

農業資材アグリクール中に含有するアバメクチン分析試験結果

【概要】

農業資材「アグリクール」4ロットについて、アバメクチンの有無とその量を測定した。

その結果、4ロット全てからアバメクチン 0.2%を検出した。なお、アバメクチンは混合物であるが、今回は主要成分であるアベルメクチン B_{1a}の分析を行った。

アグリクール中のアバメクチン含有量	
ロット No	含有量 (w/w%)
0405	0.2
0604	0.2
0607	0.2
0609	0.2

1. 分析対象

アグリクール (商品名)

ロット No : 0405, 0604, 0607 及び 0609

荷姿等 : ポリエチレン製ビン入り (内容量 100 ml、添付資料 1)

未開封、室温保存

2. 試薬及び装置

- (1) 分析用標準物質アバメクチン (関東化学、純度 92%)
- (2) 蒸留水 (高速液体クロマトグラフ用、関東化学)
- (3) アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用、関東化学)
- (4) ギ酸 (特級、関東化学)
- (5) シリンジフィルター (GLサイエンス、クロマトディスク 0.2 μm 13P)
- (6) 使い捨てシリンジ (トムシック ワンダーシリンジ 2.0 ml、5.0 ml)
- (7) 分取用高速液体クロマトグラフ (HPLC) / フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)
(島津製作所製 Prominence) (装置 1)
- (8) 同定用 HPLC/PDA/質量分析計 (MS)
(HPLC : Waters2695 シリーズ MS : Micromass 製 ZQ) (装置 2)
装置 2 は水 + アセトニトリル系のポジティブ MS
- (9) 同定・定量用 HPLC/PDA/MS
(HPLC : Waters2695 シリーズ MS : Micromass 製 Quattro micro) (装置 3)
装置 3 は 0.1% ギ酸 + アセトニトリル系のネガティブ MS

3. 分析操作

i. 試料調製

アバメクチン標準物質は純度補正を行った後、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L 溶液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

同定に使用する試料は以下のように調製した。分析対象各約 1000 mg を 10 ml メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容した後、超音波で 5 分間処理した。この溶液をシリンジフィルターで濾過し、20 μl を装置 1 に注入し、アバメクチン標準物質中のアベルメクチン B_{1a} の溶出時間に基づき該当ピークの溶出開始から溶出終了までを分取し、この分取画分を装置 2 及び装置 3 に注入し、その溶出時間・マススペクトルをアベルメクチン B_{1a} のものと比較した。

定量用試料は以下のように調製した。すなわち、分析対象各約 1000 mg（定量時に秤量結果で補正）を 20 ml メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容した後、超音波で 5 分間処理した。この溶液 1 ml を 25 ml メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容した。この溶液をシリンジフィルターで濾過し、最終溶液とした。

なお、分析精度確認のため、1 分析対象あたり 5 つの定量用試料を調製した。

添加回収試験用の試料は以下のように調製した。すなわち、分析対象のうちロット No0604 約 1000 mg（定量時に秤量結果で補正）を 20 ml メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容した後、超音波で 5 分間処理した。この溶液 1 ml を 25 ml メスフラスコに量り取り、100 mg/L アバメクチン標準溶液 1 ml を添加しアセトニトリルで定容した。この溶液をシリンジフィルターで濾過し、装置 3 に注入しアベルメクチン B_{1a} 含有量を測定し、理論値に対する回収率及び相対標準偏差を求めた。なお、精度確認のため、分析は 3 連で行い、同じ操作を 3 日後に再度行った。

ii. 分離・測定条件

(装置 1) 分取用 HPLC/PDA

HPLC：島津製作所製 Prominence

PDA：SPD-M20A

分取カラム：Inertsil-ODS (250 mm×10 mm, 5 μm, GL サイエンス)

ガードカラム：Inertsil-ODS (50 mm×10 mm, 5 μm, GL サイエンス)

溶離液：アセトニトリル/水 (9:1)

流量：3 ml/min

オープン温度：35℃

検出波長：244 nm (PDA 測定波長：190-300nm)

試料注入量：20 μl

(装置 2) 同定用 HPLC/PDA/MS (移動層 水+アセトニトリル系)

HPLC：Waters 社製 2695 シリーズ

PDA：Waters 社製 PDA2996

MS：Micromass 社製 ZQ

分析カラム：X Terra MS C18 (150×2.1mm, 3.5 μm Waters 社製)

溶離液：水+アセトニトリル

水：アセトニトリル比

0 ~ 2分		50 : 50
~10分	50 : 50	→ 20 : 80
~30分	20 : 80	→ 5 : 95
~35分		5 : 95
~42分	5 : 95	→ 50 : 50
~45分		50 : 50 (平衡化)

流量 : 0.1 ml/min

カラム温度 : 30°C

試料注入量 : 2 µl

PDA 測定波長 : 220-300 nm (定量は 244 nm)

MS 解析条件 : イオン化法	ESI
検出モード	ポジティブ
Capillary 電圧	3.0 kV
Cone 電圧	30 V
スキャン測定範囲	300-920 m/z
SIR 測定範囲	305.2 , 567.3 , 890.6 , 895.6 , 896.6 , 911.6 m/z

(装置3) 同定・定量用 HPLC/PDA/MS (移動層 ギ酸+アセトニトリル系)

HPLC : Waters 社製 2695 シリーズ

PDA : Waters 社製 PDA2996

MS : Micromass 社製 Quattro micro

分析カラム : Atlantis dC18 (150 × 2.1 mm , 3 µm Waters 社)

溶離液 : 0.1%ギ酸+アセトニトリル

0.1%ギ酸 : アセトニトリル比

0 ~ 2分		30 : 70
~10分	30 : 70	→ 10 : 90
~30分	10 : 90	→ 5 : 95
~35分		5 : 95
~40分	5 : 95	→ 30 : 70

流量 : 0.11 ml/min

カラム温度 : 40°C

試料注入量 : 2 µl

PDA 測定波長 : 220-300 nm (定量は 244 nm)

MS 解析条件：イオン化法	ESI
検出モード	ネガティブ
Capillary 電圧	3.7 kV
Cone 電圧	30 V
スキャン測定範囲	300–920 m/z
SIR 測定範囲	871.2 , 917.2 m/z

iii 同定法

装置 1 により分取した画分を装置 2 に注入し、溶出時間、ピーク部分の UV スペクトル、ピーク部分のマスマスペクトル（ポジティブ）について、標準物質のものと比較を行った。

また、定量用試料を装置 3 に注入し、溶出時間、ピーク部分のマスマスペクトル（ネガティブ）について、標準物質のものと比較を行った。

iv 定量

上記の最終溶液 2 μl を装置 3（移動層がギ酸+アセトニトリル系によるネガティブ SIR 定量）に注入し、得られたピークの面積とアベルメクチン B_{1a} の検量線から、アバメクチンの主成分であるアベルメクチン B_{1a} の濃度(mg/ml)を求め、含有量(w/w%)を計算した。

濃度は有効数字 2 桁まで求め、四捨五入により有効数字 1 桁で報告した。(単位 w/w%)

4. 結果

i. 分析法の妥当性

今回行った分析法についての妥当性を確認するため、対象物に含有すると思われる濃度レベル（0.2%）での添加回収試験を装置3を用いて実施した。

本濃度において、良好な回収率（96, 107, 105%；平均102%；相対標準偏差5.8%）が得られたので、定量下限を0.2%とした。

また、ブランク試験を実施した結果、定量結果に影響を及ぼすようなピークが存在しないことを確認した。

ii. 精度確認

分析精度の確認として、異なる日時で再試験して比較した結果、その回収率（100, 98, 95%；平均98%；相対標準偏差2.2%）も比較的安定していることを確認した。

iii. 同定

装置1によるクロマトグラフィー、本クロマトグラフィーにおいて分取した画分の装置2によるクロマトグラフィー及び装置3によるクロマトグラフィーにおいて、標準物質中のアベルメクチン B_{1a}と同じ溶出時間に溶出される画分のUVスペクトル（図1、2）及びマスペクトル（図3、4）は、アベルメクチン B_{1a}のものと一致した。

従って、アグリクール検体中にアベルメクチン B_{1a}が存在することを確認した。

iv. 定量結果

0.5–10 mg/Lの標準溶液を用いて、装置3により測定したところ、この濃度範囲で直線性を示し原点を通る検量線が得られた。また、測定値相当の注入濃度（4 mg/L相当）は検量線の範囲内であった。

定量条件：	装置	溶離液	検出	
	3	ギ酸+アセトニトリル	SIR (ネガティブ)	
ロット	分析結果 (%)		平均 (%)	相対標準偏差 (%)
0405	0.3, 0.3, 0.2, 0.2, 0.2		0.2	15
0604	0.2, 0.2, 0.2, 0.2, 0.2		0.2	10
0607	0.3, 0.2, 0.2, 0.2, 0.2		0.2	8
0609	0.2, 0.2, 0.2, 0.2, 0.2		0.2	4

定量下限：0.2%

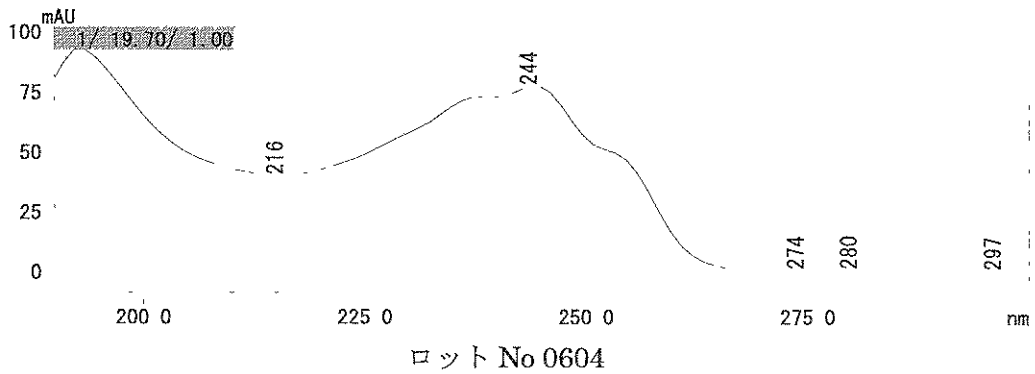
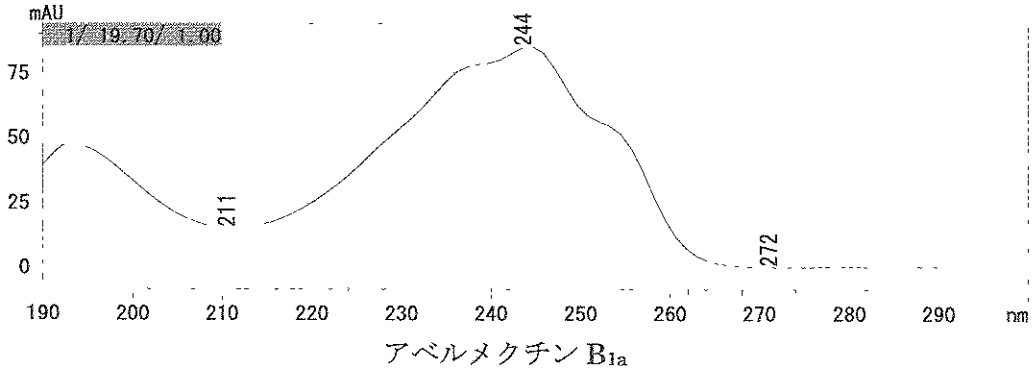
4ロット全てからアベルメクチン B_{1a}0.2%を検出した。

5. 図表一覧

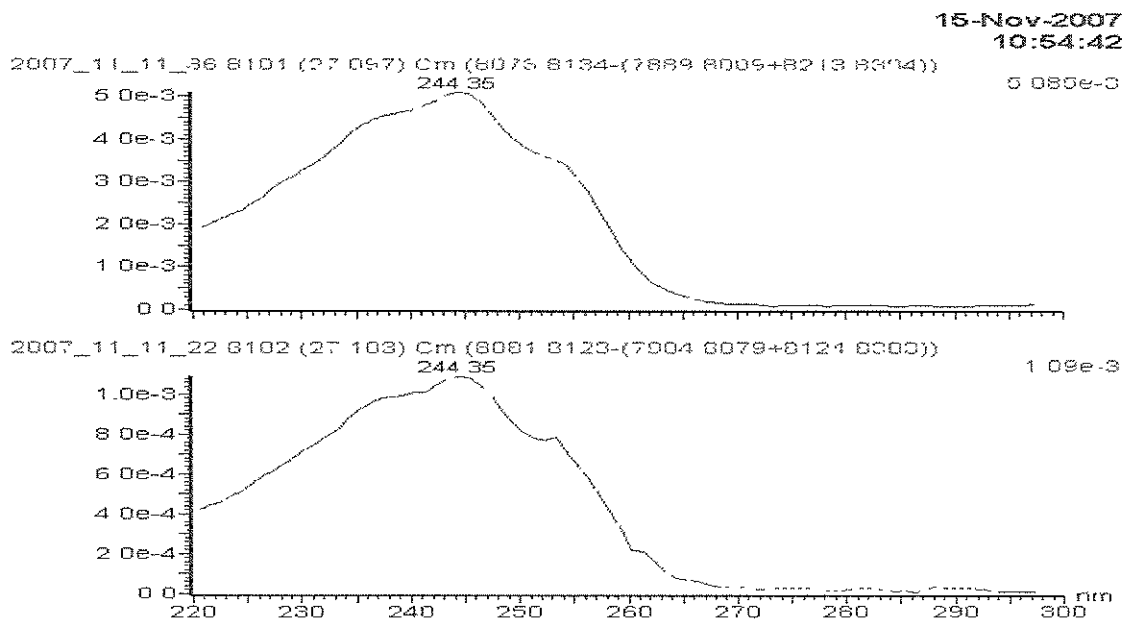
- (1). 分取画分の UV スペクトル
- (2). HPLC ピーク部分の UV スペクトル
- (3). HPLC ピーク部分のマススペクトル (ポジティブ)
- (4). HPLC ピーク部分のマススペクトル (ネガティブ)

図表

1. 分取画分の UV スペクトル

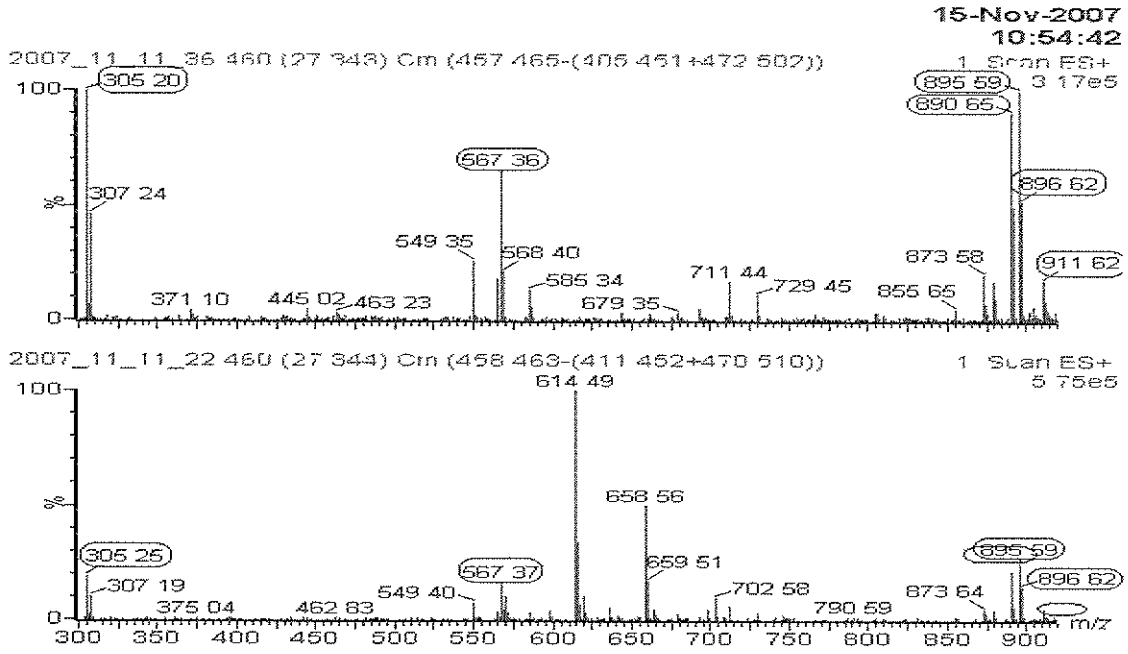


2. HPLC ピーク部分の UV スペクトル



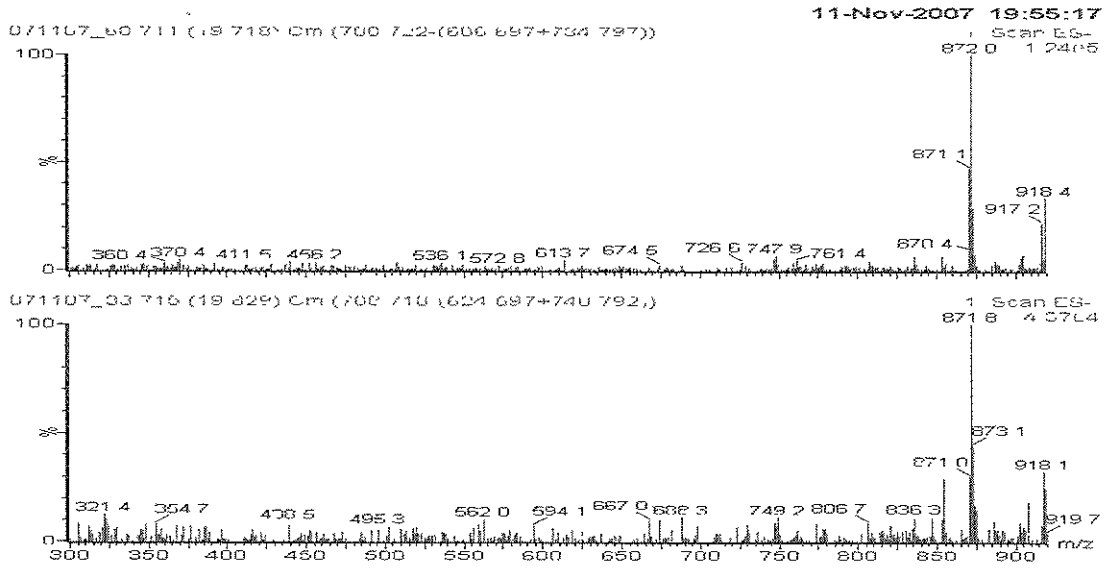
上段：アベルメクチン B_{1a}、下段：ロット No 0604

3. HPLC ピーク部分のマススペクトル (ポジティブ)



上段：アベルメクチン B_{1a}、下段：ロット No 0604
(○印が主要なフラグメント)

4. HPLC ピーク部分のマススペクトル (ネガティブ)



上段：アベルメクチン B_{1a} 下段：ロット No 0604