

※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。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

フェンピロキシメート試験法（畜産物）

フェンピロキシメート試験法（畜産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

フェンピロキシメートは、日本農薬株式会社により開発されたフェノキシピラゾール系殺虫剤（殺ダニ剤）であり、ミトコンドリア電子伝達系の阻害により殺ダニ作用を示す。米国、豪州、ニュージーランド、EU 等において登録されている。国内では 1991 年に初回農薬登録されており、ポジティブリスト制度導入に伴う暫定基準が設定されている。

今般、農薬取締法に基づく適用拡大申請に伴う基準値設定依頼が農林水産省からなされたこと及び関連企業から「国内外で使用される農薬等に係る残留基準の設定及び改正に関する指針について」に基づく残留基準の設定要請がなされたことに伴い、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基準値が見直された。

本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜産物中のフェンピロキシメート試験法の開発を行った。

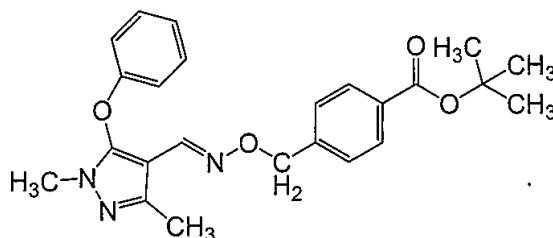
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：フェンピロキシメート

IUPAC 名

tert-Butyl(*E*)-4-[[[(1, 3-dimethyl-5-phenoxy-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene]amino}oxy)methyl]benzoate

構造式：



分子式：C₂₄H₂₇N₃O₄

分子量：421.49

溶解度：水 1.5×10⁻⁵ g/L (20℃, pH 7.5)、メタノール 15 g/L (25℃)、アセトン 150 g/L (25℃)、ジクロロメタン 1307 g/L (25℃)、クロロホルム 1197 g/L (25℃)、テトラヒドロフラン 737 g/L (25℃)

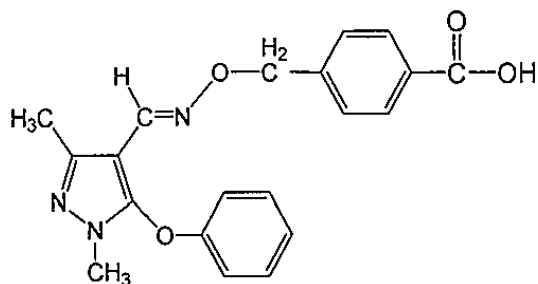
分配係数：log₁₀P_{ow}=5.01 (25℃)

分析対象化合物：代謝物 D

IUPAC 名

(*E*)-4-[[[(1, 3-dimethyl-5-phenoxy-1*H*-pyrazol-4-yl)methylene] amino}oxy)methyl]benzoic acid

構造式：



分子式：C₂₀H₁₉N₃O₄

分子量：365.38

出典： The Pesticide Manual 12th edition, British Crop Protection Council

3. 基準値（生食発 1122 第 1 号（令和 4 年 11 月 22 日））

畜産物にあつてはフェンピロキシメート及び代謝物 D をフェンピロキシメートに換算したものの和とする。

食品名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.2
豚の筋肉	0.2
その他陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.2
牛の脂肪	0.2
豚の脂肪	0.2
その他陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.2
牛の肝臓	0.8
豚の肝臓	0.8
その他陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.8
牛の腎臓	0.8
豚の腎臓	0.8
その他陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.8
牛の食用部分	0.8
豚の食用部分	0.8
その他陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.8
乳	0.01

[実験方法]

1. 試料

東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に示した。

1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

3) 牛の肝臓

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

4) 牛乳

よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

フェンピロキシメート標準品：純度 99.8%（富士フイルム和光純薬製）

代謝物 D 標準品：純度 99.2%（富士フイルム和光純薬製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：LC/MS 用（関東化学製）

アセトン：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

ギ酸：LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）

n-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

水：超純水装置 Milli-Q Integral 5（メルク製）で精製したもの

ミニカラム：InertSep SAX（500 mg/6 mL）（ジューエルサイエンス製）

標準原液

フェンピロキシメート標準品 10.0 mg を精秤し、アセトンに溶解して正確に 50 mL とし、フェンピロキシメート 200 mg/L 溶液を調製した。

代謝物 D 標準品 8.7 mg を精秤し、アセトンに溶解して正確に 50 mL とし、代謝物 D 200 mg/L 溶液（フェンピロキシメート換算）を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、0.000025~0.00015 mg/L（定量限界相当濃度）及び 0.0001~0.0006 mg/L（基準値相当濃度）の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液

① 定量限界値相当濃度（添加濃度 0.005 ppm）

フェンピロキシメート及び代謝物 D 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、0.05 mg/L の溶液を調製した。

② 基準値相当濃度

a. 牛の筋肉及び脂肪（添加濃度 0.2 ppm）

フェンピロキシメート及び代謝物 D 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、2 mg/L の溶液を調製した。

b. 牛の肝臓（添加濃度 0.8 ppm）

フェンピロキシメート及び代謝物 D 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、8 mg/L の溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスパーサー PB-95（シャフト：HG-2）（SMT COMPANY 製）

フードプロセッサー：MK-K58（パナソニック製）

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703（BUCHI 製）

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930（久保田商事製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	8060	島津製作所
LC	Prominence	島津製作所
データ処理	LC solution	島津製作所

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																					
カラム	Inertsil ODS-3（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : GL サイエンス製）																				
移動相流速（mL/min）	0.20																				
注入量（μL）	5																				
カラム温度（℃）	40																				
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸 B 液：アセトニトリル																				
グラジエント条件	<table><tr><td>時間（分）</td><td>A 液（%）</td><td>B 液（%）</td></tr><tr><td>0.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10.0</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>20.0</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>20.5</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>30.0</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>			時間（分）	A 液（%）	B 液（%）	0.0	90	10	10.0	10	90	20.0	10	90	20.5	90	10	30.0	90	10
時間（分）	A 液（%）	B 液（%）																			
0.0	90	10																			
10.0	10	90																			
20.0	10	90																			
20.5	90	10																			
30.0	90	10																			
MS 条件																					

測定モード	SRM（選択反応モニタリング）
イオン化モード	ESI（＋）
キャピラリー電圧（V）	4500
脱溶媒温度（℃）	600
ネブライザーガス	窒素、80 psi
脱溶媒ガス	窒素、60 psi
コリジョンガス	窒素
定量イオン（ m/z ）	フェンピロキシメート：422.0→366.1 [CE：25（eV）] 代謝物 D：366.0→137.9 [CE：37（eV）]
定性イオン（ m/z ）	フェンピロキシメート：422.0→138.0 [CE：41（eV）] 代謝物 D：366.0→77.0 [CE：105（eV）]
保持時間	フェンピロキシメート：13.4 分 代謝物 D：9.8 分

CE：Collision Energy

5. 定量

フェンピロキシメート及び代謝物 D 標準原液をアセトニトリルで希釈して 0.000025~0.00015 mg/L（定量限界値相当濃度添加回収試験用）及び 0.0001~0.0006 mg/L（基準値相当濃度添加回収試験用）の標準溶液を調製した。この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のフェンピロキシメート及び代謝物 D の含量を算出した。

6. 試験溶液の調製

1) 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL（アセトン溶液）を添加しよく混合した後、30 分間放置した。牛の脂肪の場合は、試料 10.0 g を 40℃で加温して融解し、添加用標準溶液 1 mL（アセトン溶液）を添加しよく混合した後、再凝固してから 30 分間放置した。

2) 抽出

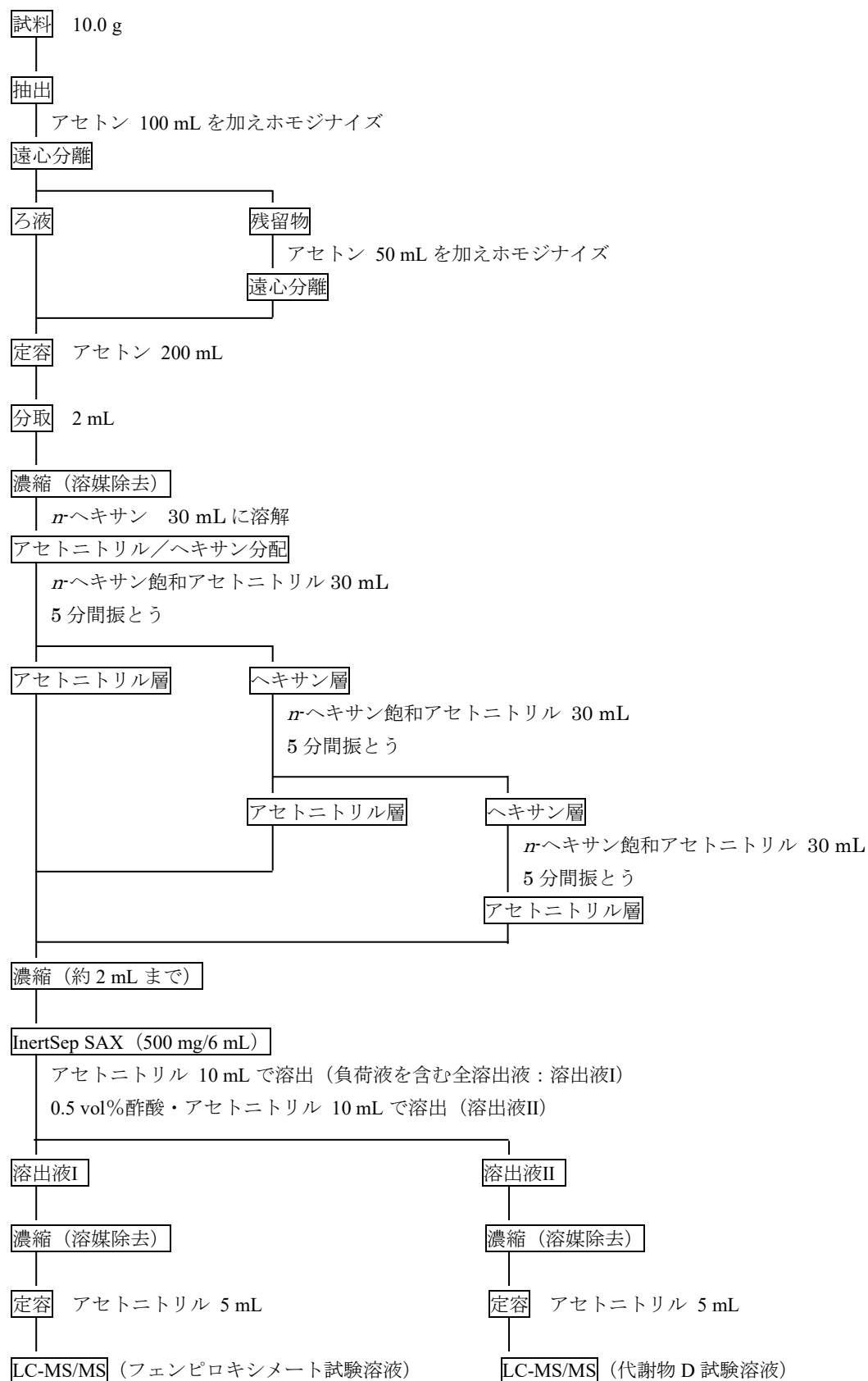
試料 10.0 g にアセトン 100 mL を加えてホモジナイズし、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。ここから正確に 2 mL を採り、40℃以下で溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40℃以下で約 2 mL まで濃縮した。

3) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg/6 mL)] にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、アセト

ニトリル 10 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採った（溶出液I）。次いで、0.5 vol%酢酸・アセトニトリル 10 mL を注入し、溶出液を採った（溶出液II）。溶出液Iを 40℃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に溶かし、正確に 5 mL としたものをフェンピロキシメート試験溶液とした。また、溶出液IIを 40℃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に溶かし、正確に 5 mL としたものを代謝物 D 試験溶液とした。

〔分析法フローチャート（案）〕



7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、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 0.2 mL を加えて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. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI (+) モードではフェンピロキシメートのプロトン付加分子である m/z 422.0[M+H]⁺及び代謝物 D のプロトン付加分子である m/z 366.0[M+H]⁺が検出された。また、ESI (-) モードではフェンピロキシメート由来の分子は検出されなかった。一方、代謝物 D については脱プロトン化分子である m/z 364.2[M-H]⁻が検出されたが、ESI (+) モードの方が高感度であった。そこで、フェンピロキシメート及び代謝物 D の測定には ESI (+) モードを用いることとした。このときのマスペクトルを図 1 及び 2 に示す。

フェンピロキシメートのプロトン付加分子である m/z 422.0[M+H]⁺をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 3 及び図 4 に示した。 m/z 366.1 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 137.9 が検出されたため、 m/z 422.0→366.1 を定量用 m/z 422.0→137.9 を定性用の測定イオンとした。

代謝物 D のプロトン付加分子である m/z 366.0[M+H]⁺をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 5 及び図 6 に示した。 m/z 137.9 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 77.0 が検出されたため、 m/z 366.0→137.9 を定量用 m/z 366.0→77.0 を定性用の測定イオンとした。

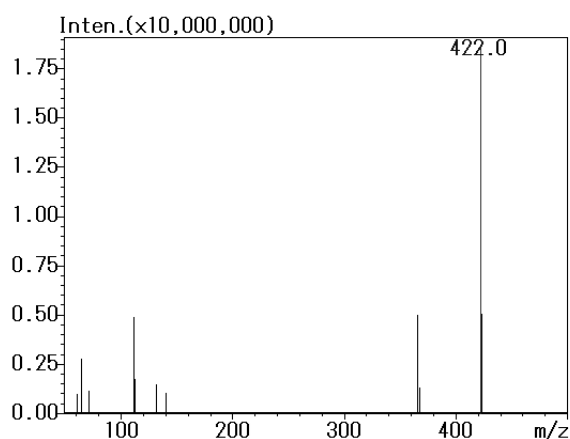


図 1 フェンピロキシメート標準溶液の
マスペクトル
スキャン範囲：50~500 amu
測定条件：ESI+

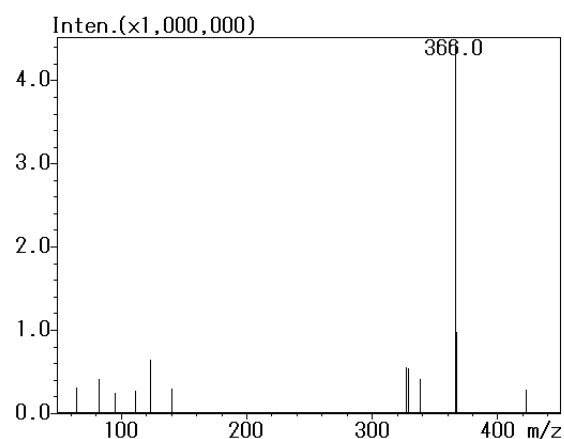


図 2 代謝物 D 標準溶液のマスペクトル
スキャン範囲：50~450 amu
測定条件：ESI+

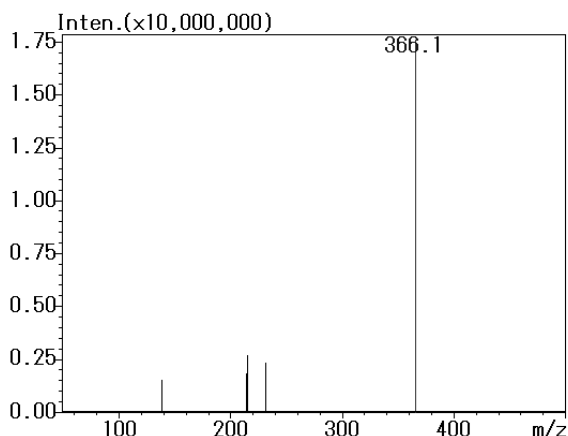


図3 フェンプロキシメートのプロダクトイオン
スペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 422.0

測定条件 : ESI+, CE = 25 eV

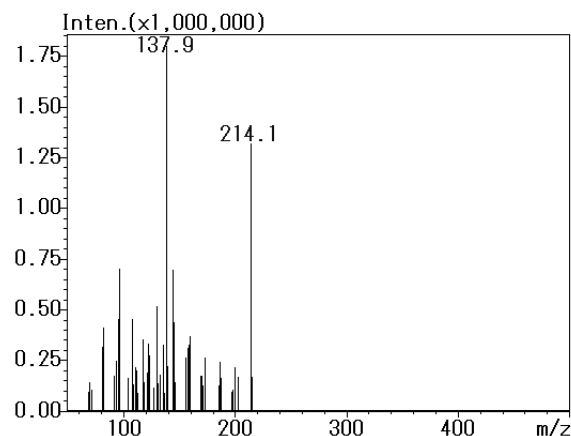


図4 フェンプロキシメートのプロダクトイオン
スペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 422.0

測定条件 : ESI+, CE = 41 eV

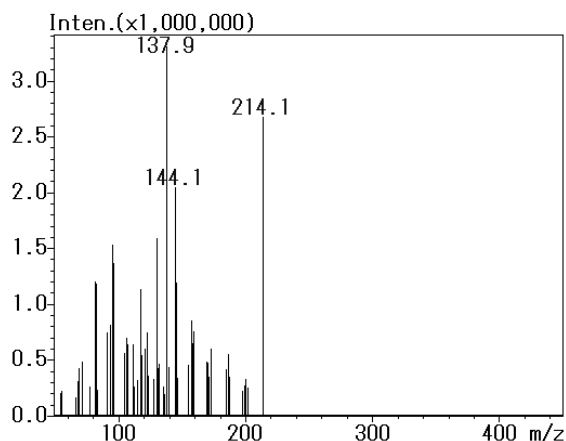


図5 代謝物 D のプロダクトイオン
スペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 366.0

測定条件 : ESI+, CE = 37 eV

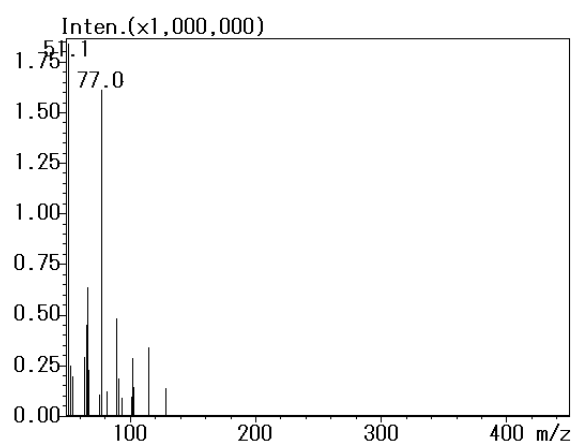


図6 代謝物 D のプロダクトイオン
スペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 366.0

測定条件 : ESI+, CE = 105 eV

2) LC 条件の検討

分析カラムについて検討を行った。オクタデシルシリル化シリカゲルカラム Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : GL サイエンス製) を用いて検討を行ったところ、保持、ピーク形状ともに良好な結果が得られたことから、分析カラムには Inertsil ODS-3 を用いることとした。

移動相条件については、アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を用いた場合に良好な感度とピーク形状が得られたので、アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を移動相として用いることにした。

3) 検量線

図 7~10 に検量線の例を示した。0.000025~0.00015 mg/L（定量限界値相当）及び 0.0001~0.0006 mg/L（基準値相当）の濃度範囲で作成した検量線は、いずれも決定係数 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

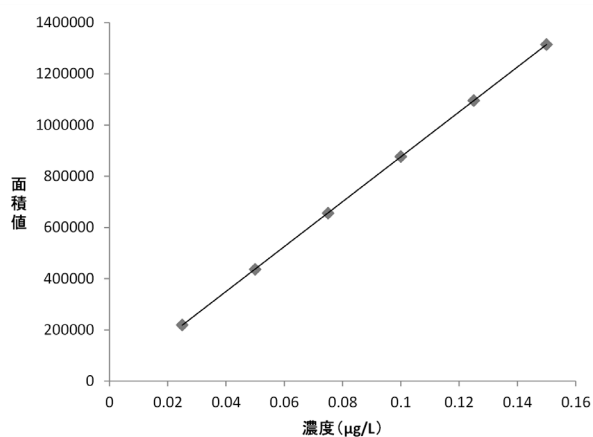


図 7 フェンプロキシメート検量線の例
（定量限界値相当）
濃度範囲：0.000025~0.00015 mg/L
 $y = 8769659x - 1123$ $r^2=1.0000$

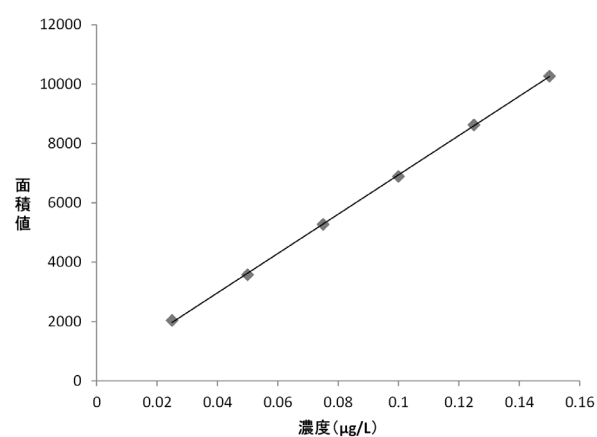


図 8 代謝物 D 検量線の例（定量限界値相当）
濃度範囲：0.000025~0.00015 mg/L
（フェンプロキシメート換算濃度）
 $y = 111129x + 535$ $r^2=0.9998$

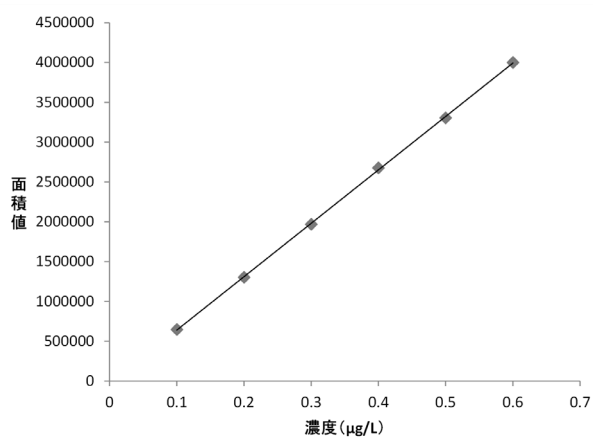


図 9 フェンプロキシメート検量線の例
（基準値相当）
濃度範囲：0.0001~0.0006 mg/L
 $y = 6708299x - 30846$ $r^2=0.9998$

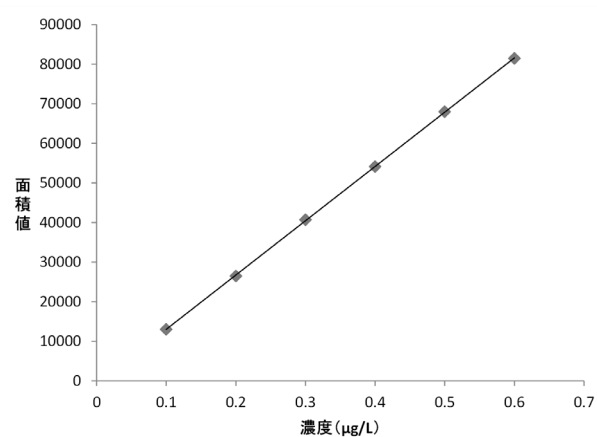


図 10 代謝物 D 検量線の例（基準値相当）
濃度範囲：0.0001~0.0006 mg/L
（フェンプロキシメート換算濃度）
 $y = 137220x - 730$ $r^2=1.0000$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

牛の脂肪及び牛の肝臓を用いて抽出溶媒の検討を行った。試料 10.0 g にフェンピロキシメート及び代謝物 D 10 mg/L 溶液（アセトン溶液）2 mL を添加（牛の脂肪の場合は 40℃で融解し、標準溶液を添加した後、再凝固）してから 30 分放置した後、アセトン 100 mL を加えてホモジナイズした。この抽出溶液を毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を分取した。残留物にアセトン 50 mL を加え、上記と同様の操作を行った。上澄液を合わせ、正確に 200 mL とした。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを試験液とした。結果は表 1 に示したとおり、いずれの試料を用いた場合も良好な回収が得られた。この結果より、抽出にはアセトンを用いて行うこととした。

表 1 抽出溶媒の検討結果（回収率（%），マトリックス添加標準溶液による補正值）

分析対象化合物	牛の脂肪	牛の肝臓
フェンピロキシメート	108.0	101.8
代謝物 D	101.8	106.0

添加量：20 µg

2) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル／ヘキサン分配の検討を行うこととした。

n-ヘキサン 30 mL にフェンピロキシメート及び代謝物 D 0.1 mg/L のアセトン溶液を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回抽出を行った結果を表 2 に示した。3 回の抽出操作でほぼ全量回収されたことから、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出することとした。

表 2 アセトニトリル／ヘキサン分配の検討（%）

分析対象化合物	試行	1 回目	2 回目	3 回目	ヘキサン層	計
フェンピロキシメート	n=1	85.3	12.1	1.6	0	99.0
	n=2	87.8	12.0	1.4	0	101.2
代謝物 D	n=1	90.4	4.6	0.6	0	95.6
	n=2	105.8	2.7	0.7	0	109.2

添加量：0.1 µg

3) カラム精製の検討

強陰イオン交換体ミニカラムによる精製 [InertSep SAX (500 mg/6 mL)]

代謝物 D はフェンピロキシメートより感度が低いため、代謝物 D の物性に合わせたカラム選択を行った。さらに、物性の異なるフェンピロキシメートと代謝物 D を同時に精製することを目的とし、InertSep SAX (500 mg/6 mL) における溶出状況の確認を行った。カラムを溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、フェンピロキシメート及び代謝物 D 0.1 mg/L 溶液（溶出溶媒の溶液）を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果は表 3 及び表 4 に示した通り、フェンピロキシ

メートはいずれの溶媒でも溶出したが、代謝物 D はアセトニトリルでは溶出せず、0.5 vol%酢酸・アセトニトリルでは 5 mL で溶出した。

表 3 InertSep SAX (500 mg/6 mL) からのフェンピロキシメートの溶出状況

溶出溶媒量	アセトニトリル	0.5 vol%酢酸・ アセトニトリル
0-5 mL	95.8	93.8
5-10 mL	2.5	2.6
10-15 mL	0	0
15-20 mL	0	0
20-25 mL	0	0
25-30 mL	0	0
計	98.3	96.4

添加量：0.1 µg

表 4 InertSep SAX (500 mg/6 mL) からの代謝物 D の溶出状況

溶出溶媒量	アセトニトリル	0.5 vol%酢酸・ アセトニトリル
0-5 mL	0	101.9
5-10 mL	0	0
10-15 mL	0	0
15-20 mL	0	0
20-25 mL	0	0
25-30 mL	0	0
計	0	101.9

添加量：0.1 µg

次にマトリックス（牛の肝臓）存在下における溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液*5 mL に 0.1 mg/L フェンピロキシメート及び代謝物 D 溶液（アセトン溶液）1 mL を加えて 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル 5 mL を加えて溶解し、アセトニトリル 10 mL で予備洗浄した SAX ミニカラムに負荷し、溶出液を分取した。アセトニトリル 10 mL を加えて溶出液を分取した後、0.5 vol%酢酸・アセトニトリル 5 mL ずつを加えて画分を分取した。このときの結果を表 5 に示す。この結果より、SAX ミニカラムにおいてアセトニトリル 10 mL で溶出したものをフェンピロキシメート画分とし、さらに 0.5 vol%酢酸・アセトニトリル 10 mL で溶出したものを代謝物 D 画分とすることとした。フェンピロキシメート画分及び代謝物 D 画分をそれぞれ 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。それぞれの残留物をアセトニトリル 5 mL に溶かし、LC-MS/MS で測定した。なお、フェンピロキシメート画分を代謝物 D 画分と合わせて測定したときのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を表 6 に示す。両画分を合わせて測定すると、代謝物 D に

0.467~0.651 (n=2) と大きなマトリックス影響があらわれたため、各画分をそれぞれ測定することとした。

表 5 InertSep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出状況 (%、試料：牛の肝臓)

溶出溶媒量	フェンピロキシメート	代謝物 D
負荷＋ アセトニトリル 10 mL	95.0	0
0.5 vol%酢酸・アセトニトリル 0-5 mL	0	100.5
5-10 mL	0	0
10-15 mL	0	0
15-20 mL	0	0
20-25 mL	0	0
25-30 mL	0	0
計	95.0	100.5

添加量：0.1 µg

表 6 フェンピロキシメート画分と代謝物 D 画分を合わせて測定した場合の
試料マトリックスの測定への影響

試料	フェンピロキシメート			代謝物 D		
	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均
牛の筋肉	1.067	1.037	1.052	0.660	0.642	0.651
牛の脂肪	1.009	0.953	0.981	0.530	0.403	0.467
牛の肝臓	0.970	0.965	0.968	0.752	0.541	0.647
牛乳	0.982	1.076	1.029	0.658	0.612	0.635

表中の数値は、マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比

※牛の肝臓抽出液の調製法

牛の肝臓 10.0 g にアセトン 100 mL を加えてホモジナイズし、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳の 4 食品を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的な SRM クロマトグラムを図 11~18 に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 19 及び 20 に示した。

なお、牛の筋肉及び牛の脂肪の基準値相当濃度の添加回収試験については試験溶液を 10 倍に希釈し、牛の肝臓の基準値相当濃度の添加回収試験については試験溶液を 40 倍に希釈して測定した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 7 に示した。検討を行ったいずれの試料においても、フェンピロキシメート及び代謝物 D の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 7 選択性の評価

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) ^{*1}							選択性の 評価 ^{*3}	備 考
					評価濃度 (ppm)		面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}			面積(高さ) 比 (a)/(b)		
					評価濃度	評価基準		n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	フェンピロキシメート	牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2384176	2406222	2395199	0.000	○
2		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2626891	2560584	2593738	0.000	○
3		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0	0	0	3368784	3274467	3321626	0.000	○
4		牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	756292	748843	752568	0.000	○
5		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	645113	656668	650891	0.000	○
6		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0	0	0	783535	797626	790581	0.000	○
7		牛乳 (LOQ)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	775062	751511	763287	0.000	○
1	代謝物D	牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	47356	45649	46503	0.000	○
2		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	49026	45319	47173	0.000	○
3		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0	0	0	49998	47159	48579	0.000	○
4		牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	11574	11755	11665	0.000	○
5		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	11586	10866	11226	0.000	○
6		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0	0	0	11855	12454	12155	0.000	○
7		牛乳 (LOQ)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	13230	12843	13037	0.000	○

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくてもよい。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 8 に示した。

定量限界相当濃度の添加回収試験では、フェンピロキシメートは真度 98.7~99.9%、併行精度 1.3~2.8%、代謝物 D は真度 90.1~98.0%、併行精度 2.2~5.2%であり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) < 25%という目標値を満足した。また、S/N はフェンピロキシメートでは 1829.9~4667.0、代謝物 D では 26.0~37.0であり、いずれの化合物においても S/N ≥ 10 を満足した。

基準値相当濃度の添加回収試験では、フェンピロキシメートは真度 99.4~100.2%、併行精度 0.9~2.5%、代謝物 D は真度 94.5~98.8%、併行精度 1.0~3.1%であり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) < 10%という目標値を満足した。

表 8 真度、精度及び定量限界の評価

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 ^{*1}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²			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	フェンピロキシメート	牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.2	0.2	—	6061441	-39483	0.9993	98.7	101.1	102.7	98.9	99.5	100.2	1.7			—	
2		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.2	0.2	—	6708299	-30846	0.9996	99.6	99.8	99.8	97.8	99.9	99.4	0.9			—	
3		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.8	0.8	—	7790635	121241	0.9995	101.2	102.5	101.7	96.6	98.1	100.0	2.5			—	
4		牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	6769659	-1123	1.0000	98.7	96.1	99.8	100.8	98.3	98.7	1.8	4159.7	5174.4	4667.0	
5		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	6985830	11221	0.9993	103.0	98.7	100.4	95.8	97.4	99.1	2.8	1980.8	2488.9	2234.8	
6		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.8	0.005	S/N	8941287	-5301	0.9997	100.0	97.7	100.3	99.6	97.5	99.0	1.3	2095.1	1970.6	2032.9	
7		牛乳 (LOQ)	0.005	0.01	0.005	S/N	8644590	-8355	0.9997	101.5	101.3	99.7	98.5	98.6	99.9	1.4	1732.1	1927.8	1829.9	
1	代謝物 D	牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.2	0.2	—	120485	205	0.9995	98.4	96.0	99.6	100.9	98.9	98.8	1.8			—	
2		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.2	0.2	—	130427	-606	0.9998	94.1	94.4	98.6	91.0	97.4	95.1	3.1			—	
3		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.8	0.8	—	137220	-730	1.0000	93.9	93.7	95.3	95.6	94.0	94.5	1.0			—	
4		牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	116849	447	0.9992	89.2	94.3	82.4	92.9	91.7	90.1	5.2	36.2	37.7	37.0	
5		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	111129	535	0.9998	97.9	92.4	93.5	101.1	96.1	96.2	3.6	23.4	32.0	27.7	
6		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.8	0.005	S/N	118030	-163	0.9994	95.7	94.1	92.9	101.0	98.3	96.4	3.4	36.2	24.9	30.6	
7		牛乳 (LOQ)	0.005	0.01	0.005	S/N	114429	45	0.9995	100.8	95.1	98.2	99.1	97.0	98.0	2.2	32.8	19.1	26.0	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 9 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。定量限界相当濃度及び基準値相当濃度におけるフェンピロキシメートの面積比は 0.98~1.02 で、代謝物 D の面積比は 0.96~1.00 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 9 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 10 及び 11 に示した。フェンピロキシメートの補正真度は 96.8~102.2%、代謝物 D の補正真度は 91.0~100.0%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 9 試料マトリックスの測定への影響

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 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								備考	
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ⁵
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	フェンピロキシメート	牛の筋肉(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.0004	面積	0	2384176	2406222	2395199	2418793	2480139	2449466	0.98	
2		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.0004	面積	0	2626891	2560584	2593738	2644715	2528062	2586389	1.00	
3		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.8	0.8	0.0004	面積	0	3368784	3274467	3321626	3305555	3267755	3286655	1.01	
4		牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.0001	面積	0	756292	748843	752568	742025	735968	738997	1.02	
5		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.0001	面積	0	645113	656668	650891	654085	663575	658830	0.99	
6		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.8	0.005	0.0001	面積	0	783535	797626	790581	797999	806937	802468	0.99	
7		牛乳(LOQ)	0.005	0.01	0.005	0.0001	面積	0	775062	751511	763287	758110	738487	748299	1.02	
1	代謝物D	牛の筋肉(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.0004	面積	0	47356	45649	46503	47265	46190	46728	1.00	
2		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.0004	面積	0	49026	45319	47173	49967	46028	47998	0.98	
3		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.8	0.8	0.0004	面積	0	49998	47159	48579	50475	51239	50857	0.96	
4		牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.0001	面積	0	11574	11755	11665	11571	11881	11726	0.99	
5		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.0001	面積	0	11586	10866	11226	11758	11067	11413	0.98	
6		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.8	0.005	0.0001	面積	0	11855	12454	12155	12578	12200	12389	0.98	
7		牛乳(LOQ)	0.005	0.01	0.005	0.0001	面積	0	13230	12843	13037	13530	12966	13248	0.98	

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて再注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 10 フェンピロキシメートの補正真度

食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)	ピーク面積比※
牛の筋肉 (MRL)	0.2	100.2	102.2	0.98
牛の脂肪 (MRL)	0.2	99.4	99.4	1.00
牛の肝臓 (MRL)	0.8	100.0	99.0	1.01
牛の筋肉 (LOQ)	0.005	98.7	96.8	1.02
牛の脂肪 (LOQ)	0.005	99.1	100.1	0.99
牛の肝臓 (LOQ)	0.005	99.0	100.0	0.99
牛乳 (LOQ)	0.005	99.9	97.9	1.02

※マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

表 11 代謝物 D の補正真度

食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)	ピーク面積比※
牛の筋肉 (MRL)	0.2	98.8	98.8	1.00
牛の脂肪 (MRL)	0.2	95.1	97.0	0.98
牛の肝臓 (MRL)	0.8	94.5	98.4	0.96
牛の筋肉 (LOQ)	0.005	90.1	91.0	0.99
牛の脂肪 (LOQ)	0.005	96.2	98.2	0.98
牛の肝臓 (LOQ)	0.005	96.4	98.4	0.98
牛乳 (LOQ)	0.005	98.0	100.0	0.98

※マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

4. 考察

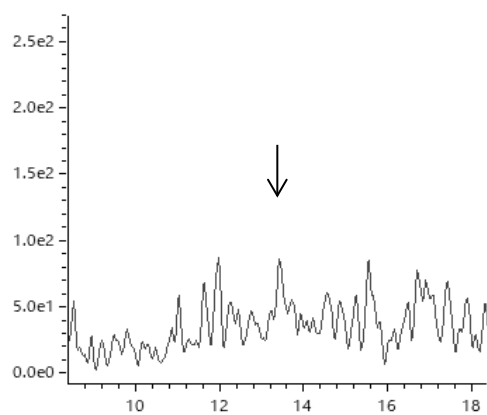
開発した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもフェンピロキシメート及び代謝物 D の定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び併行精度はいずれの化合物においても、定量限界相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%、基準値相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <10%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

[結論]

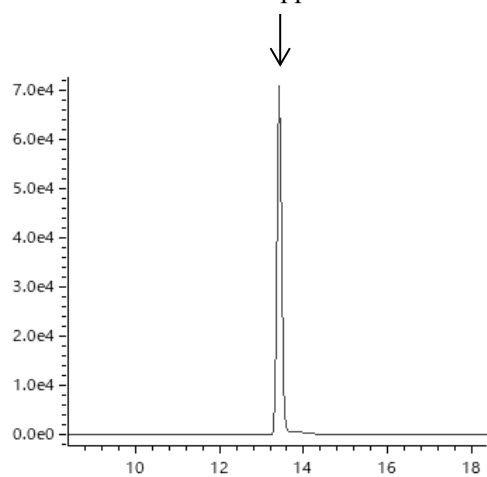
畜産物中のフェンピロキシメート試験法として、フェンピロキシメート及び代謝物 D を試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った後、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳に適用した結果、いずれの化合物においても選択性には問題なく、定量限界値相当において $S/N \geq 10$ を満足した。また、真度、併行精度の目標値を満足する良好な結果が得られた。

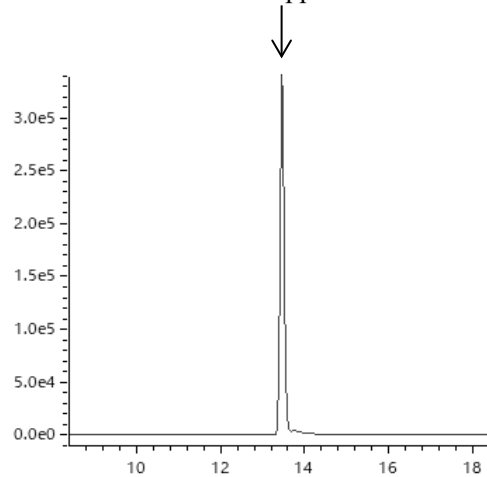
ブランク試料



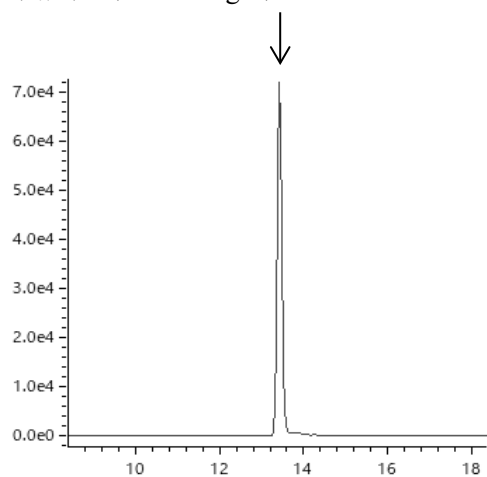
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.2 ppm 相当、10 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

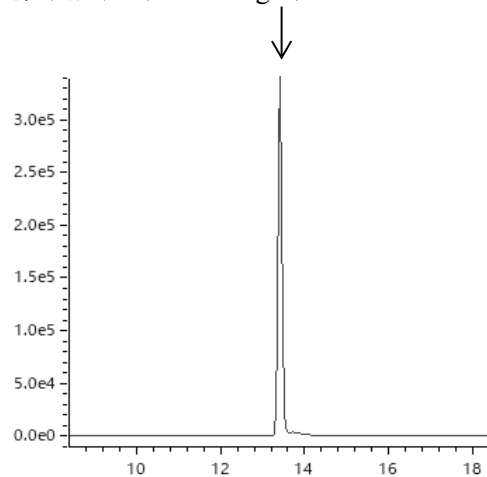
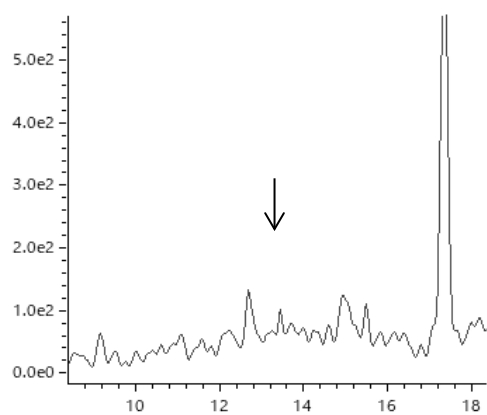
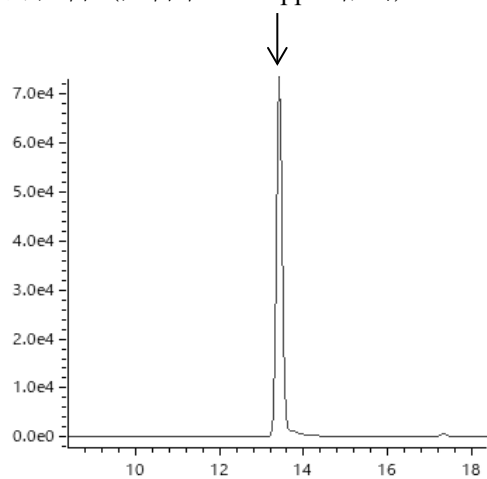


図 11 フェンピロキシメートの SRM クロマトグラム (m/z 422.0→366.1)
試料：牛の筋肉

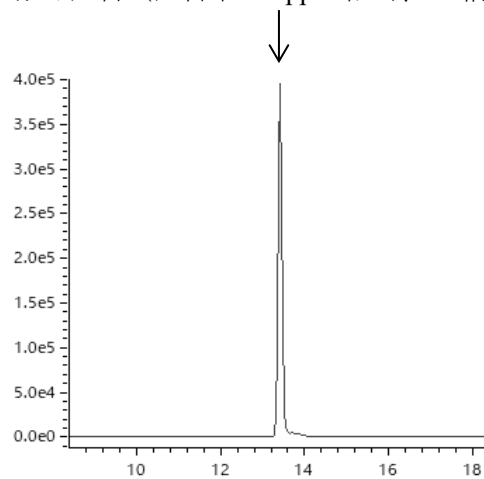
ブランク試料



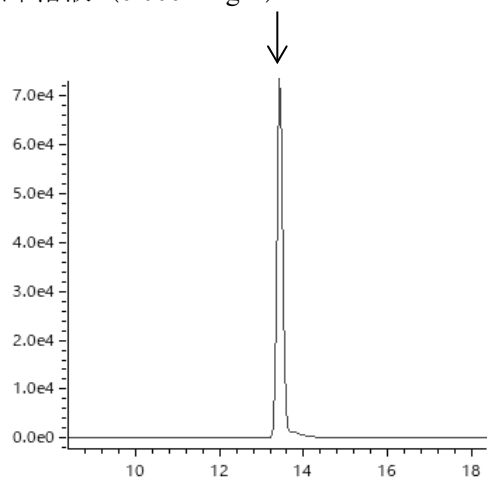
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.2 ppm 相当、10 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

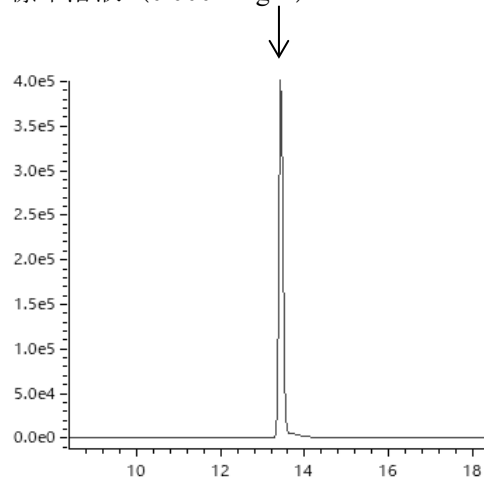
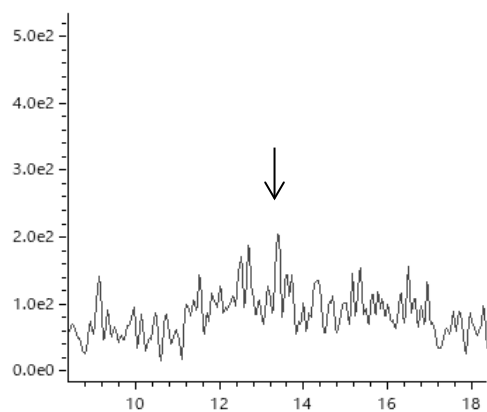
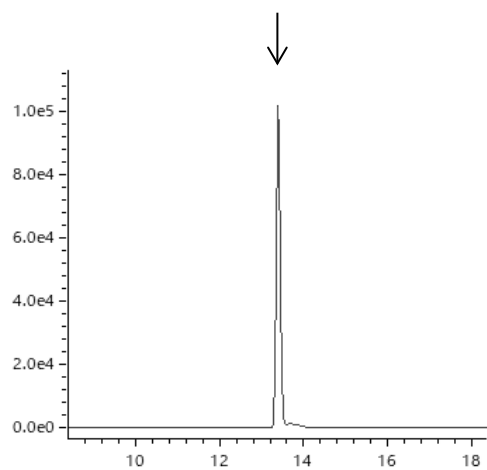


図 12 フェンピロキシメートの SRM クロマトグラム (m/z 422.0→366.1)
試料：牛の脂肪

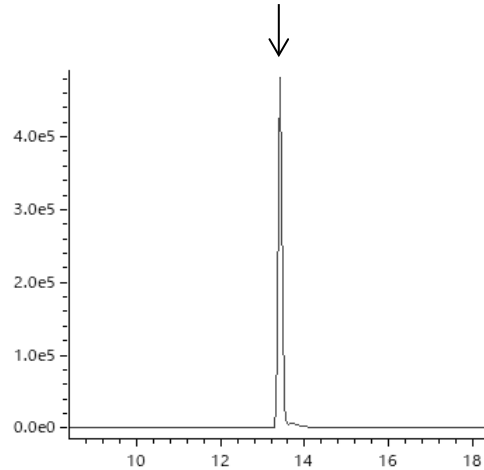
ブランク試料



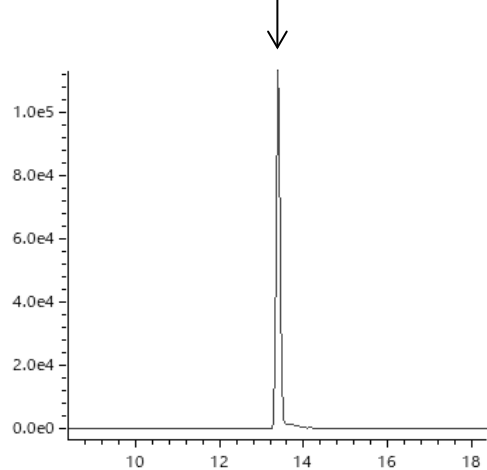
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.8 ppm 相当、40 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

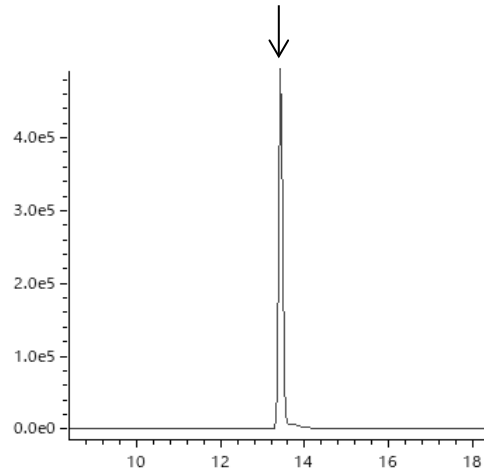
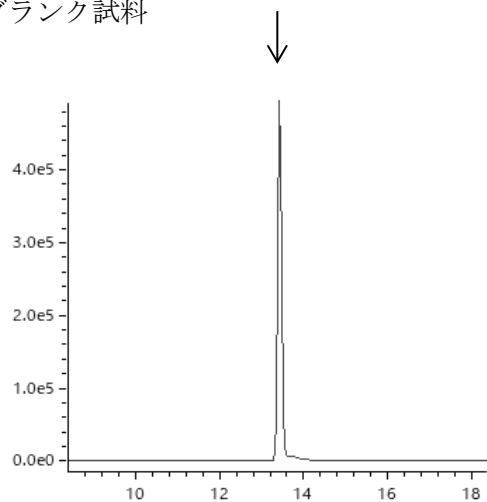
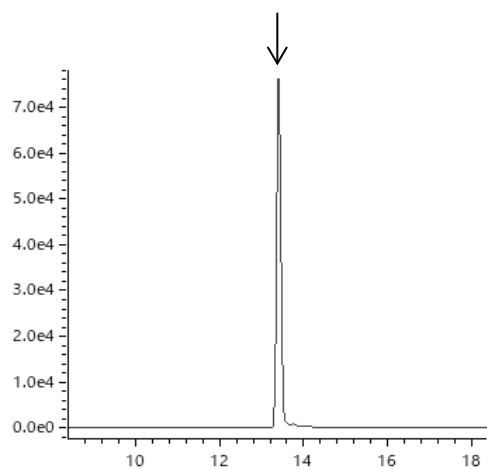


図 13 フェンプロキシメートの SRM クロマトグラム (m/z 422.0→366.1)
試料：牛の肝臓

ブランク試料



添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



標準溶液（0.0001 mg/L）

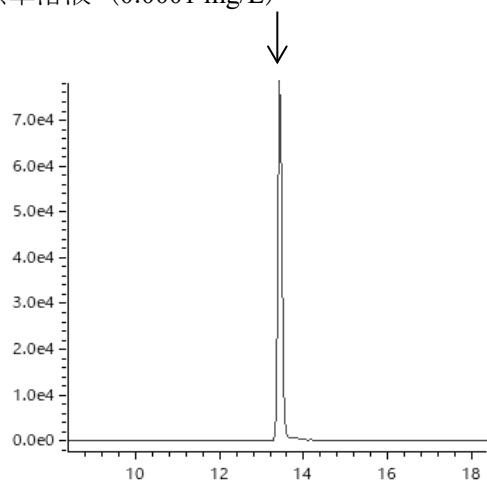
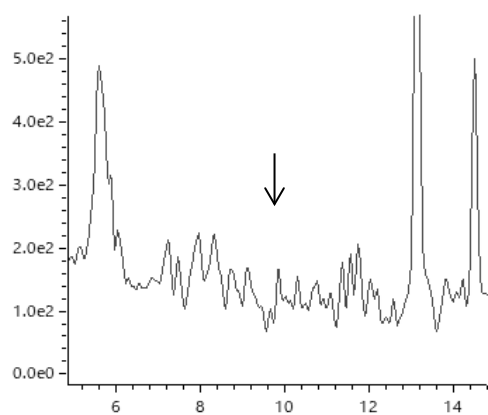
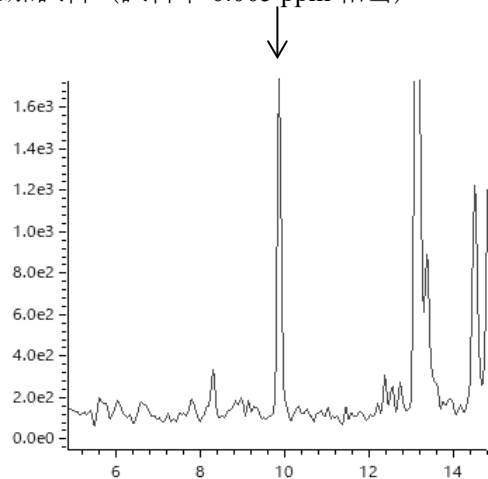


図 14 フェンピロキシメートの SRM クロマトグラム (m/z 422.0→366.1)
試料：牛乳

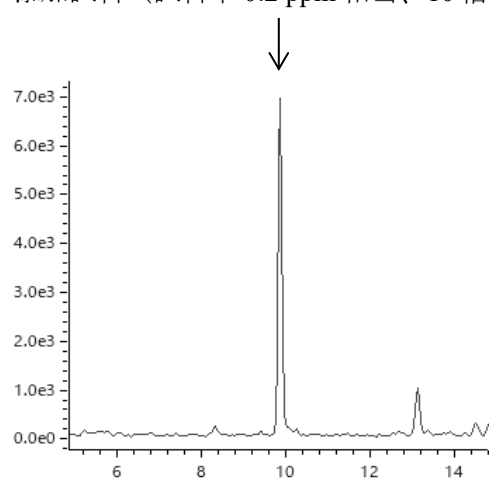
ブランク試料



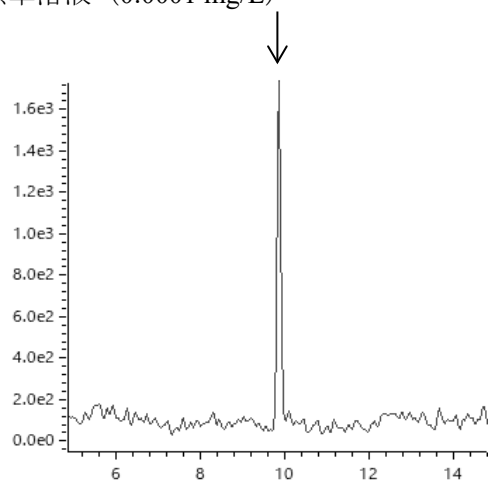
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.2 ppm 相当、10 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

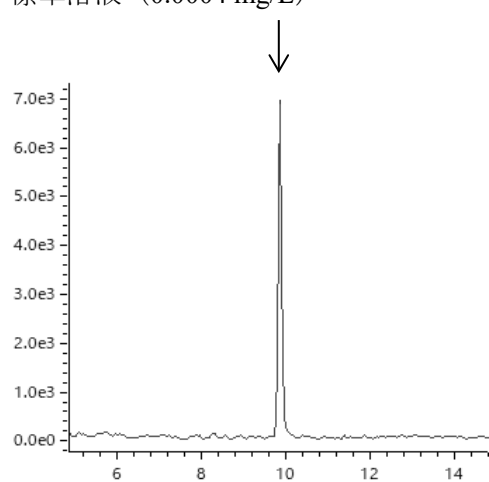
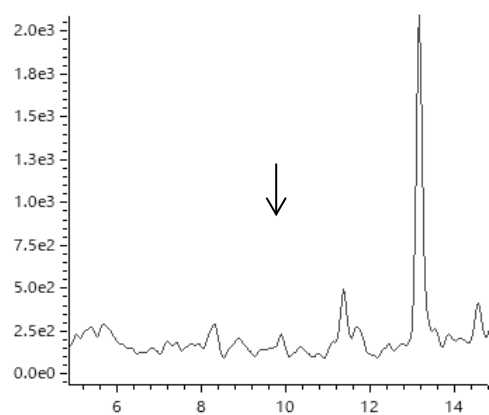
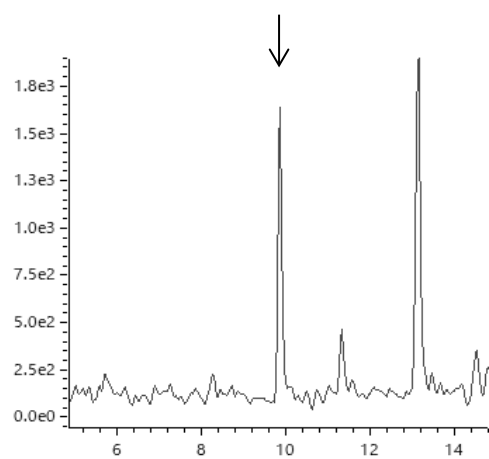


図 15 代謝物 D の SRM クロマトグラム (m/z 366.0→137.9)
試料：牛の筋肉

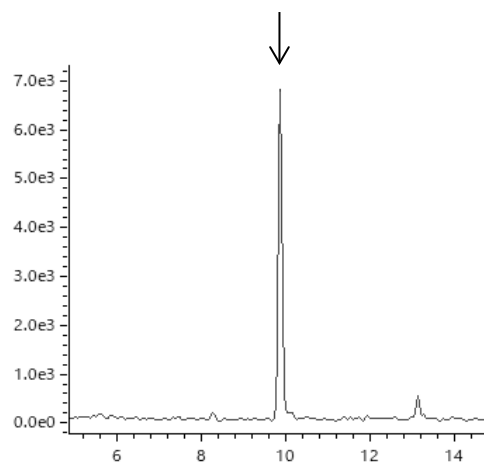
ブランク試料



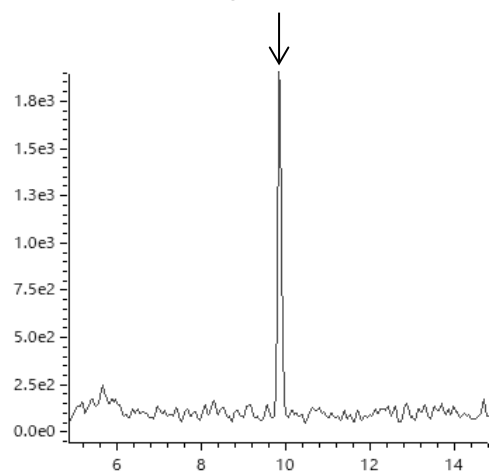
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.2 ppm 相当、10 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

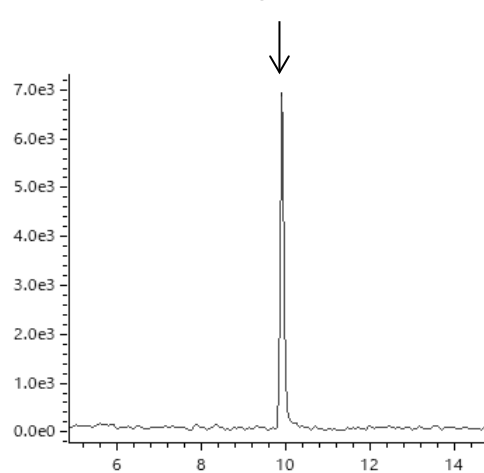
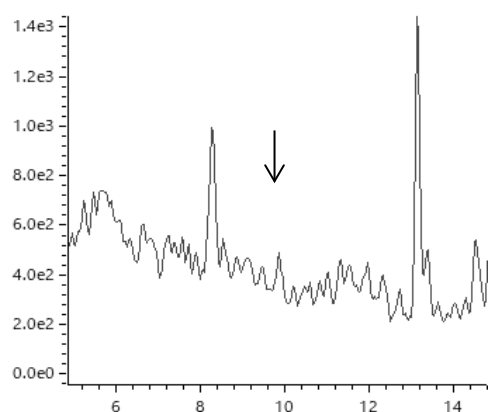
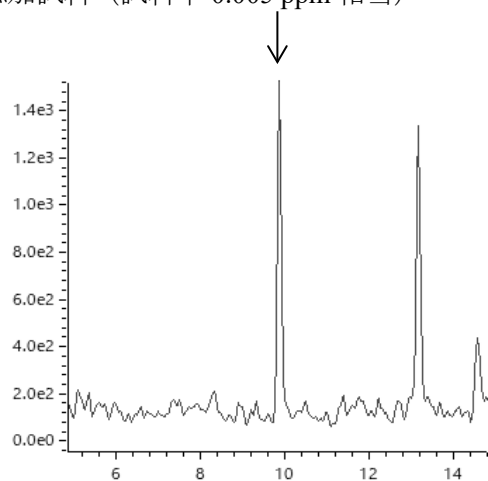


図 16 代謝物 D の SRM クロマトグラム (m/z 366.0→137.9)
試料：牛の脂肪

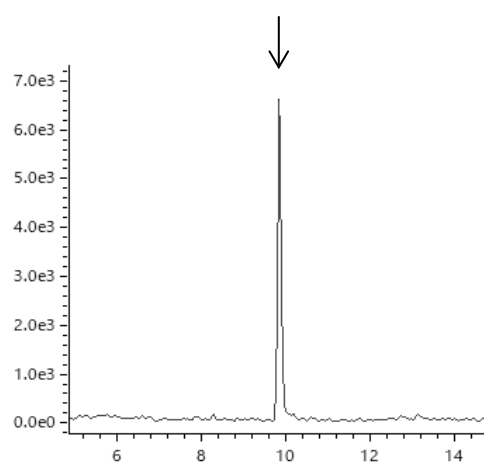
ブランク試料



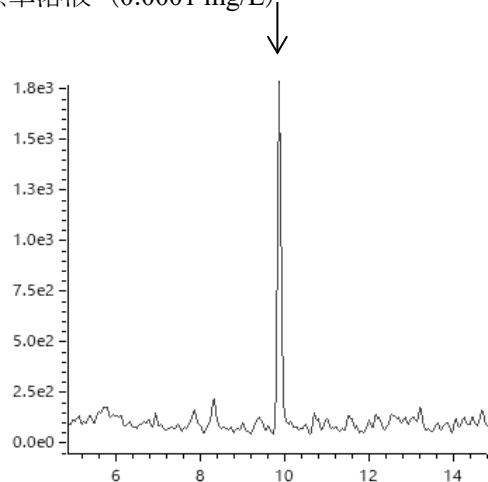
添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



添加試料（試料中 0.8 ppm 相当、40 倍希釈）



標準溶液（0.0001 mg/L）



標準溶液（0.0004 mg/L）

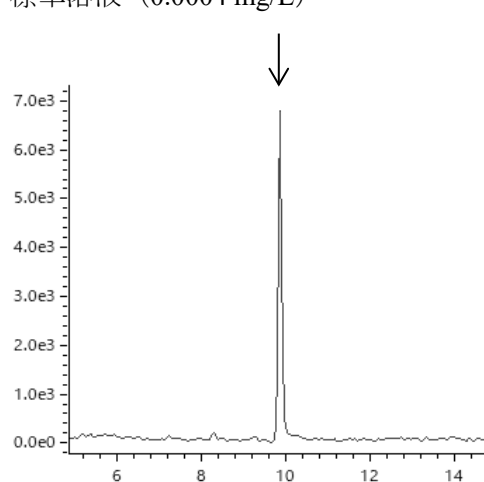
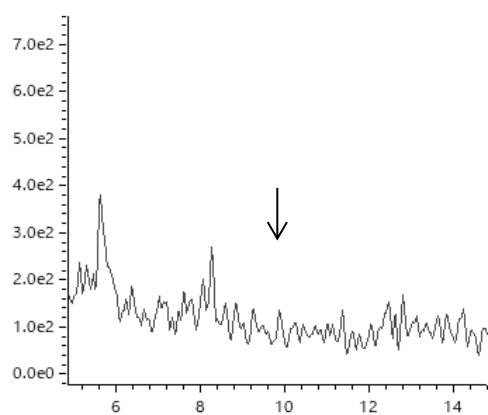
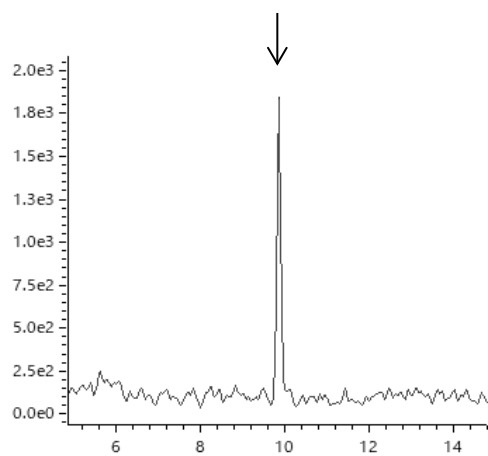


図 17 代謝物 D の SRM クロマトグラム (m/z 366.0→137.9)
試料：牛の肝臓

ブランク試料



添加試料（試料中 0.005 ppm 相当）



標準溶液（0.0001 mg/L）

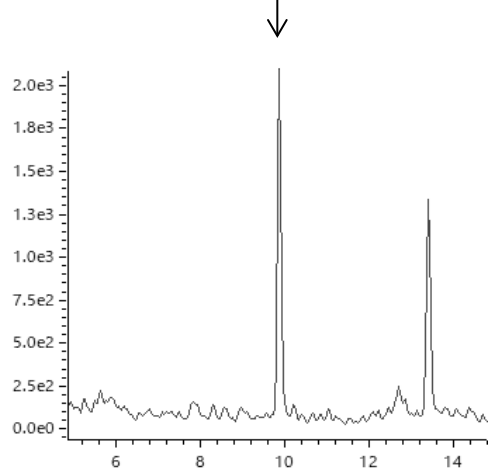
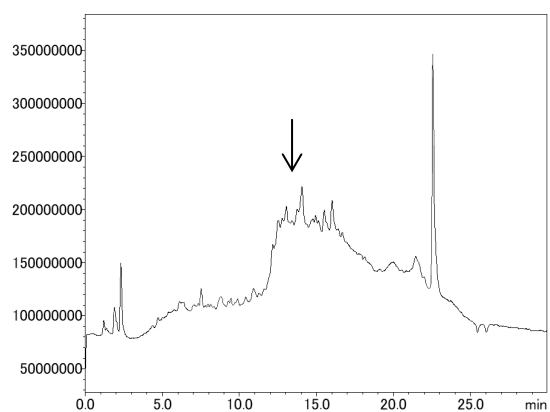


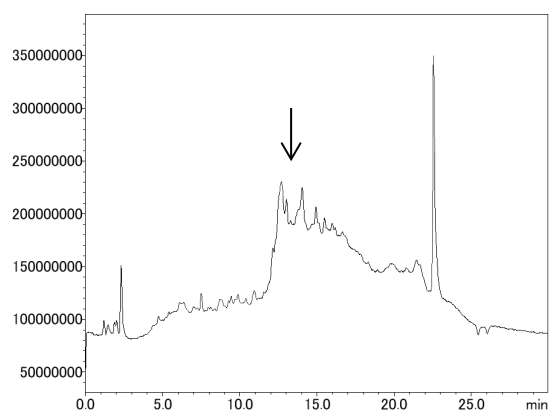
図 18 代謝物 D の SRM クロマトグラム (m/z 366.0→137.9)
試料：牛乳

フェンピロキシメート

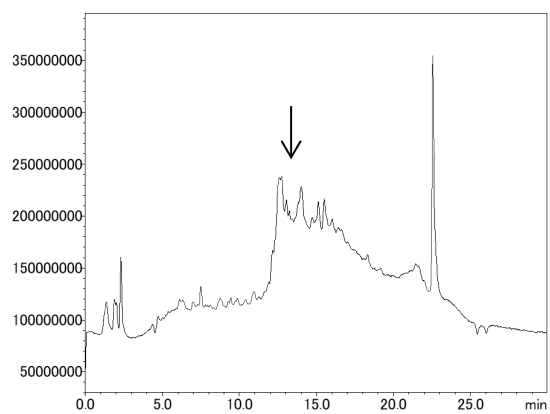
牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳

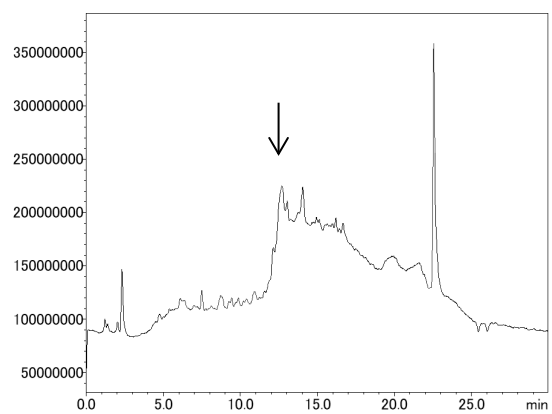
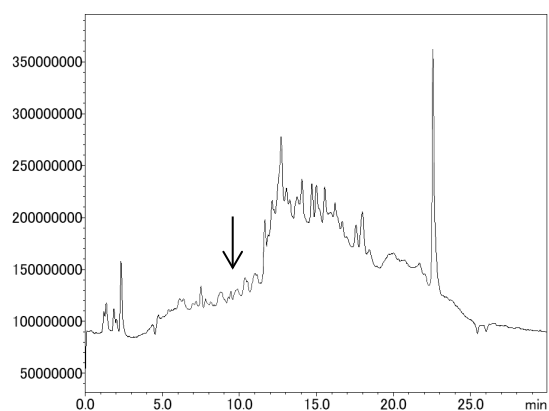


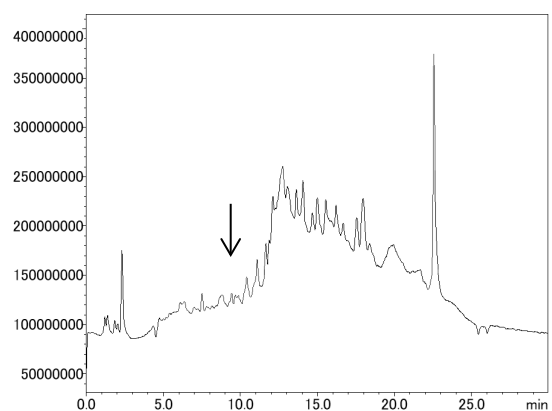
図 19 フェンピロキシメートのブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム（ポジティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu）

代謝物 D

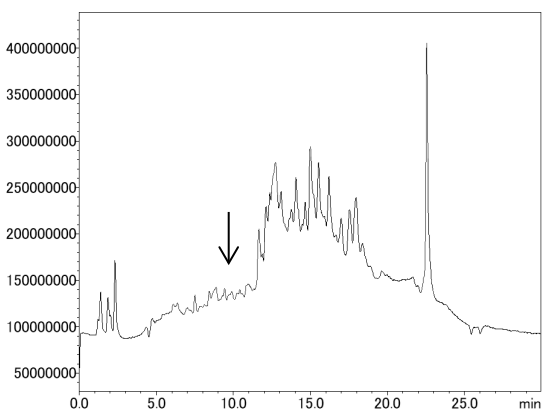
牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳

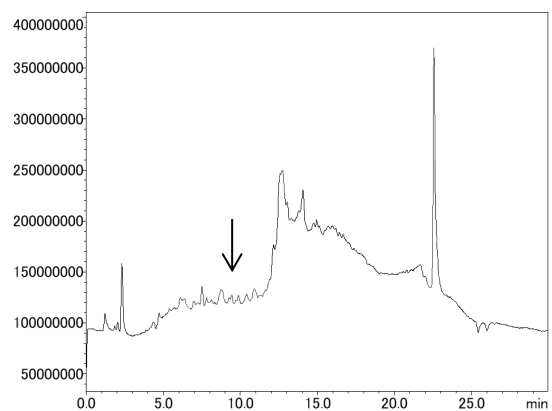


図 20 代謝物 D のブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(ポジティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)