附属書 A
(規定)

試験法の妥当性確認の手順

(1) 趣旨

本項は、肥料等試験法に収載しようとする試験法の妥当性を確認するための手順を示すものである。なお、肥料等試験法以外の方法によって試験を実施しようとする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も本項に規定する方法に準じる。

また、この項目は化学的試験法を対象とする。

備考 1. 有効態(可溶性、く溶性及び水溶性)の成分は農林水産省告示において規定されている。また、全量においても、抽出温度等の抽出条件を変更することにより測定値に影響することがあることから、抽出方法(抽出液の精製等も含む)の変更を行う場合には元となる抽出条件との比較ができる場合に限る。

(2) 用語の定義 [1、2、3、4、5、6、7)]

本項目において、用語の定義は次のとおりとする。

a) 選択性 試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象成分を正確に測定する能力。

b) 真度 複数の測定結果から得られた平均値と、真の値(1)との一致の程度。

c) 精度 定められた条件の下で繰返された独立な測定結果の間の一致の程度(又はばらつきの程度)。

d) 併行精度 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、同じ試験室で、同じオペレータが、同じ装置を用いて、短時間のうちに独立な測定結果を得る条件(併行条件)による測定結果の精度。

e) 中間精度 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、同じ試験室で、異なる要因(異なる時間、異なるオペレータ等)において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。

f) 室間再現精度 同一と見なされる分析試料の測定において、同じ方法を用い、異なる試験室で、異なるオペレータが、異なる装置を用いて独立した測定結果を得る測定の条件(室間再現条件)による測定結果の精度。

g) 定量下限(LOQ) 試料に含まれる分析対象成分の定量可能な最低量又は最小濃度。

h) 検出下限(LOD) 試料に含まれる分析対象成分の検出可能な最低量又は最小濃度。

i) 標準物質 一つ以上の規定特性について、十分均質、かつ、安定であり、測定プロセスでの使用目的に適するように作成された物質。

j) 認証標準物質 一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、規定特性の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がついている標準物質。

k) ブランク試料 分析対象成分を含まない分析用試料(2)。

l) 添加試料 分析対象成分含有量既知の分析用試料又は標準物質を添加(3)(4)若しくは調合(3)した分析用試料。

m) 自然汚染試料 有害成分等の分析対象成分を自然に含有している肥料から調製した分析用試料。

n) 流通試料 肥料生産工場等で製造された肥料(5)から調製した分析用試料。

o) サロゲート 試料の前処理操作、測定操作の各段階における収率の補正、回収率の確認などのために添加される、目的成分と化学構造が同じ、又は類似した物質。

p) SN 比 分析目的に由来する信号(応答値)S と、それ以外の要因に基づく信号(通常はノイズ)N との強度比。

注(1) 現実には認証標準物質の認証値、化合物の化学的組成、標準物質等の添加量等。
(2) 回収試験、定量下限の確認等のためのブランク試料に用いる流通肥料がない場合は、目的とするマトリックスを含有している試薬等を用いてもよい。
(3) 乳鉢等で混合し、分析対象成分を十分に均質にする。
(4) 標準液を添加した場合は、一夜放置する等の措置を実施して溶媒を十分に揮散させる。
(5) 化学的又は物理的(造粒工程等)工程により、生成又は形態が変化した分析対象成分を含む肥料など。

(3) 妥当性確認の方法

(3.1)～(3.8)の必要な項目を計画的に試験し、得られた結果から試験の性能パラメータを推定する。

推定した性能パラメータの値が、それぞれの目標値(性能規準)に適合しているかを確認して、適合している場合は妥当性確認された試験法として評価する。

(3.1) 適用範囲

単一試験室の妥当性確認試験及び共同試験を実施し、室間再現精度まで適合した試験法は、試験に用いた肥料の種類及び濃度範囲において妥当性確認された試験法とする。よって、当該試験を実施する試験室は、内部品質管理等を実施することにより妥当性確認された方法としてその性能(再現精度等)を用いることができる。

単一試験室の妥当性確認試験を実施し、真度、併行精度、中間精度等が適合した試験法は、その試験を実施した試験室及び試験に用いた肥料の種類、濃度範囲に限定し、妥当性確認された試験法とする。よって、この試験法を導入したい他の試験室は、試験法の単一試験室の妥当性確認を新たに実施する必要がある。

(3.2) 選択性[8、9、10、11)]

(3.2.1) クロマトグラフ法の場合

ブランク試料について操作を行い、分析対象成分の定量に影響するピーク(妨害ピーク)がないこと(6)を確認する。また、多成分同時測定の場合は隣接するピークが十分に分離すること(6)を確認する。

注(6) 分離度(R)は、1.5 以上が望ましいが、最低 1.0 以上であること。

備考 2. ピークの分離指標として分離度(R)が用いられる。分離度(R)1.5 以上であれば、近接する二つのピークは十分に分離しており、ピーク高さ及びピーク面積いずれを用いても定量に影響しない。分離度(R)1.0 以上であれば、近接する二つのピークはいくらか重なりはあるものの、ピーク高さを用いる方法で定量する場合問題とならない。

分離度(R)は、ピーク幅を用いて、(1a)式によって求められる。なお、ピークが正規分布であれば、ピーク半値幅を用いて、(1b)式によって求められる。クロマトグラフのデータ処理装置では、分離度(R)に(1b)式が用いられている場合が多い。

$$分離度(R) = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2} \times (W_1 + W_2)} \quad \cdots(1a)$$

$$分離度(R) = \frac{1.18 \times (t_2 - t_1)}{\left(W_{\frac{1}{2},1} + W_{\frac{1}{2},2}\right)} \quad \cdots(1b)$$

t_1: ピーク 1 のリテンションタイム　　t_2: ピーク 2 のリテンションタイム
W_1: ピーク 1 のピーク幅　　W_2: ピーク 2 のピーク幅
$W_{\frac{1}{2},1}$: ピーク 1 の半値幅　　$W_{\frac{1}{2},2}$: ピーク 2 の半値幅

(3.2.2) クロマトグラフ法以外[7]の場合

ブランク試料について操作を行い、分析対象成分以外に由来した応答で、かつ定量値の正の誤差要因になり得る応答[8]がないことを確認する。

注(**7**) 吸光光度法、原子吸光法、滴定法等で測定機器において分離を行わない方法。
(**8**) 吸光度、滴定値等をいう。

(3.3) 検量線 [8、12、13]

6～8 水準の濃度又は含量[9]の各検量線用標準液を 2～3 回測定[10]し、得られたシグナル[11]を分析対象成分の濃度又は含量の関数としてプロットした図を用いて視覚的に直線性を評価する。

直線関係が認められる場合には、最小二乗法による回帰式の計算などの統計学的手法を用いて、検量線の傾き(b)、切片(a)及びその信頼区間及び決定係数(r^2)を算出する。更に各水準における残差[12]をプロットする。

注(**9**) 検量線用空試験溶液を含めてもよい。
(**10**) 感度の変化等による非線形的混乱を避けるため、測定は反復測定ごとにランダムな順序で行う。
(**11**) 吸光度、蛍光強度、ピーク高さ、ピーク面積等。
(**12**) 測定によって得られたシグナルと回帰式より推定したシグナルの差

備考 3. 切片(a)の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれていることを推奨する。
備考 4. 決定係数(r^2)が 0.99 以上であれば使用可能であるが、精密な分析には 0.999 以上であることを推奨する。決定係数(r^2)が 0.99 未満である場合は、高次式を用いるか又は測定領域の変更を検討する。
備考 5. 残差の平均値は 0 であり、残差はランダムなパターンを示す。

(3.4) 真度 [7、8、12、14、15]

真度を評価する方法として、①認証標準物質の利用(**3.4.1**)、②妥当性確認された方法による測定値との比較(**3.4.2**)、③回収試験(**3.4.3**)の順で推奨する。

なお、サロゲートを用いる場合は、その回収率がおよそ 40 %以上であることを推奨する。

(3.4.1) 認証標準物質を利用する場合

試験対象の肥料に似たマトリックスを持ち、測定レベルの濃度の測定対象成分を含む認証標準物質が利用できる成分においては、その認証標準物質を試験法に従って 3 点以上(*n*)の併行試験を実施し、測定値の平均値と認証値(特性値)との差の絶対値が、測定値の平均値と認証値の各々の標準不確かさを合成した標準不確かさの 2 倍を超えないこと[13]。

注(13) 測定の結果と認証値(特性値)との差の評価手順は**参考 1 測定値と認証値との比較の手順**に示した。

(3.4.2) 妥当性確認された試験法が別にある場合

認証標準物質が利用できず、かつ、妥当性の確認された試験法(以下「標準試験法」という。)が別にある成分においては、**a**)又は **b**)の条件を満足することを確認する。

a) 試料数が 12 点以上ある場合 12 点以上の添加試料、自然汚染試料又は流通試料を新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ試験を実施し、各試料の 2 方法の測定値の相関図を作成し、回帰直線の傾き(*b*)、切片(*a*)及び相関係数(*r*)を算出し、更に予測区間を確認する。

ただし、測定値の最小値と最大値の幅が小さい場合は、対応のある *t* 検定を実施して有意な差が認められないことを確認する。

備考 6. 傾き(*b*)の 95 %信頼区間に 1 が含まれ、切片(*a*)の 95 %信頼区間に原点(0)が含まれ、相関係数(*r*)が 0.99 以上であることを推奨する。

b) 試料数が少ない場合 異なる 3 濃度以上の分析用試料について、新たな試験法及び標準試験法に従ってそれぞれ 4 点併行以上で試験を実施し、2 群の分析結果のばらつきが等分散であるか不等分散であるか判別し、それらに対応する *t* 検定を濃度毎に実施して両側有意水準 5 %で有意な差が認められないことを確認する。

(3.4.3) 認証標準物質がなく、妥当性確認された試験法が別にない場合

異なる 3 濃度以上の試料について、それぞれ 3 点併行で試験を実施し得られた測定値の平均値を用いて回収率を求め、評価する。真度の目安は**別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安**に示した。

(3.5) 精度 [8、12、16、17]

共同試験(**3.5.1**)により室間再現精度及び併行精度を評価する。又は、単一試験室において日を変えての反復試験(**3.5.2**)により中間精度及び併行精度を評価する。

(3.5.1) 共同試験による室間再現精度及び併行精度

有効データを得る試験室数は 8 以上[14]とし、濃度の異なる 5 種類以上の試料について、非明示の 2 点併行により共同試験を実施する。得られた測定値から室間再現精度及び併行精度を求め[15]、評価する。

これらの精度を評価するための目安は**別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安**に示した。

注(14) 必要な設備・機器を所有している試験室が限定されている場合は 5 以上。

(15) 算出方法は**参考 2 室間再現精度又は中間精度及び併行精度の算出**に示した。

(3.5.2) 単一試験室において日を変えての反復試験による中間精度及び併行精度

規定する範囲を含む異なる 2 濃度の分析用試料を用いて、1 試験日につき 2 点併行で 5～7 日間試験[16]を実施する[17]。得られた測定値から中間精度及び併行精度を求め[18]、評価する。

これらの精度を評価するための目安は**別紙 各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安**に示した。

注(16) 内部品質管理のデータを用いることができる。

(17) 同一の試験者が 5～7 日間通して試験を実施する必要はない。

(18) 算出方法は**参考 2 室間再現精度又は中間精度及び併行精度の算出**に示した。

(3.6) 定量下限(LOQ)[7, 11]

(**3.6.1**)～(**3.6.3**)に従って定量下限(LOQ)を推定する。必要に応じて、推定された定量下限付近の濃度を含む分析用試料を段階的に調製し、それぞれ 3 点併行で試験を実施し、得られた測定値の平均値が真度の目標値に適合する濃度を定量下限とする。

備考 7. 有害成分、制限成分等の定量下限(LOQ)は、含有許容量及びそれに準ずる水準が 1.0 mg/kg 以上の場合ではその 1/5 以下であり、1.0 mg/kg 未満の場合ではその 2/5 以下であること。また、主成分・主要な成分及び材料の成分の定量下限(LOQ)は、含有すべき最小量及び流通肥料中の含有最小量の 1/5 以下であることを推奨する。なお、定量下限(LOQ)がそれらの最小量の 1/5 を超える場合は、上記の併行試験を実施して定量下限を確認し、試験法の適用範囲にその旨を明記する。

備考 8. 定量下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(**3.6.1**)～(**3.6.3**)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における定量下限の定義を明記する。

(3.6.1) 併行試験により推定する方法

定量下限付近の濃度の分析用試料について、それぞれ 7～10 点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(3)式によって試料中の定量下限(LOQ)を推定する。

$$\text{試料中の定量下限(LOQ)の推定値} = 10 \times s_r \quad \cdots (3)$$

s_r: 併行標準偏差

(3.6.2) 検量線を用いて推定する方法

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾きを用いて、(4)式によって試料中の定量下限(LOQ)を推定する。

試料中の定量下限(LOQ)の推定値 $= \dfrac{10 \times s}{b}$ ・・・(4)

s: 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差
b: 検量線の傾き

(3.6.3) SN 比により推定する方法

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法においては、SN 比が 10:1 のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の定量下限(LOQ)を推定する。

(3.7) 検出下限(LOD)[7、11)]

(**3.7.1**)～(**3.7.3**)に従って検出下限(LOD)を推定する。

備考 9. 検出下限を推定するにはいくつかの方法があり、測定方法が機器分析であるか否か、使用する測定機器によって方法が異なる。(**3.7.1**)～(**3.7.3**)に示す方法とは異なる方法を用いても差し支えないが、その方法及びその方法における検出下限の定義を明記する。

(3.7.1) 併行試験により推定する方法

定量下限付近の濃度の分析用試料又はブランク試料について、それぞれ 7～10 点併行で試験を実施し、併行標準偏差を求め、(5)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

試料中の検出下限(LOD)の推定値 $= 2 \times t(n-1, 0.05) \times s_{\mathrm{r}}$ ・・・(5)

s_{r}: 併行標準偏差
$t(n-1, 0.05)$: 危険率片側 5 %のスチューデント値[20)]
n: 併行試験の併行点数

注(19) 併行試験 7 点併行の場合は 1.94 であり、10 点併行の場合は 1.83 である。

(3.7.2) 検量線を用いて推定する方法

検量線が直線の場合は、検量線の残差又は推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差と検量線の傾き(b)を用いて、(6)式によって試料中の検出下限(LOD)を推定する。

試料中の検出下限(LOD)の推定値 $= \dfrac{2 \times t(n-2, 0.05) \times s}{b}$ ・・・(6)

s: 残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差
b: 検量線の傾き
$t(n-2, 0.05)$: 危険率片側 5 %のスチューデント値
n: 検量線の測定ポイント数

(3.7.3) SN 比により推定する方法

クロマトグラフ法等のベースラインノイズを伴う試験法おいては、SN 比が 3:1 のピークの試料溶液中の濃度より算出して、試料中の検出下限(LOD)を推定する。

(3.8) 頑健性 [7、11、12)]

頑健性は、分析法を開発する段階において検討しておくべきであり、その評価方法は開発しようとする分析法のタイプに依存する。頑健性は、分析条件を故意に変動させたときの分析法の信頼性を表す。もし、測定値が分析条件の変動の影響を受け易いようであれば、分析条件を適切に制御する方法を考慮するか、あるいは、そのことを分析法の中に注意事項として盛り込む必要がある。頑健性を評価することによってシステム適合性に関する一連のパラメータ(例えば、分離度)を確立することができようにこれらのパラメータを確認することによって、日常の分析において分析法の妥当性が維持されていることを保証できる。

代表的な変動因子は、次のとおりである。

(3.8.1) 共通する変動因子 種々の試験法に共通する代表的な変動因子は、次のものがある。

a) 抽出時間、抽出温度

b) 各段階の試験溶液の安定性

c) 試薬のグレード

(3.8.2) クロマトグラフ法等における変動因子 クロマトグラフ法による測定又は固相抽出による精製の代表的な変動因子は、次のものがある。

a) カラム又はカートリッジの変更(異なるロット又は異なる銘柄)

b) 溶離液又は洗浄液の pH 及び組成の変動の影響

c) 温度

d) 流速

e) マトリックスの影響及び希釈の効果

参考文献

1) JIS K 0211: 分析化学用語(基礎部門) (2013)

2) JIS K 0214: 分析化学用語(クロマトグラフィー部門) (2013)

3) JIS Q 0035: 標準物質－認証のための一般的及び統計的な原則 (2008)

4) JIS Z 8101-2: 統計－用語及び記号－第 2 部:統計の応用 (2015)

5) JIS Z 8402-1: 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度)－第 1 部: 一般的な原理及び定義 (1999)

6) ALINORM 09/32/23 Joint FAO/WHO Food Standards Prorgamme: Repot of the Thirtieth Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Codex Alimentarius Comission Thirty-second Session (2009)

7) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (2005)

8） AOAC Official Methods of Analysis Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2012)

9） JIS K 0114：ガスクロマトグラフィー通則 (2012)

10） JIS K 0124：高速液体クロマトグラフィー通則 (2011)

11） 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知：「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について，平成 25 年 7 月 11 日，薬食審査発 0711 第 1 号 (2013)

12） Thompson, M., Ellison, S.L.R, Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratoryvalidation of methods of analysis, *Pure & Appl. Chem*. **74** (5), 835–855 (2002)

13） CLSI EP9 A2 Ed. 2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, Clinical and Laboratory Standards Institute (2002)

14） Linsinger, T.,: Comparison of a measurement result with the certified value, European Reference Materials' application note 1, European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (2010)

15） Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Procedural manual Twenty-second edition, Codex Almentarius Comission (2013)

16） AOAC Official Methods of Analysis Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

17） Horwitz，W.: Protocol for the Design，Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies，Pure & Appl. Chem.，**67** (2)，331～343 (1995)

参考 1　測定値と認証値との比較の手順

(R1.1)式により併行試験成績の総平均値(m)及び認証値(μ)とそれらの差の絶対値(Δ_m)を求める。次に、(R1.2)式より認証標準物質の認証値の標準不確かさ(u_{CRM})及び(R1.3)式より総平均値の標準不確かさ(u_m)を求める. 得られたu_m 及び u_{CRM} を用いて(R1.4)式より Δ_m の合成標準不確かさ($u_{\mathrm{C}(\Delta_m)}$)を算出し、更に包含係数($k = 2$)を用いて(R1.5)式より拡張不確かさ(U_{Δ_m})を算出する。

Δ_mとU_{Δ_m}を比較して判定式((R1.6)式)に適合しているか、すなわちΔ_mがU_{Δ_m}以下であることを確認する。

併行試験成績の総平均値と認証値の差の絶対値$(\Delta_m) = |m - \mu|$　　・・・(R1.1)

認証値の標準不確かさ$(u_{\mathrm{CRM}}) = \dfrac{U_{95\,\%}}{k_{\mathrm{CRM}}}$　　・・・(R1.2)

総平均値の測定の標準不確かさ$(u_m) = \dfrac{s_{\mathrm{r}}}{\sqrt{n}}$　　・・・(R1.3)

Δ_mの合成標準不確かさ$\left(u_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})}\right) = \sqrt{{u_m}^2 + {u_{\mathrm{CRM}}}^2}$　　・・・(R1.4)

Δ_{m} の拡張不確かさ$\left(U_{\Delta_{\mathrm{m}}}\right) = k_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})} \times u_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})} = 2 \times u_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})}$　　・・・(R1.5)

判定式　$\Delta_{\mathrm{m}} \leqq U_{\Delta_{\mathrm{m}}}$　　・・・(R1.6)

m: 測定値の総平均値
μ: 認証値
$U_{95\,\%}$: 認証値の拡張不確かさ
k_{CRM}: 認証標準物質の拡張不確かさの包含係数
s_{r}: 併行標準偏差
n: 併行試験点数
$k_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})}$: Δ_{m} の拡張不確かさの包含係数($k_{\mathrm{C}(\Delta_{\mathrm{m}})} = 2$)

参考 2　室間再現精度又は中間精度及び併行精度の算出

(1) 測定値の構造

表 1 の測定値(x_{ij})は、(R2.1)式のとおり、真値 (μ)、要因による変動(β)及び併行条件下の偶然誤差(以下、「偶然誤差」という)による変動(e)から成り立っている。p 試験室がそれぞれ n 点併行で測定する共同試験を実施したとき、β の分布は純粋な室間変動による $N(0,\ {\sigma_{\mathrm{L}}}^2)$、$e$ の分布は偶然誤差による $N(0,\ {\sigma_r}^2)$と仮定すると、(R2.2)式が導かれる。また、同一試験室おいて p 日間それぞれ n 点併行で測定する反復試験を実施したとき、β の分布は日間変動(要因 T)による $N(0,\ {\sigma_{(\mathrm{T})}}^2)$、$e$ の分布は偶然誤差による $N(0,\ {\sigma_{\mathrm{r}}}^2)$と仮定すると、(R2.3)式が導かれる。

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + \beta_i + e_{ij} \quad \cdots \text{(R2.1)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, {\sigma_{\mathrm{L}}}^2) + N(0, {\sigma_{\mathrm{r}}}^2) \quad \cdots \text{(R2.2)}$$

$$\text{測定値}(x_{ij}) = \mu + N(0, {\sigma_{(\mathrm{T})}}^2) + N(0, {\sigma_{\mathrm{r}}}^2) \quad \cdots \text{(R2.3)}$$

μ: 真値

β_i: 要因における変動　　e_{ij}: 偶然誤差

$N(0, {\sigma_{\mathrm{L}}}^2)$: 平均 0、標準偏差 σ_{L}のβ_iの正規分布　$N(0, {\sigma_{\mathrm{r}}}^2)$: 平均 0、標準偏差 σ_{r}のe_{ij}の正規分布

${\sigma_{\mathrm{L}}}^2$: 純粋な 室間分散　　${\sigma_{\mathrm{r}}}^2$: 併行分散

$N(0, {\sigma_{(\mathrm{T})}}^2)$: 平均 0、標準偏差 $\sigma_{(\mathrm{T})}$の β_iの正規分布

${\sigma_{(\mathrm{T})}}^2$: 日間分散

表1　共同試験又は日を変えた反復試験の試験成績

試験室又は試験日	分析試料番号						
(要因)	1	2	3	⋯	j	⋯	n
1	x_{11}	x_{12}	x_{13}	⋯	x_{1j}	⋯	x_{1n}
2	x_{21}	x_{22}	x_{23}	⋯	x_{2j}	⋯	x_{2n}
3	x_{31}	x_{32}	x_{33}	⋯	x_{3j}	⋯	x_{3n}
⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯
i	x_{i1}	x_{i2}	x_{i3}	⋯	x_{ij}	⋯	x_{in}
⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯	⋯
p	x_{p1}	x_{p2}	x_{p3}	⋯	x_{pj}	⋯	x_{pn}

(2) 共同試験成績よる室間再現精度び併行精度の算出手順

(2.1) 真値及び分散の推定

実際の統計解析では、真値(μ)、真の純粋な室間分散(${\sigma_{\mathrm{L}}}^2$)及び真の併行分散(${\sigma_{\mathrm{r}}}^2$)は未知であり、共同試験成績から得られる推定値に置き換えて、それぞれ平均値(m)、純粋な室間分散(${s_{\mathrm{L}}}^2$)及び併行分散(${s_{\mathrm{r}}}^2$)と表記する。

(2.2) 一元配置分散分析

共同試験に参加した試験室からの報告値のうち、プロトコルからの逸脱、機器の不調など客観的な理由が明

らかである有効でない測定値を除外し、更に Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施して外れ値を除く。外れ値を除いた成績について一元配置分散分析を実施し、表 2 の各変動要因の不偏分散(V)を求める。

表2　一元配置分散分析表

変動要因	平方和(S)	自由度(φ)	不偏分散(V)	分散の期待値($E(V)$)
試験室間 (L)	SS_L	$p-1$	V_L	$\sigma_r^2+n\times\sigma_L^2$
偶然誤差 (e)	SS_r	$p\times(n-1)$	V_r	σ_r^2

備考 1. 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(試験室間(L)→グループ間、偶然誤差(e)→グループ内、平方和→変動 等)

備考 2. 不偏分散(V)は平方和／自由度によって算出される。

(2.3) 室間再現精度び併行精度の算出

表 2 の各変動要因の分散の期待値 $E(V)$ の関係が成り立つことから、(R2.4)式及び(R2.5)式によって併行分散(s_r^2)及び純粋な室間分散(s_L^2)を算出し、更に(R2.6)式によって室間再現分散(s_R^2)を算出する[1)2)]。

$$\text{併行分散}(s_r^2)=V_r \quad \cdots \text{(R2.4)}$$

$$\text{純粋な室間分散}(s_L^2)=\frac{V_L-V_r}{n} \quad \cdots \text{(R2.5)}$$

$$\text{室間再現分散}(s_R^2)=s_L^2+s_r^2 \quad \cdots \text{(R2.6)}$$

V_r: 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(偶然誤差(e))の不偏分散

V_L: 一元配置分散分析表(表 2)の変動要因(試験室間(L))の不偏分散

得られた併行分散及び室間再現分散から、(R2.7)式及び(R2.8)式によって併行標準偏差(s_r)及び室間再現標準偏差(s_R)を算出し、更に(R2.9)式及び(R2.10)式によって併行相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)を算出する[2)3)]。

$$\text{併行標準偏差}(s_r)=\sqrt{s_r^2} \quad \cdots \text{(R2.7)}$$

$$\text{室間再現標準偏差}(s_R)=\sqrt{s_R^2} \quad \cdots \text{(R2.8)}$$

$$\text{併行相対標準偏差}(RSD_r,\%)=\frac{s_r}{m}\times 100 \quad \cdots \text{(R2.9)}$$

$$\text{室間再現相対標準偏差}(RSD_R,\%)=\frac{s_R}{m}\times 100 \quad \cdots \text{(R2.10)}$$

m: 共同試験成績の有効データの総平均値

注(1) $V_L < V_r$ の場合は、$V_L = V_r$ (すなわち、(R2.5)式の純粋な室間分散(s_L^2)＝0)と見なし、(R2.6)式で

は$s_R{}^2 = s_r{}^2$とおく。

(**2**) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。

(**3**) 平均値及び標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。

(3) 日を変えての反復試験成績により中間精度及び併行精度の算出手順

(3.1) 真値及び分散の推定

実際の統計解析では、真値(μ)、真の日間分散($\sigma_{(T)}{}^2$)及び真の併行分散($\sigma_r{}^2$)は未知であり、日を変えての反復成績から得られる推定値に置き換えて、それぞれ平均値(m)、日間分散($s_{(T)}{}^2$)及び併行分散($s_r{}^2$)と表記する。

(3.2) 一元配置分散分析

日を変えての反復試験の試験成績ついて一元配置分散分析を実施し、表 3 の各変動要因の不偏分散(V)を求める。

表3　一元配置分散分析表

変動要因	平方和(S)	自由度(φ)	不偏分散(V)	分散の期待値($E(V)$)
日間 (T)	SS_T	$p-1$	V_T	$\sigma_r{}^2+n\times\sigma_{(T)}{}^2$
偶然誤差 (e)	SS_r	$p\times(n-1)$	V_r	$\sigma_r{}^2$

備考 3. 一元配置分散分析は、市販の統計ソフトや表計算ソフトのツールを用いて容易に行える。この場合、用語が異なることがあるので留意すること。(日間(T)→グループ間、偶然誤差(e)→グループ内、平方和→変動 等)

備考 4. 不偏分散(V)は平方和／自由度によって算出される。

(3.3) 中間精度び併行精度の算出

表 3 の各変動要因の分散の期待値$E(V)$の関係が成り立つことから、(R2.11)式及び(R2.12)式によって併行分散($s_r{}^2$)及び日間分散($s_{(T)}{}^2$)を算出し、更に(R2.13)式によって中間分散($s_{I(T)}{}^2$)を算出する[2)4)]。

$$\text{併行分散}(s_r{}^2) = V_r \quad \cdots \text{(R2.11)}$$

$$\text{日間分散}\left(s_{(T)}{}^2\right) = \frac{V_T - V_r}{n} \quad \cdots \text{(R2.12)}$$

$$\text{中間分散}\left(s_{I(T)}{}^2\right) = s_{(T)}{}^2 + s_r{}^2 \quad \cdots \text{(R2.13)}$$

V_r: 一元配置分散分析表(表 3)の変動要因(偶然誤差(e))の不偏分散

V_T: 一元配置分散分析表(表 3)の変動要因(日間(T))の不偏分散

得られた併行分散の推定値及び中間分散の推定値から、(R2.14)式及び(R2.15)式によって併行標準偏差(s_r)及び中間標準偏差($s_{I(T)}$)を算出し、更に(R2.16)式及び(R2.17)式によって併行相対標準偏差(RSD_r)及び中間相対標準偏差($RSD_{I(T)}$)を算出する[2)3)]。

併行標準偏差$(s_r) = \sqrt{{s_r}^2}$　　・・・（R2.14）

中間標準偏差$(s_{I(T)}) = \sqrt{{s_{I(T)}}^2}$　　・・・（R2.15）

併行相対標準偏差$(RSD_r, \%) = \frac{s_r}{m} \times 100$　　・・・（R2.16）

中間相対標準偏差$(RSD_{I(T)}, \%) = \frac{s_I}{m} \times 100$　　・・・（R2.17）

m: 日を変えての反復試験成績の総平均値

注(**4**)　$V_T < V_r$ 場合は、$V_T = V_r$（すなわち、(R2.12)式の日間分散$({s_{(T)}}^2) = 0$)と見なし、(R2.13)式では ${s_{I(T)}}^2 = {s_r}^2$ とおく。

(4) 日を変えての反復試験成績により中間精度及び併行精度の算出例

亜りん酸塩を含む試料 1 及び試料 2 を用い、く溶性りん酸の日を変えての反復試験を実施した成績例を表 4 に示す。各試料の試験成績についてそれぞれ一元配置分散分析を実施し、各変動要因の不偏分散(V)を求める(表 5)。

(R2.11)式～(R2.17)式により、試料 1 及び試料 2 の中間精度並びに併行精度を算出した例を表 6-1 及び表 6-2 に示す。なお、各標準偏差の結果は測定値の桁まで表記し、各相対標準偏差の結果は小数第一位まで表記する。

表4　日を変えた反復試験の試験成績例　（質量分率(%)）

	試験日(要因)							総平均値
試料No	1	2	3	4	5	6	7	(m) [1)]
試料1	51.20	52.15	51.00	51.35	51.35	51.38	51.28	51.38
	51.45	51.85	51.09	51.28	51.10	51.38	51.43	
試料2	5.18	4.90	5.01	5.15	5.14	5.13	5.21	5.10
	5.00	5.12	5.06	5.14	5.07	5.11	5.18	

1)　平均値は測定値の桁に丸めて表記する。

表5　一元配置分散分析表

試料No	変動要因	平方和(S)	自由度(φ)	不偏分散(V)	分散の期待値($E(V)$)
試料1	日間（T）	1.0570	6	0.17616	${\sigma_r}^2 + n \times {\sigma_{I(T)}}^2$
	偶然誤差（e）	0.1253	7	0.01789	${\sigma_r}^2$
試料2	日間（T）	0.0478	6	0.00797	${\sigma_r}^2 + n \times {\sigma_{I(T)}}^2$
	偶然誤差（e）	0.0448	7	0.00640	${\sigma_r}^2$

表6-1　日を変えた反復試験の試料1の成績からの中間精度及び併行精度の算出[1)]

変動要因	計算式	計算	結果
併行分散(s_r^2)	$= V_r$	= 0.01789	0.01789
併行標準偏差(s_r)[2)]	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.01789}$	0.13 (%)[4)]
併行相対標準偏差(RSD_r)[3)]	$= (s_r/m)\times 100$	= (0.1338/51.38)×100	0.3 (%)
日間分散($s_{(T)}^2$)	$= (V_T \neg V_r)/n$	= (0.17616¬0.01789)/2	0.07914
中間(日間)分散($s_{I(T)}^2$)	$= s_T^2 + s_r^2$	= 0.07914+0.01789	0.09703
中間標準偏差($s_{I(T)}$)[2)]	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.09703}$	0.31 (%)[4)]
中間相対標準偏差($RSD_{I(T)}$)[3)]	$= (s_{I(T)}/m)\times 100$	= (0.3115/51.38)×100	0.6 (%)

1) 計算途中においては数値の丸めを実施しない。
2) 標準偏差は測定値の桁に丸めて表記する。
3) 相対標準偏差は小数第一位に丸めて表記する。
4) 質量分率

表6-2　日を変えた反復試験の試料1の成績からの中間精度及び併行精度の算出[1)]

変動要因	計算式	計算	結果
併行分散(s_r^2)	$= V_r$	= 0.00640	0.00640
併行標準偏差(s_r)[2)]	$= \sqrt{s_r^2}$	$= \sqrt{0.00640}$	0.08 (%)[4)]
併行相対標準偏差(RSD_r)[3)]	$= (s_r/m)\times 100$	= (0.0800/5.10)×100	1.6 (%)
日間分散($s_{(T)}^2$)	$= (V_T \neg V_r)/n$	= (0.00797¬0.00640)/2	0.00078
中間(日間)分散($s_{I(T)}^2$)	$= s_T^2 + s_r^2$	= 0.00078+0.00640	0.00718
中間標準偏差($s_{I(T)}$)[2)]	$= \sqrt{s_{I(T)}^2}$	$= \sqrt{0.00718}$	0.08 (%)[4)]
中間相対標準偏差($RSD_{I(T)}$)[3)]	$= (s_{I(T)}/m)\times 100$	= (0.0848/5.10)×100	1.7 (%)

脚注は表6-1を参照

別紙　各濃度レベルにおける真度の目標及び精度の目安

肥料の分析に使用されるクロマトグラフ法(1)並びにクロマトグラフ法以外の試験法の評価のための各濃度レベルにおける真度(回収率)の目標及び精度の目安を表 1 及び表 2 に示した。真度は、概ね表 1 の回収率以内であることを目標とする。精度は、表 2 の各相対標準偏差の 2.0 倍まで許容する。

なおこの真度の目標及び精度の目安は、肥料分析法の性能評価結果より整理され、肥料等技術検討会において協議・承認されたものである。濃度レベルの設定、目標値及び許容範囲は、コーデックス委員会(国際食品規格委員会、CAC)のガイドライン、IUPAC のプロトコル、AOAC INTERNATIONAL のガイドライン等を参考に作成している。

注(1)　ガスクロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ質量分析法、高速液体クロマトグラフ法、高速液体クロマトグラフ(タンデム)質量分析法、イオンクロマトグラフ法等をいう。

表1　各濃度レベルにおける真度の目標

濃度レベル	クロマトグラフ法 回収率 (%)	クロマトグラフ法以外の試験法 回収率 (%)
≧25 %(質量分率)	90～108	98～102
≧10 %(質量分率)	90～108	97～103
≧1 %(質量分率)	85～110	96～104
≧0.1 %(質量分率)	85～110	94～106
≧100 mg/kg	80～115	92～108
≧10 mg/kg	70～120	90～110
≧1 mg/kg	70～120	85～115
≧100 µg/kg	70～120	85～115
≧10 µg/kg	70～120	80～120
<10 µg/kg	60～125	75～125

表2　各濃度レベルにおける精度[1)]の目安

濃度レベル	クロマトグラフ法			クロマトグラフ法以外の試験法		
	室間再現相対標準偏差 (%)	中間相対標準偏差 (%)	併行相対標準偏差 (%)	室間再現相対標準偏差 (%)	中間相対標準偏差 (%)	併行相対標準偏差 (%)
≧25 %(質量分率)	8	6.5	4	2.5	2	1
≧10 %(質量分率)	8	6.5	4	3	2.5	1.5
≧1 %(質量分率)	8	6.5	4	4	3.5	2
≧0.1 %(質量分率)	8	6.5	4	6	4.5	3
≧100 mg/kg	8	6.5	4	8	6.5	4
≧10 mg/kg	11	9	6	11	9	6
≧1 mg/kg	16	13	8	16	13	8
≧100 µg/kg	22	18	11	22	18	11
≧10 µg/kg	22	18	11	22	18	11
<10 µg/kg	22	18	11	22	18	11

1) 精度は、各相対標準偏差の2.0倍まで許容する。

参考文献

1) ISO/IEC 17025 (2017): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2018,「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)

2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011) <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>

3) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002) <http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf>

4) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009) <www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>

5) ISO 13528 (2015): “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons” (JIS Z 8405: 2021,「試験所間比較による技能試験に使用する統計的方法」)

6) ISO Guide 35 (2006): “Reference materials－General and statistical principles for certification” (JIS Q 0035 : 2008,「標準物質－認証のための一般的及び統計的な原則」)

7) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)