

# サイトカニン分析における LC-MS の分析部直流 (DC) 電圧の報告

福田陽子<sup>1\*</sup>・児島清秀<sup>1</sup>

(平成25年1月28日受付)

## 要約

サイトカニンである iP (イソペンテニルアデニン)、Z (ゼアチン)、iPR (イソペンテニルアデノシン)、ZR (ゼアチンリボシド) の定量における最適条件を求めするために、DC 電圧を変えて質量スペクトルを測定した。各標準物質において最適な DC 電圧は同じで、ポジティブモードで 20V であった。

新大農研報, 65(2):123-129, 2013

キーワード: サイトカニン、質量スペクトル、質量分析、植物ホルモン、DC 電圧

## はじめに

サイトカニンには、細胞の分裂促進、カルスにおけるシュート形成の誘導、側芽成長の活性化、老化の抑制、栄養分の転流調節など、さまざまな生理作用がある (小柴, 2011)。植物内には、豊富な一次および二次代謝産物が存在する一方、内生植物ホルモンは非常に低い生理濃度で存在するため、正確な濃度の情報を取得するためには、高感度および高選択性の検出方法の開発が重要である (FU JiHong, 2011)。最近では質量分析法が主流となっている。特に多くのサイトカニン分子種を一度に測定するためには、HPLC と質量分析装置を連結した LC-MS が用いられる (小柴, 2002)。

LC-MS の測定方法には、ある一定の質量範囲を反復スキャンする Scan 法と、目的の化合物に特徴的なイオンのみを測定する SIM (selected ion monitoring) 法があり、後者の方が検出感度が向上する (丹羽, 1995)。また、種々の設定を変えることで、各試料にあったより良い分析条件の確立が可能である (庄野, 2009)。

本研究の目的は、植物体内で様々な生理作用を持つ天然型サイトカニンのうち、活性を持つ iP (イソペンテニルアデニン)、Z (ゼアチン) および、それぞれの前駆体である iPR (イソペンテニルアデノシン)、ZR (ゼアチンリボシド) に関して、高感度 (より少ない材料から) の分析を可能にするための最適な LC-MS の分析条件の確立である。そこで、SIM 法を用いて、質量分析においてその感度を大きく左右する質量分離・収束の場である Q-array 電圧のうち直流電圧の印加を左右する DC 電圧を変えて、各標準物質の質量スペクトル (パターンと強度) を測定した。

## 材料および方法

### 試薬

植物ホルモンの標品として次の試薬を使用した: イソペンテニルアデニン (isopentenyladenine; iP)、イソペンテニルアデノシン (isopentenyladenosine; iPR)、ゼアチン (zeatin; Z)、ゼアチンリボシド (zeatin riboside; ZR)

全ての標品は MeOH で 10-4M に溶解して、10  $\mu$ l (1000pmol) を注入した。

## LC/MS の設定

分析には、大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) 法の LC-MS (LCMS2010EV; SHIMADZU) を使用した。測定モードの極性は負イオン (ネガティブモード) と正イオン (ポジティブモード) とした。

### 使用条件

カラムは抵抗管を用いた。溶離液に電解質であるギ酸を含むとイオン化が促進するため (Murofushi ら, 1992)、溶離液はメタノール (MeOH, HPLC グレード) + 20mM ギ酸を使用した。流速は 0.5ml/分とした。サンプリングの m/z は、iP は 80 ~ 210、iPR は 80 ~ 340、Z は 80 ~ 225、ZR は 100 ~ 355 まで設定した。スキャンスピードは、250amu/sec とした。Q-array 電圧のうち、DC 電圧を 5V から開始して、15V 間隔で変更し、80V まで設定した。

## 結果および考察

植物ホルモンの定量における最適な Q-array (イオン分離・収束部) 電圧を求めするために、DC (印加を促す) 電圧を変えてスペクトルを測定した。S/N 比で 5 以下のピークは、マニュアルで省いた。

### (1) イソペンテニルアデニン (iP)

分析モード別にみると、ネガティブモードでは電圧を上げていくと強度が上昇し、80V で最高であった (図 1)。強度の最高値から、iP の定量に適した DC 電圧は、ネガティブモードでは 80V であった。一方、ポジティブモードでは、5V では明確なピークが確認できず (データ略)、電圧を上げていくと強度が低下し、20V が最高値であった。

両モードの中で最も強度が高い条件はポジティブモードで 20V である。分子イオンピークとして 204.1 (iP の分子量は 203.25)、フラグメントイオンピークは、136.1 であった。

### (2) ゼアチン (Z)

分析モード別にみると、ネガティブモードでは 20V および 35V で低い強度を示し、50-80V では大きな変化はなかった (図 2)。その中でも、最高強度を示した電圧は、80V であった。

<sup>1</sup> 新潟大学大学院自然科学研究科 fl1d056b@mail.cc.niigata-u.ac.jp

# イソペンテニルアデニン (iP)

## ネガティブモード

## ポジティブモード

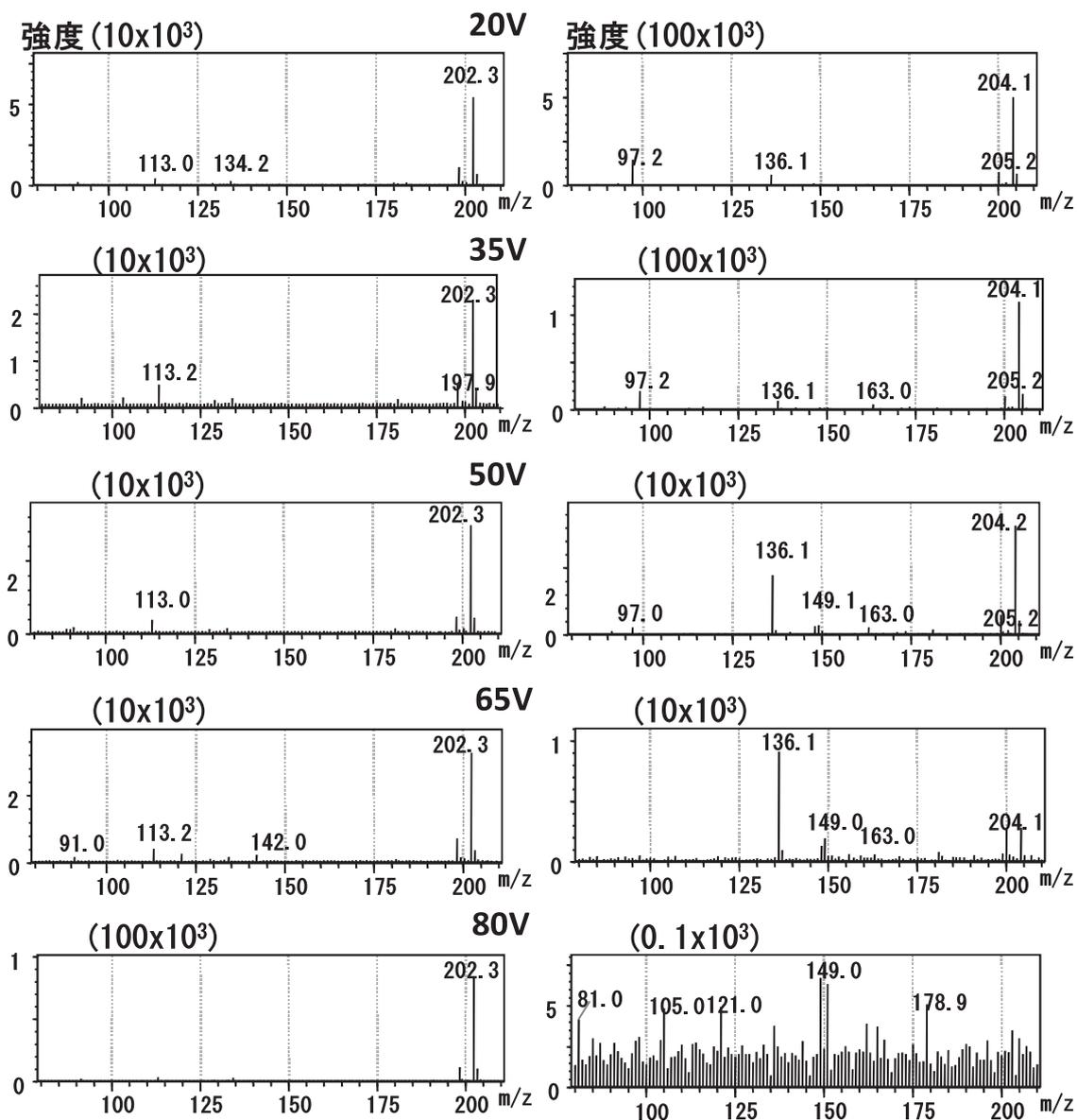


図1. iPの質量スペクトル

一方、ポジティブモードでは、5Vでは明確なピークが確認できず（データ略）、電圧を上げていくと強度が低下し、20Vが最高値であった。

両モードの中で最も強度が高い条件は、ポジティブモードで20Vである。分子イオンピークとして219.8（Zの分子量は219.25）、フラグメントイオンピークは201.8であった。

### (3) イソペンテニルアデノシン (iPR)

分析モード別にみると、ネガティブモードでは電圧を変化させても強度について大きな変化はなかった。その中でも最も高い強度を示した電圧は、20Vであった（図3）。一方、ポジティブモードでは、5Vでは明確なピークが確認できず（データ略）、電圧を上げていくと強度が低下し、20Vが最高であった。

両モードの中で最も強度が高い条件は、ポジティブモードで20Vである。分子イオンピークとして336.1（iPRの分子量は

## ゼアチン (Z)

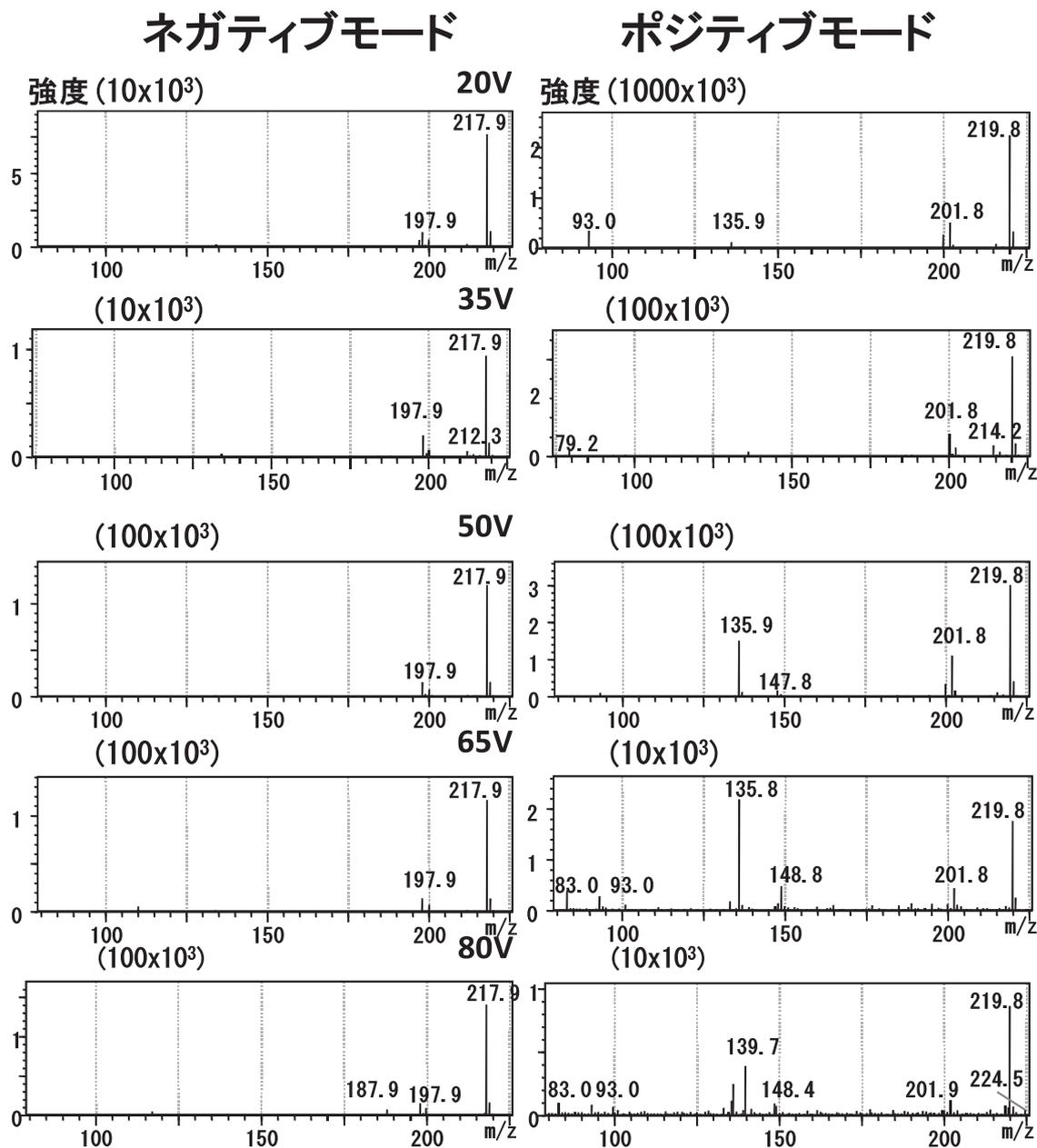


図2. Zの質量スペクトル

335.36)、フラグメントイオンピークは、204.2であった。

#### (4) ゼアチンリポシド (ZR)

分析モード別にみると、ネガティブモードでは20V から65V までは電圧を変化させても強度について大きな変化はなかったが、65V から80V に電圧を変化させると、強度は上昇した。最高値は、ネガティブモードでは80V であった。一方、

ポジティブモードでは、5V では明確なピークが確認できず(データ略)、電圧を上げていくと強度は低下し、20V が最高値であった。

両モードの中で最も強度が高い条件は、ポジティブモードで20V である。分子イオンピークとして352.1 (ZRの分子量は351.36)、フラグメントイオンピークは、220.2であった。

# イソペンテニルアデノシン (iPR)

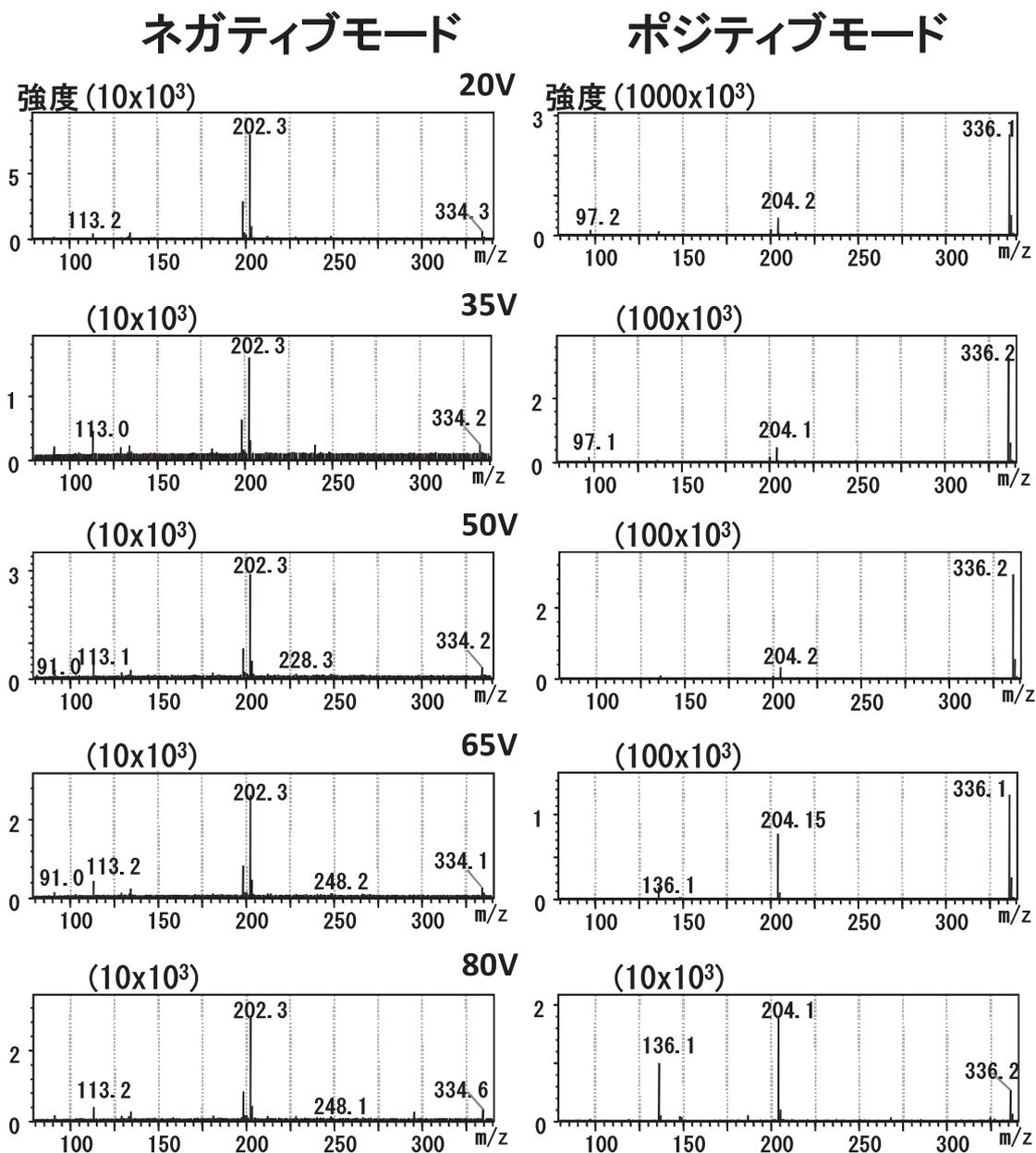


図3. iPRの質量スペクトル

## (5) 4種類の標品

児島ら (2000) の報告では、LC-MS (M-1200H, 日立) を使用し、ドリフト (分子を開裂させる) 電圧の上昇に伴って分子イオンピークの強度は低下しより小さな m/z フラグメントイオンピークにシフトしていく傾向が確認された。しかし、本報告では、DC 電圧の上昇に伴う傾向は確認できなかった。

本報告では、今回調査した CK s 4 種では各標準物質において最適な DC 電圧は同じであった。分析モードうち、ネガティ

ブモードに対しては、最適な DC 電圧が異なることが明らかとなった。全ての最適 DC 電圧がポジティブモードで 20V であったことから、より低い 5V で測定したところ、全ての標品についてどちらの分析モード (ネガティブモードおよびポジティブモード) においても、明確なピークは確認できなかった (データ略)。

# ゼアチンリボシド (ZR)

## ネガティブモード

## ポジティブモード

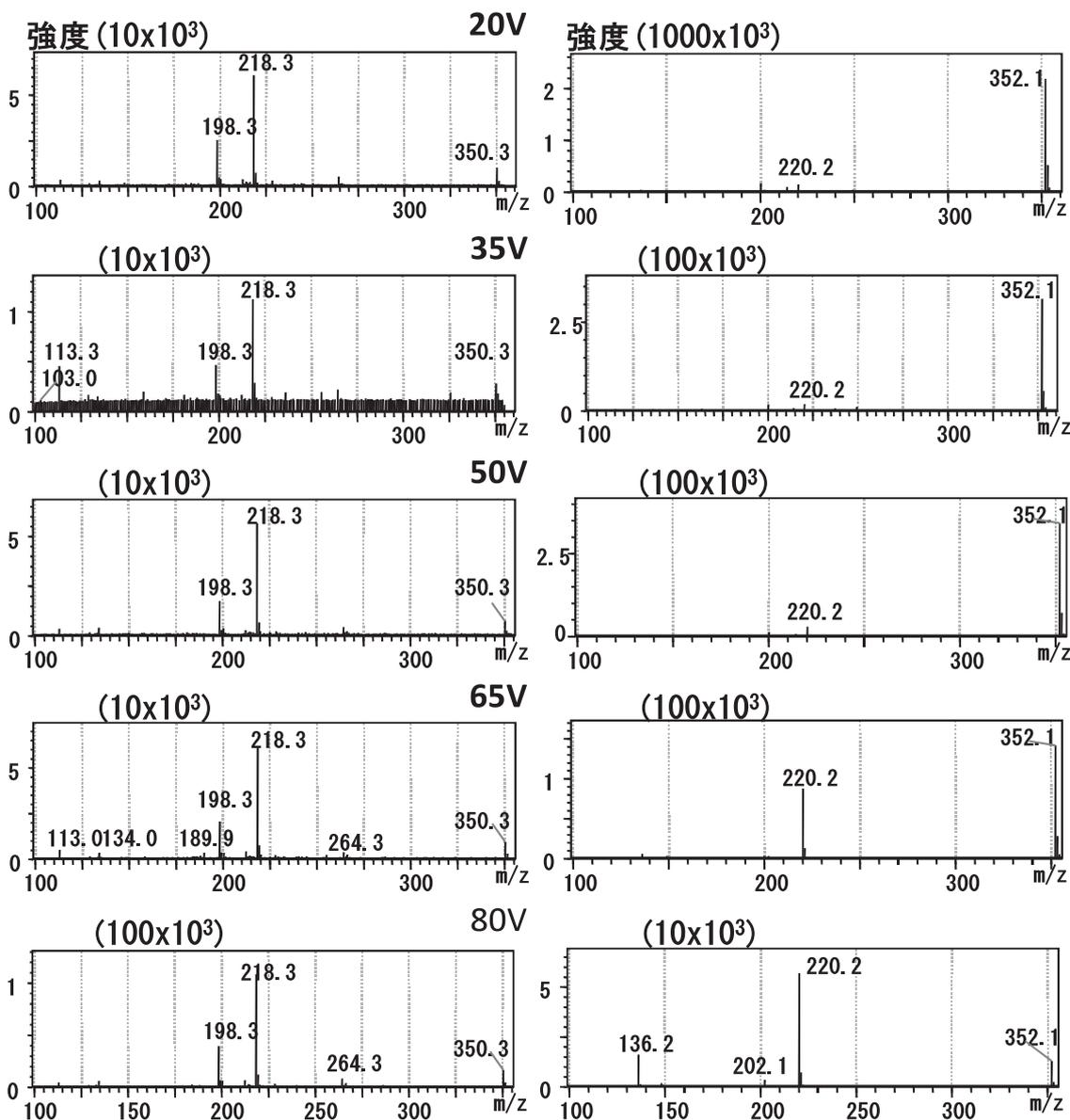


図4. ZRの質量スペクトル

### 引用文献

FU JiHong, SUN XiaoHong, WANG JiDe, CHU JinFang and YAN Cun Yu. 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. Chinese Science Bulletin. **56**: 355-366  
 小柴恭一・神谷勇治 (編). 2002. 新しい植物ホルモンの科学. pp39. 講談社. 東京

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. pp38. 講談社. 東京  
 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.  
 倉石管. 1999. 植物の成長段階における植物ホルモンの動態. 植物の科学調節. **26**. 1-10.

横田孝雄. 1983. 植物ホルモンの精製と機器分析. 実験生物学  
講座15 植物生理学 [I]. 3-68. 丸善. 東京

## The best DC voltage of LC - MS in cytokinin analysis

Youko FUKUDA<sup>1\*</sup>・Kiyohide KOJIMA<sup>1</sup>

(Received January 28, 2013)

### Summary

Mass spectrums were analyzed as DC voltage to determine the optimum condition for quantitative analysis of cytokinin: iP ( isopentenyl adenine), iPR (isopentenyl adenosine), Z (trans - zeatin) and ZR(zeatin riboside). Optimal DC voltage was same in each standard substance. Optimal DC voltage of the four types of CKs was 20V in Positive mode.

*Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 65(2):123-129, 2013*

**Key words** : Cytokinin , Mass spectrum , Mass spectrometry, Plant hormone, Voltage DC

---

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Niigata University