

サイトカイニンの標識標品の保持特性と質量スペクトル

児島清秀^{1*}・谷澤貞幸²・高橋みや子¹・塩田 望³・馬場 正²
池田富喜夫²・中野 優¹・韓 東生¹・新美芳二³

(平成14年12月27日受付)

要約 サイトカイニン (CKs) の定量において、精度と感度の向上のために、安定同位体標識とコールド (非標識の天然型) 標品の HPLC での保持と MS での質量スペクトルの特性を試験した。ODS と Ph タイプのカラムの両方で、ゼアチン (Z) とゼアチンリボシド (ZR) の両者とも、重水素ラベルの標品がコールドよりも早く溶出した。negative mode において、ZR の m/z 133/134 と 218 の消長のパターンは Z と同様で、²H₅-ZR では分子イオンの m/z 355 と断片イオンの 133/134 と 223 が見られた。positive mode において、Z では、20V から 60V で分子イオンの m/z 220 と断片の 136 が見られた。²H₅-Z では、Z の質量スペクトルの変化と同様に、分子イオンの m/z 225 と断片の 137/136 が見られた。ZR では、60V までは分子イオンの m/z 352 が見られ、m/z 136/137 と 220 の消長のパターンは Z と同様であった。しかし、negative mode と同様に、ZR の方が高いドリフト電圧が必要であった。²H₅-ZR では、分子イオンの m/z 357 と断片の m/z 136/137 と 225 が見られ、これらは ZR および ²H₅-Z のピークの m/z と矛盾なく対応していた。全般的に positive mode の intensity の値は negative mode の 10 倍以上であるので、Z と ZR の定量には positive mode が適する。

キーワード：サイトカイニン、ゼアチン、ゼアチンリボシド、マスマスペクトル

略号：CKs, cytokinins; MeOH, methanol; HPLC, high performance liquid chromatography; Mw, molecular weight; MS, mass spectrometer; m/z, 質量/電荷; ODS, octadecylsilane; Ph, phenyl; SIM, selected ion monitoring; Z, trans-zeatin; ZR, trans-zeatin-9-riboside

緒 言

サイトカイニン (CKs) は、通常は植物内に極めて低い濃度でしか存在していないので、分析には非常に困難が伴う (横田, 1983; 倉石, 1999)。これまで植物ホルモンの分析には、ガスクロマトグラフィー (GC) に質量分析計 (MS) を接続した GC-MS が最も信頼性の高い定性・定量法として使用されてきた (横田, 1983; Horgan, 1995; Kojima, 1995; 児島, 1998; Kojima ら, 1999; 児島, 1999)。しかし、GC-MS は気体しか分析できないので、誘導体化のステップが必要である。近年、溶離液に可溶性であれば分析可能な高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に検出器として質量分析計 (MS) を接続した LC-MS が、植物ホルモンの定量に利用可能になってきた (大竹ら, 1997; Kojima ら, 2002)。

HPLC のカラムは理論段数が高いほど夾雑物の分離が期待できる (波田野・花井, 1988)。一般にカラムが長くなると伴って理論段数は向上するので (日本分析化学学会関東支部, 2000)、カラムを 2 本接続することで理論段数は向上する。

多くの夾雑物を含む植物組織からの植物ホルモンのような微量物質の定量には、内部標準の使用が必須である (Akiyama ら, 1983; 倉石, 1999)。内部標準としては、MS が使用可能であれば安定同位体による標識の標品が最も定量の精度が高い。しかし、安定同位体標識 (ラベル) の標品には物理的挙動の差による同位体効果が生じる (田島・飛田, 1991)。そこで、カラムの理論段数の向上と伴に、ラベルとコールド (非標識; 天然型) の標品の間の保持時間の差が大きくなると考えられる。

MS における定量には検出感度が高い SIM (selected ion monitoring) 法を使用する。SIM 法で設定する特

¹新潟大学大学院自然科学研究科

²東京農業大学農学部

³新潟大学農学部

*代表著者: kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

Table 1. Isotope effect on retention time of HPLC columns.

Column	N.T. ^a	I. D. ^b mm	Len. ^c mm	P.S. ^d μm	F.R. ^e ml/min	Con. ^f %	² H ₅ -Z Z ² H ₅ -ZR ZR			
							retention (minite)			
Ph-3	19	4.6	250×1	5	0.5	30	17.0	17.4	17.9	18.1
ODS-3	44	6.0	250×2	5	1.0	25	23.5	24.1	55.1	56.6

^aN.T., number of theoretical plates ($\times 10^3$ N/columns); ^bI. D., inner diameter; ^cLen., column length; ^dP.S., particle size; ^eF.R., flow rate; ^fCon., methanol concentration

徹的なイオンの選択のため、Scan法(ある一定の質量範囲を反復スキャンで測定する方法)による質量スペクトルの分析が必要である。Scan法では試料をイオン化する際のドリフト電圧を上げていくと、試料はより小さなフラグメントに分解していき、質量スペクトルと感度は変化した(児島ら, 2000b)。

本研究の目的は、CKsの分析の精度と感度の向上のためのラベルとコールドの標品のHPLCでの保持特性とMSでの質量スペクトル特性の試験である。

材料および方法

試薬: CKsのZ(trans-zeatin)およびZR(trans-zeatin-9-riboside); コールド標品のZとZRは和光純薬から購入し、ラベル標品の²H₅-Zと²H₅-ZRは横田孝雄教授(帝京大学)から提供された。

1. 標品のHPLCカラムでの保持特性

カラムは、Inertsil Ph-3の1本(GL Sciences)およびInertsil ODS-3の2本接続であった(Table 1)。流量は、圧力が150kg/cm²以下になるように設定した。MeOH量が合計で20μLになるようにして混合して標品を注入し、保持時間を試験した。

2. 標品の質量スペクトルの特性

LC/MSの設定 大気圧イオン化(APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)法(高橋, 1997)のLC/MS(M-1200H, 日立)を使用し、測定モードの極性は負イオン(Negative mode)または正イオン(Positive mode)で、各種の設定は大竹ら(1997)の方法に従った。パラメーターの用語は児島・田村の報告(2001)に従った。簡単に、機能(丹羽, 1995)と設定条件を全体の流れに従って示す。HPLC→霧化部(170℃で溶媒を霧状になる)→脱溶媒室(400℃で、溶媒分子は蒸発して、試料分子が単独で浮いた状態になる)→針電極(2,700Vで、コロナ放電により試料分子がイオン化される)→第一細孔(140℃)→第二細孔(第一と第二細孔間の電圧がドリフト電圧)→マルチプライア(1,500V)→質量分析部。

溶離液に電解質を含むとイオン化が促進するので(Murofushi, 1992)、溶離液はメタノール(MeOH, HPLCグレード)+20mM酢酸を使用し、流速は1 ml/分であった。ドリフト電圧は、20Vから開始して、20V間隔で変更して140Vまで設定した。掃引数(測定点当たりのデータの取り込み回数)は、1,000回に設定した。サンプリングのm/zは、50から360まで設定した。装置内部の汚染物由来のノイズを減らすため、バックグラウンドを差し引く処理をした。

Negative mode HPLCとMS部をカラムなしで直接に接続した。標品のピーク全体の信号(信号の始りから出終わりまで)をサンプリングして、average(平均)モードに設定した。

Positive mode カラム(Inertsil Ph-3; 粒径、5μm; カラム内径、4.0mm; 長さ、15cm; GL Science)を使用した。標品のピークトップの信号をサンプリングして、average(平均)モードに設定した。

結果および考察

1. 標品のHPLCカラムでの保持特性

カラムの分離性能を表す理論段数(number of theoretical plates)はカラムの長さ按比例するので、同じカラムを2本連結すると理論段数は2倍になる(液体クロマトグラフィー研究懇談会, 2001)。理論段数が4万以上のカラムでは、重水素ラベルとコールド(非ラベルの天然型)のCKsの標品は明瞭に分離した(Table 1)。

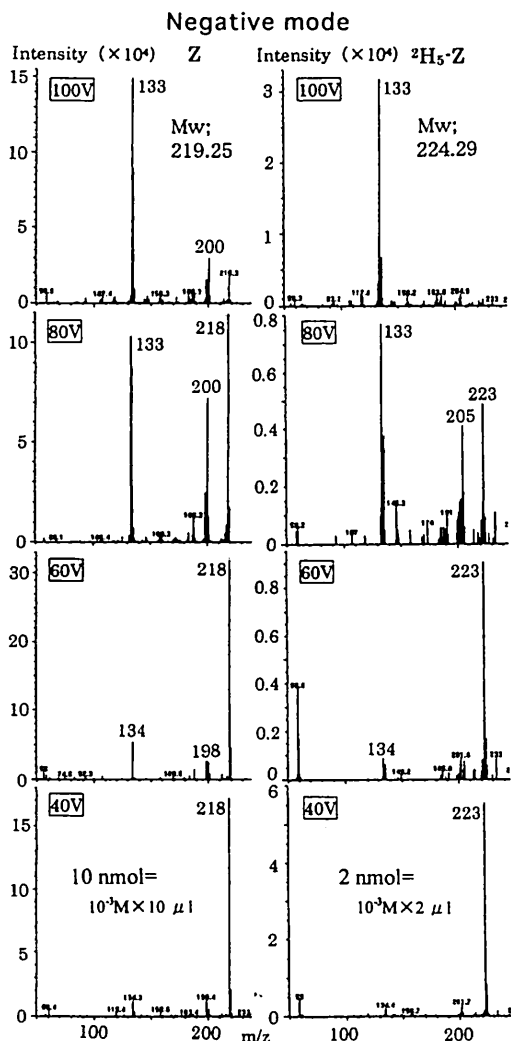


Fig. 1. Mass spectrometry of Z and $^2\text{H}_6\text{-Z}$ using a negative mode on 40-100 V of drift voltage: Inject amount, Z ($10 \text{ nmol} = 10^{-3}\text{M} \times 10 \mu\text{l}$), $^2\text{H}_6\text{-Z}$ ($2 \text{ nmol} = 10^{-3}\text{M} \times 2 \mu\text{l}$).

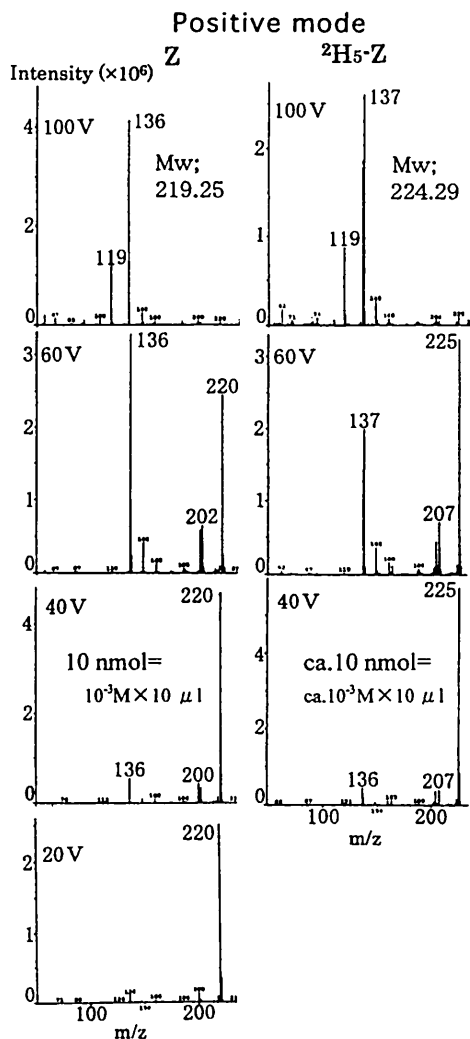


Fig. 2. Mass spectrometry of Z and $^2\text{H}_6\text{-Z}$ using a positive mode on 20-100 V of drift voltage: Inject amount, Z ($10 \text{ nmol} = 10^{-3}\text{M} \times 10 \mu\text{l}$), $^2\text{H}_6\text{-Z}$ ($\text{ca. } 10 \text{ nmol} = \text{ca. } 10^{-3}\text{M} \times 10 \mu\text{l}$).

ZとZRの両者とも、ODSとPhタイプのカラムの両方で、重水素ラベルの標品が早く溶出した。

水素と重水素に関して、化学的性質は核外電子の状態で決まるため同位体間の差はほとんどないが、質量比は2と大きいので物理的挙動の差による同位体効果は著しく大きい(化学辞典, 1994)。一般に重水素ラベルの標品の方が反応が遅くなる(田島・飛田, 1991)。そこで重水素ラベルの標品の方が、充填剤の固定層との反応が遅くなり、早く溶出すると考えられる。

以前の報告(児島ら, 2000a; 2002; Kojima, 2001)と一致して、ZとZRの保持時間(RT)は、ODSタイプのカラムでは離れ、Phタイプのカラムでは近づいていた(Table 1)。これは、HPLCによる精製の際にはODSとPhタイプのカラムの組み合わせが効果的であることを示している。さらに、ZとZRの両方を一斉に抽出する際には、1回目にはPhタイプのカラムでZとZRの両方を混合して分取し、2回目にはODSタイプのカラムに分取したZとZRの混合物を注入してZとZRを別々に分取する方法が効率的と考えられる。

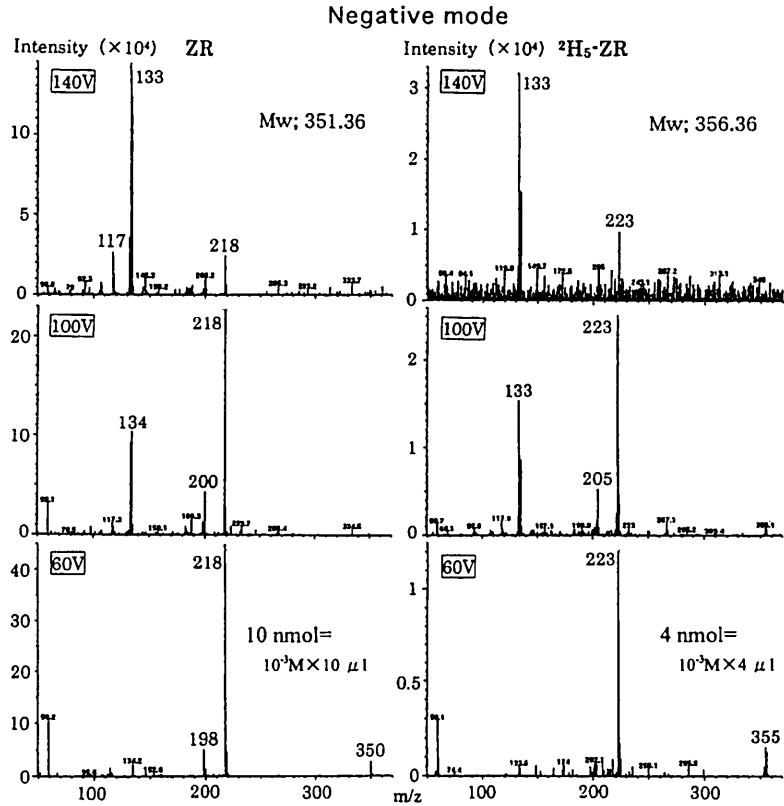


Fig. 3. Mass spectrums of ZR and ²H₅-ZR using the negative mode on 60-140 V of drift voltage: Inject amount, ZR (10 nmol = 10⁻³M × 10 μl), ²H₅-ZR (4 nmol = 10⁻³M × 4 μl).

2. 標品の質量スペクトルの特性

Negative mode

植物ホルモンの定量における最適なドリフト電圧を求めるために、ドリフト電圧を変えて質量スペクトルを測定した。negative modeでは、生成されたプロトン脱離分子イオン (M-H)⁻を検出するので標品の分子量よりも1質量単位(水素に相当)少ない値となる(丹羽, 1995)。

Zでは20V(データ略)から60Vで、分子イオンであるm/z 218と特徴的なフラグメントイオンのm/z 133/134が見られ、80Vになるとフラグメントイオンのm/z 200が見られ始めた(Fig.1 左半分)。100Vではm/z 218のピークがほとんど見られなくなった。²H₅-Zでは、Zの質量スペクトルの変化と同様に、分子イオンであるm/z 223と特徴的なフラグメントイオンのm/z 133/134が出現し、80Vでフラグメントイオンのm/z 205が見られた(Fig.1 右半分)。20Vで、Zではm/z 283と²H₅-Zではm/z 223のピークが見られた(データ略)。これは分子イオンに共通な未知の物質の結合の結果と思われる。

ZRでは、60Vで分子イオンであるm/z 350が少しは見られた(Fig.3 左半分)。m/z 133/134とm/z 218の消長のパターンはZ(Fig.1 左半分)と同様であったが、ZRの方が高いドリフト電圧が必要であった。²H₅-ZRでは、分子イオンであるm/z 355と特徴的なフラグメントイオンのm/z 133/134とm/z 223が見られ、これらはZRおよび²H₅-Zのピークのm/zと矛盾なく対応していた(Fig.3 右半分)。

Positive mode

positive modeでは、生成されたプロトン付加分子イオン(M+H)⁺を検出するので標品の分子量よりも1質

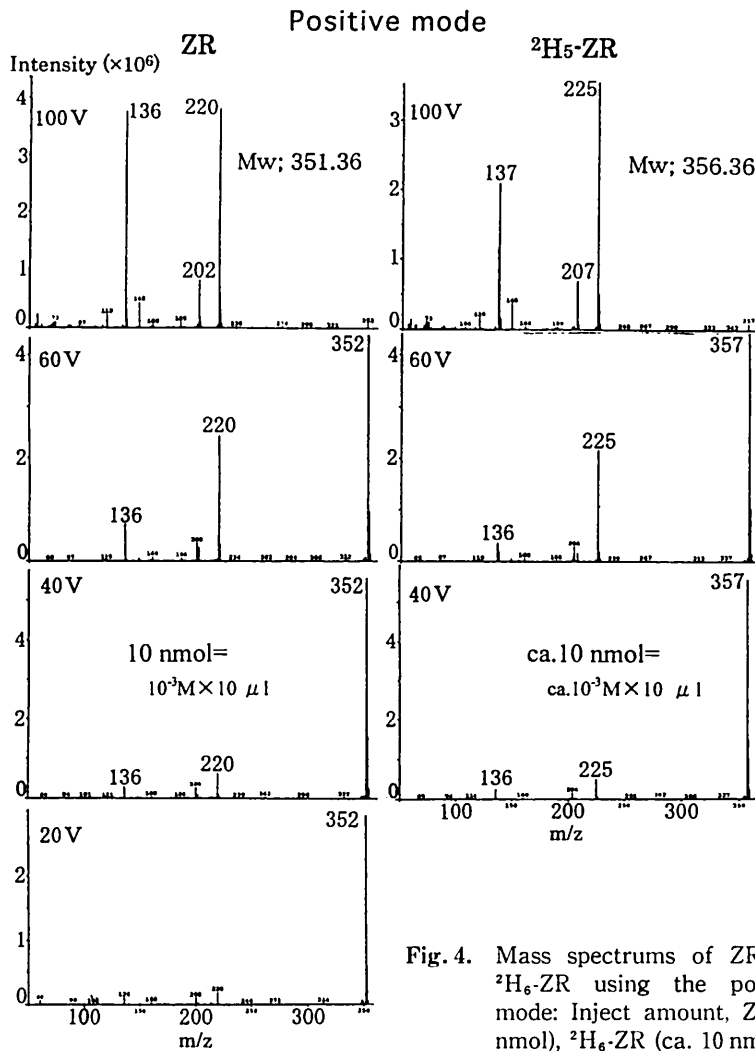


Fig. 4. Mass spectrums of ZR and $^2\text{H}_5\text{-ZR}$ using the positive mode: Inject amount, ZR (10 nmol), $^2\text{H}_5\text{-ZR}$ (ca. 10 nmol).

量単位多い値となる(丹羽, 1995)。Zでは、20Vから60Vで分子イオンである m/z 220と特徴的なフラグメントイオンの m/z 136が見られ、60Vでフラグメントイオンの m/z 202が見られた(Fig. 2 左半分)。 $^2\text{H}_5\text{-Z}$ では、Zの質量スペクトルの変化と同様に、分子イオンである m/z 225と特徴的なフラグメントイオンの m/z 137/136が見られ、60Vでフラグメントイオンの m/z 207が見られた(Fig. 2 右半分)。

ZRでは、60Vまでは分子イオンである m/z 352が見られた(Fig. 4 左半分)。 m/z 136/137と m/z 220の消長のパターンはZ(Fig. 2 左半分)と同様であったが、negative modeと同様に、ZRの方が高いドリフト電圧が必要であった。 $^2\text{H}_5\text{-ZR}$ では、分子イオンである m/z 357と特徴的なフラグメントイオンの m/z 136/137と m/z 225が見られ、これらはZRおよび $^2\text{H}_5\text{-Z}$ のピークの m/z と矛盾なく対応していた(Fig. 4 右半分)。

Negative と Positive mode の比較

コールド標品のZとZRの注入量はnegativeとpositive modeの両試験とも同じ10nmolであるので、感度はZとZRのintensityで比較できる。negative modeでは、ドリフト電圧の変更時に値の変動が大きく、変化の傾向もはっきりしない(Fig. 1と3の左半分)。これらの一連の試験は同じ日に連続して行っていたので、注入毎に感度が変化すると判断できる。対照的にpositive modeでは、ドリフト電圧の変更時に値の変動がほと

んどない (Fig. 2と4の左半分)。さらに全般的に positive mode の intensity の値は negative mode の10倍以上であるので、ZとZRの分析には positive mode が適する。

プロトン脱離分子イオン(M-H)⁻を多く生成すると考えられる IAA、ABA、GAs に関して、negative mode では、ドリフト電圧の変更時に値の変動があり、変化に傾向があると報告されている (児島ら, 2000b)。しかし、繰り返しによる再現性は確認されていないので、単に注入毎の感度変化に起因していた可能性がある。

結論として、LC-MSでのCKsの定量には positive mode が適する。SIMの設定のイオンに関して、ZとZRの分子イオンである m/z 220 (225) と352 (357) が最適である。()内は安定同位体標識の標品の m/z である。確認用のイオンとしては、ZRではZ由来のフラグメントイオン m/z 220 (225) が適する。しかし、Zではフラグメントイオン m/z 207 (202) が少ない割合でしか生成しない。そこで、高分離能のカラムでコールドとラベル標品を分離する条件で136/137を設定する方法もある。

謝 辞

²H₅-Z・²H₅-ZR を分譲頂いた横田孝雄教授 (帝京大学) および LC-MS の操作とメンテナンスに協力頂いた大竹憲邦博士に感謝いたします。本研究の一部は大学院自然科学研究科の重点教育研究の推進補助金および科研費 (No. 12660021) で行なわれた。

引用文献

- Akiyama, M., N. Sakurai and S. Kuraishi. 1983. A simplified method for the quantitative determination of indoleacetic acid by high performance liquid chromatography with a fluorometric detector. *Plant Cell Physiol.*, 24: 1431-1439.
- 液体クロマトグラフィー研究懇談会. 2001. HPLCの基礎と理論. 液体クロマトの巻, 中村洋編: 1-28. 筑波出版会.
- 波田野博行・花井俊彦. 1988. 新版実験高速液体クロマトグラフィー. 化学同人, PP. 1-22.
- Horgan, R. 1995. Instrumental methods of plant hormone. In *Plant Hormones*, P. J. Davies (ed.): 415-432, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 化学辞典. 1994. 大木他編: 943. 東京化学同人.
- Kojima, K. 1995. Simultaneous measurement of ABA, IAA and GAs in citrus - role of ABA in relation to sink ability. *JARQ*, 29: 179-185.
- 児島清秀. 1998. カンキツの果実生長と内生植物ホルモン [1]・[2]. *農業および園芸*, 73 (8・9): 871-877・967-970.
- Kojima, K., K. Shiozaki, Y. Koshita and M. Ishida. 1999. Changes of endogenous levels of ABA, IAA and GA-like substances in fruitlets of parthenocarpic persimmon. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 68: 242-247.
- 児島清秀. 1999. 果実と蔬菜の発育の生理学的研究 - 生長期の植物ホルモン及び成熟期の軟化機構 -, *植物の化学調節*, 34, 21-30.
- 児島清秀・鈴木さより・韓東生. 2000a. 植物ホルモンの分析に用いる HPLC カラムの諸特性. *新潟大学農学部報告* 53(1): 9-16.
- 児島清秀・高橋みや子・大竹憲邦. 2000b. LC-MSによる植物ホルモンの標品の質量スペクトル分析. *新潟大学農学部報告* 53(1): 17-24.
- Kojima, K. 2001. Property of HPLC column and mass spectrum of LC-MS for phytohormone analysis. *JARQ*, 35, 149-154.
- 児島清秀・田村裕一. 2001. LC-MS-SIMの高感度の設定条件. *質量分析* 49(6): 237-240.
- 児島清秀・村田憲昭・Min Wei・千田佑子・付立新. 2002. 植物ホルモン分析のための HPLC カラムの半値幅などの特性. *新潟大学農学部報告* 54(2): 109-114.
- Kojima, K., E. Ohtake and Yu Z. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. *Plant Growth Regul.* 37(3): 249-254.

- 倉石 晉. 1999. 植物の成長段階における植物ホルモンの動態, 植物の化学調節, 26, 1-10.
- 田島 進・飛田成史. 1991. 物質の質量から何がわかるか, 裳華房.
- Murofushi, N. et al. 1992. Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of gibberellin conjugates. In Progress in Plant Growth Regulation, C. M. Karssen, L. C. Van loon and D. Vreugdenhil (eds): 900-904, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 日本分析化学学会関東支部編. 2000. 高速液体クロマトグラフィーハンドブック改訂2版. 丸善, PP. 216-222.
- 丹羽利充. 1995. 最新のマススペクトロメトリー: 1-56, 化学同人.
- 大竹憲邦・山田真也・大山卓爾. 1997. LC/MS システムによる試料中アブシジン酸の同定と, 高速液体クロマトグラフィーによるダイズ種子中のアブシジン酸含有量の迅速測定. 土壌肥科学誌, 68: 52-58.
- 高橋利明. 1997. APCI 法. バイオロジカルマススペクトロメトリー, 上野民夫他編: 66-69. 東京化学同人.
- 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〕, 勝見弁行・増田芳雄編: 3-68. 丸善.

Retention property and Mass Spectrum of Labeled Standards of Cytokinins

Kiyohide KOJIMA^{1*}, Sadayuki YAZAWA², Miyako TAKAHASHI¹,
Nozomi SHIOTA³, Tadashi BABA², Fukio IKEDA², Masaru NAKANO¹,
Dong-sheng HAN¹ and Yoshiji NIIMI³

(Received December 27, 2002)

Summary

Properties of retention by HPLC and mass spectrums by mass spectrometer (MS) of stable isotope labeled and cold (non-labeled, natural type) standards were analyzed in cytokinins (CKs) quantification to improve accuracy and sensitivity. Both in zeatin (Z) and zeatin-9-riboside (ZR), deuterium labeled standards eluted earlier than cold standards in both columns of ODS and Ph types. In a negative mode, in ZR, the change patterns of m/z 133/134 and 218 were similar in Z, in ²H₅-ZR, molecular ion, m/z 355 and fragment ions, 133/134 and 223 were observed. In a positive mode, in Z, molecular ion, m/z 220 and fragment ion, 136 were observed from 20 to 60V. In ²H₅-Z, molecular ion, m/z 225 and fragment ion, 137/136 were observed as the change of mass spectrum of Z. In ZR, molecular ion, m/z 352 were observed till 60V, the change patterns of m/z 136/137 and 220 were similar in Z. However, ZR required higher drift voltage in the same as in negative mode. In ²H₅-ZR, molecular ion, m/z 357 and fragment ions, 136/137 and 225 were observed, showing the consistent correspondence of peak m/z in ZR and ²H₅-Z. The positive mode is suitable for the quantification of Z and ZR, because the intensity values of the positive mode were generally more than ten times than those of the negative mode.

Key words: cytokinins, zeatin, zeatin-9-riboside, mass spectrum

Abbreviations: CKs, cytokinins; MeOH, methanol; HPLC, high performance liquid chromatography; Mw, molecular weight; MS, mass spectrometer; m/z , mass-to-charge ratio; ODS, octadecylsilane; Ph, phenyl; SIM, selected ion monitoring; Z, trans-zeatin; ZR, trans-zeatin-9-riboside

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

³Faculty of Agriculture, Niigata University

*Corresponding author: kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp