

マラカイトグリーン試験法（案）

マラカイトグリーンは、食品安全委員会による食品健康影響評価において「発がん性のメカニズムを明らかにすることはできず、ヒトにおける発がんリスクは明確ではないが、現時点で評価した試験結果からみる限り、げっ歯類における発がん性が示唆され、遺伝毒性も否定できないことからマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンに ADI を設定することは適当でない。」と評価された。

この評価結果をふまえ、平成18年2月に、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、「食品に含有されるものであってはならない」（以下「不検出基準」という。）とすることとされ、規制対象がマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとなった。

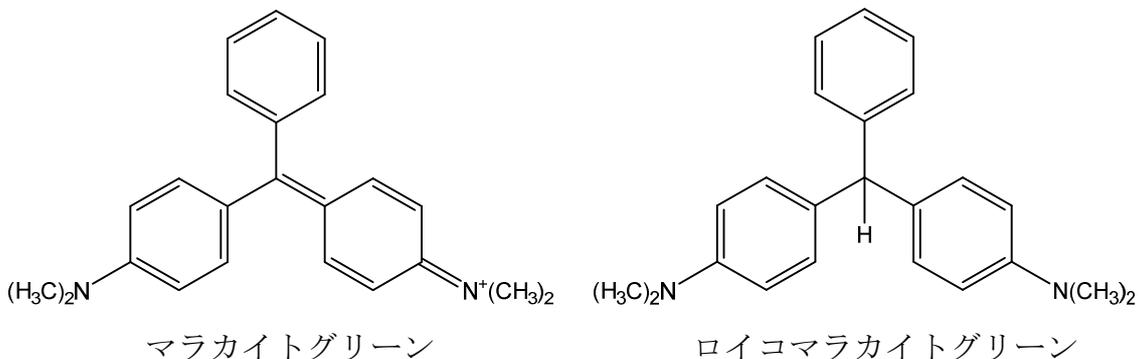
従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。

現行の告示法では有害性の高い試薬を用いていること、一部の食品において添加回収試験で回収率が低いことから、試験法について開発が進められてきたが、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

1. 概要

(1) 分析対象の化合物

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン



(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンをジブチルヒドロキシルエーテル・エタノール溶液及びクエン酸溶液を加えて摩砕均一化した試料からアセトンで抽出する。スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニ

カラムで精製し、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計で定量及び確認する方法である。

(4) 検出限界 各化合物0.002 mg/kg

2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として添加回収試験（添加濃度 0.002 ppm）を行い、真度及び併行精度の確認を実施した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ、しめさば

表 検討結果の真度及び併行精度（試行数5で実施）

	化合物	検討結果	目標値
真度	マラカイトグリーン	78～93%	70～120%
	ロイコマラカイトグリーン	77～92%	
併行精度	マラカイトグリーン	3～8%	25%未満
	ロイコマラカイトグリーン	2～8%	

3. 答申案

別紙のとおり。

(参考) これまでの経緯

平成17年 9月13日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに食品健康影響評価について要請

平成17年10月20日 食品安全委員会における食品健康影響評価（案）の公表

平成17年11月16日 厚生労働大臣から薬事・食品衛生審議会会長あてに残留基準の設定について諮問

平成17年11月21日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

平成17年11月24日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知

平成18年 2月 9日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会

平成18年 5月30日 残留基準告示

平成28年 9月16日

～11月29日 残留農薬等公示分析法検討会で検討

平成28年12月13日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会

平成28年12月20日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知

平成28年12月21日 薬事・食品衛生審議会へ諮問

平成28年12月27日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
石井 里枝	埼玉県衛生研究所化学検査室長
○大野 泰雄	公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室教授
佐々木 一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤 清	一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
佐野 元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山 敏廣	明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授
根本 了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部长
宮井 俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)

答申(案)

マラカイトグリーン試験法

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを分析対象とする。

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「(特級)」と記載したものは、日本工業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

エタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

ギ酸アンモニウム ギ酸アンモニウム(特級)

クエン酸(無水) クエン酸(無水)(特級)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体カラム(500mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体500mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体カラム

(150mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体150mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

50 mmol/lギ酸アンモニウム緩衝液(pH3.5) ギ酸アンモニウム3.15 gを量り、水990mlを加えて溶かし、ギ酸でpH3.5に調整した後、水を加えて1,000mlとする。

3. 標準品

マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品 本品はマラカイトグリーンシュウ酸塩98%以上を含む。

ロイコマラカイトグリーン標準品 本品はロイコマラカイトグリーン98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

試料を正確に量り、重量比で1/2量の15w/w%ジブチルヒドロキシルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え磨砕均一化した後、試料10.0g(脂肪の場合は5.00g)に相当する量を量り採る。アセトン100mlを加え、細切均一化した後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50ml(はちみつの場合は水10ml及びアセトン50ml)を加えて細切均一化し、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mlとする。この溶液から正確に

1 ml（脂肪の場合は2 ml）を量り採り，2 vol%ギ酸4 mlを加える。

b 精製法

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500mg）に，アセトニトリル及び2 vol%ギ酸各5 mlを順次注入し，各流出液は捨てる。四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150mg）に，アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液5 mlを注入し，流出液は捨てる。スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後，アセトニトリル5 mlを注入し，流出液は捨てる。次いで，このカラムの下部に四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを接続し，アセトニトリル及びアンモニア水の混液（9：1）10mlを注入し，溶出液を採り，アセトニトリル及びアンモニア水の混液（9：1）を加えて正確に10mlとしたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品及びロイコマラカイトグリーン標準品をそれぞれアセトンに溶かして500mg/l（マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品については，マラカイトグリーンとしての濃度）とし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液で希釈した溶液を数点調製し，それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計に注入し，ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお，本法に従って試験溶液を調製した場合，試料中0.002mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.00001mg/lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し， a 検量線の作成によりマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

（例）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm，長さ150mm，粒子径5 µm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び50 mmol/lギ酸アンモニウム緩衝液（pH3.5）混液（3：7）から（9：1）までの濃度勾配を15分間で行い（9：1）で10分間保持する。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法，ポジティブモード

主なイオン（m/z）

マラカイトグリーン：プリカーサーイオン 329，プロダクトイオン 313，165

ロイコマラカイトグリーン：プリカーサーイオン 331，プロダクトイオン 316，239

注入量：10 µl

保持時間の目安

マラカイトグリーン：8分

ロイコマラカイトグリーン：16分