

**技術レポート****3 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認**中村 哲<sup>\*1</sup>, 井上 智江<sup>\*2</sup>**Method Validations of the Determination Method of Imidacloprid by LC-MS  
for Wheat, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage**Satoru NAKAMURA<sup>\*1</sup> and Tomoe INOUE<sup>\*2</sup>(\*<sup>1</sup> Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),  
(Now Food Labeling Monitoring Department, FAMIC)<sup>\*2</sup> Kobe Regional Center, FAMIC)

A method validation of determination method of imidacloprid by liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS), which had been listed in analytical standards of feeds, was conducted for application to wheat, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS).

Imidacloprid was extracted with acetonitrile-water (13:7) and the extracted solution was filtered. The filtrate was diluted with acetonitrile to a volume of 200 mL (100 mL for wheat). The sample solutions of rice straw and WCRS were diluted 10-fold with acetonitrile. The sample solution was purified with liquid-liquid extraction and two types of SPE columns (Supelclean LC-18, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA and ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into the LC-MS to determine the level of imidacloprid. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.) using a gradient with 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on wheat, rice straw and WCRS. Imidacloprid was spiked at the levels of 0.005 or 0.2 mg/kg for wheat, 0.01 or 10 mg/kg for rice straw, and 0.009 or 3 mg/kg original matter for WCRS, respectively. The mean recoveries of imidacloprid ranged from 69.1 to 87.9 %. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 3.8 %.

As a result of recoveries and RSD<sub>r</sub>, the method was validated for wheat and WCRS. However, recoveries for imidacloprid in rice straw were under 70 %. Furthermore, the dilution of sample solution was necessary to apply the method to rice straw and WCRS, regardless of imidacloprid concentration.

**Key words:** imidacloprid; liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); wheat; rice straw; whole-crop rice silage

**キーワード:** イミダクロプリド; 液体クロマトグラフ質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 小麦; 稲わら; 稲発酵粗飼料

<sup>\*1</sup> 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, 現 表示監視部

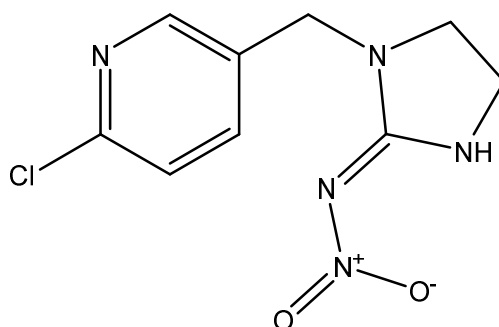
<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

## 1 緒 言

飼料中のイミダクロプリドの定量法については、液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）による方法が開発され<sup>1)</sup>、平成 18 年に飼料分析基準として掲載された<sup>2)</sup>が、その後、平成 25 年にとうもろこし及び乾牧草でイミダクロプリドの残留基準値の改正が行われ、更に小麦についても残留基準値を見直す動きがある。また、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）中のイミダクロプリドについては、飼料の有害物質の管理基準として、それぞれ 10 mg/kg 及び 3 mg/kg と定められている<sup>3)</sup>。一方、定量法の開発時の検討<sup>1), 2)</sup>及び財団法人日本食品分析センターの「平成 18 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」における検討<sup>4)</sup>では、イミダクロプリドを高濃度で添加した小麦の添加回収試験を行っておらず、稲わら及び WCRS については検討が行われていなかった。

以上を考慮し、今回、飼料中のイミダクロプリドの LC-MS による定量法について、小麦、稲わら及び WCRS の 3 種の飼料原料への適用を検討したので、その概要を報告する。

参考にイミダクロプリドの構造式等を Fig. 1 に示した。



(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> MW: 255.7 CAS No.: 138261-41-3

Fig. 1 Chemical structure of imidacloprid

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

小麦及び稲わらはそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。WCRS は 60 °C で 10~21 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

### 2.2 試 薬

1) アセトニトリル及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸ナトリウム（無水）及び酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。水は Millipore, DIRECT-Q UV 3（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) イミダクロプリド標準液

イミダクロプリド標準品（純度 99.6 %，関東化学製）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてイミダクロプリド標準原液を調製した（この液 1 mL は、イミダクロプリドとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にイミダクロプリドとしてそれぞれ 0.002~0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉碎機：

粉碎機 1 (小麦用)：ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (稲わら及び WCRS 用)：SM 2000 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 振とう機：理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振とう数 300 rpm)

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Supelclean LC-18 (充てん剤量 500 mg) Sigma-Aldrich 製

4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (充てん剤量 500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製

### 5) LC-MS：

LC 部：LC-20AB 島津製作所製

MS 部：LCMS-2010EV 島津製作所製

## 2.4 定量方法

飼料分析基準第 6 章第 1 節 28.1 の方法により定量した。LC-MS の測定条件を Table 1 に示した。なお、稲わら及び WCRS は、乾牧草の方法に準じて実施した。また、液液分配に供する試料溶液の調製については、以下のとおり実施した。

イミダクロプリドを 10 mg/kg の濃度で添加した稲わら及び原物換算して 3 mg/kg の濃度で添加した WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 20 倍希釈した溶液を液液分配に供する試料溶液とした。

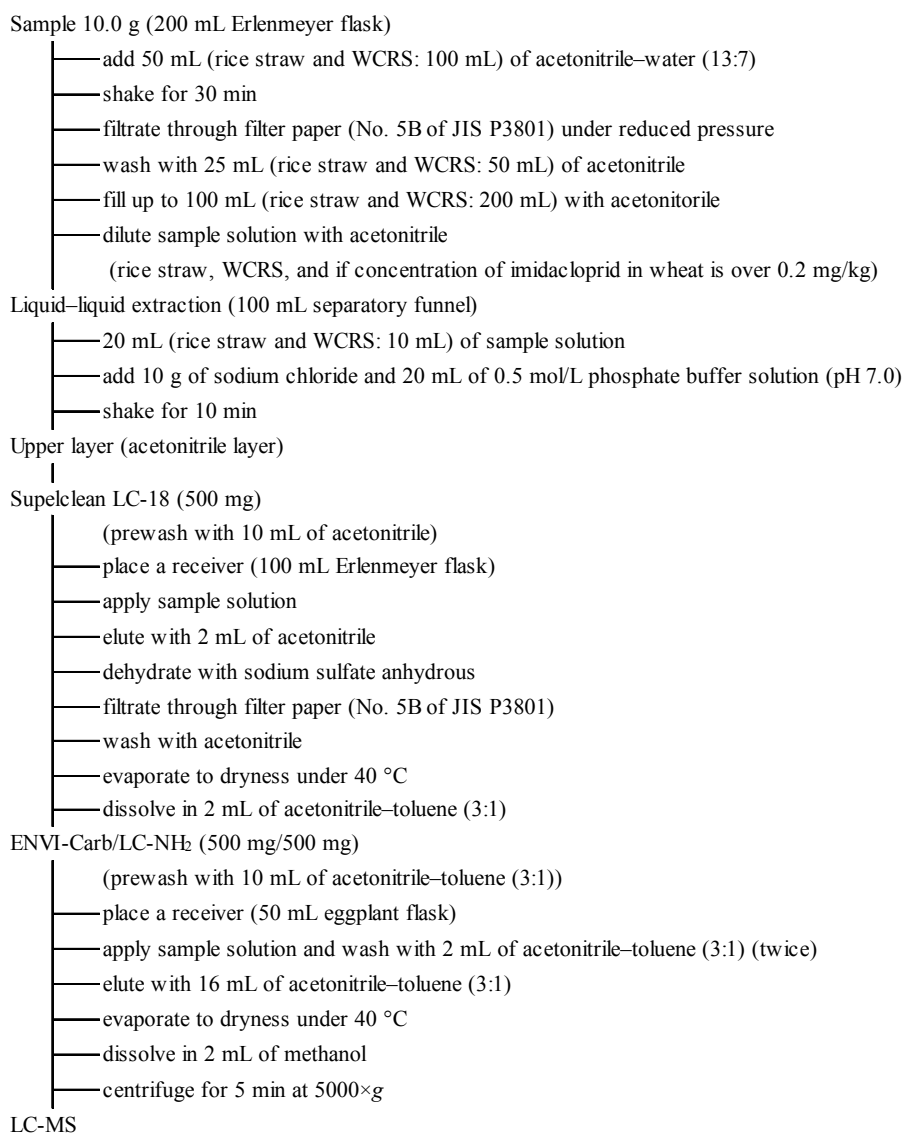
イミダクロプリドを 0.2 mg/kg の濃度で添加した稲わら及び原物換算して 0.09 mg/kg の濃度で添加した WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液を液液分配に供する試料溶液としたが、これとは別に、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈した溶液についても液液分配に供した。

イミダクロプリドを添加していない稲わら及び WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈した溶液を液液分配に供した。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution–5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (17:3) → 1 min → (3:2) (hold for 2.5 min) → 2.5 min → (1:1) → 2 min → (9:11) → 9.5 min → (1:19) (hold for 12.5 min) → (17:3) (hold for 17 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizing gas	N <sub>2</sub> (2.5 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min)
Heat block temperature	200 °C
Curved desolvation line temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 256



Scheme 1 Analytical procedure for imidacloprid in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 妨害物質の検討

小麦 2 検体, 稲わら 2 検体及び WCRS 2 検体を試料として, 2.4 により調製した試料溶液を LC-MS に注入し, 得られた選択イオン検出 (以下「SIM」という.) クロマトグラムを確認したところ, 小麦 1 検体において 0.001 mg/kg 相当, 稲わら 1 検体において 0.006 mg/kg 相当の微小ピークが認められたが, 飼料分析基準別表 3 試験法の妥当性確認法ガイドライン<sup>2)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に示された許容範囲内であった. 他の試料では妨害物質は認められなかった.

なお, 得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した.

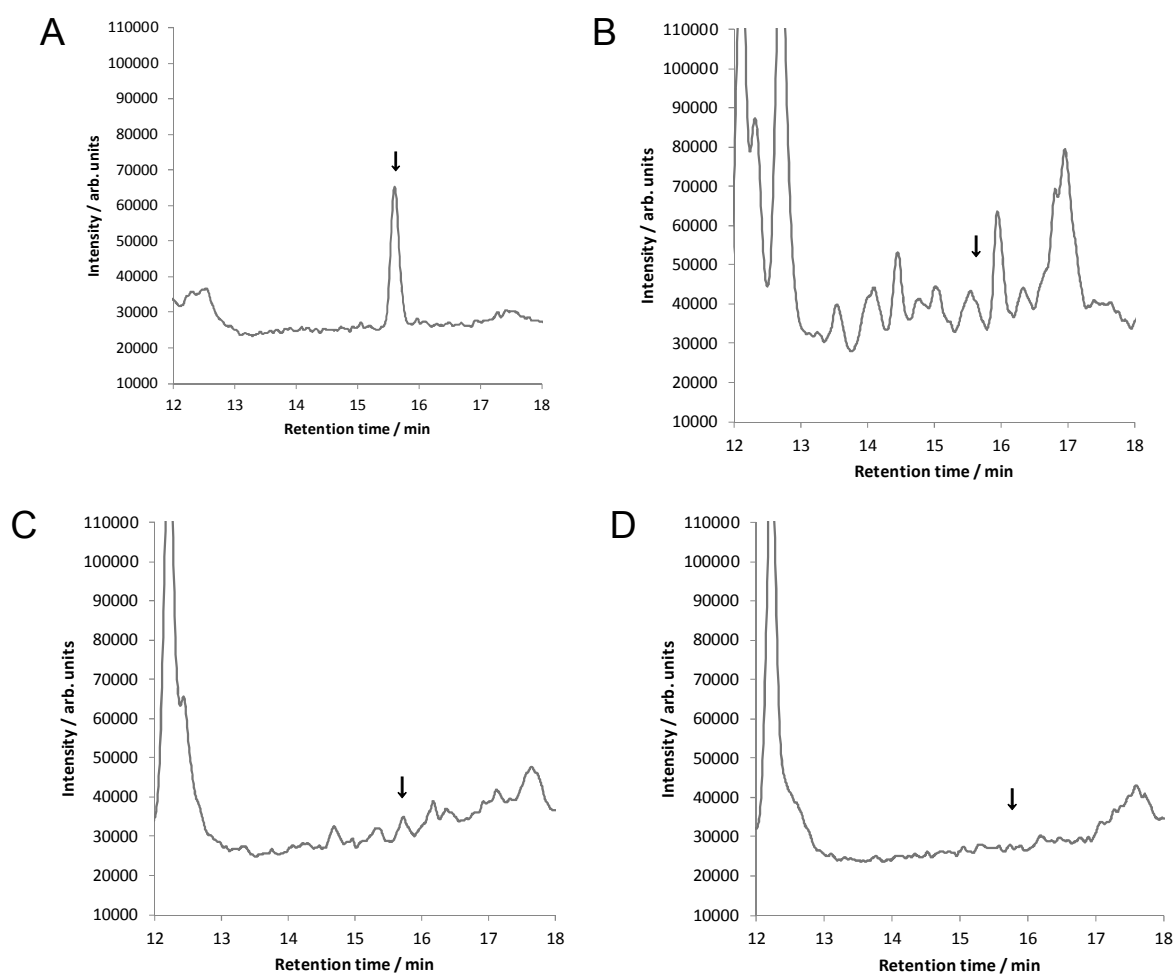


Fig. 2 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of standard solution and blank sample solutions

(LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of imidacloprid.)

- A: Standard solution (0.004  $\mu\text{g/mL}$ : 0.02 ng as imidacloprid)
- B: Wheat
- C: Rice straw
- D: WCRS

### 3.2 マトリックス効果の確認

2.4により調製した小麦2検体、稲わら2検体及びWCRS2検体のブランク試料溶液にイミダクロプリドとして、小麦に0.2 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL）、稲わらに8 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL）、WCRSに7 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.175 µg/mL）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イミダクロプリド標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、ピーク面積比はTable 2のとおり、91~104%であり、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 2 Matrix effect of samples

Feed types of matrix	Concentration of imidacloprid		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (ng/mL)	
Wheat 1	0.2	0.2	91
Wheat 2	0.2	0.2	92
Rice straw 1	0.2	8	104
Rice straw 2	0.2	8	100
WCRS 1	0.175	7 <sup>c)</sup>	104
WCRS 2	0.175	7 <sup>c)</sup>	98

$n = 3$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

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

c) mg/kg air-dry matter

### 3.3 添加回収試験

小麦、稲わら及びWCRSについて、イミダクロプリドとして、小麦に0.005及び0.2 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.005及び0.2 µg/mL）、稲わらに0.2及び10 mg/kg相当量（前者のうち、未希釈溶液を液液分配に供したものにあっては、最終試料溶液中で0.05 µg/mL. 10倍に希釈した溶液を液液分配に供したものにあっては、最終試料溶液中で0.005 µg/mL. 後者は最終試料溶液中で0.125 µg/mL. ）、WCRSに原物換算して0.09及び3 mg/kg相当量（前者のうち、未希釈溶液を液液分配に供したものにあっては、最終試料溶液中で0.05 µg/mL. 10倍に希釈した溶液を液液分配に供したものにあっては、最終試料溶液中で0.005 µg/mL. 後者は最終試料溶液中で0.0875 µg/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。

なお、WCRSに対する添加は風乾物試料にイミダクロプリドとして0.2及び7 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%と仮定して、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。

その結果（稲わら及びWCRSについては10倍に希釈した溶液を液液分配に供した結果.）はTable 3のとおり、平均回収率は69.1~87.9%、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として

3.8 %以下の成績が得られた。小麦及び WCRS（希釈溶液を液液分配に供した場合）については、妥当性確認法ガイドラインに規定された真度及び併行精度の目標値を満たしていた。稲わら及び WCRS のうち、未希釈溶液を液液分配に供した場合は、いずれも低回収となった。今回の結果から、稲わら及び WCRS についてはイミダクロプリド含量にかかわらず希釈操作が必須であることが示唆された。また、10 mg/kg 相当量のイミダクロプリドを添加した稲わらでは、希釈操作を行っても平均回収率が 70 %を下回り、低回収の傾向が見られたため、分析法の改良が必要であると考えられた。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 3 Recoveries for imidacloprid

Spiked level (mg/kg original matter)	Feed types					
	Wheat		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> (%)
0.01	87.9	3.3	—	—	—	—
0.09 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	68.3	2.4
0.09 <sup>d),e)</sup>	—	—	—	—	70.8	2.1
0.2	71.1	2.5	53.1	1.0	—	—
0.2 <sup>e)</sup>	—	—	74.9	3.8	—	—
3 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	73.3	1.9
10	—	—	69.1	1.7	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Imidacloprid was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

d) The spiked levels were 0.2 and 7 mg/kg air-dry matter. The levels of imidacloprid 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 imidacloprid in original matter (moisture 60 %)

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

e) Sample solution was diluted 10-fold with acetonitrile before liquid-liquid extraction.

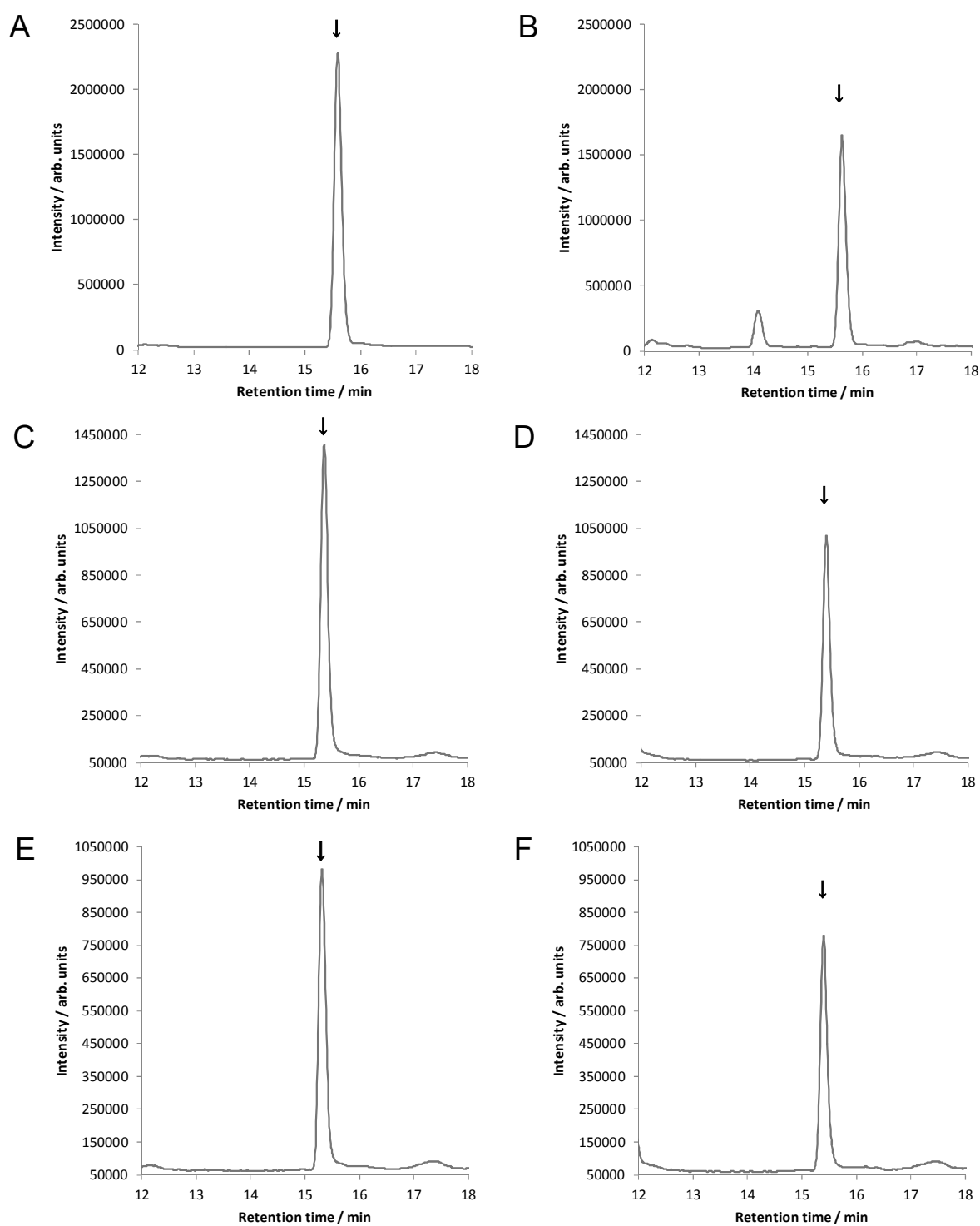


Fig. 3 SIM chromatograms of standard solutions and spiked samples (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate peaks of imidacloprid.)  
 A, C and E: Standard solutions (Each concentration of imidacloprid is A: 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , C: 0.12  $\mu\text{g/mL}$  and E: 0.08  $\mu\text{g/mL}$ .)  
 B, D and F: Sample solutions (B: wheat spiked at 0.2 mg/kg of imidacloprid (corresponding to 0.2  $\mu\text{g/mL}$ ), D: rice straw spiked at 10 mg/kg of imidacloprid (corresponding to 0.125  $\mu\text{g/mL}$ ) and F: WCRS spiked at 3 mg/kg original matter of imidacloprid (corresponding to 0.0875  $\mu\text{g/mL}$ ))



### 3.4 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、小麦 1 検体、稲わら 1 検体及び WCRS 1 検体にイミダクロプリドを添加し、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。なお、ノイズの計算方法は JIS K 0136:2015 に従った。また、稲わら及び WCRS については 10 倍希釈溶液を液液分配に供したのものに対して適用した。

その結果、小麦、稲わら及び WCRS（風乾物）において SN 比が 10 となる濃度は、0.14 mg/kg、0.42 mg/kg 及び 0.29 mg/kg であった。また、SN 比が 3 となる濃度は、0.04 mg/kg、0.13 mg/kg 及び 0.09 mg/kg であった。小麦については、飼料分析基準に定められた定量下限（0.005 mg/kg）及び検出下限（0.002 mg/kg）を満たさないものであった。また、稲わら及び WCRS についても、乾牧草の定量下限（0.2 mg/kg）及び検出下限（0.05 mg/kg）と比較して大きい値であった。これは、Fig. 2 に示しているとおおり、イミダクロプリドのピーク前後において他の妨害物質が多数存在することから、ノイズの計算においてこれらのピークの影響を除外することができなかったことに起因すると考えられた。そのため、イミダクロプリド以外のピークに左右されない方法として、定量値の標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍（自由度 4 の  $t$  分布の 0.95 分位点の 2 倍）を定量下限及び検出下限として採用することとした。その結果、定量下限の実測値は、小麦、稲わら及び WCRS についてそれぞれ、0.002 mg/kg、0.08 mg/kg 及び 0.04 mg/kg、検出下限の実測値は 0.0007 mg/kg、0.03 mg/kg 及び 0.02 mg/kg であり、いずれも飼料分析基準に示された値を下回ったため、当該分析法の定量下限及び検出下限については変更しないこととした。

なお、Table 3 に示したとおおり、飼料分析基準に定められた定量下限濃度（稲わら及び WCRS にあっては、乾牧草の定量下限濃度）における添加回収試験結果は良好であった。

## 4 まとめ

小麦、稲わら及び WCRS に残留するイミダクロプリドについて、飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したところ、小麦及び WCRS については妥当性確認法ガイドラインの目標を満たし、分析法の妥当性が確認されたが、稲わらにおいて回収率が 70 %を下回り、分析法の改良が必要であった。また、飼料分析基準では、飼料中のイミダクロプリド含量が多い場合にのみ抽出溶液を希釈することとしているが、稲わら及び WCRS についてはイミダクロプリド含量にかかわらず希釈操作が必須であることが示唆された。

## 文 献

- 1) 野崎 友春, 山多 利秋: 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法, 飼料研究報告, 32, 23-29 (2007).
- 2) 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).
- 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について, 昭和 63 年 10 月 14 日付け 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 財団法人日本食品分析センター: 平成 18 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 (飼料中の有害物質等の分析法の開発) (2007).