

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

食品中に残留する農薬等の規格基準に係る分析法における
不確実要素に関する調査研究

(課題番号) H17-食品- 一般-008

平成18年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 松岡 英明

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究年度終了報告

食品中に残留する農薬等の規格基準に係る分析法における

不確実要素に関する調査研究 1

松岡英明

II. 分担研究年度終了報告

1. 農薬等の分析値の不確かさ推定法に係わる手法の調査研究 5

松田りえ子

2. 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 16

松田りえ子・岩木和夫

3. 食品マトリクスに応じた最適前処理技術の検討 24

松岡英明

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）
総括研究年度終了報告書

食品中に残留する農薬等の規格基準に係る分析法における
不確実要素に関する調査研究

主任研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

食品検査において、分析結果の不確かさを評価し、提示することは、今日、国際的に要請されている。その具体的方法は分析対象によって個々に検討する必要がある。本研究は、食品中の残留農薬等の化学分析に適用できる推定法を提示し、国際動向に対応することを目的として、(1) 農薬等の分析値の不確かさ推定に適切な分析法バリデーション方法のガイドラインの策定のための研究、(2) 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、(3) 食品マトリクスに応じた最適前処理技術の検討、を行った。

A. 研究目的

食品検査における化学分析結果が、国際的に正当性を認められるためには、その分析値の不確かさを提示することが重要である。しかし、食品中の残留農薬等の分析に適用できる推定法は定まっていなかったため、その確立が急務となっていた。

(1) に関しては、昨年度の研究により、食品中の残留農薬等の分析の不確かさ推定のためには、分析法バリデーションデータあるいは内部精度管理データを用いる、いわゆるトップダウンアプローチが適切であることが明かとなった。

トップダウンアプローチにより正しく不確かさを推定するためには、バリデーションにより適切な室内精度を求める必要がある。現在、我が国では食品中の農薬等の分析法をバリデートする方法が標準化されておらず、個々の試験室が不確かさを推定する際に統一した方法が存在しない状況にある。従って、標準的な共

同試験あるいはインハウスバリデーションの方法を確立し、そこで得られたデータから不確かさを推定する方法を示す必要がある。本年度は残留農薬分析法バリデーションの標準的方法の確立を目的として、ガイドライン作成を行った。

(2) に関して、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。この様な系での定量では、試料中の真の濃度は求められない。イオン化率変動の影響を補正し、正しい分析結果を得るための方法として、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、通常の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。

平成 17 年度には、個々の測定濃度における測定値の標準偏差から回帰直線の標準偏差を求める方法を、標準添加法の回帰直線に応用し、不確かさを求める方法を検討するとともに、ISO 1184 Part 5 の検出限界の定義に従った検出限界の推定方法を検討した。

本年度は、確立した精度推定方法の妥当性を確認するための標準添加法模擬実験を行うため、添加農薬を選定し分離条件を確立した。また得られた条件において、マトリクスの無い状態での検出限界を求め、模擬実験における添加量を設定した。

(3) に関しては、分析法における不確かさの問題に関する、もう一つの大きな課題、すなわち微生物試験法における不確かさに関する課題である。微生物試験では、化学試験法と異なり、標準試料が得がたいため、常に培養法が標準法となってきた。すなわち、標準法の結果と直線関係が得られることが、確かさの根拠に成っている。実用的に強い要請のある迅速法は主として非培養法であるため、原理の異なる培養法との比較の上で、擬陽性、あるいは擬陰性の問題が論じられている。したがって、相関を論じても現象論に留まらざるを得ない。そこで、少なくとも、原理的には同じ方法で、迅速法培養法の相関を論じる必要がある。その具体的方法が生菌分離である。食品試料から生菌のみを分離し、これを非培養法

で計数した後、その結果を、そのまま培養した後計数した結果と比較する、というものである。このような方法によって初めて培養法を基準にした不確かさの議論が出来るようになる。

平成 17 年度は、生菌分離法として極めて有望と思われた超音波分離法に着目し、その開発グループであるスウェーデン、ルント大学より研究員を招聘して、共同実験を行った。その結果、脂肪成分や微生物生細胞が分離できる見通しを得た。しかし、本研究の本来の首題である「分析法の不確かさ」に関する知見を得るには至らなかった。本年度は、最も汎用性の高い濾過法の適用食品を調査した後、濾過の困難なものに関して、密度勾配遠心分離法の適用条件を検討した。

B. 研究方法

(1) に関しては、残留農薬分析法バリデーションガイドラインの策定では、各試験室がいわゆる single-laboratory validation を実施して得た精度から不確かさを推定することを目的として検討した。類似の目的のガイドラインとして、「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドライン」および EU の残留農薬分析手順の品質管理に関する文書 (Quality control procedures for pesticide residues analysis) の中に記載されている分析法バリデーションのクライテリアを参考として、バリデーション方法及び目標値を決定した。

残留農薬分析では多くの農作物に基準が設定されていることが多く、さらに一律基準を考えれば、全ての食品が対象となりうる。この状況で、農薬の分析法を評価する場合に、全ての農作物についてバリデーションを行うことは、実際上不可能であり、どのような作物を何種類選んで添加回収率等の性能を評価すべきかの指針が必要と考えられた。この点についても、上記 EU の品質管理文書及び EU の残留分析法のガ

イダンスに記述があるのでこれを参考にし、我が国の残留農薬分析の実状を考慮して作成した。作成したガイドライン原案について、国内の残留農薬分析専門家の意見を集約し最終的な案とした。

(2) に関しては、標準添加法における不確かさ推定法の実験計画においては、LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅰの対象となっている農薬から8種類（グループA）、LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅱから7種類（グループB）、マトリクスによりイオン化率が変動すると報告されているものを選択した。選択した農薬の HPLC 条件および LC/MS/MS の検出条件を検討し、分析方法を確立した。

(3) に関しては、市販の非培養法微生物計数装置を利用した。数十種類の食品マトリクスを適用した結果、33 種類中 21 種類は、特性に濾過装置で直接、生菌分離が可能であった。直接、濾過できない食品には、例えば、炭酸飲料、ジュース、茶、コーヒー、生乳、牡蠣、バター、などがある。そこで、これらから生菌分離するためには、個々に分離条件を検討し、最終的には分離プロトコルデータベースとしてまとめる必要があると考えられた。本年度の試験品として、生乳を選び、自然混入菌、および添加菌の分離条件を検討した。

C. 研究結果

(2) に関しては、設定した実験条件において、それぞれの農薬のピーク面積を測定した。さらに、ベースラインを測定し、フーリエ変換することによりノイズパラメータを求めた。以上の結果から、それぞれの農薬の検出限界をもとめ、これに基づいて標準添加模擬実験のデザインを確立した。

(3) に関しては、Ficoll を用いる生乳からの生菌分離を行った。その結果、① 1% Triton X-100、10 mM EDTA で、12,000 rpm×5 min、② Ficoll (10, 20,

30, 40, 50%) で 25,000×20 min の条件が適すること、この結果、添加大腸菌は Ficoll 30% および 40% に回収されることがわかった。一方、自然混入菌では、Ficoll 20% および 30% に回収されることがわかった。

D. 結論

我が国では食品中の農薬等の分析法をバリデートする方法が標準化されておらず、個々の試験室が不確かさを推定する際に統一した方法が存在しない状況にあるため、標準的なインハウスバリデーションの方法を確立する事を目的として、ガイドラインを作成した。今後、ガイドラインに従ってバリデーションを行い、分析値に不確かさを付与することにより、食品分析値の信頼性が正しく評価されることが期待される。

標準添加法における不確かさ推定研究では、昨年度確立した、標準添加法により得られた分析結果の精度推定方法の妥当性を、実験的に確認するための実験系の構築を行った。

実験系として、LC/MS/MS による農薬一斉分析法を選択した。厚生労働省より示されている、LC/MS による農薬等の一斉試験法対象農薬中から、マトリクスによる感度変動があるもの 15 種類を選び、HPLC 条件並びに LC/MS/MS による検出条件を選択した。

得られた条件におけるピーク面積を測定すると共に、ベースラインを測定し、フーリエ変換してノイズパラメータをもとめた。これらから、それぞれの農薬の検出限界を求め、検出限界に基づいて添加回収模擬実験の添加量を決定した。

微生物試験法における不確かさの議論は、培養法を「確かな方法」として、それとの比較の議論が先行している。換言すれば、培養法自体の不確かさを議論するのための前提が不十分であった。ところが、近年、一定の生菌数（30 ±

2cells/sample) の標準品が開発され、注目されている。今後は、これを利用した培養法のバリデーションを実施し、その結果に基づき、培養法における不確かさを議論する必要があるかもしれない。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Separation and Count of Viable Microbial Cells in Foods by Non-culture Method with a Bioplorer, a Focusing-free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit. *J. Food Protection* **69**, 145-151 (2006).
 - ・ K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Evaluation of the Efficacy of Microbial Cell Removal from Fabrics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 995-1002 (2006).
 - ・ T. Shimakita, H. Yamamoto, T. Naramura, A. Fujimori, T. Ide, Y. Tashiro, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid Count of Microbial Cells in Dialysis Solution. *Ther. Apher. Dial.* (2007, in press)
 - ・ K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic Mapping of Viable Microbial Cells Being Distributed in the Surface Layer of Cotton Fabrics. *Biocontrol Sci.* **12**, 31-34 (2007).
- ##### 2. 著書・総説等
- ・ 松岡英明: 微生物の迅速検出と自動化 “食中毒と食品微生物—食生活の安全性と衛生管理—” (山根誠久、仲西寿男、編) 第2章7節、臨床病理レビュー特集第136号、(2006) pp92-99
 - ・ 松岡英明: 微生物検査法の概略 “食品分析法の妥当性確認ハンドブック” (永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎、編) 第4章1節、サイエンスフォーラム (2007) pp189-198.
- ##### 3. 学会発表
- ・ 松田りえ子, 岩木和夫, 大羽宏, 中村由美子, 林 譲, 米谷民雄: 標準添加法の不確かさについて. 日本薬学会第127年会 2007年3月
 - ・ 河西ちか子, 新井達, 斉藤美佳子, 松岡英明, 島北寛仁, 田代義和, 神田修平: 生乳中の微生物迅速検出法の開発. 平成18年度日本防菌防黴学会大会、ICp-8、東京、2006年5月.
- #### G. 知的所有権の取得状況
- なし
-

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

農薬等の分析値の不確かさ推定法に係わる手法の調査研究

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

研究要旨

今日では、化学分析値を含めた多くの分野で、その結果の不確かさを評価する方向にあり、ISO/IEC 17025 の 5.4.6 測定の不確かさの推定では、「試験所は、測定の不確かさを推定する手順を持ち適用する。」ことが求められている。しかし、食品中の残留農薬等の分析は複雑なマトリクス中からの微量の物質の分析であり、適切な不確かさの評価方法を検討することが急務である。分析の不確かさについて、Codex 及び諸外国の取り組み状況を調査した結果、いわゆるトップダウンアプローチが適切であることが明かとなった。トップダウンアプローチで正しく不確かさを推定するためには、バリデーションにより適切な室内精度を求める必要があるが、我が国では食品中の農薬等の分析法をバリデートする方法が標準化されておらず、個々の試験室が不確かさを推定する際に統一した方法が存在しない状況にある。このため、残留農薬分析を単一試験室でバリデートする際の標準的手法を示したガイドラインを作成した。ガイドライン作成に当たっては、「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドライン」及び EU の残留農薬分析手順の品質管理に関する文書 (Quality control procedures for pesticide residues analysis) を参考とし、我が国の農薬分析の事情を考慮した。

A. 研究目的

1993 年、ISO は他の 6 国際機関と共同して「計測における不確かさの表現のガイド(GUM)」を発行した。計測の不確かさは、元来物理量について考えられていたが、今日では、化学分析値を含めた多くの分野で、その結果の不確かさを評価する方向にあり、ISO/IEC 17025 の 5.4.6 測定の不確かさの推定では、「試験所は、測定の不確かさを推定する手順を持ち適用する。」ことが求められている。

このような動きをうけ、Codex 委員会分析サンプリング部会(CCMAS)においては、分析法の不確かさに関するドラフトガイドラインが審議され、2004 年には「測定の不確かさに関するガイドライン(CAC/GL 54-2004)」が作成され、全ての

分析結果について不確かさを推定し、分析値の使用者の求めに応じて、不確かさを提供できるようにすることが、勧告されている。さらに残留農薬部会(CCPR)においても測定値の不確かさの推定と結果の確認についての文書が審議された。

食品中の残留農薬等の分析は複雑なマトリクス中からの微量の物質の分析であり、煩雑な手順で分析が行われる。しかしながら、GUM 等の不確かさに関するガイドでは、これらの分析法に適用できる評価法は扱われておらず、適切な不確かさの評価方法を検討することが急務である。

昨年度の本研究においては、分析の不確かさについて、Codex 及び諸外国の取り組み状況等の国際的な情勢を調査した

結果、いわゆるトップダウンアプローチが有効であることが明かとなった。トップダウンアプローチでは、分析法バリデーションで求めた精度あるいは内部精度管理で用いる室内精度から不確かさが推定される。

トップダウンアプローチにより正しく不確かさを推定するためには、バリデーションにより適切な室内精度を求める必要がある。現在、我が国では食品中の農薬等の分析法をバリデートする方法が標準化されておらず、個々の試験室が不確かさを推定する際に統一した方法が存在しない状況にある。従って、標準的な共同試験あるいはインハウスバリデーションの方法を確立し、そこで得られたデータから不確かさを推定する方法を示す必要がある。本年度は残留農薬分析法バリデーションの標準的方法を確立を目的として、ガイドライン作成を試みた。

B. ガイドライン作成

個々の試験室がそれぞれの不確かさを推定する際には、共同試験を行うよりも、個々の試験室でバリデーションを行うことが必要となる。このような性能評価は、single-laboratory validationあるいはinhouse validationと呼ばれている。single-laboratory validationは、既にバリデートされた方法を導入する際にその方法が正しく使用されていることを保証する、あるいはコラボラティブデータがない場合、正式なコラボラティブスタディの実施が現実的ではない場合は、単一あるいは小数の試験室で分析法の性能を確認する際に行われる。前者の場合には、公表されているバリデーションデータと、その試験室での性能データが同等であることを示すことができる。後者の場合は、比較する性能データは無いが、分析の目的に照らして、分析法の性能が十分であると示すことが可能である。

single-laboratory validationの実施法については、IUPACが作製したガイドラインが

あるが、全ての分析を対象としており、農薬分析に適用するためには具体的な指針とはなりがたく、残留農薬分析を対象とした分析方法評価のガイドラインが必要である。

類似の目的のガイドラインとして、「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドライン」がある(Appendix 2参照)。このガイドラインは、輸入畜水産食品中の新たな残留動物薬分析法開発を迅速に行うために、開発した分析法の評価方法と採用基準を試験法の開発者に対して示したものである。このガイドラインでは、想定される基準値レベルの添加回収試験を実施し、選択性（クロマト上の妨害の有無）、真度（回収率）、精度を推定することとしている。得られた回収率、精度の評価はTable 1に掲げた値と比較して行う。Table 1の評価基準は、Codex Committeeの値を参考としている。

また、EUは残留農薬分析手順の品質管理に関する文書(Quality control procedures for pesticide residues analysis)の一部として、分析法バリデーションのクライテリアを定めている(Table 2)。Table 1及び2に示した精度は若干数字が異なっているが、分析対象の濃度が低くなるにつれて許容される精度のRSDは大きくなる。回収率については、Table 1に示す検査法作製ガイドラインでは、低濃度では許容される回収率の幅が広いが、Table 2のEUのクライテリアでは、全ての濃度範囲で70~110%である。これらを参考にして、対象農薬の濃度範囲毎に農薬分析方法の性能基準を定めた。

また、「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドライン」では対象となる残留物質及びマトリクスが決まった状態を想定していたが、残留農薬分析では多くの農作物に基準が設定されていることが多く、さらに一律基準を考えれば、全ての食品が対象となりうる。この状況で、農薬の分析法を評価する場合に、全ての農作物についてバリデー

ションを行うことは、実際上不可能であり、どのような作物を何種類選んで添加回収率等の性能を評価すべきかの指針が必要と考えられた。この点についても、上記 EU の品質管理文書及び EU の残留分析法のガイダンスに記述があるのでこれを参考にし、我が国の残留農薬分析の実状を考慮して作成した。

作成したガイドライン原案について、国内の残留農薬分析専門家の意見を集約し最終的な案とした。作成したガイドライン案を Appendix 1 に示す。

E. 結論

農薬等の分析の不確かさ推定手法として、多くの国際的文書においていわゆるトップダウンアプローチが勧められている。

トップダウンアプローチに従い、正しく不確かさを推定するためには、バリデーションにより適切な室内精度を求める

必要がある。現在、我が国では食品中の農薬等の分析法をバリデートする方法が標準化されておらず、個々の試験室が不確かさを推定する際に統一した方法が存在しない状況にあるため、標準的なインハウスバリデーションの方法を確立する事を目的として、ガイドラインを作成した。今後、ガイドラインに従ってバリデーションを行い、分析値に不確かさを付与することにより、食品分析値の信頼性が正しく評価されることが期待される。

また、今回作成したガイドラインは、基準値がある値に設定されていることを前提としている。このため、動物薬等にしばしば見られる不検出が基準となっている場合には適用できない。このような不検出基準の場合には、検出限界の推定が不確かさ評価に大きく影響するため、このような分析における不確かさ推定方法に適用可能なバリデーション方法のガイドラインを作成する必要がある。

Table 1 緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドラインに示された分析法性能評価基準

濃度(ppm)	試行回数	回収率(%)	併行再現性(RSD%)	室内再現性(RSD%)
～ 0.001	5	50 ～120	30>	35>
0.001 ～ 0.01	5	60 ～120	25>	30>
0.01 ～ 0.1	5	70 ～110	15>	20>
0.1 ～	5	80 ～110	10>	15>

Table 2 Quality control procedures for pesticide residues analysis に示された分析法性能評価基準

濃度(ppm)	回収率(%)	併行再現性(RSD%)	
		RSD _A %*	RSD _L %**
0.001 ～ 0.01	70 ～110	30	35
>0.01 ～ 0.1	70 ～110	20	30
>0.1 ～ 1	70 ～110	15	20
>1	70 ～110	10	15

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

* サンプルの不均一性を含まない RSD%; **サンプルの不均一性(10%)を含めた RSD%

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

Appendix 1

農産物中の農薬に関する試験法評価ガイドライン（案）

1. 農産物中に残留する農薬の濃度が基準値に適合しているか否かを、試験結果に基づいて合理的に判定するためには、用いた試験法の妥当性が評価されていなければならない。本ガイドラインは、農産物中に残留する農薬の通知試験法及び独自に開発した分析法を試験室が導入する際に、その妥当性を評価するための手順を示す。

なお、本ガイドラインは、機器分析法を対象とする。

2. 食品毎に、試験法（又は分析法）の妥当性を評価する対象農薬を添加し、測定結果から以下のパラメータを求め、それぞれの基準に適合していることを確認する。

○選択性

分析対象である農薬を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害する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、

- ・ 定量限界が基準値の1/10以下の場合、そのピークの面積（又は高さ）が基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の1/10以下
- ・ 定量限界が基準値の1/10を超える場合は、定量限界濃度に相当するピークの面積の1/3以下であることを確認する。（付表参照）

○真度（回収率）

同一濃度の分析対象を添加した試料（以下添加試料）5個以上を試験法に従って定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比を求める¹⁾。

○精度

添加試料の分析をくり返し、定量値の標準偏差、相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の分析者又は分析日による室内精度を評価する。試行の回数は5回以上とする。枝分かれ実験²⁾により、併行精度と室内精度を同時に評価することができる。内部精度管理データを用いて評価することも可能である。

真度（回収率）・精度の目標値

濃度(ppm)	試行回数	回収率(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)
≤0.001	5	70 ~ 120	30>	35>
0.001 < ~ ≤0.01	5	70 ~ 120	25>	30>
0.01 < ~ ≤0.1	5	70 ~ 120	15>	20>
0.1 <	5	70 ~ 120	10>	15>

○定量限界

定量限界の一般的な求め方は、「ブランクの平均値+10×ブランク測定値のSD」のレスポンスを与える量とする。クロマトグラフィーによる分析で、ブランク試料にピークが認められない場合には、S/N比≥10で上記の真度及び精度の基準を満足できる量とする。

3. 添加を行う農産物の種類及び添加濃度

試験法を適用しようとする農産物から選択するのが基本である。一律基準を考慮した場合には、全ての農産物が対象となるが、全てについて評価するのは非現実的であるので、代表的な農産物を選択する。具体的には、成分としての特性及び抽出法の違いを考慮して、穀類（玄米など）、豆類（大豆など）、種実類、野菜（ほうれんそうなどの葉緑素を多く含むもの、キャベツなどのイオウ化合物を含むもの及びばれいしょなどデンプンを多く含むもの）、果実（オレンジ及びりんごなど）、茶（粉茶）、ホップ、スパイス等から、それぞれ目的に応じて選択することが望ましい。

農薬の添加濃度は原則として2濃度とし、一方を基準値又は基準値の2分の1の濃度とし、他方を一律基準濃度又は定量限界濃度の2倍とする。基準値と定量限界が等しい場合には、添加濃度は定量限界濃度の2倍の濃度の1濃度とする。

多成分分析の場合は、各農薬について、0.1 ppm又は1 ppm及び一律基準濃度又は定量限界濃度の2倍の2濃度とする。（付表参照）

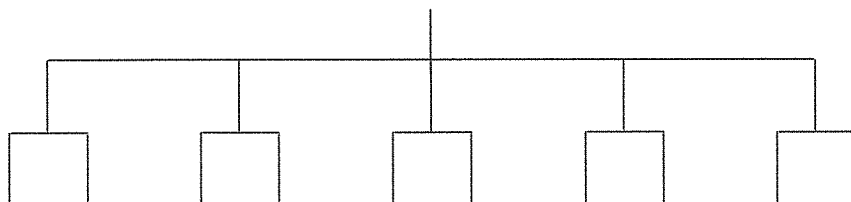
2濃度における評価が困難な場合は、基準値又は基準値の2分の1の濃度、あるいは0.1 ppm又は1 ppmを優先して実施する。

注

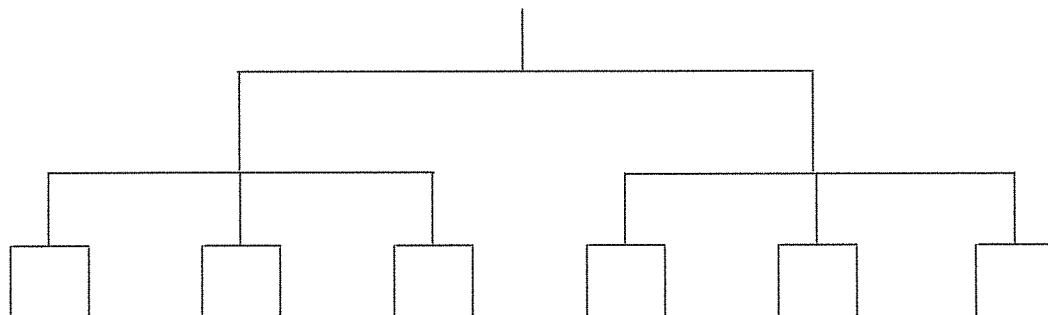
1) サロゲート（回収率の変動の補正を目的として、分析試料に添加する安定同位体標識標準品）を使用した場合には、サロゲートの回収率が40%以上であることを確認する。

2) 室内精度評価のための枝分かれ実験

例1 分析者1名が、添加試料各2個を5日間分析する実験計画



例2 分析者2名がそれぞれ添加試料2個を3日間分析する実験計画



枝分かれ

実験結果の解析方法は、JIS 8402-3 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）－第3部：標準測定方法の中間精度 に記述されている。

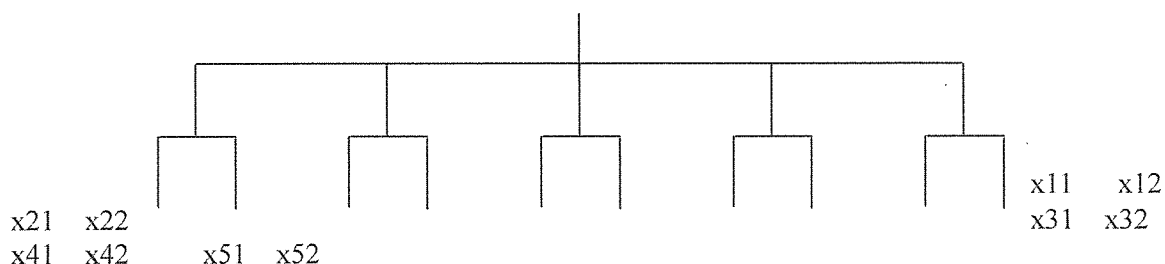
付表 定量限界と基準値の比と添加濃度及び妨害ピークの関係

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲	添加濃度	
定量限界 \leq 基準値/10	< 基準値ピーク/10	—	
定量限界 > 基準値/10	< 定量限界ピーク/3	—	
定量限界 < 基準値	—	個別分析	(基準値又は基準値/2)及び(定量限界×2又は一律基準)
	—	多成分分析	(0.1又は1ppm)及び(定量限界×2又は一律基準)
定量限界 = 基準値	—	定量限界×2	

参考

枝分かれ実験の解析方法

分析者 1 名が、添加試料各 2 個を 5 日間分析する実験計画を実施し、下記の測定値が得られた場合



これらのデータを一元配置の分散分析で解析する。
日数 = J, くり返し数 = N

分散分析表

変動要因	平方和	自由度	分散	分散の期待値
日 間	S_{RW}	J-1 (4)	V_{RW}	$\sigma_r^2 + N \sigma_d^2$
残 差	S_r	J(N-1) (5)	V_r	σ_r^2
計	S_T	JN-1 (9)		

実際の日間の分散は $\sigma_r^2 + \sigma_d^2$ で与えられる。分散分析はExcel等のスプレッドシートの統計計算ツールあるいは統計ソフトを用いて計算可能である。実際の数値例を以下に示す。

1 日	0.0485	0.0436
2 日	0.0512	0.0564
3 日	0.0559	0.0587
4 日	0.0391	0.0385
5 日	0.0468	0.0446

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散
グループ間	0.000426636	4	0.000106659
グループ内	3.2045E-05	5	6.409E-06

合計 0.000458681 9

くり返しの分散 $\sigma_r^2 = 6.409E-06$ なので $\sigma_r = 0.00253$

日間の分散 σ_d^2 は V_{RW} の期待値が $\sigma_r^2 + N \sigma_d^2$ なので
 $\sigma_d^2 = (V_{RW} - \sigma_r^2) / 2$

$$\sigma_d^2 = (0.000106659 - 6.409E-06) / 2 = 5.0125E-05$$

$$\sigma_d = 0.00708$$

$$\text{併行精度} = \sigma_r = 0.00253$$

$$\text{室内精度} = \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} = 0.00752$$

データの総平均は 0.0483 なので、それぞれの精度をRSDで表せば

$$\text{併行精度} = 0.00253/0.0483 \times 100 = 5.2\%$$

$$\text{室内精度} = 0.00752/0.0483 \times 100 = 15.6\%$$

となる。

内部精度管理で2回分析を行ったデータも同様に計算できる。

Appendix 2

緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法作成ガイドライン

1.

本ガイドラインは、食品中に残留する動物用医薬品の検査法を緊急に作成する必要がある際の手順を示したものである。精度及び再現性の高い方法を迅速に決定することを第一の目的とする。

なお、本ガイドラインでは、機器分析法について述べる。また、必要に応じて適宜改訂する。

2.

食品毎に、検査法を検討する物質の基準値（基準値が設定されていない場合は想定される定量下限）濃度を添加し、検討した方法の測定結果から、以下のパラメータを推定する。

注)

基準値がある場合は、最低基準値においてパラメータを推定することになる。基準値が設定されていない場合、目標値あるいは定量下限で実施する。

定量下限は標準的定量下限とする。

定量下限の一般的な求め方は、ブランクと比べて10SD大きいレスポンスを与える量とする。クロマトグラフィーではS/N比 ≥ 10 とし、下記の回収率、再現性の基準を満足できる量とする。

なお、分析機器の性能保証のための検出下限はS/N比=3とする。

○選択性

無添加（ブランク）試料について定量操作を行い、定量を妨害するピークがない、あるいはピークを認める場合には基準値（基準値が設定されていない場合は想定される定量下限）相当量の1/5～1/10以下であることを確認する。

○真度（回収率）

添加試料を定量し、得られた定量値と添加濃度を比較する。

LC/MSのように、マトリックスにより回収率の変動が大きい場合は、標準添加法あるいは安定同位体を用いる内標準法とする。

注) LC/MSの場合、イオン化率がマトリックスにより大きく変動する可能性があるため、精密な定量値を出すためには標準添加法か安定同位体を使った方法が望ましい。

○精度（併行再現性）

添加試料の分析を併行しておこない、定量値の標準偏差、相対標準偏差を求める。可能であれば、複数の分析者（日）による室内再現性も評価する。

回収率・精度の目標値

濃度(ppm)	試行回数	回収率(%)	併行再現性(RSD%)	室内再現性(RSD%)
～ 0.001	5	50 ～120	30>	35>
0.001 ～ 0.01	5	60 ～120	25>	30>
0.01 ～ 0.1	5	70 ～110	15>	20>

0.1 ~	5	80 ~110	10>	15>
-------	---	---------	-----	-----

Codex Committeeの値を参考にした

○確認法

下記から，3条件で標準品と保持時間，スペクトルを比較して確認する。

1. 保持時間の確認 クロマトグラフィー条件（移動相，カラム）毎に標準品と比較する。
2. UVスペクトルを標準品と比較する。
3. 蛍光スペクトルを標準品と比較する。
4. MSスペクトル イオン化条件毎にスペクトルを標準品と比較する。

注)

3条件の確認については，カラムの変更，移動相の変更，イオン化条件の変更についてもそれぞれ1条件として考える。MSしかできない場合では，移動相の変更，イオン化条件の変更等についても1条件として考える。GC/MSで特定の質量数で測定しており，スペクトルが得られない場合は，カラム極性の変更等で確認する。

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ト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。検討した推定方法を評価するための、LC/MS/MS による残留農薬分析系および実験計画を検討した。

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方法が繁用されている。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。この様な系での定量では、試料中の真の濃度は求められない。イオン化率変動の影響を補正し、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。得られた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。

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。

平成 17 年度には、個々の測定濃度における測定値の標準偏差から回帰直線の標準偏差を求める方法¹⁾を、標準添加法の回帰直線に応用し、不確かさを求める方法を検討した。

本年度は、平成 17 年に検討した精度推定方法の妥当性を確認するための標準添加法模擬実験を行うため、添加農薬を選定し分離条件を確立した。また得られた条件において、マトリクスが無い状態での検出限界を求め、模擬実験における添加量を設定した。

B. 研究方法

マトリクスによりイオン化率が変動すると報告されている農薬を、LC/MS による農薬等の一斉試験法 I²⁾の対象となっている農薬から 8 種類（グループ A）、LC/MS による農薬等の一斉試験法 II²⁾から 7 種類（グループ B）、選択した。選択した農薬を以下に示す。

LC/MS による農薬等の一斉試験法 I 対象農薬

アザメチホス
メトキシフェノジド
イプロバリカルブ
クロマフェノジド
ブタフェナシル
ナプロアニリド
ピラゾリネート
フラチオカルブ

LC/MS による農薬等の一斉試験法 II 対象

農薬

チフェンスルフロナーメチル
ブロモキシニル
アイオキシニル
ジクロルプロップ
トリフルスルフロナーメチル
アシフルオルフェン
ホサメフェン

これらの農薬について分析条件を検討し、下記の条件を決定した。

分離条件

カラム : C18 内径 2 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm
カラム温度 : 40°C
移動相 : A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液
注入量 : 5 μL

それぞれの農薬の LC/MS/MS 条件を表 1 に示す。

データ取り込み

ノイズパラメータの解析及びピーク面積測定のためのデータの取り込み間隔は 200 ms とした。

ノイズパラメータの推定

各農薬の分析条件に従ってベースラインデータを取り込み、FUMI 理論に従ってノイズパラメータを計算した。計算には専用ソフトウェア TOCO を用いた。

C 研究結果

図 1 及び 2 に、それぞれのグループの農薬の 0.1 ppm 溶液のクロマトグラムを示す。グループ B に含まれる、ブロモキシニル、アシフルオルフェン、ホサメフェンは特に感度が低かった。

図 3 にアザメチホスの検出条件 (precursor 325, product 183) で測定したベースラインを示す。このベースライ

ンを高速フーリエ変換して得られたパワースペクトルを図4に示す。パワースペクトルの強度は、全ての周波数帯でほぼ等しく、ベースラインノイズはホワイトノイズであると考えられた。他の農薬の検出条件についても同様にベースラインを測定したところ、全てホワイトノイズであった。

パワースペクトルから計算したノイズパラメータはホワイトノイズの標準偏差である w が 17, マルコフ過程の標準偏差である m は 0 であった。同様に他の農薬の検出条件について、ノイズパラメータを算出した。結果を表2に示す。すべての農薬について、 m は 0 であり、 w は 6.5 から 25 の範囲であった。

計算したノイズパラメータと 0.1ppm におけるピーク面積からそれぞれの農薬の検出限界を求めた。結果を表3に示す。グループAの農薬は0.1ppbから0.5ppbの範囲にあり、ほぼ同程度であったが、グループBのプロモキシニル、アシフルオルフェン、ホサメフェンは3-9ppbの比較的高い検出限界となった。

添加回収模擬実験のデザイン

昨年度、試料中に存在する濃度と標準添加する濃度の相対的な関係により、標準添加法による推定精度が変化することを見いだした。この関係を図5に示す。

図5より、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ることがわかる。また、どの添加条件でも、最適な試料中の農薬濃度での推定値のRSDはほぼ同じであり、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が急激に大きくなることが示された。

模擬実験では、試料中の農薬濃度を検出限界の3倍程度及び9倍とし、それぞれに、検出限界濃度の1.5, 3, 4.5, 6倍, 3, 6, 9, 12倍, 6, 12, 18, 24倍を添加することにより、図5の結果を確認

できると考えられる。

E. 結論

昨年度確立した、標準添加法により得られた分析結果の精度推定方法の妥当性を、実験的に確認するための実験系の構築を行った。

実験系として、LC/MS/MSによる農薬一斉分析法を選択した。厚生労働省より示されている、LC/MSによる農薬等の一斉試験法対象農薬中から、マトリクスによる感度変動があるもの15種類を選び、HPLC条件並びにLC/MS/MSによる検出条件を選択した。

得られた条件におけるピーク面積を測定すると共に、ベースラインを測定し、フーリエ変換してノイズパラメータをもとめた。これらから、それぞれの農薬の検出限界を求め、検出限界に基づいて標準添加法模擬実験の添加量を決定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

標準添加法の不確かさについて；松田りえ子，岩木和夫，大羽宏，中村由美子，林 譲，米谷民雄

日本薬学会第127年会 2007年3月

H. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

1) Y.Hayashi, R.Matsuda, R.B.Poe, Analyst, 121, 591-599 (1996)

2) ISO/CD 11843-5 : Capability of detection - Part 5: Methodology in the