

Application Note No. 720001951J

概要

フラゾリドン、フラルタドン、ニトロフラゾン、ニトロフラントインはニトロフラン系の抗生物質であり、EUでは食用の肉類への使用が禁止されています。「この4化合物は家畜の体内で直ちに代謝され、AOZ(3-アミノー2-オキサゾリドン)、AMOZ(3-アミノー5-モルフォリノメチルー2-オキサゾリドン)、SCA(セミカルバジド)、AHD(1-アミノヒドラントイン)となります。これらの代謝物は元の抗生物質よりも安定で検出感度が高いためこれらの抗生物質の検出のために利用されます。これらの代謝物はタンパク質への付加体として存在し、抽出の前の酸加水分解と誘導体化のメソッドが確立されています。21

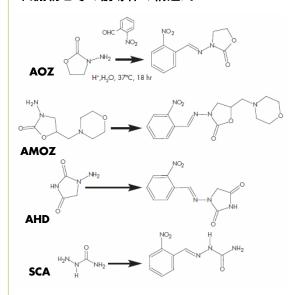
前報ではこれらの化合物に対し、インレットシステムとして Waters Alliance 2795とQuattro PremierTM XEを用いたメソッド開発を行い、鶏肉を実サンプルとして分析を行いました。³また、固相抽出による蜂蜜の前処理法の開発を行いました。⁴このアプリケーションノートではインレットとして ACQUITY UPLCTMシステムを使用し、分析時間の短縮と高感度化を目的として分析条件の移管を行った結果について説明します。

サンプルの準備

誘導体化された4代謝物と重水素化物である内部標準物質 の 2-NP-AMOZ-D₅、 2-NP-SCA- 13 C $_{1}^{15}$ N $_{2}$ 、 2-NP-AHD 13 C $_{3}$ をメタノール/水(20/80)に溶解し、8ng/mL(動物組織中の2ppbに相当)の原液を作製しました。この原液を希釈し、4、2、0.4、0.2ng/mL(1、0.5、0.1、0.05ppbの抽出液に相当 3)の溶液を調整しました。



代謝物とその誘導体の構造式



分析条件

Waters ACQUITY UPLCTM system

カラム: ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈

 2.1×100 mm , $1.7~\mu$ m

移動相: A) 水/メタノール(80/20)

+0.5mM 酢酸アンモニウム

B)水/メタノール(10/90)

|水/メタノール(10/90)

+0.5mM 酢酸アンモニウム

グラジェント: %A %B Curve

0 min 95 5 6 0.2min 95 5 6

2 min 50 50 6 2.02 min 0 100 6

3.12min 0 100 6

流速: 0.45 ml/min注入量: 50 μ l

Waters Quattro Premier™ XE タンデム四重極型質量分析計

イオン化: ESIポジティブ

キャピラリ電圧: 3kV エクストラクタ: 4V 0.5V RFレンズ: 120℃ ソース温度: 400°C 脱溶媒温度: 900L/hr 脱溶媒ガス: コーンガス: 201/hr コリジョンガス: 3.3 10⁻³mBar

ソフトウエア MassLynxTM + TargetLynxTM



表1.代謝物と内部標準化合物のMRMトランジッション

Metabolite	MRM Transition	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
2-NP-AOZ	236.1>103.9	30	22
	236.1>134.0		15
2-NP-AMOZ	335.5>100.0	32	26
	335.5>291.3		12
2-NP-SCA	209.1>166.0	24	8
	209.1>192.1		10
2-NP-AHD	249.5>133.9	30	11
	249.5>103.9		19
2-NP-AOZ-D4	240.1>134.4	30	13
2-NP-AMOZ-D ₅	340.2>296.4	30	12
2-NP-SCA- ¹³ C ₁ ¹⁵ N ₂	212.0>168.0	26	9
2-NP-AHD- ¹³ C ₃	252.1>133.9	30	12

誘導体化された代謝物と内部標準物質のMRMトランジッション、コーン電圧、コリジョンエネルギーを表1にまとめました。それぞれの化合物とその内部標準に対し、2つずつのMRMトランジションが示されています。これはEUノガイドラインに沿った手法です。51つ目のトランジションは同定のために使用され、2つ目のトランジションは確認の目的で使用されますこの分析条件ではデウエルタイム0.025秒が使用されており、このとき1ピークあたりのデータ数はおおよそ14ポイントとなります。

図1. TargetLynxTMウインドウ 誘導体化された代謝物のSN比

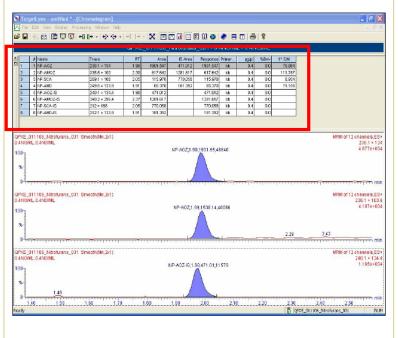


図1にACQUITYUPLCTMとQuattroPremierTMXEによる クロマトグラムと誘導体化された代謝物のSN比を示 します。サンプルの濃度は各0.4ng/mL(0.1ppbに相 当)です。

代謝物の誘導体 SN比 NP-AOZ 76.894 NP-AMOZ 111.757 NP-SCA 8.934 NP-AHD 71.158

この結果はMasslynxTMのアプリエーションマネージャーであるTargetlynxTMを使用して計算されました。この結果はEUのガイドラインに比べ約10倍高い感度となっています。



図2. UPLCTMクロマトグラム(0.4ng/mL)

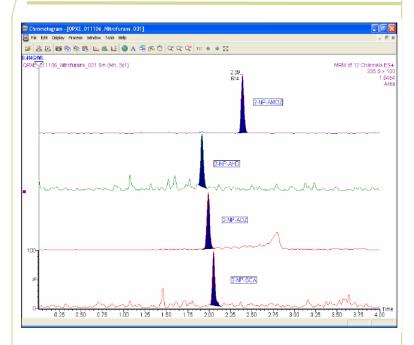
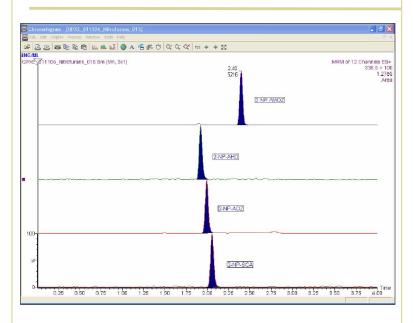


図2と図3にUPLC TM とQuattro Premier TM XEによるクロマトグラムを示します。1 サイクルの分析時間は4分となっています。

図3. UPLCTMクロマトグラム(4ng/mL)





まとめ

ニトロフラン系抗生物質であるフラゾリドン、フラルタドン、ニトロフラゾン、ニトロフラントインの各誘導体のHPLC分析条件をUPLCTM分析条件に移管することができました。ACQUITY UPLCTMとQuattro PremierTM XEタンデム四重極型質量分析計との組み合わせにより、分析時間の大幅な短縮と高感度化を同時に達成しました。この結果はEUで要求されている検出感度(MPRL)に比べ10倍高い感度となっています。

参考文献

- Commission Regulation (EC) 1442/95, Official J. European Communities, No. L143/26.
- 2. Analytica Chimica Acta, 483 (2003) 91-98.
- Determination of Nitrofuran Veterinary Drug Residues, Waters Application Note 720000847EN.
- LC/MS/MS Determination of Nitrofuran Metabolite Residues in Honey, Waters Application Note 720001034EN.
- Commission Directive 2002/657/EC, Off. J. of the European Communities No. L221/8.

Waters

大阪支社

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第 5 小池ビル

TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 カトキチ新大阪ビル 11F

TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡





