

ミルベメクチン及びレピメクチン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
ミルベメクチン	ミルベメクチンA3 (10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,22 <i>Z</i>)-(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)- 21,24-ジヒドロキシ-5',6',11,13,22-ペンタメチル-3,7,19-トリ オキサテトラシクロ [15.6.1.1 ^{4,8} .0 ^{20,24}] ペンタコサ- 10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロピラン-2- オン
	ミルベメクチンA4 (10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,22 <i>Z</i>)-(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-6'- エチル-21,24-ジヒドロキシ-5',11,13,22-テトラメチル- 3,7,19-トリオキサテトラシクロ [15.6.1.1 ^{4,8} .0 ^{20,24}]ペンタコサ- -10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロピラン- 2-オン
レピメクチン	L.A3（レピメクチンA3） (10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i>)-(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)- 21,24-ジヒドロキシ-5',6',11,13,22-ペンタメチル-2-オキシ- 3,7,19-トリオキサテトラシクロ [15.6.1.1 ^{4,8} .0 ^{20,24}]ペンタコサ- -10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロピラン- 12-イル(<i>Z</i>)-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセタート
	L.A4（レピメクチンA4） (10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i>)-(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,6' <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,21 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-6'- エチル-21,24-ジヒドロキシ-5',11,13,22-テトラメチル-2-オキ ソ-3,7,19-トリオキサテトラシクロ [15.6.1.1 ^{4,8} .0 ^{20,24}]ペン タコサ-10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロ ピラン-12-イル(<i>Z</i>)-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセター ト

2. 装置

蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

無水トリフルオロ酢酸 無水トリフルオロ酢酸（特級）

ミルベメクチンA3標準品 本品はミルベメクチンA3 95%以上を含む。

ミルベメクチンA4標準品 本品はミルベメクチンA4 95%以上を含む。

レピメクチン標準品 本品はレピメクチン 97%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

(1) 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この20 mLを採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去する。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLを加えて溶かす。

(2) 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この10 mLを採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去する。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLを加えて溶かす。

(3) 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この40 mLを採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去する。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、アセトン及び n -ヘキサン各10 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び n -ヘキサン (1 : 19) 混液15 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び n -ヘキサン (3 : 7) 混液30 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にトルエン1 mLを加えて溶かす。

3) 蛍光誘導体化

2) で得られた溶液にトリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加えて密栓し、40°Cで30分間緩やかに振とう後、トリエチルアミン0.05 mLを加え、窒素気流下で溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

1) ミルベメクチンについて

ミルベメクチンA3標準品及びミルベメクチンA4標準品の混合標準溶液 (各2 mg/Lアセトニトリル溶液) を調製する。混合標準溶液1 mLを採り窒素気流下で溶媒を除去した後、トルエン1 mLを加えて溶かし、4. 試験溶液の調製 3) 蛍光誘導体化と同様の操作を行い、蛍光誘導体の検量線用メタノール溶液を調製する。この溶液を希釈してメタノール溶液を数点調製し、それぞれHPLC-FLに注入し、ピーク高法もしくはピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は各0.002 mg/Lである。

2) レピメクチンについて

レピメクチン標準品の2 mg/Lアセトニトリル溶液を調製し、その1 mLを採り窒素気流下で溶媒を除去した後、トルエン1 mLを加えて溶かし、4. 試験溶液の調製 3) 蛍光誘導体化と同様の操作を行い、蛍光誘導体の検量線用メタノール溶液を調製する。この溶液を希釈してメタノール溶液を数点調製し、それぞれHPLC-FLに注入し、レピメクチンA3及びレピメクチンA4の両ピークの高さ又は面積の合計を用いて、ピーク高法もしくはピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.002 mg/Lである。

6. 定量

試験溶液をHPLC-FLに注入し、5の検量線でミルベメクチンA3、ミルベメクチンA4及びレピメクチンの含量を求める。

7. 確認試験

HPLC-FLにより確認する。

8. 測定条件

(例)

検出器：FL（励起波長368 nm、蛍光波長460 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル、内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び水（9：1）混液

注入量：20 μL

保持時間の目安：

ミルベメクチンA3；14分

ミルベメクチンA4；18分

レピメクチンA3；13分

レピメクチンA4；15分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ミルベメクチン（ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4）及びレピメクチン（レピメクチンA3及びレピメクチンA4）を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液で転溶した後、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボン/シリカゲル連結ミニカラムで精製した後、蛍光誘導体化しHPLC-FLで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

(1) 蛍光誘導体化において、30分間振とう後に添加するトリエチルアミンは、誘導体化反応を停止するために加える。誘導体化後に溶媒を除去した後、残留物が0.1～0.2 mL程度残る。また、蛍光誘導体は不安定であることから、蛍光誘導体化後の操作は速やかに行い、測定まで即日で行うと良い。

(2) 確認条件

検出器：蛍光光度型検出器（励起波長368 nm、蛍光波長460 nm）

カラム：フェニル結合型シリカゲル、内径4.6 mm、長さ250 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び水の混液（3：1）

保持時間の目安：

ミルベメクチンA3；13分

ミルベメクチンA4；15分

レピメクチンA3；16分

レピメクチンA4；18分

なお、試験法開発時にLC-MS/MSでの確認条件も検討したが、十分な感度が得られなかった。

(3) 試験法開発時には、レピメクチンA3及びレピメクチンA4それぞれの標準品を入手できなかったため、両者の混合標準品（それぞれの割合はレピメクチンA3が20%以下、レピメクチンA4が80%以上のもの）を用いて両ピークの合計値で定量を行った。レピメクチンA3及びレピメクチンA4の各標準品が入手可能な場合には、それぞれの含量を求めその和を分析値とする。

11. 参考文献

旧環境省告示ミルベメクチン試験法

12. 類型

C