

## Application Note

No. 50

ライフサイエンス

# GC×GC-MS を用いたクチクラワックス成分の 網羅分析

佐々木（関本）結子<sup>\*1</sup>、太田 啓之<sup>\*1</sup>



Life Science

## 1. はじめに

植物の地上部はクチクラで覆われています。クチクラは、水分の損失、紫外線、病原性細菌や菌類から植物細胞を保護する機能を持っています。クチクラはまた、植物と昆虫間の相互作用にも関与すると考えられています<sup>1)</sup>。クチクラに含まれるワックス成分は、クロロホルムなど低極性の有機溶媒を短時間処理して溶出される脂質代謝産物で、炭化水素、アルコール、ケトン、およびステロールのようないくつかの脂質クラスで構成されています。一般的に、それぞれの脂質クラスには、異なる炭素鎖長を有する分子種が含まれています。このようにクチクラワックスは種々の脂質クラスから構成される複雑な混合物であるため、GC-MS による組成分析を行う

場合、有機溶媒による溶出後に薄層クロマトグラフィーによる各脂質クラスの分離などの前処理作業を行う必要があります。多検体に対して前処理を行うためには、より多くの作業時間が必要になります。そのため、クチクラワックスを高効率かつ迅速に定性評価するためには新たな分析方法を確立する必要があります。本稿では、包括的二次元ガスクロマトグラフ質量分析 (GC×GC-MS) システムによる脂肪酸やクチクラワックスの一斉分析の例を紹介します。クチクラワックスのような生物由来物質から抽出された複雑な脂質混合物を分析する上で、このシステムは強力なツールとなることが期待されます。

\*1 国立大学法人 東京工業大学 生命理工学院

## 2. 脂肪酸およびクチクラワックスに対する GC×GC-MS の適用

### 2-1 装置

図1のAに示す GC×GC-MS システムは、Zoex 社の GC×GC モジュレータと島津製作所のガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ™8040 の組み合わせによって構成されます。この GC×GC クロマトグラフ法は 2 本の GC カラム（通常は無極性カラムと極性カラムの組み合わせ）を用いて行います。GC×GC-MS システムの原理に関する詳細については、GC×GC ハンドブックを参照してください<sup>2)3)</sup>。

無極性カラムを使用する場合、沸点に近い 2 つの化合物を 1 回の GC クロマトグラフで分離することは困難です。しかし GC×GC システムの場合、そのような化合物同士についても、極性によってさらに分離することができるため、結果として図1のBに示されるように完全に分離することができます。

**A**



**B**

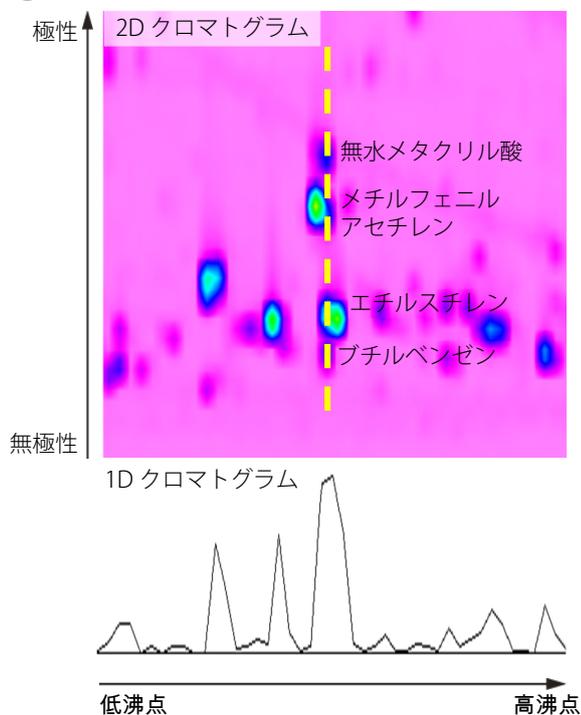


図1 GC×GC-MS システム

ここでは、SH-Rtx-1614（第1カラム用、無極性、RESTEK製）とBPX50（第2カラム用、中間極性、SGE Analytical Science製）をモジュレータを介して直列に接続しました。分析条件は表1および表2に示します。

表1 FAME の分析条件

-GC×GC-															
1 <sup>st</sup> カラム	: SH-Rtx-1614	15 m × 0.25 mm I.D., df = 0.10 μm													
2 <sup>nd</sup> カラム	: BPX50	2.5 m × 0.10 mm I.D., df = 0.10 μm													
カラムオープン温度プログラム			<table border="1"> <thead> <tr> <th>レート (°C/min)</th> <th>温度 (°C)</th> <th>ホールド時間 (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-</td> <td>40</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>160</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>270</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)	-	40	2	30	160	0	2	270	5
レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)													
-	40	2													
30	160	0													
2	270	5													
キャリアガス	: ヘリウム														
制御モード	: 圧力一定 (150 kPa)														
気化室温度	: 250 °C														
注入モード	: スプリット														
スプリット比	: 1 : 1														
試料注入量	: 1 μL														
Modulation Period	: 12 sec														
Hot Jet Duration	: 350 msec (325 °C)														
-MS-															
インタフェース温度	: 240 °C														
イオン源温度	: 230 °C														
イオン化モード	: EI														
測定モード	: スキャン														
質量範囲	: m/z 45-1000														
スキャン速度	: 20000 u/sec														

表2 クチクラワックスの分析条件

-GC×GC-												
1 <sup>st</sup> カラム	: SH-Rtx-1614	15 m × 0.25 mm I.D., df = 0.10 μm										
2 <sup>nd</sup> カラム	: BPX50	2.5 m × 0.10 mm I.D., df = 0.10 μm										
カラムオープンプログラム			<table border="1"> <thead> <tr> <th>レート (°C/min)</th> <th>温度 (°C)</th> <th>ホールド時間 (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-</td> <td>150</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>330</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)	-	150	1	2	330	20
レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)										
-	150	1										
2	330	20										
キャリアガス	: ヘリウム											
制御モード	: 圧力一定 (250 kPa)											
気化室温度	: 320 °C											
注入モード	: スプリット											
スプリット比	: 5 : 1											
試料注入量	: 1 μL											
Modulation Period	: 12 sec											
Hot Jet Duration	: 350 msec (400 °C)											
-MS-												
インタフェース温度	: 320 °C											
イオン源温度	: 230 °C											
イオン化モード	: EI											
測定モード	: スキャン											
質量範囲	: m/z 45-1000											
スキャン速度	: 20000 u/sec											

### 2-2 サンプルおよび準備作業

脂肪酸メチルエステルの標準物質としては、Supelco® 37 Component FAME Mix (Merck 製) を用いました。

クチクラワックスは、標準的な方法に基づき、サトイモの葉から抽出しました<sup>4)</sup>。具体的には、以下の方法になります。

- (1) サトイモの葉を室温で 30 秒間、クロロホルムに浸漬する。
- (2) 溶媒を 30 °C の窒素緩流下で完全に除去する。
- (3) 得られた残渣に、トリメチルクロロシランを 1% 含む *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA-TMCS) 100 μL とピリジン 100 μL を加え、80 °C で 60 分間保温して、誘導体化する。
- (4) 溶媒を 30 °C の窒素緩流下で完全に除去する。
- (5) 得られたクチクラワックス画分を、100 μL のクロロホルムに再溶解する。

### 3. 結果

#### 3-1 脂肪酸メチルエステル (FAME) の分離

最初に、飽和 FAME と不飽和 FAME を含む標準サンプルを用いて、GC×GC システムの分離能をテストしました (表 1)。37 FAME mix の分析結果を図 2 に示します。ChromSquare Ver. 2.2 ソフトウェア SP1 (Chromaleont s.r.l.、メッシーナ、イタリア) を用いて、2D クロマトグラムを作成しました。各スポットの色は信号強度に対応しています。飽和 FAME から得られたスポット (C4:0 から C24:0) は沸点の順に黒の曲線上に並びます。一方 2 つ目の次元 (極性) の保持時間は、二重結合の数に応じて増加しています (例えば C20:0 から C20:5)。サンプル中に複数の不飽和脂肪酸が共存する場合、シングル

カラムを用いた分析では、各化合物を完全に分離できない場合があります。例えば、*cis*-11、*cis*-11, 14、および *cis*-11, 14, 17 C20 FAME を、無極性カラムのみを使って分離するのは困難です。

また、予期せぬ混入物質 (例えばフタル酸) 由来のシグナルが目的化合物に重なり、その結果、目的化合物の MS スペクトルのバックグラウンドノイズが高くなる場合があります。そのような混入物質も GC×GC システムを用いることにより明確に分離することができます (図 2 角丸四角形内)。そのため、目的化合物の正確な MS スペクトルを同定することができます。

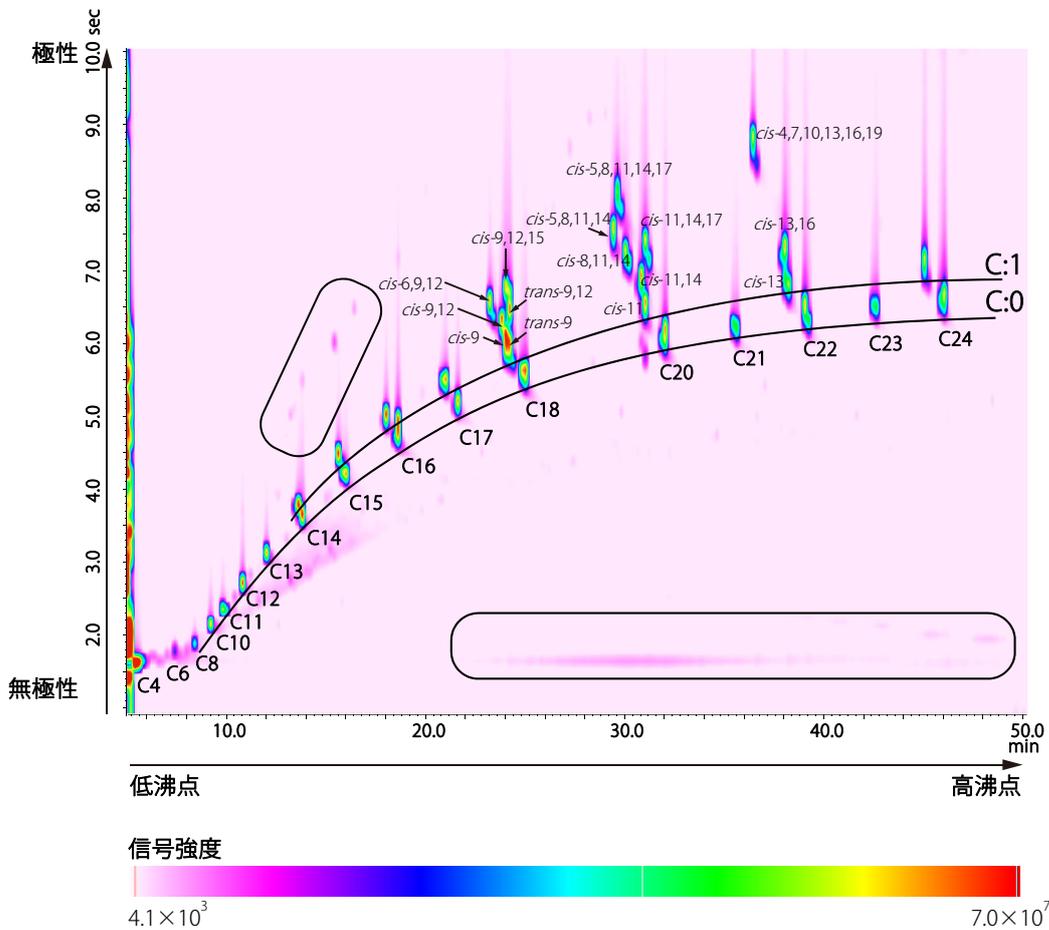


図 2 37 種 FAME の二次元クロマトグラム

#### 3-2 サトイモから抽出したクチクラワックスの定性評価

陸上植物のクチクラワックスは、通常、極長鎖脂肪酸アルコールやワックスエステルのような高沸点化合物で構成されています。そのため GC×GC システムの分析条件をクチクラワックス分析用に調整しました (表 2)。サトイモから抽出したクチクラワックスの 2D クロマトグラムを図 3 の A (全体イメージ) および図 3 の B (拡大イメージ) に示します。サトイモから抽出したクチクラワックスの主成分は極長鎖ケトンである

C31-16-one でした。極長鎖アルコールである C31-16-ol と C30-1-ol のスポットは、C31-16-one のスポットに隣接してはいますが、2 次元目 (極性) のクロマトグラフによって完全に分離することができました。そのため、これら化合物の MS スペクトルには、他の化合物に由来するバックグラウンドノイズがほとんど含まれていません。このように、信頼性の高い MS スペクトルが得られるので、GC×GC システムは定性分析に適した方法であると言えます。

クチクラワックスを、脂肪酸、第1級アルコール、ケトン等のように同じ官能基を持つ化合物（脂質クラス）ごとに分離するためには、一般的に薄層クロマトグラフィー（TLC）を用います。各脂質クラスの成分を TLC から回収し、誘導体化した後、シングル GC-MS 分析によって炭素鎖長等の同定を行います。今回の分析結果から、サトイモのクチクラワックスには、少なくとも 8 種類の主要な脂質クラス（アルデヒド、アルカン、脂肪酸、ケトン、第1級アルコール、第2級アルコール、ステロール、およびワックスエステル）が含まれて

いることがわかりました。これらの脂質クラスは、TLC 上でそれぞれ分離したスポットとして検出されるので、このクチクラワックス組成を明らかにするためには、8 回の GC-MS 分析を行う必要があります。以上のように、分離および測定プロセスには多くの時間を費やします。従って、このような過程を省略することができる GC×GC-MS システムは多検体処理に適していること、このシステムを用いることで極めて効率的な定性分析が可能になることが示されました。

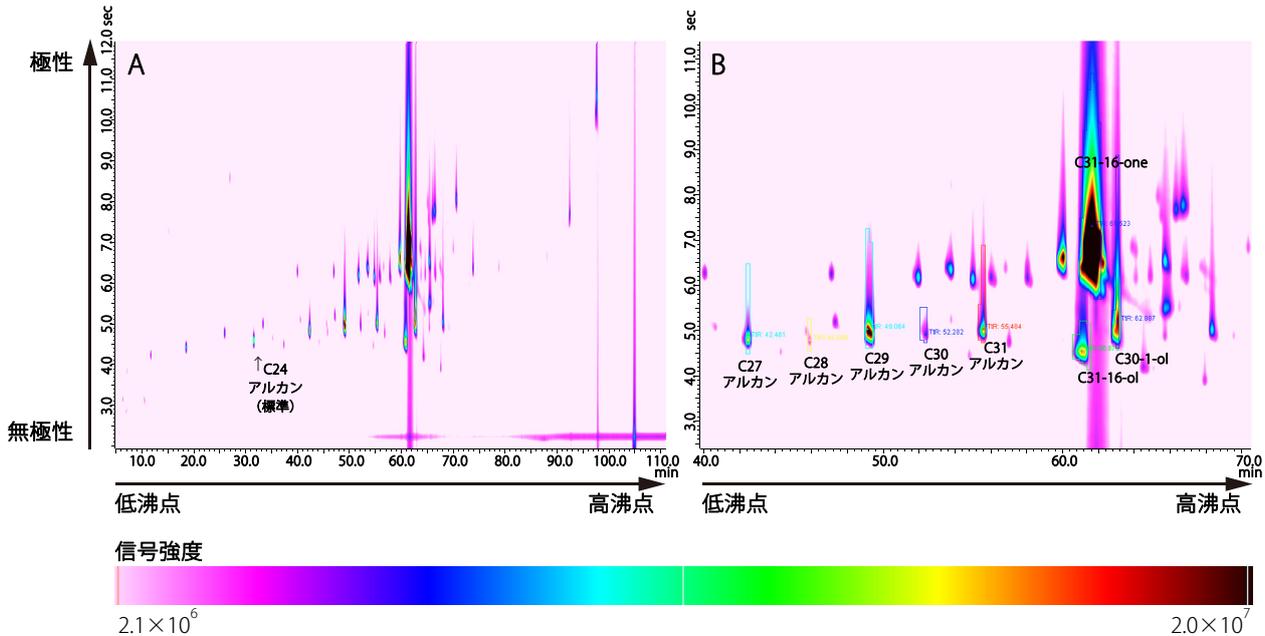


図3 サトイモから抽出したクチクラワックスの二次元クロマトグラム

#### 4. まとめ

GC×GC-MS は、FAME や生物由来物質から抽出したクチクラワックスのような複雑な脂質混合物の分析に有効なシステムです。GC×GC-MS システムによって脂質化合物の分離や同定を効率的に行うことができるため、特に多検体の脂質組成解析を行う場合に、有用であると考えられます。さらに、高分解能を示す GC×GC-MS システムを用いることで、混入物質に由来するバックグラウンドノイズを含まない、正確な MS スペクトルを得ることができます。このような GC×GC-MS システムの特性は、脂質誘導体の効率的な定性分析を行うために極めて有用であると言えます。

#### 引用文献

- 1) Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* (2013) 11: e0167. 以下から入手可能：  
<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0167>
- 2) Mondello L. Fundamental Principles of Comprehensive 2D GC. *GC×GC Handbook*. C146-E177. 以下から入手可能：  
<https://www.shimadzu.com/an/gcms/gcgc-4.html>
- 3) Mondello L. Application Compendium of Comprehensive 2D GC Vol.1-5. *GC×GC Handbook*. C146-E178. 以下から入手可能：  
<https://www.shimadzu.com/an/gcms/gcgc-4.html>
- 4) Kondo S, Hori K, Sasaki-Sekimoto Y, Kobayashi A, Kato T, Yuno-Ohta N, Nobusawa T, Ohtaka K, Shimojima M, Ohta H. Primitive Extracellular Lipid Components on the Surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum* and Their Possible Biosynthetic Pathways as Deduced from the Genome Sequence. *Front Plant Sci* (2016) 7: 1–15. 以下から入手可能：  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00952>

#### 謝辞

本研究は、科学技術振興機構の OPERA（産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム）の研究費補助金（B）No. 15H04393 およびマツダ株式会社の支援を受けています。

Supelco は、Sigma-Aldrich Co. LLC の登録商標です。

その他、本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

**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：2018年9月

© Shimadzu Corporation, 2018