

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

○小西賢治、栢木春奈、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

【目的】現在マラカイトグリーン（以下 MG）は水カビなどの治療薬として鑑賞魚に用いられるが、食用の養殖魚への使用は禁止されている。また、MG は光分解性があり、迅速な分析法が求められている。そこで、MG 及びその代謝物であるロイコマラカイトグリーン（以下 LMG）の迅速分析法を検討したのでここに報告する。

【方法】1. 試料:ウナギ蒲焼, 2. 対象成分:MG, LMG, 使用試薬: マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品、ロイコマラカイトグリーン標準品（和光純薬社製）、添加濃度:試料中濃度0.1ppm, 4. 固相カートリッジ:Smart-SPE C18-30,SCX-30（アイスティサイエンス社製）

試料 10g
|
| クエン酸・リン酸Buffer(pH 3) 4mL
| ACN 10mL
ホモジナイズ
|
| 食塩 1g
| 無水硫酸マグネシウム 4g
| 攪拌（手で振とう, 1分）
| 遠心分離(5分, 3000rpm)
| 冷凍(30分)
| ACN層
| 分取 1mL(試料1g相当)
| 固相 C18-30mg(精製)
| 洗液 ACN 0.5mL
| 固相 SCX-30mg(保持)
| 洗液 ACN 0.9mL
| 溶出 アンモニア/ACN
| (1/9) 1mL
溶出液
| 水で1mLに定容
LC/MS/MS

4. 測定条件

装置	LC:Prominence (SHIMADZU) MS:API3200 (AB SCIEX)
カラム	Atlantis(粒径3 μ m, ϕ 2.1 \times 150mm) (Waters)
移動相	A液 0.1%ギ酸水 B液 アセトニトリル
分析時間	20分(Pos+)
流速	0.2mL/min, 注入量 5 μ L
イオン化モード	ESI(+)
測定モード	MRM

【結果と考察】

1. 抽出操作の簡便化

抽出は告示法を参考に、アセトニトリル及びクエン酸・リン酸緩衝液を用いた。抽出操作の簡便化を目的として、塩析及び遠心分離による液液分配を行なった結果、アセトニトリル層と試料層の間に脂肪層ができた。30分冷凍することで、脂肪層を固化させ、n-ヘキサンを使用せずに抽出と同時に脱脂することができた。

2. 少量の固相による精製

抽出液中に含まれる脂質や低極性物質を取り除く目的で固相C18による精製を行なった。また、固相SCXの少量化にともない少量の溶媒での溶出が可能となり、溶出液の減圧濃縮操作が不要となったため操作性が向上した。操作時間も短く、非常に簡便であった。

3. 添加回収試験

うなぎの蒲焼を用いて添加回収試験を行った結果、MGは80%以上と良好な回収率が得られ、LMGは50%以上やや低めの回収率となった。

参考文献

1)厚生労働省通知職安鑑発第1013003号：食品中のマラカイトグリーンの試験法等について、平成18年10月13日



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

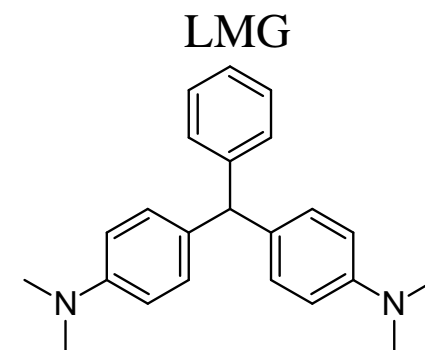
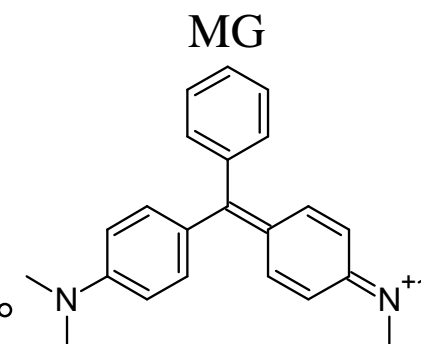
株式会社アイスティサイエンス
○小西賢治 栢木春奈 佐々野僚一

AiSTI SCIENCE

対象成分 マラカイトグリーンとは

マラカイトグリーン(以下MG)は水カビなどの治療薬として観賞魚に用いられるが、食用の養殖魚への使用は禁止されている。

- ・ MGは光分解性があり、迅速な分析法が求められている。
- ・ 酸化還元反応により、
MG \leftrightarrow ロイコマラカイトグリーン(以下LMG)の代謝が起こるとされている。
- ・ MGは食品衛生法の規格基準で不検出であり、
定量限界はMG・LMGともに**0.002ppm**(=2ppb)とされている。
- ・ 2005年8月に中国産のウナギから検出され、
そのほか輸入養殖魚からも検出が相次いだ。



告示法 前処理フロー

試料 5g
 |
 リン酸・クエン酸Buffer(pH 3)

ホモジナイズ
 |
 ACN 15mL

振とう 5min
 遠心分離 5min 3000rpm

ACN-水/残留物
 |
 ACN 15mL
 振とう 5min
 遠心分離 5min 3000rpm

ACN-水/残留物
 |
 n-ヘキサン 5mL
 ACN-水/n-ヘキサン

n-ヘキサン 5mL
 ACN-水/n-ヘキサン

20% NaCl水 50mL
 CH₂Cl₂ 10mL

ACN-CH₂Cl₂/水
 |
 Na₂SO₄ 適量

ろ過

SCX-500mg
 |
 洗液 ACN 5mL
 溶出 NH₃水/ACN(1/9) 10mL

濃縮・乾固

転溶 ACN 1mL

LC-MS/MS測定

検討項目

告示法によるマラカイトグリーンの分析は抽出工程が多く煩雑なため、抽出・前処理の簡略化を検討した。

前処理法の評価を行うために安定同位体を用いずに検討を行った。

検討① 抽出操作の簡便化

塩析と遠心分離により、液液分配と脱脂の効果が得られた。

検討② 固相ミニカラムによる精製効果の検討

脂質や低極性成分を除去するためにC18を使用した。

強陽イオン交換カラムSCXによる目的成分の溶出条件を検討した。

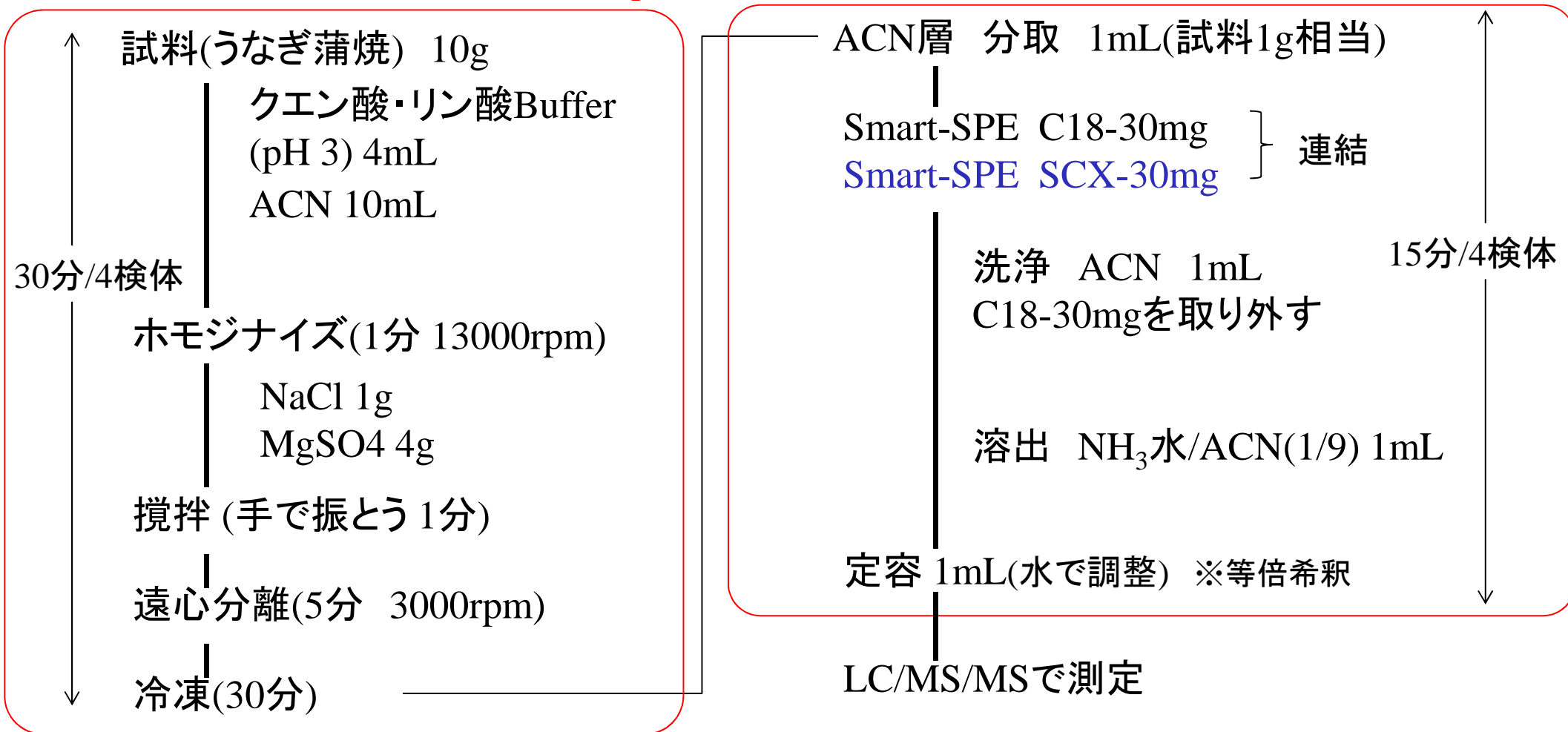
検討③ 全自動固相抽出装置による自動化

手分析に加えて全自動固相抽出装置ST-L300による添加回収試験を行った。

前処理フロー

検討①

検討②



検討① 抽出操作の簡便化

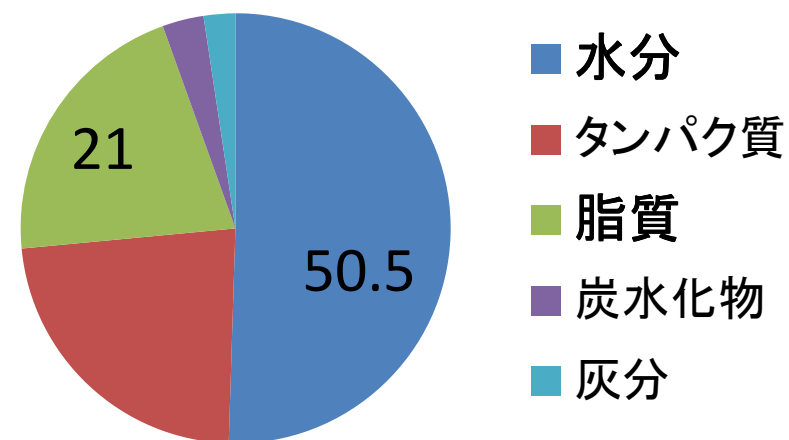
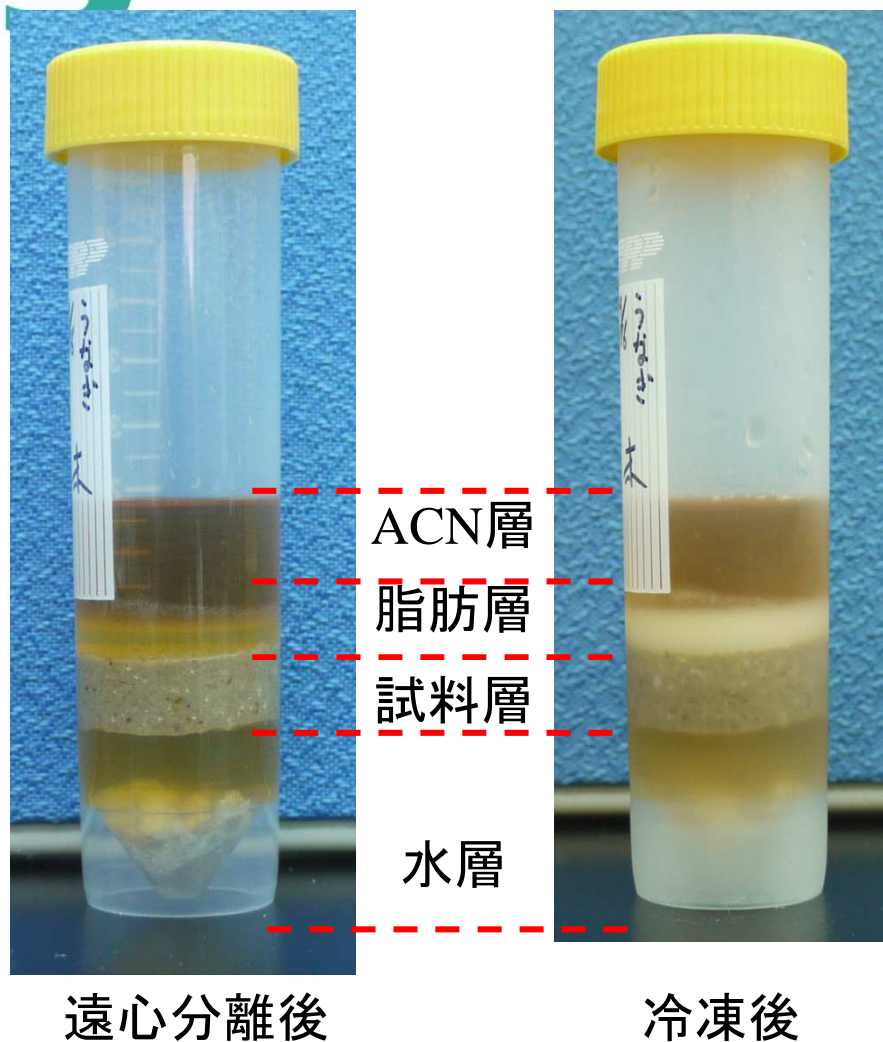


表. うなぎ蒲焼中成分表

塩析・遠心分離により液液分配を行ない、冷凍庫で脂肪層を固化させて脱脂効果も得られた。

検討② SCXミニカラムからの溶出条件の検討

ACN 1mL

Smart-SPE SCX-30mg

洗浄 ACN 1mL

溶出

- | | | |
|---|-----------------------------|------------|
| ① | NH ₃ 水/ACN(1/9) | 1mL (pH 9) |
| ② | NH ₃ 水/MeOH(1/9) | 1mL (pH 9) |
| ③ | 0.2%HCOOH/MeOH | 1mL (pH 2) |

定容 1mL(水で調整)

LC/MS/MSで測定

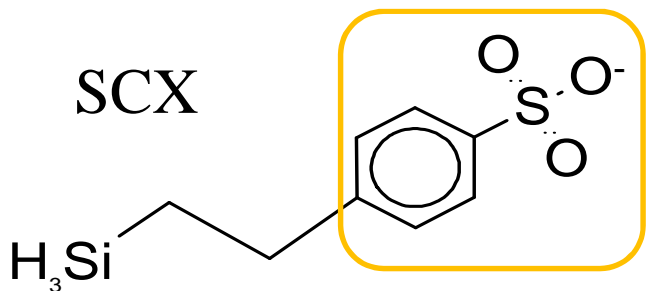
※ACNにMGを添加して
添加回収試験を行った。

①② **塩基性**条件下で
MGを非解離状態にして
SCXから溶出する。

③ **酸性**条件下で
SCXを非解離状態にして
MGを溶出する。

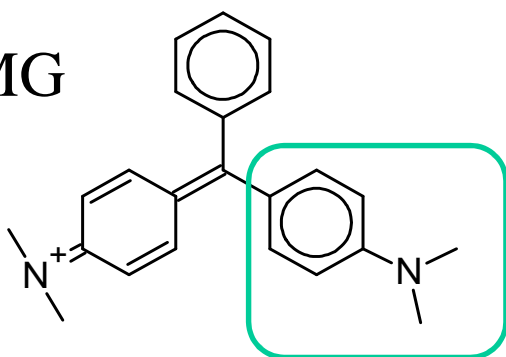
SCXによる保持のメカニズム

SCX



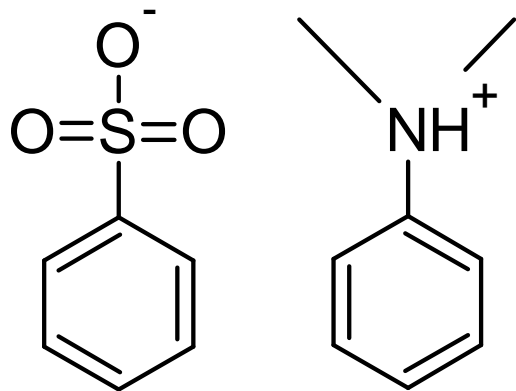
スルホンルベンゼン pKa -6.5

MG

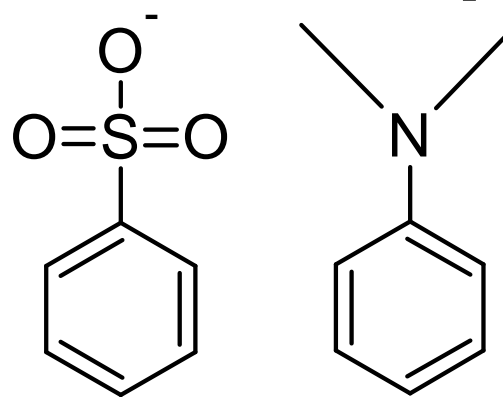


ジメチルアミノベンゼン pKa 5.06

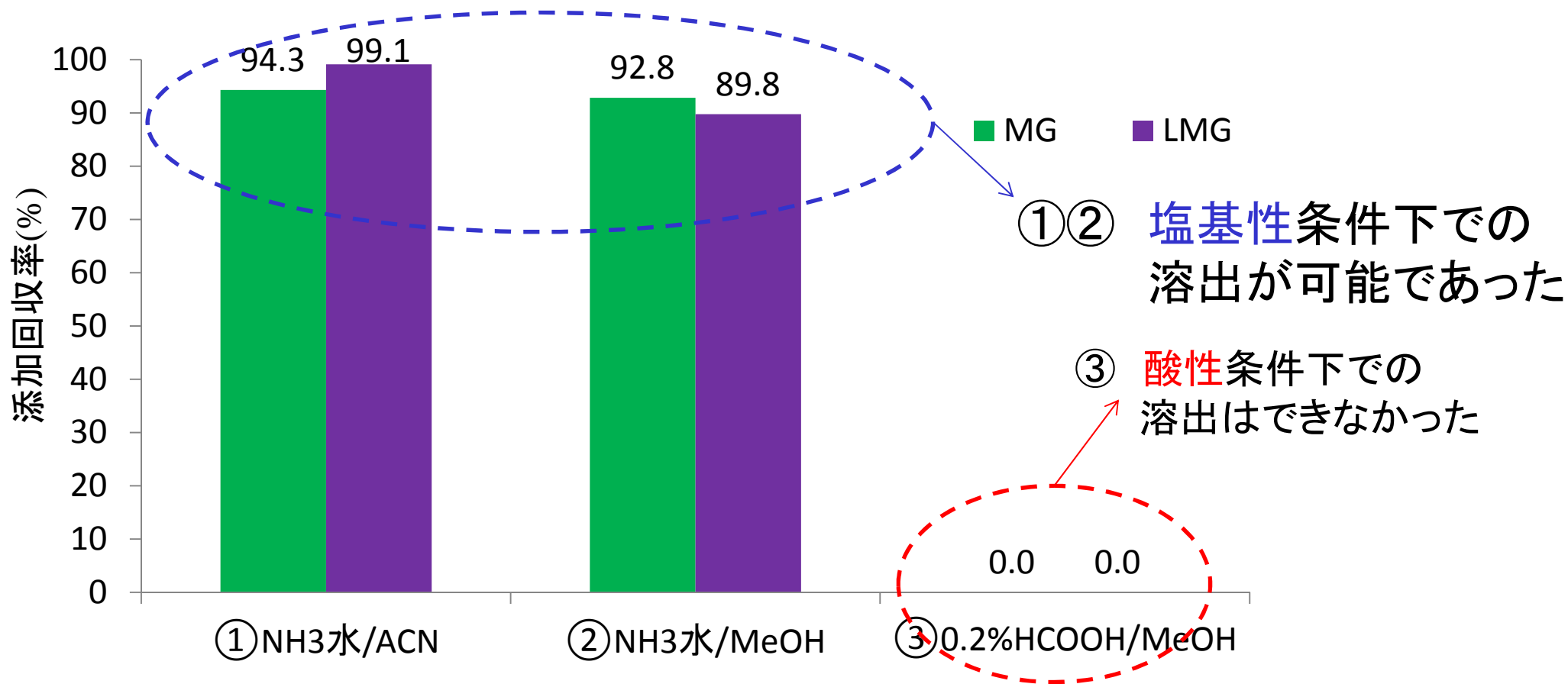
酸性条件下(抽出液 pH3)



塩基性条件下(測定液 pH9)

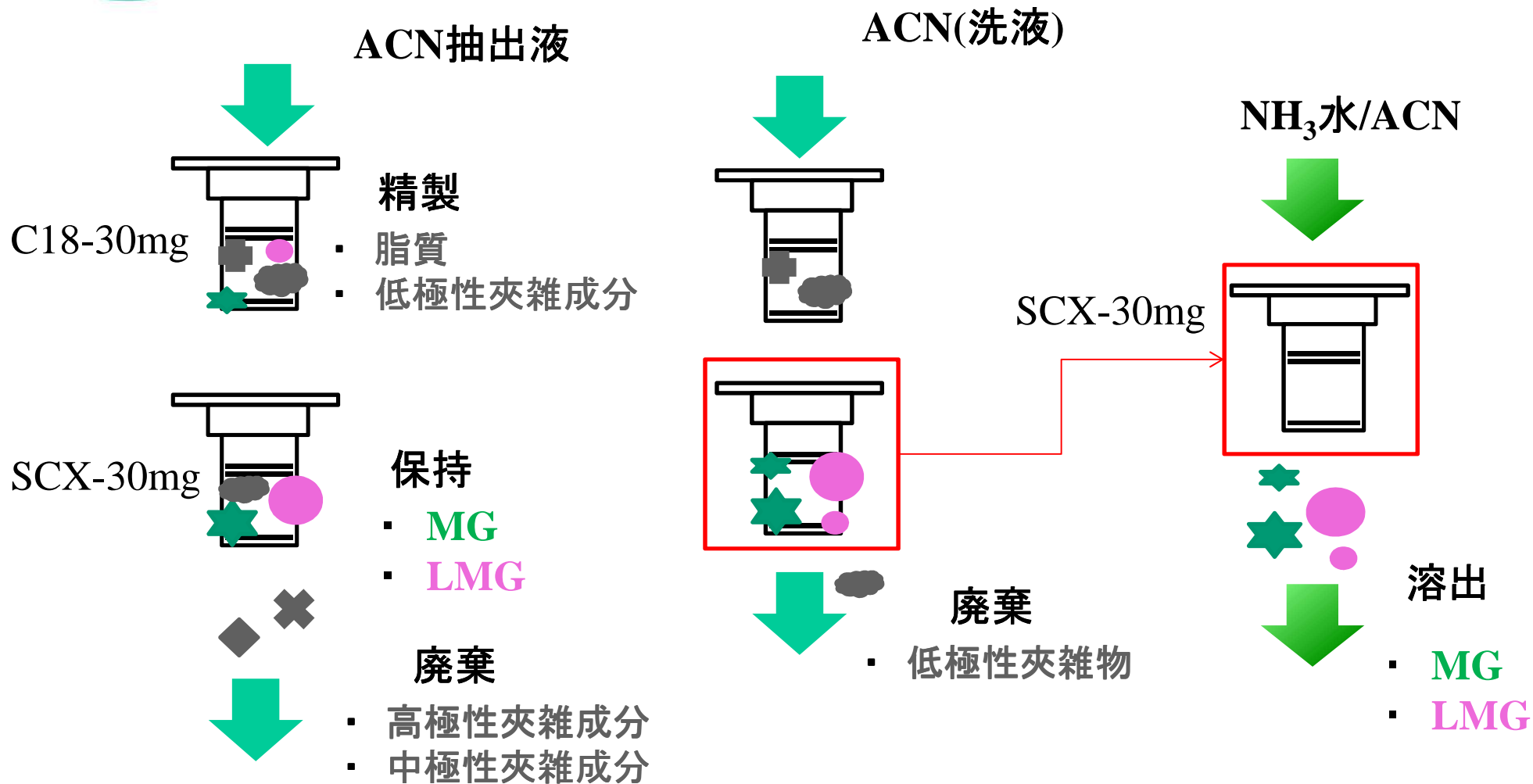


検討② SCXミニカラムからの溶出条件の検討



濃度 0.1ppm/ACN (n=1)

精製イメージ



全自動固相抽出装置 ST-L300を用いた添加回収試験

自動化 7分/検体



抽出液分取 1mL(試料1g相当)

Smart-SPE C18-30mg

Smart-SPE SCX-30mg

洗浄 ACN 2mL

C18-30mgを取り外す

溶出 NH_3 水/ACN (1/9) 1mL

定容 1mL (水で調整)

LC/MS/MSで測定

LC-MS/MS測定条件

装置	LC: Prominence(SIMADZU) MS/MS: API3200 system(AB SCIEX)
分析カラム	Atlantis T3 3 μ m 2.1 \times 150mm Column
移動相	A: 0.1%ギ酸水 B: アセトニトリル
グラジエント条件	B conc.(%) 5%(0-3min) \rightarrow 95%(3-10min) \rightarrow 95%(10-15min) \rightarrow 5%(15-20min)
分析時間	20min(Positive)
流速	0.2ml/min
注入量	10 μ L
イオン化モード	ESI Positive
イオンスプレー電圧	5500V(Pos)
イオンソース温度	350 $^{\circ}$ C
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring) Q3 SCAN (m/z: 60-500)

添加回収試験の結果(うなぎ蒲焼 n=5)

手分析 試料中100ppb	添加①	添加②	添加③	添加④	添加⑤	平均 回収率	<i>RSD</i>	前処理後 添加回収率
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MG	93.0	94.2	95.3	79.5	86.6	89.7	7.4	–
LMG	73.5	76.2	78.8	68.9	69.1	73.3	5.9	–

手分析 試料中 2ppb	添加①	添加②	添加③	添加④	添加⑤	平均 回収率	<i>RSD</i>	前処理後 添加回収率
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MG	101.0	113.5	101.5	95.5	102.0	102.7	6.4	100.0
LMG	89.0	79.0	88.0	75.5	76.0	81.5	8.0	109.0

自動化装置 試料中2ppb	添加①	添加②	添加③	添加④	添加⑤	平均 回収率	<i>RSD</i>	前処理後 添加回収率
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MG	102.5	103.0	92.5	98.5	94.0	98.1	4.9	107.0
LMG	83.0	80.5	103.5	95.0	81.5	88.7	11.4	113.0

まとめ

LC/MS/MSを用いてうなぎ中のMG及び、LMGの迅速分析法を検討した。

- 塩析、遠心分離による液液分配を行なった結果、n-ヘキサン、ジクロロメタンを用いず脱脂、脱水を行なうことができた。
- 固相の少量化に伴い、使用溶媒、及び最終検液も少量化することに成功した。エバポレーターによる減圧濃縮の必要がなくなり、操作の簡略化に成功した。
- 抽出から定容まで4検体あたり15分で前処理を行うことができ、非常に簡便であった。
- 添加回収試験を行なった結果、告示法にある定量限界2ppbでMG≒100(%)、LMG>80(%)と良好な回収率と再現性を得ることができた。