

## GC/MS による生体試料中の モノフルオロ酢酸ナトリウム (Compound 1080) の分析

月岡 忠<sup>1</sup>・小山和志<sup>1</sup>・宮澤正徳<sup>1</sup>

モノフルオロ酢酸ナトリウム(MFA)の迅速分析法の開発を行った。試料からMFAを1N-硫酸溶液で抽出し、酢酸エチルで再抽出した。これに、1-ベンジル-3-p-トリルトリアゼンのジエチルエーテル溶液を加え、還流させながらベンジル化し、シリカゲルカートリッジカラムで精製後、HCB-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>を内部標準物質としてGC/MS-SIMで定量した。本法の定量限界は0.05 μg/gで、操作時間は短く、溶媒の使用量も少なく、選択性に優れている。本法はその他のハロゲン化酢酸類にも応用が可能であり、動物の斃死事故や食品苦情等の原因究明に十分使用できる。

キーワード：モノフルオロ酢酸ナトリウム、殺鼠剤、生体試料、GC/MS

### 1. はじめに

モノフルオロ酢酸ナトリウム(MFA)は殺鼠剤として、使用されている。MFAは第二次世界大戦中にドイツの化学者によって植物中から発見され、オーストラリア、ブラジル、アフリカ等の南半球の少なくとも40種類以上の植物中に存在すると言われて<sup>1)</sup>いる。MFAの毒性はクエン酸回路阻害であり、ラットのLD<sub>50</sub>は1mg/kgである。わが国では、特定毒物に指定されており、有資格者でないと毒餌の取扱いができず、屋内での使用は禁止されている。

MFAの微量分析法については生体試料を対象としたものが多く報告されている。MFAはそのままではGC分析できないため、誘導体化した後にGCやGC/MS<sup>2)~9)</sup>で定量している。Sporkertら<sup>2)</sup>は酸性にした生体試料からSPME(Solid Phase Micro Extraction)ファイバーで抽出後、1-pyrenyldiazomethanでエステル化しGC/MSで測定している。Koryaginaら<sup>3)</sup>は水と生物試料からの抽出物を、エタノールと硫酸を用いてエチル化し、GC-FIDとGC/MSで定量している。Hoogenboomら<sup>4)</sup>は生体試料とエサからの抽出物をベンジルジメチルフェニルアンモニウムを用いてGCの注入口中でベンジル化(Bz化)し、光イオン化検出器(PID)とFIDで定量している。Eichholdら<sup>5)</sup>はラット組織からの抽出物をペンタフルオロベンジル化(PFB化)しGC/MSで定量している。Ozawaら<sup>6)</sup>は底質と生体試料中のMFAをシクロヘキシルカルボジイミド

とジクロロアニリンを用いてジクロロアニリド誘導体化合物としGC/MSで定量している。しかし、これらの方法は緊急を要する事故の原因究明には操作性の面で問題があった。Yangら<sup>10)</sup>は誘導体化せずに、血液と食物試料からの抽出物をイオンクロマトグラフィーで定量しているが、イオンクロマトグラフィーでは選択性に難点がある。

本研究は生体試料の迅速分析に対応できるよう、操作時間が短く、選択性の高いMFAの分析法の構築を目的とした。その結果、MFAを生体試料や胃内容物から硫酸溶液で抽出後、更に酢酸エチルに抽出し、Bz化合物としてGC/MSで定量する方法を構築した。本法は操作時間が短く、選択性に優れた方法で、動物の斃死事故等の原因究明に使用できると考えられる。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬

モノフルオロ酢酸ナトリウム：林純薬工業(株)製、残留農薬測定用を精製水で希釈して用いた。

酢酸エチル、n-ヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル：残留農薬分析用を用いた。

1-ベンジル-3-p-トリルトリアゼン：東京化成工業(株)製、特殊用をジエチルエーテルで1 w/v %濃度に溶解した。

硫酸、塩化ナトリウム：試薬特級を用いた。

ヘキサクロロベンゼン-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>(HCB-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>)：Cambridge

1 長野県環境保全研究所 保健衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

Isotope Laboratories, Inc. をベンゼンに溶解し、 $10 \mu\text{g/mL}$  溶液を作成した。

シリカゲルカートリッジ：バリアン製 BOND ELUT LRC-SI 500mg を用いた。

## 2.2 装置及び測定条件

### GC 条件

GC：HP 製，5890 シリーズ II

カラム：DB-5MS，内径  $0.25\text{mm}$  × 長さ  $30\text{m}$  × 膜厚  $0.25 \mu\text{m}$

カラム温度： $60^\circ\text{C}$  (2min) -  $15^\circ\text{C}/\text{min}$  -  $150^\circ\text{C}$  -  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  -  $220^\circ\text{C}$  -  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  -  $300^\circ\text{C}$  (5min)

注入口温度： $250^\circ\text{C}$

キャリアーガス：He，流速  $1\text{mL}/\text{min}$

### MS 条件

MS：日本電子(株)，JMS GC-mate

イオン化電圧： $70\text{V}$

イオン化電流： $300 \mu\text{A}$

イオン源温度： $250^\circ\text{C}$

モニターイオン (m/z)：108, 168, 290

## 2.3 試料

生体試料として、斃死した動物の筋肉、胃内容物を用いた。

## 2.4 分析操作

ホモジナイズした試料  $1 \sim 2\text{g}$  を  $15\text{mL}$  のポリプロピレン製の遠心分離管に量り採り、これに  $1\text{N}$  硫酸  $10\text{mL}$  を加え、10 分間超音波抽出後、毎分  $3000$  回転で 10 分間遠心分離し上澄み液を  $50\text{mL}$  の分液ロートに移す。これに、 $3.5\text{g}$  の塩化ナトリウムと酢酸エチル  $10\text{mL}$  を加え、10 分間振とうする。静置し分離後、水層をすて、有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、 $100\text{mL}$  のナス型フラスコに移す。これに、 $1\text{w/v}\%$  の 1-ベンジル-3-p-トリルトリアゼンのジエチルエーテル溶液  $2\text{mL}$  を加え、60 分間還流する。反応液をロータリーエバポレーターで乾固寸前まで濃縮し、これに  $n$ -ヘキサン  $5\text{mL}$  を加えて溶解させる。予め  $n$ -ヘキサンで洗浄したシリカゲルカートリッジに反応液を負荷し、ヘキサン溶液はすて、 $4\text{v/v}\%$  アセトン含有ヘキサン溶液  $5\text{mL}$  で MFA の Bz 化物を溶出させ、これに  $10 \mu\text{g/mL}$  の  $\text{HCB-}^{13}\text{C}_6$  溶液  $50 \mu\text{L}$  を加え GC/MS-SIM で測定し、検量線から定量値を求める。

## 2.5 検量線の作成

塩化ナトリウム  $3.5\text{g}$  と  $1\text{N}$  硫酸溶液  $10\text{mL}$  を入れた  $50\text{mL}$  分液ロートに  $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g}$  の MFA を段階的に添加し、2.4 と同様に酢酸エチルで抽出、Bz 化、シリカゲルカートリッジによるクリンアップ、 $\text{HCB-}^{13}\text{C}_6$  を添加後、GC/MS-SIM で測定し、内部標準物質との面積比から検量線を作成する。

## 3 結果と考察

### 3.1 試料からの抽出溶媒

農産物の残留農薬一斉分析法<sup>12)</sup>では抽出溶媒にアセトニトリルを採用しているが、MFA はアセトニトリルでは抽出率が悪かったため、硫酸溶液を用いて抽出することにした。MFA は高極性で水溶性が高く、ヘキサンのような非極性溶媒では抽出されにくいと考えられたため、塩化ナトリウムを飽和させた硫酸溶液から酢酸エチルを用いて抽出し、酸濃度と回収率の関係を検討した。その結果、酸濃度が  $0.5 \sim 2\text{N}$  の間では殆ど回収率に差は認められなかったがそれ以上酸濃度が高くなると回収率は低下したため、硫酸濃度を  $1\text{N}$  とした。Fig. 1 に硫酸濃度と回収率の関係を示した。また、試料から硫酸溶液で MFA を抽出する際、酸濃度が  $0.5\text{N}$  から  $2\text{N}$  の間では殆ど抽出率に差は認められなかった。

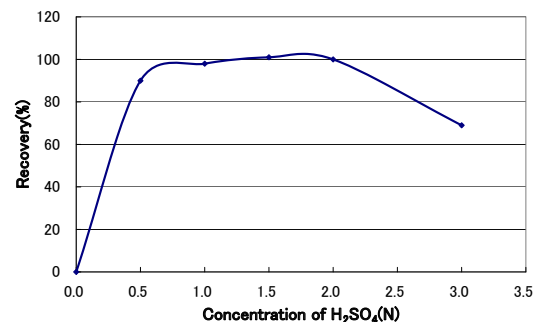


Fig.1 Relation between the concentration of sulfuric acid and the recovery.

### 3.2 Bz 化条件

MFA はそのままでは GC 分析できないため、低極性化と操作性を高めるために高質量化を目的として、Bz 化を検討した。Hoogenboom らはベンジルメチルフェニルアンモニウムを用いて Bz 化しているが、本法では、著者<sup>11)</sup>らがダラボンとテトラピオンの分析法で報告した 1-ベンジル-3-p-トリルトリアゼンの  $1\text{w/v}\%$  のジエチルエーテル溶液を使用し

た。

Fig. 2にMFAをBz化する際の反応時間と収率について検討した結果を示した。生成率は時間と共に増加し、60分以上でほぼ100%となったため、60分間還流させてBz化することにした。

### 3.3 シリカゲルカートリッジによるクリンアップ

生体試料は脂質等の妨害物質を多く含むため、クリンアップは必須である。本法では、操作時間を短

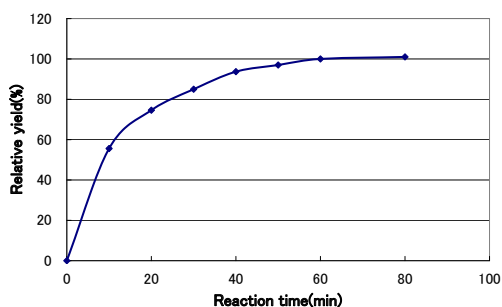


Fig.2 Relation between the reaction time and the relative yield.

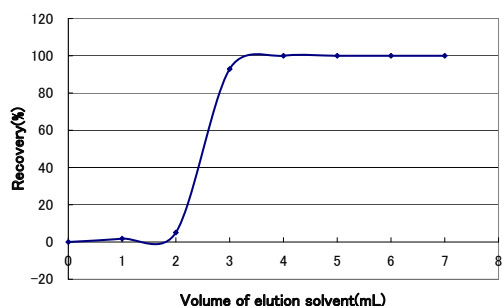


Fig.3 Relation between the volume of elution solvent and the recovery from silicagel cartridge

く、使用溶媒をできるだけ少なくする目的で、シリカゲルカートリッジを用いクリンアップ条件を検討した。MFAのBz化物はn-ヘキサンでは溶出してこなかったが、アセトンを加え極性を高めることによって溶出した。本法では4 v/v %のアセトン含有ヘキサンで1mLずつのフラクションをとり、溶出条件を検討した。Fig. 3に結果を示した。MFAのBz化物は3mLのフラクション部分に大半が溶出し、4mLのフラクションでほぼ100%が溶出している。そこで、4 v/v %のアセトン含有ヘキサン5mLで溶出させることにした。

### 3.4 GC/MS 条件

Fig. 4にMFAのBz化物のマススペクトルを示した。SIMの定量用イオンとして、分子イオンのm/z=168, 確認用にm/z=108を、また内部標準物質HCB-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>のイオンにm/z=290を用いることにした。ベースイオンのm/z=91は選択性に問題があり使用できなかった。Fig. 5にMFAのBz化物のSIMクロマトグラムを示した。

GC用カラムは微極性のDB-5MSを用いた。マグロ肉1gにMFAを0.1 μg添加し回収実験を行った結果、回収率の平均は86%, 回収率の変動係数は4.6%であった (n=5)。

### 3.5 類似物質と実試料への応用

MFAと性質が類似していると考えられる、ジフルオロ酢酸、トリフルオロ酢酸、モノクロロ酢酸<sup>13)</sup>、ジクロロ酢酸<sup>13)</sup>、トリクロロ酢酸<sup>13)</sup>、モノプロモ

Scan: 586 R.T.: 8:55.9  
Base: m/z 91; 27.5%FS TIC: 1092078

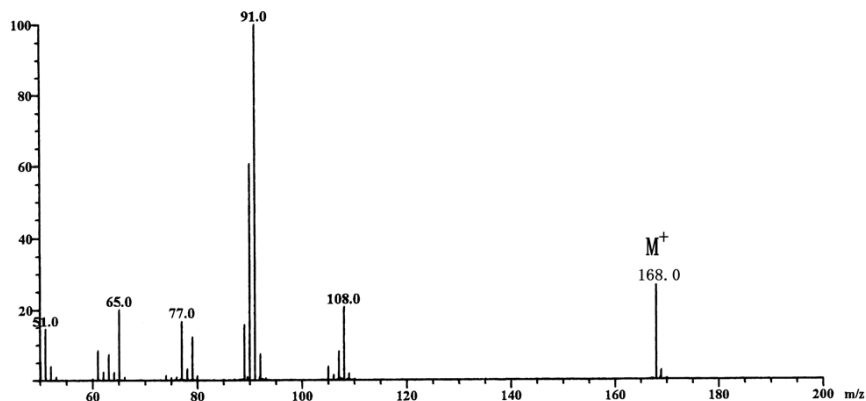


Fig.4 Mass spectrum of benzylated MFA.

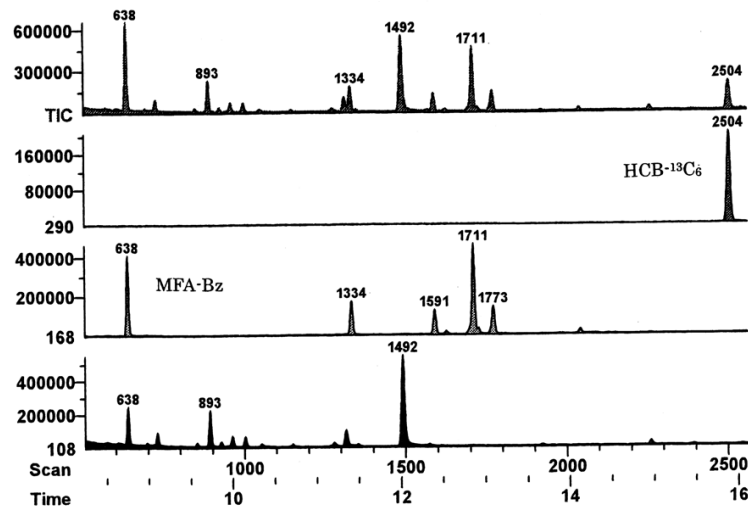


Fig.5 SIM chromatogram of benzylated MFA.

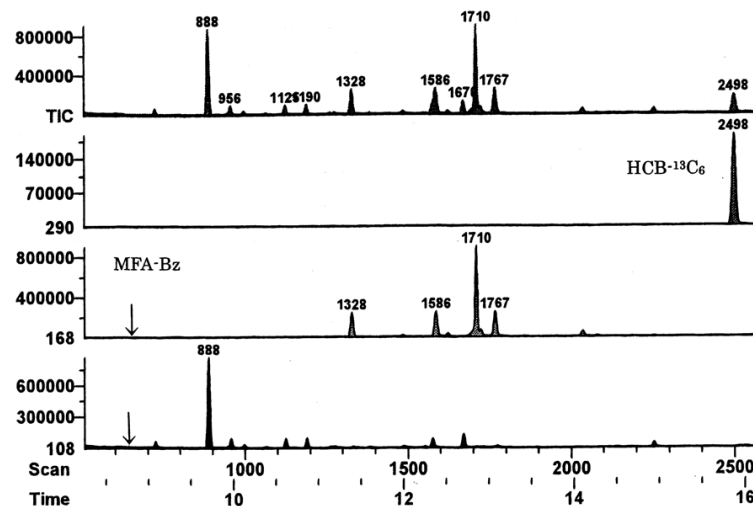


Fig.6 SIM chromatogram of a stomach content from a dead cat.

酢酸, ジブromo酢酸, トリブromo酢酸, 酢酸, プロピオン酸について2.4と同様に操作し, それぞれの分子イオンを用いて測定した結果, 感度や回収率の低いものもあったが, 動物の斃死や食品苦情の原因物質の同定に十分使用できると思われた. また, 本法を県内で発生した鳥や犬, 猫等の斃死試料に応用した. しかし, 実試料からはMFAは検出されなかった. Fig.6に斃死した猫試料のSIMクロマトグラム例を示した.

#### 4. まとめ

動物の斃死事故等の原因究明に使用できるMFAの迅速分析法の開発を行った. 試料からMFAを1N-硫酸溶液で抽出し, 酢酸エチルで再抽出した.

これに, 1-ベンジル-3-p-トリルトリアゼンのジエチルエーテル溶液を加え, 還流させながらBz化し, シリカゲルカートリッジで精製後, HCB- $^{13}\text{C}_6$ を内部標準物質としてGC/MS-SIMで定量した. 本法の定量限界は $0.05 \mu\text{g/g}$ で, 操作時間は短く, 溶媒の使用量も少なく, 選択性に優れている. 本法はまた, ハロゲン化酢酸類にも応用が可能であると考えられる.

#### 文献

- 1) Marais JCS., (1944) Monofluoroacetic acid, the toxic principle of " gifblaar" Dichapetalum cymosum, Onderstepoort Jour. Vet. Ind., 20, 67
- 2) Sporkert, F., Pragst, F., Hubner, S., mills, G., (2002)

- Headspace solid-phase microextraction with 1-pyrenyldiazomethane on-fiber derivatisation for analysis of fluoroacetic acid in biological samples, *J. Chromatogr. B analyt. Technol. Biomed. life sci.*, 25; 772(1), 45-51.
- 3) Koryagina, N.L., Savelieva, E.I., Khlebnikova, N.S., Goncharov, N.V., Jenkins, R.O., Radilov, A.S., (2006) Determination of fluoroacetic acid in water and biological samples by GC-FID and GC-MS in combination with solid-phase microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386(5), 1395-1400.
- 4) Hoogenboom, J.J., Rammell, C.G., (1987) Determination of sodium monofluoroacetate (compound 1080) in tissues and baits as its benzyl ester by reaction-capillary gas chromatography, *J. Anal. Toxicol.*, 11(4), 140-143.
- 5) Eichhold, T.H., Hookfin, E.B., Taiwo, Y.O., Wehmeyer, K.R., (1997) Isolation and quantification of fluoroacetate in rat tissues, following dosing of Z-Phe-Ala-CH<sub>2</sub>F, a peptidyl fluoromethyl ketone protease inhibitor, *Pharm. Biomed. Anal.*, 16(3), 459-467.
- 6) Hideaki, O., Tsukioka, T., (1989) Determination of sodium monofluoroacetate in soil and biological samples as the dichloroanilide derivative, *J. Chromatogr.*, 473, 251-259.
- 7) Miki, A., Tsuchihashi, H., Yamashita, M., (1998) GC and GC-MS determination of fluoroacetic acid and phenoxy acid herbicides via triphasal extractive pentafluorobenzylation using a polymer-bound phase-transfer catalyst, *J. Anal. Toxicol.*, 22(3), 237-245.
- 8) Allender, W.J., (1990) Determination of sodium fluoroacetate (compound 1080) in biological tissues, *J. Anal. Toxicol.*, 14(1), 45-49.
- 9) Casper, H.H., McMahon, T.L., Paulson, G.D., (1985) Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of fluoroacetate residues in animal tissues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(4), 722-725.
- 10) Yang, P., Shi, W., Zhou, H., Liu, L., Deng, Q., (2004) Determination of sodium monofluoroacetate in human blood and food samples by ion chromatography, *Se. Pu.*, 22(2), 177-180.
- 11) Tsukioka, T., Shimizu, S., Murakami, T., (1985) Determination of the Herbicides Frenock and Dalapon in Soil and River Water by Mass Fragmentography, 1985, *Analyst*, 110, 39-42.
- 12) 厚生労働省医薬品食品局「食安全部長通知(平成17年11月29日)「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(一部改正)」の別紙4「GC/MSによる農薬等の一斉分析(農産物)」
- 13) 環境庁環境保健部保健調査室(1985) 昭和59年度化学物質環境分析手法, 64-70

Determination of sodium monofluoroacetate(Compound 1080)  
in biological samples by GC/MS

Tadashi TSUKIOKA, Kazushi KOYAMA and Masanori MIYAZAWA

*Nagano Environmental Conservation Research Institute, Public Health Division,  
1978 Komemura Amori, Nagano 380-0944, Japan*

Abstract

A rapid analytical method for sodium monofluoroacetate (MFA) has been developed. The MFA was extracted from a sample with 1 N sulfuric acid and re-extracted with ethyl acetate. A solution of 1-benzyl-3-p-tolyltriazene in diethyl ether was added to the extract. The mixture was benzylated under reflux, purified with a silica-gel cartridge and subjected to a determination by GC/MS using HCB-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> as an internal standard substance. This method is also applicable to other halogenated acetates, and is excellent for inquiry into cases of death of animals and complaints about foods.

Key Words : sodium monofluoroacetate, rodenticide, biological sample, GC/MS