

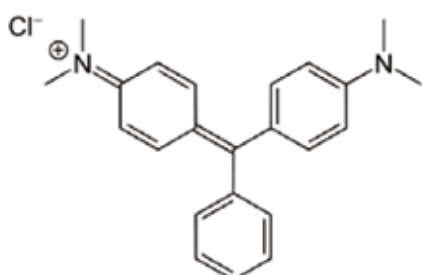
LC-MS/MS分析サンプル前処理

鮭に含まれるマラカイトグリーン、クリスタルバイオレット及びこれらのロイコ代謝物分析のためのサンプル前処理

はじめに

このアプリケーション・ノートはQuEChERSの分散SPE法とEVOLUTE CXによる固相抽出(SPE)法を組み合わせ、脂質の多い魚組織に含まれるマラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、クリスタルバイオレット(ゲンチアナ紫)、及びロイコクリスタルバイオレット(ロイコゲンチアナ紫)を分析するためのサンプル前処理方法を説明します。

■ 図1 マラカイトグリーンの構造



マラカイトグリーン(MG)やクリスタルバイオレット(CV)は防カビ・殺菌剤あるいは寄生虫駆除剤として水産養殖に使われるトリフェニルメタン染料です。これらは魚の体内でロイコマラカイトグリーン(LMG)あるいはロイコクリスタルバイオレット(LCV)に急速に代謝され、組織中に多量に留まります。MGとCVは変異原性および発癌性があるため、多くの国で使用が規制されていますが、未だ非合法で用いられています。

油分の多い魚組織に含まれる、UV吸収の低いこれらの化合物を低濃度(1ng/g(US), 2ng/g(EU))で検出するためには、LC-MS/MSによる分析が必要です。酸化アルミニウムを使用した強化分散SPE法によるQuEChERSは他の方法と比べて簡便で、抽出液中の脂質含有レベルを低減します。ポリマーベースの固相抽出法を組み合わせることで更にクリーン・アップされ、低イオンサプレッションの最終抽出液を得ることができます。この方法は再現性に優れており、回収率は70~100%を達成しています。

分析薬物

マラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、クリスタルバイオレット、ロイコクリスタルバイオレット

サンプル前処理

1. サンプルの準備:

サケ組織1.0gを秤量する。塩酸ヒドロキシルアミン(0.25mg/mL、200 μ L)、p-トルエンスルホン酸(1 M、20 μ L)、酢酸アンモニウム(1 M、pH 4.5、20 μ L)、アセトニトリル(6mL)を添加し、100ng/mLの濃度に調整した内部標準液20 μ Lを添加してホモジナイズする。

2. 相分離

QuEChERS抽出用チューブ(Part# Q0020-15V)にホモジネートしたサンプルを加える。水(2 x 1mL)でホモジナイゼーション用ビーカーをすすぎ洗いし、ホモジナイズサンプルを完全にQuEChERS抽出用チューブに移す。30秒間ボルテックス攪拌し、遠心分離(3000g、1分)で2相に分ける。

3. 分散SPE

中性アルミナ1g(Part# 9714-0100)、硫酸マグネシウム0.2gを遠心チューブ15mLに入れ、QuEChERS抽出用チューブで遠心分離したサンプルの上澄み(アセトニトリル相)を4mL加える。30秒間ボルテックス攪拌し、続いて遠心分離を行う(3000g、1分)。

サンプル前処理(続き)

4.固相抽出

使用製品:	EVOLUTE CX 50mg/3mL (Part# 611-0005-B)
コンディショニング:	アセトニトリル2mL、5%酢酸-アセトニトリル溶液2mL
サンプルロード:	遠心分離した分散SPE処理後のサンプル2mL (3mL/min)
洗浄1:	5%酢酸-アセトニトリル溶液2mL
洗浄2:	アセトニトリル (2x3 mL)
分析薬物溶出:	2%水酸化アンモニウム-アセトニトリル溶液3mL
エバポレーション・再溶解:	溶媒を留去し、70%移動相A / 30%移動相B※で再溶解する。
備考:	※HPLC条件をご参照ください。

HPLC条件

機器:	Shimadzu HPLC system (DGU-20A3脱気ポンプ、LC-20ADポンプ×2、SIL-20ACオートサンプラーにより構成)
カラム:	Supelco Ascentis Express C18, 50 x 3.0mm、dp=2.7 μmまたはWaters Xselect CSH C18,50x3.0 mm, dp=2.5μm
温度:	Ambient.
流速:	0.4mL/min
注入量:	10 μL
移動相:	溶媒A: 0.25%ギ酸-0.1M酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) 溶媒B: 0.5%ギ酸-アセトニトリル溶液

グラジエント:

Step	Time	%B
1	0	30
2	0.5	30
3	7	95
4	11	95
5	11.1	30
6	13	30

MS条件

機器:	エレクトロスプレー・インターフェイス装備AB Sciex API3200トリプル四重極質量分析装置 (陽イオンを多重反応モニタリングモード(MRM)で確認)
脱溶媒和温度:	550°C
カーテンガス:	20 psi
衝突ガス:	4 psi
イオンスプレー電圧:	4.5 kV
イオン源ガス1:	50 psi
イオン源ガス2:	30 psi

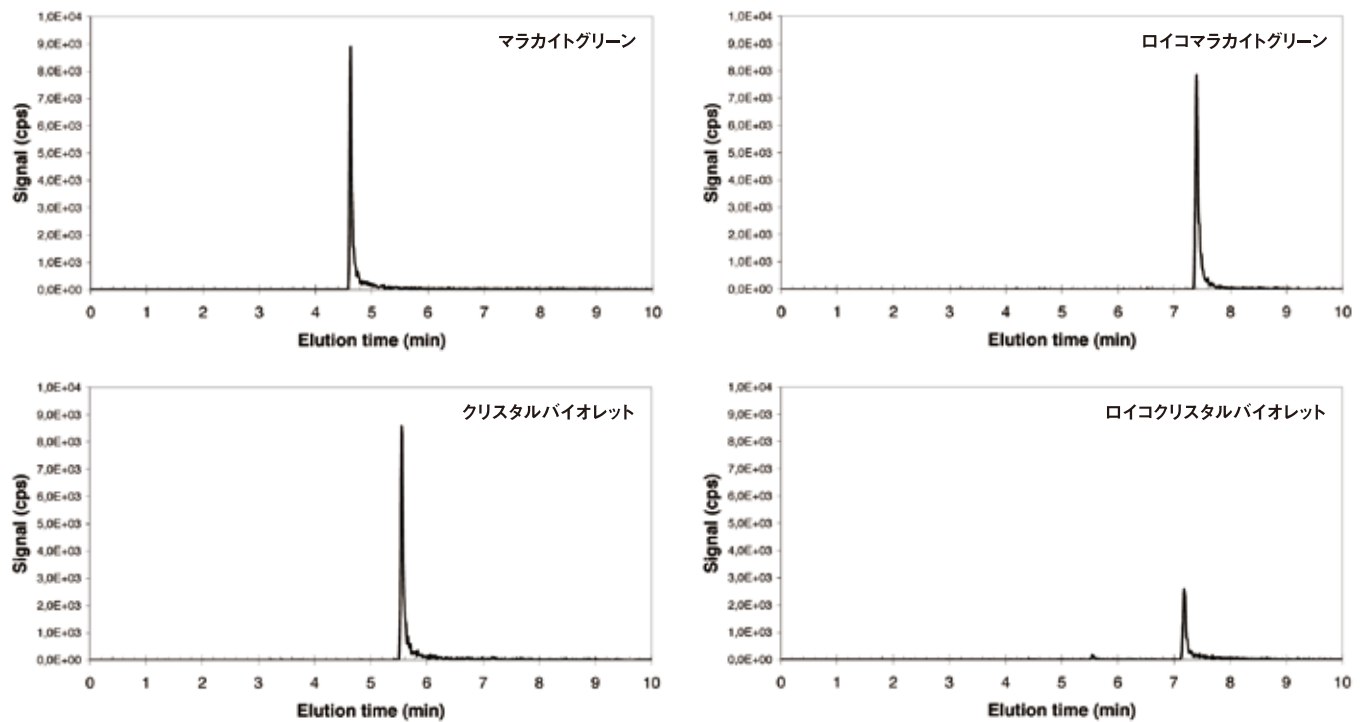
表1.分析薬物のMRMトランジション

Analyte	Q1(m/z)	Q3(m/z)	Declustering Potential(V)	Entrance potential(V)	Collision entrance potential(V)	Collision Energy(V)	Collision exit potential(V)
MG	329.4	313.3	68	6	16	46	26
LMG	331.4	239.1	58	5	15	40	20
CV	372.4	356.4	78	4	16	52	28
LCV	374.4	358.4	57	5	16	40	30
MG-d5	334.4	318.3	68	6	16	46	26
LMG-d5	336.4	239.1	58	5	15	40	20

Dwell time = 100ms

結果

■ 図1 各分析薬物について得られたLC-MSクロマトグラム(濃度:1 ng/mL)。



■ 図2 回収率

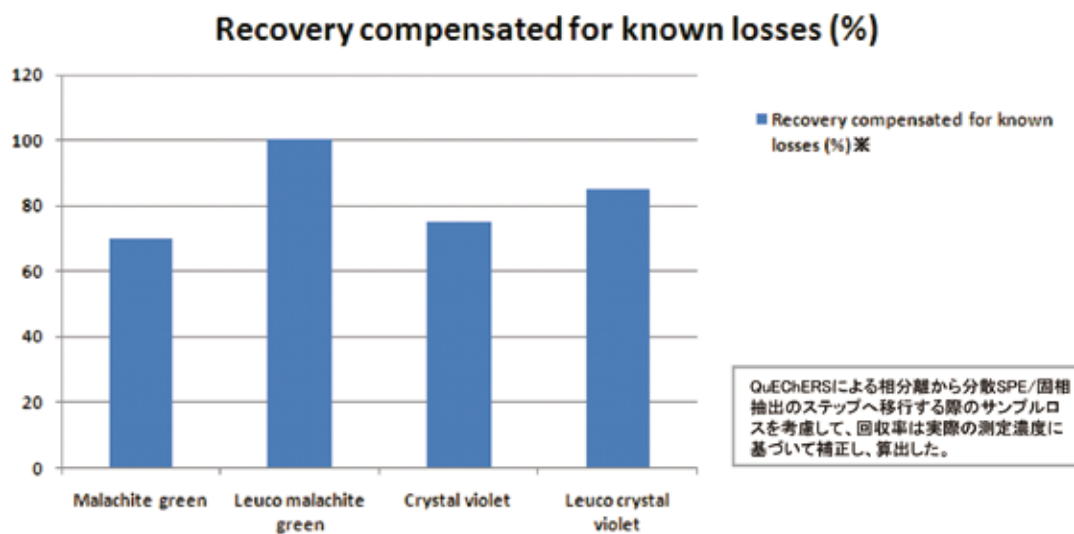


表2.イオンサプレッションと回収濃度
 それぞれの分析薬物を5ng/gでスパイクしたサケ抽出液と純溶媒の比較

	マラカイトグリーン	ロイコマラカイト グリーン	クリスタル バイオレット	ロイコクリスタル バイオレット
イオンサプレッション	4%	3%	-19%	-6%
回収濃度(ng/g)	5.3	5.6	8.1	4.8

■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
611-0005-B	EVOLUTE CX 50 mg/3mL	50
Q0020-15V	10 g QuEChERS AOAC 15mL Extraction Tube	25
9714-0100	ISOLUTE AL-N Bulk (100 g)	100 g

バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121
 大阪：〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: Japan_info@biotage.com

© 2012.無断複写・複製・転載を禁じます。記載のブランド名および製品名はすべて各社の商標または登録商標です。本書に含まれる情報は予告なしに変更することがあります。