

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 26 年度 食品・添加物等規格基準に関する 試験検査実施経費報告書

残留農薬等に関するポジティブリスト制度 導入に係る分析法開発

ニトロイミダゾール類試験法（告示試験法）の開発

ニトロイミダゾール類試験法（告示試験法）の開発（検討内容）

〔目的〕

動物用医薬品であるジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾールは、ヒトへの発がん性を有する可能性があることから、日本では「食品に含有されてはならない物質」として規定されており、告示試験法が発出されている。しかしながら、既存の告示試験法には精製操作がほとんど無いため、種々の畜水産食品に対して適用性が低い可能性があり、また、使用する装置（LC-MS(MS)）への負担が大きいことが懸念される。

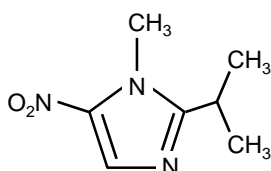
また、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、ニトロイミダゾール類の動物用医薬品（イプロニダゾール、ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾール）について、発がん性を有する可能性があることから「ADI 及び MRL を設定するべきではない」と勧告しており、現在、コーデックス残留動物用医薬品部会（CCRVDF）において、これら動物用医薬品に関するリスク管理措置案の作成が検討されている。上記の通り、CCRVDF で議論中のニトロイミダゾール類は 4 化合物が対象であるが、日本の現行の告示試験法の分析対象化合物にはイプロニダゾールが含まれていないため、本化合物を分析することはできない。

そこで本検討では、イプロニダゾールを含む 4 つのニトロイミダゾール類を同時に分析可能な試験法の開発を検討した。また、種々の畜水産食品に適用できるよう、効率的な精製操作についても検討を実施した。

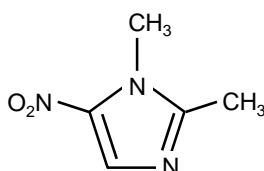
なお、現行の告示試験法における分析対象化合物は「ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾール」であることから、規制対象物質はこれら本体のみと考えられるが、海外の論文等では水酸基を有する代謝物も同時に分析しているものも多いため、本検討では「イプロニダゾール-ヒドロキシ体（イプロニダゾール代謝物 B）、メトロニダゾール-ヒドロキシ体（メトロニダゾール代謝物 A）及び 2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール（ジメトリダゾール及びロニダゾールの共通の代謝物、以下「HMMNI」という。）」の適用性についても検討した。

〔検討対象化合物の構造〕

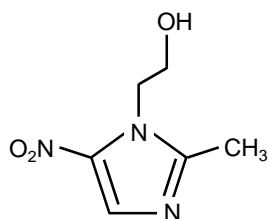
イプロニダゾール



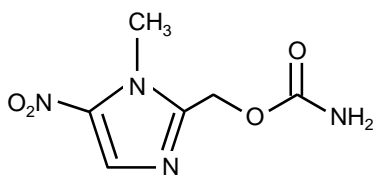
ジメトリダゾール



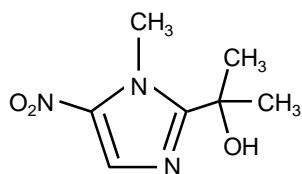
メトロニダゾール



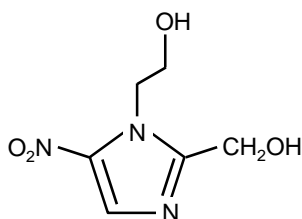
ロニダゾール



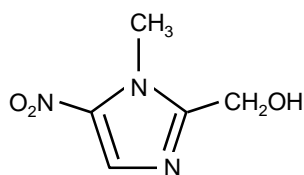
イプロニダゾール代謝物 B



メトロニダゾール代謝物 A



HMMNI



[検討対象化合物の物性等]

	分子量	分子式	融点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	log Pow	蒸気圧 (mmHg)	蒸気圧 (Pa)	施行通知の 検出限界 (ppb)	定量限界の 目標値 (ppb)
イプロニダゾール	169.0851	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	60	1740	1.36	1.49×10 ⁻⁴	1.99×10 ⁻²	—	0.1
イプロニダゾール 代謝物 B	185.0800	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₃	—	—	—	—	—	—	0.1
ジメトリダゾール	141.0538	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	139	18300	0.31	5.58×10 ⁻⁴	7.44×10 ⁻²	0.2	0.2
メトロニダゾール	171.0644	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	161	9500	-0.02	3.05×10 ⁻⁷	4.07×10 ⁻⁵	0.1	0.1
メトロニダゾール 代謝物 A	187.0593	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	—	—	—	—	—	—	0.1
ロニダゾール	200.0546	C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	168	2900	-0.38	2.45×10 ⁻⁶	3.27×10 ⁻⁴	0.2	0.2
HMMNI	157.0487	C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	—	57200	-0.35	6.53×10 ⁻⁷	8.71×10 ⁻⁵	—	0.2

ChemID plus Advanced (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、うなぎ、さけ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ）を用いた。以下に試料の採取方法を示した。

- 1) 筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 肝臓は、細切均一化した。
- 4) 乳は、よく混合して均一化した。
- 5) 卵は、殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- 6) うなぎは活鰻を使用し、頭を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を、細切均一化した。
- 7) さけは、可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- 8) しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- 9) はちみつは、よく混合して均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品及び標準溶液

標準品は、以下のものを用いた。

- ・イプロニダゾール：林純薬工業製、純度 99.9%
- ・ジメトリダゾール：Fluka 製、純度 99.9%
- ・メトロニダゾール：Fluka 製、純度 99.9%
- ・ロニダゾール：Dr. Ehrenstorfer 製、純度 98.6%
- ・イプロニダゾール-ヒドロキシ体（イプロニダゾール代謝物 B）：Fluka 製、純度 99.6%
- ・メトロニダゾール-ヒドロキシ体（メトロニダゾール代謝物 A）：Fluka 製、純度 99.3%
- ・HMMNI：Dr. Ehrenstorfer 製、純度 98.5%（商品名はジメトリダゾール-2-ヒドロキシ）

上記の標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解して 1 mg/mL の標準原液を調製した。

調製した標準原液を混合し、アセトンで適宜希釈したものを添加用混合標準溶液、0.1 vol% ギ酸で適宜希釈したものを検量線作成用混合標準溶液とした。

2) その他の試薬等

酢酸：和光純薬工業製、試薬特級

アセトン：関東化学製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

n-ヘキサン：関東化学製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

アセトニトリル：関東化学製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

ギ酸：和光純薬工業製、LC-MS 用

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム：Waters 製、Oasis MCX（500 mg）

メタノール：関東化学製、LC-MS 用

アンモニア水：関東化学製、特級

硫酸アンモニウム：和光純薬工業製、試薬特級

酢酸エチル：関東化学製、残留農薬・PCB 試験用（300 倍濃縮検定品）

無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業製、残留農薬・PCB 試験用

0.1 vol% ギ酸：関東化学製、HPLC 用

0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液：関東化学製、HPLC 用

蒸留水：関東化学製、LC-MS 用

3. 装置

液体クロマトグラフ：Acquity UPLC（Waters 製）

タンデム質量分析計：Xevo TQ-S（Waters 製）

4. 測定条件

カラム：InertSustain C18（粒子径 3.0 μm、内径 3.0 mm、長さ 150 mm、ジーエルサイエンス製）

カラム温度：40℃

移動相：A 液 0.1 vol% ギ酸、B 液 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液した。

時間（分）	A 液	B 液
0.0	98	2
5.0	90	10
15.0	5	95
20.0	5	95
20.0	98	2
30.0	98	2

移動相流速：0.2 mL/min

保持時間

イプロニダゾール：14.5 分

イプロニダゾール代謝物 B：13.1 分

ジメトリダゾール：12.1 分

メトロニダゾール：11.3 分

メトロニダゾール代謝物 A：10.6 分

ロニダゾール：11.8 分

HMMNI：11.3 分

イオン化モード：ESI（+）

質量分析パラメータ：

キャピラリー電圧 1.5 kV、脱溶媒温度 600℃、脱溶媒ガス流量 1000 L/hr、コーンガス流量 150 L/hr、コリジョンガス（Ar）流量 0.15 mL/min、ソース温度 150℃

測定イオン（*m/z*）：下表

	プリカーサー イオン	コーン電 圧(V)	プロダクト イオン (定量用)	CE (定量用)	プロダクト イオン (定性用)	CE (定性用)
イプロニダゾール	170	20	124	17	109	23
イプロニダゾール 代謝物 B	186	15	122	20	168	15
ジメトリダゾール	142	20	96	15	95	20
メトロニダゾール	172	20	82	22	128	10
メトロニダゾール 代謝物 A	188	15	123	15	126	17
ロニダゾール	201	15	140	13	55	20
HMMNI	158	15	94	22	55	17

CE: コリジョンエネルギー (eV)

5. 定量

イプロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B 及びメトロニダゾール代謝物 A

各化合物の 0.00005 mg/L~0.00015 mg/L 溶液 (0.1 vol% ギ酸) を調製した。この 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により各化合物の検量線を作成した。

ジメトリダゾール、ロニダゾール及び HMMNI

各化合物の 0.0001 mg/L~0.0003 mg/L 溶液 (0.1 vol% ギ酸) を調製した。この 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により各化合物の検量線を作成した。

試験溶液 (1 g 試料/1 mL 試験溶液) 5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法により各化合物の含量を求めた。

図 1 に、各化合物の代表的な検量線、回帰式及び決定係数 (R^2 値) を示した (左: 定量イオン、右: 定性イオン)。

図 1-1 イプロニダゾールの検量線

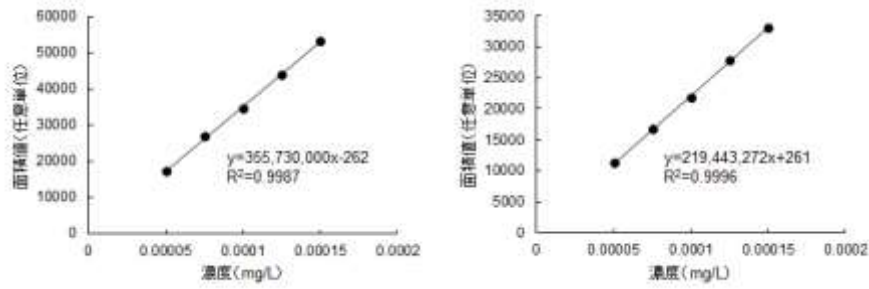


図 1-2 イプロニダゾール代謝物 B の検量線

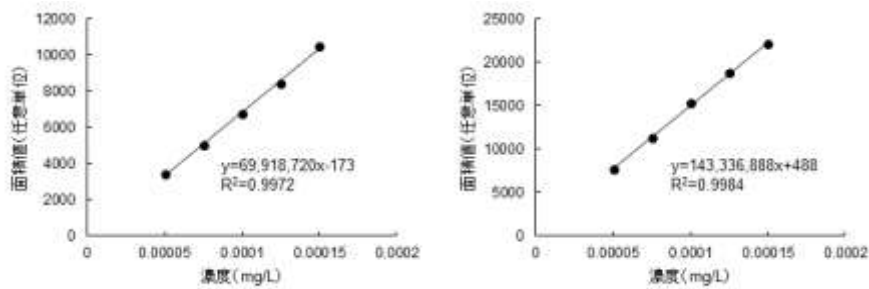


図 1-3 ジメトリダゾールの検量線

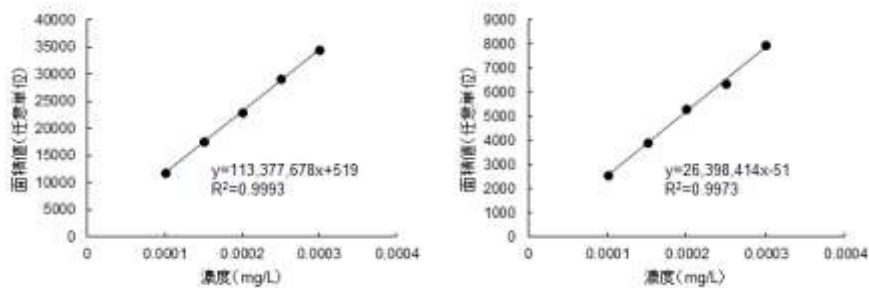


図 1-4 メトロニダゾールの検量線

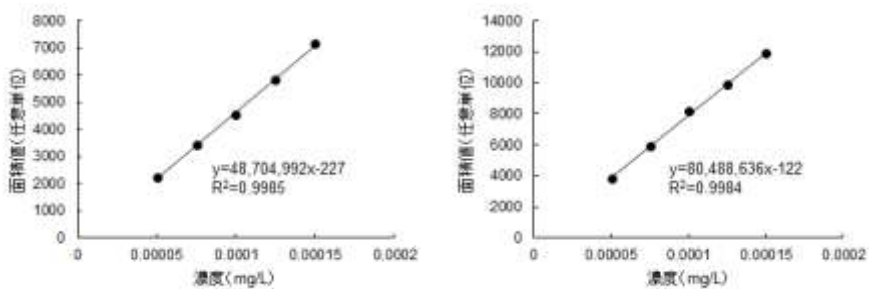


図 1-5 メトロニダゾール代謝物 A の検量線

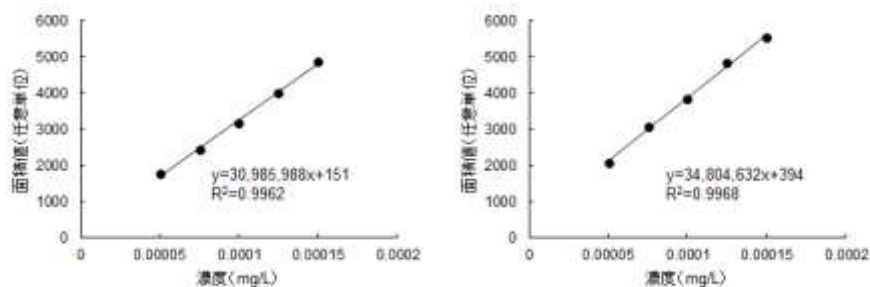


図 1-6 ロニダゾールの検量線

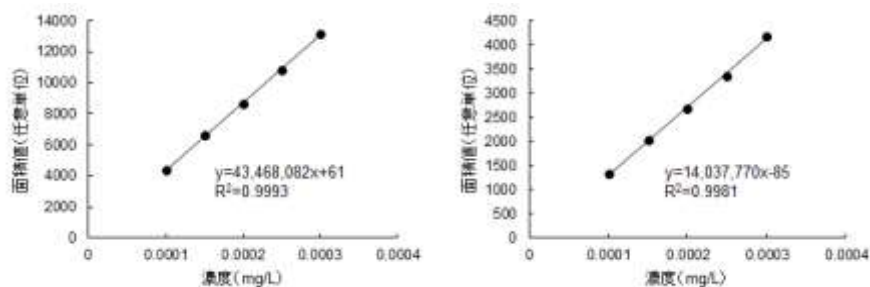
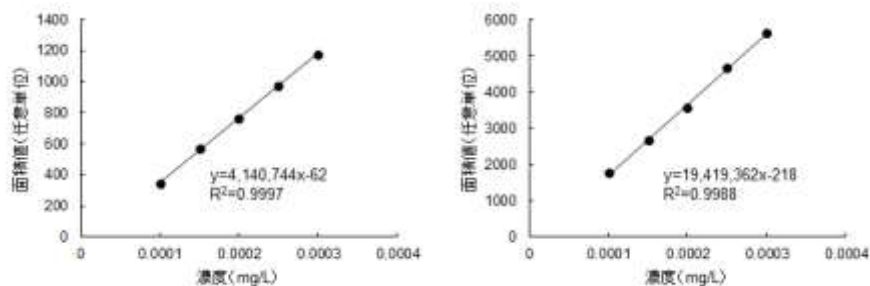


図 1-7 HMMNI の検量線



6. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 g (はちみつの場合は試料10.0 gに水10 mLを加えて溶解したもの) に酢酸1 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物(はちみつの場合は水5 mLを加えて溶解したもの) にアセトン30 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様の条件で遠心分離した。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとした。

この10 mLを採り、40°C以下で約2 mLまで濃縮した。これに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL及び*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。アセトニトリル層を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。

残留物に、2 vol%ギ酸5 mLを加えて溶かした。

2) 精製

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (Oasis MCX、500 mg) にアセトニトリル5 mL、2 vol%ギ酸5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、更に2 vol%ギ酸5 mL、メタノール5 mL、0.5%アンモニア水5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び水 (1 : 3) 混液10 mLを注入し、溶出液を採った。

この溶出液に、硫酸アンモニウム 2 g を加えて溶解した後、酢酸エチル 10 mL ずつで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水後、無水硫酸ナトリウムをろ別し、ろ液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol%ギ酸に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

フローチャート

試料 10.0 g (はちみつの場合は水 10 mL に溶解)

酢酸 1 mL 及びアセトン 50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
上澄液を採り、残留物 (はちみつの場合は水 5 mL に溶解) にアセトン 30 mL を加えて
ホモジナイズ、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンで 100 mL に定容
定容した溶液 10 mL (試料 1.0 g 相当量) を採り、40°C以下で約 2 mL まで濃縮
n-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう
遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) 後、アセトニトリル層を採り、40°C以下で濃縮、溶媒除去
残留物に、2 vol%ギ酸 5 mL を加えて溶かす・・・①

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (Oasis MCX) 精製

Oasis MCX (500 mg) にアセトニトリル 5 mL、2 vol%ギ酸 5 mL を順次注入し、流出液を捨てる
①の溶液を注入後、2 vol%ギ酸 5 mL、メタノール 5 mL で順次容器を洗い込み、洗液を順次ミニカラムに
注入し、流出液を捨てる
さらに、ミニカラムに 0.5%アンモニア水 5 mL を注入し、流出液を捨てる
次いで、アセトニトリル及び水 (1 : 3) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採る
溶出液に硫酸アンモニウム 2 g を加えて溶解し、酢酸エチル 10 mL ずつで2回振とう抽出
抽出液を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水
無水硫酸ナトリウムをろ別し、ろ液を 40°C以下で濃縮、溶媒除去
残留物に、0.1 vol%ギ酸を加えて溶解し、1 mL とする

試験溶液

試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して測定

7. マトリックス添加標準溶液の調製

上述の方法により調製したブランク試料の残留物（強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムからの溶出液を酢酸エチルで抽出し、抽出液を濃縮・溶媒除去して得られたもの）を得た。この残留物に、イプロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B 及びメトロニダゾール代謝物 A については 0.0001 mg/L、ジメトリダゾール、ロニダゾール及び HMMNI については 0.0002 mg/L の溶媒標準溶液を 1.0 mL 添加し、マトリックス添加標準溶液を調製した。

なお、調製したマトリックス添加標準溶液中の各化合物の試料中濃度は、

イプロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B 及びメトロニダゾール代謝物 A については 0.0001 mg/kg

ジメトリダゾール、ロニダゾール及び HMMNI については 0.0002 mg/kg

に相当する。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) タンデム質量分析における測定イオン及び測定パラメータの選択

まず、タンデム質量分析計における検討対象化合物の測定イオンの選択及び測定条件の最適化を試みた。すなわち、検討対象農薬等の標準溶液（100 ng/mL）を LC-MS/MS に 5 µL 注入し、スキャン測定及びプロダクトイオンスキャン測定を行い、各検討対象化合物の測定イオンの選択、コロン電圧及びコリジョンエネルギーの最適化を行った。なお、測定はフローインジェクション分析により行った。

図 2 に、得られたスペクトルを示した。

エレクトロスプレーイオン化・ポジティブモード（ESI（+））においては、各検討対象化合物のプロトン付加分子イオンが検出された。一方、ESI・ネガティブモード（ESI（-））においては、各検討対象化合物について適切な測定イオンは検出されなかった。したがって、イオン化法は ESI（+）を選択した。

SRM 測定におけるプリカーサーイオンは、全検討対象化合物において良好な測定感度のプロトン付加分子イオンが検出されたことから、これらのイオンをプリカーサーイオンとして選択した。

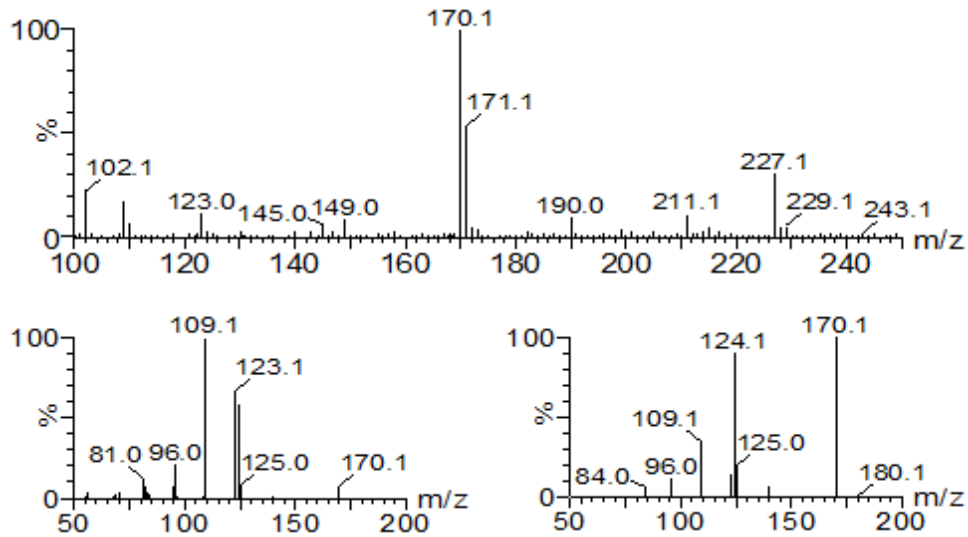
各検討対象化合物について選択したプリカーサーイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化し、プロダクトイオンを選択した。イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B、ジメトリダゾール、メトロニダゾール、メトロニダゾール代謝物 A 及びロニダゾールについては、得られるシグナルが強いプロダクトイオンを 2 つずつ選択し、定量イオン及び定性イオンとした。なお、これら 6 化合物については、定量イオン・定性イオンともに、回収率、精度、選択性、S/N は良好であった。

一方 HMMNI については、得られるシグナルが最も強いイオン（ m/z 158→140）で測定した場合、ベースラインノイズが高く、また、種々の畜水産食品マトリックスにおいて定量を妨害する夾雑ピークが確認された。3 番目にシグナル強度が高いイオン（ m/z 158→94）を用いて測定した場合、最も夾雑ピークの少ないクロマトグラムが得られたことから、これを定量イオンとし、2 番目にシグナル強度が高いイオン（ m/z 158→55）を定性イオンとした。

図2 検討対象化合物のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトル

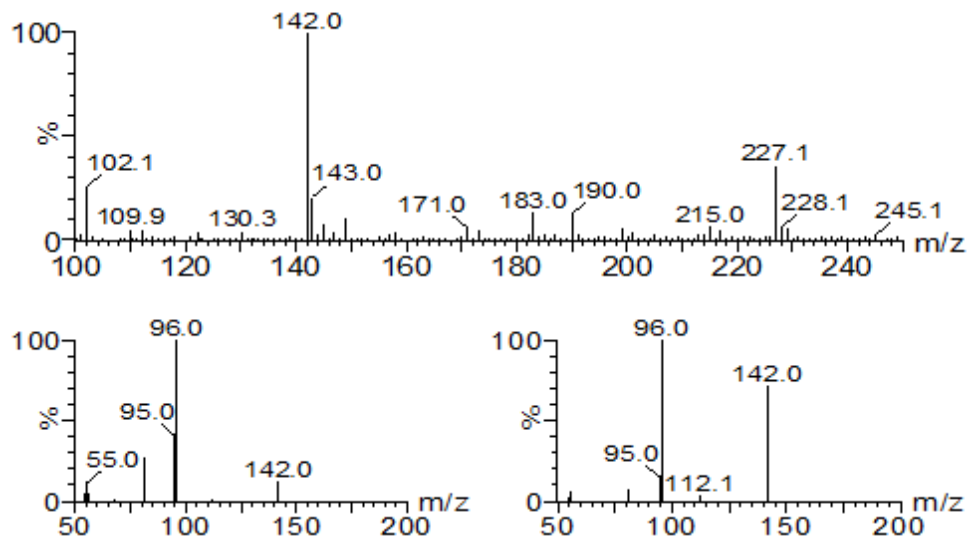
1) イプロニダゾール

上：マススペクトル（コーン電圧 20 V）、下： m/z 170 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 23 eV、右：CE 17 eV）



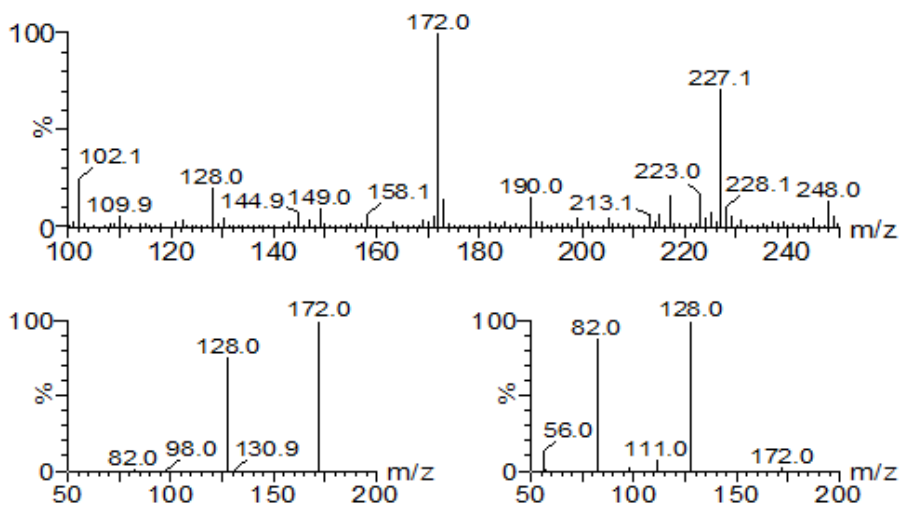
2) ジメトリダゾール

上：マススペクトル（コーン電圧 20 V）、下： m/z 142 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 20 eV、右：CE 15 eV）



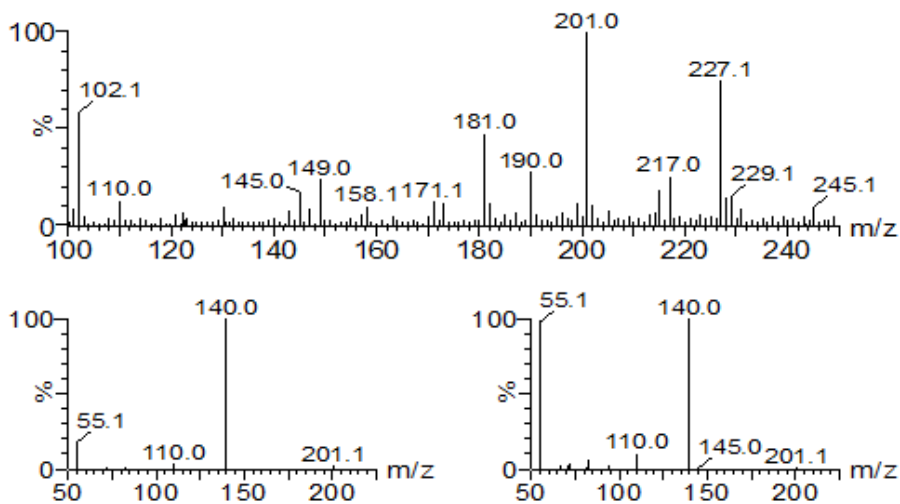
3) メトロニダゾール

上：マススペクトル（コーン電圧 20 V）、下： m/z 172 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 10 eV、右：CE 22 eV）



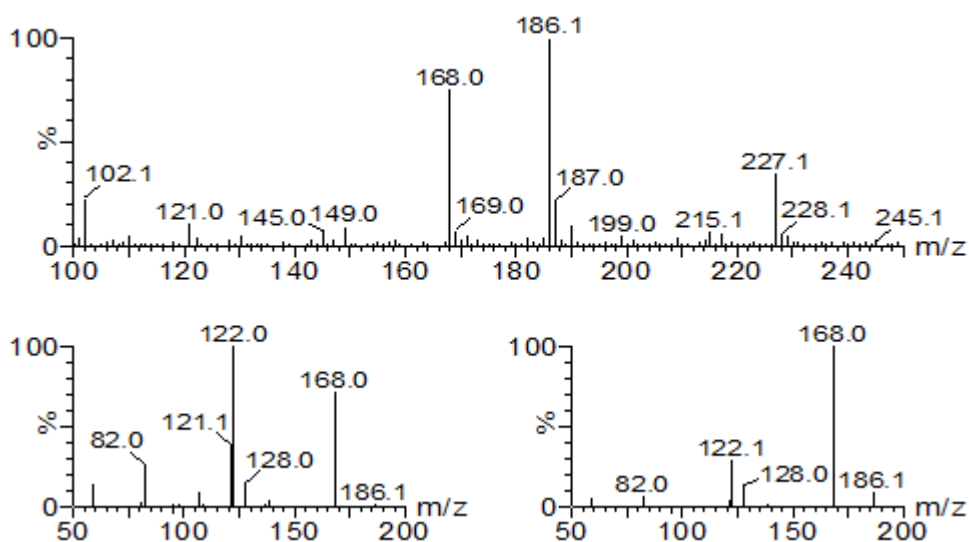
4) ロニダゾール

上：マススペクトル（コーン電圧 15 V）、下： m/z 201 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 13 eV、右：CE 20 eV）



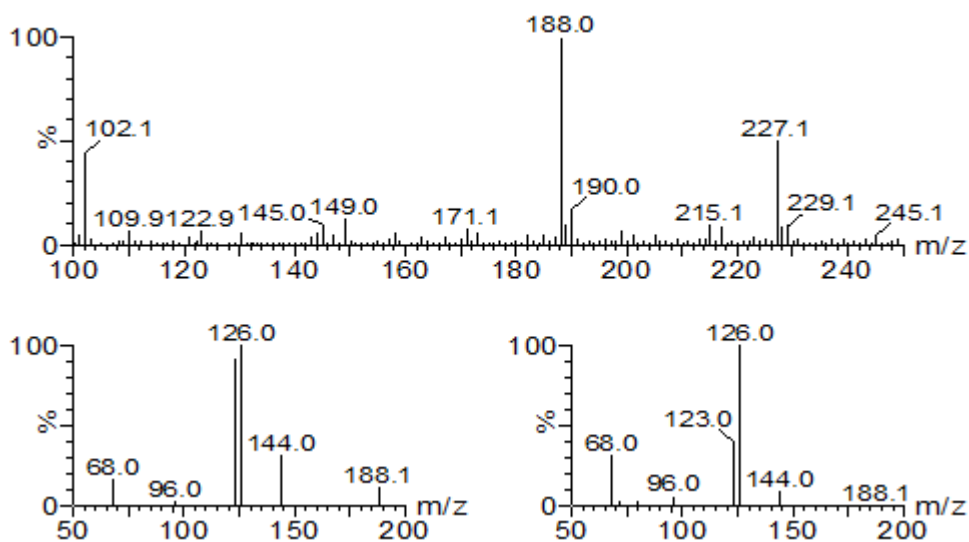
5) イプロニダゾール代謝物 B

上：マススペクトル（コーン電圧 15 V）、下： m/z 186 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 20 eV、右：CE 15 eV）



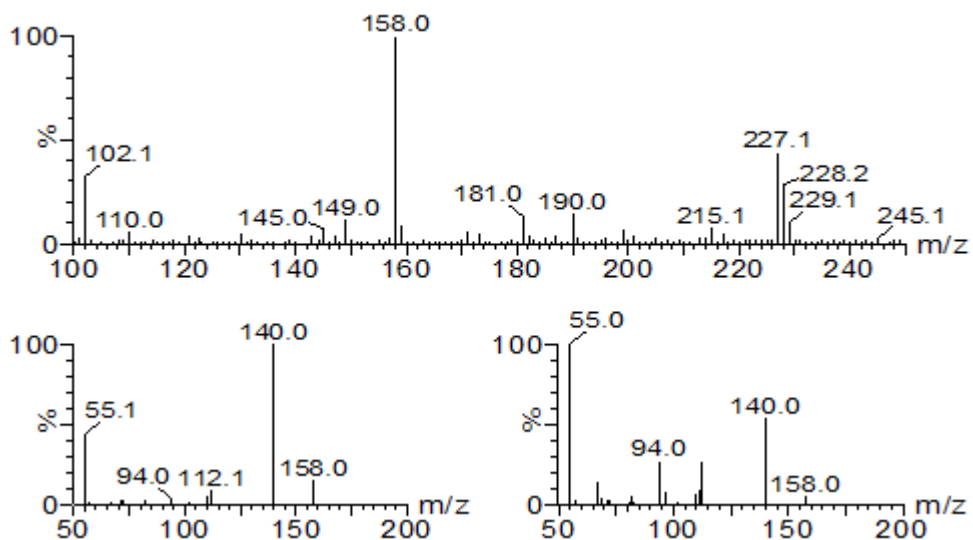
6) メトロニダゾール代謝物 A

上：マススペクトル（コーン電圧 15 V）、下： m/z 188 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 15 eV、右：CE 17 eV）



7) HMMNI

上：マスペクトル（コーン電圧 15 V）、下： m/z 158 のプロダクトイオンスペクトル（左：CE 17 eV、右：CE 22 eV）



2) HPLC における測定条件について

HPLC 測定条件等は、以下に記載の条件等を使用した。

分析カラム：InertSustain C18（ジューエルサイエンス製、 3×150 mm、粒子径 $3 \mu\text{m}$ ）

移動相：0.1 vol% ギ酸（A 液）及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル（B 液）

グラジエント条件：下表

時間（分）	A 液	B 液
0.0	98	2
5.0	90	10
15.0	5	95
20.0	5	95
20.0	98	2
30.0	98	2

なお、分析カラム及び移動相は、以下の結果等を考慮して選択した。

・分析カラム

数種類のオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）充填カラムを比較・検討した結果、ジューエルサイエンス社製 InertSustain C18 を使用することで、良好なピーク形状、低いベースラインノイズが得られたことから、本カラムを用いて検討を実施した。

・移動相（有機溶媒）

移動相の有機溶媒としては、アセトニトリルとメタノールについて比較した。アセトニトリルを用いた場合の方が各化合物のピーク形状が良好であり、ベースラインノイズも低かったことから、アセトニトリルを選択した。また、水系移動相として 0.1 vol% ギ酸を選択したことから、有機溶媒についてもギ酸を添加したもの（0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液）を使用した。

・移動相（水系移動相）

緩衝作用等を考慮し、水系移動相への塩の添加を検討した。LC-MS(/MS)測定において一般的に使用される揮発性の塩である酢酸アンモニウム及びギ酸アンモニウムを添加した場合、幾つかの検討対象化合物で得られるシグナルが低下したことから、これらの塩は使用しなかった。また、ODS 系分析カラムにおけるピークのテーリングの抑制、並びに、ESI (+) におけるイオン化促進を目的として、水系移動相への酸の添加を検討した。揮発性の酸として一般的に使用される酢酸及びギ酸について検討した結果、酢酸を用いた場合、ロニダゾールのベースラインノイズが著しく増加した。ギ酸を用いた場合、ベースラインノイズの増加もなく、全検討対象化合物で良好なピーク形状が得られたことから、水系移動相にはギ酸を用いた。ギ酸濃度は、各検討対象化合物で良好な測定感度が得られたこと、また、調製も容易であることを考慮し、0.1 vol% の濃度を選択した。

2. 抽出

抽出溶媒には、種々の畜水産物と混和し易く、検討対象化合物を効率的に抽出することが可能であると考えられたアセトンを選択した。検討対象化合物は比較的極性が高い ($\log P_{ow} -0.38 \sim 1.36$) ため、アセトンで抽出可能か以下の検討により確認した。

牛の脂肪を 40°C の湯浴中で融解した後、検討対象化合物を添加・攪拌し、-30°C で約 30 分間放置して再固化した。これに、アセトン 50 mL（抽出 1 回目）及び 30 mL（抽出 2 回目）を加えてホモジナイズ後、遠心分離し、上澄液を採った。上澄液をアセトンで 100 mL に定容し、この 10 mL（試料 1.00 g 相当量）を採り、40°C 以下で約 2 mL まで濃縮後、アセトニトリル/ヘキサン分配により精製した。残留物を 0.1 vol% ギ酸に溶解して得られた試験溶液を測定した結果、各検討対象化合物の回収率は良好であった（イプロニダゾール：79%、イプロニダゾール代謝物 B：74%、ジメトリダゾール：93%、メトロニダゾール：89%、メトロニダゾール代謝物 A：82%、ロニダゾール：108%、HMMNI：116%）。このことから、他の畜水産食品についても抽出溶媒としてアセトンを用いることで検討対象化合物を効率的に抽出可能であると推察された。一方、特に水酸基を有する検討対象化合物については、食品中の成分との相互作用により回収率が低下する可能性もあると考えられたことから、水酸基の解離を抑制可能な弱酸性条件となるよう、酢酸 1 mL を加えて抽出を行うこととした。

3. 精製

1) アセトニトリル/ヘキサン分配

種々の畜水産食品の効率的な脱脂方法として、アセトニトリル/ヘキサン分配の適用性について検討した。検討対象化合物は比較的蒸気圧が高く、畜水産食品由来の水分を含むアセトン抽出液を乾固した場合、揮散による回収率の低下が懸念されたため、アセトン抽出液を約 2 mL まで濃縮した溶液にアセトニトリル/ヘキサン分配を適用する方法について検討した。アセトン抽出液を約 2 mL に濃縮した場合、試料の水分含量により濃縮液中の水分量が異なることから、濃縮液中の水分量のアセトニトリル/ヘキサン分配に対する影響について検討した。すなわち、表 1 に示したように水分含量を変化させた①から④の組成の溶液に *n*-ヘキサン 10 mL を添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加えて振とう抽出し、遠心分離後に得られたアセトニトリル層を 0.1 vol%ギ酸で 20 mL に定容後、定容した溶液を 0.1 vol%ギ酸で更に 10 倍希釈し、LC-MS/MS で測定した。結果を表 1 に示した。

表 1 に示される通り、全検討条件において、検討対象化合物はアセトニトリル層中に良好に回収されることが確認された。このことから、試料中の水分含量に依らず、約 2 mL まで濃縮したアセトン抽出液に対してアセトニトリル/ヘキサン分配 (*n*-ヘキサン洗浄) を適用可能であることが推察された。

1 回目の分配後の *n*-ヘキサン層にアセトニトリル 10 mL を加えて振とう及び遠心分離後、アセトニトリル層を上記と同様に 0.1 vol%ギ酸で定容・希釈して測定したところ、2 回目の分配後のアセトニトリル層中には検討対象化合物は確認されなかった。

以上の結果から、アセトニトリル/ヘキサン分配 (*n*-ヘキサン洗浄) は、約 2 mL まで濃縮したアセトン抽出液に、*n*-ヘキサン 10 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加えて振とう・遠心分離し、アセトニトリル層を採る操作を採用した。

表 1 アセトニトリル/ヘキサン分配における回収率

	回収率(%)			
	①	②	③	④
イプロニダゾール	95	96	96	97
イプロニダゾール代謝物 B	102	100	104	100
ジメトリダゾール	97	97	99	100
メトロニダゾール	98	96	97	98
メトロニダゾール代謝物 A	101	95	95	102
ロニダゾール	99	97	98	99
HMMNI	99	99	102	102

①溶媒なし、②アセトン 2 mL、③アセトン及び水 (1:1) 混液 2 mL

④水 2 mL

(各検討対象化合物:200 ng 添加)

2) ミニカラム精製

アセトニトリル/ヘキサン分配 (*n*-ヘキサン洗浄) のみでは試料由来の夾雑物の除去が十分ではなかったため、ミニカラム精製操作の追加を検討した。

種々のミニカラムの適用性について検討した結果、強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (Oasis MCX、500 mg) を用いることにより、良好な精製効果及び回収率が得られたことから、本ミニカラムを用いた精製を採用した。

以下に、本ミニカラムにおける各検討対象化合物の溶出状況の確認方法を示した。

Oasis MCX (500 mg) に、アセトニトリル 5 mL、2 vol%ギ酸 5 mL を順次注入し、流出液を捨てた。次いで、2 vol%ギ酸 5 mL に各検討対象化合物 200 ng を添加し、ミニカラムに注入後、カラムからの溶出液を採った。更に、2 vol%ギ酸 5 mL、メタノール 5 mL、0.5%アンモニア水 5 mL を順次注入し、各溶出液を採った。その後、アセトニトリル及び水 (1:3) 混液 5 mL ずつを 3 回順次注入し、各溶出液を採った。

各溶出液を 0.1 vol%ギ酸で 20 mL に定容後、0.1 vol%ギ酸で更に 10 倍希釈し、LC-MS/MS を用いて各溶出液中の検討対象化合物量を求めた。

結果を表 2 に示した。

表 2 に示される通り、負荷液 (2 vol%ギ酸 5 mL) では各検討対象化合物の溶出は確認されなかった。また、2 vol%ギ酸 5 mL、メタノール 5 mL、0.5%アンモニア水 5 mL を通液した場合でも各検討対象化合物は溶出せず、これらの溶液は洗浄操作に使用することが可能であることが示された。なお、はちみつ (ソバはちみつ) 試料の抽出液をカラムに負荷し、2 vol%ギ酸 5 mL、メタノール 5 mL、0.5%アンモニア水 5 mL を順次注入し、各溶出液の状態を確認した結果、メタノール及び 0.5%アンモニア水の溶出液において黄～薄茶色の着色が見られたことから、これらの洗浄操作により試料由来の夾雑物を効果的に除去可能であると考えられた。

次に、各検討対象化合物のカラムからの溶出については、アセトニトリル及び水 (1:3) 混液を通液することにより、良好に溶出することが可能であった。

以上の結果から、Oasis MCX ミニカラム精製は、抽出及び *n*-ヘキサン洗浄後の残留物を 2 vol%ギ酸 5 mL に溶解してミニカラムに負荷後、2 vol%ギ酸 5 mL、メタノール 5 mL、0.5%アンモニア水 5 mL を順次通液して洗浄し、アセトニトリル及び水 (1:3) 混液 10 mL で溶出する操作を採用した。

なお、充填剤 200 mg の Oasis MCX を用いた場合、標準溶液では問題がないものの、ソバはちみつの試料マトリックス共存下でメタノール洗浄においてロニダゾールが 10%程度溶出することが確認されたことから、充填剤量 500 mg のミニカラムを選択した。

表 2 Oasis MCX からの溶出状況

	回収率 (%)							合計
	2 vol% ギ酸 (負荷液)	2 vol% ギ酸 (洗浄液)	メタノール (洗浄液)	0.5% アンモニア水 (洗浄液)	アセトニトリル及 水 (1:3) 混液- ① (溶出液)	アセトニトリル及 水 (1:3) 混液- ② (溶出液)	アセトニトリル及 水 (1:3) 混液- ③ (溶出液)	
イプロニダゾール	ND	ND	ND	ND	88	11	ND	99
イプロニダゾール 代謝物 B	ND	ND	ND	ND	98	ND	ND	98
ジメトリダゾール	ND	ND	ND	ND	98	ND	ND	98
メロニダゾール	ND	ND	ND	ND	97	ND	ND	97
メロニダゾール 代謝物 A	ND	ND	ND	ND	101	ND	ND	101
ロニダゾール	ND	ND	ND	ND	96	ND	ND	96
HMMNI	ND	ND	ND	ND	99	ND	ND	99

ND: Not Detected.

(各検討対象化合物を 200 ng 負荷し、各種溶液 5 mL ずつを順次流下)

3) 転溶操作

上記のミニカラム精製を行うことで、食品由来の夾雑物を効果的に除去可能であった。しかしながら、イプロニダゾール及びジメトリダゾールは比較的蒸気圧が高いため、ミニカラムからの溶出液を濃縮する操作において回収率が低下する可能性があることが確認された。採用したミニカラム溶出液は水の比率が高いため、ロータリーエバポレーターを用いた濃縮においては高真空度が必要となるが、このような高真空条件が原因で回収率が低下する可能性があることが推察された。

そこで、過度な真空度を必要とせず濃縮操作が可能となるよう、アセトニトリル及び水 (1:3) 混液からより揮発性の高い溶媒への転溶について検討した。検討に当たっては、転溶溶媒に酢酸エチルを用い、転溶する際に水層に添加する塩の効果について検討した。検討は、検討対象化合物 1 ng を添加したアセトニトリル及び水 (1:3) 混液 10 mL に塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウムを添加し、酢酸エチル 10 mL を加え、振とう及び遠心分離した。有機層 (上層) を採り、水層 (下層) に酢酸エチル 10 mL を加えて振とう及び遠心分離した。有機層を採り、先の有機層と合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮・溶媒除去して得られた残留物を 0.1 vol% ギ酸 1 mL に溶解して LC-MS/MS で測定した。結果を表 3 に示した。

表 3 に示される通り、酢酸エチルのみで抽出した場合にはロニダゾールの回収率が低いことが確認された。塩化ナトリウムを加えて抽出した場合には、ロニダゾールの回収率が若干改善されたが、一部は有機層に回収されなかった。

硫酸アンモニウムを加えて抽出した場合、ロニダゾールの回収率は良好であった。硫酸アンモニウムの添加量は、1 g の場合でもロニダゾールの回収率は良好であったが、食品由来の夾雑物の影響等を考慮し、添加量 2 g を選択した。

以上の結果及び考察から、Oasis MCX からの溶出液の濃縮及び溶媒除去は、溶出液に硫酸アンモニウム 2 g を加えて溶解した後、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出し、得られた有機層

を脱水後、濃縮及び溶媒除去する操作とした。

表 3 転溶操作の検討結果

	回収率(%)				
	添加無し	NaCl 1 g	NaCl 2 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g
イプロニダゾール	97	97	97	96	96
イプロニダゾール代謝物 B	95	97	98	98	96
ジメトリダゾール	95	96	97	96	95
メトロニダゾール	84	89	95	95	96
メトロニダゾール代謝物 A	100	100	99	97	97
ロニダゾール	70	84	84	98	99
HMMNI	96	96	98	99	97

4. 添加回収試験

検討食品は、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ）を選択した。

上記の食品に、イプロニダゾール、メトロニダゾール、イプロニダゾール-ヒドロキシ体及びメトロニダゾール-ヒドロキシ体は 0.0001 mg/kg 相当、ジメトリダゾール、ロニダゾール及び HMMNI は 0.0002 mg/kg 相当となるよう標準溶液（アセトン溶液）を添加、攪拌後、室温で 30 分間放置し、「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い、添加回収試験を実施した。

なお、牛の脂肪については、40℃の湯浴中で加温して融解させ、標準溶液を加えて攪拌後、-30℃で約 30 分間放置して再固化させたものを用いた。

結果を表 4（選択性）及び表 5（真度、精度、定量限界）に示した。

1) 選択性

イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B、ジメトリダゾール、メトロニダゾール、メトロニダゾール代謝物 B 及びロニダゾールについては、定量イオン及び定性イオンともに、検討した全ての食品（10 食品）において選択性に問題は無かった。

HMMNI については、定量イオンで測定した場合、しじみを除く 9 食品で選択性に問題は無かった。一方、定性イオンで測定した場合には、4 食品において選択性の評価の目標値を満足しなかった。

2) 真度及び精度

各検討対象化合物の真度及び併行精度（カッコ内に記載）は、以下の通りであった。

・イプロニダゾール

定量イオン：82%～92%（1%～3%）、定性イオン：85%～95%（1%～4%）

・イプロニダゾール代謝物 B

定量イオン：88%～94%（1%～3%）、定性イオン：89%～95%（1%～4%）

・ジメトリダゾール

定量イオン：89%～94%（0.5%～3%）、定性イオン：88%～94%（0.3%～4%）

・メトロニダゾール

定量イオン：82%～99%（1%～5%）、定性イオン：79%～98%（1%～5%）

・メトロニダゾール代謝物 A

定量イオン：75%～86%（2%～6%）、定性イオン：74%～85%（2%～6%）

・ロニダゾール

定量イオン：87%～95%（2%～6%）、定性イオン：90%～112%（1%～8%）

・HMMNI

定量イオン：85%～111%^{*1}（1%～8%^{*1}）、定性イオン：78%～106%^{*2}（3%～6%^{*2}）

*1：しじみにおいては、ブランク試料で妨害ピークが確認されたため、妨害ピークの面積値を差し引いて回収率を算出した。

*2：さけ及びうなぎ試料においては、妨害ピークの影響により回収率及び精度を求めることができなかった。

上記の結果から、HMMNIの定性イオンを除いて、真度及び精度の目標値を満足することが確認された。

3) 定量限界

表4に示される通り、添加回収試験溶液中の各検討対象化合物のピークはS/N \geq 10の目標値を満たしており、また、上記の2)の項に記載した通り、真度及び精度についても目標値（真度70%～120%の範囲内、併行精度30RSD%未満）を満足していたことから、

イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物B、メトロニダゾール及びメトロニダゾール代謝物Aについて0.0001 mg/kg

ジメトリダゾール、ロニダゾール及びHMMNI（定量イオンのみ）について0.0002 mg/kgの定量限界を設定可能であることが示された。

5. 測定の際の試料マトリックスの影響

「7. マトリックス添加標準溶液の調製」に記載した方法に従い、各検討食品のマトリックス添加標準溶液を調製し、LC-MS/MSで測定した。

結果を表6に示した。

各検討対象化合物のピーク面積比（マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値）は、以下の通りであった。

・イプロニダゾール

定量イオン：0.96～1.06、定性イオン：0.96～1.06

・イプロニダゾール代謝物 B

定量イオン：0.94～1.00、定性イオン：0.96～1.01

・ジメトリダゾール

定量イオン：0.96～1.00、定性イオン：0.95～1.02

・メトロニダゾール

定量イオン：0.84～1.03、定性イオン：0.82～1.02

- ・メトロニダゾール代謝物 A

定量イオン：0.89～1.01、定性イオン：0.82～1.01

- ・ロニダゾール

定量イオン：0.90～0.99、定性イオン：1.00～1.16

- ・HMMNI

定量イオン：0.91～1.13^{*1}、定性イオン：0.88～1.06^{*2}

*1：しじみにおいては、ブランク試料で妨害ピークが確認されたため、妨害ピークの面積値を差し引いて面積比を算出した。

*2：さけ及びうなぎ試料においては、妨害ピークの影響により面積比を算出することができなかった。

検討食品と検討対象化合物の組み合わせによっては、若干のイオン化抑制やイオン化促進が生じていることが推察されたが、測定の際の試料マトリックスの影響により定量値が大きく変動する可能性は少ないと考えられた。

6. 結論

畜水産物中の硝ロイミダゾール類（イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B、ジメトリダゾール、メトロニダゾール、メトロニダゾール代謝物 A、ロニダゾール及び HMMNI）の試験法として、分析対象化合物を試料から酢酸酸性下アセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂、強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムで精製後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法について、畜水産物 10 食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ（ソバはちみつ））を対象に添加回収試験を実施した結果、

○選択性

HMMNI を除く 6 化合物については、定量イオン及び定性イオンともに全ての検討食品で選択性は良好であった。HMMNI については、定量イオンで測定した場合にはしじみでのみ妨害ピークが確認され、定性イオンで測定した場合には牛の脂肪・さけ・うなぎ・しじみの 4 食品で妨害ピークが確認された。

○真度及び精度

HMMNI の定性イオンを除き、全ての検討対象化合物・全ての検討食品において真度及び併行精度の目標値を満足した。

○定量限界

添加回収試験における真度、精度及び得られたピークの S/N から、イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物 B、メトロニダゾール及びメトロニダゾール代謝物 A については 0.0001 mg/kg、ジメトリダゾール、ロニダゾール及び HMMNI（定量イオンのみ）については 0.0002 mg/kg の定量限界を設定可能と考えられた。