

クマホス試験法（案）

クマホスは、ポジティブリスト制度導入時に、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として新たに定められた。

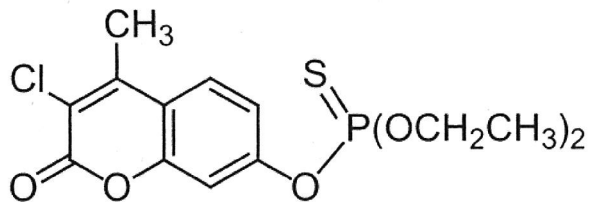
従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。当該成分の試験法については、厚生省告示第370号において示されているが、この試験法は畜水産物の全般に渡ってその試験法の性能が評価されたものではなかった。

そのため、開発が進められてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

1. 概要

(1) 分析対象の化合物

クマホス



(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

試料から塩酸酸性下でアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液で抽出する。多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂し（はちみつの場合は省略する）、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、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-FPD(P)）で定量し、ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）で確認する方法である。

(4) 検出限界 0.01mg/kg

2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として真度及び併行精度の確認を実施した。

牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、さけ、えび、あさり、牛乳、鶏卵及びはちみつ

表 検討結果の真度及び併行精度（試行数 5 で実施）

	添加濃度	検討結果	目標値
真度	0.1 ppm	81～98%	70～120%
	0.01 ppm	78～85%	70～120%
併行精度	0.1 ppm	2～7%	15%未満
	0.01 ppm	5～11%	25%未満

3. 答申案

別紙のとおり。

(参考) これまでの経緯

- 平成17年11月29日 残留基準告示
- 平成19年 1月12日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成28年 6月17日 残留農薬等公示分析法検討会で検討
- 平成28年 8月17日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
- 平成28年 8月23日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
- 平成28年 9月 5日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成28年 9月 7日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

- 穉山 浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部長
- 石井 里枝 埼玉県衛生研究所化学検査室長
- 大野 泰雄 公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
- 尾崎 博 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
- 斉藤 貢一 星薬科大学薬品分析化学教室教授
- 佐々木 一昭 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
- 佐藤 清 一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
- 佐野 元彦 東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
- 永山 敏廣 明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授

根本 了 国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子 日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
宮井 俊一 一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士 大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授
(○ : 部会長)

答申(案)

クマホス試験法

1. 装置

アルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は，第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径 63～200 μm ） カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒径 63～200 μm ）を 130℃で 12 時間以上加熱した後，デシケーター中で放冷する。

ケイソウ土 化学分析用ケイソウ土を用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

多孔性ケイソウ土カラム(20m 保持用) 内径 20～30mm のポリエチレン製のカラム管に，20ml を保持することができる量のカラムクロマトグラフィー用に製造した顆粒状多孔性ケイソウ土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。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500mg/500mg) 内径 12～13mm のポリエチレン製のカラム管に，上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルを，下層にエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルを各 500mg 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。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水，精製水，純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には，n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

クマホス 本品はクマホス 98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

① 穀類、豆類及び種実類の場合

検体を $425\ \mu\text{m}$ の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その $10.0\ \text{g}$ を量り採り、水 $20\ \text{ml}$ を加えて、 30 分間放置する。

これにアセトン $100\ \text{ml}$ を加え、 3 分間細砕した後、ケイソウ土を $1\ \text{cm}$ の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン $50\ \text{ml}$ を加え、 3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、 40°C 以下でアセトンを除去する。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液 $100\ \text{ml}$ を入れた $300\ \text{ml}$ の分液漏斗に移す。酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液 ($1:4$) $100\ \text{ml}$ を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の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、酢酸エチル及び n -ヘキサンの層を $300\ \text{ml}$ の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及び n -ヘキサンの混液 ($1:4$) $50\ \text{ml}$ を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び n -ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、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へろ過し、 n -ヘキサン $20\ \text{ml}$ を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、 40°C 以下で酢酸エチル及び n -ヘキサンを除去する。

この残留物に n -ヘキサン $30\ \text{ml}$ を加え、 $100\ \text{ml}$ の分液漏斗に移す。これに n -ヘキサン飽和アセトニトリル $30\ \text{ml}$ を加え、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 $30\ \text{ml}$ を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返す。アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、 40°C 以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にアセトン及び n -ヘキサンの混液 ($1:1$) $5\ \text{ml}$ を加えて溶かす。

② 果実、野菜、茶及びホップの場合

果実及び野菜の場合は、検体約 $1\ \text{kg}$ を精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体 $20.0\ \text{g}$ に相当する量を量り採る。

茶の場合は、検体 $5.00\ \text{g}$ を量り採り、水 $20\ \text{ml}$ を加え、 30 分間放置する。

ホップの場合は、検体を粉碎した後、 $5.00\ \text{g}$ を量り採り、水 $20\ \text{ml}$ を加え、 30 分間放置する。

これにアセトン $100\ \text{ml}$ を加え、 3 分間細砕した後、ケイソウ土を $1\ \text{cm}$ の厚さに敷

いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50ml を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器に合わせ、40℃以下でアセトンを除去する。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液 100ml を入れた 300ml の分液漏斗に移す。酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 4) 100ml を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の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、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を 300ml の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 4) 50ml を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、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にろ過する。次いで n-ヘキサン 20ml を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 5ml を加えて溶かす。

③ 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

筋肉、肝臓、腎臓及び魚介類の場合は、試料 20.0g を量り採る。脂肪の場合は、試料 5.00g を量り採る。

これに 0.1mol/l 塩酸 20ml を加え、細砕した後、アセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 2) 100ml を加え、さらに細砕した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物に n-ヘキサン 50ml を加え、細砕した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を n-ヘキサンに溶かし、正確に 20ml とする。

④ 乳、卵及びはちみつの場合

試料 10.0g を量り採る。

これに 0.1mol/l 塩酸 10 ml を加え、細砕した後、アセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 2) 100 ml を加え、さらに細砕した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物に n-ヘキサン 50ml を加え、細砕した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。乳及び卵の場合は、この残留物を n-ヘキサンに溶かし、正確に 10ml とする。はちみつの場合は、この残留物をアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) に溶かし、正確に 5ml とする。

b 精製法

① 穀類, 豆類, 種実類, 果実, 野菜, 茶及びホップの場合

内径 15mm, 長さ 300mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径 63~200 μm) 5 g をアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) に懸濁させたもの, 次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れ, カラムの上端に少量のアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) が残る程度までアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) を流出させる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後, アセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 100ml を注入し, 溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り, 40°C 以下でアセトン及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトンを加えて溶かし, 正確に 5ml として, これを試験溶液とする。

② 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 乳及び卵の場合

イ 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

多孔性ケイソウ土カラム (20ml 保持用) に a 抽出法で得られた溶液から, ③ の場合は正確に 10ml を分取し, 乳及び卵の場合は全量を注入する。このカラムを 10 分間放置し, さらに 10 分間吸引して大部分の溶媒を除去した後, n-ヘキサン飽和アセトニトリル 90ml を注入し, 溶出液を 40°C 以下で濃縮し, 溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) に溶かし, 正確に 5ml とする。

ロ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層カラムクロマトグラフィー

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500mg/500mg) にアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) 10ml を注入し, 流出液は捨てる。このカラムにイで得られた溶液から正確に 2ml を分取して注入し, さらにアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) 10ml を注入して, 全溶出液を採り, 40°C 以下で濃縮し, 溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) に溶かし, 正確に 4ml (脂肪の場合は 1ml) としたものを試験溶液とする。

③ はちみつの場合

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500mg/500mg) にアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) 10ml を注入し, 流出液は捨てる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液から正確に 2ml を分取して注入し, さらにアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) 10ml を注入して, 全溶出液を採り, 40°C 以下で濃縮し, 溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び n-ヘキサンの混液 (1 : 9) に溶かし, 正確に 4ml としたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

① 穀物，豆類，種実類，果実，野菜，茶及びホップの場合

クマホス標準品のアセトン溶液を数点調製し，それぞれアルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し，ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお，本法に従って試験溶液を調製した場合，試料中 0.01mg/kg に相当する試験溶液中濃度は，穀類，豆類及び種実類にあつては 0.02mg/l，果実及び野菜にあつては 0.04mg/l，茶及びホップにあつては 0.01mg/l である。

② 筋肉，脂肪，肝臓，腎臓，魚介類，乳，卵及びはちみつの場合

クマホス標準品のアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）の溶液を数点調製し，それぞれアルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し，ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお，本法に従って試験溶液を調製した場合，試料中 0.01mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.01mg/l である。

b 定量試験

試験溶液をアルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し，a 検量線の作成によりクマホスの定量を行う。

c 確認試験

ガスクロマトグラフ・質量分析計により確認する。

d 測定条件

① 定量用

操作条件 1（アルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ）

カラム 内径 0.53mm，長さ 10～30m のケイ酸ガラス製の細管に，ガスクロマトグラフィ用メチルシリコンを 1.5 μ m の厚さでコーティングしたものをを用いる。

カラム温度 80℃で1分間保持し，その後毎分 8℃で昇温する。250℃に到達後5分間保持する。

試験溶液注入口温度 230℃

検出器 280℃で操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

操作条件 2（アルカリ熱イオン化検出器，炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター，波長 526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ）

カラム 内径 0.32mm，長さ 10～30m のケイ酸ガラス製の細管に，ガスクロマトグラ

フィー用 50%トリフルオロプロピル-メチルシリコンを 0.25 μm の厚さでコーティングしたものを用いる。

カラム温度 70°Cで1分間保持し、その後毎分 25°Cで昇温し、125°Cに到達後は毎分 10°Cで昇温し、235°Cに到達後 12分間保持する。

試験溶液注入口温度 230°C

検出器 280°Cで操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。
空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

操作条件 3 (炎光光度型検出器 (リン用干渉フィルター, 波長 526nm) 付きガスクロマトグラフ)

カラム 内径 0.32mm, 長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管に, ガスクロマトグラフィ用 35%トリフルオロプロピル-メチルシリコンを 0.5 μm の厚さでコーティングしたものを用いる。

カラム温度 60°Cで1分間保持し、その後毎分 25°Cで昇温し、210°Cに到達後は毎分 10°Cで昇温し、280°Cに到達後 10分間保持する。

試験溶液注入口温度 250°C

検出器 280°Cで操作する

キャリヤーガス キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

注入量 2 μl

保持時間の目安 18分

② 確認用

測定条件 (ガスクロマトグラフ・質量分析計)

カラム 内径 0.25mm, 長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管に, ガスクロマトグラフィ用 5%フェニル-メチルシリコンを 0.25 μm の厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 60°Cで1分間保持し、その後毎分 25°Cで昇温し、210°Cに到達後は毎分 10°Cで昇温し、300°Cに到達後 8分間保持する。

試験溶液注入口温度 250°C

キャリヤーガス キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (m/z) : 364, 362 及び 226

注入量 2 μl

保持時間の目安 15分