

第二市場に持ち込まれた異常牛からのサルファ剤検出例

野村剛¹, 梶政彦¹, 塩見哲生¹, 福本智也¹,
新美達也¹, 森田恵一¹, 川上雅弘¹, 辻由起¹, 永井博昭¹

Detection of Sulfamonomethoxine in the meat from sick cattle carried into the Kyoto City Slaughterhouse

Go NOMURA, Masahiko KAJI, Tetsuo SHIOMI, Tomoya FUKUMOTO,
Tatsuya NIIMI, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yoshiki TSUJI, Hiroaki NAGAI

Abstract : In the Kyoto City slaughterhouse, we perform a screening if the meat is contaminated with the veterinary drugs. Last year, we detected a case suspected to be contaminated with the sulfa drugs. In this case, high concentration of residual sulfamonomethoxine (SMMX) was confirmed by the liquid chromatography/mass/mass spectrometry (LC/MS/MS).

Key Words : 残留動物用医薬品モニタリング residual veterinary drugs monitoring, サルファ剤 sulfa drugs, スルファモノメトキシン sulfamonomethoxine (SMMX), 異常牛 unusual cattle, と畜場 slaughterhouse

I はじめに

当部門では京都市中央卸売市場第一市場、同第二市場及び京都市内の各保健所で収去された畜水産食品に関する残留動物用医薬品の詳細モニタリング検査を行っている。さらに第二市場では病畜及び抗菌剤投与が疑われる食肉に対して抗菌性物質の簡易検査が行われている。このような経緯から簡易検査で陽性疑いとなった検体については当部門で詳細な検査を行う体制をとっている。

2002年8月、第二市場に病畜として持ち込まれた牛の筋肉にサルファ剤残留の疑いが生じたため、当部門への詳細な検査の依頼があった。検査の結果、サルファ剤であるスルファモノメトキシン (SMMX) が検出された。今回はこの事例について報告する。

合成抗菌剤の検査は一般的に UV による検出を行っているが、当部門では、液体クロマトグラフ質量分析計 (liquid chromatography/mass/mass spectrometry, LC/MS/MS) による検出を併用していることから、今回の SMMX 検出事例について MS/MS 検出結果及び UV 検出結果を示す。

II 方法

抽出は、平成5年4月1日付け衛乳第79号中の「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法 (改訂法)」(以後、一斉分析法と記す) に準じて行った。当部門ではこの抽出

操作後、逆相系カラムで精製し、LC/MS/MS 分析用試験液としている。また、対象薬剤を検出した場合は UV 検出も行う事としている。

依頼を受けた牛 (筋肉) に対して、モニタリング対象であるサルファ剤5種及びサルファ剤と合剤として使用される可能性のある葉酸拮抗剤2種、抗原虫剤1種 (いずれもモニタリング対象)、さらにモニタリング対象外だが標準品として入手済みのサルファ剤7種について検査を行った。表1に分析対象薬剤を示す。

表1 分析対象薬剤

化合物名	略号	分類
スルファメラジン	SMR	サルファ剤
スルファジミジン	SDD	サルファ剤
スルファモノメトキシン	SMMX	サルファ剤
スルファジメトキシン	SDMX	サルファ剤
スルファキノキサリン	SQX	サルファ剤
オルメトプリム	OMP	葉酸拮抗剤
トリメトプリム	TMP	葉酸拮抗剤
ピリメタミン	PYR	抗原虫剤
*スルフィソミジン	SID	サルファ剤
*スルファクロルピリダジン	SCPD	サルファ剤
*スルファメトキシピリダジン	SMPD	サルファ剤
*スルファメトキサゾール	SMXZ	サルファ剤
*スルフィソキサゾール	SIX	サルファ剤
*スルファドキシシン	SDOX	サルファ剤
*スルファジアジン	SDZ	サルファ剤

* モニタリング対象外

1. サンプル

第二市場から依頼された牛 (筋肉) について抗菌性物質

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

の残留検査を行った。

2. 抽出・精製

抽出・精製は前報¹⁾に従い行った。試料5 gから、アセトニトリル25mlで抽出後、アセトニトリル-ヘキサン分配により精製する。これを2回行って得られたアセトニトリル層に1-プロパノール10mlを加えて減圧乾固(水浴40℃)後、残渣をアセトニトリル-水(4:6)2mlに溶解し、アセトニトリル-水-ヘキサン分配により精製する。(アセトニトリル-水)層1mlを取り出し、これに0.3%酢酸9mlを加えて固相抽出法を行うための試験溶液(中間抽出液)とする。

Sep-Pak C₁₈ Cartridge (Waters 社製)にメタノール10ml, 0.3%酢酸10mlを順次注入した後、中間抽出液10mlを注入する。0.3%酢酸10mlで洗浄した後、メタノール10mlで溶出する。この溶液を減圧乾固(水浴40℃)後、アセトニトリル-水(4:6)1mlに溶解し、10,000回転、5分間の遠心操作を行った後、試験溶液とする。

3. MS/MS による検出

一斉分析条件 (モニタリング対象項目)

1) HPLC

測定装置 : Agilent 1100 series
 カラム : ZORBAX SB-C18 (2.1×30mm) Agilent 製
 カラム温度 : 40℃
 移動相 : A 0.1% CH₃COOH aq
 B 0.1% CH₃COOH in MeOH
 グラジエント : B 0%-36% in 12min
 流速 : 0.3ml/min
 注入量 : 10 μl
 UV : 230nm, 270nm

2) MS

測定装置 : FINNIGAN LCQ^{DECA}
 (イオントラップ MSⁿ 型)
 イオン化モード : ESI (ElectroSpray Ionization)
 Ion Polarity : positive
 Analysis time : 22min

* Scan event :

SMR : Full ms2 265.00@35.00[150.00-195.00]
 TMP : Full ms2 291.00@35.00[120.00-300.00]
 OMP : Full ms2 275.00@35.00[120.00-280.00]
 SDD : Full ms2 279.00@35.00[180.00-210.00]
 SMMX : Full ms2 281.00@35.00[130.00-240.00]
 PYR : Full ms2 249.00@40.00[170.00-250.00]
 SDMX : Full ms2 311.00@35.00[150.00-250.00]
 SQX : Full ms2 301.00@25.00[150.00-310.00]

* Scan event の見方 (例 : SMR)

質量数265.00の分子イオンのみを選択してトラップし、相対的衝突エネルギーを35%として衝突活性化によるイオン分解を行う。その結果生成したフラグメントを質量数[150.00-195.00]の範囲でモニターする。

一斉分析法条件 (モニタリング対象外項目)

1) HPLC

測定装置 : Agilent 1100 series
 カラム : ZORBAX SB-C18 (2.1×30mm) Agilent 製
 カラム温度 : 40℃
 移動相 : A 0.1% CH₃COOH aq
 B 0.1% CH₃COOH in MeOH
 グラジエント : B 0%-75% in 25min
 流速 : 0.3ml/min
 注入量 : 10 μl
 UV : 230nm, 270nm

2) MS

測定装置 : FINNIGAN LCQ^{DECA}
 (イオントラップ MSⁿ 型)
 イオン化モード : ESI (ElectroSpray Ionization)
 Ion Polarity : positive
 Analysis time : 35min

Scan event :

SID : Full ms2 279.00@27.00[100.00-330.00]
 SCPD : Full ms2 285.00@23.00[100.00-350.00]
 SMPD : Full ms2 281.00@27.00[100.00-330.00]
 SMXZ : Full ms2 254.00@25.00[100.00-300.00]
 SIX : Full ms2 268.00@22.00[100.00-300.00]
 SDOX : Full ms2 311.00@27.00[100.00-350.00]
 SDZ : Full ms2 251.00@32.00[100.00-300.00]

SMMX 検出条件

1) HPLC

測定装置 : Agilent 1100 series
 カラム : ZORBAX SB-C18 (2.1×30mm) Agilent 製
 カラム温度 : 40℃
 移動相 : A 0.1% CH₃COOH aq
 B 0.1% CH₃COOH in MeOH
 グラジエント : B 0%-13% in 13min
 流速 : 0.3ml/min
 注入量 : 10 μl
 UV : 270nm

2) MS

測定装置 : FINNIGAN LCQ^{DECA}
 (イオントラップ MSⁿ 型)

イオン化モード : ESI (ElectroSpray Ionization)

Ion Polarity : positive

Analysis time : 23min

Scan event :

SMMX : Full ms2 281.00@35.00[100.00-350.00]

4. UV(PDA : フォトダイオードアレイ検出器)による検出

1) HPLC

測定装置 : SHIMADZU LC-10ADvp

カラム : STR ODS-II S type (4.6×150mm)

SHINWA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD. 製

カラム温度 : 40℃

移動相 : A 0.3% CH₃COOH aq

B 0.3% CH₃COOH in CH₃CN:H₂O (6:4)

グラジエント : B 0-45% in 27min

流速 : 1.0ml/min

注入量 : 20 μl

UV(PDA) : 270nm

III 試験結果

1. LC/MS/MS による一斉分析結果

一斉分析法による抽出の結果、MS/MS 検出においてそれぞれサルファ剤である SMMX, SMPD, SDMX, SDZ と疑われる化合物を検出した (図1, 2参照)。物質を確実に同定するためには1つのクロマトグラムに1つのピークが現れることが望ましいが、SMMX, SMPD の標準品クロマトグラムにはピークが2つある。これは SMMX と SMPD が構造異性体²⁾であるため、分子量が同一で、かつ生成フラグメントパターンも同一になるためであった。それぞれの構造式と生成フラグメントを図3に示す。2つのピークのいずれが SMMX, SMPD であるかを確認するためにそれぞれ単独で測定した結果、図1では11.89分に SMPD, 12.41分に SMMX が溶出することがわかった。

検体から検出された化合物のなかでも SMMX あるいは SMPD の分析条件で検出された化合物の残留が顕著であったが、保持時間から高濃度で残留している化合物は SMMX であることが判明した。SMMX と SMPD を分離させる条件を検討したのち、SMMX のみを詳細に検査することとした。さらに、公定法で採用されている UV 検出も行うこととした。

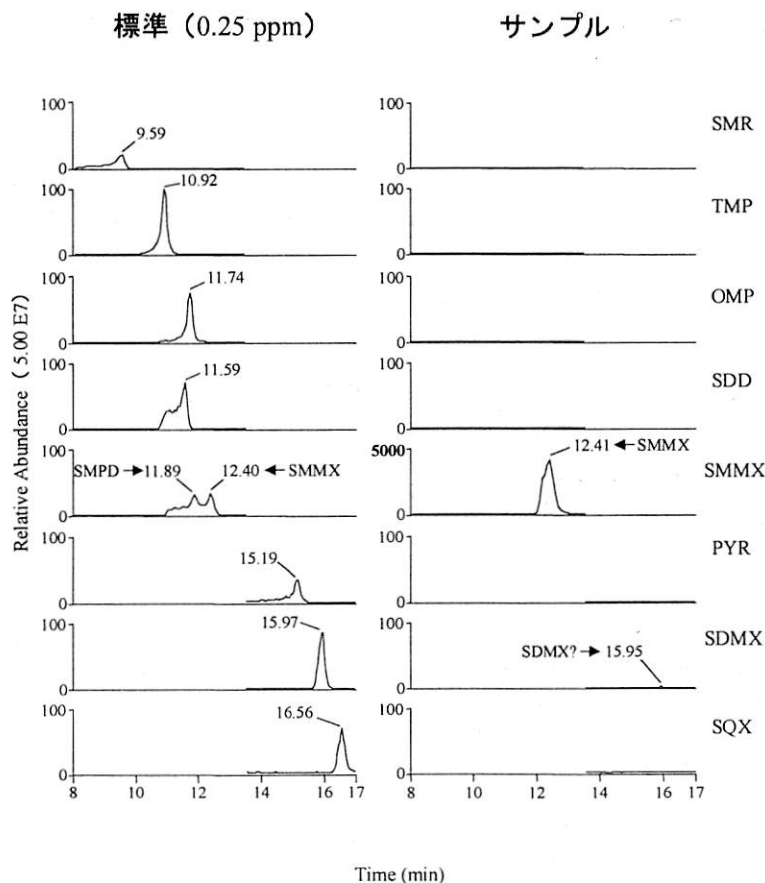


図1 一斉分析法によるMS/MSクロマトグラム (モニタリング対象項目)

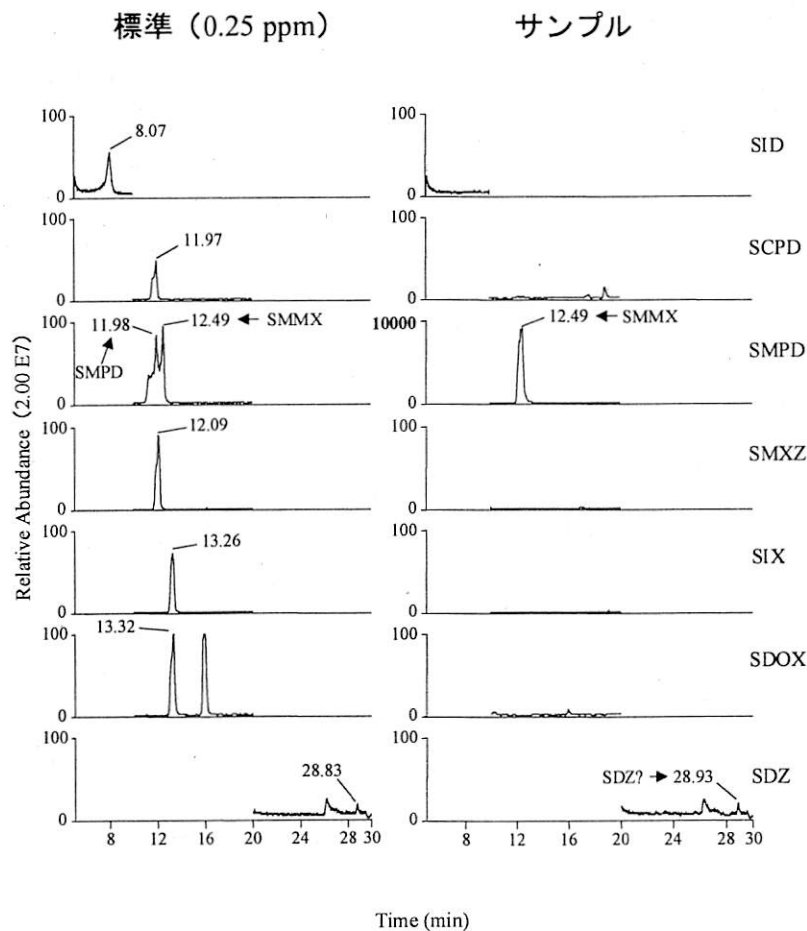


図2 一斉分析法によるMS/MSクロマトグラム (モニタリング対象項目外)

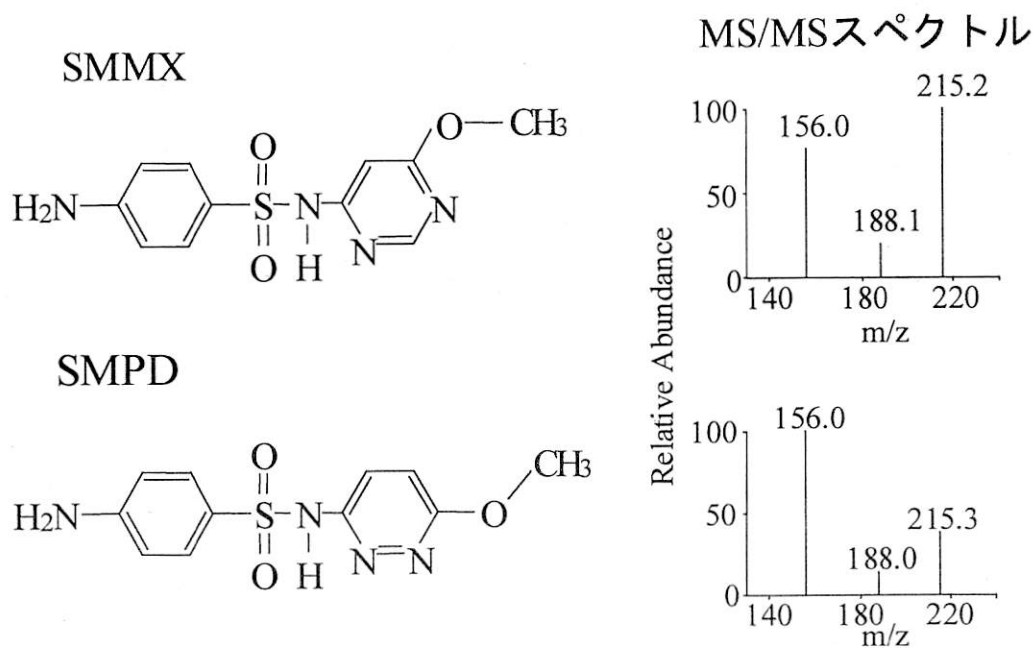


図3 SMMXとSMPDの構造式及びMS/MSによる生成フラグメント

2. LC/MS/MS による SMMX 検出結果

当該検体を4回繰り返し抽出し分析した結果、4回ともピークが認められた。SMMX 標準品と検体のクロマトグラム及び MS/MS スペクトルを図4に示す。4回中すべてのピークにおいて、MS/MS スペクトルは SMMX 標準品と高い類似度を示した。またこの検査における SMMX の添加回収率は約31%であった。MS/MS 検出での定量の結果、検出下限値 (0.03ppm) をはるかに越える平均13.12ppm の SMMX が検出された。

3. UV による SMMX 検出結果

UV(PDA)検出は MS/MS 検出に比べて夾雑成分の影響を受けやすく定量が困難であるが、公定法で採用されているため MS/MS 検出の補足として行った。SMMX 標準品とサンプル1のクロマトグラム及び UV 吸収スペクトルを図5に示す。検体中から抽出された SMMX と疑われる化合物と SMMX 標準品との PDA による UV スペクトル類似度は100%であった。また、この検査における SMMX の添加回収率は約123%であった。UV 検出での定量結果は20.6 ppm であった。

IV 考察

1. 検査法における今後の課題

SMMX 検出濃度を比較すると UV 検出の方が高かった。これは添加回収率が100%を越えていることから夾雑成分の影響が反映されていると考えられる。このため SMMX の残留濃度は MS/MS で検出した値を採用した。食肉中には複雑な夾雑成分が含まれているため、今後様々な微量物質を正確に分析するためには、合成抗菌剤のように UV 検出から MS/MS 検出に切り替えていかなければならない。

今回の SMMX 検出事例において、MS/MS による一斉分析法では SMMX 以外の物質 (SDMX, SDZ) についても残留の可能性があった。しかし第二市場では当該牛が廃棄処分されるかどうかの保留状態であったため迅速な検査が必要だった。さらに SMMX に比べて他の2物質のピークは小さく (図1, 図2参照)、定性や定量は困難であると予想されたため当部門では操作の正確性、迅速性を重視し SMMX のみ詳細に検査を行った。

検査した結果、標準品と検体中から検出されたピークの MS/MS スペクトルの類似度は高く SMMX と断定されたが、添加回収率は約31%と低かった。これは抽出後、溶出

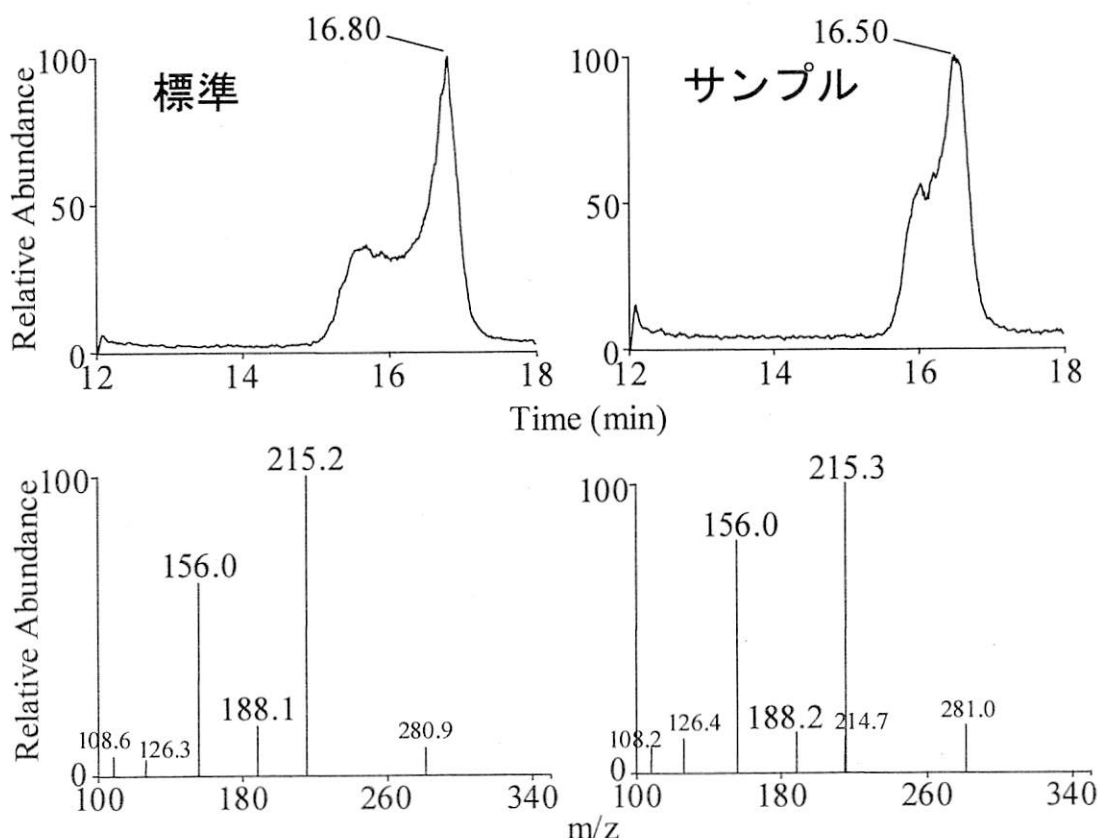


図4 SMMX検出におけるクロマトグラム及びMS/MSスペクトル

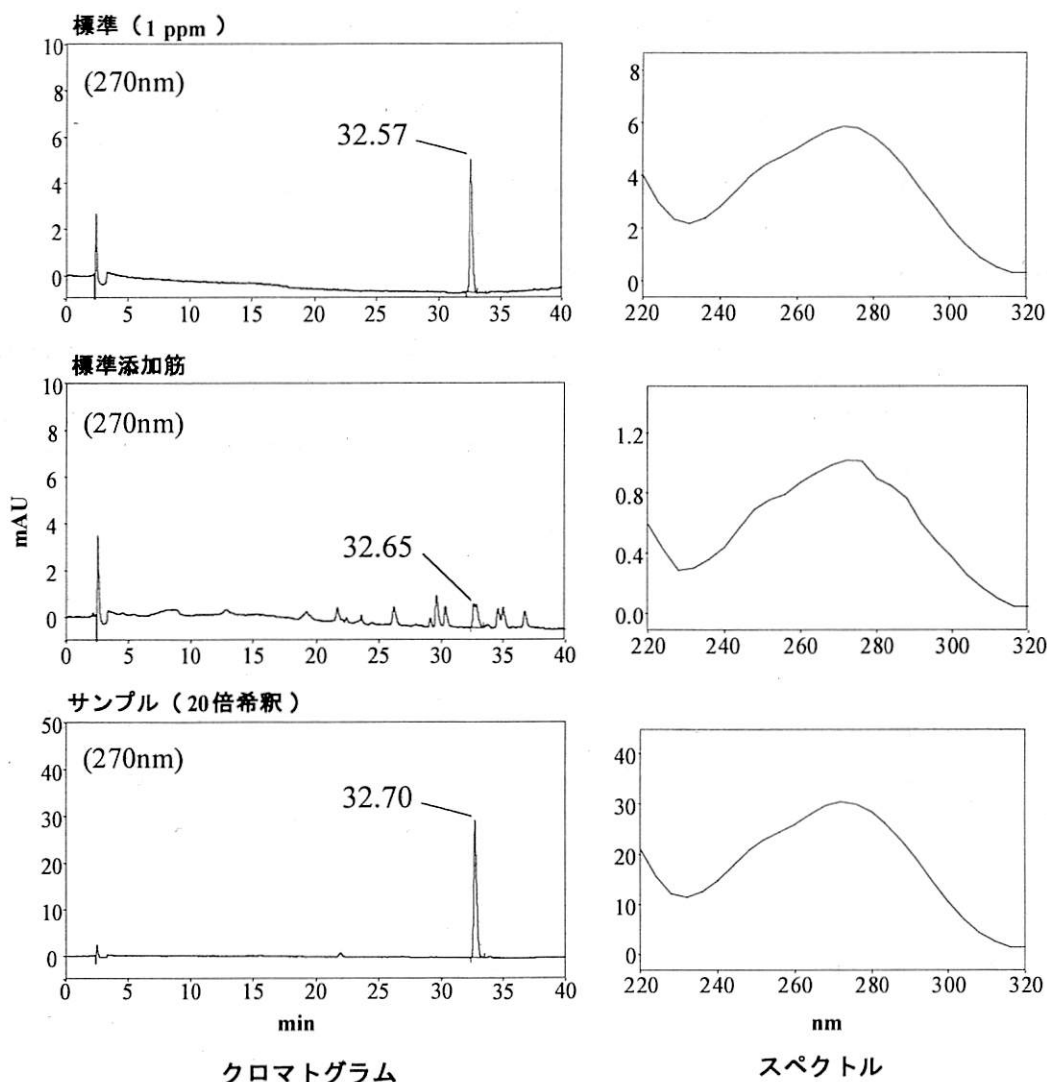


図5 SMMXのUV測定結果

条件等の検討を重ねたので時間が経過したことによりSMMXの一部が分解したためであるかもしれない。また前述したように他の2物質については十分な検討を加えていない。今後はこれらのより正確かつ迅速な分析法を模索し、確立させていかなければならない。

2. 当事例の意義

食品衛生法では、「食肉は、化学合成品たる抗菌性物質を含有してはならない。」とされているが、成分規格（残留基準値）に適合するものは「この限りではない」とされている。今回SMMXが検体中から検出されたが、SMMXは残留基準値が設定されていないため、食品衛生法不適として当該牛は廃棄処分された。第二市場での抗菌性物質の簡易検査の結果に加えて、残留合成抗菌剤の特定と高濃度残留が確定されたことにより、当該牛を廃棄処分させることができたのは非常に有意義であった。

今回の事例は前報¹⁾、前々報³⁾で報告した通常のモニタリング検査からの違反物質検出事例ではなく、第二市場からの依頼検査であった。今後も第二市場で簡易検査により動物用医薬品残留等の疑わしき検体が発見された場合は速やかに当部門で詳細な理化学検査を行い、協力体制をさらに築いていくことが望ましい。そして互いの役割をもって食肉における食品衛生上の危害防止に努めなければならない。

V 参考文献

- 1) 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門：同研究所年報，No. 68，133-139（2002）
- 2) 中沢裕之：動物用医薬品データブック，林純薬工業株式会社，大阪（1998）
- 3) 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門：同研究所年報，No. 67，111-116（2001）