

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

残留農薬等に関するポジティブリスト 制度導入に係る分析法開発

フィプロニル試験法（畜産物）

フィプロニル試験法（畜産物）の検討

〔目的〕

フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫において GABA による塩素イオンチャンネルコントロールを阻害し、神経興奮抑制を阻害することにより殺虫作用を示すと考えられている化合物である。

今般、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において食品中の農薬等のポジティブリスト制度導入時に設定された基準値（いわゆる暫定基準値）が見直された。審議結果を踏まえ、厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知「生食発0228第1号（平成30年2月28日）」において規制対象が「今回残留基準値を設定するフィプロニルとは、農産物にあつてはフィプロニル、畜産物にあつてはフィプロニル及び代謝物B【(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α,α,α -トリフルオロ-*p*-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルホニルピラゾール-3-カルボニトリル】をフィプロニルに換算したものの和とする。」に変更されたとともに、基準値が改正された。

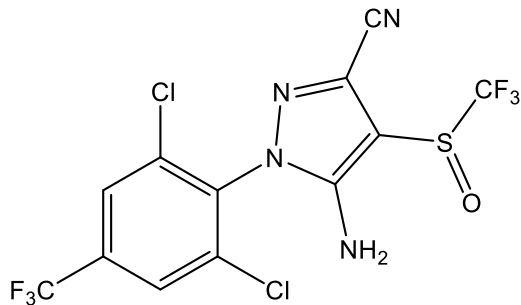
そのため、改正された規制対象及び基準値での検査に対応可能な畜産物の試験法を早急に整備する必要があることから、畜産物中のフィプロニル及びフィプロニル代謝物 B の試験法を検討した。

フィプロニルの基準値（畜産物のみ抜粋）

	基準値（ppm）	
	基準値	現行基準値
牛の筋肉	0.5	0.04
豚の筋肉	0.01	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.01	0.04
牛の脂肪	0.5	0.5
豚の脂肪	0.04	0.5
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.04	0.3
牛の肝臓	0.1	0.1
豚の肝臓	0.01	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.01	0.06
牛の腎臓	0.02	0.02
豚の腎臓	0.01	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.01	0.03
牛の食用部分	0.1	0.03
豚の食用部分	0.01	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.01	0.03
乳	0.02	0.02
鶏の筋肉	0.01	0.01
その他の家きんの筋肉	0.01	0.01
鶏の脂肪	0.02	0.04
その他の家きんの脂肪	0.02	0.04
鶏の肝臓	0.02	0.02
その他の家きんの肝臓	0.02	0.02
鶏の腎臓	0.02	0.02
その他の家きんの腎臓	0.02	0.02
鶏の食用部分	0.02	0.02
その他の家きんの食用部分	0.02	0.02
鶏の卵	0.02	0.02
その他の家きんの卵	0.02	0.02
はちみつ		0.05

[検討対象化合物の構造]

○フィプロニル



分子式：C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS

分子量：437.15

IUPAC 名：5-Amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile

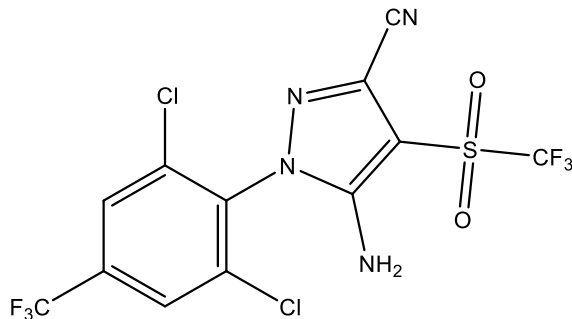
CAS 番号：120068-37-3

CAS 名：1H-Pyrazole-3-carbonitrile,5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-

log Pow:4、水溶解度：1.9 mg/L、蒸気圧：2.78×10⁻⁹ mmHg

(ChemID plus: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

○代謝物 B



分子式：C₁₂H₄Cl₂F₆N₄O₂S

分子量：453.15

IUPAC 名：5-Amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile

CAS 番号：120068-36-2

CAS 名：1H-Pyrazole-3-carbonitrile,5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]-

log Pow:不明、水溶解度：不明、蒸気圧：不明

[実験方法]

1. 試料

市販の筋肉（牛及び鶏）、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵を用いた。以下に各食品の試料採取方法を示した。

- 1) 筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 肝臓は、細切均一化した。
- 4) 牛乳は、よく攪拌し均一化した。
- 5) 鶏卵は、殻を除き、全卵を均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品、標準原液及び標準溶液

① 標準品

- ・フィプロニル標準品：林純薬工業(株)製、純度 99.4%
- ・代謝物 B 標準品：富士フィルム和光純薬(株)製、純度 99.8% (capillary GC)、99.2% (qNMR)

② 標準原液

フィプロニル及び代謝物 B 標準原液：各標準品 10 mg 程度を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1.0 mg/mL の標準原液を調製した。なお、代謝物 B については、フィプロニルとしての濃度に換算して標準原液を調製した。

③ 添加用標準溶液

- ・定量限界濃度

フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンで希釈して 0.10 mg/L の濃度の溶液を調製した。

- ・基準値濃度

- a. 牛の筋肉、牛の脂肪（添加濃度 0.5 ppm）：フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンで希釈して 50 mg/L の濃度の溶液を調製した。
- b. 牛の肝臓（添加濃度 0.1 ppm）：フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンで希釈して 10 mg/L の濃度の溶液を調製した。
- c. 牛乳、鶏卵（添加濃度 0.02 ppm）：フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンで希釈して 2.0 mg/L の濃度の溶液を調製した。
- d. 鶏の筋肉（添加濃度 0.01 ppm）：フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンで希釈して 1.0 mg/L の濃度の溶液を調製した。

④ 検量線作成用標準溶液

フィプロニル標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 1) 混液で適宜希釈した。

2) その他の試薬、試液等

- アセトニトリル：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用 (300 倍濃縮検定品)
- n-ヘキサン：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用 (300 倍濃縮検定品)

無水硫酸ナトリウム：富士フィルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB 試験用
ギ酸アンモニウム：富士フィルム和光純薬(株)製、特級
酢酸：富士フィルム和光純薬(株)製、特級
エタノール：関東化学(株)製、特級
メタノール：関東化学(株)製、LC-MS 用
0.1 vol%ギ酸：関東化学(株)製、HPLC 用
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液：関東化学(株)製、HPLC 用
水：関東化学(株)製、LC-MS 用
アンモニア水：関東化学(株)製、特級 (28%)
オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) ミニカラム：ジーエルサイエンス(株)
製、InertSep C18 FF (1,000 mg/6 mL)
アルミナ (中性) ミニカラム：ジーエルサイエンス(株)製 InertSep AL-N (1 g/6
mL)
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9)：ギ酸アンモニウム 0.63 g を量り採り水約
950 mL に溶解し、アンモニア水を用いて pH を 9 に調整した後、水を加えて 1 L に定
容したもの。

3. 装置

液体クロマトグラフ：Nexera X2 (島津製作所製)
タンデム型質量分析計：API 4000 (SCIEX 製)
濃縮装置：ロータリーエバポレーターNVC-2100 (東京理化工機(株)製)
ホモジナイザー：POLYTRON PT3100 (Kinematica AG)

4. 測定条件

カラム：InertSustain C18 HP (粒子径 3 μm 、内径 3 mm、長さ 150 mm、ジーエルサ
イエンス(株)製)
カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$
移動相：10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (A 液) 及びアセトニトリル
(B 液)
送液条件：
A 液及び B 液の混液 (1 : 4) で 5 分間送液後、(1 : 19) で 5 分間洗浄し、
(1 : 4) で 5 分間平衡化する。
移動相流速：0.4 mL/min
注入量：5 μL
保持時間：
フィプロニル 2.9 分、代謝物 B 3.3 分
質量分析パラメータ：
キャピラリー電圧 -3500 V、脱溶媒温度 600 $^{\circ}\text{C}$ 、イオンソースガス 1 流量 70
psig、イオンズプレーガス 2 流量 60 psig、カーテンガス流量 30 psig、コリジ
ョンガス (N_2) 流量 10、イオン化モード ESI (-)

表 1 測定イオン (m/z)

	プリカーサーイオン		プロダクトイオン	
	m/z	DP	m/z	CE
フィプロニル (定量)	435.0	-65	330.0	-24
フィプロニル (定性)	437.0	-65	332.0	-24
代謝物 B (定量)	451.0	-65	282.0	-38
代謝物 B (定性)	453.0	-65	284.0	-38

DP : Declustering potential (V) 、CE : Collision Energy (eV)

5. 定量

各添加濃度の回収率 25%相当濃度、回収率 50%相当濃度、回収率 75%相当濃度、回収率 100%相当濃度、回収率 125%相当濃度及び回収率 150%相当濃度の検量線作成用標準溶液 (アセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 1) 混液) を調製した。それぞれ 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により各化合物の検量線を作成した。

試験溶液 (0.5 g 試料/1 mL 試験溶液) 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりフィプロニル及び代謝物 B の含量を求めた。

図 1-1 及び図 1-2 に添加濃度 0.001 mg/kg の場合 (定量限界相当濃度) の検量線、回帰式及び決定係数 (R^2 値) を示した。

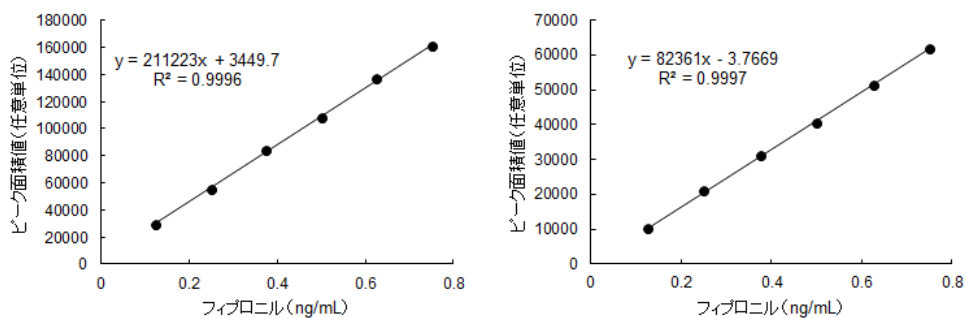


図 1-1 フィプロニルの検量線の一例

左 : 測定イオン m/z 435 \rightarrow 330、右 : 測定イオン m/z 437 \rightarrow 332

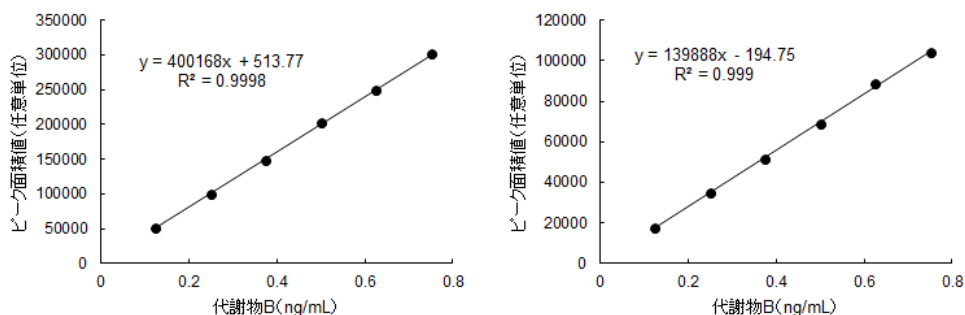


図 1-2 代謝物 B の検量線の一例

左：測定イオン m/z 451→282、右：測定イオン m/z 453→284

6. 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.10 mL を添加して混合後、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。牛の脂肪の場合は、試料 10.0g を 40°C の湯浴中で加温して融解し、添加用標準溶液 0.10 mL を添加して混合後、-30°C で 30 分間置して再固化したものを添加試料とした。

7. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採った。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに 2 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この 5 mL (試料 0.5 g 相当量) を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 2 mL を加えて溶かした。

2) 精製

アルミナ (中性) ミニカラム (1,000 mg) に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、1) で得られた溶液を注入した後、更に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、エタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH9) (4 : 1) 混液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

フローチャート

試料 10.0 g

添加試料の場合には、添加用標準溶液を添加して混合後、室温で 30 分間放置
(牛の脂肪の場合は、40℃の湯浴中で加温して融解し、添加用標準溶液を添加して混合後、-30℃で 30 分間放置)

抽出

n-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え、1 分間ホモジナイズ
無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに 2 分間ホモジナイズ
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採取
残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、2 分間ホモジナイズ
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を採取
アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容
この 5 mL (試料 0.5 g 相当) を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒除去
残留物を *n*-ヘキサン 2 mL で溶解 (抽出溶液)

アルミナ (中性) ミニカラム (1,000 mg)

カラムを予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄
抽出溶液を負荷
容器を *n*-ヘキサン 1 mL で 3 回洗い込んで注入
更に、*n*-ヘキサン 2 mL を注入
流出液を捨てる
エタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 15 mL を注入
溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去
残留物をアセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 1) 混液に溶解し、正確に 1 mL とする

LC-MS/MS (0.5 g 試料/mL)

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料を〔実験方法〕の「7. 試験溶液の調製」に従い操作し、アルミナ（中性）ミニカラムからの溶出液の溶媒を除去して得られた残留物を、検量線作成用標準溶液（回収率 100%相当濃度）1 mL に溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

〔結果及び考察〕

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

1) プリカーサーイオンの選択

まず、フローインジェクション分析により、フィプロニル及び代謝物 B の標準溶液（それぞれ 100 ng/mL の 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液（1 : 1）混液の溶液）をスキャン測定した。ESI（-）におけるフィプロニル及び代謝物 B のマススペクトルをそれぞれ図 2-1 及び図 2-2 に示した。

フィプロニル及び代謝物 B は、分子内に塩素原子を 2 つずつ有する化合物であるため、塩素の同位体（ ^{35}Cl 及び ^{37}Cl ）に由来する、質量数の異なる分子が存在する（ ^{35}Cl を 2 つ有する分子、 ^{35}Cl と ^{37}Cl を 1 つずつ有する分子、 ^{37}Cl を 2 つ有する分子）。 ^{35}Cl と ^{37}Cl の天然存在比は約 3 : 1 であることから、フィプロニル及び代謝物 B がイオン化された場合には、「 ^{35}Cl を 2 つ有する分子」と「 ^{35}Cl と ^{37}Cl を一つずつ有する分子」に由来するイオンが感度良く検出されると予想された。

図 2-1 に示される通り、フィプロニルについては、 m/z 435 及び m/z 437 において良好なシグナル強度を有するイオンが検出された。これらのイオンは、それぞれ「 ^{35}Cl , ^{35}Cl -フィプロニル」及び「 ^{35}Cl , ^{37}Cl -フィプロニル」の脱プロトン分子イオンと推定されたことから、フィプロニルについてはこれらのイオンをプリカーサーイオンとして選択した。

代謝物 B については、図 2-2 に示される通り、 m/z 451 及び m/z 453 において良好なシグナル強度を有するイオンが検出された。これらのイオンは、それぞれ「 ^{35}Cl , ^{35}Cl -代謝物 B」及び「 ^{35}Cl , ^{37}Cl -代謝物 B」の脱プロトン分子イオンと推定されたことから、代謝物 B についてはこれらのイオンをプリカーサーイオンとして選択した。

なお、ESI（+）においては、フィプロニル及び代謝物 B とともに、プロトン付加分子イオンと推定されるイオンが検出されなかった。よって、本報告においては、イオン化法及び測定モードは ESI（-）を選択した。

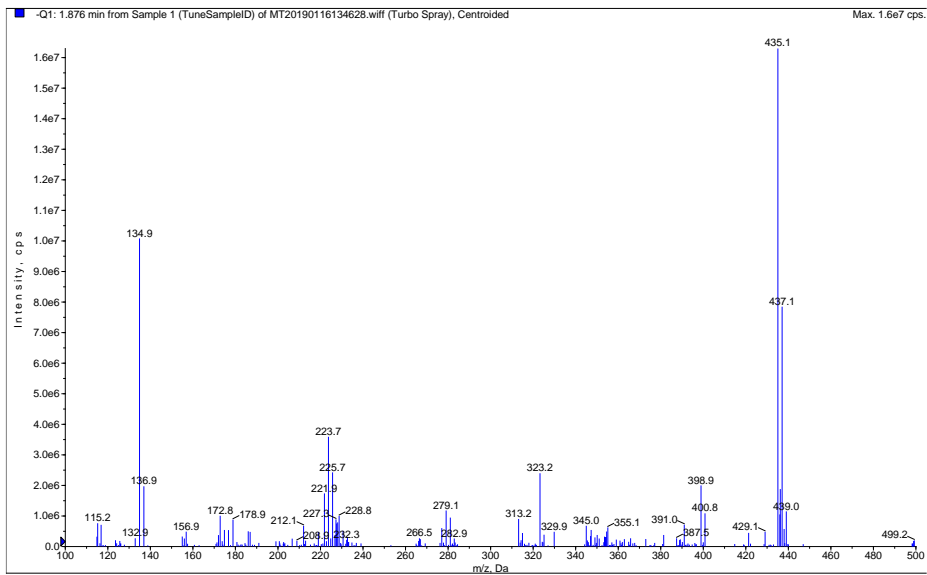


図 2-1 ESI (-) におけるフィプロニルのマススペクトル
 100 ng/mL 溶液 (0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ・アセトニトリル (1 : 1) 混液)
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V

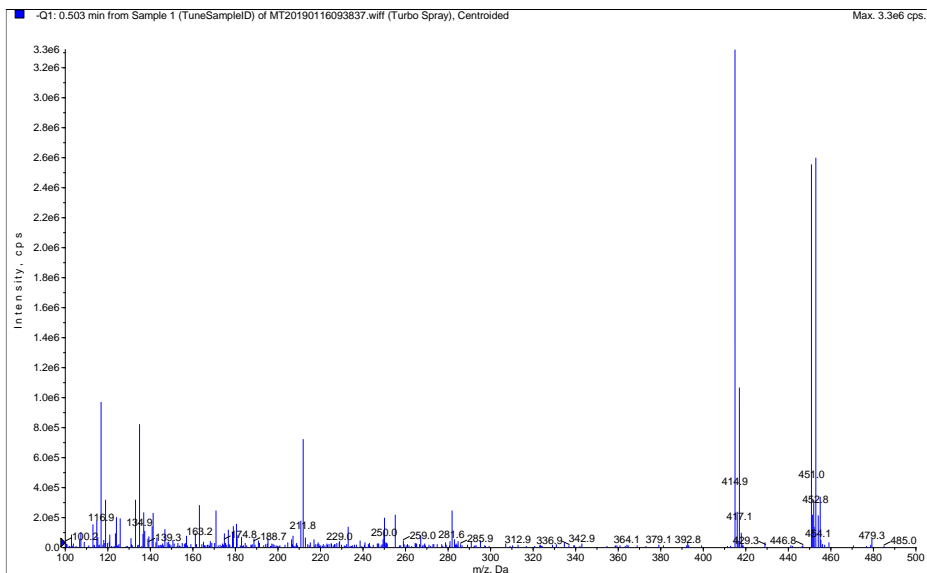


図 2-2 ESI (-) における代謝物 B のマススペクトル
 100 ng/mL 溶液 (0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ・アセトニトリル (1 : 1) 混液)
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V

2) プロダクトイオンの選択

次いで、選択したプリカーサーイオンについてプロダクトイオンスキャン測定を行った。

① フィプロニル

図 3-1 に示される通り、 m/z 435 (「 ^{35}Cl , ^{35}Cl -フィプロニル」の脱プロトン分子イオン) をプリカーサーイオンとした場合には、 m/z 330 のイオンで良好なシグナル強度が得られた。

また、 m/z 437 (「 ^{35}Cl , ^{37}Cl -フィプロニル」の脱プロトン分子イオン) をプリカーサーイオンとした場合には、図 3-2 に示される通り、 m/z 332 及び m/z 330 のイオンで良好なシグナル強度が得られた。なお、これら 2 つのイオンは、塩素原子の質量数が異なる同一のフラグメントイオン (それぞれ ^{37}Cl -フラグメントイオン及び ^{35}Cl -フラグメントイオン) であると推察された。

② 代謝物 B

図 3-3 に示される通り、 m/z 451 (「 ^{35}Cl , ^{35}Cl -代謝物 B」の脱プロトン分子イオン) をプリカーサーイオンとした場合には、 m/z 282 のイオンで良好なシグナル強度が得られた。

また、 m/z 453 (「 ^{35}Cl , ^{37}Cl -代謝物 B」の脱プロトン分子イオン) をプリカーサーイオンとした場合には、図 3-4 に示される通り、 m/z 284 及び m/z 282 のイオンで良好なシグナル強度が得られた。なお、これら 2 つのイオンは、塩素原子の質量数が異なる同一のフラグメントイオン (それぞれ ^{37}Cl -フラグメントイオン及び ^{35}Cl -フラグメントイオン) であると推察された。

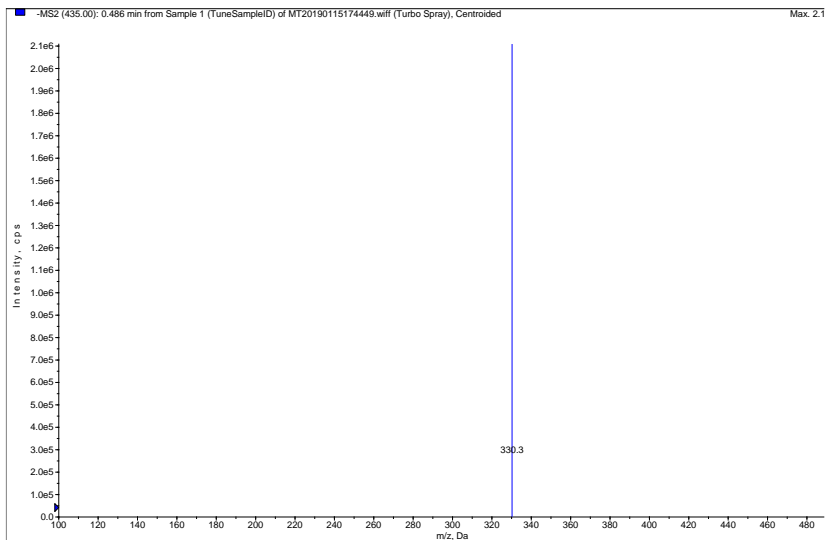


図 3-1 フィプロニルのプロダクトイオンスキャンスペクトル①
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%・ギ酸アセトニトリル (1 : 1) 混液
 ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 435、
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V、CE -24 eV

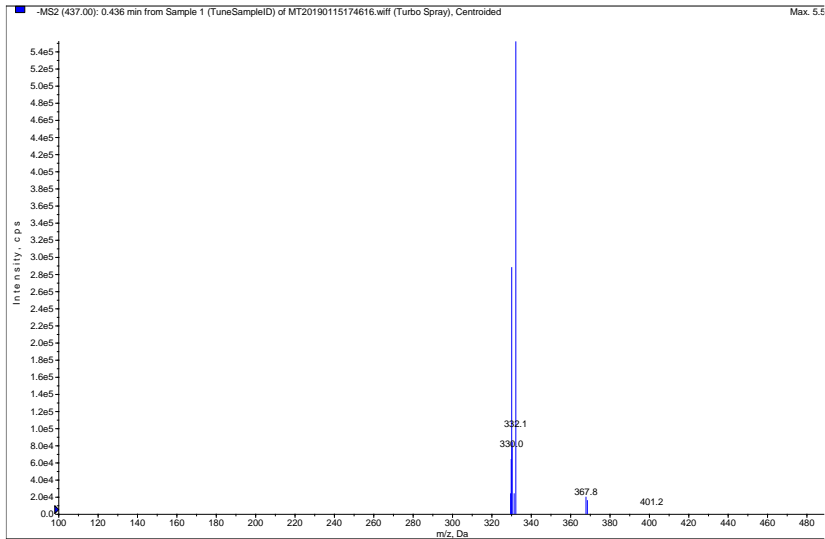


図 3-2 フィプロニルのプロダクトイオンスキャンスペクトル②
 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル (1 : 1) 混液
 ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 437、
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V、CE -24 eV

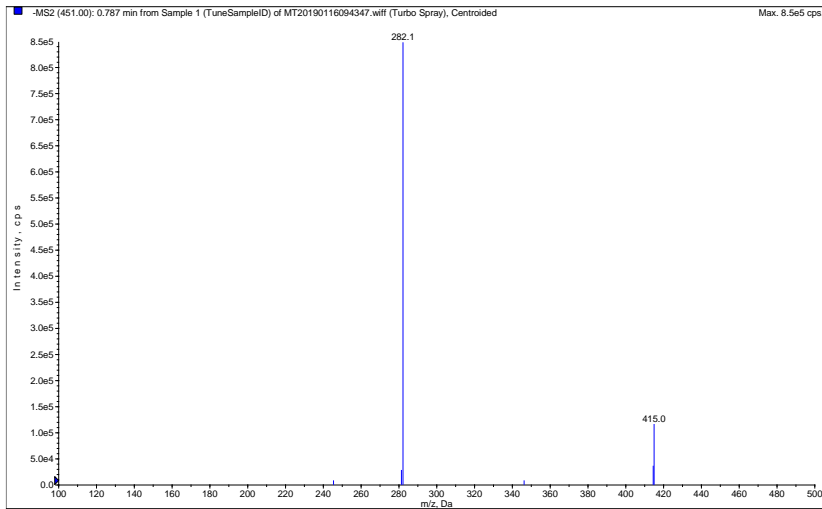


図 3-3 代謝物 B のプロダクトイオンスキャンスペクトル①
 100 ng/mL 溶液 (0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ・アセトニトリル (1 : 1) 混
 液)

ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 451、
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V、CE -38 eV

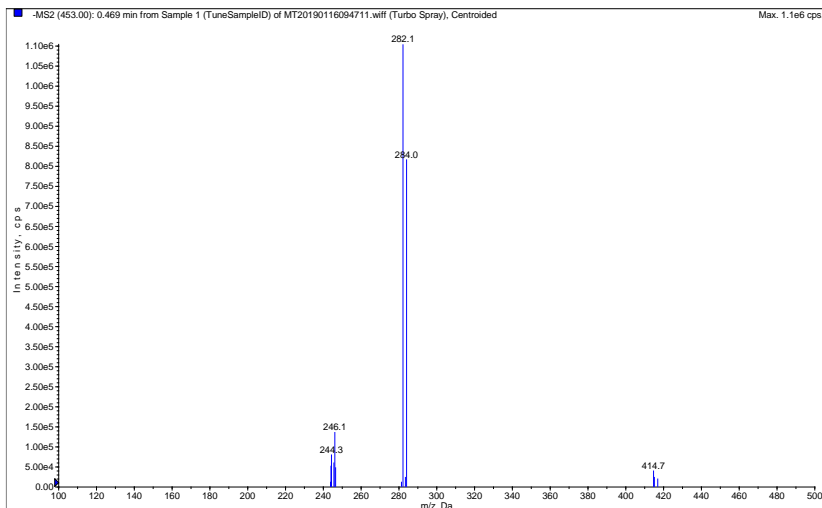


図 3-4 代謝物 B のプロダクトイオンスキャンスペクトル②
 100 ng/mL 溶液 (0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ・アセトニトリル (1 : 1) 混
 液)

ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 453、
 スキャン範囲 m/z 100~500、CV -65 V、CE -38 eV

3) タンデム質量分析における測定条件の設定

上記のマスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルの測定結果から、タンデム質量分析におけるフィプロニル及び代謝物 B の測定イオンを表 1 の通り選択した。

4) LC-MS/MS 測定における移動相の検討

検討当初、検査機関における効率的な検査体制の確立を考慮して、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の改良法」で使用されている 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を移動相としてフィプロニル及び代謝物 B を測定した。それぞれ 5 ng/mL のフィプロニル標準溶液及び代謝物 B 標準溶液を測定した結果、図 4 に示される通り良好な測定感度とピーク形状が得られた。なお、フィプロニル標準溶液の測定において代謝物 B のピーク（図 4-3 及び図 4-4）、代謝物 B の測定においてフィプロニルのピーク（図 4-1 及び 4-2）が検出されたものの、ともに極微量であったことから、定量にはほとんど影響を及ぼさない量であることが確認された（表 2）。

なお、フィプロニル標準溶液の測定で得られた代謝物 B のピークは、代謝物 B の保持時間に検出され、フィプロニルの保持時間には検出されなかった。また、代謝物 B 標準溶液の測定で得られたフィプロニルのピークは、フィプロニルの保持時間に検出され、代謝物 B の保持時間には検出されなかった。このことから、イオン化の際のフィプロニルから代謝物 B への変換、もしくは代謝物 B からフィプロニルへの変換はほとんど無く、フィプロニル標準溶液で得られた代謝物 B のピーク、代謝物 B 標準溶液で得られたフィプロニルのピークは、それぞれの標準品に不純物として含まれる各化合物由来であると推察された。

その後の検討において、試験溶液（試料マトリックスを含む溶液）を繰り返し注入した場合には、注入回数の増加に伴うピーク面積値の増加傾向が確認された。分析カラムの洗浄条件を検討したものの改善効果が確認できなかったため、移動相の変更について検討した。

フィプロニル及び代謝物 B とともに、ESI（-）においてイオン化が確認されたことから、弱塩基性の移動相の適用を検討した。すなわち、pH を調整した 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（アンモニアを加えて pH 7~10 に調整）及びアセトニトリルを移動相として、インフュージョン測定におけるフィプロニル及び代謝物 B のシグナル強度を測定し、結果を表 3 に示した。その結果、フィプロニル及び代謝物 B とともに、pH の増加に伴うシグナル強度の増加傾向が確認された。一般的な分析カラムにおいては、pH 10 以下での使用が推奨されているため、フィプロニル及び代謝物 B とともに良好な測定感度が得られると考えられた pH 9 の移動相を選択した。

選択した移動相（10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（pH 9）及びアセトニトリル）を用い、各検討食品の添加試料（定量限界相当濃度）から調製した試験溶液を繰り返し測定した結果、注入回数増加に伴うピーク面積値の増加は改善され、安定した測定値が得られることが確認された。

以上の結果から、最終的な測定条件として 4. 測定条件に示した条件が得られた。

表2 フィプロニル標準溶液及び代謝物 B 標準溶液の測定結果

	ピーク面積値		②/①×100 (%)	①/②×100 (%)
	フィプロニル標準溶液 (①)	代謝物 B 標準溶液 (②)		
フィプロニル (<i>m/z</i> 435→330)	507340	2848	0.56	
フィプロニル (<i>m/z</i> 437→332)	188680	988	0.52	
代謝物 B (<i>m/z</i> 451→282)	4240	1700300		0.25
代謝物 B (<i>m/z</i> 453→284)	1575	587000		0.27

表3 種々の移動相におけるフィプロニル及び代謝物 B のシグナル強度

移動相	シグナル強度 (任意単位)	
	フィプロニル (<i>m/z</i> 435→330)	代謝物 B (<i>m/z</i> 451→282)
0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液	120000	250000
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 7) 及びアセトニトリル	70000	140000
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 8) 及びアセトニトリル	100000	140000
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) 及びアセトニトリル	110000	200000
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 10) 及びアセトニトリル	120000	200000

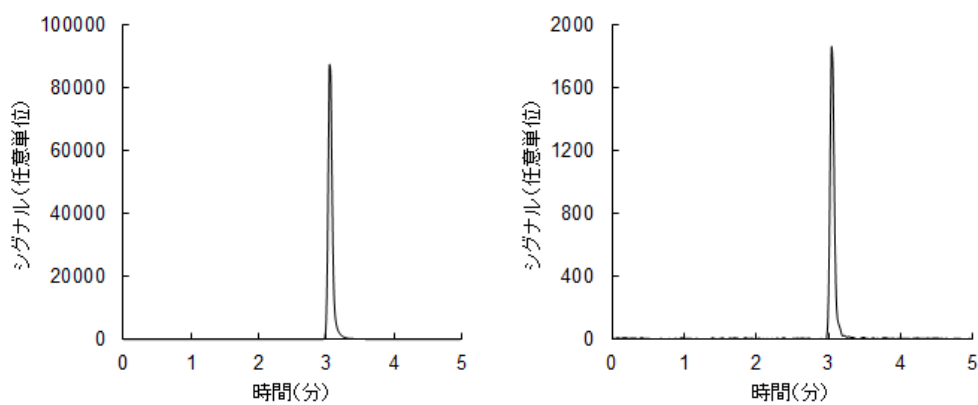


図 4-1 フィプロニル (m/z 435→330) のクロマトグラム
 左：フィプロニル標準溶液 (5 ng/mL)
 右：代謝物 B 標準溶液 (5 ng/mL)

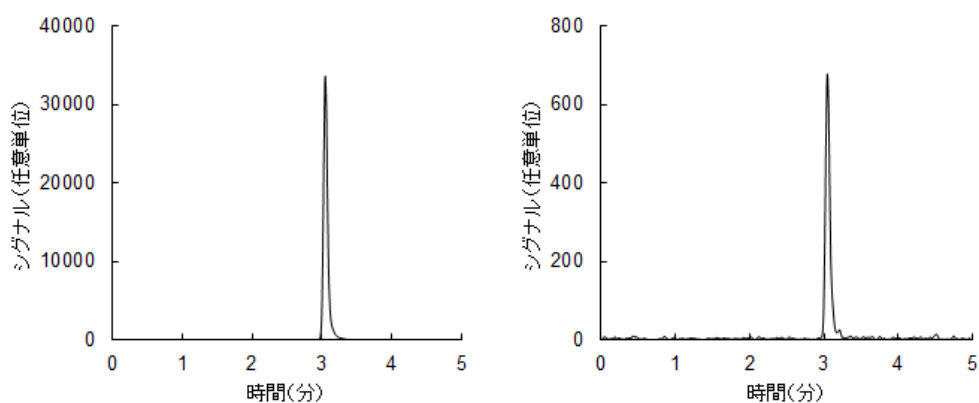


図 4-2 フィプロニル (m/z 437→332) のクロマトグラム
 左：フィプロニル標準溶液 (5 ng/mL)
 右：代謝物 B 標準溶液 (5 ng/mL)

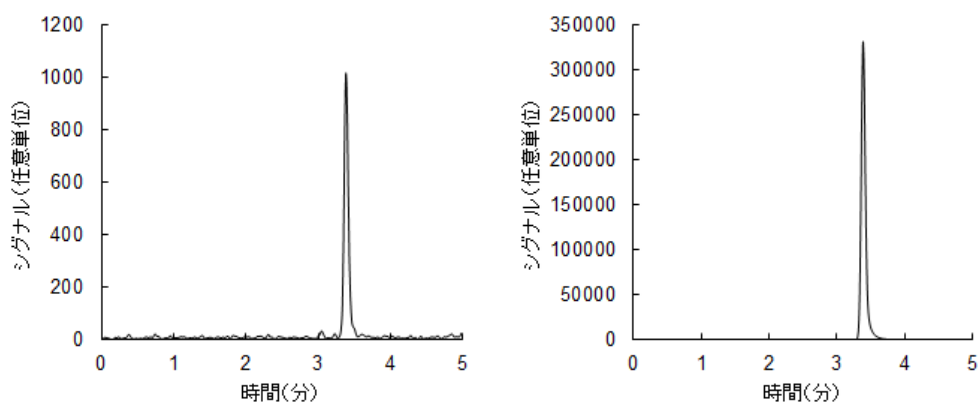


図 4-3 代謝物 B (m/z 451 \rightarrow 282) のクロマトグラム
 左：フィプロニル標準溶液 (5 ng/mL)
 右：代謝物 B 標準溶液 (5 ng/mL)

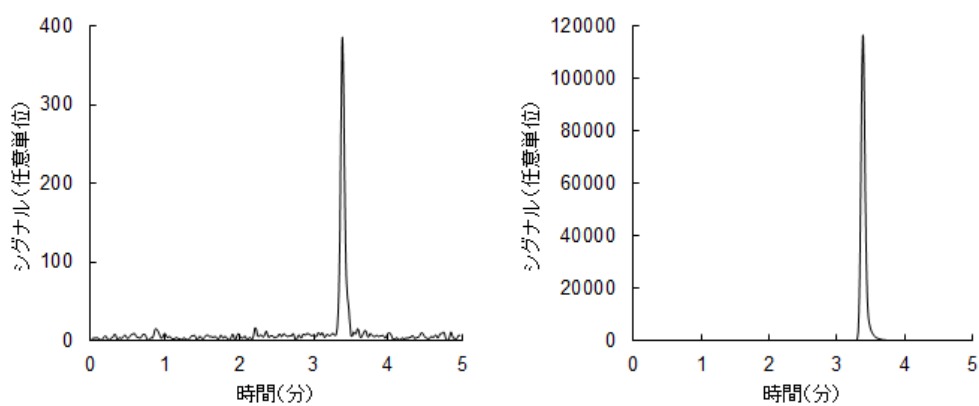


図 4-4 代謝物 B (m/z 453 \rightarrow 284) のクロマトグラム
 左：フィプロニル標準溶液 (5 ng/mL)
 右：代謝物 B 標準溶液 (5 ng/mL)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

検査機関における効率的な検査体制の確立を考慮し、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の改良法」の適用性を検討した。当該一斉試験法は、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、対象化合物を試料からアセトニトリルで抽出する方法である。検討対象化合物であるフィプロニルは、比較的極性の低い化合物（log Pow 4）であることから、一部が *n*-ヘキサン層へ分配する懸念があったことから、抽出の際のアセトニトリル層への回収率について検討した。

フィプロニル標準溶液（100 ng/mL アセトン溶液）、又は代謝物 B 標準溶液（100 ng/mL アセトン溶液）0.1 mL をガラス製遠心管に採り、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL、酢酸 1 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、2 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を 100 mL 容メスフラスコに採った。遠心管（無水硫酸ナトリウムを含む）をアセトニトリル 50 mL で洗い、洗液を先のメスフラスコに移した後、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容した。この 5 mL を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液（1 : 4）混液 1 mL に溶解して LC-MS/MS で測定し、結果を表 4 に示した。その結果、フィプロニルのみを添加した場合の回収率は、測定イオンによって 102% 又は 105% であった。代謝物 B のみを添加した場合の回収率は、測定イオンによって 100% 又は 96% であった。よって、フィプロニル及び代謝物 B は *n*-ヘキサン層にはほとんど分配されず、アセトニトリル層中に良好に分配されることが確認された。

なお、フィプロニルのみを添加した場合に代謝物 B の測定イオンで、代謝物 B のみを添加した場合にフィプロニルの測定イオンでそれぞれピークが検出されたが、それらのピーク面積値の割合は、標準溶液の測定の際に得られた割合（表 2 参照）とほとんど同様であったことから、本抽出操作におけるフィプロニルから代謝物 B への変換（酸化）、もしくは代謝物 B からフィプロニルへの変換（還元）はほとんど無いと考えられた。

以上の結果から、フィプロニル及び代謝物 B に対して「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の改良法」における抽出操作をそのまま採用可能と判断し、本試験法における抽出操作としては、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、フィプロニル及び代謝物 B を試料からアセトニトリルで抽出する方法を採用した。

表 4 抽出におけるアセトニトリル層中への回収率

	ピーク面積値*1	フィプロニル添加		代謝物 B 添加	
		ピーク面積値	回収率 (%)	ピーク面積値	回収率 (%)
フィプロニル (<i>m/z</i> 435→330)	53862	54800	102	278	(0.52)*2
フィプロニル (<i>m/z</i> 437→332)	19308	20310	105	116	(0.60)*2
代謝物 B (<i>m/z</i> 451→282)	175420	351	(0.20)*2	176020	100
代謝物 B (<i>m/z</i> 453→284)	63061	122	(0.19)*2	60375	96

*1 回収率 100%相当の標準溶液 [0.5 ng/mL (0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:4) 混液の溶液)]

*2 括弧内の数値は回収率 100%相当の標準溶液のピーク面積値に対する面積比 (%)

2) ミニカラム精製の検討

まず、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)の改良法」の適用性を考慮し、当該一斉試験法で使用されている ODS ミニカラム (InertSep C18 FF、1,000 mg) の適用性について検討した。検討の結果、当該一斉試験法で使用されている溶出条件 (0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:4) 混液 15 mL で溶出) をそのまま用いた場合、フィプロニル及び代謝物 B とともに、カラムから良好に回収されることが確認された。また、基準値相当濃度 (0.02 mg/kg) を添加した鶏卵試料からの回収率も良好であった (回収率約 100%)。しかしながら、牛の肝臓試料においては、基準値相当濃度 (0.1 mg/kg) の添加回収試験でフィプロニルの回収率が約 125% (代謝物 B は約 100%)、定量限界相当濃度 (0.001 mg/kg) の添加回収試験ではフィプロニルの回収率が約 200% (代謝物 B は約 150%) となることが確認され、食品によっては精製が不十分となる場合があることが示唆された。そのため、当該一斉試験法で使用されている精製条件をそのまま使用した場合には、食品によっては正確な分析値が得られない可能性があるかと判断し、種々の畜産物に適用可能な精製法について検討した。

検討の結果、アルミナ (中性) ミニカラムを用いることで良好な精製効果が得られたことから、InertSep AL-N (1,000 mg) を用いた精製における負荷液・洗浄溶媒・溶出溶媒について検討した。

まず、負荷液及び洗浄溶媒について検討した。予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄した InertSep AL-N (1,000 mg) に、フィプロニル及び代謝物 B (それぞれ 0.5 ng を *n*-ヘキサン 5 mL に溶解) を負荷した。次いで、*n*-ヘキサンを 5 mL ずつ 2 回注入した。負荷液及び各流出液をそれぞれ採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:4) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定し、結果を表 5-1 に示した。その結果、*n*-ヘキサンを使用した場合には、負荷液を含めて 15 mL の通液においてもフィプロニル及び代謝物 B の溶出は確認されなかった。以上の結果から、操作性や効率を考慮し、アルミナ (中

性) ミニカラム精製における負荷・洗浄操作は、『予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄したアルミナ (中性) ミニカラム (1,000 mg) に、抽出液 (溶媒除去後の残留物を *n*-ヘキサン 2 mL に溶解したもの) を負荷し、*n*-ヘキサン 5 mL で洗浄する』操作とした。

次に、溶出溶媒について検討した。予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄した InertSep AL-N (1,000 mg) に、フィプロニル及び代謝物 B (それぞれ 0.5 ng を *n*-ヘキサン 2 mL に溶解) を負荷した後、*n*-ヘキサン 5 mL で洗浄した。次いで、各種エタノール比率のエタノール及び *n*-ヘキサン混液を 5 mL ずつ注入し、各溶出液を採った。各溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物を 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 4) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定し、結果を表 5-2 に示した。その結果、フィプロニルはエタノール比率が低い溶出溶媒においても 15 mL 以内の液量でカラムから溶出が可能であったものの、代謝物 B はエタノール比率が低い溶出溶媒では溶出され難いことが確認された。エタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液を用いた場合には、フィプロニル及び代謝物 B とともに 10 mL で溶出可能であったことから、溶出溶媒としてはエタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液を選択した。また、溶出液量については、食品マトリックスによる溶出画分のずれなどを考慮し、15 mL を選択した。

以上の結果から、本報告におけるアルミナ (中性) ミニカラムを用いた精製操作は、『予め *n*-ヘキサン 5 mL で洗浄したアルミナ (中性) ミニカラム (InertSep AL-N、1,000 mg) に抽出液 (*n*-ヘキサン 2 mL に溶解したもの) を注入後、更に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、エタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 15 mL を注入し、溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。』操作とした。

表 5-1 アルミナ (中性) ミニカラムからのフィプロニル及び代謝物 B の回収率 (%)

化合物	負荷液 (5 mL)	<i>n</i> -ヘキサン	
		0~5 mL	5~10 mL
フィプロニル	ND	ND	ND
代謝物 B	ND	ND	ND

ND : フィプロニル又は代謝物 B のピークの S/N < 3

表 5-2 アルミナ（中性）ミニカラムからのフィプロニル及び代謝物 B の回収率（%）

化合物	① エタノール及び <i>n</i> -ヘキサン（1：99）混液				合計
	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	15～20 mL	
フィプロニル	2	84	12	ND	98
代謝物 B	ND	7	38	39	84

化合物	② エタノール及び <i>n</i> -ヘキサン（1：49）混液				合計
	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	15～20 mL	
フィプロニル	50	47	ND	ND	97
代謝物 B	11	62	21	1	95

化合物	③ エタノール及び <i>n</i> -ヘキサン（3：97）混液				合計
	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	15～20 mL	
フィプロニル	68	30	ND	ND	98
代謝物 B	13	76	7	ND	96

化合物	④ エタノール及び <i>n</i> -ヘキサン（1：19）混液				合計
	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	15～20 mL	
フィプロニル	80	17	ND	ND	97
代謝物 B	45	51	ND	ND	96

ND：フィプロニル又は代謝物 B のピークの S/N<3

3. 添加回収試験

検討食品は、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏の筋肉及び鶏卵（全 6 食品）を用いた。代謝物 B については、フィプロニルとしての濃度に換算して添加した。ブランク試料及び添加試料について、[実験方法]の「7. 試験溶液の調製」に従い操作し、試験溶液を調製した。調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定し、選択性、真度及び精度、S/N を評価した。なお、試験溶液の測定は、以下の通り実施した。

- ・ 定量限界相当濃度の添加回収試験溶液
得られた試験溶液をそのまま測定した。
- ・ 基準値相当濃度の添加回収試験溶液
牛乳、鶏の筋肉、鶏卵：得られた試験溶液をそのまま測定した。
牛の筋肉、脂肪、肝臓：回収率 25%～150%に相当する濃度範囲（牛の筋肉及び脂肪：0.0625 mg/L～0.375 mg/L、牛の肝臓：0.0125 mg/L～0.075 mg/L）の検量線において良好な直線性が得られなかったことから、牛の筋肉及び脂肪は 50 倍希釈、牛の肝臓は 10 倍希釈した試験溶液を測定した。

1) 選択性

検討した全ての食品のブランク試料において、フィプロニル及び代謝物 B の保持

時間（それぞれ 2.9 分及び 3.3 分）にピークが検出された。以下の理由から、これら検出されたピークは各食品に残留した微量のフィプロニル及び代謝物 B に由来するものと推察された。

- ・フィプロニル及び代謝物 B とともに、標準溶液と各ブランク試験溶液で得られるピークの保持時間が一致した。
- ・フィプロニル及び代謝物 B とともに、それぞれの定性イオン（フィプロニル： m/z 437→332 代謝物 B： m/z 453→284）においてもピークが検出された。
- ・定量イオンと定性イオンのピーク面積比（定性イオンのピーク面積値/定量イオンのピーク面積値）が、標準溶液（フィプロニル：0.36～0.38、代謝物 B：0.34～0.35）とブランク試験溶液（フィプロニル：0.34～0.39、代謝物 B：0.34～0.37）でそれぞれ同等であった。
- ・検討食品の代わりに水 10.0 g を用いて調製した試験溶液においては、フィプロニル及び代謝物 B とともにピークが検出されなかった。（試薬、器具、LC-MS/MS におけるキャリーオーバー、試験室等の環境由来ではないと考えられた。）

微量のため確認試験は実施していないが、参考として、検討した各食品で検出されたフィプロニル及び代謝物 B のおおよその含有量を表 6 に示した。

表 6 ブランク試験溶液中のフィプロニル及び代謝物 B の含有量（概算値）

	ブランク試料中の含有量 (ng/g) *	
	フィプロニル	代謝物 B
牛の筋肉	0.023	0.047
牛の脂肪	0.027	0.297
牛の肝臓	0.010	0.092
牛乳	0.018	0.046
鶏の筋肉	0.037	0.028
鶏卵	0.041	0.064

* 0.5 ng/mL 標準溶液を用いた一点検量により算出

検討した各食品のブランク試験溶液においてフィプロニル及び代謝物 B の保持時間にピークが検出されたが、選択性について評価したところ、表 7-1 及び表 7-2 に示した通り、全ての検討食品で目標値を満足する結果が得られた。

表 7-1 選択性の評価結果（フィプロニル）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ)						選択性の評価	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液				面積(高さ)比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
1	フィプロニル (m/z 435→330)	牛の筋肉	0.001	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	0	0	0	1096602	1075722	1086162	0.000	○	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	0	0	0	1043313	1038952	1041133	0.000	○	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1023912	1045296	1034604	0.000	○	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	2105	2063	2084	2094989	2044506	2069748	0.001	○	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	基準値 0.01	< 0.100	面積	4220	4304	4262	1117505	1202262	1159883	0.004	○	
6		鶏卵	0.001	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	4460	4504	4482	1981301	1980104	1980703	0.002	○	
7		牛の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	2648	2622	2635	1163336	120442	118389	0.023	○	
8		牛の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	2924	2866	2895	114283	116653	115468	0.026	○	
9		牛の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	1138	1104	1121	118984	124187	122035	0.009	○	
10		牛乳(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	2105	2148	2126	117120	117274	117197	0.018	○	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	4220	4136	4178	124335	130333	127334	0.034	○	
12		鶏卵(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	4460	4415	4437	120408	120666	120537	0.038	○	

表 7-2 選択性の評価結果（代謝物 B）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ)						選択性の評価	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液				面積(高さ)比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
1	代謝物B (m/z 451→282)	牛の筋肉	0.001	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	0	0	0	1960669	1966770	1963719	0.000	○	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	1365	1338	1351	1905992	1931527	1918759	0.001	○	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	1847	1866	1857	1903272	1913993	1908633	0.001	○	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	9343	9250	9296	3751214	3766879	3759047	0.002	○	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	基準値 0.01	< 0.100	面積	5686	5743	5714	1984094	2028536	2006315	0.003	○	
6		鶏卵	0.001	0.02	基準値 0.02	< 0.100	面積	13001	13261	13131	3788925	3708865	3748895	0.004	○	
7		牛の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	9486	9296	9391	208476	213222	210849	0.047	○	
8		牛の脂肪(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	60109	59508	59808	256421	259485	257953	0.302	○	
9		牛の肝臓(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	18340	17973	18157	229146	233838	231492	0.085	○	
10		牛乳(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	9343	9437	9390	219361	215880	217621	0.045	○	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	5686	5629	5657	208157	211340	209749	0.028	○	
12		鶏卵(LOQ)	0.001		定量限界 0.001	< 0.333	面積	13001	12741	12871	231299	233378	232339	0.059	○	

2) 真度及び精度（基準値相当濃度を添加した添加試料の結果）

基準値相当濃度を添加した場合のフィプロニルの真度及び併行精度は、それぞれ 94.6～114.9%及び 0.8～4.1 RSD%であった。また、代謝物 B の真度及び併行精度は、それぞれ 94～101%及び 0.9～5.1 RSD%であった。詳細を表 8-1 及び表 8-2 に示した。フィプロニル及び代謝物 B とともに、全ての検討食品において真度の目標値（70%～120%の範囲内）及び併行精度の目標値（15 RSD%未満）を満足することが確認された。

なお、各試料における回収率は、添加試料で得られたピーク面積値からブランク試料で得られたピーク面積値を差し引いた値から算出した。

表 8-1 真度及び精度の評価結果（フィプロニル）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	フィプロニル (m/z 435→330)	牛の筋肉	0.001	0.5	0.5	—	215808159	16445	0.9998	96	93	99	98	96	96.5	2.2	105211	83756	94483	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	0.5	—	204800149	2119	0.9997	99	100	100	100	101	100.1	0.8	100670	68332	84501	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	0.1	—	212457751	4368	0.9999	93	95	95	95	94	94.6	0.9	99001	75287	87144	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	0.02	—	199126233	89532	0.9997	95	98	101	98	99	98.4	2.1	183401	57580	120491	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	—	206551064	55705	0.9996	107	115	118	117	118	114.9	4.0	112383	56382	84383	
6		鶏卵	0.001	0.02	0.02	—	196246933	100557	0.9992	96	97	100	93	90	95.0	4.1	182515	73039	127777	

表 8-2 真度及び精度の評価結果（代謝物 B）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	代謝物 B (m/z 451→282)	牛の筋肉	0.001	0.5	0.5	—	396812708	2577	0.9996	96	94	96	96	95	95.5	0.9	74308	55080	64694	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	0.5	—	391645200	-1268	0.9999	97	98	99	98	100	98.5	1.2	88130	55541	71835	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	0.1	—	393821896	887	0.9997	94	97	96	94	95	95.2	1.1	80127	57872	69000	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	0.02	—	369156795	165905	0.9996	95	99	100	100	99	98.4	2.2	120185	76410	98297	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	—	363636806	36834	0.9999	98	103	101	100	102	100.7	2.0	79183	56919	68051	
6		鶏卵	0.001	0.02	0.02	—	371602959	171453	0.9998	96	99	98	92	87	94.3	5.1	120873	73179	97026	

3) 定量限界（定量限界相当濃度（0.001 mg/kg）を添加した添加試料の結果）

定量限界相当濃度を添加した場合のフィプロニルの真度、併行精度及び S/N は、それぞれ 86～112%、1.7～7.4 RSD%及び 6628～13613 であった。代謝物 B の真度、併行精度及び S/N は、それぞれ 84～97%、1.0～9.9 RSD%及び 6232～12754 であった。

なお、各試料における回収率は、添加試料で得られたピーク面積値からブランク試料で得られたピーク面積値を差し引いた値から算出した。

詳細を表 9-1 及び表 9-2 に示した。フィプロニル及び代謝物 B とともに、全ての検討食品において真度の目標値（70%～120%の範囲内）及び併行精度の目標値（30 RSD%未満）を満足しており、添加回収試験溶液中のピークは S/N ≥ 10 の目標値を満足することが確認されたことから、0.001 mg/kg の定量限界を設定可能であることが示された。

表 9-1 定量限界の評価結果（フィプロニル）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	フィプロニル (m/z 435→330)	牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	227672846	-454	0.9998	107	104	103	102	106	104.2	2.1	12161	6502	9331	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	211222812	3450	0.9996	101	101	105	103	103	102.4	1.7	8328	4927	6628	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	237190819	-2400	0.9989	113	113	108	112	114	112.0	2.2	13987	9132	11559	
4		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	S/N	225827563	1562	0.9995	86	79	95	81	89	86.2	7.4	9705	7419	8562	
5		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	242483297	-4472	0.9980	109	113	113	114	112	112.3	1.9	16891	10335	13613	
6		鶏卵(LOQ)	0.001		0.001	S/N	221835300	-72	0.9993	95	93	93	97	101	96.0	3.3	15717	7799	11758	

表 9-2 定量限界の評価結果（代謝物 B）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	代謝物 B (m/z 451→282)	牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	396463610	6413	0.9993	90	94	89	86	92	90.2	3.5	7406	6630	7018	
2		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	S/N	400160009	514	0.9998	96	95	98	98	97	96.8	1.0	8384	5789	7087	
3		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	S/N	407256941	3556	0.9984	100	98	92	94	100	96.8	3.8	15588	9920	12754	
4		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	S/N	407859146	5355	0.9986	84	77	97	76	88	84.4	9.9	7132	5331	6232	
5		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	S/N	412686688	773	0.9987	97	97	94	99	96	96.6	1.8	16384	6550	11467	
6		鶏卵(LOQ)	0.001		0.001	S/N	406483791	3762	0.9994	92	93	89	95	93	92.5	2.4	12807	8315	10561	

4. 測定の際の試料マトリックスの影響

フィプロニル及び代謝物 B の基準値濃度及び定量限界濃度での測定の際の試料マトリックスの影響をそれぞれ表 10-1 及び表 10-2 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、フィプロニルでは基準値濃度及び定量限界濃度でそれぞれ 0.95～1.03 及び 1.00～1.08 となった。同様に、代謝物 B では 0.95～1.01 及び 0.98～1.08 となった。以上の結果から、フィプロニル及び代謝物 B とともに、測定の際の試料マトリックスの影響により定量値が大きく変動する可能性は少ないと考えられた。

表 10-1 測定の際の試料マトリックスの影響（フィプロニル）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク	ピーク面積(高さ)						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	フィプロニル (m/z 435→330)	牛の筋肉	0.001	0.5	0.5	0.25	面積	0	1096602	1075722	1086162	1085310	1093606	1089458	1.00	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	0.5	0.25	面積	0	1043313	1038952	1041133	1022913	1026114	1024513	1.02	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	0.1	0.05	面積	0	1023912	1045296	1034604	1060807	1062948	1061877	0.97	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	2084	2094989	2044506	2067663	2072679	2128044	2100361	0.98	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	4262	1117505	1202262	1155621	1107346	1136310	1121828	1.03	
6		鶏卵	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	4482	1981301	1980104	1976221	2101612	2072678	2087145	0.95	
7		牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	2635	116336	120442	115754	114095	116355	115225	1.00	
8		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	2895	114283	116653	112573	108514	109913	109214	1.03	
9		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	1121	119884	124187	120915	113658	121024	117341	1.03	
10		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	2126	117120	117274	115071	114128	111779	112953	1.02	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	4178	124335	130333	123156	113343	115641	114492	1.08	
12		鶏卵(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	4437	120408	120666	116100	108779	112466	110622	1.05	

表 10-2 測定の際の試料マトリックスの影響（代謝物 B）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク	ピーク面積(高さ)						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	代謝物B (m/z 451→282)	牛の筋肉	0.001	0.5	0.5	0.25	面積	0	1960669	1966770	1963719	1958254	1991763	1975009	0.99	50倍希釈して測定
2		牛の脂肪	0.001	0.5	0.5	0.25	面積	1351	1905992	1931527	1917408	1943963	1942642	1943312	0.99	50倍希釈して測定
3		牛の肝臓	0.001	0.1	0.1	0.05	面積	1857	1903272	1913993	1906776	1949720	1976835	1963278	0.97	10倍希釈して測定
4		牛乳	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	9296	3751214	3766879	3749750	3906343	3886469	3896406	0.96	
5		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	5714	1984094	2028536	2000601	1953324	1996467	1974895	1.01	
6		鶏卵	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	13131	3788925	3708865	3735764	3935585	3944240	3939913	0.95	
7		牛の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	9391	208476	213222	201458	200267	205762	203015	0.99	
8		牛の脂肪(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	59808	256421	259485	198145	202705	199878	201291	0.98	
9		牛の肝臓(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	18157	229146	233838	213335	199677	203061	201369	1.06	
10		牛乳(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	9390	219361	215880	208231	202315	202802	202559	1.03	
11		鶏の筋肉(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	5657	208157	211340	204091	200854	198158	199506	1.02	
12		鶏卵(LOQ)	0.001		0.001	0.0005	面積	12871	231299	233378	219468	202622	204246	203434	1.08	

各検討食品におけるフィプロニルの SRM クロマトグラムを図 5、代謝物 B の SRM クロマトグラムを図 6、トータルイオンクロマトグラム（スキャン範囲 m/z 100～600）を図 7 に示した。

[結論]

畜産物中のフィプロニル及び代謝物 B の試験法について検討した。

まず、効率的な検査体制の確立を考慮し、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）の改良法」の適用性について検討したが、食品によっては精確な分析値が得られない可能性があると考えられたことから、新たな試験法の開発について検討した。

抽出法については、上記一斉試験法の抽出操作をそのまま適用可能であったことから、精製操作について検討し、アルミナ（中性）ミニカラムを使用することで、種々の畜産物のマトリックスを効果的且つ効率的に除去可能であることが確認された。また、LC-MS/MS 測定における移動相として 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（pH 9）及びアセトニトリルを用いることにより、繰り返し測定においても安定した測定値が得られることが確認された。

開発した方法を用い、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵を対象に添加回収試験（添加濃度：各検討食品における基準値相当濃度及び 0.001 mg/kg）を実施した結果、

- ・選択性

検討した全ての食品においてフィプロニル及び代謝物 B の残留が示唆されたものの、選択性に問題は無いことが確認された。

- ・真度及び併行精度

検討した全ての食品において、フィプロニル及び代謝物 B とともに真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・定量限界

添加濃度 0.001 mg/kg の添加試料を用いた添加回収試験において、フィプロニル及び代謝物 B とともに、真度、併行精度及びピークの S/N の目標値を満足したことから、定量限界は 0.001 mg/kg に設定可能であると考えられた。

以上の結果から、畜産物中のフィプロニル及び代謝物 B の試験法として、開発した方法を適用可能（定量限界は 0.001 mg/kg）であると判断された。

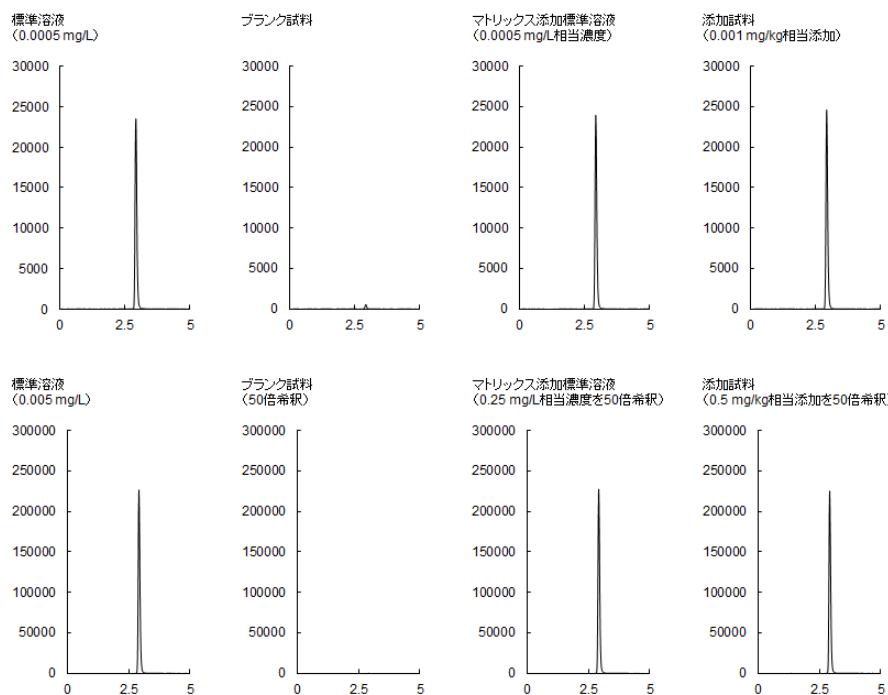


図 5-1 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
牛の筋肉（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

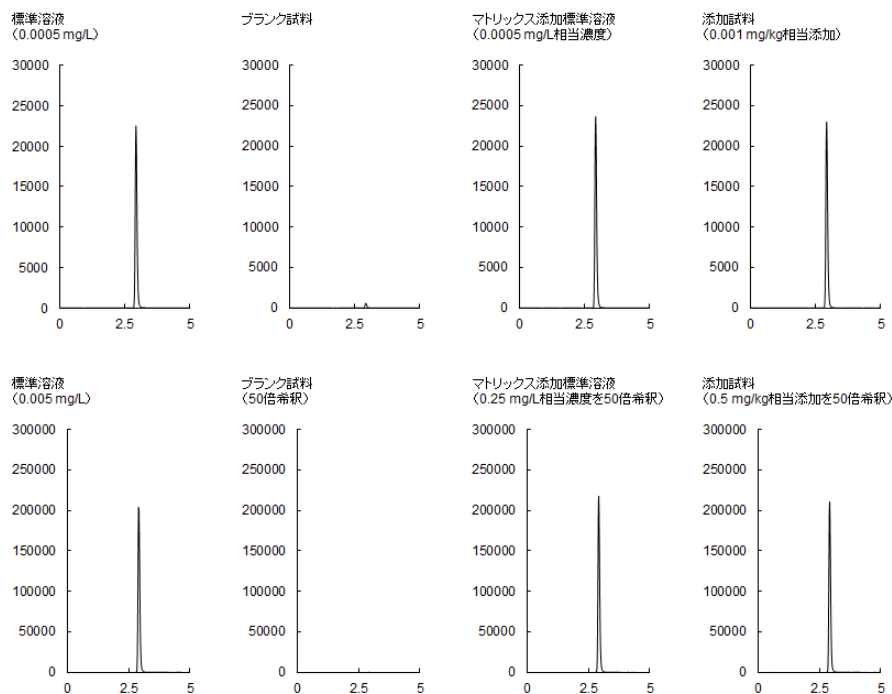


図 5-2 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
牛の脂肪（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

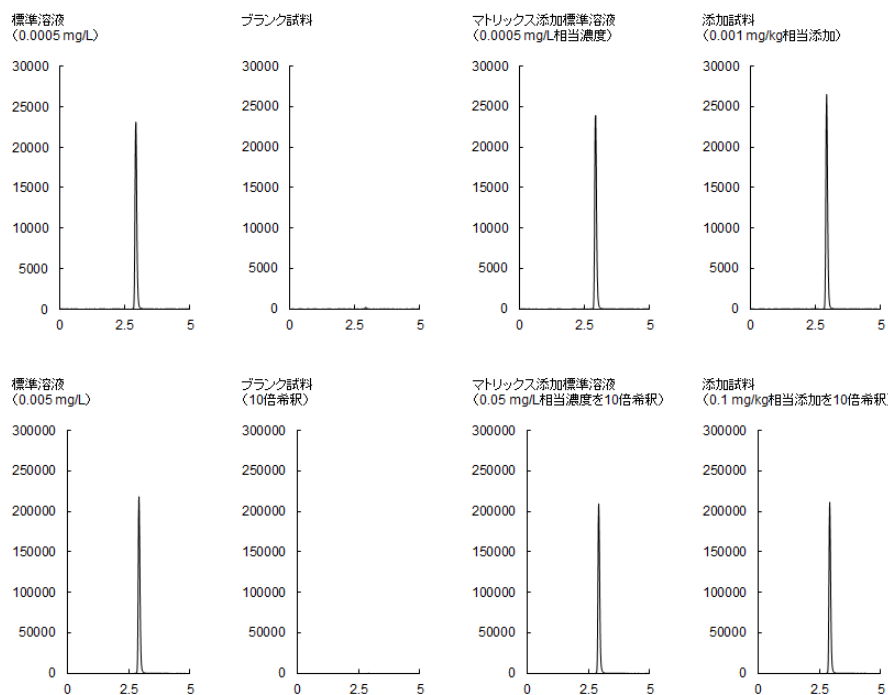


図 5-3 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
牛の肝臓（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

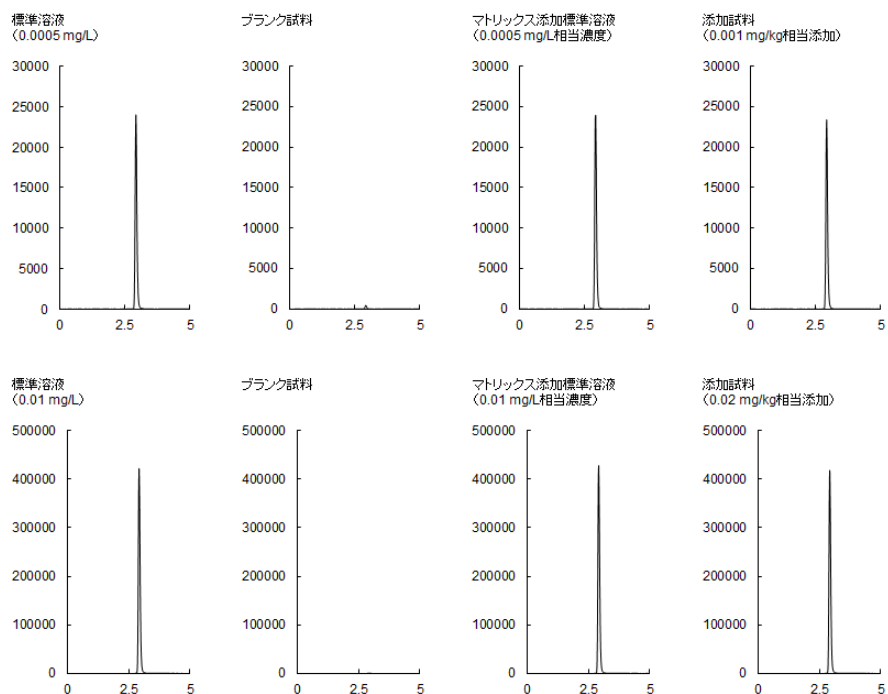


図 5-4 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
牛乳（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

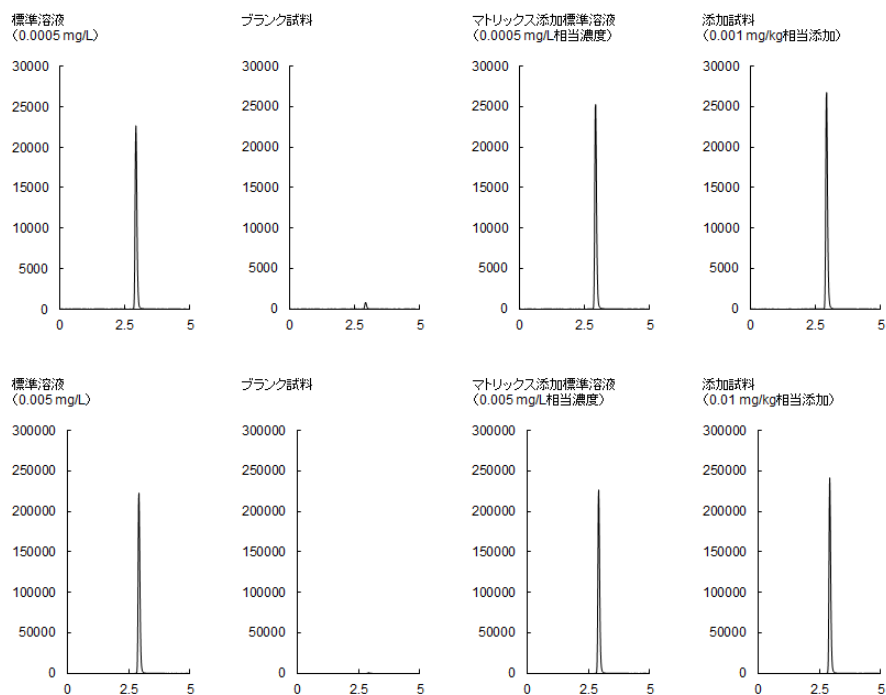


図 5-5 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
鶏の筋肉（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

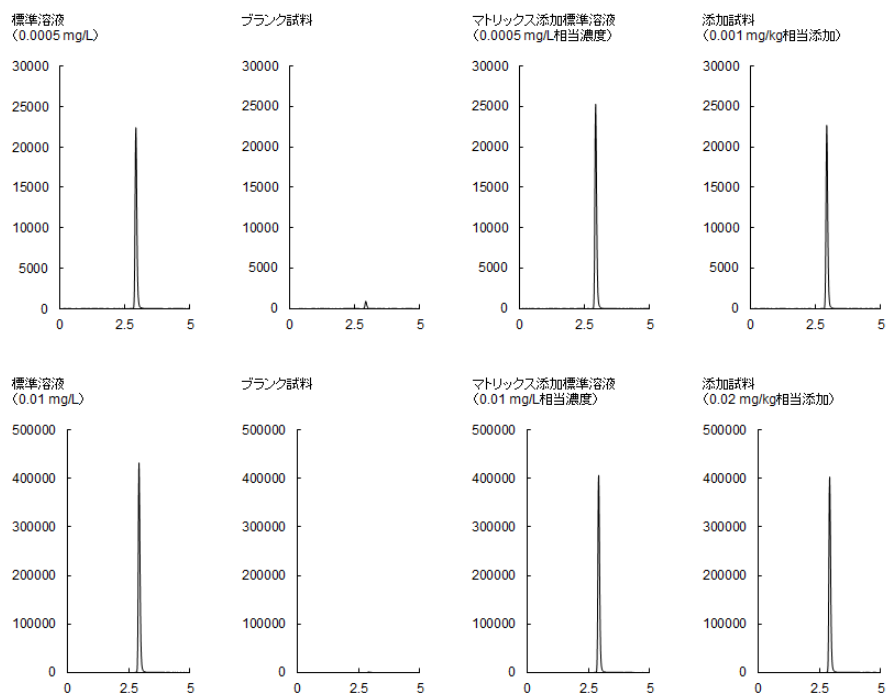


図 5-6 フィプロニル（測定イオン m/z 435→330）の SRM クロマトグラム
鶏卵（上段：定量限界相当濃度、下段：基準値相当濃度）

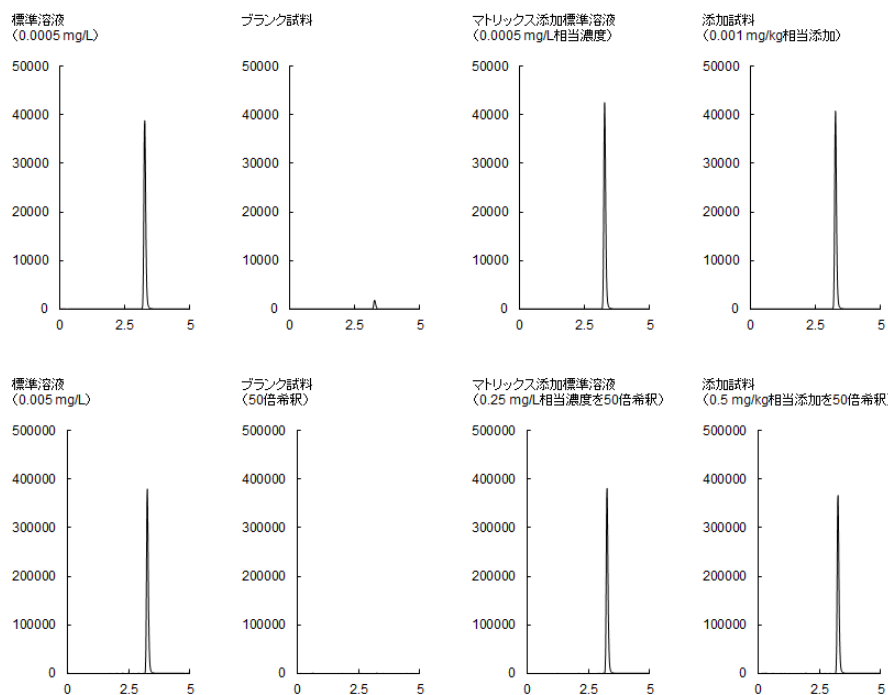


図 6-1 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
牛の筋肉 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

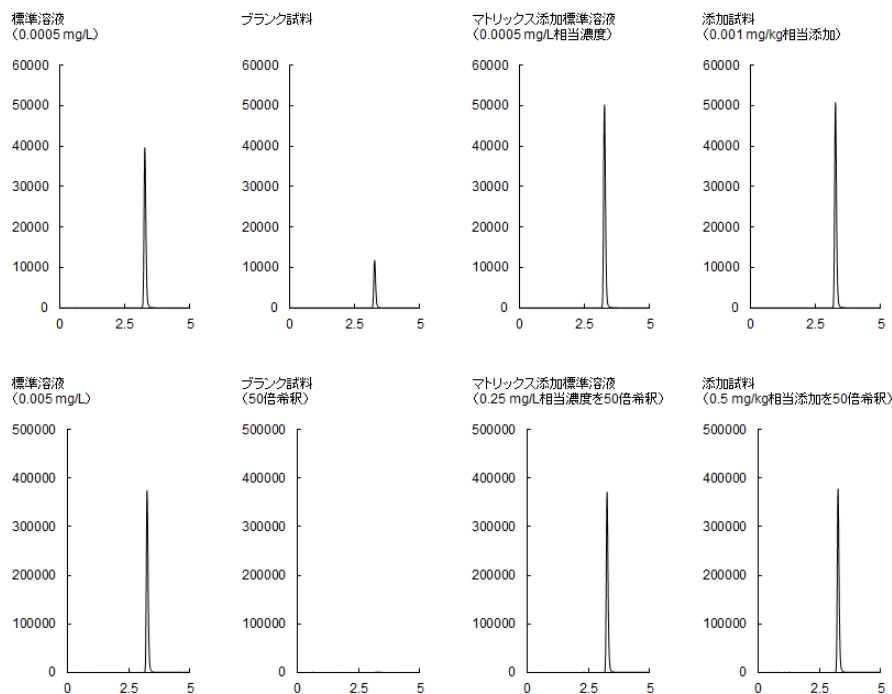


図 6-2 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
牛の脂肪 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

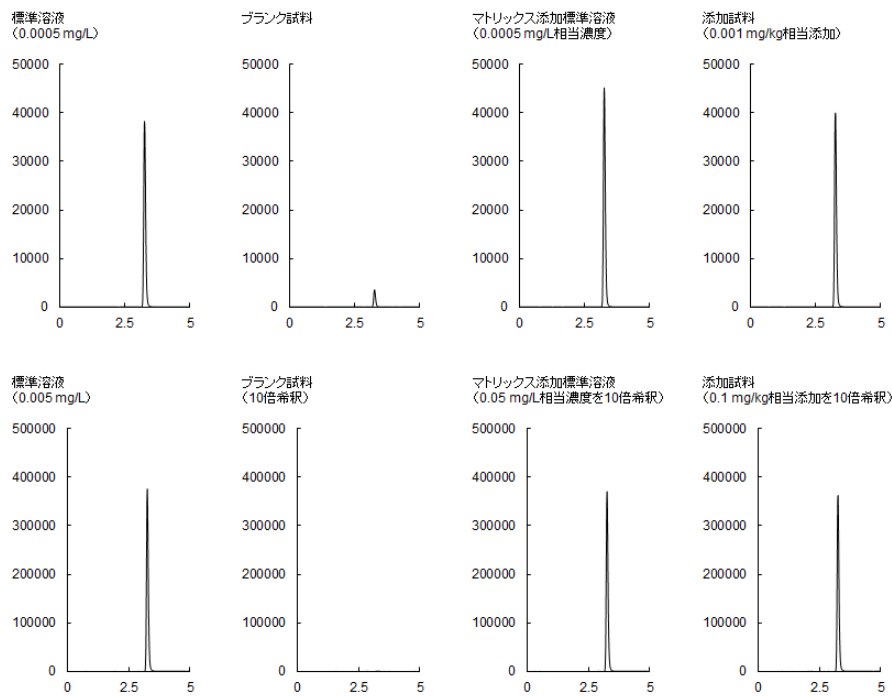


図 6-3 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
牛の肝臓 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

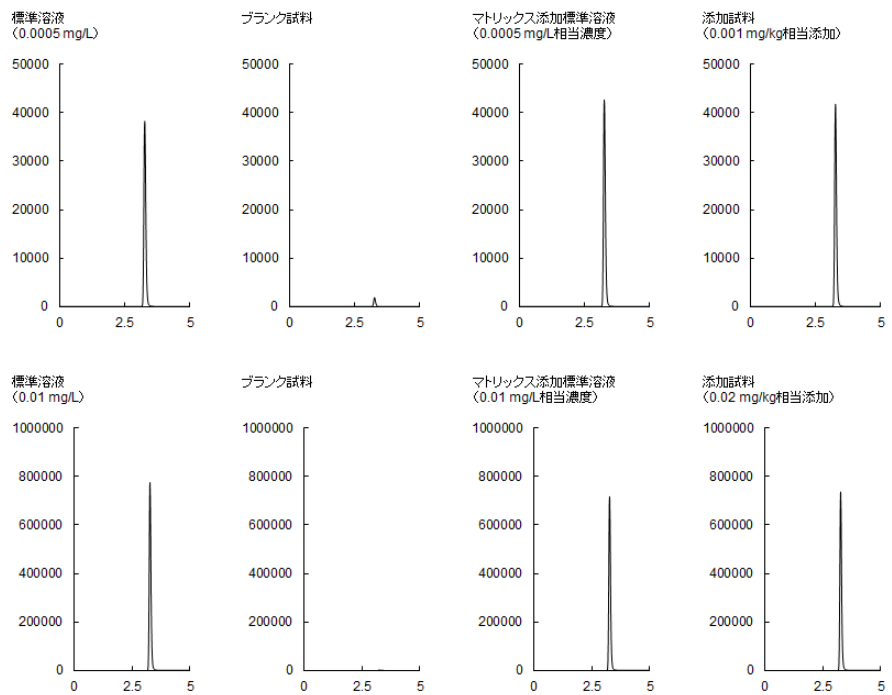


図 6-4 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
牛乳 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

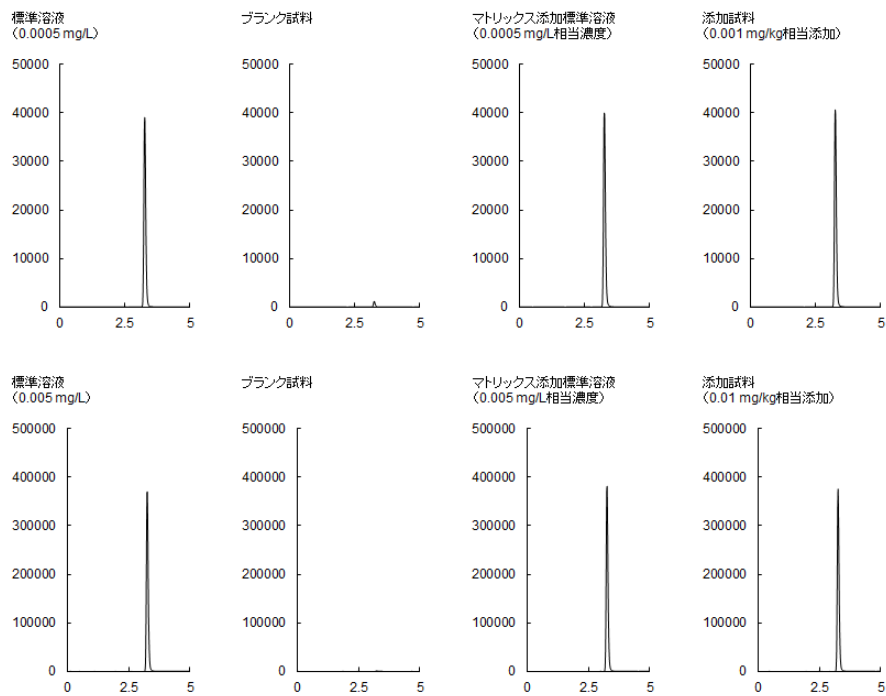


図 6-5 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
鶏の筋肉 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

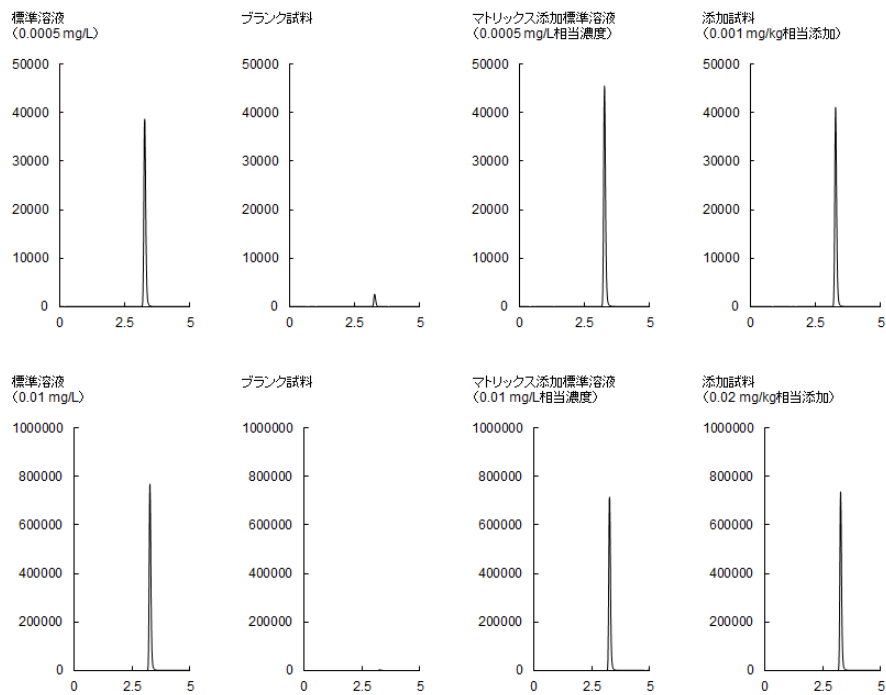


図 6-6 代謝物 B (測定イオン m/z 451→282) の SRM クロマトグラム
鶏卵 (上段: 定量限界相当濃度、下段: 基準値相当濃度)

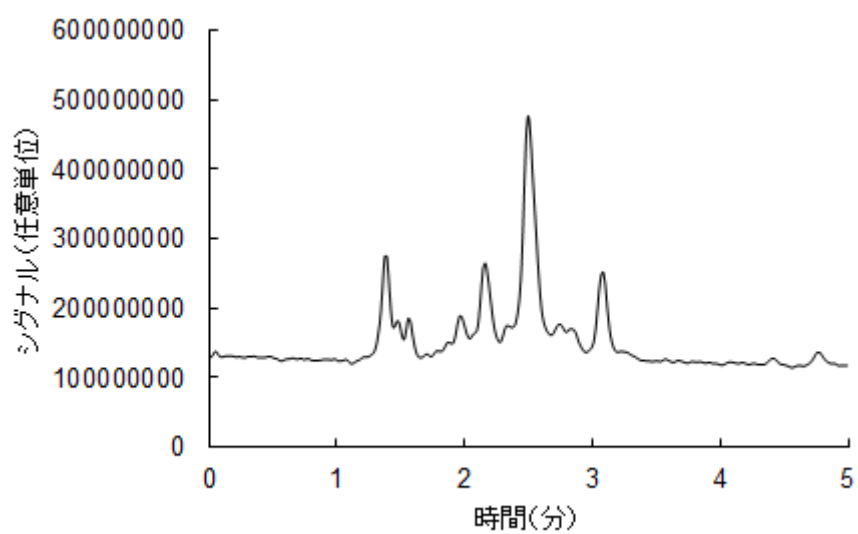


図 7-1 トータルイオンクロマトグラム (牛の筋肉)

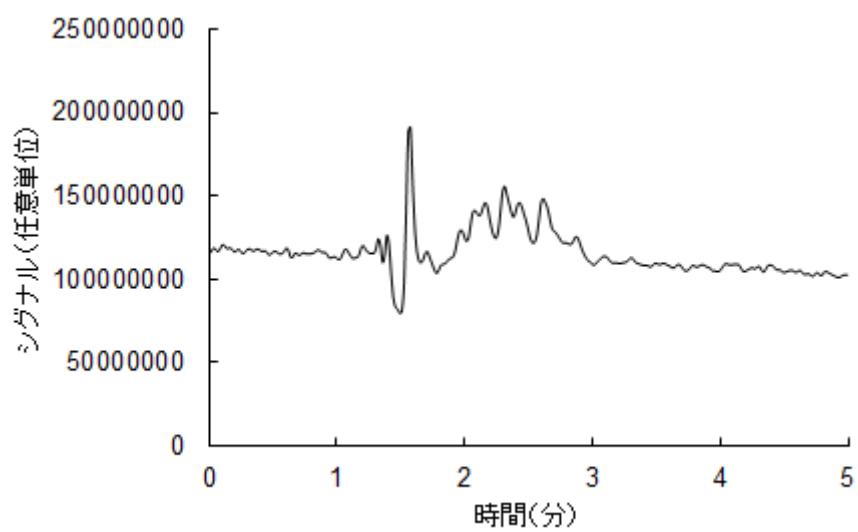


図 7-2 トータルイオンクロマトグラム (牛の脂肪)

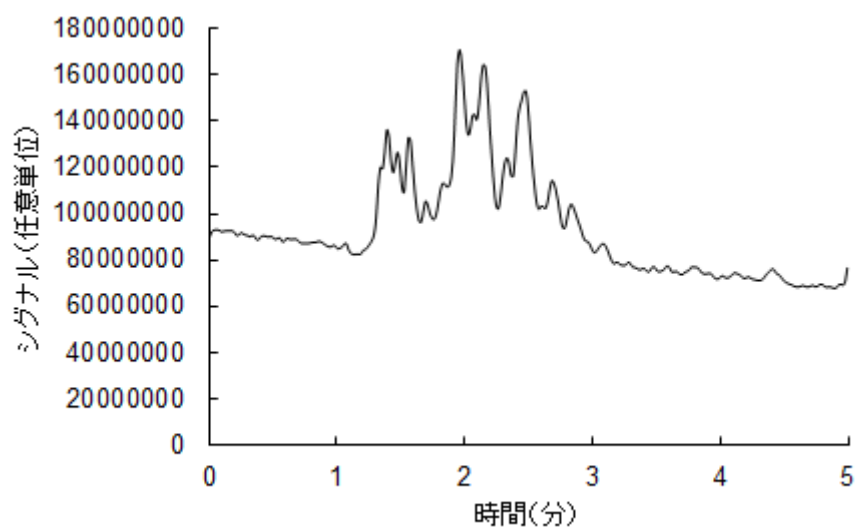


図 7-3 トータルイオンクロマトグラム (牛の肝臓)

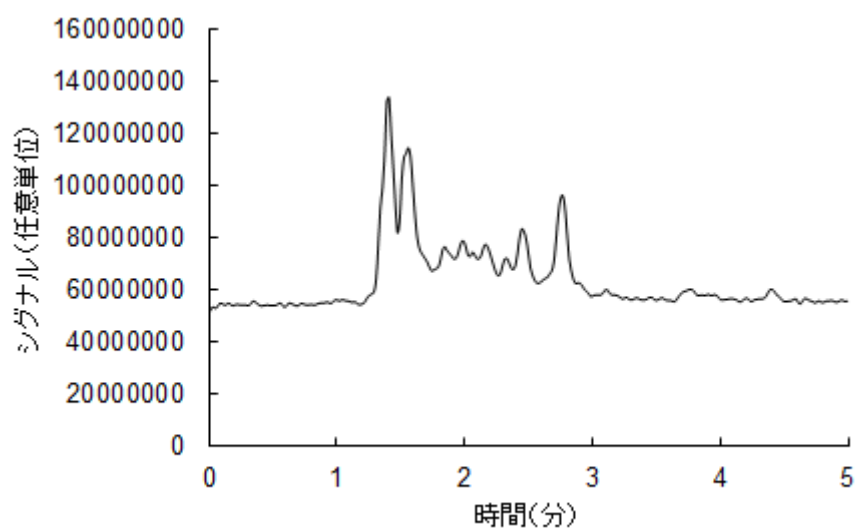


図 7-4 トータルイオンクロマトグラム (牛乳)

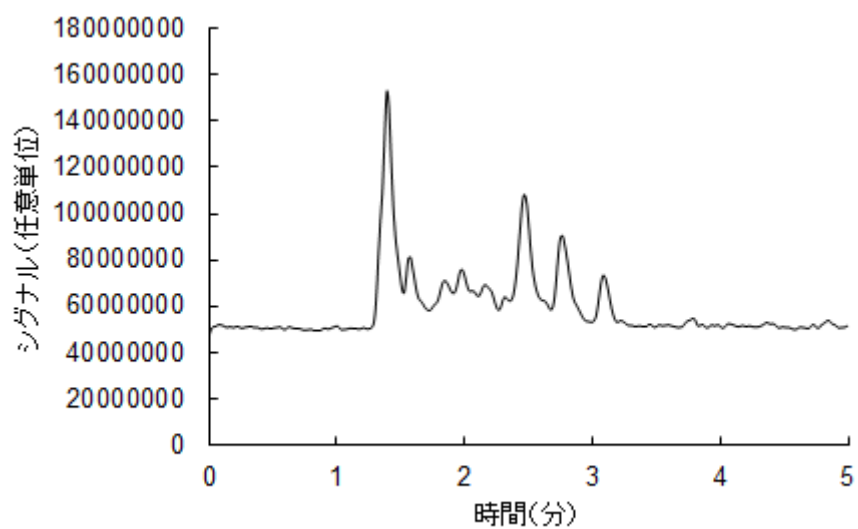


図 7-5 トータルイオンクロマトグラム (鶏の筋肉)

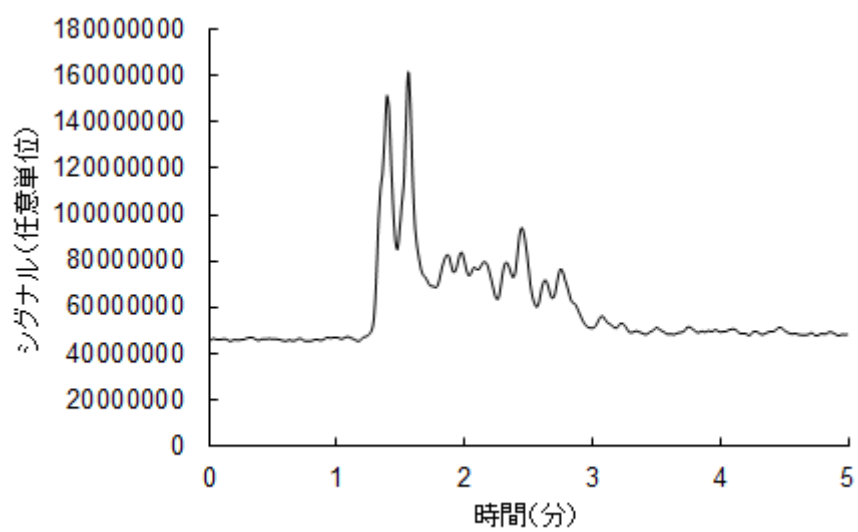


図 7-6 トータルイオンクロマトグラム (鶏卵)