

マラカイトグリーン試験法

マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを分析対象とする。

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、日本工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3.15g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

マラカイトグリーンシュウ酸塩 本品はマラカイトグリーンシュウ酸塩98%以上を含む。

ロイコマラカイトグリーン 本品はロイコマラカイトグリーン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

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（脂肪の場合には5.00 g）に相当する量を量り採る。アセトン100mlを加え、細切均一化した後、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（はちみつの場合には水10ml及びアセトン50ml）を加えて細切均一化し、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200mlとする。この溶液から正確に1 ml（脂肪の場合には2 ml）を量り採り、2 vol %ギ酸4 mlを加える。

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5 ml及び2 vol %ギ酸5 mlを順次注入し、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の混液（9 : 1）5 mlを注入し、流出液は捨てる。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a 抽出法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取り付け、アセトニトリル及びアンモニア水の混液（9 : 1）10ml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の混液（9 : 1）を加えて正確に10mlとしたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品及びロイコマラカイトグリーン標準品をそれぞれアセトンに溶かして500mg / l（マラカイトグリーンシュウ酸塩標準品にあつてはマラカイトグリーンとしての濃度）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の混液（9 : 1）で希釈した溶液を数点調製し、それぞれを液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。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には、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マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの定量を行う。

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 酢酸アンモニウム緩衝液（pH3.5）の混液（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 ポジティブモード

主なイオン（m/z）：

マラカイトグリーン プリカーサーイオン329、プロダクトイオン313、165

ロイコマラカイトグリーン プリカーサーイオン331、プロダクトイオン316、239

注入量：10 μ l

保持時間の目安：

マラカイトグリーン 8分

ロイコマラカイトグリーン 16分