

6) 水産物中マラカイトグリーン³⁾の簡易迅速分析法の検討

濱田寛尚* 山本理世 村川 弘

要 旨

水産物中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、抽出後の精製操作を省略したLC/MS/MSによる簡易迅速分析法を検討した。検討した分析条件による、活ウナギを用いた妥当性評価試験において、良好な結果が得られた。また、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス、シマアジ、マダイ、クルマエビを用いた添加回収試験 (n=3) においても、良好な回収率が得られた。これにより、本分析法は、水産物中のマラカイトグリーン分析において非常に有効な簡易迅速分析法であることが明らかとなった。

キーワード：動物用医薬品、マラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、LC/MS/MS

はじめに

マラカイトグリーン (以下「MG」という。) は、食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) において、『食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質』とされている合成抗菌剤であり、当該告示で示されている試験法 (以下「告示法」という。) は、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」という。) を分析対象としている。また、通知^{1), 2)}において、ウナギを試験に供する場合にあつては、安定同位元素標識標準品 (以下「サロゲート」という。) を用いた内標準法又は標準添加法により回収率等の補正を行い、サロゲートの回収率 40%以上を確認することとされている。

これまで、当所では告示法に準じた試験法又はアセトニトリル抽出-ヘキサン分配による方法により、水産物中マラカイトグリーン³⁾の検査を行ってきたが、サロゲートの回収率が 40%を下回る場合があるため、当該試験法の改善が必要となった。

前述の検査法では、脱脂操作にヘキサンを用いてい

るが、LMGは抽出過程でヘキサンに移行することが確認されている³⁾ため、千葉らの報告⁴⁾のようにC18ミニカラムによる脱脂を用いる事例のほか、小西らの報告⁵⁾では、告示法と同様の抽出を行い、冷凍処理により脂肪層を除去した後、少量固相のC18及びSCXを用いる精製方法が用いられている。

今回、小西ら⁵⁾の抽出方法を参考に、ミニカラム及びサロゲートを使用せずにMG及びLMGの分析が可能な簡易分析法を開発し、活うなぎ試料を用いた妥当性評価試験を行ったところ、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。また、うなぎ (素焼き) を含む 6 魚種を試料とし、当該分析法により添加回収試験 (n=3) を行ったところ、良好な回収率が得られたので報告する。

実験方法

1 試薬

1. 1 標準品

マラカイトグリーンしゅう酸塩 (林純薬工業(株))
ロイコマラカイトグリーン (林純薬工業(株))

1. 2 その他の試薬

* 現熊本県健康福祉部健康福祉政策課

メタノール（和光純薬工業(株) 残留農薬・PCB 試験用, HPLC 用), アセトニトリル（和光純薬工業(株) 残留農薬・PCB 試験用), くえん酸一水和物（和光純薬工業(株) 試薬特級), リン酸水素二ナトリウム（和光純薬工業(株) 試薬特級), アンモニア水（和光純薬工業(株) 医薬品試験用), 塩化ナトリウム（関東化学工業(株) 残留農薬試験用・PCB 試験用), 無水硫酸ナトリウム（和光純薬工業(株) 試薬特級), その他, HPLC 用, 特級を使用した。

1. 3 混合標準液

1.1 の各標準品を秤量後, メタノールに溶解して標準原液を調製後, マラカイトグリーンしゅう酸塩及びピロイコマラカイトグリーンを混合し, 1 mg/l となるようにアセトニトリルで調製し, MG・LMG 混合標準溶液とした。また, マラカイトグリーンしゅう酸塩-d₅及びピロイコマラカイトグリーン-d₆についても同様に調製し, 内部標準溶液とした。

1. 4 クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0)

第1液: クエン酸 63.0 g を量り, 水を加えて溶かし, 1,000 ml とした。

第2液: リン酸二ナトリウム 215g を量り, 水を加えて溶かし, 1,000 ml とした。

第1液に第2液を加えて混和, pH を 3.0 に調整した。

2 試料

MG 及び LMG を含まないことを確認した活ウナギ, 素焼きウナギ, ヤマメ, ニジマス, シマアジ, マダイ及びクルマエビの可食部をフードプロセッサーで細切したものをマトリックス用試料とした。また, 当該試料 5.0 g に 2 ng/g となるように MG・LMG 混合標準溶液を添加し, 混和して 30 分間静置したものを添加回収試験用試料とした。

3 LC/MS/MS 測定条件

高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 Waters2795

タンデム型質量分析装置: Waters 社製 Quattro Premier

分析カラム: Shiseido 社製 CAPCELL PAK C18 MG II (3.0 mm×100 mm, 3.0 μm)

LC/MS/MS の測定条件は表 1 及び表 2 に示した。

なお, 定量は, マトリックス一致検量線により行った。

結果及び考察

1 分析条件の検討

MG の分析法に関するこれまでの報告のうち, 小西らの方法⁵⁾は, 凍結処理による脱脂と少量固相カラムによる精製を併用し, その定量に絶対検量線を用いる方法

であり, サロゲートを使わずとも高回収率が得られる手法である。当所において, 活ウナギを試料とし, 当該方法による添加回収試験を行ったところ, 報告と同等の回収率が得られた (表 3)。

また, その際, ミニカラム精製前の抽出液を 5 倍希釈した後, マトリックス検量線を用いて定量を行ったところ, LMG の回収率が 120%を超えたものの良好な回収率が得られた (表 3)。

表 1 LC/MS/MS測定条件

LC 条件	
移動相	A=水 B=アセトニトリル C=500mM 酢酸アンモニウム
流量	0.20ml/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μl
測定時間	40min
MS/MS 条件	
イオン化方法	ESI (+/-同時取込み)
キャピラリー電圧	3.0kV (-2.5kV)
ソース温度	120°C
デゾルベーション温度	350°C
コンガス流量	50l/hr
デゾルベーションガス流量	1,000l/hr
測定モード	MRM

表 2 LC グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Flow (ml/min)
0	88	10	2	0.2
20	0	100	0	0.2
30	0	100	0	0.2
30.01	88	10	2	0.3
40	88	10	2	0.3

表 3 ミニカラム精製前後の定量値比較

	ミニカラム精製後 (絶対検量線)		ミニカラム精製前 (マトリックス検量線)	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	98.7	3.9	100.8	3.5
LMG	82.8	7.3	128.2	6.4

これらの結果より, 小西らの方法を応用し, ミニカラムによる精製を省略することで, より簡便な MG 分析法が構築できると考え, 抽出条件等の検討を行った。

小西らの方法⁵⁾は, 試料 10g にクエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) を 4 ml 及びアセトニトリルを 10 ml 添加した後にホモジナイズしている。そこで, ウナギ試料か

ら MG 及び LMG を効率よく抽出するため、試料の採取量を告示法と同じ 5.0 g とし、クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) 添加後及びアセトニトリル添加後にそれぞれホモジナイズし、抽出液の定容をアセトニトリルで行ったところ、活ウナギ試料での回収率は、MG 及び LMG ともに良好であった (表 4)。

上記の方法で、シマアジ及びマダイ試料を用いて添加回収試験を行ったところ、表 4 のとおりシマアジでは LMG が、マダイでは MG 及び LMG の両方の回収率が 70% を下回った。この理由として、抽出液の定容をアセトニトリルで行うことによる MG の還元及び LMG の分解等が考えられた。そこで、抽出液の定容溶媒をアセトニトリル：アンモニア水 (9:1) 混液で行ったところ、良好な回収率が得られたので、アセトニトリル：アンモニア水 (9:1) 混液にて定容を行うこととした。

これらの検討の結果、図 1 に示す分析法 (以下改良分析法いう。) を作成した。

なお、定量にはマトリックス一致検量線を用いることとした。

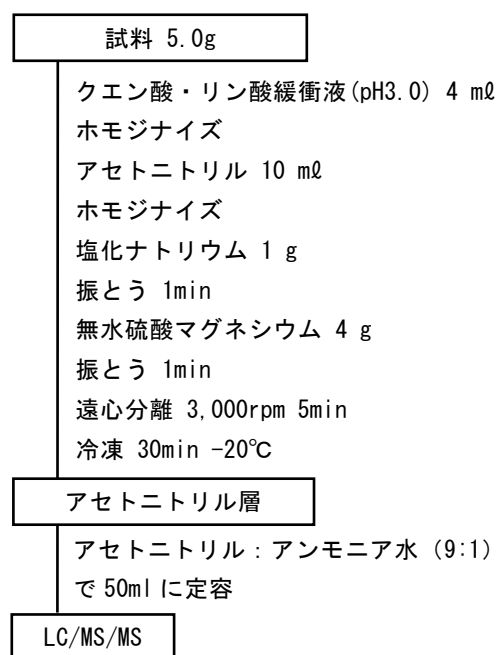


図 1 改良法分析フロー

表 4 定容溶媒の検討結果

(1) 活ウナギ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	99.8	0.6	82.3	4.1
LMG	99.3	4.3	82.0	6.4

(2) シマアジ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	90.2	8.1	91.2	13.7
LMG	60.8	15.3	82.7	2.4

(3) マダイ試料

定容 溶媒	アセトニトリル		アセトニトリル： アンモニア水 (9:1) 混液	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
MG	64.7	14.4	83.7	4.5
LMG	66.7	20.8	83.2	3.3

* 回収率 (%) は n=3 の平均値

2 活ウナギを試料とした妥当性評価試験

改良分析法について、妥当性評価ガイドラインに基づく妥当性評価試験を行った。活ウナギ試料を用い、分析者 3 名、併行回数 2 回の試験を 2 日間実施した。

その結果、表 5 に示すとおり、真度、並行精度及び室内精度について、ガイドラインの目標値を満たす結果となり、本分析法の妥当性が確認された。

表 5 活ウナギ試料を用いた妥当性評価試験結果

	真度 (%)	併行精度 RSD (%)	室内精度 RSD (%)
MG	98.7	3.9	3.5
LMG	82.8	7.3	6.4

3 他魚種試料を用いた添加回収試験

活ウナギ、シマアジ及びマダイに加え、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス及びブルマエビを試料として、改良試験法による添加回収試験 (n=3) を実施した。

その結果、表 6 に示すとおり、回収率 (真度) の平均値がガイドラインの目標値内となり、良好な結果が得られた。

表6 他魚種試料を用いた添加回収試験結果

試料	MG		LMG	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
素焼きウナギ	97.2	1.3	81.0	13.4
ヤマメ	98.7	3.9	82.8	7.3
ニジマス	106.2	3.3	83.8	8.0
クルマエビ	91.2	3.2	70.8	0.8

*回収率はn=3の平均値

まとめ

水産物中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、小西らの方法を参考にし、抽出後の精製操作を省略、希釈及びマトリックス一致検量線による改良分析法を作成した。

本分析法について、活ウナギを用いた妥当性評価試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

また、シマアジ、マダイ、素焼きウナギ、ヤマメ、ニジマス、及びクルマエビを用いた本分析法による添加回収試験 (n=3) においても、良好な回収率が得られた。

以上により、本分析法は、水産物中のマラカイトグリーン分析において有効な簡易迅速分析法であると考えられた。

文献

- 1) 「食品中のマラカイトグリーンの試験法について」厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成18年7月3日付け事務連絡.
- 2) 「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：平成18年11月30日食安発第1130001号.
- 3) 大熊紀子, 氏家愛子, 千葉美子, 吉田直人, 濱名徹：宮城県保健環境センター年報, 28, 101-102 (2010).
- 4) 千葉美子, 吉田直人, 高橋祐介, 濱名徹：宮城県保健環境センター年報, 29, 50-53 (2011).
- 5) 小西賢治, 栢木春奈, 佐々野僚一：日本食品衛生学会学術講演会要旨集.