

ブロディファコウム及びワルファリン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ブロディファコウム

ワルファリン

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ブロディファコウム標準品 本品はブロディファコウム96%以上を含む。

ワルファリン標準品 本品はワルファリン98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合は、試料10.0 gを量り採る。脂肪の場合は、試料5.00 gを量り採る。はちみつの場合は、試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて溶解する。

これに酢酸1 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて40°C以下で約10 mL（はちみつの場合は約30 mL）に濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で正確に200 mLとする。

抽出液20 mL（脂肪の場合は40 mL）を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液2 mLを加えて溶かす。

2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1）で得られた溶液を注入した後、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液8 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン、ギ酸及び*n*-ヘキサン（25：1：25）混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ブロディファコウム標準品及びワルファリン標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解して1 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、ブロディファコウムでは試料中0.0005 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lであり、ワルファリンでは試料中0.001 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/Lである。

6. 定量

試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、5の検量線でブロディファコウム及びワルファリンの含量を求める。

7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

8. 測定条件

(例)

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

カラム温度：40℃

移動相：10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び10 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液（4：1）から（1：19）までの濃度勾配を15分間で行い、（1：19）で10分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）：

ブロディファコウム プリカーサーイオン523、プロダクトイオン135、81

ワルファリン プリカーサーイオン307、プロダクトイオン250、161

保持時間の目安：ブロディファコウム20分、ワルファリン14分

9. 定量限界

ブロディファコウム 0.0005 mg/kg

ワルファリン 0.001 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ブロディファコウム及びワルファリンを試料から酢酸酸性アセトンで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液に転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

[1] ブロディファコウムのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン523、プロダクトイオン135

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン523、プロダクトイオン81

[2] ワルファリンのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン307、プロダクトイオン161

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン307、プロダクトイオン250

[3] LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、ブロディファコウムが溶出した後に移動相のメタノール濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。

[4] 脂肪の少ない食品では、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を省略しても良い。

[5] 転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行うと良い。

[6] 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条件では、脂肪酸などの夾雑成分も溶出されるので、装置の感度によっては試験溶液をメタノールで希釈するとよい。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C