

5 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分析法の追加検討及び共同試験

武田 然也^{*1}, 倉島 ちなみ^{*2}, 白井 小枝^{*1}, 名塚 英一^{*1}, 牧野 大作^{*3}

Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Fipronil in Feed by LC-MS/MS

TAKEDA Zenya^{*1}, KURASHIMA Chinami^{*2}, SHIRAI Sae^{*1}, NAZUKA Eiichi^{*1} and MAKINO Daisaku^{*3}
(*² Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), *² Nagoya Regional Center, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan), *³ Fukuoka Regional Center, FAMIC)

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

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 extraction 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 aqueous 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, it was clarified that the recovery of fipronil in rice straw can be improved by the use of NaOH solution (0.5 w/v%) instead of phosphate buffer in liquid-liquid partition. In this report, we investigated whether the method of using NaOH solution can be applied to feeds other than rice straw. However, we concluded that the method was not applicable to feeds other than rice straw due to operational problems or low recovery of fipronil.

A collaborative study was conducted by ten laboratories using formula feed for layers, formula feed for beef cattle, wheat, alfalfa hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Those materials were added with fipronil according to the following specifications: 0.01 mg/kg for formula feed for layers, 0.0016 mg/kg for formula feed for beef cattle, 0.002 mg/kg for wheat, 0.18 mg/kg for alfalfa hay, 0.25 mg/kg for rice straw, and 0.25 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 68.8 % to 82.4 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 8.2 % and less than 9.9 % respectively. The HorRat was less than 0.45.

This method was thus validated as useful for inspections of fipronil in feed.

Key words: fipronil; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed; collaborative study

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 農林水産省消費・安全局

*³ 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；飼料；共同試験

1 緒 言

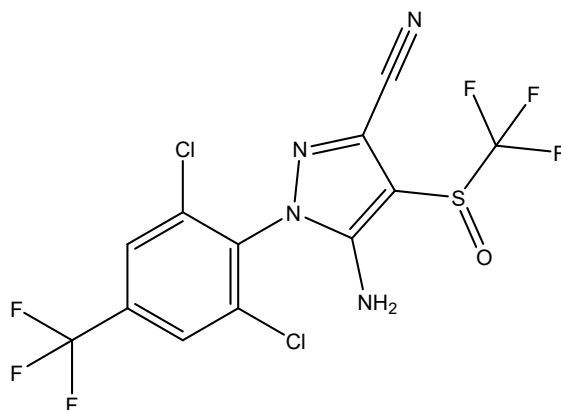
フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫に対して神経興奮抑制を阻害することにより殺虫作用を示すと考えられている¹⁾。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稻及び野菜等である。海外では米国、オーストラリア、ヨーロッパ及びアジア諸国において、とうもろこし、じゃがいも、米及び麦類等の穀物並びに野菜、果実等に登録がある²⁾。我が国の飼料中の基準値としては、えん麦、大麦、小麦及びライ麦で0.002 mg/kg、とうもろこしで0.02 mg/kg、マイロで0.01 mg/kg、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kgと法令等により定められている^{3),4)}。

飼料中のフィプロニルの分析法は、飼料分析基準⁵⁾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。今年度、飼料中のフィプロニルの基準値の改正が行われたことから⁶⁾、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された。

これまで、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法⁷⁾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。）による分析法の飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、稲わらにおいて回収率が低い傾向が認められた⁸⁾。そのため、矢野らは稲わらの分析法について更なる検討を行い、液液分配の際に用いる0.5 mol/L リン酸緩衝液の代わりに、0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液を用いることで回収率が改善することを明らかにした⁹⁾。

今回、液液分配時に0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液を用いる方法について稲わら以外の飼料にも適用できるかを検討した。また、これまで0.5 mol/L リン酸緩衝液のpH調整に用いる試薬を「1 mol/L 塩酸又は1 mol/L 水酸化ナトリウム」としていたが、本来は緩衝液を組成する試薬を用いてpHを調整すべきであるため、0.5 mol/L リン酸緩衝液のpH調整は「リン酸(1+10)又は1 mol/L 水酸化カリウム」を用いることとし、当該緩衝液の調製法の変更によるフィプロニルの分析結果への影響がないことを確認した。さらに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にフィプロニルの構造式等を以下のFig. 1に示した。



Fipronil

5-amino-1-(2,6-dichloro-4- α,α,α -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 追加検討

2.1.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，小麦，とうもろこし及び乾牧草（アルファルファ乾草）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，分析用試料とした．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，分析用試料とした．

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 Compositions 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	Swine and poultry by-product meal, fish meal, feather meal
	Others	10	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, oyster shell, feed additives

2.1.2 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．塩化ナトリウム，塩酸，水酸化カリウム，水酸化ナトリウム，硫酸ナトリウム（無水），リン酸，リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは試薬特級を用いた．1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液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）又は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211

の 5218 に定義された超純水) 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、リン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウム溶液を用いて 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)。

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それぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した。

2.1.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (配合飼料, 小麦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)

粉砕機 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-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)

3) 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

4) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 μm , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

5) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.1.4 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 (5 種 B) 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。更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

スコにろ紙（5種 B）でろ過した後、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、洗液を先のろ紙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 µL 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 aqueous solution- 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (7:3) (hold for 0.2 min) → 12.5 min → (5:95) (hold for 2.5 min) → (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)
Mode	Negative
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (700 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (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

4) 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。

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 through filter paper (No. 5B of JIS P3801) 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 with 5 mL of hexane and eluted (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

2.1.5 添加回収試験

2.1.2 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 WCRS に原物中に換算して 0.004 及び 0.11 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でそれぞれ 0.5 及び 12.5 ng/mL 相当量）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 2.1.4 の稲わらの定量法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして 0.01 及び 0.25 mg/kg 相当量となるように行い、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。

2.1.6 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法の変更の影響

0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法について、pH 調整に用いる試薬を「1 mol/L 塩酸又

は 1 mol/L 水酸化ナトリウム」から「リン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウム」に変更した影響について検討を行った。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それぞれ 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL) , 小麦に 0.002 mg/kg 相当量 (同 2 ng/mL) 並びに乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.2 mg/kg 相当量 (同 10 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後、2.1.4 の 1)に従って抽出し、液液分配に供する試料溶液を得た。得られた試料溶液について、1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を調整した 0.5 mol/L リン酸緩衝液及びリン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウムにより pH を調整した 0.5 mol/L リン酸緩衝液を用いてそれぞれ 2.1.4 の 2)に従い液液分配を実施した。その後は本法に従って定量し、平均回収率を求めた。

2.2 共同試験

2.2.1 試料

フィプロニルが残留していないことを確認した成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、乾牧草 (アルファルファ乾草) 及び稲わらをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。また、WCRS を 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。これらについて、成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及び小麦は約 12 g ずつ、アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS は約 6 g ずつ小分けしたもの (試料名は非明示) 各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

なお、試験に用いた成鶏飼育用配合飼料及び肉用牛肥育用配合飼料の配合割合を Table 4 に示した。

Table 4 Compositions of the formula feed used in a collaborative study

Formula feed types	Ingredient types	Proportion		Ingredients
		(%)		
For layers	Grains	62	Corn, rice, bread crumbs	
	Brans	3	Rice bran, wheat bran	
	Oil seed meal	20	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal	
	Animal by-products	3	Fish meal, swine meat and born meal	
	Others	12	Vegetable oil, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, feed additives	
For beef cattle	Grains	50	Corn, barley	
	Brans	32	Rice bran, wheat bran, barley bran	
	Oil seed meal	13	Soybean meal, rapeseed meal	
	Others	5	Alfalfa meal, beer yeast, molasses, sea weeds meal, calcium carbonate, salt, feed additives	

2.2.2 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 試験用又はこれと同等以上のものを用いた。メタノールは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた。塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム及び硫酸ナトリウム (無水) は試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマ

トグラフ用又はこれと同等以上のものを用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）又は高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2) フィプロニル標準原液

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）。

3) フィプロニル標準液及び検量線作成用標準原液

フィプロニル標準原液 10 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えて，1 mL 中にフィプロニルとして 10 μ g を含有するフィプロニル標準液及び検量線作成用標準原液を調製した。

4) 成鶏飼育用配合飼料添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 100 ng を含有する成鶏飼育用配合飼料添加用標準液を調製した。

5) 肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えたものからさらに 16 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 16 ng を含有する肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液を調製した。

6) 小麦添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えたものからさらに 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 20 ng を含有する小麦添加用標準液を調製した。

7) 乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 18 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 900 ng を含有する乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液を調製した。

8) 稲わら添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 25 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 1250 ng を含有する稲わら添加用標準液を調製した。

9) WCRS 添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 25 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 1250 ng を含有する WCRS 添加用標準液を調製した。

3)の検量線作成用標準原液を 1 本，4)~9)を各 2 本，濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。なお，1)の試薬については各試験室において準備した。

2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。フィプロニルとして，成鶏飼育用配合飼料

に 0.01 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して成鶏飼育用配合飼料添加用標準液 1 mL 添加）を，肉用牛肥育用配合飼料に 0.0016 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液 1 mL 添加）を，小麦に 0.002 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して小麦添加用標準液 1 mL 添加）を，乾牧草（アルファルファ乾草）に 0.18 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液 1 mL 添加）を，稲わらに 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して稲わら添加用標準液 1 mL 添加）を，WCRS に 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して WCRS 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の前日に添加して調製した。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

分析値は，分析試料中濃度（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）で表し，4桁目を四捨五入して有効桁数3桁まで報告させた。

2.2.6 分析実施期間

令和2年12月9日から令和3年1月8日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{10), 11)}を参考に，Cochran 検定，single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い，外れ値の有無を確認した上で平均回収率，繰返し精度（RSD_r）及び室間再現精度（RSD_R）を算出し，得られた RSD_R から，修正 Horwitz 式¹²⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

ジーエルサイエンス株式会社，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，一般財団法人日本食品検査福岡検査所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，フィード・ワン株式会社研究所，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター及び同神戸センター（計 10 試験室）

3 結果及び考察

3.1 追加検討

3.1.1 稲わらについて開発した分析法の稲わら以外の飼料への適用の可否

矢野らが稲わらについて適用性を確認した分析法では，液液分配時に用いた 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）を 0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液に変更することにより良好な結果を得た。そこで，リン酸緩衝液で良好な結果が得られていた稲わら以外の飼料についても，稲わらの分析法が適用できるか検討を行ったが，液液分配の操作において試料液の粘性が上がり，液液分配後のカラム処理操作が困難となったことから，すべての飼料に稲わらの分析法を適用することは適当ではないと考えられた。しかしながら，稲わらが主原料となる WCRS については試料液の粘性が上がることなく分析が可能であり，フィプロニルの定量を妨げるピークや試料マトリックスによる影響も認められなかったことから，さらに添加回収試験を実施して稲わらの分析法の適用の可否を検討することとした。

3.1.2 添加回収試験

2.1.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 5 のとおり，原物中 0.11 mg/kg の添加

濃度においては、平均回収率は 75.6 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 5.5 % 以下の成績が得られ、飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン⁴⁾ (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併行精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 21 %以下) を満たす良好な結果であった。しかし、原物中 0.004 mg/kg の添加濃度においては、平均回収率 60.6 %であり、目標値を満たすことはできなかった。このことから、WCRS に稲わらの分析法を適用することは適当ではないと考えられた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 5 Recoveries for fipronil

Sample	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)
WCRS	0.004	60.6	4.9
	0.11	75.6	5.5

a) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.01 and 0.25 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.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

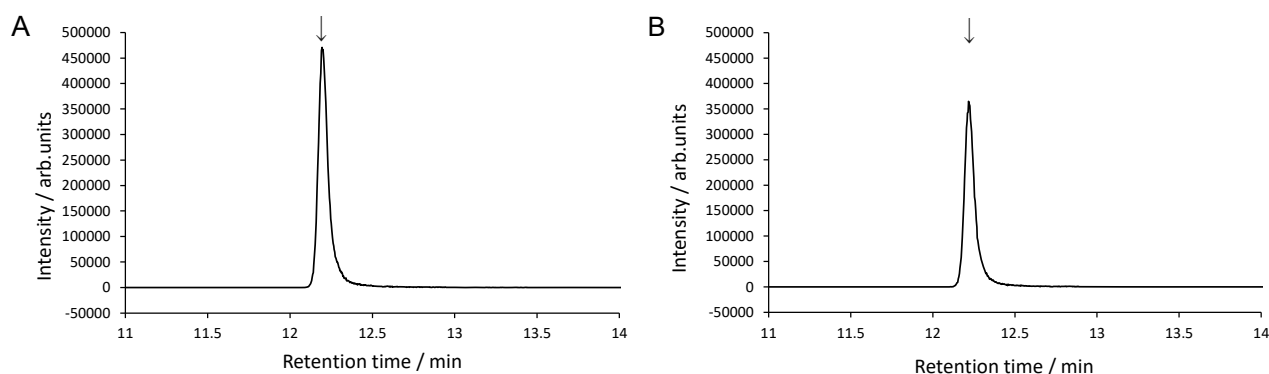


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of fipronil in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 2 and 3. Arrows indicate the peaks of fipronil.)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as fipronil)

B: Sample solution of WCRS (spiked at 0.11 mg/kg of fipronil (as 12.5 ng/mL in the sample solution))

3.1.3 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法の影響

リン酸緩衝液の調製法の影響を確認するため 2.1.6 に従って添加回収試験を実施した。その結

果は Table 6 のとおり，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値（真度：70 %以上 120 %以下）を満たしていたことから，本法においては 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）の pH 調整はリン酸（1+10）又は 1 mol/L 水酸化カリウムを使用することとした。

Table 6 Effect of composition of phosphate buffer to the recovery of fipronil

Sample	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	
		HCl, NaOH	H ₃ PO ₄ , KOH
Formula feed for layers	0.01	89.7	88.9
Corn	0.01	85.7	89.3
Wheat	0.002	79.8	74.7
Alfalfa hay	0.2	85.1	88.4

a) Mean ($n = 2$)

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため，2.2 により共同試験を実施した。

結果は Table 7-1 及び Table 7-2 のとおりであった。成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，小麦，乾牧草（アルファルファ乾草），稲わら及び WCRS について，平均回収率は 82.4，75.0，77.6，71.3，69.6 及び 68.8 %，RSD_rは 6.2，8.2，7.0，3.5，3.0 及び 5.5 %，RSD_Rは 9.0，9.9，8.3，4.1，9.3 及び 8.0 %，HorRat は 0.41，0.45，0.38，0.19，0.44 及び 0.38 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値（成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，小麦及びアルファルファ乾草については 44 %以下，稲わら及び WCRS については 42 %以下）を満たしていた。HorRat については，すべての試料で 0.5 を下回ったが，分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

参考のため，各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 7-1 Collaborative study for fipronil (1)

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for layers (mg/kg)		Formula feed for beef cattle (mg/kg)		Wheat (mg/kg)	
1	0.00957	0.00783	0.00116	0.00115	0.00144	0.00149
2	0.00733	0.00819	0.00116	0.00114	0.00145	0.00149
3	0.00901	0.00841	0.00123	0.00133	0.00170	0.00161
4	0.00782	0.00786	0.00137	0.00128	0.00156	0.00152
5	0.00754	0.00752	0.00118	0.00124	0.00130	0.00167
6	0.00782	0.00748	0.00119	0.00106	0.00158	0.00137
7	0.00897	0.00885	0.00124	0.000946	0.00168	0.00188
8	0.00729	0.00758	0.00108	0.00106	0.00150	0.00149
9	0.00887	0.00924	0.00122	0.00147	0.00160	0.00165
10	0.00920	0.00833	0.00127	0.00121	0.00155	0.00151
Spiked level (mg/kg)	0.01		0.0016		0.002	
No. labs ^{a)}	10		10		10	
No. outliers ^{b)}	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.00824		0.00120		0.00155	
Mean recovery (%)	82.4		75.0		77.6	
RSD _r ^{c)} (%)	6.2		8.2		7.0	
RSD _R ^{d)} (%)	9.0		9.9		8.3	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.41		0.45		0.38	

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7-2 Collaborative study for fipronil (2)

Lab. No.	Alfalfa hay		Rice straw		WCRS	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.129	0.123	0.158	0.158	0.172	0.175
2	0.130	0.135	0.167	0.164	0.169	0.163
3	0.136	0.130	0.172	0.170	0.160	0.174
4	0.148 ^{a)}	0.143 ^{a)}	0.199	0.182	0.184	0.182
5	0.125	0.127	0.150	0.163	0.167	0.154
6	0.122	0.132	0.198	0.199	0.183	0.182
7	0.125	0.117	0.162	0.162	0.176	0.146
8	0.134	0.129	0.161	0.167	0.160	0.148
9	0.152 ^{a)}	0.155 ^{a)}	0.193	0.196	0.195	0.187
10	0.133	0.127	0.182	0.178	0.189	0.173
Spiked level (mg/kg)	0.18		0.25		0.25	
No. labs ^{b)}	8		10		10	
No. outliers ^{c)}	2		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.128		0.174		0.172	
Mean recovery (%)	71.3		69.6		68.8	
RSD _r ^{d)} (%)	3.5		3.0		5.5	
RSD _R ^{e)} (%)	4.1		9.3		8.0	
PRSD _R ^{f)} (%)	22		21		21	
HorRat	0.19		0.44		0.38	

a) Data excluded by paired Grubbs test

b) Number of laboratories retained after the outliers were removed

c) Number of the removed outliers

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: LCMS-8060, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: Alliance e2695, Waters MS/MS: Quattro Premier, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: ExionLC AD, AB SCIEX MS/MS: TRIPLE QUAD 6500+, AB SCIEX	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
10	LC: 1260 Infinity II, Agilent Technologies MS/MS: 6470 Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)

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を用いた分析法を検討するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、収載が可能であると考えられた。

- 1) WCRS に原物中に換算してフィプロニルとして 0.004 及び 0.11 mg/kg 相当量を添加し、本法の稲わらの分析法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、0.004 mg/kg 相当量の添加濃度においては妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たすことはできなかった。
- 2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法によるフィプロニルの回収率への影響の有無について確認したところ、回収率への影響は認められなかった。
- 3) フィプロニルとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.0016 mg/kg 相当量、小麦に 0.002 mg/kg 相当量、乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.18 mg/kg 相当量、稲わらに 0.25 mg/kg 相当量、WCRS に 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 10 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいたジューエルサイエンス株式会社，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，一般財団法人日本食品検査福岡検査所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，フィード・ワン株式会社研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬・動物用医薬品評価書 フィプロニル（第2版），平成28年4月（2016）.
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：農薬抄録
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fipronil/index.htm>, cited 17 Jun. 2021.
- 3) 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，農林省令第35号，昭和51年7月24日（1976）.
- 4) 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について，昭和63年10月14日，63畜B第2050号（1988）.
- 5) 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）.
- 6) 農林水産省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，令和2年10月15日，農林水産省令71号（2020）.
- 7) 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）.
- 8) 矢野 愛子，佐藤 憲大，土井 雄悟，榊原 良成：飼料中のクロルプロファム及び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，飼料研究報告，**44**，57-74（2019）.
- 9) 矢野 愛子，佐藤 憲大，小野 雄造：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，飼料研究報告，**45**，18-27（2020）.
- 10) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 11) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 12) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).