

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

平成 29(2017)年 5 月

目 次

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 -----	1
根本 了	
II. 分担研究報告	
1. 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 -----	9
根本 了	
2. 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 -----	79
坂井隆敏	
3. 課題3: 試料調製方法の検討 -----	103
志田(齊藤)静夏	
4. 課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究 -----	125
菊地博之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	135

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、現在約 800 品目の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、多種多様な食品中の膨大な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、28 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

28 年度は、欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中の農薬の残留分析法の開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査した。農薬の残留分析法の開発では、抽出効率が鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができないため、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ことが求められる。抽出法を変更する場合には、抽出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発するために活用できるものと思われる。評価基準については、評価パラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、コーデックス委員会の残留農薬部会で議論されている目標値が参考になるものと思われる。

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、まず、アミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

両性イオン型官能基を修飾した親水性相互作用クロマトグラフィー用分析カラムを使用し、適切な移動相条件を検討した結果、選択した全ての検討対象化合物(11 化合物)において比較的良好なピーク形状が得られた。

課題3: 試料調製方法の検討

分析に供する試料量を少量化することができれば、検査の迅速化やコスト削減が期待される。しかし、試料の均質化が不十分な場合、少量の分析用試料を用いると分析値のばらつきが大きくなる。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があった。これらの結果から、規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は 10.0 ± 0.1 g が適切と考えられた。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物中の残留抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等(米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランド)における公定試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。併せて、我が国のバイオアッセイによる通知試験法を調査して、欧米等における試験法と比較した。

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(EU、米国、国際機関等)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年度は農薬の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28年度は、検討対象化合物であるアミノグリコシド系抗生物質をLC-MS/MSで高感度且つ高精度に測定可能な測定条件の確立について検討した。

課題3:試料調製方法の検討

分析に供する試料量を少量化することができれば、使用する溶媒・試薬量の削減や濃縮等の操作時間の短縮が可能となり、検査の迅速化やコスト削減が期待される。しかし、試料の均質化が不十分で、試料中の農薬等の濃度分布が一様でない場合、少量の試料を用いて分析を行うと分析値がばらつき、食品の規格基準への適否判定においては誤判定の原因となる可能性がある。

食品の種類によっては均質になりにくい場合があることや、試料調製方法によって均質性が大きく異なる場合があることは、経験的には分かっているものの、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した報告

は極めて少ない。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。また、食品の規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)について提案した。

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法は、高感度、高精度に分析することが可能な分析機器の普及に伴い、バイオアッセイ法から機器分析法への移行が進んでいる。我が国では、微生物学的試験法として 2 試験法が通知されているが、十分な検出感度が得られない等の多くの課題点が指摘されている。このため、欧米等のバイオアッセイ法の整備状況を把握し、バイオアッセイ法及び機器分析法の特性を踏まえた、新たな試験体系・試験法の提案が必要と考えられる。しかしながら、欧米等におけるバイオアッセイ法を詳細に調査した報告は極めて少ない。そこで、28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。

なお、「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」は 29 及び 30 年度に実施する予定である。

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

28 年度は、日本の厚生労働省及び農林水産省並びに欧米等の公的機関等 (EU、EPA (米国)、FDA (米国)、AOAC International (米国)、オーストラリア、ニュージーランド、コーデックス委員会、

IUPAC 及び OECD) において公開されている農薬の食品中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、分析法の開発の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

検討対象化合物は、構造や物性等を考慮し、アプラマイシン、アミカシン、カスガマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン C1、ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン及びハイグロマイシン B の合計 11 化合物を選択した。これらの検討対象化合物について、タンデム型質量分析計 (MS/MS) における測定条件を最適化した後、液体クロマトグラフ (LC) における測定条件の最適化として、種々の分析カラムの適用性検討、並びに、移動相条件の最適化を行った。

課題3: 試料調製方法の検討

予め農薬の残留を確認したオレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんごを、常温磨砕または凍結粉砕により試料調製した。得られた試料を 2、5、10 及び 20 g (各 5 個) 採り、通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準じて試験溶液を調製後、LC-Orbitrap-MS で測定し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

欧米等で、動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署へのメールでの聞き取り調査及び文献調査を実施した。我が国のバイオアッセイによる検査の実施状況等は、検疫所、食肉衛生検査所、民間の検査機関等に対して、聞き取り調査を実施した。

(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

分析法の開発は、抽出法、精製法及び測定法の検討の3つの過程に大別される。このうち、抽出法(抽出効率)は、農薬の添加試料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と考えられる。抽出法は、分析操作の中で鍵となる重要な操作であるが、実残留試料を用いた検討を、検査を実施する各試験室で行うことには限界があると考えられる。そこで、各ガイドライン等で抽出法(抽出効率)についてどのような方針を示しているかを中心に整理した。

分析法の評価基準については、各ガイドライン等について、分析法の評価基準に関して記載があるものについて整理した。

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

MS/MS 測定においては、エレクトロスプレーイオン化法・ポジティブイオンモードを採用することで、全検討対象化合物について適切な測定イオンの選択が可能であった。

LC 測定条件の検討では、先ず、種々の分析カラムの適用性を検討し、両性イオン型官能基を修飾した親水性相互作用クロマトグラフィー用分析カラムを用いることで、全検討対象化合物について良好な保持が得られることを明らかにした。次いで、移動相 A 液に 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)を用いることで、全検討対象化合物についてテーリングの小さい良好なピーク形状が得ら

れることを確認した。

課題3: 試料調製方法の検討

規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を検討するため、野菜・果実を常温磨砕または凍結粉砕により試料調製後、得られた試料を 2、5、10 及び 20 g(各 5 個)採り、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

まず、ナイフミル(理化学実験用の磨砕装置)を用いて、農薬が残留した野菜・果実(オレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんご)を常温磨砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。その結果、ぶどうを除き、いずれの食品も試料量によらず分析値のばらつきは RSD10%未満となった。ぶどうにおいて検出されたアゾキシストロビン及びイミダクロプリドについても、試料量によらず、RSD10%未満となった。これに対し、同一の試料中に残留していたシアゾファミドは、試料量 10 及び 20 g では RSD5%未満となったが、試料量 5 g では 18.5%、2 g では 33.3%と非常に大きくなった。ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドを除き、試料量 2 g の場合においても、我が国の妥当性評価ガイドライン及び EU のガイドライン(SANTE/11945/2015)の併行精度の目標値を満たした。一方、ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドは試料量 2 g では目標値を満たさなかった。ぶどうにおいて同一試料中に残留していた農薬の分析値のばらつきが、農薬によって大きく異なったのは、試料中の各農薬の濃度分布が異なることが原因と考えられた。

次に、家庭用フードプロセッサーを用いて比較的均質化が困難とされているトマトを常温磨砕し、分析値のばらつきを求めた。ボスカリドが残留したトマトを最大回転量で 15 秒間、10 回磨砕した結果、試料量 2 g でも分析値のばらつきは RSD10%未満となった。ボスカリドは浸透移行性が比較的高く、果皮だけではなく、果肉にも分布していたと考えら

れる。このため、家庭用フードプロセッサを用いて調製した試料は、ナイフミルを用いて調製した試料と比較して均質性はやや劣るものの、分析値のばらつきは大きくならなかったと考えられた。一方、フルジオキソニルが残留したトマトを最大回転量で15秒間、1回のみ磨砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めたところ、試料量20gの場合においてもRSD20%以上と非常に大きくなった。フルジオキソニルは浸透移行性が低いため、果皮に多く残留し、果肉にはほとんど分布していなかったと推測される。このような場合は、試料の均質化が十分でないと分析値のばらつきが大きくなるものと考えられた。

最後に、フルジオキソニルが残留したトマトを凍結粉碎し、分析値のばらつきを求めた。その結果、試料量2gの場合でも分析値のばらつきはRSD10%未満となり、ナイフミルを用いて常温磨砕した場合とほぼ同程度であった。

以上の結果から、①試料調製方法(使用装置、操作方法を含む)によって試料の均質性は大きく異なること、②均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を5g以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があることが示された。本研究結果から、食品の規格基準への適否判定のための試験の試料量(野菜・果実の場合)は 10 ± 0.1 gが適切と考えられた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

米国では、食肉及び家禽組織における残留抗生物質のバイオアッセイ法として、7種の平板を使用した7-plate法が公定法として示されており、その他にも、STOP法、CAST法、FAST法が、と畜場などの現場の検査室でスクリーニング法として用いられている。EUでは、1980年代に開発された4種の平板を用いる4-plate法が残留抗生物質のスクリー

ニング法として用いられている。カナダでは、バイオアッセイによる公定試験法は示されておらず、LC-MS/MS等を用いた機器分析法が示されている。カナダで実施されている「全国残留化学物質のモニタリングプログラム」では、残留抗生物質の検査法として、STOP法が畜産物のスクリーニング法として示されている。オーストラリアでは、残留抗生物質のバイオアッセイによる公定検査法は示されていなかったが、LC-MS/MSを用いる機器分析法とEUで開発された4-plate法が検査に用いられている。日本の畜水産食品中の残留抗生物質の検査は、「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」が微生物学的試験法として通知されている。本法は、現在でも食肉衛生検査所等で検査に汎用されている。

欧米等で用いられている上記のバイオアッセイ法は、検査試料をそのまま、または緩衝液で抽出した液体を培地に載せる方法である。一方で、我が国のバイオアッセイ法は、試料からの抽出操作、固相カラムを用いる精製操作を行う点において、他の国の方法と大きく異なっていた。このため、本法では操作がやや煩雑となるが、マトリックスの影響を比較的受けにくい方法であると推察された。

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

28年度は、欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中の農薬の残留分析法の開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査した。農薬の残留分析法の開発では、抽出効率が鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができないため、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ことが求められる。抽出法を変更する場合には、抽

出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発するために活用できるものと思われる。

評価基準については、評価パラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、コーデックス委員会の残留農薬部会で議論されている目標値が参考になるものと思われる。

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 28 年度は、LC-MS/MS を用いたアミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

種々の検討の結果、本研究で設定した LC-MS/MS 測定条件を用いることで、選択したアミノグリコシド系抗生物質 11 化合物について比較的良好的なピーク形状が得られた。一方、混合標準溶液の繰り返し測定においては、測定回数の増加に伴うピーク面積値の減少傾向が確認されたことから、原因を調査し、測定条件を改善する必要があると考えられた。

課題3: 試料調製方法の検討

食品の規格基準への適否判定のための試験に

おける適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があった。これらの結果から、規格基準への適否判定のための試験の試料量(野菜・果実の場合)は 10 ± 0.1 g が適切と考えられた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物中の残留抗生物質等を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における試験法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を調査した。本研究で調査した国では、様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査に用いられていることが明らかになった。しかし、いずれの方法においても、マトリックスの影響により誤判定となる可能性があり、また検出感度が低く基準値判定には適用できない等の課題が認められた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

1. 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

研究分担者 根本 了

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

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

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

欧米等(EU、米国、国際機関等)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年度は農薬の残留分析法について調査した。

残留農薬分析法の開発において、抽出効率は鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができず、標準添加法や安定同位体標識した内標準法を用いても補正することはできない。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登録申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。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されることが求められる。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。抽出法を変更する場合には、抽出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発することに活用できるものと思われる。

残留農薬分析法の評価基準については、評価するパラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については国・機関により異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、CodexのCCPRで議論されている目標値が参考になるものと思われる。

A. 研究目的

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、現在約 800 品目の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性確保のためには、膨大な数の残留農薬等を分析・監視する必要があり、効率的かつ精確に定量可能な分析法の確立が望まれている。

我が国では、食品中の残留農薬等の基準値が

遵守されていることを確認するための分析方法として、厚生労働省から公示試験法が告示又は通知されている。公示試験法の開発は、厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部基準審査課長のもとに設置された「残留農薬等公示分析法検討会」及び「残留農薬等分析法検討会」において行われている¹⁾。「残留農薬等分析法検討会」では年度計画に基づき新規個別試験法・一斉試験法の開発、既存試験法の改良、既存・新規公示試

験法の妥当性評価等を実施している。これら開発された試験法や妥当性評価結果は、残留農薬等公示分析法検討会で確認・評価され、試験法として公示される。試験法開発に当たっては、残留農薬等分析法検討会において「残留農薬等試験法検討実施要領」を作成し、本実施要領に基づいて試験法開発が行われている。この実施要領は、これまでの検討会での残留試験法の開発方針についてまとめたものであるが、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としては示されていない。

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。残留農薬等試験法開発において国際的整合性を考慮することにより、試験法の国際協調が図られ、食品の輸出入時の検査結果についても国際協調を図ることができる。更には試験法の違いによる係争を避けることも期待できる。また、試験法開発の効率化・信頼性の向上が期待される。

そこで、本研究では、欧米等(EU、米国、国際機関等)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。残留農薬と残留動物用医薬品の分析法の開発は、国際機関及び諸外国では一般に開発主体(組織・団体)が異なる。そこで、28年度は農薬の残留分析法について調査し、29年度に動物用医薬品の残留分析法について調査し、まとめることとした。

B. 研究方法

28年度は、欧米等の公的機関等(国際機関、EU、米国、オーストラリア及びニュージーランド)において公開されている農薬の食品中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た。その結果、本検討では以下の各指針について、分析法の開発の方針及び評価基準についてまとめた。

(1) 厚生労働省(日本)

食品中の残留農薬等試験法の開発は、厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部基準審査課長のもとに設置された「残留農薬等公示分析法検討会」及び「残留農薬等分析法検討会」において行われている。本検討会では、試験法開発に当たり、「残留農薬等試験法検討実施要領」¹⁾を作成し、本実施要領に基づいて試験法開発が行われていることから、本実施要領についてまとめた。

(2) 農林水産省(日本)

農薬の登録申請の際に必要な試験の実施方法等については、「12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)」等において定められている。農薬の残留分析法に関しては、当該通知の別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」の「4. 残留性に関する試験 ○農作物への残留性に関する試験 作物残留試験(識別番号 3-1-1)及び○家畜への残留性に関する試験 家畜残留試験(識別番号 3-2-1)」²⁾で定められていることから、この内容についてまとめた。

(3) EU

EUにおける農薬の登録申請に必要な残留分析法の方針をまとめたガイドラインとしては「SANCO/825/00 - Guidance document on residue

analytical methods」³⁾がある。また、モニタリングのための残留農薬分析法の精度管理及びバリデーションのための技術的なガイドラインとして「SANTE/11945/2015 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed」⁴⁾がある。これら2つのガイドラインについてまとめた。

(4) EPA(米国)

米国では、環境保護庁(EPA)から農薬の登録申請の際に必要な試験の実施方法等についてガイドラインが示されている。農薬の残留分析法に関するガイドラインとして、「OPPTS 860.1340 - Residue Analytical Method」⁵⁾(翻訳版(仮訳)を資料①として添付)が示されており、本ガイドラインについてまとめた。

(5) FDA(米国)

米国における食品全般(食肉、鶏肉及び卵を除く)及び飼料中の残留農薬のモニタリング検査は、医薬食品局(FDA)により実施されている。残留農薬のモニタリング検査に用いる分析法に関するガイドラインとしては、「Pesticide Analytical Manual, Volume I, Multiresidue Methods, 3rd Edition, 1994」⁶⁾があり、本ガイドラインについてまとめた。

(6) AOAC International(米国)

AOAC International(AOAC Int.)は米国に本部を置く、分析法に関する民間非営利団体である。AOAC Int.は分析法集(Official Methods of Analysis of AOAC International)を発行しており、当該分析法集に収載されている分析法は、米国のFDAやUSDAにおいて公定法又は公定法に準じた分析法として位置づけられている。また、AOAC Int.は、分析法を導入する際の妥当性評価試験に関するガイドラインとして「AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods

for Dietary Supplements and Botanicals」⁷⁾を示しており、本ガイドラインについてまとめた。

(7) オーストラリア

オーストラリアでは、農薬等の登録は農薬・動物用医薬品局(Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority: APVMA)が所管している。APVMAより農薬の登録申請に必要な手順やデータ等が「Agricultural Manual of Requirements and Guidelines - Ag MORAG」⁸⁾として示されており、その中に残留分析法が含まれている。更に、分析法のより詳細な要件については、「Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method」⁹⁾(翻訳版(仮訳)を資料②として添付)として示されている。これら2つのガイドラインについてまとめた。

(8) ニュージーランド

ニュージーランドでは、農薬等の登録は第一次産業省(Ministry for Primary Industries: MPI)が所管している。登録申請に必要なデータ等についてはMPIより「Residue Data for Agricultural Chemical Registration ACVM Information Requirements 41」¹⁰⁾として示されており、残留分析法もその中に含まれている。本ガイドラインでは、残留分析法はOECDガイドライン(OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5)の要件に従うことが規定されている。このOECDガイドラインは内容により約10の部分に分かれているが、農薬の残留分析に関連するガイドラインとしては、「Other Test Guidelines, Introduction to OECD Test Guidelines on Pesticide Residues Chemistry Section 5 - Part A」¹²⁾と「Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops」¹³⁾がある。この2つのOECDガイドラインについては、OECDの項で他のOECDガイドラインと合わせてまとめた。このほか、残留農薬のモニタリングに用いる分析法の要件がMPIから「Recognised pesticides analytical laboratories and

residue test methods (Plants)』¹¹⁾として示されている。ニュージーランドについては、MPI より示されている2つのガイドラインについてまとめた。

(9) コーデックス委員会

コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC)からは、残留農薬分析における GLP ガイドランとして「Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993」¹⁴⁾がだされている。本ガイドラインは、主に分析法の制度管理を目的としたものであるが、分析法の要件についても示している部分があるためこれをまとめた。また、CAC の部会の一つである残留農薬部会 (Codex Committee on Pesticide Residues: CCPR)において、食品中の残留農薬分析法の性能評価基準のためのガイドラインの検討が行われている。まだ検討中であり最終版ではないが、2016年7月の第39回コーデックス委員会でステップ6としてガイドライン原案「Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016」¹⁵⁾(翻訳版(仮訳)を資料③として添付)が採択されているためこのガイドライン原案をまとめた。

(10) IUPAC

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)は、各国の化学者を代表する国内組織の連合であり、IUPAC からは化学における国際的な標準化のための様々なガイドライン等が示されている。IUPAC のガイドラインのうち「Harmonized Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement.」¹⁶⁾は、分析結果における回収率補正に関するガイドラインであるが、分析法の考え方についても述べている部分があるため、

本ガイドラインについてまとめた。本ガイドラインは、一部修正したうえで、コーデックス委員会のガイドライン「Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001」¹⁷⁾としても採用されている。

(11) OECD

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)は、国際経済全般について協議することを目的とした国際機関であるが、農薬を含む化学物質の分析法や評価方法について様々なガイドラインを示している。また、農薬に特化した分析法や評価方法に関するガイドラインも多数示している。CCPR において検討中の食品中の残留農薬分析法の性能評価基準のためのガイドラインにおいて、OECD ガイドラインの「Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method - Guidance used in support of pre- and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products, ENV/JM/MONO(2014)20」¹⁸⁾(翻訳版(仮訳)を資料④として添付)及び「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17」¹⁹⁾(翻訳版(仮訳)を資料⑤として添付)が参考とされていることから、これらのガイドラインについてまとめた。

C. 研究結果及び考察

1. 分析法の開発の方針について

B. 研究方法で示したガイドライン等について、分析法の開発方針についてまとめた。分析法の開発は、抽出法、精製法及び測定法の検討の3つの過程に大別される。このうち、精製法及び測定法は、農薬を添加した試料を用いて評価することが可能であり、様々な検討手段を適用可能である。一方、抽出法(抽出効率)については、農薬の添

加試料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と考えられる。抽出法は、分析操作の中で鍵となる重要な操作であるが、実残留試料を用いた検討を、検査を実施する各試験室で行うことには限界があると考えられる。そこで、各ガイドライン等で抽出法(抽出効率)についてどのような方針を示しているかを中心に整理した。

(1) 厚生労働省(日本)

「残留農薬等試験法検討実施要領」¹⁾

実施要領には、試料採取、試料量、抽出溶媒、抽出操作、茶の試験法、凝固処理、濃縮、転溶、脱水、アセトニトリル/ヘキサン分配、カラムクロマトグラフィー、測定について及び全般的な事項について記載されている。抽出法については、抽出溶媒及び抽出操作の項で操作法等が示されている。各項目の中で特に留意すべき事項を以下に抜粋した。

1) 抽出溶媒

① 農産物の場合は、原則としてアセトンを使用するが、他に適切な抽出溶媒があれば他の溶媒を用いることも可能としている。

② 畜水産物の固体試料(筋肉、脂肪、内臓、魚介類等)から抽出する場合、試料から農薬等を脂肪とともに抽出し、抽出した脂肪中の農薬を分析する方法が一般的である。これは、固体試料の場合、脂肪組織とアセトニトリルのような脂肪を溶解しない溶媒との間では効率的な分配(抽出)が行われず、試料から農薬を十分に抽出できない可能性があるためである。そのため、畜水産物の固体試料に対する試験法開発に当たっては、原則として農薬を脂肪とともに抽出する方法を検討する。ただし、農薬等の物理化学的性質等から脂肪とともに抽出することが困難な場合には、脂肪を溶解しない溶媒の使用も可能としているが、その場合には、

融解脂肪を用いた抽出状況の検討をすることとされている。なお、抽出にアセトニトリルとヘキサンの混合溶媒を用いて、アセトニトリルに抽出する場合についても、脂肪はヘキサンにより溶解するが、抽出は脂肪を溶解しない溶媒(アセトニトリル)で行うため、この場合も融解脂肪を用いた抽出状況の評価を実施することとされている。

③ 融解脂肪を用いた抽出状況の検討は、畜水産物の固体試料からの農薬等の抽出において、アセトニトリルなどの脂肪を溶解しない溶媒に農薬等を抽出する場合に実施する。脂肪(牛、豚の脂肪など)を加温して融解させたものに農薬等を添加して均一にした後、再度凝固させた状態からの農薬等の抽出状況の評価する。脂肪の加温はできるだけ低温(概ね 40℃以下)で行い、添加により農薬等が分解や消失しない条件で行う。また、抽出操作は脂肪が再凝固してから 30 分間程度放置後に開始し、脂肪が溶解又は少なくとも微細な粒子として均一に分散する条件で行い、高速ホモジナイザー(ポリロン等)を用いてホモジナイズ抽出する。なお、抽出の際にエマルジョンが形成された場合には、遠心分離等の処理を行う。また、遠心分離後にもエマルジョンが残る場合には、残ったエマルジョンについて更に抽出操作を行う。エマルジョンが消失するまで必要以上に長時間放置することは避ける。

④ 畜水産物の固体試料の抽出方法を脂肪と脂肪以外の食品とで分ける理由がない場合には、脂肪以外の食品についても原則として脂肪と同一の方法で実施することが推奨されている。

⑤ 畜水産物の液体試料(乳、卵、はちみつ等)の場合には、液-液分配と見なすことができるので、アセトニトリルのような脂肪を溶解しない溶媒を用いても試料との間の分配により農薬を抽出可能と考えられる。動物用医薬品(飼料添加物を含む)につ

いても原則として同様の取扱いとする。

⑥ 抽出溶媒量は、試料量(5.00～20.0 g)に応じて、1回目 50～100 mL、2回目 25～50 mLを用いることされており、食品成分(水分含量、脂肪含量、抽出残渣量など)によっては、十分攪拌(ホモジナイズ)可能な範囲で、抽出溶媒量を適切な量に変更しても良いとしている。また、抽出時にあらかじめ抽出溶媒と混和する溶媒(水を含む)を試料に添加した場合には、添加による抽出溶媒の希釈によって抽出条件が大きく変化しないように留意する。

⑦ 全操作を通じて、ベンゼン、クロロホルム及び四塩化炭素は使用しない。ジクロロメタンの使用もできるだけ避ける。

2) 抽出操作

① 抽出操作は、1回目及び2回目ともに原則としてホモジナイズ抽出を用い、適切な理由がある場合を除き振とう抽出は原則として用いない。やむを得ず振とう抽出を採用する場合は条件も記載する。

② 抽出液の分離は、吸引ろ過又は遠心分離など適切な方法を用いる。吸引ろ過の際には、原則としてケイソウ土等をろ過助剤に使用する。ただし、ケイソウ土等を用いると吸着等の不具合を生じる場合には、ケイソウ土等を使用しないなど、他の適切な方法を用いる。なお、ケイソウ土等を用いると吸着するような場合には、そのことを記載する。

(2) 農林水産省(日本)

「12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)」別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」の「4. 残留性に関する試験 ○農作物への残留性に関する試験 作物残留試験(識別番号 3-1-1)」²⁾

農薬の農産物中の残留分析法に関連する指針については、「8. 試料の分析」の「(3)分析方法」

において、以下の事項(抜粋)が示されている。なお、試験は、「分析対象物質を科学的に分析できる方法により行う」としているが、抽出法に関する具体的な指示等は示されていない。

① 試料は、分析部位ごとにその全量又は均質化した一部を磨砕して分析に供する。

② 分析対象物質を科学的に分析できる方法により行う。なお、食品規格(残留農薬基準値)の設定に際して分析法が定められている場合は、当該方法による。

③ 分析対象物質の残留量は ppm で表す(この場合の ppm は重量比である)。

④ 分析は、各試料ごとに少なくとも 2 回行う。

⑤ 試料は、原則として、受領後速やかに分析に供することとするが、やむを得ず試料を一時保管しなければならない場合は、適切な管理条件下に保管し、保管期間中は、分析対象物質の安定性を確認するため保存安定性試験を実施する。

⑥ 保存安定性試験は、無処理区から採取した試料を、作物残留試験における分析試料と同一の形態にした上で既知量の分析対象物質を添加し、分析試料と同一条件で同一期間以上保管した試料を分析する方法により行う。

また、以下の事項を報告することとしており、試験に使用した分析方法の概要及び詳細が含まれている。i 被験物質、ii 供試農作物の栽培及び被験物質の施用方法等、iii 供試農作物の栽培期間中における気象条件(気温、降雨量、日照等)、iv 分析対象物質、v 分析方法(概要及び詳細)、vi 分析対象物質ごとの定量限界及び回収率、vii 試料の調製方法等及びviii 分析結果

「12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)」別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指

針」の「4. 残留性に関する試験 ○家畜への残留性に関する試験 家畜残留試験(識別番号 3-2-1)」²⁾

農薬の畜水産物中の残留分析法に関連する指針については、「5. 試験方法」の「(8) 試料の分析」において、「定量限界は、当該化合物の毒性によるが、原則 0.01~0.05 mg/kg 以下を目途に設定する」ことが示されている。また、「6 試験報告書に記載すべき事項」の「(2) 材料及び方法」及び「(3) 結果と考察」において、分析法に関連する事項に関連する内容を以下に抜粋した。試料の抽出、精製及び測定に用いた方法の詳細について報告することが求められているが、抽出法に関する具体的な指示等は示されていない。

(2) 材料及び方法

① 抽出、精製、測定及び解析に用いた方法

試料の抽出、精製及び測定に用いた方法の詳細。組織等中の残留物質の同定、定量及びその結果の解析に用いた方法。

② 試料の分析

ア 残留分析に採用した分析方法(妥当性検証結果、回収率及び分析感度を含む。)の詳細。分析対象物質の選定に関する陳述。なお、当該分析方法についての情報を他報告書で提出している場合には、当該報告書を引用することにより、代謝物が分析対象である場合も同様。

イ 残留濃度及び回収率の根拠となるデータ(対照群、添加回収試料(保存安定性を確認するための試料を含む。)及び投与群の試料重量、最終の抽出液量並びにクロマトグラム上のピークの高さ又はピークの面積等)

ウ 使用した分析機器(その測定条件を含む。)及び試薬。抽出及び精製方法が複雑である場合にはそのフローチャート。

エ 分析法を検証しその感度(定量限界)を確定

するため、添加回収試験の結果を記載する際には次の各項目を含める。

(ア) 添加した化合物及び試料(使用した組織等の名称)

(イ) 添加濃度

(ウ) 添加濃度ごとに添加した化合物別の反復分析回数

オ 添加、抽出、分析の日付。添加又は抽出等を行った日に分析をしない場合、当該試料の保存条件。

カ 検量線並びに各組織等ごとの対照群、添加回収試料及び投与群について残留物の代表的なクロマトグラム、生データを用いた濃度計算及び回収率の例

(3) 結果と考察

① 各組織、乳、卵での分析対象物質の回収率(%) (分析ごとの回収率を示すこと。)

② 各組織、乳、卵での分析対象物質の経時的な保存安定性。保存期間及び保存条件(温度等)。

③ 各投与量における各組織等中の残留濃度(対照群試料も含む。)(分析値は個々の試料について示し、回収率による補正を行ったかどうかを明記すること。また、分析対象物質が複数の物質である場合には、分析可能な限り各物質ごとの分析値を報告すること。なお、乳及び卵中の残留濃度は、各試料採取日の投与量ごとに報告すること。)

(3) EU

「SANCO/825/00 - Guidance document on residue analytical methods」³⁾

本ガイドラインは農薬の登録申請者及び残留基準(MRL)の設定又は修正を求める組織(国又は国際機関等)を対象として作成されたもので、EUにおける農薬の登録申請時の分析法の方針をまとめたものであり、モニタリングのための分析法の要

件等が示されている。分析法開発に関連する事項としては、ガイドラインの「2. 一般的事項」に、抽出効率に関する要件が示されている。

『2.13 抽出効率

植物、植物製品、食品（植物及び動物起源のもの）及び飼料中の残留物を定量するための残留分析法で使用される抽出法は、放射性標識された分析物由来の実残留試料を用いて、残留物 \geq LOQが予想されるすべてのマトリクスグループについて検証されるべきである。

データ又は適切な試料は、事前登録代謝試験、輪作作物試験又は給餌試験から入手可能かもしれない。そのような試料が抽出法を検証するためにもう入手できなくなった場合には、2つの溶媒系の間で「橋渡し」することが可能である*。新規マトリクスが含まれる場合も同様である。

* 詳細については、後述する OECD ガイドライン「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17」を参照することとされている。』

「SANTE/11945/2015 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed」⁴⁾

本ガイドラインは食品及び飼料中の残留農薬分析のための精度管理及びバリデーション手順を示したのであるが、分析法の要件についても示しているため抽出法に関する事項を中心にまとめた。

「C. 試料分析」の「抽出」の項には、「抽出条件及び抽出効率」に関する要件が示されており、実残留物の回収率は、添加回収試験で得られた回収率より低い可能性があり、実施可能であれば、抽出効率に関する情報をさらに得るために、実残留物を含有する試料を様々な抽出条件で分析す

ることが推奨されている。

『抽出条件及び抽出効率

C7 実残留物の回収率は、添加された試料の分析から得られた回収率より低い可能性がある。実施可能であれば、抽出効率に関する情報をさらに得るために、実残留物を含有する試料を様々な抽出条件で分析することができる。試料の処理、温度、pH、時間などの多くのパラメータが、抽出効率及び分析対象化合物の安定性に影響を及ぼす可能性がある。含水率の低い食品（穀物、乾燥果実）の抽出効率を向上させるためには、抽出前に試料に水を添加することが推奨される。許容できない損失を避けるため、分析対象化合物の損失に対する振とう時間の影響を確認すべきである。MRL における農薬の残留の定義に塩が含まれている場合は、使用される分析法により塩が解離することが重要である。これは通常、抽出工程前又は抽出工程中に水を加えることで達成できる。pH の変更が必要な場合もある。残留の定義に直接分析することのできないエステル又は抱合体が含まれる場合は、分析法に加水分解操作を含めるべきである。』

また、「C. 試料分析」の「定量のためのキャリブレーション」の項では、測定におけるマトリクス効果の補正として、「マトリクスマッチング法によるキャリブレーション」について示されている。溶媒で調製した検量線用標準液を使用するのが好ましいが、マトリクス効果を補正する目的で、試料と同種のブランクマトリクス抽出物で調製した検量線用標準液の使用が推奨されている。加えて、マトリクス効果を補正する最も有効な方法は、標準添加法又は同位体標識された内標準を使用することであるとしている。

『マトリクスマッチング法によるキャリブレーション

C22 マトリクス効果は、GC 及び LC 法の両方で頻繁に生じることが知られており、その影響につい

て分析法バリデーションの最初の段階で評価すべきである。マトリックス効果を補正するために、マトリックスマッチング法によるキャリブレーションが一般に用いられている。できれば試料と同種のブランクマトリックス抽出物をキャリブレーションに用いるべきである。GC 分析においてマトリックス効果を補正する他の実際的な手法は、検量線用溶媒標準液と試料抽出液中の農薬の応答を等しくするために、試料抽出液及び検量線用標準液の両方に分析対象化合物保護剤(analyte protectant)を添加することである。マトリックス効果を補正する最も有効な方法は、標準添加法又は同位体標識された内標準を使用することである。

C23 GC では、単一の代表的なマトリックス又は複数のマトリックス混合物を使用した代表的なマトリックスキャリブレーションは、異なる食品を含む試料バッチのキャリブレーションに使用する事ができる。溶媒で調製した検量線用標準液を使用するほうが好ましいが、厳密なマトリックスマッチング法と比較して、キャリブレーションの精確さに劣ることがある。相対的なマトリックス効果を評価して、それに応じて適切に方法を修正することが推奨される。

C24 マトリックス効果は、個々の農薬と共に抽出されたマトリックス成分(食品によって異なる)との共溶出に依存するため、LC-MS におけるマトリックス効果の補正は、さらに困難である。従って、マトリックスマッチングキャリブレーションの使用は、GC のときと比較して効果が小さいと考えられる。』

「C. 試料分析」の「定量のためのキャリブレーション」の項の「標準添加法」に関する記載を以下に抜粋した。「マトリックスマッチング法によるキャリブレーション」では、測定におけるマトリックス効果の補正に標準添加法が有効であるとしているが、標準添加法は、マトリックス効果及び回収率の損失を補正することは可能であるが、抽出効率を補正す

ることはできないことが明記されている。

『標準添加法

C25 標準添加法は、マトリックスマッチングキャリブレーション標準を使用する手法の代替法である。この手順は、マトリックス効果及び回収率の損失を補正するようにデザインされているが、抽出効率や同時抽出された分析成分のオーバーラップ/不分離ピークによって引き起こされるクロマトグラフィー上の妨害を補正するものではない。この手法は、分析対象化合物の添加量を試料中にすでに存在する量と同程度にするために、分析対象化合物の残留濃度がある程度予想されている(例:最初の分析結果から)ことを前提としている。特に標準添加法は、MRL 超過の場合及び/又はマトリックスマッチング標準溶液を調製するための適切なブランク物質が利用できない場合の確認のための定量分析に使用することが推奨される。標準添加法では、試験試料を 3 つ(又は好ましくはそれ以上)の分析試料に分ける。分析試料の 1 つはそのまま分析し、他の分析試料には抽出直前に分析対象化合物の量を徐々に増やしながら添加する。分析試料に添加する分析対象化合物の量は、すでに試料中に存在する分析対象化合物の推定量の 1~5 倍とすべきである。「無添加」試料抽出液中に存在する分析対象化合物の濃度は、試料抽出液と添加された試料抽出液中の分析対象化合物の相対応答から算出する。標準添加法では、試験用試料抽出液中の分析対象化合物濃度は外挿法によって求められるため、精確な結果を得るには適切な濃度範囲における線型応答が不可欠である。

C26 試料抽出液の一部に少なくとも 2 濃度以上の既知量の分析対象化合物を(例えば、注入前に)添加することは、標準添加法の別の方式である。この場合、補正は注入誤差及びマトリックス効果についてのみ行われ、低回収率については行われ

ない。』

「C. 試料分析」の「定量のためのキャリブレーション」の項の「様々な内標準の使用」に関する記載を以下に抜粋した。「マトリックスマッチング法によるキャリブレーション」では、同様に、測定におけるマトリックス効果の補正に、同位体標識した内標準を使用が有効であるとしているが、実残留試料での不完全な抽出を補正することはできないことが明記されている。

『様々な内標準の使用

C32 内標準 (internal standard: IS) は、分析法の一部が正しく実施されていることを確認するために、分析法の規定された段階で、試験試料又は試料抽出液に既知量で添加される化合物である。IS は化学的に安定かつ／又は通常、対象の分析対象化合物と同じ挙動を示すべきである。

C33 IS の添加が行われる分析法の段階によって、異なる用語が用いられる。注入内標準 (injection internal standard: I-IS) は、機器内標準 (instrument internal standard) と呼ばれ、測定段階 (すなわち注入時) の直前に最終抽出液に添加される。これにより注入量の変動の確認及び補正が可能となる。操作内標準 (procedural internal standard: P-IS) は、分析のすべての段階を通じて生じる誤差の様々な原因を説明するために、分析法の最初に添加される内標準である。IS はまた、分析法の特定の段階で起こり得る系統誤差及び偶然誤差の両方を補正するため、分析手順の様々な段階で添加することができる。IS を選定する際は、分析対象化合物の分析を妨害しないこと、及び分析を行う試料中に存在する可能性が極めて低いことを保証すべきである。

C34 多成分残留分析法においては、一次 IS の回収率又は検出が思わしくない場合を想定して、2 つ以上の IS を使用したほうがよい。使用目的が単

純な容量変動の補正だけであれば、IS は最小限の損失又はマトリックス効果を示すはずである。同様の性質を持つ分析対象化合物の特定のグループを分析する場合、対象の分析対象化合物と同様の特性及び分析挙動を示す IS を選択することができる。計算に用いられる IS が 1 つ以上の分析対象化合物と著しく異なる挙動 (例: 回収率やマトリックス効果について) を示す場合、すべての定量において追加の誤差が生じることとなる。

C35 各検量線用標準液に既知の濃度で IS を添加する場合は、注入した検量線用標準液から得た分析対象化合物と IS の検出器応答比を各濃度に対してプロットする。次いで、試料抽出液中の分析対象化合物と IS の検出器応答比を検量線と比較することにより、分析対象化合物濃度を求める。

C36 同位体標識した内標準 (isotopically labelled internal standard: IL-IS) は、目的とする分析対象化合物と同じ化学構造及び元素組成を有する内標準であるが、目的とする分析対象化合物分子の 1 つ以上の原子が同位体 (例: 重水素、 ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^{18}O) に置換されている。IL-IS 使用のための前提条件は、質量分析法を用いることであり、これは、共溶出する非標識分析対象化合物と対応する IL-IS との同時検出を可能とする。IL-IS は、クロマトグラフィー検出系におけるマトリックス効果及び応答ドリフトと同様に、操作中の分析対象化合物の損失及び容量変動の両方を精確に補正するために使用できる。抽出液保管中の損失 (例: 分解による) についても、IL-IS によって補正される。IL-IS の使用は、実残留試料での不完全な抽出を補正することはできない。

C37 目的とする分析対象化合物とそれに対応する IL-IS の保持時間及びピーク形状が同じとなるべきであることから、IL-IS は分析対象化合物の同定を容易にするためにも用いることができる。

C38 IL-IS は、偽陽性の可能性を最小限に抑えるため、天然の分析対象化合物をほとんど含まないものとすべきである。重水素標識された標準の場合は、重水素と水素原子との交換(例:溶媒中など)は、偽陽性及び/又は定量結果に悪影響を及ぼす可能性がある。』

また、以下に「付録 A. 分析法バリデーション手順:概要及び例示」の項の「定量分析 1. 初回フルバリデーション」の実験手順の記載を抜粋したが、添加した試料を一定時間放置したとしても、試料への添加は、実残留物をシミュレートすることはないことが明記されており、添加回収試験で抽出効率を評価できないことが示されている。

『食品への添加は、バリデーション手順において非常に重要なポイントである。通常、添加手順は、可能な限り分析法の日常的な適用において用いられている手法を反映させるべきである。例えば、試料を冷凍して粉碎し、冷凍状態で抽出する場合は、凍結したブランク試験試料に添加し、直ちに抽出する必要がある。試料を室温で粉碎し、平均して 20 分後に抽出する場合は、ブランク試験試料への添加を室温で行い、20 分間放置した後に抽出する。一般に、添加した試料を一定時間放置したとしても、試料への添加は、実残留物をシミュレートすることはない。実残留物の相対的な抽出効率を検討するには、農業的に処理された試料を採取すべきである。』

(4) EPA(米国)

「OPPTS 860.1340 - Residue Analytical Method」⁵⁾

本ガイドラインは、登録申請時に提出する残留農薬の分析法に関するデータ作成のためのガイドラインである。本ガイドラインの「(b) 目的」において、残留農薬分析法として、植物及び動物代謝試験結果に基づき総残留有害物質(total toxic residue:

TTR)の全成分を決定する分析法の開発が求められている。また、残留分析法には、①登録申請時の暴露評価及び残留に関するデータを得ること、及び②残留基準設定後はその規制施行にも使用できること、の2つの機能が求められている。

残留分析法に求められる事項について要約して以下に示した。

1) 一般的な事項

- i) 残留分析法は、実用的かつ迅速に規制対象の TTR を定量できること。また、その測定のために最先端機器の利用も可能であるが、そのような機器は市販されていなければならない。
- ii) 残留分析法は、試料マトリックスや試薬による干渉を受けないこと。結果に影響を及ぼす干渉を取り除くために適切な精製法を行うこと。
- iii) 規制施行のため残留分析法は、直接的かつ簡便に実施できること。
- iv) 規制施行のための一次分析法として、FDA 農薬分析マニュアル(PAM)第1巻⁶⁾に掲載の FDA 多成分分析法(MRM)を使用することを推奨する。申請者は、親化合物及びすべての規制対象代謝物についての MRM 試験データを提出することが要求される。また、申請者は、新規農薬について、単一成分分析法を開発する前に MRM が適合するかを検討することが推奨されるが、別途、単一分析成分の確認法の提示が求められる。

- v) 誘導体化 GC 測定法を用いる場合には、可能な限り安定した標準化合物に対する GC の保持時間及び応答値を報告すること。

2) 抽出効率

- i)-1 従来の回収率実験は、作物の実残留についての抽出効率を反映しない。分析手順において、実残留が完全に抽出されるという何らかの保証が必要である。

i)-2 植物及び／又は家畜代謝試験から得た放射能標識された試料を利用(放射能バリデーション法という)することにより、抽出の完全性に関する最良の証拠が得られる。

i)-3 TTR が実際の植物マトリックス及び／又は家畜組織、乳又は卵から抽出されるかどうかを判定するために、分析法について放射能バリデーションを行うべきである。

i)-4 試料は分析法で用いられる手順で抽出されるべきである。申請者は、抽出された放射能が代謝試験で同定された TTR の大半に由来することを証明する必要がある。これについては、分析法の定量操作において行うか、他の手順によって抽出された放射能の成分の同定及び定量を行う方法が考えられる。多くの場合、単に全抽出放射能を定量するだけでは十分とはいえない。

i)-5 分析法が植物性及び動物性食品の両方に使用される場合、植物マトリックス、動物組織及び乳か卵のいずれかについて放射能バリデーションを行うべきである。

i)-6 マトリックスには、抽出が最も難しいと予想されるものを使用すべきである。植物の場合であれば、通常、比較的長期間植物に存在する残留物を含有する乾燥試料(例 わら、飼料など)がこれにあたる。申請者は、放射能バリデーションに用いた試料の根拠を提示すべきである。

i)-7 データ収集のための分析法と規制施行のための分析法の抽出方法が大きく異なる場合は、各方法について放射能バリデーションを行うべきである。もしくは、圃場試験で得られた非放射能標識残留物(実残留試料)の複数の分割試料を用いて、2 つの分析法で同様の結果が得られることを示す資料を提出してもよい。

ii) 表面剥離法のみを用いた分析法は許可され

ない。ただし、対象食品の TTR が事実上表残留のみであるというデータが十分に得られている場合を除く。

iii)-1 TTR の成分の中には、天然に存在する植物成分と結合しているものがあり、遊離体に有効な抽出法では回収されない可能性がある。結合体のうち、抽出溶媒では回収できないが、毒性的に懸念される結合体の形成が示唆される場合は、常に、化合物を遊離させて回収できる手順に分析法を修正すべきである。

iii)-2 このような修正の例としては、処理作物を最初に酸性、塩基性又は酵素条件下で加水分解することにより化合物を遊離させる方法がある。あるいは、結合体は極性溶媒で回収できる場合もある。これらの結合性残留を、結合が非常に強いか又は植物の代謝プールに取り込まれていてどのような化学的手段によっても回収不可能な断片的成分と混同すべきではない。このような化合物は興味深い、通常は毒性的懸念はない。

また、申請時のデータの報告様式には、必要に応じて抽出効率を示す(例;乾燥作物、結合性残留等)ことが示されている。なお、申請者の判断で、放射能バリデーションデータを別途報告書に記載してもよいとされている。

3) TTR の同定

i) 残留分析法は、代謝試験で検出された TTR について測定すべきである。毒性的に懸念される成分にはいずれも共通の化学的残基が含まれることが多いため、全化合物成分を同時に測定する方法を採用してもよい。しかしながら、TTR や残留物の主要成分を測定するために、個別の抽出・精製手順やさらには全く別の分析法が必要となる場合もある。また、1 つ以上の残留成分が他の残留成分よりも有意に毒性が強く、

個別の測定が必要となる場合もある。

- ii) 規制当局の負担を軽減するため、及び／又は国際的な MRL の調和を図るため、規制施行のための分析法として一部の TTR(通常親化合物)のみを測定する分析法を認める場合がある。この成分は指標成分又はマーカー化合物と言われることがある。しかしながら、通常は食事によるリスク評価に関して十分なデータを得るため、依然として、TTR の定量によるデータ収集のための分析法が必要とされる。

4) 規制分析法に関する要件

- i) 申請される 1 つ以上の分析法は、申請される残留基準の施行に適合しなくてはならない。適用可能な場合、FDA 多成分分析法の使用を強く推奨する。また、規制施行のための分析法は、残留農薬のモニタリングコストを抑えるためにも、できる限り簡便であるべきである。

- ii) 残留データの収集に適切と考えられる分析法は、必ずしも規制施行の目的に適しているわけではない。一般に、

(A) 規制施行のための分析法は次の事項を必要とすべきではない。

- ① 未処理の食品をブランクとして使用すること。
- ② 外国産の機器又は試薬(又は製造が終了した試薬)。

(B) 規制施行のための分析法は次の通りとすべきである。

- ① 実施時間が合理的に迅速であること。一般に、規制目的の残留物の分析法は、1 日で作業を完了すべきである。1 日以上かかる分析法も場合により許可されると考えられる。急性毒性残留物については、事故や誤用による強制措置の可能性があることから 24 時間以内の分析法(分析開始から完了までの合計時間)が求められる。

- ② 同一の食品に合理的に存在すると考えられる他の農薬の残留物の存在下でその残留物を測定及び同定するのに十分な特異性。

- ③ 申請される残留基準に対して十分に高い感度。

- ④ 非常に有害な試薬や毒性の高い試薬を使用することなく実用的であること。

5) 内標準及び操作標準

i) 内標準

- ① 保持時間及び／又はピーク高／面積を校正し、定量精度を高めるために、注入直前に最終抽出物に内標準を添加することを認めている。しかしながら、回収率を補正する目的で、手順全体を通しての内標準の使用は認められない。ただし、各マトリックスについての豊富な試料データにより分析対象化合物と内標準が各段階(抽出、精製等)において同等の挙動を示すと証明できる場合を除く。

- ② クロマトグラフィー分析法においては、分析対象化合物及び内標準のピークは互いに近い位置にあると同時に十分に分離して溶出されるべきである。

- ③ 規制施行のための分析法に用いられる他の試薬又は標準物質と同様に、内標準は規制施行試験所において入手可能でなくてはならない。内標準が市販されていない場合、申請者は当局に化合物の供給を保証しなくてはならない。

ii) 操作標準

- ① 操作標準は、分析法に規定された一部又は全部の試料調製手順に、標準物質を用いることによって得られる標準とみなされる。誘導体化手順で生成された操作標準を用いた分析法は、一定の条件下で許容される。

- ② 操作標準が用いられる場合、申請者は農薬

の分析標準だけでなく、誘導体化標準も提供すべきである。誘導体化標準が入手できることにより、規制施行試験所は操作標準の生成効率を測定することが可能となる。誘導体化された標準物質が不安定であるか得られない場合、申請者は手順の効率及び再現性を示すデータを提示しなくてはならない。

(5) FDA(米国)

「Pesticide Analytical Manual, Volume I, Multiresidue Methods, 3rd Edition, 1994」⁹⁾

農薬分析マニュアル(Pesticide Analytical Manual: PAM)の第1巻は、FDAが日常の監視のための分析法として用いている多成分分析法についてまとめたものであるが、「第1章 規制の運用」及び「第3章 多種類多成分一斉分析法」において、分析法の考え方についても触れている。この中から分析法開発に関連する事項を以下に抜粋した。

1) 試料量と試料の均一性について

試験に用いる試料量については、第1章の「102C 試験室試料の混合と粉碎」の項で、『試験室試料は粉碎し、均一化することによって、分析に使用する比較的少量(25 g~100 g)の試験部位が全試料の代表となる。試験部位が試料を代表している場合にだけ意義のある残留資料が得られる。』とし、試料量として25 g~100 gが示されている。更に、個々の食品についてできるだけ均一な試料の調製が求められており、均一な試料を調製するための方法について解説されている。

2) 分析法のスケールダウンについて

第1章の「103 規制における分析法の適用の103B 分析法の選択」の『他の公表された分析』の項において、確立された分析法をスケールダウンする場合の考え方が示されている。試料重量や抽

出溶媒量の変更は認められておらず、オリジナルの方法で抽出液を得た以降の精製操作でのスケールダウンのみが受け入れられる。

i) 液液分配やカラムクロマトグラフィーによる精製の段階において、試薬の使用量のみを比例的に小さくした方法は、原法と同等と考えるのが一般的である。

ii) スケールダウン法であっても性能が確認されたも方法あれば、その方法で行われた分析は、施行措置を支持するのに十分であり、監視の目的でも同等のものであると考えられている。

iii) しかし、試料重量及び抽出溶媒量を小さくした抽出については、是認するために十分なだけの研究はなされていない。オリジナルの方法での抽出液のろ過以降の操作のみにスケールダウン法を適用することが薦められている。

3) 多成分一斉分析法の能力と限界について

第3章の「301B 多成分一斉分析法の能力と限界」において、多成分一斉分析法の全般に影響する事項として以下のことが指摘されている。

① 試料から残留化学物質を抽出する抽出溶媒や物理的操作の効率

② 試料抽出物から残留化学物質を損なうことなしに夾雑物質を除去する精製技術

③ 抽出化学物質の試験に用いる異なった測定操作の数

特に、抽出溶媒や抽出操作については重要と考えられており、これらについてさらに説明している。

i) 方法論に対する溶媒の影響

溶媒の選択は、分析法を開発している研究者によって行われる最も重要な決定事項である。これらの方法を使用する分析担当者は、個々の変法で使われる溶媒に関して次の事項について考慮しなければならない。

① 純粋溶媒の有効性

不純物はほとんどの残留分析法で溶媒留去の段階で通常濃縮されるため、溶媒純度は測定段階で潜在的な妨害を避けるために必須である。

② 溶媒に対する検出器の応答

残留分析の測定に用いるGCの元素選択的検出器では、最終抽出物質は、検出器に反応する原子を含む溶媒で溶解しないこと。

- ・窒素選択検出器： 痕跡のアセトニトリルが存在しないこと。
- ・ハロゲン選択検出器： ジクロロメタンが存在しないこと。
- ・HPLC 検出器： 測定波長で紫外吸収を示す溶媒やけい光を発生する溶媒の使用を避ける。

③ 溶媒の極性

抽出溶媒の極性を強めると、その方法における特殊な残留化学物質の抽出能を高めるが、それはまた抽出される夾雑物質をも増加させる。極性溶媒の存在は、それ以降の精製行程に影響を与えるので、残留化学物質を次の段階に入る前に異なる溶媒に移す必要がある。

④ 溶媒の沸点

検出器に適合する気化、あるいは適度な極性が必要である場合には、沸点の低い溶媒がより好ましい。いくつかの事例では、この溶媒を加えることで共沸混合物を形成できるならば、比較的高沸点の溶媒でも低い温度で気化させることができる。

⑤ 溶媒の毒性

溶媒の毒性は一樣ではなく、いくつかの選択肢のなかから最も毒性の少ないものを選ばなければならない。ある種の溶媒（ベンゼンや四塩化炭素）は残留分析に使用してはならない。

ii) 抽出

① 高水分含有試料から残留化学物質を抽出するために水と混和する溶媒を用いる必要性について、長い時間をかけて確立されてきた。高速攪拌・磨砕による抽出操作の必要性についても同様である。

② アセトン、アセトニトリル及びメタノールは、PAM 第 1 巻の多成分一斉分析法や選択的多成分一斉分析法において、果実や野菜から非イオン性の残留化学物質を抽出するために用いられる。

③ アセトンは毒性が少なく、沸点もアセトニトリルよりも低く(57°C対 82°C)、検出器に対する影響も少ない。また、果実の分析においてアセトニトリルを用いた場合に起こる水との 2 層形成もない。

④ 最初の抽出物から非極性溶媒に移す液液分配は、ほとんどの多成分一斉分析法で一般的である。この操作に用いる溶媒の性質は、残留化学物質と夾雑物質の移行の程度に影響し、例えば、石油エーテルは有機溶媒層に分配される極性植物成分を減らすために、水性アセトンやジクロロメタンに加えられる。しかし、極性の高いメタミドホスに的を絞った分析法の変更では、メタミドホスを水層から有機溶媒層への分配を促進させるために、石油エーテルの代わりにアセトンを用いる。

⑤ 乾燥試料は水分含量が極端に低いため、水と有機溶媒の協力によって抽出される。この目的のために水・アセトニトリルの使用がいくつかの研究から支持されている。水・アセトンもまた用いられるが、水・アセトニトリルよりもより少ない残留化学物質を抽出するような場合に採用される。これら 2 つの方法は、両方法により残留化学物質が測定でき、相互に同定するための照

合に用いられている。

- ⑥ 高脂肪性試料からの残留化学物質の抽出は、歴史的に試料から親油性の残留化学物質を抽出するため、先ず非極性化学物質の抽出に着目してきた。この場合、脂肪自身も共に抽出される。現在、高脂肪性試料中の残留極性化学物質の定量的測定のために適用できる方法がこのマニュアルにはない。

(6) AOAC International(米国)

「AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals」⁷⁾

当該ガイドラインでは、「2.3.4 特殊な変動要因 (Specific Variables)」の項において、分析法の『抽出』に関する考え方を示している。

すなわち、ある変動要因が結果に影響することがわかった場合、その欠点を是正するため分析法をさらに開発する必要がある。例えば、植物の抽出は不完全となる可能性があり、完全な抽出の基準となる参照試料がない。従って、抽出がいつ完了するかを決定するためには様々な手法を適用しなくてはならない。これには新鮮な溶媒による再抽出が最も一般でできである。クロマトグラフィーによる有効成分の分離のための最適条件、カラム及び溶媒を見出すためにはかなりの実験が必要となる場合もある。

- (a) 分析対象化合物の添加 — 試験試料に有効成分の溶液を添加して分析を行うことは一般に情報価値がない。なぜなら、添加された分析対象化合物は、すでに容易に抽出可能な形態だからである。抽出溶媒の容量を変える場合も同様である。これらの手法は、細胞構造に取り込まれた分析対象化合物の抽出効率を試験しない。この目的のために、溶媒の極性や抽出温

度の変更といった他の変動要因を試みなければならない。

- (b) 抽出残留物(残渣)の再抽出 — 当初の抽出後に再抽出を行うことは、元の手順による完全な抽出について調査するものである。再抽出では、扱いの難しい(抽出不能な)植物材料からの完全な抽出は調査されない。この目的のために、有効成分を損傷せずに繊維性細胞物質を破壊する試薬が必要である。分析対象化合物が細胞壁破壊剤又は粗繊維試薬(1.25% H₂SO₄ 及び 1.25% NaOH)によって破壊又は干渉されず、かつ水溶性である場合は、これらの溶液を抽出剤として使用する。しかし、有効成分はこれらの試薬で加水分解されやすい化合物を含んでいることから、機械的に非常に細かくすりつぶす方法を選択することが多い。

抽出効率は、抽出液を TLC、GC 又は HPLC クロマトグラフィーに適用することにより確認する。抽出物の総量がより多いことは、必ずしもよい抽出の指標とはならない。有効成分の定量が抽出の指標となる。天然化合物の多くは、光に感受性があるため、ある化合物の減少はこの変動要因の影響を調査すべきであることを示唆している。

- (c) 異なる溶媒との比較 — 溶媒の極性や沸点の違いにより抽出される抽出物の量が異なるが、有効分量は、クロマトグラフィー分離又は特定の反応によって追跡しなければならない。
- (d) 異なる手順で得られた結果との比較 — 分析対象化合物グループ(例:残留農薬など)の多くは、比較のための対象となる異なる原理に基づいた利用可能ないくつかの異なる標準分析法を有している。

(7) オーストラリア

「Agricultural Manual of Requirements and Guidelines - Ag MORAG」⁸⁾

本ガイドラインの「Part 5A－残留」の「4.9 残留分析法」において、申請者は、実施された試験における残留物の定量に使用された分析法の完全な詳細を提供しなければならないとし、分析法の要件が示されている。

- 1) 農薬に対する適切な特異性を有すること。
- 2) 残留物について提案された MRL よりもかなり低濃度の分析法の定量限界を有すること。
- 3) その分析法が食品中の目的する濃度において、残留物の定量に有効であることを、ブランク、回収率及び抽出データによる適切な証拠によって実証されていること。

また、日常的なモニタリング及び規制施行に適した分析法の提出が求められており、残留データの試験で用いられた分析法であっても良いが、そうでない場合では、規制目的のために別の方法が必要とされることがある。分析法の要件については、「Residue Guideline No. 19, Residue Analytical Method」⁹⁾に示されている。

「Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method」⁹⁾

本ガイドラインでは、残留分析法は、食事からの暴露評価に関するデータ作成及び残留基準 (MRL) の遵守のために用いられ、食用の農産物／動物及びその結果として生じる生産物に使用されるすべての農薬、及び農薬が使用された農産物を摂取する可能性のある動物由来の製品(例:肉、乳、卵など)には、分析法が必要であるとしている。また、分析法開発に関する要件等についてまとめた。

1) 分析法の目的

残留分析法を開発する場合は、分析法は、下記

の目的を満たす事が求められている。

- ・ 残留の定義に含まれるすべての成分について測定(同定、定量、確認)する能力を有すること。
- ・ 十分な特異性を示し、妨害物質が分析法の定量下限の 30%を超えないこと。
- ・ 実証された併行精度を有すること。
- ・ 使用対象となり得るすべての作物及び動物をカバーすること。
- ・ 有意な残留が生じた場合(即ち MRL が分析法の定量下限を超えそうな場合)、動物／農産物製品をカバーする。
- ・ 動物が農薬を使用した作物を摂取したと考えられる場合は、全ての食用畜産製品をカバーすること。
- ・ 可能であれば、残留物を測定する能力を有する多成分残留分析法を特定する。

2) 分析法の感度

残留試験に関する FAO(国連食糧農業機関)のガイドラインでは、残留農薬の定量において分析法に求められる感度レベルについて考察されており、本ガイドラインはオーストラリアにも適用され、以下に大部分が採用されている。

- ① 分析技術の進歩により残留分析の高感度化が進んでいるが、状況によっては非常に低レベルの残留物を測定することは必ずしも必須ではない。
- ② MRL の遵守を目的とした監視に用いる残留分析法では、農産物／動物に存在する可能性のある残留物を測定するために、十分な感度を有するべきである。検査レベルが精巧になりすぎると規制目的のモニタリングが困難になる可能性があるため、このような分析法は、MRL より 2 桁以上も低い残留物を定量できるほど高い感度を必ずしも必要としない。

③ 非常に低レベルの残留物を測定するために開発された分析法は、通常、非常に高価で適用が困難になり、また、分析法の分析定量下限を厳密に規定する際に技術的問題を招く可能性もある。

④ このため、定量可能な実用レベル下限 (lower practical level:LPL) を規定することにより、データの取得に関する技術的な難しさを軽減し、費用も抑えられるという利点がある。

3) LPL の設定方法

① LPL は MRL の比として以下のように規定することができる。

MRL (mg/kg)	LPL (mg/kg)
>5	0.5
0.5~5	MRL に対し 0.1~0.5
0.05~0.5	MRL に対し 0.02~0.1
<0.05	0.5 × MRL

② MRL を分析法の定量下限に設定するときは、LPL も当該レベルとする。

③ 新規の有効成分 (MRL が設定されていない) の場合。

A. 毒性学的又は生態毒性学的危険性のない有効成分

申請者の経験に基づき (例えば、使用量や予備残留データなど)、早い段階で MRL を推定すべきであり、これに基づいて、上記に従い暫定 LPL を導き出すことができる。実用上の理由から、一般に以下に示すレベル以下を測定する必要はない。これらの限度値は、一般的に入手可能な装置及び手順を用いて通常達成可能である。このような規定の限度値により、費用対効果の高い方法で安全性を確保できるものと考えられる。

食用作物、ジュース、ワイン、食肉*	0.05 mg/kg
ビール、水を添加したその他の飲料、乾燥土壌、食用臓物*	0.02 mg/kg
乳#	0.005 mg/kg
水	0.002 mg/kg

* ホルモンや類似の化合物については、より低濃度での分析を要求される場合がある。

残留物を純脂肪ベースで表すためには、乳中の脂肪含有量を測定するか、又は分析のために乳をバターに加工する必要がある。

B. 何らかの有害性が考えられる有効成分

申請者は、毒性を仲介する恐れのある試料の種類について、利用可能なすべての情報を慎重に検討し、ときには APVMA と協議の上、適切な LPL を設定しなくてはならない。

LPL を設定するときには、以下の基準に従い分析法の開発中及び使用中に分析手順の妥当性を確認すべきである。

- ブランク試料に添加することにより測定される分析法の一般的な全体回収率は、推奨 LPL 濃度において通常 70~110% となるべきである。分析バッチによりこの基準値外の回収率が許容される場合もある。許容可能性についての判断は、分析責任者の経験に委ねるべきである。
- 分析法の併行精度は、提案された LPL で添加されたブランク試料の分析 (例えば、6 回収率) によって確認すべきである。この結果から得られた相対標準偏差は、通常 20% 以下であるべきであるが、より残留濃度が低い場合は、わずかに大きくなる場合がある。また、分析法の再現精度についても可能な限り確認すべきである。

4) 分析対象化合物と同一の化合物の天然由来のバックグラウンド濃度が存在する場合の農産物

／動物の分析

- ① 農薬又は動物用医薬品を使用することにより生じる残留物が、天然由来のバックグラウンド濃度の同一化合物と区別できないことが示せるか、又は論証できる場合、それ以上の残留データは要求されない。
- ② 農薬又は動物医薬品を使用することにより生じる残留物が、天然由来のバックグラウンド濃度と区別できる濃度で天然由来の化合物の残留物を生じることが判明した場合には、GAP 下で予測される最大濃度を示す必要がある。

5) 不安定又は急速に分解する生成物のための分析

- ① 添加試料中で定量前に分解してしまい正常な分析手順が行えないことをデータ又は論証によって示すことができる場合は、不安定な成分についての残留データは要求されない。代表的な例として酸化剤があり、有機物質と接触すると直ちに分解する。
- ② 不安定な分析対象化合物が他の化合物(代謝物や基本原料)に分解する場合、結果的に残留物が存在しない(例えば、分解生成物が揮発性であるか、又は終結果的に得られた物質が毒性学的に重要ではない)ことが示せるか論証できない限り、分解生成物に関する残留データを提供する必要がある。

(8) ニュージーランド

「Residue Data for Agricultural Chemical Registration ACVM Information Requirements 41」¹⁰⁾

本ガイドラインは、農薬の登録申請に必要な残留データについてまとめられたものであり、残留分析法については「3 最小要求事項」の「3.3 残留分析」に示されている。

『3.3 残留分析

残留分析は、食品及び環境試料中に存在する残留物を抽出し検出するプロセスである。

分析法は、特定の OECD ガイドラインの要件に従って報告され、検証されなければならない。

3.3.1 試験目的のための分析法

残留試験における残留物の定量に使用された分析法の完全な詳細を提供すること。

3.3.2 規制目的のための分析法

MRL の規制のための残留物の定量のために提案する分析法の完全な詳細を提供すること。』

「Recognised pesticides analytical laboratories and residue test methods (Plants)」¹¹⁾

本ガイドラインは、農産物に対する残留農薬の試験を行う試験機関及び分析法の要件を示しており、「5 分析法の要件」に残留分析法の要件が示されている。

『5 分析法の要件

- (1) すべての認定された分析法は、ISO 17025 に従って認定機関で認定されなければならない。
- (2) 全ての認定された分析法は、第一次産業省(MPI)によって随時、指示される可能性のあるあらゆる条件に従って実施されなければならない。
- (3) 認定を維持するために、認定されて分析法は、
 - (a) ISO 17025 の要件を依然として満たしていることを確認するために、認定後毎年認定機関によって評価されなければならない。また、認定機関からの分析法評価書の写しは、要求に応じて MPI による調査のために入手可能でなければならない。
 - (b) 随時、確立される可能性のある関連する MPI の要件をすべて満たしていること。
- (4) 認定された分析法が(3)の要件に適合しない場合、MPI はその分析法の認定を取り消すことが

できる。

(5) 認定された分析法の大幅な変更(例:測定可能な分析物の妥当性確認された範囲の変更、使用する分析機器の変更、分析法の感度の変更)は、できるだけ速やかに MPI に報告しなければならない。』

(9) コーデックス委員会

「Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993」¹⁴⁾

本ガイドラインは、主に分析法の制度管理を目的としたものであるが、分析法の開発に関連する部分についてまとめた。

1) 抽出効率について

「4. 分析」、「4.4 分析法バリデーション」の「4.4.2」において、技能試験からは、抽出効率に関する情報が得られないことが示されている。該当部分を以下に抜粋した。

『技能試験(あるいは他の試験室間試験手順)は、実施可能であれば、ある分析法から得られた結果の一般的な精確さを検証するための重要な手段であり、分析結果の試験室間バリデーションに関する情報を与えるものである。しかしながら、技能試験からは、一般的には分析物の安定性又は均一性、及び処理された試料からの分析物の抽出効率についての情報は得られない。』

2) 分析法の開発・改良を行う場合

「4. 分析」、「4.4 分析法バリデーション」、「4.4.3」の項に、分析法の開発・改良を行う場合の留意点について示されている。以下に内容を抜粋した。

i) 実験室が分析法開発及び/又は分析法の改良を行うときはいつでも、バリデーションをする前に、分析の変動要因の影響を、例えば堅牢性試験などによって確立させておかなければ

ならない。

ii) 次の事項については、結果に影響を及ぼす可能性のある分析法のすべての項目に関して厳格な管理が行われなければならない。

- ・ 試料量
- ・ 分配液量
- ・ 用いた精製系の性能の変動
- ・ 試薬又は調製した誘導体の安定性
- ・ 抽出液中の分析物への光、温度、溶媒及び保存の影響
- ・ 溶媒、インジェクタ、分離カラム、移動相特性(組成及び流速)、温度、検出システム、共抽出物などの測定系への影響

iii) 測定された信号と分析物との間の定性的及び定量的な関係が明確に確立されることが最も重要な点である。

3) 分析法の選択、バリデーションに用いる代表食品及び分析物の選択

「4. 分析」、「4.4 分析法バリデーション」、「4.4.4」の項の必要部分を抜粋した。

i) 多成分残留分析法及び/又はマルチマトリックス適用性を有する分析法を優先すべきである。

ii) 代表的な分析物又はマトリックスを用いることは、分析法のバリデーションにおいて重要である。代表食品を選択する場合、食品を必要以上に区別する必要は無いが、分析法の精確さ及び精度の大幅な違いが、特に測定に関して、品種によって生じる場合がある。そのため、ある食品内の特定の品種が、分析の性能への影響において他の品種とは異なることが知られている場合には、それらの品種の分析が必要となる。

iii) 経験から、広範囲の類似した食品/試料マトリックス間で、同様の抽出効率や精製効率

を示すことが分かっている場合は、性能バリデーションに、簡略法を採用することができる。共通の特性を有する各食品グループを示す代表的な食品を例示された表から選択して使用することができる。

バリデーションデータを拡大できる食品の例

- ① 穀物：全穀粒でのバリデーションは、ぬかやパンには適用できないが、小麦でのバリデーションは、大麦穀粒あるいは小麦粉に適用できる。
- ② 畜産物：筋肉でのバリデーションは、脂肪又は内臓に適用すべきではないが、鶏脂肪でのバリデーションは、牛の脂肪には適用できる。
- ③ 果実と野菜：生鮮品全体でのバリデーションは、乾製品には適用できないが、キャベツでのバリデーションは、芽キャベツには適用できる。

iv) 代表的な分析物を用いて、分析法の性能評価をすることができる。選択に当たっては、その分析法によって定量することが意図されている分析物の物理化学的特性をカバーするように選択する。代表的な分析物の選択は、以下を考慮して、分析の目的及び範囲に基づいて行うこと。

(a) 選択された代表的な分析物は、

- (i) 代表的な分析物の物理化学的特性を含むように十分に広い範囲の物理化学的特性を有すること。
- (ii) 定期的に検出されるものか、又は結果に基づいて重要な決定が行われるものであること。

(b) 実行可能であれば、最初のバリデーション過程に含まれる全ての分析物は、定期的に試験されなければならない、また使用される定量

系において同時に定量できること。

(c) 分析法を特徴付けるために使用される分析物の濃度は、全ての食品で探索が計画されている全ての分析物の許容限界 (AL: Acceptable Limit) をカバーするように選択すること。従って、選択された代表的な分析物は、特に高 AL 及び低 AL を含むべきである。結果として、代表的な分析物/代表的な食品を用いた性能試験で使用される添加濃度は、必ずしも実際の AL に対応する必要はない。

4) 最低検量線濃度 (Lowest Calibrated Level: LCL)

「4. 分析」、「4.9 最低検量線濃度 (LCL) の概念」の必要部分を抜粋した。

i) 分析の目的が MRL (あるいは AL) の監視及び確認である場合は、残留分析法は、試料中に MRL (又は AL) 付近で存在する可能性のある残留物を確実に定量するのに十分な感度を有していなければならない。

ii) しかしながら、この目的のために MRL (又は AL) より 2 桁以上の低濃度で残留物を定量するほど高感度な分析法を使用する必要はない。非常に低い濃度で残留物を測定するために開発された分析法は、通常、非常に高価であり、適用が困難である。

iii) LCL を使用することは、データ取得の技術的な困難さを減らすことができ、コストも削減できる。

iv) LCL は MRL の比として以下のように規定することができる。また、MRL がその分析法の定量限界に設定されているときは、LCL もこの濃度になる。

(なお、この LCL の考え方は、オーストラリアのガイドライン「Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method」⁹⁾の『定量可能な

実用レベル下限 (lower practical level: LPL)』と基本的に同じと思われる。)

MRL (mg/kg)	LCL (mg/kg)
5 以上	0.5
0.5 ~ 5 未満	MRL に応じて 0.1 から 0.5 まで増加させる。
0.05 ~ 0.5 未満	MRL に応じて 0.02 から 0.1 まで増加させる。
0.05 未満	0.5 × MRL

5) 分析値の表し方

「4. 分析」、「4.10 結果の表し方」の必要部分を抜粋した。

- i) ゼロの値は、外挿によって計算された濃度未満とするよりも、LCL 濃度未満として報告すべきである。
- ii) 通常、結果は回収率によって補正せず、そして回収率が 100%からかなり異なっている場合にのみ、補正することができる。回収率で補正された結果が報告された場合は、測定値と補正值の両方を提示し、補正に関する根拠も報告すること。
- iii) 単一の試験試料(サブサンプル)の繰り返し測定(例:異なる GC カラム、異なる検出器又はマススペクトルの異なるイオンに基づく)によって陽性の結果が得られた場合は、得られた有効な値のうち最低値を報告すべきである。
- iv) 複数の試験試料の分析で陽性の結果が得られた場合は、各試験試料から得られた有効な値のうち最低値の算術平均を報告すべきである。
- v) 一般的に、20~30%の相対精度を考慮すると、結果は有効数字 2 桁のみ(例: 0.11、1.1 及び 1.1×10^2 等)で表わすべきである。より低濃度では、精度は 50%の範囲内であることがあるので、0.1 未満の残留値は、有効数字

1 桁のみで表されるべきである。

6) 本ガイドラインの「表 1 分析法バリデーションの評価すべきパラメータの概要」には、分析法バリデーションで評価すべきパラメータについて示されている。評価パラメータには、抽出効率が含まれており、必要に応じて、抽出効率の評価が求められている。該当部分を以下に抜粋した。

試験すべきパラメータ: 抽出効率^{*1,*2}

i) 既存の分析法(以前のパラメータの試験において、1 つ以上の分析物/マトリックスの組み合わせで妥当性が示されている場合)

- ① 性能検証: 不要
- ② マトリックスの追加: 理想的には必要
- ③ 分析物の追加: 理想的には必要
- ④ 分析物が非常に低濃度の場合: 理想的には必要
- ⑤ 他の試験室: 不要

ii) 既存分析法の修正

不要(異なる抽出条件で採用しない場合)

iii) バリデーションされていない新規分析法

必要(以前に試験された抽出法を使用しない場合)

*1 関連情報が利用できない場合

*2 抽出効率に関する情報は、当該化合物を登録した製造業者又は登録会社が所有している場合がある。

7) 本ガイドラインの「表 2 様々な状況における分析法バリデーションの評価すべきパラメータ」には、分析法バリデーションで評価すべき各パラメータの具体的な基準等について示されている。抽出効率については、実残留試料を用いた評価が求められている。以下に評価方法及び基準等に関する部分を抜粋した。

評価するパラメータ: 抽出効率

i) 濃度: 約 AL 又は容易に測定可能な残留量

ii) 分析回数及び要求される試験のタイプ

- ① 実残留試料又は実残留参照物質の5つ以上の複製試料を分析すること。
- ② 参照(又は異なる)手順と試験中の手順とを比較すること。
- ③ 多成分残留分析法については、試験する分析物はなるべく広範囲の Pow を持つべきこと。また、実残留試料を使用してのみ決定されるべきこと。

iii) 基準

① 定量法

実残留試料については、参照する手順と試験中の手順で得られた平均の結果は、 CV_L (実験室で得られた結果の全体の変動係)の計算値について $P=0.05$ の水準で有意差がないこと。あるいは、参照物質の合意された値と平均の残留量は、試験された分析法の CV_A を用いて計算した場合、 $P=0.05$ の水準で有意差がないこと。その分析法の CV_A (試料前処理を除いた分析の変動係数値)が、10%より大きい場合は、平均値の相対標準偏差を<5%に保つために、繰り返し分析の回数を増やさなければならない。そうでなければ、抽出効率を定量化し、報告すること(抽出後の分析段階の回収率を除く)。

② スクリーニング法

LOQ(又は LCL)濃度又はその付近の濃度の残留量が知られている実残留試料の平均値は、試料中で実際に検出可能であること。

iv) コメント

抽出物の温度、ブレンダー又はホモジナイザーの速度、抽出時間及び溶媒/水/マトリックス比は、抽出効率に非常に影響する。これらのパラメータの影響は、堅牢性試験で確認することができる。最適化された条件は、可能な限り一定に保つこと。

バリデーションは、一般的に、1つのグループ内

の食品及び同様の物理化学的特性を持つ代表的な分析物に適用可能である。バリデーションは、分析法のその後の実施手順とは独立したものである。

各分析法の平均回収率は、添加された分析試料を用いて測定すること。分析の平均回収率での補正は、100%から著しく異なっている場合に実施すること。

法規制によっては、スクリーニングキットの能力は、95%の信頼限界で陽性を検出することを試験すべきとしている。

8) 「表 4 性能検証の要件」の「4. 精度管理(性能検証); 4.1 通常使用する分析法; 4.1.6 抽出効率」において、『分析中は抽出効率を制御することはできない。適切な効率を確保するために、バリデーションされた抽出法は、いかなる変更もせずに実施されなければならない。』としている。

「Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016」¹⁵⁾

本ガイドラインでは、回収率は実残留試料からの抽出を必ずしも反映しない場合があるため、分析法が妥当である事を示すために実残留試料の分析を推奨している。以下に該当部分を抜粋した。

『40. 分析法の妥当性確認を支持するため、実残留マトリックスの分析が推奨される。回収率の解釈にあたり、試験用試料に添加した分析対象化合物は、生物学的に生じた実際の分析対象化合物(残留農薬)と同じ挙動をしない場合があることを認識する必要がある。多くの場合、抽出された実残留物の量は、実際に存在する実残留物の総量よりも少ない。これは、抽出の際の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析対象化合物

を添加されたブランクマトリックスを用いた回収試験では完全には現れない他の因子によるものと考えられる。』

(10) IUPAC

「Harmonized Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement.」¹⁶⁾

「Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001」¹⁷⁾

このガイドラインは、添加回収試験で求めた回収率情報の取り扱いに関するものであるが、抽出効率について考察する上で参考となる内容が含まれているため、関連する部分を抜粋して示した。

「3. 回収率の評価手順」の「3.1 マトリックス標準試料から得た回収率情報」において、回収率は原則として、マトリックス標準試料(matrix reference materials)の分析により予測するとしている。マトリックスが同じ検体について得られた結果は、原則として、標準試料で得られた回収率によって補正可能である。しかし、標準試料の問題として、次の点を指摘している。

1) このような回収率予測の妥当性は、分析法にその他の点でバイアスがないことを前提としなくてはならない。

2) 適切なマトリックス標準試料の入手には限界がある。

3) 検体と入手できる最も適切な標準試料のマトリックスが一致しない。(この場合には、標準試料で得られた回収率は厳密には検体に合致しないと考えられる。)

「3.2 サロゲートから得た回収率情報」の項では、同位体希釈法、添加法及び内標準法のそれぞれの方法について解説している。以下に概要を示した。

3.2 サロゲートから得た回収率情報

1) (認証)標準試料が入手できない場合、回収率は、本来の分析対象化合物のサロゲートとみなされる化合物を添加し、その回収率を分析して予測することができる。

2) このサロゲートがどの程度測定相に移行するかを別途予測し、適切な場合は、この回収率が本来の分析対象化合物にも当てはまるものとすることができる。

3) 原則として、この手順では分析対象化合物成分の損失分の修正と、もとのマトリックス中に存在する本来の分析対象化合物の濃度についてバイアスのない予測が可能となる。このような「回収率の補正」方法は、複数の異なる分析法で暗示的又は明示的に用いられており、適切に実施されている場合は妥当な手順とみなさなくてはならない。

4) その手順が妥当であることを示すためには、サロゲートがマトリックス中の本来の分析対象化合物と、特にさまざまな相の間の分配に関して、定量的に同じ挙動を示さなくてはならない。実際には、同等性を示すことは困難なことが多く、ある程度の仮定が必要となる。このような仮定はさまざまな種類のサロゲートを用いて検討することで得ることができる。

3.2.1 同位体希釈法

1) 最も適したサロゲートは分析対象化合物を同位体標識したもので、同位体希釈法に用いられる。

2) サロゲートの化学的特性は本来の分析対象化合物と同一か非常に類似しており、添加された分析対象化合物と本来の分析対象化合物が平衡状態にある限り、回収率は分析対象化合物と同じとなる。

3) 同位体希釈法では、サロゲートの回収率を

質量分析か、又は放射性同位体が使用されているのであれば放射線定量法によって別途予測することができ、本来の分析対象化合物に対して妥当に適用される。

4) ただし、有効平衡状態は必ずしも容易に得られるわけではない。

① 例えば有機物中の微量金属の測定系などでは、マトリックスを破壊する強力な試薬を添加することにより、本来の分析対象化合物とサロゲートを容易に同じ化学形態に変換することができる。この処理により有機結合した金属はサロゲートと有効平衡となる単純イオンに変換される。

② ①のような単純な手順は、通常微量金属の測定に有効であるが、残留農薬については使用できない可能性がある。残留農薬の場合、分析対象化合物が部分的にマトリックスと化学結合していることがある。強力な化学試薬を用いて分析対象化合物を破壊することなく放出させることは不可能と考えられ、よって本来の分析対象化合物とサロゲートを有効平衡にすることは不可能である。したがって、サロゲートの回収率は本来の分析成分分析対象化合物よりも大きくなる可能性がある。

③ このように最適なサロゲートであっても、予測回収率にバイアスが生じる可能性がある。さらに、同位体濃縮分析対象化合物は入手が難しくコストがかかることなどから、同位体希釈法の適用は限られる。

3.2.2 添加法

- 1) 別の試験系において分析対象化合物を添加して加え、その回収率を予測する方法は、費用効果が高く汎用されている。
- 2) マトリックスブランク(検出可能な分析対象化

合物を含有しないマトリックス試料)が入手可能であれば、分析対象化合物をブランクに添加し、通常の実験手順を行ったのち、その回収率を測定することができる。

3) マトリックスブランクが入手できない場合、添加していない測定試料と併行して通常の実験試料に添加して分析してもよい。

4) これらの2つの方法で得られた結果の相違点は、添加された分析対象化合物の回収部分であり、既知の添加量と比較することができる。本文書ではこの種の回収率予測を「サロゲート回収率(添加された分析対象化合物が本来の分析対象化合物のサロゲートとしてふるまう)」と呼ぶ。

5) この方法は標準添加法と類似し、同位体標識した分析対象化合物と同様の問題を抱える。

① 添加された分析対象化合物が本来の分析対象化合物と有効平衡にならない可能性である。

② 添加された分析対象化合物が本来の分析対象化合物のように強固にマトリックスと結合しない場合、サロゲート回収率は本来の分析対象化合物よりも高くなる傾向にある。この場合、補正された分析結果に負のバイアスをもたらす。

3.2.3 内標準法

1) 回収率の予測に用いられる3つめのサロゲートは内標準である。回収率試験で内標準法を用いる場合、サロゲートは分析対象化合物と化学的に異なるものとし、化学的特性は一致しない。

2) 通常サロゲートには分析対象化合物と化学的に密に関係し、最も実用的な化学的挙動を示すものが選択される。

3) 内標準は、例えば同一マトリックス中の多数

の分析対象化合物の分析において、個々の分析対象化合物について添加回収試験を行うことが実用的でない場合の回収率の予測に用いられる。

- 4) 実用性の問題は、多数の分析対象化合物の取り扱いにかかるコストの問題だけではない。一部の分析対象化合物(例えば新規動物用医薬品の残留物や代謝物など)は純物質として入手できない可能性がある。
- 5) 内標準は、状況によっては最も費用効果の高い方法であるが、化学的特性が分析対象化合物と同一ではないことから、最適な内標準でも厳密にはサロゲートとしての添加よりも満足度が低い。
- 6) 内標準に基づく回収率の予測では、正負両方のバイアスを生じる可能性がある。内標準は他の目的に使用される場合もある。

回収率を求めた標準試料と実際の検体との間のマトリックスの不一致は、回収率補正において一般的にみられる問題であり、「3.3 マトリックス不一致」の項で解説されている。このマトリックスの不一致の問題は、マトリックス標準溶液を用いた定量においても同様に生じると考えられる。以下に概要をまとめた。

3.3 マトリックス不一致

- 1) あるマトリックスについて回収率を予測し、他のマトリックスに適用するとき、マトリックス不一致が起こる。マトリックス不一致は、回収率のバイアスとなり得る。
- 2) この効果は、2 つのマトリックスの化学的性質が大きく異なる場合に最も深刻になると考えられる。
- 3) マトリックスが合理的で妥当(例えば異なる 2 種の野菜)であっても、また、名目上同一(例えばウシ肝臓の異なる 2 検体)であっても、根

拠がないまま回収率は有効であると仮定せざるをえない。これにより回収率及び回収率による補正值の不確かさは明らかに増大すると考えられる。

- 4) マトリックス不一致は原則として、分析対象の検体ごとに回収率試験(例えば添加法など)を行うことにより回避できる。しかしながら、このようなやり方はコストがかかることから実用的ではないことが多く、回収率の測定には各分析ランの代表検体が用いられる。

「3.4 分析対象化合物の濃度」の項では、回収率と濃度との関係について述べており、以下に概要を示した。

- 1) サロゲート又は本来の分析対象化合物の回収率は、これまでのところ濃度に依存しないものとして扱ってきた。このことは、低濃度では厳密に真であるとは言い難い。
- 2) 例えば、一部の分析対象化合物は、表層での不可逆吸着効果により回収できない場合がある。ところが、ある程度の分析対象化合物濃度になると吸着部位がすべて埋まり、さらに高い濃度では吸着による損失はこれ以上起こらないと考えられる。よって、回収率が濃度に比例しない。
- 3) 分析法バリデーションにおいてはこのような状況を調査すべきであるが、完全な試験の実施は、時間がかかりすぎる場合がある。

「4. 回収率情報を測定値の補正に使用すべきか？」の項では、回収率補正に対する賛成意見と反対意見が示されており、概要を以下にまとめた。

4.1 補正に関する賛成意見

- 分析科学の目的は、本来の分析対象化合物の真の濃度を目的に適合した不確かさとともに推定 することにある。
- 真の濃度は、非常に低い分析対象化合物の

回収率を補正した場合にのみ推定できる。

- ・ 回収率が低いことによるバイアスを補正しなければ、普遍的に比較可能かつ転用可能な結果とはならず、相互承認の裏付けには不適當である。
- ・ 提唱される補正方法は、内標準法や同位体希釈法など完全に容認されている分析法と同型であり、原理上の問題点はない。
- ・ 補正係数に何らかの不確かさを伴うことは避けられないが、不確かさは推定可能であり、最終結果の合成不確かさに取り込むことができる。

4.2 補正に関する反対意見

- ・ サロゲートにより予測された回収率は、本来の分析対象化合物に対応する値より高い可能性がある。結果を補正してもなお、負のバイアスがあると考えられる。
- ・ 推定された補正係数は、異なるマトリックスや異なる分析対象化合物濃度によってばらつきがあることから、適合性に疑問が残る。
- ・ 推定された補正係数は相対不確かさが大きいことが多く、一方補正されていない結果は、容量測定及び機器測定のみに関しては通常相対不確かさが小さい(ただし、不確かさが小さいのはバイアスをかけていない場合に限る)。よって、補正結果の相対不確かさは高くなり、その程度は、明示されれば分析における問題に精通していない人々に好ましくない印象を与えるに十分である。やがては法施行における科学に対する信頼性に影響しかねない。
- ・ 単一の補正係数からの比較的小きな逸脱は、分析対象化合物の損失よりむしろ偶然誤差によるところが大きい。この場合、補正により結果の絶対不確かさが大きくなる可能性がある。

- ・ 汚染物質について最大許容限度を課す法規制は、補正されていない結果が法施行に用いられるとの認識に基づいて構成されている。

「5. 回収率の推定」の項では、回収率の推定方法とその限界について述べている。以下に概要を示した。

- 1) 回収率を予測する方法として、すべてに適用可能で欠点がないような方法はない。しかしながら、理想的手法を用いた「思考試験」を行うことは可能である。これにより実際の手法における基準点が得られる。
- 2) この理想的手法では確実な分析法を用いることができる。つまり、回収率の損失が一切なく、バイアスもまったくない方法により分析対象化合物を測定することが可能である。この方法は、日常分析で使用するにはリソース集約的であるが、日常分析用に回収率が完全ではない代替方法がある。
- 3) 日常分析で回収率を予測する方法としては、多数の一般的な検体をまとめて分析する方法、及び要求されるマトリックスや分析対象化合物濃度を網羅した範囲を分析する方法がある。これにより、日常分析において考えられるあらゆる状況の回収率(及び不確かさ)が得られる。
- 4) 現実的には、基準点のためのこのような確実な分析法はないと考えられ、回収率の予測には標準試料又はサロゲートを用いなくてはならない。
- 5) しかし、標準試料は少なく、リソースも限られていることから、サロゲートによる回収率の予測に用いることができる検体は限られる。
- 6) さらに、サロゲートの使用自体も、本来の分析対象化合物の一部が共有結合的に、あるいは他の強力な作用でマトリックスに結合することにより、回収不可能となっているかどうかを

判断することは難しいことから、回収率の予測にも不確かさが加味されてしまう。

「7. 結論」の概要を以下に示した。

- 1) データの取り扱いにおける慣行が異なることが、データを比較できない重大な原因となっている。
- 2) この影響を緩和するため、通常、分析データに適切な補正係数を適用してから報告するという慣行が推奨されるべきである。
- 3) しかしながら、法定限度が補正係数を適用していないデータに基づいている場合、当面、現状通りに「生」データの報告が継続されるだろう。
- 4) 回収率試験及び結果の詳細は適切に報告されるべきである。検体中の本来の分析対象化合物の一部が当該分析手順によって抽出不可能であることがわかっていたり疑われる場合、当該手順は「分析可能な」分析対象化合物のみを測定するものとみなされなくてはならない。このような制限は分析証明書に明記されるべきである。
- 5) 回収率モデルでは示されないような「結合した」分析対象化合物に対しては、妥当な補正をつくることも試みることも不可能である。
- 6) 分析法の回収率測定には、(a) 精度管理の目的及び (b) 回収率の取得、の 2 つの役割があることが認知されるべきである。後者の場合、広範囲かつ詳細なデータが要求される。

本ガイドラインにおける回収率情報の使用に関する推奨事項が「8. 勧告」として示されており、その概要を以下にまとめた。IUPAC、ISO 及び EURACHEM は、本ガイドラインの科学的原則及び勧告を採用するとしているが、AOAC インターナショナルは、科学的原則は採用するが、一般的な

方針として分析結果は回収率で補正すべきという事項には合意しないとしている。また、本ガイドラインは、Codex ガイドライン CAC/GL 37-2001 として採用されたが、下線部分は削除することとされた。

- 1 定量分析の結果は特に理由がない限り回収率で補正すべきである。補正係数を推定しない、又は使用しない理由には次の場合がある。
(a) 分析法が経験的分析法とみなされる、(b) 補正されていないデータに基づいて契約又は法定限度が設定されている、又は(c) 回収率がほぼ 1 であることがわかっている場合。しかしながら、データ報告の際には、全データについて次の事柄が極めて重要である。(a) 回収率による補正が適用されたかどうかを明確にし、(b) 回収率による補正が適用されたのであれば、補正量及びどのような方法で算出したかを報告書に共に記載すべきである。これにより、データセットを直接的に比較できるようになる。適切な統計的検討により補正関数を設定し、記録し、保管し、顧客が利用できるようにすべきである。
- 2 回収率を報告するか否か、結果を補正するか否かにかかわらず、分析法バリデーションの一部として常に回収率を設定すべきである。そうすることで、測定値から補正值、補正值から測定値への変換が可能となる。
- 3 回収率の使用が妥当とされるとき、推定方法を分析法プロトコルに明記すべきである。
- 4 分析法バリデーションの実施中に回収率の IQ 管理図を作成し、すべての日常分析で使用すべきである。分析ランで管理範囲から外れた回収率が得られた場合、許容変動と見なして再分析するか、半定量値として報告すべきである。

(11) OECD

「Other Test Guidelines, Introduction to OECD Test Guidelines on Pesticide Residues Chemistry Section 5 – Part A」¹²⁾

分析法の開発に関連する事項を抜粋して、以下にまとめた。

『作物代謝』

4. 作物代謝試験の目的は有効成分の分解経路を明らかにすること、すなわち、代謝物／分解生成物を同定し、抽出できる物質とできない物質の相対量を求めることである。作物代謝試験の目標として、処理された作物からなる未加工農産物ごとに総残留放射性物質 (TRR) の 90%以上を同定、特徴づけることが望まれる。

『残留農薬分析法のバリデーション』

28. 分析法は食事暴露評価の推定に関するデータを生成し、MRL を設定し、加工係数を求めるために用いられる。分析法はまた、設定されるかもしれないいかなる MRL の規制施行にも用いられる。分析法は、食用作物／家畜、その後の生産物や加工食品、処理された作物を摂取したと考えられる動物由来の製品(肉、乳、卵など)に用いられたすべての農薬に適用される。さらに、分析法は保存安定性試験を実施する際にも必要である。
30. 分析法バリデーションの目的は、その手順が正しく適用されたときに目的に沿った結果を生成することを示すことである。残留分析法ガイダンス文書は、有効成分及び登録の承認申請の一部として含まれる分析法の妥当性を確認するために行うべき手順を記載している。意図する目的に沿うため、分析法は一定のバリデーションパラメータに関する基準を満たし

ていなければならない。残留分析法のために考慮されるべき一般的なバリデーション特性は、回収率、選択性(特異性)、校正、精度(併行精度、再現精度)、検出限界(LOD)及び定量下限(LOQ)である。本ガイダンスは次の内容にも対応している。(1)抽出効率及び放射化学手順、(2)確認分析に関する手法、(3)分析成分検出のための誘導体化法、(4)共通の構造／官能基、及び非特異的方法、(5)分析法バリデーション基準及び報告すべき関連情報。

『規制適用性及び用途』

34. 各代謝試験は植物又は家畜の代謝経路を特徴づけるため、及び規制執行を目的とした残留定義を得るために、複雑なアプローチを必要とする。代謝物は限定圃場輪作作物試験、作物圃場試験、家畜残留試験用の基準として同定及び確認され、食品又は飼料中の農薬レベルを判定するために用いられる。各試験に特有の性質、及び各化学物質の代謝経路を明らかにするために必要な特定の試験方法のため、ガイダンスを慣例的なものとすることはできない。しかしながら、各代謝テストガイドライン(作物代謝、家畜代謝、輪作作物代謝)は、放射性同位元素により標識された物質を使用し、すべての主要な代謝物が回収され特徴づけ／同定されることを保証するために 90%以上の回収率を有することを求めている。標準的な分析化学の手法が用いられるが、それらは試験で検出された各代謝物の同定・定量に関するバリデーションを求めている。各化学物質についての各代謝試験はそれぞれ独自の特性を備えているが、分析化学分野において内部的に妥当性が確認される。MRL の規制執行目的に使用される分析法は、独立して

確認又はバリデーションが行われる。』

「Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops」¹³⁾

本ガイドラインは、農薬登録申請時の植物代謝試験についてまとめたものであるが、「目的」の項において、作物代謝試験はの主要な目的の一つとして、さまざまな農産物中の最終残留物の主要成分を同定することで、残留試験で分析すべき成分(リスク評価及び規制施行の残留定義)を示すことであるとしている。MRL 施行のための規制対象化合物は、植物代謝試験により決定されることから、その検討に用いられる分析法は、規制のための残留分析法の基本になる方法と考えられる。「DISCUSSION OF THE TEST METHOD」の項において植物代謝試験に用いる分析法について示されており、残留分析法開発に関連する事項を抜粋してまとめた。

『有効成分の同位体標識』

17. 放射標識した有効成分の特異的活性は、作物代謝試験のデータ要求(作物マトリックス中の総残留放射性物質(TRR) 0.01 mg/kg の定量)を満たすのに十分であるべきである。施用時の放射化学物質の純度が 95%未満の場合、正当性を説明すべきである。

『分析』

28. 作物代謝試験の最初の分析段階では、分析対象となる作物部位を採取、細切又はホモジナイズして、TRR を算出する。すべての放射能を完全に追跡できるようにしなくてはならない。また、洗浄は浸透レベルの推定に役立つ可能性があるため、試料調製前に試料の表面を洗ってもよい。

29. オレンジ、メロン、バナナなど食べられない皮が付いている食品では、皮と果肉間の残留物の

分布を測定すべきである。

30. 試料は、予測される残留物の性質により極性や他の特性が異なる一連の溶媒又は溶媒混合液を用いて抽出される。得られた抽出物は抽出性残留物と定義される。要求される抽出性残留物及び非抽出性放射標識の特徴付けや同定を、それぞれ表 I 及び図 I にまとめる。

31. 同定とは TRR 成分の正確な構造決定をいう。特徴付けとは残留放射性物質の全般的な性質／特性の解明をいう。残留物の特徴付けに用いられる用語には、有機可溶性、水性や水溶性、中性、酸性、アルカリ性、極性、非極性、非抽出性放射性物質などがある。特徴付けには、共通構造への変換や特定の試薬の反応性にに基づき分子中に存在が知られている構造部分を説明することも含まれる。特徴付けの程度とは、特徴付けが完全な構造の同定にどれくらい近づいているかをいう。

32. 残留放射性物質の同定が完了していない場合、一部の総放射性物質に求められる特徴付けの程度は、存在する残留量、すでに同定された TRR 量、作物部位の食品又は飼料としての重要性、化合物クラスにおける毒性学的懸念、すでに行われた特徴付けを基に残留物に予想される有意性、特徴付けはされるが同定されない(共通構造への変換による)残留物を検出する分析法の能力などのいくつかの因子によって決まる。共通構造への変換は、複数の低濃度成分を特徴付けるのに認められる。ただし、大部分の残留物の同定を簡略化する方法として共通構造に変換することは認められない。

34. 通常、代謝物の立体化学を決定する必要はない。同定された代謝物が立体中心を有し、残留定義に含まれる場合、又は毒性学的懸念がある場合は、監視圃場試験において立体異性

体の比率に対処する必要がある。

35. 新たな抽出法及び分析手法を上記手法に代わって用いることができる。代替えの抽出法として、超臨界流体抽出法(SFE)、マイクロ波抽出法、加速溶媒抽出法(ASE)などの使用が可能であるが、代謝経路を十分に解明するためには分析に見合った最新の技術を用いるべきである。
36. 作物代謝試験の実施中、申請者は分析法の能力(規制施行及びデータ収集)に関して将来生じ得る問題を念頭に置き、MRL 又は食事リスク評価のために定義された残留物を効率的に抽出する必要がある。よって、放射標識試料はのちに開発される分析法を用いた将来の分析のために保存する必要があると考えられる(分析法の「ラジオバリデーション」と呼ばれることがある)。しかし、分析法の抽出手順が放射標識試験で用いられた手順とほぼ同じ場合、このようなデータは通常必要ない。分析法の抽出過程のラジオバリデーションについては分析法に関する報告の一環として提出すべきである。ラジオバリデーションは 1 件の報告として独立したものか、又は代謝報告に含まれる場合がある。フルデータパッケージのカバーレター又は要旨には発行場所を表示すべきである。

『抽出性残留物の特徴付け／同定』

38. TRR が 0.01 mg/kg より大きい場合、作物部位を極性の異なる溶媒又は溶媒混合液で抽出すべきである。その後、抽出性放射性成分をクロマトグラフィー分析によって定量し、必要な特徴付けの程度を決定すべきである。

『データ報告の検討事項』

『データ』

53. 試験のデザイン、実施、報告にあたっては次の項目を検討すべきである。

「概要及び緒言」

- (5) 規制施行／データ収集のための分析法を開発したときは、作物代謝試験で使用した試料を用いてバリデーションを行うとともに、生鮮農産物中で遊離体又は非抽出性代謝物／抱合体であるかにかかわらず、TRR の全成分の抽出能及び測定能を記載すべきである。この記述の中で用いられた分析法の検出限界、精度及び精確さについても示すべきである。抽出効率の報告は本項中、又は分析法報告書の一部もしくは独立した報告書として、又は代謝報告書の一環として提出できる。

「材料及び方法」

- f) 放射残留物の分析に使用された分析方法
- (6) mg/kg 当量及び代表的な算出例を含む定量下限を求めるための選定された代表試料の放射性物質の集計数データに関する詳細を報告すべきである。
- (7) 作物代謝試験で用いた放射標識試料による規制施行のための分析抽出条件を用いた場合の抽出効率、及び RAC 中で遊離体、抱合体、非抽出性放射性物質にかかわらず、TRR の関連成分の抽出能について記述する。
- g) 放射性物質の抽出及び分画
- (1) 各試料マトリックスに用いられた全般的な抽出法及び分画方法(スキーム)についてフローチャート又はダイアグラムを用いた完全な記述。
- (2) 採用された抽出溶媒(極性対非極性)及び脱錯化剤、超音波処理などの付加的な技術を含む抽出手順(混合、浸漬、分配、ソックスレーなど)の選定及び抽出シーケンスの根拠に関する考察を記載すべきである。
- (3) すでに抽出された作物組織及び／又は水溶性作物抽出物からの濾過ケーキ又は抽出残渣から抱合残留物を遊離するために用いら

れた酸、アルカリ、酵素による加水分解条件の説明。加水分解に用いられたすべての酵素製剤の供給元、純度、特異性及び活性に関する情報も記載すべきである。

- (4) それぞれの抽出された試料マトリックス中の全ての遊離型 vs. 抱合型の有効成分／代謝物の比率や量を求める算出方法。
- (5) 申請者は、強い溶媒抽出及び加水分解処理による抽出後の試料マトリックスに残された残留放射性物質（非抽出性放射性物質）の定量的推定値を提示すべきである。残留放射性物質の報告は、総残留放射性物質の割合（%）と総回収放射性物質の mg/kg の両方で表示すべきである。高温での濃酸や濃アルカリによる反復処理に続く抽出でも抽出されない放射標識物質の抽出に特殊な他の方法を試みた場合、申請者は使用の根拠とあわせてこれについても報告すべきである。
- (6) 収穫された全作物組織について算出及び報告された放射化学物質の抽出効率。
- (7) 分画及び単離手順に続く各段階で損失した放射性物質を説明又は追跡するデータを提示し、これらの損失を最小限にするために申請者が取った措置を考察すべきである。
- (8) 申請者は、作物組織中の非抽出性放射標識をタンパク質、でんぷん、リグニン、セルロースなどに分画する詳細な手順を報告すべきである。
- (9) 申請者は、非抽出性放射性物質と特徴付けられた有意な量の元の残留放射性物質が天然製品に取り込まれていたかどうかを報告すべきである。
- (10) 各試料画分中の放射性物質量を定量し、総放射活性 (Bq) の用語で報告し、分析対象の元の試料マトリックスから回収された総放射

性物質の割合 (%) ならびに mg/kg (有効成分当量) として報告すべきである。すべての作物部位について放射性物質を測定する試験では、総作物放射活性に対する各作物部位の割合 (%) を報告することが有用であるが、要求ではない。

『結論』

- (3) 放射標識された作物試料についてバリデーション試験が行われた場合、規制施行のための分析法及び既存の分析法が残留定義の成分を測定する能力を含む結果についても考察すべきである。

『試験報告』

54. 試験報告には次の情報が含まれるべきである。
 - ・ 放射標識物質が遊離型、抱合型、非抽出型、天然成分かに関係なく、すべての主要成分に関するデータを含み、総放射性物質に対する割合 (%TRR) 及び濃度 (mg/kg) の両方で表される生鮮農産物内での分布を反映する残留放射性物質の特徴付け／同定
 - ・ 親化合物、代謝物、関連する標準物質のクロマトグラフィーの挙動 (HPLC/GC の保持時間、TLC 基準 (Rf) 値)、及び生鮮農産物から抽出された残留放射性物質のクロマトグラフィーの挙動との比較に関する記述。試料抽出物の代表クロマトグラム及び分析用標準物質のクロマトグラム、ならびに代謝物の同定を裏付けるあらゆるスペクトルデータも添付すべきである。
 - ・ 特に(予想される) 規制施行の分析法に関係する抽出法による残留放射性物質の回収率に関する定量情報。
 - ・ 分析対象生鮮農産物で観察された分解又は代謝経路に関する詳細な考察
 - ・ 次の事項に関する結論

- (a) 成熟時又は収穫時の分析対象生鮮農産物で観察された代謝経路及び代謝の範囲
- (b) 収穫時又は家畜飼料として使用される生育段階の生鮮農産物中の TRR の性質、量及び分布
- (c) 作物代謝試験の作物試料について、規制施行のための既存の分析法が、同定された残留の定義の成分を抽出／遊離する能力の程度を示すために実施されたバリデーション試験の結果

「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17」¹⁹⁾

本ガイドラインのうち、分析法開発に関連する主要部分を抜粋して以下にまとめた。

【緒言】

- 2. 申請者が規制施行のために個別(単一成分)分析を申請する場合、本文書により独立した試験室によるバリデーション要件を含む分析法バリデーション基準に関するガイダンスが用意されている。一般に、単一残留成分についての登録前分析法と登録後分析法に対する精度基準はほぼ同様である。特に登録後個別分析法に係る情報については 48 項と 49 項に抜き出した。代表食品についてはフルバリデーションを行う必要があるが、監視圃場試験ではバリデーションのデータ量を少なく抑えることのできる添加試験が行われる。一定の分析法が用いられる場合は、分析法について毎回フルバリデーションを行う必要はない。
- 4. 規制施行のための登録後分析法について、公式の監視試験所は、多数の分析対象化合物をカバーする一斉(多成分)分析法を推奨している。MRL の規制施行においては、一斉分析法は国

によって異なり、使用可能な設備や個別の試験所の能力によるところが大きい。本ガイダンスは規制当局の一斉分析法に取って替わることやこれに優先することを意図するものではない。当該分析法のバリデーション基準については別途文書に記載されている。分析対象化合物が一斉分析法に従うことができないときは、個別分析法を用いることができる。

【目的】

- 5. 分析法バリデーションの目的は、手順が正しく用いられた際に、その手順によって目的に合致した結果が得られるかどうかを判定することである。本ガイダンスでは、農薬の承認及び登録申請の一環として、分析法の妥当性を確認するために実施すべき手順について述べる。大抵の場合、以下の目的を満たすには分析法開発及びバリデーションにおいて 2 通り以上の分析法が必要となる。
- 6. 分析法の条件は次の通りとすべきである：残留の定義(リスク評価と規制施行の両方における)に含まれると考えられる全ての分析対象化合物を定量する能力を有する；十分な選択性を有することで干渉物質が分析定量下限値(LOQ)の 30%を決して超えない；許容される回収率及び併行精度示す；農薬処理対象のすべての作物、動物及び飼料をカバーする。重大な残留が発生した場合は、処理画分及び飲料水をカバーし、食用動物が農薬処理作物を摂取する可能性が高い場合は、すべての動物性食品をカバーする。しかしながら、一部の規制当局ではこのような食品に残留が検出されることは想定していないにもかかわらず輸出入のために動物性食品に対し MRL を設けることになる。よって、規制施行における分析法には適切な LOQ を示し、MRL を LOQ に設定することが求められる。

【総論】

『対象とする分析対象化合物』

17. 登録後分析法は、MRL の規制施行に関連する残留物の定義によって、登録前の分析法とは異なる分析対象化合物を検討することがある。

『抽出効率／ラジオバリデーション Extraction Efficiency / Radio-Validation』

18. 残留分析法は残留定義の全成分について測定可能であるべきである。残留定義に複合体又は結合体が含まれている場合、分析法には「結合」残留成分を解離するのに適切な方法が含まれるべきである。

19. 抽出効率は分析法開発の鍵とみなされており、一般的に使用された抽出溶媒及び条件(温度、pH、時間)に関するデータが提示されるべきである。低い抽出効率は、分析法のバイアスの主な原因となり得る。抽出効率は、分析結果の精確さに大きく影響する可能性がある。しかしながら、抽出効率は、分析直前に添加した試料を用いて行われる従来の回収試験では検証できない。残留定義に含まれる全残留成分の効率的な抽出に関する頑健性バリデーションは、残留成分が試料に到達する通常の経路を経て含有される試料を用いた場合のみ実施可能となる。通常、代謝試験がこれにあたり、抽出効率は放射性標識された分析対象化合物を用いた方法で測定することができる。留意点として、植物及び動物由来食品中の結合残留異物に関する IUPAC 報告では次のように推奨されている。すなわち「残留分析法で用いられる抽出手順は、放射性標識試験からの(実残留)試料を用いてバリデーションを行うべきである。」

20. 理想的には、代謝及び輪作作物試験で用いた対象食品を、登録後分析法及び管理圃場試験や輪作作物試験における残留データ収集に

用いる分析法についての、抽出効率測定のために確保すべきである。試験報告書には選定された食品の根拠についても記載すべきである。確保された食品は、放射化学手順(放射線検出器を用いた燃焼分析、液体シンチレーションカウンター及びクロマトグラフ分析)によって抽出効率が容易に測定できるよう対象とする分析法での抽出手順に供すべきである。抽出効率は、代謝試験で得られた抽出量と比較することができ、代謝試験では、食品に対し分析対象化合物と想定されるほとんど(全部が無理であれば)の成分を抽出するようデザインされた厳格な抽出手順を用いているものとする。この比較はラジオバリデーションとして知られ、可能であればすべての分析法の抽出スキームについて実施すべきである。代替として、代謝試験からの試料について、アセトン+水、酢酸エチル及びアセトニトリルなどのよく使用される抽出溶媒を用い、残留定義において推定される化合物の抽出効率比較試験を行うことができる。

21. 抽出効率に関する試験は、代謝試験又は分析法開発試験の一部とすることができる。いずれの場合も、本試験結果は登録前及び登録後分析法のいずれの開発にも欠かせないものであることから、関係する分析法バリデーション報告に記載すべきである。

22. 例外的なケース(例:登録前分析法において共通構造アプローチが用いられている場合、又は広範な酵素切断ステップが含まれている場合)では、追加の精製ステップ及び回収率実験を含むフルラジオバリデーション実験(アカウンタビリティ試験)が是認される。

23. 新規分析法の開発に代謝試験の試料がもはや利用できない場合、2つの溶媒系の間を「橋渡し」することが可能である。例えば、管理圃場

試験で得られた実残留試料を用いて、第1段階では代謝試験に適用した条件下の溶媒系を用いて抽出し、第2段階では検討中の溶媒を用いて抽出することが可能である。抽出効率に関する情報は、分析結果を直接比較することにより得ることができる。

『共通構造分析法及び非特異的分析法』

29. 分析対象化合物によっては、特定の残留分析法がないことや実施が難しい場合がある。このような場合、全成分に毒性学的に重要と考えられる共通構造が含まれ、かつ単一の成分では残留濃度のマーカーとして不十分な場合、共通構造への換算が妥当である。

30. 植物及び動物製品の残留試験データの作成において、リスク評価目的で多成分残留定義が必要となる場合、共通構造分析法を用いることができる。

31. 通常、非特異的分析法の使用は勧められない。適切な分析法を選択するにはリスク評価とMRL遵守の両方のニーズを考慮すべきである。規制施行のための残留定義に多成分が含まれる場合、膨大な数の分析法が必要となる可能性がある。このような場合、「共通構造分析法」が必要とされる。非特異的分析法及び共通構造分析法の欠点は次の通りである。

a) 非特異的分析法が使用された場合、分析対象化合物の起源の識別には疑問の余地が残る可能性が高い。例えば、この分析法は、目的とする分析対象化合物と共通の構造を有するか、又は共通の化学種に誘導体化されたか、あるいは目的の分析対象化合物から分離することができない分解生成物も検出する可能性がある。このような方法は、他の構造類似化合物による干渉を受けることがある。

b) 保存安定性試験の一環として保管されてい

た製品中の有効成分の含有量を分析する際、有効成分に特異的ではない分析法によって安定性／分解を判定することは不可能である。

c) 分析法が毒性の異なる2種以上の異なる有効成分について、共通の構造を判定する場合は残留物の由来を同定し、毒性学的に意味のある残留成分に関するリスク評価を行えるようにすることが望ましい。

32. 実際、該当する場合は、規制当局が2組の残留定義(1組はリスク評価用、もう1組はMRL遵守のモニタリング用)を柔軟に設定し得るような方法によってデータを生成しなければならないことがある。このような場合、可能であれば申請者は、共通構造分析法を実施するよりも残留定義の個々の成分を別個に分析するべきである。あるいは、共通構造分析法が実際のルーチンモニタリング及び妥当な費用でのMRL施行に不相当である場合には、最初の分析は共通構造分析法によって行い、次いで、適切な標的分子について圃場試験の試料の一連の分析を併行して行うべきである。モニタリングのために実施できる適切な方法を考慮すべきである。

33. 非特異的分析法及び共通構造分析法は、他に目的の分析対象化合物を測定する実際的な方法がないといった例外的な場合にのみ認められるものとする。このような場合は十分な根拠を提示すべきである。根拠には当該化合物を特異的分析法で測定できない理由についての説明が含まれるべきである。共通構造分析法を行う場合、残留定義に関連するすべての成分について別途バリデーションデータを提示すべきである。

2. 分析法の評価基準について

B. 研究方法で示したガイドライン等について、

分析法の評価基準に関して記載があるものについて整理した。

(1) 厚生労働省(日本)

「残留農薬等試験法検討実施要領」¹⁾

分析法の評価方法及び評価基準の概要を以下に示した。

1) 評価方法

食品毎に、検討する試験法の分析対象化合物を含まない試料(ブランク試料)に分析対象化合物を添加した試料(添加試料)を試験法に従って分析し、その結果からパラメータ(選択性、真度、併行精度及び定量限界)を求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認することとしている。添加回収試験の実施手順等については、以下のよう

① 添加を行う食品の種類及び添加濃度

添加回収試験は、基準値が設定されている食品を含む「食品グループ」について実施する。対象食品の選択にあたっては、原則として添加回収試験の対象食品の表に示した「食品グループ」に属する「食品の種類」から代表食品を1食品ずつ選択する。ただし、不検出基準の品目については、原則として表の「食品の種類」から代表食品を1食品ずつ選択し、農産物及び／又は畜水産物それぞれ8食品以上について検討する。

② 添加回収試験の添加濃度

添加回収試験における農薬等の添加濃度は、原則として以下の通りとする。

i) 対象農薬等の「定量限界濃度」及び「基準値濃度」の2濃度とする。

ii) 農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合は、添加濃度は「施行通知に示された検出限界」の1濃度とする。また、施行通知に示された検出限界よりも低濃度

で評価が可能であれば、その濃度を用いてもよい。

iii) 基準値が設定されていない場合には、別途指定のない限り一律基準(0.01 ppm)を用いて同様に取扱う。

③ 定量限界について

定量限界は、基準値濃度の1/10を目処とする。また、定量限界は一律基準濃度(0.01 ppm)以下であることが望ましい。

④ 留意事項

食品成分又は液性の影響で分析操作中に分解しやすい農薬等/食品の組合せにも適用できる試験法を作成するために、添加回収試験を行う際には以下の事項に留意することが示されている。

i) 添加試料の作成にあたっては、原則として新鮮な食品を使用し、均一化して秤量した後に農薬等を添加する。凍結保存した食品又はそれを均一化した食品は、食品成分が変化している可能性があるため、できる限り使用しない。野菜や果実など、凍結保存以外に長期間の保存が不可能な試料については、そのままの状態に凍結した試料を検討に用いても良い。ただし、凍結・融解の繰り返しは避けること。

ii) 添加する農薬等の標準溶液の量は、添加溶媒により酵素活性あるいは抽出効率に変化する可能性があるため、できるだけ少量にとどめ、試料量の1/20~1/10程度とする。

iii) 添加に用いる溶媒は、試料と混合する溶媒(アセトンなど)を用いる。例えば、脂肪の添加に用いる溶媒は、アセトンなどの脂肪と混合する溶媒を用い、アセトニトリルなどの脂肪と混合しない溶媒は使用しない。

iv) 添加試料は農薬等を添加後よく混合し、30分間程度放置した後に抽出操作を開始する。

この間に農薬等の分解が見られた対象食品があった場合、農産物では全ての対象食品に共通な分解防止方法を検討する。畜水産物についても全ての対象食品に共通な分解防止方法を検討することが望ましいが、分解が認められた食品が内臓や内臓を含む食品（貝類など）などのように限定される場合には、分解が見られた食品についてのみ分解防止方法を検討することも可能である。この場合には試験法に別法あるいは注意点として分解防止方法を記載する。分解を防止する方法を見いだすことが困難な場合には、個別事例として別途添加方法等について検討する。なお、農産物と畜水産物とで取扱いが異なるのは、農産物では農薬等が分解する食品を特定することが一般に困難であるのに対し、畜水産物では肝臓やしじみなど特定の食品について分解が見られることが多いためである。

- v) 分解を防ぐ対策としては、ホモジナイズ前の食品に塩酸又はリン酸等の酸あるいは抗酸化剤を添加すること等が考えられる。また、液性による分解の場合は酸、アルカリ又は緩衝液をホモジナイズ前の食品に添加する方法等が考えられる。添加回収試験は、酸、アルカリ、抗酸化剤等を加えて調製したホモジネートに農薬等を添加後よく混合し、30分間程度放置した後に抽出操作を開始する。なお、精製操作への影響を考慮して、分解防止の目的で添加した添加剤の抽出溶液中の添加濃度は、食品によらず同じになるようにすることが望ましい。
- vi) 他の食品に比べて回収率が低い食品があった場合は、対策を検討し、原則として当該食品以外の食品もその方法で添加回収試験を実施する。

- vii) 乾燥試料に対する水添加後の放置時間は、既存の公示試験法の記載によらず原則として30分間とする。
- viii) 特に必要な場合は、ホモジナイズから転溶までの操作を速やかに行うよう通知(案)の注意点に記載する。

2) 評価基準

添加回収試験からの結果からパラメータ(選択性、真度、併行精度及び定量限界)を求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。各パラメータの目標値は妥当性評価ガイドライン(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「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」(食安発1224第1号、平成22年12月24日)で示されたパラメータが準用されている。

① 選択性

ブランク試料を試験法に従って分析し、定量を妨害するピーク(妨害ピーク)がないことを確認する。妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積(又は高さ)を基準値あるいは定量限界に対応する濃度の標準溶液から得られるピーク(又は高さ)と比較し、以下のことを確認する。なお、基準値未設定の場合には、基準値を一律基準(0.01 ppm)として同様に取扱う。

- i) 定量限界が基準値の1/3以下の場合には、基準値に相当するピーク面積(又は高さ)の1/10未満
- ii) 定量限界が基準値の1/3を超える場合は、定量限界に相当するピーク面積(又は高さ)の1/3未満
- iii) 農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合は、施行通知に示された検出限界(又は別途求めた定量限界)に相当するピーク面積(又は高さ)の1/3未満

② 真度

添加試料 5 個以上を試験法に従って分析し、得られた定量値の添加濃度に対する百分率(回収率)を求め、回収率の平均値を真度とする。なお、回収率を求める際には、計算途中の有効数字を十分確保すること。真度の目標値は表 1 のとおりとする。

③ 精度

添加試料の分析をくり返し、回収率の標準偏差及び相対標準偏差(RSD)を求め、併行精度を評価する。試行の回数は 5 回以上とする。併行精度の目標値は表IIのとおりとする。

④ 定量限界

添加試料への農薬等の添加濃度に「定量限界濃度」を用いる場合には、以下の条件 i) 及び ii) を満足していることを確認する。

i) 定量限界濃度を添加した添加試料による真度及び併行精度が表 II の目標値を満足していること。

ii) クロマトグラフィーによる分析では、定量限界濃度を添加した添加試料から得られるピークは、 $S/N \geq 10$ であること。なお、試験法の検討にあたっては、より余裕のある S/N が得られる条件での検討が望ましい。

⑤ 試料マトリックスの測定への影響

妥当性評価ガイドラインには規定されていないが、試料マトリックスの測定への影響を確認することが求められている。具体的な方法は、添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるようにブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成し、それぞれ 2 回以上測定したときのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又

は高さ)の比を求める。マトリックス添加標準溶液は、試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

(2) 農林水産省(日本)

「12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)」別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」の「4. 残留性に関する試験 ○農作物への残留性に関する試験 作物残留試験(識別番号 3-1-1)」²⁾

農産物中の残留農薬分析法の評価基準に関連する事項としては、「8. 試料の分析」の「(3)分析方法」において、以下の事項を報告することが求められている。

① 分析方法の妥当性は、以下の項目により、農作物ごとに確認又は検証する。

ア. 選択性

分析対象物質を含まない試料を用いて分析操作を行い、定量を妨害するピークがないこと。

イ. 回収率

定量限界及び分析対象物質の残留が見込まれる濃度範囲において、無処理区から採取した試料に既知量の分析対象物質を添加した試料を用いて分析法に従い定量し、得られた定量値の添加濃度に対する比の平均。

ウ. 精度

定量限界及び分析対象物質の残留が見込まれる濃度範囲における併行相対標準偏差(RSDr)

② 定量限界については、試料について分析のすべての操作を行った場合に十分な回収率及び精度が得られる最低濃度で表すこととし、試験の目的に必要な感度を確保する。

「12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)」別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」の「4. 残留性に関する試験 ○家畜への残留性に関する試験 家畜残留試験(識別番号 3-2-1)」²⁾

農薬の畜水産物中の残留分析法の評価基準に関連する事項としては、「5. 試験方法」の「(8) 試料の分析」において、「分析方法の妥当性は、作物残留試験(3-1-1)に準じて確認又は検証することが示されている。

(3) EU

「SANTE/11945/2015 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed」⁴⁾

分析法の評価方法及び評価基準についての記載を以下に抜粋した。また、バリデーションパラメータ及び基準を表Ⅲに抜粋して示した。

**『G. 分析法バリデーション及び性能基準
定量法**

G1 室内分析法バリデーションは、当該分析法が意図された目的に合致している証拠を提供するために実施すべきである。分析法バリデーションは、認定機関の要求事項であり、日常的な分析(分析精度管理及び継続的な分析法バリデーション)における分析法の性能検証により裏付けされ、拡張されなければならない。可能であれば、分析法で用いられるすべての手順(段階)についてバリデーションを行うべきである。

G2 多成分及び単成分残留分析法のバリデーションに、代表マトリックスを用いることができる。最低限、分析法の意図する適用範囲に応じて、付

属文書 A に記載の各食品グループから 1 つの代表食品についてバリデーションを行わなければならない。その分析法をより広範な種類のマトリックスに適用する場合は、補完的なバリデーションデータを、例えば、日常的な分析における継続中の QC から取得すべきである。実際のバリデーション手順を付録 A に例示する。

G3 分析法は、感度/直線性、平均回収率(真度又はバイアスの尺度として)、精度(併行精度 RSD_r として)及び LOQ を評価するために試験されなければならない。回収率及び精度を確認するため、分析法が目標とする LOQ 又は RL、及びこれより高い少なくとも 1 濃度(例:目標とする LOQ の 2~10 倍又は MRL)において最低 5 併行の分析を必要とする。残留の定義に 2 つ以上の分析対象化合物が含まれる場合、可能であれば、残留の定義に含まれるすべての分析対象化合物について分析法のバリデーションを行うべきである。

G4 分析法において回収率を測定ができない場合(例えば、液体試料の直接分析、SPME 又はヘッドスペース分析など)、検量線用標準液の繰り返し測定により精度(precision)[精確さ(accuracy)及び真度(trueness)ではない]のみを測定する。通常バイアスはゼロとみなすが、この場合には必ずしも必要ではない。SPME 及びヘッドスペース分析では、キャリブレーションに関する真度及び精度は、分析対象化合物が試料マトリックスに対して平衡に達した程度に依存することがある。分析法が平衡化に依存する場合、そのことを分析法バリデーションにおいて実証しなければならない。

G5 結果を脂肪含量又は乾燥重量に基づいて示す場合、乾燥重量又は脂肪含量の測定に使用する方法は、広く認められた方法を用い、妥当

性を確認すべきである。飼料に関しては、指令(EC) No 152/2009 の Appendix III の一覧に記載されている方法の使用が義務付けられている。

分析法性能許容基準

G6 定量分析法は、初回及び拡張バリデーションの両方において、関連する各食品グループ(付属文書 A 参照)から少なくとも 1 つの代表食品について、各添加濃度で許容可能な平均回収率を示す能力を有することを実証すべきである。許容可能な平均回収率は、分析法の適用範囲内にある全分析対象化合物について 70～120%の範囲内にあり、その併行精度 RSD_r は 20%以下である。LOQ は、これらの分析法性能許容基準を満たすバリデーションにおける最低添加濃度である。特定の場合及び一般に多成分残留分析法では、回収率がこの範囲を外れても許容される場合がある。例外的に、回収率は低いが一貫(即ち、良好な精度が得られている)で、その根拠が十分に確立されている場合(例:分配段階における分析対象化合物の分配によるなど)、平均回収率が 70%未満でも許容されることがある。しかし、可能であれば、より正確な分析法を用いるべきである。日常的な分析において継続中の QC データから求められる室内再現性 (within-laboratory reproducibility : RSD_{WR}) は、試料の不均一性による寄与分を除き、20%以下となるべきである。』

(4) EPA(米国)

「OPPTS 860.1340 - Residue Analytical Method」⁵⁾

残留分析法の評価の要件について以下に抜粋してまとめた。

1) 一般事項

規制施行のための残留分析法は、手順に関する厳しい基準に合致しなくてはならない。データ収

集のみに用いられる分析法は、規制施行分析法の要件をすべて満たす必要はないが、分析法が TTR の測定に適することを保証するのと同様の方法でバリデーションを行わなければならない。

2) 申請者による分析法バリデーション

i) -1 残留分析法は、対照試料データ及び TTR の全成分の回収率データにより、関係する食品を代表する試料に対する妥当性が確認されなくてはならない。

i) -2 対照値は合理的に低い値であるべきであり、できれば申請される残留基準の 20%未満となること。

i) -3 回収率を求める際の添加濃度は、申請される残留基準に適合し、かつ定量下限 (LOQ) を含むこと。

i) -4 回収率は、対象試料に添加された農薬及びその代謝物の既知量の 70～120%の範囲にあるべきであり、試料間で大きく変動しないこと。

i) -5 回収率が常に 100%以上となる分析法は疑わしいものとみなされる。

i) -6 回収率が 70%に満たない場合、ケースバイケースで、急性毒性を示さない有効成分又は微量代謝物については、低い回収率を示す分析法を認めることがある。

ii) -1 TTR の全成分の回収率について、個々の値、標準偏差及び信頼限界を報告すること。

ii) -2 残留レベルの測定値は、分析法の妥当性判定において欠かせない要素である。

ii) -3 分析法の妥当性判定において、70～120%の範囲から外れる回収率の妥当性は当局が検討する。例えば、平均回収率が 65%で変動係数 (CV) [又は相対標準偏差 (RSD)] が低い(例 5%)分析法は、平均回収率が 95%で CV が 20%以上の分析法より好ましいと判断される場合がある。

- iii) -1 農作物、動物組織、乳又は卵の抽出物よりも、生鮮農産品やその圧砕品に添加を行こと。
- iii) -2 対象農作物や動物組織にそれぞれ適用される実際の検出限界 (LOD) 及び定量下限の推定値について言及すべきである。実際の LOD 及び LOQ の推定値は、ブランク(作物の抽出物及び試薬による機器応答)のサイズ及び種類を考慮し、妥当な信頼度をもって検出又は定量できる農薬の最小濃度に基づくべきである。
- iv) 残留分析法は、残留データ及び残留基準の設定の対象となる各作物について妥当性を確認できること。作物群(例 根菜類及び根茎類、葉菜類(アブラナ科の野菜を除く)、穀類など)の残留基準の場合、バリデーションが必要なのは、規定される作物群の代表作物のみである。分析法自体に関して提出する報告書には、代表作物についてのみ回収率データを含める必要がある。一方、圃場試験の報告では、分析法の報告で試験されなかったあらゆる作物についてのバリデーションデータを追加すること。
- v) 動物性食品に関しては、飼養試験における残留データの収集及び/又は残留基準の設定が必要となる乳、卵及び全組織についてのバリデーションデータが要求される。動物組織には通常、牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び鶏の筋肉、脂肪、肝臓が含まれる。牛製品の回収率データは大抵の場合、ヤギ、豚、馬及び羊にも適用可能である。

(5) FDA(米国)

「Pesticide Analytical Manual, Volume I, Multiresidue Methods, 3rd Edition, 1994」⁶⁾

「第1章 規制の運用」の「103 規制における分析法の適用」の「103B 分析法の選択」において、食品に対する規制の執行を支持するためには、初回

分析、照合分析及び追加分析のすべてが公定法又は分析担当者が確認した方法で行われなくてはならないとしている。そして、食品と分析対象化合物の組合せにおいて、分析法が妥当であることを主張するための必要最小限の要件が示されている。

- 1) 試薬ブランクは、分析対象化合物と誤認するような検出器の信号を示さない。
- 2) 同じか、あるいは同様な食品で残留のないものにおいて、以前に行われた分析又は同時に行った分析は妨害となるような検出器の信号を示さない。
- 3) 残留がない試料に違反試料と同じ、あるいは同程度の水準で分析対象化合物を添加したときの回収率は、80～110%の範囲である。
- 4) 残留のないロットが容易に入手できないときは、その試験試料の残りの部分を使って、残留が認められた濃度の少なくとも2倍を添加して回収率測定を行う(例えば、最初の分析値が1 ppmならば2 ppmを加える。)

また、「105 定量限界」の「105A 定義」において、FDAは、定量限界を日常業務を実施している規制試験室において、与えられた分析法で定量及び同定確認ができる最少の残留濃度と定義している。定量限界未満の量は痕跡(トレース)と定義される。なお、多成分一斉分析法が用いられるときは、その分析法に対する各残留化学物質の挙動がそれぞれ異なるので、その分析法で測定された各残留化学物質に対しては個別の定量限界が適用される。

(6) オーストラリア

「Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method」⁹⁾

分析法ごとに各関連物質について報告すべきパラメータ示しており、以下に概要をまとめた。

1) 検量線

標準品：純度が明らかであり、分析中に安定でなければならない。

標準液の濃度範囲：定量の最低濃度及び試料抽出液中の分析対象化合物濃度をカバーするよう調製されなければならない。定量下限から試料抽出液中で測定された濃度までの各標準液濃度(最低3濃度)について、統計学的にバリデーションを行うべきである。

2) 分析法の精確さ

分析法の精確さ：試料に既知量の分析対象化合物を添加して分析することにより得られた結果の平均値が真値に一致する程度である。

確認方法：定量下限又はそれよりすぐ上の濃度、及び添加された試料中の各濃度で行うべきである。また、これらの確認は、試料の分析と同時にを行うべきである。

精確さの指標：以下に示した平均値の真値(100%)との差は、標準的な指針として用いることができる。

真値	基準
< 1 mg/kg	-50%~+20%
> 1 mg/kg	-30%~+10%

3) 定量下限

分析法の定量下限とは、許容される信頼度で定量的に測定できる試料中の残留農薬の最低濃度をいう。これは、定性的に検出することのできる分析対象化合物の最低濃度として定義される分析法の検出限界とは異なる。

4) 分析法の特異性

コントロール試験で得られた精製後の抽出液は、定量下限の30%を超える妨害物質を含まないこと。

5) 分析法の精度(回収率の範囲)

i) 回収率の変動係数(標準偏差を算術平均で

除した値として定義される)は、精度の尺度とみなすことができる。標準的な指標として以下に示す基準を用いることができる。

真値	変動係数
< 1 mg/kg	0.35
1 mg/kg~10 mg/kg	0.30
10 mg/kg~100 mg/kg	0.20
> 100 mg/kg	0.15

ii) 一般的に、回収率データは70~100%の範囲にあるべきである。しかしながら、特に分析が困難な分析対象化合物や回収率が一貫して低いか高い分析法については、60~140%の範囲が適用されることがある。回収率の相対標準偏差は、20%を超えるべきではない。

[補足]

残留物ガイドライン No.4「定量下限付近での最大残留基準案」*において、MRLが分析法の定量下限(LOQ)濃度と同じか近似している場合の回収率の取扱いについて示している。LOQは、実質的には定量的な回収率が達成される最低濃度であり、ここでいう「定量的」とは、70~120%の範囲にある回収率として定義される。実際の回収率データが利用可能な場合、実用的な仕様は以下のように規定される：LOQにおける回収率の80%が70~120%であり、かつLOQにおける全ての回収率は60~130%である。

* APVMA, Residue Guideline No. 4; Maximum Residue Limit Proposals 'at or about the Limit of Analytical Quantitation', February 2000

(7) コーデックス委員会

「Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993」¹⁴⁾

ガイドラインの「4. 分析」において、残留農薬の

試験に適用される分析法は、一般的に表Ⅳに示す基準を満たすべきであるとしている。

「Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016」¹⁵⁾

本ガイドラインでは、分析法の妥当性確認の目的・意義等として、以下の点を挙げている。

- ① 分析法の妥当性確認は、分析法が目的適合性を有していることを証明するためのプロセスである。
- ② 試験が、適切に訓練された分析者によって特定の機器及び材料を用い、分析法のプロトコルに忠実に従って実施されているとき、試料分析に関する指定された統計的な限度内において精確かつ一貫した結果が得られることを意味する。
- ③ 妥当性確認では、マトリックス効果を考慮して分析対象化合物の同一性及び濃度を実証し、回収率の統計学的特性を提示し、偽陽性率及び偽陰性率が許容されるかを示すべきである。
- ④ 分析法が適切な分析標準物質を用いて行なわれている場合には、経験豊富な残留試験室において訓練された分析者により、同一又は同等の試料物質に関して、規定の性能限界内の結果が得られるべきである。
- ⑤ 分析法の妥当性確認が時間が経っても適切であることを保証するため、継続的な技能試験や適切な精度管理試料(例 回収率用の添加試料を含む)を用いて分析法を継続的に評価すべきである。

また、分析法の性能パラメータが示されており、該当部分を以下に抜粋した。

A. 適用可能性

12. 妥当性確認後、分析法の文書には、性能特性(データ品質目標)に加え、次の情報を記載することが望ましい。
 - a. 分析対象化合物の素性、該当する場合は異性体、代謝物及びその他の適切な成分(例:エンドスルファン I 及び II、スピノシン A 及び B)を含む
 - b. 妥当性確認のカバーする濃度範囲(例: 0.01-10 mg/kg)
 - c. 妥当性確認がカバーする試料マトリックスの範囲(例:ウリ科植物、根菜類、柑橘類)
 - d. 機器、試薬、許容変動を含む段階を追った詳細な操作手順(例:100±5°Cで 30±5分間加熱する)、校正及び精度管理手順、必要とされる特別な安全注意事項、意図される用途及び不確かさに関する必須要件を記したプロトコル
 - e. 要求があれば、定量結果は拡張測定不確かさ(Measurement Uncertainty: MU)とともに報告されることが望ましい。

B. 選択性

13. 理想的には、選択性を評価して、分析に悪影響を及ぼす妨害が起こらないことを実証すべきである。あらゆる潜在的な妨害成分に対して分析法を試験することは非現実的であるが、一般的な妨害は、試料及び試薬のバッチごとにブランクを分析して確認することが望ましい。試薬ブランクでは、可塑剤、セプタムブリード、洗浄剤、試薬不純物、試験室汚染、キャリアオーバーなどのバックグラウンドレベルが出現しやすく、分析者はこれらの出現を認識しなくてはならない。また、分析対象化合物どうしの干渉についても、混合標準溶液中で個々の分析対象化合物を確認することにより

知る必要がある。マトリックス干渉については、分析対象化合物が含まれていないことが明らかな試料を分析して評価する。

14. 一般原則として、選択性は妨害の程度がわずかなものであるべきである。選択性の最終的な試験は、分析における偽陽性率及び偽陰性率に関係する。分析法の妥当性確認中の偽陽性率及び偽陰性率を最小限に見積もるためには、分析対象化合物の報告レベルで添加したマトリックスとともに、適切な数(各5試料以上を推奨)の様々なマトリックスブランク(同じソースからではない)を分析すべきである。スクリーニング分析法(分析対象化合物の有無を確認)の妥当性確認については第32～34項で述べる。

C. 校正(キャリブレーション)

15. 検量線用物質の調製における大誤差(過失誤差とも言われる)を除き、通常(常にはないが)、校正誤差が全不確かさに占める部分はわずかであり、その他に分類することは問題ない。例えば、校正による偶然誤差は不確かさの一部であるが、系統誤差は分析のバイアスを生じる。一方で、妥当性確認や分析中の精度管理では、両誤差ともひとつの誤差として評価される。それでもなお、校正にはいくつかの特性があり、これらの特性は最終プロトコルの最適化に影響するため、分析法の妥当性確認の開始にあたり知っていることが有用である。例えば、検量線が直線か二次曲線か、原点を通っているか、試料マトリックスの影響を受けているかどうかなどを前もって知る必要がある。本文書に記載のガイドラインは妥当性確認に関するものであり、日常分析で行われる校正よりも詳細に述べられている。

16. 不確かさの実験的推定には反復測定が必

要である。初回の分析法の妥当性確認では下記の校正手順が推奨される。

- a. 5濃度以上の測定を行う事が望ましい。
- b. 検量線用標準物質は対象とする濃度範囲において均等の濃度間隔とし、検量線の範囲は実際に遭遇し得る全濃度範囲を包含することが望ましい。
- c. 全シーケンスにわたり検量線の一貫性が保たれていることを示すため、検量線用標準物質をシーケンス上で分散するか、又は分析ランの最初と最後に含めるべきであり、校正関数のフィッティングについては、相関係数に頼りすぎることなく、視覚的及び/又は残差(標準物質の実測濃度と算出濃度との差)を算出することによりグラフを作成し検査すべきである。個々の残差が当該領域の検量線から±20%以上外れる場合、統計学的に外れ値を検討すべきであり、精度管理基準を満たさない場合にはシーケンスの再分析を必要とする場合がある。

D. 直線性及び切片

17. 直線性は、適切な検量線の濃度に対する応答の線形回帰により生成される残差をプロットすることにより検証可能である。曲線パターンは非線形の校正関数となることからフィッティングの不良を示唆する。この場合、5濃度以上を用いて二次関数のような他の関数を検討し適用すべきである。現在、フィッティングの質に関する指標として直線性が広く普及しているが、決定係数(R²)は高濃度の標準物質に比重が置かれるため、誤りを起こす可能性がある。この場合、1/x や 1/x² などの適切な重み付け係数を考慮すべきである。

18. 一般に、ppb(μg/kg)の低濃度の定量では、線形回帰よりも重み付け線形回帰や重み付

け二次関数の使用が推奨される。低濃度での残留濃度の算出において誤差を抑えるため、切片の値はゼロ付近(例 最低濃度の検量線用標準物質の 20%未満)となるべきである。

E. マトリックス効果

19. マトリックスマッチング校正はマトリックス効果を補正するためによく使用されている。できれば試料と同種のブランクマトリックス抽出液を校正に用いるべきである。ガスクロマトグラフィー(GC)分析においてマトリックス効果を補正する他の実用的な方法として、化学成分(アナライトプロテクタント)の使用がある。これは、(理想的には)検量線用溶液と試料抽出液中の農薬の応答を等しく増強するため試料抽出液及び検量線用溶液の両方に添加される。マトリックス効果を補正する他の方法は、標準添加法又は同位体標識化した内標準(IS)、又は化学的同族体の使用である。しかしながら、MRM(多成分残留分析法)ではこれらの方法が困難な場合が多い。これは、異なるマトリックス中に異なる濃度で含まれる残留物が多すぎると日常分析手順を構築できず、また、このような多数の分析対象化合物に対する同位体標識標準物質もないからである。溶媒のみの検量線を用いる場合、結果の同等性を示すために、マトリックスマッチ標準液と溶媒標準液の応答を比較することによって、マトリックス効果の測定を行うべきである。

F. 真度及び回収率

20. 真度とは、試験結果と測定対象成分の採択された参照値との間の一致の程度をいう。真度は「バイアス」として定量的に示され、バイアスが小さいほど真度が優れていることを示す。バイアスは一般に、認証(可能であれば)標準物質に対する分析法の応答とその物質に付

与された既知の値とを比較することにより決定される。理想的には多機関試験が望ましい。参照値において不確かさが無視できない場合には、結果の評価では標準物質の分析で生じる統計的ばらつきと同様に、標準物質の不確かさについても考慮すべきである。認証標準物質 1,5 がない場合、ガイドラインでは妥当性確認試験の目的で十分に特徴付けられた入手可能な標準物質の使用を推奨する。

21. 回収率とは、分析対象化合物を抽出前に試料(通常はブランク)に添加し、最終的に定量された値を添加量と比較した比率をいい、一般に百分率で表される。測定時の誤差は、バイアスのかかった回収率につながり、最終抽出液における真の回収率から逸脱する。日常の回収率は、試料のバッチごとの分析における精度管理スパイクで行われた測定を参考にする。

G. 精度

22. 精度とは、規定された条件下で得られた独立した(反復)試験間の結果の一致の程度をいう。通常、標準偏差(Standard Deviation: SD)又は変動係数(Coefficient of Variation: CV)としても知られる相対標準偏差(Relative Standard Deviation: RSD)として求められる。精度とバイアスの区別は分析系をどの段階で見えるかによる。従って、単一測定の観点からは、分析で用いられる校正に影響するどのような偏りもバイアスとみられるであろう。年間を通した分析を検討する分析者の観点からは、分析のバイアスは毎日異なり、関連する精度とともに確率変数のように振る舞うはずであり、この精度の推定には規定された条件をすべて取り入れるべきである。

23. 単一試験室の妥当性確認については、(a)

繰返し性(併行精度)(同一のシーケンス内での測定のみならず)、及び (b) 室内精度(同一試料の複数のセット間の結果のみならず)の2種類の精度条件が関係する。精度の値は、起こり得る試験条件を代表していることが重要である。まず、分析ラン間の条件の変動は、分析法の日常的な使用中に試験室において通常起こるであろうことを代表しているべきである。これは継続中の分析法の性能の妥当性確認/検証によって実施可能である。例えば、試薬バッチ、分析者及び機器の変動は、継続中の精度管理で測定すべきである。次に、使用される試験材料は、マトリックスや(理想的には)粉砕状態の点から、実際に適用する際に遭遇する可能性のある材料を代表するものであるべきである。

24. 単一試験室の妥当性確認では、精度は分析対象化合物の濃度によって変わることが多い。典型的な仮定としては、(a) 精度は分析対象化合物の濃度によって変化しない、又は (b) 標準偏差は分析対象化合物の濃度に対し比例(又は直線的に依存)する、である。いずれの場合も、分析対象化合物の濃度の大きな変動が予想される場合はこれらの仮定を検証する必要がある。

25. 精度データは、ここで示された最小限の繰返し性(併行精度)や分析ラン間の条件に加え、非常に多様な条件について得られる場合があり、追加情報を取得することが適切である。例えば、結果の評価や測定の向上には、日間や日内の別々のオペレータ及びラン効果に関する指標、あるいは1台又は数台の機器を用いて達成可能な精度に関する指標を有することは有用であろう。様々な試験デザインや統計解析法の使用が可能であり、このよう

な試験では常に慎重な実験デザインを選ぶことが強く推奨される。初回の妥当性確認は、分析法の目標とする定量下限(LOQ)又は報告限界、及び少なくとも1つ以上のより高濃度(例えば目標とする LOQ の 2~10 倍又は MRL)で行われるべきである。

H. 定量下限(Limit of Quantification: LOQ)

26. 分析化学者間の長年の定義によると、LOQ は分析におけるシグナル/ノイズ比(S/N)の平均値が 10 に等しくなる濃度である。実際の LOQ の正確な決定には、添加試料やマトリックスブランクについて多くの分析が必要となるが、LOQ は分析機器やその他多くの要因の性能状態により日差変動があるため、実際のところ LOQ は推定できるに過ぎない。いくつかの妥当性確認ガイドラインでは、LOQ での添加実験により、LOQ が分析法の性能基準を満たしていることを検証することが求められているが、LOQ の日差変動のために分析者は実際の分析法の LOQ よりも大幅に過大な推定をする傾向があり、厳密な LOQ の定義(S/N = 10)を実行するのは困難である。従って、最低妥当性確認濃度(Lowest Validated Level:LVL)での添加の方が記述的で適切な方法である。さらに、同一の分析系列では、分析対象化合物を最低検量線濃度(Lowest Calibrated Level:LCL)より低い濃度で定量すべきではない。LCL での S/N は 10 以上(濃度 \geq LOQ)でなくてはならず、各分析系列に必要なシステムの適合性確認項目として設定可能である。分析において報告限界(アクションレベルは通常 LCL よりも高濃度である。)が達成されていることを確認するために、精度管理のマトリックススパイクを各系列に含めることもできる。本質的には、妥当性確認のポイ

ントは LOQ を求めることではなく、最も低い報告された濃度が分析のニーズを満たしていることを示すことである。

I. 分析範囲

27. 妥当性確認の範囲は、分析法の妥当性が確認されたとみなされる分析対象化合物濃度の範囲である。LVL は、分析法の性能基準を満たす妥当性確認において評価された最低濃度である。重要なのは、妥当性確認範囲は、必ずしも検量線の有効範囲と同じである必要はないということである。検量線は幅広い濃度範囲をカバーすることができるが、妥当性確認範囲(通常、不確かさの点でより重要である)は一般的により限定された範囲をカバーする。実際には、大部分の分析法は、2 濃度以上の濃度で妥当性確認が行われている。妥当性確認範囲は、これらの濃度間では適正な外挿とみなすことができるが、多くの試験室では直線性を示すために 3 点目の濃度における妥当性確認を選択している。コーデックス基準に関する残留濃度をモニタリングする場合は、分析法は各分析対象化合物の LVL が現行のコーデックス最大残留基準値 (Codex Maximum Residue Limit: CXL) 以下となるよう十分に感度が高くないと必要はない。妥当性確認範囲は、既存の CXL をカバーすることが望ましい。CXL が存在しない場合は、国の規制当局によって設定された MRL が最低濃度となる。対象となる分析対象化合物/マトリックスの組み合わせに対して CXL や MRL が存在しない場合には、一般に 0.01 mg/kg が望ましい LVL となる。MRM では、一般的な分析目標は、様々ではあるが、代表的な食品で LVL (及び報告レベル) を 0.01 mg/kg に設定することである。

J. 堅牢性

28. 分析法の堅牢性(頑健性と同義のことが多い)とは、分析手順に記載された実験条件からの逸脱が生じたとき、分析法によって生じる結果の変化に対する抵抗性をいう。実験パラメータの限界を分析法のプロトコルに規定すべきであり(以前には常に行われていたわけではないが)、許容範囲内の逸脱においては、個別に又は任意の組み合わせによってであれ、生じる結果に意味のある変化をもたらすべきではない。ここで「意味のある変化」とは、分析法が目的への適合性によって定義されるデータの品質目標を満たさないことを意味する。結果に影響を及ぼすと考えられる分析法の側面を特定し、堅牢性試験によりその分析法の性能に対する影響を評価すべきである。

29. 堅牢性試験が対処できる因子の例には、分析機器、測定者又は試薬のブランド/ロットの変化、試薬の濃度、溶液の pH、反応温度、操作終了までの時間及び/又は他の関連因子がある。

K. 測定不確かさ(Measurement Uncertainty: MU)

30. 測定不確かさの推定に対する正式なアプローチは、真の値が、定義された確率の範囲内でその付近に存在することが期待できる推定値を、方程式又は数学モデルから算出することである。分析法の妥当性確認に記載されている手順は、結果の推定に用いられる式が、あらゆる種類の偶然誤差に関して適正な許容範囲をもって、すべての認識されかつ有意な影響を包含した妥当な式であることを保証するようにデザインされている。測定不確かさに関するさらなる考察及び説明は、「分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン (Guidelines on Estimation of Uncertainty of

Results) に記載されている。

31. 測定の不確かさを濃度の関数として表し、データに関して試験室と依頼者又はエンドユーザーとの間で合意された目的適合性の基準と関数を比較することが望ましい。可能性のひとつとして、MUを技能試験データから計算することである。

(8) IUPAC

「Harmonized Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement.」¹⁶⁾

「Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001」¹⁷⁾

「5.1 代表的な回収率試験」において、回収率試験の考え方が示されており、以下に概要をまとめた。

- 1) 分析法バリデーションでは、当該分析法が適用される全種のマトリックスを入手可能とすべきである。
- 2) 各マトリックスについての回収率(不確かさ)の正常範囲を予測するため、マトリックスごとに複数の試料を用いるべきである。
- 3) 試料の背景が分析対象化合物の回収率に影響する可能性がある場合(例えば、技術的加工や食品の調理法など)、異なるプロセス段階での試料を入手すべきである。
- 4) バリデーションがこれらを網羅しない場合、回収率の使用においてマトリックス不一致に関する不確かさが加味される。このような不確かさは経験によって推定しなくてはならない場合がある。
- 5) 分析対象化合物の回収率は濃度依存적であると考えることから、技術的及び経済的に可能な適切な濃度域の分析対象化合物について調査すべきである。

- 6) 異なる濃度の分析対象化合物をマトリックスに添加するよう検討しなくてはならない。非常に低い濃度では、分析対象化合物の大部分がマトリックス上の限られた部位に化学吸着したり、分析用容器の表層に不可逆的に吸着したりする可能性がある。このような濃度レベルでの回収率は限りなくゼロに近くなると考えられる。分析対象化合物量が吸着量を超えるようなもう少し高い濃度レベルでは、回収率は部分的となる。吸着した分析対象化合物が総量に対しごくわずかにしかならないほど十分な高濃度では、回収率は実質的に完全であると考えられる。これらの濃度域を網羅した回収率に関する情報を得る必要がある。

- 7) 完全に網羅できない場合、例えば規制限度などに必要な濃度域における分析対象化合物の回収率を予測することが望ましい。他のレベルでの回収率は、やはりさらに不確かさを加味しつつ、経験によって予測しなくてはならない場合がある。

- 8) マトリックスブランクに添加する場合、簡単に全濃度域を検討することができる。本来の分析対象化合物濃度がかなり大きい場合、サロゲートの回収率における比較的大きな不確かさを回避するため、少なくとも同程度添加すべきである。

(9) OECD

「Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method - Guidance used in support of pre- and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products. ENV/JM/MONO(2014)20」¹⁸⁾

本ガイドラインは、農薬登録時のデータ要求に際して、定量分析法の単一試験所バリデーション

についてその考え方を示したものであり、農薬製品の原体や製剤中の有効成分(活性物質)及び不純物の分析を対象としている。食品中の残留分析を想定したものではないが、定量分析における分析法バリデーションに必要なパラメータについて定義しており、各パラメータの考え方は残留分析にも共通するものである。そのため、食品中の農薬等の残留分析法の評価基準(主に定量分析)の参考として本ガイドラインを参考とした。主要部分を抜粋して以下にまとめた。

【緒言】

6. 単一試験所バリデーションは分析法を開発するプロセスの論理的結論であり、当該分析法が特定の性能要件に合致することを保証するものである。単一試験所バリデーションはその性質上、他の試験所で使用した場合に想定されるデータを提供するものではない。単一試験所バリデーションは、さらに厳しい複数試験所共同バリデーション又は分析方法の移管試験に進むことができるが、いずれについても本文書では取り扱わない。

【分析法バリデーションのパラメータ】

7. 分析法バリデーションは、特定の試料マトリックス中に存在する単一の分析対象化合物あるいは複数の分析対象化合物の定量に関し、特定の試験所において特定の手順及び測定システムによって行われる一連の品質試験である。バリデーションのデータは、個々のマトリックス中の目的の分析対象化合物を分析するための特定の試験所における手順及び測定システムの適合性を検証する。

8. 分析法バリデーションには市販の認証標準物質を使用すべきである。分析法バリデーション用にこのような標準物質が入手できない場合、分析法バリデーションに用いられる標準物質の選

定に関して詳細な説明を提示すべきである。十分に認証されていない標準物質については、十分な特徴付け(NMR や質量スペクトルデータ等)を行ってから、分析法バリデーションに使用可能かを判断すべきである。

また、分析法バリデーションのパラメータとして、次の7つのパラメータについて解説している。

a) 特異性(選択性)、b) 直線性、c) 精確さ(回収率)、d) 精度(併行精度)、e) 定量下限(LOQ)、f) 検出限界(LOD)、g) 分析対象化合物の同定

『a) 特異性(選択性) Specificity (Selectivity)』

10. 「特異性(specificity)」及び「選択性

(selectivity)」という用語は、以前より多数の管轄で同義語とされている。IUPACによると、「分析法の選択性とは、複雑な混合物中の特定の分析対象化合物を、混合物中の他の成分に妨げられることなく測定できる程度」とされている。

11. しかしながら「特異的」という用語は、IUPACの推奨によると単一の分析対象化合物のみに反応を示す方法をいう。IUPACはこの2つの用語を明確に区別しており、「特異性は選択性の究極である」としている。IUPACは、実際には分析法が「特異的」とは言い難いことから「選択性」を推奨用語とすべきであると提案している。しかし、管轄域によっては実際に、2つの用語(特異性と選択性)が今も同義語として使用されていることに留意すべきである。

12. 原体及び製剤中の目的の分析対象化合物の測定における干渉の程度を報告しなくてはならない。原体又は製剤中の目的としない化合物による干渉は、活性物質の測定値に対し3%を超えてはならない。活性物質が光学的に純粋と規定されている場合、原体及び製剤についての分析法はこれを裏付けなくてはならない。活性物

質や懸念される不純物が1つ以上の異性体や類似体等を成分とする場合、分析法は原体や製剤に存在する個々の化合物の測定を可能とすべきである。しかしながら、一部の規制当局は個々の異性体の測定に関し、光学異性体がラセミ混合物である場合や光学異性体がほぼ同等の有効性や毒性を示す場合には要求の例外を設けている。

13. 製剤に1つ以上の活性物質が含まれる場合、分析法は他の活性物質が存在しても個々の活性物質の測定を可能としなくてはならず、また、原体又は製剤に1つ以上の不純物が含まれる場合も同様に、分析法は他の不純物や活性物質が存在しても個々の不純物の測定を可能としなくてはならない。活性物質及び不純物の分析に関する特異性(選択性)については、原体及び製剤が正しく特徴付けられる程度まで留意すべきである(詳細についてはバリデーション基準の確認を参照のこと)。

『b) 直線性 Linearity』

14. 直線性は、応答の測定値と試料中の分析対象化合物濃度との間に許容される直線的相関関係を示すような分析法の能力と定義することができる。
15. 分析検量線は、関連する分析マトリックス中の分析対象化合物の想定される濃度の最低値と最大値に対して少なくとも±20%をまかなえるよう作成すべきである。3種類以上の異なる濃度で2回の測定を行うか、5種類以上の異なる濃度で単一の測定を行うべきである。検量線の式及び相関係数(r)を報告し、代表的な検量線グラフを提出しなくてはならない。直線範囲の限界を% w/w などの単位で示すべきである。直線相関係数(r)が0.99未満の場合、どのようにして検量線を正確に維持するかについて説明を提出すべきである。また、非線形の検量線を用いる場合も、説明の提出が必要である(どのように検量線の正確性を維持するかを含む)。

『c) 精確さ(回収率) Accuracy (Recovery)』

17. 精確さ(回収率)は、試料中の分析対象化合物についての測定値が認証値、真値又は基準値に一致する程度と定義することができる。分析法の精確さの測定には様々な方法があり、分析法はそのマトリックスに適合させるべきである。

19. 原体とは異なり製剤中の有効成分に関しては、登録後管理のためすべての規制管轄で実験による精確さの測定が要求されている。しかしながら、回収率データが要求されるのは、ある規制管轄での承認を目的とした製剤の有効成分についてのみである。分析法の精確さ/回収率は、製剤中の純粋な活性物質の平均回収率として報告されるべきである。分析法の精確さは分析法の直線範囲にわたって異なると考えられるため、精確さは異なる添加レベルで測定されなくてはならない。精確さは想定される範囲(例80、100、120%)を網羅すべきである。規制管轄は添加レベルを3種類以上要求していないが、必要な添加レベルの数及び各添加レベルにおける反復試料数(該当する場合)は規制管轄によって異なる可能性がある。理想的には、試料は試験所で調整し、既知量の分析対象化合物を添加した製剤助剤混合物とすべきであり、サンプリング誤差をなくしたり、マトリックス効果を特定したりするために試料全部を分析すべきである。分析対象化合物を含有しない試料マトリックスを調製することができない場合や、分析対象となる試料を複製することが困難な場合(ペレット製剤など)、標準添加法を用いてもよい。

20. 原体中の有意とされる不純物及び/又は懸念される不純物に対する分析法の精確さは、平

均回収率及び相対標準偏差(RSD)として報告すべきである。2つ以上の回収率を取得できない場合、個別の回収率を報告する必要がある。既知量の分析対象化合物を含有した代表試料について2回以上の独立した回収率を測定すべきである。標準添加法は原体中の不純物の回収率を測定する方法として認められている。回収率は物質の規格に適合したレベルで測定されるべきである。回収率の測定方法が検量線の作成方法と同じ場合、例えば、不純物と活性物質を分離する操作が必要ない場合には、回収率を測定する必要はない。この場合、分析法の精確さは、標準添加法によりマトリックス検量線の直線性を評価し、かつ他の分析法と精確さを比較することによって推定できる。

21. 製剤中の懸念される不純物に対する分析法の精確さは、平均回収率及び相対標準偏差として報告すべきである。2つ以上の回収率を取得できない場合、個別の回収率を報告する必要がある。原体中の懸念される不純物について記載した精確さの基準が製剤中の懸念される不純物にも適用される。

『d) 精度(繰返し性、併行精度) Precision (Repeatability)』

23. 精度(併行精度)は、同一試験室で、同一技師が、同一の機器を用いて短時間の内に同一の試験物質に対して同じ分析法を用いて得られた、独立した試験結果間の一致の程度と定義することができる。
24. 分析法の精度については、製造された原体中の活性物質、有意とされる不純物及び懸念される不純物に関する詳細が要求される。少なくとも5回の独立した試料測定を実施し、パーセント平均相対標準偏差(%RSD)及び測定回数を報告する。%RSDが許容値にあるかは Horwitz

の修正式(詳細は付録に記載)を用いて評価することができる。適切な統計法(Dixon 検定や Grubbs 検定など)により外れ値が検出された場合、理由を明らかにし判定すべきである。外れ値は最大1つまで除外してもよい。1つ以上の外れ値が検出された場合、別の測定を加える必要がある。

『e) 定量下限(LOQ) Limit of Quantification (LOQ)』

26. LOQ は、許容される相対標準偏差(RSD)で測定又は定量可能な分析対象化合物の最低濃度と定義することができる。RSD が許容値にあるかを判定すべきである。RSD の判定には Horowitz の基準(付録参照)を用いてもよい。Horowitz 以外の基準についても使用できる場合があるが、理由を十分明確にすべきである。
27. LOQ は、許容される回収率が得られる最低濃度と定めることもできる。LOQ はときにノイズに対し10倍のシグナル比と同等とされることがある。LOQ の決定には科学的に許容される手順が推奨される。しかしながら、LOQ の決定には様々な方法があることに留意し、具体的な LOQ の決定方法については個々の規制当局に確認すべきである。

『f) 検出限界(LOD) Limit of Detection (LOD)』

31. LOD は、正確な値としての定量を必要としないが、検出し得る試料中の分析対象化合物の最低濃度と定義することができる。
33. 原体又は製剤中の不純物の LOD に関する情報は、一部の規制管轄でのみ要求される。LOD はときにノイズに対し3倍のシグナル比と同等とされることがある。LOD の設定には科学的に許容される手順が推奨される。LOD の決定には様々な方法があるため、推奨される決定方

法については個々の規制当局に確認すべきである。

『g) 分析対象化合物の同定』

34. 同定は、特定のマトリックス中の分析対象化合物を化学的に明確に証明することと定義することができる。すべての規制当局が分析対象化合物の同定を要求しているわけではない。

35. しかしながら、要求があれば、下記の手順で分析対象化合物の同定を行うことが可能である。

a) 原体中の活性物質及び不純物(有意とされる不純物と懸念される不純物)の定量に用いられる分析法では分析対象化合物を明確にできない場合がある。分析法のバリデーション及び適用の一環として、一部の規制当局では活性物質及び不純物の同定が要求されることがある。

b) 分析が選択性/特異性の高い方法で行われている場合、分析対象化合物の同定は確立していることになる。選択性/特異性の高い方法とされるのは、3 イオンについてバリデートした GC-MS と LC-MS、また、2 つのイオンランジションについてバリデートした LC-MS/MS である。一部の規制管轄は、MS 及び MS/MS 法の特異性が高いことを示す目的で、3 イオンすべてあるいは両イオンランジションについてのフルバリデーションを要求していない。当該規制管轄では、単一のイオンあるいは単一のイオンランジションについてのバリデーションデータが得られ、残りの 2 イオンあるいは残りのイオンランジションが確認イオンあるいは確認ランジションとして選定されているのであれば、これらの分析法は特異性が高いとみなしている。

c) 一次分析で分析対象化合物を明確に同定

できない場合、いくつかの方法によって確認が可能である。

- 異なる分離方法を用いるなど異なる方法により分析する方法。分析法はフルバリデーションされる必要がある。

- クロマトグラムピーク(画分)を集めオフライン分光分析(例 MS、IR、NMR)を行う方法。同定結果を裏付けるための完全なデータ解釈が要求される。

- HPLC-DAD、ただし分析対象化合物の UV スペクトルが特徴づけられている場合のみ。認証標準物質と保持時間が一致し、原体中の分析対象化合物の対応する UV スペクトルが一致しなければならない。HPLC-DAD 法はフルバリデーションされる必要がある。

d) 一次分析法が滴定などクロマトグラフィーではない場合、特異性/選択性の妥当性を説明しなければならない。

37. 上述の手順は、化学分析の一環として同定を証明する目的のためだけに認められるものであることに留意すべきである。規制当局によっては、原体中に存在する不純物の完全な化学構造の確認/証明に関する追加データ要求を行う場合がある。このような場合、NMR、質量分析のフルデータを請求されると考えられる。

「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17」¹⁹⁾

本ガイドラインにおける、残留分析法の評価基準に関する主な事項を抜粋してまとめた。

【バリデーションパラメータの定義】

7. 分析法は、意図した目的に沿うため一定のバリデーションパラメータ基準に合致すべきである。残留分析法に対する一般的なバリデーションの

特性として、回収率、選択性(特異性)、キャリブレーション、精度(併行精度(繰返し性)、再現性(再現精度))、検出限界(LOD)及び定量下限(LOQ)を考慮すべきである。

『回収率 Recovery』

8. 回収率は、検出可能レベルの分析対象化合物を含まないか、又は既知の検出可能レベルの分析対象化合物を含む適切なマトリックスの試料に最初に添加された分析対象化合物(有効成分及び関連代謝物)の量に対する百分率として測定される量である。回収実験によって、精度と真度(バイアス)の両方に関する情報が得られ、結果として分析法の精確さが得られる。

『選択性(特異性) Selectivity (Specificity)』

9. 選択性とは、混合物中又はマトリックス中の特定の分析対象化合物を、同様の挙動を示す他の化合物の干渉を受けずに、分析法が判別することができる程度をいう。選択性に対して特異性という用語を用いる規制当局もある。

『キャリブレーション Calibration』

10. キャリブレーションとは、検出系が機器応答と試料中の分析対象化合物濃度との間に許容される明確な相関を示す能力をいう。測定される分析対象化合物濃度は、定義された機器のダイナミックレンジ内にあるべきである。

『併行精度(繰返し性) Repeatability』

11. 併行精度とは、同一試験室で、同一技師が、同一の機器を用いて短時間の内に同一の試験物質に対して同じ分析法を用いて得られた、相互に独立した試験結果間の一致の程度をいう。併行精度(分析ラン内効果)には、1回の操作内においてばらつきのある手順のあらゆる部分による寄与度が含まれ、これには正常な重量誤差及び容量誤差、試験物質の不均一性、分析中の他の測定誤差による寄与度などが含まれる。

『再現性(再現精度) Reproducibility』

12. 再現性(再現精度)とは、同一の試験物質に対して同じ分析法を用いるが、異なる条件下で得られた、独立した試験結果間の一致の程度をいう。試験室内(within-laboratory 又は intra-laboratory)再現性又は単一試験室再現性(分析ラン効果)は、分析系において作業員、試薬バッチ、機器のキャリブレーション及び試験室環境(温度変化など)の変化により日差変動に寄与する。試験室間、試験室内又は多試験室間再現性(試験室効果)は、キャリブレーション用標準の変動、現地でのプロトコル解釈の相違、機器や試薬供給元の相違、又は平均的気候条件などの環境因子の差異といったさらなる変動に寄与する。

『検出限界(Limit of Detection: LOD)』

13. 分析手順の検出限界とは、検出は可能であるが必ずしも正確な値として定量化することができない試料中の分析対象化合物の最低量である。検出限界では、特定の分析法を用いた規定のマトリックス中での検出について、妥当かつ／又は規定の信頼性をもって陽性と判定することが可能である。LODは常時必要とされるわけではない。しかしながら、精査(又は他の目的)のために必要とされる場合はLODの算定方法について説明すべきである。

『定量下限(Limit of Quantitation: LOQ)』

14. 定量下限(LOQ)は、規制上の観点から分析対象化合物を明確に同定し、許容される平均回収率とこれに伴う相対標準偏差(RSD)が得られる最低試験濃度と定義される。LOQは測定下限(limit of determination: LOD)又は分析法バリデーション下限(Lowest Limit of Method Validation: LLMV)とも呼ばれる。LOQは、分析法が意図した目的を達成するに十分低い値とな

るべきである。分析法の観点からは、LOQ の推定値をノイズの標準偏差の 6~10 倍として、添加実験によって検証する。特に記載がない限り、本文書では規制の観点から定義された LOQ を指すものとする。

【登録前分析法のバリデーション】

34. 通常、残留分析法は分析法が適用されるすべてのマトリックスについてバリデーションを行うべきである。バリデーションの範囲はすでに入手可能な情報や報告がどれほどあるかによる。フルバリデーションデータ(下記に記載)は、新規の分析法であるか、又は既存の分析法に大きな変更があった場合(例:溶媒系や定量方法の変更)のみ必要となる。このような変更は、分析法を異なる食品に適応するとき必要になると考えられる。以前に妥当性が確認された既存の分析法を食品分類内(付属文書 I に記載)の「類似」食品に適応させるとき、通常、削減又は限定バリデーションセットで十分である。削減バリデーションセット(ときに精度管理データセットともいう)は一般に管理圃場試験報告の中で報告されるが、フルバリデーションデータについては別途 GLP 報告書に含まれる。

『バリデーションのためのマトリックス数』

35. 植物材料が関係する試験の場合、食品の数は製品の使用目的によって決まる。分析対象となるすべてのマトリックスについてのバリデーションデータを提出すべきであり、食事リスク評価のための残留定義にある全成分についてバリデーションを行うべきである。

36. 該当する場合、付属文書 I に記載の各代表食品分類から、それぞれ 1 つの生鮮農産物について主にフルバリデーション実験を実施すべきである。高タンパク及び高でんぷん食品の場合、両方の食品マトリックスについてフルバリデーション

を実施する必要はない。代わりに、両方の食品分類を代表する 1 種類の乾燥(低水分含量)食品を選定する。

37. 食品分類スキームは、代表食品を用いて分析法の妥当性が正常に確認された場合、当該分析法が同じ分類内のすべての食品で機能することを意味するものではない。2 種類以上の非常に類似した食品が分析される場合には(付属文書 I 参照)、マトリックスの比較可能性及び削減させたバリデーションデータセットの事例を考慮されるかもしれない。削減バリデーションデータは、同じ食品分類に属する食品に対して認められるが、MRL を検討しようとするすべての食品についてはまだ必要である。

38. 可溶性の天然物を多く含む食品(例:タバコ、ホップ、コーヒー、茶及びスパイス類)は、対象とする分析対象化合物に干渉する可能性がある。干渉は選定した分析法及び化合物の性質に大きく左右され得る。このような問題あるマトリックスの場合、分析法の適合性を証明するため通常はフルバリデーションデータが必要となる。

39. 加工食品中の残留物測定法についてバリデーションを行うべきである。RAC と加工食品の両方について分析法が実質的に同じ場合は、限定又は削減バリデーションで十分である。

40. 動物が農薬を使用した作物を摂取している可能性が高い場合、及び飼養試験が要求/提出される場合、動物由来食品中の残留物測定法については、マトリックスとして牛乳、卵及びすべての食用組織中においてバリデーションを行うべきである。組織には通常、ウシの筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓ならびに家禽の筋肉、脂肪及び肝臓が含まれる。ほとんどの場合、ウシ由来食品についての回収率データは、ヤギ、ブタ、ウマ、ヒツジ及び家禽由来食品に有効である。

『バリデーションレベル』

41. 提案された LOQ 及び予想される残留レベル又は 10×LOQ に適合する 2 つの添加レベルについてデータを作成すべきである。また、残留試験の試料分析中に併行して回収率を測定し、残留試験の結果とともに報告すべきである。要求される LOQ は、リスク評価又は MRL 施行が必要とする感度によって異なり、対象とする各分析対象化合物について一般的に 0.01～0.05 mg/kg の範囲にあるべきである。場合に応じ、毒性の懸念がない場合はこれより高いレベルでも許容される(例:難分析マトリックス)。

42. 回収率測定に用いられる試料は未処理の食品のものとし、試料に既知量の分析対象化合物を添加し、サンプリング誤差を避けるため試料全部を分析する。新しい技術はあまり試料量を必要としないため、より高い均一性が求められる。結果は、試料中の分析対象化合物の既知の「含有量」と比較すべきである。分析対象化合物による汚染又は干渉の有無を判定するため対照(未添加)試料についての併行分析を行うべきである。

『添加実験数』

43. フルバリデーションのデータセットを作成するため、2 添加レベルのそれぞれについて、2 対照試料とともに 5 反復試料で分析を実施すべきである。試料数がこれより少ない場合には根拠を示すべきである。削減データセットでは、各バリデーションレベルで少なくとも 3 反復試料と 1 つの対照試料の測定(試料に検出可能な残留物が含まれていないことを証明するため)を用いるべきである。

『キャリブレーション』

44. 分析用のキャリブレーションは、当該分析溶液中の分析対象化合物の最低及び最高設定濃度

に対して適切な範囲に拡張して作成すべきである。3 濃度以上で 2 反復測定を行うか、又は 5 濃度以上で単一測定を行うべきである。検量線の計算式及び回帰パラメータ(例、相関係数(r))について報告し、代表的なキャリブレーションプロットを提出する必要がある。非線形のキャリブレーションを用いる場合、説明(どのようにキャリブレーションの精確性を維持するのかを含め)を記載すべきである。クロマトグラフ系又は検出系の応答に対する、試料の共抽出物によるマトリックス増強効果又は抑制効果の可能性について言及すべきである。適切な場合、分析対象試料のマトリックスと同様のマトリックスに溶解した標準液(マトリックスマッチング標準)を用いて検出系をキャリブレーションすることができる。

45. キャリブレーションが直線性を示している場合は、1 点キャリブレーションを用いることができる。キャリブレーションモデルは、100 倍の濃度レベル範囲(例:0.01～1.0 mg/kg)のみをカバーするものであり、1 点レベルは妥当性が確認されたキャリブレーション範囲内にあるべきであることに留意すること。通常、評価には 1 濃度レベル(試料中の推定される量に相当)の複数回反復測定が用いられる。

『内標準及び絶対標準の使用』

46. 操作標準(procedural standard)は、分析法に規定された試料調製手順の一部又は全部に標準品を添加して得られる標準とみなされる。誘導体化手順から生成された操作標準を用いた分析法は、一定の条件下で許容される場合がある。誘導体化された標準が不安定又は提供できない場合は、申請者は手順の効率性及び再現性を示すデータを提示しなくてはならない。

47. 内標準は、分析対象化合物の同定及び／又は定量測定を容易にするために、分析の特定

の段階において既知量で添加される化学物質である。内標準の使用は、一定の条件下でのみ認められ、通常は最終抽出液(定量前)に添加される場合である。このような使用方法では、内標準は目的の分析対象化合物と同様の挙動を示すべきである。内標準は、分解やマトリクス効果を起こしにくいものとするべきである。しかしながら、各段階(抽出、精製など)において分析対象化合物及び内標準の挙動が非常に類似していることを示す各マトリクスの多数の試料についてのデータを利用可能でなければ、回収率補正のために全操作を通じて内標準を使用することは許容されない。十分に許容される内標準法の例は、質量分析による定量を容易にするための安定同位体(例:2H、13C)の使用である。

【MRL 施行のための分析法(登録後)】

48. 通常、登録後分析法は、MRL が設定されている植物及び動物由来のマトリクスについてのみに用いられる。すべての残留物が LOQ 未満であると報告されている場合、申請者は MRL 設定のガイダンスについて規制当局に相談することが推奨される。MRL が設定されていないのであれば、申請者は登録後分析法について詳細を提示する必要はない。

しかしながら、規制当局によっては、食品中に残留物が想定されなくとも輸出入のために MRL を設定する場合がある。よって、規制施行における分析法には、適切な LOQ を示し、MRL を LOQ に設定することが要求される。

49. 通常、分析法は、MRL の設定及び施行に関連する残留物の定義に含まれる分析対象化合物をカバーすべきである。MRL に含める残留物の選定に関する議論は「残留化学試験の概要に関する OECD ガイダンス文書(OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry

Studies)」に記載されている。分析法は、迅速かつ操作が簡便で、一般的に利用できる手技／機器を用い、有害物質(例:クロロホルム、ベンゼン)を使用しないものとするべきである。規制施行の一環として当該技術が使用可能であるかどうかについては適宜検討すべきである。分析技術は常に発展していると認識されている。しかしながら、新しい技術が一般に受け入れられ、規制施行試験所で利用可能になるまでには時間がかかる場合がある。

50. 一般に、規制施行試験所は、試料中に存在が想定される全化合物に対し、個別の分析法を適用できるような十分な処理能力がないため、登録後の分析法では、たとえ回収率が特定の個別分析法よりも良好でないとしても、個別分析法に比べ多成分残留分析法の方が明らかに望ましい。

51. 適用可能であれば、申請者はまず、既存の多成分残留分析法の適合性を確認すべきである。分析速度、LOQ 及び対応できる分析対象化合物数に関して規制施行試験所の要求を満たす今日の最新の多成分残留分析法は、大部分は HPLC/MS-MS 又は GC/MS 定量法に基づくものである。登録後分析法として、多成分残留分析法の一つが許容可能と判明した場合は、バリデーションの要件について本ガイダンスの 4 項で引用された文書を参照すること。妥当性が確認された多成分残留分析法に、陽性結果を明確に確認するためのクロマトグラムやスペクトルが別途含まれていない場合、申請者は特定の確認分析法を提示する必要がある。

52. 新規化合物が、広く確立した多成分残留分析法によって分析可能であることを検証するため、異なる重要なステップを試験するモジュールアプローチ及び段階的アプローチを用いることが

望ましい。多成分残留分析法のチェックには少なくとも次のステップが含まれる。

- a) 質量分析:適切なイオン化法、適切なイオン及びトランジション(定量及び確認的)の選択
 - b) クロマトグラフィの挙動:適切なHPLC又はGC条件の選択(GCの場合:初期気化挙動)
 - c) 精製:適切な手順の選択(例:固相抽出、ろ過、液/体分配)
 - d) 抽出:適切な溶媒系の選択(例:メタノール/水、アセトニトリル/水、アセトン)(本ガイドラインの18~23項参照)
 - e) キャリブレーション:適切なキャリブレーション関数及び標準溶液調製手順の選択
- 順序は、想定される定量法の選択に依存する。例えば、GC分析法の場合は、最初に気化挙動の確認が必要となる。

MRL 施行においては、多成分残留分析法に適用される分析法は国によって異なり、使用可能な機器や個々の試験室の能力に大きく依存する。本ガイダンスは規制当局の多成分残留分析法に取って替わることやこれに優先することを意図するものではない。更なるバリデーション基準については、別途文書に記載されている。

『独立した試験室によるバリデーション試験(登録後)』

53. 登録前分析法では、独立した試験室によるバリデーション(Independent laboratory validation: ILV)試験は通常必要ない。多成分残留分析法及び個別残留分析法におけるILVの要件は世界の各地域によって異なる。米国の登録では、独立した試験室によるバリデーションは、申請者が提案した個別分析法のみに要求されるが、欧州での独立した試験室によるバリデーションは、一般的に、確立した多成分残留分析法の適合

性を証明するためにも要求される。

54. 登録後分析法は、MRL 遵守のための残留の定義に含まれる全化合物の測定に適合すべきである。分析法の適合性は適切な実験によって証明されるべきである。少なくとも1つのマトリックスについて独立してバリデーションを行うべきである。通常は、MRL が設定されている中で最も分析が困難な対象作物/食品とする。登録後分析法の重要な目的の一つは、誤用を検出することである。したがって、規制当局によっては、ILVの必要性は必ずしも対象作物に限定されない。欧州の一部の国々では、一般に、付属文書Iに記載されている各食品分類からそれぞれ1つの代表食品についてILVデータが要求される。乾燥食品の場合、高タンパク又は高でんぷん食品群のいずれかから1つの代表食品を選定することができる。ILVの対象となる食品数に関する詳細については、本文書の56項及び57項に記載する。

55. ILV 試験の実施に選出される試験室は、分析法開発及びその後の分析法の使用に関与してはならない。この基準に合致しているのであれば、ILV 試験の実施に選出される試験室は、申請者の組織内にあってもよいが、所在地が同じあってはならない。選出された試験室が、分析を行うにあたって分析法の開発者と連絡を取る必要がある場合、このことについて報告すべきである。また、元の分析法にその後追加や変更がある場合も報告すべきである。

『独立したバリデーションにおける代表マトリックス数』

56. ILV データは、付属文書Iに記載された各食品分類からそれぞれ1~4種類までの生鮮食品(RAC)について提出されるべきである。選定された食品は、その食品分類を代表するものであ

ることが望ましい。高タンパク及び高でんぷん食品の場合、両方の食品分類の代表マトリックスについて ILV を実施する必要はないが、いずれか 1 つの乾燥(低水分含量)食品をバリデーションに含むべきである。

57. 動物由来製品中の残留物を測定するための登録後分析法に関する ILV 試験については、MRL が設定されているか設定される可能性がある場合、必要に応じ次の動物性食品、すなわち乳、卵、肉及び／又は脂肪、及び腎臓及び／又は肝臓を用いるべきである。

『ILV のバリデーションレベル: LOQ-MRL』

58. ILV では、LOQ 及び MRL での添加を含むべきである。規制目的に適切な LOQ の選定については本ガイダンスの 14 項で述べている。残留レベルが低い場合、LOQ は 0.01~0.05 mg/kg とすべきである。適切な LOQ の選択は、分析対象化合物／マトリックスの組み合わせに依存する。しかしながら、申請者には、最新の技術を用いた低 LOQ での残留物測定が可能な分析法の開発が推奨される。高 LOQ が選択される場合(例:難分析マトリックス)は、いかなる場合でも、申請者は完全な正当性を示すべきである。

『添加実験数』

59. 回収率データは次の添加レベルについて作成されるべきである。すなわち、LOQ (5 試料)、10×LOQ 又は MRL のうちどちらか大きい方(5 試料)、及び対照(2 試料)。

マトリックスの分析が困難で想定される残留物の毒性学的重要性が小さい場合(例:マイナー使用)、削減した試料セットでよい場合がある。しかしながら、最低 6 試料(各添加レベル 3 試料)及び 1 対照試料とする。

『キャリブレーション』

60. 分析用のキャリブレーションは、当該分析溶液

中の分析対象化合物の最低及び最高設定濃度に対して適切な範囲に拡張して作成すべきである。3 濃度以上で 2 反復測定を行うか、又は 5 濃度以上で単一測定を行うべきである。試験報告とともにキャリブレーションに関する生データを提示する必要がある。

【分析法の最低性能特性】

『許容回収率の範囲』

62. 通常、各食品についての各添加レベルでの平均回収率は表 V に示す範囲内にあるべきである。特定の正当な理由がある場合、精度データが許容可能である又は濃度レベルが非常に低い場合であることを条件として、分析が困難なマトリックス(例:タバコ、ホップ、コーヒー、茶及びスパイスなどの)については、この範囲外の回収率も許容される。マトリックス効果が認められる場合、マトリックスマッチング標準を用いて回収率を補正することができる。

『選択性(マトリックス干渉)』

63. 未補正の回収率及びブランク(対照)値を報告すべきである。分析対象領域のブランク値(無農薬処理試料及び操作ブランク)は、添加実験に用いたマトリックスから測定されなければならない。LOQ の 30%を超えてはならない。これを超える場合は、詳細な正当性を提示すべきである。ピーク抑制やピーク増強といったマトリックス効果は、LC-MS/MS や GC などの技術によっても起こり得る。したがって、未処理試料(精度管理試料)の最終液量に標準液を添加し、これらの効果を調べるべきである。

『精度 - 併行精度(RSDとして表される)』

64. バリデーション試験における分析法の精度は、各添加レベルにおける併行精度の相対標準偏差(RSD)として報告すべきである。上記の通り、各添加レベルで 5 試料の測定を行うべきである。

一定の正当な理由がある場合(例:難分析性マトリックス又は非常に低い濃度レベルの場合)には、より大きな変動が許容される場合がある。濃度レベルと併行精度の相関を表Vに示す。

65. 適切な統計学的方法(例:Grubbs 又は Dixon 検定)を用いて外れ値が検出された場合、このことは正当化されるべきである。各添加レベルにつき最大 1 つの外れ値をは無視することができる。1 つの添加レベルで 2 つ以上の外れ値が検出された場合、バリデーション試料を追加し、説明を提示することができる。
66. 登録後の個別残留分析法に関する ILV 試験における分析法の精度は、併行精度として報告すべきである。含まれる試験室数が少数であるため、結果を統合して室間再現性を定義することはできない。よって、個々の試験室には、登録前分析法と同じ RSD 基準(表 1 参照)を適用する。
67. バリデーションにおいて許容できない結果のばらつきが認められた場合、分析法の性能に大きく影響するような分析パラメータを特定し、これを制御するよう努めるべきである(堅牢性試験)。分析法の堅牢性とは、分析手順に規定されている条件から軽微な変更があった場合に生じる結果の変化に対する抵抗性である。

D. 結論

抽出効率は残留農薬分析法開発の鍵とみなされるが、抽出効率は、分析前に分析対象化合物を添加した試料(添加試料を一定時間放置したとしても)を用いて行われる従来の回収試験では検証できない^{4),5),7),19)}。これは、添加された分析対象化合物は、すでに容易に抽出可能な形態だからである⁷⁾。抽出溶媒の容量を変える場合も同様である。これらの手法は、細胞構造に取り込まれた分析対

象化合物の抽出効率を試験しない⁷⁾。また、標準添加法や安定同位体標識した内標準法を用いても抽出効率を補正することはできない⁴⁾。残留分析法で用いられる抽出法のバリデーションは、登録申請時の放射性標識試験から得られる実残留試料を用いて抽出量を比較するラジオバリデーションを行うべきであり、可能であればすべての分析法の抽出スキームについて実施すべきであるとしている^{3),5),12),13),19)}。

ラジオバリデーションの代替法として、代謝試験からの試料について、アセトン+水、酢酸エチル及びアセトニトリルなどのよく使用される抽出溶媒を用い、分析対象化合物の抽出効率の比較試験を行うことができる¹⁹⁾。代謝試験の試料が利用できない場合には、2 つの溶媒系の間を「橋渡し」することが可能である。例えば、実残留試料を用いて、代謝試験に適用した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ことにより抽出効率に関する情報を得ることができる^{3-5),14), 15),19)}。このほか抽出効率に関する情報を得るための手段として、抽出残留物(残渣)の再抽出、異なる溶媒との比較あるいは異なる手順で得られた結果との比較する方法が提案されている⁷⁾。

分析中は抽出効率を制御することはできないため、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、いかなる変更もせずに実施されなければならない¹⁴⁾。確立された分析法をスケールダウンする場合、試料重量や抽出溶媒量の変更は認められておらず、オリジナルの方法で抽出液を得た以降の精製操作でのスケールダウンのみが受け入れられる⁶⁾。これは、試料重量及び抽出溶媒量を小さくした抽出については、是認するのに十分なだけの研究がなされていないためである。また、妥当性が確認された既存の分析法に、

妥当性が未確認のマトリックスや分析対象化合物を追加する場合、あるいは分析対象化合物が非常に低濃度の場合には、理想的には抽出効率の評価が必要とされている¹⁴⁾。

残留農薬分析法の開発において、抽出効率は鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができず、標準添加法や安定同位体標識した内標準法を用いても補正することはできない。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登録申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。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されることが求められる。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。抽出法を変更する場合には、抽出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発することに活用できるものと思われる。

残留農薬分析法の評価基準については、評価するパラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については国・機関により異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、Codex の CCPR で議論されている目標値が参考になるものと思われる。

E. 参考文献

- 1) Nemoto, S. Advancement of Official Analytical Methods for Residual Pesticides in Foods. Food Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **51**(6), 349-359 (2010).
- 2) 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知(平成 12 年 11 月 24 日付け)、一部改正平成 29 年 3 月 31 日 28 消安第 5886 号
- 3) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, SANCO/825/00 rev.8.1, 16th November 2010 - Guidance document on residue analytical methods.
- 4) European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety, Safety of the Food Chain, Pesticides and biocides, SANTE/11945/2015 (Supersedes SANCO/12571/2013), 30th November-1st December 2015 rev. 0, - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
- 5) US Environmental Protection Agency, Residue Chemistry Test Guidelines, OPPTS 860.1340 - Residue Analytical Method, EPA 712-C-95-174, August 1996
- 6) US Food and Drug Administration, Pesticide Analytical Manual, Volume I, Multiresidue Methods, 3rd Edition, 1994 (Revised, September 1996; Revised, October 1997; Revised, October 1999)
- 7) Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Part I; AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC Official Methods of Analysis (2012)
- 8) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Agricultural

Manual of Requirements and Guidelines - Ag
MORAG

- 9) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method, February 2000
- 10) New Zealand, Ministry of Agriculture and Forestry, Residue Data for Agricultural Chemical Registration, ACVM Information Requirements 41, Prepared for Approvals and ACVM Group, October 2011
- 11) New Zealand, Ministry for Primary Industries, Recognised pesticides analytical laboratories and residue test methods (Plants), 1st July 2013
- 12) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Introduction to OECD Test Guidelines on Pesticide Residues Chemistry Section 5 – Part A, 26th July 2013
- 13) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops, 8th January 2007
- 14) Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993 (Revision 2003. Amendment 2010.)
- 15) Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016
- 16) Harmonized Guidelines for the use of Recovery

Information in Analytical Measurement. *Pure & Appl. Chem.*, **71**(2),1999; 337 - 348

- 17) Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001
- 18) OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 204 and Series on Biocides No. 9 - Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method - Guidance used in support of pre- and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products, ENV/JM/MONO(2014)20, 11th July 2014
- 19) OECD Environment, Health and safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 72 and Series on Pesticides No. 39 - Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17, 13th August 2007

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 I. 作物残留試験の抽出性残留物の特徴付け／同定に関する方針*

相対量(%)	濃度(mg/kg)	要求事項
< 10	< 0.01	毒性学的懸念がない場合、いかなる特徴付け／同定も必要ない。
< 10	0.01 – 0.05	特徴付けを行う。例えば、標準物質が入手可能であるか、又は過去の試験で同定がなされている場合など分析が容易に行える場合は、確認のみを行う。
< 10	> 0.05	同定率を考慮しつつケースバイケースで特徴付け／同定を決定する。
> 10	< 0.01	特徴付けを行う。例えば、標準物質が入手可能であるか、又は過去の試験で同定がなされている場合など分析が容易に行える場合は、確認のみを行う。
> 10	0.01 – 0.05	特に代謝経路の確定が必要な場合は、できるだけ同定を試みるべきであるが、最終的には特徴付けが受け入れられる可能性がある。
> 10	> 0.05	技術的に可能な限り同定を行う。
> 10	> 0.05 非抽出性放射性物質	「非抽出性放射性物質」-42~46 項及び図 I 参照。

* Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops¹³⁾

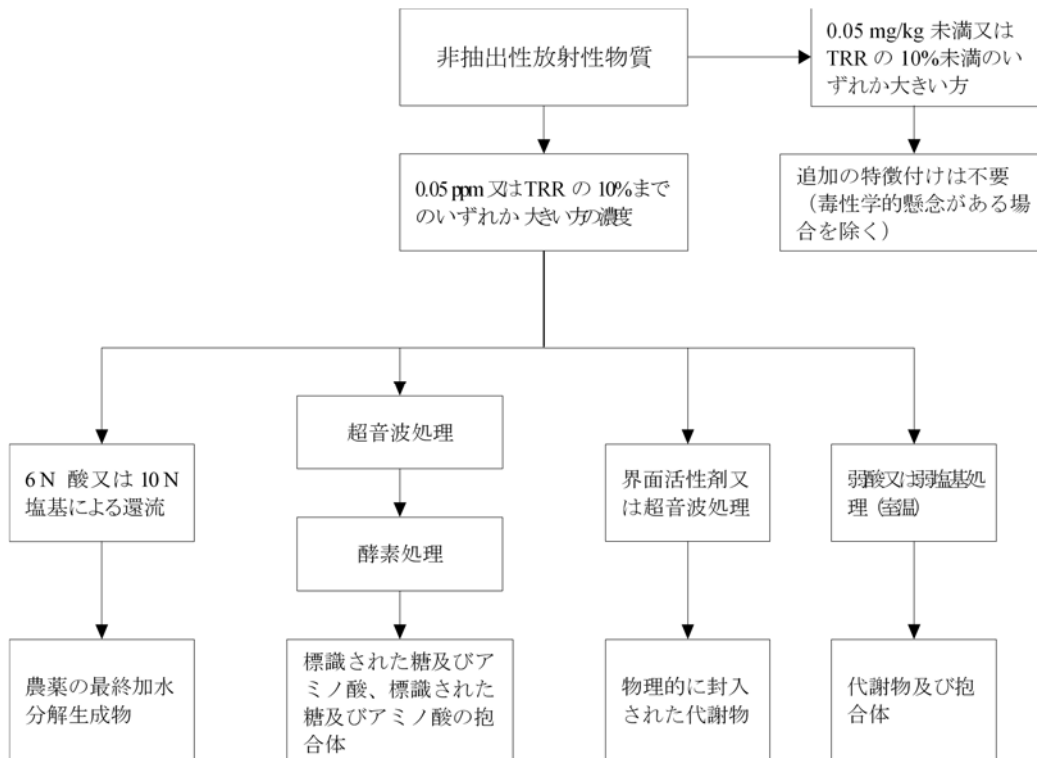


図 I. 非抽出性放射性物質の特徴付け及び同定*

* Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops¹³⁾

表II. 各濃度毎の真度及び精度の目標値*

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70~120	30>
$0.001 < \sim \leq 0.01$	5	70~120	25>
$0.01 < \sim \leq 0.1$	5	70~120	15>
$0.1 <$	5	70~120	10>

* 「残留農薬等試験法検討実施要領」¹⁾

表Ⅲ. バリデーションパラメータ及び基準*

パラメータ	対象／方法	基準
感度／直線性 Sensitivity/linearity	5 濃度からの直線性を調査	残さ< ±20%
マトリックス効果 Matrix effect	溶媒標準とマトリックスマッチング標準の応答を比較する	(±20%)
LOQ	真度及び精度に関する分析性能基準を満たしている最小添加濃度	≦ MRL
特異性 Specificity	試薬ブランク及びブランク対照試料の応答 同定基準	RL の< 30%
真度 (バイアス) Trueness (bias)	試験された添加濃度での平均回収率	70～120%
精度 (RSD _r) Precision (RSD _r)	試験された添加濃度での併行精度 RSD _r	≦ 20%
精度 (RSD _{wR}) Precision (RSD _{wR})	継続的な分析法バリデーション／検証から得られた室内再現性	≦20%
頑健性 Robustness	継続的な分析法バリデーション／検証で得られた平均回収率及び RSD _{wR}	上記参照

* SANTE/11945/2015 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed⁴⁾

表IV 残留農薬分析における試験室内分析法バリデーション基準^{1*}

濃 度	併行精度		再現精度		真度 ²
	CV _A % ³	CV _L % ⁴	CV _A % ³	CV _L % ⁴	平均回収率% の範囲
≦ 1 μg/kg	35	36	53	54	50 – 120
> 1 μg/kg ≦ 0.01 mg/kg	30	32	45	46	60 – 120
> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	20	22	32	34	70 – 120
> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	15	18	23	25	70 – 110
> 1 mg/kg	10	14	16	19	70 – 110

1. 多成分残留分析では、これらの定量的な性能基準を厳密に満たすことができないある一定の分析物がある可能性がある。これらの条件下で得られたデータの受容性は、その分析の目的に依存する。例えば、MRL への適合性を検査する場合は、技術的に可能な限り示された基準を満たしている必要があるが、MRL のかなり下のデータでは、より高い不確かさが受け入れられる可能性がある。
2. これらの回収率の範囲は、多成分残留分析に適したものである。より厳しい基準がいくつかの目的のためには必要であり得る[例え:単成分分析法又は動物薬の残留分析法など(Codex V3,1996 参照)]
3. CV_A: 試料前処理を除いた分析の変動係数。このパラメータは、参照物質又は抽出前に添加した分析試料を用いて実施した試験から推定することができる。試験室で調製された参照物質は、認証参照物質がない場合に使用することができる。
4. CV_L: 実験室で得られた結果の全体の変動係数で、10%までの分析試料間の残留物の変動(CV_{sp})を含む。注:分析試料間の残留物の変動は、残留物を含んでいる試料の繰り返し測定の不確かさ(CV_L)から計算することができる; $CV_L^2 = CV_{sp}^2 + CV_A^2$

* Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993¹⁴⁾

表V 残留農薬分析に関する試験室併行精度基準¹

濃度レベル	併行精度(RSD)	平均回収率(%)の範囲
≤ 1 µg/kg	35	50–120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	30	60–120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	20	70–120
> 0.1 mg/kg ≤ 1.0 mg/kg	15	70–110
> 1 mg/kg	10	70–110

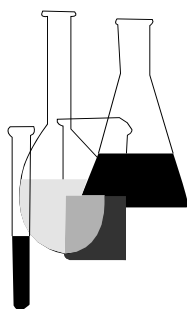
¹ 残留分析における GLP ガイドライン、CAC/GL 40-1993、修正 1-2003
併行精度の値は、 $0.67 \times \text{Horwitz}$ の式 ($\text{RSD} = 2^{(1-0.51\log C)}$) より算出
ここで C は濃度のことである ($1 \text{ mg/kg} = 10^{-6}$)。

資料①: US EPA Residue Chemistry Test Guidelines
OPPTS 860.1340 Residue Analytical Method



残留化学物質 テストガイドライン

OPPTS 860.1340 残留分析法



本文書の原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

EPA Residue Chemistry Test Guidelines
OPPTS 860.1340 Residue Analytical Method

<https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-860-residue-chemistry-test-guidelines>

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

緒言

本ガイドラインは、米国環境保護庁（EPA）の汚染防止農薬有害物質局によって作成されたガイドラインシリーズの一つであり、農薬および有害物質の試験、ならびに連邦規則に基づく審査のために、当局に提出しなければならない試験データの生成において使用されることを目的とする。

汚染防止農薬有害物質局（OPPTS）は、汚染防止有害物質部（OPPT）が管理し連邦規則集第 40 編 1 章 R 節（CFR Title 40, Chapter I, Subchapter R）に記載されるテストガイダンスおよび要求事項、農薬プログラム部（OPP）が管理し米国技術情報サービス（NTIS）の出版物に記載されるテストガイダンスおよび要求事項、ならびに経済協力開発機構（OECD）が発行するガイダンスを融合し調和することにより本ガイドラインを作成した。

上記ガイドラインを 1 つの OPPTS ガイドラインに調和する目的は、有害物質規制法（15 U.S.C. 2601）および連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（7 U.S.C. 136, *et seq.*）に基づく試験手順のばらつきを最小化し、米国環境保護庁の要求に応えることである。

ガイドラインの最終開示：本ガイドラインは米国連邦政府印刷局（Government Printing Office, Washington, DC 20402）発行の連邦掲示板（*Federal Bulletin Board*）で閲覧可能である。ディスクまたは書面による写しは、モデムダイヤル 202-512-1387、テルネットおよび [ftp: fedbbs.access.gpo.gov](ftp://fedbbs.access.gpo.gov)（IP 162.140.64.19）、インターネット <http://fedbbs.access.gpo.gov> または電話番号 202-512-0132 から入手可能である。本ガイドラインは、電子的手段により EPA 公開情報検索システム（gopher.epa.gov）のタイトル「Environmental Test Methods and Guidelines（環境試験方法およびガイドライン）」から、ASCII および PDF 形式（ポータブルドキュメントフォーマット）でも入手可能である。

OPPTS 860.1340 残留分析法

(a) 範囲—(1) 適用 本ガイドラインは、米国連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法 (FIFRA) (7 U.S.C. 136, *et seq.*) および米国連邦食品医薬品化粧品法 (FFDCA) (21 U.S.C. 301, *et seq.*) の両規制の要求を満たすことを意図する。

(2) 背景 調和された本 OPPTS テストガイドラインの作成に用いた原資料は、OPP 171-4 残留量に関する試験結果および使用分析法に関する記述 (Results of Tests on the Amount of Residue Remaining, Including A Description of the Analytical Methods Used) (農薬評価ガイドライン、細目 O 残留化学物質、EPA 報告 540/9-82-023、1982年10月) である。本ガイドラインは OPPTS 860.1000、「背景」に関連して用いられるべきである。

(b) 目的 (1)植物および動物代謝試験結果に基づき総残留有害物質 (total toxic residue : TTR) の全成分を決定する分析法の開発が当局より要求されている。残留物における全成分の同定が可能な単一の分析法を開発することは不可能な場合があり、この場合は複数の分析法が必要となる。残留物の分析法は、食事による暴露評価および残留基準の根拠となる残留データを得るために用いられ、残留基準の設定後はその規制施行に用いられる。規制施行のための分析法は、農薬登録通知 (PR Notice) 96-1 の要求 (本ガイドライン(c)(6)および(e)(3)項参照) に従い、当局に提出する前に独立した試験所でバリデーションされる。当局は、分析手順が規制施行に適切であることを保証するための分析法試験により、各新規分析法の妥当性を確認する。

(2) 残留物の分析法は 2 つの機能を果たすべきである。分析法は、表記の方法に従って使用したときに得られる残留物の同定結果および残留量の根拠となる残留データを提供しなくてはならない。また、分析法は、規制施行のための手段とならなくてはならない。分析法の範例として、FDA 農薬分析マニュアル (PAM) 第 2 巻および公定分析化学者協会 (AOAC) 公認法に記載の方法 (本ガイドライン (e)(7)および(e)(1)項参照) を使用してもよい。

(c) 試験方法—(1) 一般 (i) 分析法は、適格な分析者であれば、その手順に携わったことのない者であってもその分析を行えるよう、段階を追って詳細が十分説明されなくてはならない。残留物の分析法は、実用的かつ迅速に規制対象の TTR を定量化すべきである。当局は場合によってはその TTR を測定するために最先端機器を必要とする利用可能な最良の方法を許可することがあるが、そのような機器は米国内で市販されていなければならない。公開された方法を転載したものを提出してもよい。ただし、残留基準の設定において、他の作物に適合させるために基本の分析法を修正した場合、修正点を詳述する必要がある。これには例えば、加工副産物および肉、乳、鶏肉、または卵が含まれる。

(ii) 分析法は、基質に関連した干渉や試薬による干渉を受けるべきではない。結果に悪影響を及ぼすと考えられる不要因子を削減・排除するため、適切な精製法を取り入れるべきである。例えば、ガスクロマトグラフィー（GC）法では、対象成分の応答が干渉ピークのショルダーとして現れるのではなく、きれいに分離したピークとして得られるようにしなければならない。

(iii) 当局は規制施行のために、直接的かつ簡便に実施できる分析法の提出を推奨している。一方、分析法は、規制施行のための手順に関する当局の厳しい基準（本ガイドライン (c)(5)項参照）に合致しなくてはならない。データ収集のみに用いられる分析法は規制施行分析法の要件をすべて満たす必要はないが、分析法が TTR の測定に適することを当局に保証するのと同様の方法でバリデーションを行わなければならない。

(iv) 規制施行のための一次分析法として、本ガイドライン (e)(6)項の PAM 第 1 巻に掲載の FDA 多成分分析法（MRM）を使用することを推奨する。申請者は、親化合物およびすべての規制対象代謝物についての MRM 試験データを提出することが要求される（OPPTS 860.1360 参照）。申請者は、新規農薬の測定について、単一成分分析法を開発する前に MRM が適合するかを検討することが推奨される。規制施行のための方法として MRM が許容可能と認められた場合、本ガイドライン(c)(6)項に記載の単一試験所バリデーションは要求されない。しかしながら申請者には、PAM 第 2 巻に掲載の単一分析成分の確認法（本ガイドライン(e)(7)項参照）を提示することを求められるだろう。

(v) 特に残留物がガスクロマトグラフィーにかけられる前に誘導体に変換する場合、可能な限り、安定した標準化合物に対する GLC の保持時間および応答値を報告すべきである。GLC および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のパラメータについては、本ガイドライン(e)(6)項の多成分分析法（MRM）プロトコルのガイドラインに記載された形式で報告すべきである。

(2) 申請者による分析法バリデーション (i) 分析法は、対照試料データおよび TTR の全成分の回収率データにより、関係する食品を代表する試料に対する妥当性が確認されなくてはならない。対照値は合理的に低い値であるべきであり、できれば申請される残留基準の 20%未満となるべきである。回収率を求める際の添加濃度は、申請される残留基準に適合し、かつ定量下限（LOQ）を含むべきである。回収率は、対象試料にスパイクされた農薬およびその代謝物の既知量の 70～120%の範囲にあるべきであり、試料間で大きく変動すべきではない。回収率が常に 100%以上となる分析法は疑わしいものとみなされる。回収率が 70%に満たない場合、当局は、ケースバイケースで、急性毒性を示さない有効成分または微量代謝物については、低い回収率を示す分析法を認めるだろう。

(ii) 申請者は、TTRの全成分の回収率について、個々の値、標準偏差および信頼限界を報告するものとする。残留レベルの測定値は、分析法の妥当性判定において欠かせない要素である。本ガイドライン(e)(5)項などの文献において、残留レベルの関数に適切な変動係数(CV)または相対標準偏差(RSD)が検討されている。分析法の妥当性判定において、70~120%の範囲から外れる回収率の妥当性は当局が検討する。例えば、平均回収率が65%でCVが低い(例5%)分析法は、平均回収率が95%でCVが20%以上の分析法より好ましいと判断される場合がある。

(iii) 作物、動物組織、乳または卵の抽出物よりも、**生鮮農産品(RAC)**やその圧砕品(macerate)にスパイク添加を行うべきである。分析対象となる作物の測定試料については、本ガイドライン(e)(6)項、40 CFR 180.1、およびOPPTS 860.1000のTable 1に規定されている。申請者はまた、分析対象となる食品の測定試料に関する規則(40 CFR 180.45)を参照すべきである(本ガイドライン(e)(6)項参照)。申請者は、対象作物や動物組織にそれぞれ適用される実際の検出限界(LOD)および定量下限の推定値について言及すべきである。実際のLODおよびLOQの推定値は、ブランク(作物の抽出物および試薬による機器応答)のサイズおよび種類を考慮し、妥当な信頼度をもって検出または定量できる農薬の最小濃度に基づくべきである。申請者は、LODおよびLOQの算出方法を説明し、適切な参照文献を引用すべきである。

(iv) 分析法は、残留データおよび残留基準の設定の対象となる各作物について妥当性を確認できるものであるべきである。作物群(例 根菜類および根茎類、葉菜類(アブラナ科の野菜を除く)、穀類など)の残留基準の場合、バリデーションが必要なのは40 CFR 180.41に規定される作物群の代表作物のみである。分析法自体に関して提出する報告書には、代表作物についてのみ回収率データを含める必要がある。一方、圃場試験の報告では、分析法の報告で試験されなかったあらゆる作物についてのバリデーションデータを追加すべきである。

(v) 動物性食品に関しては、飼養試験における残留データの収集および/または残留基準の設定が必要となる乳、卵および全組織についてのバリデーションデータが要求される。動物組織には通常、牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓および鶏の筋肉、脂肪、肝臓が含まれる。牛製品の回収率データは大抵の場合、ヤギ、豚、馬および羊にも適用可能である。

(3) 抽出効率 (i) 本ガイドライン(c)(2)および(c)(3)項に記す従来の回収率実験は、作物の実残留についての抽出効率を反映しない。分析手順において、実残留が完全に抽出されるという何らかの保証があるべきである。植物および／または家畜代謝試験から得た放射能標識された試料を利用（放射能バリデーション法という）することにより、抽出の完全性に関する最良の証拠が得られる。TTR が実際の植物マトリックスおよび／または家畜組織、乳または卵から抽出されるかどうかを判定するために、分析法について放射能バリデーションを行うべきである。試料は分析法で用いられる手順で抽出されるべきである。申請者は、抽出された放射能が代謝試験で同定された TTR の大半に由来することを証明する必要がある。これについては、分析法の定量操作において行うか、他の手順によって抽出された放射能の成分の同定および定量を行う方法が考えられる。多くの場合、単に全抽出放射能を定量するだけでは十分とはいえない。分析法が植物性および動物性食品の両方に使用される場合、植物マトリックス、動物組織および乳か卵のいずれかについて放射能バリデーションを行うべきである。マトリックスには、抽出が最も難しいと予想されるものを使用すべきである。植物の場合であれば、通常、比較的長期間植物に存在する残留物を含有する乾燥試料（例わら、飼料など）がこれにあたるであろう。申請者は、放射能バリデーションに用いた試料の根拠を提示すべきである。データ収集のための分析法と規制施行のための分析法の抽出方法が大きく異なる場合、各方法について放射能バリデーションを行うべきである。もしくは、圃場試験で得られた非放射能標識残留物（実残留試料）の複数の分割試料を用いて、2つの分析法で同様の結果が得られることを示す資料を提出してもよい。

(ii) 表面剥離法のみを用いた分析法は許可されない。ただし、対象食品の TTR が事実上表残留のみであるというデータが十分に得られている場合を除く。

(iii) TTR の成分の中には、天然に存在する植物成分と結合しているものがあり、遊離体に有効な抽出法では回収されない可能性がある。結合体のうち、抽出溶媒では回収できないが、毒性学的に懸念される結合体の形成が示唆される場合は、常に、化合物を遊離させて回収できる手順に分析法を修正すべきである。このような修正の例としては、処理作物を最初に酸性、塩基性または酵素条件下で加水分解することにより化合物を遊離させる方法がある。あるいは、結合体は極性溶媒で回収できる場合もある。これらの結合性残留を、結合が非常に強いまたは植物の代謝プールに取り込まれていてどのような化学的手段によっても回収不可能な断片的成分と混同すべきではない。このような化合物は興味深い、通常は毒性学的懸念はない。OPPTS 860.1300 の抽出不能残留物に関する考察についても参照のこと。

(4) **TTR の同定** (i) 分析法は OPPTS 860.1300 「残留物の種類」に記載されており、代謝試験で検出された TTR について測定すべきである。毒性学的に懸念される成分にはいずれも共通の化学的残基が含まれることが多いため、全化合物成分を同時に測定する方法を採用してもよい。しかしながら、TTR や残留物の主要成分を測定するために、個別の抽出・精製手順やさらには完全に別の分析法が必要となる場合もある。また、1 つ以上の残留成分が他の残留成分よりも有意に毒性が強く、個別の測定が必要となる場合もある。

(ii) 規制当局の負担を軽減するため、および／または国際的な最大残留基準の調和を図るため、当局は、規制施行のための分析法として一部の TTR (通常親化合物) のみを測定する分析法を認める場合がある。この成分は指標成分またはマーカー化合物と言われることがある。しかしながら通常は、食事によるリスク評価に関して十分なデータを得るため、依然として、TTR の定量によるデータ収集のための分析法が必要とされる。規制施行またはデータ収集のいずれかの分析法に指標またはマーカー化合物の使用を検討している申請者は、当該方法の可否について当局に問い合わせることを推奨する。

(5) **規制分析法に関する要件** (i) 申請される 1 つ以上の分析法は、申請される残留基準の施行に適合しなくてはならない。適用可能な場合、本ガイドライン (c)(6)項に示す FDA 多成分分析法の使用を強く推奨する。また、規制施行のための分析法は、残留農薬のモニタリングコストを抑えるためにも、できる限り簡便であるべきである。

(ii) 残留データの収集に適切と考えられる分析法は、必ずしも規制施行の目的に適しているわけではない。一般に、

(A) 規制施行のための分析法は次の事項を必要とすべきではない。

(1) 未処理の食品をブランクとして使用すること。

(2) 外国産の機器または試薬 (または製造が終了した試薬) 。

(B) 規制施行のための分析法は次の通りとすべきである。

(1) 実施時間が合理的に迅速であること。一般に、規制目的の残留物の分析法は、1 日で作業を完了すべきである。1 日以上かかる分析法も場合により許可されると考えられる。急性毒性残留物については、事故や誤用による強制措置の可能性があることから 24 時間以内の分析法 (分析開始から完了までの合計時間) が求められる。

(2)同一の食品に合理的に存在すると考えられる他の農薬の残留物の存在下でその残留物を測定および同定するのに十分な特異性。

(3)申請される残留基準に対して十分に高い感度。

(4)非常に有害な試薬や毒性の高い試薬を使用することなく実用的であること。

(iii) 当局は、規制施行のために許容される分析法の種類について具体的なリストを用意していない。上述の基準に合致する手順（例 GC、HPLC、MS、免疫化学など）が許容されると思われる。コリンエステラーゼ阻害による分析法は規制施行の目的に適合しないものとみなされる。残留物を視覚的に測定するペーパーまたは薄層クロマトグラフィーによる分析法は、規制施行の目的には定量的に不十分と考えられるが、残留物の同定を裏付ける確認分析法としては有用な場合がある。

(iv) ガスおよび液体クロマトグラフィー検出系はもともと特異的であるが、これらの検出系による分析法は通常、規制施行のための一次分析法とは大きく異なる確認分析法によって補完されるべきである。通常、質量分析による確認試験が適切である。特別な抽出・精製手順、誘導體または並行カラムおよび/または交互カラムを用いることにより特異性が向上する場合がある。特異的な確認分析法が用意されている場合、当局は、同じ食品について登録済みの他の農薬が、対象とする農薬の測定に干渉するかどうかを示す干渉試験の実施を要求しない。

(v) 当局は、場合によって共通構造分析法の使用を認めている。共通構造分析法の適合性を評価する際は、その分析法で測定可能な懸念される全代謝物どうしの毒性学的相違が考慮される。規制施行のための一次分析法として共通構造分析法を申請する場合、他の登録農薬製品も同じ共通構造を生成するのであれば、規制施行試験所には懸念残留物に特異的な確認分析法が用意されているべきである。このことは、共通構造を生成する 2 つの農薬が同じ作物について登録されているが、残留基準は異なるという場合に特に重要である。

(vi) 規制施行のために申請される分析法は、農薬が新規かつ分析法が新規で今までにない場合、または分析が困難な食品であることが知られている場合、当局の試験所による試験に供されることがある。証明にかかる費用は申請者が負担する。その分析法が当局の試験で期待される性能を示さなかった場合、申請者は問題を解決することが求められる。また、申請者は、当該分析法を改良し、改良された分析法によって新たな残留データを取得する責任を有する。分析法の性能が十分満足され、規制施行のための分析法として認められる場合、出版物によるか、本ガイドライン(e)(7)項の PAM により

対象者が利用できるようにする。よって、申請者は、機密情報の請求や表示のない分析法の写しを提出しなくてはならない。分析法は、FIFRA 第 18 項の「緊急時の例外規定」または一時的な残留基準が有効である場合、恒久的な残留基準を設定する前に規制当局に開示される。この分析法は、本ガイドライン(e)(7)項の PAM に公開される前に、直接当局より入手することができる。

(6) 単一試験所分析法バリデーション 本項では、農薬申請の一環として単一試験所バリデーション (ILV) 試験について説明する。

(i) ILV 試験は残留基準の申請に伴って要求される。新規の分析法に関する ILV 試験の結果は、毒性学的に懸念される代謝物を含む親農薬について要求され、次の申請を伴わなくてはならない。

(A) RAC または食品／飼料中の残留農薬に関する一時的な残留基準申請を含む初回の残留基準の申請。

(B) 規制施行のための新規分析法を申請する場合、過去に残留基準が確立した残留農薬に対する新規の残留基準の申請。

(C) 過去に承認された規制施行のための分析法を、新規食品への適合にあたって大きく変更した場合、過去に残留基準が確立した残留農薬に対する新規の残留基準の申請。分析法の変更が重大かどうか申請者で判断できない場合は当局に連絡すべきである。

(ii) 当局により、既存の規制施行分析法よりも優れているとみなされる規制施行分析法に対しては、通常 ILV 試験の結果は要求されない。また一般的に、ILV 試験は確認分析法においても要求されない。しかしながら、当局の判断において、場合によっては ILV 試験が確認分析法に要求される。特に、規制施行のための化合物の一次分析法が、他の登録農薬も検出する共通構造を用いた確認分析法の場合は ILV 試験が必要と考えられる。

(iii) ILV 試験の実施に選出される試験所の試験責任者等の分析者は、当該分析法の開発およびその後の圃場試料分析での使用についてあまり知らない者でなければならない。本基準に合致し、同一の装置、機器、供給物を使用していないのであれば、ILV 試験の実施に選出される試験所が申請者の組織であってもよい。他の可能性としては、州の規制当局、大学または民間の試験所がある。申請者は、ILV 試験を実施する試験所の選出に、あらゆる分析作業に対するものと同じ品質基準を適用すべきである。

(iv) ILV 試験に関する要件。(A) ILV 試験は、40 CFR part 160 に規定される FIFRA 優良試験所基準 (GLP) に基づいて実施されなくてはならない。適切な ILV 試験には、少なくとも 1 セットの試料に対する十分な TTR の結果が必要とされ、ILV 試験の実施試験所は、該当する食品に対する分析法を用いて最大 3 セットの試料について

分析ランを行なうことができる。1 セットとは、2 つの対照試料、申請される残留基準でスパイクされた 2 つの対照試料、および LOQ でスパイクされた 2 つの対照試料からなる。残留基準が LOQ で申請される場合、2 番目のスパイク添加レベルは LOQ の 2 倍とすべきである。申請者の判断でこの試料セットに別のスパイク添加レベルを追加してもよい。分析法は、重大な変更を加えず記述された通りに実施されなくてはならない。同じ分析法によって追加の食品を分析する場合は異なる ILV 試験とみなされる。

(B) ILV 試験を実施する試験所は、最初の試料セットを分析する前に分析法の開発者または前の使用者に連絡をとってもよいが、連絡内容は全て記録し、当局に報告しなくてはならない。いかなる状況であっても、申請者、開発者または前の使用者は、観察、支援、化学者や技術者の補佐を目的として、ILV 試験の実施中に試験所を訪問すべきではない。最初（または 2 番目）のセットがうまくいかず、分析法の開発者や他の使用者とさらに連絡をとる必要がある場合、試験所はすべての連絡内容を記録すべきである。その後性能を改善するため、もとの分析法に追加や変更を行ったのであれば、バリデーションに関する当局への分析法報告書に記載すべきである。

(C) 複数の食品に対して 1 つの分析法を用いる場合、申請者により最も分析が困難とされる食品について ILV 試験を実施すべきである。同一の分析法が植物性および動物性食品の両方に使用される場合、最も困難な植物マトリックスと最も困難な動物マトリックスについてそれぞれ独立した ILV を行なうべきである。食品の選出はその根拠を提示すべきである。3 セットの試料を分析しても ILV 試験により適切な結果が得られなかった場合、申請者は分析法を変更し、異なる試験所にて 2 回目の確認試験を実施しなくてはならない。

(D) ILV 試験が成功したとみなされるには、3 セット中 1 セットは、申請者が得た結果と同様の結果が得られなければならない。回収率は 70~120% の範囲とし、干渉は申請される残留基準と比較して無視できる程度であるべきである。

(v) 当局に報告すべき情報。ILV 試験に成功した場合、申請者は次の項目を提出すべきである。

(A) 試験責任者および ILV 試験に携わった者の名前、住所および電話番号。

(B) 分析方法の説明。

(C) ILV 試験中に得られたすべての食品に関するすべての回収率および対照値。

(D) 各マトリックス中の各分析対象化合物に関する

代表クロマトグラム／スペクトル。

(E) 使用機器および操作パラメータの説明。

(F) ILV 試験中に生じた問題に関する説明およびあらゆる変更や修正に関する記述。

(G) 必須と思われる手順、すなわち、差異がほとんど許されないか、指示に忠実に従わなければならない手順。

(H) 1セットの試料分析を完了するために要する作業時間。

(I) 1セットの試料分析に要する暦日数

(J) 独立した試験所と分析法開発者またはその他の分析法に詳しい者との連絡記録。連絡の理由、連絡により生じた分析法の変更、確認試験の進捗状況に対応する連絡時期（すなわち、第1セット後、第2セット中など）。

(K) 40 CFR 160.12.下の FIFRA GLP 基準への準拠の陳述。

(vi) 分析法バリデーションは当局によって継続される。申請者が独立した試験所による ILV 試験の成功結果を提出したと当局が認めた場合、当該分析法について当局によるバリデーションが行われる。

(7) **内標準および操作標準** (i) 当局は、保持時間および／またはピーク高／面積を校正し、定量精度を高めるために、注入直前に最終抽出物に内標準を添加することを認めている。しかしながら、回収率を補正する目的で、操作全体を通しての内標準の使用は認められない。ただし、各マトリックスについての豊富な試料データにより分析対象化合物と内標準が各段階（抽出、精製等）において同等の挙動を示すと証明できる場合を除く。クロマトグラフィー分析法においては、分析対象化合物および内標準のピークは互いに近い位置にあると同時に十分に分離して溶出されるべきである。当局によって認められた内標準法の例として、質量分析によるダイオキシン分析のための同位体標識ダイオキシンの使用（本ガイドライン(e)(2)項参照）がある。規制施行のための分析法に用いられる他の試薬または標準物質と同様に、内標準は規制施行試験所において入手可能でなくてはならない。内標準が市販されていない場合、申請者は当局に化合物の供給を保証しなくてはならない。

(ii) 操作標準は、分析法に規定された一部または全部の試料調製手順に、標準物質を用いることによって得られる標準とみなされる。誘導体化手順で生成された操作標準を用いた分析法は、当局により一定の条件下で許容される。操作標準が用いられる場合、申請者は当局に対し、農薬の分析標準だけでなく、誘導体化標準も提供すべきである。誘導体化標準が入手できることにより、規制施行試験所は操作標準の生成効率を測定することが可能となる。誘導体化され

た標準物質が不安定であるか得られない場合、申請者は手順の効率および再現性を示すデータを提示しなくてはならない。

(d) **データ報告様式** データの報告には次の様式が推奨される。しかしながら、本項の情報が記載されているのであれば、他の様式も許可される。

(1) **表題／表紙** 表題ページおよび追加文書要求（データ要求やデータの機密請求方法など）は、試験報告に関連するのであれば、試験内容の前とすべきである。

(2) **目次** 目次では、試験の主項目についてページ番号を付すべきである。

(3) **報告書本文—(i) 緒言および要約 (A) 適用**（適切なマトリックス）および分析法の出典（例 PAM、会社報告書等）。

(B) 分析手順の説明および原理。測定対象の化学種、検出限界、定量下限を含む。

(ii) **材料および方法 (A) 機器—リストおよび説明。**

(B) 試薬および標準物質—リストおよび入手先や調製方法の説明

(C) 分析手順—段階を追った詳細。危険または健康被害を回避するため特別な注意を要する試薬または手順を特に強調する。

(I) **試料の調製**

(2) 抽出—必要に応じ、抽出効率を示す（例；乾燥作物、結合性残留等）。申請者の判断で放射能バリデーションデータを別途報告書に記載してもよい。

(3) **スパイク添加量—該当する場合—すなわち、分析法バリデーションの実行中。**

(4) **クリーンアップ**

(5) **誘導体化（該当する場合）**

(D) **機器—次の情報を記載する。**

(I) **説明**（例 製造元／型、検出器の選択性、カラム（充填材、サイズ）、キャリアガス等）。

(2) **操作条件**（例；流速、温度、電圧等）。

(3) **校正手順**

(E) **干渉—試験を説明する。**

(I) 試料マトリックス

(2) 他の農薬

(3) 溶媒

(4) **実験器具**

(F) 確認法—説明する。

(G) 分析時間（試料／セットの分析手順を完了するまで。判定段階を含む。）

(H) もしあれば、分析法における変更点または問題点（詳細な状況および是正措置）を記載する。

(I) 計算方法（段階を追って説明する）

(I) 校正係数

(2) 試料中の分析対象化合物

(J) その他 申請者が残留物の分析法および残留結果の算定方法についての説明を完結する上で適切かつ関連すると考えられるあらゆる追加情報。

(iii) **結果および考察** 期待される分析法の性能を記載する。

(A) 精確さ（期待される回収率の平均値および範囲）。申請者による分析法バリデーションにおける各試験食品中の TTR の各対象成分の個々の回収率、平均回収率およびその相対標準偏差を好ましくは表形式で示す。

(B) 精度

(C) 検出限界および定量下限（定義を示す）

(D) **堅牢性**試験。実施した場合。

(E) 限界

(iv) **結論** さまざまな試験基質中の特定の試験化合物を測定するための分析手順の適用可能性、機器の入手可能性、干渉等に関する考察。

(4) **証明書** 試験責任者による証明書（署名、タイプされた氏名、役職、所属先、住所、電話番号、日付）を含む。

(5) 表および図

(6) 参考文献

(7) 付録 代表クロマトグラム、スペクトル等（該当する場合）および本報告書の他の項に一致しない関連資料。

(e) 参考文献 本テストガイドラインに関する追加原資料として下記の参考文献を参照すべきである。

(1) Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Official Methods of Analysis, latest edition. Available from AOAC International, 2200 Wilson Boulevard, Arlington, VA 22201.

(2) Environmental Protection Agency, EPA Test Methods for Evaluating Solid Waste (SW-846), Method 8280 and EPA Test Methods for Organic Chemical Analysis, Method 613.

(3) Environmental Protection Agency, PR Notice 96-1, Tolerance Enforcement Methods—Independent Laboratory Validation by Petitioner, Feb. 7, 1996.

(4) FEDERAL REGISTER 58:50888-50893, Sept. 29, 1993.

(5) Horwitz, W. et al, Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents, JAOAC, Vol. 63, No. 6, pp. 1344-1354 (1980).

(6) Pesticide Analytical Manual. Food and Drug Administration. Volume I. (1994). Available from the National Technical Information Service, Springfield, VA.

(7) Pesticide Analytical Manual. Food and Drug Administration. Volume II. (1994). Available from the National Technical Information Service, Springfield, VA.

[目次(参考)]

緒言

ガイドラインの最終開示

OPPTS 860.1340 残留分析法

(a) 範囲

(1) 適用

(2) 背景

(b) 目的

(c) 試験法

(1) 一般

(2) 申請者による分析法バリデーション

(3) 抽出効率

(4) TTR の同定

(5) 規制分析法に関する要件

(6) 単一試験所分析法バリデーション

(7) 内標準および操作標準

(d) データ報告様式

(1) 表題/表紙

(2) 目次

(3) 報告書本文

(i) 緒言及び要約

(A) 適用

(B) 分析手順の説明および原理

(ii) 材料および方法

(A) 機器

(B) 試薬および標準品

(C) 分析手順

(1) 試料の調製

(2) 抽出

- (3) 添加量(該当する場合)
 - (4) クリーンアップ
 - (5) 誘導体化(該当する場合)
 - (D) 機器
 - (1) 説明
 - (2) 操作条件
 - (3) 校正手順
 - (E) 干渉
 - (1) 試料マトリックス
 - (2) 他の農薬
 - (3) 溶媒
 - (4) 実験器具
 - (F) 確認法
 - (G) 分析時間
 - (H) 分析法における変更点または問題点
 - (I) 計算方法
 - (1) 校正係数
 - (2) 試料中の分析対象化合物
 - (J) その他
 - (iii) 結果および考察
 - (A) 正確さ
 - (B) 精度
 - (C) 検出限界および定量加減(定義を示す)
 - (D) 堅牢性試験(実施した場合)
 - (E) 限界
 - (iv) 結論
 - (4) 証明書
 - (5) 表および図
 - (6) 参考文献
 - (7) 付録
- (e) 参考文献

資料②: Australian Government, Australian
Pesticides and Veterinary Medicines Authority,
Residue Guideline No. 19; Residue Analytical
Method, February 2000

残留分析法

残留物ガイドライン No. 19

2000年2月

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority

オーストラリア農薬・動物用医薬品局

本文書の原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。
Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method, February 2000

https://archive.apvma.gov.au/transition/guidelines/rgl_19.php

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じて原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

残留分析法

残留ガイドライン No. 19

2000年2月

目次

- ・ 背景
- ・ 分析法の目的
- ・ 分析法の感度
- ・ 実験計画および報告要件
- ・ 同一化合物が自然界のバックグラウンド濃度で存在する化合物に関する農産物／動物の分析
- ・ 不安定／急速分解製品の分析

背景

分析法は、食事からの暴露評価に関するデータを作成するため、および法定最大残留基準(MRL)が設定されている場合はこれを遵守するために必要である。食用の農産物／動物およびその結果として生じる生産物に使用されるすべての農薬、および農薬が使用された農産物を摂取する可能性のある動物由来の製品(例:肉、乳、卵など)には、分析法が必要である。

分析法の目的

分析法を開発する場合は、下記の目的を満たすべきである。

分析法は、

- ・ 残留の定義に含まれるすべての成分について測定(同定、定量、確認)する能力を有すること。
- ・ 十分な特異性を示し、妨害物質が分析法の定量下限の30%を超えないこと。
- ・ 実証された併行精度を有すること。
- ・ 使用対象となり得るすべての作物および動物をカバーすること。
- ・ 有意な残留が生じた場合(即ち、MRLが分析法の定量下限を超えそうな場合)、動物／農産物製品をカバーすること。
- ・ 動物が農薬を使用した作物を摂取したと考えられる場合は、全ての食用畜産製品をカバーすること。
- ・ 可能であれば、どの多成分残留分析法が残留物を測定する能力を有するかを特定すること。

分析法の感度

残留試験に関する FAO (国連食糧農業機関) のガイドラインでは、残留農薬の定量において分析法に求められる感度レベルについて考察されている。本ガイドラインはオーストラリアにも適用され、以下に大部分が採用されている。

改良された精製システムおよびより高感度でより高選択的な検出器の継続的な利用により、残留物化学者は、多くの異なる試料中のますます少量の残留物を測定ができるようになってきている。しかしながら、状況によっては非常に低レベルの残留物を測定することはそれほど必須ではないかもしれない。

残留物化学者は、国際貿易で行き交う食品中またはその表面に存在する化学物質の MRL への適合を立証するため、または監視するために、試料中の残留物測定に関わることが多い。このような場合、残留物の検出法は、MRL を立証し監視するため、および農産物／動物に存在する可能性のある残留物を測定するために、十分な感度を有するべきである。検査レベルが精巧になりすぎると規制目的のモニタリングが困難になる可能性があるため、このような分析法は、MRL より 2 桁以上も低い残留物を定量できるほど高い感度を必ずしも必要としない。

従って、非常に低レベルの残留物を測定するために開発された分析法は、通常、非常に高価で適用が困難になり、また、分析法の分析定量下限を厳密に規定する際に技術的問題を招く可能性がある。

しかしながら、どの試料においても定量可能な実用レベル下限 (lower practical level: LPL) を規定することを容認することはできる。これにはデータの取得に関する技術的な難しさを軽減し、費用も抑えられるという利点がある。様々な試料中の LPL に関する下記の提案は、残留物化学者が適切な分析法を考案するのに有用であると考えられる。

合意された MRL を有する登録された有効成分の場合は、LPL は MRL の比として規定することができる。分析の便宜上、この比はさまざまであり、以下のようにすべきである。

MRL (mg/kg)	LPL (mg/kg)
>5	0.5
0.5~5	MRL に対し 0.1~0.5
0.05~0.5	MRL に対し 0.02~0.1
<0.05	0.5 × MRL

MRL を分析法の分析定量下限に設定するときは、LPL も当該レベルとする。

新規の有効成分の場合は、当該化学物質が市販されていないのであれば MRL は設定されていない。従って、LPL の設定はさらに困難となる。以下の 2 つの状況が考えられる。

毒性学的または生態毒性学的危険性のない有効成分

申請者の経験に基づき(例えば、使用量や予備残留データなど)、早い段階で MRL を推定すべきであり、これに基づいて、上記に従い暫定 LPL を導き出すことができる。

実用上の理由から、一般に以下に示すレベル以下を測定する必要はない。

食用作物、ジュース、ワイン、食肉*	0.05 mg/kg
ビール、水を添加したその他の飲料、乾燥土壌、食用臓物*	0.02 mg/kg
乳#	0.005 mg/kg
水	0.002 mg/kg

* ホルモンや類似の化合物については、より低濃度での分析を要求される場合がある。

残留物を純脂肪ベースで表すためには、乳中の脂肪含有量を測定するか、または分析のために乳をバターに加工する必要がある。

これらの限度値は、一般的に入手可能な装置および手順を用いて通常達成可能である。このような規定の限度値により、費用対効果の高い方法で安全性を確保できるものと考えられる。

何らかの有害性が考えられる有効成分

申請者は、毒性を仲介する恐れのある試料の種類について、利用可能なすべての情報を慎重に検討し、ときには APVMA と協議の上、適切な LPL を設定しなくてはならない。

LPL を設定するときには、以下の基準に従い分析法の開発中および使用中に分析手順の妥当性を確認すべきである。

- ブランク試料に添加することにより測定される分析法の一般的な全体回収率は、推奨 LPL 濃度において通常 70～110%となるべきである。分析バッチによりこの基準値外の回収率が許容される場合もある。許容可能性についての判断は、分析責任者の経験に委ねるべきである。
- 分析法の併行精度は、提案された LPL で添加されたブランク試料の分析(例えば、6 回収率)によって確認すべきである。この結果から得られた相対標準偏差は、通常 20%以下であるべきであるが、より残留濃度が低い場合は、わずかに大きくなる場合がある。また、分析法の再現精度についても可能な限り確認すべきである。

実験計画および報告要件

使用した装置、試薬および条件の詳細を含む分析法の詳細な説明の記載が必要である。また、測定された化学物質の同一性、および親化合物とその後の代謝との関連性についても記載する必要がある。試験結果が含まれるすべての提出物に使用された分析法を記載すべきである。

分析法ごとに各関連物質について、以下のパラメータを決定し、報告しなくてはならない：抽出方法の詳細、精製法の詳細および検出方法。

分析法は、以下の詳細についても提示する必要がある。

- 残留の定義(分析対象化合物および結果の表現方法)
- 使用した試薬および装置
- **検量線** 標準品は、純度が明らかであり、分析中に安定でなければならない。標準液は、定量の最低濃度および試料抽出液中の分析対象化合物濃度をカバーするよう調製されなければならない。分析定量下限から試料抽出液中で測定された濃度までの各標準液濃度(最低 3 濃度)について、統計学的にバリデーションを行うべきである。
- **分析法の精確さ** 分析法の精確さとは、試料に既知量の分析対象化合物を添加して分析することにより得られた結果の平均値が真値に一致する程度である。これらの「確認」は、分析定量下限またはそれよりすぐ上の濃度、および添加された試料中の各濃度で行うべきである。また、これらの「確認」は、試料の分析と同時に行うべきである。以下に示した平均値の真値(100%)との差は、標準的な指針として用いることができる。

真値	基準
< 1 mg/kg	-50%~+20%
> 1 mg/kg	-30%~+10%

- **分析定量下限** 分析法の分析定量下限とは、許容される信頼度で定量的に測定できる試料中の残留農薬の最低濃度をいう。これは、定性的に検出することのできる分析対象化合物の最低濃度として定義される分析法の検出限界とは異なる。(残留物ガイドライン No.4「分析定量下限付近での最大残留基準案」を参照のこと。)
- **分析法の特異性** コントロール試験で得られた精製後の抽出液は、分析定量下限の 30%を超える妨害物質を含むべきではない。
- **分析法の精度(回収率の範囲)** 回収率の変動係数(標準偏差を算術平均で除した値として定義される)は、精度の尺度とみなすことができる。標準的な指標として以下に示す基準を用いることができる。

真値	変動係数
< 1 mg/kg	0.35
1 mg/kg～10 mg/kg	0.30
10 mg/kg～100 mg/kg	0.20
> 100 mg/kg	0.15

一般的に、回収率データは70～100%の範囲にあるべきである。しかしながら、特に分析が困難な分析対象化合物や回収率が一貫して低いか高い分析法については、60～140%の範囲が適用されることがある。回収率の相対標準偏差は、20%を超えるべきではない。

- 代表的なクロマトグラム(最低でも標準品、未処理試料および添加した未処理試料)。

分析対象化合物と同一の化合物の天然由来のバックグラウンド濃度が存在する場合の農産物／動物の分析

農薬または動物用医薬品を使用することにより生じる残留物が、天然由来のバックグラウンド濃度の同一化合物と区別できないことが示せるか、または論証できる場合、それ以上の残留データは要求されない。

農薬または動物医薬品を使用することにより生じる残留物が、天然由来のバックグラウンド濃度と区別できる濃度で天然由来の化合物の残留物を生じることが判明した場合には、GAP 下で予測される最大濃度を示す必要がある。

不安定または急速に分解する生成物のための分析

添加試料中で定量前に分解してしまい正常な分析手順が行えないことをデータまたは論証によって示すことができる場合は、不安定な成分についての残留データは要求されない。

代表的な例として酸化剤があり、有機物質と接触すると直ちに分解する。

不安定な分析対象化合物が他の化合物(代謝物や基本原料)に分解する場合、結果的に残留物が存在しない(例えば、分解生成物が揮発性であるか、または終結果的に得られた物質が毒性学的に重要ではない)ことが示せるか論証できない限り、分解生成物に関する残留データを提供する必要がある。

[1] Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Guidelines on Producing Pesticide Residues Data from Supervised Trials, Rome, 1990.

資料③: Draft Guidelines on Performance Criteria
for Methods of Analysis for the Determination of
Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex
Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food
Standards Programme, July 2016

食品中残留農薬の定量分析法のための性能基準に関するガイドライン原案 (ステップ6)

本文書は、2016年7月の第39回コーデックス委員会でステップ6として採択されたガイドラインの原案であり、最終版のガイドラインではない。また、原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

DRAFT GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA FOR METHODS OF ANALYSIS
FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD (At Step 6)

http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-718-48%252FReport%252FREP16_PRe.pdf

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

食品中残留農薬の定量分析法のための性能基準に関するガイドライン原案
(ステップ6)

目次

	項
目的	1-3
分析法の選定及び妥当性確認に関する原則	4-10
A. 分析法の目的及び適用範囲の規定	4-7
B. 他のコーデックス委員会ガイドラインの補完	8-9
C. 分析法の妥当性確認	10
分析法の性能パラメータ	11-31
A. 適用可能性	12
B. 選択性	13-14
C. 校正	15-16
D. 直線性及び切片	17-18
E. マトリックス効果	19
F. 真度及び回収率	20-21
G. 精度	22-25
H. 定量下限	26
I. 分析範囲	27
J. 堅牢性	28-29
K. 測定不確かさ	30-31
スクリーニング分析法の性能許容基準	32-34
定量分析法の性能許容基準	35-43
分析対象化合物の同定及び確認法の性能許容基準	44-51
A. MS法による同定	46-49
B. 確認	50-51
表	
定義	別紙

目的

1. 本ガイダンス文書の目的は、食品中の残留農薬分析法が適合すべき性能基準を規定し、明記することである。本文書では、意図する使用目的に合致し、国内のモニタリング及び／又は国際貿易の場で残留農薬を確実に評価するために用いられる分析法に対して、科学的に許容される信頼性を与える特性・パラメータを取り扱う。
2. 本文書は、残留の定義に基づく食品中の残留農薬の親化合物及び／又はその代謝物及び分解物を含む全ての食品中の対象化合物を分析する個別残留分析法及び多成分残留分析法（Multi-Residue Methods: MRM）のいずれにも適用可能である。
3. 本ガイダンスは、それぞれ独自の分析法の性能要件を有する定性分析及び定量分析を取り扱う。分析対象化合物の同定及び確認のための分析法に関する性能許容基準についても取り扱う。

分析法の選択及び妥当性確認に関する原則

A. 分析法の目的及び適用範囲の規定

4. 分析法の使用目的は、通常、適用範囲の文書中に記載されており、分析対象化合物（残留物）、マトリックス及び濃度範囲にいて規定される。また、その目的がスクリーニング、定量、同定及び／又は結果の確認なのかについても言及する。
5. 規制用途においては、最大残留基準値（Maximum Residue Limit: MRL）は、「残留の定義（親化合物、主代謝物、親化合物及び／又は代謝物の合計、又は分析中に残留物から生成される反応生成物などが含まれる）」の観点から表される。残留分析法は残留の定義の全成分について測定可能であることが望ましい。

6. 目的適合性は、技術及びリソースの制約の範囲内において、分析法の性能がエンドユーザーのニーズに適合する度合い、及び試験室とエンドユーザー（又は依頼主）との間でデータに関し合意された基準（データ品質目標）に一致する度合いである。目的適合性の基準は、本文書に記載の特性に基づくことも可能ではあるが、最終的には許容される合成不確かさとして表される¹。

7. 分析法の選択は分析対象化合物及び分析の意図する目的²に基づく。

B. 他のコーデックス委員会ガイドラインの補完

8. コーデックス委員会（Codex Alimentarius Commission: CAC）は、輸出入する食品の検査に関わる試験室のためのガイドライン³を発行しており、試験室に対し次のように勧告している。

- a 「化学分析試験室の内部精度管理に関するハーモナイズドガイドライン（Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories）」に記載されているような内部精度管理手順を用いること
- b 「（化学）分析試験室の技能試験に関する国際的なハーモナイズドプロトコル（The International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories）」に記載の要求事項に合致した食品分析に関する適切な技能試験に参加すること
- c 可能な限り、CAC が提示した原則に基づき妥当性が確認された分析法を用いること

9. 分析法は、文書において上記の品質保証（Quality Assurance: QA）及び精度管理（Quality Control: QC）に関する原則が一貫されるよう国際的に許容され、認可され、周知された試験室の品質マネジメントシステム（Quality Management System）⁴の範囲内で用いられるべきである。継続中の性能については、試験室内の部署で品質マネジメントシステムにより監視する。

C. 分析法の妥当性確認

10. 分析法の妥当性確認は、分析法が目的適合性を有していることを証明するためのプロセスである。つまり、試験が、適切に訓練された分析者によって特定の機器及び材料を用い、分析法のプロトコルに忠実に従って実施されているとき、試料分析に関する指定された統計的な限度内において精確かつ一貫した結果が得られることを意味する。妥当性確認では、マトリックス効果を考慮して分析対象化合物の同一性及び濃度を実証し、回収率の統計学的特性を提示し、偽陽性率及び偽陰性率が許容されるかを示すべきである。分析法が適切な分析標準物質を用いて行なわれている場合には、経験豊富な残留試験室において訓練された分析者により、同一又は同等の試料物質に関して、規定の性能限界内の結果が得られるべきである。分析法の妥当性確認が時間が経っても適切であることを保証するため、継続的な技能試験や適切な精度管理試料（例 回収率用の添加試料を含む）を用いて分析法を継続的に評価すべきである。

分析法の性能パラメータ

11. 分析法の個々の性能特性に関する一般要求事項を以下にまとめる^{1,5}。

A. 適用可能性

12. 妥当性確認後、分析法の文書には、性能特性（データ品質目標）に加え、次の情報を記載することが望ましい。

- a. 分析対象化合物の素性、該当する場合は異性体、代謝物及びその他の適切な成分（例 エンドスルファン[®]及び[®]、スピノシン A 及び B）を含む
- b. 妥当性確認のカバーする濃度範囲（例 0.01-10 mg/kg）

¹ IUPAC 単一試験室における分析法の妥当性確認に関するハーモナイズドガイドライン（IUPAC Harmonized Guidelines For Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis）、Pure & Appl. Chem., 74(5), 2002; 835 – 855

² OECD 残留農薬分析法に関するガイダンス文書（OECD Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods）、ENV/JM/MONO (2007)17

³ 食品の輸出入規制にかかわる試験室の能力評価に関するガイドライン（Guidelines for the Assessment of the Competence of Testing Laboratories Involved in the Import and Export Control of Food）、CAC/GL 27-1997

⁴ 試験室及び校正機関の能力に関する一般要求事項（[General requirements for the competence of testing and calibration laboratories](#)）、ISO/IEC 17025

⁵ OECD 単一試験室における定量分析法の妥当性確認に関するガイダンス文書—植物防疫剤及び殺生物剤の登録前及び登録後データ要求の補助に係るガイダンス（OECD Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method-Guidance used in support of pre-and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products）ENV/JM/MONO(2014)20

- c. 妥当性確認がカバーする試料マトリックスの範囲（例 ウリ科植物、根菜類、柑橘類）
- d. 機器、試薬、許容変動を含む段階を追った詳細な操作手順（例 100 ± 5 °C で 30 ± 5 分間加熱する）、校正及び精度管理手順、必要とされる特別な安全注意事項、意図される用途及び不確かさに関する必須要件を記したプロトコル
- e. 要求があれば、定量結果は拡張測定不確かさ（Measurement Uncertainty: MU）とともに報告されることが望ましい。

B. 選択性

13. 理想的には、選択性を評価して、分析に悪影響を及ぼす妨害が起こらないことを実証すべきである。あらゆる潜在的な妨害成分に対して分析法を試験することは非現実的であるが、一般的な妨害は、試料及び試薬のバッチごとにブランクを分析して確認することが望ましい。試薬ブランクでは、可塑剤、セプタムブリード、洗浄剤、試薬不純物、試験室汚染、キャリアオーバーなどのバックグラウンドレベルが出現しやすく、分析者はこれらの出現を認識しなくてはならない。また、分析対象化合物どうしの干渉についても、混合標準溶液中で個々の分析対象化合物を確認することにより知る必要がある。マトリックス干渉については、分析対象化合物が含まれていないことが明らかな試料を分析して評価する。

14. 一般原則として、選択性は妨害の程度がわずかなものであるべきである。選択性の最終的な試験は、分析における偽陽性率及び偽陰性率に関係する。分析法の妥当性確認中の偽陽性率及び偽陰性率を最小限に見積もるためには、分析対象化合物の報告レベルで添加したマトリックスとともに、適切な数（各 5 試料以上を推奨）の様々なマトリックスブランク（同じソースからではない）を分析すべきである。スクリーニング分析法（分析対象化合物の有無を確認）の妥当性確認については第 32～34 項で述べる。

C. 校正

15. 検量線用物質の調製における大誤差（過失誤差とも言われる）を除き、通常（常にではないが）、校正誤差が全不確かさに占める部分はわずかであり、その他に分類することは問題ない。例えば、校正による偶然誤差は不確かさの一部であるが、系統誤差は分析のバイアスを生じる。一方で、妥当性確認や分析中の精度管理では、両誤差ともひとつの誤差として評価される。それでもなお、校正にはいくつかの特性があり、これらの特性は最終プロトコルの最適化に影響するため、分析法の妥当性確認の開始にあたり知っていることと有用である。例えば、検量線が直線か二次曲線か、原点を通っているか、試料マトリックスの影響を受けているかどうかなどを前もって知る必要がある。本文書に記載のガイドラインは妥当性確認に関するものであり、日常分析で行われる校正よりも詳細に述べられている。

16. 不確かさの実験的推定には反復測定が必要である。初回の分析法の妥当性確認では下記の校正手順が推奨される。

- a. 5 濃度以上の測定を行う事が望ましい。
- b. 検量線用標準物質は対象とする濃度範囲において均等の濃度間隔とし、検量線の範囲は実際に遭遇し得る全濃度範囲を包含することが望ましい。
- c. 全シーケンスにわたり検量線の一貫性が保たれていることを示すため、検量線用標準物質をシーケンス上で分散するか、又は分析ランの最初と最後に含めるべきであり、校正関数のフィッティングについては、相関係数に頼りすぎることなく、視覚的及び／又は残差（標準物質の実測濃度と算出濃度との差）を算出することによりグラフを作成し検査すべきである。個々の残差が当該領域の検量線から $\pm 20\%$ 以上外れる場合、統計学的に外れ値を検討すべきであり、精度管理基準を満たさない場合にはシーケンスの再分析を必要とする場合がある。

D. 直線性及び切片

17. 直線性は、適切な検量線の濃度に対する応答の線形回帰により生成される残差をプロットすることにより検証可能である。曲線パターンは非線形の校正関数となることからフィッティングの不良を示唆する。この場合、5 濃度以上を用いて二次関数のような他の関数を検討し適用すべきである。現在、フィッティングの質に関する指標として直線性が広く普及しているが、決定係数（ R^2 ）は高濃度の標準物質に比重が置かれるため、誤りを起こす可能性がある。この場合、 $1/x$ や $1/x^2$ などの適切な重み付け係数を考慮すべきである。

18. 一般に、ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) の低濃度の定量では、線形回帰よりも重み付け線形回帰や重み付け二次関数の使用が推奨される。低濃度での残留濃度の算出において誤差を抑えるため、切片の値はゼロ付近（例 最低濃度の検量線用標準物質の 20%未満）となるべきである。

E. マトリックス効果

19. マトリックスマッチング校正はマトリックス効果を補正するためによく使用されている。できれば試料と同種のブランクマトリックス抽出液を校正に用いるべきである。ガスクロマトグラフィー (GC) 分析においてマトリックス効果を補正する他の実用的な方法として、化学成分 (アナライトプロテクタント) の使用がある。これは、(理想的には) 検量線用溶液と試料抽出液中の農薬の応答を等しく増強するため試料抽出液及び検量線用溶液の両方に添加される。マトリックス効果を補正する他の方法は、標準添加法又は同位体標識化した内標準 (IS)、又は化学的同族体の使用である。しかしながら、MRM (多成分残留分析法) ではこれらの方法が困難な場合が多い。これは、異なるマトリックス中に異なる濃度で含まれる残留物が多すぎると日常分析手順を構築できず、また、このような多数の分析対象化合物に対する同位体標識標準物質もないからである。溶媒のみの検量線を用いる場合、結果の同等性を示すために、マトリックスマッチ標準液と溶媒標準液の応答を比較することによって、マトリックス効果の測定を行うべきである。

F. 真度及び回収率

20. 真度とは、試験結果と測定対象成分の採択された参照値との間の一致の程度をいう。真度は「バイアス」として定量的に示され、バイアスが小さいほど真度が優れていることを示す。バイアスは一般に、認証 (可能であれば) 標準物質に対する分析法の応答とその物質に付与された既知の値とを比較することにより決定される。理想的には多機関試験が望ましい。参照値において不確かさが無視できない場合には、結果の評価では標準物質の分析で生じる統計的ばらつきと同様に、標準物質の不確かさについても考慮すべきである。認証標準物質¹⁵がない場合、ガイドラインでは妥当性確認試験の目的で十分に特徴付けられた入手可能な標準物質の使用を推奨する。

21. 回収率とは、分析対象化合物を抽出前に試料 (通常はブランク) に添加し、最終的に定量された値を添加量と比較した比率をいい、一般に百分率で表される。測定時の誤差は、バイアスのかかった回収率につながり、最終抽出液における真の回収率から逸脱する。日常の回収率は、試料のバッチごとの分析における精度管理スパイクで行われた測定を参考にする。

G. 精度

22. 精度とは、規定された条件下で得られた独立した (反復) 試験間の結果の一致の程度をいう。通常、標準偏差 (Standard Deviation: SD) 又は変動係数 (Coefficient of Variation: CV) としても知られる相対標準偏差 (Relative Standard Deviation: RSD) として求められる。精度とバイアスの区別は分析系をどの段階で見るとによる。従って、単一測定の観点からは、分析で用いられる校正に影響するどのような偏りもバイアスとみられるであろう。年間を通した分析を検討する分析者の観点からは、分析のバイアスは毎日異なり、関連する精度とともに確率変数のように振る舞うはずであり、この精度の推定には規定された条件をすべて取り入れるべきである。

23. 単一試験室の妥当性確認については、(a) 繰返し性 (併行精度) (同一のシーケンス内での測定のばらつき)、及び (b) 室内精度 (同一試料の複数のセット間の結果のばらつき) の2種類の精度条件が関係する。精度の値は、起こり得る試験条件を代表していることが重要である。まず、分析ラン間の条件の変動は、分析法の日常的な使用中に試験室において通常起こるであろうことを代表しているべきである。これは継続中の分析法の性能の妥当性確認/検証によって実施可能である。例えば、試薬バッチ、分析者及び機器の変動は、継続中の精度管理で測定すべきである。次に、使用される試験材料は、マトリックスや (理想的には) 粉碎状態の点から、実際に適用する際に遭遇する可能性のある材料を代表するものであるべきである。

24. 単一試験室の妥当性確認では、精度は分析対象化合物の濃度によって変わることが多い。典型的な仮定としては、(a) 精度は分析対象化合物の濃度によって変化しない、又は (b) 標準偏差は分析対象化合物の濃度に対し比例 (又は直線的に依存) する、である。いずれの場合も、分析対象化合物の濃度の大きな変動が予想される場合はこれらの仮定を検証する必要がある。

25. 精度データは、ここで示された最小限の繰返し性 (併行精度) や分析ラン間の条件に加え、非常に多様な条件について得られる場合があり、追加情報を取得することが適切である。例えば、結果の評価や測定の向上には、日間や日内の別々のオペレータ及びラン効果に関する指標、あるいは1台又は数台の機器を用いて達成可能な精度に関する指標を有することは有用であろう。様々な試験デザインや統計解析法の使用が可能であり、このような試験では常に慎重な実験デザインを選ぶことが強く推奨される。初回の妥当性確認は、分析法の目標とする定量下限 (LOQ) 又は報告限界、及び少なくとも1つ以上のより高濃度 (例えば目標とする LOQ の2~10倍又は MRL) で行われるべきである。

H. 定量下限 (Limit of Quantification: LOQ)

26. 分析化学者間の長年の定義によると、LOQ は分析におけるシグナル/ノイズ比 (S/N) の平均値が 10 に等しくなる濃度である。実際の LOQ の正確な決定には、添加試料やマトリックスブランクについて多くの分析が必要となるが、LOQ は分析機器やその他多くの要因の性能状態により日差変動があるため、実際のところ LOQ は推定できるに過ぎない。いくつかの妥当性確認ガイドラインでは、LOQ での添加実験により、LOQ が分析法の性能基準を満たしていることを検証することが求められているが、LOQ の日差変動のために分析者は実際の分析法の LOQ よりも大幅に過大な推定をする傾向があり、厳密な LOQ の定義 (S/N = 10) を実行するのは困難である。従って、最低妥当性確認濃度 (Lowest Validated Level : LVL) での添加の方が記述的で適切な方法である。さらに、同一の分析系列では、分析対象化合物を最低検量線濃度 (Lowest Calibrated Level : LCL) より低い濃度で定量すべきではない。LCL での S/N は 10 以上 (濃度 \geq LOQ) でなくてはならず、各分析系列に必要なシステムの適合性確認項目として設定可能である。分析において報告限界 (アクションレベルは通常 LCL よりも高濃度である。) が達成されていることを確認するために、精度管理のマトリックススパイクを各系列に含めることもできる。本質的には、妥当性確認のポイントは LOQ を求めることではなく、最も低い報告された濃度が分析のニーズを満たしていることを示すことである。

I. 分析範囲

27. 妥当性確認の範囲は、分析法の妥当性が確認されたとみなされる分析対象化合物濃度の範囲である。LVL は、分析法の性能基準を満たす妥当性確認において評価された最低濃度である。重要なのは、妥当性確認範囲は、必ずしも検量線の有効範囲と同じである必要はないということである。検量線は幅広い濃度範囲をカバーすることができるが、妥当性確認範囲 (通常、不確かさの点でより重要である) は一般的により限定された範囲をカバーする。実際には、大部分の分析法は、2 濃度以上の濃度で妥当性確認が行われている。妥当性確認範囲は、これらの濃度間では適正な外挿とみなすことができるが、多くの試験室では直線性を示すために 3 点目の濃度における妥当性確認を選択している。コーデックス基準に関する残留濃度をモニタリングする場合は、分析法は各分析対象化合物の LVL が現行のコーデックス最大残留基準値 (Codex Maximum Residue Limit: CXL) 以下となるよう十分に感度が高くなくてはならない。妥当性確認範囲は、既存の CXL をカバーすることが望ましい。CXL が存在しない場合は、国の規制当局によって設定された MRL が最低濃度となる。対象となる分析対象化合物/マトリックスの組み合わせに対して CXL や MRL が存在しない場合には、一般に 0.01 mg/kg が望ましい LVL となる。MRM では、一般的な分析目標は、様々ではあるが、代表的な食品で LVL (及び報告レベル) を 0.01 mg/kg に設定することである。

J. 堅牢性

28. 分析法の堅牢性 (頑健性と同義のことが多い) とは、分析手順に記載された実験条件からの逸脱が生じたとき、分析法によって生じる結果の変化に対する抵抗性をいう。実験パラメータの限界を分析法のプロトコルに規定すべきであり (以前には常に行われていたわけではないが)、許容範囲内の逸脱においては、個別に又は任意の組み合わせによってであれ、生じる結果に意味のある変化をもたらすべきではない。ここで「意味のある変化」とは、分析法が目的への適合性によって定義されるデータの品質目標を満たさないことを意味する。結果に影響を及ぼすと考えられる分析法の側面を特定し、堅牢性試験によりその分析法の性能に対する影響を評価すべきである。

29. 堅牢性試験が対処できる因子の例には、分析機器、測定者又は試薬のブランド/ロットの変化、試薬の濃度、溶液の pH、反応温度、操作終了までの時間及び/又は他の関連因子がある。

K. 測定不確かさ (Measurement Uncertainty: MU)

30. 測定不確かさの推定に対する正式なアプローチは、真の値が、定義された確率の範囲内でその付近に存在することが期待できる推定値を、方程式又は数学モデルから算出することである。分析法の妥当性確認に記載されている手順は、結果の推定に用いられる式が、あらゆる種類の偶然誤差に関して適正な許容範囲をもって、すべての認識されかつ有意な影響を包含した妥当な式であることを保証するようデザインされている。測定不確かさに関するさらなる考察及び説明は、「分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン (Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results) ⁶ に記載されている。

31. 測定の不確かさを濃度の関数として表し、データに関して試験室と依頼者又はエンドユーザーとの間で合意された目的適合性の基準と関数を比較することが望ましい。可能性のひとつとして、MU を技能試験データ ⁶ から計算することである。

⁶ 分析結果の不確かさの推定 (Estimation of Uncertainty of Results), [CAC/GL 59-2006](#)

スクリーニング分析法の性能許容基準

32. スクリーニング分析法は、通常、本質的に定性的又は半定量的であり、その目的は閾値を超える残留物が含まれない（「陰性」）試料を、閾値を超えて残留物を含む（「陽性」）試料を識別することである。従って、その妥当性確認の方策は、その値を超えていれば結果が「潜在的陽性」となる閾値濃度の設定、統計学に基づき結果が「偽陽性」又は「偽陰性」となる確率の算出、妨害の検討、適切な使用条件の設定に焦点を合わせることである。スクリーニングの概念は、試料中に存在する可能性が低い分析対象化合物にまで分析の適用範囲を拡張する効果的な方法を試験室に提供することである。より頻繁に出現する分析対象化合物については、妥当性が確認された定量的な MRM を用いて継続的にモニタリングを行うべきである。定量分析法と同様に、スクリーニング分析法の選択性や感度についても確認すべきである。使用目的によっては、市販の検査キットが役に立つかもしれないが、現在の技術は実用面で多成分残留スクリーニングの要求に経済的にみあうものではない。選択性及び分析範囲は、検出前にクロマトグラフィーや他の分離法を用いることにより向上する場合が多い。別のアプローチは、質量分析（Mass Spectrometry: MS）法を用いたスクリーニング分析法を使用することで、これにより特定の化合物を互いに区別することが可能となる。

33. スクリーニング分析法は適切な選択性を有し、試料物質中に存在すると考えられる他の物質から対象化合物又は化合物群の存在を区別できなくてはならない。スクリーニング分析法の選択性は、通常定量分析法の選択性ほど優れていない。スクリーニング分析法は、化合物群又はクラスに共通の構造がある場合に利用されることが多く、化合物を明確に同定できないイムノアッセイ法や分光光度法の応答に基づく場合がある。

34. スクリーニング検出限界（Screening Detection Limit: SDL）に基づくスクリーニング分析法の妥当性確認は、検出能に注目することができる。各代表的なマトリックスの種類について、最小限の妥当性確認では、推定 SDL で添加された 5 試料以上の分析を行うべきである。試料及びマトリックスの種類ごとに最低 2 つの異なる試料を含む異なる供給源から得た 5 個以上のマトリックスブランク（種類や数を増やすことにより妥当性確認の質は向上する）は、試験室が意図する適用範囲に適していることが望ましい。追加の妥当性確認データは、継続中の QC データ及び日常分析の間の分析法の性能検証から収集することができる。定性的スクリーニング法の SDL は、少なくとも 95% の試料（例えば、許容される偽陰性率は 5%）で分析対象化合物が検出された（必ずしも MS 同定基準を満たす必要はない）最低濃度である。

定量分析法の性能許容基準

35. 選択性は、食品中の残留農薬に関する規制管理プログラムで使用される定量分析法の性能特性を定義する際に特に重要である。理想的には、当該分析法は、試料又は試料抽出液中に存在すると考えられる他の分析対象化合物及びマトリックス化合物による干渉を受けないシグナル応答を示す必要がある。完全に分離されていないピークに基づくクロマトグラフィー分析は、信頼性の低い定量結果を示す。クロマトグラフィーによる分離と組み合わせ、元素特異的検出器、異なる検出波長又は特定の化合物や構造を区別するのに優れた MS 検出器を使用することは、定量分析法の選択性を向上させる。

36. 1 回の抽出で様々な残留農薬を回収するという要求は、個別残留分析と比較すると MRM では選択性が低下する可能性を増加させる。選択性の低い抽出法や精製法を用いると、最終抽出液中に共抽出されるマトリックス物質が増える可能性が高くなる。このような共抽出物の性質や量は、マトリックス分析法の対象成分により顕著に変動する可能性がある。従って、定量が化学的干渉を受けないことを確保するために、MRM の精度及び真度に関する基準を設定するときには注意が必要である。

37. 分析法の選択性に加え、分析法が信頼性のある定量結果を与える能力を有することを示さなければならない（即ち、真度（F 項参照）及び精度（G 項参照））。オリジナル試料と反復試料間の相対標準偏差は、30%未満であることが理想である。

38. 定量分析法の許容基準は、初回及び継続中の妥当性確認段階のいずれにおいても、各添加濃度において許容される平均回収率を与えることができることを示す必要がある。妥当性確認では、分析法の目標とする LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い 1 つ以上の濃度（例えば、LVL や MRL の 2~10 倍）で最低 5 試行の繰り返し試験（回収率及び精度を確認するため）が必要である。分析法が規制対応の試験に用いられている場合（即ち、食品に対して設定された MRL について申し立てがあったとき）は、MRL（又は CXL）が添加濃度に含まれている必要がある。残留の定義に 2 種類以上の分析対象化合物が含まれている場合には、すべての分析対象化合物について分析法の妥当性確認を行うべきである。

39. 分析法の真度は、認証標準物質を分析して、すでに性能パラメータが厳密に確立されている他の分析法（一般には共同試験が行われた分析法）により得られた結果と比較することにより、又は既知のブランク試料に添加された分析対象化合物の回収率を算出することにより求められる。規制目的のための許容される平均回収率は、70～120%（RSD≤20%）が望ましい。場合によっては（一般にはMRMで）、回収率は低いが一貫している（例えば精度が良い）ときなど、この範囲外の回収率が許容されることがある。系統的な低いバイアスの理由が化学的に十分確立している場合（例えば、分配工程における相間の分析対象化合物の分配が知られている場合など）には、この許容がさらに正当化される。しかしながら、可能であればより正確な分析法を使用すべきである。120%を超える回収率は、正の干渉かバイアスによるものと考えられ、これらについて調査すべきである。

40. 分析法の妥当性確認を支持するため、実残留マトリックスの分析が推奨される。回収率の解釈にあたり、試験用試料に添加した分析対象化合物は、生物学的に生じた実際の分析対象化合物（残留農薬）と同じ挙動をしない場合があることを認識する必要がある。多くの場合、抽出された実残留物の量は、実際に存在する実残留物の総量よりも少ない。これは、抽出の際の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析対象化合物を添加されたブランクマトリックスを用いた回収試験では完全には現れない他の因子によるものと考えられる。

41. 比較的高濃度では、分析法の回収率は100%に近いと予想される。低濃度では、特に分析法が広範囲の抽出、分離、及び濃縮操作を伴う場合には、回収率は高濃度のときよりも低くなる可能性がある。平均回収率がどのようなものであっても、必要に応じて信頼性のある補正を最終結果に対して行うことができるように、変動の小さい回収率が望ましい。

42. 一般に、平均回収率が70～120%の範囲にある場合、残留データは回収率補正をする必要はない。回収率の補正は、CAC/GL 37-2001⁷に示されるガイダンスに従って行われることが望ましい。報告の際には、すべてのデータについて(a)回収率の補正が適用されたかどうかを明確にし、(b)回収率補正が適用された場合は、補正量及び算出方法を記載することが最も重要である。これによりデータセットを直接比較できるようになる。補正関数は適切な統計学的検討をもとに設定、記録、保管され、依頼者に対し入手可能にすることが望ましい。

43. ISO IEC17025⁴に従い、技能試験プログラムに参加すべきである。残留農薬のモニタリングを行う世界中の試験室に対し、多くの技能試験スキームが利用可能であり、費用も手頃である。試験室間試験が行われることもある。

分析対象化合物の同定及び確認法の性能許容基準

44. 過失誤差（試料調製中に起こる過失）が、間違いなく、MS法における誤同定の最大の原因である。このため、すべての規制実施のため措置（MRL超過又はMRLが設定されていない食品に対する規制）では、理想的には化学的に異なる試料調製法及び／又は分析法を用いて、オリジナル試料からの再試験用試料の再抽出及び再分析による結果の確認が必要である。

45. 選択性は、同定法において第一に考慮する事項である。分析法は明確に同定するに足る選択性を有するべきである。クロマトグラフィー分離法とMSの組み合わせは、試料抽出液中の分析対象化合物を同定するのに非常に強力な組み合わせである。この方法により、クロマトグラフィーだけでは得ることのできない分析対象化合物の構造に関する情報が得られる。GC-MS及びLC-MS手法（フルスキャン、選択イオンモード、高分解能、タンデムMS/MS、ハイブリッドシステム、その他の先端技術）は、保持時間、クロマトグラムピーク形状、イオン強度及び相対強度／比、質量精度及びその他の分析対象化合物の同定に有用となる重要なパラメータを提供する。

⁷ 分析測定における回収率情報の利用に関する統一IUPACガイドライン（Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement）Pure & Appl. Chem., 71,1999; 337 – 348. [CAC/GL 37-2001](#)

A. MS法による同定

46. 一般に受け入れられている同定のための評価基準は存在しない。表 1 に評価基準の例を示す。

47. 残留農薬の定性（及び定量）分析における現在の手法は、クロマトグラフィー+選択イオン検出（SIM）法又は MS/MS 法を一般的に含んでいる。フルスペクトル（フルスキャン又は飛行時間型）MS 法もまた受け入れられる手法であり、スペクトルライブラリマッチングファクター及び/又はフルスペクトル内の主要イオンの相対強度比を使用する。後者の場合は、3 個以上のイオンを用いて、次に示すイオン比の評価基準を適用することができる。前者の場合、規制目的のための同定では、マッチングファクターは ≥ 900 （ $\geq 90\%$ 一致）であることが望ましく、また、ライブラリの参照スペクトルは、試料分析と同じ条件を用いて同じ装置で、バックグラウンドを差し引いた高純度の標準物質から取得することが望ましい。次の同定の評価基準を満たすべきである。

- a. 分析対象化合物の保持時間の参照値は、溶媒で調製した高濃度の検量線用標準溶液（妨害がないことがわかっている場合は、マトリックスマッチ検量線用標準物質を使用することができる）を同時に（同一バッチ内で）分析して決定しなければならない。
- b. イオン比の参照値は、47 a 項と同様に設定されるべきである。同定に使用される異なるイオンは、一緒に溶出され、同様のピーク形状を示さなくてはならない。検量線用標準物質から得られたイオンのうち平均強度のより高いイオンを百分率で表されるイオン比の分母として用いる（シグナル変動、マトリックス効果などによるイオン比の変化は 30%まで許容される）。
- c. 測定されたピークの SN 比は 3 以上でなければならず、及び/又は対象濃度を含む適切な検量線用標準物質又は対照の信号と比較して、信号は閾値強度レベルを超えていなければならない。
- d. 同定の目的で選択されたイオントランジションは、化学的/構造的に理にかなったものであることが望ましい（選定されたイオンは、分解物、不純物又は分析対象化合物以外の他の化合物と混同していないことを確認する）。
- e. すべての測定された試薬及びマトリックスブランク試料は、キャリーオーバー、コンタミネーション及び/又は LOQ の 20%以上の妨害がない事が示されている必要がある。

48. 分析対象化合物の許容される最小保持時間は、カラムのボイドボリュームに対応する保持時間の 2 倍以上とすべきである。抽出液中の分析対象化合物の保持時間は、ガスクロマトグラフィーと液体クロマトグラフィーのいずれについても参照値（47a）の保持時間 ± 0.2 分以内又は相対保持時間の 0.2%以内となるべきである。

49. 高分解能質量分析法に基づく分析法は、ユニット分解能質量分析法では得られない、イオンの質量/電荷を正確に測定することでより高い信頼性を提供すると考えられる。質量分析検出器の機種や型が異なれば、同定の信頼性に関連する選択性の度合いも異なる。表 1 に例示した同定のための評価基準は、化合物の有無を証明するための絶対的な基準としてではなく、同定のためのガイダンス基準としてみるべきである。

B. 確認

50. 最初の分析で明確な同定が得られないか定量分析の要件を満たさない場合は、確認分析が必要である。これには抽出液又は試料の再分析を含む場合がある。CXL/MRL を超える場合、別の試験試料を用いた確認分析が常に必要である。稀な農薬とマトリックスの組み合わせの場合も、確認分析が推奨される。

51. 最初の確認法が MS 法に基づいていない場合、確認法には MS による分析対象化合物の同定を含むべきである。更に、確認法には異なる化学的メカニズムに基づく独立したアプローチ（LC や GC 分離など）を用いるべきである。場合によって、独立した試験室による確認が適切と思われる。確認方法の基準を満たすのに適切と思われる分析法の例を表 2 にまとめる。

表 1 異なる MS 法における同定の評価基準

MS 検出器/ 特性	一般的なシステム (例)	アクイジション	同定のための要件	
			最小イオン数	その他
ユニット質量分解能	四重極、イオントラップ、TOF	フルスキャン、限定された m/z 範囲、SIM	3 イオン	$S/N \geq 3^e)$ 抽出されたイオンクロマトグラムにおける分析対象化合物のピークは、完全に重なり合わなければならない。 イオン比は同じ分析系列の検量線用標準物質の平均値の $\pm 30\%$ (相対値) 以内 ^{f)}
MS/MS	トリプル四重極、イオントラップ、Q-トラップ、Q-TOF、Q-オービトラップ	選択又は多重反応モニタリング、ユニットマス分解能と同等以上のプリカーサーイオン分離のための質量分解能	2 プロダクトイオン	
精密質量測定	高分分解能 MS: TOF 又は Q-TOF オービトラップ又は Q-オービトラップ FT-ICR-MS 磁場型 MS	フルスキャン、限定された m/z 範囲、SIM、プリカーサーイオンの選択あり又はなしのフラグメンテーション、又はその組合せ	2 イオン (質量精度 ≤ 5 ppm ^{a, b, c)})	
		シングルステージ MS とユニットマス分解能と同等以上のプリカーサーイオン分離のための質量分解能を有する MS/MS の組み合わせ	2 イオン: 1 分子イオン、プロトン付加分子 (脱プロトン分子) 又は付加イオン (質量精度 ≤ 5 ppm 以下 ^{a, c)}) 及び 1 MS/MS プロダクトイオン ^{d)}	

a) 分子イオン、プロトン付加分子 (脱プロトン分子) 又は付加イオンを含んでいることが望ましい。

b) 1 つ以上のフラグメントイオンを含む

c) m/z 200 未満の場合 1 mDa 未満

d) 10 ppm 以下

e) ノイズが無い場合、少なくとも 5 回の連続スキャンで信号が存在していることが望ましい。

f) プリカーサーイオンの質量精度が 5 ppm 未満でプロダクトイオンの質量精度が 10 ppm 未満の場合、イオン比の許容範囲は任意である。

表 2 物質の確認分析に適した検出法の例

検出法	評価規準
LC 又は GC 及び MS	十分な数のフラグメントイオンが観察される場合
LC-DAD	UV スペクトルが特徴的である場合
LC-蛍光分光	他の手法との組み合わせで
2-D TLC-(分光光度法)	他の手法との組み合わせで
GC-ECD、NPD、FPD	2 種類以上の分離法を組み合わせただけの場合のみ
誘導体化	第一選択の分析法でない場合
LC-イムノグラム	他の手法との組み合わせで
LC-UV/VIS (単一波長)	他の手法との組み合わせで

定義

分析対象化合物 (Analyte) : 検出又は定量の対象である試料中の化学物質 (CAC/GL 72-2009)。

分析対象化合物保護剤 (Analyte protectant) : ガスクロマトグラフシステムにおいて強く相互作用して活性点を塞ぐ化合物で、これにより分析対象化合物が活性点と相互作用するのを抑え、ピークテーリングや損失を防いで、その結果、分析対象化合物のより高い応答が得られる。

分析精度管理 (Analytical quality controls) : 分析対象試料のバッチ (シーケンス) が規定の性能特性 (データ品質目標) を満たすかどうかを検証するために設計された、検量線用標準、ブランク試料、添加試料、参照試料、システム適合性試料、又は同様に試験室で作成された分析試験。

適用可能性 (Applicability) : 分析法を十分に活用できる分析対象化合物、マトリックス及び濃度 (CAC/GL 72-2009)。

変動係数 (Coefficient of Variation, CV) : 相対標準偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) とされることが多い。これは、平均値の異なる複数組の値のばらつきを比較する定量的試験における精度の尺度である。

確認 (Confirmation) : 少なくとも 1 つは同定の評価基準を満たす、互いに一致している二つ以上の分析の組み合わせ。

確認法 (Confirmatory method) : 前回の結果に一致する補完情報を提示することができる方法。理想的には、初回の分析とは化学的メカニズムの異なる分析法を用いて異なるサブサンプルを分析する。これらの分析法の一つは、対象濃度において許容可能な確かさを持って分析対象化合物の同定の評価基準を満たす。

偽陽性 (False positive) : 分析対象化合物が存在するか、又は規定濃度 (例えば、CXL/MRL 又は報告レベル) を超えていることを誤って示す結果。

偽陰性 (False negative) : 分析対象化合物が存在しないか、又は規定濃度 (例えば、CXL/MRL 又は報告レベル) を超えていないことを誤って示す結果。

添加 (Fortification) : 回収率を求める目的で分析対象化合物を添加すること (spiking ともいう)。

同定 (Identification) : 分析において分析対象化合物又はその代謝物の化学的同一性を明確に決定するプロセス。

実残留物 (Incurred residue) : 試料の試験室での添加により存在する残留物とは対照的に、農薬の特定の使用、動物による摂取又は野外での環境汚染の結果として食品中に生じる残留物

妨害 (Interference) : 装置、環境、分析法又は試料に関連した電子的、化学的又はその他の因子による分析対象化合物に関連しない内因性又は外因性の応答 (例 ノイズ)。

妨害物質 (Interferent) : 妨害を引き起こす化学物質又はその他の因子。

内標準 (Internal standard, IS) : 化学分析において試料及び/又は標準物質に既知量で添加される化学物質で、ブランク及び検量線用標準を含む。そして、内部標準物質の信号に対する分析対象化合物の信号の比を濃度の関数としてプロットすることにより、この物質を検量線に使用することができる。次いで、試料についてのこの比は、分析対象化合物の濃度を求めるのに用いられる。使用される内標準は、多くの点で分析対象化合物の信号と同様の信号を示すが、2 つの信号は容易に区別できる程度に十分に異なっている必要がある。

定量下限 (Limit of quantification, LOQ) : 完全な分析法を適用することにより許容可能な精確さをもって妥当性が確認されている分析対象化合物の最低濃度又は量。実際には、一般的に定量下限は、平均の信号/ノイズが 10 となる分析対象化合物の濃度である (26 項も参照の事)。

直線性 (Linearity) : 一定範囲内において、試験室試料中の測定対象となる分析対象化合物の量に比例して分析機器の応答又は分析結果が得られる分析法の能力 (CAC/GL 72-2009)。

最低検量線濃度 (Lowest Calibrated Level, LCL) : 分析バッチを通じて、測定系が正常に校正される最低濃度 (又は質量)。

最低妥当性確認濃度 (Lowest Validated Level, LVL) : 分析法の性能許容基準を満たす、妥当性確認された最低添加濃度。

マトリックス (Matrix) : 残留農薬試験のためにサンプリングされた物質又は成分。

マトリックスブランク (Matrix blank) : 目的の分析対象化合物を検出可能な濃度で含まない試料物質又は試料部分。

マトリックス効果 (Matrix effect) : 分析対象化合物の濃度又は量の測定に対する試料由来の 1 つ以上の検出されない成分の影響。

マトリックスマッチ標準液 (Matrix-matched standards) : 分析中のマトリックス効果及び可能性のある干渉を補正することを目的とした、分析対象となる試料と同様のマトリックスブランクの最終抽出液で調製された標準溶液。

最大残留濃度/限度 (Maximum residue level/limit, MRL/CXL) : コーデックス (CXL) 又は国の規制当局 (MRL) によって設定される、法的に許可されるか又は許容可能として認識される食品中の残留物の最大濃度。一部の国では、MRL (通常 mg/kg 製品重量として表される) の同義語として「許容値 (tolerance)」という用語が使われている。

測定の不確かさ (Measurement uncertainty) : 測定結果に関連するパラメータで、合理的に測定されるものに起因して得られたと考えられる値のばらつきの特性。

マルチクラス分析法 (Multi-class method) : 2 つ以上の残留物グループ (又はファミリー) の同時測定を可能とする分析法。

多成分残留分析法 (Multiresidue method, MRM) : 一般的に化学的分類の異なる多数の化合物の定量が可能な分析法。

精度 (Precision) : 平均値付近の測定値のばらつきの程度。

定量分析法 (Quantitative method) : 規定の評価基準に適合する真度と精度をもって分析対象化合物の濃度の (確定) 結果を与えることができる分析法。

回収率 (Recovery) : 検出可能な濃度の分析対象化合物を含まないか又は既知の検出可能な濃度の分析対象化合物を含むいずれかの適切なマトリックスの試料に、元々添加された分析対象化合物 (主成分及び関連する代謝物) の量に対する測定された量の百分率。回収実験は、精度と真度の両方の情報が得られることにより、分析法の精確さに関する情報を提供する。

相対標準偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) : 標準偏差を算術平均値の絶対値で除し、百分率で表される。分析法の精度を示す (変動係数 (CV) としても知られる)。

繰返し性 (併行精度) (Repeatability) : 同一の測定手順又は試験手順、同一の作業員、同一条件下での同一の測定機器又は試験機器の使用、同一の場所で短期間で反復実施により得られた精度であり、通常 RSD で表される (CAC/GL 72-2009)。

再現性 (再現精度) (Reproducibility) : 異なる試験/測定施設において、異なる作業員により異なる機器を用いて、同一の試験/測定項目について同一の分析法により、独立した試験/測定結果が得られるような観察条件で得られた精度 (通常 RSD で表される) (CAC/GL 72-2009)。

堅牢性 (Ruggedness) : 分析法のパラメータにわずかではあるが故意の変動があっても、その影響を受けない分析手順の能力の尺度であり、通常使用時の信頼性の指標となる (CAC/GL 72-2009)。

試料調製 (Sample preparation) : 試料の試験試料の抽出、その精製及び分析用の最終抽出液に至るそのほかのステップを含む。

試料処理 (Sample processing) : 採取された試料を代表する分析用の試験試料を作成し、分析の一貫性を維持するための手順。これには、細切、ホモジナイズ、粉碎、混合、又は採取された試料及び試験試料の種類や大きさに応じて適切な手法及び装置を用いるその他の手段が含まれる。

スクリーニング検出限界 (Screening Detection Limit, SDL) : 95%信頼水準で確かさを有していることが示されている最低添加濃度。

スクリーニング分析法 (Screening Method) : 対象となる最小濃度以上で、分析対象化合物又は分析対象化合物の有無を検出するために予め設定された評価基準を満たす分析法。

選択性 (Selectivity) : 分析法が、挙動が類似する他の化合物による干渉を受けずに混合物又はマトリックス中の特定の分析対象化合物を測定できる程度 (CAC/GL 72-2009)。

感度 (Sensitivity) : ある測定系の指標値の変化と、それに対応する被測定量の値の変化の商 (CAC/GL 72-2009)。

単成分残留分析法 (Single Residue Method) : 単一の分析対象化合物又は類似の物理化学的性質を有する小グループの分析対象化合物を定量する分析法。

標準添加法 (Standard addition) : 標準添加法は、既知量の分析対象化合物を最終抽出液の一定量に直接添加することによる定量分析法の一種で、分析化学で時に用いられる。

真度 (Trueness) : 無限数の反復測定によって得られる平均値と、基準となる定量値との一致度 (CAC/GL 72-2009)。

不確かさ (Uncertainty) : 合理的に測定に起因して得られたと考えられる値のばらつきを特徴付ける測定結果に関連するパラメータ。

資料④: Guidance Document for Single Laboratory
Validation of Quantitative Analytical Method -
Guidance used in support of pre- and post-
registration data requirements for plant protection
and biocidal products, ENV/JM/MONO(2014)20

環境局
化学品委員会および化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会の合同会合

単一試験所における定量分析法のバリデーションに関するガイダンス文書-植物防疫製品および殺生物性製品の登録前および登録後データ要求の補助に係るガイダンス

試験および評価に関するシリーズ
No. 204

殺生物剤に関するシリーズ
No. 9

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。日本語訳の質と原文との整合性についての責任は翻訳の著者にあります。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

JT03360406

完全な文書の原文 OLIS で入手可能。
本文書および本文書に記載の地図は、領有状況および領有権、国・地域の境界、領域、都市または地域の名称に影響するものではない。

OECD 環境・保健・安全に関する出版物

試験および評価に関するシリーズ

No. 204

および

殺生物剤に関するシリーズ

No. 9

単一試験所における定量分析法のバリデーションに関するガイダンス文書-植物防疫製品
および殺生物性製品の登録前後に必要なデータの取得を補助するためのガイダンス

IOMC

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS

A cooperative agreement among **FAO, ILO, UNDP, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO, World Bank and OECD**

環境局
経済協力開発機構
2014年 パリ

OECDについて

経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）は、北南米、欧州およびアジア太平洋地域の先進工業国 34 カ国ならびに欧州委員会の代表が一同に会し、政策の調整および調和を行い、共通課題を討議し、協力し合いながら国際問題に対応するための政府間機関である。OECD 業務の大半は、加盟国の代表からなる 200 以上の専門委員会および作業部会が行っている。OECD の多数のワークショップおよびその他会合には、OECD での特別資格を有する非加盟国や関係国際機関がオブザーバーとして参加している。各種委員会や作業部会は、フランスのパリを本拠地とし、様々な部局で構成される OECD 事務局が運営する。

環境保健安全部は、以下の 11 シリーズの文書が無償で提供している。すなわち、試験および評価、優良試験所基準（GLP: Good Laboratory Practice）および遵守状況のモニタリング、農薬、殺生物剤、リスク管理、バイオテクノロジーにおける規制監督の調和、新規食品・飼料の安全性、化学事故、環境汚染物質排出・移動登録、排出シナリオ文書、および工業ナノ材料の安全性に関するシリーズである。環境保健安全（EHS: Environment, Health and Safety）プログラムおよび EHS 出版物の詳しい情報については、OECD のウェブサイト（<http://www.oecd.org/chemicalsafety/>）で入手可能である。

本出版物は、化学物質の適正管理のための機関間プログラム（IOMC）の一環として作成されたものである。本内容は、IOMC の各参加機関の見解や規定を必ずしも反映していない。

IOMC（Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals）は、化学物質の安全性分野において協力体制を強化し、国際協調を推進するために国連（UN）環境開発会議が 1992 年に行った勧告を受けて、1995 年に設置された。参加機関は、FAO、ILO、UNDP、UNEP、UNIDO、UNITAR、WHO、世界銀行および OECD となっている。IOMC の目的は、人の健康および環境に関連して、化学物質が健全に管理されるよう、参加機関が共同または個別に実施する政策や活動の協調を図ることである。

本出版物はインターネットを通じて無償で入手可能である。

また、試験および評価に関するシリーズでも公表されている。

本出版物および他の環境保健安全部の出版物については、OECDのウェブサイト
(www.oecd.org/chemicalsafety/) を参照するか

下記に連絡のこと

OECD 環境局
環境保健安全部

2 rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16
France

Fax: (33-1) 44 30 61 80
E-mail: ehscont@oecd.org

© OECD 2014

本文書の全文または一部の複製または翻訳の許可は下記に申請のこと。

Head of Publications Service, RIGHTS@oecd.org, OECD, 2 rue André-Pascal,
75775 Paris Cedex 16, France

序文

定量分析法は原体の活性物質や不純物および製剤の活性物質や懸念される不純物の同定・定量に用いられる方法である。この定量分析法についてのガイダンスを策定する作業が 2012 年に殺生物剤に関するタスクフォース (TFB: Task Force on Biocides) で開始された。本プロジェクトは 2013 年 4 月にテストガイドライン・プログラムの作業計画に加えられた。TFB の下、オーストラリア、ベルギー、カナダ、アイルランド (議長国)、ドイツ、オランダ、スウェーデン、英国、米国、欧州委員会および対 OECD 経済産業諮問委員会 (BIAC: Business and Industry Advisory Committee to the OECD) の専門家で構成された殺生物性化学品専門家グループ (EGBC: Expert Group on Biocide Chemistry) が結成された。

単一試験所における定量分析法のバリデーションに関するガイダンス文書-植物防疫製品および殺生物性製品の登録前後に必要なデータの取得を補助するためのガイダンスのドラフトは、2014 年 4 月にテストガイドライン・プログラムのナショナル・コーディネーター作業部会 (WNT: Working of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme) 第 26 回会合で承認された。化学品委員会 (Chemicals Committee) および化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会 (Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology) の合同会合は、2014 年 7 月 7 日付で本文書の機密解除に合意した。

本文書は、OECD の化学品委員会および化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会の合同会合の責任において発行されるものである。

目次

緒言.....	8
分析法バリデーションのパラメータ	8
a) 特異性 (選択性) Specificity (Selectivity)	9
b) 直線性 Linearity	9
c) 精確さ (回収率) Accuracy (Recovery)	10
d) 精度 (併行精度、繰返し性) Precision (Repeatability)	11
e) 定量下限 (LOQ) Limit of Quantification (LOQ)	11
f) 検出限界 (LOD) Limit of Detection (LOD)	12
g) 分析対象化合物の同定	12
バリデーション報告	13
参考文献	14
定義および略語	15
付録 バリデーション結果の統計学的検討.....	16
総論.....	16
精確さ.....	16
精度.....	17
分析対象化合物のバリデーションパラメータおよび要求項目に関するまとめ.....	18

単一試験所における定量分析法のバリデーションに関するガイダンス文書

植物防疫製品および殺生物性製品の 登録前後に必要なデータの取得を補助するためのガイドライン

緒言

1. 国際標準化機構（ISO）は分析法バリデーションを「意図された特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的証拠を提示すること」と定義している(1)。言い換えると、分析法バリデーションは個々の分析方法が意図する目的に合致するために必要ということになる。
2. 農薬製品の原体や製剤に含まれる目的の分析対象化合物の同定、純度および安定性を確認するには、正確かつ精度が高く、特異的（選択的）な定量分析法が求められる。本ガイダンス文書の目的上、植物防疫製品および殺生物性製品は農薬製品の下位に分類される。
3. 目的の分析対象化合物には、活性物質（AS: active substances）、有意とされる不純物および／または懸念される不純物が含まれる。有意とされる不純物は、製造された原体活性物質中に0.1% w/w以上の濃度で存在する不純物をいう。懸念される不純物は、やはり原体に存在するが、毒性学的、生態毒性学的または環境の観点から懸念される不純物をいう。懸念される不純物は製造された原体活性物質中に0.1% w/w以上または以下の濃度で存在する可能性がある。一部の規制管轄では、製剤に添加される補助剤にも懸念不純物が存在する可能性を考慮している。分析法バリデーションは、製造された原体中の活性物質、有意とされる不純物および懸念される不純物について要求される。一方、製剤において分析法バリデーションが要求されるのは活性物質および懸念される不純物についてのみで、有意とされる不純物については要求されない。
4. 管轄によって「有効成分（active ingredient）」、「活性物質（active substance）」、「活性成分（active constituent）」という用語が使用されているが、これらの用語は同義語であり、本ガイダンス文書の目的上いずれも有効とみなされる。
5. 本ガイダンス文書は、単一試験所の分析法バリデーションに関係する政府機関および専門機関による既存のガイダンス文書およびベストプラクティス(2)(3)(4)に基づく。
6. 単一試験所バリデーションは分析法を開発するプロセスの論理的結論であり、当該分析法が特定の性能要件に合致することを保証するものである。単一試験所バリデーションはその性質上、他の試験所で使用した場合に想定されるデータを提供するものではない。単一試験所バリデーションは、さらに厳しい複数試験所共同バリデーションまたは分析方法の移管試験に進むことができるが、いずれについても本文書では取り扱わない。

分析法バリデーションのパラメータ

7. 分析法バリデーションは、特定の試料マトリックス中に存在する単一の分析対象化合物あるいは複数の分析対象化合物の定量に関し、特定の試験所において特定の手順および測定システムによって行われる一連の品質試験である。バリデーションのデータは、個々のマトリックス中の目的の分析対象化合物を分析するための特定の試験所に

おける手順および測定システムの適合性を検証する。

8. 分析法バリデーションには市販の認証標準物質を使用すべきである。分析法バリデーション用にこのような標準物質が入手できない場合、分析法バリデーションに用いられる標準物質の選定に関して詳細な説明を提示すべきである。十分に認証されていない標準物質については、十分な特徴付け（NMR や質量スペクトルデータ等）を行ってから、分析法バリデーションに使用可能かを判断すべきである。

9. バリデーションの測定パラメータおよび許容基準は分析対象化合物（活性物質または不純物）や試料（原体または製剤）によって異なることがある。バリデーションによって下記のパラメータに関する性能データが得られる。

a) 特異性（選択性） Specificity (Selectivity)

10. 「特異性 (specificity)」および「選択性 (selectivity)」という用語は、以前より多数の管轄で同義語とされている。国際純正・応用化学連合 (IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry) によると、「分析法の選択性とは、複雑な混合物中の特定の分析対象化合物を、混合物中の他の成分に妨げられることなく測定できる程度」とされている(5)。

11. しかしながら「特異的」という用語は、IUPAC の推奨によると単一の分析対象化合物のみに反応を示す方法をいう。IUPAC はこの 2 つの用語を明確に区別しており、「特異性は選択性の究極である」としている。IUPAC は、実際には分析法が「特異的」とは言い難いことから「選択性」を推奨用語とすべきであると提案している。しかし、管轄域によっては実際に、2 つの用語（特異性と選択性）が今も同義語として使用されていることに留意すべきである。

12. 原体および製剤中の目的の分析対象化合物の測定における干渉の程度を報告しなくてはならない。原体または製剤中の目的としない化合物による干渉は、活性物質の測定値に対し 3% を超えてはならない。活性物質が光学的に純粋と規定されている場合、原体および製剤についての分析法はこれを裏付けなくてはならない。活性物質や懸念される不純物が 1 つ以上の異性体や類似体等を成分とする場合、分析法は原体や製剤に存在する個々の化合物の測定を可能とすべきである。しかしながら、一部の規制当局は個々の異性体の測定に関し、光学異性体がラセミ混合物である場合や光学異性体がほぼ同等の有効性や毒性を示す場合には要求の例外を設けている。

13. 製剤に 1 つ以上の活性物質が含まれる場合、分析法は他の活性物質が存在しても個々の活性物質の測定を可能としなくてはならず、また、原体または製剤に 1 つ以上の不純物が含まれる場合も同様に、分析法は他の不純物や活性物質が存在しても個々の不純物の測定を可能としなくてはならない。活性物質および不純物の分析に関する特異性（選択性）については、原体および製剤が正しく特徴付けられる程度まで留意すべきである（詳細についてはバリデーション基準の確認を参照のこと）。

b) 直線性 Linearity

14. 直線性は、応答の測定値と試料中の分析対象化合物濃度との間に許容される直線的相関関係を示すような分析法の能力と定義することができる。

15. 分析検量線は、関連する分析マトリックス中の分析対象化合物の想定される濃度の最低値と最大値に対して少なくとも $\pm 20\%$ をまかなえるよう作成すべきである。3種類以上の異なる濃度で2回の測定を行うか、5種類以上の異なる濃度で単一の測定を行うべきである。検量線の式および相関係数 (r) を報告し、代表的な検量線グラフを提出しなくてはならない。直線範囲の限界を% w/wなどの単位で示すべきである。直線相関係数 (r) が0.99未満の場合、どのようにして検量線を正確に維持するかについて説明を提出すべきである。また、非線形の検量線を用いる場合も、説明の提出が必要である（どのように検量線の正確性を維持するかを含む）。

16. 原体の活性物質、有意とされる不純物および懸念される不純物については直線性のデータが要求される。直線性のデータは製剤の活性物質および懸念される不純物についても要求される。

c) 精確さ（回収率） Accuracy (Recovery)

17. 精確さ（回収率）は、試料中の分析対象化合物についての測定値が認証値、真値または基準値に一致する程度と定義することができる。分析法の精確さの測定には様々な方法(6)があり、分析法はそのマトリックスに適合させるべきである。

18. 原体中の活性物質について、原体中の活性物質が多いときは回収率データによって精確さを評価することにあまり意味はないとの考えから、一部の管轄では実験による精確さの測定を要求していない。このような場合、分析法の精確さを入手可能な干渉、直線性、精度バリデーションデータから評価することが可能である。活性物質の回収率データが要求される場合、原体の不純物について記載の方法と同じ方法で測定すべきである。活性物質について回収率データが要求される例としては、活性物質の純度が低い、濃厚体、2つ以上の異性体として存在するケースなどが挙げられるがこれに限定されない。

19. 原体とは異なり製剤中の有効成分に関しては、登録後管理のためすべての規制管轄で実験による精確さの測定が要求されている。しかしながら、回収率データが要求されるのは、ある規制管轄での承認を目的とした製剤の有効成分についてのみである。分析法の精確さ／回収率は、製剤中の純粋な活性物質の平均回収率として報告されるべきである。分析法の精確さは分析法の直線範囲にわたって異なると考えられるため、精確さは異なる添加レベルで測定されなくてはならない。精確さは想定される範囲（例 80、100、120%）を網羅すべきである。規制管轄は添加レベルを3種類以上要求していないが、必要な添加レベルの数および各添加レベルにおける反復試料数（該当する場合）は規制管轄によって異なる可能性がある。理想的には、試料は試験所で調製し、既知量の分析対象化合物を添加した製剤助剤混合物とすべきであり、サンプリング誤差をなくしたり、マトリックス効果を特定したりするために試料全部を分析すべきである。分析対象化合物を含有しない試料マトリックスを調製することができない場合や、分析対象となる試料を複製することが困難な場合（ペレット製剤など）、標準添加法を用いてもよい。

20. 原体中の有意とされる不純物および／または懸念される不純物に対する分析法の精確さは、平均回収率および相対標準偏差（RSD）として報告するべきである。2つ以上の回収率を取得できない場合、個別の回収率を報告する必要がある。既知量の分析対象化合物を含有した代表試料について2回以上の独立した回収率を測定すべきである。標準添加法は原体中の不純物の回収率を測定する方法として認められている。回収率は物質の規格に適合したレベルで測定されるべきである。回収率の測定方法が検量線の作成方法と同じ場合、例えば、不純物と活性物質を分離する操作が必要ない場合には、回収率を測定する必要はない。この場合、分析法の精確さは、標準添加法によりマトリックス検量線の直線性を評価し、かつ他の分

析法と精確さを比較することによって推定できる。

21. 製剤中の懸念される不純物に対する分析法の精確さは、平均回収率および相対標準偏差として報告すべきである。2 つ以上の回収率を取得できない場合、個別の回収率を報告する必要がある。原体中の懸念される不純物について記載した精確さの基準が製剤中の懸念される不純物にも適用される。

22. 精確さの測定方法および統計的処理法については付録に詳細を記載する。

d) 精度（繰返し性、併行精度） Precision (Repeatability)

23. 精度（併行精度）は、同一試験室で、同一技師が、同一の機器を用いて短時間の内に同一の試験物質に対して同じ分析法を用いて得られた、独立した試験結果間の一致の程度と定義することができる。

24. 分析法の精度については、製造された原体中の活性物質、有意とされる不純物および懸念される不純物に関する詳細が要求される。少なくとも 5 回の独立した試料測定を実施し、パーセント平均相対標準偏差 (%RSD) および測定回数を報告する。%RSD が許容値にあるかは Horwitz の修正式（詳細は付録に記載）を用いて評価することができる。適切な統計法（Dixon 検定や Grubbs 検定など）により外れ値が検出された場合、理由を明らかにし判定すべきである。外れ値は最大 1 つまで除外してもよい。1 つ以上の外れ値が検出された場合、別の測定を加える必要がある。

25. 製剤中の活性物質および懸念される不純物にも上記と同じ基準が適用される。

e) 定量下限 (LOQ) Limit of Quantification (LOQ)

26. LOQ は、許容される相対標準偏差 (RSD) で測定または定量可能な分析対象化合物の最低濃度と定義することができる。RSD が許容値にあるかを判定すべきである。RSD の判定には Horowitz の基準（付録参照）を用いてもよい。Horowitz 以外の基準についても使用できる場合があるが、理由を十分明確にすべきである。

27. LOQ は、許容される回収率が得られる最低濃度と定めることもできる。LOQ はときにノイズに対し 10 倍のシグナル比と同等とされることがある。LOQ の決定には科学的に許容される手順が推奨される。しかしながら、LOQ の決定には様々な方法があることに留意し、具体的な LOQ の決定方法については個々の規制当局に確認すべきである。

28. 製造された原体または製剤中の活性物質については LOQ を報告しなくてもよい。

29. 製造された原体中の有意とされる不純物および懸念される不純物については LOQ を報告しなくてはならない。原体の申告規格を裏付けるには、有意とされる不純物に対する LOQ が原体中の有意とされる不純物の推定量以下（最低 0.1% w/w）となるべきである。規制当局によっては有意とされる不純物について得べき特定の下限值を設けている場合がある。原体中の懸念される不純物についての LOQ は、毒性学的、生態毒性学的または環境に懸念のある分析対象化合物の濃度に基づくべきである。

30. LOQは製剤中の懸念される不純物についても報告しなければならず、毒性学的または環境の観点から有意な、または懸念のある分析対象化合物の濃度、または該当する場合、製剤の保管中に生じる濃度を考慮しなくてはならない。

f) 検出限界 (LOD) Limit of Detection (LOD)

31. LODは、正確な値としての定量を必要としないが、検出し得る試料中の分析対象化合物の最低濃度と定義することができる。

32. 原体または製剤中の活性物質のLODは要求されない。

33. 原体または製剤中の不純物のLODに関する情報は、一部の規制管轄でのみ要求される。LODはときにノイズに対し3倍のシグナル比と同等とされることがある。LODの設定には科学的に許容される手順が推奨される。LODの決定には様々な方法があるため、推奨される決定方法については個々の規制当局に確認すべきである。

g) 分析対象化合物の同定

34. 同定は、特定のマトリックス中の分析対象化合物を化学的に明確に証明することと定義することができる。すべての規制当局が分析対象化合物の同定を要求しているわけではない。

35. しかしながら、要求があれば、下記の手順で分析対象化合物の同定を行うことが可能である。

- a) 原体中の活性物質および不純物（有意とされる不純物と懸念される不純物）の定量に用いられる分析法では分析対象化合物を明確にできない場合がある。分析法のバリデーションおよび適用の一環として、一部の規制当局では活性物質および不純物の同定が要求されることがある。
- b) 分析が選択性／特異性の高い方法で行われている場合、分析対象化合物の同定は確立していることになる。選択性／特異性の高い方法とされるのは、3イオンについてバリデーションしたGC-MSとLC-MS、また、2つのイオントラジションについてバリデーションしたLC-MS/MSである。一部の規制管轄は、MSおよびMS/MS法の特異性が高いことを示す目的で、3イオンすべてあるいは両イオントラジションについてのフルバリデーションを要求していない。当該規制管轄では、単一のイオンあるいは単一のイオントラジションについてのバリデーションデータが得られ、残りの2イオンあるいは残りのイオントラジションが確認イオンあるいは確認トラジションとして選定されているのであれば、これらの分析法は特異性が高いとみなしている。
- c) 一次分析で分析対象化合物を明確に同定できない場合、いくつかの方法によって確認が可能である。
 - 異なる分離方法を用いるなど異なる方法により分析する方法。分析法はフルバリデーションされる必要がある。
 - クロマトグラムのピーク（画分）を集めオフライン分光分析（例MS、IR、NMR）を行う方法。同定結果を裏付けるための完全なデータ解釈が要求される。

- HPLC-DAD、ただし分析対象化合物のUVスペクトルが特徴づけられている場合のみ。認証標準物質と保持時間が一致し、原体中の分析対象化合物の対応するUVスペクトルが一致しなければならない。HPLC-DAD法はフルバリデーションされる必要がある。
- d) 一次分析法が滴定などクロマトグラフィーではない場合、特異性／選択性の妥当性を説明しなければならない。
- e) CIPACが共同で検査した分析法は、管轄によって同定を必要としない場合がある。

36. 製剤中の懸念される不純物の同定も、上記と同様に行われる。

37. 上述の手順は、化学分析の一環として同定を証明する目的のためだけに認められるものであることに留意すべきである。規制当局によっては、原体中に存在する不純物の完全な化学構造の確認／証明に関する追加データ要求を行う場合がある。このような場合、NMR、質量分析のフルデータを請求されると考えられる。

バリデーション報告書

38. バリデーションを行った分析法については、操作パラメータに関連する機器の詳細、材料、サンプリング方法、標準物質および／または試料調整手順、試薬調製手順、計算方法、付属資料に関連する参考文献および有害情報や注意事項に関する詳細などを含むすべての内容を記載すべきである。分析法の妥当性および限界についても記載すべきである。シグナルの増強、マス킹または抑制を招くマトリックス効果や溶媒効果を記載すべきである。記載の手順にほぼ変更を認めない分析法についてはその旨を強調すべきである。クロマトグラム、スペクトル、滴定曲線等の機器の出力例を提示するとともに適切な注釈によって定量に用いられる重要な機能を示すべきである。機器の出力例として、対照ブランクの分析、分析標準またはマトリックスマッチング標準、最低添加濃度および名目または予測濃度が含まれるものとする。

39. バリデーションデータは方法を修正したり別途報告書としてもよい。バリデーションにおいて得られた関連データはすべて記載すべきである。これらのデータは標準物質、試薬およびブランク試料マトリックスに関する供給元および純度を含む。クロマトグラム、スペクトル、滴定曲線等の機器の出力例を提示するとともに適切な注釈によって定量に用いられる重要な機能を示すべきである。バリデーション報告書には分析法バリデーションの各パラメータおよび関連する許容基準、およびバリデーションパラメータに関連して分析法が十分な性能を有することを証明する関連バリデーションデータを記載することになっている。

参考文献

- (1) ISO/IEC 17025 Second edition (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (2) SANCO/3030/99 rev. 4 (2000). European Commission Directorate General for Health and Consumer Affairs. Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. Working document, 11th July 2000.
- (3) APVMA GL69 (2004). Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. October 2004.
- (4) Thompson M., Ellison S.L.R. and Wood R., “Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis,” Pure and Applied Chemistry. 2002. 74(5) 835-855.
- (5) Vessman J. et al, “Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001)”, Pure and Applied Chemistry. 2001. 73(8) 1381-1386.
- (6) Green J.J., “A practical guide to analytical method validation”, Analytical Chemistry News and Features. 1996, 305A-309A.
- (7) Brown S.D., Sum S.T. and Despagne F., “Chemometrics: Fundamental Review,” Analytical Chemistry. 1996. 68 21R-61R.
- (8) Miller J.C. and Miller J.N., “Statistics for Analytical Chemistry (2nd edition)”. 1988. Ellis Horwood. Chichester, London.
- (9) Grubbs F.E and Beck G., “Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations”. Technometrics. 1972. 14 847-854.
- (10) Dixon W.J. “Ratios involving extreme values”. Annals of Mathematical Statistics 1951. 22, 1, 68-78.
- (11) Albert R. and Horwitz W., “A heuristic derivation of the Horowitz curve”. Analytical Chemistry. 1997. 69 789-790.

定義および略語

AOAC – Association of Official Analytical Chemists (公的分析化学者協会)

APVMA – Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority (オーストラリア農薬・動物用医薬品局)

CIPAC – Collaborative International Pesticide Analytical Council (国際農薬分析法協議会)

GC-MS – Gas Chromatography-Mass Spectrometry (ガスクロマトグラフィー-質量分析)

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detectors (高速液体クロマトグラフィー-ダイオードアレイ検出器)

IR – Infrared Spectroscopy (赤外分光法)

ISO – International Organisation for Standardization (国際標準化機構)

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (国際純正応用化学連合)

LC-MS – Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー-質量分析)

LOQ – Limit of Quantification (定量下限)

LOD – Limit of Detection (検出限界)

NMR – Nuclear Magnetic Resonance (核磁気共鳴法)

RSD – (Relative) Standard Deviation ((相対)標準偏差)

SANCO (DG) – Directorate General for Health and consumer Affairs at the European Commission (欧州委員会 健康・消費者保護総局)

UV – Ultra Violet (紫外線)

付録

バリデーション結果の統計学的検討

総論

下記のガイダンスは原体および製剤の分析に適合するものであり、CIPAC によるガイダンスも反映されている。ガイドラインは規定された規則ではないことに留意すること。データは適切な科学的知見に照らして検討されなければならない。

使用される統計的手法は「目的にふさわしい」ものであること。したがって、選定された統計学的手法の適合性または結果について統計学的検討が本当に必要であるかを考慮すべきである。分析法に対する統計学的手法の適用に関し、有用と思われるレビューおよび最近の文献を(7)に示す。

精確さ Accuracy

測定値を Student の t 検定(8)を用いて期待値または「真」の値と比較する際、帰無仮説 (H_0) の選定がデータセットに対して適切であること。

データセットの精度は統計結果の有意性に影響する。例えば、回収率データの精度が高く、100%の「期待」値に対して 95~96%の範囲にあるとき、t 検定では測定値と期待値の間に有意差ありとする可能性があるが、精確さは許容される程度であると考えられる。しかしながらデータの精度が低くても（例えば 95~102%）、精確さは許容される程度のみであるが、データの精度は低く、t 検定では統計学的な差を得ないと考えられる。

業界との協議に基づく製剤の平均回収率 (%) に関する信頼区間を次に示す。

活性物質% (名目)	平均回収率%	不純物% (名目)	平均回収率%
>10%	98-102%	>1%	90-110%
1-10%	97-103%	0.1-1%	80-120%
0.1 – 1%	95-105%	<0.1%	75-125%
0.01-0.1%	90-110%		
<0.01%	80-120%		

分析法の回収率の測定値はこれらの値に照らして考察することが望ましい。統計学的手法を使用した場合、その詳細を報告しなくてはならない。

精度 Precision

精度データには、Grubbs 検定や Dixons 検定(9)(10)などの外れ値に対応した試験が適用される。外れ値を除外する場合は、根拠を提示しなくてはならない。精度に関する %RSD (変動係数、CV) の結果は、Horwitz の式、つまり室間再現相対標準偏差 (RSD_R) と濃度 (C) との指数関数によって判定され得る。

$$\% \text{RSD}_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

ここで併行相対標準偏差 (RSD_r) の予測値は次の式で表される。

$$\% \text{RSD}_r = \% \text{RSD}_R \times 0.67$$

Horwitz 曲線は、膨大な数の分析法精度研究の分析から実験的に得られたもので、C = (100%) から C = 10⁻⁹ の濃度域内では分析対象化合物、マトリックスおよび分析法にほとんど依存しないことが示されている (11)。ガイダンスでは併行精度の CV について、下記の Horwitz の値を用いる場合がある。併行精度の測定値がこれらの推奨値から外れる場合は、考察のために考えられる理由を提示すべきである。

% 分析対象化合物	推奨許容 RSD _r (Horwitz 値 x 0.67)
100%	1.34%
50%	1.49%
20%	1.71%
10%	1.90%
5%	2.10%
2%	2.41%
1%	2.68%
0.25%	3.30%

CIPAC が共同で検査した分析法の妥当性に関する基準では、はじめに示した Horwitz の式が用いられる。

分析対象化合物のバリデーションパラメータおよび要求項目に関するまとめ

収集する必要があるバリデーションパラメータは分析対象化合物の性質および試料マトリックスの性質によって異なる。下表に本文書に記載の分析法に推奨されるパラメータをまとめる。

試験パラメータ	原体		製剤	
	活性物質に関する試験	有意および／または懸念される不純物の測定	活性物質に関する試験	懸念される不純物の測定
特異性（選択性） Specificity (Selectivity)	必要	必要	必要	必要
直線性 Linearity	必要	必要	必要	必要
真度*（回収率） Accuracy* (Recovery)	不要 **	必要	必要	必要
精度（併行精度） Precision (Repeatability)	必要	必要	必要	必要
範囲 Range	***	必要	必要	必要
定量下限 Limit of Quantification	不要	必要	*	必要

*製剤中の活性物質については、すべての規制管轄で登録後管理のために回収率データが要求される。一部の規制管轄では、製剤中の活性物質についての回収率データは要求されない。

** 一般的に、精確さ（回収率に基づく）は原体中の活性物質に要求されない。しかしながら、状況によっては（例えば濃厚体、低純度の活性物質、2 つ以上の異性体として存在する活性物質である場合）一部の管轄で回収率データを要求する場合がある。

*** おそらく必要、個々の試験の目的による。

原文は下記のタイトルで、英語で出版されたものである：

OECD (2014), Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance Used in Support of Pre-and-Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 204 and Series on Biocides No. 9,

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmentpublicationsbynumber.htm>

© 2017 この日本語版は日本の国立医薬品食品衛生研究所（食品部）が作成した。

資料⑤: Guidance Document on Pesticide Residue
Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17

非機密文書

Organisation de Coopération et de Développement Economiques
Organisation for Economic Co-operation and Development
経済協力開発機構 (OECD)

ENV/JM/MONO(2007)17

2007年8月13日

English - Or. English

環境局

化学品委員会および化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会の合同会合

試験および評価に関するシリーズ

No. 72

農薬に関するシリーズ

No. 39

残留農薬分析法に関するガイダンス文書

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。日本語訳の質と原文との整合性についての責任は翻訳の著者にあります。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

JT03230940

完全な文書の原文は OLIS で入手可能。



ENV/JM/MONO(2007)17
Unclassified

English - Or. English

OECD 環境・健康・安全に関する出版物

試験および評価に関するシリーズ

No. 72

および

農薬に関するシリーズ

No. 39

残留農薬分析法に関する
ガイダンス文書

環境局

経済協力開発機構

2007年 パリ

試験および評価に関するシリーズについての出版物リスト：

- No. 1, *Guidance Document for the Development of OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1993; reformatted 1995, revised 2006)*
- No. 2, *Detailed Review Paper on Biodegradability Testing (1995)*
- No. 3, *Guidance Document for Aquatic Effects Assessment (1995)*
- No. 4, *Report of the OECD Workshop on Environmental Hazard/Risk Assessment (1995)*
- No. 5, *Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing (1996)*
- No. 6, *Report of the Final Ring-test of the Daphnia magna Reproduction Test (1997)*
- No. 7, *Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water (1997)*
- No. 8, *Report of the OECD Workshop on Sharing Information about New Industrial Chemicals Assessment (1997)*
- No. 9, *Guidance Document for the Conduct of Studies of Occupational Exposure to Pesticides during Agricultural Application (1997)*
- No. 10, *Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data (1998)*
- No. 11, *Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and industrial Chemicals (1998)*
- No. 12, *Detailed Review Document on Classification Systems for Germ Cell Mutagenicity in OECD Member Countries (1998)*
- No. 13, *Detailed Review Document on Classification Systems for Sensitising Substances in OECD Member Countries (1998)*
- No. 14, *Detailed Review Document on Classification Systems for Eye Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*
- No. 15, *Detailed Review Document on Classification Systems for Reproductive Toxicity in OECD Member Countries (1998)*
- No. 16, *Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*

- No. 17, *Environmental Exposure Assessment Strategies for Existing Industrial Chemicals in OECD Member Countries (1999)*
- No. 18, *Report of the OECD Workshop on Improving the Use of Monitoring Data in the Exposure Assessment of Industrial Chemicals (2000)*
- No. 19, *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation (1999)*
- No. 20, *Revised Draft Guidance Document for Neurotoxicity Testing (2004)*
- No. 21, *Detailed Review Paper: Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals (2000)*
- No. 22, *Guidance Document for the Performance of Out-door Monolith Lysimeter Studies (2000)*
- No. 23, *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2000)*
- No. 24, *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (2001)*
- No. 25, *Detailed Review Document on Hazard Classification Systems for Specifics Target Organ Systemic Toxicity Repeated Exposure in OECD Member Countries (2001)*
- No. 26, *Revised Analysis of Responses Received from Member Countries to the Questionnaire on Regulatory Acute Toxicity Data Needs (2001)*
- No. 27, *Guidance Document on the Use of the Harmonised System for the Classification of Chemicals Which are Hazardous for the Aquatic Environment (2001)*
- No. 28, *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2004)*
- No. 29, *Guidance Document on Transformation/Dissolution of Metals and Metal Compounds in Aqueous Media (2001)*
- No. 30, *Detailed Review Document on Hazard Classification Systems for Mixtures (2001)*
- No. 31, *Detailed Review Paper on Non-Genotoxic Carcinogens Detection: The Performance of In-Vitro Cell Transformation Assays (2007)*

- No. 32, *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Repeat-Dose Toxicity Studies* (2000)
- No. 33, *Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures* (2001)
- No. 34, *Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods in Hazard Assessment* (2005)
- No. 35, *Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (2002)
- No. 36, *Report of the OECD/UNEP Workshop on the use of Multimedia Models for estimating overall Environmental Persistence and long range Transport in the context of PBTS/POPS Assessment* (2002)
- No. 37, *Detailed Review Document on Classification Systems for Substances Which Pose an Aspiration Hazard* (2002)
- No. 38, *Detailed Background Review of the Uterotrophic Assay Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Assay* (2003)
- No. 39, *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (in preparation)
- No. 40, *Detailed Review Document on Classification in OECD Member Countries of Substances and Mixtures Which Cause Respiratory Tract Irritation and Corrosion* (2003)
- No. 41, *Detailed Review Document on Classification in OECD Member Countries of Substances and Mixtures which in Contact with Water Release Toxic Gases* (2003)
- No. 42, *Guidance Document on Reporting Summary Information on Environmental, Occupational and Consumer Exposure* (2003)
- No. 43, *Draft Guidance Document on Reproductive Toxicity Testing and Assessment* (in preparation)
- No. 44, *Description of Selected Key Generic Terms Used in Chemical Hazard/Risk Assessment* (2003)
- No. 45, *Guidance Document on the Use of Multimedia Models for Estimating Overall Environmental Persistence and Long-range Transport* (2004)

- No. 46, *Detailed Review Paper on Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances (2004)*
- No. 47, *Detailed Review Paper on Fish Screening Assays for the Detection of Endocrine Active Substances (2004)*
- No. 48, *New Chemical Assessment Comparisons and Implications for Work sharing (2004)*
- No. 49, *Report from the Expert Group on (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SARs] on the Principles for the Validation of (Q)SARs (2004)*
- No. 50, *Report of the OECD/IPCS Workshop on Toxicogenomics (2005)*
- No. 51, *Approaches to Exposure Assessment in OECD Member Countries: Report from the Policy Dialogue on Exposure Assessment in June 2005 (2006)*
- No. 52, *Comparison of emission estimation methods used in Pollutant Release and Transfer Registers (PRTRs) and Emission Scenario Documents (ESDs): Case study of pulp and paper and textile sectors (2006)*
- No. 53, *Guidance Document on Simulated Freshwater Lentic Field Tests (Outdoor Microcosms and Mesocosms) (2006)*
- No. 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (2006)*
- No. 55, *Detailed Review Paper on Aquatic Arthropods in Life Cycle Toxicity Tests with an Emphasis on Developmental, Reproductive and Endocrine Disruptive Effects (2006)*
- No. 56, *Guidance Document on the Breakdown of Organic Matter in Litter Bags (2006)*
- No. 57, *Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays (2006)*
- No. 58, *Report on the Regulatory Uses and Applications in OECD Member Countries of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models in the Assessment of New and Existing Chemicals (2006)*
- No. 59, *Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats (2006)*

No. 60, *Report of the Initial Work towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1A) (2006)*

No. 61, *Report of the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances (Phase 1B) (2006)*

No. 62, *Final OECD Report of the Initial Work towards the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase-1, Androgenic Response to Testosterone Propionate, and Anti-Androgenic Effects of Flutamide (2006)*

No. 63, *Guidance Document on the Definition of Residue (2006)*

No. 64, *Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006)*

No. 65, *OECD Report of the Initial Work towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay – Phase One (2006)*

No. 66, *OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay - Phase 2: Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories (2006)*

No. 67, *Report on the Validation of the Uterotrophic Bioassay: Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents (2007)*

No. 68, *Summary Report of the Uterotrophic Bioassay Peer Review Panel, including Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report (2006)*

No. 69, *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models (2007)*

No. 70, *Report on Preparation of GHS Implementation by the OECD Countries (2007)*

No. 71, *Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay – Procedure to Test for Antioestrogenicity (2007)*

© OECD 2007

本文書の全文または一部の複製または翻訳の許可は下記に申請のこと：
Head of Publications Service, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775
Paris Cedex 16, France

農薬に関するシリーズについての出版物リスト：

- No.1 *Data Requirements for Pesticide Registration in OECD Member Countries: Survey Results (1993)*
- No.2 *Final Report on the OECD Pilot Project to Compare Pesticide Data Reviews (1995)*
- No.3 *Data Requirements for Biological Pesticides (1996)*
- No.4 *Activities to Reduce Pesticide Risks in OECD and Selected FAO Countries. Part I: Summary Report (1996)*
- No.5 *Activities to Reduce Pesticide Risks in OECD and Selected FAO Countries. Part II: Survey Responses (1996)*
- No.6 *OECD Governments' Approaches to the Protection of Proprietary Rights and Confidential Business Information in Pesticide Registration (1998)*
- No.7 *OECD Survey on the Collection and Use of Agricultural Pesticide Sales Data: Survey Results (1999)*
- No.8 *Report of the OECD/FAO Workshop on Integrated Pest Management and Pesticide Risk Reduction (1999)*
- No.9 *Report of the Survey of OECD Member Countries' Approaches to the Regulation of Biocides (1999)*
- No.10 *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Repeat-Dose Toxicity Studies (2000)*
- No.11 *Survey of Best Practices in the Regulation of Pesticides in Twelve OECD Countries (2001)*
- No.12 *Guidance for Registration Requirements for Pheromones and Other Semiochemicals Used for Arthropod Pest Control (2001)*
- No.13 *Report of the OECD Workshop on Sharing the Work of Agricultural Pesticide Reviews*
- No.14 *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies.*
- No. 15 *Persistent, Bioaccumulative and Toxic Pesticides in OECD Member Countries, (2002)*
- No. 16 *OECD Guidance for Industry Data Submissions for Pheromones and Other Semiochemicals and their Active Substances (Dossier Guidance for Pheremones and Other Semiochemicals) (2003)*

- No. 17 *OECD Guidance for Country Data Review Reports for Pheromones and Other Semiochemicals and their Active Substances (Monograph Guidance for Pheromones and other Semiochemicals), (2003)*
- No. 18 *Guidance for Registration Requirements for Microbial Pesticides (2003)*
- No. 19 *Registration and Work sharing, Report of the OECD/FAO Zoning Project (2003)*
- No. 20 *OECD Workshop on Electronic Tools for data submission, evaluation and exchange for the Regulation of new and existing industrial chemicals, agricultural pesticides and biocides (2003)*
- No. 21 *Guidance for Regulation of Invertebrates as Biological Control Agents (IBCA) (2004)*
- No. 22 *OECD Guidance for Country Data Review Reports on Microbial Pest Control Products and their Microbial Pest Control Agents (Monograph Guidance for Microbials) (2004)*
- No. 23 *OECD Guidance for Industry Data Submissions for Microbial Pest Control Product and their Microbial Pest Control Agents (Dossier Guidance for Microbials) (2004)*
- No. 24 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group Seminar on Compliance (2004)*
- No. 25 *The Assessment of Persistency and Bioaccumulation in the Pesticide Registration Frameworks within the OECD Region*
- No. 26 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Group Seminar on Minor Uses and Pesticide Risk Reduction*
- No. 27 *Summary Report of the OECD Project on Pesticide Terrestrial Risk Indicators (TERI) (2005)*
- No. 28 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group: Seminar on Pesticide Risk Reduction through Good Container Management (2005)*
- No. 29 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group Seminar on Risk Reduction through Good Pesticide Labelling (2006)*
- No. 30 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group: The Second Risk Reduction Survey (2006)*
- No. 31 *Guidance Document on the Definition of the Residue (2006)*

No. 32 *Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006)*

No. 33 *Overview of Country and Regional Review Procedures for Agricultural Pesticides and Relevant Documents (2006)*

No. 34 *Frequently Asked Questions about Work Sharing on Pesticide Registration Reviews (2007)*

No. 35 *Report of the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group Seminar "Pesticide Risk Reduction through Better Application Technology" (2007)*

No. 36 *Analysis and Assessment of Current Protocols to Develop Harmonised Test Methods and Relevant Performance Standards for the Efficacy Testing of Treated Articles/Treated Materials (2007)*

No. 37 *Report on the OECD Pesticide Risk Reduction Steering Group Workshop "Pesticide User Compliance (2007)'*

No. 38 *Survey of the Pesticide Risk reduction Steering Group on Minor Uses of Pesticides (2007)*

別冊 :

OECD Guidance for Country Data Review Reports on Plant Protection Products and their Active Substances-Monograph Guidance (1998, revised 2001, 2005)

OECD Guidance for Industry Data Submissions on Plant Protection Products and their Active Substances-Dossier Guidance (1998, revised 2001, 2005)

Report of the Pesticide Aquatic Risk Indicators Expert Group (2000)

© OECD 2007

本文書の全文または一部の複製または翻訳の許可は下記に申請のこと:
Head of Publications Service, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775
Paris Cedex 16, France

OECD について

経済協力開発機構（OECD）は、北米、欧州およびアジア太平洋地域の先進工業国 30 カ国ならびに欧州委員会の代表が一同に会し、政策の調整および調和を行い、共通課題を討議し、協働して国際問題に対応するための政府間機関である。OECD 業務の大半は、加盟国の代表からなる 200 以上の専門委員会および作業部会が行っている。OECD の多数のワークショップおよびその他場合には、OECD での特別資格を有する非加盟国や関係国際機関がオブザーバーとして参加している。各種委員会や作業部会はフランスのパリを本拠地とする OECD 事務局が運営し、さまざまな部局に統合される。

環境・健康・安全部は、以下の 10 シリーズの文書が無償で提供している。すなわち、**試験および評価、優良試験所基準（GLP: Good Laboratory Practice）および遵守状況のモニタリング、農薬および殺生物剤、リスク管理、バイオテクノロジーにおける規制監督の調和、新規食品・飼料の安全性、化学事故、環境汚染物質排出・移動登録、排出シナリオ文書、および工業ナノ材料の安全性に関するシリーズ**である。環境保健安全(EHS) プログラムおよび EHS 出版物の詳細な情報については、OECD のウェブサイト (<http://www.oecd.org/ehs/>) で入手可能である。

本出版物は、化学物質の適正管理のための機関間プログラム(IOMC)の一環として作成されたものである。本内容は、IOMC の各参加機関の見解や規定を必ずしも反映していない。

IOMC (Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals) は、化学物質の安全性分野において協力体制を強化し、国際協調を推進するために国連 (UN) 環境開発会議が 1992 年に行った勧告を受けて、1995 年に設置された。参加機関は、FAO、ILO、OECD、UNEP、UNIDO、UNITAR および WHO であり、世界銀行および UNDP はオブザーバーである。IOMC の目的は、人の健康および環境に関連して、化学物質が健全に管理されるよう、参加機関が共同または個別に実施する政策や活動の協調を図ることである。

本出版物はインターネットを通じて無償で入手可能である。
本文書および他の環境・健康・安全に関する出版物については、
OECDのウェブサイト (www.oecd.org/ehs/) を参照するか、

下記に連絡のこと

OECD 環境局
環境保険安全部

2 rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16
France

Fax: (33-1) 44 30 61 80
E-mail: ehscont@oecd.org

序文

本文書は残留分析法についてのガイダンスを提供するものである。分析法は、食事による暴露評価のためのデータを作成し、最大残留農薬基準値（MRL）を設定し、加工係数を算定するために用いられている。また、分析法はのちに確立される法的 MRL の施行においても用いられる。分析法は、食用作物・家畜および二次産品、加工食品に使用される農薬、および曝露作物を摂取すると考えられる動物由来の製品（例：肉、牛乳、卵）に関連する農薬のすべてに適用される。さらに分析法は、保存安定性試験の実施においても必要である。

2003年にOECDは、残留農薬化学に関して調和のとれたテストガイドラインおよびガイダンス文書の策定に着手した。調和ガイドラインは、農薬作業部会が農薬登録および再登録について目標を共有しながら作業を進める際に欠かせないものである。調和にあたっては、オーストラリア、カナダ、日本、米国、欧州連合および国際連合食糧農業機関（Food and Agriculture Organisation : FAO）で用いられている食品および動物飼料中における農薬曝露測定のための現行のガイドラインに基づいた。このようなガイドラインから得られるデータは、産業界において国または地域の農薬登録要件を満たすために使用されるだけでなく、MRLに関するFAOの勧告作成にも役立つと考えられる。

本テストガイドラインおよびガイダンス文書のドラフトは、OECDの残留農薬化学専門家グループ（Expert Group on Pesticide Residue Chemistry : RCEG）によって起草された。RCEGは米国を議長国とし、オーストラリア、カナダ、ドイツ、イタリア、日本、オランダ、ニュージーランド、英国、米国、欧州委員会、欧州食品安全機関、FAOおよびクワックライフ・インターナショナル/経済産業諮問委員会（BIAC）の専門家家で構成された。業務の取りまとめおよび問題の特定は、専門家グループに代わり小運営委員会（Steering Committee）が行った。本委員会は大まかに言うと、異なる地域（北米、欧州、アジア、オセアニア）および組織（EC、FAO、OECD）につき1名の専門家グループメンバーから構成された。専門家グループからガイドラインおよびガイダンス文書ごとに1つのドラフト作成チームが選出され、業務を遂行した。

RCEGは、監督を担う登録運営グループ（Registration Steering Group）/農薬作業部会（Working Group on Pesticides : WGP）に対し、ドラフト提示までの初期開発段階を報告した。ドラフト文書はナショナルコーディネーター会合（Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme : WNT）に提出された。

残留農薬化学プロジェクトはいくつかの段階から構成されている。

RCEG活動の第1段階は2004年に開始され、5つのテストガイドライン（501：作物代謝；502：家畜代謝；503：輪作代謝；504：限定圃場輪作残留；505：家畜残留）および2つのガイダンス文書（残留の定義および残留化学試験の概要）の策定を行った。

第2段階は2006年初旬に開始した。WGPのコメントを得るため2006年11月に2つのテストガイドラインおよび1つのガイダンス文書のドラフトが回覧された。RCEGはこれら文書の最終化に向けて、2007年1月16～18日に米国バージニア州アーリントンにある米国環境保護庁（EPA）で会合した。本文書は、最終化する前の2006年1月30日にWNTに送付された。2007年3月の第19回WNT会議において、2つのドラフトガイドライン（保存食品中の残留農薬の安定性および加工食品中の残留農薬の性質-高温加水分解）および残留農薬分析法に関するガイダンス文書が承認された。

本文書は、OECDの化学品グループ（Chemicals Group）と化学物質管理特別プログラム管理委員会（Management Committee of the Special Programme on the Control of Chemicals）の合同会合の責任において発行されるものである。

目次

OECD について.....	12
序文.....	14
緒言	17
目的.....	18
バリデーションパラメータの定義	18
回収率	18
選択性（特異性）	18
キャリブレーション	18
併行精度（繰返し性）	19
再現性（再現精度）	19
検出限界（Limit of Detection : LOD）	19
定量下限（Limit of Quantitation : LOQ）	19
総論.....	20
対象とする分析対象化合物	20
抽出効率／ラジオバリデーション.....	20
確認方法.....	21
誘導体化.....	22
共通構造分析法（Common Moiety Methods）および非特異的分析法	22
登録前分析法のバリデーション.....	23
バリデーションのためのマトリックス数.....	23
バリデーションレベル	24
添加実験数	24
キャリブレーション	24
内標準および操作標準の使用	25

MRL 施行のための分析法（登録後）	25
独立した試験室によるバリデーション試験（登録後）	26
独立したバリデーションにおける代表マトリックス数	27
ILV のバリデーションレベル：LOQ-MRL	27
添加実験数	27
キャリブレーション	27
分析法のための最低限の性能特性	28
許容回収率の範囲.....	28
選択性（マトリックス干渉）	28
精度 - 併行精度(RSDとして表される)	28
安定性試験.....	29
最終液量の抽出液中の分析対象化合物の保存安定性試験	29
ワーキング溶液（添加／キャリブレーション）の安定性	30
試験報告書.....	30
参考文献.....	32
付属文書1 登録前および登録後分析法バリデーションのための食品分類	34

緒言

1. 本文書は、残留分析法についてのガイダンスを提供するものである。分析法は、食事による曝露評価のためのデータを作成し、最大残留農薬基準値（MRL）を設定し、加工係数を算定するために用いられている。また、分析法はのちに確立される法定 MRL の実施においても用いられる。分析法は、食用作物・家畜および二次産品、加工食品に使用される農薬、および農薬処理作物を摂取すると考えられる動物由来の製品（例：肉、牛乳、卵）に関連する農薬のすべてに適用される。さらに分析法は、保存安定性試験の実施にも必要である。
2. 申請者が規制施行のために個別（単一成分）分析を申請する場合、本文書により独立した試験室によるバリデーション要件を含む分析法バリデーション基準に関するガイダンスが用意されている。一般に、単一残留成分についての登録前分析法と登録後分析法に対する精度基準はほぼ同様である。特に登録後個別分析法に係る情報については 48 項と 49 項に抜き出した。代表食品についてはフルバリデーションを行う必要があるが、管理圃場試験ではバリデーションのデータ量を少なく抑えることのできる添加試験が行われる。一定の分析法が用いられる場合は、分析法について毎回フルバリデーションを行う必要はない。
3. 分析法には、特定の農薬に関する残留の定義に基づく分析対象化合物が含まれることに留意することが重要である。「残留化学試験の概要に関する OECD ガイダンス文書」（本文書の 77(a)項参照）に記載の通り、食事リスク評価に用いられる残留定義は、MRL の規制施行に用いられるものとは異なるため、分析法も異なってくる。ある分析法で残留定義の対象成分をすべてカバーできない場合には、2 通り以上の分析法が必要になることがある。
4. 規制施行のための登録後分析法について、公式の監視試験所は、多数の分析対象化合物をカバーする多成分残留分析法を推奨している。MRL の規制施行においては、多成分残留分析法は国によって異なり、使用可能な設備や個別の試験所の能力によるところが大きい。本ガイダンスは規制当局の多成分残留分析法に取って替わることやこれに優先することを意図するものではない。当該分析法のバリデーション基準については別途文書に記載されている（本文書の 77(b)、77(c)、77(d)および 77(e)項参照）。分析対象化合物が多成分残留分析法に従うことができないときは、個別分析法を用いることができる。

目的

5. 分析法バリデーションの目的は、手順が正しく用いられた際に、その手順によって目的に合致した結果が得られるかどうかを判定することである。本ガイダンスでは、農薬の承認および登録申請の一環として、分析法の妥当性を確認するために実施すべき手順について述べる。大抵の場合、以下の目的を満たすには分析法開発およびバリデーションにおいて 2 通り以上の分析法が必要となる。

6. 分析法の条件は次の通りとすべきである：残留の定義（リスク評価と規制施行の両方における）に含まれると考えられる全ての分析対象化合物を定量する能力を有する；十分な選択性を有することで干渉物質が分析定量下限値（LOQ）の 30%を決して超えない；許容される回収率および併行精度を示す；農薬処理対象のすべての作物、動物および飼料をカバーする。重大な残留が発生した場合は、処理画分および飲料水をカバーし、食用動物が農薬処理作物を摂取する可能性が高い場合は、すべての動物性食品をカバーする。しかしながら、一部の規制当局ではこのような食品に残留が検出されることは想定していないにもかかわらず輸出入のために動物性食品に対し MRL を設けることになる。よって、規制施行における分析法には適切な LOQ を示し、MRL を LOQ に設定することが求められる。

バリデーションパラメータの定義

7. 分析法は、意図した目的に沿うため一定のバリデーションパラメータ基準に合致すべきである。残留分析法に対する一般的なバリデーションの特性として、回収率、選択性（特異性）、キャリブレーション、精度（併行精度（繰返し性）、再現性（再現精度））、検出限界（limit of detection: LOD）および定量下限（limit of quantitation: LOQ）を考慮すべきである。

回収率 Recovery

8. 回収率は、検出可能レベルの分析対象化合物を含まないか、または既知の検出可能レベルの分析対象化合物を含む適切なマトリックスの試料に最初に添加された分析対象化合物（有効成分および関連代謝物）の量に対する百分率として測定される量である。回収実験によって、精度と真度（バイアス）の両方に関する情報が得られ、結果として分析法の精確さが得られる。

選択性（特異性） Selectivity (Specificity)

9. 選択性とは、混合物中またはマトリックス中の特定の分析対象化合物を、同様の挙動を示す他の化合物の干渉を受けずに、分析法が判別することができる程度をいう。選択性に対して特異性という用語を用いる規制当局もある。

キャリブレーション Calibration

10. キャリブレーションとは、検出系が機器応答と試料中の分析対象化合物濃度との間に許容される明確な相関を示す能力をいう。測定される分析対象化合物濃度は、定義された機器のダイナミックレンジ内にあるべきである。

併行精度（繰返し性） Repeatability

11. 併行精度とは、同一試験室で、同一技師が、同一の機器を用いて短時間の内に同一の試験物質に対して同じ分析法を用いて得られた、相互に独立した試験結果間の一致の程度をいう。併行精度（分析ラン内効果）には、1回の操作内においてばらつきのある手順のあらゆる部分による寄与度が含まれ、これには正常な重量誤差および容量誤差、試験物質の不均一性、分析中の他の測定誤差による寄与度などが含まれる。

再現性（再現精度） Reproducibility

12. 再現性（再現精度）とは、同一の試験物質に対して同じ分析法を用いるが、異なる条件下で得られた、独立した試験結果間の一致の程度をいう。試験室内（within-laboratory または intra-laboratory）再現性または単一試験室再現性（分析ラン効果）は、分析系において作業者、試薬バッチ、機器のキャリブレーションおよび試験室環境（温度変化など）の変化により日差変動に寄与する。試験室間、試験室内または多試験室間再現性（試験室効果）は、キャリブレーション用標準の変動、現地でのプロトコル解釈の相違、機器や試薬供給元の相違、または平均的気候条件などの環境因子の差異といったさらなる変動に寄与する。

検出限界（Limit of Detection : LOD）

13. 分析手順の検出限界とは、検出は可能であるが必ずしも正確な値として定量化することができない試料中の分析対象化合物の最低量である。検出限界では、特定の分析法を用いた規定のマトリックス中での検出について、妥当かつ／または規定の信頼性をもって陽性と判定することが可能である。LOD は常時必要とされるわけではない。しかしながら、精査（または他の目的）のために必要とされる場合は LOD の算定方法について説明すべきである。

定量下限（Limit of Quantitation : LOQ）

14. 定量下限（LOQ）は、規制上の観点から分析対象化合物を明確に同定し、許容される平均回収率とこれに伴う相対標準偏差（relative standard deviation: RSD）が得られる最低試験濃度と定義される。LOQ は測定下限（limit of determination : LOD）または分析法バリデーション下限（Lowest Limit of Method Validation : LLMV）とも呼ばれる（本文書の 77(e)~77(l) 項参照）。LOQ は、分析法が意図した目的を達成するに十分低い値となるべきである。分析法の観点からは、LOQ の推定値をノイズの標準偏差の 6~10 倍として、添加実験によって検証する。特に記載がない限り、本文書では規制の観点から定義された LOQ を指すものとする。

総論

15. 本ガイダンス文書では節を設け、残留分析法のニーズごとに言及する。題目として、抽出効率／ラジオバリデーション、確認法、誘導体化、共通構造分析および非特異的分析法、分析法バリデーション基準および報告すべき情報について述べる。

対象とする分析対象化合物

16. 上述の通り、登録前に用いる分析法は通常、食事リスク評価で用いられる残留の定義に含まれる分析対象化合物に適用される。分析法は、試料マトリックスの存在下において有効成分および／または関連代謝物（変換生成物）を測定する能力を有すべきである。試料中に有効成分または関連代謝物の異性体、類似体などが2つ以上含まれる場合、当該分析法は、食事リスク評価での必要に応じて個々の異性体／類似体を同定すべきである。

17. 登録後分析法は、MRLの規制施行に関連する残留物の定義によって、登録前の分析法とは異なる分析対象化合物を検討することがある（本文書の77(a)項の参考文献「残留化学試験の概要に関するOECDガイダンス文書」を参照）。

抽出効率／ラジオバリデーション Extraction Efficiency / Radio-Validation

18. 残留分析法は残留定義の全成分について測定可能であるべきである。残留定義に複合体または結合体が含まれている場合、分析法には「結合」残留成分を解離するのに適切な方法が含まれるべきである。

19. 抽出効率は分析法開発の鍵とみなされており、一般的に使用された抽出溶媒および条件（温度、pH、時間）に関するデータが提示されるべきである。低い抽出効率は、分析法のバイアスの主な原因となり得る。抽出効率は、分析結果の精確さに大きく影響する可能性がある。しかしながら、抽出効率は、分析直前に添加した試料を用いて行われる従来の回収試験では検証できない。残留定義に含まれる全残留成分の効率的な抽出に関する頑健性バリデーションは、残留成分が試料に到達する通常の経路を経て含有される試料を用いた場合のみ実施可能となる。通常、代謝試験がこれにあたり、抽出効率は放射性標識された分析対象化合物を用いた方法で測定することができる。留意点として、植物および動物由来食品中の結合残留異物に関するIUPAC報告（本文書の77(n)項参照）では次のように推奨されている。すなわち「残留分析法で用いられる抽出手順は、放射性標識試験からの（実残留）試料を用いてバリデーションを行うべきである。」

20. 理想的には、代謝および輪作作物試験で用いた対象食品を、登録後分析法および管理圃場試験や輪作作物試験における残留データ収集に用いる分析法についての、抽出効率測定のために確保すべきである。試験報告書には選定された食品の根拠についても記載すべきである。確保された食品は、放射化学手順（放射線検出器を用いた燃焼分析、液体シンチレーションカウンターおよびクロマトグラフ分析）によって抽出効率が容易に測定できるよう対象とする分析法での抽出手順に供すべきである。抽出効率は、代謝試験で得られた抽出量と比較することができ、代謝試験では、食品に対し分析対象化合物と想定されるほとんど（全部が無理であれば）の成分を抽出するようデザインされた厳格な抽出手順を用いているものとする。この比較はラジオバリデーションとして知られ、可能であればすべての分析法の抽出スキームについて実施すべ

きである。代替として、代謝試験からの試料について、アセトン+水、酢酸エチルおよびアセトニトリルなどのよく使用される抽出溶媒を用い、残留定義において推定される化合物の抽出効率比較試験を行うことができる。

21. 抽出効率に関する試験は、代謝試験または分析法開発試験の一部とすることができる。いずれの場合も、本試験結果は登録前および登録後分析法のいずれの開発にも欠かせないものであることから、関係する分析法バリデーション報告に記載すべきである。
22. 例外的なケース（例：登録前分析法において共通構造アプローチが用いられている場合、または広範な酵素切断ステップが含まれている場合）では、追加の精製ステップおよび回収率実験を含むフルラジオバリデーション実験（アカウンタビリティ試験）が是認される。
23. 新規分析法の開発に代謝試験の試料がもはや利用できない場合、2つの溶媒系の間を「橋渡し」することが可能である。例えば、管理圃場試験で得られた実残留試料を用いて、第1段階では代謝試験に適用した条件下の溶媒系を用いて抽出し、第2段階では検討中の溶媒を用いて抽出することが可能である。抽出効率に関する情報は、分析結果を直接比較することにより得ることができる。

確認方法

24. 通常、一次残留分析法が目的の分析対象化合物に特異的であり、分析対象化合物/残留物の起源がわかっている場合、追加の確認分析を行う必要はない。特に、登録前またはデータ作成目的のためだけに開発された分析法がこれにあたる。場合に応じ、例えば最初の分析法が免疫アッセイであるか、または試料保管中に生成した分解物の同一性確認のための分析では、追加確認が必要になる場合がある。
25. 確認方法は、非常に特異的な手法を用いる場合（下記参照）を除き、単一残留成分の登録後分析法または MRL 施行のための分析法に用いられ、分析法の感度を確認するものである。適切な確認方法を選択するには、分析対象化合物の特性を考慮すべきである。
26. 元となる分析法が質量分析法や他の非常に特異性の高い方法に基づいている場合は、通常、別途確認分析を行う必要はない。例として、GC/MS は、同定/定量に m/z が 100 以上のフラグメントイオンを 3 つ以上用いれば、分析対象化合物に対し非常に特異性が高いと考えられている。選択したイオンはその選定理由とともに報告すべきである。HPLC/MS-MS の場合、2組のイオンランジションについてバリデーション済みであれば非常に特異性が高いとみなされる。このような条件下では、追加の確認分析法は必要ない。
27. 許容される確認方法とみなされる方法は次の通りである。GC/MS または LC/MS、ただし十分な数のイオンがモニターされ、選定理由が示されている場合とする。HPLC/DAD、ただし LOQ で添加された試料において特有の UV スペクトルを示す場合。この場合、測定条件下で得られた UV スペクトルが提出されるべきである。他の許容される確認方法としては、基本の分析法から逸脱した代替クロマトグラフィー（HPLC \leftrightarrow GC）、代替検出法、誘導体化（第1選択の分析法ではなかった場合）、クロマトグラフィーにおける選択性に差異のある顕著に異なった固定相または移動相の使用などがある。さらに、さまざまな分離および精製手順も確認に有用な場合がある。

誘導体化

28. 非常に極性が高い化合物やクロマトグラフ特性に乏しいような化合物の分析では、誘導体化を必要とする場合がある。誘導体化はクロマトグラフ分析の前やクロマトグラフ手順の一環として行われる（カラム前またはカラム後）。誘導体化法を使用した場合は全手順および根拠について報告すべきである。誘導体化は安定かつ再現性があるべきである。誘導体の測定に基づいて定量が行われる場合、誘導体の標準液を用いてキャリブレーションを行うことが望ましいが、誘導体化手順が検出システムに不可欠なものである場合はこの限りではない。標準品として誘導体が入手できない場合、試料に適用されるのと同じ誘導体化手順により分析セット内で誘導体を生成すべきである。このような場合は、十分な根拠を提示すべきである。可能であれば誘導体化手順の平均回収率および精度を示すべきである。誘導体化された化学種がその分析対象化合物に特異的であれば、分析法は目的の分析対象化合物に対して特異的であるとみなされる。しかしながら、形成される当該誘導体が 2 種以上の有効成分または代謝物に共通するものである場合や、他の有効成分として分類されるような場合、分析法は非選択的であるとみなされるべきである。

共通構造分析法および非特異的分析法

29. 分析対象化合物によっては、特定の残留分析法がないことや実施が難しい場合がある。このような場合、全成分に毒性学的に重要と考えられる共通構造が含まれ、かつ単一の成分では残留濃度のマーカーとして不十分な場合、共通構造への換算が妥当である。

30. 植物および動物製品の残留試験データの作成において、リスク評価目的で多成分残留定義が必要となる場合、共通構造分析法を用いることができる。

31. 通常、非特異的分析法の使用は勧められない。適切な分析法を選択するにはリスク評価と MRL 遵守の両方のニーズを考慮すべきである。規制施行のための残留定義に多成分が含まれる場合、膨大な数の分析法が必要となる可能性がある。このような場合、「共通構造分析法」が必要とされる。非特異的分析法および共通構造分析法の欠点は次の通りである：

- a) 非特異的分析法が使用された場合、分析対象化合物の起源の識別には疑問の余地が残る可能性が高い。例えば、この分析法は、目的とする分析対象化合物と共通の構造を有するか、または共通の化学種に誘導体化されたか、あるいは目的の分析対象化合物から分離することができない分解生成物も検出する可能性がある。このような方法は、他の構造類似化合物による干渉を受けることがある。
- b) 保存安定性試験の一環として保管されていた製品中の有効成分の含有量を分析する際、有効成分に特異的ではない分析法によって安定性／分解を判定することは不可能である。
- c) 分析法が毒性の異なる 2 種以上の異なる有効成分について、共通の構造を判定する場合は残留物の由来を同定し、毒性学的に意味のある残留成分に関するリスク評価を行えるようにすることが望ましい。

32. 実際、該当する場合は、規制当局が 2 組の残留定義（1 組はリスク評価用、もう 1 組は MRL 遵守のモニタリング用）を柔軟に設定し得るような方法によってデータを作成しなければならないことがある。このような場合、可能であれば申請者は、共通構造分析法を実施するよりも残留定義の個々の成分を別個に分析するべきである。あるいは、共通構造分析法が実際のルーチンモニタリングおよび妥当な

費用での MRL 施行に不相当である場合には、最初の分析は共通構造分析法によって行い、次いで、適切な標的分子について圃場試験の試料の一連の分析を併行して行うべきである。モニタリングのために実施できる適切な方法を考慮すべきである。

33. 非特異的分析法および共通構造分析法は、他に目的の分析対象化合物を測定する実際的な方法がないといった例外的な場合にのみ認められるものとする。このような場合は十分な根拠を提示すべきである。根拠には当該化合物を特異的分析法で測定できない理由についての説明が含まれるべきである。共通構造分析法を行う場合、残留定義に関連するすべての成分について別途バリデーションデータを提示すべきである。

登録前分析法のバリデーション

34. 通常、残留分析法は分析法が適用されるすべてのマトリックスについてバリデーションを行うべきである。バリデーションの範囲はすでに入手可能な情報や報告がどれほどあるかによる。フルバリデーションデータ（下記に記載）は、新規の分析法であるか、または既存の分析法に大きな変更があった場合（例：溶媒系や定量方法の変更）のみ必要となる。このような変更は、分析法を異なる食品に適応するとき必要になると考えられる。以前に妥当性が確認された既存の分析法を食品分類内（付属文書 I に記載）の「類似」食品に適応させるとき、通常、削減または限定バリデーションセットで十分である。削減バリデーションセット（ときに精度管理データセットともいう）は一般に管理圃場試験報告の中で報告されるが、フルバリデーションデータについては別途 GLP 報告書に含まれる。

バリデーションのためのマトリックス数

35. 植物材料が関係する試験の場合、食品の数は製品の使用目的によって決まる。分析対象となるすべてのマトリックスについてのバリデーションデータを提出すべきであり、食事リスク評価のための残留定義にある全成分についてバリデーションを行うべきである。

36. 該当する場合、付属文書 I に記載の各代表食品分類から、それぞれ 1 つの生鮮農産物（raw agricultural commodity: RAC）について主にフルバリデーション実験を実施すべきである。高タンパクおよび高でんぷん食品の場合、両方の食品マトリックスについてフルバリデーションを実施する必要はない。代わりに、両方の食品分類を代表する 1 種類の乾燥（低水分含量）食品を選定する。

37. 食品分類スキームは、代表食品を用いて分析法の妥当性が正常に確認された場合、当該分析法が同じ分類内のすべての食品で機能することを意味するものではない。2 種類以上の非常に類似した食品が分析される場合には（付属文書 I 参照）、マトリックスの比較可能性および削減させたバリデーションデータセットの事例を考慮されるかもしれない。削減バリデーションデータは、同じ食品分類に属する食品に対して認められるが、MRL を検討しようとするすべての食品についてはまだ必要である。

38. **可溶性**の天然物を多く含む食品（例：タバコ、ホップ、コーヒー、茶およびスパイス類）は、対象とする分析対象化合物に干渉する可能性がある。干渉は選定した分析法および化合物の性質に大きく左右され得る。このような問題あるマトリックスの場合、分析法の適合性を証明するため通常はフルバリデーションデータが必要となる。

39. 加工食品中の残留物測定法についてバリデーションを行うべきである。RAC と加工

食品の両方について分析法が実質的に同じ場合は、限定または削減バリデーションで十分である。

40. 動物が農薬を使用した作物を摂取している可能性が高い場合、および飼養試験が要求／提出される場合、動物由来食品中の残留物測定法については、マトリックスとして牛乳、卵およびすべての食用組織中においてバリデーションを行うべきである。組織には通常、ウシの筋肉、脂肪、肝臓および腎臓ならびに家禽の筋肉、脂肪および肝臓が含まれる。ほとんどの場合、ウシ由来食品についての回収率データは、ヤギ、ブタ、ウマ、ヒツジおよび家禽由来食品に有効である。

バリデーションレベル

41. 提案された LOQ および予想される残留レベルまたは $10 \times \text{LOQ}$ に適合する 2 つの添加レベルについてデータを作成すべきである。また、残留試験の試料分析中に併行して回収率を測定し、残留試験の結果とともに報告すべきである。要求される LOQ は、リスク評価または MRL 施行が必要とする感度によって異なり、対象とする各分析対象化合物について一般的に $0.01 \sim 0.05 \text{ mg/kg}$ の範囲にあるべきである。場合に応じ、毒性の懸念がない場合はこれより高いレベルでも許容される（例：難分析マトリックス）。

42. 回収率測定に用いられる試料は未処理の食品のものとし、試料に既知量の分析対象化合物を添加し、サンプリング誤差を避けるため試料全部を分析する。新しい技術はあまり試料量を必要としないため、より高い均一性が求められる。結果は、試料中の分析対象化合物の既知の「含有量」と比較すべきである。分析対象化合物による汚染または干渉の有無を判定するため対照（未添加）試料についての併行分析を行うべきである。

添加実験数

43. フルバリデーションのデータセットを作成するため、2 添加レベルのそれぞれについて、2 対照試料とともに 5 反復試料で分析を実施すべきである。試料数がこれより少ない場合には根拠を示すべきである。削減データセットでは、各バリデーションレベルで少なくとも 3 反復試料と 1 つの対照試料の測定（試料に検出可能な残留物が含まれていないことを証明するため）を用いるべきである。

キャリブレーション Calibration

44. 分析用のキャリブレーションは、当該分析溶液中の分析対象化合物の最低および最高設定濃度に対して適切な範囲に拡張して作成すべきである。3 濃度以上で 2 反復測定を行うか、または 5 濃度以上で単一測定を行うべきである。検量線の計算式および回帰パラメータ（例、相関係数 (r)）について報告し、代表的なキャリブレーションプロットを提出する必要がある。非線形のキャリブレーションを用いる場合、説明（どのようにキャリブレーションの精確性を維持するのかを含め）を記載すべきである。クロマトグラフ系または検出系の応答に対する、試料の共抽出物によるマトリックス増強効果または抑制効果の可能性について言及すべきである。適切な場合、分析対象試料のマトリックスと同様のマトリックスに溶解した標準液（マトリックスマッチング標準）を用いて検出系をキャリブレーションすることができる。

45. キャリブレーションが直線性を示している場合は、1 点キャリブレーションを

用いることができる。キャリブレーションモデルは、100 倍の濃度レベル範囲（例：0.01～1.0 mg/kg）のみをカバーするものであり、1 点レベルは妥当性が確認されたキャリブレーション範囲内にあるべきであることに留意すること。通常、評価には 1 濃度レベル（試料中の推定される量に相当）の複数回反復測定が用いられる。

内標準および操作標準の使用

46. 操作標準（procedural standard）は、分析法に規定された試料調製手順の一部または全部に標準品を添加して得られる標準とみなされる。誘導体化手順から生成された操作標準を用いた分析法は、一定の条件下で許容される場合がある。誘導体化された標準が不安定または提供できない場合は、申請者は手順の効率性および再現性を示すデータを提示しなくてはならない。

47. 内標準は、分析対象化合物の同定および／または定量測定を容易にするために、分析の特定の段階において既知量で添加される化学物質である。内標準の使用は、一定の条件下でのみ認められ、通常は最終抽出液（定量前）に添加される場合である。このような使用方法では、内標準は目的的分析対象化合物と同様の挙動を示すべきである。内標準は、分解やマトリックス効果を起こしにくいものとすべきである。しかしながら、各段階（抽出、精製など）において分析対象化合物および内標準の挙動が非常に類似していることを示す各マトリックスの多数の試料についてのデータを利用可能でなければ、回収率補正のために全操作を通じて内標準を使用することは許容されない。十分に許容される内標準法の例は、質量分析による定量を容易にするための安定同位体（例： $2H$ 、 $13C$ ）の使用である。

MRL 施行のための分析法（登録後）

48. 通常、登録後分析法は、MRL が設定されている植物および動物由来のマトリックスについてのみ用いられる。すべての残留物が LOQ 未満であると報告されている場合、申請者は MRL 設定のガイダンスについて規制当局に相談することが推奨される。MRL が設定されていないのであれば、申請者は登録後分析法について詳細を提示する必要はない。

しかしながら、規制当局によっては、食品中に残留物が想定されなくとも輸出入のために MRL を設定する場合がある。よって、規制施行における分析法には、適切な LOQ を示し、MRL を LOQ に設定することが要求される。

49. 通常、分析法は、MRL の設定および施行に関連する残留の定義に含まれる分析対象化合物をカバーすべきである。MRL に含める残留物の選定に関する議論は「残留化学試験の概要に関する OECD ガイダンス文書（OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies）」（本文書の 77(a)項参照）に記載されている。分析法は、迅速かつ操作が簡便で、一般的に利用できる手技／機器を用い、有害物質（例：クロロホルム、ベンゼン）を使用しないものとすべきである。規制施行の一環として当該技術が使用可能であるかどうかについては適宜検討すべきである。分析技術は常に発展していると認識されている。しかしながら、新しい技術が一般に受け入れられ、規制施行試験所で利用可能になるまでには時間がかかる場合がある。

50. 一般に、規制施行試験所は、試料中に存在が想定される全化合物に対し、個別の分析法を適用できるような十分な処理能力がないため、登録後の分析法では、たとえ回収率が特定の個別分析法よりも良好でないとしても、個別分析法に比べ多成分残留分析法の方が

明らかに望ましい。

51. 適用可能であれば、申請者はまず、既存の多成分残留分析法の適合性を確認すべきである。分析速度、LOQ および対応できる分析対象化合物数に関して規制施行試験所の要求を満たす今日の最新の多成分残留分析法は、大部分は HPLC/MS-MS または GC/MS 定量法に基づくものである。登録後分析法として、多成分残留分析法の一つが許容可能と判明した場合は、バリデーションの要件について本ガイダンスの 4 項で引用された文書を参照すること。妥当性が確認された多成分残留分析法に、陽性結果を明確に確認するためのクロマトグラムやスペクトルが別途含まれていない場合、申請者は特定の確認分析法を提示する必要がある。

52. 新規化合物が、広く確立した多成分残留分析法によって分析可能であることを検証するため、異なる重要なステップを試験するモジュールアプローチおよび段階的アプローチを用いることが望ましい。多成分残留分析法のチェックには少なくとも次のステップが含まれる：

- a) 質量分析：適切なイオン化法、適切なイオンおよびトランジション（定量および確認的）の選択
- b) クロマトグラフィの挙動：適切な HPLC または GC 条件の選択（GC の場合：初期気化挙動）
- c) 精製：適切な手順の選択（例：固相抽出、ろ過、液／体分配）
- d) 抽出：適切な溶媒系の選択（例：メタノール／水、アセトニトリル／水、アセトン）
（本ガイドラインの 18～23 項参照）
- e) キャリブレーション：適切なキャリブレーション関数および標準溶液調製手順の選択

順序は、想定される定量法の選択に依存する。例えば、GC 分析法の場合は、最初に気化挙動の確認が必要となる。

MRL 施行においては、多成分残留分析法に適用される分析法は国によって異なり、使用可能な機器や個々の試験室の能力に大きく依存する。本ガイダンスは規制当局の多成分残留分析法に取って替わることやこれに優先することを意図するものではない。更なるバリデーション基準については、別途文書に記載されている（本文書の 77(b)、77(c)、77(d)および 77(e)項参照）。

独立した試験室によるバリデーション試験（登録後）

53. 登録前分析法では、独立した試験室によるバリデーション（Independent laboratory validation: ILV）試験は通常必要ない。多成分残留分析法および個別残留分析法における ILV の要件は世界の各地域によって異なる。米国の登録では、独立した試験室によるバリデーションは、申請者が提案した個別分析法のみに要求されるが、欧州での独立した試験室によるバリデーションは、一般的に、確立した多成分残留分析法の適合性を証明するためにも要求される。

54. 登録後分析法は、MRL 遵守のための残留の定義に含まれる全化合物の測定に適合すべきである。分析法の適合性は適切な実験によって証明されるべきである。少なくとも 1 つのマトリックスについて独立してバリデーションを行うべきである。通常は、MRL が設定されている中で最も分析が困難な対象作物／食品とする。登録後分析法の重要な目的の一つは、誤用を検出することである。したがって、規制当局によっては、ILV の必要性は必ずしも対象作物に限定されない。欧州の一部の国々では、一般に、付属文書 I に記載されている各食品分類からそれぞれ 1 つの代表食品について ILV データが要求される。乾燥食品の場合、高タンパクまたは高でんぷん食品群のいずれかから 1 つの代表食品を選定することができる。ILV の対象となる食

品数に関する詳細については、本文書の 56 項および 57 項に記載する。

55. ILV 試験の実施に選出される試験所は、分析法開発およびその後の分析法の使用に関与してはならない。この基準に合致しているのであれば、ILV 試験の実施に選出される試験所は、申請者の組織内にあってもよいが、所在地が同じあってはならない。選出された試験所が、分析を行うにあたって分析法の開発者と連絡を取る必要がある場合、このことについて報告すべきである。また、元の分析法にその後追加や変更がある場合も報告すべきである。

独立したバリデーションのための代表的なマトリックス数

56. ILV データは、付属文書 I に記載された各食品分類からそれぞれ 1~4 種類までの生鮮食品 (RAC) について提出されるべきである。選定された食品は、その食品分類を代表するものであることが望ましい。高タンパクおよび高でんぷん食品の場合、両方の食品分類の代表マトリックスについて ILV を実施する必要はないが、いずれか 1 つの乾燥 (低水分含量) 食品をバリデーションに含むべきである。

57. 動物由来製品中の残留物を測定するための登録後分析法に関する ILV 試験については、MRL が設定されているか設定される可能性がある場合、必要に応じ次の動物性食品、すなわち乳、卵、肉および/または脂肪、および腎臓および/または肝臓を用いるべきである。

ILV のバリデーションレベル : LOQ-MRL

58. ILV では、LOQ および MRL での添加を含むべきである。規制目的に適切な LOQ の選定については本ガイダンスの 14 項で述べている。残留レベルが低い場合、LOQ は 0.01~0.05 mg/kg とすべきである。適切な LOQ の選択は、分析対象化合物/マトリックスの組み合わせに依存する。しかしながら、申請者には、最新の技術を用いた低 LOQ での残留物測定が可能な分析法の開発が推奨される。高 LOQ が選択される場合 (例: 難分析マトリックス) は、いかなる場合でも、申請者は完全な正当性を示すべきである。

添加実験数

59. 回収率データは次の添加レベルについて作成されるべきである。すなわち、LOQ (5 試料)、10×LOQ または MRL のうちどちらか大きい方 (5 試料)、および対照 (2 試料)。

マトリックスの分析が困難で想定される残留物の毒性学的重要性が小さい場合 (例: マイナー使用)、削減した試料セットでよい場合がある。しかしながら、最低 6 試料 (各添加レベル 3 試料) および 1 対照試料とする。

キャリブレーション

60. 分析用のキャリブレーションは、当該分析溶液中の分析対象化合物の最低および最高設定濃度に対して適切な範囲に拡張して作成すべきである。3 濃度以上で 2 反復測定を行うか、または 5 濃度以上で単一測定を行うべきである。試験報告とともにキャリブレーションに関する生データを提示する必要がある。

分析法のための最低限の性能特性

61. 分析法が目的に適合していることを証明するため、性能特性に関する情報を提示すべきである。以下に示した性能特性は、登録前分析法および登録後個別残留分析法の双方にとって重要である。

許容可能な回収率の範囲

62. 通常、各食品についての各添加レベルでの平均回収率は表 1 に示す範囲内にあるべきである。特定の正当な理由がある場合、精度データが許容可能であるまたは濃度レベルが非常に低い場合であることを条件として、分析が困難なマトリックス（例：タバコ、ホップ、コーヒー、茶およびスパイスなどの）については、この範囲外の回収率も許容される。マトリックス効果が認められる場合、マトリックスマッチング標準を用いて回収率を補正することができる。

選択性（マトリックス干渉） Selectivity (Matrix Interference)

63. 未補正の回収率およびブランク（対照）値を報告すべきである。分析対象領域のブランク値（無農薬処理試料および操作ブランク）は、添加実験に用いたマトリックスから測定されなければならない。LOQ の 30%を超えてはならない。これを超える場合は、詳細な正当性を提示すべきである。ピーク抑制やピーク増強といったマトリックス効果は、HPLC/MS-MS や GC などの技術によっても起こり得る。したがって、未処理試料（精度管理試料）の最終液量に標準液を添加し、これらの効果を調べるべきである。

精度 – 併行精度（相対標準偏差として表される）

Precision - Repeatability (expressed as relative standard deviation)

64. バリデーション試験における分析法の精度は、各添加レベルにおける併行精度の相対標準偏差（RSD）として報告すべきである。上記の通り、各添加レベルで 5 試料の測定を行うべきである。一定の正当な理由がある場合（例：難分析性マトリックスまたは非常に低い濃度レベルの場合）には、より大きな変動が許容される場合がある。濃度レベルと併行精度の相関を表 1 に示す。

併行精度の値は、 $0.67 \times \text{Horwitz}$ の式 ($\text{RSD} = 2^{(1-0.5\log C)}$) より算出
ここで C は濃度のことである ($1 \text{ mg/kg} = 10^{-6}$)。

表 1：残留農薬分析に関する試験室併行精度基準¹

濃度レベル	併行精度 (RSD)	平均回収率 (%) の範囲
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	35	50 - 120
$> 1 \mu\text{g/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$	30	60 - 120
$> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$	20	70 - 120
$> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1.0 \text{ mg/kg}$	15	70 - 110
$> 1 \text{ mg/kg}$	10	70 - 110

¹ 残留分析における GLP ガイドライン、CAC/GL 40-1993, 修正 1-2003 [77(c)項参照]

65. 適切な統計学的方法（例：Grubbs または Dixons 検定）を用いて外れ値が検出された場合、このことは正当化されるべきである。各添加レベルにつき最大 1 つの外れ値をは無視することができる。1 つの添加レベルで 2 つ以上の外れ値が検出された場合、バリデーション試料を追加し、説明を提示することができる。
66. 登録後の個別残留分析法に関する ILV 試験における分析法の精度は、併行精度として報告すべきである。含まれる試験室数が少数であるため、結果を統合して室間再現性を定義することはできない。よって、個々の試験室には、登録前分析法と同じ RSD 基準（表 1 参照）を適用する。
67. バリデーションにおいて許容できない結果のばらつきが認められた場合、分析法の性能に大きく影響するような分析パラメータを特定し、これを制御するよう努めるべきである（堅牢性試験）。分析法の堅牢性とは、分析手順に規定されている条件から軽微な変更があった場合に生じる結果の変化に対する抵抗性である。

安定性試験

最終液量の抽出液中の分析対象化合物の保存安定性試験

68. バリデーション試料は、最初の抽出から 24 時間以内に分析するのが理想的である。ある状況下では、それよりも長期に室温（例：オートサンプラー内）又は冷蔵庫（例：分析が 1 作業日で完了できない場合）で保存されることがある。このような場合、最終液量の抽出液中の分析対象化合物の保存安定性に関する情報を提供すべきである。
69. **最初の抽出物中の安定性に関する関連情報は、時には代謝試験から得ることができる。**一般的に代謝試験では、抽出物のクロマトグラフィープロファイルは、数日から数カ月の期間にわたり調査される。分析対象化合物が類似の溶媒系において同様の条件下で安定であった場合、短期間の保存中に分解が起こるとは考えにくい。
70. 最終段階またはいずれかの中間段階における安定性に関する関連情報は、分析法バリデーション中に実施された添加実験から得ることができる。添加試料の回収率が 70~120%の許容範囲内であれば、安定性は十分に証明される。
71. **例えば、分析対象化合物の急速な分解が予想される場合などの例外的ケースに限り、**さらに別の調査が必要となる。これらの別の調査の間に、保存した抽出液／最終液量抽出液の回収率データを新たに調製した抽出液のデータと比較する。試験には代表マトリックスを選択することで十分である。安定である場合は、付属文書 I に記載の全食品分類から得られた抽出液について分析する必要はない。試験を行った保存条件は報告し、分析中に適用された一般的な保存条件を反映すべきである。
72. **冷凍条件下での抽出液の長期安定性に関する要件は、「保存分析試料中の残留農薬の安定性に関する OECD ガイドライン」（77(m)項参照）に記載されている。**

ワーキング溶液（添加／キャリブレーション）の安定性

73. 管理された保存条件下での安定性が実証されている場合、添加溶液およびキャリブレーション溶液を長期間にわたり使用することができる。そうでない場合には、溶液は毎日新たに調製しなくてはならない。

74. 安定性試験の期間は、一般的な用途を反映すべきである。通常、それらは数日から数週間にわたって使用される。通常、溶液は数日から数週間にわたって使用される。試験条件（例：適切な溶媒系、室温または冷蔵庫、明／暗）は、分析実施中に適用される通常の保管条件を反映するよう選択すべきである。

75. 試験では、保存溶液の安定性を、新たに調製された添加および／またはキャリブレーション溶液と比較（一般にピーク面積またはピーク高）すべきである。濃度については、起こり得る分解を観察できるような濃度を選択すべきである。濃度依存性が観察されない場合、分析に用いた全濃度について調査する必要はない。信頼性のあるデータを得るため、保存溶液および新たに調製した溶液について少なくとも3回注入して比較すべきである。

試験報告書

76. 本項では、残留化学試験で用いられる分析法を説明する際に含めるべき一般的な情報について記載する。

A. 緒言

- (i) 適用範囲または適用可能性。適切な食品／マトリックスおよび分析法のソース（例：PAM、会社報告書など）について記載する。
- (ii) 測定する化学種の同定、LOD（必要に応じて）およびLOQを含む、分析手順の原理。

B. 材料および方法

- (i) 標準化合物
 - (1) 例えば、化学名、CAS 番号、化学構造、分子式および質量、純度、有効期限、保管条件などの記載
 - (2) 原液の調製
 - (3) キャリブレーション溶液の調製
- (ii) 手順。詳細な分析手順について段階的記載し、安全性や健康被害を避けるための特別な予防措置が必要な試薬や手順を特に強調する。
 - (1) 試料の調製
 - (2) 抽出 — **関連性がある場合**（例：乾燥作物基質、結合残留物など）は、抽出効率を実証する；申請者の判断でラジオバリデーションデータを別の報告書に記載してもよい。
 - (3) 添加（該当する場合） — すなわち分析法バリデーションのラン中。
 - (4) 精製

- (5) 誘導体化（該当する場合）
- (6) クロマトグラフィー分離が用いられる場合は、クロマトグラフィー条件／移動相組成。
- (7) 標準液および抽出液の安定性

(iii) **装置**

- (1) 説明（例：製造元／型、検出器の種類／選択性、カラム（充填材、サイズ）、キャリアーガスなど）。
- (2) 操作条件（例：流速、温度、電圧、クロマトグラフィー条件など）
- (3) キャリブレーション手順。

(iv) **妨害**。以下のようなあらゆる妨害を記載する。

- (1) 試料マトリックス
- (2) 他の農薬
- (3) 溶媒
- (4) **実験器具**

(v) **確認方法**

(vi) 分析法における修正点または問題点がある場合には、それを記載（詳細な状況および是正措置）する。

(vii) 算定。段階的に説明する。

- (1) キャリブレーション係数
- (2) 試料中の分析対象化合物

(viii) その他。残留分析法の方法論および残留結果の計算方法について完全で綿密な説明を提供するために適切かつ関連すると考えられるあらゆる追加情報。

C. **性能**。分析法の期待される性能を記載する。

- (i) 回収率（期待される回収率の平均値および範囲）。分析法バリデーションの間に試験された各試験食品で残留が懸念される各成分について、個々の回収率、平均回収率およびその RSD を含める。
- (ii) 精度。
- (iii) LOD（必要に応じて）および LOQ（定義を示す）。
- (iv) **堅牢性試験**（実施した場合）。
- (v) **制限事項**

D. 代表的なクロマトグラム。試験報告書には次の代表的なクロマトグラムを含めるべきである。

- (i) ブランクコントロール
- (ii) 分析／マトリックス標準
- (iii) 最低添加レベル
- (iv) 被験試料

E. 結論。様々な試験基質中の特定の試験化合物を測定するための分析手順の適用可能性、機器の入手可能性、妨害、安定性などについてまとめる。

参考文献

77. 本文で引用した参考文献を以下に記す。

- (a) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2006. Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies. ENV/JM/MONO (2006)32. 61 pp.
- (b) European Union Health & Consumer Protection Directorate General (SANCO). 2006 Doc. No. SANCO/10232/2006 (dated: March 24, 2006): Quality control procedures for pesticide residue analysis (limited to Method validation requirements; p. 11 ff and confirmatory techniques)
- (c) Codex Alimentarius Commission (CAC). 1993. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis
- (d) U.S. Environmental Protection Agency 1996. Residue Chemistry Test Guidelines. OPPTS 860.1360 Multiresidue Method
- (e) SANCO. 2004. SANCO/825/00 rev 7, 17.03.2004: Guidance document on residue analytical methods (post-registration requirements for annex II and annex III)
- (f) European Food Safety Authority (EFSA). 2006. Document (adopted May 17, 2006): Opinion of the Scientific Panel on Analytical methods
- (g) European Union (EU)/Germany. 2003., Anforderungen an Analysenmethoden zur Bestimmung fuer Pflanzenschutzmittelrueckstaenden im Rahmen des Zulassungsverfahrens, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz, 55, 275
- (h) Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) 2004. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products.
- (i) Codex Alimentarius Commission (CAC). 2005. CAC/GL 56-2005, Guidelines on the Use of Mass Spectrometry (MS) for Identification, Confirmation and Quantitative Determination of Residues
- (j) Food and Agriculture Organization (FAO) . 2002. Plant Production and Protection Paper 170, Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed.

(k) U.S. Environmental Protection Agency. 1996. Residue Chemistry Test Guidelines. OPPTS 860.1340 Residue Analytical Method.

(l) Pest Management Regulatory Agency (PMRA) 1998. Residue Chemistry Guidelines, Regulatory Directive Dir98-02. Section 3 Residue Analytical Method, Section 4 Multiresidue Method. (Canada)

(m) OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 2007. Stability of Pesticide Residues in Stored Analytical Samples. Proposal for a New Test Guideline, January 11, 2007.

(n) Skidmore, M W., G.D. Paulson, H.A. Kuiper, B. Ohlin, and S. Reynolds. 1998. Bound xenobiotic residues in food commodities of plant and animal origin. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 1423-1447.

78. 追加参考文献

(a) SANCO. 2000. SANCO/3029/99 rev 4, 11.07.2000: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for annex II and annex III

(b) Commission of the European Communities. 1997. Working document 7028/VI/95 rev. 3, 22.07.1997: Metabolism and distribution in plants (for extraction efficiency)

(c) Netherlands RIVM. 2002. Factsheets for the (eco)toxicological risk assessment strategy of the National Institute for Public Health and the Environment Part II. Report 601516009/2002. Chapter 3: Pesticide residue analysis in plant and animal products

(d) Part A2: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 6) and Annex III (part A, Section 8) of Directive 91/414 (Draft, 29 June 2003)

(e) Siebers, J. and R. Haenel. 2003. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals. Assessment of residue analytical methods for crops, food, feed, and environmental samples: The approach of the EU. John Wiley, New York.

(f) BVL. 2002. Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutzdienst, Vol. 54, 157 (Document, in German, on requirements for residue analytical methods)

(g) Alder, L. 2003. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals (Validation of analytical methods for post-registration control and monitoring purposes in the EU; includes information on extraction efficiency) .John Wiley, New York.

(h) Veith, B. 2005. Enforcement methods by registrants - revision of guidance document 825/00 rev. 7. Presented at Fresenius Conference, June 2005)

(i) Alder L. et al. 2006. European Pesticide Residue Workshop 2006, "Residue analysis of 500 high priority pesticides – better by GC/MS or LC/MS/MS?"

(j) Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) .Residue Guideline No. 19 – Residue analytical method; <http://www.apvma.gov.au/guidelines/guidln19.shtml>

付属文書 1
登録前および登録後分析法バリデーションのための食品分類

同じ分類内の他の食品に外挿するための試験に用いる代表食品を選定する場合、慎重に判断する必要がある。例えば、油分含有食品の範囲を代表する試験に対してスパイス類やホップ類のみを選定するのは不適切と考えられる。

食品分類	本分類に含まれる食品	一般的な代表食品
高水分食品	仁果類 核果類 鱗茎菜類 果菜類／ウリ科 アブラナ科 葉菜類および生鮮ハーブ類 茎菜類 飼料／飼料作物 生鮮豆菜類 根菜類および根茎類の葉 サトウキビ 生鮮緑茶 キノコ類	リンゴ、ナシ アプリコット、サクランボ、モモ タマネギ トマト、ピーマン、キュウリ、メロン カリフラワー、芽キャベツ、キャベツ レタス、ホウレンソウ リーキ、セロリ、アスパラガス 小麦および大麦飼料、アルファルファ 生鮮鞘付きエンドウマメ、エンドウマメ、キヌサヤ、ソラマメ、ベニバナインゲンマメ、サヤインゲン テンサイおよび飼料用テンサイ根
高油分食品	種実類 油料種子 オリーブ アボカド ホップ カカオ豆 コーヒー豆 スパイス	クルミ、ヘーゼルナッツ、栗 油料アブラナ種子、ヒマワリ種子、綿実、大豆、らっかせい
高タンパク食品	乾燥豆菜類／豆類	飼料用ソラマメ、乾燥ソラマメ、乾燥インゲンマメ（黄、白／青、茶、斑入り）
高でんぷん食品	穀類 根菜類および根茎類の根 イモ類	小麦、ライ麦、大麦およびオーツ麦 テンサイおよび飼料用テンサイ根、ニンジン ジャガイモ、サツマイモ
高酸食品	柑橘類 ベリー類 スグリ類 ブドウ類 キウイ パイナップル ルバーブ	レモン、マンダリン、タンジェリン、オレンジ イチゴ、ブルーベリー、ラズベリー カシス、アカフサスグリ、シロフサスグリ

重要な留意点：

上記食品リストは使用される可能性のある食品／マトリックスを完全に網羅したものではなく、そのほかの食品を用いることもできる。申請者はそほかの食品の使用に際して規制当局に相談すべきである。通常、高タンパクおよび高でんぷん食品の代表には乾燥食品を 1 点選定するだけでよい。

原文は下記のタイトルで、英語で出版されたものである：
OECD (2007), Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 72 and Series on Pesticides No. 39,
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmentpublicationsbynumber.htm>

© 2017 この日本語版は日本の国立医薬品食品衛生研究所（食品部）が作成した。

Ⅱ．分担研究報告

2. 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

研究分担者 坂井隆敏

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
平成 28 年度 分担研究報告書

食品中残留農薬等の分析法に関する研究
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

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

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、先ず、アミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

両性イオン型官能基を修飾した親水性相互作用クロマトグラフィー用分析カラムを使用し、適切な移動相条件を検討した結果、選択した全ての検討対象化合物(11 化合物)において比較的良好なピーク形状が得られた。

A. 研究目的

アミノグリコシド系抗生物質は、人や動物用の医薬品として広く使用されている。

農薬・動物用医薬品等の成分である物質については、使用された動物由来の食品の摂食により人の健康に害を及ぼすことのないよう、食品中の残留基準が設定されており、アミノグリコシド系抗生物質についても、動物用医薬品として使用される物質については食品中の残留基準が設定されている。したがって、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、食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法が必要不可欠である。

畜水産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の試験法としては、「ゲンタマイシン試験法(畜水産物)」及び「ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン試験法(畜水産物)」が通知されているが、食品によっては効率的に精確な分析値が得られない場合があることが報告されている。また、当該試験法は、LC-MS(/MS)測定においてイオンペア

試薬(ヘプタフルオロ-*n*-酪酸)を含む移動相が使用されているが、LC-MS 用のイオンペア試薬の多くは腐食性が高く、分析機器への負担が大きい。

以上のような理由から、本研究においては、食品中のアミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法の開発を検討した。

研究初年度である平成 28 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、イオンペア試薬を使用することなく、また、誘導体化などの煩雑な操作を行うことなく、LC-MS/MS で高感度且つ高精度に測定可能な測定条件の確立について検討した。

B. 研究方法

①検討対象化合物

検討対象化合物は、アミノグリコシド系抗生物質の中から構造や分子量、物性等を考慮し、アプラマイシン、アミカシン、カスガマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン C1(ゲンタマイシンの主要構成成分)、ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシン

、ネチルマイシン及びハイグロマイシン B(ハイグロマイシンの主要構成成分)の合計 11 化合物を選択した。

②標準原液及び標準溶液の調製

選択した検討対象化合物について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液(1:1)混液で希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

③タンデム型質量分析条件の設定

調製した標準溶液を用いて、タンデム型質量分析計(MS/MS)における測定条件の最適化を行った。すなわち、各検討対象化合物の 10 µg/mL 標準溶液をそれぞれフローインジェクションでMS/MSに注入し、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等の測定パラメータを最適化した。

④液体クロマトグラフィー条件の検討

液体クロマトグラフ(LC)における測定条件の検討は、種々の分析カラムと移動相を用いて測定を行い、各検討対象化合物について得られたピーク形状や測定感度等を比較・考察し、最適測定条件の設定を試みた。なお、本検討には各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液を用いた。

⑤装置及び測定条件等

以下に、本研究で使用した装置及び測定条件等を示した。

LC: Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム: ZIC-cHILIC PEEK HPLC Column(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm、MERCK MILLIPORE 社製)

カラム温度: 40°C

流速: 0.4 mL/分

注入量: 5 µL

移動相:

A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)、など

B 液 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件:

t₀, B=50%; t₅, B=50%; t₁₅, B=5%; t₂₅, B=5%; t_{25.1}, B=50%; t₃₅, B=50%

MS/MS: Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度: 150°C

脱溶媒温度: 600°C

窒素ガス流量: 1000 L/hr

コーンガス流量: 150 L/hr

キャピラリー電圧: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法・ポジティブイオンモード

C. 研究結果及び考察

①タンデム型質量分析条件の設定

MS/MS 測定条件の最適化において得られた、各検討対象化合物のプリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等を表 1 に示した。表 1 に示される通り、全ての検討対象化合物は、ESI のポジティブイオンモードにおいて「プロトン付加分子イオン」と推察されるイオンが検出された。本研究では、これらのイオンを検討対象化合物のプリカーサーイオンとして選択した。プロダクトイオンは、選択したプリカーサーイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化して得られるイオンの中から、最もイオン強度が高いイオンを選択した。

以上のように、MS/MS 測定における測定イオンとして、各検討対象化合物に特異的と考えられるイオンを選択可能であったことから、設定した MS/MS 条件を適切な LC 条件と組み合わせ

ることにより、誘導体化等の煩雑な操作を行うことなく、各検討対象化合物を複雑な食品マトリクス中から特異的に検出可能であることが期待された。

②液体クロマトグラフィー条件の検討

LC における測定条件の検討は、先ず種々の分析カラムを用いてアミノグリコシド系抗生物質測定への適用性を検討した。親水性相互作用クロマトグラフィーで一般的に使用されるカルバモイル基、トリアゾール基、ジオール基を修飾した分析カラムを検討したところ、全ての検討対象化合物においては満足できる保持、ピーク形状及び測定感度が得られなかった。

そこで、両性イオン型官能基を修飾した ZIC-HILIC 及び ZIC-cHILIC (共に MERCK MILLIPORE 社製) を検討したところ、イオンペア試薬を用いることなく、非常に高い極性を有する検討対象化合物について良好な保持が得られたことから、以降、これら 2 種の分析カラムを用いて最適な移動相条件の検討を実施した。

LC-MS/MS 測定の移動相として一般的に使用される 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いた場合には、ZIC-HILIC ではカスガマイシン及びスペクチノマイシンのみの溶出が確認された。一方、ZIC-cHILIC では、ネオマイシンを除く検討対象化合物について溶出が確認されたものの、アプラマイシン、ゲンタマイシン C1、ネオマイシン及びネチルマイシンではピークのテーリングが確認され、良好なピーク形状が得られなかった。これらの結果から、ZIC-HILIC は検討対象化合物の保持が強すぎると判断し、以降は ZIC-cHILIC について適切な移動相条件の検討を行った。

分析カラムに ZIC-cHILIC、移動相に 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用

いた場合には、ネオマイシン以外の検討対象化合物は溶出可能であったものの、アプラマイシン、ゲンタマイシン C1、ネオマイシン及びネチルマイシンにおいてはピークのテーリングが確認された。そこで、ネオマイシンの溶出、並びに、テーリングが確認された検討対象化合物のピーク形状の改善を目的として、移動相 A 液のギ酸濃度を 0.2 vol% に増加して測定を行った。その結果、ネオマイシンについても溶出が確認され、本研究で選択した全ての検討対象化合物の保持・溶出が可能であることが確認された一方、テーリングが確認された検討対象化合物のピーク形状は改善されなかった。

次いで、検討対象化合物のピーク形状の改善を目的として、移動相の添加剤(塩)濃度の検討を行った。添加する塩としては、MS/MS 測定における揮発性等を考慮してギ酸アンモニウムを選択した。なお、上述の通り、全検討対象化合物の溶出には低 pH 条件が必要と考えられたことから、移動相の pH は 0.2 vol% ギ酸の pH と同様に 2.5 に調整(ギ酸を用いて pH 調整)した。移動相 A 液に 0.2 vol% ギ酸、2 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)、5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)、10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)、20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) 及び 50 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) を用い、各検討対象化合物のピーク形状及び測定感度等を比較検討した。

図 1 に、0.2 vol% ギ酸、5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) 及び 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) で得られた各検討対象化合物のクロマトグラムを示した。図 1 に示される通り、移動相 A 液にギ酸アンモニウムを添加することにより、検討対象化合物のピーク形状を改善可能であることが推察された。

また、表 2 に、本検討で得られた各検討対象化合物の保持時間、ピーク面積、ピーク高さ及び S/N を示した。また、ピーク形状の指標として「高さ/面積」の値を示した。一般的には、算出した「高さ/面積」の値が大きい程、ピーク形状は良好になるものと予想された。表 2 に示される通り、移動相 A 液中のギ酸アンモニウム濃度の増加に伴い、「高さ/面積」の値が増加する傾向が確認された。このことから、移動相 A 液中のギ酸アンモニウム濃度の増加に伴い、各検討対象化合物について得られるピーク形状も良好になることが予想された。

一方、表 2 に示される通り、移動相 A 液中のギ酸アンモニウム濃度の増加に伴い、各検討対象化合物で得られるピーク面積、ピーク高さ及び S/N は減少する傾向が確認された。

本研究では、検討対象化合物のピーク形状と測定感度の兼ね合いを考慮し、移動相 A 液としては 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) を選択した。

以上の検討結果及び考察から、本研究で設定した LC-MS/MS 測定条件を用いることで、イオンペア試薬を使用することなく、また、誘導体化などの煩雑な操作を行うことなく、多くのアミノグリコシド系抗生物質を特異的且つ簡便に測定可能であると考えられた。

③設定した LC-MS/MS 測定条件下における各検討対象化合物の測定

本研究で設定した LC-MS/MS 測定条件下で、各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液を 10 併行で測定した。結果を表 3 に示した。

表 3 に示される通り、各検討対象化合物の保持時間の変動は 0.3 RSD%未満であり、繰り返し測定における保持時間のずれはほとんど無いことが確認された。

一方、ピーク面積値の変動は 2.4~16.3 RSD% であり、特にゲンタマイシン C1、ネオマイシン及びネチルマイシンにおいて変動が大きいことが確認された。今回の繰り返し測定においては、全検討対象化合物について、測定回数の増加に伴うピーク面積値の減少傾向が確認された。ゲンタマイシン C1、ネオマイシン及びネチルマイシンについては特に減少の割合が大きく、その結果、ピーク面積値の変動が大きくなったものと考えられた。

今回の検討で確認されたピーク面積値の減少傾向の原因を調査し、全検討対象化合物についてより安定した測定結果が得られるよう、測定条件を改善する必要があると考えられた。

D. 結論

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、研究初年度である平成 28 年度は、LC-MS/MS を用いたアミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

MS/MS 測定条件については、各検討対象化合物の測定条件 (プリカーサーイオン、プロダクトイオン、クオン電圧及びコリジョンエネルギー) を設定した。LC 条件については、種々の検討結果から、分析カラムとして ZIC-cHILIC (MERCK MILLIPORE 社製)、移動相として 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることで、全ての検討対象化合物について良好なピーク形状が得られた。

設定した LC-MS/MS 条件を用いて各検討対象化合物の繰り返し測定を行ったところ、一部の化合物においては測定回数の増加に伴うピーク面積値の減少傾向が大きいことが確認されたこ

とから、原因を調査した後、測定条件の若干の改善が必要であると考えられた。

なし

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 タンデム型質量分析における検討対象化合物の測定条件

検討対象化合物	分子量	化学式	ESI	プリカーサーイオン (m/z)	コロン電圧 (V)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
アラマイシン	539.59	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁	+	540.3	20	217.2	25
アミカシン	585.60	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	+	586.3	20	163.2	25
カスガマイシン	379.36	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₉	+	380.1	20	112.1	15
カナマイシン	484.50	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	+	485.3	20	163.2	20
ゲンタマイシンC1	477.60	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	+	478.3	20	322.3	15
ジヒドロストレプトマイシン	583.59	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	+	584.3	80	263.2	25
ストレプトマイシン	581.58	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	+	582.3	100	263.2	30
スペクチノマイシン	332.35	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇	+	333.2	60	98.1	25
ネオマイシン	614.65	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	+	615.4	20	161.2	25
ネチルマイシン	475.58	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₇	+	476.3	20	299.3	20
ハイグロマイシンB	527.50	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃	+	528.2	20	177.2	25

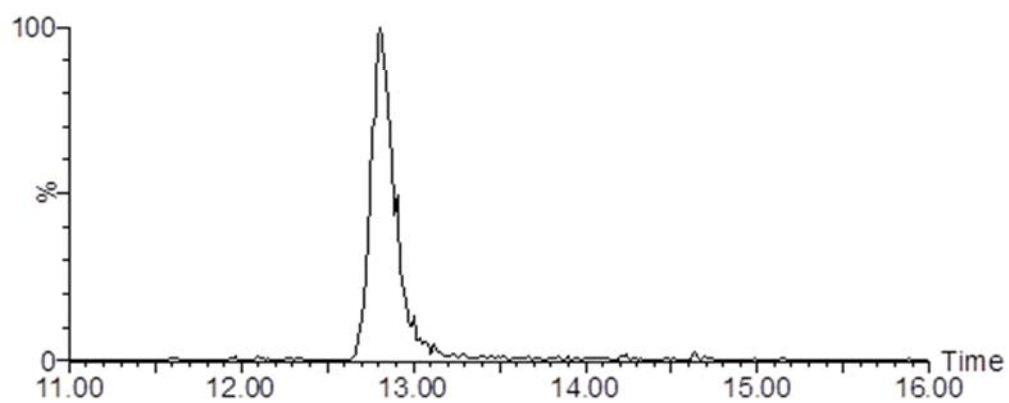
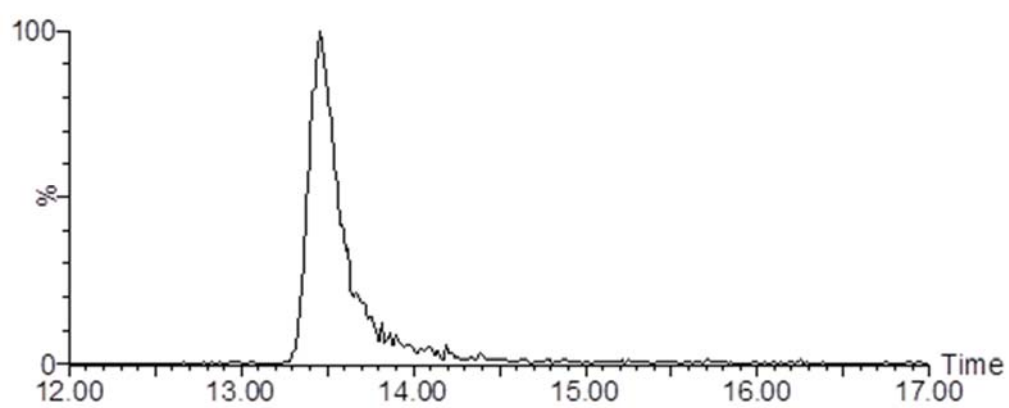
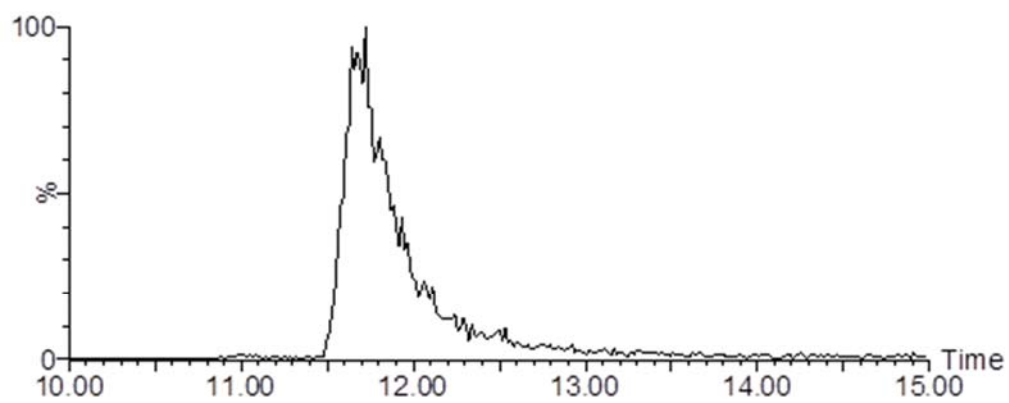


図 1-1 アプラマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

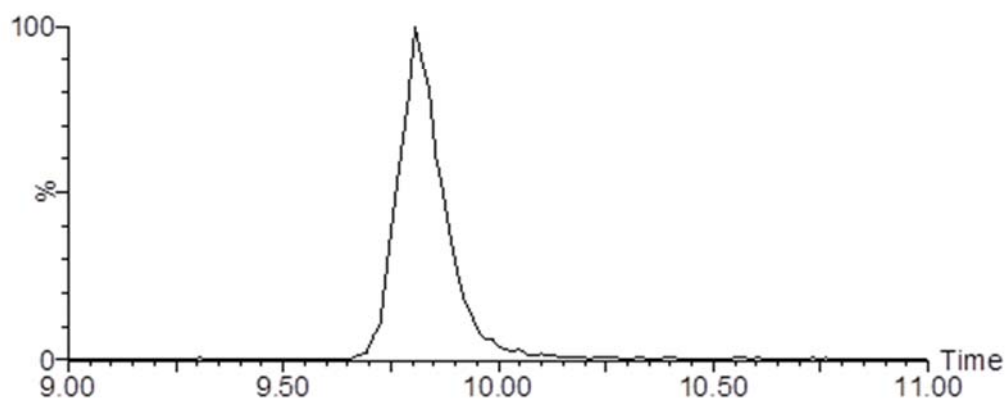
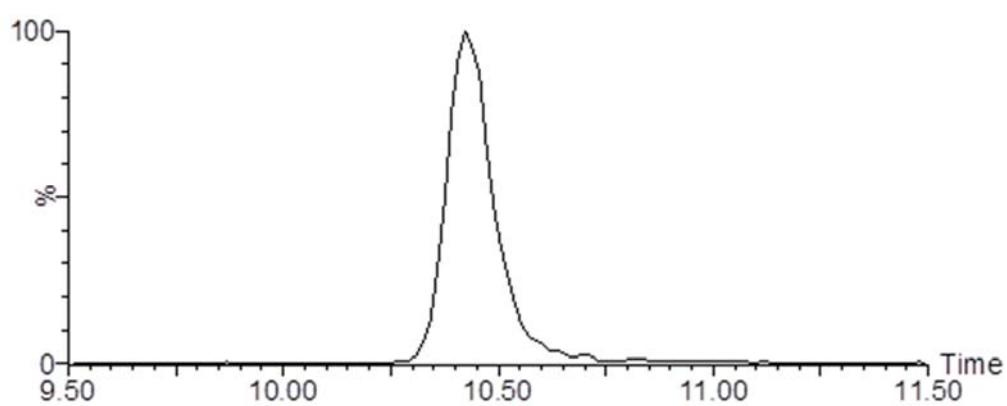
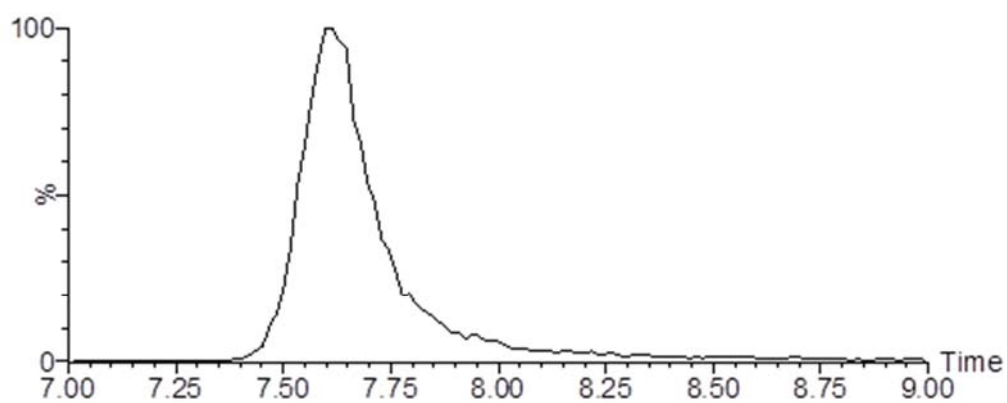


図 1-2 アミカシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

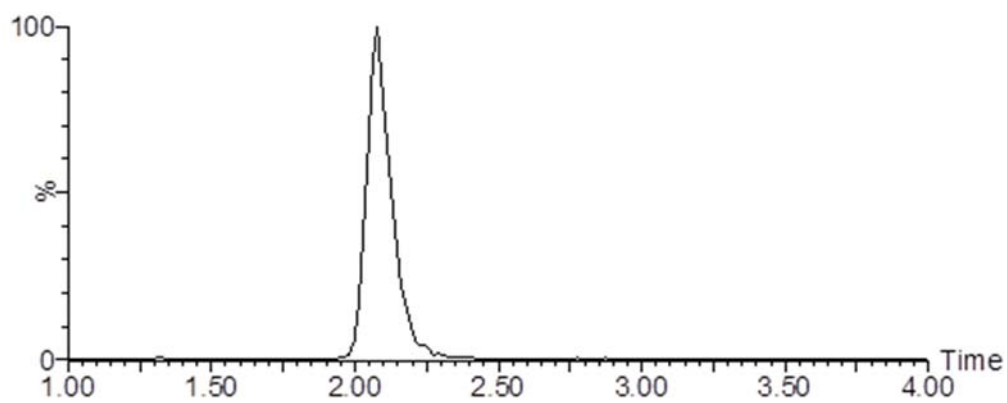
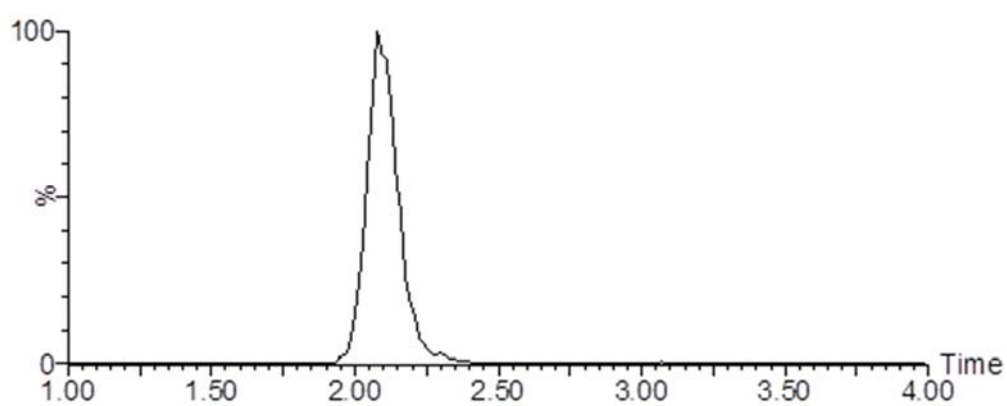
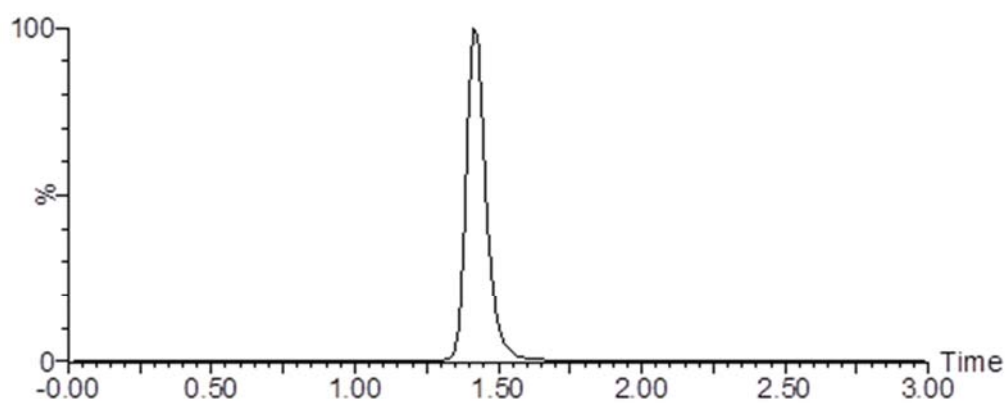


図 1-3 カスガマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

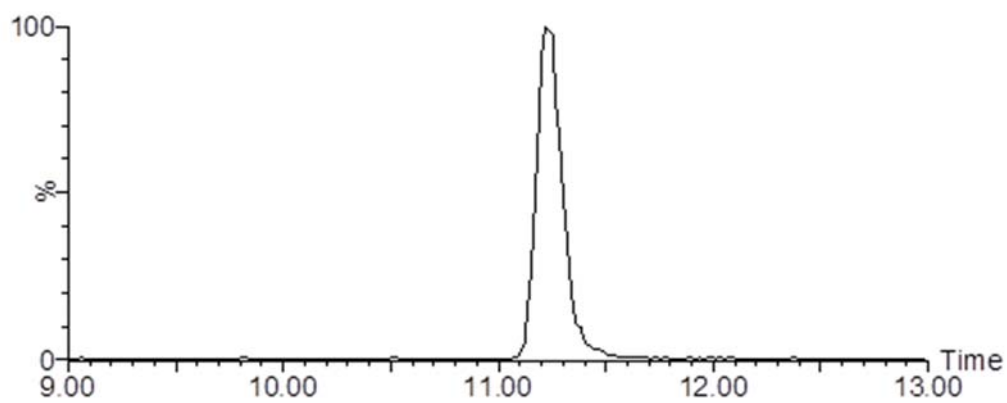
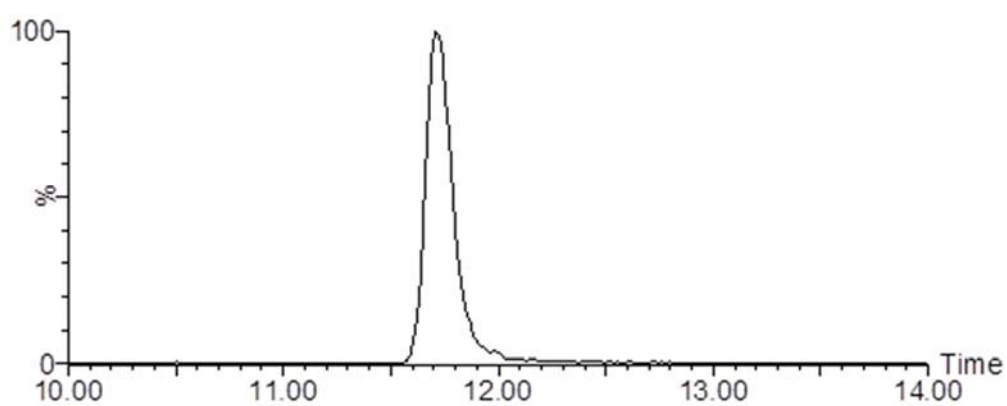
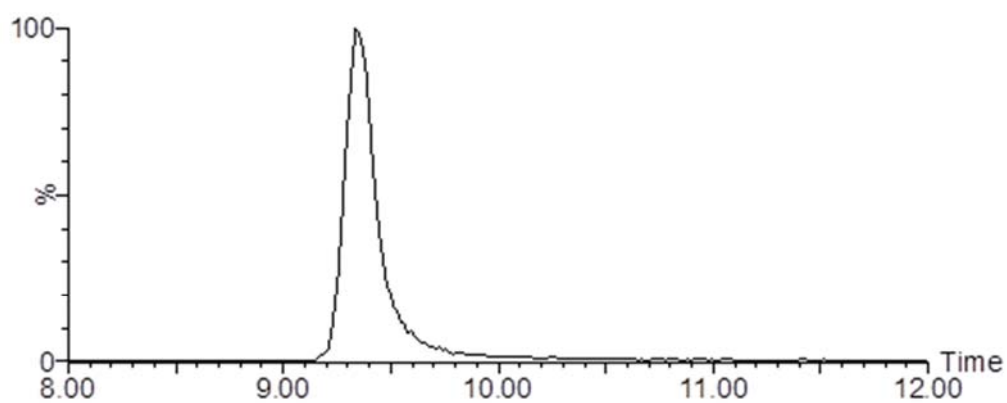


図 1-4 カナマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

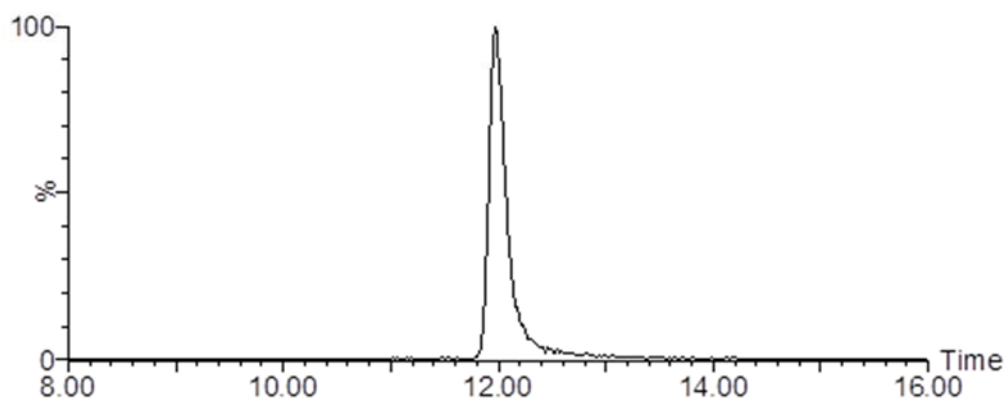
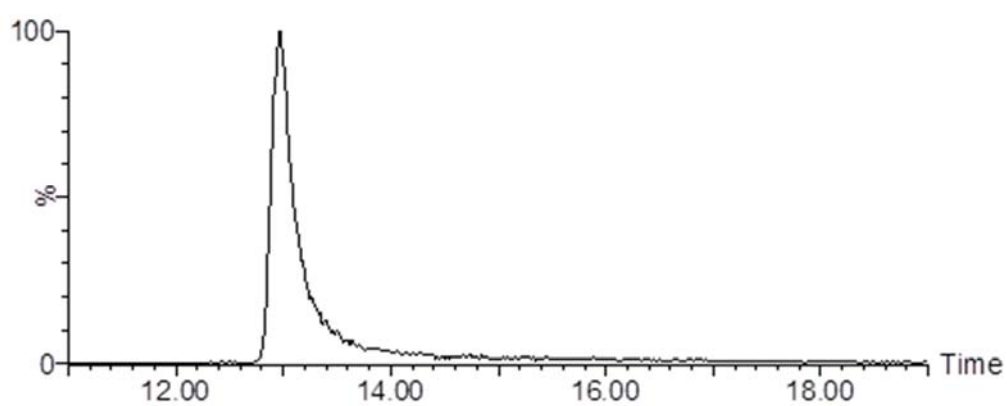
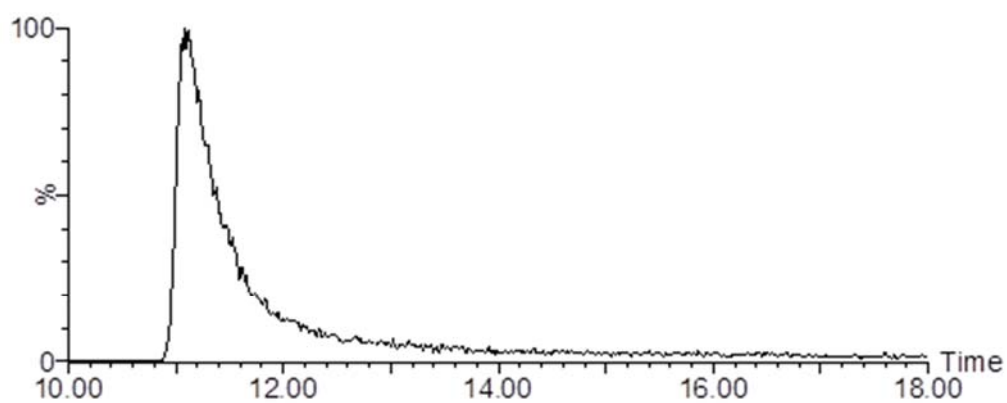


図 1-5 ゲンタマイシン C1 のクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

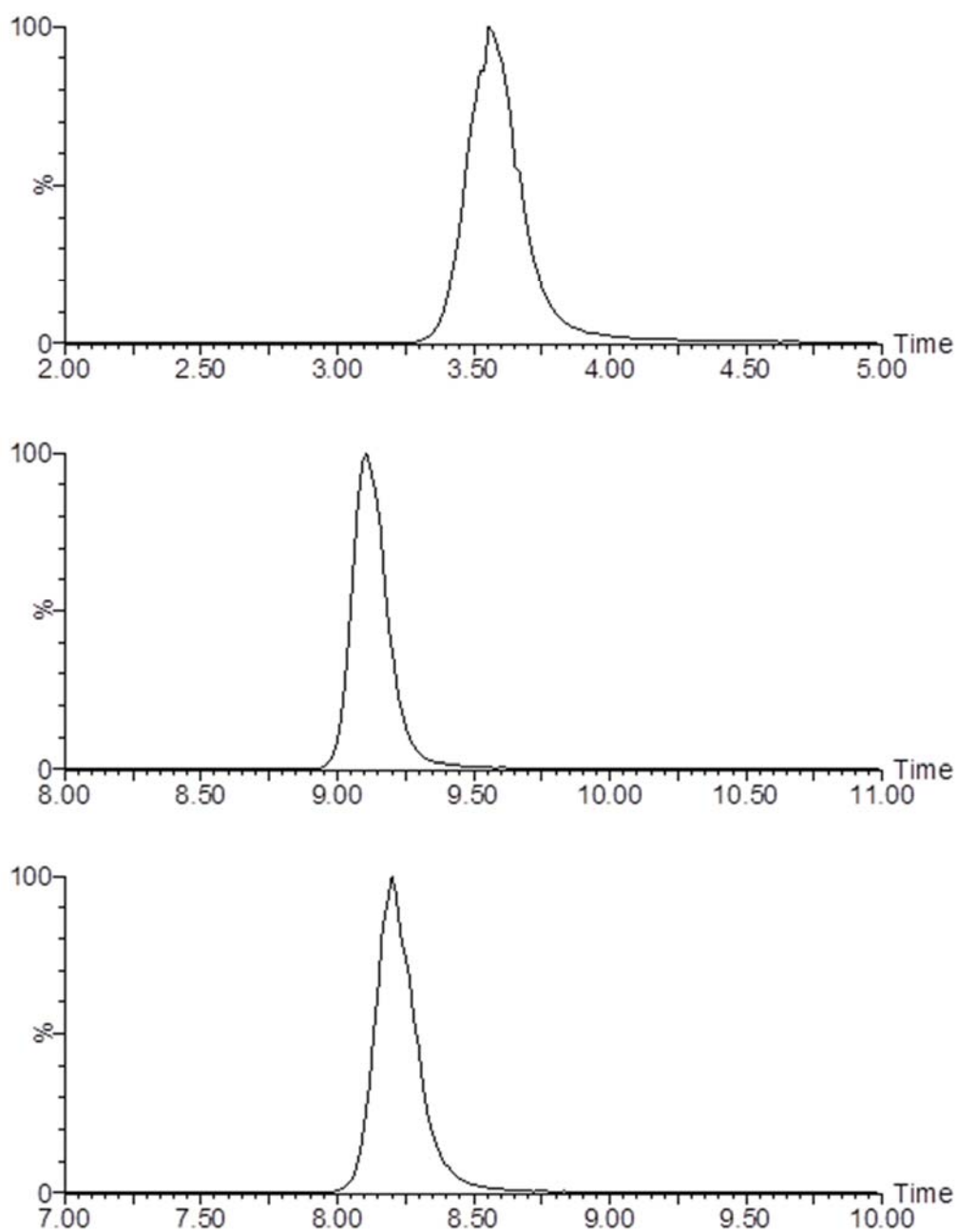


図 1-6 ジヒドロストレプトマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

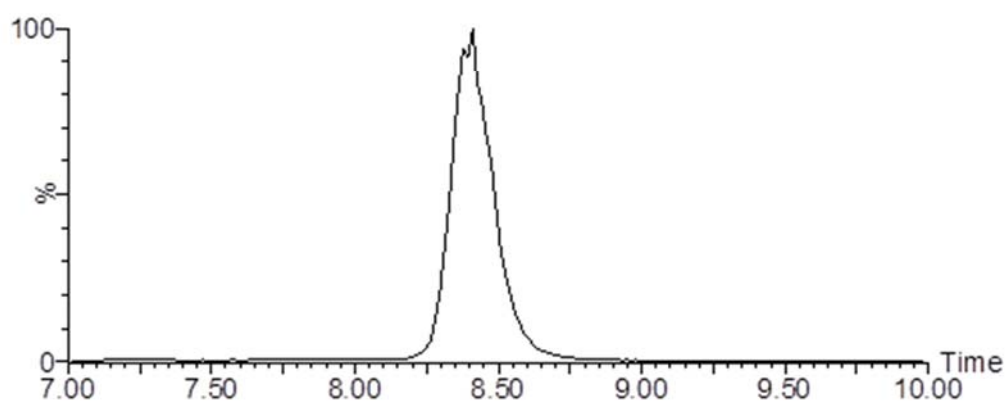
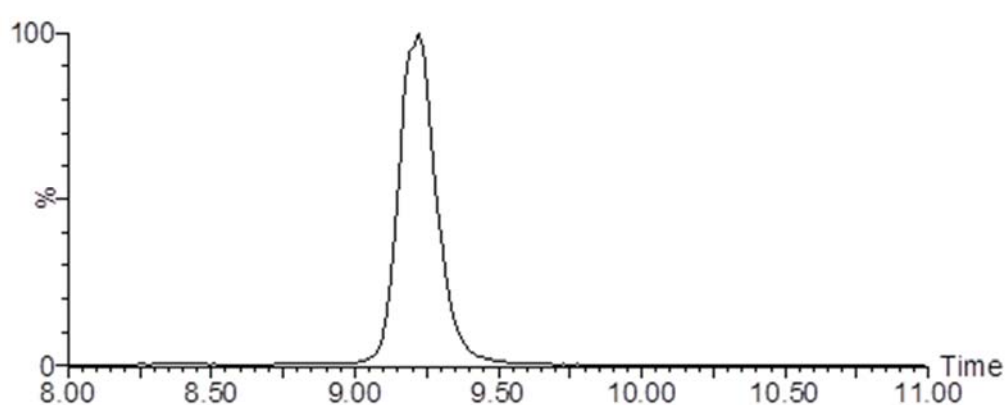
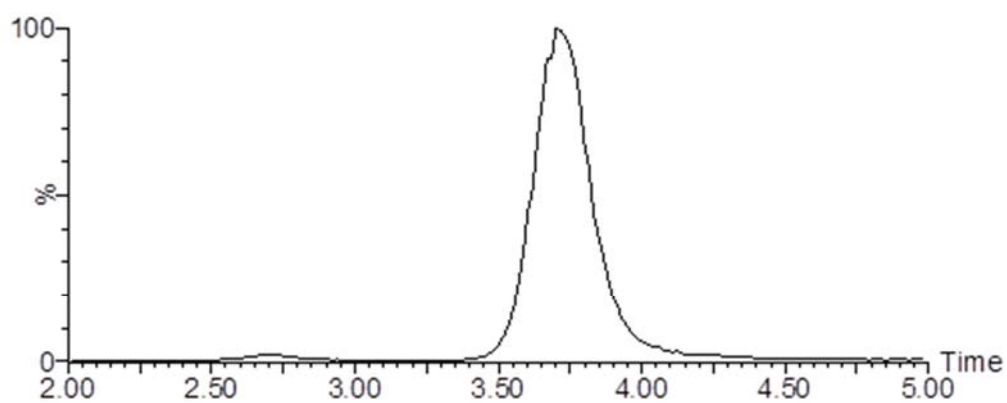


図 1-7 ストレプトマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

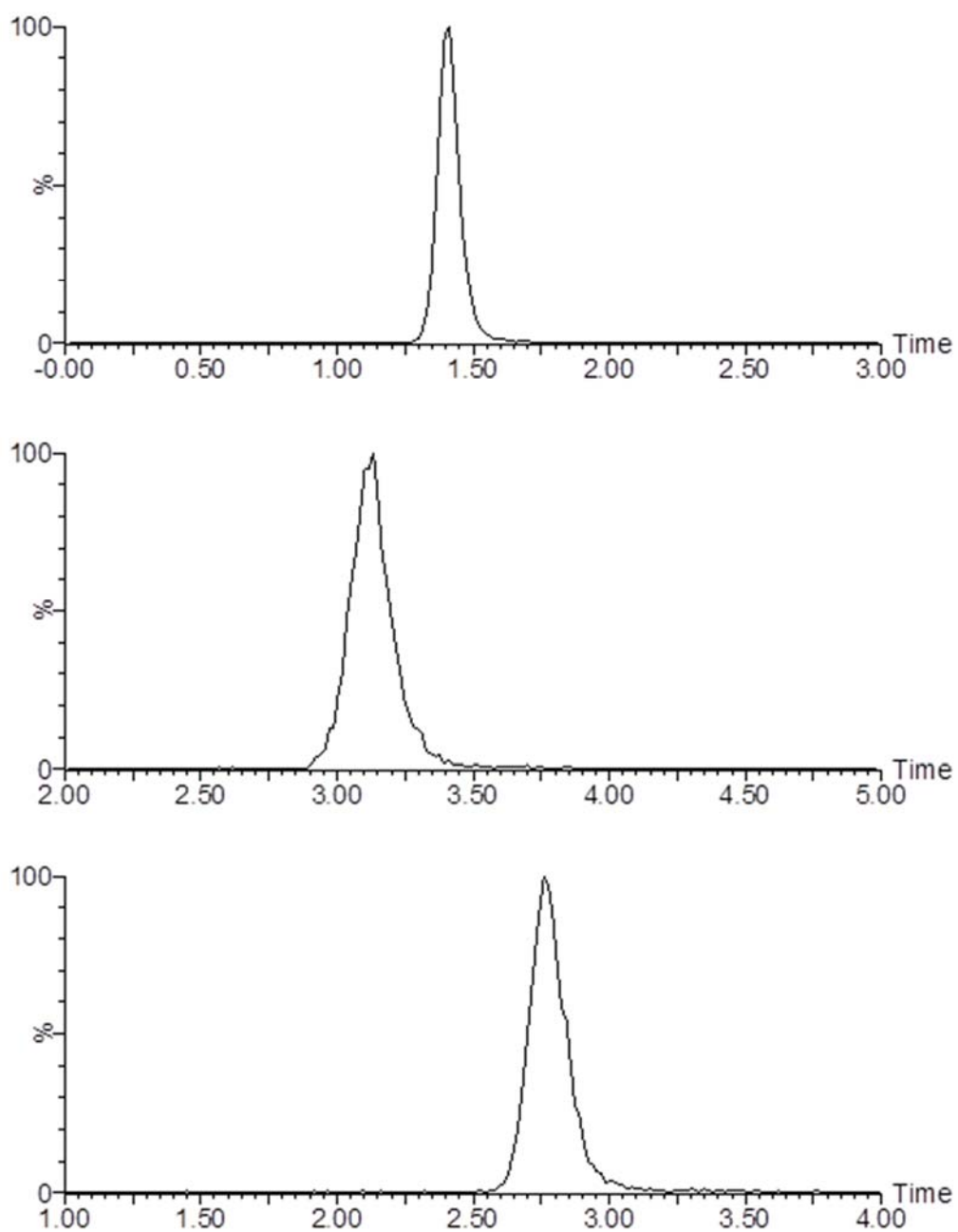


図 1-8 スペクチノマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

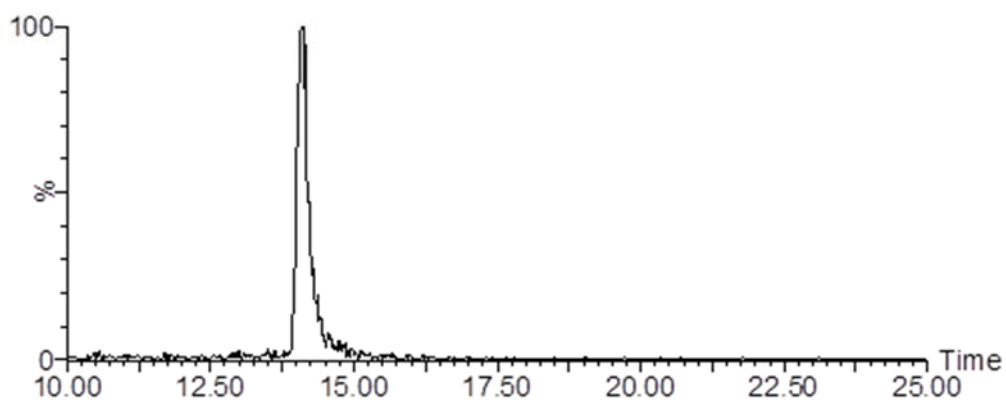
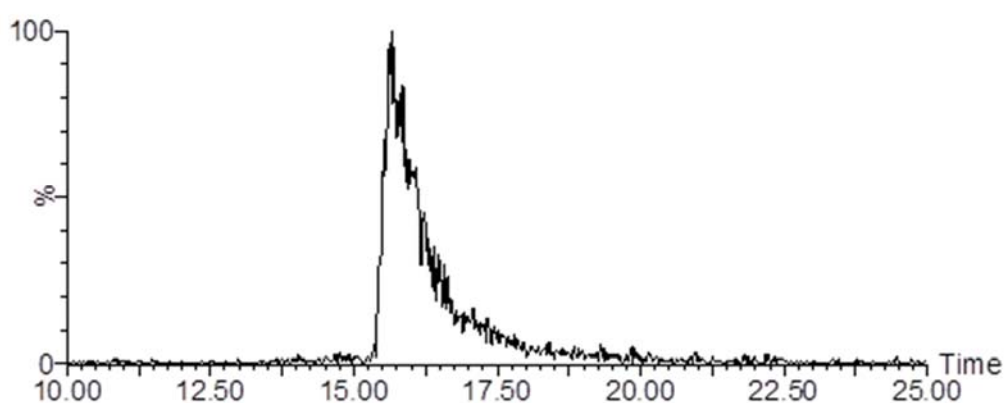
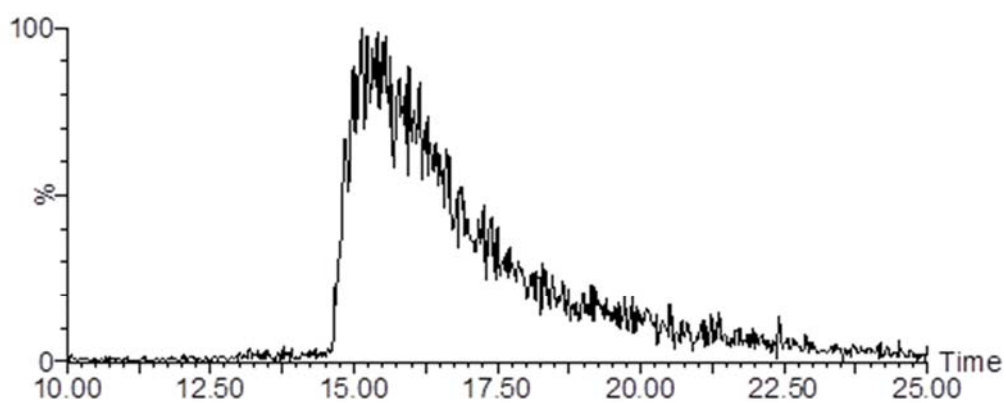


図 1-9 ネオマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

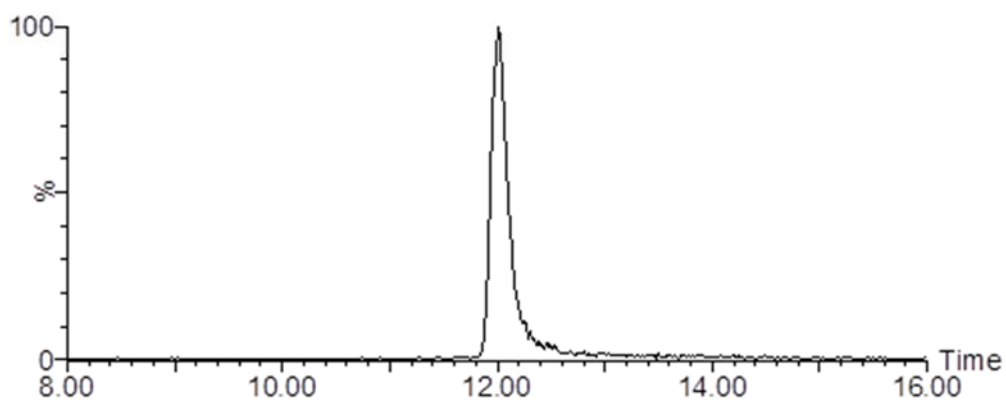
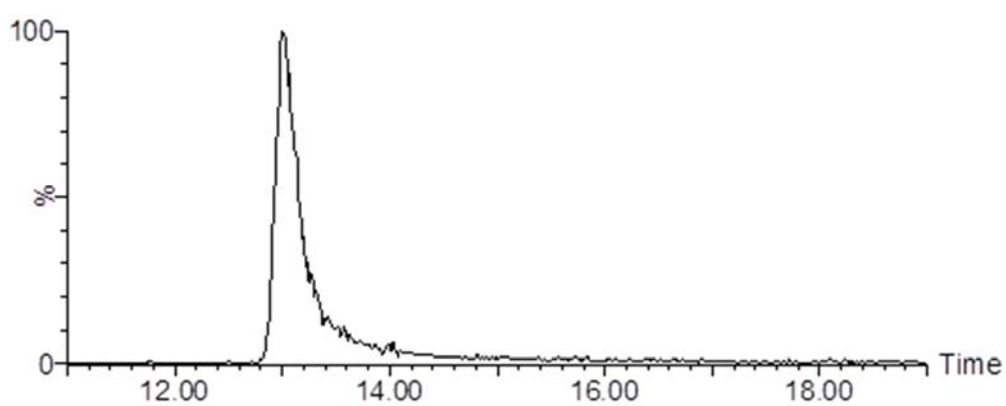
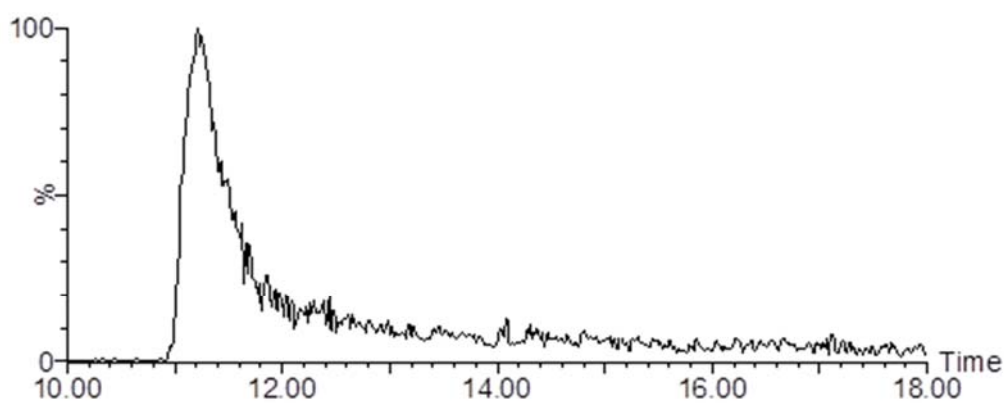


図 1-10 ネチルマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

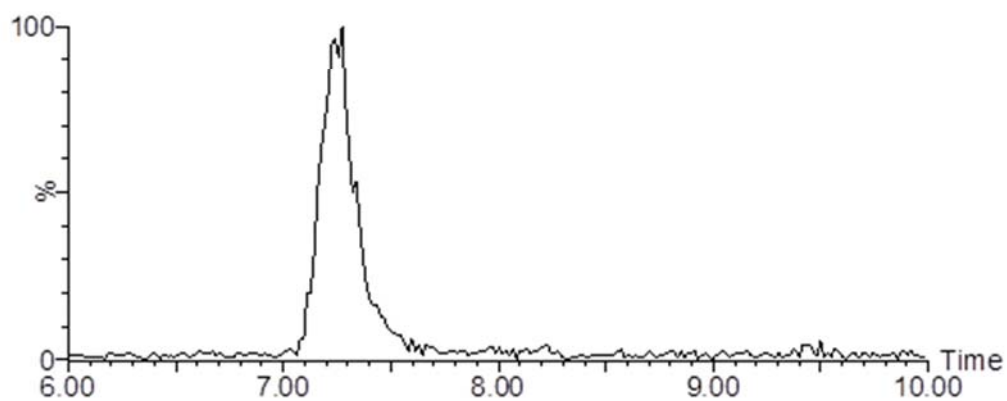
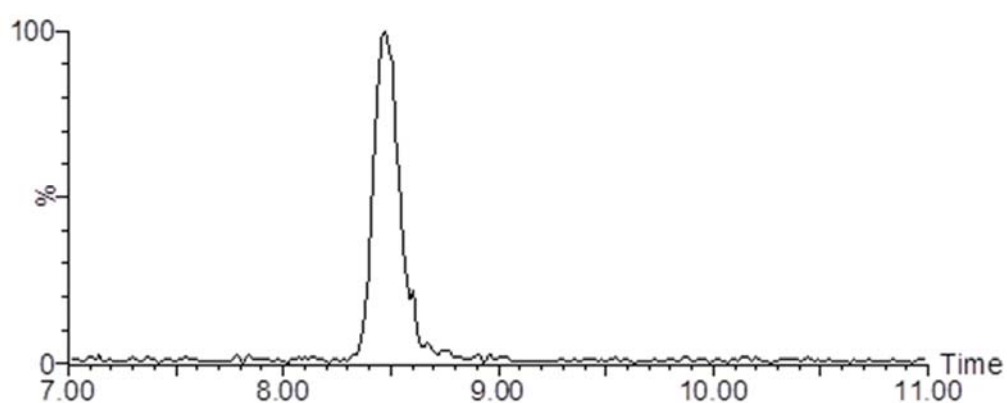
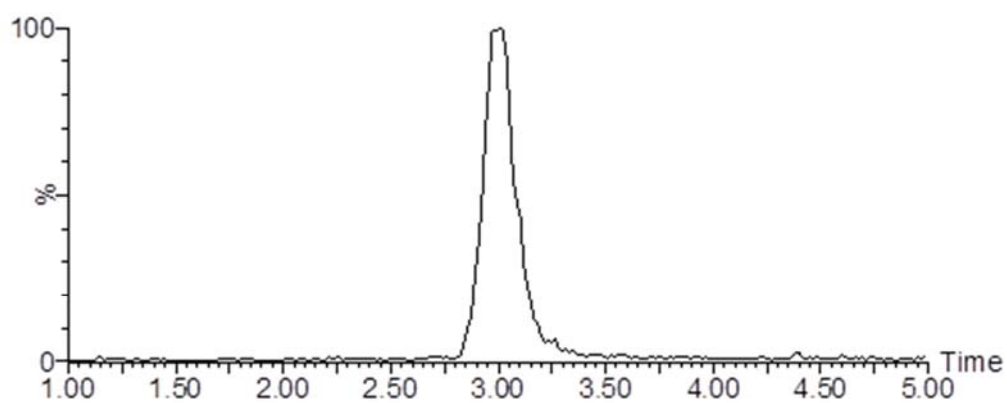


図 1-11 ハイグロマイシンのクロマトグラム

上段:移動相 A 液 0.2 vol%ギ酸

中段:移動相 A 液 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

下段:移動相 A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)

表 2-1 各移動相条件におけるアプラマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	11.7	13910	35455	2.5	282
2 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	13.2	9323	28626	3.1	363
5 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	13.5	7498	28934	3.9	453
10 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	13.6	5398	25034	4.6	566
20 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	12.8	4255	23461	5.5	434
50 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	11.2	3057	17591	5.8	235

表 2-2 各移動相条件におけるアミカシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	7.6	39907	183352	4.6	1430
2 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	9.9	26366	171132	6.5	2156
5 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	10.4	16352	113093	6.9	1442
10 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	10.6	10770	74768	6.9	1317
20 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	9.8	8643	58484	6.8	938
50 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	8.0	7127	39737	5.6	439

表 2-3 各移動相条件におけるカスガマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	1.4	40781	388215	9.5	6349
2 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	1.9	15633	110258	7.1	4706
5 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	2.1	10569	73974	7.0	2640
10 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	2.2	7176	53558	7.5	1848
20 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	2.1	4962	38956	7.9	779
50 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	1.9	3943	33105	8.4	1201

表 2-4 各移動相条件におけるカナマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	9.4	55559	277044	5.0	1958
2 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	11.2	40877	237792	5.8	2906
5 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	11.7	24247	148058	6.1	2529
10 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	11.9	16996	106529	6.3	1578
20 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	11.2	12880	84167	6.5	1149
50 mmol/L 半醜アンモニウム(pH 2.5)	9.6	10147	59598	5.9	694

表 2-5 各移動相条件におけるゲンタマイシン C1 の測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	11.1	68499	110871	1.6	418
2 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	12.7	76163	180966	2.4	688
5 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	13.0	54880	179841	3.3	935
10 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	13.0	43869	166493	3.8	1240
20 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	12.0	38330	181836	4.7	1385
50 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	9.7	14111	69808	4.9	1142

表 2-6 各移動相条件におけるジヒドロストレプトマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	3.6	569317	2293054	4.0	6302
2 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	8.3	734410	4112044	5.6	21917
5 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	9.1	597495	3627920	6.1	34691
10 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	9.2	351111	2070806	5.9	27979
20 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	8.2	434947	2275358	5.2	31245
50 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	5.8	80118	282231	3.5	9400

表 2-7 各移動相条件におけるストレプトマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	3.7	225168	892460	4.0	463
2 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	8.4	264761	1537624	5.8	8696
5 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	9.2	214742	1305176	6.1	17220
10 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	9.3	129859	788513	6.1	10462
20 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	8.4	155361	825408	5.3	13003
50 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	6.3	30696	110707	3.6	4258

表 2-8 各移動相条件におけるスペクチノマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ/面積	S/N
0.2 vol% 半醜	1.4	35332	300871	8.5	3538
2 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	2.5	10374	59632	5.7	959
5 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	3.1	9900	51401	5.2	734
10 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	3.2	10005	51874	5.2	696
20 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	2.8	10414	59348	5.7	693
50 mmol/L 半醜アンモニウム (pH 2.5)	2.2	8134	55816	6.9	800

表 2-9 各移動相条件におけるネオマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ面積	S/N
0.2 vol% 酢酸	15.1	34130	13314	0.4	58
2 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	16.5	8466	5264	0.6	39
5 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	15.7	13034	15755	1.2	114
10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	15.4	4549	11000	2.4	106
20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	14.1	4908	18188	3.7	215
50 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	12.2	3672	18894	5.1	152

表 2-10 各移動相条件におけるネチルマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ面積	S/N
0.2 vol% 酢酸	11.2	21919	28680	1.3	90
2 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	12.8	26364	54400	2.1	357
5 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	13.0	23752	73868	3.1	612
10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	13.0	23790	86344	3.6	826
20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	12.0	17931	86071	4.8	760
50 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	9.7	12264	57967	4.7	571

表 2-11 各移動相条件におけるハイグロマイシンの測定結果

移動相A液	保持時間 (分)	ピーク面積	ピーク高さ	高さ面積	S/N
0.2 vol% 酢酸	3.0	12676	68508	5.4	657
2 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	7.7	8542	50304	5.9	599
5 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	8.5	5692	37054	6.5	345
10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	8.4	4247	26822	6.3	278
20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	7.2	3472	16697	4.8	189
50 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 2.5)	4.6	2650	12565	4.7	67

表 3 標準溶液の測定結果

	保持時間		ピーク面積値			
	平均値 (分)	相対標準偏差 (RSD%)	最小値	最大値	平均値	相対標準偏差 (RSD%)
アブラマイシン	12.652	0.090	3083.7	4304.0	3618.0	9.046
アミカシン	9.695	0.073	2439.1	3113.4	2797.3	7.331
カスガマイシン	2.060	0.000	4503.0	5067.5	4841.4	3.531
カナマイシン	11.089	0.029	10804.5	12839.0	11589.4	5.527
ゲンタマイシンC1	11.814	0.127	7585.3	13172.8	9671.4	16.283
ジビロストレプトマイシン	8.074	0.104	88523.5	112963.4	101283.6	8.321
ストレプトマイシン	8.271	0.069	37037.8	45773.9	41824.7	7.398
スペクチノマイシン	2.713	0.178	8075.7	8655.3	8340.5	2.349
ネオマイシン	13.916	0.217	3229.1	4619.0	3775.9	11.395
ネチルマイシン	11.840	0.113	8757.1	14729.2	11025.8	15.357
ハイグロマイシン	7.108	0.089	2248.2	2612.3	2464.9	5.455

Ⅱ. 分担研究報告

3. 課題3:試料調製方法の検討

研究分担者 志田(齊藤)静夏

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題3: 試料調製方法の検討

研究分担者 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

研究要旨

分析に供する試料量を少量化することができれば、使用する溶媒・試薬量の削減や濃縮等の操作時間の短縮が可能となり、検査の迅速化やコスト削減が期待される。しかし、試料の均質化が不十分で、試料中の農薬等の濃度分布が一様でない場合、少量の試料を用いて分析を行うと分析値がばらつき、食品の規格基準への適否判定においては誤判定の原因となる可能性がある。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、試料調製方法によっては分析値のばらつきが非常に大きくなる場合があったが、適切な方法で試料調製を行えば、均質化が比較的容易な食品では分析に供する試料量を 2 g としても分析値のばらつきは十分小さくなる(RSD 10%未満)ことが示された。一方、ぶどうのような均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下にすると分析値のばらつきが大きくなる(RSD 15%以上)場合があった。これらの結果から、規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は 10.0 ± 0.1 g が適切と考えられた。

A. 研究目的

残留農薬等の公示試験法において、分析に供する試料量は、表 1 のようになっている。農産物については 30 年以上前に設定された。¹⁾この試料量の設定根拠は不明であるが、試料の均質性に加えて、試料量を設定した当時の測定装置の感度を考慮したものと推測される。しかし近年、測定装置の感度は大幅に向上しており、より少量の試料(分析用試料)を用いても分析することが可能である。欧米において汎用されている QuEChERS 法の試料量は、我が国の公示試験法の試料量よりも少量(野菜・果実の場合は AOAC Official Method 2007.01 では 15 g、CEN Standard Method EN 15662 では 10 g)である。分析に供する試料量を少量化することができれば、使用する溶媒・試薬量

の削減や濃縮等の操作時間の短縮が可能となり、検査の迅速化やコスト削減が期待される。

分析に供する試料(分析用試料)を少量化する際に注意すべきこととして試料の均質性が挙げられる。試料が十分均質でなく、試料中の農薬等の濃度分布が一様でない場合、少量の分析用試料を用いて分析をすると分析値がばらつき、食品の規格基準への適否判定においては誤判定の原因となる可能性がある。このため、分析用試料を少量化するためには、より均質な試料が必要となる。前述した QuEChERS 法のうち、CEN Standard Method EN 15662 は、常温での磨砕よりも均質になりやすいとされている凍結粉砕による試料調製を前提としている。²⁾一方、AOAC Official Method 2007.01 は常温磨砕による試料調製も想定し、

CEN Standard Method EN 15662 よりも若干、試料量を多く設定している。²⁾

食品の種類によっては均質になりにくい場合があることや、試料調製方法によって均質性が大きく異なる場合があることは、経験的には分かっているものの、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した報告は極めて少ない。野田ら³⁾は農薬を人為的に付着させたトマト及びミニトマトを用いて、磨砕方法による分析値のばらつきの違いについて検討し、試料量 20 g においても磨砕方法によってはばらつきが大きくなったこと、ミニトマトよりも果肉に対する果皮の比率が低いトマトの方がばらつきが大きかったことを報告している。トマトやミニトマトでは磨砕することにより、果肉は容易に液状となるが、果皮は細かくすることが困難であり、試料を秤取する際、果肉と果皮の割合が変動したことが分析値のばらつきが大きくなった原因と考察している。

一方、藪崎ら¹⁾は農薬が残留したもも(果肉のみ)、すもも(果皮及び果肉)及びおうとう(果皮及び果肉)を用いて、試料量 5 g での分析値のばらつき(2 併行)を求めたところ、いずれも RSD 20% 未満となり、大きなばらつきはなかったと報告している。すももやおうとうは、果肉部分に繊維質を多く含むため、果肉と果皮が混合されやすい。このため、少量(5 g)の試料を用いて分析を行っても分析値のばらつきは大きくならなかったと考察している。

このように、食品の種類や試料調製方法によって均質性は大きく異なり、精確な分析値を得るのに必要な試料量も異なると考えられる。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。また、規格基準への適否判定のための試

験における試料量(野菜・果実の場合)を提案した。

なお、本研究では以下の用語を使用した。

検体:食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370)の第 1 食品の部 A 食品一般の成分規格に示された食品の部位

試料:検体を一部採り、均質化(試料調製)したもの

試料調製:均質化

分析用試料:分析に供する試料

試料量:分析用試料の量

(常温)磨砕:検体(の一部)をナイフミルやフードプロセッサー、ミキサー等を用いて常温で試料調製すること

(常温)粉碎:乾燥した検体(の一部)をミルや遠心粉碎機等を用いて常温で試料調製すること

凍結粉碎:検体を凍結後、フードプロセッサー等を用いて粉碎し、試料調製すること

B. 研究方法

1. 食品

オレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう、りんご、くるみ(素焼き)、ごま(いり)、大豆及び牛の筋肉は東京都内の小売店で購入し、食品、添加物等の規格基準の第 1 食品の部 A 食品一般の成分規格に示された部位を検体とした。

試料量等による分析値のばらつきの検討には、オレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんごを 147 農薬(表 2)についてスクリーニング分析し、予め残留を確認した食品(オレンジ イマザリル及びチアベンダゾール; トマト 1 ブプロフェジン及びボスカリド; トマト 2 フルジオキソニル; トマト 3 ボスカリド; トマト 4 フルジオキソニル; トマト 5 フルジオキソニル; ぶどう アゾキシストロビン、イミダクロプリド及びシアゾファミド; ほうれんそう イミダクロプリド及びシアゾファミド; りんご クレソキシ

ムメチル、フェンプロパトリン及びボスカリド)を用いた。

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリル、トルエン及びメタノールは関東化学社製の残留農薬試験用試薬、水は超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。塩化ナトリウムは、和光純薬工業社製の残留農薬試験用試薬を用いた。リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは、和光純薬工業社製の特級を用いた。ろ紙は桐山製作所製 No.5B、ケイソウ土は和光純薬工業社製のセライト 545 を用いた。ドライアイス(ペレット)はアイスティサイエンス社から購入した。

(2) 農薬標準品及び標準溶液

表 2 に示した 147 農薬を検討に用いた。各農薬標準品は、林純薬工業社、関東化学社、和光純薬工業社、Sigma-Aldrich 社、Dr. Ehrenstorfers 社、Riedel-de Haën 社及び AccuStandard 社の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、アセトニトリル(アセトニトリルへの溶解性が低い場合はメタノール) 10 mL に溶解して調製した。アラマイトは、AccuStandard 社製の標準溶液(2 mg/mL)を用いた。検量線作成用の混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して調製した。

(3) 精製ミニカラム

オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)ミニカラムは、Mega Bond Elut C18(1000 mg、Agilent 製)を用いた。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル(NH₂)積層ミニカラムは InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス社製)を用いた。

(4) 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 水酸化ナトリウム溶液または 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。

3. 装置

常温磨砕は、ナイフミル Grindomix GM200 (Retsch 社製)及び家庭用フードプロセッサー multiquick professional MR 5550 M CA (BRAUN 社製)を使用して行った。

凍結粉砕は、業務用粉砕機 Robot Coupe BLIXER-3D (Robot Coupe 社製)を使用して行った。

水分率の測定は、電子水分計 MOC63u (島津製作所社製)を用いて、標準乾燥自動停止モード(120°C、停止条件:水分変化率 0.05%未満/30 秒)で行った。

試料温度の測定は、防水型デジタル温度計(佐藤計量器製作所社製)を使用して行った。

二酸化炭素濃度の測定は、GM70 ハンディタイプ CO₂ 計(ヴァイサラ社製)に食品用標準センサ SWP II -01M (ヴァイサラ社製)を接続して行った。

LC-Orbitrap-MS は、UltiMate-3000 (Dionex 社製)及び Q Exactive (Thermo Fisher Scientific 社製)を使用した。

4. 測定条件

(1) MS 条件

イオン化法 ESI(+);スプレー電圧 3000 V;ベーパーライザ温度 300°C;キャピラリー温度 230°C; Aux ガス流量 15 arb;スウィープガス流量 3 arb;シースガス流量 60 arb;S-lens RF level 60;スキャンモード フルスキャン;スキャン範囲 m/z 70~1000;分解能 70,000 FWHM (m/z 200); AGC target $3 \times e^6$;Maximum IT 200 ms;質量較正は、外部標準法で以下を用いて行った。N-ブチルアミン m/z 74.09643、カフェイン m/z 138.06619、

195.087652、MRFA m/z 524.26496、UltraMark1621 m/z 1221.99063、1421.97786、1621.96509;定量イオン表2に示した。

(2)LC条件

カラム Inertsil ODS-4(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2 μ m、ジーエルサイエンス社製);カラム温度 40°C;注入量 3 μ L;移動相 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A液)及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B液);流速 0.30 mL/min;グラジエント条件 0分(A:B=95:5)→10分(A:B=5:95)→13分(A:B=5:95)→13.01分(A:B=0:100)→18分(A:B=0:100)→18.01分(A:B=95:5);保持時間表2に示した。

5. 試料調製

(1)常温磨砕

①ナイフミルを用いた試料調製

a. くるみ(素焼き)、ごま(いり)及び大豆以外の食品

オレンジは果実全体を包丁で8等分したもの、トマトはへたを除去後、包丁で8等分したもの、ぶどうは果梗を除去したもの、ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除去後、包丁で約5 cm幅に切ったもの、りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除去後、包丁で8等分したもの、牛の筋肉は約3 cm角に切ったもの 250~300 gをナイフミルに入れ、3500 rpmで15秒間磨砕した後、7000 rpmで15秒間、9回磨砕した。

b. くるみ(素焼き)、ごま(いり)及び大豆

検体 200 gをナイフミルに入れ、3500 rpmで15秒間粉砕した後、7000 rpmで15秒間、9回粉砕した。

②家庭用フードプロセッサーを用いた試料調製

トマト(へたを除去後、包丁で8等分したもの)約250 gを家庭用フードプロセッサー(multiquick professional MR 5550 M CA、BRAUN社製)を用

いて最大回転量(level 12)で15秒間、1回または10回磨砕した。

(2)凍結粉砕

①くるみ(素焼き)、ごま(いり)及び大豆以外の食品

トマトはへたを除去後、包丁で4等分したもの、ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除去後、包丁で約5 cm幅に切ったもの、牛の筋肉は約3 cm角に切ったもの 250~300 gに同量のドライアイス(粉砕したもの)を加えて混合し、3分間放置した。これを、ドライアイス約100 gを粉砕して予冷した業務用粉砕機に入れ、2分間粉砕した。

②くるみ(素焼き)、ごま(いり)及び大豆

ドライアイス約200 g(大豆は約300 g)を粉砕して予冷した粉砕機に、検体約200 g(大豆は約300 g)を入れて2分間放置後、2分間粉砕した。

6. 試験溶液の調製

通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」に準じて以下のように調製した。

(1)抽出及び塩析

試料(2、5、10及び20 g(各5個))を量り採り、アセトニトリル 50 mLを加え、約1分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mLを加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。

抽出液を、試料量 2 gの場合は 25 mL(試料 0.5 g相当)、5 gの場合は 20 mL(試料 1 g相当)、10 gの場合は 10 mL(試料 1 g相当)、20 gの場合は 5 mL(試料 1 g相当)採った。これにアセトニトリルを試料量 10 gの場合は 10 mL、20 gの場合は 15 mL加えた。塩化ナトリウム 10 g及びリン酸緩衝液 20 mL(試料量 2 gの場合は 15 mL)を加えて 5分

間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。

(2) 精製

① ぶどう以外

(1) で得られたアセトニトリル層を採り、予めアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした ODS カラムに負荷し、アセトニトリル 5 mL で溶出した。全溶出液を 40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。トマト及びりんごの場合は、残留物にメタノール 2 mL (試料量 2 g の場合は 1 mL) を加えて溶解した後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を試験溶液とした (試料 0.5 g/mL)。ほうれんそうの場合は、残留物にメタノール 5 mL (試料量 2 g の場合は 2.5 mL) を加えて溶解した後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。上清 100 µL にメタノール 900 µL を加えて混合したものを試験溶液とした (試料 0.02 g/mL)。オレンジの場合は、残留物にメタノール 10 mL (試料量 2 g の場合は 5 mL) を加えて溶解した後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を試験溶液とした (試料 0.1 g/mL)。

② ぶどう

(1) で得られたアセトニトリル層を採り、40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル/トルエン (3:1) 2 mL に溶解した。これを予めアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL でコンディショニングしたグラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に注入した後、アセトニトリル/トルエン (3:1) 20 mL を注入した。全溶出液を 40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をメタノール 1 mL (試料量 2 g の場合は 0.5 mL) に溶解したものを試験溶液 (試料 1 g/mL) とした。

7. 検量線の作成

標準溶液 (0.002、0.005、0.01、0.02、0.05 及び 0.1 µg/mL) を調製し、それぞれ 3 µL を LC-Orbitrap-MS に注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。

8. 分析値のばらつきの検討

農薬が残留した野菜・果実を常温磨砕または凍結粉砕により試料調製した。試料 2、5、10 及び 20 g (各 5 個) を採り、6. 試験溶液の調製に従って試験溶液を調製し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

C. 研究結果及び考察

規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を検討するため、野菜・果実を常温磨砕または凍結粉砕により試料調製後、得られた試料を 2、5、10 及び 20 g (各 5 個) 採り、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

1. 常温磨砕

(1) ナイフミル

ナイフミル (理化学実験用の磨砕装置) を用いて、農薬が残留した野菜・果実 (オレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんご) を常温磨砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。結果を表 3 及び図 1 に示した。ぶどうを除き、いずれの食品も試料量によらず分析値のばらつきは RSD10% 未満となった。試料量による分析値のばらつきの違いは認められなかった。ぶどうにおいて検出されたアゾキシストロビン及びイミダクロプリドについても、試料量によらず、RSD10% 未満となった。これに対し、同一試料中に残留していたシアゾファミドは、試料量 10 及び 20 g では RSD5% 未満となったが、試料量 5 g では 18.5%、2 g では 33.3% と非常に大きくなった。

CAC/GL 40-1993 (Guidelines on Good

Laboratory Practice in Residue Analysis[残留分析における適正試験所規範ガイドライン])では、分析法の性能評価において評価すべきパラメータの一つとして試料の均質性を挙げており、分析用試料中の濃度のばらつき(CV_{sp})について、定量分析では10%以下、スクリーニング分析では15%以下を目標値として設定している。 CV_{sp} が求められない場合は、残留試料の分析値のばらつき(CV_L)が目標値を満たすことを求めている。

今回の検討では、ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドを除き、試料量2gの場合においても、我が国の妥当性評価ガイドラインの併行精度の目標値(0.001 ppm < 添加濃度 ≤ 0.01 ppm: 25%未満、0.01 ppm < 添加濃度 ≤ 0.1 ppm: 15%未満、添加濃度 > 0.1 ppm: 10%未満)及びEUのガイドライン(SANTE/11945/2015[食品および食餌中の残留農薬分析のための分析的品質管理および分析法バリデーション手順])の併行精度の目標値(20%)を満たした。一方、ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドは試料量2gでは目標値を満たさなかった。ぶどうにおいて検出された農薬のうち、アゾキシストロビン及びイミダクロプリドは浸透移行性が高いため、果皮のみならず果肉にも残留していた可能性が高い。これに対し、シアゾファミドは浸透移行性が低いため、果皮の残留濃度が高く、果肉は非常に低かったと推測される。ぶどうでは、試料が十分に均質にならず、試料秤取の際に果皮と果肉の割合が変動したことがシアゾファミドの分析値のばらつきが大きくなった原因と考えられた。岩越ら⁴⁾は、アセタミプリド、イミダクロプリド、シプロジニル、ピラクロストロビン及びボスカリドが残留したブルーベリーを冷凍後、フードプロセッサで粉砕して試料調製し、試料量2、5、10及び20gでの分析値のばらつき(4併行)を求めた。その結果、ピラクロストロビン以外の農薬では試料量2gでも分

析値のばらつきはRSD10%未満となったが、ピラクロストロビンは試料量5g以下ではRSD10%以上となったと報告している。このように同一試料中に残留していても、農薬によって試料中の濃度分布が異なり、均質化が不十分な試料では少量の試料を分析に供すると分析値のばらつきが大きくなる場合があると考えられた。

本研究で検出された農薬のうち、アゾキシストロビン、イミダクロプリド及びボスカリドは浸透移行性が高く、その他の農薬は比較的低い。浸透移行性が低い農薬についても、ぶどう以外の食品では試料量によらず分析値のばらつきは小さいことから、食品によって均質化の容易さは異なるものと考えられた。

以上の結果から、均質化が比較的容易な食品では分析に供する試料量を2gとしても分析値のばらつきは十分小さくなる(RSD 10%未満)ことが示された。一方、ぶどうのような均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を5g以下にすると分析値のばらつきが大きくなる(RSD 15%以上)場合があった。これらの結果から、食品の規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は10g程度が望ましいと考えられた。

(2) 家庭用フードプロセッサ

家庭用のフードプロセッサやミキサー等を用いて磨砕を行うと、果皮が十分細かくならなかったり、短時間で固形分と水分が分離したりすることがある。野田ら²⁾は人為的に農薬を塗布したサンプルを用いて、磨砕装置や方法による分析値のばらつきを比較し、家庭用フードプロセッサを用いた場合、業務用ブレンダーと比べて分析値のばらつきが大きくなったと報告している。そこで本研究では、比較的均質化が困難とされているトマトを用いて家庭用フードプロセッサで磨砕し、得られた試

料の外観や分析値のばらつきをナイフミル(理化学実験用の磨砕装置)で調製した場合と比較した。

まず、ボスカリドが残留したトマト 3 を家庭用フードプロセッサーを用いて最大回転量で 15 秒間、10 回磨砕した。その結果、2~3 mm 角程度の果皮や種子が粉砕されずに残っていた(図 2(a))。これに対し、ナイフミルで 15 秒間、10 回磨砕した場合、種は 1 mm 角以下に粉砕され、果皮も肉眼では確認できない程、微細となり(図 2(c))、磨砕後の試料の外観は用いた装置により大きく異なった。家庭用フードプロセッサーで磨砕した試料の分析値のばらつきを求めたところ、試料量 2 g においても RSD10%未満となり、ナイフミルを用いた場合とほぼ同程度となった(表 3、図 1)。ボスカリドは浸透移行性が比較的高く、果皮だけではなく、果肉にも分布していたと考えられる。このため、家庭用フードプロセッサーを用いて調製した試料は、ナイフミルを用いて調製した試料と比較して均質性はやや劣るものの、分析値のばらつきは大きくならなかったと考えられた。

次に、フルジオキソニルが残留したトマト 4 を家庭用フードプロセッサーを用いて最大回転量で 15 秒間、1 回のみ磨砕した(図 2(b))。その結果、5 mm 角程度の果皮や、粉砕されていない種子が多く残った。各試料量での分析値のばらつきを求めたところ、試料量 20 g においても RSD20%以上と非常に大きくなった。フルジオキソニルは浸透移行性が低いいため、果皮に多く残留し、果肉にはほとんど分布していなかったと推測される。このような場合は、試料の均質化が十分でないと分析値のばらつきが大きくなるものと考えられた。

これらの結果から、試料調製方法(使用装置、操作方法を含む)によって試料の均質性は大きく異なることが示唆された。また、均質化が困難な食品では、試料調製方法によっては試料量を 20 g と

多くしても分析値のばらつきが大きくなる場合があることが示された。

農薬等の検査では、家庭用の磨砕装置を使用して試料調製する場合がある。しかし、家庭用の磨砕装置は理化学実験用の装置と比較して、性能が低く、均質化が困難な場合が多い。加えて、家庭用の磨砕装置はパッキン部分にゴム等が使用されている場合が多く、ゴム添加剤によって試料が汚染されたり、ゴム部分に農薬が吸着したりする可能性がある。これらのことから、試料調製の際は、できる限り性能の良い理化学実験用の装置を用いるとともに、使用する装置での操作方法(時間や回転数等)についても検討することが必要と考えられた。

2. 凍結粉砕

凍結粉砕した試料は、常温磨砕した試料よりも均質性が高いと期待される。凍結粉砕による試料調製には様々な方法があるが、いずれの方法においても注意すべき点として、吸湿や結露による試料重量の増加が挙げられる。加えて、ドライアイスを用いて粉砕する場合は、ドライアイスの残存による試料重量の増加にも注意する必要がある。そこで、本研究では予冷方式ドライアイス凍結粉砕法による試料調製方法を検討後、農薬が残留した食品を凍結粉砕によって試料調製し、分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。

(1) 凍結粉砕による試料調製の検討

①ドライアイスの残存による影響

まず、凍結粉砕により調製した試料にドライアイスが残存しているかを確認するため、ほうれんそう、くるみ(素焼き)、ごま(いり)、大豆及び牛の筋肉を凍結粉砕し、試料温度-50、-40、-30、-25 及び-20℃での二酸化炭素濃度(試料から約 2cm 上)をCO₂計を用いて測定した。結果を表 4 に示した。なお、室内の二酸化炭素濃度は約 0.05%であった。

試料温度-40℃以下では、いずれの試料も2%(測定上限)を超えていた。試料温度-20℃では0.13~0.34%であり、-40℃より濃度は低いものの、ドライアイスが残存していた。

次に、凍結粉砕した試料5gを量り採り、秤取直後と10分間室温放置後の重量に変化があるかを確認した。結果を表5に示した。試料温度-50℃以下で試料を秤取した場合、ドライアイスの残存量が非常に多く、試料採取直後から重量が急速に減少し、秤量することはできなかった。試料温度-40℃以上では、重量変化率は-0.4%未満であり、分析に大きな影響はないと考えられた。

くるみ(素焼き)以外の食品では試料温度が-20℃となってもパウダー状であった。これに対し、脂質含量が高いくるみ(くるみ(いり)の脂質含量は68.8%⁵⁾)では、試料温度が-40℃以上になると、徐々に粘性が上がった。これは、融点が低い植物性脂質が融解したことが原因と考えられる。植物性脂質が多い食品では、試料温度が高くなり過ぎないうちに秤取するのがよいと考えられた。

以上の結果から、ドライアイスは残存しているものの、試料温度-30℃程度で試料を秤取するのがよいと考えられた。

②吸湿・結露による影響

凍結粉砕した試料と常温磨砕・粉砕した試料の水分率を比較した。その結果、両者の水分率の差はいずれも0.5%未満であった(表5)。空気中の水分を吸湿しやすいと予想された乾燥食品(くるみ(素焼き)、ごま(いり)及び大豆)においても、大きな差は見られず、吸湿や結露による影響は認められなかった。水分率のばらつきは、検討したすべての食品で凍結粉砕した試料の方が、常温磨砕・粉砕した試料と比較して小さく、凍結粉砕した試料の方が均質性が高いことが示唆された。

本検討は室温22~25℃、湿度20~35%で行っ

たが、室温や湿度が高い条件では、結露しやすくなり、ドライアイスの昇華速度も速くなると予想される。今後、室温や湿度がより高い条件においても問題がないか検討が必要と考えられた。

(2) 試料量による分析値のばらつきの検討

浸透移行性が低いフルジオキソニルが残留したトマトを凍結粉砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。その結果、試料量2gの場合でも分析値のばらつきはRSD10%未満となり、ナイフミルを用いて常温磨砕した場合とほぼ同程度となった(表3、図1)。

本検討では、凍結粉砕と常温磨砕(ナイフミル)で試料の均質性に違いは認められなかった。しかし、畜水産物は、常温磨砕では皮や筋等を細かくするのは困難であり、凍結粉砕の方が均質性の高い試料が得られると考えられる。また、くるみやごまのように植物性脂質が多く、常温ではペースト状となり、油脂と残渣が分離するような食品についても、凍結粉砕で調製した方が均質性の高い試料が得られると期待される。

3. 試料量の提案

農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、試料調製方法によっては分析値のばらつきが非常に大きくなる場合があったが、適切な方法で試料調製を行えば、均質化が比較的容易な食品では分析に供する試料量を2gとしても分析値のばらつきは十分小さくなる(RSD 10%未満)ことが示された。一方、ぶどうのような均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を5g以下にすると分析値のばらつきが大きくなる(RSD 15%以上)場合があった。これらの結果から、食品の規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は10gが適当と考えら

れた。現行の残留農薬等の公示試験法では、試料量 20.0 g(19.95 g 以上 20.05 g 未満)、10.0 g(9.95 g 以上 10.05 g 未満)及び 5.00 g(4.995 g 以上 5.005 g 未満)での試料秤取における誤差はそれぞれ $\pm 0.25\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 及び $\pm 0.1\%$ まで許容している(表 1)。しかし、規格基準の適否判定において分析値を求める際は、「基準値より 1 けた多く求め、その多く求めた 1 けたについて四捨五入す」こととなっており、残留農薬等の基準値は通常 1 けたであるため、試料秤取の許容誤差は $\pm 1\%$ としても問題はないと考えられる。欧米において汎用されている QuEChERS 法のうち AOAC Official Method 2007.01 は 15.0 ± 0.1 g、CEN Standard Method EN 15662 は 10.0 ± 0.1 g を野菜・果実の場合の試料量としている。以上のことから、食品の規格基準への適否判定のための試験(野菜・果実の場合)における試料量として 10.0 ± 0.1 g を提案する。

D. 結論

食品の規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、①試料調製方法(使用装置や操作方法を含む)によって試料の均質性は大きく異なること、②均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があることが示された。本研究結果から、食品の規

格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は 10 ± 0.1 g が適切と考えられた。

なお、本研究において検出された農薬はいずれも基準値未満であった。

E. 参考文献

- 1) 藪崎隆ら、第 39 回農薬残留分析研究会講演要旨集、153-156(2016)
- 2) Lehotay, S.J. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods, *Methods Mol Biol*, 747, 65-91 (2011).
- 3) 野田聡子ら、第 34 回農薬残留分析研究会講演要旨集、63-69(2011)
- 4) 岩越景子ら、LC-MS/MS を用いた農産物中残留農薬の迅速試験法に関する検討、*食衛誌*、55、254-260(2014)
- 5) 日本食品標準成分表 2015 年版

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 残留農薬等の公示試験法の試料量

食 品		試料量(g) *
農産物	野菜、果実、ハーブ	20.0
	穀類、豆類、種実類	10.0
	茶、ホップ	5.00
畜水産物	固体試料(脂肪以外)	10.0、20.0
	固体試料(脂肪)	5.00、10.0、20.0
	液体試料(乳、卵、はちみつ等)	5.00、10.0、20.0

*試料量の許容範囲は、20.0 g の場合 19.95 g 以上 20.05 g 未満、10.0 g の場合 9.95 g 以上 10.05 g 未満、5.00 g の場合 4.995 g 以上 5.005 g 未満

表 2 検討化合物の保持時間及び定量イオン

化合物	組成式	定量イオン		保持時間 (min)
		イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)	
1 Acetamidrid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	[M+H] ⁺	223.0745	5.3
2 Acetochlor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	[M+H] ⁺	270.1256	9.9
3 Acibenzolar- <i>S</i> -methyl	C ₈ H ₆ N ₂ OS ₂	[M+H] ⁺	210.9995	9.7
4 Acrinathrin	C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO ₅	[M+NH ₄] ⁺	559.1663	12.0
5 Ametryn	C ₉ H ₁₇ N ₃ S	[M+H] ⁺	228.1278	9.3
6 Anilofos	C ₁₃ H ₁₉ ClNO ₃ PS ₂	[M+H] ⁺	368.0305	10.3
7 Aramite	C ₁₅ H ₂₃ ClO ₄ S	[M+NH ₄] ⁺	352.1345	11.2
8 Atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	[M+H] ⁺	216.1011	8.5
9 Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	404.1241	9.2
10 Benalaxyl	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	326.1751	10.4
11 Bendiocarb	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	[M+H] ⁺	224.0918	7.3
12 Benzofenap	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	431.0924	11.2
13 Bitertanol	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	338.1863	10.5
14 Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	343.0400	9.2
15 Bromacil	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	261.0233	7.2
16 Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	[M+H] ⁺	306.1635	11.3
17 Butafenacil	C ₂₀ H ₁₈ ClF ₃ N ₂ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	492.1144	9.7
18 Cadusafos	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	[M+H] ⁺	271.0950	10.8
19 Carpropamid	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₃ NO	[M+H] ⁺	334.0527	10.3
20 Chlorfenvinphos (<i>E, Z</i>)	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	[M+H] ⁺	358.9768	10.4
21 Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	222.0429	5.4
22 Chloroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	291.0895	9.6
23 Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	[M+H] ⁺	351.9307	11.6
24 Chlorpyrifos methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	[M+H] ⁺	321.9023	10.9
25 Chromafenozide	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	395.2329	9.8
26 Clomeprop	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ NO ₂	[M+H] ⁺	324.0553	11.2
27 Cloquintocet mexyl	C ₁₈ H ₂₂ ClNO ₃	[M+H] ⁺	336.1361	11.4
28 Clothianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	[M+H] ⁺	250.0160	4.7
29 Cumyluron	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	303.1259	9.6
30 Cyanazine	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	[M+H] ⁺	241.0963	7.0
31 Cyazofamid	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	325.0521	9.9
32 Cycloprothrin	C ₂₆ H ₂₁ Cl ₂ NO ₄	[M+NH ₄] ⁺	499.1187	11.8
33 Cyflufenamid	C ₂₀ H ₁₇ F ₅ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	413.1283	10.6
34 Cyproconazole	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	292.1211	9.3
35 Cyprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	[M+H] ⁺	226.1339	10.7
36 Daimuron	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O	[M+H] ⁺	269.1649	9.5
37 Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	[M+H] ⁺	305.1083	10.6
38 Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	406.0720	10.7
39 Diflubenzuron	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	311.0394	10.0
40 Diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	395.0814	11.0
41 Dimethirimol	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	[M+H] ⁺	210.1601	8.1
42 Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	[M+H] ⁺	230.0069	5.2
43 Dimethomorph (<i>E, Z</i>)	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	[M+H] ⁺	388.1310	9.18,9.38
44 Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	233.0243	8.5
45 Edifenphos	C ₁₄ H ₁₅ O ₂ PS ₂	[M+H] ⁺	311.0324	10.4
46 Epoxiconazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	[M+H] ⁺	330.0804	9.9
47 Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	[M+H] ⁺	384.9949	11.4
48 Ethiprole	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ F ₃ N ₄ OS	[M+H] ⁺	396.9899	9.0
49 Etoxazole	C ₂₁ H ₂₃ F ₂ NO ₂	[M+H] ⁺	360.1770	11.8
50 Etrinfos	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	[M+H] ⁺	293.0720	10.5

表 2 (つづき)

化合物	組成式	定量イオン		保持時間 (min)
		イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)	
51 Fenamidone	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	[M+H] ⁺	312.1165	9.2
52 Fenarimol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	331.0400	9.8
53 Fenbuconazole	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄	[M+H] ⁺	337.1215	9.8
54 Fenobucarb	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	208.1332	8.9
55 Fenoxaprop ethyl	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	[M+H] ⁺	362.0790	11.1
56 Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	302.1387	10.1
57 Fenpropathrin	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	[M+NH ₄] ⁺	367.2016	11.8
58 Fenpropimorph	C ₂₀ H ₃₃ NO	[M+H] ⁺	304.2635	12.5
59 Ferimzone (E, Z)	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	[M+H] ⁺	255.1604	9.4
60 Fipronil	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	[M+NH ₄] ⁺	453.9726	9.9
61 Flamprop methyl	C ₁₇ H ₁₅ ClFNO ₃	[M+H] ⁺	336.0797	9.5
62 Fludioxonil	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	266.0736	9.4
63 Flufenacet	C ₁₄ H ₁₃ F ₄ N ₃ O ₂ S	[M+H] ⁺	364.0738	9.7
64 Fluquinconazole	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	[M+H] ⁺	376.0163	9.7
65 Fluridone	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ NO	[M+H] ⁺	330.1100	9.1
66 Fluvalinate	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	520.1609	11.8
67 Furametpyr	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₂	[M+H] ⁺	334.1317	8.3
68 Hexaconazole	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	[M+H] ⁺	314.0822	10.4
69 Hexaflumuron	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ F ₆ N ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	482.9708	10.9
70 Hexythiazox	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	[M+H] ⁺	353.1085	11.5
71 Imazalil	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	297.0556	10.3
72 Imibenconazole	C ₁₇ H ₁₃ Cl ₃ N ₄ S	[M+H] ⁺	412.9971	11.2
73 Indanofan	C ₂₀ H ₁₇ ClO ₃	[M+H] ⁺	341.0939	10.0
74 Indoxacarb	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	[M+H] ⁺	528.0780	10.8
75 Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	321.2173	9.7
76 Isoprocarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	194.1176	8.2
77 Isoxathion	C ₁₃ H ₁₆ NO ₄ PS	[M+H] ⁺	314.0611	10.8
78 Kresoxim methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	314.1387	10.3
79 Lactofen	C ₁₉ H ₁₅ ClF ₃ NO ₇	[M+NH ₄] ⁺	479.0828	11.2
80 Linuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	249.0192	9.2
81 Lufenuron	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	528.0122	11.4
82 Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	[M+H] ⁺	331.0434	9.5
83 Mepanipyrim	C ₁₄ H ₁₃ N ₃	[M+H] ⁺	224.1182	10.1
84 Metalaxyl	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	280.1544	8.4
85 Methabenzthiazuron	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	[M+H] ⁺	222.0696	8.5
86 Methidathion	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	[M+NH ₄] ⁺	319.9957	8.9
87 Methiocarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	[M+H] ⁺	226.0896	9.2
88 Metolachlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	[M+H] ⁺	284.1412	10.0
89 Monolinuron	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	215.0582	8.0
90 Myclobutanil	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	[M+H] ⁺	289.1215	9.4
91 Naproanilide	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂	[M+H] ⁺	292.1332	10.1
92 Napropamide	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	272.1645	9.9
93 Norflurazon	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	[M+H] ⁺	304.0459	8.7
94 Novaluron	C ₁₇ H ₉ ClF ₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	493.0196	11.0
95 Oxadixyl	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	279.1340	6.8
96 Oxaziclomefone	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	[M+H] ⁺	376.0866	11.1
97 Paclobutrazol	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	294.1368	9.2
98 Penconazole	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	[M+H] ⁺	284.0716	10.2
99 Pencycuron	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	329.1415	10.7
100 Pentoxazone	C ₁₇ H ₁₇ ClFNO ₄	[M+H] ⁺	354.0903	11.2

表 2 (つづき)

化合物	組成式	定量イオン		保持時間 (min)
		イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)	
101 Phenmedipham	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	[M+NH ₄] ⁺	318.1448	8.8
102 Phenthoate	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	[M+H] ⁺	321.0379	10.3
103 Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	[M+NH ₄] ⁺	385.0207	10.6
104 Phosphamidon	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₅ P	[M+H] ⁺	300.0762	6.8
105 Piperonyl butoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	[M+NH ₄] ⁺	356.2432	11.4
106 Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	239.1503	8.3
107 Pirimiphos methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	[M+H] ⁺	306.1036	10.8
108 Prochloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	376.0381	10.5
109 Profenofos	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	[M+H] ⁺	374.9402	11.1
110 Prometryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	[M+H] ⁺	242.1434	10.1
111 Propachlor	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	[M+H] ⁺	212.0837	8.5
112 Propanil	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	[M+H] ⁺	218.0134	9.1
113 Propaquizafop	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	[M+H] ⁺	444.1321	11.3
114 Propargite	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	[M+NH ₄] ⁺	368.1891	11.6
115 Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	342.0771	10.4
116 Propyzamide	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	[M+H] ⁺	256.0291	9.4
117 Pyraclofos	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₂ O ₃ PS	[M+H] ⁺	361.0537	10.6
118 Pyraclostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	[M+H] ⁺	388.1059	10.6
119 Pyrazophos	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	[M+H] ⁺	374.0934	10.8
120 Pyrifthalid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	[M+H] ⁺	319.0747	9.2
121 Pyrimethanil	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	[M+H] ⁺	200.1182	9.5
122 Pyriproxyfen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	322.1438	11.6
123 Quinalphos	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	[M+H] ⁺	299.0614	10.4
124 Quinoxifen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	[M+H] ⁺	308.0040	11.7
125 Quizalofop ethyl	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	[M+H] ⁺	373.0950	11.2
126 Simazine	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	[M+H] ⁺	202.0854	7.5
127 Simeconazole	C ₁₄ H ₂₀ FN ₃ OSi	[M+H] ⁺	294.1433	9.7
128 Spinosyn A	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	[M+H] ⁺	732.4681	12.2
129 Spinosyn D	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀	[M+H] ⁺	746.4838	12.5
130 Spiroxamine	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	[M+H] ⁺	298.2741	11.4
131 Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	308.1524	10.1
132 Tebufenpyrad	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	334.1681	11.2
133 Tebuthiuron	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	[M+H] ⁺	229.1118	7.5
134 Teflubenzuron	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	380.9815	11.3
135 Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	[M+H] ⁺	242.1434	10.1
136 Tetrachlorvinphos	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	[M+H] ⁺	366.9037	10.1
137 Tetraconazole	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	[M+H] ⁺	372.0288	9.7
138 Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	[M+H] ⁺	202.0433	7.2
139 Thiacloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	[M+H] ⁺	253.0309	6.0
140 Tolfenpyrad	C ₂₁ H ₂₂ ClN ₃ O ₂	[M+H] ⁺	384.1474	11.4
141 Triadimefon	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	[M+H] ⁺	294.1004	9.5
142 Triadimenol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	[M+H] ⁺	296.1161	9.5
143 Triazophos	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	[M+H] ⁺	314.0723	9.8
144 Trifloxystrobin	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	409.1370	10.9
145 Triflumizole	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	[M+H] ⁺	346.0929	11.0
146 Triflumuron	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	359.0405	10.5
147 Triticonazole	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	318.1368	9.7

表 3 分析に供する試料量と分析値のばらつき

均質化方法	試料	農薬	分析値*				基準値 (ppm)	
			平均 (mg/kg)	RSD(%)				
				試料量				
				2 g	5 g	10 g		20 g
常温磨砕(ナイフミル)	オレンジ	Imazalil	0.78	6.9	6.4	6.5	3.0	5
常温磨砕(ナイフミル)		Thiabendazole	0.53	6.7	4.6	3.6	2.4	10
常温磨砕(ナイフミル)	トマト 1	Boscalid	0.037	4.3	4.7	2.8	6.3	5
常温磨砕(ナイフミル)		Buprofezin	0.012	4.2	4.4	2.9	8.3	1
常温磨砕(ナイフミル)	トマト 2	Fludioxonil	0.056	4.9	5.0	2.6	4.2	5
常温磨砕(ナイフミル)	ぶどう	Azoxystrobin	0.0094	8.2	3.2	2.1	4.5	10
常温磨砕(ナイフミル)		Cyazofamid	0.0082	33.3	18.5	4.8	4.9	10
常温磨砕(ナイフミル)		Imidacloprid	0.0024	3.8	3.7	2.7	1.1	3
常温磨砕(ナイフミル)	ほうれんそう	Cyazofamid	1.0	3.7	5.8	3.2	1.6	25
常温磨砕(ナイフミル)		Imidacloprid	0.50	3.5	6.3	4.3	1.1	15
常温磨砕(ナイフミル)	りんご	Boscalid	0.0081	8.2	8.1	3.1	2.6	2
常温磨砕(ナイフミル)		Fenpropathrin	0.11	9.6	8.4	5.0	4.5	5
常温磨砕(ナイフミル)		Kresoxim methyl	0.017	3.5	6.9	6.3	7.1	5
常温磨砕(家庭用フードプロセッサー)	トマト 3	Boscalid	0.077	1.5	8.2	6.3	5.1	5
常温磨砕(家庭用フードプロセッサー)	トマト 4	Fludioxonil	0.037	24.3	10.3	29.6	21.9	5
凍結粉砕	トマト 5	Fludioxonil	0.037	8.0	5.9	7.0	4.3	5

*各試料量 5 併行

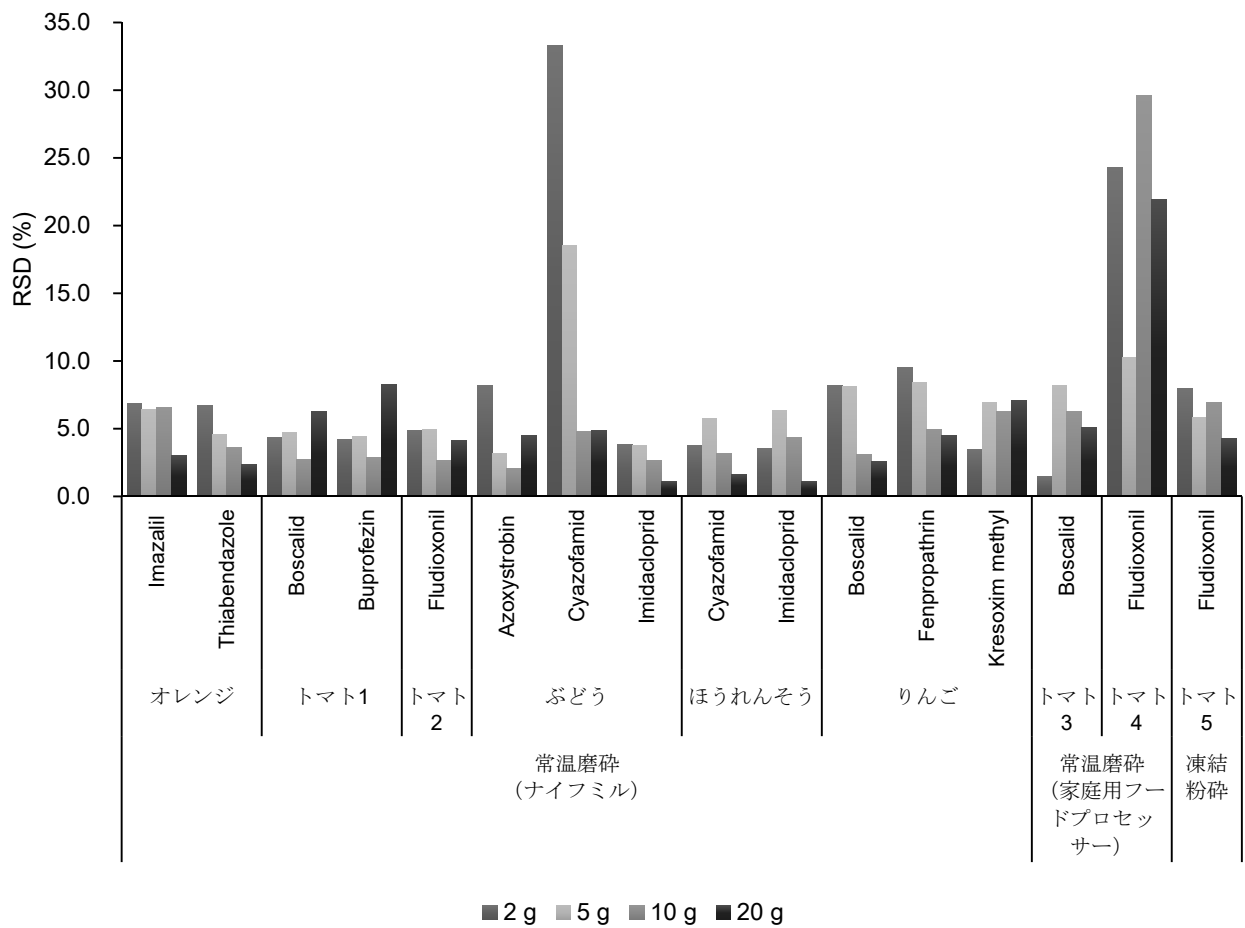


図 1 分析に供する試料量と分析値のばらつき

(a)



(b)



(c)



図2 常温磨砕したトマト試料

- (a) 家庭用フードプロセッサーを用いて最大回転量(level 12)で15秒間、10回磨砕した
- (b) 家庭用フードプロセッサーを用いて最大回転量(level 12)で15秒間磨砕した
- (c) ナイフミルを用いて3500 rpmで15秒間磨砕後、7000 rpmで15秒間、9回磨砕した

表 4 凍結粉碎後の試料温度と二酸化炭素濃度(%)*

試料温度(℃)	ほうれんそう	くるみ(素焼き)	ごま(いり)	大豆	牛の筋肉
-50	>2	>2	>2	>2	>2
-40	>2	>2	>2	>2	>2
-30	0.56	0.33	0.33	>2	0.76
-25	0.48	0.21	0.21	0.88	0.40
-20	0.34	0.13	0.13	0.24	0.30

*試料から約 2 cm 上での濃度
(室内の二酸化炭素濃度は約 0.05%)

表 5 凍結粉碎試料(試料量 5 g)の秤取直後と 10 分間室温放置後の重量変化率(%)*

試料温度(℃)	ほうれんそう	くるみ(素焼き)	ごま(いり)	大豆	牛の筋肉
-40	-0.29	-0.13	-0.03	-0.03	-0.22
-30	-0.36	-0.06	-0.02	-0.04	-0.34
-20	-0.35	-0.11	-0.02	-0.02	-0.16

* (10 分間室温で放置後の重量－秤取直後の重量)/10 分間室温で放置後の重量×100(%)

表 6 常温磨砕・粉砕及び凍結粉砕した試料の水分率(%)*

	常温磨砕・粉砕		凍結粉砕		水分率の差 (B-A、%)
	平均(A、%)	RSD(%)	平均(B、%)	RSD(%)	
ほうれんそう	87.45	3.31	87.38	0.11	-0.07
くるみ(素焼き)	1.36	10.22	1.64	3.81	0.28
ごま(いり)	1.06	6.60	1.49	2.05	0.43
大豆	11.26	1.29	11.52	0.35	0.26
牛の筋肉	73.06	0.81	72.96	0.05	-0.10

*試料量 5 g、3 併行

Ⅱ．分担研究報告

4. 課題5. 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題 5. 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

畜水産物中の残留抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における公定試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドを調査対象として、各国政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署への聞き取り調査及び文献調査等を行った。得られた調査結果から、各国で実施されている残留抗生物質のバイオアッセイ法の整備状況等を取り纏めた。併せて、我が国のバイオアッセイによる通知試験法を調査して、欧米等で行われているバイオアッセイによる試験法と比較した。欧米等の多くの国では、抗生物質の検査法として、現在でも様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられていた。しかし、マトリックスの影響による誤判定、検出限界濃度が高く基準値判定には適用できない等の多くの課題点があることが明らかになった。しかし、と畜場等の現場の検査室では、バイオアッセイ法は極めて有効な方法であることから、バイオアッセイ法の特性を生かした新たな検査方法の提案が必要であると考えられた。

A. 研究目的

畜水産物に残留する抗生物質の検査法は、高感度、高精度に分析することが可能な LC-MS/MS、GC-MS/MS 等の分析機器の普及に伴い、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、機器分析法では、試験法が未開発の抗生物質が存在する一方で、バイオアッセイ法は低コストで多数の抗生物質を簡便に試験できることから、と畜場等の検査室を中心に、現在でも一次スクリーニング法として汎用されている。

我が国では、平成 6 年に示された「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」が微生物学的試験法として通知されている。本法は、試料の前処理が簡便であり、多数の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、抗生物質の同定が出来ない等の課題点も指摘されている。また、本法は、試験法が通知されてから 20 年以上が経過しているが、その間に試験法の改定は行われていない。

近年では、抗菌物質の不適切な使用を背景として、薬剤耐性菌が世界的に増加する一方で、新たな抗菌薬の開発は減少傾向にあり、国際社会でも大きな課題となっている。これら薬剤耐性 (AMR: Antimicrobial Resistance) の問題に適切に対応するためにも、国際的なバイオアッセイ法の整備状況等を把握し、バイオアッセイ法及び機器分析法の特性を踏まえた、新たな試験体系・試験法の提案が必要と考えられる。しかしながら、欧米等で実施されている畜水産物の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法について、その詳細を調査した報告は極めて少ない。

そこで、初年度は、欧米等(米国、カナダ、EU、

オーストラリア、ニュージーランド)におけるバイオアッセイによる試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。併せて、欧米等で実施されている試験法と比較するために、我が国におけるバイオアッセイによる試験法の概要及び検査の実施状況を調査した。

B. 研究方法

欧米等(米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランド)で、動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署へのメールでの聞き取り調査及び文献調査を実施した。また、各国独自に「残留抗生物質のモニタリング調査」を実施している場合には、それらの検査方法を調査した。我が国のバイオアッセイによる検査の実施状況等は、検疫所、食肉衛生検査所、民間の検査機関に対して、聞き取り調査を実施した。

C. 研究結果及び考察

1. バイオアッセイによる残留抗生物質の検査法

最も初期に利用されていた食品中の残留抗生物質の検出方法は、種々の微生物の成長阻害を検出する方法であり、現在用いられているバイオアッセイ法も同様の原理に基づいている。基本的な微生物阻害試験は、寒天または液体培地中に播種した微生物を用いる。多くの場合、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Micrococcus luteus*、*Escherichia coli*、*Bacillus megatherium*、*Streptococcus thermophiles* 等の培養を行う。次いで、これに乳、尿、組織、卵、または蜂蜜試料等を培地上に載せて、インキュベートする。検査試料は、試料を含浸させたペーパーディスク、またはステンレススチール製シリンダーで培地に直接載せる。イ

ンキュベーション中に液体が培地中に拡散することがあるが、試料に十分量の阻害化合物が含まれている場合、微生物の成長が低減あるいは阻害され、試料中の阻害化合物の存在は、阻止円によって示される。一般に、バイオアッセイ法は、ペニシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗生物質に対して極めて高い感受性を示す一方で、マクロライド系抗生物質、サルファ剤、テトラサイクリン系抗生物質、クロラムフェニコールなどの場合には、検出感度は 1/100 程度に低下する。また、検査の性能は、①寒天培地の組成及び pH、②試験菌株の種類、③インキュベーションの温度及び時間、④寒天培地の深さなどの多様な要因が影響することが示されている。特に、試料由来のマトリックスに大きく影響を受けることが報告されており、リゾチーム、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、長鎖脂肪酸、胆汁、乳酸などが、測定結果に大きな影響を与える因子となる。これらの影響は、ペーパーディスクを使用すること、試験前にサンプルの熱処理を行うこと、または低分子量の抗生物質から高分子量のタンパク質を分離するための透析膜を使用することで払拭できることが報告されている。

米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドで動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査を実施したが、LC-MS/MS、GC-MS/MS 等の分析機器を用いる残留抗生物質の試験法の情報はあるものの、バイオアッセイに関する情報は極めて少なかった。また、文献調査の結果、多くの国で、主にと畜場の検査室において、バイオアッセイによる試験を実施しているようであるが、具体的な試験方法や検査結果は、殆ど公開されていなかった。以下に、各国におけるバイオアッセイによる試験法について調査した結果を示した。

2. 米国におけるバイオアッセイ法

米国では、米国農務省(USDA:United States Department of Agriculture)の食品安全検査局(FSIS:Food Safety and Inspection Service)により、食肉及び家禽組織における残留抗生物質のバイオアッセイ法として、7種の平板を使用した試験法(7-plate法)が公定法として示されている。本法では、*Bacillus cereus* ATCC 11778(以下、*B. cereus* という。)とペニシリナーゼを含む培地(プレート1)、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341a(以下、*K. rhizophila* という。)を植菌した培地(プレート2)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート3)、*B. subtilis* とペニシリナーゼを含む培地(プレート4)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート5)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート6)、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228(以下、*S. epidermidis* という。)とペニシリナーゼを含む培地(プレート7)の7枚のプレートを用いて検査を行う。各プレートは、それぞれ、テトラサイクリン系、β-ラクタム系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、ストレプトマイシン、マクロライド系抗生物質、エリスロマイシン、アミノグリコシド系抗生物質を検出することを目的としている。試料は各培地に適したpHの緩衝液で抽出した溶液200 μLをプレートに注入して、プレート1~6は、29℃で16~18時間、プレート7は、37℃で16~18時間インキュベートする。インキュベート後の阻止円の大きさと標準溶液を用いて作成した標準曲線により、試料中の残留濃度を算出する。

この他の残留抗生物質のバイオアッセイ法として、スワブテスト・オンプレミス法(STOP法:Swab Test On Premises)、STOP法を改良したキャスト法(CAST法:Calf Antibiotec and Sulfa Test)、及

びファスト法(FAST法:Fast Antimicrobial Screening Test)等などが同機関により開発され、と畜場などの現場の検査室でスクリーニング法として用いられている。なお、米国で実施している「食肉、家禽、及び卵製品を対象とした全米残留物検査プログラム」では、上記のバイオアッセイ法による検査は採用されておらず、LC-MS/MSを用いた一斉分析法が採用されている。

3. EUにおけるバイオアッセイ法

EUでは、1980年に開発された4種の平板を用いる4-plate法(FPT:Four Plate Test)が残留抗生物質のスクリーニング法として用いられている。本法では、pHを6、7.2、8とした培地に*B. subtilis*を播種した3種のプレートと、pHを8とした培地に*M. luteus*を播種したプレートの4種のプレートを用いる。なお、pHを7.2とした培地には、サルファ剤への感受性を高めるために、培地にトリメプリンを加える。本試験法では、試料からの抽出操作、クリーンアップの操作を行わない。-5℃程度の試料の表面をメスで除去した後、試料の中心部をくり抜き、2mmの厚さで8つの試料を採取する。各プレートに対角線上に試料をそのまま載せて、*B. subtilis*のプレートは、30℃で18~24時間、*M. luteus*のプレートは、37℃で18~24時間インキュベートする。4つのプレートのうち、阻止円の大きさが2mm以上のものを陽性と判断する。本法では、検体を事前に抽出、精製することなく、β-ラクタム、テトラサイクリン系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、サルファ剤、マクロライド系抗生物質の残留を検出することが可能である。しかしながら、同試験で得られる検出限界に対する試料マトリックスの影響を調査した研究によると、セフトオフル、サ

ルファ剤、ストレプトマイシン及びマクロライド系抗生物質は、検出が困難であることが明らかとなっている。また、腎臓を試料とした場合に、マトリックスの影響により疑陽性と判定されることも問題視されている。

4. カナダにおけるバイオアッセイ法

カナダでは、カナダ食品検査局 (CFIA : Canadian Food Inspection Agency) のホームページの調査及び担当部署への聞き取り調査を行った。カナダでは、抗生物質の検査法として、バイオアッセイによる公定試験法は示されておらず、LC-MS/MS 等を用いた理化学的試験が示されている。カナダで実施されている「全国残留化学物質のモニタリングプログラム」では、残留抗生物質の検査法として、USDA の FSIS により開発された STOP 法が畜産物の一次スクリーニング法として示されている。本法では、腎臓等の試料にコットンの綿棒を挿入して、30 分間程度、湿潤液を綿棒に十分に吸収させる。*B. subtilis* を播種した寒天培地に、ネオマイシンを添加したディスク (N5 disc) 及び試料を浸潤させた綿棒を載せて、28~30°C で 16~18 時間インキュベートする。綿棒の周辺に 1 mm 以上の阻止帯幅が認められたものを陽性と判定する。なお、本法は家禽類の検査にはマトリックスの影響による疑陽性及び偽陰性となる場合が報告されていること、及びサルファ剤の検出が出来ない点が問題視されている。また、カナダのと畜場の検査室では、STOP 法を改良した CAST 法や FAST 法が一次スクリーニング法として用いられている。CAST 法では、試験菌に *Bacillus megaterium* ATCC 9885 (以下、*B. megaterium* という。) を用いて、Mueller Hinton 培地に播種したプレートで試験を行う。コットンの綿棒を用いた試料のサンプリン

グは、STOP 法と同様であるが、インキュベーションは、45°C で 16~20 時間行う。本法は、STOP 法に比べて、サルファ剤への検出感度が向上している。一方、FAST 法では、CAST 法と同じ試験菌を用いるが、培地にデキストロース及びプロモクレゾールパープルが含まれている。これにより、微生物の成長が早く、インキュベーション時間も CAST 法の 16~20 時間から 6 時間に大幅に短縮されており、迅速に測定結果を得ることが可能な方法である。

5. オーストラリアにおけるバイオアッセイ法

オーストラリアでは、農薬及び動物用医薬品の残留を規制しているオーストラリア農薬、動物用医薬品局 (APVMA : Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) のホームページを調査したが、抗生物質の公定試験法等は示されていなかった。そこで、国立残留調査所 (National Residue Survey) の残留化学物質及び性能評価局 (Residue Chemistry and Laboratory Performance Evaluation Section) に聞き取り調査を行った。オーストラリアでは、残留抗生物質のバイオアッセイによる公定検査法はないが、一般に、LC-MS/MS を用いる機器分析法と EU で開発された FPT 法が用いられている。具体的な検査法は、各企業や分析機関により独自に改良、開発した方法を用いており、それらの詳細な情報は公開されていなかった。

6. ニュージーランドにおけるバイオアッセイ法

ニュージーランドでは、農薬及び動物用医薬品の登録、輸入食品のモニタリング、製造、販売等を規制しているニュージーランド食品安全局 (NZFSA : New Zealand Food Safety Authority) の農薬及び動物用医薬品グループ (ACVM :

Agriculture Compounds and Veterinary Medicines)のホームページ等を調査した。バイオアッセイによる試験法の情報はなく、担当部署への問い合わせを行ったが、回答は得られなかった。

7. 日本におけるバイオアッセイ法

我が国の畜水産食品中の残留抗生物質の検査は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易法という。）」、「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(以下、分別推定法という。）」が微生物学的試験法として通知されている。簡易法では、抗生物質を試料からクエン酸・アセトン緩衝液で抽出する。この抽出液にペーパーディスクを浸漬した後、3種の試験菌(*Micrococcus luteus* ATCC 9341(以下、*M. luteus* という。)、*Bacillus subtilis* ATCC 6633(以下、*B. subtilis* という。)、*Bacillus mycoides* ATCC 11778(以下、*B. mycoides* という。))を用いた検査用平板上に載せて、培養後に得られた阻止円の大きさが直径12 mm以上のものを陽性と判定する方法であり、主に一次スクリーニングとして用いられている。一方、分別推定法は、簡易法で陽性と判定された試料に対して、抗生物質の系統、すなわちマクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、アミノグリコシド系抗生物質のいずれかであるかを決定するために実施される。本法では、抗生物質を試料からエチレンジアミン四酢酸含有マルキベン緩衝液で抽出した後、*n*-ヘキサンで脱脂を行う。その後、抽出液からクロロホルムに対する溶解性を利用して、マクロライド系抗生物質を分離し、次いで、ODS ミニカラムを使用して、テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質を分離する。ミニカラムを通過する高極性の塩基性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は、

カルボキシル基を有するイオン交換カラムで分離する。それぞれの溶出液を簡易法で用いた3種の試験菌による検査用平板上に載せる。培養後に得られた阻止円について、3種類の試験菌感受性パターンから、残留する抗生物質を系統別に推定する(7判定法)。判定は、阻止円の大きさが直径12 mm以上のものを陽性と判定する。本法は、「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査」において採用されている方法であるが、7判定法に基づき陽性と判定されたものについては、告示法又は通知法により陽性物質名の同定及び定量を行いように努めることとされている。本法は、試料の前処理が簡便であり、多数の検体を同時に検査することが可能であるため、抗生物質の残留の有無を判定するスクリーニング法として、極めて有用である。このため、検疫所、食肉衛生検査所、検査機関、地方衛生研究所等では、本通知試験法が現在でも汎用されている。しかし、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、抗生物質の同定が出来ないこと、使用する固相カラムが高価である等の多くの課題点が指摘されている。

8. 日本と欧米等におけるバイオアッセイ法の比較

本研究で調査した多くの国では、残留抗生物質の検査法として、現在でも、サンプリング方法、試験菌、培養条件が異なる様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられている(表1)。しかし、それらの多くは、1970年代頃に開発された方法を基礎とした改良法である。操作が簡便で短時間に検査結果が得られるため、と畜場等の現場の検査室では有効な試験法であると考えられた。一方で、抗生物質の種類によっては、十分な感度が得られない場合

があり、またマトリックスの影響により、疑陽性及び偽陰性と判定される場合が多く報告されている。このため、国際的な残留抗生物質の検査法の傾向としては、バイオアッセイ法からLC/MS/MS等による機器分析法に移行が進むものと推察された。また、多くの国で用いられているバイオアッセイ法は、検査試料をそのまま、または緩衝液で抽出した液体を培地に載せる方法である。一方で、我が国で用いられているバイオアッセイ法(分別推定法)は、試料からの抽出操作、固相カラムを用いる精製操作を行う点において、他の国の試験法と大きく異なっていた。このため、我が国の試験法は操作がやや煩雑となるが、マトリックスの影響を比較的受けにくい方法であると推察された。表2に各バイオアッセイ法による抗生物質の検出限界濃度と我が国で牛の筋肉に設定されている残留基準値をまとめた。バイオアッセイ法では、基準値レベルを検出できない場合があることが明白であった。バイオアッセイ法は、スクリーニング法としては、有用であるが、偽陰性、偽陽性となる可能性は否定できないため、更なる改良が必要であると考えられた。

D. 結論

畜水産物中の残留抗生物質等を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における試験法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を

調査した。各国政府機関への聞き取り調査及び文献調査を行い、得られた調査結果から、米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドで実施されている残留抗生物質のバイオアッセイ法の検査現状を取り纏めた。併せて、諸外国で実施されているバイオアッセイによる試験法と比較するために、我が国におけるバイオアッセイによる試験法の概要並びに実施状況を整理した。本研究で調査した多くの国では、抗生物質の検査法として、現在でもサンプリング方法、試験菌、培養条件が異なる様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられていることが明らかになった。しかし、マトリックスの影響による誤判定、検出限界濃度が高く基準値判定には適用できない等の多くの課題点があることが明らかになった。しかし、と畜場等の現場の検査室では、バイオアッセイ法は有効な方法であるため、バイオアッセイ法の特性を生かした新たな検査方法の提案が必要であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 欧米等で用いられているバイオアッセイ法のまとめ

使用国	日本		米国		EU、オーストラリア		米国、カナダ		米国、カナダ		米国、カナダ			
バイオアッセイ法	簡易法		分別推定法		6-Plate法		FPT法		STOP法		CAST法		FAST法	
	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地
	<i>M. luteus</i>	Antibiotic Medium (AM 5)	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>B. cereus</i>	AM 8 + penicillinase	<i>B. subtilis</i>	pH 6	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>B. megaterium</i>	Mueller Hinton agar	<i>B. megaterium</i>	Mueller Hinton agar+glucose+Bromocresol Purple
	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4	<i>B. subtilis</i>	pH 7.2 + trimethoprim						
試験菌及び培地	<i>B. mycooides</i>	AM 8	<i>B. mycooides</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4 + penicillinase	<i>B. subtilis</i>	pH 8						
					<i>B. subtilis</i>	AM 5 + penicillinase	<i>M. luteus</i>	pH 8						
					<i>K. rhizophila</i>	AM 11 + penicillinase								
					<i>S. epidermidis</i>	AM 11 + penicillinase								
試料調製	緩衝液による抽出操作のみ		緩衝液による抽出操作 固相カラムによる精製操作		緩衝液による抽出操作のみ		試料(厚さ2 mm)をそのまま培地に載せる		綿棒に直接、湿潤液を取る		綿棒に直接、湿潤液を取る		綿棒に直接、湿潤液を取る	
培養温度、時間	30℃、18時間		30℃、18時間		29℃、16～18時間 (プレート1～6) 37℃、16～18時間 (プレート7)		30℃、18～24時間 (<i>B. subtilis</i>) 37℃、18～24時間 (<i>M. luteus</i>)		28～30℃、16～18時間		45℃、16～20時間		45℃、6時間	
判定方法	阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止円の大きさが8 mm以上を陽性と判定 標準曲線により定量		阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定	

表2 欧米等で用いられているバイオアッセイ法の検出限界濃度と我が国で設定されている基準値

抗生物質	簡易法	分別推定法	FPT法	STOP法	CAST法	FAST法	日本のMRL*
Ampicillin	0.2	0.0025	0.01	0.01	0.1		0.03
Amoxycillin	0.2	0.0025			0.5		0.04
Bacitracin	3.13		2.5	100	0.5		0.5
Benzylpenicillin	0.39	0.0025					0.05
Chloramphenicol			1.0	0.5	0.5		不検出
Chlortetracycline	0.1	0.01		0.01	0.05	0.3	0.2**
Colistin	>10		50.0	50	10.0		0.15***
Doxycycline	0.2	0.01			0.25		0.05
Erythromycin	0.78	0.05	0.05	0.1	0.1	0.05	0.2****
Gentamicin		2.5	0.5	0.01	0.1	0.05	0.1
Kanamycin	12.5	1.0	50.0	0.025	0.05		0.04
Kitasamycin	3.13	0.25			2.5		0.2
Neomycin			0.5	0.1	0.1	0.1	0.5
Oleandomycin	1.56	0.1		0.25	0.5		0.05
Oxytetracycline	0.78	0.05		0.1	0.1	0.7	0.2**
Penicillin				0.01	0.1	0.1	
Spiramycin	6.25	1.0	0.1	0.5	1.0	0.125	0.2*****
Streptomycin		1.0		0.025	0.5	1.0	0.6*****
Sulfadimethoxine	>10	0.1		10	0.1	4.0	0.05
Sulfaguanidine					2.5		0.1
Sulfamethazine				50.0	0.25	3.0	0.1
Tetracycline	1.56	0.05		0.05	0.1	0.7	0.2**
Tylosin	3.13	0.1		0.125	2.5	0.125	0.1

*牛の筋肉の場合

** オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの総和とする

*** コリスチンA及びコリスチンBの和とする

****エリスロマイシンとは、エリスロマイシンAとする

*****スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I の和とする

*****ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンの和とする

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					