

Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations

農薬製剤の分析方法の妥当性を確認するための検証方法についての指針

この文書は、2003年7月28日にCIPACの文書番号3807/Rを印刷してcipac.orgで公開したものを、誤記を修正して書き起こしたものである。

1. 目的

本指針は主に製剤の分析方法を対象としているが、原体中の有効成分の含有量にも適用でき、また物理的性状の試験方法にも部分的に適用できる(3.2.2項参照)。残留分析や微量分析には適用されない。

本指針の推奨事項は、PSD(訳者注:Pesticides Safety Directorate、英国、2008.4 Health and Safety Executiveに改組、2009.4 Chemical Regulation Directorateに改組)に提出する試験への適用を特に意図したものであるが、EC指令の統一原則(Uniform Principles)案(訳者注)に示された製剤の分析法のパリデーション(妥当性検証)の幅広い要件を満たす必要がある。

訳者注:COUNCIL DIRECTIVE 97/57/EC of 22 September 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997L0057&from=LT>)のこと。

Annex VI: UNIFORM PRINCIPLES FOR EVALUATION AND AUTHORIZATION OF PLANT PROTECTION PRODUCTSの2.6. Analytical methodsの2.6.1. for formulation analysisにおいて、評価項目が定められている。

2. 定義

2.1. 誤差

本指針で検証の対象としている誤差の種類は以下のとおりである:

2.1.1. 確率的誤差

これは通常は小さな誤差で、平均的な結果の周辺に結果の広がりをもたらすものである。言い換えれば、手順の併行精度または室間再現性を規定するものである。

2.1.2. 系統的誤差

これは、観測された平均値が真の値よりも高くなったり低くなったりするような、得られた結果に偏りを生じさせる誤差のことである(つまり、結果を不正確にするような特徴が手順にある)。

2.2. 精度

精度とは、確率的な誤差の尺度であり、併行精度または室間再現性として表現されることもある。これらの用語は、ISO 5725-1986Eで定義されている(訳者注:ISO 5725-2 2019年版が最新):

2.2.1. 併行精度とは、同一の実験室において、同一の試験材料を用いて同一の方法で、同一の実験者が同一の装置を用いて短時間のうちに得られた、相互に独立した試験結果の一致度(ばらつき)のことである。

2.2.2. 室間再現性とは、同一の試験材料に対して同一の方法で、異なる試験所で異なる実験者が異なる装置を用いて得られた試験結果の一致度のことである。

2.3. 精確度

分析における精確度とは、観測された結果が試料中の分析成分の真の値にどの程度対応しているかの度合いを示すものである。

2.4. 直線性

分析における直線性とは、試料中の分析物の濃度(量)に比例した検査結果を得ることができる性能(所定の範囲内)のことである。

2.5. 特異性

分析における特異性とは、定量に用いられる信号に上昇を生じさせる種と定義される。

3. 分析方法の妥当性

ほとんどの農薬製造者は、分析方法の妥当性検証のための内部手順を持っていると思われる。その手順が本指針の要求事項に適合していることを確認することは、製造者の責任となる。

提出された分析方法のバリデーションデータは、以下の問題に対処する必要がある：

- ・分析対象成分（必要に応じて内部標準物質も）に対する分析方法の応答の直線性。
- ・手順の精度の推定値。
- ・手順の精度の証明。
- ・補助成分による妨害がないことの証明。
- ・定量される種の定義。

室間再現性は、広く一般的に使用されることが提案されている方法にとって重要であるが、その評価は本指針の一部としては必要ないと考えられる。

室間再現性は（必要であれば）、CIPAC または AOAC による大規模共同試験を通じて評価するのが最善である。

3.1. 直線性

分析対象成分に対するレスポンスの直線性は、少なくとも分析対象成分の公称濃度±20%の範囲内で実証する必要がある。少なくとも3つの濃度をそれぞれ繰り返して測定する必要がある。作成された検量線は、傾き、切片、相関係数のデータとともに提出する必要がある。

測定された傾きは、レスポンスと分析対象成分の濃度の間に明確な相関関係があることを示す必要がある。測定結果は、相関係数（r）が公称値±20%の範囲で 0.99 以上であることを意味する直線性からの有意な逸脱を示してはならない。これが当てはまらない場合、提出者はどのようにして方法の妥当性を維持するかを説明しなければならない。また、非線形応答を意図的に使用した場合には、その説明も提供しなければならない。

3.2. 精度

3.2.1. 化学分析

化学分析の指針では、再現性の簡単な評価が受け入れられる。最低でも試料を5回の繰り返し測定を行い、相対標準偏差（RSD）（%）を含む結果の簡単な統計的評価を行う必要がある。

適切と思われる場合は、外れ値に対する適切な検定（例：Dixon または Grubbs 検定）を結果に適用することができる（訳者注：Dixon 検定は外れ値1つのみ検出可能）。しかし、結果が破棄された場合は明確に示され、異常値が発生した理由を説明する試みがなされる必要がある。

結果の許容範囲は、修正された Horwitz (文献 1) の式に基づく必要がある。

$$RSD_r < 2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67 = \text{Horwitz 式による相対標準偏差の予測値 (PRSD) より小さい}$$

ここで、C は試料中の分析対象成分の濃度（10 進法の分数）。

Horwitz 方程式の説明と実例は附属書 1 に記載されている。

3.2.2. 物理的・化学的性状

物理的特性または物理化学的性状の測定については、公定法（CIPAC または OECD など）を使用する場合、更なる妥当性検証は必要ない。これは、そのような方法の密接な適応にも適用される。別の方法を使用する場合は、その再現性を決定する必要があるが、Horwitz 式に準拠する必要はない。

3.3. 精確度

分析手順の精確度は、既知の重量の分析対象成分を含む実験室で調製された「合成」製剤の少なくとも 4 つの試料の調製および分析によって評価される必要がある。結果は、付属書 2 に記載されている Student の t-検定またはその他の受け入れ可能なアプローチを用いて評価することができる。

3.4. 分析対象成分以外による妨害

補助成分による妨害は、分析方法に系統的な誤差を与えるため、これは精度の評価によってある程度カバーされる。しかし、妨害がないことを証明するため、あるいは発生している妨害を定量化するために、製剤ブランクを用いた分析を実施する必要がある。試料のクロマトグラムまたはその他の結果を提出する必要がある。

有効成分の原体中に特定の不純物が存在することが知られている場合には、分析に使用した条件下で分析成分または内部標準物質の測定された総ピーク面積に対して、これらの不純物が 3%以上寄与しないことを証明しなければならない。このような既知のバイアスがある場合には、提出された結果が補正されているか否かを示さなければならない。

3.5. 特異性

分析方法の特異性は、分析対象となる種の観点から定義される必要がある。通常、GC/MS、LC/MS、ダイオードアレイ検出器、または分光学的検査によるピーク補正などを用いて、分析種の分光学的検査が行われる必要がある。これは通常、有効成分の特性評価法または分析用標準品のバリデーション法のいずれかで行われる。

これらのほとんどの場合、クロマトグラフィー法である。製剤分析がこれらの方法の一つに基づいている場合は、この作業を繰り返す必要はない。

クロマトグラフィー法が全くのオリジナルである場合には、その方法の特異性を確立する必要がある。分光法を用いる場合は、スペクトルから分析種の同一性を推測することができる。

実際に定量される分析種は、提出物に記載される必要がある。それができない場合は、検討のために理由のある説明が提供されなければならない。

4. 一般的な事項

4.1. 検出システムの直線性応答の範囲は、多くの場合、装置に非常に依存している。ある分析方法を異なるシステムで使用する場合は、直線性を再確認する必要がある。

4.2. 本指針で規定されている最低値を下回る性能の方法が提出された場合、その方法が許容できると考えられる理由について詳細な論拠を示す必要がある。

4.3. 分析方法の妥当性を裏付けるために有用と思われるデータがさらに提出される必要がある。

これには、室間再現性の評価（例：共同試験による）や、軽微な変更に対する手順の堅牢性に関する情報が含まれる場合がある。

4.4. バリデーションデータの複数の製剤への適用性。

一般的に、バリデーションデータは製剤固有のものとする必要がある。しかし、製造業者が非常に類似した製剤を多数製造している場合は認識されており、これらに対して単一の方法を使用することが可能な場合がある。相互適用性の基準は以下のとおりである：

- a) 製剤に同一の（または非常に類似した）補助成分が含まれている必要がある。補助成分に質的な変化があった場合は、妨害の可能性がないか確認する。

- b) 製剤の物理化学的性質（pH など）に著しい違いがあってはならない。
- c) 分析溶液中の有効成分の濃度は、実証された直線性の範囲内でなければならない。
- d) 相対的な補助成分の濃度が変化しても、重大な妨害が生じてはならない。

このバリデーションの相互適用性に基づいて提出された分析方法は、上記の点を考慮する必要がある。

4. 5. 提示された分析方法の妥当性検証では、標準物質として認証された標準物質（またはトレーサブルのようなもの）のみを使用する必要がある。この要件は内部標準物質には適用されない。

5. 参考文献および利用可能な文書

1. K. W. Boyer, W. Horwitz and R. Albert : *Analytical Chemistry* **57**, 454-459 (1985).
2. Miller J.C. and Miller J.N. 分析化学のための統計学、 Ellis Horwood、 1988（第2版）。
3. 分析方法の性能を評価するために実施する CIPAC 共同試験の指針（GIFAP により公開中）。
4. 国際標準 ISO 5725. 精度の検定方法—併行精度と室間再現性. 参照番号: ISO 5725 – 1986 (E).
訳者注：最新は、ISO 5725-2 (2019)

付属書 1 室間再現性を受け入れるための Horwitz 式

この式は、長年にわたって AOAC が行ってきた数多くの共同試験を実際に検討し、Horwitz ら（文献 1）が定義したものである。この文書では、0.25%から 100%の範囲で例を示している。

式は次のとおりである： $RSD_R \% = 2^{(1-0.5\log C)}$

ここで、 RSD_R %は実験室間の変動係数（CV）であり、C は試料中の分析対象成分の濃度を 10 進数で表したものである。

つまり、純度 100%の試料の場合、 $C = 1$ 、 $\log C = 0$ となり、 $RSD_R = 2^{(1-(0.5 \times 0))} = 2^1 = 2$ となる。

50%の試料（例：500 g/kg WP）の場合、 $C = 0.5$ 、 $\log C = -0.3010$ となり、 $RSD_R = 2^{(1-(0.5 \times -0.3010))} = 2^{1.1505} = 2.22$ となる。

その他の値は次のとおり：

分析対象成分濃度	RSD_R
20%	2.55
10%	2.83
5%	3.14
2%	3.60
1%	4.00
0.25%	4.93

Horwitz は、 RSD_r （再現性の CV）の値は、通常、 RSD_R の半分から 2/3 の間であると述べている。このため、併行精度の許容値は、 RSD_R の Horwitz 値×0.67 として提案されている。

上記の値の場合、次のようになる：

分析成分%	Horwitz RSD_R	許容可能な RSD_r の提案値
100	2	1.34
50	2.22	1.49
20	2.55	1.71
10	2.83	1.90
5	3.14	2.10
2	3.60	2.41
1	4.0	2.68
0.25	4.93	3.30

現在、CIPAC による共同試験における許容基準として、修正されていない Horwitz 式が使用されている。

訳者注：後日、指針「Extension of the "Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations" with the HorRat value」が制定された。

付属書 2 精確度の推定

以下の手法は、手順の精確度を推定するための様々なアプローチを示している。

1) 手順の精度は、既知の量の分析対象成分を含むいくつかの「試料」を調べることによって決定することができる。これらは、既知の量の分析物（分析方法で要求される量に対応する）が添加された実験室で調製された補助成分の混合物である必要がある。添加される分析物は、純度がわかっている有効成分の原体である必要がある。試料採取誤差をなくすために、試料全体を分析する必要がある。提案された手順に正確に従って、少なくとも 4 回の回収率試験を行う必要がある。結果は次のように処理される必要がある：

- (a) 平均回収率と回収率の相対標準偏差を算出する。
- (b) これらの結果と室間再現性の推定から得られた結果の RSD に F 検定を適用し、回収結果が推定精度と有意に異なる RSD を示さないことを確認する（サンプルがわずかに異なって調製されているため）。
- (c) (b)が満足 of いくものであれば、回収結果に Student の t-検定を適用する。
すなわち、観察された回収値（平均値）が、ランダムな誤差によってのみ添加された濃度と異なることを証明する（系統的な誤差の証拠はない）。

$$|t| = \left| \frac{(\bar{x} - \mu) \sqrt{n}}{s} \right|$$

\bar{x} = 試料の平均値

μ = 真の値

n = 試料数

s = 標準偏差

t の棄却限界値は、様々な自由度（例：サンプル数-1）の統計表に記載されている。t で得られた値が棄却限界値を超えなければ、与えられた信頼区間（通常は 95% で十分）では系統的な誤差があるとは証明されない。

2) 上記の式は、平均値の信頼区間を得るために再構成することができる。この信頼区間は、真の値が（ある信頼度で）存在すると言える範囲として定義される。

$$\mu = \bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

模造剤の平均回収率を以下のように算出する：

$$\text{平均回収率\%} = \frac{\text{定量された平均含有量\%}}{\text{理論的含有量\%}} \times 100$$

この平均回収率は、以下の範囲内であることが望ましい：

有効成分\% (名目上)	平均回収率\%
>10	98 - 102
1 - 10	97 - 103
<1	95 - 105

訳者注：平均回収率の許容範囲は、SANCO/3030/99 rev. 4 と同じ。ただし、小数点以下はないので、これに合わせた。

3) 上記のいずれの場合も、試料採取誤差をなくすために、完全な模造混合物を分析する。同じ手順を組成既知の混合物の補助試料に適用することもできるが、これは試料採取時に均質でない製剤の平均値の信頼区間に人為的に大きな値を与える傾向があることに留意しなければならない。

4) 分析する製剤を再現することが非常に困難な場合（例：ペレットまたはブロックペイトタイプの場合）は、標準添

加法で精度を推定することができる。この場合、標準添加法をどのように行ったかの詳細を提出する必要がある。