

Technical Report

GC/MS/MSを用いた植物試料中の代謝物一斉分析

Application for plant metabolome analysis using GC/MS/MS Smart Metabolites Database

岡本 真美¹、高信 淳子¹、佐藤 心郎¹、八巻 聡²、澤田 有司¹、平井 優美¹

Abstract:

GC/MS/MSのSmart Metabolites Databaseは、生物に共通する中心代謝に関わる475種の成分の高感度検出条件が格納されています。このデータベースを利用し、トマトの成熟葉で検出可能な成分を調べた結果、アミノ酸、有機酸、糖など170種が確認されました。また、内標準物質の分析精度について、相対溶出時間、検出強度、確認イオン比率で検証を行ったところ、高い精度で定量的な検出が可能であることが分かりました。

Keywords: 植物、メタボローム分析、抽出物、GC/MS/MS

1. はじめに

植物中の低分子代謝物の種類や量は、農産物の重要な形質（色、味、香りなど）に直結します。このため、効率的な広範囲分析方法として植物に特化したメタボローム解析が求められています。本アプリケーションでは、トマトの成熟葉を対象としてGC/MS/MSのSmart Metabolites Databaseを利用した植物メタボローム解析を検討しました。本データベースを利用すれば、GC/MS/MSの導入後、短期間のトレーニングで高精度の広範囲解析が可能になります。

2. 分析手法

凍結乾燥したトマト成熟葉の80%メタノール抽出物に、内標準物質としてRibitolを加えました。誘導体化処理は、メトキシ化とトリメチルシリル化（TMS化）を行いました。また、解析においてサンプル間の比較をする際、Quality Control（QC）補正を行うため、全サンプルを等量混合したQCサンプルを用意し、同様に前処理を実施しました。分析方法は、Table 1に示した条件と、Smart Metabolites Databaseに含まれるMRMメソッドを用い、475化合物について分析を行いました。

Table 1 分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8040		
カラム	: BPX-5 (30 m, 0.25 mm I.D., df=0.25 μm) (SGE, P/N:054101)		
ガラスインサート	: スプリットインサート ウール入り (RESTEK, P/N:225-20803-01)		
オートインジェクタ	: AOC-5000 Plus		
GC		MS	
気化室温度	: 250℃	インターフェース温度	: 280℃
カラムオープン温度	: 60℃ (2分) → (15℃/分) → 330℃ (3分)	イオン源温度	: 200℃
注入モード	: スプリット	測定モード	: MRM
スプリット比	: 30	ループタイム	: 0.25秒
キャリアガス制御	: 線速度 (39.0 cm/秒)		
注入量	: 1 μL		

3. 結果

分析の結果、得られたトータルイオンカレントクロマトグラムの一例をFig. 1に示します。

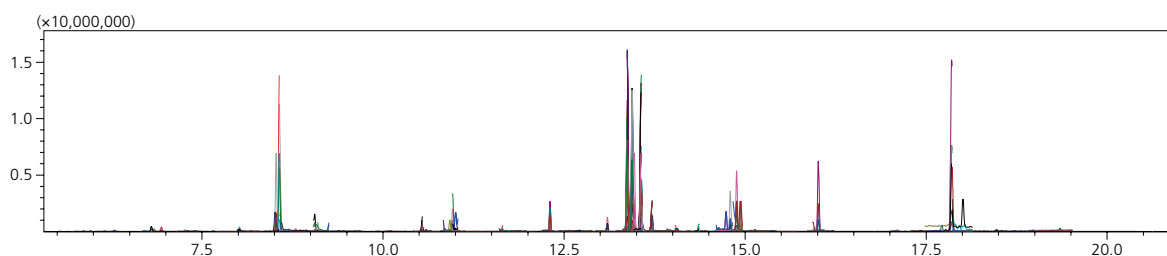


Fig. 1 トマト成熟葉に含まれる代謝物成分のトータルイオンカレントクロマトグラム

本分析において、内標準物質Ribitolが再現性よく検出されていることが確認されました。Fig. 2にQCサンプル中のRibitolのマスクロマトグラムを、Table 2に相対溶出時間、検出強度、確認イオン比率とそのばらつき (Relative standard deviation, RSD) を示します。

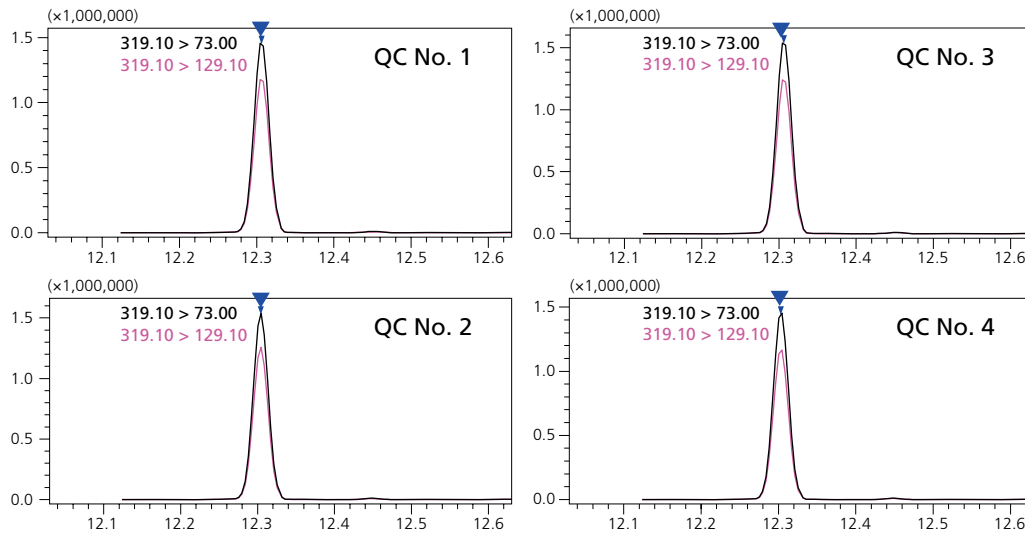


Fig. 2 内標準物質RibitolのTMS誘導体化物のマスクロマトグラム

Table 2 内標準物質Ribitolの検出の再現性について

	相対溶出時間(分)	検出強度(面積値)	確認イオン比率(%)
QC No. 1	12.306	2,097,224	80.44
QC No. 2	12.306	2,213,044	80.83
QC No. 3	12.304	2,187,242	81.50
QC No. 4	12.303	2,098,004	80.20
平均	12.305	2,148,879	80.70
%RSD	0.01	2.80	0.70

本分析によって、Table 3に示す通り、トマト成熟葉に含まれる代謝物の170種のTMS誘導体化代謝物を検出することができました。また、検出された化合物のうち、糖、有機酸、アミノ酸、核酸のマスクロマトグラムの例をFig. 3に示します。

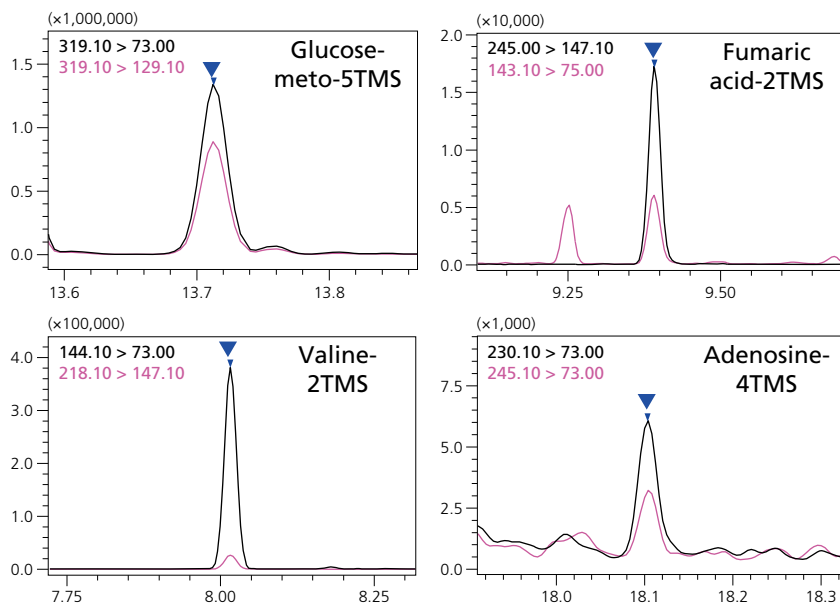


Fig. 3 糖 (Glucose-meto-5TMS)、有機酸 (Fumaric acid-2TMS)、アミノ酸 (Valine-2TMS)、核酸 (Adenosine-4TMS) のマスクロマトグラム

Table 3 MRM分析によりトマト成熟葉で検出されたTMS誘導体化代謝物一覧

1	1,6-Anhydroglucose-3TMS	61	Fumaric acid-2TMS	121	Norepinephrine-5TMS
2	2-Aminoadipic acid-3TMS	62	Galactosamine-5TMS(1)	122	Octopamine-4TMS
3	2-Aminoethanol-2TMS	63	Galactosamine-5TMS(2)	123	Oleamide-TMS
4	2-Aminoethanol-3TMS	64	Galactose-meto-5TMS(1)	124	Ornithine-4TMS
5	2-Aminopimelic acid-3TMS	65	Galactose-meto-5TMS(2)	125	Pantothenic acid-3TMS
6	2-Deoxy-glucose-4TMS(1)	66	Galacturonic acid-meto-5TMS(1)	126	Phenylalanine-2TMS
7	2-Deoxy-glucose-4TMS(2)	67	Galacturonic acid-meto-5TMS(2)	127	Phosphoric acid-3TMS
8	2-Deoxy-glucose-meto-4TMS	68	Glucaric acid-6TMS	128	Proline-2TMS
9	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	69	Gluconic acid-6TMS	129	Psicose-meto-5TMS(1)
10	2-Hydroxyhippuric acid-3TMS	70	Glucono-1,5-lactone-4TMS	130	Psicose-meto-5TMS(2)
11	2-Ketoadipic acid-meto-2TMS(2)	71	Glucosamine-5TMS(1)	131	Putrescine-4TMS
12	2-Ketoadipic acid-oxime-3TMS(2)	72	Glucosamine-5TMS(2)	132	Pyridoxal-meto-2TMS(1)
13	2-Ketoglutaric acid-meto-2TMS	73	Glucose 6-phosphate-meto-6TMS(1)	133	Pyridoxamine-3TMS
14	3-Aminoglutaric acid-2TMS	74	Glucose-meto-5TMS(1)	134	Pyruvic acid-meto-TMS
15	3-Aminopropanoic acid-3TMS	75	Glucose-meto-5TMS(2)	135	Rhamnose-meto-4TMS(1)
16	3-Dehydroshikimic acid-meto-3TMS(2)	76	Glucuronic acid-meto-5TMS(1)	136	Rhamnose-meto-4TMS(2)
17	4-Aminobutyric acid-2TMS	77	Glutamic acid 5-methylester-2TMS	137	Ribitol-5TMS
18	4-Aminobutyric acid-3TMS	78	Glutamic acid-3TMS	138	Ribonic acid-5TMS
19	4-Hydroxyphenyllactic acid-3TMS	79	Glutamine-4TMS	139	Ribose-meto-4TMS
20	4-Hydroxyphenylpyruvic acid-meto-2TMS	80	Glyceric acid-3TMS	140	Ribulose-meto-4TMS
21	5-Aminovaleric acid-3TMS	81	Glycerol-3TMS	141	S-Benzyl-Cysteine-4TMS
22	5-Dehydroquinic acid-meto-4TMS	82	Glycine-3TMS	142	Sedoheptulose 7-phosphate-meto-7TMS
23	5-Oxoprolinone-2TMS	83	Hippuric acid-TMS	143	Serine-2TMS
24	6-Phosphogluconic acid-7TMS	84	Histidine-3TMS	144	Serine-3TMS
25	Acetylglycine-2TMS	85	Histidinol-3TMS	145	Shikimic acid-4TMS
26	Aconitic acid-3TMS	86	Indol-3-acetic acid-2TMS	146	Sorbose-meto-5TMS(1)
27	Adenosine-4TMS	87	Inosine-4TMS	147	Sorbose-meto-5TMS(2)
28	Alanine-2TMS	88	Inositol-6TMS(2)	148	Spermine-6TMS
29	Allantoin-3TMS	89	Isocitric acid-4TMS	149	Suberylglycine-2TMS
30	Allantoin-4TMS	90	Isoleucine-2TMS	150	Sucrose-8TMS
31	Allose-meto-5TMS(1)	91	Isomaltose-meto-8TMS(1)	151	Tagatose-meto-5TMS(2)
32	Allose-meto-5TMS(2)	92	Isomaltose-meto-8TMS(2)	152	Tartaric acid-4TMS
33	Arabinose-meto-4TMS	93	Kynurenine-2TMS	153	Threitol-4TMS
34	Arabitol-5TMS	94	Kynurenine-3TMS	154	Threonic acid-4TMS
35	Arginine-3TMS	95	Lactitol-9TMS	155	Threonine-3TMS
36	Ascorbic acid-4TMS	96	Lactose-meto-8TMS(1)	156	Trehalose-8TMS
37	Asparagine-4TMS	97	Lactose-meto-8TMS(2)	157	Triethanolamine-3TMS
38	Aspartic acid-3TMS	98	Leucine-2TMS	158	Tryptamine-2TMS
39	Batyl alcohol-2TMS	99	Lysine-4TMS	159	Tryptophan-3TMS
40	Biotin-3TMS	100	Lyxose-meto-4TMS(1)	160	Tyramine-3TMS
41	Cadaverine-4TMS	101	Lyxose-meto-4TMS(2)	161	Tyrosine-3TMS
42	Citramalic acid-3TMS	102	Malic acid-3TMS	162	Urea-2TMS
43	Citric acid-4TMS	103	Maltitol-9TMS	163	Ureidopropionic acid-3TMS
44	Cytidine-4TMS	104	Maltose-meto-8TMS(1)	164	Ureidosuccinic acid-3TMS
45	Dihydroorotic acid-3TMS	105	Maltose-meto-8TMS(2)	165	Uridine-3TMS
46	Dihydrouracil-TMS	106	Mannitol-6TMS	166	Urocanic acid-2TMS
47	Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS(1)	107	Mannose 6-phosphate-meto-6TMS(1)	167	Valine-2TMS
48	Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS(2)	108	Mannose 6-phosphate-meto-6TMS(2)	168	Xylose-meto-4TMS(1)
49	Docosaheptaenoic acid-TMS	109	Mannose-meto-5TMS(1)	169	Xylose-meto-4TMS(2)
50	Docosapentaenoic acid-TMS	110	Mannose-meto-5TMS(2)	170	Xylulose-meto-4TMS
51	Dopa-4TMS	111	Melatonin-TMS		
52	Dopamine-4TMS	112	meso-Erythritol-4TMS		
53	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(1)	113	Methoprene acid-TMS		
54	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(2)	114	Metoprolol-2TMS		
55	Erythrulose-meto-3TMS(1)	115	N-Acetyl-Lysine-2TMS		
56	Erythrulose-meto-3TMS(2)	116	N-Acetylmannosamine-meto-4TMS(1)		
57	Fructose 6-phosphate-meto-6TMS	117	N-Acetylmannosamine-meto-4TMS(2)		
58	Fructose-meto-5TMS(1)	118	N-Acetylneuraminic acid-6TMS		
59	Fructose-meto-5TMS(2)	119	N-Acetyl-Ornithine-4TMS		
60	Fucose-meto-4TMS(1)	120	N-Acetyltyrosine-2TMS		

4. まとめ

GC/MS/MSのSmart Metabolites Databaseを利用することによって、475成分の広範囲解析が可能です。トマトの成熟葉においては、アミノ酸、有機酸、糖など中心代謝に関わる複数の物質群を含む、170種のTMS誘導体化代謝物が検出されました。また、内標準物質の検出精度（相対溶出時間、検出強度、確認イオン比率）は、いずれもRSDが5%以下であり、植物試料中の代謝物の定量的な比較が可能であることが示されました。本アプリケーションを利用した植物メタボローム解析を行えば、幅広い農業形態に関連する代謝産物の探索が可能になります。

謝辞

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（管理人：農研機構 生物系特定産業技術研究支援センター、略称「生研センター」）によって実施されました。

トリプル四重極型 ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040

日常の分析を飛躍させるSmart性能

多種多様な試料に含まれるさまざまな化学物質を微量まで測定する場合、GC-MS/MSによる測定が有効ですが、多くのパラメータ設定や適切なメソッドの作成が必要になります。GCMS-TQ8040では、煩雑なメソッドの作成作業を自動化し、高感度な多成分一斉分析を可能にしたことで、生産性を飛躍的に向上させます。

Smart Productivity

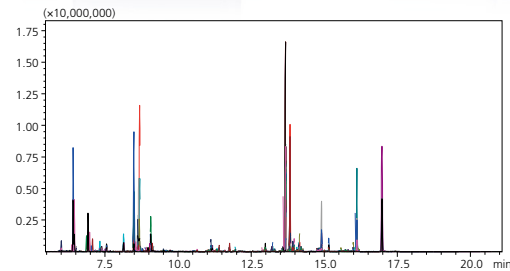
- 新しいファームウェア・プロトコルを搭載
- より多くの化合物を高感度・高精度に一斉分析
- Twin Line MSシステムによりカラム交換作業を軽減

Smart Operation

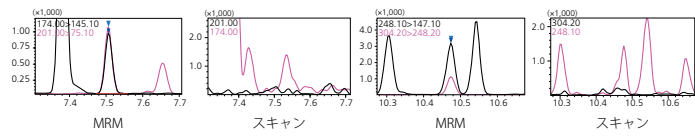
- Smart MRMによる最適なメソッドを自動作成
- 最適なトランジションを自動探索
- AART機能による保持時間自動修正

Smart Performance

- 特許技術の高感度イオン源により、更なる高感度化を実現
- OFF-AXIS イオン光学系によりノイズを低減
- シングルGC-MSとしても高感度分析可能



ヒト標準血漿中代謝成分のMRM分析で得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC)



ヒト標準血漿に含まれる代謝物のマスクロマトグラム比較

詳細カタログ C146-0315

GC/MS代謝物分析用データベース

Smart Metabolites Database

微量成分検出を可能にする

MRMによる475成分の同時測定

代謝物測定を支援するGC/MS、GC-MS/MSデータベースソフトウェアです。

GCMS-TQシリーズで測定することにより、高感度、高分離なMRM分析が可能です。メタボロミクスで取り扱うサンプルには、多くの代謝物や多様なマトリックスが含まれているため、それらの成分が重なり測定が難しい化合物があります。

質量分離を2回行うMRM測定は、上記の影響を排除できるため、従来のスキャン、SIMでは検出できない成分を検出することが可能です。



GCMS-TQ8040

詳細カタログ C146-0331

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2016年4月
© Shimadzu Corporation, 2016