

# QuEChERS 法を用いた LC/MS/MS による フィプロニル測定方法の検討及び実態調査

山口 玲子

(環境保健研究所 健康科学課)

**要 旨** 2017 年 7 月に EU 域内の産卵鶏農場でフィプロニル (殺虫剤) が違法に使用されていたことが判明した。そこで日本国内に汚染された鶏卵等が輸入されることを想定し、QuEChERS 法で抽出し LC/MS/MS で測定する方法を検討したところ、妥当性が確認され測定可能となった。また、国内産の鶏卵及び乾燥卵白について実態調査を行ったところ、定量限界値を超えて検出された検体は無く、汚染は確認されなかった。

**Key Words** : QuEChERS 法, フィプロニル, LC/MS/MS

## 1. はじめに

フィプロニルはフェニルピラゾール系殺虫剤で、1994年に農薬登録され農業用殺虫剤として広範囲の害虫に使用される他、イヌ・ネコのノミやマダニの駆虫、家庭用誘引殺虫剤、土壌処理剤、シロアリ駆除剤として用いられる<sup>1)</sup>。国内では畜産動物を対象とした動物用医薬品として承認されていないが、海外では牛を対象とした動物用医薬品として承認されている<sup>2)</sup>。

2017年7月にEU域内の産卵鶏農場でフィプロニルが違法に使用されていたことが判明した<sup>3)</sup>。汚染された鶏卵は世界40か国で見つかり、クッキーやケーキ等の加工品として流通していた可能性が指摘された<sup>4)</sup>。また、これを受けて韓国が検査を実施したところ、汚染された鶏卵が見つかり社会問題となった<sup>5)</sup>。

国内では、これまでに汚染された鶏卵及び加工品の流通は確認されていないが、今後輸入品等からの検出事例が発生した場合を想定し、簡便な QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 法<sup>6)</sup>を用いたフィプロニル及び代謝体 B の測定方法<sup>7)</sup>を検討し、妥当性評価及び流通品の実態調査を行った。

なお、畜水産物の基準値はフィプロニル及び代謝体 B をフィプロニルに換算した値の和となっており、鶏卵の基準値は 0.02ppm である。

## 2. 試料

測定方法の検討と妥当性評価には、予めフィプロニル及び、代謝体 B が検出されないことを確認した鶏卵と鶏肉 (むね肉) を使用した。

実態調査は鶏卵 20 検体 (全て国内産)、乾燥卵白 2 検体 (イタリア産、国内産) の計 22 検体について行った。

## 3. 試薬・試液

- (1) フィプロニル標準液 (100 $\mu$ g/mL) : フィプロニル標準物質 (和光純薬) 10mg をメタノールで 100mL に定容した。
- (2) 代謝体 B 標準液 (100 $\mu$ g/mL) : フィプロニルスルホン標準液 (和光純薬製) 100 $\mu$ g/mL を使用した。
- (3) 混合標準液 (2 $\mu$ g/mL) : フィプロニル標準液、代謝体 B 標準液各 1mL をメタノールで 50mL に定容した。
- (4) QuEChERS (AOAC2007.01) 50mL チューブ (硫酸マグネシウム 6g、酢酸ナトリウム 1.5g) : Bond Elut QuEChERS 抽出キット Part No.5982-5555 (アジレント製)
- (5) 脱脂用分散チューブ : Bond Elut QuEChERS EMR Lipid Part No.5982-1010 (アジレント製)
- (6) 脱水用分散チューブ : Bond Elut QuEChERS EMR Lipid 脱水キット Part No.5982-0101 (アジレント製)
- (7) 精製用ミニカラム : Envi-Carb II/PSA 500mg/500 mg Part No.54067-U (スペルコ製)
- (8) アセトニトリル、トルエン (3 : 1) 混液 : アセトニトリル及びトルエンは和光純薬製の残留農薬・PCB 試験用を使用した。

- (9) 10mM 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウムはシグマアルドリッチ製の LC/MS 用を使用した。
- (10) メタノール: 和光純薬製の LC/MS 用を使用した。

#### 4. LC/MS/MS 測定条件

測定機器: Quattro Micro API System (Waters 社製)

##### LC

カラム: InertSustain C18 (GLサイエンス)

2.1mm×150mm 3μm

カラム温度: 40°C

流量: 0.2mL/min

グラジェント条件

移動相 A: 10mM 酢酸アンモニウム溶液

移動相 B: メタノール

A:B=85:15 (初期) →50:50 (3分) →25:75 (7.5分)

→5:95 (15分. 5分間ホールド) 全 20分

##### MS/MS

ESI-Negative: MRM モード

イオンソース温度: 120°C

脱溶媒温度: 400°C

コーンガス流量: 50L/h

脱溶媒ガス流量: 800L/h

コーン電圧 (V): 17.0

コリジョン電圧 (eV): 14.0

各項目の測定条件を以下に示す (表 1)。

表 1 各項目の測定条件

	フィプロニル	代謝体B
プレカーサーイオン (m/z)	435.1	451.1
プロダクトイオン (m/z)	330.1	415.1
コーン電圧 (V)	16	21
コリジョン電圧 (eV)	18	17

#### 5. 検量線及び定量限界値の検討

##### 5.1 検量線直線性の確認

混合標準液を希釈し 0.1~0.0005μg/mL の範囲で測定したところ、フィプロニル、代謝体 B ともに相関係数 (R<sup>2</sup>) が 0.999 以上となり、検量可能であった (図 1)。

また、低濃度 (0.01~0.0005μg/mL) に範囲を限定した場合も相関係数 (R<sup>2</sup>) は 0.999 以上となった (図 2)。

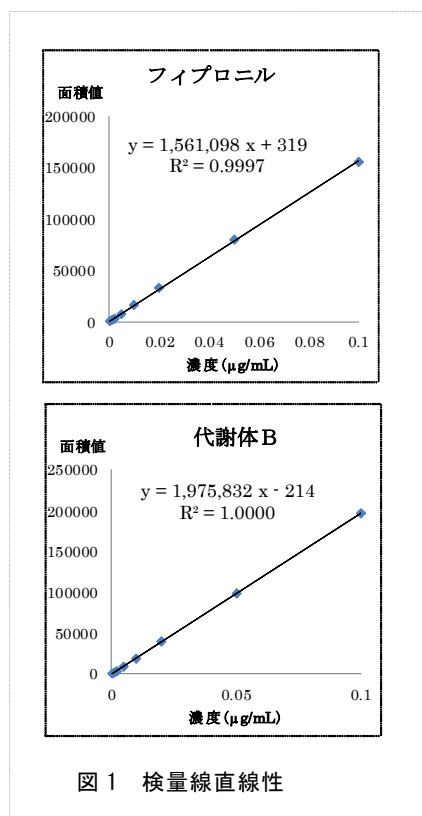


図 1 検量線直線性

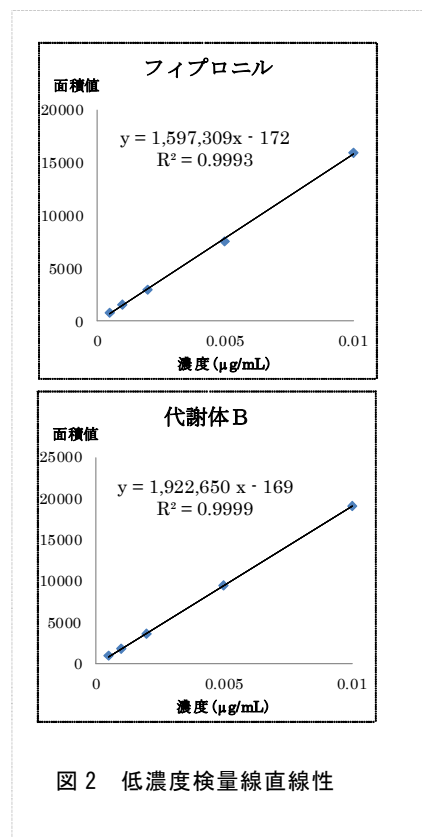


図 2 低濃度検量線直線性

##### 5.2 定量限界値

定量限界値はクロマトグラムの S/N 比と一律基準値の濃度 (0.01μg/g) を踏まえ、フィプロニル、代謝体 B ともに 0.0005μg/mL として検量線を作成することとした (図 3)。

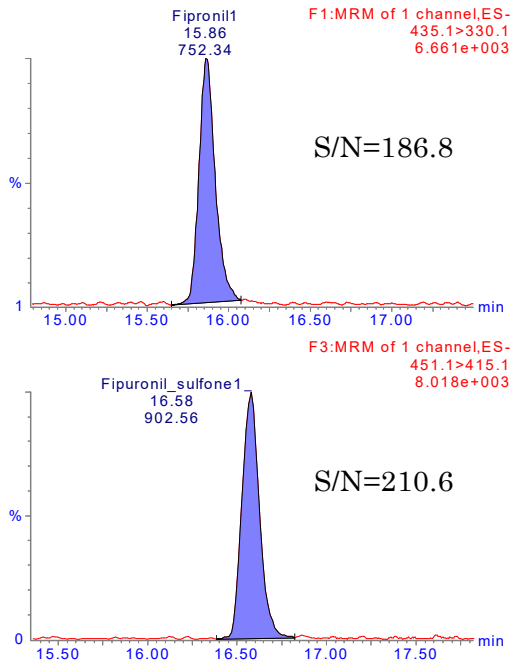


図3 定量限界値クロマトグラム

## 6. 試験溶液調製方法の検討

試験溶液調製方法は QuEChERS 法を参考に以下の手順による検討を行った (図4)。

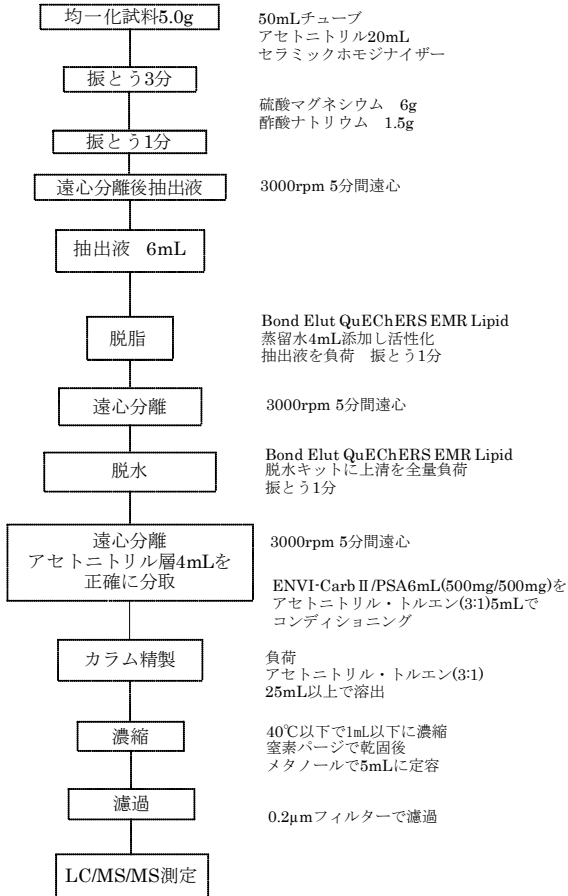


図4 試験溶液調製方法

## 6.1 各工程の添加回収率

鶏卵と鶏肉について、鶏卵基準値の10倍にあたる0.2 $\mu$ g/gを添加して試験溶液を調製し、各工程の添加回収率を確認した(表2)。

表2 各工程の添加回収率

	フィプロニル(%)		代謝体B(%)	
	鶏卵	鶏肉	鶏卵	鶏肉
抽出液	94	94	92	94
脱脂後	96	98	96	97
カラム精製後	97	92	96	96

## 6.2 カラム精製効果について

各工程の添加回収率から、カラム精製を行わなくても測定値に影響がないことが示唆された。しかし鶏卵では、カラム精製を行わない場合に色素の残存見られた(図5)。



カラム精製無 カラム精製有

図5 カラム精製効果

また、鶏肉でもカラム精製を行わない場合には、試験溶液に目視で確認できる程度の色素の残存が見られた。夾雑物質(色素等)を低減することで測定機器に対する負荷を軽減できることから、カラム精製を行うこととした。

## 7. 試験法の評価

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を参考に<sup>8)</sup>、鶏卵及び鶏肉を用いて妥当性評価を行った。添加濃度は鶏卵の基準値0.02 $\mu$ g/gとし、試行回数は、真度は6回、精度は分析者1名が1日3回5日間分析する枝分かれ実験を行った。なお、検量範囲は0.01~0.001 $\mu$ g/mLとし、この場合の定量下限値は0.005 $\mu$ g/gとなる。

鶏卵、鶏肉ともに真度、併行精度及び室内精度が目標値を満たしていることから、本法の妥当性が確認された(表3)。

表3 評価結果

	フィプロニル(%)		代謝体B(%)		目標値(%)
	鶏卵	鶏肉	鶏卵	鶏肉	
真度	92.5	100	91.7	97.5	70~120
併行精度	3.1	3.4	1.8	3.0	<15
室内精度	3.3	3.4	1.9	3.6	<20

## 8. 実態調査

千葉市内の小売店で販売されていた鶏卵 20 検体と、通信販売で購入した乾燥卵白 2 検体について、実態調査を行った。

検量範囲及び定量下限値は、妥当性評価と同様にして測定したところ、フィプロニル及び代謝体 B とともに定量下限値 (0.005 $\mu\text{g/g}$ ) を超えて検出された検体は無かった。鶏卵 3 検体と乾燥卵白 1 検体からクロマトグラム上で痕跡程度 (定量限界値の 5 分の 1~10 分の 1) ではあるが代謝体 B のみが検出された。検出された鶏卵のうち 2 検体は選別包装者が同一であった (表 4、5)。

表 4 鶏卵実態調査結果

選別包装地	検体数	定量下限値以上 検出検体数	備考
愛知県	1	0	
茨城県	3	0	
群馬県	1	0	
埼玉県	3	0	2検体から痕跡程度の検出
千葉県	9	0	1検体から痕跡程度の検出
東京都	1	0	
三重県	2	0	
合計	20	0	

表 5 乾燥卵白実態調査結果

原産国	検体数	定量下限値以上 検出検体数	備考
イタリア	1	0	痕跡程度の検出
日本	1	0	
合計	2	0	

## 9. 考察

鶏卵のフィプロニルは、通知試験法<sup>9)</sup>の GC/MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物) の分析対象化合物の中に含まれているため、当初は GC/MS で測定することを目指し、検量線測定を行ったが直線性、感度ともにあまり良い結果が得られなかった (相関係数=0.9 程度、定量限界値=0.01 $\mu\text{g/mL}$ )。一方、LC/MS/MS では GC/MS より直線性、感度ともに良好であったため、分析法の検討を行い、妥当性を確認することが出来た。

検体前処理では、脱脂以降にミニカラム精製を加えることで、測定機器に対する負荷を軽減することが出来たが、処理時間が増加することになった。しかし、今回は脱脂までの工程を QuEChERS 法として、振とうと遠心分離操作で行うこととしたため、他の抽出脱脂法に比べて大幅に時間短縮できることから、検体前処理時間は、5 検体で 3 時間程度となった。機器測定の時間を考慮しても、検体搬入翌日には検査結果を確認できることから、ある程度の迅速性を担保できるものとする。

実態調査では、定量下限値を超えて検出された検体は無く、汚染は確認されなかった。代謝体 B が痕跡程

度検出された体については、飼料から摂取されたものが体内で代謝された可能性が示唆された。日本では、鶏又はうずら用飼料のフィプロニルの基準が 0.01mg/Kg<sup>10)</sup>とされている。

2019 年 2 月 1 日に日本と欧州連合との経済連携協定が発効し、鶏卵 (乾燥粉末を含む) やその加工品 (菓子類等) の輸入が増加する可能性がある。EU 地域で汚染があった場合、日本国内で問題となることもあり得るため、標準作業書を作成し検査に備える共に、海外の情勢も注視することが重要である。

## 文献

- 1) 公益財団法人 日本中毒情報センター, “保健師・薬剤師・看護師向け中毒情報”, <http://www.j-poison-ic.or.jp> (2018. 10. 18 アクセス)
- 2) 食品安全委員会, “フィプロニル”, <http://www.fcs.go.jp> (2018. 10. 18 アクセス)
- 3) 厚生労働省, “EU (欧州連合)等における鶏卵のフィプロニル汚染に関する Q&A”, <http://www.mhlw.go.jp> (2018. 10. 18 アクセス)
- 4) ニュースウィーク日本版, “殺虫剤フィプロニルが混入した卵、EU 加盟国など 40 か国で発見”, <http://www.newsweekjapan.jp> (2018. 10. 18 アクセス)
- 5) BuzzFeedNews, “広がる「汚染卵」日本は大丈夫なのか？韓国で給食に「卵なしオムライス」が…”, <http://www.buzzfeed.com> (2018. 10. 18 アクセス)
- 6) M.Anastassiades, S.J.Lehotay, D.stajnbaher, F.T.Schenck : Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, JAOAC International, 86, 421-431, 2003
- 7) Agilent Technologies China, September, 2017, 動物由来食品中フィプロニルの分析ソリューション, <https://www.chem-agilent.com> (2018. 10. 18 アクセス)
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長, 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, 食安発第 1224 第 1 号, 平成 22 年 12 月 24 日
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長, 食品中に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法, 食安発第 0124001 号, 平成 17 年 1 月 24 日
- 10) 農林水産大臣, 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