

食肉中のセファゾリン試験法の検討

食肉衛生検査所 ○八巻幸子、岸野巧*、宮地義則

衛生研究所 林孝子 *現動物愛護センター

はじめに

セフェム系抗生物質であるセファゾリン (CEZ) は、牛の乳房炎、細菌性肺炎、細菌性下痢症等の治療薬として広範に使用され、当所へも使用履歴のある牛が搬入されている。食肉からの検出事例も報告されており [1, 2]、検査の必要性が高い薬剤の一つである。しかし、厚生労働省が示している食肉中の CEZ 試験法は液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS 又は LC/MS/MS) を用いた方法 (以下「通知法」という。) [3] であり、同機器を保有していない当所では検査実施が困難であった。

そこで今回、通知法の試験溶液調製手順を当所が保有する HPLC 用に改良し、妥当性を評価するとともに、確認 (定性) 試験は LC/MS/MS を保有する神奈川県衛生研究所 (以下「衛研」という。) に依頼する方法を検討したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 材料、装置、測定条件

使用した検体、標準品、試薬等は表 1 に、HPLC の装置及び測定条件は表 2 に示した。LC/MS/MS の装置及び測定条件は表 3 に示した。

表 1 検体、標準品、試薬等

検体	牛筋肉及び牛腎臓
標準品	セファゾリンナトリウム標準品 (富士フィルム和光純薬㈱製の HPLC 用)
標準溶液	標準品を精密に量り、メタノールに溶解して標準原液 (1000µg/mL) とし、水:メタノール (7:3) で適宜希釈したものを標準溶液 (STD) とした。
試薬	水は超純水、メタノール及びアセトニトリルは HPLC 用、その他の試薬は特級を用いた。
シカラム	Oasis HLB [60mg/3mL] (Waters ㈱製)※ Oasis HLB [500mg/6mL] (Waters ㈱製)※ Inert-Sep PLS-2 [270mg/20mL] (ジューエルサイエンス ㈱製)※ ※[メタノール及び水でコンデューション]後に使用]

表 2 HPLC の装置及び測定条件 (当所)

装置	WATERS ACQUITY Arc Systems (Waters ㈱製)
検出器	フォトダイオードアレイ検出器 (Waters ㈱製)
測定波長	272nm
分析カラム	CORTECS T3 (2.7µm, 3mm×150mm) Column (Waters ㈱製)
カラム温度	40°C
移動相	A: 0.02mol/L リン酸ナトリウム溶液、B: アセトニトリル
グラジエント条件	A: 94% (0分) → 94% (30分) → 40% (31分) → 40% (39分) → 94% (40分) → 94% (50分)
流速	0.4mL/min
注入量	15µL

表 3 LC/MS/MS の装置及び測定条件 (衛研)

LC測定条件		MS測定条件		測定モードごとの測定条件		
装置	ExionLC (SCIEX製)	装置	QTRAP5500+ (SCIEX製)	MRM測定条件		
分析カラム	Inertsil ODS-4 (2µm, 2.1mm×100mm) (ジューエルサイエンス ㈱製)	イオンモード	ESI (+)		定量イオン	確認イオン
移動相	A: 0.1% 酸水溶液、B: アセトニトリル	測定モード	MRM及びプロダクトイオンスキャン	MRM Trace	m/z455→323	m/z455→156
グラジエント条件	B: 5% (0分) → 50% (15分) → 99% (20分) → 5% (20.1分)	Curtain Gas	40psi	Collision Energy	17eV	25eV
カラム温度	40°C	Ion Spray Voltage	5500V	プロダクトイオンスキャン測定条件		
流速	0.25mL/min	Desolvation Temperature	400°C	プリカーサーイオン	m/z455	
注入量	2µL	Source Gas1	50psi	Collision Energy	17eV	
		Source Gas2	80psi			
		Declustering potential	91V			

2 方法

(1) 試験溶液調製方法及び HPLC 測定条件の検討

通知法のろ過工程である吸引ろ過は、当所の所有している器具では1検体ずつしか処理できず非効率的であり、また、作業が煩雑であるため、遠心分離（8000rpm、5分）及び綿栓ろ過に変更した（図1）。次に、精製工程で使用するミニカラムの検討として、通知法の示すジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（60mg）の他に、表4に示したミニカラムで添加回収試験（検体：牛筋肉、添加濃度：0.05ppm、n=1）を実施し、回収率及び操作性を比較した。また、同時に HPLC の移動相の組成、流速、検体注入量等、最適な測定条件を検討した。

(2) LC/MS/MS による確認試験法の構築

牛筋肉及び牛腎臓について試験溶液を調製し、衛研に検出確認を依頼した（n=5）。

(3) 妥当性評価

(1)の結果から、回収率及び操作性が良好であったミニカラムを用いた試験法（改良法）（図1）により、牛筋肉及び牛腎臓を検体として妥当性評価ガイドライン（以下「ガイドライン」という。）[4]に従い妥当性評価を実施した。添加濃度は残留基準値濃度（0.05ppm）とし、得られた結果から選択性、真度（平均回収率）、併行精度及び室内精度の各性能パラメータを求め、それぞれガイドラインの目標値に適合しているかを確認した。検量線は 0.05 μg/mL から 0.5 μg/mL の範囲に調製した標準溶液を用いて作成した。

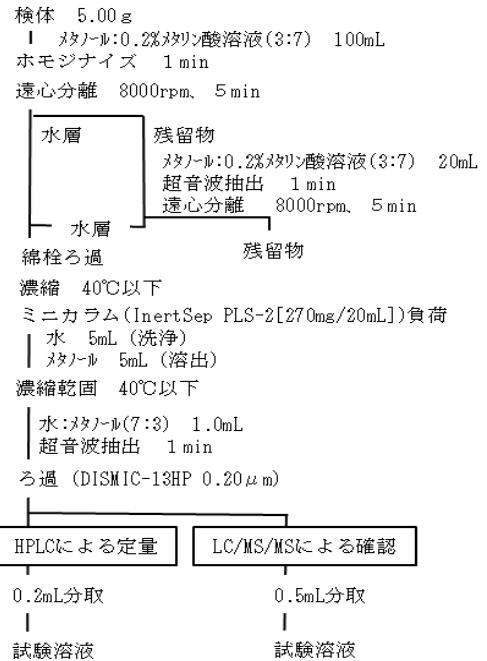


図1 試験溶液調製手順

成 績

1 試験溶液調製方法及び HPLC 測定条件の検討

表4に各ミニカラムの比較結果を示した。ミニカラム①は目詰まりにより通液が完全に止まり、試験溶液調製作業を完了できず測定することができなかった。ミニカラム②は、回収率は良好だったが検体負荷が完了するまでにミニカラム③の約3倍時間がかかった。ミニカラム③は、回収率及び操作性が良好であった。HPLC 測定条件は表2の条件でピーク形状及び分離状況が良好であった（図2）。

表4 ミニカラムの比較結果

ミニカラム※	回収率(%)	検体負荷 所要時間
① ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (60mg) Oasis HLB (60mg/3mL)	-	-
② ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500mg) Oasis HLB (500mg/6mL)	80.4	約120分 (1検体あたり)
③ スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (270mg) Inert Sep PLS-2 (270mg/20mL)	84.4	約40分 (1検体あたり)

※上段は一般名、下段は製品名

2 LC/MS/MS による確認試験法の構築

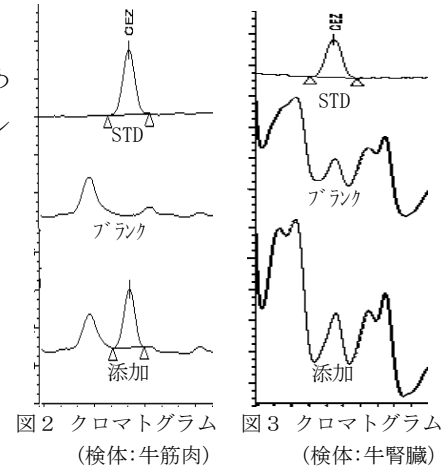
牛筋肉及び牛腎臓ともに標準溶液添加検体全てで CEZ の検出が確認された。

3 妥当性評価

牛腎臓では妨害ピークが CEZ のピークと重なり、定量不能であった (図 3)。牛筋肉では、全ての性能パラメータがガイドラインの目標値を満たした (表 5)。

表 5 妥当性評価結果

検体	選択性	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
牛腎臓	×	-	-	-
牛筋肉	○	104.4	1.5	4.2
目標値	○	70~120	15未満	20未満



考 察

試験溶液調製におけるろ過工程では、通知法の示す吸引ろ過を遠心分離及び綿栓ろ過に変更したことにより、作業が簡便となり前処理にかかる時間が短縮されるなど効率化を図ることができた。精製工程で使用するミニカラムの検討では、通知法の示すミニカラムは通液性が不良であったため、より広い口径で接液面積が大きい類似の化学的性質を持つミニカラムに変更したところ、通液性、回収率ともに良好であった。衛研に LC/MS/MS による確認試験を依頼した結果、添加検体全てで CEZ が検出された。併せて、当所 HPLC を用いて妥当性評価を実施した結果、牛筋肉では全ての性能パラメータがガイドラインの目標値を満たしたことから、改良法により CEZ 残留検査が実施可能であることが示された。一方、牛腎臓では妨害ピークにより定量不能であった。これは、腎臓に多様な夾雑物が含まれていることが原因と推察された。

まとめ

CEZ 試験法について、通知法をもとに当所の器具及び測定機器に適した方法 (改良法) を考案し、確認試験及び妥当性評価を実施した。確認試験では、添加検体全てで検出が確認され、妥当性評価では、牛筋肉において、全ての性能パラメータがガイドラインの目標値を満たし、改良法により CEZ 残留検査が実施可能であることが示された。今後は標準作業書の作成及び検査体制を整え、収去検査等の日常検査に取り入れたい。

引用文献

- [1] 山口菜穂 他：平成 31 年度熊本県保健環境科学研究所報 第 49 号, 36-41
- [2] 星野勇矢 他：第 35 回全国食肉衛生検査所協議会理化学部会研修会資料, 55-57 (2017)
- [3] 「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」(平成 17 年 1 月 24 日付食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- [4] 「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 1 月 24 日付食安発第 1224 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)