

## 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試験法

イプロニダゾールにあつてはイプロニダゾール及び1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾールを、ジメトリダゾールにあつてはジメトリダゾール及び2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールを、メトロニダゾールにあつてはメトロニダゾール及び1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾールを、ロニダゾールにあつてはロニダゾール及び2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールを分析対象とする。

### 1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

### 2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

ギ酸 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、強酸性陽イオン交換樹脂500mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

### 3. 標準品

イプロニダゾール標準品 本品はイプロニダゾール98%以上を含む。

1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール標準

品 本品は1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール98%以上を含む。

ジメトリダゾール標準品 本品はジメトリダゾール98%以上を含む。

メトロニダゾール標準品 本品はメトロニダゾール98%以上を含む。

1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール標準品 本品は1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール98%以上を含む。

ロニダゾール標準品 本品はロニダゾール98%以上を含む。

2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール標準品 本品は2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール98%以上を含む。

#### 4. 試験溶液の調製

##### a 抽出法

試料10.0 g (はちみつの場合は試料10.0 g に水10mlを加えて溶かしたもの) に酢酸 1 ml及びアセトン50mlを加えて細切均一化し、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物 (はちみつの場合は水 5 mlを加えて溶かしたもの) にアセトン30mlを加えて細切均一化し、上記と同様に遠心分離し上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンで正確に100mlとする。

この溶液から正確に10mlを採り、40℃以下で約 2 mlに濃縮する。これに n-ヘキサン飽和アセトニトリル10ml及び n-ヘキサン10mlを加えて振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。アセトニトリル層を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に 2 vol%ギ酸 5 mlを加えて溶かす。

##### b 精製法

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500mg) にアセトニトリル 5 ml及び 2 vol%ギ酸 5 mlを注入し、流出液は捨てる。このカラムに a 抽出法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及び0.5%アンモニア水 5 mlを順次注入し、流出液は捨てる。この溶液にアセトニトリル及び水の混液 (1 : 3) 10mlを注入し、溶出液を採る。

この溶出液に、硫酸アンモニウム 2 gを加えて溶かした後、酢酸エチル10mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1vol%ギ酸に溶かし、正確に 1 mlとしたものを試験溶液とする。

#### 5. 操作法

##### a 検量線の作成

各標準品の0.1vol%ギ酸の溶液を数点調製し、それぞれを液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作

成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、イプロニダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール、メトロニダゾール及び1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾールにあつては試料中0.0001mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0001mg/lである。同様に、ジメトリダゾール、ロニダゾール及び2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾールにあつては試料中0.0002mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0002mg/lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成により各分析対象化合物の定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径3mm、長さ150mm、粒子径3 $\mu$ m

カラム温度：40°C

移動相：0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.1vol%ギ酸の混液（98：2）から（90：10）までの濃度勾配を5分間で行い、その後（5：95）までの濃度勾配を10分間で行い、5分間保持する。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン（m/z）：

イプロニダゾール プリカーサーイオン170、プロダクトイオン124、109

1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール プリカーサーイオン186、プロダクトイオン168、122

ジメトリダゾール プリカーサーイオン142、プロダクトイオン96、95

メトロニダゾール プリカーサーイオン172、プロダクトイオン128、82

1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール プリカーサーイオン188、プロダクトイオン126、123

ロニダゾール プリカーサーイオン201、プロダクトイオン140、55

2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール プリカーサーイオン158、プロダクトイオン94、55

注入量：5 $\mu$ l

保持時間の目安：

イプロニダゾール 15分

1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール

ル 13分

ジメトリダゾール 12分

メトロニダゾール 11分

1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - ヒドロキシメチル - 5 - ニトロイミダ  
ゾール 11分

ロニダゾール 12分

2 - ヒドロキシメチル - 1 - メチル - 5 - ニトロイミダゾール 11分