

SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT

Number 72

SERIES ON PESTICIDES

農薬のシリーズ

Number 39

GUIDANCE DOCUMENT ON PESTICIDE RESIDUE ANALYTICAL METHODS

農薬残留分析法に関する指針書

本和訳は、暫定和訳です。

2～14ページは省略

目次

内容は省略

緒言

1. 本文書の主な目的は、残留分析法に関する指針を提示することである。分析法は、食事暴露評価を推定するためのデータを得ること、最大残留基準値（MRLs）を設定すること、また、加工変換係数を決定することを目的として用いられる。設定される可能性のあるあらゆる法定MRLsの施行においても分析法を使用する。食用作物／家畜とそれに続く農産物と加工食品の製品に使用される全ての農薬に対して、また、処理した作物を消費する可能性のある動物が原料の製品（例えば、肉、乳、卵）に対して分析法を適用する。加えて、分析法は保存安定性試験を実施するために必要である。
2. 申請者が施行目的のために単一残留分析法を提案する場合、本文書は独立した試験施設によるバリデーションの要求事項を含む分析法バリデーション判定基準に関するガイダンスを提示する。一般に、登録前の方法に関する品質判定基準と単一残留分析法の登録後の分析法に関する品質判定基準は非常に類似している。単一残留分析法の登録後の分析法に特有な局面をパラグラフ48と49で強調している。フルバリデーションは、代表的な商品に対する保証であり、その一方で減少させたバリデーションデータセットとして役立つ可能性のある添加実験は、管理圃場試験内で実施される。ある分析法を使用するごとに分析法のフルバリデーションを実施する必要はない。
3. 分析法には実際の農薬に関する残留物定義に応じて対象となる分析成分が含まれる点に注意することが重要である。OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies（本文書のパラグラフ77(a)参照）に記載のとおり、食事リスク評価の目的で用いる残留物定義は、MRL施行目的で用いる定義とは異なることがあり、そのため結果として分析法が異なることがある。問題となっている残留物定義の全ての構成成分を1つの方法で網羅できない場合は、1つ以上の方法が必要となることがある。
4. 施行目的の登録後の分析方法として、公定監視試験施設では多数の分析成分を包括できる可能性のある多成分残留分析法が好まれる。MRL施行のための多成分残留分析法に適用される試験方法は国ごとに異なり、利用できる機器と個々の試験施設の能力によって大いに異なる。本ガイダンスは、規制当局の多成分残留分析法に置き換える、あるいはそれより優先することを意図するものではない。そのような方法のバリデーション判定基準は、別の文書（本文書のパラグラフ77(b)、77(c)、77(d)および77(e)を参照のこと）に記載している。多成分残留分析法の技法に適さない分析成分の場合は、単一残留物分析法が提示されることがある。

目的

5. 分析法バリデーションの目的は、正しく適用された場合に目的に適合した結果がその手順によりもたらされることを実証することである。本ガイダンスには、有効成分の承認および登録申請の一環として含まれる分析法の妥当性を確認するために実施されるべき手順を記載している。たいていの場合、方法の開発およびバリデーション中に以下の目的に適合させるために、1つ以上の方法が要求される。

6. 方法は以下の通りであること：(リスク評価および施行に関する双方の) 残留物定義に含まれる可能性のある、存在すると考えられる分析成分全てを測定する能力を持っていること；妨害物質が分析定量限界 (LOQ) の30%を決して越えることがないように十分に選択的であること；許容可能な回収率および併行精度を示すこと；取り扱っている全ての作物、動物および食料品目を網羅すること。有意な残留物が発生した場合は、加工部分と飲料水を網羅すること。また、動物が処理作物を消費する可能性がある場合は、全ての食用動物商品を網羅すること。しかし、規制当局によっては貿易目的のために食用動物商品に関して、それらの商品中には残留物はいずれも存在しないと予想されるにも関わらず、最大残留基準値を設定する場合もある。従って施行法には、適切な定量限界を実証し、LOQでのMRLsを設定することが要求される。

バリデーションパラメーターの定義

7. 意図した目的に適合させるため、方法は一定のバリデーションパラメーター基準を満たすこと。残留分析法の考慮すべき典型的なバリデーション特性は、以下の通りである。回収率、選択性 (特異性)、キャリブレーション、精度 (併行精度、再現精度)、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ)。これらのパラメーターの定義を以下に示す。

回収率

8. 回収率は、検出可能なレベルでの分析成分を含まない、あるいは既知量の検出レベルの分析成分を含むかのいずれかの適切なマトリックス試料に、最初に添加した分析成分 (有効成分および関連代謝物) 量に対する割合として測定された量である。回収試験により、精度と真度 (バイアス) の双方に関する情報を得ることができ、それにより方法の精確さに関する情報を得ることができる。

選択性 (特異性)

9. 選択性は、混合物あるいはマトリックスにおいて、同様の挙動を示す他の構成成分からの妨害を受けることなく特定の分析成分を測定するために方法を用いることのでき

る範囲を言う。規制当局によっては、選択性を言及するために特異性という用語を使用するところもある。

キャリブレーション

10. キャリブレーションは、試料中の分析成分の機器応答と濃度の間に許容可能な、明確に定義された相関関係を発生させる検出システムの能力をいう。測定される分析成分濃度は、機器の定義されたダイナミックレンジ内であること。

併行精度

11. 併行精度は、同一の被験物質について同じ方法を用いて、同じ試験施設において、同じ操作者が同じ機器を用いて短期間で得られる相互に独立した試験結果間の一致の近さをいう。併行精度（分析ラン内効果）には、標準重量測定誤差、体積誤差、被験物質の不均一性および分析中の他の操作上の誤差といった寄与を含む、操作内で変化する操作のあらゆる段階での寄与が含まれる。

再現精度

12. 再現精度は、同一の被験物質について同じ方法を用いるが、異なる条件下で得られた独立した試験結果間の一致の近さをいう。実験室内または実験室間再現精度、あるいは単一試験施設再現精度（分析ラン効果）は、分析者、試薬のバッチ、機器の再校正および試験施設環境（例えば温度変化）などの変化による分析システムにおける日々の変動に寄与する。実験室間または実験室内再現精度、あるいは複数の試験施設の再現精度（試験施設効果）は、キャリブレーション標準品における変動、試験計画書の現地間の解釈の違い、機器や試薬の入手元の違い、あるいは平均気象条件の相違といった環境要因の違い等の追加的な変動に寄与する。

検出限界（LOD）

13. 分析手順の検出限界とは、検出できるが必ずしも正確な値として定量できる必要のない試料中の分析成分の最低量である。検出限界において、特定の分析法を用いて定義されたマトリックスにおいて合理的におよび／または以前測定された確信のもとポジティブな同定が成し遂げられる。LODは典型的には要求されない。しかし、正確な評価（または他の目的）に必要な場合、LODが導き出された方法の説明を提示すること。

定量限界（LOQ）

14. 定量限界（LOQ）は、分析成分の明確な同定を実証でき、許容可能な平均回収率が、許容可能な相対標準偏差（RSD）と共に得られる試験した最低濃度として規制の観点から定義され、測定限界（LOD）あるいは方法バリデーションの最低限度（LLMV）とも呼ば

れる（パラグラフ77(e)～77(I)に含まれる項目を参照）。LOQは、方法の意図された目的を達成するのに十分な低さであること。分析の観点から、ノイズの標準偏差の6～10倍がLOQの推定値として示され、このLOQについて添加試験により妥当性を確認する。他に記載がない限り、本文書では、規制の観点からLOQを言及する。

一般的な局面

15. 本ガイダンスは、残留分析法の必要性について取り扱っているセクションに分けられており、以下の議題について議論している：抽出効率／ラジオバリデーション、確認技法、誘導体化、一括分析法および非特異的方法、方法のバリデーション判定基準、および報告されるべき当該情報。

検討中の分析成分

16. 上述のとおり、登録前が目的の分析法は、一般に食事リスク評価で用いる残留物定義に含まれる分析成分に適用する。その方法は、試料マトリックスの存在下で有効成分および／または関連代謝物（変換生成物）を測定できる能力を有すること。有効成分あるいは関連代謝物の一種以上の異性体、類縁物等が試料に含まれる場合、食事リスク評価を実施する必要がある際にはその方法により個々の異性体／類縁物が区別できること。

17. MRL施行目的のための当該残留物の定義によって、登録後の方法は、登録前の方法と異なる分析成分を考慮することがある（本文書のパラグラフ77(a)で述べているとおり OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studiesを参照のこと）。

抽出効率／ラジオバリデーション

18. 残留分析法は、残留物定義の全ての構成成分を測定できること。残留物定義に抱合体あるいは結合残留物が含まれる場合、方法には、「結合した」残留物を放出する適切な技法を含めること。

19. 抽出効率は方法の開発の鍵と見なされるため、典型的に使用される溶媒および条件（温度、pH、時間）に関するデータを提示すること。方法でのバイアスの主な原因が抽出効率の低さのこともある。抽出効率は、分析結果の精確さに大いに影響することがある。しかし抽出効率の妥当性は、分析直前に添加した試料を用いて実施する伝統的な回収試験により確認できない。残留物定義に含まれる全ての残留物の抽出効率の厳密なバリデーションは、残留物が通常試料にたどり着いたと考えられるルートを介して残留物が発生している試料を用いてのみ、実施することが可能である。これは通常、放射性標識された分析成分により抽出効率を測定できる代謝試験の場合である。植物および動物起源の食料商品

中の生体異物結合型残留物に関するIUPAC報告書（本ガイドラインのパラグラフ77(n)参照）では以下のことを推奨していることに注意すること。「残留分析法で使用した抽出手順は、放射性標識試験から[生じた残留物を含む]試料を用いて妥当性を確認すること・・・」

20. 登録後の方法および管理圃場試験と後作物試験の残留試験データを収集するための方法の抽出効率を測定するため、代謝試験および後作物試験からの対象商品を保管しておくことが理想的である。選択した商品が正当である理由を試験報告書に記載すること。抽出効率を放射化学的手順（燃烧分析、液体シンチレーション計測および放射線検出器を用いたクロマトグラフィー分析）を使って着実に測定できるように、対象分析法に記載された抽出操作により保管した商品を抽出すること。対象となる潜在的な分析成分の全てとはいかなくてもほとんどを取り出すように設計された厳密な手順により商品を抽出する代謝試験で抽出された相対量に対してその効率を比較できる。この比較はラジオバリデーションとして知られていて、可能であれば全ての方法での抽出計画について実施すること。別の方法として、例えばアセトン+水、酢酸エチルおよびアセトニトリルといったよく使用される抽出溶媒を含む抽出効率比較試験を、残留物定義で予想される化合物の代謝物試験から得た試料について実施することもある。

21. 抽出効率を試験することは、代謝試験または方法開発試験のいずれかの一環である可能性がある。いずれの場合も、それらは両タイプ（登録前および登録後）の方法の開発にとって重要であるため、調査結果を当該分析法のバリデーション試験に引用すること。

22. 追加的な精製段階および回収試験（「責任能力試験」）を含むフルラジオバリデーション実験は、例えば登録前の方法に一括分析手法が用いられる時、あるいは広範囲な酵素的切断の段階が含まれる時といった例外的な場合に認められる。

23. 代謝試験の試料が、新規分析法の開発にもはや利用できない場合、二つの溶媒系を「橋渡し」することは可能である。例えば、管理圃場試験中に得られた発生残留物を、第一段階として代謝試験中に適用した条件下で溶媒系を用いて抽出し、続いて第二段階として検討中の溶媒を用いて抽出することもある。抽出性に関する情報は、分析結果を直接比較することにより得ることができる。

確認技法

24. 一般に、一次残留分析法が対象分析成分に特有であることが示され、また、分析成分／残留物の起源が既知の場合は、追加の確認分析は必要ないであろう。これは典型的には、登録前またはデータ生成目的のために専門的に開発されている方法の場合である。ケースバイケースで、例えば最初の方法が免疫測定法である、あるいは、試料保管中に形

成された分解物の同定確認用である場合などは、追加確認が必要と考えられる。

25. 高度に特異的な技法を採用しない限り（下記参照）、単一残留物登録後の方法またはそれらの感度を実証するためのMRL施行法には、確認技法が用いられる。適切な技法を決定する際には、分析成分の特性を考慮すること。

26. 最初の方法が質量分析または別の高度に特異的な方法に基づく場合、一般的に別途、確認方法を開発する必要はない。例えば、100を超えるm/z比を用いて3フラグメントイオン以上を同定/定量に使用する場合は、その分析成分に関してGC/MSは非常に特異的であると考えられる。選択したイオンは報告し、それらの選択理由を記載すること。HPLC/MS-MSの場合、2つのイオン変換の妥当性が確認されている場合、その方法は高度に特異的であると見なされる。これらの必要条件下において追加の確認試験は必要ない。

27. 以下の技術は、許容可能な確認技法と見なされる；十分なイオン数をモニターし、それらの選定理由が述べられている場合はGC/MSまたはLC/MS；定量限界で添加した試料のUVスペクトルが特徴的である場合は、HPLC/DAD。この場合、測定条件下で得られたUV-スペクトルは提出すること。他の許容可能な確認技法には以下の項目が含まれる；原法から逸脱している別のクロマトグラフィー原理（HPLC⇔GC）、別の検出技法、誘導体化（それが最初に選択した方法でない場合）および著しく異なるクロマトグラフィー固定相あるいは選択性が異なる移動相。加えて、分配および精製段階の変更も確認には有益である可能性がある。

誘導体化

28. 高極性またはクロマトグラフィー特性に乏しいといった一部の化合物の分析には、誘導体化が必要なことがある。誘導体は、クロマトグラフィー分析前に、または、クロマトグラフィー手順（プレ-またはポスト-カラム）の一環として調製されることがある。誘導体化法の使用については詳細に報告し、正当とする理由を記載すること。誘導体は安定であり、その形成は再現可能であること。誘導体の測定に基づき定量する場合は、誘導体化段階が検出システムと統合された部分でない限り、誘導体の標準溶液を用いてキャリブレーションを実施することが望ましい。誘導体が標準品として利用できない場合は、試料に適用した誘導体化手順と同じ手順を用いて分析セット内で作成すること。これらの状況下において、正当とする完全な理由を記載すること。誘導体化段階の平均収率および精度について可能であれば実証すること。誘導体種がその分析成分に対して特異的である場合、その方法は対象分析成分に特異的であると考えられる。しかし、形成された誘導体が二種以上の有効性成分または代謝物に共通である場合、あるいは別の有効成分として分類される場合、その方法は非特異的であると考えべきである。

一括分析法および非特異的方法

29. 分析成分の中には、特異的な残留分析法が利用できない、あるいは実施することが困難なものがある。このような場合、その部分を含む全ての構成成分が毒物学的に重要であると考えられる場合、また残留濃度の適切なマーカーとなる単一構成成分がない場合は、一括分析法へ変更することは妥当である。

30. 多成分残留物定義がリスク評価目的に必要なと考えられる場合、植物および動物製品の残留試験データを得るために、一括分析法が用いられることがある。

31. 非特異的方法の使用は、通常、推奨されない。適切な方法を選択する際は、リスク評価とMRL遵守の両方の必要性を考慮すること。施行目的の残留物定義に多成分が含まれる場合、これは結果として方法の数が過剰となる可能性がある。これらの状況下では「一括分析法」が認められることがある。非特異的な、あるいは一括分析法を用いる欠点は以下の通りである。

- a) 非特異的な方法が使用されている場合、分析成分の起源の同一性が疑わしくなる可能性がある。例えば、その方法により、意図した分析成分に共通する部分、あるいは共通種へと誘導体化されている部分、または対象分析成分から分離できない部分のいずれかの部分を含む分解生成物も検出する可能性がある。そのような方法は、類似構造を持つ化合物からの妨害もまた受けやすい。
- b) 保存安定性試験の一環として保存していた製品中の有効成分含量を分析する際、有効成分に特異的でない方法を用いて安定性／分解を測定することが不可能なことがある。
- c) 異なる毒性を持つ二種以上の明らかに異なる有効成分に共通の部分測定する方法の場合、毒性学的に重要な残留成分について実施することになっているリスク評価ができるように残留物の起源を同定することが望ましい。

32. 実際には、一つ目はリスク評価を目的として、また二つ目はMRL遵守監視を目的として、必要に応じて二つの別々の残留物定義を設定できるような柔軟性を規制当局に持たせられる方法でデータを得なければならないことがある。そのような場合、可能であれば申請者は、一括分析法を実施するよりはむしろ、残留物定義の個々の構成成分を別々に分析するか、あるいは、一括分析法が実際のルーチン監視および妥当な費用でのMRL施行に不適切である場合、まず、一括分析手法に従い分析し、次に併行して適切な指示分子に

ついて圃場試験の試料の一連の分析を実施するかのをいずれかを行うこと。監視目的の当該方法の有効性について考慮すること。

33. 非特異的な方法および一括分析法は、対象分析成分を測定する実用的な方法が他にない場合の例外的な状況においてのみ許容されると考えられる。このような場合、完全な正当化の理由付けを提示すること。これには、その化合物を特異的な分析技法では測定できない理由についての説明を含めること。一括分析法が提案されている場合、残留物定義の当該構成成分全てについて、別々にバリデーションデータを提示すること。

登録前の方法のバリデーション

34. 一般に残留分析法は、方法が用いられる全てのマトリックスについて妥当性を確認すること。バリデーションの程度は、既に利用でき報告されている情報に依存する。フルバリデーションデータ（以下のセクションで記載の通り）は、新規の方法の場合、または既存の方法を大きく変更した場合（例えば、溶媒系や定量技法の変更など）のみに提示すること。方法を異なる商品に適応させる際にそのような変更が必要なこともある。以前に妥当性が確認されている既存の方法を、あるカテゴリー（Annex Iに記載の通り）内の他の「同等な」商品に適用する場合、通常、減少させた、あるいは制限したバリデーションセットで十分である。減少させたバリデーションセット（品質管理データセットと言われることもある）は、典型的に管理圃場試験の報告書で報告されるが、その一方でフルバリデーションデータは、別のGLP報告書に含まれる。

バリデーション用のマトリックス数

35. 植物性の素材を含む試験の場合、製品の用途によって商品数が変化する。バリデーションデータは、分析されることになっている試料マトリックス全てについて提出し、食事リスク評価に関する残留物定義の全ての構成成分についてバリデーションを実施すること。

36. 該当する場合、Annex Iに一覧表として記載した代表的な各商品カテゴリーから主に一つの農産品（RAC）についてフルバリデーション実験を実施すること。高タンパク質および高デンプン含量の商品の場合、両方の商品の代表的なマトリックスについてフルバリデーションを実施する必要はない。その代わりに、両群の代表として一つの乾燥（低水分）商品を選択すること。

37. 商品カテゴリー構想は、方法の妥当性が代表的な商品を用いてうまく確認された場合に、その方法が同じカテゴリー内の全商品に対してうまくいくということの暗示を意図するものではない。非常に類似した二種類以上の商品を分析することになっている場合

(Annex 1参照) は、マトリックスの比較可能性や減少させたバリデーションデータセットの例を考えることもある。同じ商品カテゴリーに属している商品に関する減少させたバリデーションデータは許容可能であり、MRLを求める商品全てに対しても必要である。

38. 例えはたばこ、ホップ、コーヒー、茶およびスパイスといった可溶性天然物を高い割合で含む商品は、検討中の分析成分を妨害することがある。妨害は、選択した試験方法と構成成分の特性によって変化する可能性がある。このような難しいマトリックスの場合、方法の適合性を証明するために一般にフルバリデーションデータが要求される。

39. 加工商品における残留物測定法の妥当性を確認すること。農産品 (RAC) と加工商品の両方に対してその方法が実質上同じ場合は、制限した、または減少させたバリデーションで十分なこともある。

40. 動物が処理作物を消費する可能性があり、飼養試験が要求/提出されている場合、動物起源の製品中の残留物測定法は、以下のマトリックスにおいて妥当性を確認すること：乳、卵および全ての可食組織。組織には通常、家禽類の筋肉、脂肪および肝臓に加え牛の筋肉、脂肪、肝臓および腎臓を含む。たいていの場合、牛商品における回収率データは、ヤギ、豚、馬、羊および家禽類の製品に有効である。

バリデーションレベル

41. 提案されたLOQおよび潜在的な残留レベルまたはLOQの10倍の濃度に該当する2添加レベルについてデータを得ること。併行回収試験は、残留試験用試料の分析中にも実施し、残留試験結果と共に報告すること。要求される定量限界 (LOQ) は、リスク評価またはMRL施行に必要な感度により変化する。一般に、検討中の各分析成分について0.01~0.05mg/kgの範囲であること。ケースバイケースで (例えば、難しいマトリックスについて) 毒性学的な懸念がない場合、より高いレベルが許容可能である。

42. 回収率測定に使用されることになっている試料は既知量の分析成分が添加されている無処理商品であり、サンプリング誤差を減らすために試料全体を分析すること。新しい技法により必要な試料物質が減り、その結果、均一性を増すことが必要となる。結果は、試料の既知の分析成分「含量」と比較すること。コントロール (無添加) 試料を同時に分析し、対象分析成分や妨害物によるいかなる汚染も測定すること。

添加試験数

43. フルバリデーションデータセットを得るために、コントロール2試料と共に2添加レベルのそれぞれについて5連で分析を実施すること。より少ない試料数については正当な

理由を述べること。減少させたデータセットについては、各バリデーションレベルで少なくとも3測定試料とコントロール1試料（試料が検出可能な残留物を含まないことを証明するため）を使用すること。

キャリブレーション

44. 分析的キャリブレーションは、当該分析溶液中の分析成分の最低および最高設定濃度に対して適切な範囲に渡ること。3濃度以上において2連で、あるいは5濃度以上において1連での測定のいずれかを用いること。検量線の式および例えば相関係数(r)といった回歸パラメーターは報告しなければならない、典型的な検量線のプロットを提出しなければならない。非線形の検量線を使用する場合、説明（検量線の精確さの維持方法を含む）を提示すること。試料の同時抽出物のクロマトグラフィーシステムまたは検出システム応答への予想されるマトリックス向上効果または抑制効果について取り上げる。適切な場合、分析することになっている試料のマトリックスと同様のマトリックスを加えて調製した標準液（マトリックス添加標準液）を用いて検出システムのキャリブレーションを実施することもある。

45. 直線の検量線が実証されている場合、単一濃度の検量線を使用できる。検量線モデルは、20倍の濃度レベル（例えば0.01～1.0 mg/kg）を網羅するのみのモデルであり、単一濃度レベルが妥当性の確認された検量範囲内となるように注意すること。一般に、評価には1濃度レベル（試料中で予想される量に相当）のキャリブレーション標準液を複数回繰り返して使用する。

内標準物質および操作上の標準品の使用

46. 操作上の標準品は、方法で特定した試料調製の一部または全手順に参照標準品を添加して得た標準品と考えられる。誘導体化段階から得た操作上の標準品を使用している方法は、条件によっては許容されることもある。誘導体化標準品が不安定または提供できない場合、申請者は手順の有効性および再現精度を実証するデータを提示しなければならない。

47. 内標準物質は、分析成分の同一性および／または量の測定が容易となるように、分析の特定の段階に既知量で添加する化学物質である。内標準法の使用は、通常最終抽出液（定量前）に添加する時といった、特定の状況下においてのみ許容できる。このように使用される場合、内標準物質は対象分析成分と同じ挙動を示すこと。また、分解せず、マトリックス効果の傾向を示さないこと。しかし、回収率補正のために全手順を通して内標準物質を使用することは、分析成分および内標準物質が各段階（抽出、精製など）において非常に類似して挙動することを示すために各マトリックスについて莫大な数の試料に関

するデータが利用できない限りは、許容できない。質量分析によって定量を容易にしている安定同位体（例えば²H、¹³C）の使用が完全に許容できる内標準法の例である。

MRL施行法（登録後）

48. 一般に登録後の方法は、MRLが設定されている植物および動物起源のマトリックスに対してのみ使用される。申請者は、全ての残留物がLOQ未満であると報告する場合はMRLs設定に関するガイダンスについて規制当局に相談することが推奨される。MRLが設定されない場合、申込者が登録後の方法に関してさらなる情報を提供する必要はない。

しかし、規制当局によっては、これらの商品において残留が予想されないものの貿易目的のためにMRLsを設定するところもある。従って施行法には、適切な定量限界を実証し、LOQでのMRLsを設定することが要求される。

49. 一般に方法は、MRL設定および施行に関連する残留物定義に含まれる分析成分を網羅すること。MRLsに包括する残留物の選定に関する議論は、OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies（本文書のparagraph77(a)参照）に記載されている。方法は迅速で、その実施が容易で、一般的に利用できる技法／機器を使用し、有害物質（例えばクロロホルム、ベンゼン）を避けるものであること。施行法の一環として技法を承認することに関して、適切な間隔で議論すること。分析試験方法は絶え間なく開発されていると認識されている。しかし、新しい技術が一般に受け入れられ、実施試験施設が利用できるまでには長時間かかることがある。

50. 一般的に実施試験施設は、存在する可能性のある全ての化合物に対して個々の方法を適用するのに十分な能力がないため、登録後の方法に関して特定の個別の方法を用いた回収率ほど良好な回収率を得られない場合でも、単一残留物法よりも多成分残留分析手法が明らかに好まれる。

51. 該当する場合、申請者は既存の多成分残留分析手法の適合性を最初に確認すること。速度、LOQおよび網羅する分析成分数に関して実施試験施設の要求を遂行する最近の最先端の多成分残留分析法は、HPLC/MS-MSまたはGC/MS定量に基づく。多成分残留分析法の一つが登録後の方法として許容できることが判明した場合、バリデーションの要求事項に関しては本ガイダンスの Paragraph 4 で引用している文書を参照のこと。妥当性の確認された多成分残留分析法に、ポジティブ検出の明確な確認のためのクロマトグラムまたはスペクトルが別途含まれない場合、申請者は特定の確認法を提示することが必要なことがある。

52. 新規化合物が一般的に確立された多成分残留分析手法により分析できるかについての検証は、異なる鍵となる段階を試験しているモジュールアプローチおよび段階的アプローチにより実施することが望ましい。多成分残留分析法の確認には少なくとも以下の段階が含まれる：

- a) 質量分析：適切なイオン化技法、適切なイオンおよび変換（定量および確認目的）の選択。
- b) クロマトグラフィー上の挙動：適切なHPLCまたはGC条件の選択（GCに関して：最初の蒸発挙動）。
- c) 精製：適切な手順（例えば固相抽出、ろ過、液／液分配）の選択。
- d) 抽出：適切な溶媒系（例えばメタノール／水、アセトニトリル／水、アセトン）（本ガイドラインのパラグラフ18～23参照）の選択。
- e) キャリブレーション：適切なキャリブレーション関数および標準品調製手順の選択。

想定される定量技法の選択に基づき順序を決定する。例えば、蒸発挙動は、GC法の場合は最初に確認する必要がある。

MRL施行を目的とした多成分残留分析法に適用される試験方法は国ごとに異なり、利用できる機器および個々の試験施設の能力により大きく異なってくる。本ガイダンスは、規制当局の多成分残留分析法を置き換えたり、それよりも優先したりすることを意図しない。更なるバリデーション判定基準については、別文書に記載する（本文書のパラグラフ77(b)、77(c)、77(d)および77(e)参照）。

独立した試験施設によるバリデーション試験（登録後）

53. 独立した試験施設によるバリデーション（ILV）試験は、一般に登録前の方法には必要ない。多成分残留分析および単一残留物分析法のILVsに関する要求事項は、世界の様々な地域で異なる。一方、US登録に関して、独立した試験施設によるバリデーション試験は、申請者が提案した単一残留物分析法のみに要求され、ヨーロッパでの独立した試験施設によるバリデーション試験は、典型的に確立された多成分残留分析法の適合性を証明するためにも要求される。

54. 登録後の方法は、MRLに準拠するための残留物定義に含まれる全化合物の測定に適切であること。方法の適合性は、適切な実験によって証明すること。少なくとも1つのマトリックスについて、典型的に、MRLが設定されている最も難しい対象作物／商品について

て、独立して妥当性を確認すること。登録後の方法の重要な目的の一つは、あらゆる不正使用を検出することだろう。従って一部の規制当局にとっては、ILVの必要性は必ずしも対象作物に限られるものではない。ヨーロッパ諸国の一部では、典型的にAnnex Iで定義された各商品カテゴリーからの代表的な1商品についてILVデータが要求される。乾燥商品の場合、高タンパク質または高デンプンのカテゴリーのいずれかから1つの代表商品を選択できる。ILVに含まれるべき商品数に関する更なる議論を本文書のパラグラフ56および57に記載する。

55. ILV試験を実施するために選ばれた試験施設は、方法開発およびそれ以降の方法の使用に関与してはならない。この判定基準が満たされるという条件でILV試験を実施するために選ばれた試験施設は、申請者の組織に所属してもよいが、同じ所在地であってはならない。選ばれた試験施設が、分析を実施するために方法の開発者と連絡を取り合うことが必要な場合は、このことについて報告すること。またそれ以降の最初の方法へのあらゆる追加または修正に関しても報告すること。

独立したバリデーションのための代表的なマトリックス数

56. Annex Iの一覧表に記載された各商品カテゴリーから選択した1~4種の範囲の農産品（RAC）についてILV データを提出すること。選択した商品は、そのカテゴリーの代表であること。高タンパク質および高いデンプン含量の商品の場合、両方のカテゴリーの代表的なマトリックスについてILVを実施する必要はないが、むしろバリデーションに乾燥（低水分）商品を含めることが必要となる。

57. 動物起源の製品における残留物測定のための登録後の方法のILV試験について、MRLが確立されるか、提案されそうである場合、必要に応じて以下の動物商品を使用すること：乳、卵、肉および／または脂肪、腎臓および／または肝臓。

ILVs用バリデーションレベル：定量限界—最大残留基準値

58. ILVには、LOQおよびMRLでの添加を含めること。規制目的のための適切なLOQの選択については、本ガイダンスのパラグラフ14で議論している。残留レベルが低い場合、LOQは0.01~0.05 mg/kgとすること。適切なLOQの選択は、分析成分／マトリックスの組み合わせに依存する。しかし申請者には、最先端の技術を用いることで低いLOQsで残留物を測定できる方法を開発することが推奨される。高LOQが選択される（例えば難しいマトリックスに関して）どんな場合でも、申請者は完全な正当性の理由付けを示すこと。

添加試験数

59. 回収率データは、以下の添加レベルについて得ること：LOQ（5試料）、LOQまた

はMRLの10倍のいずれか高い濃度（5試料）、およびコントロール（2試料）。

分析が難しいマトリックスであり、推定残留レベルが毒性学的にさほど重要でない（例えばマイナーな用途）場合、減少させた試料セットが許容できることもある。しかし、最低でも6試料（各添加濃度で3試料）およびコントロール1試料とすること。

キャリブレーション

60. 分析的キャリブレーションは、当該分析溶液中の分析成分の最低および最高設定の濃度に適切な範囲を網羅すること。3濃度以上の2連分析、または5濃度以上での単回分析を実施すること。キャリブレーションの生データは、試験と共に提出しなければならない。

方法の最低性能特性

61. 目的に対する方法の適合性を実証するため、性能特性に関する情報を提供すること。以下に指定した性能特性は、登録前および単一残留物の登録後の方法の双方にとって重要である。

許容可能な回収率の範囲

62. 一般に、各添加レベルにおける、また各商品に関する平均回収率は、表1に記載の範囲であること。特定の正当化された場合、精度データが許容可能であるまたは非常に低濃度レベルの場合を条件として、例えばタバコ、ホップ、コーヒー、茶およびスパイスといった分析が難しいマトリックスに関してこの範囲外の回収率も認められると考えられる。マトリックス効果が顕著な場合は、マトリックス添加した標準液を用いて回収率を補正することもある。

選択性（マトリックス干渉）

63. 補正なしの回収率およびブランク（コントロール）値を報告すること。分析対象の領域におけるブランク値（無処理試料および操作上のブランク）は、添加実験で用いたマトリックスから測定しなければならず、LOQの30%を越えないこと。これを越える場合は、正当性の詳細を提示すること。ピーク抑制または増強といったマトリックス効果は、HPLC/MS-MSおよびGCといった一部の技法を用いても起こりうる。従ってこれらの効果を確認するため、無処理試料（「品質管理試料」）の最終希釈液に標準液を添加すること。

精度—併行精度（相対標準偏差として表される）

64. バリデーション試験における方法の精度は、各添加レベルでの併行精度の相対標準偏差（RSD）として報告すること。上記で規定の通り、各添加レベルにおいて5連で測定

すること。特定の正当化された（例えば難しいマトリックスまたは非常に低濃度レベル）場合には、より高い変動が認められることもある。濃度レベルと併行精度との相関を表1に示す。

併行精度の値は、 $0.67 \times \text{Horwitz}$ の式から求めた：

$$\text{RSD} = 2^{(1-0.5\log C)}$$

ここでCは濃度である（ $1 \text{ mg/kg} = 10^{-6}$ ）。

表1：農薬残留分析¹に関する試験施設の併行精度判定基準¹

| Concentration level | Repeatability (relative standard deviation) | Range of mean % recovery |
|---|--|--------------------------|
| $\leq 1 \mu\text{g/kg}$ | 35 | 50 - 120 |
| $> 1 \mu\text{g/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ | 30 | 60 - 120 |
| $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ | 20 | 70 - 120 |
| $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1.0 \text{ mg/kg}$ | 15 | 70 - 110 |
| $> 1 \text{ mg/kg}$ | 10 | 70 - 110 |

¹Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003 [see paragraph 77 (c)]

65. 適切な統計学的方法（例えばGrubbsまたは Dixon's 検定）を用いて外れ値が確認された場合、このことの正当性を証明すること。各添加レベルにつき最大の外れ値の1つを無視することもある。添加レベルにつき1つ以上の外れ値が認められている場合、追加のバリデーション試料を加え、説明を提示することもある。

66. 単一残留物の登録後の方法に関するILV試験での方法の精度は、併行精度として報告すること。(2)に包括される試験施設の数が少ないため、実験室間再現精度を定義するために結果を合わせることはできない。従って登録前の方法（表1参照）については、各試験施設が同じRSD判定基準を適用すること。

67. バリデーション中に受け入れられない結果の変動が示された場合、方法性能に主に影響を及ぼすこれらの方法パラメーターを識別し、管理する努力をすること（堅牢性試験）。分析法の堅牢性とは、手順に記載されている条件のマイナーな変更がなされた際に得られる結果における変化に対する抵抗力である。

安定性調査

最終希釈した保存抽出液における分析成分の安定性

68. バリデーション試料は、最初の抽出から24時間以内に分析することが理想的である。ある状況下では、例えばオートサンプラー上といった室温条件下で、あるいは例えば1作業日に分析が完了できなかった場合に冷蔵条件下で、それよりも長い時間保存されることもある。この場合、抽出液中および最終希釈液中の分析成分の保存安定性に関する情報を提供すること。

69. 最初の抽出液中での安定性に関する関連情報が代謝試験に由来することがある。典型的に代謝試験において、抽出液のクロマトグラフィープロファイルは、数日から数カ月の長期間に渡って調査される。分析成分が同様の溶媒系において類似条件下で安定であった場合、短期間の保存中にはいかなる分解も起こらないと考えられる。

70. 最終あるいはあらゆる中間段階における安定性に関する関連情報は、方法のバリデーション中に実施される添加実験から得ることができる。添加試料における回収率が70～120%の許容範囲内である場合は、安定性は十分に証明される。

71. 例えば、分析成分の迅速な分解が予想される場合といった例外的な場合にのみ、さらなる、および別の調査が必要となる。これらの別調査中に、保存抽出液／最終希釈液の回収率データを、新たに調製した抽出液のデータと比較する。試験に関しては、代表的なマトリックスを選ぶことで十分である。安定である場合、Annex I に指定された全ての商品カテゴリーから得た抽出液を分析する必要はない。試験した保存条件は報告し、分析中に適用した典型的な保存条件を反映させること。

72. 冷凍条件下の抽出液の長期安定性に関する要求事項については、OECD Guideline on Stability of Pesticide Residues in Stored Analytical Samples [パラグラフ77(m)参照] の適用を受けている。

ワーキング（添加／キャリブレーション）溶液の安定性

73. 管理された保存条件下の安定性が実証されている場合、その添加溶液およびキャリブレーション溶液は長期間使用可能である。そうでない場合、溶液は毎日新たに調製しなければならない。

74. 安定性試験の期間は、典型的な用途を反映すること。一般に、それらは数日あるいは数週間の期間に渡って使用される。例えば、適切な溶媒系、室温か冷蔵か、明／暗と

いった試験条件は、分析実施内で適用される通常の保存条件を反映するように選択すること。

75. 保存溶液の安定性を試験するため、新たに調製した添加および／またはキャリブレーション溶液と比較すること（典型的にピーク面積またはピーク高さ）。濃度は、起こりうる分解を観察できるように選択すること。濃度依存性が認められない場合、適用する濃度を全て調査する必要はない。信頼性のあるデータを得るために、保存溶液および新たに調製した溶液をそれぞれ3回以上注入して比較すること。

試験報告書

76. 本セクションには、残留化学試験で用いた分析法を記載する際に含めるべき一般的情報を記載している。

A. 緒言。

- (i) 適用範囲または適用可能性。適切な商品／マトリックスおよび例えばPAM、会社報告書といった、方法の出所について記載すること。
- (ii) 測定する化学種の同定および検出限界（必要に応じて）および定量限界を含む分析手順の原理。

B. 材料および方法。

- (i) 標準化合物
 - (1) 例えば化学名、CAS番号、化学構造、分子式および質量、純度、有効期限、保存条件などの記載。
 - (2) 原液の調製。
 - (3) キャリブレーション溶液の調製。
- (ii) 手順。試薬または安全性や健康に有害なものを避けるための特別な予防措置が必要な試薬や手順段階を特に強調して、分析手順の詳細を段階的に記載すること。
 - (1) 試料の調製。
 - (2) 抽出。該当する場合（例えば乾燥作物素材、結合残留物など）は、効率を明示すること；ラジオバリレーションデータは、申請者の判断で別の報告書に記載されることもある。
 - (3) 該当する場合は、すなわち方法のバリレーション操作中の添加。
 - (4) 精製。

- (5) 誘導体化（ある場合）。
- (6) クロマトグラフィー分離を使用する場合は、クロマトグラフィー条件／移動相組成。
- (7) 標準液と抽出液の安定性

(iii) 装置。

- (1) 説明（例えば検出器の製造元／モデル、型／選択性、カラム（充填剤、大きさ）、キャリアーガスなど）。
- (2) 操作条件（例えば、流速、温度、電圧、クロマトグラフィー条件など）。
- (3) キャリブレーション手順。

(iv) 妨害物。以下の様なあらゆる妨害物について記載のこと。

- (1) 試料マトリックス。
- (2) 他の農薬。
- (3) 溶媒。
- (4) 実験器具類。

(v) 確認技法。

(vi) ある場合、分析法における修正または潜在的問題（詳細な状況および取るべき是正措置）について記載すること。

(vii) 計算。段階的に説明すること。

- (1) キャリブレーションファクター。
- (2) 試料中の分析成分。

(viii) その他。残留分析試験方法の完全で綿密な説明および残留結果の計算法を提示するのに適切で関連すると考えられるありとあらゆる追加情報。

C. 性能。方法の予想される性能を記載すること。

(i) 回収率（推定される平均回収率および回収率の範囲）。方法のバリデーション中に試験した各商品で懸念される各残留成分の個々の回収率の値、平均回収率および相対標準偏差を含めること。

(ii) 精度。

(iii) 検出限界（必要に応じて）および定量限界（定義を提示すること）。

(iv) 実施した場合は、堅牢性試験。

(v) 限界。

D. 代表的なクロマトグラム。試験報告書には、以下の代表的なクロマトグラムを含めること。

(i) ブランクコントロール。

(ii) 分析／マトリックス標準物質。

(iii) 最低添加レベル。

(iv) 処理試料。

E. 結論。様々な試験素材中の特定の試験化合物を測定する分析手順の適用可能性、機器の有効性、妨害物、安定性等をまとめて記載すること。