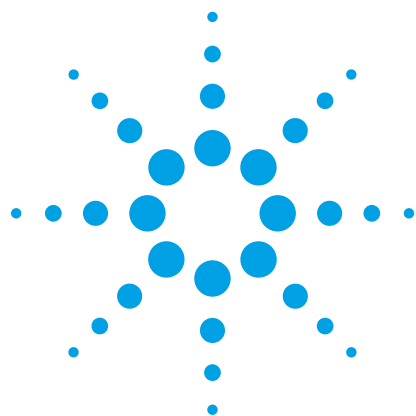




高分離能精密質量分析計 (LC/Q-TOF MS) および精密質量解析ツールを用いた タマネギ中のイミダクロプリド代謝物の 同定

アプリケーションノート

食品

著者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Center for Environmental Mass
Spectrometry
Department of Environmental
Engineering
University of Colorado
Boulder, CO
USA
Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent 6540 Q-TOF LC/MS システムと Agilent MassHunter ソフトウェアツールの使用により、MS/MS 分析でイミダクロプリドの 6 種類の新しい代謝物を同定できました。精密質量 MS/MS 分析によってこれらの代謝物とその構造を推測し、タマネギ中のイミダクロプリド代謝物に加えて、毒性研究のための新しい標的代謝物の理解を深めることができました。



Agilent Technologies

はじめに

このアプリケーションノートでは、この実験の詳細な技術レポート [1] で使用したツールについて説明します。イミダクロプリドは、アブラムシ、ウンカ、コナジラミなどの同翅類害虫に加えて特定の甲虫を駆除するために 1990 年代後半に市場に導入されたネオニコチノイド系農薬です。特に農業分野で最も広く使用される殺虫剤の 1 つとなりました。イミダクロプリドはニコチノイドアセチルコリン受容体の作動体として機能し、昆虫に対する高い特異性を持っています [2、3]。

イミダクロプリドは、ハチにとって最も毒性の高い殺虫剤の 1 つです。イミダクロプリドやその他の殺虫剤が農業分野で広く使用されたことが、2006 年以降にヨーロッパや北米で見られたミツバチ群体の減少の原因の 1 つであることを示す研究があります。したがって、イミダクロプリドは、植物内での動態と代謝物の研究において分析対象となる重要な殺虫剤です [4]。

これまでも、いくつかの穀物についてイミダクロプリド代謝物の研究が行われてきましたが、タマネギでは詳細な研究は実施されていません。このアプリケーションノートでは、MS、全イオン MS/MS、および標的 MS/MS モードの超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC)/四重極時間飛行型質量分析計 (Q-TOF MS) を用いたタマネギ中のイミダクロプリド代謝物の測定に使用する方法とツールについて説明します。いくつかの精密質量解析ツールを使用して、これまでに報告されていない 6 種類を含む代謝物を同定しました。このメソッドを使用して、タマネギ植物、土壌、および浸出液でのイミダクロプリド代謝物の分布を調べました。

実験方法

試薬および標準溶液

個別の農薬原液 (約 1,000 µg/mL) をメタノールに溶解し、-18 °C で保存しました。以前の文献の説明 [1] に従って、この溶液をアセトニトリルおよび水で希釈することにより作業用標準溶液を調製しました。イミダクロプリドを 1.0 N HCl 中に 45 °C で 1 時間置いて加水分解し、グアニジン代謝物を合成しました。この処理も以前の文献の説明に従いました [1]。

装置

この実験は、Agilent 1290 Infinity LC システムを、エレクトロスプレー Jet Stream 技術を備えた Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) 精密質量 Q-TOF LC/MS システムに接続して行いました。分析条件を表 1 に示します。

表 1. LC および Q-TOF MS の分析条件

LC の分析条件	
カラム	分析カラム Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8、4.6 × 150 mm、3.5 µm (p/n 963967-906)
カラム温度	25 °C
注入量	20 µL
移動相	A = 0.1 % ギ酸水溶液 v/v B = アセトニトリル
リニアグラジエント	10 % B で 5 分間、次に定流量、25 分間で 10 % B ~ 100 % B、100 % B で 10 分間保持
流量	0.6 mL/min
Q-TOF MS の条件	
イオンモード	ESI、ポジティブイオンモード
ネブライザ圧力	45 psig
乾燥ガス流量	10 L/min
乾燥ガス温度	250 °C
シースガス流量	11 L/min
シースガス温度	350 °C
ノズル電圧	ポジティブイオンモードで 0 V
フラグメンタ電圧	190 V
キャピラリ電圧	3,500 V
質量範囲	50 ~ 1,000 m/z
検出器レート	2 GHz
分離能	35,000 ± 500
精度	2 ppm

農薬の処理

以前の文献の説明に従って [1]、タマネギ (*Allium cepa* L.) を認定済みの種子から温室環境で栽培しました。200 mL の水に 2.5 µg/mL の濃度で前処理したイミダクロプリドを各植物に処理しました。

サンプル前処理

1 週間に 1 回、3 週間にわたって水サンプル (浸出液) を収集しました。土壌および植物サンプルを 28 日、38 日、および 53 日目に 3 回収集し、合計で 36 個のサンプルを得ました。水サンプルを必要に応じてろ過し、重水素化したイミダクロプリドをスパイクしました。図 1 に示すように土壌と植物の抽出を行いました。

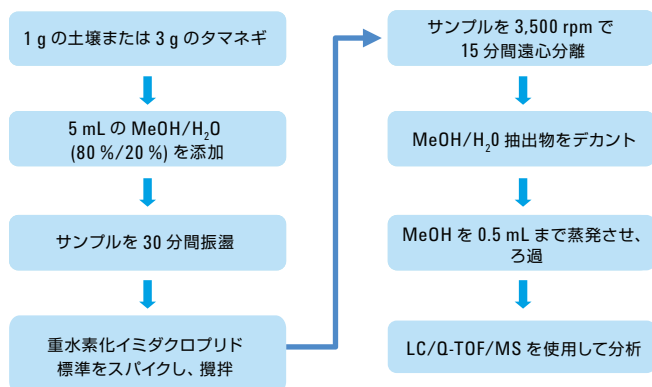


図 1. 土壌および植物サンプルの抽出に使用した手順の流れ図

データ解析

Molecular Feature Extractor、Molecular Formula Generator、Mass Profiler、および精密質量データベースなど、アジレントのいくつかのソフトウェアツールを使用してイミダクロプリド代謝物の同定を行いました。親化合物が塩素化されているため、塩素フィルタなど、著者が一部変更を加えたソフトウェア [5] も使用しました [6]。

結果と考察

既知代謝物のデータベース検索

タマネギ抽出物の典型的な全イオンクロマトグラム (TIC) は非常に複雑であるため、イミダクロプリド代謝物の同定は非常に困難です (図 2A)。ただし、イミダクロプリドとその 12 種類の既知代謝物のデータベース検索により、タマネギ抽出物の抽出イオンクロマトグラム (EIC) に示すように (図 2B)、親化合物 (m/z 256.0594 で測定) とグアニジン代謝物 (m/z 211.0743 で測定) に対応する可能性のある少なくとも 2 つのピークの存在が明らかになりました。 m/z 256 のピークの MS/MS 分析により、これがイミダクロプリドと同定されました [1]。

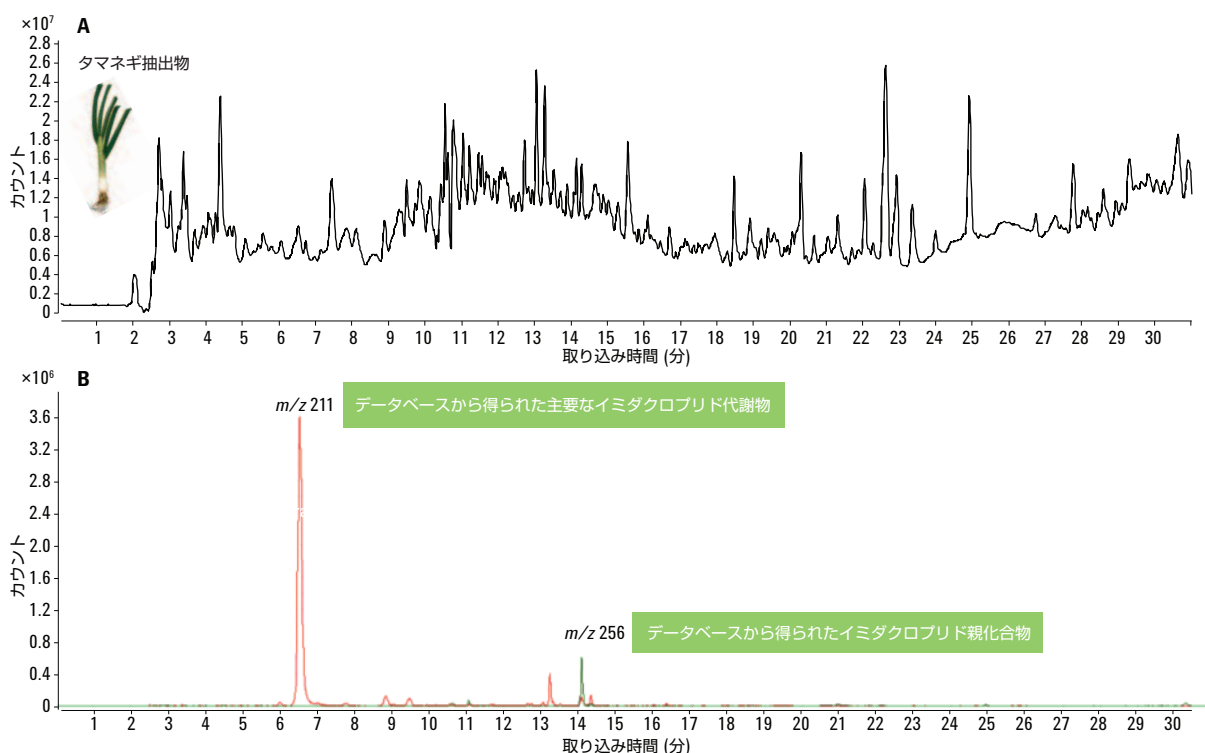


図 2. イミダクロプリドで処理し、28 日目に収穫したタマネギ植物からのタマネギ抽出物の典型的な TIC (A) と、親化合物と m/z 211 のグアニジン代謝物の主なピークを示す、イミダクロプリドのいくつかの既知代謝物の EIC (B)。

m/z 211.0743 のピークはグアニジン代謝物について算出された精密質量の 1 ppm 以内に収まり、このピークの MS/MS 分析によって同定されました [1]。これらの化合物を標準と比較することで同定を確認しました。

精密質量データベース検索により、12 種類の既知代謝物の中からさらに 2 種類、すなわち 4-ヒドロキシイミダクロプリドおよびイミダクロプリドの尿素類似体が発見されました。精密質量と 5-ppm の精密質量ウィンドウ内の抽出イオンクロマトグラムから、他の 9 種類の既知代謝物がタマネギ抽出物に存在しないことがわかりました [1]。

診断イオンおよび全イオン MS/MS

診断用フラグメントイオンはイミダクロプリドの構造の一部位であり、関連する構造を持つ化合物で、一般にその代謝物内に存在するという点で一貫性があります。これらは全イオン MS/MS アプローチによるフラグメント化で生成できるため、クロマトグラム全体の診断イオン検索 (DIS) が可能です。これは、低電圧から高電圧にフラグメンタ (TOF または Q-TOF) を変化させ、

またはコリジョンエネルギーを 0 から中程度に変化させ (Q-TOF は RF 専用モードの四重極の場合のみ)、対象の診断イオンを生成させることで行います。次にこの診断イオンを使用して潜在的な新しい関連代謝物を同定できます。

m/z 126 のイオンは、MS/MS でイミダクロプリドのグアニジン代謝物から生成されたものであり、イミダクロプリド親化合物構造の一部です (図 3)。イミダクロプリドで処理した植物のタマネギ抽出物で m/z 126 イオンを使用して DIS を実行したところ、代謝物と思われるいくつかのピークが同定されました (図 3)。これらの 1 つは、既知代謝物であるグアニジン類似体 (リテンションタイム (RT) 6.6 分) です。 m/z 209.0589 (RT 6.4 分) のショルダピークはグアニジン類似体のオレフィンと同定されました。これは以降の MS/MS によって新たに観察された代謝物です [1]。 m/z 226.0845 (RT 6.0 分) の第 3 のピークは MS/MS によりイミダクロプリドの還元アミン類似体と同定されました。この代謝物もこれまでに報告されていません [1]。イミダクロプリドで処理していないタマネギは、DIS で m/z 126 にピークを示しませんでした。

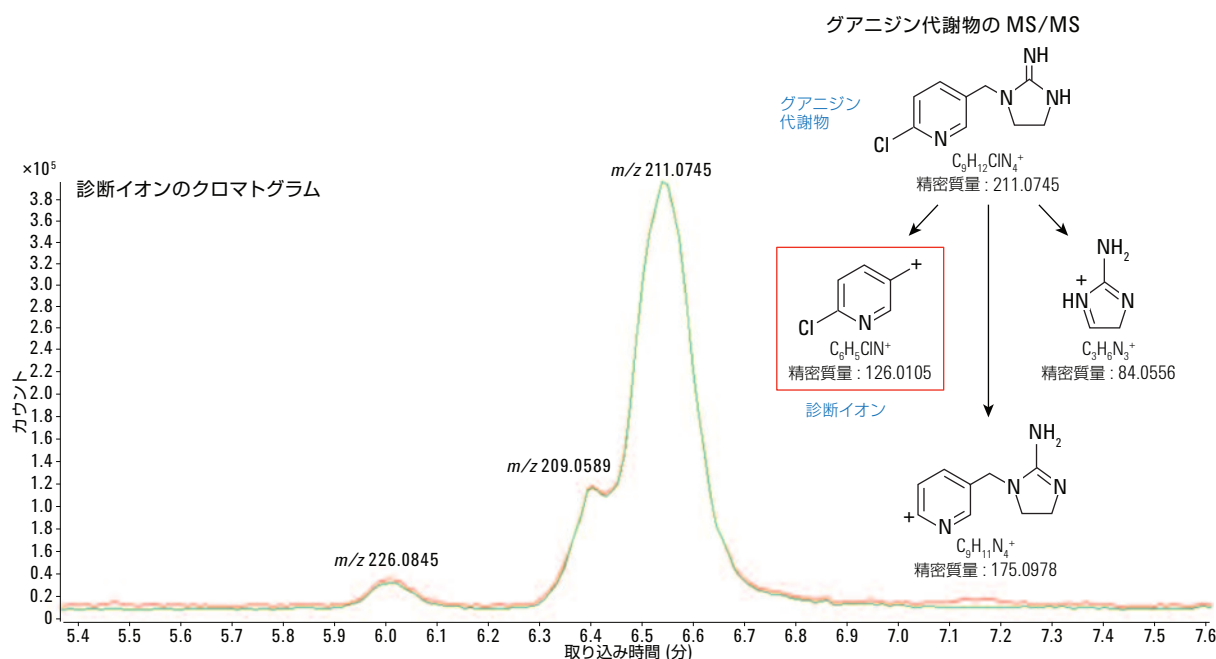


図 3. グアニジン代謝物の MS/MS 生成物である m/z 126 のイオンを使用して行った、イミダクロプリド処理タマネギ抽出物の全イオン MS/MS 分析の診断イオンとイミダクロプリドの構造の一部。植物サンプルは、この農薬での処理後 28 日目に収集しました。コリジョン電圧は 0 eV および 30 eV に設定しました。

塩素フィルタを使用した代謝物の検出

MassHunter ソフトウェアの塩素フィルタ [6] は、新しい代謝物の同定に使用するもう 1 つのツールです。最初に Molecular Feature Extractor を使用して、クロマトグラムでイオン強度 10,000 カウントを超える化合物を見つけます。イミダクロプリドに含まれる塩素原子は 1 つだけであるため、抽出された化合物について 1 つの塩素原子だけを含む分子式を生成しました。タマネギ抽出物で塩素フィルタを実行したところ、データベース検索でも診断イオン検索でも見つからなかった複数の新しい推定代謝物が見つかりました (図 4)。

塩素フィルタだけで見つかった化合物の 1 つは質量が m/z 354.0955、リテンションタイムが 10.96 分で、イミダクロプリドよりも 98 単位大きい質量単位を持っていました。分子式には親化合物よりも炭素原子が 5 個、酸素原子が 2 つ多く含まれる一方、塩素および窒素含有量は親と同じであるため、別の基の抱合が示唆されました。

システイン、グリシン、およびグルタミン酸で構成されるトリペプチドであるグルタチオンの抱合が農薬で報告されていますが、イミダクロプリドではそのような報告はありません。グルタチオンでは新しい代謝物に加わる質量が大きすぎますが、グルタミン酸であれば、追加される炭素は 5 つです。ただし、グルタミン酸によって加わる質量単位は 98 ではなく 147 です。

Cpd	RT	Label	Formula	m/z	Height	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)
1387	14.094	Cpd 1387: C9 H10 Cl N5 O2	C9 H10 Cl N5 O2	256.0578	601240		
336	6.544	Cpd 336: C9 H11 Cl N4	C9 H11 Cl N4	211.0738	3576138		
314	6.011	Cpd 314: C9 H9 Cl N4	C9 H9 Cl N4	209.0582	145349		
337	6.544	Cpd 337: C6 H4 Cl N	C6 H4 Cl N	126.0104	393210		
773	10.964	Cpd 773: C14 H16 Cl N5 O4	C14 H16 Cl N5 O4	354.0955	254645		
1413	14.257	Cpd 1413: 14.257		297.0552	59487		
625	10.192	Cpd 625: C12 H14 Cl N5 O2	C12 H14 Cl N5 O2	296.0891	101477		
785	11.045	Cpd 785: C12 H14 Cl N5 O2	C12 H14 Cl N5 O2	296.0903	87287		
1135	12.814	Cpd 1135: 12.814					
1700	17.054	Cpd 1700: 17.054					
1	2.019	Cpd 1: 2.019					
2	2.022	Cpd 2: 2.022					
3	2.023	Cpd 3: 2.023					
4	2.055	Cpd 4: 2.055					

Element	Minimum	Maximum
C	0	20
H	0	25
O	0	5
N	0	5
S	0	0
Cl	1	1

図 4. 1 つの塩素原子だけを含むように制限された分子式を生成する塩素フィルタ。 m/z 354.0955 で測定された精密質量を持つ新しい代謝物 (ハイライトで示す) を含む複数の代謝物をこのツールで特定できました。

MS/MSを使用したこれらの化合物の分析により、46 amu の2つの部位の中性損失が明らかになりました (図 5)。これらの各損失の測定質量は $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ (ギ酸) 程度でした。グルタミン酸によるニトロ基の還元がこのデータと一致します。別の主要なフラグメントは m/z 209.0550 (測定された精密質量) イオンであり、これもグルタミン酸の損失によって形成されます (図 5)。このデータにより、新しい代謝物の構造が、イミダクロプリドのグルタミン酸抱合体と同定されました。

塩素フィルタによって検出された m/z 240.0996 のもう1つの化合物の分子式は $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ となりました。これは m/z 226 (イミダクロプリドのアミン類似体) の代謝物にメチル基を付加したものと同じ、MS/MS によってメチルイミダクロプリドと同定されました [1]。メチル化はタマネギの DNA で一般に見られますが、農薬については見られません。前述の理由により、この推定構造は、イミダクロプリドの別の新しい潜在的毒性代謝物を示しています。

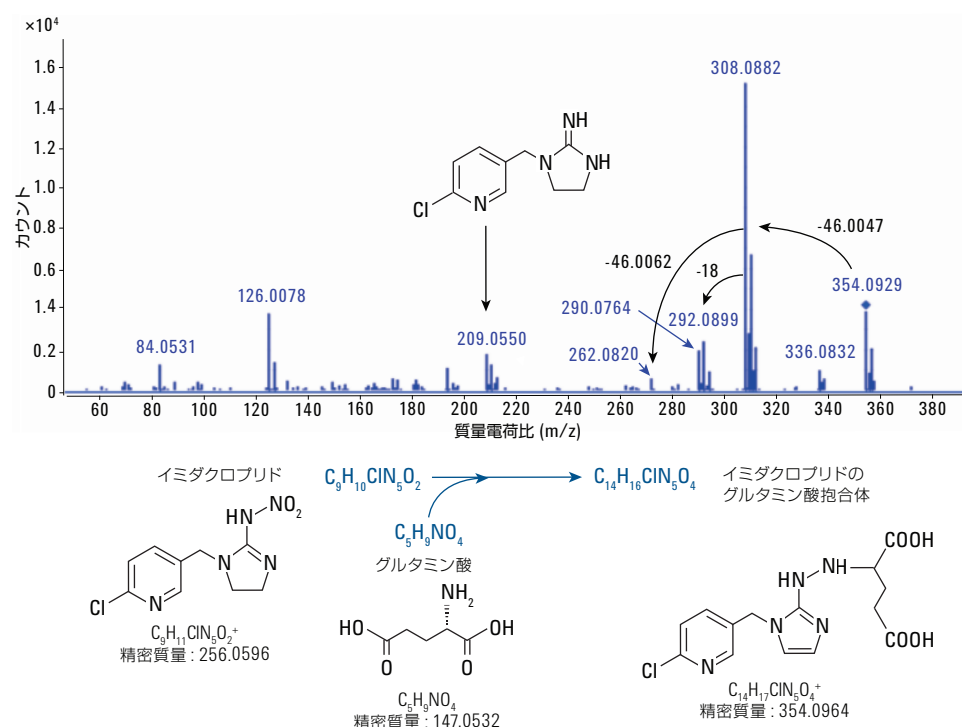


図 5. MS/MS の遷移と植物代謝物の情報を使用した m/z 354.0955 の代謝物の構造特定。2つの 46 amu 部位の中性損失は、2つの $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ (ギ酸) 基の喪失以外では説明できません。グルタミン酸によるイミダクロプリド上のニトロ基の還元により、代謝物上の2つのカルボキシル基と、イミダクロプリドからの5つの炭素および6つの水素の増加を説明でき、これによって代謝物の正しい質量が得られます。

Mass Profiler による差異の識別

農薬で処理した植物で Molecular Feature Extractor により検出されたすべての化合物を、Agilent Mass Profiler ソフトウェアを使用して未処理の植物の対照と比較しました (図 6)。2 つの植物抽出物のプロファイルは代謝物を推定するには複雑すぎますが、この結果は、農薬による植物の処理によって、農薬自体の代謝だけではなく、植物の化学組成に数多くの変化が生じることを示唆しています。これは、植物の栄養分に農薬が与えるプラスの影響とマイナスの影響の両方について研究を進める必要性を示す明らかな現象です。

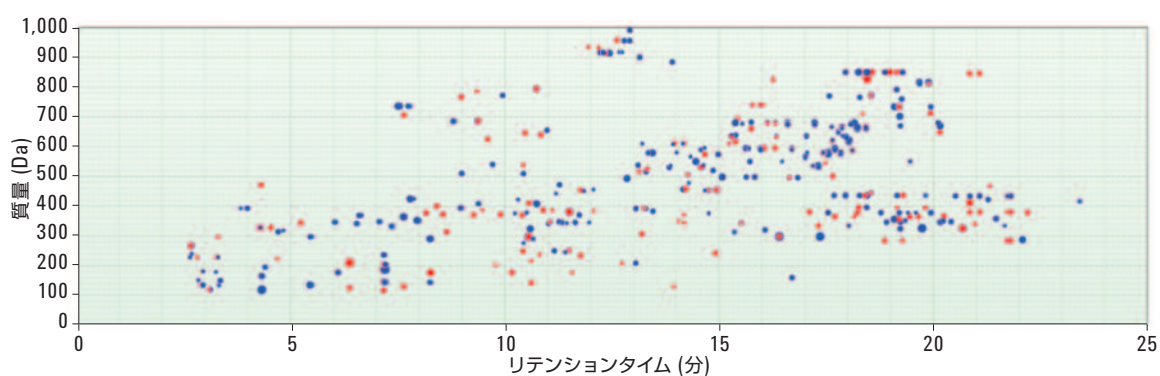
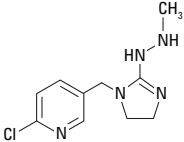
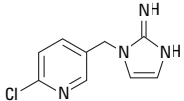
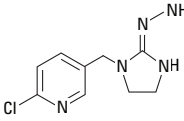
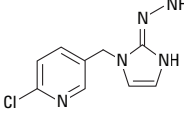
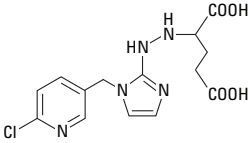
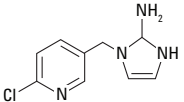


図 6. 3 つのブランク、すなわち未処理タマネギ抽出物の平均値と、イミダクロプリドで処理し、28 日目に収集した 3 つのサンプルの平均値の比較 (青い点は両方のサンプルセットに共通の特徴を、赤い点は処理済みサンプルに固有の特徴を示す)

イミダクロプリドとその代謝物の分布

この分析によってイミダクロプリドの6種類の新しい代謝物が同定されました(表2)。植物および土壌抽出物でのイミダクロプリドとこれらの6種類の代謝物の分析により、植物には主にグアニジン代謝物が含まれ、土壌には代謝されていない農薬が主に含まれることがわかりました。他の5種類の新しい代謝物は、グアニジン代謝物や親農薬に比べて、いずれも含有量は微量でした(図7)。

表2. MS/MS 分析により新たに同定された6種類のイミダクロプリド代謝物

代謝物	元素組成	リテンション タイム (分)	精密質量 [M+H] ⁺	化学構造
メチル化された イミダクロプリド	C ₁₀ H ₁₄ ClN ₅	8.3	240.1010	
グアニジン類似体の オレフィン	C ₉ H ₉ ClN ₄	6.4	209.0589	
イミダクロプリド - アミン類似体	C ₉ H ₁₂ ClN ₅	6.0	226.0854	
オレフィン - イミダクロプリド - アミン類似体	C ₉ H ₁₀ ClN ₅	4.8	224.0697	
イミダクロプリドオレフィング アニジンのグルタミン酸抱合体	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₄	10.7	354.0964	
グアニジンイミダクロプリドの 異性体	C ₉ H ₁₁ ClN ₄	7.1	211.0745	

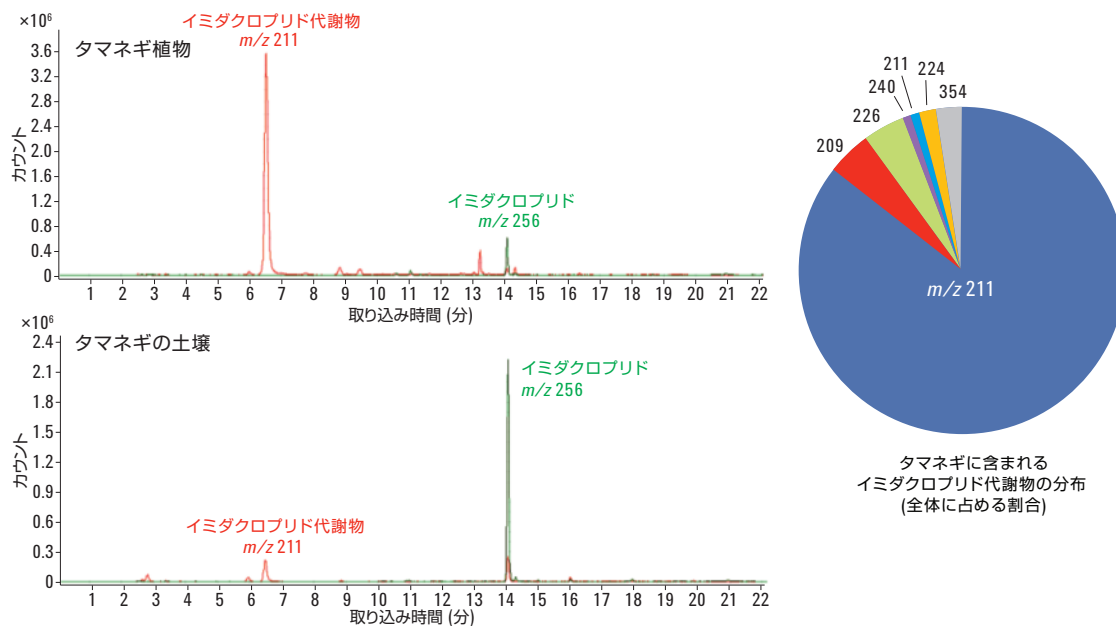


図 7. 土壌抽出物および植物抽出物中の農薬とその主要な代謝物、つまりグアニジン類似体 (m/z 211) の分布。円グラフは、5 つの新たに同定された代謝物と、グアニジン類似体の 2 つの同位体を含むグアニジン類似体 (m/z 211) のタマネギ植物中での分布を、7 種類の代謝物の合計を基準にした割合として表しています。

結論

Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) 精密質量 Q-TOF LC/MS システムとソフトウェアは、植物および環境中の農薬動態の詳細な研究を可能にするだけでなく、イミダクロプリドの代謝物を同定し、特性解析を行うためのパワフルなツールとなります。精密質量データベース検索、診断イオンと全イオン MS/MS、塩素フィルタ、および Mass Profiler などのツールを使用することで、構造に関する予備情報がほとんど、またはまったくない場合でも新しい代謝物を明確にすることができます。これらのツールは、複雑なサンプル内に中程度の強度で発生する、親化合物からの大量の未知誘導体の同定が必要なすべての研究に一般に適用できます。

参考文献

1. E.M.Thurman, *et al.* "Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **27**(17):1891-903 (2013).
2. S. Kagabu "Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs" *J. Agric.Food Chem.* **59**, 2887- 2896 (2011).
3. M. Tomizawa, J.E.Casida "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors" *Annu.Rev. Entomol.* **48**, 339-364 (2003).
4. T. Iwasa, *et al.* "Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*" *Crop Protection* **23**, 371-378 (2004).
5. E.M.Thurman and I. Ferrer "The isotopic mass defect:A tool for limiting molecular formula by accurate mass" *Anal.Bioanal.Chem.* **397**, 2807-2816 (2010).
6. I. Ferrer and E.M.Thurman "Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *Anal.Chem.* **82**, 8161-8168 (2010).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

November 22, 2013

5991-3397JAJP



Agilent Technologies