

Technical Report

植物メタボローム解析のためのGC/MS/MS メソッドの最適運用：複数イオン情報の活用

Appropriate use of the GC/MS/MS method for plant metabolome analysis

岡本 真美¹、高信 淳子¹、佐藤 心郎¹、八巻 聡²、増田 潤一²、澤田 有司¹、平井 優美¹

Abstract:

GC/MS/MSのSmart Metabolites Databaseには、ひとつの化合物について分析可能な複数のイオンの情報が搭載されています。分析メソッド作成時に、各化合物のターゲットイオンと確認イオンの組み合わせにおいて、検出感度が異なるイオンを選択することで、植物試料に含まれる幅広い濃度範囲の化合物についてメソッドを最適化できることが示されました。

Keywords: 植物、メタボローム分析、飽和、GC/MS/MS

1. はじめに

植物試料では、主な代謝物である糖やアミノ酸等に限定しても、1,000倍以上の濃度分布を示します。このため、全代謝物の同時検出を目指すメタボローム分析では、検出強度の高いイオンが検出器の測定上限を超えることがあります。この“飽和ピーク”では、真値と検出値間の誤差が数倍から数十倍以上生じるため、定量値や確認イオン比率に基づく代謝産物の同定結果の信頼性が著しく低下してしまいます。ひとつの代謝物について、複数の検出可能なイオンの情報が搭載されているSmart Metabolites Databaseでは、検出強度が異なるイオンを選択することができます。すなわち、低濃度の代謝物は検出強度の高いイオンを、高濃度の代謝物は検出強度が低く、かつユニークなイオンを選択することにより、対象とする全ての代謝物を検出器の測定範囲内に収めたメソッドの作成が可能です。この方法は、サンプルの特徴に応じて変更が可能であり、スプリット比やサンプル希釈率の変更に伴う、低濃度代謝物のデータの取りこぼしを防ぐことが期待できます。本データシートでは、上記の方法を利用した広範囲の濃度分布をもつ植物試料中の代謝物の分析例を紹介します。

2. 分析条件

凍結乾燥したトマト成熟葉（日本型とオランダ型の2品種）の80%メタノール抽出物（2.5 mg 乾燥重量/mL）に内標準物質としてRibitolを加えました。誘導体化処理としてメトキシ化とトリメチルシリル（TMS）化を行い分析したところ、全475化合物中7化合物について飽和ピークが認められました。そこで、Smart Metabolites Databaseに記載されている複数のイオン情報を使用し、飽和した糖の定量イオンと確認イオンのトランジションを、感度の低いイオンに変更することで、検出器の飽和の改善を目指しました。尚、メソッド作成方法はSmart Metabolites Databaseのマニュアルに準拠しました。サンプル調製方法はFig. 1を、分析条件の詳細はTable 1をご参照ください。

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		

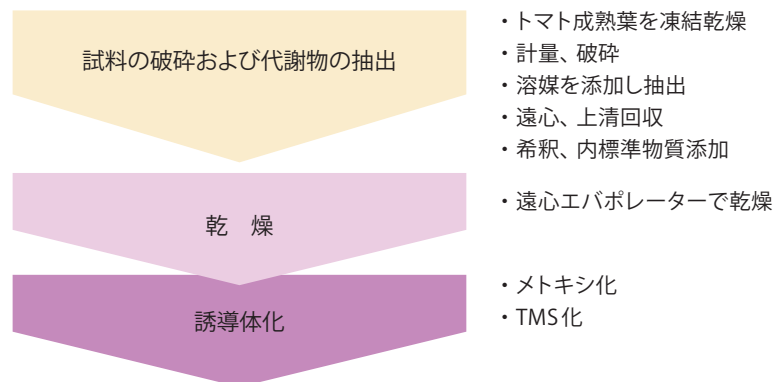


Fig. 1 サンプルの調製方法についてのフローチャート

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. 2に示します。

各化合物について解析を行った結果、一部の化合物で過大なイオンが入射していることが分かりました。この状態は検出器の上限を超えたことを示しており、解析ソフトウェア上で“飽和ピーク”

として表されます。

Fig. 3は、化合物濃度と面積値の関係性を表したグラフと代表的なクロマトグラムの形状を示しています。サンプル中に含まれる化合物の濃度が検出範囲を超えた場合、正しい面積値を反映することができません。

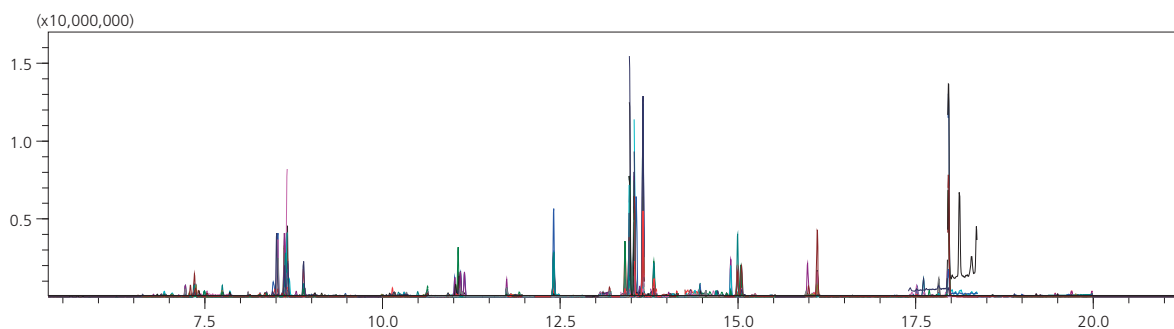


Fig. 2 トマト成熟葉に含まれる代謝物成分のトータルイオンカレントクロマトグラム

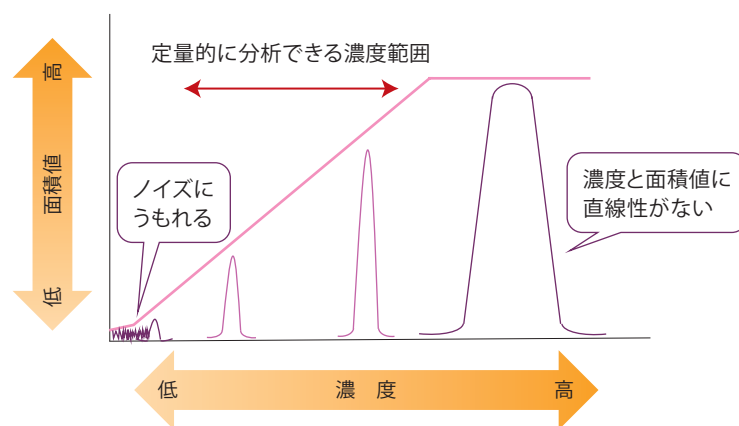


Fig. 3 化合物濃度と面積値の関係と、クロマトグラフのイメージ図

Smart Metabolites Databaseには、ひとつの化合物について3つ以上のトランジション候補が掲載されており、候補イオン同士の「比率」情報に基づいて使用するイオンの組み合わせを決定します。

メソッド変更前後のマスキングクロマトグラムの例をFig. 4に示します。解析ソフトウェアの定量ブラウザのクロマトグラムビューでは、飽和するとクロマトグラムの一部が赤く表示されます。

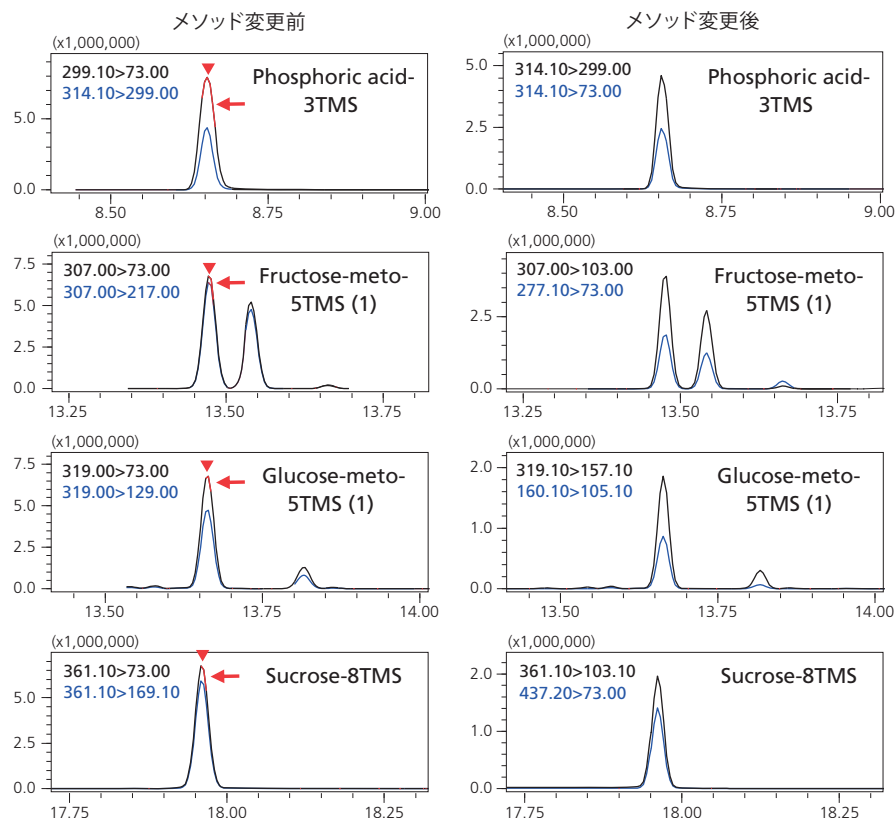


Fig. 4 定量イオン、確認イオン変更前後のマスキロマトグラム

サンプルに用いた日本型とオランダ型のトマト成熟葉における、メソッド変更前に飽和していた化合物の検出状態が改善されたかについて追跡しました。Table 2は、メソッド変更前後の検出状態を示しています。メソッド変更前に飽和ピークが認められた

4種の化合物について、ターゲットイオンと確認イオンの組み合わせを調整したメソッドによって検出範囲内に収めることができ、サンプル濃度を変更することなく分析することができました。

Table 2 2品種におけるメソッド変更前後の検出状態

化合物名	メソッド変更	日本型	オランダ型
Phosphoric acid-3TMS	前	×	×
	後	○	○
Fructose-meto-5TMS (1)	前	○	×
	後	○	○
Glucose-meto-5TMS (1)	前	×	○
	後	○	○
Sucrose-8TMS	前	×	×
	後	○	○

×：飽和、○：飽和でない

4. まとめ

Smart Metabolites Databaseを利用し、個々の化合物に対して複数のイオンからターゲットイオンを選択することにより、サンプル試料中の幅広い濃度範囲の代謝物について最適化された網羅的な分析ができました。本手法は、サンプルの特徴に応じたスプリット比や希釈率の変更に加え、MS条件の調整による検討方法です。本レポートにおいて、トマトの葉のサンプルで良好な再現性が得られたことから、代謝物含量の構成が大きく異なる種々の植物試料への適用が期待できます。

謝辞

本研究は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 「次世代農林水産業創造技術」(管理法人：農研機構 生物系特定産業技術研究支援センター) 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

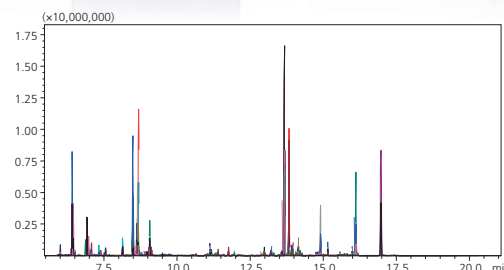
- 新しいファームウェア・プロトコルを搭載
- より多くの化合物を高感度・高精度に一斉分析
- Twin Line MSシステムによりカラム交換作業を軽減

Smart Operation

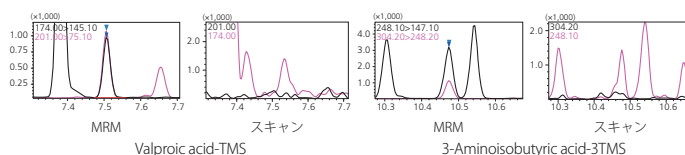
- Smart MRMによる最適なメソッドを自動作成
- 最適なトランジションを自動探索
- AART機能による保持時間自動修正

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。



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著者に帰属しており、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：2017年7月
© Shimadzu Corporation, 2017