

クロラムフェニコール試験法（案）

クロラムフェニコールは、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。この見直しが平成 26 年に行われ、食品安全委員会による食品健康影響評価において「遺伝毒性を有しているものと考えられること、発がん性を有する可能性が否定できないこと及びヒトでは用量相関性のない再生不良性貧血に関連していると考えられることから、一日摂取許容量を設定することは適当でない。」と評価された。

この評価結果をふまえ、平成 26 年 10 月に、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、引き続き「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。）とすることとされ、規制対象がクロラムフェニコール及びクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体に変更となった。

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。

既存試験法はクロラムフェニコールのみを分析対象として開発されたものであり、クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体を分析対象としてその試験法の性能が評価されたものではない。そのため、試験法について開発が進められてきたが、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

クロラムフェニコール及びクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体

(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

クロラムフェニコール及びクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体を試料からメタノールで抽出する。クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体を β -グルクロニダーゼで加水分解してクロラムフェニコールに変換した後、酢酸エチルに転溶する。ジビニルベンゼン-*N*-ビリルピロリドン共重合体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。

(4) 検出限界 0.0005 mg/kg（ローヤルゼリーは0.005 mg/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、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、うなぎ、しじみ、はちみつ及び
ローヤルゼリー（生及び乾燥）

表 検討結果の真度及び併行精度

		検討結果	目標値
真度	親化合物	84～109%	70～120%
	抱合体	79～104%	
併行精度	親化合物	1.6～4.8%	30%未満
	抱合体	2.8～6.3%	

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23年 1月24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26年 3月 3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26年 7月31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26年10月21日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成28年 3月 残留農薬等公示分析法検討会で検討
- 平成28年 5月17日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成28年 5月18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 5月24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 5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

● 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]

- 穂山 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)

クロラムフェニコール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

クロラムフェニコール

クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体

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。

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。

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500mg） 内径12～13mmのポリエチレン製のカラム管に，ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体500mg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。

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。

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。

β -グルクロニダーゼ（タイプIX-A） 本品は，*Escherichia coli* 由来の β -グルクロニダーゼタイプIX-Aを用いる。本品の1単位は，フェノールフタレイン β -D-グルクロニドを基質として，pH6.8，37°Cにおいて1時間に1.0 μ gのフェノールフタレインを生成する酵素量とする。

β -グルクロニダーゼ溶液 β -グルクロニダーゼ（タイプIX-A）を0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH6.8）に溶解して，1,500単位/mLとなるように調製する。用時調製する。

0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH6.8） 第1液：リン酸二水素カリウム1.36gを量り，水を加えて溶かし正確に100mLとする。第2液：リン酸水素二ナトリウム1.42gを量り，水を加えて溶かし正確に100mLとする。第1液に第2液を加えて混和し，pHを6.8に調整する。

4. 標準品

クロラムフェニコール標準品 本品はクロラムフェニコール98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

筋肉，脂肪，肝臓，腎臓及び魚介類等の場合は，検体を細切均一化した後，試料10.0gを

量り採る。乳，卵，はちみつ及びローヤルゼリーの場合は，検体をよく混合して均一化した後，試料 10.0g を量り採る。ローヤルゼリー（乾燥）は，検体をよく混合して均一化した後，試料 5.00g を量り採り，水 10mL を加えて 30 分間放置する。

これにメタノール 50mL を加え，ホモジナイズした後，毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し，上澄液を採る。残留物にメタノール 30mL を加えてホモジナイズした後，上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ，メタノールで正確に 100mL とする。この溶液から正確に 4mL を分取し，40℃以下で溶媒を除去する。この残留物に 0.1mol/L リン酸緩衝液（pH6.8）9mL を加えて，超音波処理を行いよく混合する。

b 加水分解

a で得られた溶液に β -グルクロニダーゼ溶液 1 mL を加え，37℃で60分間加温する。加水分解後の溶液に酢酸エチル10mLを加え振とう抽出する。毎分3,000回転で5分間遠心分離し，酢酸エチル層を採る。水層に酢酸エチル10mLを加えて振とう抽出した後，上記と同様に遠心分離する。得られた酢酸エチル層を合わせ，40℃以下で濃縮し，溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（1：1）混液 5 mL を加え，超音波処理を行いよく混合する。

c 精製法

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）にメタノール5mL，水及びメタノール（1：1）混液5mLを順次注入し，各流出液は捨てる。このカラムに b で得られた溶液5mLを負荷した後，水及びメタノール（1：1）混液 5 mL 注入し，流出液は捨てる。次いで，水及びメタノール（1：4）混液10mLを注入し，溶出液を40℃以下で濃縮し，溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（3：7）混液に溶かし，正確に2mL [ローヤルゼリー（乾燥）については正確に1mL] としたものを試験溶液とする。

6. 操作法

a 検量線の作成

クロラムフェニコール標準品のアセトニトリル及び水（3：7）混液の溶液を数点調製し，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0.0005mg/kgに相当する試験溶液の濃度は，0.0001mg/Lである。

b 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入して，7の検量線でクロラムフェニコールの含量を求める。

c 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

d 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 μ m

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（3：7）混液

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）

プリカーサーイオン321，プロダクトイオン152

プリカーサーイオン323，プロダクトイオン152

注入量：5 μ L

保持時間の目安：4分