

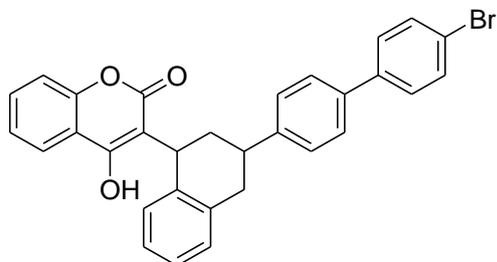
※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

ブロディファコウム及びワルファリン試験法(畜水産物) の検討結果

実施年度：平成22年度

1. 分析対象化合物の物理化学的性質及び構造

ブロディファコウム(brodifacoum)



IUPAC 名: 3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxycoumarin

分子式: $C_{31}H_{23}BrO_3$

分子量: 523.4

外観: 白色粉末

Log P_{ow} : 8.5¹⁾

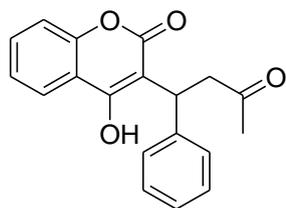
p K_a : 弱酸性¹⁾

蒸気圧: < 0.001 mPa¹⁾

融点: 228-232 °C¹⁾

安定性: 50°Cまで安定。直射日光 30 日間安定。溶液中では UV で分解。¹⁾

ワルファリン(warfarin)



IUPAC 名: 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)coumarin

分子式: $C_{19}H_{16}O_4$

分子量: 308.3

外観: 白色粉末

蒸気圧: 1.5×10^{-3} mPa¹⁾

融点: 161-162 °C¹⁾

安定性: 非常に安定¹⁾

¹⁾ The e-Pesticide Manual 14th ed., ver.4

2. 基準値(暫定)

ブロディファコウム: 0.0005 ppm(牛の筋肉、牛の肝臓、豚の筋肉等)、0.001 ppm(その他の
畜水産物)

ワルファリン: 0.001 ppm(すべての畜水産物)

[実験方法]

1. 試薬・試液

有機溶媒及び試薬は、残留農薬試験用試薬を用いた。

ブロディファコウム標準品はRiedel-de Haën社製（純度99.3%、融点221.1-221.8℃）の残留農薬試験用試薬を用いた。ワルファリン標準品はDr. Ehrenstorfer GmbH社製（純度98%、融点161.8℃）の残留農薬試験用試薬を用いた。

標準原液（1000 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。検量線作成用及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。

2. 装置

LC-MS/MS： Waters 社製高速液体クロマトグラフ Alliance 2695 及び同社製質量分析計 Micromass Quattro Premier を使用した。

3. 測定条件

(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℃

注入量： 5 μL

移動相

A 液： 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液： 10 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

移動相流速： 0.20 mL/min

グラジエント条件：

| 時間 (分) | A 液 (%) | B 液 (%) |
|--------|---------|---------|
| 0.0 | 80 | 20 |
| 15.0 | 5 | 95 |
| 25.0 | 5 | 95 |
| 25.1 | 0 | 100 |
| 35.0 | 0 | 100 |
| 35.1 | 80 | 20 |

保持時間： ブロディファコウム 20.3 分、ワルファリン 13.8 分

(2) MS 条件

イオン化モード: ESI(-)

測定モード: SRM(selected 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: N₂, 50 L/hr

脱溶媒温度: 400 °C

脱溶媒ガス: N₂, 800 L/hr

コリジョンガス: Ar, $\pm 3.1 \times 10^{-3}$ mbar

測定イオン:

| | | <i>m/z</i> | コーン電圧 (V) | コリジョン エネルギー (eV) |
|-----------|-------|-------------|--------------|---------------------|
| プロディファコウム | 定量イオン | 522.8→134.8 | 60 | 35 |
| | 定性イオン | 522.8→80.9 | 60 | 42 |
| ワルファリン | 定量イオン | 307.0→160.9 | 30 | 28 |
| | 定性イオン | 307.0→249.9 | 30 | 28 |

4. 試験溶液の調製

(1) 抽出

試料 10.0 g(脂肪の場合は 5.00 g)を量り採った。牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の筋肉の添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、メタノールで調製した混合標準溶液(プロディファコウム 5 µg/L、ワルファリン 10 µg/L) 1 mL を添加して 30 分間放置した。さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵及び牛乳の添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、メタノールで調製した混合標準溶液(プロディファコウム及びワルファリン各 10 µg/L) 1 mL を添加して 30 分間放置した。脂肪の添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、アセトンで調製した混合標準溶液(プロディファコウム及びワルファリン各 10 µg/L) 0.5 mL を添加して 30 分間放置した。はちみつ及びそばみつの添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、メタノールで調製した混合標準溶液(プロディファコウム及びワルファリン各 10 µg/L) 1 mL を添加して 30 分間放置後、水 20 mL を加えて溶解した。これに酢酸 1 mL 及びアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1cm 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、40°C以下で約 10 mL(はちみつの場合は約 30 mL)に濃縮した。

これを 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL 及び酢酸エチル/ヘキサン(1:1) 100 mL で分液漏斗に移し、5 分間振とうした。有機層を採り、水層に酢酸エチル/ヘキサン(1:1) 50 mL を加え、5 分間振とうした。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。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、酢酸エチル/ヘキサン(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以下で溶媒を除去し、残留物をアセトン/ヘキサン(1:1) 2 mL に溶解し

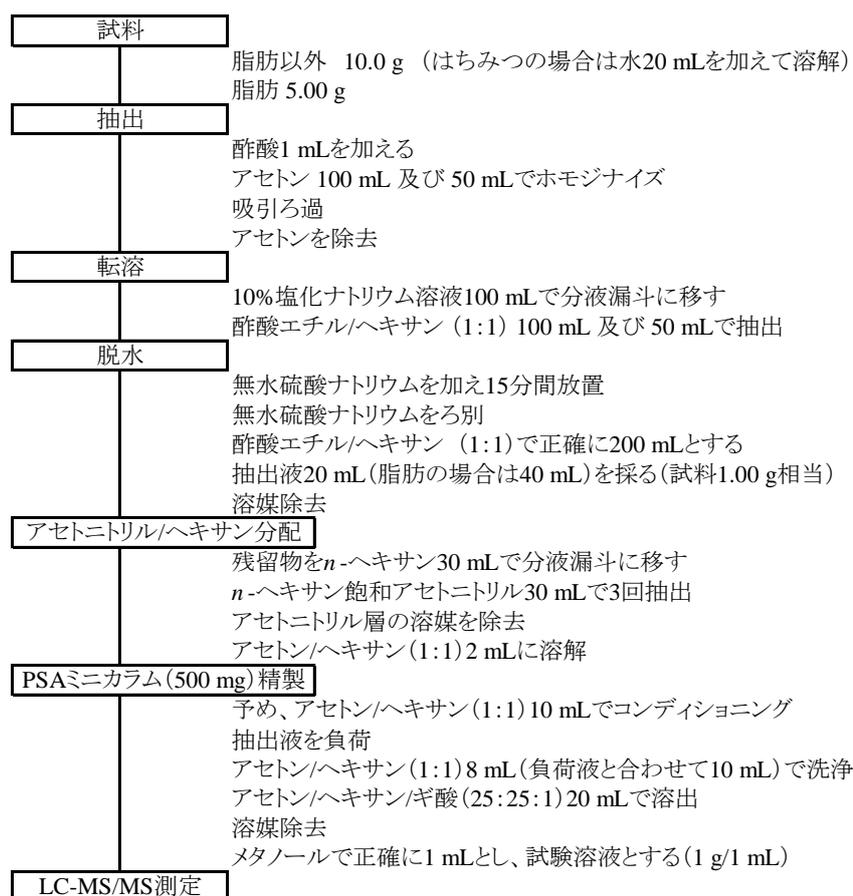
た。

(2) 精製

この溶液を、予めアセトン/ヘキサン(1:1) 10 mLで洗浄したPSAミニカラム(500 mg)に負荷し、さらにアセトン/ヘキサン(1:1) 8 mLを注入して流出液は捨てた。次いで、アセトン/ヘキサン/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(1.0 g試料/mL)とした。

5. 定量

標準溶液 0.125、0.25、0.50、0.75、1.0 及び 1.5 µg/L(ブロディファコウムは、牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の筋肉においては 0.0625、0.125、0.25、0.375、0.50 及び 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、検量線から濃度を求めた。



分析法のフローチャート

[検討結果]

1. マスペクトル等

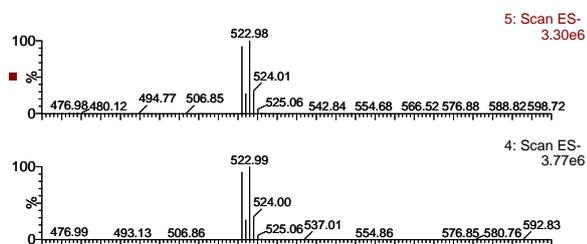


図 1-1 ブロディファコウムのマススペクトル
 コーン電圧 (V) : 下から 30、40、50、60、70

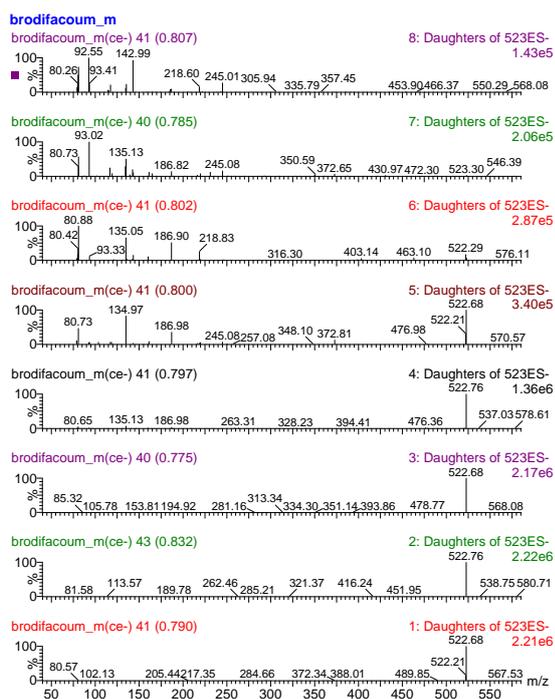


図 1-2 ブロディファコウムのプロダクトイオンスキャンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z 523
 コーン電圧 (V) : 60
 コリジョンエネルギー (eV) : 下から 7、14、21、28、35、42、49、56

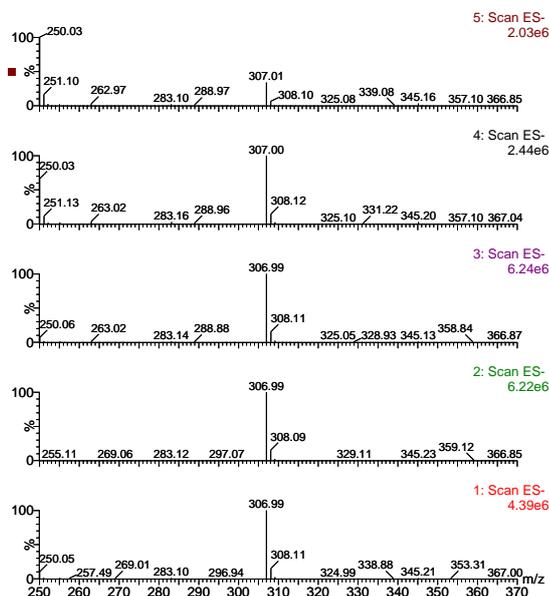


図 2-1 ワルファリンのマススペクトル
 コーン電圧 (V) : 下から 20、30、40、50、60

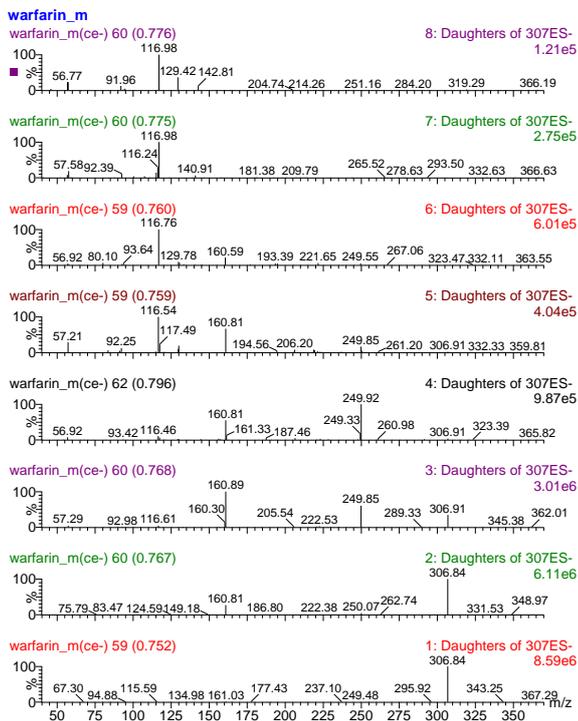


図 2-2 ワルファリンのプロダクトイオンキャンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z 307
 コーン電圧 (V) : 60
 コリジョンエネルギー (eV) : 下から 7、14、21、28、35、42、49、56

2. 検量線の例

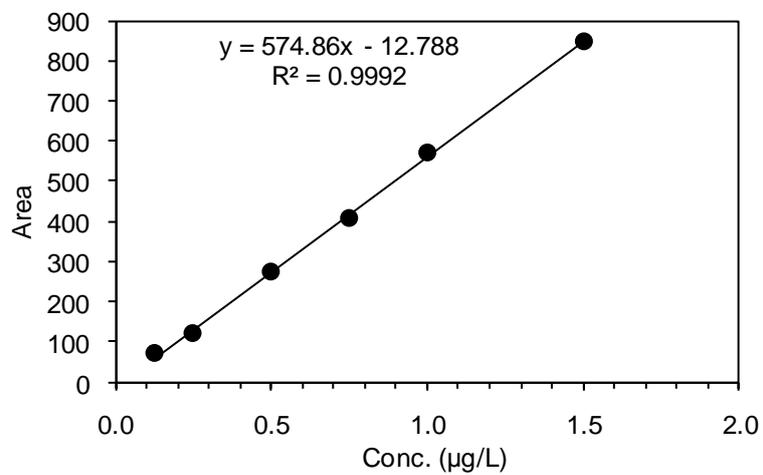


図3 プロディファコウムの検量線 (0.125~1.5 µg/L)

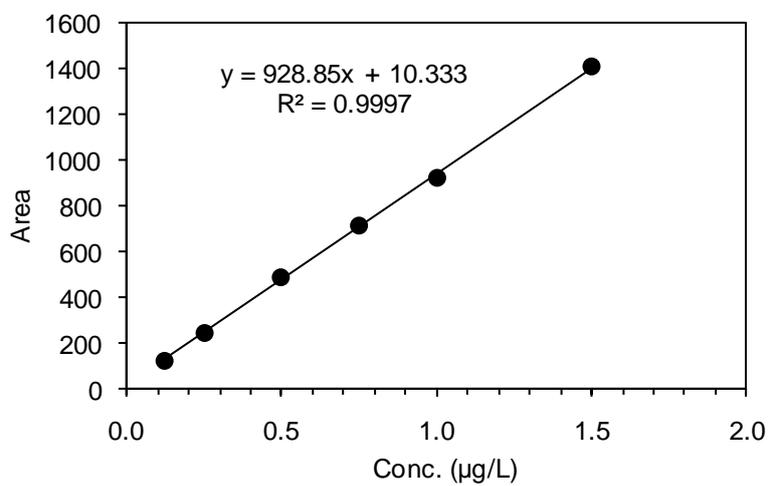


図4 ワルファリンの検量線 (0.125~1.5 µg/L)

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、はちみつ及びそばみつを用いて、5 併行の添加回収試験を行った。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標準溶液 (1 mg/L) をアセトンで希釈した溶液を添加した。

(1) 選択性

検討した 11 食品では、定量を妨害するピークはなかった。

(2) 真度及び精度

ブロディファコウム

| 試料 | 添加濃度 (mg/kg) | 回収率(%) | | | | | 真度 (平均) | RSD(%) |
|------|-----------------|--------|-----|-----|-----|-----|------------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 牛の筋肉 | 0.0005 | 91 | 94 | 96 | 85 | 93 | 92 | 5 |
| 牛の脂肪 | 0.001 | 86 | 81 | 84 | 83 | 85 | 84 | 2 |
| 牛の肝臓 | 0.0005 | 79 | 90 | 90 | 84 | 86 | 86 | 5 |
| 豚の筋肉 | 0.0005 | 104 | 88 | 101 | 99 | 96 | 98 | 6 |
| さけ | 0.001 | 93 | 97 | 91 | 96 | 94 | 94 | 3 |
| うなぎ | 0.001 | 90 | 86 | 87 | 97 | 93 | 91 | 5 |
| しじみ | 0.001 | 87 | 85 | 84 | 87 | 84 | 86 | 2 |
| 鶏卵 | 0.001 | 91 | 98 | 90 | 99 | 88 | 93 | 5 |
| 牛乳 | 0.001 | 89 | 93 | 94 | 91 | 88 | 91 | 3 |
| はちみつ | 0.001 | 108 | 107 | 113 | 106 | 108 | 108 | 3 |
| そばみつ | 0.001 | 89 | 95 | 93 | 99 | 97 | 95 | 4 |

ワルファリン

| 試料 | 添加濃度 (mg/kg) | 回収率(%) | | | | | 真度 (平均) | RSD(%) |
|------|-----------------|--------|-----|-----|-----|-----|------------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 牛の筋肉 | 0.001 | 96 | 99 | 102 | 92 | 100 | 98 | 4 |
| 牛の脂肪 | 0.001 | 103 | 100 | 93 | 93 | 98 | 98 | 4 |
| 牛の肝臓 | 0.001 | 105 | 106 | 97 | 101 | 101 | 102 | 3 |
| 豚の筋肉 | 0.001 | 90 | 92 | 96 | 87 | 95 | 92 | 4 |
| さけ | 0.001 | 92 | 96 | 96 | 99 | 95 | 96 | 3 |
| うなぎ | 0.001 | 104 | 94 | 98 | 103 | 96 | 99 | 4 |
| しじみ | 0.001 | 91 | 94 | 92 | 89 | 90 | 91 | 2 |
| 鶏卵 | 0.001 | 102 | 103 | 95 | 88 | 98 | 97 | 7 |
| 牛乳 | 0.001 | 99 | 96 | 105 | 95 | 97 | 98 | 4 |
| はちみつ | 0.001 | 111 | 108 | 108 | 106 | 109 | 108 | 2 |
| そばみつ | 0.001 | 97 | 95 | 94 | 97 | 100 | 97 | 2 |

(3) 定量限界

1) ブロディファコウム

添加濃度 0.0005 mg/kg で添加回収試験を行った牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の筋肉では、真度及び併行精度の目標値を満足しており、得られたピークは $S/N \geq 10$ であったことから、定量限界を 0.0005ppm と設定した。

2) ワルファリン

添加濃度 0.001 mg/kg で添加回収試験を行った結果、検討したすべての食品において真度及び併行精度の目標値を満足しており、得られたピークは $S/N \geq 10$ であったことから、定量限界を 0.001 mg/kg と設定した。

(4) 試料マトリックスの測定への影響

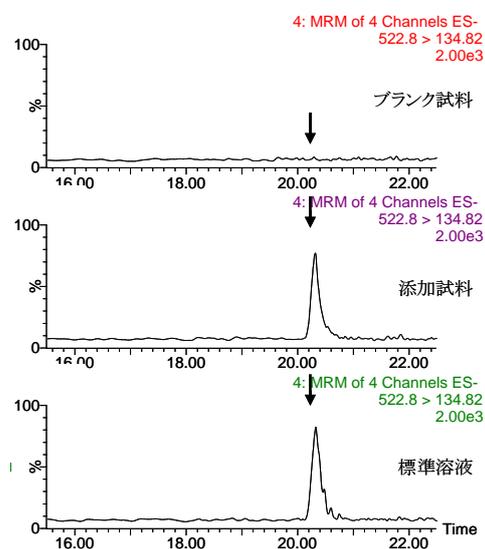
| 試料 | ピーク面積比 (マトリックス標準溶液/溶媒標準溶液) | |
|------|-------------------------------|--------|
| | ブロディファコウム | ワルファリン |
| 牛の筋肉 | 0.97 | 0.93 |
| 牛の脂肪 | 0.91 | 0.99 |
| 牛の肝臓 | 0.93 | 1.00 |
| 豚の筋肉 | 1.04 | 0.92 |
| さけ | 0.95 | 0.94 |
| うなぎ | 0.88 | 0.99 |
| しじみ | 0.87 | 0.94 |
| 鶏卵 | 0.91 | 1.07 |
| 牛乳 | 1.00 | 0.98 |
| はちみつ | 0.97 | 0.91 |
| そばみつ | 0.99 | 1.04 |

[まとめ]

畜水産物中のブロディファコウム及びワルファリン試験法として、酢酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチル及びヘキサンの混液で転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配及び PSA ミニカラムで精製して LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。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、はちみつ及びそばみつの 11 食品について適用した結果、ブロディファコウムは真度 84~108%、併行精度 2~6%、ワルファリンは真度 91~108%、併行精度 2~7% の良好な結果が得られた。また、定量限界として、ブロディファコウムは 0.0005 mg/kg、ワルファリンは 0.001 mg/kg を設定可能であることが確認された。

添加回収試験における代表的なクロマトグラム(牛の筋肉)

ブロディファコウム (添加濃度 0.0005 mg/kg)



ワルファリン(添加濃度 0.001 mg/kg)

