

## 資料

LC/MS/MSを用いたマラカイトグリーン及びロイコマラカイト  
グリーンを含む残留動物用医薬品の一斉分析法の検討Examination of Simultaneous Method of Residual Veterinary Drugs  
Including Malachite green and Leucomalachite green by LC/MS/MS弓 場 香 純      清 川 由 樹<sup>1</sup>      吉 田 純 一

## 1 はじめに

合成抗菌剤であるマラカイトグリーン（以下「MG」という。）及びロイコマラカイトグリーン（以下「LMG」という。）は、日本国内では2005年8月に養殖魚への使用が全面禁止となった。しかし、その後も2016年度までに輸入養殖魚介類及びその加工品等からMG及びLMG（以下「MG類」という。）の検出事例が80件近く発生しており<sup>1)</sup>、検査等による監視の強化が求められている。

一方、当センターにおいては、食品中に残留する動物用医薬品の試験は、「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）<sup>2)</sup>」に準じ、LC/MS/MSを用いて実施しているが、MG類については別途個別の試験法<sup>2)</sup>により実施する必要があり、検査に時間を要するため、現在実施していない。

そこで今回、MG類を含む一斉分析法の検討を行ったので報告する。

## 2 方法

## 2. 1 試料

試料には、分析対象の動物用医薬品が含まれないことを確認したエビ、ウナギ、ウナギ蒲焼きを使用した。

エビは頭、殻及びわたを、ウナギは頭、内臓、骨及び皮を、ウナギ蒲焼きはタレ及び皮をそれぞれ除去し、フードプロセッサーで細切、均一化した。

## 2. 2 対象化合物

既報<sup>3)</sup>で報告した61物質から、その後不検出基準となったクロルスロン<sup>4)</sup>を除外した60項目にMG及びLMGを

追加し、合計62項目を対象化合物とした。

## 2. 3 試薬及び試液

## 2. 3. 1 試薬

混合標準品：和光純薬工業(株)製の動物用医薬品混合標準液PL-1-3、PL-2-1及びキノロン剤（各20µg/mL、メタノール）を用いた。

標準品：オキシベンダゾール、クロキサシリン、クロピドール、ナイカルバジン、フルベンダゾール、モラントール、リファキシミンは和光純薬工業(株)製を、MG、LMG、スルファエトキシピリダジン、チアベンダゾール代謝物は林純薬工業(株)製を、ジクラズリルは関東化学(株)製を用いた。

有機溶媒：抽出用のアセトニトリル（HPLC用）、メタノール（HPLC用）は関東化学(株)製を、LC/MS/MSの移動相用のアセトニトリル（LC/MS用）は和光純薬工業(株)製を用いた。

その他の試薬：ギ酸（HPLC用）、酢酸アンモニウム（特級）は和光純薬工業(株)製を、クエン酸（特級）、リン酸二ナトリウム（特級）は関東化学(株)製を、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物（試験研究用）（以下「EDTA」という。）は(株)同仁化学研究所製を用いた。

## 2. 3. 2 試液

EDTA含有クエン酸緩衝液：EDTA1.86gに第1液307mLと第2液193mLを加えて混和し、溶解した。

第1液：クエン酸一水和物21gを水に溶かして1000mL

1 退職

とした。

第2液：リン酸二ナトリウム71.6gを水に溶かして1000mLとした。

### 2. 3. 3 標準原液及び混合標準溶液の調製

各標準品10mgをはかりとり、表1に示す調製方法のとおりに100mLに溶解、定容したものを各標準原液とした。これを混合し、アセトニトリル:水(4:6)混液で2 $\mu$ g/mLに調製したものを自家調製混合標準液とした。

自家調製混合標準液と混合標準品を混合し、アセトニトリル:水(4:6)混液で1 $\mu$ g/mLに調製したものを、混合標準溶液とした。

表1 各標準原液の調製

化合物名	調製方法
クロピドール, ナイカルバジン, チアベンダゾール代謝物, ジクラズリル, スルファエトキシピリダジン	メチルホルムアミドに溶解後, メタノールで定容
フルベンダゾール	テトラヒドロフランに溶解後, メタノールで定容
オキシベンダゾール	テトラヒドロフランに溶解, 定容
クロキサシリン, モランテル, リファキシミン, MG, LMG	メタノールに溶解, 定容

### 2. 4 装置

高速液体クロマトグラフはProminenceシリーズ(島津製作所社製)を使用し、送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

質量分析装置は4000QTRAP(ABSciex社製)を使用し、イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

### 2. 5 LC/MS/MS測定条件

新たに追加したMG類のプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、MRMにおけるDP(Decustering Potential), CE(Collision Energy)及び保持時間(RT: Retention Time)を表2に示す。また、測定条件は表3のとおりとした。

表2 化合物ごとのMS/MSパラメータ及び保持時間

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)
MG	331.2	239.1	91	43	11.2
LMG	329.2	313.1	111	51	14.2

表3 LC/MS/MSの測定条件

分析カラム	ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-SP PEEKカラム (内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径3 $\mu$ m)	
流速	0.2mL/min	
注入量	ポジティブモード5 $\mu$ L ネガティブモード2 $\mu$ L	
カラム温度	40 $^{\circ}$ C	
移動相	A: 2.5mM酢酸アンモニウム水溶液 (1%ギ酸含有) B: 2.5mM酢酸アンモニウム含有 アセトニトリル(1%ギ酸含有)	
グラジエント条件	0min(A:B=95:5)→3min(95:5) →15min(5:95)→22min(95:5)	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン法(ESI)	
	ポジティブ	ネガティブ
イオンスプレー電圧	5.5kV	-4.5kV
イオンソース温度	500 $^{\circ}$ C	500 $^{\circ}$ C
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring)	

### 2. 6 試験溶液の調製

松本らの方法<sup>9)</sup>をもとに、図1に示す試験フローのとおりに実施した。

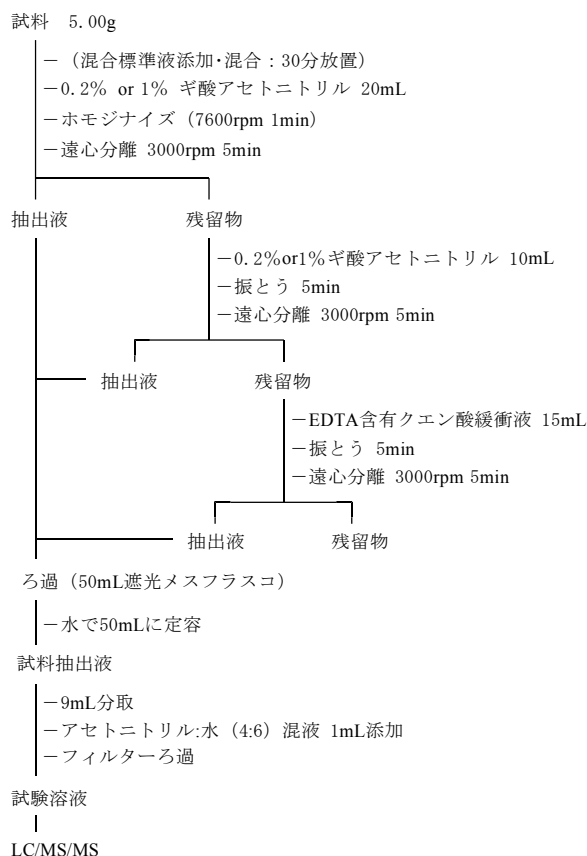


図1 試験フロー

2. 7 溶媒標準液及びマトリックス添加標準液の作成

2. 7. 1 溶媒標準液

混合標準液をアセトニトリル：水（4:6）混液で希釈し、フィルターろ過したものを溶媒標準液（100, 10, 5, 1, 0.5ng/mL）とした。

2. 7. 2 マトリックス添加標準液

試験抽出液と同様の手法で抽出したマトリックス溶液9mLにアセトニトリル：水（4:6）混液で希釈した1000, 100, 50, 10, 5ng/mLの混合標準液1mLを加え、フィルターろ過したものをマトリックス添加標準液（100, 10, 5, 1, 0.5ng/mL）とした。

2. 8 添加回収試験用試料

対象化合物が入っていないことを確認した試料5.00gに対し、試料中の最終濃度が0.01μg/g及び0.1μg/gとなるように混合標準液をそれぞれ添加し、30分間放置したものを添加回収試験用試料とした。各濃度2併行で実施した。

3 結果及び考察

3. 1 検量線の直線性

0.5～100ng/mLの範囲でピーク面積を用いて絶対検量線を作成したところ、溶媒標準検量線、マトリックス添加標準検量線、共に、62化合物中、MG及びLMGを含む53化合物について、相関係数が0.990以上となる良好な直線性が得られた。残り9化合物（α-トレンボロン、β-トレンボロン、クロピドール、クロキサシリン、デキサメタゾン、プレドニゾロン、スルファセタミド、スルファジアジン、トリクロルホン）については、ピークの分離が悪い、もしくは強度が不十分となり、直線性は得られなかった。

3. 2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表4に示す。回収率において、70～120%の範囲を満たしたのは、溶媒標準検量線を用いた場合、添加濃度0.01μg/gの低濃度でエビ21項目、ウナギ27項目、ウナギ蒲焼き19項目であり、添加濃度0.1μg/g

の高濃度でエビ28項目、ウナギ34項目、ウナギ蒲焼き26項目であった。マトリックス添加標準検量線を用いた場合、0.01μg/gでエビ42項目、ウナギ46項目、ウナギ蒲焼き39項目であり、添加濃度0.1μg/gでエビ50項目、ウナギ50項目、ウナギ蒲焼き45項目であった。

全ての食品において、マトリックス添加標準検量線を用いる方が70～120%の範囲を満たす項目が多かった。

MGについて回収率が70～120%の範囲を満たしたものは、溶媒標準検量線を用いた場合、エビのみであったが、マトリックス添加標準検量線を用いた場合、エビ、ウナギ、ウナギ蒲焼きにおいて満たすことができた。LMGについては全てにおいて回収率70～120%の範囲を満たさなかった。

表4 添加回収率が70～120%の範囲を満たした項目数

添加濃度(μg/g)	エビ		ウナギ		ウナギ蒲焼	
	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1
溶媒標準検量線	21	28	27	34	19	26
マトリックス添加標準検量線	42	50	46	50	39	45

MG類の添加回収試験結果を表5に示す。MGはウナギ、ウナギ蒲焼きにおいてマトリックス添加標準検量線を用いることで、低濃度、高濃度ともに回収率が改善され、70～120%の範囲を満たすことができた。

一方、LMGは全ての食品において改善が見られず、70～120%の範囲を満たすことができなかった。LMGは夾雑物の存在下では化学的に不安定となる場合があることが報告されており<sup>6)</sup>、夾雑物の影響を少なくするために、精製工程の検討が必要と考えられた。

3. 3 マトリックス効果について

図2は、MGの10ng/mLのピークとエビ、ウナギ、ウナギ蒲焼きそれぞれのマトリックス添加標準液10ng/mLのピークの面積比である。

MGは全てのマトリックス添加標準液でピーク面積が小さくなっており、イオン化抑制（イオンサプレッション）の影響を受けていることが考えられた。

表5 MG及びLMGの添加回収試験結果 (%)

	MG						LMG					
	エビ		ウナギ		ウナギ蒲焼き		エビ		ウナギ		ウナギ蒲焼き	
添加濃度(μg/g)	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1
溶媒標準検量線	71.6	82.9	53.2	60.8	57.3	65.3	42.1	48.9	69.1	56.2	40.3	34.0
マトリックス添加標準検量線	76.8	89.8	74.2	72.3	73.4	71.8	31.3	40.8	20.8	48.6	33.1	30.5

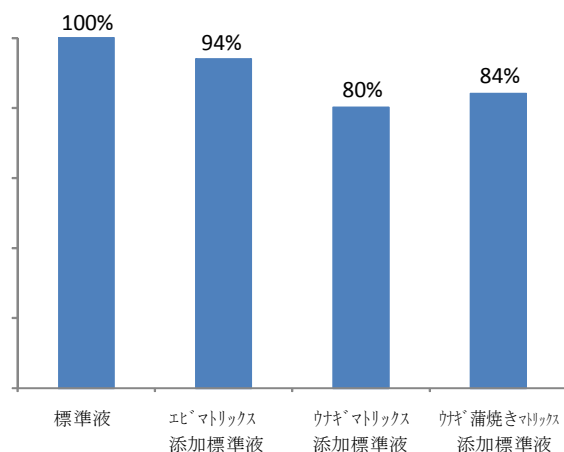


図2 10ng/mLにおけるMGのピーク面積の比較  
(標準液の面積値を100%とした場合の割合)

### 3. 4 今後の課題

抽出操作において、2%のギ酸アセトニトリルをエビやウナギ蒲焼きに加えると、酸によるタンパク質凝固を誘引し、ホモジナイズができない状態となった。そのため、ギ酸の濃度をエビで0.2%、ウナギ蒲焼きで1%に変更したところ、ホモジナイズが可能となった。このことから、適切なギ酸濃度については、更なる検討が必要と考える。

また、前処理中に細かな泡の発生があり、定容等の作業が困難であったので、泡の発生を抑制する方法を同時に検討したい。

MG類は光分解性を有し、不安定な性質があると報告されている<sup>7)</sup>。そこで褐色ガラス器具を使用し、遮光を徹底した。また、MGは酸性条件で安定化したとする千葉らの報告<sup>9)</sup>を参考に、抽出液及び移動相にギ酸を用いた。これらに配慮した操作によりMGの回収率については70~120%の範囲を満たす値が得られたが、LMGの回収率については満たすことができなかった。今後は、LMGを安定的かつ効率良く抽出するために、前処理法について更なる検討を行う必要がある。

## 4 まとめ

エビ、ウナギ、ウナギ蒲焼きにおいて、これまで実施していた60項目の一斉分析法にMGを加えた、61項目の一斉分析法が確立できた。また、夾雑物質の多い食品には、標準添加法（マトリックス添加標準検量線）を採用することで、回収率が良好となる項目を増やせることがわかった。

なお、LMGについては、前処理法等について更に検討を加え、一斉分析法への追加を行いたい。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省；違反事例  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/yunyu\\_kanshi/ihan/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html)
  - 2) 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、試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法（食安発1129002号），平成17年11月29日
  - 3) 臼井力，下堂蘭栄子，他；LC-MS/MSを用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価，本誌，15，65～73（2014）
  - 4) 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（食安発0918第1号），平成27年9月18日
  - 5) 松本理世，飛野敏明，他；LC/MS/MSを用いた畜水産物中動物用医薬品等の迅速一斉分析法の検討（第3報），熊本県保健環境科学研究所報，44，28～37（2014）
  - 6) 厚生労働大臣照会資料；食品安全基本法第11条第1項第1号の食品健康影響評価を行うことが明らかに必要でないときについて（発食安第1002006号），平成18年10月2日
  - 7) 服部涼子，後藤操，他；輸入水産食品中の使用禁止抗菌剤，マラカイトグリーン LC/TOF-MSによる分析の検討，兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告，6，19～25（2015）
  - 8) 千葉美子，吉田直人，他；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，宮城県保健環境センター年報，29，50～53（2011）
- ※上記アドレスについては、原稿作成時のものであり、変更される場合があります。