

## フェンピロキシメート試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

- ・フェンピロキシメート
- ・ 1-hydroxymethyl-1-methylethyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-yl)methyleneamino-oxy)-*p*-toluate（代謝物G2）
- ・ (*E*)-4-[(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-yl) methyleneamino-oxy)methyl] benzoic acid（代謝物M-3）

### 2. 装置

- 筋肉、乳、脂肪：高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）  
肝臓、腎臓：液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）

### 3. 試薬、試液

酢酸	:	HPLC用
アセトン	:	HPLC用
アセトニトリル	:	HPLC用
アンモニア水	:	A.C.S.グレード
ジエチルエーテル	:	A.C.S.グレード
酢酸エチル	:	HPLC用
ヘキサン	:	HPLC用
シクロヘキサン	:	HPLC用
塩酸	:	A.C.S.グレード
メタノール	:	HPLC用
水酸化カリウム	:	A.C.S.グレード
炭酸ナトリウム	:	A.C.S.グレード
塩化ナトリウム	:	A.C.S.グレード
無水硫酸ナトリウム	:	A.C.S.グレード
水	:	脱イオン水またはHPLC用
分析対象化合物	:	分析用標準品
その他の試薬	:	特級
シリカゲルミニカラム	:	Mega Bond Elut SI 1 g/6 mL（Agilent Technologies Inc. 製） Mega Bond Elut SI 2 g/12 mL（Agilent Technologies Inc. 製）

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 筋肉の場合

試料20 gにアセトン100 mL及びセライト6-8 gを加え1分間磨砕・均一化し、ろ過する。ろ紙上の残渣をアセトン/水（2：1）混液80 mLにて

1分間抽出しろ過する（2回行う）。全ての濾液を合一し、濃塩酸1 mLを加えて酸性化し、アセトン进行留去する。濃縮残渣を分液漏斗に移し、酢酸エチル50 mL及び必要に応じて塩化ナトリウム4 gを入れて分配し、酢酸エチル層を採る（3回行う）。得られた酢酸エチル層を分液漏斗に移し、0.1 mol/L炭酸ナトリウム水溶液25 mLを加え分配する（3回行う）。

#### フェンピロキシメート及び代謝物G2

①の酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム10-20 gを載せた漏斗に通す。分液漏斗を酢酸エチル20 mLですすぎ、同様に漏斗に通す。全ての濾液を合一し、濃縮乾固する。濃縮残渣をジエチルエーテル3 mLにて洗い込みながら試験管に移す（3回行う）。40°C以上の水浴上で油状になるまで濃縮する。油状の残留物にアセトニトリル1 mLを加えて振とうし、アセトニトリル層を回収、試験管に移す（4回行う）。濃縮乾固し、ヘキサン/ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解し、2）の精製に供する。

#### 代謝物M3

①の炭酸ナトリウム水溶液層に濃塩酸1 mLを加えpH 1程度に調整する。酢酸エチル50 mLを加え分配する（2回行う）。酢酸エチル層を採り、無水硫酸ナトリウム10-20 gを載せた漏斗に通す。分液漏斗を酢酸エチル10 mLですすぎ、同様に漏斗に通す。全ての濾液を合一し、濃縮乾固する。濃縮残渣をジエチルエーテル3 mLにて洗い込みながら試験管に移す（3回行う）。3）の誘導体化に供する。

#### ② 乳の場合

乳試料100 g（97 mL）にアセトン200 mLを加え振とうし、2500 rpmで10分間遠心分離し、上清を採る。残渣にアセトン/水（2：1）混液80 mLを加え振とうし、2500 rpmで10分間遠心分離し、上清を採る。全てのの上清を合一し、濃塩酸1 mLを加え酸性化、アセトンを留去する。濃縮残渣を分液漏斗に移し、酢酸エチル50 mL及び必要に応じて塩化ナトリウム4 gを入れ分配、酢酸エチル層を採る（3回行う）。得られた酢酸エチル層を分液漏斗に移し、0.1 mol/L炭酸ナトリウム水溶液25 mLを加え分配する（3回行う）。

#### フェンピロキシメート及び代謝物G2

②の酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウム1-2 gを入れ、その後無水硫酸ナトリウム5-10 gを載せた漏斗に通す。分液漏斗を酢酸エチル20 mLですすぎ、同様に漏斗に通す。全ての濾液を合一し、濃縮乾固する。濃縮残渣をジエチルエーテル3 mLにて洗い込みながら試験管に移す（3回行う）。40°C以上の水浴上で油状になるまで濃縮する。油状の残留物にアセトニトリル1 mLを加えて振とうし、アセトニトリル層を回収、

試験管に移す（4回行う）。濃縮乾固し、ヘキサン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解し、2）の精製に供する。

### ③ 脂肪の場合

試料20 gにアセトニトリル100 mLを加え、10分間振とう、2500 rpmで10分間遠心分離し、上清を採る（2回行う）。全ての上清を合一し濃縮乾固、濃縮残渣をヘキサン5 mLで洗い込みながら分析漏斗に移す（4回行う）。炭酸ナトリウム水またはアンモニア水（0.1mol/L）10 mLを入れ振とうし、ヘキサン層と水層を分離する（2回行う）。

#### フェンピロキシメート及び代謝物G2

③のヘキサン層を合一し、濃縮乾固する。濃縮残渣をジエチルエーテル3 mLにて試験管に移す（3回行う）。油状になるまで濃縮し、油状の残留物にアセトニトリル1 mLを加えて振とうし、アセトニトリル層を回収、試験管に移す（4回行う）。濃縮乾固、ヘキサン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解し、2）の精製に供する。

#### 代謝物M3

③の水層に濃塩酸を加えpH1程度に調整し酢酸エチル20 mLを加え分配する（2回行う）。酢酸エチル層を採取し、無水硫酸ナトリウム5 gを載せた漏斗に通す。分液漏斗を酢酸エチル20 mLですすぎ、同様に漏斗に通す。全ての濾液を合一し、濃縮乾固する。濃縮残渣をジエチルエーテル3 mLにて洗い込みながら試験管に移す（2回行う）。1 mL程度になるまで濃縮し、3）の誘導体化に供する。

### ④ 肝臓及び腎臓の場合

#### フェンピロキシメート、代謝物G2及び代謝物M3

試料5 gにアセトニトリル及び水（8：2）混液75 mLを加え、磨砕・均一化する。遠心分離し、上清を採る（2回行う）。得られた上清を合一する。上清の5分の2を分液漏斗に採取し、酢酸0.5 mLを加えて酸性化（pH 4程度）する。塩化ナトリウム4 gを入れ分配し、上層（アセトニトリル層）を採取する。下層にアセトニトリル20 mLを加え分配し、上層を採取する。得られた上層を合一、濃縮乾固する。濃縮残渣を酢酸エチル5 mLに溶解し、塩化ナトリウム／硫酸ナトリウム（1：1）混合物3.5 gを添加する。シクロヘキサン5 mLを加え、シリンジフィルターでろ過する。これを2）の精製に供する。

## 2) 精製

### ① 筋肉の場合

シリカゲルミニカラム（SIミニカラム）による精製

#### フェンピロキシメート及び代謝物G2

SIミニカラム (2 g/12 mL) にヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入し、前処理する。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ジエチルエーテル15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去し、3) の加水分解及び誘導体化に供する。

3) の加水分解及び誘導体化後の溶液は、ヘキサン及びジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入して前処理したSIミニカラム (1 g/6 mL) に注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入し、溶出液は捨てる (3回行う)。その後ヘキサン/ジエチルエーテル (1 : 1) 混液5 mLを注入し、溶出液を回収する (3回行う)。溶出液から溶媒を留去、アセトン1 mLに溶解したものを試験溶液とし、GC/NPD分析に供する。

### 代謝物M3

3) の加水分解及び誘導体化後の溶液は、ヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入して前処理したSIミニカラム (1 g/6 mL) に注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ヘキサン/ジエチルエーテル (1 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去、アセトン1 mLに溶解したものを試験溶液とし、GC/NPD分析に供する。

## ② 乳の場合

シリカゲルミニカラム (SIミニカラム) による精製

### フェンピロキシメート及び代謝物G2

SIミニカラム (2 g/12 mL) にヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入し、前処理する。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ジエチルエーテル15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去し、3) の加水分解及び誘導体化に供する。

3) の加水分解及び誘導体化後の溶液は、ヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入して前処理したSIミニカラム (1 g/6 mL) に注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ヘキサン/ジエチルエーテル (1 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去、アセトン1 mLに溶解したものを試験溶液とし、GC/NPD分析に供する。

③ 脂肪の場合

シリカゲルミニカラム (SIミニカラム) による精製

フェンピロキシメート及び代謝物G2

SIミニカラム (2 g/12 mL) にヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入し、前処理する。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ジエチルエーテル15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去し、3) の加水分解及び誘導体化に供する。

代謝物M3

SIミニカラム (1 g/6 mL) にヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液5 mLを注入し、前処理する。このカラムに3) で得られた溶液を注入し、溶出液は捨てる。次いでヘキサン/ジエチルエーテル (9 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液は捨てる。その後ヘキサン/ジエチルエーテル (1 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を回収する。溶出液から溶媒を留去する。アセトン1 mLに溶解したものを試験溶液としGC/NPD分析に供する。

④ 肝臓及び腎臓の場合

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) による精製

フェンピロキシメート、代謝物G2及び代謝物M3

GPCに1) で得られた溶液5 mLを注入し、以下の条件で溶離液を流す。

担体 : Bio-Beads S-X3

溶離液 : 酢酸エチル/シクロヘキサン (1 : 1)

流速 : 5 mL/分

19-32分の溶離液を採取し、濃縮乾固したものを3) の誘導体化に供する。

3) 誘導体化、加水分解など

① 筋肉の場合

フェンピロキシメート及び代謝物G2

2) で得られた濃縮残渣をメタノール1 mLに溶解し、2 mol/L水酸化カリウム水溶液1 mLを加え混合、60°Cの水浴で2時間加温する。1 mL未満になるまで溶媒を留去し、水2 mLを加える。ヘキサンを加えて分配し、ヘキサン層を捨てる (ヘキサン4 mLで1回、2 mLで1回行う)。濃塩酸を加えpH1程度に調整し、ジエチルエーテル2 mLにて分配する (3回行う)。有機層を試験管に移す。ここに過剰量のジアゾメタン (ジエチルエーテル溶液) を加え、10分間室温で静置する。溶媒を留去し、ヘキ



サン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解する。2）の精製に供する。

#### 代謝物M3

1）で得られた溶液に酸性メタノール（0.1%酢酸含有メタノール）100  $\mu$ L及び過剰量のジアゾメタン（ジエチルエーテル溶液）を加え、10分間室温で静置する。溶媒を留去し、ヘキサン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解する。2）の精製に供する。

#### ② 乳の場合

##### フェンピロキシメート及び代謝物G2

2）で得られた濃縮残渣をメタノール1 mLに溶解し、2 mol/L水酸化カリウム水溶液1 mLを加え混合、60°Cの水浴で2時間加温する。1 mL未満になるまで溶媒を留去し、水2 mLを加える。ヘキサン2 mLを加えて分配し、ヘキサン層を捨てる（2回行う）。濃塩酸を加えpH 1程度に調整し、ジエチルエーテル2 mLにて分配する（3回行う）。有機層を試験管に移す。ここに酸性メタノール（0.1%酢酸含有メタノール）100  $\mu$ L及び過剰量のジアゾメタン（ジエチルエーテル溶液）を添加、10分間室温で静置する。溶媒を留去し、ヘキサン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解する。2）の精製に供する。

#### ③ 脂肪の場合

##### フェンピロキシメート及び代謝物G2

2）で得られた濃縮残渣をメタノール1 mLに溶解し、2 mol/L水酸化カリウム水溶液1 mLを加え混合、60°Cの水浴で2時間加温する。1 mL未満になるまで溶媒を留去し、水1-2 mLを加える。ヘキサン2 mLを加えて分配し、ヘキサン層を捨てる（2回行う）。濃塩酸を加えpH 1程度に調整し、ジエチルエーテル2 mLにて分配する（3回行う）。有機層を試験管に移す。1 mL程度になるまで濃縮し、酸性メタノール（0.1%酢酸含有メタノール）100  $\mu$ L及びジアゾメタン（ジエチルエーテル溶液）2 mLを添加、10分間室温で静置する。溶媒を留去し、アセトン1 mLに溶解したものを試験溶液としGC分析に供する。

#### 代謝物M3

1）で得られた濃縮残渣に酸性メタノール（0.1%酢酸含有メタノール）100  $\mu$ L及びジアゾメタン（ジエチルエーテル溶液）2 mLを加え、10分間室温で静置する。溶媒を留去し、ヘキサン／ジエチルエーテル（9：1）混液5 mLに溶解する。2）の精製に供する。

#### ④ 肝臓及び腎臓の場合

##### フェンピロキシメート、代謝物G2及び代謝物M3

2) で得られたGPC精製後の濃縮残渣にジエチルエーテル1 mL及びジアゾメタン (ジエチルエーテル溶液) 4 mLを加え、1時間室温で静置する。窒素気流下溶媒を除去し、アセトニトリル1 mLに溶解したものを試験溶液としLC-MS/MS分析に供する。

## 5. 検量線の作成

### 筋肉、乳、脂肪

代謝物M-3標準品をアセトンに溶解し、過剰量のジアゾメタン (ジエチルエーテル溶液) を添加し、室温にて10分静置する。その後窒素気流下濃縮乾固し、一定量のクロロホルムに溶解する。溶液をTLCプレートに塗布、クロロホルム/メタノール (9 : 1) 混合液にて展開し、該当部分のシリカゲルをかきとり、アセトニトリル15 mLにて3回抽出、抽出液を濃縮乾固する。得られたサンプルを秤量し、アセトンに溶解、1.0 mg/mLの標準溶液を調製する。それをさらにアセトンにて希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれGC/NPDに注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

### 肝臓、腎臓

フェンピロキシメート標準品をアセトニトリルに溶解し、1.0 mg/mLの標準溶液を調製する。これをさらにアセトニトリルで希釈して検量線用の標準液を数点調製し、LC-MS/MSに注入、ピーク面積法で検量線を作成する。

代謝物M-3標準品をアセトニトリルに溶解し、1.0 mg/mLの標準溶液を調製する。これを0.010, 0.1及び1.0 ng/ $\mu$ LになるようにGPC精製後の無処理区試料溶液に添加、ジアゾメタン (ジエチルエーテル溶液) を添加し、室温にて10分静置する。メチル化後アセトニトリルで定容する。順次希釈して検量線用の標準液を数点調製し、LC-MS/MSに注入、ピーク面積法で検量線を作成する。

## 6. 定量

試験溶液をGC/NPDまたはLC-MS/MSに注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

## 7. 測定条件

### GC/NPD

装置	:	Model No. 5890 Hewlett Packard Gas Chromatograph Injector Type: HP7673 and 6890 Autosampler Detector Type: Nitrogen/Phosphorus
カラム	:	J&W Scientific DB-5 Fused Silica Capillary Column (15 mm $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 $\mu$ m film thickness Western Analytical製)
注入口温度	:	240 °C

検出器温度 : 300 °C  
 オープン温度 : 代謝物M-3のメチル化物  
 初期 204 °C、5分  
 204 °C-4 °C/分-228 °C (5分) -30 °C/分-280 °Cまたは  
 320 °C (5分)  
 ガス流量 : キャリアガス (ヘリウム) 15 mL/min  
 メイクアップガス (水素) 3 mL/min  
 メイクアップガス (空気) 100 mL/min  
 注入量 : 2 µL  
 保持時間の目安 : 代謝物M-3のメチル化物 ; 7-8分  
 検出器 : 窒素リン検出器

#### LC-MS/MS

装置 : Finnigan LCQ Ion Trap LC/MS  
 カラム : Merck LiChroCart 125-3 Purosphere RP-18 endcapped (5 µm), 125 mm, 3 mm, i,d.  
 移動相 : A) 0.1%ギ酸含有水  
 B) アセトニトリル

グラジエント  
 条件 :

時間 (分)	%A	%B	グラジエント
0	60	40	リニアグラジ エント
20	10	90	
20-23	10	90	保持
23-25	60	40	保持

注入量 : 20 µL  
 流速 : 0.5 mL/min.  
 Full scan MS : APCI-MS (正イオン検出)  
 Full scan mode : Mass range 100 to 500 m/z

モニタリング  
 イオン :

	プレカーサーイ オン (m/z)	プロダクトイオ ン(m/z)
代謝物M-3 メチル化物	380	231, 215, 214
フェンピロ キシメート	422	366

保持時間の目安 : M-3 methyl ester : ~13.0 min  
 Fenpyroximate : ~18.4 min

#### 8. 定量限界

フェンピロキシメート、代謝物G2、代謝物M-3  
 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓 0.01 mg/kg



乳

0.005 mg/kg

9. 留意事項

水産物は、畜産物の分析法を参考にして適宜改良して実施すること

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。