

LC/MS を用いた植物ホルモン分析における分析部直流 (DC) 電圧の報告

福田陽子^{1*}・児島清秀¹

(平成24年8月3日受付)

要 約

植物ホルモンである IAA (インドール-3-酢酸)、ABA (アブシシン酸)、GA1 (ジベレリン1)、GA4 (ジベレリン4) の定量における最適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。各標準物質において最適な DC 電圧は異なることが明らかとなり、分析モードに対しても、最適な DC 電圧は異なることが明らかとなった。それぞれの最適な DC 電圧は、IAA は Negative Mode で65V、ABA は Positive Mode で20V、GA1は Positive Mode で20V、GA4は、ごく少量の試料であれば、Negative Mode で65V あるいは80V、ある程度量のある試料であれば Positive Mode で20V であった。

新大農研報, 65(1):85-91, 2012

キーワード：植物ホルモン、質量分析、DC 電圧、質量スペクトル

はじめに

植物ホルモンは、植物内で情報伝達を主に担っている (倉石, 1988)。植物内には、豊富な一次および二次代謝産物が存在する。しかし、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)。

植物ホルモンの分析法 (定量) は生物検定法、免疫検定法および機器分析法の3つに大別することができ、機器分析法が最も信頼性が高い。機器分析のうち、液体クロマトグラフィー (HPLC) に質量分析計 (MS) を接続した LC/MS は、高感度で極めて再現性の高い分析が可能であるうえ、試料の誘導体化の必要がないため、内生植物ホルモンの定量に適している。

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、植物ホルモンでその重要性が特に指摘されている、IAA (インドール-3-酢酸)、ABA (アブシシン酸)、GA1 (ジベレリン1)、GA4 (ジベレリン4) 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：インドール酢酸 (Indole-3-acetic acid; IAA; Shigma Chemical Co.U.S.A)、アブシシン酸 (Abscisic acid; ABA; Shigma)、ジベレリン (Gibberellin; GA1, GA4)。

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 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) 法の LC/MS (LCMS2010EV; SHIMADZU) を使用した。測定モードの極性は負イオン (Negative Mode) と正イオン (Positive Mode) とした。

使用条件

カラムは CadenzaCD-C18 (3 μ m, 4.6 \times 250mm, GL Sciences) 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 0.5ml/分。サンプリングの m/z は、IAA は 80 ~ 180、ABA は 110 ~ 270、GA1、GA4 は 100 ~ 350 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 20V 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 (イオンの分離・収束部) 電圧を求めるために、DC (印加を促す) 電圧を変えて質量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 新潟大学大学院自然科学研究科 fl1d056b@mail.cc.niigata-u.ac.jp

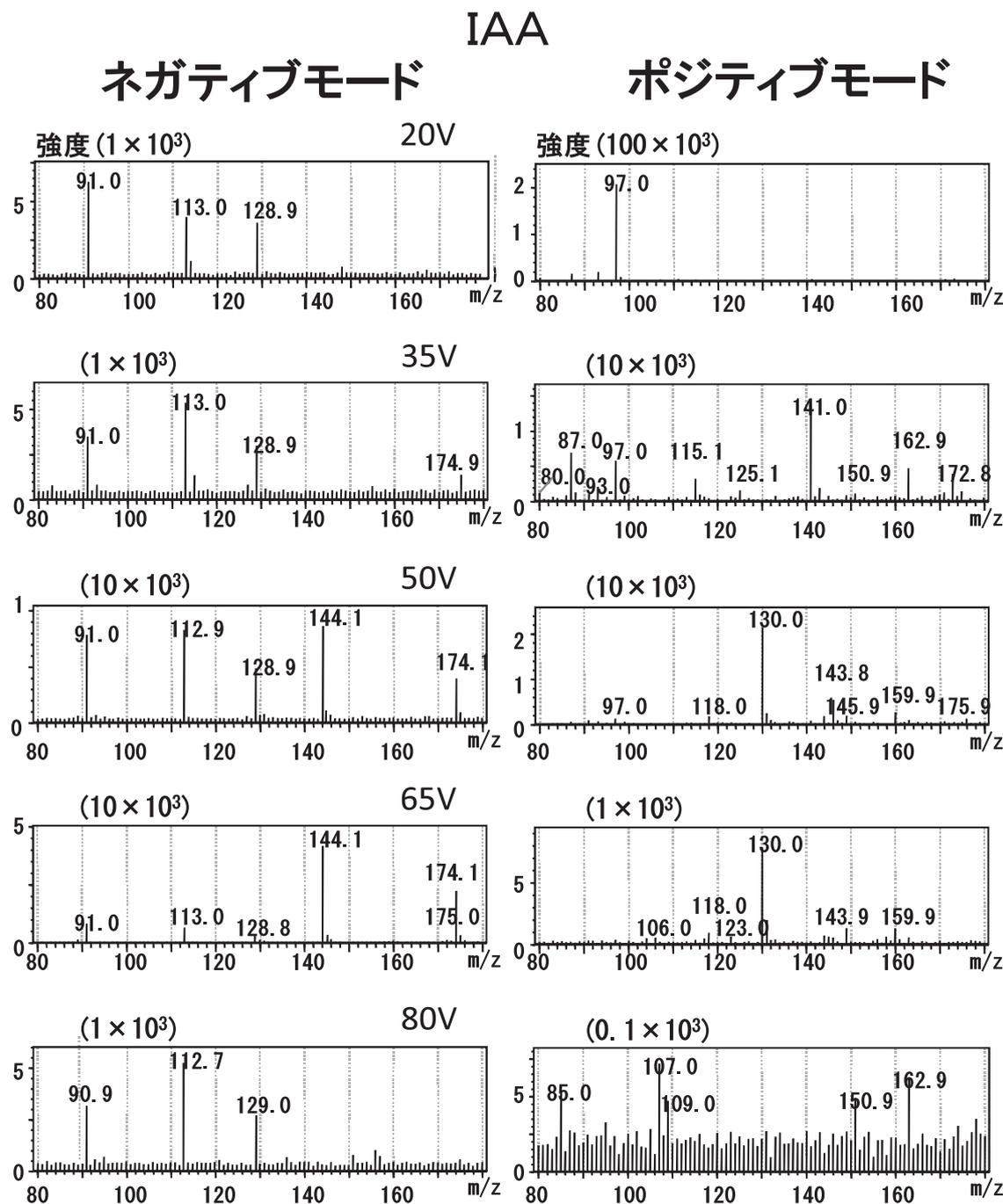


図1 IAA の質量スペクトル

(1) IAA

分析モード別にみると、Negative Mode では電圧を上げていくと 65V までは強度が増加し、80V では強度が減少した (図 1.)。最も強い強度を示したことから、IAA の定量に適した DC 電圧は、Negative Mode では 65V であることが分かった。一方、Positive Mode では、最も大きい強度を示した電圧は 20V であり、電圧を上げると強度は減少した。

両モードの中で最も強度が強い条件は Positive Mode で 20V

であるが、分子イオンは検出せず、フラグメントイオンも 97.0 のみであることから、実際の定量には適さない。このことを踏まえて、IAA の定量に最適な条件は、Negative Mode で 65V であることが分かった。分子イオンピークとして 174.1 (IAA の分子量は 175.18)、フラグメントイオンピークは 144.1 であった。

(2) ABA

分析モード別にみると、Negative Mode では電圧を上げて

ABA

ネガティブモード

ポジティブモード

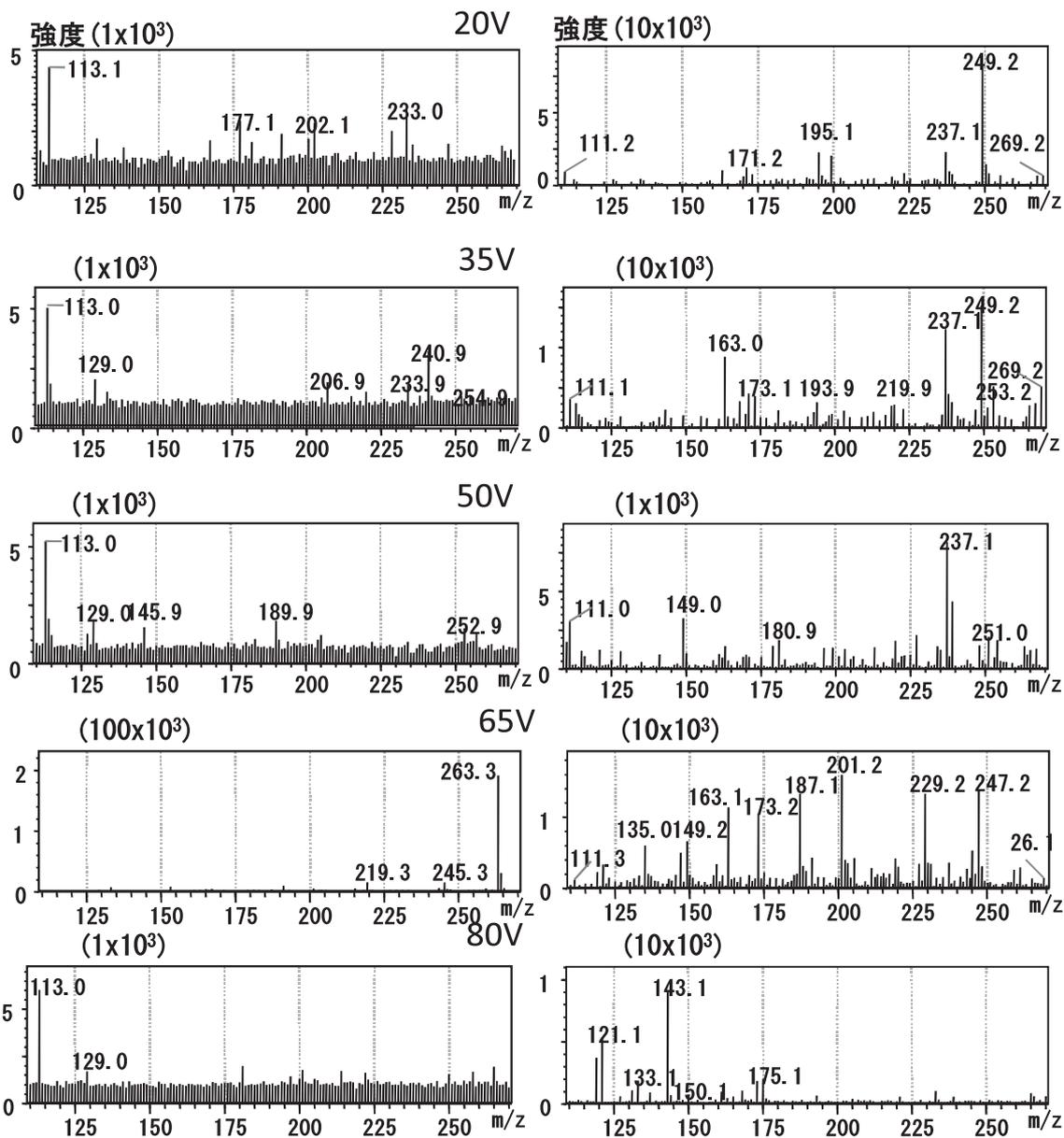


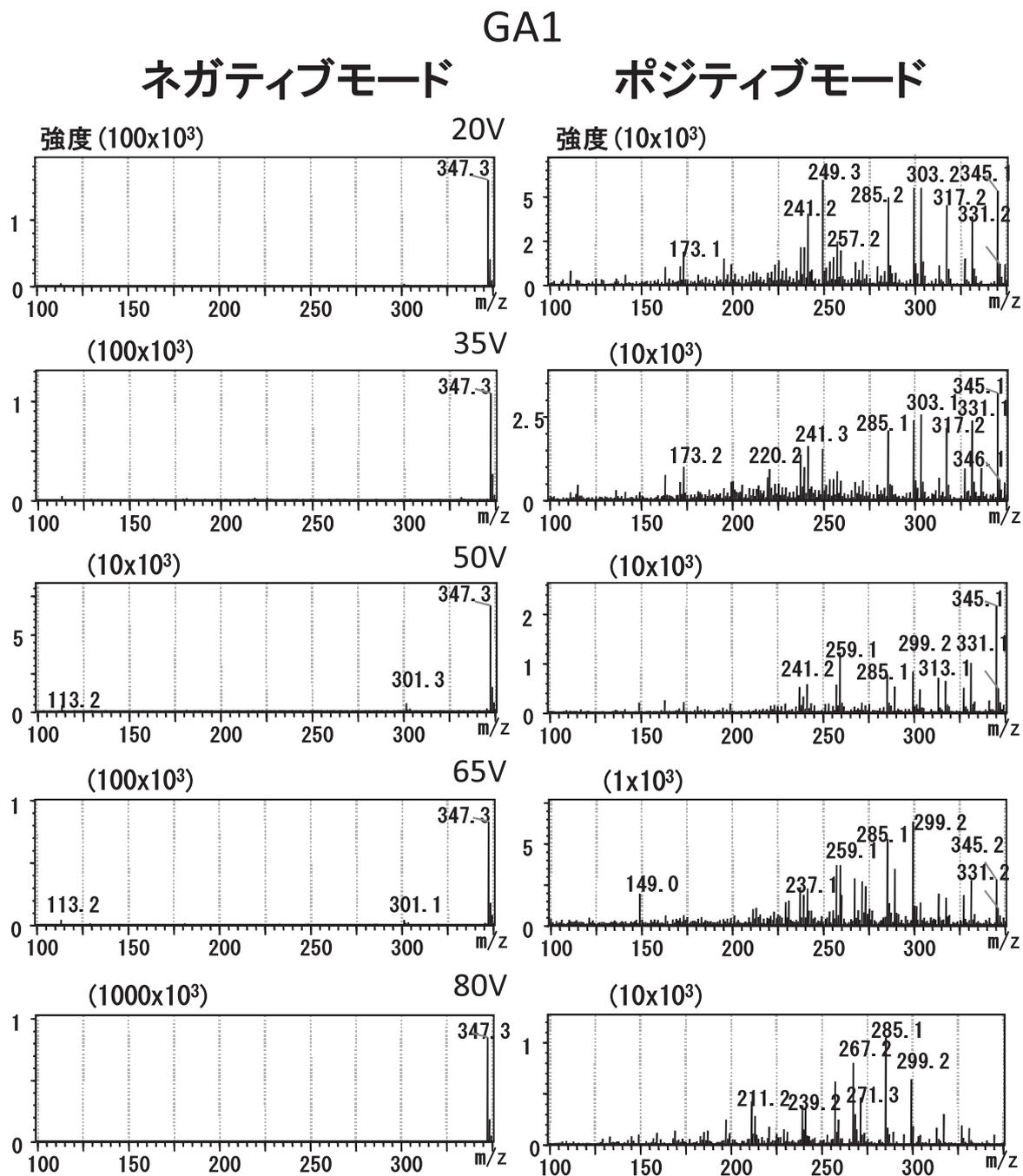
図2 ABAの質量スペクトル

いくと 65V までは強度が増加し、80V では強度が減少した (図 2.)。Positive Mode では、電圧を上げていくと 50V までは強度が減少し、65V では強度が増加した。しかし、Negative Mode の 65V だけ強度が増加し、Positive Mode の 50V だけ強度が減少している。このような 1 つの電圧だけの变化は考えにくい。これらのことを踏まえて、ABA の定量には、Positive Mode で 20V の条件が最適であることが分かった。263 程度の分子イオンピーク (ABA の分子量は 264.32) は、65V でしか

検出できなかった。Positive Mode の 20V では、フラグメントイオンピークは 249.2、237.1 であった。

(3) GA₁

分析モード別にみると、Negative Mode では分子イオンピーク (GA₁ の分子量は 348.40) が全ての電圧で検出されたが、有効なフラグメントイオンピークは検出されなかった (図 3.)。強度が一番大きい DC 電圧は、Negative Mode で 80V であった。しかし、フラグメントイオンピークは検出されなかった。この

図3 GA₁の質量スペクトル

ことから、GA₁の定量には、ごく少量の試料であれば、最高強度を示した Negative Mode で 80V の条件が適しており、ある程度の量の試料の定量の場合、強度が大きく、有効なフラグメントイオンピークが検出された Positive Mode で 20V の条件が適していることが分かった。Positive Mode で 20V の場合、フラグメントイオンピークは、249.3、299.2、303.2、345.1 であった。

(4) GA₄

分析モード別にみると、Negative Mode では分子イオンピーク (GA₄の分子量は、332.40) が全ての電圧で検出されたが、有効なフラグメントイオンピークは検出されなかった(図4.)。強度が一番大きい DC 電圧は、Negative Mode で 65V あるいは 80V であった。しかし、フラグメントイオンピークは検出されなかった。このことから、ごく少量の試料であれば、最高強度を示した Negative Mode で 65V あるいは 80V の分析条件

GA₄

ネガティブモード

ポジティブモード

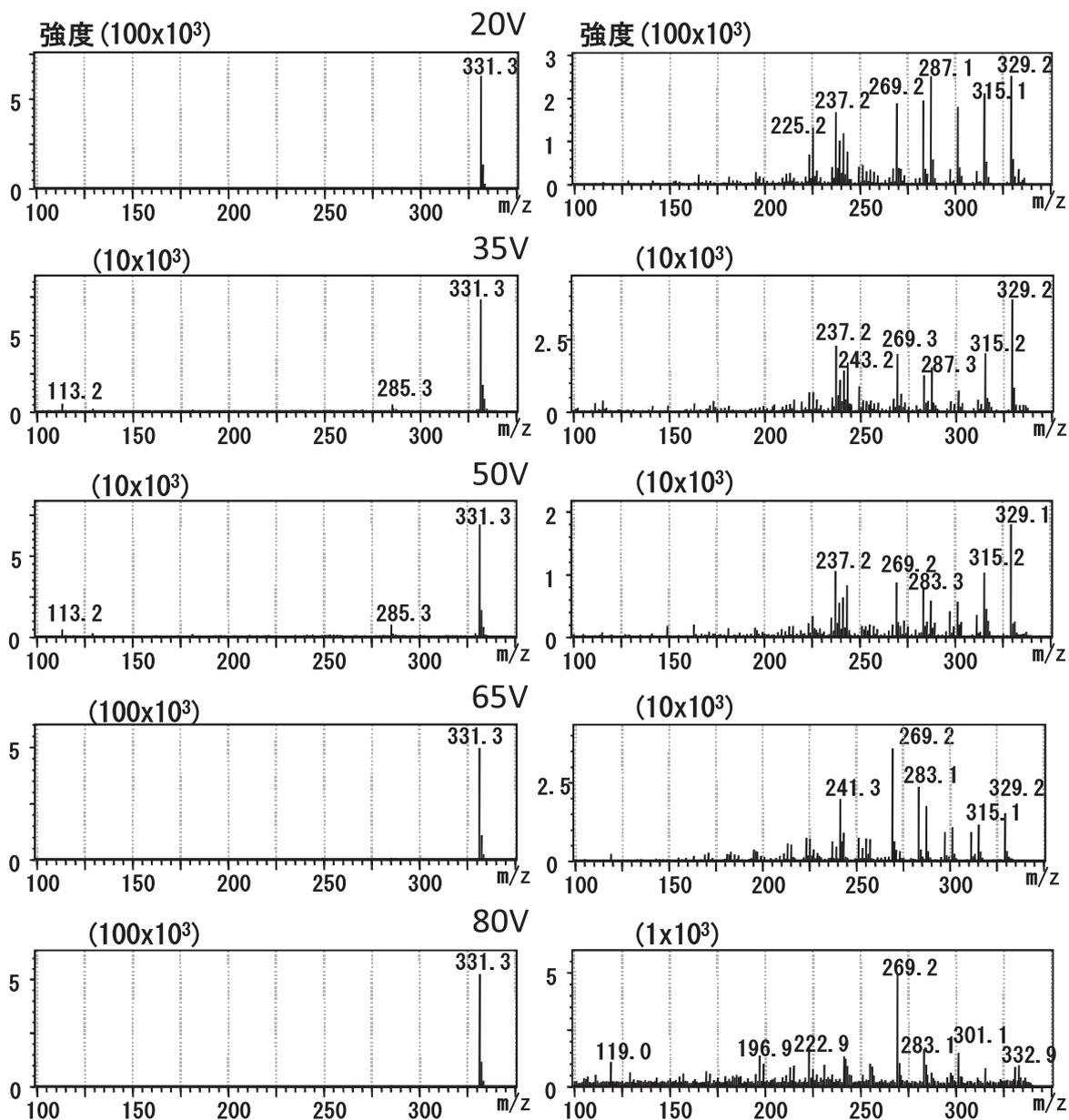


図4 GA₄の質量スペクトル

が適しており、ある程度の量の試料の分析の場合、強度が高く、有効なフラグメントイオンピークが検出された Positive Mode で 20V の条件が適していることが分かった。フラグメントイオンピークは、269.2、287.1、315.1、329.2 であった。

(5) GAs

GAs は、Negative Mode ではフラグメントイオンピークが発生しにくい傾向があることから、スペクトルパターンの特徴として、マイナスに帯電したフラグメントイオンが発生しにく

いことが明らかになった。

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減少し、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、各標準物質において最適な DC 電圧は異なることが明らかとなり、分析モード (Negative Mode と Positive

Mode) に対しても、最適な DC 電圧が異なることが明らかとなった。

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
- 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. 1988. 植物ホルモン [第二版]. 東京大学出版会.
- 庄野利之・脇田久伸. 2009. 入門機器分析化学. 三共出版株式会社, 東京.
- 丹羽利充. 1995. 最新のマススペクトロメトリー. 化学同人.

The best DC voltage in plant hormone analysis using LC / MS

Youko FUKUDA^{1*}・Kiyohide KOJIMA¹

(Received August 3, 2012)

Summary

Mass spectrums were analyzed as DC voltage to determine the optimum condition in quantitative analysis of phytohormones ; IAA (indore 3-acetic acid), ABA (abscisic acid) and GA₁(gibberellic acid1) and GA₄(gibberellic acid4). Optimal DC voltage differed in each standard substance and analysis mode. In IAA,optimal DC voltage was 65V in Negative Mode, in ABA, 20V in Positive Mode, and in GA₁, 20V in Positive Mode. As GA₄ was very a small amount of samples, optimal DC voltage was 65V or 80V in Negative Mode.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 65(1):85-91, 2012

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

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University