

LC-MS/MS による豚筋肉及び豚肝臓中の 抗凝血性殺鼠剤一斉分析法の検討

Study on Simultaneous Analysis Method of Anticoagulant Rodenticides in
Swine Muscle and Kidney using LC-MS/MS

加賀 岳朗 藤井 良昭 上田友紀子
青柳 直樹 西村 一彦

Takero KAGA, Yoshiaki FUJII, Yukiko UEDA,
Naoki AOYANAGI and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : rodenticide (殺鼠剤) ; LC-MS/MS (高速液体クロマトグラフ-質量分析計) ;
simultaneous analysis (一斉分析)

緒 言

畜産業におけるネズミ対策は病原微生物の伝播予防等に不可欠であることから、その化学的防除手段として殺鼠剤が使用されている。日本で用いられる殺鼠剤はインダンジオン系殺鼠剤やヒドロキシクマリン系殺鼠剤が主流であり、これらは血液凝固メカニズムを阻害する抗凝血作用によりその効果を示す¹⁾。殺鼠剤について、国内では家畜による製剤誤食事例²⁾や国産畜産食品からの検出事例^{3, 4)}等が報告されている。畜産食品を対象とした殺鼠剤分析法は2種の個別試験法が通知されており^{5, 6)}、合計3物質の殺鼠剤が試験可能となっている。しかし、使用されている主な殺鼠剤を分析するには試験法が不十分であり、複数の個別試験法での分析では結果判定までに時間を要する。本研究では、複数の抗凝血性殺鼠剤を迅速に同時分析することを目的とし、LC-MS/MSを用いた抗凝血性殺鼠剤8物質(インダンジオン系3物質、ヒドロキシクマリン系5物質)の一斉分析法を開発し、妥当性評価を実施したので報告する。

方 法

1. 分析対象物質

分析対象とした殺鼠剤8物質の物質名を表1に示した。殺鼠剤標準品は富士フィルム和光純薬(株)製の残留農薬試験用のダイファシノン、ピンドン、ワルファリン、クマテトラリル、Dr.Ehrenstorfer社製のクロロファシノン、プロマジオロン、プロディファコウム、ジフェチアロンを用いた。

標準原液(100 µg/mL)は各標準品をひょう量し、アセトニトリルで溶解し調製した。ジフェチアロンは購入標準品が10 mg/Lのアセトニトリル溶液のため、そのまま標準原液とした。添加用混合標準溶液は、各標準原液から各殺鼠剤濃度が1,000 ng/mLとなるよう採取、混合しアセトニトリルで定容したもの、及びクロロファシノン、クマ

表1 分析対象物質のMRM条件

系統及び物質名		Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)
インダンジオン系				
ダイファシノン	定量	339.4	167.2	40
	定性	339.4	116.1	54
クロロファシノン	定量	373.4	145.1	38
	定性	373.4	202.2	30
ピンドン	定量	229.3	116.1	40
	定性	229.3	144.2	30
ヒドロキシクマリン系				
ワルファリン	定量	307.4	161.2	30
	定性	307.4	251.2	26
クマテトラリル	定量	291.4	142.2	40
	定性	291.4	246.2	40
プロマジオロン	定量	525.5	250.0	44
	定性	525.5	219.9	60
プロディファコウム	定量	521.5	134.9	50
	定性	521.5	142.9	62
ジフェチアロン	定量	539.5	151.3	50
	定性	539.5	133.1	60

Q1: プリカーサーイオン
Q2: プロダクトイオン
CE: コリジョンエナジー

テトラリル、ジフェチアロン濃度が500 ng/mL、その他殺鼠剤5物質の濃度が50 ng/mLとなるよう採取、混合シアセトニトリルで定容したものの2種類を用いた。

2. 試料

北海道産豚の筋肉及び肝臓を細切均一化したものをそれぞれ試料（以下、ブランク試料とする）とした。

3. 試薬・試液

試薬は富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用のアセトニトリル、メタノール、ギ酸、酢酸、超純水、残留農薬・PCB 試験用の *n*-ヘキサン（以下、ヘキサンとする）、特級の無水硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、クエン酸一水和物、ジーエルサイエンス(株)製 LC/MS 用の酢酸アンモニウムを用いた。固相抽出にはジーエルサイエンス(株)製のエチレンジアミン-*N*-プロピル基結合シリカゲルを充填剤とする InertSep PSA (500 mg, 6 mL)（以下、PSA ミニカラムとする）、フロリジルを充填剤とする InertSep Slim-J FL-PR (1,000 mg)（以下、FL ミニカラムとする）、Waters 社製のオクタデシル基結合シリカゲルを充填剤とする Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (360 mg)（以下、C18 ミニカラムとする）、逆相-弱陰イオン交換ミックスモードポリマーを充填剤とする Oasis WAX (150 mg)（以下、WAX ミニカラムとする）を用いた。

4. 装置

ホモジナイザーは IKA 製の ULTRA-TURRAX T25 basic を用いた。シャフトジェネレーターは IKA 製の S25N-18G を用いた。ボルテックスミキサーはサイエンティフィックインダストリーズ社の VORTEX-GENIE 2 を用いた。超音波洗浄槽は AGC テクノグラス(株)社製の Ultrasonic cleaner USC-12 を用いた。固相抽出操作にはジーエルサイエンス(株)製の GL-SPE 吸引マニホールドキットを用いた。ロータリーエバポレーターは Buchi 社製の R-210、R-100 を用いた。

5. LC-MS/MS 条件

1) LC 条件

LC は Agilent Technologies 社製 1260 Infinity LC を用い、LC カラムは Agilent Technologies 社製 ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (2.1 × 100 mm, 3.5 μm) を用いた。カラム温度は 40℃、移動相は 0.1% 酢酸含有 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) とメタノール (B 液) のグラジエント溶出とし、グラジエント条件は B 液 30% (0 min) → 90% (10 min) → 90% (18 min) → 30% (18.1 min) → 30% (28 min)、流速は 0.3 mL/min、注入量は 4 μL とした。

2) MS/MS 条件

MS/MS は Agilent Technologies 社製 6495 Triple Quad LC/MS を用いた。イオン化モードは ESI (-)、分析モードは多重反応モニタリング (MRM)、ドライガス温度は 200℃、ドライガス流速は 20 L/min、シーズガス温度は 400℃、シーズガス流速は 12 L/min、キャピラリ電圧は 3,000 V とした。表 1 に化合物ごとの MRM 条件を示した。

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を以下に、概略を図 1 に示した。ポリプロピレン (PP) 製 50 mL 遠沈管に試料 10 g をひょう取し、超純水 2.5 mL を加えボルテックスミキサーで 1 分間激しくかくはんした。さらに、アセトニトリル 15 mL を加えボルテックスミキサーで 1 分間激しくかくはんした後、時々かくはんしつつ 5 分間静置した。これに無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 2 g 及びクエン酸一水和物 1.5 g を加え、1 分間振とう後 1 分間超音波処理した。これを遠心分離 (3,300 rpm、5 分間) し、分離したアセトニトリル層を採取した。残留物にアセトニトリル 15 mL を加え、1 分間振とうした後、遠心分離 (3,300 rpm、5 分間) した。アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合わせ、30 mL に定容し抽出液とした。

抽出液の 15 mL を採取し、脱脂のためアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加え、1 分間振とう後遠心分離 (3,300 rpm、5 分間) した。ヘキサン層を採り、そこにアセトニトリル 30 mL を加え、1 分間振とう後遠心分離 (2,000 rpm、5 分間) し、アセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合一した。これに超純水 1 mL を加え、1 分間振とう後遠心分離 (2,000 rpm、5 分間) し、アセトニトリル層をエバポレーターで濃縮乾固した。乾固後の残留物にアセトニトリル 9 mL を加え再溶解し、アセトニトリルで 10 mL に定容後、遠心分離 (3,300 rpm、5 分間) し、上清を負荷溶液とした。アセトニトリル 10 mL を通液してコンディショニングした FL ミニカラムに負荷溶液 8 mL を負荷し、流出する溶液を回収した。さらにアセトニトリル 2 mL を注入し、流出液を合一した後、アセトニトリルで 10 mL に定容した。分析時のピーク形状を改善するため、この溶液 700 μL に超純水 300 μL を加えて希釈し、遠心分離 (15,000 rpm、10 分間、4℃) した上清を試験溶液とした。

7. 検量線

検量線作成にはマトリックス標準溶液をアセトニトリル：水 = 7：3 となるよう、超純水で希釈したものを用いた。マトリックス標準溶液はブランク試料から調製した定容後のミニカラム溶出液（以下、ブランク試験溶液とする）を用い、「方法 1.」で示した添加用混合標準溶液を適宜希釈して調製した。検量点は各殺鼠剤の添加回収試験における回収率 50%、75%、100%、125% 及び 150% 相当濃度とした。

8. 試料マトリックスの分析への影響

添加用混合標準溶液をブランク試験溶液及びアセトニトリルでそれぞれ希釈し、マトリックス標準溶液及び溶媒標準溶液を調製した。これらをアセトニトリル：水 = 7：3 となるよう超純水で希釈した溶液を LC-MS/MS で分析した。マトリックスの影響はマトリックス標準溶液のピーク面積を溶媒標準溶液のピーク面積で除した値（各 2 回分析した平均値）を算出して評価した。

9. 妥当性評価試験

豚筋肉及び豚肝臓試料を用いて、殺鼠剤 8 物質を対象に

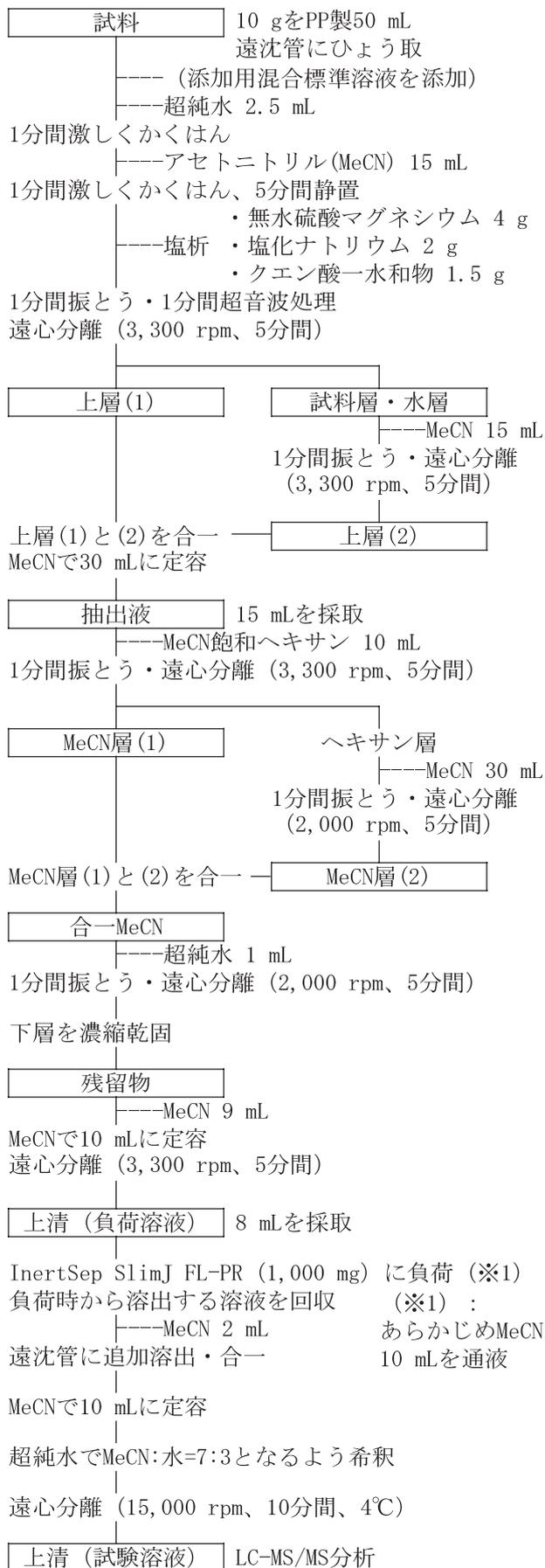


図1 開発した分析法による試験溶液調製のフロー

妥当性評価試験を実施した。添加濃度は2濃度とし、あらかじめ殺鼠剤残留がないことを確認したブランク試料10 gに、各殺鼠剤の添加濃度がそれぞれ一律基準濃度(0.01 mg/kg相当)及び定量限界濃度(0.005 mg/kgもしくは0.0005 mg/kg)となるよう添加用混合標準溶液を添加して調製した。妥当性評価試験は分析者2名が、それぞれ添加試料を1日2併行、3日間分析する枝分かれ実験計画により実施した。分析結果から選択性、真度、併行精度及び室内精度を算定し、「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」(以下、ガイドラインとする)⁷⁾の目標値への適合性を評価した。

結果と考察

1. 塩析条件の検討

抽出はNakajimaら⁸⁾のQuEChERS法に基づく方法の一部を改良し、牛筋肉を対象とした西村らの方法⁹⁾を基に検討した。ワルファリンのpK_aが5.87であるという報告¹⁰⁾から、殺鼠剤は酸性条件で塩析時に有機溶媒層に移行しやすいと考え、豚肝臓試料を用い、抽出溶媒を5%ギ酸含有アセトニトリルで酸性とし、無水硫酸マグネシウム4 g及び塩化ナトリウム2 gで塩析を行った条件と、抽出溶媒をアセトニトリルとし、無水硫酸マグネシウム4 g及び塩化ナトリウム2 gと同時にクエン酸一水和物1.5 gを加え、塩析時に酸性とした条件で検討した。結果を図2に示した。抽出溶媒を酸性とした条件ではクロロファシノンの回収率は80%程度であったが、塩析時に酸性とする条件では、すべての殺鼠剤で90%以上の良好な回収率が得られた。以上の結果から、抽出溶媒はアセトニトリルとし、無水硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムと同時にクエン酸一水和物を加え酸性条件とする方法を用いることとした。

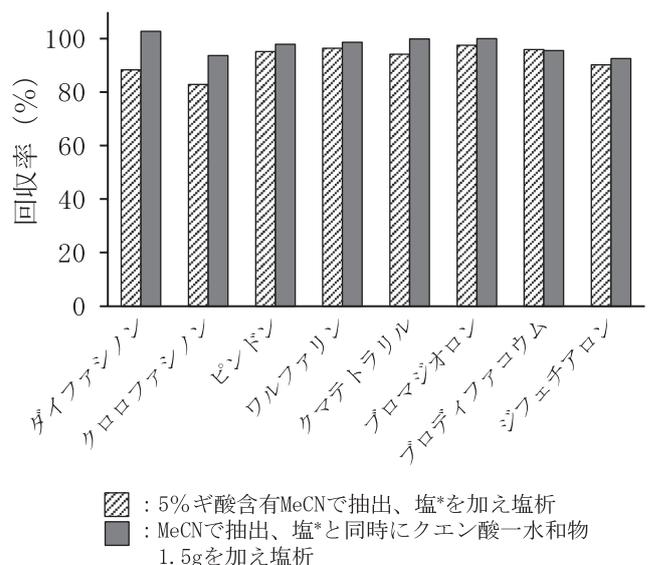


図2 LC-MS/MSによる殺鼠剤一斉分析法の回収率に及ぼす塩析条件の影響

*無水硫酸マグネシウム4 g、塩化ナトリウム2 g

2. 脱脂条件の検討

アセトニトリル-ヘキサン分配による脱脂の検討を行った。抽出液 15 mL にアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加え振とう、遠心分離後のヘキサン層を除去したところ、ピンドンの回収率が 65% 程度となり、ヘキサン層に一部が分配していることが考えられた。このため、回収率改善を目的にヘキサン層からの殺鼠剤の再分配を検討した。すなわち、振とう、遠心分離後のヘキサン層を全量回収し、そこに体積比 3 倍量のアセトニトリルを加え振とう、遠心分離後、アセトニトリル層に含まれる殺鼠剤の回収率を算出した。結果を図 3 に示した。その結果、ピンドンは回収率 94%、ダイファシノン は 102%、クロロファシノンは回収率 96% となり、すべての殺鼠剤で 94~102% の良好な回収率が得られたため、アセトニトリルによる再分配を行うこととした。

3. 固相抽出ミニカラムを用いた精製条件の検討

通知試験法^{5,6)} を参考に PSA ミニカラム及び C18 ミニ

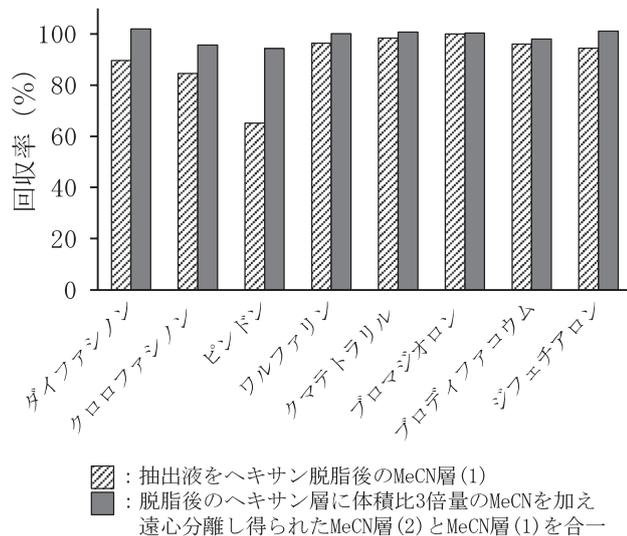


図 3 LC-MS/MS による殺鼠剤一斉分析法の回収率に及ぼすヘキサン脱脂の影響

カラムを用い、脱脂及び再溶解後の負荷溶液について精製を検討した。その結果、PSA ミニカラムはジフェチアロンの保持が弱く、回収率が低かった。また、C18 ミニカラムは概ね良好に保持されるものの、ピンドンが溶出しなかった。そこで、陰イオン交換及び疎水性相互作用を持つ WAX ミニカラムを検討した結果、殺鼠剤は良好に保持され、回収が可能であった。しかし、殺鼠剤と試料由来の夾雑色素を分離溶出させることはできず、十分な精製効果が得られなかった。そのため、精製には異なる吸着メカニズムを用いる必要があると考え、順相系の FL ミニカラムを用いた方法を検討した。あらかじめアセトニトリル 10 mL を通液し、コンディショニングを行った FL ミニカラムに、負荷溶液 8 mL を負荷した後、追加のアセトニトリル 2 mL を注入し、回収率を算出した。その結果、すべての殺鼠剤において、回収率は 90% 以上と良好であった。また、夾雑色素の大部分はフロリジルに吸着し、除去可能であった。従って、精製は FL ミニカラムを用い、負荷溶液を通過させ、アセトニトリル 2 mL で溶出する方法とした。

4. マトリックス効果

「方法 8.」に従い調製した溶液のピーク面積比は、殺鼠剤全体では豚筋肉試料で 0.78~1.05、豚肝臓試料で 0.78~1.09 であり、両試料ともにピンドンに最も大きなイオンサプレッションが認められた。このため、殺鼠剤濃度を正確に定量することは困難と考えられたことから、検量線はマトリックス標準溶液を用いることとした。

5. 妥当性評価

開発した分析法を用いた、豚筋肉及び豚肝臓試料における妥当性評価結果を表 2 及び 3 に示した。検討した殺鼠剤 8 物質すべてでガイドライン⁷⁾ の目標値を満足し、良好な結果が得られた。ブランク試料を「方法 6.」に従い調製した試験溶液において、定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。定量限界 (S/N 10 以上) は、マトリックス標準溶液のピーク高さから、クロロファシノン、クマテトラリル及びジフェチアロンで 0.005 mg/kg、ダイファシノン、ピンドン、ワルファリン、プロマジオロン及

表 2 LC-MS/MS による豚筋肉中殺鼠剤一斉分析法の妥当性評価結果

物質名	定量限界 (mg/kg)	定量限界添加 (0.005 or 0.0005 mg/kg)			一律基準添加 (0.01 mg/kg)		
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
ダイファシノン	0.0005	90	4.4	4.7	94	3.4	4.8
クロロファシノン	0.005	84	3.8	6.2	86	2.7	6.2
ピンドン	0.0005	82	3.2	7.7	86	2.7	5.3
ワルファリン	0.0005	91	3.1	5.9	94	2.0	4.8
クマテトラリル	0.005	89	3.3	6.5	95	1.9	6.5
プロマジオロン	0.0005	94	2.8	5.3	100	1.8	4.9
プロディファコウム	0.0005	87	6.0	6.0	90	2.3	4.4
ジフェチアロン	0.005	90	2.5	5.3	91	2.3	5.8
ガイドラインの目標値		70~120	※ 1	※ 1	70~120	25 >	30 >

※ 1 添加濃度が 0.005 mg/kg の殺鼠剤については併行精度 25 >、室内精度 30 > (RSD%)
 添加濃度が 0.0005 mg/kg の殺鼠剤については併行精度 30 >、室内精度 35 > (RSD%)

表 3 LC-MS/MS による豚肝臓中殺鼠剤一斉分析法の妥当性評価結果

物質名	定量 限界 (mg/kg)	定量限界添加 (0.005 or 0.0005 mg/kg)			一律基準添加 (0.01 mg/kg)		
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
ダイファシノン	0.0005	85	4.2	7.7	84	0.7	2.7
クロロファシノン	0.005	80	5.4	13.4	77	6.1	6.1
ピンドン	0.0005	87	3.2	12.5	85	1.9	3.1
ワルファリン	0.0005	94	4.4	8.3	94	1.4	1.6
クマテトラリル	0.005	92	5.7	9.7	92	3.7	3.7
プロマジオロン	0.0005	92	3.8	8.3	90	1.2	1.8
プロディファコウム	0.0005	95	4.3	11.7	89	2.4	2.7
ジフェチアロン	0.005	85	2.7	10.2	85	1.5	2.0
ガイドラインの目標値		70~120	※ 1	※ 1	70~120	25 >	30 >

※ 1 添加濃度が 0.005 mg/kg の殺鼠剤については併行精度 25 >、室内精度 30 > (RSD%)
 添加濃度が 0.0005 mg/kg の殺鼠剤については併行精度 30 >、室内精度 35 > (RSD%)

びプロディファコウムで 0.0005 mg/kg とした。

以上の結果から、本法は豚筋肉及び豚肝臓試料中の抗凝血性殺鼠剤 8 物質の一斉分析法として有用と考えられる。

文 献

- Ivan Valchev, Rumen Binev, Veska Yordanova, Yordan Nikolov: Anticoagulant rodenticide intoxication in animals - a review. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **32**(4), 237-243 (2008)
- 竹島由実子, 稲垣達也, 石川邦生: 豚のクマリン中毒. *日獣会誌*, **48**(1), 18-20 (1995)
- 厚生労働省ホームページ: 平成 27 年度 食品中の残留農薬等検査結果について, <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000202113.pdf> (確認: 2022 年 8 月 8 日)
- 厚生労働省ホームページ: 平成 19 ~ 23 年度 食品中の残留農薬等検査結果について, <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000133424.pdf> (確認: 2022 年 8 月 8 日)
- 厚生労働省ホームページ: ピンドン試験法 (畜水産物), <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000148508.pdf> (確認: 2022 年 8 月 8 日)
- 厚生労働省ホームページ: プロディファコウム及びワルファリン試験法 (畜水産物), <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-248.html> (確認: 2022 年 8 月 8 日)
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部食安発 1224 第 1 号「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
- Nakajima T, Nagano C, Sasamoto T, Hayashi H, Kanda M, Kanai S, Takeba K, Matsushima Y and Takano I: Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **53**(5), 243-253 (2012)
- 西村一彦, 山口博美, 橋本 諭, 平間祐志: LC/MS/MS による動物用医薬品の迅速一斉分析法の改良と妥当性評価. *道衛研所報*, **63**, 57-63 (2013)
- Paweł Wiczling, Michał J. Markuszewski and Roman Kaliszan: Determination of pKa by pH gradient reversed-phase HPLC. *Anal. Chem.*, **76**(11), 3069-3077 (2004)