

試験法の妥当性評価手法について

1

分析法バリデーションの必要性

CAC/GL27 (1997)

*Codex Guidelines for the Assessment of the
Competence of Testing Laboratories Involved in the
Import and the Export of Food*

ISO/IEC Guide25を遵守している

技能試験に参加する

バリデートされた方法を使用している

内部精度管理を実施している

2

JIS Q17025 **ISO/IEC 17025 (2005)**

試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項

General requirements for the competence of testing
and calibration laboratories (2005)

5 技術的要求事項

5.4 試験・構成の方法及び方法の妥当性確認

5.4.5 方法の妥当性確認

5.4.6 測定の不確かさの推定

3

分析法の性能パラメータ

真度

選択性

検出限界

定量限界

直線性

範囲

頑健性

精度

併行精度

室内再現精度

室間再現精度

4

真度と精度

真度 (=バイアス, 回収率)

分析結果の平均値と真値の差(比)

誤差:1つの分析結果と真値の差

精度

1つ1つの分析値が一致する程度

5

精度の種類

併行精度 repeatability

試験者、試験日、試薬、機器が全て同じ

室内精度

色々なレベルの精度

intermediate reproducibility

室間再現精度 reproducibility

試験者、試験日、試薬、機器が全て異なる

6

In-house validation

- ・ 正式なcollaborative trialの前に正当性を保証する.
- ・ すでにバリデートされた方法が正しく実施されていることを保証する.
- ・ collaborative studyの実施が困難な場合に, 分析法の信頼性の証拠を示す.

7

食品中に残留する農薬等に関する 試験法の妥当性評価ガイドライン

8

ガイドライン設定の目的

- ・試験室が農薬の試験法を採用する際に行う
single-laboratory validation方法の標準化
- ・試験法採用基準の設定
基準を満たすための試験方法の修正
- ・測定値の不確かさ推定方法の標準化

9

ガイドラインで想定した分析目的

食品中の残留農薬レベルが基準値に適合しているかどうかを正しく判定すること。

スクリーニング、モニタリングは目的としていない

10

2. 本ガイドラインの対象

通知で示している試験方法以外の方法によって試験を実施するために、通知の別添の第1章の5.の(1)に基づき、各試験機関において開発した試験法とする。

＝同等以上の方法

11

評価するパラメータ

選択性

真度(回収率)

室内精度

定量限界

12

4. 評価の方法

食品毎に、妥当性を評価する試験法の分析対象である農薬等を添加し、測定結果から評価パラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

認証標準物質を分析し、回収率を求める。

認証標準物質、金属を含有する試料、添加試料を分析し、精度を求める。

13

真度と精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70 ~ 120	30 >	35 >
$0.001 < \sim \leq 0.01$	5	70 ~ 120	25 >	30 >
$0.01 < \sim \leq 0.1$	5	70 ~ 120	15 >	20 >
$0.1 <$	5	70 ~ 120	10 >	15 >

14

真度と精度の目標値

濃度 (mg/kg)	試行回数 (回)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01 < ~ ≤ 0.1	5	80 ~ 120	15 >	20 >
0.1 < ~ ≤ 1	5	80 ~ 110	10 >	15 >
1 < ~ ≤ 10	5	80 ~ 110	10 >	15 >
10 < ~ ≤ 100	5	90 ~ 110	10 >	15 >
100 <	5	90 ~ 110	10 >	15 >

15

単一試験室でバリデートした分析法選択のための
一般基準

(Codex procedural manual)

- i. 国際的に認められたプロトコルに従っている
- ii. ISO/IEC 17025に適合した品質システム下で行われるべきである
- iii. 精確さに関する情報を補完する
技能試験への参加, CRMの使用
回収率の確認
他のバリデートされた方法との比較

16

食安発第 1 1 1 5 0 0 1 号

平成 1 9 年 1 1 月 1 5 日

各
〔 都道府県知事
保健所設置市長
特別区長 〕 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（以下「農薬等」という。）に関する試験法については、食品、添加物等の規格基準（昭和 3 4 年厚生省告示第 3 7 0 号）及び「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成 1 7 年 1 月 2 4 日付け食安発第 0 1 2 4 0 0 1 号。以下「通知」という。）により定めているところである。

このうち、通知で試験法を定めている農薬等について、通知で定める試験法（以下「通知試験法」という。）以外の方法によって試験を実施しようとする場合には、通知試験法と比較して真度、精度及び定量限界において、同等又はそれ以上の性能を有するとともに、特異性を有すると認められる方法（以下「同等な試験法」という。）によって実施するものとしている（通知の別添の第 1 章の 5. の（1））ところであるが、今般、通知試験法以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインを別添のとおり策定した。

については、今後、各試験機関において、通知試験法以外の試験法で試験を実施しようとする場合に、その試験法について、本ガイドラインのそれぞれの基準に適合していることが確認されれば、通知で定める同等な試験法とみなすこととするのでご了承ください。

また、本ガイドラインの内容につき、関係者への周知方よろしく願います。

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン

1 趣旨

本ガイドラインは、食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（以下「農薬等」という。）に関する試験法について、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号。以下「通知」という。）において定める試験法以外の方法によって試験を実施する場合に、各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順を示すものである。

なお、本ガイドラインは、機器分析法を対象とする。

注：ここに示す手順は、試験法の妥当性を評価する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできる。

2 本ガイドラインの対象

通知で示している試験方法以外の方法によって試験を実施するために、通知の別添の第1章の5.の(1)に基づき、各試験機関において開発した試験法とする。

ただし、抗生物質又は化学合成品（化学的手段により元素又は化合物に分解反応以外の化学的反応を起こさせて得られた物質をいう。）たる抗菌性物質に関する試験法については、個別に残留基準値を設定している食品に関するものに限る。

3 用語の定義

本ガイドラインにおいて、用語の定義は次のとおりとする。

- (1)「選択性」とは、試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象物を正確に測定する能力をいう。
- (2)「真度(回収率)」とは、十分多数の試験結果から得た平均値と承認された標準値（添加濃度）との一致の程度をいう。
- (3)「精度」とは、指定された条件下で繰り返された独立した試験結果間の一致の程度をいう。
- (4)「併行精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用いて、同一の試験室で、同一の実施者が同一の装置を用いて、短時間のうちに独立した試験結果を得る条件（併行条件）による測定結果の精度をいう。
- (5)「室内精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用い、同一の試験室で、独立した試験結果を得る条件(室内条件)による測定結

果の精度をいう。

(6) 「定量限界」とは、適切な精確さをもって定量できる分析対象物の最低量又は濃度をいう。本ガイドラインでは、原則として通知に示された定量限界を用いる。

(7) 「枝分かれ実験計画」とは、ある因子の全ての水準が、他の全ての因子の一つの水準だけに現れる実験の計画をいう。

4 評価の方法

食品毎に、妥当性を評価する試験法の分析対象である農薬等を添加し、測定結果から以下のパラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

(1) 選択性

分析対象である農薬等を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、

- ① 定量限界が基準値の1/3以下の場合は、そのピークの面積（又は高さ）が、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の1/10未満、
- ② 定量限界が基準値の1/3を超える場合は、定量限界濃度に相当するピーク面積（又は高さ）の1/3未満であることを確認する（表1参照）。

表1 定量限界及び基準値の比と妨害ピークの許容範囲

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 ≤ 基準値の1/3	< 基準値ピークの1/10
定量限界 > 基準値の1/3	< 定量限界ピークの1/3

(2) 真度（回収率）

同一濃度の分析対象である農薬等を添加した試料（以下「添加試料」という。）5個以上を試験法に従って 定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比を求める^(注1)。

真度（回収率）の目標値は表2のとおりとする。

注1) サロゲート（回収率の変動の補正を目的として、分析試料に添加する安定同位体標識標準品）を使用した場合には、サロゲートの回収率が40%以上であることを確

認する。

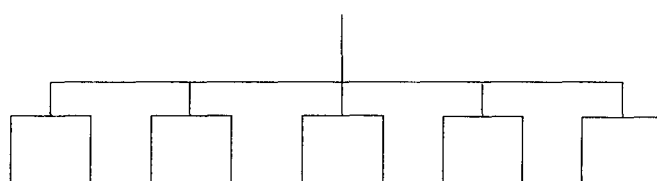
(3) 精度

添加試料の分析をくり返し、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の分析者又は分析日による室内精度を評価する。試行の回数は5回以上とする。この場合、室内精度評価のための枝分かれ実験^{注2)}により、併行精度と室内精度を同時に評価することが可能である。また、内部精度管理データを用いて評価することも可能である。

併行精度及び室内精度の目標値は表2のとおりとする。

注2) 室内精度評価のための枝分かれ実験の例

(例1) 分析者1名が、同一の添加試料を1日2回、5日間分析する枝分かれ実験計画



(例2) 分析者2名が、それぞれ添加試料を1日2回、3日間分析する枝分かれ実験計画

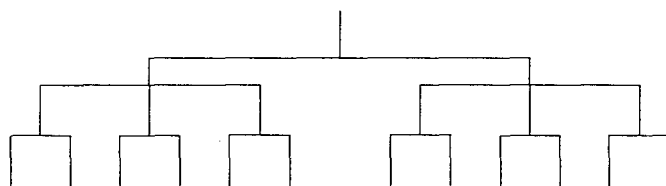


表2 各濃度毎の真度 (回収率) 及び精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70 ~ 120	30 >	35 >
$0.001 < \sim \leq 0.01$	5	70 ~ 120	25 >	30 >
$0.01 < \sim \leq 0.1$	5	70 ~ 120	15 >	20 >
$0.1 <$	5	70 ~ 120	10 >	15 >

(4) 定量限界

基準値が定量限界と一致している場合には、以下の条件を満足していることを確認する。

- ① 定量限界濃度を添加したブランク試料を分析したとき、表2の真度（回収率）及び精度（併行及び室内）の目標値を満足していること。
- ② クロマトグラフィーによる分析では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークが、 $S/N \geq 10$ であること。

5 添加を行う食品の種類及び添加濃度

(1) 添加を行う食品の種類

添加を行う食品は、原則試験法を適用しようとする食品から選択する。一律基準を考慮した場合には、全ての食品が対象となるが、全ての食品について評価するのは現実的に困難であるので、代表的な食品を選択する。具体的には、成分としての特性及び抽出法の違いを考慮して、それぞれの目的に応じて、原則として、下記に示すものを選択する。

① 農産物

- ・穀類（玄米等）
- ・豆類（大豆等）
- ・種実類
- ・野菜（ほうれんそう等の葉緑素を多く含むもの、キャベツ等のイオウ化合物を含むもの及びばれいしょ等のデンプンを多く含むもの）
- ・果実（オレンジ、りんご等）
- ・茶
- ・ホップ
- ・スパイス等

② 畜水産物

- ・牛、豚、鶏等の筋肉
- ・牛、豚、鶏等の脂肪
- ・牛、豚、鶏等の肝臓
- ・牛、豚、鶏等の腎臓
- ・鶏卵
- ・牛乳
- ・はちみつ等の養蜂製品
- ・魚介類（うなぎ等の脂肪を多く含むもの）等

(2) 添加濃度に関する留意事項（表3参照）

- ① 農薬等の添加濃度は原則として2種類の濃度とし、一方を「基準値又は基準値の1/2の濃度」とし、他方を「一律基準濃度又は定量限界濃度（又はその2倍）」とする。基準値と定量限界が等しい場合には、添加濃度は「定量限界濃度」の1種類の濃度とする。

② 2種類の濃度における評価が困難な場合は、「基準値又は基準値の1/2の濃度」による評価を優先して実施する。

ただし、通知の別添第2章に掲げる一斉法において、各農薬等の基準値が異なるために基準値濃度の添加が困難な場合にあつては、「各農薬等の基準値に近い一定の濃度」としてもよい。

表3 定量限界及び基準値の関係比と添加濃度

定量限界と基準値の関係	添 加 濃 度
定量限界<基準値	「基準値又は基準値の1/2の濃度」及び「定量限界濃度(又はその2倍)又は一律基準濃度」
定量限界=基準値	定量限界

(3) 添加試料の作成等に当たつての留意事項

① 添加試料の作成に当たつては新鮮な食品を使用し、均一化して秤量した後に農薬等を添加する。添加する農薬等の標準溶液の量はできるだけ少量にとどめ1～2mL程度とする。溶媒は試料と混合する溶媒を用いる。農薬等の添加後よく混合し、30分程度放置した後に抽出操作を行う。

ただし、飼料添加物及び動物用医薬品にあつては、特に指定のない限り、添加後直ちに抽出操作を行うこと。

② 枝分かれ実験等、数日間にわたり試験を行う場合にあつては、均一化した試料を冷凍保存し、凍結及び融解を繰り返すことを避け、試験を実施する日毎に添加試料を作成すること。

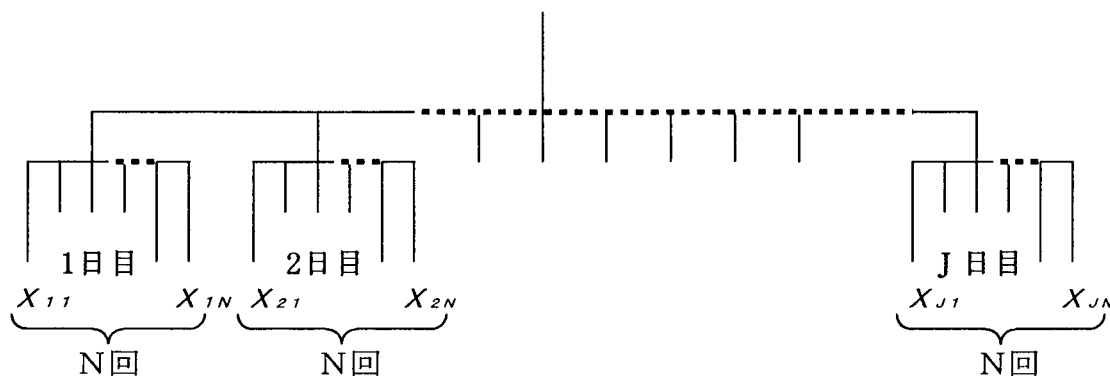
(別紙)

枝分かれ実験の解析方法 (参考)

1 一般的な解析方法の考え方

(1) 分析者 1 名が、同一ロットの食品から作成した添加試料を 1 日 N 回、J 日間分析する実験計画の場合、枝分かれ実験計画は下記のとおりとなる。

<枝分かれ実験計画>



(2) 一日当たりの試験回数、実験計画日数及び実験計画に従って分析を行い得られた分析値を用いて、一元配置の分散分析による解析を行い、試験法の評価に必要な併行精度及び室内精度を算出する。

<各測定値>

	1 日	2 日	J 日
1 回目	X_{11}	X_{21}	X_{J1}
2 回目	X_{12}	X_{22}	X_{J2}
3 回目	X_{13}	X_{23}	X_{J3}
⋮	⋮	⋮		⋮
N 回目	X_{1N}	X_{2N}	X_{JN}

<一元配置の分散分析表>

変動要因	平方和	自由度	分散の期待値
日 間	S_{RW}	$J - 1$	V_{RW}
併 行	S_r	$J(N - 1)$	V_r
合 計	S_T	$JN - 1$	

注) 一元配置の分散分析は、市販の統計ソフトや表作成ソフトのツールを用いて、容易に行える。この場合、使用するソフトによって、分散分析表の各用語がこの例示と異なる場合があるので留意すること。

(平方和→変動、日間→グループ間、併行→グループ内 等)

各日における母平均の標準偏差を σ_d 、併行標準偏差を σ_r とすると、併行精度及び室内精度は、次のとおり。

併行精度 : σ_r (併行標準偏差)

室内精度 : $\sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2}$

また、分散分析の結果から求められる分散の期待値と σ_d 及び σ_r の間には次の関係がある。

$$\cdot V_{RW} = \sigma_r^2 + N \sigma_d^2$$

$$\cdot V_r = \sigma_r^2$$

$$\left(\begin{array}{l} \sigma_d^2 : \text{各日における母平均の分散} \\ \sigma_r^2 : \text{併行分散} \\ N : \text{一日当たりの試験回数} \end{array} \right)$$

従って

$$\cdot \sigma_r = \sqrt{V_r}$$

$$\cdot \sigma_d = \sqrt{(V_{RW} - \sigma_r^2) / N}$$

これらから、併行精度及び室内精度が求められる。

さらに、データの総平均を求め、それぞれの精度のRSD%を算出する。

$$\text{併行又は室内精度 (RSD\%)} = \text{併行又は室内精度} / \text{データの総平均} \times 100$$

(3) 判定

上記により求められた併行精度、室内精度のRSD%及び分析値をガイドラインの「表2 各濃度毎の真度(回収率)及び精度の目標値」に照らし、それぞれが目標値に適合しているか否かを確認する。

(4) その他

- ① 内部精度管理で2回分析を行ったデータも同様に計算することが可能である。
- ② 分析者2名が、それぞれ添加試料を1日2回、3日間分析する枝分かれ実験計画(3(3)注2)の例2)において、試験者と試験日の効果をそれぞれについて判定する必要がない場合には、上記と同様に一元配置の分散分析により解析することが可能である。

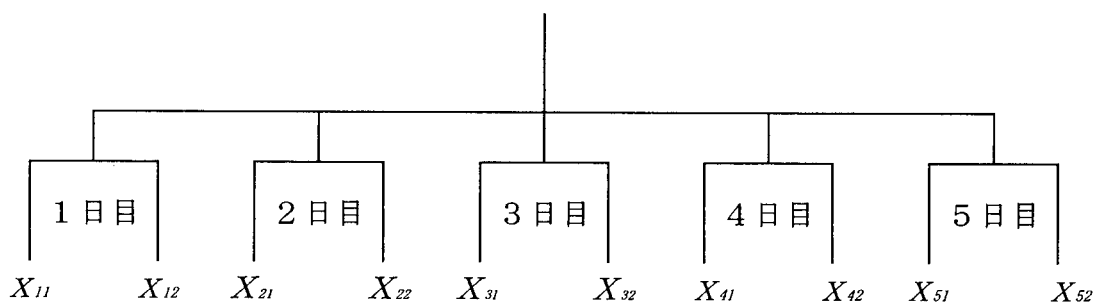
この場合、上記参考例のJは測定者数(2名)と日間(3日間)の組合せの数($2 \times 3 = 6$)、Nは1日当たりの試験回数(2)となる。

2 具体的な解析事例

(例題)

分析者1名が、同一ロットの食品から作成した添加試料を1日2回、5日間分析する枝分かれ実験計画を実施した場合

<枝分かれ実験計画>



<各測定値>

	1日	2日	3日	4日	5日
1回目	0.0485	0.0512	0.0559	0.0391	0.0468
2回目	0.0436	0.0564	0.0587	0.0385	0.0446

(解析)

- (1) 一元配置の分散分析を実施し、評価に必要なパラメータ(日間標準偏差及び併行標準偏差)を算出する。

<分散分析表>

変動要因	平方和	自由度	分散の期待値
日 間	0.000426636	4	0.000106659
併 行	0.000032045	5	0.000006409
合 計	0.000458681	9	

各日における母平均の標準偏差を σ_d 、併行標準偏差を σ_r とすると、

$$\begin{aligned} \cdot \sigma_r^2 &= V_r = 0.000006409 & \therefore \sigma_r &= 0.00253 \\ \cdot \sigma_d^2 &= (V_{RW} - \sigma_r^2) / N = (0.000106659 - 0.000006409) / 2 \\ &= 0.000050125 \\ \therefore \sigma_d &= 0.00708 \end{aligned}$$

従って

$$\begin{aligned} \cdot \text{併行精度} &: \sigma_r = 0.00253 \\ \cdot \text{室内精度} &: \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} = \sqrt{0.00253^2 + 0.00708^2} = 0.00752 \end{aligned}$$

データの総平均は 0.0483 なので、それぞれの精度のRSD%は、

$$\begin{aligned} \cdot \text{併行精度 (RSD\%)} &= 0.00253 / 0.0483 \times 100 = 5.2 \% \\ \cdot \text{室内精度 (RSD\%)} &= 0.00752 / 0.0483 \times 100 = 15.6 \% \end{aligned}$$

(2) 判定

各分析値は、 $0.01 < \sim \leq 0.1$ の範囲にあるので、併行精度(RSD%)は $15 >$ 、室内精度(RSD%)は $20 >$ の範囲にならない。

上記の結果から、併行精度、室内精度ともにこの目標値に適合しているので、今回、導入しようとする試験法は妥当なものとして評価される。

食品中の金属試験法評価ガイドライン（案）

1. 食品中に存在する金属の濃度が成分規格に適合しているか否かを、試験結果に基づいて合理的に判定するためには、用いた試験法の妥当性が評価されていなければならない。本ガイドラインは、食品中に残留する金属の通知試験法および独自に開発した分析法を試験室が導入する際に、その妥当性を評価するための手順を示す。

なお、本ガイドラインは機器分析法を対象とし、また、基準値が定められているものに適用する（基準が「検出するものであってはならない」の場合は除く）。

2. 試験法について以下のパラメータを求め、それぞれの基準に適合していることを確認する。

○選択性

試料についてマトリクス中の他金属による定量の妨害がないことを確認する。

妨害となる信号が認められる場合は、対象金属の信号の1/10未満であることを確認する。

○真度

濃度およびマトリクスが適切な認証標準物質を分析し、得られた分析値と認証値の比から回収率を求める。あるいは、分析対象とする金属を添加していない試料（空白試料）および空白試料に既知の量を添加した試料（添加試料）をそれぞれ5個以上、試験法に従って定量し、得られた定量値の平均値の差の添加量に対する比（回収率）を求める。

真度（回収率）の目標値は、表のとおりとする。

○精度

分析対象金属濃度は基準値濃度の1/10～2倍の範囲の濃度とする。認証標準物質、分析対象とする金属を含有する食品試料、あるいは添加試料について、分析をくり返し、定量値の標準偏差および相対標準偏差を求め、併行精度および複数の分析者または分析日による室内精度を評価する。食品試料を用いる場合には、あらかじめ十分に均一化する。試行の回数は5回以上とする。枝分かれ実験⁽¹⁾によれば、併行精度と室内精度を同時に評価することができる。

併行精度および室内精度の目標値は表のとおりとする。

真度（回収率）および精度の目標値

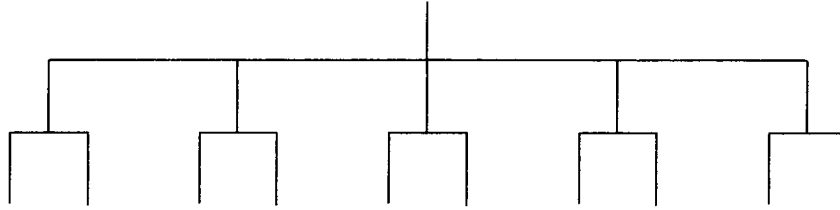
濃度 (mg/kg)	試行回数 (回)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01 < ~ ≤ 0.1	5	80 ~ 120	15 >	20 >
0.1 < ~ ≤ 1	5	80 ~ 110	10 >	15 >
1 < ~ ≤ 10	5	80 ~ 110	10 >	15 >
10 < ~ ≤ 100	5	90 ~ 110	10 >	15 >
100 <	5	90 ~ 110	10 >	15 >

添加試料作成方法

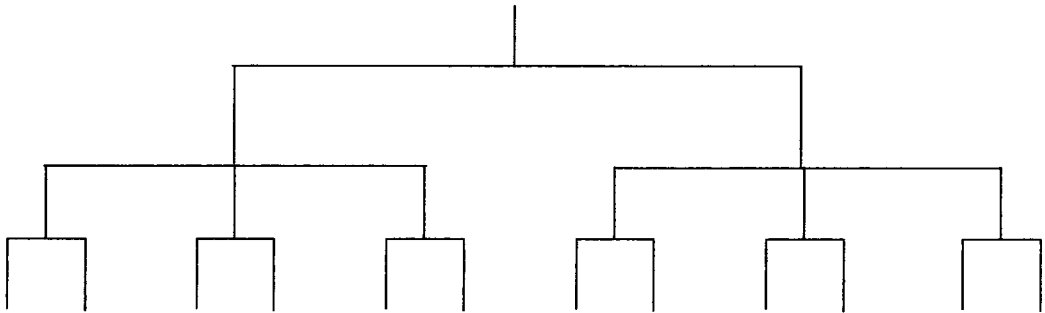
分析対象金属濃度が基準値の 1/2 以下であることを確認した試料をブランク試料とし、基準値の 1/2 レベルの金属を添加する。

注 1) 室内精度評価のための枝分かれ実験

例 1 分析者 1 名が試料各 2 個を 5 日間分析する実験計画



例 2 分析者 2 名がそれぞれ試料 2 個を 3 日間分析する実験計画



枝分かれ実験結果の解析方法は、JIS 8402-3 測定方法および測定結果の精確さ（真度および精度）—第3部：標準測定方法の中間精度 に記述されている。

具体的な解析方法は、食品中の農薬等の試験法評価ガイドライン（平成19年11月15日通知，食安発第1115001号）中の参考に示されている。