

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～平成 30 年度 総合研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

令和元(2019)年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

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	-----	15
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	-----	135
坂井隆敏		
3. 課題3: 試料調製方法の検討	-----	155
志田(齊藤)静夏		
4. 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	-----	177
志田(齊藤)静夏		
5. 課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究	-----	221
菊地博之		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	243
---------------------	-------	-----

I. 総合研究報告

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、約 800 品目の農薬等に基準値が設定されている。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、食品中残留農薬等の分析法開発に資する以下の5課題について研究を行った。このうち課題1は平成 28～29 年度に、課題3は平成 28 年度に実施した。

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

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整備されていない。そこで、欧米等(EU、米国、オーストラリア、国際機関等)における食品中の残留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。平成 28 年度は農薬の残留分析法について、平成 29 年度は動物用医薬品(及び畜産物)を対象とした残留分析法について調査した。試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
 - 1) 認証標準物質を用いた評価
 - 2) 参照分析法との分析値の比較
 - 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較
 - ①2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)
 - ②実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。
 - 4) 添加回収試験: 抽出残留物を異なる溶媒の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

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

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、LC-MS/MS を用いた高感度且つ高精度な測定法、畜産食品からの効率的な抽出法、種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。検討結果を基に効率的な分析法を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験を実施することで、構築した分析法の適用性を評価した。

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、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4: スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な試験法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本研究ではスクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法のガイドラインのスクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインを参考にして、分析データを基にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

欧米等を調査対象として、各国における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、公定検査法の整備状況、検査方法の概要等を調査し取り纏めた。その結果、多くの国で、様々なバイオアッセイによる検査が行われていることを明らかにした。また、我が国で公定検査法として通知されている簡易検査法による検査結果の信頼性を評価するために、本法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の両検査法で分析して、検査結果を比較した。その結果、バイオアッセイによる検査では多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が高いことが示された。平成 30 年度には、簡易検査法をより高感度な検査が可能となるように、検査法の改良を試みた。本法で規定されている抽出液量を半量にするとともに、試験菌を米国の公定法で用いられている菌に変更して検査を実施した。その結果、いずれの検討においても、良好な結果は得られなかった。以上のことから、簡易検査法を国際的に整合性のある検査法に改良するためには、試料からの抽出方法、精製方法等を含めて、検査法の大幅な見直しが必要であると考えられた。しかし、本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、本法をスクリーニング検査法として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。

研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

菊地博之(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

A. 研究目的

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

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

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

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。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いる。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。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。平成 28 年度は、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。平成 29 年度は、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。平成 30 年度は、畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製方法の確立について検討した。また、検討した抽出法及び測定法と組み合わせる分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の分析法としての適用性について検討した。

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4:スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本分担課題では、スクリーニング分析法の性能評価方法を確立することを目的とした。海外の残留農薬等分析法に関するガイドライン等について、スクリーニング分析に関する項目を調査後、調査したガイドライン等を参考にして、分析データを基にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

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は、従来のバイオアッセイ法から機器分析法への移行が世界的に進んでいる。しかしながら、機器分析法では検査が困難な化合物が存在するが、バイオアッセイ法は多数の抗生物質を簡便に検査できることから、現在でもスクリーニング法として汎用されている。我が国では、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という。)、並びに分別推定法」がバイオアッセイ法として通知されて

いる。本法は、分析操作が簡便で多検体を同時に検査することが可能であるが、抗生物質の種類によっては十分な検出感度が得られないこと等の課題点が多く指摘されている。そこで、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、検査法の概要等を調査した。更に、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、簡易検査法と機器分析法の両検査法により同一試料を分析して、検査結果の比較を行った。平成 30 年度は、国際的な整合性を考慮した試験体系・試験法を提案することを目的として、これまでに得られた知見を基に、簡易検査法の改良を試みた。本法で規定されている抽出量を変更するとともに、試験菌を米国の公定法等で使用されている試験菌に変更して検査を実施して、その検討結果を考察した。

B. 研究方法

課題1:欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

平成 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。平成 29 年度は、欧米等の公的機関等(Codex、OECD、EU、米国、オーストラリア及びニュージーランドなど)において公開されている動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発に関するガイドライン等について調査し、分析法の開発方針及び評価基準についてまとめた。

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

平成 28 年度は、LC-MS/MS 測定条件の確立について検討した。すなわち、検討対象化合物のタンデム質量分析における測定パラメータを最適化した後、LC 分析における適切な分析カラムの選択及び最適グラジエント条件の確立について検討した。平成 29 年度は、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、種々の抽出溶媒を用いた際の操作性や回収率について検討した。また、試料中のタンパク質等を沈殿させるための添加剤として、塩及び酸の添加について検討した。平成 30 年度は種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。また、検討した抽出法、精製法及び測定法を組み合わせる分析法を構築し、添加回収試験の実施により適用性を評価した。

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碎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

1. スクリーニング分析に関するガイドライン等の調査

平成 29 年度は、EU、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC) の残留農薬部会 (Codex Committee on Pesticide Residues: CCRP) 及び食品残留動物用医薬品部会 (Codex

Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods: CCRVDF) において公開している食品中の残留農薬等の分析法に関するガイドライン(1)～(3)について、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。また、米国農務省 (USDA) が公開している畜産物中の農薬のスクリーニング分析法(4)に記載されている性能基準等についてもまとめた。平成 30 年度は、EU において公開している動物用医薬品等の分析法の性能基準等に関するガイドライン(5)及びその付属文書の残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン(6)について、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。

(1) SANTE/11813/2017 (EU) 「Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (食品及び飼料中の残留農薬分析法についての精度管理およびバリデーション手順に関するガイダンス文書)」

(2) CAC/GL 90-2017 (CCPR) 「Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (食品及び飼料中残留農薬の分析法についての性能基準に関するガイドライン)」

(3) CAC/GL 71-2009 (CCRVDF) 「Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals (食料生産動物における動物用医薬品の使用に関連する国家規制食品安全保証プログラムの設計及び実施に関するガイドライン)」

(4) CLG-PST5.07 (USDA) 「Screening for Pesticides by LC/MS/MS and GC/MS/MS (LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬のスクリーニング分析法)」

(5) 2002/657/EC (EU) 「Commission Decision of 12

August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221:8–36」

(6) CRLs 2010 (2002/657/EC (EU) 付属文書) 「Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) (残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン)」

2. 性能評価方法への分析データの適用検討

LC-TOF-MS を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価試験データを用いて、(1)スクリーニング分析法の性能評価方法または(2)妥当性評価ガイドラインに従って評価した。

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。また、簡易検査法とLC-MS/MS等による機器分析法による検討結果の比較は、牛の筋肉、肝臓を試料とした。基準値濃度の抗生物質を添加した検体を作成し、同一検体を簡易検査法と機器分析法により検査を実施した。更に、簡易検査法に改良検討は、牛の筋肉を試料として、基準値濃度の抗生物質を添加した検体を作成した。簡易検査法では、クエン酸・アセトン緩衝液が抽出液として用いられているが、その液量を20 mLから半量の10 mLに変更して検査を行った。また、試験菌は米国の公定法で使用されている試験菌を用いて検査を実施した。

(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、分析法の抽出法(抽出効率)は、真の残留濃度を測定するための重要な要素であるが、添加回収試験のみの評価では、実際の残留試料からの抽出を反映することができない場合がある。そのため、多くのガイドライン等において、抽出法(及び抽出効率)に関する方針が示されている。そこで、平成28年度は農薬の残留分析法の開発については、平成29年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発について、抽出法(抽出効率)を中心に、分析法開発に関連する事項を整理した。

分析法の評価基準については、各ガイドライン等で評価基準に関する記載があるものについてまとめた。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。目標値の違いは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。

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

LC-MS/MS測定条件については、分析カラムとして両性イオン型官能基を修飾したZIC-cHILIC(MERCK MILLIPORE社製)を、移動相として20

mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用い、適切なグラジェント条件を設定することで、各検討対象化合物について良好な測定感度及びピーク形状が得られた。また、混合標準溶液の繰り返し測定においても良好な精度が得られた。畜産食品からの効率的な抽出法については、水及びメタノールの混液を抽出溶媒とし、食品由来のタンパク質などを沈殿させることを目的として塩酸及びギ酸アンモニウムを添加することで、種々の畜産食品において比較的清澄な抽出液が得られ、また、得られた抽出液中への各検討対象化合物の回収率も比較的良好であった。畜産食品由来の試料マトリックスの効率的な精製法については、種々の精製用固相カートリッジカラムの適用性を検討した。強酸性陽イオン交換カラム(InertSep MC-1, 500 mg)を用いた場合には、種々の畜産食品で比較的良好的な精製効果が得られるものの、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンはカラムから溶出されず、これらの化合物には適用出来ないことが確認された。弱酸性陽イオン交換カラム(Oasis WCX, 500 mg)を用いた場合には、カスガマイシンを除く検討対象化合物について良好な保持及び溶出が得られたものの、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいては良好な精製効果が得られない場合があることも確認された。検討した抽出法、精製法及び測定法を組み合わせることで構築した分析法を用いて添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね真度は 50%以上であり、併行精度は良好であった。

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。一方、フルジオキシ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 20 g 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 2 g 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 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

調査した海外の残留農薬等分析法のガイドラインではいずれもスクリーニング分析について言及しているが、CRLs 2010(EU)を除き、性能評価方法の詳しい手順については示されていない。そこで、分析データを CRLs 2010(EU)に示されている性能評価方法へ適用した。その結果、CRLs 2010(EU)の性能評価方法を以下のように変更するのがよいと考えられた。

- LC-MS(/MS)や GC-MS(/MS)では測定感度が変動するため、標準溶液に対するピーク面積比を用いて評価する。
- 偽陰性率 1%未満となるように、カットオフ値(C) = $S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$ とする。偽陽性率は、

CRLs 2010(EU)と同様に、5%未満となるように、閾値(T) = $B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$ とする。

($S_{Average}$: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値、 S_{SD} : 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差、 $B_{Average}$: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値、 B_{SD} : ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差)

- 添加試料のピーク面積が標準溶液のピーク面積と比べて非常に小さい場合、定量性が低くなるため、カットオフ値(C)は 0.2 以上とする。
- 「添加試料のピークは $S/N \geq 10$ であること」を性能要件に加える。

分析データの適用検討の結果を基に、スクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

米国では、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た。EU では、4種の平板を用いる 4-plate 法が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。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。簡易検査法と機器分析法による検査結果の比較については、牛の筋肉を試料とした場合は、簡易検査法では 30 化合物のうち 5 化合物、機器分析法では 26 化合物が正しく判定された。上記の通り、簡易検査法による検査結果と、機器分析法による検査結果を比較すると、バイオ

アッセイ法においては、多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が極めて高いことが示された。簡易検査法の改良検討では、抽出液量及び試験菌を変更して検査を行ったが、良好な結果は得られなかった。

D. 結論

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

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

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
 - 1) 認証標準物質を用いた評価
 - 2) 参照分析法との分析値の比較
 - 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較
 - ① 2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)
 - ② 実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。
 - 4) 添加回収試験: 抽出残留物を異なる溶媒

の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

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

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

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発を目的として、LC-MS/MS 測定条件、抽出法及び精製法について検討した。検討した各方法を組み合わせることで分析法を構築し、種々の畜産食品を用いて添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、真度は概ね 50%以上であり、併行精度は良好であった。よって、本検討で構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法として有用であると考えられ、本法を用いた分析の実施により残留が疑われる場合には、精製用固相カートリッジカラムへの負荷量の調整や異なる固相カートリッジカラムを用いた精製の実施などにより、効率的な分析が可能と考えられた。

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4:スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討

スクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法に関するガイドライン等について、スクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインのうち、2002/657/EC の付属文書 CRLs 2010 を参考にして、残留濃度が基準値の 1/2 以上の試料を「陽性」と判定(偽陰性率 1%未満及び偽陽性率 5%未満)できるように性能評価方法及び性能要件を設定した。本方法によって評価した分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある検体のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化を図ることができると考えられる。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

欧米等におけるバイオアッセイによる検査法の整備状況、概要等を調査した。調査した国では、各国で様々な検査法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。また、

簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の検査結果を比較したところ、本研究において検討した 30 種の抗生物質を検査対象とした限りでは、簡易検査法においては、多くの抗生物質で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。今後は、簡易検査法の高感度化に向けた改良を行うとともに、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。次に、簡易検査法の高感度に向けた検討を行った。クエン酸・アセトン緩衝液の液量を半量に減らして、牛の筋肉を試料に用いて検査を実施するとともに、米国の公定法で用いられている試験菌を用いて、検査を実施した。抗生物質 15 種を対象に検査を行ったところ、両検討とも、良好な検査結果をえることが出来なかった。以上のことから、簡易検査法をより高感度分析が可能な検査法とするためには、抽出方法、精製方法等を含めて、検査法的大幅な見直しが必要と考えられた。しかし、本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、本法をスクリーニング検査法として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Saito-Shida S., Nemoto S., Teshima R., Akiyama H. • Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2016 • 33 (119-127)

Saito-Shida S., Sakai T., Nemoto S., Akiyama H. • Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2017 • 34 (1153-1161)

Saito-Shida S., Hamasaka T., Nemoto S.,

Akiyama H. • Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers. • Food Chemistry • 2018 • 256 (140–148)

2. 学会発表

坂井隆敏, 菊地博之, 根本 了, 穠山 浩: HILIC カラムを用いた LC-MS/MS によるアミノグリコシド系抗生物質の測定条件の検討: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会 (2017.11.22)

志田(齊藤)静夏, 林智子, 根本 了, 穠山 浩: 残留農薬分析における試料量と分析値のばらつきについて: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会

(2017.11.22)

菊地博之, 坂井隆敏, 根本 了, 穠山 浩: 欧米等における畜水産食品中の残留抗生物質のバイオアッセイ法に関する調査: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会 (2017.11.22)

菊地博之, 坂井隆敏, 大倉知子, 根本 了, 穠山 浩: 畜産食品中の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法と LC-MS/MS の比較: 第 55 回全国衛生化学技術協議会年会 (2018.11.30)

F. 知的所有権の取得状況

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(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)の分析法の開発方針、開発方法及び評価基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。平成 28 年度は農薬の残留分析法について、平成 29 年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法について調査した。

農薬及び動物用医薬品ともに、残留分析法の開発において、真の残留濃度を測定するための最も重要な要素は「抽出効率」であった。そのため、試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。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ことから、分析法開発に際して抽出効率を確保するための基本的な考え方が各ガイドライン等で示されており、共通する主な考え方を以下にまとめた。

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

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、検査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。また、実残留試料を用いた評価も、検査機関では実施が困難であると思われる。そのため、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おり、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。

試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合に最も採用可能な方法と考えられるのは、添加回収試験であるが、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

残留分析法の評価基準については、分析法の評価パラメータについては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、各国の動向も踏まえ、必要に応じて見直すことが望ましいが、その際には Codex ガイドライン CAC/GL 90-2017「Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed.」等が参考になるとと思われる。

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、約 800 品目の農薬等に基準値が設定された。食品の安全性確保のためには、これらの多数の農薬等の食品中の残留について監視する必要があり、そのためには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・生活衛生局食品基準審査課長のもとに設置された「残留農薬等試験法開発事業評価会議(旧残留農薬等公示分析法検討会)」及び「残留農薬等試験法開発連絡会議(旧残留農薬等分析法検討会)」において行われている。「残留農薬等試験法開発連絡会議」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、残留農薬等試験法開発事業評価会議で確認・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、評価会議において「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^{1),11)-1)}。本実施要領は、これまでの評価会議での残留試験法の開発方針等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。しかし、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(国際機関、EU、米国、オーストラリア等)における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価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。食品中の残留分析法の開発については、農薬と動物用医薬品とでは、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、29 年度は動物用医薬品及び畜産物を対象とした残留分析法について調査した。これらの調査結果を踏まえ、農薬等の残留試験法について、技術的な観点から海外の手法の日本への適用の必要性などについてまとめた。

B. 研究方法

I. 農薬の残留分析法

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)」¹²⁾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」¹³⁾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」¹⁴⁾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」¹⁵⁾[翻訳版(仮訳)は平成 28 年度 総括・分担報告書に資料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」¹⁶⁾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」¹⁷⁾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」¹⁸⁾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」^{I-9}[翻訳版(仮訳)は平成 28 年度 総括・分担報告書に資料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」^{I-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」^{I-12}と「Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops」^{I-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)」^{I-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 ガイドラインとして「Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis

CAC/GL 40-1993」^{I-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」^{I-15}[翻訳版(仮訳)は平成 28 年度 総括・分担報告書に資料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.」^{I-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」^{I-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」¹⁻¹⁸⁾ [翻訳版(仮訳)は平成 28 年度 総括・分担報告書に資料④として添付]及び「Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods, ENV/JM/MONO(2007)17」¹⁻¹⁹⁾ [翻訳版(仮訳)は平成 28 年度 総括・分担報告書に資料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。

II. 動物用医薬品及び畜産物の残留分析法

29 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など)において公開されている動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発に関するガイドライン等について調査した。その結果、本検討では以下の各指針等について、分析法の開発の方針及び評価基準等についてまとめた。

(1) 厚生労働省(日本)

食品中の残留農薬等試験法については、諸外国では、農薬と動物用医薬品とで一般に所管が異なることから、関連する指針等も別々に示されている。一方、日本ではいずれも厚生労働省の食品基

準審査課において、前出の「残留農薬等試験法検討実施要領」¹¹⁻¹⁾に基づいて開発が行われている。本実施要領の内容については28年度の報告書にまとめた。

(2) 農林水産省(日本)

動物用医薬品の承認申請の際に必要な添付資料等の作成等については、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて[12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正 平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)]」¹¹⁻²⁾で示されている。動物用医薬品の残留分析法に関しては、当該通知の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」で示されていることから、この内容についてまとめた。

(3) EU

EU では、動物及び動物由来製品における動物用医薬品を含む有害物質の残留を監視するための分析法に関する性能基準等をまとめたガイドラインとして、「COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results」¹¹⁻³⁾が示されており、本ガイドラインについてまとめた。

(4) FDA(米国)

米国食品医薬品局(FDA)の食品・動物用医薬品部(OFVM)では、FDA 試験室において実施されている、食品や飼料を対象とした規制遵守、調査及び規制施行を目的とした日常監視プログラムや緊急対応において、化学物質等を検出するために使用される化学分析法が満たすべき性能基準等を、「Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition」¹¹⁻

4) [翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料①として添付]として、科学研究運営委員会 (SRSC)* を通じて示している。これらの基準は、すべての食品・動物用医薬品 (FVM) プログラムの化学分析法を評価・検証するための基準であり、FVM プログラムの実施を想定した化学分析成分のための規制分析法の開発、及びその妥当性評価に参加する際に FDA 試験室に適用される。本ガイドラインについてまとめた。

* FDA 食品・動物用医薬品 (FVM: Foods and Veterinary Medicine) 科学研究運営委員会 (SRSC: Science and Research Steering Committee) は、食品動物用医薬品部 (OFVM: Office of Foods and Veterinary Medicine)、食品安全・応用栄養センター (Center for Food Safety and Applied Nutrition)、動物用医薬品センター (Center for Veterinary Medicine)、規制業務部 (Office of Regulatory Affairs)、国立毒性研究センター (National Center for Toxicological Research)、国際部 (Office of International Programs) 及びチーフ・サイエンティスト部 (Office of the Chief Scientist) の代表者で構成される。SRSC は、FDA の FVM プログラムの作業班全体に関わる、食品・飼料関連の科学及び調査活動の優先順位を付け、調整し、統合する任務を負っている。

(5) 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 より動物用医薬品の承認申請に必要な手順やデータ等が「Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG」として示されており、その中の「Part 5A - Residues」^{II-5)}[翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料②として添付]において残留分析法について示されている。また、オーストラリアでは、動物用医薬品の承認申請の際に分析法も合わせて提出す

ることになっており、その分析法の要件については「Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods」^{II-6)}[翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料③として添付]に規定されている。APVMA からは、このほか動物用医薬品の承認申請時の残留分析法に関するガイドラインとして「Analytical Methodology」^{II-7)}[翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料④として添付]が示されている。これら 3 つのガイドラインについてまとめた。

(6) 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」^{II-9)}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 (Organisation for Economic Co-operation and Development) のガイドライン (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 ガイドラインのうち、畜産物の分析法開発に関連する記載があるガイドラインとしては「OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock」^{II-11)}がある。本ガイドラインについては、(8) OECD の項に記載した。

(7) 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、残留動物用医薬品部会 (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods: CCRVDF) において作成された動物用医薬品の残留規制のための分析法に関連するガイドラインが、「Guidelines for the Design and

Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009).」¹¹⁻¹¹⁾[残留規制のための分析法(134～195 項)の部分抜粋した。翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料⑤として添付]として示されており、本ガイドラインについてまとめた。本ガイドラインは、残留動物用医薬品に対する食品安全保証プログラムの設計及び実施に関する包括的な原則を示したものである。そのため、ガイドラインには試料採取の原則等を含む安全保証プログラムの策定に関する全般的な内容が含まれているが、この中で残留規制のための分析法について規定している部分について整理した。

(8) OECD

(6) ニュージーランドの項で記載したように、畜産物の分析法に関連するガイドラインとして、「OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock」¹¹⁻¹¹⁾[翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料⑥として添付]についてまとめた。本ガイドラインは化学物質の家畜代謝に関するガイドラインであるが、リスク評価及び規制施行で分析される対象成分に関する情報を提供する試験であることから、検討に用いられた分析法は、畜産物の規制のための分析法としても有用である。

C. 研究結果及び考察

C-1. 分析法の開発の方針について

I. 農薬の残留分析法

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°C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)』^{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)」^{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よい。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」¹⁻³⁾

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ッ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*。新規マトリッ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」¹⁻⁴⁾

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ックス効果の補正として、「マトリッ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、マトリッ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ッ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とされている。

『マトリックスマッチング法によるキャリブレーション』
C22 マトリックス効果は、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かつて添加する。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)とも呼ばれ、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、¹⁵N、¹³C、¹⁸O)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」¹⁻⁵⁾

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¹⁻⁶⁾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」¹⁻⁶⁾

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方法があれば、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、検出器に応答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： 測定波長で紫外部吸光を示す溶媒やけい光を発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質量をも増加させる。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℃対 82℃)、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」¹⁻⁷⁾

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、有効成分量は、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」¹⁻⁸⁾

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」¹⁻⁹⁾に示されている。

「Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method」¹⁻⁹⁾

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

性があるので、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。

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

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。

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」⁽¹⁻¹⁰⁾

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

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」¹⁹⁾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、実残留試料を使用する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」¹⁻¹⁵⁾

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」¹⁻¹⁶⁾

「Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001」¹⁻¹⁷⁾

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

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実験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実験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実験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実験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

の実験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、多数の実験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さな逸脱は、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係数を設定し、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」¹⁻¹²⁾

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、特徴づけすることが望まれる。

『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』¹⁻¹³⁾

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
 - 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

- 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
- 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」¹⁻¹⁹⁾

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】

- 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。
- 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を示す； 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

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、あるいは目的的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施行に不適當である場合には、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、他に目的的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。

II. 動物用医薬品及び畜産物の残留分析法

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関連する事項についてまとめた。

(1) 農林水産省(日本)

12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」¹¹⁻²⁾

「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」は、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される残留性に関する試験について、標準的な実施方法を示したものであり、14-1~14-6 の6項目からなる。この中で残留分析法に関連する事項として、14-1 では試験の目的の一つとして、残留基準値遵守の確認を目的とした分析法における指標物質となりうる残留物に関するデータを提供することを上げており、適切な指標残留の特徴の一つとして、残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある事としている。14-3 では、試験の目的の一つは薬剤投与後、指標残留が、規制の安全基準(例えば、残留基準値又はトレランス)まで減衰することを証明することとし、分析法は、組織又は畜産物中の指標残留を、適切な濃度(すなわちMRL又はトレランス)で、確実に検出できる方法でなければならないとしている。また、14-5 のガイドラインは、動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための残留試験において使用される分析法のバリデーションを示したものであり、残留規制のための分析法の手順を示したものである。しかし、この情報は、各国における残留規制に用いられ、多くの場合、バリデートされた組織中の残留物の分析方法は、規制当局による残留モニタリングの分析方法の基礎となる、としている。

以下に14-1、14-3及び14-5の該当部分を抜粋した。

『14-1 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験:残留物の定性及び定量のための代謝試験(VICH GL46)』

(2) 指針/A 目的

動物用医薬品の食品の安全性評価は、投薬動物に由来する食品を人が摂取しても安全であることを担保することに役立つものであることから、データ収集の一部として、動物用医薬品の投与動物に由来する食品中の残留量及び残留物の性状を明らかにするための試験を実施しなければならない。これらの代謝試験は、①動物用医薬品投与後の複数の時点における投与動物の可食組織での対象物の残留の消失性、②可食組織中における対象物の残留を構成する個々の残留成分又は残留物、③残留基準値遵守の確認(すなわち動物用医薬品の適正使用に関するモニタリング)を目的とした分析法における指標物質となりうる残留物及び④国内又は地域のモニタリングのための標的組織の特定、に関するデータを提供する。

(2) 指針/U 残留物の定性及び定量のための試験/(エ)代謝物の分離及び確認/(i)分析法

試験報告書には、分析方法の詳細を記載する。その記載には、標準品、試薬、溶液及び分析用試料(残留物の抽出、分画、分離及び単離)の調製、使用機器並びに標準品、対照組織、薬剤添加組織及び薬剤投与動物から採材した組織のデータを含む。分析方法については、少なくとも回収率、検出限界及び変動性のバリデーションを行わなければならない。

(3) データの報告

総残留に対する指標残留の比、指標残留及び標的組織が、国又は地域の規制当局から要求される場合、これらを決定するためのデータを示さなければならない。各採材時点における各組織の総

残留濃度を報告する。様々な処理(酵素、酸等)を用いて抽出される総残留の放射活性量(抽出率)も示す。標的組織は、対象動物中の総残留をモニターするために選択された可食組織である。標的組織は、必ずではないが、通常、残留消失が最も遅い組織である。

総残留濃度との比較のために、各採材時点における総残留の構成成分についても報告する。指標残留を選択するために、総残留の構成成分(親化合物及び代謝物)について検討する。指標残留は、通常、親化合物であるが、親化合物と代謝物の組み合わせ又は1つの誘導体若しくはフラグメント分子に化学的に変換した残留物の合計とする場合がある。

適切な指標残留には、以下の特徴がある。

① 対象組織において、指標残留と総残留の濃度の間に確立された既知の関係がある。

② 指標残留は、注目すべき時点(すなわち休薬期間時点付近)における残留性を分析するために適切でなければならない。

③ 残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある。』

『14-3 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験:製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験(その1)(VICH GL48R)』

(2) 指針/A 目的

本指針では、以下の目的のため、推奨される新動物用医薬品の承認に適用される対象動物での指標残留減衰試験を示す。

・薬剤投与後、指標残留が、規制の安全基準(例えば、残留基準値又はトランス)まで減衰することを証明すること

・消費者の安全性の懸念に対処した適切な休薬

期間及び使用禁止期間の設定にふさわしいデータを作成すること

(2) 指針／エ 指標残留の定量のための分析方法

残留減衰試験において可食組織(該当する場合には乳汁及び卵)から得られる試料中の指標残留の検出のために、承認申請者は、適切な分析方法を提出する。分析方法は、組織又は畜産物中の指標残留を、適切な濃度(すなわち MRL 又はトレランス)で、確実に検出できる方法でなければならない。

分析方法のバリデーションに必要なパラメータは、14-5(VICH GL49)による。』

『14-5 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験:残留試験において使用される分析方法のバリデーション(VICH GL49R)』

(1) 緒言／イ 背景

残留減衰試験は、動物用医薬品の開発過程において、動物用医薬品を投与された動物の可食組織(組織、乳、卵又は蜂蜜)中に存在する1つ以上の残留物の濃度を測定するために実施される。この情報は、各国における残留規制に用いられる。残留規制のための分析方法(すなわち、承認後の残留モニタリングの分析方法)の提出及びそのバリデーションの要件については、通常、各国の規制当局によって適切に定められており、国又は地域の法律によって定められる場合もある。しかし、残留減衰試験は、通常、残留規制のための分析方法が確立される前に実施される。多くの場合、バリデートされた組織中の残留物の分析方法は、規制当局による残留モニタリングの分析方法の基礎となる。残留減衰試験で使用され、残留基準(MRL)及び休薬期間を裏付けるために規制当局に提出

される分析方法のバリデーションの要件については、国際的に調和されなければならない。本指針の意図は、VICH 地域の規制当局が受け入れ可能な、残留減衰試験で使用するためのバリデーションの手順を提示することにある。このバリデートされた分析方法は、後に修正され「残留規制のための分析方法」となるかもしれないが、本ガイドラインではその段階の過程については記述しない。

分析方法に関する様々なバリデーションのガイドラインがあり、それらのバリデーションの手順の多くが、指針に取り入れられている(VICH GL1 (バリデーションの定義。1998年10月)及びVICH GL2 (バリデーションの方法論。1998年10月))。しかし、本指針で記述される動物用医薬品の残留分析方法に関するバリデーションの手順については、以前の指針では記述されていない。本指針では、特に動物用医薬品の残留分析方法のバリデーションについて記述することを意図している。』

(参考)

VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products: 動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力)は、動物用医薬品の承認申請資料の共通利用を通じて開発費の削減や承認審査の迅速化することで、臨床現場への安価かつ迅速な動物用医薬品の供給を図ることを目的として、1996年に国際獣疫事務局(OIE)傘下で日米EUの三極の規制当局及び企業代表をメンバーとして組織された。VICH GLはVICHにより示されたガイドラインを指す。

(2) EU

COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results^{II-3)}

COMMISSION DECISION 2002/657/ECの付属文書で分析法の性能基準、その他の要求事項及

び手順が示されている。その中で、回収率は認証標準物質(Certified reference material:CRM)を用いて求めるのが基本であり、そのような認証標準物質が入手できない場合に、添加試料から得られた回収率により評価することが許容されるとしている。以下に、関連部分を抜粋した。

『1. 定義

1.7. 「認証標準物質」とは、規定量の分析成分を含有した物質をいう。

1.27. 「回収率とは、分析手順において回収された物質の真の濃度のパーセンテージをいう。認証標準物質を入手できない場合、回収率は妥当性評価において決定される。

2. 分析法の性能基準及びその他の要求事項

2.3. 有機残留物及び汚染物質の確認分析法

2.3.2. 定量分析法についての追加の性能基準及びその他の要求事項

2.3.2.1. 定量分析法の真度

認証標準物質の繰り返し分析の場合、実験的に決定された回収率で補正された平均質量分率の認証値からの逸脱に関するガイドラインの範囲は、以下の通りである。

表 2 定量分析法の最小真度

質量分率	範囲
≤ 1 µg/kg	- 50 % ~ + 20 %
> 1 µg/kg ~ 10 µg/kg	- 30 % ~ + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % ~ + 10 %

そのような認証標準物質が入手できない場合、測定値の真度は、既知量の分析成分をブランクマトリックスに添加して得られた回収率により評価することが許容される。平均回収率で補正されたデータは、表 2 に示す範囲内にある場合のみが許容される。』

『3. 妥当性評価(バリデーション)

3.1. バリデーション手順

3.1.1. モデルによらない性能特性

3.1.1.2. 真度 Trueness

本項では、真度(精確さの要素の一つ)の測定について説明する。真度は認証標準物質(CRM)によってのみ設定することができる。CRM が入手可能な場合はこれを必ず用いること。手順については ISO 5725-4 (5)で詳しく説明されている。以下に例を示す。

- 分析法の指示書に従って、CRM を 6 回繰り返し分析する。
- 各繰り返し分析試料中の分析成分濃度を測定する。
- これらの濃度の平均値、標準偏差及び変動係数(%)を計算する。
- 検出された平均濃度を認証値(濃度として測定)で除し、結果をパーセンテージで表すために 100 を乗じて真度を算出する。

真度(%) = 平均回収率で補正された検出濃度 × 100 / 認証値

CRM が入手できない場合、真度の代わりに、下記の 3.1.2.1 に記載されているように回収率を算出することができる。』

『3.1.2.1. 回収率 Recovery

CRM が入手できない場合、回収率は添加ブランクマトリックスを用いた実験により測定されなくてはならない。以下にそのスキームを例示する。

- 18 等分(アリコート aliquots)のブランク試料を選択し、最小要求性能限界*の 1、1.5 及び 2 倍の濃度又は許容基準の 0.5、1 及び 1.5 倍ごとに 6 アリコートに添加する。
- 試料を分析し、各試料に存在する濃度を算出する。
- 以下の式を用いて、各試料の回収率を算出する。
- 各濃度における 6 つの結果から平均回収率及

び CV を算出する。

－ %回収率 = 100 × 測定濃度/スパイク添加濃度
(以下略)

* 「最小要求性能限界 (minimum required performance limits: MRPL)」とは、少なくとも検出及び確認されなくてはならない試料中の分析成分の最低含有量をいう。MRPL は、許容基準が設定されていない物質の分析法の分析性能の調和を意図するものである。』

(3) FDA(米国)

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition¹¹⁻⁴⁾

本ガイドラインは、化学分析成分のための規制分析法の開発、及びその妥当性評価に参加する際に FDA 試験室に適用される。また、ガイドラインに記載された要件は、新たに開発された分析法及び既存の分析法に重大な変更がなされた場合にのみ適用される。

分析法の妥当性評価に当たっては、可能であればマトリックスブランク、参照物質及び実残留試料の使用が推奨されている。以下に関連する部分を抜粋した。

『2.1 一般的な妥当性評価ツール及びプロトコルガイダンス General Validation Tools and Protocol Guidance (抜粋)

一般的プロトコル (General Protocol) : 分析法妥当性評価レベルの項及び下記の表 1 で一般的に記載されるように、既知濃度の分析法ブランク*、マトリックスブランク、参照物質 (入手可能な場合) 及びマトリックススパイク (利用可能な場合はマトリックスブランクを使用) を準備して分析する。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データはまた、試料マトリックスの変化に起因する分析法のマトリックス効果及び堅牢性/頑健性

を評価するためにも用いられる。

参照物質及び認証標準物質 (Reference materials and certified reference materials) : 既知の参照物質 (利用可能で適用可能な場合) の使用は、分析法の精確さ又はバイアスの評価、ならびに干渉に関する情報を得るために組み込まれるべきである。

マトリックスブランク (Matrix Blank) : この種のブランクは、マトリックス成分に関して分析される試料と厳密に一致する物質である。マトリックスブランクは、分析成分のバックグラウンドレベル (有無) を確立し、試料マトリックス及び装置が分析信号に干渉しないか、又は影響しないことを確認するために用いられる。

マトリックススパイク (試験室添加マトリックス) [Matrix Spikes (Laboratory Fortified Matrix)] : 回収率測定は、既知量の分析成分をスパイクし、添加回収率を算出することで推定できる。(注: 添加回収率は、自然に生じた分析成分の回収率を正確に反映しているとは限らない。) これらの試料で、マトリックス効果も評価することができる。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データは、また、試料マトリックスの変化に起因する分析法の頑健性を評価するために用いることもできる。

実残留試料 (Incurred Samples) : この種の試料 (入手可能な場合) は、対象となる分析成分 (試験室添加ではない) を含み、精度及びバイアスを評価するために用いることができる (分析成分濃度が高い信頼性で既知である場合)。分析成分の回収率はまた、試料の連続抽出及び/又は既知のバイアスを有する他の分析手順との比較により評価することができる。

* 分析法ブランク (Method blank) : 目的の分析成分を含まないが、試験試料を分析するために使用されるす

すべての試薬を含む、すべての試料処理操作に供される物質。分析成分を含まない適切なマトリックスブランクがない場合には、試薬としての水の一定分量がしばしば分析法ブランクとして使用される。』

「2.0 化学分析法の妥当性評価に関する基準及びガイドランス」においては、代替分析法あるいは新規分析法の性能評価をする際には、参照分析法と比較することが適切な場合があるとしている。

『2.2 参照分析法 Reference Method

参照分析法は、それにより代替分析法又は新規分析法の性能を測定又は評価することができる分析法である。化学分析成分については、必ずしも適切な参照分析法が特定又は利用可能ではない。しかしながら、輸出管理規定で使用するために指定された分析法を置き換える場合など、参照分析法の使用が適切である場合がいくつかある。参照分析法の使用が必要かどうか決定する際には、発案試験室と CMVS (化学分析法妥当性評価小委員会 Chemistry Methods Validation Subcommittee) 及びプログラム事務局 (Program Office) 間で協議することを勧める。』

「2.3 性能特性」の項において、『試料調製及び/又は抽出手順/分析法が既存の試験手順から修正される場合、その変更が得られるデータの精度及び精確さに悪影響を及ぼさないことを実証すべきである。修正された方法を実施するために、一般的にはまず初めに標準又は既存の分析法が実施される。その後、既存の分析法と比較することにより、修正された方法の性能が検証される。』とし、以前に妥当性評価された分析法に対して、試料調製法及び抽出手順の変更は慎重に行う必要があり、変更する場合には既存の分析法との比較により修正後の分析法の性能を担保することが求められて

いる。

分析結果の確認方法については、例示として、質量スペクトルのフラグメンテーションパターン、あるいは独立した分析法の結果との比較による実証必要としている。

『2.4 同定の確認 Confirmation of Identity (抜粋)

各分析成分の同定の確認は、規制施行のための分析法妥当性評価の一部として、定性及び定量分析法の両方について検証されなければならない。明白な同定の確認は、通常、妥当性評価対象の新規分析法の適用範囲内の各分析成分の主要な特徴を、例えば質量スペクトルフラグメンテーションパターンによるか、又は独立した分析を用いて得られた結果と一致していることを実証することにより、分析的に確認することを必要とする。』

本ガイドラインでは「限度試験 (Limit Tests)」の考え方を示している。限度試験はスクリーニング法の一つであるが、一般のスクリーニング分析が任意の濃度の分析成分の有無を判定することを目的としているのに対して、限度試験では、分析成分が懸念レベル(基準値など)付近又はその上の濃度で存在するかどうかを判定することが目的である。限度試験スクリーニング法を活用することにより、検査において、先ず限度試験で多数の試料を迅速にスクリーニングし、そのうち偽陽性試料についてのみ更に定量分析法又は確認分析法を行うことで、より効率的な検査が可能となると思われる。

『3.4 限度試験(一般的な半定量的スクリーニング法) Limit Tests (common semi-quantitative screening method)

定性分析法の1つの特定のカテゴリーとして、定義済みの懸念レベルを有する分析成分に対する限度試験(バイナリ試験又はパス/フェイル試験)がある。これらのスクリーニング法の目的は、分析成

分が懸念レベルの近く又はその上の濃度で存在するかどうかを判定することである。これは、任意のレベルで分析成分の有無を判定することを目的とするスクリーニング法とは対照的である。限度試験妥当性評価は、懸念レベルにおける分析成分についての分析法の精度の測定を含まなければならない。

限度試験スクリーニング法は、一般に、分析結果の 5%未満の偽陰性率を有する偽陰性を避けることが望ましい。偽陽性の発生は、推定的な陽性が定量的分析法又は確認分析法によって更に分析されるので、あまり重要ではない。しかし、不必要な確認分析を回避するために、偽陽性率は通常 10~15%未満である事が望ましい。理想的には、限度試験は多数の試料を迅速にスクリーニングして、追加の分析の必要性を最小限にすることができる。限度試験スクリーニング法で用いられる一般的なアプローチは、信頼区間を用いて試験室の閾値又はカットオフ値を設定することにより、その値より上の応答のみが更なる試験を必要とするようにすることである。機器応答に基づく限度試験の場合、閾値又はカットオフ値は、応答の標準偏差又は懸念レベルの分析成分を添加した試料中の分析成分濃度の推定値に基づいて、信頼限界により決定することができる。

例:

乳試料(n=21)が、懸念レベル(10 ng/mL)のスルファメタジンを添加された。LC-MS/MS 限度試験スクリーニング法が、抽出された乳試料中のこの薬物を測定するために用いられた。平均検出濃度は 10.99 ng/mL で、標準偏差は 2.19 であった。10 ng/mL 以上のスルファメタジンを含む試料の 95%が閾値を超える応答を有するように、閾値又はカットオフ値が算出された:

閾値 = [平均濃度 - (t * 標準偏差)]

$$= [10.99 - (1.725 * 2.19)] = 7.21 \text{ ng/mL}$$

ここで、t は 95%信頼水準における自由度 n-1 の片側スチューデントの t 値

このアプローチは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 又は光学的バイオセンサアッセイなどの免疫吸着アッセイにも用いることができる。これらの試験は非競合的(分析成分応答の直接測定)又は競合的(間接測定)であっても良い。競合的免疫吸着試験からのデータの分析は、観察された応答が分析成分濃度の増加と共に減少するという事実を説明しなければならない。従って、閾値又はカットオフ値より低い応答は、推定上の陽性応答とみなされる。免疫吸着アッセイでは、ブランクマトリックス試料について観測される応答を測定し、ブランクの応答が閾値の応答と(統計学的に)区別可能であることを検証することも重要である。

限度試験の性能特性:

新規限度試験の妥当性評価は、最低限、以下の性能特性の評価を含むことが望ましい:感度、特異性、精度、閾値又はカットオフ値、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度(閾値/カットオフ値より低くすべきである)、及び堅牢性/頑健性。』

また、用語集のうち理解に役立つ部分を以下に抜粋した。

『付録 1—用語集

同定の確認 Confirmation of Identity: 質量分析などの非常に特異的な手法、又は2つ以上の独立した分析結果の一致を実証することによる分析成分の明確な同定。

実残留試料 Incurred Samples: 試験室添加から由来するものではなく、外因性暴露又は内因性起源などの発生源に由来する対象の分析成分を含む試料。外因性暴露は、例えば農薬使用、動物による摂取、又は環境曝露を含む。

内標準 Internal Standard: 分析成分の定量を

容易にするために、分析の特定の段階で既知量で試料に添加される化学物質。内標準は、マトリックス効果、不完全な添加回収率などを修正するために用いられる。分析成分濃度は、その応答を内標準により生成された応答と比較することにより推定される。内標準は、分析成分に類似の物理化学的性質を有するべきである。

分析法妥当性評価 Method Validation: 分析法がその意図された目的に適していることを実証又は確認するプロセス。妥当性評価は、精確さ、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性、適用範囲、堅牢性及び頑健性などの性能特性を実証することを含む。

分析法検証試験 Method Verification: 試験室が許容可能なレベルで妥当性評価された分析法を再現できることを実証するプロセス。』

(4) オーストラリア

1) Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG: Part 5A - Residues¹¹⁻⁵⁾

本ガイドラインは、動物用医薬品申請に関する要求事項に関するものであるが、規制のためのモニタリング分析法に関連する事項についても触れられており、関連する事項についてまとめた。

「3. 薬物動態及び残留評価の原則」の「MRLの決定 Determination of MRLs」において、検討に当たっては、日常モニタリングでの使用に適する分析検出法の利用可能性についても考慮することが求められている。

『**MRLの決定 Determination of MRLs:** 各組織の総残留に対する指標残留の比は、1日のフードバスケット中の残留物の総量の計算(EDIによって反映される)に使用され、MRL案が勧告された場合に、EDIがADIを超えないことを検証するために使用される。EDIがADIを超える場合、MRL案

は勧告されず、(より低い)MRL案を用いてさらに評価を繰り返す。

MRL勧告前に、動物用医薬品の適正使用規範(Good Practice in the Use of Veterinary Drugs: GPVD)に従い、動物用医薬品を使用後に食品に残ることが予想される残留濃度、及び日常モニタリングでの使用に適する分析検出法の利用可能性についても考慮する。これらの要因を考慮した後、得られたMRLは、最大許容残留濃度(許容食事暴露より推定)より低いことはあっても決してこれを超えることはない。

場合によっては、動物用医薬品のMRLの設定は必ずしも必要とされない場合がある。このような場合の動物用医薬品及びその使用パターンはMRL基準の表5に含まれている。』

「4. 一般的な指示」の「4.4. 申請様式」では、動物用医薬品の申請に必要な要求事項として、「分析法」も含まれており、薬物動態及び残留動態試験並びに指標残留減衰試験に使用された分析法及び妥当性評価データの要約の提出が求められている。提出すべきデータの内容については、「5. 残留データ要求事項」の「5.4. 分析法」に示されており、申請者は指標残留を決定するために使用された(妥当性評価された)分析法の詳細を報告することが求められている。分析法の詳細には、「組織抽出液の調製及び精製」が含まれており、規制のための試験法を開発する際の重要な情報になると思われる。

『5.4. 分析法

申請者は、以下の試験で使用され、妥当性評価された分析法の完全な詳細を提出しなくてはならない。

- ・ 薬物動態及び残留動態試験
- ・ 休薬期間(Withholding Period: WHP)推定の

ために実施される試験において指標残留を決定するための分析

分析法の詳細については、最低限以下の内容を含めなくてはならない。

- ・ 目的及び適用範囲
- ・ 試薬
- ・ 機器
- ・ 試料の収集
- ・ 試料の保管
- ・ 試験室試料の調製
- ・ 組織抽出液の調製及び精製
- ・ 残留物の定量手順
- ・ 標準化の方法などの結果の計算方法、検量線の使用(数学的モデル、パラメータ、測定範囲)
- ・ 精度管理(内部)
(以下略)』

2) Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods^{II-6)}

動物用医薬品の申請の際には、日常的なモニタリング及び規制施行のための分析法を提出すべきであることが以下のように「緒言」の項で示されている。

『緒言 Introduction

本ガイドラインは、動物用医薬品を登録する際に、残留分析法を開発するか/又は使用する分析化学者の実践的な支援を提供するために作成されたものである。動物用医薬品の性質上、多くの農薬に用いられている多成分分析法を使用できないことが多い。これは、動物用医薬品の物理化学的特性がクラス間で大きく異なり、場合によっては、たとえ同じクラスに属していても個々の化合物間で大きく異なるためである。このような違いにより、比較的単純なバイオアッセイや免疫学的試験から複

雑な機器分析まで、多様な分析技術の利用が必要とされる。残留動物用医薬品の同定及び定量にどの分析法が適合するかは、分析法の意図する目的に依存する。

申請には、日常的なモニタリングのための分析法と規制施行のための分析法を含めるべきである。場合によっては、この分析法は、MRL(最大残留基準値)の設定を申請するために実施される試験において、残留物を定量するのに用いられる方法であるかもしれない。その他、規制目的に別の分析法が要求される場合がある。』

分析法の中で、バイオアッセイについては、現在も多数の試料をスクリーニングするのに重要であるが、一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さないとしている。一方、機器分析法は、その特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量の方がバイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましいとしている。バイオアッセイ、イムノアッセイ及び機器分析法のどれを選ぶかは、検討目的などの状況により判断するが NRA (National Registration Authority オーストラリア政府登録局) では、特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する、としている。以下に該当部分を抜粋した。

『分析法の種類 Types of Analytical Methods

現在、残留動物用医薬品の定量に利用できる分析法は次の通りである。

・バイオアッセイ Bioassays: オーストラリアでは、尿、乳及び腎臓中の抗菌剤の有無を日常的にスクリーニングするため、広域スペクトルバイオアッセイが広く用いられている。バイオアッセイは、現在も阻害物質の有無について多数の試料をスクリーニングするのに重要である。一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さない。動物

用医薬品、特に抗生物質の残留を定量するために、特定のバイオアッセイ又はイムノアッセイが用いられる。

・機器分析法 Instrumental methods: GLC や HPLC は、様々な検出器と組み合わせて、ほとんどの動物用医薬品の日常分析及びその残留物の同定・定量の両方に用いられる。機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量の方がバイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましい。

・その他の機器分析法 Other instrumental methods: 走査型 TLC や分光法などの機器分析法は、残留動物用医薬品の定量に用いることはあまり一般的ではない。

バイオアッセイ、免疫学的試験及び機器分析法のどれを選ぶかは、それぞれの分析法が目的の作業に適合しているかどうかによる。どの分析法が適切かは状況により判断する。NRA では、特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。』

「分析法の目的」の項において、動物用医薬品の機器分析法を開発する際の方針が示されており、重要な方針の一つとして、実証済みで許容可能な抽出効率を有する、ことが示されている。

『分析法の目的 Objectives Of Analytical Methods

動物用医薬品の機器分析法を開発する際には、以下の方針が重要であり、これらを満足させるべきである。

- ・ 実証済みで許容可能な抽出効率を有する。
- ・ 残留定義に含まれるすべての成分を測定(同定及び定量)する能力を有する。
- ・ 妨害物質が定量限界(LOQ)の 30%を決して超えないような十分な特異性を有する。
- ・ 許容可能な精度及び真度を有する。
- ・ 登録申請の対象となり得るすべての動物種を網

羅する。

- ・ 登録申請に関連する組織及び食品(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、卵、乳及びはちみつなど)に適用される。

バイオアッセイ及びイムのアッセイの場合、上記目標のうち関連するもののみ満足させる必要がある。』

更に、「分析法の開発」の項において、分析法開発の際に考慮すべき事項が示されているが、このうち分析法を開発する際に参考になる事項を以下に抜粋した。

- ① バイオアッセイは、残留に関して多数の試料のスクリーニングには適しているが、一般に、MRL 設定の目的には受け入れられない。機器分析法が用いられる場合、残留の定義は、測定された部分構造(moiety/moieties)、即ち親化合物及び/又は1つ以上の代謝物に基づくべきである。特定の状況によっては、残留の定義は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。
- ② 分析法の抽出効率は、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残留試料を用いて決定する必要がある。分析法は、放射性標識試験のための試料の分析によって、又は実残留試料を異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用して一連の徹底抽出をすることによって実証された抽出手順を採用すべきである。前者については、分析法の開発に放射性標識薬剤を用いた代謝試験と関連付けるのも一つの手段である。
- ③ ジェネリック動物用医薬品に関する申請に用いられる分析法の抽出効率についても、検討し実証する必要がある。これは、食品分析技能評価スキーム (Food Analysis Performance

Assessment Scheme : FAPAS) や政府残留調査 (National Residue Survey : NRS) プログラムのような技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等であることを実証することで達成可能である。

- ④ ジェネリック動物用医薬品のための分析法を開発する必要がある申請者は、可能であれば、先ず MRL 設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいは、Codex 又は公表された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。
- ⑤ 分析法の感度は、意図する目的に適合するものでなくてはならない。例えば、MRL がすでに設定されている場合や輸出入に関係しない場合は MRL の 1/2 又はそれ以下の濃度を検出する感度が必要である。しかし、データが MRL 又は WHP (休薬期間) のいずれかを変更する根拠として、あるいは ESI (Export Slaughter Intervals 輸出向けと畜保留期間) の設定に用いられる場合、分析法は MRL の 1/2 未満の濃度の残留物を検出する必要がある (通常 LOQ 又は LOD までの残留物が報告される)。
- ⑥ 回収率データは、試験試料中で生じる残留濃度の範囲全体にわたって作成する必要があり、最低限、LOQ 及び提案された MRL での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには 1 濃度のみの回収率では不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提供しなくてはならない。
- ⑦ バイオアッセイ及びイムノアッセイは、特異性を判定し、残留の定義に見合う定量を実証するために、機器分析法と比較する必要がある。バイ

オアッセイ及び/又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的の残留データの作成には適さない。

上述したように、分析法開発に当たっては「抽出効率」に関する検討が必須であり、検討結果の詳細を報告することが「分析法の報告」の項に明記されている。該当部分を抜粋した。

『**分析法の報告 Reporting Of Analytical Methods** 以下の情報を報告すべきである。

1. 装置及び機器の詳細、使用した試薬類、試料調製、抽出及びクリーンアップ手順、並びに分析成分の定量を含む分析法の完全な説明。
2. 生データを含む妥当性評価結果の完全な詳細。
3. 検討された試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及びその結果。
4. 代表的なクロマトグラム。提出すべき最低限の情報は、標準品、未処理試料、添加した未処理試料、及び薬剤投与動物から採取した各マトリックスについての試料である。』

3) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Analytical Methodology^{II-7)}

本ガイドラインは「International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products guideline (VICH* GL) 49 (動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力ガイドライン (VICH GL) 49)^{II-8)}に基づいている。VICH GL 49 は、残留動物用医薬品の定量分析法に関して、オーストラリアのほとんどのガイドラインの内容をカバーしているが、これとは別にオーストラリア独自の追加の検討事項についても含まれている。本ガイ

ドラインは、前出の「Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods^{II-6)}」と重複する部分がある。以下に、分析法開発に関連する事項を抜粋した。

『1. 残留分析法に関するガイダンス

本ガイドラインは、動物用医薬品の残留分析法（指標残留減衰試験で残留を測定するために開発された分析法）の評価のために開発された分析手順のみに使用されることを意図している。規制目的のモニタリング検査手順の妥当性評価に必要な評価基準を規定することは意図していない。』

『1.1. 緒言

残留データは、最大残留基準値の設定、既存の最大残留基準値に適合していることの実証、適切な休薬期間の決定及び輸出向けと畜保留期間の判断に用いられる。食糧生産動物種の内部又は表面に投与される動物用医薬製品の登録を裏付ける残留データに加え、残留データの作成に使用された分析法を提供する必要がある。

動物用医薬品のための分析法を開発する場合、分析法は以下のようにすべきである。

- ・ 残留の定義又は指標残留に含まれる全成分を測定（同定、定量及び確認）する能力を有する。
- ・ 妨害物質が分析定量限界の 30%を決して超えない十分な特異性を有する。
- ・ くり返し性（併行精度）が示されている。
- ・ 薬剤が投与された動物から得られるすべての組織又は食品をカバーする。』

「1.2. 分析法の種類」の項において、残留動物用医薬品の定量に用いる分析法は、バイオアッセイや免疫アッセイよりも機器分析法の方が望ましいとしている。以下に概要をまとめた。

- ① バイオアッセイは、現在も多数の試料中の障害物質をスクリーニングするのに重要であるが、規

制目的の定量データの作成には適さない。

- ② 機器分析法は、ほとんどの動物用医薬品の日常的な分析及びそれらの残留物の確認及び定量の両方に使用でき、機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量は、バイオアッセイや免疫アッセイによる定量よりも好ましい。
- ③ 走査型薄層クロマトグラフィーや分光法などの分析法が残留動物用医薬品の定量に用いられる頻度は低い。
- ④ 分析法の選択は、目的の作業に適合しているかどうかによるが、APVMA では特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。

「1.3. 分析法の目的」の項において、動物用医薬品の機器分析法を開発する際には、実証済みで許容可能な抽出効率を有することが求められている。

「1.4. 分析法の開発」の項では、分析法の開発において考慮すべき事項が示されており、以下に分析法開発に関連する部分を抜粋した。

- ① バイオアッセイは、多数の試料について残留をスクリーニングすることは許容可能であるが、一般に、最大残留基準値を設定する目的には受け入れられない。機器分析法を使用する場合、残留の定義又は指標残留は、残基（moiety）又は測定された残基（すなわち、親化合物及び/又は 1 つ以上の代謝物）に基づくべきである。ある特定の状況によっては、残留の定義や指標残留は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。
- ② 分析法の抽出効率は、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残留試料を用いて決定されるべきである。分析法

は、放射性標識試験のための試料の分析、又は実残留試料の連続抽出に異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用した一連の徹底抽出により実証された抽出手順を採用すべきである。分析法の開発に、放射性標識薬剤を利用した代謝試験と関連付けることは、前者を達成するための1つの手段である。

- ③ ジェネリック動物用医薬品に関連する申請に用いられた分析法の抽出効率についても、検討して実証すべきである。これは、国家残留調査プログラムなどの技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等性を実証することによって達成できる。
- ④ ジェネリック動物用医薬品の分析法を開発する必要がある場合、可能であれば、先ず最大残留基準値の設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいはまた、コーデックス委員会で出版された方法又はその他の出版された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。マトリックスから残留物を放出するための他の方法の使用についても検討すべきである(例:組織からネオマイシンを放出させる過塩素酸の使用、抱合体残留物から遊離させるグルクロニダーゼの使用、タンパク結合残留物を放出させるプロテアーゼの使用)。
- ⑤ 分析法の感度は、意図した目的に適合すべきである。留意点として、最近では、モニタリングや監視を行う試験室において、タンデム質量分析計付き液体クロマトグラフィーによる検出法が日常的に用いられており、最新の分析法は同等の選択性と感度を有する必要がある。データが最大残留基準値又は休薬期間のいずれかを変更する根拠、あるいは輸出向けと畜保留期間の設

定の根拠として用いられる場合、分析法はその定量限界/検出限界濃度で残留を検出できる必要がある。さらに、試験室は、残留データの統計解析を補足するために分析法の検出限界と定量限界の間の値を定量し測定値を報告することが求められる。

- ⑥ 試験試料中に生じる残留濃度の全範囲を網羅する回収率データを作成すべきであり、最低でも、定量限界及び最大残留基準値(案)での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには、1濃度のみの回収率データでは不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提示すべきである。
- ⑦ バイオアッセイ及びイムノアッセイは、特異性を判断し、残留の定義の定量が同等であることを示すために機器分析と比較する必要がある。バイオアッセイ又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的のための残留データの作成には不相当である。

分析法開発では、分析法の抽出効率は重要な要素であることから、「1.5. 分析法の報告」の項においては、試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及び結果の報告が求められている。

(5) コーデックス委員会

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009)^{II-11)}

本ガイドラインの中で残留規制のための分析法について規定している部分についてまとめた。

食品中の残留動物用医薬品に関する分析法は、対象とする分析成分を確実に検出し、その濃度を定量し、そして分析成分を正確に同定しなくてはならない。そのために、残留規制プログラムに使用される分析法を、目的に応じて、分析法が単に対象残留物の存在を検出する(スクリーニング分析法)か、定量する(定量分析法)か又は確認する(確認分析法)かの3つのカテゴリーに分類している。これらの3つのカテゴリーの分析法(スクリーニング、定量及び確認分析法)は、残留規制プログラムでは、連続して用いられる可能性がある。

スクリーニング分析法で「陽性」の試料は疑わしい(偽陽性)とみなされ、通常、試料が MRLVD (Maximum Residue Limit for Veterinary Drugs: 動物用医薬品の最大残留基準値)を超過しているかどうかを確定するために、さらに定量分析法及び/又は確認分析法が適用される。一般に、定量分析法や確認分析法よりもスクリーニング分析法の方が簡便で迅速な方法であることから、スクリーニング分析法を使用して、全試料の中から偽陽性試料のみを選択し、さらに定量分析や確認分析を行うことにより、より効率的な検査が可能となる。ただし、分析値の確定には定量分析法及び/又は確認分析が必須であるため、スクリーニング分析の単独使用はすべきでないとしている。以下にスクリーニング、定量及び確認分析法についてのガイドラインの規定を抜粋した。

『139. スクリーニング分析法は、その性質上、定性又は準定量的であり、MRLVD 又は管轄当局により設定された他の規制値を超える残留物を含有する可能性のある一群の動物又はロットから採取された試料の存在(又は不在)を特定するスクリーニング分析法として用いられる。これらの分析法は、存在する濃度の正確な測定や残留物の構造確認を行うものではないが、どの物質についてさらに検

査すべきか、又はどれが免除可能かを迅速に判断するために用いられる。これらの分析法は、試料中に規制値を超える残留物が含まれているかどうかを決定するために、フードチェーンに入る時点、検査施設又は試験室での試料の受領時に適用される。このような分析法は、通常、より高い分析効率を提供し、非試験室環境で実施できる場合があり、規制管理プログラムでの使用においては、試験室内で行われる検査よりも安価と考えられる。スクリーニング分析法を使用することにより、この試験を用いて同定された推定陽性(疑い)試料の分析に、試験室資源を集中することが可能となる。これらの分析法(規定された低い偽陰性率を有するべきである)は、MRLVD に適合していない可能性があると特定された試料に適用するために、適切に妥当性評価された定量分析法及び/又は確認分析法がないのであれば、公的な試料に関する残留規制目的では、単独で使用すべきではない。

140. 定量分析法は、ある試料中の残留物が MRLVD 又は他の規制値超過の決定に用いられる定量的情報が得られるが、残留物の同定の明確な確認をすることはできない。このような定量結果を得る分析法は、MRLVD 又は規制措置限界を挟む分析範囲内において良好な統計管理がなされていなければならない。

141. 確認分析法は、残留物の同定の明確な確認を提供し、またその含有量を確認することもできる。確認分析法は最も決定的な分析であり、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS)などのクロマトグラフィー法及び質量分析法に基づくことが多い。残留物の同定確認に用いられる場合、このような分析法は設定された統計的限界の範囲内で確実な構造情報を示すべきである。確認分析法により定量的情報が得られない場合、元の定量分析法又は適切に妥当性評価された代替の定量分析法

を用いて、複製試験試料を分析することにより、元の定量分析法の定量結果を検証すべきである。』

本ガイドラインの「分析法の選択及び妥当性評価のための考慮事項」の「単一試験室妥当性評価－クライテリアアプローチ」の項において、試験室間で妥当性評価された分析法(特に多成分分析法及び新規分析成分)であっても、必ずしも使用可能又は適合可能でないと認識されており、分析法の選択に関する根拠を示すために、単一試験室で分析法の妥当性評価をする場合があるとしている。また、分析法の精確さ(真度及び精度)は、技能試験、認証標準物質、添加回収試験、及び他の妥当性評価された分析法との比較により検証するとしている。

以下に該当部分を抜粋した。

『単一試験室妥当性評価－クライテリアアプローチ

155. IUPAC により技術報告書として、単一試験室における分析法の妥当性評価に関するガイダンス文書、「単一試験室における分析法の妥当性評価に関する調和ガイドライン (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis)⁶」が発行されている。手続きマニュアル(Procedural Manual)⁷では、試験室間で妥当性評価された分析法は、特に多成分/多基質分析法及び新規分析成分については、必ずしも使用可能又は適合可能でないと認識されている。そのような場合、分析法の選択に関する一般基準ならびに以下に示す追加の基準を満たすために、単一試験室で分析法の妥当性評価をする場合がある。

(a) 分析法は、国際的に認められたプロトコル(例えば、上記で参照した単一試験室における分析法の妥当性評価)に関する IUPAC ガイドラインなどに従い妥当性評価される。

(b) 分析法の使用を、ISO/IEC 17025 (2005) 規格又は GLP 原則 (Principles of Good Laboratory Practice) に準拠した品質管理システムに組み込む。

(c) 分析法は、以下の例によって示された精確さに関する情報によって補完されるべきである。

- 可能であれば、定期的な技能試験への参加
- 適用可能な場合、認証標準物質による校正
- 分析成分の予測濃度で実施された回収試験
- 可能であれば、他の妥当性評価された分析法による結果の検証

⁶ Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. (2002) Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure and Applied Chemistry 74: 835-855.

⁷ FAO/WHO コーデックス委員会手続きマニュアル (Procedural Manual)』

「分析法の開発における検討事項」の項では、分析法を開発するにあたり、検討すべき基本的な事項について示している。以下に該当部分を抜粋した。

『**分析法の開発における検討事項**

158. 分析法の開発には、用いられる分析技術に熟練した分析者、ならびに適切な試験室空間、装置及び経済的支援を必要とする。分析法の開発を開始する前に、要求される性能パラメータを含む、残留規制プログラムにおける分析法の使用目的及び必要性を設定すべきである。他の検討事項には、分析法の要求される適用範囲(対象とする化合物又は化合物の種類及び試料の種類)、予測される干渉物質、測定系に要求される性能特性、分析法の性能に影響すると考えられる関連する物理化学特性、望ましい試験系の特異性及びその判定方法、分析成分及び試薬の安定性データ並びに試薬の純度、分析法の性能因子を満たすために許

容される操作条件、試料調製ガイドライン、分析法の性能に影響する可能性のある環境要因、安全上の配慮事項、及びプログラムのニーズに関連するその他の特定の情報などがある。特に、通常の保存及び使用条件下並びに試料処理中の両方の条件における標準物質の安定性を評価すべきである。確認を目的とした再分析の可能性に備えて保留されている期間を含む、分析前の試料の一般的な保存条件における試料中の分析成分の安定性についても決定すべきである。

159. 分析法の性能属性を確立することは、公衆衛生プログラムの策定及び管理に必要な情報を食品安全に関する機関に提供するという点で不可欠である。また、分析法の性能属性は、将来の計画、評価及び製品の処理において良好な管理の決定根拠ともなる。動物医療業界にとっては、分析手順の開発において達成しなくてはならない性能を正確に知るためのガイドラインとなる。十分に規定された分析法の性能因子を有することは、全関係者に有益なものとなる。分析法の性能要件は、最大残留基準値が設定されている残留物のスクリーニング、定量又は確認に使用される分析法か、あるいは ADI 及び MRLVD が提案されていない残留薬剤の分析法かによって異なる。後者の場合、管轄当局は、規制管理目的で使用される分析法が満たさなくてはならない最低性能基準を設定することができる。しかしながら、これらの化合物の食品中の安全な濃度が設定されていない場合、管轄当局は、技術及び分析能力の向上が反映されていることを確認するために、そのような基準を定期的に見直すことができる。このような基準が管轄当局によって正式に設定されていない場合、通常は規制試験室で用いられる分析法の検出能によって事実上設定される。』

分析法の精確さ(Accuracy)の決定方法については、セクション 167 において示されており、精確さは、① 認証標準物質の分析、② 性能パラメータがすでに厳密に確立されている他の分析法(一般に、試験室間試験で妥当性評価された分析法)により得られた結果との比較、③ ①及び②がない場合は添加回収試験により決定される。一般に、認証標準物質及び試験室間試験によって妥当性評価された分析法の両方とも使用できないことが多いため、添加回収率として精確さを決定することが、食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の妥当性評価に頻繁に用いられる、としている。しかし、回収率の解釈では、試料に添加された分析成分は、生物学的に生じた実残留試料の同じ分析成分と同じ挙動を示さない可能性があることを認識する必要があるとしている。以下に該当部分を抜粋した。

『167. 分析法の精確さ Accuracy は、認証標準物質の分析により、又は性能パラメータがすでに厳密に確立されている他の分析法(一般に試験室間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、あるいは認証標準物質や試験室間試験で妥当性評価された分析法がない場合は、既知のブランク試料に添加された分析成分の回収率 recoveryを測定することによって、決定することができる。認証標準物質及び試験室間試験によって妥当性評価された分析法の両方とも使用できないことが多いので、回収率として精確さを決定することが、食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の妥当性評価に頻繁に用いられる。測定値の精確さは、系統誤差 systematic error(分析法バイアス)及び分析成分の回収率(回収百分率として測定)と密接に関連する。分析法の精確さに関する要求事項は、試験結果を規制でどのように使用するかにより異なる。精確さは、MRLVD 付近

の濃度又は規制措置のための目標濃度(一般的には、目標濃度の0.5~2.0倍の濃度)で、慎重に特徴づけを行い、規定の統計的信頼水準内で規制措置限度を超えることを決定することができる残留物を含有する試料に対してのみ、規制措置が講じられるようにすべきである。

168. 回収率 Recovery は、通常、既知の濃度で試料に添加した後に実験的に測定した分析成分の百分率として表され、分析法の分析範囲をカバーする濃度で評価すべきである。回収率の解釈では、試料に添加された分析成分は、生物学的に生じた実残留試料の同じ分析成分(残留動物用医薬品)と同じ挙動を示さない可能性があることを認識する必要がある。多くの状況において、抽出される実残留物の量(収量又は回収率)は、存在する総実残留物量よりも少ない。これは抽出時の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析成分を添加したブランク組織を用いた回収実験では完全には再現されない他の要因によるものと思われる。比較的高濃度では、分析法の回収率は100%に近づくことが予想される。より低濃度では、特に広範囲の抽出、分離及び濃縮操作を伴う分析法では、回収率はより低くなる可能性がある。観察される平均回収率に関係なく、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、変動の少ない回収率が望ましい。回収率補正は、コーデックス委員会によって提供されるガイダンスに従って行われるべきである。』

分析法の開発時に得られた分析法のばらつき(精度)は、その分析法を使用する別の試験室で得られるばらつきよりも通常小さく、分析法が開発された試験室で適切な性能基準を達成できないのであれば、他の試験室でそれよりもよくなることは期待できないと明記されている。このことは自明の

ことかもしれないが、例えば、試験法開発でのすべてのパラメータが分析法の性能基準を満たしている場合であっても、その値がすべて目標値ぎりぎりであるような場合は、他の機関で実施する際に目標値を満たさない可能性があるため、開発時にはできる限り余裕を持った条件設定が望ましいと思われる。

『170. 分析法を開発している試験室で得られる分析法のばらつきは、開発後に分析法を使用する別の試験室で得られるばらつきよりも通常小さい。分析法が開発された試験室で適切な性能基準を達成できないのであれば、他の試験室でそれよりもよくなることは期待できない。』

また、「規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性」の項では、分析法は、堅牢(頑健)で、費用対効果が高く、比較的複雑ではなく、移植性があり、かつ一連の試料を効率的に同時に取り扱うことができるものであるべきである、との考え方を示している。なお、移植性(Portability)とは、確立された分析性能特性を失うことなく、ある場所から別の場所に移すことが可能であるという分析法の特性である。

また、「残留規制分析法に関する分析法の開発及び妥当性評価の検討事項」において、内標準の使用に関する留意点を示しており、以下に抜粋した。

『内標準の使用

191. 残留分析法は、分析管理のための内標準を用いて設計されることがある。内標準を正しく使用することにより、分析変動の一部が補正され、精度が向上する。しかしながら、内標準の使用が不適切であれば、分析測定的重要事項である変動要因があいまいになる場合がある。内標準を使用する場合は、操作のできるだけ早い段階で試料に添

加すべきであり、分析開始前に試験試料に添加するのが望ましい。内標準は、対象とする分析成分の回収率を、一定の、そして、予測可能な形で反映しなくてはならない。分析法において、対象となる分析成分の挙動を反映しない内標準は、最終結果の計算で重大な誤差を招く。内標準を選定する際は、内標準が対象の分析成分の回収率を変更したり、測定過程に干渉したりすることがないように注意しなければならない。分析法に対する内標準の影響の程度及び予測可能性を知ることが重要である。内標準は、適切に使用されると分析法の性能を大きく向上させることができる。』

(6) OECD

OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock^{II-10)}

本ガイドラインの中で分析法に関連する部分についてまとめた。

「試験の実施」の「一般的な考慮事項」においての『7. 申請者は、最大残留基準値(MRL)案に将来影響を及ぼす可能性のある新規で予期しない農薬の代謝物が存在する可能性に常に注意すべきである。代謝物又は変質生成物の構造が、別の登録済みの農薬と同一で、その情報が公開されている場合、申請者はその旨を明記すべきである。』とし、代謝試験が将来の規制対象化合物の選択に重要な役割を担っていることを示唆している。

また、「家畜における残留の特徴」の項では『17. 家畜代謝試験の実施中、申請者は、MRL/許容値又は食事リスク評価の目的のために定義された残留物を効率的に抽出するための分析法(規制施行及びデータ収集)の能力に関して、発生する可能性のある将来の問題を念頭に置く必要がある。好ましくは、肝臓及び乳の試料を用いるべきである

が、特定の代謝物が特定の臓器に蓄積する場合、当該臓器の試料も保存すべきである。従って、放射性標識された試料は、後に開発される分析法による将来の分析(ときに分析法の「ラジオバリデーション」と呼ばれる)のために保存する必要があると考えられる。しかし、分析法の抽出手順が放射性標識試験で用いられたものを反映する場合、そのようなデータは一般的に必要なものであろう。』とし、代謝試験の段階から、将来の規制対象化合物を効率的に抽出するための分析法について留意することが求められている。加えて、将来の規制分析法のラジオバリデーションによる評価のために、代謝試験で得られた放射性標識された試料の保存についても求められている。

本ガイドラインの「分析段階」では『37. 新たな抽出及び分析手法の使用が、上記の手法に代わるものとして利用するのに適切な場合がある。超臨界流体抽出法 supercritical fluid extraction (SFE)、マイクロ波抽出法 microwave extraction、高速溶媒抽出法 accelerated solvent extraction (ASE) などの代替抽出法を用いることができる。いずれの場合も、代謝経路を完全に解明するためには、利用可能な最善の技術を用いるべきである。』としている。しかし、この規定はあくまで代謝経路の解明のための手法と理解される。諸外国では、別途、残留規制のための分析法の提出も求めていることから、あまり問題になることはないと思われるが、規制対象化合物を選択するための試験で用いられた主要な分析法が、上記の SFE 法や ASE 法などのように必ずしも規制分析において汎用されているとはいえない手法であった場合には、そのままでは規制分析法に適用することは困難と考えられる。特に、抽出法を変更しようとする場合には注意が必要である。なお、農林水産省の動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン^{II-2)}では「残留基準値の濃度

で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある。」ことが求められている。分析法は常に進歩していると認識されるが、新たな手法が一般に受け入れられ利用できるようになるまでにはある程度の時間がかかる事を念頭に置いて、できる限り汎用性の高い試験法の開発が望まれる。

C-2. 分析法の評価基準について

I. 農薬の残留分析法

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易い農薬等/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よい。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、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の面積(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)に相当するピークの面積(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)」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)」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」¹⁻⁴⁾

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 RSDr 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、回収率は低いが一応(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」^{L5)}

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」¹⁻⁶⁾

「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」¹⁻⁹⁾

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」¹⁻¹⁴⁾

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」¹⁻¹⁵⁾

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℃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

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、セプトムブリード、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、単一測定の見点からは、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見点からは、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) 以下となるように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.」¹⁻¹⁶⁾

「Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001」¹⁻¹⁷⁾

「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性であると考えられることから、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」¹⁻¹⁸⁾

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)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設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。
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」¹⁻¹⁹⁾

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所は、分析

法開発及びその後の分析法の使用に關与してはならない。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て低 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。これを超えず、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's 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。

II. 動物用医薬品及び畜産物の残留分析法

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) 農林水産省(日本)

12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」^{II-2)}

分析法の評価基準については、本ガイドラインの 14-5 に記載されており、以下に抜粋した。

「14-5 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験:残留試験において使用される分析方法のバリデーション(VICH GL49R)」

動物用医薬品の残留農薬分析法の評価基準に関連する事項を以下抜粋した。

(3) 分析能パラメータ

通常、分析方法のバリデーションには、特定の分析能パラメータがある。それらの分析能パラメータは、以下のように定義される:

- 直線性(Linearity)
- 真度(Accuracy)
- 精度(Precision)
- 検出限界(Limit of Detection)
- 定量限界(Limit of Quantification)
- 選択性(Selectivity)

- ・基質中での安定性 (Stability in Matrix)
- ・処理試料中の安定性 (Process Sample Stability)
- ・頑健性 (Robustness)

各パラメータは、動物用医薬品の残留減衰試験での使用を意図した分析方法のバリデーションに適用されるもので、以下のとおり規定される。

ア 直線性 (Linearity)

予測される基質 (組織、乳、卵又は蜂蜜) 中濃度の範囲内で、直線関係を評価するための検量線を作成しなければならない。標準品の検量線は、溶媒又は緩衝液中の標準品、対照基質の抽出物に添加された標準品及び対照基質に添加され、抽出過程を経た標準品の3つの方法で作成することができる。直線性については、少なくとも5水準の濃度を使用し、既知濃度に対する反応を、線形、多項式又は他の (適切な) 回帰プロットによって示す。重み係数の許容については、残渣がランダムに分布しているか確定するために、3回の分析による残差の評価によって決定しなければならない。残差の評価は、少なくとも独立した3回の分析で行う。

検量線の推奨許容基準は、検量線の算出方法に依存する。対照試料に添加され、前処理過程を経た標準品により作成された検量線では、試料と同じ許容基準が適用される (ウを参照)。溶媒又は緩衝液中の標準品又は対照基質の抽出物へ添加された標準品により作成された検量線では、より厳密な許容基準 (併行精度: 全ての濃度で 15 % (LOQ 以下は 20 %) が要求される。

直線性を得るために、対数変換を必要とする定量法 (例えば、微生物学的定量法) もあれば、用量-反応関係を確立するためにより複雑な関数を用いた計算を必要とする定量法 (例: ELISA、RIA) もある。ここでも、選択した関数の「許容」については、

その関数を使用した場合の残差の評価によって検証しなければならない。

イ 真度 (Accuracy)

分析方法の真度とは、分析対象の濃度の真値と実験過程を経て得られる値の平均値との一致の程度のことである。真度は、系統誤差 (分析方法による偏り) 及び分析対象の回収率 (回収率%として評価される) と密接な関係がある。残留分析方法の推奨される真度は、分析対象の濃度によって異なる。真度は、表 1 に示した範囲に適合しなければならない。

ウ 精度 (Precision)

分析方法の精度とは、同一の均質の被験物質から、規定された条件に従って測定して得られた、複数の試験結果の間の一致の程度のことである。異なる施設間の分析のばらつきを室間再現精度と定義し、施設内での反復分析によるばらつきを併行精度と定義する。単一施設のバリデーションの精度には、分析ラン内 (併行精度) と分析ラン間の精度を含まなければならない。

バリデーションの過程の中で、分析方法の分析ラン内及び分析ラン間の精度を求めることができる。多くの場合、分析法を開発する施設と残留減衰試験の試料を分析する施設は同じであるため、通常、残留減衰試験を実施するために、室間再現精度 (施設間の精度) を求める必要はない。分析方法の室間再現精度の代わりに、分析ラン内精度を求めることができる。分析ラン内及び分析ラン間精度は、バリデートしようとする範囲 (LOQ を含む。) を含む3水準の濃度で、3日間で少なくとも3回ずつ繰り返した分析結果の評価により決定する。

残留分析方法のバリデーションでは、許容されるばらつきは、分析対象の濃度に依存する。精度は、表 2 に示した範囲に適合しなければならない。

エ 検出限界 (Limit of Detection)

分析方法の検出限界 (LOD) とは、許容される確かさで試験試料中の分析対象を検出可能な最低濃度のことである。LOD を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法的科学的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記1及び付記2として LOD を求めるプロトコールを、付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

オ 定量限界 (Limit of Quantification)

分析方法の定量限界 (LOQ) とは、規定された真度及び精度で測定可能な分析対象の最低濃度のことである。LOD と同様、LOQ を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法的科学的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記1及び付記2として LOQ を求めるプロトコールを、付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

カ 選択性 (Selectivity)

選択性とは、測定する分析対象と測定する試料に共存する他の物質を識別する分析方法の能力のことである。残留減衰試験で用いられる分析方法では、選択性は、主に測定する試料中の内因性物質について規定される。残留減衰試験は、十分に管理されており、その他の投与物質(すなわち、他の動物用医薬品又はワクチン)は予めわかっているか、試験中の投与が禁止されている。バリデートされた分析方法を残留規制の分析方法として提出する必要がある場合、試験実施者は、供試動物に使用される既知の物質について試験し、想定される分析への妨害の有無を確認するとよい。

分析方法の選択性の適切な尺度は、ブランク試料の反応である(オを参照)。対照試料の反応は、LOQ での反応の 20 %以下としなければならない。

付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

キ 基質中での安定性 (Stability Matrix)

残留減衰試験から採材した試料(組織、乳、卵又は蜂蜜)は、通常、分析するまで凍結保存する。予定される保存条件下で、過度の減少なしに試料を保存できる期間を、分析前に明らかにする必要がある。適切な保存条件(4℃、-20℃及び-70℃)及び分析前に試料を保存できる期間を明らかにするために、バリデーションの一部又は別の試験として、安定性試験を実施する必要がある。

試料に既知量の分析対象を添加し、適切な条件下で保存する。試料は規定した間隔(例:開始時、1週目、1か月目、3か月目)で分析する。試料を凍結する場合には、凍結融解試験(1日1回の凍結及び解凍の繰り返しを最低3回)を実施する。また、保存開始時の濃度を決定する初期試料として、投与動物試料を用いることができる。基質中での安定性の評価のため、バリデートされた範囲の最高と最低付近の2水準の濃度で分析を行うプロトコールが推奨される。規定した保存時点で得た平均濃度が、イで規定された真度の許容範囲以内で、保存開始時の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加した試料の分析結果と一致する場合、基質中での安定性は許容される。

ク 処理試料の安定性 (Processed Sample Stability)

試料処理の翌日に定量すること又は機器の故障のため何日か保存することはよくある。処理試料の保存条件下での安定性を明らかにするため、必要であれば、処理試料の抽出物中の分析対象の安定性を検討する。室温で4~24時間及び4℃で48時間が、保存条件の例として考えられる。処理方法により、その他の保存条件を検討する。処理試料の安定性の評価のため、バリデートされた

範囲の最高と最低付近の2水準の濃度で3回の分析を行うプロトコールが推奨される。規定した保存時点で得た平均濃度が、イで確立された真度の許容範囲以内で、処理直後の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加して処理した試料の分析結果と一致する場合、処理試料中での安定性は十分である。

ケ 頑健性 (Robustness)

残留規制の分析方法では、頑健性の評価は重要である。通常、1つの施設で、同じ機器を使用して実施する残留分析方法では、頑健性の評価は重要ではない。しかし、特に、経時的に変更又は改定が行われる分析方法の要因については、頑健性を評価しなければならない。試薬のロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間、抽出回数、固相抽出 (SPE) カートリッジのメーカー及びロット、分析カラムのメーカー及びロット並びに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 溶出溶媒の組成が、これらの要因に含まれる。分析方法の開発、バリデーション又は使用において、これらの要因のいずれか又は全てが分析方法に与える影響の程度を明らかにし、分析方法に影響を及ぼす可能性が最も高い条件での変動について評価しなければならない。

表 1 真度の許容範囲

分析対象の濃度	真度の許容範囲
< 1 µg/kg	- 50% ~ + 20%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	- 40% ~ + 20%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	- 30% ~ + 10%
≥ 100 µg/kg	- 20% ~ + 10%

表 2 精度の許容範囲

分析対象の濃度	許容される分析ラン内精度(併)	許容される分析ラン間精

	行精度) %CV	度 %CV*
< 1 µg/kg	30%	45%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	25%	32%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	15%	23%
≥ 100 µg/kg	10%	16%

* : Horwitz の式 $[CV = 2^{(1-0.5 \log C)}]$ C = 小数で表される濃度 (例えば、1 µg/kg は、 10^{-9} として表される。) により決定。

(2) EU

COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results^{II-3)}

本ガイドラインで分析法の性能評価パラメータとして、以下の 11 パラメータが示されている。

- 1) 特異性
- 2) 真度
- 3) 安定性
- 4) 回収率
- 5) 併行精度 (繰り返し性)
- 6) 室内再現性
- 7) 室間再現精度 (再現性)
- 8) 判定限界 (CC α)
- 9) 検出能力 (CC β)
- 10) 検量線
- 11) 頑健性: 軽微な変化又は大きな変化

1. 分析法の開発の方針についての (2) EU の項でも述べたように、定量分析法の真度については、以下のように規定されている。

『2.3.2.1. 定量分析法の真度

認証標準物質の繰り返し分析の場合、実験的に決定された回収率で補正された平均質量分率の認証値からの逸脱に関するガイドラインの範囲は、以下の通りである。

表 2 定量分析法の最小真度

質量分率	範囲
≤ 1 µg/kg	- 50 % ~ + 20 %
> 1 µg/kg ~ 10 µg/kg	- 30 % ~ + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % ~ + 10 %

そのような認証標準物質が入手できない場合、測定値の真度は、既知量の分析成分をブランクマトリックスに添加して得られた回収率により評価することが許容される。平均回収率で補正されたデータは、表 2 に示す範囲内にある場合のみが許容される。』

精度のうち室間精度(再現性)については、以下のように目標値が規定されているが、併行精度及び室内精度については、目安が示されているのみで、具体的な値は示されていない。

『2.3.2.2. 定量分析法の精度

再現性条件下での、標準試料又は添加試料の反復分析についての試験室間の変動係数(coefficient of variation :CV)は、Horwitz 式により算出されたレベルを超えないものとする。Horwitz 式を以下に示す。

$$CV = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

この式において、Cは 10 のべき乗(指数)(例:1 mg/g = 10³)として表される質量分率である。例を表 3 に示す。

表 3 分析成分の質量分率範囲における定量分析の再現性 CV の例

質量分率	再現性 CV(%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) 100 µg/kg 未満の質量分率については、Horwitz 式を適用すると許容できない高値になる。したがって、100 µg/kg 未満の質量分率の CV は可能な限り低いものとする。

繰り返し条件下で行われる分析については、室内 CV(訳者注:併行精度)は、一般に上記の値の 2 分の 1 から 3 分の 2 の範囲にあると考えられる。室内再現性条件下で行われる分析については、室内再現性 CV(訳者注:室内精度)は室間再現性 CV(訳者注:再現精度)を超えないものとする。許容限界が設定されている物質の場合、分析法は許容限界の 0.5 倍の濃度で対応する室間再現性 CV を超えない室内再現性を達成するものとする。』

本ガイドラインでは判定限界(CCα)及び検出能力(CCβ)の概念を規定している。CCα は、α(許容基準が設定されている場合:1 %, 許容基準が設定されている場合:5 %)の誤差をもって偽陽性となる濃度であり、CCβ は β(5 %)の誤差をもって偽陰性となる濃度を表している。以下に該当部分を抜粋した。

『3.1.2.5. 判定限界 Decision Limit (CCα)

判定限界は、「分析法の性能基準及びその他の要求事項 Performance criteria and other requirements for analytical methods (part 2)」に規定されている同定、又は同定プラス定量の要求事項に従い設定されなくてはならない。

許容基準が設定されていない物質の場合、CCα は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線手順(当文書では正味状態変数の限界値(critical value of the net state variable)と呼ぶ)のいずれかによる。この場合、最小要求性能限界濃度以上で、等間隔で添加されたブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。切片の室内再現性の標準偏差の 2.33 倍を y 切片に加えた値に対応する濃度が判定限界に等しい。これは定量分析のみに適用される(α = 1%)。

— 又は、分析成分が予想される時間枠内でシグ

ナル対ノイズ比を算出できるように、マトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。シグナル対ノイズ比の 3 倍を判定限界として用いることができる。これは定量分析及び定性分析に適用される。

許容基準が設定されている物質の場合、 $CC\alpha$ は以下のいずれかにより設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順(当文書では正味状態変数の限界値(critical value of the net state variable)と呼ぶ)のいずれかにより。この場合、許容基準付近で等間隔で添加されたブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を許容基準に加えた値に対応する濃度が判定限界に等しい($\alpha = 5\%$)。

— 又は、許容基準で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。対応する標準偏差の 1.64 倍を許容基準に加えた濃度が判定限界となる($\alpha = 5\%$)。

3.1.2.6. 検出能力 Detection capability ($CC\beta$)

検出能力は、規定されているスクリーニング、同定、又は同定プラス定量の要求事項に従い設定されなくてはならない。

許容基準が設定されていない物質の場合、 $CC\beta$ は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順(当文書では正味状態変数値の最小検出可能値(minimum detectable value of the net state variable)と呼ぶ)。この場合、最小要求性能限界濃度以下で等間隔で添加された代表的なブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。判定限界で測定された平均含有量の室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値に対応する濃度が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 判定限界で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。試料を分析し、分析成分を同定する。測定された含有量の室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 定量結果がまったく得られない場合、検出能力は、判定限界以上の濃度で添加したブランク試料の調査により設定可能である。この場合、偽適合結果が 5%以下に留まるのであれば、その濃度が分析法の検出能力に等しい。従って、この設置に関して信頼性の高い根拠を確保するためには少なくとも 1 濃度について少なくとも 20 回の調査を行わなくてはならない。

許容基準が設定されている物質の場合、 $CC\beta$ は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順[当文書では正味状態変数値の最小検出可能地(minimum detectable value of the net state variable)と呼ぶ]のいずれかによる。この場合、許容基準付近で等間隔で添加された代表的なブランク試料を用いるものとする。試料を分析し、分析成分を同定する。判定限界での平均測定含有量の標準偏差を計算する。室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値に対応する濃度が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 又は、判定限界で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。対応する標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。』

(3) FDA(米国)

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition^{II-4)}

分析法の性能特性として検討すべきパラメータ

については、分析の使用目的・種類・以前に妥当性評価された程度に応じて 3 つに分類されている。以下に該当部分を抜粋した。

『2.3 性能特性 Performance Characteristics

分析法を妥当性評価するために評価すべき性能特徴は、分析法の使用目的、分析法の種類(例:定量的か、定性的か)、及びそれが以前に妥当性評価された程度(例:マトリックス拡張、分析成分拡張、プラットフォーム拡張)に応じて変化する。これらの特性の定義は付録 1(用語集)に含まれているが、この文書は、分析法の検出レベル、検出限界又は定量限界などの特性を計算する様々な方法を扱うことを意図するものではない。

新規定量分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定量分析法の妥当性評価は、次の性能特性について最低限評価すべきである: 精確さ、精度、選択性、検出限界、定量限界、直線性(又は他の校正モデル)、適用範囲、測定不確かさ、堅牢性、同定の確認、及び添加回収率。

新規定性分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定性分析法の妥当性評価は、最低限次の性能特性について評価すべきである: 感度、選択性、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度、堅牢性、及び同定の確認。

分析法拡張の妥当性評価のための性能特性: 以前に妥当性評価された分析法の拡張について妥当性評価するには、その拡張の目的を慎重に評価する必要がある。試料調製及び/又は抽出手順/分析法が既存の試験手順から修正される場合、その変更が得られるデータの精度及び精確さに悪影響を及ぼさないことを実証すべきである。修正された方法を実施するために、一般的にはまず初めに標準又は既存の分析法が実施される。その後、既存の分析法と比較することにより、修正された方法の性能が検証される。』

本ガイドラインでは、また、食品中の化学分析成分に関する規制分析法の妥当性評価の要件について、分析法の目的に応じて以下の 4 つのレベルを定義している。各レベルの主要な妥当性評価パラメータの要件は表 1(「図表」参照)にまとめられている。

レベル 1: 緊急/限定的使用

レベル 2: 単一試験室妥当性評価

レベル 3: 多施設妥当性評価

レベル 4: 完全共同試験

厚生労働省における試験法開発をこの分類に当てはめると(完全に一致するわけではないが)、個別試験法開発についてはレベル 2 に、一斉試験法の妥当性評価試験はレベル 3 に相当すると思われる。評価基準の目標値については、定量分析法の場合は表 A2.1(「図表」参照)に、定性分析法(限度試験/スクリーニング分析法)の評価基準(偽陽性率及び偽陰性率)は表 A.2.2(「図表」参照)に示した。

(4) オーストラリア

1) Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG: Part 5A - Residues^{II-5)}

「5. 残留データ要求事項」の「5.4. 分析法」において、標的組織中の指標残留濃度で使用された分析法について、適切な妥当性評価データの提出が求められており、そのデータには次の内容が含まれなくてはならないとしている。

特異性 Specificity: 選択性と同義

真度 Accuracy: 真の値と実験手順を非常に多数回適用することにより得られる結果の平均値との一致の近さと定義しているが、添加回収実験によっても測定可能であるとしている。

精度 Precision: 精度には併行精度(繰り返し性)と室内精度(室内再現性)があり、%相対標準偏差

で表されるとしている。

検出限界 Limit of Detection (LOD) : LOD を許容される統計的確かさをもって分析成分の存在を推測することができる分析成分の最小測定量と定義している。LOD を推定する 1 つの方法として、異なるソースから採取され調製されたブランク試料を分析 ($n \geq 20$) し、分析成分濃度の算術平均を求め、これにその標準偏差の 3 倍を加える方法を示している。

定量限界 Limit of Quantification (LOQ) : LOQ をその濃度以上であれば規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定量であると定義している。

保存及び分析中の分析成分の安定性 Stability of the analyte during storage and analysis : 試料を 6 ヶ月以上保存する場合には、指標残留が安定であることを示すデータを提示することを求めている。同様に、分析操作中の指標残留の安定性を実証する事が求められている。

2) Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods⁽¹⁻⁶⁾

「分析法の妥当性評価」の項において、分析法妥当性評価において考慮すべき項目が示されている。各項目について一部要約して以下に示した。

- ① **標準検量線 Standard calibration** : 既知の純度の参照化合物を用いて、LOQ から試料抽出液中に見込まれる最大濃度又は MRL (案) のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも 3 点の標準濃度を用いて評価する。
- ② **分析法の真度 Accuracy of the method** : 分析法の真度とは、真値と回収率で補正された結果の平均値との一致の近さである。後者は、既知量の化合物を添加した試料を分析することにより得られる。真度の決定には LOQ かそれよりや

や高濃度を用いる。(注: Accuracy は一般に精確さと訳されるが、精確さは真度と精度を合わせた概念であり、ここでは trueness (真度) のことを指していると思われる。)

- ③ **検出限界 Limit of detection** : 検出及び確認は可能であるが、必ずしも定量化できるわけではない試料中の分析成分の最低濃度である。機器分析法では、通常、S/N = 3:1 が受け入れられるが、この値は目安である。
- ④ **分析定量限界 Limit of analytical quantitation** : 許容可能な確かさをもって、試料中で定量可能な残留物の最低濃度である。MRL の設定を目的とした場合、LOQ は 定量的な回収が達成される最低濃度である。従って、どのような分析法であっても、提案された LOQ での回収率データを提出しなくてはならない。提出がなければ、LOQ は、食品について提出された許容可能な回収率データでの最低濃度と等しいとみなされる。
- ⑤ **分析法の特異性 Specificity of the method** : 測定対象の分析成分と試験マトリックス中に存在すると考えられる他の物質とを識別する分析法の能力である。特異性の測定には、対象物質及び類似物質の代謝に関する知識、並びに適切な参照標準が必要となる。(注: この場合、IUPAC では選択性 Selectivity の用語が推奨されている。)
特異性は、以下に示すどれか 1 つの方法で示すことができる。
 - i) クリーンアップ後の対照抽出物を用いて、LOQ の 30% を超える共抽出物質による干渉がないことを示す。
 - ii) 構造的に類似した物質に対する特異性は、クロマトグラフィー分離又は他の適切な測定方法により、in vitro で示すのが最適である。

iii) i) 及び ii) が上手くいかない場合は、実残留組織の検討が適切と思われる。

⑥ 分析法の精度(回収率の範囲) Precision of the method (recovery range): 精度の2つの尺度は、繰り返し性(併行精度)及び再現性(室間精度)である。繰り返し性とは、同一試験室で、同一実施者が行った分析法で得られた、試験結果間の変動をいう。再現性は、異なる実施者、及び好ましくは異なる試験室による変動の尺度である。回収率の変動係数は、精度の尺度とみなすことができる。

動物用医薬品について検討する際の分析法の妥当性評価の許容基準を下表にまとめた。

分析成分の濃度, mg/kg	繰り返し性 CV%	再現性 CV%	真度(平均回収率%の範囲)
≤0.001	36	54	50~120
>0.001 - 0.01	32	46	60~120
>0.01 - 0.1	22	34	70~120
>0.1 - 1	18	25	70~110
>1	14	19	70~110

3) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Analytical Methodology^{II-7)}

「2. 残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス」の「2.1. 性能特性」の項において、分析法妥当性評価で評価する性能特性を以下に示した。このうち重要なものを抜粋してまとめた。

性能特性 Performance characteristics

- ① 標準較正 standard calibration
- ② 線形性 linearity
- ③ 真度 accuracy (訳者注: accuracy は一般に「精確さ」をさすが、この文書では真度(trueness)として取扱う。)
- ④ 精度 precision

- ⑤ 検出限界 limit of detection
- ⑥ 定量限界 limit of quantitation
- ⑦ 選択性又は特異性 selectivity or specificity
- ⑧ マトリックス中での安定性 stability in matrix
- ⑨ 保存安定試験の実施 conduct of storage stability trials
- ⑩ 工程試料の安定性 process sample stability
- ⑪ 頑健性 robustness

2.1.1. 標準較正 Standard calibration

直線性は、定量限界から試料抽出液中に見込まれる最大濃度又は最大残留基準値(案)のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも5点の標準濃度を用いて評価すべきである。

2.1.2. 線形性 Linearity

1) 標準検量線は、方法に応じて3つの形式で作成することができる。

- ① 溶媒又は緩衝液中の標準
- ② 対照マトリックス抽出液に添加された標準
- ③ 対照マトリックスに添加され抽出手順により処理された標準

2) 直線性は、最低5点の異なる濃度を用いて、既知の濃度に対する応答についての、直線、多項式又は他の(適切な場合)回帰プロットによって記述する。

3) 重み係数の受け入れ可能性は、3回の測定ランにおいて残差がランダム分布しているかどうかを評価することにより判断されるべきである。残差の評価は、少なくとも3回の独立した測定ランで行う。

4) 検量線の推奨される許容基準

上記1)の①及び②: より厳格な許容基準(すべての濃度で繰り返し性(併行精度)15%以下、但し、定量限界以下では20%以下が許容可能)が要求される。

上記1)の③: 試料と同じ精度の受け入れ基準

に従う。

2.1.3. 真度 Accuracy

真度とは、分析成分の濃度の真値と実験手順を非常に多数回適用して得られる結果の平均値との一致の近さをいう。また、真度は、添加したブランクマトリックス(相互に独立した複製試料)を用いた回収率実験によっても決定することができる。残留分析法の推奨される真度は、分析成分の濃度に依存する。真度は、表 1 に示す範囲を満たすことが望ましい。

表 1: 分析成分の濃度と許容される真度の範囲

分析成分の濃度(μg/kg)*	真度の許容範囲
< 1 μg/kg	-50% ~ +20% (50~120%)
≥ 1 μg/kg	-40% ~ +20% (60~120%)
≥ 10 μg/kg < 100 μg/kg	-30% ~ +10% (70~110%)
≥ 100 μg/kg	-20% ~ +10% (80~110%)

* μg/kg = ng/g = ppb (マイクログラム/キログラム = ナノグラム/グラム = 10 億分の 1)

2.1.4. 精度 Precision

一般に、分析成分の様々な濃度における反復分析(n = 6)のパーセント相対標準偏差で表される。異なる試験室間の分析の変動は再現性(再現精度、reproducibility)と定義され、試験室内での繰り返し分析の変動は繰り返し性(併行精度、repeatability)と定義される。単一試験室妥当性評価の精度には、ラン内(繰り返し性、併行精度)及びラン間の要素を含めるべきである。

分析法のラン内及びラン間の精度は、妥当性評価手順の一部として測定することができる。分析法を開発している試験室は、多くの場合、残留試験の試料を分析する試験室と同じであることが多いため、通常、残留減衰試験を実施するために再現性(室間精度)を測定する必要はない。分析法の

再現性を確立する代わりに、ラン内精度を測定することができる。ラン内及びラン間の精度は、3 日間の分析において、意図された妥当性評価範囲(定量限界を含むべきである)を代表する異なる 3 濃度で、最低 3 回の反復分析を評価することにより決定すべきである。

残留分析法の妥当性評価に関しては、許容可能な変動は分析成分の濃度に依存する。精度は、表 2 に示す範囲を満たすべきである。

表 2: 分析成分の濃度と許容可能なラン内及びラン間精度

分析成分の濃度	ラン内精度(併行精度)の許容される変動係数(CV)	ラン間精度の許容される(CV)
< 1 μg/kg	30%	45%
≥ 1 μg/kg 及び < 10 μg/kg	25%	32%
≥ 10 μg/kg 及び < 100 μg/kg	15%	23%
≥ 100 μg/kg	10%	16%

2.1.5. 検出限界 Limit of detection

検出限界(LOD)は、許容される確かさをもって試験試料中の分析成分の存在を推定することができる分析成分の最小測定濃度である。LOD は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値 + 平均値の標準偏差の 3 倍として推定される。

2.1.6. 定量限界 Limit of quantitation

定量限界(LOQ)は、規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定濃度である。LOQ は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値 + 平均値の標準偏差の 10 倍として推定される。

推定された LOQ で真度及び精度の試験を行うことは、LOQ の決定に関する確定的な証拠を提供

する。当該濃度での真度及び繰り返し性(併行精度)が、表 2 の許容範囲以下であれば、推定された LOQ は許容される。

2.1.11. 頑健性 Robustness

頑健性は、特に時間の経過とともに変更や修正を受けると考えられる分析法の条件について評価すべきである。これらの条件には、試薬ロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間及び抽出回数、固相抽出カートリッジのブランド及びロット、分析カラムのブランド及びロット、及び高速液体クロマトグラフィーの溶出溶媒の組成などが含まれる。測定法の開発、妥当性評価又は使用中に、これらの条件の一部又はすべてに対する分析法の感度を明らかにすることができる、そのため分析法の性能に最も影響を与える可能性がある条件の変動について評価することが望ましい。

(5) コーデックス委員会

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009)^{II-11)}

本ガイドラインでは、分析法の性能特性について、スクリーニング分析法、定量分析法及び確認分析法に分けて規定している。

スクリーニング分析法の性能特性として、偽陽性率(rate for “false positive”)、偽陰性率(rate for “false negative”)、感度、選択性及びカットオフ値(又は閾値)を規定している。しかし、感度や選択性の評価に 30 以上のデータを必要としており、また、「一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、又は

発色反応に基づくものが多い」としていることから、検査キットなどを想定している可能性がある。そのため、本ガイドラインの機器分析への適用についてはさらに検討が必要と思われる。以下に該当部分を示した。

『スクリーニング分析法の性能特性

160. スクリーニング分析法は、通常、その性質上定性的又は準定量的であり、閾値を超える検出可能な残留物が含まれていない(「陰性」)試料と閾値を超える残留物を含む(「陽性」)試料を区別することを目的としている。従って、妥当性評価の方針は、結果が「陽性」となる閾値濃度の設定、統計学に基づいた結果の「偽陽性」率及び「偽陰性」率の決定、干渉に関する試験及び適切な使用条件の設定に重点が置かれる。

161. 特に検査キットを用いるスクリーニング検査において、「感度(sensitivity)」という用語は、分析対象物が規定の統計的限界内で確実に検出される最低濃度をいう。検査キットに関する AOAC 性能検査プログラム(AOAC Performance Tested Program)では、感度は、標的濃度で分析成分を添加した最低 30 の残留のない試料を試験することにより実験的に決定される。試料は最低 6 つの異なる供給源(即ち、少なくとも 6 つの供給源の各々から少なくとも 5 つの反復試料)から採取されるべきであり、これらの試料は標的濃度で添加したときにすべて陽性結果となるべきである。3 つ以上の陰性結果を生じた場合は、感度検査に不合格となる。1 つ又は 2 つの陰性結果を生じた場合は、実験を繰り返す必要があり、その結果陰性結果が 2 つであれば不合格となる。実験は、既知の実残留試料が入手可能であればこれを用いて標的濃度で繰り返し行うべきである。

162. スクリーニング分析法の「選択性(selectivity)」とは、陰性応答を与える試料が真に

陰性であることを判定する試験能力をいう。また、試験は、標的化合物又は化合物群の存在を、試料に存在すると考えられる他の物質と区別できなくてはならない。スクリーニング分析法は、化合物グループ又は種類に共通の構造的特徴を利用することが多いため、通常、その選択性は定量分析法ほど良好ではない。一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、又は発色反応に基づくものが多い。スクリーニング分析法の選択性は、クロマトグラフィー又は他の分離手法の後に検出系を用いることにより増大させることができる。95%信頼水準(スクリーニング試験に推奨される)で少なくとも90%の選択率を実証するために、最低6つの異なる供給源からの代表的ブランク試料マトリックスについて、30回の反復分析を実施する。すべての結果は、陰性となるべきである。その後、予想される干渉及び交差反応について、予想される干渉物質(動物に投与される可能性のある他の薬剤、予想される環境汚染物質、薬剤の代謝物、又は化学的関連のある化合物など)を添加したブランクマトリックス物質を試験することにより追加試験を行うことができる。これら化合物が、試料中に合理的に予想される濃度で存在するとき、応答はやはり陰性となるべきである。

163. 特定の化合物に対する試験の「カットオフ値」又は閾値は、濃度を漸増して、各濃度で添加した、通常、30個の複製試料(少なくとも6つの供給源からの)を用いた濃度-応答実験により設定する。30個の複製試料のすべてが陰性応答を示す濃度及び30個の複製試料のすべてが陽性応答を示す濃度が確定したならば、「すべて陰性」の濃度と「すべて陽性」の濃度の間の均等な間隔の4濃度で添加したブランクマトリックス物質を用いて実験

を繰り返す。追加のセットは、「すべて陽性」の濃度より20%高い濃度で試験を行う。結果の統計解析により、使用者は必要な信頼水準(通常95%)⁸で信頼できる検出濃度(detection concentration)を設定することが可能となる。

⁸Finney, D.J. (1978) Statistical Method in Biological Assay, 3rd edition. MacMillan Publishing Co., New York.』

定量分析法の性能特性としては、選択性(Selectivity)、精確さ(accuracy) [真度(trueness)又はバイアス(bias)]、回収率(Recovery)、精度(precision) [併行精度(repeatability)及び再現精度(reproducibility)]、検量線(calibration curve)、直線性(linearity)、検出限界(detection limit)及び定量限界[limit of quantification (LOQ)]を規定している。ただし、このうち精度については、「単一試験室における分析法妥当性評価では、精度は、最低6つの異なる蓄積組織、異なる試薬バッチ、望ましくは異なる装置などを用い、望ましくは異なる分析者により異なる日に実施した実験から決定すべきである。」としているため、室内精度(室内再現性)(Within-laboratory Reproducibility)のことを指しているものと思われる。即ち、再現精度(室間精度)の代わりに室内精度を求めることを意図しているものと思われるが、評価基準の目標値については明確には示されていない。

このうち、MRLVDの規制施行のための分析法では、表1(「図表」参照)に示す真度及び精度の性能基準を満たすことが推奨されている。以下に、関連部分を抜粋した。

『定量分析法の性能特性』

164. 選択性 Selectivity(化合物からのシグナル応答を、試料中に存在し得る他の化合物の存在下で検出し区別する分析法の能力)は、食品中の残留

動物用医薬品に関する規制管理プログラムで用いられる分析法の性能特性を定義する際に特に重要である。これには考慮しなくてはならない 2 つの側面がある — 即ち、試料中又は試料抽出物中に存在し得る他の化合物の干渉を受けずにシグナル応答を示す分析法の能力、及び特定の化合物だけに関連するものとしてシグナル応答を確実に同定する分析法の能力である。定量分析法に対しては、定量に用いたシグナルは、対象とする分析成分のみに関連し、共抽出物質に関する寄与が含まれていないことが要求される。完全に分離し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。特定の化合物又は構造により特異的な元素特異的検出器や検出波長又は質量選択検出器の使用は、クロマトグラフィー分離と組み合わせることにより、食品中の残留動物用医薬品に関する定量分析法の選択性は向上する。

165. 分析法の選択性に加え、信頼性のある定量結果を与える分析法の能力を実証しなくてはならない。これは 2 つの要素からなる。

(a) 試料中に存在する分析成分の濃度に関して、真値又は許容される値に対する結果の近さ。(精確さ accuracy、真度 trueness、又はバイアス bias として表される。)及び

(b) 反復測定において一貫した結果を与える分析法の能力。[精度 precision (併行精度 repeatability 及び再現精度 reproducibility)として表される。]

166. コーデックス MRLVD をサポートするために用いられる分析法は、表 1 に示す真度及び精度に関する性能基準を満たすことが推奨される。表中、 CV_A は、抽出前に添加されたブランクマトリックスの試験試料によって決定される変動係数を表し、 CV_L は試料処理のばらつきに関する 10%の推定

値を加味した試験室全体の変動係数を表す。

167. (前出のため略)

168. (前出のため略)

169. 精度 Precision は、同一試料からの測定試料についての反復測定間のばらつきを数値化したものであり、これもまた、試料中の残留物が MRLVD 又は他の規制措置限界を超えていると考えられる場合の判定において重要な検討事項である。分析法の精度は、通常、試験室内変動(併行精度)及び分析法が多施設試験にかけられた時には試験室間変動(再現精度)で表される。単一試験室における分析法妥当性評価では、精度は、最低 6 つの異なる蓄積組織、異なる試薬バッチ、望ましくは異なる装置などを用い、望ましくは異なる分析者により異なる日に実施した実験から決定すべきである。分析法の精度は、通常、標準偏差として表される。別の有用な用語は、相対標準偏差又は変動係数(算術平均の絶対値で除した標準偏差)である。精度は 100 を乗じることによって百分率として報告されることがある。

170. (前出のため略)

171. 定量分析法は、通常、試料中の分析成分からの応答と、既知濃度の溶液中の分析成分の標準品からの応答との比較に基づいている。分析法の開発と妥当性評価では、最初に検量線を決定し、一連の濃度範囲わたる標準品に対する検出器応答を評価すべきである。これらの濃度(最低 5 濃度及びブランク)は、対象分析成分の全濃度範囲を網羅し、結果として生じる曲線(検量線)は、統計学的に表現されるべきである。しかしながら、校正サンプルに適切なブランク試料を含めることが推奨されるが、これは、定量結果を得るために、検量線の低濃度範囲への外挿が許容されることを意味するものではない。分析関数は、対象分析成分の範囲全体にわたって、様々な濃度で試料から回収さ

れる分析成分の応答を関係づける。特定の試料(マトリックス)中に MRLVD 又は規制値が設定されている分析成分については、応答は、一般に、既知のブランク試料及び MRLVD の上下の濃度範囲で添加されたブランク試料(6 つの異なる供給源のブランク物質の使用が推奨される)について測定される。

172. 分析関数の実験データは、また、各濃度での分析回収率の計算にも使用することができ、マトリックス共抽出物の存在によって分析成分の応答が分析成分の標準品と比較して変化する場合に特に重要である。直線性 linearity は、分析関数の実験から決定され、目標濃度を添加した試料の分析のために得られた検量線の統計的表現法である。直線性は、一般に、線形応答があると仮定し、データの線形回帰分析から決定される。既知の代表的なブランクマトリックス物質に目標値をはさむ適切な濃度範囲で標準品を添加して作成した検量線(分析関数)に基づいて定量を行うことが、食品中の残留動物用医薬品の分析法によくみられるようになっている。較正のためのこのような「組織検量線 tissue standard curve」の使用は、得られた分析結果に回収率補正が組み込まれている。

173. 特定の分析法を用いて分析成分の存在に関する確実な検出、定量、又は確認を行うことができる下限値を確立することも必要である。検出限界 detection limit は、実際的には、試料中の分析成分を同定可能な最低濃度として説明される。検出限界は、上述の分析関数実験で作成された検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差($S_{y/x}$)を用いて推定することができる。この手法を用いると、検出限界は、検量線の y 切片(正の値と仮定) + 3 $S_{y/x}$ を使用して計算される。この手法は、検出限界の控えめな推定を与える。検出限界はまた、代表的な検体の測定により、ブランク中の分析成分の

最小応答値にその標準偏差の 3 倍を加えることによっても推定が可能である。この手法を用いる場合は、ほとんど検出できないような応答が生じる濃度で検体に添加し、ブランクの標準偏差の近似値を得る必要があることが多い。

174. 定量限界 limit of quantification (LOQ) は、limit of quantification 又は quantification limit とも呼ばれ、同じ実験で検量線の y 切片 + 10 $S_{y/x}$ により設定することができる。コーデックス委員会により設定された MRLVD をサポートするために使用される分析法の定量限界については、表 1 の精度及び精確さ(回収率)の基準を満たし、MRLVD と同じかその 1/2 以下が望ましい。しかしながら、分析法の定量限界が、MRLVD の遵守のためにモニターされた実際の濃度よりも低い場合、分析法の妥当性評価及びその後の適用は、最低較正濃度 lowest calibrated level (LCL) に基づくべきであり、この濃度は一般には MRLVD の 0.5 倍である。規制プログラムでの使用では、MRLVD 以下の濃度で残留物をモニタリングすることに関心がある残留物への暴露を推定するのに分析法が適用される場合、又は ADI や MRLVD が持たない物質について残留分析を行う場合は、検出限界及び定量限界が重要なパラメータとなる。MRLVD の遵守の監視のためには、MRL 濃度が確実に定量されることを実証する分析法に LCL を含めることが重要である。MRLVD をサポートするために使用される分析法の LCL は、LOQ より小さくするべきではない。コーデックスの手続きマニュアルでは、「クライテリアアプローチで用いられる用語(Terms to be Used in the Criteria Approach)」の項で定量限界に determination limit という用語を推奨している。』

確認分析法の性能特性については、選択性が確認分析法のための第一の考慮事項であるとして

いる。また、フーリエ変換赤外分光法又は質量分析などの特定の機器技術は、明確な同定を提供するのに十分な選択性があり、確認分析法ではこれらの機器による技術に基づくことが多いとしている。質量分析のうち、低分解能 GC/MS 及び LC/MS に基づく確認分析法の性能要件が表 2 に示されている。

表 2 種々の質量分析法技術を用いた相対イオン強度(標準品に対する試料の値)の性能要件

相対イオン強度 (ベースピークに対する%)	GC-MS (EI) (相対)	GC-MS (CI), GC-MS/MS, LC- MS, LC-MS/MS (相対)
>50%	≤10%	≤20%
20%~50%	≤15%	≤25%
10%~20%	≤20%	≤30%

質量分析については、低分解能質量分析法(シングル及びMS/MS)及び高分解能質量分析法(シングル及びMS/MS)について、同定ポイントの概念を導入して確認のための指標を示している。しかし、この同定ポイントに基づく確認方法は、科学的ではないとする意見もある¹²⁾。

質量分析法意外にも手法を組み合わせることで確認手法と同等の選択性を達成できる場合がある。例えば、同定は以下のような方法の組み合わせにより検証が可能であるとしている。

- (a) 薄層クロマトグラフィー
- (b) 元素特異的ガスクロマトグラフィー及び付属する検出システム
- (c) 特徴的な誘導体形成に続いて追加クロマトグラフィー、又は
- (d) 極性の異なる複数のクロマトグラフィーシステムを用いた化合物に特異的な相対保持時間の測定

そのほかの性能特性としては、「規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性」の項で、堅牢性 (Ruggedness)と分析中の分析成分の安定性 (Analyte stability)に言及している。堅牢性試験では、管理ポイントを決定するために、試薬容量又は濃度、pH、インキュベーション又は反応時間及び温度、試薬の品質、及び試薬又はクロマトグラフィー材料の異なるバッチ又は供給源などの変動を検討すべき要因としている。安定性については、規制のためのすべての分析法について、処理から分析完了まで、及び試料が分析を待つ間の一般的な保管条件において、試料物質の存在下で標準物質及び分析成分の両方について確立しなければならないとしている。

D. 結論

I. 農薬の残留分析法

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^{1-4),1-5),1-7),1-19)}。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¹⁻⁷⁾。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¹⁻⁷⁾。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¹⁻⁴⁾。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^{1-3),1-5),1-12),1-13),1-19)}。

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¹⁻¹⁹⁾。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^{1-3,1-5,1-14,1-15,1-19)}。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¹⁻⁷⁾。

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¹⁻¹⁴⁾。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¹⁻⁶⁾。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¹⁻¹⁴⁾。

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。目標値の違いは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。

II. 動物用医薬品及び畜産物の残留分析法

28年度の農薬の残留分析法に関する調査から、分析法の「抽出効率」が、真の残留濃度を測定するための最も重要な要素であった。29年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法に関する分析法開発の方針等について調査したところ、同様に多くのガイドライン等で分析法の抽出効率あるいは抽出操作について詳細な検討及び報告が求められていた^{II-2, II-4-II-7, II-11)}。オーストラリアのガイドラインでは、分析法の抽出効率は、実残留試料を用い

て決定する必要があり、放射性標識試験のための試料の分析(ラジオバリデーション)又は実残留試料を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出することによって実証された抽出手順を採用すべきであることが示されている^{II-6,II-7}。

28年度の調査により、抽出効率は、分析前に分析対象化合物を添加した試料を用いた従来の添加回収試験並びに標準添加法及び安定同位体標識した内標準法を用いても検証できないことが示されている。理想的には前出の実残留試料を用いたラジオバリデーションを行うべきであるが、検査機関での実施は現実的ではない。ラジオバリデーションの代わりに、EUのガイドライン^{II-3})では、認証標準物質を用いて真度*を求めて評価することを推奨しており、認証標準物質が入手できない場合に、添加試料から得られた回収率*により評価することが許容されるとしている>(* 認証標準物質で求めた場合を真度、添加回収試験で求めた場合を回収率として区別しているが、どちらも同じ目標値を用いている。)

米国のガイドライン^{II-4})においても、真度は認証標準物質によってのみ設定することができ、認証標準物質が入手可能な場合はこれを必ず用いることと規定している。認証標準物質が入手できない場合に、真度の代わりに添加回収試験で回収率を算出することができるとし、回収率はあくまで次善の方法として位置づけられている。また、入手可能な場合は、実残留試料を用いて、精度及びバイアスを評価するために用いることができるとしている。さらに、参照分析法(既存公示試験法や妥当性評価された試験法など)と開発した分析法の性能を比較することにより評価することも一つの方法である。

まとめ

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

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
 - 1) 認証標準物質を用いた評価
 - 2) 参照分析法との分析値の比較
 - 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較
 - ① 2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)
 - ② 実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。
 - 4) 添加回収試験: 抽出残留物を異なる溶媒の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法であると考えられる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を

反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

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

[追補]

28 年度に、コーデックス委員会の残留農薬部会 (CCPR) において検討されていた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) についてまとめたが、本ガイドラインは 29 年に「Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed CAC/GL 90-2017⁽¹¹⁻¹⁴⁾」[翻訳版(仮訳)は平成 29 年度 総括・分担報告書に資料⑦として添付]として公表された。対象マトリックスに飼料を追加し、一部文言の修正や要求事項の修正等が行われたが、基本的な内容については、原案からの大きな変更はなかった。

E. 参考文献

I. 農薬の残留分析法

I-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).

I-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

I-3) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, SANCO/825/00 rev.8.1, 16th November 2010 - Guidance document on residue analytical methods.

I-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.

I-5) US Environmental Protection Agency, Residue Chemistry Test Guidelines, OPPTS 860.1340 - Residue Analytical Method, EPA 712-C-95-174, August 1996

I-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)

I-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)

I-8) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Agricultural Manual of Requirements and Guidelines - Ag MORAG

- I-9) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Residue Guideline No. 19; Residue Analytical Method, February 2000
- I-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
- I-11) New Zealand, Ministry for Primary Industries, Recognised pesticides analytical laboratories and residue test methods (Plants), 1st July 2013
- I-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
- I-13) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops, 8th January 2007
- I-14) Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis CAC/GL 40-1993 (Revision 2003. Amendment 2010.)
- I-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
- I-16) Harmonized Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. *Pure & Appl. Chem.*, **71**(2),1999; 337 - 348
- I-17) Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement. CAC/GL 37-2001
- I-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
- I-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
- II. 動物用医薬品及び畜産物の残留分析法
- II-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).
- II-2) 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて:12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正 平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)
- II-3) COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044), *Official Journal of the European Communities* L221/8-36, 17.8.2002
- II-4) Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition,

- US Food & Drug Administration, Office of Foods and Veterinary Medicine, April 2015
- II-5) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG, Part 5A – Residues.
- II-6) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods
- II-7) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Analytical Methodology (2014)
- II-8) International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, Guidance for Industry “Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies” VICH GL49(R), U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, March 2015.
- II-9) 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
- II-10) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock, 8th January 2007.
- II-11) Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programme Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (Adopted in 2009; Revised in 2012). CAC/GL 71-2009.
- II-12) Lehotey S. J., *et al.* • Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques *Trend in Analytical Chemistry* • 2008 • 27(1070-1090)
- II-13) 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:食安発 1224 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(平成 22 年 12 月 24 日付け)
- II-14) Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed CAC/GL 90-2017 (2017)

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

「図表」

I. 農薬の残留分析法

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 Crops¹⁻¹³⁾

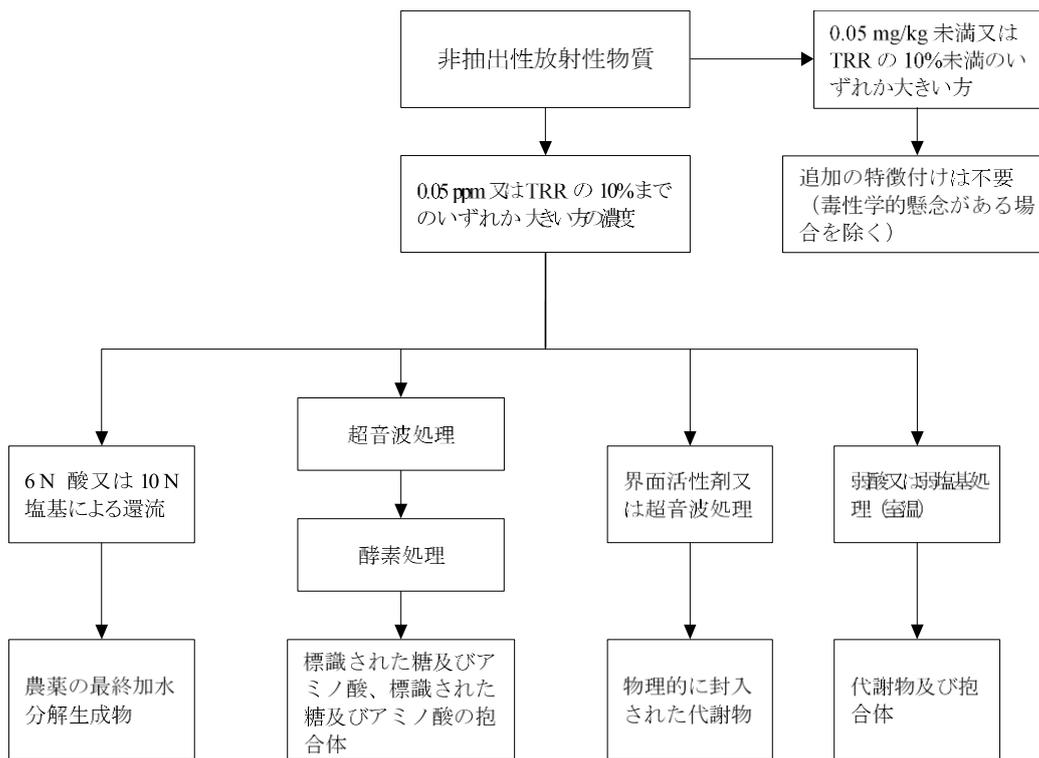


図 I. 非抽出性放射性物質の特徴付け及び同定*

* Other Test Guidelines, Test No. 501: Metabolism in Crops^{I-13)}

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」¹⁻¹⁾

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 feed」¹⁻⁴⁾

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 40-1993¹⁻¹⁴⁾

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 ($\text{RSD} = 2^{(1-0.5 \log C)}$) より算出
ここで C は濃度のことである ($1 \text{ mg/kg} = 10^{-6}$)。

「図表」

Ⅱ．動物用医薬品及び畜産物の残留分析法

(図表の番号は、各参考文献の番号を用いた。)

[FDA]

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition⁽¹⁻⁴⁾

表 1. 化学分析法の主要な妥当性評価パラメータ要件

	レベル 1: 緊急/ 限定的使用	レベル 2: 単一試験室 妥当性評価	レベル 3: 多施設 妥当性評価	レベル 4: 完全共同試験
参加試験室数	1	1	≥ 2	8 (定量) 10 (定性)
マトリックスソースの数 (マトリックス 当たり)*	≥ 1	≥ 3 (可能な場合、 推奨)	≥ 3 (可能な場合、 推奨)	≥ 3 (可能な場合、 推奨)
分析成分の添加レベル数 (少なくとも 1 つのマトリックスソ ースに対して)**	≥ 2 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク
必要な繰り返し数 (試験室ごとにテストされた各レ ベルでのマトリックスソース当た り)	≥ 2 (定量) ≥ 2 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)
必要な繰り返し数 (用いられるマトリックスソースが 1 つのみの場合、試験室ごとにテ ストされた各レベル当たり)	≥ 4 (定量) ≥ 6 (定性)	≥ 6 (定量) ≥ 9 (定性)	≥ 3 (定量) ≥ 6 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 6 (定性)

* 異なる物理化学特性を有する様々な食品マトリックスが選択される場合、各食品試料マトリックスのソース数は 1 つ以上である可能性があるが、もし 1 つの食品マトリックスしか試験されない場合には、入手可能であるならば 3 つ以上のソースが推奨される。添加レベルとマトリックスの組合せの総数が適切な場合 (例: 各添加レベルにおいて定量分析法では 6 つ以上、定性分析法では 9 つ以上の繰り返し試験) に限り、特にブランクのマトリックスソースを得ることが困難な場合は、マトリックスソース数を減らしてもよい。

** 添加レベル数は、マトリックスの少なくとも 1 つのソースに対して推奨される。マトリックスの他の同様のソース (例: 同じカテゴリー内、付録 4 参照) は、1 つ又は 2 つの添加レベル (例: 対策/指導又は許容レベル、又は定量/検出限界付近) で試験されてもよい。

表 A2.1. 分析濃度の桁の増加に対する評価基準

ML* ユニット	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
代替 ML* ユニット	1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm	10 ppm	100 ppm	0.1%	1%
ML 濃度比 (C _{ML})	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
最少適用範囲	0.0006~ 0.0014 mg/kg	0.006~ 0.014 mg/kg	0.03~ 0.17 mg/kg	0.52~ 1.48 mg/kg	6.6~ 13.3 mg/kg	76~ 124 mg/kg	0.83~ 1.2 g/kg	8.8~ 11 g/kg
LOD (≤ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LOQ (≤ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD _r **	22%	22%	11%	8%	6%	4%	3%	2%
PRSD _R #	22%	22%	22%	16%	11%	8%	6%	4%
RSD _R ###	≤ 44%	≤ 44%	≤ 44%	≤ 32%	≤ 22%	≤ 16%	≤ 12%	≤ 8%
回収率	40%- 120%	60%- 115%	80%- 110%	80%- 110%	80%- 110%	90%- 107%	95%- 105%	97%- 103%

* ML は分析濃度であり、分析法の使用目的に応じて、最大濃度、最小濃度、標準濃度又は濃度範囲として、分析成分/試料マトリックスの組合せで定義することができる。

** RSD_r 又は繰り返し性は、短い期間内で条件ができるだけ一定に保たれる場合の結果の一致の程度(例: 単一の試験室により示された反復試験の相対標準偏差又は最善の精度)を言う。一般的に、RSD_r の許容値は、表中の値の 1/2 から 2 倍である(HorRat_r = RSD_r(測定値、%)/RSD_r(計算値、%))。濃度比が ≥10⁻⁷ の場合は Horwitz 理論が適用される。濃度比が <10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

PRSD_R 又は予測相対再現性標準偏差(Predicted Relative Reproducibility Standard Deviation)は、Horwitz/Thompson 式に基づく。濃度比が <10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

RSD_R 又は再現性(再現精度)は、操作条件ができるだけ異なる場合の結果の一致の程度(例: 異なる試験室の同じ試験試料)を言い、Horwitz/Thompson 式から計算されるべきである。Horwitz/Thompson 式が適用できない場合(分析目的又は規制に従ったため)、もしくは分析法を基準に「変換する」場合は、適切な分析法性能試験から得られた RSD_R に基づくことが望ましい。測定値と予測値の比は、≤ 2 が望ましい(HorRat_R = RSD_R/PRSD_R ≤ 2)。

表 A2.2. 限度試験/スクリーニング分析法の一般的評価基準

偽陰性率	≤ 5% (懸念レベルにおいて ¹⁾)
偽陽性率	≤ 10-15%

¹ 許容可能な偽陰性率は、分析法の使用目的に大きく依存する。

[コーデックス委員会]

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009)^(I-11)

表 1. 食品中の残留動物用医薬品の MRLVD をサポートするための定量分析法としての使用に適した分析法が満たすべき性能基準¹⁰

濃度 µg/kg	変動係数 Coefficient of Variability (CV)				真度 Trueness
	併行精度 (室内、CV _A) %	併行精度 (室内、CV _L) %	再現精度 (室間、CV _A) %	再現精度 (室間、CV _L) %	平均回収率% の範囲
≤ 1	35	36	53	54	50 - 120
1 ~ 10	30	32	45	46	60 - 120
10 ~ 100	20	22	32	34	70 - 120
100 ~ 1000	15	18	23	25	70 - 110
≥ 1000	10	14	16	19	70 - 110

CV_A: 抽出前に添加されたブランクマトリックスの試験試料によって決定される変動係数

CV_L: 試料処理のばらつきに関する 10%の推定値を加味した試験室全体の変動係数⁹

⁹ Fajgelj A., Ambrus A., eds. (2000) Principles of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.

¹⁰ CAC/GL 37-2001 分析法の回収率データの使用に関する IUPAC 調和ガイドライン (Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement)、Thompson, M., Ellison, S., Fajgelj, A., Willetts, P., & Wood, R. (1999) Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement, Pure Applied Chemistry, 71: 337-348 も参照のこと。

表 I 分析法の主な性能評価パラメータ

ガイドライン等 パラメータ	厚労省 (試験法 開発)	厚労省 (妥当性 評価)	農水省 (農薬)	農水省 (動薬)	EU (SANTE/11 945/2015)	EU (2002/657 /EC)	EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM I)	FDA (新規定量 分析法)	オーストラリア (農薬)	オーストラリア (動物薬①)	オーストラリア (動物薬②)	オーストラリア (動物薬③)	Codex (CAC/GL 40-1993)	CCPR (CAC/GL 90-2017)	CCRVDF (CAC/GL 71-2009)	OECD (ENV/JM/ MONO (2007)17)
選択性/特異性	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
真度/精確さ/回収率*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
併行精度(繰り返し性)	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○
室内精度(室内再現性)	-	○	-	○	○	○	-	-	-	-	○	-	○	-	○	△	△
(室間)再現精度(再現性)	-	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	○	-	○	-	○	○
検出限界 (LOD)	-	-	-	○	-	-	○	-	○	-	○	○	○	○	△	○	○
定量限界 (LOQ)	○	○	○	○	○	-	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○
マトリックスの効果	○	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
直線性、検量線	-	-	-	○	○	○	-	-	○	○	-	○	○	○	○	○	○
溶液中の安定性	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
試料中での安定性	-	-	-	○	-	○	-	-	-	-	○	-	○	○	-	○	-
分析操作中の安定性	○	-	-	○	○	-	-	-	-	-	○	-	○	○	-	○	-
頑健性(堅牢性)	-	-	-	○	○	○	-	-	○	-	-	-	○	-	○	○	-
測定不確かさ	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	○	○	-
判定限界 (CC α)	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
検出能力 (CC β)	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
偽陽性率	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
偽陰性率	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
参考文献	II-1)	II-13)	I-2)	II-2)	I-4)	II-3)	I-5)	I-6)	II-4)	I-9)	II-5)	II-6)	II-7)	I-14)	II-14)	II-11)	I-19)

○:記載あり、△:記載はないが読み取れる、-:記載なし。

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値

ガイドライン等 パラメータ	厚労省 (試験法開発)		厚労省 (妥当性評価試験)		農水省 (農薬)	農水省 (動薬)				
	定量限界 ≤ 基準値 1/3	< 基準値濃度に相当するピークの 1/10	定量限界 ≤ 基準値 1/3	< 基準値濃度に相当するピークの 1/10	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。	ブランク試料の応答	LOQ の応答の 20% 以下			
選択性/特異性	定量限界 > 基準値 1/3	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3	定量限界 > 基準値 1/3	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3						
	不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3	不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3						
	真度/精確さ/回収率*	70% ~ 120%	70% ~ 120%	70% ~ 120%	-	< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%			
併行精度(繰り返し性)、RSD%	≤ 0.001 mg/kg	< 30%	≤ 0.001 mg/kg	< 30%	-	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	60% ~ 120%			
	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 25%	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 25%		≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	70% ~ 110%			
	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 15%	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 15%		≧ 0.1 mg/kg	80% ~ 110%			
	> 0.1 mg/kg	< 10%	> 0.1 mg/kg	< 10%		< 0.001 mg/kg	< 30%			
室内精度(室内再現性)、RSD%	-	-	≤ 0.001 mg/kg	< 35%	-	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	< 45%			
	-	-	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 30%		≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	< 32%			
	-	-	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 20%		≧ 0.1 mg/kg	< 23%			
	-	-	> 0.1 mg/kg	< 15%		≧ 0.1 mg/kg	< 16%			
(室間)再現精度(再現性)、RSD%	-	-	-	-	-	-	-			
検出限界(LOD)	-	-	-	-	-	-	-			
定量限界(LOQ)	基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合には、以下の条件①及び②を満足していることを確認する。 ① 添加試料の試験結果に基づく真度及び併行精度が上記の目標値を満足していること。 ② クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク(①で得られるピークあるいはブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピーク)は、S/N ≧ 10 であること。		基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合には、以下の条件①及び②を満足していることを確認する。 ① 添加試料の試験結果に基づく真度、併行精度及び室内精度が上記の目標値を満足していること。 ② クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク(①で得られるピークあるいはブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピーク)は、S/N ≧ 10 であること。		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。	-	-			
参考文献	II-1)		II-13)		I-2)	II-2)				

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	EU (SANTE/11945/2015)		EU (2002/657/EC)		EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM 1)	FDA (新規定量分析法)	
選択性/特異性	試薬ブランク及びブランク 対照試料の応答	RLの30%未満 (RL: Reporting Level)	1) 十分な数の代表ブランク試料(n≥20)を分析し、対象分析成分が溶出すると予測される関心領域での干渉を確認する。 2) 代表的なブランク試料には、分析成分の同定及び/又は定量に干渉する可能性のある物質を関連する濃度で添加する。 3) 分析後、以下について調査する。 ① 存在が誤った同定につながる可能性がある。 ② 対象分析成分の同定が1つ以上の干渉の存在によって妨害される。 ③ 定量に著しく影響する。		基準値の<20%	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。	-	
真度/精確さ/回収率*	70 ~ 120%		< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%	70 ~ 120%	80 ~ 110%	0.001 mg/kg	40% ~ 120%
≥ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg			70% ~ 110%	0.01 mg/kg			60% ~ 115%	
≥ 0.01 mg/kg			80% ~ 110%	0.1 mg/kg			80% ~ 110%	
				1 mg/kg			80% ~ 110%	
							10 mg/kg	80% ~ 110%
							100 mg/kg	90% ~ 107%
							1000 mg/kg (0.1%)	95% ~ 105%
							10000 mg/kg (1%)	97% ~ 103%
併行精度(繰り返し性)、 RSD%	≥ 20%		室間精度の1/2~2/3		試料間で大きく変動しないこと。	-	0.001 mg/kg	22%
							0.01 mg/kg	22%
							0.1 mg/kg	11%
							1 mg/kg	8%
							10 mg/kg	6%
							100 mg/kg	4%
							1000 mg/kg (0.1%)	3%
							10000 mg/kg (1%)	2%
室内精度(室内再現性)、 RSD%	≥ 20%		室間精度を超えないこと		-	-	-	
(室間)再現精度(再現性)、 RSD%	-		0.001 mg/kg	Horwitz 式を適用すると許容できない高値になるため、可能な限り低いものとする。	-	-	0.001 mg/kg	44%以下
0.01 mg/kg			44%以下					
0.1 mg/kg			44%以下					
1 mg/kg			32%以下					
10 mg/kg			22%以下					
		0.1 mg/kg	23%			100 mg/kg	16%以下	
		1 mg/kg	16%			1000 mg/kg (0.1%)	12%以下	
						10000 mg/kg (1%)	8%以下	

ガイドライン等 パラメータ	EU (SANTE/11945/2015)		EU (2002/657/EC)	EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM 1)	FDA (新規定量分析法)	
	検出限界 (LOD)	-		-	-	-	0.001 mg/kg
						0.01 mg/kg	0.002 mg/kg 以下
						0.1 mg/kg	0.01 mg/kg 以下
						1 mg/kg	0.1 mg/kg 以下
						10 mg/kg	1 mg/kg 以下
						100 mg/kg	10 mg/kg 以下
						1000 mg/kg (0.1%)	100 mg/kg 以下
						10000 mg/kg (1%)	1000 mg/kg 以下
定量限界 (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	基準値以下	-	-	-	0.001 mg/kg	0.0004 mg/kg 以下
						0.01 mg/kg	0.004 mg/kg 以下
						0.1 mg/kg	0.02 mg/kg 以下
						1 mg/kg	0.2 mg/kg 以下
						10 mg/kg	2 mg/kg 以下
						100 mg/kg	20 mg/kg 以下
						1000 mg/kg (0.1%)	200 mg/kg 以下
						10000 mg/kg (1%)	2000 mg/kg 以下
参考文献	I-4)		II-3)	I-5)	I-6)	II-4)	

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	オーストラリア (農薬)		オーストラリア (動物薬②)		オーストラリア (動物薬③)	
選択性/特異性	-		ブランク試料の応答は、LOQ の応答の 30 % 以下		妨害物質の応答は、LOQ の応答の 30 % 以下	
真度/精確さ/回収率*	< 1 mg/kg	50% ~ 120%	≦ 0.001 mg/kg	50% ~ 120%	< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%
			> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	60% ~ 120%	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	60% ~ 120%
	> 1 mg/kg	70% ~ 110%	> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	70% ~ 120%	≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	70% ~ 110%
			> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	70% ~ 110%	≧ 0.1 mg/kg	80% ~ 110%
		> 1 mg/kg	70% ~ 110%			
併行精度(繰り返し性)、 RSD%	< 1 mg/kg	35%	≦ 0.001 mg/kg	36%	< 0.001 mg/kg	30%
	> 1 mg/kg < 10 mg.kg	30%	> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	32%	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	25%
	> 10 mg/kg < 100 mg.kg	20%	> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	22%	≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	15%
	> 100 mg.kg	15%	> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	18%	≧ 0.1 mg/kg	10%
			> 1 mg/kg	14%		
室内精度(室内再現性)、 RSD%	-		-		< 0.001 mg/kg	45%
					≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	32%
					≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	23%
					≧ 0.1 mg/kg	16%
(室間)再現精度(再現性)、 RSD%	-		≦ 0.001 mg/kg	54%	-	
			> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	46%		
			> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	34%		
			> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	25%		
			> 1 mg/kg	19%		
検出限界(LOD)	-		検出及び確認は可能であるが、必ずしも定量化できるわけではない試料中の分析成分の最低濃度である。機器分析法では、通常、S/N = 3:1 が受け入れられるが、この値は目安である。		LOD は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 3 倍として推定される。	
定量限界(LOQ)	-		LOQ は 定量的な回収が達成される最低濃度。 LOQ での回収率データがなければ、LOQ は許容可能な回収率データでの最低濃度。		LOQ は 20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 10 倍として推定される。 推定された LOQ で真度及び精度の試験を行うことは、LOQ の決定に関する確定的な証拠を提供する。当該濃度での真度及び繰り返し性(併行精度)が、上記の許容範囲以下であれば、推定された LOQ は許容される。	
参考文献	I-9)		II-6)		II-7)	

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	Codex (CAC/GL 40-1993)		CCPR (CAC/GL 90-2017)		CCRVDF (CAC/GL 71-2009)		OECD (ENV/JM/MONO (2007)17)	
選択性/特異性	測定したレスポンスの由来が、その分析物成分のみからのものであること。		<ul style="list-style-type: none"> ・有意に悪影響を及ぼす妨害が起こらないこと。 ・試薬のバッチごとに試薬(工程)ブランクを分析することによって共通の妨害を確認する。 ・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。 ・一般的な原則として、妨害が分析法の性能に全く影響を与えないような選択性が必要である。 ・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。 		定量分析法に対しては、定量に用いたシグナルは、対象とする分析成分のみに関連し、共抽出物質に関する寄与が含まれていないことが要求される。		分析対象領域のブランク値は、LOQ の 30%を超えてはならない。	
真度/精確さ/回収率*	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%	LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い少なくとも 1 濃度(例えば、LVL の 2~10 倍又は基準値)で最低 5 試行の繰り返し試験 [LVL:Lowest Validated Level (最低妥当性評価濃度)]	70% ~ 120%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%
併行精度(繰り返し性)、RSD%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%	LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い少なくとも 1 濃度(例えば、LVL の 2~10 倍又は MRL)で最低 5 試行の繰り返し試験	$\leq 20\%$	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%
室内精度(室内再現性)、RSD%	-		$\leq 20\%$		-		-	
(空間)再現精度(再現性)、RSD%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	54% 46% 34% 25% 19%	-		$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	54% 46% 34% 25% 19%	-	
検出限界(LOD)	-		定量には有効ではないが、分析対象化合物の存在を推測するために、検出限界(LOD) (S/N = 3)を計算する場合もある。		<ul style="list-style-type: none"> ・試料中の分析成分を同定可能な最低濃度 ・検量線の y 切片(正の値と仮定) + 3 S_{y/x} (S_{y/x}: 検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差) ・ブランク中の分析成分の最小応答値 + 標準偏差 × 3 倍 (ほとんど検出できないような応答が生じる濃度で検体に添加し、ブランクの標準偏差の近似値を得ることも可能。) 		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。	

ガイドライン等 パラメータ	Codex (CAC/GL 40-1993)	CCPR (CAC/GL 90-2017)	CCRVDF (CAC/GL 71-2009)	OECD (ENV/JM/MONO (2007)17)	
定量限界 (LOQ)	<ul style="list-style-type: none"> ・5 点以上 ・添加濃度:0、LCL、AL 及び AL 濃度の 2~3 倍 ・3 反復以上 [LCL:Lowest calibration leve (最低検量線濃度)] [AL: Acceptable Limit (許容限界)]	平均回収率及び精度は、上記を参照のこと。 参照試料を分析した平均残留量は、合意値から有意 (P=0.05) に異なること。	<ul style="list-style-type: none"> ・分析化学的な定義に基づく LOQ (S/N=10) は、分析機器やその他多くの要因により日差変動があるため、実際に推定できるに過ぎない。妥当性評価ガイドラインによっては、LOQ での添加実験による検証が求められているが、この日差変動のために実際の分析法の 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、LOQ の代わりに最低妥当性評価濃度 (Lowest Validated Level: LVL) で添加とすることが適切である。妥当性評価の目的は、LOQ を求めるのではなく、報告された最低濃度が分析の要求を満たしていることを示すことである。 ・定量は、LVL より低濃度で行うべきではない。 ・最低校正濃度 (Lowest Calibrated Level: LCL) での S/N は ≥ 10 (濃度 \geq LOQ) でなくてはならない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・検量線の y 切片 + 10 S_{y/x} (S_{y/x}: 検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差) ・基準値と同じかその 1/2 以下が望ましい。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・LOQ の推定値: ノイズの標準偏差の 6~10 倍 (添加実験によって検証する。)
参考文献	I-14)	II-14)	II-11)	I-19)	

○: 記載あり、-: 記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

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

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、LC-MS/MS を用いた高感度且つ高精度な測定法、畜産食品からの効率的な抽出法、種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。検討結果を基に効率的な分析法を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験を実施することで、構築した分析法の適用性を評価した。

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。

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。平成 29 年度は、非常に極性が高い物質であるアミノグリコシド系抗生物質について、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。平成 30 年度は、畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製方法の確立について検討した。また、前年度に検討した抽出法と組み合わせて分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の分析法としての適用性について検討した。

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 効率的な抽出法の検討

種々の畜産物からの効率的な抽出法について検討した。

すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、種々の抽出溶媒を用いた際の操作性や回収率について検討した。また、試料中のタンパク質等を沈殿させるための添加剤として、塩及び酸の添加について検討した。

⑥ 効率的且つ効果的な精製法の検討

種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。

すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

⑦ 添加回収試験

検討対象食品として、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。各食品に、検討対象化合物を基準値濃度 (基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm) 添加し、各食品の添加試料 5 個を以下に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。

試料 10.0 g を量り採り、2 mol/L 塩酸及びメタノール (1:1) 混液 50 mL、ギ酸アンモニウム 2 g を加えてホモジナイズした。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、水/メタノール混液層を採った。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン層を除去し、水/メタノール混液層を採った。残留物に 2 mol/L 塩酸及びメタノール (1:1) 混液 30 mL、ギ酸アンモニウム 2 g を加えてホモジナイズした。上記と同様の条件で遠心分離後、水/メタノール混液層を採り、先の水/メタノール混液層と合わせ、水を加えて 100 mL に定容した。定

容後の抽出液 10 mL を採り、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液 10 mL を加えて振とう後、上記と同様の条件で遠心分離した。上層 (酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液層) を捨て、下層 (水/メタノール混液層) を採った。この 1 mL に水 4 mL を加えた後、アンモニア水を用いて pH を 7.0~7.5 に調整した。

Oasis WCX (500 mg) にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を順次注入してコンディショニングした後、上記で得られた溶液を注入した。次いで、アセトニトリル及び水 (1:4) 混液 5 mL、100 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 5 mL、水 5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリル、ギ酸及び水 (2:1:7) 混液 10 mL で溶出した。溶出液に 2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 0.1 mL を加えた後、エタノールを加えながら 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液及び 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) (1:1) 混液 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。

また、検討対象化合物を添加していない試料 (ブランク試料) からマトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出し、測定の際の試料マトリックスの影響を確認した。

図 1 に、試験溶液調製操作のフローを示した。

⑧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 100 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)

B 液 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件:

t_0 , B=60%; t_6 , B=5%; t_{14} , B=5%; $t_{14.1}$, B=60%; t_{24} , B=60%

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。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。

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。

種々の検討結果から、分析カラムとして ZIC-cHILIC を用い、移動相として 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることで、各検討対象化合物について良好な測定感度及びピーク形状が得られた。確立した LC-MS/MS 測定条件を用いて各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液を繰り返し測定 (n=10) したところ、ピーク面積値の減少や増加傾向は確認されず、相対標準偏差 (RSD%) 7% 未満の良好な精度が得られた (表 2)。

③効率的な抽出法の検討

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、検討対象化合物を効率的に抽出可能な抽出溶媒について検討した。

検討対象化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は非常に極性が高い化合物である一方、対象食品である畜産物は脂肪等の低極性夾雑物を含む食品も多いことから、先ず、極性の高い含水溶媒と低極性の非水系溶媒を同時に用いる方法について検討した。

なお、抽出に含水溶媒を用いた場合には、食

品に依っては遠心分離後に残留物が得られず、清澄な抽出液が得られないこともあるため、タンパク質を沈殿させることを目的として塩及び酸の添加を検討した。添加する塩としては、LC の移動相にも使用しているギ酸アンモニウムを選択し、酸としては比較的取扱いが容易なギ酸を選択した。

各検討食品に水及びメタノールもしくはアセトニトリル、*n*-ヘキサンもしくは酢酸エチル、ギ酸アンモニウム及びギ酸を加え、ホモジナイズ及び遠心分離を行った結果、下層の含水溶媒層 (水及びメタノールもしくはアセトニトリル) は比較的清澄な溶液が得られたが、食品に依っては上層の非水系溶媒層がゲル状になる、上層と下層の間に浮遊物層が得られるなど、抽出液である含水溶媒層を採る操作が困難となる場合があることが確認された。

そこで、非水系溶媒を使用せず、含水溶媒である水及びメタノール混液のみでの抽出を検討した。

水及びメタノール混液のみで抽出する場合であっても、清澄な抽出液を得るためには塩及び酸の添加が必要であったことから、上述のギ酸アンモニウム及びギ酸を添加して検討した。

試料 10.0 g に対して、水及びメタノール混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を添加後、ホモジナイズ、遠心分離した結果、メタノール比率が 50% 以上の場合に各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、水及びメタノール (1:1) 混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を加えて抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定したところ、ネオマイシン等の特に極性が高い化合物が抽出されていないことが確認された。

添加する酸について再検討したところ、ギ酸の代わりに塩酸を添加することで、各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。

そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、各比率の水及びメタノール混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定した。また、各ブランク試料を同様に抽出し、抽出液に各検討対象化合物を添加したものをマトリックス添加標準溶液とした。各検討対象化合物について「抽出液におけるピーク面積値」/「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値」×100 の値を算出し、これを回収率とした。結果を表 3 に示した。塩酸酸性条件下で抽出した場合には、水とメタノールの比率に関わらず、ネオマイシン等の非常に極性が高い物質であっても効率的に抽出可能であった。以上の結果から、高極性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質を効率的に抽出するためには、強酸性条件下で抽出する必要があると考えられた。

次いで、他の畜産物への適用性について検討した。すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵をそれぞれ 10.0 g 量り採り、各検討対象化合物 100 µg を添加した。室温で 30 分間放置後、水及びメタノール(1:1)混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出した。抽出液を合わせ、100 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。結果を表 4 に示した。検討対象化合物と検討食品に組み合わせによっては、回収率が 60% 程度となる場合もあることが確認された。本検討においては、抽出液をそのまま測定したため、測定の際の試料マトリックスの影響により正確な測定値が得られていない可能性などを考慮する

と、得られた回収率は比較的良好であったと考えられた。

以上の結果及び考察から、塩酸酸性下、水及びメタノール混液を用いてホモジナイズ抽出することで、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵から極性の高い各検討対象化合物を効率的に抽出可能であると推察された。

精製用固相カートリッジカラムにおける保持及び精製効果に対する影響等を考慮し、最終的には抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を選択し、抽出の際に添加するギ酸アンモニウム量は 2 g とした。

④効率的且つ効果的な精製法の検討

畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

先ず、強酸性陽イオン交換基を有する InertSep MC-1(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、強酸性の抽出液をそのまま注入可能であった。また、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合であっても、各検討対象化合物の保持は良好であった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、アセトニトリル、アンモニア水及び水(5:1:4)混液などを用いることで比較的良好な回収率が得られたが、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンは全く溶出しないことが確認された。表 5 に、牛の肝臓及び鶏卵の添加試料(添加濃度 0.1 ppm, n=1)における各検討対象化合物の回収率を示した。

次いで、弱酸性陽イオン交換基を有する

Oasis WCX(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合でも比較的良好な保持が得られたが、食品や抽出液中の塩濃度等の影響により回収率が低下する可能性があることが確認された。洗浄においては、アセトニトリルやメタノールなど、種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、高濃度(10 vol%程度)のギ酸を含む溶液を用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいてはイオン化抑制傾向が確認されたが、比較的良好な回収率が得られた。

以上の結果から、本研究においては弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCXを用いた精製法を採用した。

なお、精製用固相カートリッジカラムからの抽出液を測定用試験溶液に置換する際など、検討対象化合物を含む溶液を効率的に濃縮するためには、エタノールなどを加えながらロータリーエバポレーター等で減圧濃縮を行う必要があるが、一部の検討対象化合物については濃縮工程において回収率が低下することが確認された。ギ酸アンモニウム等の塩を添加して濃縮することで、回収率低下を抑制することが可能であったことから、本研究においては、2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 0.1 mL 添加して濃縮操作を実施した。

⑤添加回収試験

本研究で構築した分析法を用いて添加回収試験を実施した。検討対象食品には、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。添加濃度は

各食品における各検討対象化合物の基準値とし、基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm を添加濃度とした。本研究で用いた検討食品と検討対象化合物の添加濃度の組み合わせを表 6 に示した。作成した添加試料を「B. 研究方法④添加回収試験」に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。また、マトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出した。

本検討で得られた結果を表 7 及び表 8 に示した。また、牛の筋肉における各検討対象化合物のクロマトグラムを図 2~11 に示した。

牛の筋肉では、スペクチノマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、カナマイシン及びネオマイシンにおいては若干低い真度が得られたが、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試験溶液調製工程における損失が原因であることが推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の脂肪においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン B 及びアミカシンにおいては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、

比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の肝臓においては、ストレプトマイシンで真度 10%程度、その他の化合物で真度 50%～60%程度と低値であった。マトリックス添加標準溶液の測定結果から、ストレプトマイシンを除いて測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試料マトリックスの影響により精製用固相カートリッジカラムである Oasis WCX への保持が弱まったことなどが原因と推察された。

牛乳においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン及びハイグロマイシン B においては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

鶏卵においては、ジヒドロストレプトマイシンで高い真度が得られ、スペクチノマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン B、アプラマイシン及びネオマイシンで若干低い真度となった。

なお、カスガマイシンについては、使用した Oasis WCX に保持されなかったため、全ての検討食品において回収が得られなかった。

以上のように、本研究で構築した分析法を用いて畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質を分析した場合には、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。このことから、構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。実際の検査においては、本法を実施し、残留が疑われる場合には、ストレプトマシ及びジヒドロ

ストレプトマシについては弱酸性陽イオン交換カートリッジカラムへの負荷量を減らして実施し、その他の化合物については強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製の実施により、効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

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、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、種々の畜産物からの効率的な抽出法、畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法の確立について検討した。検討した測定法、抽出法及び精製法を組み合わせる分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質分析法としての適用性を検討した。

LC-MS/MS 測定条件については、適切な MS/MS 条件を設定した後、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 2.5) 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。また、適切なグラジエント条件を設定することで、混合標準溶液の繰り返し測定において良好な併行精度が得られた。

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

精製法については、強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラムを用いた場合には、カスガマイシン、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンには適用できないものの、その他の検討対象化合物については比較的良好な回収率が得られた。弱酸性陽イオン交換固相カートリッジカラムを採用した分析法を用い、添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。

以上の結果から、本検討で構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。本法を用いた分析の実施により残留が疑われる場合には、精製用固相カートリッジカラムへの負荷液量の調整や異なる固相カートリッジカラムを

用いた精製の実施などにより効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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 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)	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
アブラマイシン	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 ₁₉ 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

表 2 混合標準溶液の繰り返し測定結果

化合物名	相対標準偏差 (RSD%)
アブラマイシン	2.8
アミカシン	6.3
カスガマイシン	4.7
カナマイシン	6.2
ゲンタマイシンC1	6.4
ジヒドロストレプトマイシン	3.6
ストレプトマイシン	3.8
スペクチノマイシン	3.5
ネオマイシン	6.2
ネチルマイシン	3.8
ハイグロマイシンB	2.7

表 3 牛の筋肉抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	水及びメタノール混液			
	(1:4)	(2:3)	(3:2)	(4:1)
アブラマイシン	119	105	96	96
アミカシン	97	80	85	105
カスガマイシン	88	94	95	81
カナマイシン	92	99	103	96
ゲンタマイシンC1	81	90	95	70
ジヒドロストレプトマイシン	83	90	93	107
ストレプトマイシン	84	89	98	115
スペクチノマイシン	84	99	94	94
ネオマイシン	102	91	71	76
ハイグロマイシンB	98	93	93	94

表 4 各試料抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	牛の筋肉	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
アブラマイシン	72	80	139	67
アミカシン	71	82	149	72
カスガマイシン	100	88	90	79
カナマイシン	81	60	99	67
ゲンタマイシンC1	82	84	73	69
ジヒドロストレプトマイシン	94	70	107	72
ストレプトマイシン	84	64	96	69
スペクチノマイシン	88	72	103	81
ネオマイシン	91	81	114	75
ハイグロマイシンB	86	88	111	83

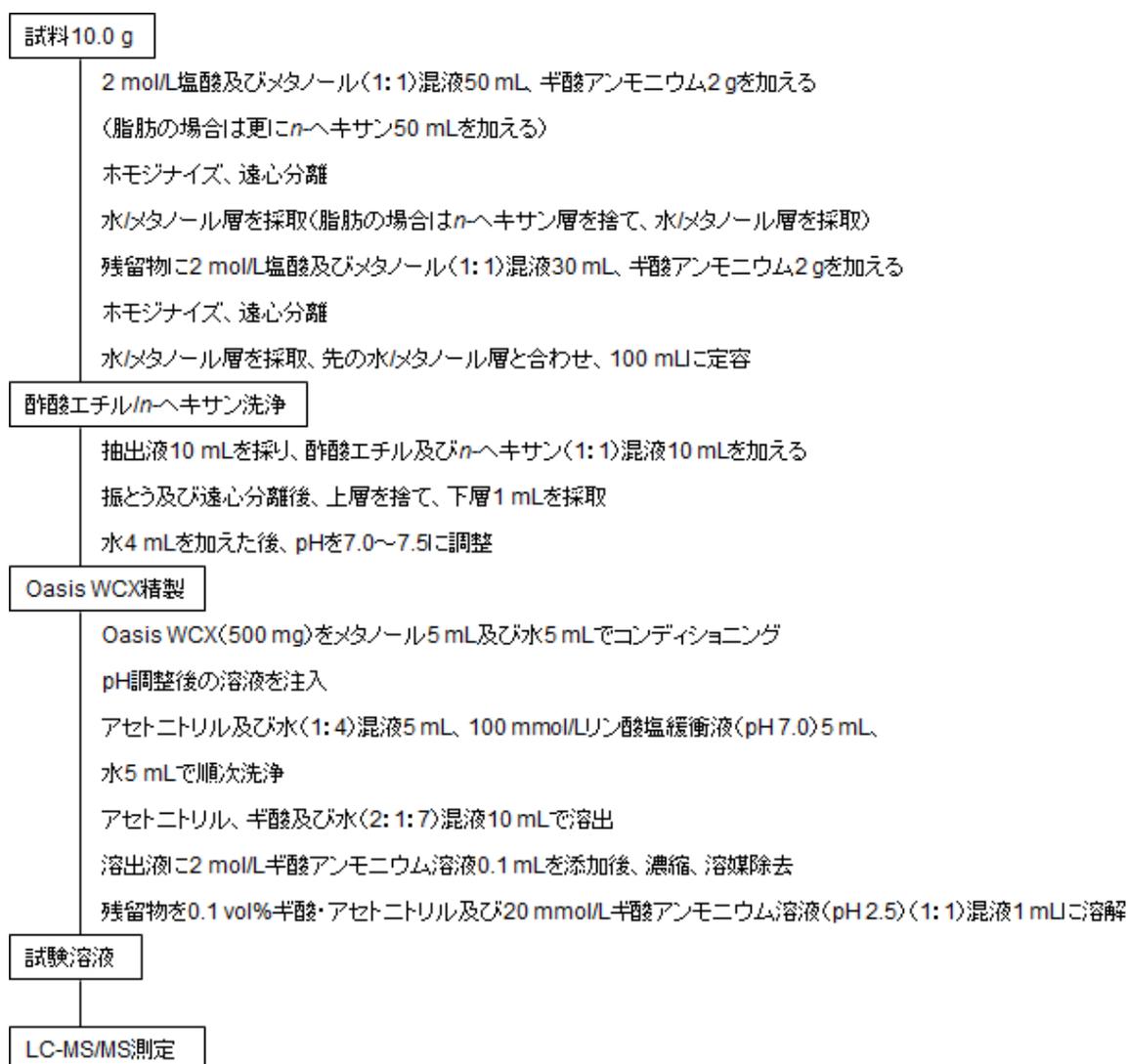


図 1 試験溶液調製法のフローチャート

表 5 強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製における検討対象化合物の回収率

	回収率(%、n=1、添加濃度0.1 ppm)	
	牛の肝臓	鶏卵
スペクチノマイシン	37	72
カスガマイシン	-	-
ネチルマイシン	110	184
ゲンタマイシンC1	80	104
カナマイシン	103	108
ハイグロマイシンB	42	133
アブラマイシン	99	99
ストレプトマイシン	-	-
ジヒドロストレプトマイシン	-	-
アミカシン	62	155
ネオマイシン	105	104

表 6 添加回収試験における検討対象化合物の添加濃度

	添加濃度(ppm)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	0.5	2	2	0.2	2
カスガマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネチルマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ゲンタマイシンC1	0.1	0.1	2	0.2	0.1
カナマイシン	0.04	0.04	1	0.7	0.2
ハイグロマイシンB	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
アブラマイシン	0.5	0.5	5	0.1	0.1
ストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
ジヒドロストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
アミカシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネオマイシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

*: 基準値が未設定の食品と検討対象化合物の組み合わせ

表 7 添加回収試験結果

	牛の筋肉		牛の脂肪		牛の肝臓		牛乳		鶏卵	
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)								
スペクチノマイシン	233	13.0	44	5.0	63	4.2	59	5.3	48	10.2
カスガマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	95	2.6	85	5.5	62	5.8	87	5.0	75	6.0
ゲンタマイシンC1	76	2.9	88	6.2	58	4.2	94	4.4	78	4.7
カナマイシン	61	10.2	78	4.9	55	7.5	71	6.4	62	6.7
ハイゲロマイシンB	78	5.0	47	11.9	60	2.4	61	12.6	54	5.5
アブラマイシン	74	3.4	76	3.9	58	3.6	80	9.0	69	7.1
ストレプトマイシン	80	1.1	103	5.9	13	4.8	110	11.0	105	12.0
ジヒドロストレプトマイシン	133	2.1	171	9.7	53	5.5	172	11.0	154	5.3
アミカシン	83	7.2	63	9.3	54	14.4	78	7.0	76	11.0
ネオマイシン	59	9.5	72	3.2	51	8.7	84	4.8	68	4.9

表 8 測定の際の試料マトリックスの影響

	測定の際の試料マトリックスの影響*				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	3.80	0.51	0.91	0.69	0.76
カスガマイシン	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	1.20	1.02	1.01	0.99	0.84
ゲンタマイシンC1	1.14	1.05	0.92	1.00	1.33
カナマイシン	1.01	1.02	1.01	0.80	0.94
ハイゲロマイシンB	1.03	0.71	0.91	0.73	0.81
アブラマイシン	0.99	0.94	0.93	0.94	1.16
ストレプトマイシン	1.02	0.85	0.31	1.33	1.74
ジヒドロストレプトマイシン	1.37	2.24	0.75	2.06	2.27
アミカシン	1.19	0.77	0.90	0.87	1.13
ネオマイシン	1.07	0.92	1.05	1.01	0.87

*:マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

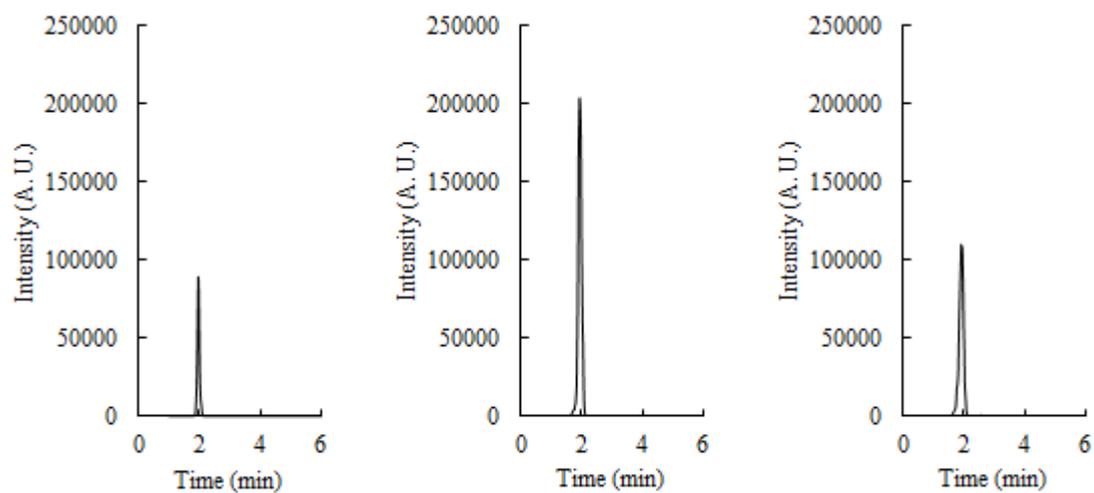


図 2 筋肉における SRM クロマトグラム(スペクチノマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

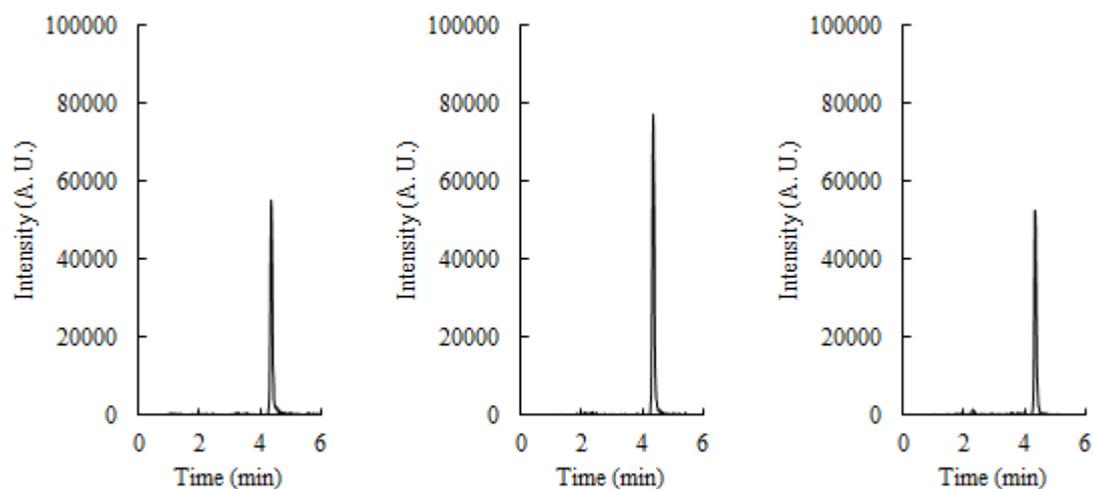


図 3 筋肉における SRM クロマトグラム(ネチルマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

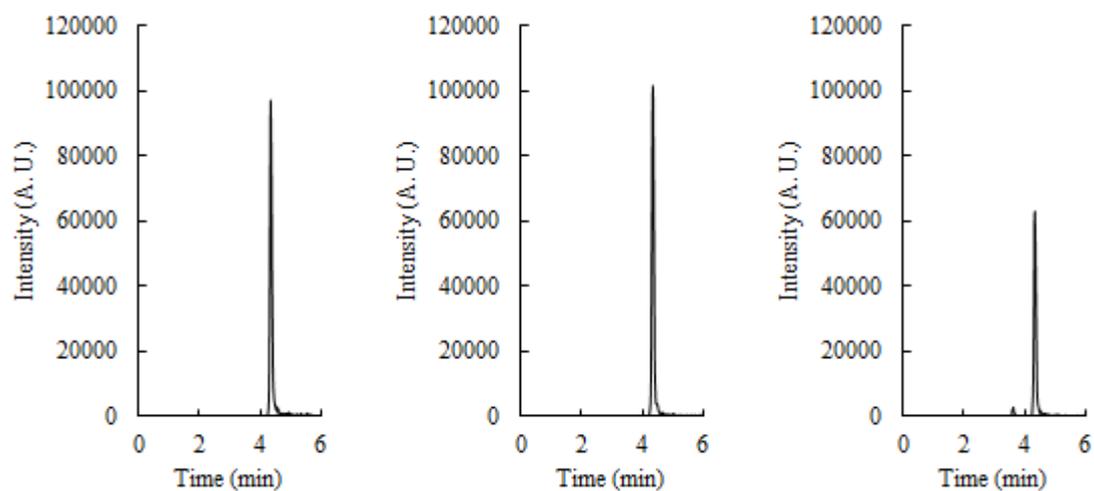


図 4 筋肉における SRM クロマトグラム(ゲンタマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

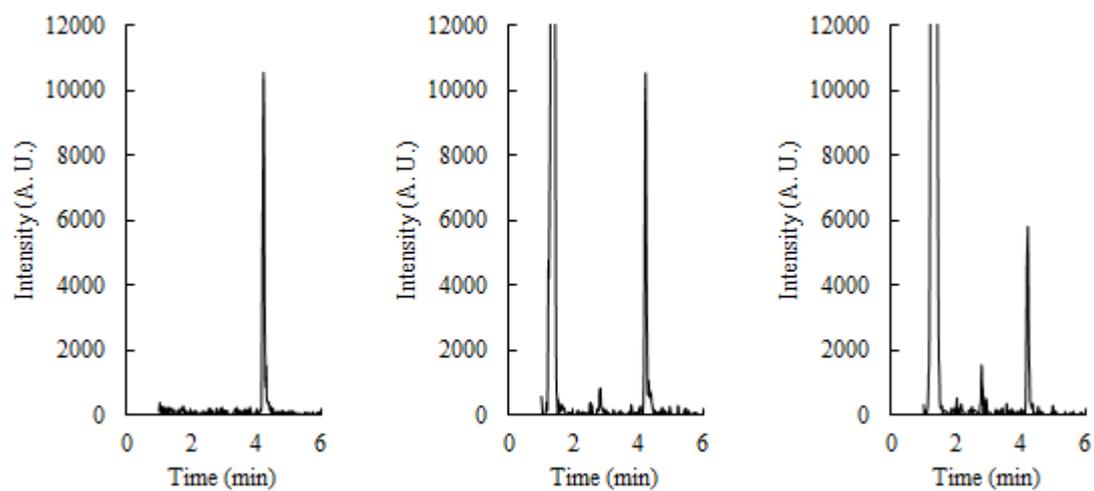


図 5 筋肉における SRM クロマトグラム(カナマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

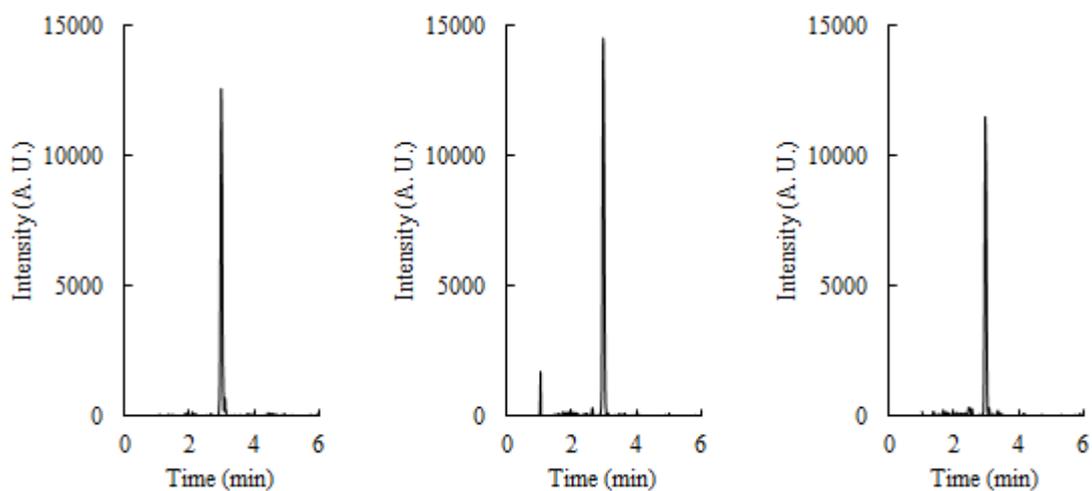


図 6 筋肉における SRM クロマトグラム(ハイグロマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

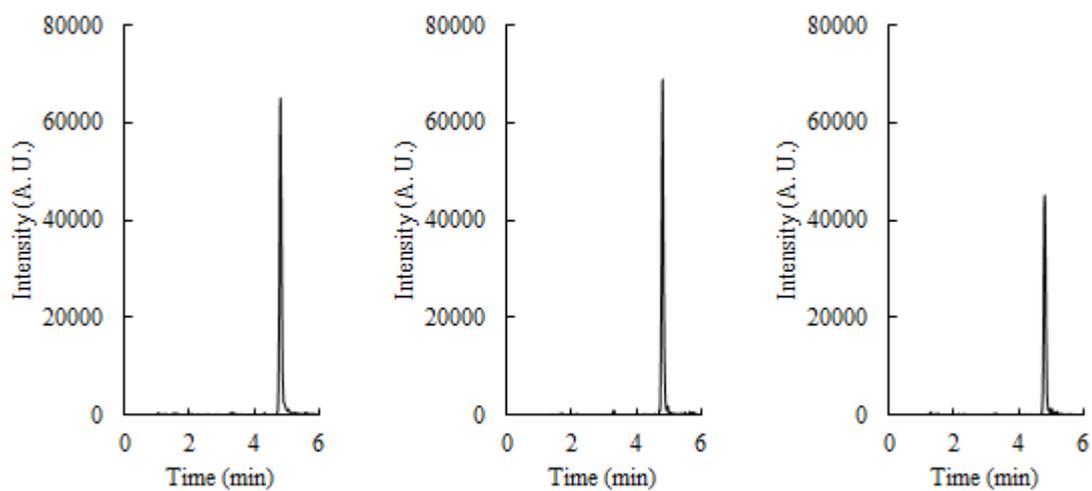


図 7 筋肉における SRM クロマトグラム(アプラマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

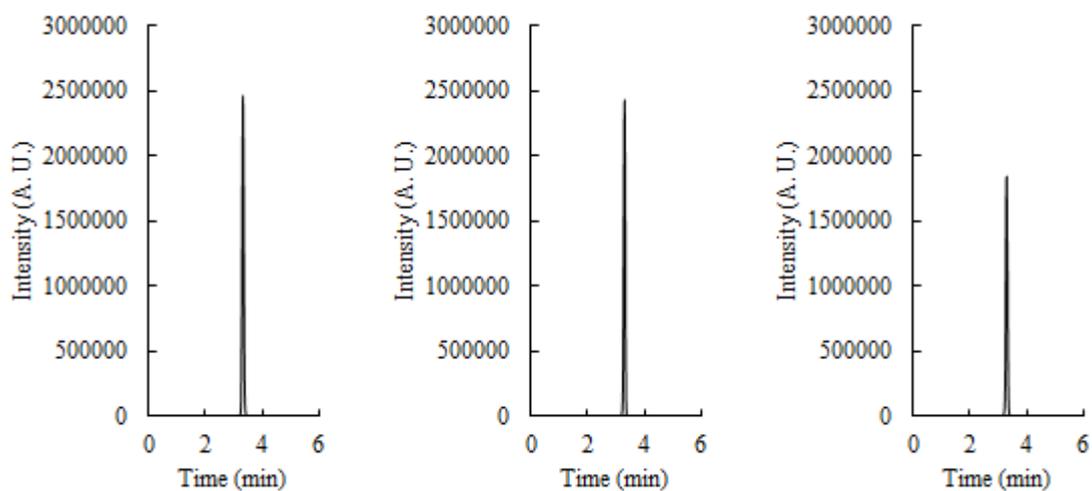


図 8 筋肉における SRM クロマトグラム(ストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

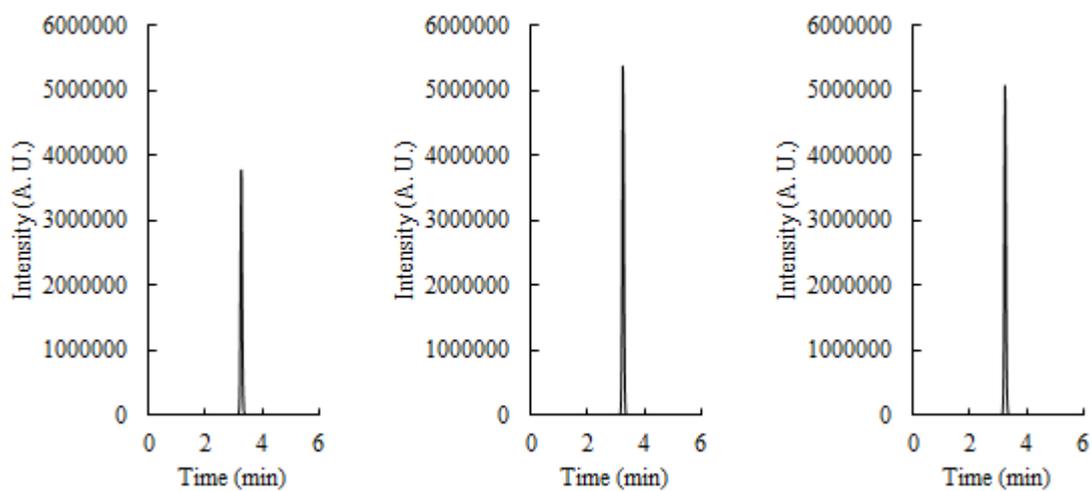


図 9 筋肉における SRM クロマトグラム(ジヒドロストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

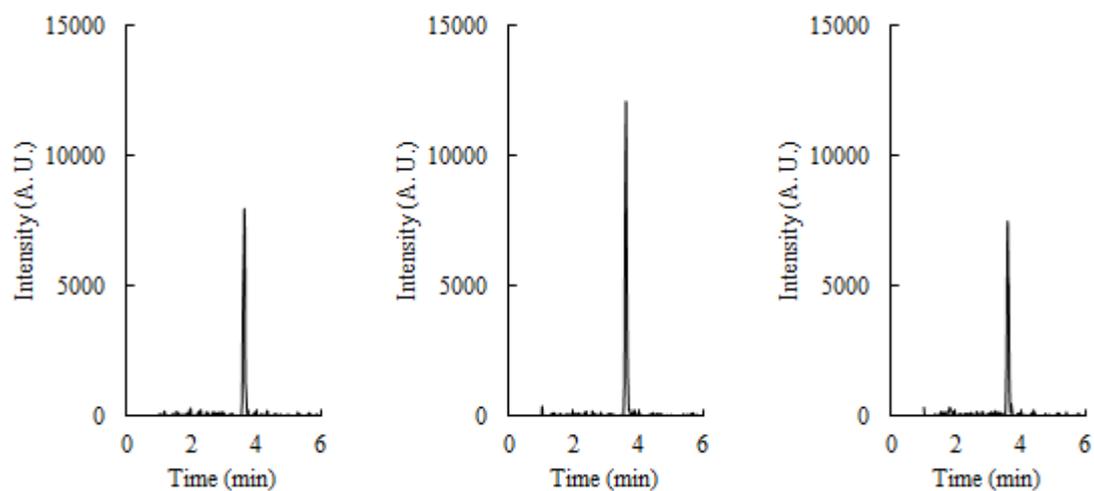


図 10 筋肉における SRM クロマトグラム(アミカシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

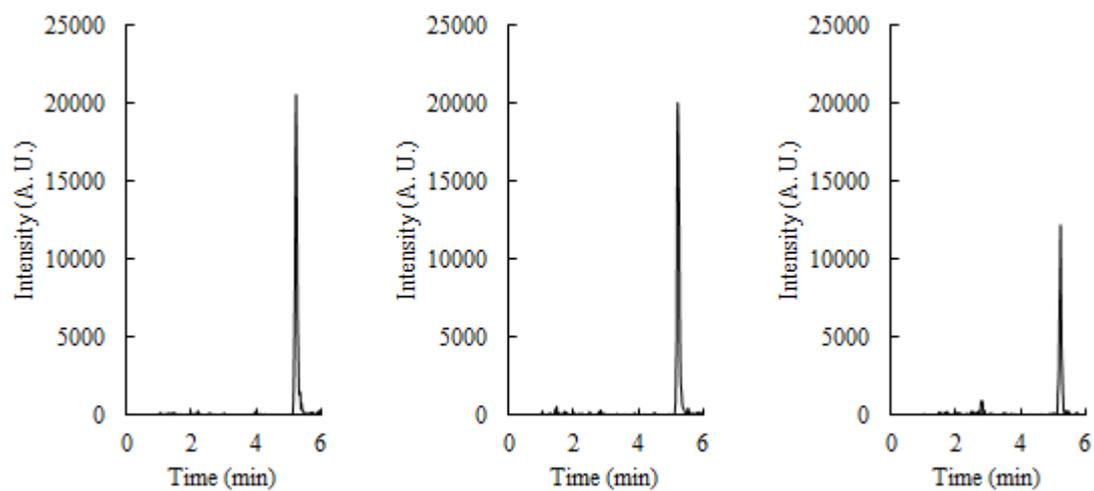


図 11 筋肉における SRM クロマトグラム(ネオマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

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% 未滿となり、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 3cm 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 3cm 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 200g(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、2~3mm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1mm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2g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、5mm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20g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。

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20g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、ドライアイスは残存していた。

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ること」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 Isoproc carb	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 Paclbutrazol	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 Pyrifitalid	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 Thiachloprid	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

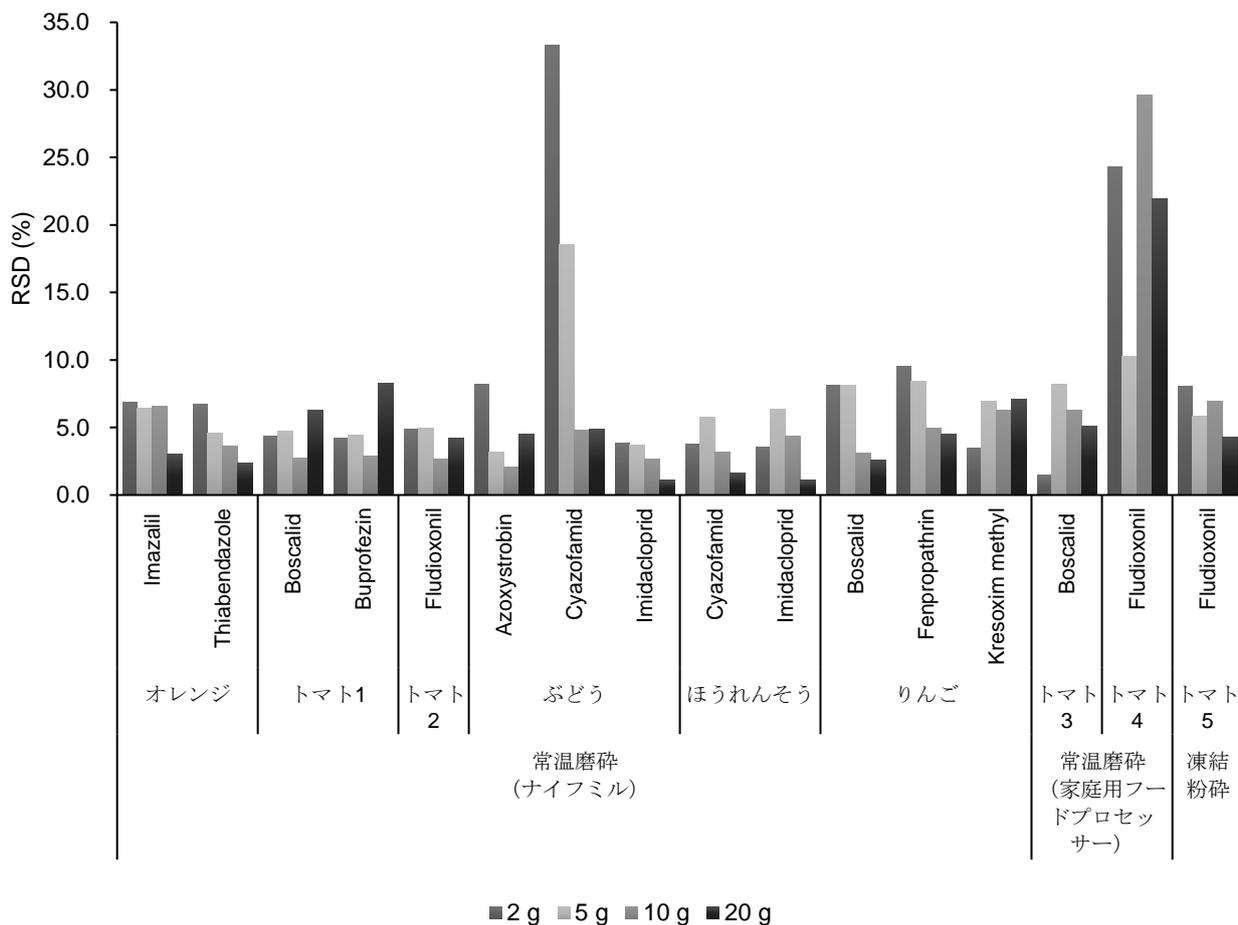
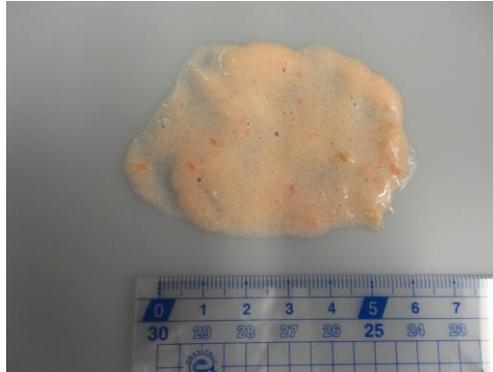


図1 分析に供する試料量と分析値のばらつき

(a)



(b)



(c)

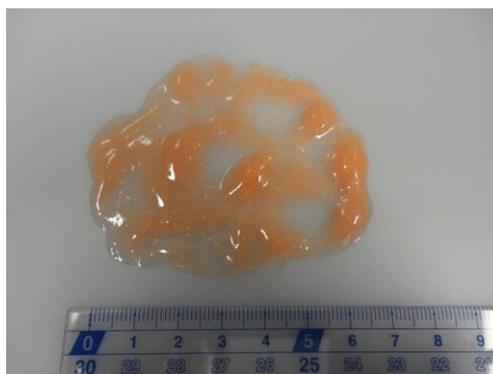


図 2 常温磨砕したトマト試料

- (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

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

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

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

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な試験法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本研究ではスクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法のガイドラインのスクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインのうち、EU において公開している Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン、2002/657/EC 付属文書)を参考にして、残留濃度が基準値の 1/2 以上の試料を「陽性」と判定(偽陰性率 1%未満及び偽陽性率 5%未満)できるように分析データを基に性能評価方法及び性能要件を提案した。

A. 研究目的

食品中の農薬等(農薬、飼料添加物及び動物用医薬品)の残留基準は、現在、約 740 品目に設定されている。地方公共団体や検疫所による国産及び輸入食品中残留農薬等の検査(平成 27 年度、約 298 万件)における検出割合は 0.36%(基準値超過の割合は 0.008%)と非常に低く、検出される農薬の種類も 100 前後と言われている。しかし、農薬等の不適切な使用や意図的/非意図的な混入の可能性もあることから、検出頻度の高い農薬等だけではなく、残留の可能性の低い農薬等も対象とした効率の良い検査方法の確立が望まれている。

食品中の残留農薬等の基準値は低いものが多いため、精確な分析値を求めるためには、時間やコストを要する分析法で分析を行う必要がある。しかし、前述のように残留農薬等の検出頻度は非常

に低いことから、まず、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング(基準値超過の可能性のない検体をふるい分け)し、基準値超過の疑いがある検体のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化を図ることが可能である。海外の残留農薬等分析法のガイドライン等では、スクリーニング分析について言及されているものが多いが、我が国にはスクリーニング分析に関するガイドラインはない。

本分担課題では、スクリーニング分析法の性能評価方法を確立することを目的とした。海外の残留農薬等分析法に関するガイドライン等について、スクリーニング分析に関する項目を調査後、調査したガイドライン等を参考にして、分析データを基にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

B. 研究方法

I. スクリーニング分析に関するガイドライン等の調査

平成 29 年度は、EU、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC) の残留農薬部会 (Codex Committee on Pesticide Residues: CCPR) 及び食品残留動物用医薬品部会 (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods: CCRVDF) において公開している食品中の残留農薬等の分析法に関するガイドライン(1)～(3)について、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。また、米国農務省 (USDA) が公開している畜産物中の農薬のスクリーニング分析法(4)に記載されている性能基準等についてもまとめた。平成 30 年度は、EU において公開している動物用医薬品等の分析法の性能基準等に関するガイドライン(5)及びその付属文書の残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン(6)について、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。

(1) SANTE/11813/2017 (EU) 「Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (食品及び飼料中の残留農薬分析法についての精度管理およびバリデーション手順に関するガイダンス文書)」¹⁾

(2) CAC/GL 90-2017 (CCPR) 「Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (食品及び飼料中残留農薬の分析法についての性能基準に関するガイドライン)」²⁾

(3) CAC/GL 71-2009 (CCRVDF) 「Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with

the use of veterinary drugs in food producing animals (食料生産動物における動物用医薬品の使用に関連する国家規制食品安全保証プログラムの設計及び実施に関するガイドライン)」³⁾

(4) CLG-PST5.07 (USDA) 「Screening for Pesticides by LC/MS/MS and GC/MS/MS (LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬のスクリーニング分析法)」⁴⁾

(5) 2002/657/EC (EU) 「Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221:8-36」⁵⁾

(6) CRLs 2010 (2002/657/EC (EU) 付属文書) 「Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) (残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン)」⁶⁾

II. スクリーニング分析法の開発

1. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

試験溶液の調製及び LC-TOF-MS 測定においては、関東化学製 LC-MS 用アセトニトリル、メタノール及び蒸留水を用いた。硫酸マグネシウム(無水)は関東化学製の特級を用いた。クエン酸三ナトリウム二水和物及び酢酸アンモニウムは和光純薬工業製の特級、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物は和光純薬工業製の一級、塩化ナトリウムは、和光純薬工業製の残留農薬試験用試薬を用いた。

リファレンス(ロックマス)用試薬は、ロイシン-エンケファリン酢酸塩水和物 (Sigma-Aldrich 製) を水

及びメタノール(1:1)混液に溶解したものをを用いた。

(2) 農薬標準品及び標準溶液

検討農薬(130化合物)を表1に示した。各農薬標準品は、林純薬工業、関東化学、和光純薬工業、Sigma-Aldrich、Dr. Ehrenstorfers 及び Riedel-de Haën 及び AccuStandard 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。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) スピнкаラム

ジーエルサイエンス製の Monospin C18、Monospin C18 FF、Monospin C18-AX 及び Monospin SAX を用いた。

2. 試料

市販のりんご及びほうれんそうを凍結粉碎したものをを用いた。凍結粉碎は以下のように行った。りんごは果梗を除去後、包丁で約 16 等分に切ったもの 250~300 g、ほうれんそうは包丁で約 5 cm 幅に切ったもの 250~300 g に、同量のドライアイス(粉碎したものを)を加えて混合し、3 分間放置後、予めドライアイス約 100 g を粉碎して予冷した粉碎機に入れ、2 分間粉碎した。

3. 装置

LC-TOF-MS は、ACQUITY UPLC I-Class 及び Xevo G2-S QTOF (Waters 製)を使用した。粉碎機は Robot Coupe 製 Robot Coupe BLIXER-3D を用いた。遠心分離機は、50mL 遠心管ではテーブルトップ多本架遠心機 8100 (久保田商事製)、スピнкаラムでは Centrifuge 5417R (Eppendorf)を使用した。

4. 測定条件

(1) MS 条件

イオン化法 ESI(+); キャピラリー電圧 1000

V; コーン電圧 20 V; ソース温度 120°C; 脱溶媒ガス温度 450°C; 脱溶媒ガス 800 L/h(N₂); コーンガス 50 L/h(N₂); コリジョンガス Ar; コリジョンエネルギー 4 eV(低エネルギー)及び 10-40 eV(高エネルギー); スキャン範囲 m/z 50~1000; リファレンス(ロックマス) ロイシン-エンケファリン; 分解能 >30,000 FWHM、 m/z 556.2766; 定量イオン 表1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 µm、ジーエルサイエンス社製); カラム温度 40°C; 注入量 3 µL; 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1に示した。

5. 試験溶液の調製

試料 10.0 g をポリプロピレン製遠心管(50 mL)に量り採り、アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間振とうした。これに無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、1 分間振とうし、遠心分離(毎分 3000 回転、5 分間)した。得られたアセトニトリル層を分取し、アセトニトリルで 10 mL に定容し、抽出液とした。

スピнкаラム(Monospin C18)にアセトニトリル 0.1 mL を加え、遠心分離(毎分 3000 回転、1 分間)し、得られた溶液は捨てた。このスピнкаラムに抽出液 0.2 mL を負荷し、遠心分離(毎分 3000 回転、1 分間)後、アセトニトリル 0.1 mL を加えて再度、遠心分離(毎分 3000 回転、1 分間)した。得られた溶液にアセトニトリルを加えて 0.5 mL にして試験溶液とした(試料 0.4 g/mL)。

6.マトリックス標準溶液の調製

ブランク試験溶液 100 μL をバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を回収率 100%相当濃度の混合標準溶液 100 μL に溶解した。

Ⅲ. 性能評価方法への分析データの適用検討

性能評価方法への分析データの適用検討は、平成 27 年度に行った LC-TOF-MS を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価試験データ⁷⁾を、(1)スクリーニング分析法の性能評価方法、または(2)妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従って評価した。

添加回収試験：1日2併行、5日間、2食品(牛肉、牛乳)

検討化合物：動物用医薬品 81 化合物

添加濃度：0.01 ppm

試験溶液の調製方法：通知一斉試験法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」を改良した方法⁷⁾

(1)スクリーニング分析法の性能評価方法による評価

ブランク試料及び添加試料について回収率 100%相当濃度の標準溶液に対するピーク面積比を求めた。以下のように閾値(T)及びカットオフ値(C)を求め、CRLs 2010(EU)の性能要件(C>T、 $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)または性能要件①～④で評価した。なお、スクリーニング濃度(添加濃度)は 0.01 ppm とした。

閾値(T)

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

$B_{Average}$ ：ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD} ：ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

(ブランク試料にピークがない場合は T=0 とした)

カットオフ値(C)

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD} \text{ または}$$

$$C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$$

$S_{Average}$ ：添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD} ：添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

性能要件①：C>T、添加試料のピーク S/N \geq 10
($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件②：C>T、添加試料のピーク S/N \geq 10
($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

性能要件③：C>T、C \geq 0.2、添加試料のピーク S/N \geq 10 ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件④：C>T、C \geq 0.2、添加試料のピーク S/N \geq 10 ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

(2)妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従った評価

検量線(6点)を用いて定量したデータを用いて妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従って評価した。

C. 研究結果及び考察

I. スクリーニング分析に関するガイドライン等の調査

平成 29 年度は、SANTE/11813/2017 (EU)¹⁾、CAC/GL 90-2017 (CCPR)²⁾、CAC/GL 71-2009 (CCRVDF)³⁾の各ガイドラインのスクリーニング分析に関する部分、及び USDA が公開しているスクリーニング分析法 CLG-PST5.07⁴⁾に記載されている性能基準等について調査した。平成 30 年度は、2002/657/EC (EU)⁵⁾のスクリーニング分析に関する部分及び 2002/657/EC (EU)の付属文書の残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン CRLs 2010 (EU)⁶⁾について調査した。

(1)SANTE/11813/2017(EU)¹⁾

G. 分析法バリデーションおよび性能基準

G7 スクリーニング法、特に自動 MS による検出を採用した方法は費用対効果が高く、試料中に存在する可能性の低い分析対象化合物への適用範囲拡大に貢献する。検出頻度の高い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一斉分析法により検出および測定を継続すべきである。

G8 スクリーニング法においては、一定の濃度での分析対象化合物の検出信頼性を確立すべきである。これは、定量分析バリデーションで得られた報告下限 (RL) に基づくスクリーニング法または定性分析バリデーションで得られたスクリーニング検出限界 (SDL) に基づくスクリーニング法により達成可能である。

G9 スクリーニング法を用いる場合、少なくとも一連の測定の最初と最後に RL または SDL に相当する検量線用標準液を注入し、分析対象化合物が一連の測定の全バッチを通して検出可能であることを保証すべきである。分析対象化合物が検出された場合、暫定報告のみ行うことができる。引き続き妥当性が確認され適切な校正手順を踏んだ定量分析法による確認分析を行ってから、信頼性のある定量結果を報告しなければならない。分析対象化合物が検出されない場合、結果を <SDL mg/kg または <RL mg/kg として報告しなければならない。

G10 SDL に基づくスクリーニング法のバリデーションは検出能力に注目することができる。各個別食品群 (付属文書 A 参照) について、基本的なバリデーションは、推定される SDL において 20 試料以上の分析を行うべきである。選択された試料は、同じ食品グループの複数の食品を代表し、各食品について最低 2 種類の試料を用いるべきである。またこれらは試験所が意図する適用範囲を代表す

べきである。追加のバリデーションデータは、ルーチン分析における継続 AQC データおよび分析法性能検証から収集することができる。

G11 スクリーニング法を定性分析目的にのみ使用しようとする場合、分析対象化合物の回収率に関する要求事項はない。選択性を評価するには、偽陽性の有無について未添加試料 (できれば「ブランク」) を用いて検証すべきである。スクリーニング法によって暫定的に検出された分析対象化合物が同定され、適切な確認方法を用いた試料の二次分析においてこれが確認される限り、偽陽性数に関する厳格な基準の必要はない。定性スクリーニング法の SDL は、95% 以上の試料において (即ち、許容される偽陰性率は 5%) 分析対象化合物が検出される最低濃度 (MS 同定基準を満たす必要はない) とする。

G12 初回または継続分析法バリデーションに含まれなかった分析対象化合物については、ある一定の残留濃度での検出の信頼水準は不明となる。結果として、バリデーションの適用範囲にない分析対象化合物は、当該分析法により検出可能であるが SDL については特定できない。

G13 定性スクリーニング法を用いる場合、妥当性が確認された分析対象化合物のみ試験所のルーチン分析適用範囲に追加することができる。

C. 試料分析

ルーチン分析中の継続分析法の性能検証

C46 非常に多くの分析対象化合物を対象とした定性一斉分析法では、各分析バッチですべての分析対象化合物を対象とすることは現実的でないと考えられる。各バッチについての全般的な分析法の性能を検証するには、分析法のすべての重要点を満たす少なくとも 10 以上の代表 (指標) 分析対象化合物 (有効適応範囲内) をマトリックスに添加すべきである。ローリングプログラムにおいて、

適応範囲内にあるすべての分析対象化合物に対する性能について以下の表に示す通りに検証すべきである。

表 回収率評価の最低頻度(スクリーニング法性能検証)

	代表(指標)分析対象化合物	その他の分析対象化合物
分析対象化合物数	1 検出系につき分析法に関するすべての重要点を網羅した 10 以上の分析対象化合物	定性分析として適用可能な全分析対象化合物
回収率の確認の最低頻度	各バッチ	最低 12 カ月ごと、可能であれば 6 カ月ごと
濃度	SDL	SDL
基準	全(指標)分析対象化合物が検出可能	全(適用可能)分析対象化合物が検出可能

(2)CAC/GL 90-2017(CCPR)²⁾

スクリーニング分析法(Screening Method)は、「最小関心濃度以上で分析対象化合物または分析対象化合物群の有無を判別するよう予め設定した基準に合致する分析法」と定義している。

『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一般的に、定性または半定量のいずれかの性質をもち、その目的は閾値以上の農薬等が含まれない(「陰性」)試料を、閾値以上の農薬等を含む(「陽性」)試料と判別することである。よって、そのバリデーション戦略は、その値以上であれば結果が「陽性の可能性」となる閾値濃度の設定、統計学に基づき結果が「偽陽性」または「偽陰性」となる確率の算出、選択性の評価、適切な使用条件の設定に注目することである。スク

リーニングの概念は、試料中に残留する可能性が低い農薬等にまで分析の適用範囲を広げるような効率的な方法を試験所に提供することである。検出頻度の高い農薬等については、妥当性が確認された定量一斉分析法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。場合によっては、市販の検査キットが有用となるが、現在の技術は実用面で多成分残留スクリーニングのニーズに費用的に見合うものではない。選択性および分析範囲は、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。他のアプローチは、質量分析(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他の化合物と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、試料中に存在すると考えられる他の物質から分析対象化合物または化合物グループ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また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免疫測定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バリデーションは、検出能に注目することができる。それぞれを代表するマトリックスについて、最低限のバリデーションでも推定 SDL でスパイクした 5 試料以上の分析を行うべきである。反復試料の種類や数を増やすことでバリデーションの質は向上する。マトリックスの種類ごとに最低 2 つの異なる試料について、試験所が意図する適用範囲に適合すべきである。追加のバリデーションデータは、継続中

の QC データおよび日常分析中の分析法性能評価から収集することができる。定性スクリーニング分析法の SDL は、少なくとも 95%の試料(許容される偽陰性率は 5%)で農薬等が検出された(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。

(3)CAC/GL 71-2009(CCRVDF)³⁾

14. 残留規制のための分析法に関する概論

スクリーニング分析法はその性質上定性または半定量的であり、MRLVD(動物用医薬品の最大残留基準値)または管轄当局により設定された他の規制値を超える残留物を含有する可能性のある、一群の動物またはロットから採取される試料の有無を特定するスクリーニング分析法として用いられる。これらの分析法は存在する濃度の正確な測定や残留物の構造確認を行うものではないが、どの物質についてさらに検査すべきか、またはどれが免除可能かを迅速に判断するために用いられる。これらの分析法はフードチェーンまたは検査施設に入る時点、または試料中に規制値を超える残留物が含まれているかどうかを決定する試験所での試料の受領時に適用される。このような分析法は、通常分析効率を高め、試験所外で実施できる場合があり、規制管理プログラムでの使用においては試験所内で行われる検査よりも低費用と考えられる。スクリーニング分析法を使用することにより、試験所は、本検査により陽性(疑い)が推測される試料の分析に集中することが可能となる。これらの分析法は、偽陰性率が低いことが明らかで、公的な試料に関する残留規制目的では、MRLVD に適合していない可能性があるとして特定された試料への適用に妥当性が確認された定量分析法や確認分析法がないのであれば、単独で使用すべきではない。

スクリーニング、定量、および確認の 3 つのカテゴリの分析法は、一部の性能特性を共有することがよくある。さらに、カテゴリごとに特定の懸念事項を有する。バランスのとれた残留規制プログラムの開発および実施には、これら 3 つのカテゴリの分析法同士の関係を理解することが重要である。残留規制プログラムでは、これら 3 つのカテゴリの分析法が続けて用いられる可能性がある。

スクリーニング分析法で「陽性」の試料は疑わしいとみなされ、通常さらに確定的な分析法を用いた試験所検査に供される。これにはスクリーニング分析法による試料の反復検査が含まれる場合があるが、試料が規制値を超えた残留物を含有していることを確定するには、試験所において定量分析法や確認分析法を用いるのが一般的である。このような検査は、最初の検査で検出された分析対象化合物が間違いなく疑わしい物質であり、MRLVD (または当局が設定した他の規制値)を確実に超過していることを確認するために、最初のスクリーニング分析法で用いた試料からの新たな分析試料について実施されるべきである。性能属性または特性は、スクリーニング、定量および確認の各種分析法の分析法バリデーションにおいて決定される必要がある。これについては下記の「食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の特性」に記載する

『食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の特性』

18.1 スクリーニング分析法の性能特性

通常、スクリーニング分析法はその性質上定性または半定量的であり、閾値以上の検出可能な残留物が含まれていない(「陰性」)試料と閾値以上の残留物を含む(「陽性」)試料を区別する目的を有する。よって、バリデーションの方針は「陽性」結果となる閾値濃度の設定、統計学に基づいた結果

の「偽陽性」および「偽陰性」率の決定、選択性に関する検査および適切な使用条件の設定に重点を置く。

スクリーニング分析法の「選択性」とは、陰性応答を示す試料が真に陰性であることを判定する検査能力をいう。また、検査は、標的化合物または化合物群の存在と試料に存在すると考えられる他の物質とを区別できなくてはならない。スクリーニング分析法は化合物グループまたはクラスに共通の構造的特徴を利用することが多いため、通常、その選択性は定量分析法ほど良好ではない。一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、または発色反応に基づくものが多い。スクリーニング分析法をクロマトグラフィーまたは他の分離手法後の検出系として用いた場合、その選択性は増大する。95%信頼水準で 90%以上の選択性(スクリーニング検査に推奨される)を示すため、最低 6 つの異なるソースからの代表的ブランク試料マトリックスについて 30 の反復試料分析を実施する。結果はすべて陰性となるべきである。その後、予想される干渉および交差反応について、予想される夾雑成分(動物の処置に用いられる可能性のある他の薬剤、予想される環境汚染物質、薬剤の代謝物、または化学的関連のある化合物など)を添加したブランクマトリックスを検査することにより追加検査を行うことがある。試料中に合理的に存在すると考えられる濃度でこれら化合物が存在するとき、反応結果はやはり陰性となるべきである。

ある化合物の検査のための閾値の「カットオフ値」は一般に、濃度を漸増し、各濃度でスパイク添加した 30 反復試料(最低 6 つのソースから採取)を用いた濃度-応答実験により設定する。30 反復試料のすべてが陰性応答を示す濃度と陽性応答を示

す濃度が確定したならば、ブランクマトリックス物質を用い、「すべて陰性」の濃度と「すべて陽性」の濃度の間の均等な間隔の4濃度でスパイク添加して実験を繰り返す。別のセットを用い「すべて陽性」の濃度の 20%増で検査を行う。結果の統計解析により、使用者は要求される信頼水準(通常 95%)で確実な検出濃度を設定することが可能となる。

『付録 C: 残留動物用医薬品の多成分一斉分析法(MRM)の性能特性』

C5. スクリーニング分析のための MRM の性能特性

スクリーニング分析のためのMRMは、通常定性的であり、ある範囲の分析対象化合物が閾値またはカットオフ値を上回る濃度の残留物を含まない試料(「陰性/適合」と、その値を上回る濃度の残留物を含む試料(「陽性/推定陽性/疑わしい陽性」とを判別することを目的としている。

承認された動物用医薬品のスクリーニング分析法は、定義した統計的限界(通常は95%信頼限界)内で対象化合物が確実に検出される最低濃度において95%の信頼水準で90%の選択性を示すべきである。規制目的では、これらのスクリーニング方法で「陽性/推定陽性/疑わしい陽性」試料は、追加の確認および/または定量分析を行い、「疑わしい」残留物の存在を同定、確認及び/または定量しなければならないため、少数の「偽陽性」のみ許容することができる。

(4) CLG-PST5.07 (USDA)⁴⁾

G. 計算/同定

1. 計算

b. 推定濃度

スクリーンカットオフレベルとの比較により計算した定量的推定濃度。ポジティブコントロールをリファレンスとした 1 点校正に基づいている。MS 装置

は、この計算を自動的に行うようにプログラムすることができるとができる。

$$D = E \times A_{\text{sample}} / A_{\text{pos. ctrl.}}$$

D = 試料中の推定濃度 (ppb)

E = ポジティブコントロールの添加濃度 (ppb)

A_{sample} = サンプルの相対感度係数

A_{pos. ctrl.} = ポジティブコントロールの相対感度係数

c. スクリーンカットレベル

この濃度は、試料が陰性/陽性を判定するために使用される。規制値違反を見逃さないように、2つの安全係数が含まれている。

$$F = 0.5 \times G \times H$$

F = スクリーンカットレベル (ppb)

G = 規制値 (ppb)

規制値またはアクションレベルは、各試料/分析対象化合物について参照する必要がある。

ゼロ・トレランスまたは規制値がない場合、試料はポジティブコントロールの添加濃度でスクリーニングされ、 $G = 2 \times E$ 及び $F = E \times H$ とする。

第一の安全係数は規制値の 1/2 でスクリーニングすることである。

H = 回収率の最小値/最大値

(値は CLG-PST5.07⁵⁾ の表 7 および表 8 参照。値は更新されることがある。)

これは、回収率のばらつきによって違反を見逃さないようにするための第 2 の安全係数である。これらの値は、ポジティブコントロールの回収率の最大値と最小値に基づいている。

2. スクリーニング基準

a. 保持時間は、一連の測定開始時に測定したポジティブコントロールまたは標準溶液の保持時間と一致 (LC の場合 5%、GC の場合 1% 以内) しなければならない。

b. CLG-PST5.07⁵⁾ の表 5 および 6 に示された

定量イオン及び少なくとももう 1 つのイオンが存在しなければならない。

c. 選択されたすべてのイオンについて $S/N \geq 3$ でなければならない。これは目視で確認することができる。

d. 規制値がポジティブコントロールの添加濃度の 10 倍を超える ($G > 10 \times E$) 化合物を検出した場合は、スクリーニング陽性かどうかを判定するために希釈および再測定が必要な場合がある。推定濃度がポジティブコントロールの添加濃度の 10 倍を超える場合 ($D > 10 \times E$) は、ISTD を添加していないブランクマトリックス抽出物でサンプルを 10 倍に希釈し、適切な質量分析計で再測定を行う。

e. 推定濃度がスクリーンカットオフレベルと等しいまたは超える場合 ($D \geq F$)、試料は陽性である。

f. ブランク中の全ての定量イオンのピーク面積は、一連の測定の開始時に測定したポジティブコントロールの 10% 未満でなければならない。

g. 一連の測定の開始時に測定した標準溶液、ポジティブコントロール、及び一連の測定の最後に測定したポジティブコントロールは、分析対象化合物の 95% で b, c の全ての基準を満たさなければならない。関連する QC 試料でスクリーニング基準を満たさない化合物について陽性となった場合、追加試験が必要である。

(5) 2002/657/EC (EU) ⁵⁾

『分析法の性能基準、その他の要求事項および手順

1. 定義

1.35. 「スクリーニング分析法」とは、目的濃度において物質または物質クラスが存在を検出するために用いられる分析法をいう。このような分析法はサンプルのハイスループット能力を有し、大量のサンプルから不適合結果を示す可能性のあるサンプル

を選別するのに用いられる。この分析法は特に偽適合(陰性)結果を避けるようにデザインされている。

2. 分析法の性能基準およびその他の要求事項

2.2. スクリーニング分析法

指令 96/23/EC に準拠したスクリーニング目的には、妥当性が確認され、目的濃度において 5%未満の偽適合(β 過誤)率を示す分析法であることが、文書化された追跡可能な方法で証明できる分析法のみを使用するものとする。不適合結果が疑われる場合、この結果を確認分析法で確認するものとする。

3. バリデーション

バリデーションは、分析法が関連する性能特性に適用される基準に準拠していることを示すものとする。

異なる規制目的には、異なる種類の分析法が要求される。以下の表に分析法の種類ごとに検証すべき性能特性を規定する。

表 分析法の分類と測定が求められる性能特性

			判定限界 CC α	真度/ 回収率	精度	選択性/ 特異性	適合性/ 頑健性/ 安定性
定性分 析法	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
定量分 析法	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = スクリーニング分析法、C = 確認分析法、+ = 測定が義務付けられる』

(6) CRLs 2010 (EU)⁶⁾

『2. 定義

2.2. スクリーニング標的濃度

スクリーニング標的濃度は、スクリーニング試験においてスクリーニング陽性と判定する濃度である。

- ・ スクリーニング標的濃度は基準値以下とする

(基準値の 1/2 濃度に設定するのが望ましい)。

- ・ 使用が禁止されている化合物や認可されていない化合物のスクリーニング標的濃度は最小要求性能限界(MRPL)以下としなければならない。

2.3. 検出能力 CC β

検出能力(CC β)は、 β の過誤確率をもって試料中の分析対象化合物の検出、同定および/または定量が可能となる最低含有量をいう。 β 過誤は、陽性の試料に対して陰性の結果が得られる確率である。スクリーニング試験の場合、 β 過誤(偽陰性率)は<5%であるべきである。基準値が設定されている試料の場合、CC β は $1-\beta$ の統計学的確かさをもって分析法が許容基準濃度を検出できる濃度である。CC β は、偽陰性率が $\leq 5\%$ の濃度である。この場合、CC β は基準値濃度以下でなければならない。

2.4. カットオフレベル

カットオフレベルは、スクリーニング分析のレスポンスまたはシグナルであり、試料がスクリーニング標的濃度以上の分析対象化合物を含むことを示す。カットオフレベルを超えた場合、確認試験を行う。

4. スクリーニング分析法の性能評価を行う上で従うべき原則

4.1. 必須要件

(定性または(半)定量)スクリーニング分析法に対する必須要件は、選択されたスクリーニング標的濃度で分析対象化合物を確実に検出し、偽陰性を回避する能力である。スクリーニング標的濃度は、分析対象化合物が基準値濃度で試料中に存在する場合、試料が「スクリーニング陽性」として確実に判定されるのに十分に低くあるべきである。性能評価は、この重要な要件が満たされているという客観的な証拠を提供するべきである。

5. 性能評価方法

5.1. 古典的アプローチによる特異性/選択性および検出能力 $CC\beta$ の決定

5.1.1. 性能評価に必要な試料数

各分析対象化合物のスクリーニング陽性試料(すなわち、スクリーニング標的濃度で添加した試料)の数は、要求される統計的信頼度、およびスクリーニング標的濃度と基準値の關係に依存する。基準値と比較してスクリーニング標的濃度が低いほど、基準値濃度で汚染された試料のスクリーニング判定において同程度の信頼性を与えるのに必要な試料数は少ない。

- ・スクリーニング標的濃度が基準値の 1/2 濃度の場合、少なくとも 20 のスクリーニング陽性試料を分析して偽陰性が 1 または 0 個であれば、 $CC\beta$ は基準値の 1/2 濃度以下である。
- ・スクリーニング標的濃度が基準値の 50~90% の場合、少なくとも 40 のスクリーニング陽性試料を分析して、偽陰性が 2 個以下であれば $CC\beta$ は基準値以下である。
- ・スクリーニング標的濃度が、基準値に近い場合は、より多くのスクリーニング陽性試料を分析する必要がある。 $CC\beta$ がその目的に適合していることを実証するためには、最大 60 の試料を分析(偽陰性が 3 個以下)する必要がある。

5.1.2. カットオフレベルの同定と $CC\beta$ の計算

カットオフレベルを設定するために、ブランク試料に添加するスクリーニング標的濃度 (x_1) は、理想的には基準値の 1/2 濃度に設定すべきである。不可能な場合は、基準値の 50~100% の濃度を選択すべきである。

マトリックスが牛の筋肉の場合、各試料は異なるバッチのものを用いる。信頼性の高い $CC\beta$ を求め、特異性を評価するためには、少なくとも 60 個のブランク試料と 60 個の添加試料を分析する必要がある。

ステップ 1

60 個のブランク試料に分析対象化合物を濃度 x_1 で添加する。

ステップ 2

SOP に従って、60 個の添加試料と 60 個のブランク試料を分析する。これらの分析は、異なる日に行うべきであり、好ましくは異なる分析者によって行われるべきである。理想的には、方法を使用するときに遭遇する可能性のある全ての条件を模倣すべきである。

ステップ 3

半定量スクリーニング分析法のカットオフレベルの設定方法は、後述するアプローチ I(付属文書)及びアプローチ II(付属文書)に示されている。

ステップ 4

カットオフレベル以下の添加試料の数を確認する。60 個のうち 3 個(5%)以上の添加試料がカットオフレベルを下回っている場合、スクリーニング標的濃度は低すぎる。

ステップ 5 $CC\beta$ の計算

60 個の添加試料を分析して偽陰性が 5% 以下となった場合、添加濃度(スクリーニング標的濃度)が分析法の検出能力 $CC\beta$ である(60 個の添加試料のうち、偽陰性が 3 個以下の濃度)。

5.1.3. スクリーニング分析法の適用性及び堅牢性の評価

適用性

スクリーニング分析法を、性能評価を行ったマトリックスとは別のマトリックスに適用した場合、同じ $CC\beta$ が得られるとは限らない。このため、新たに適用するマトリックスを用いて $CC\beta$ を求めなければならない。

検討スキーム

例：4 つの異なる種からの同じ種類のマトリックス(筋肉など)の場合

基準値がすべての種で同じであり、既に性能評価したマトリックスと同じである場合、CCβ は 20 個のブランク試料(1 種あたり 5 試料)及び同じ 20 個のブランク試料にスクリーニング標的濃度を添加した添加試料を分析して求める。

- ・ 20 個の添加試料がすべて陽性である(カットオフレベルを超える)場合、またはカットオフレベル以下が 1 個までの場合、新しいマトリックス(または種)は既に性能評価されたマトリックスと同じ CCβ を適用できる。
- ・ 陰性となった添加試料が 2 個以上ある場合、それらの種の CCβ は既に性能評価されたマトリックスの CCβ よりも大きいと推測される。そのような場合、スクリーニング分析法は新たに適用するマトリックスについて完全に性能評価すべきである(スクリーニング標的濃度を上げて、性能評価を行う)。

異なるマトリックスおよび／または異なる種への分析法の適用拡大

最初の性能評価試験で 1 つのマトリックス(例えば、牛の筋肉)に対して CCβ を求め、その分析法を同じ種または別の種の異なるマトリックス(例えば、肝臓)に適用する場合、ほぼ確実に顕著なマトリックス効果があり、同じ CCβ を新たなマトリックスに適用できるとは限らない。そのため、CCβ は新たに適用するマトリックスで求めなければならない。

この問題への一つのアプローチは、2002/657 / EC の 3.1.3 に示されているようなマトリックス包括的アプローチを使うことである。あるいは、20 個のブランク試料(例えば、豚肝臓)および同じ 20 個のブランク試料(豚肝臓)にスクリーニング標的濃度で添加した試料を分析することによって、それぞれの新しい種／マトリックスの組み合わせについて CCβ を求めることができる。この試験は、各分析対

象化合物、または各グループの代表的な分析対象化合物について実施すべきである。

5.2. マトリックス包括的アプローチによる特異性/選択性および検出能力(CCβ)の決定

マトリックス包括的アプローチによる性能評価方法は2002/657 / ECの3.1.3に示されている。この多因子アプローチを使用すると、性能評価に必要な分析数(因子-レベルの組み合わせ)を減らすことができる。』

10. 付属文書

CRLs 2010 の付属文書には、半定量スクリーニング分析法のカットオフレベルを設定するための 2 つのアプローチが示されている。

『1. 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルと CCβ の設定

例 A (表 2)

MRL = 1.0 µg/ kg

望ましいスクリーニング標的濃度 = 0.5 µg/kg

20 個(またはその倍数)の異なるブランク試料を選択する。これらにスクリーニング標的濃度、この場合は 0.5 µg/ kg で添加する。

ブランク試料及び添加試料は、好ましくは異なる日に分析する。ブランク試料のレスポンスのうち、最大のレスポンスを選択する- この場合 0.137 units。添加試料のレスポンスのうち、最小のレスポンスを選択する- この場合、0.252 units。

示されている例では、添加試料のレスポンスとブランク試料のレスポンスの範囲は重ならないため、このスクリーニング分析法の CCβ は 0.5 µg/ kg 以下と言える。

示されている例では、最小のレスポンスが 0.252 であるため、カットオフレベルは 0.252 である。この値を超えるレスポンスを示す試料は全て「スクリーニング陽性」と見なされ、スクリーニング分析法の CCβ を超える。

スクリーニング試験においては、バッチ許容基準として、添加試料のレスポンスは 0.25 以上でなければならない。

例 B (表 3)

MRL = 1.0 µg/ kg

望ましいスクリーニング標的濃度 = 0.5 µg/kg

この例では、ブランク試料の最大のレスポンスは 0.137 units であるが、添加試料の最小のレスポンスは 0.132 units である。この場合、2 つの母集団の間に 5% を超える重なりがある (2 つの添加試料のレスポンスが、ブランク試料のレスポンスの最大値よりも小さい)。

明確なカットオフレベルを設定することはできない (ブランク試料と添加試料のレスポンスの範囲が重なっているため)。これらのデータから、 $CC\beta$ は 0.5 µg/ kg より大きく、この分析法で 0.5 µg/ kg のスクリーニング標的濃度を確実に検出することはできないと推論することができる。分析法を改良するか、より高いスクリーニング標的濃度で性能評価を行う必要がある。

2. 半定量スクリーニングのためのカットオフレベルと $CC\beta$ の設定

閾値 T

$T = B + 1.64 \times SD_b$ またはテクニカル閾値

B: ブランク試料のレスポンスの平均値、

SD_b : ブランク試料のレスポンスの標準偏差

カットオフ ファクター F_m

$F_m = M - 1.64 \times SD$

M: 添加試料のレスポンスの平均値

SD: 添加試料のレスポンスの標準偏差

$F_m > B$ の場合: 分析法の検出能力の妥当性が確認される

$B < F_m < T$ の場合: 偽陽性率は 5% より大きい

$F_m > T$ の場合: 偽陽性率は 5% 未満 』

II. スクリーニング分析法の開発

1. 分析法の検討

(1) 試験溶液の調製

抽出は、QuEChERS 法の一つである European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662 と同条件で行うこととした。

QuEChERS 法は定容操作がなく、内標を加えて補正を行う方法を採用しているが、本分析法では抽出液を正確に 10 mL に定容した後、一部を分取し、精製する方法とした。

QuEChERS 法では、精製方法として C18、PSA、グラファイトカーボン等の粉末状の固相を用いた分散固相抽出を採用している。この方法は、ミニカラム精製と比較して迅速且つ簡便で安価であるものの、精製効果は劣る。そこで本研究では、分散固相抽出と比較して精製効果が高いと考えられたシリカモノリススピнкаラムを用いた迅速且つ簡便な精製方法を検討した。シリカモノリスは、3次元網目構造をとっており、貫通孔であるスルーポア (数十 µm 程度) と細孔であるメソポア (数 nm 程度) を有しているため、高い空隙率を維持しながら、大きな表面積を持つ。シリカモノリススピнкаラムは従来のミニカラムと比較して①コンディショニング、洗浄、溶出等が遠心分離によってできるため、操作が簡便、②内部に液がほとんど残らないため、少量の溶媒で高回収率が得られる、③充填剤の溶出がない等の利点がある。

まず、4 種類のスピнкаラム (Monospin C18FF、Monospin C18、Monospin C18-AX、Monospin SAX) について、各農薬の回収率を比較した。スピнкаラムにアセトニトリル 100 µL を加え、遠心分離 (毎分 3000 回転、1 分間) し、コンディショニングを行った。これに、混合標準溶液 (アセトニトリル、1 µg/mL) 200 µL を負荷し、遠心分離 (毎分 3000 回転、1 分間) 後、アセトニトリルを加えて遠心分離

(毎分 3000 回転、1 分間)し、各農薬の回収率を求めた(表 4 及び 5)。その結果、imazalil、spinosyn A、spinosyn D 及び spiroxamine を除き、いずれのスピンカラムからもアセトニトリル 100 μ L で回収率 80%以上が得られた。

次に、ほうれんそうの抽出液を用いて各スピンカラムでの精製効果を比較した。その結果、Monospin C18 や Monospin C18FF では緑色色素が除去されたのに対し、Monospin C18-AX や Monospin SAX では緑色色素の除去効果が低かった。Monospin C18 及び Monospin C18FF では色素の除去効果に大きな差は認められなかった。このため、本研究では Monospin C18 を用いて精製を行うこととした。確立した試験溶液の調製方法を図 1 示した。

(2) 添加回収試験

りんご及びほうれんそうを用いて、130 農薬について添加濃度 0.01 ppm で 5 併行の添加回収試験を行った。定量は回収率 100%相当のマトリックス標準溶液(1 点)を用いて行った。真度及び併行精度の結果を表 6 に示した。りんご及びほうれんそうのいずれも fenpropimorph を除き、妨害ピークは認められなかった。真度が 70%未満となった化合物はりんご 3 化合物、ほうれんそう 2 化合物、併行精度 25%以上となった化合物はりんご 4 化合物であった。ほうれんそうでは併行精度 25%以上となった化合物はなかった。

III. 性能評価方法への分析データの適用検討

調査した海外の残留農薬等分析法のガイドライン^{1~3, 5, 6)}ではいずれもスクリーニング分析について言及しているが、CRLs 2010(EU)⁶⁾を除き、性能評価方法の詳しい手順については示されていない。そこで、CRLs 2010(EU)⁶⁾に示されている性能評価方法を分析データに適用し、問題点等を考察し

た後、性能評価方法及び性能要件を提案することとした。

適用検討は、平成 27 年度に行った LC-TOF-MS を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価試験データ⁷⁾を用いて行った。CRLs 2010(EU)⁶⁾では、カットオフレベルを設定する方法として、2 つの方法(I 及び II)を示している。本検討では統計学的方法である II を用いることとした。CRLs 2010(EU)⁶⁾では分析対象化合物のレスポンスを用いて評価しているが、LC-MS(/MS)や GC-MS(/MS)では測定感度が変動するため、標準溶液に対するピーク面積比を用いて評価した。また、CRLs 2010(EU)⁶⁾では食品毎に性能評価を行うこととなっているが、本検討では牛乳及び牛肉の 2 食品のデータ(1 食品につきブランク試料及び添加試料各 10 試料)を用いた。スクリーニング濃度は 0.01 ppm とし、動物用医薬品 81 化合物を対象とした。CRLs 2010(EU)⁶⁾と同様に、カットオフ値(C)は $C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$ とし、性能要件は $C > T$ (偽陰性率 5%未満、偽陽性率 5%未満)とした。

代表的な結果を図 2~4 に示した。アザペロン(図 2)は $C > T$ であり、CRLs 2010(EU)⁶⁾の性能要件を満たした。一方、オラキンドックス(図 3)は牛肉においてマトリックスの影響を大きく受けて $C < T$ となり、性能要件を満たさなかった。牛肉において定量を妨害するピークが認められたスルファチアゾール(図 4)も $C = T$ となり、性能要件を満たさなかった。牛乳のデータのみを用いて評価した場合は、オラキンドックス、スルファチアゾールのいずれも $C > T$ となり、性能要件を満たした。これらの結果から、回収率やマトリックスの影響、選択性は食品によって大きく異なる場合があるため、スクリーニング分析法の性能評価は食品毎に行う必要があると考えられた。

カットオフ値(C)の下限值

図 5 に回収率が低いダノフロキサシンの結果を示した。C は低いものの、 $C > T$ であり、CRLs 2010 (EU)⁶⁾では C の下限値は設定されていないため、性能要件を満たしている。しかし、添加試料のピーク面積が標準溶液のピーク面積と比べて非常に小さい場合、定量性が低くなるため、C の下限値を設定した方がよいと考えられた。C は 0.2 程度がよいと考えられる。

偽陰性率

CRLs 2010 (EU)⁶⁾では、偽陰性率 5%未満となるように $C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$ としている。しかし、 $C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$ としても、一部の化合物では添加試料 20 試料のうち、2 試料のピーク面積比が C よりも低い値となった(図 6)。

$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$ (偽陰性率 5%未満)とした場合、検討した 81 化合物中 40 化合物で C よりピーク面積比が低い試料が 1 試料以上あった(図 7)。6 化合物は C よりピーク面積比が低い試料が 2 試料あった。一方、 $C = S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$ (偽陰性率 1%未満)とした場合、C よりピーク面積比が低い試料があったのは 81 化合物中 5 化合物のみであり、いずれも 1 試料のみであった。これらの結果から $C = S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$ (偽陰性率 1%未満)とするのがよいと考えられた。

偽陽性率

調査したガイドライン^{1,3,5,6)}のうち、偽陽性率の許容範囲を設定しているのは CRLs 2010 (EU)⁶⁾のみであった。偽陽性があっても確定試験を行えば正しい判定は可能である。しかし、確定試験が必要な化合物/検体が多いと検査の効率は向上しない。このため、CRLs 2010 (EU)⁶⁾の方法と同様に偽陽性率 5%未満となるように性能要件 ($T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$, $C > T$)を設定するのがよいと考えられた。

感度

CRLs 2010 (EU)⁶⁾の性能評価方法では、感度が非常に低い場合でも、 $C > T$ を満たせば、性能要件を満たす。しかし、非常に感度が低い場合、定量性は低いと考えられることから、「添加試料のピークは $S/N \geq 10$ であること」を性能要件に加えるのがよいと考えられた。

試料数

CRLs 2010 (EU)⁶⁾の性能評価方法では、スクリーニング標的濃度が基準値の 1/2 の場合、試料数はブランク試料及び添加試料各 20 試料としている。試料数を多くすれば信頼性の高い評価が可能であるが、性能評価に時間を要する。このため、試料数はブランク試料及び添加試料各 10 試料以上とするのが良いと考えられた。

表 7 及び表 8 に各性能要件(①～④)での性能評価結果を示した。また、図 8 にスクリーニング分析法の性能評価方法及び妥当性評価ガイドライン⁸⁾による評価での適合化合物数を示した。スクリーニング分析法の性能評価では性能要件を厳しくすると不適合となる化合物数が増加したが、性能要件が最も厳しい④($C > T$, $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ (ただし $C = S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$))を用いた場合においても、妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従った評価と比較して不適合となる化合物数は 4 割以下と少なかった。

IV. 性能評価方法及び性能要件の提案

分析データの適用検討の結果を基に、以下にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案する。性能要件は、残留濃度が基準値の 1/2 以上の試料を「陽性」と判定(偽陰性率 1%未満及び偽陽性率 5%未満)できるように設定した。

(1) 性能評価方法

農薬等を含まない試料(ブランク試料)及び農薬

等を添加した試料(添加試料)を各 10 試料以上分析し、標準溶液に対するピーク面積比から①閾値(T)及び②カットオフ値(C)を求め、(2)性能要件に適合していることを確認する。添加濃度(スクリーニング濃度)は基準値の 1/2 濃度とする。性能評価は食品毎に行う。異なる試料を用いて、異なる日に実施するのが望ましい。

①閾値(T)

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

B_{Average} : ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD} : ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差
(ブランク試料にピークがない場合は $T=0$ とする)

②カットオフ値(C)

$$C = S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$$

S_{Average} : 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD} : 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

(2)性能要件

以下の性能を有する分析法とする。

- $C > T$
- $C \geq 0.2$
- 添加試料から得られるピークは $S/N \geq 10$

(3)判定基準

試料を分析し、基準値の 1/2 に相当する濃度の標準溶液に対するピーク面積比がカットオフ値(C)以上となった場合、「陽性」とする。陽性となった場合、妥当性が確認された定量分析法での確定試験を行う。

なお、スクリーニング濃度は、基準値の 1/2 濃度より低い濃度でもよいが、残留濃度が基準値より低い試料を陽性と判定してしまう可能性が高くなる。また、カットオフ値(C)は $C < S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$ とし

てもよいが、残留濃度が基準値より低い試料を陽性と判定してしまう可能性が高くなる。

D. 結論

スクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法のガイドラインのスクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインのうち、2002/657/EC⁵⁾の付属文書 CRLs 2010⁶⁾を参考にして、残留濃度が基準値の 1/2 以上の試料を「陽性」と判定(偽陰性率 1%未満及び偽陽性率 5%未満)できるように性能評価方法及び性能要件を設定した。本方法によって評価した分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある検体のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化を図ることができると考えられる。

E. 参考文献

- 1) European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 21 – 22 November 2017 rev.0.
- 2) Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 90-2017, Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed. Adopted in 2017.
- 3) Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 71-2009, Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. Adopted 2009. Revision 2012, 2014.
- 4) United States Department of Agriculture

Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. CLG-PST5.07. Screening for Pesticides by LC/MS/MS and GC/MS/MS. Revision: .07. 03/14/2016.

5) Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results (2002/657/EC). Off. J. Eur. Commun. L221:8–36.

6) Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer).

7) 厚生労働科学研究補助金 食品の安全確保推進研究事業 「食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究」、平成 27 年度総括・分担研究報告書

8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 「食品に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号(平成 22 年 12 月 24 日一部改正、食安発 1224 第 1 号)

F. 研究発表

1. Saito-Shida S., Nemoto S., Teshima R., Akiyama H. • Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2016 • 33 (119-127)

2. Saito-Shida S., Sakai T., Nemoto S., Akiyama H. • Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2017 • 34 (1153-1161)

3. Saito-Shida S., Hamasaka T., Nemoto S., Akiyama H. • Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers. • Food Chemistry • 2018 • 256 (140–148)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 検討化合物の保持時間及び定量イオン

	化合物	組成式	保持時間 (分)	イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)
1	Acetamidrid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	5.5	[M + H] ⁺	223.0745
2	Acibenzolar- <i>S</i> -methyl	C ₈ H ₆ N ₂ OS ₂	9.1	[M + H] ⁺	210.9994
3	Acrinathrin	C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO ₅	10.9	[M + NH ₄] ⁺	559.1662
4	Ametryn	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	8.8	[M + H] ⁺	228.1277
5	Anilofos	C ₁₃ H ₁₉ ClNO ₃ PS ₂	9.6	[M + H] ⁺	368.0305
6	Atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	8.1	[M + H] ⁺	216.1010
7	Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	8.6	[M + H] ⁺	404.1241
8	Benalaxyl	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	9.7	[M + H] ⁺	326.1751
9	Benzofenap	C ₂₂ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	10.3	[M + H] ⁺	431.0924
10	Bitertanol	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	9.8	[M + H] ⁺	338.1863
11	Bromacil	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	7.1	[M + H] ⁺	261.0233
12	Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	8.7	[M + H] ⁺	343.0399
13	Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	10.4	[M + H] ⁺	306.1635
14	Butafenacil	C ₂₀ H ₁₈ ClF ₃ N ₂ O ₆	9.0	[M + NH ₄] ⁺	492.1144
15	Cadusafos	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	10.0	[M + H] ⁺	271.0950
16	Carpropamid	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₃ NO	9.6	[M + H] ⁺	334.0527
17	Chlorfenvinphos	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	9.6, 9.8	[M + H] ⁺	358.9768
18	Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	5.6	[M + H] ⁺	222.0429
19	Chloroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	9.0	[M + H] ⁺	291.0895
20	Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	10.7	[M + H] ⁺	349.9336
21	Chromafenozide	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₃	9.1	[M + H] ⁺	395.2329
22	Clomeprop	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ NO ₂	10.4	[M + H] ⁺	324.0553
23	Cloquintocet mexyl	C ₁₈ H ₂₂ ClNO ₃	10.5	[M + H] ⁺	336.1361
24	Cumyluron	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O	9.0	[M + H] ⁺	303.1259
25	Cyanazine	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	6.9	[M + H] ⁺	241.0963
26	Clothianidin	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	5.1	[M + H] ⁺	250.0160
27	Cyazofamid	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S	9.3	[M + H] ⁺	325.0521
28	Cycloprothrin	C ₂₆ H ₂₁ Cl ₂ NO ₄	10.8	[M + NH ₄] ⁺	499.1186
29	Cyflufenamid	C ₂₀ H ₁₇ F ₅ N ₂ O ₂	9.7	[M + H] ⁺	413.1283
30	Cyproconazole	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	8.8, 9.0	[M + H] ⁺	292.1211
31	Cyprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	9.9	[M + H] ⁺	226.1339
32	Daimuron	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O	8.9	[M + H] ⁺	269.1648
33	Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	9.8	[M + H] ⁺	305.1083
34	Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	9.9, 10.0	[M + H] ⁺	406.0720
35	Diflubenzuron	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	9.4	[M + H] ⁺	311.0393
36	Diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	10.1	[M + H] ⁺	395.0813
37	Dimethirimol	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	7.8	[M + H] ⁺	210.1601
38	Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	5.4	[M + H] ⁺	230.0069
39	Dimethomorph	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	8.6, 8.8	[M + H] ⁺	388.1310
40	Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	8.1	[M + H] ⁺	233.0243

表 1 (つづき)

	化合物	組成式	保持時間 (分)	イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)
41	Edifenphos	C ₁₄ H ₁₅ O ₂ PS ₂	9.7	[M + H] ⁺	311.0324
42	Epoxiconazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	9.2	[M + H] ⁺	330.0804
43	Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	10.5	[M + H] ⁺	384.9949
44	Ethiprole	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ F ₃ N ₄ OS	8.5	[M + H] ⁺	396.9899
45	Etoazole	C ₂₁ H ₂₃ F ₂ NO ₂	10.8	[M + H] ⁺	360.1770
46	Etrimfos	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	9.8	[M + H] ⁺	293.0719
47	Fenamidone	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	8.6	[M + H] ⁺	312.1165
48	Fenarimol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	9.2	[M + H] ⁺	331.0399
49	Fenbuconazole	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄	9.2	[M + H] ⁺	337.1215
50	Fenobucarb	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	8.5	[M + H] ⁺	208.1332
51	Fenoxaprop ethyl	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	10.2	[M + H] ⁺	362.0790
52	Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	9.4	[M + H] ⁺	302.1387
53	Fenpropathrin	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	10.8	[M + H] ⁺	350.1751
54	Fenpropimorph	C ₂₀ H ₃₃ NO	11.4	[M + H] ⁺	304.2635
55	Flamprop methyl	C ₁₇ H ₁₅ ClFNO ₃	8.9	[M + H] ⁺	336.0797
56	Fludioxonil	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	8.8	[M + NH ₄] ⁺	266.0736
57	Flufenacet	C ₁₄ H ₁₃ F ₄ N ₃ O ₂ S	9.1	[M + H] ⁺	364.0737
58	Fluquinconazole	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	9.1	[M + H] ⁺	376.0163
59	Fluridone	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ NO	8.6	[M + H] ⁺	330.1100
60	Furametpyr	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₂	7.9	[M + H] ⁺	334.1317
61	Hexythiazox	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	10.6	[M + H] ⁺	353.1085
62	Imazalil	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	9.6	[M + H] ⁺	297.0556
63	Imibenconazole	C ₁₇ H ₁₃ Cl ₃ N ₄ S	10.4	[M + H] ⁺	410.9999
64	Indanofan	C ₂₀ H ₁₇ ClO ₃	9.3	[M + H] ⁺	341.0939
65	Indoxacarb	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	9.9	[M + H] ⁺	528.0780
66	Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	9.0	[M + H] ⁺	321.2173
67	Isoproc carb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	7.9	[M + H] ⁺	194.1176
68	Isoxathion	C ₁₃ H ₁₆ NO ₄ PS	10.0	[M + H] ⁺	314.0610
69	Lactofen	C ₁₉ H ₁₅ ClF ₃ NO ₇	10.3	[M + NH ₄] ⁺	479.0827
70	Linuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	8.7	[M + H] ⁺	249.0192
71	Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	8.9	[M + H] ⁺	331.0433
72	Mepanipyrim	C ₁₄ H ₁₃ N ₃	9.5	[M + H] ⁺	224.1182
73	Metalaxyl	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	8.0	[M + H] ⁺	280.1543
74	Methabenzthiazuron	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	8.1	[M + H] ⁺	222.0696
75	Methiocarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	8.7	[M + H] ⁺	226.0896
76	Metolachlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	9.3	[M + H] ⁺	284.1412
77	Monolinuron	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	7.7	[M + H] ⁺	215.0582
78	Myclobutanil	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	8.8	[M + H] ⁺	289.1215
79	Naproanilide	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂	9.5	[M + H] ⁺	292.1332
80	Napropamide	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	9.3	[M + H] ⁺	272.1645

表 1 (つづき)

	化合物	組成式	保持時間 (分)	イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)
81	Norflurazon	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	8.2	[M + H] ⁺	304.0459
82	Novaluron	C ₁₇ H ₉ ClF ₈ N ₂ O ₄	10.1	[M + H] ⁺	493.0196
83	Oxadixyl	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	6.7	[M + H] ⁺	279.1339
84	Oxaziclomefone	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	10.2	[M + H] ⁺	376.0866
85	Paclobutrazol	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	8.7	[M + H] ⁺	294.1368
86	Penconazole	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	9.5	[M + H] ⁺	284.0716
87	Pencycuron	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O	9.9	[M + H] ⁺	329.1415
88	Phenthoate	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	9.6	[M + H] ⁺	321.0379
89	Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	9.8	[M + H] ⁺	367.9941
90	Phosphamidon	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₃ P	6.7	[M + H] ⁺	300.0762
91	Piperonyl butoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	10.5	[M + NH ₄] ⁺	356.2431
92	Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	7.9	[M + H] ⁺	239.1503
93	Pirimiphos methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	10.0	[M + H] ⁺	306.1036
94	Prochloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	9.8	[M + H] ⁺	376.0381
95	Profenofos	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	10.3	[M + H] ⁺	372.9424
96	Prometryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	9.3	[M + H] ⁺	242.1434
97	Propachlor	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	8.1	[M + H] ⁺	212.0837
98	Propanil	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	8.7	[M + H] ⁺	218.0134
99	Propaquizafop	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	10.4	[M + H] ⁺	444.1321
100	Propargite	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	10.7	[M + NH ₄] ⁺	368.1890
101	Propiconazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	9.6	[M + H] ⁺	342.0771
102	Propyzamide	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	8.9	[M + H] ⁺	256.0290
103	Pyraclufos	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₂ O ₃ PS	9.8	[M + H] ⁺	361.0537
104	Pyraclostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	9.9	[M + H] ⁺	388.1059
105	Pyrazophos	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	10.0	[M + H] ⁺	374.0934
106	Pyrifthalid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	8.6	[M + H] ⁺	319.0747
107	Pyrimethanil	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	9.0	[M + H] ⁺	200.1182
108	Pyriproxyfen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	10.7	[M + H] ⁺	322.1438
109	Quinalphos	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	9.7	[M + H] ⁺	299.0614
110	Quinoxifen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	10.8	[M + H] ⁺	308.0040
111	Quizalofop ethyl	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	10.3	[M + H] ⁺	373.0950
112	Simazine	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	7.3	[M + H] ⁺	202.0854
113	Simeconazole	C ₁₄ H ₂₀ FN ₃ OSi	9.0	[M + H] ⁺	294.1432
114	Spinosyn A	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	11.4	[M + H] ⁺	732.4681
115	Spinosyn D	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀	11.6	[M + H] ⁺	746.4838
116	Spiroxamine	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	10.4, 10.5	[M + H] ⁺	298.2741
117	Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	9.5	[M + H] ⁺	308.1524
118	Tebufenpyrad	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	10.3	[M + H] ⁺	334.1681
119	Tebuthiuron	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	7.3	[M + H] ⁺	229.1118
120	Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	9.4	[M + H] ⁺	242.1434

表 1 (つづき)

	化合物	組成式	保持時間 (分)	イオン	計算精密質量 (<i>m/z</i>)
121	Tetrachlorvinphos	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	9.4	[M + H] ⁺	366.9036
122	Tetraconazole	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	9.1	[M + H] ⁺	372.0288
123	Thiacloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	6.1	[M + H] ⁺	253.0309
124	Tolfenpyrad	C ₂₁ H ₂₂ ClN ₃ O ₂	10.5	[M + H] ⁺	384.1473
125	Triadimefon	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	8.9	[M + H] ⁺	294.1004
126	Triazophos	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	9.1	[M + H] ⁺	314.0723
127	Trifloxystrobin	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	10.1	[M + H] ⁺	409.1370
128	Triflumizole	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	10.1	[M + H] ⁺	346.0929
129	Triflumuron	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	9.7	[M + H] ⁺	359.0405
130	Triticonazole	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O	9.0	[M + H] ⁺	318.1368

表 2 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルと CCβ の設定 (例 A)

Sample number	Negative samples	Spike sample (0.5 µg/kg)
1	0	0.355
2	0.09	<u>0.252</u>
3	0	0.532
4	0	0.554
5	0	0.408
6	0.07	0.501
7	0	0.524
8	0.015	0.559
9	0	0.471
10	0.01	0.661
11	0.07	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.64
16	<u>0.137</u>	0.75
17	0.112	0.655
18	0.12	0.66
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

表 3 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルと CCβ の設定 (例 B)

Sample number	Negative samples	Spike sample (0.5 µg/kg)
1	0	0.355
2	0.09	<u>0.132</u>
3	0	0.532
4	0	0.554
5	0	<u>0.135</u>
6	0.07	0.501
7	0	0.524
8	0.015	0.559
9	0	0.471
10	0.01	0.661
11	0.07	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.64
16	<u>0.137</u>	0.75
17	0.112	0.655
18	0.12	0.66
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

表4 スピノカラム(C18FF、C18)からの回収率(%)

化合物	C18FF			合計	C18			合計	
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
1	Acetamiprid	92	0	0	92	92	0	0	92
2	Acibenzolar-S-methyl	95	0	0	95	88	0	0	88
3	Acrinathrin	96	0	0	96	92	0	0	92
4	Ametryn	94	0	0	95	92	0	0	93
5	Anilofos	97	0	0	98	93	0	0	93
6	Atrazine	93	0	0	94	93	0	0	93
7	Azoxystrobin	97	0	0	97	94	0	0	95
8	Benalaxyl	97	0	0	97	94	0	0	95
9	Benzofenap	97	0	0	97	93	0	0	94
10	Bitertanol	100	0	0	100	93	0	0	93
11	Bromacil	97	0	0	97	94	0	0	94
13	Buprofezin	100	0	0	100	96	0	0	96
14	Butafenacil	98	0	0	98	94	0	0	94
15	Cadusafos	96	0	0	96	94	1	0	94
16	Carpropamid	99	0	0	99	95	0	0	95
17	Chlorfenvinphos	98	0	0	98	95	0	0	95
18	Chloridazon	94	0	0	94	93	0	0	94
19	Chloroxuron	97	0	0	97	95	0	0	96
20	Chlorpyrifos	94	0	0	94	84	0	0	84
21	Chromafenozide	101	0	0	101	92	0	0	92
22	Clomeprop	98	0	0	98	95	0	0	95
23	Cloquintocet mexyl	100	0	0	100	94	0	0	94
25	Cumyluron	96	0	0	96	94	0	0	94
26	Cyanazine	94	0	0	94	93	0	0	93
27	Cyazofamid	97	0	0	98	94	0	0	94
28	Cycloprothrin	96	0	0	96	91	0	0	91
29	Cyflufenamid	98	0	0	98	95	0	0	95
30	Cyproconazole	96	0	0	96	93	0	0	94
31	Cyprodinil	95	0	0	95	94	0	0	94
32	Daimuron	96	0	0	96	94	0	0	94
33	Diazinon	95	0	0	95	91	0	0	92
34	Difenoconazole	97	0	0	97	94	0	0	94
35	Diiflubenzuron	99	0	0	99	95	0	0	95
36	Diiflufenican	99	0	0	99	93	0	0	93
37	Dimethirimol	94	1	0	95	93	1	0	94
38	Dimethoate	94	0	0	94	93	0	0	94
39	Dimethomorph	97	0	0	97	93	0	0	93
40	Diuron	95	0	0	95	96	0	0	96
41	Edifenphos	97	0	0	97	95	0	0	95
42	Epoxiconazole	97	0	0	97	94	0	0	94
43	Ethion	97	0	0	97	91	0	0	91
44	Ethiprole	96	0	0	96	93	0	0	94
45	Etoxazole	97	0	0	98	95	0	0	95
46	Etrimfos	96	0	0	96	86	0	0	86
47	Fenamidone	97	0	0	97	95	0	0	95
48	Fenarimol	96	0	0	96	91	0	0	91
49	Fenbuconazole	97	0	0	97	93	0	0	93
50	Fenobucarb	94	0	0	94	90	0	0	90

表 4 (つづき)

化合物	C18FF				C18				
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
51	Fenoxaprop ethyl	97	0	0	98	94	0	0	94
52	Fenoxycarb	98	0	0	98	95	0	0	95
53	Fenpropathrin	93	0	0	93	91	0	0	91
54	Fenpropimorph	114	0	0	114	96	0	0	96
55	Flamprop methyl	97	0	0	97	95	0	0	95
56	Fludioxonil	101	0	0	101	95	0	0	95
57	Flufenacet	97	0	0	97	94	0	0	94
58	Fluquinconazole	97	0	0	97	92	0	0	93
59	Fluridone	96	0	0	96	95	0	0	95
60	Furametpyr	96	1	0	97	94	0	0	95
61	Hexythiazox	93	0	0	93	93	0	0	93
62	Imazalil	93	5	2	99	93	2	0	96
63	Imibenconazole	98	0	0	98	92	0	0	92
64	Indanofan	98	0	0	98	94	0	0	94
65	Indoxacarb	99	0	0	99	95	0	0	95
66	Iprovalicarb	98	0	0	98	93	0	0	93
67	Isoproc carb	93	0	0	93	92	0	0	92
68	Isoxathion	97	0	0	97	98	0	0	98
69	Lactofen	97	0	0	97	93	0	0	94
70	Linuron	95	0	0	95	94	0	0	94
71	Malathion	97	0	0	97	94	0	0	94
72	Mepanipyrim	95	0	0	96	94	0	0	94
73	Metalaxyl	95	0	0	95	93	0	0	93
74	Methabenzthiazuron	95	0	0	95	94	0	0	94
75	Methiocarb	98	1	0	99	93	0	0	93
76	Metolachlor	97	0	0	97	94	0	0	94
77	Monolinuron	94	0	0	94	92	0	0	92
78	Myclobutanil	95	0	0	95	93	0	0	93
79	Naproanilide	96	0	0	96	94	0	0	94
80	Napropamide	97	0	0	97	93	0	0	94
81	Norflurazon	96	0	0	96	95	0	0	96
82	Novaluron	99	0	0	99	91	0	0	91
83	Oxadixyl	96	0	0	96	93	0	0	93
84	Oxaziclomefone	97	0	0	97	94	0	0	94
85	Paclobutrazol	96	0	0	96	94	0	0	94
86	Penconazole	96	0	0	96	91	0	0	92
87	Pencycuron	97	0	0	97	95	0	0	95
88	Phenthoate	98	0	0	99	95	0	0	95
89	Phosalone	97	0	0	97	95	0	0	95
90	Phosphamidon	96	0	0	96	92	0	0	92
91	Piperonyl butoxide	100	0	0	100	94	0	0	95
92	Pirimicarb	95	0	0	95	93	0	0	93
93	Pirimiphos methyl	98	0	0	98	93	0	0	93
94	Prochloraz	99	0	0	100	96	0	0	97
95	Profenofos	96	0	0	96	93	0	0	94
96	Prometryn	95	0	0	96	93	0	0	93
97	Propachlor	94	0	0	94	93	0	0	93
98	Propanil	96	0	0	97	95	0	0	95
99	Propaquizafop	99	0	0	99	95	0	0	95
100	Propargite	94	1	0	95	83	0	0	83

表 4 (つづき)

化合物	C18FF				C18				
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
101	Propiconazole	96	0	0	97	94	0	0	94
102	Propyzamide	96	0	0	96	93	0	0	93
103	Pyraclofos	97	0	0	97	95	0	0	95
104	Pyraclostrobin	96	0	0	97	95	0	0	96
105	Pyrazophos	96	0	0	96	93	0	0	94
106	Pyrifthalid	97	0	0	97	95	0	0	95
107	Pyrimethanil	94	0	0	94	92	0	0	92
108	Pyriproxyfen	96	0	0	96	90	0	0	90
109	Quinalphos	95	0	0	95	93	0	0	93
110	Quinoxifen	96	0	0	96	92	0	0	92
111	Quizalofop ethyl	98	0	0	98	95	0	0	95
112	Simazine	92	0	0	93	92	0	0	92
113	Simeconazole	97	0	0	97	95	0	0	95
114	Spinosyn A	86	4	2	92	83	5	1	90
115	Spinosyn D	81	5	1	87	82	5	2	89
116	Spiroxamine	58	10	5	73	59	15	7	81
117	Tebuconazole	97	0	0	97	93	0	0	93
118	Tebufenpyrad	96	0	0	96	93	0	0	93
119	Tebuthiuron	94	0	0	95	92	0	0	92
120	Terbutryn	96	0	0	97	94	0	0	94
121	Tetrachlorvinphos	97	0	0	98	95	0	0	95
122	Tetraconazole	97	0	0	97	93	0	0	93
123	Thiacloprid	95	0	0	95	94	0	0	94
124	Tolfenpyrad	99	0	0	99	94	0	0	94
125	Triadimefon	95	0	0	96	93	0	0	93
126	Triazophos	98	0	0	98	94	0	0	94
127	Trifloxystrobin	98	0	0	98	94	0	0	94
128	Triflumizole	95	0	0	95	89	1	0	90
129	Triflumuron	99	0	0	99	95	0	0	95
130	Triticonazole	97	0	0	97	94	0	0	94

表5 スピンカラム(C18-AX、SAX)からの回収率(%)

化合物	C18-AX			合計	SAX			合計	
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
1	Acetamiprid	95	0	0	95	94	0	0	94
2	Acibenzolar-5-methyl	99	0	0	99	90	0	0	90
3	Acrinathrin	96	0	0	96	88	0	0	88
4	Ametryn	98	0	0	98	95	0	0	95
5	Anilofos	98	0	0	98	93	0	0	93
6	Atrazine	97	0	0	97	83	0	0	84
7	Azoxystrobin	98	0	0	98	95	0	0	95
8	Benalaxyl	98	0	0	98	95	0	0	95
9	Benzofenap	97	0	0	97	98	0	0	98
10	Bitertanol	100	0	0	100	85	0	0	85
11	Bromacil	98	0	0	98	85	0	0	85
13	Buprofezin	99	0	0	99	88	0	0	88
14	Butafenacil	98	0	0	98	93	0	0	93
15	Cadusafos	98	0	0	98	86	1	0	87
16	Carpropamid	97	0	0	97	90	0	0	90
17	Chlorfenvinphos	97	0	0	97	96	0	0	96
18	Chloridazon	96	0	0	96	91	1	0	92
19	Chloroxuron	98	0	0	98	95	0	0	96
20	Chlorpyrifos	97	0	0	97	95	0	0	95
21	Chromafenozone	97	0	0	97	85	0	0	85
22	Clomeprop	96	0	0	97	88	0	0	88
23	Cloquintocet mexyl	99	0	0	99	95	0	0	95
25	Cumyluron	97	0	0	97	95	0	0	96
26	Cyanazine	97	0	0	97	83	0	0	83
27	Cyazofamid	98	0	0	98	86	0	0	86
28	Cycloprothrin	97	0	0	97	90	0	0	90
29	Cyflufenamid	98	0	0	98	91	0	0	91
30	Cyproconazole	98	0	0	98	84	0	0	84
31	Cyprodinil	97	0	0	97	96	0	0	96
32	Daimuron	97	0	0	97	90	0	0	91
33	Diazinon	97	0	0	97	99	0	0	99
34	Difenoconazole	97	0	0	97	93	0	0	93
35	Diflubenzuron	97	0	0	97	85	1	0	86
36	Diflufenican	102	0	0	102	87	0	0	87
37	Dimethirimol	98	1	0	99	97	0	0	97
38	Dimethoate	96	0	0	96	93	0	0	93
39	Dimethomorph	98	0	0	98	86	0	0	86
40	Diuron	99	0	0	100	90	1	0	91
41	Edifenphos	98	0	0	98	94	0	0	94
42	Epoxiconazole	97	0	0	97	89	0	0	89
43	Ethion	98	0	0	98	81	0	0	81
44	Ethiprole	97	0	0	97	90	0	0	90
45	Etoxazole	98	0	0	98	96	0	0	96
46	Etrifos	98	0	0	98	102	0	0	102
47	Fenamidone	97	0	0	98	87	0	0	87
48	Fenarimol	98	0	0	98	87	0	0	87
49	Fenbuconazole	98	0	0	98	89	0	0	89
50	Fenobucarb	97	0	0	97	90	0	0	90

表 5(つづき)

化合物	C18-AX			合計	SAX			合計	
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3		
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
51	Fenoxaprop ethyl	98	0	0	98	93	0	0	93
52	Fenoxycarb	99	0	0	99	90	0	0	90
53	Fenpropathrin	96	0	0	96	81	0	0	81
54	Fenpropimorph	112	0	0	112	111	7	1	119
55	Flamprop methyl	98	0	0	98	90	0	0	91
56	Fludioxonil	102	0	0	102	87	1	0	88
57	Flufenacet	98	0	0	98	92	0	0	92
58	Fluquinconazole	98	0	0	98	91	0	0	91
59	Fluridone	97	0	0	98	96	0	0	96
60	Furametpyr	97	0	0	98	89	0	0	89
61	Hexythiazox	102	0	0	103	84	0	0	84
62	Imazalil	101	1	0	101	99	0	0	99
63	Imibenconazole	95	0	0	95	91	0	0	91
64	Indanofan	97	0	0	97	88	0	0	88
65	Indoxacarb	97	0	0	97	92	0	0	92
66	Iprovalicarb	99	0	0	99	91	0	0	91
67	Isoprocarb	100	0	0	100	92	0	0	92
68	Isoxathion	96	0	0	96	94	0	0	94
69	Lactofen	97	0	0	97	96	0	0	97
70	Linuron	98	0	0	98	90	0	0	91
71	Malathion	98	0	0	98	93	0	0	93
72	Mepanipyrim	98	0	0	98	94	0	0	94
73	Metalaxyl	97	0	0	97	95	0	0	95
74	Methabenzthiazuron	97	0	0	97	92	0	0	93
75	Methiocarb	100	0	0	100	88	0	0	88
76	Metolachlor	98	0	0	98	94	0	0	94
77	Monolinuron	98	0	0	98	92	0	0	92
78	Myclobutanil	97	0	0	97	89	0	0	89
79	Naproanilide	97	0	0	97	93	0	0	93
80	Napropamide	98	0	0	98	94	0	0	94
81	Norflurazon	98	0	0	99	91	0	0	92
82	Novaluron	99	0	0	99	84	0	0	84
83	Oxadixyl	96	0	0	96	94	0	0	94
84	Oxaziclomefone	98	0	0	98	93	0	0	93
85	Paclobutrazol	98	0	0	98	83	0	0	83
86	Penconazole	98	0	0	98	91	0	0	91
87	Pencycuron	98	0	0	98	94	0	0	94
88	Phenthoate	100	0	0	100	89	0	0	89
89	Phosalone	97	0	0	97	93	0	0	93
90	Phosphamidon	96	0	0	96	96	0	0	96
91	Piperonyl butoxide	98	0	0	98	87	0	0	87
92	Pirimicarb	98	0	0	98	97	0	0	97
93	Pirimiphos methyl	99	0	0	99	94	0	0	94
94	Prochloraz	98	0	0	99	89	0	0	89
95	Profenofos	96	0	0	96	97	0	0	97
96	Prometryn	98	0	0	98	99	0	0	99
97	Propachlor	98	0	0	98	97	0	0	97
98	Propanil	103	0	0	103	81	0	0	81
99	Propaquizafop	97	0	0	97	93	0	0	93
100	Propargite	99	0	0	100	82	2	2	86

表 5(つづき)

化合物	C18-AX				SAX				
	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	合計	
	負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		負荷液 +0.1 mL	0.1~0.2 mL	0.2~0.3 mL		
101	Propiconazole	97	0	0	97	94	0	0	94
102	Propyzamide	97	0	0	97	90	0	0	90
103	Pyraclufos	98	0	0	98	93	0	0	93
104	Pyraclostrobin	97	0	0	97	96	0	0	96
105	Pyrazophos	98	0	0	98	92	0	0	92
106	Pyrifthalid	97	0	0	98	97	0	0	97
107	Pyrimethanil	97	0	0	97	97	0	0	97
108	Pyriproxyfen	99	0	0	99	91	0	0	91
109	Quinalphos	102	0	0	102	94	0	0	94
110	Quinoxifen	97	0	0	97	87	0	0	87
111	Quizalofop ethyl	98	0	0	98	93	0	0	93
112	Simazine	98	0	0	98	84	0	0	84
113	Simeconazole	98	0	0	98	90	0	0	90
114	Spinosyn A	87	1	0	88	89	0	0	89
115	Spinosyn D	99	1	0	100	97	0	0	97
116	Spiroxamine	83	9	3	95	100	0	0	100
117	Tebuconazole	98	0	0	98	88	0	0	88
118	Tebufenpyrad	96	0	0	96	91	0	0	91
119	Tebuthiuron	98	0	0	98	88	0	0	88
120	Terbutryn	98	0	0	98	95	0	0	95
121	Tetrachlorvinphos	98	0	0	98	95	0	0	95
122	Tetraconazole	98	0	0	98	92	0	0	92
123	Thiacloprid	96	0	0	96	93	0	0	93
124	Tolfenpyrad	98	0	0	98	89	0	0	89
125	Triadimefon	98	0	0	98	92	0	0	92
126	Triazophos	99	0	0	99	92	0	0	92
127	Trifloxystrobin	98	0	0	98	93	0	0	93
128	Triflumizole	98	0	0	99	92	0	0	92
129	Triflumuron	99	0	0	99	87	0	0	87
130	Triticonazole	98	0	0	98	88	0	0	88

秤 取

- ↓ 試料 10.0 g
- ↓ アセトニトリル 10 mL を加える
- ↓ 1 分間振とう
- ↓ 無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加える
- ↓ 1 分間振とう
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間)
- ↓ アセトニトリルで 10 mL に定容 (抽出液)

Monospin C18 精製

- ↓ アセトニトリル 0.1 mL を加え、遠心分離 (毎分 3000 回転、1 分間)
- ↓ 抽出液 0.2 mL を負荷
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、1 分間)
- ↓ アセトニトリル 0.1 mL を加え、遠心分離 (毎分 3000 回転、1 分間)
- ↓ アセトニトリル 0.5 mL に定容

LC-TOF-MS 測定

図 1 試験溶液の調製方法

表 6 添加回収試験結果

	化合物	りんご		ほうれんそう	
		真度(%)	併行精度 (RSD%)	真度(%)	併行精度 (RSD%)
1	Acetamiprid	97	10	78	3
2	Acibenzolar-S-methyl	97	6	80	8
3	Acrinathrin	87	11	88	2
4	Ametryn	83	3	86	1
5	Anilofos	81	3	85	1
6	Atrazine	77	4	85	1
7	Azoxystrobin	82	3	87	2
8	Benalaxyl	82	5	86	1
9	Benzofenap	80	5	80	1
10	Bitertanol	113	12	86	4
11	Boscalid	106	20	88	1
12	Bromacil	76	11	72	4
13	Buprofezin	81	3	80	1
14	Butafenacil	79	7	89	2
15	Cadusafos	79	5	85	2
16	Carpropamid	91	12	82	2
17	Chlorfenvinphos	86	7	84	1
18	Chloridazon	81	7	74	3
19	Chloroxuron	84	3	88	1
20	Chlorpyrifos	90	8	92	4
21	Chromafenozide	82	8	88	3
22	Clomeprop	84	8	66	2
23	Cloquintocet mexyl	81	5	83	2
24	Clothianidin	89	14	82	2
25	Cumyluron	82	5	88	1
26	Cyanazine	81	7	84	2
27	Cyazofamid	88	7	87	1
28	Cycloprothrin	111	24	84	4
29	Cyflufenamid	75	6	88	1
30	Cyproconazole	81	3	89	3
31	Cyprodinil	88	5	85	1
32	Daimuron	84	6	89	1
33	Diazinon	59	56	83	2
34	Difenoconazole	93	8	83	2
35	Diflubenzuron	92	20	83	3
36	Diflufenican	81	10	84	3
37	Dimethirimol	71	4	81	1
38	Dimethoate	79	5	80	2
39	Dimethomorph	85	3	86	1
40	Diuron	79	5	76	0.5
41	Edifenphos	83	6	86	1
42	Epoxiconazole	94	6	86	2
43	Ethion	84	9	82	1
44	Ethiprole	85	5	87	3
45	Etoxazole	79	2	85	1
46	Etrimfos	76	11	92	7
47	Fenamidone	80	6	88	2
48	Fenarimol	77	18	86	3
49	Fenbuconazole	85	12	85	3
50	Fenobucarb	86	7	89	3

表 6 (つづき)

化合物	りんご		ほうれんそう		
	真度(%)	併行精度 (RSD%)	真度(%)	併行精度 (RSD%)	
51	Fenoxaprop ethyl	78	3	87	1
52	Fenoxycarb	82	7	88	1
53	Fenpropathrin	95	12	82	3
54	Fenpropimorph	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
55	Flamprop methyl	89	8	89	2
56	Fludioxonil	91	26	99	2
57	Flufenacet	86	8	87	2
58	Fluquinconazole	96	9	86	2
59	Fluridone	84	1	86	0.5
60	Furametpyr	77	3	86	2
61	Hexythiazox	75	14	90	5
62	Imazalil	93	5	84	1
63	Imibenconazole	68	10	58	3
64	Indanofan	84	9	86	5
65	Indoxacarb	86	7	84	2
66	Iprovalicarb	89	4	86	2
67	Isoprocarb	95	5	93	4
68	Isoxathion	84	5	86	2
69	Lactofen	80	2	80	2
70	Linuron	83	9	86	2
71	Malathion	82	8	90	2
72	Mepanipyrim	82	2	87	1
73	Metalaxyl	84	4	85	1
74	Methabenzthiazuron	81	3	80	2
75	Methiocarb	91	13	94	7
76	Metolachlor	81	5	85	1
77	Monolinuron	81	8	84	2
78	Myclobutanil	85	6	88	1
79	Naproanilide	76	6	86	2
80	Napropamide	85	5	86	2
81	Norflurazon	83	2	88	0.4
82	Novaluron	69	9	82	4
83	Oxadixyl	89	10	83	3
84	Oxaziclomefone	79	6	84	1
85	Paclobutrazol	82	5	88	3
86	Penconazole	71	5	86	2
87	Pencycuron	80	3	86	1
88	Phenthoate	83	9	85	3
89	Phosalone	79	9	84	2
90	Phosphamidon	86	4	83	2
91	Piperonyl butoxide	82	10	89	2
92	Pirimicarb	78	3	84	1
93	Pirimiphos methyl	85	7	83	2
94	Prochloraz	76	6	84	1
95	Profenofos	73	4	79	1
96	Prometryn	86	4	86	1
97	Propachlor	87	6	83	1
98	Propanil	105	8	95	2
99	Propaquizafop	79	5	77	1
100	Propargite	95	5	92	3

表 6 (つづき)

化合物	りんご		ほうれんそう		
	真度(%)	併行精度 (RSD%)	真度(%)	併行精度 (RSD%)	
101	Propiconazole	87	10	85	2
102	Propyzamide	84	16	89	1
103	Pyraclufos	84	3	87	1
104	Pyraclostrobin	83	28	87	1
105	Pyrazophos	79	3	86	1
106	Pyrifthalid	83	2	86	1
107	Pyrimethanil	88	8	80	2
108	Pyriproxyfen	83	6	87	1
109	Quinalphos	82	2	86	2
110	Quinoxifen	74	5	83	1
111	Quizalofop ethyl	84	4	84	1
112	Simazine	83	6	83	2
113	Simeconazole	86	3	90	2
114	Spinosyn A	82	3	84	1
115	Spinosyn D	89	8	90	3
116	Spiroxamine	85	4	88	1
117	Tebuconazole	73	12	87	1
118	Tebufenpyrad	82	4	74	1
119	Tebuthiuron	79	4	81	2
120	Terbutryn	81	5	85	1
121	Tetrachlorvinphos	74	6	84	1
122	Tetraconazole	89	7	88	2
123	Thiacloprid	82	6	80	2
124	Tolfenpyrad	78	1	84	1
125	Triadimefon	86	10	87	1
126	Triazophos	81	5	88	1
127	Trifloxystrobin	99	32	87	1
128	Triflumizole	74	3	85	2
129	Triflumuron	76	6	87	3
130	Triticonazole	76	8	89	2

^a 妨害

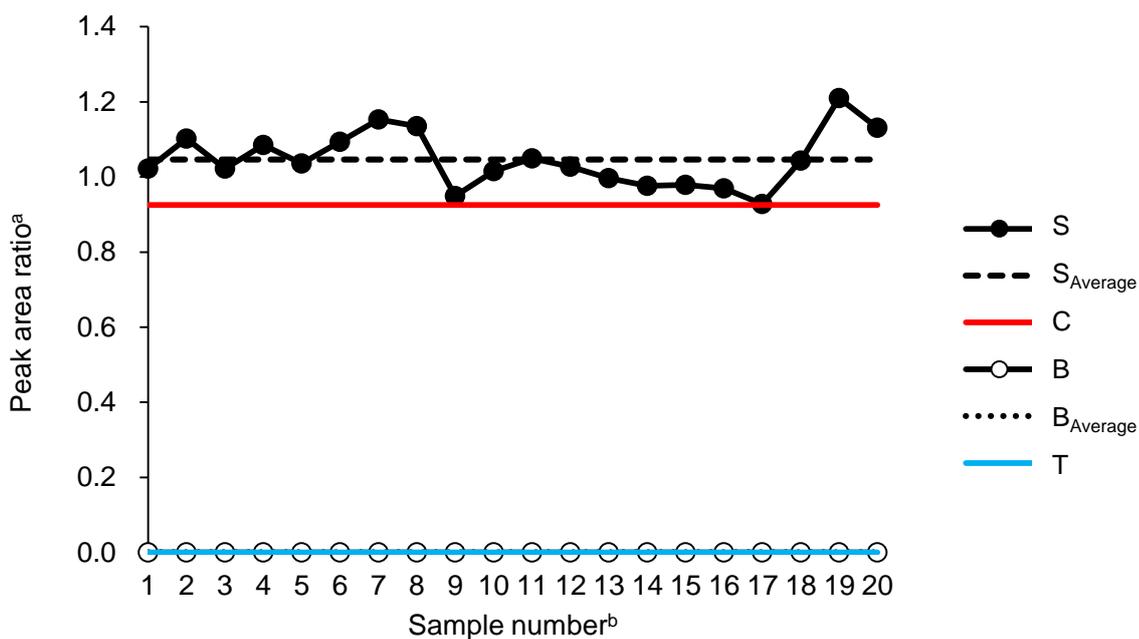


図 2. アザペロンの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$$

S_{Average}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

B: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

B_{Average}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

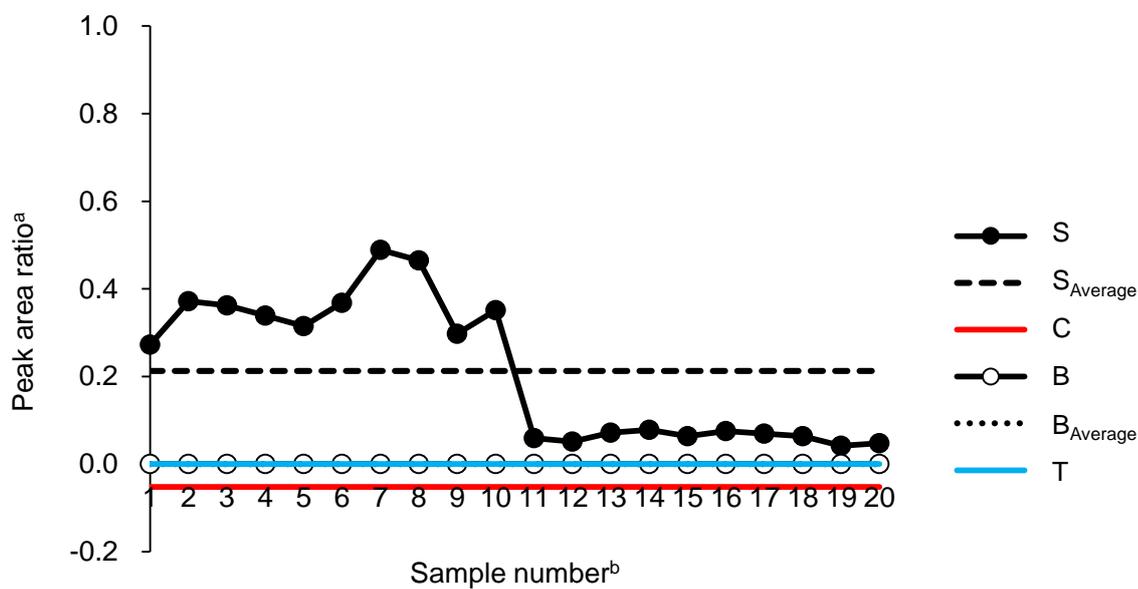


図 3. オラキンドックスの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

S_{Average}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

B: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

B_{Average}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

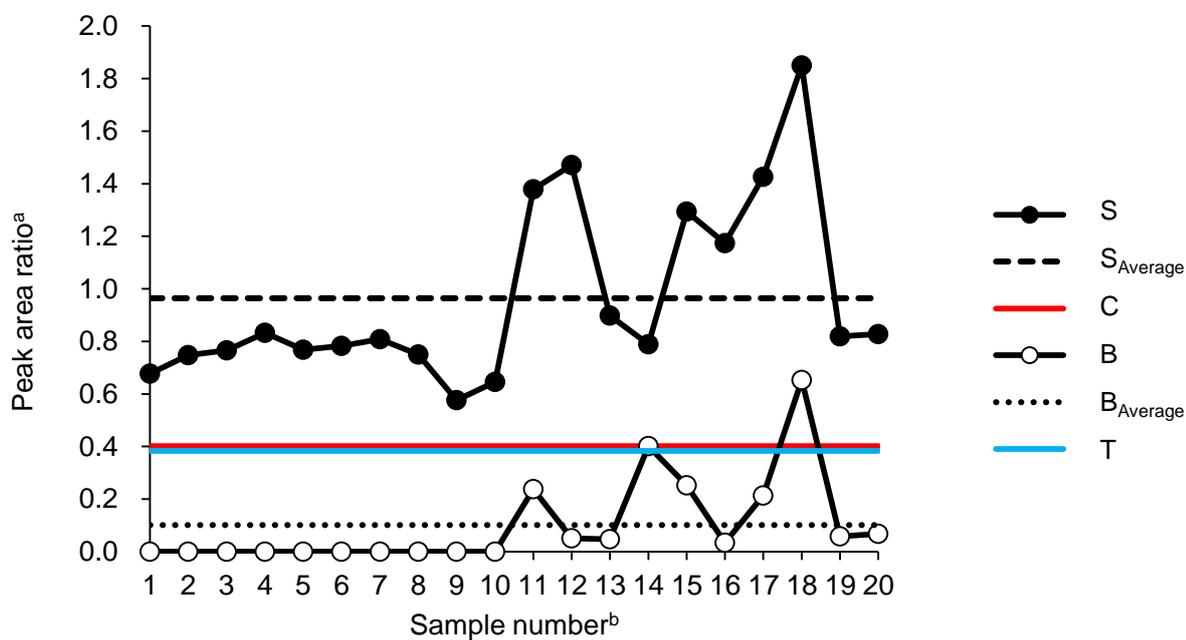


図 4. スルファチアゾールの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$$

S_{Average}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

B: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

B_{Average}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

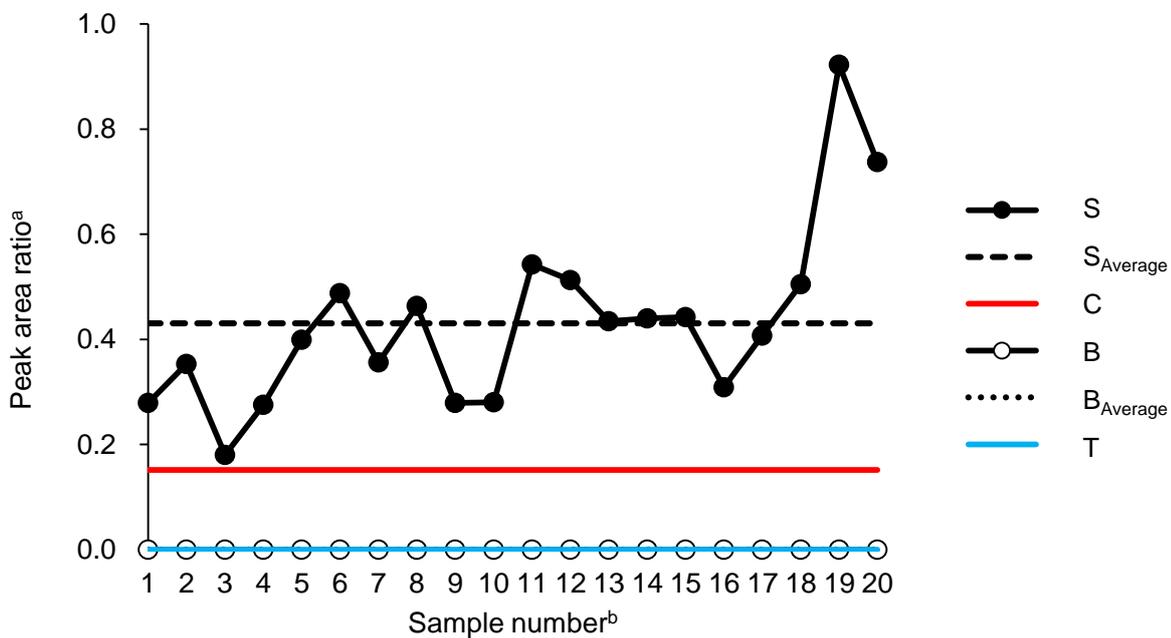


図 5. ダノフロキサシンの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

S_{Average} : 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD} : 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

B: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

B_{Average} : ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD} : ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

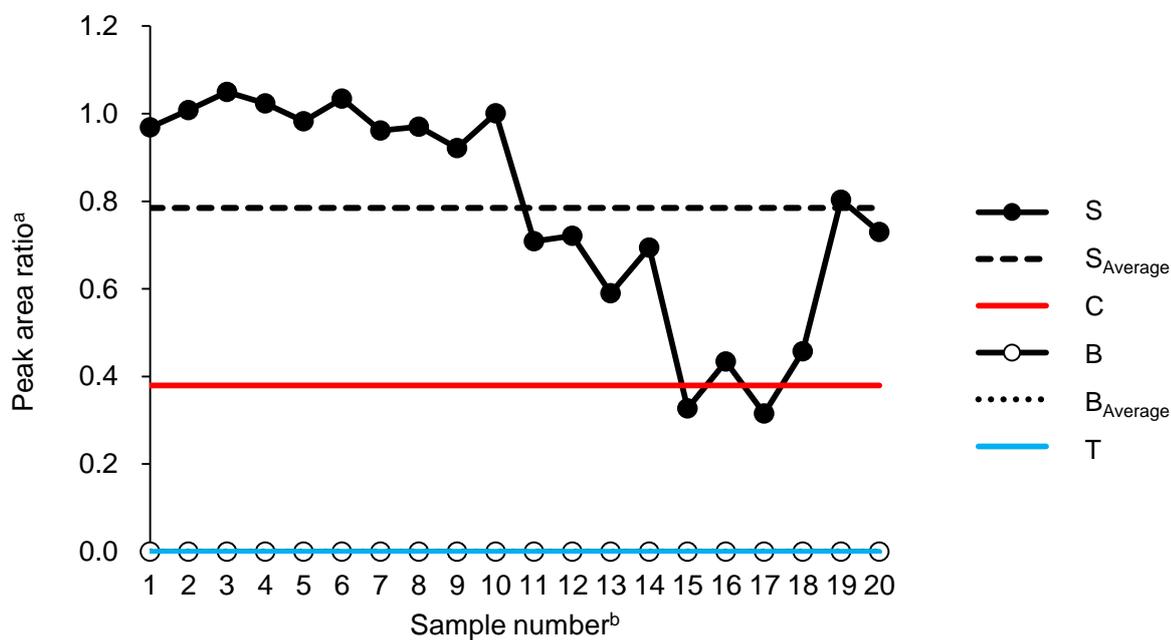


図 6. 5-ヒドロキシチアベンダゾールの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

S_{Average}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

S_{SD}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差

B: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

B_{Average}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値

B_{SD}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差



図 7. S(標準溶液に対する添加試料のピーク面積比) < C(カットオフ値)となる試料の数
 A : $C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$ 、B : $C = S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$

数字は化合物数

表7 牛乳のスクリーニング分析の性能評価結果

		ブランク試料			添加試料			性能要件への適合				備考	
		B _{AVERAGE}	B _{SD}	T	S _{AVERAGE}	S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -1.64×S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -2.33×S _{SD}	①	②	③		④
1	2-Acetylmisofenbutrazole	0.00	0.00	0.00	1.00	0.14	0.77	0.67	○	○	○	○	
2	Abendazole	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.94	○	○	○	○	
3	Alrenogest	0.00	0.00	0.00	0.84	0.04	0.76	0.73	○	○	○	○	
4	Azaperone	0.00	0.00	0.00	1.06	0.06	0.96	0.91	○	○	○	○	
5	Benzocaine	0.00	0.00	0.00	0.60	0.04	0.53	0.50	○	○	○	○	
6	Bromacil	0.00	0.00	0.00	1.10	0.15	0.85	0.75	○	○	○	○	
7	Butizolam	0.00	0.00	0.00	1.08	0.04	1.01	0.98	○	○	○	○	
8	Cefoperazone	0.00	0.00	0.00	0.94	0.27	0.50	0.32	×	×	×	×	低感度
9	Chlormadinone	0.00	0.00	0.00	1.01	0.07	0.90	0.85	○	○	○	○	
10	Cisbucol	0.00	0.00	0.00	1.04	0.05	0.97	0.93	○	○	○	○	
11	Danofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.34	0.10	0.18	0.11	○	○	×	×	
12	Dexamethasone	0.00	0.00	0.00	0.99	0.09	0.85	0.79	○	○	○	○	
13	Diazepam	0.00	0.00	0.00	0.75	0.15	0.51	0.40	○	○	○	○	
14	Dicyclanil	0.00	0.00	0.00	0.91	0.06	0.81	0.77	○	○	○	○	
15	Difloxacin	0.00	0.00	0.00	0.64	0.08	0.52	0.47	○	○	○	○	
16	Difluzuron	0.00	0.00	0.00	1.02	0.07	0.90	0.86	○	○	○	○	
17	Emamectin Benzoate	0.00	0.00	0.00	0.96	0.06	0.87	0.83	○	○	○	○	
18	Enrofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.50	0.09	0.35	0.28	○	○	○	○	
19	Ethopazine	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	0.99	0.94	○	○	○	○	
20	Fampridine	0.00	0.00	0.00	1.07	0.05	0.99	0.96	○	○	○	○	
21	Fenobucarb	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.53	0.48	○	○	○	○	
22	Flubendazole	0.00	0.00	0.00	1.08	0.04	1.01	0.98	○	○	○	○	
23	Flumequine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.08	0.74	0.68	○	○	○	○	
24	Floxacin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.93	○	○	○	○	
25	Halofuginone	0.00	0.00	0.00	0.64	0.10	0.48	0.41	○	○	○	○	
26	5-Hydroxythiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.99	0.04	0.93	0.90	○	○	○	○	
27	Ketoprofen	0.00	0.00	0.00	1.06	0.05	0.98	0.94	○	○	○	○	
28	Levamisole	0.00	0.00	0.00	0.93	0.04	0.87	0.85	○	○	○	○	
29	Lincomycin	0.00	0.00	0.00	0.93	0.04	0.86	0.83	○	○	○	○	
30	Mafloxacin	0.00	0.00	0.00	1.04	0.02	1.00	0.99	○	○	○	○	
31	Marfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.31	0.08	0.18	0.12	○	○	×	×	
32	Mebendazole	0.00	0.00	0.00	1.06	0.03	1.02	1.00	○	○	○	○	
33	Mebexicam	0.00	0.00	0.00	0.88	0.04	0.82	0.79	○	○	○	○	
34	Mebutone	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	0.99	0.95	○	○	○	○	
35	Methylprednisolone	0.00	0.00	0.00	1.09	0.08	0.96	0.91	○	○	○	○	
36	Mifloxacin	0.00	0.00	0.00	0.59	0.13	0.39	0.30	○	○	○	○	
37	Morantel	0.00	0.00	0.00	0.72	0.03	0.68	0.66	○	○	○	○	
38	Nalidixic acid	0.00	0.00	0.00	0.85	0.07	0.73	0.68	○	○	○	○	
39	Ofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.37	0.10	0.21	0.14	○	○	○	×	
40	Oquinox	0.00	0.00	0.00	0.36	0.07	0.25	0.20	○	○	○	○	
41	Orfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.74	0.06	0.64	0.60	○	○	○	○	
42	Omeprazole	0.00	0.00	0.00	0.95	0.04	0.87	0.84	○	○	○	○	
43	Oxibendazole	0.00	0.00	0.00	1.04	0.02	1.01	0.99	○	○	○	○	
44	Oxolinic acid	0.00	0.00	0.00	0.62	0.17	0.34	0.22	○	○	○	○	
45	Phenoxymethylpenicillin	0.00	0.01	0.01	0.72	0.15	0.46	0.36	×	×	×	×	低感度
46	Praziquantel	0.00	0.00	0.00	1.09	0.04	1.03	1.00	○	○	○	○	
47	Prednisolone	0.00	0.00	0.00	1.08	0.11	0.89	0.82	○	○	○	○	
48	Priflutim bromide	0.00	0.00	0.00	0.90	0.02	0.87	0.86	○	○	○	○	
49	Pyrantel	0.00	0.00	0.00	0.85	0.02	0.81	0.80	○	○	○	○	
50	Pyrimethamine	0.00	0.00	0.00	1.00	0.02	0.96	0.94	○	○	○	○	
51	Robenidine	0.00	0.00	0.00	0.83	0.10	0.67	0.60	○	○	○	○	
52	Sarafloxacin	0.00	0.00	0.00	0.56	0.08	0.43	0.37	○	○	○	○	
53	Sulfabenzamide	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
54	Sulfabromomethazine	0.00	0.00	0.00	0.84	0.06	0.75	0.71	○	○	○	○	
55	Sulfacetamide	0.00	0.00	0.00	0.74	0.10	0.57	0.50	○	○	○	○	
56	Sulfachlorpyridazine	0.01	0.03	0.06	0.84	0.08	0.71	0.66	○	○	○	○	
57	Sulfadiazine	0.00	0.00	0.00	0.40	0.23	0.03	-0.13	○	×	×	×	
58	Sulfadimethoxine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
59	Sulfadimidine	0.00	0.00	0.00	0.78	0.06	0.67	0.63	○	○	○	○	
60	Sulfadoxine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
61	Sulfathiazopyridazine	0.00	0.00	0.00	0.77	0.08	0.64	0.59	○	○	○	○	
62	Sulfamerazine	0.00	0.00	0.00	0.79	0.07	0.67	0.62	○	○	○	○	
63	Sulfamethoxazole	0.00	0.00	0.00	0.87	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
64	Sulfamethoxypyridazine	0.00	0.00	0.00	0.75	0.06	0.65	0.61	○	○	○	○	
65	Sulfamonomethoxine	0.00	0.00	0.00	0.84	0.06	0.74	0.70	○	○	○	○	
66	Sulfapyridine	0.00	0.00	0.01	0.90	0.13	0.69	0.60	○	○	○	○	
67	Sulfaquinoxaline	0.00	0.00	0.00	0.78	0.04	0.71	0.68	○	○	○	○	
68	Sulfathiazole	0.00	0.00	0.00	0.74	0.08	0.61	0.55	○	○	○	○	
69	Sulfathoxazole	0.00	0.00	0.00	0.87	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
70	Temephos	0.00	0.00	0.00	1.01	0.13	0.79	0.70	○	○	○	○	
71	Thiabendazole	0.00	0.00	0.00	1.04	0.10	0.87	0.80	○	○	○	○	
72	Thiamulin	0.00	0.00	0.00	1.00	0.03	0.95	0.92	○	○	○	○	
73	Thiolenamic acid	0.00	0.00	0.00	0.89	0.05	0.81	0.78	○	○	○	○	
74	Thiorenolone	0.00	0.00	0.00	0.96	0.05	0.88	0.85	○	○	○	○	
75	Trichlorfon	0.00	0.00	0.00	0.77	0.12	0.57	0.49	○	○	○	○	
76	Trimethoprim	0.00	0.00	0.00	0.93	0.09	0.78	0.72	○	○	○	○	
77	Triphenamine	0.00	0.00	0.00	0.90	0.06	0.80	0.76	○	○	○	○	
78	Tylosin	0.00	0.00	0.00	1.04	0.33	0.49	0.26	○	○	○	○	
79	Vahemulin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.04	0.95	0.93	○	○	○	○	
80	Warfarin	0.00	0.00	0.00	1.06	0.04	1.00	0.97	○	○	○	○	
81	Xylazine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.05	0.77	0.74	○	○	○	○	

性能要件①: C>T、添加試料のピーク S/N \geq 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件②: C>T、添加試料のピーク S/N \geq 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 性能要件③: C>T、C \geq 0.2、添加試料のピーク S/N \geq 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件④: C>T、C \geq 0.2、添加試料のピーク S/N \geq 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 ○: 適合、×: 不適合

表 8 牛肉のスクリーニング分析の性能評価結果

		ブランク試料			添加試料			性能要件への適合				備考	
		B _{AVERAGE}	B _{SD}	T	S _{AVERAGE}	S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -1.64×S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -2.33×S _{SD}	①	②	③		④
1	2-Acetylmisofluthazole	0.00	0.00	0.00	0.85	0.11	0.66	0.58	○	○	○	○	
2	A benzazole	0.00	0.00	0.00	0.88	0.03	0.83	0.80	○	○	○	○	
3	Atrenogest	0.00	0.00	0.00	0.57	0.07	0.46	0.42	○	○	○	○	
4	Azaperone	0.00	0.00	0.00	1.03	0.08	0.89	0.84	○	○	○	○	
5	Benzocaine	0.00	0.00	0.00	0.63	0.04	0.56	0.53	○	○	○	○	
6	Bromacil	0.00	0.00	0.00	0.91	0.05	0.84	0.81	○	○	○	○	
7	Butizolam	0.00	0.00	0.00	1.18	0.11	1.01	0.93	○	○	○	○	
8	Cefoperazone	0.00	0.00	0.00	0.65	0.30	0.16	-0.05	×	×	×	×	低感度
9	Chlormadinone	0.00	0.00	0.00	0.59	0.04	0.52	0.49	○	○	○	○	
10	Cisbambol	0.00	0.00	0.00	0.91	0.05	0.82	0.79	○	○	○	○	
11	Danofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.53	0.18	0.23	0.11	○	○	○	×	
12	Dexamethasone	0.00	0.00	0.00	0.87	0.11	0.70	0.63	○	○	○	○	
13	Diazepam	0.00	0.00	0.00	0.66	0.03	0.62	0.60	○	○	○	○	
14	Dicyclanil	0.00	0.00	0.00	0.74	0.07	0.62	0.56	○	○	○	○	
15	Difloxacin	0.00	0.00	0.00	0.75	0.08	0.62	0.57	○	○	○	○	
16	Difluzuron	0.00	0.00	0.00	0.27	0.07	0.15	0.10	○	○	×	×	
17	Emamectin Benzoate	0.00	0.00	0.00	0.93	0.22	0.57	0.42	○	○	○	○	
18	Enrofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.68	0.10	0.51	0.44	○	○	○	○	
19	Ethopazine	0.00	0.00	0.00	0.98	0.08	0.85	0.79	○	○	○	○	
20	Fampridine	0.00	0.00	0.00	0.97	0.05	0.90	0.86	○	○	○	○	
21	Fenobucarb	0.00	0.00	0.00	0.69	0.05	0.61	0.58	○	○	○	○	
22	Flubendazole	0.00	0.00	0.00	1.03	0.04	0.96	0.93	○	○	○	○	
23	Flumequine	0.00	0.00	0.00	0.94	0.08	0.81	0.76	○	○	○	○	
24	Flunixin	0.00	0.00	0.00	0.94	0.02	0.90	0.89	○	○	○	○	
25	Halofuginone	0.00	0.00	0.00	0.59	0.04	0.52	0.49	○	○	○	○	
26	5-Hydroxythiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.58	0.18	0.28	0.16	○	○	○	×	
27	Ketoprofen	0.00	0.00	0.00	0.98	0.05	0.90	0.87	○	○	○	○	
28	Levamisole	0.00	0.00	0.00	0.88	0.04	0.82	0.79	○	○	○	○	
29	Lincomycin	0.00	0.00	0.00	0.71	0.04	0.64	0.61	○	○	○	○	
30	Mafloxacin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.94	○	○	○	○	
31	Marfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.48	0.11	0.29	0.21	○	○	○	○	
32	Mebendazole	0.00	0.00	0.00	1.03	0.04	0.97	0.95	○	○	○	○	
33	Mebexicam	0.00	0.00	0.00	0.87	0.05	0.79	0.76	○	○	○	○	
34	Mebutone	0.00	0.00	0.00	0.91	0.08	0.78	0.72	○	○	○	○	
35	Methylprednisolone	0.00	0.00	0.00	0.98	0.11	0.80	0.72	○	○	○	○	
36	Mifloxacin	0.00	0.00	0.00	0.77	0.13	0.57	0.48	○	○	○	○	
37	Morantel	0.00	0.00	0.00	0.76	0.04	0.70	0.68	○	○	○	○	
38	Nalidixic acid	0.00	0.00	0.00	0.99	0.09	0.83	0.77	○	○	○	○	
39	Ofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.52	0.06	0.42	0.38	○	○	○	○	
40	Oquinox	0.00	0.00	0.00	0.06	0.01	0.04	0.03	○	○	×	×	
41	Orfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.71	0.06	0.62	0.58	○	○	○	○	
42	Ometoprim	0.00	0.00	0.00	0.89	0.03	0.85	0.83	○	○	○	○	
43	Oxibendazole	0.00	0.00	0.00	0.97	0.03	0.92	0.90	○	○	○	○	
44	Oxolinic acid	0.00	0.00	0.00	0.74	0.11	0.55	0.47	○	○	○	○	
45	Phenoxymethylpenicillin	0.01	0.02	0.05	0.86	0.23	0.48	0.32	×	×	×	×	低感度
46	Praziquantel	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	1.00	0.96	○	○	○	○	
47	Prednisolone	0.00	0.00	0.00	0.89	0.07	0.77	0.72	○	○	○	○	
48	Prinidazole	0.00	0.00	0.00	0.90	0.03	0.84	0.82	○	○	○	○	
49	Pyrantel	0.00	0.00	0.00	0.85	0.04	0.78	0.75	○	○	○	○	
50	Pyrimethamine	0.00	0.00	0.00	0.90	0.03	0.85	0.83	○	○	○	○	
51	Robenidine	0.00	0.00	0.00	0.66	0.09	0.52	0.46	○	○	○	○	
52	Sarafloxacin	0.00	0.00	0.00	0.53	0.16	0.26	0.14	○	○	○	×	
53	Sulfabenzamide	0.00	0.00	0.00	0.62	0.06	0.52	0.48	○	○	○	○	
54	Sulfabromomethazine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
55	Sulfacetamide	0.00	0.00	0.00	0.15	0.06	0.05	0.01	○	○	×	×	
56	Sulfachlorpyridazine	0.00	0.00	0.00	0.72	0.06	0.63	0.58	○	○	○	○	
57	Sulfadiazine	0.00	0.00	0.00	0.42	0.07	0.30	0.25	○	○	○	○	
58	Sulfadimethoxine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
59	Sulfadimidine	0.00	0.00	0.00	0.71	0.06	0.61	0.56	○	○	○	○	
60	Sulfadoxine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
61	Sulfathiazopyridazine	0.00	0.00	0.00	0.73	0.07	0.62	0.58	○	○	○	○	
62	Sulfamerazine	0.00	0.00	0.00	0.73	0.04	0.66	0.63	○	○	○	○	
63	Sulfamethoxazole	0.02	0.03	0.06	0.72	0.06	0.62	0.58	○	○	○	○	
64	Sulfamethoxypyridazine	0.00	0.00	0.00	0.59	0.11	0.40	0.32	○	○	○	○	
65	Sulfamonomethoxine	0.00	0.00	0.00	0.76	0.06	0.66	0.62	○	○	○	○	
66	Sulfapyridine	0.00	0.00	0.00	0.66	0.05	0.58	0.55	○	○	○	○	
67	Sulfaquinoxaline	0.00	0.00	0.00	0.72	0.05	0.63	0.60	○	○	○	○	
68	Sulfathiazole	0.20	0.20	0.53	1.19	0.35	0.61	0.37	○	×	○	×	
69	Sulfatiazoxazole	0.00	0.00	0.00	0.85	0.07	0.73	0.67	○	○	○	○	
70	Temephos	0.00	0.00	0.00	0.54	0.05	0.47	0.44	○	○	○	○	
71	Thiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.83	0.04	0.77	0.74	○	○	○	○	
72	Thiamulin	0.00	0.00	0.00	0.97	0.04	0.91	0.88	○	○	○	○	
73	Thiolenamic acid	0.00	0.00	0.00	0.65	0.05	0.57	0.54	○	○	○	○	
74	Thiorenolone	0.00	0.00	0.00	0.72	0.02	0.68	0.67	○	○	○	○	
75	Trichlorfon	0.00	0.00	0.00	0.59	0.05	0.51	0.48	○	○	○	○	
76	Trimethoprim	0.00	0.00	0.00	0.79	0.03	0.74	0.72	○	○	○	○	
77	Triphenamine	0.00	0.00	0.00	1.00	0.06	0.89	0.85	○	○	○	○	
78	Tylosin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.19	0.70	0.57	○	○	○	○	
79	Vahemulin	0.00	0.00	0.00	0.85	0.06	0.75	0.70	○	○	○	○	
80	Warfarin	0.00	0.00	0.00	0.80	0.09	0.66	0.60	○	○	○	○	
81	Xylazine	0.00	0.00	0.00	0.80	0.04	0.74	0.71	○	○	○	○	

性能要件①: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件②: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 性能要件③: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件④: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 ○: 適合、×: 不適合

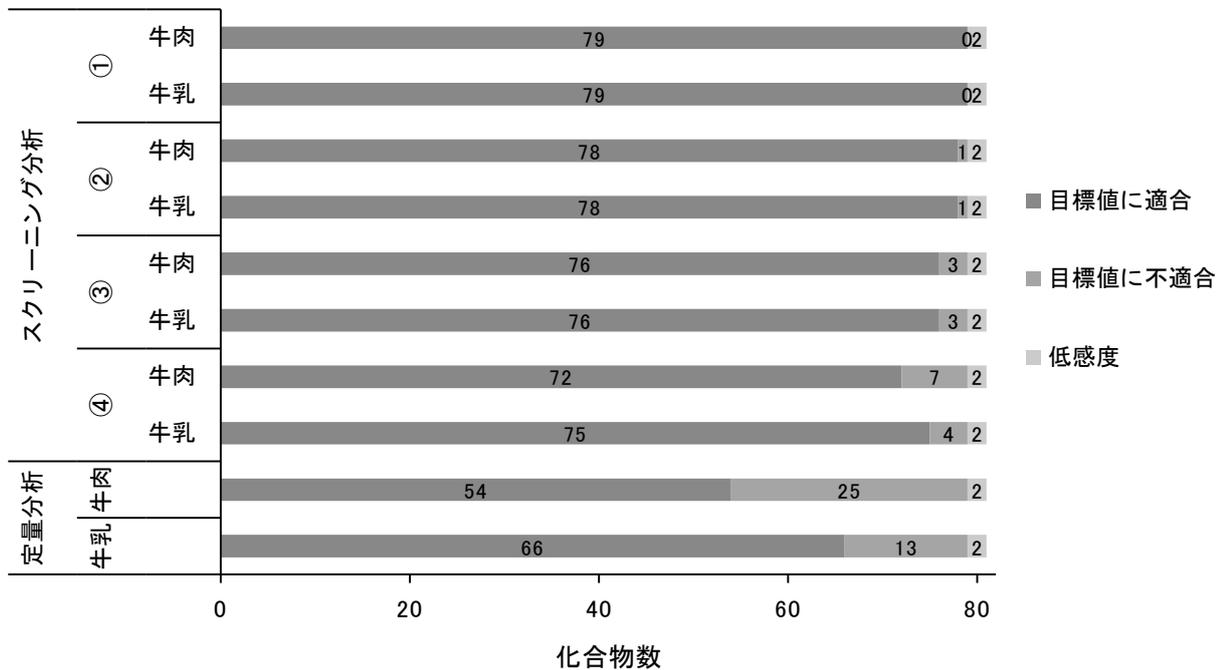


図 8. スクリーニング分析法の性能評価方法 (性能要件①～④) 及び妥当性評価ガイドラインによる評価での適合化合物数

スクリーニング分析: 1日2併行、5日間の添加回収試験(スクリーニング濃度: 0.01 ppm)によって得られたデータ(試料数: 添加試料 10、ブランク試料 10)を用いて評価した。

性能要件①: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件②: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

性能要件③: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件④: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

定量分析: 1日2併行、5日間の添加回収試験(添加濃度: 0.01 ppm)を行い、検量線(6点)を用いて定量したデータを妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従って評価した。

Ⅱ. 分担研究報告

5. 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

我が国では、畜水産物に残留する抗生物質の公定検査法として、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という)、並びに分別推定法」が、バイオアッセイ法として通知されている。これらの検査法は前処理操作が簡便で多検体の同時検査が可能であることから、と畜場などの検査室を中心に汎用されている。しかし、抗生物質の種類に依り、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などの多くの課題点が指摘されている。また、検査法の国際的整合性の観点からも、十分に対応可能であるとは言い難い。このため、欧米等の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それぞれの特性を踏まえた、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少ない。そこで、平成 28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる公定検査法の整備状況、検査法の概要等を調査して、取り纏めた。平成 29 年度は、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、30 種の抗生物質を添加した検体を作成して、本法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の両検査法で検査を行い、検査結果を比較した。その結果、本研究で検討した化合物においては、バイオアッセイ法では多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が高いことが示された。平成 30 年度は、欧米等で用いられているバイオアッセイ法に関する知見及びこれまでの検討結果を基に、より高感度な検査が可能となるように、簡易検査法の改良を試みた。本検査法で規定されている抽出量を減量するとともに、米国の公定法で使用されている試験菌を用いて検査を実施した。その結果、両検討ともに、正しい検査結果を得ることは出来なかった。簡易検査法を国際的に整合性のある検査法にするためには、試験法の大幅な見直し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は、分析対象化合物を高感度、高精度に分析することが可能な LC-MS/MS 等の分析機器の普及に伴い、従来のバイオアッセイ法から機器分析法への移行が世界的に進んでいる。しかし、抗生物質の物理化学的特性により機器分析法では分析が困難な化合物が存在する一方で、バイオアッセイ法は多数の抗生物質を簡便に検査できることから、と畜場等の検査室を中心に、現在でもスクリーニング法とし

て汎用されている。我が国では、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(以下、簡易検査法という。)、並びに分別推定法」が微生物学的試験法(バイオアッセイ法)として通知されている。これらの検査法は、試料の前処理操作が機器分析法に比べて比較的簡便であり、多検体の同時検査が可能である。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、抗生物質を同定するところが出来ない等の課題点が指摘されている。更に、本検査法が通知さ

れてから 20 年以上が経過しているが、その間に検査法の改定等を行われおらず、国際的な整合性の観点からも検査法の改良等の検討が必要であると考えられる。近年では、抗菌性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しており、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、国際的に整合性のある新たな試験体系・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中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。このため、平成 28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる公定試験法の整備状況、検査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検査法の概要及び検査の実施状況を調査した。平成 29 年度には、簡易検査法による検査結果の信頼性を評価するために、同一試料を簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法とで、検査を実施して、得られた検査結果の比較を行った。マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、セファロスポリン系、キノロン系抗生物質、サルファ剤、合成抗菌剤など、30 種の抗生物質を検査対象とした。平成 30 年度は、国際的な整合性を考慮した試験体系・試験法を提案することを目的として、これまでに得られた知見を基に、簡易検査法の改良を試みた。簡易検査法で規定されている抽出液量を半量とし、及び試験菌を米国の公定法等で使用されている試験菌に変更して検査を実施して、その検討結果を考察した。

B. 研究方法

1) 欧米等におけるバイオアッセイ法の調査方法

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。

2) 試料

平成 29 年度の検討では、牛の筋肉、肝臓を用いた。平成 30 年度の検討では、牛の筋肉のみを試料とした。

3) 分析対象化合物

表 3 に示す 30 種類の抗生物質を対象とした。マクロライド系抗生物質 4 化合物 (エリスロマイシン、オレアンドマイシン、タイロシン、チルミコシン)、テトラサイクリン系抗生物質 3 化合物 (オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)、ペニシリン系抗生物質 5 化合物 (ベンジルペニシリン、クロキサシン、メシリナム、ナフシリン、オキサシリン)、セファロスポリン系抗生物質 (セファピリン)、キノロン系抗生物質 4 化合物 (フルメキン、エンロフロキサシン、ダノフロキサシン、オキシソリン酸)、サルファ剤 7 化合物 (スルファジメトキシム、スルファジアジン、スルファキノサリン、スルファジミジン、スルファメラジン、スルファドキシム、スルファモノメトキシム)、合成抗菌剤 6 化合物 (オルメトプリム、トリムトプリム、チアンフェニコール、クロピドール、クロラムフェニコール、ニトロフラントイン)。なお、平成 30 年度の検討では、15 種類の抗生物質を対象とした。マクロライド系抗生物質 3 化合物 (エリスロマ

イシン、オレアンドマイシン、タイロシン)、テトラサイクリン系抗生物質 3 化合物(オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)、ペニシリン系抗生物質 1 化合物(ベンジルペニシリン)、キノロン系抗生物質 3 化合物(フルメキン、エンロフロキサシン、オキシリン酸)、サルファ剤 3 化合物(スルファジメトキシ、スルファジアジン、スルファモメトキシ)、合成抗菌剤 2 化合物(クロピドール、クロラムフェニコール)。

4) 添加濃度

機器分析法は基準値濃度とし、バイオアッセイ法では基準値を超過する最低の濃度を添加濃度とした。(表 3)

5) バイオアッセイ法

平成 6 年 7 月 1 日付衛乳第 107 号中の厚生労働省「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」に準拠した。試料 5 g にクエン酸・アセトン緩衝液 20 mL、または 10 mL を加えてホモジナイズした後、ろ紙でろ過した。抽出液にペーパーディスクを浸漬した後、これを検査用平板上に置き、ピンセットを用いて平板に固着させた。これを 30 分間冷蔵で放置した後、30℃で 18 時間培養した。培養後の阻止円の直径が 12 mm 以上のものを陽性と判定した。また、添加濃度に調製した抗生物質の標準溶液に浸漬したペーパーディスクを陽性対照、クエン酸・アセトン緩衝液に浸漬したペーパーディスクを陰性対照として、同一の平板で培養した。(スキーム 1)

5-1) 試験菌

簡易検査法に規定されている試験菌 (*Micrococcus luteus* ATCC9341、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Bacillus mycoides* ATCC 11778)を用いた。一方で、米国の公定法など(7-plate 法、STOP 法、FAST 法)で使用されている試験菌としては、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341a、

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228、*Bacillus megaterium* ATCC 9885)を用いた。

5-2) 試液及び培地

クエン酸一水和物、水酸化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、アセトンは、富士フィルム和光純薬工業製のものを用いた。アンピシリンナトリウム、カナマイシン硫酸塩、オキシテトラサイクリン塩酸塩は、富士フィルム和光純薬製を用いた。普通寒天培地(日水製薬製)、感受性測定用ブイヨン(日水製薬製)、Antibiotic Medium 4 (Difco 製)、Antibiotic Medium 5 (Difco 製)、Antibiotic Medium 8 (Difco 製)、Antibiotic Medium 11 (Difco 製)、Mueller Hinton Ager (日本 BD 製)を用いた。

5-3) 装置

安全キャビネット:LAL-1300XA2(オリエンタル技研工業製)、オートクレーブ:LSX-500(トミー精工製)、恒温槽:MIR-262(サンヨー製)、遠心分離機:H-201FR(コンサン製)、ペーパーディスク(直径 10 mm、厚さ 1.1~1.2 mm)を用いた。

5-4) 判定方法

阻止円の直径が 12 mm 以上のものを陽性と判定した。なお、陽性対照において、阻止円が形成されない平板は、検査が成立していないものとし、3 プレートの中で、2 枚以上のプレートの阻止円の直径の平均値で判定した。

6) 機器分析法

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I(畜水産物)、HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 II(畜水産物)、HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III(畜水産物)に準拠した。また、ニトロフラントインは、昭

和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号「食品、添加物等の規格基準」ニトロフラントイン、フラゾリドン及びフラクタドン試験法(個別試験法)に準拠した。

6-1) 装置

液体クロマトグラフ: Prominence (島津製作所製)、質量分析計: API 4000 QTRAP (SCIEX 製)、ホモジナイザー: T25 digital (IKA 製)、振とう機: KM Shaker V-DX (IWAKI 製)、遠心分離機: HM-5R (コクサン製)。

6-2) LC-MS/MS 測定条件

6-2-1) 一斉試験法 I

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%ギ酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=1%、t₁:B=1%、t₃₅:B=100%、t₄₀:B=100%、t_{40.1}:B=1%、t₄₈:B=1%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-2) 一斉試験法 II

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%ギ酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=1%、t₁:B=1%、t₃₅:B=100%、t₄₀:B=100%、t_{40.1}:B=1%、t₄₈:B=1%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-3) 一斉試験法 III

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%酢酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=5%、t₁:B=5%、t₁₅:B=80%、t₂₀:B=80%、t_{20.1}:B=5%、t₃₀:B=5%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-4) 個別試験法

分析カラム: Inertsil ODS-4 (2.1×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%酢酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=80%、t₁:B=80%、t₁₅:B=20%、t_{15.1}:B=80%、t_{20.1}:B=80%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-5) MRM 条件

イオン化法は、ESI 法とし、ポジティブモードで測定した。各分析対象化合物の MRM 測定において設定した各種パラメータは表 4 に示した。

C. 研究結果及び考察

1. 欧米等におけるバイオアッセイ法の調査

1-1. 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、*B. cereus*とペニシリナーゼを含む培地(プレート1)、*K. rhizophila*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)、*S. epidermidis*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°Cで16~18時

間、プレート 7 は、37°C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。

1-2. 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°C 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、2 mm 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°Cで 18～24 時間、*M. luteus* のプレートは、37°C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 2 mm 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。

1-3. 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 *B. megaterium* 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。

1-4. 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、国立残留調査所の残留化学物質及び性能評価局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。

1-5. 日本におけるバイオアッセイ法

簡易検査法では、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ドイスクを浸漬した後、3 種の試験菌 (*M. luteus*、*B. subtilis*、*B. mycoides*) 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。

1-6. 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。

2. 簡易検査法と機器分析法による検査結果の比較

2-1. 簡易検査法による検査結果

牛の筋肉及び肝臓を試料として、簡易検査法により検査した結果を表 5、6 に纏めた。本法では、3種の試験菌を用いて、1枚の平板に陽性対照(抗生物質の標準溶液)、陰性対照(クエン酸・アセトン緩衝液)、添加試料から得られた抽出液を浸漬したペーパーディスク、計3枚を培地に静置して培

養を行った。牛の筋肉、肝臓ともに、30化合物中25化合物が陰性と判定された。一方で、正しく陽性と判定された検体は5化合物(エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン、フルメキン)であり、牛の筋肉と肝臓で同様の結果が得られた。このため、テトラサイクリン系抗生物質は、本法においても高感度に検出することが可能であると考えられた。また、検査したすべての平板において、陰性対照からは、阻止円は認められなかった。一方で、陽性対照とした標準溶液を用いた試験区では、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。このことは、これまでに文献等で報告されている通り、簡易検査法における抗生物質の検出限界濃度が高く、基準値の判定には適用が困難であるとする結果と一致した。また、抗生物質の系統別では、特にサルファ剤、セファロスポリン系抗生物質、合成抗菌剤のすべてで、陽性対照からも阻止円は認められず、全て陰性と判定された。以上の結果から、本検討の限りにおいては、現行の公定法である簡易検査法では、テトラサイクリン系抗生物質を除き、偽陰性と判定される可能性が高いものと考えられた。

2-2. 機器分析法の検討結果

一斉試験法 I(畜水産物)、一斉試験法 II(畜水産物)、一斉試験法 III(畜水産物)及び個別試験法としてニトロフラントイン、フラゾリドン及びフルタルドン試験法に準拠して試験した。添加回収試験の結果を表 7 に示す。牛の筋肉の場合には、エリスロマイシン、メシリナム、セファピリンの3化合物で、回収率70%を下回り、クロルテトラサイクリンでは、回収率120%を上回った。一方で、牛の肝臓の場合には、エリスロマイシン、タイロシン、ベンジルペニシリン、クロサキシリン、メシリナム、ナフシリン、オキサシリン、セファピリンの6化合物が回収率70%を下回った。本検討では、機器分析法として、多検体

の同時分析が可能な一斉試験法を適用して検討を実施したが、これらの十分な回収率が得られなかった化合物は、個別試験法を適用することで良好な回収率が得られるものと考えられる。

2-3. 機器分析法による簡易検査法の評価

牛の筋肉を試料とした場合には、簡易検査法では 5 化合物、機器分析法では 26 化合物が正しく判定された。また、牛の肝臓の場合には、簡易検査法では 5 化合物、機器分析法では 22 化合物が正しく判定された。上記に通り、簡易検査法による検査結果と、LC-MS/MS を用いる機器分析法による検査結果を比較すると、簡易検査法では、多くの抗生物質で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。

3. 簡易検査法の改良検討

3-1. 抽出量が検査結果に与える影響

昨年度に、30 種類の抗生物質を対象として、残留基準値を超過する濃度の抗生物質を添加した牛の筋肉及び肝臓を検体として検査を実施したところ、多くの抗生物質で阻止円が形成されず、陰性と判定された。更に、標準溶液を用いた試験区においても、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。このことから、現行の方法では、検出限界が高く、基準値濃度の判定が困難であるものと考えられた。そこで、本検討では、試験溶液中の分析対象化合物の濃度を高くするために、クエン酸・アセトン緩衝液の液量を現行の 20 mL から半量の 10 mL に変更して、検査を実施した。牛の筋肉を試料として、簡易検査法により検査した結果を表 8 に纏めた。本法では、3 種の試験菌 (*M. luteus*、*B. subtilis*、*B. mycoides*) を用いて、1 枚の平板に陽性対照 (抗生物質の標準溶液)、陰性対照 (クエン酸・アセトン緩衝液、牛の筋肉の抽出溶液)、添加試料から得られた抽出液を浸漬したペーパーディスク、計 4 枚を培地に静置して培養を行った。その

結果、正しく陽性と判定された検体は 4 化合物 (エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン) のみであった。また、検査したすべての平板において、陰性対照からは阻止円は認められなかったが、陽性対照とした標準溶液を用いた試験区では、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。これらの検討結果は、抽出液量を 20 mL とした場合と殆ど同様の結果であった。抽出液量を半量とすることで、検出感度が向上することを期待したが、そのような結果は得られなかった。このことは、簡易検査法をより高感度分析が可能な検査法とするためには、方法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。

3-2. 試験菌の種類の変更が測定結果に与える影響

現行の簡易試験法では、3 種の試験菌が指定されているが、先の抽出液量を変化させた検討結果からも、基準値濃度の判定に適用可能な方法にするためには、大幅な試験法の改良が必要と考えられた。そこで、本検討では、試験菌を米国の公定法等で使用されている試験菌に変更して、検査を行った。試験菌は、7-plate 法で使用されている *K. rhizophila*、*S. epidermidis* の他、STOP 法、FAST 法で用いられている *B. megaterium* を用いた。牛の筋肉を試料として、検査した結果を表 9 に纏めた。テトラサイクリン系の一部の抗生物質では阻止円が形成されたが、多くの試験菌と化合物で阻止円は形成されなかった。これらの試験菌を用いる際には、pH が測定結果に大きな影響を与えられ、pH 等を変化させて更なる検討が必要であると考えられた。

D. 結論

平成 28 年度には、畜水産物に残留する抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等

における検査法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を調査した。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徴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。

平成 29 年度には、30 種の抗生物質を検査対象として、同一の検体をバイオアッセイ法と LC-MS/MS 等による機器分析法により検査を行い、その結果の比較を行った。本検討の結果からは、簡易検査法においては、多くの検体で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。

平成 30 年度は、簡易検査法の高感度化に向けた検討を実施した。抗生物質 15 種を対象に検査を行ったところ、陽性対照、添加試料共に、阻止円が形成される抗生物質及び試験菌の組み合わせは殆ど認められなかった。以上のことから、簡易検査法をより高感度に検査が可能な方法とするためには、試験法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。しかし、テトラサイクリン系抗生物質については、基準値濃度を正しく判定することが出来た。本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、本法をスクリーニング検査法として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。

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	
試験菌及び 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	試験菌	培地
	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>B. cereus</i>	AM 8 + penicillina se	<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						
	<i>B. mycooides</i>	AM 8	<i>B. mycooides</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4 + penicillina se	<i>B. subtilis</i>	pH 8						
					<i>B. subtilis</i>	AM 5 + penicillina se	<i>M. luteus</i>	pH 8						
					<i>K. rhizophila</i>	AM 11 + penicillina se								
					<i>S. epidermidis</i>	AM 11 + penicillina se								
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
Amoxicyllin	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

表3 分析対象化合物及び添加濃度

抗生物質の系統	分析対象化合物	牛の筋肉への添加濃度		牛の肝臓への添加濃度	
		機器分析法	バイオアッセイ法	機器分析法	バイオアッセイ法
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0.2	0.25	0.2	0.25
	オレアンドマイシン	0.05	0.055	0.05	0.55
	タイロシン	0.1	0.15	0.1	0.15
	チルミコシン	0.1	0.15	1	1.5
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
	クロルテトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
	テトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	0.05	0.055	0.05	0.055
	クロキサシリン	0.04	0.045	0.04	0.045
	メシリナム	0.05	0.055	0.05	0.055
	ナフシリン	0.005	0.0055	0.005	0.0055
	オキサシリン	0.3	0.35	0.3	0.35
セファロスポリン系抗生物質	セファピリン	0.03	0.035	0.03	0.035
キノロン系抗生物質	フルメキン	0.5	0.55	0.5	0.55
	エンロフロキサシン	0.05	0.055	0.1	0.15
	ダノフロキサシン	0.2	0.25	0.4	0.45
	オキソリン酸	0.1	0.15	0.1	0.15
サルファ剤	スルファジメトキシ	0.05	0.055	0.05	0.055
	スルファジアジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファキノサリン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファジミジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファメラジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファドキシ	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファモノメトキシ	0.01	0.055	0.05	0.055
合成抗菌剤	オルメトプリム	0.02	0.025	0.02	0.025
	トリムトプリム	0.05	0.055	0.05	0.055
	チアンフェニコール	0.02	0.025	0.02	0.025
	クロピドール	0.2	0.25	2	2.5
	クロラムフェニコール	0.0005	0.00055	0.0005	0.00055
	ニトロフラントイン	0.001	0.0015	0.001	0.0015

スキーム1 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)のフローチャート

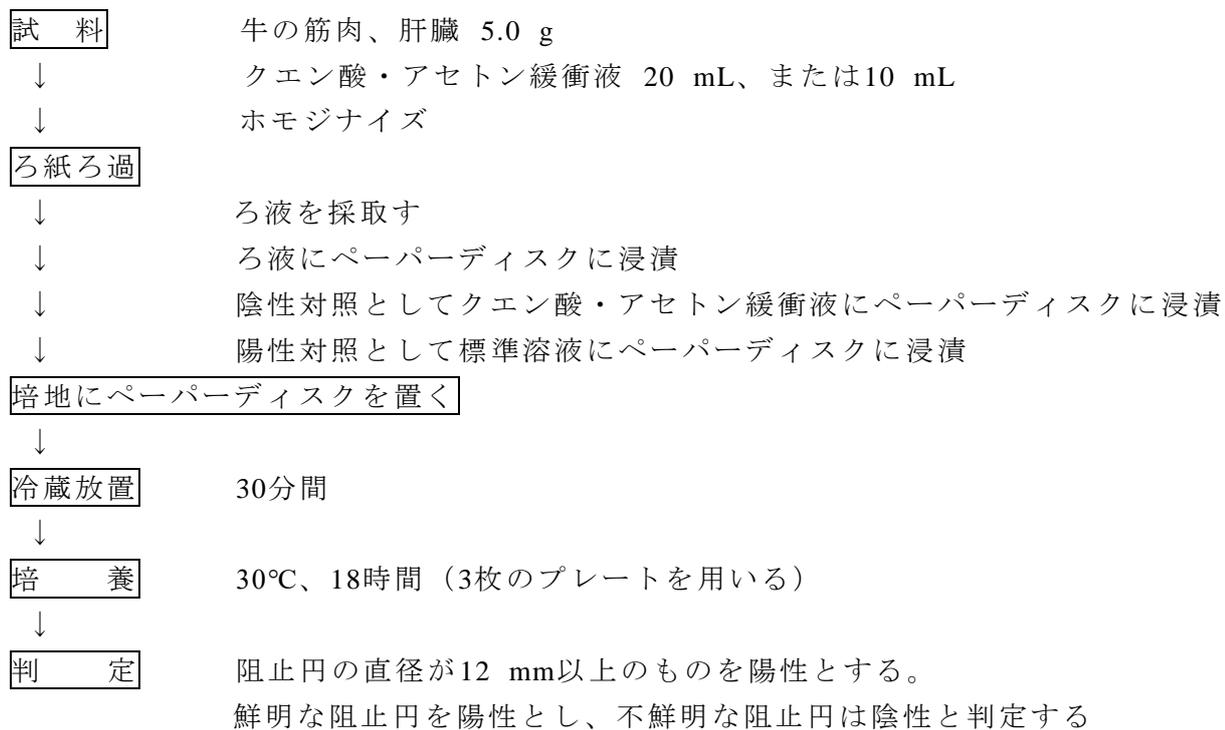


表 4 分析対象化合物のMRM条件

分析対象化合物	デクラスタリング電位 (DP)	定量イオン			確認イオン		
		MRMトランジッション	コリジョンエネルギー (CE)	コリジョンセルイグジット電位 (CXP)	MRMトランジッション	コリジョンエネルギー (CE)	コリジョンセルイグジット電位 (CXP)
エリスロマイシン	86	m/z 734.4 → 158.2	43	18	m/z 734.4 → 576.2	29	12
オレアンドマイシン	96	m/z 688.4 → 544.2	25	14	m/z 688.4 → 158.2	41	12
タイロシン	106	m/z 917.4 → 174.2	57	10	m/z 917.4 → 773.4	43	14
チルミコシン	116	m/z 870.5 → 174.1	57	18	m/z 870.5 → 697.4	63	16
オキシテトラサイクリン	71	m/z 461.2 → 426.1	27	4	m/z 461.2 → 443.0	19	4
クロルテトラサイクリン	76	m/z 479.2 → 440.0	31	4	m/z 479.2 → 462.1	25	4
テトラサイクリン	76	m/z 445.2 → 410.1	29	4	m/z 445.2 → 154.1	39	4
ベンジルペニシリン	61	m/z 335.0 → 160.0	15	4	m/z 335.0 → 176.0	17	4
クロキサシリン	96	m/z 436.0 → 277.0	19	21	m/z 436.0 → 160.1	21	16
メシリナム	110	m/z 326.1 → 167.3	31	12	m/z 326.1 → 139.2	45	14
ナフシリン	110	m/z 415 → 199.0	19	4	m/z 415.0 → 177.0	33	16
オキサシリン	71	m/z 402.1 → 160.1	21	14	m/z 402.1 → 243.2	19	16
セファピリン	61	m/z 424.0 → 292.1	23	24	m/z 424.0 → 152.1	35	12
フルメキン	56	m/z 262.0 → 244.0	27	20	m/z 262.0 → 202.0	47	16
エンロフロキサシン	91	m/z 360.3 → 316.2	27	8	m/z 360.3 → 245.1	39	14
スルファジアジン	56	m/z 251.1 → 156.2	21	4	m/z 251.1 → 92.2	35	4
スルファキノサリン	51	m/z 301.0 → 156.2	23	4	m/z 301.0 → 92.3	39	4
スルファジミジン	46	m/z 279.0 → 186.0	25	4	m/z 279.0 → 92.0	45	4
スルファメラジン	46	m/z 265.1 → 92.2	41	4	m/z 265.1 → 108.0	33	4
スルファドキシシン	61	m/z 311.1 → 156.1	23	4	m/z 311.1 → 92.1	43	4
オルメトプリム	81	m/z 275.2 → 123.1	33	4	m/z 275.2 → 81.1	53	4
ニトロフラントイン	70	m/z 249.1 → 134.0	19	8	m/z 249.1 → 178.0	25	14

表 5 簡易検査法による牛の筋肉の検査結果

	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	判定
試験菌	<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus mycoides</i>		
品目	阻止円の直径 (mm)						
エリスロマイシン	24	17	13.5	12	15	11	陽性
オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	陰性
タイロシン	13	0	0	0	0	0	陰性
チルミコシン	13	0	0	0	0	0	陰性
オキシテトラサイクリン	14	11	17	13	23	16	陽性
クロルテトラサイクリン	18	12	20	17	28	22	陽性
テトラサイクリン	13	11	18	12	23	16	陽性
ベンジルペニシリン	30	20	0	0	0	0	陰性
クロキサシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
メシリナム	0	0	0	0	0	0	陰性
ナフシリン	11	0	0	0	0	0	陰性
オキサシリン	27	21	11	0	14	0	陰性
セファピリン	0	0	11	0	11	0	陰性
フルメキン	0	0	20	18	25	16	陽性
エンロフロキサシン	0	0	12	0	0	0	陰性
ダノフロキサシン	0	0	16	0	0	0	陰性
オキシリン酸	0	0	11	0	0	0	陰性
スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジアジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファキノサリン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファメラジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファドキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
オルメトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
トリムトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
チアンフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロピドール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
ニトロフラントイン	0	0	0	0	0	0	陰性

表 6 簡易検査法による牛の肝臓の検査結果

	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	判定
試験菌	<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus mycoides</i>		
品目	阻止円の直径 (mm)						
エリスロマイシン	21	17	14	11	12	12	陽性
オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	陰性
タイロシン	13	0	0	0	0	0	陰性
チルミコシン	12	0	0	0	0	0	陰性
オキシテトラサイクリン	18	13	13	13	24	21	陽性
クロルテトラサイクリン	21	17	17	20	30	27	陽性
テトラサイクリン	19	11	14	16	27	20	陽性
ベンジルペニシリン	29	20	0	0	0	0	陰性
クロキサシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
メシリナム	0	0	0	0	0	0	陰性
ナフシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
オキサシリン	29	22	13	0	13	0	陰性
セファピリン	11	0	0	13	0	0	陰性
フルメキン	0	0	19.5	16.5	25	16	陽性
エンロフロキサシン	0	0	16	11	0	0	陰性
ダノフロキサシン	0	0	19.5	0	0	0	陰性
オキシリン酸	0	0	11	0	0	0	陰性
スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジアジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファキノサリン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファメラジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファドキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
オルメトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
トリムトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
チアンフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロピドール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
ニトロフラントイン	0	0	0	0	0	0	陰性

表 7 機器分析法による検査結果

分析対象化合物	試験法	添加濃度 (mg/kg)	牛の筋肉			牛の肝臓		
			回収率 (%)			回収率 (%)		
			n = 1	n = 2	平均値	n = 1	n = 2	平均値
エリスロマイシン	一斉 I 法	0.2	66	58	<u>62</u>	36	31	<u>34</u>
オレアンドマイシン	一斉 I 法	0.05	120	106	113	96	82	89
タイロシン	一斉 I 法	0.1	94	80	87	27	23	<u>25</u>
チルミコシン	一斉 I 法	0.1	115	98	106	88	88	88
オキシテトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	83	79	81	85	87	86
クロルテトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	125	123	<u>124</u>	87	86	86
テトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	114	107	111	77	79	78
ベンジルペニシリン	一斉 II 法	0.05	98	98	98	80	52	<u>66</u>
クロキサシリン	一斉 II 法	0.04	83	68	76	78	52	<u>65</u>
メシリナム	一斉 I 法	0.05	55	49	<u>52</u>	21	18	<u>19</u>
ナフシリン	一斉 I 法	0.005	89	91	90	52	73	<u>63</u>
オキサシリン	一斉 II 法	0.3	95	85	90	82	57	<u>69</u>
セファピリン	一斉 II 法	0.03	56	64	<u>60</u>	17	16	<u>16</u>
フルメキン	一斉 I 法	0.5	103	98	101	89	84	87
エンロフロキサシン	一斉 I 法	0.05	97	91	94	78	81	80
スルファジアジン	一斉 I 法	0.1	96	91	93	90	84	87
スルファキノサリン	一斉 I 法	0.1	98	89	93	82	76	79
スルファジミジン	一斉 I 法	0.1	98	90	94	83	81	82
スルファメラジン	一斉 I 法	0.1	105	96	100	90	80	85
スルファドキシシン	一斉 I 法	0.1	104	98	101	88	85	86
オルメトプリム	一斉 I 法	0.02	98	92	95	82	72	77
ニトロフラントイン	個別試験法	0.001	76	-	76	90	-	90

表 8 抽出液量を 10 mL としたときの検査結果

抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)									判定
		<i>Micrococcus luteus</i>			<i>Bacillus mycoides</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	23	17	0	13	12	0	16	13	陽性
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	タイロシン	0	15	0	0	0	0	0	0	0	陰性
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	12	0	0	21	16	0	13	12	陽性
	クロルテトラサイクリン	0	17	12	0	26	22	0	23	18	陽性
	テトラサイクリン	0	13	0	0	22	16	0	20	13	陽性
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	26	19	0	0	0	0	13	0	陰性
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	15	0	陰性
	オキソリン酸	0	0	0	0	0	0	0	14	0	陰性
サルファ剤	スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性

表9 米国の公定検査法で使用されている試験菌を用いた検査結果

抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)								
		<i>Kocuria rhizophila</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>			<i>Bacillus megaterium</i>		
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	21	15	0	13	0	0	0	0
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	タイロシン	0	13	0	0	0	0	0	0	0
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	13.5	0	0	0	0	0	13	0
	クロルテトラサイクリン	0	16	11	0	0	0	0	15	0
	テトラサイクリン	0	12	0	0	0	0	0	0	0
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	27	20	0	0	0	0	0	0
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	14	0	0	17	13
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	0	12
	オキソリン酸	0	0	0	0	0	0	0	0	13
サルファ剤	スルファジメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファモノメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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
Saito-Shida S., Nemoto S., Teshima R., Akiyama H.	Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry.	Food Addit. Contam. A	33	119～127	2016
Saito-Shida S., Sakai T., Nemoto S., Akiyama H.	Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry.	Food Addit. Contam. A	34	1153～1161	2017
Saito-Shida S., Hamasaka T., Nemoto S., Akiyama H.	Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers.	Food Chemistry	256	140～148	2018