

平成 30 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 国立医薬品食品衛生研究所

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（規格値）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分析対象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として、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。

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、実際にエンロフロキサシンとセフチオフルを投与したブタの筋肉を試料とする技能試験のパイロットスタディを実施した。また、ブタの筋肉にエンロフロキサシンを添加した試料の分析も行い、両試料における分析結果の分布の差を検討した。

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品質科学センター
渡邊 敬浩 国立医薬品食品衛生研究所

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（規格値）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、分析結果が正しいことの根拠となる品質保証システムが必須である。

分析結果の品質保証では、妥当性を確認（validate）され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）化し、SOPの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により評価される技能試験への参加が必須であり、食品分野も例外ではない。

それぞれの試験所が実施する分析の分析対象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、分析対象、試料のマトリクス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、試料の均質性及び安定性、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、新規の食品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として、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で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。

本分担課題では、食品分析を対象とした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。初年度の平成 29 年には、最初のパイロットスタディの対象として、二枚貝中の下痢性貝毒を選択し、技能試験を行った。二年目の本年度は、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を実施した。

B. 研究方法

技能試験の対象とする食品と化合物の選

定

動物用医薬品技能試験のための試料基材として、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トロフル及びエンロフロキサシンを選択した。

試料の作製

セフトロフル及びエンロフロキサシンを投与したブタの肉から作製した試料と、豚肉にエンロフロキサシンを添加した試料を作製した。試料作製の概要を以下に示す。

投与試料の作製 セフトロフル2 mg/kg、エンロフロキサシン3 mg/kgの用量で、豚の頸部筋中に注射により投与した。投与約6時間後に屠殺し、投与試料作製の豚枝肉を得た。得られた豚枝肉からロース芯を切り出し、サイレントカッターを用いて均質化した。これを100 mL容のポリプロピレン製容器に30 gずつ小分けし、真空フィルムに入れ真空・冷凍した。

添加試料の作製 動物用医薬品の残留がない豚ロース肉から、ロース芯を切り出しサイレントカッターで粗く粉碎したものを4.74 kg得た。これに、エンロフロキサシンの2 mg/mLアセトン溶液を5 mL添加した（添加濃度2.1 mg/kg）。さらにサイレントカッターで十分に均質化し、100 mL容のポリプロピレン製容器に60 gずつ小分けし、真空フィルムに入れ真空・冷凍した。

分析法の性能確認

均質性確認のためのセフトロフル及びエンロフロキサシン分析法の性能を確認した。セフトロフル分析法の性能確認は、豚肉5 gにデスフロイルセフトロフル濃度が0.2 mg/mLとなるように添加し、一日2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は、豚肉5 gにエンロフロキサシン及びシプロフロキサシン濃度が1 mg/mLとなるように添加し、一日2併行分析を5日間実施した。

分析は一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所で実施した。セフトロフル及びエンロフロキサシン分析法を以下に示す。

セフトロフル分析法

試薬

塩化カリウム、四ほう酸ナトリウム十水和物、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸、水酸化ナトリウム、メタノール、ジチオエリスリトール、クロロホルムは試薬特級を使用した。ヨードアセトアミドは試薬一級を使用した。ギ酸及びアセトニトリルは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Sep-pak C18 Classic (Waters製)を使用した。

セフトロフル塩酸塩標準品（純度99.3%）はSIGMA-ALDRICH社製を使用した。

試液等

リン酸緩衝液 (pH7): リン酸二水素カリウム6.80 g及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液29 mLを水1000 mLに溶解し、pHを7.0に調整した。

試料抽出液 (ジチオエリスリトール・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を精製水1000 mLに溶解した。

ヨードアセトアミド・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 (pH 7.0) 50 mLに溶解した。

1%リン酸緩衝液 (pH 6.0): リン酸二水素カリウム7.0 g及びリン酸水素二ナトリウム十二水和物6.0 gを水750 mLに溶解し、pHをリン酸で6.0に調整した後、水を加えて1000 mLとした。

セフチオフル標準液: セフチオフル塩酸塩標準品を精密に量り、1%リン酸緩衝液 (pH6.0)を加えて溶解し、デスフロイルセフチオフルとして1000 mg/Lの標準原液を調製した。標準原液を精製水で希釈し、4 mg/Lとした。この液1 mLに試料抽出液14 mLを加え、50 で15分間振とうした後、ヨードアセトアミド・リン酸緩衝液を3 mL加え室温で30分間放置、さらに4 で30分間冷却した。あらかじめメタノール10 mL、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mLで洗浄したSep-pak C18 Classicに負荷し、カラムをリン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mLで洗浄後、水及びメタノールの混液 (8:2) 5 mLで溶出した。溶出液をロータリーエバポレーター (40)で濃縮し、室温で窒素ガ

スを通じ溶媒を除去した。残留物を水及びメタノールの混液 (8:2) 10 mLに溶解し、水及びメタノールの混液 (8:2) で適宜希釈し、0.0025、0.005、0.025、0.05及び0.1 mg/mLの標準溶液を調製し、これを検量線用標準液とした。

試料溶液の調製

- 1) デスフロイル化: 試料5 gを量り取り、試料抽出液70 mLを加えホモジナイズした。クロロホルム100 mLを加え10分間振とうし、毎分3500回転で10分間遠心分離し、上層をろ過した。窒素ガスで溶媒を除去後、15 mLを分取し、50 、15分間振とうした後、ヨードアセトアミド・リン酸緩衝液3 mLを加え良く混合し、室温で30分間放置、さらに4 で30分間冷却した。その後、4 で毎分3500回転で10分間遠心分離し、水層を分取した。
- 2) 精製: 1)で得た水層を、あらかじめメタノール10 mL、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mLで洗浄したSep-pak C18 Classicに負荷し、カラムをリン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 mLで洗浄後、水及びメタノールの混液 (8:2) 5 mLで溶出した。溶出液をロータリーエバポレーター (40)で濃縮し、室温で窒素ガスを通じ溶媒を除去した。
- 3) 定容: 残留物を水及びメタノールの混液 (8:2) 10 mLに溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

定量

検量線用標準溶液の各5 μ Lを液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計に注入し、ピーク面積から検量線を作成した。

試料溶液5 μ Lを液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計に注入し、検量線及び得られたピーク面積から、試料溶液中の物質の濃度を求めた。

液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計操作条件

機種：LC部 島津製作所製LC-30AD、MS部 AB SCIEX製4000 QTRAP

カラム：東ソー製TSKgel Super-ODS、内径2.0 mm、長さ100 mm

移動相：水：ギ酸（1000：1）及びアセトニトリルの混液（95：5）

流量：0.3 mL/min

カラム温度：40

注入量：5 μ L

イオン化モード：ESI正イオン検出

コリジョンガス：窒素

コリジョンエネルギー：29 eV

質量数： m/z 487 241

エンロフロキサシン分析法

試薬

メタノール、メタリン酸、塩酸、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水、水酸

化ナトリウムは試薬特級を使用した。ギ酸はLC/MS用を使用した。アセトニトリルは試薬特級及びLC/MS1用を使用した。自ビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムはOasis HLB（60 mg）を使用した。

エンロフロキサシン標準品（純度99.8%）は富士フィルム和光純薬工業製を、シプロフロキサシン塩酸塩一水和物標準品（純度100.0%）はSIGMA-ALDRICH社製を使用した。

試液等

0.2%メタリン酸溶液：メタリン酸1 gを水500 mLに溶解した。

0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム4 gを水750 mLに溶解後1000 mLに定容した。

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム77.08 gを水に溶解して1000 mLとした。

1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム（pH 3.5）：1 mol/L酢酸アンモニウム溶液25 mLにギ酸5 mLを加え、25 %アンモニア水でpH 3.5に調整したものを水で500 mLとした。

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を精密に量り、メタノールを加えて超音波照射により溶解した後、100 mLに定容し、エンロフロキサシン標準原液（100 mg/L）とした。

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約10 mgを精密に量り、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL及びメタノールを加えて超音波照射により溶解した後、メタノールで100 mLに定容し、シプロフロキサシン標準原液(100 mg/L)とした。

検量線用標準溶液：エンロフロキサシン標準原液及びシプロフロキサシン標準原液各2.5 mLを、水、メタノール、塩酸の混液(500:500:1)で50 mLに定容し、5 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この液を水、メタノール、塩酸の混液(500:500:1)で希釈し、0.5 mg/L混合標準溶液及び0.05 mg/L混合標準溶液を調製した。さらに希釈し、0.25、0.5、1、2.5及び5 µg/Lの混合標準溶液を調製し、検量線用標準溶液とした。

試料溶液の調製

- 1) 抽出：試料5 gを量り取り、0.2%メタリン酸溶液及びアセトニトリルの混液(3:2)を80 mL加えた後、ホモジナイズした。毎分3500回転で5分間遠心分離後、上清をろ過し、0.2%メタリン酸溶液及びアセトニトリルの混液(3:2)で100 mLに定容した。
- 2) 精製：抽出液10 mLをロータリーエバポレーター(40)で約3 mLに濃縮した。濃縮液をあらかじめメタノール5 mL、水10 mLで洗浄したOasis HLBに負荷した。メタノール5 mLで溶出し、溶出液をロータリーエバポレーター(40)で1 mL以下に濃縮し、室温で窒素ガスを通じ溶媒を除去した。

- 3) 定容：残留物を水、メタノール、塩酸の混液(500:500:1)10 mLに溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

定量

検量線用標準溶液の各10 µLを液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計に注入し、ピーク面積から検量線を作成した

試料溶液10 µLを液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計に注入し、検量線及び得られたピーク面積から、試料溶液中の物質の濃度を求めた。

液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計操作条件

機種：LC部 島津製作所製LC-30AD、MS部 AB SCIEX製4000 QTRAP

カラム：Waters製 ACQUITY UPLC HSS C18、内径2.1 mm、長さ100 mm

移動相：1 vol%ギ酸含有50 mmol/L酢酸アンモニウム(pH 3.5)とアセトニトリルのグラジエント

流量：0.35 mL/min

カラム温度：40

注入量：10 µL

イオン化モード：ESI正イオン検出

コリジョンガス：窒素

コリジョンエネルギー：29 eV(エンロフ

ロキサシン)、31 eV(シプロフロキサシン)

質量数： m/z 360 316(エンロフロキサシン)、 m/z 332 314(シプロフロキサシン)

試料の均質性確認

試料の均質性を確認するために、作製した試料からランダムに10個を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、それぞれから2試験試料を採取し、セフトオフル及びエンロフロキサシン濃度を測定した。

パイロットスタディ

国内の試験所から参加者を募集し、ブタ筋肉中セフトオフル及びエンロフロキサシン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、冷凍宅配便により送付した。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。

添加試料のエンロフロキサシン分析

技能試験試料のエンロフロキサシン濃度の平均値に近い濃度のエンロフロキサシンを添加した試料を作製し、希望する試験所で、技能試験試料と同様に分析した。分析を行った試験所は10か所であった。

C. 結果と考察

分析法性能確認結果

検量線

デスフロイルセフトオフル濃度0.0025、0.005、0.025、0.05、0.1 mg/mLの検量線作成用標準溶液を測定し、検量性を作成した。検量線の相関係数は0.999以上であった。

エンロフロキサシン及びシプロフロキサシン濃度0.25、0.5、1、2.5及び5 µg/Lの検量線作成用標準溶液を測定し、検量線を作成した。検量線の相関係数はいずれも0.999以上であった。

選択性

ブタ筋肉を試験したところ、クロマトグラム上に、デスフロイルセフトオフル、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの定量を妨害するピークは現れなかった。

真度及び精度

セフトオフル分析法の性能確認で得られた分析結果をTable 1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 2に示す。

性能確認結果10個の総平均の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 3に示す。

セフトオフル分析法の真度は109%、併行精度はRSD 2.6%、室内精度はRSD 4.8%であった。エンロフロキサシンの真度は85.1%、併行精度はRSD 2.3%、室内精度はRSD 3.1%であった。シプロフロキサシ

ンの真度は83.3%、併行精度はRSD 2.9%、室内精度はRSD 3.4%であった。

Codex Procedural Manual¹⁾に示された真度の規準は、セフチオフル添加量の0.2 mg/mL、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの添加量の1.0 mg/mLでは、80-110%である。性能確認で得られた真度はこの規準を満足していた。

Horwitz式のThompson修正式^{2,3)} (以下Horwitz式)により予想される室間精度は、セフチオフル添加濃度ではRSDとして20%、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシン添加濃度ではRSDとして16%である。得られた室内精度はこれらの値の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。

試料の均質性確認

作製した試料からランダムに10個を抜き取り、セフチオフル及びエンロフロキサシンを2回分析した結果をTable 4及びTable 5に示す。これら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。

The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories⁴⁾に示されているRecommendation 7及び8により試料の均質性の評価を行った。Recommendation 7は、均質性試験に使用された分析法の繰り返しの標準偏差 s_{an} が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。

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。

均質性試験結果をTable 6に示す。全ての化合物において、Recommendation 7と8の条件を満足したため、試料は技能試験に適切な均質性を有すると評価した。

エンロフロキサシンを添加して作成した試料の均質性も、同様に確認した。この試料においてもRecommendation 7と8の条件を満足した。

技能試験パイロットスタディ

19か所の試験所から参加の申し込みがあった。1か所が国の機関、12か所が地方自治体の衛生研究所、6か所が登録検査機関であった。各試験所に試料1個を送付した。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。全ての試験所から報告があり、すべての試験所がエンロフロキサシンとシプロフロキサシンの結果を報告したが、1試験所がエンロフロキサシンの結果のみを報告した。セフチオフルの結果を報告した試験所は5か所であった。報告結果をTable 7に、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、両者の和のヒストグラムをFig.1に示す。

エンロフロキサシンのヒストグラムは、中央が高く対称的だが、値の高い側と低い側に離れた値が見られた。シプロフロ

キサシンのヒストグラムは高濃度側に離れた値が2つ見られた。エンロフロキサシン濃度はシプロフロキサシン濃度の30倍程度のため、エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの和のヒストグラムは、エンロフロキサシンとよく似た形となった。

参加試験所の評価

参加試験所が少数の場合の評価方法を示したIUPAC/CITACガイド “ Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants – chemical analytical laboratories ”⁵⁾では、参加試験所数 $N < 20$ のとき、ロバスト統計は推奨されないとされている。このような場合の試料の付与値の決定法として、認証標準物質あるいは認証物質にトレーサブルな試料を開発することが示されている。また、標準偏差としては、Horwitzの式による室間再現標準偏差の予測値を用いることが示されている。昨年度のオカダ酸技能試験では、認証標準物質を用いて真度を検証した方法で試料を分析した結果を付与値とし、Horwitz式により求めた室間標準偏差を標準偏差とした。本年度の分析対象物質であるエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンには適切な認証標準物質がないため、添加により性能を確認した分析法により、試料濃度を求めた。

参加試験所からのエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、両者の合計の報告値から平均、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

平均及び標準偏差の計算はalgorithm A⁶⁾を用いた。セフチオフルの報告結果は少数であるため、ロバスト平均及びロバスト標準偏差の計算を行わなかった。通常の平均値、通常の標準偏差、ロバスト平均値、ロバスト標準偏差、分析により求めた付与値、Horwitz式により求めた標準偏差をTable 8に示す。

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、両者の合計の通常の平均値、ロバスト平均値、分析による付与値はほぼ一致した。一方、ロバスト標準偏差は通常の標準偏差よりも小さくなった。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ており、これらの値が通常の標準偏差を大きくしたと考えられた。Horwitz式により推定したエンロフロキサシン、エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの合計の室間標準偏差は、ロバスト標準偏差よりやや大きかった。これに対して、シプロフロキサシンの推定室間標準偏差はロバスト標準偏差より小さかった。

参加者の技能の評価は、妥当性確認された方法による分析によって求めた付与値と、Horwitz式から求めた室間の標準偏差を用いて計算したz-スコアによることとした。計算したz-スコアをTable 9に示す。参考のためにロバスト平均値とロバスト標準偏差から計算したz-スコアも示した。Fig.2にはz-スコアを昇順に並べたバーチャートを示す。

エンロフロキサシンのz-スコアは-2.47～3.31の範囲にあり、19試験所中17

試験所が |z-スコア| 2となり、満足と評価された。|z-スコア| 3となり、不満足となった試験所数は1であった。シプロフロキサシンのz-スコアは-2.43 ~ 6.81の範囲にあり、18試験所中14試験所が |z-スコア| 2となり、満足と評価された。|z-スコア| 3となり、不満足となった試験所数は2であった。エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの和のz-スコアは-3.07 ~ 3.75の範囲にあり、18試験所中16試験所が |z-スコア| 2となり、満足と評価された。|z-スコア| 3となり、不満足となった試験所数は1であった。

エンロフロキサシン報告結果のロバスト標準偏差は予測された室間標準偏差よりも小さいために、ロバスト統計量から計算したz-スコアが3以上で、不満足となった試験所数は増加して2となった。

分析条件

参加試験所から報告されたエンロフロキサシンの分析条件は、通知された「エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルピフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）」を準用した方法が大部分であった。

抽出溶媒はアセトニトリル及び0.2%メタリン酸溶液の他、ギ酸を添加したアセトニトリル、アセトニトリル-メタノールがあった。

精製として、ジビニルベンゼン-*N*-ビニ

ルピロリドン共重合体ミニカラムを使用した試験所が9か所あったが、カラム精製を実施していない試験所も7か所あった。また、ヘキサンによる脱脂を行った試験所は8か所あった。

17か所の試験所がLC-MS/MSにより測定を行ったが、TOFMSを用いた試験所が1か所、蛍光検出により測定した試験所が1か所あった。

これらの分析条件と分析結果のz-スコア間に、関係性は認められなかった。

添加試料のエンロフロキサシン分析

技能試験試料のエンロフロキサシン濃度の平均値に近い2.1 mg/kgを添加した試料の分析結果の平均値は2.08 mg/kg、標準偏差は0.44 mg/kgであった。数が少ないためロバスト統計量は計算しなかった。平均値は添加量に近い値となり、相対標準偏差も22%で、技能試験試料の分析結果のRSDである21%とほぼ同じであった。このことから、動物に投与して作成した試料と添加試料間で、エンロフロキサシン分析結果の分布に大きな違いはないと考えられた。

Fig.3には2つの試料のエンロフロキサシン分析結果のプロットを示す。2試料の分析を行った10試験所中8試験所のプロットは直線状に並んだが、2試験所の結果は直線から離れていた。この2試験所の技能試験試料のエンロフロキサシン結果は、低い方からの2つであったが、添加試料では平均値よりも高い分析結果となった。

以上の結果から、通常の試験所においては、エンロフロキサシンを投与した動物から作製した試料と、エンロフロキサシンを添加した試料との分析結果には強い相関があると考えられた。一方、2か所の試験所はこのような相関に従わず、投与した試料においては低濃度の結果が得られた。実際の検査では、動物に投与した動物用医薬品が残留した試料が分析されるため、投与により作製した試料による技能試験は、添加により作製した試料を用いるよりも、実際の結果の変動をよく反映していると考えられた。

セフチオフル分析

使用頻度の高い動物用医薬品であるセフチオフルを技能試験の対象として選択し、試料を作成したが、技能試験に参加した試験所数は5にとどまった。参加した試験所は登録検査機関と国の機関であり、自治体の試験所からの参加はなかった。セフチオフルの分析法にはデスフロイル化の操作が含まれ、安定した結果が得られにくいことが、参加機関が少ない原因となっている可能性がある。

妥当性確認した方法により技能試験用試料を分析した結果は0.131 mg/kgであり、技能試験結果の平均値は0.109 mg/kgであった。標準偏差は0.026 mg/kgであり、Horwitz式により予測した標準偏差と同程度であった。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

参考文献

- 1) Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Codex procedural manual
- 2) W. Horwitz, L. R. Kamps and K. W. Boyer, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 1344 (1980)
- 3) Thompson M., Analyst (Lond.), 125, 385-386, 2000
- 4) Thompson M, Ellison L. R., Wood R, Pure Appl. Chem., 78, 145-196, 2006
- 5) Kuselman I, Fajgelj A, Pure Appl. Chem., 82, 1099-1135, 2010
- 6) ISO 13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, 2016

Table 1 セフチオフル分析法の性能確認で得られた分析結果

日	1	2
1	0.231	0.220
2	0.229	0.225
3	0.217	0.217
4	0.205	0.204
5	0.204	0.217

Table 2 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

エンロフロキサシン			シプロフロキサシン		
日	1	2	日	1	2
1	0.831	0.860	1	0.825	0.821
2	0.897	0.881	2	0.874	0.850
3	0.846	0.821	3	0.844	0.819
4	0.853	0.846	4	0.841	0.850
5	0.813	0.858	5	0.768	0.836

Table 3 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	添加濃度 mg/mL	真度	併行精度 RSD	室内精度 RSD
セフチオフル	0.2	108.5%	2.6%	4.8%
エンロフロキサシン	1.0	85.1%	2.3%	3.1%
シプロフロキサシン	1.0	83.3%	2.9%	3.4%

Table 4 セフチオフル均質性確認結果

試料No.	1	2
3	0.131	0.137
4	0.139	0.140
5	0.132	0.132
9	0.130	0.129
13	0.124	0.130
14	0.127	0.123
22	0.131	0.131
34	0.131	0.133
36	0.126	0.128
42	0.128	0.128

Table 5 エンロフロキサシン均質性確認結果

エンロフロキサシン			シプロフロキサシン		
試料No.	1	2	試料No.	1	2
3	2.302	2.430	3	0.068	0.068
4	2.338	2.303	4	0.066	0.066
5	2.141	2.259	5	0.070	0.069
9	2.184	2.019	9	0.071	0.066
13	2.309	2.148	13	0.070	0.066
14	2.262	2.333	14	0.071	0.072
22	2.302	2.168	22	0.073	0.067
34	2.528	2.329	34	0.075	0.071
36	2.061	2.152	36	0.068	0.069
42	2.229	2.121	42	0.070	0.068

Table 6 均質性試験結果

化合物	平均値 mg/kg	くり返しSD mg/kg	試料間SD mg/kg	$p \times 0.5$ mg/kg	S_{sam}^2	$1.88 \times S_{all}^2$ $+1.01 \times S_{an}^2$
セフチオフル	0.131	0.0022	0.0044	0.0142	2.18.E-10	1.41.E-04
エンロフロキサシン	2.246	0.091	0.125	0.159	5.41.E-05	2.56.E-02
シプロフロキサシン	0.0692	0.0023	0.0025	0.0076	8.62.E-13	4.48.E-05

Table 7 技能試験パイロットスタディ報告値

試験所 番号	報告値			
	エンロフロキサシン mg/kg	シプロフロキサシン mg/kg	両者の和 mg/kg	セフチオフル mg/kg
1	1.63	0.0644	1.6944	-
2	2.4	0.058	2.458	-
3	2.26	0.06	2.32	0.12
4	2.36	0.12	2.48	-
5	1.46	0.0322	1.4922	-
6	2.49	0.0752	2.5652	-
7	2.1	0.06	2.16	0.12
8	3.3	0.0833	3.3833	-
9	2.22	0.0486	2.2686	-
10	1.668	0	-	-
11	2.52	0.06	2.58	0.09
12	2.39	0.0979	2.4879	-
13	2.3	0.08	2.38	-
14	2.31	0.0571	2.3671	-
15	2.3	0.1	2.4	-
16	2.7	0.087	2.787	0.14
17	2.11	0.0562	2.1662	0.076
18	2.35	0.0603	2.4103	-
19	2.33	0.173	2.503	-

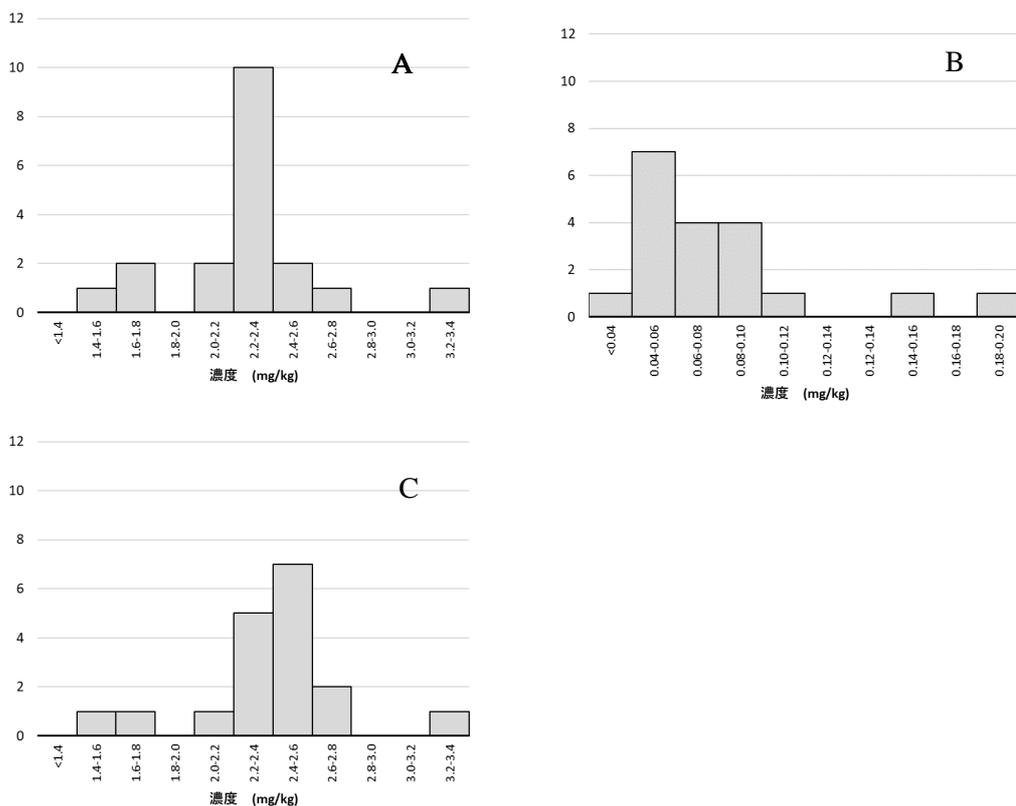


Fig. 1 技能試験パイロットスタディ報告値のヒストグラム
A:エンロフロキサシン、B:シプロフロキサシン、C:両者の和

Table 8 技能試験報告結果の平均値と標準偏差

	エンロフロキサシン mg/kg	シプロフロキサシン mg/kg	両者の和 mg/kg	セフトオフル (mg/kg)
平均値	2.27	0.076	2.38	0.109
ロバスト平均値	2.29	0.072	2.40	-
分析による付与値	2.25	0.069	2.32	0.131
標準偏差	0.40	0.032	0.40	0.026
ロバスト標準偏差	0.27	0.024	0.23	-
室間標準偏差予測値	0.32	0.015	0.33	0.028

Table 9 参加試験所の z-スコア

試験所 番号	z-スコア*			試験所 番号	z-スコア**		
	エンロフロ キサシン	シプロフロ キサシン	両者の和 mg/kg		エンロフロ キサシン	シプロフロ キサシン	両者の和 mg/kg
1	-1.94	-0.32	-1.90	1	-2.44	-0.33	-3.04
2	0.48	-0.74	0.44	2	0.41	-0.59	0.27
3	0.04	-0.61	0.01	3	-0.10	-0.51	-0.33
4	0.36	3.33	0.51	4	0.27	1.99	0.36
5	-2.47	-2.43	-2.52	5	-3.07	-1.67	-3.92
6	0.77	0.39	0.77	6	0.75	0.12	0.73
7	-0.46	-0.61	-0.48	7	-0.70	-0.51	-1.02
8	3.31	0.92	3.27	8	3.75	0.46	4.28
9	-0.08	-1.35	-0.14	9	-0.25	-0.98	-0.55
10	-1.82	-	-	10	-2.30	-	-
11	0.86	-0.61	0.81	11	0.86	-0.51	0.80
12	0.45	1.88	0.53	12	0.38	1.07	0.40
13	0.17	0.71	0.20	13	0.04	0.32	-0.07
14	0.20	-0.80	0.16	14	0.08	-0.63	-0.13
15	0.17	2.02	0.26	15	0.04	1.15	0.02
16	1.43	1.17	1.45	16	1.53	0.61	1.69
17	-0.43	-0.86	-0.46	17	-0.66	-0.67	-1.00
18	0.33	-0.59	0.29	18	0.23	-0.50	0.06
19	0.26	6.81	0.58	19	0.15	4.19	0.46

* 付与値と Horwitz 式から求めた室間の標準偏差を用いて計算した z-スコア

** 報告値のロバスト平均値とロバスト標準偏差を用いて計算した z-スコア

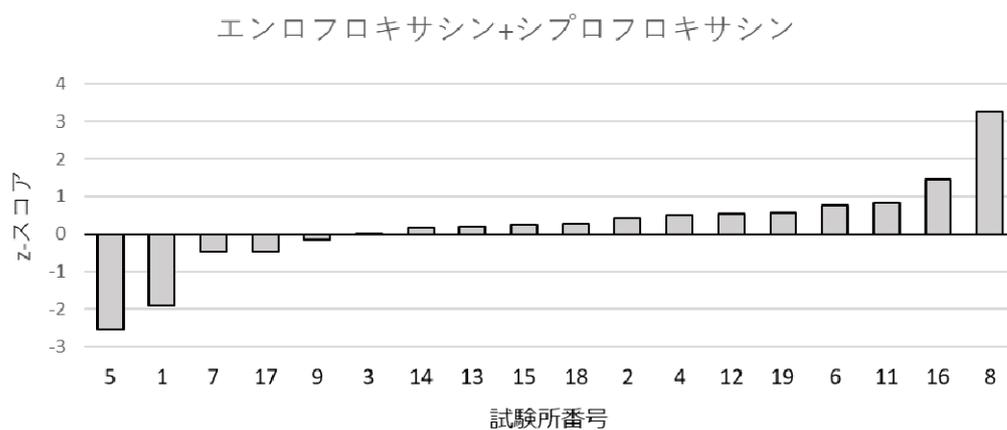
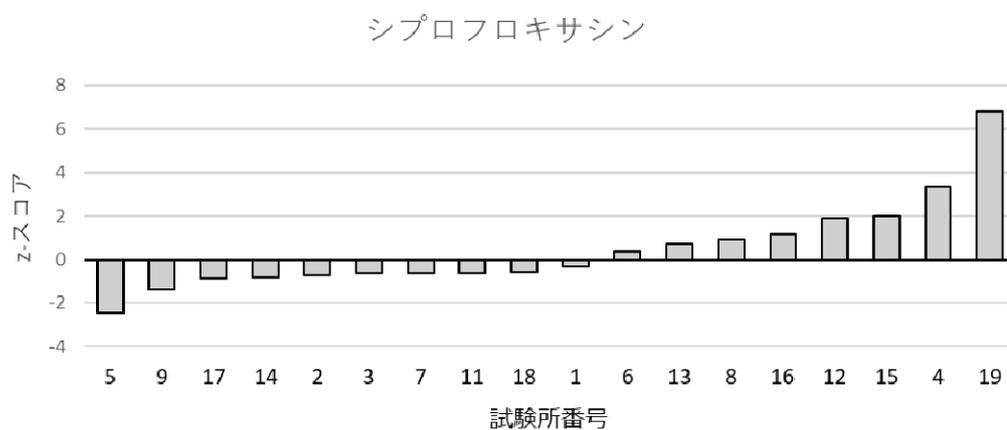
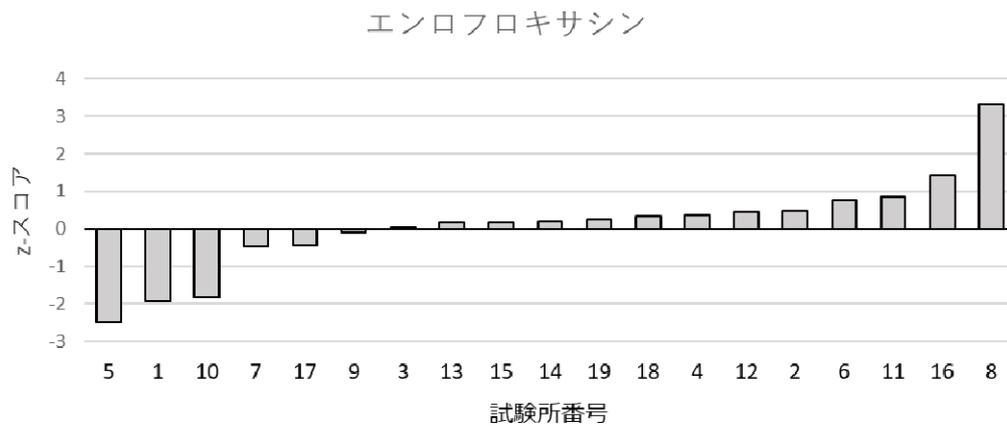


Fig.2 参加試験所の z-スコア

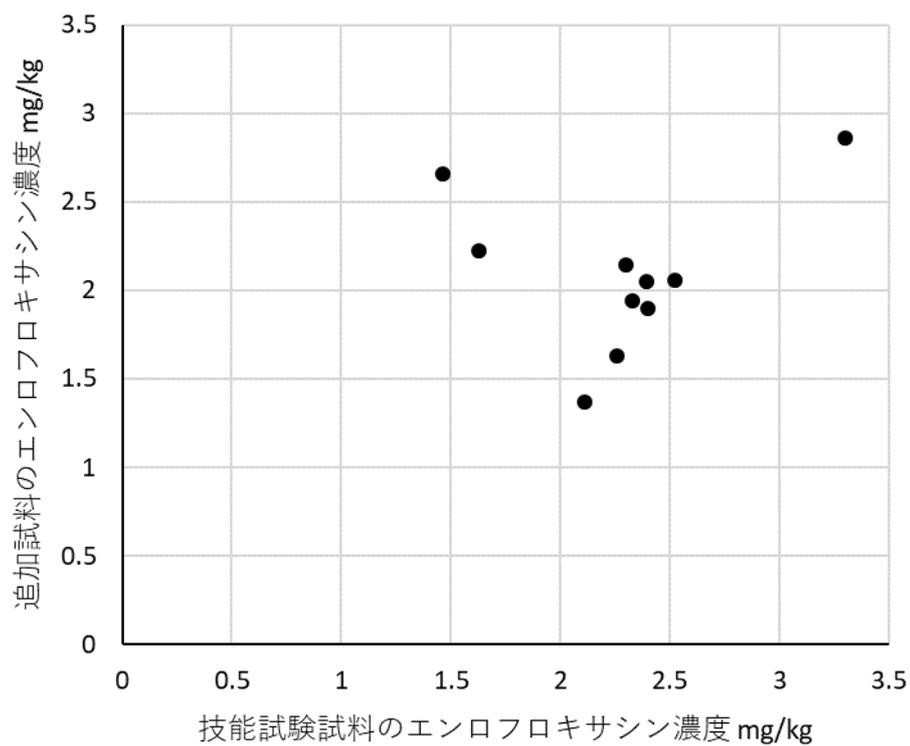


Fig.3 技能試験試料と添加試料のエンロフロキサシン濃度