

短報

LC-MS/MS を用いた牛肉中のセファゾリン確認分析

林 孝子¹, 八巻幸子², 宮地義則²,
福光 徹¹, 熊坂謙一¹

Confirmatory analysis of cefazolin in beef by LC-MS/MS

Takako HAYASHI, Sachiko YAMAKI, Yoshinori MIYAJI, Toru FUKUMITSU and Kenichi KUMASAKA

はじめに

セファゾリン (図 1) は、第一世代のセファロスポリン系抗生物質でグラム陽性細菌に抗菌活性を示す¹⁾。作用機序は、細菌の細胞壁ペプチドグリカンの生合成の阻害で、国内外で動物用及びヒト用医薬品として使用されている¹⁾。

動物用医薬品として、国内ではセファゾリンを有効成分とする牛の乳房炎を適応症とした乳房注入剤やセファゾリンナトリウム又はその水和物を有効成分とする牛の細菌性肺炎、細菌性下痢症等を適応症とした静脈内及び筋肉内投与の注射剤が承認されている¹⁾。本成分は畜産動物の感染症治療薬として幅広く使用される一方、食肉からの検出事例も報告されており²⁾、検査の必要性が高い医薬品である。

厚生労働省が示す食肉中のセファゾリン試験法は、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS または LC-MS/MS) を用いる方法³⁾であるが、食肉衛生検査所ではセファゾリン使用履歴のある牛の搬入に対応するため、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた改良法を検討し、LC-MS/MS を保有する衛生研究所が確認試験 (定性) を担当することとなった。今回、牛筋肉及び牛腎臓を対象とした改良法の妥当性評価を食肉衛生検査所が実施することに伴い、当所において LC-MS/MS を用いた確認分析及び定量分析を検討したので報告する。

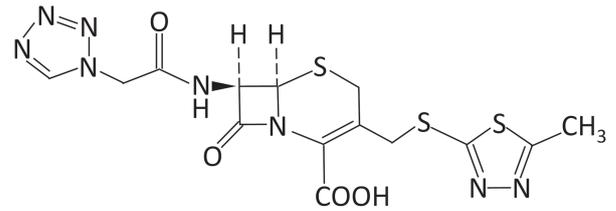


図 1 セファゾリンの構造式

方法

1. 試料

試料は牛筋肉及び牛腎臓を用いた。食肉衛生検査所において、改良法 (図 2) による基準値濃度 (0.05 ppm) の妥当性評価を行うため調製した試験溶液 (各 n=5) と試料ブランクを対象とした。

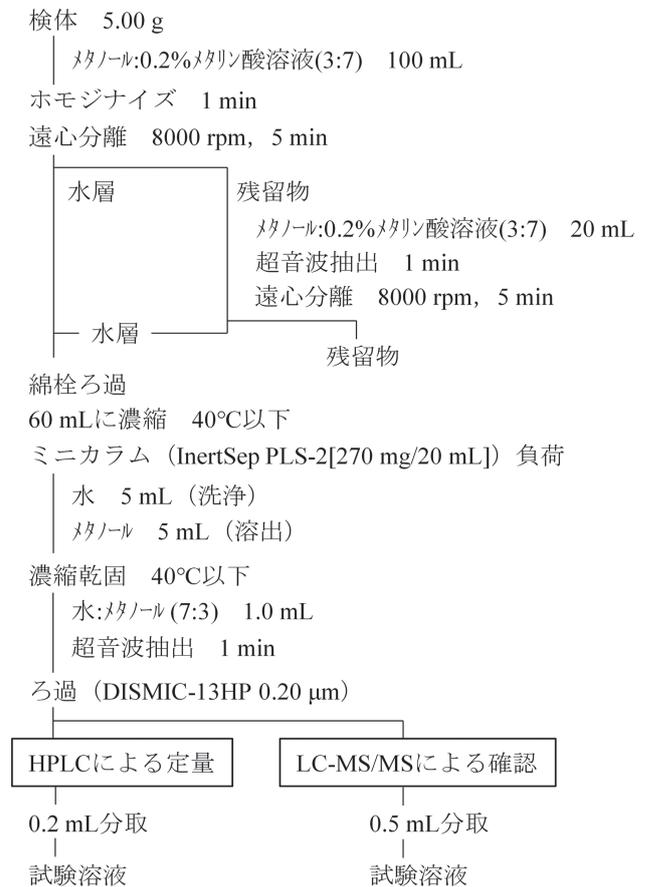


図 2 試験溶液の調製 (食肉衛生検査所改良法)

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
2 神奈川県食肉衛生検査所 精密検査課

2. 試薬

セファゾリン標準溶液は、富士フィルム和光純薬(株)製のセファゾリンナトリウム標準品(HPLC用)を使用し、メタノールで溶解した標準原液(1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)から水:メタノール(7:3)で50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したものを食肉衛生検査所より供与された。当所においても、水:メタノール(7:3)で適宜希釈して使用した。メタノール、アセトニトリル及びギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製LC/MS用を用いた。水はMerck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した。

3. 装置及び分析条件

LC-MS/MS装置はSCIEX社製のLC(Exion LC)及びMS(QTRAP5500+)を用いた。分析カラムはInertsil ODS-4(2.1 mm i.d. x 100 mm, 粒子径2 μm , ジーエルサイエンス社製)を用い、カラム温度は40 $^{\circ}\text{C}$ 、移動相はA液(0.1%ギ酸水溶液)とB液(アセトニトリル)を用いたグラジエント送液とした。送液条件は、流量0.25 mL/minにてB液を5%(0 min) - 50%(15 min) - 99%(20 min) - 5%(20.01 min)と直線勾配で変化させた。注入量は2 μL とした。MS条件は、イオン化法はESI(ポジティブモード)、脱溶媒温度は400 $^{\circ}\text{C}$ 、Ion Spray Voltageは5500 V、Declustering Potential(DP)は91 V、測定モードはSRM(選択反応モニタリング)とした。MS/MS条件は、プリカーサーイオン m/z 455、プロダクトイオン m/z 323(Target)及び m/z 156(Qualifier)とし、コリジョンエネルギー(CE)はそれぞれ17 eV、25 eVとした。また、プロダクトイオンスキンのプリカーサーイオンは m/z 455、コリジョンエネルギーは17 eV、他はSRMと同じ条件とした。

結果及び考察

1. LC-MS/MSによるセファゾリン分析の確立

対象としたセファゾリンについてLC-MS/MSにより分析法を構築した。質量分析におけるイオン化法としてESI法を採用し、ダイレクトインフュージョンによりイオン化条件を検討した結果、セファゾリンはポジティブモードにおいてプロトン付加分子($[\text{M}+\text{H}]^+$)である m/z 455が確認された。この分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ をプリカーサーイオンとして衝突誘起解離(CID)によって得られたプロダクトイオン(m/z 323及び m/z 156)を選定、SRMモードにおける測定条件を最適化し、化合物依存のMS/MSパラメーター(DP, CE)を決定した。続いてLCを用いたフ

ローインジェクション分析(FIA)を実施し、SRMモードにおける電圧、ガス圧、イオン源温度等を決定した。LC分析に使用した固定相は、汎用性の高い逆相分配系のセミマイクロODSカラム(2.1 mm i.d. x 100 mm)を選択した。移動相は0.1%ギ酸を含む5~99%アセトニトリル水溶液のグラジエントモードにより流量0.25 mL/min、20分間の溶離を行った結果、セファゾリンのピークは約8.3分に良好な溶出・分離が確認された(図3A)。

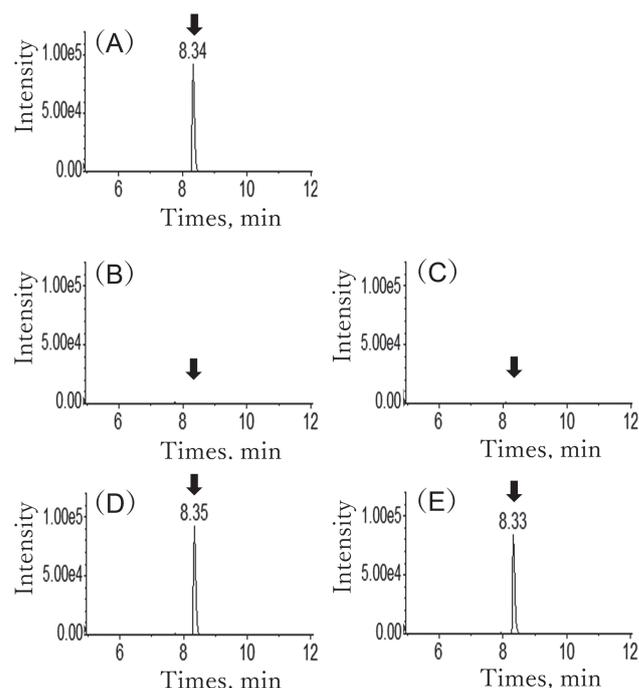


図3 セファゾリンのSRMクロマトグラム

(A) セファゾリン標準溶液(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (B) 牛筋肉, (C) 牛腎臓, (D) セファゾリン添加牛筋肉(セファゾリン0.25 μg), (E) セファゾリン添加牛腎臓(セファゾリン0.25 μg), 測定イオン: m/z 455 > 323, 矢印はセファゾリンの保持時間を示す。

2. セファゾリン確認分析(定性)結果

LC-MS/MSによるSRM分析の結果、牛筋肉及び牛腎臓試料からセファゾリンの保持時間に妨害となるピークは検出されなかった(図3B, C)。これら試料に、基準値濃度(0.05 ppm)となるようにセファゾリンを添加(0.25 μg)し、改良法により調製した全ての試験溶液から、セファゾリンの保持時間にピークが認められた(図3D, E)。検出ピークの確認は、EUのガイドライン⁴⁾に基づき、セファゾリン標準溶液とのピーク強度の比較により行った。今回、セファゾリン標準溶液(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のピーク強度比(Q/T: Qualifier ion intensity/Target ion intensity)は37.8%であった。EUガイドラインによる目的物質の

同定許容範囲は、標準溶液ピーク強度比が 20 ~ 50% の場合、標準溶液ピーク強度比の± 25%とされている。牛筋肉添加試料及び牛腎臓添加試料のピーク強度比はそれぞれ 37.7 ~ 39.6%及び 36.9 ~ 39.2%であり、添加試料から検出されたピークはセファゾリンと確認された。さらに、SRM と同時分析を行ったプロダクトイオンスキャンにおいても、セファゾリンのマススペクトルとの一致が確認された (図 4)。検出ピークは、ピーク強度比とプロダクトイオンスキャン両者の確認をもって最終的にセファゾリンと同定された。

これらの結果から、牛筋肉及び牛腎臓試料中でのセファゾリンの検出・同定が可能であり、LC-MS/MS を用いた確認分析法が有効であることが示唆された。

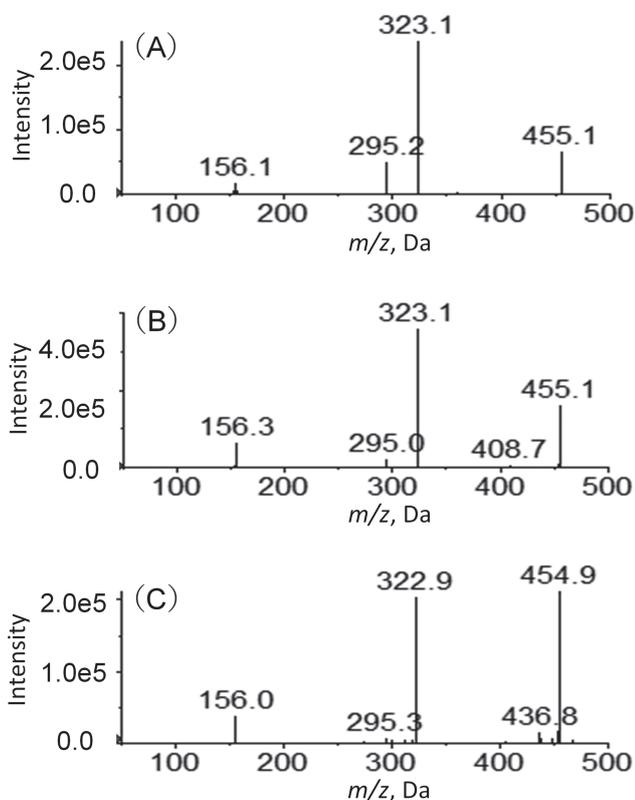


図 4 セファゾリンのプロダクトイオンスキャンによるマススペクトル

- (A) セファゾリン標準溶液 (0.25 µg/mL),
 (B) セファゾリン添加牛筋肉,
 (C) セファゾリン添加牛腎臓, 添加量はいずれも 0.25 µg.

3. LC-MS/MS による定量分析の検討

LC-MS/MS による定量分析の検討を行った。供与されたセファゾリン標準溶液を適宜希釈し、0.05 ~ 0.5 µg/mL の溶媒検量線を作成し定量を行った。併せて、牛筋肉及び牛腎臓のマトリックス添加標準溶液を調製し、各 0.05 ~ 0.5 µg/mL のマトリックス検量線による定量を実施した。定量分析の結果を表 1 に

示す。

表 1 各検量線による定量結果

溶媒検量線 (検量線範囲 : 0.05 ~ 0.5 µg/mL, 6点, $r^2 = 0.998$)				
試験溶液 濃度 ng/mL	回収率 (%)	平均 回収率 (%)	相対標準 偏差 (%)	
牛筋肉 添加1	276.3	110.5	107.1	9.16
牛筋肉 添加2	284.4	113.8		
牛筋肉 添加3	279.4	111.8		
牛筋肉 添加4	273.9	109.6		
牛筋肉 添加5	224.4	89.8		
牛腎臓 添加1	253.4	101.4	103.5	5.11
牛腎臓 添加2	255.1	102.0		
牛腎臓 添加3	281.9	112.8		
牛腎臓 添加4	254.2	101.7		
牛腎臓 添加5	248.8	99.5		
マトリックス検量線 (牛筋肉) (検量線範囲 : 0.05 ~ 0.5 µg/mL, 7点, $r^2 = 0.996$)				
試験溶液 濃度 ng/mL	回収率 (%)	平均回 収率 (%)	相対標準 偏差 (%)	
牛筋肉 添加1	264.6	105.8	102.6	9.09
牛筋肉 添加2	272.3	108.9		
牛筋肉 添加3	267.6	107.0		
牛筋肉 添加4	262.3	104.9		
牛筋肉 添加5	215.2	86.1		
マトリックス検量線 (牛腎臓) (検量線範囲 : 0.05 ~ 0.5 µg/mL, 7点, $r^2 = 0.999$)				
試験溶液 濃度 ng/mL	回収率 (%)	平均回 収率 (%)	相対標準 偏差 (%)	
牛腎臓 添加1	252.3	100.9	103.0	5.07
牛腎臓 添加2	254.0	101.6		
牛腎臓 添加3	280.5	112.2		
牛腎臓 添加4	253.1	101.2		
牛腎臓 添加5	247.7	99.1		

溶媒検量線は $r^2=0.998$ と良好な直線性を示した。基準値濃度 (0.05 ppm) 添加の定量結果は、牛筋肉添加試料で回収率 89.8 ~ 113.8%, 相対標準偏差 9.16%, 牛腎臓添加試料で回収率 99.5 ~ 112.8%, 相対標準偏差 5.11%であった。また、マトリックス添加標準溶液を調製し定量を行った結果、牛筋肉マトリックス検量線は $r^2=0.996$, 牛腎臓マトリックス検量線は $r^2=0.999$ といずれも良好な直線性を示した。牛筋肉マトリックス検量線による牛筋肉添加試料の定量結果は回収率 86.1 ~ 108.9%, 相対標準偏差 9.09%となり、牛腎臓マトリックス検量線による牛腎臓添加試料の定量結果は回収率 99.1 ~ 112.2%, 相対標準偏差 5.07%であった。LC-MS/MS によるセファゾリン分析において、溶媒検量線、マトリックス検量線いずれの定量においても、回収率 70 ~ 120%内の良好な添加回収結果を示した。

今回、改良法による HPLC 測定の結果、牛筋肉ではセファゾリンのピークが確認されたが、牛腎臓では試料由来の夾雑物が妨害となりセファゾリンのピーク

確認ができなかったため、改良法の適用は対象が牛筋肉のみとなった（食肉衛生検査所）。一方、同牛腎臓試料を LC-MS/MS で分析した結果、セファゾリンのピークは良好に検出され、夾雑物が除外された選択性の高い分析結果が得られた。以上の結果から、LC-MS/MS は牛肉中のセファゾリンの確認分析に有用であり、定性、定量いずれにおいても十分に対応可能であることが示唆された。

近年、動物用医薬品の理化学試験はその選択性と精度の高さから LC-MS/MS 等質量分析計を用いた試験法が主流となっている。今後とも迅速な検査対応のため、県検査機関の協力体制の強化・維持が必要と考える。

（令和 7 年 7 月 7 日受理）

文献

- 1) 食品安全委員会委員長通知：食品健康影響評価の結果の通知について 別添，府食第 129 号，平成 25 年 2 月 18 日
- 2) 山口菜穂，小林将英，西名武士，福島宏暢：LC-MS/MS による食肉中抗菌性物質の同定，熊本県保健環境科学研究所報，49，36-41（2019）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について，食安発第 1227001 号，平成 18 年 12 月 27 日
- 4) Official Journal of the European Communities：2002/657/EC，L221/8（2002）