

LC-MS / MS による畜水産物およびはちみつ中の4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤分析法

| | |
|-------|----------------------------------|
| 誌名 | 食品衛生学雑誌 |
| ISSN | 00156426 |
| 著者名 | 齋藤,静夏 坂井,隆敏 根本,了 松田,りえ子 |
| 発行元 | [日本食品衛生学会] |
| 巻/号 | 52巻4号 |
| 掲載ページ | p. 244-250 |
| 発行年月 | 2011年8月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

LC-MS/MS による畜水産物およびはちみつ中の
4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤分析法

(平成 23 年 2 月 22 日受理)

齊藤 静夏* 坂井 隆敏 根本 了 松田 りえ子

Determination of 4-Hydroxycoumarin Rodenticides in Animal Products, Fishery Products,
and Honey by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Shizuka SAITO*, Takatoshi SAKAI, Satoru NEMOTO and Rieko MATSUDA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

A sensitive and selective method for the determination of 4-hydroxycoumarin-type rodenticides (warfarin, coumatetralyl, bromadiolone, and brodifacoum) in animal products, fishery products, and honey was developed. 4-Hydroxycoumarin rodenticides were extracted with acidified acetone, and the crude extract was purified by liquid-liquid partitioning followed by PSA column cleanup. Gradient liquid chromatographic separation was performed by using an Inertsil ODS-4 column, with methanol and water containing ammonium acetate as the mobile phase. Detection was carried out on a tandem mass spectrometer with electrospray ionization in the negative mode. Average recoveries from bovine muscle, bovine liver, bovine fat, swine muscle, salmon, eel, freshwater clam, egg, milk, and honey spiked at 0.0005–0.001 mg/kg were in the range of 79–108%, and the relative standard deviations were 2–8%. The limits of quantitations of the developed method were 0.0005 mg/kg for brodifacoum, 0.001 mg/kg for warfarin, coumatetralyl, and bromadiolone.

(Received February 22, 2011)

Key words: 殺鼠剤 rodenticide; 4-ヒドロキシクマリン 4-hydroxycoumarin; ワルファリン warfarin; クマテトラリル coumatetralyl; ブロマジオロン bromadiolone; ブロディファコウム brodifacoum; 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 LC-MS/MS

緒 言

ワルファリン, クマテトラリル, ブロマジオロンおよびブロディファコウムは (Fig. 1), 4-ヒドロキシクマリン骨格を有する殺鼠剤であり, 血液凝固抑制作用を示す¹⁾. これらの 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤は養豚場などで広く使われており, 豚などの家畜や野生動物の誤食による中毒事例が報告されている^{1), 2)}. わが国では 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤のうち, ワルファリンおよびブロディファコウムについて, 農産物および畜水産物に 0.0005~0.001 ppm の暫定基準値が設定されており, 高感度な試験法が必要とされている.

これまでに 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤の分析法は, UV や蛍光検出器付き HPLC を用いた方法が多く報告されている^{2)~6)}. しかしながら, これらの方法は LC-MS (/MS) を用いた方法と比較して感度および選択性の面で劣る. 最近では LC-MS (/MS) を用いた血清⁷⁾, 血漿⁸⁾, 肝

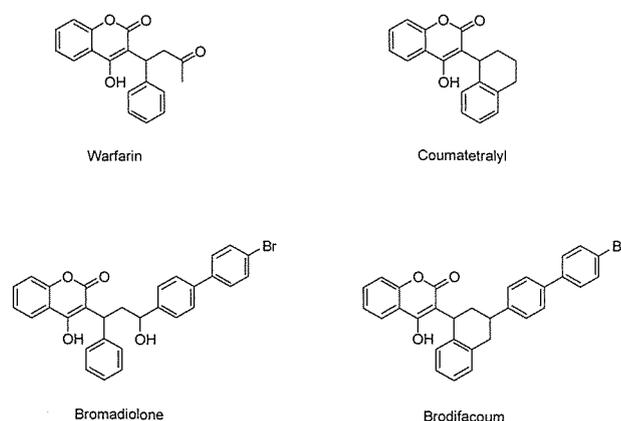


Fig. 1. Chemical structures of warfarin, coumatetralyl, bromadiolone, and brodifacoum

臓^{8), 9)}および腎臓⁹⁾中の 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤の分析法も報告されているが, 幅広い畜水産物に適用できる高感度な分析法の報告例はない. そこで本研究では, ワルファリンおよびブロディファコウムに, 基準値が未設定のクマテトラリルおよびブロマジオロンを加えた 4-ヒドロ

* 連絡先: shizsaito@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

Table 1. LC-MS/MS analysis parameters for 4-hydroxycoumarin rodenticides

| Compound | Retention time (min) | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|---------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Warfarin | 13.8 | 307 [M-H] ⁻ | 161* | 30 | 28 |
| | | | 250 | 30 | 28 |
| Coumatetralyl | 14.0 | 291 [M-H] ⁻ | 141* | 40 | 28 |
| | | | 106 | 40 | 28 |
| Bromadiolone | 18.8 | 527 [M-H] ⁻ | 250* | 60 | 35 |
| | | | 93 | 60 | 35 |
| Brodifacoum | 20.3 | 523 [M-H] ⁻ | 135* | 60 | 35 |
| | | | 81 | 60 | 42 |

* Transition used for quantitation.

キシクマリン系殺鼠剤4化合物について、畜水産物およびはちみつ中の高感度なグループ分析法を開発し、10食品への適用を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳およびはちみつを用いた。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓および豚の筋肉は、フードカッターで細切均一化した。さけおよびうなぎは、可食部（内臓は除く）をフードカッターで細切均一化した。しじみは殻を除去後、フードカッターで細切均一化した。鶏卵は殻を除去後、よくかくはん均一化した。牛乳およびはちみつは、よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

有機溶媒および試薬は、関東化学(株)または和光純薬工業(株)の残留農薬試験用試薬を用いた。ケイソウ土は、和光純薬工業(株)製のセライト545を用いた。ギ酸（特級）および酢酸（精密分析用）は、和光純薬工業(株)製を用いた。

ワルファリン、クマテトラリルおよびプロマジオロン標準品はDr. Ehrenstorfer GmbH社製の残留農薬試験用試薬を用いた。プロディファコウム標準品はRiedel-de Haën社製の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1,000 mg/L)は各標準品10 mgを精秤し、アセトニトリル10 mLに溶解して調製した。検量線作成用および添加回収試験用の混合標準溶液は、標準原液をメタノールで適宜希釈して調製した。なお、脂肪の添加回収試験においては、メタノールで調製した標準溶液(1 mg/L)をアセトンで希釈したものを添加回収試験用の混合標準溶液とした。

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(500 mg)は、Varian社製Bond Elut Jr-PSA(担体量500 mg)を用いた。

3. 装置

フードカッターはBRAUN社製multiquick professional MR 5550 M CA、ホモジナイザーはKinematica社製Polytron PT 10-35 GTを用いた。pHメーターはHoriba社製F-52を用いた。LC-MS/MSは、Waters社

製高速液体クロマトグラフAlliance 2695および同社製質量分析計Micromass Quattro Premierを使用した。

4. LC-MS/MS測定条件

4.1 LC条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒子径3 μm, GL Sciences社製), ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径1.5 mm, 長さ10 mm, 粒子径3 μm, GL Sciences社製), カラム温度: 40°C, 注入量: 5 μL, 移動相: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A液)および10 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B液), 移動相流速: 0.20 mL/min, グラジエント条件: 0分(A:B=80:20)→15分(A:B=5:95)→25分(A:B=5:95)→25.1分(A:B=0:100)→35分(A:B=0:100)→35.1分(A:B=80:20), 保持時間: Table 1に示した。

4.2 MS条件

イオン化モード: ESI(-), 測定モード: MRM (multiple reaction monitoring), キャピラリー電圧: 0.5 kV, ソース温度: 120°C, コーンガス流量: 50 L/h (N₂), 脱溶媒温度: 40°C, 脱溶媒ガス流量: 800 L/h (N₂), コリジョンガス流量: $\pm 3.1 \times 10^{-3}$ mbar (Ar), 測定イオン(m/z): Table 1に示した。

5. 試験溶液の調製

試験溶液調製方法の概略をFig. 2に示した。

5.1 抽出

試料10.0 g (脂肪の場合は5.00 g)を量り採った。はちみつの場合は試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて溶解した。これに酢酸1 mLおよびアセトン100 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。残留物を採り、アセトン50 mLを加えて上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、40°C以下で約10 mL (はちみつの場合は約30 mL)に減圧濃縮した。

これを10%塩化ナトリウム溶液100 mLおよびヘキサン-酢酸エチル(1:1)100 mLで分液漏斗に移し、5分間振とう後、有機層を採った。なお、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行った。水層を分液漏斗に戻し、ヘキサン-酢酸エチル(1:1)50

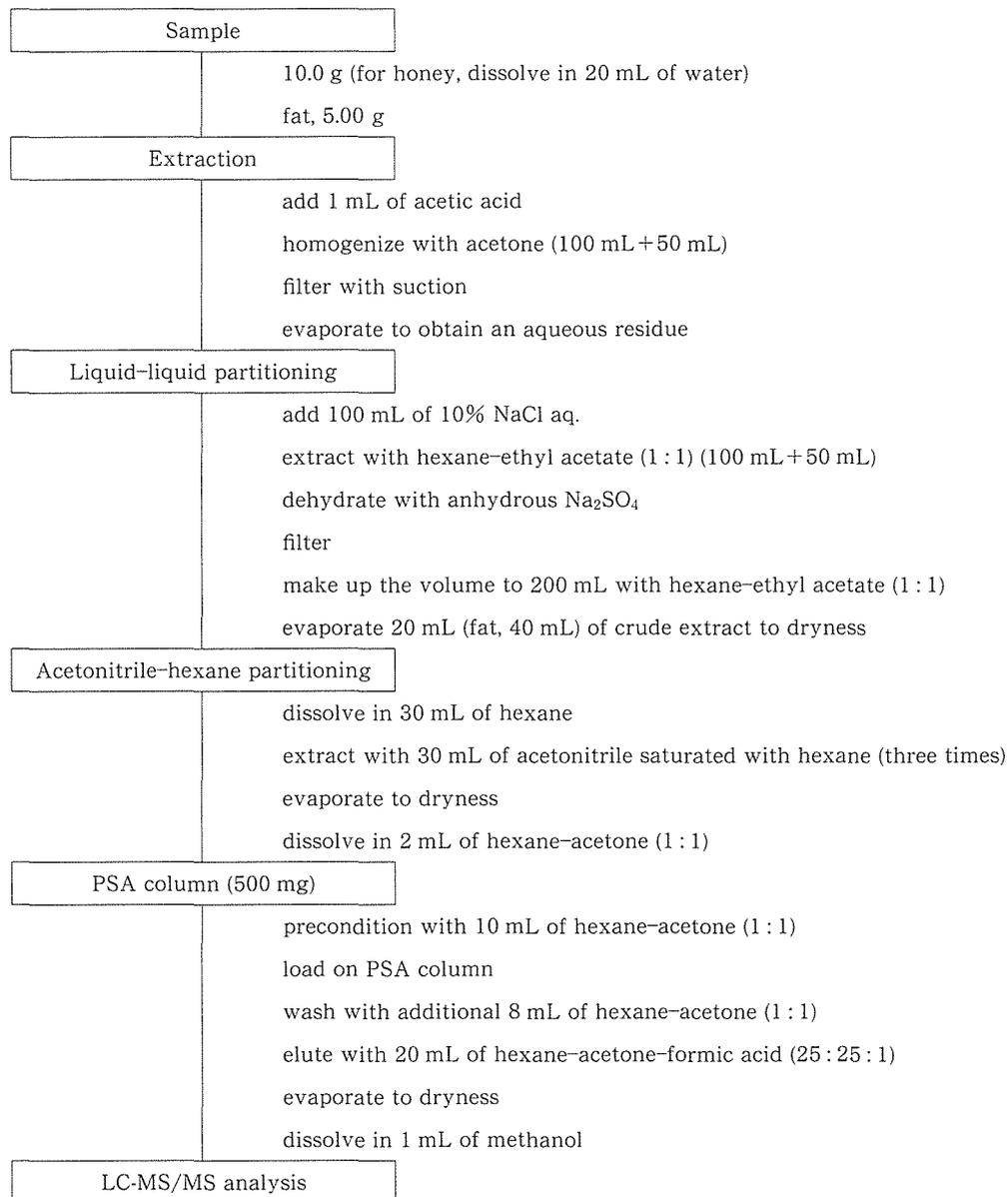


Fig. 2. Schematic representation of the analytical procedure

mLを加え、上記と同様に操作した。有機層を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて15分間放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別し、ヘキサン-酢酸エチル(1:1)を加えて、正確に200 mLとした。

抽出液20 mL(脂肪の場合は40 mL、試料1 g相当)を採り、40°C以下で約2 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を留去した。この残留物をヘキサン30 mLおよびヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで分液漏斗に移し、5分間振とう後、アセトニトリル層を採った。ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返した。アセトニトリル層を合わせ、40°C以下で約2 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を留去し、残留物をヘキサン-アセトン(1:1)2 mLに溶解した。

5.2 精製

この溶液を、あらかじめヘキサン-アセトン(1:1)10 mLで洗浄したPSAミニカラム(500 mg)に負荷し、さらにヘキサン-アセトン(1:1)8 mLを注入して流出液は捨てた。次いで、ヘキサン-アセトン-ギ酸(25:25:1)20 mLを注入し、溶出液の溶媒を40°C以下で約2 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を留去した。なお、カラムからの溶出は流速1~2 mL/minとなるよう適宜加圧した。残留物をメタノール1 mLに溶解して試験溶液(1.0 g試料/mL)とした。

6. 定 量

標準溶液0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0および1.5 µg/L(プロディファコウムは、牛の筋肉、牛の肝臓および豚の筋肉においては0.0625, 0.125, 0.25, 0.375, 0.50および

0.75 µg/L) をメタノールで調製し、それぞれ5 µL を LC-MS/MS に注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。試験溶液5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により濃度を求めた。なお、プロマジロンは各異性体のピーク面積の和を用いて定量した。

7. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試料を用いて、分析法に従って調製した試験溶液(ブランク試験溶液)100 µL をバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した。これに標準溶液100 µL を加えて溶解し、マトリックス標準溶液とした。同じ濃度のマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液を交互に測定し、ピーク面積を比較して試料マトリックスの測定への影響を評価した。

実験結果および考察

1. 測定条件の検討

1.1 LC-MS/MS

1.1.1 MS 条件

移動相として、20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液およびメタノール(1:1)混液、または20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液およびアセトニトリル(1:1)混液を用いてフローインジェクションでMS条件および測定イオンの最適化を行った。メタノール系とアセトニトリル系を比較したところ、生成イオンや感度に大きな違いは見られなかった。検討した4化合物は、ESI(+)およびESI(-)の両モードで測定可能であったが、ESI(-)での測定のほうが高いS/N比が得られた。コーン電圧について10~70 Vの範囲で10 V刻みで検討したところ、4化合物いずれも脱プロトン化分子[M-H]⁻が観察され、プリカーサーイオンに設定した。また、コリジョンエネルギーについて7~56 eVの範囲で7 eV刻みで検討し、観察されたプロダクトイオンの中で最も強度の大きいイオンを定量イオン、2番目に大きいイオンを定性イオンとした(Table 1)。

1.1.2 LC 条件

まず、分析カラムの検討を行った。酢酸アンモニウム溶液およびアセトニトリル混液、または酢酸アンモニウム溶液およびメタノール混液を用いて、Xterra MS C18 (Waters社製)、Atlantis dC18 (Waters社製)およびInertsil ODS-4 (GL Sciences社製)を比較した。その結果、Inertsil ODS-4で良好な測定感度およびピーク形状が得られた。次に、移動相条件を検討した。酢酸アンモニウム溶液およびアセトニトリル混液と、酢酸アンモニウム溶液およびメタノール混液を検討した結果、検討したすべての化合物でメタノールを用いたほうが高いピーク強度が得られた。また、酢酸アンモニウムの濃度について5, 10, 20 mmol/Lを比較したところ、10 mmol/Lでプロマジロンおよびプロディファコウムのピーク強度が最大となった。クマテトラリルおよびワルファリンは検討した濃度ではピーク強度に大きな差は見られなかった。

これらの結果から、分析カラムにはInertsil ODS-4、移

動相には10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液および10 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液を用いて測定を行うこととした。

標準溶液(10 µg/L)と鶏卵などのブランク試験溶液を交互に測定し、繰り返し測定に対するマトリックスの影響について検討した。その結果、検討した4化合物の中で最も溶出の遅いプロディファコウムにおいて、繰り返し注入によりピーク面積が徐々に減少し、最大で1回目注入時の約60%にまで減少した。これはカラム洗浄が不十分であり、直前に測定したマトリックスのキャリアオーバーが原因と推測された。測定条件を検討した結果、プロディファコウムが溶出した後に移動相B液:100%でのカラム洗浄を10分間行くと、プロディファコウムのピーク面積値の低下が見られなくなった。10分間のカラム洗浄を加えた測定条件で、混合標準溶液(10 µg/L)と鶏卵のブランク試験溶液をこの順番で交互に5回測定したところ、検討した4化合物のピーク面積値の変動(RSD)はいずれも2~3%となり、良好な再現性が得られた。

1.2 検量線

検討した4化合物は、添加回収試験で定量に用いた濃度範囲で良好な直線性($r \geq 0.999$)を示した。また、濃度範囲を0.5~20 µg/Lと高濃度側に延長しても良好な直線性($r > 0.999$)が得られた。

2. 試験溶液調製方法の検討

2.1 抽出溶媒

検討した化合物はいずれも酸性化合物であるため、鶏卵などの塩基性を示す食品からはアセトンのみでは抽出されにくいと予想された。食品のpHによらず抽出可能な方法とするため、酸を加えてアセトンで抽出を行うこととした。

抽出時に加える酸について、塩酸、ギ酸および酢酸を検討した。牛の肝臓10.0 gに2 mol/L 塩酸1 mLまたはギ酸1 mLを加えた後、アセトン(1回目100 mL, 2回目50 mL)で抽出したところ、赤色素が大量に抽出された。これに対して、酢酸1 mLを添加して抽出した場合は色素の抽出量が非常に少なかった。鶏卵抽出液(アセトン除去後)のpHを測定したところ、アセトンのみで抽出した場合は塩基性(pH 9以上)を示したが、酢酸を1 mL加えて抽出した場合にはpH 3となり、弱酸性化合物(pK_a 4~5)である4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤の抽出が可能と考えられた。幅広い食品に適用可能な分析法とするため、抽出方法をすべての食品で統一し、酢酸1 mLを加えた後、アセトン(1回目100 mL, 2回目50 mL)で行うこととした。この抽出溶媒を用いて牛の脂肪をホモジナイズしたところ、均一に分散したことから、脂肪においても本抽出溶媒で抽出可能と考えられた。

2.2 転溶溶媒

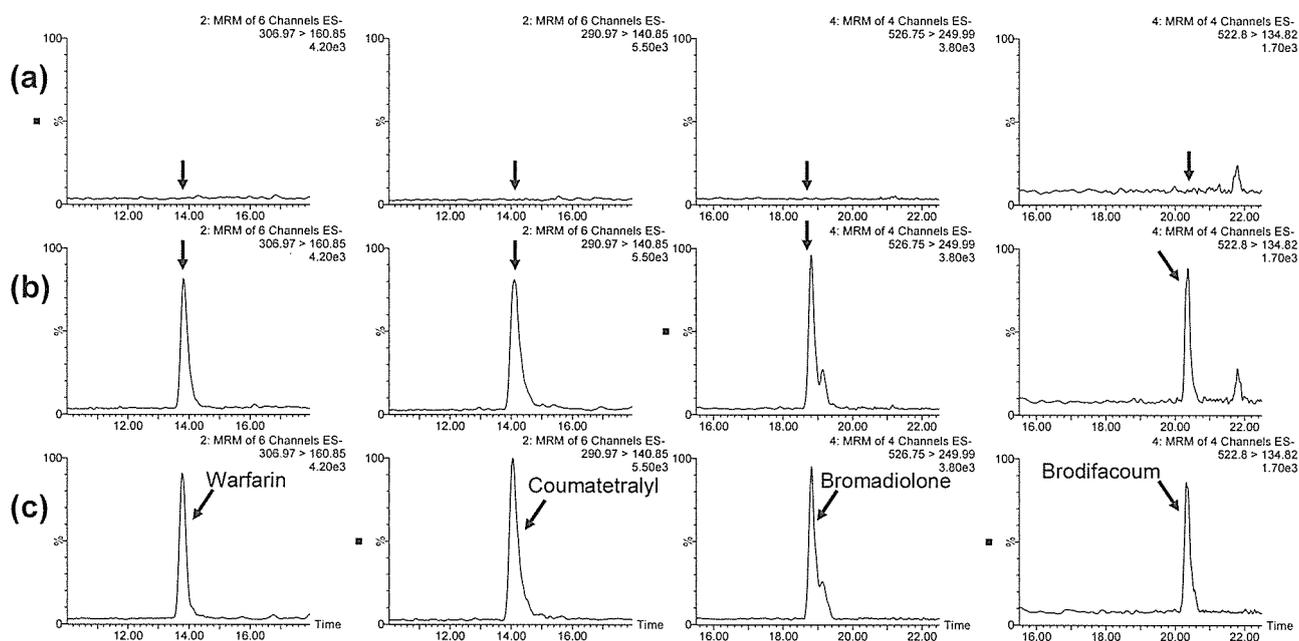
ヘキサン、ヘキサン-酢酸エチル(1:1)および酢酸エチルを用いて、10%塩化ナトリウム溶液からの回収率を比較した(Table 2)。ヘキサンではワルファリン、プロマジ

Table 2. Extraction rates of 4-hydroxycoumarin rodenticides from 100 mL of 10% sodium chloride aqueous solution

| Compound | Extraction rate (% , n=1) | | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|----------------|-------|------------------------------|----------------|-------|-----------------|----------------|-------|
| | Hexane | | | Hexane-ethyl acetate (1 : 1) | | | Ethyl acetate | | |
| | 1st (100 mL) | 2nd (50 mL) | Total | 1st (100 mL) | 2nd (50 mL) | Total | 1st (100 mL) | 2nd (50 mL) | Total |
| Warfarin | 7 | 5 | 12 | 103 | 1 | 104 | 102 | 1 | 103 |
| Coumatetralyl | 89 | 6 | 95 | 99 | 1 | 100 | 102 | 0 | 102 |
| Bromadiolone | 2 | 1 | 3 | 98 | 0 | 98 | 55 | 0 | 55 |
| Brodifacoum | 66 | 2 | 68 | 100 | 1 | 101 | 89 | 1 | 90 |

Table 3. Recoveries of 4-hydroxycoumarin rodenticides from PSA column

| Compound | Recovery (% , n=1) | | | | | | |
|---------------|------------------------|--------|--|----------|----------|----------|-------|
| | Hexane-acetone (1 : 1) | | Hexane-acetone-formic acid (25 : 25 : 1) | | | | Total |
| | 0-15 mL | 0-5 mL | 5-10 mL | 10-15 mL | 15-20 mL | 20-25 mL | |
| Warfarin | 0 | 82 | 13 | <1 | <1 | 0 | 95 |
| Coumatetralyl | 0 | 101 | <1 | <1 | 0 | 0 | 101 |
| Bromadiolone | 0 | 86 | <1 | 0 | 0 | 0 | 86 |
| Brodifacoum | 0 | 98 | <1 | 0 | 0 | 0 | 98 |

**Fig. 3.** Chromatograms of (a) extract of blank bovine liver, (b) extract of bovine liver spiked with 0.001 mg/kg (0.0005 mg/kg for brodifacoum) of 4-hydroxycoumarin rodenticides, and (c) 1 µg/L (0.5 µg/L for brodifacoum) standard solution of 4-hydroxycoumarin rodenticides

オロンおよびブロディファコウム，酢酸エチルではブロマジオンが低回収率であったが，ヘキサン-酢酸エチル(1 : 1)では検討したすべての化合物で良好な回収率が得られた。ブロマジオンは，飽和食塩水を用いた場合や酸性条件下においても酢酸エチルでは90%以上の回収率が得られず，ヘキサン-酢酸エチル(1 : 1)よりも酢酸エチルを用いた場合のほうが回収率が低い原因は不明であった。ヘキサン-酢酸エチル(1 : 1)では，4化合物いずれも，1回目(100 mL)の抽出で98%以上の回収率が得られたが，

試料によってはエマルジョン形成による抽出率低下のおそれがあるため，10%塩化ナトリウム溶液100 mLからヘキサン-酢酸エチル(1 : 1)で2回(100 mL, 50 mL)抽出を行うこととした。

2.3 精製方法

2.3.1 PSA ミニカラム

PSA ミニカラム(500 mg)での精製を検討した結果，検討した4化合物はヘキサン-アセトン(1 : 1)15 mLでは溶出せず，ヘキサン-アセトン-ギ酸(25 : 25 : 1)10 mLで

Table 4. Recoveries of 4-hydroxycoumarin rodenticides from animal products, fishery products, and honey

| Compound | Samples | MRL (mg/kg) | Spiked level (mg/kg) | Recovery (% mean, n=5) | RSD (%) | Peak area ratio ^{a)} |
|---------------|-----------------|----------------|-------------------------|---------------------------|---------|----------------------------------|
| Warfarin | Bovine muscle | 0.001 | 0.001 | 98 | 4 | 0.93 |
| | Bovine fat | 0.001 | 0.001 | 98 | 4 | 0.99 |
| | Bovine liver | 0.001 | 0.001 | 102 | 3 | 1.00 |
| | Swine muscle | 0.001 | 0.001 | 92 | 4 | 0.92 |
| | Salmon | 0.001 | 0.001 | 96 | 3 | 0.94 |
| | Eel | 0.001 | 0.001 | 99 | 4 | 0.99 |
| | Freshwater clam | 0.001 | 0.001 | 91 | 2 | 0.94 |
| | Egg | 0.001 | 0.001 | 97 | 7 | 1.07 |
| | Milk | 0.001 | 0.001 | 98 | 4 | 0.98 |
| | Honey | 0.001 | 0.001 | 108 | 2 | 0.91 |
| Coumatetralyl | Bovine muscle | — | 0.001 | 95 | 4 | 0.98 |
| | Bovine fat | — | 0.001 | 93 | 4 | 0.94 |
| | Bovine liver | — | 0.001 | 93 | 4 | 1.00 |
| | Swine muscle | — | 0.001 | 98 | 5 | 1.03 |
| | Salmon | — | 0.001 | 99 | 3 | 0.96 |
| | Eel | — | 0.001 | 97 | 3 | 0.98 |
| | Freshwater clam | — | 0.001 | 79 | 4 | 0.80 |
| | Egg | — | 0.001 | 94 | 2 | 1.01 |
| | Milk | — | 0.001 | 95 | 3 | 0.96 |
| | Honey | — | 0.001 | 104 | 3 | 1.01 |
| Bromadiolone | Bovine muscle | — | 0.001 | 86 | 4 | 0.97 |
| | Bovine fat | — | 0.001 | 89 | 3 | 0.92 |
| | Bovine liver | — | 0.001 | 84 | 4 | 0.88 |
| | Swine muscle | — | 0.001 | 90 | 6 | 1.04 |
| | Salmon | — | 0.001 | 91 | 6 | 0.98 |
| | Eel | — | 0.001 | 88 | 8 | 1.02 |
| | Freshwater clam | — | 0.001 | 87 | 7 | 0.85 |
| | Egg | — | 0.001 | 95 | 6 | 0.93 |
| | Milk | — | 0.001 | 89 | 6 | 0.96 |
| | Honey | — | 0.001 | 92 | 7 | 1.09 |
| Brodifacoum | Bovine muscle | 0.0005 | 0.0005 | 92 | 5 | 0.97 |
| | Bovine fat | 0.001 | 0.001 | 84 | 2 | 0.91 |
| | Bovine liver | 0.0005 | 0.0005 | 86 | 5 | 0.93 |
| | Swine muscle | 0.0005 | 0.0005 | 98 | 6 | 1.04 |
| | Salmon | 0.001 | 0.001 | 94 | 3 | 0.95 |
| | Eel | 0.001 | 0.001 | 91 | 5 | 0.88 |
| | Freshwater clam | 0.001 | 0.001 | 86 | 2 | 0.87 |
| | Egg | 0.001 | 0.001 | 93 | 5 | 0.91 |
| | Milk | 0.001 | 0.001 | 91 | 3 | 1.00 |
| | Honey | 0.001 | 0.001 | 108 | 3 | 0.97 |

^{a)} Matrix standard/standard in solvent

良好な回収率が得られた (Table 3). ワルファリンおよびクマテトラリルは、わずかではあるものの10~20 mLの画分にも溶出が見られたため、ヘキサン-アセトン(1:1) 10 mLで洗浄後、ヘキサン-アセトン-ギ酸(25:25:1) 20 mLで溶出することとした。

2.3.2 アセトニトリル-ヘキサン分配

脱脂方法としてアセトニトリル-ヘキサン分配を検討した。各標準品0.1 µgをヘキサン30 mLおよびヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで分液漏斗に移し、5分間振とう後、アセトニトリル層を採った。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、同様の操作を2回行い、各化合物の回収率を求めた。その結果、いずれの化合物も良好な回収率(>94%)が得られたことから、アセト

ニトリル-ヘキサン分配で脱脂を行うこととした。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳およびはちみつを用いて、5併行の添加回収試験を行った。添加濃度はTable 4に示した。抽出操作は、標準溶液を添加してから30分後に開始した。なお、脂肪以外の食品ではメタノールで調製した標準溶液を添加した。脂肪においては、試料がメタノール溶液と混合しなかったため、メタノールで調製した混合標準溶液(1 mg/L)をアセトンで希釈した溶液を添加した。

検討した10食品では、真度79~108%、併行精度2~8%の良好な結果が得られた (Table 4)。また、いずれの食品においてもブランク試料に定量を妨害するピークはな

かった (Fig. 3). 溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を Table 4 に示した. ワルファリンは試料マトリックスの大きな影響を受けることなく測定が可能であった. クマテトラリル, ブロマジオンおよびプロディファコウムは, しじみで若干の負のマトリックス効果が見られたものの, 試験法の評価には大きな影響なく測定可能と考えられた. 本法を用いた試料中の定量限界は, いずれの食品においても, ブロディファコウムは 0.0005 mg/kg, ワルファリン, クマテトラリルおよびブロマジオンは 0.001 mg/kg であった.

ま と め

畜水産物およびはちみつ中の 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤 (ワルファリン, クマテトラリル, ブロマジオン, プロディファコウム) の高感度な分析法を開発した. 4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤を畜水産物およびはちみつから酢酸酸性下アセトンで抽出し, 酢酸エチルおよびヘキサンの混液で転溶後, アセトニトリル/ヘキサン分配および PSA ミニカラムで精製して LC-MS/MS で測定を行った. 牛の筋肉, 牛の肝臓, 牛の脂肪, 豚の筋肉, さけ, うなぎ, しじみ, 鶏卵, 牛乳およびはちみつの 10 食品を用いて, 添加濃度 0.0005 または 0.001 mg/kg で 5 併行の添加回収試験を行った結果, 真度 79~108%, 併行精度 2~8% の良好な結果が得られた.

本研究は「平成 22 年度厚生労働省医薬食品局食品安全部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事業」により実施した.

文 献

1) Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V., Nikolov, Y. Anti-coagulant rodenticide intoxication in animals—A review. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **32**, 237-243 (2008).

2) Nojiri, T., Hashidzume, N., Satoh, T., Mori, G., Yamachi, S., Hosoi, Y. Simple, rapid determination of coumarin rodenticides in swine tissues by high-performance liquid chromatography. *Nippon Juishikai Zasshi (J. Jpn. Vet. Med. Assoc.)*, **54**, 213-216 (2001).

3) Giorgi, M., Mengozzi, G. An HPLC method for the determination of bromadiolone plasma kinetics and its residues in hen eggs. *J. Chromatogr. Sci.*, **48**, 714-720 (2010).

4) Palazoglu, M. G., Tor, E. R., Holstege, D. M., Galey, F. D. Multiresidue analysis of nine anticoagulant rodenticides in serum. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4260-4266 (1998).

5) Jin, M. C., Chen, X. H., Zhu, Y. Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in animal liver tissues by ion chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **55**, 57-61 (2007).

6) Vudathala, D., Cummings, M., Murphy, L. Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method. *J. Anal. Toxicol.*, **34**, 273-279 (2010).

7) Jin, M. C., Chen, X. H., Chen, H. P. Determination of warfarin and coumatetralyl in serum by HPLC coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, 2641-2650 (2006).

8) Vandenbroucke, V., Desmet, N., Backer, P. D., Croubels, S. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **869**, 101-110 (2008).

9) Jin, M. C., Xu, G. Z., Ren, Y. P., Chen, X. H., Xu, X. M. Identification and determination of coumatetralyl and coumafuryl in animal tissues by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Appl. Toxicol.*, **28**, 621-627 (2008).

LC-MS/MSによる畜水産物およびはちみつ中の4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤分析法（報文）

齊藤静夏* 坂井隆敏 根本 了 松田りえ子
食衛誌 52(4), 244~250 (2011)

畜水産物およびはちみつ中の4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤（ワルファリン，クマテトラリル，プロマジオロン，プロディファコウム）の高感度な分析法を開発した。4-ヒドロキシクマリン系殺鼠剤を畜水産物およびはちみつから酢酸酸性下アセトンで抽出し，酢酸エチルおよびヘキサンの混液で転溶後，アセトニトリル/ヘキサン分配およびPSA ミニカラムで精製してLC-MS/MSで測定を行った。牛の筋肉，牛の肝臓，牛の脂肪，豚の筋肉，さけ，うなぎ，しじみ，鶏卵，牛乳およびはちみつの10食品を用いて，添加濃度0.0005または0.001 mg/kgで5併行の添加回収試験を行った結果，真度79~108%，併行精度2~8%の良好な結果が得られた。本法を用いた試料中の定量限界は，いずれの食品においても，プロディファコウムは0.0005 mg/kg，ワルファリン，クマテトラリルおよびプロマジオロンは0.001 mg/kgであった。

* 国立医薬品食品衛生研究所