

平成 29 年度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）

食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究

研究分担報告書

新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究

研究代表者 渡辺 卓穂 （一財）食品薬品安全センター秦野研究所

研究分担者 松田 りえ子 公益社団法人食品衛生協会

研究要旨

食品衛生に関わる多くの検査においては、有害物質の定量結果を規格に定められた値（基準値）と比較することによって、検査対象となった食品ロットの適合を判定している。従って、誤った判定を避けるためには、検査に携わる試験所が正しい分析結果を得ることが必要である。消費者からの検査への信頼性を確保するため、また国際的な食品の輸出入にあっては、検査の結果が正しいことを示すためには、分析結果の品質保証が必須である。

試験所間比較による技能試験は、分析結果の品質保証において必須である。それぞれの試験所が実施する試験のアナライズと食品の組合せによる技能試験に参加できることが理想であるが、現実には、限られた組合せの技能試験スキームが提供されているに過ぎない。新規技能試験プログラムの開発を困難にしている大きな要因は、技能試験での使用に耐えうる均質性と安定性を備えた試料開発の困難さが挙げられる。また、分析を実施している試験所が少なく、参加者数が限られると予想される場合には、通常の評価方法が適用できないことも新規技能試験プログラム開発を困難にしている。

本分担課題では、上記の要因を解決し、新規技能試験プログラムの開発を促進することを目的とした。試料開発の課題と協力して、新たな基準値が設定された二枚貝中のオカダ酸群の分析技能試験を行った。その結果に、参加試験所数が少ない場合のガイドラインである、IUPAC/CITAC ガイド “ Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants –chemical analytical laboratories ” に従った評価を試みた。また、次年度に向けて、実際に動物用医薬品を投与した動物の筋肉を試料とする技能試験スキームの開発に着手し、試料の均質性確認のための分析法を検討し、性能を確認した。

研究協力者	井部 明広	実践女子大学
	荒川 史博	日本ハム株式会社中央研究所
	渡邊 敬浩	国立医薬品食品衛生研究所
	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所
	内藤 成弘	農業・食品産業技術総合研究機構
	井上 誠	公益社団法人食品衛生協会食品衛生研究所
	野田 晴美	公益社団法人食品衛生協会食品衛生研究所

A. 研究目的

厚生労働省は、食品による健康危害リスクを管理すること目的に、有害物質等の上限濃度を規定した食品規格を策定し、規格への適合を判断するための検査を実施している。多くの検査においては、有害物質の定量結果を規格に定められた値（基準値）と比較することによって、検査対象となった食品ロットの適合を判定している。従って、誤った判定を避けるためには、検査に携わる試験所が正しい分析結果を得ることが必要である。消費者からの検査への信頼性を確保するため、また国際的な食品の輸出入にあっては、検査の結果が正しいことを示すためには、分析結果の品質保証が必須である。

分析結果の品質保証では、妥当性を確認（validate）した分析法を採用すること、それが正しく実施できることを確認（verify）すること、試験に関わる手順の文書（SOP）化、手順通りに行われたことを確認し記録することが必要である。これらの結果として、分析結果がある一定の範囲に納まるような管理状態が達成される。さらに継続

して管理状態にあることは、内部品質管理によって確認される。以上の手順は試験所内において実施されるが、分析結果の妥当性を客観的に評価するためには、他の試験所との比較と客観的評価を得られる技能試験への参加が必須である。

それぞれの試験所が実施する試験のアナライトと食品の組合せによる技能試験に参加できることが理想であるが、現実には、限られた組合せの技能試験スキームが提供されているに過ぎない。技能試験スキームを計画する際には、技能試験の対象となるアナライト、食品を選定するだけでなく、予想される参加者数、技能試験試料の作製法、試料の均質性および安定性、参加試験所の報告結果処理に使用する統計方法とパフォーマンス評価方法を考慮しなくてはならない。これらの中で、新規技能試験プログラムの開発を困難にしている大きな要因は、技能試験での使用に耐えうる均質性と安定性を備えた試料開発の困難さが挙げられる。食品分析の技能試験に必要な試料のマトリクスは当然食品であるが、多くの食品は均質化することが難しく、また生物

由来のため安定性にも乏しい。

また、その分析を実施している試験所が少なく、参加者数が限られると予想される場合には、通常の評価方法が適用できないことも新規技能試験プログラム開発を困難にしている。

本分担課題では、新規技能試験プログラムを計画し、パイロットスタディを行うことにより、上記の問題点の解決法を探ることを目的とした。

最初のパイロットスタディの対象として、平成 27 年 3 月に機器分析が導入され新たな基準値が設定された、二枚貝中の下痢性貝毒を選択し、技能評価までを完了した。試料の開発は、本研究で実施されている課題「新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究」と協力して実施した。また、参加試験所が少数の場合の適切な評価方法である IUPAC/CITAC ガイドに従った、参加者技能の評価方法の適用を試みた。

さらに次年度に向けて、実際に動物用医薬品を投与した動物の筋肉から調製した試料を用いた技能試験のパイロットスタディ実施のため、試料分析法の確立と妥当性評価を行った。以下、これら 2 つの内容を分けて報告する。

・二枚貝中オカダ酸群分析技能試験 のパイロットスタディ

B. 研究方法

試料作製

二枚貝中オカダ酸群分析技能試験の試料開発は、本研究の分担課題である「新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究」により行われた。

作製法の概略

ホタテガイむき身(全体)5kg にオカダ酸 (和光純薬株式会社製 (code-158-03273))1,000 µg を添加し、サイレントカッターを用いて粉碎・均質化処理を行った。均質化した試料を平 3 号缶に約 85g ずつ小分けし、ミニシーマ MS4S (木村エンジニアリング株式会社製)を用いて製缶した。

試料の均質性及び安定性の確認

作製した試料からランダムに 10 缶を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、2 試験試料を採取し、オカダ酸濃度を測定した。さらに、試料作製 2 か月後に 3 缶のオカダ酸濃度を測定した。分析は一般社団法人青森県薬剤師会衛生検査センターで実施した。オカダ酸測定法を以下に示す。

装置 : LC-MS/MS Waters 社製 Xevo TQ(R-006-03)

カラム ODS

測定質量数 : 803.5 255.0

測定溶液作製 : 試料 2 g から 90 %メタノールでオカダ酸を抽出し、2.5 M 水酸化ナトリウムを加え 76 で加水分解

した。加水分解後の溶液を ODS カートリッジカラムにより精製し、LC-MS/MS により定量した。

パイロットスタディ

国内の試験所から参加者を募集し、二枚貝中オカダ酸分析技能試験のパイロットスタディを実施した。参加試験所にはそれぞれ試料 1 個を、冷蔵宅配便により送付した。また、希望する試験所にはオカダ酸及びジノフィシストキシン-I の標準品を送付した。分析回数は 1 回とした。同時に使用した分析法の概略も報告することとした。

C. 結果及び考察

オカダ酸分析の性能確認

国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センターの認証標準物質 CRM-7520-a 3 試料を分析した。結果は、オカダ酸が 0.201 mg/kg、0.202 mg/kg、0.202 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.340 mg/kg、0.348 mg/kg、0.349 mg/kg、であった。本認証標準物質の拡張不確かさを含めた認証値は、オカダ酸が 0.205 ± 0.061 mg/kg (0.144 mg/kg ~ 0.266 mg/kg)、ジノフィシストキシン-I が 0.45 ± 0.11 mg/kg (0.34 mg/kg ~ 0.56 mg/kg) であり、定量結果は認証値の範囲にあった。分析結果平均の認証値に対する比は、オカダ酸が 0.983、ジノフィシストキシン-I は

0.768 であった。

また、後述する均質性試験結果から推定されたオカダ酸分析の併行精度は RSD として 1.7% であることが確認された。試料にはジノフィシストキシン-I を含んでいないため、均質性試験結果からは精度を推定できず、認証試料分析は回数不足のため、併行精度を確認することはできなかった。

試料の均質性評価

作製した試料からランダムに 10 缶を抜き取り、2 回分析した結果を Table 1 に示す。総平均は 0.146 mg/kg であった。この結果を分散分析し、繰り返しの分散と試料間の分散を求め、それぞれから標準偏差を計算した。繰り返し分析の標準偏差は、0.0024 mg/kg であり、相対標準偏差としては 1.7% であった。試料間の標準偏差は 0.0046 mg/kg であった。

The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories¹⁾ に示されている Recommendation 7 及び 8 により評価を行った。Recommendation 7 は、均質性試験に使用された分析法の精度と試料内の均質性の評価であり、繰返しの標準偏差 s_{an} が Horwitz 式の Thompson 修正式²⁾ (以下 Horwitz 式) から予測される室間精度 $\sigma_p \times 0.5$ 以下であれば、妥当と評価される。試料濃度である 0.146 mg/kg から Horwitz 式を用いて推定した σ_p は 0.0312 mg/kg であった。 s_{an} は 0.0024 mg/kg であ

り、条件を満たしたことから、試料内の均質性と分析の繰り返し性能は妥当と評価した。

Recommendation 8は試料間の均質性の評価である。試料数10、繰り返し分析数2であれば、試料間の分散を s_{sam}^2 、 $\sigma_{all} = 0.3 \times \sigma_p$ とすると、

$$s_{sam}^2 < 1.88 \times \sigma_{all}^2 + 1.01 \times s_{an}^2$$

を満たせば試料は均質と判断される。式の左辺は0.000021、右辺は0.00017であり式が成立したため、試料は技能試験に適切な均質性を有すると評価した。

試料を121 で15分間加熱した後の、オカダ酸濃度は0.142 mg/kg及び0.145 mg/kgであった。この結果から、試料中のオカダ酸は常温で一年間程度安定と考えられた。確認のため、試料作製の2か月後に試料中のオカダ酸の測定を行った。3缶を測定した結果は、0.144 mg/kg、0.139 mg/kg、0.148 mg/kg (平均0.144 mg/kg)であった。均質性評価時の濃度(平均0.146 mg/kg)と有意の差は認められず、試料は安定と判断した。

技能試験パイロットスタディ

28か所の試験所から参加の申し込みがあった。2か所が国の機関、17か所が地方自治体の衛生研究所、9か所が登録検査機関であった。各試験所に試料1缶を送付した。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。報告〆切までに24試験所から報告があり、その後1か月の間

に3か所から結果が報告され、報告を行った試験所数は27となった。参加試験所から報告されたオカダ酸濃度のヒストグラムをFig.1に示す。オカダ酸群の分析法では、ジノフィシストキシン-Iも測定されるが、今回は試料に添加していないため、技能試験における評価対象とはしなかった。

評価方法

参加者数が少数の場合には、通常の実験で用いられている、参加者の報告値から計算した平均値と標準偏差に基づくz-スコアによる評価に変わる方法として、IUPAC/CITACガイド “Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants -chemical analytical laboratories”³⁾ が示されている。以下、このガイドの概要を示す。

IUPAC/CITACガイド概要

参加者が少数(N<30)の場合には、

1. 報告値から計算する付与値と標準偏差の統計的信頼性が低い。
2. N<20のとき、ロバスト統計は通常推奨されない。
3. 外れ値検定の検出力は低い。

といった問題が生じる。これらの問題に

対する対応策として、技能の評価に必要なパラメータを報告値から計算せず、試料の付与値、技能試験の目的に適合した標準偏差を用いることが推奨される。

試料の付与値の決め方としては以下の方法が考えられる

1. 認証標準物質を参加機関に非明示で配付し、認証値を付与値に用いる。
2. 認証標準物質の配付が現実的でない場合は、認証標準物質にトレーサブルな in-house 標準物質（管理試料）を開発して参加機関に非明示で配付し、管理試料の付与値を用いる。
3. 利用可能な認証標準物質がない場合は、in-house 標準物質（管理試料）を開発して参加機関に非明示で配付し、管理試料の付与値を用いる。

技能試験の目的に適合した標準偏差 σ_{ffp} の決め方として、以下の方法が考えられる。

1. 国際規格等で決められた不確かさを用いる。
2. 規制濃度 ML (Maximum Limit) の 1/2 を用いる。
3. Horwitz の式による室間再現標準偏差の予測値を用いる。ただし、参加機関は 1 試料あたり 1 回分析することを前提とする。
4. 予備試験等の結果を参考に専門家集団が決めた値を用いる。

技能の評価指標は z-スコア、あるいはスコア又は En 数とする。

z-スコアは下式で計算され、 $-2 < z$ -スコア < 2 を許容の範囲とする。

$$z_i = \frac{c_i - c_{ass}}{\sigma_{ffp}}$$

c_i は参加機関の報告値である。 c_{ass} は認証標準物質の認証値又は管理試料の付与値を用いる。 σ_{ffp} は技能試験の目的に適合した標準偏差で、報告値のデータを用いずに決める。また、付与値の不確かさ u_{ass} は無視できる大きさであることが求められている。 $u_{ass}^2 < 0.1\sigma_{ffp}^2$

スコアは下式で計算され、 $-1 < \text{スコア} < 2$ を許容の範囲とする。

$$\xi_i = \frac{c_i - c_{ass}}{\sqrt{u(c_i)^2 + u_{ass}^2}}$$

$u(c_i)$ は参加機関の報告値の不確かさ、 u_{ass} は付与値の不確かさである。

En 数は下式で計算され、 $-1 < \text{En} < 1$ を許容の範囲とする。

$$E_n = \frac{c_i - c_{ass}}{\sqrt{U(c_i)^2 + U_{ass}^2}}$$

$U(c_i)$ は参加機関の報告値の拡張不確かさ、 U_{ass} は付与値の拡張不確かさである。

本研究では参加者の報告値に不確かさが付与されていないことから、z-スコアによって評価することとした。

参加試験所の評価

参加試験所からの報告値から平均、標準偏差、ロバスト平均、ロバスト標準偏差を計算した。ロバスト平均および標準偏差の計算はalgorithm A⁴⁾を用いた。平均値は0.126 mg/kg、ロバスト平均は0.127 mg/kg、標準偏差は0.026 mg/kg、ロバスト標準偏差は0.028 mg/kgであった。通常の統計量とロバストな統計量はほぼ同じ値であった。報告値のヒストグラムには、外れ値と考えられるような離れた値が認められないことから、この結果は当然と考えられる。

認証標準物質CRM-7520-aの結果は、オカダ酸が0.201 mg/kg、0.202 mg/kg、0.202 mg/kgで、認証範囲(0.205 ± 0.061 mg/kg)内であった。このことから、この分析法の真度は98%程度と考えられる。従って、認証物質と併行して実施した3試料の分析結果の平均0.144 mg/kgは、試料の付与値として適切と考えられた。試料数が限られていたため、推奨される数での分析ができず、付与値の不確かさを付与することはできなかった。報告値の平均は、付与値とした値より12%程度小さくなった。

Horwitz式により室間標準偏差は0.031 mg/kgと予測された。この値は、報告値の標準偏差あるいはロバスト標準偏差よりやや大きい値となった。

参加者の技能の評価は、試料の付与値である0.144 mg/kgと、はHorwitz式から

求めた室間の標準偏差0.031 mg/kgとを用いて計算したz-スコアによることとした。計算したz-スコアを報告値と共にTable 2に示す。

z-スコアの範囲は-2.37 ~ 0.45で、-3以下あるいは3以上はなかった。z-スコアが-3から-2の範囲となった試験所は1か所で、27試験所中26試験所が-2 < z-スコア < 2の範囲にあった。

D. 考察

技能試験参加試験所の評価

結果において述べたように、このオカダ酸分析技能試験では、z-スコアの計算に、試料の付与値とHorwitz式から予測される室間精度を用いた。一方、IUPAC/CITACガイドでは、参加者が少数(N < 30)の場合には信頼性が低いとしながらも、N < 20のとき、ロバスト統計は通常推奨されないと記載されており、今回の技能試験の参加試験所数である27において、通常のロバスト統計量の使用も可能と考えられる。

Fig.2には、試料の付与値とHorwitz式から予測される室間精度から計算したz-スコア(A)と、ロバスト統計量から計算したz-スコア(B)を示す。ロバスト統計量から計算したz-スコアの範囲は、-1.94 ~ 1.17で、参加試験所全てが-2 < z-スコア < 2の範囲にあった。

z-スコア=0の位置は、(A)が全体の中心

よりも右側に位置しているが、(B)のロバスト統計量から計算した場合にはほぼ中央にあった。これは、ロバスト平均が試料の付与値より0.02 mg/kg小さかったためである。

Fig.1のヒストグラムでは、報告値全体が1つの正規分布に従っておらず、高値と低値の2つのグループに分かれている。この状況で正規分布を前提としたロバスト統計量から計算したz-スコアによる評価は、妥当ではないと考えられる。試料の付与値はヒストグラムの中央ではなく、高値側から2番目のカラムに相当する位置にあった。このため、z-スコアの多くが負の値となった。

オカダ酸を含む下痢性貝毒の規制は、平成27年3月から、マウス法による0.05 MU/gから機器分析法によるオカダ酸当量0.16 mg/kgに変更された。この時に、機器分析法が導入され、分析法の性能基準と操作例が通知された。従って、わが国におけるオカダ酸の機器分析の実施経験は比較的短く、未だ習熟していないために付与値よりも低い値の報告が多くなった可能性がある。

試験所数が少ないことに加えて、経験が十分ではない分析においては、参加者報告値から求めた統計量による評価が必ずしも妥当とはいえず、可能であればトレーサブルな値を試料に付与し、これを用いることが重要と考えられる。

分析法の影響

参加試験所からは、分析結果と共に使用した分析結果が報告された。大部分の試験所が、下痢性貝毒分析の通知に記載された、

1. メタノール-90%メタノールによる抽出
2. 加水分解
3. 脱脂
4. ミニカラム精製
5. LC-MS/MSによる定量

からなる分析を実施していたが、脱脂処理は12験所、カラム精製は5験所が実施していなかった。脱脂処理とカラム精製の両者を実施していない試験所は3か所あったが、z-スコアは-1.81、-0.77、-0.19で、特に高い値あるいは低い値になる傾向は認められなかった。また、TOF/MSを使用した試験所が1か所あった。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

．実際に動物薬を投与した畜肉を試料として用いる技能試験のための分析法の

確立

B. 研究方法

技能試験の対象とする化合物の選定

技能試験のための基材として検査数の多いブタ肉を選択した。ブタに投与する動物用医薬品として、使用頻度の高いセフチオフル及びエンロフロキサシンを選択した。

セフチオフル分析法

試薬

セフチオフル塩酸塩標準品は和光純薬工業(株)製を使用した。

アセトニトリル、メタノールはHPLC用、水酸化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸一カリウム、四ほう酸ナトリウム十水和物は特級試薬を使用した。ヨードアセトアミドは和光純薬工業(株)製、ジエリスリトールは東京化成工業(株)製、ギ酸は和光純薬工業(株)製LC/MS用を使用した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムはWaters製Sep-Pak Plus C18 360mg)を使用した。

セフチオフル標準液：セフチオフル塩酸塩標準品13.0 mgをメタノール100 mLに溶解しセフチオフル標準原液とした(デスフロイルセフチオフルとして100 µg/mL)。標準原液を水で希釈し、添加用標準溶液10 µg/mLおよび試験用標準溶液0.05- 5 µg/mLを調製した。

リン酸緩衝液 (pH7)：リン酸一カリウム

1.36 g、0.2M水酸化ナトリウム29.5 mLを水に溶かして200 mLとした。

ジエリスリトール・ホウ酸緩衝液：塩化カリウム3.7 g、ジチオエリスリトール4.0 g及び四ほう酸ナトリウム十水和物19.0 gを水1000 mLに溶かした。

ヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液：ヨードアセトアミド7.0 gをリン酸緩衝液 (pH7) 50 mLに溶かした。

装置

ホモジナイザーは(株)セントラル貿易製、遠心分離機は(株)クボタ製作所製を使用した。

高速液体クロマトグラフは島津製作所製 Nexera X2を、質量分析計はSCIEX製 SCIEX TQ-6500を使用した。測定条件を以下に示す。

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18、2.1×100 mm、1.7 µm(Waters)

移動相：移動相A；0.1%ギ酸と移動相B；0.1%ギ酸アセトニトリルによるグラジエント

注入量：1 µL

カラム温度：40

質量分析測定モード：多重反応モニタリング法(MRM)

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法(ESI+)

モニターイオン： m/z 487 125

試験溶液の調製：

(a) デスフロイル化

試料5.00 gにジチオエリスリトール・
ホウ酸緩衝液70 mLを加え、ホモジナイズ
した後、毎分3,000回転で10 分間遠心分
離を行い、上澄液3 mLを採取し、50 の
水浴中で15分間振とうした。ヨウ化アセ
トアミド・リン酸緩衝液0.6 mLを加え、
振り混ぜた後、室温で30分間静置後、4
に冷却し、毎分3,000回転で10 分間遠心
分離を行い、上澄液を4 とした。

(b) 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニ
カラムにメタノール5 mL及びリン酸緩衝
液 (pH7) 5 mLを順次注入し、流出液は捨
てた。このカラムに (a) デスフロイル化
で得られた溶液を注入した後、リン酸緩
衝液 (pH7) 5 mLおよび水5 mLを注入し流
出液は捨てた。次いで、メタノール及び
水の混液 (2:8) 5 mLを注入し、流出液を
採取し、メタノール及び水の混液 (2:8)
を加えて10 mLに定容し試験溶液とした。

検量線用溶液作製：

各濃度のセフチオフル標準液を0.2 mL採
取し、ジエリスリトール・ホウ酸緩衝液3
mLを加え、50 の水浴中で15分間振とう
した後、試料溶液の調製法に従って、デ
スフロイル化および精製を行い、検量線
作成用標準溶液1- 100 ng/mLを作製した。

エンロフロキサシン分析法

エンロフロキサシン標準品及びシプロフ
ロキサシン塩酸塩一水和物標準品は和光
純薬工業(株)を使用した。

PL動物用医薬品サロゲート混合標準溶液
は林純薬工業(株)製を使用した。

アセトニトリルは残留農薬試験用及び
HPLC用を使用した。メタノールはHPLC用
を使用した。ヘキサン及び無水硫酸ナト
リウムは残留農薬試験用を、ギ酸はLC/MS
用を、N,N-ジメチルホルムアミドは特級
を使用した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカ
ラムはWaters製Sep-Pak Plus C18 360mg)
を使用した。

エンロフロキサシン標準原液：エンロフ
ロキサシン標準品10 mgを少量のN,N-ジメ
チルホルムアミドに溶解後、メタノール
で100 mLに定容した(エンロフロキサシン
として100 $\mu\text{g/mL}$)。

シプロフロキサシン標準原液：シプロフ
ロキサシン塩酸塩一水和物標準品11.6 mg
を少量のN,N-ジメチルホルムアミドに溶
解後、メタノールで100 mLに定容した (シ
プロフロキサシンとして100 $\mu\text{g/mL}$)。

添加用標準溶液：エンロフロキサシン標
準原液またはシプロフロキサシン標準原
液をアセトニトリル及び水の混液 (1:3)
を用いて希釈し、添加用標準溶液10 $\mu\text{g/mL}$
とした。

内部標準溶液：PL動物用医薬品サロゲ
ート混合標準溶液 をアセトニトリル及び

水の混液(1:3)を用いて希釈し、内部標準液(10 ng/mL)及び添加用内部標準溶液(0.4 µg/mL)とした。

検量線作成用標準溶液：エンロフロキサシン添加用標準溶液またはシプロフロキサシン添加用標準溶液に、内部標準溶液0.5 mLを加え、アセトニトリル及び水の混液(1:3)を用いて10 mLとし、検量線作成用標準溶液0.125 - 125 ng/mL(内部標準0.5 ng/mL含有)とした。

装置

ホモジナイザーは(株)セントラル貿易製、遠心分離機は(株)クボタ製作所製を使用した。

高速液体クロマトグラフは島津製作所製 Nexera X2を、質量分析計はSCIEX製 SCIEX TQ-6500を使用した。測定条件を以下に示す。

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18、2.1×100 mm、1.7 µm(Waters)

移動相：移動相A；0.1%ギ酸と移動相B；0.1%ギ酸アセトニトリルのグラジエント

注入量：2 µL

カラム温度：40

質量分析測定モード：多重反応モニタリング法(MRM)

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法(ESI+)

モニターイオン：エンロフロキサシン m/z

360 316、シプロフロキサシン m/z
332 288、エンロフロキサシン-d8
 m/z 368 324、シプロフロキサシン-d8
 m/z 340 296 m/z

試験溶液の調製： 試料5.00 gを量り、添加用内部標準溶液0.25 mLを添加した後、アセトニトリル20 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン20 mL、無水硫酸ナトリウム10 gを加え、ホモジナイズした。これを毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採取した。得られた有機層からアセトニトリル層を分取した。遠心分離した沈殿物に残ったn-ヘキサン層を加え、さらにアセトニトリル20 mLを加えて激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採取した。得られた有機層からアセトニトリル層を分取し先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルで50 mLに定容した。定容した溶液0.25 mLに蒸留水を加えて1 mLとし、アセトニトリル飽和ヘキサン0.5 mLを積層して振り混ぜた後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。アセトニトリル-水層を試験溶液とした。

セフチオフル分析法の性能確認

豚肉試料5 gにセフチオフル標準溶液10 µg/mLを0.5 mL(1 µg/g相当)添加し、2回併行分析を5日間実施した。

エンロフロキサシン分析法の性能確認

豚肉試料5 gにエンロフロキサシン標準溶液10 µg/mL及びシプロフロキサシン標準溶液10 µg/mLをそれぞれ0.5 mL (1 µg/g相当) 添加し、2回併行分析を5日間実施した。

C. 結果と考察

分析法性能確認結果

検量線

セフチオフル検量線作成用標準溶液0-10 ng/mLの7濃度及び2.0-40 ng/mLの5濃度を測定し、得られた応答値から検量線を作成した。検量線の相関係数 (r^2) は0.995以上であった。前者の検量線は未添加試料の測定に、後者は添加試料の測定に使用した。

エンロフロキサシン検量線作成用標準溶液0.125- 5.0 ng/mLの6濃度及び2.5-125 ng/mLの6濃度を測定し、得られたエンロフロキサシン又はシプロキサシン応答値と内部標準の応答値の比から検量線を作成した。検量線の相関係数 (r^2) は0.995以上であった。前者の検量線は未添加試料の測定に、後者は添加試料の測定に使用した。

添加試料の分析結果

セフチオフル分析法の性能確認で得られた分析結果をTable 3に、エンロフロキサシンの分析法の性能確認で得られた分

析結果をTable 4に示す。

添加試料による真度と精度の確認

セフチオフル分析法の性能確認結果及びエンロフロキサシン分析法の性能確認結果の総平均と添加量に対する比を真度とした。また、一元配置分散分析を行い、併行精度と室内精度を推定した。結果をTable 5に示す。

これらの分析法の使用目的は、技能試験試料の均質性の確認であることから、併行精度を評価した。セフチオフル分析の併行精度は6.2%であった。セフチオフル添加量から、Horwitz式により予想される室間精度はRSDとして16%である。得られた併行精度6.2%はこの1/2以下であり、試料の均質性確認に使用可能と判断された。シプロフロキサシン及びエンロフロキサシン分析の併行精度は5.5%及び5.1%であり、添加量から予測される室間精度は22%であることから、これらの分析も試料の均質性確認に使用可能と判断された。

セフチオフル分析法の真度は87.7%、シプロフロキサシンとエンロフロキサシン分析法の真度は77.8%及び77.5%であり、試料の付与値を決定するための性能としては不十分と判断された。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

参考文献

- 1) Thompson M, Ellison L. R., Wood R, Pure Appl. Chem., 78, 145-196, 2006
- 2) Thompson M., Analyst (Lond.)., 125, 385-386, 2000
- 3) Kuselman I, Fajgelj A, Pure Appl. Chem., 82, 1099-1135, 2010
- 4) ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, 2016

Table 1 オカダ酸分析技能試験試料の均質性評価

試料番号	オカダ酸濃度 mg/kg	
	1	2
1709-05	0.149	0.141
1709-14	0.143	0.142
1709-19	0.142	0.144
1709-20	0.146	0.138
1709-21	0.137	0.138
1709-24	0.148	0.153
1709-28	0.148	0.150
1709-31	0.149	0.149
1709-37	0.155	0.153
1709-44	0.150	0.146

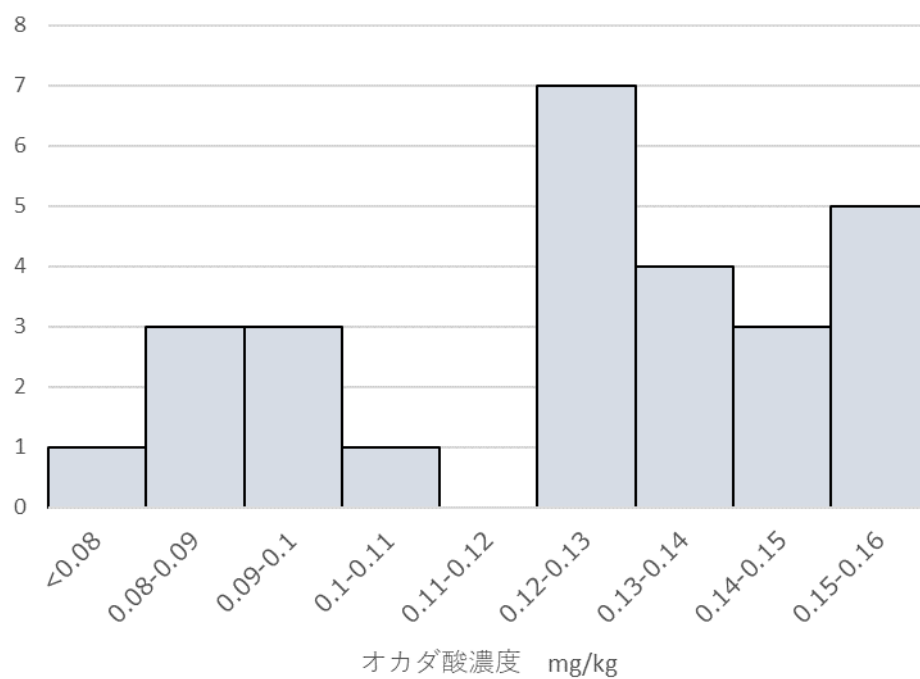


Fig.1 オカダ酸分析結果のヒストグラム

Table 2 参加試験所から報告されたオカダ酸濃度と z-スコア

No	オカダ酸濃度 mg/kg	z-スコア
1	0.140	-0.19
2	0.154	0.26
3	0.092	-1.73
4	0.150	0.13
5	0.160	0.45
6	0.130	-0.52
7	0.130	-0.52
8	0.093	-1.70
9	0.090	-1.81
10	0.130	-0.52
11	0.140	-0.19
12	0.127	-0.61
13	0.131	-0.48
14	0.151	0.16
15	0.072	-2.37
16	0.150	0.13
17	0.122	-0.77
18	0.101	-1.45
19	0.100	-1.48
20	0.130	-0.52
21	0.090	-1.81
22	0.140	-0.19
23	0.155	0.29
25	0.150	0.13
26	0.090	-1.81
27	0.130	-0.52
28	0.160	0.45

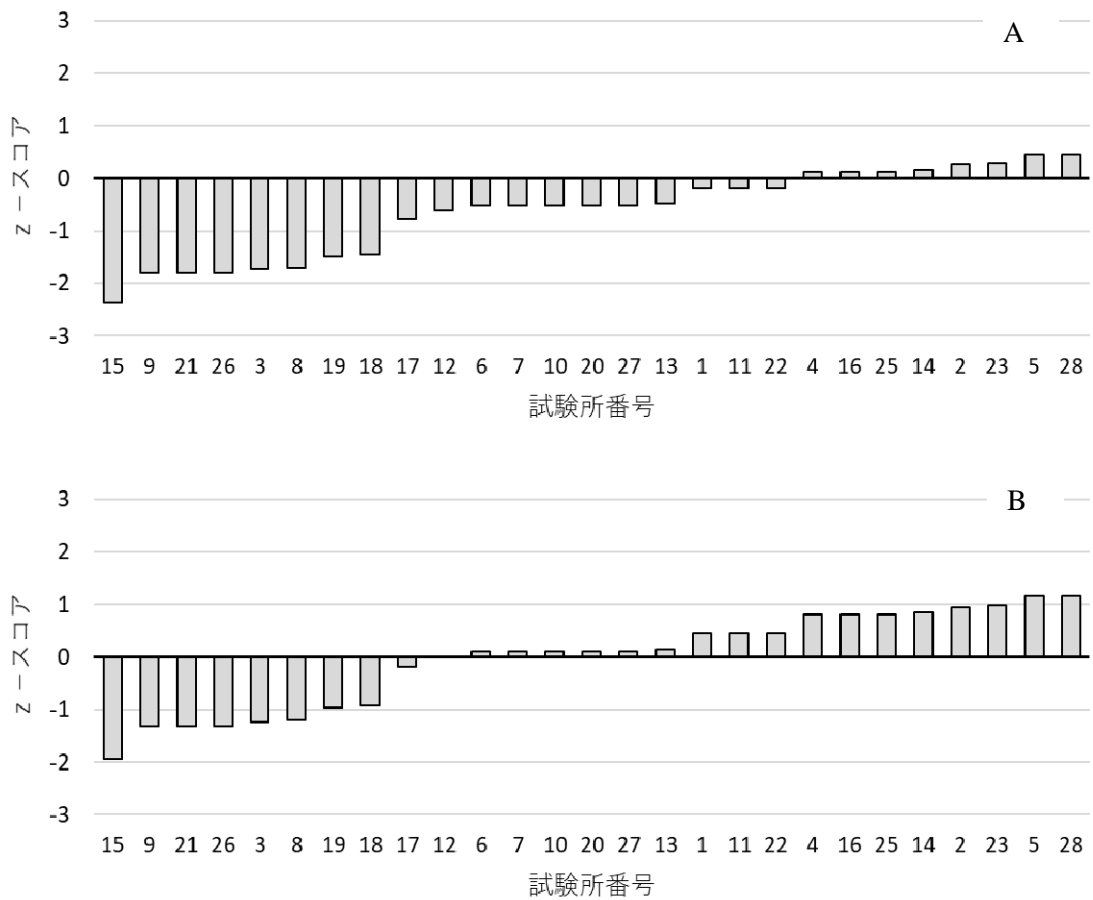


Fig. 2 試料の付与値と Horwitz 式から予測される空間精度から計算した z-スコア(A)と、ロバスト統計量から計算した z-スコア(B)

Table 3 セフチオフル分析法の性能確認で得られた分析結果

化合物名	試行	試料中濃度 (µg/g)				
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
セフチオフル	1	0.7755	0.8745	0.9838	0.9140	0.8989
	2	0.7218	0.7490	1.0780	0.8733	0.9061

Table 4 エンロフロキサシン分析法の性能確認で得られた分析結果

化合物名	試行	試料中濃度 (µg/g)				
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
シプロフロキサシン	1	0.03846	0.03676	0.04006	0.03903	0.04211
	2	0.03671	0.03574	0.03901	0.04083	0.04039
エンロフロキサシン	1	0.03786	0.03569	0.04213	0.03938	0.03743
	2	0.04006	0.03915	0.04042	0.03870	0.03655

Table 5 セフチオフル分析法及びエンロフロキサシン分析法の性能確認結果

化合物名	添加濃度 µg/g	分析結果平均 µg/g	真度 %	併行精度		室内精度	
				標準偏差 µg/g	相対標準偏差 %	標準偏差 µg/g	相対標準偏差 %
セフチオフル	1	0.877	87.7	0.054	6.2	0.11	13
シプロフロキサシン	0.05	0.0389	77.8	0.0011	2.7	0.0021	5.5
エンロフロキサシン	0.05	0.0387	77.5	0.0014	3.7	0.0020	5.1