

# 大豆の残留農薬検査における抽出工程でのろ過条件の比較

保健科学課 微量分析担当

## 1 はじめに

大豆の残留農薬の一斉試験法では、大豆を粉砕しその粉砕試料 10 g に対し水 20 mL を加え 30 分放置後、アセトニトリルを加えホモジナイズすることで抽出液を調製する。ホモジナイズ後のろ過は、通知試験法である GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）

（<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000075497.htm>）では吸引ろ過が採用されている。一方、ホモジナイズ後の大豆試料を定量ろ紙（5 種 A）で自然ろ過したところ目詰まりなくろ過できたことから、ろ過器具等が少ない自然ろ過を行うことができれば操作の効率化が期待される。そこで、試験法の効率化の参考とするため、大豆を用いて、GC-MS/MS による残留農薬検査における抽出工程での吸引ろ過と自然ろ過との比較を行ったので報告する。

## 2 分析方法

### 2.1 試料

大豆を、粉砕機にて 2,000 rpm で 20 秒粉砕後、粒子径が 1 mm 以下になるよう 10,000 rpm で 20 秒粉砕し、均一化したもの。

### 2.2 試薬

標準原液：農薬混合標準品は、林純薬工業（株）PL2005 GC/MS MixI～VI及び7(20 mg/L アセトン溶液)を用いた。個別の農薬標準品は、各残留農薬用標準品を 10～30 mg の範囲で精秤し、1,000 mg/L となるようアセトンで定容した。

混合標準原液：各農薬混合標準品及び個別標準品を混合し、1 mg/L となるようにアセトン及び *n*-ヘキサン（1:1）混液で希釈した。

混合標準溶液：混合標準原液 1 mg/L をアセトン及び *n*-ヘキサン（1:1）混液で希釈し 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/L の混合標準溶液を調製した。

検量線用マトリックス添加混合標準溶液：大豆ブランク試料溶液をガラスインサートに適量分取し、窒素ページにて濃縮乾固後、分取量と同量の混合標準溶液を注入し、0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/L のマトリックス添加混合標準溶液を調製した。

アセトニトリル：関東化学（株）製の高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH7.0）：リン酸水素二カリウム 52.7 g 及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、1 mol/L 水酸化ナトリウム又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L としたものを使用した。

C18 カートリッジカラム：GLサイエンス（株）製 InertSep C18/DRY（1 g/3 g/12 mL）をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングしたものを使用した。

GC/NH2 カートリッジカラム：GLサイエンス（株）製 InertSep GC/NH2（1 g/1 g/20 mL）をアセトニトリル及びトルエン（3:1）混液 10 mL でコンディショニングしたものを使用した。

その他の有機溶媒：残留農薬試験用

その他の試薬：残留農薬試験用又は特級品

水：蒸留水製造装置で処理した水を使用した。

### 2.3 装置・器具等

ガラス繊維ろ紙：ADVANTEC®東洋濾紙（株）製 GA200 ろ紙：ADVANTEC®東洋濾紙（株）製 定量ろ紙 5 種 A 蒸留水製造装置：ADVANTEC®（株）東洋製作所製 RFD240NC

粉砕機：ヴァーダー・サイエンティフィック（株）製 グラインドミックス GM 200

吸引ろ過セット：ガラスフォルダータイプ

ガラス製ロート

GC-MS/MS：GC 部；（株）島津製作所製 GC-2010 Plus、MS 部；（株）島津製作所製 TQ8050

### 2.4 測定条件

GC-MS/MS の測定条件を表 1 に、測定イオンを表 2 に示す。

表 1 GC-MS/MS の測定条件

注入口温度	250 °C
インターフェース温度	280 °C
分析カラム	SH-Rxi-5Sil MS (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm)
カラム温度	105 °C (3 min) - 10 °C/min - 130 °C - 4 °C/min - 200 °C - 8 °C/min - 290 °C (6 min) - 290 °C (6 min) - 10 °C/min - 300 °C (3 min)
カラム流量	1.4 mL/min
注入量	2 µL (スプートレットレス 1min)
イオン化モード (電圧)	EI (70 eV)



## 2.5 試験方法

試験方法を図1に示す。

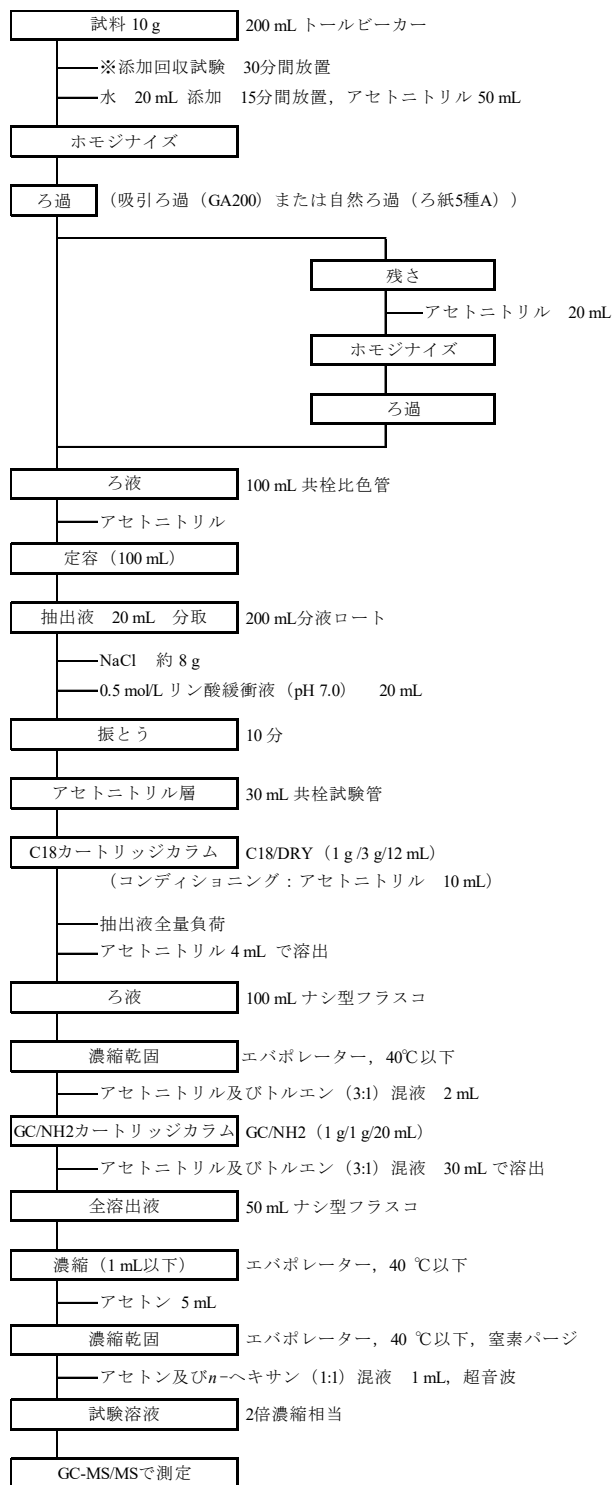


図1 試験溶液調製のフローチャート

## 2.6 添加回収試験

2.5の試験方法について、ホモジナイズ後のろ過を吸引ろ過と自然ろ過の2種類のろ過条件で行った。添加濃度は試料換算濃度として一律基準濃度である0.01 mg/kg及びガイドライン<sup>1)</sup>に従い「各農薬等の基準値に近い一定の

濃度」として選択した0.1 mg/kgの2濃度とし、各濃度の添加回収試験を5併行で実施した。定量は検量線用マトリックス添加混合標準溶液による絶対検量線(検量線範囲は0.01 mg/kgでは0.01~0.1 mg/L, 0.1 mg/kgでは0.05~0.5 mg/L)を用いて行った。ガイドライン<sup>1)</sup>に従い選択性を評価し、真度(以下、「回収率」とする。)及び併行精度を求めた。

## 3 分析結果及び考察

### 3.1 添加回収試験結果

マトリックス検量線の決定係数が0.99以上を満たさない化合物は吸引ろ過条件(以下、「吸引ろ過」とする。)の0.01 mg/kgでのメトプレンだけであった。また、分析対象である農薬等を含まない試料(以下、「ブランク試料」とする。)溶液での選択性が得られなかった化合物は、吸引ろ過ではトリアジメノール、ベナラキシル及びメトプレンの3化合物、自然ろ過条件(以下、「自然ろ過」とする。)ではXMC、ジスルホトン、トリアジメノール、プロマシル及びメトプレンの5化合物であり、ろ過条件により化合物に違いが見られた。

本比較の目的は抽出工程でのろ過条件による回収率への影響の確認であるため、ろ過条件の比較を行う対象は、選択性に問題がなく定量可能な化合物を選択することとし、上記化合物を除外した条件で、0.01 mg/kgで208化合物、0.1 mg/kgで213化合物に対して回収率を比較した。なお、各濃度の対象化合物の併行精度はガイドライン<sup>1)</sup>の目標値を満たしていたことから、ろ過条件による影響については回収率だけで評価することとした。それぞれのろ過条件において、0.01 mg/kgでの回収率比較を図2に、0.1 mg/kgでの回収率比較を図3に示す。

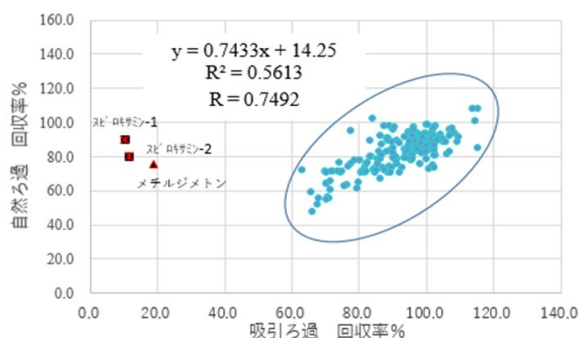


図2 0.01 mg/kg 添加回収試験におけるそれぞれのろ過条件での回収率比較

0.01 mg/kgの回収率では、スピロキサミン(異性体1, 異性体2)及びメチルジメトンの3化合物が吸引ろ過で20%未満であったのに対し、自然ろ過では76~90%と高

くガイドライン<sup>1)</sup>の範囲内であった。そこで、上記3化合物を除く化合物の吸引ろ過と自然ろ過の回収率に対して相関係数及び決定係数を確認した結果、相関係数0.7492と強い正の相関が確認されたが、決定係数は0.5613であった。自然ろ過の回収率は、近似直線式の数値から吸引ろ過の回収率より低くなると考えられ、決定係数が0.6未満であったことから吸引ろ過とやや異なる変動を示すと示唆された。

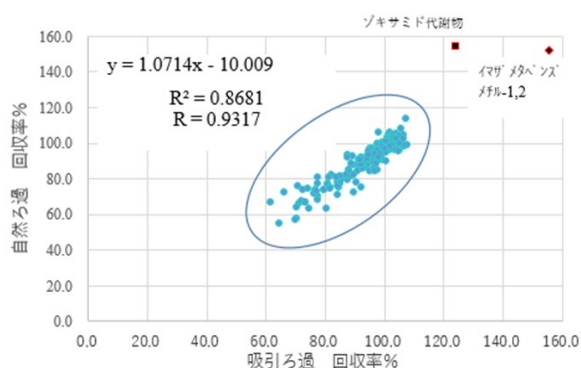


図3 0.1 mg/kg 添加回収試験におけるそれぞれのろ過条件での回収率比較

一方、0.1 mg/kg の回収率についても、回収率が120%を超えたイマザメタベンズメチル及びゾキサミド代謝物の2化合物を除く化合物の吸引ろ過と自然ろ過の回収率に対して相関係数及び決定係数を確認した結果、相関係数0.9317とかなり強い正の相関が確認され、決定係数は0.8681であった。自然ろ過の回収率は、近似直線式の数値から吸引ろ過と同程度と考えられ、決定係数が0.8以上であったことから吸引ろ過と同様の変動を示すと示唆された。

### 3.2 回収率のろ過条件による有意差の検定

回収率のろ過条件による有意差の有無を確認するため、Excelのデータ分析を用いて、一対の標本による平均の差の検定(t検定)を行うこととした。有意水準については、最初5%で行ったところ、有意差が確認されたため1%に引き下げ、対立仮説は「回収率は吸引ろ過の方が自然ろ過よりも大きい」として片側検定を行った。対象の化合物の選定については、3.1と同様、選択性に問題がなく定量可能な化合物とした。0.01 mg/kg 添加回収試験でのろ過条件による有意差の検定結果を表3に、0.1 mg/kg 添加回収試験でのろ過条件による有意差の検定結果を表4に示す。

いずれの濃度においても、回収率の平均値は吸引ろ過の方が大きく、片側検定の結果P値は<0.01であったことから、「回収率は吸引ろ過の方が自然ろ過よりも大きい」と示唆された。

一方、各濃度のそれぞれのろ過条件の回収率平均値を比

較すると、0.01 mg/kg では吸引ろ過の方が8.4ポイント高いのに対し、0.1 mg/kg では吸引ろ過の方が3.1ポイント高かったことから、0.1 mg/kg では0.01 mg/kg よりもろ過条件による回収率の差は小さいと示唆された。

表3 0.01 mg/kg 添加回収試験でのろ過条件による回収率の有意差のt検定結果(有意水準 1%)

	吸引ろ過	自然ろ過
平均	91.519952	83.107893
分散	201.72173	111.12858
観測数	208	208
ピアソン相関	0.5631832	
仮説平均との差異	0	
自由度	207	
t	10.102775	
P(T<=t)片側	4.587E-20	
t境界値片側	2.344497	

表4 0.1 mg/kg 添加回収試験でのろ過条件による回収の有意差のt検定結果(有意水準 1%)

	吸引ろ過	自然ろ過
平均	95.256188	92.09692
分散	115.42067	162.91265
観測数	208	208
ピアソン相関	0.9322795	
仮説平均との差異	0	
自由度	207	
t	9.5729108	
P(T<=t)片側	1.657E-18	
t境界値片側	2.344497	

### 3.3 各化合物の物理的特性等と回収率

#### 3.3.1 ろ過条件による試料マトリックスへの影響

試料マトリックスは、測定へ影響を与える一因であると考えられるため、回収率に影響を及ぼす可能性がある。そこで、添加回収試験においてそれぞれのろ過条件で試料マトリックスに有意差があるかどうかを確認するため、3.1で選定した0.01 mg/kg の208化合物を対象に、マトリックス添加混合標準溶液 0.05 mg/L の混合標準溶液 0.05 mg/L に対するピーク面積の比をそれぞれのろ過条件での試料マトリックス比とし、比較した。結果を図4に示す。さらに、それらの比について一対の標本による平均の差の検定(t検定)を行うこととした。有意水準については、最初5%で行ったところ、有意差が確認されたため1%に引き下げ、対立仮説は「試料マトリックス比は吸引ろ過の方が自然ろ過よりも大きい」として片側検定を行った。結果を表5に示す。

各条件での試料マトリックス比の変動幅は、吸引ろ過が0.62~1.64、自然ろ過が0.51~1.80であり、変動の幅は自然ろ過の方が大きかった。なお、自然ろ過の方が吸引ろ過

よりも回収率が良好だった3化合物については、吸引ろ過が1.05~1.11, 自然ろ過が0.97~1.17で、3化合物の各試料マトリックス比は1に近かった。

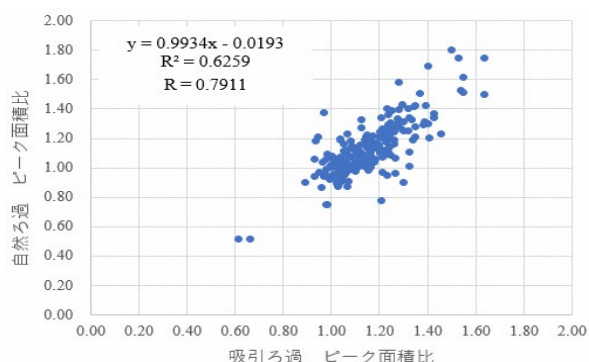


図4 添加回収試験におけるろ過条件による試料マトリックス比の比較

各ろ過条件の試料マトリックス比の比較のため相関係数及び決定係数を確認した結果、相関係数は0.7911と強い正の相関が確認されたが、決定係数は0.6259であった。近似直線式の数値から自然ろ過は吸引ろ過と同程度の試料マトリックス比であると推察されたが、決定係数が0.6程度であったことから吸引ろ過とはやや異なる変動を示すと推察された。

表5 添加回収試験でのろ過条件による試料マトリックス比の有意差のt検定結果(有意水準 1%)

	吸引ろ過	自然ろ過
平均	1.1529851	1.1261169
分散	0.0224159	0.0353456
観測数	208	208
ピアソン相関	0.7911239	
仮説平均との差異		0
自由度		207
t	3.3696138	
P(T<t) 片側	0.0004489	
t境界値 片側	2.344497	

一方、試料マトリックス比の平均値は吸引ろ過の方が大きく、片側検定の結果P値は<0.01であったことから、「試料マトリックス比は吸引ろ過の方が自然ろ過よりも大きい」と考えられた。試料マトリックス比が大きくなると回収率はガイドラインの範囲外になることが予想される。しかし、吸引ろ過の試料マトリックス比は1.15と1に近いこと、定量はマトリックス添加混合標準溶液による検量線を用いて行っていること、回収率の平均値は試料マトリックス比の平均値が高い吸引ろ過の方が高かったことから、試料マトリックスについては、ろ過条件による回収率への影響が少ないものと推測された。

### 3.3.2 各化合物のオクタノール/水分係数とそれぞれのろ過条件での回収率と比較

オクタノール/水分係数(以下、「LogP<sub>ow</sub>」とする)は化学物質の疎水性の尺度であることから、各化合物のLogP<sub>ow</sub>が回収率に影響を与えることが予想される。そこで、厚生労働省の職場のあんぜんサイトのGHSモデルSDS情報([https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen\\_pg/GHS\\_MSD\\_FND.aspx](https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen_pg/GHS_MSD_FND.aspx))等<sup>2~6)</sup>でLogP<sub>ow</sub>を確認できた184化合物(異性体については同じ値とした)に対し、3.1と同様、選択性に問題がなく定量可能な化合物を各濃度で選択し(0.01 mg/kgで181化合物, 0.1 mg/kgは184化合物)、各化合物のLogP<sub>ow</sub>と各濃度におけるそれぞれのろ過条件の回収率を比較した。

0.01 mg/kgでのそれぞれのろ過条件での結果を図5に、0.1 mg/kgでのそれぞれのろ過条件での結果を図6に示す。なお、自然ろ過の方が吸引ろ過よりも回収率が良好だったスピロキサミンのLogP<sub>ow</sub>は2.89, メチルジメトンのLogP<sub>ow</sub>は1.32であった。

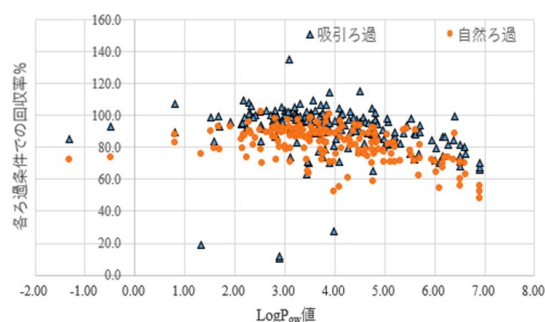


図5 0.01 mg/kg 添加回収試験におけるそれぞれのろ過条件での各化合物のLogP<sub>ow</sub>と回収率比較

0.01 mg/kg 添加回収試験では、LogP<sub>ow</sub>が4までは、同程度のLogP<sub>ow</sub>の場合、自然ろ過で回収率が良好なスピロキサミン(異性体1, 異性体2)及びメチルジメトンを除く化合物で、回収率が100%に近い化合物は吸引ろ過が多かった。LogP<sub>ow</sub>が4を超えるとどちらのろ過条件でも回収率は比例して低くなっていたが、回収率が高い化合物は吸引ろ過が多かった。さらに、LogP<sub>ow</sub>が6以上の9化合物(DDD-p,p', DDE-p,p', DDT-o,p', DDT-p,p', エトフェンプロックス, クロルデン-trans, フェノトリン(異性体1, 異性体2), ヘプタクロル及びペルメトリン-cis)は、自然ろ過で回収率70%を下回り、DDE-p,p', DDT-o,p'及びDDT-p,p'の3化合物については吸引ろ過でも回収率70%を下回っていた。

0.1 mg/kg 添加回収試験では、LogP<sub>ow</sub>が4までは、ろ過条件に関わらず回収率は100%に近い化合物が多かったが、LogP<sub>ow</sub>が4を超えるとそれぞれのろ過条件ともに回収率は低下し、LogP<sub>ow</sub>が6以上の6化合物(DDE-p,p', DDT-o,p', DDT-p,p', ビフェントリン, ヘプタクロル及



びペルメトリン-cis) は、自然ろ過で回収率 70 %を下回っていた。

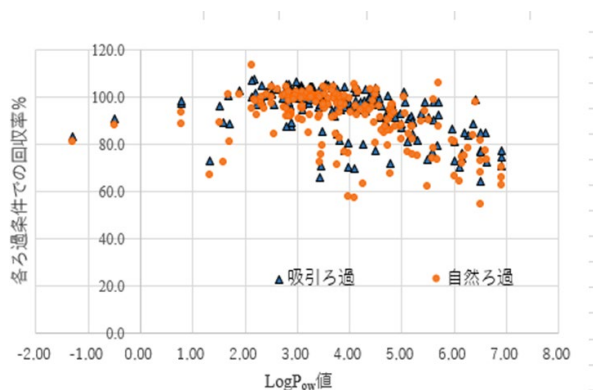


図5 0.1 mg/kg 添加回収試験におけるそれぞれのろ過条件での各化合物の LogPow と回収率比較

以上のことから、0.01 mg/kg 添加回収試験では LogPow に関わらず回収率は吸引ろ過の方が高くなる傾向にあったが、0.1 mg/kg では 0.01 mg/kg よりもろ過条件による回収率の差は小さいと推測された。一方、LogPow が 4 より大きくなると添加濃度に関わらず回収率は低下する傾向にあり、LogPow が 6 以上になると、自然ろ過の方が回収率 70%を下回るものが多かった。

#### 4 まとめ

試験法の効率化の参考とするため、大豆を用いた GC-MS/MS による残留農薬検査について、2 濃度 (試料換算濃度 0.01 mg/kg 及び 0.1 mg/kg) の添加回収試験を行い、抽出工程での吸引ろ過と自然ろ過との比較を行った。その結果、いずれの濃度においても回収率は吸引ろ過が高くなる傾向があると示唆されたが、0.1 mg/kg では 0.01 mg/kg よりもろ過条件による回収率の差は小さいと示唆された。また、0.01 mg/kg については、スピロキサミ

ン (異性体 1, 異性体 2), メチルジメトンの 3 化合物の回収率は、吸引ろ過で 20%未満であったのに対し、自然ろ過では 76~90%と高くガイドライン<sup>1)</sup> の範囲内であった。なお、試料マトリックスについては、ろ過条件による回収率への影響が少ないものと推測された。

各化合物の LogPow と回収率との比較では、添加濃度によりろ過条件による変動の差が確認された。一方、LogPow が 4 より大きくなると添加濃度に関わらず回収率は低下する傾向にあり、LogPow が 6 以上になると、自然ろ過の方が回収率 70%を下回るものが多かった。

#### 文献

- 1) 厚生労働省通知食安発 1224 第 1 号: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について, 平成 22 年 12 月 24 日
- 2) 環境省: 水域の生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準  
<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html> (2021.3.25 閲覧)
- 3) 国際化学物質安全性カード (ICSCs) [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3?p\\_lang=ja](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3?p_lang=ja) (2021.3.25 閲覧)
- 4) 環境ホルモンとして疑われている化合物の例, 環境ホルモンとして疑われている化合物の例とその有機性・無機性など [http://www.ecosci.jp/env/eh\\_jmol.html](http://www.ecosci.jp/env/eh_jmol.html) (2021.3.25 閲覧)
- 5) 陣矢大助, 他: 固相抽出法と GC-MS 自動同定定量データベース法による水資料中半揮発性化学物質の包括分析法の開発, 環境化学, 21 (1), 35~48, 2011
- 6) 富士フィルム和光純薬株式会社 HP 農薬・動物用医薬品混合標準液検索  
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/search/pesticides.html> (2021.3.25 閲覧)