

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合は、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

平成19年度

残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る  
分析法開発（残留農薬個別試験法開発）報告書

ジフェニルアミン試験法（農産物）

## ジフェニルアミン試験法（農産物）の検討結果

### 〔緒言〕

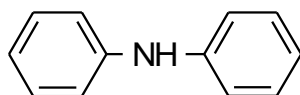
#### 1. 目的

ジフェニルアミンは、海外でポストハーベスト農薬として使用される殺菌剤であり、りんごなどの貯蔵障害として大きな問題となっているやけ病防止に効果があることが知られている<sup>1)</sup>。日本では農薬登録されていないが、ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、りんごには10 ppm、日本なし及び洋なしには5 ppm、その他の農産物には0.05 ppmの基準値が設定された。分析法として厚生労働省から通知されたGC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）の適用が検討されたが、平均回収率の中央値が50%以上、70%未満となり、適用対象農薬とはならなかった\*1。これまでにジフェニルアミンの分析法として、高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）<sup>2)</sup>、GC-MS<sup>3-5)</sup>、蛍光光度型検出器付きHPLC<sup>6)</sup>（以下HPLC-FL）およびLC-MS(/MS)<sup>7),8)</sup>を用いた方法などが報告されているが、いずれも数種類の果実または野菜で検討しているにすぎない。また、穀類など脂質の多い農産物に対する報告例はなく、脱脂操作を含めた抽出・精製方法の検討が必要と思われた。ジフェニルアミンをGCで測定すると、マトリックスによる測定値への影響が大きかったことから、今回、穀類、豆類、野菜、果実、種実類及び茶を対象とするHPLC-FLを用いた分析法を検討し、また、併せてLC-MS/MSによる確認法についても検討した。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：ジフェニルアミン

構造式：



分子式：C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N

分子量：169.22

化学名：IUPAC名：ジフェニルアミン、CAS番号：122-39-4

外観：本物質は葉状晶である<sup>a)</sup>

融点：53-54°C<sup>b)</sup>

蒸気圧：1.07×10<sup>-1</sup>Pa (20°C)<sup>a)</sup>

溶解性：水溶解度；300 mg/L (25°C)<sup>a)</sup>

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)：3.50<sup>a)</sup>

解離定数 (pKa)：0.78 (24°C)<sup>a)</sup>

安定性：日光にさらされると黒く着色する<sup>b)</sup>

#### 〔出典〕

a) 環境省：1. 物質に関する基本的事項 [13] ジフェニルアミン

[http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02\\_3\\_13.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02_3_13.pdf)

b) Tomlin, C.D.S. ed. The pesticide manual, 12th ed. Farnham, UK, British Crop Protection Council, 2000, p.187-188.

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
とうもろこし	0.05
大豆	0.05
小豆類	0.05
えんどう	0.05
そら豆	0.05
らつかせい	0.05
その他の豆類	0.05
ばれいしょ	0.05
さといも類(やつがしらを含む)	0.05
かんしょ	0.05
やまいも(長いもをいう)	0.05
こんにやくいも	0.05
その他のいも類	0.05
てんさい	0.05
だいこん類(ラディッシュを含む)の根	0.05
だいこん類(ラディッシュを含む)の葉	0.05
かぶ類の根	0.05
かぶ類の葉	0.05
西洋わさび	0.05
クレソン	0.05
はくさい	0.05
キャベツ	0.05
芽キャベツ	0.05
ケール	0.05
こまつな	0.05
きょうな	0.05
チンゲンサイ	0.05
カリフラワー	0.05
ブロッコリー	0.05
その他のあぶらな科野菜	0.05
ごぼう	0.05
サルシフィー	0.05
アーティチョーク	0.05
チコリ	0.05
エンダイブ	0.05
しゅんぎく	0.05
レタス(サラダ菜及びちしやを含む)	0.05
その他のきく科野菜	0.05
たまねぎ	0.05
ねぎ(リーキを含む)	0.05
にんにく	0.05
にら	0.05

食品名	基準値(ppm)
アスパラガス	0.05
わけぎ	0.05
その他のゆり科野菜	0.05
にんじん	0.05
パースニップ	0.05
パセリ	0.05
セロリ	0.05
みつば	0.05
その他のせり科野菜	0.05
トマト	0.05
ピーマン	0.05
なす	0.05
その他のなす科野菜	0.05
きゅうり(ガーキンを含む)	0.05
かぼちや(スカッシュを含む)	0.05
しろうり	0.05
すいか	0.05
メロン類果実	0.05
まくわうり	0.05
その他のうり科野菜	0.05
ほうれんそう	0.05
たけのこ	0.05
オクラ	0.05
しょうが	0.05
未成熟えんどう	0.05
未成熟いんげん	0.05
えだまめ	0.05
マッシュルーム	0.05
しいたけ	0.05
その他のきのこ類	0.05
その他の野菜	0.05
みかん	0.05
なつみかんの果実全体	0.05
レモン	0.05
オレンジ(ネーブルオレンジを含む)	0.05
グレープフルーツ	0.05
ライム	0.05
その他のかんきつ類果実	0.05
りんご	10
日本なし	5
西洋なし	5
マルメロ	0.05

食品名	基準値(ppm)
びわ	0.05
もも	0.05
ネクタリン	0.05
あんず(アプリコットを含む)	0.05
すもも(プルーンを含む)	0.05
うめ	0.05
おうとう(チェリーを含む)	0.05
いちご	0.05
ラズベリー	0.05
ブラックベリー	0.05
ブルーベリー	0.05
クランベリー	0.05
ハuckleベリー	0.05
その他のベリー類果実	0.05
ぶどう	0.05
かき	0.05
バナナ	0.05
キウイ	0.05
パパイヤ	0.05
アボカド	0.05
パイナップル	0.05
グアバ	0.05
マンゴー	0.05
パッションフルーツ	0.05
なつめやし	0.05
その他の果実	0.05
ひまわりの種子	0.05
ごまの種子	0.05
べにばなの種子	0.05
綿実	0.05
なたね	0.05
その他のオイルシード	0.05
ぎんなん	0.05
くり	0.05
ペカン	0.05
アーモンド	0.05
くるみ	0.05
その他のナッツ類	0.05
茶	0.05
ホップ	0.05

## [実験方法]

### 1. 試料

玄米、とうもろこし（スイートコーン）、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（せん茶）は、札幌市内の小売店で購入した。

#### (1) 玄米、大豆及び茶（せん茶）

Retsch 社[現 ヴァーダー・サイエンティフィック社]製 ZM1 型超遠心粉碎機を用いて 425  $\mu$ m の標準網ふるいを通るように粉碎し、均一化した。

#### (2) とうもろこし（スイートコーン）

外皮、ひげ及びびしんを除去した種子 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて細切均一化した。

#### (3) ばれいしょ

泥を軽く洗い流し、細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

#### (4) キャベツ

外側変質葉及びびしんを除去し、細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

#### (5) なす

へたを除去し、細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

#### (6) ほうれんそう

ひげ根及び変質葉を除去し、細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

#### (7) オレンジ

細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

#### (8) りんご

花おち、しん及び果梗の基部を除去し、細切した後、試料 1 kg 当たり 500 g の 5 vol% リン酸を加え、松下電器産業（株）[現 パナソニック（株）] 製スピードカッターMK-K77 を用いて均一化した。

### 2. 試薬・試液

ジフェニルアミン標準品：純度 99%、融点 53~55°C [和光純薬工業（株）製]

アセトニトリル、エーテル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

メタノール：LC/MS 用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

蒸留水：LC/MS 用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

ケイソウ土：セライト No. 545 [和光純薬工業（株）製]

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C18 (1,000 mg) (以下 C18 ミニカラムとする) をあらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした後、用いた。

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：Agilent Technologies 社製 Bond Elut Jr PSA (500 mg) (以下 PSA ミニカラムとする) をあらかじめエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL でコンディショニングした後、用いた。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

リン酸、塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム：特級 [関東化学（株）製]

標準原液：ジフェニルアミン標準品 25.0 mg を精秤し、アセトンに溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈し、回収率 25、50、75、100、125 及び 150% 相当濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.1 及び 1 mg/L 溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタルにシャフトジェネレーターS25N-18G を装着 (IKA 社製)

粉砕器：ZM1 型 [Retsch 社 (現 ヴァーダー・サイエンティフィック社) 製]

スピードカッター：MK-K77 [松下電器産業 (株) (現 パナソニック (株)) 製]

濃縮装置：エバポレーター；N-1000 [東京理化工機 (株) 製]、真空ポンプ；FTP-34A [AGC テクノグラス (株) 製]、真空コントローラ；NVC-2100 [東京理化工機 (株) 製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化工機 (株) 製]

#### HPLC-FL

装置	型式	会社
ポンプ	LC-20AB	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
蛍光光度型検出器	RF-20A	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオープン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8040	(株) 島津製作所
LC		
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオープン	CTO-20A	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

### 4. 測定条件

#### HPLC-FL

カラム	Mightysil RP-18GP [内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 $\mu$ m : 関東化学 (株) 製]
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 ( $\mu$ L)	10
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40
移動相	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

グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	30	70
	15.0	30	70
	15.1	5	95
	30.0	5	95
	30.1	30	70
検出器波長	励起波長 : 285 nm、蛍光波長 : 360 nm		
保持時間 (min)	10.5		

#### LC-MS/MS

LC 条件			
カラム	L-column 2 ODS [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 $\mu$ m : (財) 化学物質評価研究機構製]		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 ( $\mu$ L)	5		
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40		
移動相	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		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	85	15
	1.0	60	40
	3.5	60	40
	6.0	50	50
	8.0	45	55
	17.5	5	95
	30.0	5	95
	30.1	85	15
MS 条件			
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)		
イオン化モード	ESI (+)		
インターフェイス電圧	4.0 kV		
DL 温度	200 $^{\circ}$ C		
ネブライザー流量	3.0 L/min		
ヒートブロック	500 $^{\circ}$ C		
ドライイングガス流量	15.0 L/min		
コリジョンガス	窒素		
定量イオン (m/z)	MS/MS: +170 $\rightarrow$ 93 [25 (V)], +170 $\rightarrow$ 92 [19 (V)], +170 $\rightarrow$ 66 [45 (V)]		
保持時間 (min)	17.7		



## 5. 定量

標準原液をメタノールで希釈して添加濃度 0.01 mg/kg の試料では 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625 及び 0.0075 mg/L、添加濃度 0.05 mg/kg の試料では 0.00625、0.0125、0.01875、0.025、0.03125 及び 0.0375 mg/L の標準溶液を調製した。添加濃度 10 mg/kg の試料（りんご）では、試験溶液を 10 倍希釈して測定したため、0.125、0.25、0.375、0.5、0.625 及び 0.75 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10  $\mu$ L を HPLC-FL に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 10  $\mu$ L を HPLC-FL に注入し、絶対検量線法によりジフェニルアミンの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

玄米（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に 5 vol%リン酸 10 mL を加え、引き続き水 20 mL を加え混和した。添加用標準溶液（0.1 mg/L）1.0 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

大豆（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料 10.0 g に 5 vol%リン酸 10 mL を加え、引き続き水 20 mL を加え混和した。添加用標準溶液（1 mg/L）0.5 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう及びオレンジ（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料 20.0 g 相当（秤取 30.0 g）に添加用標準溶液（1 mg/L）1 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

りんご（添加濃度：10 mg/kg）：試料 20.0 g 相当（秤取 30.0 g）に標準原液（500 mg/L）0.4 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

茶（せん茶）（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料 5.00 g に 5 vol%リン酸 10 mL を加え、引き続き水 20 mL を加え混和した。添加用標準溶液（1 mg/L）0.25 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

ジフェニルアミンをリン酸処理した試料からアセトニトリルで抽出し、C18ミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶した。さらにPSAミニカラムで精製した後、HPLC-FLで定量し、LC-MS/MSで確認した。

### (1) 抽出

とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びりんごは試料 20.0 g 相当（秤取 30.0 g）をガラス製遠沈管に採った。玄米及び大豆は試料 10.0 g、茶は試料 5.00 g をガラス製遠沈管に採り、それぞれ 5 vol%リン酸 10 mL、引き続き水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙〔直径 6 mm、No. 707、日本理化学器械（株）製〕を用いて吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL とした。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C18 (1,000 mg/6 mL)] にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記抽出液 20 mL を注入した後、アセトニトリル 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C以下で約 5 mL に濃縮した。これに 10w/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 回振とう抽出した。抽出液に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 に濃縮した。

## (2) 精製

エチレンジアミン-*N*-*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*-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Agilent Technologies 社製 Bond Elut Jr PSA (500 mg)] にエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、エーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶解し、玄米及び大豆は 2 mL、とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びりんごは 4 mL、茶は 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

### 前処理

- | とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご
- | : 試料 1 kg に対し 500 g の 5 vol%リン酸を加え、細切均一化
- ↓ 玄米、大豆、茶 : 425  $\mu$ m の標準網ふるいを通るように粉碎し均一化

### 秤 取

- | とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご
- | : 試料 20.0g 相当 (秤取 30.0 g)
- | 玄米、大豆 : 試料 10.0g に 5 vol%リン酸 10 mL 及び水 20 mL を加え 30 分間放置
- ↓ 茶 : 試料 5.00g に 5 vol%リン酸 10 mL 及び水 20 mL を加え 30 分間放置

### アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 100 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物にアセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容

### オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C18 (1,000 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 20 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 5 mL で溶出 (負荷液を含む全溶出液を採取)

### 濃 縮

- ↓ 約 5 mL に減圧濃縮

### 転 溶

- ↓ 10w/v%塩化ナトリウム溶液 30 mL
- ↓ *n*-ヘキサン 30 mL、15 mL

### 脱 水

- ↓ 無水硫酸ナトリウム

### 濃 縮

↓ 約 2 mL に減圧濃縮

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

[Agilent Technologies 社製 Bond Elut Jr PSA (500 mg)]

↓ エーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を注入

↓ エーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL で溶出 (負荷液を含む全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

| 残留物をメタノールに溶解

| とうもろこし、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご : 4 mL

| 玄米、大豆 : 2 mL

↓ 茶 : 1 mL

試験溶液

↓

HPLC-FL

#### 8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象農産物の添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の溶媒標準溶液 0.2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

ジフェニルアミンをGCで測定すると、試料マトリックスによる測定値への影響が大きかったことから、HPLCを用いた測定方法を検討した。ジフェニルアミンは、HPLC-FL及びLC-MS/MSの両方で測定可能であったので、両者の測定条件を検討し、検出感度等を比較した。

#### (1) HPLC-FLの測定条件の検討

ジフェニルアミンのHPLC-FLを用いた測定方法については、大塚らの報告<sup>\*2</sup>を参考に励起波長285 nm、蛍光波長360 nmとした。ジフェニルアミンの励起及び蛍光スペクトルを図1及び2に示した。図1は、蛍光波長を360 nmに固定して測定したときの励起スペクトルであり、図2は、励起波長を285 nmに固定して測定したときの蛍光スペクトルである。また、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムのMightysil 1 RP-18GP [4.6×250 mm、5 μm、関東化学(株)製]を分析カラムに用い、移動相としてギ酸-アセトニトリル、または酢酸-アセトニトリルを検討したところ、ピーク形状はブロードとなり、再現性も悪かった。そこで大塚らの報告<sup>\*2</sup>を参考に、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)を用いたところ、良好な測定(ピーク形状及び再現性)が可能であったことから、本条件を採用した。ただし、農産物より調製した試験溶液を測定後、カラムの洗浄をしないで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ったことから、測定終了後に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(1:19)で15分間カラム洗浄を行い、その後、次の測定を行うこととした。

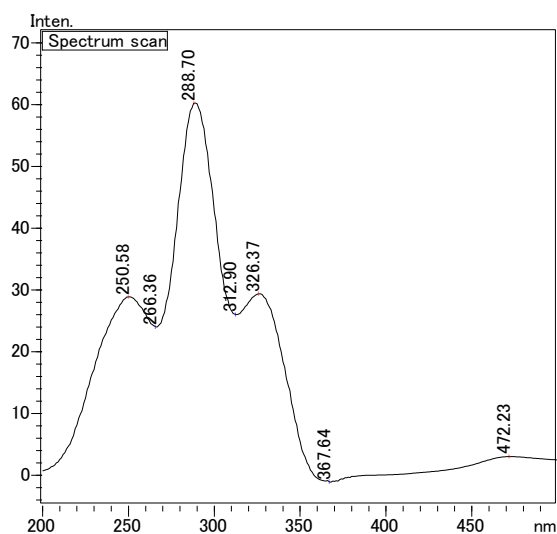


図1 励起スペクトル (360 nm 検出)

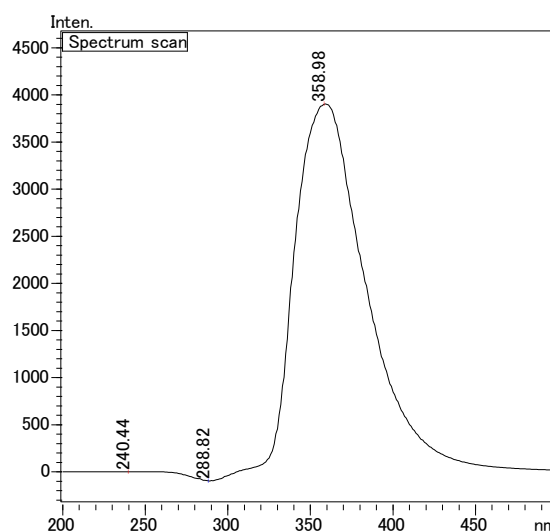


図2 蛍光スペクトル (285 nm 励起)

#### (2) LC-MS及びLC-MS/MSの測定条件の検討

ジフェニルアミンのLC-MS及びLC-MS/MSの測定条件を検討するため、まず、ESI (+) 及びESI (-) 両モードで、SCAN測定を行った。ジフェニルアミンは、ESI (+) ではイオン化したが、ESI (-) モードでは適当なイオンが確認できなかった。そのため、測定はESI (+) モードで行うことにした。

ジフェニルアミンのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。強度の強い73及び59はバックグラウンドも高かった。そこで、ジフェニルアミンのプロトン付加分子 ( $m/z$  170 [M+H]<sup>+</sup>)、その同位体イオン ( $m/z$  171) 及び  $m/z$  91をLC-MS測定時のモニターイオンとした。また、LC-MS/MS測定用プリカーサーイオンとして  $m/z$  170を選択した。  $m/z$  170をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4～6に示した。プロダクトイオンには、強度の高かった93、92及び66を選択

した。

移動相は、(1) HPLC-FLの測定条件の検討の結果より 5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液および 5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いることとした。分析カラムは、L-column2 ODS [2.1×150 mm、3 μm、(財)化学物質評価研究機構製]を用い、厚生労働省通知「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (農産物)」\*3のグラジエント条件を用いたところ、良好な結果(ピーク形状及び再現性)が得られた。

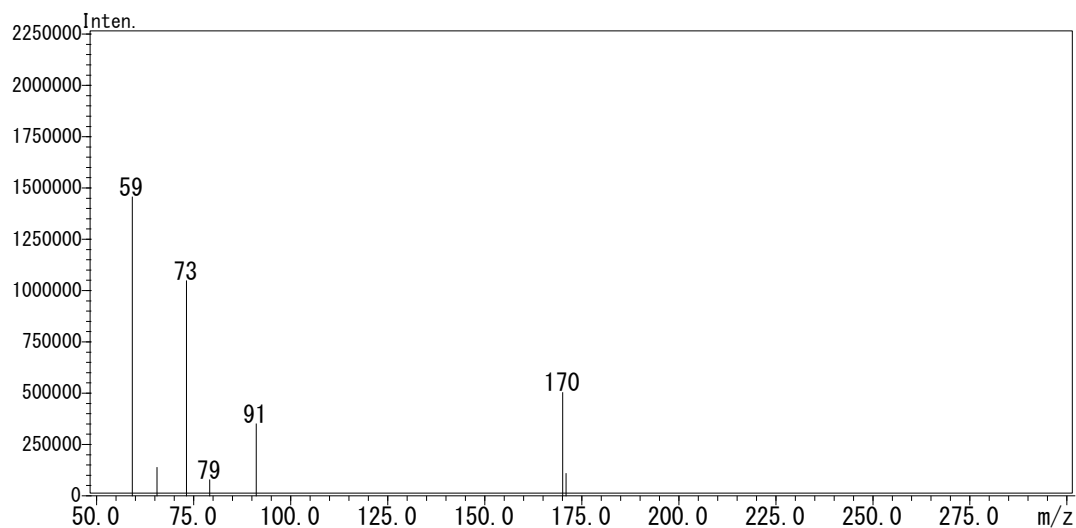


図3 ジフェニルアミンのマススペクトル  
スキャン範囲：10～300 amu  
測定条件：ESI (+)  
ジフェニルアミン：1 mg/L

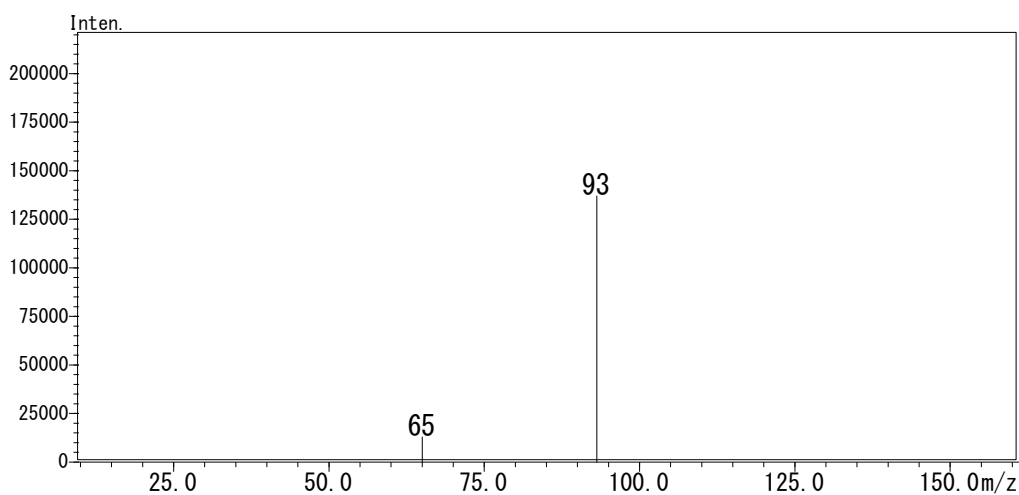


図4 ジフェニルアミンのプロダクトイオンペクトル  
プリカーサーイオン：m/z 170  
測定条件：ESI (+)，CE=25 V (CE：collision energy)  
ジフェニルアミン：1 mg/L

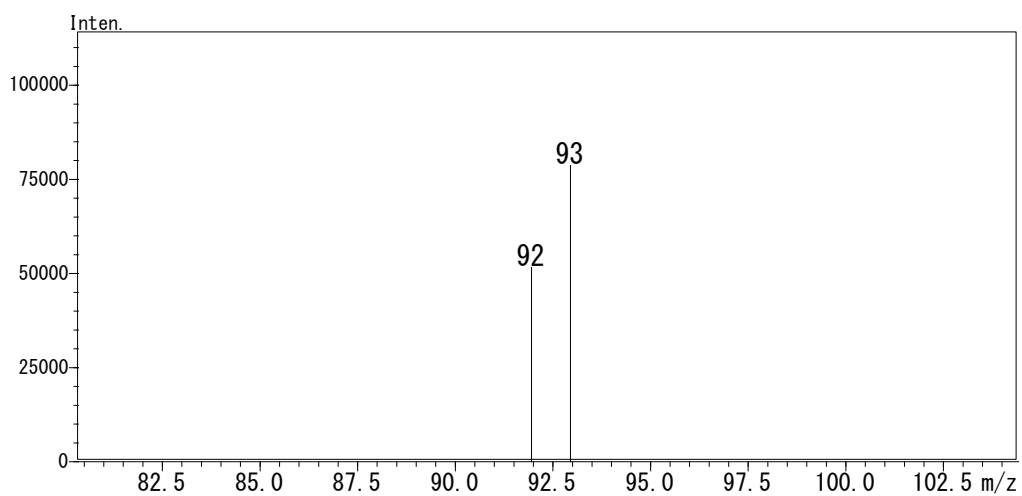
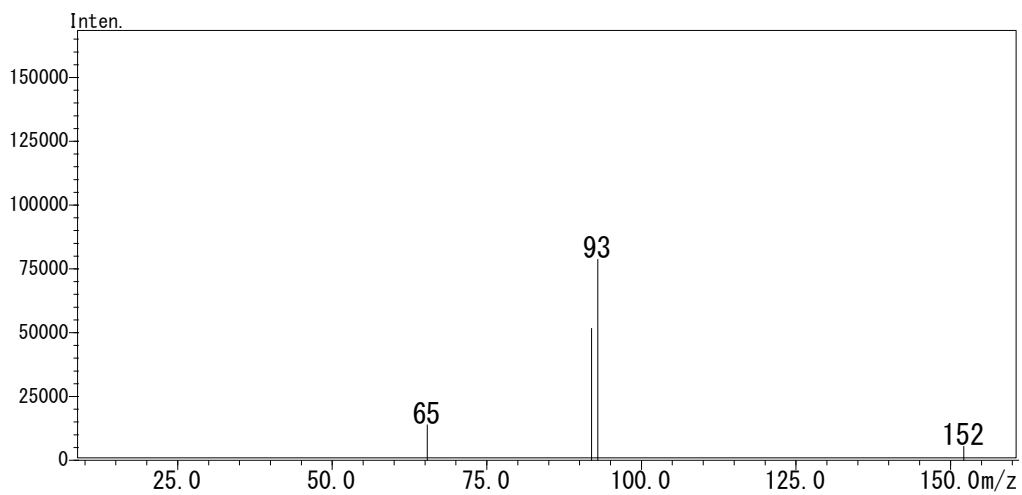


図5 ジフェニルアミンのプロダクトイオンペクトル  
 プリカーサーイオン： $m/z$  170  
 測定条件：ESI (+)，CE=20 V (CE: collision energy)  
 ジフェニルアミン：1 mg/L

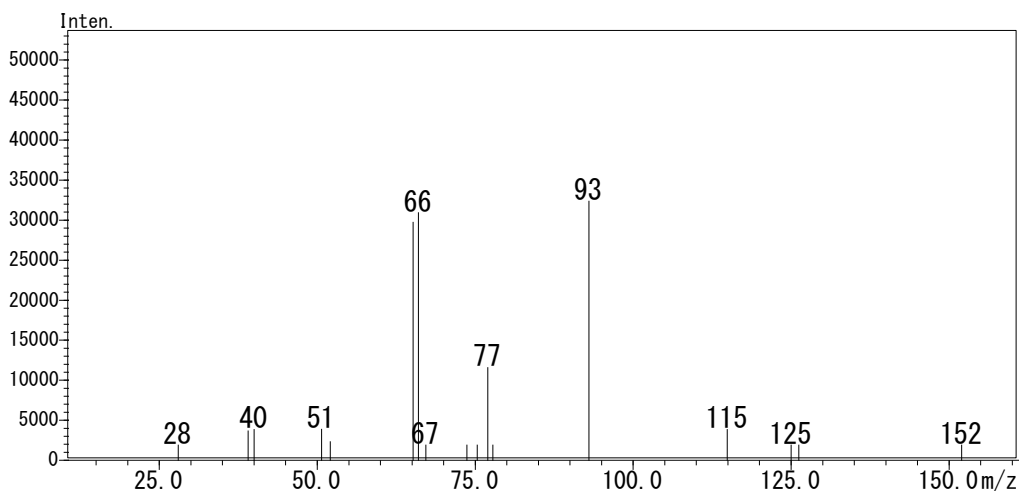


図6 ジフェニルアミンのプロダクトイオンペクトル  
 プリカーサーイオン:  $m/z$  170  
 測定条件: ESI (+), CE=45 V (CE: collision energy)  
 ジフェニルアミン: 1 mg/L

### (3) HPLC-FL、LC-MS 及び LC-MS/MS 測定の比較

0.005 mg/L のジフェニルアミン標準溶液を HPLC-FL、LC-MS 及び LC-MS/MS で測定したところ、LC-MS では感度不足のため、ピークが確認できなかった。一方、HPLC-FL (図 7\_1) 及び LC-MS/MS (図 7\_2) では、ピークが確認できた。HPLC-FL 及び LC-MS/MS 測定におけるジフェニルアミン 0.005 mg/L のピークの S/N はそれぞれ 715, 500 及び 38 であり、HPLC-FL の方が LC-MS/MS よりも約 19,000 倍高感度であった。また、各農産物の試験溶液を測定したところ、LC-MS 測定では妨害ピークが大きく、良好な測定ができなかった。そこで、試料中のジフェニルアミンの測定は、HPLC-FL で行うこととし、LC-MS/MS により確認する方法を選択した。

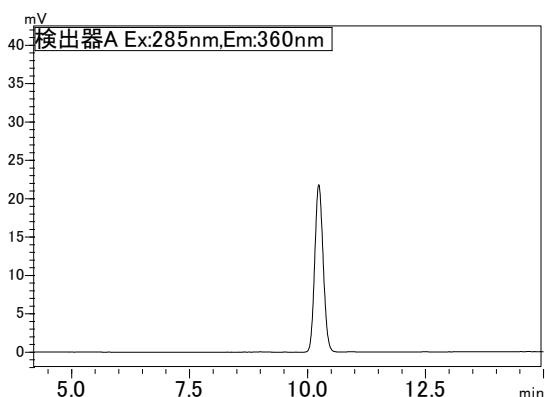


図 7\_1 ジフェニルアミン標準溶液  
 (0.005 mg/L) のクロマトグラム (HPLC-FL)

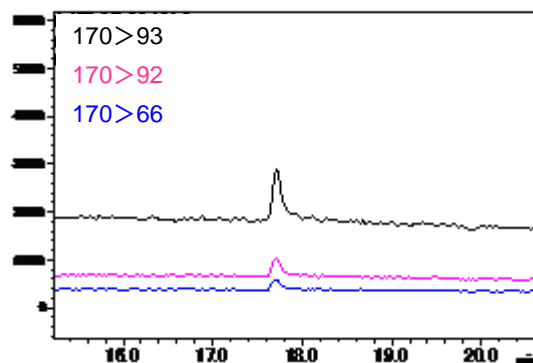


図 7\_2 ジフェニルアミン標準溶液  
 (0.005 mg/L) のマスクロマトグラム

#### (4) 検量線

図 8 に HPLC-FL で測定したジフェニルアミンの検量線を示した。0.005～0.5 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数  $r^2$  は、0.999 であり良好な直線性を示した。

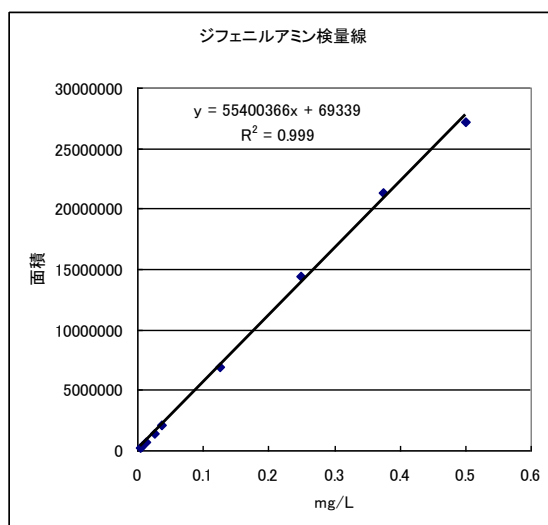


図 8 ジフェニルアミン検量線

#### (5) 定量限界

各農産物のブランク試料から調製した試験溶液及び 0.005 mg/L マトリックス添加標準溶液（試料中 0.01 mg/kg 相当）を測定したところ、各ブランク試料でジフェニルアミンの保持時間に定量を妨害するピーク（妨害ピーク）が認められた。当該ピークを試料中ジフェニルアミン濃度として求めたところ、0.00024～0.0017 mg/kg であった（表 1）。妥当性評価ガイドライン<sup>4</sup>における妨害ピークの許容範囲は、「定量限界が基準値の 1/3 以下の場合、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/10 未満。定量限界が基準値の 1/3 を超える場合には、定量限界に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/3 未満。」と規定されている。このことから、定量限界を 0.01 mg/kg に設定した場合、今回の妨害ピークは、全て定量限界相当ピーク面積の 1/3 未満であるので、基準値 0.01 mg/kg に対応することが可能だと考えられる。また、各試料中 0.01 mg/kg 相当ピークの S/N は 40,000 以上と十分な測定感度が得られていたことから、本試験法の定量限界を 0.01 mg/kg に設定した。

表 1 各ブランク試料で認められた妨害ピークのジフェニルアミン換算試料中濃度

農産物名	妨害ピーク濃度 (mg/kg)
玄米	0.00041
とうもろこし	0.00081
大豆	0.00024
ばれいしょ	0.00057
キャベツ	0.00035
なす	0.00054
ほうれんそう	0.00025
オレンジ	0.00067
りんご	0.00085
茶	0.0017



## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 細切均一化及び抽出方法の検討

ジフェニルアミンの抽出は、通知試験法のGC/MSによる一斉試験法<sup>\*3</sup>を参考に、アセトニトリルを用いて検討した。各試料を細切均一化し、ジフェニルアミンの添加回収を検討したところ、ばれいしょからの回収率が低かった。そこで、ばれいしょを用いて細切均一化の方法等について検討した。結果を表2に示した。細切均一化したばれいしょ20.0 gにジフェニルアミンを0.05 mg/kgの濃度で添加し、30分後にアセトニトリルで抽出したときの回収率は67.8%であった。ジフェニルアミンがやけ病に効果があるのは、その抗酸化作用によると考えられていること<sup>9),10)</sup>、また、ジフェニルアミン処理した低温貯蔵りんごから、ジフェニルアミンが酸化され生成したと考えられるヒドロキシル体が検出されていること<sup>7)</sup>などから、ばれいしょに含まれる酵素で酸化されたことにより回収率の低下が引き起こされたと考えられた。そこで、酵素を失活させる目的で試料重量の半量の5 vol%または10 vol%リン酸を加えて細切均一化したばれいしょ試料30.0 g (ばれいしょ20.0 g相当) にジフェニルアミンを添加し、30分後に抽出を開始したところ、回収率は90.0%及び86.5%と向上したが、5 vol%と10 vol%リン酸の間に大きな差は認められなかった。また、細切均一化したばれいしょ20.0 gにジフェニルアミンを添加し、30分後に5 vol%リン酸10 mLを加え、アセトニトリルにより抽出したところ、回収率は73.7%であった。以上の結果から、野菜及び果実等の前処理は、試料1 kgに対し500 gの5 vol%リン酸を加え、細切均一化することとした。玄米、とうもろこし、大豆及び茶において、5 vol%リン酸を加えることなく抽出した場合の回収率は、各々87.0%、87.2%、79.1%及び109.7%であり、標準品添加後放置中のジフェニルアミンの減少は認められず、リン酸添加は必要ないと考えられた。しかし、全ての穀類、豆類、種実類及び茶でリン酸の添加が不要とは断言できないため、注意点に「穀類、豆類、種実類及び茶においても分解が認められた場合は、試料に対し、重量比で等量(茶は2倍量)の5 vol%リン酸及び2倍量(茶は4倍量)の水を加え、30分間放置した後、アセトニトリルで抽出する」と記載した。

表2 細切均一化及び抽出方法の検討

試料	抽出条件	回収率 (%)
リン酸を加えることなく細切均一化した ばれいしょ 20.0 g	アセトニトリル 100 mL+50 mL	67.8
半量の5 vol%リン酸を加え、細切均一化した ばれいしょ 30.0 g (試料20.0 g相当)	アセトニトリル 100 mL+50 mL	90.0
半量の10 vol%リン酸を加え、細切均一化した ばれいしょ 30.0 g (試料20.0 g相当)	アセトニトリル 100 mL+50 mL	86.5
リン酸を加えることなく細切均一化した ばれいしょ 20.0 g	5 vol%リン酸 10 mL加えた後、 アセトニトリル 100 mL+50 mL	73.7

添加濃度：0.05 mg/kg、添加30分後に抽出を開始

(2) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C18 (1,000 mg/6 mL)] による精製の検討

脂質及び低極性化合物を除去する目的で、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討した。カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、ジフェニルアミン1  $\mu$ gを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表3に示した。ジフェニルアミンは、アセトニトリル2 mLで80%が溶出され、4 mLでほぼ全量が溶出された。そこでカラムのロット間差等を考慮し、アセトニトリル5 mLで溶出することとした。この操作により、緑色色素の除去も可能であった。

表3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

		アセトニトリル			合計
		0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	
回収率 (%)	1回目	79.7	24.7	0.4	104.8
	2回目	95.9	13.9	0.2	110.0

負荷量：1  $\mu$ g (10 mg/L アセトニトリル溶液0.1 mLをC18ミニカラムに負荷)

### (3) 転溶溶媒の検討

10w/v%塩化ナトリウム30 mLに5%リン酸1 mL、ジフェニルアミン3  $\mu$ gを加え、*n*-ヘキサン30 mL及び15 mLで2回振とう抽出を行った結果を表4に示した。*n*-ヘキサン1回の転溶でほぼ全量回収できたが、転溶操作は、*n*-ヘキサン30 mL及び15 mLの2回振とう抽出で行うこととした。

表4 *n*-ヘキサンへの転溶の検討

	30 mL (1回目)	15 mL (2回目)	合計
回収率 (%) ( <i>n</i> =3)	100.6	0.7	101.3

(4) 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による精製 [Agilent Technologies 社製 Bond Elut Jr PSA (500 mg)] の検討

カラムを*n*-ヘキサン10 mLで予備洗浄した後、ジフェニルアミン3  $\mu$ gを負荷し、エーテル及び*n*-ヘキサン(1:9)混液または(3:17)混液で溶出したときの溶出状況を表5に示した。ジフェニルアミンは、エーテル及び*n*-ヘキサン(1:9)混液の場合、9 mLでほぼ全量が溶出された。また、エーテル及び*n*-ヘキサン(3:17)混液の場合、6 mLでほぼ全量が溶出された。以上の結果から、カラムのロット間差等を考慮し、エーテル及び*n*-ヘキサン(3:17)混液10 mLで溶出することとした。この操作により、色素のほとんどが除去可能であった。

表5 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からの溶出状況

		エーテル及び <i>n</i> -ヘキサン混液	0-3 mL	3-6 mL	6-9 mL	9-12 mL	合計
回収率 (%)	1:9		2.4	61.1	42.0	0.4	105.9
	3:17		87.3	12.5	0.2	0.1	100.1

負荷量：3  $\mu$ g (10 mg/L *n*-ヘキサン溶液0.3 mLをPSAミニカラムに負荷)

(5) 水にジフェニルアミンを添加したときの回収率

水 10 mL にジフェニルアミン 0.5  $\mu$ g を添加し、5 vol%リン酸 5 mL を加え、アセトニトリルで 100 mL にメスアップし、分析法フローチャートの C18 ミニカラム精製以降の操作を行った。そのときの回収率は 94.2% ( $n=3$ ) と良好な結果が得られた。

3. 添加回収試験

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、りんご及び茶の 10 農産物を試料に用いて、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表 6 に示した。検討した全ての試料においてジフェニルアミンの定量を妨害するピークが認められたが、いずれも妥当性評価ガイドラインの妨害ピークの許容範囲\*4であり、問題はなかった。しかし、全ての試料に妨害ピークが認められたことから、試薬等からの汚染の可能性があった。そこで、水を試料とし、試験溶液を調製した（操作ブランクとする）。このとき、併行して大豆のブランク試料についても試験溶液の調製を行った。操作ブランクからはジフェニルアミンの定量を妨害するピークは認められなかったが、大豆ブランク試料からは妨害ピークが検出された（図 9～11）。以上の結果から、妨害ピークは、試薬等由来ではなく試料由来であると考えられた。

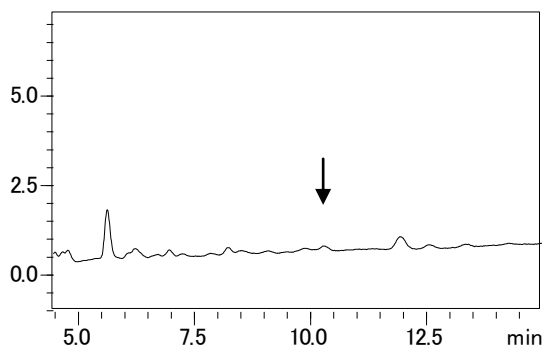


図 9 操作ブランクのクロマトグラム

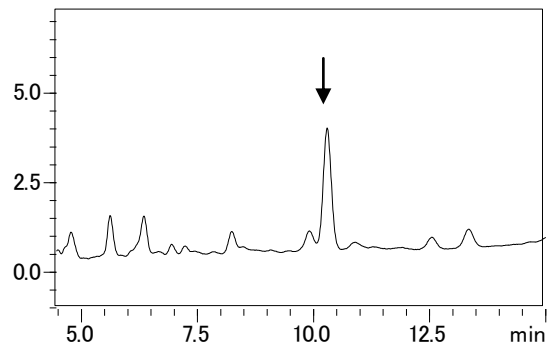


図10 大豆無添加試料のクロマトグラム

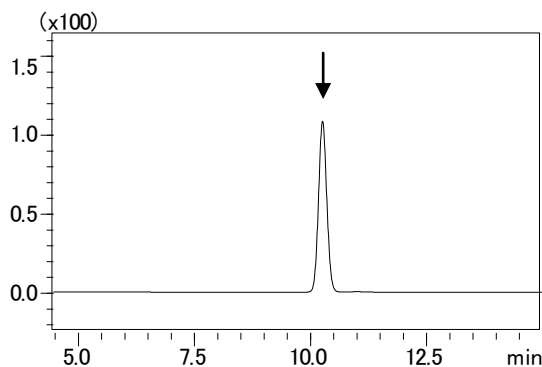


図11 ジフェニルアミン標準溶液 (0.025 mg/L) のクロマトグラム

表6 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積 (高さ) <sup>3</sup>			選択性の評価 <sup>5</sup>	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>4</sup> (b)	面積 (高さ) 比 (a)/(b)			
1	ジフェニルアミン	玄米	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	10429	255436	0.043	○	
2	ジフェニルアミン	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	21999	1380620	0.016	○	
3	ジフェニルアミン	大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	6155	1366523	0.005	○	
4	ジフェニルアミン	ばれいしよ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	15215	1379588	0.011	○	
5	ジフェニルアミン	キャベツ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	9035	1367498	0.007	○	
6	ジフェニルアミン	なす	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	13682	1370938	0.010	○	
7	ジフェニルアミン	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	6931	1354872	0.005	○	
8	ジフェニルアミン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	17977	1387973	0.013	○	
9	ジフェニルアミン	りんご	0.01	10.	10.	基準値	10.	< 0.100	面積	2039	217772850	0.000	○	10倍希釈して測定
10	ジフェニルアミン	茶	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	47359	1397495	0.035	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。

\*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合 (定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合) には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*4 試料中の濃度が『評価対象濃度 (基準値濃度又は定量限界濃度)』相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積 (高さ) は求めなくても良い。

\*5 面積 (高さ) 比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表7に示した。真度は77~95%、併行精度は1~6%であり、良好な結果が得られた。また、定量限界と添加濃度が同じであった玄米については、S/N比の平均値は96511であり、十分な感度が得られていた。添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各農産物のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図12\_1~12\_10に示した。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表8に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図13\_1~13\_9に示した。定量限界の設定については、「結果および考察 1. 測定条件の検討 (5) 定量限界」に記載したとおり0.01 mg/kgとした。

表7 真度、精度及び定量限界の評価

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 北海道立衛生研究所

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	検査値			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	ジフェニルアミン	玄米	0.01	0.01	0.01		2633	-4778	0.999	91	94	90	88	91	91	2	88874	104148	96511	
2	ジフェニルアミン	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	*	14054	-11680	1.000	88	88	91	92	91	90	2	558938	519069	539004	
3	ジフェニルアミン	大豆	0.01	0.05	0.05	*	13694	-4957	1.000	89	87	87	88	91	88	2	1119080	829091	974086	
4	ジフェニルアミン	ばれいしよ	0.01	0.05	0.05	*	13620	7067	1.000	85	85	84	85	85	85	1	1099295	852018	975657	
5	ジフェニルアミン	キャベツ	0.01	0.05	0.05	*	13567	16879	1.000	82	79	81	76	78	79	3	1217619	997640	1107630	
6	ジフェニルアミン	なす	0.01	0.05	0.05	*	13752	6620	1.000	79	80	69	79	78	77	6	968539	600397	784468	
7	ジフェニルアミン	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	13826	-9376	1.000	92	89	88	86	88	89	2	203489	183845	193667	
8	ジフェニルアミン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	13655	20535	1.000	88	88	85	86	84	86	2	1018012	947144	982578	
9	ジフェニルアミン	りんご	0.01	10.	10.	*	296320	-810703	0.997	83	86	86	84	86	85	1	2829980	2930804	2880392	10倍希釈して測定
10	ジフェニルアミン	茶	0.01	0.05	0.05	*	14241	-17162	1.000	96	94	93	95	96	95	1	231769	187594	209682	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。

\*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

\*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/N比を求める。

表8 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	標準溶液濃度 <sup>3</sup> (mg/L)	ピーク面積 (高さ) <sup>4</sup>						S/N比		平均値		備考					
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5</sup>	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		平均	#VALUE!	#VALUE!	#DIV/0!	#DIV/0!
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均								
1	ジフェニルアミン	玄米	0.01	0.01	0.01		0.005	面積	-	-	-	#VALUE!	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	ジフェニルアミン	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	21530	288226	289002	267084	268122	267800	267961	49334	48460	100	48897				
3	ジフェニルアミン	大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	6394	275170	275104	268743	266286	266896	266591	255229	301033	101	278131				
4	ジフェニルアミン	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	15288	281960	282524	266954	271076	270903	270990	397953	216338	99	307146				
5	ジフェニルアミン	キャベツ	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	9318	275786	276610	266880	274128	274246	274187	275623	305094	97	290359				
6	ジフェニルアミン	なす	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	14125	277968	278294	264006	270141	269665	269903	186985	184906	98	185946				
7	ジフェニルアミン	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	6558	272190	272549	265812	267011	267188	267100	265888	274609	100	270249				
8	ジフェニルアミン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	17980	286674	286779	268747	273483	272814	273149	183944	234381	98	209163				
9	ジフェニルアミン	りんご	0.01	10	10	*	0.005	面積	22438	285941	285664	263365	269622	268655	269139	130477	121675	98	126076				
10	ジフェニルアミン	茶	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	46932	314883	316196	268608	266077	267231	266654	49605	47495	101	48550				
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!				

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度とが異なる場合には、『\*』が表示される。  
 \*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。  
 \*4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)  
 \*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。  
 \*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めたところ、面積比は 0.98~1.01 であり、測定値へのマトリックスの影響は非常に小さかった。

表9 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2</sup> (mg/L)	ピーク面積 (高さ) <sup>3</sup>						ピーク面積 (高さ)比 <sup>6</sup>	備考		
							面積又は高さの別	ブランク <sup>4</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>5</sup>			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1			n=2	平均
1	ジフェニルアミン	玄米	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	11563	279420	279081	267688	266770	266502	266636	1.00	
2	ジフェニルアミン	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	21999	1380620	1383748	1360185	1346701	1345925	1346313	1.01	
3	ジフェニルアミン	大豆	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	6155	1366523	1364628	1359421	1362385	1364604	1363495	1.00	
4	ジフェニルアミン	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	15215	1379588	1382874	1366016	1362232	1360381	1361307	1.00	
5	ジフェニルアミン	キャベツ	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	9035	1367498	1370643	1360036	1367873	1365616	1366745	1.00	
6	ジフェニルアミン	なす	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	13682	1370938	1374822	1359198	1363545	1362519	1363032	1.00	
7	ジフェニルアミン	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	6931	1354872	1355457	1348234	1364739	1366744	1365742	0.99	
8	ジフェニルアミン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	17977	1387973	1391450	1371735	1383418	1382451	1382935	0.99	
9	ジフェニルアミン	りんご	0.01	10	10	5	面積	2039	21772850	21507538	21638155	21640867	21694660	21667764	1.00	10倍希釈して測定
10	ジフェニルアミン	茶	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	47359	1397495	1400506	1351642	1350362	1351584	1350973	1.00	
					0.						0			0	#DIV/0!	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。  
 \*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)  
 \*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。  
 \*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。  
 \*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

(4) LC-MS/MS 測定の検討

LC-MS/MS によるジフェニルアミンの確認について検討した。LC-MS/MS では妨害ピークはほとんど認められなかった。ジフェニルアミンの検出感度は蛍光光度型検出器より低い、定量限界濃度 [0.005 mg/L (0.01 mg/kg 相当)] のマトリックス添加標準溶液において、ジフェニルアミンの確認は可能であった。代表的なクロマトグラムを図 14\_1~14\_10 に示した。

#### (5) その他

平成 18 年 5 月 29 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「食品中のジフェニルアミンの試験に当たっての留意点」<sup>\*5</sup>において、ジフェニルアミンはポリエチレン容器等からの移染の可能性が示されている。そこで、以下の実験を行った。ほうれんそう及びオレンジの各試料を 5 vol%リン酸で処理した後、2 等分し、一方をガラス製容器、他方をポリエチレン製袋に入れ、冷蔵庫に保管した。1 週間後、各試料のジフェニルアミンを測定したところ、ガラス製容器に保管した試料からジフェニルアミンは検出されなかった（定量限界未満）が、ポリエチレン製袋に保管した試料からは、各々 0.05 mg/kg のジフェニルアミンが検出された。ジフェニルアミンは石油製品の酸化防止剤等に使用されていることから、注意が必要と考えられる。

#### 4. 考察

ジフェニルアミンは通知試験法の GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）では、B-2 判定（平均回収率の中央値が 50%以上、70%未満）<sup>\*1</sup>であった。ジフェニルアミンは比較的蒸気圧が高い [ $1.07 \times 10^{-1}$  Pa (20°C)] ことから、アセトニトリル及びトルエンなど沸点の高い溶媒を除去する際に損失したことが低回収率の原因の一つと考えられた。そのため、試験溶液調製法は、比較的低温で除去しやすい溶媒を用い、可能な限り乾固する回数を減らした方法を考案した。

各試料を細切均一化し、ジフェニルアミンの添加回収を検討したところ、ばれいしょからの回収率が低かった。ジフェニルアミンがやけど病に効果があるのは、その抗酸化作用によると考えられていること<sup>9),10)</sup>、また、ジフェニルアミン処理した低温貯蔵りんごから、ジフェニルアミンが酸化され生成したと考えられるヒドロキシル体が検出されていること<sup>7)</sup>などから、ばれいしょに含まれる酵素で酸化されたことにより回収率の低下が引き起こされたと考えられた。そこで、酵素を失活させる目的で細切均一化の際に 5 vol%リン酸を加えたところ、回収率が改善した。

開発した方法を用いて、まず水にジフェニルアミンを添加して回収率を検討した結果、良好な回収率が得られた。そこで次に玄米等 10 農産物の添加回収試験を行ったところ、選択性、真度及び精度は、妥当性評価ガイドラインの目標値<sup>\*4</sup>を満足し、試料マトリックスの測定への影響も非常に小さいという良好な結果が得られた。また、定量限界として 0.01 mg/kg を設定可能であった。

ジフェニルアミンの LC-MS/MS による確認について検討したところ、妨害ピークもほとんど認められず、定量限界濃度 [0.005 mg/L (0.01 mg/kg 相当)] のマトリックス添加標準溶液も良好に測定可能であった。

以上の結果から、本ジフェニルアミン試験法は、穀類、豆類、野菜、果実、種実類及び茶の農産物に適用可能であると判断された。

#### 【結論】

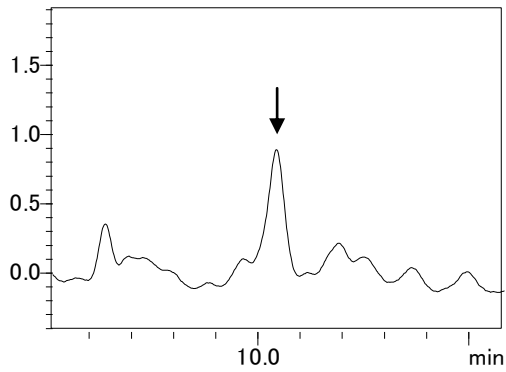
農産物中のジフェニルアミン試験法として、ジフェニルアミンを 5 vol%リン酸処理した試料からアセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶し、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-FL で定量し、LC-MS/MS で確認する方法を開発した。開発した試験法を玄米、とうもろこし、大豆、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご及び茶の 10 農産物に適用した結果、真度 77~95%、併行精度 1~6%の良好な結果が得られた。また、定量限界として 0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

## [参考文献]

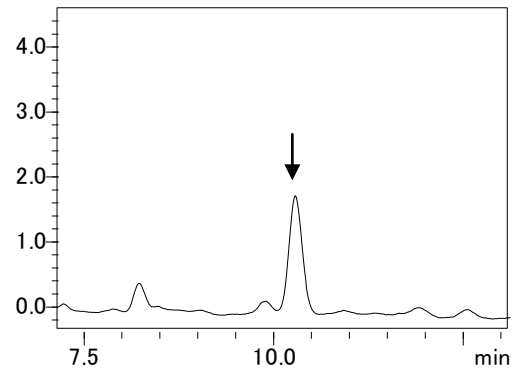
- 1) Smock, R. M. A comparison of treatments for control of the apple scald disease. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 69, 91-100 (1957)
  - 2) Garrido, J., de Alba, M., Jimenez, I., Cadado, E., Folgeiras, M. L. Gas chromatographic determination of diphenylamine in apples and pears : Method validation and results of spanish official residue monitoring program 1995. J. AOAC Int., 81 (3), 648-651 (1998)
  - 3) Bramlage, W. J., Potter, T. L., Ju, Z. Detection of diphenylamine on surfaces of nontreated apple (*Malus domestica* Bonkh.). J. Agric. Food Chem, 44 (5), 1348-1351 (1996)
  - 4) Yu, L., Schoen, R., Dunkin, A., Firman, M., Cushman, H., Fontanilla, A. Determination of *o*-phenylphenol, diphenylamine, and propargite pesticide residue in selected fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry. J. AOAC Int., 80(3), 651-656 (1997)
  - 5) Lehotay, S. J., De Kok, A., Hiemstra, M., Van Bodegraven, P. Validation of fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetable using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection, 88 (2), 595-614 (2005)
  - 6) Saad, B., Haniff, N. H., Saleh, M. I., Hashim, N. H. H., Abu, A., Ali, N. Determination of orto-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. Food Chem., 84, 313-317 (2004)
  - 7) Rudell, D. R., Mattheis, J. P., Fellman, J. K. Evaluation of diphenylamine derivatives in apple peel using gradient reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet-visible absorption and atmospheric pressure chemical ionization mass selective detection. J. Chromatogr. A, 1081, 202-209 (2005)
  - 8) Frenich, A. G., Fernández, M. D. M. M., Moreno, L. D., Vidal, J. L. M., López-Gutiérrez, N. Multiresidue pesticide analysis of tuber and root commodities by QuEChERS extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J. AOAC Int. 95(5), 1319-1330 (2012)
  - 9) Huelin, F. E., Coggiola, I. M. Superficial scald, a functional disorder of stored apples. V. Oxidation of  $\alpha$ -farnesene and its inhibition by diphenylamine. J. Sci. Food Agric., 21, 44-48 (1970)
  - 10) Whitaker, B. D. DPA treatment alters  $\alpha$ -farnesene metabolism in peel of 'Empire' apples stored in air or 1.5% O<sub>2</sub> atmosphere. Postharv. Biol. Tech., 18, 91-97 (2000)
- \*1 厚生労働省, 農作物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC/MS 一斉試験法, 並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法の検討結果 (平成 15・16 年度),  
<http://www-bm.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/positivelist/dl/040806-111.pdf>
- \*2 大塚健治, 小林麻紀, 田村康宏, 富澤早苗, 上條恭子, 岩越景子, 影山百合子, 高野伊知郎, 永山敏廣, HPLCによるジフェニルアミンの分析, 第97回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 2009, p. 34
- \*3 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品に残留する農薬, 試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について (一部改正)” 平成 17 年 11 月 29 日, 食安発第 1129002 号 (2005).
- \*4 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について” 平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1224 第 1 号 (2010).
- \*5 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡 “食品中のジフェニルアミンの試験に当たっての留意点” 平成 18 年 5 月 29 日 (2006).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

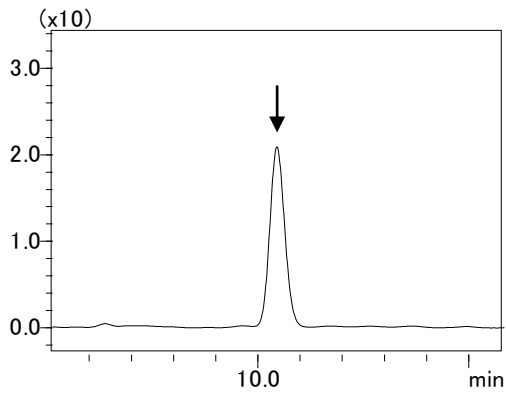
玄米 ブランク試料



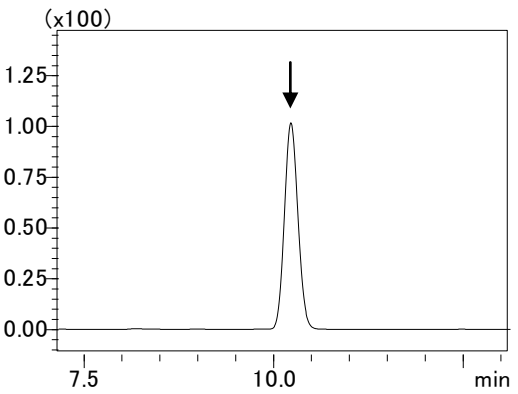
とうもろこし ブランク試料



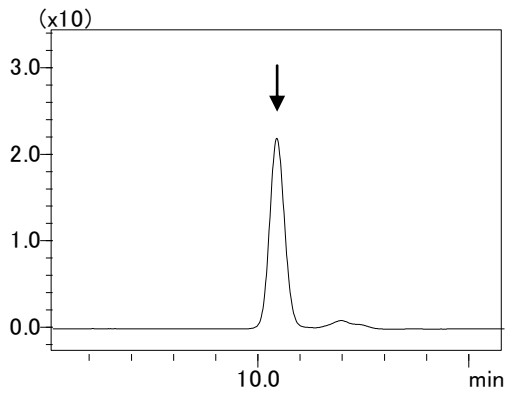
玄米 添加試料 (添加濃度 0.01 mg/kg)



とうもろこし 添加試料 (添加濃度 0.05 mg/kg)



標準溶液 0.005 mg/L



標準溶液 0.025 mg/L

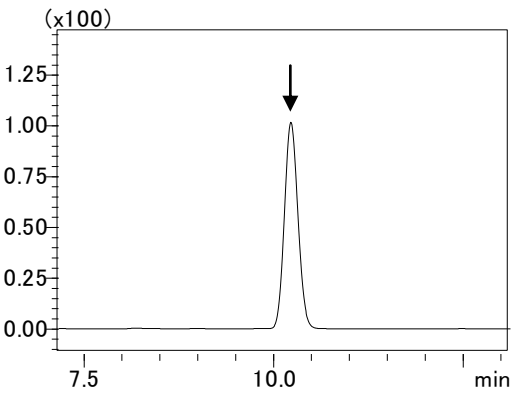
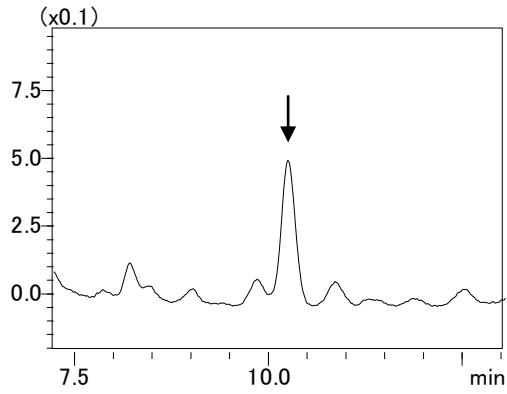


図 12.1 玄米の HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

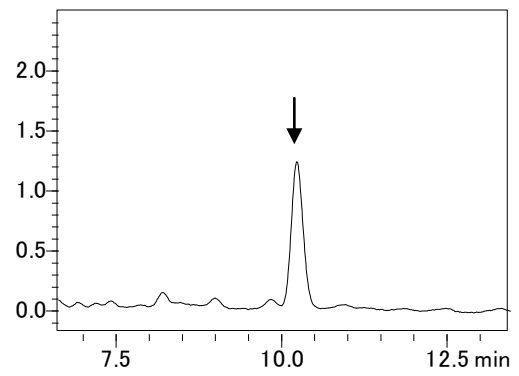
図 12.2 とうもろこしの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)



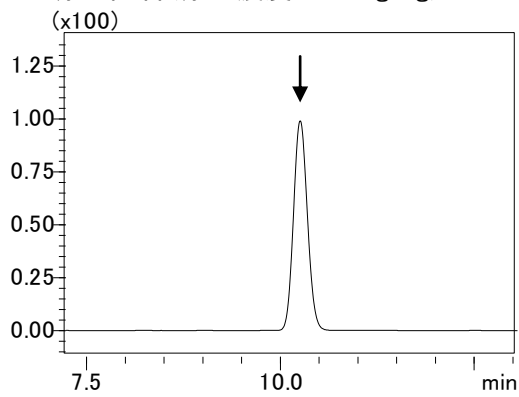
大豆 ブランク試料



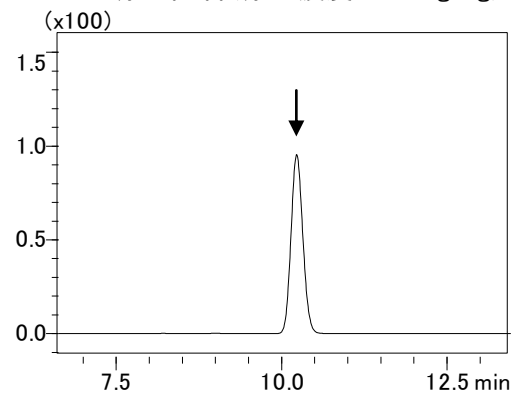
ばれいしょ ブランク試料



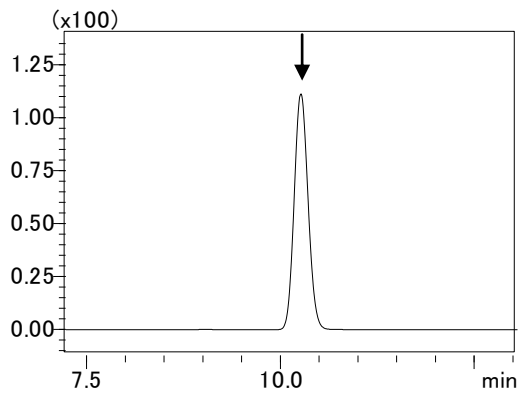
大豆 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



ばれいしょ 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



標準溶液 0.025 mg/L



標準溶液 0.025 mg/L

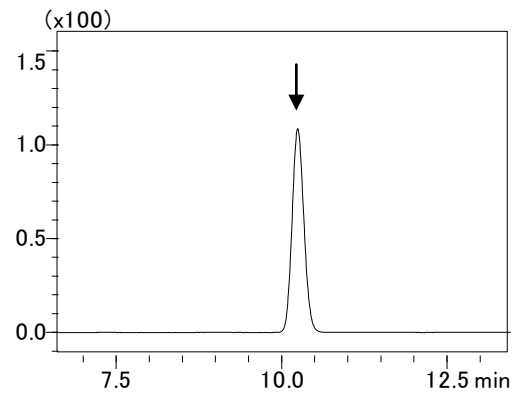
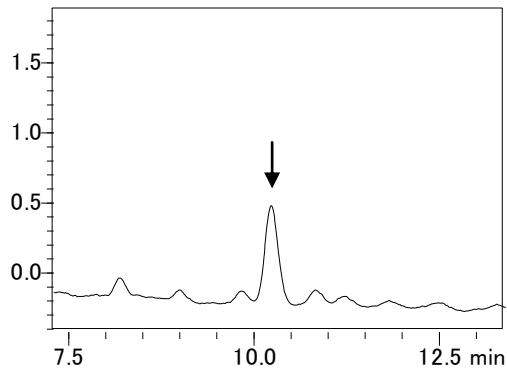


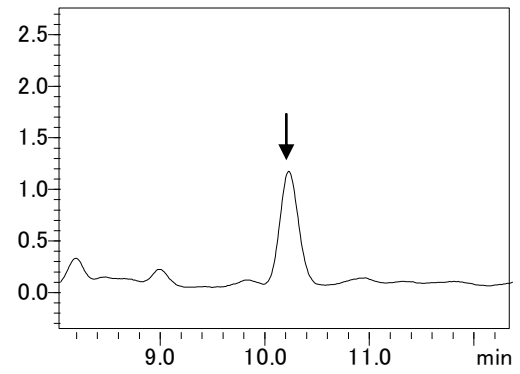
図 12\_3 大豆の HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

図 12\_4 ばれいしょの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

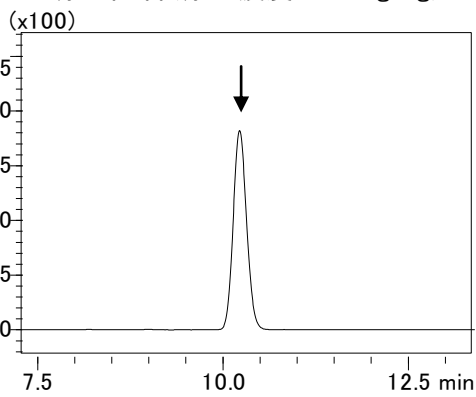
キャベツ ブランク試料



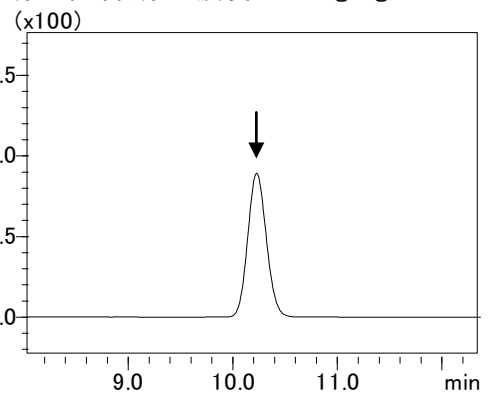
なす ブランク試料



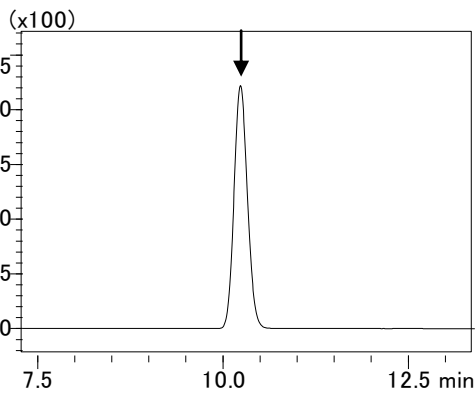
キャベツ 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



なす 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



標準溶液 0.025 mg/L



標準溶液 0.025 mg/L

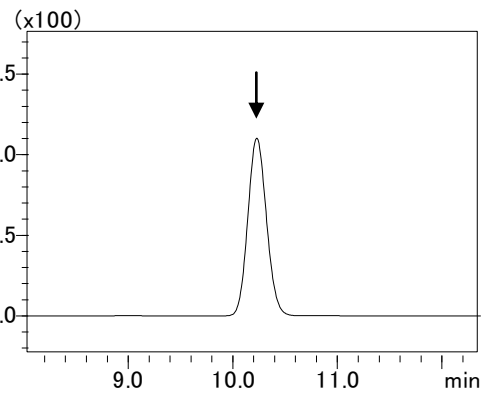
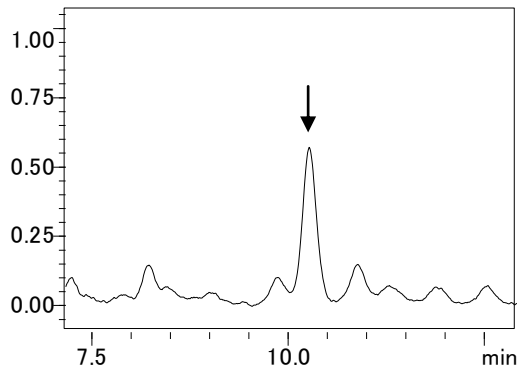


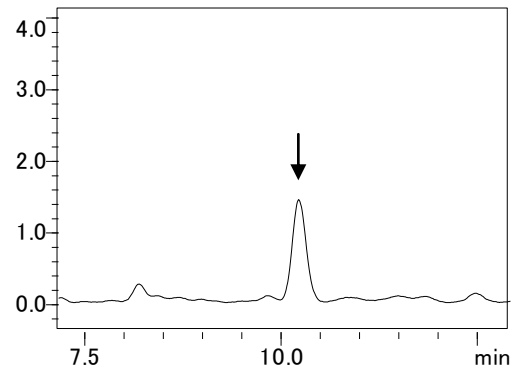
図 12\_5 キャベツの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

図 12\_6 なすの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

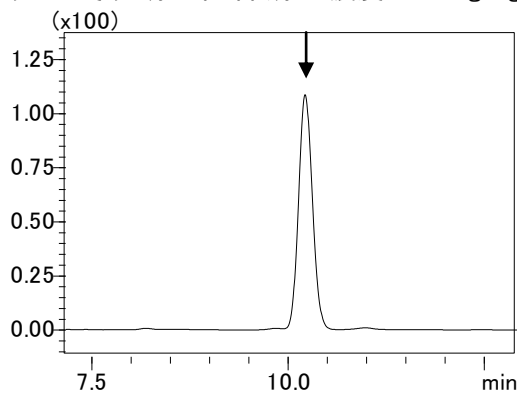
ほうれんそう ブランク試料



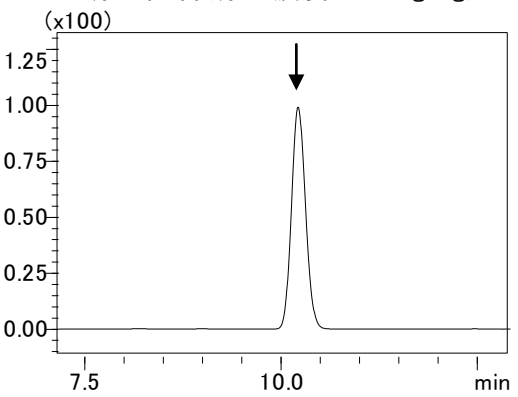
オレンジ ブランク試料



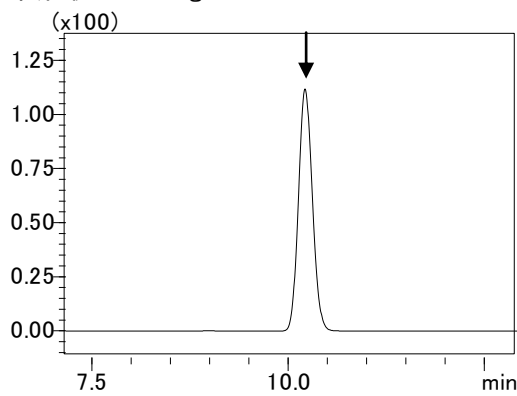
ほうれんそう 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



オレンジ 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



標準溶液 0.025 mg/L



標準溶液 0.025 mg/L

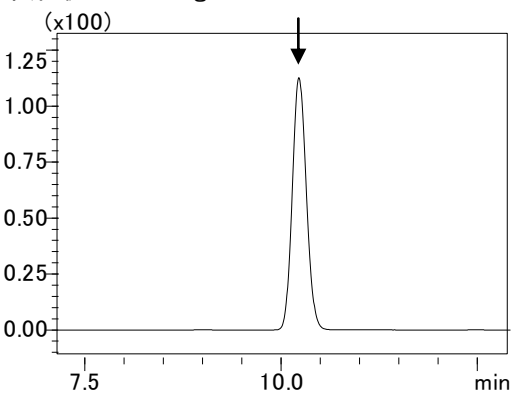
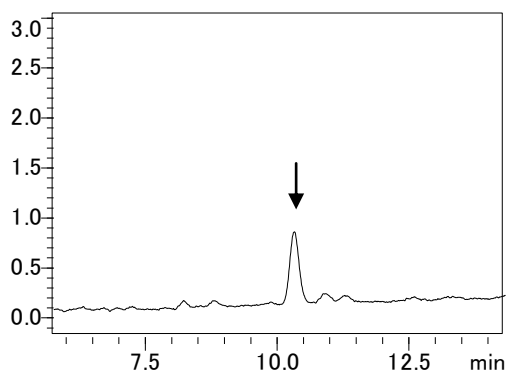


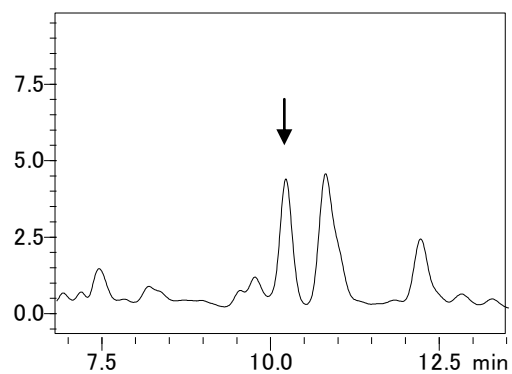
図 12.7 ほうれんそうの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

図 12.8 オレンジの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

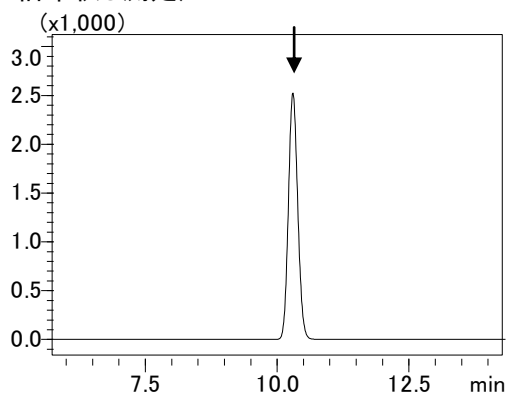
りんご ブランク試料(10倍希釈し測定)



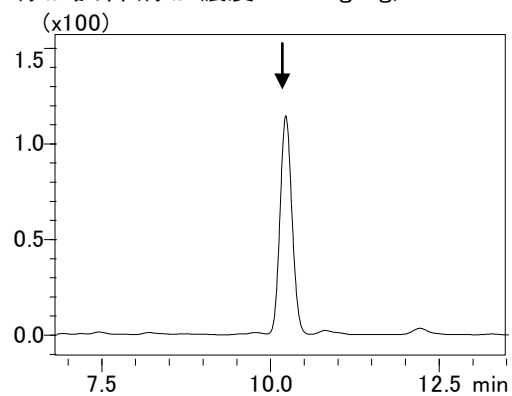
茶 ブランク試料



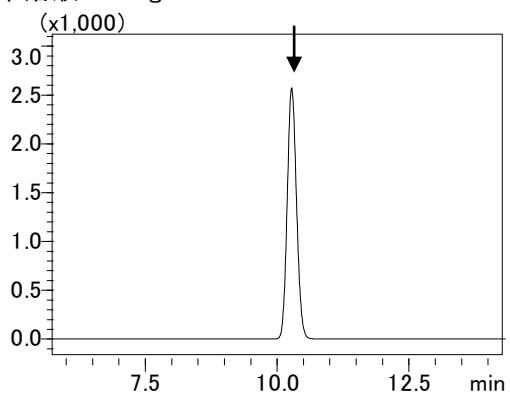
りんご 添加試料(添加濃度 10 mg/kg)  
(10倍希釈し測定)



茶 添加試料(添加濃度 0.05 mg/kg)



標準溶液 0.5 mg/L



標準溶液 0.025 mg/L

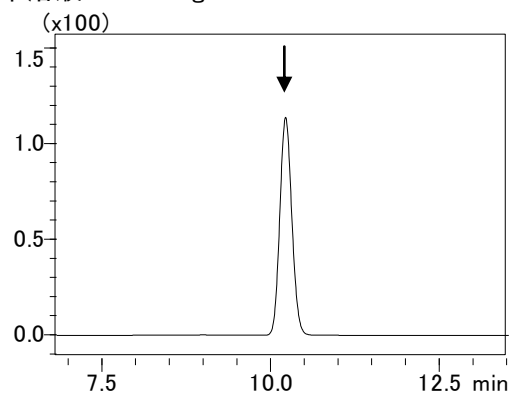
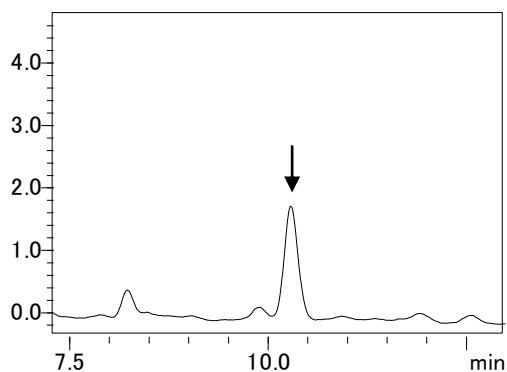


図 12\_9 りんごの HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 10 mg/kg)

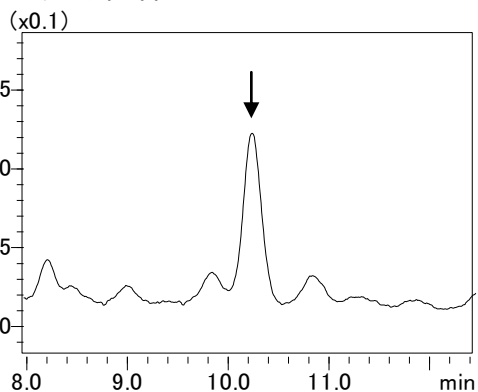
図 12\_10 茶の HPLC-FL のクロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

②定量限界の推定における代表的なクロマトグラム  
(定量限界相当濃度)

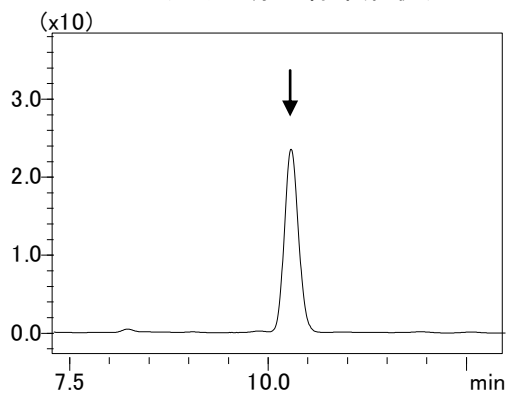
とうもろこし ブランク試料



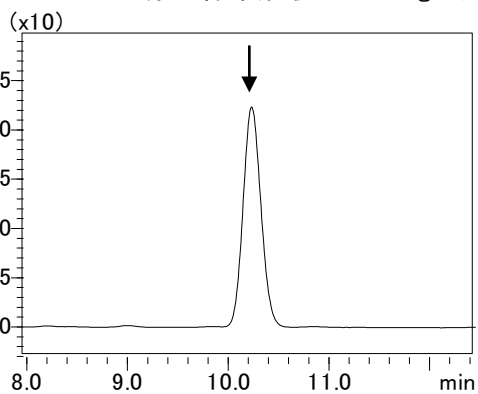
大豆 ブランク試料



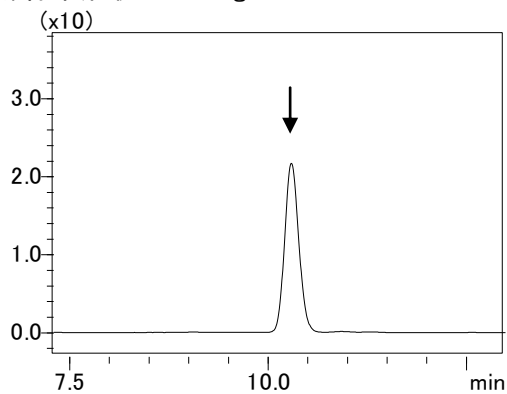
とうもろこし マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



大豆 マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



溶媒標準溶液 0.005 mg/L



溶媒標準溶液 0.005 mg/L

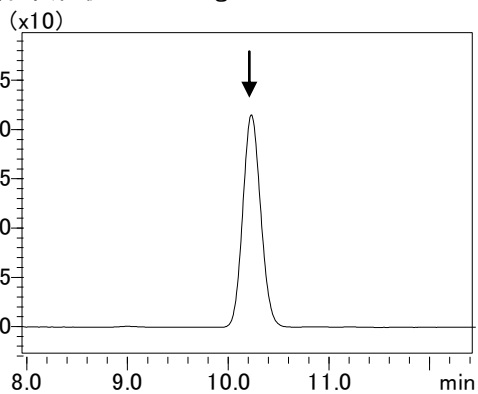
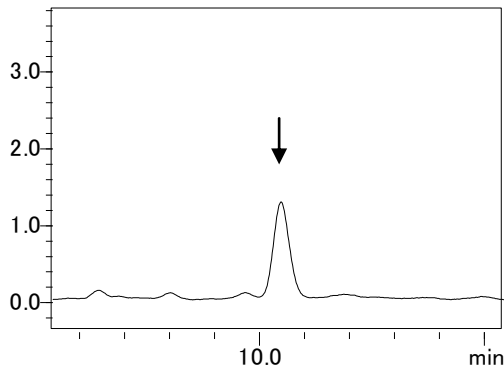


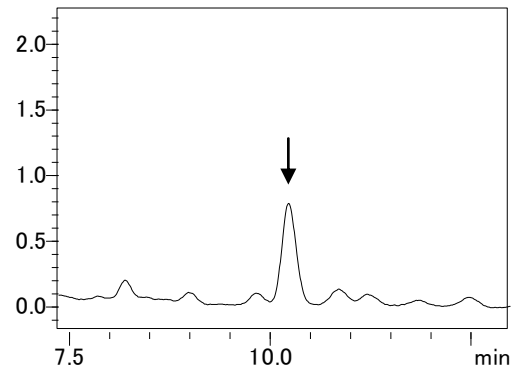
図 13.1 とうもろこしの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

図 13.2 大豆の HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

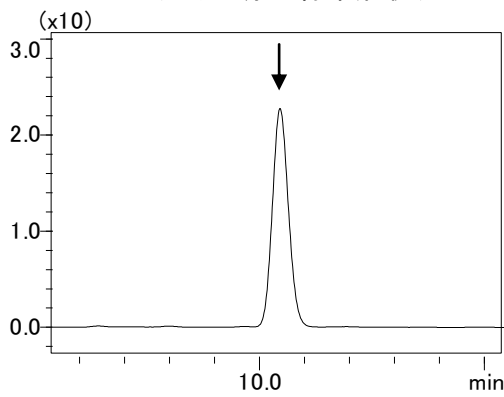
ばれいしょ ブランク試料



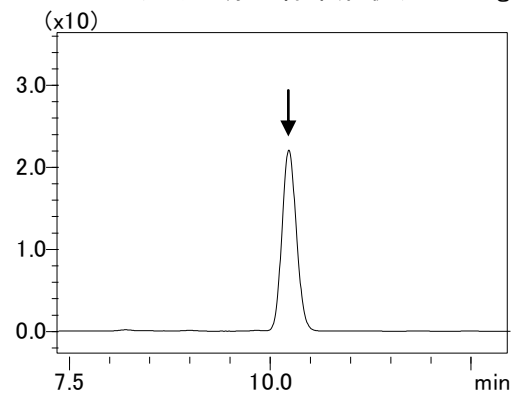
キャベツ ブランク試料



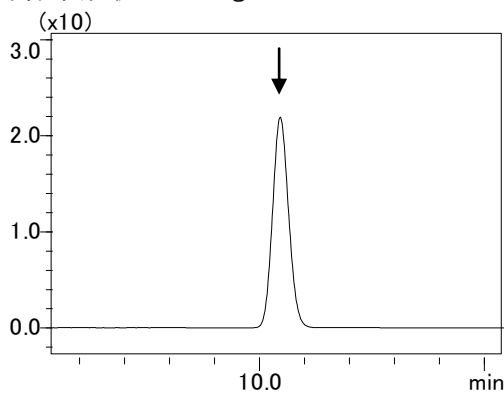
ばれいしょ マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



キャベツ マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



溶媒標準溶液 0.005 mg/L



溶媒標準溶液 0.005 mg/L

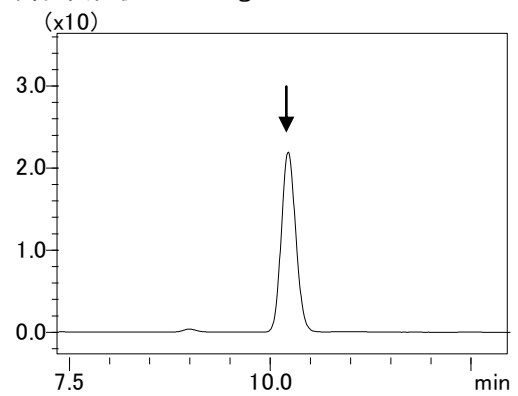
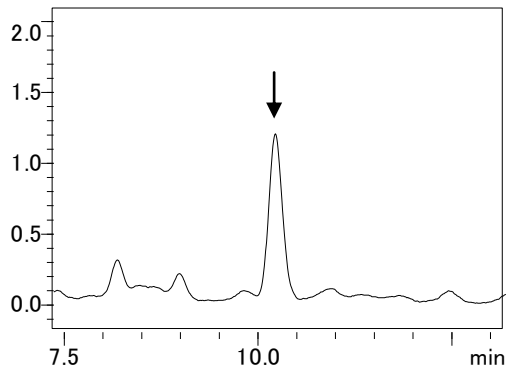


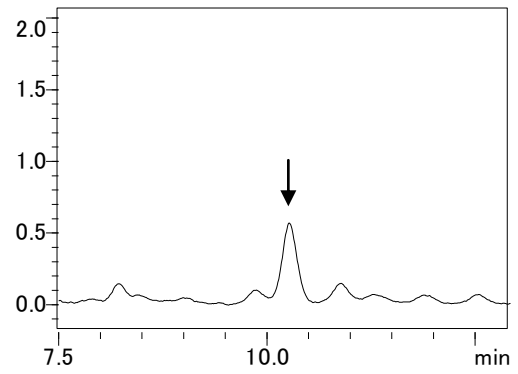
図 13\_3 ばれいしょの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

図 13\_4 キャベツの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

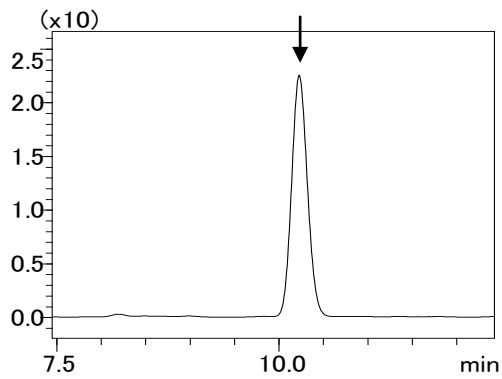
なす ブランク試料



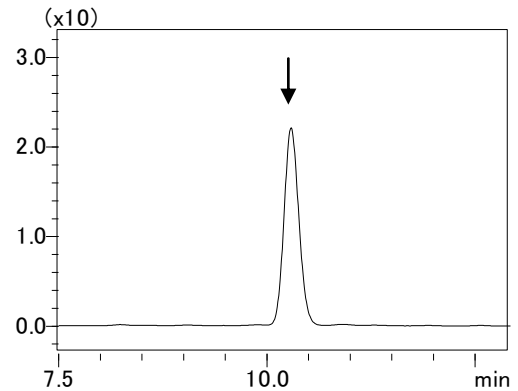
ほうれんそう ブランク試料



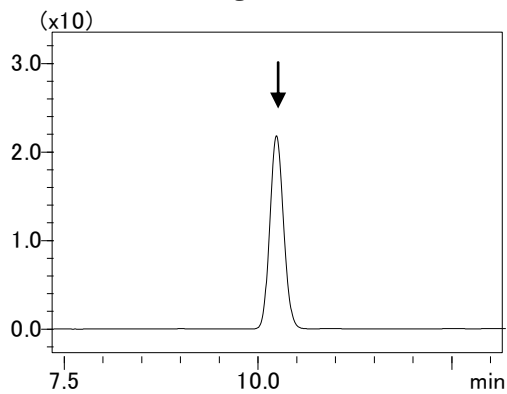
なす マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



ほうれんそう マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



溶媒標準溶液 0.005 mg/L



溶媒標準溶液 0.005 mg/L

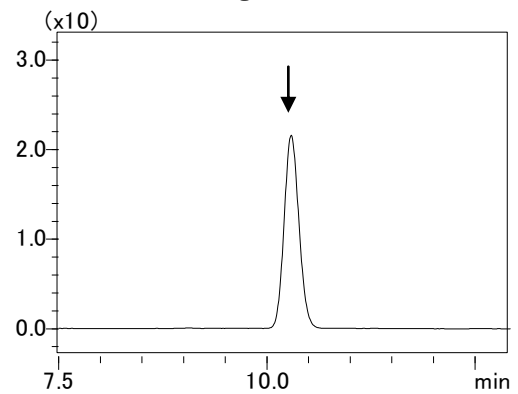
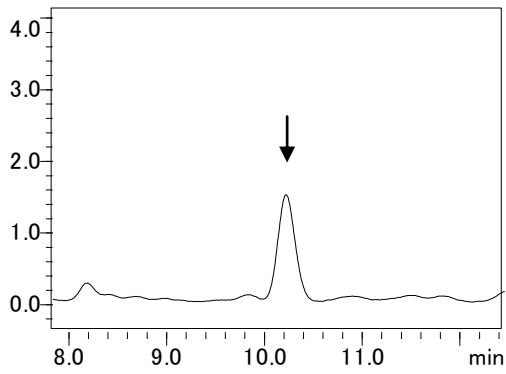


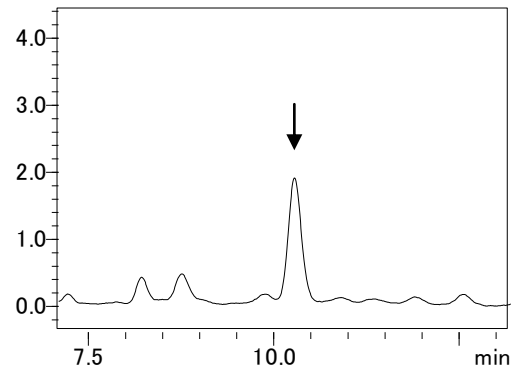
図 13.5 なすの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

図 13.6 ほうれんそうの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

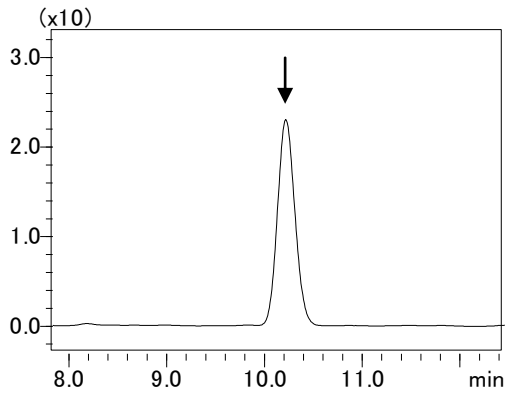
オレンジ ブランク試料



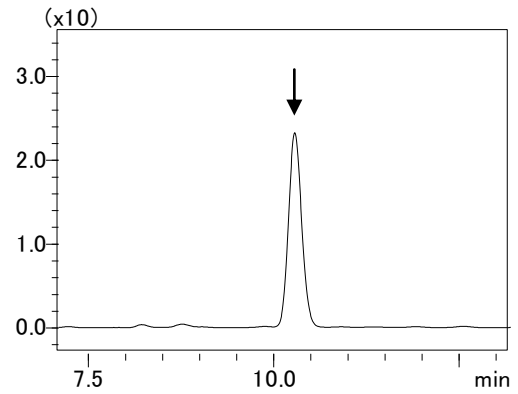
りんご ブランク試料



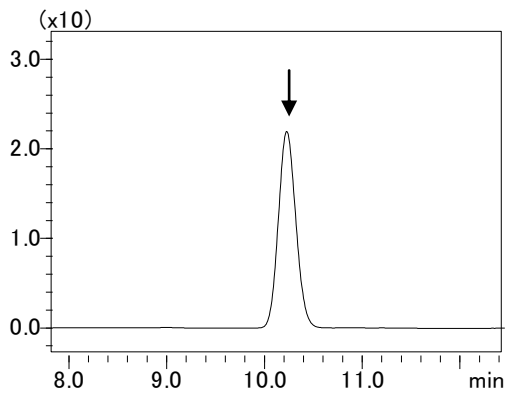
オレンジ マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



りんご マトリックス添加標準溶液(0.005 mg/L)



溶媒標準溶液 0.005 mg/L



溶媒標準溶液 0.005 mg/L

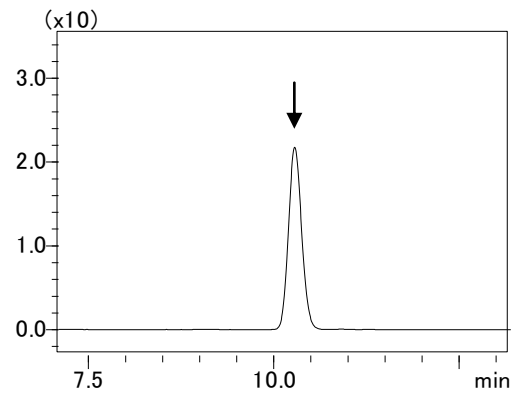
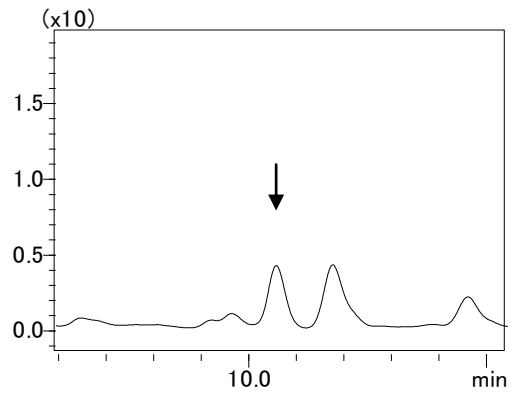


図 13.7 オレンジの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

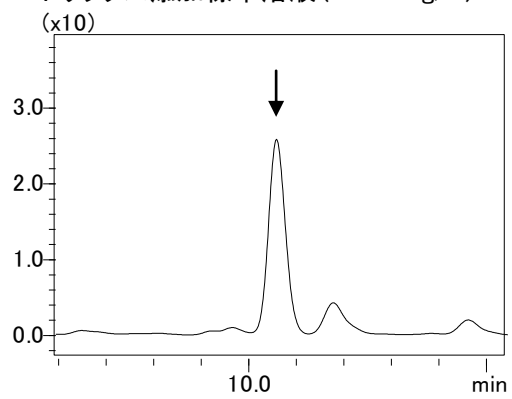
図 13.8 りんごの HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)



茶 ブランク試料



茶 マトリックス添加標準溶液 (0.005 mg/L)



溶媒標準溶液 0.005 mg/L

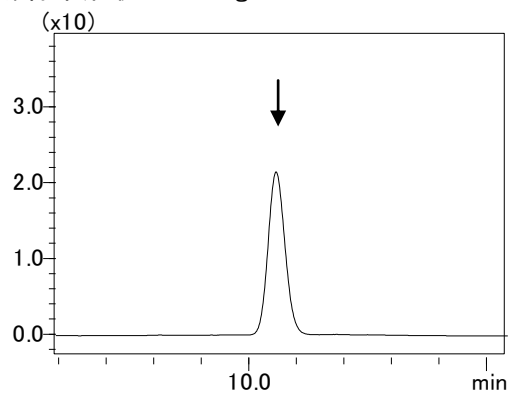


図 13\_9 茶の HPLC-FL のクロマトグラム  
(試料中 0.01 mg/kg 相当)

LC-MS/MS測定における定量限界濃度の代表的なクロマトグラム

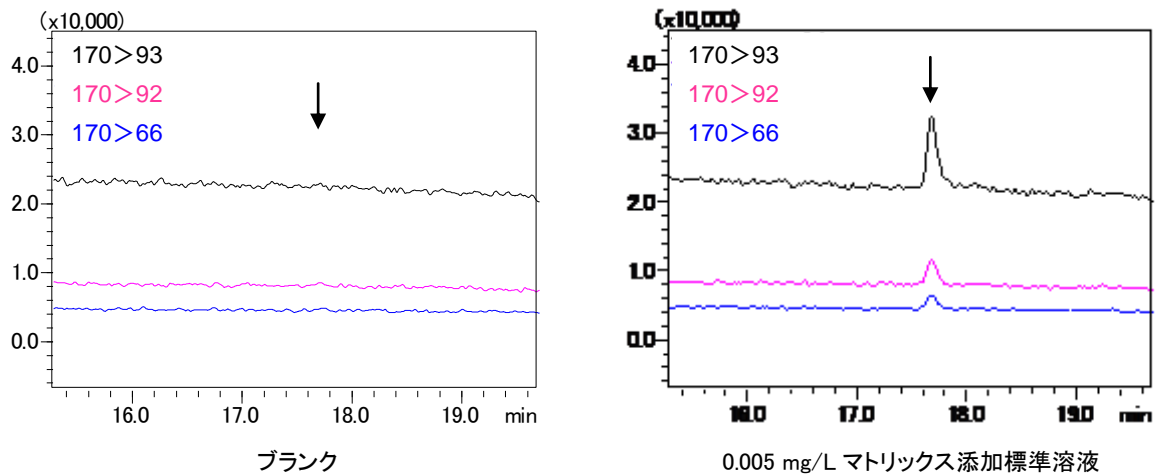


図 14.1 玄米の LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)

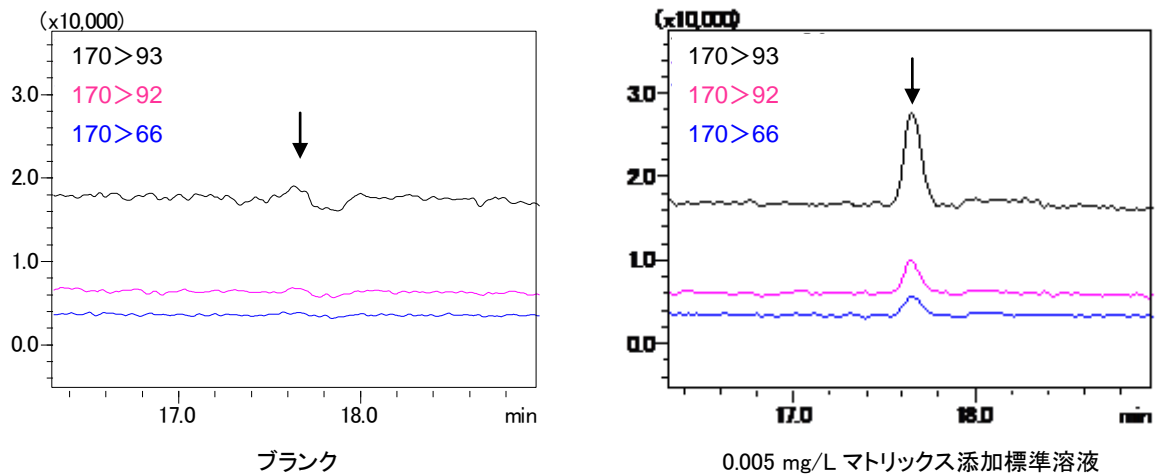


図 14.2 とうもろこしの LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)

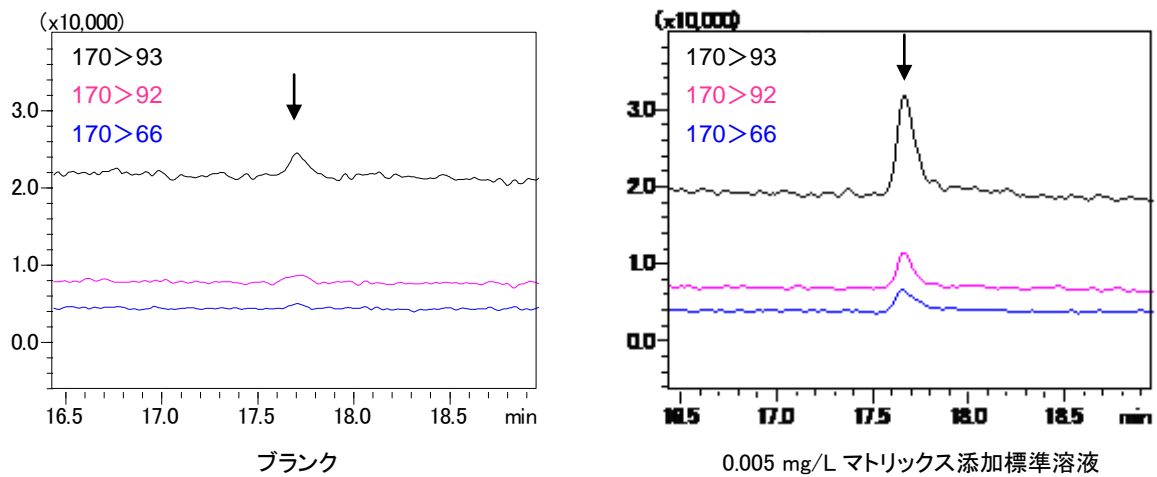


図 14.3 大豆の LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)

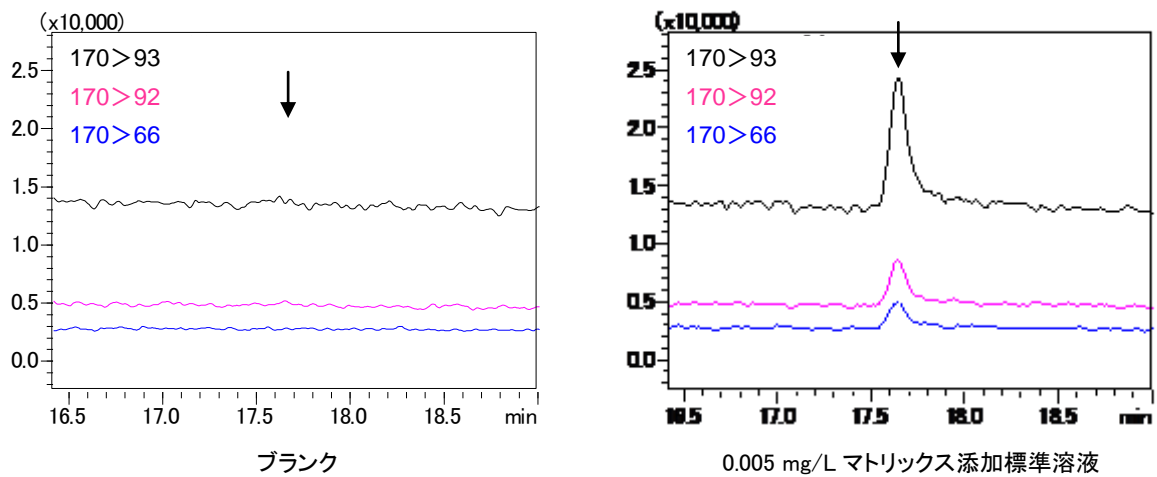


図 14\_4 ばれいしょの LC-MS/MS マスクロマトグラム (試料中 0.01 mg/kg 相当)

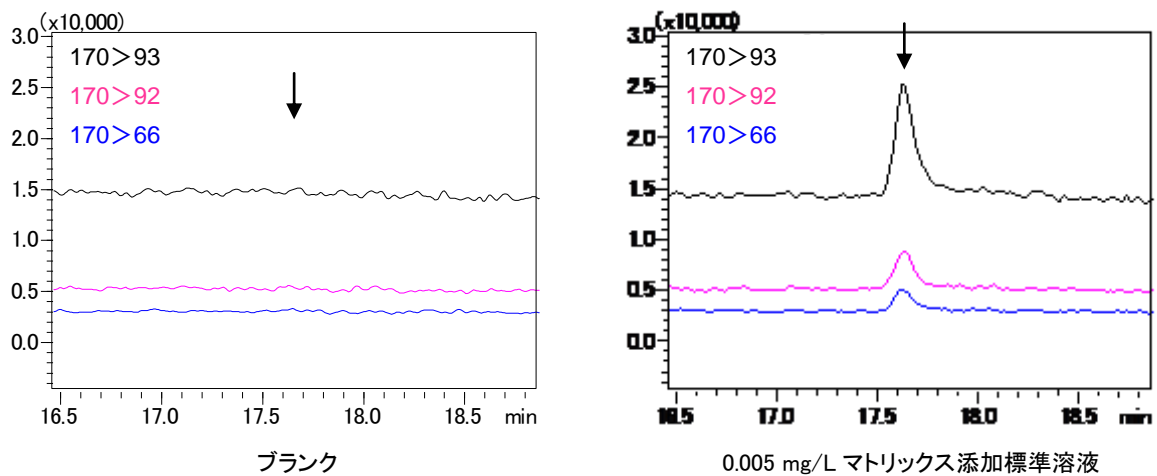


図 14\_5 キャベツの LC-MS/MS マスクロマトグラム (試料中 0.01 mg/kg 相当)

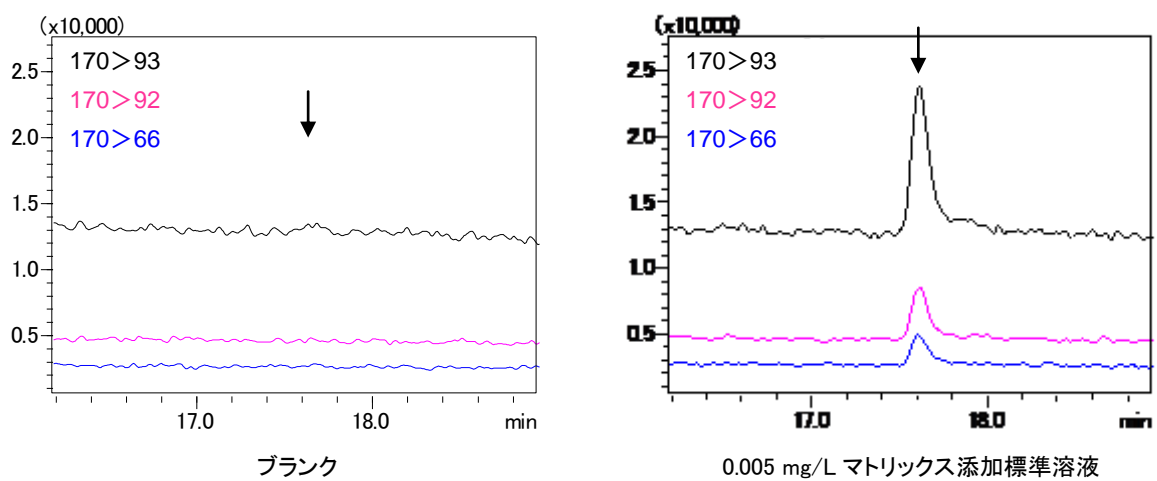
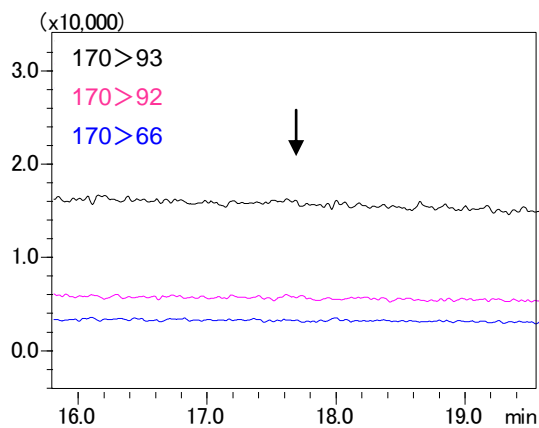
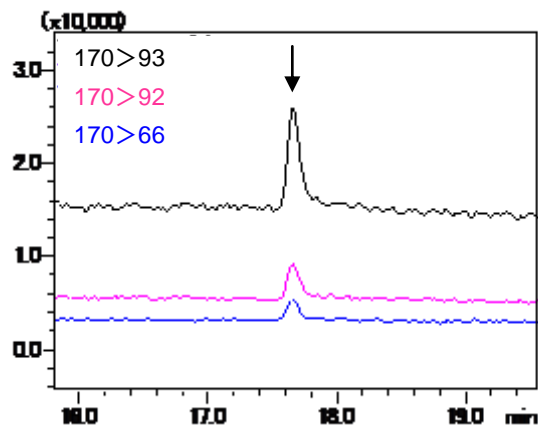


図 14\_6 なすの LC-MS/MS マスクロマトグラム (試料中 0.01 mg/kg 相当)

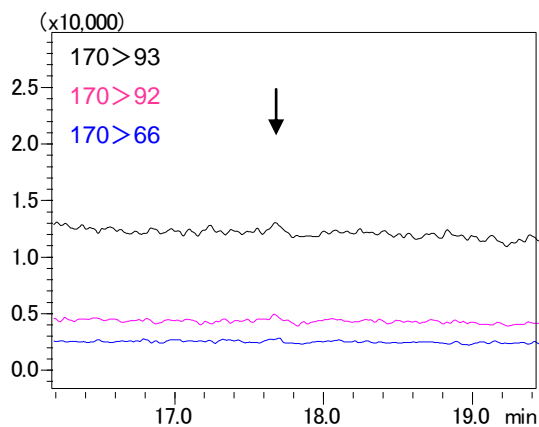


ブランク

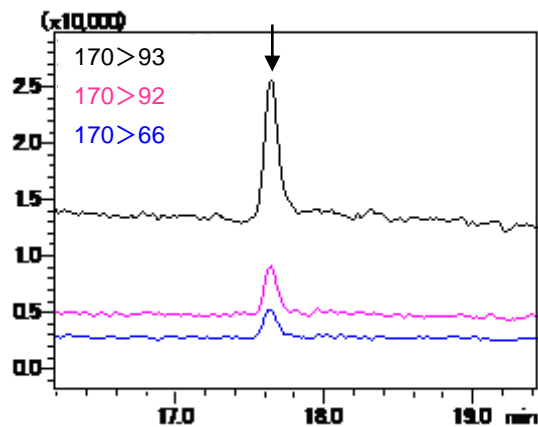


0.005 mg/L マトリックス添加標準溶液

図 14\_7 ほうれんそうの LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)

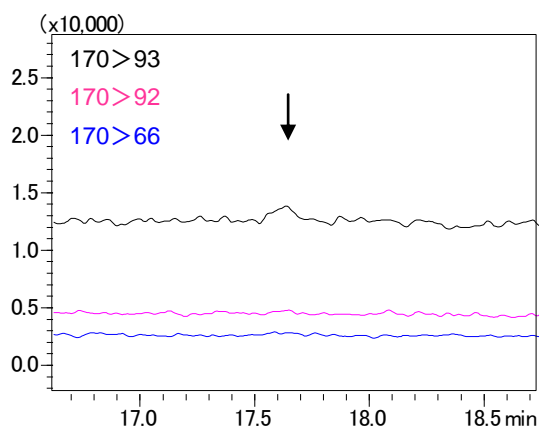


ブランク

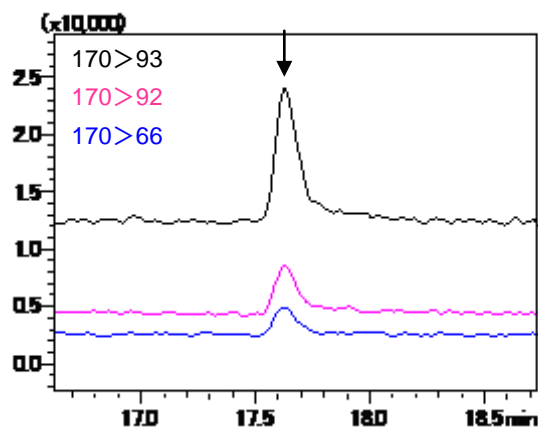


0.005 mg/L マトリックス添加標準溶液

図 14\_8 オレンジの LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)

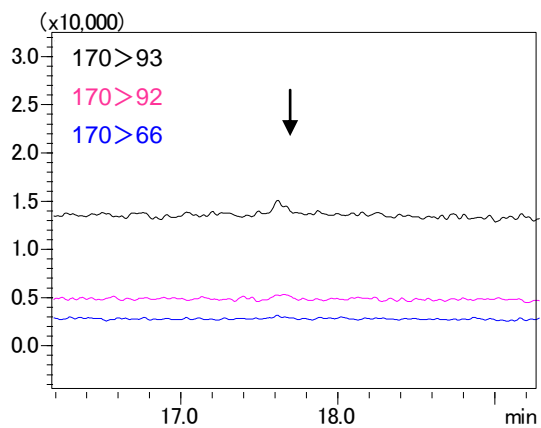


ブランク

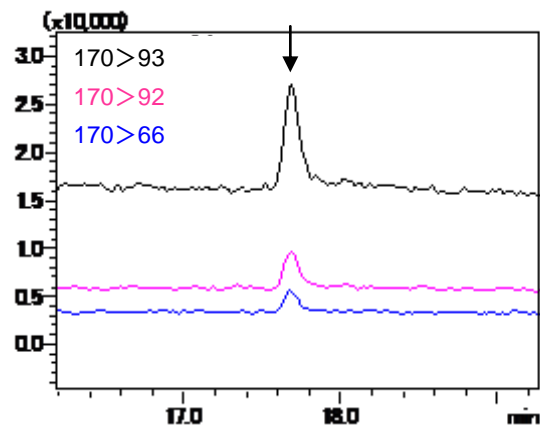


0.005 mg/L マトリックス添加標準溶液

図 14\_9 りんごの LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)



ブランク



0.005 mg/L マトリックス添加標準溶液

図 14\_10 茶の LC-MS/MS マスクロマトグラム(試料中 0.01 mg/kg 相当)