

クリスタルバイオレット及びメチレンブルー試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
クリスタルバイオレット	クリスタルバイオレット
メチレンブルー	メチレンブルー

2. 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）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2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ものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

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（pH3.0）

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。

クリスタルバイオレット標準品 本品はクリスタルバイオレット（ $C_{25}H_{30}ClN_3$: 407.98）94%以上を含み、融点は 215°C である。

メチレンブルー標準品 本品はメチレンブルー（ $C_{16}H_{18}N_3S_2Cl$: 319.85）97%以上を含み、融点は 169~170°C である。

4. 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（pH3.0）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にろ過し、40°C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。

5. 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）混液で希釈して0.0125～0.5mg/Lの標準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。

6. 定量

試験溶液をHPLCに注入し、5の検量線で各物質の含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：VIS（測定波長：クリスタルバイオレット 590 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）

9. 定量限界

クリスタルバイオレット 0.005 mg/kg

メチレンブルー 0.005 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

クリスタルバイオレット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（pH3.0）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。

11. 参考文献

春日ら、食品衛生学雑誌、32, 137（1991）

12. 類型

C