

農薬集取品の分析における効率化の検討

木村 穰*, 渡辺高志*, 塚田勇輝**, 倉浪佑実子*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

** 農林水産省消費・安全局

現在、農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、立入検査で集取した農薬製剤（集取品）の分析方法として見本検査法を採用しているが、国際農薬分析法協議会（Collaborative International Pesticides Analytical Council, 以下「CIPAC」という。）では、農薬製剤の品質管理に用いる定量方法として、標準品や溶媒の使用量や分析時間が少なくすむ簡便な「ブラケット法」を採用している。集取品の分析における同法の採用の可否を検討するため、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーまたは紫外可視分光法で分析する9種類の有効成分について、有効成分の含有率が低濃度から高濃度までの製剤7種（乳剤、水和剤、粒剤、粉剤および水溶剤）を用いて、見本検査法とブラケット法における検量線および分析結果を比較した。いずれも原点付近を通る直線性の良い検量線が得られたこれらの農薬においては、見本検査法（4～5点検量線）による分析結果とブラケット法（1点検量線）による分析結果は同等となった。また、試料の分析点数の違いによる有効成分の含有率の比較から、分析点数を2点とした場合でも十分な精度を持つことが確認された。従って、ブラケット法は集取品の分析におけるスクリーニング分析法として導入可能と判断された。

Keywords：農薬、製剤分析、ブラケット法、CIPAC

緒 言

農薬登録申請時には、農薬製剤の品質管理に係る資料として、農薬の見本、農薬登録申請見本検査書および農薬の見本の検査に関する資料等を提出する必要がある^{1,2)}。見本中の有効成分の含有率の検査方法（見本検査法）は、有効成分の含有率が表示値に適合しているかどうかを検査する方法であるため高い精度が求められ、選択性、直線性、精確性、再現性といった妥当性が確認された方法である³⁾。FAMIC 農薬検査部では、新規申請された農薬の登録検査時に、見本検査法の検証を行っている。一般的な見本検査法の概要を以下に示す（表1(1)参照）。

- ・濃度の異なる標準溶液（見本検査法標準溶液）を4～5点調製し、分析機器を用いて定量する。
- ・最小二乗法を用いて濃度等－レスポンス（ピーク面積、面積比、吸光度等）の検量線（見本検査法検量線）を作成する。
- ・試料溶液は5点調製して定量し、得られたレスポンスから濃度等を逆推定する。これらを平均して、製剤中の有効成分の含有率を算出する（4～5点検量線）。

さらに、FAMIC 農薬検査部は、品質不良農薬や無登録農薬等の流通を防止するため、農薬取締法

に基づく農林水産大臣の指示による農薬製造者への立入検査を行い、その際に集取した農薬（集取品）中の有効成分の含有率の検査も実施している。検査結果は監督処分等の根拠とされるものである一方、所定の期限内に農林水産大臣宛に報告する必要があるため、高い精度かつ短期間での分析が求められている。現在は集取品の分析にも見本検査法が採用されているが、検量線用に作成する標準溶液や分析点数が多く、高価な標準品や溶媒等を多量に必要とし、さらに分析にも時間を要するという欠点がある。

一方、農薬は国際流通商品であることから、FAO（国際連合食糧農業機関）・WHO（世界保健機関）が共同で製剤および原体の規格を定めており、この規格への適合性を確認するための試験方法をCIPACが定めている（CIPAC法）。この試験方法は、国際的な共同試験を実施した上で定められていることから信頼性かつ堅牢性の高い方法であるが、ここでは、試料溶液を標準溶液ではさみ、一点検量線により定量する簡便な方法（以下「ブラケット法」という。）が採用されている⁴⁾。ブラケット法の概要を以下に示す（表1(2)参照）。

- ・試料を定量する時の溶液濃度（ C_1 ）、その0.5倍量の濃度および2倍量の濃度の標準溶液（CIPAC法標準溶液）を調製し、分析機器を用

表 1. 見本検査法とブラケット法の標準溶液の調製点数と標準品使用量の比較 (例)

| (1) 見本検査法 | |
|------------------------------|-----------|
| 【検量線 1】 | |
| 検量線 1 (標準品 1mg/mL) | |
| 検量線 2 (標準品 2mg/mL) | |
| 検量線 3 (標準品 3mg/mL) : 1 倍量に相当 | |
| 検量線 4 (標準品 4mg/mL) | |
| 検量線 5 (標準品 5mg/mL) | |
| 【試料分析】 | |
| 試料 1 | |
| 試料 2 | |
| 試料 3 | |
| 試料 4 | |
| 試料 5 | |
| 【検量線 2】: 実施する場合 | |
| 検量線 1 | |
| 検量線 2 | |
| 検量線 3 | |
| 検量線 4 | |
| 検量線 5 | |
| 試料点数 : 10 点 | |
| 定量点数 : 10~15 点 | |
| 標準品使用量 | |
| (1+2+3+4+5) = 15mg | |
| (2) ブラケット法 | |
| 【試料分析】 | |
| 標準溶液 1-1 (標準品 3mg/mL) | } 1 ブラケット |
| 試料 1 | |
| 標準溶液 1-2 (標準品 3mg/mL) | } 2 ブラケット |
| 試料 2 | |
| 標準溶液 1-1 | } 3 ブラケット |
| 試料 3 | |
| 標準溶液 1-2 | |
| 試料 4 | |
| 標準溶液 1-1 | |
| 試料 5 | |
| 標準溶液 1-2 | |
| 【直線性確認】(事前の確認) | |
| 0.5 倍量 標準溶液 (標準品 1.5mg/mL) | |
| 1 倍量 (標準溶液 1-1 を使用) | |
| 2 倍量 標準溶液 (標準品 6mg/mL) | |
| 試料点数 : 9 点 | |
| 定量点数 : 11 点 | |
| 標準品使用量 | |
| (3+3+1.5+6) = 13.5mg | |

いて定量する。

・得られたレスポンスから、見本検査法と同様、検量線 (CIPAC 法検量線) を作成し、直線性および検量線が原点付近を通ることを事前に確認する。

・試料の定量にあたって、濃度 C_1 の標準溶液を 2 点 (C_{1-1} , C_{1-2} : ブラケット法標準溶液) 調製する。試料溶液は、原則として 2 点調製し、試料溶液を標準溶液ではさみながら定量する (1 点検量線)。

・ C_{1-1} および C_{1-2} におけるレスポンスファクターを求め、次式よりレスポンス (面積等) から濃度を算出し、平均して製剤中の有効成分の含有率を算出する。このとき、試料の定量は 1 つのブラケット内で行う。

$$f = s P / H_s$$

$$\text{content (g/kg)} = H_w f / w$$

ここで、 f はレスポンスファクター、 H_s は標準溶液におけるピーク面積、 H_w は試料溶液におけるピーク面積等、 s は標準溶液中の標準物質重量 (mg)、 w は試料採取量 (mg)、 P は標準物質の純度 (g/kg)、 content は製剤中の有効成分の含有率。

ブラケット法と見本検査法と比較するとブラケット法の方が検量線に係るコストと労力が少ない (表 1)。さらに、見本検査法では 5 点の試料分析が行われているが、CIPAC 法では通常 2 点の試料分析を採用していることから、分析に必要な時間も短い。従って、ブラケット法が導入できれば、分析時間の短縮、さらに標準品や溶媒の使用量の削減等の検査の合理化が期待される。しかし、5 点検量線を 1 点検量線に変更、5 点の試料分析から 2 点の試料分析に変更することにより精度が低下するおそれがある。そのため、本調査研究では、ブラケット法と見本検査法を用いて農薬製剤を分析し、その結果を比較し、分析上の精度が低下した場合に、その程度が許容できるかどうかを検討し、集取品の分析業務へのブラケット法の導入の可能性について検討した。

材料および方法

1. 供試製剤等

1.1. 供試製剤

集取品分析において、見本検査法からブラケット法への代替が可能かどうか検討するため、供試製剤は、剤型、有効成分含有率、定量原理に幅を持たせるよう選定した。

剤型は、乳剤1点、水和剤3点（粉状2点、フロアブル1点）、粒剤1点、粉剤1点、水溶剤1点の計7製剤を選定した。うち2製剤は混合剤である。

有効成分含有率は、10%以下の成分を3点、10%超50%未満の成分を3点、50%以上の成分を3点の計9種類を選定した。選定した有効成分を、以下、A~Iと標記する。

分析方法は、高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）で分析する成分が6点、ガスクロマトグラフ（以下「GC」という。）で分析する成分が2点、紫外可視分光光度計（以下「UV」という。）で分析する成分が1点であった。

1.2. 分析機器

HPLCはフォトダイオードアレイ紫外可視吸光検出器（PDA）付き島津製作所製LC-20を用いた。

GCは水素炎イオン化検出器（FID）付きAgilent社製6890Nを用いた。

UVは日本分光製V-630を用いた。

1.3. 標準品、内部標準物質および溶媒

有効成分の標準品は、林純薬工業株式会社または和光純薬工業株式会社より入手した。

内部標準物質は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社または関東化学株式会社製試薬を用いた。

溶媒は、和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用または特級を用いた。

1.4. 標準溶液の調製

1.4.1. 見本検査法標準溶液

標準溶液は、申請者より提出された見本検査書に記載された方法に準じて、濃度の異なる溶液を4~5点調製した。

1.4.2. ブラケット法

1.4.2.1. CIPAC法標準溶液

定量する試料溶液の濃度を1倍量とし、0.5倍量および2倍量の濃度に相当する標準溶液を1点ずつ調製した。この標準溶液は直線性の確認のみに用いる。

1.4.2.2. ブラケット法標準溶液

定量する試料溶液の濃度を1倍量とし、1倍量に相当する標準溶液を2点（以下「標準溶液1-1（C_{1,1}）」および「標準溶液1-2（C_{1,2}）」という。）調製した。

なお、標準溶液1-1と標準溶液1-2は、標準物質を別々に秤量して作成した。

1.5. 試料溶液の調製

見本検査法およびブラケット法とも、申請者より提出されている見本検査法に準拠して、試料溶液を調製した。

1.6. 農薬製剤の分析

農薬製剤の分析方法は、以下のとおり、見本検査法に記載されている方法で実施した。

Aは無極性カラムを用いたGCで分析し、定量には内部標準法を用いた。

Bは高極性カラムを用いたGCで分析し、定量には内部標準法を用いた。

C, D, E, F, HおよびIは逆相カラムを用いたHPLCで分析し、定量には内部標準法を用いた。

GはUVで分析し、定量には絶対検量線法を用いた。

2. 検量線パラメータ

1.4で作成した見本検査法標準溶液、CIPAC法標準溶液およびブラケット法標準溶液を用いて検量線を作成した。

2.1. 選択性

これらの標準溶液を用いて、定量する成分の分離状況を確認し、妨害する成分の有無を調べた。

2.2. 直線性

見本検査法標準溶液およびCIPAC法標準溶液を用いて、濃度等とレスポンス（ピーク面積等）が直線関係にあるかどうかを確認するため、最小二乗法により検量線を作成し、相関係数を検討した。

2.3. 切片

検量線が原点から大きく外れる場合には、原点を通る一点検量線により測定した場合の誤差が大きくなると考えられるため、見本検査法標準溶液およびCIPAC法標準溶液を用いて作成した検量線の切片について検討した。

3. レスポンスの再現性（ブラケット法のみ）

ブラケット法標準溶液を用いて、標準溶液1-1を2回連続で測定した場合の1回目と2回目のレスポンスの差および標準溶液1-1、標準溶液1-2を連続で測定した場合の標準溶液1-1と標準溶液1-2

のレスポンスの差を評価した。標準溶液 1-1, 標準溶液 1-2 は別々に調製したため, 標準物質の秤量値が異なるので, レスポンスの差を評価する際は, 単位濃度あたりのレスポンスを求めた。評価には次式により求めた測定間のレスポンスの差の百分率 (以下「変動率」という。) を用いた。

$$\text{変動率} = ((\text{最大レスポンス} - \text{最小レスポンス}) / \text{最大レスポンス}) \times 100 (\%)$$

4. ブラケット法の導入可能性

4~5 点検量線を用いて見本検査法および 1 点検量線を用いてブラケット法で試料 5 点を分析した製剤中の A~I の分析値および相対標準偏差等を比較した。

また, ブラケット法については, 試料を 5 点分析した場合の分析値と 2 点分析した場合の分析値を比較した。

結果および考察

1. 検量線パラメータ

1.1. 選択性

クロマトグラフで測定する有効成分 (A~F, H 及び I), 内部標準物質およびその他の成分は完全に分離, また, UV で測定する有効成分 G のブランクの吸光度はほぼ 0 であり, 定量を妨害する成分は認められなかった。

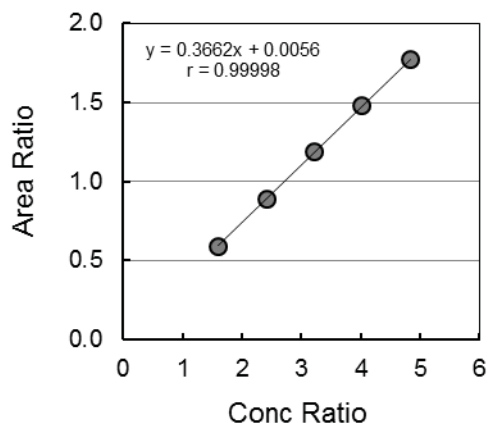


図 1. 見本検査法による 5 点検量線の例 (有効成分 A)

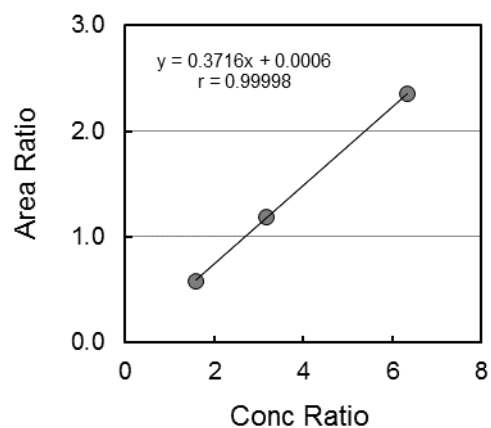


図 2. CIPAC 法による 3 点検量線の例 (有効成分 A)

1.2. 直線性

見本検査法による 5 点検量線および CIPAC 法による 3 点検量線として, 有効成分 A の例をそれぞれ図 1 と図 2 に示す。

見本検査法標準溶液および CIPAC 法標準溶液の濃度範囲, 濃度等とレスポンスにおける相関式のパラメータと相関係数を表 2 に示す。

直線性の判断基準は, AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Chemists International) で採用されている食品分析における妥当性確認の基準である「相関係数は 0.99 以上であること」⁵⁾とした。その結果, 見本検査法および CIPAC 法の検量線の相関係数は, いずれの有効成分も 0.99 以上であり, 見本検査法および CIPAC 法とも試験した濃度範囲では良好な直線性が認められた。

1.3. 切片

見本検査法検量線および CIPAC 法検量線における切片 α の 95% 信頼区間を求め, この区間に原点が含まれているかどうかを確認した^{6,7)}。その結果, 供試した有効成分について, 見本検査法および CIPAC 法とも信頼区間に原点が含まれていた。また, 見本検査法における切片の 95% 信頼区間は, CIPAC 法における信頼区間よりも狭い傾向にあった (表 2)。これは, 検量線の点数が多いため, 誤差が小さくなるためと考えられた。

表 2. 見本検査法と CIPAC 法の検量線の測定結果

| ai | 検量線 | 濃度範囲 | 係数 α | 係数 β | r | β/β | 切片の 95%信頼区間 |
|----|---------------|--------------|-------------|--|----------|---------------|----------------|
| A | 見本検査法 (5 点) | 0.64-1.9 | 0.0056 | β_{ref} :0.3662 | 0.99998 | 1.014 | -0.0050~0.0162 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.64-2.6 | 0.0006 | β_{c3} :0.3716 β_{c1} :0.3715 | 0.99998 | 1.000 | -0.1195~0.1208 |
| B | 見本検査法 (5 点) | 2.7-8.0 | -0.0006 | β_{ref} :0.4256 | 0.999998 | 1.003 | -0.0035~0.0023 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 2.7-11 | -0.0019 | β_{c3} :0.4268 β_{c1} :0.4251 | 0.999990 | 0.996 | -0.0442~0.0556 |
| C | 見本検査法 (5 点) | 0.0048-0.024 | -0.0003 | β_{ref} :10.5581 | 0.999996 | 1.022 | -0.0045~0.0039 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | 0.0057 | β_{c3} :10.7860 β_{c1} :10.8469 | 0.999996 | 1.006 | -0.0442~0.0556 |
| D | 見本検査法 (5 点) | 0.40-2.0 | -0.0013 | β_{ref} :0.6261 | 0.999991 | 0.998 | -0.0077~0.0051 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.60-2.4 | 0.0022 | β_{c3} :0.6248 β_{c1} :0.6272 | 0.999995 | 1.004 | -0.0393~0.0437 |
| E | 見本検査法 (5 点) | 0.0070-0.035 | -0.0012 | β_{ref} :0.9590 | 0.99997 | 1.000 | -0.0050~0.0026 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | -0.0016 | β_{c3} :0.9590 β_{c1} :0.9517 | 0.999998 | 0.992 | -0.0101~0.0068 |
| F | 見本検査法 (5 点) | 0.033-0.17 | 0.0031 | β_{ref} :2.0559 | 0.99998 | 1.005 | -0.0374~0.0313 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.050-0.20 | 0.0179 | β_{c3} :2.0665 β_{c1} :2.0860 | 0.999990 | 1.018 | -0.1812~0.2169 |
| G | 見本検査法 (5 点) | 0.010-0.050 | -0.0001 | β_{ref} :15.1759 | 0.999995 | 1.008 | -0.0032~0.0030 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | 0.0002 | β_{c3} :15.2950 β_{c1} :15.2964 | 0.999995 | 1.000 | -0.0169~0.0172 |
| H | 見本検査法 (5 点) | 0.10-0.50 | 0.0025 | β_{ref} :4.3733 | 0.99998 | 0.993 | -0.0084~0.0134 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.15-0.60 | 0.0005 | β_{c3} :4.3435 β_{c1} :4.3448 | 0.999998 | 1.000 | -0.0343~0.0353 |
| I | 見本検査法 (4 点) | 0.15-0.60 | 0.0034 | β_{ref} :3.7242 | 0.999995 | 1.001 | -0.0101~0.0170 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.19-0.76 | -0.0005 | β_{c3} :3.7277 β_{c1} :3.7984 | 0.999998 | 0.999 | -0.0311~0.0301 |

ai : 有効成分名. 濃度の単位 : mg/mL. 係数 α と係数 β : 重量比または濃度を説明変数(x), 面積比または吸光度を目的変数(y)としたときの相関式を $y=\alpha+\beta x$ とし, 係数 α は切片, 係数 β は傾き. r : 相関係数. β/β : 上段は β_{c3}/β_{ref} , 下段は β_{c1}/β_{c3} . β_{ref} : 見本検査法検量線の傾き. β_{c3} : CIPAC 法検量線の傾き. β_{c1} : ブラケット法標準溶液を用いた 1 点検量線の傾き. 切片の 95%信頼区間 : 回帰分析における切片の 95%信頼区間.

2. レスポンスの再現性

標準溶液のレスポンスの再現性 (system equilibration) である標準溶液の繰り返し注入および 2 つの標準溶液間での変動率は, 最新の CIPAC ハンドブック O では, amisulbrom が $\pm 1.0\%$, brodifacoum が $\pm 1\%$ のようになっている⁸⁾.

標準溶液 1-1, 1-2 を連続して分析した場合および標準溶液 1-1 の連続分析を行った場合の変動率を求めた結果, いずれの有効成分も全て 1.0% 以下であり, 秤量操作, 試料調製, 機器による定量値等の再現性に問題のないことが確認された(表 3).

表 3. レスポンスの再現性

| ai | 標準溶液 1-1 を連続注入した場合の変動率 | 標準溶液 1-1 と標準溶液 1-2 を連続注入した場合の変動率 |
|----|------------------------|----------------------------------|
| A | 0.52 | 0.81 |
| B | 0.37 | 0.95 |
| C | 0.72 | 0.11 |
| D | 0.04 | 0.38 |
| E | 0.04 | 0.36 |
| F | 0.88 | 0.52 |
| G | 0.06 | 0.95 |
| H | 0.14 | 0.67 |
| I | 0.13 | 0.36 |

ai : 有効成分名, 単位 : %

3. ブラケット法の導入可能性

1で得られた検量線を用いて、見本検査法、ブラケット法のそれぞれで試料5点の分析値の比較を行うとともに、ブラケット法を集取品の分析に採用するに当たっての条件・課題について検討した。

3.1. 分析値の比較

供試製剤を見本検査法およびブラケット法を用いて分析した結果は表4のとおりとなった。

HorRat⁹⁾は、見本検査法およびブラケット法とも2以下であった。

次に、見本検査法およびブラケット法を用いて定量された結果を比較した。各試料についてのブラケット法における分析値の見本検査法における

分析値に対する比率は、98.8~100.5%の範囲であった(調製した試料をブラケット法と見本検査法の両方で分析した試料に限る)。さらに、該当する25試料中9試料の比率が99.9~100.1%の範囲内にあり、見本検査法の分析値と概ね一致がみられた。

ブラケット法では、標準試料の数が少なく、標準試料の調製作業で生じる誤差が平準化されにくいこと、強制的に原点を通る検量線を引くことによって、得られる分析値に一定のバイアスがかかる可能性がある。有効成分 A, F, H, I では、両分析法の分析値に一定の大小関係が見られ、このようなバイアスが影響している可能性は否定できないが、いずれにせよ、分析値に及ぼす影響はそれほど大きくないと判断される。

表4. 見本検査法とブラケット法を用いた分析結果の比較

| ai | 方法 | 含有率 (%) | | | | | | 標準偏差 | 相対標準偏差 | HorRat |
|----|--------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 平均 | | | |
| A | 見本検査法 | 77.18 | 77.02 | 77.27 | 77.34 | 76.94 | 77.15 | 0.17 | 0.22 | 0.19 |
| | ブラケット法 | 77.11 | 76.86 | 77.17 | 77.25 | 76.90 | 77.06 | 0.17 | 0.22 | 0.20 |
| | 比率 (%) | 99.9 | 99.8 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | | | |
| B | 見本検査法 | 40.25 | 40.65 | 40.63 | 40.44 | 40.63 | 40.52 | 0.18 | 0.43 | 0.27 |
| | ブラケット法 | 40.97 | 41.02 | 40.71 | 40.10 | 40.45 | 40.65 | 0.38 | 0.94 | 0.60 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.3 | | | |
| C | 見本検査法 | 50.93 | 50.57 | 50.92 | 50.60 | 50.79 | 50.76 | 0.17 | 0.34 | 0.24 |
| | ブラケット法 | 51.03 | 50.64 | 51.01 | 50.71 | 50.78 | 50.83 | 0.18 | 0.35 | 0.25 |
| | 比率 (%) | 100.2 | 100.1 | 100.2 | 100.2 | 100.0 | 100.1 | | | |
| D | 見本検査法 | 23.61 | 23.75 | 23.85 | 23.92 | 23.94 | 23.81 | 0.14 | 0.57 | 0.28 |
| | ブラケット法 | 23.94 | 23.92 | 23.91 | 23.86 | 23.89 | 23.90 | 0.030 | 0.13 | 0.06 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.4 | | | |
| E | 見本検査法 | 0.484 | 0.481 | 0.479 | 0.488 | 0.490 | 0.484 | 0.0046 | 0.95 | 0.48 |
| | ブラケット法 | 0.485 | 0.485 | 0.496 | 0.498 | 0.486 | 0.490 | 0.0064 | 1.3 | 0.66 |
| | 比率 (%) | | | | | | 101.2 | | | |
| F | 見本検査法 | 2.52 | 2.50 | 2.51 | 2.46 | 2.51 | 2.50 | 0.023 | 0.94 | 0.60 |
| | ブラケット法 | 2.49 | 2.47 | 2.49 | 2.46 | 2.48 | 2.48 | 0.013 | 0.53 | 0.34 |
| | 比率 (%) | 98.8 | 98.8 | 99.2 | 100.0 | 98.8 | 99.1 | | | |
| G | 見本検査法 | 39.66 | 40.12 | 40.10 | 39.77 | 39.70 | 39.87 | 0.22 | 0.56 | 0.35 |
| | ブラケット法 | 40.16 | 39.91 | 40.01 | 40.17 | 39.52 | 39.95 | 0.27 | 0.67 | 0.42 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.2 | | | |
| H | 見本検査法 | 1.003 | 0.984 | 0.980 | 0.995 | 0.987 | 0.990 | 0.0092 | 0.93 | 0.52 |
| | ブラケット法 | 1.004 | 0.985 | 0.985 | 1.005 | 0.992 | 0.994 | 0.0098 | 0.99 | 0.55 |
| | 比率 (%) | 100.1 | 100.1 | 100.5 | 101.0 | 100.5 | 100.4 | | | |
| I | 見本検査法 | 75.24 | 75.37 | 75.22 | 74.67 | 75.27 | 75.15 | 0.28 | 0.37 | 0.32 |
| | ブラケット法 | 75.43 | 75.74 | 75.55 | 74.97 | 75.63 | 75.46 | 0.30 | 0.40 | 0.34 |
| | 比率 (%) | 100.3 | 100.5 | 100.4 | 100.4 | 100.5 | 100.4 | | | |

ai : 有効成分名, HorRat : 実験で求められた相対標準偏差と Horwitz 式 ($2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67$ (Cは分析対象有効成分の重量分率)) を用いて求めた相対標準偏差の比, 相対標準偏差 : %
比率は同一試料を見本検査法とブラケット法で定量した場合のみ記載した。

3.2. 1点検量線の採用によるバイアスの推定

見本検査法に準拠して作成した検量線はいずれも原点付近を通り、切片の95%信頼区間に原点が含まれていたが、真の検量線が95%信頼区間の上限又は下限に相当するものであった場合には、原点を通る1点検量線を用いるブラケット法におけるバイアスが大きくなる可能性がある。このため、見本検査法で、同じデータを用い、それぞれ切片を表2の上限又は下限に固定して、最小二乗法による検量線を作成し直し、それにより得られる分析値について、ブラケット法での分析値と再度比較を行った(表5)。

その結果、ブラケット法における分析値の見本検査法における分析値に対する比率は98.5~101.0%となり、表5中の切片下限と切片上限を代入して求めた濃度は、HorwitzのRSDから求められる濃度範囲内であり、バイアスは大きくないと判断された。しかし、これは今回対象とした9農薬に限った検証結果であり、検量線の相関係数が低くなれば、切片の95%信頼区間も広くなり、ブ

表5 見本検査法検量線における切片の上限値と下限値を固定した場合の計算結果

| ai | ブラケット法 | 切片下限値 | 通常切片 | 切片上限値 |
|----|--------|-------|-------|-------|
| A | 77.06 | 77.08 | 77.15 | 77.22 |
| | — | 100.0 | 100.1 | 100.2 |
| B | 40.65 | 40.46 | 40.52 | 40.53 |
| | — | 99.5 | 99.7 | 99.7 |
| C | 50.83 | 50.85 | 50.76 | 50.76 |
| | — | 100.0 | 99.9 | 99.9 |
| D | 23.90 | 23.79 | 23.81 | 23.83 |
| | — | 99.5 | 99.6 | 99.7 |
| E | 0.490 | 0.483 | 0.484 | 0.486 |
| | — | 98.5 | 98.8 | 99.2 |
| F | 2.48 | 2.49 | 2.50 | 2.50 |
| | — | 100.6 | 100.8 | 101.0 |
| G | 39.95 | 39.97 | 39.87 | 40.12 |
| | — | 100.1 | 99.8 | 100.6 |
| H | 0.994 | 0.988 | 0.990 | 0.992 |
| | — | 99.4 | 99.6 | 99.8 |
| I | 75.46 | 74.99 | 75.15 | 75.34 |
| | — | 99.4 | 99.6 | 99.8 |

ai : 有効成分名, 上段は有効成分濃度, 下段はブラケット法定量値との比率(%)

ラケット法による分析値における潜在的なバイアスはこれよりも大きくなる。このため、ブラケット法の採用に当たっては、直線性を検証する三点検量線において、切片の95%信頼区間に原点が含まれるだけでなく、相関係数が今回の分析対象と同等(0.9999以上)であることを条件とすべきと考えられる。なお、見本検査法として提出されている分析法の大半は、相関係数が0.9999以上となっている。

3.3. 試料点数の影響

ブラケット法では見本検査法に比べ試料点数が少ないため、秤量や抽出の操作に関連する要因により、本来あるべき濃度からのずれが大きい試料が作成された場合、分析値が真の値からずれるリスクが大きくなる。そこで、見本検査法、ブラケット法のそれぞれについて、5点の試料の分析値の標準偏差に基づき、見本検査法については標本数が5、ブラケット法については標本数が2の場合の標準誤差を算出した。標本の分析値の平均の95%信頼区間は、母集団平均±2標準誤差となることから、各農薬について、両法で95%信頼区間にどの程度の差が出るかを検証した。

その結果、表6に示したように、今回対象とした9農薬の比率は98.2~103.3%となり、ブラケット法と見本検査法で3%程度分析値がずれる可能性があることが示された。

集取品の分析においては、農薬製剤中の有効成分の含有濃度が、登録票に示された濃度から一定の管理幅¹⁰⁾の範囲内にあるか否かを判断することとなる。実際の有効成分の含有濃度が、管理幅の中央付近にある場合には、上記のずれや一点検量線の採用によるバイアスが結果に影響する可能性は少ないが、含有濃度が管理幅の上限又は下限付近にある製剤では、これらが無視できなくなると考えられる。

従って、ブラケット法による分析の結果、有効成分濃度が管理幅の範囲外となった場合や、上限又は下限付近となった場合(例えば、分析値が管理幅の80%相当の範囲外となる)は、見本検査法でも分析し、その上で指導・監督処分を講じることとすべきと考えられる。

表6 見本検査法とブラケット法で定量した場合の分析値の信頼下限と信頼上限

| ai | 見本検査法 | | ブラケット法 | |
|----|-------|-------|----------------|----------------|
| | 信頼下限 | 信頼上限 | 信頼下限 | 信頼上限 |
| A | 77.00 | 77.30 | 76.67 99.6 | 77.45 100.2 |
| B | 40.36 | 40.68 | 39.64 98.2 | 41.48 102.0 |
| C | 50.61 | 50.92 | 50.45 99.7 | 51.23 100.6 |
| D | 23.69 | 23.94 | 23.82 100.5 | 23.98 100.2 |
| E | 0.480 | 0.489 | 0.479 99.6 | 0.505 103.3 |
| F | 2.48 | 2.52 | 2.45 98.6 | 2.51 99.4 |
| G | 39.67 | 40.07 | 39.20 98.8 | 40.50 101.1 |
| H | 0.982 | 0.998 | 0.975 99.3 | 1.015 101.7 |
| I | 74.91 | 75.40 | 74.59 99.6 | 76.13 101.0 |

ai : 有効成分名

上段 : 分析値 (%)

下段 : 信頼下限と信頼上限についてのブラケット法/
見本検査法の比率 (%)

結論

集取品の分析にブラケット法による定量法を導入できるかを確認するため、剤型、有効成分含有率、定量原理に幅を持たせて選定した農薬を用いて、見本検査法とブラケット法を用いて試料を5点分析した結果を比較した。

検量線パラメータは、いずれの有効成分においても、見本検査法検量線およびCIPAC法検量線とも選択性に問題はなく、直線性は良好、両者の傾きは同等、原点を通ることが確認された。

4~5点検量線による見本検査法と1点検量線によるブラケット法の分析値は同等であり、見本検査法とブラケット法は同等の精度をもつことが確認できた。

また、農薬の分析方法の国際的な標準化を図っているCIPACは、通常2点の試料分析としたブラ

ケット法を採用しており、集取品の分析においても、少ない分析点数で5点分析と同様な結果が得られれば、分析時間の短縮や溶媒使用量等の削減に繋がる。このため、ブラケット法における分析点数を2点とした場合の精度低下について検討したところ、試料5点による分析値と同等となることが確認された。

農薬の品質に問題があった場合、農薬取締法による監督処分の対象となり、その場合の検査方法(分析方法)は公定法を用いることとされている¹⁾。公定法は1970年代を最後に制定が行われていないため、現在国内で登録のある有効成分に適用できるものは少ない。そのため、FAMICでは、登録申請時に提出された見本の検査方法(分析方法)を適用している。見本検査法は前述のように5点の検量線と5点の試料分析を基本としているため、高い精度での分析が行われるものの多くの時間と経費を有するという問題点がある。今回、国際的な分析方法に用いられているブラケット法(1点検量線と2点の試料分析)と見本分析法が同等の結果を示すことが確認されたことから、集取品の分析にあたり、まず、分析方法を見本検査法に準拠したブラケット法での定量をスクリーニングとして行い、農薬の品質管理上の問題が生じた場合に、妥当性が確認されている見本検査法を用いて再分析を行うことが合理的と判断される。

謝辞

本研究の実施にあたり、農薬登録申請時に提出された見本の検査法を参考にさせていただきましたので、この場を借りて当該農薬の申請者の方々にお礼申し上げます。

なお、供試製剤及び分析方法の詳細は、提出した企業の知的財産に該当するため、記載を省略させていただきます。

引用文献およびURL

(全URLのリンクについての確認は、2018年12月1日に実施。)

- 1) 農薬取締法(昭和23年7月1日法律第82号), http://elaws.e-gov.go.jp/search/elawsSearch/elaws_search/lsg0500/detail?lawId=323AC0000000082
- 2) 農薬の登録申請書等に添付する資料等について(13生産第3987号農林水産省生産局長通知) <http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/3987.pdf>

- 3) 「農薬の登録申請書等に添付する資料等について」の運用について (13 生産第 3988 号農林水産省生産局生産資材課長通知)
<http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/3988/3988.pdf>
- 4) CIPAC : CIPAC Guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods
<http://www.cipac.org/images/pdf/study.pdf>
- 5) AOAC INTERNATIONAL : AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals
http://aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- 6) AOAC INTERNATIONAL : AOAC Official Methods of Analysis Appendix K, Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals (2013)
http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター : 肥料等試験法 (2018)
http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2018_10.pdf#page=29
- 8) Collaborative International Pesticides Analytical Council : CIPAC HANDBOOK VOLUME O (ed. by M. C. Cardeal de Oliveria and J. Garvey) (2017)
- 9) FAO/WHO : GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY (CAC/GL 72-2009)
http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B72-2009%252Fcxg_072e.pdf
- 10) FAO/WHO : Manual on the Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides, First edition, third revision (2016)
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/JMPS_Manual_2016/3rd_Amendment_JMPS_Manual.pdf