

第7部 短報

目 次

1. LC/MS/MS による豚の残留トリメトプリム及びスルファメトキサゾール検出例	- (生活衛生)	-- 133
2. ベンジルペニシリン検査法について	----- (生活衛生)	-- 140
3. 神経芽細胞腫検査用コンピュータソフトの開発について	----- (臨 床)	-- 143
4. 病原性大腸菌 O25 HNM による食中毒事例について	----- (臨 床)	-- 146
5. 黄色ブドウ球菌による食中毒事例について	----- (臨 床)	-- 147
6. 豚の中皮腫の1症例について	----- (病 理)	-- 148
7. 牛の尿毒症について	----- (病 理)	-- 150
8. 京都市高齢者の生活状況について -平成10年国民生活基礎調査データより-	-- (疫学情報)	-- 153
9. 京都市感染症発生動向調査における流行性耳下腺炎の定点当たり報告数の解析	- (疫学情報)	-- 162
10. 定量 PCR を用いたアデノウイルス B 亜群感染症の早期診断の試み	----- (調査研究)	-- 165

Chapter 7 Short notes

Contents

1 . Detection of Residual Trimethoprim and Sulfamethxazole in pork by LC/MS/MS	- (Food)	-- 133
2 . Detection of residual benzylpenicillin in livestock products	----- (Food)	-- 140
3 . Development of Windows Application Programs for Neuroblastoma-Mass-Screening in Kyoto City	----- (Clin)	-- 143
4 . Food borne diseases caused by enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O25 HNM	---- (Clin)	-- 146
5 . A case of food borne diseases by <i>Staphylococcus aureus</i>	----- (Clin)	-- 147
6 . A case of mesothelioma in swine	----- (Path)	-- 148
7 . Uremic cattle delivered to the Kyoto City Slaughter House	----- (Path)	-- 150
8 . Living condition of the elderly in Kyoto City Based on the data of Comprehensive Survey of Living Conditions of People on Health and Welfare 1998	----- (Epid)	-- 153
9 . Analysis of Mumps Epidemic from the Cases Reported per Sentinel Site in the Kyoto City Surveillance of Infectious Diseases during 1984-2002	----- (Epid)	-- 162
10. Early diagnosis of Adenovirus subgroup B infection using real-time quantitative PCR	----- (Pub)	-- 165

LC/MS/MS による 豚の残留トリメトプリム及びスルファメトキサゾール検出例

塩見哲生¹, 辻由起¹, 梶政彦¹, 福本智也¹,
新美達也¹, 森田恵一¹, 川上雅弘¹, 井崎やゑ子¹, 森田正和¹

Detection of Residual Trimethoprim and Sulfamethoxazole in pork by LC/MS/MS

Tetsuo SHIOMI, Yoshiki TSUJI, Masahiko KAJI, Tomoya FUKUMOTO,
Tatsuya NIIMI, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yaeko IZAKI, Masakazu MORITA

Key Words : 豚肉 pork, 残留動物用医薬品モニタリング residual veterinary drugs monitoring,
トリメトプリム trimethoprim (TMP), 葉酸拮抗剤 anti folic acid drugs,
スルファメトキサゾール sulfamethoxazole (SMXZ), サルファ剤 sulfa drugs,
LC/MS/MS liquid chromatography/mass/mass spectrometry

I はじめに

動物用医薬品残留による健康被害防止のために、「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査実施要領（厚生労働省）」に基づいて全国的に畜水産食品の定期的モニタリング検査が行われている。そのうち、豚肉には抗生物質（4系統5物質）、合成抗菌剤（13種類（表1参照）、内寄生虫用剤（3種類）がモニタリング対象項目として設定されている。平成12年度のスルファキノキサリン検出事例（平成12年度京都市衛生公害研究所年報参照）に続いて、平成13年度に、葉酸拮抗剤トリメトプリム (TMP) が第二市場収去の豚肉から検出されたので、この事例について以下に報告する。

合成抗菌剤検出は一般的に UV 検出によるが、当部門では、平成12年度に液体クロマトグラフ質量分析計（liquid chromatography/mass/mass spectrometry, LC/MS/MS）を導入し、平成13年度からは合成抗菌剤の検出を MS/MS 検出に変更していることから、今回の TMP 検出事例について、MS/MS 検出結果を示している。

また、TMP はサルファ剤との合剤として使用される事が多いため、TMP 検出時にサルファ剤を検出することは TMP 検出の強力な確証となる。このため、TMP との合剤で市販されている4種類のスルファ剤についての検査を行ったので、その結果についても報告する。

表1 豚肉における合成抗菌剤のモニタリング対象項目

化合物名	分類
スルファメラジン	サルファ剤
スルファジミジン	サルファ剤
スルファモノメトキシ	サルファ剤
スルファジメトキシ	サルファ剤
スルファキノキサリン	サルファ剤
オキシリン酸	キノロン系抗菌剤
チアンフェニコール	クロラムフェニコール系抗菌剤
オルメトプリム	葉酸拮抗剤
トリメトプリム	葉酸拮抗剤
ピリメタミン	葉酸拮抗剤
フラゾリドン	ニトロフラン剤
ジフラゾン	ニトロフラン剤
カルバドックス	ジオキシキノキサリン系抗菌剤

II 検査法

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、逆相系カラムによる精製操作を加えている。精製後の試験溶液を LC/MS/MS 分析用試験液としている。また、検出事例に遭遇した場合は UV 検出も行う事としている。

1. サンプル

第二市場の食品衛生監視員により収去された豚10ロット（1ロットに筋肉、腎臓、肝臓を含む、計30検体）について残留検査を行った。サンプルは1個体から筋肉、腎臓、肝臓を採取するものとする。

2. 抽出・精製

試料5gから、アセトニトリル25mlで抽出後、アセトニ

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

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、残さをアセトニトリル-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

TMP 検出

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%-21% in 7 min

流速: 0.3ml/min

注入量: 10 μl

UV: 230nm

2) MS

測定装置: FINNIGAN LCQ^{DECA}

(イオントラップ MS⁺型)

イオン化モード: ESI(ElectroSpray Ionization)

Ion Polarity: positive

Segment time: 17min

Scan event:

Full ms2 291.00@35.00[120.00-300.00]

質量数291.00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[120.00-300.00]の範囲でモニターする。

サルファ剤検出

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%-45% in 15min

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 MS⁺型)

イオン化モード: ESI(ElectroSpray Ionization)

Ion Polarity: positive

Segment time: 19min

Scan event:

SDOX: Full ms2 311.00@35.00[100.00-320.00]

質量数311.00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[100.00-320.00]の範囲でモニターする。

SMXZ: Full ms2 254.00@35.00[90.00-260.00]

質量数254.00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[90.00-260.00]の範囲でモニターする。

SCPD: Full ms2 285.00@23.00[100.00-290.00]

質量数285.00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23%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[100.00-290.00]の範囲でモニターする。

4. UV (PDA: フォトダイオードアレイ検出器) による検出

TMP 検出

測定装置: SHIMADZU LC-10ADvp

カラム: STR ODS-II S type(150mm × 4.6mm I.D.)

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 0-30% in 18min

流速: 1.0ml/min

注入量: 20 μl

UV(PDA): 230nm

III 試験結果

1. LC/MS/MS による TMP 検出結果

MS/MS 検出の結果、検査を行った10ロット(30検体)

中で、4ロット4検体（腎臓）から TMP を検出した。この検出結果を表2に示す。この4検体すべてにおいて検出下限値0.05ppmを越える TMP が検出された。

表2 MS検出による定量結果

	部位	検出 TMP 濃度 (検体中) (ppm)	検出 SMXZ 濃度 (検体中) (ppm)
サンプル1	腎臓	0.08	0.31
サンプル2	腎臓	0.11	0.21
サンプル3	腎臓	0.07	0.24
サンプル4	腎臓	0.13	0.27

検体中から抽出された TMP と疑われる化合物と TMP 標準品との MS/MS スペクトル類似度は高かった。また、この検査におけるトリメトプリムの添加回収率は123.30%であった。

TMP 標準品と4検体のクロマトグラム、及び TMP 標準品とサンプル4で検出された化合物の MS/MS スペクトルを図1に示す。TMP 分子イオン (m/z : 291.00) とイオン分解による生成フラグメント (m/z : 123.00, 230.00, 258.00, 276.00) (図1参照) をモニターした結果、標準品とほぼ同一の保持時間にピークが検出された。検出されたピークの MS/MS スペクトルと TMP 標準 MS/MS スペクトルは高い類似度を示した。

2. UV による TMP 検出結果

一斉分析法に基づいた UV(PDA)検出でも、MS/MS 検出と同一の4検体から TMP を検出した。検体中から抽出された TMP と疑われる化合物と TMP 標準品との PDA による UV スペクトル類似度はすべて97%以上であった。また、この検査におけるスルファキノキサリンの添加回収率は243%であった。

TMP 標準品と4検体のクロマトグラム、及び TMP 標準品とサンプル4で検出された化合物の UV 吸収スペクトルを図2に示す。

表3 UV検出による定量結果

	部位	検出 TMP 濃度 (検体中) (ppm)
サンプル1	腎臓	0.44
サンプル2	腎臓	0.59
サンプル3	腎臓	0.37
サンプル4	腎臓	0.51

3. LC/MS/MS による SMXZ 検出結果

TMP と合剤として使用されるのは、スルファジメトキシシン(SDM), スルファドキシシン(SDOX), スルファメトキ

サゾール(SMXZ), スルファクロルピリダジン(SCPD), スルファジアジン(SDZ)が主なものであった(図3参照)。このうち、SDM についてはモニタリング項目の中に入っており、一斉分析の結果から残留していないことが判明している。また、SDZ については当部門に標準品がなかったために検討することができなかった。従って、残り3種類のサルファ剤に関して MS 検出条件を検討した後、検査を行った。

その結果、TMP が検出された全ての検体から SMXZ が検出された。この検出結果を表2に示す。

検体中から抽出された SMXZ と疑われる化合物と SMXZ 標準品との MS/MS スペクトル類似度は高かった。また、この検査におけるスルファメトキサゾールの添加回収率は85%であった。

SMXZ 標準品と4検体のクロマトグラム、及び SMXZ 標準品とサンプル4で検出された化合物の MS/MS スペクトルを図3に示す。SMXZ 分子イオン (m/z : 254.00) のイオン分解による生成フラグメント (m/z : 147.00, 156.00, 188.00, 190.00, 194.00, 198.00) (図4参照) をモニターした結果、標準品とほぼ同一の保持時間にピークが検出された。検出されたピークの MS/MS スペクトルと SMXZ 標準 MS/MS スペクトルは高い類似度を示した。

また、夾雑物の影響が大きい事や SMXZ, SDOX の保持時間が近いことから UV 検出は困難であった。

IV 考察

当部門では、昨年度より畜水産食品における合成抗菌剤検出に LC/MS/MS を採用している。その成果として、昨年は鶏肉におけるスルファキノキサリン検出を報告した。さらに今年度は2例目となる豚肉での TMP 検出事例を報告することができた。

スルファキノキサリン検出事例と同様に、従来の UV 検出だけでは TMP, SMXZ の検出を断定するのは困難であったと考えられる。以下にその理由について考察した。

1. 回収率が243%という事より、ピーク純度がかなり低い事が明らかであるにも関わらず、UV 吸収スペクトル類似度が高くなってしまっている。これは TMP の UV 吸収スペクトルの形状に特異性が無いためであり、UV 検出のデータのみでは、検出された化合物が TMP と断定するのは困難である。

2. TMP は230nmで検出するために移動相であるアセトニトリルの UV 吸収の影響が大きくピークとして検出されにくい。

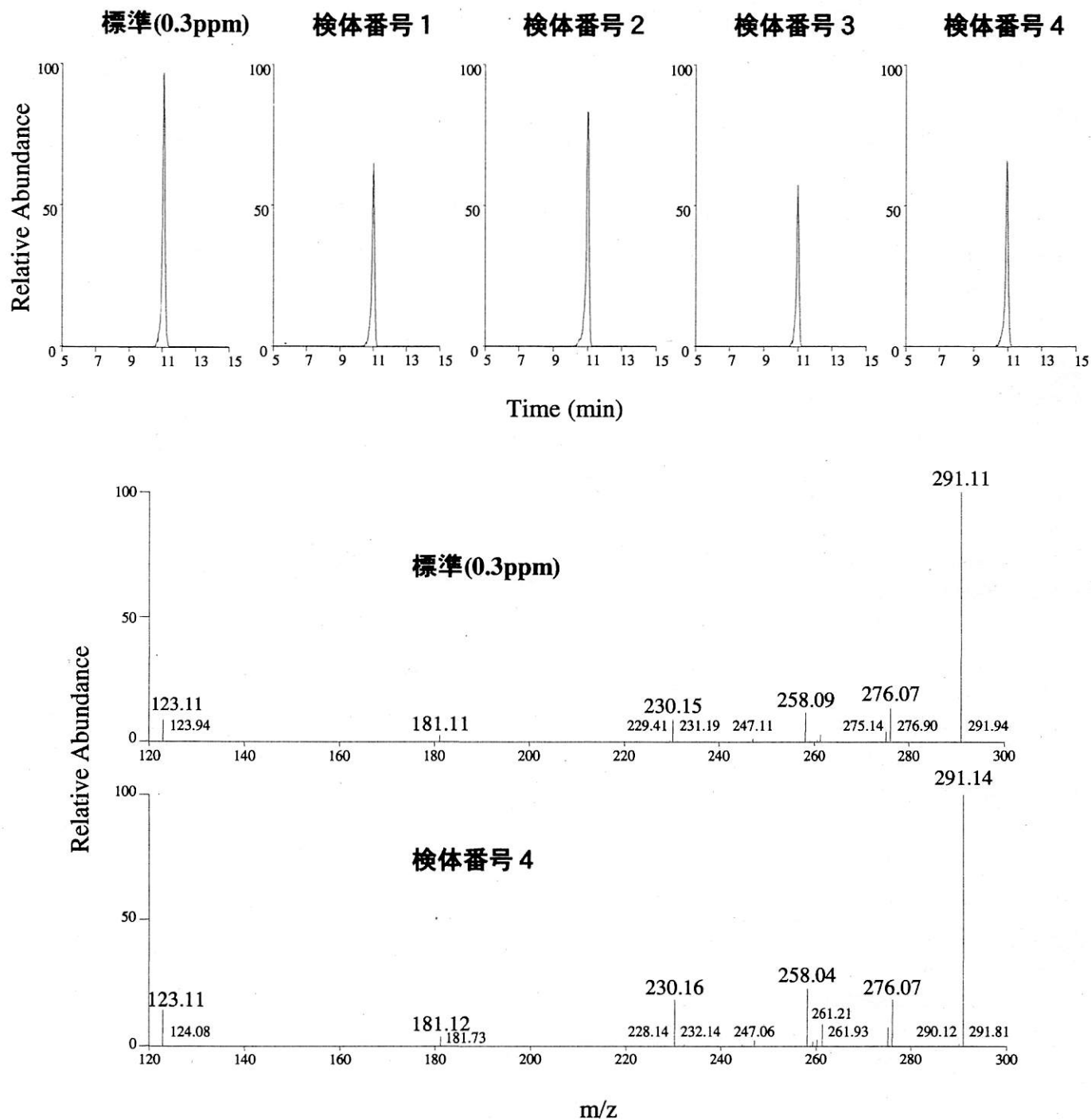


図 1 TMP検出のLC/MS/MSクロマトグラムとマススペクトル

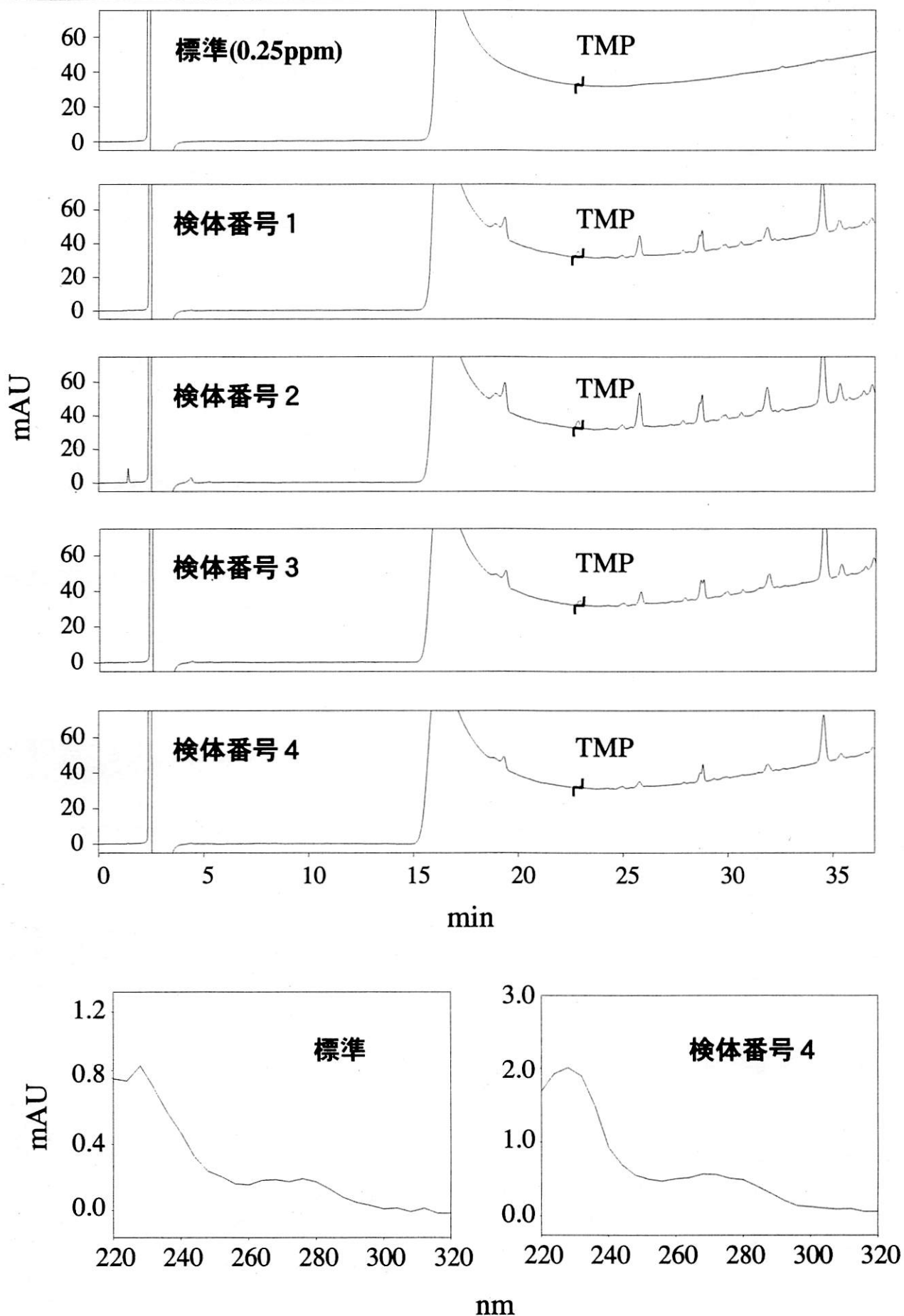


図2 TMP検出のUV(230nm)クロマトグラムとUVスペクトル

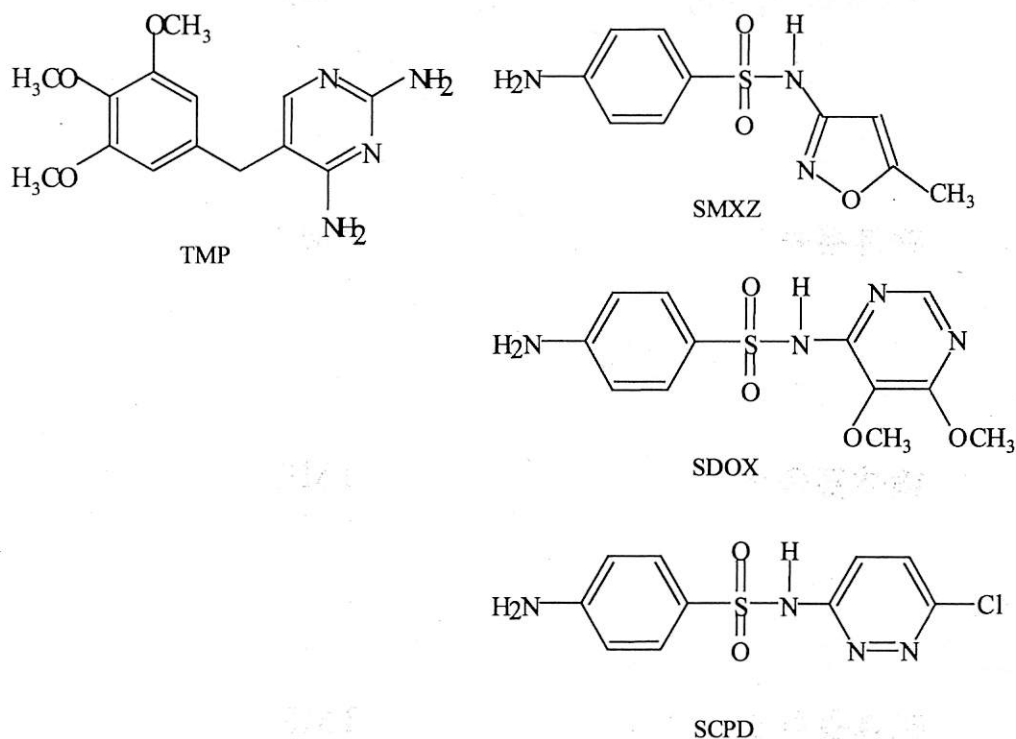


図3 TMPとサルファ剤の構造式

3. 4 検体全てにおいて、MS/MS 検出結果より UV 検出結果の方が残留濃度が高くなっている。回収率から、これも夾雑成分の影響と考えられるが、実際の残留濃度より高く検出してしまう可能性があり、定量も困難である。

以上の事から、TMP の検査は特に UV 検出では困難である。

また、今回、TMP が葉酸拮抗剤であり、一般的にサルファ剤との合剤として使用されていることから、モニタリング項目外の3種類のサルファ剤についても検査を行った。その結果、MS/MS 検出によって TMP 検出検体すべてから SMXZ を検出した。

この SMXZ 検出においても、UV 検出では夾雑物の影響及び SMXZ, SDOX の保持時間が近い事等から検出は困難であったが、MS/MS 検出(図4)では良好なクロマトグラムと MS/MS スペクトルを得ることができた。SMXZ 標準品と検体中から抽出された SMXZ と疑われる化合物の MS/MS スペクトル類似度も高く、SMXZ を検出したと断定することができた。

以上のことから、MS/MS 検出によって収去された豚検

体には TMP と SMXZ の合剤が投与され、なんらかの原因で腎検体中に検出下限値以上の TMP が残留したものと考えられる。

違反事例に遭遇した際に、今回のようにモニタリング項目についてだけでなく、より多くの情報を食品衛生監視員に提供することによって、より良い指導をできるようにサポートすることが重要であると考えられる。そのためには、現在行っている合成抗菌剤に加えて抗生物質や内寄生虫用剤であるフルベンダゾール、イベルメクチン、チアベンダゾールについての MS/MS 検出の検討をできるだけ早く行い、現在行っている検査の精度をさらに向上させるようにしなければならない。

IV 参考文献

- 1) 丹羽利充：最新のマススペクトロメトリーー生化学・医学への応用ー，化学同人，京都(1995)
- 2) 中沢裕之：動物医薬品データブック，林純薬工業株式会社，大阪(1998)
- 3) (財)畜産生物科学安全研究所：畜水産食品の薬物残留とその分析法，近代出版，東京(1995)

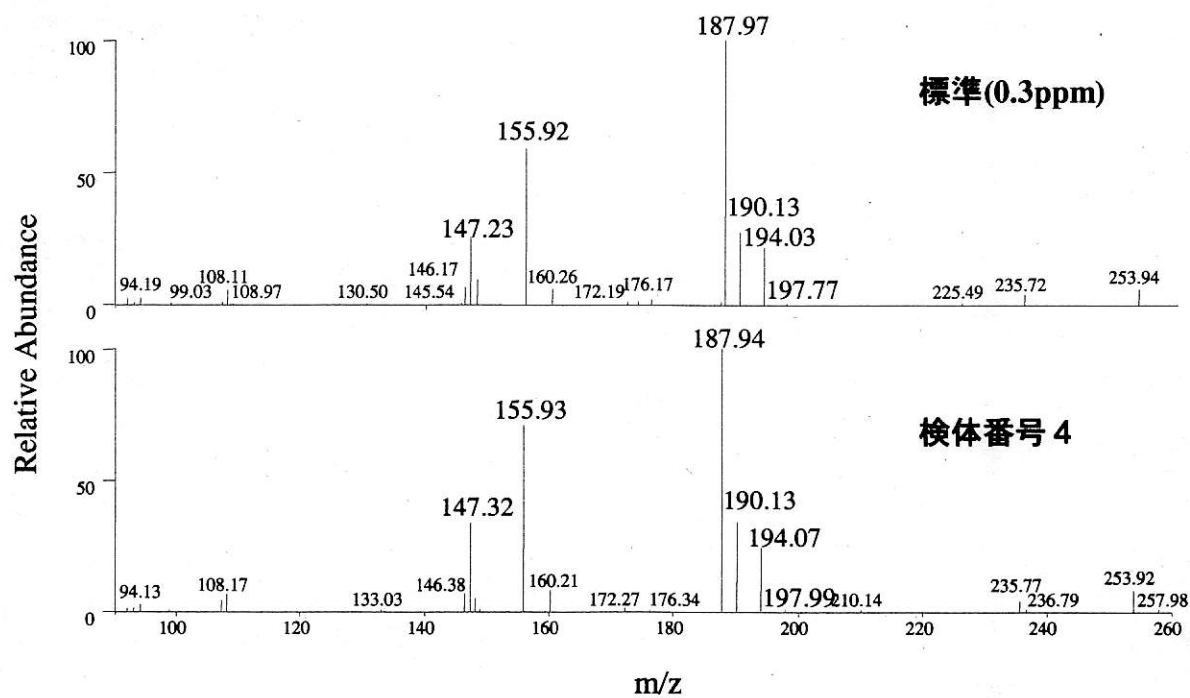
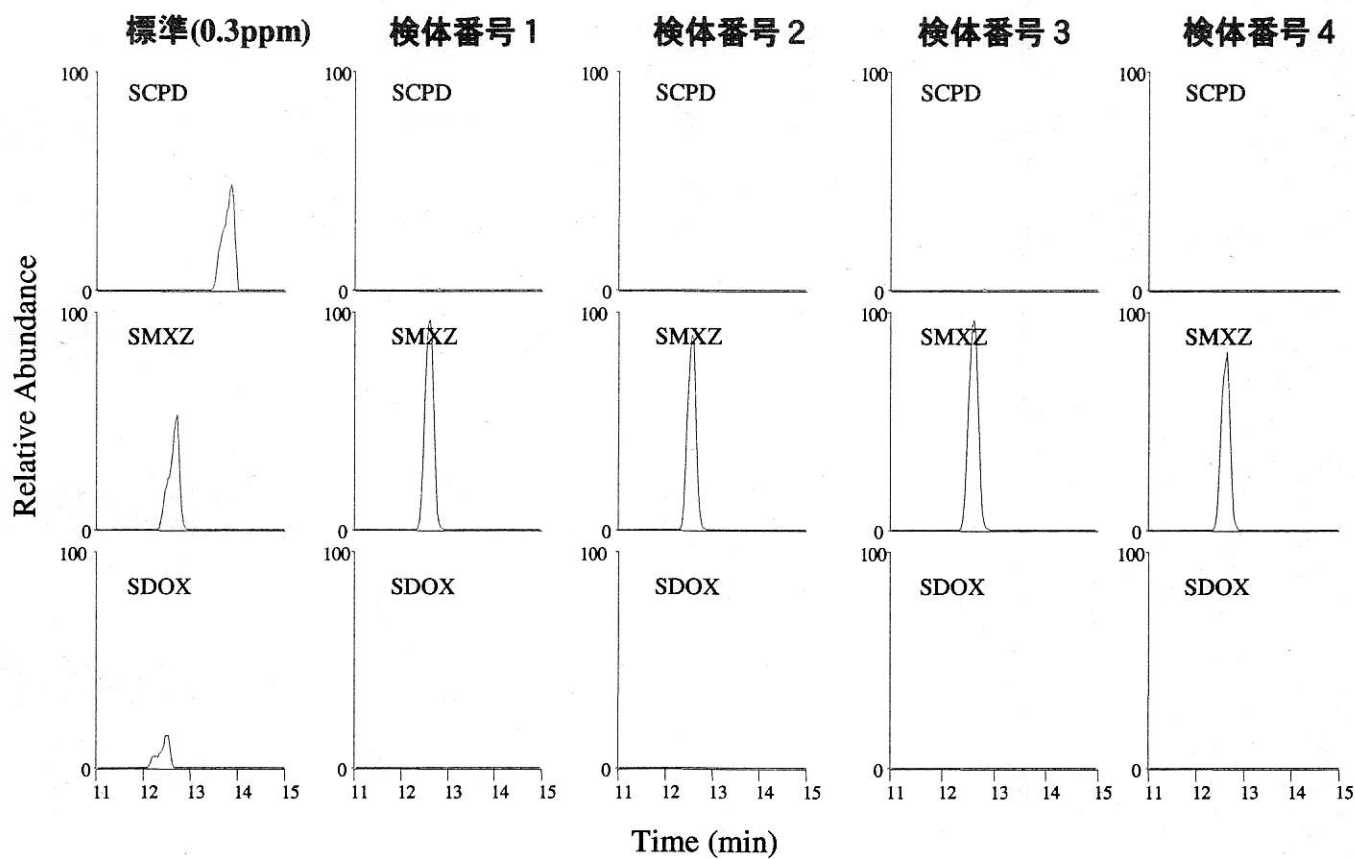


図4 SMXZ検出のLC/MS/MSクロマトグラムとマススペクトル