

検査におけるサンプリング計画ならびに手順のハーモナイゼーションに関する研究

研究分担報告書

サンプリングに起因する不確かさの推定方法の検討

研究代表者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長

研究分担者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長

研究要旨

母集団の分布が明らかでなければ、母集団を代表するサンプルが採取されたことを証明することができない。また、代表サンプルを採取し、それらの分析を通じて母平均を推定することをサンプリング計画は目的とするため、適正な計画の策定には母集団の分布を考慮する必要がある。本分担課題では、1)対象とする母集団における測定対象物質の分布を、実際にサンプリングした試料由来の分析値に基づき推定すること、2)推定された分布を当該母集団における分布と仮定し、サンプリングの実行にともなう不確かさの推定方法およびこれを指標とした適切なサンプルサイズについて検討することを目的とする。

本年度は、昨年度検討した残留農薬濃度に比べ比較的高濃度に、また人為的に与えられるのではなく生来その食品に含まれている測定対象物質として硝酸塩を選択し、種々の生鮮野菜および、それらの一部については部位別に分析を行い測定値を得た。さらに、得られた測定値のばらつきを詳細に解析することで、分析に起因する測定値のばらつき(併行精度)、個別サンプルに含まれる硝酸塩濃度のばらつき(サンプル間のばらつき)および、測定値に含まれる全てのばらつき(総標準偏差)について推定した。その結果、採用した分析法の精度は相対標準偏差として3%未満であり、一方サンプル間での硝酸塩濃度のばらつきが10.9~27.4%であったのに比べると十分に小さく、不確かさへの寄与は低いと考えられた。また推定されたサンプリングの不確かさは、サンプルサイズが3の場合でも14.7%(全生鮮野菜を通じて最大)であり、Thompson修正式を用いて対応する濃度について一般に推定される測定値の不確かさを指標とすれば、3~10といった現実的なサンプルサイズにより、十分な精度で母集団中の濃度の平均を推定することが可能であると考えられた。

A. 研究目的

食品分析の実際として、サンプルとなる食品の一個(アイテム)、もしくは規定された量(インクリメント)が、輸入貨物、大型量販店や小売店の店頭、あるいは加工食品製造所等様々な場面においてサンプリングされる。また食品としてまとめられる一群の中には、ジャガイモや白菜といった農産物から缶詰といった各種工業製品、さらには総菜といった加工食品まで、多種多様な食品が含まれている。

検査においては、サンプルから得られた測定値(測定対象物質の濃度)の平均値を母集団中での濃度の平均(母平均)と考え、法に定められた基準と比較することで適合判定する。そのため、まず母集団を決め、母平均の正しい推定値となりうる測定値を得ることが求められる。しかし、得られた測定値が上記のとおり「正しい推定値」であるか否かは、その正しさの程度を含め、対象とする母集団を明確に識別あるいは定義した上で当該母集団中での測定対象物質の分布が推定されていなければ評価できない。

母集団中での分布を推定するには多大な労力がかかるため、サンプリ

ング計画の策定ならびにサンプリングの不確かさ推定においては、母集団の分布型を正規分布として仮定することが一般的に容認されている。しかし実際には、種々の食品あるいは様々な場面に応じた異なる内容として構成される母集団(ロットあるいはコンサインメント)中の測定対象物質の分布は、ロット等を構成する食品および測定の対象とする化学物質の種類に大きく依存して変化すると予想される。上述の通り、分析により、母平均のより正しい推定値としての測定値を得、適切な判定を行うためには、母集団中での測定対象物質の分布を考慮したサンプリング計画を策定すること、あるいは、分布の情報を活用し、規定のサンプリング計画の妥当性を評価することが重要となる。また、実際の測定値から推定された母集団の分布に基づき、サンプリングの不確かさを推定した例は少ない。

そこで本研究では、規定したサンプリング計画に従ってサンプルを採取し、それらから得た測定値の分散から母集団中での測定対象物質の濃度の分布を仮定した。さらに仮定された分布型の

母集団からのサンプリングに付随する不確かさの推定を試み、その大きさに対するサンプルの数(サンプルサイズ)の効果についても検討した。昨年度は、圃場から直接採取した生鮮野菜に含まれる残留農薬濃度の測定値に基づき、圃場を母集団としてその分布を仮定し、不確かさを推定した。本年度は、同様にして採取した生鮮野菜中に本来的に含まれる成分の一つとして、欧州では食品成分規格の設定もされている硝酸塩に着目し、母集団とした圃場中での硝酸塩濃度の分布を、種々の生鮮野菜さらに可能な場合には生鮮野菜の部位ごとに仮定し、サンプリングの不確かさの推定を試みた。

B. 研究方法

B-1. 試料

ダイコン(葉および根)、ホウレンソウ、キャベツ、ハクサイ、ナスを対象生鮮野菜として選択した。いずれの野菜も、茨城県桜川市の農家において、市販を目的に通常の方法にて栽培された。また、分析法の性能評価試験において使用する試料には、硝酸塩濃度の低いことを確認した上でトマトとアスパラガスを選択し、世田谷区内のスーパーから購入し用いた。

B-2. サンプリング計画および手順

圃場全体を 50 の区画に区分し左端

より 1~50 の数値を割り付け、発生させた 1~50 の一様乱数と一致した圃場の 1 区分から 1 サンプル(一次サンプル)を採取した。アイテムは野菜 1 個を基本とし、分析に必要な重量を確保する目的から、ナスおよびホウレンソウについては同一区画の隣接する 2 個あるいは 4 株を 1 つの一次サンプルとした。この計画に従い 1 回のサンプリングあたり 8 個の一次サンプルを採取しこれを 1 セットとした。また、サンプリングは 2 回繰り返し実施した。よって、1 種の生鮮野菜あたり採取した一次サンプルの総数は、8 つの一次サンプルの 2 セット分となる 16 である。

B-3. 分析法

本研究で採用した硝酸塩の分析法を以下に示す。

・抽出

試料 5 g を量り、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 16 mL、80°C の水 30 mL を加えて攪拌しながら 80°C で 20 分間加温後、室温まで冷却し、水を加えて 100 mL に定容した。液中の残渣が十分に沈降するまで静置した後、上澄み液をシリンジフィルターでろ過し、HPLC に供した。なお、微量の亜硝酸塩の溶出が確認されたことから、シリンジフィルターは事前に蒸留水 10 mL により洗浄した後に用いた。また、分析試料

中の硝酸塩濃度が高く、設定した検量線範囲を外れる場合には蒸留水により適宜希釈し、再測定した。HPLC 条件を以下に示す。

・ HPLC 条件

ガードカラム : Shodex Asahipak NH2P-50G 4A、4.6 mm×1 cm

カラム : Shodex Asahipak NH2P-50 4E、4.6 mm×25 cm

カラム温度 : 50℃

移動相 : 0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む 10 mmol/L リン酸塩緩衝液

流量 : 1.0 mL/min

注入量 : 10 µL

測定波長 : 210 nm

B-4. 試薬

硝酸カリウム、水酸化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物、エタノールの各試薬は和光純薬(株)社製、蒸留水は関東化学(株)社製を用いた。

硝酸カリウムを蒸留水に溶解することで標準原液(1 mg/mL)を調製し、これを蒸留水で適宜希釈することで 0.5、2、5、10、20、50、100 µg/mL 濃度の各検量点溶液を調製した。

分析法の性能評価試験時に用いた添加試料調製の際には、1 mg/mL の濃度に加え 5 mg/mL 濃度の標準原液を調製

し、これを分析試料 5 g に対し 1 mL 添加した。

B-5. 機器

分析試料の混合均一化には Retsch 社製グラインドミックス GM200 を 1 L 容ステンレス容器と組み合わせて用いた。シリンジフィルタ(Nylon Filter Membrane)には Whatman 社製の孔径 0.45µm の製品を蒸留水にて十分洗浄した後に用いた。

高速液体クロマトグラフ(HPLC) : Waters 社製 2695 Alliance に 2996 Photodiode Array 検出器を付属させ使用した。

B-6. 分析計画

1) 分析法の性能評価(妥当性確認)

各種試料の分析に先立ち、使用する分析法の性能を評価し妥当性を確認した。これまでの生鮮野菜中に含まれる硝酸塩濃度に関する報告事例から、200 mg/kg および 1000 mg/kg を定量限界の目標値として設定した。

性能評価のための実験計画は以下の通りである。

1)-1 検体とした試料

硝酸塩は生鮮野菜中に広く分布しており、その濃度も様々である。そこで事前調査を行い、他の野菜に比

べてより低濃度の硝酸塩を含むことが判明したトマトおよびアスパラガスを多量に購入の上、混合均一化した試料を性能評価時のコントロール試料とした。また、これらコントロール試料を 5 g 分取した後、1 および 5 mg/kg 濃度の標準原液 1mLを加えることで添加試料を調製した(試料重量あたり濃度として 200 および 1000 ppm)。

1)-2 実験計画

一日あたり、コントロール試料ならびに各濃度の添加試料を 2 検体ずつ、計 6 検体を併行して分析し、この分析を 5 日間実施した。

1)-3 分析結果の解析と評価

下記の通り、精度と真度について評価した。

精度：各添加試料から得られた測定値から全コントロール試料から得られた測定値の平均を引いた後、一元配置の分散分析を行い、算出された分散から、併行精度および室内精度を推定した。

真度：各添加試料の測定値から全コントロール試料の測定値の平均を引いた数値の平均を求め、これと添加濃度との差を百分率として求めた。

2) 分析試料(試験室サンプルならびに分析ポーション)の調製

圃場より採取した一次サンプルから試験室サンプル(個別サンプルならびにコンポジットサンプル)を調製する際に用いた方法およびそれらからの分析ポーションの採取は以下の通り行った。

ダイコンの葉は 2 分割し、半分を細切混合しこれを個別サンプルとした。ダイコンの根は、水平方向に 3 分割、垂直方向に 4 分割し、垂直方向に隣接しない 3 切片(4 分の 1 個)を採取し、合わせて細切混合しこれを個別サンプルとした。ナス 2 個を垂直方向に 4 分割し、そのうちの 4 分の 3 ずつを採取し(合計 1.5 個分)、合わせて細切混合しこれを個別サンプルとした。キャベツは垂直方向に 8 分割し、向かい合う 2 切片(4 分の 1 個)を採取し、合わせて細切混合しこれを個別サンプルとした。ハクサイはまず垂直方向に 8 分割した上で向かい合う 2 切片を 2 組抜き取り、これをさらに水平方向に 4 分割して互い違いになるよう採取し(4 分の 1 個)合わせて細切混合しこれを個別サンプルとした。ホウレンソウ 4 株を垂直方向に 4 分割し、そのうちの 4 分の 2 ずつを採取し(合計 2 株分)、合わせて細切混合しこれを個別サンプルとした。個別サンプルは、サンプリング時に規定した一

次サンプルごとに調製した。

また、個別サンプルとは別に、1回のサンプリングで採取された8個の一次サンプルを縮分の上混合均一化することでコンポジットサンプルを調製した。コンポジットサンプル調製時、ナスおよびダイコンの葉については個別サンプルの調製に使用しなかった1つの一次サンプルあたり0.5個分、ホウレンソウについては1つの一次サンプルあたり2株分、ダイコンの根、キャベツおよびハクサイについては個別サンプル調製時と同様の方法で採取した1つの一次サンプルあたり4分の1個分を操作に供した。混合均一化しペースト状になった個別ならびにコンポジットサンプルのそれぞれから5gの分析ポーションを2つ採取し、これらを分析に供した。

以上の試料調製法に従い調製された分析ポーション数は、1種の生鮮野菜あたり36、本研究で対象とした全生鮮野菜種を通じての総計は216となる。

B-10. 統計解析

最初に、1回目と2回目のサンプリングごとに得られた $n=16$ の測定値(個別サンプル $8 \times$ 分析ポーション 2)を一組のデータセットとして一元配置の分散分析を実施し、分析の併行

精度、サンプル間のばらつき、測定値に含まれる全てのばらつきの大きさ(総標準偏差)を推定した。分散分析は全ての生鮮野菜について実施し、全データセットにおいて分析の併行精度が十分に小さく分析法の性能評価結果に一致していることを確認した。次いで、個別サンプルのそれぞれについて、採取した2つの分析ポーションから得られた測定値の平均値を当該個別サンプルの代表値(個別サンプル代表値)とし、2回のサンプリング間で得られる測定値の平均値の差に有意な差が認められるかの検定を行った。その際にはまず、1回目と2回目のそれぞれのサンプリングにより得られた $n=8$ の個別サンプル代表値の分散に差があるかを検定(F検定)し、検定結果を危険率5%で判断した。その結果、全データセットについて等分散が確認されたため、Student's t検定により平均の差の検定を行った。

B-11. サンプリングの不確かさの推定

本研究のサンプリング計画として、1種の生鮮野菜(およびダイコンについてはその部位)につき、8つのサンプルを2回繰り返してサンプリングする事で計16の一次サンプルを得た。さらに16の一次サンプルから個別サン

プルを調製した上で 2 つの分析ポーションを分取し分析することで計 32 の測定値を得た。サンプリングの不確かさ推定の際には、これら 32 の測定値をデータセットとして用いた。まず、一元配置の分散分析を行い、その結果から分析の併行精度、サンプル間のばらつきを推定した。推定されたサンプル間のばらつきを母集団中での対応する硝酸塩濃度の標準偏差と仮定した。サンプリングの不確かさの推定の際には分析精度は一定とし、サンプルサイズによる推定値への影響についても検討した。

C.D. 研究結果および考察

C.D.-1. 圃場からのサンプリング

図 1 に、生鮮野菜をサンプリングした圃場の一例を示す。圃場全体を仮想的な 50 の区画に区分し、サンプルを採取する区画は乱数によって決定した。図中に丸印にて示したとおり、特に規則性なくサンプルが抽出されていることがわかる。圃場中での硝酸塩濃度の分布が均一かつ正規分布であると仮定するならば、2 回のサンプリングにより得られたそれぞれ 8 つの一次サンプル中での硝酸塩濃度は正規分布し、2 セット間の平均および分散には有意の差がないと期待される。

C.D.-2. 分析法の性能評価結果

本研究では、サンプリング計画に従い採取された一次サンプルから個別サンプルを調製し、1 つの個別サンプルにつき 2 つの分析ポーションを分析した。このサンプリングおよび分析計画に従い得られた測定値からも、分析の併行精度を推定することが可能であり、後述するとおり実際にも推定した。しかし、これら分析ポーションを分析する前提としても分析法の性能が評価されていることが重要である。そこで、分析法の性能を評価することを目的とした試験を、別途計画し、事前に実施した。

測定値を得るための計測の過程において、対象試料に含まれている多種多様な成分(マトリクス)が妨害や促進といった影響を与える可能性が考えられる。そのため、厳密に言えば、分析法の性能は、測定を目的とする試料を用いて抽出から測定までの一連の操作を通じて評価するのが適切である。しかし、本研究の対象であるダイコン、ホウレンソウ、キャベツ、ハクサイといった生鮮野菜中には、本来的に比較的高濃度の硝酸塩が含まれていることが予想された。一方で性能を評価する際には、含まれている測定対象物質の濃度が明らかでありかつ評価を意図する濃度に影響を与えないレベルである試

料を用いることが重要である。そこで本研究で実施した性能評価試験では、硝酸塩の濃度が低いことを明らかにしたうえで、トマトとアスパラガスをコントロール試料として選定し、そこに規定量の硝酸塩を添加し、性能評価用試料として用いることとした。添加濃度としては、試料重量あたりの濃度として 200 および 1000 ppm を設定し、本濃度域での精度と真度の妥当性を判断した。

一日あたり、コントロール試料ならびに各濃度の添加試料を 2 検体ずつ、計 6 検体を併行して分析し、この分析を 5 日間実施した。得られた測定値を解析し、推定された回収率ならびに精度(併行ならびに室内精度)を表 1 に示した。各濃度のトマトおよびアスパラガス試料を通じて、回収率は 97.6-102.4%、併行精度および室内精度はそれぞれ相対標準偏差として 0.4-1.3%および 0.8-1.5%であった。使用した生鮮野菜の種類によることなく、回収率、併行精度ならびに室内精度ともに、一般的な理化学分析に要求される性能評価基準を満たしており、信頼性の高い測定値を得るための分析が可能であると判断した。

C.D.-3. 各生鮮野菜中の硝酸塩濃度の測定結果

C.D.-3-1. 概要

表 2~6 に、分析ポーションの測定結果を生鮮野菜の種類ごとに示す。各表では、サンプリングの 1 回目と 2 回目、また 2 つの分析ポーションに区別してデータをまとめ、それぞれのサンプリングごとに合計 8 つの分析ポーションから得られた測定値の平均値と変動(標準偏差; SD および相対標準偏差; RSD)を合わせて示した。また、図の 2 には、1 つの個別サンプルに由来する 2 つの分析ポーションから得た測定値の平均を個別サンプル代表値として、サンプリングごとに散布図として示した。

まずデータを俯瞰すれば、生鮮野菜の種類を問わず、同一の個別サンプルから採取した 2 つの分析ポーション(表中 A と B)から得られた測定値がよく一致していることがわかる。これら 2 つのポーション間での測定値の差から推定される分析の併行精度については後述するが、その値が個別サンプル間での測定値の変動に比べ明らかに小さいことを確認したうえで、2 つのポーションでの測定値の平均値(個別サンプル代表値)およびばらつきは算出した。

C.D.-3-2. ダイコン葉中の硝酸塩濃度の測定結果

次に、生鮮野菜ごとに硝酸塩濃度の

変動について詳述する。

ダイコン葉中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 4214 ppm、2回目のサンプリングで 5011 ppm であり、分析に供した全生鮮野菜を通じ最も高いことが明らかとなった(表 2 左)。また、サンプリング回ごとの個別サンプル代表値の変動(相対標準偏差;RSD)は 17.4 および 15.5%であった。一方、2つの分析ポーションの測定値はよく一致しており、分析手順による測定値への影響は分析法の性能評価結果から予測される大きさと同程度であると予測された。また、ダイコン葉中の硝酸塩濃度は、EU においてハウレンソウに定められている基準値(3000 mg/kg; 10月~3月期)と仮に比較すると、その値を超過していた。

1 回目のサンプリングで採取した一次サンプル(n=8)から調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 4449 ppm、分析ポーション B について 4414 ppm であった。また、2 回目のサンプリングにより得られたコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 5093 ppm、分析ポーション B について 4924 ppm であった。2 回のサンプリングを通じ、個別サンプル代表値の平均

値と、対応する一次サンプルの一部を採取して調製したコンポジットサンプルの 2 つの分析ポーションから得られた測定値がよく一致している。これらの結果は、分析に供したダイコン葉中での硝酸塩濃度の均一性が高い事を示唆しており、二つの分析ポーションの測定値に比べ個別サンプル代表値の変動が大きい結果によっても支持される。つまり、少なくともダイコン葉中の硝酸塩濃度を測定する場合には、同一試料からの分析を繰り返すよりはむしろ、多数の個別サンプルの分析を行った方が、より対象母集団中での硝酸塩濃度の平均を正確に推定できるものと考えられる。

個別サンプル間に認められた測定値の変動とそれに基づく圃場での硝酸塩濃度の分布の推定、分析手順による測定値の変動への影響、繰り返しサンプリングにより生じる圃場での硝酸塩濃度推定値の差についてのより詳細な解析結果については後述する。

C.D.-3-3. ダイコン根中の硝酸塩濃度の測定結果

ダイコン根中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 2228 ppm、2回目のサンプリングで 2755 ppm であり、それぞれの RSD は 15.3 および

11.1%であった(表 2 右)。1 回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 2096 ppm、分析ポーション B について 2128 ppm であった。また、2 回目のサンプリングにより得られたコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 2724 ppm、分析ポーション B について 2614 ppm であった。個別サンプル間での硝酸塩濃度の測定値はダイコン葉中と同程度の変動を示した。また、2 回のサンプリングを通じ、個別サンプル代表値の平均値と、対応する一次サンプルの一部を採取して調製したコンポジットサンプルの 2 つの分析ポーションから得られた測定値もよく一致した。

いずれも食することが可能な部位として、ダイコンの葉と根を区別し、部位ごとの硝酸塩濃度を測定した。その結果からは、根に比べ葉中での硝酸塩濃度が 2 倍程度高い事が明らかとなった。これは同重量の葉と根を摂食すると仮定すれば摂取される硝酸塩の量は、2 倍異なることを意味している。また葉と根では細胞の大きさ、密度や水分含量が大きく異なると予想され、一概に言うことはできないが、植物の器官による生理機能の差が、食品としての部位別の濃度の差に影響している可能

性も考えられる。サンプリング手順の観点から言えば、ダイコンの全体のうちに明らかに硝酸塩濃度の異なる部位が存在することから、これらを十分に混合均一化しない限り、分析試料中の濃度が不均一となり、硝酸塩濃度の正確な推定値を得ることが難しくなると予測される。分析の目的にもよるが、ダイコンとしての硝酸塩濃度を推定する場合には、部位を区別した上で試料調製および分析をし、いずれかの部位での測定値に基づき評価をする、あるいは、部位ごとに得られた測定値の平均値を便宜上算出し、それをダイコン全体としての測定値とするといった方策をとることが望ましいと考えられる。いずれにせよ、部位別に分析する限り、サンプリングの不確かさを推定するために必要となる個別サンプル間での濃度の分布ならびに分析の併行精度に対する分析試料の均一性の寄与は低い。

C.D.-3-4. ホウレンソウ中の硝酸塩濃度の測定結果

ホウレンソウ中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1 回目のサンプリングで 1271 ppm、2 回目のサンプリングで 1172 ppm であり、それぞれの RSD は 27.4 および 24.0%であった(表 3)。一方で、1 回目のサンプリングで調製したコンポジッ

トサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1339 ppm、分析ポーション B について 1337 ppm であった。また、2 回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1186 ppm、分析ポーション B について 1198 ppm であった。上記のとおり、個別サンプル間での硝酸塩濃度の測定値は、ダイコンの場合に比べ大きな変動を示した。また、個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルでの測定値とは、2 回のサンプリングを通じてよく一致した。

C.D.-3-5. キャベツ中の硝酸塩濃度の測定結果

キャベツ中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1 回目のサンプリングで 1264 ppm、2 回目のサンプリングで 1263 ppm であり、それぞれの RSD は 23.7 および 16.3% であった(表 4)。一方で、1 回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1271 ppm、分析ポーション B について 1267 ppm であった。また、2 回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1374 ppm、分析ポーション B について 1382 ppm

であった。上記のとおり、個別サンプル代表値の平均値および個別サンプル間での測定値のばらつきの程度は、ホウレンソウの場合と非常によく似ていた。個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルでの測定値とは、2 回のサンプリングを通じてよく一致した。

C.D.-3-6. ハクサイ中の硝酸塩濃度の測定結果

ハクサイ中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1 回目のサンプリングで 1678 ppm、2 回目のサンプリングで 1829 ppm であり、それぞれの RSD は 17.1 および 10.9% であった(表 5)。一方で、1 回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1534 ppm、分析ポーション B について 1513 ppm であった。また、2 回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 1598 ppm、分析ポーション B について 1589 ppm であった。上記のとおり、個別サンプル代表値の平均値は、ダイコン程ではないが、ホウレンソウやキャベツに比べると若干高めである一方で、個別サンプル間の測定値のばらつきは小さかった。個別サンプル代表値の平均値と

対応するコンポジットサンプルでの測定値とは、2回のサンプリングを通じてよく一致した。

C.D.-3-7. ナス中の硝酸塩濃度の測定結果

ナス中の硝酸塩濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 371 ppm、2回目のサンプリングで 404 ppm であり、本研究で対象とした生鮮野菜中最低であった。またそれぞれの RSD は 11.6 および 11.1% でありハクサイで得られた結果に近かった(表 6)。一方で、1回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 369 ppm、分析ポーション B について 368 ppm であった。また、2回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 410 ppm、分析ポーション B について 407 ppm であり、それぞれ対応する個別サンプル測定値の平均値と非常に近い結果となった。

C.D.-4. 測定結果の統計解析

表 2~6 に示した全測定結果から、全ての生鮮野菜を通じて分析手順による測定値のばらつきへの影響は小さくまた、それに比較すると個別サンプル間で硝酸塩濃度は広い範囲に分布して

いるが、同一のサンプリング手順を繰り返し実行する事で得られる測定結果の一致の程度は高いと考えられた。これらの結果についてより詳細を明らかにすることを目的に、統計解析を実施した。まず、分析により生じたばらつきの大きさ(併行精度)、個々の個別サンプルに含まれる硝酸塩濃度の変動(サンプル間のばらつき)の大きさおよび、測定値に含まれる全ての変動の大きさ(総標準偏差)について推定するため、一元配置の分散分析を行った。1回目と2回目のサンプリングごとに得られた $n=16$ の測定値(個別サンプル $8 \times$ 分析ポーション 2)を一組のデータセットとし分散分析を行い、得られた分散に基づき算出された併行精度、サンプル間の変動、総標準偏差を SD ならびに RSD として表 7 に示す。全サンプリングを通じて、併行精度(RSD)は約 0.8~2.3%の範囲にあるのに対し、サンプル間の変動(RSD)は 10.9~27.4%のより大きな値となった。また総標準偏差に占めるサンプル間の変動の寄与が非常に大きいことも明らかとなった。併行精度の大きさについては、トマトおよびアスパラガスに規定量の硝酸塩を添加した試験料を用いて実施した、性能評価試験の結果から推定される併行および室

内精度によく一致している。性能評価試験の際に添加した硝酸塩濃度と個別サンプルに含まれていた硝酸塩濃度との差や、同一試料を複数繰り返し分析した結果から推定された精度であるか、複数の個別試料を分析した結果から推定された精度であるかの違いを考慮すると、本研究で採用した分析法は生鮮野菜の種を問わず広く適用可能な、ばらつきの小さい方法であると言える。

以上の結果に基づき、サンプル間の変動に比べ併行精度が十分に小さいと判断し、個別サンプルのそれぞれについて採取した、2つの分析ポジションから得られた測定値の平均値を当該個別サンプルの代表値(個別サンプル代表値)とし、2回のサンプリング間で得られる測定値の平均に有意差が認められるかについて検定を行った。生鮮野菜ごとの個別サンプル代表値を1回目と2回目のサンプリングに分けて示した散布図を図2に示した。

まず、1回目と2回目のサンプリングごとに得られた $n=8$ の個別サンプル代表値の分散に差があるかを検定(F検定)した(表7)。検定の結果はP値として示したが、全ての代表値について等分散が確認された。この結果か

ら、2回のサンプリング間で得られた個別サンプル代表値の分散は等しいと仮定し、Student's t 検定により平均値の差を検定した。その結果、ダイコンの葉から得られた個別サンプル代表値の検定結果についてのみP値が0.05を下回り(0.006)、2回のサンプリングで得られた平均値の差に有意の差があると考えられた。この結果は、サンプリングを繰り返し実行することにより得られる測定値が有意に異なる可能性が高いことを示唆するものであるが、ダイコンの葉についてのみ、そのような結果となった原因は特定できない。ダイコンの葉と根との間で硝酸塩濃度を比較してみると、単位重量あたりの水分含量が大きく違うことの影響も大きいと想像されるが、明らかに葉中の濃度が高く、根での濃度の約2倍である。この結果からは、ダイコンには葉中に硝酸塩を積極的に蓄積する生理機能が備わっている可能性も考えられ、その生理機能の固体による違いが、ダイコンの葉を対象としたサンプリング間での測定値に影響を与えているのかも知れない。サンプリングの観点から考察すれば、ダイコンから得られた結果は、葉に関する2回の繰り返しサンプリング並びに葉と根という異なる部位のサンプリングの両方

が、特定の母集団中での濃度の分布が均一ではなく、異なる平均値を持つ分布が混在した状態を想像させる。そのような場合にはランダムサンプリングを実行したにせよ、抜き取られるサンプル数が十分に大きくなければサンプリングごとに推定される平均値の差が均一な分布からのサンプリングに比べ大きくなり、サンプリング計画の策定上、留意しなければならないケースだと考えられる。そもそもどのような規格が設定されるかにも依るが、食品中での測定対象物質の分布が明らかであるならば、採取する食品部位をサンプリング手順として規定し、測定値による推定の精度を高めることが誤りの少ない判定を効率よく行うためには有効であると考えられる。

ダイコンを除くその他の生鮮野菜については、繰り返しサンプリング間で得られた測定値の平均に有意な差は認められなかった。つまり、本研究で採用したサンプリング計画に従って同一の集団(圃場)から複数回サンプリングを行って得られる測定値の平均に差が生じる可能性が非常に低いことが確認された。言い換えれば、今回の計画は圃場での硝酸塩の分布を反映した代表性のあるサンプルを偏ることなく繰り返し採取することの

可能な適切な計画であったといえる。

C.D.-4. 不確かさの推定

生鮮野菜ごとに硝酸塩濃度の測定におけるサンプリングの不確かさを推定した。推定の前段階として、まず、16の一次サンプルに対応する個別サンプルから分析ポーションを2つずつ採取し得られた測定値($n=32$)をデータセットとして一元配置の分散分析を行った。次いで、分散分析の結果から、分析の併行精度ならびにサンプル間での硝酸塩濃度の変動を推定した。推定されたサンプル間での硝酸塩濃度の変動を、母集団(圃場)中の硝酸塩濃度分布の標準偏差と仮定した。サンプリングの不確かさ推定の際には、分析精度は一定として不確かさに含めるものとし、サンプルサイズを3、5、10、16と変更した場合の影響についても検討した。推定されたサンプリングの不確かさ(標準不確かさ)をSDおよびRSDとして表8に示す。

まず、全ての生鮮野菜を通じて、サンプルサイズの増加に伴いサンプリングの不確かさが小さくなることがわかる。これは中心極限定理に従い、母平均推定値の分散がサンプルサイズの増加に伴って小さくなるためである。また、サンプルサイズが3の場合でも、サンプリングの不確かさ(RSD)はハウ

レンソウについて推定された 14.7%が最大であり、これは昨年度報告したサンプルサイズを 16 と仮定して推定される残留レベルの農薬測定におけるサンプリングの不確かさの最も小さな幅(16.5%)とほぼ同等の結果である。この結果は、分析対象とする物質の濃度とその存在様式の違いを反映したものと考える。昨年度報告した個別サンプル測定値の平均とコンポジットサンプル測定値が乖離するという結果からは、農薬類は個別の生鮮野菜の個体中に一律の濃度で残留しているわけではなく、散布されたときに付着しやすい箇所あるいは、雨風等の環境による影響を受けにくい箇所等に高い濃度で存在することが強く示唆される。これに対し、硝酸塩は植物性食品に幅広く含まれ、植物種あるいは葉と根といった生理学上区別される器官によって濃度の平均が異なる可能性は否定できないものの、分布の幅は狭く、個体差も生じにくいものと考えられる。このように分析対象とする物質の濃度やアイテム中での局在、また母集団中での分布に関する情報を得て、分析の目的と合わせて総合的に評価する事が適切なサンプリング計画の策定には必要となる。

また測定値には、サンプリングの不確かさと同時に、対象物質の抽出、分

離、計測といった分析行為に起因する不確かさ(測定の不確かさ)が含まれている。この測定の不確かさに比べ、サンプリングの不確かさを小さくすること(サンプリングサイズを大きくすること)は、労力やコストの点から現実的ではない。そのため、測定の不確かさを推定し、これを指標にサンプリングの不確かさを評価する事でサンプリング計画の適正を諮る事が有効な手段になりうると考える。測定の不確かさを推定するために一般的に用いられる Thompson 修正式により、本研究で得られた測定値に対応する濃度レベルである 1000 ppm での拡張不確かさ(包含係数 2)を推定すると 8%となる。この測定値の拡張不確かさと同等の不確かさを与えるサンプルサイズは約 5~10 であり、ナスのように生鮮野菜の種類によっては 3 でも十分な場合もある。さらに言えば、本研究で推定しているサンプリングの不確かさには寄与は小さいものの一定の分析精度を含めているため、より小さなサンプルサイズにしても不確かさの幅が同程度に保たれることが期待される。

E. 結論

規定したサンプリング計画と手順に基づき、圃場から複数の生鮮野菜を採取し、そこに含まれる硝酸塩の濃度を

測定した。その結果、個々のサンプル間での測定値の変動は、分析による測定値のばらつき(併行精度)に比べ大きく、総標準偏差への寄与割合を考えた場合には主たる要因になることが明らかとなった。しかし、Thompson修正式を用いて一般に推定される測定値の不確かさを指標とすれば、3~10といった現実的なサンプルサイズにより、十分な精度で母集団中の濃度の平均を推定することが可能であると考えられた。

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Takahiro Watanabe, Yoshiki Tsukakoshi, Satoshi Takatsuki, Rieko Matsuda ; 123th AOAC INTERNATIONAL Annual meeting (2009年9月12~17日; 米国 Philadelphia)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

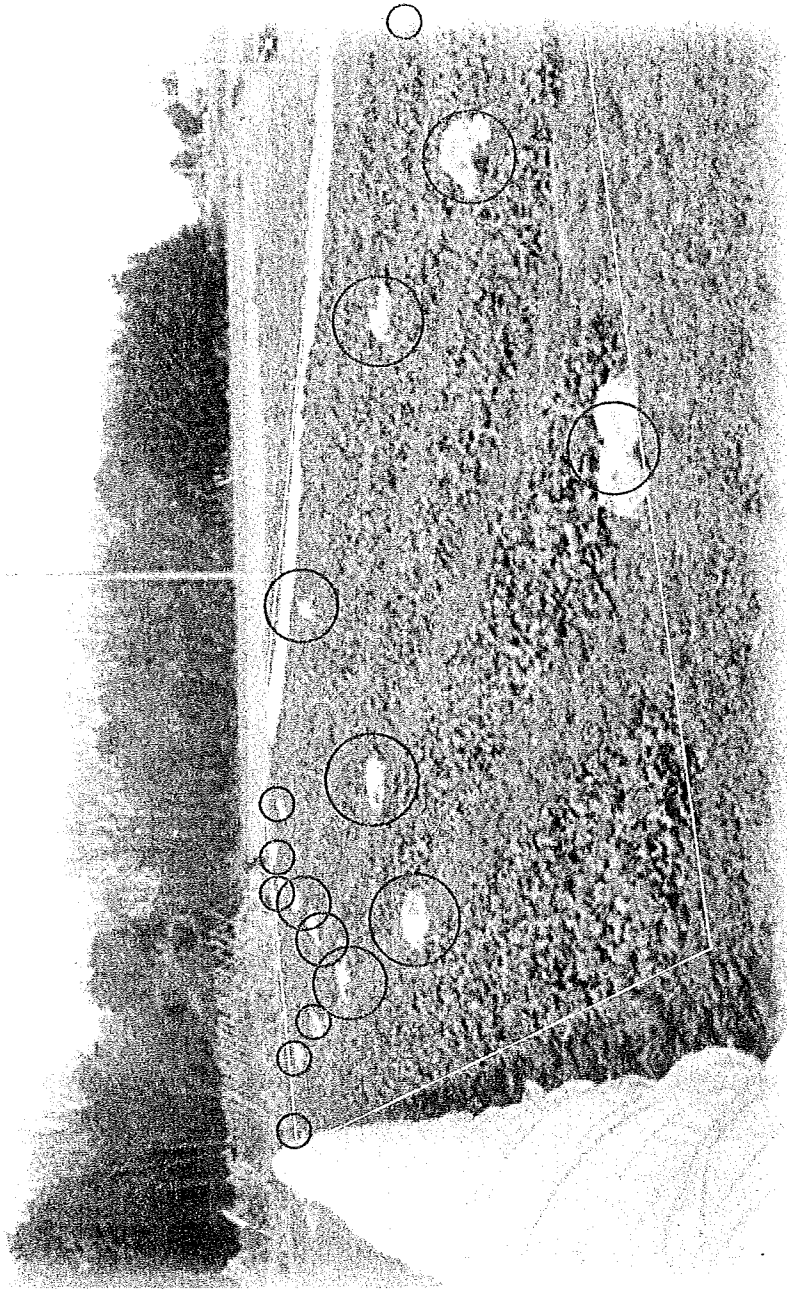


図1 サンプルングを行った圃場を行った圃場が採取された区画の圃場中での位置を○にて合わせて図示した)

添加濃度	添加試料測定値とコントロール 試料測定値の平均との差	Days					Ave.	Repeatability (%)	Reproducibility (within- laboratory) (%)	Trueness (%)
		1st	2nd	3rd	4th	5th				
200	sample 1	205.6	207.0	205.6	201.4	204.4	204.3	1.1	1.1	102.2
	sample 2	203.9	204.2	203.7	206.3	201.5				
1000	sample 1	997.1	981.8	999.0	988.3	987.7	989.1	0.7	0.8	98.9
	sample 2	992.6	983.0	987.3	999.8	974.1				
コントロール試料 測定値										
	Sample 1	37.14	37.18	35.58	37.30	35.94	Ave.	SD		
	Sample 2	34.89	37.18	36.53	37.68	35.70	36.51	0.929		

ppm

表 1-1 トマトをコントロール試料として使用した場合の分析法性能評価結果

添加濃度	添加試料測定値とコントロール 試料測定値の平均との差	Days					Ave.	Repeatability (%)	Reproducibility (within- laboratory) (%)	Trueness (%)
		1st	2nd	3rd	4th	5th				
200	sample 1	202.5	202.6	205.5	204.3	203.6	204.8	1.3	1.5	102.4
	sample 2	199.6	205.5	205.7	208.2	210.1				
1000	sample 1	988.4	974.1	978.8	986.3	962.3	976.0	0.4	1.0	97.6
	sample 2	976.3	970.8	978.4	984.8	959.9				
コントロール試料 測定値										
	Sample 1	19.88	20.24	22.30	21.83	21.27	Ave.	SD		
	Sample 2	19.23	20.54	20.57	21.72	21.17	20.87	0.955		

ppm

表 1-2 アスパラガスをコントロール試料として使用した場合の分析法性能評価結果

Repeated Test portion	Daikon radish (Leaf)				Daikon radish (Root)			
	1st		2nd		1st		2nd	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Sample No. 1	3890.22	3898.02	4841.34	4713.91	2085.24	2161.49	3084.78	3000.46
2	5051.51	4953.93	6354.83	6400.05	2003.56	2076.79	3130.46	3133.56
3	4833.38	4715.30	4984.96	4897.81	2732.02	2678.84	2903.54	2914.92
4	3191.14	3241.89	4454.32	4384.28	1756.00	1753.88	2504.89	2431.99
5	3760.33	3752.56	5722.99	5667.79	2070.66	2069.39	2383.44	2320.19
6	3658.49	3632.95	4292.27	4258.42	2297.59	2191.32	2735.14	2723.49
7	4152.05	4082.70	4171.19	4106.54	2131.65	2126.93	2536.36	2324.89
8	5308.93	5296.52	5330.47	5592.83	2711.16	2796.28	3002.75	2955.30
Average	4230.76	4196.74	5019.05	5002.70	2223.49	2231.86	2785.17	2725.60
SD	751.29	715.23	753.62	808.62	342.21	341.19	286.53	325.52
RSD	17.8	17.0	15.0	16.2	15.4	15.3	10.3	11.9
composite	4449.37	4414.17	5093.46	4924.16	2096.01	2127.80	2724.25	2613.86

表2 ダイコン中に含まれる硝酸塩濃度の測定値
(相対標準偏差;RSD%を除き ppmにて表記)
(表左;ダイコンの葉、表右;ダイコンの根)

Spinach						
Repeated Test portion	1st		2nd		A	B
	A	B	A	B		
Sample No. 1	1891.61	1915.71	1456.26	1495.73		
2	1234.34	1208.76	1258.20	1292.04		
3	1204.40	1199.84	1221.79	1202.73		
4	974.89	971.21	1626.50	1622.28		
5	1536.15	1519.75	857.60	849.16		
6	772.53	772.93	1017.50	1005.43		
7	1168.98	1127.78	1086.92	1084.99		
8	1411.11	1417.95	840.15	841.98		
Average	1274.25	1266.74	1170.62	1174.29		
SD	343.79	351.81	277.06	285.69		
RSD	27.0	27.8	23.7	24.3		
composite	1339.13	1336.62	1185.59	1197.68		

表3 ホウレンソウ中に含まれる硝酸塩濃度の測定値
(相対標準偏差;RSD%を除き ppm にて表記)

Cabbage						
Repeated Test portion	1st		2nd		A	B
	A	B	A	B		
Sample No. 1	1285.78	1255.59	1089.56	1075.59		
2	838.37	862.09	1438.42	1425.63		
3	1570.86	1560.44	1102.70	1077.91		
4	1265.04	1260.99	1236.32	1224.68		
5	1424.74	1420.52	1611.41	1619.57		
6	1369.36	1378.96	1069.21	1057.24		
7	783.70	792.67	1170.65	1136.33		
8	1577.85	1584.08	1441.85	1430.96		
Average	1264.46	1264.42	1270.01	1255.99		
SD	302.83	295.64	202.25	210.66		
RSD	23.9	23.4	15.9	16.8		
composite	1270.90	1266.98	1374.21	1382.29		

表4 キャベツ中に含まれる硝酸塩濃度の測定値
(相対標準偏差;RSD%を除き ppm にて表記)