

食安基発第 1013001 号
食安監発第 1013003 号
平成 18 年 10 月 13 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等について

標記については、平成 18 年 5 月 25 日付け食安輸発第 0525003 号及び平成 18 年 6 月 16 日付け食安基発第 0616001 号・食安監発第 0616001 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、今般、マラカイトグリーンの代謝物であるロイコマラカイトグリーンをより安定的に分析可能とする改良を行ったことから、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検査を実施することとします。

検査の結果、ロイコマラカイトグリーンを検出した場合には、その結果を分析値とし、マラカイトグリーンを検出した場合には、平成 16 年 12 月 16 日付け食安監発第 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」により確認検査を行い、その結果を分析値とすることとします。

なお、登録検査機関に対して、速やかに本試験法による検査を実施するよう依頼しており、本試験法による検査の実施が可能となるまでの間は、平成 18 年 5 月 25 日付け食安輸発第 0525003 号及び平成 18 年 6 月 16 日付け食安基発第 0616001 号・食安監発第 0616001 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

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS 又は LC/MS/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 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

ギ酸アンモニウム ギ酸アンモニウム (特級)

強酸性陽イオン交換体ミニカラム (500 mg) 内径8~9 mm のポリエチレン製カラム管に、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲル 500 mg 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。

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。

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 本品の融点は 103°Cである。

安定同位体元素標識シュウ酸マラカイトグリーン

安定同位体元素標識ロイコマラカイトグリーン

安定同位体元素標識標準溶液 安定同位体元素標識シュウ酸マラカイトグリーン及び安定同位体元素標識ロイコマラカイトグリーンをアセトニトリルに溶解して、各 25 ng 相当/mL とする。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

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。

うなぎの場合は、検体を細切均一化した後、その 5.00 g を量り採り、安定同位体元素標識標準溶液 1 mL を添加し、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 *n*-ヘキサン 5 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を採る。これに *n*-ヘキサン 5 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採る。

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、振とう機を用いて 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、ろ過する。

b 精製法

強酸性陽イオン交換体ミニカラム (500 mg) に、アセトニトリル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 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。このカラムにアセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C 以下でアセトニトリル及びアンモニア水を除去する。この残留物にアセトニトリル 1.0 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で希釈し、0.01~0.1 mg/L 溶液を数点調製する。それぞれ LC/MS 又は LC/MS/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。

うなぎを検査する場合にあっては、それぞれの標準原液をアセトニトリルで希釈し、安定同位体元素標識標準シュウ酸マラカイトグリーン及び安定同位体元素標識ロイコマラカイトグリーンを加えて、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン 0.01~0.1 mg/L・各安定同位体元素標識標準品 0.025 mg 相当/L 含有溶液を数点調製する。それぞれ LC/MS 又は LC/MS/MS に注入し、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンと、各安定同位体元素標識標準品のピーク高又はピーク面積の比を求めて検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC/MS 又は LC/MS/MS に注入し、5. 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 又は LC/MS/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 0.01mol/L ギ酸アンモニウムの混液（1：9）から（1：0）までの濃度勾配を 20 分間で行い、（1：0）で 10 分間保持する。マラカイトグリーンが約 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 0.002 mg/kg

ロイコマラカイトグリーン 0.002 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、強酸性陽イオン交換体ミニカラム（500 mg）で精製し、LC/MS 又は LC/MS/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 アセトニトリル-水層/ヘキサン分配及びジクロロメタン転溶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 回収率が 70%未満又は 120%を超える場合には、安定同位元素標識標準品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 シュウ酸マラカイトグリーン（ $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{12}$: 927.02）12.7 mgが、マラカイトグリーン（ $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$: 364.90）10.0 mgに相当する。