

農薬製剤の品質の検査方法の改良

村上賢太*, 栗山 泰**, 原田日路香**, 田淵友梨*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

** 内閣府食品安全委員会事務局

国際農薬分析法協議会 (Collaborative International Pesticides Analytical Council, 以下, CIPAC) では, 抽出方法や測定条件を変更することなく, 複数の有効成分および製剤へ適用可能な分析法である MAIMM (Multi Active Ingredient and Matrix Methods) の検討が進められている. 本調査研究では, 国内で登録されている有効成分および農薬製剤について, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた MAIMM の適用可能性を検討した. 有効成分 8 種, 延べ 10 種の農薬製剤を MAIMM で分析したところ, 3 回反復注入の併行精度, 直線性および 5 回反復分析の併行精度は良好であった. また, 検討対象とした 10 種の農薬製剤について, 新規申請時に提出された妥当性を確認済みの分析法 (以下, 見本検査法) を用いて分析し, MAIMM の分析結果と比較したところ, 有効成分含有濃度および併行精度はおおむね同程度であった. 従って, 検討対象とした有効成分および農薬製剤について, MAIMM は適用可能と考えられた.

Keywords : 農薬, 製剤分析, CIPAC, MAIMM

結 言

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¹⁾に基づき, 農林水産大臣の指示により農薬製造者への立入検査を実施している. 立入検査では農薬製剤を集取しており, 製造された農薬製剤中の有効成分含有濃度が登録された内容から逸脱していないかを検査している. 当該検査で用いられる見本検査法は, 登録申請ごとに申請者が提案するため, 使用する装置, カラム, 試料溶液の調製, 測定条件などが製剤ごとに異なり, 効率的な検査の妨げとなっている.

一方, CIPAC においては, アイルランドが 2016 年に分析方法・測定条件を変更することなく複数の有効成分および製剤へ適用することを目的とした MAIMM を提案して以来, 検討が進められている. 2018 年会合において MAIMM の要件等がベルギーより提案され, 2019 年 6 月の会合において, 具体的な分析方法および共同試験の結果が報告されている²⁾. MAIMM は, 農作物中の残留農薬の一斉分析法と同様に, 一つの分析条件で複数の有効成分と製剤を対象とする分析手法であり, 製剤ごとにカラム, 溶媒等の測定条件の切り替えを必要としない. また, 見本検査法では通常 4~5 濃度の検量線を用いて定量するのに対し, MAIMM では各分析試料の前後に標準溶液を注入し定量するブラケット法を採用していることから, 立入検査で集取した農薬製

剤の分析に MAIMM を利用できれば分析時間の短縮と試薬の購入コストの節約が見込まれる.

しかし, MAIMM は, EU を中心に適用可能性の検討が進められているため, EU で登録のない有効成分や製剤は適用の可否が検討されていない.

本調査研究では, CIPAC において適用可能性が検討されていない農薬製剤について, 測定装置に HPLC を用いた MAIMM への適用可能性を検討するとともに, 分析結果を見本検査法と比較することにより, 立入検査で集取した農薬製剤の分析法を見本検査法から MAIMM に変更可能であるかを検討した.

材料および方法

1. 材料

1.1. 供試製剤

国内で登録のある農薬製剤の中から, MAIMM の試験結果が報告されていない 8 種の有効成分 (農薬製剤として 10 製剤) を選定した. 各農薬製剤の有効成分濃度, 許容される濃度範囲 (以下, 中央値管理幅) および剤型を表 1 に示した.

表 1. 供試製剤

	有効成分濃度 (中央値管理幅)	剤型
農薬 1	A : 30.0 % (28.50~31.50 %)	水和剤

農薬 2	B : 0.50 % (0.425~0.575 %)	粉剤
農薬 3	C : 19.5 % (18.33~20.67 %)	液剤
農薬 4	D : 5.0 % (4.50~5.50 %)	水和剤
農薬 5	E : 2.6 % (2.34~2.86 %) F : 25.0 % (23.50~26.50 %) X : 25.0 %	水和剤
農薬 6	G : 10.0 % (9.00~11.00 %)	乳剤
農薬 7	G : 0.50 % (0.425~0.575 %)	粉剤
農薬 8	G : 20.0 % (18.80~21.20 %)	乳剤
農薬 9	H : 0.50 % (0.425~0.575 %)	粉剤
農薬 10	H : 6.0 % (5.40~6.60 %) Y : 0.75 %	粒剤

X, Y : 分析対象外の有効成分

条件を使用機器に適合させ、表 2 および表 3 のとおりとした。

表 2. HPLC 測定条件

装置	: 島津製作所製 LC-20AD
検出器	: フォトダイオードアレイ検出器 島津製作所製 SPD-M20A
カラム	: phenomenex Kinetex XB-C18 (内径 4.6 mm×長さ 100 mm, 粒径 2.6 μm)
カラム温度	: 40°C
移動相	A 液 : 0.1 % (v/v) リン酸水溶液 B 液 : アセトニトリル (グラジエント条件: 表 3)
流速	: 1.0 mL/min
測定波長	: 220~290 nm
注入量	: 5 μL

表 3. グラジエント条件

時間 (min)	A 液 : B 液 (比)		A 液 : B 液 (比)
0 ~ 0.01	65:35	→	65:35
~ 10.0	65:35	→	15:85
~ 16.0		→	15:85
~ 16.4	15:85	→	65:35
~ 25.0		→	65:35

2. 分析方法

2.1. MAIMM

2.1.1. 直線性確認用標準溶液の調製

1.1 に示した 8 種の有効成分の標準品をアセトニトリルで溶解して 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L および 150 mg/L の直線性確認用標準溶液を調製した。

2.1.2. 定量用標準溶液の調製

1.1 に示した 8 種の有効成分の標準品 10 mg を 100 mL メスフラスコにはかり取り、アセトニトリルで溶解・定容して定量用標準溶液を調製した。これを 2 点作成した (以下、標準溶液 C_A および標準溶液 C_B)。

2.1.3. 試料溶液の調製

有効成分として 9~11 mg 相当量の試料を 100 mL メスフラスコにはかり取った。懸濁液剤の場合は分散させるためさらに水を 5 mL 加えた。これにアセトニトリル約 70 mL 加え、必要であれば超音波照射した。室温に戻したのち、アセトニトリルで定容した。この溶液を 0.45 μm メンブランフィルターでろ過し、分析試料とした。

2.1.4. 測定条件

CIPAC で提案されている MAIMM の HPLC 測定

2.1.5. システムの平衡化

標準溶液 C_A の 2 回連続注入により得られる保持時間の変動が 1.0 % 以内、ピーク面積の変動が 1.0 % 以内になるまで注入を繰り返した。

2.1.6. 測定

定量用標準溶液および試料溶液をブラケット法 (試料溶液の前後に定量用標準溶液を注入する方法) にて注入し、ピーク面積を求めた (例: 標準溶液 C_A, 試料溶液, 標準溶液 C_B, 試料溶液, 標準溶液 C_A, …)。

2.1.7. 計算

次式により試料溶液前後の定量用標準溶液における個々のレスポンスファクターを求め、試料中の有効成分含有濃度を計算した。

$$f_i = (s \times P) / H_s$$

$$\text{有効成分含有濃度 (\%)} = (f \times H_w) / w \times 100$$

$$f_i = \text{個々のレスポンスファクター}$$

f = 試料溶液前後の標準溶液のレスポンスファクターの平均値

$$H_s = \text{標準溶液中の有効成分のピーク面積値}$$

$$H_w = \text{試料溶液中の有効成分のピーク面積値}$$

$$s = \text{標準溶液中の標準品量 (mg)}$$

w = 供試した試料量 (mg)
P = 標準品の純度 (%)

2.2. 見本検査法

申請者より報告されている見本検査法 (表 4) に準じた。なお、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、記載は省略した。

表 4. 見本検査法における HPLC 測定条件

	カラム	検出波長	定量法
農薬 1	C ₁₈	280 nm	内部標準法
農薬 2	C ₁₈	254 nm	内部標準法
農薬 3	C ₁₈	280 nm	内部標準法
農薬 4	C ₁₈	260 nm	内部標準法
農薬 5	C ₁₈	240 nm	内部標準法
農薬 6	C ₁₈	275 nm	内部標準法
農薬 7	C ₁₈	275 nm	内部標準法
農薬 8	C ₁₈	275 nm	内部標準法
農薬 9	C ₈	270 nm	内部標準法
農薬 10	C ₁₈	290 nm	内部標準法

3. 有効成分への MAIMM の適用要件の確認

選定した表 1 の有効成分 8 種・農薬 10 剤について、MAIMM の要件を参考に、以下の評価項目で MAIMM への適用可能性を確認した。

3.1. 反復注入の併行精度

2.1.2 に従って調製した標準溶液 C_A を HPLC に 3 回繰り返し注入し、得られたクロマトグラムにおけるピーク面積の変動係数 (RSD) が 1% 以内になることを確認した。

3.2. 直線性

2.1.1 に従って調製した直線性確認用標準溶液を HPLC に 2 回繰り返し注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。作成した検量線の相関係数 (r) が 0.99 以上になることを確認した。

3.3. 反復分析の併行精度

2.1.3 に従って調製した試料溶液 5 点を 2.1.6 の方法により HPLC で測定し、得られたクロマトグラムから算出される試料中の有効成分含有濃度の RSD が 5% 以内になることを確認した。

4. MAIMM と見本検査法による分析結果の比較

4.1. 測定された製剤中の有効成分含有濃度の比較

表 1 の供試製剤 10 剤について、MAIMM および

見本検査法を用いて 5 反復分析を行い、製剤中の有効成分含有濃度の平均値 (以下、分析値) を比較した。

4.2. 反復分析の併行精度

4.1 の 5 反復分析結果から RSD を求めた。この RSD と、試料濃度に基づく Horwitz 式から求められる相対標準偏差 (RSD_r) との比 (HORRAT_r) を比較し、2 以下になることを確認した³⁾。

$$RSD_r (\%) = 2^{(1-0.5 \times \log C)} \times 0.67$$

C : 分析対象製剤の有効成分含有濃度 (次元のない質量比)

$$HORRAT_r = RSD / RSD_r$$

結果および考察

1. 有効成分への MAIMM の適用要件の確認

いずれの有効成分とも反復注入の RSD は 1% 以内、検量線の相関係数は 0.99 以上、反復分析の RSD は 5% 以内であり、MAIMM の適用要件を満たしていた (表 5)。

表 5. MAIMM の適用可能性の検討結果

有効成分	反復注入の RSD (%)	相関係数	反復分析の RSD (%)
A	0.02	0.9999	0.96
B	0.03	1.0000	0.18
C	0.31	1.0000	0.27
D	0.07	1.0000	0.32
E	0.14	0.9996	0.27
F	0.05	1.0000	0.71
G (3 製剤)	0.04	1.0000	0.90 - 1.81
H (2 製剤)	0.00	1.0000	0.26 - 0.72

2. MAIMM と見本検査法による分析値の比較

分析値は、MAIMM と見本検査法のいずれも有効成分含有濃度の中央値管理幅の範囲内であった (表 6)。見本検査法による分析値を 100% とした場合の MAIMM による分析値の相対値を算出したところ、98.1~114.1% となり、MAIMM 法と見本検査法の分析値はおおむね同程度の値が得られた。農薬 5 の MAIMM のクロマトグラムの例を図 1、見本検査法のクロマトグラムの例を図 2 に示す。

試料を 5 点分析した併行精度は、HORRAT_r が、MAIMM では 0.06~1.06、見本検査法では 0.07~1.38 と、いずれの農薬でも 2 以下であり同程度の結果になった。

結論

検討対象とした有効成分 8 種，農薬製剤 10 剤について，MAIMM の適用可能性が示唆された。立入検査の集取農薬の分析への MAIMM の導入により，業務の効率化およびコストダウンが可能となることが期待される。ただし，集取農薬の分析に MAIMM を採用するためには，分析対象の有効成分に対する MAIMM の適用可否を事前に検証しなければならない点に留意する必要がある。

参考文献

- 1) 農薬取締法（昭和 23 年 7 月 1 日法律第 82 号），
<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=323AC000000082>
- 2) MULTI-ACTIVE METHOD FOR THE ANALYSIS OF ACTIVE SUBSTANCES IN FOURMULATED PRODUCTS TO SUPPORT QUALITY CONTROL, <https://www.cipac.org/images/MAM%20Method%20Rev%202.1%20June%202020.pdf>
- 3) FAO/WHO: GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY (CAC/GL 72-2009), http://www.fao.org/input/download/standards/11357/cxg_072e.pdf

表 6. 試料の分析結果

分析	対象	方法	分析値 (%)					平均	RSD	HORRATr
			1	2	3	4	5			
農薬 1	A	MAIMM	31.46	30.91	31.69	31.27	31.12	31.29	0.96	0.60
		見本検査法 相対値*	29.25	29.39	29.77	29.86	29.78	29.61	0.92	0.57
農薬 2	B	MAIMM	0.528	0.530	0.530	0.530	0.529	0.529	0.18	0.06
		見本検査法 相対値*	0.525	0.525	0.526	0.527	0.524	0.525	0.22	0.07
農薬 3	C	MAIMM	20.16	20.16	20.29	20.19	20.21	20.20	0.27	0.16
		見本検査法 相対値*	19.53	19.48	19.51	19.55	19.53	19.52	0.14	0.08
農薬 4	D	MAIMM	5.03	5.08	5.06	5.04	5.04	5.05	0.32	0.15
		見本検査法 相対値*	5.16	5.15	5.14	5.14	5.16	5.15	0.19	0.09
農薬 5	E	MAIMM	2.67	2.67	2.65	2.67	2.66	2.66	0.27	0.12
		見本検査法 相対値*	2.64	2.64	2.61	2.61	2.61	2.62	0.63	0.27
		MAIMM	26.04	25.81	25.57	25.68	25.67	25.75	0.71	0.43
農薬 6	G	見本検査法 相対値*	25.13	24.69	24.78	24.78	24.73	24.82	0.71	0.43
		MAIMM	10.56	10.35	10.44	10.34	10.50	10.44	0.90	0.48
農薬 7	G	見本検査法 相対値*	10.23	10.28	10.32	10.31	10.33	10.29	0.39	0.21
		MAIMM	0.467	0.481	0.468	0.471	0.460	0.470	1.58	0.53
農薬 8	G	見本検査法 相対値*	0.454	0.452	0.450	0.452	0.446	0.451	0.67	0.23
		MAIMM	20.75	21.72	21.26	20.85	21.20	21.16	1.81	1.06
農薬 9	H	見本検査法 相対値*	19.72	20.07	19.26	20.26	19.24	19.71	2.35	1.38
		MAIMM	0.565	0.558	0.555	0.563	0.558	0.560	0.72	0.24
農薬 10	H	見本検査法 相対値*	0.491	0.490	0.492	0.493	0.488	0.491	0.39	0.13
		MAIMM	5.93	5.95	5.96	5.93	5.93	5.94	0.26	0.13
		見本検査法 相対値*	5.96	5.93	5.96	5.94	5.94	5.95	0.23	0.11
							99.8			

* : (MAIMM での分析値 / 見本検査法での分析値) × 100 (%)

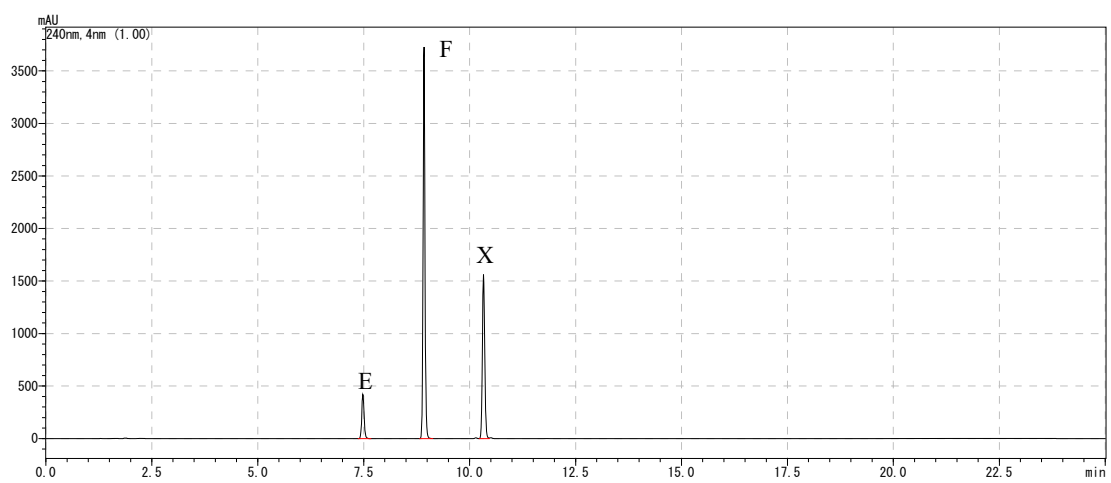


図 1. 農薬 5 の MAIMM のクロマトグラム の例

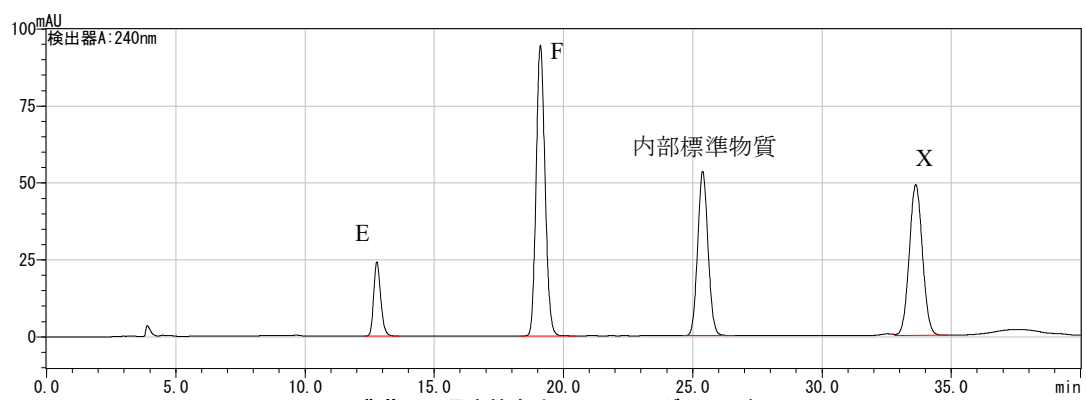


図 2. 農薬 5 の見本検査法のクロマトグラム の例