

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発報告書

ゲンチアナバイオレット試験法（畜水産物）

ゲンチアナバイオレット試験法（畜水産物）の検討結果

【緒言】

1. 目的及び試験法の検討方針

ゲンチアナバイオレット（以下「GVと略す」）はpH指示薬や染色剤として用いられているほか、殺菌消毒効果もあるため微生物培養検査における抗菌剤としても用いられている。現在、食品における基準値は設定されていない。

本検討では、抗菌剤であるマラカイトグリーンと類似した物理化学性質を持っていることに着目し、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）に規定する試験法、マラカイトグリーン試験法が、ゲンチアナバイオレット及びロイコゲンチアナバイオレット（以下「LGVと略す」）にも適用可能であるか検討を行った。

1) 規制対象物質

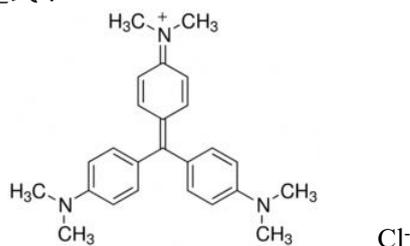
GV及びLGV

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

GV

構造式：



化学式：C₂₅H₃₀ClN₃

分子量：407.99

化学名：[4-[Bis[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]-dimethylazanium

外 観：緑色粉末

融 点：215℃

蒸気圧：1.02×10⁻¹³ mm Hg (25℃)

溶解性：水：4000 mg/L (25 °C)

エタノール 3～14、アセトン 0.4、クロロホルム 5.1 (以上 %)

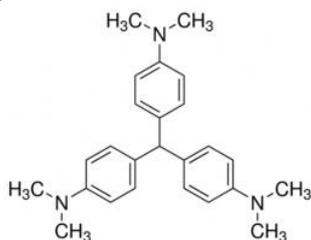
キシレンに不溶

オクタノール/水分配係数：log Kow = 0.96

(出典：HSDB)

LGV

構造式：



化学式：C₂₅H₃₁N₃

分子量：373.54

化学名：4-[Bis[4-(dimethylamino)phenyl]methyl]-N,N-dimethylaniline

外 観：白色結晶粉末

融 点：175℃

溶解性：ベンゼンに可溶

オクタノール/水分配係数：log Kow = 5.7

(出典：MSDS)

2) 基準値

食品において「不検出」とされる農薬等の成分に該当する。検出限界は0.002ppmである。

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

どじょう、なまず及びうなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、さけ、えび、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

①どじょうは可食部（頭部、内臓、骨、皮及び尾部を含む）100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

②なまずは、頭部、皮、ひれ、内臓及び骨を除いた筋肉部100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

③うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

④しじみは、貝殻を除いた後約5分間水切りを行った試料100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

⑤さけは可食部（皮を含む）100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

⑥えびは頭部、尾部及び殻を除いた試料100gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/w%ジブチルヒドロキシトルエン・エタノール溶液及び重量比で1/2量の50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

⑦牛の筋肉は脂肪層を可能な限り除いた後、試料100 gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/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50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

⑧牛の脂肪は筋肉部を可能な限り除いた後、試料100 gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/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50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、脂肪組織が半液状となる程度まで磨砕均一化した。

⑨牛の肝臓は試料100 gを正確に量り、重量比で1/2量の15 w/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50 w/w%クエン酸溶液をそれぞれ加え、磨砕均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

GV標準品：純度94.0%（富士フィルム和光純薬製）

LGV標準品：純度97.0%（富士フィルム和光純薬製）

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン及びエタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル及びメタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸：試薬特級（関東化学製）

アンモニア水（28%）：試薬特級（小宗化学薬品製）

ギ酸アンモニウム、クエン酸及びジブチルヒドロキシルエン（BHT）：和光特級（富士フィルム和光純薬製）

ガラス繊維ろ紙（GFP）：桐山漏斗用（直径60 mm、桐山製作所製）

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

：Oasis MCX（充てん量500 mg/6 mL、Waters製）

4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

：Oasis MAX（充てん量150 mg/6 mL、Waters製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：GV標準品（純度94.0%）10.64 mgを精秤し、メタノールに溶かして100 mg/L溶液を調製した。LGV標準品（純度97.0%）10.31 mgを精秤し、メタノールに溶かして100 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：GV標準原液及びLGV標準原液をアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液で希釈し、GV及びLGV各0.000005～0.000015 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：GV標準原液及びLGV標準原液をメタノールで希釈して各0.1 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

50 mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液（pH 3.5）

ギ酸アンモニウム3.15 gを量り、水990 mLを加えて溶かし、ギ酸でpH 3.5に調整した後、水を加えて1,000 mLとした。

50 w/w%クエン酸溶液

クエン酸50 g及び水50 gを混合した。

15 w/w%BHT・エタノール溶液

BHT15 g及びエタノール85 gを混合した。

2 vol%ギ酸

ギ酸20 mLに水を加えて混合し、1,000 mLとした。

アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液

アセトニトリル450 mL及びアンモニア水50 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック (イカ・ジャパン製)

ロータリーエバポレーター：R-200 (BUCHI製) 等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	MS-8050	島津製作所
LC 装置	LC-30AD	島津製作所
データ処理	LabSolutions	島津製作所

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	XBridge C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm (Waters 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：50 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.5) B液：アセトニトリル																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	70	30	15	10	90	25	10	90	25.1	70	30	30	70	30
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.0	70	30																			
15	10	90																			
25	10	90																			
25.1	70	30																			
30	70	30																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (kV)	4.0																				
イオン化室温度 (°C)	400																				
脱溶媒ガス	窒素 5.0 L/min																				
コリジョンガス	アルゴン																				
定量イオン (m/z)	GV +372.2→356.4[コーン電圧：13 (V)、コリジョンエネルギー：39 (eV)] LGV +374.2→358.5[コーン電圧：13 (V)、コリジョンエネルギー：24 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	GV +372.2→340.4[コーン電圧：13 (V)、コリジョンエネルギー：55 (eV)] LGV +374.2→238.4[コーン電圧：13 (V)、コリジョンエネルギー：28 (eV)]																				
保持時間 (min)	GV : 10.0、LGV : 15.4																				

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した混合標準溶液10 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からGV及びLGVの量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用混合標準溶液を使用した。

牛の脂肪以外（添加濃度：0.002 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを0.2 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.002 ppm）：1. 2) の試料5.00 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを0.1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

GV及びLGVをBHT・エタノール溶液及びクエン酸溶液を加えて磨砕均一化した試料からアセトンで抽出した。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（以下「MCXと略す」）及び4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（以下「MAXと略す」）で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

1. 2) の試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に相当する量を200 mL遠心管に量り採り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、GFPを用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。GFP上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から正確に1 mL（牛の脂肪の場合は2 mL）を分取した。

2) 精製

MCX [Oasis MCX (500 mg)] にアセトニトリル及び2 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。MAX [Oasis MAX (150 mg)] 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、流出液は捨てた。1) で得られた分取液に2 vol%ギ酸4 mLを加え、MCXに注入した後、アセトニトリル5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、MCXの下部にMAXを接続し、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、溶出液を採り、アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 試料100 gに15 w/w%BHT・エタノール溶液50 g及び50 w/w%クエン酸溶液50 gを加え、
- ↓ 磨砕均一化後、試料10.0 g相当（牛の脂肪：5.00 g相当）を量り採る

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過 (GFP)
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過 (GFP)
- | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液1 mL（牛の脂肪：2 mL）分取

MCX (500 mg) 及びMAX (150 mg) 精製

- | MCX：アセトニトリル及び2 vol%ギ酸各5 mLでコンディショニング

- | MAX : アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液5 mLでコンディショニング
- | 分取液に2 vol%ギ酸4 mLを加えMCXに注入
- | アセトニトリル5 mLで洗浄
- | MCXの下部にMAXを連結
- | 連結カラムからアセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液10 mLで溶出
- | アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液で正確に10 mLとし、
- ↓ 試験溶液とする

LC-MS/MS定量

10 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00001 mg/Lの検量線用混合標準溶液0.5 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

GV及びLGVはESI (+) モードでの測定が可能であった。GVのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして372が得られた。 m/z 372をプリカーサーイオンとした場合、強度及び選択性ともに良好であったため、プロトン付加イオンでなく、GVの分子イオン (m/z 372 [M]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 372をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度順としては m/z 356、次いで、340であったため、 m/z 356を定量用イオン、 m/z 340を定性用イオンとした。

LGVのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして374が得られたので、LGVのプロトン付加分子 (m/z 374 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 374をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。強度として m/z 358が強く、次いで m/z 238であったため、 m/z 358を定量用イオン、 m/z 238を定性用イオンとした。

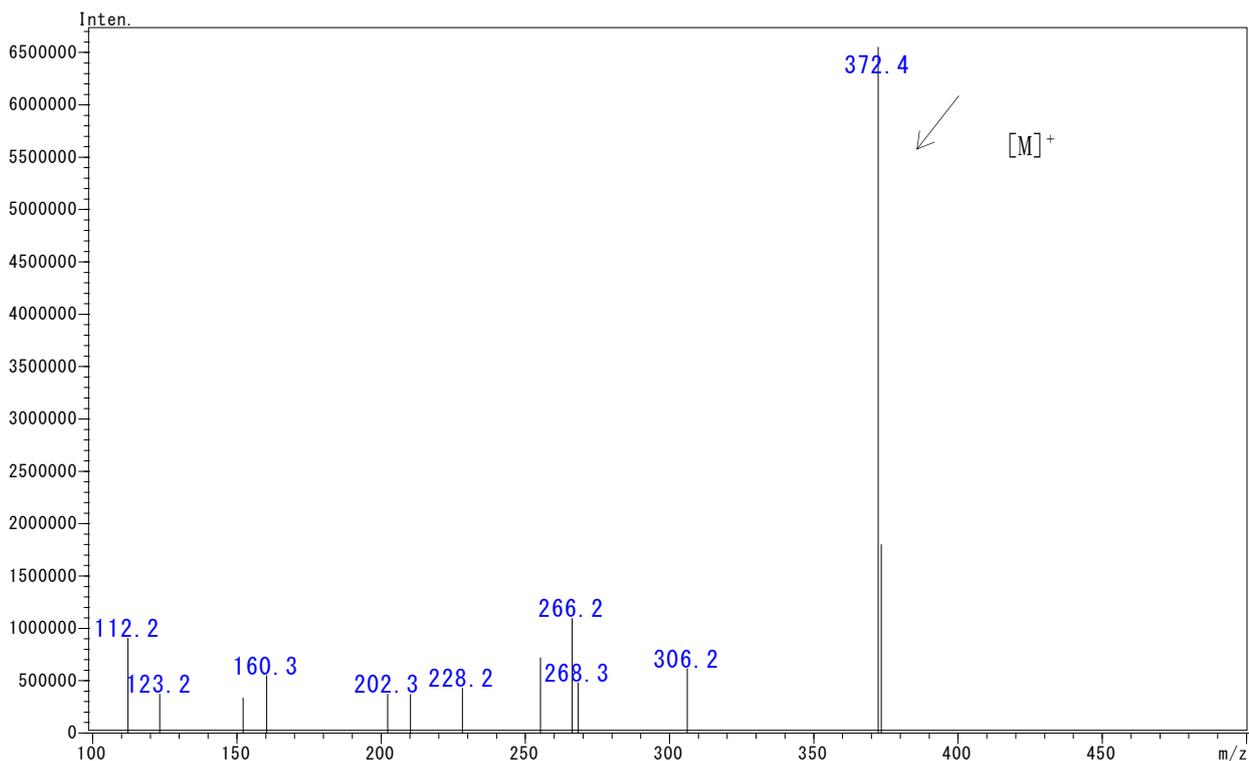


図1 GVのマススペクトル
 スキャン範囲：m/z 100~500
 測定条件：ESI+、CV=13 (CV=コーン電圧)

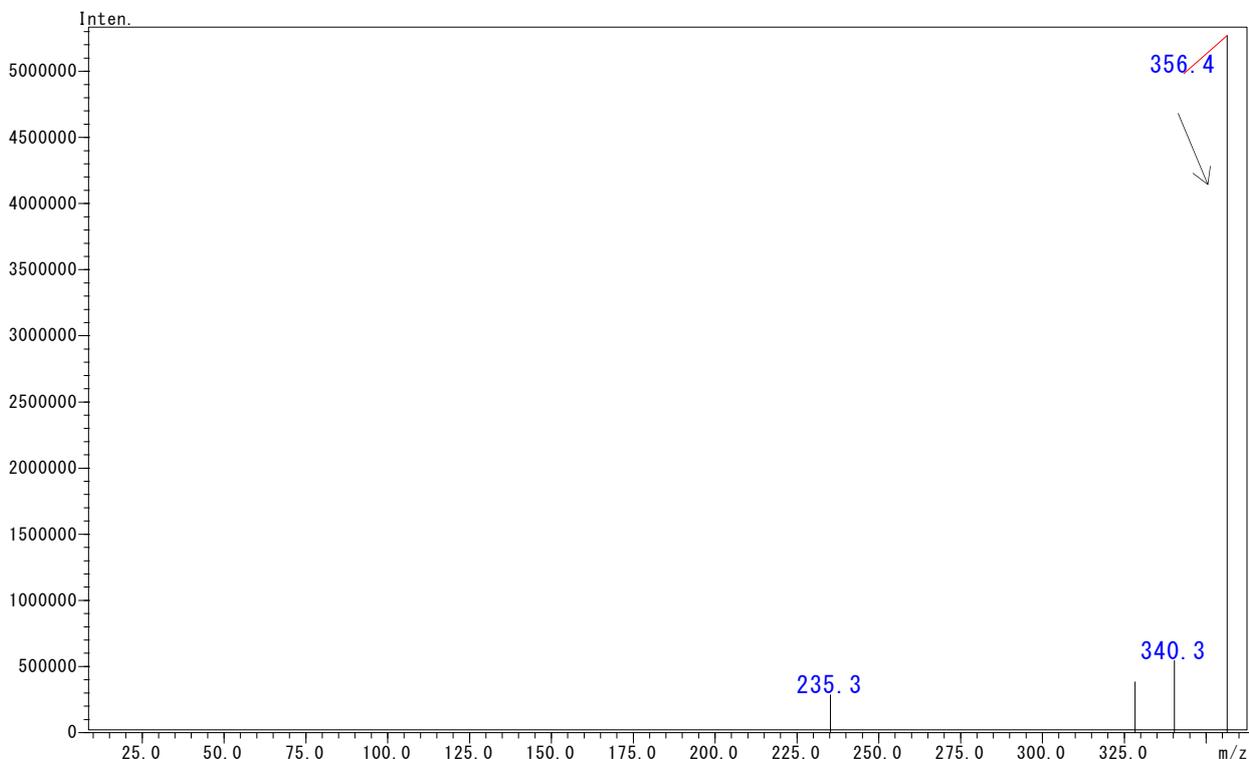


図2-1 GVのプリカーサーイオンm/z 372のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：m/z 9~362
 測定条件：ESI+、CV=13、CE=39 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

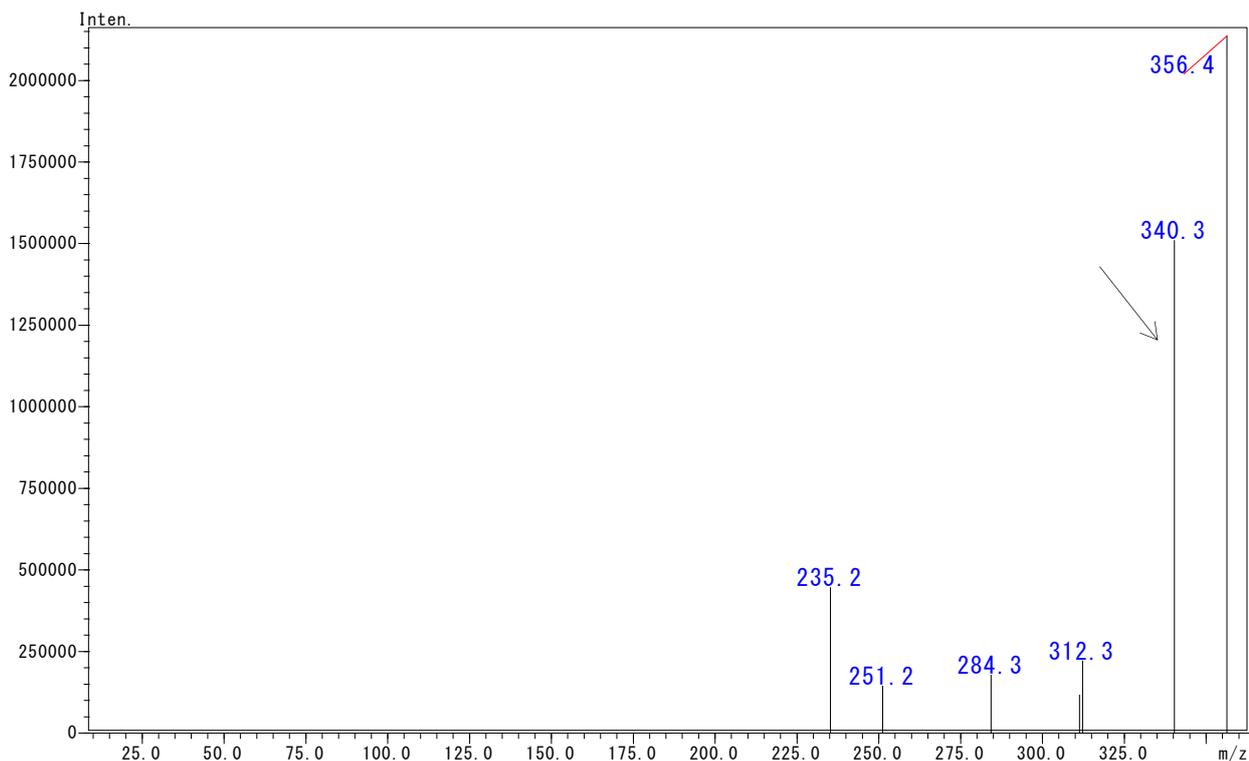


図2-2 GVのプリカーサーイオン m/z 372のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲： m/z 9~362
 測定条件：ESI+、CV=13、CE=55 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

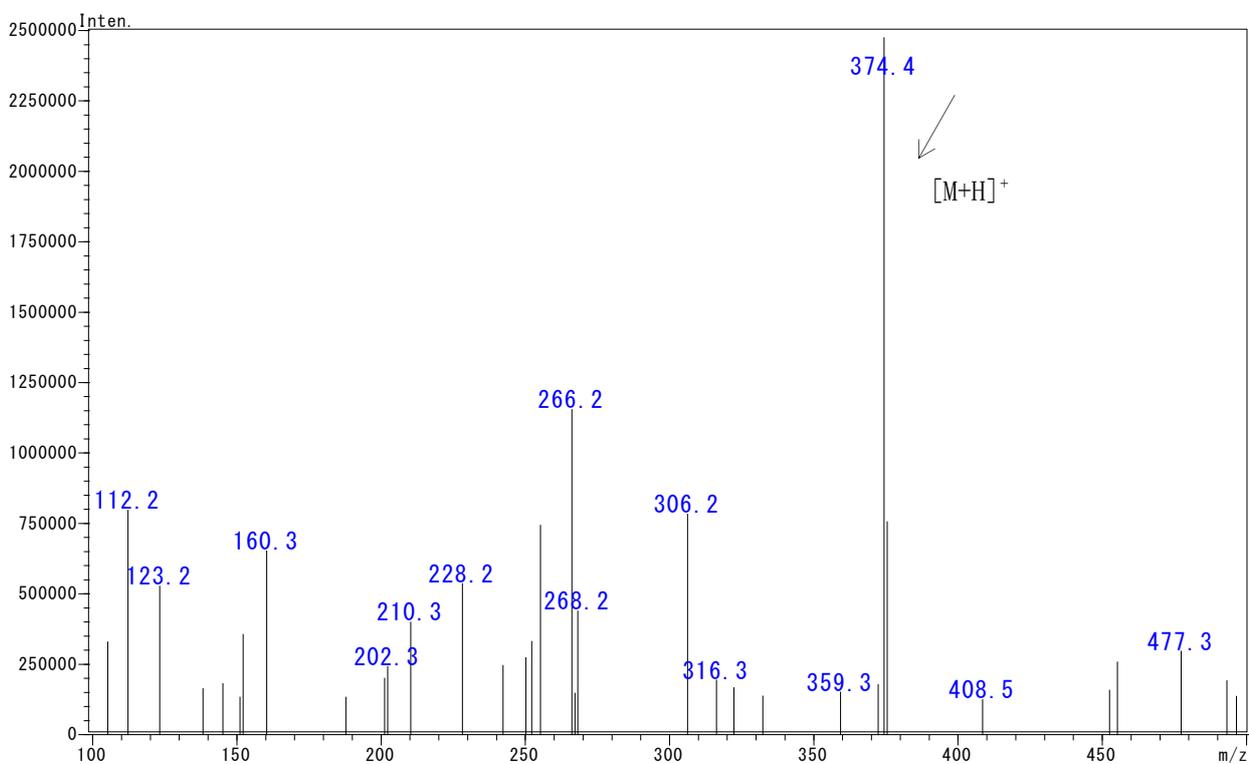


図3 LGVのマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 100~500
 測定条件：ESI+、CV=13 (CV=コーン電圧)

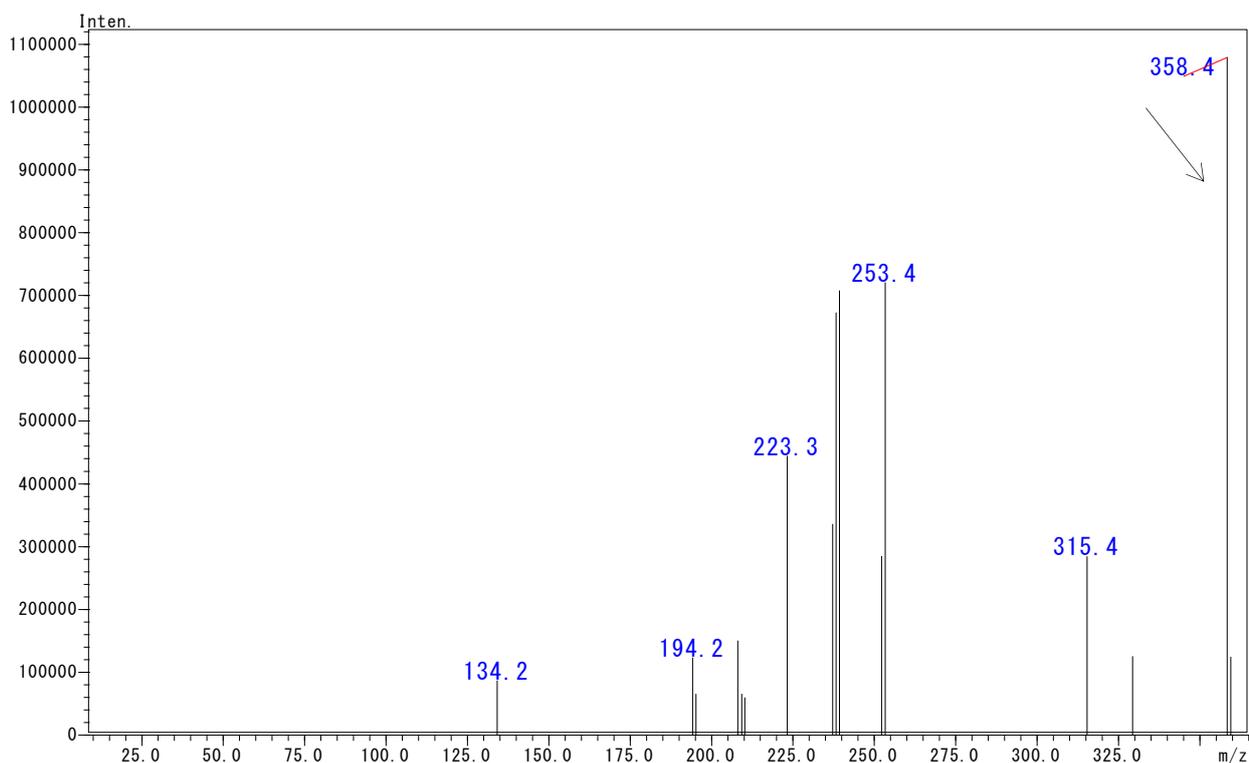


図4-1 LGVのプリカーサーイオン m/z 374のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲 : m/z 9~364

測定条件 : ESI+, CV=13, CE=24 (CV=コーン電圧, CE=コリジョンエネルギー)

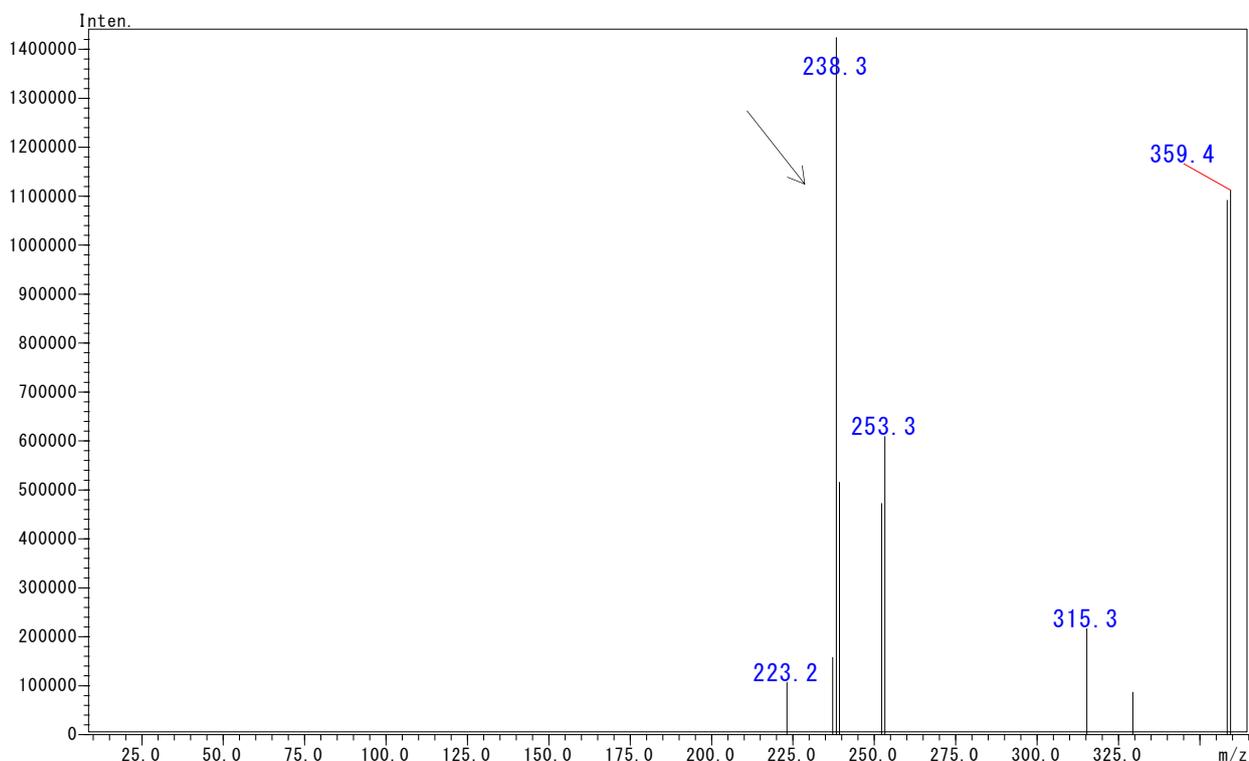


図4-2 LGVのプリカーサーイオン m/z 374のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲 : m/z 9~364

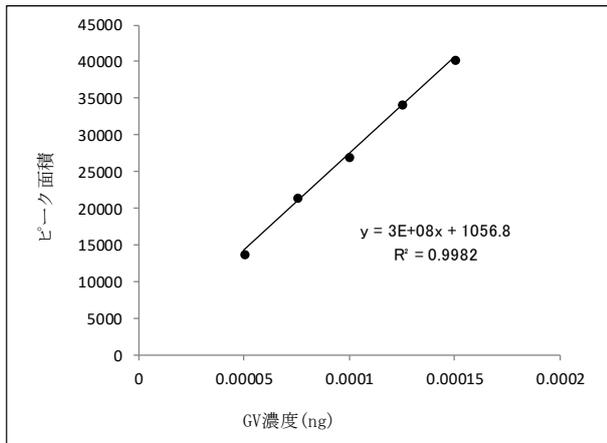
測定条件 : ESI+, CV=13, CE=28 (CV=コーン電圧, CE=コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分離カラムとしてXBridge C18（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm）を用い、移動相として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）を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはXBridge C18（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm）を、移動相には、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）を用い、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）（3：7）から（9：1）までの濃度勾配を15分間で行い、（9：1）で10分間保持することとした。

3) 検量線

図5にGV及びLGVの検量線の例を示した。0.00005 mg/L (0.00005 ng) ～0.00015 mg/L (0.00015 ng) の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は0.996以上であり良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例

機種（メーカー）：LabSolutions

（島津製作所製）

ピークの定量方法：ピーク面積法

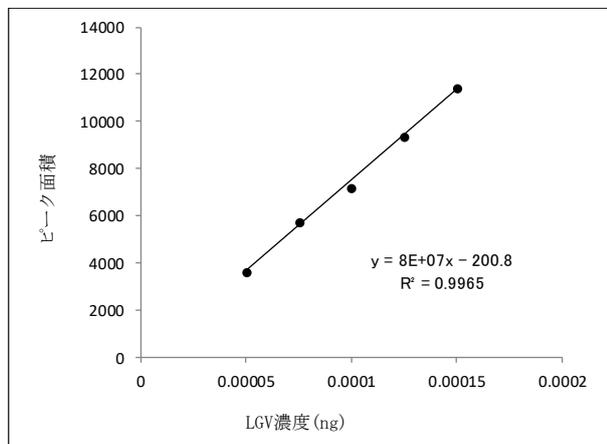
検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.00005 ng～0.00015 ng

$y = 2638143x + 1057$

$R^2 = 0.9982$

図 5-1 GV 検量線例 (m/z 372→356)



データ処理装置設定条件の一例

機種（メーカー）：LabSolutions

（島津製作所製）

ピークの定量方法：ピーク面積法

検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.00005 ng～0.00015 ng

$y = 769286x - 201$

$R^2 = 0.9965$

図 5-2 LGV 検量線例 (m/z 374→358)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

0.002 mg/kg [(10 mL/0.05 g*) × (0.0001 ng/10 μL)]

* 10.0 g × 1 mL/200 mL (牛の脂肪以外)、5.00 g × 2 mL/200 mL (牛の脂肪)

2. 精製方法の検討

①MCX精製について

精製カラムとして、マラカイトグリーン試験法で採用されているMCX及びMAXを用いた精製が適用

可能かを検討した。負荷液は実試料分析時のアセトン抽出液1 mL分取を想定して、アセトン1 mL及び2 vol%ギ酸4 mLとした。MCXをアセトニトリル及び2 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、GV及びLGV各0.0001 µgをアセトン1 mLに添加し、2 vol%ギ酸4 mLを加えてMCXに負荷し、アセトニトリル5 mLを流下させた。MCXの下部にあらかじめアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液10 mLで予備洗浄したMAXを接続し、アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液10 mLで溶出した後、MAXを取り外し、MCXからさらにアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液10 mLで溶出した結果を表1に示した。GV及びLGVは負荷液及びアセトニトリル5 mLでは溶出せず、アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液10 mLで溶出された。ただし、本試験で使用したカラムでは、GVがMCXにおけるアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）溶出液10 mL～20 mL画分に5%程度溶出がみられた。

表1 MCX 及び MAX からの溶出状況（%）

	アセトン1 mL	アセトニトリル	アセトニトリル及びアンモニア水		合計
	及び2 vol%ギ酸4 mL	*1	(9：1)		
		*1	5 mL	0-10 mL ^{*2}	
GV	0	0	79	5	84
LGV	0	0	88	0	88

Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

Oasis MAX、充てん量150 mg、Waters製

添加量：各0.0001 µg

*1：MCXのみからの溶出（流出速度：0.5 mL/分）

*2：MCXの下部にMAXを連結した状態で溶出

*3：MAXを取り外しMCXのみからの溶出

MCXからのカラムのロットによる溶出のずれを確認するため、本試験で使用していない別ロットのMCXカラムを用いて同様の溶出試験を行った結果を表2に示した。別ロットのMCXを使用した結果、GV、LGVとも主にアセトニトリル及びアンモニア水（9：1）溶出液0 mL～10 mL画分に溶出が確認されたが、10 mL～20 mL画分にも溶出が確認され、LGVは回収率が70%を下回る結果となった。本試験法にてGV及びLGVを分析する際には、あらかじめカラムのロットの溶出ずれを確認し、良好な回収率が得られるものを選定する必要がある。

表2 別ロットの MCX からの溶出状況（%）

	アセトン1 mL	アセトニトリル	アセトニトリル及びアンモニア水		合計
	及び2 vol%ギ酸4 mL	5 mL	(9：1)		
			0-10 mL	10-20 mL	
GV	0	0	82	11	93
LGV	0	0	67	10	77

Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

添加量：各0.0001 µg

3. 添加回収試験

どじょう、なまず、うなぎ、しじみ、さけ、えび、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓の9食品を用いて、
 [実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図6 (GV) 及び7 (LGV) に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定に

よる代表的なトータルイオンクロマトグラムを図8に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表3に示した。検討した何れの試料においてもGV及びLGVの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表3 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ¹⁾						選択性 の評価 ³⁾	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾					
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	GV	どじょう	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		なまず	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		しじみ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		さけ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		えび	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛筋肉	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛肝臓	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
2	LGV	どじょう	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		なまず	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		しじみ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		さけ	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		えび	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛筋肉	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛肝臓	0.002	定量限界	0.002	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表4に示した。GVの真度は74.2~92.4%、併行精度は2.6~10.2%であり、目標値を十分に満たした。LGVの真度は76.2~98.8%、併行精度は3.6~13.6%であり、目標値を十分に満たした。GVのS/N比の平均値は37~49、LGVのS/N比の平均値は32~43でありS/N≥10を十分に満たした。

表4 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値	
1	GV	どじょう	0.002	-	0.002	S/N	4058035	1817	0.9959	94.2	93.1	97.2	85.3	81.2	90.2	7.4	51.2	38.0	44.6	
		なまず	0.002	-	0.002	S/N	4058035	1817	0.9959	83.1	95.5	101.5	93.3	88.6	92.4	7.5	46.7	39.3	43.0	
		うなぎ	0.002	-	0.002	S/N	3785312	839	0.9975	72.3	74.4	72.8	71.8	82.7	74.8	6.1	39.4	34.5	37.0	
		しじみ	0.002	-	0.002	S/N	3785312	839	0.9975	75.7	71.5	73.1	76.9	73.9	74.2	2.8	46.7	46.0	46.4	
		さけ	0.002	-	0.002	S/N	3236528	121	0.9981	89.6	83.6	80.9	82.3	85.7	84.4	4.0	56.8	40.7	48.8	
		えび	0.002	-	0.002	S/N	3057962	2235	0.9962	81.9	75.7	70.8	78.7	76.1	76.6	5.3	46.7	42.0	44.4	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	S/N	2638143	1057	0.9982	72.3	83.8	77.4	78.6	71.8	76.8	6.4	38.7	35.3	37.0	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	S/N	3473753	359	0.9967	76.0	73.6	71.3	76.9	81.1	75.8	4.8	41.3	43.3	42.3	
2	LGV	どじょう	0.002	-	0.002	S/N	2638143	1057	0.9982	79.0	74.2	85.8	96.9	83.3	83.8	10.2	46.7	42.7	44.7	
		なまず	0.002	-	0.002	S/N	1200267	663	0.9960	88.0	82.7	73.5	84.8	85.6	82.9	6.7	44.0	31.3	37.7	
		うなぎ	0.002	-	0.002	S/N	1200267	663	0.9960	93.9	88.2	96.6	85.7	85.6	90.0	5.5	46.7	36.7	41.7	
		しじみ	0.002	-	0.002	S/N	1003990	375	0.9971	95.7	96.0	95.5	88.4	88.9	92.9	4.2	34.5	33.0	33.8	
		さけ	0.002	-	0.002	S/N	1003990	375	0.9971	85.0	79.8	80.0	74.7	87.8	81.5	6.2	42.7	36.7	39.7	
		えび	0.002	-	0.002	S/N	1030651	505	0.9903	86.0	70.5	74.9	76.1	76.5	76.8	7.4	46.7	35.3	41.0	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	S/N	1009800	248	0.9969	80.5	77.5	77.6	86.8	80.8	80.6	4.7	46.7	27.5	37.1	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	S/N	769286	201	0.9965	71.2	96.6	72.8	72.4	82.4	79.1	13.6	33.3	30.0	31.7	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	S/N	1073503	112	0.9990	74.9	75.2	72.9	79.3	78.8	76.2	3.6	46.7	38.3	42.5	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	S/N	769286	201	0.9960	96.6	101.7	114.6	96.3	84.9	98.8	10.9	35.0	31.5	33.3	

*1 S/Nを求める必要がある場合には[S/N]と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max)及び最小値を与えるピーク(Min)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表5に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。GVの面積比は1.02~1.09、LGVの面積比は0.86~1.06であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表5で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表7に示した。補正真度はGV70.6~84.8%、LGV 73.8~107.4%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛

盾は見られなかった。

表5 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*2}							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
1	GV	どじょう	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	42029	40791	41410	40007	36528	38268	1.08	
		なまず	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	40481	40533	40507	37801	36722	37262	1.09	
		うなぎ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	38627	38582	38605	35222	37301	36262	1.06	
		しじみ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	38568	36528	37548	35169	38551	36860	1.02	
		さけ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	32749	34202	33476	32432	32118	32275	1.04	
		えび	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	35905	36019	35962	34141	32176	33159	1.08	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	33254	36160	34707	33050	31267	32159	1.08	
		牛脂肪	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	34016	35293	34655	32072	32862	32467	1.07	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	34903	32646	33775	32656	33799	33228	1.02	
2	LGV	どじょう	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	10794	10091	10443	11329	11349	11339	0.92	
		なまず	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	9963	10114	10039	10762	9864	10313	0.97	
		うなぎ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	10840	10759	10800	10744	9714	10229	1.06	
		しじみ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	10466	9767	10117	9590	10216	9903	1.02	
		さけ	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	9838	10189	10014	10287	8940	9614	1.04	
		えび	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	11560	10335	10948	11047	11118	11083	0.99	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	8495	8756	8626	9599	10500	10050	0.86	
		牛脂肪	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	10282	9365	9824	9411	10033	9722	1.01	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	0.00001	面積	0	8671	9158	8915	9996	9468	9732	0.92	

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表6 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	GV	どじょう	0.002	-	0.002	90.2	1.08	83.5	
		なまず	0.002	-	0.002	92.4	1.09	84.8	
		うなぎ	0.002	-	0.002	74.8	1.06	70.6	
		しじみ	0.002	-	0.002	74.2	1.02	72.7	
		さけ	0.002	-	0.002	84.4	1.04	81.2	
		えび	0.002	-	0.002	76.6	1.08	70.9	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	76.8	1.08	71.1	
		牛脂肪	0.002	-	0.002	75.8	1.07	70.8	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	83.8	1.02	82.2	
2	LGV	どじょう	0.002	-	0.002	82.9	0.92	90.1	
		なまず	0.002	-	0.002	90.0	0.97	92.8	
		うなぎ	0.002	-	0.002	92.9	1.06	87.6	
		しじみ	0.002	-	0.002	81.5	1.02	79.9	
		さけ	0.002	-	0.002	76.8	1.04	73.8	
		えび	0.002	-	0.002	80.6	0.99	81.4	
		牛筋肉	0.002	-	0.002	79.1	0.86	92.0	
		牛脂肪	0.002	-	0.002	76.2	1.01	75.4	
		牛肝臓	0.002	-	0.002	98.8	0.92	107.4	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

4. 考察

マラカイトグリーンで開発した分析法を用いて、どじょう等9食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、GVの真度は74.2~92.4%、併行精度は2.6~10.2%、LGVの真度は76.2~98.8%、併行精度は3.6~13.6%の良好な結果が得られた。

本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類等の畜水産物に適応可能であると考えられた。

[結論]

畜水産物中のGV及びLGVの試験法として、BHT・エタノール溶液及びクエン酸溶液を加えて調製した

試料からGV及びLGVをアセトンで抽出し、MCX及びMAXで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。なお、本試験法はマラカイトグリーン試験法と同じ方法である。

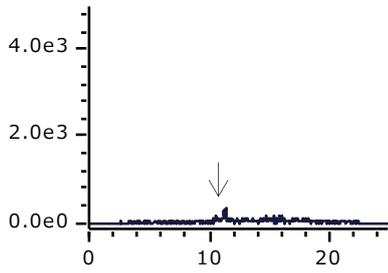
開発した試験法をどじょう、なまず、うなぎ、しじみ、さけ、えび、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、GVの真度は74～92%、併行精度は3～10%、LGVの真度は76～99%、併行精度は4～14%、定量限界は0.002 mg/kgが可能であり、マラカイトグリーン試験法がGV及びLGVにも適用可能であることが確認できた。

[参考文献]

食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）に規定する試験法 マラカイトグリーン試験法

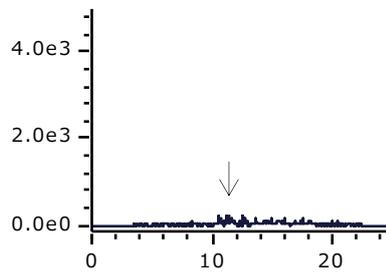
GVの添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 3.20e2
 どじょうCONT_08



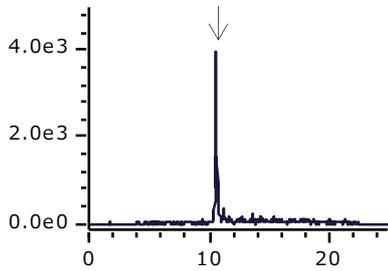
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 2.34e2
 なまずCONT_15



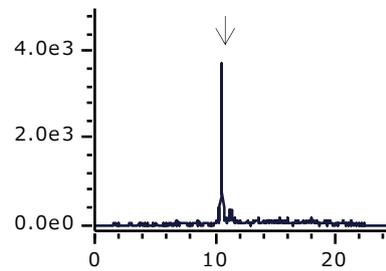
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 3.99e3
 どじょうADD1_09



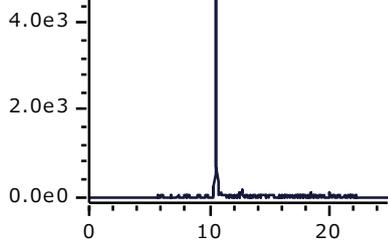
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 3.69e3
 なまずADD1_16



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 4.99e3
 ↓
 STD0.00001_23



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 4.99e3
 ↓
 STD0.00001_23

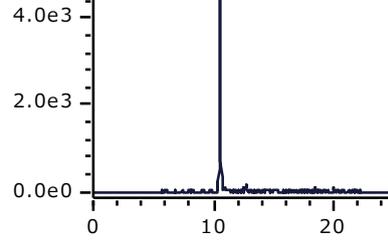
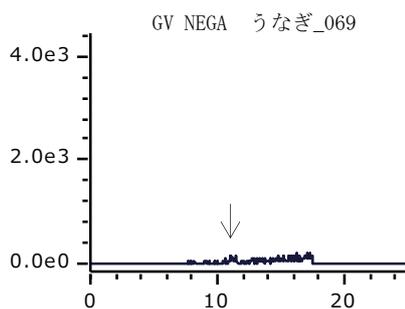


図 6-1 どじょうの SRM クロマトグラム
 GV (m/z 372→356)
 添加濃度 : 0.002 ppm

図 6-2 なまズの SRM クロマトグラム
 GV (m/z 372→356)
 添加濃度 : 0.002 ppm

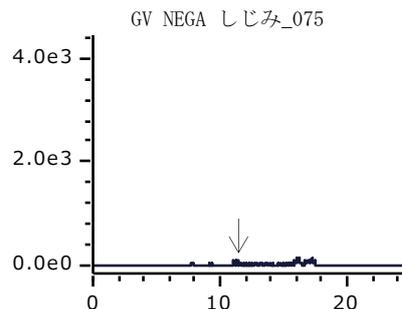
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 2.17e2



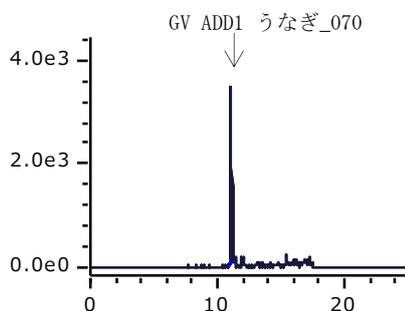
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 1.71e2



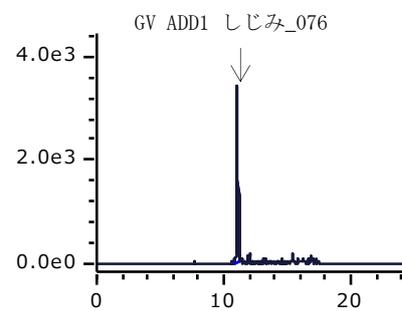
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 3.46e3



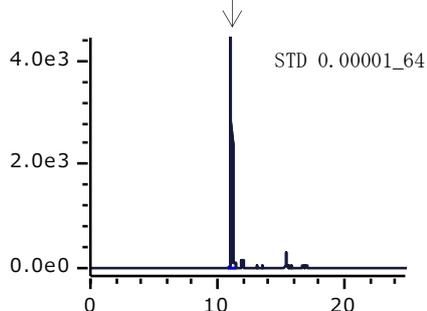
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 3.42e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 4.43e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 4.43e3

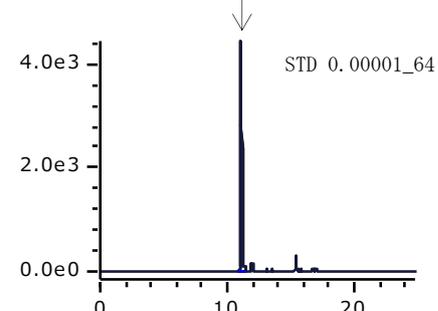
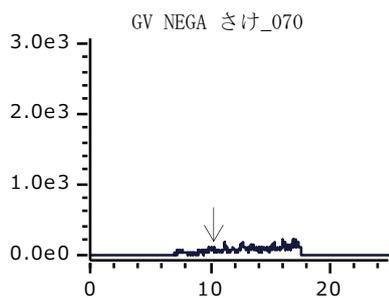


図 6-3 うなぎの SRM クロマトグラム
GV (m/z 372→356)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 6-4 しじみの SRM クロマトグラム
GV (m/z 372→356)
添加濃度 : 0.002 ppm

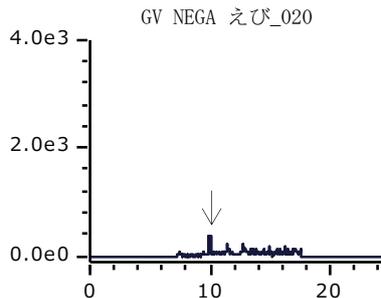
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 2.08e2



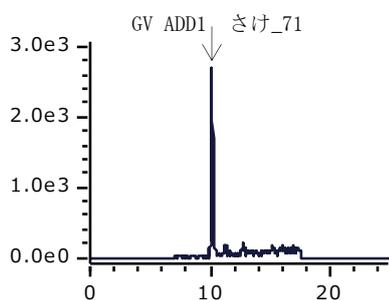
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 3.84e2



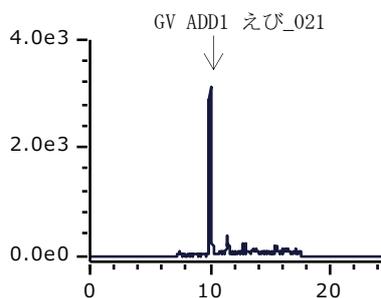
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 2.71e3



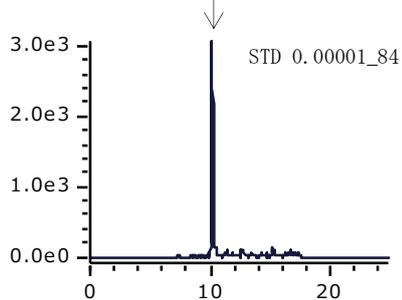
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 3.13e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 3.07e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 3.07e3

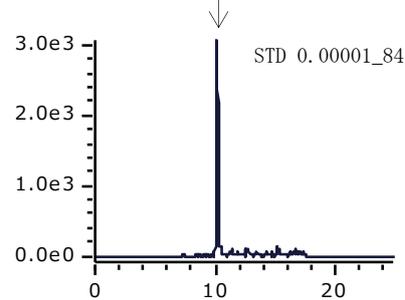


図 6-5 さけの SRM クロマトグラム

GV (m/z 372→356)

添加濃度 : 0.002 ppm

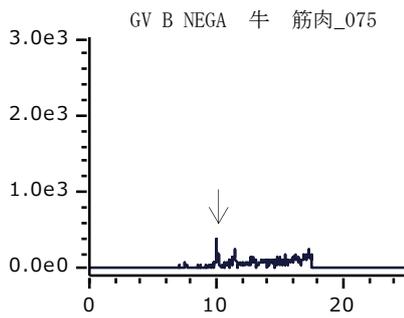
図 6-6 えびの SRM クロマトグラム

GV (m/z 372→356)

添加濃度 : 0.002 ppm

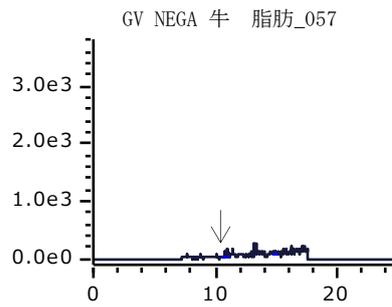
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 3.88e2



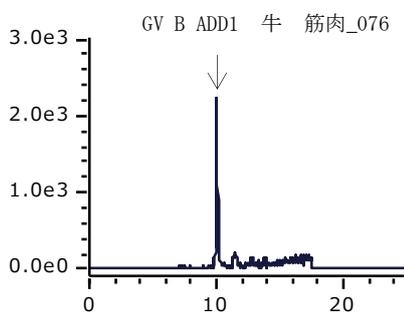
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 2.64e2



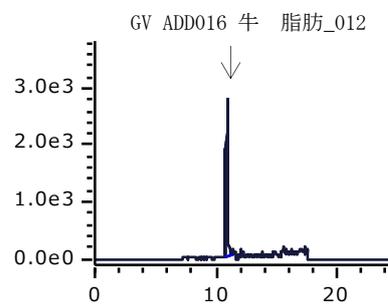
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 2.22e3



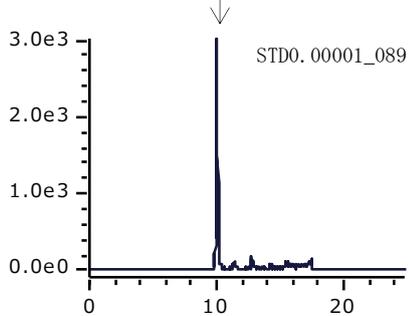
添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 2.81e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 3.02e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 3.84e3

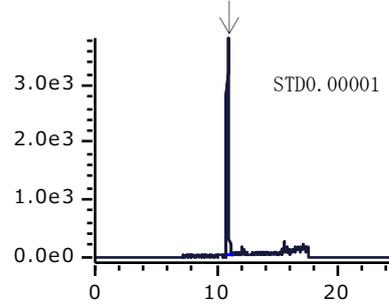
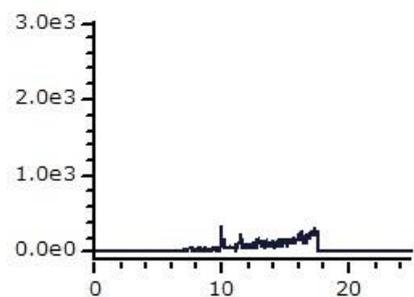


図 6-7 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
GV (m/z 372→356)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 6-8 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
GV (m/z 372→356)
添加濃度 : 0.002 ppm

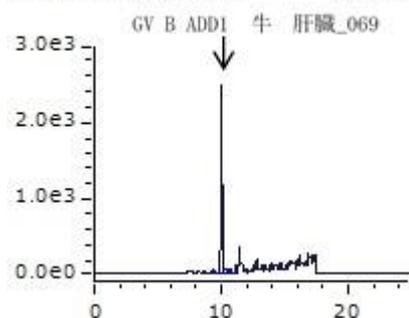
ブランク

Q 372.20>356.40 (+) 3.42e2



添加試料

Q 372.20>356.40 (+) 2.49e3



標準溶液

Q 372.20>356.40 (+) 3.02e3

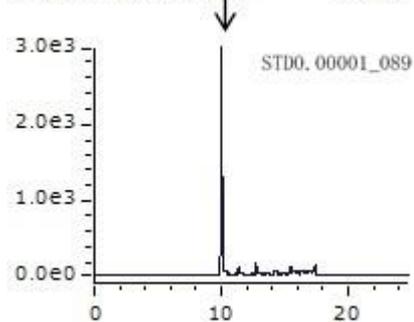
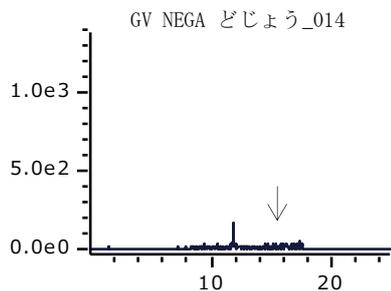


図 6-9 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
GV (m/z 372→356)

添加濃度 : 0.002 ppm

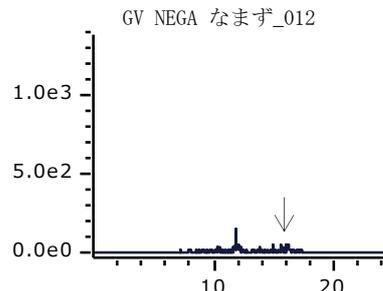
LGVの添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 1.63e2



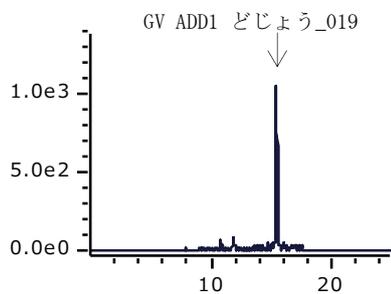
ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 1.35e2



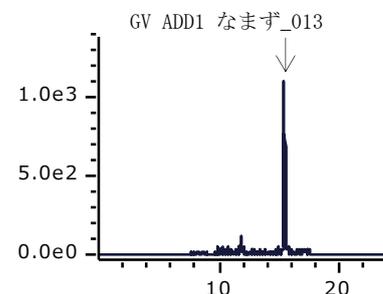
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 1.05e3



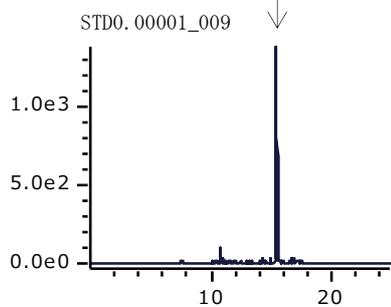
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 1.10e3



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.39e3



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.39e3

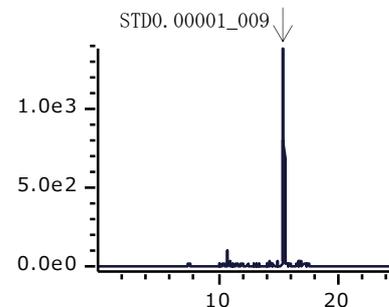
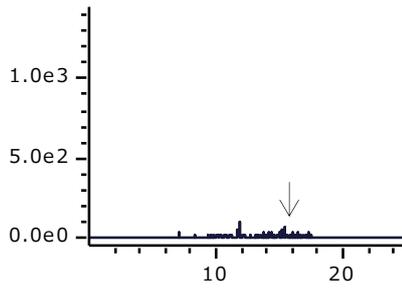


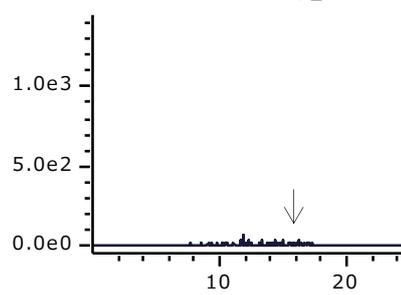
図 7-1 どじょうの SRM クロマトグラム
 LGV (m/z 374→358)
 添加濃度 : 0.002 ppm

図 7-2 なまズの SRM クロマトグラム
 LGV (m/z 374→358)
 添加濃度 : 0.002 ppm

ブランク
Q 374.20>358.45 (+) 1.02e2
GV NEGA うなぎ_069

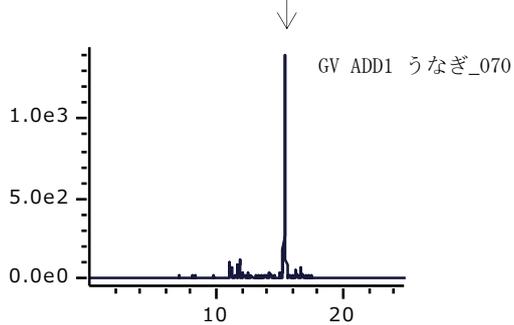


ブランク
Q 374.20>358.45 (+) 6.70e1
GV NEGA しじみ_075



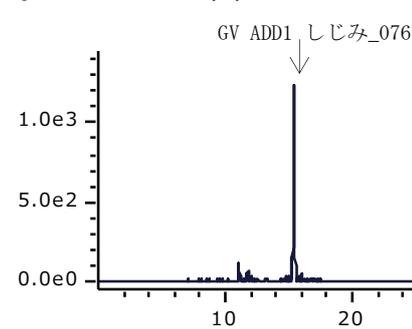
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 1.39e3



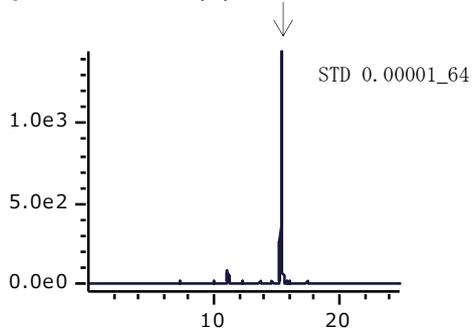
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 1.24e3



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.45e3



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.45e3

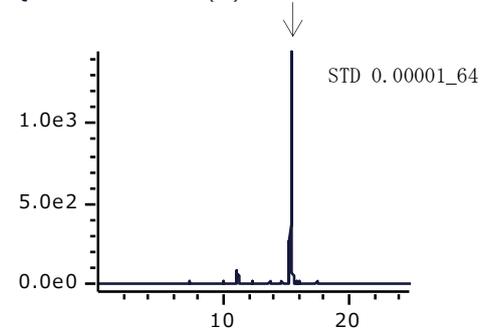
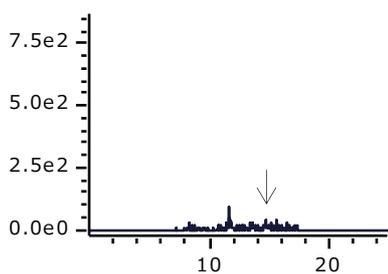


図 7-3 うなぎの SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 7-4 しじみの SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

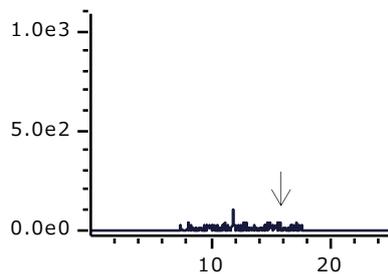
ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 9.10e1
GV NEGA さけ_070



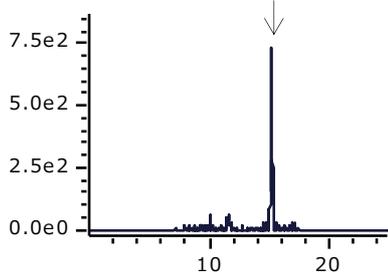
ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 9.60e1
GV NEGA えび_020



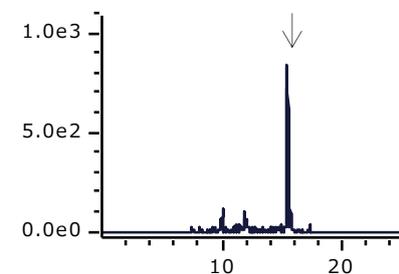
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 7.38e2
GV ADD1 さけ_71



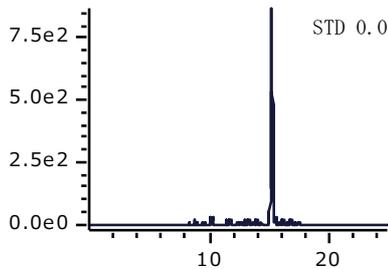
添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 8.38e2
GV ADD1 えび_021



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 8.70e2
STD0.00001_84



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.09e3
STD0.00001_028

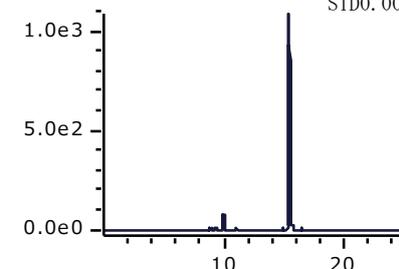
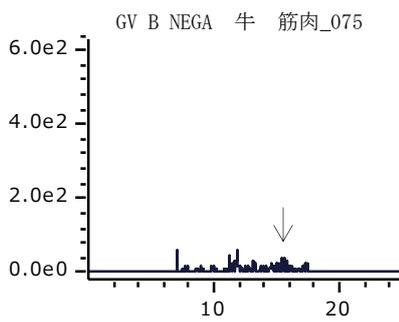


図 7-5 さけの SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 7-6 えびの SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

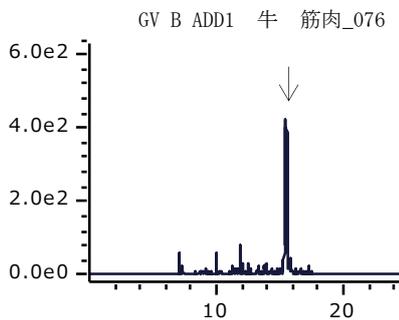
ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 6.00e1



添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 4.23e2



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 6.30e2

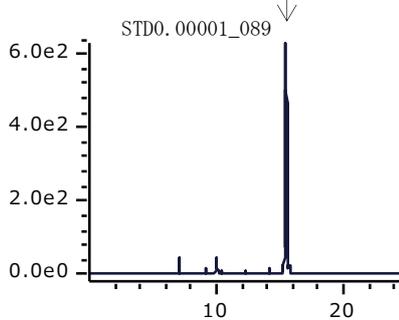
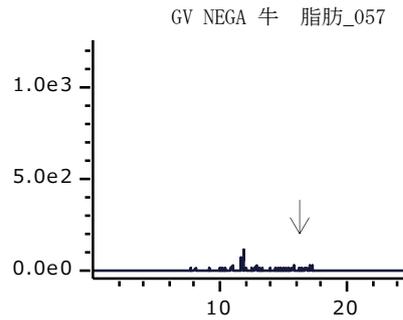


図 7-7 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

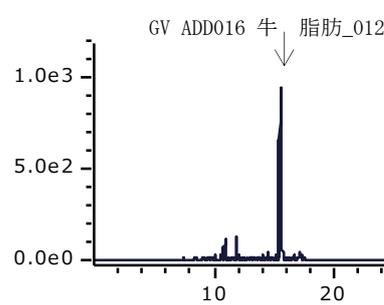
ブランク

Q 374.20>358.45 (+) 1.13e2



添加試料

Q 374.20>358.45 (+) 9.53e2



標準溶液

Q 374.20>358.45 (+) 1.19e3

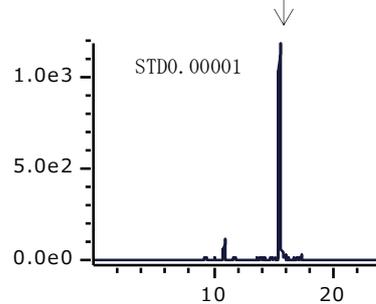
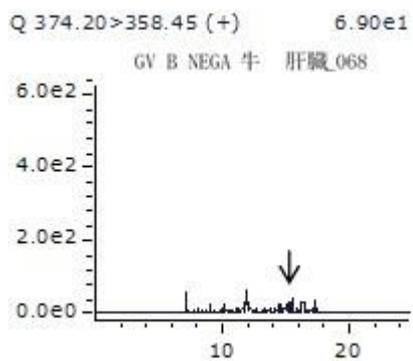
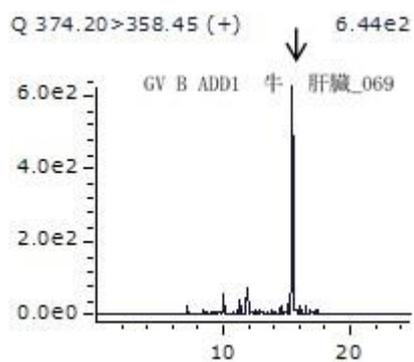


図 7-8 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

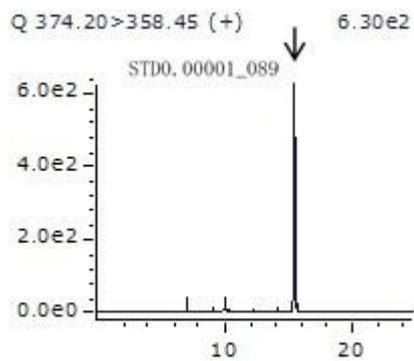
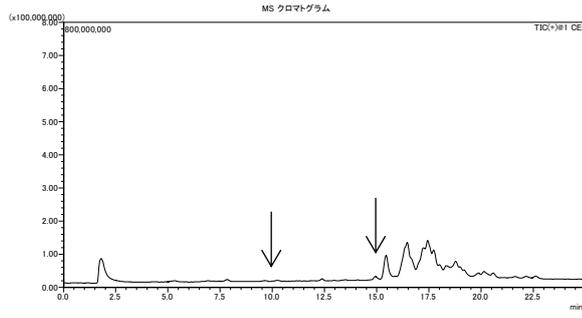
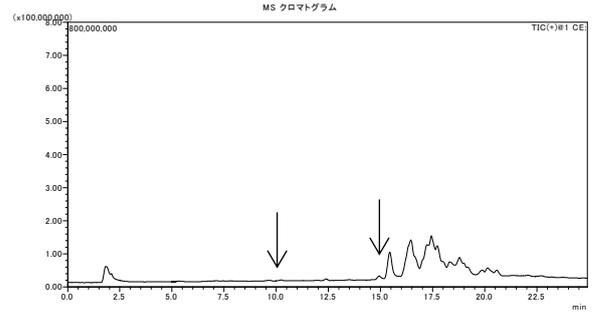


図 7-9 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
LGV (m/z 374→358)
添加濃度 : 0.002 ppm

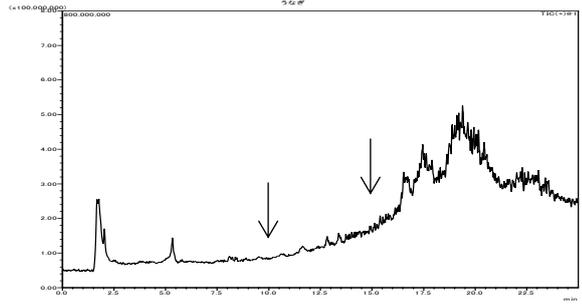
どじょう



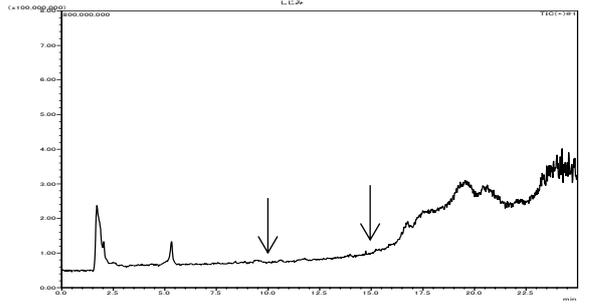
なまず



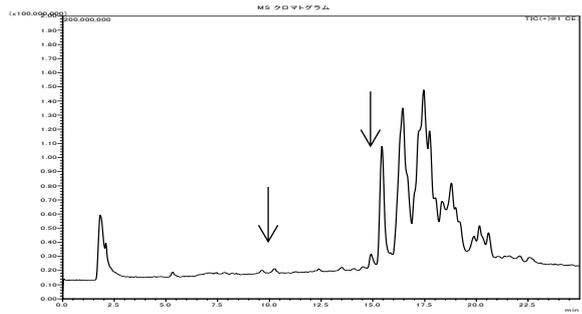
うなぎ



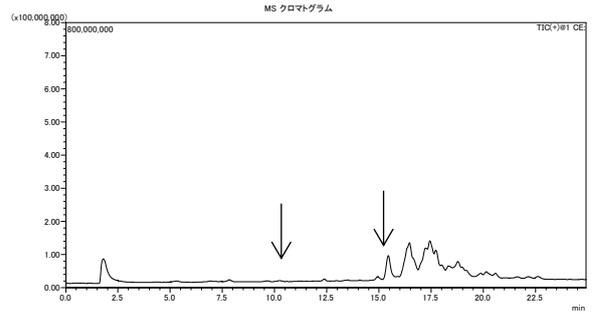
しじみ



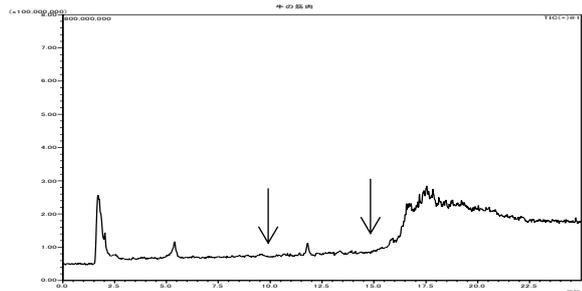
さけ



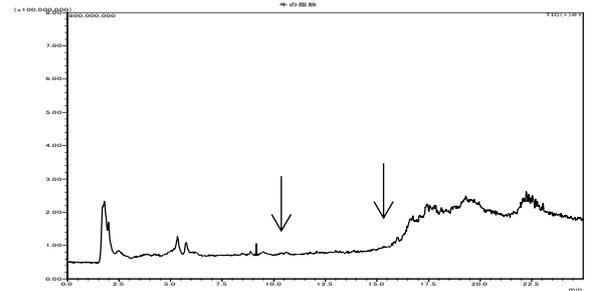
えび



牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓

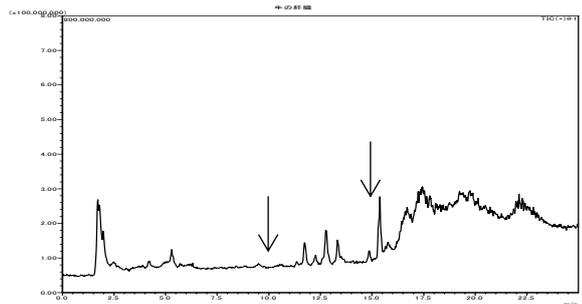


図8 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲： m/z 50~500、コロン電圧：13 (V))