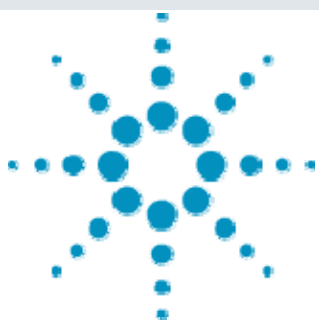




Agilent 6410 による養殖うなぎ中 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン の高感度分析の紹介



＜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)の養殖うなぎ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、定量分析にはサロゲート物質にマラカイトグリーン-d₅ 及びロイコマラカイトグリーン-d₆ を用いた内部標準法を使用しました。その結果、養殖うなぎ中で妨害ピークの影響なく MG, LMG 共に 0.002ppm 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、養殖うなぎ、LC-MS/MS

1. はじめに

マラカイトグリーン(MG)はトリフェニルメタン系合成抗菌剤であり観賞魚用の水かび病治療薬として使用されています。しかし養殖うなぎ等の養殖魚では使用が禁止されており、平成 18 年厚生労働省告示第 377 号により食品衛生法第 11 条第 1 項の規定に基づき食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質として規定するとともに、マラカイトグリーン試験法を定め、その対象物質をマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン(LMG)としています。また、検出限界は両化合物共に 0.002ppm と設定されています。この試験方法では LC-MS 法が指定されていますが、今回 Agilent6410 Triple Quadrupole LC-MS を用いた養殖うなぎ中の MG 及び LMG の分析法について紹介します。また、LMG は養殖うなぎ中でイオン化阻害が大きく定量値が低下することからサロゲート物質として MG-d₅ 及び LMG-d₆ を使用しました。

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 10mM ギ酸アンモニウム水溶液を用いました。試料には養殖うなぎを使用しましたが、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 0.002ppm 相等の MG 及び 0.004ppm 相当の LMG を添加し、回収率の補正用サロゲート物質には重水素でラベル化した MG-d₅ 及び LMG-d₆ を各々 0.005ppm 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 既に飼料中の MG, LMG で報告している様にプリカーサーイオンは MG, LMG 共にプロトン化分子であり、プロダクトイオンは強度の強い 2 イオンを選

択しました。その結果、プロダクトイオンには表.1 の通り MG は m/z=313, 208、LMG は m/z=239, 316 を選択しました。

表.1 MG, LMG の LC-MS/MS 条件

LC	: 1200LC
Column	: L-Column 2(150mm, 2mm, 3 µm)
Mobile phase	: A: 10mMCH ₃ COONH ₄ , B: ACN 10%B---(20min)---100%B/10min
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 2µL
Flow rate	: 0.35mL/min
MS	: Agilent 6410 Triple quadrupole LC-MS
Ionization	: ESI (Positive)
Drying gas	: 10L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

No		Precurser	Target	Qualifier	CE1	CE2	R.time
1	Malachite green	329	313	208	40	40	10.51
2	Malachite green-d ₅	334	318	213	40	40	10.47
3	Leucomalachite green	331	239	316	30	20	17.85
4	Leucomalachite green-d ₆	337	240	322	30	20	17.76

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。

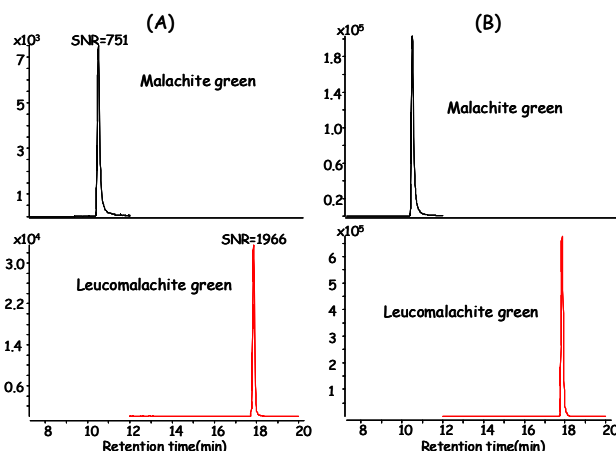


図.2 MG, LMG の MRM クロマトグラム

(A) : MG:0.01ppm, LMG:0.02ppm

(B) : MG:0.2ppm, LMG:0.4ppm



Agilent Technologies

この結果から標準品においては 0.001ppm 以下の測定が可能であることがわかりまし。

直線性に関しては図. 3 に安定同位体を内部標準とし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。

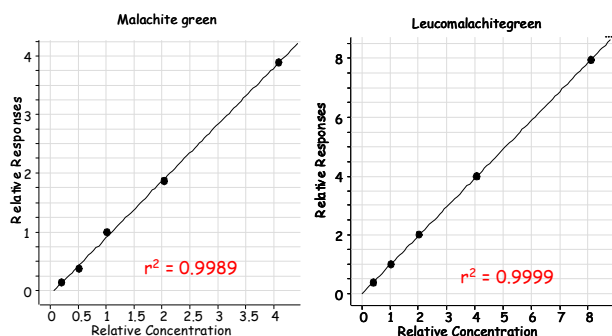


図. 3 MG, LMG の検量線 (濃度: MG: 0.01–0.2ppm, LMG: 0.02–0.4ppm、I.S.: 0.05ppm)

養殖うなぎ MG 及び LMG を 0.01ppm 及び 0.02ppm 添加した養殖うなぎは告示法に従いアセトニトリル抽出、ヘキサン/アセトニトリル分配による脂質の除去、脱水後、強陽イオン交換樹脂 (SCX) のミニカラムによる精製を行い、併行試験として n=5 で実施しました。結果のクロマトグラムは図. 4 に示しました通り、試料由来の妨害ピークは全く観察されず、MG, LMG 共に S/N 比>500 の結果が得られました。また、試料マトリックスによるイオン化阻害に関しては、無添加養殖うなぎ抽出液に MG, LMG を 0.05 及び 0.1ppm 相当添加した試料の測定結果と比較することで確認しましたが MG, LMG の強度の低下は 20%以下でした。

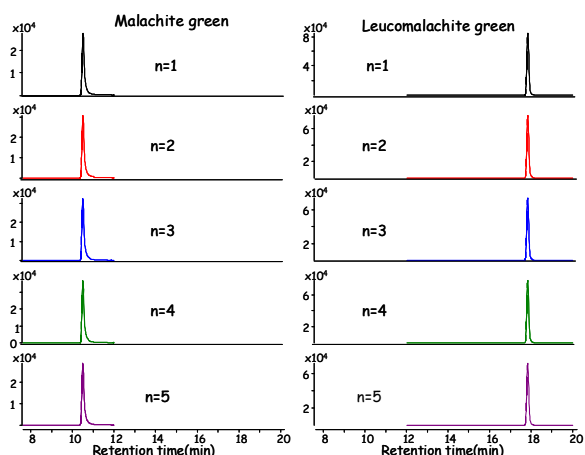


図. 4 養殖うなぎ中 LG, LMG の MRM クロマトグラム (添加濃度 MG: 0.01ppm, LMG: 0.02ppm)

表. 2 には MG, LMG の検量線用標準液及び MG, LMG 添加養殖うなぎの n=5 での併行試験の結果を示しました。その結果サロゲート物質で補正した MG, LMG の回収率は平均で 90 及び 98%と非常に良好でした。また再現性は相対標準偏差で 2.22 及び 1.12%と良好でした。しかし、各サロゲート物質の回収率は平均で 76 及び 45%と低い値でした。イオン化阻害が 20%以下で

あったことからサロゲート物質の回収率の低下は試料前処理によるものと考えられます。

表. 2 魚粉、配合飼料中 LG, LMG の定量結果 (ng/g)

Name	Malachite green Results						I.S	
	Area	Calc. Conc.	Accuracy	Final Conc.	Ratio	Area	Area	Recovery
MG:0.01, LMG:0.02	65949	0.011	106	0.011	32	482384		
MG:0.025, LMG:0.05	174747	0.023	89	0.023	30	472933		
MG:0.05, LMG:0.1	405436	0.055	108	0.055	31	408469		
MG:0.1, LMG:0.2	828752	0.100	98	0.100	31	444184		
MG:0.2, LMG:0.4	1797608	0.204	100	0.204	31	461741		
P1[eel]	243177	0.044	87	0.009	30	307484	69	
P2[eel]	271525	0.047	93	0.009	31	321340	72	
P3[eel]	282747	0.046	91	0.009	30	342610	77	
P4[eel]	321233	0.046	90	0.009	31	392769	88	
P5[eel]	253946	0.046	89	0.009	31	312871	70	
Average	274526	0.046	90	0.009	31	335415	76	
STDEV	30267.501	0.001017	1.99487	0.000203	0.57	34741.1	7.82132	
RSD	11.03	2.22	2.22	2.22	1.87	10.36	10.36	

Name	Leucomalachite green Results						I.S	
	Area	Calc. Conc.	Accuracy	Final Conc.	Ratio	Area	Area	Recovery
MG:0.01, LMG:0.02	236375	0.019	95	0.019	39	624221		
MG:0.025, LMG:0.05	625389	0.050	99	0.050	40	631444		
MG:0.05, LMG:0.1	1263410	0.102	101	0.102	40	631835		
MG:0.1, LMG:0.2	2494625	0.203	101	0.203	41	623962		
MG:0.2, LMG:0.4	4919702	0.404	100	0.404	41	619610		
P1[eel]	596436	0.099	98	0.020	40	307174	49	
P2[eel]	536109	0.099	98	0.020	40	274869	44	
P3[eel]	521045	0.098	97	0.020	40	270173	43	
P4[eel]	550128	0.099	98	0.020	40	283244	45	
P5[eel]	512749	0.101	100	0.020	40	258156	41	
Average	543293	0.099	98	0.020	40	278723	45	
STDEV	32978.675	0.001109	1.09838	0.000222	0.49	18308.9	2.9343	
RSD	6.07	1.12	1.12	1.12	1.22	6.57	6.57	

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、MG-d₅ 及び LMG-d₆ をサロゲート物質に使用しましたが告示法通りの試料前処理、分析条件により MG で 0.01ppm, LMG で 0.02ppm 以下の高感度分析が可能であり、サロゲート物質による補正により養殖うなぎ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-200902TK-002】

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