

ゲンチアナバイオレット試験法

ゲンチアナバイオレット及びロイコゲンチアナバイオレットを分析対象とする。

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「(特級)」と記載したものは、日本産業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

エタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

ギ酸アンモニウム ギ酸アンモニウム (特級)

クエン酸 (無水) クエン酸 (無水) (特級)

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カラム (500mg) 内径 12~13mm のポリエチレン製のカラム管に、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 500mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

四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カラム (150mg) 内径 12~13mm のポリエチレン製のカラム管に、四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 150mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

50mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) ギ酸アンモニウム 3.15 g を量り、水 990mL を加えて溶かし、ギ酸で pH3.5 に調整した後、水を加えて 1,000mL とする。

3. 標準品

ゲンチアナバイオレット標準品 本品はゲンチアナバイオレット 90%以上を含む。

ロイコゲンチアナバイオレット標準品 本品はロイコゲンチアナバイオレット 98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

試料を正確に量り、重量比で 1/2 量の 15w/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 50w/w% クエン酸溶液をそれぞれ加えて磨砕均一化した後、試料 10.0 g (脂肪の場合は 5.00 g) に相当する量を量り採る。アセトン 100mL を加え、ホモジナイズした後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200mL とする。この溶液から正確に 1mL (脂肪の場合は 2mL) を分取する。

b 精製法

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 (500mg) に、アセトニトリル及び2 vol%ギ酸各 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。四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 (150mg) 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、流出液は捨てる。a 抽出法で得られた分取液に 2 vol%ギ酸 4 mL を加え、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に注入した後、アセトニトリル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、このカラムの下部に四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する。

5. 操作法

a 検量線の作成

ゲンチアナバイオレット標準品及びロイコゲンチアナバイオレット標準品をそれぞれメタノールに溶かして 100mg/L とし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、4. 試験溶液の調製に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.002mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.00001mg/L である。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成によりゲンチアナバイオレット及びロイコゲンチアナバイオレットの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 5 μ m

カラム温度：40°Cに保持する。

移動相：アセトニトリル及び 50mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) 混液 (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。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン (m/z) :

ゲンチアナバイオレット プリカーサーイオン 372、プロダクトイオン 356、340

ロイコゲンチアナバイオレット プリカーサーイオン 374、プロダクトイオン 358、238

注入量：10 μ L

保持時間の目安：

ゲンチアナバイオレット 10 分

ロイコゲンチアナバイオレット 15 分