

# Application News

## No. C161

LC/MS

### MRM スペクトルモードを用いた 残留動物用医薬品の一斉分析

動物用医薬品は、治療・感染予防または感染予防・成長促進などの様々な目的で使用されています。規制当局は動物から作られた食品に対する安全性保証のために、動物用医薬品の食品への残留に対する最大残留限界：Maximum Residue Limits (MRL's) を、対象となる薬物、組織および動物種ごとに規定しています。また、規制当局により特定されたいくつかの薬理活性化合物は使用が禁止されており、あらゆるレベルでの危険性が考慮されています（EU regulation EC 37/2010; Commission Decision 2003/181/EC; 21CFR Part 556 Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food）。本報告では、高感度かつ高選択性であるトリプル四重極質量分析計を MRM スペクトルモードと呼称する測定モードで動作させることにより、擬陽性と擬陰性結果の低減に、如何に寄与するかについて述べます。MRM スペクトルモードでは、それぞれの対象化合物に対して多数のフラグメントイオンを取得し、それらをフラグメントスペクトルとして再構築することにより、定型化されたライブラリーサーチや化合物確認に類似度スコアとともに利用できます。

David Baker<sup>1)</sup>, Laetitia Fages<sup>2)</sup>, Eric Capodanno<sup>2)</sup>, Neil Loftus<sup>1)</sup>  
1) Shimadzu, Manchester, UK  
2) Phytocontrol, Nimes, France

#### ■ 試料と分析条件

測定試料は、牛肉・卵・蜂蜜・鮭の切り身の抽出液に、動物用医薬品を 0.001 から 0.1 mg/kg で添加したものを用意しました。再現性評価は低濃度試料と高濃度試料で実施しました。測定機器は、島津製作所 UHPLC Nexera X2 とトリプル四重極質量分析計 LCMS-8060 を用いました（表 1 および表 2）。200 種類以上の動物用医薬品をターゲット化合物として設定し、12 分間のグラジエント溶出時間内に、2000 個以上の MRM をポジティブとネガティブの両極性でモニターしました。

表 1 UHPLC 条件

Liquid chromatography				
UHPLC	Nexera LC system			
Analytical column	Restek Biphenyl (100×2.1, 2.7 μm)			
Column temperature	40 °C			
Flow rate	0.4 mL/minute			
Solvent A	0.1 % formic acid 0.5 mM ammonium formate solution			
Solvent B	0.1 % formic acid in methanol			
Binary Gradient	Time (mins)	%B	Time (mins)	%B
	0.00	2	14.60	2
	12.50	100	17.50	Stop
	14.50	100		

表 2 MS/MS 検出パラメータ

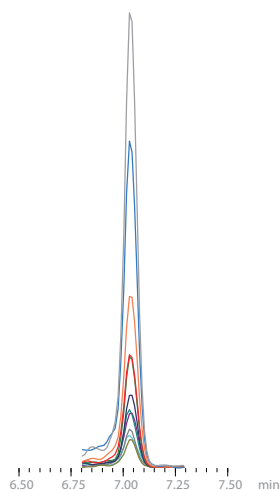
Mass spectrometry	
Mass spectrometer	Shimadzu LCMS-8060
Pause time/dwell time	1 msec/3 msec
Polarity switching time	Pos/neg switching time set to 5 msec
Scope	218 drugs in positive ion mode (including internal standards) 11 drugs in negative ion mode Structure Analytics (in house development tool)
Source temperatures (interface; heat block; DL)	350 °C; 300 °C; 150 °C
Gas flows (nebulising; heating; drying)	3 L/min; 10 L/min; 10 L/min

#### ■ MRM スペクトルモードの利点

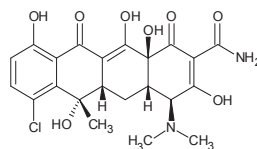
測定メソッドは、LabSolutions LCMS の MRM 最適化機能と測定ウィンドウ (MRM Synchronization) 設定により、容易に設定でき、各溶出ピークに対して高いデータ密度と高サンプリングレートを実現します。本手法は、一貫性のあるルーブタイムとサンプリングレートを生成し、信頼性の高い定量とピーク積分を実行します。また、定量イオン・定性イオン選択の自由度の向上により、ルーチンでの動物用医薬品一斉分析において、オペレーターにより大きな利便性を提供することができます。単一のプリカーサーイオンから生成されるフラグメントイオン数は、動物用医薬品の化学構造にのみ制限されます。

#### ■ 結果

各動物用医薬品に対して多数のフラグメントイオンを取得するために、MRM スペクトルモードを利用しました。クロルテトラサイクリンでは、11 個のプリカーサーフラグメントが、それぞれに最適化されたコリジョンエネルギーで取得されました（図 1）。多数のフラグメントイオンランジションを取得することにより、それぞれの動物用医薬品に対して、化合物確認とライブラリーサーチを可能とするフラグメント合成スペクトルを生成できます。（クロルテトラサイクリンはテトラサイクリン類の抗菌剤です。2016 年に発行された 6th ESVAC レポートによると、2014 年における EU 加盟の 29 カ国での抗菌剤の販売は、mg/PCU の比率で示されており、テトラサイクリン類が 33.4%と最多です。以下、ペニシリン類 (25.5%)、サルファ剤類 (11.0%) となっています。クロルテトラサイクリンは代表例として選択しました。）



Compound name Chlortetracycline  
Accurate mass 479.1216 [M+H]<sup>+</sup>  
Formula C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
CAS 57-62-5



**MRM Spectrum Mode**

11 MRM's acquired for chlortetracycline at 10pg/uL in egg.

1:479.10>444.00 (+)	CE: -23V	7:479.10>300.80(+)	CE: -45V
2:479.10>461.95 (+)	CE: -35V	8:479.10>287.90(+)	CE: -53V
3:479.10>154.00 (+)	CE: -34V	9:479.10>274.95(+)	CE: -44V
4:479.10>98.05(+)	CE: -45V	10:479.10>370.95(+)	CE: -31V
5:479.10>260.05(+)	CE: -60V	11:479.10>285.85(+)	CE: -56V
6:479.10>303.05(+)	CE: -37V		

**MRM Spectrum mode**

Higher specificity  
Higher reporting confidence  
Library searchable fragment data.

The number of precursor-fragment ion transitions monitored is limited only by the structural chemistry of the molecule. Typically more than 10 precursor-fragment ion transitions were monitored for each veterinary drug.

図1 MRM スペクトルモードの利用 (クロルテトラサイクリン)

図2 にクロルテトラサイクリンについてフラグメント構造を帰属した MRM 参照スペクトルを示しました。MRM スペクトルモードは MRM とプロダクトイオンスペクトル生成を融合した測定モードです。プロダクトイオンスペクトルはライブラリサーチによる化合物同定に利用できます。

コリジョンエネルギーが各フラグメントイオンに最適化されてプロダクトイオンスペクトルが生成されるため、ライブラリ内のスペクトルは、非常に高い特異性と選択性を兼ね備えています。

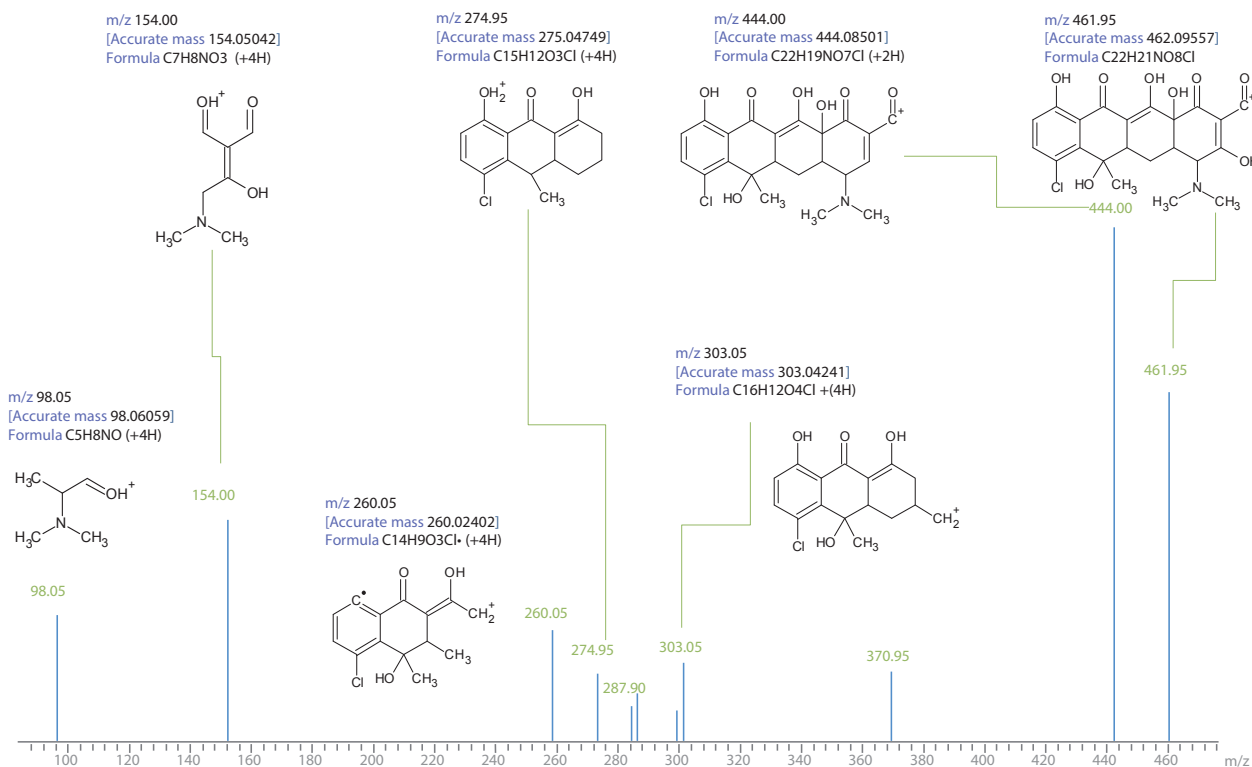


図2 フラグメント構造を帰属した MRM 参照スペクトル (クロルテトラサイクリン)

■ MRM スペクトルモードを用いたライブラリー同定

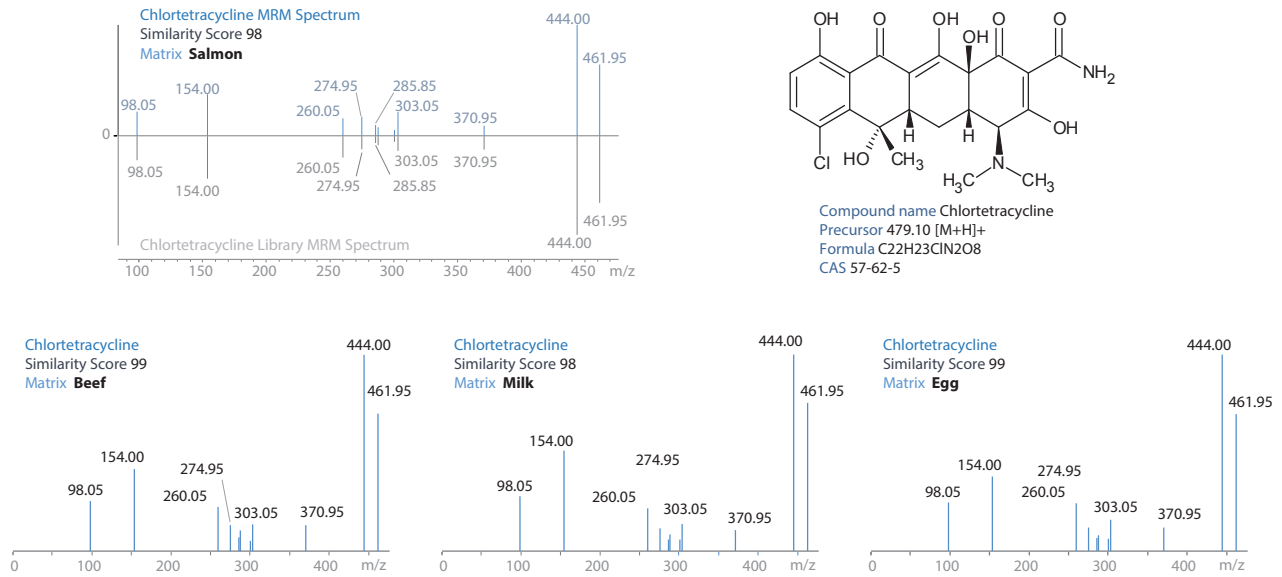


図3 異なる試料マトリックスに 10 pg/μL で添加したライブラリーサーチ可能な MRM スペクトル (クロルテトラサイクリン)

図4に鮭切り身抽出液にバージニアマイシン S1 を 10 pg/μL で添加した際の MRM スペクトルと 4 化合物に関する n=10 の測定結果を示しました。類似度スコアはすべての注入において、99 以上でした (最初の注入と 5 回目、10 回目注入の MRM スペクトルを図示しました)。また一般的な MRM 測定

メソッド (MRM : 2 個) を用いて、鮭切り身抽出液にオキシテトラサイクリン、スルファジメトキシシ、オルメトプリム、バージニアマイシンを各 10 pg/μL 添加したサンプルを測定し、MRM スペクトルモードと %RSD を比較しました。

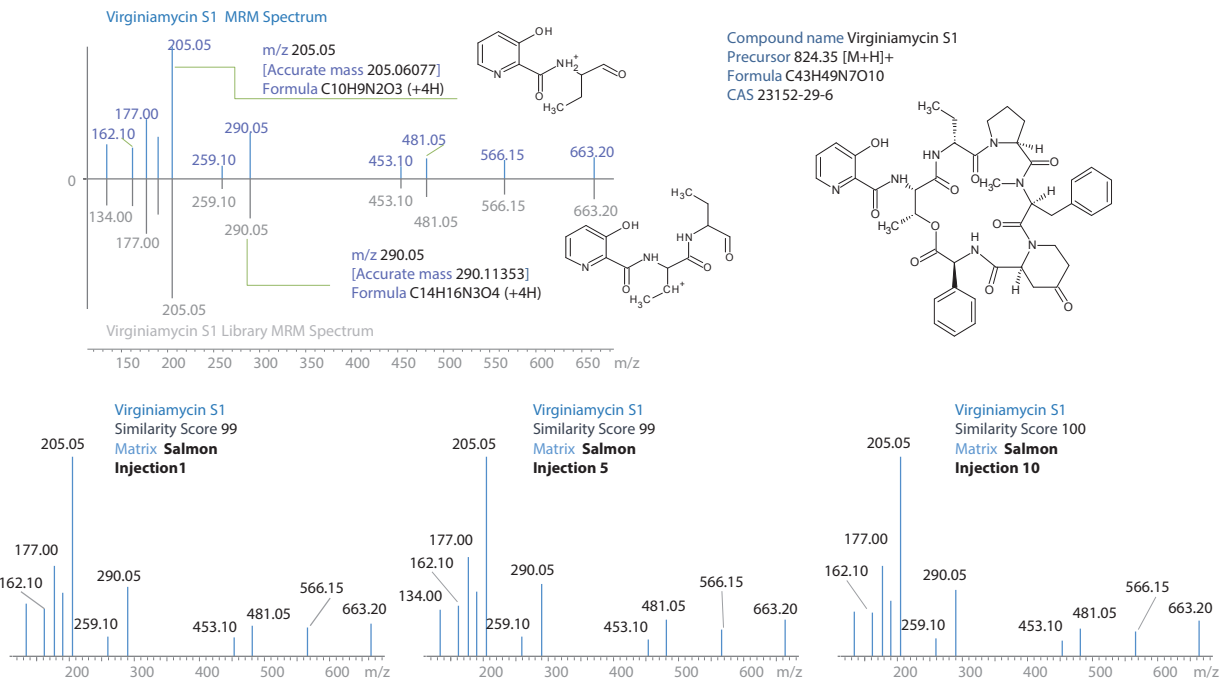


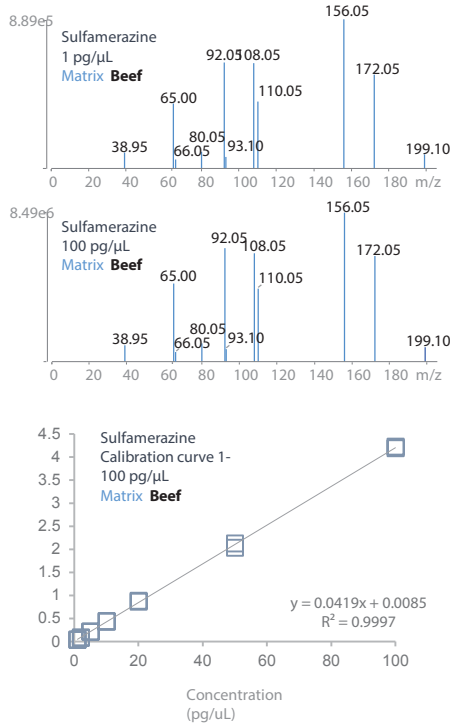
図4 鮭切り身抽出液にバージニアマイシン S1 を 10 pg/μL で添加した際の MRM スペクトルと n=10 の結果

Compound name	Oxytetracycline		Sulfadimethoxine		Ormetoprim		Virginiamycin	
Number of MRM's	2MRM's	8MRMs	2MRM's	11MRMs	2MRM's	11MRMs	2MRM's	11MRMs
Mean peak area								
Quantitation ion	1890170	1729171	7809989	7227748	8291171	8160952	2232967	1956045
%RSD	3.74	3.04	1.49	1.46	1.54	1.18	0.91	1.65

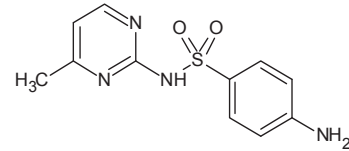
## MRM スペクトルモードを用いた定量結果

MRM スペクトルモードの頑健性を評価するために、同一サンプルを繰り返し注入しました。使用した評価法は、EU ガイドライン：SANTE/11945/2015 にて規定された同定基準に対応したものです（保持時間と少なくとも 2 個の MRM のイオンレシオが許容範囲内かどうか）。絶対強度とシグナル

強度の変化を MRM スペクトルモードと比較しました（図 4）。両方のメソッドで 4% 以下の %RSD を示しました（n=10、10 pg/μL 添加/鮭切り身）。図 5 には定量結果の代表例としてスルファメラジンの MRM スペクトルと検量線を示しました。



Compound name Sulfamerazine  
Precursor 265.10 [M+H]<sup>+</sup>  
Formula C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S  
CAS 127-79-7



MRM Spectrum Mode  
11 MRM's acquired for sulfamerazine in beef.

1:265.10>156.05 (+)	CE: -17V
2:265.10>92.05 (+)	CE: -30V
3:265.10>172.05 (+)	CE: -15V
4:265.10>108.05 (+)	CE: -26V
5:265.10>65.00 (+)	CE: -11V
6:265.10>110.05 (+)	CE: -22V
7:265.10>80.05 (+)	CE: -15V
8:265.10>38.95 (+)	CE: -14V
9:265.10>199.10 (+)	CE: -21V
10:265.10>93.10 (+)	CE: -30V
11:265.10>66.05 (+)	CE: -24V

図 5 スルファメラジンの MRM スペクトルと検量線 (1 pg/μL から 100 pg/μL)

## 結論

擬陽性と擬陰性結果を抑制するために、多数の MRM トランジションをそれぞれの動物用医薬品ターゲットに用いたメソッドを開発し、化合物同定と確認における信頼性の向上を実現しました。各ターゲットに対するトランジション数はターゲットの化学構造に依存していますが、一般的に 1 化合物につき 10 トランジション以上モニター可能です。MRM スペクトルモードはルーティン定量とクオリティの高いプロ

ダクトイオンスペクトルの生成を結合し、ライブラリーサーチによる信頼性の高い化合物同定と化合物確認ワークフローを追加することができます。今回の例では、212 個の動物用医薬品 (MRM 数: 2,009) の定量と同定を MRM スペクトルモードを用いて、検証しました。一般的な定量メソッド (MRM 数: 2 個/化合物) と比較して、検出限界、直線性および再現性の劣化は見られませんでした。