

ジャスモン酸類の抽出・精製方法およびLC-MSでの最適なDC電圧

佐藤翔一・児島清秀*

(平成26年2月20日受付)

要約

植物ホルモンであるJA (ジャスモン酸) および MeJA (ジャスモン酸メチル) における、抽出原料からの効率のよい抽出・精製方法を検討した。検討した方法では、JA で約62%、MeJA で約55% 回収できることがわかった。また、LC/MSでのJA および MeJA の最適な分析条件を求めるために、DC電圧を変えて質量スペクトルを測定した。最適なDC電圧は、JA はネガティブモードで20V、MeJA はポジティブモードで10Vであった。

新大農研報, 66(2):125-129, 2014

キーワード：質量スペクトル、質量分析、ジャスモン酸、ジャスモン酸メチル、DC電圧

はじめに

植物ホルモンの一つであるJA (ジャスモン酸) や、MeJA (ジャスモン酸メチル) には、傷害応答、病害応答、葉の老化、離層形成、花の形成など、様々な生理作用がある (小柴, 2010)。ジャスモン酸類の生理活性物質としての研究は、比較的浅く、内生量など分析機器を用いた研究が必要である。

植物組織からの植物ホルモンの抽出・精製には、溶媒分画法が多く利用される。JA や MeJA は、植物体内に微量で存在し、揮発性が高いため、抽出・精製時には、回収率が極端に低くなる可能性がある (小柴と神谷, 2010)。正確な定量分析を行なうためには、効率のよい抽出・精製方法の確立が必要である。

また、定量手段としてHPLC (High Performance Liquid Chromatography、高性能液体クロマトグラフィー) と、MS (Mass Spectrometry、質量分析法) を一体化したLC/MSが用いられる。LC/MSを用いた測定では、試料にあった測定条件を設定することで、より検出感度の高い測定を行なうことができる (中村, 2005)。

本研究の目的は、JA および MeJA の正確な定量分析を行なうための、効率のよい抽出・精製方法と、LC/MSの最適な分析条件の確立である。そこで、JA および MeJA の効率のよい抽出・精製方法を検討した。また、LC/MSによる測定では、スキャンモードにおけるQ-array (イオン分離・収束部) 電圧のうち、DC電圧を変更して、JA および MeJA のマススペクトル (強度とスペクトルパターン) を測定した。

材料および方法

試葉

植物ホルモンの標品として次の試葉を使用した；ジャスモン酸 [(±)-Jasmonic Acid: JA、Life Science]、ジャスモン酸メチル [(Methyl Jasmonate: MeJA)、d₂-JA [(±)-JA-9、10-d₂、

東京化成工業株式会社]、d₂-MeJA [Methyl(±)-Jasmonate-9、10-d₂、東京化成工業株式会社]。

抽出・精製方法の検討

JA および MeJA を抽出・精製する方法について、Robert A. Creelman (1992, 1995)、Patrick S. Blake (2002)、Shigeru Tamogami (1998) らの方法を参考にした。また、各過程におけるJA および MeJA の回収率について調査した。

検討した方法を図1に示す。まず抽出材料に80%エタノールを加え、破碎・濾過した。濾過した水溶液を減圧濃縮し、濃縮した水溶液を溶媒分画法で抽出した。抽出液を減圧濃縮し、残渣に50%エタノールを加え、定量分析を行った。

減圧濃縮

ロータリーエバポレーター (湯せん温を30℃に設定) での減圧濃縮後、JA および MeJA の回収率を求めるために、各溶媒で以下の操作を行った。

(1) エタノール

エタノール200mlに、JA および MeJA を1×10⁶pmol加え、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮水溶液をHPLC[流量:1.5ml/min、移動相:50%エタノール/50%超純水、カラム:Inertsil® ODS-3 (6.0×250mm、GL Science Inc)、検出器:UV検出器 (SPD-10Avp、SHIMADZU)、波長:210nm] で分析した。既知量の標品とのピーク面積の比から、JA および MeJA の回収率を求めた。

(2) 水

水50mlに、JA および MeJA を1×10⁶pmol加え、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮水溶液をHPLCで分析した。

(3) 80%エタノール

80%エタノール100mlに、JA および MeJA を1×10⁶pmol加え、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮水溶液を

抽出材料
 ↓ 80%エタノール
 ↓ 破碎・濾過
 ↓ 減圧濃縮
 濃縮水溶液
 ↓ 抽出
 抽出液
 ↓ 減圧濃縮
 残渣
 ↓ 50%エタノール
 定量分析

図1. 抽出・精製方法

表1. エタノール200mlを減圧濃縮した場合のJA類回収率

濃縮後体積 (ml)	3.90	1.98ml	0.45ml
JA 回収率 (%)	99	99	87
MeJA 回収率 (%)	92	92	73

HPLCで分析した.

(4) ジエチルエーテル

ジエチルエーテル 50ml に、JA および MeJA を 1×10^6 pmol 加え、さらに水を 0.5ml 加えた後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮水溶液を HPLC で分析した。

抽出・精製

抽出原料として水 50ml に、JA および MeJA を 1×10^6 pmol 加えた。希塩酸で pH2.5 に調整し、分液ロートを用いて、ジエチルエーテルで抽出操作を行なった。エーテル層を取り出し、水を 0.5ml 加え、ロータリーエバポレーター（湯せん温度 30℃）でエーテル層を除去した。濃縮後の水溶液を HPLC で分析した。

LC/MS の設定

大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization : APCI) の LC/MS (MS : LCMS2010EV、SHIMADZU) を使用した。HPLC は、流量を 0.1ml/min とし、溶離液は 100% エタノール、カラムとして抵抗管を用いた。MS の分析モードはスキャンモードとし、スキャンスピードは 150amu/sec とした。測定モードは、ネガティブモード (脱プロトン化された $[M-H]^-$ が生成する) と、ポジティブモード (プロトン化された $[M+H]^+$ が生成される) を使用した。測定する m/z (イオンの質量数 / 電荷数) は、100 ~ 230 に設定した。Q-array (イオン分離・収束部) 電圧のうち、DC 電圧を 5V ~ 50V まで変更し、分析を行なった。試料として、JA と MeJA、重水素でラベルした JA と MeJA を 1000pmol (10^{-4} M を 10 μ l) 注入した。

表2. 水50mlを減圧濃縮した場合のJA類回収率

濃縮後体積 (ml)	4.75	1.50	0.35
JA 回収率 (%)	85	84	85
MeJA 回収率 (%)	54	28	21

表3. 80%エタノール100mlを減圧濃縮した場合のJA類回収率

濃縮後体積 (ml)	28	26	20
JA 回収率 (%)	92	100	89
MeJA 回収率 (%)	92	100	90

表4. エーテル50ml+水0.5mlを減圧濃縮した場合のJA類回収率

濃縮後体積 (ml)	0.75	0.55	0.45
JA 回収率 (%)	69	68	70
MeJA 回収率 (%)	60	57	63

表5. 体積比 水相 : エーテル相 = 1 : 1 における JA 類の抽出率

	抽出1回 + 減圧濃縮	抽出1回
JA 回収率 (%)	55	80
MeJA 回収率 (%)	53	88

抽出操作を1回行なって減圧濃縮した場合のJA類の平均回収率(左)を、エーテルにおける濃縮後の回収率(図5)で割り、JA類の平均抽出率を求めた(右)。

結果および考察

減圧濃縮後の回収率

(1) エタノール

ロータリーエバポレーターで、エタノール 200ml を 3.40ml、1.98ml まで濃縮しても、JA および MeJA での回収率は 90% 以上であった(表1)。0.45ml まで濃縮すると、JA で 87%、MeJA で 73% となり、回収率が低下した。

(2) 水

ロータリーエバポレーターで水溶液 50ml を 4.75ml、1.50ml、0.35ml まで濃縮した(表2)。JA の回収率は、ほぼ変わらなかったが、MeJA では、濃縮後体積が小さくなるにつれて、回収率が低下した。

(3) 80%エタノール

ロータリーエバポレーターで、エーテルだけを飛ばし、水溶液に濃縮すると、JA および MeJA で約 94% の回収率が得られた(表3)。

(4) ジエチルエーテル+水

ロータリーエバポレーターで、エーテルだけを飛ばし、水溶液に濃縮すると、JA で約 69%、MeJA で約 60% の回収率が得られた(表4)。

分液における抽出率

抽出原料である水溶液からエーテルで抽出操作を行ない、水を少量加え、ロータリーエバポレーターで水溶液に濃縮した場合、平均回収率は JA で 55%、MeJA で 53% であった(表5)。この結果と、エーテルの減圧濃縮後における回収率から、水とエーテルにおける平均抽出率は、体積比 1 : 1 で、JA で 80%、MeJA で 88% であることがわかった。また計算から、抽出操

作を 2 回行った場合、JA で約 96%、MeJA で約 98% が抽出できることがわかった。

LC/MS

(1) JA (ジャスモン酸：分子量=210.27)

分析モード別に見ると、ネガティブモードでは、カルボキシル基からプロトンが離脱したマイナスの分子イオンピーク (m/z 209.1) が観測された (図 2)。これは、田母神(2001)の結果と

一致した。強度は、DC 電圧 20V で 4.8 万となり、最大となった。

ポジティブモードでは、分子イオンピーク m/z 211 の強度が、5V で 4.0 万となり、最大となった。

両モードの中で、分子イオンピークの強度が最も高い条件は、ネガティブモードで 20V であった。

重水素でラベルした d_2 -JA (分子量=212.28) でも、ネガティブモードの 20V で、 m/z 211.1 の 5.5 万の強度が得られた (図 3)。また、 m/z 209 の強度は 0.3 万となった。このことから、試葉

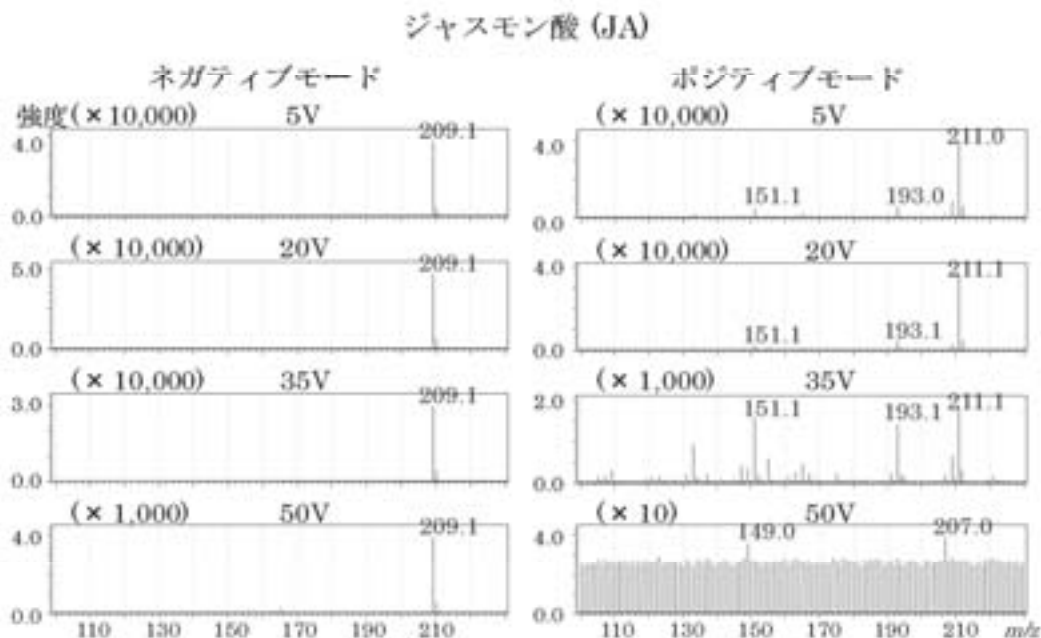


図 2. ジャスモン酸 (JA) における DC 電圧 5~50V での質量スペクトルの変化

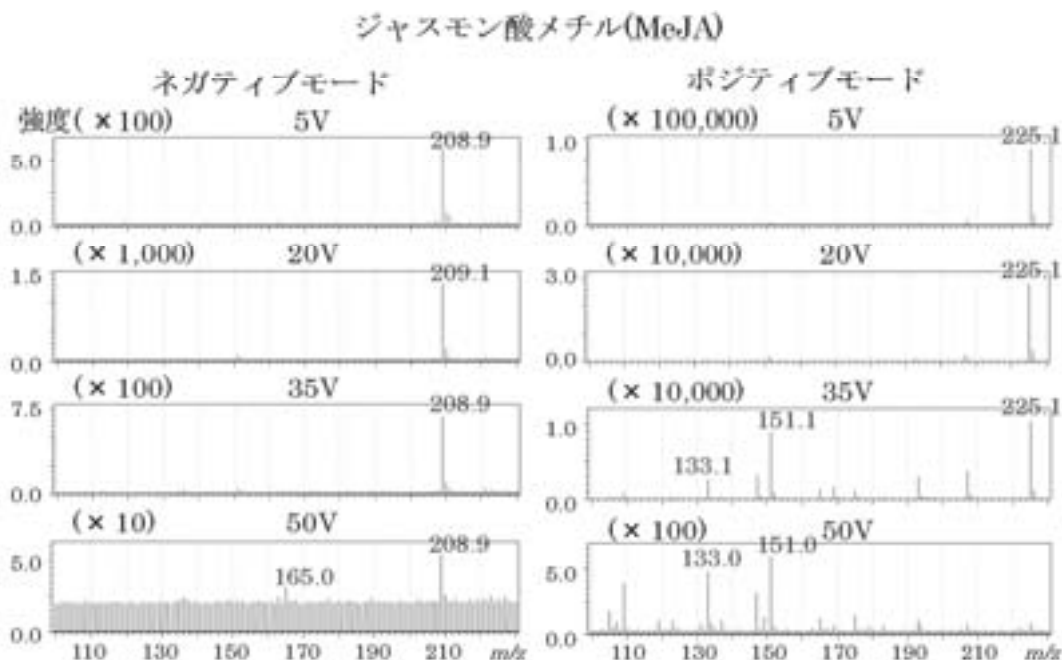


図 3. ジャスモン酸メチル (MeJA) における DC 電圧 5~50V での質量スペクトルの変化

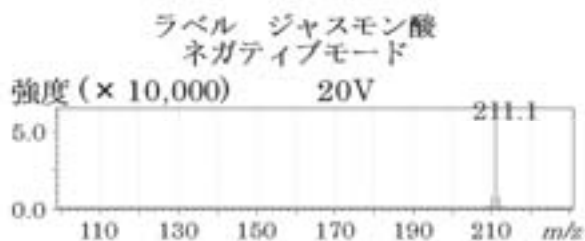


図4. ラベル ジャスモン酸 における質量スペクトル

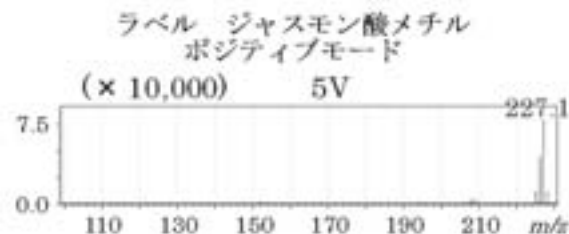


図5. ラベル ジャスモン酸メチル における質量スペクトル

d_2 -JA には、重水素でラベル化されていない天然体と同じJAが5.5%存在することがわかった。今回使用した d_2 -JA を内部標準物質として用いる場合、天然体と同じJAが5.5%存在するため、留意が必要である。

(2) MeJA (ジャスモン酸メチル：分子量=224.30)

分析モード別に見ると、ネガティブモードでは、分子イオンピーク m/z 209.1 の強度が、DC 電圧 20V で 0.1 万となり、最大となった。(図4)

ポジティブモードでは、分子イオンピーク m/z 225.1 の強度が、5V で 9.0 万となり、最大となった。

両モードの中で、分子イオンピークの強度が最も高い条件は、ポジティブモードで 5V であった。

重水素でラベルした MeJA (分子量=226.31) でも、ポジティブモードの 5V で、 m/z 227.1 の 8.0 万の強度が得られた(図5)。 m/z 225 の強度は、1.0 万となった。このことから、試薬 d_2 -MeJA には、ラベル化されていない天然体と同じ MeJA が 12.5% 存在することがわかった。今回使用した d_2 -MeJA を内部標準物質として用いる場合、天然体と同じ MeJA が 12.5% 存在するため、留意が必要である。

結論

本研究では、検討した抽出・精製方法(図1)で、JA で約 62%、MeJA で約 55% 回収できた。

JA、MeJA の LC/MS での最適な DC 電圧は、JA はネガティブモードで 20V、MeJA はポジティブモードで 5V である。

引用文献

- Creelman, R. A., M. L. Tierney., and J. E. Mullet. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4938-4941.
- Creelman, R. A., and J. E. Mullet. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plant: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4114-4119.
- 福田陽子, 児島清秀. 2013. サイトカイニン分析における LC-MS の分析部直流 (DC) 電圧の報告. *新大農法*, **65**(2): 123-129.
- 児島清秀, 高橋みや子, 大竹憲邦. 2000. LC-MS による植物ホルモンの標品の質量スペクトル分析. *新大農法*, **53**: 17-24.
- Tabogami, S., and O. Kodama. 1998. Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high-performance liquid chromatography-turboionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **822**: 310-315.
- Blake, P. S., J. M. Taylor., and W. E. Finch-Savage. 2002. Identification of abscisic acid, indole-3-acetic acid, jasmonic acid, indole-3-acetonitrile, methyl jasmonate and gibberellins in developing, dormant and stratified seeds of ash (*Fraxinus excelsior*). *Plant Growth Regulation* **37**: 119-125.
- 小柴恭一, 神谷勇治(編). 2010. 新しい植物ホルモンの科学 第2版. 講談社, 東京.

The extraction and purification methods, and the most suitable DC voltage of LC/MS in jasmonate

Shoichi SATO and Kiyohide KOJIMA*

(Received February 20, 2014)

Summary

The efficient extraction and purification method from extraction raw materials in JA (jasmonic acid) and MeJA (Methyl-Jasmonate) was examined. It was revealed that 55% in JA and 62% in MeJA by the method examined were collected. In addition, the DC voltage was changed and the mass spectrum was measured to find the most suitable condition of JA and MeJA analysis in LC/MS. The most suitable DC voltage was 20V in a negative mode in JA and 10V in a positive mode in MJA.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 66(2):125-129, 2014

Key words : Mass spectrum, Mass spectrometry, Jasmonic acid, Metyl-Jasmonate, the DC voltage