

HPLCによる食品中の有機系殺鼠剤クマテトラリル, ダイファシノン,ワーファリンの迅速検査法の検討

西田政司¹

Application for Rapid and Simultaneous Determination Method of Coumatetralyl, Diphacinone and Warfarin in Various Foods by HPLC

Seiji NISHIDA

要 旨

A simultaneous determination method of coumatetralyl, diphacinone and warfarin in various foods by HPLC was developed. These rodenticides were extracted with ethyl acetate. The extract was evaporated to dryness and the residue was partitioned between acetonitrile and hexane. The acetonitrile layer was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 15% acetone-hexane and was applied to SIL+FLO cartridge column. The column was lined with 20% acetone-hexane, then SIL cartridge was separated from FLO cartridge. Diphacinone was eluted from SIL cartridge with methanol. Coumatetralyl and warfarin were eluted from FLO cartridge with methanol.

The HPLC separation was carried out on a Inertsil[®] Ph-3 column (250mm × 4.6mm i.d., 5 μm) with methanol-0.1M KH₂PO₄, pH 5.4 as the mobile phase at a flow rate of 1.2mL/min, with a UV detector at 310nm. The recoveries of the rodenticides from 6 kinds of foods at the level of 1 μg were 46.4 ~ 108.6%.

Key Words : 殺鼠剤 Rodenticide, クマテトラリル Coumatetralyl, ダイファシノン Diphacinone, ワーファリン Warfarin, 高速液体クロマトグラフ HPLC

はじめに

平成 10 年 6 月に和歌山県で起こったヒ素入りカレー事件以後全国各地で様々な毒物混入事件が発生した。当研究所にもその後の 4 年間で保健所から毒物混入の疑いがある 40 件の検査依頼が持ち込まれた¹⁻⁴⁾。

このような中で当研究所では人の健康に甚大な被害をもたらす恐れがある化学物質の検査体制を整えるべく検査可能な物質とそうでない物質の区別を行うとともに食品に毒物が混入した場合を想定して毒物の簡易・迅速分析法の開発を行ってきた⁵⁻⁸⁾。

今回は我々が生活する中で、手軽に手に入り、身近にある有毒物質の一つである殺鼠剤のクマテトラリル, ダイファシノン, ワーファリンを検討の対象とした。

殺鼠剤には無機系と有機系のものがあり, 2001 年の生産量は 229.2 t で無機系が 55%, 有機系が 45%であっ

た⁹⁾。有機系にはダイファシノン系, クマリン系, モノフルオロ酢酸塩, クロロファシノンがある¹⁰⁾。(Table1)

今回は有機系殺鼠剤の中でも生産量の多いダイファシノン系のダイファシノン, クマリン系のクマテトラリルとワーファリンの一斉分析法の検討を行ったので結果を報告する。

方 法

Table 1 The Amount of Production of Rodenticide in Japan in 2001

Rodenticide		Amount of Production (t/year)
Inorganic Group	Zinc Phosphide	223
	Thallium Sulfate	55
Organic Group	Diphacin Group	177
	Coumarin Group	46
	Fluoroacetate	7
	Chlorophacinone	0

diphacinone : diphacinon group

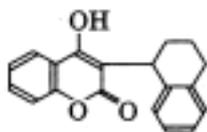
coumatetralyl, warfarin : coumarin group

1. 福岡市保健環境研究所 理化学課

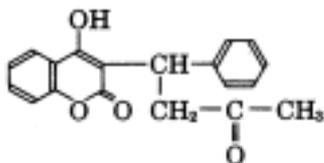
1 試薬

・標準試薬：クマテトラリル，ワーファリン，ダイファシノンは Accu St.Inc 製を使用した。Fig.1 に3殺鼠剤の構造式を示す。

1) Coumatetralyl



2) Diphacinone



3) Warfarin

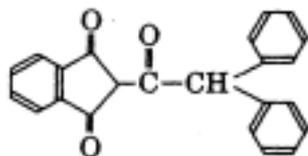


Fig.1 Chemical structure of rodenticide

・アセトニトリル，アセトン，酢酸エチル，ヘキサン，無水硫酸ナトリウム，メタノール：市販の残留農薬用試薬を使用した。

・酢酸亜鉛：市販特級を使用した。

・殺鼠剤標準原液：クマテトラリル，ワーファリン，ダイファシノンそれぞれ 4.0 μg を精秤し，メタノールで 20mL に定容し，200ppm 標準原液とした。

・殺鼠剤混合標準液：各殺鼠剤標準原液 1.0mL をとり，メタノールで 10mL に定容し 20ppm 混合標準液とした。

・シリカゲル(SIL)カートリッジカラム：WATERS Sep-Pak[®] Plus Silicagel(1g)をメタノール 10mL 及び 20%アセトン-ヘキサン 10mL で調整した。

・フロリジル(FLO)カートリッジカラム：WATERS Sep-Pak[®] Plus Florisil(1g)をメタノール 10mL 及び 20%アセトン-ヘキサン 10mL で調整した。

2 機器及び運転条件

1) 高速液体クロマトグラフ

ポンプ：WATERS 510，検出器：WATERS[™] 486，オートインジェクター：JASCO AS-950，レコーダー：JASCO 801-IT，恒温槽：スガイケミー（株）U 620

2) 運転条件

カラム：Inertsil Ph-3(i.d.4.6mm × 250mm ,5 μm)，波長：310nm，カラム温度：40℃，流量：1.0mL/min，注入量：10 μL，移動相：メタノール-0.1MKH₂PO₄ (55:45) pH5.4

3 検査方法

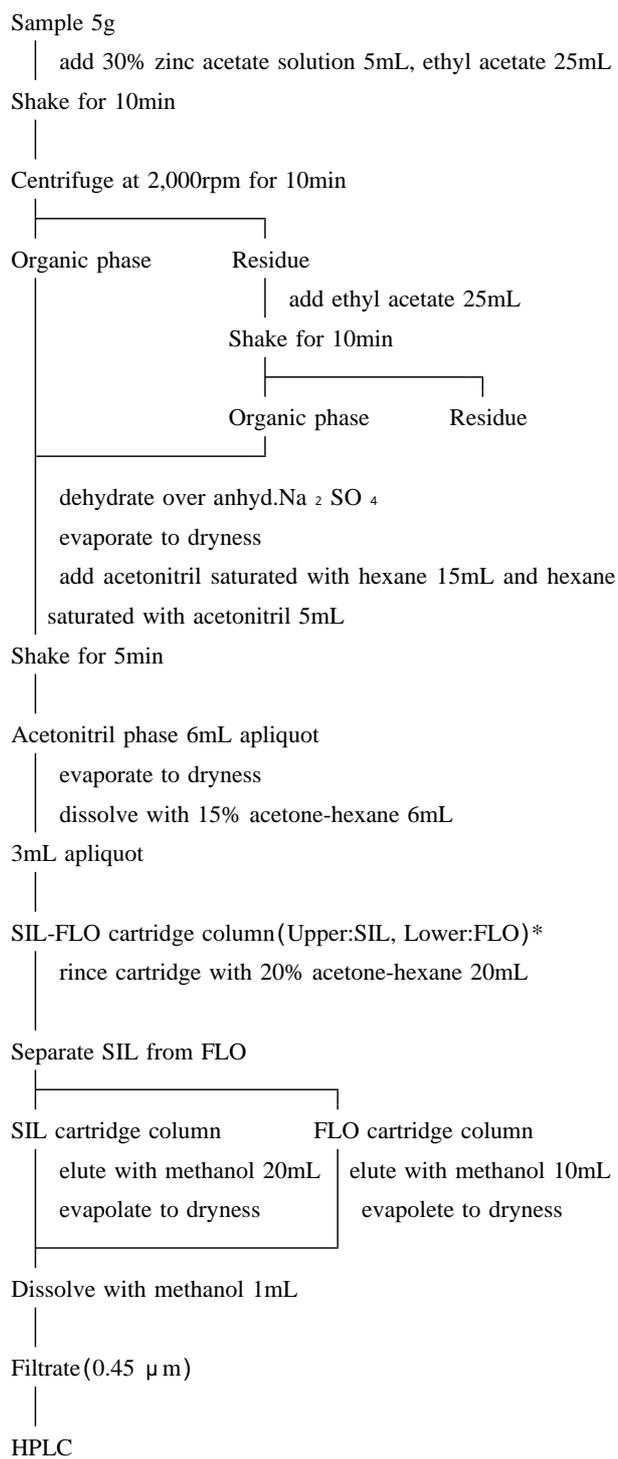


Fig.2 Analytical procedure for coumatetralyl, diphacinone and warfarin

試料 5g に 30%酢酸亜鉛溶液 5mL を加え，激しく振とう後，酢酸エチル 25mL を加え，10 分間振とう後遠心分離し，酢酸エチル層を分取，残渣に酢酸エチル 25mL を加え，同様に処理し，酢酸エチル層を無水硫酸ナトリ

ウムで脱水後、濃縮・乾固した。これにアセトニトリル 15mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 5mL を加え、1 分間振とうし、アセトニトリル層を濃縮・乾固し、20% アセトン/ヘキサン 5mL で溶解した。1mL をあらかじめメタノール 10mL、20%アセトニトリル-ヘキサン 10mL で調整した SIL-FLO カートリッジカラムに負荷し、20% アセトニトリル-ヘキサン 20mL で洗浄後、SIL カートリッジカラムとFLO カートリッジカラムをはずし、それぞれから殺鼠剤をメタノール 20mL で溶出させた。これを濃縮・乾固し、メタノール 1mL に溶解し、0.45 μm ディスポーザブルフィルターでろ過し、HPLC 用試料とし、10 μl を HPLC に負荷した。

Fig.2 に検査のフローを示す。

結果と考察

1 分離カラムと移動相の検討

オクタデシル基結合シリカゲルカラムとメタノール-10mM リン酸 1 カリウムの移動相で分離を試みたが、溶出しなかった。そこでオクチル基結合シリカゲルを使用したところ、クマテトラリルとワーファリンは良好に分離して検出されたが、ダイファシノンは検出されなかった。次にリン酸 1 カリウム濃度を 0.1M にしたところ、ダイファシノンが検出されるようになったが、テーリングが激しかったのでカラムをフェニル基結合シリカゲルの Inertsil Ph-3 (i.d.4.6mm × 250mm, 5 μm) とし、移動相をメタノール-0.1M リン酸 1 カリウム (55:45) pH5.6 としたところ、3 種の殺鼠剤は良好に検出された。pH によって Table 2 のように保持時間が変化したので、検討した食品のマトリックスの影響を受けにくい pH5.4 で以後の検討を行った。Fig.3 に移動相の pH を 5.4 としたときの 3 殺鼠剤の HPLC クロマトグラムを示す。

Table 2 Retention Time of Rodenticide

pH	Retention Time (min)		
	coumatetralyl	diphacinone	warfarin
5.4	11.9	14.1	17.3
5.6	9.5	12.7	13.7
6.2	7.6	11.8	9.8
6.5	7.1	11.5	8.1

* flow rate : 1.0mL/min

pH of mobile phase : 5.4 ~ 6.5

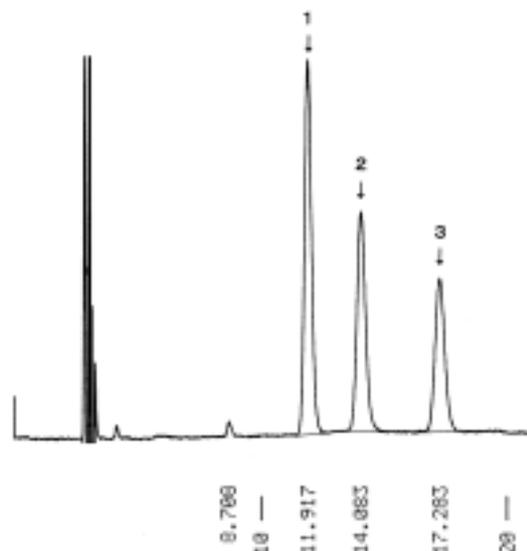


Fig.3 HPLC chromatogram of rodenticide

1 : coumatetralyl, 2 : diphacinone, 3 : warfarin

Concentration of rodenticide : 1mg/L

2 定量範囲の検討

1 の条件での直線性を 0.25 ~ 20mg/L の範囲で求めた。Fig.4 に示すようにクマテトラリルとワーファリンはピーク高と濃度との間の相関係数は 0.9999 で良好な直線性がみられたが、ダイファシノンは 5pm 以上でピーク形状が悪くなり、ピーク高と濃度との間に直線性はみられなかった。しかし 0.25 ~ 2.5mg/L の範囲ではピーク高と濃度との間の相関係数は 0.9999 で直線性がみられた。よってクマテトラリルとワーファリンは 0.25 ~ 20mg/L、ダイファシノンは 0.25 ~ 2.5ppm を定量範囲とした。

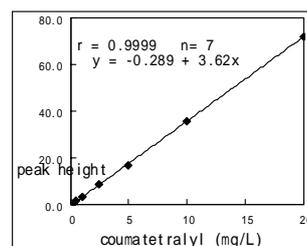


Fig.4 Calibration curves for rodenticide

3 抽出方法の検討

酢酸エチルで抽出するとき牛乳では抽出時にエマルジョンが起り、回収が低下したので 30%酢酸亜鉛溶液 5mL を加えて抽出したところ、エマルジョンは解消し、回収も良くなったので、試料に 30%酢酸亜鉛溶液 5mL を加えることとした。

4 SIL-FLOカートリッジラムによる精製

1) SILカートリッジラムによる精製

食品から殺鼠剤を、3 の条件で抽出し、濃縮・乾固し、メタノールで調整した試料溶液を HPLC で測定したところ、カレー、コーヒー、味噌汁、ジャムではマトリックスによる妨害ピークのため測定することはできなかった。

そこで SIL カートリッジラムで精製を行った。カートリッジに 10%アセトン-ヘキサンで調整した試料溶液を負荷した後 10%アセトン-ヘキサン 10mL で洗浄したところ、クマテトラリルとワーファリンが一部溶出したので両者が溶出しにくい 7.5%アセトン-ヘキサン 10mL で洗浄し、ダイファシノンが全て溶出するメタノール 20mL で溶出を行った。しかし、カレー、コーヒーがまだ妨害ピークの影響を受けたので、SIL と FLO カートリッジラムを組み合わせて妨害の除去を行うことにした。

2) SIL-FLOカートリッジラムによる精製

SIL と FLO カートリッジラムを直結して、20%アセトン-ヘキサンで調整した試料溶液を負荷し、20%アセトン-ヘキサン 20mL で洗浄した。この操作で負荷したクマテトラリルとワーファリンは全て SIL カートリッジラムを出て FLO カートリッジラムに保持された。またダイファシノンは全て SIL に保持されていた。

ダイファシノンは FLO カートリッジラムからはメタノールでは溶出しにくかったので、この時点で SIL と FLO カートリッジラムを分離し、メタノールでそれぞれのカートリッジラムから殺鼠剤を溶出させた。

FLO カートリッジラム中のクマテトラリルとワーファリンはメタノール 10mL、SIL カートリッジラム中のダイファシノンはメタノール 20mL で全て溶出した。両溶出液を併せて濃縮・乾固し、メタノールで調整し、HPLC で測定したところ 6 種の食品とも測定を妨害するピークはみられなかった。

Fig.4 に 1ppm の殺鼠剤標準溶液と各食品の HPLC 試料溶液のクロマトグラムを示す。

5 食品からの回収

6 種類の食品 5g に 3 種の殺鼠剤をそれぞれ 5 μ g 添加したときの回収率はクマテトラリルが 83.2 ~ 100.7%、

ダイファシノンが 46.4 ~ 97.7%、ワーファリンが 75.6 ~ 108.6%であった。

牛乳、マーガリンでは他の食品の場合に比べクマテトラリルとワーファリンは回収率が低く、逆にダイファシノンでは回収率が高かった。これは脂肪が多い牛乳や、マーガリンではカートリッジラムから溶出しやすいクマテトラリルとワーファリンは 20%アセトン-ヘキサン画分に溶出し、カートリッジラムから溶出しにくいダイファシノンはラムに保持されにくくなったことが原因である。

また RSD はカレーのダイファシノン以外は全て 10%以下でばらつきは小さかった。

Fig.5 に各食品の HPLC クロマトグラムを示す。

Table3 Recoveries of Spiked Rodenticides from Foods

Foods	Recovery(%), (RSD)(%)		
	Coumatetralyl	Diphacinone	Warfarn
Caffe	100.7 (1.1)	56.8 (11.3)	108.6 (1.3)
Curry	97.2 (8.6)	46.9 (6.2)	101.1 (5.0)
Margarine	88.0 (9.1)	97.7 (2.4)	75.6 (9.2)
Milk	83.2 (1.2)	69.5 (2.7)	78.3 (1.9)
Miso soup	99.1 (5.4)	46.4 (5.0)	101.3 (6.4)
Strawberry jam	92.0 (6.1)	46.4 (7.0)	84.5 (5.7)

To each foods, 5.0 μ g/5g of rodenticides.

ま と め

平成 10 年以降、当研究所では食品中に混入した毒物を迅速に定性、定量できるように検査体制の整備を進めている。

今回は殺鼠剤のうち比較的生産量の多いクマテトラリル、ワーファリン、ダイファシノンが食品に混入した場合を想定して検査法の検討を行った。

食品試料から酢酸エチル抽出し、ヘキサン-アセトニトリル分配で脂肪を除去し、SIL 及び FLO カートリッジラムで精製した後、HPLC で同時分析を行った。

主成分の異なる 6 食品に 1ppm レベルで 3 殺鼠剤を添加したときの回収率は、クマテトラリル、ワーファリンは 75%以上で満足のものであったが、ダイファシノンはカートリッジラムからの溶出が悪く、50%前後のものが多かった。この回収率を上げるためにはクマテ

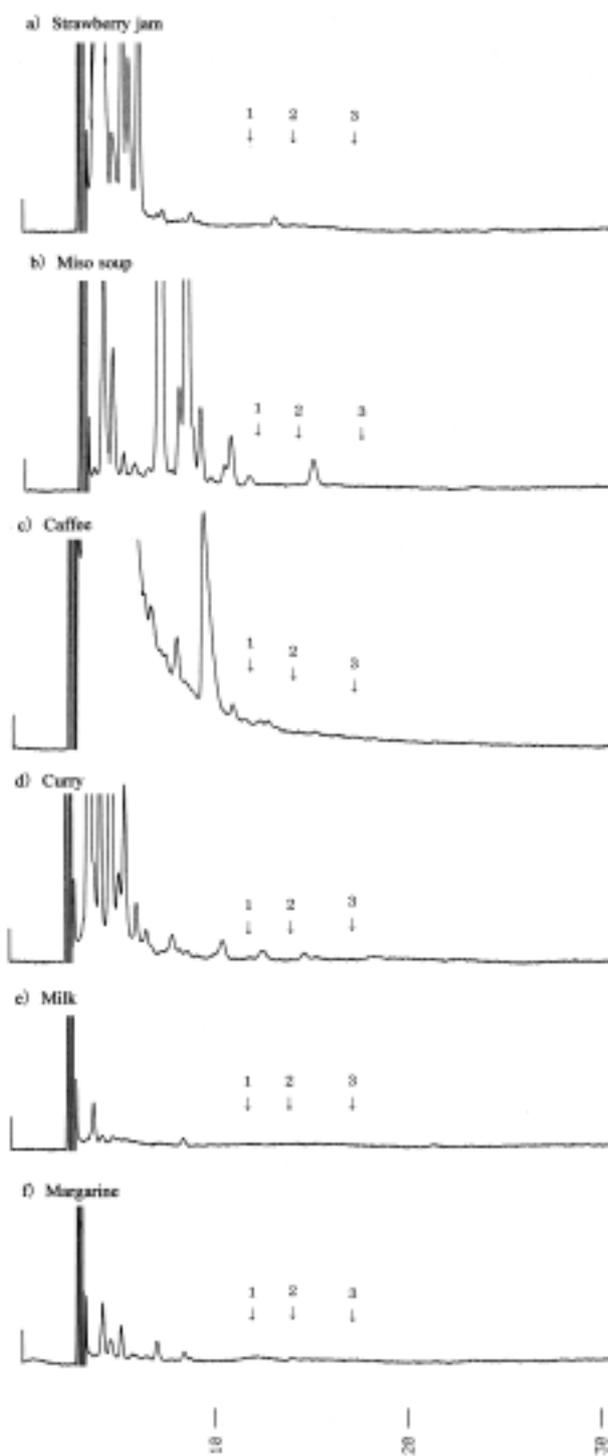


Fig.5 HPLC chromatogram of foods
 a) strawberry jam , b) miso soup , c) coffee ,
 d) curry , e) milk , f) margarine

トラリル，ワーファリンとは別の精製を行う必要があると考えているが，今回は毒物混入時の検査を想定したため，回収率の向上よりも迅速性を重視して同時精製を選択した．

今後はより正確な定性を行うために，HPLC/MS による確認が必要と考えている．

文 献

- 1) 厚生省告示第 258 号，(2001)
- 2) 小林英樹：福岡市保健環境研究所報，23, 239 ~ 242，(1998)
- 3) 小林英樹：福岡市保健環境研究所報，24, 124 ~ 127，(1999)
- 4) 江頭 勝, 小林英樹，西田政司：福岡市保健環境研究所報，25, 138 ~ 141，(2000)
- 5) 宮崎悦子, 西田政司：福岡市保健環境研究所報，26, 140 ~ 144，(2001)
- 6) 江頭 勝：福岡市保健環境研究所報，26, 145 ~ 148，(2001)
- 7) 厚生省告示第 237 号，(1999)

