

Agilent6410 によるマラカイトグリーン及び ロイコマラカイトグリーンの高感度分析の紹介



要旨> 食品衛生法で養殖魚への使用が禁止されているマラカイトグリーン(MG)及びその代謝物であるロイコマラカイトグリーン(LMG)の配合飼料及び魚粉中での微量分析法として LC-MS/MS 法について検討しました。また、定量分析には飼料分析基準で指定されている重水素ラベル化安定同位体を用いた内部標準法を使用しました。その結果、配合飼料、魚粉中で妨害ピークの影響なく MG, LMG 共に 2ng/g での正確な定量が可能でした。

Key Words: マラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、魚粉、配合飼料、LC-MS/MS

1. はじめに

マラカイトグリーン(MG)は食品衛生法で養殖魚に使用が禁止されている有機色素抗菌剤です。平成 18 年 11 月から実施されたポジティブリスト制では『食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質』にロイコマラカイトグリーン(LMG)と共に指定されています。一方、家畜飼料においては中国産の魚粉から MG、LMG が検出されたことから輸入、国産魚粉及びこれを使用した飼料への MG 及び LMG の混入のモニタリングの実施のため、MG 及び LMG の分析法が開発され飼料分析基準に記載されています。飼料分析基準では安定同位体を用いた LC-MS/MS 法が指定されています。そこで Agilent6410 Triple Quadrupole LC-MS を用いた魚粉及び配合飼料中の MG 及び LMG の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、飼料分析基準通り移動相にはアセトニトリル及び酢酸、アンモニア混合水溶液を用いました。試料には魚粉及び配合飼料を使用しましたが、前処理は飼料分析基準に準じて行いました。添加回収試験には試料に 2ng/g 相等の MG、LMG 混合溶液及び回収率の補正にサロゲート物質として重水素でラベル化した MG-d5 及び LMG-d6 の混合溶液を 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、MRM 条件は表. 1 に示した通りです。

3. 結果

標準品 MG, LMG 及びその安定同位体のプリカーサーイオンをプロトン化分子としたプロダクトイオン scan による MS/MS スペクトルは図. 1 に示しました。その結果、プロダクトイオンには表. 1 の通り MG は m/z=313, 318、LMG は m/z=239, 240 を選択しました。

表. 1 MG, LMG の LC-MS/MS 条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Eclipse plus C18 (150mm,2.1mm,5 μ m)
Mobile phase	: A: 40mMNH ₃ +500mMHCOOH/water/ACN=10/81/9 B: 40mMNH ₃ +500mMHCOOH/water/ACN=10/9/81 30%B/1min—(7min)—100%B/10min
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 10uL
Flow rate	: 0.25mL/min
MS	: Agilent 6410 LC-MS
Ionization	: ESI (Positive)
Collision energy	: see next table(N ₂ gas)
Scan range	: m/z 100-450
Drying gas	: 10L/min at 350C
Nebulizer gas	: 50psi
Fragmentor	: 100V

	Precursor	Product	Collision
Malachite green	329	313	40
Malachite green-d5	334	318	40
Leucomalachite green	331	239	25
Leucomalachite green-d6	337	240	25

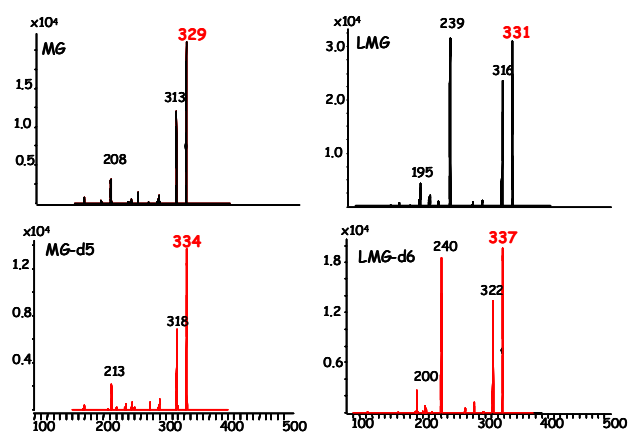


図. 1 MG, LMG 及び各安定同位体の MS/MS スペクトル

表. 1 の条件で測定した MG 及び LMG の MRM クロマトグラムは図. 2 に示しましたが、濃度は MG, LMG が 0.5ng/mL で安定同位体は 5ng/mL です。この結果から標準品においては 0.1ppb 以下での測定が可能であるとわかりました。直線性に関しては図. 3 に安定同位体を用いた検量線を示しましたが、



決定係数は 0.999 以上と良好な結果でした。

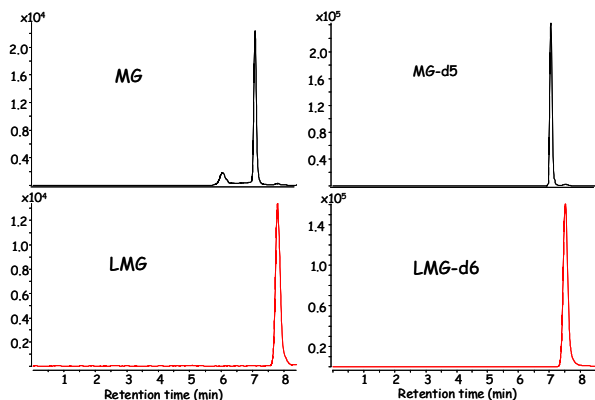


図. 2 MG, LMG 及び各安定同位体の MRM クロマトグラム (濃度 MG, LMG:0.5ppb, MG-d5, LMG-d6:5ppb)

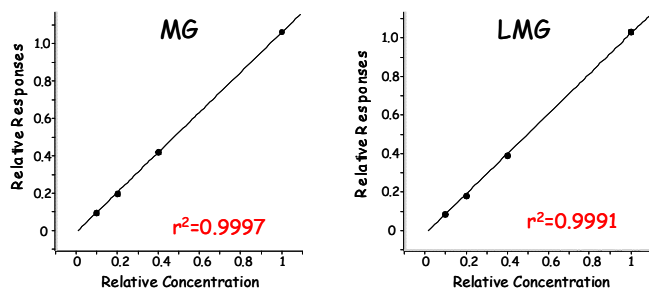


図. 3 MG, LMG の検量線 (濃度:5-0.5ng/mL, I. S:5ng/mL)

魚粉、配合飼料 魚粉及び配合飼料は飼料分析基準に従いアセトニトリル抽出及び強陽イオン交換樹脂 (SCX) のミニカラムによる前処理を行いました。結果のクロマトグラムは図. 4 に示しましたが、試料由来の妨害ピークは全く観察されず、MG, LMG 共に良好な結果が得られました。試料マトリックスによるイオン化抑制に関しても、SCX による精製によりイオン化効率の顕著な低下は認められませんでした。

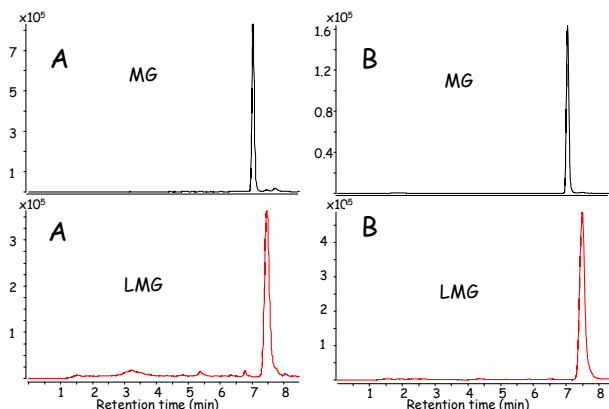


図. 4 魚粉 (A) 及び配合飼料 (B) 中 LG, LMG の MRM クロマトグラム (添加濃度:2ng/g)

図. 5 には魚粉中 LG, LMG の n=5 での繰り返し再現性の MRM クロマトグラムを示しましたが、表. 2 に示した通り相対標準偏差は 2.13%と 2.11%と良好でした。また、図. 4 の魚粉、配合飼料中 LG と LMG の定量結果も表. 2 に示しましたが、配合飼料中に若干 LMG は存在していたことから、添加回収率は 100%を超えましたが、その他は 85%以上と良好な結果でした。

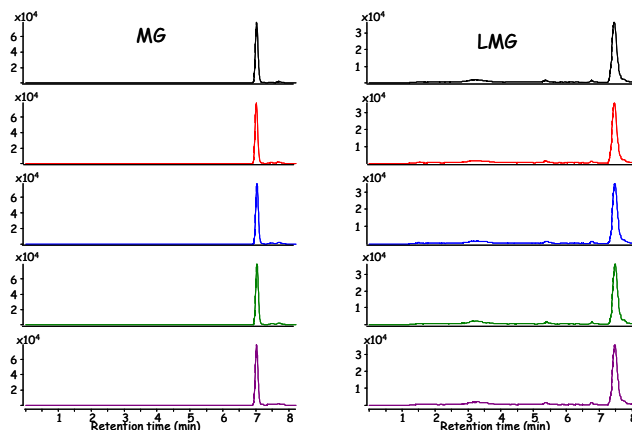


図. 5 魚粉中 LG, LMG の MRM クロマトグラム (n=5)

表. 2 魚粉、配合飼料中 LG, LMG の定量結果 (ng/g)

Name	MG		LMG	
	Area	Conc.	Area	Conc.
Fish meal	169650	1.73	132163.8	1.76
Feed	380850	1.96	285873	2.56
Fish meal-1	169650	1.73	132163.8	1.76
Fish meal-2	160534.6	1.73	131180.3	1.67
Fish meal-3	165886.4	1.78	125435.9	1.63
Fish meal-4	167816.8	1.75	130286.7	1.75
Fish meal-5	163892.7	1.74	131825.8	1.69
Average	165556	1.75	130179	1.70
STDEV	3534.219	0.020	2746.048	0.055
RSD	2.13	1.16	2.11	3.23

まとめ

今回、LC-MS/MS を用いたマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの分析法を紹介しましたが、飼料分析基準通りの試料前処理、分析条件を用いることで 2ng/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魚粉及び配合飼料中の微量マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを正確に測定することが可能でした。

[LCMS-200807TK-003]

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