



Agilent 6410 によるニトロフラン代謝物の 高感度分析の紹介



要旨> ニトロフラン系合成抗菌剤(フラゾリドン、フラルタドン、ニトロフラントイン)の代謝物である AOZ, AMOZ 及び AHD の LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。これら合成抗菌剤の測定は告示法として分析法が規定されていることから MS 条件以外は告示法通りの条件で測定しました。その結果、全てのニトロフラン代謝物で 1ppb 以下の測定が可能でした。また、うなぎ蒲焼抽出液中で妨害ピークは検出されず、顕著なイオン化抑制もなく良好な結果が得られました。

Key Words: ニトロフラン代謝物、AOZ、AMOZ、AHD、LC-MS/MS、MRM、うなぎ蒲焼

1. はじめに

ニトロフラン類は合成抗菌剤として使用されていましたが、現在では遺伝毒性発ガン性物質である可能性が高い或いは疑いが否定できないことから国内及び諸外国の多くで禁止されています。しかし発展途上国においては安価なことから未だに使用されており 2002 年にタイ産鶏肉で大きな問題となりました。国内ではポジティブリスト制の導入に伴い『食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質』にニトロフラゾン、フラゾリドン、ニトロフラントイン、フラルタドンが指定されています。具体的にはその代謝物である SEM、AOZ、AHD、AMOZ を分析対象化合物とした分析法が告示により規定され、これら化合物の規制が実施されています。しかし、ニトロフラゾンの代謝物である SEM はニトロフラゾンの使用の有無に係わらず、いくつかの食品から検出されることが判明し、分析対象から除外されています。そこで今回、三連四重極型質量分析計である Agilent6410 Triple Quadrupole LC-MS を用いた分析法について紹介します。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示しましたが、告示法通り移動相にはアセトニトリル及び 0.1%酢酸を用いました。試料にはうなぎ蒲焼を使用しましたが、前処理は告示法に準じて行いました。添加回収試験には試料に 0.3ng/g 相等の AOMOZ, AHD, AOZ 混合溶液及び回収率の補正にサロゲート物質として各ニトロフラン代謝物の安定同位体混合溶液を 5ng/g 相当添加しました。MS はイオン源に ESI を使用し正イオンモードで測定を行いました。各ニトロフラン代謝物の MRM 条件は Q3 スキャンによる質量スペクトルからプリカーサーイオンには全てプロトン化分子を選択しプロダク

トイオンスキャンにより表.1の通り2プロダクトイオン及びコリジョンエネルギーを最適化しました。また、プロダクトイオンは定量用と確認用に2イオンを選択しました。

表.1 ニトロフラン代謝物の分析条件

| | |
|---------------|--|
| LC | : 1200LC |
| Column | : ZORBAX Eclipse XDBC18(150mm, 2.1mm, 3.5µm) |
| Mobile phase | : A: ACN, B: 0.1%CH ₃ COOH 20%A---(15min)---80%A |
| Column temp | : 40°C |
| Sample volume | : 5µL |
| Flow rate | : 0.2 mL/min |
| MS | : Agilent 6410 Triple Quadrupole LC-MS |
| Ionization | : ESI(Positive) |
| Drying gas | : 10L/min at 350C |
| Nebulizer gas | : 345kPa |
| Fragmentor | : 100V |

| No | Name | Precursor | Product 1 | Product 2 | Collision 1 | Collision 2 | R.time |
|----|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------|
| 1 | NP-AMOZ | 335 | 291 | 262 | 6 | 12 | 2.99 |
| | NP-AMOZ-d5 | 340 | 296 | NA | 6 | NA | 2.99 |
| 2 | NP-AHE | 249 | 134 | 178 | 9 | 12 | 7.47 |
| | NP-AHE- ¹³ C3 | 252 | 134 | NA | 6 | NA | 7.47 |
| 3 | NP-AOZ | 236 | 134 | 104 | 9 | 12 | 8.66 |
| | NP-AOZ-d4 | 240 | 134 | NA | 6 | NA | 8.61 |

3. 結果

標準品 標準溶液は実試料同様に塩酸水溶液中で 2-NBA 誘導體化、ミニカラムによる抽出、精製により調製しました。この際、誘導體化、珪藻土カラムによる回収率の補正のため各ニトロフラン代謝物の安定同位体 (AMOZ-d5, AHD-¹³C3, AOZ-d4) をサロゲート物質とする内部標準法を使用しました。図.1 には各ニトロフラン代謝物 (0.3ppb) の NP 誘導體の MRM クロマトグラムを示しました。このクロマトグラムでの S/N 比は NP-AMOZ:176, NP-AHD:10, NP-AOZ:65 でした。内部標準法による検量線は図.2 に示しましたが、r² は全て 0.999 以上と良好でした。



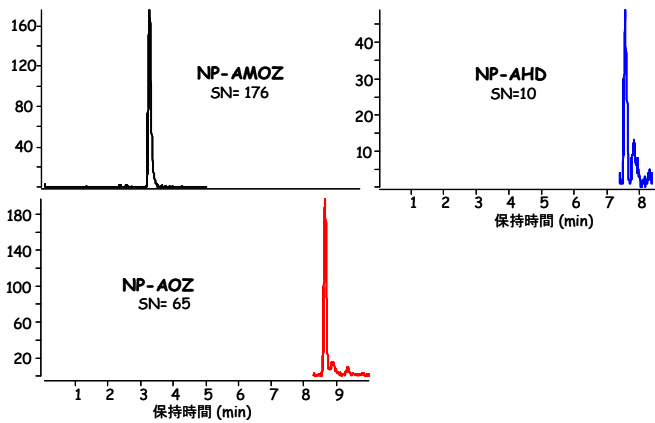


図.1 各ニトロフラン代謝物のMRMクロマトグラム (0.3ppb)

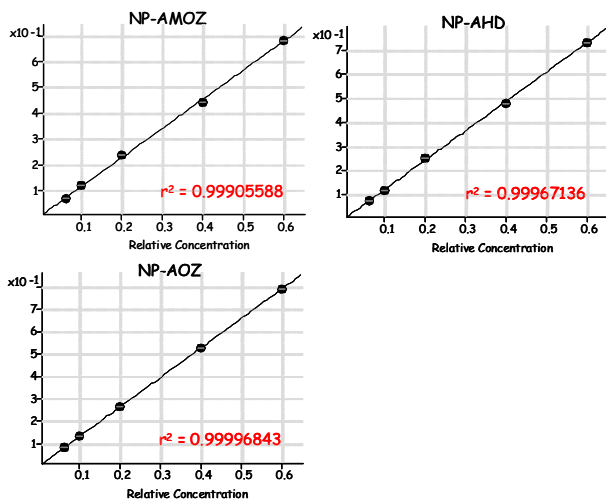


図.2 各ニトロフラン代謝物の検量線

うなぎ蒲焼 実試料にはうなぎ蒲焼を使用しました。試料前処理は告示法通りです。結果のMRMクロマトグラムは標準液と共に図.3に示しました。

標準液とうなぎ蒲焼抽出液での比較において、AMOZ及びAOZはうなぎ蒲焼抽出液中でも妨害ピークは全く観察されず強度も標準液と近い値でした。しかしAHDに関してはうなぎ蒲焼抽出液で妨害ピークが認められました。またうなぎ蒲焼抽出液で強度が標準液と比較して50%以下でした。原因はうなぎ抽出液中での誘導体化効率の低下や珪藻土カラムでの回収率の低下と考えられます。しかし今回、安定同位体をサロゲート物質とした内部標準法で定量を行ったので表.2の通り定量精度は全てのニトロフラン代謝物で95-105%と良好な結果でした。また確認用イオンの相対強度も全濃度標準液及びうなぎ蒲焼抽出液中で一定であり、プロダクトイオンを2イオン選択することでMRM法においてもその比率から確認に有効であることが実証されました。

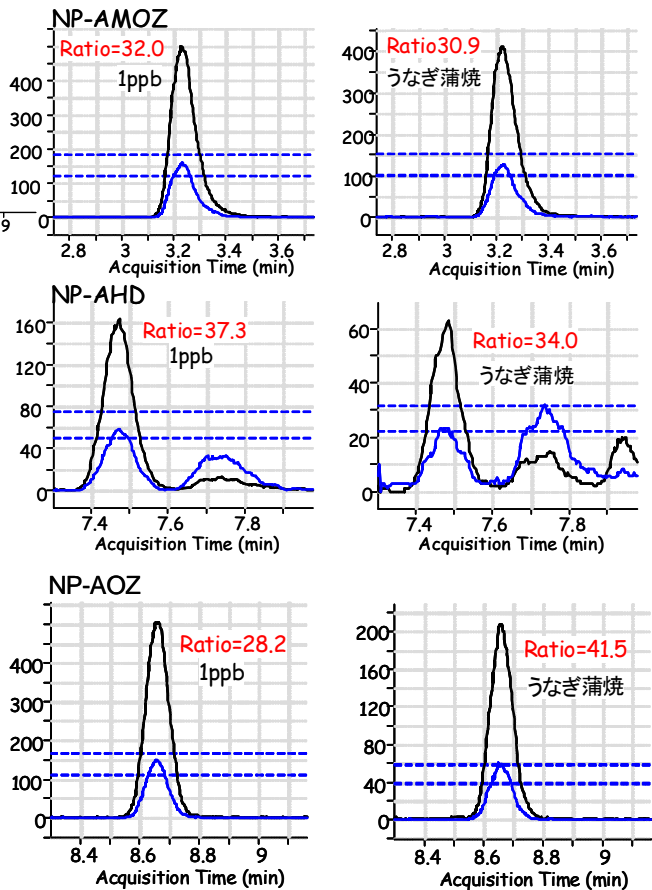


図.3 各ニトロフラン代謝物の定量、確認用MRMクロマトグラム

表.2 うなぎ蒲焼中ニトロフラン代謝物の定量結果

| | AMOZ | | | AHD | | | AOZ | | |
|---------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | Accuracy | Conc. | Ratio | Accuracy | Conc. | Ratio | Accuracy | Conc. | Ratio |
| STD0.3 | 95 | 0.28 | 31 | 101 | 0.30 | 31 | 103 | 0.31 | 28 |
| STD0.5 | 105 | 0.52 | 30 | 96 | 0.48 | 39 | 100 | 0.50 | 29 |
| STD1 | 104 | 1.04 | 32 | 103 | 1.03 | 37 | 100 | 1.00 | 28 |
| STD2 | 97 | 1.94 | 30 | 99 | 1.97 | 38 | 100 | 1.99 | 28 |
| STD3 | 101 | 3.02 | 31 | 100 | 3.01 | 38 | 100 | 3.00 | 28 |
| うなぎ蒲焼-1 | 103 | 1.03 | 31 | 105 | 1.05 | 34 | 102 | 1.02 | 29 |
| うなぎ蒲焼-1 | 100 | 1.00 | 31 | 98 | 0.98 | 37 | 104 | 1.04 | 28 |
| うなぎ蒲焼-1 | 104 | 1.04 | 30 | 95 | 0.95 | 43 | 105 | 1.05 | 29 |

添加量:2ppb

まとめ

今回、LC-MS/MSを用いた3種類のニトロフラン代謝物の分析法を紹介しましたが、告示法通りの試料前処理、分析条件を用いることで1ng/g?以下の高感度分析が可能であり、サロゲート物質を使用した内部標準法によりうなぎ蒲焼中の微量ニトロフラン代謝物を正確に測定することが可能でした。

【LCMS-200805TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies