

I. 総括研究報告

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、約 800 品目の農薬等に基準値が設定された。食品の安全確保のためには、多種多様な食品中の多数の残留農薬等を分析し監視しなければならない。そのためには、精確かつ効率的に分析が可能な食品中残留農薬等の分析法が必要である。そこで、29 年度は以下の 4 課題について実施した。

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

欧米等における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。28 年度の農薬の残留分析法に続き、29 年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法について調査した。農薬及び動物用医薬品ともに、分析法の抽出効率が、真の残留濃度を測定するための最も重要な要素であった。そのため、抽出効率の評価を中心に分析法開発に関連する基本的な考え方をまとめた。分析法の評価基準については、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。分析法の性能評価パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、国際的な動向も踏まえ、適切に設定することが望ましいと思われる。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速な分析法の開発を目的として、種々の畜産食品からの効率的な抽出法の検討を実施した。抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液を使用し、添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を添加することにより、種々の畜産食品から高極性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質を効率的に抽出可能であると推察された。

課題4: スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な試験法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本研究ではスクリーニング分析法の性能評価方法を確立し、性能基準を設定するため、海外のスクリーニング分析に関するガイドラインを調査し、検討すべき性能評価項目を選択した。また、スクリーニング分析法の性能評価方法及び性能基準を検討するため、新規スクリーニング分析法としてシリカモノリスピンカラム及び LC-TOF-MS を用いた迅速且つ簡便で、精製効果の高い方法を確立した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

我が国では、畜水産物に残留する抗生物質を検査するバイオアッセイ法として、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法並びに分別推定法」が通知されており、と畜場などを中心にスクリーニング検査法として汎用されている。本研究では、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、30 種

の抗生物質を添加した試料を作成して、本法と機器分析法の両検査法で分析して、検査結果の比較を行った。その結果、本研究で検討した化合物においては、バイオアッセイによる検査では多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が高いことが示された。しかし、本法は簡便で多検体を同時に検査ができるなどの利点も多くあることから、今後は高感度化に向けた検査法の改良を行うとともに、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。

研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所

食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

菊地博之(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

A. 研究目的

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

我が国では、食品中の残留農薬等試験法開発のための公的なガイドラインは示されていない。食品の輸出入が増加し、食品中の残留農薬等の安全性について関心が高まる中、食の安全を確保するためには残留農薬等の検査が重要な役割を担っているが、国際貿易の場において検査結果の信頼性を相互に確保するためには、残留農薬等の検査に用いる分析法についても技術的進歩や国際的な動向等も踏まえて国際的な調和を図る必要がある。そこで、本研究では、欧米等(国際機関、EU、米国、オーストラリア等)における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。28年度の農薬の残留分析法に続き、29年度は動物用医薬品及び畜産物を対象とし

た残留分析法について調査しまとめた。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

動物用医薬品として使用されるアミノグリコシド系抗生物質については、食品中の残留基準が設定されている。よって、各食品中のアミノグリコシド系抗生物質を検査する必要があるが、効率的な検査を実施するためには、簡易・迅速且つ高精度な分析法が必要不可欠である。

本研究では食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速、高感度且つ高精度な分析法の開発を目的として、平成29年度は、非常に極性が高い物質であるアミノグリコシド系抗生物質について、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。

課題4: スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本分担課題では、偽陰性・偽陽性が少なく、効率の良いスクリーニング分析法とするための性能要件について分析データを基に明らかにし、スクリーニング分析法の性能評価方法及び性能基準を確立することを目的とした。平成29年度は海外のスクリーニング分

析に関するガイドライン等を調査し、検討すべき性能評価項目を選択した。また、スクリーニング分析の性能評価方法及び性能基準を検討するため、迅速且つ簡便なスクリーニング分析法を検討した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物に残留する抗生物質の検査は、高感度測定が可能な分析機器の普及に伴い、従来のバイオアッセイ法から機器分析法への移行が世界的に進んでいる。しかしながら、抗生物質の物理化学的特性により機器分析法では、検査が困難な化合物が存在する一方で、バイオアッセイ法は多数の抗生物質を簡便に検査できることから、と畜場等の検査室を中心に、現在でもスクリーニング法として汎用されている。我が国では、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という。)並びに分別推定法」がバイオアッセイ法として通知されている。簡易検査法は、分析操作が簡便で多検体を同時に検査することが可能であるが、抗生物質の種類によっては十分な検出感度が得られないこと、抗生物質の種類を同定することが出来ない等の課題点が指摘されている。そこで、本年度は、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、簡易検査法と機器分析法の両検査法により同一試料を分析して、検査結果の比較を行った。

なお、「課題3: 試料調製方法の検討」は平成 28 年度で終了した。

B. 研究方法

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

29 年度は、欧米等の公的機関等 (Codex、OECD、EU、米国、オーストラリア及びニュージー

ランドなど) において公開されている動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発に関するガイドライン等について調査し、分析法の開発方針及び評価基準についてまとめた。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

LC 測定条件の再検討については、昨年度の検討で設定した LC 条件について、グラジエント条件や分析カラムの長さを再検討し、より高精度且つ効率的な測定条件の確立について検討した。

種々の畜産物からの効率的な抽出法の検討については、検討食品として牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵を用い、種々の抽出溶媒及び添加剤を用いた際の操作性や回収率について検討した。

課題4: スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

EU、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission : CAC) の残留農薬部会 (Codex Committee on Pesticide Residues : CCPR) 及び食品残留動物用医薬品部会 (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods : CCRVDF) において公開している食品中の残留農薬等の分析法に関するガイドラインについて、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。また、米国農務省 (USDA) が公開している畜産物中の農薬のスクリーニング分析法 CLG-PST5.07 に記載されている性能基準等についてもまとめた。加えて、我が国で唯一、食品衛生法の検査法として「スクリーニング分析法」が示されている事務連絡「食品中の放射性セシウムスクリーニング法」の性能評価項目等についてもまとめた。各ガイドライン等を参考にし、スクリーニング分析において検討すべき性能評価項目を選択した。また、スクリーニング分析の

性能評価方法及び性能基準を検討するため、農薬 130 化合物を用いて、シリカモノリスピンカラム及び LC-TOF-MS を用いた迅速且つ簡便なスクリーニング分析法を検討した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

牛の筋肉、肝臓を試料として、基準値濃度の抗生物質を添加した検体を作成し、同一検体を簡易検査法と機器分析法(一斉試験法 I、II、III 及び個別試験法)により検査を実施した。検査結果は、簡易検査法では、培養後の阻止円の直径の大きさにより、機器分析法は回収率を基に評価した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に必要としなかった。

C. 研究結果及び考察

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

分析法の抽出効率、真の残留濃度を測定するための重要な要素であるが、添加回収試験のみの評価では、実際の残留試料からの抽出を反映することができない場合がある。そのため、多くのガイドライン等において、抽出法(及び抽出効率)に関する方針が示されている。そこで、分析法の開発については、抽出法(抽出効率)を中心に、分析法開発に関連する事項を整理した。分析法の評価基準については、各ガイドライン等で評価基準に関する記載があるものについて整理し、昨年度の農薬の残留分析法での調査結果と合わせてまとめた。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

LC 測定条件の改良については、分析カラムの平衡化の際の水和層の形成が不十分であることが推察されたため、平衡化時間を延長したところ、良好な併行精度が得られた。また、分析カラムの長さを 15 cm から 10 cm に変更することで、より効率的な測定が可能となった。

抽出法については、抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液を使用し、タンパク質等を沈殿させるための添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を用いることで、検討した牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵から、極性の高い検討対象化合物を効率的に抽出可能であることが推察された。

課題4: スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

スクリーニング分析の目的は、基準値超過の可能性がない検体をふるい分けることである。このためには、基準値超過の可能性がない検体と、基準値超過の疑いがある検体を判別するための適切な「閾値」の設定が必要である。スクリーニング分析においては、測定のばらつきだけでなく、真度や精度、マトリックスの影響が分析値に大きく影響する。このため、真度、精度及びマトリックスの影響を考慮して、偽陽性が少なく、偽陰性のない「閾値」を設定する方法やその評価方法を検討する必要があると考えられた。加えて、選択性の性能評価方法、性能基準の設定が必要と考えられた。

シリカモノリスピンカラム及び LC-TOF-MS を用いた迅速且つ簡便なスクリーニング分析法を検討した。確立した分析法でりんご及びほうれんそうを用いて 130 農薬について添加濃度 0.01 ppm で添加回収試験を行った。その結果、りんご及びほうれんそうのいずれも fenpropimorph を除き、妨害ピークは認められなかった。また、真度が 70% 未満となった化合物はりんご 3 化合物、ほうれんそう 2 化合物、併行精度 25% 以上となった化合物はりんご 4

化合物であり、検討農薬のほとんどで良好な結果が得られた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

牛の筋肉を試料とした場合は、簡易検査法では30化合物のうち5化合物、機器分析法では26化合物が正しく判定された。また、牛の肝臓の場合は、簡易検査法では30化合物のうち5化合物、機器分析法では22化合物が正しく判定された。上記の通り、簡易検査法による検査結果と、機器分析法による検査結果を比較すると、バイオアッセイ法においては、多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が極めて高いことが示された。

D. 結論

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
 - 1) 認証標準物質を用いた評価
 - 2) 参照分析法との分析値の比較

3) 実残留試料を用いた抽出法の比較

① 2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)

② 実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。

4) 添加回収試験

抽出残留物を異なる溶媒の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法であると考えられる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

分析法の性能評価パラメータについては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。性能評価パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、国際的な動向も踏まえ、適切に設定することが望ましいと思われる。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発を目的として、平成29年度は、LC測定条件の改良、並びに、種々の畜産物からの効率的な抽出法について検討した。

先ず、LC測定条件の改良については、平衡化時間の延長により併行精度が改善され、短い分析カラムを用いることでより効率的な測定が可能と

なった。

抽出法については、抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液を使用し、添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を用いることで、検討食品から極性の高い検討対象化合物を効率的に抽出可能であることが推察された。

課題4:スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

スクリーニング分析法の性能評価方法を確立し、性能基準を設定するため、海外の残留農薬等分析法のガイドライン等についてスクリーニング分析に関する項目を調査した。真度、精度及びマトリックスの影響を考慮して、偽陽性が少なく、偽陰性のない「閾値」を設定する方法やその評価方法を検討する必要があると考えられた。加えて、選択性の性能評価方法の確立及び性能基準の設定が必要と考えられた。

また、迅速且つ簡便なシリカモノリスピンカラム及び LC-TOF-MS を用いた新規スクリーニング分析法を確立した。H30 年度は本分析法を用いてスクリーニング分析を行い、分析データを基に性能評価方法及び性能基準を設定する予定である。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

本研究において検討した 30 種の抗生物質を検査対象とした限りでは、簡易検査法においては、多くの抗生物質で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。本法は、分析操作が簡

便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、スクリーニング検査として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。今後は、簡易検査法の高感度化に向けた改良を行うとともに、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito-Shida S., Nemoto S., Teshima R., Akiyama H. • Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2016 • 33 (119-127)
2. Saito-Shida S., Sakai T., Nemoto S., Akiyama H. • Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2017 • 34 (1153-1161)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし