

## 2 飼料中のイマザピック及びイマザピルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

桑原 正良\*, 中村 哲\*

### Simultaneous Determination of Imazapic and Imazapyr in Feed by LC-MS/MS

Masayoshi KUWABARA\* and Satoru NAKAMURA\*

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

An analytical method was developed to determine the levels of imazapic and imazapyr in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, imazapic and imazapyr were extracted with hydrochloric acid (0.02 mol/L)-methanol (2:3) and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with hydrochloric acid (0.02 mol/L)-methanol (2:3) to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with InertSep C18-C (GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and Bond Elut SCX (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of imazapic and imazapyr. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 µm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using a gradient with 0.1 v/v% formic acid solution and methanol as the mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for finishing beef cattle, wheat, soybean, corn, soybean meal and Sudangrass hay. The formula feed for cattle was spiked with 0.005 or 0.01 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Wheat was spiked with 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean was spiked with 0.005, 0.05 or 0.5 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.05 or 5 mg/kg of imazapyr. Corn was spiked with 0.005 or 0.01 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean meal was spiked with 0.005, 0.05 or 0.5 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.05 or 7 mg/kg of imazapyr. Sudangrass hay was spiked with 0.05, 0.5 or 3 mg/kg of imazapic, and 0.05, 0.5 or 30 mg/kg of imazapyr. The mean recoveries ranged from 82.7 % to 106 % for imazapic and 84.9 % to 109 % for imazapyr. The relative standard deviations of repeatability ( $RSD_r$ ) were not more than 7.0 % for imazapic and 6.7 % for imazapyr.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using formula feed for finishing beef cattle, wheat, corn, soybean meal and Sudangrass hay spiked with imazapic and imazapyr. Formula feed for finishing beef cattle was spiked with 0.01 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Wheat was spiked with 0.05 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Corn was spiked with 0.01 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean meal was spiked with 0.5 mg/kg of imazapic and 7 mg/kg of imazapyr. Sudangrass hay was spiked with 3 mg/kg of imazapic and 30 mg/kg of imazapyr. The ranges of mean recoveries, the relative standard deviations of repeatability ( $RSD_r$ ), the relative standard deviations of reproducibility ( $RSD_R$ ) and HorRat, respectively, were 81.4 % to 98.2 %, 3.6 % to 10 %, 6.8 % to 14 % and 0.38 to 0.65 for imazapic, and 76.6 % to 91.0 %, 2.2 % to 13 %, 6.2 % to 20 % and 0.49 to 0.90 for imazapyr.

This method was validated and established for use in the inspection of imazapic and imazapyr in feed.

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

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

キーワード：飼料；イマザピック；イマザピル；高速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；共同試験

## 1 緒 言

イマザピック及びイマザピルは、American Cyanamid Co. (現 BASF SE) により開発されたイミダゾリノン系除草剤である。それらの作用機構は分岐鎖アミノ酸の植物体内での生合成を司るアセトヒドロキシ酸合成酵素を阻害し、DNA 合成及び細胞分裂を阻止して枯死させると考えられている<sup>1),2)</sup>。飼料中の残留基準値は、イマザピックにおいては、小麦 0.05 mg/kg, 大豆 0.5 mg/kg, とうもろこし 0.01 mg/kg, 大豆油かす 0.5 mg/kg 及び牧草 3 mg/kg, また、イマザピルにおいては、小麦 0.05 mg/kg, 大豆 5 mg/kg, とうもろこし 0.05 mg/kg, 大豆油かす 7 mg/kg 及び牧草 30 mg/kg である<sup>3)</sup>。

飼料中の分析法は、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 26 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した方法<sup>4)</sup> (以下「JFRL 法」という。)がある。この JFRL 法を基に飼料分析基準<sup>5)</sup>への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

参考にイマザピック及びイマザピルの構造式等を Fig. 1 に示した。

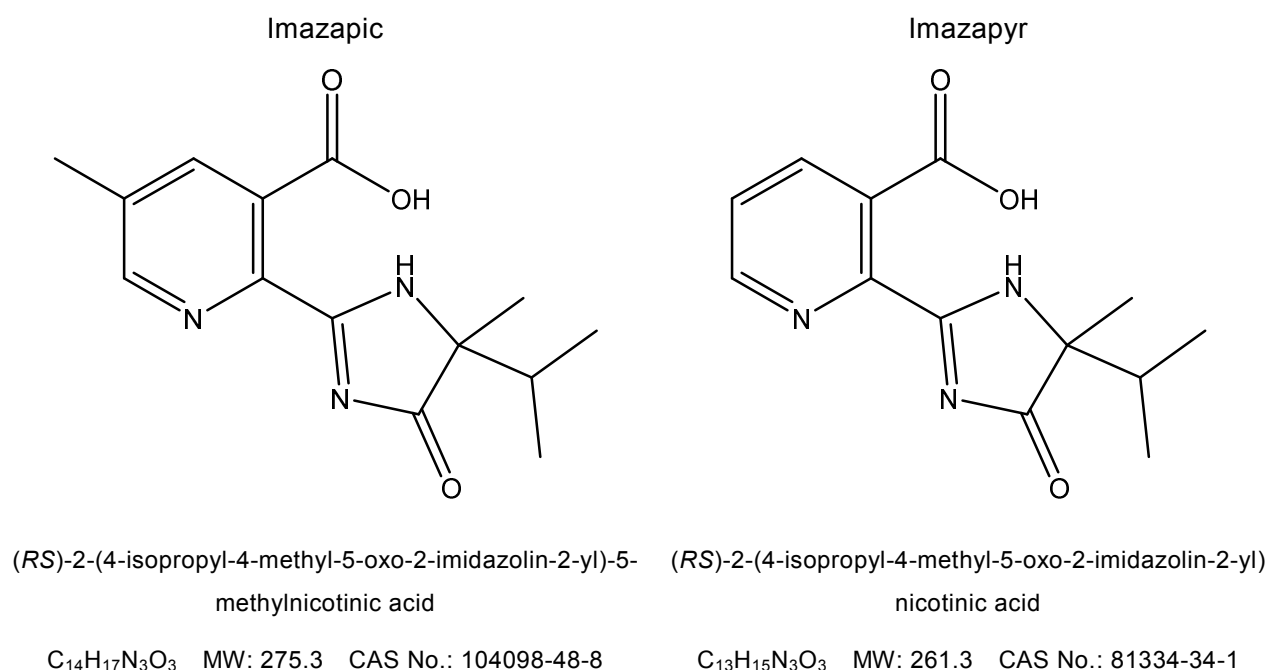


Fig. 1 Chemical structures of imazapic and imazapyr

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用及び肉用牛肥育用），小麦，大豆，とうもろこし，大豆油かす及び乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）をそれぞれ 1 mm の

スクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

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 finishing period broiler	Grains	61	Corn, polished rice, milo
	Oil seed meal	27	Soybean meal, rapeseed meal
	Animal by-products	3	Chicken meal, fish meal, pork chicken meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	8	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed yeast, fructo-oligosaccharides syrup, silica, feed additives
For finishing pig	Grains	74	Corn, polished rice, milo, wheat, bread crumb
	Oil seed meal	19	Soybean meal, rapeseed meal
	Brans	2	Bran, rice bran
	Others	5	Bakery waste, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, animal fat, feed additives
For finishing beef cattle	Grains	63	Corn, barley, milo
	Brans	30	Bran, corn gluten feed, hominy feed, rice bran
	Oil seed meal	4	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	3	Molasses, soybean curd residue, calcium carbonate, salt, feed additives

## 2.2 試薬

1) メタノールは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アンモニア水、ギ酸及び塩酸は試薬特級（ギ酸及びアンモニア水はそれぞれ 99 %及び 28 %のもの）を用いた。ケイソウ土は Celite 545 (Imerys Minerals California, Inc.製) を用いた。水は超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

### 2) イマザピック標準原液

イマザピック標準品（残留農薬試験用，純度 99.9 %，和光純薬工業製）25 mg を正確に量って 50 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イマザピック標準原液を調製した（この液 1 mL は，イマザピックとして 0.5 mg を含有する．）。

### 3) イマザピル標準原液

イマザピル標準品（残留農薬試験用，純度 99.7 %，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，同溶媒を加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてイマザピル標準原液を調製した（この液 1 mL は，イマザピルとして 0.5 mg を含有する．）。

### 4) 農薬混合標準液

各標準原液 2 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，イマザピック及びイマザピルとして各 20 µg を含有する．）。更に，農薬混合標準原液の一定量を，0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (7+3) で正確に希釈し，1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとして 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 及び 2000 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-2000 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1690 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 250 rpm）
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18-C（充てん量 1000 mg） ジーエルサイエンス製
- 5) ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Bond Elut SCX（充てん量 500 mg） Agilent Technologies 製
- 6) 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。）  
LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製  
MS 部：ACQUITY TQD Waters 製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ，水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え 30 分間静置後，更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）100 mL（乾牧草は 120 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，抽出液をあらかじめケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）60 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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）を加えた．この液 2 mL（乾牧草は，更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）で正確に 10 倍希釈した後，その液 2 mL）を 20 mL 以上の試験管等のガラス容器に正確に入れ，塩酸（0.01 mol/L）18 mL を加えて，カラム処理に供する試料溶液とした．

### 2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール 10 mL 及び塩酸（0.01 mol/L）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流出させた．先のミニカラムの下にあらかじめメタノール 10 mL 及び塩酸（0.01 mol/L）10 mL で順次洗浄したベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し，試料溶液の入っていたガラス容器を塩酸（0.01 mol/L）－メタノール（1+1）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．

次に，オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを外し，メタノール 5 mL をベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに加え，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，アンモニア水－メタノール（1+99）10 mL をミニカラムに加え，イマザピック及びイマザピルを溶出させた．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．0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（7+3）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

### 3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 4  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し，選択反応検出（以下「SRM」という．）クロマトグラムを得た．

LC-MS/MS の測定条件を Table 2 及び Table 3 に示した．

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid-methanol (8:2) → 10 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (650 L/h, 500 °C)
Capillary voltage	1 kV
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/min)

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> )		
Imazapic	276	231	—	35	20
		—	163		25
Imazapyr	262	217	—	35	25
		—	69		30

## 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからイマザピック及びイマザピルのピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のイマザピック量及びイマザピル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (30 mL for grass hay) and allow to stand for 30 min
  - add 100 mL of HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3) (120 mL for grass hay)
  - shake for 30 min
  - filter through No.5B using diatomite under reduced pressure
  - wash with 60 mL of HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - fill up to 200 mL with HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - dilute sample solution of grass hay 10-fold dilution with HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - transfer 2 mL of sample solution to 20 mL centrifuge tube and add 18 mL of HCl (0.01 mol/L)
- InertSep C18-C and Bond Elut SCX
- prewash each minicolumn with 10 mL of methanol and 10 mL of HCl (0.01 mol/L)
  - apply the sample solution to InertSep C18-C
  - attach Bond Elut SCX under InertSep C18-C
  - wash with 5 mL of HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1) (twice)
  - remove InertSep C18-C and wash with 5 mL of methanol
  - elute with 10 mL of ammonia-methanol (1:99)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 1 mL of 0.1 v/v% formic acid-methanol (7:3)
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for imazapic and imazapyr in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4)に従って調製したイマザピック及びイマザピルとして各 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 及び 2000 ng/mL 相当量の各農薬混合標準液各 4  $\mu$ 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ピーク高さを用いて検量線を作成した. 得られた検量線は, Fig. 2 のとおりであり, イマザピック及びイマザピルで 0.2~2000 ng/mL (注入量として 0.0008~8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

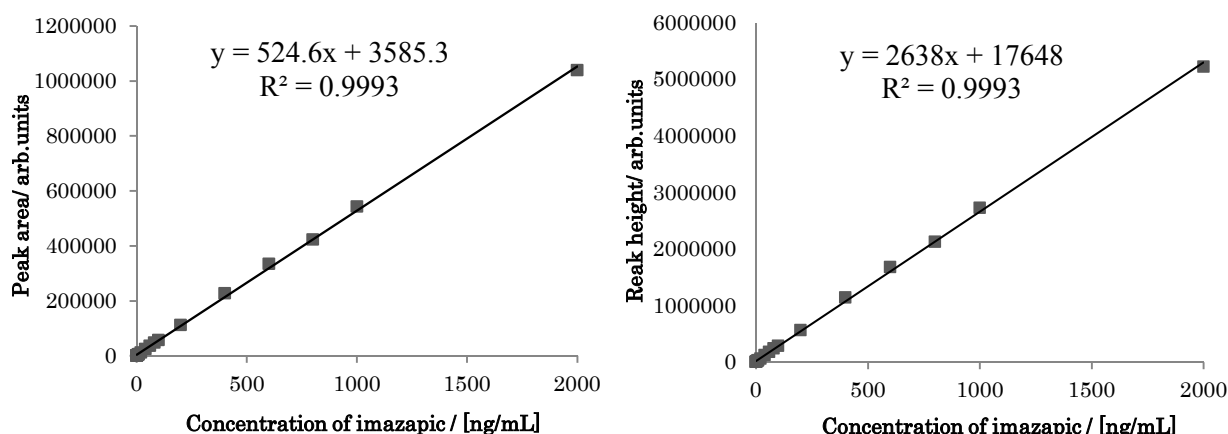


Fig. 2-1 Calibration curves of imazapic by peak area (left) and peak height (right)

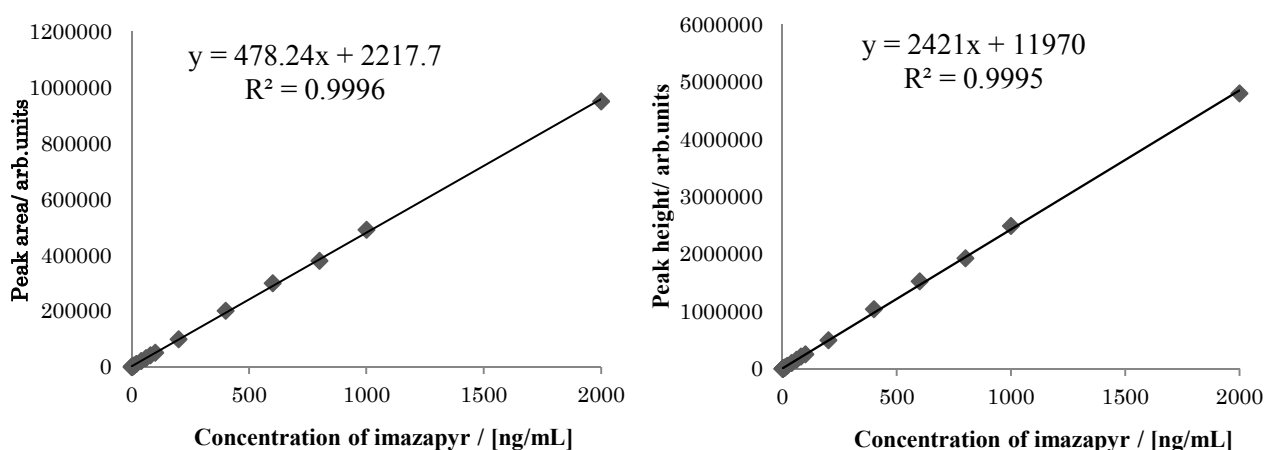


Fig. 2-2 Calibration curves of imazapyr by peak (left) area and peak height (right)

### 3.2 ミニカラムからの溶出画分の確認

#### 1) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

大豆油かすを用い、2.4 の 1) に従って調製した試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 50 ng/mL) を添加し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は、Table 4 のとおり、イマザピック及びイマザピルは塩酸 (0.01 mol/L) 10 mL の画分では溶出せず、塩酸 (0.01 mol/L) -メタノール (1+1) 0~10 mL の画分に溶出し、10~20 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、JFRL 法と同様に本カラムにおける溶出液量は、塩酸 (0.01 mol/L) -メタノール (1+1) 10 mL とした。

Table 4 Elution pattern of imazapic and imazapyr from InertSep C18-C

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total
	HCl (0.01 mol/L)		HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1)				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
Imazapic	0	0	89	3	0	0	92
Imazapyr	0	0	90	0	0	0	90

a) Mean (n=3)

## 2) ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム

大豆油かすを用い、2.4 の 1)に従って調製を行い、2)のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を行った試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 ng/mL）を添加し、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は、Table 5 のとおり、イマザピル及びイマザピックはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出溶媒である塩酸（0.01 mol/L）-メタノール（1+1）0~10 mL の画分及びメタノール 5 mL では溶出せず、アンモニア水-メタノール（1+99）0~10 mL の画分に溶出し、10~20 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、本カラムにおける溶出液量はアンモニア水-メタノール（1+99）10 mL とした。

Table 5 Elution pattern of imazapic and imazapyr from Bond Elut SCX

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total	
	HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1)		Methanol	Ammonia solution-methanol (1:99)				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL		15~20 mL
Imazapic	0	0	0	43	54	0	0	97
Imazapyr	0	0	0	41	51	0	0	92

a) Mean (n=3)

## 3.3 妨害物質の検討

配合飼料（ブロイラー肥育後期用、肉豚肥育用及び肉用牛肥育用）、小麦、大豆、とうもろこし、大豆油かす及び乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）各 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

なお、妨害物質の検討で得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。



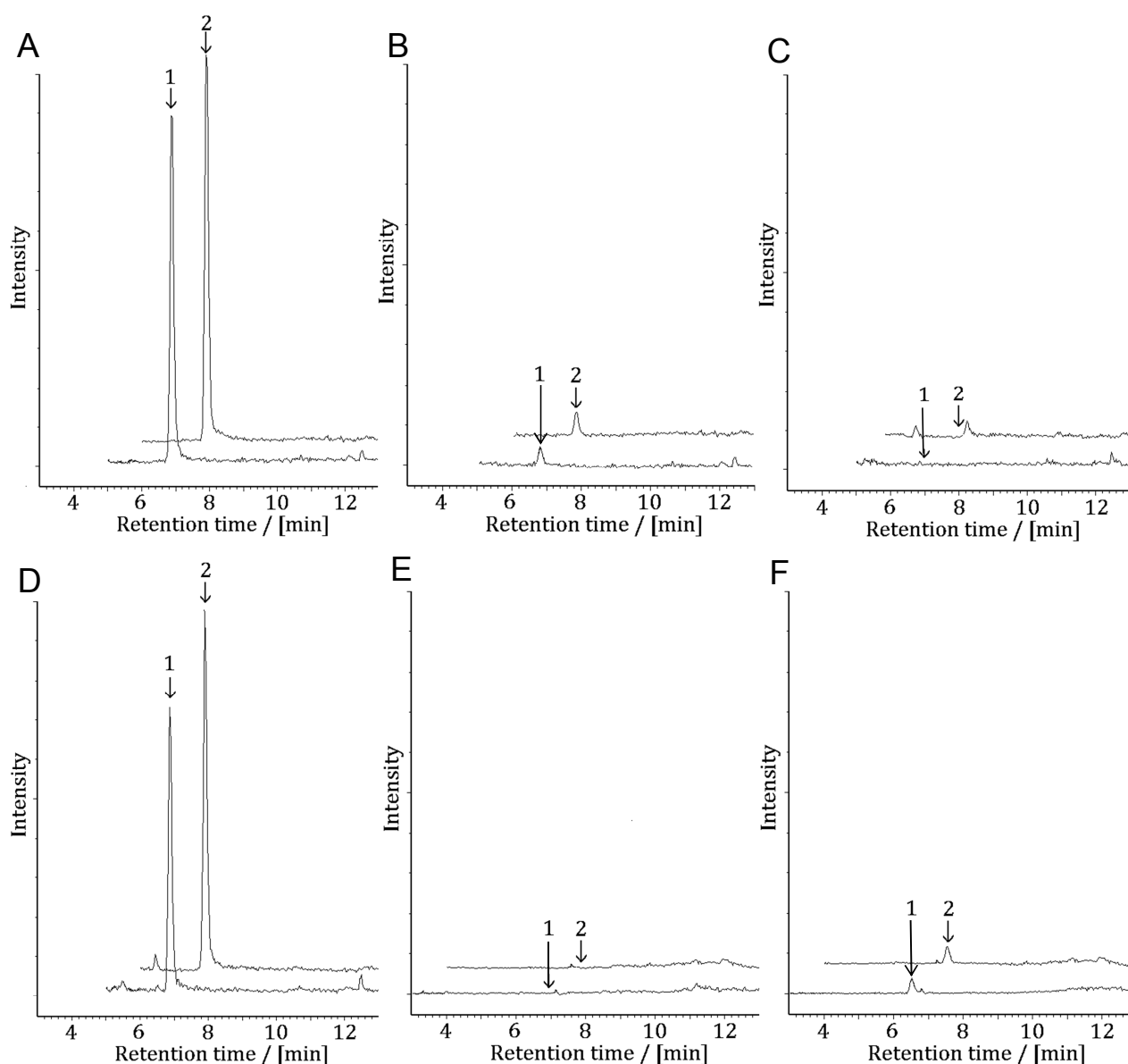


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the retention times of 1: imazapyr and 2: imazapic. The peak height of the 5 ng/mL standard solution is to be shown as 100 %, and the baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (5 ng/mL: 20 pg as each pesticide)

B: Standard solution (0.5 ng/mL: 2 pg as each pesticide)

C: Sample solution of wheat (blank)

D: Sample solution of wheat spiked at 0.05 mg/kg of imazapic and imazapyr (5 ng/mL as each pesticide)

E: Sample solution of Sudangrass hay (blank)

F: Sample solution of Sudangrass hay spiked at 0.05 mg/kg of imazapic and imazapyr (0.5 ng/mL as each pesticide)

### 3.4 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 2)により調製した配合飼料 (ブロイラー肥育後期用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育

用), 小麦及びとうもろこしのブランク試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして各 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 1 ng/mL 相当量), 大豆及び大豆油かすのブランク試料溶液に各 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 4 ng/mL 相当量), 乾牧草 (アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草) のブランク試料溶液に各 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 2 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 2) に従って調製した同濃度の農薬混合標準液に対するピーク面積比を確認したところ, イマザピックは 88~98 %, イマザピルは 88~101 % であり, イマザピック及びイマザピ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.

### 3.5 添加回収試験

イマザピックについては, 肉用牛肥育用配合飼料に 0.005 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 1 ng/mL), 小麦に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆に 0.005, 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 50 ng/mL) を, とうもろこしに 0.005 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 1 ng/mL) を, 大豆油かすに 0.005, 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 50 ng/mL) を, スーダングラス乾草に 0.05, 0.5 及び 3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 30 ng/mL) を, イマザピルについては, 肉用牛肥育用配合飼料に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 小麦に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆に 0.005, 0.05 及び 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 500 ng/mL) を, とうもろこしに 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆油かすに 0.005, 0.05 及び 7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 700 ng/mL) を, スーダングラス乾草に 0.05, 0.5 又は 30 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 300 ng/mL) をそれぞれ添加し, 本法により 3 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果は Table 6 のとおり, イマザピックについては平均回収率 82.7~106 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 7.0 % 以下, イマザピルについては平均回収率 84.9~109 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 6.7 % 以下であり, 良好な成績が得られた.

Table 6 Recoveries for imazapic and imazapyr

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Soybean	
		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> (%)
Imazapic	0.005	93.2	2.4	82.7	3.5	89.5	4.4
	0.01	96.0	6.5	87.8	2.3	—	—
	0.05	—	—	100	2.4	96.3	3.3
	0.5	—	—	—	—	96.2	0.4
Imazapyr	0.005	87.9	6.7	88.9	4.9	90.1	6.5
	0.01	93.4	3.8	98.5	3.5	—	—
	0.05	84.9	0.8	105	2.2	102	1.4
	5	—	—	—	—	94.0	0.7

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
		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> (%)
Imazapic	0.005	87.7	1.7	89.9	5.1	—	—
	0.01	97.7	5.0	—	—	—	—
	0.05	—	—	106	2.1	91.7	7.0
	0.5	—	—	102	1.2	99.4	1.5
	3	—	—	—	—	92.9	0.9
Imazapyr	0.005	95.2	6.2	87.1	4.1	—	—
	0.01	100	4.9	—	—	—	—
	0.05	85.4	0.7	107	2.1	100	5.1
	0.5	—	—	—	—	109	2.3
	7	—	—	98.5	1.4	—	—
	30	—	—	—	—	92.5	0.4

—: Not tested

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、イマザピック及びイマザピルを添加し、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、イマザピック及びイマザピルともに  $SN$  比が 10 となる濃度は 0.005 mg/kg (乾牧草は 0.05 mg/kg) ,  $SN$  比が 3 となる濃度は 0.002 mg/kg (乾牧草は 0.02 mg/kg) であった。

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。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、肉用牛肥育用配合飼料にイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.1 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、小麦にイマザピックとして 0.05 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.5 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、とうもろこしにイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.1 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、大豆油かすにイマザピックとして 0.5 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 7 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 5 µg 及びイマザピル 70 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）並びにスーダングラス乾草にイマザピックとして 3 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 30 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 30 µg 及びイマザピル 300 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

参加試験室は、全国農業協同組合飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、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、同神戸センター及び同福岡センター（計 9 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>6), 7)</sup>を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の有無の確認及び棄却等を行った上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_f$ ) 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<sup>8)</sup>を用いて HorRat を求めた。

イマザピックの結果は Table 7 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、大豆油かす及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 87.6, 81.4, 89.0, 98.2 及び 84.4 %,  $RSD_f$  は 9.3, 8.6, 10, 3.6 及び 6.7 %,  $RSD_R$  は 11, 13, 14, 6.8 及び 9.1 %, HorRat は 0.50, 0.61, 0.64, 0.38 及び 0.65 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものがみられたが、分析操作が比較的簡便であることによるものと考えられた。

イマザピルの結果は Table 8 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、大豆油かす及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 76.6, 78.8, 83.7, 89.4 及び 91.0 %,  $RSD_f$  は 7.6, 13, 8.6, 2.2 及び 3.8 %,  $RSD_R$  は 19, 20, 19, 6.2 及び 4.8 %, HorRat は 0.85, 0.90, 0.85, 0.51 及び 0.49 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものがみられたが、分析操作が比較的簡便であることによるものと思われた。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 9 に示した。

Table 7 Collaborative study for imazapic

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0103	0.00781	0.0526	0.0463	0.0103	0.00827	0.516	0.490	2.78	2.99
2	0.00894	0.00886	0.0383	0.0484	0.00916	0.00986	0.501	0.476	2.68	2.16
3	0.00724	0.00906	0.0321	0.0345	0.00718	0.00699	0.559	0.527	2.65	2.83
4	0.00720	0.00743	0.0387	0.0453	0.00744	0.00858	0.421	0.456	2.47	2.53
5	0.00828	0.00897	0.0397	0.0401	0.00883	0.00931	0.507	0.512	2.71	2.58
6	0.00875	0.00891	0.0423	0.0433	0.00949	0.00957	0.487	0.490	2.47	2.48
7	0.00989	0.0105	0.0388	0.0409	0.00919	0.0120	0.451	0.459	2.39	2.63
8	0.00860	0.00858	0.0331	0.0350	0.00742	0.00815	0.494	0.522	2.39	2.08
9	0.00857	0.00976	0.0395	0.0440	0.00889	0.00950	0.468	0.502	2.42	2.35
Spiked level (mg/kg)	0.01		0.05		0.01		0.5		3	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.00876		0.0407		0.00890		0.491		2.53	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	87.6		81.4		89.0		98.2		84.4	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	9.3		8.6		10		3.6		6.7	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	11		13		14		6.8		9.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22		22		18		14	
HorRat	0.50		0.61		0.64		0.38		0.65	

a)  $n=18$ 

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Collaborative study for imazapyr

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
1	0.0403	0.0394	0.0554	0.0380	0.0438	0.0415	5.99	5.85	27.1	29.5
2	0.0418	0.0398	0.0393	0.0456	0.0438	0.0473	6.35	6.06	25.9	25.2
3	0.0280	0.0376	0.0295	0.0323	0.0317	0.0296	6.71	6.50	27.7	29.4
4	0.0257	0.0282	0.0322	0.0414	0.0329	0.0383	3.59 <sup>a)</sup>	3.50 <sup>a)</sup>	27.3	27.5
5	0.0389	0.0415	0.0389	0.0401	0.0418	0.0445	6.82	6.90	27.4	26.9
6	0.0448	0.0445	0.0449	0.0444	0.0467	0.0485	6.17	6.26	28.5	28.3
7	0.0472	0.0484	0.0415	0.0452	0.0464	0.0577	5.74	5.84	25.5	28.2
8	0.0291	0.0311	0.0262	0.0262	0.0300	0.0349	5.99	5.89	28.5	27.0
9	0.0385	0.0447	0.0427	0.0453	0.0447	0.0493	6.37	6.70	25.8	25.8
Spiked level (mg/kg)	0.05		0.05		0.05		7		30	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	0.0383		0.0394		0.0419		6.26		27.3	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	76.6		78.8		83.7		89.4		91.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.6		13		8.6		2.2		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	19		20		19		6.2		4.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		22		22		12		10	
HorRat	0.85		0.90		0.85		0.51		0.49	

a) Data excluded by Cochran test

b) Formula feed for finishing beef cattle:  $n=18$ ; Wheat:  $n=18$ ; Corn:  $n=18$ ; Soybean meal:  $n=16$ ; Sudangrass hay:  $n=18$

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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC colume
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC Waters	X Bridge C18, Waters
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: 1200 Series, Agilent Technologies	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
8	LC: LC-20AD, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: API 4000, Applied Biosystems	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)

#### 4 まとめ

飼料中に残留するイマザピック及びイマザピルについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時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、以下の結果を得られ、適用が可能であると考えられた。

1) 検量線はそれぞれ 0.2~2000 ng/mL (注入量として 0.0008~8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、イマザピックとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.5 及び 1 ng/mL 相当濃度、小麦に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆に 0.5, 5 及び 50 ng/mL 相当濃度、とうもろこしに 0.5 及び 1 ng/mL 相当濃度、大豆油かすに 0.5, 5 及び 50 ng/mL 相当濃度、スーダングラス乾草に 0.5, 5 及び 30 ng/mL 相当濃度、イマザピルとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、小麦に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆に 0.5, 5 及び 500 ng/mL 相当濃度、とうもろこしに 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆油かすに 0.5, 5 及び 700 ng/mL 相当濃度、スーダングラス乾草に 0.5, 5 及び 300 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従って得られた SRM クロマトグラムでは、6 種類の飼料原料及び 3 種類の配合飼料において定量を妨げるピークは認められなかった。

- 3) 肉用牛肥育用配合飼料，小麦，大豆，とうもろこし，大豆油かす及びスーダングラス乾草にイマザピックとして 0.005~3 mg/kg 相当量，イマザピルとして 0.005~30 mg/kg 相当量を添加した試料について添加回収試験を実施し，回収率及び繰返し精度を求めたところ良好な結果が得られた。
- 4) 本法によるイマザピック及びイマザピルの定量下限は 0.005 mg/kg（乾牧草は 0.05 mg/kg），検出下限は 0.002 mg/kg（乾牧草は 0.02 mg/kg）であった。
- 5) 肉用牛肥育用配合飼料にイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量，小麦にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 0.05 mg/kg 相当量，とうもろこしにイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量，大豆油かすにイマザピックとして 0.5 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 7 mg/kg 相当量並びにスーダングラス乾草にイマザピックとして 3 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 30 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，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全国農業協同組合飼料畜産中央研究所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び一般財団法人食品環境検査協会東京事業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：イマザピック農薬評価書（第 2 版），平成 26 年 1 月 (2014)。
- 2) 食品安全委員会：イマザピル農薬評価書（第 2 版），平成 26 年 3 月 (2014)。
- 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，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター，一般財団法人食品環境検査協会：平成 26 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業 (2015)。
- 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) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995)。
- 7) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a Method of Analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed. Gaithersburg, MD, USA.
- 8) 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)。