

研 究

分析試験法における実験計画法を用いた 条件検討効率化の試み

佐々木秀樹

宮城県食肉衛生検査所

要 約

導入を検討する試験法の前処理方法について、操作条件の変動による結果への影響を観測した。実験計画法を用いることにより、実験回数を大幅に低減させながら、試験法の各操作の変動が結果に及ぼす影響について把握することが可能であった。また、統計ソフトで解析用のスクリプトを作成することで、解析の再現性を確保できるとともに、同様の実験を効率よく計画可能となった。

キーワード：Rスクリプト、実験計画法、食肉中の残留動物用医薬品試験法

緒 言

食肉に残留する動物用医薬品の分析試験は、その分析対象となる化合物が多種多様であり、化合物の系統毎に試験法を用意する必要がある。新たな試験法を導入する際には、多くの場合、様々な条件検討が必要となる。条件検討は、多くの労力と時間を要し、特に分析における各「操作」が分析結果に与える影響を解析し適切に評価することには苦慮することが多い。

今回、導入を予定する試験法の前処理方法を検討するに当たり、各「操作」の分析結果への影響について、実験計画法により条件検討をしたところ、実験回数を低減させ、かつ一定の成果が得られたので、その概要について報告する。

材料および方法

1. 検討対象とした前処理法：QuEChERS法を応用したY. Jungらの方法¹⁾をもとに図1の通り設計した。
2. 検出対象とした化合物：サルファ剤6種（スルファメラジン（以下、SMR）、スルファジミジン（以下、SDD）、スルファメトキサゾール（以下、SMZ）、スルファジメトキシシン（以下、SDM）、スルファモノメトキシシン（以下、SMM）、スルファキノキサリン（以下、SQX））を検出対象とした。添加回収試験は、残留基準値の100倍濃度の標準液200 μ Lを牛の筋肉2gに加え、抽出操作を行い、HPLC注入時に基準値相当となるよう設計した。
3. HPLC条件：当所におけるサルファ剤分析法を一部変更して設定した（図3右）。
4. 統計ソフトウェア：R ver. 4.2.0. package : conjoint ver. 1.41
5. 設定した実験パラメータ：図1に示した抽出法における※①～⑤の操作を因子とし、各因子について表1に示した2または3水準を設定した。
6. 解析：回収率＝測定されたArea値÷標準品（基準値濃度）のArea値×100として算出し、解析に供した。得られた回収率についてaov関数により分散分析を実施した。解析のRスクリプトを図2に示した。

表1 試行した実験の条件と回収率

試行 No.	NaClの 添加量	Na ₂ SO ₄ の添加量	H ₂ Oの 添加量	混和	抽出溶媒 の量	回収率 (%)
1	0g	2g	0mL	hand	9mL	87.81
6	1g	2g	4mL	hand	9mL	100.28
11	0g	5g	0mL	shaker	9mL	82.66
16	1g	5g	4mL	shaker	9mL	97.22
23	0g	5g	4mL	hand	10mL	63.55
26	1g	2g	0mL	shaker	10mL	89.37
36	1g	5g	0mL	hand	11mL	60.45
45	0g	2g	4mL	shaker	11mL	45.53

表2 分散分析の結果

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
NaCl	1	574.1	574.1	525.717	0.0277	*
Na ₂ SO ₄	1	45.6	45.6	41.802	0.0977	.
H ₂ O	1	23.5	23.5	21.516	0.1352	
Shake	1	0.9	0.9	0.828	0.5299	
ExtSolv	2	2037.9	1018.9	933.071	0.0231	*
Residuals	1	1.1	1.1			

Signif. ‘*’ p<0.05. ‘.’ p<0.1

成績

caFactorialDesign関数により、8パターンの試行が得られた(表1)。試行パターンは本来すべての組み合わせを見るために $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3 = 48$ パターン必要なところ、6分の1に削減された。割り付けられた8パターンの試行において、6種類の化合物のうち、SDMが妨害を受けずに分析可能であった(図3)。そこで、試行により得られたSDMの回収率を算出し、分散分析に供した結果、塩化ナトリウムの添加量(NaCl)及び抽出溶媒の量(ExtSolv)について有意差(p<0.05)が認められた(表2)。

考察

実験計画法では、直交表と呼ばれる組み合わせの表を用いる²⁾。直交表には因子数や水準数によりさまざまな種類があり、交互作用や因子の水準の設定、解析の際にある程度の統計学の知識が必要であるなど、実験計画法を使いこなすためには、ある程度の習熟を要する。このため、実験をデザインするうえ

で実験計画法を導入するハードルが高い。今回、統計ソフトの関数を用いて、直交表を出力することで、因子の割り付けが容易に可能であり、実験をデザインしデータを解析するまで定型化することができた。また、統計ソフトの操作をスクリプト化することで、解析の再現性も確保できた。

当所では、HPLC-UVによる試験法により検査を行ってきたが、近年の検査法はLC-MS/MSによる試験が前提となっており、試験機器の更新が必要となっている。LC-MS/MSを導入する場合、改めてSOPの策定、妥当性評価、速やかな新試験法への移行が求められ、加えて、QuEChERS法などこれまでに全く試行したことのない試験法についても検討する必要が生じる。QuEChERS法は、抽出の際に塩析や分散固相抽出(d-SPE)を用いるなど当所ではあまり馴染みのない手法で、過去に実施した経験がなかった。そこで今回、試験法の各操作が結果に及ぼす影響を把握することを試みた。

今回の解析から、①塩化ナトリウムの添加及び抽出溶媒量は有意な影響を与える。②抽出溶媒を加える前に予め試料に添加するH₂Oの量は有意な影響を与えない。③脱水のために添加する無水硫酸ナトリ

ウム量は有意な影響を与えない。④手作業による混和とシェーカーによる混和で有意な差は無い等の試験法における各操作の影響について、実験計画法と構築したスクリプトにより効率よく把握することができた。

引用文献

- 1) Jung YS, Kim DB, Nam TG, Seo D, Yoo M. :Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS. Food Chem. 2022 Jul 15;382:132313.
- 2) 長畑秀和：直交表による方法，Rで学ぶ実験計画法，48，朝倉書店，東京（2016）

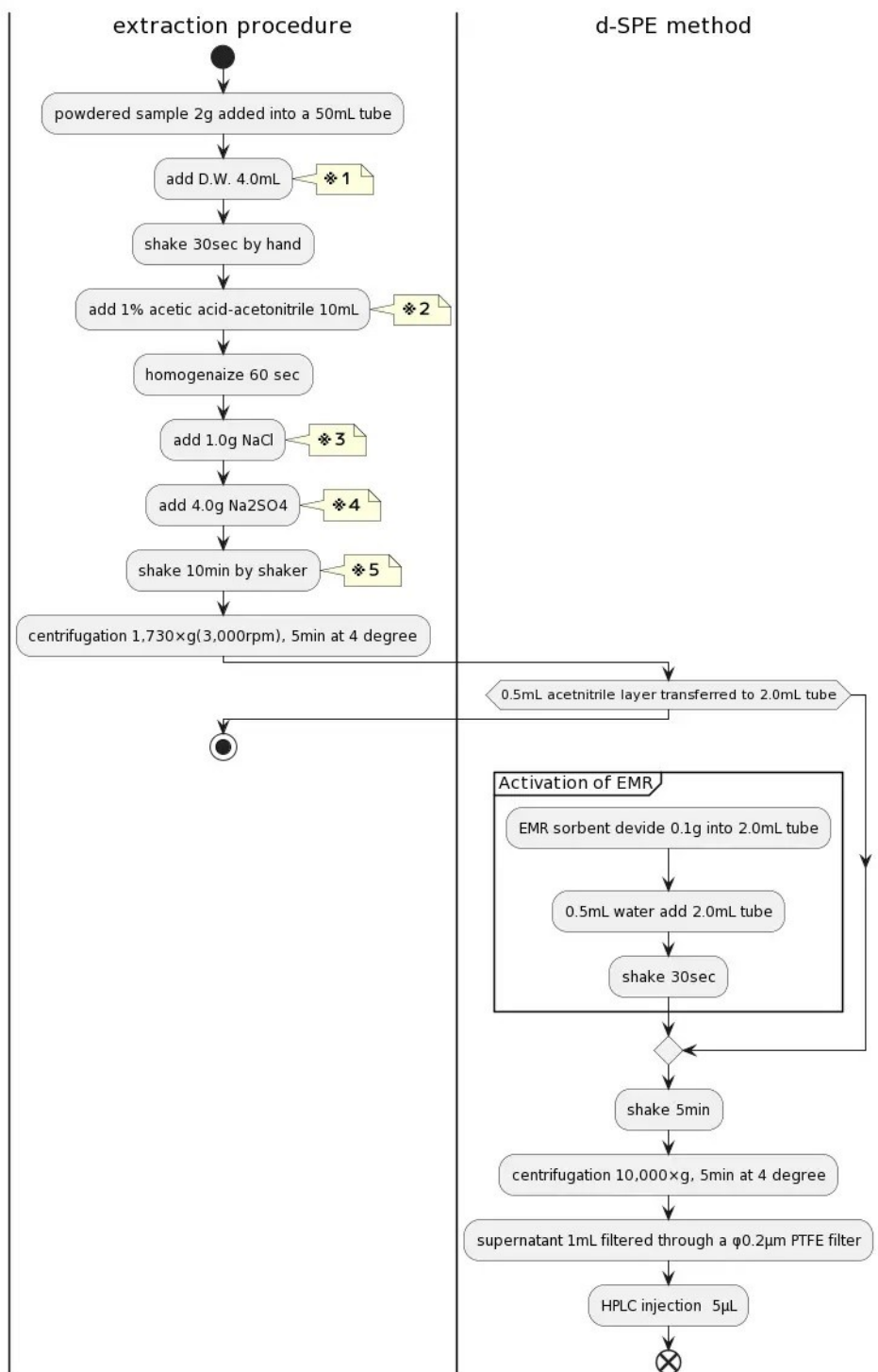


図1 抽出フロー図

```
#load conjoint package
library(conjoint)
#create list
Factors <- expand.grid(
  NaCl = c("0g","1g"),
  Na2SO4 = c("2g","5g"),
  H2O = c("0mL","4mL"),
  Shake = c("hand","10minByShaker"),
  ExtSolv = c("9mL","10mL","11mL")
)
#create orthogonal table
designort <- caFactorialDesign(data = Factors,type = "orthogonal")
#show orthogonal table
designort
#check of orthogonal table
cor(caEncodedDesign(designort))
#create dataframe for anova
recoveryratio <- c(87.81,100.28,82.66,97.22,63.55,89.37,60.45,45.53)
datFrame <- cbind(designort,recoveryratio)
#5way anova
result <- aov(recoveryratio~.,data=datFrame)
#show summary
summary(result)
#show graph
layout(matrix(1:5, ncol=5))
plot(datFrame$NaCl,datFrame$recoveryratio,ylab="recovery ratio",xlab="NaCl")
plot(datFrame$Na2SO4,datFrame$recoveryratio,ylab="",xlab="Na2SO4")
plot(datFrame$H2O,datFrame$recoveryratio,ylab="",xlab="H2O")
plot(datFrame$Shake,datFrame$recoveryratio,ylab="",xlab="Shake")
plot(datFrame$ExtSolv,datFrame$recoveryratio,ylab="",xlab="ExtSolv")
```

図2 解析に用いたRスクリプト

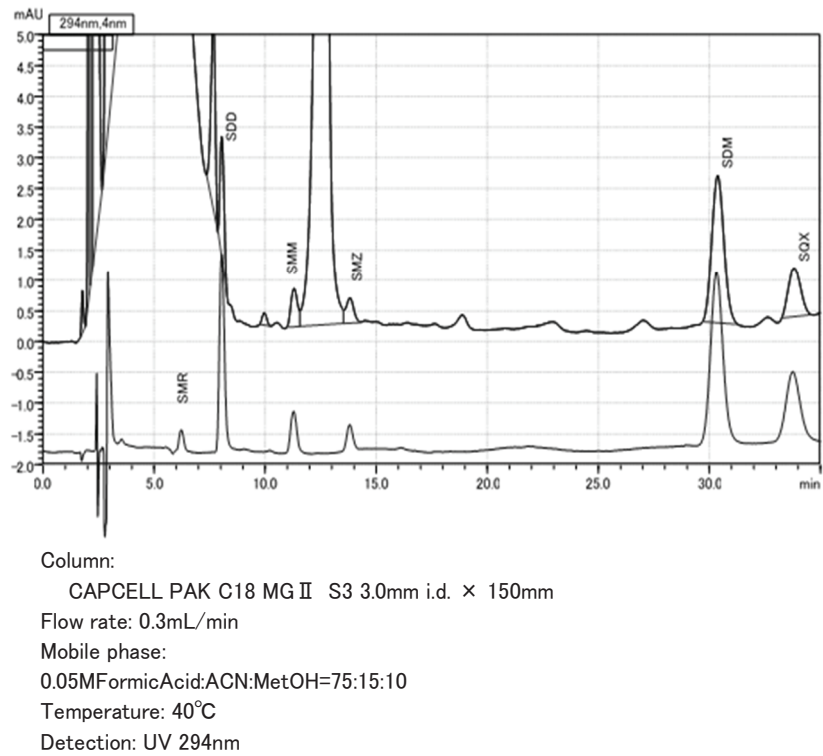


図3 試行No.1で得られたクロマトグラム(上)及び標準品6種のクロマトグラム(下)並びにHPLC条件