

**技術レポート**

### 3 飼料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の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法に係る添加回収率等の確認及び共通試料による共同試験の結果について

小森谷 敏一\*

#### 1 緒 言

マラカイトグリーン（以下「MG」という。）は、緑色の合成色素で工業的にトリフェニルメタン染料として繊維等の染色に使用されている。また、抗菌活性を示し、水産において水カビ病の治療薬として使用されていたが、近年、発がん性が示唆されており、遺伝毒性が疑われている<sup>1)</sup>。また、ロイコマラカイトグリーン（以下「LMG」という。）は、MGが生体内で還元されて生じる代謝物である。

国内では薬事法の一部改正及びそれに伴う動物用医薬品等取締規則の一部改正により、現在の食用水産用動物に対しての使用が禁止されている。

農林水産省が実施した「平成18年度有害化学物質リスク管理基礎調査事業」において、MG及びLMGによる魚粉の汚染が判明したところであり、このような汚染魚粉が飼料として使用され、食品にMG及びLMGが残留することのないよう、早急にモニタリングを実施する必要がある。

飼料中のMG及びLMGの分析法については、魚粉を主体とした養殖魚用飼料を対象とした分析法として「養殖魚用飼料を対象としたマラカイトグリーン等の分析法のお知らせについて」（平成18年11月21日付け18消安第9224号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知）が暫定的に定められていたが、この方法について、適用範囲を魚粉及び畜産用配合飼料に拡大した上で飼料分析基準に収載するため、その添加回収率等に係る検討及び共通試料による共同試験を実施したので、その結果を報告する。

#### 2 実験方法

##### 2.1 試 料

市販の飼料原料（魚粉）及び配合飼料（まだい育成用、中すう育成用及び子豚育成用配合飼料）をそれぞれ1mmの網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

##### 2.2 定量方法

分析法は飼料分析基準<sup>2)</sup>第8章第2節1によった。

##### 2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）：

LC部：Agilent Technologies 製 1200 Series

MS部：Agilent Technologies 製 6410 Triple Quad LC/MS

2) 高速ホモジナイザー：Hsiangtai 製 HG-200（使用時回転数15,000 rpm）

3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

- 4) 遠心分離器：久保田製作所製 8410
- 5) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200
- 6) ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) :  
Varian 製 Bond Elut SCX (リザーバー容量 3 mL)
- 7) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK 13 溶媒系 (PTFE 製)

## 2.3 試 薬

- 1) 標準液調製用 MG (シュウ酸塩) : Sigma-Aldrich 製, 純度 97.2%
- 2) 標準液調製用 LMG : 林純薬工業製, 純度 99.9%
- 3) 内標準液調製用安定同位体元素標識 MG (MG-d<sub>5</sub>) (シュウ酸塩) : 林純薬工業製, 純度 94.6%
- 4) 内標準液調製用安定同位体元素標識 LMG (LMG-d<sub>6</sub>) : 林純薬工業製, 純度 99.9%
- 5) 溶離液調製用アセトニトリル : 関東化学製, LC-MS 用

## 3 結果及び考察

### 3.1 検量線及び定量上限

MG 及び LMG として 1 mL 中に 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 及び 200 ng を含有し, かつ, 安定同位体元素標識 MG (MG-d<sub>5</sub>) 及び安定同位体元素標識 LMG (LMG-d<sub>6</sub>) としてそれぞれ 5 ng を含有する各混合標準液を調製し, これらの液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し, 得られた MRM クロマトグラムから MG 及び LMG と MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積比を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は, MG 及び LMG として 1.25~1,000 pg の範囲で直線性を示した.

本法の検量線の直線範囲から, 最終試料溶液における定量上限は, MG 及び LMG として 200 ng/mL である. 従って, 200 µg/kg を超えて MG 又は LMG を含有する試料については, 内標準添加量及び最終液量をそれぞれ増やして分析を行う必要があると考えられた.

### 3.2 妨害物質の検討

魚粉及び配合飼料 (養魚用, 鶏用及び豚用) について本法に従って MRM クロマトグラムを作成し, MG 及び LMG の定量を妨害するピークの有無を検討した. その結果, MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった.

### 3.3 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した.

MG 及び LMG として, 魚粉及び配合飼料にそれぞれ 5 及び 100 µg/kg 相当量ずつを添加した試料について, 本法に従って 3 回分析を行い, その回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果, 表 1 のとおり, MG の平均回収率は 73.7~90.5%, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4% 以下であった. また, LMG の平均回収率は 77.1~99.0%, その繰返し精度は RSD として 3.7% 以下であった.

なお, 参考として, 内標準として添加した安定同位体標識 MG について, ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値及び RSD は, それぞれ 53.5% 及び 4.5% であった. 同様に, 安定同位体標識 LMG については, それぞれ 62.4% 及び 3.3% であった.

表 1 添加回収試験結果

(%)				
添加成分	試料の種類	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回収率 <sup>a)</sup>	繰返し精度 <sup>b)</sup>
MG	魚粉	5	78.1	2.4
		100	81.4	1.2
	まだい育成用配合飼料	100	73.7	1.6
		中すう育成用配合飼料	5	87.9
	100		84.2	0.7
	子豚育成用配合飼料	5	85.6	1.4
100		90.5	1.6	
LMG	魚粉	5	85.0	3.7
		100	77.1	2.6
	まだい育成用配合飼料	100	93.9	1.9
		中すう育成用配合飼料	5	94.5
	100		95.2	1.6
	子豚育成用配合飼料	5	98.3	1.1
100		99.0	3.1	

a)  $n=3$ 

b) 相対標準偏差

### 3.4 共同試験

本法の再現精度を調査するため、魚粉及び子豚育成用配合飼料に MG 及び LMG としてそれぞれ  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した共通試料を用い、本法に従って共同試験を実施した。参加試験室は、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、財団法人食品環境検査協会東京事業所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同規格検査部及び同神戸センターの 9 試験室であった。

MG の共同試験の結果は表 2 のとおりであり、魚粉における平均回収率は 86.1%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 3.9% 及び 7.4%、HorRat は 0.34 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 93.8%、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.0% 及び 5.4% であり、HorRat は 0.25 であった。

また、LMG の共同試験の結果は表 3 のとおりであり、魚粉における平均回収率は 91.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 4.6% 及び 16%、HorRat は 0.74 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 100%、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 3.9% 及び 6.1% であり、HorRat は 0.28 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を表 4 に示した。

表 2 MG の共同試験結果

試験室	(μg/kg)			
	魚粉 <sup>a)</sup>		子豚育成用配合飼料 <sup>a)</sup>	
1	1.60	1.76	1.79	1.97
2	1.50	1.66	1.79	1.78
3	1.90	1.98	2.01	2.04
4	1.68	1.66	1.81	1.88
5	1.63	1.64	1.96	1.89
6	1.66	1.60	1.78	1.79
7	1.71	1.70	1.73	1.89
8	1.79	1.93	1.76	1.93
9	1.80	1.79	2.02	1.95
総平均値	1.72		1.88	
回収率 (%)	86.1		93.8	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.9		4.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.4		5.4	
HorRat	0.34		0.25	

- a) 添加濃度 : 2 μg/kg  
 b) 室内繰返し精度 (相対標準偏差)  
 c) 室間再現精度 (相対標準偏差)

表 3 LMG の共同試験結果

試験室	(μg/kg)			
	魚粉 <sup>a)</sup>		子豚育成用配合飼料 <sup>a)</sup>	
1	1.70	1.46	1.73	1.98
2	1.76	1.86	2.18	2.04
3	2.46	2.51	2.19	2.23
4	1.89	1.91	1.96	2.07
5	1.70	1.78	1.99	2.00
6	1.55	1.53	2.00	1.98
7	1.67	1.50	1.81	1.93
8	2.03	2.01	2.01	1.99
9	1.71	1.85	2.01	2.05
総平均値	1.83		2.01	
回収率 (%)	91.3		100	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.6		3.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	16		6.1	
HorRat	0.74		0.28	

- a) 添加濃度 : 2 μg/kg  
 b) 室内繰返し精度 (相対標準偏差)  
 c) 室間再現精度 (相対標準偏差)

表 4 共同試験に使用された LC-MS/MS 機器等

試験室	液体クロマトグラフ	タンデム型質量分析計	LCカラム (内径×長さ, 粒径)
1	Agilent Technologies 1100 Series	Applied Biosystems API 4000	和光純薬工業 Wakosil-II 5C18 RS (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
2	Waters Alliance 2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	島津製作所 LC20 AD	Applied Biosystems API 4000	和光純薬工業 Wakosil-II 5C18 RS (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
4	Waters Alliance 2695	Waters micromass Quattro Micro	ジーエルサイエンス Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 1.8 µm)
6	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×150 mm, 5 µm)
8	Waters Alliance 2795	Waters micromass Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
9	Waters ACQUITY UPLC	Waters micromass Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

飼料中の MG 及び LMG の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法について、添加回収率、繰返し精度等に係る検討及び共同試験による室間再現精度の確認を行ったところ次の結果が得られ、本法は、魚粉及び畜産用配合飼料に適用可能と考えられた。

- 1) MG 及び LMG として、魚粉及び配合飼料に 5 及び 100 µg/kg 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率はそれぞれ 73.7~90.5%及び 77.1~99.0%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4%以下及び 3.7%以下であった。
- 2) 魚粉及び子豚育成用配合飼料に MG 及び LMG としてそれぞれ 2 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室において本法による共同試験を実施した。その結果、MG については魚粉における平均回収率は 86.1%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 3.9%及び 7.4%であり、HorRat は 0.34 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 93.8%であり、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.0%及び 5.4%であり、HorRat は 0.25 であった。

次に LMG については魚粉における平均回収率は 91.3%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.6%及び 16%であり、HorRat は 0.74 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 100%、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 3.9%及び 6.1%であり、HorRat は 0.28 であった。

- 3) 本法は、平成 20 年 4 月 1 日付けで新たに制定された飼料分析基準に記載された。なお、前述の「養殖魚用飼料を対象としたマラカイトグリーン等の分析法のお知らせについて」（平成 18 年 11 月 21 日付け 18 消安第 9224 号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知）は、同日付けで廃止された。

#### 謝 辞

共同試験に御協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社，全国酪農業協同組合連合会，財団法人食品環境検査協会，社団法人日本科学飼料協会，財団法人日本食品分析センター及び財団法人日本冷凍食品検査協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 17 年 11 月 24 日，府食第 1140 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).