

以 LC-MS/MS 建立小鼠血漿中依滅草和福賽絕濃度分析方法

李彥芸¹、王凱平^{1*}

摘要

李彥芸、王凱平。2026。以 LC-MS/MS 建立小鼠血漿中依滅草和福賽絕濃度分析方法。臺灣農藥科學 20 : 79-91。

本研究目的為建立小鼠血漿中濃度分析方法，以依滅草與福賽絕農藥原體為例，使用含 1% 甲酸之乙腈溶液作為萃取溶液，並以 Phree 磷脂去除方案試劑組 (Phree Phospholipid Removal Solutions Kit) 進行前處理使血漿中的蛋白質和磷脂質去除，及利用液相層析串聯式質譜儀 (Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS) 進行測定。血漿基質添加依滅草標準品 (0.1 µg/mL, n = 3) 測得回收率範圍介於 97.68-111.44%，及相對標準偏差均小於 2.19%，福賽絕標準品 (0.1 µg/mL, n = 3) 測得回收率範圍介於 101.12-103.48% 之間，及相對標準偏差均小於 4.28%；顯示本分析方法之建立可有效進行小鼠血漿中依滅草與福賽絕濃度檢測之定性與定量，從血漿樣本中均可檢測出兩農藥原體之濃度範圍分別為依滅草 16.92-101.84 µg/mL 及福賽絕 0.001-0.025 µg/mL，故可運用此 LC-MS/MS 分析技術檢測試物質是否存在於血漿中進而供小鼠微核試驗證明該物質暴露於標的組織之依據。

關鍵詞：液相層析串聯式質譜儀、磷脂去除方案試劑組、依滅草、福賽絕、小鼠血漿、小鼠微核試驗

接受日期：2026 年 6 月 25 日

* 通訊作者。E-mail: ian902567@acri.gov.tw

¹ 臺中市 農業部農業藥物試驗所

前言

目前血漿樣品中最常用的萃取技術包括液-液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 和傳統的有機溶劑沉澱法 (organic solvent precipitation)，這些技術均具備良好的萃取效果。然而，LLE 和 SPE 方法通常需要多個步驟來進行樣品純化，增加操作的複雜性和耗時。相比之下，使用 LC-MS/MS 結合 Phree 固相萃取技術來去除小鼠血漿中的磷脂和蛋白質，能有效減少干擾物質的影響，從而顯著提升樣品的純化效果。與傳統的有機溶劑沉澱法相比，該技術進一步提高了實驗的精準度 (accuracy) 和精密度 (precision)^(9, 15)。此外，Phree 固相萃取還能有效地降低磷脂對層析柱的污染，從而延長層析柱的使用壽命和減少更換頻率，顯著降低分析成本。

依據農藥理化性及毒理試驗準則⁽¹⁾化學農藥原體新有效成分於初登記時，或核准登記屆滿八年之農藥原體其理化性及產品成分不符合等同性評估者，均需繳交三項致變異性試驗。其中應有一種試驗為哺乳動物細胞遺傳學體內試驗 (*in vivo* cytogenetic assays)，而哺乳動物紅血球微核試驗是常用的方法之一。國際上主要參考指引為經濟合作暨發展組織 OECD Test Guideline 474 (2016)⁽¹⁸⁾ (簡稱 OECD TG 474)，內容明確的指出測試物質需暴露到標的組織骨髓 (bone marrow) 之證據：一

則可從試驗物質處理組之動物是否出現血液毒性 (hematological toxicity) 或系統性毒性 (systemic toxicity) 來進行間接判定⁽⁸⁾，但若無上述毒性症狀出現時，即須分析動物的血漿內是否有測試物質的存在，作為暴露骨髓的證明。故本研究將以農藥原體之福賽絕與依滅草為例，建立小鼠血漿之液相層析串聯式質譜儀測試物質濃度分析方法，供做小鼠紅血球微核試驗之骨髓暴露的佐證資料。

材料與方法

一、試藥

依滅草 (imazapyr, 2-(4-methyl-5-oxo-4-propan-2-yl-1H-imidazol-2-yl)pyridine-3-carboxylic acid, 99.67%)、福賽絕 (fosthiazate, 3-[butan-2-ylsulfanyl(ethoxy)phosphoryl]-1,3-thiazolidin-2-one, 98.34%) 標準品，購自 Dr. Ehrenstorfer 公司 (奧格斯堡，德國)。依滅草農藥原體 (98.1%)，由惠光股份有限公司提供；而福賽絕農藥原體 (95.0%)，由育禾化學興業有限公司提供。其他相關分析試藥包括：層析級甲醇 (methanol, 99.9% 以上) 與層析級乙腈 (acetonitrile, 99.9% 以上)，購自 J. T. Baker (賓夕法尼亞州，美國)、質譜級甲酸 (formic acid, 98.0% 以上)，購自 Honeywell (塞爾策，德國)。Phree 磷脂去除方案試劑組 (Phree Phospholipid Removal Solutions

Kit) 購自 Phenomenex (加利福尼亞州，美國)。玉米油 (corn oil, 99%) 購自 Selleckchem (德克薩斯州，美國) 與 MedChemexpress (MCE) 公司 (新澤西州，美國)。K₂ EDTA 抗凝血管購自 Becton, Dickinson and Company (BD) 公司 (新澤西州，美國)。

二、試驗體系

試驗動物依 2018 年行政院農業委員會 (現農業部) 發行之實驗動物照護⁽³⁾ 及使用指引執行並經實驗農業部農業藥物試驗所動物照護及使用委員會 (或小組) 審核同意後進行 (IACUC 核准編號: 23-TACTRI-IACUC-05), ICR 品系小鼠 6 週齡購自樂斯科實驗動物中心，試驗週齡為 7-8 週齡。

三、標準品溶液配製

精秤標準品，以乙腈溶解及定量至 1,000 µg/mL，作為標準儲備溶液 (standard stock solution)，於 -20°C 條件下避光儲存。使用時，放置室溫回溫約 30 分鐘，取適量標準儲備溶液，以乙腈稀釋成 1 µg/mL 之標準品工作液 (standard working solution) 備用。

四、標準檢量線之製作

取依滅草標準工作液分別以乙腈製作

0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 及 0.2 µg/mL 及福賽絕標準工作液以乙腈製作 0.00005、0.0001、0.0005、0.001、0.002、0.005、0.01 及 0.02 µg/mL，進行 LC-MS/MS 分析，以波峰面積對濃度作圖，繪製成標準檢量線，其判定係數 R² 需大於 0.995，顯示具良好線性關係。

五、儀器設備

超純水製造機 (Milli-Q Water, Millipore, 達姆施塔特，德國)，液相層析儀 (LC-20AD XR, SHIMADZU，京都，日本)，三段四極桿質譜儀 (LCMS-8045, SHIMADZU，京都，日本)，控制及數據分析軟體 LabSolutions (Version 5.89, SHIMADZU，京都，日本)，固相萃取管真空裝置 (Chromabond SPE，迪倫，德國) 及離心機 (5810R, Eppendorf，漢堡，德國)。

六、儀器分析條件

1. 液相層析儀

層析管柱為 HPLC Column Poroshell 120 EC-C18, 2.7 µm, 4.6×150 mm (Agilent Technologies, 加利福尼亞州，美國)。層析管柱溫度為 40°C，流速 0.4 mL/min，注射量 5 µL，移動相 A 液為超純水、B 液為乙腈。移動相為等位沖提 (isocratic elution)，分析條件⁽¹⁶⁾ 如表一。

2. 串聯質譜儀

離子源採用電灑離子化正離子 (positive electrospray ionization, ESI+)、界面電壓 (interface voltage) 為 4 kV、脫溶劑管溫度 (DL temperature) 為 250°C、界面溫度 (interface temperature) 為 250°C、乾燥氣體溫度 (heat block temperature) 為 400°C、霧化氣體流速 (nebulizer gas flow) 為 3 L/min、乾燥氣體流速 (drying gas flow) 為 10 L/min 及加熱氣體流速 (heating gas flow) 為 10 L/min。偵測模式採多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM)。分析參數包括滯留時間 (retention time, RT) 及偵測離子對與碰撞能量 (collision energy)，如表二及圖一、圖二。

七、藥劑處理動物及血漿樣本收集

1. 依滅草農藥

依滅草劑量的選擇參考小鼠口服急性性之半數致死劑量 ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg b.w.)⁽¹⁷⁾，選用 2,000 mg/kg b.w. 為最高測試劑量，另依據藥物動力學資料⁽⁴⁾ 指出依滅草原體能快速被代謝掉，因此於第二次投藥後 1 及 6 小時 (hour, hr) 收集血樣，試驗分組包含空白對照組 (無藥物處理)、負對照組 (Corn oil, 10 mL/kg b.w.) 與依滅草劑量組 (2,000 mg/kg b.w.)，以上雌 (female, F)、雄 (male, M) 小鼠每組各 1 隻，劑量組與負對照組經胃管灌注 (10 mL/kg b.w.) 間隔 24 小時投藥兩次，於最後一次投藥後 1 及 6 小時，以異氟烷麻醉後心臟採血，將血液各自放入含 K₂ EDTA 抗凝血管，再經 2,500 rpm，4°C，離心 15 分鐘，取血漿部分約 0.5-1 mL，凍存至 -20°C 待進行 LC-MS/MS 分析。

表一、液相層析移動相條件

Table 1. HPLC gradient conditions

Run time (min)	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)	Flow rate (mL/min)
0	30	70	0.4
7	30	70	0.4

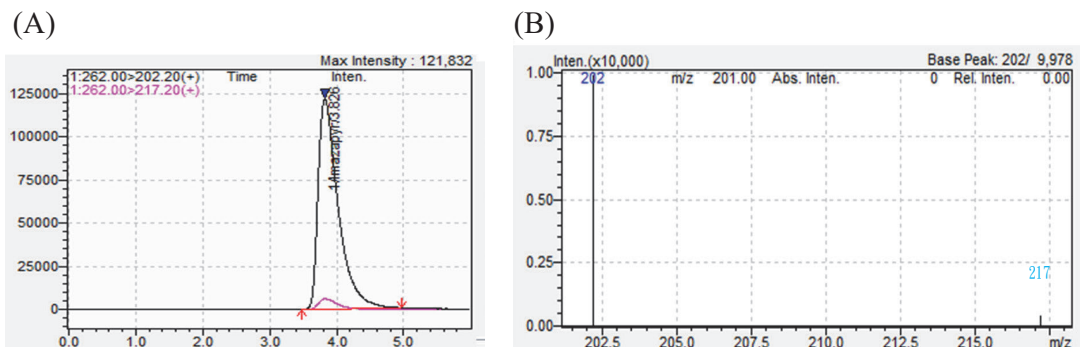
¹⁾ mobile phase A solution: H₂O.

²⁾ mobile phase B solution: ACN.

表二、依滅草、福賽絕之多重反應偵測模式參數

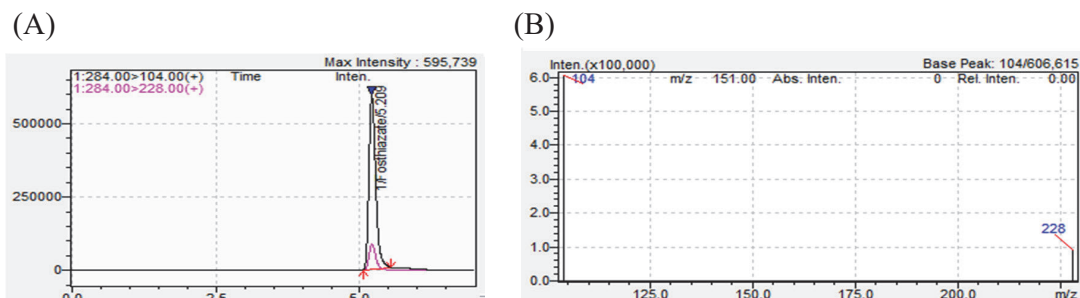
Table 2. MRM parameters employed in imazapyr and fosthiazate analysis

Compound name	RT (min)	Quantitative			Qualitative		
		Precursor> Product (m/z)	Q1/Q3pre bias (V)	Collision energy (eV)	Precursor> Product (m/z)	Q1/Q3pre bias (V)	Collision energy (eV)
Imazapyr	3.82	262>202.2	-20/-26	-18	262>217.2	-38/-10	-36
Fosthiazate	5.20	284>104	-20/-26	-11	284>228	-38/-10	-23



圖一、(A) 0.2 µg/mL 依滅草基質層析圖 (B) 多重反應偵測質譜圖。

Fig. 1. (A) Representative ion chromatogram of 0.2 µg/mL imazapyr in matrix. (B) Representative mass chromatogram determined through multiple reaction monitoring of 0.2 µg/mL imazapyr in matrix.



圖二、(A) 0.2 µg/mL 福賽絕基質層析圖 (B) 多重反應偵測質譜圖。

Fig. 2. (A) Representative ion chromatogram of 0.2 µg/mL fosthiazate in matrix. (B) Representative mass chromatogram determined through multiple reaction monitoring of 0.2 µg/mL fosthiazate in matrix.

2. 福賽絕農藥

福賽絕劑量的選擇參考小鼠口服急性毒性之半數致死劑量 ($LD_{50} = 91 \text{ mg/kg b.w.}$)⁽¹⁶⁾ 取其 LD_{50} 約 50-80% 的劑量 50 mg/kg b.w. 作為最高測試劑量，另依據藥物動力學資料⁽⁵⁾ 顯示福賽絕原體可被快速代謝掉，故選用第二次投藥後 1 及 6 小時收集血樣，試驗分組包含空白對照組 (無藥物

處理)、負對照組 (Corn oil, 10 mL/kg b.w.) 與福賽絕劑量組 (50 mg/kg b.w.)，後續心臟採血等操作流程同依滅草農藥方式處理。另雌小鼠之劑量組於最後一次投藥後 6 小時死亡，故無進行血漿收集。

八、血漿樣品前處理

將 phree 管柱與固相萃取管真空裝置連接，加入 0.2 mL 血漿樣品後再加入 0.6 mL 的 1% 甲酸之乙腈溶液（濃度稀釋 4 倍）。拿起 phree 管柱至試管震盪器混合後接回固相萃取管真空裝置。啟動抽氣馬達，收集淨化後之溶液，供作檢液⁽¹³⁾。

九、添加回收試驗

取空白血漿樣品，添加依滅草與福賽絕標準品溶液使其濃度為 0.1 µg/mL，依樣品前處理操作流程，以 LC-MS/MS 進行分析，同時進行空白試驗 (blank analysis) 作為對照分析比對，測得農藥碎片離子與波峰之滯留時間及面積，分別與標準溶液進行鑑別與定量，求其回收率應符合規範 (2, 11, 20)。

十、基質效應

以空白血漿樣品檢液，添加依滅草與福賽絕標準品溶液使其最終濃度，依滅草為 0.01、0.02、0.05、0.1 及 0.2 µg/mL 福賽絕為 0.0001、0.0005、0.001、0.002、0.005、0.01 及 0.02 µg/mL，進行 LC-MS/MS 分析，以波峰面積對濃度作圖，繪製成基質匹配檢量線，其判定係數 R^2 需大於 0.995，顯示具良好線性關係。基質效應計算公式如下：

基質效應 = (基質匹配檢量線斜率 - 純溶劑檢量線斜率) / 純溶劑檢量線斜率 × 100 %

十一、定量極限評估

以空白血漿樣品檢液，添加依滅草與福賽絕標準品溶液，經前處理操作流程後進行分析濃度為依滅草為 0.01 µg/mL 及福賽絕為 0.0001 µg/mL，回收率需符合 60% 以上或定量離子訊號 / 雜訊比 (signal/noise ratio, S/N ratio) 至少大於 10，以此作為定量極限判定標準⁽²⁾。

結果

一、標準檢量線與基質效應

評估基質干擾物對分析物於質譜儀離子化影響情況，分別製備標準檢量線 (standard calibration curve, SCC)，及基質匹配檢量線 (matrix calibration curve, MCC)，比較其斜率來評估基質效應，如基質效應微弱，可忽視基質干擾，但若為增強或抑制 >20% 以上，則必須使用基質匹配檢量線⁽¹²⁾。

其測得依滅草 SCC 為 $y = 12766.05X + 3316.99$ ，及 MCC 為 $y = 13381.17X - 37830.45$ ；福賽絕 SCC 為 $y = 86510.67X + 1240.302$ ，及 MCC 為 $y = 74569.11X + 1414.851$ 。

利用 (基質匹配檢量線斜率 - 純溶劑檢量線斜率) / 純溶劑檢量線斜率 × 100%，計算公式求得基質效應為依滅草 4.8%，福賽絕 -13.8%，結果顯示依滅草與福賽絕基質效應微弱，未增強或抑制

>20% 以上，因此本實驗樣品分析時使用標準檢量線進行定量分析。

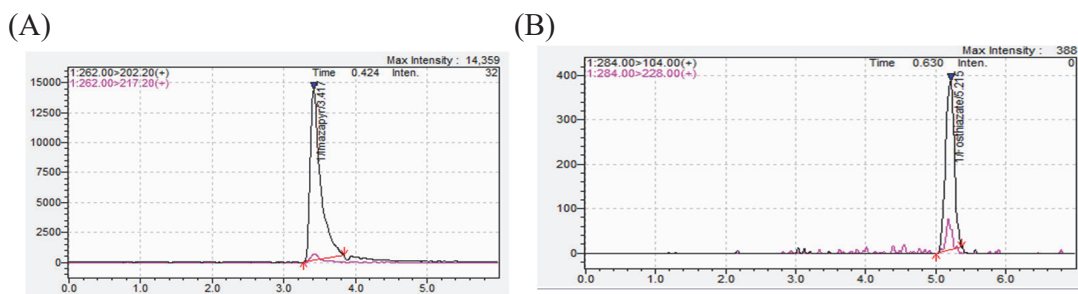
二、添加回收試驗

以空白血漿樣品檢液分別添加依滅草與福賽絕標準溶液使其最終濃度為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，依樣品前處理操作流程進行方法回收率試驗 ($n=3$)。回收率分別為依滅草測得範圍介於 97.68-111.44% 之間，及相對標準偏差均小於 2.19%；福賽絕測得範圍介於 101.12-103.48% 之間，及相對標準偏差均小於 4.28%。參考衛生福利部食品藥物管理署檢驗機構實驗室品質系統基本規範^(2, 11)，分析方法回收率應介於 70-120%，且相對標準偏差 $\leq 20\%$ ，或是生物分析方法驗證指引 (Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry)⁽²⁰⁾，分析方法回收率應介於 85-115%，其結果均符合規範要求。而依滅草與福賽絕實際樣品濃度與添加回收試驗濃度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 有明顯差距，因此依據實際樣品濃度範圍進行相近濃度的添加回收試驗，依

滅草最終濃度為 10 $\mu\text{g/mL}$ ，福賽絕最終濃度為 0.001 $\mu\text{g/mL}$ ，其回收率 ($n=3$) 分別測得為依滅草範圍介於 94.80-104.02% 之間，及相對標準偏差均小於 5.95%；福賽絕測得範圍介於 93.2-96.0% 之間，及相對標準偏差均小於 3.42%，顯示所用之方法具良好的準確性。

三、定量極限評估

檢驗方法依滅草與福賽絕係經由樣品實際添加之定量極限可至 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.0001 $\mu\text{g/mL}$ ，如圖三，其回收率 ($n=3$) 分別測得為依滅草範圍介於 96.3-101.8% 之間，及相對標準偏差均小於 2.78%，其定量離子訊號／雜訊比為 31.02-53.54；福賽絕測得範圍介於 104.1-108.8% 之間，及相對標準偏差均小於 2.21%，其定量離子訊號／雜訊比為 38.73-47.67，其結果皆符合回收率需符合 60% 以上或定量離子訊號／雜訊比 (signal/noise ratio, S/N ratio) 至少大於 10⁽²⁾。



圖三、(A) 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 依滅草與 (B) 0.0001 $\mu\text{g/mL}$ 福賽絕於基質層析圖。

Fig. 3. Representative ion chromatogram of (A) 0.01 $\mu\text{g/mL}$ imazapyr and (B) 0.0001 $\mu\text{g/mL}$ fosthiazate in matrix.

四、樣品分析結果

1. 血漿中的依滅草農藥分析

經過前處理使用 Phree 管柱需要加入 0.2 mL 血漿樣品後再加入 0.6 mL 的 1% 甲酸乙腈後得到萃取液體為稀釋 4 倍。萃取液再以 1% 甲酸乙腈稀釋 500 倍。其分析結果如表三，無論雌、雄其空白對照組與負對照組的血漿內的濃度低於定量極限 (below limit of quantification 0.01 $\mu\text{g/mL}$)，視為未檢出，而劑量組 (2,000 mg/kg b.w.) 血漿內的濃度分別為 81.18 $\mu\text{g/mL}$ (1hr-M)、101.84 $\mu\text{g/mL}$ (1hr-F) 與 16.92 $\mu\text{g/mL}$ (6hr-M)、28.34 $\mu\text{g/mL}$ (6hr-F)。另劑量組之稀釋倍率之計算值如表四所示。

2. 血漿中的福賽絕農藥分析

經過前處理使用 Phree 管柱需要加入 0.2 mL 血漿樣品後再加入 0.6 mL 的 1% 甲酸乙腈後得到萃取液體為稀釋 4 倍。其分析結果如表五，無論雌、雄其空白對照組與負對照組的血漿內的濃度低於定量極限 (below limit of quantification 0.0001 $\mu\text{g/mL}$)，視為未檢出，而劑量組 (50 mg/kg b.w.) 血漿內的濃度分別為 0.018 $\mu\text{g/mL}$ (1hr-F)、0.025 $\mu\text{g/mL}$ (1hr-M) 與 0.001 $\mu\text{g/mL}$ (6hr-M)。另劑量組之稀釋倍率之計算值如表六所示。

討論

依滅草與福賽絕兩農藥原體均可在血漿中被檢測出，另也顯示血漿中的濃度會

表三、依滅草農藥原體於不同時間點的血漿濃度分析

Table 3. Analysis of concentration of imazapyr in plasma at different points

Treatment ¹⁾	Mean of conc. ($\mu\text{g/mL}$) ²⁾
Blank-1hr-M	ND
Corn oil-1hr-M	ND
2,000 mg/kg b.w.-1hr-M	81.18
Blank-1hr-F	ND
Corn oil-1hr-F	ND
2,000 mg/kg b.w.-1hr-F	101.84
Blank-6hr-M	ND
Corn oil-6hr-M	ND
2,000 mg/kg b.w.-6hr-M	16.92
Blank-6hr-F	ND
Corn oil-6hr-F	ND
2,000 mg/kg b.w.-6hr-F	28.34

¹⁾ 空白對照組 (Blank)；負對照組 (Corn oil 10mL/kg b.w.)；劑量組 (2,000 mg/kg b.w.)。

²⁾ ND – Not detectable (below limit of quantification 0.01 $\mu\text{g/mL}$)。

表四、依滅草農藥原體劑量組 (2,000 mg/kg b.w.) 之血漿樣品稀釋倍率計算**Table 4.** Calculation of plasma sample dilution ratio for imazapyr technical treatment group (2,000 mg/kg b.w.)

Treatment	Time (hr)	Dilution	Conc. unit (ppb)	Final conc. in plasma (ppm)
2,000 mg/kg b.w.-M	1	2,000	40.59	81.18
	6	2,000	8.46	16.92
2,000 mg/kg b.w.-F	1	2,000	50.92	101.84
	6	2,000	14.17	28.34

表五、福賽絕農藥原體於不同時間點的血漿濃度分析**Table 5.** Analysis of concentration of fosthiazate in plasma at different points

Treatment ¹⁾	Mean of conc. (µg/mL) ²⁾
Blank-1hr-M	ND
Corn oil-1hr-M	ND
50 mg/kg b.w.-1hr-M	0.025
Blank-1hr-F	ND
Corn oil-1hr-F	ND
50 mg/kg b.w.-1hr-F	0.018
Blank-6hr-M	ND
Corn oil-6hr-M	ND
50 mg/kg b.w.-6hr-M	0.001

¹⁾ 空白對照組 (Blank)；負對照組 (Corn oil 10mL/kg b.w.)；劑量組 (50 mg/kg b.w.)。

²⁾ ND – Not detectable (below limit of quantification 0.0001 µg/mL)。

表六、福賽絕農藥原體劑量組 (50 mg/kg b.w.) 之血漿樣品稀釋倍率計算**Table 6.** Calculation of plasma sample dilution ratio for fosthiazate technical treatment group (50 mg/kg b.w.)

Treatment	Time (hr)	Dilution	Conc. unit (ppb)	Final conc. in plasma (ppm)
50 mg/kg b.w.-M	1	4	6.15	0.025
	6	4	0.26	0.001
50 mg/kg b.w.-F	1	4	4.45	0.018

隨時間增長而下降，依滅草之雌、雄小鼠於 6 小時的血漿濃度分別下降 72.2% 及 79.2% (與 1 小時相比)，福賽絕之雄小鼠於 6 小時的血漿濃度下降 96% (與 1 小時

相比) 符合文獻提及可被快速代謝掉，因此要進行此類的試驗時需考量藥物在體內的代謝情形，以避免檢測不到血漿中的濃度。

哺乳動物紅血球微核試驗 (OECD TG 474) ⁽¹⁸⁾ 之目的係利用微核發生率來評估測試物質是否引起細胞遺傳性損傷 (cytogenetic damage)，這種損傷會導致形成含有滯留染色體片段 (lagging chromosome fragments) 或完整染色體 (whole chromosome) 的微核所引起的結構性或數目性染色體畸變反應 (structural or numerical chromosomal aberrations)。在其指引原則 (principle) 有特別指出，測試物質若無法暴露於骨髓中 (亦即本試驗之標的器官)，則不適用於此法進行試驗；另在試驗結果判讀方面，判定測試物質具明確陰性結果 (不會在測試的物種內增加未成熟紅血球微核發生率) 須滿足四個要點：(1) 無任一劑量組與負反應對照組相比有顯著增加微核發生率；(2) 經適當的趨勢測試評估其任何採樣時間點與劑量之間無顯著增加的相關性；(3) 所有結果均落在歷史負反應對照組數據範圍內及 (4) 證明測試物質暴露於骨髓。有鑒於此，判定測試物質有無「骨髓暴露」，為判定試驗結果是否能被採用很重要的關鍵。

根據 OECD TG 474 試驗指引與第 8 次基因毒性試驗國際工作小組 (International Workshop on Genotoxicity Testing, IWGT) 會議 ^(8, 18) 提出可由多方證據，證明測試物質的確有暴露於骨髓內，包括 (1) 觀察到血液毒性症狀，即未成熟紅血球佔成熟紅血球的比率下降；(2) 出現系統性的毒性症狀；(3) 骨髓為多孔性結構，通透性高，在特定的血液或血漿中 (血液循環

系統) 檢測到測試物質可佐證骨髓暴露；(4) 若使用靜脈注射給藥就不需要暴露證據；或 (5) 採用藥物動力學的數據，但須在一個獨立研究中，使用相同的途徑和相同的物種所獲得數據，才得以採用為骨髓暴露證明。

目前國際上公開的文獻並未看到依滅草與福賽絕原體是以小鼠物種進行藥物動力學的數據資料 ^(4, 5, 10, 14, 19)，且於依滅草與福賽絕原體對小鼠紅血球微核試驗報告無任一劑量組出現血液毒性或系統性的毒性症狀 ^(6, 7)，故為證明兩農藥有暴露於骨髓，本研究建立以 LC-MS/MS 分析方法均可檢測出小鼠血漿中有依滅草與福賽絕的存在。因此，本研究之血漿分析技術可應用於體內小鼠微核試驗之測試物質暴露於骨髓佐證用。

謝辭

本研究於試驗期間蒙本所應用毒理組詹玲琴女士協助動物飼養試驗工作，使本研究得以順利完成，蒙本所蔡麗任博士與盧欣怡副研究員提供寶貴意見，謹此一併致謝。

引用文獻

1. 行政院農業委員會。2021。農藥理化性及毒理試驗準則。農防字第 1101490216 號。
2. 衛生福利部食品藥物管理署。2022。檢

- 驗機構實驗室品質系統基本規範。FDA 品字第 1110023301 號。
3. 行政院農業委員會。2018。實驗動物照護及使用指引。農牧字第 1070043010A 號。
4. 厚生労働省食品安全委員会。2020。イマザピル農薬評価書。檢自 <https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20190905056&fileId=210> (Feb. 2, 2023)
5. 厚生労働省食品安全委員会。2020。ホスチアゼート農薬評価書。檢自 <https://www.mhlw.go.jp/content/1112,0000/000784610.pdf> (Jan. 1, 2023)
6. 農業藥物試驗所 GLP 實驗室。2023。依滅草原體之小鼠紅血球微核試驗。惠光股份有限公司報告編號：1124G22GMN_(c)。
7. 農業藥物試驗所 GLP 實驗室。2023。福賽絕 96%原體之小鼠紅血球微核試驗。育禾化學興業有限公司報告編號：1143G22GMN_(c)。
8. Beevers, C., Uno, Y., Meurer, K., Hamada, S., Hashimoto, K., Kirkland, D., LeBaron, M. J., Curieux, F. L., Hegarat, L. L., Martus, H. J., Masumura, K., Ohyama, W., Roberts, D. J., Vasquez, M., Whitwell, J., and Witt, K. L. 2025. *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 8th international workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Environ. Mol. Mutagen* 66: 81-100.
9. Casati, S., Ravelli, A., Angeli, I., Durello, R., Minoli, M., and Orioli, M. 2019. An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *J. Chromatogr. A* 1589: 1-9.
10. European Chemicals Agency. 2023. Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of fothiazate (ISO); S-sec-butyl O-ethyl (2-oxo-1,3thiazolidin-3-yl)phosphonothioate. Retrieved from <https://echa.europa.eu/documents/10162/1e835638-9198-9c20-2b27-00e83bbd2bba> (Nov. 6, 2024).
11. Directorate General for Health and Food Safety, European Commission. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document number SANTE/11813/2017.
12. Feng, X., He, Z., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., and Liu, X. 2015. Multiresidue analysis of 36 pesticides in soil using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method by liquid chromatography with tandem quadruple linear ion trap mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 38: 3047-3054.
13. Guo, H., Wang, J., Wu, Y., Liu, W., Bu, J.,

- and Zhao, Q. 2018. Sensitive and simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in human blood by UPLC-MS-MS with phospholipid removal pretreatment. *J. Anal. Toxicol.* 42: 459-466.
14. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 2014. Pesticide residues in food 2013, Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. FAO plant production and protection paper 219.
15. Majhi, P. K., Sayyad, S., Mishra, P., Kamte, S., Sahu, R., Ghosh, G., and Subudhi, B. B. 2023. Low-volume plasma sampling for determination of dextromethorphan and dextrorphan in rat plasma: LC-MS/MS method and its application in pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 37: e5588.
16. National Library of Medicine. 2024. Fosthiazate. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91758#section=Acute-Effects> (Nov. 11, 2024)
17. National Library of Medicine. 2024. Imazapyr. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imazapyr#section=Acute-Effects> (Nov. 11, 2024)
18. Organization for Economic Cooperation and Development. 2016. Test No. 474: mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. 21pp.
19. United States Environmental Protection Agency. 2004. Fosthiazate. Retrieved from https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-129022_01-Jan-04.pdf (Nov. 12, 2024)
- U.S. Food and Drug Administration. 2018. Bioanalytical method validation guidance for industry. Docket number FDA-2013-D-1020.

Establishment of Analytical Method for Imazapyr and Fosthiazate Concentrations in Mouse Plasma by LC-MS/MS

Yen-Yun, Lee¹, King-Ping Wang^{1*}

Abstract

Lee, Y. Y., and Wang, K. P. 2026. Establishment of analytical method for imazapyr and fosthiazate concentrations in mouse plasma by LC-MS/MS. *Taiwan Pestic. Sci.* 20: 79-91.

The objective of this study was to establish a method for the analysis of pesticide concentrations in mouse plasma, using imazapyr and fosthiazate as test analytes. A phospholipid removal solutions kit was used to clear plasma protein and phospholipids from mouse plasma, in which acetonitrile containing 1% formic acid served as the extraction solvent. Results from analysis conducted using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) revealed that the recovery range for imazapyr (at 0.1 µg/mL, n = 3) was between 97.68% and 111.44%, with a relative standard deviation less than 2.19 %, and that for fosthiazate (at 0.1 µg/mL, n = 3) was between 101.12% and 103.48%, with a relative standard deviation less than 4.28%. The concentration ranges detected in plasma samples for imazapyr and fosthiazate were 16.92–101.84 µg/mL and 0.001–0.025 µg/mL, respectively. Our findings indicate that the established LC/MS/MS analytical method coupled with a mouse erythrocyte micronucleus test is effective for the qualitative and quantitative detection of imazapyr and fosthiazate and could therefore be a model to determine the presence and levels of other pesticides in plasma, providing a basis for verifying exposure of pesticides to target tissues.

Key words: LC-MS/MS, phospholipid removal solutions kit, imazapyr, fosthiazate, plasma, mouse erythrocyte micronucleus test

Accepted: June 25, 2026.

* Corresponding author, E-mail: ian902567@acri.gov.tw

¹ Agricultural Chemicals Research Institute, Ministry of Agriculture, Taichung