

Sep-pak C₁₈ PLUS (ウォーターズ社製、500mg、コンディショニングはメタノール10mL及び水10mL)、Bond Elut NH₂ (バリアン社製、500mg、3mL、コンディショニングはメタノール10mL)、その他、Bond Elut C₁₈、PRS、SAX、SCX (バリアン社製、500mg、3mL)を用いた。

4. LC/MS条件

装置 島津製作所製LC/MS QP-2010

デガッサー	DGU14AM
送液ユニット	LC-10AD _{VP}
オートインジェクター	SIL-10AD _{VP}
カラムオープン	CTO-10AC _{VP}
フォトダイオードアレイ	SPD-10AD _{VP}
質量検出部	LC/MS QP-2010

カラム

Shim-pack VP-ODS (2.0mm i.d. ×150mm、充填剤粒径の直径5 μm)

移動相

A液 0.2%酢酸アンモニウム水溶液

B液 0.2%酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント条件

0 - 5分(30→95%), 5 - 15分(95→97%),

15 - 18分(97%), 18 - 19分(97→100%),

19 - 22分(100%), 23分(30%)

注入量	10 μL
カラム温度	50℃
イオン化モード	ESI(+)
霧化ガス流量	4.5 L/min

プローブ電圧	+4.5kV
CDL電圧	5V
Q-array	38.0V
リフレクター	150V
ヒートブロック温度	200℃
脱溶媒部温度	300℃
脱溶媒部電圧	-60V
デフレクター電圧	+70V
検出器ゲイン	1.8kV
分析モード	Scan及びSIMモード
分析範囲	m/z 200~1000 (Scan)
	m/z=872,886,922,936, 895,897,551,565
データ取込時間	0.5sec/scan

5. 試験溶液の調製

①野菜の場合

a.抽出法

検体をミキサーで細切化した後、その5gを25mLのポリエチレン製遠心分離管に量り採り、アセトン20mLを加え、3分間振とうした後、ろ紙を用いて300mlのすり合わせ減圧濃縮器中にろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン10mLを加え、3分間振とうした後、上記と同様に操作してろ液をすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で大部分のアセトンを除去し、抽出液を得た。

b.精製法

a で得た抽出液をカラムに注入した後、10mLの水を注入し、溶出液は捨てた。次いでミニカラムを吸引してカラム中の水分を取り除いた。メタノール2mLを用いて、抽出物

を濃縮するのに用いたすり合わせ減圧濃縮器を洗い、抽出物を保持したSep-pak C₁₈に洗液を注入する操作を2回繰り返した後、さらにメタノール5mLを注入し、これらの流出液を100mLのすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でメタノールを除去した。この残留物を1%酢酸含有アセトニトリル溶液に溶かして正確に1mLとし、試験溶液とした。

②茶の場合

a.抽出法

検体0.5gを25mLのポリエチレン製遠心分離管に量り採り、アセトン20mLを加え、振とう機を用いて3分間激しく振り混ぜた後、7,500gで約3分間遠心分離を行い、アセトン層をすり合わせ減圧濃縮器中に移した。遠心分離管の残留物にアセトン10mLを加え、上記と同様に操作して、アセトン層を上記のすり合わせ減圧濃縮器に移し、40℃以下でアセトンを除去し、抽出液を得た。

b.精製法

メタノール2mLを用いてすり合わせ減圧濃縮器を洗い、洗液をSep-pak C₁₈に注入した後、メタノール5mLを2回注入し、これらを上記のすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でメタノールを除去した。この残留物を1%酢酸含有アセトニトリルに溶かして正確に1mLとし、試験溶液とした。これらの試験溶液調製法を図3に示した。

6. 検量線

エマメクチン類の検量線用標準混合溶液の作成は、添加回収試験用標準混合溶液を1%酢酸含有アセトニトリル溶液で希釈して調製した。

7. 添加回収実験

エマメクチン類の添加回収試験用標準混合溶液(各10μg/mL)を、茶に0.5ppm、だいこん、トマトに0.1ppmになるように添加し、本法に従い農薬を回収した。農薬の回収率の算出は、各ブランク試料に標準混合溶液を添加したものを参照標準溶液として行った。

C. 結果及び考察

1.LC/MS条件について

①SIM測定時のモニターイオン

図4-1から3に各化合物のマススペクトルを示した。いずれも[M+Na]⁺あるいは[M+H]⁺をベースピークとする開裂の少ないマススペクトルパターンを示したので、各ベースピークをモニターイオンとした。

②移動相の選択

LC/MS測定では、各々の測定対象物質をその特異的なm/zで検出することができるが、HPLV(UV)法より少ないとはいえ、作物成分によるイオン強度の増強や妨害、あるいは同一m/zをもつ作物由来成分による妨害が考えられるため、ある程度の分離を行う必要がある。そのため、精製のミニカラムは少なくし、HPLC測定はグラジエント溶出で行った。

分析にあたって、移動相の検討を行った。表4は、0.5μg/mL標準混合溶液を10μL注入し、①0.2%酢酸-0.2%酢酸含有アセトニトリル、②0.2%酢酸-0.2%酢酸含

有メタノール及び③0.2%酢酸アンモニウム-0.2%酢酸アンモニウム含有メタノールの3条件でのグラジエント溶出で分析を行いピーク面積及びピーク高の比較を行った結果である。③は①及び②に比較して感度に優れ、特に①の条件では測定できなかったミルベメクチンが②及び③では測定できた。従って、エマメクチン類の測定に関して、移動相はアセトニトリル系よりもメタノール系の方が適当であると考えられたので、移動相としては0.2%酢酸アンモニウム-0.2%酢酸アンモニウム含有メタノールを用いた。なお、エマメクチンB₁₁はマイナー成分であり全体に占める割合も小さいので、以後検討対象からは除外した。

③標準混合溶液中の溶媒の影響

エマメクチン類の安定性について、標準混合溶液中の溶媒の影響を検討した。10 μ g/mL標準混合溶液をメタノール、1%酢酸含有メタノール、1%酢酸アンモニウム含有メタノール、アセトニトリル、1%酢酸含有アセトニトリルにそれぞれ溶解し0.5 μ g/ml溶液にしたものをLC/MSで測定し、ピーク面積の経時変化を観察した(図5-1と2)。その結果、メタノール系で調製したものはエマメクチンB₁₁やアミノ体のピーク面積が1日後では半分近く減少し、逆にミルベメクチンやイベルメクチンでは増加した。アセトニトリル

系の溶媒では、ピーク面積の変化は少なかった。従って、標準混合溶液の調製にはアセトニトリル系溶媒を用いることとし、酢酸を添加した場合にはピーク形状が良好になる傾向があることから、これに酢酸を加えた溶媒、すなわち、1%酢酸含有アセトニトリルを用いることとした。

④注入量の検討

標準混合溶液(0.5 μ g/mL)を5、10及び20 μ L注入したときの、注入量とピーク面積の関係を調べ、結果を図6-1と2に示した。エマメクチン及びその代謝物に関しては、概ね10 μ L注入時まではピーク面積が点線で示したような原点を通る直線性を示したが、20 μ L注入時では原点を通る直線から外れる傾向を示した。アバメクチン、ミルベメクチン及びイベルメクチンでは、全体的に原点を通る直線を描くことが困難であった。また、イベルメクチンを除いて5 μ L注入時よりも10 μ L注入の方がCV値が低く、ばらつきも少なかったため、結論として10 μ Lを標準的な注入量とした。

⑤検量線の直線性と検出限界

エマメクチン類について、LC/MSによるピーク検量線の直線性と検出限界を表5示し、その検量線を図7-1と2に示した。検量線の直線性は測定濃度範囲内でR²値が0.97以上で良好な直線性を示した。また、

検出限界は0.1から0.5ng/mL(10 μ L注入時)で蛍光法と同等以上の感度を示した。

⑥繰り返し測定時の測定値の安定性について

表6には標準混合溶液添加トマト抽出液(C₁₈処理の後にNH₂カラム処理を加えた試料：各0.5 μ g/ml)の10 μ Lを10回連続で注入して得られたピークの範囲、平均値、標準偏差及びCV値を示した。アバメクチンやミルベメクチンなどはCV値が10%を超えるなど、化合物によっては測定値にばらつきが見られたが、その他の化合物は比較的安定した値が得られた。

2. 試験溶液調製法について

①現告示試験法の簡易化

現告示試験法では抽出液をC₁₈、NH₂ミニカラムで精製し、だいこんの場合には蛍光誘導体化妨害物質を取り除くため、さらにPRS及びC₁₈ミニカラムを使用する試験法となっている。また、蛍光誘導体化の際には脱水を十分行う必要があり、使用する容器もシリル化しておくなど、操作が煩雑となっている。今回はLC/MS測定を行うため誘導体化の必要はなく、精製もできるだけ簡略化した試験法の作成を目指した。

抽出液の精製度をC₁₈のみの場合とC₁₈及びNH₂の場合とを茶で比較すると図8-3と4

に示したように、両者においてクロマトグラム上での差異は見られなかった。また、告示試験法では別法とさせていただきにおいても他の農作物と同様に妨害ピークは見られなかった。精製はC₁₈ミニカラムのみとした。ただし、茶中のアバメクチン、ミルベメクチンA₄は妨害と重なり測定が困難であったが、試験法の簡易化を優先して、C₁₈のみの統一試験法とした。

②他の精製用ミニカラム

茶など妨害物の多い試料をさらに高度に精製したい場合を考慮して、使用可能なカラムを検索した。表7-1から3は、告示試験法で用いられているC₁₈、NH₂、PRSとそれ以外のSAX、SCXミニカラムについて、溶出条件の検討を行った。表7-1におけるBond Elut C₁₈とSep-pak C₁₈の結果を比較すると、Sep-pak C₁₈では第1級及び第2級アミンであるエマメクチン安息香酸や8,9-Z異性体、アミノ体は、メタノールだけで溶出されるのに対し、Bond Elut C₁₈カラムでは、メタノールだけでは溶出せず、酢酸アンモニウム含有メタノールでしか溶出しなかった。前回、我々が蛍光検出によるエマメクチン類の分析法を作成した際に用いたのは、Bond Elut C₁₈カラムで、メタノールだけで良好に溶出された^{4,5)}が、今回用いたロットでは、溶出パターンが大きく異なる結果となった。こ

の違いは、C₁₈担体表面の残留シラノール基の違いによるものと考えられ、シラノール基の水酸基が上に示した第1級及び第2級アミン類と結合するためと考えられる。また、茶抽出物を酢酸アンモニウム含有メタノールでBond Elut C₁₈から溶出させると有色成分のほとんどが溶出してしまい、精製効果が期待できないと考えられた。一方、Sep-pak C₁₈を用いた場合、10mLのメタノールのみで、すべての化合物が100%前後の回収率で溶出され、しかも、試料由来物質による妨害はより少なかった。

陰イオン交換ミニカラムであるNH₂とSAXと、陽イオン交換カラムであるPRSとSCXは溶離液の組成によって溶出パターンが大きく異なる結果が得られた。前者はメタノールで、後者は酢酸アンモニウム含有メタノールで溶出される傾向を示した。これらのことから、本法における精製には、Sep-pak C₁₈のみを用いることとし、試験法をセミマイクロ化するため試料採取量を少なくし、C₁₈ミニカラムは充填量0.5gを使用した。

3. 添加回収試験について

① 添加回収率

エマメクチン類を茶に0.5ppm、だいこん及びトマトに0.1ppmと残留基準値になるように添加したときの、各化合物の回収率を求

め表8-1から3に示した。また、各作物について農薬を添加したものと無添加のものとのLC/MSクロマトグラムを図8-1から4に示した。

本法による回収率はトマトで90.1から103.5%、だいこんで95.1から105.6%であった。クロマトグラム上に妨害ピークもなく、標準偏差は0.4から4.9と比較的安定した値であった。一方、茶での回収率は91.4から120.9%、標準偏差は0.5から11.4であったが、アバメクチンとミルベメクチンA₄では、同一のm/zを持ち保持時間がほぼ一致する妨害ピークが見られたため(蛍光誘導体化法で分析した結果から、試料として用いた茶にはいずれのエマメクチン類も含まれていないことを確認済み。)、測定不能であった。また、茶では精製が不十分なためか、試料を注入することによりLCカラムが汚染され、分離やピークパターンが悪化した。セミマイクロカラムでは充填剤の量が少ないためカラムが容易に汚染されると考えられる。

② イオン化抑制

一方、上記作物試験溶液のLC/MS測定ではマスクロマトグラムの良好さには関係なく、いずれも作物由来物質によると思われるイオン化抑制が見られた。

表9には標準混合溶液、トマト抽出液(トマトブランク)に標準混合溶液を添加した溶

液、トマトに標準混合溶液を添加して回収した試験溶液について、各ピーク面積とその変動を示した。測定時間の経過とともに各ピーク面積値が増加する傾向にあり、しかも標準混合溶液に比してトマトからの抽出液ではいずれもイオン化抑制が見られた。

しかし、トマトに抽出後標品を添加した溶液とトマトに抽出前標品を添加して回収した試験溶液は近似した値を示し、しかも測定順位前後における値の変動は小さかった。従って、LC/MSで農薬の定量を正確に行うためには、標準添加法で検量線を作成し、試験溶液と標準添加溶液を交互に注入して測定する必要があると考えられた。

③残留量の算出

蛍光誘導体化による告示試験法を作成した際には、トマト試料においてエマメクチン B_1 や8,9-Z異性体がアミノ体にFA体がエマメクチン B_{10} に変化する現象が見られたため、添加回収試験においては複数の添加回収用試験溶液に分ける必要があった。今回の蛍光誘導体化を必要としないLC/MSでの測定ではそのような現象は見られなかったため、添加回収試験は一度に行うことができた。従って、本法では各農薬及び代謝物を同時個別分析することが可能となった。なお、実試料の測定においては、試料中のエマメクチン及びエマメクチン代謝物の全てを

エマメクチン安息香酸塩に換算した合計値で、ミルベメクチンは A_3 体と A_4 体の合計値で表す必要がある。

D. 結論

LC/MSを用いたエマメクチン安息香酸塩及びその代謝物の迅速分析法を作成し、本法をトマト、だいこん、茶に適用した。また、本試験法は、構造類似のエマメクチン類(アバメクチン、ミルベメクチン、イベルメクチン)にも適用できることを明らかにした。本試験法の特徴として、精製に使用するミニカラムは C_{18} のみで、蛍光誘導体化を必要としないため、簡便であり、短時間で試料調製が可能なことである。また、試験溶液調製中にエマメクチン類の化学構造変化が見られなかったため、各化合物の同時個別分析が可能となった。

なお、試料溶液のLC/MS測定においてイオン化抑制が見られたが、標準添加法を用いることによって、ほぼ良好な回収率を得た。しかし、茶試料では C_{18} ミニカラム精製だけでは妨害物の除去が不十分であり、更に高度な定量分析を目的とする場合には、他のミニカラムと併用して精製度を上げる、LC/MSのモニターイオンを変えて測定するなどの工夫が必要と考えられた。

E. 参考文献

- 1) 平成11年11月22日厚生省告示第22号
- 2) 平成14年4月24日環境省告示35号
- 3) 平成12年12月21日環境省告示8号
- 4) Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Simultaneous determination of residues of emamectin and its metabolites, and milbemectin, ivermectin, and abamectin in crops by liquid chromatography with fluorescence detection, J. AOAC Int., **84**, 910-917(2001)
- 5) Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A., **27; 896**, 75-85.(2000)

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Simultaneous determination of residues of emamectin and its metabolites, and milbemectin, ivermectin, and abamectin in crops by

liquid chromatography with fluorescence detection, J. AOAC Int., **84**, 910-917(2001)

Yoshii K., Kaihara A., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr A., **27;896**, 75-85.(2000)

2. 学会発表

吉井公彦, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀 : 農作物中の残留エマメクチン安息香酸塩類, アバメクチン, ミルベメクチン, イベルメクチンのLC/MSによる迅速分析法, 日本食品衛生学会第85回学術講演会, 平成15年5月, 東京(予定)

表1 エマメクチン安息香酸塩の厚生労働省食品残留基準値

	食品残留基準値 (ppm)
だいこん類(含ラディシュ)の根	0.1
だいこん類(含ラディシュ)の葉	0.1
はくさい	0.1
キャベツ(含芽キャベツ)	0.1
はなやさい(ブロッコリー)	0.1
トマト	0.1
なす	0.1
きゅうり(含ガーキン)	0.1
茶	0.5

平成11年11月22日厚生省告示第237号より

表2 エマメクチン安息香酸塩の環境省登録保留基準値

	基準値 (ppm)
小麦以外の麦類	0.1
みかん	0.1
第一大粒果実類	0.1
小粒果実類	0.1
第一果菜類	0.2
第二果菜類	0.1
さや付未成熟豆類	0.1
第二葉菜類	0.5
根・茎類	0.1
いも類	0.1

平成14年4月24日環境省告示第35号より

表3 ミルベクチンの環境省登録保留基準値

	基準値 (ppm)
みかん	0.2
みかん以外のかんきつ類	0.2
第一大粒果実類	0.2
第二大粒果実類	0.2
小粒果実類	0.5
第二果菜類	0.2
第二葉菜類	5
いも類	0.1
大豆以外の豆類	0.2
茶	2

平成12年12月21日環境省告示第8号より

表4 LC/MS 移動相とピーク面積の関係
ピーク面積

	条件①		条件②		条件③	
	面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ
Emamectin B _{1b}	234,366	25,017	152,448	18,780	526,445	63,878
Amino	1,959,247	213,798	881,495	96,519	2,577,135	291,015
Emamectin B _{1a}	6,624,439	703,299	3,509,266	377,583	16,065,820	1,763,083
Emamectin 89Z	7,081,126	722,861	4,495,113	475,200	16,978,043	1,675,392
Emamectin FA	2,866,859	290,800	6,010,053	591,322	6,876,692	618,601
Emamectiin MFA	2,209,378	140,270	5,685,750	418,202	8,011,874	413,487
Abamection	2,624,244	251,525	5,015,761	604,448	5,080,477	610,588
Ivermectin	2,631,335	260,924	5,071,470	462,662	6,128,298	509,678
Milbemectin A ₃	427,599	44,928	38,343,860	4,338,598	34,836,564	3,863,687
Milbemectin A ₄	211,607	22,344	37,874,530	4,103,283	39,636,211	4,146,298

条件①から③のグラジエント条件は以下のとおりである。

条件①

A: 0.2%酢酸 B: 0.2%酢酸含有アセトニトリル

時間(分)	B.Conc(%)
20	97
30	97
31	30

条件②

A: 0.2%酢酸 B: 0.2%酢酸含有メタノール

時間(分)	B.Conc(%)
10	97
30	97
31	50

条件③

A: 0.2%酢酸アンモニウム B: 0.2%酢酸アンモニウム含有メタノール

時間(分)	B.Conc(%)
5	95
15	97
18	97
19	100
22	100
23	30

表5 検量線の直線性及び検出限界

化合物	保持時間 (min)	m/z	検量線の 直線性 (R ² 値)*	検量線範囲* (μ g/ml)	検出限界 ** (ng/ml)	参考値 (ng/ml) (蛍光検出器による検出限界**)
Amino	11.56	873	0.9955	0.05-0.5	0.2	0.2
Emamectin B _{1a}	11.70	886	0.9999	0.05-1.0	0.2	0.2
Emamectin 8,9-Z	12.18	886	1.000	0.05-1.0	0.2	0.2
Emamectin FA	11.81	922	0.9972	0.05-0.5	0.2	0.2
Emamectiin MFA	12.63	936	0.9980	0.05-1.0	0.5	0.5
Abamection	12.45	895	0.9798	0.05-0.5	0.2	0.5
Ivermectin	14.38	897	0.9821	0.05-1.0	0.2	0.5
Milbemectin A ₃	12.56	551	0.9793	0.05-1.0	0.2	0.5
Milbemectin A ₄	13.28	565	0.9889	0.05-1.0	0.1	0.5

*10 μ l 注入時の検量線における値

**S/N=3

表6 標準混合溶液添加トマト抽出液連続注入時の測定値の安定性
ピーク面積

	RANGE(n=10)				
	Minimum	Maximum	Ave.	SD	CV (%)
Amino	2312948	3047143	2722756	179701.8	6.6
Emamectin B _{1a}	17307006	19174198	18477489	619650.3	3.4
Emamectin 8,9-Z	17813400	20787815	19452014	488853	2.5
Emamectin FA	5200973	7268721	6595263	443506	6.7
Emamectiin MFA	8903626	10550507	10016412	372907.3	3.7
Abamection	3192244	5369586	4262577	587744	13.8
Ivermectin	3847236	5159481	4490695	302196.6	6.7
Milbemectin A ₃	3856134	7237007	5750422	577902.5	10.0
Milbemectin A ₄	4008853	7393607	5117637	760862.1	14.9

ピーク高

	RANGE(n=10)				
	Minimum	Maximum	Ave.	SD	CV (%)
Amino	249162	272403	264679	5927.8	2.2
Emamectin B _{1a}	1935099	2052374	1930673	82951.56	4.3
Emamectin 8,9-Z	1502246	1822676	1665939	74624.22	4.5
Emamectin FA	468573	691455	637521.7	44829.08	7.0
Emamectiin MFA	547869	615564	583997.1	21490.48	3.7
Abamection	312029	407842	376621.5	19983.5	5.3
Ivermectin	292808	470012	354001.1	46260.74	13.1
Milbemectin A ₃	426989	716901	586757.9	58392.5	10.0
Milbemectin A ₄	362946	694028	473476.1	72750.94	15.4

・エマメクチン類各0.5 μ g/ml 含有トマト抽出液 (C₁₈ 処理の後に NH₂ カラム処理を加えた試料、・トマト濃度は5g/ml、トマト中のエマメクチン類濃度は0.1ppm) を10 μ L ずつ注入した。

表 7-1 精製用ミニカラムの検討

Bond Elut C₁₈ (First 10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	CH ₃ CN	1% CH ₃ COOH /CH ₃ CN	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ CN	CH ₃ OH	1% CH ₃ COOH /CH ₃ OH	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH
Amino	0%	0%	0%	0%	0%	94%
Emamectin B _{1a}	0%	0%	0%	0%	1%	98%
8,9-Z	0%	0%	0%	0%	3%	96%
FA	98%	73%	79%	100%	103%	103%
MFA	100%	37%	33%	108%	104%	107%
Abamectin	105%	69%	65%	106%	108%	96%
Ivermectin	72%	33%	28%	100%	105%	102%
Milbemectin A ₃	94%	49%	42%	96%	98%	103%
Milbemectin A ₄	96%	38%	0%	90%	100%	98%

Bond Elut C₁₈ (Second 10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	CH ₃ CN	1% CH ₃ COOH /CH ₃ CN	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ CN	CH ₃ OH	1% CH ₃ COOH /CH ₃ OH	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH
Amino	0%	14%	8%	6%	88%	0%
Emamectin B _{1a}	0%	17%	11%	5%	96%	0%
8,9-Z	0%	8%	2%	3%	92%	0%
FA	2%	3%	2%	0%	0%	0%
MFA	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Abamectin	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ivermectin	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Milbemectin A ₃	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Milbemectin A ₄	0%	0%	0%	5%	0%	0%

Sep-pak C₁₈ (10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	CH ₃ CN	1% CH ₃ COOH /CH ₃ CN	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ CN	CH ₃ OH	1% CH ₃ COOH /CH ₃ OH	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH
Amino	0%	2%	96%	97%	95%	97%
Emamectin B _{1a}	0%	0%	98%	92%	94%	96%
8,9-Z	0%	0%	94%	97%	93%	94%
FA	0%	104%	101%	95%	98%	103%
MFA	0%	96%	96%	93%	92%	105%
Abamectin	0%	95%	96%	94%	92%	101%
Ivermectin	0%	103%	108%	94%	104%	106%
Milbemectin A ₃	0%	97%	93%	91%	92%	92%
Milbemectin A ₄	0%	108%	101%	96%	102%	108%

すべてそれぞれ 10ml ずつの溶離液で溶出した。

表 7-2 精製用ミニカラムの検討

Bond Elut NH₂ (10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	CH ₃ CN	1% CH ₃ COOH /CH ₃ CN	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ CN	CH ₃ OH	1% CH ₃ COOH /CH ₃ OH	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH
Amino	1%	98%	0%	95%	88%	79%
Emamectin B _{1a}	28%	93%	9%	94%	86%	91%
8,9-Z	34%	91%	13%	97%	87%	92%
FA	14%	101%	10%	95%	87%	106%
MFA	69%	102%	87%	91%	80%	104%
Abamectin	0%	106%	0%	95%	86%	108%
Ivermectin	0%	96%	0%	94%	82%	97%
Milbemectin A ₃	91%	94%	92%	94%	92%	94%
Milbemectin A ₄	81%	105%	101%	96%	74%	100%

Bond Elut SAX (10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	CH ₃ CN	1% CH ₃ COOH /CH ₃ CN	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ CN	CH ₃ OH	1% CH ₃ COOH /CH ₃ OH	1% CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH
Amino	100%	102%	95%	100%	103%	21%
Emamectin B _{1a}	101%	98%	101%	95%	105%	28%
8,9-Z	101%	103%	100%	103%	105%	34%
FA	88%	97%	92%	96%	94%	28%
MFA	100%	97%	96%	99%	105%	55%
Abamectin	100%	96%	96%	102%	102%	47%
Ivermectin	87%	108%	76%	69%	68%	44%
Milbemectin A ₃	102%	106%	101%	105%	105%	34%
Milbemectin A ₄	94%	108%	88%	91%	73%	26%

すべてそれぞれ 10ml ずつの溶離液で溶出した。

表 7-3 精製用ミニカラムの検討

Bond Elut PRS (10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	1% CH ₃ COOH		1% CH ₃ COONH ₄		1% CH ₃ COONH ₄	
	CH ₃ CN	/CH ₃ CN	/CH ₃ CN	CH ₃ OH	/CH ₃ OH	/CH ₃ OH
Amino	0%	0%	0%	0%	0%	88%
Emamectin B _{1a}	0%	0%	0%	0%	0%	96%
8,9-Z	0%	0%	0%	0%	0%	96%
FA	0%	0%	0%	89%	89%	88%
MFA	0%	0%	0%	87%	88%	89%
Abamectin	0%	0%	0%	91%	94%	96%
Ivermectin	0%	0%	0%	90%	87%	90%
Milbemectin A ₃	72%	0%	0%	96%	99%	93%
Milbemectin A ₄	82%	0%	0%	96%	108%	102%

Bond Elut SCX (10ml Eluate)

Eluate	Recovery (%)					
	1% CH ₃ COOH		1% CH ₃ COONH ₄		1% CH ₃ COONH ₄	
	CH ₃ CN	/CH ₃ CN	/CH ₃ CN	CH ₃ OH	/CH ₃ OH	/CH ₃ OH
Amino	0%	0%	0%	0%	0%	84%
Emamectin B _{1a}	0%	0%	0%	0%	0%	89%
8,9-Z	0%	0%	0%	0%	0%	92%
FA	0%	0%	0%	76%	0%	80%
MFA	0%	0%	0%	76%	77%	90%
Abamectin	0%	0%	0%	54%	62%	91%
Ivermectin	0%	0%	0%	44%	86%	92%
Milbemectin A ₃	0%	0%	0%	101%	93%	90%
Milbemectin A ₄	0%	0%	0%	81%	102%	102%

表 8-1 トマト試料からの添加回収試験結果

	回収率(%)				
	1	2	3	Ave	SD
Amino	90.1	98.8	95.9	94.9	3.2
Emamectin B _{1a}	93.8	92.8	93.1	93.2	0.4
Emamectin 8,9-Z	94.6	96.4	101.0	97.3	2.4
Emamectin FA	99.3	92.3	88.9	93.5	3.9
Emamectiin MFA	94.4	89.1	92.4	92.0	1.9
Abamection	97.4	84.4	88.3	90.1	4.9
Ivermectin	99.8	89.7	97.6	95.7	4.0
Milbemectin A ₃	99.6	92.3	102.5	98.1	3.9
Milbemectin A ₄	108.8	98.3	103.5	103.5	3.5

表 8-2 だいこん試料からの添加回収試験結果

	回収率(%)				
	1	2	3	Ave	SD
Amino	95.3	96.0	94.0	95.1	0.7
Emamectin B _{1a}	102.8	102.2	97.3	100.8	2.3
Emamectin 8,9-Z	104.6	101.2	104.6	103.4	1.5
Emamectin FA	99.4	103.7	107.7	103.6	2.8
Emamectiin MFA	101.2	103.1	96.1	100.1	2.7
Abamection	100.5	98.0	97.8	98.7	1.1
Ivermectin	104.7	103.7	108.3	105.6	1.8
Milbemectin A ₃	97.6	105.2	101.0	101.3	2.6
Milbemectin A ₄	104.6	98.0	108.3	103.6	3.8

表 8-3 茶試料からの添加回収試験結果

	回収率(%)				
	1	2	3	Ave	SD
Amino	92.3	89.0	93.1	91.4	1.6
Emamectin B _{1a}	100.4	99.5	99.3	99.7	0.5
Emamectin 8,9-Z	125.9	115.5	105.3	115.6	6.9
Emamectin FA	95.9	87.8	106.9	96.9	6.7
Emamectiin MFA	92.1	94.5	98.7	95.1	2.4
Abamection	nd	nd	nd	nd	nd
Ivermectin	103.7	122.1	136.7	120.9	11.4
Milbemectin A ₃	87.9	95.0	101.5	94.8	4.6
Milbemectin A ₄	nd	nd	nd	nd	nd

nd : 妨害のため測定不能

表9 トマト添加回収試験におけるピーク面積値の変動

注入順	1	2	3	4	5	6	7	8
試料名	標準溶液*	トマト ブランク**	トマトブラン ク+STD***	トマト添加 回収試料1	トマト添加回 収試料2	トマト添加 回収試料3	トマトブラン ク+STD	標準溶液
Amino	7511184	94529	5560617	5096395	5664353	5580714	5901787	8121058
Emamectin B _{1a}	28747066	821739	25020898	23892846	24035247	24467942	26632772	33670108
89-Z	27862225	4787626	27204314	26325715	27070101	28466870	28579717	32643785
FA	16917276	539474	5461071	5444639	5117109	4966073	5535984	18407164
MFA	23288509	526344	12435373	11844407	11275688	11750970	12752927	26051320
Abamection	15724307	198091	3880120	3800524	3330905	3490715	3939786	15908319
Ivermectin	18326934	76553	3629920	3631703	3279051	3566408	3661458	15330738
Milbemectin A ₃	26451548	3637	5152009	5306368	5079872	5821858	5854627	23740224
Milbemectin A ₂	13254744	463573	3042194	3397348	3236641	3504555	3525016	13145855

これらの試料は1から8に示す順に注入し、LC/MS測定を行った。

*標準溶液は0.5 μg/mlになるように、添加回収試験用標準混合溶液を希釈して製した。

**トマトブランクはエマメクチン類を添加しないで試料調製を行った試料である。

****トマトブランク+STDは上記のトマトブランクに0.5 μg/mlになるように作成した定量用の参照標準混合溶液である。

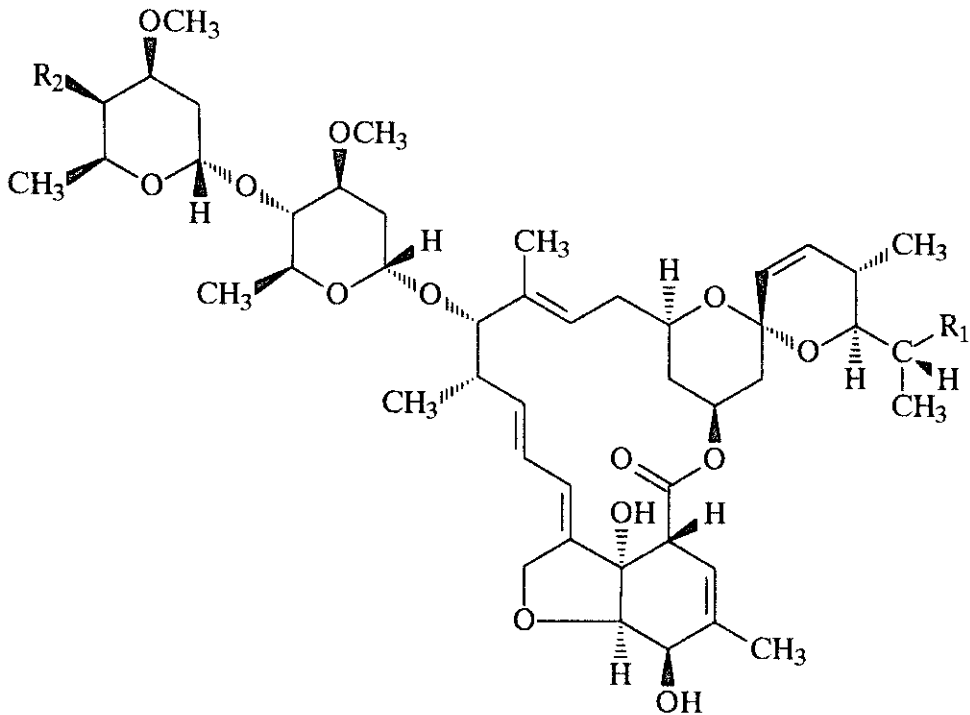


図 1-a. エマメクチンとその代謝物及びアバメクチン

①エマメクチン安息香酸塩

B_{1a} C₅₆H₈₁NO₁₅ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=CH₃NH- (M.W. 1008.3)

B_{1b} C₅₅H₇₉NO₁₅ [R₁]=CH₃- [R₂]=CH₃NH- (M.W. 994.2)

②代謝物 アミノ体

B_{1a} C₄₈H₇₃NO₁₃ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=NH₂- (M.W. 872.1)

B_{1b} C₄₇H₇₁NO₁₃ [R₁]=CH₃- [R₂]=NH₂- (M.W. 858.1)

③代謝物 ホルミルアミノ体 (FA 体)

B_{1a} C₄₉H₇₃NO₁₄ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=COHNH- (M.W. 900.1)

B_{1b} C₄₈H₇₁NO₁₄ [R₁]=CH₃ [R₂]=COHNH- (M.W. 886.1)

④代謝物 N-メチルホルミルアミノ体 (MFA 体)

B_{1a} C₅₀H₇₅NO₁₄ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=COHN(CH₃)- (M.W. 914.1)

B_{1b} C₄₉H₇₃NO₁₄ [R₁]=CH₃ [R₂]=COHN(CH₃)- (M.W. 900.1)

⑧アバメクチン

B_{1a} C₄₈H₇₂O₁₄ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=CH₃- (M.W. 873.1)

B_{1b} C₄₇H₇₀O₁₄ [R₁]=CH₃- [R₂]=CH₃- (M.W. 860.1)

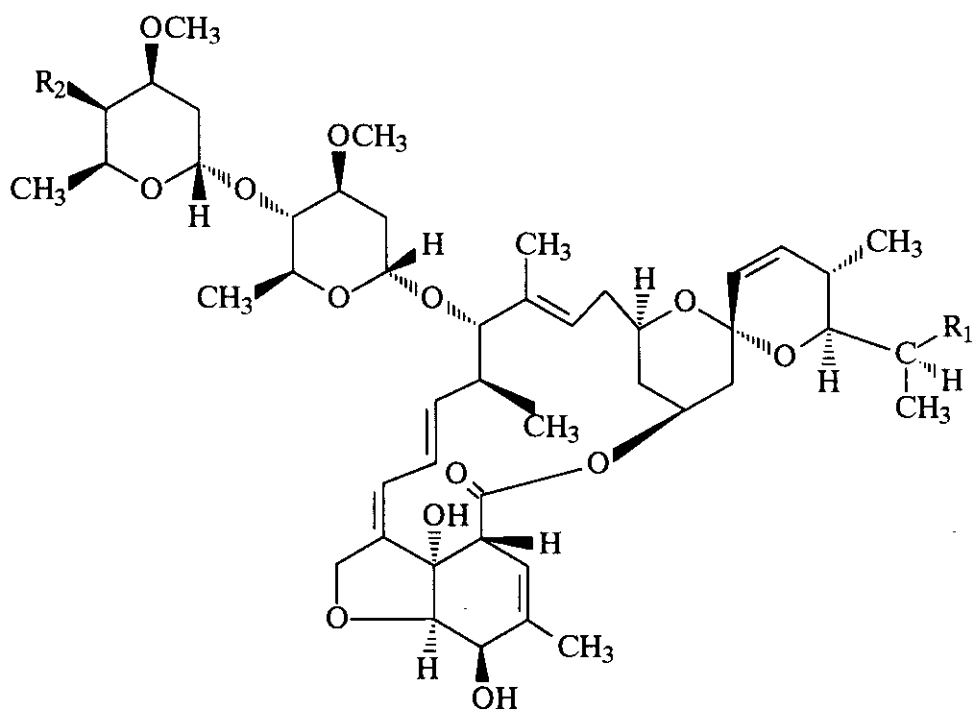


図 1-b エマメクチン代謝物 8,9-Z 異性体

⑤エマメクチン代謝物 8,9-Z 異性体 (B_{1a} の異性体)

C₄₉H₇₅NO₁₃ [R₁]=C₂H₅- [R₂]=CH₃NH- (M.W. 886.1)

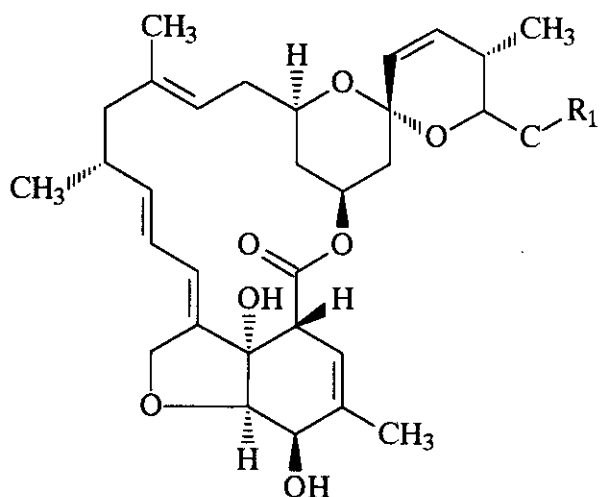


図 1-c ミルベメクチン

⑥ミルベメクチン

A₃ C₃₁H₄₄O₇ [R]=CH₃ (M.W. 528.7)

A₄ C₃₂H₄₆O₇ [R]=C₂H₅ (M.W. 542.7)

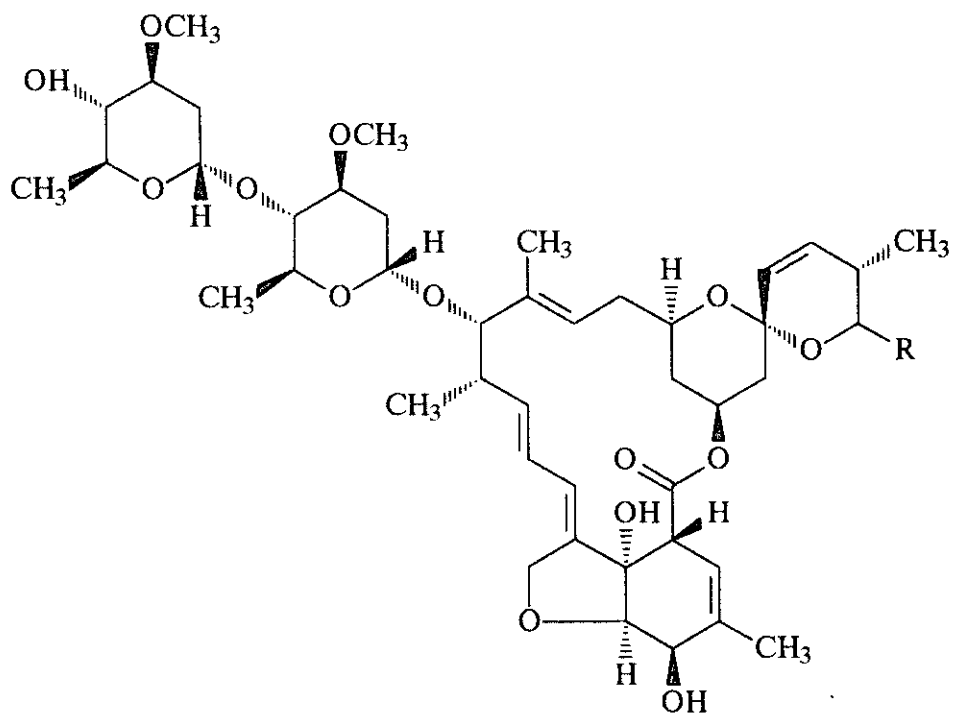


図 1-d イベルメクチン

⑦イベルメクチン

B_{1a} C₄₈H₇₄O₁₄ [R]=CH(CH₃)C₂H₅ (M.W. 875.1)

B_{1b} C₄₇H₇₂O₁₄ [R]=CH(CH₃)CH₃ (M.W. 862.1)

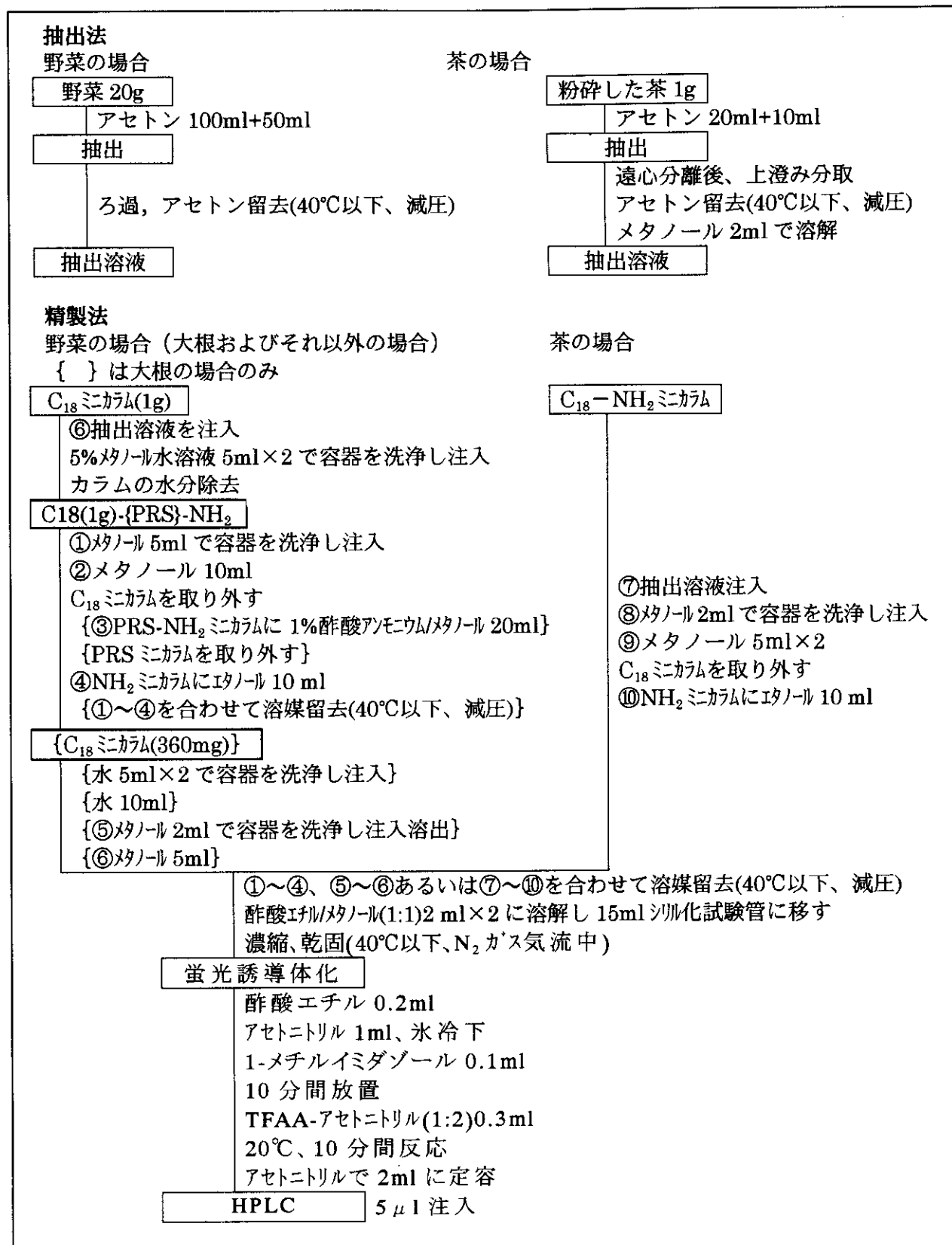


図2 厚生労働省によるエマメクチン安息香酸塩告示試験法のフローシート

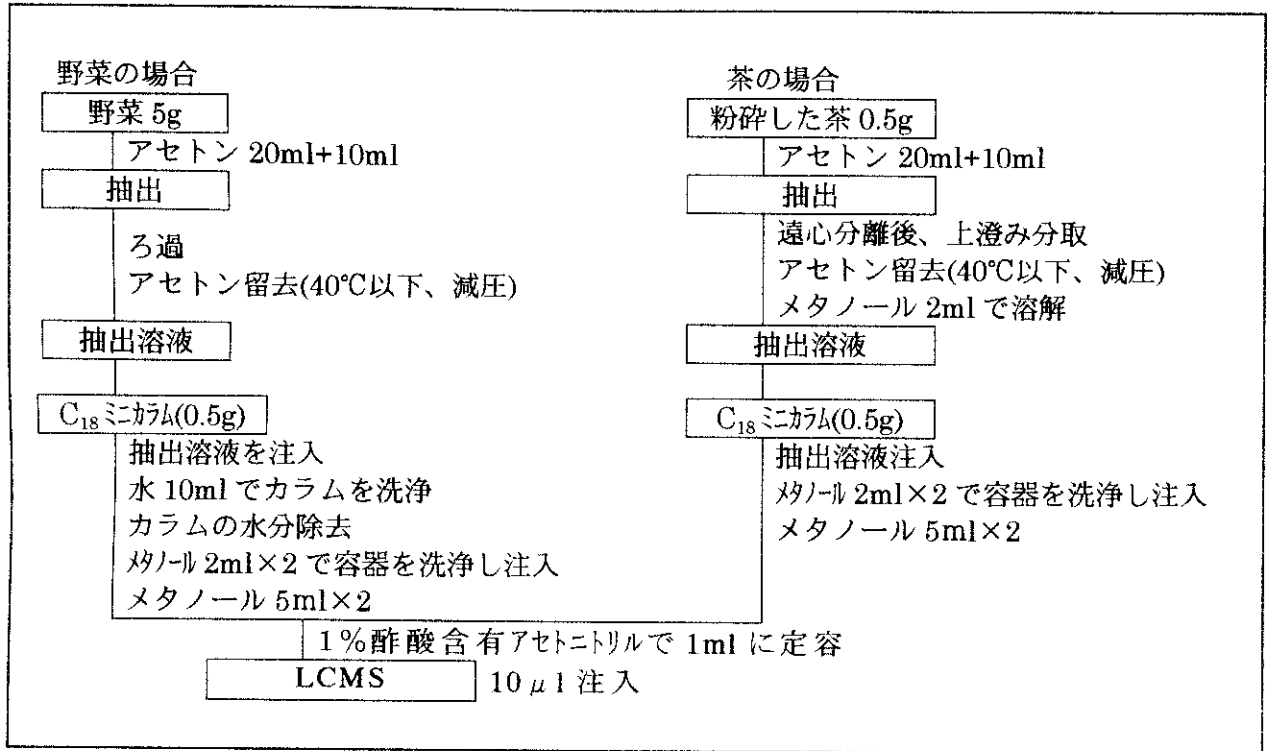


図3 本法によるエマメクチン類試験法のフローシート