

## 4 魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

小森谷 敏一\*

### Simultaneous Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Fish Oil by LC-MS/MS

Toshiichi KOMORIYA\*

(\* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method for determination of malachite green and leucomalachite green in fish oil using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. Malachite green and leucomalachite green were extracted with acetonitrile-acetic acid (19+1) and hexane (saturated with acetonitrile). The extracts were purified by Bond Elut SCX (Varian) column, and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of malachite green and leucomalachite green. A recovery test was conducted using refined fish oil and non-refined fish oil spiked with 2 and 100 µg/kg of malachite green and leucomalachite green. The mean recoveries of malachite green were in the range of 89.9~101 % with the relative standard deviation of within 10 %. These respective values were 94.6~112 % and 3.9 % for leucomalachite green. A collaborative study was conducted in eight laboratories using refined fish oil and non-refined fish oil spiked with 5 µg/kg of malachite green and leucomalachite green. The mean recovery of malachite green in the refined fish oil was 87.4 %, and repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 6.8 % and 13 % respectively, and HorRat was 0.60. The mean recovery of leucomalachite green was 108 % with RSD<sub>r</sub> of 3.8 %, RSD<sub>R</sub> of 8.2 % and HorRat of 0.37. For the non-refined fish oil, these respective values were 85.9 %, 2.5 %, 12 % and 0.56 for malachite green, and 101 %, 4.2 %, 6.2 % and 0.28 for leucomalachite green.

Key words: 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; マラカイトグリーン malachite green ; ロイコマラカイトグリーン leucomalachite green ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 liquid chromatograph-tandem mass spectrometer ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 魚油 fish oil ; 共同試験 collaborative study

### 1 緒 言

マラカイトグリーン（以下「MG」という）は、緑色の合成色素で工業的にトリフェニルメタン染料として繊維等の染色に使用されている。また、抗菌活性を示し、水産において水カビ病の治療薬として使用されていたが、近年、発がん性が示唆され、遺伝毒性が疑われている<sup>1)</sup>。また、ロイコマラカイトグリーン（以下「LMG」という）は、MGが生体内で還元されて生じる代謝物である。

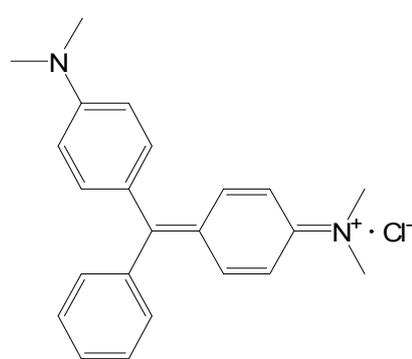
\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

国内では薬事法の一部改正及びそれに伴う動物用医薬品等取締規則の一部改正により現在、すべての食用水産動物に対しての使用が禁止されている。

魚粉及び配合飼料の MG 及び LMG の分析法については、平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知にて飼料分析基準<sup>2)</sup>に記載されているが、魚油については分析法が検討されていない。

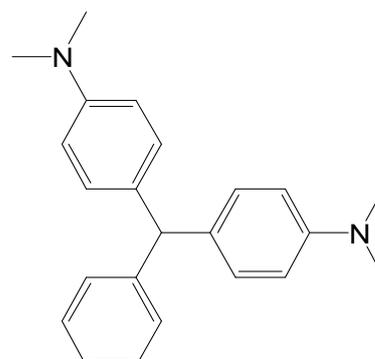
今回、「平成 19 年度 飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した「魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの分析法」<sup>3)</sup>(以下「分析センター法」という。)を基に飼料分析基準への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの構造式を Fig. 1 に示した。



Malachite green (MG) chloride  
N-[4-[[4-(dimethylamino)-phenyl]  
phenylmethylene]-2,5-cyclohexadien-  
1-ylidene]-N-methylmethanaminium  
chloride

$C_{23}H_{25}ClN_2$  MW: 364.9  
CAS No.: 569-64-2



Leucomalachite green (LMG)  
4,4'-benzylidenebis(N,N-dimethylaniline)

$C_{23}H_{26}N_2$  MW: 330.5  
CAS No.: 129-73-7

**Fig. 1 Chemical structures of MG and LMG**

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の精製魚油及び未精製魚油を用いた。

### 2.2 試薬

#### 1) MG 標準原液

MG シュウ酸塩標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 97.2 %) 12.7 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて MG の標準原液を調製した (この液 1 mL は, MG として 100  $\mu$ g ( $f=0.972$ ) を含有する. ) .

#### 2) LMG 標準原液

LMG 標準品 (林純薬工業製, 純度 99.9 %) 10.0 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて LMG の標準原液を調製した (この液 1 mL は, LMG として 100  $\mu$ g ( $f=0.999$ ) を含有する. ) .

3) MG-d<sub>5</sub> (安定同位体元素標識 MG) 内標準原液

MG シュウ酸塩-d<sub>5</sub> 標準品 (林純薬工業製, 純度 97.5%) 6.4 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて MG-d<sub>5</sub> の標準原液を調製した (この液 1 mL は, MG-d<sub>5</sub> として 100 µg ( $f=0.975$ ) を含有する. ).

4) LMG-d<sub>6</sub> (安定同位体元素標識 LMG) 内標準原液

LMG-d<sub>6</sub> 標準品 (林純薬工業製, 純度 99.9 %) 5.0 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて LMG-d<sub>6</sub> の標準原液を調製した (この液 1 mL は, LMG-d<sub>6</sub> として 100 µg ( $f=0.999$ ) を含有する. ).

## 5) 混合内標準液

使用に際して, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> 内標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリルを加えて, 1 mL 中に MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> として各 1 µg を含有する混合内標準液を調製した.

## 6) 検量線作成用標準液

使用に際して, MG 及び LMG 各標準原液並びに混合内標準液の一定量をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に MG 及び LMG としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 及び 20 ng を含有し, かつ MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 5 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

## 7) 溶離液調製用アセトニトリルは LC-MS 用, 標準液調製用メタノール及びアセトニトリルは HPLC 用を用いた. 特記している以外の試薬については特級を用いた.

## 2.3 装置及び器具

## 1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) :

LC 部 : Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部 : Agilent Technologies 製 6410 Triple Quad LC/MS

## 2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

## 3) 遠心分離器 : 久保田製作所製 5200

## 4) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

## 5) ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) :

Varian 製 Bond Elut SCX (リザーバー容量 3 mL) に 10 mL のリザーバーを連結したもの

## 2.4 定量方法

## 1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ, 混合内標準液 50 µL を正確に加えた. 更にアセトニトリル-酢酸 (19+1) 40 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加えた. 10 分間振り混ぜた後, 2,600 rpm (1,300×g) で 5 分間遠心分離し, ヘキサン層 (上層) を駒込ピペットで除去し, アセトニトリル層 (下層) を試料溶液とした.

## 2) 精製

ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル-酢酸 (19+1) 5 mL で洗浄した. 試料溶液 4 mL をミニカラムに正確に加え, 自然流下で液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 更にアセトン 2.5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた.

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトニトリル-アンモニア水 (19+1)

10 mL をミニカラムに加えて MG 及び LMG を溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，プラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ，10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し，上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

### 3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という。) に注入し，Table 1 及び Table 2 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

**Table 1 Operating conditions for LC-MS/MS for analysing MG and LMG**

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	A: 0.3 v/v % ammonia solution-2 v/v % formic acid solution-water-acetonitrile (10:81:10:8) B: 0.3 v/v % ammonia solution-2 v/v % formic acid solution-water-acetonitrile (10:9:8) B(v/v%) 30 v/v% (1 min)→7 min→100 v/v% (10 min)
Flow rate	0.25 mL/min
Column temp.	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer	N <sub>2</sub> (340 kPa)
Drying gas temp.	N <sub>2</sub> (350 °C)
Capillary voltage	4,000 V

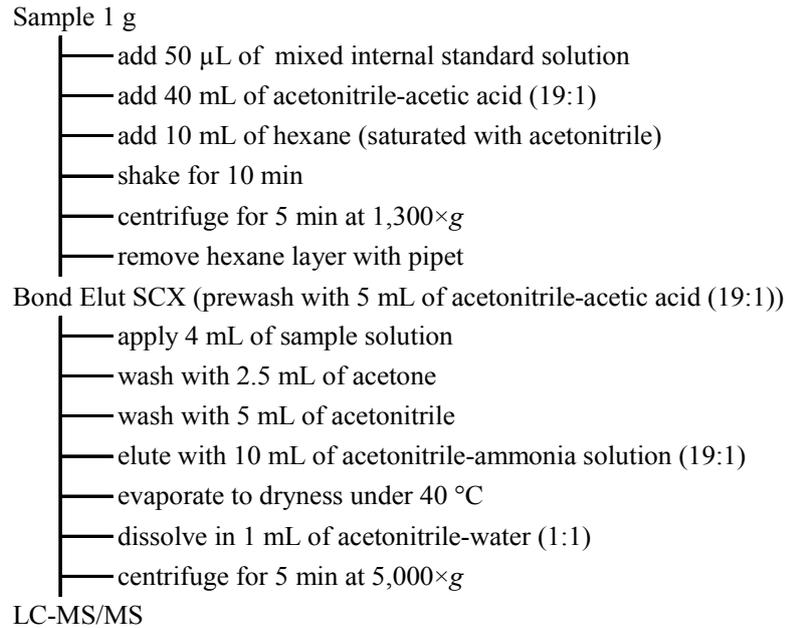
**Table 2 MS/MS Parameters**

Substance	Mode	Precursor ( <i>m/z</i> )	Product ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Collision (eV)
MG	+	329	313	208	100	40
MG-d <sub>5</sub>	+	334	318	—	100	40
LMG	+	331	239	316	100	25
LMG-d <sub>6</sub>	+	337	240	—	100	25

### 4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し，試料中の MG 及び LMG 量を算出した。

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。

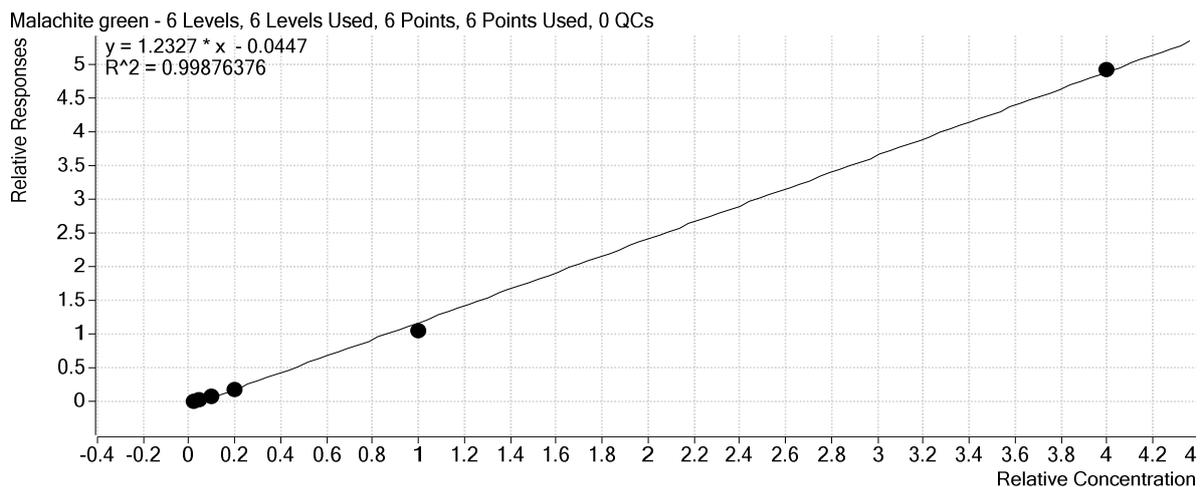


**Scheme 1 Analytical procedure for MG and LMG in fish oil**

### 3 検討内容

#### 3.1 検量線

MG 及び LMG として 1 mL 中に 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 及び 20 ng を含有し、かつ、MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 5 ng を含有する各混合標準液を調製し、これらの液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムから MG 及び LMG と MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 及び Fig. 3 のとおり、MG 及び LMG として 0.5~100 pg の範囲で直線性を示した。



**Fig. 2 Calibration curve of MG**

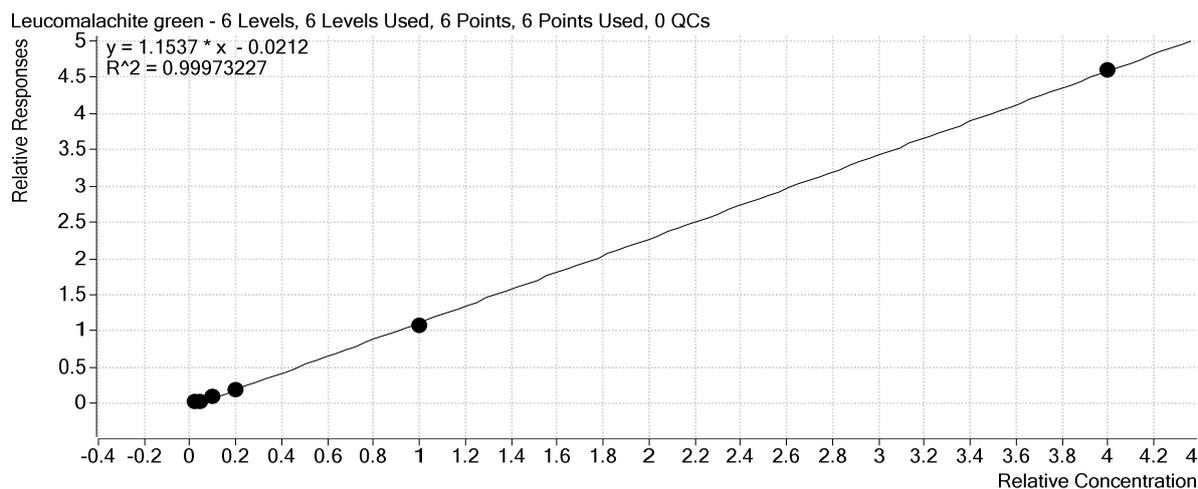


Fig. 3 Calibration curve of LMG

### 3.2 妨害物質の検討

精製魚油 4 点及び未精製魚油 6 点について本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成し、MG 及び LMG の定量を妨害するピークの有無を検討した。その結果、MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった。

### 3.3 窒素ガスによる通気乾燥操作の必要性の有無

分析センター法ではミニカラムにおける精製においてアセトニトリル流出後に溶媒を揮散させるために窒素ガスによる通気乾燥を行うこととなっているが、妨害物質の検討時に内標準物質の回収率が低くなる（10%以下）傾向が見られたので、以降、本操作は行わないこととした。

### 3.4 ミニカラム処理における溶出画分の確認

ミニカラム処理による MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> の溶出状況を確認した。

精製魚油に MG 及び LMG としてそれぞれ 100 µg/kg 相当量ずつを添加し、本法により操作した後、ミニカラム処理を行い、MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> 溶出状況を確認した。

その結果、Table 3 のとおりアセトニトリル-アンモニア水（19+1）10 mL でほぼ溶出され、内標準物質も同様の挙動を示すことから、溶出液量は 10 mL で十分であると思われた。

Table 3 Elution pattern from Bond Elut SCX

Fraction volume (mL)		0~10	10~12	12~14	14~16	16~18	18~20
MG	area (arb. units)	443,558	2,249	1,083	969	758	773
	relative value (%)	100	0.51	0.24	0.22	0.17	0.17
MG-d <sub>5</sub>	area (arb. units)	190,314	1,045	448	360	316	320
	relative value (%)	100	0.55	0.24	0.19	0.17	0.17
LMG	area (arb. units)	162,683	1,271	859	371	443	658
	relative value (%)	100	0.78	0.53	0.23	0.27	0.40
LMG-d <sub>6</sub>	area (arb. units)	74,077	623	382	160	228	331
	relative value (%)	100	0.84	0.52	0.22	0.31	0.45

### 3.5 添加回収試験及び検出下限

本法による回収率及び繰返し精度を確認するため、添加回収試験を実施した。

精製魚油 2 種類及び未精製魚油 2 種類に MG 及び LMG としてそれぞれ 2 及び 100 µg/kg 相当量ずつを添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 4 及び Table 5 のとおり、MG の平均回収率は 89.9~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 10 %以下であった。また、LMG の平均回収率は 94.6~112 %、その繰返し精度は RSD として 3.9 %以下であった。

また、内標準として添加した MG-d<sub>5</sub> について、ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値は、67.8 %であった。同様に、LMG-d<sub>6</sub> については、41.8 %であった。なお、添加回収試験で得られた精製魚油における選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

以上の結果から、本法は、魚粉及び配合飼料の MG 及び LMG の分析法の検出下限である試料中 2 µg/kg 相当量を魚油において同様に検出可能であると考えられた。

**Table 4 Results of recovery test for MG**

Spiked level (µg/kg)	refined fish oil 1		refined fish oil 2		non-refined fish oil 1		non-refined fish oil 2	
	Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>		Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>						
100	93.3	( 1.8)	89.9	( 3.1)	91.8	( 2.1)	94.2	( 2.5)
2	97.4	( 5.9)	98.0	( 3.3)	98.1	(10.0)	101	( 4.6)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

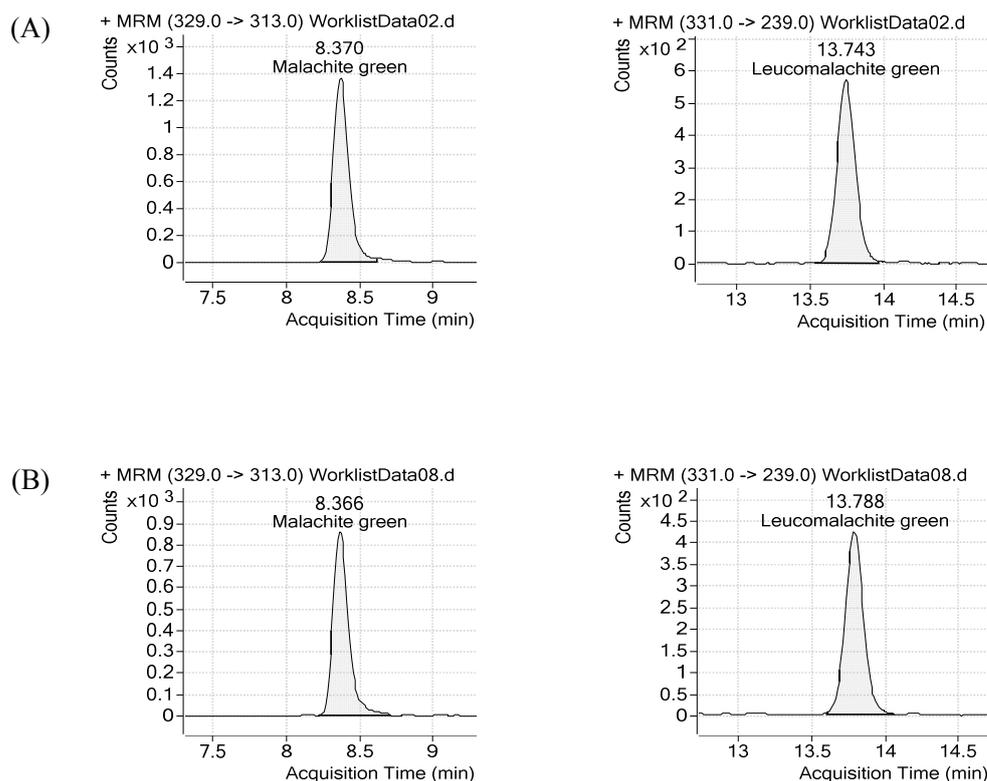
b) Relative standard deviation (RSD)

**Table 5 Results of recovery test for LMG**

Spiked level (µg/kg)	refined fish oil 1		refined fish oil 2		non-refined fish oil 1		non-refined fish oil 2	
	Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>		Recovery <sup>a)</sup>		RSD <sup>b)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>						
100	99.5	( 0.5)	103	( 3.9)	94.6	( 1.7)	99.4	( 1.6)
2	107	( 3.0)	112	( 3.1)	97.7	( 1.6)	105	( 1.1)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)



**Fig. 4 Chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Standard solution (The amount of MG and LMG are each 1 pg.)

(B) Sample solution of refined fish oil spiked MG and LMG at each 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.6 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

精製魚油及び未精製魚油に MG 及び LMG としてそれぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した共通試料を用いて、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、協同飼料株式会社研究所、財団法人食品環境検査協会東京事業所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部及び同仙台センター（8 試験室）において、本法に従って共同試験を実施した。

MG の共同試験の結果は Table 6 のとおりであり、精製魚油における平均回収率は 87.4 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 6.8 % 及び 13 %，HorRat は 0.60 であった。未精製魚油における平均回収率は 85.9 %，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.5 % 及び 12 % であり，HorRat は 0.56 であった。

LMG の共同試験の結果は Table 7 のとおりであり、精製魚油における平均回収率は 108 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 3.8 % 及び 8.2 %，HorRat は 0.37 であった。未精製魚油における平均回収率は 101 %，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.2 % 及び 6.2 % であり，HorRat は 0.28 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。

**Table 6 Collaborative study results of MG**

Lab. No.	Sample			
	Refined fish oil		Non-refined fish oil	
1	4.95	4.04	4.21	4.35
2	4.39	4.18	4.02	4.13
3	4.57	4.54	4.50	4.57
4	5.10	4.81	4.86	5.03
5	3.86	3.62	3.82	3.88
6	3.58	3.36	3.47	3.31
7	4.70	5.27	5.05	4.74
8	4.55	4.43	4.38	4.40
Spiked level	5.00		5.00	
Mean value <sup>a)</sup>	4.37		4.30	
Recovery (%)	87.4		85.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.8		2.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		12	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.60		0.56	

a) Mean value ( $n=16$ )

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

**Table 7 Collaborative study results of LMG**

Lab. No.	Sample			
	Refined fish oil		Non-refined fish oil	
1	5.80	5.47	5.07	4.73
2	4.78	5.38	4.48	4.80
3	5.33	5.53	5.18	5.20
4	6.19	6.02	5.21	5.20
5	5.05	5.05	5.61	5.17
6	5.02	4.95	4.85	4.74
7	5.34	4.96	5.28	4.75
8	5.85	5.90	5.35	5.44
Spiked level	5.00		5.00	
Mean value <sup>a)</sup>	5.41		5.07	
Recovery (%)	108		101	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.8		4.2	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.2		6.2	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.37		0.28	

a) Mean value ( $n=16$ )

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

**Table 8 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Premier XE	Shiseido CAPCELL-PAK C18 UG120 (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LC20AD	Applied Biosystems API 3200Q	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Chemicals Evaluation and Research Institute L-Column2 ODS (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	Waters Alliance2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Plus-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
8	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

魚油中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) MG 及び LMG の検量線は 0.5~100 pg の範囲で直線性を示した。
- 2) 精製魚油 4 点及び未精製魚油 6 点を用い、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) ミニカラム処理による MG, LMG, MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> の溶出画分を確認したところ、溶出液量は 10 mL で十分であった。
- 4) 精製魚油 2 種類及び未精製魚油 2 種類に MG 及び LMG として、それぞれ 2 及び 100 μg/kg 相当量ずつを添加し、添加回収試験を実施したところ、MG の平均回収率は 89.9~101 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 10 %以下, LMG の平均回収率は 94.6~112 %, その繰返し精度は RSD として 3.9 %以下の成績が得られた。
- 5) 本法は試料中の MG 及び LMG を 2 μg/kg で検出可能であった。

なお、本法は、平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

#### 謝 辞

共同試験に参加して頂いたアジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、協同

飼料株式会社研究所，財団法人食品環境検査協会東京事業所，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター彩都研究所，財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 17 年 11 月 24 日，府食第 1140 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業（分析法の開発） (2008).