

### 3 飼料中のクリスタルバイオレット及びメチレンブルー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

高橋 亜紀子\*

#### Determination of Crystal violet and Methylene blue in Feeds by LC-MS/MS

Akiko TAKAHASHI\*

(\*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method for determination of crystal violet and methylene blue in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. After addition of 5 mL of mixed internal standard solution (crystal violet-d<sub>4</sub> and methylene blue-d<sub>6</sub>) and 20 mL of acidic buffer, the sample was left standing for 30 minutes. Crystal violet and methylene blue were extracted with 100 mL of acetonitrile. The extract was filtered and topped up to 200 mL with acetonitrile. 4 mL of sample solution was mixed with 40 mL of water and 5 mL of phosphoric acid buffer, the sample solution adjust to pH 7 with 1 mol/L sodium hydroxide. The sample solution was purified by weak acidic cation-exchange mini column (Varian, Bond Elut CBA) with 10 mL of methanol-hydrochloric acid (1,000:1). After the elute was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile-water (1:1) and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of crystal violet and methylene blue. The LC separation was carried out on an ODS column, (Shiseido, CAPCELLPAK C18 AQ, 2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm), and acetonitrile-5 mmol/L heptafluorobutyric acid solution was used as a mobile phase. The determination was performed in a selected reaction monitoring (SRM) mode. A spike test was conducted with there kinds of formula feed and fish meal spiked with 10 and 100 μg/kg of crystal violet and methylene blue. The spike test resulted in recoveries ranging from 98.6 % to 112 % of crystal violet and from 97.2 % to 110 % of methylene blue, and in relative standard deviations (RSD) within 7.6 % and 7.4 % respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layer, formula feed for red sea bream and fish meal spiked with crystal violet and methylene blue at 20 μg/kg, 40 μg/kg and 80 μg/kg respectively. The mean recovery of crystal violet in the formula feed for layer was 94.5 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 3.4 %, 7.5 % and 0.34 respectively. These values were 101 %, 2.1 %, 3.1 % and 0.14 for the formula feed for red sea bream, 99.1 %, 0.83 %, 3.2 % and 0.15 for fish meal respectively. The mean recovery of methylene blue, in the formula feed for layer was 83.5 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 2.2 %, 13 % and 0.59 respectively. These values were 93.3 %, 2.6 %, 15 % and 0.70 for the formula feed for red sea bream, 97.7 %, 2.9 %, 14 % and 0.62 for fish meal respectively.

\* 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, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

**Key words:** クリスタルバイオレット crystal violet ; メチレンブルー methylene blue ; 合成抗菌剤 synthetic antibacterial ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 liquid chromatograph-tandem mass spectrometer(LC-MS/MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 飼料 feed ; 魚粉 fish meal

## 1 緒 言

クリスタルバイオレット（以下「CV」という。）は塩基性色素のトリフェニルメタン染料の一種で、木材、繊維、紙等の染色に使用されている。魚に対し、抗菌剤や寄生虫の予防や治療目的にも使われるが、現在、わが国では、動物用医薬品として承認はされていない。

メチレンブルー（以下「MB」という。）は塩基性色素のチアジン染料の一種であり、細菌の染色や指示薬としても使用されている。魚に対して水カビ病、カラムナリス症、ワタカブリ病、白点病などの予防や治療に用いられており、わが国においても観賞魚用の動物用医薬品として承認されている。MB は、耐光性の低い色素であり、市販の観賞魚用の動物用医薬品でも、暗所保管や直射日光をさけて使用するとされている。

CV 及び MB はいずれも、飼料添加物として指定されていない抗菌性物質であり、飼料安全法に基づく成分規格<sup>1)</sup>では飼料に含んではならないこととされている。近年、未承認の水産用動物用医薬品が輸入水畜産物に残留する事例が多く報告されており<sup>2)</sup>、例えば EU のモニタリングにおいて、インドネシア産、タイ産、ジャマイカ産及び中国産の魚介類から CV が検出されたことが報告されている<sup>2)</sup>。また、米国のモニタリングの結果では、ナマズ及びエビからの CV の検出が報告されている<sup>2)</sup>。このため、飼料用として輸入される魚粉に CV が残留することが懸念されている。

食品等からの CV 及び MB の分析法としては、厚生労働省通知試験法としてクリスタルバイオレット、ブリリアントグリーン及びメチレンブルー試験法が規定されている<sup>3)</sup>。

飼料からの分析法としては、厚生労働省通知試験法を参考として、(財)日本食品分析センターが「平成 19 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において、CV 及び MB の液体クロマトグラフ質量分析計及び液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で測定する分析法（以下「分析センター法」という。）を開発した<sup>4)</sup>。

今回、この分析センター法を基に、飼料分析基準<sup>5)</sup>への適応の可否について検討したので報告する。

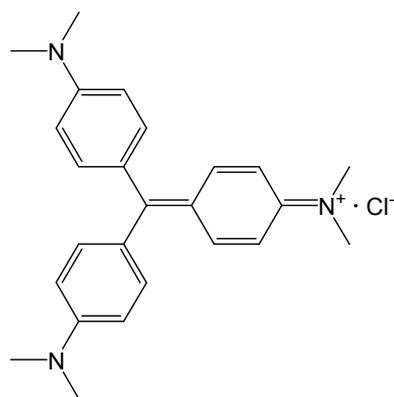
なお、CV 及び MB の構造式を Fig. 1 に示した。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

成鶏飼育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、まだい育成用配合飼料及び魚粉をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

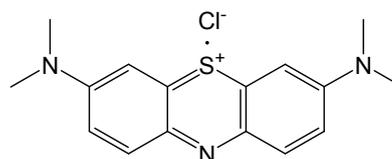


Crystal violet (CV)

((4-Bis(*p*-(dimethylamino)phenyl)methylene)-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)dimethylammonium chloride

C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub> MW: 408.0

CAS No.: 548-62-9



Methylene blue (MB)

3,7-Bis(dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S MW: 319.9

CAS No.: 61-73-4

Fig. 1 Chemical structures of crystal violet (CV) and methylene blue (MB)

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn, Milo
	Oil seed meal	26	Soybean meal, Corn gluten meal
	Brans	2	Rice bran
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extracts, Silicic acid, Bacillus subtilis, Enzyme processed copra meal, Fermented milk powder, Feed additives
For growing pig	Grains	68	Corn, Milo, Cassava
	Oil seed meal	19	Soybean meal, Rapeseed meal
	Brans	5	Rice meal, Distiller's dried grains with solubles
	Others	8	Bakery waste, Calcium carbonate, Molasses, Salt, Calcium phosphate, Wakame powder, Feed additives
For red sea bream	Animal by-products	60	Fish meal
	Grains	16	Wheat flour
	Oil seed meal	12.5	Soybean meal
	Brans	2	Rice bran
	Others	9.5	Fish oil, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Feed yeast, Seaweed powder, Licorice powder, Marigold, Bread yeast, Dextrin, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) CV 標準原液

CV [C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>] (Riedel-de Haën 製, 純度 89 %) 11.3 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 CV 標準原液を調製した（この液 1 mL は、CV として 100  $\mu\text{g}$  ( $f=1.006$ ) を含有する。）。

2) MB 標準原液

MB [ $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$ ]（林純薬工業製，純度 97.2 %）10.2 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 MB 標準原液を調製した（この液 1 mL は、MB として 100  $\mu\text{g}$  ( $f=0.991$ ) を含有する。）。

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

CV-d<sub>4</sub> 標準品 [ $\text{C}_{25}\text{D}_4\text{H}_{26}\text{ClN}_3$ ]（林純薬工業製，純度 97.9 %）5 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 CV-d<sub>4</sub> 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、CV-d<sub>4</sub> として 100  $\mu\text{g}$  ( $f=0.979$ ) を含有する。）。

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

MB-d<sub>6</sub> 標準品 [ $\text{C}_{16}\text{D}_6\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{S}$ ]（林純薬工業製，純度 98.5 %）5 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 MB-d<sub>6</sub> 内標準原液を調製した（この液 1 mL は、MB-d<sub>6</sub> として 100  $\mu\text{g}$  ( $f=0.985$ ) を含有する。）。

5) 混合内標準液

CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> 各内標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を標線まで加えて、1 mL 中に CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 1  $\mu\text{g}$  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、CV 及び MB 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 CV 及び MB としてそれぞれ 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15 ng を含有し、かつ CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> としてそれぞれ 50 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した。

7) メタノール、アセトニトリルは残留農薬試験用試薬を用いた。ヘプタフルオロ酪酸は、IPC-PFFA-4（東京化成工業製，0.5 mol/L 水溶液）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。

8) クエン酸-リン酸緩衝液

クエン酸一水和物 63.0 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液に、リン酸三ナトリウム・12水 228 g を水に溶かして 1,000 mL とした溶液 110 mL 程度を加えて pH を 3.0 に調整した。

9) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 2.71 g を水に溶かして 1,000 mL とし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7.0 に調整した。

## 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 部：Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部：Agilent Technologies 製 Agilent 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) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

4) 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム：Varian 製 Mega Bond Elut CBA（充てん剤量 1,000 mg）

## 2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の三角フラスコに入れ、混合内標準液 5 mL 及びクエン酸-リン酸緩衝液 20 mL を加えて 30 分間静置した。更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加えた。この液 4 mL を 100 mL の三角フラスコに正確に入れ、水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加えた後、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7 に調整し、カラム処理に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理

弱酸性陽イオン交換ミニカラムをメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した (吸引マニホールドを使用した。以下同様。)。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた。試料溶液の入っていた三角フラスコをメタノール 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えて同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-塩酸 (1,000+1) 10 mL をミニカラムに加えて CV, MB, CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> 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、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、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

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 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 2 及び Table 3 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 2 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing CV and MB

Column	Shiseido, CAPCELLPAK C18 (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	5 mmol/L heptafluorobutyric acid solution-acetonitrile (3:1)→5 min→(9:11) (5 min)→0.01 min→(1:9)(6 min)→0.01min→(3:1)(14 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (340 kPa)
Drying gas temperature	N <sub>2</sub> (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

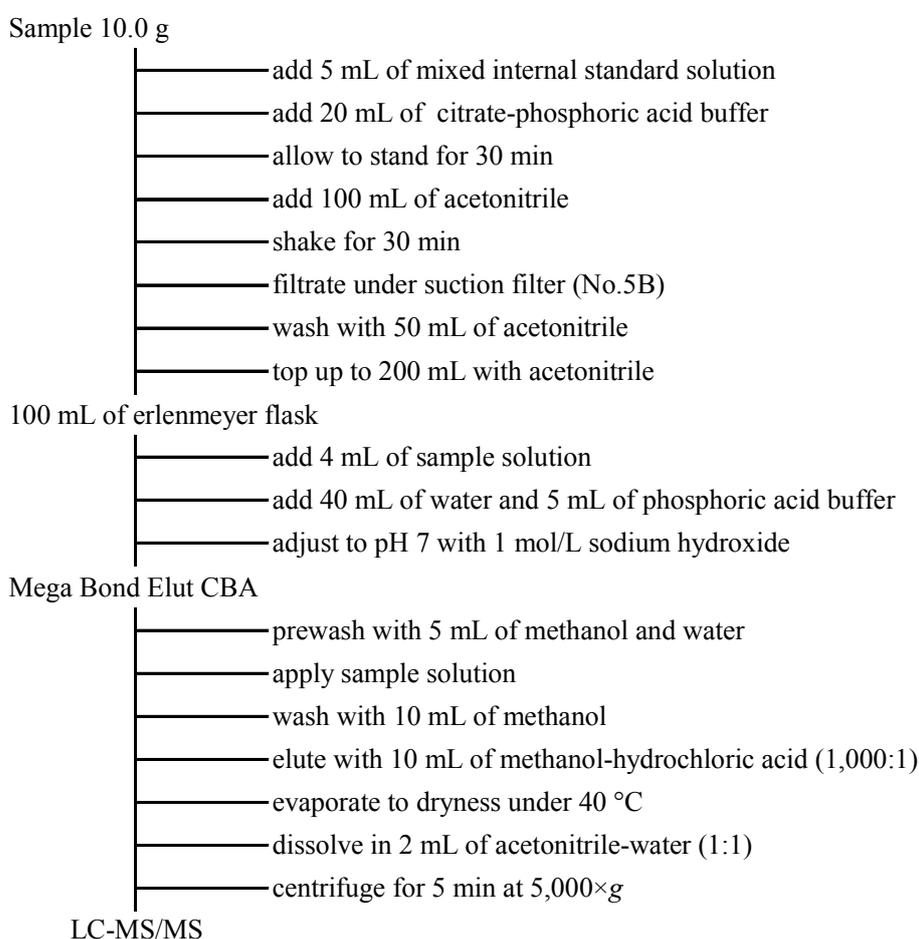
Table 3 MS/MS Parameters

Substance	Precursor ( <i>m/z</i> )	Product ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Collision (eV)
CV	372	356	340	100	45
CV-d <sub>4</sub>	376	360		100	45
MB	284	268	240	100	40
MB-d <sub>6</sub>	290	274		100	40

## 4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから CV, MB, CV-d<sub>4</sub> 及び MB-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 CV 量及び MB 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 CV and MB in feeds

## 3 結果及び考察

## 3.1 タンデム型質量分析計条件の検討

分析センター法<sup>4)</sup>では、魚粉中の MB を測定する際には妨害物質の影響を受けるため、LC-MS/MS により測定を行い、CV 及びその他の飼料中の MB を測定する際には、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により測定する方法として検討された。

そこで、魚粉について 2.4 に示した方法に従って調製した試料溶液を LC-MS で測定したところ、Fig. 2 のとおり、CV 及び MB の溶出時間付近に妨害ピークが認められた。そのため、LC-MS での測定は困難であると判断し、より選択性の高い LC-MS/MS での測定条件を検討した。

CV, MB, CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> の各標準液について、本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ、Fig. 3 の MS/MS スペクトルが得られた。この結果から、CV, MB, CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> の各定量イオンとして、それぞれ  $m/z$  356,  $m/z$  268,  $m/z$  360 及び  $m/z$  274 を採用し、CV 及び MB の各確認イオンとしてそれぞれ  $m/z$  340 及び  $m/z$  240 を採用した。

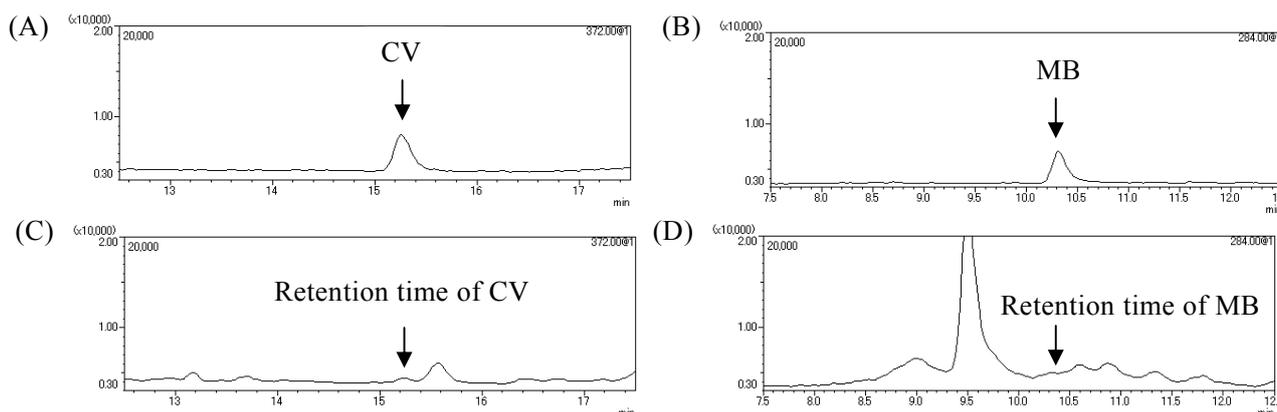


Fig. 2 SIM chromatograms by LC-MS (CV;  $m/z$  372, MB;  $m/z$  284)

(A) Standard solution of CV (0.5 ng/mL)

(B) Standard solution of MB (0.5 ng/mL)

(C) Fish meal (not spiked)

(D) Fish meal (not spiked)

(Arrows indicate the retention time of CV and MB)

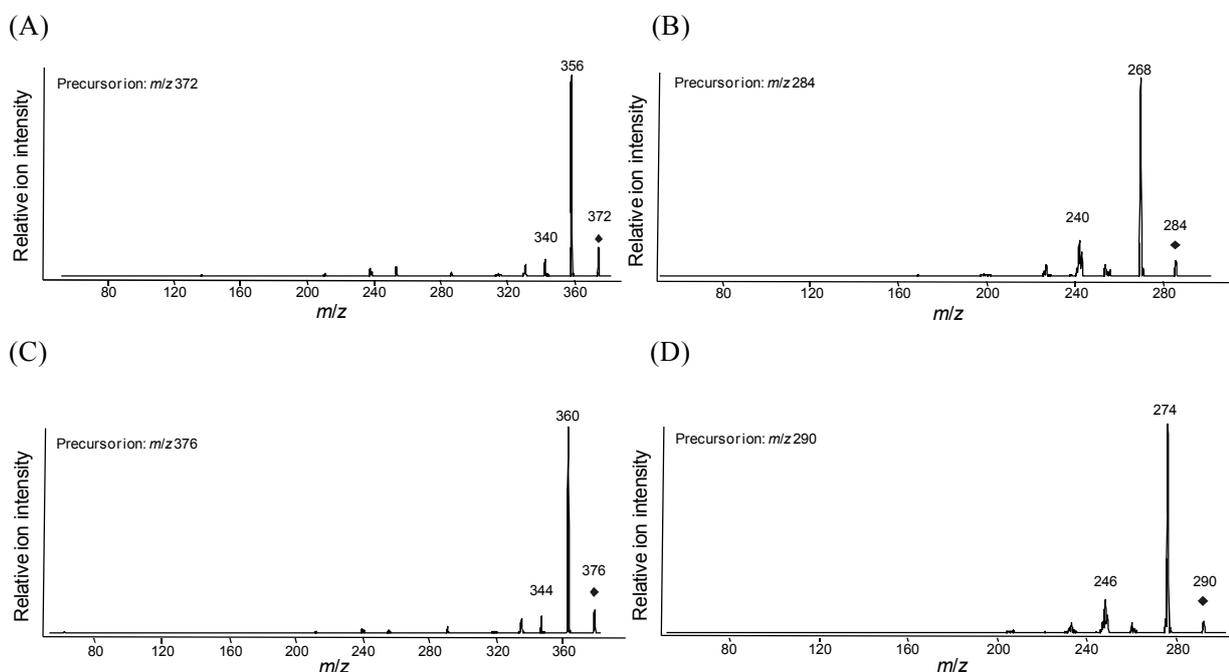


Fig. 3 MS/MS spectrum of mixed standard solution

(A) CV, (B) MB, (C) CV-d<sub>4</sub>, (D) MB-d<sub>6</sub>

### 3.2 検量線の作成

CV 及び MB として 1 mL 中に 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15 ng を含有する各混合標準液を調製し, これらの液各 10  $\mu$ 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 CV 及び MB のピーク面積を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は Fig. 4 のとおり, CV 及び MB として 0.25~15 ng/mL (注入量として 2.5~150 pg) の範囲で直線性を示した.

2.2 の 6) で調製した各検量線作成用標準液各 10  $\mu$ 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 CV と CV-d<sub>4</sub> 及び MB と MB-d<sub>6</sub> の各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. 4 のとおり, CV 及び MB の絶対検量線と同範囲で直線性を示した.

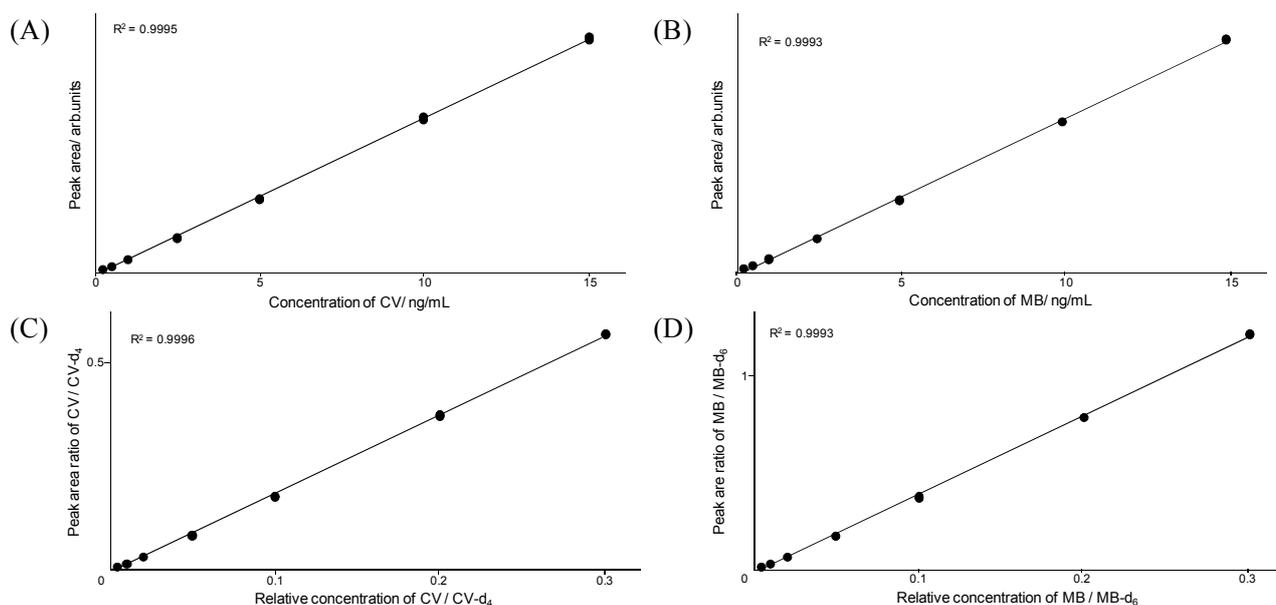


Fig. 4 Calibration curves of CV and MB

- (A) CV (absolute calibration method), (B) MB (absolute calibration method)  
 (C) CV (internal standard method), (D) MB (internal standard method)

### 3.3 遮光条件の検討

MB は, 耐光性の低い色素であるため, 遮光条件の必要性について検討を行った. 成鶏飼育用配合飼料, 肉豚肥育用配合飼料, まだい育成用配合飼料及び国産魚粉について, 昼光の入る試験室において蛍光灯を点けた場合と, 昼光の入らない試験室において紫外線を除去した照明を点けた場合で本法に従い定量を行い, 内標準物質の回収率を求めた. その結果は, Table 4 のとおりであり, 遮光した状態の方が, 全ての試料で内標準物質の回収率が高くなった. また, MB-d<sub>6</sub> は遮光しない状態での回収率が 40 %を下回っているため, 本法の定量操作は遮光した状態で行うこととした.

Table 4 Recoveries of CV-d<sub>4</sub> and MB-d<sub>6</sub> under shading or not-shading conditions

Matrix	Internal standard name			
	CV-d <sub>4</sub>		MB-d <sub>6</sub>	
	Not-shading <sup>a)</sup>	Shading <sup>b)</sup>	Not-shading <sup>a)</sup>	Shading <sup>b)</sup>
	Recovery <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>c)</sup> (%)
Formula feed for layer	89.1	97.6	34.6	74.4
Formula feed for growing pig	90.7	96.3	38.8	61.7
Formula feed for red sea bream	82.9	90.6	11.2	48.6
Fish meal (domestic)	76.7	90.3	22.8	50.9

a) Under the fluorescent lighting in a laboratory with window that daylight enters

b) Under the lighting that removes ultraviolet rays in a laboratory with window that daylight doesn't enter

c) Mean( $n=3$ )

### 3.4 弱酸性陽イオン交換体ミニカラムの溶出画分の検討

成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉を用いて、それぞれ 2.4 の 1)により抽出を行い、各抽出液中の濃度が CV 及び MB として各 5 ng/mL 相当量となるように各標準液を添加した。この液 4 mL に水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加え、弱酸性陽イオン交換ミニカラムに負荷し、洗浄液であるメタノールとミニカラムからの溶出液であるメタノール-塩酸 (1,000+1) の各溶出画分を確認した。その結果、Table 5 のとおり CV, MB, CV-d<sub>4</sub> 及び MB-d<sub>6</sub> は、分析センター法<sup>4)</sup>と同様メタノールによる洗浄画分には流出せず、メタノール-塩酸 (1,000+1) 10 mL で良好に溶出された。

Table 5 Elution pattern from weak-acid cation exchange mini column

Matrix	Methanol 10 mL	Methanol-hydrochloric acid (1,000:1)		Total
		0~10 mL	10~20 mL	
Recovery <sup>a)</sup> of CV (%)	0	105	0	105
Formula feed for layer	0	105	0	105
Recovery <sup>a)</sup> of CV-d <sub>4</sub> (%)	0	92	1	93
Recovery <sup>a)</sup> of MB (%)	0	92	1	93
Recovery <sup>a)</sup> of MB-d <sub>6</sub> (%)	0	106	0	106
Fish meal (domestic)	0	106	0	106
Recovery <sup>a)</sup> of CV (%)	0	86	1	87
Recovery <sup>a)</sup> of CV-d <sub>4</sub> (%)	0	86	1	87
Recovery <sup>a)</sup> of MB (%)	0	86	1	87
Recovery <sup>a)</sup> of MB-d <sub>6</sub> (%)	0	86	1	87

a)  $n=1$

### 3.5 妨害物質の検討

配合飼料 8 種類 (成鶏飼育用, 幼すう育成用, 肉豚肥育用, ほ乳期子豚育成用, 種豚飼育用, まだい育成用, ブリ類育成用及びます類育成用), 国産魚粉 2 種類及び輸入魚粉 3 種類を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

### 3.6 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

Table 1 の配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用及びまだい育成用）及び魚粉（国産魚粉，輸入魚粉（ペルー産））に CV 及び MB として 100 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量をそれぞれ添加した試料を用いて，本法に従って 3 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

分析センター法では，絶対検量線法での回収率の悪い MB のみを内標準物質を用いることとしているが，CV の内標準物質の使用についても検討した。

その結果は，内標準法では Table 6 のとおり，CV の平均回収率は 98.6~112 %，繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 7.6 %以下，MB の平均回収率は 97.2~110 %，繰返し精度は RSD として 7.4 %以下であった。絶対検量線法では Table 7 のとおり，CV の平均回収率は 89.0~109 %，繰返し精度は RSD として 7.5 %以下，MB は，平均回収率は 48.2~87.6 %，繰返し精度は RSD として 24 %以下であった。

CV は，内標準法及び絶対検量線法とも良好な結果であったが，MB は，内標準法による定量結果のみが良好であった。本法では，MB 及び CV 共に内標準物質を使用することとした。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 6 Recoveries of CV and MB from five kinds of feed with internal standard method

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Feed types										
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Domestic)		Fish meal (Peruvian)		
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	
CV	100	103	0.5	103	0.5	101	0.5	98.6	0.9	100	1.0
	10	109	2.3	103	7.6	108	3.3	99.3	5.3	112	5.1
MB	100	106	0.6	105	2.0	97.2	0.9	101	2.9	105	0.8
	10	108	3.3	104	2.4	110	4.0	99.9	7.4	106	2.9

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries of CV and MB from five kinds of feed with absolute calibration method

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Feed types										
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Domestic)		Fish meal (Peruvian)		
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	
CV	100	102	0.9	100	1.5	91.7	4.2	89.0	3.8	92.5	0.5
	10	108	2.3	103	7.5	104	3.5	91.1	5.6	109	4.4
MB	100	79.2	3.1	65.7	2.4	48.2	24	52.2	9.8	61.9	4.6
	10	87.6	4.4	74.6	3.3	77.5	15	58.7	9.6	78.5	4.8

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

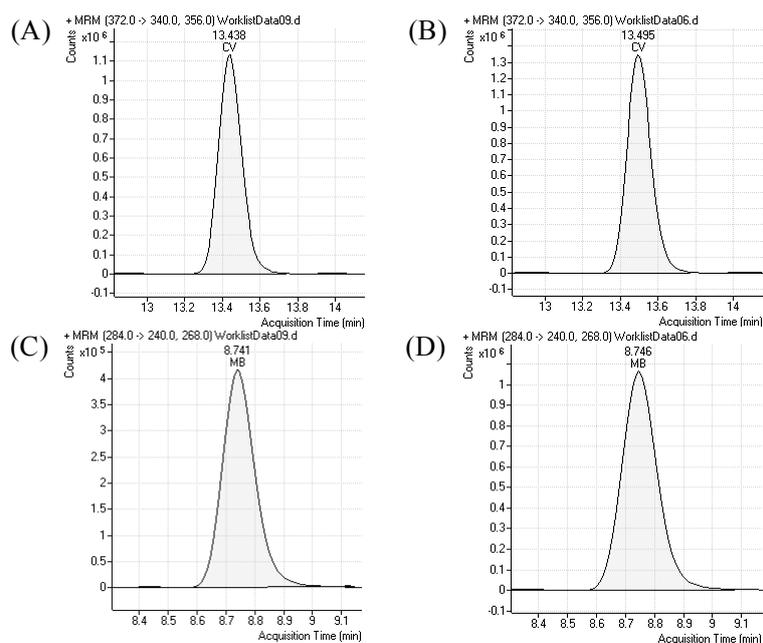


Fig.5 SRM chromatograms of CV and MB

LC-MS/MS conditions are shown in Table 2 and 3.

- (A) Fish meal spiked CV at 100 µg/kg (B) Standard solution of CV (10 ng/mL)  
 (C) Fish meal spiked MB at 100 µg/kg (D) Standard solution of MB (10 ng/mL)

### 3.7 検出下限

本法の検出下限 (CV 及び MB は、飼料に含まれてはならない抗菌性物質であるため、定量下限相当の精度を有する濃度をもって検出下限と表す。)を確認するため、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 となる濃度を求めた。

その結果、ピークの SN 比が 10 となる濃度は、5 µg/kg であった。

確認のため、成鶏飼育用配合飼料及び国産魚粉に CV 及び MB として 5 µg/kg 相当量を添加した試料について、本法により 3 点併行で定量を行った。その結果は、Table 8 のとおり、CV の平均回収率は 109~116 %、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4 %以下、MB の平均回収率は 112~114 %、繰返し精度は RSD として 5.5 %以下であった。

以上の結果から、本法による CV 及び MB の検出下限は、試料中 5 µg/kg であった。

Table 8 Recoveries and limit of detection of CV and MB in feeds

	Spiked level (µg/kg)	Feed types			
		Formula feed for layer		Fish meal (Domestic)	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
CV	5	109	2.4	116	1.1
MB	5	114	5.5	112	2.0

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、成鶏飼育用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 20 µg/kg

相当量，まだい育成用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量，輸入魚粉に CV 及び MB としてそれぞれ 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，協同飼料株式会社，日本ウォーターズ株式会社，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，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 8 試験室）において，本法に従い共同試験を実施した。

CV の結果を Table 9 に示した．成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 94.5 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 3.4 % 及び 7.5 % であり，HorRat は 0.34 であった．まだい育成用配合飼料では，平均回収率は 101 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.1 % 及び 3.1 % であり，HorRat は 0.14 であった．魚粉では，平均回収率は 99.1 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 0.83 % 及び 3.2 % であり，HorRat は 0.15 であった。

MB の結果を Table 10 に示した．成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 83.5 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.2 % 及び 13 % であり，HorRat は 0.59 であった．まだい育成用配合飼料では，平均回収率は 93.3 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.6 % 及び 15 % であり，HorRat は 0.70 であった．魚粉では，平均回収率は 97.7 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.9 % 及び 14 % であり，HorRat は 0.62 であった。

なお，MB の結果において，Grubbs 検定で外れ値とされるデータが認められた．そのデータを除外しなくても前述のとおり良好な成績であったが，参考までにそのデータを除外して室内繰返し精度，室間再現精度及び HorRat についても算出した．その結果は，成鶏飼育用配合飼料では，室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.3 % 及び 3.9 %，HorRat は 0.18 であった．まだい育成用配合飼料では，室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 2.9 % 及び 7.1 % であり，HorRat は 0.32 であった．魚粉では，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 3.3 % 及び 5.3 % であり，HorRat は 0.24 であった。

参考のため，各試験室で使用した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study for CV

Lab.No.	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Ecuadorian)	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
1	19.6	19.5	40.8	41.1	81.4	80.0
2	20.0	19.5	40.5	40.0	79.2	79.2
3	18.1	18.5	40.0	40.4	79.6	79.5
4	18.9	16.8	39.6	39.8	77.5	77.8
5	18.4	17.8	38.9	40.3	78.7	79.5
6	17.7	17.5	39.3	39.1	76.1	77.5
7	18.3	18.6	41.8	38.9	77.2	76.6
8	21.1	22.2	43.0	42.4	83.8	85.2
Spiked level (µg/kg)	20		40		80	
Mean value <sup>a)</sup> (µg/kg)	18.9		40.4		79.3	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	94.5		101		99.1	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.4		2.1		0.83	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.5		3.1		3.2	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22		22	
HorRat	0.34		0.14		0.15	

a)  $n=16$ 

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 10 Collaborative study for MB

Lab.No.	Formula feed for layer		Formula feed for red sea bream		Fish meal (Ecuadorian)	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
1	16.3	16.2	36.4	37.2	82.6	81.8
2	16.7	16.1	36.3	35.8	73.0	72.7
3	16.5	16.4	36.2	36.3	74.9	75.3
4	16.6	16.2	34.8	34.1	75.7	72.4
5	14.9	15.5	32.2	28.6	75.6	67.2
6	16.3	15.5	37.1	37.4	74.5	73.6
7	14.9	15.5	37.1	36.9	71.7	73.0
8	21.6 <sup>e)</sup>	22.1 <sup>e)</sup>	50.4 <sup>e)</sup>	50.1 <sup>e)</sup>	103 <sup>e)</sup>	103 <sup>e)</sup>
Spiked level (µg/kg)	20		40		80	
Mean value <sup>a)</sup> (µg/kg)	16.7		37.3		78.1	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	83.5		93.3		97.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.2		2.6		2.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		15		14	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22		22	
HorRat	0.59		0.70		0.62	
RSD <sub>r</sub> <sup>b')</sup> (%)	2.3		2.9		3.3	
RSD <sub>R</sub> <sup>c')</sup> (%)	3.9		7.1		5.3	
HorRat <sup>f)</sup>	0.18		0.32		0.24	

a)  $n=16$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

b') Relative standard deviations of repeatability within laboratory calculated excluding Lab.No.8

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

c') Relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated excluding Lab.No.8

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

e) Date excluded by Grubbs test

f) HorRat calculated excluding Lab.No.8

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies 1200series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
2	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	Waters Alliance2695	Waters Micromass Quattro micro API	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
6	Shiseido NANOSPACE SI-2	Thermo Electron TSQ Quantum DISCOVERY	Shiseido CAPCELL-PAK C18 UG120 (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1200series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Waters Atlantis dC18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

### 3.9 ろ紙の検討

本検討当初から 3.8 の共同試験まで定量操作に使用するろ紙は、分析センター法で使用していた 4 種を使用していたが、汎用性の観点から飼料分析基準において他の多くの成分の定量で使用されている 5 種 B が使用出来ることが望ましい。5 種 B は、4 種に比べ保留孔径が大きいことから、使用するろ紙を 4 種から 5 種 B に変更した場合の影響について検討した。

配合飼料 8 種類（成鶏飼育用、幼すう育成用、肉豚肥育用、ほ乳期子豚育成用、種豚飼育用、まだい育成用、ブリ類育成用及びます類育成用）、国産魚粉 2 種類及び輸入魚粉 3 種類を用い、ろ紙（5 種 B）を使用して本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

配合飼料（成鶏飼育用及びまだい育成用）及び魚粉（エクアドル産）に CV 及び MB として 100 μg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、ろ紙（5 種 B）を用いて本法による添加回収試験を実施した。その結果を、Table 12 に示した。CV の回収率は 105~106 %、CV-d<sub>4</sub> の回収率は 93.8~100 %、MB の回収率は 109~111 %、MB-d<sub>6</sub> の回収率は 75.1~77.7 %であった。定量結果及びクロマトグラムは 4 種を用いた場合と同様であり、内標準物質の回収率から吸着等も認められなかったため、ろ紙を 4 種から 5 種 B に変更をしても問題はないものと考えられた。

Table 12 Recoveries of CV and MB in feeds using filter paper No.5B

	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for layer ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Formula feed for red sea bream ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Fish meal (Ecuadorian) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
		Recovery <sup>a)</sup>	Recovery of internal std <sup>a)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	Recovery of internal std <sup>a)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	Recovery of internal std <sup>a)</sup>
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
CV	100	106	100	106	98.4	105	93.8
MB		111	75.4	110	77.7	109	75.1

a)  $n=1$ 

#### 4 まとめ

飼料中に残留しているクリスタルバイオレット (CV) 及びメチレンブルー (MB) 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たところ、次の結果を得た。

- 1) 魚粉については、夾雑成分の影響により LC-MS による定量は困難であったが、LC-MS/MS による定量とすることで改善された。
- 2) 混合標準液を使用して CV 及び MB の検量線を作成したところ、絶対検量線法及び内標準法検量線ともに 2.5~150 pg の範囲で直線性を示した。
- 3) 遮光した状態と遮光しない状態での内標準物質の回収率を比較した結果、遮光しない状態で定量操作を行うと MB-d<sub>6</sub> 回収率が 40 %を下回ることがあったため、本法の定量操作は遮光下で行うこととした。
- 4) 弱酸性陽イオン交換体ミニカラムからの溶出画分を検討した結果、溶出溶媒の必要量は、10 mL であった。
- 5) 8 種類の配合試料及び 5 種類の飼料原料について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ CV 及び MB の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料、肉豚肥育用配合飼料、まだい育成用配合飼料及び魚粉 2 種類に、CV 及び MB としてそれぞれ 100 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施した。その結果、CV の平均回収率は 98.6~112 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 7.6 %以下、MB の平均回収率は 97.2~110 %、その繰返し精度は RSD として 7.4 %以下の成績が得られた。
- 7) CV は、CV-d<sub>4</sub> を使用しない絶対検量線法による定量も可能であったが、MB は、MB-d<sub>6</sub> を用いた内標準法による定量が必要であるため、本法は CV 及び MB ともに内標準法による定量を採用した。
- 8) 本法による CV 及び MB の検出下限は、試料中 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。
- 9) 成鶏飼育用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量、まだい育成用配合飼料に CV 及び MB としてそれぞれ 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量、輸入魚粉に CV 及び MB としてそれぞれ 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて、8 試験室において、本法に従い共同試験を実施した。その結果、CV について、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 94.5 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 3.4 %及び 7.5 %であり、HorRat は 0.34 であった。まだい育成用配合飼料では、平均回収率は 101 %、その室内繰返し精

度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 2.1 %及び 3.1 %であり、HorRat は 0.14 であった。魚粉では、平均回収率は 99.1 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 0.83 %及び 3.2 %であり、HorRat は 0.15 であった。MB について、成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 83.5 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 2.2 %及び 13 %であり、HorRat は 0.59 であった。まだい育成用配合飼料では、平均回収率は 93.3 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 2.6 %及び 15 %であり、HorRat は 0.70 であった。魚粉では、平均回収率は 97.7 %，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 2.9 %及び 14 %であり、HorRat は 0.62 であった。

- 10) 検討当初から共同試験まで使用していたろ紙（4 種）を、飼料分析基準に記載されている他の多くの成分の定量法で用いているろ紙（5 種 B）に変更するために、ろ紙（5 種 B）を用いて本法に従い定量を妨げるピークの有無の確認と添加回収試験を行った。その結果、ろ紙を変更することによる影響は認められなかったため、本法ではろ紙（5 種 B）を採用した。

## 謝 辞

共同試験に参加して頂いた財団法人日本食品分析センター多摩研究所，協同飼料株式会社，日本ウォータース株式会社の試験室の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 2) 山本 都，登田 美桜，杉田 たき子，田中 敬子，畝山 智香子，森川 馨：“わが国及び各国における畜水産食品中の残留動物用医薬品の検出状況について”，国立衛研報第 127 号，84 (2009).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 19 年度 飼料中の有害物等残留基準を設定するための分析法及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発，77 (2008).
- 5) 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).