

＜その1＞ ポリ乳酸を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装 における溶出試験の総乳酸定量分析法の性能評価

研究協力者 海野 明広
研究分担者 片岡 洋平
研究協力者 阿部 裕
研究代表者 六鹿 元雄

愛知県衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品衛生法における食品・添加物等の規格基準では、ポリ乳酸(PLA)を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装について、個別規格が設定されている。そのうち総乳酸については、溶出量として 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の規格値とともに、溶出試験を行うための試験法(以下、告示試験法)が定められている。

告示試験法において、総乳酸試験法は標準溶液と試験溶液を測定機器により分析し、測定機器により得られる信号強度等を比較して規格値への適否を判定するいわゆる限度試験法である。PLA から溶出したラクチド又はオリゴマーをアルカリで乳酸に加水分解した後、モノマーとして測定される。この時、試験溶液中の乳酸のピーク面積は、乳酸標準溶液(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のピーク面積より大きくてはならないとされている。しかし、この告示試験法については、これまで多試験所が参加した共同実験による性能評価がされておらず、分析法の妥当性が確認されていない。また、告示試験法に規定される注入量 100 μL では、負荷量が原因と推定されるピーク割れ等がしばしば発生するなど定性及び定量性に課題があった。

近年、分析機器の高性能化に伴い、少量の注入量で規格値レベルの乳酸を検出できるようになった。そこで、従来の 100 μL から 20 μL に変更し、さらに、限度試

験法から定量分析法への改良を検討し、総乳酸定量分析法を構築した(＜別添＞ポリ乳酸を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装を対象とした溶出試験の総乳酸定量分析法共同実験プロトコル(以下、手順書))。本研究では、構築した総乳酸定量分析法について、26 試験所で室間共同実験を実施し、その性能を評価した。

B. 研究方法

1. 配付試料

1) 試料

PLA カップ(SW95 16 オンス)

2) 試薬等

水:オルガノ株式会社製超純水装置ピューリック ω で精製した水及び蒸留水:高速液体クロマトグラフィー用、富士フイルム和光純薬株式会社製

水酸化ナトリウム:特級、シグマアルドリッチジャパン社製

リン酸:高速液体クロマトグラフィー用、関東化学株式会社製

アセトニトリル:LC/MS用、Waters製
L-乳酸リチウム標準品:生化学用、富士フイルム和光純薬株式会社製

1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳酸標準原液:L-乳酸リチウム標準品 171.2 mgを量りとり、水で 100 mLに定容した。

4600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 乳酸標準原液:L-乳酸リチウ

ム標準品 492.2 mg を量りとり、水で 100 mL に定容した。

6000 µg/mL 乳酸標準原液:L-乳酸リチウム標準品 642.0 mg を量りとり、水で 100 mL に定容した。

8400 µg/mL 乳酸標準原液:L-乳酸リチウム標準品 898.8 mg を量りとり、水で 100 mL に定容した。

11400 µg/mL 乳酸標準原液 : L-乳酸リチウム標準品 1219.8 mg を量りとり、水で 100 mL に定容した。

1000 µg/mL 乳酸標準溶液(検量線用標準溶液) : L-乳酸リチウム標準品 1070.0 mg を量りとり水で 1000 mL に定容した。

0.2 mol/L 水酸化ナトリウム試液 : NaOH8.0 g を水に溶かして 1000 mL に定容した。

0.2 mol/L リン酸 : リン酸 14 mL に水を加えて 1000 mL に定容した。

3) 浸出液の調製

PLA カップを 10 cm×25 cm に切断し、予め 60°C に加温した水 1000 mL に浸漬し、60°C に設定した低温恒温振とう水槽内に 30 分間静置した。この操作を 14 回繰り返し行い、得られた溶液を 20 L ポリプロピレン製容器に移し、よく混合した後の溶液を浸出液とした。

4) 配付試料の調製

試料原液 1:1600 µg/mL 乳酸標準原液 10 mL を正確に量りとり、浸出液を加えて 2000 mL に定容した(濃度 : 8 µg/mL)。

試料原液 2:4600 µg/mL 乳酸標準原液 10 mL を正確に量りとり、浸出液を加えて 2000 mL に定容した(濃度 : 23 µg/mL)。

試料原液 3:6000 µg/mL 乳酸標準原液 10 mL を正確に量りとり、浸出液を加えて 2000 mL に定容した(濃度 : 30 µg/mL)。

試料原液 4:8400 µg/mL 乳酸標準原液 10

mL を正確に量りとり、浸出液を加えて 2000 mL に定容した(濃度 : 42 µg/mL)。

試料原液 5 : 11400 µg/mL 乳酸標準原液 10 mL を正確に量りとり、浸出液を加えて 2000 mL に定容した(濃度 : 57 µg/mL)。

ブランク試料 1 及びブランク試料 2 : 浸出液。

試料 2 及び試料 8 : 試料原液 1

試料 3 及び試料 10 : 試料原液 2

試料 1 及び試料 5 : 試料原液 3

試料 4 及び試料 6 : 試料原液 4

試料 7 及び試料 9 : 試料原液 5

5) 配付

ブランク試料 1~2、試料 1~10 を 1 組として、それぞれ容量 15mL のねじ口ガラス瓶に分注し、濃度非明示で令和 3 年 9 月 14 日にクール便で室間共同実験の参加試験所に配付した。

6) 均質性及び安定性の確認

均質性の確認は試料配付後 1 週間以内(0 日目)に、安定性の確認は試料配付後約 3 か月後(90 日目)にそれぞれ国立医薬品食品衛生研究所にて実施した。

方法は原則として手順書(別添)に準じて実施した。ただし、試料測定溶液の調製は、ブランク試料 1~2、試料 1~10 を 1 組としたものを、ランダムに 10 組を選択し、各組の試料 2 及び試料 8、試料 3 及び試料 10、試料 1 及び試料 5、試料 4 及び試料 6、並びに試料 7 及び試料 9 を併行分析した。

試料測定溶液をランダムに分析して得られた分析値を用いて以下の方法により試料の均質性及び安定性を確認した。

試料の均質性は、IUPAC の技能試験のハーモナイズドプロトコールの 2006 年版¹⁾ Appendix により示されている統計的手法を用いて分析結果を解析して評価し

た。すなわち、0 日目に分析した各試料の分析値とその値を下記の判定式(式 1)に代入し、判定式が成立する場合は均質性に問題はないと判断した。なお、併行分析した測定溶液の点数に応じて、自由度 9 の χ^2 値(1.88)と F 値(1.01)を代入した。 σ_R は各試料の濃度に対応する Horwitz/Tompson 式($\sigma_R=0.02C^{0.8495}$ 、C: 試料濃度)から算出し代入した。

$$(式 1) \quad S_{sam}^2 \leq \chi^2 \times (0.3\sigma_R) + F \times S_{an}^2$$

S_{sam} : 試料間標準偏差

χ^2 : χ^2 値

σ_R : 室間再現標準偏差の予測値

F: F 値

S_{an} : 試料内標準偏差

試料の安定性は ISO 13528:2015²⁾ Annex B により示されている統計的手法を参考に分析結果を解析して評価した。すなわち、90 日目に分析した各試料の分析値と 0 日目と 90 日目に分析した分析値の平均値の最大値と最小値を下記の判定式(式 2)に代入し、判定式が成立する場合は安定性に問題はないと判断した。

$$(式 2) \quad X_{max} - X_{min} \leq 0.3\sigma_R$$

X_{max} : 検証期間中に取得した分析結果の平均値の最大値

X_{min} : 検証期間中に取得した分析結果の平均値の最小値

σ_R : 室間再現標準偏差の予測値

2. 参加試験所

室間共同実験の計画及びプロトコール作成には民間の登録検査機関 14 試験所と公的な衛生研究所など 16 試験所の計 30 試験所が参加し、このうち室間共同実験の実施には 26 試験所が参加した。なお、

同一企業であっても地域が異なる試験所で実施した場合は別試験所として扱った。

3. 室間共同実験の実施と結果の解析

1) 室間共同実験の実施

室間共同実験は手順書(別添 1)にしたがい実施した。手順書には、分析方法の他、分析の全般、配付試料の保管、分析計画、分析実施期間、分析結果の報告に関する注意事項を示した。また、ガラス器具は洗浄後の使用を徹底するなど、妨害ピークの発生を未然に防ぐための注意事項を会議にて周知した。室間共同実験の分析の実施期間は、試料到着後の 2021 年 9 月 15 日～2021 年 12 月 15 日の約 3 ヶ月間とした。分析方法及び分析結果の報告について以下に示した。

①分析方法

・ 試料測定溶液の調製

試料 10 mL を試験管にとり、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム試液 1 mL ずつ加えて密栓し、60°C に保ちながら時々振り混ぜて 15 分間放置した。冷後、0.2 mol/L リン酸 1 mL ずつ加えた溶液を試料測定溶液とした。また、ブランク試料についても、同様の分析操作を実施した。

・ 検量線用測定溶液の調製

1000 $\mu\text{g/mL}$ 乳酸標準溶液(検量線用標準溶液)を各 0.5 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL 量りとり、水で 100 mL に定容した(濃度は 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、70 $\mu\text{g/mL}$)。また、0 $\mu\text{g/mL}$ 溶液として水を用いた。これら各濃度の溶液をそれぞれ 10 mL ずつ採り、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム試液 1 mL ずつ加えて密栓し、60°C に保ちながら時々振り混ぜて 15 分間放置した。冷後、0.2 mol/L リン酸 1 mL ずつ加えた溶液を検量線用測

定溶液とした。

- 分析操作

試料測定溶液及び検量線用測定溶液 20 µL を HPLC に注入した。

- 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 µm) を用いた。

カラム温度：40°C

移動相：リン酸、アセトニトリル及び水混液(0.1 : 1 : 99)

流速：1 mL/min

測定波長：210 nm

- 定量

検量線用測定溶液の乳酸のピーク面積又はピーク高さから濃度との 1 次回帰式を求め、乳酸の検量線を作成した。作成した各検量線に試料測定溶液の乳酸のピーク面積又はピーク高さを内挿し、分析値(定量値)を算出した。

②分析結果の報告

Microsoft Excel を使って作成した結果報告シートを配付し、分析結果の他、分析環境の情報、また分析に関して気づいた点などの情報を提供するように参加試験所に依頼した。

2) 結果の解析

参加試験所から報告された室間共同実験結果は Codex 分析・サンプリング部会の関連文書である CXG64-1995³⁾に示されたプロトコールにしたがい、Microsoft Excel 2016 を使用して解析した。ただし、試料 1 及び 5 の結果は試料原液 3 の 2 併行分析の結果、試料 2 及び 8 の結果は試料原液 1 の 2 併行分析の結果、試料 3 及び 10 の結果は試料原液 2 の 2 併行分析の結果、試料 4 及び 6 の結果は試料原液 4 の 2 併行分析の結果、試料 7 及び 9 の結

果は試料原液 5 の 2 併行分析の結果と見なした。解析で併行相対標準偏差 (RSD_r %)、室間再現相対標準偏差 (RSD_R %) 及び RSD_R と Horwitz/Thompson 式で予測される室間再現相対標準偏差 (PRSD_R %) の比である HorRat 値を算出した。なお、PRSD_R は各試料の濃度に対応する Horwitz/Thompson 式である PRSD_R % = 2C^{-0.1505} (C : 試料濃度) から算出した。また、HorRat 値による分析法の性能評価における性能規準の指標として Codex 委員会の手順書⁴⁾を参照した。なおこの手順書では、分析法の性能規準として、HorRat 値 2 以下を設定している。

C. 研究結果及び考察

1. 試料の均質性及び安定性

試料の均質性については、0 日目に分析した各試料の分析値を判定式に代入した。その結果、いずれの試料についても B.1.6) で示した判定式(式 1)が成立したことから、試料が均質であると確認された(表 1)。

試料の安定性については、90 日目の各試料の分析値と 0 日目と 90 日目の分析値の平均値の最大値と最小値を上記の判定式に代入した。その結果、いずれの試料についても B.1.6) で示した判定式(式 2)が成立したことから、各試料の 90 日目までの安定性が確認された(表 1)。したがって、手順書に記載の分析実施期間における試料の安定性に問題はないと判断した。

2. 共同実験で取得された分析結果の解析

1) 室間共同実験の概要

共同実験の分析は令和 3 年 9 月 16 日から 12 月 2 日までに実施され、手順書の実施期間内に完了した。

全 26 試験所が使用した装置及び測定条件の概要を表 2 に示した。

表 1 0 日目及び 90 日目の試料原液の分析結果と均質性及び安定性の解析結果

	試料原液 1				試料原液 2				試料原液 3			
	0日目濃度(μg/mL)		90日目濃度(μg/mL)		0日目濃度(μg/mL)		90日目濃度(μg/mL)		0日目濃度(μg/mL)		90日目濃度(μg/mL)	
	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2
1	8.01	8.00	8.00	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.2	30.1
2	8.01	8.02	8.01	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.2	30.2	30.2	30.2
3	8.00	8.00	8.01	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.2	30.2	30.2	30.2
4	8.01	8.00	8.02	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.2	30.2
5	8.01	8.01	8.01	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.2	30.2	30.2
6	8.01	8.01	8.01	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.2	30.2
7	8.02	8.02	8.01	8.02	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.2	30.1
8	8.01	8.01	8.02	8.02	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.2	30.2
9	8.02	8.01	8.00	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.3	30.1	30.2
10	8.01	8.01	8.01	8.01	23.0	23.0	23.0	23.0	30.3	30.2	30.2	30.1
s_{sam}^2	0.0000237				0.0000475				0.000251			
$\chi^2 \times (0.3\sigma_R) + F \times s_{an}^2$	0.149				0.892				1.42			
$X_{max} - X_{min}$	0.0193				0.0328				0.187			
$0.3\sigma_R$	0.281				0.689				0.868			

	試料原液 4				試料原液 5			
	0日目濃度(μg/mL)		90日目濃度(μg/mL)		0日目濃度(μg/mL)		90日目濃度(μg/mL)	
	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2
1	42.0	42.0	42.1	42.0	57.2	57.1	57.1	57.1
2	42.0	42.0	42.0	42.1	57.2	57.1	57.1	57.1
3	42.1	42.1	42.0	42.0	57.2	57.1	57.1	57.2
4	42.0	42.0	42.0	42.0	57.2	57.2	57.1	57.1
5	42.0	42.0	42.0	42.1	57.1	57.1	57.2	57.3
6	42.0	42.0	42.1	42.0	57.1	57.1	57.2	57.2
7	42.1	42.1	42.0	42.0	57.1	57.1	57.2	57.1
8	42.1	42.1	42.0	42.0	57.2	57.2	57.1	57.1
9	42.0	42.0	42.0	42.0	57.1	57.1	57.0	57.1
10	42.1	42.0	42.1	42.1	57.1	57.2	57.2	57.1
s_{sam}^2	0.00117				0.000388			
$\chi^2 \times (0.3\sigma_R) + F \times s_{an}^2$	2.48				4.19			
$X_{max} - X_{min}$	0.115				0.138			
$0.3\sigma_R$	1.15				1.49			

表 2 各試験所の分析条件の概要

試験所コード	メーカー	HPLC-UV-Vis/PDA	カラムの種類		乳酸の保持時間(min)
1	島津製作所	LC-20AD SPD-20A	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.1
2	島津製作所	prominence	GL Science	Inertsil-ODS3V	5.3
3	HITACHI	L-2000シリーズ L-2450	GL Science	Inertsil ODS-3	5.1
4	Waters	Arc HPLC	関東化学	Mightysil RP-18GP	4.5
5	島津製作所	Prominence-i	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	5.2
6	島津製作所	LC-20A SPD-M20A	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.7
7	Waters	Alliance e2695 2998PDA	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	5.2
8	島津製作所	Prominence LC-20AT SPD-M20A	化学物質評価研究機構	L-column2 ODS	4.5
9	Waters	alliance e2695 2998PDA	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.4
10	島津製作所	LC-20AD SPD-M20A	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	5.1
11	Agilent Technologies	1260 Infinity 1200 Series	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.8
12	島津製作所	LC-20AT SPD-20A	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.4
13	島津製作所	Nexera XR SPD-40	化学物質評価研究機構	L-column3 CERI C18	4.3
14	島津製作所	LC-20AD SPD-M20A	GL Science	Inertsil ODS- II	4.5
15	島津製作所	Prominence SPD-M20A	島津製作所	Shim-pack VP-ODS	4.9
16	島津製作所	LC-20AD SPD-20AV	関東化学	Mightysil RP-18 GP	4.7
17	島津製作所	Prominence SPD-M20A	GL Science	Inertsil ODS-3	5.1
18	Agilent Technologies	1260 LC 1260 DAD	ナカライテスク	COSMOSIL 5C18-MS- II	4.4
19	島津製作所	Nexera SPD-20AV	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.7
20	Agilent Technologies	1260 シリーズ	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.9
21	島津製作所	LC-20ADXR SPD-M20A	GL Science	Inertsil ODS-4	5.0
22	Waters	Alliance e2695 Separation Module	GL Science	Inertsil ODS-2	4.4
23	Agilent Technologies	Agilent 1290 システム	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.8
24	Waters	ACQUITY UPLC H-Class ACQUITY UPLC PDA eA	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	5.0
25	Agilent Technologies	1200 Series	Tosoh	TSKgel ODS-80Ts	4.9
26	島津製作所	LC-2030C 3D Plus	島津GLC	Kinetex C18	5.2

2) ピーク形状の解析

検量線用測定溶液(30 µg/mL)のクロマトグラムを図1に示した。告示試験法に規定される注入量 100 µL では、26 試験所中 2 試験所で 2 峰性のピークが確認されたが、20 µL 注入では、このようなピークは確認されなかった。これらの結果より、注入量を 20 µL に変更することでピーク形状への影響を改善できることが確認できた。

なお、2 峰性のピークが観察された試験所において使用された試薬、カラム及び測定機器に傾向があるか確認するため、各試験所で使用された試薬等の種類(製造元、等級)を比較したが傾向はわからなかった。

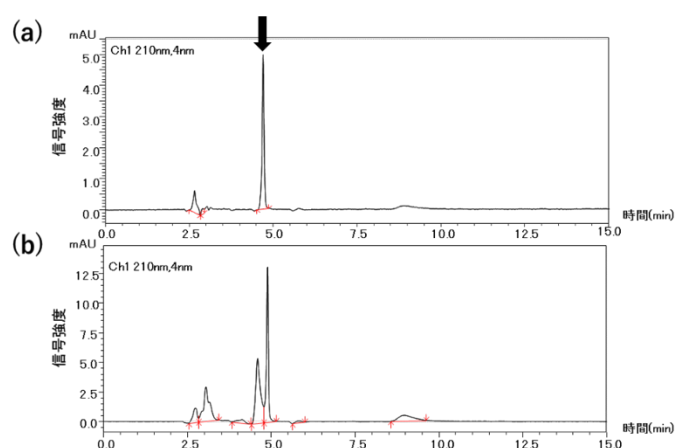


図 1 検量線用測定溶液(30 µg /mL) のクロマトグラム

(a)20 µL 注入、(b)100 µL 注入
矢印は乳酸のピークを示す(約 4.7min)

3) 外れ値の検定

全 26 試験所から報告された各試料の分析結果を用いて解析した。全分析結果を表 3 に示した。

CXG64-1995 で示された Cochran 検定と Grubbs 検定を実施した。その結果、試料原液 1(濃度：8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、2 試験所の分析結果が外れ値に該当した。試料原液 2(濃度：23 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び試料原液 3(濃度：30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、それぞれ 1 試験所の分析結果が外れ値に該当した。試料原液 4(濃度：42 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び試料原液 5(濃度：57 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、それぞれ 5 試験所の分析結果が外れ値に該当した。

検量線用測定溶液の調製方法やガラス器具の取り扱い注意事項を記載するなど詳細な手順書を策定することで室間共同実験の可能な限りの管理を行ったが、得られた分析結果には、試料測定溶液の取り違い(2 施設)や検量線用測定溶液の誤調製(1 施設)が原因と推察される外れ値が観察された。

4) 分析結果の解析

外れ値除外前の全分析値と外れ値除外後の分析値をそれぞれ一元配置の分散分析し、それぞれを初期推定結果及び最終推定結果として分析法の性能パラメータを求めた。これらの結果を表 4 及び表 5 に示した。初期推定の RSD_f は 0.70~12.2%、 RSD_R は 3.35~12.5%であった。最終推定された RSD_f は 0.48~2.26%、 RSD_R は 1.00~4.03%であった。最終推定された RSD_f 、 RSD_R の値は、初期推定の値と比較し最大で約 1/15 の値である場合も確認され、外れ値となった分析値は、試験所内及び試験所間のばらつきが大きかった。

RSD_R は、室間共同実験を行うことでし

か推定することのできない重要な性能パラメータである。そこで推定されたこれらの値に基づいて総乳酸定量分析法の性能を評価するために、Horwitz/Thompson 式を用いて計算される $PRSD_R$ から算出される HorRat 値を指標にした。

試料原液 1 から試料原液 5 の HorRat 値は、0.12~0.35 の範囲にあり、Codex 委員会の指標値 2 を下回っていた。ただし、HorRat 値が 0.5 を下回る場合には、分析法の性能が過度に小さく推定されていないか考察する必要がある⁵⁾。複雑な精製や高度な測定機器が必要となる他の理化学分析法に比べて、本分析法の工程は単純であることが、HorRat の値が 0.5 を下回った要因であると推察された。

以上の解析結果より、総乳酸定量分析法は、精確な分析法であると考えられた。

D. 結論

PLA を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装における溶出試験の総乳酸定量分析法について、26 試験所が参加する共同実験を実施し、共同実験により得られた分析結果を、国際的なハーモナイズドガイドラインに沿って統計的に解析した。

その結果として推定された RSD_R と Horwitz/Thompson 式を用いて計算される $PRSD_R$ から算出される HorRat 値を指標として評価した結果、総乳酸定量分析法は、Codex 委員会が分析法承認のために設定している性能規準の指標値を満たしており、分析法として妥当な水準にあることが確認された。したがって、本分析法は規格の判定を行う分析法として期待できる分析法であると判断した。

表 3 各試験所の分析結果

試験所コード	試料原液 1		試料原液 2		試料原液 3		試料原液 4		試料原液 5	
	併行分析1 試料2	併行分析2 試料8	併行分析1 試料3	併行分析2 試料10	併行分析1 試料1	併行分析2 試料5	併行分析1 試料4	併行分析2 試料6	併行分析1 試料7	併行分析2 試料9
1	7.67	7.64	23.1	23.1	29.3	29.6	41.4	41.9	56.2	56.2
2	8.06	8.03	23.3	23.2	30.1	30.2	42.1	42.2	57.2	57.3
3	8.58	8.52	22.8	23.1	29.9	29.8	41.6	41.1	(55.2)*	(55.0)*
4	7.51	7.56	22.1	22.6	30.2	29.5	(28.4)*	(41.1)*	56.5	57.0
5	8.20	7.97	22.9	22.9	29.7	29.8	41.8	41.8	56.8	56.4
6	8.35	8.25	22.9	22.8	29.7	29.7	41.8	42.3	57.1	57.1
7	(10.7)*	(10.6)*	(26.2)*	(26.9)*	(34.3)*	(34.9)*	(48.0)*	(47.6)*	(64.3)*	(64.5)*
8	8.09	8.36	22.9	23.1	29.9	29.8	41.9	41.7	56.4	56.7
9	8.49	9.03	23.3	23.2	30.5	30.1	42.1	41.9	58.6	57.3
10	(9.50)*	(8.48)*	22.9	22.5	29.7	29.7	41.5	41.3	55.9	57.8
11	8.29	7.81	23.9	23.7	30.6	30.3	42.8	42.3	57.5	57.4
12	8.15	8.08	22.8	23.5	29.8	30.1	(41.4)*	(43.9)*	(62.3)*	(57.0)*
13	8.13	8.09	22.9	23.0	29.9	30.0	41.9	41.9	56.9	56.8
14	8.01	7.96	22.7	22.3	29.3	29.4	41.4	42.0	56.1	57.0
15	8.78	8.12	22.8	22.4	29.2	29.1	(41.2)*	(44.6)*	56.3	57.5
16	8.25	8.09	23.3	23.2	30.3	30.2	42.4	42.3	57.3	57.8
17	8.18	8.10	23.0	23.1	30.1	30.0	41.9	41.6	56.7	56.7
18	8.12	7.99	23.1	22.9	30.0	30.0	42.1	42.1	(57.1)*	(8.10)*
19	8.23	8.44	23.6	23.6	31.2	30.7	42.3	42.3	57.5	57.4
20	7.82	8.05	23.0	22.8	29.9	29.8	41.7	41.5	56.5	56.6
21	8.27	8.44	23.2	23.4	30.2	29.7	42.0	42.2	56.7	56.9
22	7.88	7.76	23.2	23.0	30.2	29.8	42.0	41.9	56.3	56.2
23	8.07	8.03	22.7	22.8	29.5	29.6	41.3	41.4	56.2	56.2
24	7.58	7.90	23.0	22.9	29.7	30.0	42.0	42.0	56.8	57.0
25	7.89	7.73	22.7	22.4	29.9	29.7	(43.2)*	(41.7)*	56.5	56.3
26	8.42	8.85	23.8	24.1	31.1	30.7	43.1	43.1	(57.6)*	(60.1)*

単位 : µg/mL

*: 外れ値(Cochran検定とGrubbs検定の結果) 参考文献:Pure appl chem67(2)331-343,1995

表 4 分析法性能の推定結果(初期推定結果)

分析対象試料	試料原液 1	試料原液 2	試料原液 3	試料原液 4	試料原液 5
試験所数	26				
平均値($\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.25	23.2	30.1	42.0	56.3
併行標準偏差 S_r ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.23	0.21	0.21	1.88	6.86
併行許容差 $2.8S_r$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.63	0.59	0.59	5.26	19.2
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.74	0.91	0.70	4.47	12.2
室間再現標準偏差 S_R ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.61	0.80	1.01	2.33	7.06
室間再現許容差 $2.8S_R$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.72	2.23	2.83	6.51	19.8
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	7.44	3.44	3.35	5.54	12.5

表 5 分析法性能の推定結果(最終推定結果)

分析対象試料	試料原液 1	試料原液 2	試料原液 3	試料原液 4	試料原液 5
試験所数	26				
データ解析に有効な試験所数	24	25	25	21	21
外れ値になった試験所数	2	1	1	5	5
平均値($\mu\text{g}/\text{mL}$)	8.12	23.0	29.9	42.0	56.8
併行標準偏差 S_r ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.18	0.19	0.20	0.20	0.45
併行許容差 $2.8S_r$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.51	0.53	0.56	0.56	1.26
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.26	0.83	0.66	0.48	0.79
室間再現標準偏差 S_R ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.33	0.40	0.44	0.44	0.57
室間再現許容差 $2.8S_R$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.92	1.13	1.22	1.23	1.59
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	4.03	1.74	1.45	1.05	1.00
HorRat	0.35	0.18	0.15	0.12	0.12

E. 参考文献

- 1) Thompson, M., Ellison, S. L., Wood, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **78**, 145-196 (2006).
- 2) ISO, E. 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO 13528 (2015).
- 3) Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994 (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 4) Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. Procedural manual (Twenty-seventh edition). Food & Agriculture Org. (2004).
- 5) AOAC Int. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 18 ed., Gaithersburg, MD, USA. 2005