別紙 2

試験法の妥当性確認ガイドライン

1　趣　旨

本ガイドラインは、飼料中に残留する農薬等有害化学物質、飼料が含有する飼料添加物等（以下「農薬等」という。）の定量を目的として試験を実施する場合に、各試験機関が使用する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[注1]。

注 1　ここに示す手順は、試験法の妥当性を確認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

飼料のサーベイランス[注2]又はモニタリング[注2]に使用される機器分析による試験法（飼料分析基準本文に示す試験法及びそれ以外の方法）であって、妥当性が未確認のものを対象とする。

注 2　「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」（農林水産省公表。http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/guide_zenbun_1.pdf）の用語の定義による。

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」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)　「中間精度」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（中間条件）による測定結果の精度をいう。

(6)　「室間再現精度」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、異なる試験室で、異なる従事者が異なる装置を用いて独立した試験結果を得る条件（室間再現条件）による測定結果の精度をいう。

(7)　「定量下限」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。飼料分析基準本文に分析法が収載されていない成分を除き、原則として飼料分析基準本文に示された定量下限を用いる。

(8)　「検出下限」とは、試料に含まれる分析対象物（不検出であることが基準とされる物質を除く。）の検出可能な最低量又は濃度をいう。

(9)　「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。

(10) 「標準物質」とは、一つ以上の特性値が十分に均一で、適切に確定されている物質をいう。

(11) 「認証標準物質」とは、一つ以上の特性値について計量学的に妥当な手順により値付けされ、特性値及びその不確かさ並びに計量学的トレーサビリティを記載した認証書付きの標準物質をいう。

4 確認の方法

5 に規定する飼料の種類及び濃度ごとに、妥当性を確認する試験法の分析対象である農薬等を添加した試料（標準試料が入手可能であればこれを優先する。以下同じ。）を用いて試験を実施し、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。なお、検量線は標準液 5 濃度以上の測定値から作成し、検量線用の各標準液は少なくとも 2 反復、可能であれば 3 反復以上をランダムな順番で測定する。

(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（妨害ピーク）がないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、

i 定量下限が基準値の 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（ただし、定量下限濃度に相当するピーク面積（又は高さ）を超えないこと。）

ii 定量下限が基準値の 1/3 を超える場合又は基準値が定められていない場合は、定量下限濃度に相当するピークの面積（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 定量下限及び基準値の比と妨害ピークの許容範囲

定量下限と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量下限≦基準値の1/3	＜基準値ピークの1/10
定量下限＞基準値の1/3	＜定量下限ピークの1/3

(2) 真度

以下のいずれかにより真度を確認する。

i 認証標準物質が利用できる成分及び認証標準物質は利用できないが標準物質が利用できる成分においては、その認証標準物質又は標準物質を試験法に従って繰り返し定量し、測定値の平均値と認証値との差の絶対値が、測定の結果と認証値の合成不確かさの 2 倍を超えないこと。

ii 標準物質が利用できず、かつ、妥当性の確認された分析法（以下「標準分析法」という。）が別にある成分においては、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。）2 以上の n 個を試験法（A）及び標準分析法（B）に従って 3 以上の p 回の中間条件で定量し、各測定値の平均値の差の絶対値

が、下式により算出される s の 2 倍を超えないこと。

$$s=\sqrt{s_A^2+s_B^2}$$

$$s_A^2=\frac{s_{R_A}^2-(1-1/n)s_{r_A}^2}{p}$$

$$s_B^2=\frac{s_{R_B}^2-(1-1/n)s_{r_B}^2}{p}$$

s_{r_A} ：試験法の併行標準偏差の推定値

s_{r_B} ：標準分析法の併行標準偏差の推定値

s_{R_A} ：試験法の中間標準偏差の推定値

s_{R_B} ：標準分析法の中間標準偏差の推定値

iii　標準物質が利用できず、かつ、標準分析法のない成分においては、添加試料 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、これを真度とする。

真度の目標値[注3]は、70 %以上 120 %以下（ただし、抗菌性飼料添加物の表示量に対する試験にあっては 90 %以上 110 %以下）とする。

注 3　サロゲート（真度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 %以上であることを合わせて確認する。ただし、サロゲート添加前の分析操作の回収率が分析値に影響を及ぼす可能性に留意すること。

(3)　精度

添加試料の分析を 5 回以上繰り返し、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度を評価する。併行精度の目標値は下式から求める。

また、共同試験により室間再現精度を評価する。共同試験が実施できない場合は、複数の分析者又は分析日による中間精度を評価する。

i　共同試験を実施する場合

有効データを得る試験室は 8 以上とし、5 種類以上の試料について、非明示の 2 点併行により分析を行う。

上記の条件が困難な場合は、試験室／試料／濃度の組合せとして 16 以上×2 点併行の有効データを得ることとする。

室間再現精度の目標値は下式から求める。

ii　単一試験室内での中間精度により評価する場合

試行の回数は、併行点数 2 以上、かつ、分析者及び分析日の自由度が 4 以上となるようにする。この場合、中間精度評価のための枝分かれ実験により、併行精度と中間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。

中間精度の目標値は下式から求める。

併行精度、室間再現精度及び中間精度の目標値

併行精度（$\mathrm{RSD}_r\%) \leq \mathrm{PRSD}_R(C)$

中間精度（$\mathrm{RSD}_I\%) \leq \frac{5}{4}\mathrm{PRSD}_R(C)$

室間再現精度（$\mathrm{RSD}_R\%) \leq 2\mathrm{PRSD}_R(C)$

$$\left(\begin{array}{l} C：分析対象物質の質量\ 分率 \\ \mathrm{PRSD}_R(C) = \begin{cases} C^{-0.5} & C > 0.138 \\ 2C^{-0.1505} & 1.2\times10^{-7} \leq C \leq 0.138 \\ 22 & C < 1.2\times10^{-7} \end{cases} \end{array}\right)$$

(4)　定量下限及び検出下限（不検出であることが基準とされる物質を除く。）

①　添加回収試験を実施し、以下の条件に該当する濃度を定量下限とする。

i　定量下限付近濃度を添加したブランク試料を繰返し分析したときの分析値の標準偏差の 10 倍。

ii　クロマトグラフィーによる分析では、定量下限濃度に対応する濃度から得られるピークが、S/N≧10 であること。

②　同様に以下の条件に該当する濃度を検出下限とする。

i　定量下限付近の濃度を添加したブランク試料を n 回分析したときの分析値の標準偏差に Student の t-値（片側、有意水準 0.05、自由度 n−1）を乗じた値の 2 倍。

ii　クロマトグラフィーによる分析では、得られるピークが、S/N≧3 となる濃度。

基準値の定められた分析対象物質に係る定量下限及び検出下限の目標値は表 2 のとおりである。

表 2　基準値に対する定量下限及び検出下限の目標値

基準値	定量下限の目標値	検出下限の目標値
0.1 mg/kg以上	基準値の1/5以下	基準値の1/10以下
0.1 mg/kg未満	基準値の2/5以下	基準値の1/5以下

5　添加を行う飼料の種類及び添加濃度

(1)　添加を行う飼料の種類

添加を行う飼料は、原則として試験法を適用しようとする飼料から選択する。全ての単体飼料について評価すること及び複数の原料の混合物である配合飼料について、あらゆるマトリックスを対象として評価することは不可能であるので、代表的な単体飼料及び配合飼料を選択して評価する。代表的な飼料としては、成分としての特性の違いを考慮して、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　単体飼料

I　穀類

・とうもろこし、マイロ

・麦類

・米
・大豆
等

II　粗飼料
・わら
・乾草
・サイレージ
等

III　植物性副産物
・そうこう類（ふすま、DDGS、米ぬか油かす等）
・植物性油かす類（大豆油かす、なたね油かす、コーングルテンミール等）
等

IV　動物質性飼料
・魚粉
・家きん、ほ乳動物由来たん白質（チキンミール、肉骨粉等）
・乳製品（脱脂粉乳等）
等

②　配合飼料
・鶏用又は豚用配合飼料
・牛用配合飼料（粗飼料を多く含むもの）
・ほ乳期子牛又は子豚用配合飼料（脱脂粉乳等を比較的多く含むもの）
・養殖水産動物用配合飼料
等

(2)　添加濃度に関する留意事項（表 3 参照）

i　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「定量下限濃度（又はその 2 倍）」とする。基準値と定量下限が等しい場合には、添加濃度は「定量下限濃度」の 1 種類の濃度とする。

ただし、多成分分析法において、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っては、「各農薬等の基準値に近い一定の濃度」としてもよい。

ii　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。

表 3　定量下限及び基準値の関係と添加濃度

定量下限と基準値の関係	添加濃度
定量下限＜基準値	「基準値又は基準値の1/2の濃度」及び 「定量下限濃度（又はその2倍）」
定量下限＝基準値	定量下限

(3)　添加試料の作製等に当たっての留意事項

i　添加試料の作製に当たっては変敗のない試料を使用し、均質化して量り取っ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 1~2 mL 程度とする。溶媒は試料と混合する又は容易に揮散する溶媒を用いる[注 4]。農薬等の添加後よく混合し、一夜静置して溶媒を揮散させた後に抽出操作を行う。ただし、化学的に不安定な農薬等にあってはこの限りでない。

ii　冷凍保存が必要な試料について枝分かれ実験等、数日間にわたり試験を行う場合にあっては、凍結及び融解を繰り返すことを避けるため、均質化した試料を小分けして保存し、試験を実施する日ごとに添加試料を作製すること。

注 4　抽出溶媒と混和しない溶媒は用いないこと。