

どちらの場合も50%である。結論として、測定濃度が法的レベルを超えた場合は、結果の不確かさを考慮しなければ、すべて偽陽性の決定を与えることになる。真の濃度が許容あるいは法的な限度を超えていることを、測定結果から確実に示すために、委員会決定2002/657/ECでは $CC\alpha$ の考え方を使用している。この濃度は、法的あるいは許容濃度よりも高い領域で、ある確率で真の濃度が許容濃度以上であることが確実な最低濃度である。 $CC\alpha$ は判断限界であり、真の値が許容限度以下であるリスクが α で示される。 α の典型的な値は5%であり、これは偽陽性の確率が5%であることを示している。

CC α の評価

分析法の $CC\alpha$ 濃度は、ブランク試料20個に、許容あるいは法的な濃度の分析対象を添加し、20測定の結果の平均値と標準偏差を計算して決定される。 α として5%を受け入れるなら、 $CC\alpha$ は平均値プラス標準偏差の1.64倍である。

CC β の評価

CC β の議論では、逆の状況を考える。つまり、分析値が許容限度以下なのに、（実際には）分析対象物が限度値以上に含まれている試料の場合である。ここでは、分析が明確に試料の不適合を示すことが重要である。しかし、不適合を証明する分析法の能力は、分析対象の真の濃度に依存する。前項の例をもう一度考えよう。真の濃度は $CC\alpha$ に等しいとする。この濃度の分析対象物を含む試料は不適合とされるべきであるが、測定値が $CC\alpha$ 以下になり、偽陰性の結果を与える確率は50%である。真の濃度が判断限界であるときには、分析法が不適合を検出する能力については不十分であると結論されるだろう。実際には、偽陰性の率を低くして不適合を証明できるのは、試料の真の濃度が $CC\alpha$ 以上の場合のみである。偽陰性の確率が、例えば5%以下となる許容濃度を定めることは興味深いだろう。この濃度は許容濃度 $CC\beta$ と呼ばれることになる。

この濃度は、ブランク試料20個に $CC\alpha$ 濃度の分析対象を添加し、20測定の結果の平均値と標準偏差を計算して決定される。 β として5%を受け入れるなら、 $CC\beta$ は平均値プラス標準偏差の1.64倍である。

コメント

$CC\alpha$ および $CC\beta$ は統計的に誘導された指標であり、その目的は、適合試料が誤って不適合と分類されるリスクを限定し、偽陰性が十分低い条件で、分析法が不適合を表明できる濃度を示すことであると、認識することが重要である。さらに、これらの限度値を、定量限界のような他の性能指標と混同してはならない。事実、 $CC\alpha$ と $CC\beta$ が基準値を超えていたとしても、委員会決定2002/657/ECは、許容濃度以下で分析法の真度と併行精度が十分であることを示すよう求めている。

通常の執行のための分析では、 $CC\beta$ の考え方は使用されず、全ての状況において、濃度が法的限度以下であると判断されなくてはならない。

Annex II-6 AOAC INTERNATIONAL アプローチ

以下の論文は、最近*Journal of AOAC INTERNATIONAL*に発表されたもので、測定の不確かさに対するAOAC INTERNATIONALの立場を示している。「不確かさ」が分析分野で広く議論され使用されている状況を、説明しようとする試みである。

とても単純なアイデアである。自分の測定からどの程度の変動を予想するかだ。しかし、この考え方は、もともと計測学から試験室に導入されたために、誤差の原因として可能性のあるものを調査し、ベクトルの足し合わせ、結果としての全誤差を統計的に拡張して、95%の確率を付した結果に到達する。しかしながら、分析化学者は、典型的なマトリクスを典型的な試験室が何カ所かで分析して、標準的方法を試験室間で試験すれば、自然が作り出したほとんど全ての不確かさを再現できることを、ずっと前から認識していた。この実際的な方法が、不確かさの議論に取り込まれつつある。

測定の不確かさの公的な定義（NISTのウェブサイト<http://physics.nist.gov/cuu/Uncertainty/glossary.html> から）は

- ・（測定の）不確かさ：測定の結果に付随した、合理的に測定量に結びつけられ得る値のばらつきを特徴づけるパラメータ
- ・このパラメータは、例えば標準偏差（あるいはそのある倍数）であっても、あるいは信頼水準を明示した区間の半分の値であってもよい。
- ・測定の不確かさは一般に多くの成分を含む。これらのし絵文の一部は一連の測定の結果の統計分布から推定することができ、また実験標準偏差によって特徴づけられる。その他の成分は、それもまた標準偏差によって特徴づけられるが、経験又は他の情報に基づいて確率分布を想定して評価される。
- ・測定の結果は測定量の値の最良推定値であること、及び、補正や参照標準に付随する成分のような系統効果によって生ずる成分も含めた、全ての不確かさの成分はばらつきに寄与することが理解される。

“不確かさ”という用語が、分析法にではなく、結果に付随していることに気づけば、この用語に伴っている少なからぬ混乱が直ちに払拭される。つまり、測定の不確かさが議論されており、分析法の不確かさではない。後に、どのように分析法が議論に係わっているかが分かるだろう。

事実上全ての定量分析の教科書の序説で分析の変動が議論され、一連のくり返しの平均値と、それから後同一の方法で分析が行われたなら、その大部分(95%)の結果がおさまるような区間の形で、結果を報告するよう、しばしば勧められる。しかし、化学分析の経済学は1試料について数回の分析を要求するので、最近まで、このような理論的な訓告は大幅に無視されていた。今や、認定を目的として、試験室はその分析結果に測定の不確かさについて示す必要がある。

あなたの結果報告をとりまく不確かさの後光を手に入れるためには、4つのオプションがある。

- (1) くり返しの標準偏差に“t”を適用した信頼区間を計算するオプション
- (2) 9つの国際組織がゴム印を押した、不確かさのバイブルが推奨する理論的ボトムアップアプローチ
- (3) IUPAC/AOACハーモナイズドプロトコルあるいはISO 5725による試験室間試験から得られた、相対標準偏差からの、実用的トップダウンアプローチ
- (4) 質量分率で表した濃度と相対標準偏差を関連付けるHorwitz式、 $RSD_R = 2C^{(-0.15)}$ を適用して得られる推定値。この式は*Journal of AOAC INTERNATIONAL*に発表された10000を超える試験室間の結果の

調査に立脚している。

$$[\text{代替式 } \sigma_H = 0.02c^{0.8495} \text{ 及び } RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}]$$

オプション1

検討中の試料を十分な回数くり返し分析すれば、ルーチン業務において結果がばらつく範囲について、かなり上手く予想できる。20%の脂肪を含むという製品を、毎日毎日製造しているなら、統計学者に手伝ってもらって、製品の脂肪含量、サンプリング、分析すべての不確かさが分かるだろう。しかし、将来二度と見る事のない様な試料の2回分析結果のセットから、不確かさの推定値を出すように言われたなら、その1対の結果の標準偏差を1.2倍するしかない。こんな推定値は、本質的に役に立たない。人並み程度の経験の分析者なら、予測したような極端なばらつきを出すことは滅多にないことは、経験から分かっているからだ。

ついでながら、くり返し数を増やしたからといって、平均値や標準偏差の「真値」は変わらない。くり返し数が多ければ、真の濃度と真の標準偏差を挟む区間推定に、より多くの信頼性が得られる。

オプション2

まず座り込んで、結果に影響する可能性の全てを考え、されにそれぞれが最終の値に寄与する時の変動を推定する。以下に示す項目の標準偏差が含まれる

- ・標準分銅の補正
- ・浮力の補正（温度，圧力）
- ・容量フラスコの補正（校正，温度）
- ・ピペットの容量補正（校正，温度）
- ・標準試料の濃度の不確かさ
- ・検量用試料の濃度の不確かさ
- ・シグナル測定の不確かさ
- ・時間測定の不確かさ
- ・抽出の変動（体積，温度，溶解性効果）
- ・反応あるいは分離の変動
- ・あるかもしれないし、ないかもしれない妨害の効果

反応，分離，測定に影響する可能性を全て考えたら，それぞれの因子に標準偏差を割り付けて，分散を足し合わせ，平方根を計算して得られる最終の標準偏差が，測定の不確かさとして測定結果に付与される。それから，この最終的な標準偏差に包含係数(k)として2をかけると，95%の確率が保証される。つまり，外側に真値がある確率がたった5%しかない，拡張不確かさである。ついでながら，ロットと分析のサンプリングを忘れてはいけない。これらは個々のロットに特有なので，完全を期すならこれらの成分を個々にくり返して推定する必要がある。「実際のな」例がEURACHEMガイドにある。

これはボトムアップアプローチとして知られている。何ヶ月もたって報告書のことも忘れた頃に，初め見逃していた要因を，同僚や友好的な評価者に指摘されても，もう一度やってみることができる。

この（分析化学にとっては）馬鹿げていて，予算を食いつぶすアプローチは度量衡化学者から発案され，5-9桁の有効数字を持つ物理過程（重力定数，光速など）を測定する人々の間で発展してきた概念であるのに，有効数字が2か3の分析化学に適用されてしまった。非常に多くの因子の影響を受ける化学分析法もあるが，あるものは正に，あるものは負に作用して，相殺されることが多いし，多くの

化学分析では数個の因子が、公表された例に挙げられている重量や容量の不確かさを圧倒している。このアプローチはこれらの事実も無視している。

オプション3

ヨーロッパで受け入れられるようになってきた、このアプローチでは、IUPAC/AOAC調和プロトコルあるいはISO 5725プロトコル（外れ値の除去を除けば、同一の統計モデルを利用している）を使って、試験室間試験を実施する。プロトコルでは最小8試験室が、関心のある試料を含む最小5種のマトリクスを分析する。試験室間の標準偏差(S_R)が測定の不確かさと比例関係にあるとする。これは、トップダウンアプローチとして知られている。おそらく典型的と思われる試験室が、異なる状況下で5種の試料を分析したデータを使えば、実際に起こりうる主要な誤差要因の大部分が含まれているだろう。従って、 S_R を測定の不確かさと同等と見なし、標準測定不確かさ（標準不確かさ）と呼んだとしても、結果 $\pm S_R$ の範囲に少なくとも70%の確率で「真」の値が入ると確信できる。 S_R を包含係数である2倍すれば、拡張不確かさが得られる。結果 $\pm 2S_R$ の範囲に少なくとも95%の確率で「真」の値が入ると確信できる。

この共同試験アプローチを用いると、結果的にはISO 17025による「標準方法」に帰着する。この時、重要な変数の全てが、限界内で特定され理解されていることを確実にせねばならない（OMAの用語の定義と解説を参照）。重量は $\pm 10\%$ 以内（計算には実際の重量を使用する）、ガラス容量器の容量は示された値であり、その不確かさは機器分析の場合は無視できる（滴定法では無視できない）、容量の読みとりはスケールを用い、温度は $\pm 2^\circ\text{C}$ 、pHは ± 0.05 、時間は5%以下の範囲で、機器のスケール、ダイヤル、マーカは最も細かい設定である。ISO 17025、5.4.6.2の注にあるように「広く認められた試験方法が測定の不確かさの主要な要因の値に限界を定め、計算結果の表現形式を規定している場合には、試験所はその試験方法及び報告方法の指示に従うことによってこの項目を満足すると考えられる。」こうした条件で、試験室がその方法の性能限界内で操作しているとするならば、基礎となる共同試験から導かれた S_R は報告結果と同じ単位をもち、有効数字の桁数が通常2-3で、標準不確かさとして使用できる。

オプション4あるいは0

最後のやむを得ない手段として、あるいは何も分析していないときには、予想される濃度での予想される不確かさが、所期の目的に適合しているかどうかを決めるための、ラフな計算法がある。Horwitzの式（または、1つの試験室のような特別の場合を説明できる適切な変更バージョン）と予想される濃度に適用し、室内の S_r を求め、2をかけて拡張不確かさとする。Horwitzの式は、%で表した室間再現性パラメータと重量分率Cに適用すると

$$RSD_R(\text{in}\%) = 2C^{(-0.15)}$$

あるいは標準偏差として

$$S_R = 0.02C^{(0.85)}$$

である。室内精度に適用するためには、2で割ってこれを標準不確かさ推定値とする。

$$S_r = 0.01C^{(0.85)}$$

拡張不確かさは2をかけて

$$S_R = 0.02C^{(0.85)}$$

である。例えば、純粋で単純な物質を扱うなら、質量分率で表したCは1であり、期待される拡張不確かさ、 $2S_r$ 、は0.04あるいは4%である。この解釈は、期待される結果の95%が96と104%の間に入る、である。独立したくり返し分析を行えば、不確かさを「改善」できる。「独立した」の最小限の意味は、「同時ではない」であるが、経済はこれを許さないの、理論的予想より改善の程度はかなり小さく

なる。

まとめ：Horwitzの式は、期待される不確かさが典型的な方法のおおよその限度内にあるかどうかを教えてくれる。トップダウンアプローチで得られる最大の範囲は、実際的な状況のほぼ全てにおいて、“真の値”を含むだろう。最も注意深い分析者であっても起こるような予測できない策略を自然に任せておく方が、予算のかかるアプローチに従って事前に予測しようと勇敢に立ち向かうよりも、一般的に容易な方法だろう。ここで、分析法の不確かさが、測定の不確かさと絡み合ってくる。

注1：これらの「予測できない策略」には、温度計を落としたり小数点を書き漏らすような、無秩序なものがある。これらは統計的な記述の対象外である。偶発的な欠陥は品質管理で扱われるが、定量的に予測はできない。これらの欠陥は、分析法に固有ではない。

注2：分析法の不確かさ、バイアス、変動性は個々の測定値のひろがり、つまり1組の測定の平均値と標準偏差で表される。理論では、それぞれの真の濃度に対して無限個の濃度推定値が得られると想定しているが、不運な有限数の化学者は、たいていは1か2種類の与えられた濃度の無限の集合からサンプリングせざるを得ない。化学分析が適切に行われても、外的な影響による明らかな外れ値があれば、外れ値の検定を行って取り除く。バイアスと変動性という不確かさの成分は、真の濃度の関数であることも注意が必要である。変動性はバイアスよりも、濃度への依存が強い。

回収率（バイアス）で補正されるならば、分析法中に指示をしておく。多くの行政的な方法では、規格値（許容値）自信がその方法で確立されており、いわば回収率が規格に組み込まれているので、補正の必要はない。

注3：試験室サンプルがロットを正しく反映しているかどうかの情報はほとんど得られないので、分析化学者はサンプリングの不確かさを無視することが一般的である。分析の情報とサンプリングの情報を整合させるのは、管理部門の仕事である。しかし、サンプルが統計理論（通常非常に多数の単位を必要とする）に従って収集され、単位毎に分析されてサンプリングの不確かさ推定値の基礎が得られるなら、誤差伝播則によって、「サンプリング+分析」の全不確かさが与えられる。

注4：微生物検査の測定と分析の不確かさの表現の問題は、あえて除外してきた。微生物検査では、標準法の結果と試験法の結果の比較のために、分析の対象は故意に「真の」偽陽性及び「真の」偽陰性にまで希釈される。

Annex II.7 内部精度管理アプローチ

認定を受けた試験室は、容認できる内部精度管理手順を導入しなくてはならない。食品分野では、Codex委員会により、国際調和ガイドラインの使用が推奨されている。

精度管理手順の使用から、内部精度管理手順で使用するシェーハート管理図で用いられる標準偏差を使って、試験室内の併行および室間精度の推定値を求められる。この値を1.6倍すると適切な室間精度が得られ、先に述べたのと同じように σ_R の値として使用できる。

この手順はNetherlands Food Inspection Serviceで使用されている。

Annex II.8 NKML(Nordic Committee of Food Analysis)のアプローチ

NKML手順No.5(1977)「化学分析における測定の不確かさの推定と表現」は、与えられた結果の不確かさを推定し表す方法のいくつかのガイドラインから構成されている。この手順では、分析法のそれぞれのステップの不確かさを推定した後、それらを結合して全体の誤差にまとめ上げる原則に基づいた、文書の存在を認識している。しかし、この手順の草案作成時に、測定の不確かさを評価するより時間のかからないモデル、つまり室内の再現性、を基本とすることが決定された。

現行のNKML手順は改訂作業中である。改定案の主要な点は、誤差のまとめ上げを基本とした測定の不確かさ推定の方向に移動するようだ。改訂手順はGUM文書を考慮しながら、実験データの徹底的な利用の可能性を示した新たなEURACHEM文書の重要部分を基礎としている。測定の不確かさ推定において、経験とバリデーションデータを考慮することが適切であるとしたISO/IEC 17025規格とも一致している。実験データを用いれば、全体の測定の不確かさ推定が簡単になるのは明らかである。しかし、分析と結果の不確かさに寄与する原因を同定することは、やはり重要である。分析法の全ての段階を詳細に評価することにより、化学者は誤差の主要な原因が見いだされる場所についての重要な情報を手に入れて、分析法の全誤差を小さくする方法に関する知識が改善される。

改訂手順の目的は、バリデーションあるいは他のタイプの品質保証で得られるデータを用いて、測定の不確かさを推定する方法を、分かりやすく簡潔に記述することである。

Annex II.9 微生物分析

序論

ISO/TC 34/SC 9 “食品製品—微生物”は、最新の会議（バンコク、12月2-4日、2002年）における微生物分析の測定の不確かさのトピックを扱っている。

量的な測定（計数および他の定量法）のための一般的アプローチを定義することに合意した。定性的測定（存在／非存在の試験）にていするアプローチの必要性は明らかであるが、その件について調和アプローチを受け入れるのに十分詳細な考察がなされていないことから、2004年の会議で再度考慮される。

会議で合意された定量分析のための一般的アプローチは、「食品及び動物試料の微生物学—定量分析の測定の不確かさ表現のガイド」というタイトルのISO技術仕様書に記載される。第一原案が、コメントのために回覧された。

このアプローチでは、特定の試験室の結果に伴う、対象微生物の測定の不確かさの1個（あるいは数個）の値を定めている。分析の最終結果の室間精度の標準偏差に基づいた、包括的な“トップダウン”アプローチに従っている。測定過程の包括的モデル作成が難しく、無視できない不確かさ原因を忘れてしまいがちな、食品の微生物分析の場合には、「ステップバイステップ」アプローチの適用は不満足であると、ISO/TC 34/SC 9は考えている。MUの過小評価のリスクは高い。さらに、ステップバイステップアプローチは、選択した包括的アプローチよりも、試験室の負担が大きい。

次に示す3つのオプションが、室内精度の標準偏差を実験的に求めるために利用できる。最初のものほど望ましい。

- ・最初のオプション：試験室自身が確立した、試験室内精度の標準偏差
- ・2番目のオプション：使用した分析法試験室間バリデーションを通じて確立した、試験室内精度の標準偏差
- ・3番目のオプション：その試験室が参加した試験室間技能試験を通じて確立した、試験室内精度の標準偏差

ISO技術仕様書は、オプション1の詳細な分析プロトコルと、オプション2及び3を使用する条件を示している。特に、試験室間試験から導かれたバイアスと精度と、試験室の値が同等であることを示さなくてはならない。さらに、試験で用いられた試料は、試験室で通常使用する試料と、マトリクス・微生物の系統・バックグラウンドとなる菌相・汚染レベルを代表するものでなくてはならない。

測定の不確かさに関連した結果の解釈

既存の共同体の法令における、微生物の基準に関連した測定の不確かさは、挽肉及び肉製品に関する委員会指示94/65/EECと調理した甲殻類と軟体貝類に関する委員会決定93/51/EECにある。コレラの条項では、測定の不確かさの効果を考慮に入れるために、伝統的な‘3×限度’アプローチが使われている。他の強制力のある共同体法令注の微生物基準については、測定の不確かさが述べられていない。

ヨーロッパ委員会の健康及び消費者DGは、共同体法令中の微生物基準の改定と、微生物基準設定の方策に関する討議文書の作成過程にある。これらの文書の草案は、加盟国の専門家により、色々な機会に討論されている。法的な限度（微生物基準の量的な限度）の存在する試験結果が適合しているかを解釈する際に、測定の不確かさを考慮すべきかどうかと、もしするならばその方法とは、討議中の

項目である。

科学的な参照文献

AAG (Accreditation Advisory Group of the Institute of Food Science Technology) 2000 Guideline no. 13. "Uncertainty of Measurement in Food Microbiology by Analysis of Variance."

Andrews, W.H. 1996 Validation of modern methods in food microbiology by AOAC International, collaborative study. *Food Control*, 7: 19-29

Andrews, W.H. 1997 New trends in food microbiology: An AOAC international perspective. *Journal of AOAC International*, 80: 908

Fuentes-Arderiu, X. Uncertainty of measurement in clinical microbiology. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 13 (4): <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol113no4/130401006.htm>

IAHA 2001 Guidelines for Uncertainty Estimation, Revision 0.

In't Veld, P.H. 1998 The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 35-41

ISO 2001 Milk and milk products – Quality control in the microbiological laboratory – Part 1: Analyst performance assessment for colony counts ISO/CD 14461-1| IDF 169-1

ISO 2001 Milk and milk products – Quality control in the microbiological laboratory – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps ISO/CD 14461-2|IDF 169-2

ISO 2002 Statistics of analytical data. Protocol for the establishment of precision characteristics of microbiological quantitative methods by interlaboratory studies, 1st draft, ISO/TC 34/SC 9 N 543

ISO 2002 Microbiology – Determination of measurement uncertainty, proposal, ISO/TC 34/SC 9 N 558

Lightfoot, N. F. & Maier, E. A. (eds) 1998 *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Elsevier, Amsterdam

Miemi, R. M. & Niemelä, S. I. 2001 Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. *Accreditation and quality assurance*, 6: 372-375

Niemelä, S.I, 2002 Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of micro organisms. 2nd edition, Centre for Metrology and Accreditation, Advisory Commission for Metrology, Chemistry Section, Expert Group for Microbiology, Helsinki, Finland, Publication J3/2002.

NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) 1989 Report no. 9 Handbook for Microbiological Laboratories. Introduction to Internal Quality Control of Analytical Work.

NMKL 1994 Report no. 5, 2nd edition Quality assurance guidelines – for microbiological laboratories.

NMKL Procedure No 8 (1999) Measurement of Uncertainty in Microbiological Examination of Foods

Peterz, M. 1992 Laboratory performance in a food microbiology proficiency testing scheme. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 210-216.

Annex II.10 分析に不確かさに関する、有用な参考文献

Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry “Uncertainty of Measurement -Implications of its Use in Analytical Science”, Analyst, 1995, 120 (9), 2303-2308.

Dveyrin, Z., Ben-David, H., Mates, A. 2001 Proficiency testing as tool for ISO 17025 implementation in National Public Health Laboratory: a mean for improving efficiency. Accreditation & Quality Assurance, 6: 190-194

EURACHEM Guidance Document No. 1/WELAC Guidance No. WGD 2: “Accreditation for Chemical Laboratories: Guidance on the Interpretation of the EN 45000 series of Standards and ISO/IEC Guide 25”

ISO (2nd ed., 1993) VIM “International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology”. Geneva.

NMKL Procedure no. 3 (1996) Control charts and control samples in the internal quality control in chemical food laboratories

NIST Technical note 1297 (1994 Edition): “Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results”

Örnemark, U., Boley, N., Saeed, K., van Berkel, P.M., Schmidt, R., Noble, M., Mäkinen, I., Keinänen, M., Uldall, A., Steensland, H., Van der Veen, A., Tholen, D. W., Golze, M., Christensen, J.M., De Bièvre, P., De Leer, W. B (ed). 2001 Proficiency testing in analytical chemistry, microbiology, and laboratory medicine – working group discussions on current status, problems, and future directions. Accreditation & Quality Assurance, 6: 140-146.

UKAS (United Kingdom Accreditation Service) 2000 The Expression of Uncertainty in Testing Edition 1, UKAS Publication ref: LAB 12

Annex III 回収率の評価手順

序論

回収率の推定と使用は、分析化学者間で実践法が異なる分野である。食品及び環境分析のような複雑なマトリクス中の、動物用医薬品や農薬の残留の定量において、実践法の違いは最も顕著である。これらの方法では、文 s ねきたいしょうぶつを複雑なマトリクスから、より単純な溶液に移動し、その溶液中の分析対象物を機器分析にかける。しかし、移動手順によって分析対象物が失われる。このような手順では、抽出後も分析対象物のかなりの部分がマトリクス中に残っており、移動は不完全である。その後の測定では、元々の試料中の真の濃度よりも低い値が得られる。損失に対する補償がなければ、異なる試験室間で得られた結果の間に大きな食い違いが起こる。損失を補償する試験室としない試験室があれば、もっと大きな食い違いとなる。

回収率の検討は、明らかに全ての分析法のバリデーションと使用における必須要素である。分析結果の製造と解釈に係わる人が全員この問題を認識し、報告された結果が何に基づいているかに注意することが重要である。現時点では、回収率情報の推定、表現、適用への、定義された単一のアプローチは存在しない。実際の分析で最も重要な不一致は、生の測定値の補正に係わる事項である。補正によ

れば（原理上は），分析対象の損失による負のバイアスをなくすることができる．補正係数の信頼性の高い推定に係わる困難さが，一部の分野の分析実施者が補正を適用することを妨げている．

回収率情報の推定と使用についての一貫した方針が存在していないので，異なる試験室の結果の意味のある比較，あるいは所期の目的に対するデータの適合性の確認が困難になっている．このような透明性の欠如は，データの解釈にとって重要な結果となる．例えば，執行力のある分析で補正係数を分析データに適用するかしないかの違いは，その結果が法的限度を超えているかあるいは限度に適合しているかの違いになることがある．このように，真の濃度の推定値が必要な状況で，報告された分析結果から損失の補償を計算することが強制される場合もある．

ガイドラインで使用される定義と用語

本ガイドラインが読まれる際には，一般的な分析用語が受け入れられているとする．ガイドラインに関連の深い用語の特別な定義を以下に示す．

回収率：試料の分析部分に存在するもしくは添加された分析対象物中，抽出されて測定に供された量の分率．

サロゲート：試料に添加された純粋な化合物あるいは元素であって，その化学的及び物理的挙動が，ネイティブな分析対象物を代表すると見なせるもの．

サロゲートの回収率：試験試料あるいは分析用部分にスパイクとして加えられた，純粋な化合物あるいは元素の回収率（‘限界回収率’と呼ばれることがある）

ネイティブな分析対象物：自然の過程あるいは製造手順により，試料中に導入された分析対象物（‘incurred analyte’と呼ばれることがある）．ネイティブな分析対象物には，分析界のある分野で，‘incurred analyte’あるいは‘incurred residue’と見なされるものを含む．分析手順中に加えられた分析対象と区別するために定義されている．

経験的分析法：分析法それ自身によってのみ到達できる値を定量する分析法．測定量を確認するための唯一の手段として分析法が定義されている（‘定義分析法’と呼ばれることがある）．

理論的分析法：同定可能な化学物質あるいは分析対象を定量する方法であり，同等の分析法が複数利用できる．

回収率評価方法

原理的には，マトリクス標準試料を分析して推定可能であった．存在すると表示されている濃度に対する，見いだされた濃度の比が回収率となる．同一のマトリクスの試料から得られた結果は，原理的には，標準試料で確立された回収率を元にして，回収率補正できる．しかしながら，標準試料の使用を，多くの問題点が潜在的に取り巻いている．(a)回収率の正当性は，他の点では分析法にバイアスが無いことを前提とすることで，成り立っている；(b)適切なマトリクスの標準試料が得られる範囲は限られている；(c)入手できる最も適切な標準試料と試験試料間のマトリクスが一致していない可能性がある．

最後の例では，標準試料で得られた回収率は，厳密には試験試料に適用できない．食品分析分野のように，標準物質が均一性と安定性の補償のために，微粉末とされ乾燥されているような場合に，特にこのようなことが起こる．このような処理をすると，同種の新鮮な食品での回収率と比較して，影響

を受けがちである。しかし、マトリクスの一不致は回収率適用の一般問題であるので、別の場所で扱う。

サロゲートから得られる回収率情報

(認証) 標準物質が利用できない場合は、ネイティブな分析対象物に対するサロゲートと見なされる、化合物あるいは元素を添加して、回収率を検討し、分析対象物の回収率を推定する。サロゲートが測定相に移動する程度を推定すれば、もし適切であれば、この回収率がネイティブな測定対象の性質でもあるとされる。原理的には、この手順で分析対象物の損失が補正され、元のマトリクス中のネイティブな分析対象物の、バイアスのない推定値が得られる。こうした、「回収率補正」方法は、多くの異なる分析法において、明示的あるいは暗黙的に行われており、適切に実行されていることが示されれば正当な手順と見なされるべきである。

この手順が正当となるためには、サロゲートとマトリクス中のネイティブな分析対象物が、特に種類の相への分配において、定量的に等しい挙動を示さなくてはならない。実際に同等性を示すことは困難なことが多く、ある種の仮定としなくてはならない。この仮定の性質は、使用されている多くのサロゲートのタイプを考察すると明らかになる。

同位体希釈

サロゲートの最高のタイプは、同位体希釈アプローチで用いられる、アイソトープで修飾した分析対象物である。サロゲートの化学的性質はネイティブな分析対象物と同一、あるいは非常によく似ているので、添加した分析対象物とネイティブな分析対象物が有効な平衡状態にあれば、その回収率は等しい。同位体希釈法では、サロゲートの回収率は質量分析か、放射性同位体が使われれば放射線の分析で別個に推定され、それがネイティブな分析対象物に適用される。しかしながら、有効な平衡状態を達成することが、いつも容易とは限らない。

例えば、有機物中の痕跡量の金属の定量のような化学システムならば、マトリクスを破壊するような激しい試薬を使って、ネイティブとサロゲートを同じ化学形に容易に変換できる。この処理で、有機物に結合した金属も単純なイオンに変換され、サロゲートと有効な平衡状態となる。痕跡量の金属の定量では、このような簡単な手順が有効であるが、残留農薬には適用できない。農薬の例では、分析対象物の一部がマトリクスに化学的に結合している。農薬自身を壊す危険があるので、分析対象物を遊離させるために過激な化学試薬を使うことはできない。ネイティブとサロゲートは有効な平衡に達することができない。従って、サロゲートの回収率は、ネイティブよりも大きくなりやすい。このように、最高のタイプのサロゲートであっても、推定した回収率のバイアスが存在しうる。さらに、同位体希釈法によるアプローチには、適用性とアイソトープ修飾のコストによる限界が存在する。

添加

コストの面で有利であり、非常に広範に使われているのが、スパイクとして加えた分析対象物の回収率を、別の実験で推定する方法である。マトリクスブランク（實際上分析対象を含まないマトリクスの試料）が使えるならば、そこに分析対象物を添加し、通常の手順で分析して回収率を決定する。マトリクスブランクが手に入らない場合は、通常試料にスパイクし、スパイクしていない試料と平衡して分析する。2つの結果の差が添加した分析対象物の回収された部分であり、添加した既知量と比較することができる。このタイプの回収率推定値をここでは「サロゲート回収率」（添加した分析対象物はネイティブに対するサロゲートとして働く）と呼ぶ。標準添加法と類似している。アイソトープで標識した分析対象物と同じ問題点がある。添加した分析対象物が、ネイティブほどマトリクスに強固に結合していないと、サロゲート回収率はネイティブの回収率に比べて高くなる傾向を持つ。このような状況で分析結果を補正すれば、負のバイアスを持つことになる。

内部標準

回収率推定に用いられるサロゲートの第3のタイプは内部標準である。内部標準が回収率推定実験に使われる場合は、サロゲートは分析対象物とは化学的に区別できる存在であり、従って同一の化学的性質ではない。しかし、通常は分析対象物と化学的に近似しているものが選択されるので、化学的挙動を実際的な最大限に表している。例えば、同じマトリクス中の非常に多数の分析対象物が定量されるような場合には、個々の分析対象の「限界回収率」評価実験をする事は実際的ではないだろう。実際性は、多くの分析対象物を扱うコスト以上の問題である。純粋な物質として入手できない分析対象物（新種の動物用医薬品、あるいは代謝物）もある。内部標準はある種の状況下では、最もコストのかからない手段ではあるが、スパイクしたサロゲートよりも技術的な満足度は劣っている。なぜならば、化学的性質が分析対象物と同一ではないからである。内部標準に基づく回収率補正の使用は、どちらの方向のバイアスも起こりうる。内部標準が他の目的で使用されることもある。

マトリクスの不一致

あるマトリクスで推定した回収率の値を別のマトリクスに適用すると、マトリクスの不一致が起こる。マトリクス不一致の効果は、上記で議論したバイアス以外の、回収率のバイアスとして現れる。2つのマトリクスの化学的な性質が大きく異なると、その影響は非常に大きくなる。しかし、たとえマトリクスが適当に一致していて（野菜のことなる2種類）も、名目上は同一と考えられて（牛肝臓の2つの試料）も、分析化学者は、回収率が適切であるという根拠のない仮定を強制されているのかもしれない。こうして、回収率と回収率で補正した結果の不確かさは、明らかに増加する。回収率実験（スパイクなど）を、分析する試料それぞれに行えば、原理的にはマトリクスの不一致が避けられる。しかし、コストを考えればこのようなアプローチは非現実的なことが多く、それぞれの分析で代表的となる試料によって、回収率が決定される。

分析対象物の濃度

サロゲートあるいはネイティブな分析対象物の回収率は、これまでは、濃度に関係であるかのように扱ってきた。低濃度においても、これが厳密に正しいとは考えにくい。例えば、表面への不可逆的吸着により、分析対象物の一部が回収されていないかもしれない。しかし、ある分析対象物濃度で、吸着サイトが全てふさがれるならば、それより高い濃度では損失は起こらない。このとき、回収される量は濃度に対して比例しない。このような状況は、分析法バリデーション中に研究すべきだが、臨時分析において完全に検討するのは、時間がかかりすぎるだろう。

回収率の推定

欠点のない、全てに適用できる回収率推定法はない。しかし、理想的な手順を用いた「思考実験」は可能である。これが、実際の手順の参照点となる。この理想的な手順では、完全な分析法を使う：回収の損失がない、完全にバイアスのない方法で分析対象が定量される。この方法は、あまりに物資を使うのでルーチン分析には使用できないが、不完全な回収率のルーチン用の代替法がある。ルーチン法の回収率は、典型的な多数の、必要なマトリクスの範囲と分析対象物の濃度を含んでいる試料のセットを、両分析法で分析して推定できる。こうすれば、全ての状況に置けるルーチン法の回収率（とその不確かさ）が得られる。

実際にはそんな完全分析法を参照することはできないので、標準試料やサロゲートで回収率を推定するしかない。でも、標準試料の数は少なく、研究資源が無いのでサロゲートを使ったとしても、回収率推定に使用する試料の範囲は限られている。これに加えて、分析対象物中のマトリクスに共有結合したり、そうではなくても強固に結合していて回収できない部分は定量できないので、サロゲートの使用自身が回収率推定の不確かさを増大させる。

この問題に対処するためによく使われる方法は、分析法バリデーション中に回収率を推定することである。研究資源が許す範囲のマトリクスと分析対象物濃度で、回収率を求める。以後の分析法の使用中はこれらの値が適用できる。仮定を正当化するために、内部精度管理として標準試料（あるいはスパイク試料）を分析のルーチンに含める。こうすると、分析システムは、回収率を推定した時から、有意に変化していないことを保証するのに役に立つ。研究費の欠如のために以下のポイントを完全に実施できないとしても、考えてみることを提言する。

代表的な回収率検討

分析法バリデーションでは、その方法が適用されるマトリクスの範囲全体を使用すべきである。さらに、マトリクスタイプ毎の回収率の正常範囲を推定するためには、タイプ毎にいくつかの例を使うべきである。試料の履歴が分析対象物の回収率に影響しそうならば（加工技術や食品調理）、異なる加工段階の試料を調達すべきである。バリデーションで全ての範囲を含められなかったら、回収率の使用におけるマトリクス不一致により不確かさが増える。その不確かさは実験で推定しなくてはならない。

分析対象物の回収率が濃度依存的である可能性があるため、技術的、財政的に可能な限り、適切な分析対象物濃度範囲を検討すべきである。異なる濃度の分析対象物をマトリクスに添加することを考慮すると良い。非常に低い濃度では、分析対象物がマトリクスの有限の吸着サイトに化学吸着したり、分析容器表面に不可逆的に吸着するかもしれない。この濃度レベルでの回収率はゼロに近くなるだろう。少し高い濃度では分析対象物が吸着よりも過剰になり、部分的に回収される。高濃度では、吸着される分析対象物は全体と比較して小部分に過ぎず、回収はほとんど完全となる。このような濃度範囲全体の回収率情報を、分析化学者は持っている必要がある。全濃度を完全に含められないなら、分析対象物の重要な濃度、例えば法的限度で回収率を推定することが適切である。他の濃度での値は経験から推定するが、不確かさは増加する。

マトリクスブランクに分析対象物をスパイクするならば、全濃度範囲を容易に考慮できる。ネイティブな分析対象物の濃度がかかなり高いと、サロゲート回収率が相対的に大きくなるのを防ぐために、スパイク添加量は少なくとも同程度にすべきである。

内部品質管理

内部品質管理(IQC)の現地と適用を記述する。IQCの目的は、分析システムの性能が使用中に実質的に変化していないことの保証である。統計管理の概念は、IQCをルーチン分析（臨時分析に対して）似て起用する際に、非常に重要である。回収率にIQCを適用するときには、特別な性質を考慮しなくてはならない。回収率のIQCは、使用する管理試料のタイプにより、2つの異なる方法となる。

(a)マトリクスが一致した標準試料を、管理試料として使用できる。この試料の回収率と、ラン間の変動の初期推定値は、分析法バリデーションにおいて決定される。以後のルーチン分析では、通常の試料と完全に同じ方法で管理試料を分析し、その結果を管理図（あるいは数学的に同等な図）にプロットする。ランの結果が管理下であれば、バリデーション時の回収率推定値はそのランで正当とされる。結果が管理外になれば、検討が必要となり、そのランの結果を却下するか、回収率を再度検討する可能性がある。ランの長さ、濃度範囲に応じて、数種類の管理試料の使用が必要である。

(b) 品質管理にはスパイク試料も使用できる。通常、平均的回収率の初期推定値とラン間の変動は、分析法バリデーションにおいて決定され、管理図の作成に使用される。試料の安定性により、次の2つのアプローチのいずれかが用いられる。(a) 単一の（あるいは複数の）長期管理試料を調製しそれぞれ

のランで使うか, (b)ラン中の試料を全てあるいはランダムに選んでスパイクする. どちらの方法でも, サロゲートの回収率を管理図にプロットする. 回収率が管理下にある間は試料に適用できる. 2つの方法のうち, 後者(実際の試料を使う)は代表性がより高いが, 要求が過酷である.

IQCの役割を, 単なる回収率推定(適切と見なす)と混同する傾向が見られる. IQC結果は分析過程が管理下にあることをチェックする手段とのみ考えたほうが良い. 分析法バリデーションで推定した回収率は, 試料の典型的濃度と変動の検討により多い時間を費やしており, 以後の管理下にあるランに適用するために, より精確である. その時々スパイクを用いて回収率を補正するなら, 標準添加法による検量の一つと見なされる.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

標準添加法における不確かさおよび検出限界の推定に関する研究

分担研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長
研究協力者 岩木和夫 奥羽大学薬学部

研究要旨

農薬等の LC/MS あるいは LC/MS/MS 分析において、マトリックスの影響を除くために標準添加法が使用される。標準添加法は1回の分析のために試料調製から測定までの全工程を4-6回実施する必要がある。通常の方法でバリデーションして不確かさを求めることは困難である。また、検量線は用いない特殊性から、一般的な検出限界の定義を適用することもできない。本研究では、回帰直線の信頼区間を計算する方法を標準添加法に適用し、その不確かさと検出限界を求める方法を検討した。さらに、標準添加法の不確かさに影響する因子についても検討した。

A. 研究目的

食品中の農薬等の分析においては、GC/MS や LC/MS のような質量分析計を検出系とした分析法が多用されている。これらの検出系は選択性に優れており、例えば UV 検出に比較して試料の前処理によるクリーンアップを容易にできる。一方、質量分析による検出においては、試料溶液に残っている食品マトリックスが、分析対象物のイオン化率に大きく影響し、溶媒中の標準品とは異なるピーク強度となることが知られている。このような系での定量では、試料中の真の濃度は求められない。これを防ぎ、正しい分析結果を得るために、同位体内標準を添加する方法がある。同位体内標準は分析対象とほぼ同じ挙動をとることが期待されるので、イオン化率が変化しても正しい定量値が得られる。しかしながら、800種類ともいわれる分析対象農薬全てに、同位体の内標準を揃えることは困難である。

同位体内標を使わずに、マトリックス

等によるイオン化率の変動の影響を避ける方法として、標準添加法がある。標準添加法では、試料に既知量の分析対象物を段階的に添加して分析する。測定値を添加量に対してプロットし、最小二乗法により直線を当てはめる。この回帰直線の X 切片が、元の試料中に存在する分析対象物の量となる。

標準添加法による定量では、1試料の定量に3-5測定が必要であること、試料中の分析対象の濃度と添加する量の関係により、精度が変化すること等により、通常バリデーションで行われるくり返しにより、精度あるいは不確かさを求めることが困難である。また、農薬分析のような残留分析では、検出限界が重要な分析法の性能であるが、ブランク測定値の SD を元にした検出限界の定義を適用することができないため、標準添加法による分析の検出限界を定めることができない。

林等は検量線（回帰直線）の信頼区間を、個々の測定濃度における測定値の標

標準偏差から求める方法を発表している¹⁾。この方法を適用すれば、標準添加法における回帰直線の標準偏差を求めることができる。標準添加法の最終的な定量値はX切片の値である。上記の方法でこの濃度でのSDを計算すれば、これから標準添加法の不確かさを推定することができる。

ISO 11843は検出能力に係わる規格である。このPart 5²⁾として、最終的な濃度推定値(分析値)の精度が30%となる濃度を検出限界とする定義が審議されている。この定義に従えば、標準添加法の検出限界を定めることが可能となる。つまり、標準添加法で作成する回帰直線のX切片の標準偏差をX切片で割った値が0.3となる濃度が検出限界である。

本研究では、個々の測定値の分散から回帰直線の信頼区間を求める方法を、標準添加法での回帰直線に適用し、X切片の標準偏差を求め、これから検出限界を定めるとともに、標準添加法の不確かさ及び検出限界に、影響を与える要因について検討した。

B. 研究方法

回帰直線 (ax+b)のパラメータの計算に伴う不確かさ

標準溶液をN個(濃度は $X_1 \cdots X_N$)をHPLCで測定し、測定値 $Y_1 \cdots Y_N$ が得られたとき、検量線 $Y = aX + b$ のパラメータaとbは、以下の式から計算される。

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) Y_i}{S_{XX}} \quad (1)$$

$$b = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_i \right) - a\bar{X} \quad (2)$$

この検量線の信頼区間の幅は

$$\tilde{Y}^2 = A_X^2 (X - B_X)^2 + C_X^2 \quad (3)$$

で表され、係数 A_X , B_X , C_X はそれぞれ

$$A_X = \tilde{a} \quad (4)$$

$$B_X = -\frac{\text{Cov}(a, b)}{\tilde{a}^2} \quad (5)$$

$$C_X = \tilde{b} \left[1 - \frac{\text{Cov}(a, b)^2}{\tilde{a}^2 \tilde{b}^2} \right]^{1/2} \quad (6)$$

である。 \tilde{a} は検量線の傾きaのSD、 \tilde{b} は切片bのSD、 $\text{Cov}(a, b)$ は傾きと切片の共分散である。これらの値は以下の式で表される。

$$\tilde{a}^2 = \frac{1}{S_{XX}^2} \left\{ \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \tilde{e}_i^2 \right\} \quad (7)$$

$$\tilde{b}^2 = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{1}{N} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}} (X_i - \bar{X}) \right\}^2 \tilde{e}_i^2 \right] \quad (8)$$

$$\text{Cov}(a, b) = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{(X_i - \bar{X})}{NS_{XX}} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}^2} (X_i - \bar{X}) \right\} \tilde{e}_i^2 \right] \quad (9)$$

X, Y, Nは与えられているので、各測定値 Y_i の標準偏差 e_i が分かれば、検量線の信頼区間を計算することができる。

測定値 Y_i の不確かさ e_i には、HPLCによる測定に伴う不確かさと、溶液の濃度の不確かさ、つまり前処理による試験溶液中の濃度のばらつきが含まれる。

$$e_i^2 = (SD_{prep})^2 + (SD_{meas})^2 \quad (10)$$

・測定の不確かさ

HPLC 測定に伴う不確かさ SD_{meas} は、装置に注入される溶液の量の不確かさと、検出器からのノイズが信号に加わることによる不確かさに分けられる。

$$e_i^2 = (SD_{prep})^2 + (SD_{inj})^2 + (SD_{noise})^2 \quad (11)$$

装置に注入される溶液量の不確かさは、使用している装置の性能から推定できる。通常、注入量の不確かさは RSD% で与えられる。注入に伴う測定値の SD_{inj} は、それぞれの測定値にこの RSD をかけた値となるので、濃度により異なる。

$$SD_{inj} = Y \times RSD_{inj}$$

ノイズによる測定値の不確かさ SD_{noise} は、FUMI 理論を使いベースラインノイズを解析することによって求められる。

・濃度の不確かさ

前処理によって生じる試験溶液中の分析対象物の濃度の不確かさは、添加する標準液の濃度及び量の不確かさと、前処理操作による不確かさの和である。

以上より、測定値 Y_i の不確かさには

- a. 測定器への注入量の変動
- b. ノイズによるピーク面積の変動
- c. 添加する標準液の濃度の変動
- d. 添加する標準液の量の変動
- e. 前処理による濃度の変動

が寄与することが分かる。

a の注入量は HPLC であれば 0.5% 以下、GC でも 2% 程度である。相対標準偏差 (RSD) として一定と考えられ、ピーク面

積の SD として表現すると、濃度 X に応じて変化する。

b のノイズによる変動は、濃度によらず一定である。影響の程度は濃度に依存する。農薬分析の場合は検出限界に近い濃度を測定することもあり、この変動はピーク面積の 10-20% 程度となる可能性がある。

c 及び d は標準品の秤取、溶媒を加えて溶解する際の溶媒量、溶液を添加する量のばらつき等から求められる。天秤、メスフラスコ、ピペット等の不確かさは小さいので、c 及び d の大きさは、大きくても 1% 程度と考えられる。

e は操作手順の複雑さによるが、抽出・カラム精製・再溶解等を全て含めて 5-20% 程度の影響と考えられる。

不確かさ評価では、最大の寄与原因の 1/3 以下の寄与は無視できるといわれている。従って、目的とする濃度が検出限界より十分に大きい場合には e のみ、検出限界に近い場合には b と e を考慮する必要がある。

上記の計算方法を用いると、色々な条件における標準添加法の精度が計算可能となる。精度は試料中に存在する分析対象物濃度添加する濃度の関数として表すことができ、精度プロファイルと呼ばれている。添加濃度レベル、レベルの数等の標準添加デザイン、前処理による濃度の変動 (RSD) が、標準添加法の精度プロファイル及び検出限界にどのように影響するかを検討した。

添加濃度デザイン、前処理による変動の精度プロファイルへの影響

分析対象物の想定濃度を 0.01 ppm 付近とし、

a 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm

b 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm

c 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm

を添加する3種のデザインにおける精度プロファイルを計算した。

イオン化率がマトリクスの影響を受けていない場合の検量線の傾きを100とした。従って0.01 ppmでのピーク面積は1となる。

計算に含めるパラメータは、

1. ノイズによるピーク面積変動
 2. 前処理による試料溶液中濃度の変動
 3. イオン化率の変動
- とした。

定量限界に近い濃度域にあると考え、ノイズによる面積変動のSDは、通常イオン化率での0.01 ppmのピーク面積の1/10、つまり0.1とした。イオン化率変動があっても、この値は一定とした。前処理による変動は、5,10,15%の3種類を設定した。イオン化率の変動は検量線の傾きの変化として現れるので、傾きが2倍の200の場合と、1/2の50になった場合を検討した。

標準添加法における添加濃度の影響の確認実験

添加濃度デザインが標準添加法結果に与える影響を実証するために、実際の食品中の農薬等の定量実験を行う必要がある。このため、実際に標準添加法が適用される可能性の高いとして、厚生労働省より公表されている、農作物中の残留農薬 LC/MS(/MS) 一斉分析法結果で感度の変動が認められている作物として、オレンジとダイズを選定した。2種類の作物中の農薬をLC/MS/MSで分析するための、カラム、移動相等の操作条件の設定を行った。

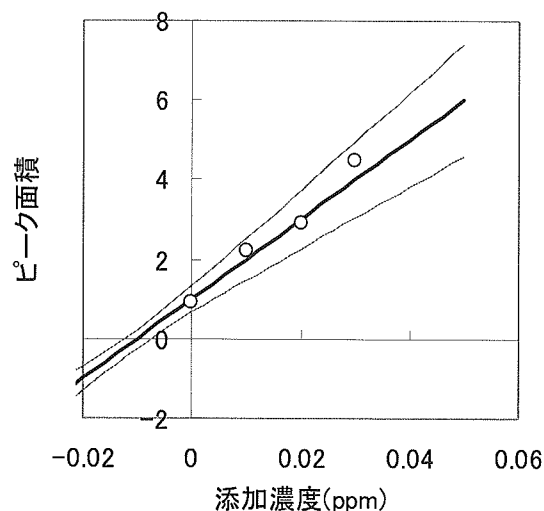


Figure 1 標準添加法の回帰直線と信頼区間

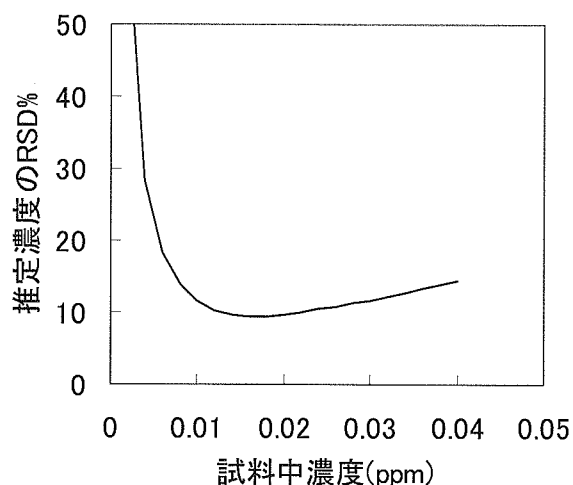


Figure 2 精度プロファイル
添加量 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
検量線の傾き 100, ノイズSD 1, 前処理 RSD 10% として計算した

C 研究結果

回帰直線の信頼区間と不確かさ

Figure 1 は、0.01 ppm の分析対象物を含む試料中に、0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm を添加した際の、添加濃度に対するピーク面積のプロットである。中央の太い線は変動の影響を受けない真の検量線である。添加しない試料から得られるピーク面積は 1 であり、X 切片は分析対象物存在量の 0.01 ppm となる。

実際の分析値は種々の変動の影響を受けて、○のように真の検量線とは異なる値となり、回帰分析により真の直線とは異なる直線が得られる。このような実験を多数行って得られる回帰直線の 95% 信頼区間を、灰色の線で示す。信頼区間の幅は、式(3)で求められる。

実際の分析で重要なのは、Y 軸方向のピーク面積の変動ではなく、定量値である X 切片の変動である。図に示した信頼区間の上側と下側が X 軸と交わる点は、厳密には対称ではないが、Y=0 における信頼区間を検量線の傾きで割って近似することとした。

Figure 1 では、ベースラインノイズによる変動の SD を 1、前処理による変動の RSD を 10% とした。この条件で、試料中に存在する分析対象物の各濃度での、分析値の RSD を計算し、Fig. 2 に示した。分析値の精度は、0.017 ppm 付近で最も小さくなり、これよりも高濃度では RSD が大きくなった。この図から、測定により試料中の分析対象物の濃度が得られたときの RSD が求められるので、それから不確かさを求めることができる。この条件で 0.02 ppm の定量値が得られた場合には、RSD は 19% であるので、不確かさは

$0.02 \times 0.19 = 0.0038 \text{ ppm}$,
拡張不確かさは 0.0076 ppm となり、95% 区間は、0.0124 ~ 0.0276 ppm となる。

検出限界

一般的な検出限界の定義は、ブランク測定値の SD の 3.3 倍の測定値が得られる濃度である。この定義は、検量線が直線である場合に適用できるが、そうでない場合には適用できない。ISO 11843 は分析法の検出能力の規格である。この Part 5 が現在審議中であり、この中で検量線が直線ではない場合の検出限界を、分析値（濃度推定値）の RSD が 30% となる濃度としている。この定義によれば、検量線が右下がりのシグモイドになるような競合法 ELISA の検出限界が定義できる。

標準添加法での検量線にあたる回帰直線は直線ではあるが、ブランク測定値の SD を基礎とする一般的な定義は適用できないのは明らかである。しかし、Fig. 2 のような精度プロファイルを描くことにより、ISO 11843 Part 5 の定義により検出限界が求められる。Fig. 2 の系では、0.007 ppm が検出限界となる。

標準添加デザインの影響

添加する分析対象物の濃度を

- a 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm
- b 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
- c 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm

としたときの精度プロファイルを Fig. 3 に示す。

添加量が全体に大きくなると共に、検出限界及び精度が最も良い濃度が高くなった。最適濃度での RSD はほぼ同じであった。試料中に存在する濃度が添加量上限よりも大きくなると、RSD が急激に大きくなった。例えば、試料中に 0.06 ppm 以上の分析対象物が存在している場合に、a の様な標準添加法を行うと、得られ結果の RSD は 40% 以上となる。このような条件で求めた濃度推定値は不確かさがあまりにも大きく、例えば規格への適合の判定に用いることはできない。

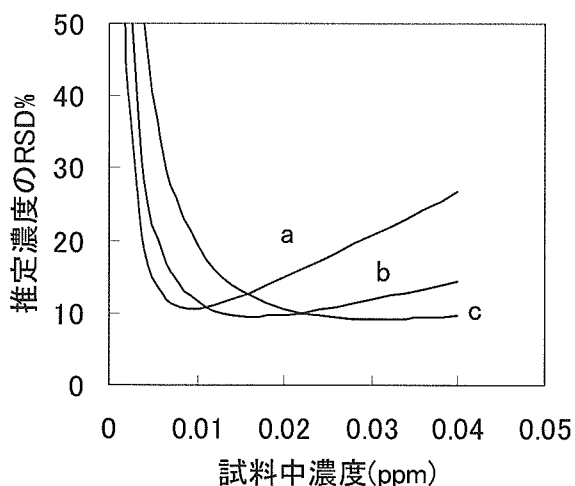


Figure 3 添加濃度の精度プロファイルへの影響

添加量 a 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm;
 b 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm;
 c 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm
 検量線の傾き 100, ノイズ SD 1, 前処理 RSD 10% として計算した

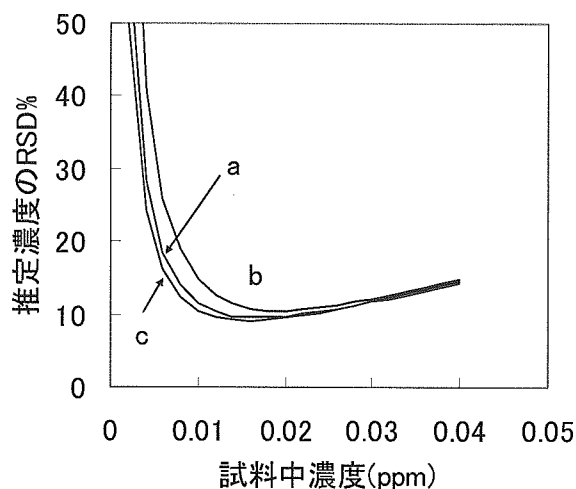


Figure 4 イオン化率変動の精度プロファイルへの影響

添加量 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
 検量線の傾き a:100, b:50, c:200
 ノイズ SD 1, 前処理 RSD 10% として計算した

イオン化率変動の影響

MSのイオン化率がマトリクス効果によって変動すると、回帰直線の傾きが変化し、ピーク面積が変動する。このような場合の標準添加法の精度プロファイルの変化を検討した。

Figure 2 と同一条件(a), イオン化率が50%に低下した場合(b), 2倍になった場合(c)の精度プロファイルを Fig.4 に示す。イオン化率が低下してピーク面積が小さくなった場合には、精度プロファイルが右にシフトし、検出限界が1.5倍程度上昇した。イオン化率が大きくなった場合には、精度プロファイルに大きな変化は認められなかった。

前処理の RSD の影響

試料の前処理によるバラツキの変動と精度プロファイルの関係を検討した。前処理の RSD を 5%, 10%, 15% としたときの精度プロファイルを Fig.5 に示す。当然

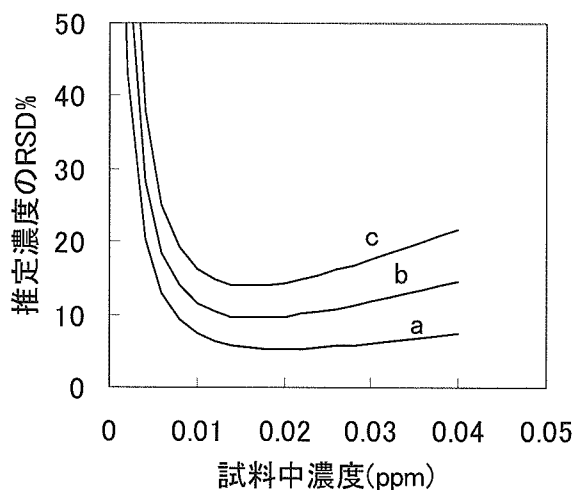


Figure 5 前処理 RSD の精度プロファイルへの影響

添加量 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
 前処理 RSD a:5%, b:10%, c:15%
 ノイズ SD 1, 検量線の傾き 100 として計算した