

## ジフェニルアミン試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

ジフェニルアミン

### 2. 適用食品

農産物

### 3. 装置

蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/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。

ジフェニルアミン標準品 本品はジフェニルアミン98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

##### ② 果実及び野菜の場合

試料を精密に量り、重量比で1/2量の5 vol%リン酸を加え磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を量り採る。これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

##### ③ 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

#### 2) 精製

##### ① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液から正確に20 mLを分取して注入し、さらにアセトニトリル5 mLを注入して全溶出液を採り、40°C以下で約5 mLに濃縮する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液30 mLを加え、*n*-ヘキサン30 mL及び15 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で約2 mLに濃縮する。

## ② エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にエーテル及び*n*-ヘキサン (3:17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入し、さらにエーテル及び*n*-ヘキサン (3:17) 混液10 mLを注入して全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に2 mL、果実及び野菜の場合は正確に4 mL、茶の場合は正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

ジフェニルアミン標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれHPLC-FL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、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.005 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をHPLC-FLに注入し、6の検量線でジフェニルアミンの含量を求める。

## 8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 9. 測定条件

(例)

### 1) HPLC

検出器：FL (励起波長285 nm、蛍光波長360 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.6 mm、長さ250 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (3:

### 7) 混液

注入量：10 µL

保持時間の目安：10分

### 2) LC-MS/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40°C

移動相：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

B液：5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)：プリカーサーイオン170、プロダクトイオン93、92、66

注入量：5  $\mu$ L

保持時間の目安：18分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

ジフェニルアミンを試料からリン酸酸性下アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶する。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-FLで定量し、LC-MS/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

① ばれいしょの試料採取中にジフェニルアミンの分解がみられたことから、果実及び野菜では分解を防止するために検体をリン酸酸性下で磨砕均一化する操作とした。一方、試験法開発時に検討した玄米、とうもろこし、大豆及び茶では、試料採取中のジフェニルアミンの分解はみられなかったことから、穀類、豆類、種実類及び茶ではリン酸添加をしない操作とした。しかし、検討した食品が限られていることから、穀類、豆類、種実類及び茶において分解が認められた場合には、5. 試験溶液の調製の1) 抽出において次のように操作する。

試料10.0 g (茶は5.00 g) に5 vol%リン酸10 mLを加え、さらに水20 mLを加え30分間放置する。これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mL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、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

② ジフェニルアミンは揮発性が比較的高いので、窒素気流下における溶媒除去時には穏やかに窒素を吹きつけ、乾固したら直ちに窒素の吹き付けを終了する。

③ HPLC-FLでの測定終了後、そのまま続けて次の試験溶液を測定すると、直前に測定した試料の夾雑物のピークが妨害となる場合がある。その場合は、ジフェニルアミン溶出後に移動相の5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の比率をさらに上げて洗浄するとよい。

④ ジフェニルアミンは、ポリエチレン容器等から食品に移染の可能性があるため、ポリエチレン製以外の容器等を用いて検体を採取する。

⑤ 試験法開発時に検討した食品：玄米、とうもろこし、大豆、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご及び茶

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C