

LC/MS/MS による養殖魚類中のマラカイトグリーン および代謝物ロイコマラカイトグリーンの分析

赤木浩一・久保記久子・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Determination of Malachite Green and its Metabolite Leucomalachite Green in Cultured Fishes by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Kouichi AKAKI, Kikuko KUBO and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

A simple and rapid method was developed for the determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green in cultured fishes by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Malachite green-d5 and leucomalachite green-d6 was added as an internal standard before extraction. Malachite green and leucomalachite green was extracted with acetonitrile. The LC separation was performed on a C18 column with a gradient system of 0.02% formic acid-acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The mass spectral acquisition was done in the negative ion mode by applying selected reaction monitoring (SRM). The recoveries of malachite green and leucomalachite green from cultured fishes was 78-89% and 103-104%. The lower limits of quantification of malachite green and leucomalachite green were below 0.001 ppm.

Key Words : マラカイトグリーン malachite green , ロイコマラカイトグリーン leucomalachite green , 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS , 養殖魚類 cultured fish

はじめに

マラカイトグリーン(MG)は、有機色素の一種で鉱物マラカイト(孔雀石)に似た緑色の合成色素として絹・羊毛・黄麻・革・綿・紙等の染色や合成抗菌剤として観賞魚の水カビ病の治療などに使用されている。発ガン性が指摘され、養殖魚類への使用は禁止されているが、2005年8月、中国産のウナギから検出されたのをはじめ、輸入養殖魚類からMGの検出が相次いだ。

養殖魚類中のMGの分析方法は、厚生労働省の通知¹⁾では可視部検出器付き高速液体クロマトグラフを用いているが、同定能力に劣り、可視部吸収を持たない代謝物のロイコマラカイトグリーン(LMG)を測定することが

できない。

そこで、養殖魚類中のMGおよびLMGを選択性の高い高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて、高感度に測定する方法について検討した。

実験方法

1. 試料

市販の養殖魚類(ウナギ, ウナギ蒲焼, タイ)を用いた。

2. 試薬等

標準品: MG, LMG, MG-d5, LMG-d6 標準品は林純

薬工業（株）製を使用した。

標準原液：標準品 2mg を精秤し，100mg/L となるようメタノールで溶解し調製した。

標準溶液：MG および LMG の標準原液を混合しメタノールで適宜希釈して使用した。

内部標準溶液：MG-d5 および LMG-d6 の標準原液を混合し，1mg/L となるようメタノールで希釈して使用した。

その他の試薬：すべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

質量分析装置 (MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。

4. 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は Table 1 に示した。

Table 1. LC/MS/MS Conditions for Analysis of Malachite Green and Leucomalachite Green

Column	GL Science ODS-3	
	50 mm × 2.1 mm i.d. 5 μm	
Column temp.	30	
Mobile phase	Solvent A:0.02% formic acid Solvent B:acetonitrile	
Gradient profile	Time(min)	0 3 15 20
	B(%)	5 5 95 95
Post time	15 min	
Injection volume	5μL	
Ionization	ESI(-)	
Ionspray voltage	-4.5 kV	
Turbo gas temp.	700	
Dwell time	120ms	
	Malachite green	Leucomalachite green
Declustering potential(DP)	-96V	-86V
Collision energy (CE)	-51eV	-45eV
Precursor ion	<i>m/z</i> 329(334)*	<i>m/z</i> 331(337)*
Product ion	<i>m/z</i> 313(318)*	<i>m/z</i> 240(240)*

(*)*:IS

5. 試験溶液の調製

試料 5g を 200mL ビーカーにとり，内部標準溶液 0.5mL，アセトニトリル 30mL を加えてホモジナイズした。5A ろ紙を用いてろ過し，残さにアセトニトリル 15mL を加えて同様に操作した。ろ液をあわせアセトニ

トリルを加えて 50mL とした後，うち 10mL を 40 以下で減圧濃縮し，窒素を吹き付け乾固した。残留物にメタノール 5mL を加え溶解させ，0.2μm フィルターでろ過し試験溶液とした。

6. 定量

MG および LMG のクロマトグラムと MG-d5 および LMG-d6 のクロマトグラムのそれぞれのピーク面積比から内部標準法により作成した検量線を用いて，試験溶液中の MG および LMG 濃度を求め試料中の含量を算出した。

結果及び考察

1. LC条件の検討

MG の測定は，厚生労働省の通知¹⁾では C18 カラムで，移動相に 0.5%酢酸+メタノール(40:60)を用いているが，今回は，他の動物用医薬品等の検査との機器の併用を考慮し，既報²⁾のとおり 0.02%ギ酸+アセトニトリルを用いたグラジエント条件で行った。アセトニトリル 5%で 3 分間保持し 12 分間で 95%まで変化させて 5 分間保持した結果，MG および LMG とも良好なピーク形状が得られた。

2. MS条件の検討

MG 標準溶液 (100ng/mL) をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し測定条件を検討した。MG の分子からプロトンが外れた *m/z* 329[M-H]⁻ をプレカーサーイオンとし，オリフィスプレートの電圧(DP)を変化させて最適化した結果，-96V で最大感度が得られた。定量用モニターイオンについては，コリジョンエネルギーの電圧(CE)を変化させて感度が強く得られたプロダクトイオンのうち，試料由来のきょう雑ピークの影響が少なく，最も S/N が高く得られた *m/z* 313 を選択した。CE は，-51eV で最大感度が得られた。

LMG，MG-d5 および LMG-d6 も同様に操作し Table 1 のとおりモニターイオンを設定した。

3. 検量線

MG および LMG ともに検量線は 0.2 ~ 100ng/mL の範囲で相関係数 0.999 であった。

4. 添加回収試験

試料からの MG の抽出は，厚生労働省の通知¹⁾ではマキルベン緩衝液 (pH3.0) を用いているが，今回は他の動物用医薬品等の検査との抽出溶液の併用を考慮し，既報²⁾のとおりアセトニトリルで抽出することにした。

ただし、最終試験溶液の調製は MG および LMG の溶解性を考慮しメタノールにより調製した。また、定量性を確保するため MG および LMG と同 d 体を内部標準物質として用いた。

本法を用いて、ウナギ、ウナギ蒲焼およびタイに MG および LMG をそれぞれ 0.1 μ g/g 添加して回収試験 (n=3) を行った。Table 2 に示すように MG および LMG の内部標準物質で補正した回収率はそれぞれ 78 ~ 89 % ,103 ~ 104 % , 相対標準偏差はそれぞれ 2.1 ~ 6.4 % , 2.8 ~ 3.1 % と良好であった。また、内部標準物質の回収率はそれぞれ 14 ~ 48 % , 40 ~ 56 % であった。

Table 2. Recoveries of Malachite Green and Leucomalachite Green from Cultured Fishes

Sample	Fortification level (μ g/g)	Average recovery ^{a)}	
		MG	LMG (%)
Eel	0.1	80(6.4)	104(2.8)
Kabayaki (Eel)	0.1	89(2.1)	104(2.9)
Red sea bream	0.1	78(3.5)	103(3.1)

^{a)} n=3

()=RSD

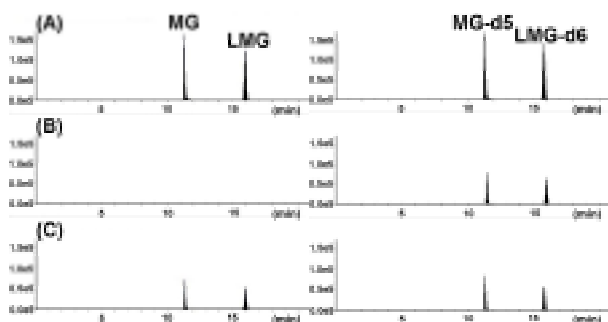


Fig.1. SRM chromatograms of malachite green and leucomalachite green in standard solution containing 20ng/mL of each(A), blank kabayaki (B) and kabayaki fortified with 0.1 μ g/g (C).

Fig.1 に標準溶液(20ng/mL), MG および LMG を含まないウナギ蒲焼ならびに MG および LMG を 0.1 μ g/g 添加したウナギ蒲焼から得られたクロマトグラムを示した。定量に支障のある試料由来の夾雑ピークは見られなかった。

本法による定量下限値(S/N=10)は 0.001ppm 以下であり、厚生労働省の通知の 0.005ppm を下回った。

本法は既報による他の動物用医薬品等の一斉分析法と抽出液を併用することができ代謝物の測定も可能であることから、日常の残留分析法として有用な手法と考える。

文 献

- 1)厚生労働省通知食安監発第 1216002 号：養殖魚に対するマラカイトグリーンの分析法について、平成 16 年 12 月 16 日
- 2)中尾朱美・畑野和広：LC/MS/MS による畜水産食品の残留動物用医薬品および合成抗菌剤の迅速一斉分析() 福岡市保健環境研究所報, 30, 167 ~ 169, 2005