

要調査項目等調査マニュアル

(水質、底質、水生生物)

(案)

(精度管理に関する部分の抜粋)

平成 16 年 3 月

環境省環境管理局水環境部企画課

．分析精度管理

要調査項目等は、化学物質の環境リスク対策を系統的かつ効率的に進めるにあたって、水環境中での検出状況や複合影響等に関する知見を優先的に集積すべき物質（群）として選定されたものである。本調査マニュアルは、これらの物質を対象として既に開発され実績のある測定方法のうち、検証試験等によってその基本的性能が確認できたものを中心に提示している。実際の水質、底質および生物試料への適用に際しては、各試験機関において事前に分析能力の評価を行うとともに、試料採取から前処理、測定、報告に至る過程で適切な精度管理を実施し、測定値の信頼性の確保に努めなければならない。分析精度の管理は、1）標準作業手順（SOP：Standard Operating Procedure）、2）分析方法の妥当性、器具、装置の性能の評価と維持管理および3）測定値の信頼性の評価によって行われ、基本的な留意事項を以下に示す。個々の測定対象物質に応じた具体的な留意事項は各分析方法に従う。

1 標準作業手順（SOP）

試験機関においては以下の項目等について作業手順を設定しておく。この作業手順は具体的で分かり易いこと、および関係者に周知徹底することが重要である。

試料採取・運搬用器具等の準備、メンテナンス、保管および取扱い方法。

前処理用試薬類の準備、精製、保管および取扱い方法。

分析用試薬、標準物質等の準備、標準溶液の調製、保管および取扱い方法。

水質、底質および生物試料における前処理操作の手順。

分析装置の測定条件の設定、調整、操作手順。

分析方法全工程の記録（使用するコンピュータのハードおよびソフトを含む）。

2 分析方法の妥当性、器具、装置の性能の評価と維持管理

（1）試料採取と運搬、保管

具体的には、本調査マニュアルの「 ．試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従うが、試料採取に必要な器具類、材料および試薬等については、予め測定対象物質や

測定に妨害を及ぼす物質が検出されないことを確認する。これらの物質が検出される場合は、その原因を究明し、各分析方法の目標検出下限値に相当する量を越えないように対処する。また、常に同一の品質を維持するために、器具類、材料および試薬等の管理方法を規格化しておき、その規格について説明ができるようにしておく。

試料の採取に当たっては、調査の目的に対して適切な精度を保ち、かつ代表性のある試料を採取し、試料間相互の汚染（クロスコンタミネーション）に留意しながら、必要に応じて混合、固定化、異物除去等の処理を行う。

運搬と保管に際しては、外部からの汚染や分解、吸着等に留意し、試料品質の維持に努めなければならない。

（２）分析室内環境と器具・機材、試薬類

（ア）分析室内環境

測定対象物質によっては、野外環境よりも室内の濃度が高い場合があり、測定に重大な影響を及ぼす可能性がある。器具・機材の洗浄、乾燥、保管、試料調製、前処理、計測等を行う室内については、事前に空気中の対象物質濃度を実測することなどによって、室内環境の汚染が試料の測定に支障を及ぼさないことを確認しておく。支障があれば、その原因を追求し、回避する対策をとらなければならない。

（イ）器具・機材類

器具・機材類は、破損しがたいもので、測定を妨害する成分の溶出がなく、揮散、付着・吸着、分解等による損失がない、もしくはそれが洗浄等によって回避できる品質・形状のものを選択する。例えば、容器内壁に付着しやすい物質に対しては、有機溶媒や酸による洗浄で付着の回収が容易にできるよう、凹凸が少なく平滑な面を持つ品質・形状が望ましい。揮発性物質では蓋や接合部の気密性、光分解性物質では遮光性への配慮が不可欠である。また、洗浄後の保管にあっては、測定対象物質に応じた適切な管理を行う。

（ウ）試薬類

試薬類は、適切な品質・純度をもつものを準備し、後述の操作ブランク試験や添加回収試験を通じて、妨害成分の有無を確認する。共存する不純物、分解物、添加物等が測定を妨害する可能性は高いため、製造ロットや使用履歴を記録しておくとともに、保管中、と

りわけ開封後の品質の劣化に注意する必要がある。また、洗浄、蒸留、再結晶化などの精製を行う場合は、精製のたびに、その品質や純度を確認しなければならない。

(エ) 標準物質（溶液）

測定値は標準溶液の濃度に基づいて決定されるので、その信頼性の確保のために、可能な限りトレーサビリティの保証された標準物質、標準溶液を用いることが望ましい。入手できなければ、純度が98%以上の高純度分析用試薬や試薬特級等で代用する。これらの標準物質、標準溶液については、製造メーカ、ロット、供給元、調製方法と日時などの記録を適切に行う。標準溶液を保管する場合は、有効期限を明確にするとともに、使用前に濃度に変化がないことを確認する。

(オ) 内標準物質、サロゲート物質

内標準法に用いる添加用標準物質である。内標準物質は装置測定直前の試験液に添加して試料注入誤差や分析装置の変動を補正、サロゲート物質は試料採取または前処理段階の試料に添加して添加位置以降から測定に至る分析操作の変動を補正するために利用する。これらの標準物質の選定、添加の位置と量は、個々の分析方法に従うが、選定にあっては測定対象物質と区別できること、試料マトリックス中に存在しないこと、分析操作の過程で安定であり、可能な限り対象物質と似た挙動をとること、検出感度が高いことが条件となる。GC/MS、LC/MSを分析装置とする場合は、 ^2H または ^{13}C をラベルした安定同位体標識物質の利用が多い。しかし、未反応のまま残存する非標識体は、その量が多いと測定値に重大な影響を及ぼすことになるので、可能な限り純度の高い標準物質を用い、併せて製造メーカ、ロット、供給元、調製方法とその日時などの記録を適切に行い、調製した標準溶液の有効期限を明確にしておく。

(3) 試料調製と前処理

(ア) 試料調製

乾燥、混合、均一化、解剖等の試料調製にあたっては、クロスコンタミネーションに十分に注意するとともに、室内や器材に起因する外部からの汚染にも配慮しなければならない。

(イ) 前処理操作

抽出、精製、濃縮、誘導体化などの前処理は、操作に知識や熟練を要するため人為的な誤差の要因となり易い。本調査マニュアル「 . 分析法」章にある個別分析法の操作手順と留意事項を理解し、適切に操作しなければならない。各操作の適否は操作ブランク試験と添加回収率試験で確認する。

(4) 分析装置の調整

使用する分析装置は、SOP に従い、試料の測定が可能になるよう測定条件を設定し、調整する。この際、感度、直線性、安定性等に問題がないことを確認するほか、干渉の有無や大きさ、その補正機能等が正常に機能するかどうかを確認しておく。

3 測定の信頼性の評価

(1) 装置の変動

1日に1回以上、定期的に検量線の間程度濃度の標準溶液を測定して、測定対象物質または内標準物質の感度が検量線作成時に比べ大きく変動していないことを確認する。測定対象物質と内標準物質との強度比である相対感度でみると、検量線作成時に比較して $\pm 20\%$ の範囲を超えて変動する場合には、その原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。GC や LC を用いる分析装置において、分離カラムの劣化等によって保持時間が変動する場合には、必要に応じて対応をとればよいが、比較的短い期間の変動（通常、1日に保持時間が $\pm 5\%$ 以上、内標準物質との保持比が $\pm 2\%$ 以上）に対しては、その原因を取り除き、それ以前の試料の再測定を行う。分離カラムの劣化等によって長期にわたり徐々に保持時間が変動する場合には、必要に応じて対応をとればよい。

(2) 検量線（作成と直線性の確認）

検量線は通常5段階以上の濃度の標準溶液を分析し作成する。

内標準法による分析方法の場合、予め使用する分析装置固有の相対感度係数（RRF：Relative Response Factor）を求める。各検量線作成用標準溶液を3回以上繰り返して分析し、対象物質とそれに対応させる内標準物質（またはサロゲート物質）の濃度比と応答比（ピーク面積比など）の関係から、次式によりRRFを算出する。

$$RRF = (Cis/Cs) \times (As/Ais)$$

ここで、Cis：標準溶液中の内標準物質の濃度、Cs：標準溶液中の測定対象物質の濃度、As：標準溶液中の測定対象物質の応答値、Ais：標準溶液中の内標準物質の応答値である。

各検量線作成用標準溶液の分析で得られた RRF の平均値が、実試料分析時の検量線確認の基準となるが、RRF の平均値を指標にして相対標準偏差が 5% 以内の変動におさまるよう装置等の設定条件をあらかじめ検討する必要がある。また、検量線データから最小自乗法で一次回帰直線を求め、その傾きを基準の RRF とすることができるが、切片が限りなく 0（ゼロ）に近いことを確認する。なお、維持管理等による分析装置の動作状況の変化、あるいは新たな標準溶液の調製などがあった場合には、同様の標準溶液の繰り返し分析によって基準となる RRF を新たに算出しなければならない

実試料の分析開始時には、2～3 濃度の検量線作成用標準溶液を分析して RRF を求め、その値が基準の RRF に対して 20% 以内の変動であることを確認する。これを超えて変動する場合は、原因を取り除き、再度標準溶液を分析して RRF を確認する。

実試料の分析開始後は、想定される試験溶液中の濃度と同程度の標準溶液を定期的に測定し、RRF が 20% 以内の変動であることを確認する。GC/MS や LC/MS の利用にあっては、内標準物質との保持比の変化が $\pm 0.5\%$ 以内であることを確認する。

分析装置の基準となる RRF を算出しない場合は、実試料の分析の都度、併行して 5 段階以上の検量線作成用標準溶液を分析し、濃度比と応答比の関係から検量線を作成しなければならない。この検量線の作成は、一連の分析の開始、中間および終了時の実施することが望ましく、一次回帰直線の傾きの変動が 20% 以内であることを確認して、定量に用いる。

内標準物質またはサロゲート物質を用いない分析方法にあっては、実試料の分析の都度、上述と同様に標準溶液の分析を行い、対象物質の濃度と応答値の関係、すなわち絶対検量線法の検量線を作成する。作成頻度は、一連の試料分析に対して 3 回以上が望ましく、一次回帰直線の傾きの変動が 20% 以内であることを確認する。

(3) 操作ブランク試験

操作ブランク試験は空試験ともいい、試験液の調製または分析装置への導入操作等に起因する汚染を確認して、試料の分析に支障がない測定環境に設定し、分析値の信頼性を確保するために行う。試験の手順は各分析法に記載の通りであるが、試料マトリックスのみがない状態で調製した試験液について、測定対象成分が検出されるか否か、検出されれば

その濃度を、併せて他の妨害成分の有無を十分把握しておき、必要に応じてその値を提示できるようにしておく。

操作ブランク値が大きいと検出下限・定量下限が高なるばかりでなく、人為的な原因による異常値が出現する可能性が高くなり、分析値の信頼性が低下する。したがって、操作ブランク値は分析値に影響がないよう極力低減を図り、試料濃度への換算値が目標定量下限値以下になるよう管理する。試験頻度は、10 試料ごとに 1 回、または 1 日に 1 回（測定試料が 10 試料以下）が目安である。

（４）検出下限値および定量下限値

検出下限値および定量下限値は、装置と分析方法については繰り返し分析で得られる測定値の標準偏差に基づき算出し、試料測定時の検出下限値と定量下限値は実測時のシグナル/ノイズ比（S/N 比）から推定する。

（ア）装置の検出下限値（IDL：Instrument Detection Limit）および定量下限値（IQL：Instrument Quantification Limit）

分析に用いる測定装置が、分析方法に記載されている検出下限値や定量下限値を満足するか否かは、装置検出下限値（IDL）を算出することで判断する。

IDL は標準溶液の繰り返しによる分析値のバラツキに基づき算出する。検量線作成用標準溶液の最低濃度（定量下限値付近）、もしくはシグナル/ノイズ（S/N）比が 5～15 程度に相当する標準溶液を通常 7 回、可能であればそれ以上繰り返し測定し、得られた分析値から標準偏差（s）を求め、次式より装置検出下限値を求める。

$$IDL = 2 \times s \times t(n-1, 0.05)$$

ここで、IDL は装置検出下限値、 $t(n-1, 0.05)$ は危険率 5%、自由度 $n-1$ の t 値（片側）、s は標準偏差である（次項表参照）。

標準溶液の繰り返し分析の値は正規性を示していることが前提となるので、繰り返しの分析値の中にはずれ値など異常値と判定される値が得られた場合は、装置の再調整を行い、測定し直さなければならない。

試料採取量、最終試験液量、分析装置への導入量等から、IDL の試料換算濃度を求め、この値が各分析方法の目標検出下限値以下であることを確認する。もし、これを満足しなければ、装置の再調整等などによって原因を解消する。また、装置の感度が改善しない場

合は、試料の供試量を増やす、試料濃縮率を高めるなどによって、目標検出下限値の達成が可能か否かを検討する。

装置定量下限値 (IQL) は、IDL の算出に用いた標準偏差 s の 10 倍値とする。

$$IQL=10 \times s$$

(イ) 分析方法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit) および定量下限値 (MQL : Method Quantification Limit)

定量下限値付近の濃度をもつ試料を用いて、所定の操作により分析し、得られた分析値を試料濃度に換算する。この操作を 7 回以上繰り返して、その時の標準偏差から次式により分析方法の検出下限値を求める。

$$MDL = 2 \times s \times t(n-1, 0.05)$$

ここで、MDL は分析方法の検出下限値、 $t(n-1, 0.05)$ は次表に示す通り、危険率 5%、自由度 $n-1$ の t 値 (片側)、 s は標準偏差である。

表 Student の t 分布におけるパーセント点 (危険率 1%、片側)

繰り返し回数(n)	自由度(n-1)	$t(0.01, n-1)$ 、片側
7 回	6	1.943
8 回	7	1.895
9 回	8	1.860
10 回	9	1.833

ここで求めた MDL が各分析方法の目標検出下限値を満足していることを確認する。満足できない場合は、分析装置の再調整を行う。また、試料量を増やしたり、測定用試料液をより濃縮することなどで対応してもよいが、その手順を記録しておく。

MDL は、使用する分析装置やその操作条件により異なるため、これらに変更があった時など必要に応じて、MDL を求め、目標検出下限値を満足していることを確認する。

また、試料中の含有濃度が高すぎたり、低すぎる場合は適切な MDL が算出できないので、試料の選定や試料調製は以下に従う。

MDL 算出用試料の選定

MDL の算出に用いる試料は可能な限り対象物質や妨害物質を含まないものから選定する。含有量が不明の場合は、実試料と同量の試料を供試して、所定の前処理、試験液の調

製を行い、実測で確認する。操作ブランク値も含め、含有濃度が目標検出下限値の5倍以内であり、妨害物質も不検出であれば、MDL算出用の試料とすることができる。

試料の調製

操作ブランク試験およびMDL算出用試料の分析結果に応じ、次のいずれかで試料を調製する。

- ・ 操作ブランク試験およびMDL算出用試料の分析の結果、対象物質が検出されない（目標検出下限値以下）場合

選定した試料に対象物質を目標検出下限値の5倍程度の濃度となるよう添加し、必要に応じて所定量のサロゲート物質を添加して、十分に混合し均一化させ、所定の前処理、試験液の調製を行い、分析値を求める。MDLの算出は7回以上の繰り返し分析の結果が根拠となるので、調製試料の均一性が重要となり、一連の繰り返し分析に供試できる充分量を、一時期に調製することが望ましい。

- ・ 操作ブランク試験またはMDL算出用試料に対象物質が検出され、その濃度が目標検出下限値の5倍を超えない場合

選定した試料に対象物質を添加するが、添加後の分析値が目標検出下限値の5倍程度の濃度となるよう添加量を調整する。添加後は上記の通りとする。但し、対象物質の添加により人為的なバイアスが生じる可能性が高いと判断される場合には、対象物質の添加は行わず、選定した試料をそのまま繰り返し分析に供してもよい。

なお、操作ブランク試験などにおいて対象物質が検出され、その濃度が目標検出下限値の5倍を超える場合は、MDLの算出は行わず、溶媒、試薬、器具類の見直し等により、その原因を取り除く。

調製試料の分析

調製試料は所定の方法で抽出から前処理、試料液調製、測定に至る全操作を行い、分析

値を求める。1 回の分析に供試する調製試料の量は実試料と同じとし、繰り返しは最低 7 回行い、MDL 算出の基礎データとする。

分析方法の定量下限値 (MQL) は MDL の算出に用いた標準偏差 s の 10 倍値とする。

$$MDL=10 \times s$$

この MDL、MQL は、前処理や測定条件によって変動するため、ある一定の周期で確認し、常に MQL が目標定量下限以下であるよう管理しなければならない。また、試料濃縮率を考慮した MDL、MQL は、試料量、前処理操作 (濃縮比) により異なるため、試料ごとに算出する必要がある。

分析方法以外の、例えばリスク情報を根拠として目標定量下限が設定されている場合など、目標検出下現値よりもはるかに低いレベルの検出が可能な方法においては、目標定量下限値に関係なく、分析方法がもつ感度性能を最大限発揮して低濃度域まで測定することによって、将来的な濃度変化の解析に役立つ。

(ウ) 試料測定時の検出下限値 (PDL : Practice Detection Limit) および定量下限値 (PQL : Practice Quantification Limit)

実試料の分析において、MDL 未満でピークが認識される場合は、そのクロマトグラム上 (クロマトグラフィー法以外では、実試料を連続して測定する間のベースラインの変動) の S/N 比から試料測定時の検出下限値 (PDL) と定量下限値 (PQL) を推定する。PDL は S/N=3 程度のピーク、PQL は S/N=10 程度のピークの面積を概算して、それぞれを濃度の算出式に代入して求める。

ピークが検出されない場合は、ピーク近傍 (ピークの半値幅の 10 倍程度の範囲) のベースラインのノイズを計測し、その標準偏差の 2 倍をノイズ幅 (N) とする。経験的には、計測範囲のノイズの最大値と最小値の幅は標準偏差の約 5 倍となるので、最大値と最小値の差の 2/5 を N としてもよい。次いで、ノイズの中央値をベースラインとし、N の 3 倍の高さ (S) のピークを想定し、標準液から得られる該当ピークの半値幅をあてて、そのピーク面積を概算し、濃度の算出式に代入して PDL を求める。一方、PQL は S/N=10 のピークを想定して、PDL と同様に求める。

PDL と PQL はそれぞれ MDL、MQL 未満になるよう管理しなければならない。この確保

ができない場合は、前処理操作、測定方法等に問題があったか否かを確認し、必要に応じ再分析や再測定を行う。また、MDLの算出に用いた試料の性状、あるいは分析法が対象とする試料の性状が実試料のそれと大きく異なっている可能性もあるので、実試料に近い性状をもつ試料でのMDLの再測定や他の分析法の採用も考慮する。

(5) 添加回収率試験

基本的には、試験液中の濃度が定量下限値の10倍程度となるよう測定対象の標準物質及び必要に応じ所定量のサロゲート物質を試料に添加して、分析方法と同じ前処理、試料液の調製、測定を行い、添加量と分析値から回収率を算出する。ここで、操作ブランク値が大きかったり、試料中に対象物質が含まれる場合は、その濃度が回収率の測定に影響しない程度に標準物質の添加量を増やして試験する。回収率の許容範囲の目安は70～120%であり、同位体希釈法ではサロゲート物質の回収率は50～120%の範囲を目標とする。

回収率が許容できる範囲を大きく逸脱する場合は、その原因を究明した後、試料の再採取または粗抽出液から測定をやり直す。

回収率の測定は実試料の測定に先だてて行う。また、用いる器具・試薬類の製造メーカーあるいはロットの変更が回収率に影響する可能性がある時には、添加回収率試験を行い回収率を確認する必要がある。

(6) 二重測定

試料採取、前処理操作および装置分析における総合的な信頼性を確保するために、同一条件で採取した2つ以上の試料について同様に分析する。頻度は10試料ごとに1回が目安であり、定量下限値以上の濃度の被検物質に対して2つ以上の測定値の差が平均値に比べて30%以下であることを確認する。測定値の差が大きい場合は、その原因を精査して取り除き、再測定する。

(7) トラベルブランク試験

トラベルブランク試験は、試料採取準備時から試料測定時までの汚染の有無を確認するためのものであり、採取操作以外は試料と全く同様に扱い持ち運んだものを測定し、トラベルブランク値とする。移送中に汚染が考えられる場合には、一連の試料採取において試料数の10%程度の頻度で、少なくとも3試料以上行う。

但し、トラベルブランク値を毎回行わなくてもよいが、試料採取における信頼性を確保するため、前もってトラベルブランク値について十分検討しておき、必要に応じてそのデータが提示できるように管理しておく。

4 データの管理及び評価

(1) 異常値、欠測値の取扱い

操作ブランク値が大きい、二重測定の結果が大きく異なる、トラベルブランク値が大きいなど、精度管理上の基準を満たさない場合は、測定値の信頼性に問題があると考えられるため、欠測扱いとして再測定を行う。再測定には、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、試料の採取時期が異なることから解析上の支障も生じ、調査全体の評価に影響することになる。したがって、事前のチェックを十分に行い、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出現した経緯を十分に検討し、記録に残して、以後の再発防止に役立てることが重要である。

(2) 測定操作の記録

試料採取・運搬から試料調製、抽出、測定に至る過程の操作に関し、以下のデータを記録し、整理・保管しておき、報告要請があれば提出できる準備をしておく。

試料採取、保管、運搬の方法

- ・装置や器具の特定、調整および操作の状況
- ・採取対象の条件及び状況（採取方法、採取地点、採取日時など）
- ・気象条件
- ・容器等の取扱い及び保管の状況
- ・運搬の方法

試料に関する付加情報

- ・水質：pH、有機物濃度、懸濁物質質量など
- ・底質：外観、臭気、夾雑物、水分含量、強熱減量など
- ・生物：種、生物計測データ、生育段階、脂質含量など

試料調整の条件と方法

- ・水質：ろ過の有無とその方法など

- ・底質：間隙水除去とその方法、乾燥の有無とその方法など
- ・生物：試料採取部位とその方法など

試料の前処理法

- ・変更、改良、改善点とその検証結果
- ・その他特記事項

前処理・分析装置の操作条件と校正記録

- ・製造メーカー、製品番号、動作状況など
- ・維持管理記録

測定値を得るまでの各種の数値

- ・試料供給量、抽出液量、濃縮率など
- ・各装置の設定条件など

5 精度管理に関する報告

精度管理に関する以下の情報を記録し、データと共に報告する。

試料採取と運搬、保管の履歴

分析操作の記録（前処理・分析に関する記録）

装置の検出下限値および定量下限値

分析方法の検出下限値および定量下限値

試料測定時における検出下限値および定量下限値

操作ブランク試験結果

添加回収試験結果

二重測定結果

トラベルブランク試験結果

SOP に規定されていること

- ・ 分析装置の種類と測定条件
- ・ 日常的点検、調整（装置の校正等）の記録
- ・ 標準物質・標準溶液等の履歴・調整・保管方法
- ・ 分析装置の感度変動の記録