

食安基発第 0616001 号  
食安監発第 0616001 号  
平成 18 年 6 月 16 日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部基準審査課長  
監視安全課長  
(公印省略)

### 食品中のマラカイトグリーンの試験法について

標記については、平成 18 年 5 月 25 日付け食安輸発第 0525003 号にて通知し、本年 11 月 29 日までの間、検査命令及びモニタリング検査における食品中のマラカイトグリーンの試験については、同通知に示す試験法により検査を実施するよう通知したところですが、当該試験法では食品によっては試験が困難な場合があることが判明したことから、今後実施する検査命令及びモニタリング検査における食品中のマラカイトグリーンの試験については別添の試験法により、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを分析対象として検査を実施することとします。

なお、当分の間は、平成 18 年 5 月 25 日付け食安輸発第 0525003 号により試験を実施しても差し支えないこととします。

## マラカイトグリーン試験法

## 1. 分析対象化合物

マラカイトグリーン  
ロイコマラカイトグリーン

## 2. 装置

高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS) を用いる。

## 3. 試薬・試液

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の第

## 2 添加物の部 C 試薬・試液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 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0)

第 1 液：クエン酸 63.0 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。

第 2 液：リン酸二ナトリウム 215 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。

第 1 液に第 2 液を加えて混和し、pH を 3.0 に調整する。

ジクロロメタン ジクロロメタン (特級)

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 無水硫酸ナトリウム(特級)。当該農薬等の分析の妨害物質を含む場合には、酢酸エチルで洗浄したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

シュウ酸マラカイトグリーン 本品はシュウ酸マラカイトグリーン 97%以上を含み、分解点は 164°C である。

ロイコマラカイトグリーン 本品はロイコマラカイトグリーン 97%以上を含み、融点は 103°C である。

## 4. 試験溶液の調製

検体を細切均一化した後、その 5.00 g を量り採り、クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) 10 mL を加えて細砕する。これにアセトニトリル 15 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、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る。残留物にアセトニトリル 15 mL を加え、上記と同様に振り混ぜ、遠心分離した後、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせる。

これに 20%塩化ナトリウム溶液 50 mL 及びジクロロメタン 10 mL を加え、穏やかに振とうした後、静置し、アセトニトリル層を採る。

これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中をろ過し、40°C 以下でアセトニトリル及びジクロロメタンを除去する。

この残留物にアセトニトリル 20 mL 及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 10 mL を加え、

振とう器を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトニトリルを除去する。なお、脂質の多い検体の場合は、*n*-ヘキサン層にアセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様に振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でアセトニトリルを除去する。

この残留物にアセトニトリル及び 0.1%ギ酸（3：7）混液 1 mL を加えて溶かし、これを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

マラカイトグリーンとして 10.0 mg に相当するシュウ酸マラカイトグリーンをメタノールに溶解して 100 mL とし、マラカイトグリーン標準原液とする。

ロイコマラカイトグリーンとして 10.0 mg に相当するロイコマラカイトグリーンをメタノールに溶解して 100 mL とし、ロイコマラカイトグリーン標準原液とする。

それぞれの標準原液をアセトニトリル及び 0.1%ギ酸（3：7）混液で希釈して 0.025～0.5 mg/L 溶液を数点調製する。

それぞれ LC/MS 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。

## 6. 定量

試験溶液を LC/MS に注入し、5. の検量線でマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの含量をそれぞれ求める。

## 7. 測定条件

### LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 2～5 μm）、内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm のステンレス管を用いる。

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.1%ギ酸の混液（2：8）から（19：1）までの濃度勾配を 10 分間で行い、（19：1）で 10 分間保持する。マラカイトグリーンが 10 分で流出する流速に調整する。

主なイオン：ESI(+)においてマラカイトグリーン 329、ロイコマラカイトグリーン 331

## 8. 定量限界

マラカイトグリーン 0.005 mg/kg

ロイコマラカイトグリーン 0.01 mg/kg

## 9. 留意事項

### 1) 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試料からアセトニトリル及びクエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）で抽出し、ジクロロメタンに転溶した後、アセトニトリル／ヘキサン分配により脱脂し、LC/MS で測定する方法である。

## 2) 注意点

- ① マラカイトグリーン未変化体と代謝物の置換が起こり得ることから、試験操作を速やかに行うこと。
- ② ジクロロメタン転溶及びアセトニトリル／ヘキサン分配の際に溶媒が乳化する場合は、遠心分離等により層を完全に分離すること。
- ③ LC/MS の代わりに LC/MS/MS を用いても良い。LC/MS 又は LC/MS/MS においては、安定同位体標識物質を用いた補正を行うことが望ましい。回収率が 70%未満の場合には、安定同位体標識物質を用いた内標準法又は標準添加法により補正すること。
- ④ LC/MS の他に、可視分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-VIS) 又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-DAD) により測定することが可能である。その際には以下の変更を行うこと。

試験溶液調製用溶媒、標準原液希釈用溶媒及び移動相に用いる 0.1%ギ酸を、0.05 mol/L 酢酸アンモニウム又は 0.05 mol/L クエン酸等の溶液 (pH 3～7) に置き換える。

オクタデシルシリル化シリカゲルカラムと可視分光光度型検出器又は多波長検出器の間に、二酸化鉛 (PbO<sub>2</sub>: 純度 85%以上) を内径 2～5 mm、長さ 10 mm のステンレス管に充てんしたカラムを連結して操作する。

測定波長は 620 nm 付近の極大吸収波長とする。
- ⑤ シュウ酸マラカイトグリーン (C<sub>52</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>: 927.02) 12.7 mg が、マラカイトグリーン (C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>: 364.90) 10.0 mg に相当する。