

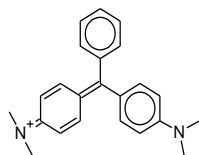
# マラカイトグリーン

(全自動固相抽出装置ST-L300)

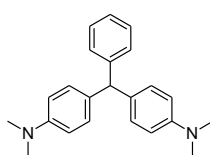
## はじめに

マラカイトグリーンは水カビなどの治療薬として観賞魚に用いられていますが、食用養殖魚への使用は禁止されています。マラカイトグリーンは光分解性があり、分析には迅速性が求められます。本アプリケーションでうなぎ蒲焼を用いてマラカイトグリーンとその代謝物であるロイコマラカイトグリーンの迅速分析法を検討しました。

マラカイトグリーン

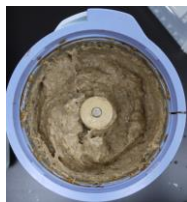


ロイコマラカイトグリーン



## 実験方法

- 粉砕方法：常温粉砕（ミル使用）
- 添加濃度（試料中）：0.002 ppm
- 最終バイアル中濃度：2ppb
- 標準溶液：和光純薬製  
マラカイトグリーンシユウ酸塩標準品  
ロイコマラカイトグリーン標準品
- 検量線：1点：2ppb（絶対検量線）
- 検量線希釈溶媒：28%アンモニア水-アセトニトリル(1/9)



ミルで粉砕後の試料

## 前処理フロー

- 試料 10g 採取
  - 0.5ppm混合標準溶液 40μL
  - クエン酸・リン酸Buffer(pH3) 4mL
  - アセトニトリル 10mL
- ホモジナイズ(13,000rpm 1分間)
  - 塩化ナトリウム 1g
  - 無水硫酸マグネシウム 4g
- 攪拌（手で振とう 1分間）
- 遠心分離（3,000rpm 5分間）
- 冷凍（1時間）
- アセトニトリル層(抽出液)



全自動固相抽出装置 ST-L300



STQ法前処理キット



SCX

C18-30

負荷 [通液] 抽出液 1mL

Smart-SPE C18-30mg / SCX-30mg : 保持

— 洗浄 アセトニトリル 1mL

C18-30を取り外す

Smart-SPE SCX-30mg

— 溶出 28%アンモニア水-アセトニトリル(1/9) 1mL

定容 1mL（水で調整）

LC-MS/MS(注入量10μL 試料10mg相当)



全自動固相抽出装置  
ST-L300  
For STQ Method

## Sample



## Information

水分：50.5%  
脂質：21%  
脂肪酸：18.6%  
たんぱく質：23%

付属のタレを除きミルで粉砕

## Key word

動物用医薬品  
STQ法  
自動前処理  
固相抽出

AiSTI SCIENCE

## Product

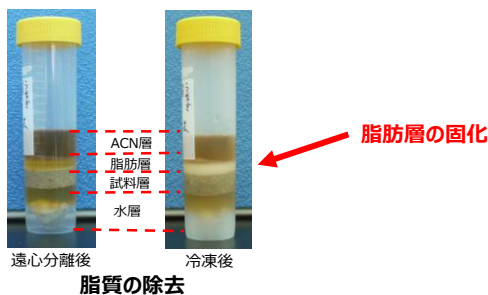
ST-L300  
Smart-SPE C18-50  
Smart-SPE C18-30  
Smart-SPE PSA-30  
STQ法前処理キット

株式会社アイスティサイエンス  
www.aisti.co.jp

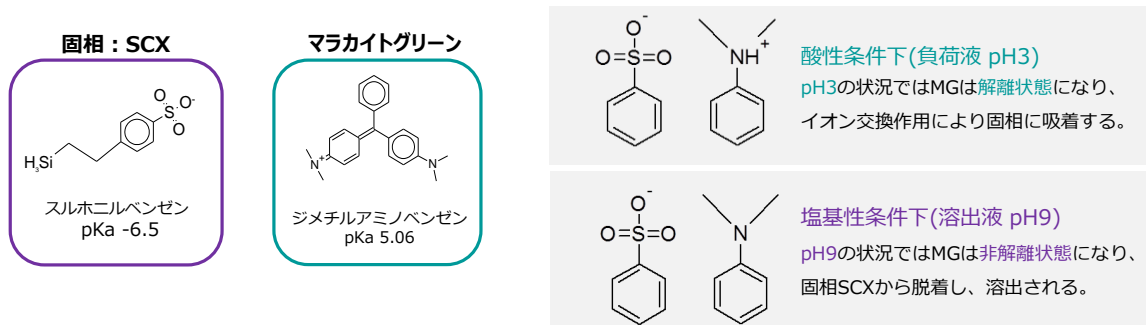
お問い合わせ先  
TEL. 073-475-0033  
E-Mail; as@aisti.co.jp

## 前処理ポイント

うなぎ蒲焼は脂質を多く含みますが液液分配と冷凍による脂肪層の固化により概ね除去することができました。  
(冷凍時間：約1時間)



トリグリセリドやコレステロールを含む無極性夾雑成分はC18に保持させることで除去しました。中極性夾雑物と脂肪酸は固相をスルーさせることで除去しました。マラカイトグリーンは酸性条件下(pH3)で負荷することでSCXに保持させ、その後アルカリ条件下(pH9)でSCXから溶出しました。



マラカイトグリーンのSCXへの保持の原理

## 測定条件

【装置】

LC：Prominence(島津製作所) MS/MS：API3200 system(AB SCIEX)

【LC条件】

分析カラム：Atlantis T3 3 $\mu$ m 2.1 $\times$ 150mm Column  
 移動相 A液：0.1%ギ酸水  
 B液：アセトニトリル  
 流速：0.2ml/min  
 グラジエント：B.Conc 5%(0-3min) $\rightarrow$ 95%(10-15min) $\rightarrow$ 5%(15-20min)  
 注入量：10  $\mu$ L  
 カラム温度：40  $^{\circ}$ C  
 分析時間：20分

【MS条件】

イオン化モード：ESI positive  
 イオンブレイ電圧：5500V  
 イオンソース温度：350 $^{\circ}$ C  
 測定モード：MRM

## 結果

うなぎ蒲焼添加回収試験結果

(n=5)

	手動法		自動化法	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
マラカイトグリーン	103	6.4	98.1	4.9
ロイコマラカイトグリーン	82	8.0	88.7	11.4

添加回収率はn=5の平均値

## まとめ

冷凍による固化で脂肪層の多くを除去することができました。今回の試料では測定に夾雑成分の影響は見られず、マラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーンともに良好な回収率と再現性が得られました。イオン化阻害等測定時に夾雑成分の影響が見られる場合は内部標準物質による補正をご検討下さい。

## 参考文献

小西賢治、栢木春奈、佐々野僚一：  
 LC/MS/MSを用いた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迅速分析法の検討、第103回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集、p.45