

LC-MS/MSによる鰻・鰻加工品中のトリフェニルメタン系色素の分析

坂本 美穂, 竹葉 和江, 笹本 剛生, 草野 友子, 林 洋
金井 節子, 神田 真軌, 永山 敏廣, 森 謙一郎

Determination of Triphenylmethane Dyes in Eel and Boiled Eel by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Miho SAKAMOTO, Kazue TAKEBA, Takeo SASAMOTO, Tomoko KUSANO, Hiroshi HAYASHI,
Setsuko KANAI, Maki KANDA, Toshihiro NAGAYAMA and Ken'ichiro MORI

LC-MS/MSによる鰻・鰻加工品中のトリフェニルメタン系色素の分析

坂本美穂*, 竹葉和江**, 笹本剛生**, 草野友子**, 林洋**
金井節子**, 神田真軌**, 永山敏廣**, 森謙一郎*

LC-MS/MSによる鰻・鰻加工品中のトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物のマラカイトグリーン, ロイコマラカイトグリーン, クリスタルバイオレット, ロイコクリスタルバイオレット, ブリリアントグリーンについてマラカイトグリーン告示分析法による一斉分析を検討した. 本法による添加回収試験結果は, 回収率93.2~109.0%, 変動係数5.6~9.2%であった. 本法を用いて2005年8月~2008年7月の間に都内で流通した鰻・鰻加工品中のトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物の分析を行った結果, 食品衛生法に違反する試料はなかった.

キーワード: マラカイトグリーン, ロイコマラカイトグリーン, クリスタルバイオレット, ロイコクリスタルバイオレット, ブリリアントグリーン, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法, 鰻, 鰻加工品

はじめに

トリフェニルメタン系色素のマラカイトグリーン (以下MGと略す) はFigure 1のように構造にトリフェニルメタン骨格を有しており, 抗菌活性を示すため水産業において水カビ病等の治療薬として使用されていた¹⁻³⁾. しかし, MG及びその代謝物のロイコマラカイトグリーン (以下LMGと略す) は, ラットやマウスを用いた動物実験で発ガン性や遺伝毒性が示唆されているため⁴⁻¹⁰⁾, 日本では養殖水産動物などへの使用が禁止されると共に, 食品衛生法においても「食品から検出されてはならない」とされている. 一方, クリスタルバイオレット (以下CVと略す) やその代謝物のロイコクリスタルバイオレット (以下LCVと略す), ブリリアントグリーン (以下BGと略す) も, MGとの構造の類似性から発ガン性や遺伝毒性を有するのではないかと危惧されている¹¹⁾.

一方, MGは2005年8月に検疫所で実施している輸入時のモニタリング検査で中国産の養殖鰻加工品から検出されて以降, 種々の養殖魚などからMG及びLMGが検出されている¹²⁾. また, 2007年6月にはアメリカの食品医薬品局FDAが養殖魚からMG及びCVが検出されたことを発表するなど¹³⁾, トリフェニルメタン系色素の食品への残留が問題となっている. 現在, 食品中のトリフェニルメタン系色素の試験法としては, 厚生労働省から告示試験法¹⁴⁾や通知試験法¹⁵⁾が示されているが, 色素によって, 試験溶液の調製法や測定条件が異なっている.

そこで, 現在, 標準品が入手可能なトリフェニルメタン系色素のMG, CV及びBGとそれらの代謝物であるLMG及びLCVの5種類の化合物について, 鰻及び鰻加工品中の一斉分析法の検討を行ったので報告する. また, 本分析法を用いて, 都内で流通していた鰻及び鰻加工品中のトリフェニルメタン系色素の残留実態調査を実施したので, その結果についても報告する.

実験方法

1. 試料

2005年8月~2008年7月の間に都内で流通した活鰻7試料うち中国産6, 国産1, 鰻白焼4試料うち中国産3, 台湾産1, 鰻蒲焼51試料うち中国産50, 国産1の計62試料を用いた.

2. 試薬・試液

強酸性陽イオン交換体ミニカラム: Varian社製SCXカラムでカラムサイズが500 mg, 3 mLのものをアセトニトリル5 mLでコンディショニングしたものを用いた.

アンモニア水: 和光純薬工業 (株) 製の特級28%アンモ

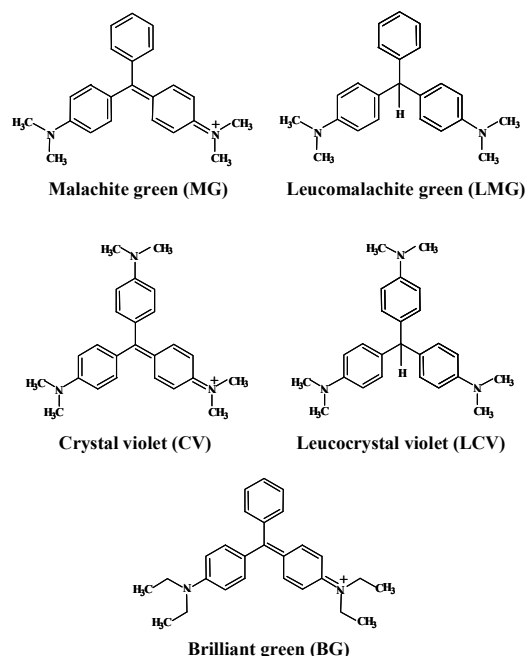


Figure 1. Chemical Structures of Malachite Green, Leucomalachite Green, Crystal Violet, Leuocrystal Violet and Brilliant Green

* 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

ニア水を用いた。

ギ酸アンモニウム：和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用1 mol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いた。

クエン酸・リン酸緩衝液 pH 3.0：クエン酸一水和物63.0 gを量り、水を加えて溶かして1,000mlとした。これを第1液とした。リン酸二ナトリウム十二水和物215 gを量り、水を加えて溶かして1,000mlとした。これを第2液とした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを3.0に調整した。

アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は、高速液体クロマトグラフ用を用いた。

上記以外の試薬については、特級を用いた。

3. 標準品・標準原液

MG標準原液：林純薬工業（株）製1,000 µg/mLシュウ酸マラカイトグリーン-アセトニトリル溶液を用いた。本原液はマラカイトグリーンとして787.4 µg/mLに相当する。

MG-d5標準品：林純薬工業（株）製シュウ酸マラカイトグリーン-d5を用いた。

BG標準品：和光純薬工業（株）製を用いた。

上記以外の標準品：林純薬工業（株）製を用いた。

MG以外の標準原液：LMG, CV, BG及びCV-d4は、それぞれ100 µg/mLになるようにメタノールを用いて調製した。LCV, MG-d5, LMG-d6及びLCV-d4は、それぞれ100 µg/mLになるようにアセトニトリルを用いて調製した。

混合標準溶液：MG, LMG, CV, LCV及びBGの各標準原液を混合して、適宜、アセトニトリルで希釈して調製した。

安定同位体標識標準品用混合標準溶液：MG-d5, LMG-d6, CV-d4及びLCV-d4の各標準品の標準原液を混合して、適宜、

アセトニトリルで希釈して調製した。

4. 装置

液体クロマトグラフ：Waters社製 ACQUITY UPLCを使用した。

質量分析装置：Waters社製 Quattro Premier XEを使用した。

5. 測定条件

1) LC条件

分析カラム：Waters社製 ACQUITY BEH C18 粒子径1.7 µm, 2.1 mm i.d.×100 mm

移動相：A液 10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液, B液 アセトニトリル, グラジエント条件：0分 A:B=90:10→20分 B=100→30分 B=100

流量：0.2 mL/min, カラム温度：40°C

2) MS条件

イオン化法：ESI(+), キャピラリー電圧：0.7 kV, ソース温度：120°C, デソルベーション温度：400°C, コーンガス流量：N₂, 50 L/hr, デソルベーションガス流量：N₂, 900 L/hr

化合物毎の測定条件はTable 1に示した。

6. 試験溶液の調製

試料、ただし、鰻蒲焼の場合は検体に付着したタレをよく拭き取ったものをキッチンバサミで細切した後、さらにフードプロセッサーで細切均一化を行い、その5 gを量り採った。これにMG-d5, LMG-d6, CV-d4及びLCV-d4を25 ng/gになるように添加した後、厚生労働省から告示されている「マラカイトグリーン試験法」¹⁴⁾に従い、前処理を行った

Table 1. MRM settings for positive ion MS/MS analysis of MG, LMG, CV, LCV and BG

Compound	Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	Collision energy (eV)	Cone voltage (V)	Retention times (min)
MG	329 [M] ⁺	313*	37	60	10.8
		165	65		
		208	40		
MG-d5	334 [M] ⁺	318	37	60	10.8
LMG	331 [M+H] ⁺	239*	55	43	17.7
		223	32		
		316	23		
LMG-d6	337 [M+H] ⁺	240	55	43	17.7
CV	372 [M] ⁺	356*	37	45	12.6
		235	50		
		340	48		
CV-d4	376 [M] ⁺	360	37	45	12.6
LCV	374 [M+H] ⁺	358*	32	45	17.9
		238	35		
		253	30		
LCV-d4	378 [M+H] ⁺	362	32	45	17.9
BG	385 [M] ⁺	341*	38	45	14.2
		297	48		
		355	35		

* Quantitative ion

ものを試験溶液とした。

7. 定量

各試験溶液をLC-MS/MSに注入し、得られたMGとMG-d5, LMGとLMG-d6, CVとCV-d4, LCVとLCV-d4及びBGとCV-d4のピーク面積比を用いた内標準法でトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物の定量を行った。

結果及び考察

1. LC-MS/MS測定条件の検討

各標準溶液を用いて、MSスキャンを行ったところ、MG, CV及びBGでは $[M]^+$ が、LMG及びLCVでは $[M+H]^+$ が認められた。そこで、それぞれのイオン強度が最大になるようにコーン電圧を設定した後、各イオンをプリカーサーイオンとして、コリジョンエネルギーを変化させてMS/MSスキャンを行った。その結果、イオン強度の強かった3種類のプロダクトイオンをモニターイオンとして、その中の1つを定量用イオン、それ以外のプロダクトイオンを定性用イオンとした。トリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物のモニターイオンをTable 1に示した。コーン電圧及びコリジョンエネルギー以外のMS条件については、MGのプリカーサーイオンのイオン強度が最大になるように設定した。

LC条件は厚生労働省から示されている試験法^{14,15)}の測定条件に従って、トリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物の混合標準溶液を測定したところ、Figure 2のように保持時間10～18分の間にピークが認められた。

各トリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物を内標準法で検量線を作成したところ、MGは0.5～50 pg, LMG及びLCVは0.1～100 pg, CVは0.1～20 pg, BGは0.1～50 pgの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性が得られた。

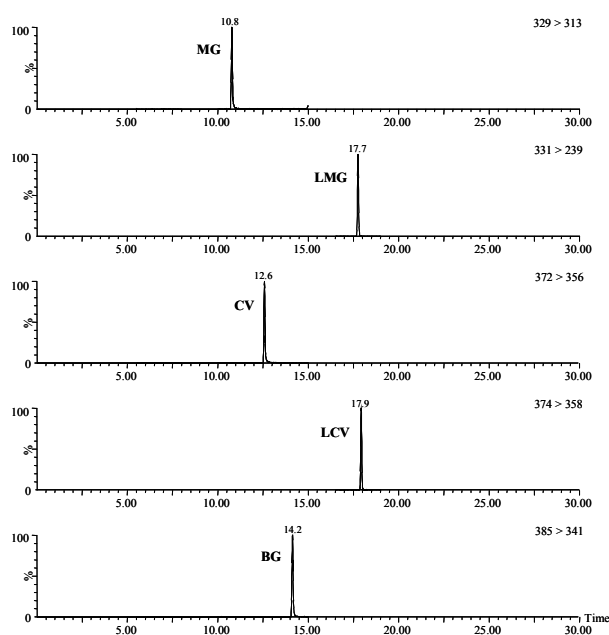


Figure 2. Chromatograms obtained in MRM mode for MG, LMG, CV, LCV and BG standard solution at 10 ng/mL

Table 2. Recovery of MG, LMG, CV, LCV and BG from spiked boiled eel ^a

Compounds	Spiked level (ng/g)	Recovery (%)	RSD ^b (%)
MG	2	100.0	6.1
LMG	2	99.4	5.6
CV	2	100.2	6.0
LCV	2	109.0	9.2
BG	2	93.2	7.0

^a Means of 4-7 replicates.

^b RSD = Relative standard deviation.

2. 添加回収試験

現在、食品中のトリフェニルメタン系色素の試験法としては、厚生労働省から「マラカイトグリーン試験法」¹⁴⁾が告示され、「クリスタルバイオレット、ブリリアントグリーン及びメチレンブルー試験法（畜水産物）」¹⁵⁾が通知されている。しかし、告示試験法は他の試験法では代替できないこと¹⁶⁾、分析対象としているトリフェニルメタン系色素の中でマラカイトグリーンの検出事例が最も多いことから「マラカイトグリーン試験法」の試験溶液の調製法を用いて、添加回収試験を実施した。

あらかじめトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物が含有されていないことを確認した鰻蒲焼に、各トリフェニルメタン系色素とそれらの代謝物を2 ng/gになるように添加して、添加回収試験を行ったところ、Table 2のように安定同位体標識標準品があるMG, LMG, CV及びLCVでは、回収率99.4～109.0%、変動係数5.6～9.2%と良好な結果が得られた。しかし、安定同位体標識標準品のないBGは、絶対検量線法を用いて定量を行ったところ、回収率が70%未満であった。そこで、内標準としてMG-d5, LMG-d6, CV-d4及びLCV-d4を用いて内標準法による定量について検討したところ、CV-d4を内標準として用いた際に回収率93.2%、変動係数7.0%と良好な結果が得られたため、BGの定量の際にはCV-d4を内標準として用いることにした。Figure 3に鰻蒲焼のブランクのクロマトグラムを、Figure 4にトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物を添加したときの鰻蒲焼の代表的なクロマトグラムを示した。

3. 実態調査結果

本法を用いて、2005年8月～2008年7月の間、都内に流通していた鰻・鰻加工品62試料について、実態調査を実施した。その結果、鰻蒲焼3試料からLMGが2～17 µg/g, 1試料からLCVが34 µg/g検出された。なお、このときの検出限界は2 ng/gであった。確認のため、LMG及びLCVが検出された試料について、LMG及びLCVの定量用イオンと定性用イオンの相対強度比を標準溶液のものと比較したところ、両者はよく一致し、試料から検出されたピークがLMG及びLCVであることが確認できた。Figure 5, Figure 6にLMG及びLCVの標準溶液とLMG及びLCVが検出された試料の代表的なクロマトグラムを示した。

今回、LMG及びLCVが検出された試料は、いずれも2005年8月に都内に流通していた中国産の鰻蒲焼であった。当時

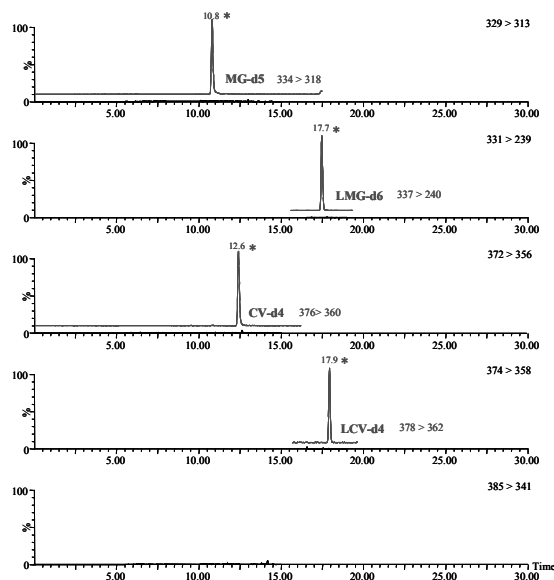


Figure 3. Chromatograms obtained in MRM mode for blank boiled eel

* Surrogate peak

の食品衛生法では、Table 3のようにMGは食品中に検出限界5 ng/gで検出されてはならないことになっていたが、その他のトリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物は規制されていなかった。そのため、いずれの試料も食品衛生法上、違反にはならなかった。その後、2006年5月にポジティブリスト制度施行に伴う改正により食品中のトリフェニルメタン系色素の残留に関する法規制が変わり、現在では、MG及びLMGはいずれも食品中から検出限界2 ng/gで検出されてはならないことになった。また、CV、LCV及びBGは一律基準0.01 ppmが適用されることになった。2005年8月以降、都内ではトリフェニルメタン系色素は、いずれの検体からも検出されていない。しかし、海外や他の地方自治体では、養殖魚や鰻蒲焼からトリフェニルメタン系色素が検出されており¹⁷⁻¹⁸⁾、今後も継続的にモニターしていくことが重要であると考ええる。

まとめ

トリフェニルメタン系色素及びそれらの代謝物5種類について、LC-MS/MS条件及びマラカイトグリーン告示法による前処理法について検討した。鰻蒲焼に各トリフェニルメタン系色素とそれらの代謝物を2 ng/gになるように添加

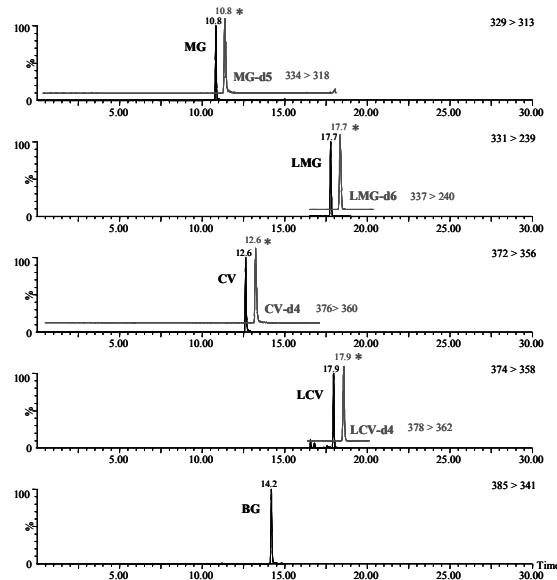


Figure 4. Chromatograms obtained in MRM mode for boiled eel extract spiked with MG, LMG, CV, LCV and BG at 2 ng/g

* Surrogate peak

して、添加回収試験を行ったところ、回収率93.2～109.0%、変動係数5.6～9.2%と良好な結果が得られ、本法を用いて、これらの化合物を同時にスクリーニング分析できることが分かった。

2005年8月から2008年7月の間に、都内で流通していた鰻・鰻加工品62検体の実態調査を実施したところ、鰻蒲焼3試料からLMGが、1試料からLCVが検出された。LMG及びLCVが検出された鰻蒲焼は、いずれも2005年8月に都内に流通していた中国産の鰻蒲焼であり、当時の食品衛生法では違反ではなかった。

文 献

- 1) Foster, F. J., Woodbury, L.: *Prog. Fish-Cult.*, **18**, 7-9, 1936.
- 2) Alderman, D. J.: *J. Fish Dis.*, **8**, 289-298, 1985.
- 3) Schnick, R. A.: *Prog. Fish-Cult.*, **50**, 190-196, 1988.
- 4) Culp, S. J.: *Toxic Rep. Ser.*, **71**, MID-15208078, 2004.
- 5) NTP: *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, **527**, 1-312, 2005.
- 6) Clemmensen, S., Jensen, J. C., Jensen, N. J., et al.: *Arch. Toxicol.*, **56**, 43-45, 1984.

Table 3. The Japanese maximum residue limits of tryphenylmethane dyes in foods

Terms	MG	LMG	CV, LCV, BG
～2006/5/28	N.D. (Detection limit 5 ng/g)		
2006/5/29～ 2006/11/29	N.D. (Detection limit 5 ng/g)	Uniform limit (0.01 ppm)	Uniform limit (0.01 ppm)
2006/11/30～	N.D. (Detection limit 2 ng/g)	N.D. (Detection limit 2 ng/g)	Uniform limit (0.01 ppm)

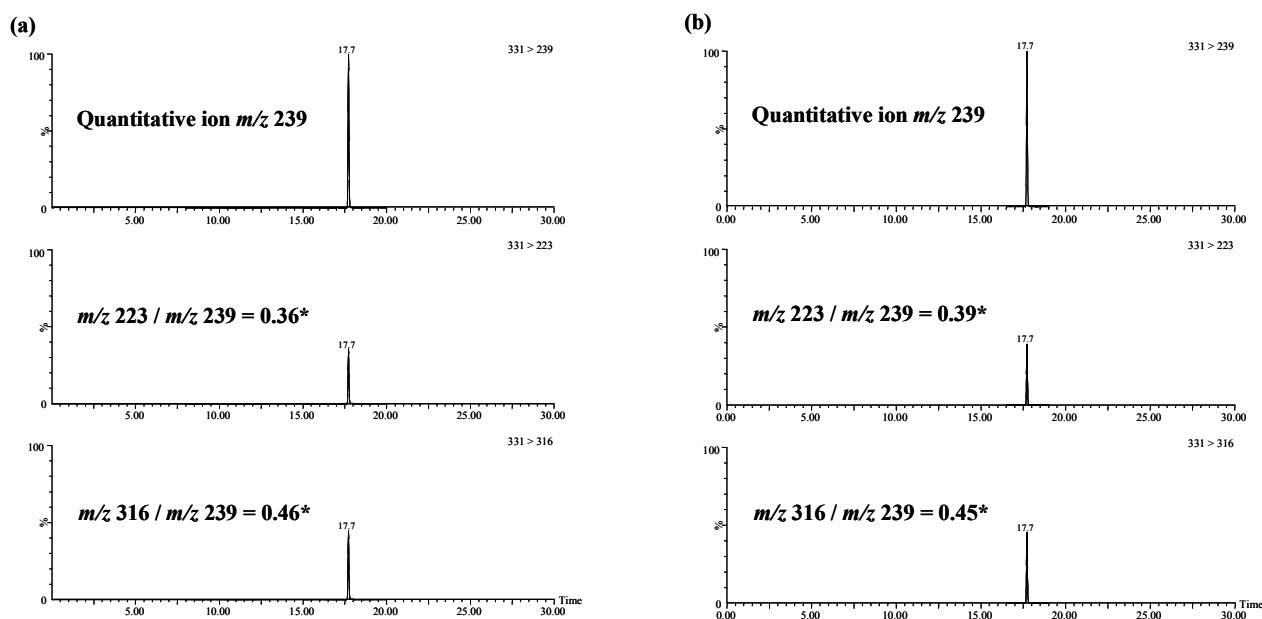


Figure 5. Chromatograms obtained in MRM mode for 2.5 ng/mL LMG standard solution (a) and LMG positive boiled eel (b)

* Relative intensity to the quantitative ion

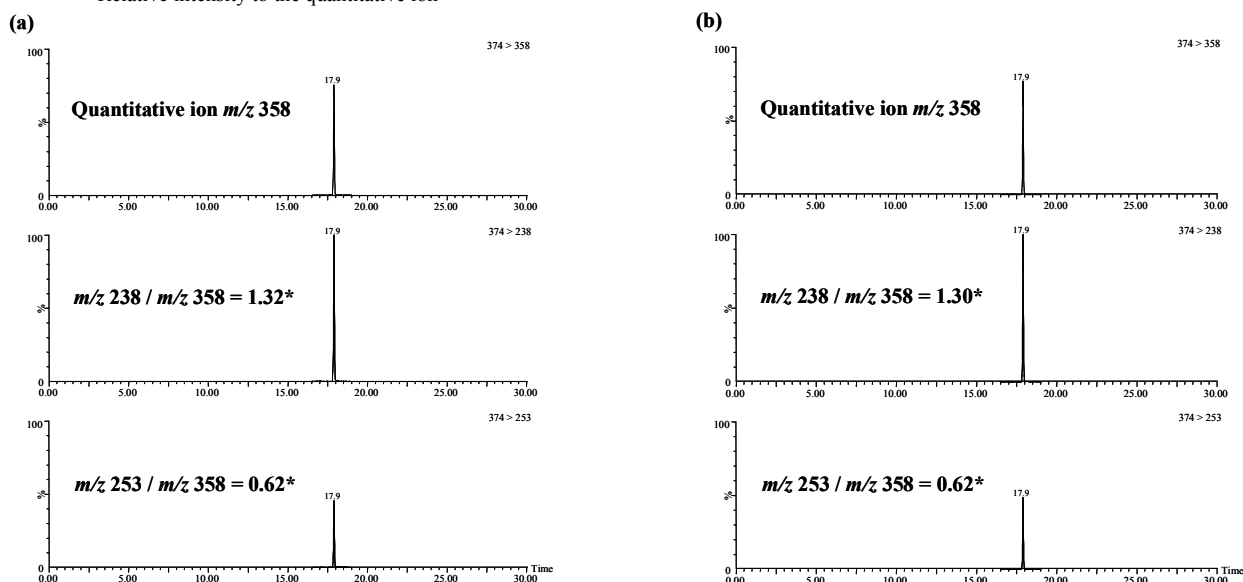


Figure 6. Chromatograms obtained in MRM mode for 2.5 ng/mL LCV standard solution (a) and LCV positive boiled eel (b)

* Relative intensity to the quantitative ion

- 7) Fessard, V., Godard, T., Huet, S., et al.: *J. Appl. Toxicol.*, **19**, 421-430, 1999.
- 8) Mittelstaedt, R. A., Mei, N., Webb, P. J., et al.: *Mutat. Res.*, **561**, 127-138, 2004.
- 9) Culp, S. J., Blankenship, L. R., Kusewitt, D. F., et al.: *Chem. Biol. Interact.*, **122**, 153-170, 1999.
- 10) Culp, S. J., Beland, F. A., Heflich, R. H., et al.: *Mutat. Res.*, **507**, 55-63, 2002.
- 11) Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M.: *FDA LIB*, **23**, No.4395, 2007.
- 12) 厚生労働省：輸入食品等の食品衛生法違反事例，
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/ihan/index.html>
(2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 13) FDA: Press Announcements,
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108941.htm> (2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 14) 平成18年11月30日厚生労働省告示第645号 “マラカイトグリーン試験法”。
- 15) 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，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法の一部改正について” 平成19年9月21日食安発第0921004号(2007)。
- 16) 昭和34年12月28日厚生省告示第370号 “食品，添加物等の規格基準”。

- 17) 国立医薬品食品衛生研究所：食品安全情報，
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html> (2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 18) 群馬県：食品衛生法に基づく収去検査の結果，
http://www.pref.gunma.jp/cts/PortalServlet?DISPLAY_ID=U000004&CONTENT_S_ID=60530 (2009年8月1日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

**Determination of Triphenylmethane Dyes in Eel and Boiled Eel by Liquid Chromatography
Coupled with Tandem Mass Spectrometry**

Miho SAKAMOTO^{*}, Kazue TAKEBA^{**}, Takeo SASAMOTO^{**}, Tomoko KUSANO^{**}, Hiroshi HAYASHI^{**},
Setsuko KANAI^{**}, Maki KANDA^{**}, Toshihiro NAGAYAMA^{**} and Ken'ichiro MORI^{*}

A method in which liquid chromatography was coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for determining the residues of malachite green, leucomalachite green, crystal violet, leucocrystal violet, and brilliant green in eel and boiled eel. Samples were extracted with citric acid-phosphate buffer (pH 3.0)-acetonitrile, and cleaned up by liquid-liquid separation with acetonitrile and *n*-hexane, and SCX solid-phase cartridges. The compounds were determined by reversed-phase LC using a C18 column with 10 mM ammonium formate-acetonitrile. Mass spectral acquisition was performed in the positive mode by applying multiple reaction monitoring. The method was validated in boiled eel spiked with these compounds at 0.002 µg/g, and average recoveries were in the range 93.2%–109.0%, with relative standard deviations of 5.6%–9.2%. The method was applied to 62 eel and boiled eel samples. The concentrations of these compounds in all samples were lower than the Japanese maximum residue limits.

Keywords: malachite green, leucomalachite green, crystal violet, leucocrystal violet, brilliant green, LC-MS/MS, eel, boiled eel

^{*} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Pharmaceutical Sciences
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

^{**} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Food Safety