

農薬製剤のFT-IR/ATRスペクトルによる異同識別

| | |
|-------|------------------------------|
| 誌名 | Journal of pesticide science |
| ISSN | 1348589X |
| 著者名 | 石原,悟 豊留,夏紀 |
| 発行元 | 日本農薬学会 |
| 巻/号 | 37巻2号 |
| 掲載ページ | p. 190-195 |
| 発行年月 | 2012年5月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



|||||
技術資料
|||||

農薬製剤のFT-IR/ATRスペクトルによる異同識別

石原 悟*, 豊留 夏紀

農林水産消費安全技術センター農薬検査部

(2011年7月29日受付, 2012年2月26日受理)

Discriminant analysis of pesticide formulations by FT-IR/ATR spectroscopy

Satoru ISHIHARA* and Natsuki TOYODOME

*Incorporated Administrative Agency Food and Agricultural Materials Inspection Center,
Agricultural Chemicals Inspection Station,
2-772 Suzuki-cho, Kodaira-shi, Tokyo 187-0011, Japan*

To ensure the safety of the environment and human health, the manufacture of pesticide formulations must be in accord with registered formula components. The Agricultural Chemicals Inspection Station therefore regularly inspects the formula components of commercial samples. The purpose of this paper is to introduce a simple method using Fourier transform infrared attenuated total reflection (FT-IR/ATR) spectroscopy for the identification of the formula components of registered and commercial samples. The FT-IR/ATR technique is fast and relatively easy to use; it requires no sample pretreatment for most solid and liquid pesticide formulations, with the exception of some ready-to-use liquid formulations. The transmittance spectrum ($4,000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) is useful for inspection. We used three evaluation methods to identify the components of the formula: overlap of two spectra, calculation of the purity index, and use of principal component analysis (PCA). © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: FT-IR/ATR, mid-infrared spectrum, purity index, principal component analysis (PCA).

はじめに

農薬製剤は農薬として主な効果を示す有効成分と補助成分とで構成されており、登録申請時には製剤毎に詳細な処方と有効成分を含め全ての成分を分析する方法の報告が実施されている¹⁾。登録された農薬製剤は、申請時の処方で製造された製剤を用いて毒性、薬効・薬害の有無など各種安全性と効果が確認されているため、これらを担保する観点から原則的

には登録時の処方を変更することは認められておらず、やむを得ず変更する場合は、必要に応じ追加の試験成績の提出が求められている²⁾。諸外国においても、農薬製剤の処方変更については、軽微な変更を除き再評価が必要とされている^{3,4)}。

農林水産消費安全技術センター農薬検査部では、集取品(農薬製剤製造工場の立入検査に伴い集取した農薬)について処方検査(申請処方と農薬製造工場で購入した処方の異同識別の検査)を行っている。処方検査では各補助成分について個別に分析(定性および定量)し、処方の異同識別を行うことが望ましいが、多大な労力と分析コストを必要とするため、通常は申請時の処方と製造現場で確認した処方の比較による検査で対応している。

* 〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772
E-mail: satoru_ishihara@acis.famic.go.jp
Published online April 29, 2012
© Pesticide Science Society of Japan

これまで当部（前身の農薬検査所）では、簡易で科学的な処方検査の手法として、核磁気共鳴装置（NMR）の利用を検討し、処方検査への実用性を示した⁵⁻⁷⁾。しかし、NMRは総所有コストが高額なため、分析コストが高額となる短所があることから、簡易かつ低分析コストで科学的な処方検査の手法開発が急務であった。

IR（赤外分光法）は振動分光法の一つで、固体、液体、気体などさまざまな状態にある試料に適用できる。また、測定が簡易で試料を損傷することなく非破壊分析が可能のため、さまざまな分野において品質管理、異同識別、分類などに利用されている⁸⁻¹⁴⁾。IRの中でもFT-IR（フーリエ変換赤外分光法）は、1) 分解能が高い、2) 測定時間が短い、3) 総所有コストが低い、など優れた特徴を有していることから、医薬品の有効成分の異同識別法¹⁵⁾としても採用されているFT-IRに着目し、同法を用いた農薬製剤処方の異同識別手法の開発を進めた¹⁶⁻¹⁸⁾。その結果、処方検査で実用が期待される結果が得られたので報告する。

1. 農薬製剤の赤外スペクトルの測定手法の検討

農薬製剤（気体の製剤を除く）の処方検査に用いる赤外スペクトルの測定手法として、FT-IRの透過法と全反射法（ATR: Attenuated Total Reflection）を、測定波数領域として、中赤外（4,000–400 cm^{-1} 、対応可能波数範囲が7,800–240 cm^{-1} のDLATGS検出器を使用）、と近赤外（12,500–4,000 cm^{-1} 、対応可能波数範囲が12,500–3,800 cm^{-1} のInGaAs検出器を使用）の領域を検討した。FT-IRの測定は、IRPrestige-21（Shimadzu Co. Kyoto, Japan）を用い、ATR法では1回反射ATR装置（DuraSampl IRIITM, SensIR Technologies, Danbury, CT, USA）を接続して測定した。透過法による透明液体製剤の測定では、光路長2mmの石英セルを用いた。ATR法では、試料をダイヤモンド/セレン化亜鉛結晶（入射角度約45度、有効面積直径1mm、測定可能な波数領域20,000–650 cm^{-1} ）上に置き、測定試料が固体の場合、直径3mmの金属棒を用いて押しつけ、密着した状態で測定した。測定条件は、透過法とATR法ともに、積算回数40回、分解能4 cm^{-1} とした。

検討の結果、農薬製剤の形状は、粉末、粒状、液体、ペースト状など多様であることから、処方検査での赤外スペクトルの測定には、さまざまな形状の試料の測定が可能であるATR法が透過法と比較して有用であることが示された¹⁶⁻¹⁸⁾。また、ATR法は希釈等試料の前処理をほとんど必要とせず、農薬製剤の赤外スペクトルの測定が可能であったことから、より簡易な異同識別手法の確立が期待された。

ATR法による測定では近赤外領域（7,800–4,000 cm^{-1} ）に波形比較が可能な吸収ピークは検出されなかった（図1）。乳剤やフロアブルなどの透過法による測定で検出される近赤外領域の吸収ピークがATR法による測定で検出されなかつ

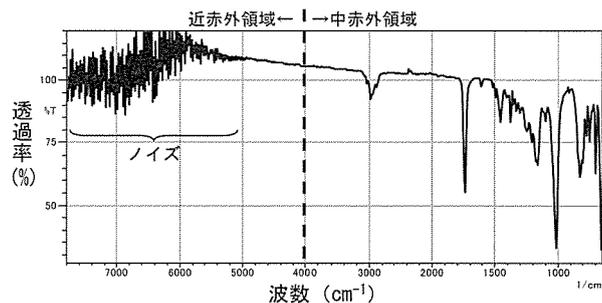


図1. ATR法で測定した乳剤*の赤外スペクトル
* マラソン乳剤

た要因として、光路長が2mmのセルを使用して測定した透過法と比較し、ATR法では赤外線の染み込みの深さが1 μm と浅いため、低感度な測定法であることが考えられた。これまでATR法で測定した農薬製剤試料に関して近赤外領域（7,800–4,000 cm^{-1} ）に処方検査に有用な吸収ピークは検出されなかったこと、また、今回の測定条件では、同領域（>5,000 cm^{-1} ）に強いノイズが確認されたことから、ATR法による測定結果を処方検査に利用する場合、波形比較に用いる波数領域は中赤外領域（4,000–400 cm^{-1} ）が適当であると考えられた。なお、今回の検討におけるATRアクセサリと検出器の組み合わせでは測定可能波数領域が7,800–650 cm^{-1} であったことから、測定波数領域は4,000–650 cm^{-1} に設定した。

1.1. ATR法による農薬製剤の測定

ATR法による測定では、ATRエレメントと呼ばれる結晶の表面に試料を接触させて試料表面のわずかな厚み部分の測定を行っている。試料とATRエレメントとの接触の度合い（密着度）が測定結果を左右する（密着度が高いとピーク強度が強くなる）ため、高い再現性で赤外スペクトルを測定するには、試料とATRエレメントとの密着度に留意する必要がある。測定試料が液体の場合、試料とATRエレメントとの密着度は測定ごとにばらつきが小さく、再現性の高い測定が容易であった。一方、測定試料が固体の場合、試料とATRエレメントとの密着度が測定ごとにばらつくため、ATR装置に付属する加圧プレスで密着度を調整し、測定毎のスペクトル強度を一定にする必要があった。また、測定試料が粒剤の場合、試料の不均一性を解消するため、試料を乳鉢で粉碎する前処理が必要であった¹⁷⁾。

1.2. 差スペクトルの利用

水分子は赤外領域に極めて強い吸収があるため、水分を多量に含有する製剤（フロアブル、液剤）のスペクトルは、水のスペクトル（図2-A）とよく似ていた（図2-B）。通常これらの製剤の水分以外の成分に帰属する吸収ピークは、水に帰

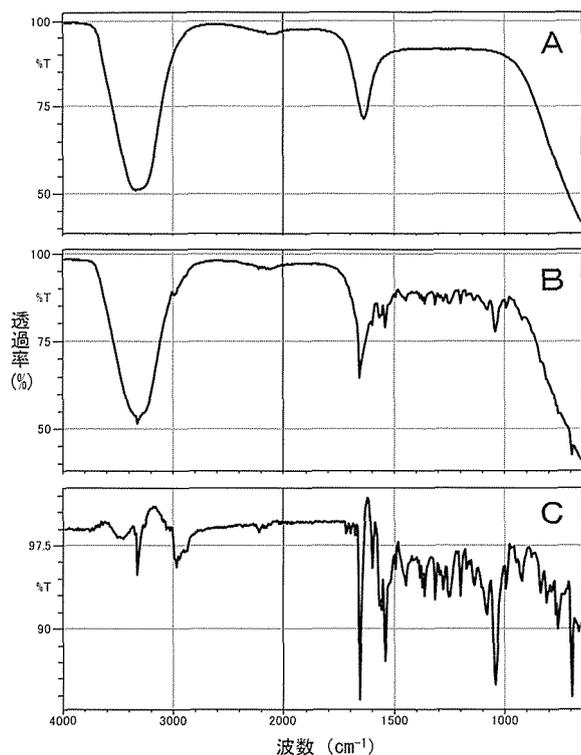


図2. ATR法で測定した水道水 (A) および水和剤* (フロアブル) (B) の赤外スペクトルとその差スペクトル (C)

*ダイムロン・ピラクロニル・プロモブチド・ベンスルフロメチル水和剤

属する吸収ピークと比較し、微弱なピークであるため、赤外スペクトル波形（生データ）の比較から処方の異同識別を行うことは困難であり、製剤の生データを処方検査に利用することは効率的でないと考えられた。そこで、ATR法によるフロアブルおよび液剤の測定結果から水の吸収を差し引いたスペクトル（差スペクトル）の計算を行った。差スペクトルの計算は、計測機器の制御ソフトウェア（IRsolution 1.40, Shimadzu Co. Kyoto, Japan）におけるスペクトル演算機能を利用し、演算に必要な係数は、処理結果スペクトルを確認し、ベースラインが水平になるよう調整して決定した。その結果、差スペクトルは生データと比較し、製剤の水分以外の成分特有のピークを鮮明に確認でき、スペクトル波形の比較が容易になった（図2-C）。

差スペクトルを利用することで、水分を96%含有する製剤で、微弱ながら異同識別に利用可能と考えられる水分以外の成分特有のスペクトルを得ることができた。製剤構成成分における赤外吸収の強弱にもよるが、これまでの測定結果では、前処理を行わず赤外スペクトルを測定し評価する手法の限界は、水分含量96%程度であった。なお、水分含有率が極めて高い製剤（AL剤など）に関しては、前処理として製剤中に含まれる一部の成分をジクロロメタン相に転溶・濃縮した溶液（約20倍濃縮）を測定試料とすることで、ジクロ

ロメタン相に転溶される成分由来に限られるものの異同識別に利用可能な製剤特有の赤外スペクトルの測定が可能であった¹⁸⁾。

2. 異同識別手法

赤外スペクトル波形の比較を利用した処方の異同識別手法として、1) スペクトルの重ね描き、2) 一致度計算、3) PCA（主成分分析）の3つの手法について検討した。

2.1. スペクトルの重ね描き

見本品（農薬登録申請時に提出される製剤）の赤外スペクトルと同条件で測定し得られた集取品の赤外スペクトルを重ねあわせることで、検出されるピークの比較が可能であった（図3-A）。本手法は簡易で有効な評価手法であるが、波形の細かな異なりを評価することが困難であった。

2.2. 一致度計算

一致度計算は、計測機器の制御ソフトウェア（IRsolution）に付属された機能を利用した。一致度（ P ; purity index）は赤外スペクトル間の一致の度合を表す係数で、対象となる2つの赤外スペクトルのすべての強度について計算される最小二乗近似係数によって与えられ、次の式により計算されたものである。

$$P = \frac{\sum_i^n (s_i - \bar{s})(r_i - \bar{r})}{\sqrt{\sum_i^n (s_i - \bar{s})^2 \sum_i^n (r_i - \bar{r})^2}}$$

s_i = 同じ横軸値における強度値（試料）

r_i = 同じ横軸値における強度値（見本品）

n = スペクトル点数

一致度計算の結果得られる一致度および相関図（図3-B）は処方検査における異同識別の判定に有用であり、スペクトルの重ね描きで識別し難い細かな波形の異なりを判別する有効な評価手法であると考えられた。

2.3. PCA（主成分分析）

本検討で測定した赤外スペクトルは透過率と波数からなる多変量情報であることから、各製剤の赤外スペクトルを相互に関連する情報と考え、多変量解析を行うことで、製剤処方の同一性の確認が可能となると考えられた。このような化学的データの統計学的解析手法はケモメトリックスと呼ばれ、計算機の性能の向上とともに汎用性が高まり多様な分野での利用が進んでいる¹⁹⁾。本検討におけるPCAは、市販のケモメトリックス用ソフトウェア（Pirouette3.11, Infometrix Inc., Bothell, WA, USA.）を用い、ATR法により測定した波

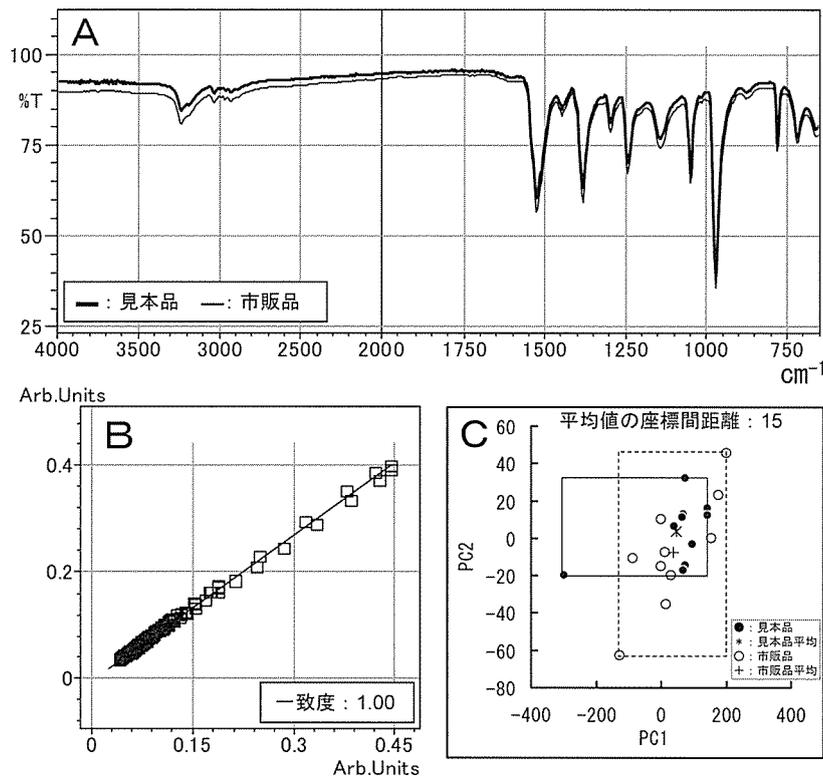


図3. 水和剤*の赤外スペクトル（見本品および市販品を各10回測定）について形状比較により処方上の異同識別を行った結果
 スペクトルの重ね描き (A), 一致度計算 (B), PCA (C)
 * ポリカーバメート水和剤

数領域 ($4,000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) の透過率もしくは差スペクトルの同波数領域の透過率データをデータセットとして2次元に射影し2次元散布図で解析を行う手法を検討した。なお、本検討では、スペクトルデータの前処理および変換として、平均化およびベースライン補正を行った。

2次元散布図から製剤処方の同一性を評価する指標としては、プロットされる座標領域の重なり具合や座標間距離の利用が期待された (図3-C)。評価の指標とするにはさらなる測定事例の集積に努める必要があるが、これまでの結果では、同一処方と考えられる製剤の解析結果で座標間の距離 (10回測定の平均値) は液体製剤で40、固形製剤で150を超えることはなく、この数値を評価の一定の目安としている。

PCAで解析を行ったことで、前述の重ね描きや一致度計算で検出が困難な赤外スペクトル波形の異なりが検出可能であることから、処方検査における異同識別の手法として有用であると考えられた。

PCAによる解析の異同識別能力の高さを示す一例として、MEP乳剤中のキシレンの異性体組成の識別について例示する。キシレンは農薬製剤の補助成分として使用頻度の高い有機溶媒であり、通常農薬製剤の製造には工業用のキシレンが使用されている。異性体を含む工業用キシレンはオルトキシレン、メタキシレン、パラキシレンおよびエチルベンゼンの

混合物として組成されており、溶剤としての使用が多い分解系キシレンは約40%のエチルベンゼンが含有されている^{20,21)}。原料によるエチルベンゼンの含有量の差異は大きいため、製剤中のエチルベンゼン含量は製品により異なる。図4は製造ロットの異なる同一処方の50%MEP乳剤8試料についてFT-

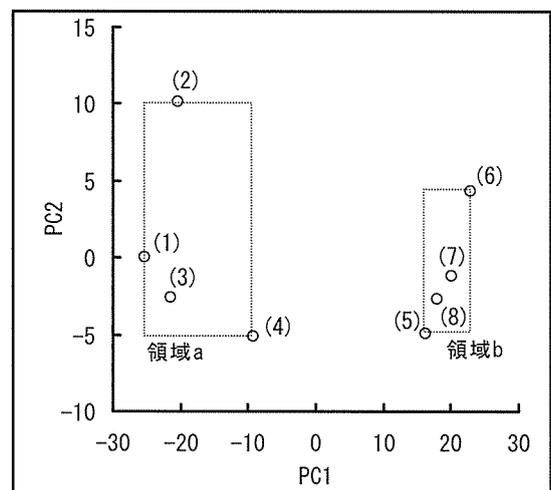


図4. MEP乳剤 (8試料) の赤外スペクトルの測定値にPCAを施した結果
 括弧内の数値は試料番号を示す

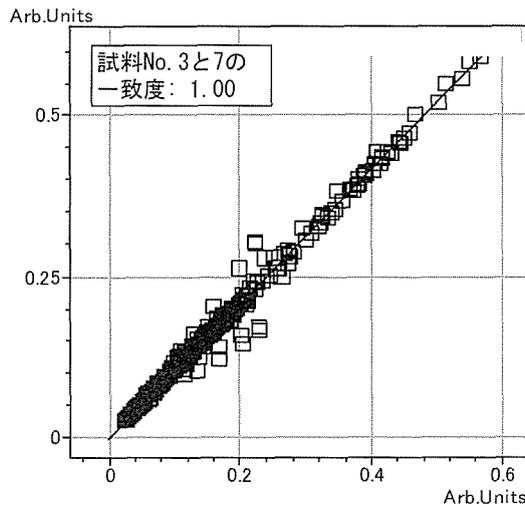


図5. MEP乳剤(試料No. 3と7)の赤外スペクトルの一致度

IR/ATR法で測定した測定値(透過率, 波数領域 $4,000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$)を主成分分析で解析した結果である。同一処方の製剤の測定結果であるが, 散布図では2つの領域に分離しプロットされる結果が得られた。高速液体クロマトグラフにより試料中のキシレンの異性体構成を明らかにしたところ, 領域aにプロットされた試料の方が領域bにプロットされた試料に比べエチルベンゼンの含有率が低いことが明らかになった¹⁶⁾。補助成分として使用されているキシレン中の異性体構成比の違いは, スペクトルの重ね描きや一致度計算(図5)から判別することは困難であり, PCAによる解析の異同識別能力の高さを示す結果が得られた。

3. 市販品の処方の異同識別

市販の農薬製剤8剤を測定試料として, FT-IR/ATR法による処方検査の試験的運用を行った。測定した赤外スペクトルを前述の1-3)の方法で評価したところ, すべての製剤で提出された見本品の測定結果と高い相同性を示し, 処方の変更が疑われる事例は確認されなかった(表1)。

本検討で製剤処方の異同識別に利用した赤外スペクトルは, いずれも同じ測定機器で同時期に測定したものである。今後の課題として, 本手法の汎用性の確認を行うとともに, スペクトルデータのデータベース化を進める必要があると考えられた。

おわりに

FT-IR/ATR法を利用することで, 簡易かつ低分析コストで科学的な処方検査の手法を確立できた。検査結果の良否判定には判別曲線や信頼区間など適正な統計的手法を選択することが望ましいが, 農薬製剤を測定試料とする場合, 集取する試料数には限度があり, 通常の処方検査において統計的手法を用い良否判定を下すことはできない。本検査結果だけで処方の良否判定を下すことは望ましいことではなく, 赤外スペクトル波形の比較による処方検査はスクリーニング評価と位置付け, さらなる検査(使用されている補助成分の定性・定量)の要・不要の判断への利用が期待される。

謝 辞

本研究の実施にあたり, クミアイ化学工業株式会社, 住友化学株式会社, 日産化学工業株式会社, 三井化学アグロ株式会社より農薬補助成分の試料をご提供いただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

表1. 赤外スペクトルの形状比較による処方検査の結果

| 試料番号 | 剤型 | 評価した赤外スペクトルの種類 | 一致度 | PCA座標間距離* |
|------|--------------------------|----------------|------|-----------|
| 1 | 粉剤 ¹⁾ | ATR→生データ | 1.00 | 40 |
| 2 | 粒剤 ²⁾ | ATR→生データ | 1.00 | 132 |
| 3 | 水和剤 ³⁾ | ATR→生データ | 1.00 | 15 |
| 4 | 水和剤(フロアブル) ⁴⁾ | ATR→差スペクトル | 0.99 | 14 |
| 5 | 水和剤(フロアブル) ⁵⁾ | ATR→差スペクトル | 0.99 | 39 |
| 6 | 液剤 ⁶⁾ | 濃縮試料→ATR→生データ | 0.95 | 1 |
| 7 | 乳剤 ⁷⁾ | ATR→生データ | 1.00 | 9 |
| 8 | 乳剤 ⁸⁾ | ATR→生データ | 1.00 | 34 |

1) イミノクタジン酢酸塩・フサライド粉剤, 2) カフェンストロール・ダイムロン・ベンスルフロメチル・ベンゾピシクロン粒剤, 3) ポリカーバメート水和剤, 4) ダイムロン・ピラクロニル・プロモブチド・ベンスルフロメチル水和剤, 5) テフリルトリオン・メフェナセツト水和剤, 6) シフルトリン・ピテルタノール液剤, 7) ジメテナミド乳剤, 8) オキサジアゾン・ブタクロール乳剤

*主成分得点の平均値の2次元散布図上における座標間距離

引用文献

- 1) 農林水産省生産局生産資材課長通知, 13生産第3988号, 平成14年1月10日.
- 2) http://www.acis.famic.go.jp/youshiki/9_2.pdf/2011年11月10日閲覧
- 3) U.S.EPA, Pesticide Registration Manual: Chapter 7—Notifications and Minor Formulation Amendments, <http://www.epa.gov/opprd001/registrationmanual/chapter7.html>/2011年11月10日閲覧
- 4) HSE, Data Requirements Handbook, <http://www.pesticides.gov.uk/Resources/CRD/Migrated-Resources/Documents/P/physchem.pdf>/2011年11月10日閲覧
- 5) 西澤幸夫, 小倉一雄, 百宏: 農薬検査所報告 **29**, 17-22 (1989).
- 6) 西澤幸夫, 廣瀬欣也, 鈴木 修: 農薬検査所報告 **31**, 135-140 (1991).
- 7) 西澤幸夫: 農薬検査所報告 **32**, 21-25 (1992).
- 8) 尾崎幸洋編: 実用分光法シリーズ赤外分光法, アイピーシー出版部, 1998.
- 9) 佐藤朋覚, 熊谷昌則, 天野敏男, 小川信明: 分析化学 **52**, 653-660 (2003).
- 10) 近藤みゆき: 名古屋文理大学紀要 **7**, 23-28 (2003).
- 11) 橋本 篤, 森 久典, 狩野幹人, 亀岡孝治, 島津秀雄, 小林香織: 照明学会誌 **93**, 501-509 (2009).
- 12) 三木誉史, 徳竹翔太, 石澤広明: 照明学会誌 **94**, 436-440 (2010).
- 13) 渡 正博, 尾崎幸洋: 分析化学 **59**, 379-397 (2010).
- 14) M. Taki, N. Otomo, H. Otani, S. Tomiya, T. Uno and M. Nagai: *J. Jpn. Petrol. Inst.* **54**, 103-107 (2011).
- 15) 日本薬局方, 厚生労働省告示第111号 (平成13年3月30日).
- 16) 石原 悟, 豊留夏紀, 横山央子, 池長 宙, 斎藤玲奈, 野口雅美: 農薬調査研究報告 **1**, 24-27 (2010).
- 17) 石原 悟, 豊留夏紀: 農薬調査研究報告 **2**, 19-23 (2011).
- 18) 石原 悟, 豊留夏紀: 農薬調査研究報告 **3**, 14-18 (2012).
- 19) 宮下芳勝, 佐々木慎一: ケモメトリックス, 共立出版, 1995.
- 20) <http://www.jaia-aroma.com/MSDS/msds03.pdf>/2011年6月23日閲覧
- 21) 山川雅弘, 市岡高男, 早川修二, 山本晃道, 仲 邦熙: 三重県保健環境研究所年報 **2**, 2000.