

# うなぎ中のマラカイトグリーン分析における脂質精製と 溶解溶媒の違いによる標準溶液の安定性の検討

## Study of Lipid Clean-up on Malachite green Analysis in Eels and of Stability of Standard Solutions with Difference of Solvents

千葉 美子 吉田 直人 高橋 祐介 氏家 愛子  
Yoshiko CHIBA, Naoto YOSHIDA, Yusuke TAKAHASHI, Aiko UJIIE

うなぎ中のマラカイトグリーン検査のための試験溶液調製法について検討した。試験溶液の調製溶媒をマラカイトグリーンは0.2%ギ酸/アセトニトリル、ロイコマラカイトグリーンはアセトニトリルとすることにより、マラカイトグリーンからロイコマラカイトグリーンへの変換およびロイコマラカイトグリーンからのメチル基脱離を抑制できた。また、脱脂操作による、ロイコマラカイトグリーンのヘキサンへの移行を抑制するため、ヘキサン/アセトニトリル分配に代え、精製用ミニカラム InertSep C18 を用いることにより脱脂効果を得た。この方法によりマラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーンとそれらのサロゲートとの回収率も一致し、サロゲートの回収率も40%以上を確保できた。

**キーワード**：うなぎ；マラカイトグリーン；ロイコマラカイトグリーン；変換；安定同位元素標識標準品

**Key words**：eel；Malachite green；Leucomalachite green；conversion；surrogate

### 1 はじめに

動物用医薬品マラカイトグリーン(以下 MG と略す、図1参照)は、食品衛生法により、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して規定されている。MGの告示による試験法<sup>1)2)</sup>は、分析対象をMGおよびその代謝物であるロイコマラカイトグリーン(以下 LMG と略す)とし、うなぎを試験に供する場合には、安定同位元素標識標準品(以下サロゲートと略す)を用いた内標準法又は標準添加法により試験を行うことと改正されている。しかし、この検査法は、脱脂に用いるヘキサンに、LMGが移行するということが指摘されており<sup>3)</sup>、当所の検査においても、LMGとそのサロゲートの回収率が一致せず、サロゲートの回収率が40%を下回る結果となった。さらに、試験溶液の溶解溶媒を告示法によりアセトニトリルとすると、MGからLMGへの変換が起こることなどが問題となり、大熊らは代替法の検討結果を報告<sup>4)</sup>した。

しかし、その後の検討により大熊らの方法は、ミニカラムの担体容量が小さいため、試験品の含脂質量によっては脱脂が不十分な試料があること、また、サロゲートを使用しない方法であるため、絶対検量線から求めた平均回収率が70%であり、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup>」(以下ガイドラインと略す)の真度(回収率)の目標値70~120%の範囲内にあるものの、必ずしも満足できる結果ではなかった。

そこで、LMGとそのサロゲートの回収率が一致しない原因を明らかにし、ミニカラム精製による脱脂の検討

を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

### 2 試料および検査方法

#### 2.1 試料

試料は、2010年度買上検査試験品のうなぎ蒲焼を、フードプロセッサーにより細切、均一化後凍結保存したものを使用した。

#### 2.2 試薬等

##### 2.2.1 標準品および標準原液

MG標準原液は、マラカイトグリーンしゅう酸塩1,000 $\mu$ g/mLアセトニトリル溶液、マラカイトグリーン-d5(以下MG-d5と略す)標準品は、マラカイトグリーンしゅう酸塩-d5、LMG標準品およびロイコマラカイトグリーン-d6(以下LMG-d6と略す)標準品はいずれも、林純薬工業(株)製を用いた。MG以外の標準原液は、告示法に則り、それぞれ100 $\mu$ g/mLになるようにメタノールを用いて調製し、LMG、LMG-d6はアセトニトリルで、MG、MG-d5は0.2%ギ酸/アセトニトリルを用いて所定の濃度に希釈した。

##### 2.2.2 試薬

ギ酸は、和光純薬工業(株)LC/MS用を、その他の試薬類は、関東化学(株)残留農薬試験・PCB試験用(300倍濃縮)および高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

##### 2.2.3 精製用ミニカラム

Bond Elut Jr. SCX(500mg, Varian)  
Sep-pak Vac C18(1g, Waters)  
InertSep C18(1g, GL Sciences)  
Empore C18 Extraction Disks(3M)

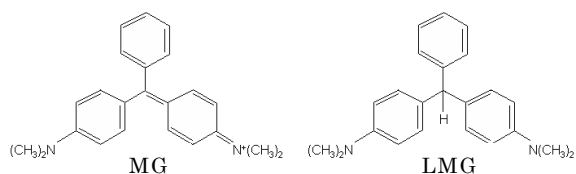


図1 MG および LMG の構造

表1 LC 測定条件

カラム :	Inertsil ODS-3(GL Sciences) 2.1×150mm
移動相 :	A : 10mMギ酸アンモニウム B : アセトニトリル A/B : 90/10(0min) → 0/100(12min) → 0/100(17min)
流速 :	0.3mL/min
カラム温度 :	40°C
注入量 :	5μL

表2 MS 条件と測定イオン

イオン化法 :	化合物	m/z	フラグメンター電圧(V)
ESI(Positive)	MG	329	200
キャピラリー電圧 : 1,500V	MG-d5	334	200
ネブライザーガス : 窒素 50psi	LMG	331	190
乾燥ガス流量 : 窒素 12.0L/min	LMG-d6	337	190
乾燥ガス流量 : 350°C			

表3 LC 測定条件

カラム :	TSK-GEL Super-ODS(東ソー) 2.1×100mm
移動相 :	A : 10mMギ酸アンモニウム B : アセトニトリル A/B : 70/30(0min) → 0/100(8min) → 0/100(15min)
流速 :	0.2mL/min
カラム温度 :	40°C
注入量 :	5μL

表4 MS/MS 条件と測定イオン

イオン化法 :	化合物	Q1>Q3(m/z)	DP(V)	CE(V)
ESI(Positive)	MG	329>208	56	47
測定 : MRM	MG	429>239	56	113
イオン源温度 : 500°C	MG-d5	334>213	61	47
ネブライザーガス流量 : 15L/min	MG-d5	334>244	61	101
カーテンガス流量 : 8L/min	LMG	331>239	56	47
コリジョンガス流量 : 6L/min	LMG	331>223	56	75
	LMG-d6	337>240	61	45
	LMG-d6	337>224	61	75

### 2.3 装置および測定条件

LC/MS : Agilent Technologies 製

1100 シリーズ LC/MSD

LC/MS/MS : AB Sciex 製 API3000

LC/MS 測定条件を表1 および表2 に示した。また、LC/MS/MS 測定条件を表3 および表4 に示した。

### 2.4 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法について、詳細を図2 に示した。試験溶液は、アセトニトリルにより調製したものを LMG および LMG-d6 の試験溶液とした。また、その半量の 500μL に 10%ギ酸を 10μL 添加し、0.2%ギ酸/アセトニトリル溶液に調製したものを MG および MG-d5 の試験溶液とした。

## 3 結果および考察

### 3.1 希釈溶媒の検討

MG は生体内で酵素により還元され、LMG に代謝さ

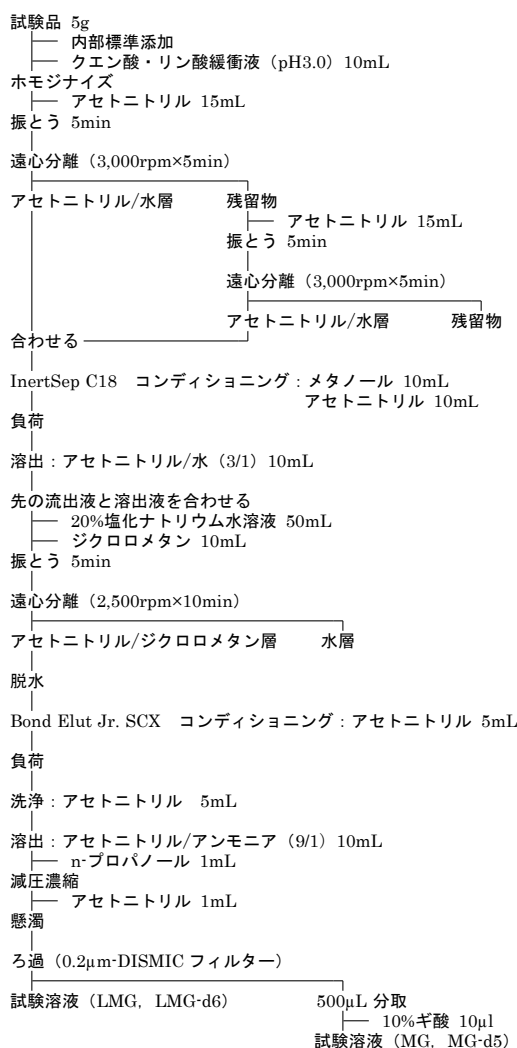


図2 試験溶液の調製法

れるが、アセトニトリルで調製した標準液に同様の現象が見られたため、MG、MG-d5、LMG および LMG-d6 標準液をそれぞれアセトニトリルおよび 0.2%ギ酸/アセトニトリルで調製し、経時変化を LC/MS により測定した。アセトニトリルで調製した各標準溶液の経時変化について、調製直後の測定アバンダンスを 100%として、その増減率の結果を図3 に示した。時間の経過とともに MG の濃度が減少し、それに伴い MG が変換して生成されたと思われる LMG の濃度が上昇した。同様に MG-d5 でも MG と同じような減少傾向を示したが、生成した LMG-d6 の増加率は、LMG に比べて小さいものとなり、この増加率の差が分析中における LMG とそのサロゲートの回収率が一致しない原因と推測された。

一方、LMG および LMG-d6 アセトニトリル標準溶液では、8 時間後まで減少は認められず、また、MG、MG-d5 も検出されなかった。

次に MG および MG-d5 の LMG および LMG-d6 への変換を抑制する目的で、0.2%ギ酸/アセトニトリルを用いて標準溶液を調製し、経時変化を測定した。その結果を図4 に示した。溶媒を酸性にすることにより、8 時間後まで MG および MG-d5 は安定で、LMG および

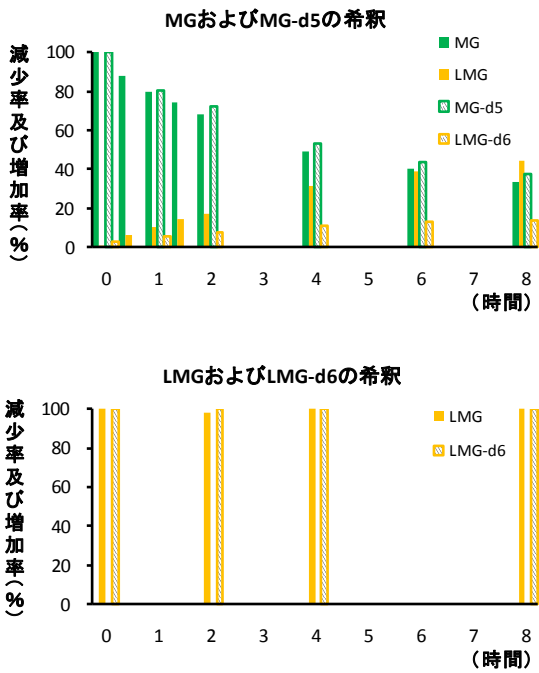


図3 標準溶液のアセトニトリル調製による経時変化

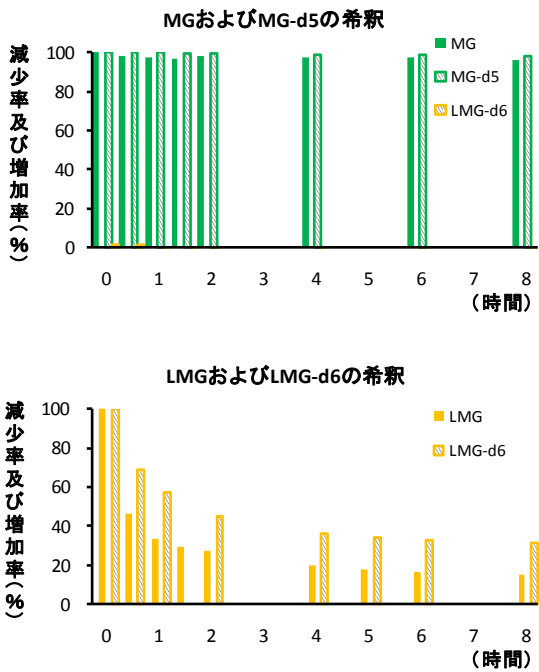


図4 0.2%ギ酸/アセトニトリル調製による経時変化

LMG-d6 への変換は起こらなかった。

一方、LMG および LMG-d6 は、時間の経過とともにアバンダンスの低下が認められ、両者の低下傾向は一致しなかった。また、MG および MG-d5 は検出されなかった。

以上の結果より、MG および LMG の測定では、Bond Elut Jr. SCX による精製後、濃縮乾固した残留物にアセトニトリル 1ml を加え、溶解・ろ過したものを LMG および LMG-d6 の試験溶液に、この溶液の半量に 0.2% の濃度になるように 10%ギ酸を添加して 0.2%ギ酸/アセトニトリル溶液に調製したものを MG および MG-d5

の試験溶液とすることとした。

### 3.2 0.2%ギ酸/アセトニトリル溶液中での LMG 経時変化の原因

0.2%ギ酸/アセトニトリルで調製した LMG および LMG-d6 のアバンダンス低下が、HPLC 分析カラム内で生じている可能性を検討するため、一般的な ODS 系カラムについて 4 社の製品を抽出し、それらを用いて LC/MS により LMG および LMG-d6 の標準溶液測定を行った。その結果を図 5 に示した。すべての分析カラムで LMG および LMG-d6 におけるアバンダンスの低下が認められたが、その低下率は分析カラムによって大きく

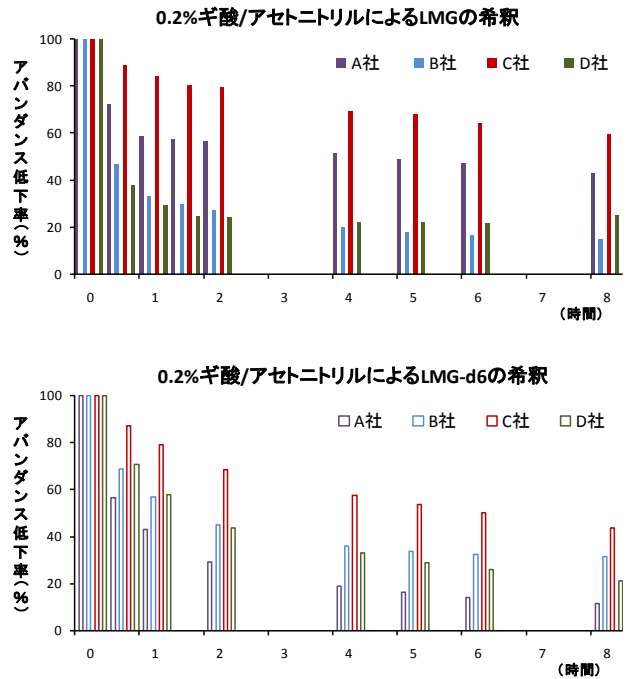


図5 HPLC 分析用カラムによる経時変化

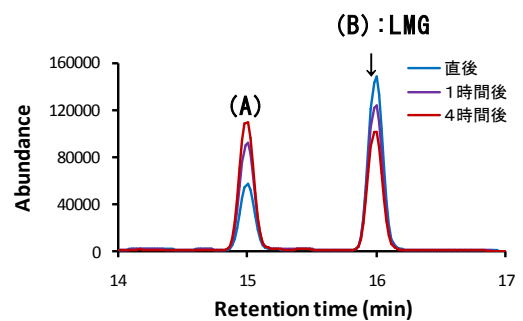


図6 LMG 標準液の LC/MS スキャン分析によるトータルイオンクロマトグラム

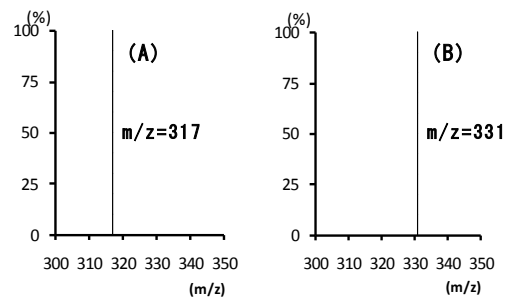


図7 各ピークの MS スペクトル

異なり、同じ分析カラムでの LMG および LMG-d6 の減少率の差も、各社のカラム間で大きな差があった。そこで、LMG が減少する原因究明のため、LMG のスキャン分析を実施したところ、LMG のピークの前に未知のピークが検出され(図 6 参照)、これが時間の経過とともに増大した。スペクトル解析をした結果、LMG の測定イオン 331 に対して、メチル基が一つ取れたと推測される 317 のイオンが検出された(図 7 参照)。この現象は、LMG-d6 でも同様に起こっていることが確認できた。分析カラムを使用しないフローインジェクション分析

(FIA) で検出されたイオンは、LMG では 331 のみ、LMG-d6 では 337 のみであったことから、分析カラムを通過する際にメチル基の脱離が起きていると推定された。

### 3.3 ミニカラムによる脱脂方法の検討

ヘキサンによる脱脂に代わる方法として、脂質の除去に有効と考えられる C18 系ミニカラムの検討を、添加回収試験を用いて行った。添加量は、告示法規定のとおり検出下限値の 2 倍量、試料換算にして 0.004ppm とし、LC/MS/MS により測定した。図 2 により分取したアセトニトリル/水層をミニカラムに負荷し、流出液を採取、その後、アセトニトリル/水 (3/1) で溶出し、採取した溶出液と先の流出液を合わせてジクロロメタンに転溶する方法を用いた。また、脱脂効果を高めるため、ミニカラムへの負荷前に C18 系ディスクカラムを通過させる方法も合わせて検討した。各ミニカラムによる脱脂を行い、絶対検量線法により算出した MG, MG-d5, LMG および LMG-d6 の回収率の結果を表 5 に示した。使用した 3 種の精製カラムの中で、ガイドラインの真度 70 ~ 120%, 併行精度 25% 未満を満足するものはなかった。サロゲートとして用いた MG-d5 および LMG-d6 の回収率についてみると、InertSep C18 を単独で用いたものでは、MG-d5 では 61%, LMG-d6 では 45% の回収率が得られ、ガイドラインに示されているサロゲートの回収率 40% 以上という条件を満たした。さらに、絶対検量線から求めた MG と LMG の回収率が、MG-d5 と LMG-d6 の回収率とほぼ一致していた。そこで、サロゲート補正を行って回収率を算出した結果を表 6 に示した。Sep-pak C18 を除き、回収率、変動係数ともに良好な結果が得られた。これらの結果から、脱脂に使用するミニカラムは、InertSep C18 が適当であると考えられた。

## 4 まとめ

うなぎ中の MG 分析法について、試験溶液の調製溶媒およびヘキサン/アセトニトリル分配を使用しない脱脂法について検討を行った。試験溶液の調製溶媒については、MG, MG-d5 は、0.2%ギ酸/アセトニトリルを用いて、LMG, LMG-d6 は、アセトニトリルを用いて調製することにより、MG から LMG への変換および LMG からのメチル基脱離を抑制することができ、安定した測定を行うことができた。また、ヘキサン/アセトニトリ

表 5 ミニカラム脱脂法での回収率 (絶対検量線法)

		MG	MG-d5	LMG	LMG-d6
		平均回収率 (%)	平均回収率 (%)	平均回収率 (%)	平均回収率 (%)
Sep-pak C18(1g)	n=5	110 (31)	67 (20)	26 (110)	58 (9.7)
InertSep C18(1g)	n=5	64 (15)	61 (14)	44 (11)	45 (12)
Empore-InertSep C18(1g)	n=5	54 (4.2)	52 (9.4)	31 (11)	31 (12)

( ) 内数字 : 相対標準偏差 (%)

表 6 サロゲートの回収率

		MG		LMG	
		平均回収率 (%)	CV%	平均回収率 (%)	CV%
Sep-pak C18(1g)	n=4	160	15	110	70
InertSep C18(1g)	n=5	101	7.4	99	3.7
Empore-InertSep C18(1g)	n=5	98	5.1	100	1.2

ル分配を使用しない脱脂法については、C18 系のミニカラムを用いることにより脱脂効果は得られたが、Sep-pak C18 では MG と LMG およびそれらのサロゲートとの回収率に大きな差が認められた。一方、InertSep C18 では MG と LMG およびそれらのサロゲートとの回収率が一致し、サロゲートの回収率については 40% 以上を確保することができた。平成 22 年 12 月にガイドラインの一部が改正<sup>6)7)</sup>され、告示試験法についても同等以上の性能を有すると認められる試験法による試験が可能となったことから、今後は、本法の妥当性の評価を実施していき、日常業務に適用していく予定である。

## 5 参考文献

- 1) 厚生省告示第 370 号(1959) “食品、添加物等の規格基準” 昭和 34 年 12 月 28 日
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について” 平成 18 年 11 月 30 日、食安発第 1130001 号(2006)
- 3) 平成 20 年度地方衛生研究所北海道・東北・新潟ブロック専門家会議資料
- 4) 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)
- 5) 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等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて” 平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号(2007)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について” 平成 22 年 12 月 13 日、食安発 1213 第 1 号(2010)
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について” 平成 22 年 12 月 24 日、食安発 1224 第 1 号(2010)