Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

残留農薬による野生動物の中毒例：野生動物保護のための幅広いTOFスクリーニングアプローチ

George Keenan[1], Anna Giela[1], Michael Taylor[1], Jennifer Watson[1], Eleanor Riches[2], James Morphet[2], Paul Silcock[2], Peter Hancock[2], and Hilary Major[2]

[1]SASA, Edinburgh, Scotland
[2]Waters Corporation, Manchester, UK

目的

保護猛禽類の胃内容物を、ACQUITY UPLC/Xevo G2 QTof、POSI±IVEソフトウェア、MassFragmentツールを用いたスクリーニング分析を行い、薬中毒の原因となる農薬の検出と同定を行う

ウォーターズソリューション

ACQUITY UPLC

Xevo G2 QTof

キーワード

アカトビ（猛禽類）

野生生物保護

農薬による薬中毒

ワシタカ科

milvus milvus

はじめに

現在国内外で、絶滅の危機に瀕している野生動物をはじめ、環境中の生態系の保護、良好な自然環境の保全が積極的になされています。自然の生息場所で野生動物の保護を行うことが最も望ましいことですが、絶滅危惧種の場合人為的に保護することが効果的な場合もあります。このアプリケーションノートでは保護鳥である猛禽類アカトビの農薬中毒事件における、TOFスクリーニングアプローチについてご紹介します。

アカトビ（ワシタカ科、学名:*milvus milvus*）（図1）は、タカ、ワシと同一科の猛禽類です。アカトビは現在ドイツ、フランス、スペインを中心にヨーロッパで約18,000-24,000のつがいが生息しています。19世紀半ばまでイギリスではアカトビを害鳥として駆除していましたが、現在では絶滅の危機にあるとしてアカトビの保護活動が行われています。現在わずか1000のつがいがウェールズ地方やスコットランドを中心にイギリスで生息しています。[1, 2]

図 1. アカトビ.（学名:milvus milvus）

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC
分析時間:	5.00 分
カラム:	ACQUITY BEH C_{18} 1.7 μm, 2.1 x 50 mm
カラム温度:	45 ℃
移動相 A:	10 mM酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B:	10 mM酢酸アンモニウム含有メタノール
流速:	0.6 mL/min
注入量:	3.0 μL

MS 条件

MS システム:	Xevo G2 QTof
イオン化モード:	ESI ポジティブ
分析モード:	Resolution mode
スキャンタイム:	0.1 s
キャピラリー電圧:	1.0 kV
コーン電圧:	30.0 V
ソース温度:	120 ℃
脱溶媒温度:	550 ℃
脱溶媒ガス:	1000 L/hr
コーンガス:	50 L/hr
マスレンジ:	50 – 1000 *m/z*

MS^E 条件

低エネルギー:	6.0
高エネルギーランプ:	25.0 – 35.0

LockSpray 条件

リファレンス化合物:	Leucine enkephalin
m/z:	556.2771 及び278.1141
流速:	20 μL/min
キャピラリー電圧:	3.0 kV
コリジョンエネルギー:	21.0 eV

アカトビは主に虫、小型哺乳類および腐肉を食する猛禽類です。偶然であれ故意的であれ、腐肉に農薬等が含まれていた場合、アカトビが薬中毒を起こす危険性があります。またアカトビだけでなく、同じ食性を持つキツネやカラスも同様の危害が及ぶ可能性があります。

イギリスではアカトビは1981年のWildlife and Countryside Actにおいて保護対象の野生動物に指定され特別な罰則により“特別に保護”されています。[3] 更に2004年のNature Conservation (Scotland) Actにより、スコットランド政府のさらなる保護も受けています。[4] もし、アカトビが警察や野生動物保護責任者により発見され、薬物中毒の疑いがある場合スコットランド行政部門であるSASA (Science and Advice for Scottish Agriculture) で死因が検証されます。この検証では、死因の薬剤の同定 (どのような種類の農薬が使用されたか) が行われます。

このアプリケーションノートでは、ACQUITY UPLC®/Xevo™ G2 QTof、POSI±IVE™ソフトウェア、MassFragment™ツールを用いたスクリーニング分析を紹介します。サンプルとしてアカトビの胃内容物を用い、使用された農薬のスクリーニング及び同定を行いました。その結果、アカトビの胃内容物から、薬中毒を引き起こした農薬の高感度検出及び明確な同定を行う事ができました。

実験

サンプルクリーンアップ

- アカトビの胃内容物2 gを計り取り、5 mLの酢酸エチルで抽出
- 酢酸エチル抽出液1 mLに、メタノールを加え400 mLに定容

（400 mLの試料液に0.4 g の胃内容物が含有）

- 0.2 μm のフィルターを使用し、サンプルをろ過

表 1. ACQUITY UPLC グラジエント条件

	時間 (分)	流速 (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.60	98	2	
2	0.10	0.60	98	2	6
3	3.75	0.60	1	99	6
4	4.25	0.60	1	99	6
5	4.26	0.60	98	2	11
6	5.00	0.60	98	2	6

結果と考察

アカトビの胃内容物中の農薬のスクリーニング分析条件の詳細を前ページに示しました。データ取得にはMS^{E}モードを使用しました。図2に分析の結果得られた低エネルギー条件でのプレカーサーイオンのトータルイオンクロマトグラム（TIC）と高エネルギー条件で取得したMS^{E}フラグメントイオンのトータルイオンクロマトグラム（TIC）を表示しました。

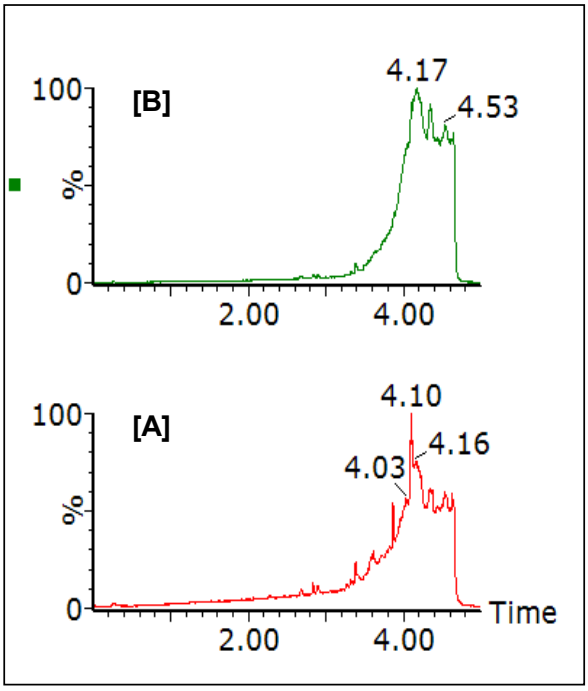


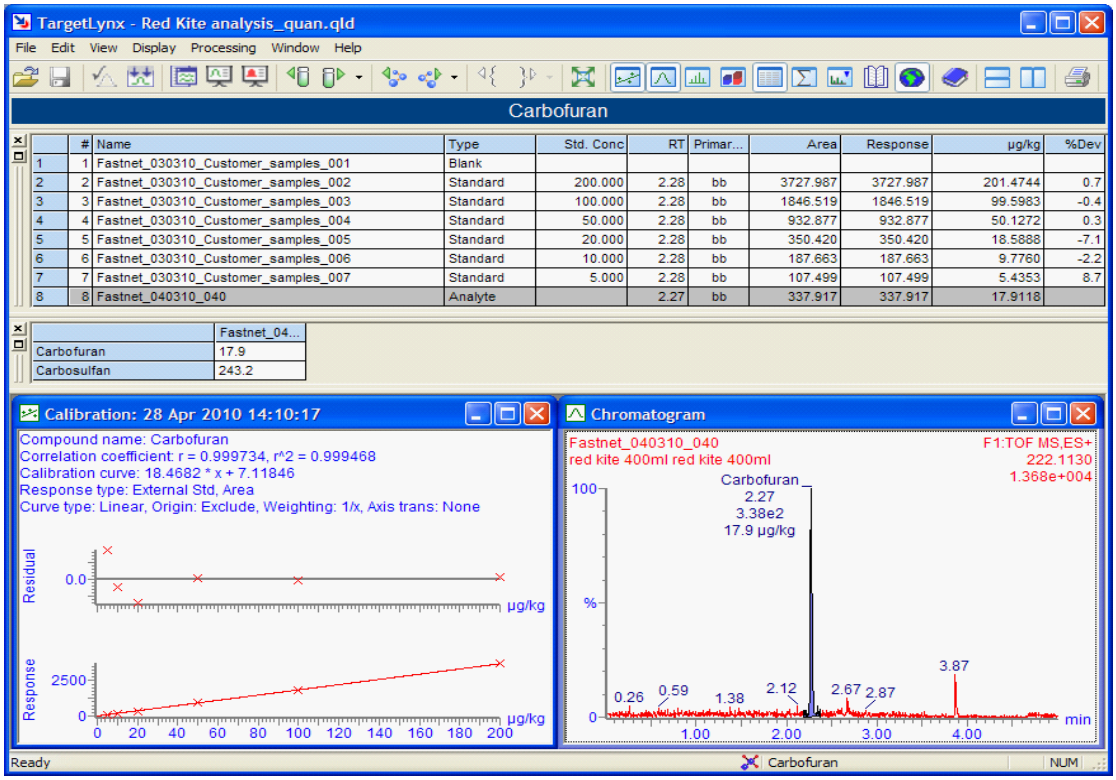
図 2. [A]低エネルギーモードにおけるアカトビ胃液の MS^E TICクロマトグラム
[B] 高エネルギーモードにおけるアカトビ胃液の MS^E TICクロマトグラム

得られたデータは、アカトビサンプル中に含まれる農薬を正確に同定するため、POSI±IVEソフトウェアと農薬の標準品を用いて解析を行いました。今回の分析ではマトリックスマッチドスタンダード法は用いませんでした。

図3にPOSI±IVEソフトウェアで解析をした場合の、ChromaLynx™ XSの同定結果ブラウザーを表示しました。585の農薬データベースからのスクリーニング結果より、カルボフランとカルボスルファンの2農薬が候補化合物として検出されました。ブラウザー画面にはMS^{E}モードで取得した低エネルギーモードによるプレカーサーイオンと高エネルギーモードによって得られたフラグメントイオン情報が表示されています。精密質量データ結果も図3に示すようにカルボスルファンにおいて（プレカーサーイオン: *m/z* 381.2212, フラグメントイオン: *m/z* 118.0690）もΔM 値が+0.2 mDa及び-0.3 mDaと非常に精度の良い結果が得られ、化合物の同定の精度を更に向上させることができました。

図 3. ChromaLynx XS同定結果画面。MS^E モードで得られたプリカーサーイオンとフラグメントイオンより、カルボフランとカルボスルファンが候補化合物として検出

図4にPOSI±IVEソフトウェアで解析をした場合の、TargetLynxの定量結果ブラウザーを表示しました。定量には、カルボフラン及びカルボスルファンの標準品を用いました。



#	Name	Type	Std. Conc	RT	Primar...	Area	Response	µg/kg	%Dev
1	Fastnet_030310_Customer_samples_001	Blank							
2	Fastnet_030310_Customer_samples_002	Standard	200.000	2.28	bb	3727.987	3727.987	201.4744	0.7
3	Fastnet_030310_Customer_samples_003	Standard	100.000	2.28	bb	1846.519	1846.519	99.5983	-0.4
4	Fastnet_030310_Customer_samples_004	Standard	50.000	2.28	bb	932.877	932.877	50.1272	0.3
5	Fastnet_030310_Customer_samples_005	Standard	20.000	2.28	bb	350.420	350.420	18.5888	-7.1
6	Fastnet_030310_Customer_samples_006	Standard	10.000	2.28	bb	187.663	187.663	9.7760	-2.2
7	Fastnet_030310_Customer_samples_007	Standard	5.000	2.28	bb	107.499	107.499	5.4353	8.7
8	Fastnet_040310_040	Analyte		2.27	bb	337.917	337.917	17.9118	

	Fastnet_04...
Carbofuran	17.9
Carbosulfan	243.2

図4. TargetLynx 定量結果画面。カルボフランとカルボスルファンの定量結果が示されています

まず585の農薬データベースを用いたスクリーニング分析において薬中毒の原因化合物はカルボフランとカルボスルファンと同定されました。検出された2農薬の中毒例の場合、代謝物が検出されることがSoler, et al.[5]の文献より知見として得られましたので、更に農薬データベースに代謝物の情報を加えてPOSI±IVEソフトウェアを用いて再解析を行いました。図5に再解析に使用した農薬データベースを表示しました。検出された2農薬及び追加した代謝化合物をハイライト表示しています。

確認したい代謝化合物の中には標準試料を入手できないものがありました。POSI±IVE ソフトウェアは標準資料の入手が困難な化合物を定量分析する場合には、類似化合物を用いて定量を行う事ができます。図5に表示したデータベースでは3-ヒドロキシ-7-フェノールカルボフラン、3-ケト-7-フェノールカルボフラン、7-フェノールカルボフランがサンプル中に含まれている場合は、カルボフランで定量するように設定されています。

Butylate	C11H23NOS	3.43	
Carbaryl	C12H10NO2NH4	2.13	
Carbendazim	C9H9N3O2	1.82	
Carbofuran	C12H15NO3	2.27	
Carbofuran-3-hydroxy	C12H14NO4	1.72	
Carbofuran-3-keto	C12H13NO4	1.98	
Carbofuran-3-hydroxy-7-phenol	C10H12O3		CarboFuran
Carbofuran-3-keto-7-phenol	C10H10O3		CarboFuran
Carbofuran-7-phenol	C10H12O2		CarboFuran
Carbosulfan	C20H32N2O3S	3.85	
Carboxin	C12H13NO2S	2.33	
Chlorbromuron	C9H10BrClN2O2	2.83	
Chlorfenvinphos	C12H14Cl3O4P	3.23	

図 5.今回検出される可能性のある化合物をハイライト表示した農薬データベース

データ再解析の結果、カルボフランの代謝物である7-フェノールカルボフランが同定されました。その後カルボフラン標準液を用いて代謝物の定量を行いました。図6に定量結果を示します。

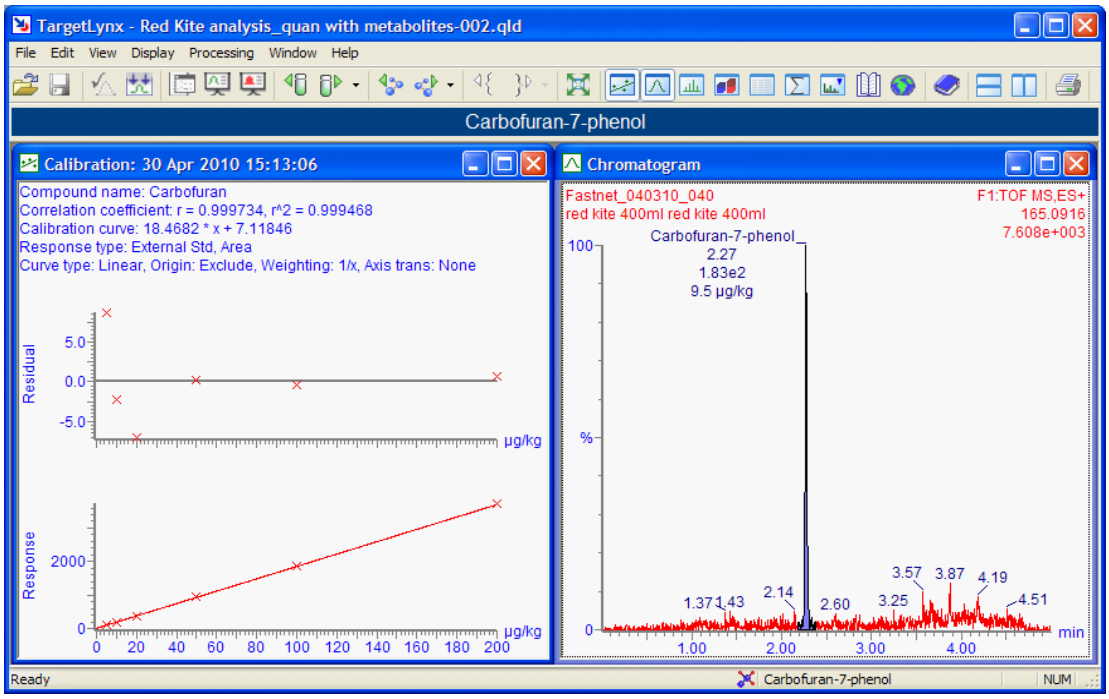


図6. 代謝物である7-フェノールカルボフランの検出、及びカルボフランの検量線を用いた定量結果

更に、化合物の同定精度の向上を目的としてMassFragmentツールを用いて、フラグメントの帰属を行いました。構造の帰属はMS^{E}の高エネルギーモードで得られたフラグメントスペクトルを用いました。図7にMassFragmentによって帰属された保持時間2.27分のマススペクトル及び化合物の構造情報を、図8に保持時間3.87分のマススペクトル及び化合物の構造情報を表示しました。

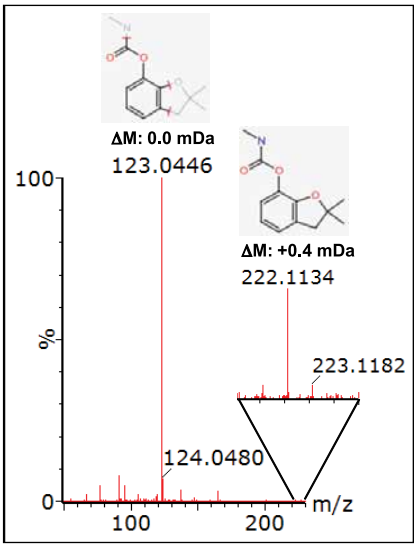


図 7. MS^E 高エネルギーモードにおけるフラグメントイオンスペクトル (2.27分) カルボフランのプレカーサーイオンと、フラグメントイオンの精密質量誤差とMassFragmentツールによる構造帰属結果

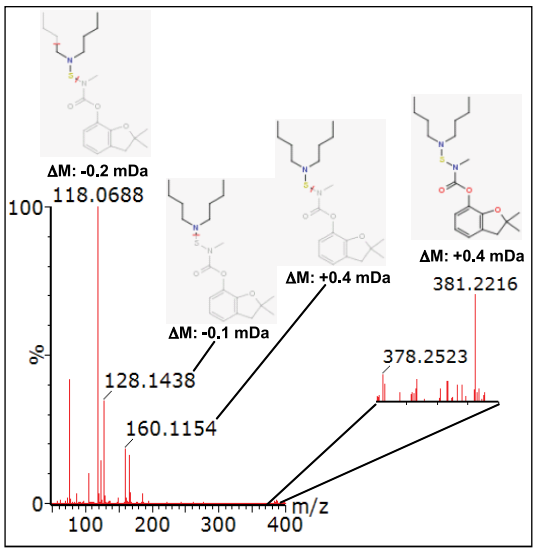


図8. MS^E 高エネルギーモードにおけるフラグメントイオンスペクトル (3.87分) カルボスルファンのプレカーサーイオンとフラグメントイオンの精密質量誤差とMassFragmentツールによる構造帰属結果

結論

- 野生動物の薬中毒の原因究明を目的とした、広範囲の農薬スクリーニングを行ないました。その結果アカトビ胃液中のカルボスルファンとカルボフランを高精度に同定、定量する事ができました。
- Xevo G2 QTof のMS^E 機能は一回の迅速分析において、低エネルギーモード（プレカーサーイオン情報）と高エネルギーモード（フラグメントイオン情報）を同時に取得することができる、非常に情報量の豊富な取り込み手法です。
- Xevo G2 QTof の非常に高い再現性と精密質量精度は結果の信頼性の向上に有用です。
- POSI±IVEソフトウェア 、MassFragment ツールを用いたデータ解析手法は、農薬スクリーニング分析において化合物の同定プロセスを自動化することができます。

最後にサンプル及び標準試料をご提供いただいたSASAにこの場を借りて感謝いたします。

References

1. ウェブサイト: http://www.redkites.co.uk/
2. ウェブサイト: http://www.rspb.org.uk/wildlife/birdguide/name/r/redkite/index.aspx
3. ウェブサイト: http://www.jncc.gov.uk/page-3614
4. ウェブサイト: http://www.opsi.gov.uk/legislation/scotland/acts2004/asp_20040006_en_1
5. Soler C, Hamilton B, Furey A, James KJ, Manes J, and Pico Y. Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Carbosulfan, Carbofuran, 3-Hydroxycarbofuran and Other Metabolites in Food. Analytical Chemistry, 2007; 79: 1492-1501.

このISO9001認証登録ロゴは、ウォーターズコーポレーションのものです。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル 11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

Waters および ACQUITY UPLC は Waters Corporationの登録商標です。The Science of What's Possible、Xevo、POSI±IVE、MassFragment、ChromaLynx および TargetLynx は Waters Corporation の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2010 Waters Corporation

May 2010 720003470JA AG-PDF

1037 06A