報 文

LC-MS/MSを用いた畜水産物中のニトロイミダゾール類および
主要代謝物の分析法

(平成29年3月14日受理)

坂井隆敏* 根本 了 手島玲子 穂山 浩

Analytical Method for Nitroimidazoles and Their Major Metabolites
in Livestock and Fishery Products Using LC-MS/MS

Takatoshi SAKAI*, Satoru NEMOTO, Reiko TESHIMA and Hiroshi AKIYAMA

National Institute of Health Sciences:

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; *Corresponding author

A sensitive and reliable method for the simultaneous determination of four nitroimidazoles (ipronidazole (IPZ), dimetridazole (DMZ), metronidazole (MNZ) and ronidazole (RNZ)) and three metabolites (IPZ-OH, MNZ-OH and 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI)) in livestock and fishery products was developed. The analytes were extracted from samples with acetone containing acetic acid. The crude extracts were defatted by liquid-liquid partition using acetonitrile and *n*-hexane followed by solid-phase extraction using a cartridge column packed with divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer bearing sulfo groups. The analytes in the eluate from the cartridge column were extracted with ethyl acetate after addition of ammonium sulfate. The solvent was removed from the extract, and the residue was dissolved in 0.1 vol% formic acid. The HPLC separation was performed on a C18 column with a gradient formed from water containing 0.1 vol% formic acid and acetonitrile containing 0.1 vol% formic acid. For detection of the analytes, tandem mass spectrometry with positive ion electrospray ionization was used. The recovery tests were performed on 10 livestock and fishery products. The truenesse ranged from 74.6 to 111.1%, with repeatability of 0.5–8.3 RSD% for the entire procedure. The limit of quantification was 0.0001 mg/kg for IPZ, IPZ-OH, MNZ and MNZ-OH, and 0.0002 mg/mg for DMZ, RNZ and HMMNI.

(Received March 14, 2017)

Key words: ニトロイミダゾール類 nitroimidazoles; LC-MS/MS; 畜水産物 livestock and fishery products; 主要代謝物 major metabolites

緒 言

イプロニダゾール (IPZ), ジメトリダゾール (DMZ), メトロニダゾール (MNZ) およびロニダゾール (RNZ) は、ニトロイミダゾール骨格を有する化合物 (ニトロイミダゾール類) であり、主に寄生虫駆除を目的として使用される動物用医薬品である (Fig. 1)。これらニトロイミダゾール類は、比較的安価で広域な寄生虫駆除効果を示す一方、ヒトへの発がん性や遺伝毒性を有する可能性が指摘されている^{1), 2)}。

わが国において、DMZ, MNZ および RNZ については、すでに「食品において不検出とされる農薬等の成分である物質」として規定され、試験法が告示されている^{*1}。一

方、IPZ については、個別に残留基準は示されておらず、公定試験法は整備されていない。

2015年の内閣府食品安全委員会による食品健康影響評価において、「イプロニダゾールについては、遺伝毒性を示す可能性を否定することができず、発がん性が示唆されたことから、ADIを設定すべきではない」と評価されたことを受けて、リスク管理機関において迅速にIPZの公定試験法を整備する必要が生じた。

食品中のIPZ, DMZ, MNZ および RNZ の残留分析法については、これらの主要代謝物を含めて同時分析が可能な方法がすでに報告されているが、対象食品が限定的であり^{3)~8)}、種々の畜水産食品に対する適用性に関しては詳細な情報が報告されていない。

そこで、高感度で選択性の高いLC-MS/MSを用い、IPZ, DMZ, MNZ および RNZ の4つのニトロイミダゾール類に加え、これらの主要代謝物であるイプロニダゾール-ヒド

* 連絡先 tasakai@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀1-18-1

*1 厚生省告示第370号

Fig. 1. Structures of analytes

ロキシ体 (IPZ-OH), メトロニダゾール-ヒドロキシ体 (MNZ-OH) および2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール (HMMNI) を対象とした, 畜水産物中のニトロイミダゾール類の分析法を開発したので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

試料は, 都内のスーパーで購入した牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳, 鶏の筋肉・卵, うなぎ, さけ, しじみおよびはちみつ (ソバはちみつ) を用いた。なお, 筋肉は可能な限り脂肪層を取り除いたもの, 脂肪は可能な限り筋肉層を取り除いたもの, うなぎは頭を除いた可食部 (内臓, 骨および皮を含む), 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分間水切りしたものをを用いた。

IPZ標準品 (純度99.9%) は林純薬工業(株)製, IPZ-OH標準品 (純度99.6%), DMZ標準品 (純度99.9%), MNZ標準品 (純度99.9%) およびMNZ-OH標準品 (純度99.3%) はFuluka社製, RNZ標準品 (純度98.6%) およびHMMNI標準品 (純度98.5%) はDr. Ehrenstorfer社製のものをを用いた。各標準品は, アセトニトリルに溶解して標準原液 (1 mg/mL) とした。

アセトン, *n*-ヘキサン, アセトニトリルおよび酢酸エチルは関東化学(株)製の残留農薬・PCB試験用 (300倍濃縮検定品) を, 0.1 vol% 酢酸および0.1 vol% 酢酸-アセトニトリルは関東化学(株)製のHPLC用を, メタノール, 酢酸および蒸留水は関東化学(株)製のLC-MS用を, 無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製の残留農薬・PCB試験用を, そのほかの試薬はすべて特級品を用いた。

精製用固相ミニカラムはWaters社製のOasis MCX (充填剤量500 mg, 粒子径60 μm) をを用いた。

2. 装置

ホモジナイザーはKINEMATICA社製ポリトロンPT3100, 遠心分離機はKUBOTA社製8420, ロータリーエバポレーターはEYELA社製N-1100を用いた。LC-MS/

MSはWaters社製Acquity UPLCおよびXevo TQ-Sを用いた。

3. 測定条件

LC-MS/MS測定条件はTable 1に示した。

4. 定量

各化合物の標準溶液を0.1 vol% 酢酸で希釈・混合し, 検量線用標準溶液を調製した。検量線用標準溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し, 得られたクロマトグラムから各化合物のピーク面積値を求め, 絶対検量線法により検量線を作成した。

作成した検量線を用い, 試験溶液 (5 μL) 中の各化合物の濃度を求めた。

5. 試験溶液の調製

はちみつ以外の場合は, 試料10.0 gを350 mLガラス製遠沈管に量り取り, アセトン50 mLおよび酢酸1 mLを加えてホモジナイズした。はちみつの場合は, 試料10.0 gを350 mLガラス製遠沈管に量り取り, 水10 mLを加えて溶解した後, アセトン50 mLおよび酢酸1 mLを加えてホモジナイズした。室温, 2,400×*g*で5分間遠心分離し, アセトン層を100 mLメスフラスコに採取した。残留物 (はちみつの場合は, 残留物に水5 mLを加えて溶解したもの) にアセトン30 mLを加えて上記と同様に操作した。得られたアセトン層を合わせ, アセトンを加えて正確に100 mLとした。定容後の溶液10 mLを100 mLナスフラスコに採り, ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約2 mLまで濃縮した。その濃縮液を50 mLポリプロピレン製遠沈管に移し, *n*-ヘキサン10 mLおよび*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを加えて振とうした。アセトニトリル層を100 mLナスフラスコに採り, ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮した後, 窒素気流下で溶媒を除去した。この残留物に2 vol% 酢酸5 mLを加えて溶解した。この溶液をあらかじめアセトニトリル5 mLおよび2 vol% 酢酸5 mLで洗浄したOasis MCXに負荷した。次に, 2 vol% 酢酸5 mL, メ

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameter	Settings
LC conditions	
LC column	InertSustain C18 column (3.0 mm×150 mm, 3.0 μm)
Mobile phase	A=0.1 vol% formic acid, B=0.1 vol% formic acid in acetonitrile
Gradient	
	Time (min) A (%) B (%)
	0 98 2
	5 90 10
	15 5 95
	20 5 95
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40°C
Injection volume	5 μL
Total run time	30 min
MS conditions	
Ionization mode	ESI (positive mode)
Capillary voltage	1.5 kV
Source temperature	150°C
Desolvation temperature	600°C
Desolvation gas flow	1,000 L/hr
Cone gas flow	150 L/hr

タノール5 mL, 0.5%アンモニア水5 mLを順次注入し、カラムを洗浄した。つづいて、アセトニトリル-水 (1:3) 混液10 mLを注入し、50 mLポリプロピレン製遠沈管に溶出液を得た。

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を加えて振とうした。静置後、酢酸エチル層を採り、別の50 mLポリプロピレン製遠沈管に移した。残った水層に再度酢酸エチル10 mLを加えて上記と同様に振とう後、静置した。酢酸エチル層を別の50 mLポリプロピレン製遠沈管に移し合わせ、適量 (2 g程度) の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液をロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。この残留物を0.1 vol%ギ酸1 mLに溶解し、試験溶液とした。

6. 添加回収試験

IPZ, IPZ-OH, MNZおよびMNZ-OHについては試料中濃度が0.0001 mg/kg, DMZ, RNZおよびHMMNIについては試料中濃度が0.0002 mg/kgとなるよう標準溶液を添加して回収試験を行い、真度および併行精度を求めた。

7. 試料マトリックスの測定への影響

実験方法5. 試験溶液の調製に記載した方法に従ってブランク試料を操作し、ブランク試料の残留物を得た。この残留物に、添加回収試験における添加濃度に相当する標準溶液1 mLを加えて溶解し、マトリックス標準溶液とした。得られた溶液をLC-MS/MSで測定し、溶媒標準溶液で得られた各化合物のピーク面積値に対するマトリックス標準溶液でのピーク面積値の比を求め、試料マトリックス

の測定への影響を検討した。

結果および考察

1. LC-MS/MS測定条件の検討

1.1 質量分析条件の検討

質量分析におけるイオン化法としてESI法を採用し、イオン化条件を検討したところ、ポジティブモードにおいて各化合物のプロトン化分子イオン ($[M+H]^+$) の生成が確認された。次に、Selected Reaction Monitoring (SRM) モードにおける測定条件について検討した。各化合物のプロトン化分子イオン $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られるフラグメントイオンの測定条件を最適化した。各化合物のモニターイオンおよび最適測定条件をTable 2に示した。

1.2 HPLC条件の検討

各化合物についてプロトン化分子イオン $[M+H]^+$ の生成が確認されたことから、これらのイオンの生成を促進させるため、移動相には0.1 vol%ギ酸を用いた。また、分析カラムに保持された各化合物を溶出させるための有機溶媒としては、0.1 vol%ギ酸-アセトニトリルを選択した。

上記の移動相を用い、種々のODSカラムを検討した。InertSustain C18 (GL Sciences社製、粒子径3 μm, 内径3 mm, 長さ150 mm) を分析カラムとして測定したところ、各化合物について良好なピーク形状が得られた。

1.3 検量線

IPZ, IPZ-OH, MNZおよびMNZ-OHについては0.00005~0.00015 mg/Lの濃度範囲において、DMZ, RNZおよびHMMNIについては0.0001~0.0003 mg/Lの濃度

範囲において、相関係数 (r) が0.99以上の良好な直線性が認められた。

2. 前処理方法の検討

2.1 抽出操作の検討

抽出溶媒には、種々の畜水産物と混和しやすく、各化合物を効率的に抽出可能と考えられたアセトンを選択した。本報における各化合物は比較的極性が高く、アセトンは比較的極性が低い溶媒であるため、以下の検討により、アセトンの抽出溶媒としての適用性を確認した。

すなわち、牛の脂肪を40℃の湯浴中で融解した後、各化合物を添加・かくはんし、−30℃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) および30 mL (抽出2回目) を加えてホモジナイズ・遠心分離後、得られたアセトン抽出液中の各化合物の回収率を求め

た。その結果、各化合物の回収率は74~116%と良好であったことから、抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、種々の畜水産物から各化合物を効率的に抽出可能であることが示唆された。

なお、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、本報においては抽出時に酢酸1 mLを添加して抽出する方法を採用した。

2.2 精製操作の検討

アセトン抽出液を濃縮後、アセトニトリル/ヘキサン分配を行うことで、畜水産物由来の脂質等の低極性夾雑物を効果的に除去可能であった。しかしながら、色素等の夾雑物は除去できず、その後のLC-MS/MS測定において多くの夾雑ピークが確認された。そこで、イミダゾール類のような塩基性化合物を効果的に精製可能な⁴⁾ スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (Oasis MCX) の適用性について検討した。

各化合物の標準溶液 (各化合物200 ngを2 vol% 酢酸5 mLに溶解したもの) を用いて検討した結果、2 vol% 酢酸5 mLでミニカラムに負荷し、2 vol% 酢酸5 mL、メタノール5 mLおよび0.5% アンモニア水5 mLで順次洗浄した場合であっても、各化合物は溶出せず、カラムに保持されていることが示された。つづいて、アセトニトリル-水 (1:3) 混液5 mLずつを3回注入し、各溶出液中の各化合物の回収率を求めたところ、10 mLの液量で各化合物をミニカラムから溶出可能であることが示された。なお、洗浄工程でアンモニア水を使用していることから、塩基性の溶出液を用いることなくミニカラムからの溶出が可能であったと推察された。また、溶出液の含水比率については、低極性夾雑物の溶出を抑えることを目的として可能な限り含水比率の高い溶出液を検討し、アセトニトリル-水 (1:3) 混液を選択した。Oasis MCXミニカラムからの各化合物

Table 2. SRM parameters

	Monitored reactions precursor m/z > product m/z	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
IPZ	170>124 ^{*1}	20	17
	170>109 ^{*2}	20	23
DMZ	142>96 ^{*1}	20	15
	142>95 ^{*2}	20	20
MNZ	172>82 ^{*1}	20	22
	172>128 ^{*2}	20	10
RNZ	201>140 ^{*1}	15	13
	201>55 ^{*2}	15	20
IPZ-OH	186>122 ^{*1}	15	20
	186>168 ^{*2}	15	15
MNZ-OH	188>126 ^{*1}	15	17
	188>123 ^{*2}	15	15
HMMNI	158>94 ^{*1}	15	22
	158>55 ^{*2}	15	17

^{*1} Quantification

^{*2} Confirmation

Table 3. Recoveries of the analytes from clean-up cartridge column

Recovery (%) ^{*6}								
	Load ^{*1}	Wash-1 ^{*2}	Wash-2 ^{*3}	Wash-3 ^{*4}	Elute-1 ^{*5} (0–5 mL)	Elute-2 ^{*5} (5–10 mL)	Elute-3 ^{*5} (10–15 mL)	Elute (total)
IPZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	88	11	N.D.	99
DMZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	98	N.D.	N.D.	98
MNZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	97	N.D.	N.D.	97
RNZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	101	N.D.	N.D.	101
IPZ-OH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	96	N.D.	N.D.	96
MNZ-OH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	98	N.D.	N.D.	98
HMMNI	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	99	N.D.	N.D.	99

^{*1} 200 ng of each analytes in 5 mL of 2 vol% formic acid

^{*2} 5 mL of 2 vol% formic acid

^{*3} 5 mL of methanol

^{*4} 5 mL of 0.5% ammonia solution

^{*5} 5 mL of mixture of acetonitrile–water (1:3)

^{*6} $n = 1$

N.D.: not detected

の溶出状況を Table 3 に示した。

また、色素含量が高いと考えられた試料（ソバはちみつ、牛の肝臓、さけ）を用いて精製効果を確認したところ、溶出液はほぼ無色となったことから、本カラムを用いる方法は、ニトロイミダゾール類と色素類との分離が可能で、高い精製効果が得られることが示唆された。

なお、筆者らは充填剤量 200 mg のミニカラムを用いた場合には、標準溶液では問題がないものの、はちみつなどの一部の食品マトリックス共存下では洗浄操作で RNZ が若干溶出することを確認している。一方、充填剤量 500 mg のミニカラムを用いたところ、種々の食品マトリックス共存下でも洗浄操作において RNZ の溶出は認められなかったことを確認しており、本報においては充填剤量 500 mg のミニカラムを選択して用いた。

2.3 転溶操作の検討

上述のように Oasis MCX 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ると考えられた。一方、ニトロイミダゾール類およびその代謝物を高感度に分析するためには、溶出液の濃縮操作が必要であるが、含水比率が高いミニカラム溶出液をそのまま濃縮した場合、比較的蒸気圧が高い IPZ および DMZ において回収率が低下する場合があることが確認された。

そこで、温和な条件で濃縮が可能となるように、揮発性の高い溶媒への転溶を試みた。

転溶操作の検討結果を Table 4 に示した。Oasis MCX 溶出液（アセトニトリル-水（1:3）混液 10 mL に各化合物 1 ng を溶解したもの）を酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した場合、RNZ の回収率が若干低いことが確認された。塩析効果を得ることを目的として、抽出液に塩化ナトリウムを加えて酢酸エチルで振とう抽出した場合には、RNZ の回収率は若干改善されたものの、十分な回収率は得られなかった。そこで、塩化ナトリウムよりも水溶解度の高い硫酸アンモニウムについて検討したところ、RNZ を良好に回収可能であり、ほかの化合物についても良好な回収率が得られることが示された。なお、硫酸アン

Table 4. Effect of salt addition on the recoveries of analytes on liquid/liquid partition

	Recovery (%)				
	None	NaCl 1 g	NaCl 2 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g
IPZ	97	97	97	96	96
DMZ	95	96	97	96	95
MNZ	84	89	95	95	96
RNZ	70	84	84	98	99
IPZ-OH	95	97	98	98	96
MNZ-OH	100	100	99	97	97
HMMNI	96	96	98	99	97

Analytes (1 ng) were extracted twice with 10 mL of ethyl acetate from a mixture of acetonitrile-water (1:3) containing the indicated additive ($n=1$).

Table 5. Results of recovery tests from livestock and fishery products

	Bovine muscle		Bovine fat		Bovine liver		Milk		Poultry muscle		Egg		Salmon		Eel		Freshwater clam		Honey	
	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}	Trueness ^{#1} (%)	RSD% ^{#2}
IPZ	86.0	3.0	86.9	3.0	92.9	1.3	86.7	2.7	87.1	2.1	89.5	0.8	91.5	2.0	90.2	1.3	89.9	2.5	82.2	3.0
DMZ	91.9	2.6	90.8	1.8	92.4	2.6	90.7	3.0	93.7	2.0	88.8	1.0	90.2	3.0	91.4	1.4	88.9	1.5	93.0	0.5
MNZ	92.7	4.0	99.3	0.9	93.1	2.5	96.1	4.0	89.7	2.4	88.3	4.1	86.1	0.9	90.1	2.9	90.8	2.9	81.9	5.0
RNZ	87.2	1.7	93.5	1.7	90.2	1.8	93.4	2.2	87.0	4.8	94.8	1.9	90.4	1.9	91.3	2.0	91.5	3.0	87.0	5.9
IPZ-OH	93.8	2.5	90.0	2.3	93.0	3.1	92.3	2.6	93.4	1.7	92.3	3.2	91.3	2.3	93.0	2.9	88.1	3.2	93.5	1.3
MNZ-OH	82.9	6.3	82.1	5.1	81.1	3.1	87.3	5.6	82.9	4.5	86.3	1.4	80.3	4.2	78.0	5.9	77.7	2.3	74.6	5.2
HMMNI	88.6	8.3	111.1	5.3	85.9	1.0	99.7	3.8	97.5	2.4	94.3	2.7	85.7	4.2	88.7	6.1	88.9	6.3	84.7	4.4

^{#1} $n=5$

^{#2} Repeatability

Fig. 2. Typical SRM chromatograms of analytes

(a) Standard solution (0.1 ng/mL for IPZ, IPZ-OH, MNZ and MNZ-OH, 0.2 ng/mL for DMZ, RNZ and HMMNI)

(b) Blank sample of bovine muscle

(c) Fortified sample of bovine muscle (0.0001 mg/kg for IPZ, IPZ-OH, MNZ and MNZ-OH, 0.0002 mg/kg for DMZ, RNZ and HMMNI)

Table 6. Effect of sample matrices on the ionization of analytes

	Peak area ratio*									
	Bovine muscle	Bovine fat	Bovine liver	Milk	Poultry muscle	Egg	Salmon	Eel	Freshwater clam	Honey
IPZ	0.99	0.96	1.06	1.02	1.02	1.02	1.01	1.02	0.99	0.97
DMZ	0.97	1.00	0.96	0.99	0.98	0.97	0.97	0.96	0.96	0.97
MNZ	1.02	1.03	0.95	0.99	0.92	0.96	0.96	0.92	0.95	0.84
RNZ	0.95	0.99	0.93	0.94	0.93	0.99	0.97	0.96	0.99	0.90
IPZ-OH	1.00	0.98	0.96	0.99	0.95	0.99	0.99	0.98	0.94	0.99
MNZ-OH	0.94	1.01	0.85	0.95	0.93	1.01	0.82	0.90	1.02	0.89
HMMNI	0.92	1.13	0.93	1.05	0.97	0.99	1.00	0.99	0.91	0.99

* Peak area of matrix standard / Peak area of solvent standard ($n=1$)

モニウムの添加量は、1 gの場合でも全検討対象化合物について良好な回収率が得られたが、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。

3. 添加回収試験

開発した方法を用いて添加回収実験を行った。IPZ, IPZ-OH, MNZおよびMNZ-OHについては試料中濃度が0.0001 mg/kg, DMZ, RNZおよびHMMNIについては試料中濃度が0.0002 mg/kgとなるよう標準溶液を添加したものを添加試料として用いた。牛の脂肪以外の試料については、試料に標準溶液を添加・かくはん後、室温で30分間放置した後、抽出操作を行った。牛の脂肪については、試料を40℃の湯浴上で加温して溶かし、標準溶液を添加・かくはん後、-30℃で30分間放置して固化した後、抽出操作を行った。各食品5併行の添加回収試験を実施した結果、各化合物における真度および併行精度は、それぞれ、IPZ: 82.2~92.9%および0.8~3.0 RSD%, IPZ-OH: 88.1~93.8% および 1.3~3.2 RSD%, MNZ: 81.9~99.3% および0.9~5.0 RSD%, MNZ-OH: 74.6~87.3% および1.4~6.3 RSD%, DMZ: 88.8~93.7%および0.5~3.0 RSD%, RNZ: 87.0~94.8%および1.7~5.9 RSD%, HMMNI: 84.7~111.1%および1.0~8.3 RSD%と良好であった (Table 5)。また、いずれの食品においても、ブランク試料において各化合物の定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された。各分析対象化合物の標準溶液、ブランク試料および添加試料（ともにウシの筋肉試料）から得られた試験溶液のクロマトグラムをFig. 2に示した。

4. 試料マトリックスの測定への影響

マトリックス添加標準溶液で得られた各化合物のピーク面積値と溶媒標準溶液で得られた各化合物のピーク面積値の比を求め、LC-MS/MS測定における試料マトリックスの測定値への影響について検討した (Table 6)。なお、マトリックス添加標準溶液および溶媒標準溶液中の各化合物の濃度は、IPZ, IPZ-OH, MNZおよびMNZ-OHについては0.0001 mg/L, DMZ, RNZおよびHMMNIについては0.0002 mg/mLとなるよう調製した。その結果、各検討食品における比は、IPZ: 0.96~1.06, IPZ-OH: 0.94~1.00, MNZ: 0.84~1.03, MNZ-OH: 0.82~1.02, DMZ: 0.96~1.00,

RNZ: 0.90~0.99, HMMNI: 0.91~1.13であった。これらの結果から、各化合物に対する測定の際の試料マトリックスの影響は少なく、種々の畜水産食品において絶対検量線法を用いて簡便かつ迅速な定量が可能と推察された。

ま と め

LC-MS/MSを用いた種々の畜水産物中のニトロイミダゾール類の分析法を開発した。

各化合物を試料から酢酸酸性下アセトンで抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製する方法を開発した。測定にはLC-MS/MSを用い、イオン化はESI法（ポジティブイオンモード）により行った。また、移動相には0.1 vol%ギ酸および0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリルを用い、分析カラムにはODSカラム (Inert-Sustain C18) を用いた。

開発した方法を用い、種々の畜水産物10食品について添加回収試験を実施したところ、真度は70~120%の範囲内、併行精度は30 RSD%未満であった。また、添加回収試験溶液の測定において、各化合物S/N $\geq$ 10のピークが得られたことから、本法における定量下限値は、IPZ, IPZ-OH, MNZおよびMNZ-OHについては0.0001 mg/kg, DMZ, RNZおよびHMMNIについては0.0002 mg/kgと設定可能であった。

本法は、これまでの報告例よりも広範囲の食品に対して適用が可能であり、種々の畜水産食品中のニトロイミダゾール類およびその主要代謝物について、食品衛生法で規定される規格基準への適合性を判定する分析法として有用であると考えられる。

謝 辞

本研究は、厚生労働省医薬食品局食品安全部「食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業」により実施した。

文 献

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity,

- Supplement 7, 1987.
- 2) Thirty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, evaluation of certain veterinary drug residues in food, World Health Organisation, Geneva, 1989.
 - 3) Mark C., Patrice B., Barry F., Edward M., Liam R. Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 8101–8109 (2009).
 - 4) Xi X., Xiaowei L., Shuangyang D., Suxia Z., Haiyang J., Jiancheng L., Jianzhong S. Determination of 5-nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in swine kidney by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analyt. Chim. Acta*, **637**, 79–86 (2009).
 - 5) Xi X., Xiaowei L., Suxia Z., Shuangyang D., Haiyang J., Jiancheng L., Jianzhong S. Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1208**, 101–108 (2008).
 - 6) Mark C., Patrice B., Barry F., Edward M., Liam R. Development and validation of a rapid method for the determination and confirmation of 10 nitroimidazoles in animal plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **877**, 1494–1500 (2009).
 - 7) Xi X., Yuanyuan W., Xia W., Yun L., Feng Z., Xiaowei L., Yaoling H., Shuangyang D., Jianzhong S. Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1292**, 96–103 (2013).
 - 8) Kamila M., Andrzej P., Jan Z. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **81**, 1273–1280 (2010).