農薬製剤中の抗生物質における機器分析法の検討

布上樹生*，大島　雄*，松本明日香*，南美由紀*，池長　宙*，木村　穣*，篠田隆祥*，
工藤幹子**，有賀俊裕*，井上優子*，馬場北透*，泉澤　努*

*独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部
** 関東農政局　消費・安全部

抗生物質を有効成分とする一部の農薬製剤では，農薬登録申請に必要な製剤中の有効成分濃度の定量に，発育阻止円を指標とする生物検定が用いられている．しかし，国内の試験施設においては，生物検定を農薬GLP 基準に則って実施することが困難であるため，機器分析による代替手法の開発が求められてきた．本研究では，農薬用途で広く利用されるアミノグリコシド系抗生物質のイオン性及び高い親水性に着目し，イオン対試薬を利用した逆相クロマトグラフィー及び親水性相互作用クロマトグラフィーを検討した．カスガマイシンを含む農薬を供試した結果，従来の生物検定と整合する定量結果が得られ，分析値の併行精度は顕著に向上した．これらの分析法は，生物検定に代替可能な機器分析法の第一選択肢となることが期待される．

Keywords：農薬，抗生物質，力価検定，機器分析

緒言

微生物が産生する他の微生物の発育を抑制する物質（以下「抗生物質」という）は，農作物を加害する病原菌の防除手段として農薬用途に利用されてきた．農薬取締法[1]（昭和 23 年法律第 82 号）に基づき登録された農薬のうち，抗生物質を有効成分とするものとしては，カスガマイシン，ストレプトマイシン，ポリオキシン，バリダマイシンなどが挙げられる．これらはいずれも分子構造中にアミノ糖を含むアミノグリコシド系抗生物質であり（図 1），我が国において農薬用途で広く利用されている．

農薬登録の申請に際しては，「農薬の登録申請において提出すべき資料について」[2]（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知）（以下「第 6278 号通知」という）に基づき，製剤中の有効成分含有濃度に関する経時安定性試験成績の提出が要求される．一般的な農薬では高速液体クロマトグラフィー等の機器分析によって有効成分含有濃度を定量できる．しかしながら，抗生物質を含有する一部の農薬では，今もなお平板培地上の発育阻止円の大きさを指標とする生物学的定量法（以下「力価検定」という）が用いられている．

2020 年 4 月 1 日付けで改正された「特定試験成績及びその信頼性の確保のための基準に関する省令」（平成 30 年農林水産省令第 76 号）[3]により，経時安定性試験は「特定試験成績」へと指定され，同省令で定める基準（以下「農薬 GLP」という）に準拠した試験の実施が求められることとなった．農薬 GLP に基づく試験を実施可能な試験機関の多くは機器分析用の実験設備を備えている一方，力価検定の実施には試験菌の培養装置など特殊な設備が必要である．このため，抗生物質を有効成分とする農薬について農薬 GLP に従った経時安定性試験を実施できる国内試験機関は，令和 7 年 9 月現在確認されていない．抗生物質を有効成分とする農薬の有効成分濃度分析を力価検定から機器分析に代替でき

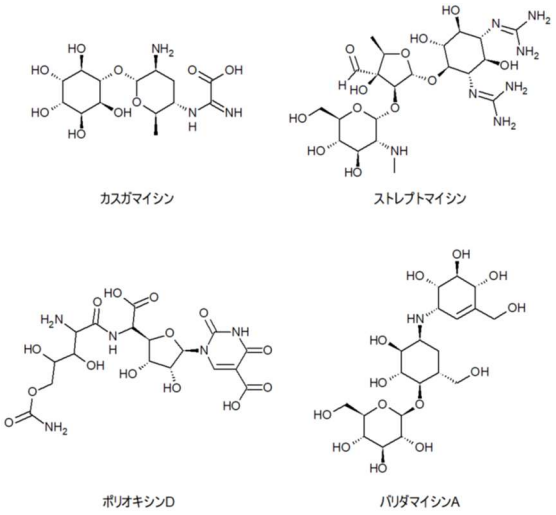


図 1　既登録農薬中に含まれる抗生物質の代表例

れば，多くの試験機関で農薬 GLP 準拠の経時安定性試験が可能になる．

しかしながら，抗生物質の機器分析法の確立は容易ではないと考えられる．特にアミノグリコシド系抗生物質は，分子内に多数の水酸基を有するために強い親水性を示すとともに，アミノ基等のプロトン受容部位により酸性条件下でカチオン化する．このような特性をもつ分子は疎水性相互作用が弱く，一般的に農薬分析で用いられる逆相クロマトグラフィー条件では分離が困難となる．

そこで本研究では，力価検定を代替可能な機器分析法を開発するための基礎的検討として，親水性の高い化合物の分析に適したクロマトグラフィー条件を使用し，抗生物質の定量に有効となり得る分析条件を探索することを目的とした．

材料および方法

1. 供試製剤

本研究ではアミノグリコシド系抗生物質を含む農薬を分析する適切な条件の探索のため，被験物質としてカスガマイシンを選定した．カスガマイシンは，農薬用途として稲のいもち病を始めとして広範な糸状菌病及び細菌病に使用される代表的な抗生物質であり，令和 6 年 11 月現在 32 剤が農薬登録されている．また，カスガマイシンは，分子内に解離性の官能基が複数あることに起因して複数の解離定数（$pK_{a1} = 3.23$, $pK_{a2} = 7.73$, $pK_{a3} = 11.0$）[4]を示し，広い pH 範囲で複雑なイオン化挙動を示す．複数の解離定数はストレプトマイシン，ポリオキシンにおいても報告されているため，種々の pH 条件におけるカスガマイシンの分析妥当性を確認することで，その他のアミノグリコシド系抗生物質を分析する上でも有用な情報を得られると考えた．カスガマイシンは，銅との混合剤であるカスガマイシン・銅水和剤としての製造量が最も多い（令和 4 年度出荷量 195 t）[5]ことから，供試製剤はカッパーシン水和剤（登録番号：第 15744 号）を選定した．カッパーシン水和剤の有効成分の種類及び含有濃度は以下のとおりである．

カスガマイシン一塩酸塩	5.7 %
（カスガマイシンとして	5.0 %）
塩基性塩化銅	75.6 %
（銅として	18.7 %）

2. 力価検定

2.1. 試験条件の設計

機器分析の結果と比較するための力価検定は，公定検査法[6]に準じた方法を用いた．

2.2. 試薬の調製

1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）：リン酸二水素カリウム（特級，富士フイルム和光純薬製）5.68 g 及びリン酸水素二ナトリウム（特級，富士フイルム和光純薬製） 3.63 g を水 1 L に溶解した．

陽イオン界面活性剤加用 1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）：1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）にニューカルゲン NT-13（竹本油脂製）を 2.5 g/L 加用した．

培地：Antibiotic Medium 1（BD Difco 製） 30.5 g を水 1 L に溶解した．

2.3. 常用標準カスガマイシン希釈液の調製

常用標準カスガマイシン（純度：カスガマイシンとして 87.8 %）0.03417 g を 10 mL 容全量フラスコに秤量して 1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）を加えて 10 mL に定容し，15 分間超音波抽出し標準液（3.0 mg（力価）/mL）とした．標準液を 1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）で 10 倍希釈した 300 µg（力価）/mL 希釈液及び 20 倍希釈した 150 µg（力価）/mL 希釈液を調製した．

2.4. 試験品希釈液の調製

カッパーシン水和剤 300 mg（カスガマイシンとして 15 mg）を陽イオン界面活性剤加用 1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）50 mL に溶解した．室温で 10 分間攪拌後，15 分間超音波抽出し，遠心分離（3000 rpm，10 分間）を行った．その上澄液を定量 0.45 µm フィルターで濾過し，300 µg（力価）/mL（推定値）希釈液とした．さらに 1/15 mol/L リン酸緩衝液で正確に 2 倍に希釈して 150 µg（力価）/mL（推定値）希釈液を調製した．

2.5. 試験方法

滅菌した培地約 20 mL をシャーレ（90 φ ×20 mm）5 枚にそれぞれ分注して厚さ 2～5 mm 程度の均一な平板培地（基層培地）とした．

試験菌（*Pseudomonas fluorescens* NIHJ B-254）を 7 日間培養した種菌斜面培地に滅菌水を 10 mL 加え，斜面の半分程度の菌を掻き取り懸濁し，試験菌浮遊液を調製した．滅菌後約 50 ℃まで冷却した培

地 100 mL に対し試験菌浮遊液 1～5 mL を添加し，種層培地とした．

基層培地に種層培地 4 mL を積層し，その上にステンレス製の円筒を 4 つ設置し，各円筒に常用標準カスガマイシン希釈液（300 または 150 µg（力価）/mL）もしくは試験品希釈液（300 または 150 µg（力価）/mL（推定値））を 200 µL ずつ滴下し，培地中に拡散させた．

試験菌を 28 ℃で 18～20 時間培養後，形成された阻止円直径を測定した．計算式 1 により，製剤中のカスガマイシン含有濃度を定量した．

3. 機器分析

3.1. 試験条件の設計

カスガマイシンが高い水溶性を示す（水溶解度 = 228 g/L）[4]ことから，供試製剤からカスガマイシンを抽出するための溶媒は水を選択した．分離及び定量には紫外可視吸光検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用し，分離機構はイオン性物質の分離において保持力を発揮すると考えられる以下の 2 通りを選定した．

1) イオン対試薬（IPC）を利用した逆相クロマトグラフィー

イオン化した測定対象物質を分析する際，HPLC の移動相に疎水性の高い対イオンを含む塩（IPC）を添加することで，分析中に測定対象物質とのイオン対が形成され，カラムとの疎水性相互作用が大きくなる．本研究ではカチオン分析用 IPC である 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを移動相に添加した．さらに，カスガマイシンのカチオン化度による影響を調べるため，リン酸緩衝液を用いて pH を 2～11 の範囲で調整した（表 1，条件番号 A1～A4）．IPC を使用しない条件でも別途分析し，結果を比較した（表 1，条件番号 対照区 1～対照区 4）．

2) 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）

カスガマイシンは高い親水性を有することから，親水性の置換基を有するカラムとは強く相互作用すると予想される．カスガマイシンは水に極めて溶けやすい一方で有機溶媒には溶けにくいため，水系の移動相と親水性のカラムにより分離する HILIC 条件が適切と考えた．厚生労働大臣が告示した農産物中のカスガマイシン分析法においても HILIC 条件が利用されていることから，本研究における分析条件の参考とした．カスガマイシンのカチオン化度による影響を調べるため，移動相にはギ酸，酢酸または酢酸アンモニウムを用いた（表 1，条件番号 B1～B3）

3.2. カスガマイシン標準溶液の調製

カスガマイシン塩酸塩一水和物標準品（残留農薬試験用，富士フイルム和光純薬製，純度：99.2 %）を 28.6 mg を水（Merck Millipore 製超純水製造装置から採水）100 mL に希釈した（カスガマイシンとして 250 mg/L）．この溶液を 2,3,4,5,6 mL はかり取ってそれぞれ水で希釈し 10 mL に定容した（カスガマイシンとして各 50, 75, 100, 125, 150 mg/L）．

3.3. 試料溶液の調製及び分析

カッパーシン水和剤 180～220 mg（カスガマイシンとして 9～11 mg 相当量）を水 70 mL で希釈し，

計算式 1.

Σ UH：試験品 300 µg（力価）/mL（推定値）希釈液の阻止円直径の合計
Σ UL：試験品 150 µg（力価）/mL（推定値）希釈液の阻止円直径の合計
Σ SH：常用標準カスガマイシン 300 µg（力価）/mL 希釈液の阻止円直径の合計
Σ SL：常用標準カスガマイシン 150 µg（力価）/mL 希釈液の阻止円直径の合計

$$\log\theta = \frac{\{(\sum \mathrm{UH} + \sum \mathrm{UL}) - (\sum \mathrm{SH} + \sum \mathrm{SL})\}}{\{(\sum \mathrm{UH} + \sum \mathrm{SH}) - (\sum \mathrm{UL} + \sum \mathrm{SL})\}} \times \log 2$$

製剤中のカスガマイシン含有濃度(%)

$$= \theta \times 300\ \mathrm{mg}\left(\text{標準品の力価}\right) \times \frac{50\ \mathrm{mL}}{1000\ \mathrm{mL}}\left(\text{採取した製剤の希釈倍数}\right) \times \frac{1}{300\ \mathrm{mg}\left(\text{試験品の力価}\right)} \times 100$$

表 1. 分析条件

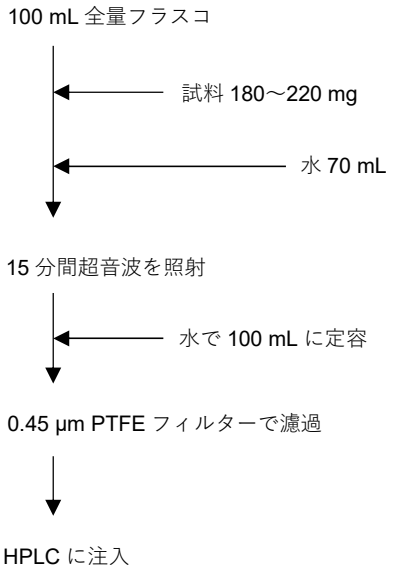
条件	カラム	移動相※		
		A 液	B 液	A 液/B 液
対照区 1	CAPCELL PAK C18 KG S5 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)	50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.1)	アセトニトリル	90/10
対照区 2		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.7)	アセトニトリル	90/10
対照区 3		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5)	アセトニトリル	90/10
対照区 4		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 10.9)	アセトニトリル	90/10
A1	CAPCELL PAK C18 UG80 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)	50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.1) + IPC	アセトニトリル	90/10
A2		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.7) + IPC	アセトニトリル	90/10
A3		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0) + IPC	アセトニトリル	90/10
A4		50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 10.8) + IPC	アセトニトリル	90/10
B1	ZIC-pHILIC 5um, polymeric (4.6 mm×150 mm, 5 μm)	0.1 %ギ酸水溶液 (pH 2.6)	アセトニトリル	50/50
B2		0.1 %酢酸水溶液 (pH 3.3)	アセトニトリル	50/50
B3		5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5)	アセトニトリル	25/75

装置 ：島津製作所製 Nexera XS，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
流速：1.0 mL/min，注入量：5 μL，カラム温度：40 ℃，測定波長：240 nm （条件 B3 のみ 220nm）
IPC = 5 mmol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム

※移動相の調製方法
アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用，富士フイルム和光純薬製
0.1 %ギ酸水溶液：ギ酸（高速液体クロマトグラフ用，富士フイルム和光純薬製）1 mL を水 1 L に溶解した.
0.1 %酢酸水溶液：酢酸（高速液体クロマトグラフ用，富士フイルム和光純薬製）1 mL を水 1 L に溶解した.
50 mmol/L リン酸緩衝液：目標 pH に応じて以下のとおり調製した．IPC を添加する場合は，さらに 1-オクタンスルホン酸ナトリウム（富士フイルム和光純薬製）を 1.081 g を加えて溶解した.

pH 2.1：りん酸（特級，富士フイルム和光純薬製）2 mL 及びりん酸二水素ナトリウム・二水和物（特級，富士フイルム和光純薬製）3.233g を 1 L の水に溶解した.
pH 5.7：りん酸二水素ナトリウム・二水和物 7.34 g 及びりん酸水素二ナトリウム 12 水（特級，富士フイルム和光純薬製）1.07 g を 1 L の水に溶解した.
pH 7.5 ～ 8.0：りん酸二水素ナトリウム・二水和物 1.07 g 及びりん酸水素二ナトリウム 12 水 15.61 g を 1 L の水に溶解した.
pH 10.8 ～ 10.9：りん酸水素二ナトリウム 12 水 15.85 g 及びりん酸三ナトリウム 12 水（特級，富士フイルム和光純薬製）2.38 g を 1 L の水に溶解した.

室温で 15 分間超音波を照射した．水で 100 mL に定容し，0.45 μm PTFE フィルターで濾過し，試験溶液とした. 各カスガマイシン標準溶液及び試験溶液を表 1 の条件の HPLC に 2 回ずつ注入し，ピーク面積を記録した. カスガマイシン標準溶液の濃度に対する検量線を作成し，検量線から製剤中のカスガマイシン含有濃度を定量した.



機器分析の試料調製スキーム

結果および考察

1. 力価検定

カスガマイシン含有濃度の 8 反復の平均値は 4.9 %であり（表 2），相対標準偏差は 5.5 %であった．公定検査法では，表示値の 85～130 %を分析結果の許容範囲と定めており，分析結果は許容範囲内に収まっていた.

2. 機器分析の結果

1) IPC を利用した逆相クロマトグラフィー

対照区 1～対照区 4 は保持時間が 1.3 min であり，ほとんどカスガマイシンが保持されなかった（表

表 2. 力価検定結果

条件	分析値 (%)									相対標準偏差(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	平均値	
力価検定	5.1	4.8	5.2	4.8	5.4	4.8	4.5	4.8	4.9	5.5
許容範囲									4.25 ～ 6.5*	

*公定検査法において，表示値の 85～130 %を許容範囲と定めている.

3)．分析結果は「農薬（製剤）の品質に関する審査ガイダンス」(以下「ガイダンス」という.）で定める管理幅を超えており，製剤に含有される補助成分が分離できなかったことが原因と考えられる．いずれの条件でも保持時間は変化していないことから，pH 2～11 の範囲においてカスガマイシンは完全な非イオン化状態にはなっておらず，いずれかの官能基がイオン化していると考えられた.

一方，条件 A1，A2，A3，A4 はそれぞれ保持時間が 5.4, 3.9, 2.4, 2.1 min であり，IPC を添加した移動相の pH を酸性に傾けることで，カスガマイシンがカラムへ強く保持された (表 3)．酸性条件下ではカスガマイシンがプロトン化され，1-オクタンスルホン酸とのイオン対がより多く形成されたと考えられる.

分析結果を力価検定と比較すると，相対標準偏差は 5.5 %から 0.49 %～0.78 %まで大幅に低下した(図 2)．分析結果の平均値はガイダンスで定める管理幅の範囲内であるが，力価検定より僅かに大きかっ

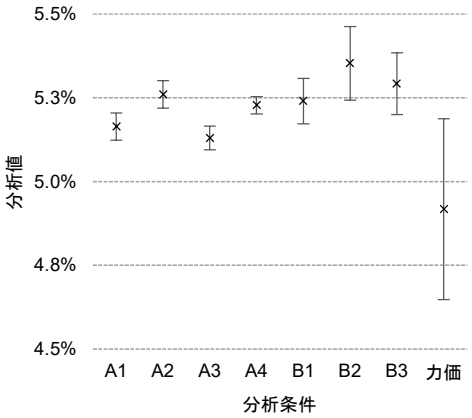


図 2　機器分析と力価検定の分析結果比較
×：各分析条件における分析結果平均
エラーバー：分析結果の標準偏差

表 3. 機器分析結果

条件	標準溶液の分析		分析値 (%)						相対標準偏差 (%)
	保持時間 (min)	直線性	1	2	3	4	5	平均値	
対照区 1	1.3	0.9999	5.72	5.81	5.86	5.77	5.90	5.81	1.25
対照区 2	1.3	0.9998	5.62	5.70	5.75	5.64	5.79	5.70	1.22
対照区 3	1.3	0.9998	5.50	5.57	5.63	5.52	5.66	5.58	1.23
対照区 4	1.3	0.9997	5.47	5.54	5.60	5.47	5.60	5.53	1.15
A1	5.4	0.9999	5.18	5.22	5.15	5.16	5.11	5.16	0.78
A2	3.9	0.9999	5.23	5.29	5.21	5.31	5.26	5.26	0.78
A3	2.4	0.9999	5.14	5.13	5.07	5.16	5.15	5.13	0.71
A4	2.1	1.0000	5.22	5.21	5.20	5.26	5.25	5.23	0.49
B1	8.1	0.9999	5.19	5.23	5.34	5.17	5.27	5.24	1.28
B2	20.7	0.9991	5.24	5.33	5.40	5.26	5.42	5.33	1.50
B3	13.3	0.9998	5.17	5.29	5.40	5.24	5.36	5.29	1.74
許容範囲								4.5 ～ 5.5 *1	～ 2.0 *2

*1 ガイダンスで定める管理幅

*2 第 6278 号通知で定める許容範囲(Horwitz 式×0.67 から計算)

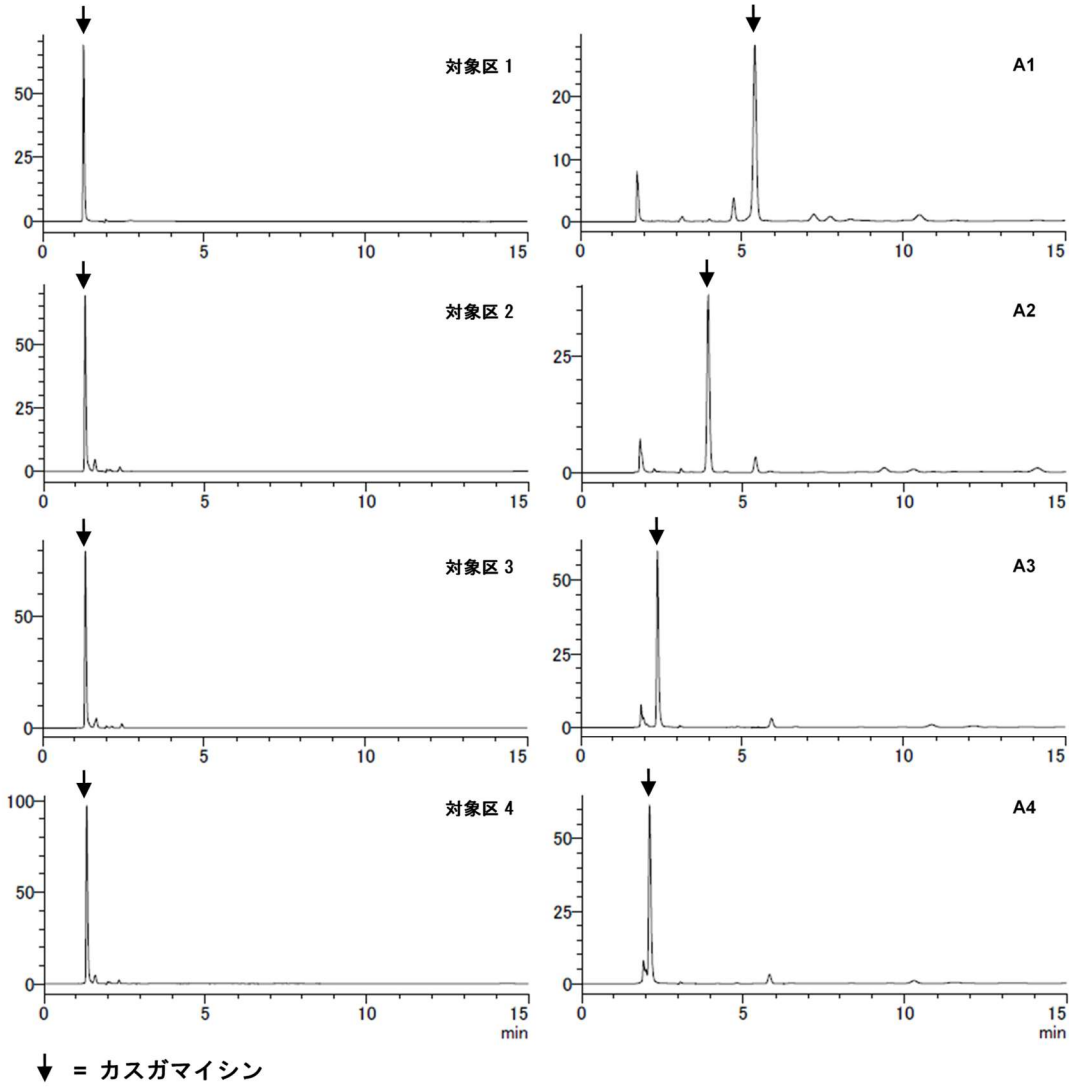


図 3　逆相クロマトグラフィーによる分析結果

た．クロマトグラム上には補助成分由来と思われる小さなピークが多数存在しており（図 3），一部のピークはカスガマイシンと重なっている可能性が考えられるが，移動相の pH 及び有機相との混合比について適切な分離条件を設定することで改善されると期待される．

以上の結果から，IPC を利用した逆相クロマトグラフィーは，カッパーシン水和剤に対する力価検定の代替として利用可能と考えられる．また，移動相の pH や有機相との混合比など適切な分離条件を探索することで，他の製剤や有効成分についても有効であることが期待される．

2) HILIC

条件 B1～B3 においてカスガマイシンはカラムに良好に保持された（表 3）．分析結果の平均値は 5.29～5.36 %となり，ガイダンスで定める管理幅の範囲内であったが，条件 A1～A4 の結果よりわずかに高い値を示した．条件 A1～A4 と比べ条件 B1～B3 のピーク形状はブロードであり，HILIC による分離が困難な成分がカッパーシン水和剤に含まれている可能性が考えられる（図 4）．分析結果の相対標準偏差は 1.28 %～1.96 %であり，条件 A1～A4 より併行精度が悪いものの，第 6278 号通知で定める許容範囲内に収まった．

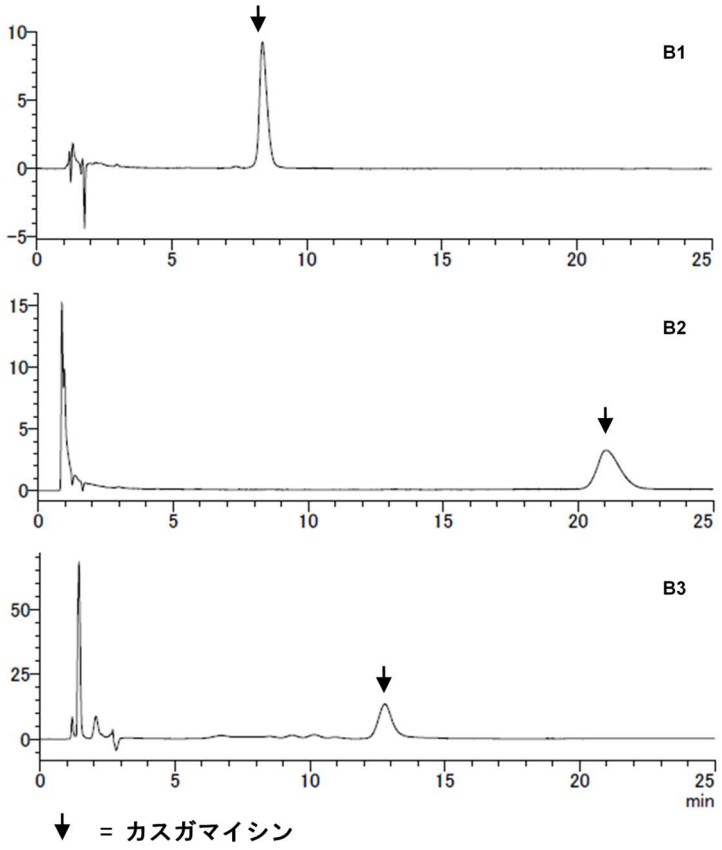


図 4　HILIC による分析結果

以上の結果から，HILIC 条件は，カッパーシン水和剤に対する力価検定の代替として利用可能と考えられる．一方，他の製剤や有効成分の分析に HILIC 条件を用いる場合，補助成分と有効成分の組み合わせによっては分析結果に大きく影響するおそれもある．

結論

本調査研究では，製剤中の抗生物質の含有濃度を機器分析により定量する方法を調査するため，被験物質としてカスガマイシン及びカッパーシン水和剤を選定し，IPC を利用した逆相クロマトグラフィーまたは HILIC を用いた各分析条件の妥当性を検証した．IPC を利用した逆相クロマトグラフィーは，移動相の pH 及び有機相との混合比など，分析対象物質の保持時間を調整する手段が複数あり，カッパーシン水和剤のみならず様々な製剤や有効成分についても有効であることが期待される．しかしながら，一般的に IPC は洗浄によりカラムから完全に取り除くことが難しく，保持時間の再現性に問題が生じる場合もあり，必ずしも万能な方法ではない．HILIC については，補助成分と有効成分の組み合わせによっては分離に懸念が生じるおそれが示唆されたものの，HILIC の移動相には不揮発性物質を用いないため，質量分析計を検出器に使用する選択が採りうる．農薬製剤中の抗生物質における機器分析法の開発時，IPC を利用した逆相クロマトグラフィー及び HILIC は，条件検討を始める際の第一選択肢として有用であると期待される．

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=323AC0000000082
2) 農薬の登録申請において提出すべき資料について（平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号

農林水産省消費・安全局長通知),
https://www.acis.famic.go.jp/shinsei/6278/6278_20240401.pdf
3) 特定試験成績及びその信頼性の確保のための基準に関する省令（平成 30 年農林水産省令第 76 号),
https://laws.e-gov.go.jp/law/430M60000200076/
4) 北興化学工業株式会社（2012）：農薬抄録,
https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/kasugamycin/kasugamycin_01.pdf
5) 一般社団法人日本植物防疫協会（2023）：農薬要覧 2023
6) 農薬取締法第三十一条第三項の規定に基づく検査方法（個別の農薬の検査方法),
https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/nouyaku_kennsa.html