

フルオピラム分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

- ・フルオピラム
- ・2-(トリフルオロメチル)ベンズアミド（以下、代謝物 M21）

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

フルオピラム標準品	:	分析用標準品
代謝物 M21 標準品	:	分析用標準品
フルオピラム安定同位体標識標準品	:	フェニル環を ^{13}C で標識標準品
代謝物 M21 安定同位体標識標準品	:	フェニル環を ^{13}C で標識標準品
アセトニトリル	:	クロマトグラフィー用
メタノール	:	クロマトグラフィー用
水	:	Milli-Q 精製装置（ミリポア製）で精製したもの
ギ酸	:	純度 98%以上（Merck 製）
C ₁₈ ミニカラム	:	Mega Bond Elute-C18 カートリッジ

4. 試験溶液の調製

1) 内標準溶液の調製

フルオピラム及び代謝物 M21 の安定同位体標識標準品をアセトニトリルに溶解し、100 µg/mL の標準原液をそれぞれ調製する。次いで、これら原液をメタノール及び水（1 : 9, v/v）混液+10 mmol/L ギ酸アンモニウム +120 µL/L ギ酸混液で希釈し、フルオピラム及び代謝物 M21 の混合内標準溶液（濃度各 1.0 または 0.1 µg/mL）を調製する。

2) 抽出及び精製

①筋肉（鶏）、脂肪（牛及び鶏）、肝臓（鶏）、乳及び卵の場合

均質化した試料 5 g にアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液 40 mL を加えて磨砕抽出（2分）する。ブレンダーをアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液 15 mL で洗浄する。抽出液を C₁₈ ミニカラムに添加し、溶出液を取る。次いで、残留物をアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液約 10 mL で洗浄する。1 µg/mL の混合内標準溶液 0.5 mL を加え、アセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液で 100 mL とした後、水及びメタノール（9 : 1, v/v）混液 +10 mmol/L ギ酸アンモニウム +120 µL/L ギ酸混液で 5 倍希釈し、その一部を試験溶液とする。

②筋肉（牛）、肝臓（牛）及び腎臓（牛）の場合

均質化した試料 5 g にアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液 30 mL を加え、20 分間マイクロ波抽出する（120°Cまで 900W で 5 分間加熱、120°Cを 600W で 15 分間維持、約 35°Cまでクールダウン）。抽出液の上澄みをデカントして C₁₈ ミニカラムに添加し、溶出液を取る。さらにアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液 30 mL を加え、前と同様の条件でマイクロ波抽出した後、抽出液を C₁₈ ミニカラムに添加し、溶出液を取る。容器内をアセトニトリル及び水（4 : 1, v/v）混液 10 mL で 2 回洗浄し、洗液を C₁₈ ミニカラムに添加し、溶出液を取る。1 µg/mL の混合内標準溶液 0.5 mL を加え、アセトニトリル/水（4 : 1, v/v）混液で 100mL とした後、水及びメタノール（9 : 1, v/v）混液 + 10 mmol/L ギ酸アンモニウム + 120 µL/L ギ酸混液で 5 倍希釈し、その一部を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルオピラム標準品及び代謝物 M21 標準品をアセトニトリルに溶解し、100 µg/mL の標準原液をそれぞれ調製する。次いで、これらの標準原液をメタノール及び水（1 : 9, v/v）混液 + 10 mmol/L ギ酸アンモニウム + 120µL/L ギ酸混液で希釈してフルオピラム及び代謝物 M21 の混合標準溶液（濃度各 0.1 または 0.01 µg/mL）を調製する。混合標準溶液と混合内標準溶液を所定の割合で混合した後、メタノール及び水(1 : 9, v/v)混液 + 10 mmol/L ギ酸アンモニウム + 120 µL/L ギ酸混液で 100 mL とし、以下の濃度の検量線用標準溶液を調製する。

用いた混合標準溶液及び混合内部標準溶液	混合する容量 (mL)	最終濃度 (µg/mL)	濃度比*
0.1 µg/mL 混合標準溶液	5	0.005	5
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	
0.1 µg/mL 混合標準溶液	1	0.001	1
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	
0.1 µg/mL 混合標準溶液	0.5	0.0005	0.5
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	
0.1 µg/mL 混合標準溶液	0.1	0.0001	0.1
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	
0.01 µg/mL 混合標準溶液	0.5	0.00005	0.05
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	
0.01 µg/mL 混合標準溶液	0.2	0.00002	0.02
0.1 µg/mL 混合内部標準溶液	1	0.001	

*安定同位体標識標準品の濃度 0.001 µg/mL に対する分析標準品の濃度比

これらの溶液を LC-MS /MS に注入し、標準品ピーク及び内標準品ピークの面積比及び濃度比から検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5. の検量線を用いて濃度比を求める。得られた濃度比を用いて、下式より残留濃度を求める。

残留濃度 (ppm)

= 濃度比 × 内部標準溶液濃度 (0.001 µg/mL)

× $\frac{\text{最終液量 (500 mL)}}{\text{試料採取量 (5.0 g)}}$

7. 測定条件

(例)

装置 : HPLC ; HP 1100 (Agilent Technologies 製)
MS ; API 4000 (Applied Biosystems 製)

カラム : Luna HTS C18、粒径 ; 2.5 µm、2.0 mm i.d. x50 mm
(Phenomenex 製)

カラム温度 : 60 °C

移動相 : 移動相 A : 水及びメタノール (9/1, v/v) 混液 + 10 mmol/L ギ酸アンモニウム + 120 µL ギ酸/L
移動相 B : メタノール及び水 (9/1, v/v)混液 + 10 mmol/L ギ酸アンモニウム + 120 µL ギ酸/L

グラジエントプログラム :

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	MS/廃液
0.0	95	5	廃液
2.0	--	--	MS
4.5	5	95	MS
6.0	5	95	MS
6.0	--	--	廃液
6.1	95	5	廃液
8.0	95	5	廃液

流量 : 0.5mL/分

注入量 : 25µL

保持時間の目安 : フルオピラム ; 約 4.7 分、代謝物 M21 ; 約 2.4 分

イオン化モード : ESI (+)

イオン検出法 : MRM 法

モニタリング
イオン :

	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)
フルオピラム	397	173
標識フルピラム	403	179
代謝物 M21	190	170
標識代謝物 M21	196	176

8. 定量限界
各 0.01 ppm

9. 添加回収試験を実施した食品
鶏の卵、鶏の筋肉、鶏の肝臓、牛の乳、牛の筋肉、牛の肝臓、牛の腎臓、牛の脂肪

10. 留意事項
特になし

※ 本分析法は、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。