

ブリリアントグリーン及びメチレンブルー試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ブリリアントグリーン
メチレンブルー

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

可視分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-VIS）
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したのものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したのものを用いる。

ギ酸アンモニウム ギ酸アンモニウム（特級）

クエン酸・リン酸緩衝液（pH 3.0）

第1液：クエン酸57.6 gを量り、水を加えて溶かして1,000 mLとする。

第2液：リン酸三ナトリウム228 gを量り、水を加えて溶かして1,000 mLとする。

第1液に第2液を加えて混和し、pHを3.0に調整する。

ブリリアントグリーン標準品 本品はブリリアントグリーン（ $C_{27}H_{34}N_2O_4S$: 482.64）95%以上を含む。

メチレンブルー標準品 本品はメチレンブルー（ $C_{16}H_{18}N_3SCl$: 319.85）97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

試料5.00 gを量り採り、クエン酸・リン酸緩衝液（pH 3.0）10 mLを加えて5分間細砕する。これにアセトニトリル40 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、毎分2,600回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を分液ロートに採る。残留物にアセトニトリル20 mLを加え、上記と同様に操作し、得られたアセトニトリル層を先の分液ロートに合わせる。これに*n*-ヘキサン80 mLを加えて激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を採る。これに20%塩化ナトリウム溶液50 mL及びジクロロメタン50 mLを加えて5分間振とうした後、静置し、アセトニトリル層を採る。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中をろ過し、40℃以下でアセトニトリル層を除去する。この残留物にアセトニトリル2.0 mLを加えて溶かし、これを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

各標準品の10 mg/100 mLメタノール溶液を調製し、アセトニトリル及び0.01 mol/Lギ酸アンモニウム溶液（1:9）混液で希釈した溶液を数点調製する。それぞれHPLC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、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.005 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0125 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をHPLCに注入し、6.の検量線で各物質の含量を求める。

8. 確認試験

LC-MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

HPLC

検出器：VIS (測定波長：ブリリアントグリーン 625 nm、メチレンブルー 665 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0~6.0 mm、長さ 100~250 mm、粒子径2~5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.01 mol/Lギ酸アンモニウム溶液の混液 (1:9) から (1:0) までの濃度
勾配を20分間で行い、(1:0) で10分間保持する。

保持時間の目安：12分 (メチレンブルー)

10. 定量限界

ブリリアントグリーン 0.005 mg/kg

メチレンブルー 0.005 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ブリリアントグリーン及びメチレンブルーを試料からアセトニトリル及びクエン酸・リン酸緩衝液 (pH 3.0) で抽出し、ジクロロメタンに転溶した後、HPLC-VIS で測定し、LC-MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① ジクロロメタン転溶の際に溶媒が乳化する場合は、遠心分離等により層を完全に分離すること。
- ② HPLC-VIS及びLC-MSにおける標準溶液及び試験溶液の標準的な注入量は、内径3.0 mmのカラムにおいて10 μLであるが、カラム及び装置により最適な注入量が異なる場合があるので、必要に応じて最適注入量を検討すること。
- ③ LC-MSにおける測定条件は用いる装置により、最適なイオン化方法、生成するイオンが異なる場合があるので、装置ごとに最適条件を検討すること。

12. 参考文献

春日ら、食品衛生学雑誌、32, 137 (1991)

13. 類型

C