

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^{1*}・児島清秀¹

(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 μ 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。

¹ 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

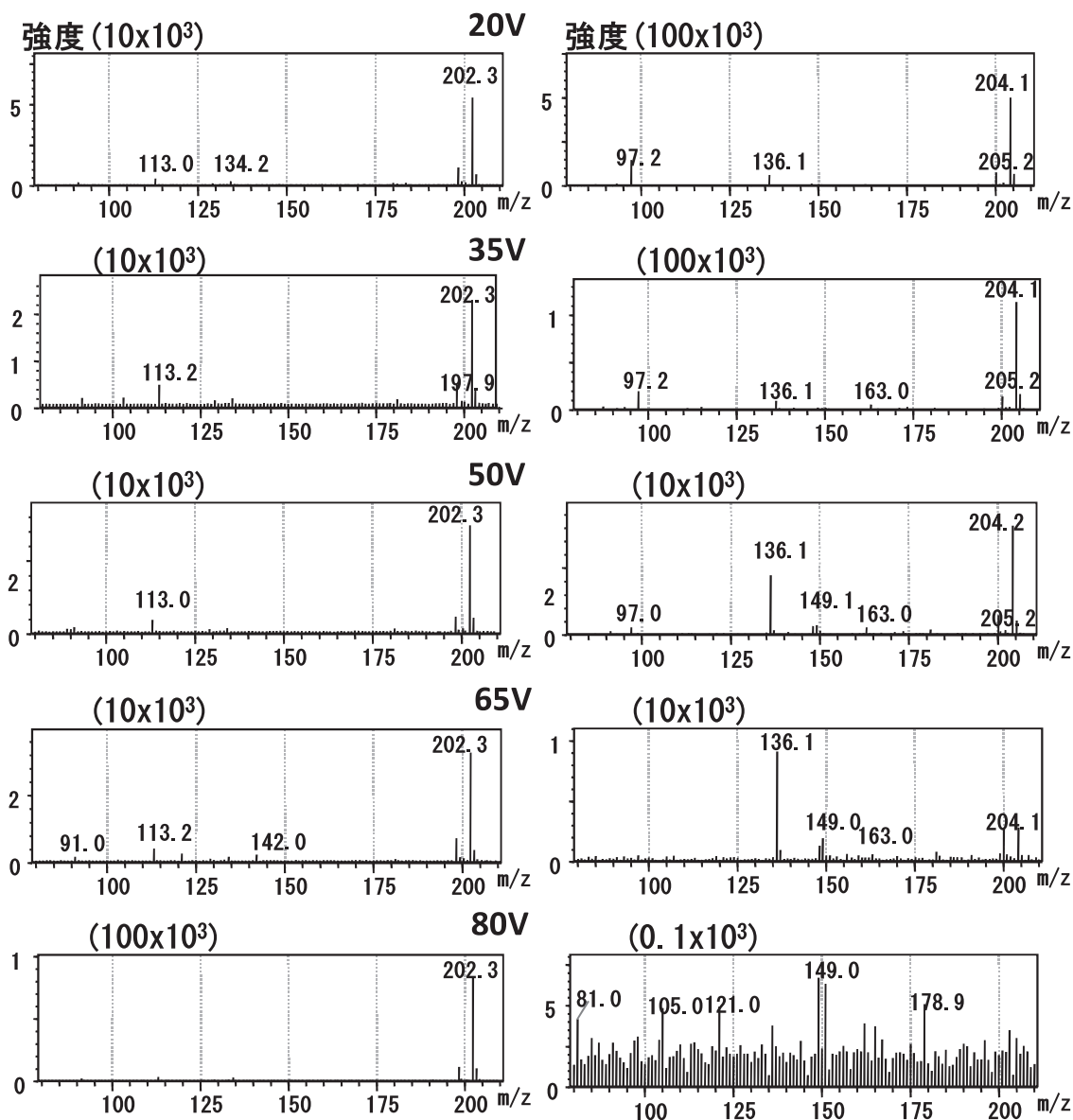


図1. iPの質量スペクトル

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)

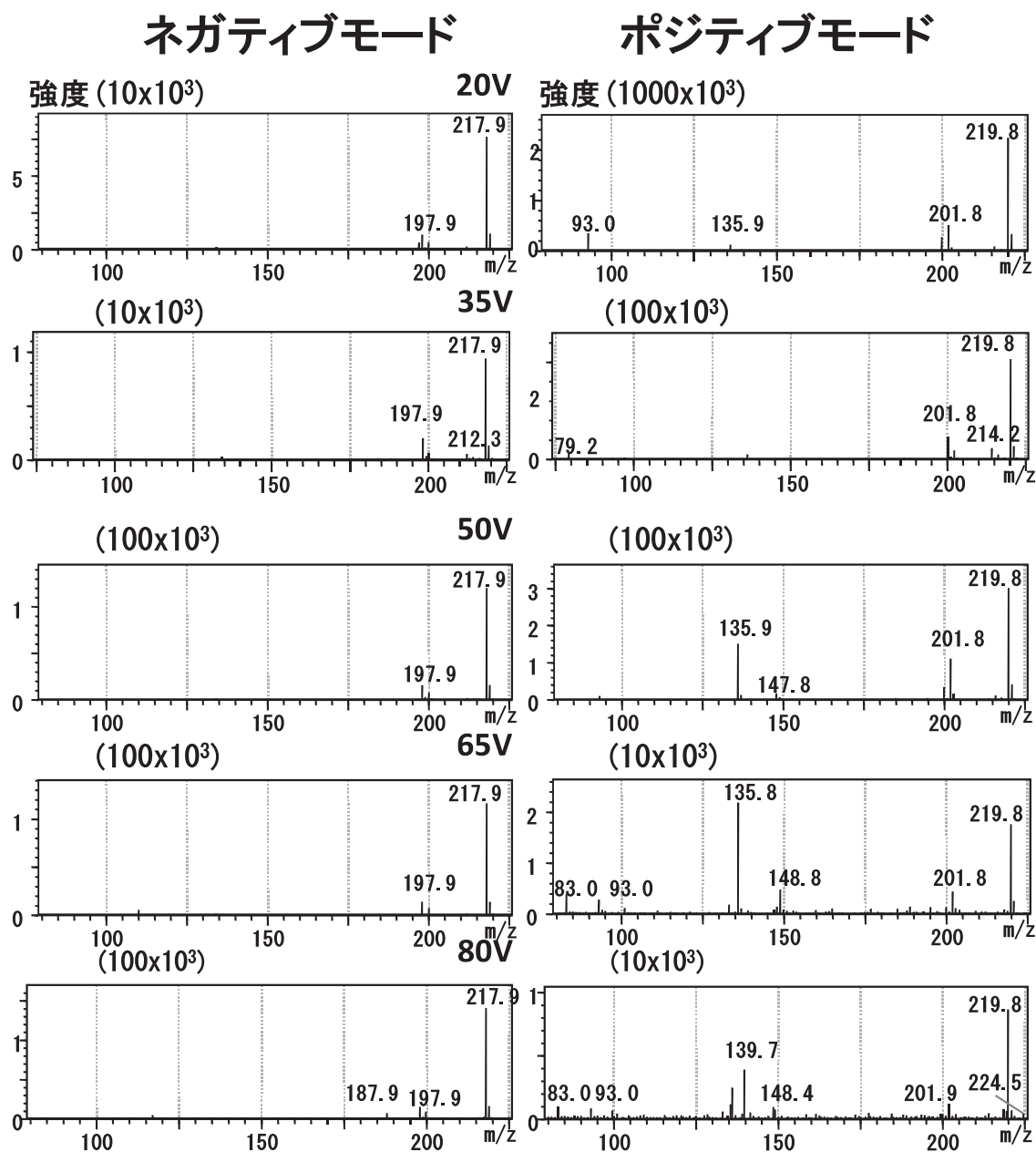


図2. Zの質量スペクトル

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)

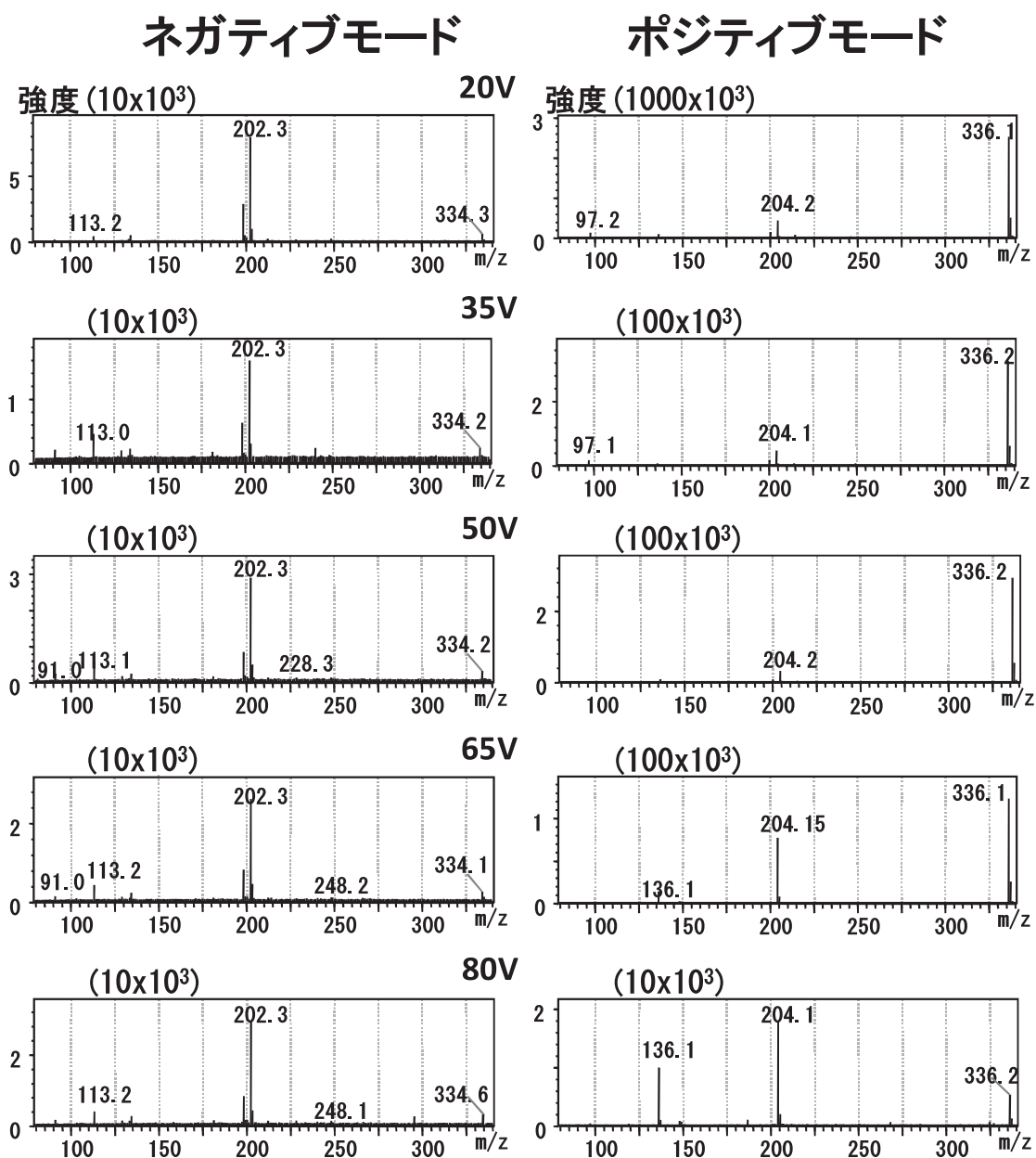


図3. iPRの質量スペクトル

(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

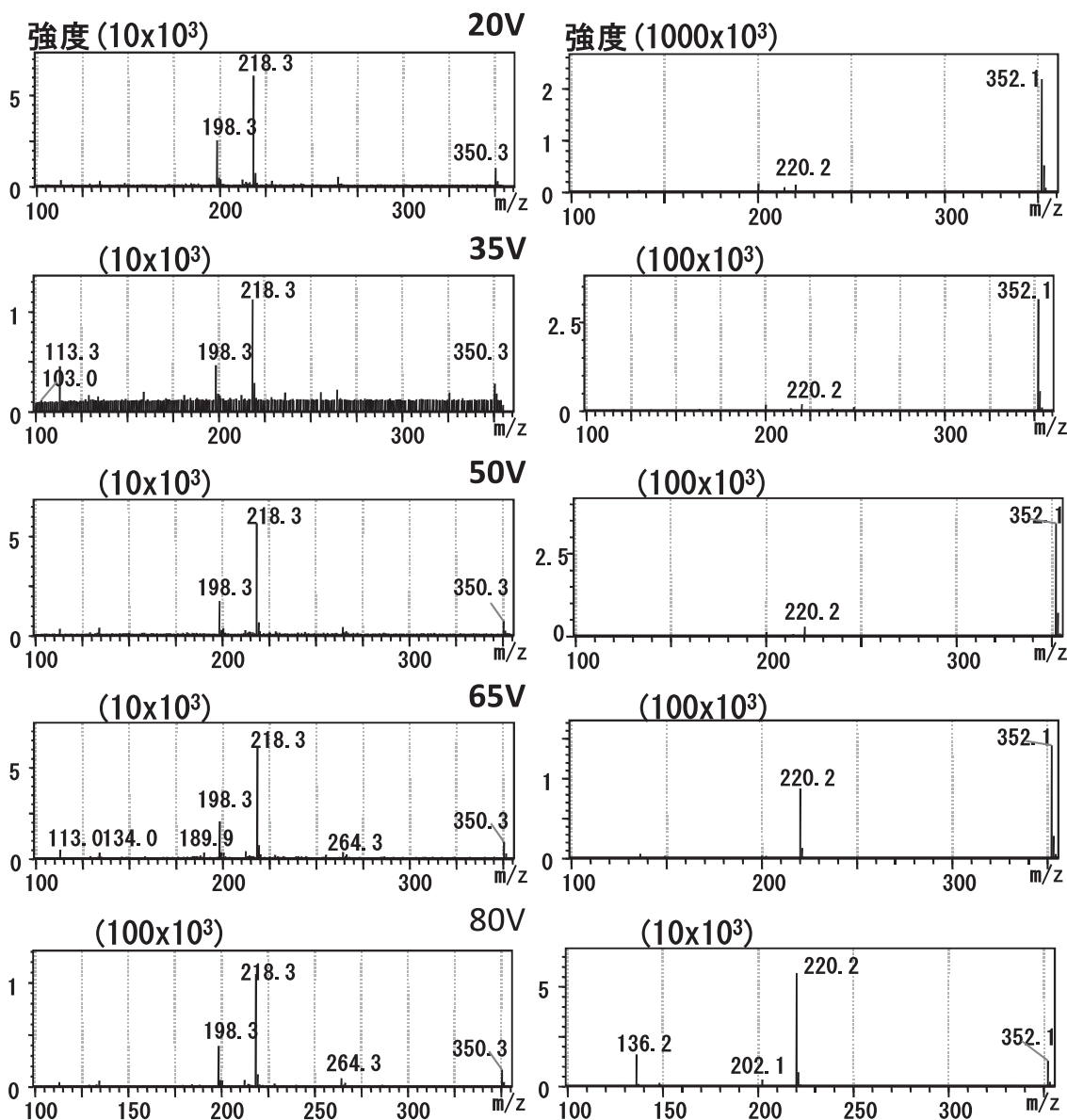


図4. ZRの質量スペクトル

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^{1*}・Kiyohide KOJIMA¹

(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

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University