

動物由来食品中フィプロニルの 分析ソリューション

Agilent Technologies China
吴翠玲/李建中/孔晔

前書き

近日、ヨーロッパ市場でフィプロニル（fipronil）という殺虫剤で汚染された卵が出回りました。汚染された卵は1年余り販売されたと見られ、鶏肉、マヨネーズなどの加工食品についても消費者から懸念が寄せられています。

香港では、オランダから輸入された卵を検査した結果、基準値を超えたフィプロニルが検出されました。

オランダでは、ワッフルやマドレーヌといった卵を使った菓子類についても検査が進められています。韓国では、フィプロニルに加え、ビフェントリン、エトキサゾール、フルフェノクスロン、ピリダベンが卵から検出され、対策が進められています。

フィプロニルはフェニルピラゾール系殺虫剤として使用されています。チョウ目、カメムシ目などに殺虫作用があり、農業分野において広く使用されています。また、猫や犬などの体についたノミ、ゴキブリやアリなどの殺虫にも使用されています。

フィプロニル-人体にも毒性を及ぼします。

フィプロニルは、ネオニコチノイド系農薬と同じように環境汚染において懸念される殺虫剤の成分であり、甲殻類とミツバチなど特に影響が出ています。そのため国際的に使用制限が規定されてきています。

EUは2014年より規制を開始し、温室作物種の処理や開花期前のニラ、玉ねぎなどには使用が許可されています。

中国では使用制限が**2009年**から始まり、**1部**の使用用途を除いて国内販売を禁止しています。人体に対しても影響があり大量に摂取すると急性中毒、消化系、神経に対する影響があります。

吐き気、腹痛、めまい、筋肉震え、手足の痙攣、ひどい場合には精神的にも影響がありますが、長期的な接触に関して人体にどのような影響がでるのかは明確にされていません。

動物試験では生殖・発生毒性、神経毒性がみられています。

FAO/WHO合同残留農薬専門家会議（**JMPR**）において決められた一日摂取許容量（**ADI**）によると、体重**1**キロに対し**0.0002mg**の摂取量が安全範囲とされています。日本では、**ADI**は**0.00019 mg/kg** 体重/日に設定されています。平成**29**年度輸入食品等モニタリング計画に基づき、検疫所による欧州産鶏卵のフィプロニルの検査に実施されています。

動物由来食品中のフィプロニル分析



Agilent Technologies

Bond Elut EMR-Lipidsによる高速前処理



高感度高選択性6470LC—QQQ



最高のパフォーマンスと信頼性
7000シリーズトリプル四重極GC

サンプル前処理方法

ホモジナイズしたサンプル5g、水3mL、セラミックホモジナイザ（P/N 5982-9313）を50mL遠沈管に入れる

1分間振とう、アセトニトリル10mLを加えて更に1分間振とう

Bond Elut QuEChERS抽出キット（P/N 5982-5550）を加えて1分間振とう

4℃、9000rpmの条件で遠心分離10分

アセトニトリル層5mLを取り出し、3mLの水を入れて活性化させたEMR-Lipidsに添加(P/N 5982-1010)

試験管ミキサーで1分間攪拌後、4℃、9000rpmの条件で遠心分離10分

上清を脱水キット（P/N 5982-0101）に入れ、セラミックホモジナイザ（P/N 5982-9313）を追加、試験管ミキサーで1分攪拌

4℃、9000rpmの条件で遠心分離10分、上清(アセトニトリル層)3mLを取り出し窒素パージ

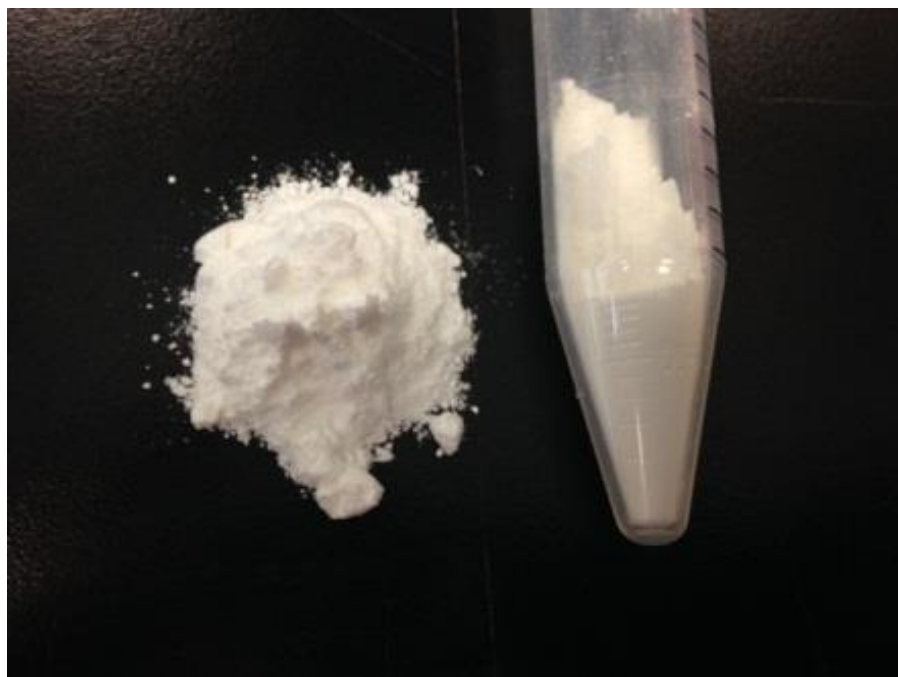
メタノールで1mLに定容、アジレントCaptiva RCエコノフィルタ0.2μm（P/N 5190-5110）に通しLC/MS/MSまたはGC/MS/MS分析

Bond Elut QuEChERS EMR Lipid の製品群



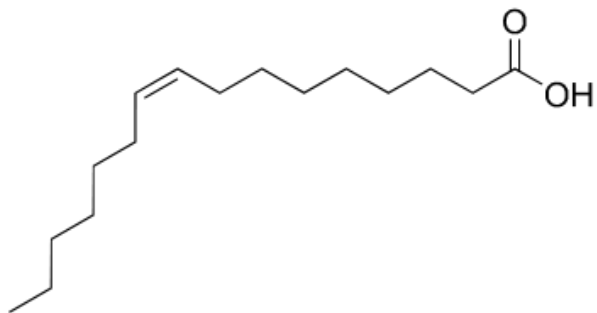
- 1) 抽出キット選択：必要であればQuEChERS抽出キットを使用
- 2) EMR-Lipid 分散キット (P/N 5982-1010)
- 3) EMR-Polish 脱水キット (P/N 5982-0101)

Bond Elut QuEChERS EMR Lipid 分散キットの特長

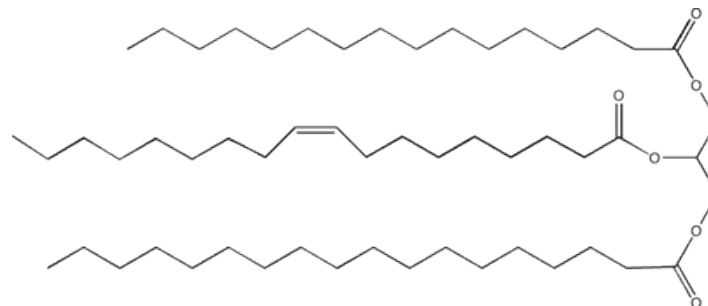


- 水で活性化させる
- 広い表面積を持ち、主に長い炭素鎖の夾雑成分をトラップする
- 充填剤粒子と夾雑物を遠沈で除去する
- キット1点あたりの充填剤量は1g

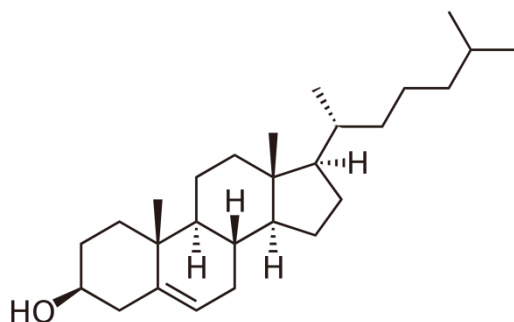
Bond Elut QuEChERS EMR Lipidが除去する脂質類



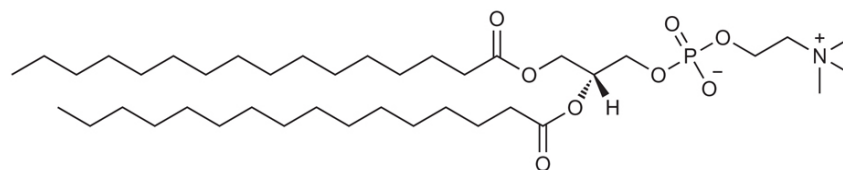
遊離脂肪酸



トリグリセリド

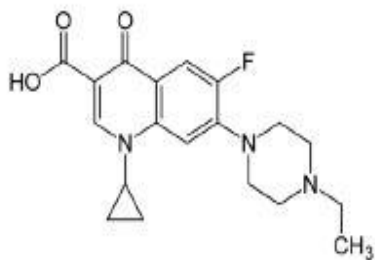


コレステロール

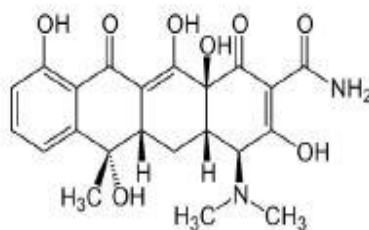


リン脂質

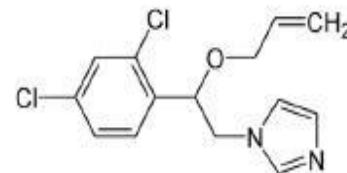
EMR Lipidが除去しない化合物



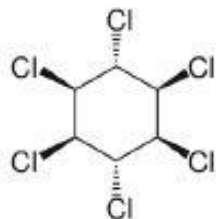
フルオロキノロン系の薬物



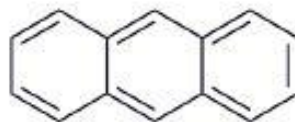
テトラサイクリン



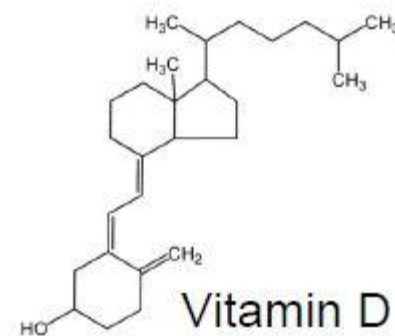
イミダゾール系農薬



有機塩素系農薬

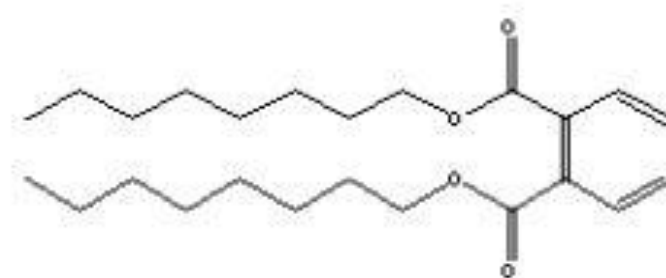
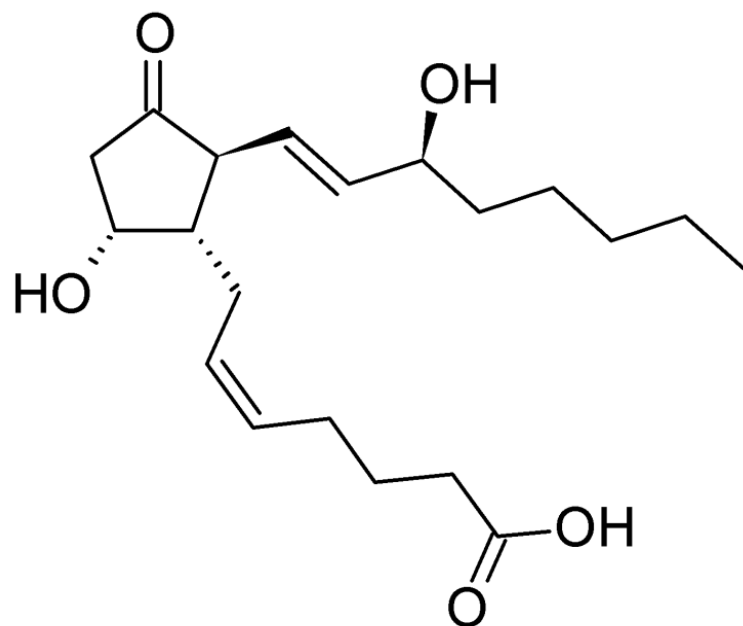


PAH



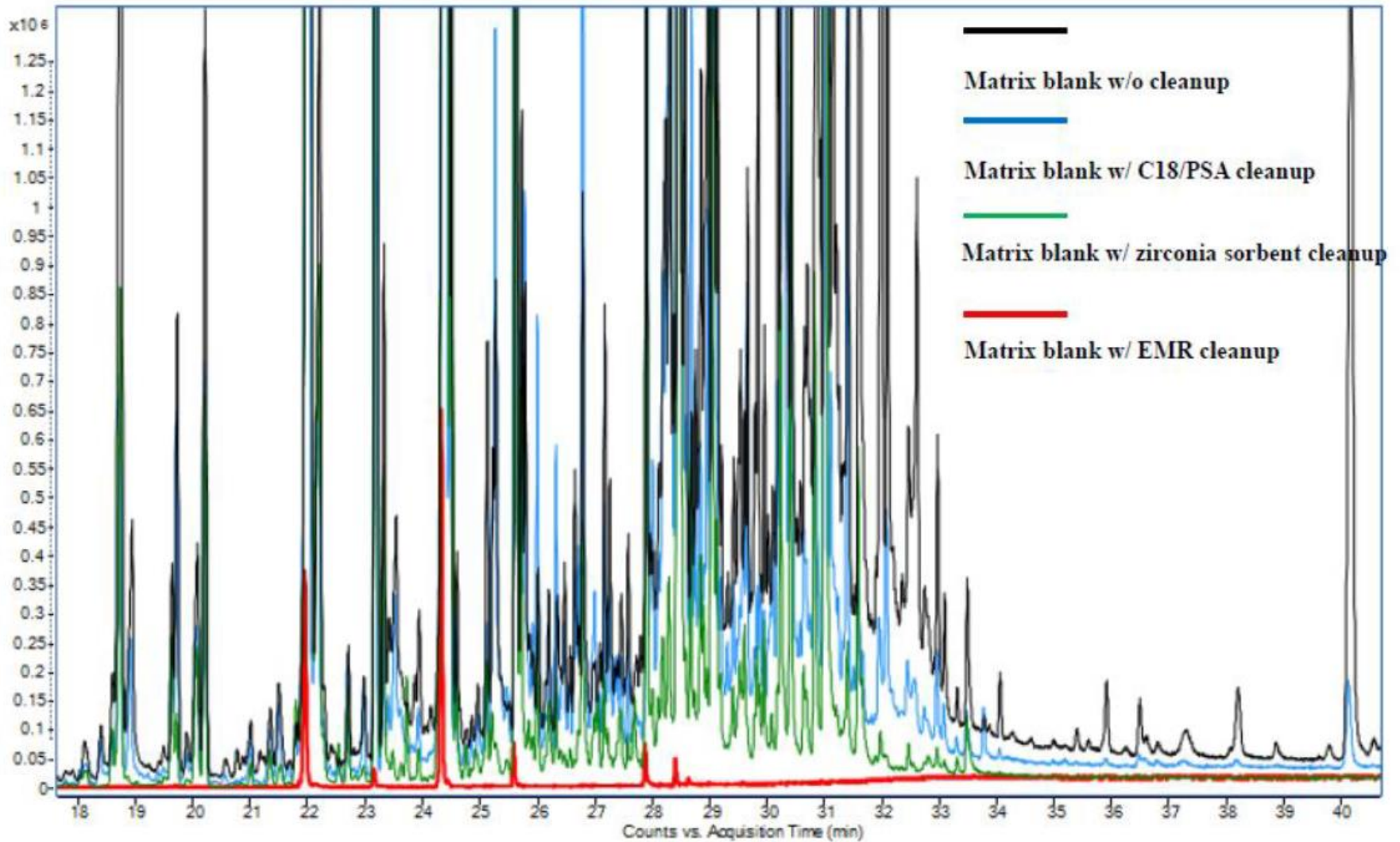
Vitamin D

例外：官能基の長い脂肪族化合物は除去
(例：プロスタグランジン)



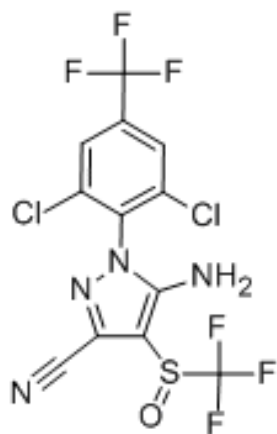
DNOP

脂質除去効果：GC/MSフルスキャン

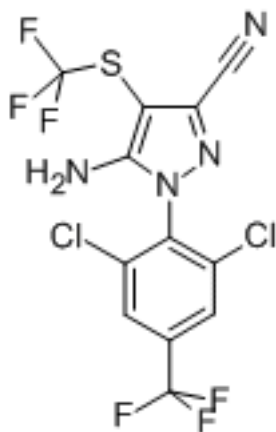


高い脂質除去効果とピーク形状の改善

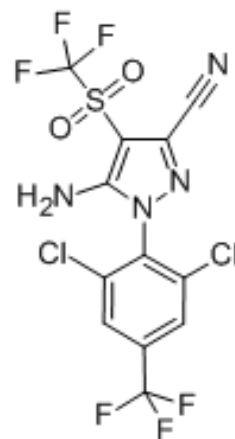
6470LC/MS/MSのフィプロニルおよび代謝物分析



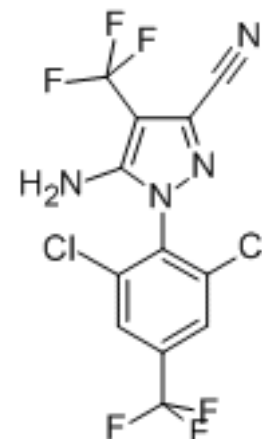
英文名称 : Fipronil
 日本語名称 : フィプロニル
 MF : C₁₂H₄Cl₂F₆N₄O
 MW : 437.15
 CAS : 120068-37-3



英文名称 : Fipronil-Sulfide
 日本語名称 : フィプロニル
 スルフィド
 MF : C₁₂H₄Cl₂F₆N₄S
 MW : 421.152
 CAS : 120067-83-6



英文名称 : Fipronil-Sulfone
 日本語名称 : フィプロニル
 スルホン
 MF : C₁₂H₄Cl₂F₆N₄O₂S
 MW : 453.15
 CAS : 120068-36-2



英文名称 : Fipronil-Desulfinyl
 日本語名称 : フィプロニル
 デスルフィニ
 MF : C₁₂H₄Cl₂F₆N₄
 MW : 389.086
 CAS : 205650-65-3

LC分析条件

Injection volume: 2 μ L

Column Temp: 40 °C

Column: Poroshell120 EC C18 (2.1 $\times$ 50mm, 2.7 μ m) PN/699775-902

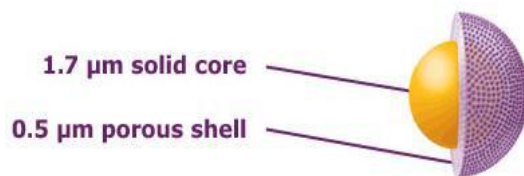
Pump Flow: 0.4mL/min

Mobile Phase: A = Water (0.1% Formic acid + 5mM AA)

B = MeOH



Time [min]	Δ	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]
0.00		40.00	60.00	0.400
3.00		30.00	70.00	---
3.50		2.00	98.00	---
4.50		2.00	98.00	---
4.60		40.00	60.00	---



Flow	
0.400 mL/min	
Solvents	
A:	40.00 %
1	100.0 % Water V.03 0.1%FA
2	100.0 % Water V.03
B:	60.00 %
1	100.0 % Methanol V.03
2	100.0 % Methanol V.03
Pressure Limits	
Min:	0.00 bar
Max:	1,300.00 bar
Stoptime	
As Injector/No Limit	
6.00 min	
Posttime	
Off	
1.00 min	

MS分析条件



Source parameters

Gas Temp:	250 °C	300 °C	
Gas Flow:	7 l/min	3.0 l/min	
Nebulizer:	35 psi	14.9 psi	
Sheath Gas Temp:	325 °C	124.9872 °C	
Sheath Gas Flow:	11 l/min	3.0 l/min	
Capillary:	4000 V	3500 V	34 nA
Nozzle Voltage:	1000 V	500 V	
Chamber Current:			0.13 µA

ポジティブ

ネガティブ

Time segments						
#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
▶ 1	0	Dynamic MRM	To MS	300	0	☒

Time segments						
#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
▶ 1	0	Dynamic MRM	To MS	0	200	☒

分析条件（単独でフィプロニル及び代謝物分析を行う際はネガティブモードを推奨）

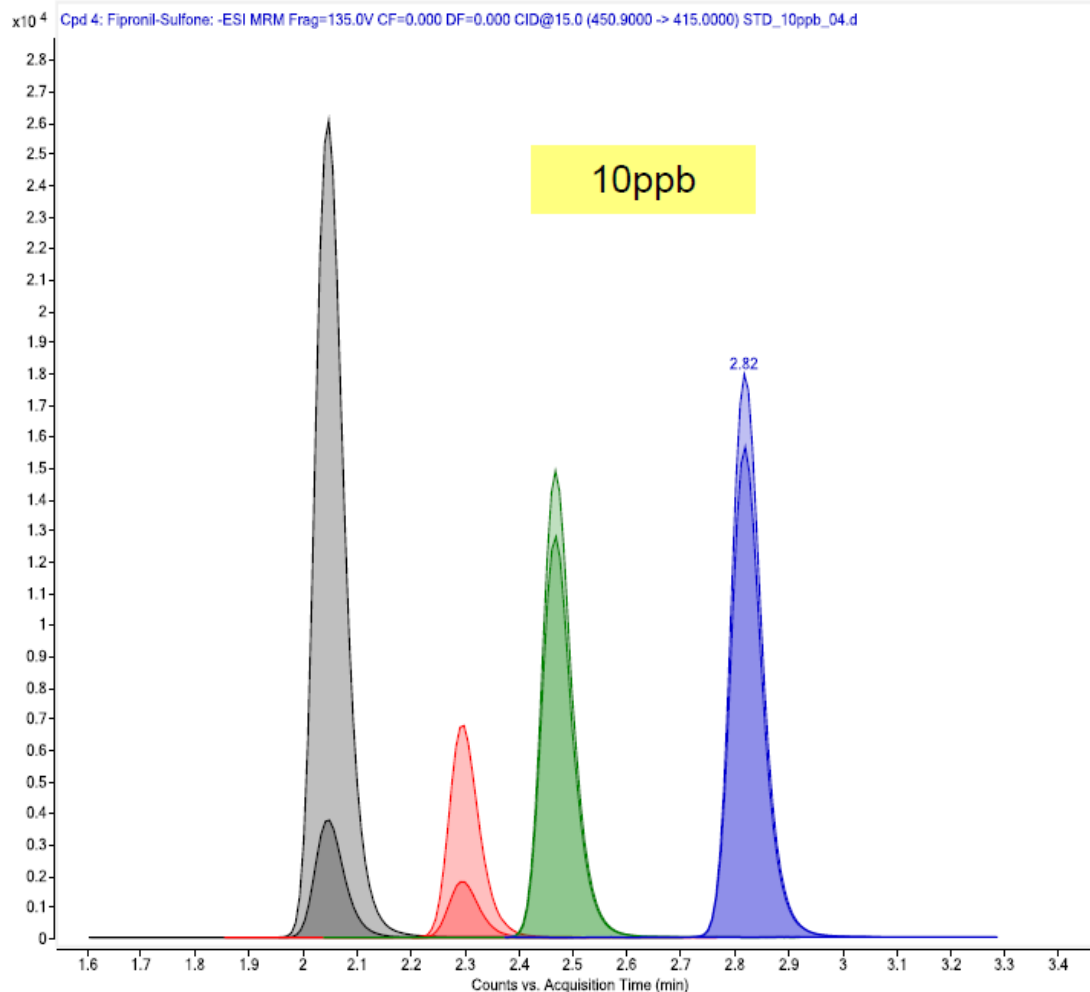
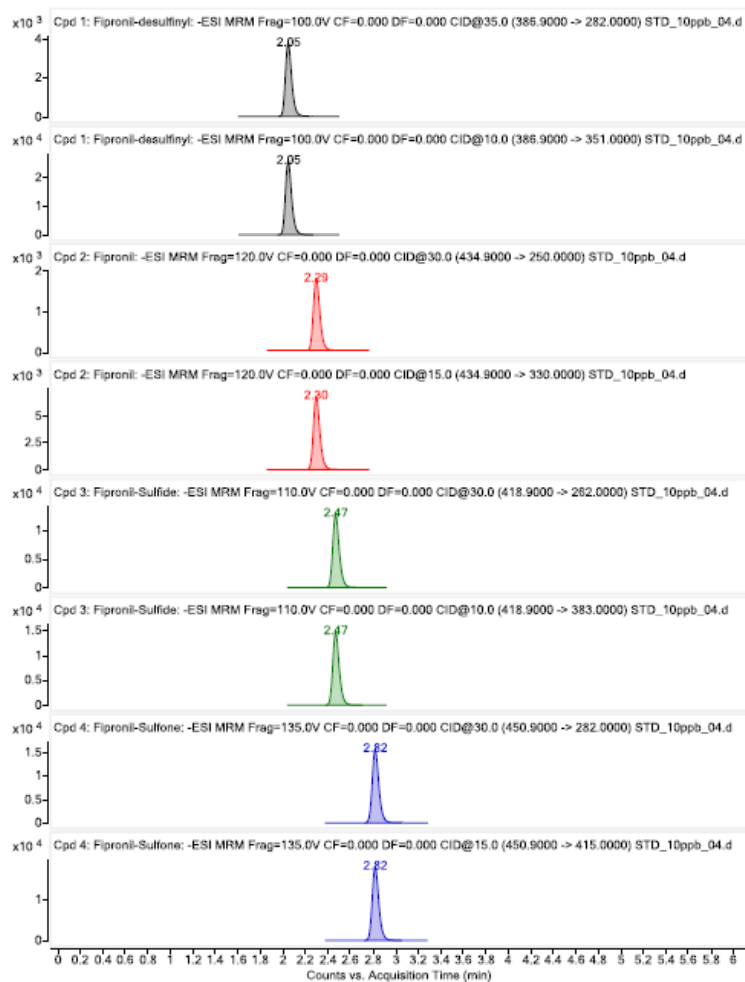
ポジティブ

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Ret Time (min)	Delta Ret Time	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	Fipronil Sulfide	☐	423	Unit	319	Unit	2.48	0.58	150	35	3	Positive
	Fipronil Sulfide	☐	421	Unit	320	Unit	2.48	0.58	150	30	3	Positive
	Fipronil Sulfide	☐	421	Unit	317	Unit	2.48	0.58	150	30	3	Positive
	Fipronil Sulfone+NH4	☐	470	Unit	453	Unit	2.83	0.5	100	15	3	Positive
	Fipronil Sulfone+NH4	☐	470	Unit	320	Unit	2.83	0.5	100	35	3	Positive
	Fipronil+H	☐	437	Unit	368	Unit	2.31	0.88	150	20	3	Positive
	Fipronil+H	☐	437	Unit	290	Unit	2.31	0.88	150	30	3	Positive
	Fipronil-desulfinyl	☐	389	Unit	334	Unit	2.06	0.6	150	30	3	Positive
	Fipronil-desulfinyl	☐	389	Unit	213	Unit	2.06	0.6	150	45	3	Positive

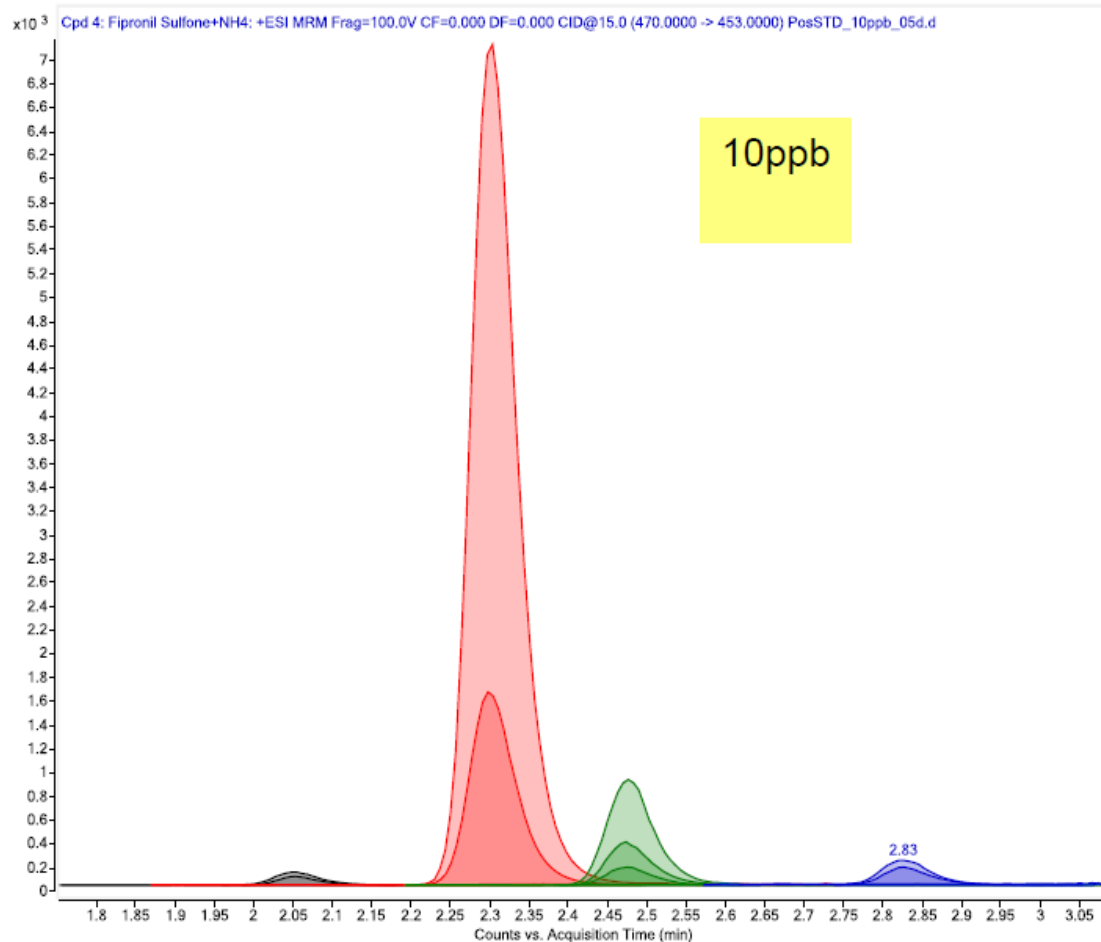
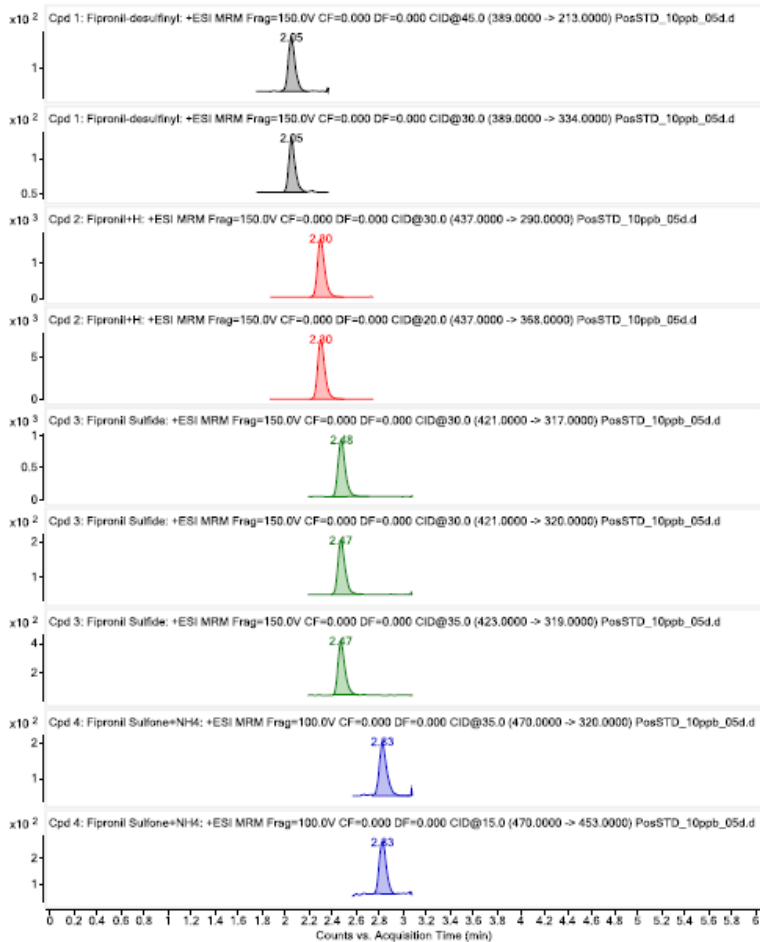
ネガティブ（推奨）

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Ret Time (min)	Delta Ret Time	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	Fipronil	☐	434.9	Unit	330	Unit	2.31	0.91	120	15	3	Negative
	Fipronil	☐	434.9	Unit	250	Unit	2.31	0.91	120	30	3	Negative
	Fipronil-desulfinyl	☐	386.9	Unit	351	Unit	2.06	0.89	100	10	3	Negative
	Fipronil-desulfinyl	☐	386.9	Unit	282	Unit	2.06	0.89	100	35	3	Negative
	Fipronil-Sulfide	☐	418.9	Unit	383	Unit	2.48	0.87	110	10	3	Negative
	Fipronil-Sulfide	☐	418.9	Unit	262	Unit	2.48	0.87	110	30	3	Negative
	Fipronil-Sulfone	☐	450.9	Unit	415	Unit	2.83	0.91	135	15	3	Negative
	Fipronil-Sulfone	☐	450.9	Unit	282	Unit	2.83	0.91	135	30	3	Negative

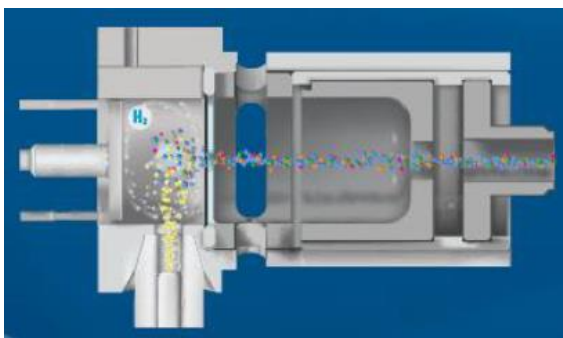
MRM : ネガティブモード (推奨)



MRM : ポジティブモード



GC/MS/MS分析



Agilent JetCleanセルフクリーニングイオン源は、マニュアル作業でのイオン源のクリーニング頻度を削減します。
手作業でのクリーニングの回数を毎月1回から6か月に1回に削減することも可能です。

GC分析条件

Constant Flow Screening Method:				
Configuration	MMI + 15m + PUU + 15m + MS			
Column	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 μm , 19091S-431 UI			
PUU	Purged Ultimate Union (for backflush)			
GC	Agilent 7890A Series			
Inlet	MMI			
Inlet liner	5190-2293			
Carrier gas	Helium			
Inlet flow (column 1)	1 mL/min			
PUU flow (column 2)	column 1 flow + 0.2 mL/min			
Inlet temperature	60°C(0.1min)-600°C/min-280°C			
Injection mode	splitless			
Injection volume	1 μL			
Purge flow to split vent	60 mL/min at 1.1 min			
Gas saver	On (20 mL/min at 4.0 min)			
Oven temperature program		60°C	1 min	
	40°C/min	120°C	0 min	
	5°C/min	310°C	0 min	40.5 min

MS分析条件

Capillary flow technology	
Aux EPC gas	Helium
Aux EPC pressure	3.0 psi during run, 55.0 psi during backflush
Analytical columns (2)	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 μm , 19091S-431 UI
Retention time locking	Chlorpyrifos-methyl locked to 18.111 min
Tandem Mass Spectrometer Mode	Agilent 7000 Series Electron impact
Transfer line temperature	300 °C
Source temperature	280 °C
Quadrupole temperature	Q1 and Q2 = 150 °C
Tune file	atunes.eiex.tune.xml
MRM Mode Conditions	
MS1 resolution	Wide
MS2 resolution	Wide
Collision gas flow	Nitrogen at 1.5 mL/min,
Quenching gas flow	Helium at 2.25 mL/min
Detector Gain	10
Backflushing Conditions	
Timing	5 min duration during post-run
Oven temperature	310 °C
Aux EPC pressure	50 psi
Inlet pressure	2 psi

フィプロニルMRMパラメータ

化合物名	RT	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	ドゥエル タイム	コリジョン エネルギー
Fipronil	21.652	350.8	254.8	10	15
Fipronil	21.652	366.8	212.8	10	25
Fipronil	21.652	254.9	228.0	10	15
Fipronil sulfide	21.388	351.0	254.9	10	20
Fipronil sulfide	21.388	420.0	350.9	10	10
Fipronil sulfide	21.388	254.9	227.9	10	15

フィプロニルGC/MS/MS MRM(10ppb)

