

短報

うなぎ蒲焼き中のマラカイトグリーン 試験法の検討及び妥当性評価

小菅教仁², 福光徹¹, 脇ますみ¹,
林孝子¹, 岸弘子¹

Examination and validation on the analysis of malachitegreen in broiled eels

Norihito KOSUGE, Toru FUKUMITSU,
Masumi WAKI, Takako HAYASHI
and Hiroko KISHI

緒言

トリフェニルメタン系合成抗菌剤であるマラカイトグリーン（以下、MG）は、食品、添加物等の規格基準¹⁾で、食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質（以下、不検出物質）として規定されている。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）の試験方法は食品、添加物等の規格基準¹⁾で定められている（以下、告示試験法）が、平成22年12月の通知²⁾により、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。

また、平成22年12月の通知³⁾により改正された、「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（以下、妥当性評価ガイドライン）」では、告示試験法も妥当性評価の対象とされ、安定同位元素標識標準品（以下、サロゲート）を使用した場合には、その回収率が40%以上であることを確認することとされた。当所では、告示試験法に従い、サロゲートを用いた内標準法により、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて、うなぎ蒲焼き中のMG及びLMG検査を実施してきたが、LMGのサロゲートの回収率が40%未満であった。

これまでに、LMGのサロゲートの低回収率に対する改善法について、告示試験法を改良した試験法^{4), 5)}が報告されている。そこで今回、これらの試験法を参考に、告示試験法の試験溶液及び前処理方法を検討し、妥当性評価を実施したので報告する。

方法

1. 試料

うなぎ蒲焼きの皮及びたれを可能な限り取り除き、細切、均一化したものを試料とし、あらかじめMG及びLMGを含まないことを確認した。

2. 試薬等

標準品はいずれも和光純薬工業㈱製を用いた。MGしゅう酸塩及びLMG標準品は高速液体クロマトグラフ用を用いた。サロゲートとして、MG及びLMGを重水素標識したMG-d5しゅう酸塩及びLMG-d5標準品を使用し、いずれも環境分析用を用いた。各標準品を精密に量り、メタノールに溶解して100 μ g/mLの標準原液を調製した。各標準原液を混合し、0.05%ギ酸含有メタノール溶液で希釈し、各サロゲートが0.025 μ g/mL含まれるよう混合標準溶液を調製した。内標準液は、各サロゲートの濃度が0.025 μ g/mLになるよう0.05%ギ酸含有メタノール溶液を用いて調製した。

クエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）は、クエン酸63.0gを水に溶かして1000mLとしたものと、リン酸二ナトリウム215gを水に溶かして1000mLとしたものをpH3.0となるように混和した。

固相抽出カラムはAgilent Technologies社製Bond Elut SCX（500mg）、GL Science社製Inert Sep C18（1g）、GL Science社製Inert Sep NH₂（500mg）及びGL Science社製Inert Sep PSA（500mg）を用いた。

試薬及び試液はいずれも和光純薬工業㈱製を用いた。アセトニトリルは残留農薬・PCB試験用及びLC/MS用、メタノール、ギ酸及びギ酸アンモニウムはLC/MS用、無水硫酸ナトリウム及び塩化ナトリウムは残留農薬・PCB試験用、その他の試薬は特級を用いた。

3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（HPLC）はWaters社製ACQUITY UPLC H-classを、質量分析装置（MS/MS）はWaters社製Xevo TQを用いた。分析カラムは化学物質評価研究機構製L-column2 ODS（2.1mm i.d.×150mm, 3 μ m）を用いた。その他の測定条件を表1に、各分析対象化合物の多重反応モニタリング（MRM）測定パラメータを表2に示した。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

2 神奈川県食肉衛生検査所
〒243-0022 厚木市酒井892-1
前 神奈川県衛生研究所 理化学部

表 1 HPLC及びMS/MS測定条件

HPLC条件	
移動相	A : 0.01mol/L ぎ酸アンモニウム溶液 B : アセトニトリル
グラジエント条件	B:10%(0分)→50%(8分)→99%(9分)→100%(10分) →100%(18分)
カラム温度	40℃
流速	0.2mL/min
注入量	5 μ L
MS/MS条件	
イオン化方式	ESI+ ソース温度 150℃
測定モード	MRM 脱溶媒温度 500℃
キャピラリー電圧	3kV 脱溶媒ガス流量 800L/Hr
コーンガス流量	50L/Hr コリジョンガス流量 0.15mL/min

表 2 MRM測定パラメータ

分析対象化合物	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	Cone (V)	Coll (eV)
MG	329.2	313.2	29	35
		208.1	29	42
LMG	331.2	239.1	36	32
		316.2	36	22
MG-d5	334.2	318.2	54	38
LMG-d5	336.2	329.1	36	32

Cone : コーン電圧 Coll : コリジョン電圧

4. 試験溶液の調製

改良試験法による試験溶液の調製方法を図1に示した。試料5.00gに内標準液を正確に1mL添加し、クエン酸・リン酸緩衝液(pH3.0)10mLを加えてホモジナイズした後、アセトニトリル15mLを加えて5分間振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物にアセトニトリル15mLを加え、上記と同様に振とう及び遠心分離し、アセトニトリル層を合わせた。これに20%塩化ナトリウム溶液30mLを加えて5分間振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。

この溶液を予めアセトニトリル10mLでコンディショニングしたInert Sep NH₂に負荷し、さらにアセトニトリル5mLを注入して全溶出液を採り、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、無水硫酸ナトリウムをろ過し、ろ液にぎ酸0.5mLを加えた。この溶液を予め1%ぎ酸含有アセトニトリル溶液5mLでコンディショニングしたBond Elut SCXに負荷し、さらに1%ぎ酸含有アセトニトリル溶液3mLにより洗浄後、アセトニトリル/アンモニア水(9:1)10mLを注入して溶出した。これを40℃以下で減圧濃縮し、窒素気流下で乾固した。残留物に0.05

%ぎ酸含有メタノール溶液を正確に1mL加えて溶解し、フィルターろ過したものを試験溶液とした。

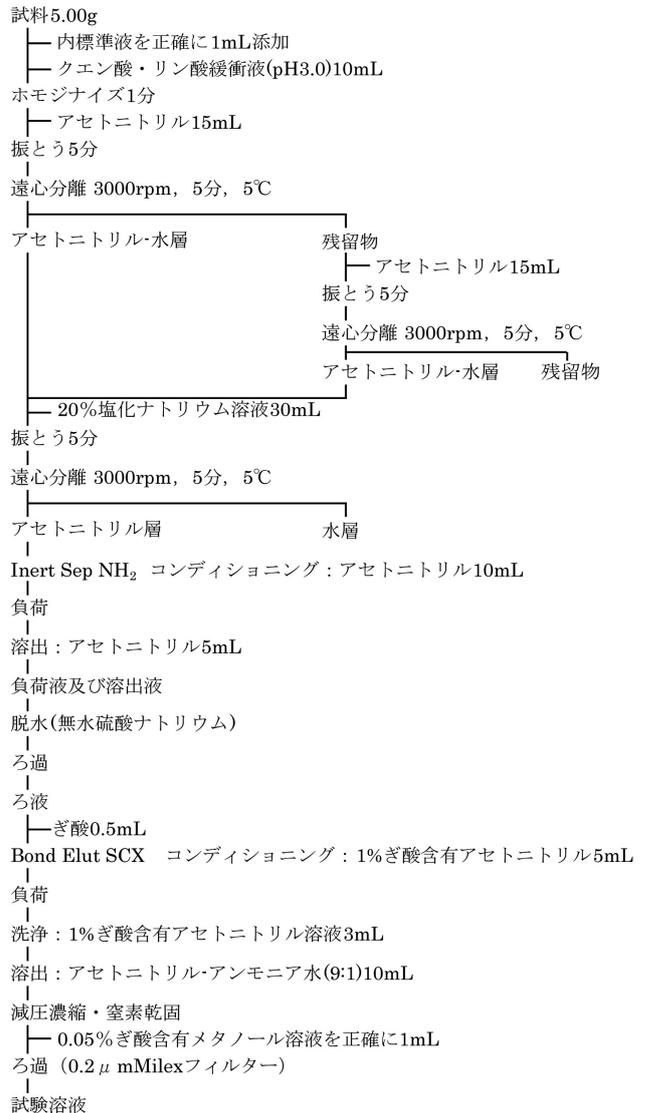


図 1 改良試験法による試験溶液の調製法

5. 検量線及び定量方法

検量線はMG及びLMGの濃度が0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.015及び0.02 μg/mLとなるように調製した。各サロゲートの濃度は0.025 μg/mLとし、定量はサロゲートを用いた内標準法により行った。

6. 妥当性評価

検討した試験法を用いて、妥当性評価ガイドラインに従って添加回収試験を実施し、各性能パラメータ(選択性、真度、併行精度、室内精度及び定量限界)を求め、目標値等に適合しているか評価した。

6. 1 添加濃度

不検出物質では検出限界を定量限界と同義とし、これ

を添加濃度とする³⁾とされているため、MG及びLMGの添加濃度を $0.002 \mu\text{g/g}$ とした。

6. 2 選択性

試料において、定量を妨害するピーク（以下、妨害ピーク）がないことを確認した。妨害ピークを認められた場合は、不検出物質の許容範囲として定められた、「妨害ピークの面積が定量限界濃度に相当する標準溶液から得られるピークの1/3未満であること」を確認した。

6. 3 真度及びサロゲートの回収率

添加試料5個以上を試験法に従って試験し、サロゲート補正後の定量値の平均値の添加濃度に対する比を求め、添加濃度 $0.002 \mu\text{g/g}$ の目標値70~120%であることを確認した。サロゲートの回収率は、添加回収試験溶液の面積と検量線用標準溶液の面積の平均との比から算出し、40%以上であることを確認した。

6. 4 併行精度及び室内精度

添加試料の試験を5回繰り返し実施し、得られた試験結果の標準偏差及び相対標準偏差を求め、添加濃度 $0.002 \mu\text{g/g}$ の目標値である併行精度25%未満及び複数の実施者又は実施日による室内精度30%未満を確認した。

6. 5 定量限界

試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度の混合標準溶液（以下、マトリックス混合標準溶液）から得られるピークのS/N比が、10以上であることを確認した。

結果及び考察

1. 試験溶液の検討

告示試験法に基づき、MG標準原液をアセトニトリルで希釈し、測定したところ、MGから変換したLMGのピークが認められた（図2-a）。希釈溶媒を酸性にすることでMGからLMGへの変換が抑制されるとの報告⁶⁾があることから、MG及びLMG標準原液をぎ酸含有アセトニトリル溶液及びぎ酸含有メタノール溶液（各ぎ酸濃度：0.05%、0.1%、0.2%）で定量限界相当濃度（ $0.01 \mu\text{g/mL}$ ）に希釈後、LC-MS/MSで測定し、MG及びLMGの面積値を比較した（表3）。

MGは、アセトニトリル溶液中に比べ、酸性溶液中でLMGへの変換が抑制され、MGから変換したLMG（以下、変換LMG）の面積値は、ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が、ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より小さかった。

一方、LMGは、アセトニトリル溶液中に比べ、酸性溶液中では面積値が低下し、LMGからMGへの変換が認められた。LMGの面積値は、ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が、ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より著しく小さく、LMGから変換したMG（以下、変換MG）

の面積値は、ぎ酸含有アセトニトリル溶液中の方が、ぎ酸含有メタノール溶液中の面積値より大きかった。

以上の結果より、ぎ酸含有アセトニトリル溶液と比較して、変換LMGの面積値はやや大きくなるが、LMGの面積値が大きく、変換MGの面積値が小さいぎ酸含有メタノール溶液を希釈溶媒とした。また、ぎ酸含有メタノール溶液のぎ酸濃度については、MG、LMG、変換MG及び変換LMGの面積値に大きな差が認められなかったことから、0.05%とした（図2-b）。

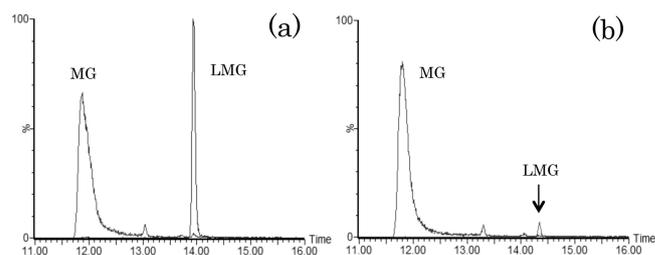


図2 希釈溶媒の違いによるMG標準溶液のトータルイオンクロマトグラム

(a) 告示法に従ってアセトニトリルで調製したMG標準溶液($0.01 \mu\text{g/mL}$)
(b) 0.05%ぎ酸含有メタノール溶液で調製したMG標準溶液($0.01 \mu\text{g/mL}$)

表3 希釈溶媒の違いによるMG及びLMGの面積値の比較

MG標準溶液 ($0.01 \mu\text{g/mL}$)		
希釈溶媒	MG	変換LMG
アセトニトリル	153373	61693
ぎ酸含有 アセトニトリル		
0.05%	139136	1161
0.1%	129630	597
0.2%	150283	340
ぎ酸含有 メタノール		
0.05%	161375	3424
0.1%	157306	3191
0.2%	159951	2243
LMG標準溶液 ($0.01 \mu\text{g/mL}$)		
希釈溶媒	LMG	変換MG
アセトニトリル	801805	0
ぎ酸含有 アセトニトリル		
0.05%	78660	4914
0.1%	9556	20216
0.2%	10749	6559
ぎ酸含有 メタノール		
0.05%	304672	1849
0.1%	329462	1587
0.2%	278861	1690

2. 抽出方法及び精製方法の検討

告示試験法では、試料の精製のため、n-ヘキサンによる脱脂、塩析及びジクロロメタンによる転溶を行い、強酸性陽イオン交換体ミニカラム (Bond Elut SCX等)を用いるとされている。しかし、LMGは脱脂に用いるn-ヘキサン層に移行し、回収率低下の一因となることが確認されている⁶⁾こと、転溶に用いるジクロロメタンは検査従事者の健康への影響が危惧されることから、n-ヘキサン及びジクロロメタンによる精製に代わる方法を検討した。代替として、20%塩化ナトリウム溶液による塩析後、Bond Elut SCXの精製前に、千葉らの報告⁵⁾で示された、脂質除去に有効とされるC18固相抽出カラムのうち、Inert Sep C18を用いることとした。さらに、試験溶液の検討結果により、溶液中の酸濃度が、MG、LMG、MG-d5及びLMG-d5の変換に影響を与えることから、Bond Elut SCX負荷液にぎ酸0.5mLを添加し、さらにSCXカラムのコンディショニング及びSCXカラム負荷後の洗浄溶液をアセトニトリルから1%ぎ酸含有アセトニトリルに変更する試験法を検討した。

その結果、サロゲートの回収率は平均でMG-d5 : 43.6%、LMG-d5 : 53.3%となり、いずれも40%以上を満たしたが、40%を下回る試料も一部認められた (表4)。

この原因として、抽出液中に残存した夾雑物質がBond Elut SCXのイオン交換作用を妨害すると推察し、Inert Sep C18に代えて陰イオン交換固相抽出カラム (Inert Sep NH₂及びInert Sep PSA) により精製する試験法を検討した。

表4 SCXカラムへの保持の改良による添加回収率

分析対象化合物	試 料					average (%)
	No.1 (%)	No.2 (%)	No.3 (%)	No.4 (%)	No.5 (%)	
MG	99.0	99.0	98.3	100.7	96.3	98.7
LMG	89.2	99.8	92.6	99.6	92.2	94.7
MG-d5	68.2	60.0	20.2	48.3	21.2	43.6
LMG-d5	64.9	53.2	59.4	38.5	50.5	53.3

*添加濃度は定量限界濃度 : 0.002 μg/g (サロゲート : 0.005 μg/g)

試料を抽出後、塩析し、得られたアセトニトリル層に定量限界相当量 (0.01 μg) のMG及びLMGを添加し、各固相抽出カラム (Inert Sep NH₂, Inert Sep PSA及びInert Sep C18) で精製後、Bond Elut SCXを用いて精製した。得られた試験溶液をLC-MS/MSで測定し、MG及びLMGの回収率を求めた (表5)。その結果、Inert Sep NH₂では、MGが58.2%、LMGが97.3%であり、Inert Sep PSA及びInert Sep C18に比べて良好であったため、Inert Sep NH₂を用いることとした。

表5 MG及びLMGの回収率

分析対象化合物	Inert Sep NH ₂ (%)	Inert Sep PSA (%)	Inert Sep C18 (%)
MG	58.2	33.4	4.6
LMG	97.3	95.9	73.0

*n=2で実施

*添加濃度は定量限界相当量 : 0.01 μg

3. 妥当性評価

固相抽出カラムをInert Sep NH₂に変更した改良試験法について、試料を用いて添加回収試験を行い、妥当性評価を実施した結果を表6に、MG及びLMGのMRMクロマトグラムを図3に示した。

検量線は、MG及びLMGともに0.0025~0.02 μg/mLの範囲で相関係数0.99以上の良好な直線性が得られた。

MG及びLMGの選択性、真度、併行精度、室内精度及び定量限界は、いずれも目標値を満たした。サロゲートの回収率は、MG-d5 : 54.6% (40.1~67.4%)、LMG-d5 : 70.0% (44.3~90.5%)であり、目標値である40%以上を満たし、うなぎ蒲焼きについて改良試験法の妥当性が確認された。

表6 改良試験法による妥当性評価結果

分析対象化合物	選択性	真度 (%)	サロゲート真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	定量限界 (マトリックス混合標準溶液 0.01 μg/mLのS/N比)
MG	定量限界濃度 (0.01 μg/mL) の面積値×1/3	97.5	54.6	3.6	4.0	527
LMG		96.7	70.0	4.0	2.9	999

**添加濃度は定量限界濃度 : 0.002 μg/g (サロゲート : 0.005 μg/g)

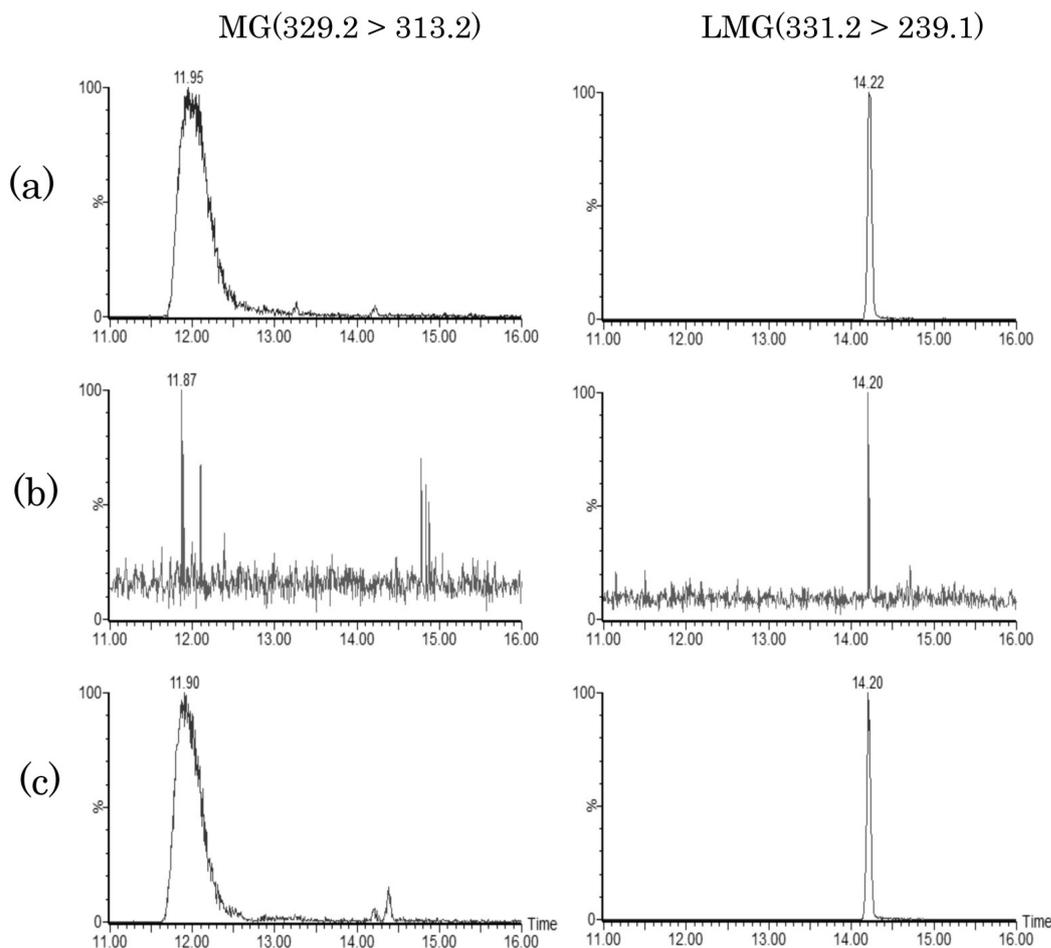


図3 MG及びLMGのMRMクロマトグラム

- (a) 混合標準溶液(0.01 $\mu\text{g/mL}$)
 (b) うなぎ蒲焼き抽出液
 (c) マトリックス混合標準溶液(0.01 $\mu\text{g/mL}$)

まとめ

今回、うなぎ蒲焼きを対象として、告示試験法の試験溶液及び前処理方法を検討した。試験溶液を0.05%酸含有メタノールに変更したところ、MGからLMGへの変換が抑制された。併せて、n-ヘキサン及びジクロロメタンを用いた精製から、Inert Sep NH_2 を用いた固相抽出カラムによる精製に変更し、Bond Elut SCX負荷液にギ酸を添加することとした。この改良試験法により、LMG-d5の回収率は大幅に改善し、妥当性評価の性能パラメータの全項目で目標値を満たし、うなぎ蒲焼きについて妥当性が確認された。

今後は、改良試験法を用いて、過去に検出事例のあるうなぎ肝串蒲焼き及びサバ塩焼き等の加工食品を含む、他の食品についても妥当性評価を実施していきたい。

(平成27年8月1日受理)

文献

- 1) 厚生省：告示第370号(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：食安発1213第1号(平成22年12月13日)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発第1224第1号(平成22年12月24日)
- 4) 山下毅, 西川清文, 篠崎史義, 伴埜行則, 川上雅弘：LC-MS/MSによるうなぎかば焼中のマラカイトグリーン分析法の妥当性評価, 食衛誌, 56(1), 31-36 (2015)
- 5) 千葉美子, 吉田直人, 高橋祐介, 氏家愛子：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, 20-53 (2011)
- 6) 大熊紀子, 氏家愛子, 千葉美子, 吉田直人, 濱名徹：うなぎ中のマラカイトグリーン分析法の検討, 宮城県保健環境センター年報, 28, 101-102 (2010)