

融点 109.8°C) の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液 (1,000 mg/L) は、ピンドン 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。

グラファイトカーボンミニカラム (充てん量 500 mg) は、SUPELCO 社製 Supelclean ENVI-Carb (充てん量 500 mg) を用いた。シリカゲルミニカラムは、Waters 社製 Sep-Pak Vac Silica (充てん量 1,000 mg) を用いた。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 (PSA ミニカラム, 充てん量 500 mg) は、Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA (充てん量 500 mg) およびジューエルサイエンス社製 Inertsep Slim-J PSA (充てん量 500 mg) を用いた。

### 3. 装置

フードカッターは Retsch 社製 Grindomix GM200, 遠心粉碎機は Retsch 社製 ZM 200, ホモジナイザーは Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を用いた。蒸留水精製装置は、藤原製作所(株)製の超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW 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  $\mu$ m, ジューエルサイエンス社製), ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3  $\mu$ m, ジューエルサイエンス社製), カラム温度: 40°C, 注入量: 5  $\mu$ L, 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: 14.1 分

#### 4.2 MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ネガティブモード (ESI(-)), 測定モード: multiple reaction monitoring (MRM), キャピラリー電圧: 0.5 kV, ソース温度: 120°C, コーンガス: 50 L/h (N<sub>2</sub>), 脱溶媒温度: 400°C, 脱溶媒ガス: 800 L/h (N<sub>2</sub>), コリジョンガス:  $\pm 3.1 \times 10^{-3}$  mbar (Ar), 測定イオン (*m/z*): 229→116 (定量イオン, コーン電圧 50 (V), コリジョンエネルギー 35 (eV)) および 229→172 (定性イオン, コーン電圧 50 (V), コリジョンエネルギー 21 (eV))

### 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

##### 5.1.1 穀類, 豆類および種実類の場合

試料 10.0 g を量り採り, 添加回収試験において標準溶液を添加する場合は 10  $\mu$ g/L 標準溶液 1 mL を添加して

30 分間放置した。これに, 水 20 mL を加えてさらに 30 分間放置した。

アセトン 100 mL を加えて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吸引ろ過した。残留物を採り, アセトン 50 mL を加えて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, アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

抽出液 40 mL (試料 2.0 g 相当) を採り, 40°C 以下で約 6 mL に濃縮した。これを 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL およびヘキサン 100 mL で分液漏斗に移し, 5 分間振とうした。ヘキサン層を採り, 水層にヘキサン 50 mL を加え, 5 分間振とうした。ヘキサン層を合わせ, 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, 40°C 以下で溶媒を除去した。

残留物にヘキサン 30 mL を加え, ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ, 40°C 以下で溶媒を除去し, 残留物をヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 2 mL に溶解した。

##### 5.1.2 果実, 野菜および茶の場合

果実および野菜の場合は, 試料 20.0 g を量り採り, 添加回収試験において標準溶液を添加する場合は 20  $\mu$ g/L 標準溶液 1 mL を添加して 30 分間放置した。茶の場合は, 試料 5.00 g を量り採り, 添加回収試験において標準溶液を添加する場合は 10  $\mu$ g/L 標準溶液 0.5 mL を添加して 30 分間放置し, これに水 20 mL を加えてさらに 30 分間放置した。

アセトン 100 mL を加えて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吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えて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, アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

抽出液 20 mL (茶の場合は 80 mL, 試料 2.0 g 相当) を採り, 40°C 以下で約 3 mL (茶の場合は約 12 mL) に濃縮した。これを 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL およびヘキサン 100 mL で分液漏斗に移し, 5 分間振とうした。ヘキサン層を採り, 水層にヘキサン 50 mL を加え, 5 分間振とうした。ヘキサン層を合わせ, 適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 15 分間放置した。無水硫酸ナトリウムをろ別後, 40°C 以下で溶媒を除去し, 残留物をヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 2 mL に溶解した。

### 5.2 精製

#### 5.2.1 果実および野菜の場合

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) の下にシリカゲルミニカラム (1,000 mg) を連結したカラムを, ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 10 mL で洗浄した。この連結カラムに, 5.1 で得られた溶液を負荷し, さらにヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 18 mL を注入した。負荷液を含む全溶出液の溶媒を 40°C 以下で除去し, 残留物をメタノールに溶解して正確に 1 mL としたものを試験溶液 (2.0 g 試料/mL) とした。

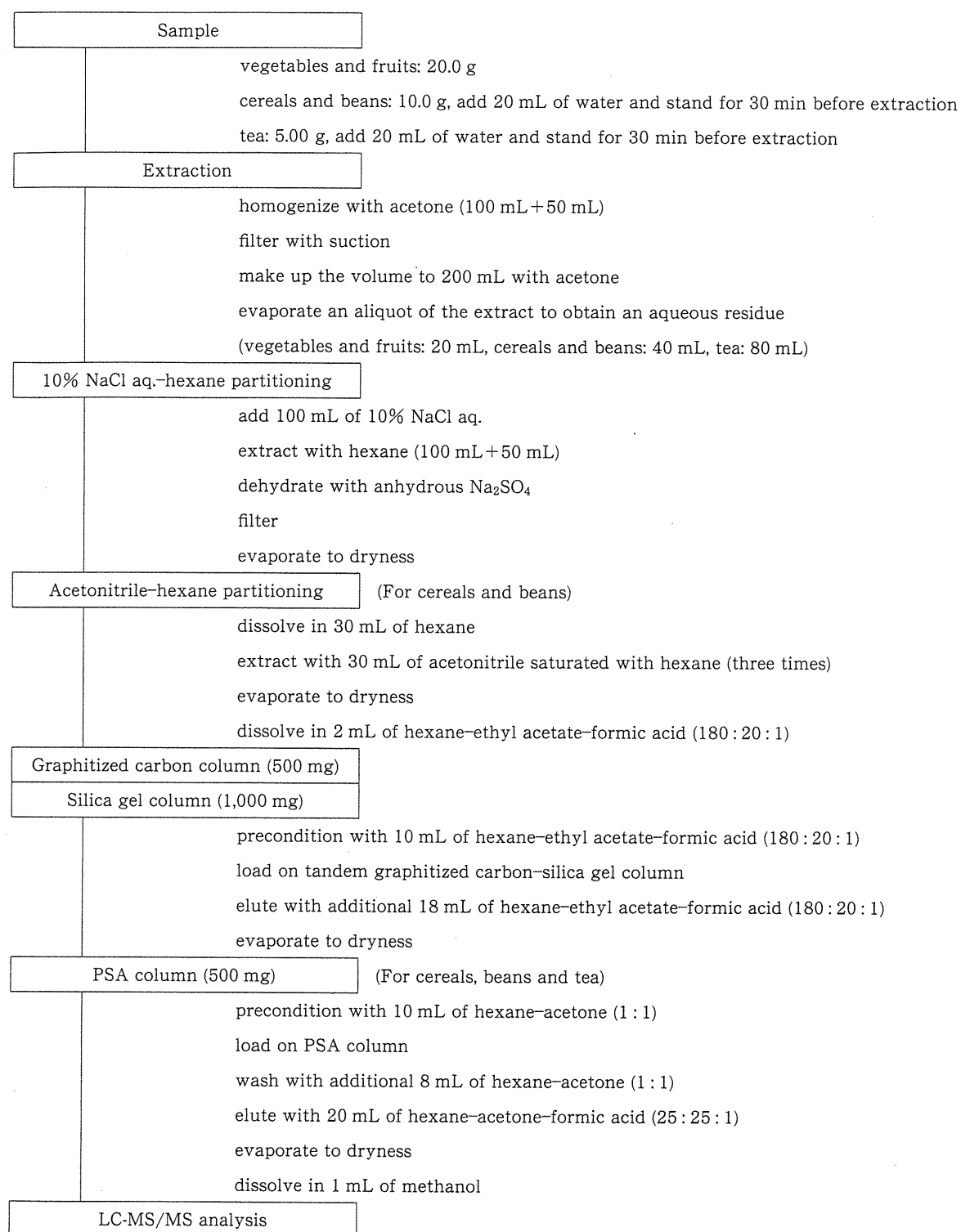


Fig. 2. Schematic representation of the analytical procedure

### 5.2.2 穀類, 豆類, 種実類および茶の場合

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) の下にシリカゲルミニカラム (1,000 mg) を連結したカラムを, ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 10 mL で洗浄した。この連結カラムに, 5.1 で得られた溶液を負荷し, さらにヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 18 mL を注入した。負荷液を含む全溶出液の溶媒を 40°C 以下で除去し, 残留物をヘキサン-アセトン (1:1) 2 mL に溶解した。

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 (Bond Elut Jr-PSA, 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 以下で除去した。残留物をメタノールに溶解し, 正確に 1 mL としたものを試験溶液 (2.0 g 試料/mL) とした。

## 6. 定 量

標準溶液 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 および 3.0  $\mu\text{g/L}$  をメタノールで調製し、それぞれ 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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。

## 7. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液（玄米，大豆，ばれいしょ，ほうれんそう，キャベツ，りんご，オレンジ，トマト，きゅうりおよび茶の各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）100  $\mu\text{L}$  をバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の標準溶液 100  $\mu\text{L}$  に溶解してマトリックス標準溶液とした。マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液をこの順番で交互に各 2 回測定し、溶媒標準溶液のピーク面積の平均値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の平均値の比を求め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

ピンドンは GC-MS による測定では十分な感度が得られず、基準値レベルでの測定はできなかった。高感度な分析法を開発するため、LC-MS/MS を用いた測定を検討した。移動相として、20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (1:1) または 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1:1) 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の移動相では、生成イオンや感度に大きな違いは見られなかった。ESI (+) および ESI (-) での測定を検討した結果、ESI (-) で高い S/N 比が得られた。コーン電圧について 20~60 (V) の範囲で 10 V 刻みで検討した結果、プリカーサーイオンとして脱プロトン化分子  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  229 が観察され、50 V で強度が最大となった。また、コリジョンエネルギーについて 7~49 (eV) の範囲で 7 eV 刻みで検討した結果、プロダクトイオンとして  $m/z$  116, 144, 172 などが観察され、強度の大きい  $m/z$  116 (コリジョンエネルギー 35 eV) を定量イオン、 $m/z$  172 (コリジョンエネルギー 21 eV) を定性イオンとした。キャピラリー電圧について、0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 kV を検討した結果、0.5 kV でイオン強度が最大となった。よって、測定は ESI (-) で行い、キャピラリー電圧は 0.5 kV を用いることとした。

##### 1.1.2. LC 条件

酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル、または酢酸アンモニウム溶液-メタノールを用いて、分析カラムの検討を行った。ピンドンは ODS カラムではテーリングしやすく、酸性条件でもピーク形状は改善されなかった。ピンド

ンは  $\beta$ -ジケトン構造を有するため、金属不純物との結合がテーリングの原因と推測された。そこで、種々の ODS カラムを検討したところ、残存シラノール基および金属不純物が少ない Inertsil ODS-4 (ジエールサイエンス社製) で良好なピーク形状が得られ、測定感度が向上した。このカラムを用いて、さらに移動相条件を検討した結果、アセトニトリルよりもメタノールを含む移動相のほうが保持時間は長くなったが、ピーク形状が改善し、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 でピーク強度が最大となった。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。

### 1.2 検量線

添加回収試験で定量に用いた濃度範囲である 0.25~3.0  $\mu\text{g/L}$  で、検量線を作成したところ、良好な直線性 ( $r=0.999$ ) が得られた。また、濃度範囲を高濃度側に延長した 0.5~20  $\mu\text{g/L}$  の範囲においても、検量線は良好な直線性 ( $r=0.999$ ) が認められた。

### 2. 試験溶液調製方法の検討

#### 2.1 抽出溶媒

残留農薬の通知試験法では、抽出溶媒として幅広い極性の化合物を抽出することが可能なアセトンが汎用されている。ピンドンは水に難溶であるが、ほとんどの有機溶媒に易溶であることから、アセトンを用いて抽出したところ、問題なく回収可能であった。よって本分析法では、抽出溶媒としてアセトンを用いることとした。

#### 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 1)。いずれの溶媒でも、良好な回収率が得られたが、一般に、低極性溶媒を用いた転溶のほうが精製効果が高いことから、10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL からヘキサンの 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 アセトニトリル-ヘキサン分配

穀類、豆類および種実類の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。ピンドン 0.1  $\mu\text{g}$  をヘキサン 30 mL に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で

Table 1. Recovery of pindone from 100 mL of 10% sodium chloride aqueous solution

Extraction solvent	Recovery		
	1st 100 mL	2nd 50 mL	Total
Hexane	105	2	107
Hexane-ethyl acetate (1:1)	98	1	99
Ethyl acetate	101	1	102

Table 2. Recovery of pindone from silica gel and graphitized carbon columns

Column	Recovery (%)					Total
	Hexane-ethyl acetate-formic acid (180:20:1)					
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
Silica gel	81	16	1	0	0	98
Graphitized carbon	76	19	1	0	0	96
Graphitized carbon-silica gel	0	101	1	1	0	103

Table 3. Recovery of pindone from PSA columns

Column	Recovery (%)						Total
	Hexane-acetone (1:1) 0-15 mL	Hexane-acetone-formic acid (25:25:1)					
		0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
A *1	0	92	0	0	0	0	92
B *2	0	87	3	1	1	0	92

\*1 Bond Elut Jr-PSA (500 mg, Varian)

\*2 Inertsep Slim-J PSA (500 mg, GL Sciences)

3回抽出を行った時の回収率は、1回目が90%、2回目が8%、3回目が2%であり、3回抽出でほぼ100%の良好な回収率が得られた。よって、ヘキサン30 mLから、ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出することとした。

### 2.3.2 シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) での精製を検討した。ピンドンはヘキサン-酢酸エチル (9:1) では溶出しなかったが、ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 15 mL でほぼ100%溶出した (Table 2)。シリカゲルミニカラム精製により、高極性の夾雑成分はカラムに保持され、ばれいしょ、キャベツ、りんご、オレンジおよびトマトでは、残留物のほとんどない無色の試験溶液が得られた。しかしながら、茶、ほうれんそうおよびきゅうりでは緑色色素および黄色色素の除去が不十分であったことから、色素の除去について検討することとした。

### 2.3.3 色素の除去

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) を用いて色素の除去方法を検討した。シリカゲルミニカラムからの溶出に用いた溶媒 (ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1)) で、グラファイトカーボンミニカラムからの溶出を検討したところ、ピンドンは15 mL でほぼ100%溶出した (Table 2)。色素を除去後に高極性の夾雑成分を除去するため、グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) の下にシリカゲルミニカラム (1,000 mg) を連結したカラムからの溶出を検討したところ、ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 15 mL で良好な回収率が得られた。食品マトリックスによって若干の溶出位置のずれはあるものの、20 mL 以降の画分には溶出されなかったことから、溶出溶媒量を20 mLとした。グラファイトカーボンミニカラムとシリカゲルミニカラムの連結カラムによる精製で、ほうれんそうおよびきゅうりの緑色色素および黄色色素の除去が可能であったが、茶では黄色色素の溶出が見られた。

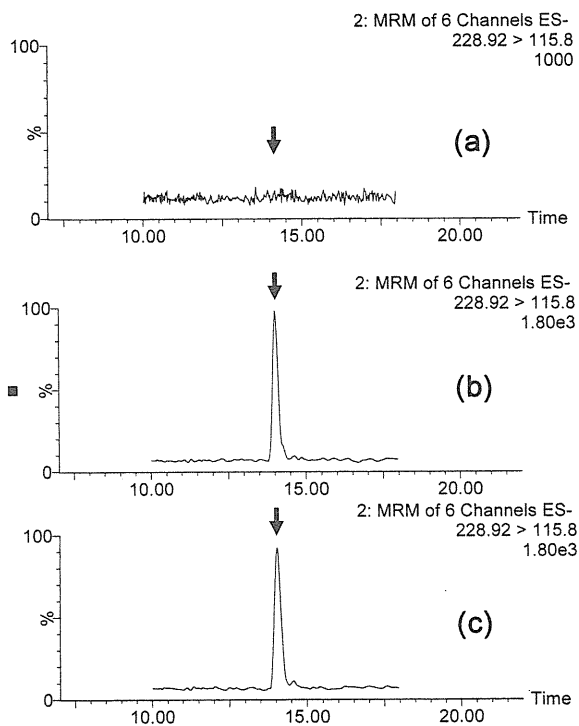
### 2.3.4 玄米、大豆および茶の追加精製

玄米、大豆および茶では、グラファイトカーボンミニカラムとシリカゲルミニカラムの連結カラムによる精製のみでは夾雑成分の除去が不十分であり、溶媒除去後に残留物が認められた。この残留物はメタノール (最終試験溶液の溶解溶媒) への溶解が不十分であった。そこで PSA ミニカラム (500 mg) を用いた精製を検討した (Table 3)。Bond Elut Jr-PSA (Varian 社製) を用いたところ、ピンドンはヘキサン-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) 5 mL でほぼ100%溶出した。Inertsep Slim-J PSA (500 mg, ジーエルサイエンス社製) からの溶出についても検討したところ、Bond Elut Jr-PSA を用いた場合と同様にヘキサン-アセトン-ギ酸 (25:25:1) 5 mL で大部分が溶出されたものの、5~20 mL の画分にも溶出が見られた。これらの結果から、ヘキサン-アセトン (1:1) 10 mL で洗浄し、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。なお、添加回収試験においては Bond Elut Jr-PSA (500 mg, Varian 社製) を用いた。PSA ミニカラム精製を追加することにより、茶の黄色色素も除去され、玄米、大豆および茶では無色で濃縮残留物のほとんどない試験溶液が得られた。

なお、未検討ではあるが、残留物の状況から判断して、色素の少ない農産物ではグラファイトカーボンミニカラム精製を省略できると推察された。すなわち、ばれいしょなど色素の少ない果実および野菜ではシリカゲルミニカラム精製のみで、また、玄米および大豆など脂肪を含む農産物でも色素が少ないものであれば、シリカゲルミニカラムと PSA ミニカラムによる精製のみで、LC-MS/MS で測定可能な試験溶液が得られると推測される。しかし、多種多様な農産物に適用できる方法とするため、果実および野菜ではグラファイトカーボンミニカラムとシリカゲルミニカラムの連結カラムで精製し、穀類、豆類、種実類および茶では連結カラムに加えて PSA ミニカラムで精製する方法を

**Table 4.** Recoveries of pindone from agricultural products

Sample	Recovery* (% mean)	RSD (%)
Brown rice	84	4
Soybean	81	7
Potato	91	2
Spinach	91	3
Cabbage	83	4
Apple	87	4
Orange	88	2
Tomato	93	2
Cucumber	90	3
Tea	81	5

\* Spiked level: 0.001 mg/kg,  $n=5$ **Fig. 3.** Chromatograms of (a) extract of tea, (b) extract of tea spiked with 0.001 mg/kg of pindone, (c) standard solution of pindone (2 µg/L)

採用した。

### 3. 添加回収試験

玄米, 大豆, ばれいしょ, ほうれんそう, キャベツ, りんご, オレンジ, トマト, きゅうりおよび茶を用いて, 添加濃度として基準値と同じ 0.001 mg/kg における, 5 併行の添加回収試験を行った。その結果, 検討した 10 種類の農産物では, 真度 81~93%, 併行精度 2~7% の良好な結果が得られた (Table 4)。定量イオン, 定性イオンともに, いずれの農産物で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 5 に示した。検討した 10 種類の農産物のピーク面積比は, 90~106% であり, ピンドンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。また, 10 種類の農産

**Table 5.** Matrix effect of pindone in agricultural products

Sample	Matrix effect* (% mean, $n=2$ )
Brown rice	97
Soybean	106
Potato	97
Spinach	102
Cabbage	99
Apple	90
Orange	96
Tomato	91
Cucumber	94
Tea	100

\* Matrix effect expressed as the ratio of the mean peak area of matrix standard to the mean peak area of standard in solvent multiplied by 100. A value of &gt;100% indicates ionization enhancement, and value of &lt;100% indicates ionization suppression.

物の添加回収試験においては, ピンドンのピーク形状に大きな変化は見られなかった。本法を用いた試料中のピンドンの定量限界 ( $S/N \geq 10$ ) として, 検討したいずれの農産物においても 0.001 mg/kg を設定可能であった。

### まとめ

農産物中のピンドン分析法として, アセトンで抽出し, ヘキサンで転溶後 (穀類, 豆類および種実類の場合はアセトニトリル-ヘキサン分配で脱脂する), グラファイトカーボンミニカラムおよびシリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製し (穀類, 豆類, 種実類および茶の場合は PSA ミニカラムで追加精製する), LC-MS/MS で定量および確認する方法を開発した。玄米, 大豆, ばれいしょ, ほうれんそう, キャベツ, りんご, オレンジ, トマト, きゅうりおよび茶の 10 種類の農産物に適用した結果, 真度 81~93%, 併行精度 2~7% の良好な結果が得られた。

本研究は「平成 20 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。

### 参考文献

- 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) Jin, M. C., Cai, M. Q., Chen, X. H. Simultaneous measurement of indandione-type rodenticides in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 294-300 (2009).
- 3) 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).
- 4) Chen, X. H., Cai, M. Q., OuYang, X. K., Jin, M. C. Ion chromatography tandem mass spectrometry for simul-

- taneous confirmation and determination of indandione rodenticides in serum. *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 1217-1226 (2009).
- 5) Chen, X. H., Cai, M. Q., Jin, M. C. Analysis and confirmation of rodenticide pindone in human plasma by IC-ESI-IT-MS. *Chromatographia*, **70**, 1201-1206 (2009).
- 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., Ye, M. L., Zhu, Y. Analysis of indandione anticoagulant rodenticides in animal liver by eluent generator reagent free ion chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1213**, 77-82 (2008).
- 8) Marek, L. J., Koskinen, W. C. Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 571-576 (2007).

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 SARU, Takatoshi SAKAI, Satoru NEMOTO and Rieko MATSUDA

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

(報 文)

食品衛生学雑誌 第 52 卷 第 4 号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygiene and Safety Science

Vol. 52, No. 4, August 2011

**Food Hyg. Saf. Sci.**  
(ShokuhinEiseigakuZasshi)

食 衛 誌

## 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<sup>1)</sup>。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<sup>1), 2)</sup>。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<sup>2)~6)</sup>。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<sup>7)</sup>, 血漿<sup>8)</sup>, 肝

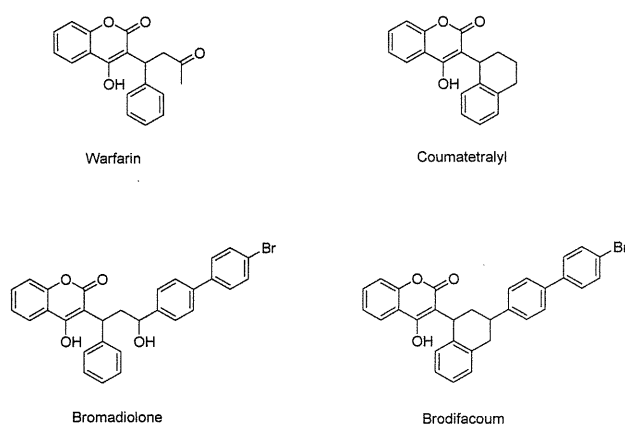


Fig. 1. Chemical structures of warfarin, coumatetralyl, bromadiolone, and brodifacoum

臓<sup>8), 9)</sup>および腎臓<sup>9)</sup>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] <sup>-</sup>	161*	30	28
			250	30	28
Coumatetralyl	14.0	291 [M-H] <sup>-</sup>	141*	40	28
			106	40	28
Bromadiolone	18.8	527 [M-H] <sup>-</sup>	250*	60	35
			93	60	35
Brodifacoum	20.3	523 [M-H] <sup>-</sup>	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olon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 (N<sub>2</sub>), 脱溶媒温度: 40°C, 脱溶媒ガス流量: 800 L/h (N<sub>2</sub>), 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

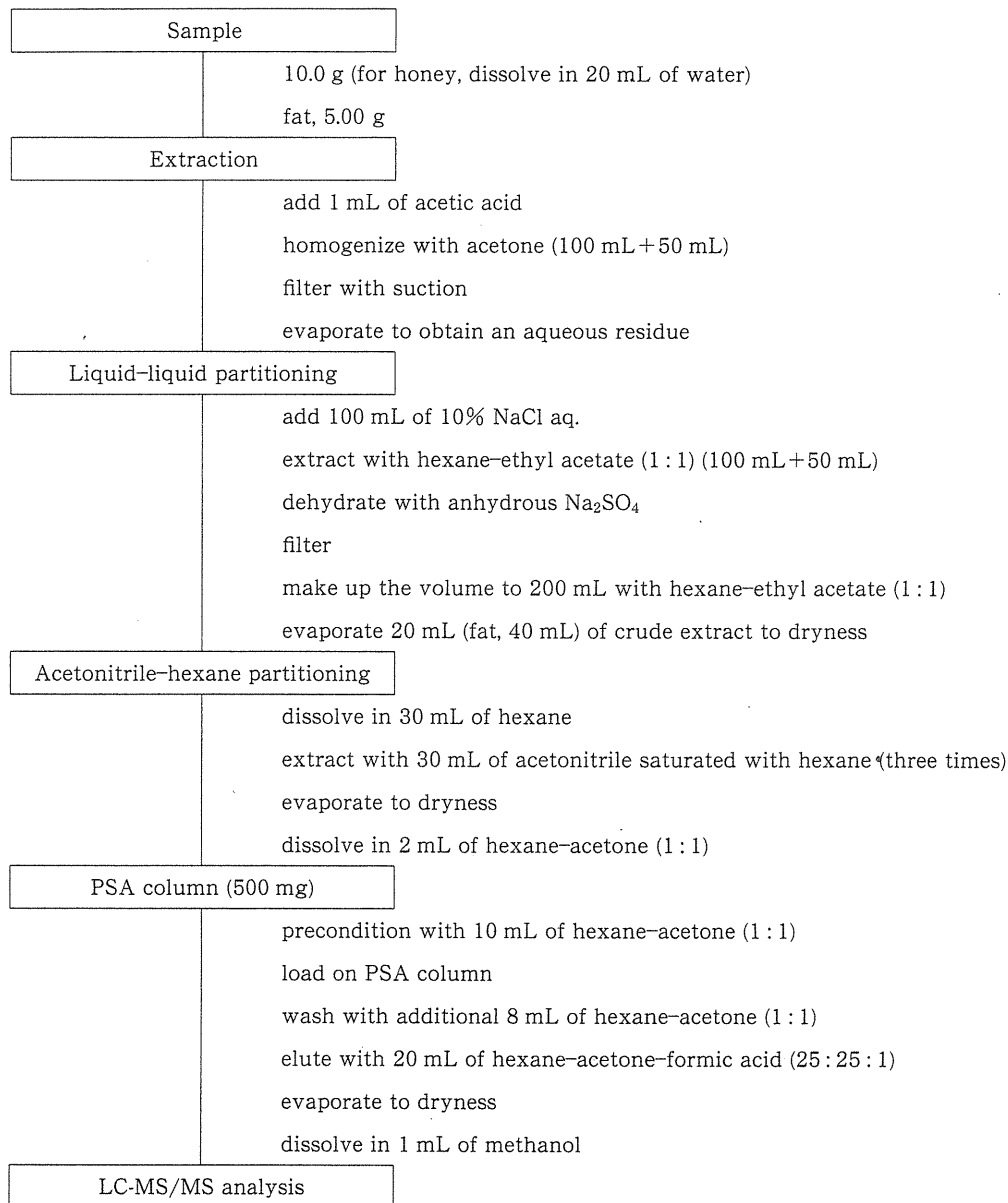


Fig. 2. Schematic representation of the analytical procedure

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、ブロマジオ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]<sup>-</sup>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でブロマジオ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ー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

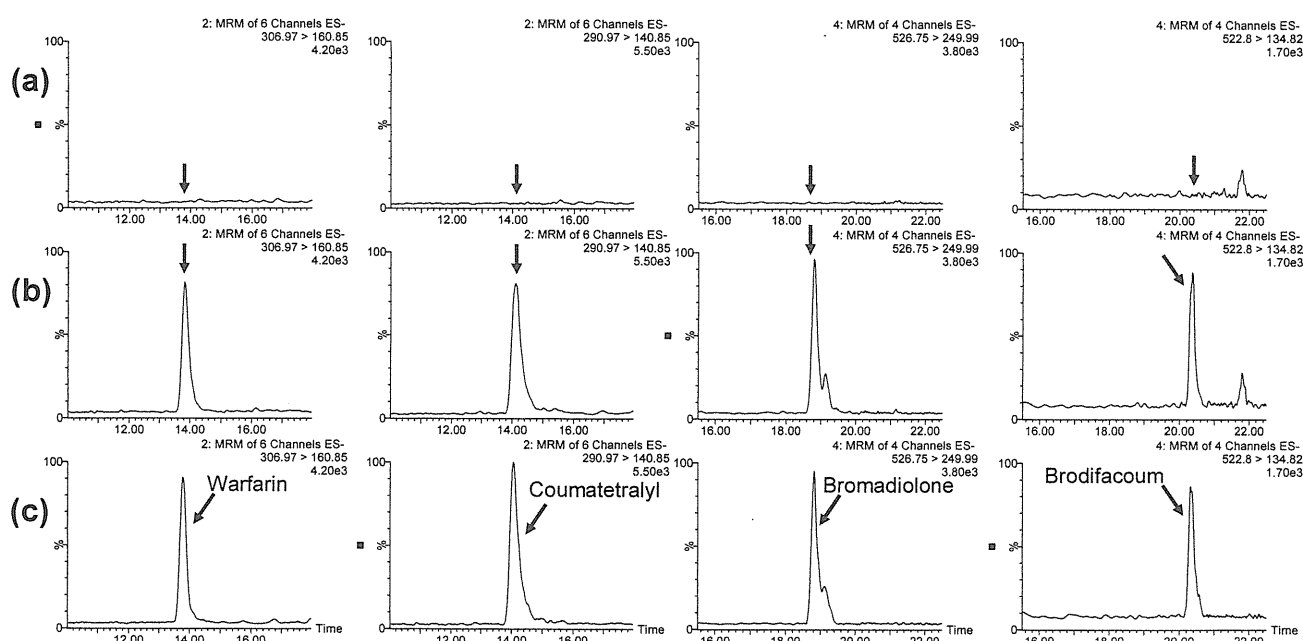
ヘキサン、ヘキサン-酢酸エチル(1:1)および酢酸エチルを用いて、10%塩化ナトリウム溶液からの回収率を比較した(Table 2)。ヘキサンではワルファリン、ブロマジ

**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)							Total
	Hexane-acetone (1 : 1)		Hexane-acetone-formic acid (25 : 25 : 1)					
	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

オロンおよびプロディファコウム、酢酸エチルではブロマジオロ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。ブロマジオロンは、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 <sup>a)</sup>
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

<sup>a)</sup> 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 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, ブロマジオロ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, 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ブロマジオロンは 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. Anticoagulant 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) Vandebroucke, 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ピンドン分析法

(平成 23 年 4 月 1 日受理)

齊藤静夏\* 坂井隆敏 根本 了 松田りえ子

Determination of Pindone in Animal Products,  
Fishery Products, and Honey by LC-MS/MS

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

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan; \* Corresponding author

(ノート)

食品衛生学雑誌 第 52 卷 第 5 号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygiene and Safety Science

Vol. 52, No. 5, October 2011

**Food Hyg. Saf. Sci.**  
(ShokuhinEiseigakuZasshi)

食 衛 誌

## ノート

## LC-MS/MSによる畜水産物およびはちみつ中のピンドン分析法

(平成23年4月1日受理)

齊藤静夏\* 坂井隆敏 根本 了 松田りえ子

Determination of Pindone in Animal Products,  
Fishery Products, and Honey by LC-MS/MS

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

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan; \* Corresponding author

A sensitive and selective analytical method for the determination of the rodenticide pindone in animal products, fishery products, and honey by LC-MS/MS was developed. Pindone was extracted with acidified acetone, and the crude extract was purified by liquid-liquid partitioning, followed by silica gel and ODS column chromatography. LC separation was performed on an ODS column with methanol/water containing ammonium acetate as the mobile phase, and detection was carried out using tandem mass spectrometry (MS/MS) with electrospray ionization (ESI) in the negative mode. The average recoveries from fortified bovine muscle, bovine liver, bovine fat, chicken muscle, salmon, eel, freshwater clam, egg, milk, and honey spiked at 0.001 mg/kg were in the range of 76–92%, and the relative standard deviations were 4–8%. The limit of quantitation ( $S/N \geq 10$ ) of the developed method was 0.001 mg/kg for all the tested foods.

(Received April 1, 2011)

**Key words:** ピンドン pindone; 殺鼠剤 rodenticide; インダンジオン indandione; 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 LC-MS/MS; 分析法 analytical method

## 緒 言

ピンドンはインダンジオン骨格を有する殺鼠剤である。インダンジオン系殺鼠剤や4-ヒドロキシマリニン系殺鼠剤(ワルファリンなど)は養豚場などで広く使われており、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<sup>1)</sup>。わが国では、ピンドンは農産物および畜水産物に0.001 ppmの暫定基準値が設定されているが、公定試験法は整備されていない。

これまでにピンドンの分析法に関する報告は複数あるが<sup>2)~8)</sup>、食品中の残留量が基準に適合しているかの判定にそのまま適用できる高感度かつ選択性に優れた分析法は報告されていない。著者らは前報<sup>9)</sup>で幅広い農産物に適用可能なピンドン分析法を報告した。本研究では抽出および精製方法について追加検討し、高感度な畜水産物およびはちみつ中のピンドン分析法を開発した。開発した分析法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳およびはちみつの10食品への適用を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

## 実験方法

## 1. 試 料

市販の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、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、牛の肝臓および鶏の筋肉は、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。試験溶液の調製で用いた水は、超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。LC-MS/MSの移動相溶媒は、関東化学(株)製のLC-MS用蒸留水およびメタノールを用いた。

ピンドン標準品はDr. Ehrenstorfer社製の残留農薬試験用試薬(純度98.5%)を用いた。標準溶液は前報<sup>9)</sup>に従って調製した。

シリカゲルミニカラムは、Waters社製Sep-Pak Vac Silica(充てん量1,000 mg)を用いた。オクタデシルシ

\* 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



リル化シリカゲル(ODS)ミニカラムは, Varian 社製 Bond Elut C18 (充てん量 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(株)堀場製作所製 F-52 を用いた. 蒸留水精製装置は,(株)藤原製作所製の超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW 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

LC-MS/MS 測定は前報<sup>9)</sup>に従って行った.

#### 4.1 LC 条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3  $\mu$ m, ジェールサイエンス社製), ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3  $\mu$ m, ジェールサイエンス社製), カラム温度: 40°C, 注入量:

5  $\mu$ L, 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: 14.1 分

#### 4.2 MS 条件

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ネガティブモード (ESI(-)), 測定モード: multiple reaction monitoring (MRM), キャピラリー電圧: 0.5 kV, ソース温度: 120°C, コーンガス: 50 L/h ( $N_2$ ), 脱溶媒温度: 400°C, 脱溶媒ガス: 800 L/h ( $N_2$ ), コリジョンガス:  $\pm 3.1 \times 10^{-3}$  mbar (Ar), 測定イオン ( $m/z$ ): 229→116 (定量イオン, コーン電圧 50 (V)), コリジョンエネルギー 35 (eV) および 229→172 (定性イオン, コーン電圧 50 (V)), コリジョンエネルギー 21 (eV)

### 5. 試験溶液の調製

試験溶液調製方法の概略を Fig. 1 に示した.

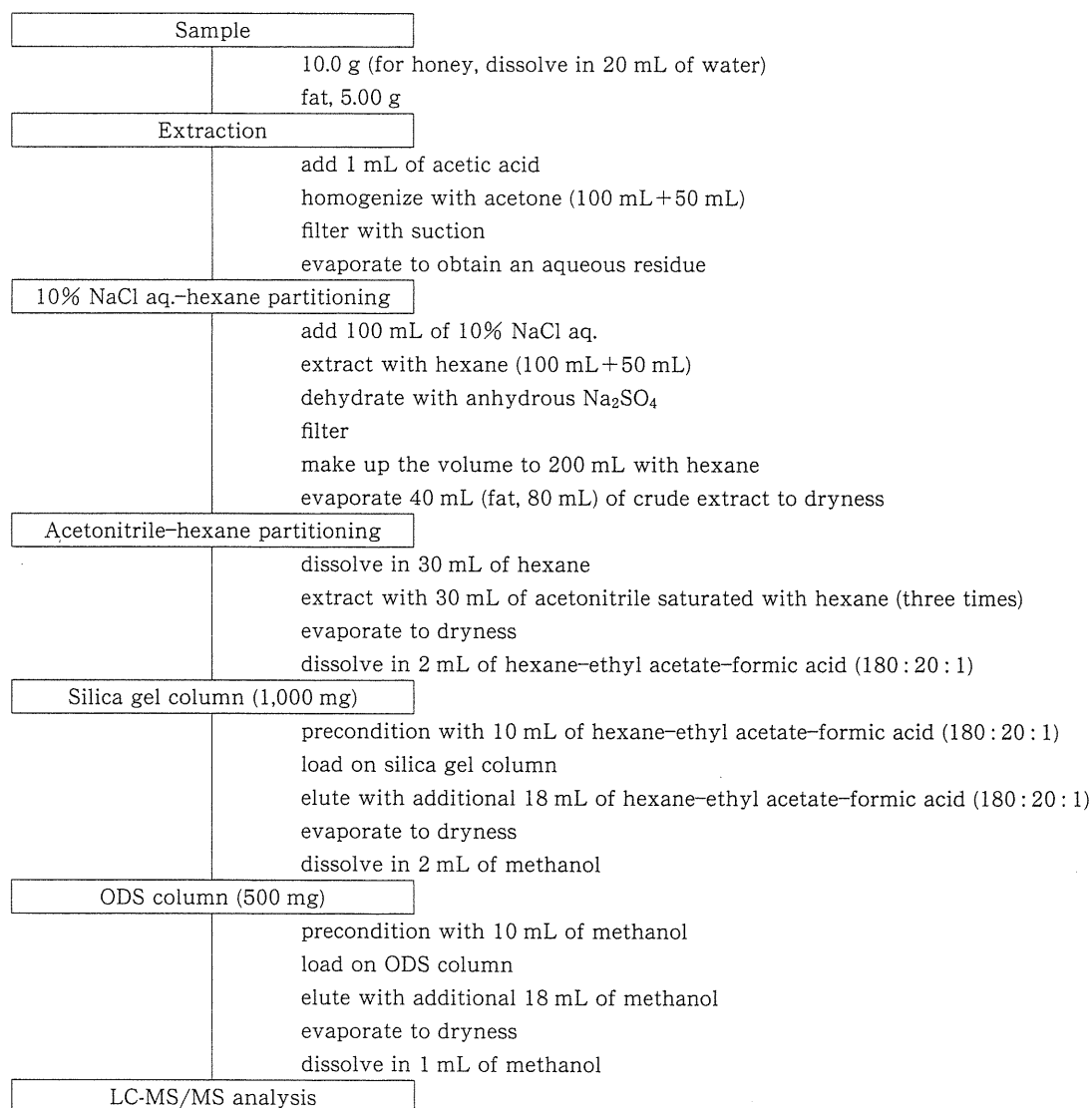


Fig. 1. Schematic representation of the analytical procedure

### 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、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。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 100 mL で分液漏斗に移し、5 分間振とう後、ヘキサン層を採った。水層を分液漏斗に戻し、ヘキサン 50 mL を加え、上記と同様に操作した。ヘキサン層を合わせ、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、ヘキサンを加えて正確に 200 mL とした。

抽出液 40 mL (脂肪の場合は 80 mL, 試料 2 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除去した。ヘキサン 30 mL を加え、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回振とう抽出した。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除去し、残留物をヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 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-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 10 mL で洗浄したシリカゲルミニカラム (1,000 mg) に負荷し、さらにヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (180:20:1) 18 mL を注入した。負荷液を含む全抽出液を 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除去し、残留物をメタノール 2 mL に溶解した。

この溶液を、あらかじめメタノール 10 mL で洗浄した ODS ミニカラム (500 mg) に負荷し、さらにメタノール 18 mL を注入した。負荷液を含む全抽出液を 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除去し、残留物をメタノール 1 mL に溶解して試験溶液 (2.0 g 試料/mL) とした。

## 6. 定 量

前報<sup>9)</sup>と同様に、試験溶液および標準溶液 (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 および 3.0 µg/L) それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積を用いて絶対検量線法により定量した。

## 7. 試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100% 相当濃度のマトリックス標準溶液<sup>9)</sup>と溶媒標準溶液を交互に各 2 回測定し、溶媒標準溶液のピーク面積の平均値に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の平均値の比を求め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

LC-MS/MS 測定は前報<sup>9)</sup>で最適化した条件で行った。ピンドンはβ-ジケトン構造を有し、テーリングしやすいため、分析カラムには残存シラノール基および金属不純物が少ない Inertsil ODS-4 を用いた。

#### 2. 試験溶液調製方法の検討

ピンドンは弱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、酸を加えた抽出法の検討を行うこととした。Table 1 に鶏卵の添加回収試験 (添加濃度 0.01 mg/kg, 3 併行) の結果を示した。アセトンのみで抽出を行った場合は回収率 50% 以下となった。これに対し、酢酸 1 mL を添加後、アセトンで抽出した場合は 85% となり、大幅に回収率が向上した。回収率 100% 相当の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は、いずれの場合も 1.02~1.04 であったことから、回収率の差はマトリックスの影響によるものではないことが示唆された。鶏卵の抽出液 (アセトン除去後) の pH を測定したところ、酸を添加せずにアセトンで抽出した場合は塩基性 (pH 9 以上) を示したが、酢酸 1 mL 加えてアセトンで抽出した場合は pH 3 であった。幅広い畜水産物に適用できる分析法とするため、抽出は酢酸酸性下アセトンで行うこととした。

得られた抽出液はアセトン除去し、前報<sup>9)</sup>と同様にヘキサンへの転溶によって水溶性夾雑成分を除去した後、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂を行った。

転溶およびアセトニトリル/ヘキサン分配のみでは濃縮残留物が多かったため、前報<sup>9)</sup>と同様にシリカゲルミニカラム (1,000 mg) での精製を行った。その結果、さけ、しじみ、鶏卵などに含まれる色素などの高極性の夾雑成分を除去することができた。しかしながら、うなぎ等の食品では、シリカゲルミニカラム精製のみでは低極性成分の除去が不十分であり、溶媒除去後に残留物が認められた。そこで、ODS ミニカラム (500 mg) を用いた追加精製を検討し

Table 1. Recovery of pindone from egg sample

Extraction solvent	Recovery <sup>a</sup> (% mean)	Peak area ratio <sup>b</sup>
Acetone (100 mL + 50 mL)	41	1.04
Acetic acid (1 mL) and acetone (100 mL + 50 mL)	85	1.02

<sup>a</sup> Spiked level: 0.01 mg/kg, *n*=3

<sup>b</sup> Matrix standard/standard in solvent

**Table 2.** Recovery of pindone from silica gel and ODS columns

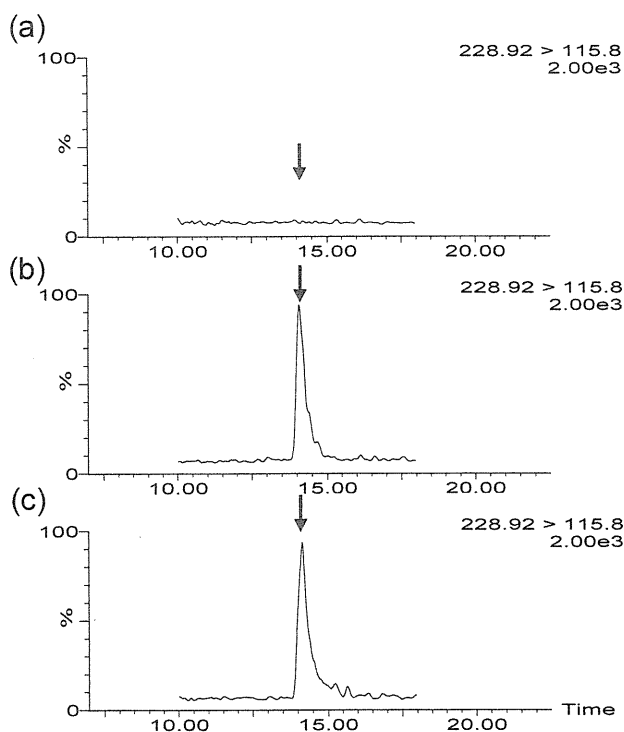
SPE column	Elution solvent	Recovery (%)			
		0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	Total
Silica gel (1,000 mg)	Hexane-ethyl acetate (9 : 1)	0	0	0	0
	Hexane-ethyl acetate-formic acid (180 : 20 : 1)	96	1	0	97
ODS (500 mg)	Methanol	82	12	0	94

**Table 3.** Recovery of pindone from animal products, fishery products, and honey

Sample	Recovery <sup>a</sup> (% mean)	RSD (%)
Bovine muscle	76	8
Bovine fat	92	4
Bovine liver	91	6
Chicken muscle	84	4
Salmon	91	7
Eel	88	6
Freshwater clam	81	6
Egg	80	4
Milk	84	7
Honey	83	6

<sup>a</sup> Spiked level: 0.001 mg/kg, n=5**Table 4.** Ratio of peak area of matrix standard to that of standard in solvent

Sample	Peak area ratio <sup>a</sup>
Bovine muscle	0.98
Bovine fat	1.03
Bovine liver	0.98
Chicken muscle	1.04
Salmon	1.03
Eel	0.94
Freshwater clam	1.00
Egg	0.98
Milk	0.93
Honey	1.02

<sup>a</sup> Matrix standard/standard in solvent**Fig. 2.** Chromatograms of (a) extract of blank bovine liver, (b) extract of bovine liver spiked with 0.001 mg/kg of pindone, and (c) standard solution of pindone (2 µg/L).

た。メタノールでの溶出を検討したところ、20 mL で良好な回収率が得られた (Table 2)。シリカゲルミニカラムおよび ODS ミニカラム精製により、検討した 9 種類の畜水産物 (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳) およびはちみつでは、いずれも無色で濃縮残留物のほとんどない試験溶液が得ら

れた。

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳およびはちみつを用いて、添加濃度として基準値である 0.001 mg/kg における、5 併行の添加回収試験を行った。なお、牛の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。牛の脂肪においては、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 9 種類の畜水産物およびはちみつでは真度 76~92%、併行精度 4~8% の良好な結果が得られ (Table 3)、いずれもブランク試料に定量を妨害するピークはなかった (Fig. 2)。また、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は 0.93~1.04 であり、ピンドンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった (Table 4)。本法を用いた試料中のピンドンの定量限界 ( $S/N \geq 10$ ) は、いずれの食品においても 0.001 mg/kg であった。

### まとめ

農産物中のピンドン分析法<sup>9)</sup>を畜水産物およびはちみつへ適用するため、各種条件について追加検討した。酢酸酸性下アセトンで抽出し、ヘキサンで転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配、シリカゲルミニカラムおよび ODS ミニカラムで精製して LC-MS/MS で定量および確認した。本法を、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳およびはちみつの 10 食品に適用した結果、真度 76~92%、併行精度 4~8% の良好な結果が得られた。

## 文 献

- 1) Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V., Nikolov, Y. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals—A review. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **32**, 237–243 (2008).
- 2) Jin, M. C., Cai, M. Q., Chen, X. H. Simultaneous measurement of indandione-type rodenticides in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **33**, 294–300 (2009).
- 3) 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).
- 4) Chen, X. H., Cai, M. Q., OuYang, X. K., Jin, M. C. Ion chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous confirmation and determination of indandione rodenticides in serum. *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 1217–1226 (2009).
- 5) Chen, X. H., Cai, M. Q., Jin, M. C. Analysis and confirmation of rodenticide pindone in human plasma by IC-ESI-IT-MS. *Chromatographia*, **70**, 1201–1206 (2009).
- 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., Ye, M. L., Zhu, Y. Analysis of indandione anticoagulant rodenticides in animal liver by eluent generator reagent free ion chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1213**, 77–82 (2008).
- 8) Marek, L. J., Koskinen, W. C. Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 571–576 (2007).
- 9) Saito, S., Nemoto, S., Matsuda, R. Determination of pindone in agricultural products by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **52**, 237–243 (2011).