

## 2 飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発

矢野 愛子<sup>\*1</sup>, 佐藤 憲大<sup>\*2</sup>, 小野 雄造<sup>\*3</sup>

### Development of Determination Method of Fipronil in Feed by LC-MS/MS

Aiko YANO<sup>\*1</sup>, Norihiro SATO<sup>\*2</sup> and Yuzo ONO<sup>\*3</sup>

(<sup>\*1</sup> Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now Kyushu Regional Agricultural Administration Office, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

<sup>\*2</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan), <sup>\*3</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC)

We have developed a quantitative determination method of the concentration of fipronil in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, fipronil was extracted with acetonitrile, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid partition and SPE column (InertSep GC/PSA, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of fipronil. LC separation was then carried out on an ODS column (Capcell Pak C18 MG II, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm, Osaka Soda Co. Ltd.; Osaka, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

As documented in the previous report, whereas we conducted the recovery test on rice straw, the mean recovery of fipronil did not comply with the validation standard stipulated in the Feed Analysis Standard of Japan. On the other hand, in this report, we investigated the possible cause of the low recovery of fipronil. We found that the low fipronil recovery was caused by a water soluble material in rice straw matrix, and the effect of the material can be removed by the use of NaOH solution (0.5 w/v%) instead of phosphate buffer in liquid-liquid partition.

Recovery tests were carried out on rice straw. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.2 mg/kg, and the resulting mean recoveries ranged from 76.7 % to 84.8 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 13 % for fipronil.

Formula feed for layers, corn, alfalfa hay and whole-crop rice silage (WCRS) were also brought to recovery tests in order to determine the limit of quantification of fipronil in feed. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.0008 mg/kg for formula feed for layers and corn, 0.01 mg/kg for alfalfa hay, and 0.004 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting data together with the data obtained from the previous report thus enabled us to determine the limit of quantification of fipronil in feed.

Key words: fipronil; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw;

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 農林水産省九州農政局

<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 農林水産省消費・安全局

<sup>\*3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

キーワード：フィプロニル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら

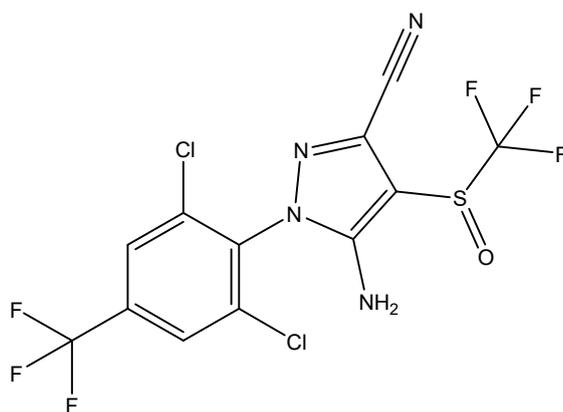
## 1 緒 言

フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫に対して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<sup>1)</sup>。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稲及び野菜等である<sup>1)</sup>。飼料中の基準値としては、牛、めん羊、山羊及びしか用配合飼料並びに豚用配合飼料で0.02 mg/kg、鶏及びうずら用配合飼料で0.01 mg/kg、牧草で0.2 mg/kg と設定されている<sup>2)</sup>。また、飼料中の管理基準値として、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kg と定められている<sup>3)</sup>。

飼料中のフィプロニルの分析法としては、飼料分析基準<sup>4)</sup>においてガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法が収載されており、定量下限は0.01 mg/kg である。今般、飼料中のフィプロニルについて、設定基準値及び対象飼料の変更が検討されており、基準値に対して十分な精確さを持つ分析法の開発が急務となっている。

昨年度に筆者らは、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法<sup>5)</sup>を基に、飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、稲わら以外の試料については飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び精度の目標値を満たす結果であった。稲わらについては真度の目標値を満たさなかったため、今回、その原因究明及び定量法の改良を検討したので、その概要を報告する。また、稲わら以外の試料について、昨年度未検討であった定量下限及び検出下限を検討したので併せて報告する。

参考にフィプロニルの構造式等を Fig. 1 に示した。



Fipronil

5-amino-1-(2,6-dichloro-4- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-4-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile  
 $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  MW: 437.1 CAS No.: 120068-37-3

Fig. 1 Chemical structure of fipronil

## 2 実験方法

### 2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし，アルファルファ乾草及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎した。

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of the formula feed

Formula feed type	Ingredient type	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	61	Corn
	Brans	1	Rice bran
	Oil seed meal	22	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	6	Pork and chicken meal, fish meal, feather meal
	Others	10	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, oyster shell, feed additives

### 2.2 試薬

1) アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。アンモニア水，塩化ナトリウム，塩酸，酢酸，酢酸アンモニウム，硝酸，水酸化ナトリウム，トリクロロ酢酸，トリフルオロ酢酸ナトリウム，リン酸水素二カリウム，リン酸二水素カリウム，硫酸亜鉛七水和物及び硫酸ナトリウム（無水）は試薬特級を用いた。トリフルオロ酢酸は SAJ 特級（Sigma-Aldrich 製）を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は LC-MS 用の超純水（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用いた。

2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）

リン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り，水約 500 mL に溶解し，1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.0 に調整した後，水を加えて 1 L とした。

3) フィプロニル標準液

フィプロニル標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.4 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフィプロニル標準原液を調製した（この液 1 mL は，フィプロニルとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して，フィプロニル標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にフィプロニルとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する検量線作成用フィプロニル標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（配合飼料及びとうもろこし用）：

ZM-200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 18000 rpm）

粉碎機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

- 2) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2DW タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) ろ紙: 5 種 B 桐山製作所製
- 4) グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製
- 5) メンブランフィルター: DISMIC-25HP (孔径 0.20  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製
- 6) LC-MS/MS :  
LC 部: ACQUITY UPLC System Waters 製  
MS 部: ACQUITY TQ Detector Waters 製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g (乾牧草, 稲わら及び WCRS は 5.0 g) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 15 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. さらに全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた. この液 20 mL を, 液液分配に供する試料溶液とした.

### 2) 液液分配

試料溶液 20 mL をあらかじめ塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL (稲わらは水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) 20 mL) を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に加え, 10 分間振り混ぜた後静置し, アセトニトリル層 (上層) を 100 mL の三角フラスコに入れた. アセトニトリル層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し 100 mL のなす形フラスコに綿栓ろ過した後, 先の三角フラスコを順次少量のアセトニトリルで洗浄し, 洗液を先の綿栓を通してろ液を合わせた. ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理に供する試料溶液とした.

### 3) カラム処理

ミニカラムをアセトン 10 mL 及びヘキサン 10 mL で順次洗浄した. 試料溶液をミニカラムに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下した. 試料溶液の入っていた 100 mL のなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL をミニカラムに加えてフィプロニルを溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. メタノール 1 mL (乾牧草, 稲わら及び WCRS にあっては 10 mL) を正確に加えて残留物を溶かした後, メンブランフィルターでろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

### 4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各フィプロニル標準液各 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し, 選択反応検出 (SRM)

クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Capcell Pak C18 MGII (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), Osaka soda
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate- 2 mmol/L ammonium acetate methanol (7:3) (hold for 0.2 min) → 12.5 min → (5:95) (hold for 2.5 min) → 2 min → (7:3) (hold for 12 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Negative ion mode)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (700 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)
Capillary voltage	2.5 kV

Table 3 MS/MS Parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Fipronil	435	330	—	25	15
		—	250	25	30

## 5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のフィプロニル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

### 2.5 添加回収試験

2.2 の 3) のフィプロニル標準原液をメタノールで正確に希釈し添加に用いた。

フィプロニルとして、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしに 0.0008 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.8 ng/mL），アルファルファ乾草に 0.01 mg/kg 相当量（同 0.5 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.004 mg/kg 相当量（同 0.5 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして 0.01 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った。

Sample 10.0 g (5.0 g for grass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) (200 mL Erlenmeyer flask))

- added 15 mL of water and allowed to stand for 30 min
- added 100 mL of acetonitrile and shook for 30 min
- filtered through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetonitrile
- filled up to 200 mL with acetonitrile

Transferred 20 mL of sample solution to a 100 mL separating funnel

- added 10 g of sodium chloride and 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 7.0)  
(20 mL of NaOH solution (0.5 w/v%) for rice straw)
- shook for 10 min and allowed to stand for a while
- discarded the water layer and transferred the acetonitrile layer to a 100 mL Erlenmeyer flask
- added some amount of sodium sulfate and dehydrated the acetonitrile layer
- filtrated to a 100 mL eggplant flask
- washed the Erlenmeyer flask with acetonitrile and filtrated to the eggplant flask
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 2 mL of hexane

GC/PSA column (500 mg/500 mg)

- prewashed with 10 mL of acetone and 10 mL of hexane
- applied sample solution and let it flow out
- washed the eggplant flask and eluted with 5 mL of hexane (twice)
- set a reciever (50 mL eggplant flask)
- eluted with 15 mL of hexane-acetone (4:1)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 1 mL of methanol (10 mL for grass hay, rice straw and WCRS)
- filtrated through hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.2 μm)

LC-MS/MS

### Scheme 1 Analytical procedure for fipronil

## 3 結果及び考察

### 3.1 稲わらでの低回収率の原因の究明

昨年度、稲わらについてフィプロニルの回収率が低い原因を検討したところ、液液分配に問題がある可能性が高いことが示唆された。そこで、原因物質の推定及び回収率の改善方法を検討したところ、以下のことが判明した。

- ① 低回収率の原因物質は、高温処理に対して安定な水溶性物質である。
- ② 除たん白に用いられるいくつかの試薬により回収率が改善される。
- ③ 酸よりもアルカリの方が、回収率の改善効果が高い。
- ④ 回収率改善のために添加する試薬は、抽出時ではなく、液液分配時に添加する必要がある。

これらの検討の結果、液液分配時に、リン酸緩衝液の代わりに水酸化ナトリウム溶液を添加した場合が最も良好な回収率となった。

そこで、液液分配時の水酸化ナトリウム溶液の最適濃度を検討した。稲わらにフィプロニルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加後、本法に従って調製した抽出液 20 mL を用い、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に代えて 0.1, 0.5, 1, 2 又は 5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を使用して、本法に従って液液分配以降の操作を行った。対照として先の抽出液 20 mL に本法に従って 0.5

mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を使用し、液液分配以降の操作を行った。その結果、Table 4 のとおり、フィプロニルは水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) を使用した場合に最も高回収率であった。したがって、液液分配に使用する水酸化ナトリウムの最適濃度は 0.5 w/v% と考えられた。

以上の結果から、稲わらについては液液分配時に 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の代わりに水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) を用いることとした。

Table 4 Optimal concentration of NaOH in liquid-liquid partition (LLP)

Sample	Phosphate buffer	Recovery (%)				
		NaOH (w/v%)				
		0.1	0.5	1	2	5
Rice straw 1	53.0	83.6	87.4	81.5	70.9	71.7

$n = 1$

### 3.2 稲わらにおける妨害物質の検討

稲わら 5 検体を試料として、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

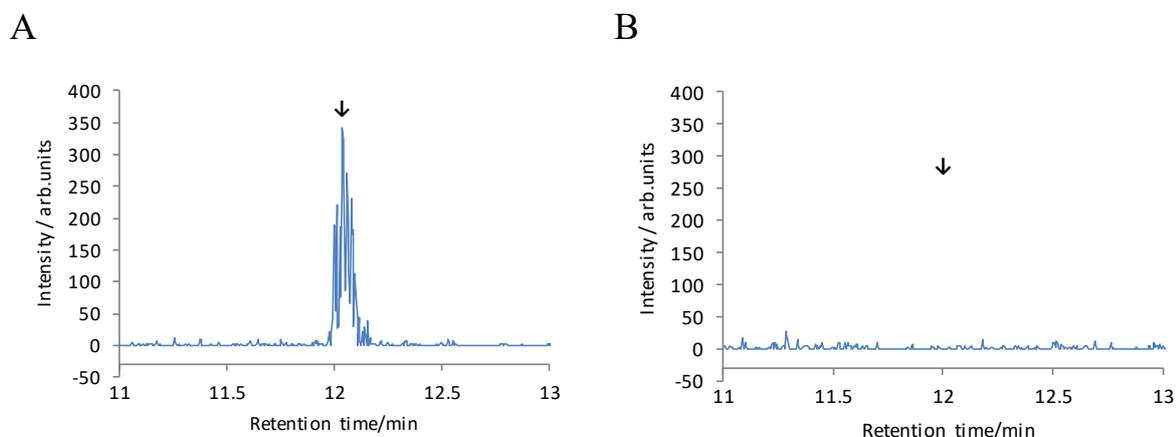


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of fipronil in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of fipronil.)

A: Standard solution (0.1 ng/mL)

B: Blank sample solution (rice straw)

### 3.3 稲わらにおける添加回収試験

稲わら 5.0 g にフィプロニルとして 0.01 又は 0.2 mg/kg 相当量を添加後よく混合し、一夜静置した後、本法に従って定量し、フィプロニルの平均回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、Table 5 のとおり、フィプロニルの平均回収率は 76.7~84.8 %、その繰返し精度は相対標準偏差

( $RSD_r$ ) として 13 %以下の成績であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 22 %以下 (0.01 mg/kg), 20 %以下 (0.2 mg/kg)) を満たしていた.

Table 5 Recoveries of fipronil with NaOH in LLP

Spiked level (mg/kg)	Rice straw 1		Rice straw 2	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
0.01	77.4	13	84.8	9.0
0.2	84.6	1.3	76.7	2.6

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.4 稲わらにおける定量下限及び検出下限の検討

フィプロニルの検量線が直線性を示した範囲 0.1~10 ng/mL の下端付近となる濃度 (稲わらで 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 ng/mL 相当量)) における添加回収試験の結果, 得られたピークの  $SN$  比が 10 以上であったため, これを稲わら中のフィプロニルの定量下限とした. この濃度は, 稲わら中のフィプロニルの管理基準値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/5 以下) を満たした. なお, Table 5 に示したとおり, 当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの  $SN$  比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は 0.004 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた.

### 3.5 稲わら以外の試料における定量下限及び検出下限の検討

#### 1) 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 6 のとおり, 平均回収率は 81.3~102 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 12 %以下の成績であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 22 %以下 (0.0008~0.11 mg/kg), 20 %以下 (0.2 mg/kg)) を満たす結果であった. なお, Table 6 には, 参考のために昨年度に実施した添加回収試験の結果を併せて記載した.

Table 6 Recoveries for fipronil

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Wheat		Corn		Alfalfa hay		WCRS <sup>d)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.0008	102 <sup>c)</sup>	3.9 <sup>c)</sup>	81.3	8.9	91.1 <sup>c)</sup>	12 <sup>c)</sup>	—	—	—	—
0.002	—	—	86.2	6.7	—	—	—	—	—	—
0.004	—	—	—	—	—	—	—	—	102 <sup>c)</sup>	7.0 <sup>c)</sup>
0.008	—	—	—	—	85.8	6.6	—	—	—	—
0.01	83.2	7.1	—	—	—	—	81.6 <sup>c)</sup>	5.5 <sup>c)</sup>	—	—
0.018	—	—	—	—	—	—	—	—	87.5	7.2
0.02	81.3	7.0	—	—	90.0	1.8	—	—	—	—
0.04	—	—	—	—	—	—	86.7	4.1	—	—
0.11	—	—	—	—	—	—	—	—	85.6	5.2
0.2	—	—	—	—	—	—	85.8	6.7	—	—

— : Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Test results conducted in this report. Others were conducted in the previous report.

d) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 2.5 mg/kg as air-dry basis for fipronil. The levels of fipronil as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

$$\begin{aligned} & \text{The levels of fipronil as fed basis (moisture 60 \%)} \\ & = \text{the levels of fipronil as air-dry basis (moisture 10 \%)} / 2.25 \end{aligned}$$

## 2) 定量下限及び検出下限

フィプロニルの検量線が直線性を示した範囲, 0.1~10 ng/mL の下端付近となる濃度 (成鶏飼育用配合飼料, 小麦及びとうもろこしは 0.0008 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.8 ng/mL 相当量) 並びにアルファルファ乾草及び WCRS (風乾物中) は 0.01 mg/kg 相当量 (同 0.5 ng/mL 相当量) ) における添加回収試験の結果, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, これらをフィプロニルの定量下限とした. これらの濃度は, 配合飼料における基準値の最小値である鶏及びうずら用配合飼料中のフィプロニルの基準値 (0.01 mg/kg) に対して 2/25, 牧草中のフィプロニルの基準値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20, WCRS 中のフィプロニルの管理基準値の風乾物中換算値 (0.2 mg/kg) に対して 1/20 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 未満 : 2/5 以下, 基準値 0.1 mg/kg 以上 : 1/5 以下) を満たしていた. なお, Table 6 に示したとおり, 当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料, 小麦及びとうもろこしで 0.0002 mg/kg, アルファルファ乾草及び WCRS (風乾物中) で 0.004 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値 0.1 mg/kg 未満 : 1/5 以下, 基準値 0.1 mg/kg 以上 : 1/10 以下) を満たしていた.

## 4 まとめ

飼料中に残留するフィプロニルについて、LC-MS/MSによる定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討した。稲わらについては、昨年度の検討においてフィプロニルの回収率が低かった原因の究明及び定量法の改良を検討し、稲わら以外の試料については、昨年度未実施であった定量下限及び検出下限を検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 稲わら中のフィプロニルは、稲わら中の水溶性夾雑物の影響により低回収率となること及び液体分配時に水酸化ナトリウム溶液を用いることにより回収率が改善することが明らかとなった。
- 2) 稲わらを用いて本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 稲わらに、フィプロニルとして 0.01 又は 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。
- 4) 本法のフィプロニルの定量下限は、成鶏飼育用配合飼料、小麦及びとうもろこしで 0.0008 mg/kg, アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料、小麦及びとうもろこしで 0.0002 mg/kg, アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.004 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：フィプロニル農薬・動物用医薬品評価書，平成 28 年 1 月 (2016).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策委託事業（飼料中の農薬分析法開発委託事業） (2018).