

2 食品衛生外部精度管理調査の基本概念

外部精度管理調査の解析については、すでに Codex より提示された「Proficiency Testing of Laboratories」¹⁾に示されている。これは IUPAC、ISO、AOAC により取りまとめられたもので、「International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories (1993)」²⁾として示されており、特に食品衛生外部精度管理調査の理化学調査についてはこのプロトコルを参考として解析を行っている。定量的な微生物学調査の結果解析法については基本的には理化学調査と同様であるが、統計学的処理方法については、理化学調査を一部変更した別の方法を採用している。これは、食品衛生調査会食品規格部会精度管理分科会において討議検討されたものである。さらに、食品衛生外部精度管理調査では、調査試料分析機関に到着してから最終的な結果報告を行うまでの全ての過程を各分析機関の操作手順書(SOP)に従って実施することとしている。これは、技能試験としてあつかった場合には、検査方法及びその結果にのみ特化した解析となり、しかも、真値と近似した値をどのように検出するのかを問題とすることになる。これに対して、ここで言う外部精度管理調査では公定法又は公定法と同等であると妥当性確認された方法を用いたときに得られる結果がどの程度ばらついているのか、また分析機関の組織体制、検査体制を含め試料の受入からその結果をどのような過程で得ているのかという「GLP システムにおける試験」という概念に基づいている。

3 調査の流れと基本的な統計処理

食品衛生外部精度管理調査は図 1 に示すような流れで行われている。まず食品薬品安全センターにおいて外部精度管理調査の計画を策定し年度の事業として参加機関に対して参加申込書を送付する。計画に従って調査試料の作製と配布を行い、参加機関は検査を実施し、結果を報告する。一方、報告された結果の統計解析は食品薬品安全センターで行い、報告書の作成を行う。調査結果は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課及び食品衛生外部精度管理調査成績評価会において評価する。参加機関は結果を確認し、必要ならば改善を行う。

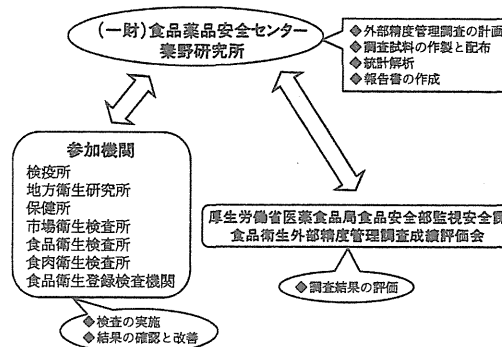


図 1：食品衛生外部精度管理調査の流れ

従来方式(これまでの評価法)における外部精度管理調査の解析フローを図 2-1 に示す。各参加検査機関よりデータを回収後、範囲を大きく外れた機関、すなわち、理化学検査では添加量の 1/10 以下及び 10 倍以上の報告値を含む機関を除外し、添加量が明確でないときには外部精度管理調査機関の測定値を暫定値として同様の処理を行う。一方、一般細菌数測定検査では外部精度管理調査機関の測定値(暫定値)の 1/100 以下及び 100 倍以上の報告値を含む機関を除外する。また、報告値が理化学調査では 5 個未満、微生物学調査では 3 個未満の報告値を回答した機関については、その機関の報告値全てを以後の解析対象から除外する。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理

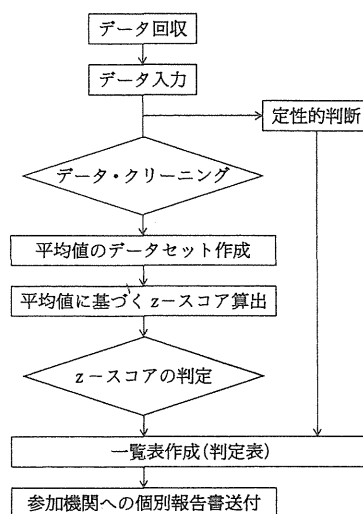


図 2-1：外部精度管理調査の解析フロー(従来方式)

図を代用する方法で観察した後、各検査機関からの報告値の平均値について、基本統計量、順序統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を掌握する。分布に極端なひずみやとがりが観察された場合には2シグマ(平均値±2×標準偏差)以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行い、最終的に各検査機関のZスコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行う。ただし一般細菌数測定検査については基本的には $\bar{X}-R$ 管理図のみで各検査機関の解析を行い、Zスコアは参考に留める。また、理化学調査ならびに微生物学調査における定性検査については、報告結果を入力した後、判定結果について表示する。

図2-2にロバスト方式における外部精度管理調査の解析フローを示す。平成21年度より、新たにロバスト統計量による解析法の導入を行い、これまでの解析法による従来方式とロバスト方式による評価法を併記している。ロバスト方式は、食品衛生や分析化学に関与する検査機関の技能試験に関連して、測定データの分析評価に用いるさまざまな統計手法が、IUPAC、FAPAS、AOAC、ISOまたはJISなどから提案されている³⁾⁻⁹⁾。統計手法の導入に関心を示す理由の一つには、こうした手法が測定値の分布の観測ツールとして有効であるだけでなく、測定法や測定値の構造が次

第に複雑になり、より科学的、客観的な評価法が求められているからである。たとえば、現実の測定値の分布には、はずれ値やゴミの混入を伴うことがあり、これへの解析上の対応策が必要とされている。こうしたはずれ値の影響を受けにくい統計量の一つとしてロバスト統計量(頑健統計量)があり、近年、これの利用を薦める提案が多くなってきている。食品衛生外部精度管理調査でもこうした解析手法の導入をはかるため、種々の方法のある中Huberの提唱したProposal2「H15」と呼称される方式を用いて解析を行っている。すなわち、データ・クリーニング済みのデータのメジアン±メジアン×50%の範囲を超える報告値を除外した後、ロバスト統計量に基づくZスコアによる各検査機関の解析を行う。

ここでZスコアを算出するには指示値が必要であり、指示値は、食品マトリックス中の分析対象物の真値の代用値として「The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (2006)」⁹⁾においてはいくつかの方法によって求められるとされている。ここで推奨している一つの方法として専門試験室グループによる平均値の利用が提案されているが、この方法による評価は当面実施困難である。そこで、まず、従来方式では、暫定的に検査機関の報告値についてデータ・クリーニングを行った後、各検査機関の報告値の機関別平均値の平均値(つまり総平均値 \bar{x})を求めて、それを指示値としてみなすこととしている。また、ヒストグラムの分布に外れ値が観測されたときは、さらに2シグマ以上(総平均値 $\bar{x} \pm 2 \times$ 標準偏差 s の範囲を超える)の値を報告した検査機関の全ての測定値を除外して、同様に指示値を再度算出することとしている。こうして得た平均値と標準偏差を用いて、Zスコアを算出する。その式を次に示す。

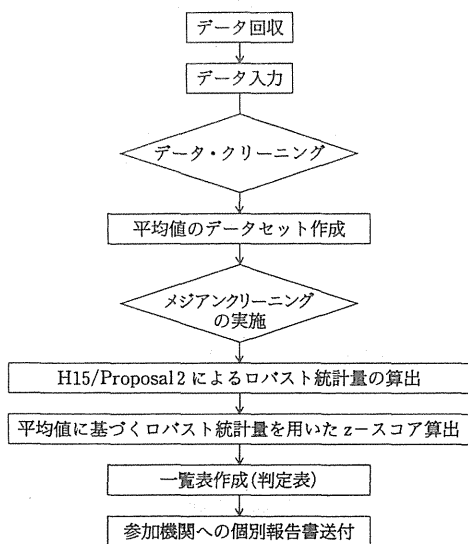


図2-2：外部精度管理調査の解析フロー(ロバスト方式)

$$z = \frac{(x - \bar{x})}{s}$$

- x：各分析機関からの報告値の平均値
- \bar{x} ：参加分析機関全体の平均値(指示値)
- s：標準偏差

なお、ロバスト方式の場合は、上のデータ・クリーニングの他に、更に必要に応じてメジアンを用いたク

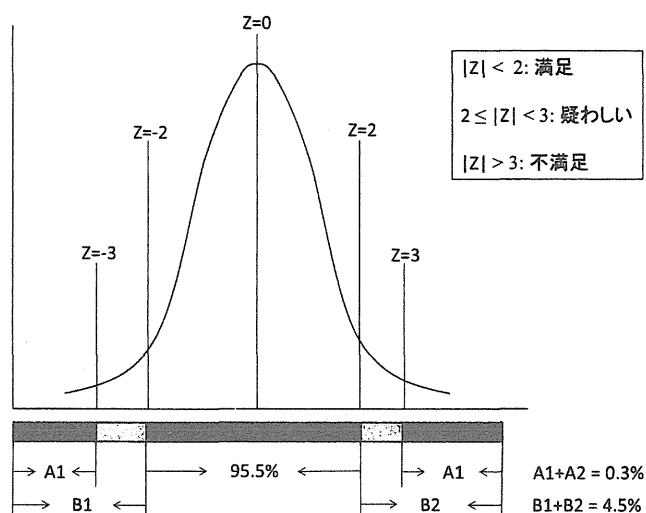


図3：Zスコアの分布図

リーニングを行う。その後、各検査機関の報告値の機関別平均値を用いて、ロバスト平均値とロバスト標準偏差を推定し、これを用いてZスコアを算出する。Zスコアとは標準化の操作をいい、標準化とは上の式に見られるように、Zスコアの平均値は「0」となる。図3にZスコアの分布図を示す。典型的な化学分析の結果は正規分布になるので、結果の大部分は平均値付近に集まるが、当然いくつかの結果は分布の外れに来てしまう。Zスコアの絶対値が2以上のデータ数は全体の約4.5%、3以上のデータ数は全体の約0.3%となる。よって、評価基準は、測定値にこうした仮定が満たされたときに成り立つ関係であることに注意すべきである。たとえば、Codex、IUPAC、AOAC、ISOでは、このZスコアは同一検査機関内で時系列的に観測することとしており、その評価基準は図3に示すとおりである。食品衛生外部精度管理調査もほぼこの解釈に従っている。すなわち、Zスコアの絶対値が2未満であれば「良好」、2以上3未満であれば「改善措置が必要か否かの検討が必要」、3以上であれば「改善措置の必要あり」とする。このZスコアは当該検査機関の報告値が全検査機関に対してどのような成績にあるのかに関する位置づけを測定値の標準化を行うことで相対的に示したものである。従って、Zスコアの絶対値が3以上の場合には、“調査に参加した検査機関全体の分布の傾向と比較”して大き

くずれが生じているため、測定法の再点検と何らかの対策をとることが必要である。このことからZスコアの絶対値が4や5といった値となる場合には、確率から考えて、その外れた値は、全体の傾向から明らかなずれを生じていると判断しよう、と考えるのである。しかし、現実的には調査項目によっては機関別平均値が総平均値付近に集中する傾向がある（すなわち「尖度」が大きくなる傾向にある）。つまり、大半の検査機関の報告値の機関内変動が少なくなる傾向になる。一方、この集中化現象から外れる測定値を報告する検査機関も存在する。結果として、機関別平均値の分布の変動（分散、標準偏差）が過小に評価される傾向にあり、調査項目によっては、この影響が変動係数の大小に関係する。なお、ロバスト方式を用いた場合も、上述したロバスト統計量（ロバスト平均値、ロバスト標準偏差）を用いる算出式で得たZスコアについて、この同じ評価基準を適用している。

Zスコアの他に解析する評価法として $\bar{X}-R$ 管理図（図4）がある。 $\bar{X}-R$ 管理図は米国のシューハートにより提唱された方法で、“quality control chart”と命名された総計的手法を導入した製品の工程管理の方法である。この管理図の特色はデータに変動（ばらつき）があることを認め、管理図の中に管理限界線を置いて工程の稼働状況を客観的に評価しようとするところにある。 $\bar{X}-R$ 管理図では、工程から数個の

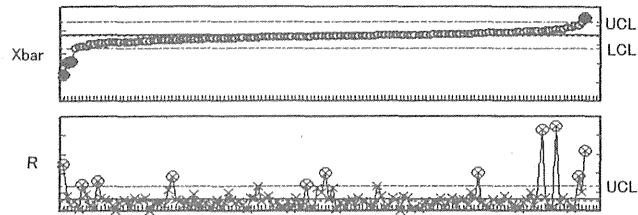


図4： $\bar{X}-R$ 管理図の例

試料を逐次的に抽出し、その平均値 \bar{X} やばらつきの測度としての範囲 R を計算しプロットしたものである。管理図には管理限界を示す一対の管理限界線を引き、これに測定値を表す点を打つ。その点が管理限界線の内側にあるか、外側にあるかによって製造工手が良い状態にあるかどうかを知ることができる。管理図に記入した多くの点が管理限界線の内側に収まって入れば、その製造工程は安定した状態であるとみなせるが、点がこの外側にあるときは、製造工程に見逃せないばらつきを生み出す原因があるので、原因を究明し改善処置を取らなければならないことを示す。通常の $\bar{X}-R$ 管理図は、前述の通り各工程から抽出された、ある大きさの試料(群)が時間軸に沿って時系列的に観測される測定値で、ある母集団から順次サンプリングされた試料であるとの前提で考えている。しかし、外部精度管理調査では、各検査機関を単に一つの群と見なして、この群内(検査機関内)変動(測定値のばらつき)と検査機関間における群間変動(平均値のばらつき)とを総合的に比較し観察するために同管理図を代用している。 \bar{X} と R は検査機関ごとの結果報告(理化学調査では $n=5$ 、微生物学調査では $n=3$)から求め、縦軸に配列しプロットする。 R はある検査機関の n 個の測定値内の(最大値 - 最小値)を示す。外部精度管理調査における管理限界線は JIS の方法ではなく基本的には添加量を用いて計算している。すなわち理化学調査での上部管理限界線(UCL)は添加量の120%、下部管理限界線(LCL)は70%、微生物学検査での上部管理限界線は各検査機関の報告値の機関別平均値の総平均値に対して300%、下部管理限界線は30%と設定している。なお、理化学調査における管理限界線設定値は添加回収試験における回収率の目安である添加量の70%~120%を参考として設定している。一方、 R の上部管理線(UCL)は \bar{R} に係数を乗じ

て求める。すなわち理化学調査では $n=5$ 測定であるため係数表より係数は2.115となる。

4 解析結果の基本的な考え方

ここでは理化学調査における解析結果の基本的な考え方を示す。まず、データ・クリーニング又は2シグマ処理によって除外された場合は、報告値が参加機関全体の平均値から大きく離れていることを意味する。すなわち、信頼性確保システムの基本的な管理及び運営に問題がある可能性があるため、試験品の管理、試験法、機器の管理、試薬等の管理、報告書の作成、内部点検、信頼性保証体制について検証する必要がある。特に、データ・クリーニングで除外された場合には単位の付け間違い、転記ミス、希釈倍率など計算ミスも考えられる。次に、 \bar{X} 管理図で平均値、中央値から大きく外れた場合は、マトリックスの種類や採用する分析操作手順の違いにより添加量に対する期待回収率基準管理線から外れる機関数が増える場合もあるが、平均値から大きく離れた場合には、試験品の管理、試薬等の管理及び試験法について内部点検を行うことを推奨する。また、 R 管理図で管理限界線を越えた場合は、一連の検査操作のばらつき状態を示す目安となるため、管理限界線を越えた場合には再現性の悪い操作で検査しているため、操作の熟練度及び試験法について内部点検を行うことを推奨する。最後に、Zスコアの絶対値が限界外となった場合は、上述したように、仮に各検査機関の報告値の平均値が正規分布ないしはそれに近い場合にはZスコアの絶対値が2以上である確率は全体の分布の両端約4.5%に位置することとなるため、統計的な観点から、Zスコアがこの範囲に入ることもこの程度の確率で起こりうることであり、言い換えると各参加機関の適切な内部精度管理の遵守を薦めるものである。そのため、Zスコアによ

る評価を試験の点数と判断せず、それぞれの検査機関が信頼性確保システムを検証する目安として考えていただきたい。また、絶対値が3以上の場合にはこれに加えて試験法のバリデーションの実施も推奨する。

5 おわりに

これまで述べてきたように、外部精度管理調査への参加は、自機関の分析精度を他機関と比較することにより相対的な位置づけを知ることができる。このことは内部精度管理が実施されていることが前提となる。すなわち、各検査機関内で分析精度や不確かさ等を検証し、掌握しておくことによってはじめて他機関との比較が行えること意味している。実際、水質、環境や臨床等において外部精度管理調査が行われているが、ここで評価された結果は、ある限定されたときの成績にすぎないということで、その分析機関の通年の成績ではなく、結果の判断は経年的に行うことが必要である。 $\bar{X}-R$ 管理図やZスコアで限界外となった場合には、その原因を追及することや改善をどのように行ったかが最も重要な事項となる。上述したように、外部精度管理と技能試験は厳密には違いがあるが、現在は同様にとらえられており、試験所認定を受けるには技能試験の参加が必須であったり、ある分野では入札要件として使われるケースもあり、外部精度管理の結果がその試験機関の評価としてとらえられている。そのために、外部精度管理調査への参加は良い結果を出すための競争試験と考えられているのも事実である。しかし、本来の外部精度管理調査の目的は、分析結果の信頼性を確保するために自機関の現状を掌握し、全体の中での位置づけの確認をするための手段として利用していただきたい。

参考文献

- 1) Proficiency Testing of Laboratories(CX/MAS 94/6), Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (1994)
- 2) Thompson, M. and Wood, R.: International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, *J. AOAC Int.*, Vol.76, No.4, 926-940 (1993).
- 3) AMC Technical Brief: Robust Statistics(2001): A Method of Coping with Outliers, *Analytical Methods Committee* No.6 Apr 2001.
- 4) Analytical Methods Committee(1998): Robust Statistics -How Not to Reject Outliers, Part 1. Basic Concepts, *Analyst*, December 1989, Vol.114, 1693-1697.
- 5) Analytical Methods Committee(1998): Robust Statistics -How Not to Reject Outliers, Part 2. Inter-laboratory Trials, *Analyst*, December 1989, Vol.114, 1699-1702.
- 6) FAPAS-Central Science Laboratory(2002): Food Analysis Performance Assessment Scheme(FAPAS), Protocol for the Organization and Analysis of Data, Sixth Edition, 2002.
- 7) JISハンドブック 57 品質管理(2008年版)、日本規格協会。
- 8) Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons, ISO-13528, 2005-09-01.
- 9) The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, No.1, pp.145-196, 2006.

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 26 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表

残留農薬分析におけるマトリックス効果補正法の比較

○高取 聡、北川陽子、福井直樹、山口聡子、吉光真人、
小阪田正和、梶村計志、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）

〔目的〕

食品中の残留農薬分析においてマトリックス効果の補正は不可欠である。精製工程を経てもなお試験液に残存する食品由来成分（いわゆるマトリックス）の影響により、GC-MS等の機器分析で標準品を溶媒に溶解した標準溶液との比較で定量値に解離を生ずることがあり、これをマトリックス効果と称している。マトリックス効果の解消には、試験液に残存するマトリックスを極力減らすように高度に精製を行う、または試験液の希釈が行われる。しかし、残留農薬一斉分析法では、多数の農薬を複数の食品で分析できるようにするため精製にも限界がある。また、一般的にGC-MSではLC-MS/MSと比較して定量下限が高く、一律基準相当の農薬を定量するうえで試験液の希釈にも限界がある。このため、GC-MSを用いる場合、検量線を構成する標準溶液に意図的にマトリックスを添加し、試験液とのマトリックス効果を補正する手法が多用される。添加するマトリックスとしては、試験対象品と同じ食品から調製したブランク試験液やポリエチレングリコール 300 (PEG) 等が一般的である。昨年の本会において、汎用性のある食品由来マトリックスとして野菜果実ジュース (VFJ) から調製したマトリックス (VFJ マトリックス) の有用性について報告した¹⁾。今回、GC-MSを用いた残留農薬分析法におけるマトリックス効果の補正能力について、標準溶液への添加するマトリックスを変えて比較したので報告する。

〔方法〕

【基本試験液の調製】

試料（りんご、ほうれんそうまたは野菜果実ジュース）10 g をアセトニトリル 20 mL で抽出した。抽出後、塩化ナトリウム 1 g、無水硫酸マグネシウム 4 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g およびクエン酸二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を添加して塩析・脱水し、試料 4 g 相当の有機層をグラファイトカーボン/PSA 積層カラムで精製した。カラム通過液を減圧濃縮し、50%アセトンヘキサン溶液 1 mL に再溶解した（基本試験液；4 g/mL 相当）。

【模擬試験液および検量線の調製】

模擬試験液（農薬濃度：50 ppb）は、試料から調製した基本試験液に 136 農薬混合溶液（200 ppb）、200 ng/mL トリフェニルリン酸 (TPP) 溶液（内部標準溶液）、0.2% PEG 溶液または 50%アセトンヘキサン溶液を等量混合して調製した（模擬試験液；1 g/mL 相当）。模擬試験液中の農薬の定量するために異なるマトリックスを添加した A～E の 5 種類の検量線を作成した（表 1）。

【マトリックス効果補正能力の比較】

GC-MS は、QP-2010 Ultra (EI 法) を用いた。注入量は 1 μ L とし、模擬試験液を検量線 A～E 用いて絶対検量線法で定量した。また、内部標準を活用する際は相対検量線法で定量した。マトリックス効果補正能力は理論値となる 50 ppb に対する百分率（定量率）として評価した。

妥当性評価ガイドラインを踏まえた残留農薬検査における大阪府の取り組み

○山口聡子、高取聡、福井直樹、北川陽子、吉光真人、小阪田正和、梶村計志、尾花裕孝
(大阪府立公衆衛生研究所)

【目的】

我々は、残留農薬検査における妥当性評価対象食品と検査対象食品の関係について整理するため、食品分類として「類型」を考案した。

一律基準を考慮した残留農薬検査では、個々の食品を妥当性評価の対象とすることが目標であるが、その作業は容易ではない。そこでガイドラインでは、代表的な食品を優先的に評価することが示されている。すなわち、試験法への影響が想定されるクロロフィルあるいは硫黄成分等を多く含む食品（ほうれんそう・キャベツなど）を先に評価し、これらと異なる食品は、評価食品との解離の度合いに応じて、別途、妥当性評価を実施する、あるいは部分評価（選択性、真度あるいは併行精度の確認）を実施することが求められている。

評価済み食品が限られる状況では、検査対象食品を限定する、あるいはすべての評価食品で目標値を満たした項目に限定することは有効な対処方法であるが、逆に検査の範囲を過剰に制限することになる。円滑かつ効率的に評価結果が行政検査に反映されるよう妥当性評価対象食品と検査対象食品との関係を整理する必要があることから、今回「類型」を考案するに至った。

【方法】

大阪府は、消費地としての属性が強いため、残留農薬検査では、多岐にわたる食品を対象としてきた。平成24年度は277検体（55種類）の食品を対象にしており、妥当性評価実施以降も同様の検査ができるよう、まず16食品について妥当性

評価を実施した^{1,2)}。この妥当性評価結果を踏まえ、上記の概念を基に類型を考案した。なお、類型と検査項目の関係は、以下のとおり規定した。

【類型】(1)食品としての特徴、(2)試験法の種類および(3)試験法の適用結果を観点に分類したものであり、妥当性評価対象とした基幹食品と暫定的に基幹食品と同じ評価結果を得るものとみなす付随食品からなる。

【検査項目】各類型の検査項目は、基幹食品において目標値を満たした項目から選定する。各類型において基幹食品1～3食品を選定し、複数の基幹食品を選定した場合は、その共通項目とする。また、付随食品については、基幹食品と同じ検査項目を適用する（同一類型では基幹・付随食品とも検査項目は同じ）。

【追加評価】かぼちゃ、にんじん、さやいんげんおよびメロンについて、行政検査と併行して妥当性評価を実施し、これらに適用される検査項目における不具合の有無を検証している。

【結果】

平成26年度当初の類型、検査項目数および試験法を表-1および図-1に示した。類型は1～11から成り、基幹食品と付随食品を併せて約80食品を掲載し、これらを今年度の検査可能食品に挙げて行政検査を開始した。なお、検査項目の選定は、付随食品における検査項目の推認性を補うために、当該類型の基幹食品を含む概ね10以上の基幹食品で目標値を満たした項目から選定した。現在、付随食品4食品は追加評価中である。

同位体希釈質量分析法による食品衛生外部精度管理調査試料 (残留農薬分析用)の分析

鎗田孝¹、大竹貴光¹、青柳嘉枝¹、高坂典子²、鈴木達也²、渡辺卓穂²
(産業技術総合研究所計量標準総合センター¹、食品薬品安全センター秦野研究所²)

【目的】

食品分析の精度管理手法の一つとして、技能試験等の外部精度管理への参加がある。我が国においては、技能試験の付与値として、参加機関の分析結果から算出した合意値を用いることが一般的である。一方、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043: 2010 では、付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定等が挙げられている。同位体希釈質量分析法 (IDMS) は、分析対象化合物の安定同位体標識化合物を内標準に用いた測定法であり、認証標準物質の値付け分析などに利用されている。そこで本研究では、技能試験における IDMS の精確さを評価するために、食品薬品安全センター秦野研究所が主催した平成 25 年度食品衛生外部精度管理調査 (残留農薬 I : とうもろこしペースト中のフェニトロチオンとクロルピリホスの定量) の調査試料を IDMS によって分析し、その結果を精度管理調査の付与値等と比較した。

【方法】

IDMS を適用した 2 分析法 (安定同位体標識化合物としてクロルピリホス-d10 とフェニトロチオン-d6 を使用) によって対象農薬を分析した。第 1 法では、厚生労働省の通知試験法 (一斉試験法) に準じてアセトニトリルを用いたホモジナイズ抽出を行った後、C18 カートリッジと ENVI-Carb/NH₂ カートリッジを用いた固相抽出 (SPE) によって順次精製した試験液を、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS、カラム: DB-5MS) によって測定した。第 2 法では、厚生労働省の通知試験法 (りん系農薬を対象とした個別試験法) に準じてアセトンを用いたホモジナイズ抽出を行った後、ヘキサン/アセトニトリル分配と、シリカカートリッジを用いた SPE によって順次精製した試験液を、GC/MS (カラム: DB-35MS) によって測定した。

【結果及び考察】

IDMS を適用した 2 分析法の結果は良好に一致した。分析結果の重み付け平均値はフェニトロチオンが (0.495 ± 0.019) mg/kg、クロルピリホスが (0.245 ± 0.014) mg/kg [± の後ろは拡張不確かさ ($k = 2$) を示す] であり、調査試料の調製における対象農薬の添加濃度 (0.5 mg/kg および 0.24 mg/kg) と一致した。また、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値 (従来方式による) はフェニトロチオンが (0.458 ± 0.062) mg/kg、クロルピリホスが (0.224 ± 0.028) mg/kg (総平均値 ± 標準偏差) であり、IDMS の方が約 8 % 高かった。この原因としては、参加機関のほとんどが試料前処理における分析対象農薬の回収率 (損失) を補正していないためと考えられた。一方、IDMS による分析値の相対標準不確かさは付与値の相対標準偏差の 25 % 以下であり、参加機関間のばらつきと比較して IDMS が十分な精度を持つことが示唆された。

付記: 本研究は、厚労科研費「検査機関の信頼性確保に関する研究」の一環として実施した。

安定同位体標識内部標準を用いた残留農薬分析における マトリックス効果の影響

○鎗田 孝、大竹 貴光、青柳 嘉枝
(産業技術総合研究所 計量標準総合センター)

1. はじめに

残留農薬分析では、分析試料溶液と標準液のマトリックスの特性が大きく異なることが多い。そのため、測定における対象農薬のレスポンスが両者で異なり、結果として、実際の濃度から偏った測定値が得られる場合がある¹⁾。このようなマトリックス効果の影響を低減する手法がいくつか報告されているが、その一つとして、分析試料類似のブランク試料の前処理液で標準液の溶媒を置換するマトリックスマッチングが適用されている。

一方、一般的な分析法よりも精確な分析を行うためには、対象農薬の安定同位体標識化合物（以下、標識体という）を内部標準に用いることが有効である。対象農薬とその標識体は分析過程において同じ挙動をとると考えられるために、前処理（抽出やクリーンアップ）における対象農薬の損失（回収率）が補正されるためである。更には、マトリックス効果が測定値に及ぼす影響も補正されると考えられているが、その効果を定量的に評価した例はほとんどない。

そこで本研究では、GC/MS 測定を行う農薬を対象に、標識体を内部標準に用いた際のマトリックス効果の影響を評価した。その結果、標準液のマトリックスマッチングの有無によって、得られる定量値に差が生じることを明らかにした。

2. 実験

2.1. 試薬

本研究で対象とした農薬とその標識体を表 1 に示す。また、分析試料の基材としては、食品薬品安全センター秦野研究所から提供されたとうもろこしペースト、にんじんペースト、枝豆ペースト、かぼちゃペーストを用いた。これらのペーストは、同所が主催する食品衛生外部精度管理調査試料の基材である。

2.2. 標準液等の調製

対象農薬のアセトン混合液（農薬混合液）と、標識体のアセトン混合液（標識体混合液）を別々に調製した後、両者をあわせて添加溶液（対象農薬とその標識体の濃度：4.55 $\mu\text{g/mL}$ ）とした。次に、シリンジスパイク溶液としてアラクロールのアセトン溶液を調製し、これと添加溶液を混合して標準液A（対象農薬とその標識体の濃度：1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）とした。また、農薬混合液と標識体混合液の混合比を変えてアセトンに希釈し、標準液B1～B6（対象農薬の濃度：0.2～5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、標識体の濃度：1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）を調製した。なお、これらの調製をより正確に行うために、標準品や溶液、溶媒等はすべて秤量したうえで混合し（質量比混合）、調製濃度は質量分率で算出した。

表1 対象農薬とその標識体、及びGC/MSにおけるモニターイオン (m/z)

対象農薬	標識体
シマジン (201)	シマジン-d ₆ (211)
ダイアジノン (304)	ダイアジノン-d ₁₀ (314)
フェントロチオン (277)	フェントロチオン-d ₆ (283)
マラチオン (158)	マラチオン-d ₆ (164)
クロルピリホス (314)	クロルピリホス-d ₁₀ (324)
チオベンカルブ (257)	チオベンカルブ-d ₁₀ (267)
イソプロチオラン (290)	イソプロチオラン-d ₄ (294)
イソキサチオン (313)	イソキサチオン-d ₁₀ (323)
エトフェンプロックス (163)	エトフェンプロックス-d ₅ (168)

2.3. 試料前処理

試料 5.0 g を秤量し、秤量した添加溶液 0.55 mL を添加した後、通知試験法 (GC/MS による農薬等の一斉試験法) ²⁾ に準拠して前処理を行った。途中、ホモジナイズ抽出後に抽出液の約 40% を分画し、以降の操作に供した。また、とうもろこしペーストと枝豆ペーストの固相抽出精製では、グラファイトカーボン/NH₂-シリカゲルによる精製の前に、ODS による精製を行った。得られた処理液は窒素で濃縮し、更に秤量したシリンジスパイク溶液 1 mL で置換した後、GC/MS 測定に供した。

2.4. GC/MS 測定

Agilent Technology 製 GC/MS 装置 (7890A/5975C) を使用した。注入量は 1 μ L とし、注入はスプリットレス法 (温度: 220°C) で行った。キャリアガスはヘリウム、カラムには Agilent Technology 製 DB-5ms (0.25 mm \times 30 m、膜厚: 0.25 μ m) を用い、温度プログラムは 50°C (1min) \rightarrow 125°C (+25°C/min) \rightarrow 300°C (+10°C/min、6.5min 保持) とした。イオン化は EI とし、表 1 に示すモニターイオンによる SIM 測定を行った。

2.5. 標準液のマトリックスマッチング

標準液 (A、B1~B6) の一部について、次の方法によってマトリックスマッチングを行った。まず、分析試料の基剤と同じペーストを、2.3.の方法によって前処理した。その際、ホモジナイズ抽出の前に添加溶液は添加せず、また、処理液のシリンジスパイク溶液による置換も行わなかった。得られた処理液を窒素気流下で乾固した後、処理液と同容量の標準液 (A、B1~B6) に溶解した。

3. 結果と考察

3.1. 添加回収実験による検討

4 種の基材を用いて添加回収実験を行った。その結果を表 2~5 に示す。表中の"回収率"

表2 とうもろこしペーストを基材とした添加回収実験の結果

対象農薬	定量値(添加量に対する比、%)		回収率(%)
	標準液A による定量	マトリックスマッ チングした標準液A による定量	
シマジン	96.3 ± 0.4	99.7 ± 0.4	84.3 ± 2.2
ダイアジノン	97.5 ± 0.6	100.4 ± 0.6	81.9 ± 2.0
フェニトロチオン	90.1 ± 1.8	99.6 ± 2.0	82.2 ± 1.7
マラチオン	92.5 ± 0.2	99.9 ± 0.2	84.5 ± 2.8
クロルピリホス	99.5 ± 0.1	100.2 ± 0.1	83.2 ± 2.4
チオベンカルブ	98.2 ± 0.9	100.3 ± 0.9	83.7 ± 2.6
イソプロチオラン	90.1 ± 0.7	100.1 ± 0.8	84.8 ± 2.5
イソキサチオン	92.5 ± 0.7	99.9 ± 0.8	83.0 ± 3.6
エトフェンプロックス	93.8 ± 0.9	99.3 ± 1.0	84.1 ± 3.6

添加濃度:0.5 µg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

表3 にんじんペーストを基材とした添加回収実験の結果

対象農薬	定量値(添加量に対する比、%)		回収率(%)
	標準液A による定量	マトリックスマッ チングした標準液A による定量	
シマジン	96.0 ± 0.3	100.3 ± 0.4	88.5 ± 2.2
ダイアジノン	97.8 ± 0.2	100.6 ± 0.2	82.0 ± 2.4
フェニトロチオン	87.5 ± 0.6	99.7 ± 0.7	88.1 ± 2.4
マラチオン	95.4 ± 0.4	99.3 ± 0.5	87.4 ± 1.5
クロルピリホス	99.7 ± 0.1	99.9 ± 0.1	85.6 ± 1.7
チオベンカルブ	98.8 ± 0.3	100.4 ± 0.3	86.9 ± 2.2
イソプロチオラン	88.0 ± 0.5	99.9 ± 0.5	89.3 ± 1.5
イソキサチオン	84.6 ± 0.2	100.8 ± 0.2	92.9 ± 4.1
エトフェンプロックス	91.7 ± 0.6	101.2 ± 0.6	88.7 ± 1.9

添加濃度:0.5 µg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

表4 枝豆ペーストを基材とした添加回収実験の結果

対象農薬	定量値(添加量に対する比、%)		回収率(%)
	標準液A による定量	マトリックスマッ チングした標準液A による定量	
シマジン	95.8 ± 0.6	99.8 ± 0.3	87.9 ± 2.6
ダイアジノン	96.2 ± 0.7	100.2 ± 0.7	84.6 ± 1.3
フェントロチオン	91.2 ± 1.1	99.5 ± 1.4	83.8 ± 0.3
マラチオン	92.5 ± 0.7	99.7 ± 0.8	88.2 ± 1.9
クロルピリホス	100.5 ± 0.2	100.0 ± 0.2	86.4 ± 1.8
チオベンカルブ	99.5 ± 0.2	99.5 ± 1.0	86.5 ± 2.3
イソプロチオラン	85.2 ± 2.8	102.8 ± 3.7	87.3 ± 2.5
イソキサチオン	92.9 ± 1.2	100.7 ± 1.2	87.0 ± 1.7
エトフェンプロックス	92.9 ± 0.3	99.8 ± 0.7	89.4 ± 7.1

添加濃度:0.5 µg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

表5 かぼちゃペーストを基材とした添加回収実験の結果

対象農薬	定量値(添加量に対する比、%)		回収率(%)
	標準液A による定量	マトリックスマッ チングした標準液A による定量	
シマジン	95.6 ± 0.6	100.7 ± 0.7	82.2 ± 2.5
ダイアジノン	98.5 ± 0.4	100.8 ± 0.4	79.4 ± 2.2
フェントロチオン	92.8 ± 0.9	102.0 ± 1.0	76.3 ± 2.8
マラチオン	94.3 ± 0.4	100.2 ± 0.4	81.4 ± 2.7
クロルピリホス	100.0 ± 0.1	100.3 ± 0.1	81.5 ± 1.9
チオベンカルブ	99.0 ± 0.4	100.5 ± 0.4	77.8 ± 2.1
イソプロチオラン	89.9 ± 0.2	100.1 ± 0.2	82.8 ± 2.7
イソキサチオン	96.1 ± 1.4	101.7 ± 1.5	77.6 ± 3.7
エトフェンプロックス	94.4 ± 0.6	99.5 ± 0.7	85.3 ± 3.7

添加濃度:0.5 µg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

は、分析試料（基材）に添加した対象農薬量と、前処理操作後に回収した対象農薬量の比（ただし、処理液の分画比で補正済み）を示しており、一般的な添加回収試験の結果に相当する。得られた回収率は76～93%であり、その再現性（標準偏差）は概ね4%以内であった。

これに対し表中の”定量値”は、分析試料（基材）中の対象農薬について、添加量に対する標識体を用いて得た分析値の比を示している。分析値としては、標準液Aをそのまま校正に用いて得た結果と、マトリックスマッチングを行った後に校正に用いて得た結果の両方を示した。得られた”定量値”は”回収率”よりも100%に近く、また、再現性（標準偏差）も概ね1.5%以内と良好であったことから、標識体を内部標準に用いることにより、分析精度が向上したことが示された。その理由としては、この定量過程では、前処理等における対象農薬の損失が補正されたことに加え、GC/MS 測定の併行精度も向上したためと考えられた。

一方、実験に用いた添加溶液と標準液Aでは、各対象農薬とその標識体の濃度比は同じである。そのため、分析過程において両者の平衡が保たれている限り、定量値は100%になるはずである。しかしながら、標準液Aをそのまま校正に用いた場合、多くの農薬の定量値は100%を下回り、特にフェントロチオンやイソプロチオラン、イソキサチオンでは90%以下になる基材もあった。これに対し、マトリックスマッチングを行った標準液Aを校正に用いた場合、すべての農薬と基材について、定量値はほぼ100%であった。

得られたクロマトグラムの一例として、にんじん基材中のイソキサチオンとその標識体のクロマトグラムを図1に示す。添加回収実験によって得られた試料溶液と、マトリックスマッチングを行った標準液Aは、対象農薬とその標識体の両方において、ピーク面積と形状はほぼ同じであった。これに対し、標準液A（マトリックスマッチング無）のクロマトグラムでは対象農薬とその標識体の両方ともピーク面積が小さくなっており、とりわけ標識体がより小さくなる傾向があった。その原因は明らかではないが、標識体を内部標準に用いたとしても、定量値がマトリックス効果の影響を受けうることが示唆された。

3.2. 検量線

次に、標準液B1～B6を用い、トウモロコシペーストの前処理液を用いてマトリックスマッチングを行った場合とそうでない場合の検量線を作成した。その結果を図2に示す。各対象農薬とその標識体の含有比と、両者の面積比は良好な直線関係 ($R^2 > 0.999$) を示した。一方で、ほとんどの対象農薬について、標準液をそのまま用いて作成した検量線の方が、マトリックスマッチングを行った標準液から作成した検量線よりも傾きは大きくなり、特にフェントロチオンとイソキサチオンでは15%以上も大きくなった。このことは、たとえ標識体を内部標準に用いた場合でも、マトリックスマッチングを行っていない標準液を用いた場合には、実際の濃度よりも低い分析値が得られる可能性があることを示している。

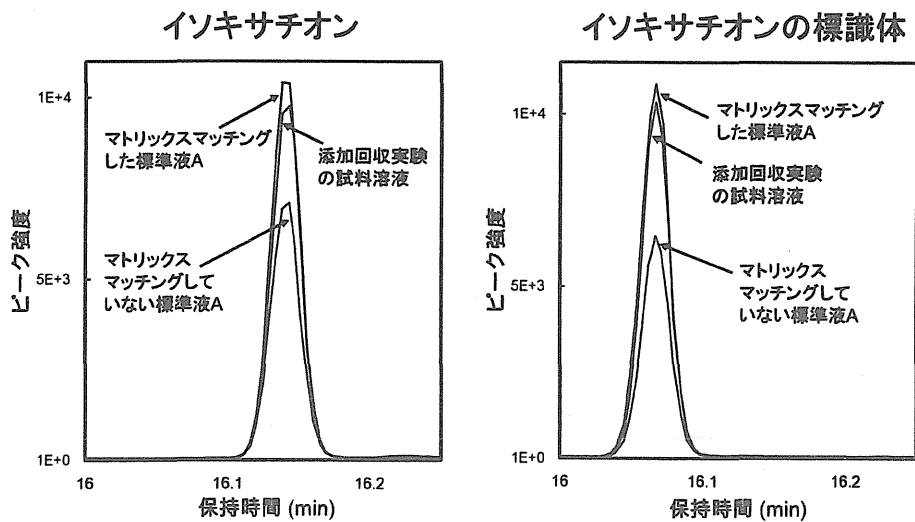


図1 イソキサチオンのGC/MSクロマトグラム (基材: にんじんペースト)

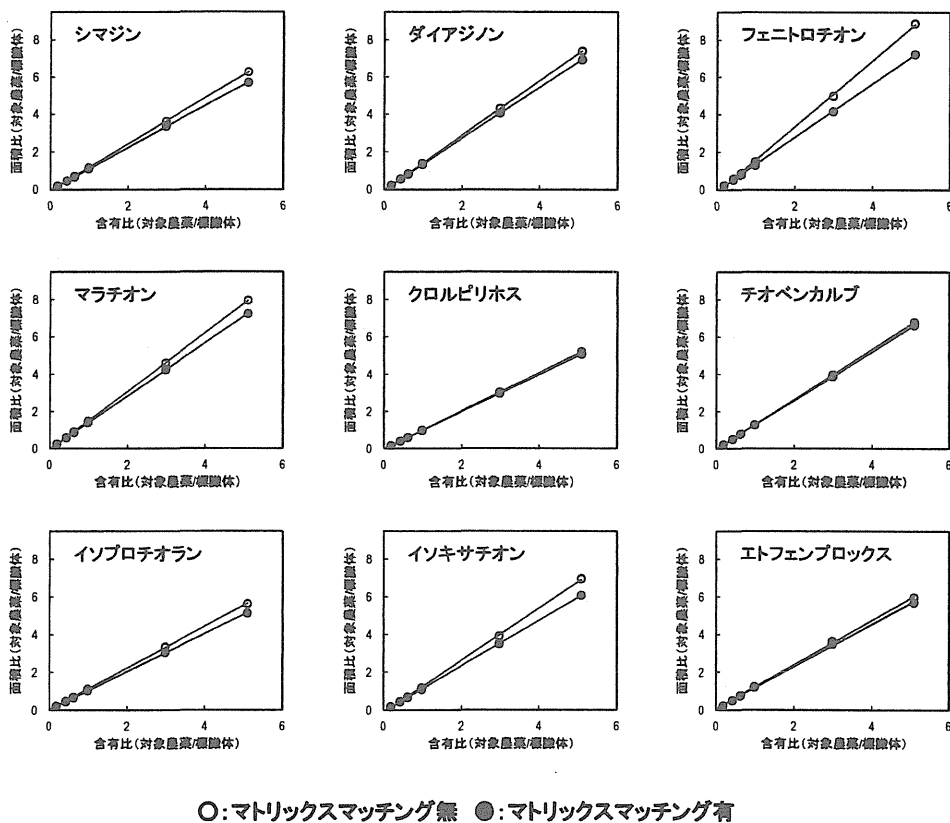


図2 標識体を内部標準に用いた検量線におけるマトリクスマッチングの影響 (基材: トウモロコシペースト)

4. まとめ

GC/MS 測定を行う農薬を対象に、標識体を内部標準に用いた際のマトリックス効果の影響を評価した。その結果、マトリックスマッチングを行っていない標準液を用いた場合には、対象農薬と標識体のピーク面積比(対象農薬/標識体)が高くなる農薬があった。そのため、たとえ標識体を内部標準に用いた場合でも、正確な分析値を得るためにはマトリックスマッチングした標準液を用いるべきであることが示された。

謝辞

分析試料の基材と食品衛生外部精度管理調査に関する情報をご提供いただいた食品薬品安全センター秦野研究所の渡辺卓穂氏と高坂典子氏に感謝する。本研究は、厚生労働科学研究費補助金により実施した。

文献

- 1) 残留農薬分析知っておきたい問答あれこれ, p.115, 日本農薬学会, 2012 (改訂第3版).
- 2) GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物), 平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 別添, 2005.

農薬残留玄米試料を用いた技能試験結果の概要

○大竹貴光、鎗田孝、青柳嘉枝、沼田雅彦、高津章子
(産業技術総合研究所 計量標準総合センター)

1. 緒言

食品分析の信頼性を保証し、分析結果の国際整合性を確保するためには精度管理が必要である。そのため、産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) では、残留農薬分析用食品認証標準物質の開発を行ってきた。さらに 2012 年度からは、食品メーカーや受託分析機関などを対象に「農薬残留分析の信頼性向上のための技能試験」を開始したり。

ここでは、2013 年度に実施した玄米粉末を用いた農薬残留分析の技能試験結果の概要について報告する。本試験では、分析対象農薬が残留した玄米を原料とした試料を用いたため、ブランクの食品試料に農薬を添加して調製した試料を用いる一般的な技能試験と比較して、抽出効率をより正確に評価できた。さらに各参加機関の分析結果を、2 種類の Z スコア：①参加機関の合意値に基づいた Z スコア (Z)、および②NMIJ の分析値に基づいた Z スコア (Z_{NMIJ}) により評価を行った。

2. 方法

2-1. 試料調製

イソプロチオラン、エトフェンプロックスおよびフェニトロチオンが残留するように栽培した玄米 (品種: コシヒカリ) を、収穫後に自然乾燥して脱粒した。これを凍結粉碎し、さらに均質化処理を行った後に瓶詰め (20 g 入) し、 γ 線照射によって滅菌したものを本試験の試料とした。

2-2. 試料の均質性および安定性試験

均質性試験のために、調製した 192 本の瓶から無作為に抜き取った 10 本について、各瓶内の異なる部位を 2 回サンプリングし、2-5 で述べる方法で対象農薬を分析した。分析結果を分散分析し、均質性を評価した。安定性は、 -30°C 程度で遮光保管していた試料中の農薬を、参加機関に試料を配布する前後で 2-5 の方法を用いて計 3 回分析し (配布前 1 回、配布後 2 回)、その結果を統計的に解析することで評価した。

2-3. 参加機関への試料の配布

58 機関から参加申し込みがあった。その内訳は、食品メーカー、農林水産関連業種、受託分析機関がそれぞれ約 1/4 であり、他に公的研究機関や分析機器メーカーなどからの申し込みもあった。これらの機関に対して、2013 年 5 月 7 日に、機関番号を記した送付案内及び、取扱注意事項を記した書類とともに試験試料 2 瓶を冷凍便により送付した。また、同日 E メールにて結果報告用のファイルを送付した。分析方法は指定せず、結果報告用ファイルに適用した方法についての記述を求めた。締め切りである 2013 年 7 月 26 日までに、57 機関から分析結果を受領した。分析する農薬は自由に選択可能としたところ、農薬別の結果報告の機関数はイソプロチオラン: 52, エトフェンプロックス: 52, フェニトロチオ

ン56であった。

2-4. 参加機関の分析値を基にした合意値の決定

参加機関の分析結果を、以下の手順で処理して合意値を決定した。まず、Cochran 検定と Grubbs 検定によって外れ値の検定を行った（その結果、各農薬とも 1 機関を除外）。次に、有効データから中央値を算出し、これを参加機関の分析結果を基に算出した合意値 (\bar{X}) とした。さらに、第 3 四分位数 (3/4 分位) と第 1 四分位数 (1/4 分位) の差である四分位数範囲 (IQR) を求め、 IQR に正規化係数 0.7413 を乗ずることにより正規四分位数範囲 ($NIQR$) を算出した。

2-5. NMIJ による試料の分析方法と分析値の決定

均質性試験、安定性試験、および NMIJ の分析値を求めるために用いた分析法を図 1 に示す。測定は、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) を用いた同位体希釈質量分析法 (IDMS) により行い、マトリックスマッチング法により定量した。本方法は、現在頒布されている玄米標準物質 (NMIJ 7504-a) の認証にも用いられた分析法であり²⁾、十分に妥当性が確認されている。

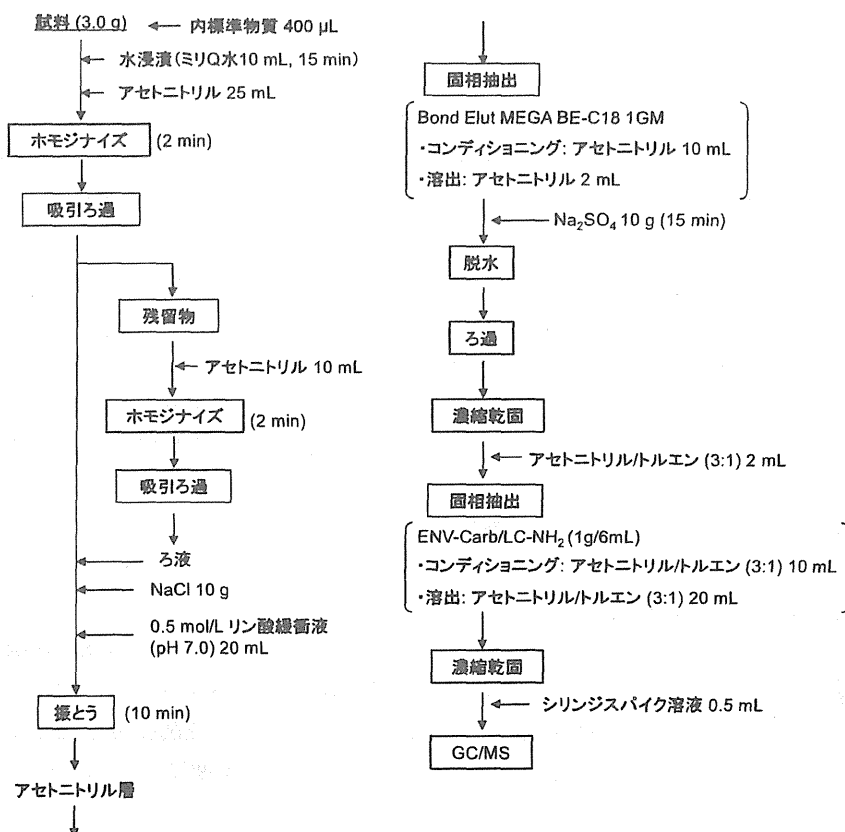


図 1 NMIJ による玄米中イソプロチオラン、エトフェンプロックスおよびフェントロチオンの分析フロー

NMIJによる分析値 (X_{NMIJ}) は、安定性試験のために3回分析して得られた濃度の平均値とした。また、分析の再現性に関する不確かさ、GC/MS測定における不確かさ、校正用標準液の調製の不確かさ、試験試料の均質性に関する不確かさ、試料中農薬の安定性に関する不確かさなどを合成して、 X_{NMIJ} の拡張不確かさを算出した。

2-6. zスコアの算出方法

本試験では、2種類のzスコア (z および z_{NMIJ})により各参加機関の分析結果を評価した。それぞれの計算式を以下に示す。

$$z = (x_i - \bar{X}) / NIQR \quad (1)$$

$$z_{NMIJ} = (x_i - X_{NMIJ}) / SD_R \quad (2)$$

(x_i : 各参加機関の分析結果, SD_R : Horwitzの修正式から求めた室間再現標準偏差の予測値)

3. 結果と考察

3-1. 試料の均質性および安定性試験の結果

均質性試験において得られた結果を分散分析した結果、すべての対象農薬について瓶間のばらつきは有意ではなく ($p < 0.05$)、試料が十分に均質であることが示された。均質性に関する相対標準不確かさは、イソプロチオラン: 0.55%, エトフェンプロックス: 0.66%, フェニトロチオン: 0.71%であった。

安定性試験の結果を、図2に示す。

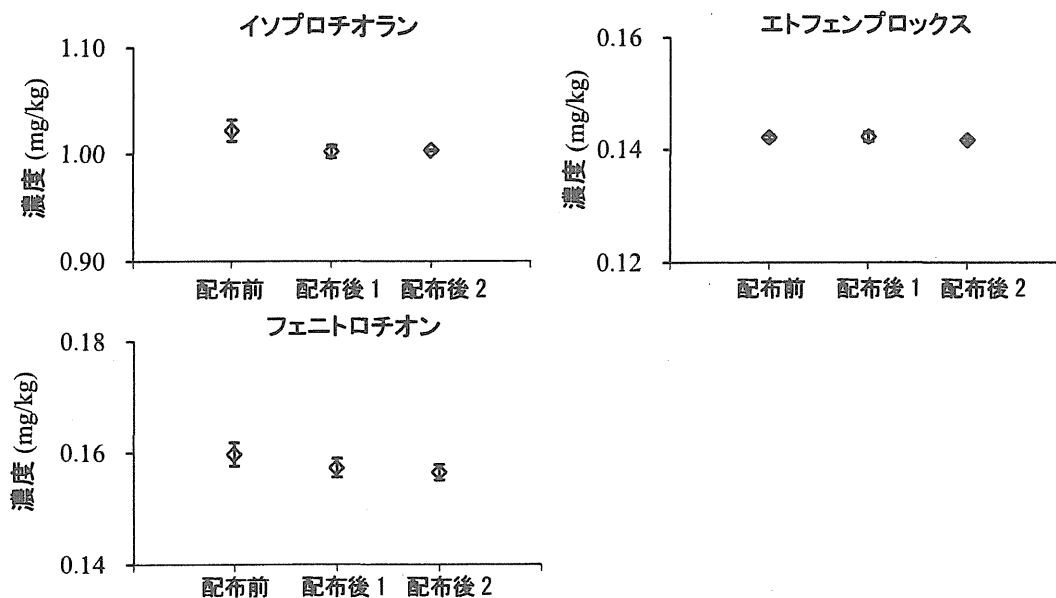


図2 玄米中農薬の安定性試験結果

(エラーバーは標準偏差を示す; 安定性試験は参加機関に試料を配布する前に1回、配布後に2回実施; 各プロットの $n=4$)

エトフェンプロックス、フェニトロチオンについては統計的に有意な濃度変化は見られ

ず、試験期間中に安定であったことが示された。イソプロチオランについては、安定性試験の期間中に有意な濃度減少（減少量は0.02 mg/kg）が見られたが、 $NIQR$ (= 0.179 mg/kg) と比較すると十分に小さかったため、分析対象農薬に含めることに問題はないと判断した。なお濃度減少の理由としては、分解などの可能性もあるが現時点では明らかではない。安定性に関する相対標準不確かさは、イソプロチオラン: 1.04 %, エトフェンプロックス: 0.12 %, フェニトロチオン: 0.91 %であった。以上の均質性、安定性に関する不確かさは、 X_{NMIJ} の不確かさに組み込まれた。

3-2. 参加機関の分析方法

本試験では参加機関に対して、分析結果だけでなく、適用した分析方法の報告も求めた。それより、抽出・精製法および測定法ごとの機関数を集計したので、それぞれ表1と2に示す。本試験における抽出・精製法には、厚生労働省通知である食安発第0124001号（通知法）の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法」³⁾またはそれに準拠した方法がもっとも多く適用されていた。NMIJもこの一斉試験法をベースに分析を行った。次いで機関数は、STQ法（Solid Phase Extraction Techniques with QuEChERS method）が多く、超臨界流体抽出法、QuEChERS法（the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe method）、その他の方法がほぼ同じであった。また測定に関しては、本試験の対象農薬の性質上、GC/MSやGC/MS/MSが多く使用されていた。以上のように、本試験では様々な分析方法が適用されていたが、抽出・精製法および測定法間で、各対象農薬に対する分析値に有意な差は検出されなかった。

表1 抽出・精製法ごとの機関数

	一斉試験法 (GC/MS)	STQ	超臨界流体 抽出法	QuEChERS	その他
イソプロチオラン	21	13	7	4	7
エトフェンプロックス	22	13	7	5	5
フェニトロチオン	25	13	7	4	7

（その他: LC/MSによる一斉試験法や参加機関の独自法などが含まれる）

表2 測定法ごとの機関数

	GC/MS	GC/MS/MS	LC/MS	LC/MS/MS
イソプロチオラン	26	19	1	6
エトフェンプロックス	25	21	1	5
フェニトロチオン	29	23	0	4

3-3. 参加機関の合意値とNMIJの分析値の比較

参加機関の合意値 (X) と、それに関連する統計量 ($NIQR$, 第3四分位数, 第1四分位数) を表3に示す。またNMIJの分析値 (X_{NMIJ}) と拡張不確かさを、表4に示す。