

# 残留農薬等公示試験法の 見方・考え方

平成25年度残留農薬等研修会

2013年10月10日

国立医薬品食品衛生研究所

食品部 根本 了

1

## 主な内容

1. 試験法通知「第1章 総則」の改定
2. 公示試験法の見方・考え方
3. 残留農薬等公示試験法開発の考え方

2

## 1. 試験法通知「第1章 総則」の改定

## 2. 公示試験法の見方・考え方

## 3. 残留農薬等公示試験法開発の考え方

3

### 試験法通知

#### 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」

- 通知：食安発第0124001号 平成17年1月24日厚生労働省医薬食品局 食品安全部長通知（別添）
- 対象：残留基準（不検出基準を除く）が定められている農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質（その物質が化学的に変化して生成した物質を含む）
- 第1章 総則
  - 1. 用語、 2. 装置、 3. 試薬・試液、 4. 試料採取、
  - 5. 分析上の留意事項、別紙
- 第2章 一斉試験法
- 第3章 個別試験法

4

## 試験法通知「第1章 総則」の改定

改定通知：食品安全部長通知 食安発0919第1号(平成25年9月19日)

新	旧
<p>1. 用語</p> <p>(1) 「分析対象化合物」とは、第2章及び第3章に規定する試験法によって分析する化合物であって、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号。以下「告示」という。)の第1食品の部A食品一般の成分規格の6の(1)の表の第1欄若しくは7の(1)の表の第1欄若しくは9の(1)の表の第1欄に掲げる農薬、飼料添加物又は動物用医薬品(以下「農薬等」という。)の成分である物質(その物質が化学的に変化して生成した物質を含む。)及びその類似物質(例えば、塩や光学異性体など)をいう。</p> <p>(2) 「分析値」とは、告示に定める食品に残留する農薬等の成分である物質の量の限度(以下「基準値」という。)と比較する値をいう。</p>	<p>1. 用語</p> <p>(1) 「分析対象化合物」とは、第2章に規定する試験法によって分析する化合物であって、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号。以下「告示」という。)の第1食品の部A食品一般の成分規格の6の(1)の表の第1欄若しくは7の(1)の表の第1欄若しくは9の(1)の表の第1欄に掲げる農薬、飼料添加物又は動物用医薬品(以下「農薬等」という。)の成分である物質(その物質が化学的に変化して生成した物質を含む。)及びその類似物質(例えば、塩や光学異性体など)をいう。</p>

5

新	旧
<p>1. 用語</p> <p>(3) 「種実類」とは、オイルシード、ナッツ類、カカオ豆及びコーヒー豆をいう。</p> <p>(4) 「定量限界」とは、<u>適切な精確さをもって定量できることが確認された分析対象化合物の最低量又は濃度をいう。</u></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0; width: fit-content;"> <p>妥当性評価ガイドラインの定義に合わせた。</p> </div> <p>(5) 「類型」とは、当該試験法の由来をいい、以下のとおり分類している。</p> <p>A: 公定法(乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(昭和26年厚生省令第52号)、告示及び通知に定めてきたもののうち、Cを除く。)</p> <p>B: 諸外国の政府機関等が定めている試験法(Aを除く。)</p> <p>C: 有識者からなる検討会によって作成された試験法</p> <p>D: 文献から引用した試験法(A～Cを除く。)</p>	<p>1. 用語</p> <p>(4) 「定量限界」とは、試料に含まれる分析対象化合物の定量が可能な最低の量又は濃度をいい、クロマトグラフィーの場合には、概ねS(ピーク高さ)/N(ベースラインノイズ) = 10となる分析対象化合物の量を農薬等の成分である物質の濃度として示してある。</p>

6

新	旧
<p>2. 装置</p> <p>第2章及び第3章に規定する試験法によって試験を実施する場合の装置について、「ガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる」と規定している場合は、<u>GC-MS</u>及び<u>GC-MS/MS</u>いずれの使用も可能である。また、「液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる」と規定している場合は、<u>LC-MS</u>及び<u>LC-MS/MS</u>いずれの使用も可能である。</p> <p>3. 試薬・試液</p> <p>第2章及び第3章に規定する試験法によって試験を実施する場合の試薬・試液は、同章において個別に示すもののほか、告示の第2添加物の部C試薬・試液等の1.に掲げるもの又は別紙に掲げるものとする。</p> <p>なお、「(特級)」と記載したものは、日本工業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。</p>	<p>2. 装置</p> <p>第2章及び第3章に規定する試験法によって試験を実施する場合の装置について、「ガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる」と規定している場合は、GC/MS及びGC/MS/MSいずれの使用も可能である。また、「液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる」と規定している場合は、LC/MS及びLC/MS/MSいずれの使用も可能である。</p> <p>3. 試薬・試液</p>

7

新	旧
<p>4. 試料採取</p> <p>第2章及び第3章に規定する試験法によって試験を実施する場合の試料採取は、別に規定する場合を除き、以下の方法に従って行う。</p> <p>(1) 穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を425 μmの標準網ふるいを通るように粉砕し<u>均一化する</u>。<u>ただし、粉砕中にペースト状になるなど粉砕が困難な食品の場合には、1～3 mmのふるいを通るように粉砕し、次いで425 μmの標準網ふるいを通るように再度粉砕し均一化する。それでもなお粉砕が困難な場合には、1～3 mmのふるいを通るように粉砕してよく均一化したものを試験に用いることができるが、その場合は必ずホモジナイズ抽出する。</u></p> <p>(2) 果実、野菜及びハーブの場合は、検体約1 kgを精密に量り、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する。</p>	<p>4. 試料採取</p> <p>(1) 穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を425 μmの標準網ふるいを通るように粉砕する。</p>

らっかせいなど、脂肪含量が高いために粉砕中にペースト状になる食品に対応

8

新	旧
<p>4. 試料採取</p> <p>(3) 茶及びホップの場合は、検体を425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し<u>均一化する。ただし、抹茶以外の茶にあって、熱湯浸出法により試験する場合は、粉碎せずによく混合して均一化する。</u></p> <p>(4) スパイスの場合は、その食品成分 (<u>脂肪含量や水分含量など</u>) に応じて、種実類又は果実の場合に準ずる。</p> <p>(5) 筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化する。</p> <p>(6) 脂肪の場合は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化する。</p> <p>(7) 肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合は、細切均一化する。</p> <p>(8) <u>乳</u>の場合は、よく混合して均一化する。</p>	<p>4. 試料採取</p> <p>(3) 茶及びホップの場合は、検体を425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し、抹茶以外の茶の場合は、均一化する。</p> <p>(4) スパイスの場合は、その形状に応じて、種実類又は果実の場合に準ずる。</p> <p>(8) 乳及びはちみつの場合は、よく混合して均一化する。</p>

熱湯浸出法で試験する場合には、茶葉を粉碎する必要が無いことを明確にした。

9

新	旧
<p>4. 試料採取</p> <p>(9) <u>はちみつの場合は、必要に応じて加温(概ね40 以下)して溶かしてから、よく混合して均一化する。加温が適さない場合には、必要に応じて適量の水を量って加え溶解してから、よく混合して均一化する。</u></p> <p>(10) 魚類の場合は、可食部を細切均一化する。</p> <p>(11) 貝類の場合は、殻を除去し、細切均一化する。</p> <p>(12) 甲殻類の場合は、小型のものは全体を、大型のものは外側の殻を除去し、細切均一化する。</p> <p>(13) 卵の場合は、殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化する(卵白中又は卵黄中に残留基準が設けられている場合を除く)。</p> <p>(14) <u>乾燥野菜及び乾燥果実については、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する。</u></p>	<p>4. 試料採取</p> <p>(9) はちみつの試料採取法を追加</p> <p>(14) 乾燥野菜及び乾燥果実の試料採取法を追加</p>

10

新	旧
<p>5. 分析上の留意事項</p> <p>(1) 第2章及び第3章に規定する試験法以外の方法によって試験を実施しようとする場合には、同章に規定する試験法と比較して、<u>選択性</u>、真度、精度及び定量限界において、<u>同等又はそれ以上の性能を有すると認められる方法</u>によって実施するものとする。</p> <p>(2) 分析値を求める際には、<u>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ものとする。</u></p> <p>(3) 個別試験法に示す定量限界は、通知された方法により試験を実施した場合の一般的な定量限界値を示すものである。試験の対象となる食品の残留基準(食品衛生法第11条第3項に定める人の健康を損なうおそれのない量として厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて定める量を含む)に相当する濃度を測定することが困難な場合には、機器の測定条件(例えば、カラムの種類、カラム温度、移動相の流速及び組成、キャリアーガスの流速、質量分析の場合には測定モード、測定イオン、電圧)を変更する、機器への試験溶液注入量を増やす、試験溶液を濃縮する、精製を追加してノイズを減らす、試料量を増やすことなどにより対応する必要がある。また、一斉試験法など、他の試験法が通知されている場合には、その採用についても検討することとする。</p>	<p>5. 分析上の留意事項</p> <p>(1) 第2章及び第3章に規定する試験法以外の方法によって試験を実施しようとする場合には、同章に規定する試験法と比較して、真度、精度及び定量限界において、同等又はそれ以上の性能を有するとともに、特異性を有すると認められる方法によって実施するものとする。</p>

妥当性評価ガイドラインの用語に合わせて、「特異性」を「選択性」に修正

新	旧
<p>5. 分析上の留意事項</p> <p><u>(4) 第2章及び第3章に規定する試験法によって試験を実施する際に、試験溶液の調製において、試験法を適用する食品を「穀類及び豆類の場合」、「果実及び野菜の場合」あるいは「茶の場合」などのように分けて記載してある場合、試料の食品成分(脂肪含量や水分含量など)によっては、適切な調製法を選択することが必要である。</u></p> <p><u>(5) 第2章及び第3章に規定する試験法において、抹茶以外の茶の方法が示されている場合、茶の基準値が設定されていない農薬等においては、抹茶の方法により試験を実施する。</u></p>	<p>5. 分析上の留意事項</p> <p>例えば、果実・野菜であっても、脂肪含量が高く、脱脂操作が必要な食品では、穀類等の試験法を適用して試験溶液を調製することを検討することなどが考えられる。</p> <p>茶葉の試験法 [基準値あり]……通知で熱湯浸出法を規定 基準値変更 [基準値削除 一律基準適用] 抹茶の方法(溶媒抽出法)で実施</p>

# 1. 試験法通知「第1章 総則」の改定

## 2. 公示試験法の見方・考え方

## 3. 残留農薬等公示試験法開発の考え方

13

### 公示試験法の記載項目

試験法(農産物)	
1. 分析対象化合物	7. 確認試験
2. 装置	8. 測定条件
3. 試薬、試液	9. 定量限界
4. 試験溶液の調製	10. 留意事項
1) 抽出 [農産物の場合(例)] 穀類, 豆類及び種実類の場合 果実, 野菜, ハーブ, 茶及びホップの場合 [畜水産物の場合(例)] 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓及び魚介類の場合 乳, 卵及びはちみつの場合	1) 試験法の概要 2) 注意点
2) 誘導体化、加水分解など	11. 参考文献
3) 精製	12. 類型
5. 検量線の作成	A: 公定法(乳等省令, 規格基準告示および通知に定めてきたもののうちCを除く.) B: 諸外国の政府機関等が定めている試験法(Aを除く.) C: 有識者からなる検討会によって作成された試験法 D: 文献から引用した試験法(A~Cを除く.)
6. 定量	13. その他

14

## 公示試験法の各記載項目の見方・考え方

### 試験法（農産物）

- 1) 試験法の名称
- 2) ( )内は試験対象の食品：（農産物）（畜水産物）（畜産物）（水産物）
- 3) 試験法開発において適用可能であった具体的な食品名は通知文の鑑に記載

#### 1. 分析対象化合物

- 1) 分析する直接的な化合物ではなく、試験法が網羅している分析対象化合物を記載

抱合体

- 2) 略称を用いる場合は、ここで規定し、以下の記載は略称を用いる。  
(以下「                    」という。)

#### 2. 装置

- 1) 測定装置の名称

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FID）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）  
炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター）付きガスクロマトグラフ（GC-IPD(P)）  
炎光光度型検出器（硫黄用干渉フィルター）付きガスクロマトグラフ（GC-IPD(S)）  
炎光光度型検出器（スズ用干渉フィルター）付きガスクロマトグラフ（GC-IPD(Sn)）  
電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（GC-ECD）  
紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）  
蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）、多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-DAD）  
可視分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-VIS）、  
ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）、ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（GC-MS/MS）  
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

- 2) 特殊な装置（蒸留装置など）の名称及び図

15

都道府県知事  
保健所設置市長 殿  
特別区長

食安発0919第1号  
平成25年9月19日

厚生労働省医薬食品局食品安全部 長  
(公印省略)

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の一部改正について

今般、農薬、飼料添加物及び動物用医薬品に関する試験法に係る知見の集積等を踏まえ、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号通知。以下「試験法通知」という。）の別添の一部を下記のとおり改正することとしたので、関係者への周知方よろしく願います。

なお、改正後の試験法を実施するに際しては、試験法通知別添の第1章総則部分を参考とされたい。

記

1. 目次を別紙1のとおり改める。なお、改正部分を下線で示す。
2. 第1章総則を別紙2のとおり改める。なお、改正部分を下線で示す。
3. 第3章個別試験法中「ピリミジフェン試験法（農産物）」に係る部分の次に別紙3の「ピリミスルファン試験法（農産物）」を、「フェンヘキサミド試験法（農産物）」に係る部分の次に別紙4の「フェンヘキサミド試験法（畜水産物）」を、「ミクロプタニル試験法（農産物）」に係る部分の次に別紙5の「ミルベメクチン及びレベメクチン試験法（農産物）」を、「ラクトバミン試験法（畜水産物）」に係る部分の次に別紙6の「ラフォキサニド試験法（畜水産物）」を加える。  
なお、各試験法の開発に当たっては、1機関の結果ではあるが、「ピリミスルファン試験法（農産物）」にあつては、**玄米、大豆、ごま、ばれいしょ、ほれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、コーヒー豆（生）及び茶**について、「フェンヘキサミド試験法（畜水産物）」にあつては、**牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、さけ、うなぎ、えび及びしじみ**について、「ミルベメクチン及びレベメクチン試験法（農産物）」にあつては、**玄米、大豆、ばれいしょ、ほれんそう、キャベツ、ねぎ、りんご、オレンジ、コーヒー豆（生）及び茶**について、「ラフォキサニド試験法（畜水産物）」にあつては、**牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓、牛乳、鶏卵はちみつ、さけ、うなぎ及びしじみ**について、各試験法が適用可能であることが確認されており、各試験の実施に際しては参考とされたい。

16



### 3. 試薬、試液

- 1) 総則の3. 試薬・試液に記載されていないものだけを記載する。  
・告示の第二添加物の部C 試薬・試液等の1. 試薬・試液に掲げるもの又は通知の別紙に掲げるものは記載を省略する。  
例) 次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。  
無水トリフルオロ酢酸 無水トリフルオロ酢酸(特級)
- 2) 五十音順に記載する。ただし、標準品は最後に記載する。
- 3) ミニカラムで充填量が異なるものについては記載する。  
例) シリカゲルミニカラム(800 mg) 内径8~9 mmのポリエチレン製のカラム管に、カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル800 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。
- 4) 標準品は純度のみを記載し、融点は記載しない。  
(融点は、測定方法の違いなどにより、メーカーによって値が異なる場合があるため。)  
・純度規格は、現在は、通知発出時点における主な試薬メーカーから供給されている標準品の純度の調査結果から設定している。  
例) 標準品 本品は 99%以上を含む。
- 5) 抗生物質の純度は、原則として理化学的純度を用いる。  
(複数の構成成分からなる場合など純度を表記できない場合においては力価を用いる。)

17

### 4. 試験溶液の調製

旧告示試験法の記載を簡略化する。

- 1) 器具・装置の指定・記載を削除
- 2) 一般的な操作の記載の簡略化
- 3) 前掲の混液、溶媒名は「溶媒」と記載

#### 1) 抽出

- 1) 原則として液-液分配と凝固処理は「抽出」に記載する。
- 2) 試料重量は有効数字3桁(例: 20.0 g, 5.00 g)で記載する。
- 3) 抽出液等の定容操作では、容量に「正確に」を記載する。
- 4) 混合溶媒  
溶媒名は、五十音順(混合比率の高い順ではない)に記載  
混合比率は、約分した整数で示す。  
例) A及びB(3:7)混液

#### 2) 誘導体化、加水分解など

- 1) 誘導体化や加水分解などの特殊な操作を記載する。
- 2) 項目名は、蛍光誘導体化、メチル化など具体的に記載してもよい。

18

## 4. 試験溶液の調製

### 3) 精製

- 1) 原則として、固相カラム処理は「**精製**」に記載する。
- 2) カラム精製では、捨てる画分は「**流出液**」、目的物を含む画分は「**溶出液**」と記載する。
- 3) 精製にミニカラムを使用する場合、項目名を付ける場合には「ミニ」は付けず、「**～カラムクロマトグラフィー**」とする。具体的な操作の記載では「ミニ」を付け、「**～ミニカラム**」とする。  
例) 2) 精製  
グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー  
グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にアセトン5 mLを注入し、流出液は捨てる。
- 4) 固相重量をカラムの後ろに( )書きで記載する。
- 5) コンディショニングに2種の溶媒を使用する場合は、「メタノール及び酢酸エチル各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。」のようにまとめて記載する。
- 6) 試験溶液の容量には、「**正確に**」を記載する。  
例) この残留物をメタノールに溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

[参考] ミニカラムについては、平成17年1月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法に係る分析上の留意事項について」の別添及び同事務連絡の平成19年12月28日付け改正事務連絡が参考になる。

19

### 【残留農薬等の分析における「正確に」の考え方】

『容量を「正確に量る」とは、別に規定するもののほか、ホールピペット又はこれと同程度以上の精度のある容量計を用いて計量することを意味する。また、「正確に100 mLとする」等と記載した場合は、通例、メスフラスコを用いる。(食品衛生検査指針 残留農薬編)』

#### 最終液量を数mL程度に定容するときのように、メスフラスコの使用が困難な場合

実際の分析ではホールピペット(又はスピペット)で溶媒を採取して、それを残留物に加えて溶かす方法が用いられている。

残留農薬等の分析では、この場合の「正確に」とは、校正された容量計を用いて溶媒を採取することが許容される。

添加後に溶媒の気散による容量変化ができるだけないように注意が必要

20

## 試験溶液調製の記載の簡略化

### [記載の主な簡略部分]

- (1) 器具・装置の指定・記載を削除
  - 1) ガラス器具(すり合わせ減圧濃縮器、分液漏斗、三角フラスコなど)の指定を削除
  - 2) 振とう機など一般的な装置の名称の記載を削除
- (2) 一般的な操作の記載の簡略化
  - 1) 吸引ろ過操作 ろ過助剤(ケイソウ土等)使用の記載を省略  
(ただし、ろ過の際にろ過助剤の使用が必須であるときは記載し、注意点にもその旨を記載する。)
  - 2) 試料採取法を削除 総則に記載
  - 3) 転溶操作 使用溶媒、回数のみ記載
  - 4) アセトニトリル/ヘキサン分配操作 使用溶媒、回数のみ記載
  - 5) 脱水操作 無水硫酸ナトリウムの洗い込み操作を省略
- (3) 前掲の混液、溶媒名は「溶媒」と記載



- 記載の簡略化はポジ化以降の新規の通知試験法から適用(旧告示試験法については未対応)
- 記載を簡略した部分 原則として従来通りの操作をすることで差し支えない。

21

## 試験溶液調製の記載の簡略化(例)

	従来の記載	現在の記載
例1) 試料採取	<u>検体を425 μmの標準網ふるいを通して粉砕した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、30分間放置する。</u>	試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。
例2) 吸引ろ過操作	これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、 <u>ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて</u> 吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、 <u>3分間</u> 細砕した後、上記と同様に操作して、得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。	これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、 <u>吸引ろ過する。</u> ろ紙上の残留物に、アセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。
例3) 転溶操作	この10 mLを <u>あらかじめ</u> 10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。 <u>n-ヘキサン100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、n-ヘキサン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にn-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、n-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせる。</u>	この10 mLを採り、10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、 <u>n-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。</u>

22

## 試験溶液調製の記載の簡略化(例)

	従来の記載	現在の記載
例4) 脱水操作	これに <u>適量の無水硫酸ナトリウム</u> を加え、 <u>時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中</u> に <u>ろ過する。n-ヘキサン20 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液で</u> 紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。 <u>両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40 以下でn-ヘキサンを除去する。</u>	抽出液に <u>無水硫酸ナトリウム</u> を加えて脱水し、 <u>無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40 以下で濃縮し、溶媒を除去する。</u>
例5) アセトニトリル/ヘキサン分配操作	この残留物にn-ヘキサン30 mLを加え、 <u>100 mLの分液漏斗に移す。</u> これにn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、 <u>振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。n-ヘキサン層にn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返し、アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40 以下でアセトニトリルを除去する。</u> この残留物にn-ヘキサンを加えて溶かし、正確に5 mLとする。	この残留物にn-ヘキサン30 mLを加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にn-ヘキサンを加えて溶かし、正確に5 mLとする。

23

### 5. 検量線の作成

- 1) 標準原液の調製に留意点がある場合は、原液の調製法も記載する。
- 2) 検量線の濃度範囲は、目的などに応じて適宜設定する必要があるので、原則として記載しない。
- 3) 溶液の調製に使用する溶媒を記載する。
- 4) 抗生物質の濃度は、原則として理化学的純度に基づく濃度を用いることとし、複数の構成成分からなる場合など純度を表記できない場合においては力価濃度を用いる。
- 5) 試験法に従って試験溶液を調製したときの定量限界に相当する試験溶液中濃度( mg/L)を記載し、 には定量限界を記載する。

(従来の記載)

標準品の0.1 ~ 2 mg/L溶液(アセトン)を数点調製し、それぞれ2 μLをGCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

↓

(変更後)……食安発0919第1号(平成25年9月19日)より

標準品のアセトン溶液を数点調製し、それぞれGCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は mg/Lである。

24

## 6. 定量

・ 含量を求める際に、換算係数を使用する場合

換算係数は一般に分子量の比であるため、精密に求められた値であることから4桁を用いる。

例1)

試験溶液をGCに注入し、5の検量線で の含量を求め、次式により、 の含量を求める。  
( を含む。)の含量 (ppm) = の含量 (ppm) × 1.234

例2)

試験溶液をGC-MSに注入し、5の検量線で 及び の含量を求める。次式により、  
を含む の含量を求める。

( を含む。)の含量 (ppm) = A + B × 1.234

A: の含量 (ppm)

B: の含量 (ppm)

## 7. 確認試験

- 1) GC-MS(/MS)又はLC-MS(/MS)による確認を原則として記載する。
- 2) 定性、定量をMSで行う場合であっても、この項目を記載する。
- 3) MSIによる確認が困難な場合には、10.留意事項の2)注意点に適切と思われる確認手段を示す。

25

## 8. 測定条件

(例)

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル  
内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度: 40

移動相: アセトニトリル及び2 mmol/L酢  
酸アンモニウム溶液(3:7)から(9:1)  
までの濃度勾配を10分間で行い、  
(9:1)で5分間保持する。

イオン化モード: ESI(-)又はESI(+)

主なイオン ( $m/z$ ):

ESI(-); プリカーサーイオン 300、  
プロダクトイオン 264

ESI(+); プリカーサーイオン 302、  
プロダクトイオン 97

注入量: 5 µL

保持時間の目安: 8分

1) 測定条件の例示であることを明確にするた  
めに(例)と記載する。

2) 移動相

溶媒名は五十音順に並べる。

混合比率は約分した整数で示す。

グラジエント条件は、測定終了までの条件  
を記載し、測定終了後のカラムの洗浄時間  
初期条件へ戻す時間及び移動相の安定  
化時間は記載しない。

3) 主なイオン

数値の大きい順に記載

(感度順ではない → 機種間差があるため)  
定量イオン及び定性イオンに関する情報  
は、注意点に記載

4) 注入量は、「5. 検量線の作成」及び「6. 定  
量」には記載せずに、「8. 測定条件」に例示  
として記載する。

5) 保持時間の目安 原則として整数で示す。  
(目安なので「約」は記載しない)。

26

## 9. 定量限界

- 1) 単位は mg/kg を用いる。
- 2) 食品の種類により定量限界が異なる場合は、食品の種類毎に記載する。  
例) 0.01 mg/kg (茶の場合は0.02 mg/kg)
- 3) 測定法により定量限界が異なる場合は、それぞれについて記載する。  
例) GC-ECD: 0.01 mg/kg  
HPLC-UV: 0.02 mg/kg
- 4) 換算係数がかかり、定量限界の数値に端数がでる場合の取扱い  
換算係数は一般に分子量の比であるため、精密に求められた値であることから4桁が妥当と考えられる。しかし、定量限界は測定値から求めているので、精度を考慮した場合、2桁が妥当と思われる。従って、桁数の多い換算係数で乗除した結果を1桁に丸める。

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

抽出操作、精製操作、測定法などについて簡潔に記載する。

例)

を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルで転溶した後、穀類、豆類及び種実類はアセトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボン/シリカゲル連結ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

27

## 10. 留意事項

### 2) 注意点

- 1) 試験法に特化した注意点\*を記載する。  
(ただし、特殊なカラム担体などを使用する場合は、商品名を事務連絡などで別途提示する。)  
\* 抽出操作の注意点、追加精製法、誘導体化操作に関する情報、標準品に関する情報、対象化合物に関する情報(分解性、セライトへの吸着性など)、測定時の注意点など
- 2) 定量イオン及び定性イオンに関する情報は、注意点に記載する。

[定量イオン及び定性イオンの記載例]

例1)

のGC-MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン ( $m/z$ ): 254

定性イオン ( $m/z$ ): 178, 102

例2)

のLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン ( $m/z$ ): プリカーサーイオン 382、プロダクトイオン 180

定性イオン ( $m/z$ ): プリカーサーイオン 382、プロダクトイオン 72

## 11. 参考文献

## 12. 類型

28

## 試験法における溶液名の記載方法

<p>(1) 溶液名を示すためには、濃度、溶質名、溶媒名と「溶液」の文字の順に記述する。また、溶質名と溶媒名の間には「・」をつける。</p> <p>【記載方法の原則: (濃度) (溶質名) ・ (溶媒名) 溶液】</p>	<p>(例1) 3 mol/Lエチルマグネシウムプロミド・エーテル溶液</p> <p>(例2) 5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液</p> <p>(例3) 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液</p>
<p>(2) 溶質名の次にその溶媒名を示さないものは水溶液を示す。ただし、水は溶媒として常用されるので省略する。</p>	<p>(例4) 1 mol/L水酸化ナトリウム溶液</p> <p>(例5) 5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液</p>
<p>(3) 液状の試薬名に単に濃度を表示したものは、別に規定するもののほか、水を用いて希釈したものを示す。(液状の試薬の水溶液の場合は、「溶液」を付さない。)</p> <p>注) 塩酸、硫酸、硝酸などの液状の酸、ビリジジンなどの液状の塩基(アンモニア水は除く)及びエタノールなどの液状のアルコールなど水と混和する液状の試薬に水を加えて希釈する場合、水は溶媒として常用されるので省略する。</p>	<p>(例6) 1 mol/L塩酸</p> <p>(例7) 0.1 vol%ギ酸</p> <p>(例8) 50 vol%エタノール</p>

29

<p>(4) 混液の記載方法</p> <p>1) 混液の溶媒(溶液)名は五十音順(混合比率の高い順ではない)に記載する。混合比率は約分した整数で示し、比率の後ろに「混液」と記載する。(例9)及び(例10)</p> <p>2) 移動相のグラジエント条件を記載する場合は、次のように記載する。 「<math>A</math>及び<math>B</math>の混液」のあとに比率を記載する。(例11)</p> <p>上記に従って混液を記載するとわかりにくい場合は、(例12)を参考にして記載する。</p>	<p>(例9) エーテル及び<math>n</math>-ヘキサン(3:7)混液</p> <p>(例10) アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸(1:1)混液</p> <p>(例11) 移動相: アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸の混液(1:1)から(9:1)までの濃度勾配を5分間で行い、(9:1)で10分間保持する。</p> <p>(例12) 移動相: <math>A</math>液及び<math>B</math>液の混液(1:1)から(1:9)までの濃度勾配を5分間で行い、(1:9)で10分間保持する。 <math>A</math>液: <math>A</math>及び<math>B</math>(<math>W:X</math>)混液 <math>B</math>液: <math>A</math>及び<math>B</math>(<math>Y:Z</math>)混液</p>
---	---

[参考] パーセント濃度

- %: 重量百分率
  - w/v%: 液体100 mL中の物質含量(g)
  - w/w%: 物質100 g中の液体含量(mL)
  - vol%: 液体100 mL中の物質含量(mL)又はガス100 mL中の物質含量(mL)
- ただし、別に規定するもののほか、物質含量(g)は、無水物として算定した量を表す。

30



## 公示試験法の見方・考え方

- 実施機関の実情に合わせてられようするために、ある程度自由度を持たせた記載としている(器具・装置の指定や記載を削除)
- 文章の繰り返しなど記載が煩雑にならないようにするため、一般的な操作の記載は簡略化

➡ **公示試験法の記載は、試験法としての最小限を示したもの**



- 記載されていないことでも、一般的な操作や科学的に妥当と判断されることは実施しても良い。

— ➡但し、試験法の性能に影響する可能性がある場合には検証が必要

例) 吸引ろ過の際のケイソウ土の使用が記載されていない場合

ろ過助剤としてのケイソウ土の使用は一般的なもので、使用は問題ない。

- ・ 試験法開発では、必ずケイソウ土を使用して検討を実施
- ・ ケイソウ土の使用に問題があれば、注意点に記載
- ・ ケイソウ土にはセライト545などが使用される。

31

## 1. 試験法通知「第1章 総則」の改定

## 2. 公示試験法の見方・考え方

## 3. 残留農薬等公示試験法開発の考え方

32



## 残留農薬等試験法検討実施要領

### ・残留農薬等試験法について 試験法の検討要領、考え方

- |          |                    |                  |
|----------|--------------------|------------------|
| 1. 試料採取  | 6. 凝固処理            | 11. カラムクロマトグラフィー |
| 2. 試料量   | 7. 濃縮              | 12. 測定法          |
| 3. 抽出溶媒  | 8. 転溶              | 13. 全般的な事項       |
| 4. 抽出操作  | 9. 脱水              |                  |
| 5. 茶の試験法 | 10. アセトニトリル/ヘキサン分配 |                  |

### ・添加回収試験実施要領 評価方法、添加回収試験の実施方法

- |                     |         |
|---------------------|---------|
| 1. 用語の定義            | 4. 定量限界 |
| 2. 評価の方法            | 5. 留意事項 |
| 3. 添加を行う食品の種類及び添加濃度 |         |

33

## ・残留農薬等試験法について

### 2. 試料量

#### (1) 農産物

野菜、果実、ハーブ: 20.0 g<sup>\*1</sup>

穀類、豆類、種実類: 10.0 g<sup>\*2</sup> (水 20 mL を添加し、30分間放置する)

茶、ホップ: 5.00 g<sup>\*3</sup> (水 20 mL を添加し、30分間放置する)

\*1: 十分に均一化すれば、試料量として十分である。

\*2: 脱脂の効率を考慮し、野菜、果実より少量とする。

\*3: 10.0 gでは取扱いが困難なため、5.00 gとする。

#### (2) 畜水産物

固体試料(脂肪以外): 10.0 ~ 20.0 g<sup>\*4</sup>

固体試料(脂肪): 5.00 ~ 10.0 g<sup>\*4</sup>

液体試料(乳、卵、はちみつ等): 5.00 ~ 20.0 g<sup>\*4</sup>

\*4: 試料の均一性を考慮した場合、試料量はできるだけ多い方が望ましい。

34

### 3. 抽出溶媒

#### (1) 農産物の場合

原則としてアセトンを使用する。

(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。)

#### (2) 畜水産物の固体試料(筋肉、脂肪、内臓、魚介類等)の場合

原則として農薬等を脂肪とともに抽出する方法を検討する。

農薬等の極性が高いため脂肪とともに抽出することが困難な場合

抽出に脂肪を溶解しない極性の高い溶媒(アセトニトリル等)を用いる

ことも可能

ただし、融解した脂肪に農薬等を添加し、再凝固させた状態からの抽出状況を評価する。

抽出方法を脂肪と脂肪以外の食品とで分ける必要がない場合には、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。

#### (3) 畜水産物の液体試料(乳、卵、はちみつ等)の場合

脂肪を溶解しない溶媒(アセトニトリル等)を用いて抽出しても良い。

液-液分配と見なすことができるので、脂肪を溶解しない溶媒を用いても、試料ととの間の分配により農薬等を抽出可能と考えられる。

35

#### (4) 抽出溶媒量

[変更前]

試料量20 gを用いる場合: 1 回目 100 mL、2 回目 50 mL

試料量が20 gより少量の場合には、溶媒量を適切な量に減らしても良い。

(例: 試料量10 g : 1 回目 50 mL、2 回目 25 mL)

↓

[変更後]

・原則として、抽出溶媒量は次表に示された量を使用する。

・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。

・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。

36

(4) 抽出溶媒量 (続き)

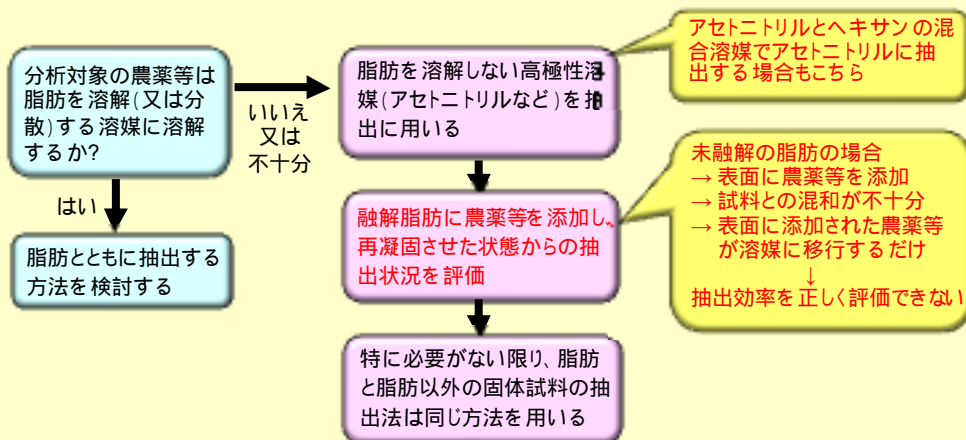
食品	水分含量	試料量 (g)	水の添加量 (mL)	抽出溶媒量 (mL)		
				1回目	2回目	
農産物	野菜、果実、ハーブ	高	20.0	-	100	50
	穀類、豆類、種実類	低	10.0	20	100	50
	茶、ホップ	低	5.00	20	100	50
畜水産物	固体試料(脂肪以外)	中～高	10.0	-	50	25
			～20.0	-	～100	～50
	固体試料(脂肪)	低～中	5.00	-	50	25
			～10.0	-	～100	～50
液体試料(乳、卵、はちみつ等)	中～高	5.00	-	50	25	
		～20.0	-	～100	～50	

- : 食品成分やホモジナイズ時の攪拌状況などによって適宜判断する。

37

【畜水産物の抽出溶媒について】

- (1) 液体試料(乳、卵、はちみつ等)の場合  
アセトニトリルなどの脂肪を溶解しない溶媒の使用も可能
- (2) 固体試料(筋肉、脂肪等)の場合



38

## 【畜水産物の固体試料の抽出溶媒について】

〔脂肪を溶解しない溶媒で抽出する場合の抽出状況の評価方法〕

脂肪を加温して融解させたものに農薬等を添加して均一化して、再凝固させた状態からの農薬等の抽出状況の評価する。

### 【方法】

脂肪を加温して融解させる。加温はできるだけ低温(概ね40℃以下)で行い、添加により農薬等が分解や消失しない条件で行う。

融解脂肪に農薬等を添加し均一にする。添加用の標準溶液は、試料と混合する溶媒(アセトンなど)で調製する。

脂肪が再凝固してから30分程度放置後に抽出を開始する。

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し、**脂肪が溶解又は微粒子として均一に分散する条件**で抽出する。

抽出時にエマルジョンが形成された場合

- ・遠心分離を行う。(抽出の際の水層あるいは有機層の液量が多い方が、エマルジョンが形成されずに良好に分離することがある。)
- ・遠心分離後もエマルジョンが残る場合は、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。

39

## 【畜水産物の固体試料の抽出溶媒について(続き)】

〔脂肪を溶解しない溶媒で抽出する場合の抽出状況の評価方法〕

### 【牛の脂肪のホモジナイズ状況】

- ・アセトニトリル  
脂肪がホモジナイザーのシャフトや容器の壁に付着  
抽出困難
- ・アセトン、メタノール  
脂肪がホモジナイザーのシャフトや容器の壁に付着することなく**微粒子となって均一に分散可能**  
抽出可能



(日本食品分析センター提供)

40

## 公示試験法：畜水産物(固体試料)の抽出溶媒

抽出溶媒	特徴・注意点(畜水産物固体試料の場合)
アセトン及びヘキサン混液	脂肪を溶解可能 <b>抽出可能</b> 高極性農薬等の抽出が不十分
アセトン、メタノール、エタノールなど	脂肪を一部溶解し、かつ分散可能 <b>抽出可能</b> 高極性農薬等の抽出が可能 分散するため抽出は問題ないと思われるが、 <u>融解脂肪を用いた検討で確認しておくことが望ましい。</u>
脂肪を溶解しない高極性溶媒(アセトリルを含む)とヘキサンの組合せの場合	ヘキサンにより脂肪を溶解可能 <b>抽出可能</b> 高極性農薬等の抽出が可能 脂肪を溶解しない高極性溶媒に抽出 <u>融解脂肪を用いた評価が必要</u> (従来の公示試験法は、融解脂肪を用いた評価を行っていないので、採用にあたっては確認が必要)
ヘキサン、酢酸エチルなど	脂肪を溶解可能 抽出可能??? 高極性農薬等の抽出が不十分 農薬等が水分含量の高い組織中に残留する場合、水と混和しないため、組織中に浸透して効率よく抽出できるか疑問がある。 <u>水と混和するアセトンなどの溶媒を用いる方が良い。</u>
脂肪を溶解しない高極性溶媒(アセトリルを含む)のみの場合	脂肪を溶解(分散)できない <b>抽出困難</b> <b>抽出溶媒の変更が必要</b>

41

## 公示試験法：畜水産物(固体試料)の抽出溶媒

一斉試験法	抽出溶媒 (畜水産物固体試料)		特徴・注意点
GC-MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)	アセトン及びnヘキサン(1:2)混液		脂肪を溶解可能 <b>抽出可能</b> 高極性農薬等の抽出が不十分 <b>新規一斉試験法(畜水産物)の検討</b>
LC-MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)			
HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法(畜水産物)	アセトリル、アセトリル飽和nヘキサン、無水硫酸ナトリウム		脂肪を溶解可能 <b>抽出可能</b> アセトリルに抽出 <u>融解脂肪で未評価 確認が必要</u>
HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法(畜水産物)	脂肪以外	95%アセトリル溶液	脂肪を溶解(分散)できない。 <b>抽出困難</b> 脂肪以外も脂肪と同じ方法で実施する必要がある。
	脂肪	95%アセトリル溶液、nヘキサン	脂肪を溶解可能 <b>抽出可能</b> アセトリルに抽出 <u>融解脂肪で未評価 確認が必要</u>
HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法(畜水産物)	アセトリル、メタノール及び0.2%メタリン酸溶液(1:1:3)混液		脂肪を溶解(分散)できない <b>抽出困難</b> <b>抽出溶媒の変更が必要</b> 脂肪以外も脂肪と同じ方法で実施する必要がある。

42

## 4. 抽出操作

### (1) 抽出法・・・ホモジナイズ(細砕)

- ・ホモジナイザーカップを使用する場合：3分間
- ・高速ホモジナイザー(ポリロン等)を使用する場合：1～2分間
- ・抽出は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。

#### [理由]

振とう条件には様々な因子\*があり、一律に規定することは困難。

実施機関で使用している振とう機を用いて、最適な条件を検討する必要がある。

\* 振とう方式(立て振とう、斜め振とう等)、振とう距離、振とう速度、容器内の空間の大きさ等

液-液分配に振とうを用いる場合 添加回収試験により条件を検討することが可能

試料からの抽出に振とうを用いる場合

試料からの農薬等の抽出効率は添加回収試験では確認できない。

確認には農薬等の残留試料を用いた検討が必要

残留試料を用いた検討は現実的ではないため、試料からの抽出では原則として

振とう抽出は用いないこととし、より抽出力の強いホモジナイズ抽出を用いる。

43

## 4. 抽出操作(続き)

### (2) 分離法

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のろ過助剤を使用する。

農薬等のろ過助剤への吸着性等を評価するため

↓

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。

- ・ケイソウ土等への吸着に関する情報については、通知の注意点に記載
- ・使用するケイソウ土が多すぎると、予期しない吸着が起きる可能性があるの  
で、使用量は必要最小限にとどめ、過剰に使用しないほうが良い。

44

## 7. 濃縮

- (1) ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で濃縮する。  
(他の適切な濃縮装置を用いても良い。)  
……減圧濃縮時の損失について、必要に応じて検討することが望ましい。
- (2) アセトン抽出液の濃縮  
抽出液中に水が約20 mL存在した場合……約30 mLまで濃縮する。  
(次に転溶する場合は、容器を転溶溶媒で洗って分液ろうとに移す。)
- (3) 濃縮乾固する場合  
ロータリーエバポレーターなどを用いる場合は、少量の溶媒を残し、最後の数mLは窒素ガス等を吹き付けて溶媒を揮散させる。  
特に揮発性の高い農薬等については、必要に応じてキーパーなどの使用も検討する。

45

## 8. 転溶

(例)

食塩水：10%塩化ナトリウム溶液 100 mL

転溶溶媒：1回目 100 mL、2回目 50 mLで2回転溶

振とう時間：5分間

(農薬等の特性に応じて、塩化ナトリウム溶液の濃度などを適切な条件に変更しても良い。)

## 9. 脱水

適量の無水硫酸ナトリウムを加え15～30分間放置する。  
容器及び無水硫酸ナトリウムは溶媒20 mLで2回洗う。

46

## 10. アセトニトリル / ヘキサン分配

ヘキサン30 mLに対してヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出する。

- (1) アセトニトリル及びヘキサンの比率  
脱脂効果を高めるため原則として1:1とする。  
(アルドリンのようにアセトニトリル層に分配しにくい農薬等では、脱脂効果は落ちるが、アセトニトリルの比率を高くしても良い。)
- (2) アセトニトリル及びヘキサンの溶媒量  
食品中の脂肪含量に応じて適宜変更して良い。
- (3) 分配操作の回数  
回収率、脱脂効果等に問題がなければ3回以外の操作回数(3回より少ない場合あるいは多い場合を含む)でも良い。
- (4) ヘキサン洗浄  
損失のない農薬等については、アセトニトリル層のヘキサン洗浄を行っても良い。

47

## 11. カラムクロマトグラフィー

- (1) ガラスカラム及び市販のミニカラムのいずれを使用しても良い。
- (2) 複数のミニカラムを連結した連結カラムを用いた場合には、各カラム単独での溶出挙動に加え、カラムを連結した状態での溶出挙動についても確認する。  
[理由]各カラム内での拡散により、カラム連結後に溶出位置がずれることがあるため。
- (3) シリカゲル及びフロリジルについて
  - ・ 精製効果、再現性等に問題が無い場合にはミニカラムを用いて良い。
  - ・ ミニカラムではロット差や吸湿等により溶出位置がずれる場合、安定した結果を得るにはガラスカラムを使用した方が良い場合がある。
- (4) ガラスカラムを用いる場合の標準的な方法  
カラム：内径1.5 cmのガラスカラム  
活性化：130 で12時間以上加熱活性化した充填剤をデシケーター中で放冷した後使用する。  
充填剤の量：必要最小量(5又は10 g)  
無水硫酸ナトリウムの量：約5 g  
充填溶媒：湿式充填の場合は調製溶媒を明記する。

48



### 13. 全般的な事項

- (1) 試験法の開発に当たっては、定量は溶媒で希釈した標準溶液を用いて絶対検量線法で行う。原則としてマトリックス添加標準溶液、標準添加法及びサロゲートを用いない方法を検討する。また、検量線の濃度は、例えば回収率の25、50、75、100、125、150%相当濃度などを用いる。

【理由】

- 測定がマトリックスの影響を受ける場合に、その影響を補正するために次のような手法を用いた場合  
マトリックス添加標準溶液、 擬似マトリックス(PEG、 analyte protectantsなど)の添加、  
標準添加法、 サロゲート(安定同位体標識標準品を用いた内標準法)  
精製を省略してもある程度結果(回収率)は得られる。  
精製方法の検討が不十分になり、精製方法に関する情報が少なくなる。  
～ の手法には課題もあり、補正が適切か検証が必要だが、検証のための手順が示されていない。
- 公示試験法
  - ・ 検査に使用するためには、食品を限定せずにできるだけ**広範囲の食品に適用できる方法**が望ましい。
  - ・ 基準値への適否判定を目的としているため、**精確な分析値を求める必要がある。**  
種類の異なる8食品を用いて、溶媒で希釈した標準溶液を用いた絶対検量線法で定量可能な方法(マトリックスの測定への影響が少ない方法)を開発  
精製法に関する情報を提供  
精製の難しい食品にもできるだけ適用可能な試験法として開発

49

#### 【マトリックスの影響を補正するために用いられる手法の課題】

マトリックス添加標準溶液

- ・ 適切なブランク試料を食品毎に準備する必要がある。
- ・ 同じ食品でも個体差があり、測定に影響を及ぼすマトリックスの量・種類が異なる。

擬似マトリックス(PEG、 analyte protectantsなど)

- ・ 全ての食品について、対象とする食品マトリックスと同じように補正ができるとは限らない。

標準添加法

- ・ 操作が煩雑
- ・ 食品中の残留分析に適用する標準的な方法及び評価基準がない。

サロゲート(安定同位体標識標準品を用いた内標準法)

- ・ 安定同位体の入手できる農薬等は限られている。
- ・ 安定同位体は高価
- ・ 測定対象化合物が使用する安定同位体の数だけ増加する。  
GC-MS(/MS)、LC-MS(/MS)の多成分分析ではモニターイオン数に制限がある。
- ・ 食品中の残留分析に適用する標準的な方法及び評価基準がない。  
( サロゲートが正しく機能すれば補正された回収率は100%になるはず。 )

50

### 13. 全般的な事項(続き)

- (2) 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。
- (3) 試験溶液と検量線作成用の標準溶液は、同じ溶媒で調製する。
- (4) 既存の公示試験法を適用する場合には、その試験法が分析対象としている他の農薬等との分離についても検討する。
- (5) GC-MS(/MS)あるいはLC-MS(/MS)による確認方法についても検討する。
- (6) 試料マトリックスの測定への影響の検討について
  - ・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)の比を求めて確認する。
  - ( \* 添加回収試験における回収率100%相当濃度の標準溶液を、それぞれブランク試料の試験溶液及び溶媒で調製する。 )
  - ↓
  - ・できる限り試料マトリックスの測定への影響の少ない(面積(又は高さ)比が1になる)試験法を検討する。

51

### 13. 全般的な事項(続き)

- (7) 抗生物質の純度
  - ・原則として理化学的純度を用いる。
  - ・複数の構成成分からなるなど、理化学的純度を表記できない場合には力価を用いる。
  - ・検量線の作成に当たっても、原則として理化学的純度に基づく濃度を用いる。(理化学的純度を表記できない場合には力価濃度を用いる。)
- (8) 試験溶液に不溶物がある場合
  - ・原則として遠心分離を行い上清を測定に用いる。
  - ・吸着等の影響を避けるためフィルターろ過は行わない。
    - ・……フィルターろ過を行う場合には、検討対象の全ての食品(あるいはフィルターろ過を行う食品)について、食品マトリックス共存下での農薬等の吸着の有無を検証する。

52

## ・添加回収試験実施要領

### 1. 用語の定義、2. 評価方法<sup>注)</sup>

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、その結果から以下のパラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

[パラメータ]

- (1) 選択性
- (2) 真度
- (3) 併行精度
- (4) 定量限界
- (5) 試料マトリックスの測定への影響 …… **ガイドラインにはない項目**

注) 「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」厚生労働省食品安全部長通知 食安発1224第1号(平成22年12月24日)も参考にする。

53

### (1) 選択性

[定義] 試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象化合物を正確に測定する能力をいう。

[評価方法] ・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)について表1のことを確認する。

表1 定量限界と基準値\*の関係と妨害ピークの許容範囲

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 基準値の1/3	< 基準値濃度に相当するピークの1/10
定量限界 > 基準値の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

\* 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。

54

## (2) 真度

[定義] 十分多数の試験結果から得た平均値と承認された標準値(添加濃度等)との一致の程度をいう。

[評価方法]

- ・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。  
(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。)

## (3) 精度

[定義]

精 度: 指定された条件下で繰り返された独立した試験結果間の一致の程度をいう。

併行精度: 同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用いて、同一の試験室で、同一の実施者が、同一の装置を用いて、短時間のうちに独立な試験結果を得る条件(併行条件)による測定結果の精度をいう。

[評価方法]

- ・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。

55

表2 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 < ~ 0.01	5	70 ~ 120	25 >
0.01 < ~ 0.1	5	70 ~ 120	15 >
0.1 <	5	70 ~ 120	10 >

56

#### (4) 定量限界

[定義] 適切な精確さをもって定量できる分析対象化合物の最低量又は濃度をいう。  
(実施要領では、原則として通知試験法に示された定量限界を用いる。)

「不検出」基準の農薬等の場合 施行通知\*1 に示された検出限界\*2 を用いる。

\*1: 平成17年11月29日付け食安発1129001号食品安全部長通知

\*2: 本実施要領において「定量限界」と同義として取扱う。

[評価方法]

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 及び を満足していることを確認する。

(\* 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」とされる場合など)

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2の目標値を満足していること。

クロマトグラフィーによる分析では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク( から得られるピークあるいは標準溶液から得られるピーク) は、 $S/N$  10であること。

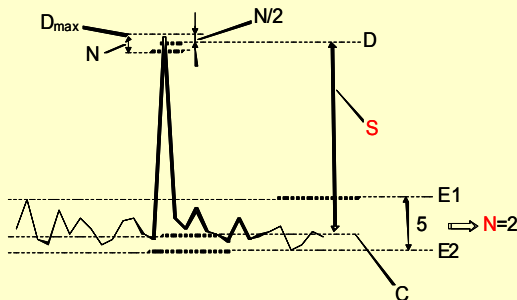
57

#### (4) 定量限界 (続き)

##### < S/N比の求め方 >

経験的にノイズの最大値(E1)と最小値(E2)との幅はノイズの標準偏差( $\sigma$ )のおよそ5倍となるため、その幅の2/5を ノイズ幅(N)とする。

一方、ノイズの中央値(C)をベースラインとし、ピークの最大値( $D_{max}$ )からN/2を引いた値をピークトップ(D)とし、CとDの幅を ピーク高さ(S)とする。SをNで除した値をS/N比とする。



(参考) ノイズが観察されない場合

データ取り込みの際にノイズをカットする設定になっていないか確認する。  
繰り返し測定におけるピーク面積の標準偏差から求める方法もある。

58

#### (4) 定量限界(続き)

##### [定量限界の推定]

- ・添加濃度が定量限界濃度と異なる場合(添加濃度が基準値濃度の場合)  
定量限界を求めるためには、別途、定量限界濃度での添加回収試験を実施する必要がある。  
試験法開発の負担軽減のために、定量限界濃度での追加の添加回収試験の実施を省略(可能であれば、定量限界濃度での添加回収試験から、定量限界を求めることが望ましい。)  
その代わりに「**定量限界の推定**」を行う。

##### (方法)

試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、マトリックス添加標準溶液\*1及び溶媒標準溶液\*2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(%)及びS/N比を求める\*3。

**面積(又は高さ)比(%)は、表2の真度の目標値を満足し、かつS/N比 10であることが望ましい。**

\*1 ブランク試料の試験溶液で調製

\*2 溶媒で調製

\*3 定量限界濃度での添加回収試験を2回以上実施して評価しても良い。

59

#### 【検出限界と定量限界について】

##### 1) 検出限界(limit of detection: LOD)

装置の検出限界・・・分析対象を含まない標準液(又は検出限界近傍の濃度の標準液)の測定から求めた最低量

**方法の検出限界**・・・ブランク試料の測定から求めた最低量

##### 2) 定量限界(limit of quantitation: LOQ)

装置の定量限界・・・定量限界近傍の濃度の標準液の測定から求めた最低量

**方法の定量限界**・・・添加試料の測定から適切な精確さをもって定量できる最低量

##### 3) **通知法の定量限界**(告示法では検出限界)

公示試験法の目的は基準値の判定 **正しく基準値を判定できることが重要**

基準値が定量限界よりも高濃度の場合 分析法の性能としての定量限界(方法の定量限界)を厳密に求めることは必ずしも重要ではない。

試験法の定量限界を食品毎に求めるには、**食品毎に定量限界濃度での添加回収試験を実施して評価する必要がある。** 大変な労力が必要

基準値濃度での添加回収試験による評価を実施

##### (注)

・検出限界と定量限界には、いくつかの考え方と求め方があるので上記は一例である。

・分析化学の用語としては定量上限も定義できるので、通知の定量限界は「定量下限」に相当する。一方、高濃度の場合は希釈して測定することで対応が可能のため、方法の定量上限を求めることは残留農薬等の検査では一般に実施されていないので、定量下限という用語を用いなくても実施上は問題はないと思われることから、従来から用いられている「定量限界」の用語をそのまま用いている。

60

### (5) 試料マトリックスの測定への影響

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比を求めて、試料マトリックスの測定への影響を確認する。

- ・ 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回以上測定する。

\* 試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

↓

各食品の回収率とピーク面積比に矛盾がないか。

必要に応じてピーク面積比で回収率を補正した補正回収率を求めて確認すると良い。

61

## 3. 添加を行う食品の種類及び添加濃度

### (1) 添加回収試験の対象食品

添加回収試験は、原則として次表に示した**8食品以上**について実施する。

対象食品の選択にあたっては、基準値が設定されている食品を優先して選択する。

下線で示した食品に基準値が設定されていない場合には基準値が設定されている他の類似の食品と入れ替えて実施する。

基準値が設定されている食品が8食品に満たない場合であっても、試験法の頑健性等を考慮し、表の食品を参考として8食品以上を選択して実施する。

(参考)

試験法開発の負担軽減と効率化を図るために、食品数を10食品から8食品以上に変更された。また、基準値が設定されている食品を中心に試験を実施することが明確にされた。

62



### 添加回収試験の対象食品

#### 1) 農産物(下線の食品を優先する。)

穀類(脂肪を含む食品)	玄米、小麦、大麦、ライ麦、ともちなど
豆類(脂肪を含む食品)	大豆、らっかせい、小豆類、えんどう、そら豆など
野菜(葉緑素を多く含むもの)	ほうれんそう、こまつな、しゅんぎくなど
野菜(イオウ化合物を含むもの)	キャベツ、たまねぎ、ねぎ、だいこん類、かぶ類、ブロッコリー、にんにくなど
野菜(デンプンを多く含むもの)	ばれいしょ、さといも類、やまいもなど
果実(柑橘類)	オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ライムなど
果実(柑橘類を除く)	りんご、なし、左記以外の果実類
茶	緑茶(煎茶)

#### 2) 畜水産物(下線の食品を優先する。)

筋肉	生の筋肉、豚の筋肉、鶏の筋肉など
脂肪	生の脂肪、豚の脂肪、鶏の脂肪など
内臓	生の肝臓、豚の肝臓、鶏の肝臓、牛の腎臓、豚の腎臓、鶏の腎臓など
卵	鶏卵
乳	牛乳
はちみつ等の養蜂製品	はちみつ*
魚介類(脂肪を多く含むもの)	うなぎ、さけなど
魚介類(貝類)	いじみ、あさりなど

\* らっかせい: 生らっかせいを用いる。殻を除去した豆(渋皮を含む)を試料とする。

はちみつ: 可能であればそば蜜又は百花蜜などの着色したものをを用いて検討することが望ましい。

うなぎ: 活鰻を使用する。頭を除いた可食部(内臓、骨及び皮を含む)を試料とする。

63

## 3. 添加を行う食品の種類及び添加濃度

### (2) 添加濃度

- 1) 添加濃度は、原則として「基準値濃度」を用いる。
- 2) 定量限界が基準値以上の場合 「定量限界濃度」を用いる。
- 3) 「不検出」基準の場合 「定量限界濃度」を用いる。
- 4) 基準値未設定の場合\* 定量限界 < 一律基準では「一律基準濃度」を、定量限界 一律基準では「定量限界濃度」を用いる。

表3 定量限界と基準値の関係と添加濃度

定量限界と基準値の関係	添加濃度
定量限界 < 基準値	基準値濃度
定量限界 基準値	定量限界濃度
不検出	定量限界濃度
基準値未設定*	
定量限界 < 一律基準	一律基準濃度
定量限界 一律基準	定量限界濃度

\* 基準値未設定の場合には、基準値の代わりに一律基準(0.01 ppm)を用いて同様に取扱う。

64



#### 4. 定量限界

定量限界は、基準値濃度の1/10を目処とする\*。

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\*。

定量限界の評価方法は、1. 評価の方法の(4)定量限界に従うこと。

\* 基準値が非常に低い農薬等/食品の組合せ、あるいは検出が困難な農薬等に関してはこの限りではない。

65

#### 5. 留意事項

- (1) 添加回収試験に用いる食品について  
原則として新鮮な食品を使用し、均一化して秤量後、農薬等を添加する。  
凍結保存した食品又はそのホモジネートは、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、有姿で凍結した試料を検討に用いても良い。(ただし、凍結・融解の繰り返しは避ける。)
- (2) 添加する標準溶液の量: **試料量の1/20 ~ 1/10程度**  
・ 添加溶媒により、酵素活性あるいは抽出効率が増減する可能性があるため、できるだけ少量にする。(例: 試料10 g → 0.5 ~ 1 mL)
- (3) 添加する標準溶液の調製溶媒  
・ **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。)
- (4) 添加後の放置時間  
農薬等を添加後よく混合し、**30分程度放置後\***に抽出操作を開始する。  
\* この間に分解が見られる場合には、分解を防止する方法について検討する。

66

## 5. 留意事項(続き)

### (5) 分解防止法の検討について

農産物 全ての検討対象食品に共通な分解防止方法を検討する。

畜水産物 全ての検討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。 試験法通知には、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。

#### [理由]

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。

#### (参考)

従来は、農薬等の分解が見られた食品が1食品でもあった場合は、すべての検討対象食品について、分解防止操作を行った添加回収試験を実施していたが、試験法開発の負担軽減と効率化を図るために、畜水産物については上記のような取扱いに変更された。

67

## 5. 留意事項(続き)

(6) 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。

#### [添加回収試験での評価方法]

分解防止操作を行っ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。

(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することが望ましい。)

(7) 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。

(8) 乾燥試料に対する水添加後の放置時間

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。

(9) 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試験法(案)の注意点に記載する。

68

## 試験法の評価

### 『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』

厚生労働省医薬食品局 食品安全部長通知  
食安発第1115001号(平成19年11月15日)  
食安発第1224第1号(平成22年12月24日改正)

1. 趣旨
  - 1) 食品規格(残留基準)への適合判定を目的として実施する試験
  - 2) 各試験機関が使用する試験法の妥当性を評価するための手順
  - 3) 機器分析による試験法を対象
  - 4) 国際的に認められた他の手順を使用することも可能
2. ガイドラインの対象
  - 1) 食品規格への適合判定のために使用される試験法  
告示試験法、 通知試験法、 及び 以外の方法
  - 2) 妥当性が未評価の方法

69

## 試験法の評価

### 『食品中に残留する農薬等に関する試験法 妥当性評価ガイドライン』

3. 用語の定義
  4. 妥当性評価の方法
    - (1) 選択性、(2) 真度、(3) 精度、(4) 定量限界
  5. 添加を行う食品の種類及び添加濃度
    - (1) 添加を行う食品の種類
    - (2) 添加試料の作成等にあたっての留意事項
- 別紙1 妥当性評価された試験法の試験室への導入及び一部を変更する際に評価すべき項目
- 別紙2 室内精度評価のための実験の例
- 別紙3 既存のデータを用いた妥当性評価例

70

## 抽出方法を変更する場合

別紙1 妥当性評価された試験法の試験室への導入及び一部を変更する際に評価すべき項目

### 3. 妥当性評価された試験法の一部を変更する場合

妥当性評価された試験法あるいは検証試験を行って導入した試験法の一部を変更する場合には、本ガイドラインで定めた一部の性能パラメータについて評価を要しない場合がある。但し、選択性及び真度の確認は常に必要である。

最終試験溶液の液量あるいは測定条件(注入量、分析カラムの種類及びサイズ、キャリアーガスの種類、昇温条件、移動相組成、移動相流速、グラジエント条件、カラム温度、MS測定モード及び測定イオン等)を変更した場合は、選択性及び真度を評価し、必要であると判断される場合は併行精度を評価する。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、定量限界も評価する。

上記以外の部分を変更する場合は、選択性及び真度を含めて試験法の性能が大きく変わる可能性があるため、妥当性を評価された試験法の変更ではなく、原則として新たな試験法と考え、本ガイドラインに従った妥当性評価を実施する。特に、試料量、試料採取方法、抽出溶媒の種類あるいは量は変更しないことが望ましい。

71

## 抽出方法を変更する場合

### ▶ 公示試験法

- 1) 試料採取方法、試料量 → 試料のバラツキを考慮
- 2) 抽出溶媒の種類及び量、抽出操作 → 抽出効率を考慮
- 3) 食品の種類に影響を受けにくい方法 → 抽出の難しい食品を考慮

### ▶ 抽出方法を変更する場合 → 抽出効率に影響する可能性がある。

- 1) 試料量を変更 …… 減らす(又は増やす)
- 2) 抽出溶媒を変更 …… 種類、量の変更
- 3) 抽出操作を変更 …… ホモジナイズ抽出 → 振とう抽出に変更



公示試験法と変更後の方法を比較して、同等又はそれ以上の性能を示す。

72

## 抽出方法を変更する場合

- 公示試験法と同等又はそれ以上の性能を示すには、  
添加回収試験での評価のみでは不十分な場合がある。  
(特に抽出効率が低下すると思われる変更の場合)



- ・添加回収試験は、農薬等を外から食品に添加  
→ 試験操作中の損失がないかを確認しているのみ  
→ 実際に食品中に移行・残留した農薬等を抽出できるかが重要



農薬等の実際の残留試料での比較が望ましい



- ・抽出方法 原則として変更しない。  
変更する場合には慎重な検討が必要。
- ・精製方法、測定方法 変更可能(評価は必要)

73

ご清聴ありがとうございました。

74