.9	81.1	78.8	77.6
併行精度(%)	3.9	4.3	4.5	4.1	8.1	6.5	6.2	4.3
室内精度(%)	6.6	5.5	11.2	6.4	13.0	7.2	8.9	6.3

2. 妥当性評価

通知一斉試験法および改良試験法の妥当性評価の結果を示した(表1)。

両方法のクロマトグラムにおいて、選択性について問題となるピークは認められなかった。真度、併行精度および室内精度においても目標値を満たしており、いずれの方法においてもインドキサカルブおよびフィプロニルの基準適合性の判定に使用するうえでの妥当性が示された。

小林らは、1992～2010年の輸入茶中の残留農薬実態を取りまとめ、116検体のうち3検体に基準値超過が認められ、そのうち2検体が一律基準での超過であったと報告している⁷⁾。

このことから一律基準での適合性を判定できる方法は重要であると考えられる。一律基準あるいはそれ以下の濃度での基準適合性の判定において、茶は他の食品と比較して色素、カフェイン等の多量の莢雑成分を含むことから、試験液の精製工程を慎重に行う必要がある。改良試験法はこれら色素、カフェイン等の妨害成分が除かれており、分析機器への影響が軽微になる利点がある。

これらのことから、改良試験法はインドキサカルブおよびフィプロニル以外の農薬についても、一律基準あるいはそれ以下の濃度での基準適合性の判定に適用可能であると推定される。

文献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」[平成17年11月29日食安発第1129002号]
- Kanrar, B., Mandal, S., and Bhattacharyya, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 67 pesticides in made tea, tea infusion, and spent leaves using ethyl acetate extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **93**, 411-424 (2010)
- 岩屋あまね, 下堂菌栄子, 福司山郁恵, 榎元清美, 佐久間弘匡: 茶の残留農薬一斉分析における精製法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報, **11**, 102-108 (2010)
- 荒川正人, 佐野仁, 馬場吉武, 牛谷公郎, 加藤一郎: 超臨界流体抽出(SFE)およびGC-MSによる茶の残留農薬一斉分析法の検討, 食品衛生学雑誌, **53**, 139-145 (2012)
- 齊藤静夏, 根本了, 松田りえ子: LC-MS/MSによる緑茶中の残留農薬一斉試験法, 日本食品化学学会誌, **19**, 104-110 (2012)
- Pang, G.F., Fan, C.L., Chang, Q.Y., Li, Y., Kang, J., Wang, W.W., Cao, J., Zhao, Y.B., Li, N., Li, Z.Y., et al. High-throughput analytical techniques for multiresidue, multiclass determination of 653 pesticides and chemical pollutants in tea--Part III: Evaluation of the cleanup efficiency of an SPE cartridge newly developed for multiresidues in tea. *J. AOAC Int.* **96**, 887-896 (2013)
- 小林麻紀, 大塚健治, 田村康宏, 富澤早苗, 木下輝昭, 上條恭子, 岩越景子, 佐藤千鶴子, 永山敏廣, 高野伊知郎: 輸入茶中の残留農薬実態(1992年4月～2010年3月), 食品衛生学雑誌, **54**, 224-231 (2013)