

## 技術レポート

## 3 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

矢野 愛子\*, 佐藤 憲大\*, 土井 雄悟\*, 榊原 良成\*

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

Aiko YANO\*, Norihiro SATO\*, Yugo DOI\* and Yoshinari SAKAKIBARA\*

(\* Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

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

Having added water to a sample, chlorpropham and fipronil were 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 chlorpropham and 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 positive mode electrospray ionization (ESI+) for chlorpropham, and the negative mode electrospray ionization (ESI-) for fipronil were respectively used.

Recovery tests were conducted on formula feeds for layers and suckling pigs, barley, wheat, corn, alfalfa hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Chlorpropham was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.4 mg/kg for formula feed for layers, 0.01 and 0.2 mg/kg for formula feed for suckling pigs, 0.008 and 0.04 mg/kg for barley, 0.008 and 0.02 mg/kg for wheat, and 0.02 and 0.05 mg/kg for corn respectively. Fipronil was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.02 mg/kg for formula feed for layers, 0.0008 and 0.002 mg/kg for wheat, 0.008 and 0.02 mg/kg for corn, 0.04 and 0.2 mg/kg for alfalfa hay, 0.2 mg/kg for rice straw, and 0.018 and 0.11 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting mean recoveries ranged from 84.7 % to 101 % and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 8.5 % for chlorpropham, and the mean recoveries ranged from 81.3 % to 90.0 % and RSD<sub>r</sub> was less than 8.9 % for fipronil except in rice straw. The mean recovery was 44.8 % and RSD<sub>r</sub> was 12 % for fipronil in rice straw.

Key words: chlorpropham; fipronil; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); barley; wheat; corn; alfalfa hay; rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：クロルプロファム；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；大麦；小麦；とうもろこし；アルファルファ乾草；稲わら；稲発酵粗飼料

\* 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

## 1 緒 言

クロルプロファムはカーバメート系の除草剤及び植物成長調整剤であり、細胞分裂阻害作用により殺草効果を示すと考えられている<sup>1)</sup>。海外においてはジャガイモの保存・輸送中の発芽抑制剤として収穫後に使用されている。我が国では1954年に初回農薬登録され、適用農作物等は麦、雑穀、野菜、豆及び花き等である<sup>1)</sup>。飼料中の基準値としては、大麦、小麦、とうもろこし及びライ麦で0.05 mg/kgと設定されている<sup>2)</sup>。飼料中のクロルプロファムの分析法としては、飼料分析基準<sup>3)</sup>において、アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフを用いた系統的分析法及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いた一斉分析法が記載されており、定量下限はそれぞれの分析法について0.02及び0.05 mg/kgである。

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>4)</sup>。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稻及び野菜等である<sup>4)</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、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と設定されている<sup>2) 5)</sup>。飼料中のフィプロニルの分析法としては、飼料分析基準においてガスクロマトグラフ質量分析計を用いた一斉分析法が記載されており、定量下限は0.01 mg/kgである。

現在、飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルについて、設定基準値及び対象飼料の見直しが検討されており、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。

今回、農林水産省の平成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）において、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法<sup>6)</sup>（以下「JFIC法」という。）を基に、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飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にクロルプロファム及びフィプロニルの構造式等をFig. 1に示した。

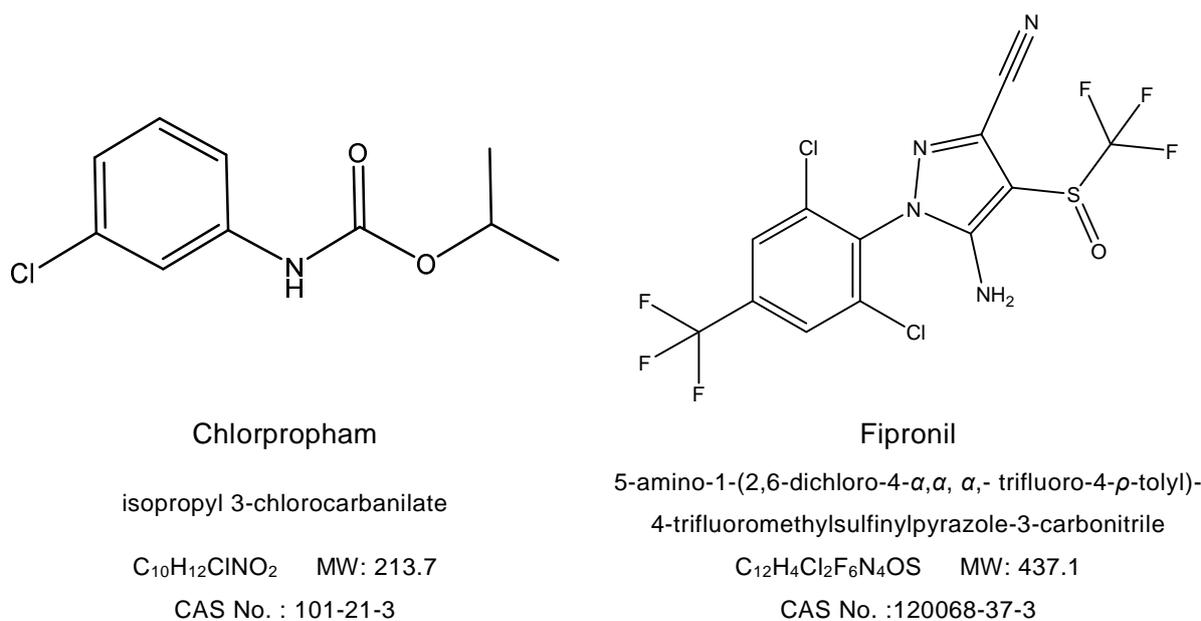


Fig. 1 Chemical structures of chlorpropham and fipronil

## 2 実験方法

### 2.1 試料

配合飼料（成鶏飼育用，ほ乳期子豚育成用，子豚育成用，乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用），大麦，小麦，とうもろこし，ライ麦，ポテトグルテンフィード，アルファルファ乾草，チモシー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 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	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
For suckling pigs	Grains	62	Corn, bread meal, wheat flour, roasted soybean flour
	Oil seed meal	10	Fermented soybean meal, concentrated soybean protein, soybean meal
	Animal by-products	15	Dried whey, fish meal, concentrated whey protein
	Others	13	Confectionery meal, calcium phosphate, animal oil, glucose, lactose, calcium carbonate, feed additives
For growing pigs	Grains	72	Corn, wheat
	Brans	3	Bran
	Oil seed meal	21	Soybean meal, corn germ meal
	Others	4	Calcium carbonate, animal oil, molasses, salt, calcium phosphate, garlic powder, feed additives
For dairy cattle	Grains	37	Corn, barley, rice, wheat flour
	Brans	33	Bran, rice bran, Corn gluten feed, poteto gluten feed
	Oil seed meal	26	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, feed additives
For beef cattle	Grains	81	Corn, barley
	Brans	13	Poteto gluten feed, bran
	Oil seed meal	3	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	3	Molasses, calcium carbonate, beer yeast, 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。塩化ナトリウム，酢酸，酢酸ナトリウム（無水），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 Ultra Pure Water System RFU354BA（東洋製作所製）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、1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

3) 0.5 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

酢酸 2.41 mL 及び酢酸ナトリウム (無水) 6.84 g を量り、水約 200 mL に溶解し、1 mol/L 塩酸を用いて pH を 5.0 に調整した後、水を加えて 250 mL とした。

4) クロロプロファム標準原液

クロロプロファム標準品 (Sigma-Aldrich 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クロロプロファム標準原液を調製した (この液 1 mL は、クロロプロファムとして 0.2 mg を含有する.) .

5) 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 を含有する.) .

6) 混合標準液

クロロプロファム標準原液 10 mL 及びフィプロニル標準原液 1 mL を 200 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までメタノールを加えて混合標準原液を調製した (この液 1 mL は、クロロプロファムとして 10 µg 及びフィプロニルとして 1 µg を含有する.) .

使用に際して、混合標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にクロロプロファムとして 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng, 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 を含有する各混合標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (配合飼料, とうもろこし及び麦類用) : ZM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 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-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 µm, 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋ろ紙製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

7) 多孔性ケイソウ土カラム (以下「ケイソウ土カラム」という.) : Chem Elut カートリッジ (20 mL 保持用) Agilent Technologies 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 (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. 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 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, 先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のアセトニトリルで洗浄し, 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させた. 試料溶液の入っていた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クロルプロファム及び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

試料溶液及び各混合標準液各 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 Operating 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 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) → 2 min → (7:3) (hold for 12 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive (chlorpropham), Negative (fipronil)
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	Positive: 3.0 kV, Negative: 2.5 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
			Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Chlorpropham	+	214	172	—	20	10
			—	154	20	20
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、試料中のクロルプロファム量及び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)
- add 15 mL of water and allow to stand for 30 min
  - add 100 mL of acetonitrile and shake for 30 min
  - filter through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
  - wash with 50 mL of acetonitrile
  - fill up to 200 mL with acetonitrile
- Transfer 20 mL of sample solution to a 100 mL separating funnel
- add 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) and 10 g of sodium chloride
  - shake for 10 min and allow to stand for a while
  - discard the water layer and transfer the acetonitrile layer to a 100 mL Erlenmeyer flask
  - add some amount of sodium sulfate and dehydrate the acetonitrile layer
  - filtrate to a 100 mL eggplant flask
  - wash the Erlenmeyer flask with acetonitrile and filtrate to the eggplant flask
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 2 mL of hexane
- GC/PSA column (500 mg/500 mg)
- prewash with 10 mL of acetone and 10 mL of hexane
  - apply sample solution and let it flow out
  - wash the eggplant flask and elute with 5 mL of hexane (twice)
  - set a receiver (50 mL eggplant flask)
  - elute with 15 mL of hexane-acetone (4:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 1 mL of methanol (10 mL for grass hay, rice straw and WCRS)
  - filtrate through hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.2 μm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for chlorpropham and fipronil

## 2.5 ケイソウ土カラムによる精製方法（以下「ケイソウ土カラム法」という。）

ほ乳期子豚育成用配合飼料 10.0 g を 200 mL の共栓三角フラスコに秤量した。抽出操作は 2.4 の 1)と同様に行い、ろ液を 300 mL のなす形フラスコで受けた。試料溶液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL になるまで減圧濃縮し、試料溶液の全量をケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をケイソウ土カラムに負荷した。5 分間静置した後、ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 計 100 mL で溶出し、溶出液を 300 mL のなす形フラスコで受けた。溶出液を 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮後、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、以降のカラム精製操作は 2.4 の 3)と同様に行った。

なお、ケイソウ土カラム法では最終試料溶液濃度が JFIC 法の 10 倍となるため、検量線の濃度範囲内に収まるようメタノールで適宜希釈し、LC-MS/MS による測定に供した。

## 2.6 添加回収試験

2.2 の 4)~5)のクロルプロファム標準原液及び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。

### 1) クロルプロファム

クロルプロファムとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 400 ng/mL）、ほ乳期子豚育成用配合飼料に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試

料溶液中で 10 及び 200 ng/mL 相当量), 大麦に 0.008 及び 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 40 ng/mL 相当量), 小麦に 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量), とうもろこしに 0.02 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 及び 50 ng/mL 相当量) 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, 検量線範囲を超える添加濃度については, 検量線の濃度範囲内に収まるよう最終試料溶液をメタノールで適宜希釈して測定した.

## 2) フィプロニル

フィプロニルとして, 成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 及び 20 ng/mL 相当量), 小麦に 0.0008 及び 0.002 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.8 及び 2 ng/mL 相当量), とうもろこしに 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量), アルファルファ乾草に 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2 及び 10 ng/mL 相当量), 稲わらに 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL), WCRS には原物換算して 0.018 及び 0.11 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.9 及び 5.5 ng/mL 相当量) 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. WCRS への添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして, 0.04 及び 0.25 mg/kg 相当量になるように行い, 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. なお, 検量線範囲を超える添加濃度については, 検量線の濃度範囲内に収まるよう最終試料溶液をメタノールで適宜希釈して測定した.

## 3 結果及び考察

### 3.1 検量線

2.2 の 6) に従って調製した各混合標準液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し, 得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した. 得られた検量線の一例は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおりであり, クロルプロファムは 1~100 ng/mL (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) 及びフィプロニルは 0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

なお, 当該検量線の濃度範囲は, クロルプロファムを 0.001~0.1 mg/kg 及びフィプロニルを 0.0001~0.01 mg/kg 含有する分析用試料 (乾牧草, 稲わら及び WCRS にあってはフィプロニルを 0.002~0.2 mg/kg 含有する分析用試料) を本法に従い調製した最終試料溶液中の各濃度範囲に相当する.

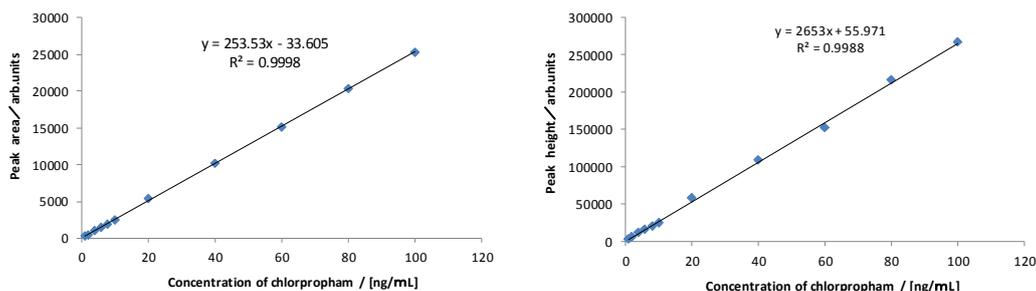


Fig. 2-1 Calibration curves of chlorpropham by peak area (left) and peak height (right)

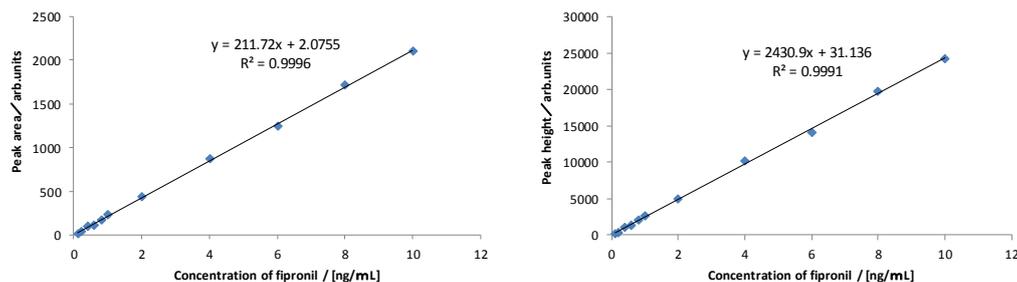


Fig. 2-2 Calibration curves of fipronil by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 ケイソウ土カラム法による添加回収試験

JFIC 法では精製過程の液液分配で分液漏斗を使用しているが、分液漏斗の使用は、分析技術の習熟を必要とし個人差による分析値のばらつき的重要因素となり得るため、飼料分析基準収載の「農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法」（以下「農薬一斉法」という。）で使用するケイソウ土カラムを用いて分液漏斗による操作を簡略化できるか検討した。ケイソウ土カラムによる精製方法は、農薬一斉法を参考に、2.5の方法で行った。

試料 10.0 g に対して、クロルプロファムとして 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2000 ng/mL）、フィプロニルとして 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 200 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後にケイソウ土カラム法により分析を実施した。ケイソウ土カラム法による添加回収試験を行った結果を Table 4 にまとめた。フィプロニルは良好な回収率を示したが、クロルプロファムは低回収率であった。

Table 4 Recoveries of pesticides using diatomaceous earth column

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Formula feed for suckling pigs
		Recovery (%)
Chlorpropham	0.2	10.0
Fipronil	0.02	95.1

$n = 1$

ケイソウ土カラムによる精製操作は農薬一斉法でも行われているが、同法の検討時に実施された添加回収試験におけるクロルプロファムの回収率は全て 100 % を超える結果である。このため、クロルプロファム低回収率の原因は、ケイソウ土カラム及び 2.4 の 3) のカラム処理以降の精製

方法によって除けなかった夾雑物の影響と考えられた。

また、ケイソウ土カラム法で調製した試料溶液を LC-MS/MS で測定後、標準液のピークが割れるあるいはテーリングすることがあった。ケイソウ土カラム法で調製した試料溶液中に残留する夾雑物が LC カラムに悪影響を及ぼしている可能性があるため、精製操作又は希釈操作の追加を検討する必要があると考えられた。

### 3.3 液液分配における転溶の確認

とうもろこしを用いて 2.4 の 1)により調製した試料溶液 20 mL にクロルプロファム 100 ng (0.1 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 100 ng/mL 相当量) 及びフィプロニル 10 ng (0.01 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 2.4 の 2)から 3)により操作し, 液液分配における転溶の確認を行った。なお, 1 回目の液液分配で分離した水層にアセトニトリルを再度加えることにより, 2 回目の確認を行った。その結果 Table 5 のとおり, クロルプロファム及びフィプロニルは 1 回の液液分配により回収できることを確認した。

Table 5 Recoveries of the pesticides on liquid-liquid partition in corn matrix

Pesticide	Recovery (%)		
	Acetonitrile		Total
	First 20 mL	Second 20 mL	
Chlorpropham	89.0	0.0	89.0
Fipronil	91.0	0.0	91.0

*n* = 1

### 3.4 ミニカラムからの溶出画分の確認

とうもろこしを用いて 2.4 の 1)から 2)により調製した試料溶液にクロルプロファム 100 ng (0.1 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 100 ng/mL 相当量) 及びフィプロニル 10 ng (0.01 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 2.4 の 3)により操作してミニカラムからの溶出画分の確認を行った。Table 6 のとおり, クロルプロファム及びフィプロニルはヘキサンによっては溶出せず, ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL により溶出することを確認した。

Table 6 Elution pattern of the pesticides in corn matrix using InertSep GC/PSA

Pesticide	Recovery (%)						Total
	Hexane		Hexane-acetone (4:1)				
	0~ 5 mL	5~ 10 mL	0~ 5 mL	5~ 10 mL	10~ 15 mL	15~ 20 mL	
Chlorpropham	0.0	0.0	93.4	1.2	0.0	0.0	94.6
Fipronil	0.0	0.0	87.0	1.5	0.0	0.0	88.5

*n* = 1

### 3.5 妨害物質の検討

配合飼料 (成鶏飼育用, ほ乳期子豚育成用, 子豚育成用, 乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用), 大麦, 小麦, とうもろこし, ライ麦, ポテトグルテンフィード, アルファルファ乾草, チモシー

乾草、稲わら及び WCRS を用い、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クロルプロファム及びフィプロニルの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. 3-1 及び Fig. 3-2 に示した。

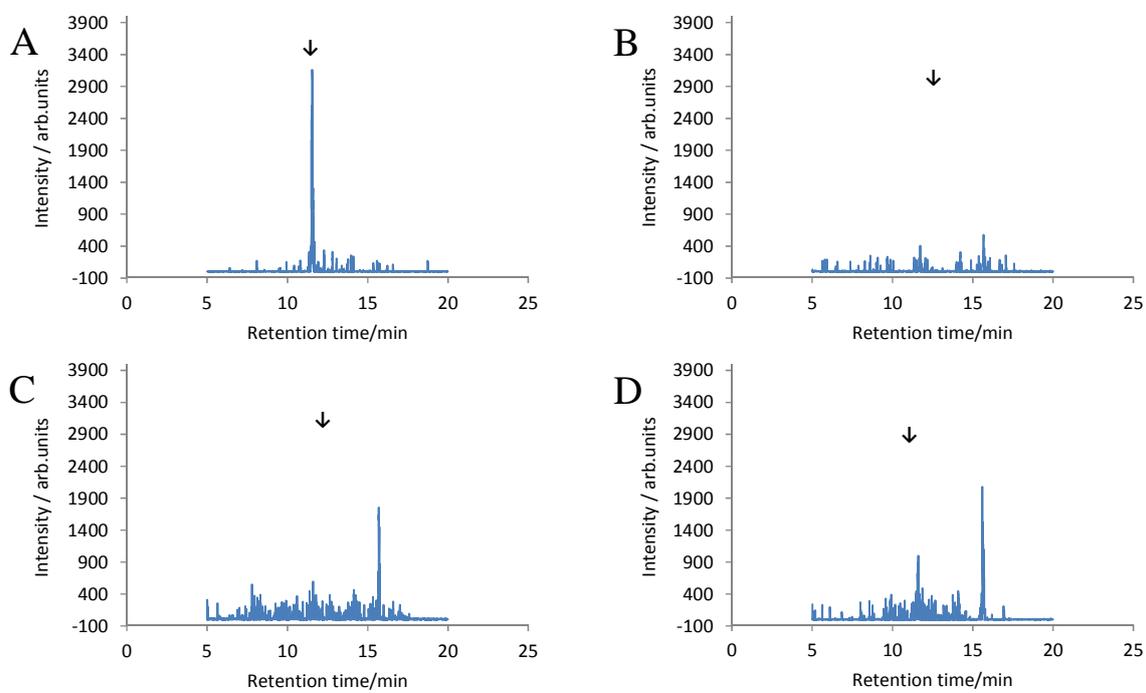


Fig. 3-1 Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

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

- A: Standard solution (1 ng/mL as chlorpropham)
- B: Blank sample solution (formula feed for layers)
- C: Blank sample solution (barley)
- D: Blank sample solution (corn)

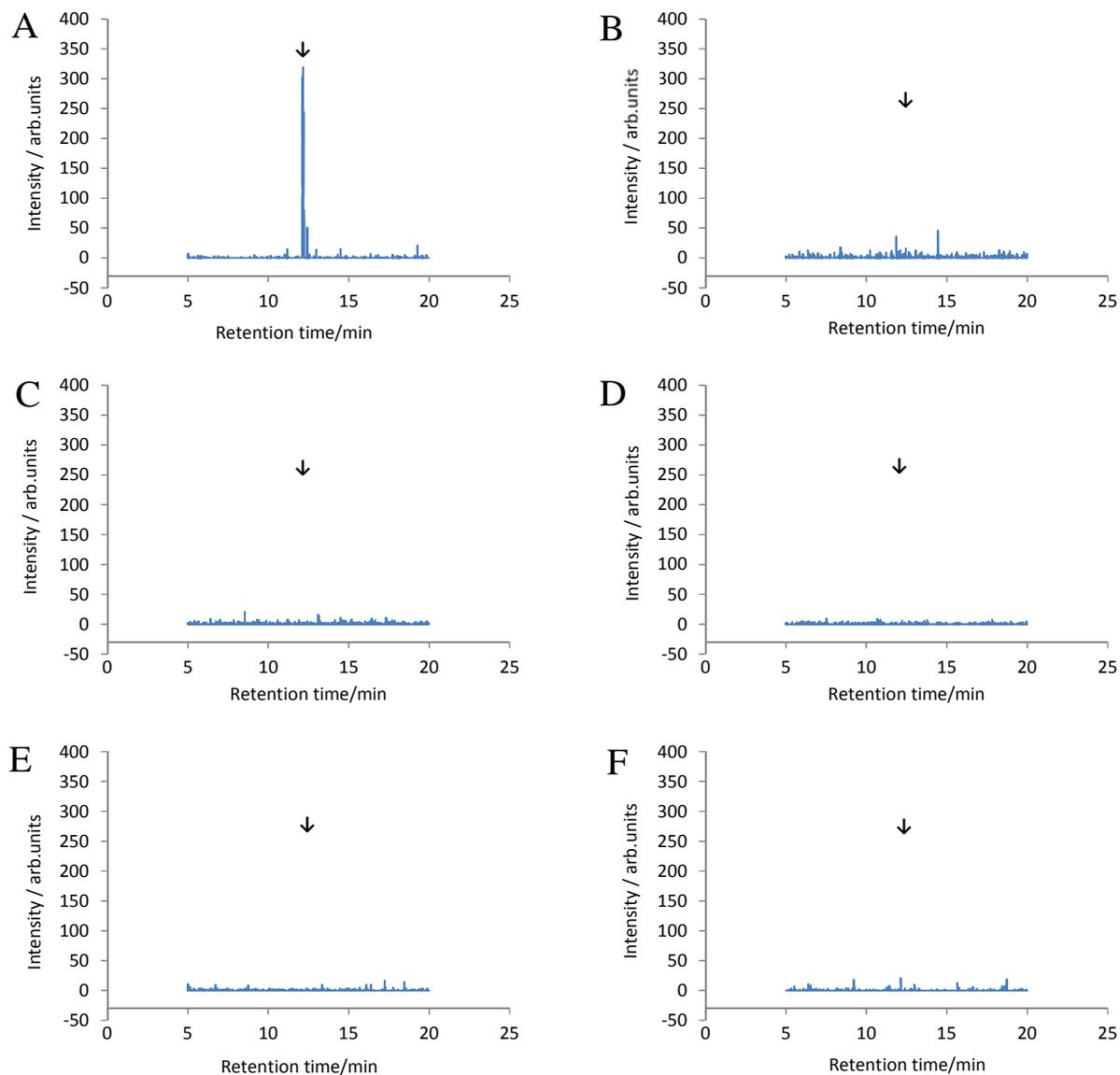


Fig. 3-2 SRM chromatograms of standard and blank sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of fipronil.)

- A: Standard solution (0.1 ng/mL as fipronil)
- B: Blank sample solution (formula feed for layers)
- C: Blank sample solution (barley)
- D: Blank sample solution (corn)
- E: Blank sample solution (alfalfa hay)
- F: Blank sample solution (rice straw)

### 3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した小麦及びとうもろこしのブランク試料溶液にクロルプロファムとして 0.02 及び 0.025 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 及び 25 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 6)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 7 のとおりであった. また, 同様に調製した小麦, と

うもろこし、アルファルファ乾草及び稲わらのブランク試料溶液にフィプロニルとして 0.002, 0.01, 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2, 10, 20 及び 10 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 6) に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ、Table 8 のとおりであった。各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 7 Matrix effect to chlorpropham

Matrix	Concentration of chlorpropham		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in the matrix solution (ng/mL)	in the sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	
Wheat	20	0.02	103
Corn	25	0.025	99

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix solution

b) Ratio of the peak area of chlorpropham in the presence of matrix to that in the absence of matrix

Table 8 Matrix effect to fipronil

Matrix	Concentration of fipronil		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in the matrix solution (ng/mL)	in the sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	
Wheat	2	0.002	101
Corn	10	0.01	99
Alfalfa hay	20	0.4	91
Rice straw	10	0.2	102

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix solution

b) Ratio of the peak area of fipronil in the presence of matrix to that in the absence of matrix

### 3.7 添加回収試験

#### 1) クロルプロファム

2.6 の 1) により添加回収試験を実施した。その結果、Table 9 のとおり、平均回収率は 84.7~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 8.5 % 以下の成績であり、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した。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 9 Recoveries for chlorpropham

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Formula feed for suckling pigs		Barley		Wheat		Corn	
	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> (%)
0.008	—	—	—	—	95.4	4.4	85.2	8.5	—	—
0.01	96.0	2.1	101	5.8	—	—	—	—	—	—
0.02	—	—	—	—	—	—	96.0	2.9	84.7	1.7
0.04	—	—	—	—	95.6	3.3	—	—	—	—
0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	95.7	0.7
0.2	—	—	93.0	5.3	—	—	—	—	—	—
0.4	94.7	4.7	—	—	—	—	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

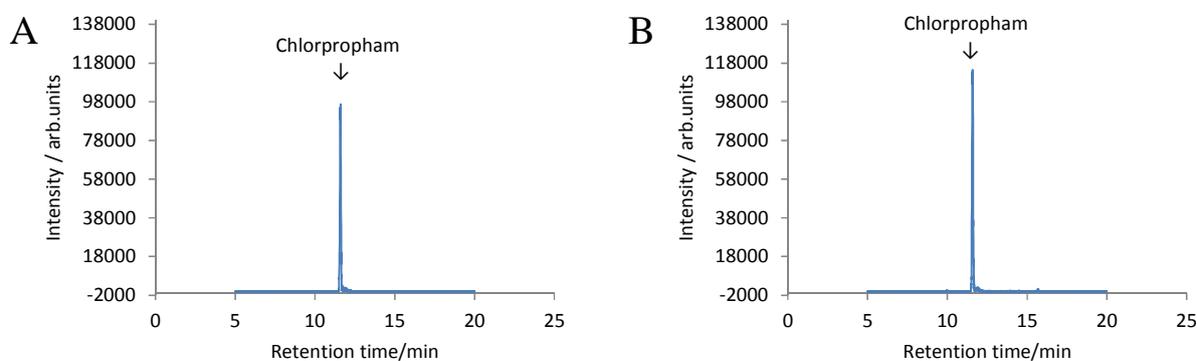


Fig. 4 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3.)

A: Standard solution (40 ng/mL: 0.2 ng as chlorpropham)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.05 mg/kg of chlorpropham (The concentration in the sample solution is 50 ng/mL as chlorpropham.))

## 2) フィプロニル

2.6 の 2)により添加回収試験を実施した。その結果、Table 10 のとおり、稲わら以外の試料について平均回収率は 81.3~90.0 %，RSD<sub>r</sub>は 8.9 %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を満たした。稲わらについては，平均回収率は 44.8 %，RSD<sub>r</sub>は 12 %の成績であり真度の目標値を満たさなかった。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 10 Recoveries for fipronil

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Wheat		Corn		Alfalfa hay		Rice straw		WCRS <sup>c)</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>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.0008	—	—	81.3	8.9	—	—	—	—	—	—	—	—
0.002	—	—	86.2	6.7	—	—	—	—	—	—	—	—
0.008	—	—	—	—	85.8	6.6	—	—	—	—	—	—
0.01	83.2	7.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
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	44.8	12	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 0.25 mg/kg air-dry matter for fipronil. The levels of fipronil in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of fipronil in original matter (moisture 60 %)

= the levels of fipronil in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

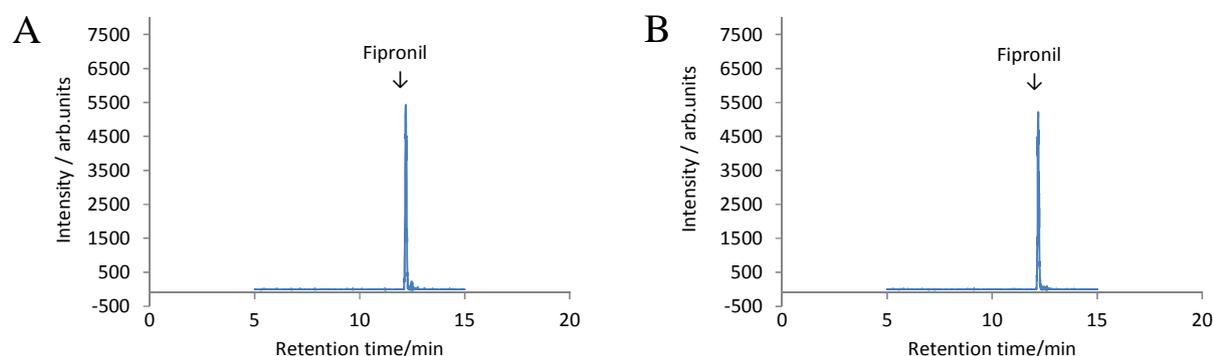


Fig. 5 SRM chromatograms on recovery test  
(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3.)

A: Standard solution (2 ng/mL: 0.01 ng as fipronil)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.02 mg/kg of fipronil (The concentration in the sample solution is 20 ng/mL as fipronil.)) Sample solution was diluted ten times by methanol before the injection into a LC-MS/MS.

### 3.8 稲わら低回収率の原因の検討について

稲わらを用いたフィプロニルの添加回収試験の結果、妥当性確認法ガイドラインに定める真度の目標値を下回った原因を究明するために以下の検討を行った。

#### 1) 時間経過によるフィプロニル減衰の確認

フィプロニルが稲わらへの添加後に時間の経過とともに減衰した可能性を考え、フィプロニル添加後速やかに抽出精製を行ったところ、Table 11 のとおり添加回収率は添加後一晩静置し

たものと同程度であった。フィプロニルの低回収率は、添加後の時間経過の問題ではないと考えられた。

Table 11 Recoveries for fipronil from rice straw

Spiked level (mg/kg)	Spiked timing	
	One night before <sup>a)</sup>	Just before <sup>b)</sup>
	Recovery (%)	Recovery (%)
0.2	43.1	47.6

$n = 1$

a) Rice straw was spiked at fipronil one night before the analysis.

b) Rice straw was spiked at fipronil just before the analysis.

## 2) ミニカラムからの溶出画分の確認

稲わらのマトリックス共存下で、ミニカラム精製においてフィプロニルの保持及び溶出が影響を受けた可能性を考え、稲わらを用いて 2.4 の 1) から 2) に従って操作した後フィプロニル 100 ng (0.2 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 2.4 の 3) に従って操作しミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果, Table 12 のとおり, フィプロニルの溶出パターン及び回収率は Table 6 と同程度であり, 特に問題無い結果であった。

Table 12 Elution pattern of fipronil in rice straw matrix using InertSep GC/PSA

Pesticide	Recovery (%)							Total
	Hexane	Hexane-acetone (4:1)						
	0~ 10 mL	0~ 5 mL	5~ 10 mL	10~ 15 mL	15~ 20 mL	20~ 25 mL	25~ 30 mL	
Fipronil	0.0	85.5	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	86.6

$n = 1$

## 3) 転溶の確認

稲わらマトリックス等の影響により, 液液分配時に 1 回目のアセトニトリル 20 mL だけではフィプロニルを回収できなかった可能性を考え, 3.3 に準じ, 稲わらを用いた試料溶液 20 mL にフィプロニル 100 ng (0.2 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を加え, 液液分配における転溶の確認を行った。対照としてアルファルファ乾草を用いて同様に操作した。その結果, Table 13 のとおり, 1 回目のアセトニトリル 20 mL によってアルファルファ乾草試料溶液中のフィプロニルは全て回収されたが, 稲わら試料溶液中のフィプロニルは低回収率であり, 2 回目のアセトニトリルからはフィプロニルは検出されなかった。

稲わらでは液液分配時にフィプロニルが水層に残った可能性を考え, 稲わらを用いて同様に操作した後, 2 回目の抽出操作としてアセトニトリルより極性の低い酢酸エチル 20 mL を用いてフィプロニルを回収できるか別途確認したが, フィプロニルは 1 回目のアセトニトリル層からのみ低回収率で検出され, 2 回目の酢酸エチル層からは検出されなかった。

Table 13 Recoveries for fipronil on liquid-liquid partition

Sample	Recovery (%)		
	Acetonitrile		Total
	First 20 mL	Second 20 mL	
Rice straw	58.6	0.0	58.6
Alfalfa hay	97.8	0.0	97.8

$n = 1$

また、同じ稲わら由来である WCRS の添加回収試験結果に問題は認められなかったことから、分液操作時の pH 条件が影響している可能性を考え、リン酸緩衝液より低 pH の酢酸緩衝液を用いて同様に転溶の確認を行った。対照として WCRS 及びリン酸緩衝液を用いた。その結果、Table 14 のとおり、酢酸緩衝液を用いた場合も、稲わらにおけるフィプロニルは低回収率であった。

Table 14 Recoveries for fipronil on liquid-liquid partition in the acetate buffer

Sample	Recovery (%)	
	Acetonitrile (20 mL)	
	Acetate buffer pH 5.0	Phosphate buffer pH 7.0
Rice straw	49.5	48.6
WCRS	95.1	93.5

$n = 1$

以上の検討により、稲わらを用いたフィプロニル添加回収試験における低回収率の原因として、液液分配に何らかの問題がある可能性が高いと考えられた。液液分配のどこに問題があるのか、今のところ不明であるため、引き続き原因究明が必要であると考えられた。

#### 4 まとめ

飼料中に残留するクロルプロファム及びフィプロニルについて、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、クロルプロファムは 1~100 ng/mL (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) 及びフィプロニルは 0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、クロルプロファムを 0.001~0.1 mg/kg 及びフィプロニルを 0.0001~0.01 mg/kg 含有する分析用試料 (乾牧草、稲わら及び WCRS にあってはフィプロニルを 0.002~0.2 mg/kg 含有する分析用試料) を本法に従い調製した最終試料溶液中の各濃度範囲に相当する。

- 2) 配合飼料 (成鶏飼育用、ほ乳期子豚育成用、子豚育成用、乳用牛飼育用及び肉用牛肥育用)、大麦、小麦、とうもろこし、ライ麦、ポテトグルテンフィード、アルファルファ乾草、チモシー乾草、稲わら及び WCRS を用い、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) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、クロルプロファム及びフィプロニルは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) クロルプロファムとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 400 ng/mL）、ほ乳期子豚育成用配合飼料に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 200 ng/mL 相当量）、大麦に 0.008 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 40 ng/mL 相当量）、小麦に 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量）、とうもろこしに 0.02 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 及び 50 ng/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、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精度の目標値を満たす結果であった。
- 5) フィプロニルとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 20 ng/mL 相当量）、小麦に 0.0008 及び 0.002 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.8 及び 2 ng/mL 相当量）、とうもろこしに 0.008 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 20 ng/mL 相当量）、アルファルファ乾草に 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 10 ng/mL 相当量）、稲わらに 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL）、WCRS は原物中に換算して 0.018 及び 0.11 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.9 及び 5.5 ng/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、稲わら以外の試料については、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。
- 6) 稲わらを用いたフィプロニルの添加回収試験における低回収率は、ミニカラム処理やマトリックス効果によるものではなく、液液分配に何らかの問題があることによる可能性が高いと考えられた。

## 文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会（第 57 回）：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料，平成 29 年 5 月 22 日 (2017).
- 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).
- 4) 食品安全委員会農薬専門調査会：農薬・動物用医薬品評価書 フィプロニル，平成 28 年 1 月，(2016).
- 5) 農林水産省畜産局長通達：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).
- 6) 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).