

オラキンドックス及びカルバドックス試験法について（案）

オラキンドックスの食品安全委員会における評価結果（遺伝毒性を有しているものと考えられるほか、発がん性及び催奇形性を有する可能性も否定できないことから、ADIを設定することは適当でない。）に基づき、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、オラキンドックスの規格基準を「食品に含有されるものであってはならない」（以下、「不検出基準」という。）と改正することとされた。

従来より、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、その検出限界を別途通知しているところである。

以上のとおり、オラキンドックスの試験法について開発を進めていたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について、上記分科会において審議を行うものである。試験法が告示されているカルバドックスについても類似化合物であることから、本試験法により同時分析が可能であるため、当該2品目の試験法を併せて「オラキンドックス及びカルバドックス試験法」として告示する。なお、本試験法の改正に伴い、既存のカルバドックス試験法は廃止することとする。

1. 概要

(1) 分析対象の化合物

- ・3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（以下、「MQCA」という。）
オラキンドックスの代謝物
- ・キノキサリン-2-カルボン酸（以下、「QCA」という。）
カルバドックスの代謝物

(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

はちみつ以外の試料については、試料を水酸化カリウム・メタノール溶液で加水分解した後、MQCA及びQCAを抽出し、塩酸酸性下でスチレンジビニルベンゼン共重合体カラムで精製した後、ヘキサンで洗浄する。酢酸エチルに転溶し、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シルカゲルカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う。はちみつについては、MQCA及びQCAを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、酢酸エチルに転溶し、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シルカゲルカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う。

(4) 検出限界 MQCA 0.001 mg/kg
QCA 0.001 mg/kg

2. 真度及び精度の評価

<試験法開発における検討対象食品>

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、うなぎ、さけ、しじみ、はちみつ

MQCA

	検討結果	目標値
真度	72.1~94.7%	70~120%
併行精度	2.3~11.8%	30>

QCA

	検討結果	目標値
真度	71.6~96.9%	70~120%
併行精度	2.4~16.8%	30>

(参考) これまでの経緯

- 平成20年 3月11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21年10月 1日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
- 平成22年 1月27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
- 平成22年 3月 3日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成22年度 試験法開発
- 平成24年 6月～平成26年 3月
残留農薬等公示分析法検討会で随時検討
- 平成26年 5月20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26年 5月20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26年 5月21日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成26年 5月23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

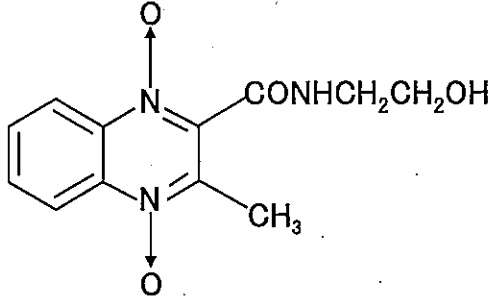
● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

- | | |
|--------|-----------------------------|
| 石井 里枝 | 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長 |
| 延東 真 | 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科教授 |
| ○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 |
| 佐藤 清 | 一般財団法人残留農薬研究所業務執行理事・化学部長 |
| 高橋 美幸 | 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所上席研究員 |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター薬学教育部門教授 |
| 根本 了 | 国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長 |
| 宮井 俊一 | 一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問 |
| 山内 明子 | 日本生活協同組合連合会執行役員組織推進本部長 |
| 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)

オラキンドックス (Olaquinox)

審議の対象	飼料添加物及び動物用医薬品の食品中の残留基準の設定
経緯	ポジティブリスト制度導入時に設定した残留基準の見直しを行うもの
構造式	 <p>The chemical structure shows a benzimidazole core. The benzene ring is fused to the imidazole ring. At position 2 of the imidazole ring, there is a methyl group (CH₃). At position 3, there is a hydroxyethylamide group (-CONHCH₂CH₂OH). At positions 4 and 5, there are nitro groups (-NO₂).</p>
適用動物/適用疾患	豚/成長の促進、豚赤痢及び細菌性下痢症の防止
我が国の承認状況	平成 13 年に飼料添加物の指定を削除されている。また、動物用医薬品としての承認はされていない。
諸外国の状況	国際基準は設定されていない。 オーストラリアにおいて豚、鶏等に基準値が設定されている。
食品安全委員会における食品健康影響評価結果	現時点で評価した知見から見る限り、オラキンドックスについては、遺伝毒性を有しているものと考えられるほか、発がん性及び催奇形性を有する可能性も否定できないことから、オラキンドックスに ADI を設定することは適当でない。
基準値案	別紙のとおり、食品安全委員会における評価結果を踏まえ、オラキンドックスは食品に含有されるものであってはならないものとする。 残留の規制対象物質：3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（代謝物）
答申案	食品に含有されるものであってはならないとする食品規格を設定することが適当である。

オラキンドックス

食品名	基準値案 ppm	基準値現行 ppm	豪州 ppm
豚の筋肉		0.3	0.3
豚の脂肪		0.3	
豚の肝臓		0.3	0.3
豚の腎臓		0.3	0.3
豚の食用部分*1		0.3	0.3
鶏の筋肉		0.3	0.3
鶏の脂肪		0.3	
鶏の肝臓		0.3	0.3
鶏の腎臓		0.3	0.3
鶏の食用部分		0.3	0.3
その他の家きんの筋肉		0.3	0.3
その他の家きんの脂肪		0.3	
その他の家きんの肝臓		0.3	0.3
その他の家きんの腎臓		0.3	0.3
その他の家きんの食用部分		0.3	0.3

平成 17 年 11 月 29 日厚生労働省告示第 499 号において新しく設定した基準値については、網をつけて示した。

* 1 : 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

答申 (案)

オラキンドックス及びカルバドックス試験法 (畜水産物)

(6) オラキンドックス及びカルバドックス試験法 (畜水産物に限る。)

1. 分析対象化合物

オラキンドックスは3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸を、カルバドックスはキノキサリン-2-カルボン酸を分析対象とする。

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

3. 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。

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。

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となる物質を含まないものを用いる。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム (500 mg) 内径8~9 mmのポリエチレン製のカラム管に、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル500 mgを充填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。

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

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (150 mg) 内径約12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、弱塩基性陰イオン交換樹脂150 mgを充填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。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体500 mgを充填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となる物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水あるいは純水など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となる物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

4. 標準品

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 本品は3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 96%以上を含む。

キノキサリン-2-カルボン酸 本品はキノキサリン-2-カルボン酸 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出法

① 筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳、卵及び脂肪の場合

筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合は試料10.0 gを量り採る。脂肪の場合は試料5.00 gを量り採る。

これに2 mol/L水酸化カリウム・メタノール溶液20 mLを加え、還流冷却器を取り付けて、85°Cの水浴中で2時間加熱した後、放冷する。これにメタノール60 mLを加え、10分間激しく振とうした後、吸引ろ過する。ろ過器をメタノール20 mLで洗い、洗液を先のろ液に合わせて、メタノールで正確に200 mLとした後、20 mLを採り、3 mol/L塩酸2 mLを加える。

② はちみつの場合

試料10.0 gに水20 mLを加えて溶かし、塩酸0.5 mLを加える。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。この20 mLを採り、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出する。抽出液に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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製法

① 筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳、卵及び脂肪の場合

a スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg）に水及びメタノール（1：10）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水及びメタノール（1：10）混液6 mLを注入し、溶出液を合わせて分液ロートに移し、*n*-ヘキサン20 mLで2回振とうしてヘキサン層は捨てる。次いで、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出する。抽出液に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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを加えて溶かす。

b エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム（500 mg）にギ酸及びメタノール（1：500）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにa で得られた溶液を注入し、さらにギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール（3：97）混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール（3：97）混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合する。

c 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（150 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにb で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、水5 mLを注入し、流出液は捨てる。さらにメタノール10 mLを注入し流出液を捨てた後、25%アンモニア水及びメタノール（1：19）混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール（1：1）混液に溶解し、脂肪以外の場合は正確に1 mL、脂肪の場合は正確に0.5 mLとしたものを試験溶液とする。

② はちみつの場合

a エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム（500 mg）にギ酸及びメタノール（1：500）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、さらにギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール（3：97）混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸及びメタノール（3：97）混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合する。

b 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（150 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにa で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、水5 mL

を注入し、流出液は捨てる。さらにメタノール10 mLを注入し流出液を捨てた後、25%アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸及びキノキサリン-2-カルボン酸各標準品をそれぞれメタノールに溶解して標準原液を調製し、混合した後、水及びメタノール (1 : 1) 混液を用いて標準溶液を数点調製する。それぞれLC-MS/MS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0.001 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は各化合物ともに0.001 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸及びキノキサリン-2-カルボン酸の含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸 (1 : 19) から (1 : 1) までの濃度勾配を15分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z) :

3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 145、
143

キノキサリン-2-カルボン酸 プリカーサーイオン 175、プロダクトイオン 129、102

注入量：5 µL

保持時間の目安：3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸 11分

キノキサリン-2-カルボン酸 11分