

LC/MS/MSを用いた水質中マラカイトグリーンの分析

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

【資 料】

LC/MS/MSを用いた水質中マラカイトグリーンの分析

Analysis of Malachite green in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

水質苦情に伴い、環境試料（水質中）のマラカイトグリーンの分析法について検討した。

分析法は陽イオン交換カートリッジで濃縮後、カートリッジを水、有機溶媒の順に洗浄した後、アンモニア含有アセトニトリルで溶出し、LC/MS/MS（SRM法）で測定する方法とした。

苦情の環境試料を分析したところ、マラカイトグリーンが50 μ g/L程度検出された。参考として合わせて実施した添加回収試験や操作ブランク試験も良好な結果であった。

[キーワード：マラカイトグリーン, LC/MS/MS法]

[Key words : Malachite green, LC/MS/MS]

1 はじめに

平成24年4月、当県内で「河川が緑色に着色している」との苦情が寄せられた。採水に当たった職員が、水の色がマラカイトグリーンに似ていると証言したことから、マラカイトグリーンの分析を実施した。

マラカイトグリーンは、繊維等の染色や観賞魚の水カビ病の治療などに使用されているが、養殖水産動物への使用は禁止されており、過去には輸入の養殖鰻加工品などから検出された化合物である。

マラカイトグリーンの水質分析法は公定法がないため、文献^{1),2)}等を参考に独自法で実施したところ、マラカイトグリーンが50 μ g/L程度検出された。また、合わせて添加回収試験や操作ブランク試験を実施し、検討を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

マラカイトグリーン : 林純薬工業製
塩酸 : 1 mol/Lに調製済みの市販品
ギ酸アンモニウム : 和光純薬工業製
濃アンモニア水溶液 : 25% 有害金属測定用和光純薬工業製
アセトニトリル : LC/MS用 和光純薬工業製
精製水 : ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製
強酸性陽イオン交換カートリッジ : VARIAN MEGA BE SCX (1g, 6mL)

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム : Atlantis T3 150mm \times 2.1mm, 3 μ m
(Waters製)

移動相 : A (10mMギ酸アンモニウム水溶液) : B
(アセトニトリル)

0~0.1min A : B = 80 : 20

0.1~9 min A : 80 \rightarrow 0 B : 20 \rightarrow 100 linear gradient

9~20min A : B = 0 : 100

20~20.5min A : 0 \rightarrow 80 B : 100 \rightarrow 20 linear gradient

20.5~33min A : B = 80 : 20

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 10 μ L

(MS条件)

使用機種 : Micromass Quattro micro API

キャピラリー電圧 : 3.0kV

ソース温度 : 100 $^{\circ}$ C

デゾルベーション温度 : 500 $^{\circ}$ C

コーンガス流量 : 50L/hr

デゾルベーションガス流量 : 600L/hr

イオン化法 : ESI Positive

コーン電圧 : 40V

コリジョンエネルギー : 25eV

モニターイオン

: 329.20 $>$ 329.20, 329.20 $>$ 313.17, 329.20 $>$ 208.11

(下線部は本分析で定量に用いたモニターイオン)

2.3 前処理操作

分析法のフローを図1に示す。

水質試料100mLを1 mol/Lの塩酸を用いてpH 3程度に調整する。これを、あらかじめアセトニトリル5mL、水5mLの順にコンディショニング済みの強酸性陽イオン交換カートリッジ (SCX) に10mL/minの速さで通水し捕集する。カートリッジを水10mL、アセトニトリル5mLの順に洗浄する。これを、アセトニトリル：25%濃アンモニア水溶液=9：1溶液10mLで溶出し、40℃以下で窒素を吹き付け、0.5mL程度に濃縮する。アセトニトリルで1mLに定容し、試験液とする。なお、懸濁物がある場合にはフィルターでろ過を行い、試験液とする。試験液をLC/MS/MS-SRMにて分析する。

なお、検量線は1～100ng/mLの範囲であるため、試験液の濃度が範囲を外れる場合は適宜アセトニトリルで希釈し、範囲に入るように調製する。

2.4 検量線

マラカイトグリーン3mgを正確に量り取り、アセトニト

リルで10mLに定容し、300mg/Lの標準原液とした。

これを、アセトニトリルを用いて希釈し、1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ng/mLの標準液を調製し、その10μLをLC/MS/MSに注入し、ピーク面積法により図2の検量線を作成した。

3 結果及び考察

3.1 質量分析条件の検討

MS条件の検討を行った。マラカイトグリーンは、容易にPositiveイオン化し、コリジョンの結果、そのまま(329.20)、脱メチル(313.17)、脱ジメチルフェニルアミン(208.11)等のイオンを生成する。

本測定における条件では、そのまま(329.20>329.20)のイオンが最も良い感度を示したが、脱ジメチルフェニルアミン(329.20>208.11)のイオンは、検量線の直線性が良く安定してイオン化することと、質量数が離れていることから選択性が良いと考えられたので、定量イオンは当該イオンを採用した。

また、上記3種類のイオンを同時にモニターし、同程度

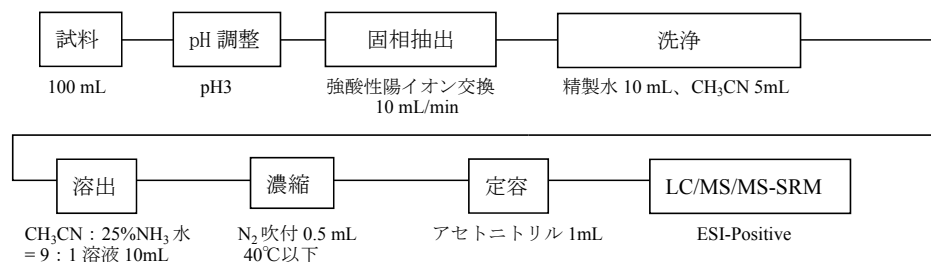


図1 分析法のフローチャート

Compound name: MalachiteGreen(329>208)
Correlation coefficient: $r = 0.999430$, $r^2 = 0.998861$
Calibration curve: $652.821 \cdot x + -170.81$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

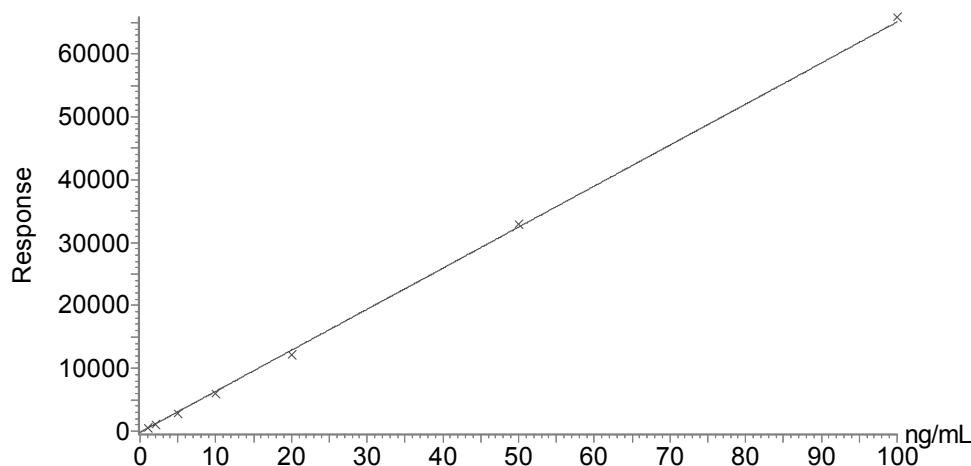


図2 検量線 (329.20>208.11のイオン)

の定量値となることを確認することで、より選択性が高くなるように留意した。

3.2 前処理法の検討

前処理法の検討を行った。食品中のマラカイトグリーン分析法¹⁾が厚生労働省から通知されており、これを参考にした。

マラカイトグリーンは容易に陽イオンになることから、塩酸性にしたのち、強酸性陽イオン交換カートリッジを用いて精製を行う方法とした。

本前処理により、十分な精製効果が得られるとともに、100倍の濃縮が可能となった。

3.3 添加回収試験結果

添加回収試験を実施したところ、76.6%と良好な回収率が得られた。標準液と添加回収試験のクロマトグラムを図3、4に示す。

添加回収試験は、市販のミネラルウォーター（ボルヴィックスティルウォーター）を用い、添加濃度は150 μ g/Lとした。添加濃度は苦情（50 μ g/L）よりやや濃い着色になるように調整し、オーバーロード等により破過が生じてないことを確認した。

なお、試験液は検量線の範囲内に入るように100倍濃縮の前処理後に1000倍希釈したため、測定溶液では15ng/mL

であった。

3.4 ブランク試験結果

ブランク試験を実施したところ、妨害となるピークは見られなかった。ブランク試験のクロマトグラムを図5に示す。

ブランク試験は、市販のミネラルウォーター（ボルヴィックスティルウォーター）を用いた。

なお、試験液は100倍濃縮の前処理後に若干の残渣が生じたため、10倍希釈したが、他のサンプルは1000倍希釈を行っていることから、十分な濃縮率となっていた。

3.5 河川水試験結果

河川水の試験を実施したところ、52.8 μ g/Lのマラカイトグリーンが検出された。河川水のクロマトグラムを図6に示す。

なお、試験液は検量線の範囲内に入るように100倍濃縮の前処理後に1000倍希釈したため、測定溶液では5.28ng/mLであった。

検量線の最低濃度の1ng/mLが十分な感度であることから、河川水中のマラカイトグリーンを10ng/L程度まで検出できることがわかった。

一般的に、マラカイトグリーンは50 μ g/L程度の濃度で魚の治療等に使用されることから、本事象は、使用済みあるいは不要となったものが何らかの原因で環境中に流出し

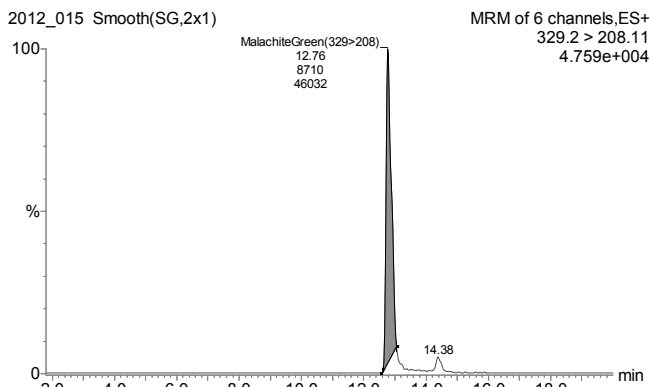


図3 標準液のクロマトグラム (添加回収試験濃度15ng/mL)

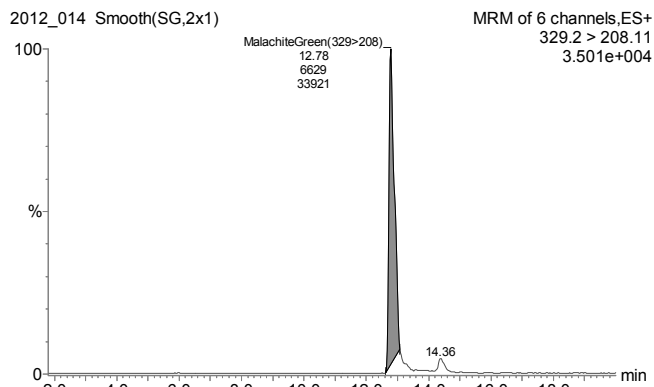


図4 添加回収試験液のクロマトグラム (1000倍希釈)

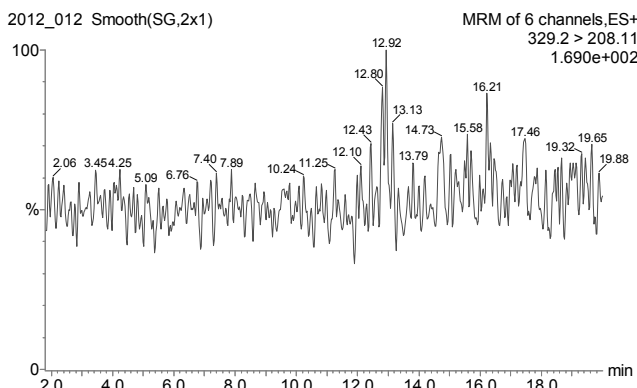


図5 ブランク試験液のクロマトグラム (10倍希釈)

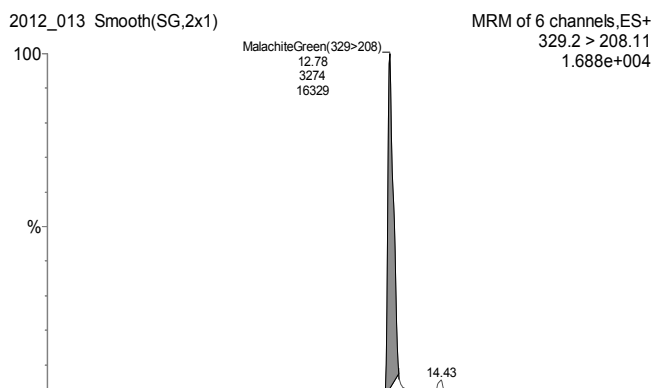


図6 河川水のクロマトグラム (1000倍希釈)

た可能性が考えられたが、発生源等の特定には至らなかった。

4 まとめ

河川の着色苦情に伴い河川水のマラカイトグリーンを分析を実施し、次の結果を得た。

- 1) 河川水から52.8 $\mu\text{g/L}$ のマラカイトグリーンが検出された。検出下限は10ng/L程度であった。
- 2) 強酸性陽イオン交換カートリッジによる前処理方法を検討し、76.6%の良好な回収率が得られた。
- 3) 市販のミネラルウォーターを用いてブランク試験を実施したところ、妨害となるピークは見られなかった。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について「個別試験法，マラカイトグリーン試験法」，食安発第0124001号，平成17年1月24日，2005
- 2) 日本ウォーターズ株式会社：マラカイトグリーンとその代謝物のLC/MS/MS分析，LC/MS/MS Application Notes，MSMSJ009