

令和4年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品添加物の指定等手続きの国際整合に資する研究

（課題番号：22KA1008）

令和4年度研究分担報告書

食品添加物の成分規格試験に用いる分析法の留意事項について

研究分担者 窪崎敦隆 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部

研究要旨

新たな食品添加物を使用したい場合（新規指定）、成分規格や使用基準等を改正したい場合（規格・基準改正）には、厚生労働大臣にその要請を行う必要がある。その際、要請者が要求される根拠情報をまとめた要請書が十分な理解の上で作成するにあたり、要請者が食品添加物の成分規格試験を設定するとき、適切な分析法が選択され、品質が十分に確保できていることが客観的に判断できる十分な情報を要請資料として提出できるように「食品添加物の成分規格試験に用いる分析法についての留意事項」をまとめた。

研究協力者 杉本直樹
国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

用基準改正に関する指針（衛化第29号別添，一部改正 生食発0929第3号）に基づき，その基本的な考え方「食品添加物は，人の健康を損なうおそれがなくかつその使用が消費者に何らかの利点を与えるものでなければならない。」を満たす要請書を作成して厚生労働省へ提出する必要がある。すなわち，要請書には，公衆衛生の観点から科学的見地に基づき審議されるとき，その審議において公正な判断を可能とする正確な情報が記載されていなければならない。

A. 研究目的

我が国では，食品衛生法で使用が認められている食品添加物のみが使用できる，ポジティブリスト制で食品添加物が管理されている。よって，新たな食品添加物を使用したい場合（新規指定）、成分規格や使用基準等を改正したい場合（規格・基準改正）には，厚生労働大臣にその要請を行う必要がある。新規指定又は規格・基準改正を要請する者（以下，要請者）は，食品添加物の指定及び使

これまでに，前述の指針以外にも，要請者が新規指定又は規格・基準改正を

求めたとき、健康影響評価の考え方を理解するため、食品安全委員会からは食品健康影響評価指針が発出された。更に、新規指定又は規格・基準改正の手続きの理解を深めるために、「食品添加物の指定及び使用基準改正要請資料作成に関する手引（以下、手引）」を通知されると共に、要請書の作成等を支援する組織として、食品添加物指定等相談センター（以下、FADCC）が設立された。FADCCにおいては、公平且つ科学的見地から要請者からの相談に対応しているところではあるが、提出される要請書及び付随する資料の「質」に頭を悩ませている。すなわち、各種の指針、手引等により、要請書の作成法や要件は要請者に理解されているが、根拠情報に必要とされる客観性や正確性が十分に理解されていないと思われ、記述された内容の信頼性が判断できない場合も多々ある。最も大きな問題として上げられるのは、要請品目の成分規格及びその設定根拠の正当性の欠如である。成分規格が必要且つ十分な精度で設定できているとき、その品質は一定の範囲内で制御できていると判断できる。しかし、試験法に採用される分析法の妥当性が確認されていなかったり、試験法自体の精度が悪かったり、一定の品質の製品が供給されていないと判断せざるを得ない場合も多い。更に、このよう

な一定の品質が確保されているとはいえない製品では、安全性評価や有効性評価等の結果に科学的な正当性があるとは言えない。

本研究では、上述の問題に対応するため、「食品添加物の成分規格試験に用いる分析法の留意事項」をまとめることを目的とした。すなわち、要請者が食品添加物の成分規格試験を設定するとき、適切な分析法が選択され、品質が十分に確保できていることが客観的に判断できる十分な情報を要請資料として提出できるようにその留意点をまとめた。

B. 研究方法

第十八改正日本薬局方：参考情報 G1.理化学試験関連 分析法バリデーション <G1-1-130>を参考に「食品添加物の成分規格試験に用いる分析法の留意事項」をまとめた。

C. D. 結果及び考察

日本薬局方原案作成要領には、原案を作成に関する細則がまとめられている。書式、具体的な記載方法が解説されており、同要領に従えば、完成度の高い原案が作成されるようになっている。また、成分規格の試験法に用いる分析法が使用する意図に合致すること、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる程度であることを科学的に立証できるように、日本薬局方の参考情報に分

析法バリデーションが収載されている。

食品添加物の成分規格の設定においても、日本薬局方の原案作成要領と同様な考え方が取り入れられており、「食品添加物の成分規格作成の解説」(http://www.nihs.go.jp/dfa/dfa_jp/img/sakuseiforweb_15.pdf)が国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部のホームページ上で以前より公開されている。したがって、書式、具体的な記載方法については要請者に周知されていると考えられる。一方、試験法に採用する分析法の正当性を判断するものはこれまで公開されておらず、要請者は、試験法に設定する分析法に求められる許容誤差等の評価に関する情報が得られていない状態であった。そこで、日本薬局方の参考情報の分析法バリデーションを参考に食品添加物の試験法に用いる分析法の留意事項をまとめた。日本薬局方に収載される医薬品の試験法は、製品品質を一定に確保するために設定されている点において、食品添加物の試験法設定の意義と等しいことから、分析法バリデーションに関する考え方は、同様であるべきと思われた。一方、留意事項をまとめる目的が、新たな食品添加物の成分規格設定及び既収載品目の規格改正を行うにあたり、必要且つ十分な根拠情報が提出されるように周知するためであることから、試験法、実験データ、資料の作成法等について最低限の留意事項を盛り込んだ。別添資料 1 は、令和 4 年 11 月に作成し

た留意事項(案)である。留意事項(案)について、令和 5 年度中に添加物業界及び専門家から意見を募り、修正後、一般に公開する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

食品添加物の成分規格試験に用いる分析法についての留意事項（案）

令和 4 年 11 月

内容

1	1. 添加物の成分規格に設定する試験法の分析法バリデーション	4
2	1-1. 概要の作成	4
3	1-2. 分析法の詳細を示す資料作成	4
4	1-3. 分析法の妥当性を示す資料作成	6
5	2. 分析能パラメーター (Validation characteristics)	7
6	2-1. 真度 (Accuracy/Trueness)	7
7	2-1-1. 定義	7
8	2-1-2. 評価方法	7
9	2-2. 精度 (Precision)	7
10	2-2-1. 定義	7
11	2-2-2. 評価方法	8
12	2-3. 特異性 (Specificity)	8
13	2-3-1. 定義	8
14	2-4. 検出限界 (Detection limit)	9
15	2-4-1. 定義	9
16	2-4-2. 評価方法	9
17	2-5. 定量限界 (Quantitation limit)	9
18	2-5-1. 定義	9
19	2-5-2. 評価方法	9
20	2-6. 直線性 (Linearity)	10
21	2-6-1. 定義	10
22	2-6-2. 評価方法	10
23	2-7. 範囲 (Range)	10
24	2-7-1. 定義	10
25	2-7-2. 評価方法	10
26	3. 分析法を適用する試験法の分類	10
27	4. システム適合性	11
28	4-1. 概要	11
29	4-2. システム適合性設定時の留意事項	12
30	4-2-1. 許容限度値の設定	12
31	4-2-2. システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法	13
32	4-3. 分析システム変更時の考え方(分析システム変更時の管理)	14
33	5. 分析法バリデーションの実施方法	14
34	5-1. 標準物質, 試薬等 (Reference Material, Reagent, etc.)	15
35	5-2. 特異性 (Specificity)	17
36	5-3. 直線性 (Linearity)	18

37	5-4. 範囲 (Range)	19
38	5-5. 真度 (Accuracy)	20
39	5-6. 精度 (Precision)	21
40	5-7. 検出限界 (Detection limit)	21
41	5-8. 定量限界(Quantitation limit)	23
42	5-9. 頑健性 (Robustness)	24
43	5-10. システム適合性 (System suitability testing)	25
44	6. 分析法バリデーションで用いられる用語	25

食品添加物の成分規格試験に用いる分析法についての留意事項

食品添加物（以下、添加物と略す）の成分規格は、通例、品目名、構造式、組成式、定義、含量、確認試験、純度試験、定量法により構成される。成分規格試験を行うとき、その品質及び安全性の確保を目的とした試験を行うとき、目標とする精確さを満たした分析法を用いなければならない。すなわち、成分規格試験を実施しようとする者は、当該添加物に対して適切な分析法を選択し、得られる試験結果の妥当性が確認された分析法を試験に用いる必要がある。目標とする特異性、真度及び精度は、添加物として使用しようとする製品（原体、製剤）の有効性、安全性、使用目的、使用基準等より、製品毎に異なるが、現時点での科学技術、その他の知見に照らし合わせ、十分に確保されていなければならない。

添加物の新規指定又は成分規格改正を要請する目的で成分規格案を示す場合、食品添加物公定書に新たに収載する成分規格案又は食品添加物公定書に収載されている成分規格の改正案を提案する場合、及び通則の規定に基づき、食品添加物公定書に収載されている試験法以外の分析法を用いて試験する場合には、成分規格試験に使用する分析法について、原則として本文に基づく分析法バリデーションを行い、実施者の責任において、その結果を示す資料を提出しなければならない。

当該添加物の成分規格について資料を作成しようとするとき、以下の1)～4)に分類し、それぞれ試験項目毎にまとめて資料を作成しなければならない。

1) 成分規格又は成分規格案

既に成分規格が告示されている場合は、その成分規格を示す。

添加物の新規指定又は成分規格改正を要請する場合、食品添加物公定書に新たに収載する成分規格案又は食品添加物公定書に収載されている成分規格の改正案を提案する場合及び食品添加物公定書に収載されている試験法以外の分析法を用いて試験する場合には、食品添加物公定書に収載されている他の添加物の成分規格を参考に、成分規格案を作成して示す。

2) 分析法の概要

成分規格試験に用いた分析法の原理、概要を示す。

なお、食品添加物公定書に収載されている一般試験法を用いる場合は、その旨を示し、分析法の概要を省略してよい。

- a) 確認試験
- b) 純度試験
- c) 定量法
- d) その他

3) 試験結果及び分析法バリデーション結果

成分規格試験の成績と共に、試験に用いた分析法のバリデーション結果を示す。

- a) 確認試験
- b) 純度試験
- c) 定量法
- d) その他

4) その他，資料，参考情報等

- a) 確認試験
- b) 純度試験
- c) 定量法

【試験法の分析法バリデーションの留意点】

1. 添加物の成分規格に設定する試験法の分析法バリデーション

添加物の試験法には必要に応じて、様々な分析法を用いることができる。分析法バリデーションとは、添加物の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる程度であることを科学的に立証することである。分析法の能力は種々の分析能パラメーターにより表される。提案する分析法の分析能パラメーターが、試験法の規格値などを基にして設定する基準を満たしていることを実証することにより、分析法の妥当性を示すことができる。

1-1. 概要の作成

試験法に設定する分析法の原理の簡潔な説明、その分析法より得られる情報、他の分析法と比較したときの利点、分析法の設定の必要性、バリデーションの要約などを記載する。分析法を改正する場合には、既存の分析法の限界及び新たに提案する分析法によりもたらされる利点も記載する。

1-2. 分析法の詳細を示す資料作成

添加物の成分規格の試験法に使用しようとする分析法を正しく評価できるように、また、第三者が追試を行って再評価できるように、試験法毎に分析法の詳細に記載する。

分析法には、分析の具体的な手順、標準試料の調製法、試薬・試液の調製法、留意事項、分析システムが正しく作動していることを検証する方法(例えば、クロマトグラフィーにおけ

る分離効率の検証), 分析結果を導くための式及び測定回数等が含まれる。また, 食品添加物公定書に規定されていない装置又は器具を用いる場合には, それについても図や写真を用いて詳細に記載する。分析の基準となる定量用標品, 試薬, 標準品を規定する場合には, その物質の物理的, 化学的又は生物学的な特性値を明らかにし, 試験法を記載する。

【記載例】

設定する試験法: 純度試験 オクテニルコハク酸デンプンナトリウム中の残存オクテニルコハク酸の定量

適用する分析法: HPLC/UV によるオクテニルコハク酸の定量

試験法, 規格値: 純度試験 残存オクテニルコハク酸 0.8%以下

本品約 0.1 g を精密に量り, メタノール 20 mL を加え, 18 時間以上振とうする。毎分約 3000 回転で 5 分間遠心分離し, 上澄液 10 mL を正確に量り, 減圧下, 40°C で乾固し, 水を加えて溶かして正確に 5 mL とし, 検液とする。別に, オクテニルコハク酸無水物約 20 mg を精密に量り, 水酸化カリウム溶液 (7→1250) 10 mL を加え, 80°C で 3 時間加熱する。冷後, リン酸 (1→200) 8 mL を加え, 更に水を加えて正確に 20 mL とする。この液 2 mL を正確に量り, 水を加えて 20 mL とする。この液 1 mL, 2 mL, 5 mL 及び 10 mL を正確に量り, 水を加えて正確に 20 mL とし, 標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ 20 µL ずつ量り, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。標準液のオクテニルコハク酸の二つのピーク面積を測定し, ピークの合計面積と標準液に含まれるオクテニルコハク酸無水物濃度から, オクテニルコハク酸無水物の検量線を作成する。検液のオクテニルコハク酸の二つのピークの合計面積を求め, 検量線を用いて検液中のオクテニルコハク酸無水物としての濃度 (µg/mL) を求める。次式により試料中の残存オクテニルコハク酸の含量を求める。

残存オクテニルコハク酸 (C₁₂H₂₀O₄) の含量 (%) =

(検液中のオクテニルコハク酸無水物濃度 (µg/mL) × 1.086) / 乾燥物換算した試料の採取量 (g) × 1000

試験に用いる試薬, 器具, 装置等の情報

溶媒: メタノール (〇〇社製, Cat. No. XXX)

器具: ホールピペット 1.0 mL

装置: HPLC: 〇〇社製 LC-XXX, 検出器: 〇〇社製 PDA-XXX

カラム: 〇〇社製 X-column (4.6 mm × 25 cm, 5 µm) (担体: HPLC 用オクタデシルシリル化シリカゲル)

試薬：オクテニルコハク酸無水物，〇〇社製，Cat.No. XXX，Lot. YYY

なお，以下の規格に合致する試薬を用いる．

オクテニルコハク酸無水物 $C_{12}H_{18}O_3$ [42482-06-4] 【無水オクテニルコハク酸】

本品は，cis 及び trans 型オクテニルコハク酸無水物の混合物で，無～微黄色の液体である．

含量本品は，オクテニルコハク酸無水物 ($C_{12}H_{18}O_3$) 95.0%以上を含む．

屈折率 $n_D^{20} = 1.468\sim 1.470$

比重 $d_{20}^{20} = 1.025\sim 1.028$

定量法 本品約 1.5 g を精密に量り，200mL の共栓三角フラスコに入れる．0.5mol/L モルホリン・メタノール溶液 25mL を正確に加えて溶かし，1 時間放置した後，過量のモルホリンを 0.5mol/L 塩酸・メタノール溶液で滴定し，その消費量を S mL とする（指示薬 BANASS・ブリリアントエロー試液）．終点は，液の赤色が青紫色に変わるときとする．別に空試験を行い，0.5mol/L 塩酸・メタノール溶液の消費量を B mL とし，次式により，含量を求める．

オクテニルコハク酸無水物 ($C_{12}H_{18}O_3$) の含有量 (%)

$$\frac{(B - S) \times 0.1051}{\text{試料の採取量 (g)}} \times 100$$

1-3. 分析法の妥当性を示す資料作成

添加物の成分規格の試験法に用いられる分析法が妥当なものであることを立証する資料を示す．本資料は，分析能パラメーターを求めるための実験計画，実験データ，計算結果及び検定結果を含む．

試験項目毎に資料を作成する．

1) 試験データ

設計された試験が確実に可能な限り，試験の生データ，あるいはそれに替わるデータを示す．クロマトグラム，スペクトルデータ，その他，写真等を示す．

2) 計算結果

実測値，検量線等，計算に用いた情報を示す．計算結果等をわかりやすく表にまとめて示す．

3) 実験計画

試験法に従って実際に試験を行う際の操作手順，試験法の妥当性を確認するために必要な計画を立てる．ここで設計した実験計画に従い試験が行われてなければならない．やむを得ず，試験操作，妥当性確認のための試験の試行回数などの変更等を行った場合は，その詳細と理由を示さなければならない．

4) 検定結果

検定の方法を示すと共に計算結果等をわかりやすく表にまとめて示す．

2. 分析能パラメーター (Validation characteristics)

2-1. 真度 (Accuracy/Trueness)

2-1-1. 定義

真度とは，分析法で得られる測定値の偏りの程度のこと，真の値と測定値の総平均との差で表される．

2-1-2. 評価方法

分析法の真度の推定値は，室内再現精度又は室間再現精度を求めるときに得られる測定値の総平均と真の値との差として表される．定量用試薬，標準品，標準液の認証値又は合意された値を真の値とする．

また，特異性の高い分析法であることを示すことにより，分析法の偏りが小さいことを推論できる．

得られた真度の推定値と室間(内)再現精度から計算される標準誤差の値から，真度の 95% 信頼区間を計算する．この区間が 0 を含んでいることを確認するか，又は同区間の上限値及び下限値が分析法に要求される真度の基準の値の範囲内であることを確認する．

2-2. 精度 (Precision)

2-2-1. 定義

精度とは，均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分析して得られる一連の測定値が，互いに一致する程度のことであり，測定値の分散，標準偏差又は相対標準偏差で表される．精度は，繰り返し条件が異なる三つのレベルで表され，それぞれ，併行精度，室内再現精度及び室間再現精度という．

- i. 併行精度 (Repeatability/Intra-assay precision) : 併行精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなどの分析条件を変えずに、均質な検体から採取した複数の試料を短時間内に繰り返し分析するとき (併行条件) の精度である。
- ii. 室内再現精度 (Intermediate precision) : 室内再現精度とは、同一試験室内で、試験者、試験日時、装置、器具及び試薬のロットなどの一部又は全ての分析条件を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分析するとき (室内再現条件) の精度である。
- iii. 室間再現精度 (Reproducibility) : 室間再現精度とは、試験室を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返して分析するとき (室間再現条件) の精度である。

2-2-2. 評価方法

はじめに、精度を検討するのに十分な量の均質な試料を確保する。溶液は均質な試料である。均質な試料が得られないときには、例えば、大量の製剤を均質とみなせるまで混合粉碎した検体、又は製剤の配合成分を均質とみなせるまで混合した検体を、均質な検体として用いる。二つ以上のレベルの精度を同時に評価するためには、一元配置などのような適当な実験計画の下に実験を行うとよい。このとき、分析法の精度を正しく推定するために、十分な数の繰り返し数、分析条件の水準数及び試験室数を揃える。バリデートしようとする分析法で、考えられる可能な限りの分析の変動要因について検討する。各レベルの精度の分散、標準偏差、相対標準偏差、分散の 90%信頼区間及びこれに対応する標準偏差の区間を示す。分析法に要求される精度の基準の値に照らし合わせ、分析法を採用してもよいことを示す。通例、室間 (内) 再現精度の値から分析法の採否を決定する。

2-3. 特異性 (Specificity)

2-3-1. 定義

特異性とは、試料中に共存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のことで、分析法の識別能力を表す。個々の分析法が特異性に欠ける場合には、別の試験法によりこれを補うこともできる。

2-3-2. 評価方法

分析法を適用する試験法の目的に応じて、分析法が確実に分析対象物を確認できること、又は分析対象物の量又は濃度を正確に測定できることを確認する。特異性は、例えば、分析対象物のみを含む試料、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産物を含む検体に分析対象物を添加した試料及び分析対象物は含まず、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産物のみ

を含む試料などの分析結果を比較することにより評価できる。不純物の標準品が得られない場合には、不純物を含有すると考えられる試料、例えば、経時変化した試料などを用いることもできる。

2-4. 検出限界 (Detection limit)

2-4-1. 定義

検出限界とは、試料に含まれる分析対象物の検出可能な最低の量又は濃度のことである。検出限界では定量できるとは限らない。

2-4-2. 評価方法

通例、検出限界における消費者及び生産者の危険率が5%以下となるように検出限界を定める。検出限界は、ブランク試料又は検出限界付近の分析対象物を含む試料の測定値の標準偏差及び検出限界付近の検量線の傾きから算出される。例えば、検出限界は、測定値が正規分布し連続な場合には、検出限界付近の検量線の傾き及びブランク試料の測定値の標準偏差から、次式により求めることができる。

$$DL = 3.3 \sigma / \text{slope}$$

DL：検出限界

σ ：ブランク試料の測定値の標準偏差

slope：検出限界付近の検量線の傾き

クロマトグラフィーの場合には、測定値の標準偏差の代わりにノイズ・レベルを用いることができる。分析法の検出限界が試験の規格値よりも小さいことを確認する。

2-5. 定量限界 (Quantitation limit)

2-5-1. 定義

定量限界とは、試料に含まれる分析対象物の定量が可能な最低の量又は濃度のことである。定量限界の分析対象物を含む試料の測定値の精度は、通例、相対標準偏差で表して10%である。

2-5-2. 評価方法

定量限界は、ブランク試料又は定量限界付近の分析対象物を含む試料の測定値の標準偏差及び定量限界付近の検量線の傾きから算出される。例えば、定量限界は、測定値が正規分布し連続な場合には、定量限界付近の検量線の傾き及びブランク試料の測定値の標準偏差から、次式により求めることができる。

$$QL = 10 \sigma / \text{slope}$$

QL : 定量限界

σ : ブランク試料の測定値の標準偏差

slope : 定量限界付近の検量線の傾き

クロマトグラフィーの場合には、測定値の標準偏差の代わりにノイズ・レベルを用いることができる。分析法の定量限界が試験の規格値よりも小さいことを確認する。

2-6. 直線性 (Linearity)

2-6-1. 定義

直線性とは、分析対象物の量又は濃度に対して直線関係にある測定値を与える分析法の能力のことである。このとき、必要があれば、分析対象物の量、濃度又は測定値を正確に定義された数式により変換した値を用いてもよい。

2-6-2. 評価方法

量(濃度)が異なる分析対象物を含む試料を用意し、分析法に述べられている手順に従って各試料を繰り返し分析し、測定値を得る。回帰式及び相関係数から直線性を評価する。必要ならば、測定値の回帰式からの残差を分析対象物の量又は濃度に対してプロットし、特定の傾向が観察されないことを確認する。通例、5種類の量(濃度)が異なる試料を用いる。

2-7. 範囲 (Range)

2-7-1. 定義

分析法バリデーションにおける範囲とは、適切な精度及び真度を与える、分析対象物の下限及び上限の量又は濃度に挟まれた領域のことである。直線性のある分析法の場合には、適切な精度及び真度を与え、また、直線性が成り立つ分析対象物の下限及び上限の量又は濃度に挟まれた領域のことである。

2-7-2. 評価方法

通例、分析法バリデーションにおける範囲は、試験の規格値±20%程度でよい。範囲の上限値、下限値及び範囲の中央付近の値の試料について、精度、真度及び直線性を検討する。

3. 分析法を適用する試験法の分類

試験法は、その目的により以下に示すように大きく三つのタイプに分類することができる。

各タイプの試験法に適用する分析法のバリデーションに、通例、要求される分析能パラメーターを表に示す。これは原則であり、評価が必要な分析能パラメーターは、分析法の特性や分析法を適用する試験法の目的に依存して変わる。

- i. タイプ I：確認試験。添加物中の主成分等をその特性に基づいて確認するための試験。
- ii. タイプ II：純度試験。添加物中に存在する不純物の量を測定するための試験。
- iii. タイプ III：定量法。添加物中の主成分の量を測定するための定量法。

表 試験のタイプと検討が必要な分析能パラメーター

タイプ	タイプ I	タイプ II		タイプ III
		定量試験	限度試験	
分析能パラメーター				
真度	-	+	-	+
精度				
併行精度	-	+	-	+
室内再現精度	-	-*	-	-*
室間再現精度	-	**	-	**
特異性**	+	+	+	+
検出限界	-	-	+	-
定量限界	-	+	-	-
直線性	-	+	-	+
範囲	-	+	-	+

- 通例評価する必要はない。

+ 通例評価する必要がある。

* 分析法及び試験法が実施される状況に応じて、室内再現精度又は室間再現精度のうち、少なくとも一方の評価を行う。分析法のバリデーションでは、通例、後者を評価する。

** 特異性の低い分析法の場合には、関連する他の分析法により補うこともできる。

4. システム適合性

4-1. 概要

システム適合性とは、試験に使用するシステムが、当該成分規格が設定されたときと同様に、試験を行うのに適切な性能で稼働していることを確認するための試験法と適合要件について

て規定したものである。すなわち、システム適合性試験とは、試験を行う施設の分析システムが、当該試験法の目的に適う試験結果を与えることを予め検証する、あるいは、分析システムの稼働状態を日常的に確認するための試験である。

システム適合性の試験方法及び適合要件は、添加物の成分規格の試験法の中で通常規定する。規定されたシステム適合性の適合要件が満たされない場合には、その分析システムを用いて行った品質試験の結果を採用してはならない。この規定は、装置、電子的情報処理系、分析操作及び分析試料、更には試験者から構成される分析システムが、全体として適切な状態にあることを確認するための試験方法と適合要件を当該試験法の中に規定することによって、システムとして完結するとの考え方に基づいている。

添加物の成分規格の試験法にシステム適合性が規定されたものは現在少ないが、システム適合性は、機器分析法による多くの規格試験法に不可欠な規定となると考えられる。よって、添加物の成分規格を設定しようとするものは、システム適合性の規定を検討することが望ましい。

4-2. システム適合性設定時の留意事項

添加物の成分規格の試験法中に設定すべきシステム適合性の項目は、試験の目的と用いられる分析法のタイプに依存している。また、システム適合性の試験は、日常的に行う試験であることから、使用する分析システムが目的とする品質試験を行うのに適切な状態を維持していることを確認するのに必要な項目を選び、迅速かつ簡便に行えるような試験として設定することが望ましい。

例えば、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いた純度試験(不純物の定量法)の場合には、以下の項目等について設定する。

- i. システムの性能(分析対象物質を特異的に分析しうることの確認)
- ii. システムの再現性(繰り返し注入におけるばらつきの程度の確認)
- iii. 検出の確認(限度値レベルでのレスポンスの数値的信頼性の確認)

食品添加物公定書の一般試験法「液体クロマトグラフィー」に記載されたシステム適合性の規定を補完する事項を以下に記載する。

4-2-1. 許容限度値の設定

食品添加物公定書の一般試験法「液体クロマトグラフィー」のシステム適合性の項に「繰り返し注入の回数、6回を原則とする」、また、「システムの再現性の許容限度値は、当該試験法の適用を検討した際のデータと試験に必要とされる精度を考慮して、適切なレベルに

設定する。」と規定されていることから、6 回繰り返し注入における許容限度値を下記の記載を参考にして設定する。なお、添加物の成分規格に規定された試験法により試験を行う場合には、当該成分規格に規定された許容限度値に従う。

1) 主成分の定量法(主成分の含量がほぼ 100%、あるいはそれに近い場合)

分析システムが、製品中の主成分含量のばらつきの評価に適切な精度で稼働していることを確認できるレベルに設定する。

例えば、含量規格の幅が、液体クロマトグラフィーを用いた定量法において 98.0～102.0%の場合のように、5%以下の場合には「1.0%以下」を目安として適切に設定する。

2) 純度試験(不純物の定量法)及びその他の試験

標準液やシステム適合性試験用溶液等、システム再現性の試験に用いる溶液中の主成分濃度を考慮して、適切に設定する。試料液を希釈し、0.5～1.0%の有効成分濃度の溶液を調製して、システム再現性の試験に用いる場合には、通例、「2.0%以下」を目安として適切に設定する。

なお、上記の目安は、ガスクロマトグラフィーの場合には適用しない。

4-2-2. システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法

食品添加物公定書の一般試験法「液体クロマトグラフィー」のシステム適合性の項に「繰り返し注入の回数は 6 回を原則とするが、グラジエント法を用いる場合や試料中に溶出が遅い成分が混在する場合など、1 回の分析に時間がかかる場合には、6 回注入時とほぼ同等のシステムの再現性が担保されるように達成すべきばらつきの許容限度値を厳しく規定することにより、繰り返し注入の回数を減らしてもよい。」と規定されている。これと関連して、システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法を以下に示した。この方法により、必要な場合には、繰り返し注入の回数を減らして設定することができる。また、日常の品質試験の中でも同様な考えに基づいて運用することができる。

システムの再現性の試験の質を繰り返し注入の回数が 6 回($n=6$)の試験と同等に保つために、 $n=3\sim 5$ の試験で達成すべきばらつきの許容限度値を下記の表に示した。しかしながら、繰り返し注入の回数を減らすということは、システムの再現性を確認する上での 1 回の試験の重みが増すということであり、適切な技術レベルにある試験者が担当するとともに、装置が適切に維持管理されることがより重要となることに留意する必要がある。

表 システムの再現性の試験の質を $n=6$ の試験と同等に保つために $n=3\sim 5$ の試験で達成すべきばらつきの許容限度値*

		許容限度値(%)					
n=6 の試験に規定されたばらつきの許容限度値		1%	2%	3%	4%	5%	10%
達成すべきばらつきの許容限度値	n=5	0.88%	1.76%	2.64%	3.52%	4.40%	8.81%
	n=4	0.72%	1.43%	2.15%	2.86%	3.58%	7.16%
	n=3	0.47%	0.95%	1.42%	1.89%	2.37%	4.73%

*排除すべき性能の分析システムがシステム適合性の試験に合格する確率を5%とした。

4-3. 分析システム変更時の考え方(分析システム変更時の管理)

目的に適う試験結果を与えることが検証された試験法と分析システムが基本的に変更されずに、品質試験が日常的に繰り返される場合には、システム適合性で規定された適合要件を満たしていることを確認すればよい。しかしながら、当該の品質試験が長期にわたって続けられる間には、試験法や分析システムにも種々の変更が必要となる状況も起こり得る。これらの変更は、製造方法の変更の場合のように製品の品質に直接影響を与えるものではないが、品質を評価する際の尺度に影響を与えるものであり、変更の結果、評価の尺度に狂いが生じれば、適切でない品質のものを許容したり、逆に適切な品質のものを排除したりすることも起こり得る。そのため、試験法や分析システムの変更時には当該の変更が適切なことを確認して、評価の尺度に狂いが生じないように管理する必要がある。試験法を変更する場合には、変更の内容に応じた適切なバリデーションを行う。一方、例えば、同じ試験室において液体クロマトグラフィーの装置やカラムの更新、試験者の交替などを行う場合には、上述の変更時の管理の一環として、変更した分析システムにより少なくともシステム適合性の試験を行って、変更前と同等の結果が得られることを確認する。同等な結果が得られないとき、例えば、液体クロマトグラフィーのカラムを交換したとき、新しいカラムによって試験の対象成分と分離確認用物質との溶出順が逆転するなどの溶出パターンの大きな変化がもたらされるような場合には、特異性などが担保されているかが懸念されるため、そのカラムを当該品質試験に用いても目的に適う試験結果が得られることを再検証する必要がある。

5. 分析法バリデーションの実施方法

添加物の成分規格設定において、確認試験、純度試験、定量法等の試験法が設定される。試験法には、目的に応じて様々な分析法の適用が可能であるが、設定される分析法は添加物の品質及び安全性を十分に確保するために、その精度、特異性、妥当性等を検討することは、添加物の成分規格を設定しようとする者の責任である。それには、最も適したバリデーションの方法とプロトコールを選択する必要がある。このとき、添加物の試験法に用いる分析法が意図した目的に適う方法であることを立証するという分析法バリデーションの目的を念

頭に置いておくことが重要である。また、添加物の成分規格を設定する者の責任として、分析法バリデーションを実施した際に得られた種々のデータ及び評価結果を資料としてまとめなければならない。

ここでは、比較的純度の高い化学物質を添加物として使用したいとき、その成分規格を設定する際を例として分析法のバリデーションの実施法を論じている。したがって、複雑な混合物、高分子、酵素等に用いられる分析法に対してはここに示す方法とは異なる手法が適用されることがある。また、添加物の品質管理の目標や目的に応じて、異なる手法が適用されることもある。いかなる場合においても、添加物の成分規格を設定しようとする者の責任において、分析法バリデーションを設計し、それを実施しなければならない。

以下本文は、分析法の開発、その評価の過程を考慮して構成されている。これを参考に、目的に応じた分析法バリデーションを実施することを推奨する。

5-1. 標準物質、試薬等 (Reference Material, Reagent, etc.)

試験法を設定し、試験法に用いられる分析法のバリデーションを行う場合、用いた試薬、標準物質、定量用標品等の情報(カタログ番号、ロット番号等)を正確に付す。日本産業規格(JIS)に適合する試薬については、その番号を付し、特級、1級、pH標準液用等の種類のある場合には、種類も付す。用いる試薬の名称が日本産業規格の名称と異なるものには、名称の次に日本産業規格の試薬の名称を付す。これらの情報を資料としてまとめ添付する。

分析法に使用される化学物質は、目標とする精度の試験結果が得られ、且つ、再現性が確保できるように、一般に入手可能で品質が確保されたものを可能な限り用いなければならない。特に、定量分析に用いる標準物質、試薬等は、添付の書類に純度が明記されており、十分に特性が明らかなものを用いる必要がある。

なお、分析法に使用されるものとして以下のものがある。分析法のバリデーションにおいては、どのような標準物質や試薬を用いるか、どの程度の特性値が必要であるかは、分析法の目的による。

1) 標準物質、標準液、標準ガス

標準物質とは、単一または複数の特性値が十分均一で、よく確定された物質又は材料をいう。国が供給する国家標準物質と民間団体などが供給する標準物質がある。各種化学分析などにおいて、定量的な目盛りの役割を果たすと共に、機器の使用条件、特性、分析者の差異などの補正のために用いられる。

認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)とは、日本産業規格(Japanese Industrial Standard: JIS)に規定された JIS Q0034 に適合し JIS Q0031 に規定する認

証書が添付されたもの又はこれと同等の認証書が添付されたものをいう。

計量法に規定する標準液又は標準ガスとは、JIS Q0034に適合し、計量法（昭和26年法律第207号）第144条第1項に基づく証明書が添付されたものをいう。

2) 容量分析用標準物質

容量分析用標準物質とは、滴定用溶液（規定液）の正確な濃度値の決定（標定）に用いられる標準物質である。滴定用溶液は、酸・アルカリ滴定、酸化還元滴定、キレート滴定等々の容量分析に用いられる。この物質は、容量分析における「ものさし」の役を果たしており、表示されている純度値をもとにして物質質量、含有量などの数値がきめられる。

JIS K 8005 容量分析用標準物質として、11品目（亜鉛(Zn)、アミド硫酸(HOSO_2NH_2)、塩化ナトリウム(NaCl)、酸化ひ素(III) (As_2O_3)、しゅう酸ナトリウム($\text{NaOCOCOO}\text{Na}$)、炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)、銅(Cu)、二クロム酸カリウム($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、フタル酸水素カリウム($\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOK})(\text{COOH})$)、ふっ化ナトリウム(NaF)、よう素酸カリウム(KIO_3))が規定されている。

3) 容量分析用標準液

容量分析用標準液とは、規定のモル濃度に精密に調整された溶液で主に容量分析に用いられる。標準液につき規定された物質1モルが1000 mL中に正確に含まれるように調製した溶液が1モル濃度溶液であり、1 mol/Lで表される。また必要に応じて、それらを一定の割合に薄めた液を用いることができる。例えば1 mol/L溶液を10倍容量に正確に希釈したものは0.1 mol/L溶液として用いることができる。

4) 試薬

試薬とは、化学的方法による物質の検出もしくは定量、物質の合成の実験または物理的特性の測定のために使用される化学物質である。検査、試験、研究、実験など試験・研究的な場合において、測定基準、物質の検出・確認、定量、分離・精製、合成実験、物性測定などに用いられるものであって、それぞれの使用目的に応じた品質が保証されたものである。定量分析の目的で調製された試薬は、定量用試薬又は定量用標準品と呼ばれることがある。ただし、試薬、定量用試薬又は定量用標準品として流通するものは、試薬メーカーが独自にその品質を保証しているのみで、絶対含量や絶対純度を保証していない場合が多いので、これら定量法や純度試験の標品として用いる場合は、得られた結果が真値を示しているかどうか十分に評価する必要がある。

5-2. 特異性 (Specificity)

添加物の成分規格の確認試験，有効成分の定量法及び純度試験(不純物の純度試験)に用いる分析法のバリデーションでは，特異性の検討を行い資料として添付する。

特異性を立証するための手法は，分析法が適用される目的に依存する。すなわち，品質を確保する上で十分な特異性を立証するのみでよい。ただし，ある1つの分析法が特定の分析対象物に対して極めて特異的で完璧な識別性を持つとしても，立証することが困難であることも多い。よって，1つの分析法によってその識別性を立証できない場合，2つ以上の分析法を組み合わせることによって，添加物の試験法として必要な識別能力の水準を達成することが多い。

1) 確認試験

確認試験には，共存する可能性のある構造的に類似した化合物同士を識別できる方法の設定が望ましい。分析法の識別能力は，分析対象物を含む試料を用いて(多くの場合には，既知の物質についての結果と比較することにより)求めた陽性の結果と分析対象物を含まない試料を用いて求めた陰性の結果とを得，比較することによって確認できる。分析対象物と構造的に類似する物質又は分析対象物に密接に関連する物質に確認試験を適用して，陽性の反応が得られないことを確認してもよい。特異性を検討するときには，分析法を実施する上で起こり得る妨害について考察し，適切な科学的判断に基づいて，上記のような妨害を引き起こす可能性のある物質を選択する必要がある。

2) 定量法と純度試験

クロマトグラフ法では，代表的なクロマトグラムを示すことによって，特異性を立証する。クロマトグラムの個々のピークには，識別しやすいように適切な表示を施しておく。他の分離分析法についても，同様の配慮が必要である。クロマトグラフ法では，成分が互いに分離されていることを示す分離限界(Critical Separation)について，適当な濃度の試料を用いて検討する。特異性を示すために，互いに最も近接して溶離する2つの成分の分離度を用いて分離限界を表してもよい。

非特異的な定量法が分析対象物のみを定量していることを支持するような他の分析法のデータを添えて，総合的に特異性を立証する。例えば，定量法に滴定法を採用する場合には，その定量法に適当な純度試験を組み合わせることによって，特異性が証明可能である。

特異性を立証するための手法は，定量法と純度試験とで同じである。

3) 不純物が入手できるとき

定量法では、不純物が存在する下で、分析対象物を識別できることを立証する。実際には、当該添加物に適当な濃度の不純物を添加したときの定量結果をこれらの物質が添加されていないときに得られる定量結果と比較し、これらの物質が共存していても定量結果が影響されないことを示すことによって特異性を立証できる。

純度試験では、当該添加物に適当な濃度の不純物を添加し、これらの不純物が互いに分離していること、又はこれらの不純物が試料中に存在する他の成分から分離していることを示すことによって識別能力を立証できる。

4) 不純物が入手できないとき

不純物の標品が入手できない場合には、不純物を含む試料を設定しようとする分析法で測定した結果と別の分析能パラメーター既知の分析法で測定した結果とを比較することによって、特異性が立証できることもある。分析能パラメーター既知の分析法とは、例えば、食品添加物公定書に記載された方法又はそれ以外の既にバリデートされている分析法のことをいい、設定しようとする分析法とは全く別の分析法のことである。必要に応じて、不純物を含む試料として、起こり得る苛酷条件(光、熱、湿度、酸又は塩基加水分解及び酸化)の下で曝露した試料を検討に用いる。

- ・ 定量法では、2つの定量結果を比較する。
- ・ 純度試験では、不純物プロファイルを比較する。

クロマトグラム上の分析対象物のピークが複数の成分に由来していないことを示すためには、ダイオードアレイや質量分析計などを検出器として用いるクロマトグラフ法のピーク純度試験(ピーク単一性試験)が有用である。

5-3. 直線性 (Linearity)

分析対象物質の濃度と検出器の応答に直線性があることを確認し、相関係数、 y -切片、回帰直線の傾き及び残差平方和を記載した資料を添付する。データをプロットした図も資料に添付する。

通常、直線性は、以下のような試験により確認する。

希釈した標準液の系列を用いて有効成分の濃度に対する検出器の応答の直線性を直接的に証明するか、また、試料の混合物の重量に対して直線性を直接的に証明する。後者は、測定したい試料に対する分析法の適用範囲を検討するとき、同時に検討することができる。

直線性を立証するときには、少なくとも5水準の濃度を用いることが望ましい。別の手法を用いて直線性を立証するときには、その手法の妥当性の根拠を示す。

シグナルを分析対象物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直線の計算などの統計学的手法を用いて直線性の程度を数学的に評価する。実測値と回帰直線上の予測値との差を濃度に対してプロットした図を解析することも直線性を評価する上で有用である。分析値と試料濃度との間の直線関係を得るために、回帰分析を行う前に、測定データを数学的に変換する必要があることもある。いかなる変換を行っても直線性を示さない分析法(イムノアッセイ等)の場合は、可能な限り、検出器の応答を試料中の分析対象物の濃度(量)の適当な関数(理論式 又は近似式)で表す。

なお、「4. 範囲」に示す分析法の範囲の全域にわたって、直線性が保持されていなければならない。

5-4. 範囲 (Range)

分析法が適用される範囲は、成分規格に規定する試験法の目的を満たさなければならない。適用される範囲は、通常、直線性を検討することによって導かれる。範囲内又は範囲の両端の量の分析対象物を含む試料を用いて分析を行い、分析法の直線性、真度及び精度が容認できる程度であることを確認することによって、範囲を立証する。

規定すべき範囲として、少なくとも次に示す範囲を検討する。

1) 添加物の主成分又は有効成分の定量法

80% < 規定する含量 < 120%

添加物の主成分又は有効成分の含量規定に対する適否判定を行うに当たり、十分な精度の定量法が設定される必要がある。

2) 純度試験(不純物の定量試験)

規定する限度値 < 120%

検出/定量限界がその不純物が制御されるべき限度に見合っている必要がある。特に、不純物が強い有害性を持つことが知られている場合、添加物の安全性を確保するために、不純物の定量試験においては可能な限り高感度で、且つ、高精度な分析法の設定が要求される。

3) その他の試験

規定する限度値<120%.

設定する試験の目的に応じ、検出/定量限界が規定する限度に見合っている必要がある。

5-5. 真度 (Accuracy)

真度は、分析法の規定する範囲全域にわたって、立証される必要がある。

通常、真度は、規定する範囲を含む濃度について、分析法の全操作を繰り返して測定した結果から評価する。設定しようとする成分規格の試験法の目的を満たしていることを説明できる必要がある。例えば、3濃度について分析法の全操作を各濃度3回ずつ繰り返して測定し、合計9回の測定結果より評価する。

真度は、既知量の分析対象物を添加した試料を定量する場合には回収率として表され、一方、真の値又は真の値として認証又は合意された値と比較する場合にはこれらの値と平均値との差として表される。

いずれかの形で表した真度及び真度の信頼区間を添付資料に記載する。

1) 定量法

真度を決定するために、いくつかの方法が利用できる。

i. 真の値が既知の場合

純度既知の分析対象物(例えば、標準物質)に対してバリデートしようとする分析法を適用する。

ii. 真度既知の分析法が存在する場合

バリデートしようとする分析法による結果と真度既知の分析法による結果とを比較する。

iii. 新たに分析法を設定する場合

設定しようとする分析法の精度、直線性及び特異性を立証することによって、真度を推定する。

2) 純度試験(不純物の定量試験)

通常、既知量の不純物を添加した添加物の試料を定量することにより、真度が評価される。主要な分析対象物の全てにおいて、例えば、重量百分率による、あるいは面積百分率によるなど、個々の不純物の量又は不純物の総量の決め方を明記しておく必要がある。

3) その他の試験

原則として、1)、2)と同様な手順で真度を評価する。ただし、分析法の真度が、設定する試験の目的を十分満たすことが明らかな場合、省略してもよい。例えば、類似する添加物の試験法に同じ分析法が既に設定され、添加物の物性や品質から同等な真度が得られると説明できるとき、省略しても差し支えない。

5-6. 精度 (Precision)

定量法、純度試験(不純物の定量試験)及びその他の試験の分析法のバリデーションを行うときは、その精度を評価する。

原則として、各タイプの精度ごとに、標準偏差、相対標準偏差(変動係数)及び標準偏差の信頼区間を記載したものを資料に添付する。他の方法で評価するとき、あるいは、何らかの理由により精度の評価が十分に行えないとき、その詳細を記載する。

1) 併行精度(Repeatability)

併行精度は、原則として、次のいずれかの方法で評価する。

- i. 規定する範囲を含む濃度について、分析法の全操作を少なくとも9回繰り返して測定する。例えば、3濃度について分析法の全操作を各濃度3回ずつ繰り返して測定する。
- ii. 試験濃度の100%に相当する濃度で、分析法の全操作を少なくとも6回繰り返して測定する。

2) 室内再現精度(Intermediate precision)

室内再現精度の検討範囲は、分析法が使用される状況に応じて定まる。分析法の精度に及ぼすランダムな事象の影響を確認する必要がある。検討が必要な代表的な変動要因は、試験日、試験者、装置などである。これらの影響を別々に検討する必要はなく、実験計画法を利用することを奨励する。

3) 室間再現精度(Reproducibility)

室間再現精度は、試験室間の共同実験によって評価される。例えば、食品添加物公定書に分析法を一般試験法として収載するなど、分析法を標準化する必要が生じた際に室間再現精度の検討が原則として必要である。一方、添加物の試験法に分析法を設定する場合、室間再現精度に関するデータを資料として必ずしも添付する必要はない。

5-7. 検出限界 (Detection limit)

検出限界(DL)及びそれを求めるときに用いた方法を資料に添付する。

視覚的評価又はシグナル対ノイズ(S/N)比によって検出限界(DL)を決定した場合には、その妥当性を示すために、関連するクロマトグラムを資料として添付する。

計算又は外挿によって検出限界の推定値を得た場合には、更に、検出限界の濃度となるように調製した適当な数の試料又は濃度が検出限界(DL)付近であることが知られている適当な数の試料について、別途分析を行い、この推定値が妥当であることを示す資料を添付する。

検出限界(DL)を求め方には様々な手法がある。また、分析法が機器分析であるか否かによって検出限界(DL)の求め方は異なる。ここに示す手法とは異なる手法を用いても差し支えない。

1) 視覚的評価に基づく方法

機器を使わない分析法では、視覚的に評価を行うが、機器分析法についても視覚的に評価を行ってもよい。

検出限界(DL)は、既知濃度の分析対象物を含有する試料を分析し、分析対象物が確実に検出できる最低の濃度を確認することによって決められる。

2) シグナル対ノイズ(S/N)比に基づく方法

この手法は、ベースラインノイズを伴う分析法にのみ適用できる。

シグナル対ノイズ(S/N)比は、分析対象物を既知の低濃度で含有する試料のシグナルをブランク試料のシグナルと比較することによって求めることができる。これを用いて分析対象物が確実に検出できる最低の濃度を求める。検出限界(DL)設定には、3~2:1のシグナル対ノイズ(S/N)比が一般的に許容されている。

3) レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

検出限界(DL)を次式により決定することもできる。

$$DL=3.3\sigma/S$$

ここで、 σ はレスポンスの標準偏差を、Sは検量線の傾きを表す。

傾きSは、分析対象物(不純物)の検量線から推定できる。標準偏差 σ については、種々の推定方法があるが、以下はその例である。

i. ブランクの標準偏差に基づく方法

適当な数のブランク試料を分析し、そのレスポンスの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積もる。

ii. 検量線に基づく方法

検出限界付近の濃度の分析対象物を含む試料を用いて、検量線を作成する。回帰直線の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を標準偏差 σ として利用できる。

5-8. 定量限界(Quantitation limit)

定量限界及びそれを求めるときに用いた方法を資料に添付する。

定量限界の濃度となるように調製した適当な数の試料又は濃度が定量限界付近であることが知られている適当な数の試料について、別途分析することによって定量限界が妥当であることを示す資料を添付する。

定量限界(QL)を求め方には様々な手法がある。また、分析法が機器分析であるか否かによって定量限界(QL)の求め方は異なる。ここに示す手法とは異なる手法を用いても差し支えない。

1) 視覚的評価に基づく方法

機器を使わない分析法では、視覚的に評価を行うが、機器分析法についても視覚的に評価を行ってもよい。

定量限界(QL)は、既知濃度の分析対象物を含有する試料を分析し、分析対象物が許容できる真度と精度で定量できる最低の濃度を確認することによって決められる。

2) シグナル対ノイズ(S/N)比に基づく方法

この手法は、ベースラインノイズを伴う分析法にのみ適用できる。

シグナル対ノイズ(S/N)比は、分析対象物を既知の低濃度で含有する試料のシグナルをブランク試料のシグナルと比較することによって求めることができる。これを用いて分析対象物が確実に定量できる最低の濃度を求める。定量限界(QL)設定のための標準的なシグナル対ノイズ(S/N)比は、10 : 1である。

3) レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

定量限界(QL)を次式によって決定することもできる。

$$QL=10\sigma/S$$

ここで、 σ はレスポンスの標準偏差を、 S は検量線の傾きを表す。

傾き S は、分析対象物の検量線から推定できる。標準偏差 σ については、種々の推定方法があるが、以下はその例である。

i. ブランクの標準偏差に基づく方法

適当な数のブランク試料を分析し、そのレスポンスの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積もる。

ii. 検量線に基づく方法

定量限界 (QL) 付近の濃度の分析対象物を含む試料を用いて、検量線を検討する。回帰直線の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を標準偏差 σ として利用できる。

5-9. 頑健性 (Robustness)

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。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。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る。また、これらのパラメーター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。

- 1) 種々の分析法に共通する変動因子
 - ・試験溶液の安定性
 - ・抽出時間
- 2) 液体クロマトグラフ法の代表的な変動因子
 - ・移動相のpHの変動の影響
 - ・移動相の組成の変動の影響
 - ・カラムの変更 (異なるロット又は異なる銘柄)
 - ・温度
 - ・流速

3) ガスクロマトグラフ法の代表的な変動因子

- ・ カラムの変更(異なるロット又は異なる銘柄)
- ・ 温度
- ・ 流速

5-10. システム適合性 (System suitability testing)

システム適合性試験は、電子工学的技術を組み込んだ装置を用いた完結したシステムだけで、分析操作及び分析試料の評価できるように構成されているかどうかを評価するために行う。すなわち、設定した試験法に適合したシステムを用いるとき、得られた試験結果が完全に保証され、一方、システムが適合していないとき、得られた試験結果の信頼性は十分ではないと判断される。

分析法において確立すべきシステム適合性のパラメーターは、バリデートしようとする分析法のタイプに依存している。添加物の成分規格の試験法にシステム適合性を設定する必要があると判断されるとき、これを設定する。このとき、システム適合性を設定する根拠と妥当性を示す資料を添付する。

6. 分析法バリデーションで用いられる用語

- 頑健性(Robustness)：頑健性とは、分析条件を小さい範囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力のことである。反応液のpH、反応の温度、反応時間又は試薬の量などの分析条件を適当な範囲で変化させ、測定値の安定性を検討する。測定値が分析条件に対して不安定な場合には、安定な測定値が得られるように分析法に改良を加える。また、頑健性の結果は、最終的な分析法において分析条件を示す数値の有効数字又は留意事項として反映させる。
- 試験室：試験室とは、試験を行う部屋、施設を意味する。本分析法バリデーションでは、試験室を変えるということは、試験者、装置及び試薬ロットなどの分析条件が変化することを意味する。
- 試験法：試験法とは、一般試験法及び各条における試験方法、例えば、純度試験、定量法などを意味する。試験法には、試料の採取方法、規格値、分析法などが含まれる。
- 測定回数：分析法の手順の中に含まれる回数。分析法の精度を上げるために、分析法の中であらかじめ測定回数を2回以上に指定することがある。分析法バリデーションでは、分析法の中で定められた測定回数も含めた分析法を評価す

る．分析法の精度を評価するために繰り返し分析を行うときの繰り返し数とは別のものである．

- v. 測定値：1回の分析により得られる1個の値．
- vi. 分析法：本文が対象としている分析法は，試料中に存在する分析対象物の量又は濃度に依存する測定値を与える分析法及び確認試験に用いられる分析法である．本文における分析法とは，試験法の分析過程を意味する．

