

※本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

マラカイトグリーン試験法の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針

マラカイトグリーン（以下「MG」と略す）は青緑色の染料であり、紙、皮革及びプラスチックの染色、レーキ顔料の製造原料として用いられている。また抗菌性があることから、魚類の病気の治療薬として水産業で使用されてきたが、2005年8月1日より観賞魚、食用に供しない採卵用親魚以外の使用が禁止されている。MGは食品において不検出とされており、規制対象はMG及びその代謝物であるロイコマラカイトグリーン（以下「LMG」と略す）である。現在食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）に規定する試験法として告示試験法（以下「告示法」と略す）が提示されているが、現行の告示法では試験操作にジクロロメタンを使用する問題点があり、また一部の試料では添加回収試験で回収率が悪くなることを経験している。本研究では主に試験操作中の分解防止及び抽出操作について検討を行い、更にジクロロメタンを使用しない試験法を開発した。

1) 規制対象物質

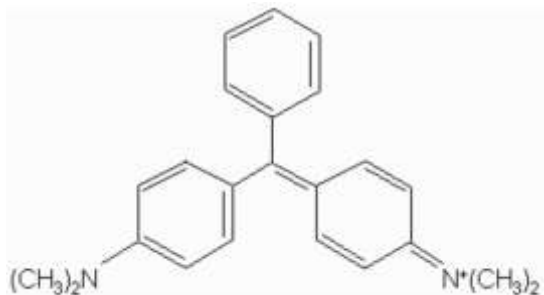
MG及びLMG

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

MG

構造式：



化学式：C₂₃H₂₅N₂

分子量：329.47

化学名：4-{[4-(dimethylamino)phenyl](phenyl)methylidene}-N,N-dimethyl-2,5-cyclohexadien-1-iminium

外 観：緑色結晶

融 点：112～114℃

蒸気圧：2.4×10⁻¹³ mm Hg (25℃)

溶解性：エタノールに極めて溶けやすく、メタノール、その他アルコール類に溶けやすい。

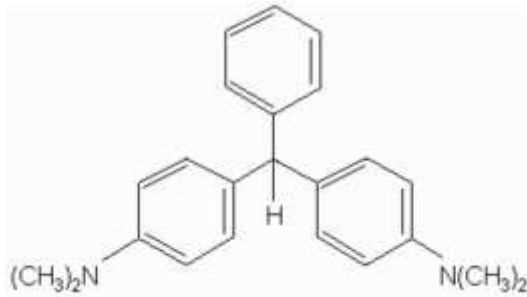
水：4.0×10⁴ mg/L (25℃)

オクタノール/水分配係数：log Kow = 0.62

(出典：HSDB)

LMG

構造式：



化学式： $C_{23}H_{26}N_2$

分子量：330.47

化学名：4,4'-Benzylidenebis(N,N-dimethylaniline)

外 観：灰色～薄茶色の粉末

融 点：102℃

蒸気圧： 1.92×10^{-7} mm Hg (25℃)

溶解性：ベンゼン、エチルエーテルに極めて溶けやすい。

エチレングリコールモノメチルエーテル 30、エタノール 4 (以上 mg/mL)

水： 6.4×10^{-2} mg/L (25 °C)

オクタノール/水分配係数： $\log Kow = 5.72$

酸解離定数： $pKa = 5.46$

(出典：HSDB)

2) 基準値

不検出 (検出限界：0.002 mg/kg)

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、その他の試料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牛の筋肉は脂肪層を除いた後、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牛の脂肪は筋肉部を除いた後、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、脂肪組織が半液状となる程度まで磨砕均一化した。

③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鶏の筋肉は脂肪層を除いた後、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牛乳は試料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鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合した後、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はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）した後、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。

⑧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）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。

⑨しじみは、貝殻を除いた後約5分間水切りを行った試料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。

⑩しめさばは試料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. 試薬・試液

1) 標準品

MGシュウ酸塩標準品：純度99.4%（和光純薬工業製）

LMG標準品：純度100.0%（和光純薬工業製）

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：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（無水）及びジブチルヒドロキシトルエン（BHT）：
和光特級（和光純薬工業製）

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、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、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：MGシュウ酸塩標準品35.4 mg（MGとして25 mg）を精秤し、アセトンで50 mLに定容して500 mg/L溶液を調製した。

LMG25 mgを精秤し、アセトンで50 mLに定容して500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：MG標準原液及びLMG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、MG及びLMGの0.00005～0.00015 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：MG標準原液及びLMG標準原液をアセトンで希釈して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> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	70	30	15	10	90	25	10	90	25.1	70	30
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																
0.0	70	30																
15	10	90																
25	10	90																
25.1	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 (+)																	
キャピラリー電圧 (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)	MG +329→313[コーン電圧：12 (V)、コリジョンエネルギー：36 (eV)] LMG +331→239[コーン電圧：12 (V)、コリジョンエネルギー：31 (eV)]																	

定性イオン (<i>m/z</i>)	MG +329→165 [コーン電圧 : 12 (V)、コリジョンエネルギー : 55 (eV)] LMG +331→316 [コーン電圧 : 12 (V)、コリジョンエネルギー : 22 (eV)]
保持時間 (min)	MG : 8、LMG : 16

5. 定量

検量線用混合標準溶液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MG及びLMG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

MG及びLMG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 (はちみつの場合は水10 mL及びアセトン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 (脂肪の場合は2 mL) を分取し100 mL遠心管に採り、2 vol%ギ酸4 mLを加えた。

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。MCXに1) 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（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（はちみつ：水10 mL及びアセトン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（脂肪：2 mL）分取、2 vol%ギ酸4 mLを加える

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
- | MCXに全量注入
- | 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10 mL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

MG及びLMGはESI (+) モードでの測定が可能であった。MG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329が得られた。 m/z 329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、MGの分子量(m/z 329 [M]⁺)をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 329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。強度として m/z 313が強く、次いで m/z 165であったため、 m/z 313を定量用イオン、 m/z 165を定性用イオンとした。

LMG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331が得られたので、LMGのプロトン付加分子 (m/z 331 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 331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 239が強く、次いで m/z 316であったため、 m/z 239を定量用イオン、 m/z 316を定性用イオンとした。

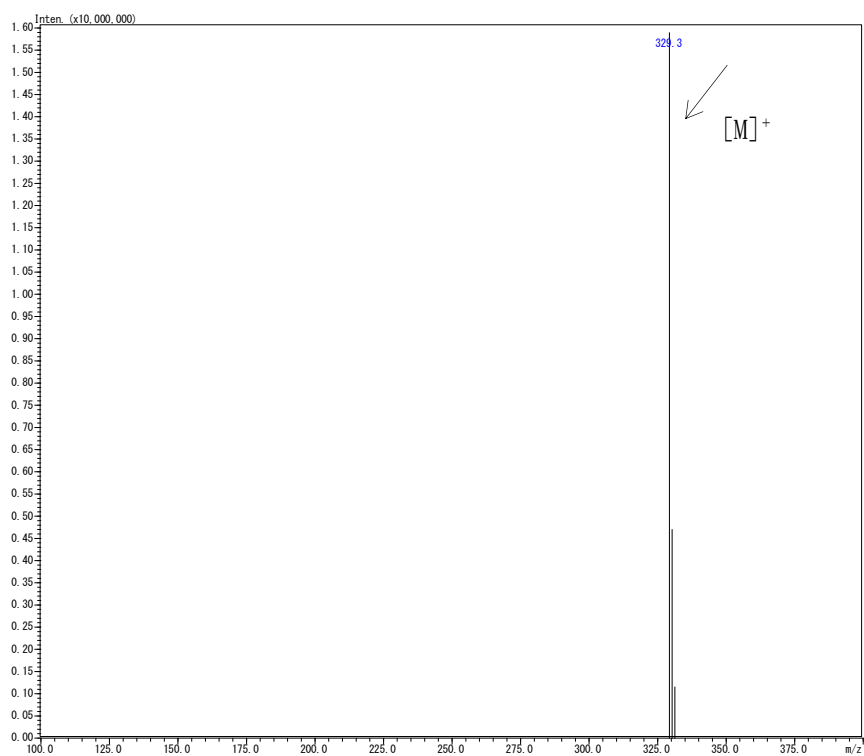


図1 MGのマススペクトル
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI⁺、CV=12 (CV=コーン電圧)

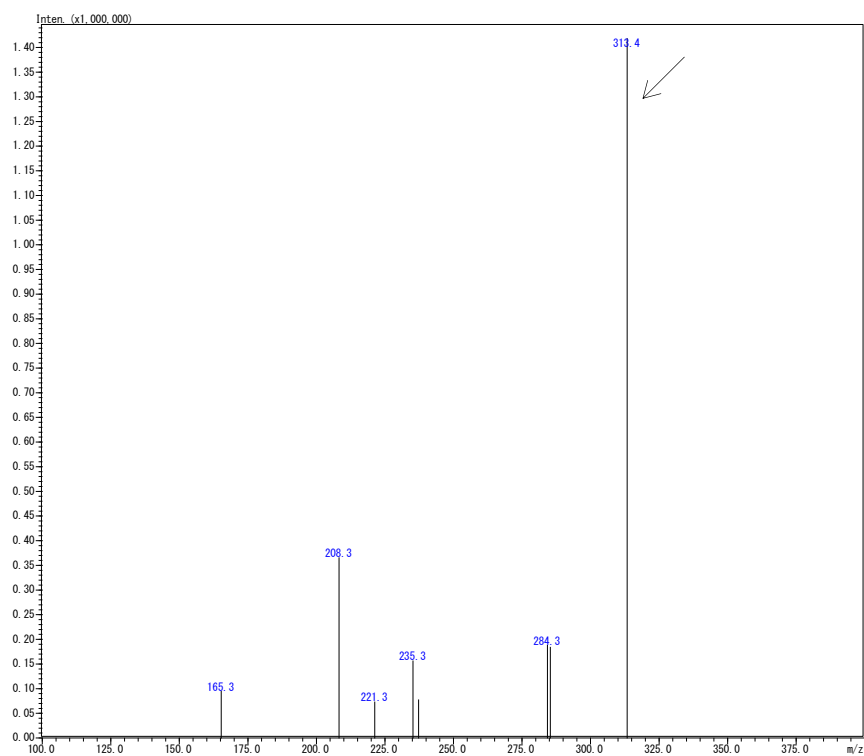


図2-1 MGのプリカーサーイオンm/z 329のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI⁺、CV=12、CE=36 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

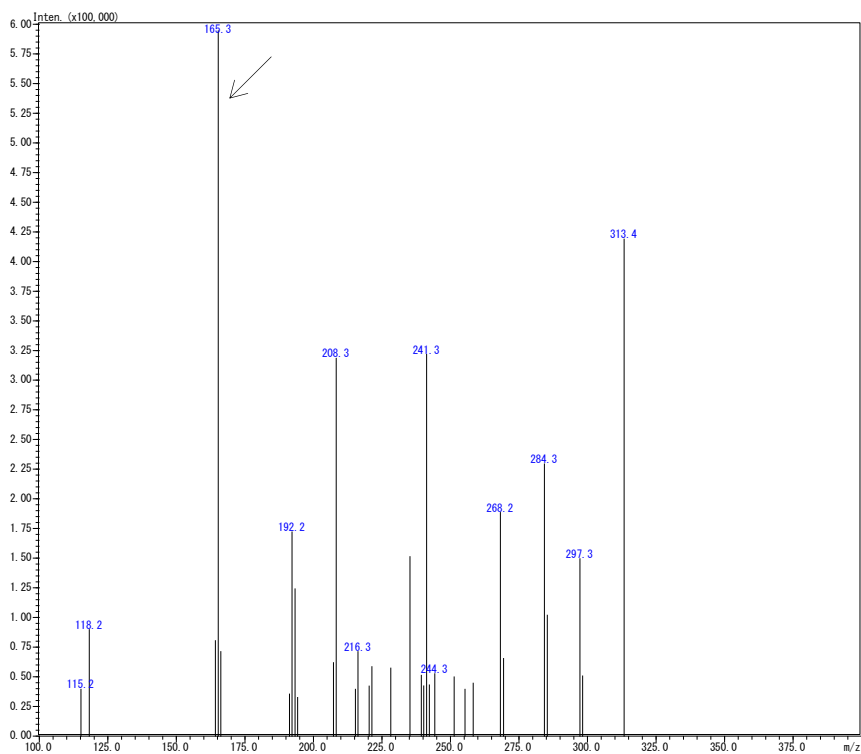


図2-2 MGのプリカーサーイオン m/z 329のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=12、CE=55 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

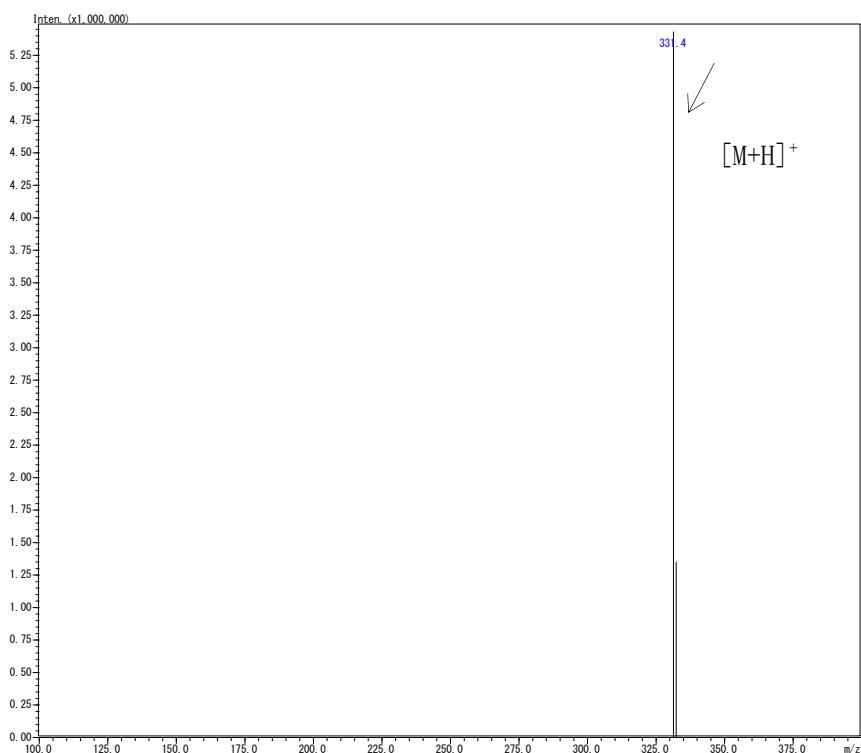


図3 LMGのマスペクトル
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI+, CV=12 (CV=コーン電圧)

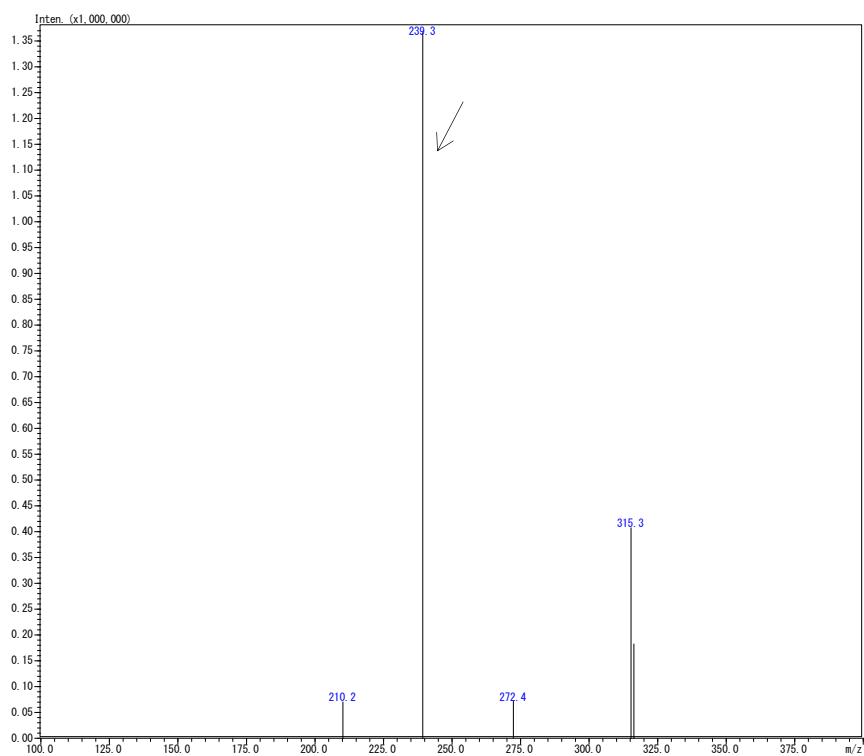


図4-1 LMGのプリカーサーイオン m/z 331のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI+、CV=12、CE=31 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

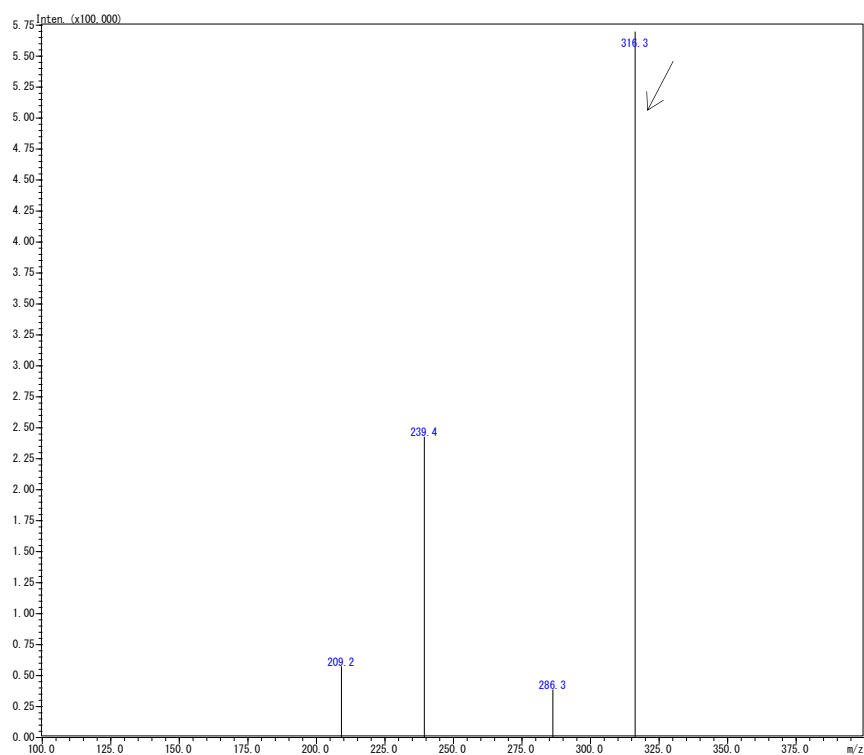


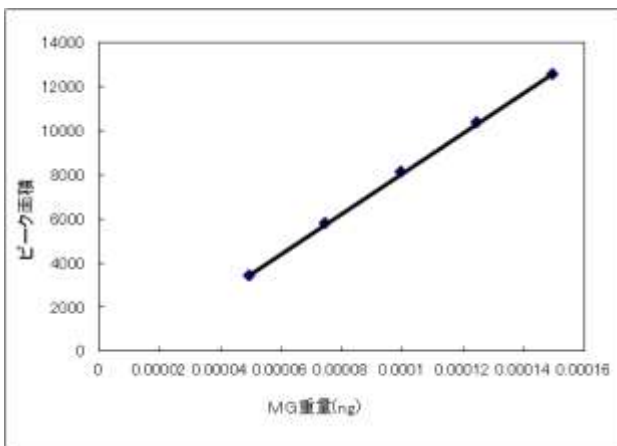
図4-2 LMGのプリカーサーイオン m/z 330のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：100~400 m/z
 測定条件：ESI+、CV=12、CE=22 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

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、移動相条件について、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸並びに2 mmol/L酢酸アンモニウムを用いて検討を行ったところ、MGのテーリングが大きく良好なピーク形状を得ることが出来なかった。次いで、MGのように4級アンモニウム塩を持つ化合物は使用する測定カラム中の残存シリールなどに吸着性が強いと考えられ、そのような条件下では溶出力が強く作用すると考えられるギ酸アンモニウム塩の緩衝液を用いて検討を行った。LMGのpKaが約5.5との情報があるため、緩衝液のpHはpKaより2低い3.5とした。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。

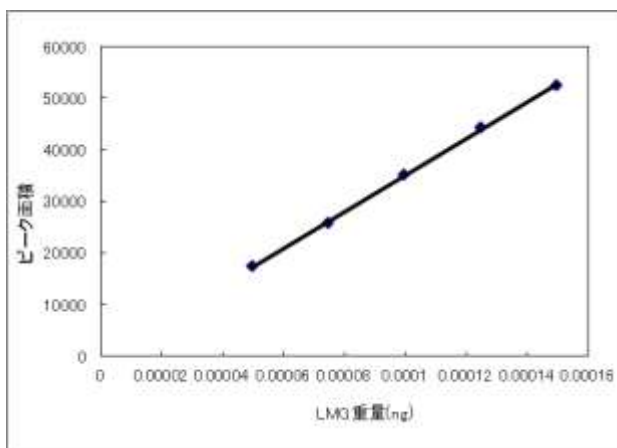
3) 検量線

図5にMG及びLMGの検量線の例を示した。0.000005 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0.9995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
 $y=91268000x-1071$
 $R^2=0.9997$

図 5-1 MG 検量線例 (m/z 329→313)



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
 $y=353808000x-384$
 $R^2=0.9995$

図 5-2 LMG 検量線例 (m/z 331→239)

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 (脂肪以外)、5.00 g × 2 mL/200 mL (脂肪)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

現行の告示法では、クエン酸・リン酸緩衝液 (pH3.0) 酸性下でアセトニトリル抽出を行っている。しかしこの方法ではしめさばなど一部の試料について LMG の添加回収率が悪くなることを経験している。本検討では、MG 及び LMG 共に良好な回収率が得られる同時分析法の確立を目標とし、以下の①～⑧の検討事項について検証した。

①酸添加について

MG は 4 級アンモニウム塩を持つ化合物であり、試料への吸着性が強いことが予想される。そこで、主に MG の添加回収率の改善を目的として、現行の告示法同様、抽出時に酸添加が必要か検証した。

②酸化防止剤の添加について

LMG は還元剤として作用し、自身は酸化されて MG 又は他の物質になることが知られている。現行の告示法で試験した際に一部の試料で LMG が低回収となる原因として、試料由来の物質によって LMG が酸化されて分解した可能性が考えられる。そこで、主に LMG の添加回収率の改善を目的として、酸化防止剤の添加について検討した。

③n-ヘキサン及びn-ヘキサン飽和アセトニトリルによる抽出の検討

現行の告示法ではアセトニトリルで抽出を行った後 n-ヘキサンを加え、アセトニトリル層を分取している。しかし LMG は Log Kow=5.72 と低極性の物質であり、アセトニトリルでの抽出の妥当性について検証する必要がある。そこで、脂肪組織との混和性を考慮し、n-ヘキサン及び n-ヘキサン飽和アセトニトリルによる抽出が可能か検証した。

④アセトンによる抽出の検討

MG 及び LMG はいずれもアセトンへの溶解性が十分であるため、脂肪組織との混和性を考慮しアセトンによる抽出を検討した。

⑤～⑧では、①～②の検討結果を基に、酸及び酸化防止剤を加え試料調製を行う方法について検討した。

①酸添加について

本検討では抽出時に酸添加が必要か検証した。検証には実試料としてしめさばを用い、試料10 gに MG及びLMG各0.2 µgを添加した後、酸を加えないもの、各酸 (10 vol%ギ酸、10 vol%酢酸、10 vol%リン酸、10 w/v%クエン酸溶液及び1 mol/L塩酸) 10 mLを添加したのについて、それぞれ試験した結果を表1に示した。酸を添加した場合、いずれも酸無添加よりMGの回収率の改善が見られた。一方、LMGの回収率は塩酸添加したものを除き、改善されなかった。

表1 各酸を添加して添加回収試験を行った結果 (%)

	無添加	10 vol% ギ酸	10 vol% 酢酸	10 vol% リン酸	10 w/v% クエン酸溶液	1 mol/L 塩酸
添加量	—	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
pH	6	2	2	1	2	0
MG	24	42	49	66	80	85
LMG	49	14	2	11	48	79

添加量：各0.2 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製

マトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積値を100%として算出

MGの添加回収率が良好であったクエン酸添加及びMG、LMG共に良好な回収率が得られた塩酸添加について、定量限界相当の添加回収試験を試行数3で行った。しめさば試料10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加した後、10 w/v%クエン酸溶液又は1 mol/L塩酸10 mLを加え、試験した結果を表2に示した。クエン酸添加ではLMGの低回収は改善されなかったが、MGはいずれも70%以上の回収率が得られた。一方、塩酸添加ではMG、LMG共に回収率の向上が見られたが、試験回数ごとにばらつきが大きく安定した回収率が得られなかったため、より安定した回収率の得られたクエン酸を以降の検討に用いることとした。

表2 クエン酸及び塩酸を添加して添加回収試験を行った結果 (%)

	10 w/v%クエン酸溶液			1 mol/L塩酸		
	10 mL			10 mL		
	試行数1	試行数2	試行数3	試行数1	試行数2	試行数3
MG	78	73	76	54	86	43
	平均76			平均61		
LMG	19	11	12	46	79	31
	平均14			平均52		

添加量：各0.02 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

マトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積値を100%として算出

次に、加えるクエン酸量について検討を行った。しめさば試料10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加した後、0.5、2.5、5及び10 w/v%のクエン酸溶液各10 mLを加え、試験した結果を表3に示した。クエン酸溶液濃度2.5 w/v%以上ではほぼ一定の回収率が得られたため、以降の検討では5 w/v%クエン酸溶液10 mL又はそれ以上の濃度のクエン酸溶液を加えて分析操作を行うこととした。

表3 各濃度のクエン酸溶液を加え添加回収試験を行った結果 (%)

	クエン酸濃度 (w/v%)			
	0.5	2.5	5	10
添加量	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
MG	42	89	87	95

添加量：0.2 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

マトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積値を100%として算出

LMGは添加回収試験実施せず

②酸化防止剤の添加について

①酸添加についての検証より、クエン酸を添加することでMGの回収率の向上がみられたが、LMGの低回収は改善されなかった。試料によってLMGが酸化されている可能性が考えられたため、酸化防止剤の添加について検討した。しめさば試料10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加した後、5 w/v%クエン酸溶液10 mL及び各酸化防止剤 (5 w/v%システイン塩酸塩溶液、5 w/v%アスコルビン酸溶液、5 w/v%ジフェニルカルボノヒドラジド (以下「DPH」と略す)・アセトン溶液及び5 w/v%BHT・アセトン溶液)を加え、試験した結果を表4に示した。また、クエン酸を添加せず5 w/v%BHT・アセトン溶液を加え同

様に抽出を行った結果も合わせて表4に示した。酸化防止剤を用いた結果、システイン塩酸塩を除き、LMGの回収率が無添加と比べ、改善がみられた。一方、MGについては、システイン塩酸塩で50%、アスコルビン酸で25%、DPHで20%程度低下した。BHTを添加した場合はMG及びLMG共に良好な回収率が得られた。なお、クエン酸を添加せず5 w/v%BHT・アセトン溶液のみを添加してアセトン抽出を行った場合、MGが低回収となった。

表4 クエン酸及び各酸化防止剤を添加して添加回収試験を行った結果 (%)

酸化防止剤	無添加	5 w/v% システイン 塩酸塩溶液	5 w/v% アスコルビン酸 溶液	5 w/v%DPH アセトン溶液	5 w/v%BHT アセトン溶液	
添加量	—	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
5 w/v%クエン酸溶液 添加量	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	添加せず
MG	91	45	66	70	89	34
LMG	32	22	54	99	102	77

添加量：各0.2 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製

マトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積値を100%として算出

次に、表4の結果でMG及びLMG共に良好な回収率が得られたBHTについて、添加濃度の検討を行った。しめさば試料10 gにMG及びLMG各0.2 µgを添加した後、5 w/v%クエン酸溶液10 mL並びに0.5、2.5、5及び10 w/v%のBHT・アセトン溶液各2 mLを加え、試験した結果を表5に示した。BHT濃度5 w/v%以上で良好な回収率が得られたが、以降の検討ではさらに十分量として10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mLを加えて分析操作を行うこととした。

表5 5 w/v%クエン酸溶液 10 mL 及び各濃度の BHT・アセトン溶液を加え添加回収試験を行った結果 (%)

	BHT 濃度 (w/v%)			
	0.5	2.5	5	10
添加量	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
MG	54	69	89	88
LMG	22	73	102	85

添加量：0.2 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製

マトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積値を100%として算出

①及び②の結果から、クエン酸添加は主にMGの回収率向上に寄与しており、BHT添加は酸化を防止することで主にLMGの回収率向上に寄与していると推測された。そのため本検討では抽出時に酸及び酸化防止剤の両方の添加が必要と考え、以降の検討ではクエン酸及びBHTを加えて分析操作を行うこととした。

③n-ヘキサン及びn-ヘキサン飽和アセトニトリルによる抽出の検討

a) n-ヘキサン飽和アセトニトリルへの分配率について

MG及びLMG各0.02 µgを5 w/v%クエン酸溶液10 mL、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mL及びn-ヘキサン

50 mLと同時に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル100 mL及び50 mLで3回振とう抽出を行った際の結果を表6に示した。MG及びLMGはいずれも*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル2回で抽出が可能であった。

表6 *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルへの分配率 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	100 mL	50 mL	50 mL	
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
MG	105	0	0	105
LMG	88	9	0	97

添加量：各 0.02 µg

b) セライト及びろ紙による吸着について

現行の告示法では抽出操作時の分離操作として、遠心分離を行って抽出液を分離している。本検討では、より短時間で簡便に抽出液を分離できる吸引ろ過操作が適用できるか検討するため、吸引ろ過時に使用するセライト及びろ紙による吸着について検証を行った。MG及びLMG各0.02 µgを5 w/v%クエン酸溶液10 mL、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mL及び*n*-ヘキサン 50 mLと同時に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル100 mL及び50 mLで抽出を行った抽出液を、No.4ろ紙及びセライト並びにGFPを用いて吸引ろ過した際の回収率を表7に示した。No.4ろ紙及びセライト並びにGFPいずれを使用した場合もLMGの回収率が低下することが確認され、吸着の可能性が示唆された。以上より、*n*-ヘキサン及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを用いての実試料での検討は吸引ろ過操作は行わず、現行の方法に合わせ、遠心分離で抽出液を分取することとした。

表7 吸引ろ過した際の回収率 (%)

	抽出溶媒： <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル	
	No.4ろ紙及びセライト	GFP
MG	110	109
LMG	37	73

添加量：各0.02 µg

それぞれ試行数2の平均値

吸引ろ過前のMG及びLMGの面積を100%として算出

c) 試料共存下で添加回収試験を行った結果について

牛の肝臓試料及びしめさば試料共存下で添加回収試験を行った際の回収率について比較した。各試料10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加し、5 w/v%クエン酸溶液10 mL、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル100 mL及び50 mLで抽出を行い、遠心分離 (3000 rpm、5分) によって抽出液を分離しアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルで200 mLに定容した際の回収率を表8に示した。牛の肝臓についてLMGの回収率が70%を下回る結果となった。この結果より、試料共存下では*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルによる抽出ではLMGの抽出が不十分であると考えられた。

表 8 試料共存下での回収率 (%)

抽出溶媒： <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル		
	牛の肝臓	しめさば
MG	93	98
LMG	64	74

添加量：各0.02 μg 、試料10 g共存下

抽出液定容以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製
それぞれ試行数2の平均値

④アセトンによる抽出の検討

a) セライト及びろ紙による吸着について

アセトン抽出溶媒として選択した時に、*n*-ヘキサン及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルでの抽出検討時同様、吸引ろ過操作が適用可能か検討するため、吸引ろ過時に使用するセライト及びろ紙による吸着について検証を行った。MG及びLMG各0.02 μg を5 w/v%クエン酸溶液10 mL、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mLと同時に加え、アセトン100 mL及び50 mLで抽出を行った抽出液を、No.4ろ紙及びセライト並びにGFPを用いて吸引ろ過した際の回収率を表9に示した。No.4ろ紙及びセライトではLMGの回収率が80%程度になったが、GFPを使用した場合はMG及びLMGいずれも良好な回収率が得られた。

表 9 吸引ろ過した際の回収率 (%)

抽出溶媒：アセトン		
	No.4ろ紙及びセライト	GFP
MG	94	95
LMG	83	98

添加量：各0.02 μg

それぞれ試行数2の平均値

吸引ろ過前のMG及びLMGの面積を100%として算出

b) 試料共存下で添加回収試験を行った結果について

牛の肝臓試料及びしめさば試料共存下で添加回収試験を行った際の回収率について比較した。各試料10 gにMG及びLMG各0.02 μg を添加し、5 w/v%クエン酸溶液10 mL、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mLを加え、試験した結果を表10に示した。MG及びLMGいずれも良好な回収率が得られた。

表 10 試料共存下での回収率 (%)

抽出溶媒：アセトン		
	牛の肝臓	しめさば
MG	88	96
LMG	89	84

添加量：各0.02 μg 、試料10 g共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製
それぞれ試行数2の平均値

③及び④の結果から、抽出溶媒にはアセトンを選択し、抽出液の分離操作には吸引ろ過を選択することとした。

⑤試料調製時のクエン酸の必要性について

①より、抽出操作時に酸添加することでMGの回収率が向上することが判明した。そこで、クエン酸添加が試料調製時に必要か（試料調製時にもMG及びLMGの損失に注意が必要か）、あるいは抽出操作時のみ添加すればよいかについて検討した。牛の筋肉及び牛の肝臓試料10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加した後、直ちに30 w/v%クエン酸溶液（30 w/v%の理由については⑥で後述）10 mL及び10 w/v% BHT・アセトン溶液2 mLを加え、試験した結果と、MG及びLMG各0.02 µgを添加した後、30分間放置してから30 w/v%クエン酸溶液10 mL及び10 w/v%BHT含有アセトン溶液2 mLを加え、試験した結果を表11に示した。30分放置してから抽出を行った場合、MGが低回収となったため、試料調製時にクエン酸添加が必要と考えられた。

表11 標準溶液添加後30分間放置の有無による添加回収率 (%)

	牛の筋肉		牛の肝臓	
	なし	あり	なし	あり
30分放置				
MG	88	59	89	57
LMG	78	84	94	88

添加量：各0.02 µg、試料10 g共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

それぞれ試行数2の平均値

⑥試料調製時のクエン酸濃度について

試料の調製段階でクエン酸の添加が必要となったことから、改めて牛の肝臓試料を用い、調製時のクエン酸濃度について検討した。なお、脂肪試料との調製時の混和性を考慮し、クエン酸はエタノール及び水（1：1）混液に溶解して調製した。試料10 gに対し各濃度のクエン酸含有（エタノール及び水（1：1）混液）10 mLを添加し、よく混合してからMG及びLMG各0.02 µgを添加し、30分間放置した後10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mLを加えて試験した結果を表12に示した。クエン酸濃度20 w/v%以上でMG及びLMGともに良好な回収率が得られた。

表12 各濃度のクエン酸溶液を加え試料調製後、添加回収試験を行った結果 (%)

試料：牛の肝臓	クエン酸濃度 (w/v%)			
	10	20	30	35
MG	68	82	88	85
LMG	57	113	89	86

添加量：各0.02 µg、牛の肝臓試料10 g共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

それぞれ試行数2の平均値

⑦試料調製時のBHTの必要性について

②より、BHT・アセトン溶液を添加することでLMGの回収率が改善されることが判明したが、クエン酸同様にBHTの添加も試料調製時に必要か（試料調製中のMG及びLMGの損失を防止できるか）検証した。

a) 牛の脂肪試料共存下で放置時間中でのMG及びLMGの減少について

30 w/v%クエン酸含有（エタノール及び水（1：1）混液）5 mLを加えよく混合した牛の脂肪試料5 gを用いて、i) MG及びLMG各0.01 µgを添加し、30分間放置してから抽出時に10 w/w%BHT・アセトン

溶液2 mLを加え試験した（BHT非共存下で30分間放置）結果と、ii) MG及びLMG各0.01 µgを添加した後、直ちに10 w/w%BHT・アセトン溶液を加え、30分間放置してから試験した（BHT共存下で30分間放置）結果を表13に示した。牛の脂肪試料では、BHT非共存下で30分間放置したものではLMGの回収率が70%を下回る結果となったが、BHT共存下で放置した場合にはMG及びLMG共に良好な回収率が得られた。以上の結果から、添加回収試験において安定した回収率を得るために、クエン酸と同様にBHTも試料調製時に加えることが必要と考えられた。

表 13 BHT 共存下及び BHT 非共存下で 30 分間放置した後、添加回収試験を行った結果 (%)

試料：牛の脂肪	i) BHT 非共存下で 30 分間放置後、抽出時に BHT を添加した場合	ii) BHT 共存下で 30 分間放置後に抽出した場合
	MG	80
LMG	62	80

添加量：各0.01 µg、牛の脂肪試料5 g共存下

抽出以降の操作は〔分析法フローチャート〕に従って試験溶液を調製
それぞれ試行数2の平均値

b) しめさば試料共存下で放置時間中でのMG及びLMGの減少について

さらに、30 w/v%クエン酸含有（エタノール及び水（1：1）混液）10 mLを加え、よく混合したしめさば試料 10 gにMG及びLMG各0.02 µgを添加し、0、30、60及び120分間放置した後、10 w/v%BHT・アセトン溶液2 mLを加え試験した結果を表14に示した。30分程度の放置時間では80%以上の回収率が得られたが、60分以上放置したものではLMGの回収率が70%を下回った。放置時間中にも分解が進んでいることが推測された。

表 14 MG 及び LMG を添加し、各時間放置した後抽出を行った結果 (%)

試料：しめさば	放置時間（分）			
	0	30	60	120
MG	84	86	81	72
LMG	85	80	69	51

添加量：各0.02 µg、しめさば試料10 g共存下

抽出以降の操作は〔分析法フローチャート〕に従って試験溶液を調製
それぞれ試行数2の平均値

⑧試料調製法について

⑤～⑦の結果より、試料調製時にクエン酸及びBHTを加える必要があったため、試料調製法について検討した。まず、クエン酸及びBHTをエタノール及び水（1：1）混液に溶解させようと試みたが、BHTは低極性の物質であり、高濃度のBHTはエタノール及び水（1：1）混液に溶解できなかった。そこで、エタノールのみに溶解させたBHT溶液をあらかじめ調製し、試料調製時にクエン酸水溶液と混合して磨砕均一化し、調製後に試料重量と等重量のエタノール及び水（1：1）を加えた場合と同様の混合比となるように調製する方法を検討した。この調製法における検討事項について以下に示した。

a) 分解防止のために試料調製時に添加する溶液（試料調製溶液）の混合方法について

試料調製は重量比で混合し、試料100 gに対しBHT・エタノール溶液50 g及びクエン酸溶液50 gを加えて（試料：BHT・エタノール溶液：クエン酸溶液＝2：1：1）磨砕均一化し、試料10 g相当量（脂肪の場

合は5 g相当量) を秤取することとした。

b) クエン酸濃度について

⑥より、試料10 gに対して等量の添加溶媒として20 w/v%以上のクエン酸溶液を10 mL (クエン酸2 g) 加えれば良好な回収率が得られた。本検討ではさらに十分量として、試料10 gに対してクエン酸2.5 g相当となるように添加することとした。高濃度のクエン酸を溶解させる必要があるため、より調製の簡便なw/w%での調製法で50 w/w%クエン酸溶液を調製することとした。a)で記載した混合比率で調製した場合、試料100 gに対し50 w/w%クエン酸溶液50 g、従って試料10 g中のクエン酸濃度は2.5 g (50 w/w% × 5 g) となり、50 w/w%クエン酸溶液を加えればクエン酸量として十分と考えられた。

c) エタノール溶液中のBHT濃度について

牛の肝臓、牛の脂肪及びしめさばについて、試料調製時に加えるBHT・エタノール溶液のBHT濃度について検討した。各試料100 gに対し各濃度のBHT・エタノール溶液50 g及び50 w/w%クエン酸溶液50 gを加えて磨砕均一化し、試料調製を行った。この20 g (脂肪の場合は10 g) (試料10 g相当量、脂肪の場合は5 g相当量) を秤取し、MG及びLMG各0.02 µg (脂肪の場合は0.01 µg) を添加して30分間放置した後試験した結果を表15に示した。また、牛の肝臓について同様の結果を図6に示した。牛の脂肪及びしめさばについてはBHT濃度5 w/w%で、牛の肝臓についてはBHT濃度12.5 w/w%以上でMG及びLMGともに良好な回収率が得られた。本検討から、余裕を見てエタノール中のBHT濃度は15 w/w%とした。

以上の検討結果より、試料調製は試料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を加え磨砕均一化することとした。

表 15 エタノール中の BHT 濃度の添加回収率への影響 (%)

		BHT 濃度 (w/w%)						
		0	2.5	5	8	10	12.5	15
MG	牛の肝臓	61	—	78	76	77	84	78
	牛の脂肪	67	—	87	—	—	—	—
	しめさば	70	84	80	—	—	—	—
LMG	牛の肝臓	32	—	65	70	75	87	83
	牛の脂肪	39	—	84	—	—	—	—
	しめさば	2	75	82	—	—	—	—

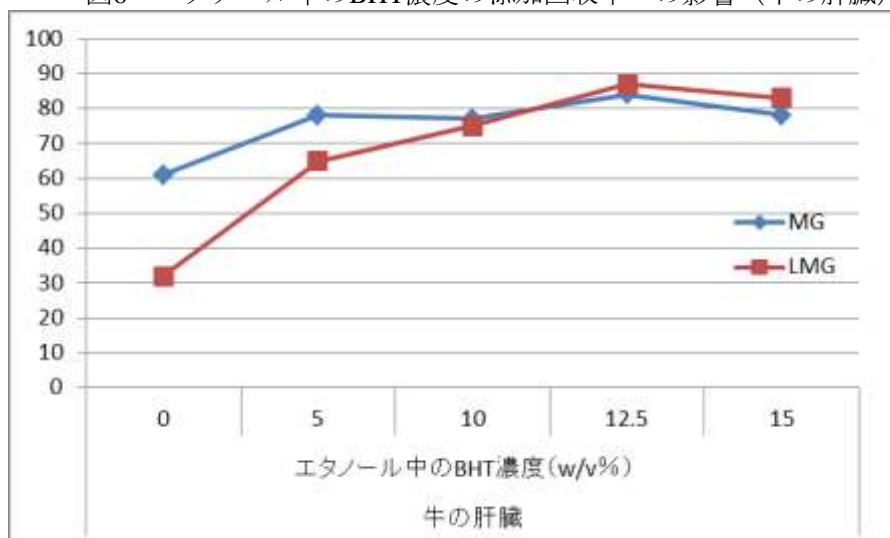
添加量：各0.02 µg (牛の肝臓及びしめさば)

各0.01 µg (牛の脂肪)

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製

試行数2の平均値、「—」実施せず

図6 エタノール中のBHT濃度の添加回収率への影響 (牛の肝臓)



2) 減圧濃縮、乾固操作による損失について

MG及びLMGについて濃縮乾固操作による回収率の低下があるか検討した。MG及びLMGの0.00001 mg/L検量線用標準溶液1 mL及びしめさばマトリックス標準溶液0.00001 mg/L相当1 mLをa) 減圧濃縮せず、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去したもの、b) 40℃以下で減圧濃縮し、液がなくなった後1分放置したものについて、それぞれアセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液1 mLに再溶解した際の回収率を表16に示した。その結果、標準溶液では窒素乾固、減圧濃縮乾固に関わらずMG及びLMGの回収率の低下が確認された。しめさば試験溶液中では窒素乾固、減圧濃縮ともに大きな回収率の低下は起こらなかったが、損失のリスクを考慮し本検討では濃縮操作を必要としない方法を検討することとした。

表 16 乾固操作による各成分の回収率 (%)

	標準溶液		しめさば試験溶液	
	a) 窒素乾固	b) 濃縮乾固	a) 窒素乾固	b) 濃縮乾固
MG	61	70	101	87
LMG	28	53	95	99

各0.00001 mg/L相当となるようMG及びLMGを添加しめさば試験溶液は [分析法フローチャート] に従って調製濃縮前の標準溶液中及びマトリックス標準溶液中のMG及びLMGの面積を100%として算出

3) 精製方法の検討

①MCX精製について

MG及びLMGはいずれも塩基性官能基を持つため、陽イオン交換カラムであるMCXを用いた精製を検討した。MGは4級アンモニウム塩を持つため負荷時のpH調整は不要であるが、LMGのpKaは約5.5との情報があり、LMGを解離状態にしてカラムに保持させるためにはpH3以下に下げることが望ましいと考えられる。本検討ではLC-MS/MSへの注入を考えて、揮発性の酸であるギ酸を加えて酸性下にして負荷することとした。なお、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。アセトニトリル及び2 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、MG及びLMG各0.01 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を流下させた後、アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液20 mLで溶出した結果を表17に示した。MG及びLMG

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。なお、MCX精製の際に、流速が速いと負荷及び洗浄の際にロイコマラカイトグリーンが流出することことがあるため、流速に留意する必要がある。

表 17 MCX からの溶出状況 (%)

	アセトン1 mL 及び2 vol%ギ酸4 mL	アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1)			合計
		アセトニトリル 5 mL	0-10 mL	10-20 mL	
MG	0	0	90	0	90
LMG	0	0	100	0	100

Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

添加量：各0.01 µg

次に、MCXからの溶出に必要なアンモニア水濃度について検討した。MG及びLMG各0.01 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を流下させた後、アセトニトリル中のアンモニア水濃度について1、3、4、5、6、10及び15 vol%としてそれぞれ溶出を行った結果を表18に示した。また、0-10 mLまでの溶出率を図7に示した。アンモニア水濃度が1 vol%では0-10 mLでは溶出できず、10-20 mL画分に溶出が認められたが、4 vol%以上であれば10 mLの溶出で良好な溶出が確認された。本分析ではさらに十分量として、アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液（アンモニア水濃度10 vol%）10 mLで溶出することとした。なお、MCXからのMG及びLMGの溶出は、ロットによって最適な条件が異なる場合があるため、ロットごとに溶出調査を事前に行い、十分な回収が得られることを確認してから使用することが望ましいと考えられた。

表18 MCXからの各アンモニア水濃度での溶出状況 (%)

アセトニトリル中の アンモニア水濃度 (vol%)		溶出量 (mL)	
		0-10	10-20
1	MG	0	69
	LMG	0	75
3	MG	87	0
	LMG	81	3
4	MG	89	0
	LMG	83	0
5	MG	81	0
	LMG	81	0
6	MG	87	0
	LMG	85	0
10	MG	84	0
	LMG	86	0
15	MG	79	0
	LMG	83	0

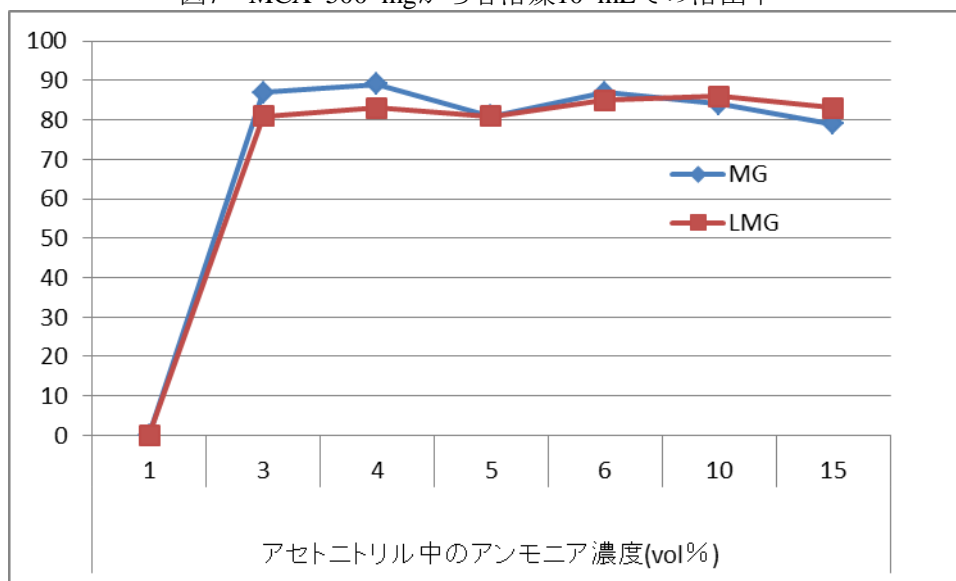
Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

添加量：各0.01 µg

負荷、洗浄画分については表17と同様、

MG及びLMGの溶出は確認されなかったため記載を省略

図7 MCX 500 mgから各溶媒10 mLでの溶出率



次に、試料共存下でMCXから溶出を行った。MG及びLMG各0.02 µgをしめさば抽出液1 mLに添加し、表17と同様にMCXでの精製操作を行った際の回収率を表19に示した。LMGについてイオン化抑制がみられ、回収率が50%程度となったため、更なる精製が必要であった。

表19 しめさば試料共存下でMCXによる精製を行った結果 (%)

しめさば	
MG	92 (0.90)
LMG	49 (0.54)

添加量：各0.02 µg、しめさば試料共存下
Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製
() 内はマトリックス標準溶液の面積比

②MAX精製について

1) で採用した抽出法では高濃度の酸共存下で抽出を行っているため、酸性官能基を持つ妨害物質が多く抽出されることが考えられる。そこで、追加精製として強陰イオン交換カラムであるMAXを用いた精製を検討した。なお、本精製カラムの検討はMCXでの精製後に追加することを前提に溶出条件を検討した。アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液5 mLで予備洗浄した後、MG及びLMG各0.01 µgをアセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液で負荷、溶出した結果を表20に示した。MG及びLMGはいずれも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。

表20 MAXからの溶出率 (%)

	アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液			合計
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
MG	98	11	0	109
LMG	103	9	0	112

Oasis MAX、充てん量150 mg、Waters製
添加量：各0.01 µg

③MCX/MAX 連結精製について

①及び②の結果から、各カラムの溶出条件を確認できたが、MCX及びMAXを連結して溶出可能か検討した。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、MG及びLMG各0.01 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を流下させた後、あらかじめアセトニトリル及びアンモニア水(9:1)混液5 mLで予備洗浄したMAXをMCXの下部に接続した。このカラムからアセトニトリル及びアンモニア水(9:1)混液20 mLで溶出した結果を表21に示した。MG及びLMGは負荷液及びアセトニトリル5 mLでは溶出せず、連結ミニ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で溶出された。

表 21 MCX 及び MAX からの溶出状況 (%)

	アセトン1 mL 及び2 vol%ギ酸4 mL	アセトニトリル *1	アセトニトリル及びアンモニア水 (9:1) *2		合計
	*1	5 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	MG	0	0	94	
LMG	0	0	93	0	93

Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

Oasis MAX、充てん量150 mg、Waters製

添加量：各0.01 µg

*1：MCXのみからの溶出

*2：MCXの下部にMAXを連結した状態で溶出

次に、試料共存下でMCX及びMAXから溶出を行った。MG及びLMG各0.02 µgをしめさば抽出液1 mLに添加し、表21と同様にMCX及びMAXで精製を行った結果を表22に示した。MAX精製を行った結果、LMGのイオン化阻害が改善されたため、MAXによる追加精製が有効であると考えられた。

表22 しめさば試料共存下でMCX及びMAXによる精製を行った結果 (%)

	しめさば
MG	87 (0.95)
LMG	85 (0.90)

添加量：各0.02 µg、しめさば試料共存下

Oasis MCX、充てん量500 mg、Waters製

Oasis MAX、充てん量150 mg、Waters製

添加量：各0.02 µg

()内はマトリックス標準溶液の面積比

①～③の結果から、精製カラムの溶出条件は、アセトン抽出液から分取した1 mLに2 vol%ギ酸4 mLを加えてMCXに負荷し、アセトニトリル5 mLを流下させた後、あらかじめアセトニトリル及びアンモニア水(9:1)混液5 mLで予備洗浄したMAXをMCXの下部に連結し、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で溶出することとした。

④オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について検討した。アセトニトリル及び水（9：1）混液5 mLで予備洗浄した後、アセトニトリル及び水（9：1）混液で負荷、アセトニトリルで溶出した結果を表23に示した。MGが溶出されず、LMGの溶出も不十分であったためさらなる検討は実施しなかった。

表 23 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況（%）

	アセトニトリル及び水 (9：1) 混液		アセトニトリル		合計
	0-10 mL	10-20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	MG	0	0	0	
LMG	0	0	75	0	75

Sep-pak plus C18、充てん量360 mg、Waters製
添加量：各0.02 µg

⑤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精製について

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精製について検討した。アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アセトニトリル及び水（9：1）混液で負荷した後、アセトニトリルで溶出した結果を表24に示した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに比べ、MGの溶出がアセトニトリルで確認できたが、MG及びLMGともに溶出は不十分であり、さらなる検討は実施しなかった。

表 24 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からの溶出状況（%）

	アセトニトリル及び水 (9：1) 混液		アセトニトリル		合計
	0-10 mL	10-20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	MG	0	0	53	
LMG	0	0	50	0	50

Oasis HLB、充てん量500 mg、Waters製
添加量：各0.02 µg

⑥アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

②MAX精製の検討と同じく、MCX精製前後の追加の精製カラムとして、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製についても検討した。アセトン5 mLで予備洗浄した後、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにアセトンで負荷、溶出した結果を表25に示した。MG及びLMGはいずれもアセトン20 mLで溶出できたが、MAXによる精製でより高い回収率が得られたため不採用とした。

表 25 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出率（%）

溶出量	アセトン			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
MG	76	13	0	89
LMG	72	10	0	82

Bond Elut NH2、充てん量1000 mg、Agilent technologies製
添加量：各0.01 µg

3. 添加回収試験

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、しめさば及びしじみの10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8 (MG) 及び9 (LMG) 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10に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表26に示した。検討した何れの試料においてもMG及びLMG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 26 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 ² (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³			選択性の評価 ⁵	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)
1	MG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しめさば	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
2	LMG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しめさば	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.002	不検出	0.002	定量限界	0.002 < 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*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。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合 (定量限界と基準値との関係が、『定量限界 < 基準値 < 定量限界 × 3』となる場合) には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度 (基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

*5 面積 (高さ) 比が、妨害ピークの許容範囲の判定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27に示した。MGの真度は78~93%、併行精度は3~8%であり、目標値を十分に満たした。LMGの真度は77~92%、併行精度は2~8%であり、目標値を十分に満たした。MGのS/N比の平均値は28~58、LMGのS/N比の平均値は151~302でありS/N ≥ 10を十分に満たした。

表 27 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 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³			備考			
							傾き	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値				
1	MG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002		196390000	1041	0.9966	72.5	80.1	77.7	77.9	80.3	77.7	4.0	31.7	30.9	31.3			
		牛の脂肪	0.002	不検出	0.002		942249000	-275	0.9932	106	93.1	86.9	88.4	90.6	93.0	8.2	76.8	39.0	57.9			
		牛の肝臓	0.002	不検出	0.002		972220000	638	0.9970	73.9	82.1	82.0	86.5	81.1	81.1	5.6	36.8	33.3	35.1			
		鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002		596200000	109	0.9971	84.6	81.9	81.1	84.0	86.7	83.7	2.7	30.3	27.9	29.1			
		牛乳	0.002	不検出	0.002		101004000	-174	0.9992	80.8	77.3	86.1	81.3	78.7	80.8	4.1	58.6	31.7	45.2			
		鶏卵	0.002	不検出	0.002		826880000	408	0.9944	82.0	88.5	91.2	98.6	80.6	88.2	8.3	33.3	25.6	29.5			
		はちみつ	0.002	不検出	0.002		906890000	69	0.9984	93.7	89.9	88.5	87.6	83.6	88.7	4.1	50.3	41.3	45.8			
		うなぎ	0.002	不検出	0.002		912890000	-1071	0.9997	80.0	86.1	81.3	83.5	77.2	81.6	4.1	37.0	19.8	28.4			
		しめさば	0.002	不検出	0.002		101004000	-174	0.9992	76.1	76.5	84.5	79.3	74.4	78.2	5.1	47.0	37.0	42.0			
		しじみ	0.002	不検出	0.002		168564000	1840	0.9989	80.0	86.2	95.2	89.1	85.1	87.1	6.4	46.7	37.0	41.9			
		2	LMG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002		385800000	2430	0.9994	79.6	83.7	80.6	77.3	78.2	79.9	3.1	196.4	178.9	187.7	
				牛の脂肪	0.002	不検出	0.002		195936000	2688	0.9970	84.3	79.8	81.9	96.7	91.1	86.8	8.1	395.8	207.5	301.7	
				牛の肝臓	0.002	不検出	0.002		272324000	-4707	0.9947	84.4	80.6	80.0	81.6	80.2	81.4	2.2	196.4	187.1	191.8	
				鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002		196192000	100	0.9983	91.0	90.9	86.3	81.1	90.9	88.0	5.0	263.3	232.1	247.7	
牛乳	0.002			不検出	0.002		209488000	-79	0.9960	87.9	88.3	90.3	85.5	84.7	87.3	2.6	207.5	197.0	202.3			
鶏卵	0.002			不検出	0.002		156930000	405	0.9953	86.6	90.1	93.8	86.3	85.6	88.5	3.9	162.8	139.8	151.3			
はちみつ	0.002			不検出	0.002		194040000	-69	0.9989	75.9	81.4	74.6	74.6	80.5	77.4	4.3	196.4	196.4	196.4			
うなぎ	0.002			不検出	0.002		256884000	-4426	0.9929	83.9	79.3	79.5	88.1	81.3	82.4	4.5	170.5	134.5	152.5			
しめさば	0.002			不検出	0.002		239489000	-79	0.9960	79.1	80.3	72.5	76.9	79.1	77.6	4.0	304.0	197.0	250.5			
しじみ	0.002			不検出	0.002		332809000	-384	0.9995	88.8	91.7	96.5	92.9	89.2	91.8	3.4	219.1	186.3	202.7			

*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。
 2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 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(Mn.)のそれぞれのS/N比を求める。

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28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。MGの面積比は0.93~1.03、LMGの面積比は0.89~1.00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28で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表29に示した。補正真度はMG78~93%、LMG86~95%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 28 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 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³										備考	
							面積又は高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ⁶			
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均						
1	MG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	5238	5478	5358.0	5545	5447	5496.0	0.97			
		牛の脂肪	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	8408	8601	8504.5	8378	8156	8267.0	1.03			
		牛の肝臓	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	8123	8553	8338.0	8901	8521	8711.0	0.96			
		鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	5590	5835	5712.5	5715	5859	5787.0	0.99			
		牛乳	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	8627	9528	9077.5	8550	9112	8831.0	1.03			
		鶏卵	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	9019	9909	9464.0	9162	9630	9396.0	1.01			
		はちみつ	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	8979	8814	8896.5	9145	9577	9361.0	0.95			
		うなぎ	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	5980	6068	6024.0	6418	6599	6508.5	0.93			
		しめさば	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	9163	9412	9287.5	9173	9438	9305.5	1.00			
		しじみ	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	17916	18384	18150.0	18496	17609	18052.5	1.01			
		2	LMG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	14234	13988	14111.0	16009	15134	15571.5	0.91	
				牛の脂肪	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	18926	18530	18728.0	18452	18851	18651.5	1.00	
				牛の肝臓	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	20155	20971	20563.0	22699	20745	21722.0	0.95	
				鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002	0.00001	面積	0	15284	14913	15098.5	15737	15213	15475.0	0.98	
牛乳	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	18274	18012	18143.0	19434	18784	19109.0	0.95			
鶏卵	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	17159	16972	17065.5	17108	17005	17056.5	1.00			
はちみつ	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	15890	17318	16604.0	18335	18781	18558.0	0.89			
うなぎ	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	18073	15685	16879.0	18144	16891	17517.5	0.96			
しめさば	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	18741	17463	18102.0	19704	20440	20072.0	0.90			
しじみ	0.002			不検出	0.002	0.00001	面積	0	35774	35296	35536.0	37833	35631	36732.0	0.97			

*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。
 *2 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。
 *3 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。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 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。
 *5 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。
 *6 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 29 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	MG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	77.7	0.97	80.1	
		牛の脂肪	0.002	不検出	0.002	93.0	1.03	90.3	
		牛の肝臓	0.002	不検出	0.002	81.1	0.96	84.5	
		鶏の筋肉	0.002	不検出	0.002	85.3	0.99	86.2	
		牛乳	0.002	不検出	0.002	80.8	1.03	78.4	
		鶏卵	0.002	不検出	0.002	88.2	1.01	87.3	
		はちみつ	0.002	不検出	0.002	88.7	0.95	93.4	
		うなぎ	0.002	不検出	0.002	81.6	0.93	87.7	
		しめさば	0.002	不検出	0.002	78.2	1.00	78.2	
		しじみ	0.002	不検出	0.002	87.1	1.01	86.2	
		2	LMG	牛の筋肉	0.002	不検出	0.002	79.9	0.91
牛の脂肪	0.002			不検出	0.002	86.8	1.00	86.8	
牛の肝臓	0.002			不検出	0.002	81.4	0.95	85.7	
鶏の筋肉	0.002			不検出	0.002	88.0	0.98	89.8	
牛乳	0.002			不検出	0.002	87.3	0.95	91.9	
鶏卵	0.002			不検出	0.002	88.5	1.00	88.5	
はちみつ	0.002			不検出	0.002	77.4	0.89	87.0	
うなぎ	0.002			不検出	0.002	82.4	0.96	85.8	
しめさば	0.002			不検出	0.002	77.6	0.90	86.2	
しじみ	0.002			不検出	0.002	91.8	0.97	94.6	

*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

抽出溶媒は、アセトンを用いたところ添加回収試験で良好な回収率が得られた。クエン酸を添加し酸性条件で抽出することでMGの回収率が向上し、酸化防止剤としてBHTを加えて抽出することでLMGの回収率が向上した。また、加えるクエン酸及びBHTは試料調製時にクエン酸溶液及びBHT・エタノール溶液として加え、混合し、アセトン抽出を行うことでMG及びLMGともに良好な回収率を得ることができた。精製カラムについて、MCX及びMAXを検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した分析法を用いて、牛の筋肉等10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、MGの真度は78～93%、併行精度は3～8%、LMGの真度は77～92%、併行精度は2～8%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、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると考えられた。

[結論]

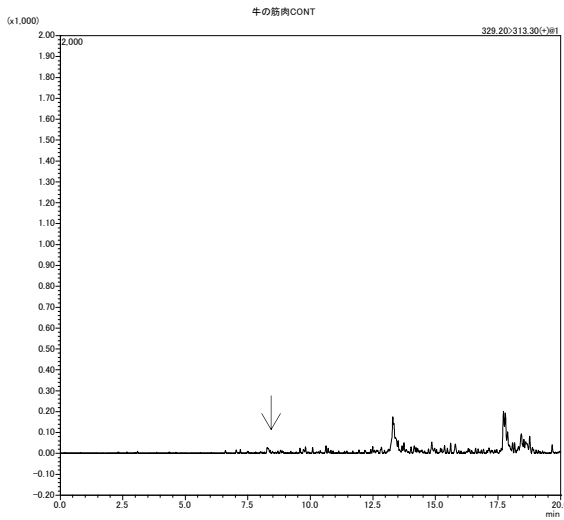
畜水産物中のMG及びLMGの試験法として、BHT・エタノール溶液及びクエン酸溶液を加えて調製した試料からMG及びLMGをアセトンで抽出し、MCX及びMAXで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しめさば及びしじみに適用した結果、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、MGの真度は78～93%、併行精度は3～8%、LMGの真度は77～92%、併行精度は2～8%、定量限界は0.002 mg/kgが可能であることが確認できた。

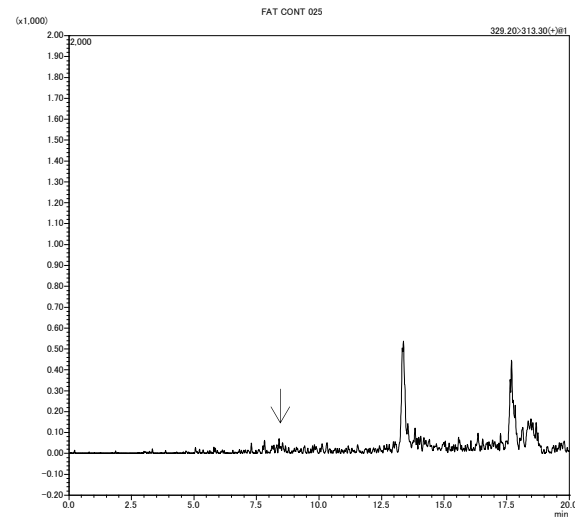
[参考文献]

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

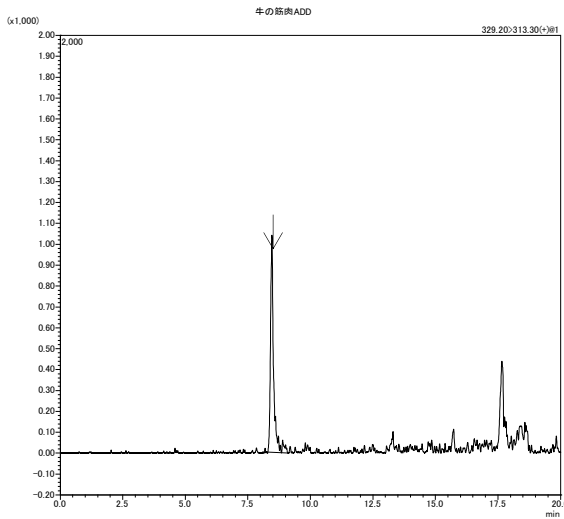
MGの添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク



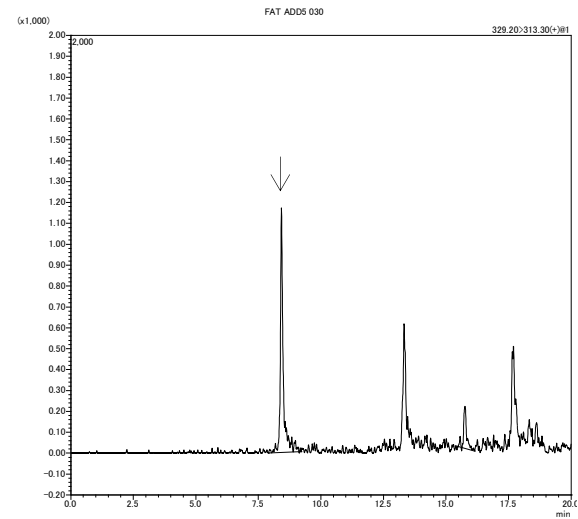
ブランク



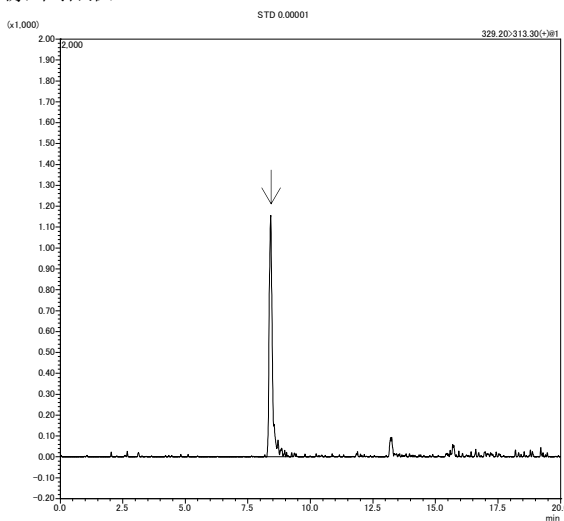
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

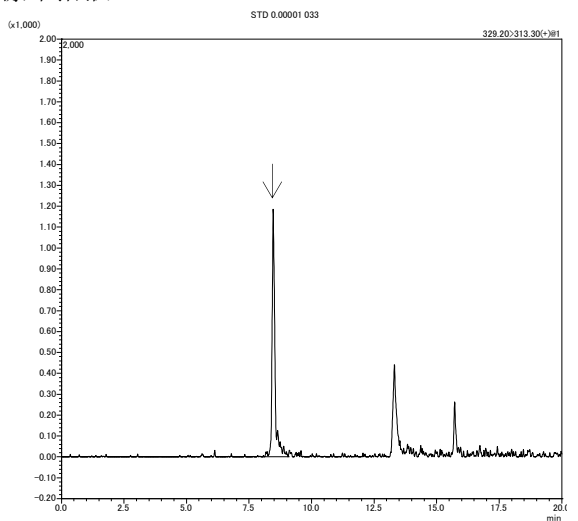
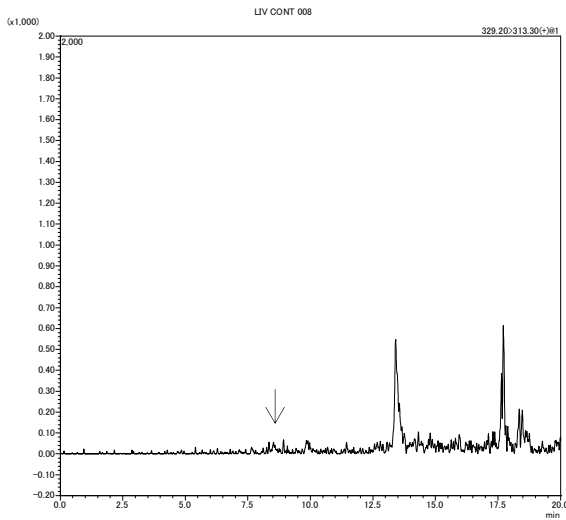


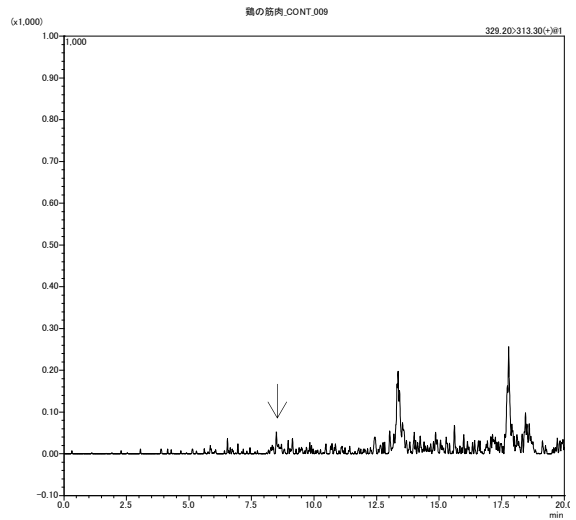
図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 MG (m/z +329→313)
 添加濃度 : 0.002 ppm

図 8-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 MG (m/z +329→313)
 添加濃度 : 0.002 ppm

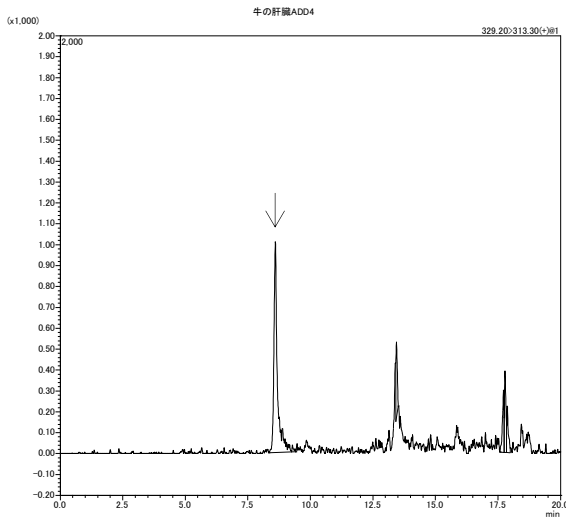
ブランク



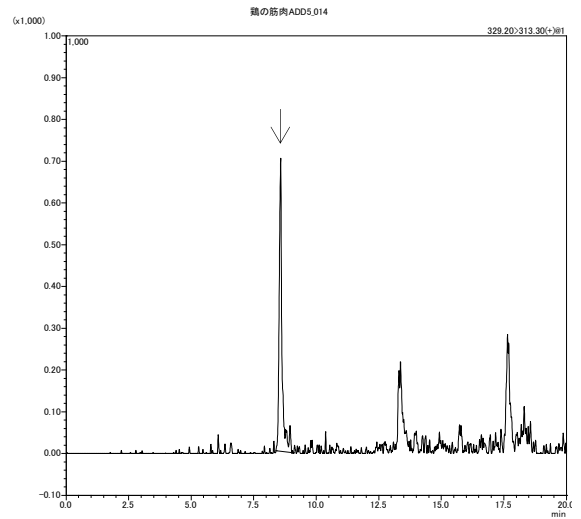
ブランク



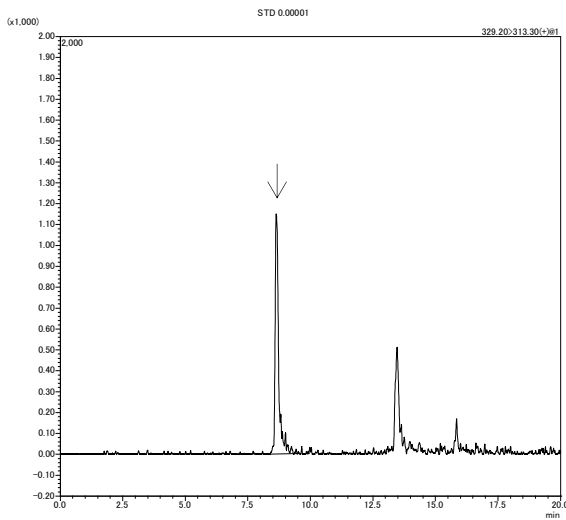
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

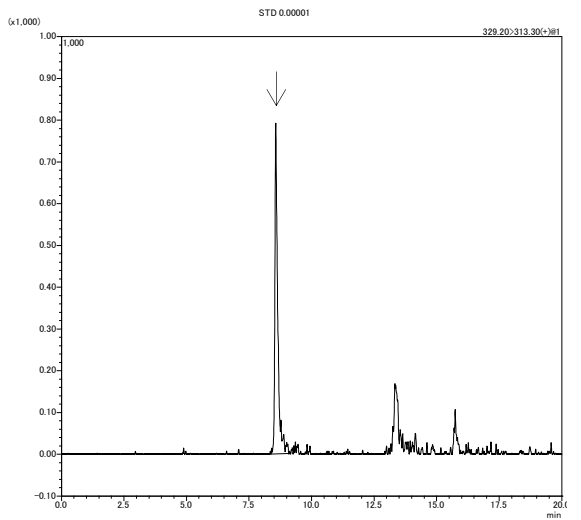
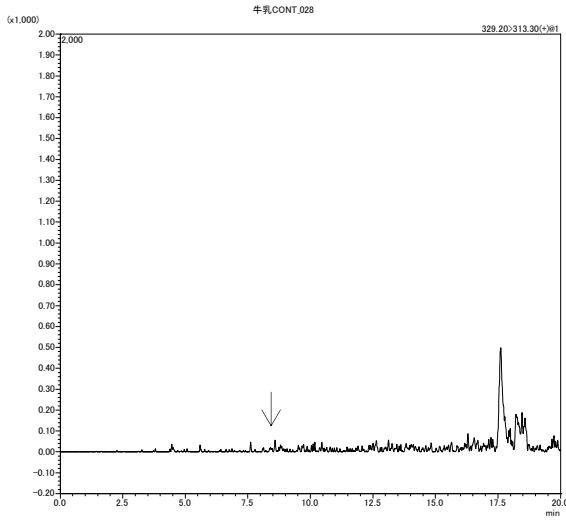


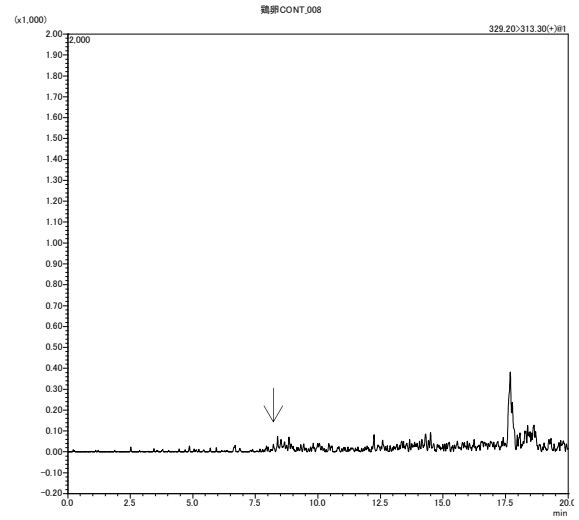
図 8-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 8-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

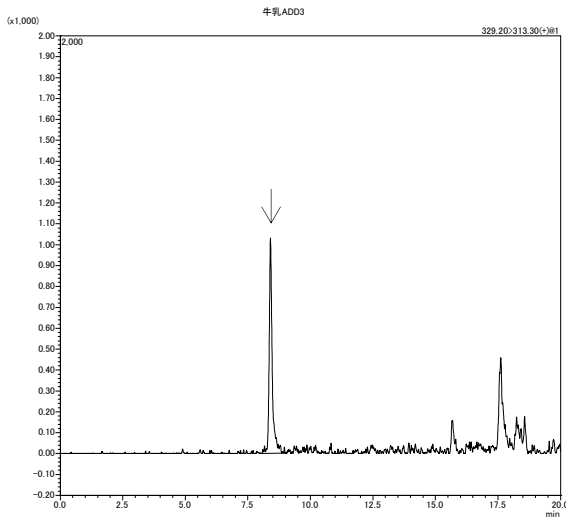
ブランク



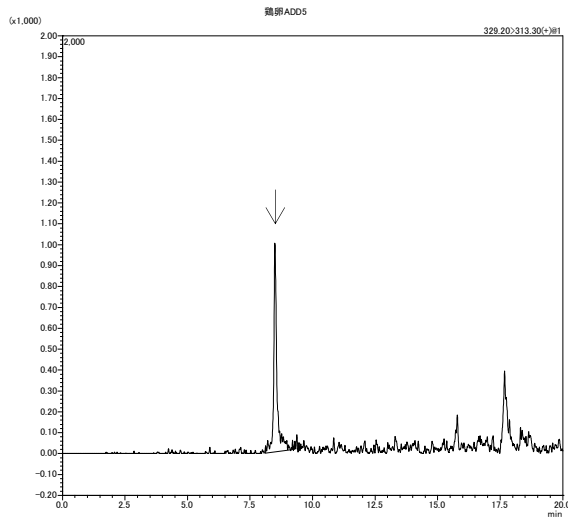
ブランク



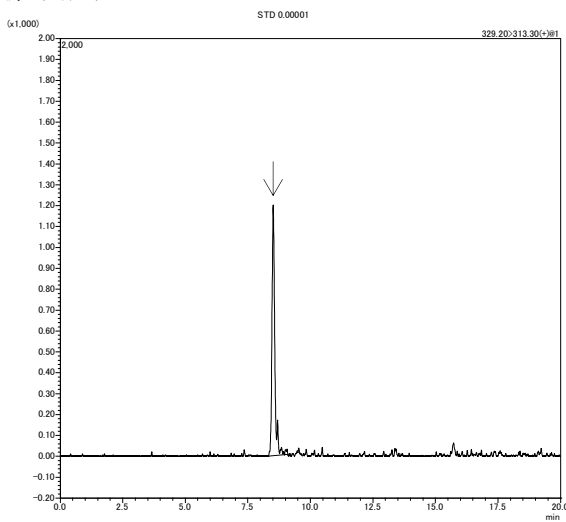
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

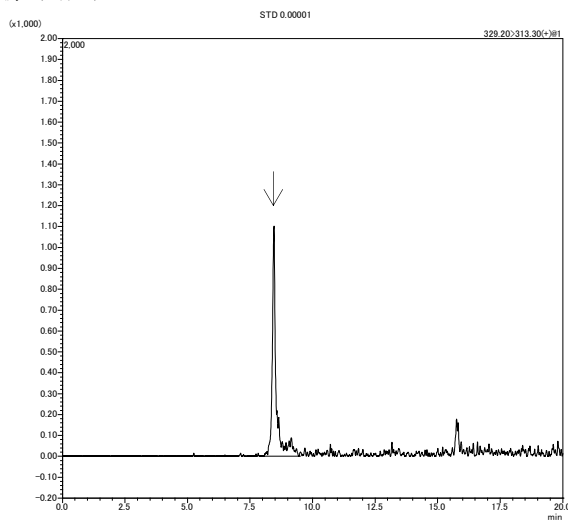
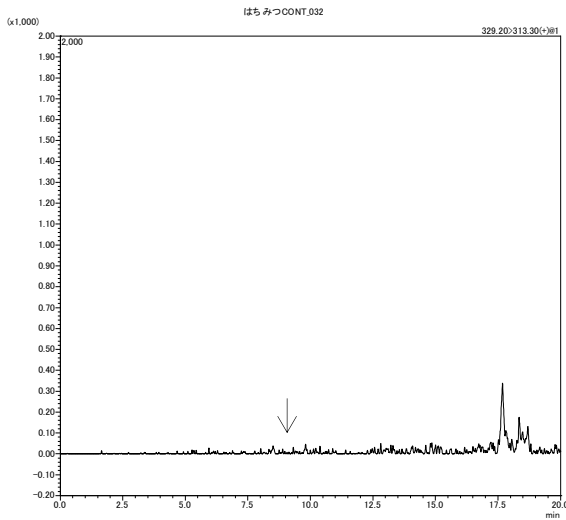


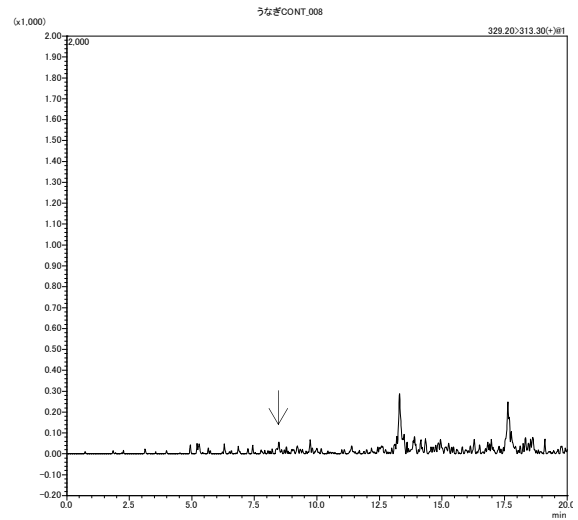
図 8-5 牛乳の SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 8-6 鶏卵の SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

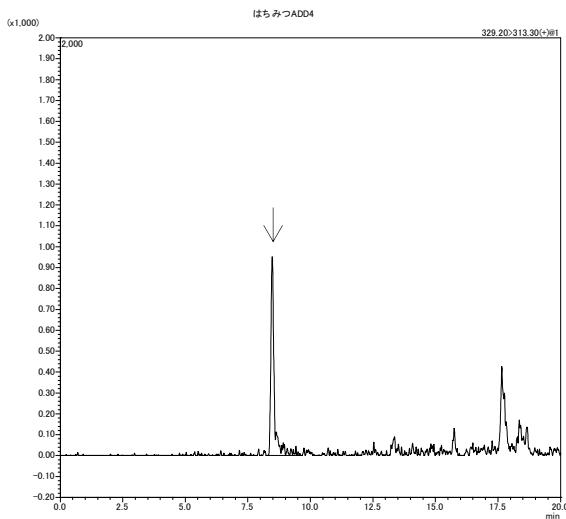
ブランク



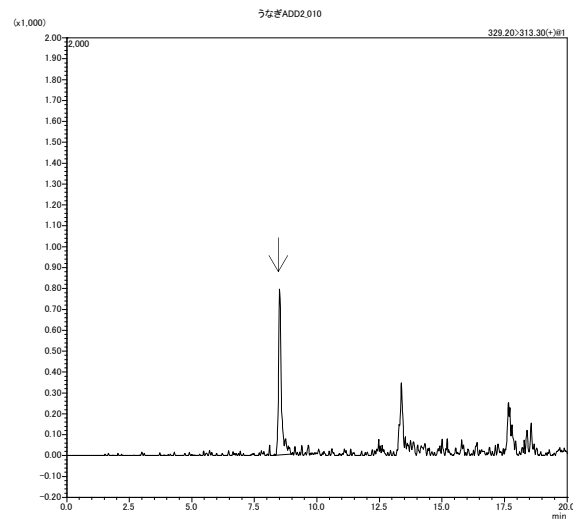
ブランク



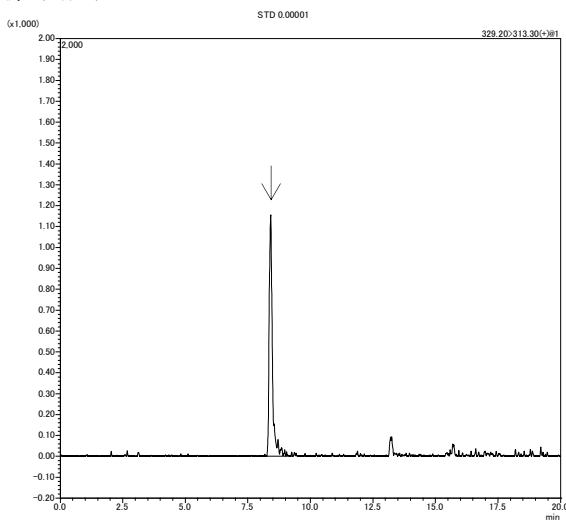
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

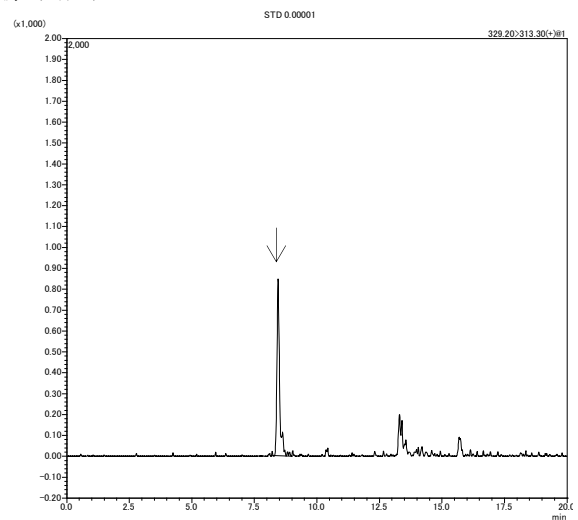
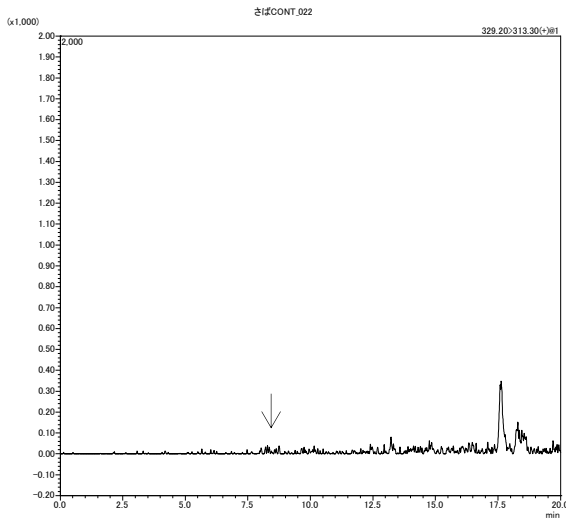


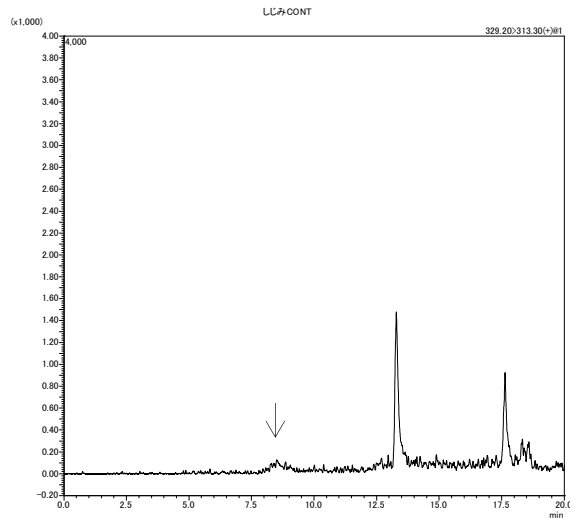
図 8-7 はちみつの SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 8-8 うなぎの SRM クロマトグラム
MG ($m/z + 329 \rightarrow 313$)
添加濃度 : 0.002 ppm

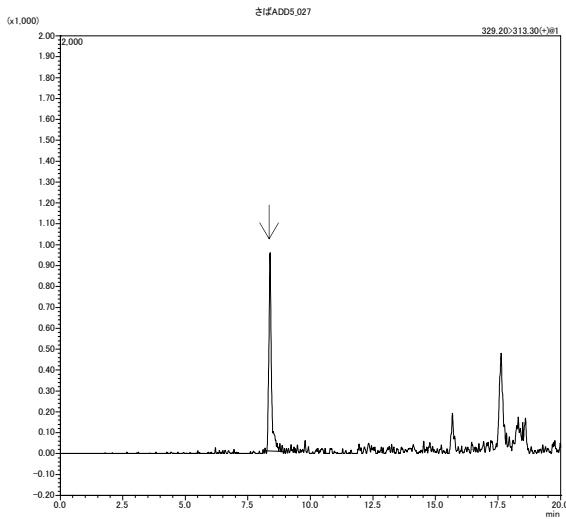
ブランク



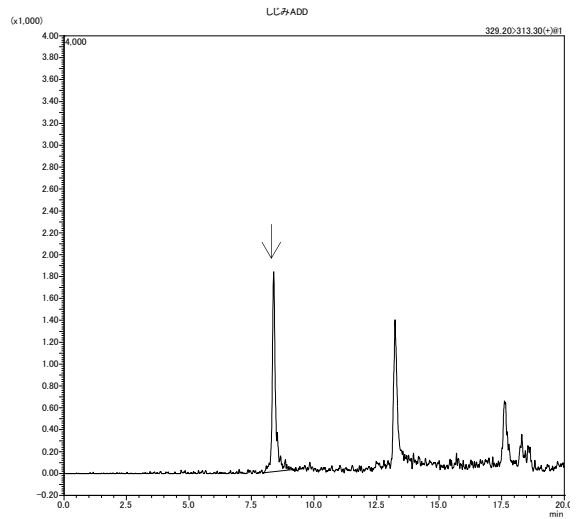
ブランク



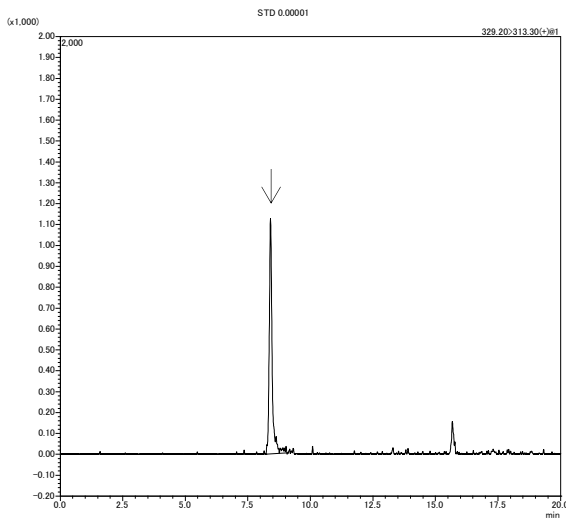
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

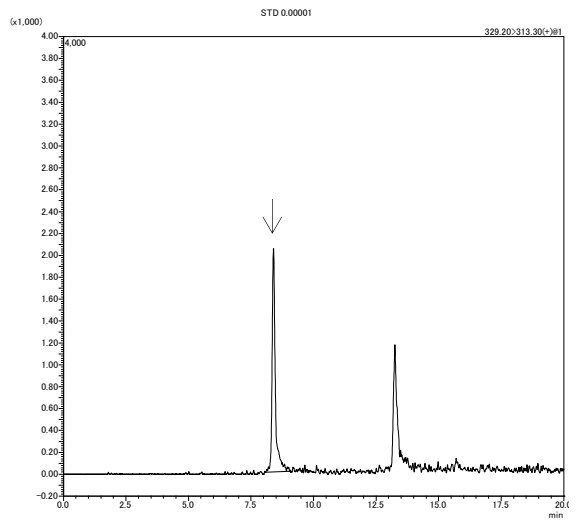
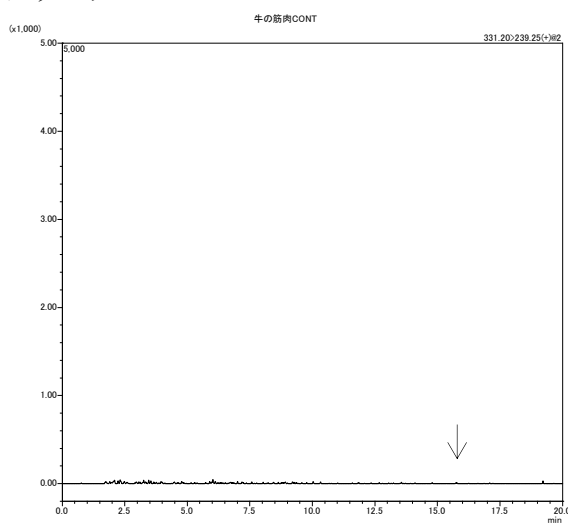


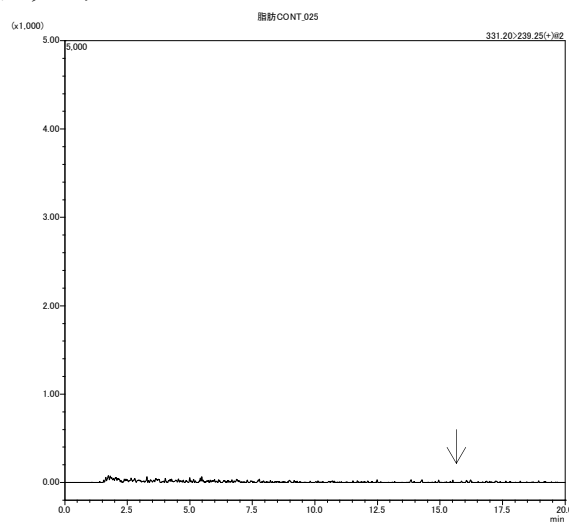
図 8-9 しめさばの SRM クロマトグラム
MG (m/z +329→313)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 8-10 しじみの SRM クロマトグラム
MG (m/z +329→313)
添加濃度 : 0.002 ppm

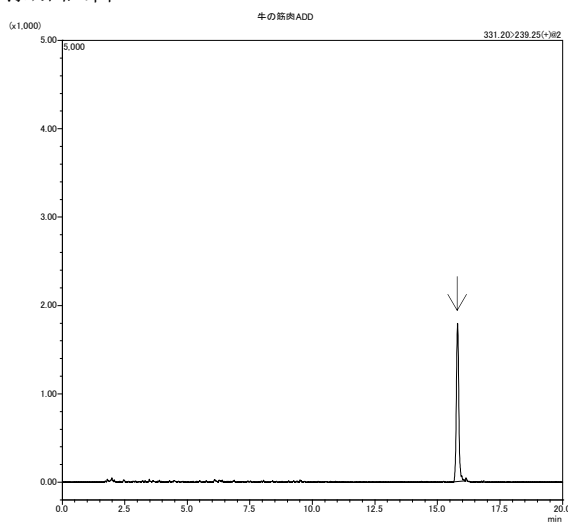
LMGの添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク



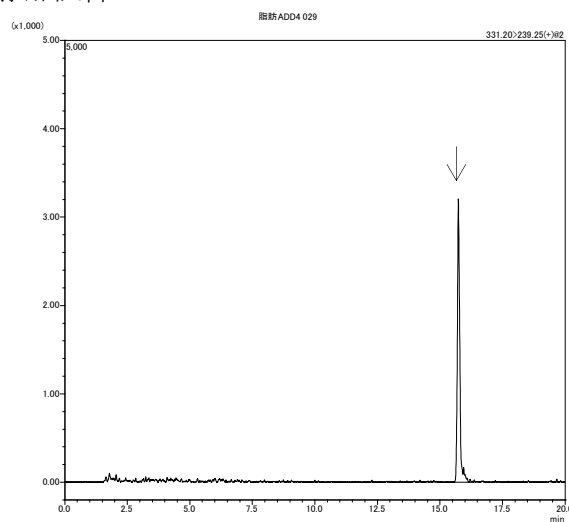
ブランク



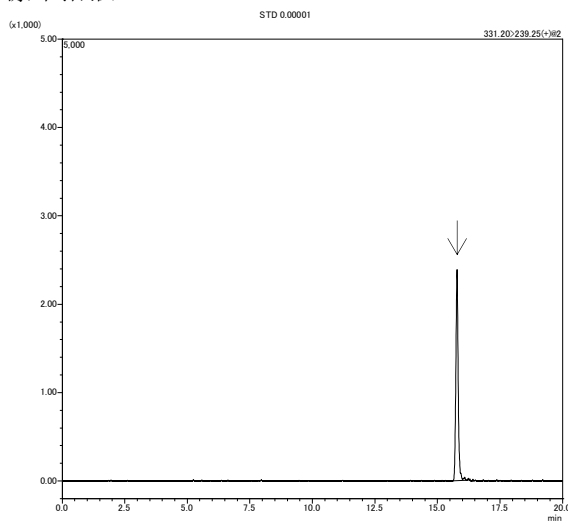
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

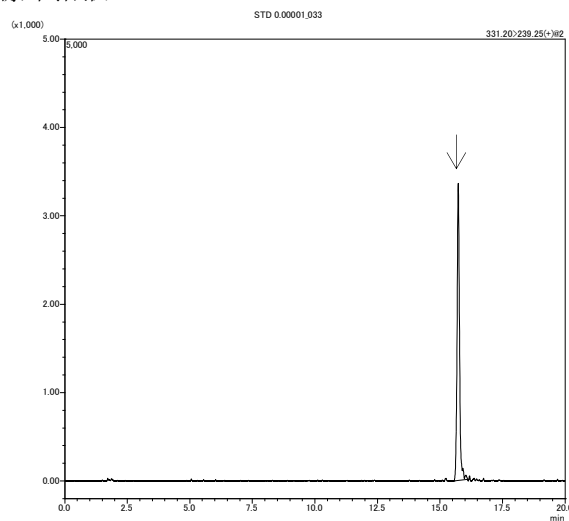
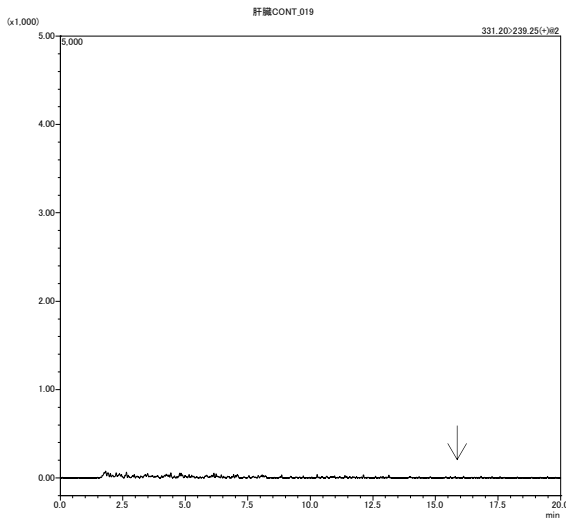


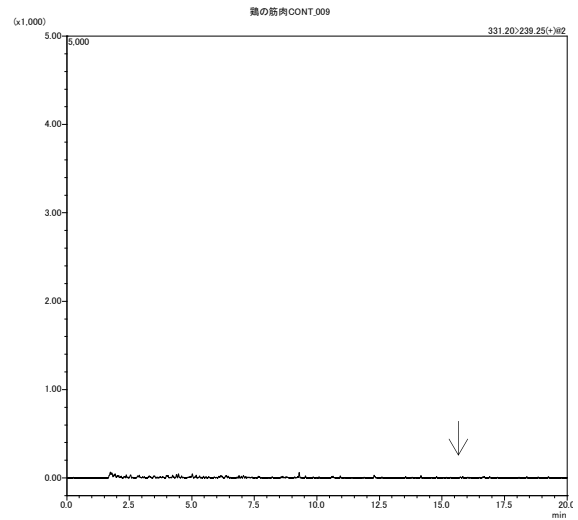
図 9-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 LMG (m/z +331→239)
 添加濃度：0.002 ppm

図 9-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 LMG (m/z +331→239)
 添加濃度：0.002 ppm

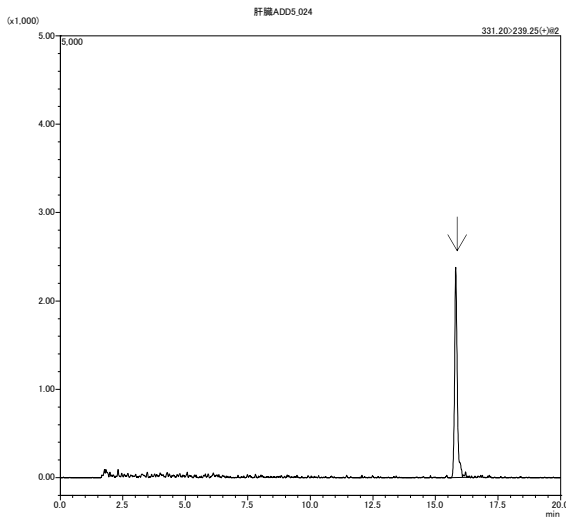
ブランク



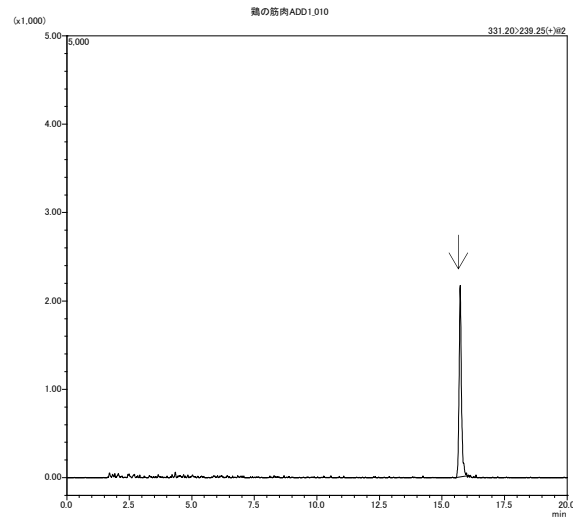
ブランク



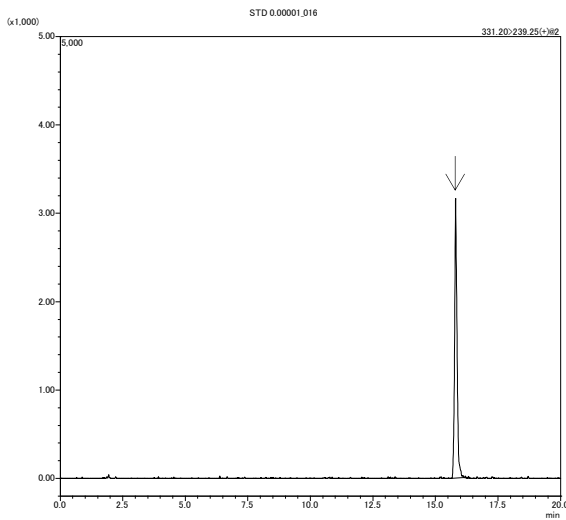
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

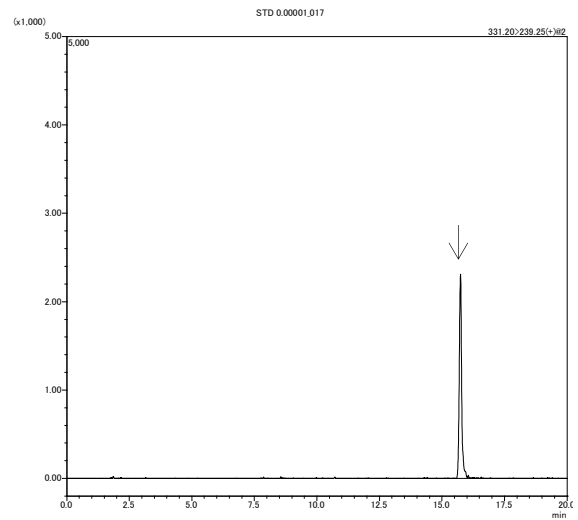
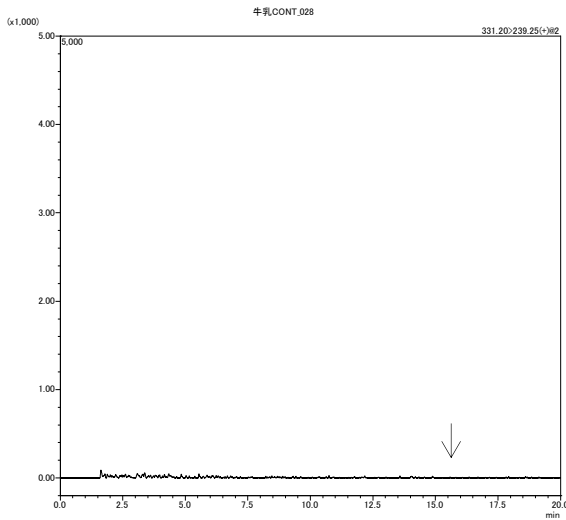


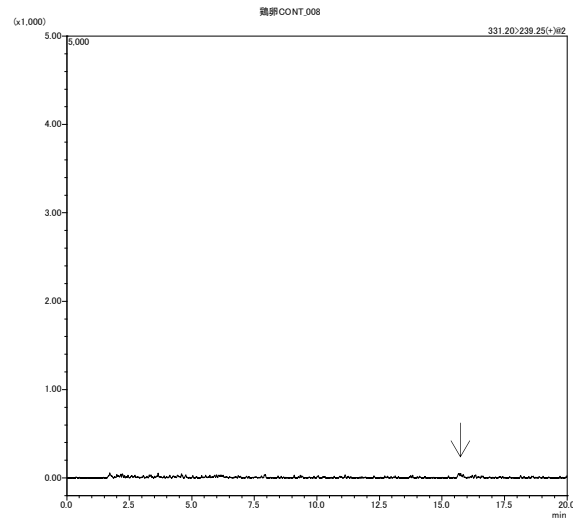
図 9-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 9-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

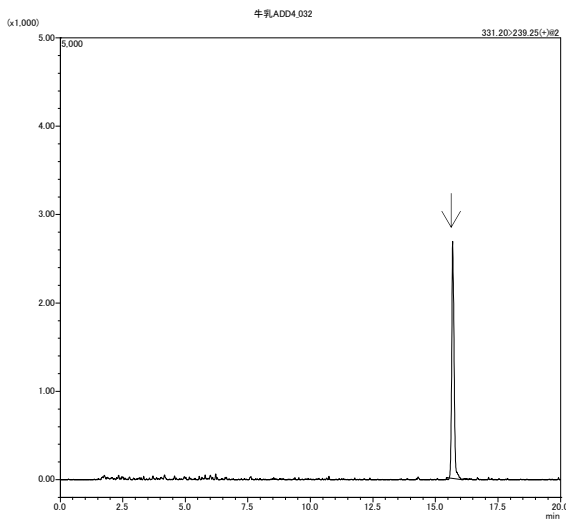
ブランク



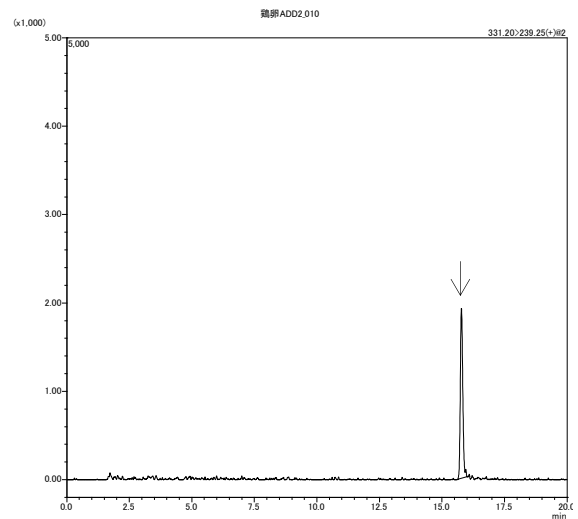
ブランク



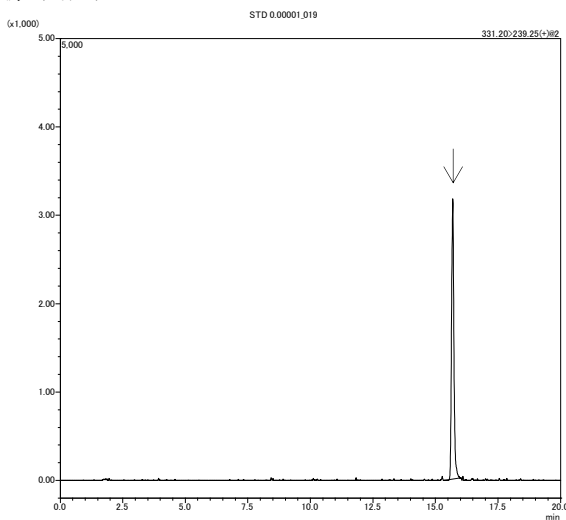
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

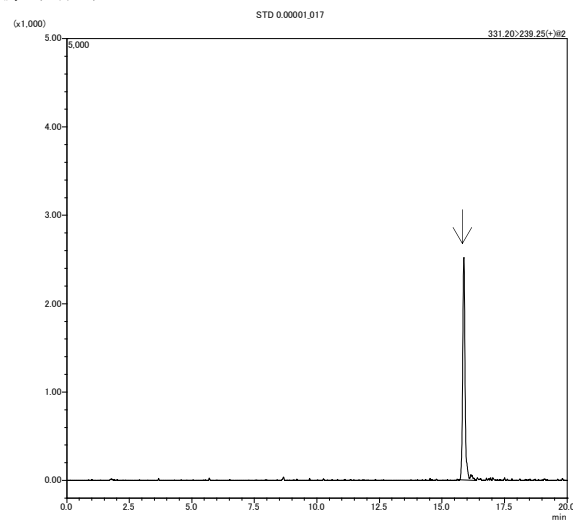
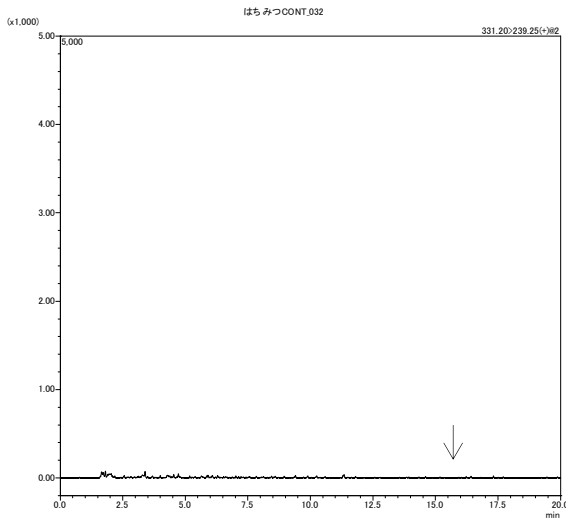


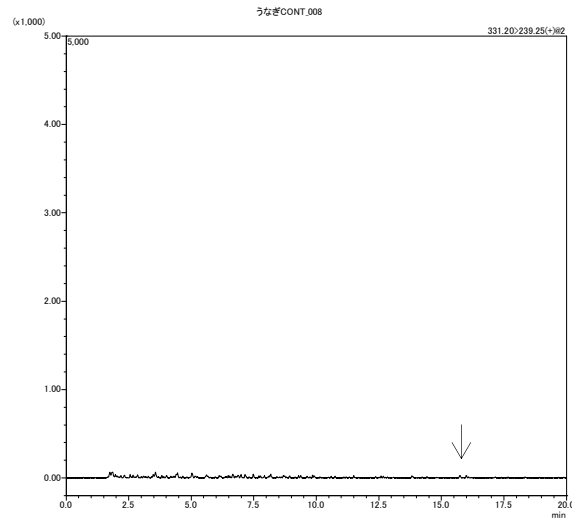
図 9-5 牛乳の SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 9-6 鶏卵の SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

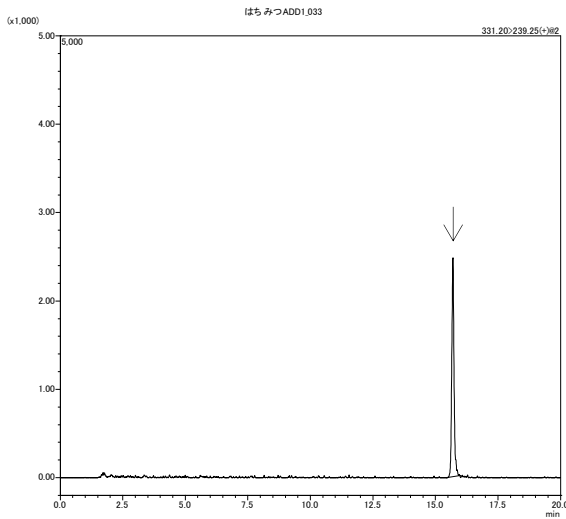
ブランク



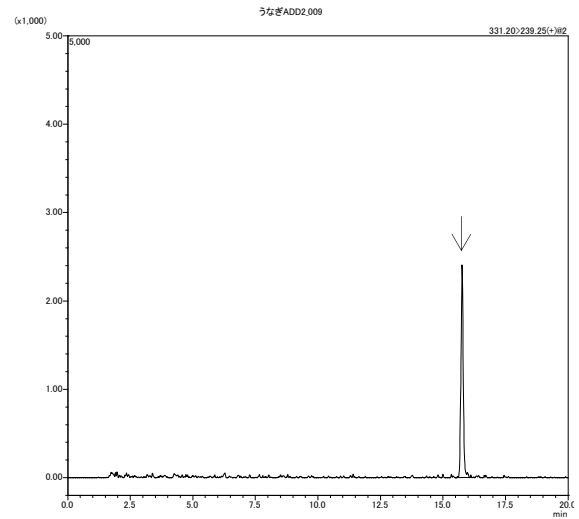
ブランク



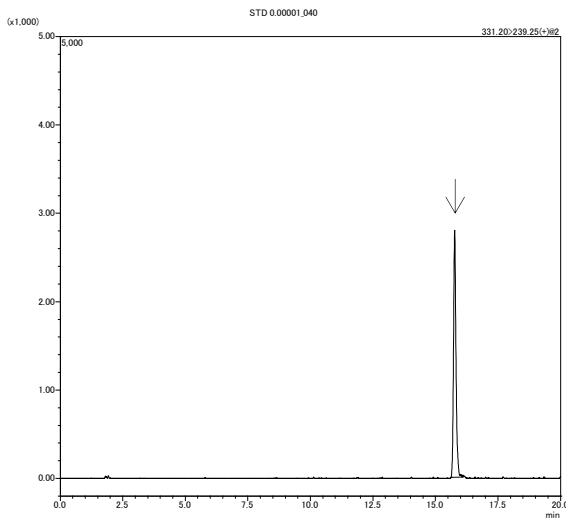
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

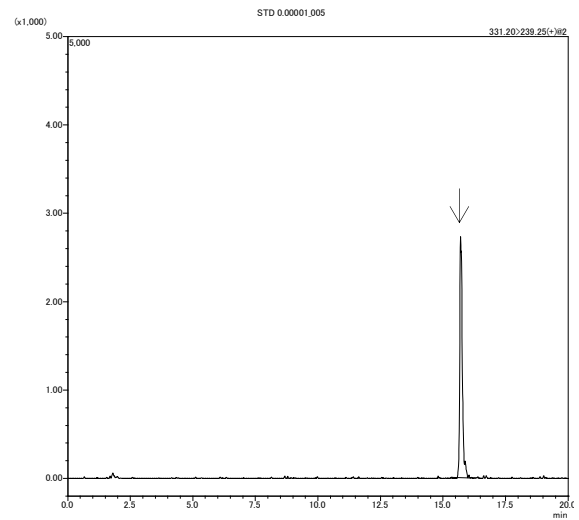
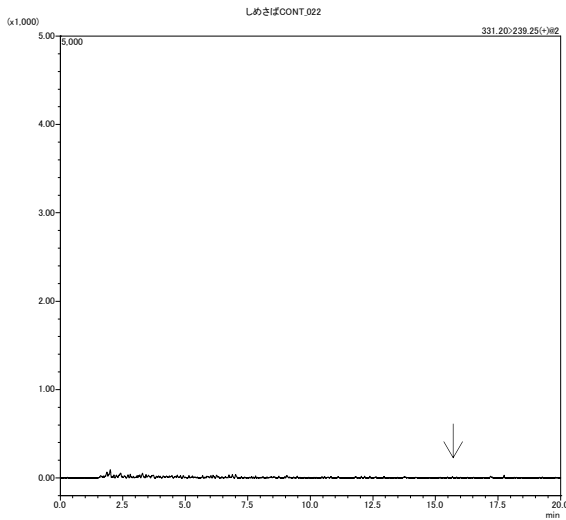


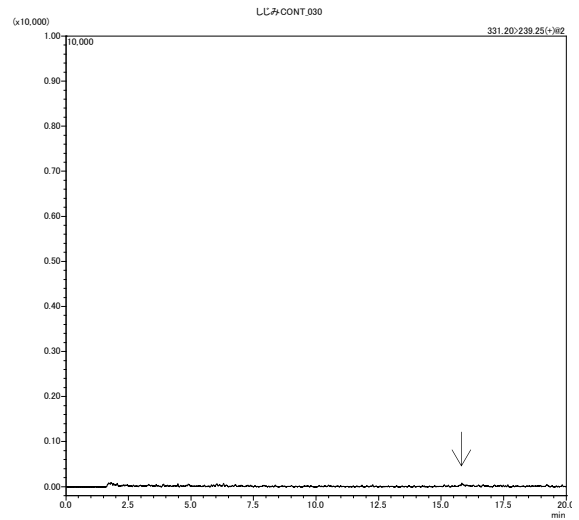
図 9-7 はちみつの SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 9-8 うなぎの SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

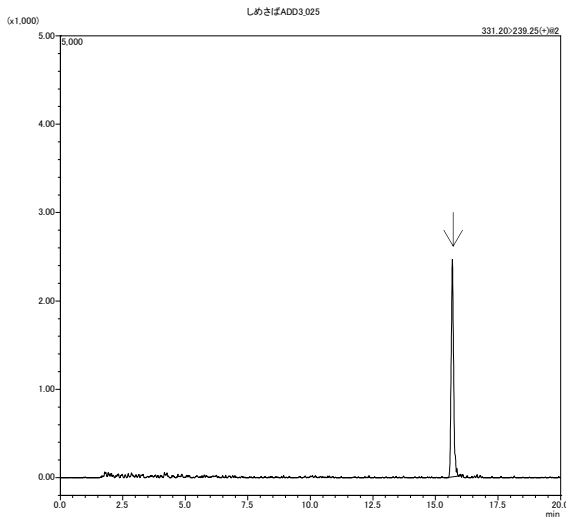
ブランク



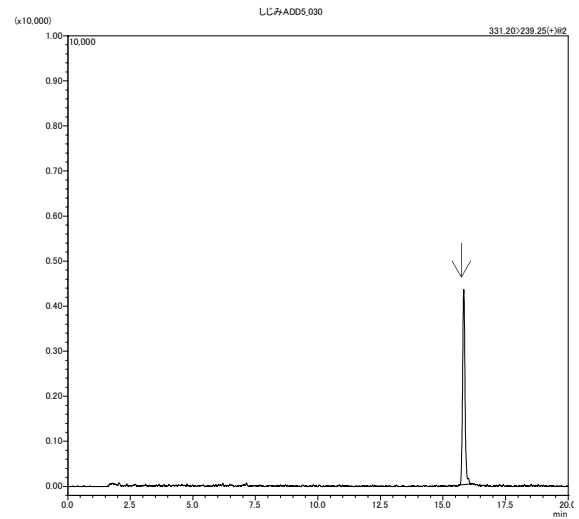
ブランク



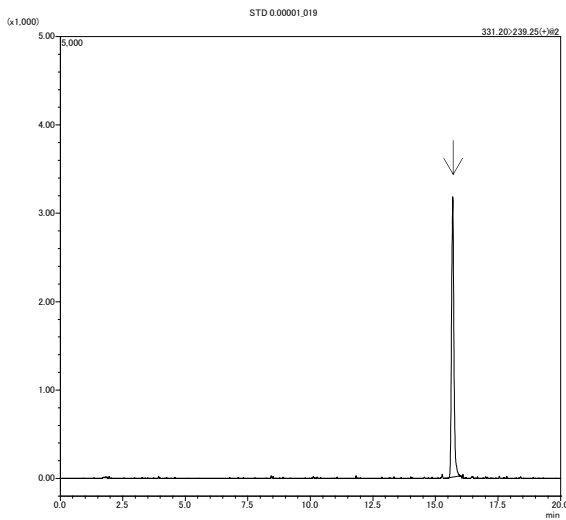
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

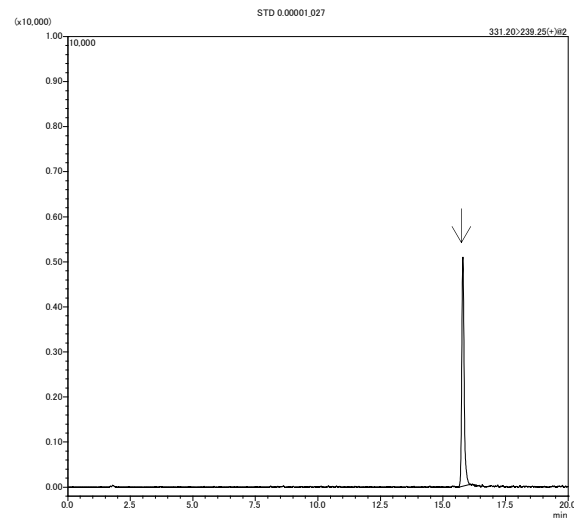
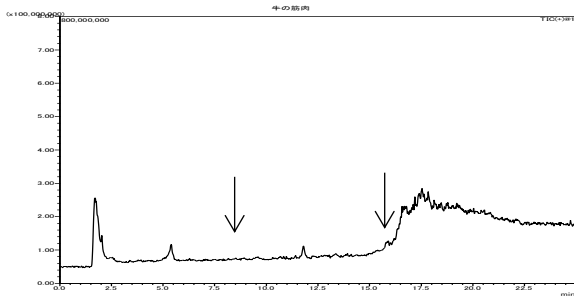


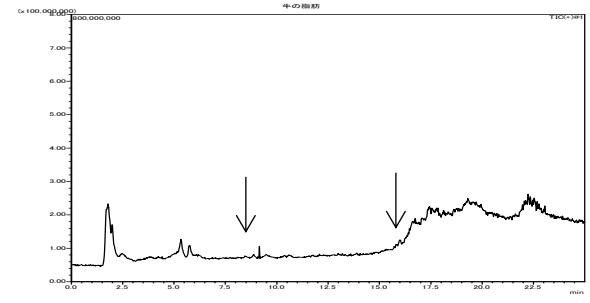
図 9-9 しめさばの SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

図 9-10 しじみの SRM クロマトグラム
LMG (m/z +331→239)
添加濃度 : 0.002 ppm

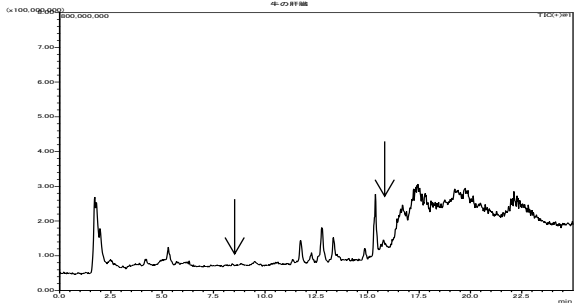
牛の筋肉



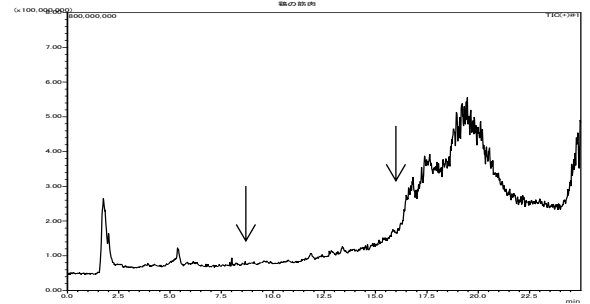
牛の脂肪



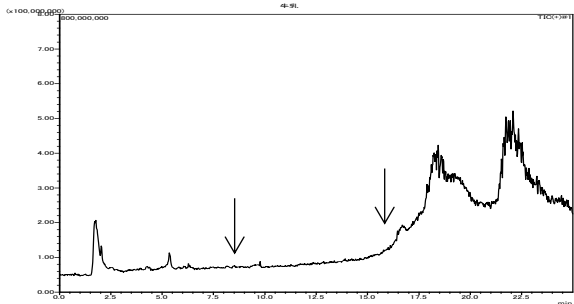
牛の肝臓



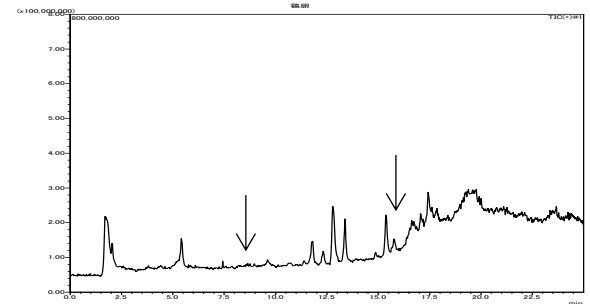
鶏の筋肉



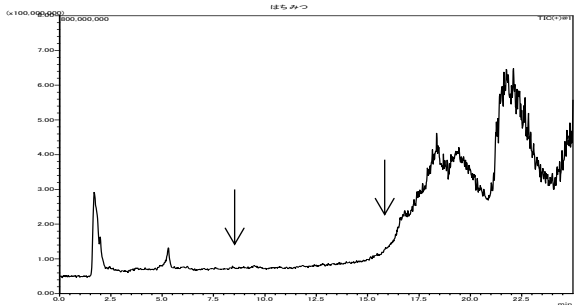
牛乳



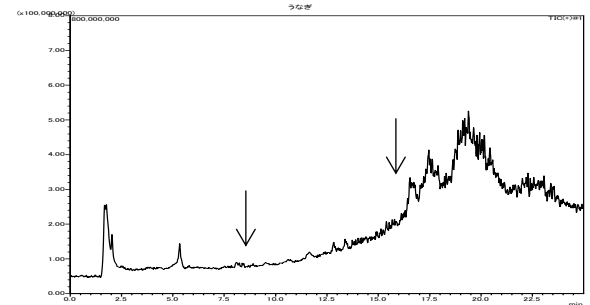
鶏卵



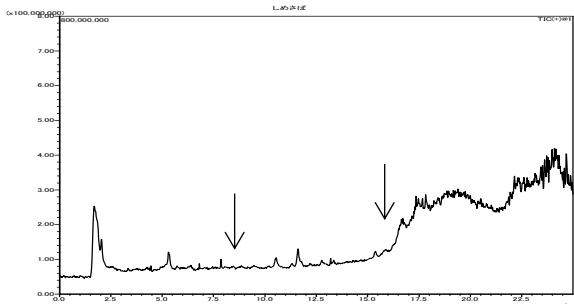
はちみつ



うなぎ



しめさば



しじみ

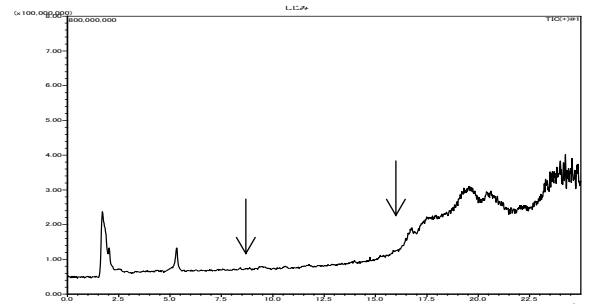


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲 : 50~500 m/z 、コーン電圧 : 12 (V))