



ベンチトップGC-TOFMSを用いた、トウモロコシ・ コメ抽出物のメタボロミクスプロファイリング

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: GC-TOFMS, トウモロコシ, コメ, 誘導体化, ハイスループット, 定量, メタボロミクス, アミノ酸, デコンボリューション

1. Introduction

トウモロコシとコメは食糧、飼料、そしてエネルギーとして世界中で最重要視されています。^{1,2}メタボロミクスプロファイリングはトウモロコシとコメの一般的な特性、耐虫性、そして環境へのストレス耐性を研究するにあたって最も効率的なアプローチです。³メタボロミクスは作物の多様性や耐病性の研究に活用できます。これらの研究は、品質や生産量、栄養価の向上につながります。^{4,5}より具体的には、食品中の生化学物質を決定することで、香りや味、見た目、保存期間、そして栄養価といった品質にまつわる特性を評価することが可能です。⁶本研究では、新しいベンチトップGC-TOFMSをトウモロコシとコメ抽出物のメタボロミクスプロファイリングに活用いたしました。装置のパラメータは、シリル化によりサンプルが誘導体化されたのち、多種多様な代謝物を迅速に検出するよう最適化されました。LECOの新しいPegasus[®] BT 質量分析機器により生成された、情報量が豊富で高品質なスペクトルデータを取得し、ピークを発見、そして素早くアノテーションするために強力なソフトウェアを利用しました。

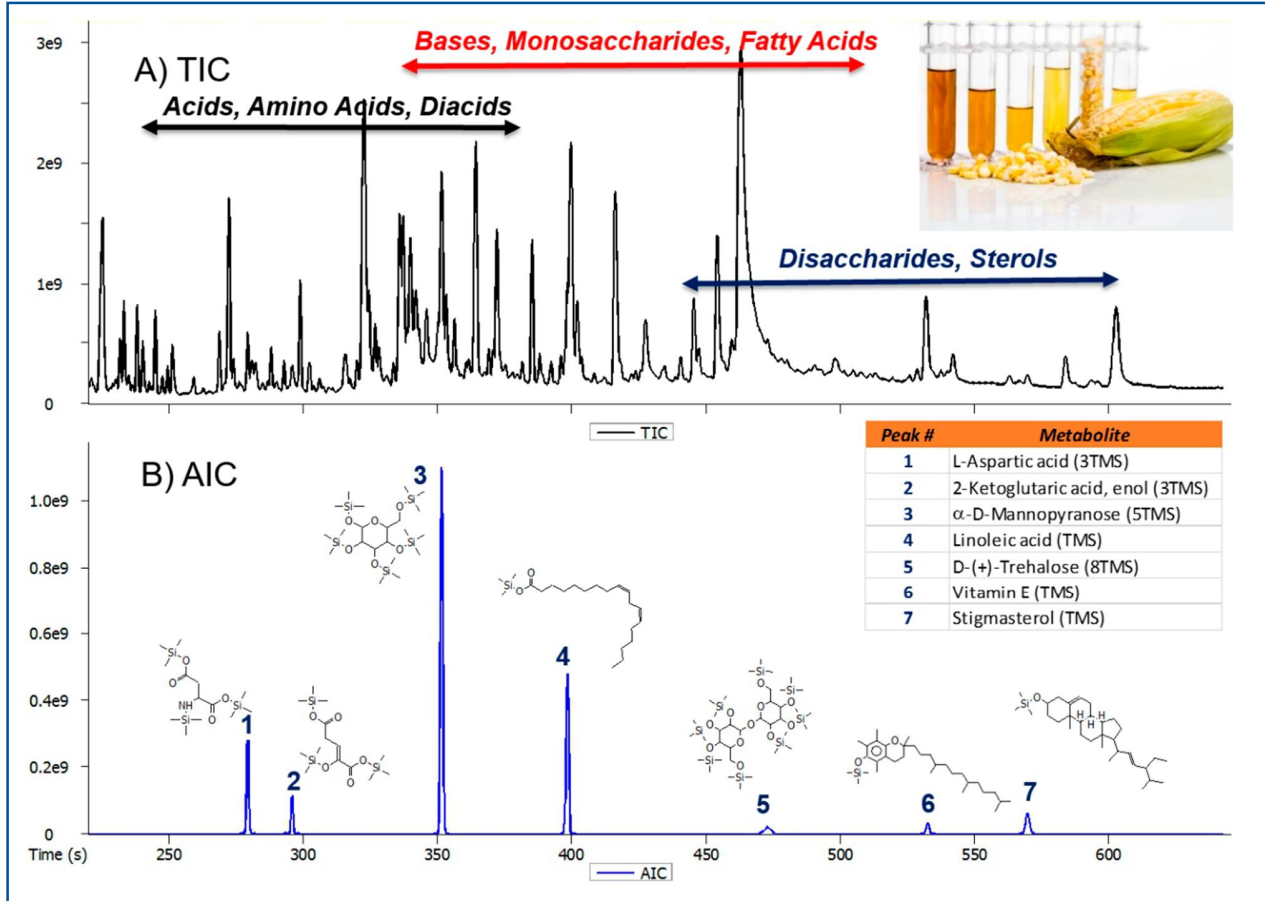


図1. トータルイオンクロマトグラム (A) アナリティカルイオンクロマトグラム (B) 複雑なトウモロコシ葉抽出物から選択的な分析対象の決定が可能であることを示している。

2. Experimental

1. 抽出

凍結乾燥した植物試料 25 mg に対し、メタノール/水 (4:1, v/v) 400 μ L を添加しました。得られた不均一混合物を 5 分間ボルテックス混合し、70°C で 15 分間加熱した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上清 400 μ L に内部標準としてリビトール (10 μ L ; 水中 2000 μ g/mL) を添加しました。得られた混合液を、60°C に設定したスピードバックを用いて減圧下で乾固しました。

2. 誘導体化

乾固したサンプルに MSTFA 100 μ L を添加し、60°C で 1 時間加熱することで誘導体化を行いました。

Table 1. GC- TOFMS (*Pegasus BT*) 測定条件

| Gas Chromatograph | Agilent 7890 with GERSTEL MPS2 Autosampler | |
|-------------------|--|----------------------|
| 注入条件 | 1 μ L、スプリット比 20:1、注入口温度 270°C | |
| キャリアガス | ヘリウム (He)、定流量 0.80 mL / min | |
| カラム | Rxi-5ms, 20 m x 内径0.18 mm x 膜厚0.18 μ m | Bellefonte, PA, USA) |
| 昇温プログラム | 60°C (0.5 分) 保持後、36°C / min で 320°C まで昇温 (3 分保持) | |
| トランスファーライン | 300°C | |
| Mass Spectrometer | LECO Pegasus BT | |
| イオン源温度 | 250°C | |
| 質量範囲 | 45-600 m/z | |
| データ取得速度 | 20 spectra/s | |

3. Results and Discussion

Pegasus BT は、速度、堅牢性、クロマトグラフィー分離能など、最先端の GC-TOFMS に期待される特性を備えたベンチトップ型装置です。加えて、ピコグラム毎兆 (ppt) レベルの高感度と、 10^5 に及び拡張された直線ダイナミックレンジを実現しています。これらの特長は、0.01~50 pMol/ μ L のキャリブレーション範囲で測定したアミノ酸一式の結果により明確に示されています (表2)。

キャリブレーション曲線の直線性は極めて良好であり、メチオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、リシンについて得られた相関係数は 0.996~0.998 の範囲でした (図2)。さらに、分岐鎖アミノ酸であるロイシンおよびイソロイシンについて、曲線の低濃度領域を拡大して評価した結果、キャリブレーション範囲全体にわたり直線性が維持されていることが確認されました (図3 ; $r = 0.999$)。

表2. アミノ酸標準物質の濃度を、pMol/ μ L (0.01~50 pMol/ μ L) および 1 μ L 注入・スプリット比 20:1 条件におけるカラムオン量 (pg) として示す。

| Amino Acid | pg On Column after a 1 μ L Injection/Split 20:1 | | | | | | | | |
|---------------------|---|-----|----|----|-----|-----|------|------|-------|
| Ala | 223 | 111 | 45 | 22 | 4.5 | 2.2 | 0.45 | 0.22 | 0.045 |
| Arg | 436 | 218 | 87 | 44 | 8.7 | 4.4 | 0.87 | 0.44 | 0.087 |
| Asp | 333 | 166 | 67 | 33 | 6.7 | 3.3 | 0.67 | 0.33 | 0.067 |
| Cys | 303 | 151 | 61 | 30 | 6.1 | 3.0 | 0.61 | 0.30 | 0.061 |
| Glu | 368 | 184 | 74 | 37 | 7.4 | 3.7 | 0.74 | 0.37 | 0.074 |
| Gly | 188 | 94 | 38 | 19 | 3.8 | 1.9 | 0.38 | 0.19 | 0.038 |
| His | 388 | 194 | 78 | 39 | 7.8 | 3.9 | 0.78 | 0.39 | 0.078 |
| Ile | 328 | 164 | 66 | 33 | 6.6 | 3.3 | 0.66 | 0.33 | 0.066 |
| Leu | 328 | 164 | 66 | 33 | 6.6 | 3.3 | 0.66 | 0.33 | 0.066 |
| Lys | 365 | 183 | 73 | 37 | 7.3 | 3.7 | 0.73 | 0.37 | 0.073 |
| Met | 373 | 187 | 75 | 37 | 7.5 | 3.7 | 0.75 | 0.37 | 0.075 |
| Phe | 413 | 206 | 83 | 41 | 8.3 | 4.1 | 0.83 | 0.41 | 0.083 |
| Pro | 288 | 144 | 58 | 29 | 5.8 | 2.9 | 0.58 | 0.29 | 0.058 |
| Ser | 263 | 131 | 53 | 26 | 5.3 | 2.6 | 0.53 | 0.26 | 0.053 |
| Thr | 298 | 149 | 60 | 30 | 6.0 | 3.0 | 0.60 | 0.30 | 0.060 |
| Tyr | 453 | 226 | 91 | 45 | 9.1 | 4.5 | 0.91 | 0.45 | 0.091 |
| Val | 293 | 146 | 59 | 29 | 5.9 | 2.9 | 0.59 | 0.29 | 0.059 |
| Conc. pMol/ μ L | 50 | 25 | 10 | 5 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 |

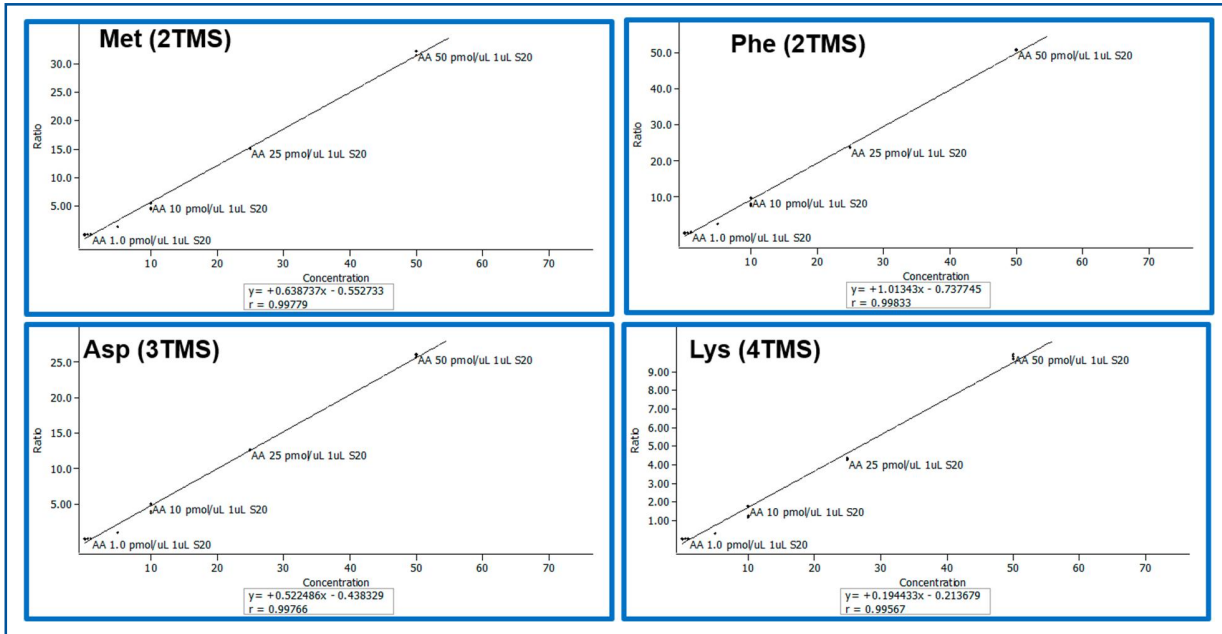


図2. メチオニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、およびリシンのキャリブレーションカーブ (0.01~50 pMol/μL)。

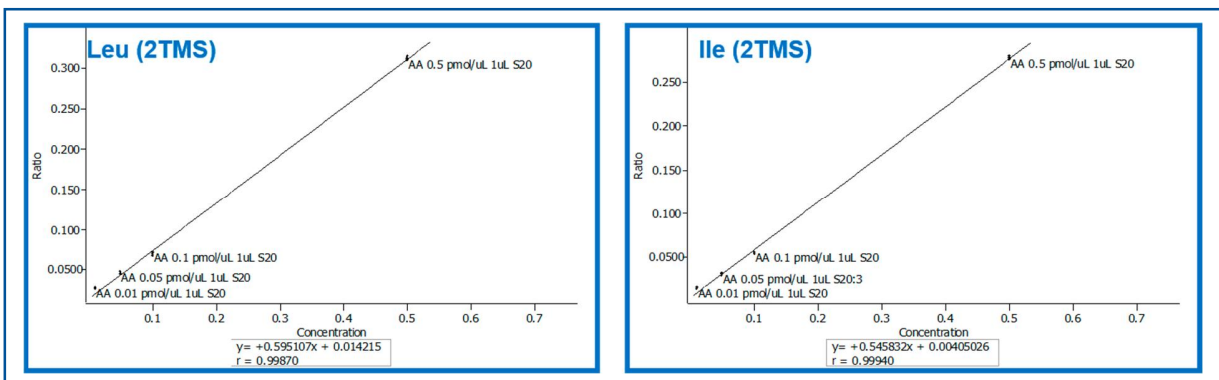


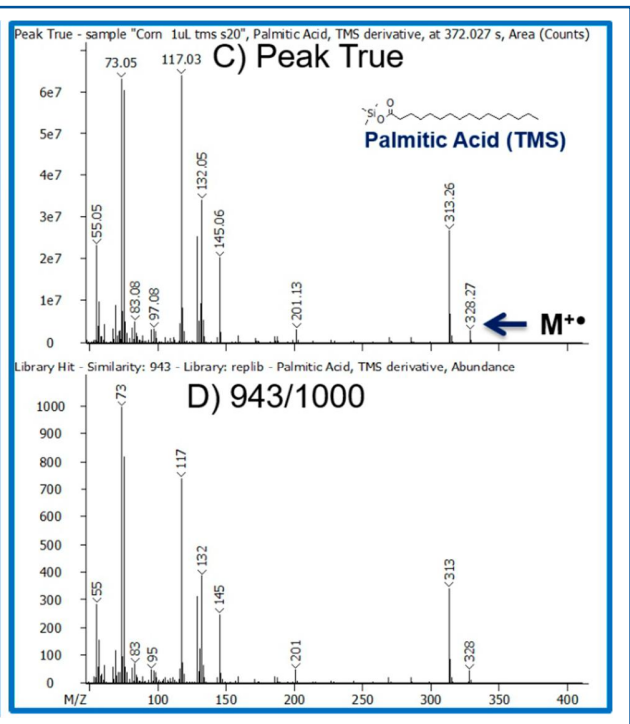
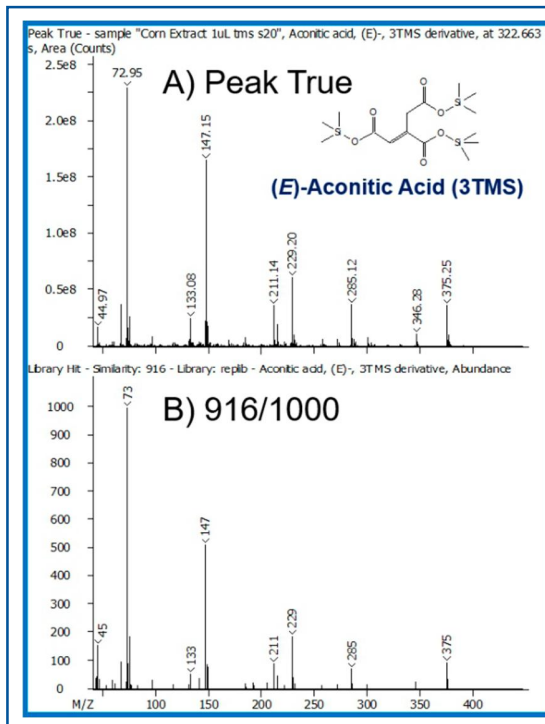
図3. ロイシンおよびイソロイシンのキャリブレーションカーブ低濃度領域の拡大図 (0.01~0.5 pMol/μL)。

LECO の高性能ハードウェアと次世代 ChromaTOF® ブランドソフトウェア (バージョン 5.0) を組み合わせることで、トウモロコシおよび米サンプルにおける注射付き代謝物のカバレッジが向上しました。包括的なメタボロミクスデータは、わずか 10 分強で取得されています。代謝物は、ピーク検出 (Peak Find)、大規模かつ実績のあるデータベースに対するスペクトル類似度検索、ならびに保持指数 (Retention Index) 値の活用を含む自動かつ包括的なデータ処理により、信頼性高く同定されました。

トウモロコシ抽出物中で検出・注射付けされた代表的な 42 種類の代謝物を表3に示します。これらには、アミノ酸、有機酸、ジカルボン酸、単糖類、二糖類、テルペン、テルペノイド、ステロール類が含まれます。代謝物は NIST および Wiley データベースと比較され、平均スペクトル類似度スコアは 870/1000 でした。Pegasus BT により得られるデータの品質と情報量の豊富さは、(E)-アコニット酸およびパルミチン酸について、Peak True (デコンボリューション後) スペクトルと NIST データベース質量スペクトルを比較した結果からも明確に示されています。これらの類似度スコアは、それぞれ 916 および 943/1000 でした (図4)。

| Peak # | Name | Formula | R.T. (s) | Retention Index | Area | Similarity |
|--------|--------------------------------|---|----------|-----------------|------------|------------|
| 1 | Isoleucine 2TMS | C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₅ Si ₂ | 230 | 1291 | 395477933 | 814 |
| 2 | Niacin TMS | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂ Si | 230 | 1294 | 108299128 | 870 |
| 3 | Malonic Acid 2TMS | C ₅ H ₈ O ₆ Si ₂ | 231 | 1298 | 1436217142 | 876 |
| 4 | Succinic 2TMS | C ₆ H ₁₀ O ₆ Si ₂ | 233 | 1306 | 2251723198 | 854 |
| 5 | Glyceric Acid 3TMS | C ₁₁ H ₂₀ O ₇ Si ₃ | 238 | 1328 | 1516160071 | 929 |
| 6 | Itaconic Acid 2TMS | C ₆ H ₈ O ₆ Si ₂ | 240 | 1340 | 2239319374 | 918 |
| 7 | Methylmaleic Acid 2TMS | C ₁₁ H ₁₈ O ₆ Si ₂ | 242 | 1351 | 992776815 | 805 |
| 8 | Serine 3TMS | C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₅ Si ₃ | 244 | 1361 | 1484484365 | 909 |
| 9 | (E)-Erythrono-1,4-lactone 2TMS | C ₁₀ H ₁₆ O ₆ Si ₂ | 249 | 1384 | 1013322110 | 937 |
| 10 | Threonine 3TMS | C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₅ Si ₃ | 251 | 1392 | 2342030066 | 905 |
| 11 | Methylmaleic Acid 2TMS | C ₁₁ H ₁₈ O ₆ Si ₂ | 252 | 1396 | 857642597 | 865 |
| 12 | Malic Acid 3TMS | C ₁₃ H ₂₀ O ₇ Si ₃ | 272 | 1496 | 3562505366 | 874 |
| 13 | Threonic Acid 4TMS | C ₁₄ H ₂₀ O ₈ Si ₄ | 288 | 1572 | 2221809977 | 947 |
| 14 | 2-Ketoglutaric Acid 3TMS | C ₁₄ H ₂₀ O ₈ Si ₃ | 296 | 1610 | 1425602596 | 871 |
| 15 | Pyrogallol 3TMS | C ₁₃ H ₁₀ O ₇ Si ₃ | 297 | 1615 | 70015660 | 804 |
| 16 | Glutamic Acid 3TMS | C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₇ Si ₃ | 299 | 1627 | 1737232874 | 853 |
| 17 | L-Rhamnose 4TMS | C ₁₄ H ₂₄ O ₈ Si ₄ | 302 | 1644 | 1956202287 | 830 |
| 18 | (Z)-Aconitic Acid 3TMS | C ₁₃ H ₂₀ O ₇ Si ₃ | 322 | 1754 | 5787376222 | 923 |
| 19 | Neophytadiene | C ₂₀ H ₃₈ | 339 | 1846 | 330374033 | 931 |
| 20 | Glucopyranose 5TMS | C ₂₁ H ₄₀ O ₈ Si ₅ | 352 | 1923 | 3685576368 | 904 |
| 21 | Mannose 5TMS | C ₂₁ H ₄₀ O ₈ Si ₅ | 352 | 1923 | 3164023678 | 810 |

| Peak # | Name | Formula | R.T. (s) | Retention Index | Area | Similarity |
|--------|------------------------------------|--|----------|-----------------|------------|------------|
| 22 | Glucose 5TMS | C ₂₁ H ₄₀ O ₈ Si ₅ | 365 | 1999 | 2193633580 | 912 |
| 23 | Palmitic Acid TMS | C ₂₄ H ₄₈ O ₂ Si | 372 | 2050 | 2740753179 | 943 |
| 24 | D-Gluconic acid 6TMS | C ₂₄ H ₄₆ O ₈ Si ₆ | 374 | 2057 | 285082038 | 828 |
| 25 | Ferulic Acid 2TMS | C ₁₈ H ₂₀ O ₄ Si ₂ | 382 | 2110 | 351778560 | 853 |
| 26 | Myo-Inositol 6TMS | C ₂₄ H ₄₆ O ₈ Si ₆ | 385 | 2133 | 1907082179 | 824 |
| 27 | Caffeic Acid 3TMS | C ₁₈ H ₂₀ O ₆ Si ₃ | 388 | 2152 | 1090954337 | 885 |
| 28 | Phytol TMS | C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si | 393 | 2181 | 1688201136 | 913 |
| 29 | Stearic Acid TMS | C ₂₃ H ₄₆ O ₂ Si | 402 | 2246 | 970175017 | 869 |
| 30 | Tryptophan 3TMS | C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ Si ₃ | 404 | 2258 | 336310682 | 811 |
| 31 | 2-O-Glycerol galactopyranoside 6TM | C ₂₂ H ₄₀ O ₈ Si ₆ | 416 | 2347 | 3540461506 | 906 |
| 32 | Glucose 6-Phosphate 6TMS | C ₂₄ H ₄₁ O ₉ PSi ₆ | 426 | 2414 | 486549797 | 803 |
| 33 | Myo-Inositol Phosphate 7TMS 7 | C ₂₃ H ₄₀ O ₉ PSi ₇ | 434 | 2475 | 525744735 | 902 |
| 34 | Adenosine 5'-Phosphate 5TMS | C ₂₄ H ₄₁ N ₅ O ₉ PSi ₅ | 520 | 3132 | 66380886 | 776 |
| 35 | α-Tocopherol TMS | C ₃₂ H ₅₄ O ₂ Si | 533 | 3228 | 575984929 | 903 |
| 36 | 3-O-Feruloylquinic Acid 5TMS | C ₃₂ H ₄₆ O ₈ Si ₅ | 540 | 3279 | 683024379 | 820 |
| 37 | Chlorogenic Acid 6TMS | C ₃₄ H ₄₆ O ₈ Si ₆ | 543 | 3298 | 3292317512 | 779 |
| 38 | Mannobiose 8TMS | C ₃₂ H ₅₆ O ₁₁ Si ₈ | 567 | 3479 | 2142914778 | 850 |
| 39 | Stigmasterol TMS | C ₃₂ H ₅₄ O ₂ Si | 570 | 3501 | 482314345 | 843 |
| 40 | 3-hydroxystigmast-5-ene TMS | C ₃₂ H ₅₂ O ₂ Si | 585 | 3608 | 1079446063 | 918 |
| 41 | α-Amyrin TMS | C ₃₃ H ₅₈ O ₂ Si | 594 | 3678 | 305914381 | 888 |
| 42 | Sucrose 8TMS | C ₃₄ H ₆₀ O ₁₁ Si ₈ | 600 | 3718 | 1779898280 | 885 |



(E)-アコニット酸およびパルミチン酸における Peak True (デコンボリューション後、上段) スペクトルとライブラリスペクトル (下段) の比較。

保持時間指数 (Retention Index : RI) 値とデータベース検索結果を組み合わせることで、代謝物同定の確信度がさらに高まりました。図5に示すセリンおよびフィトールの例では、スペクトル類似度スコアはそれぞれ 966 および 945/1000 であり、RI 値はセリンが 1361 (参照値=1369)、フィトールが 2179 (参照値=2181) でした。

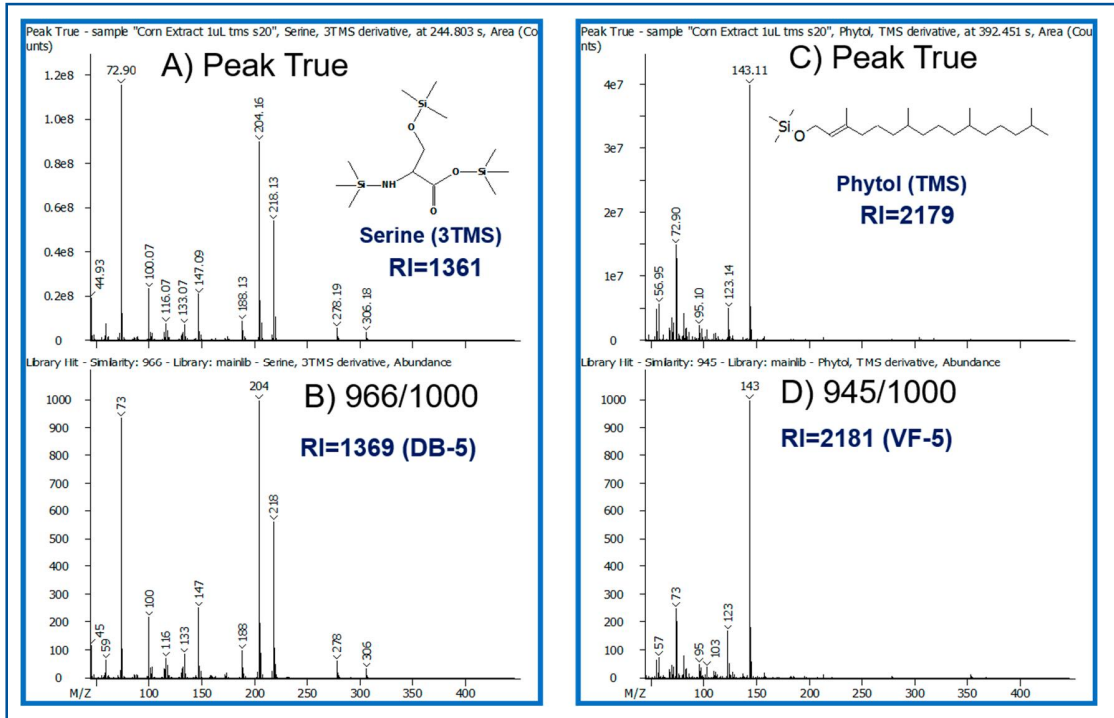


図5. セリンおよびフィトールにおける Peak True (デコンボリューション後、上段) スペクトルとライブラリスペクトル (下段) の比較。算出された RI 値も併記。

A ChromaTOF 5.0 の非常に有用な機能の一つが、包括的に取得したデータを、後処理でターゲット指向に解析できる点です。Target Analyte Finding (TAF) は、微量分析、定量分析、ならびに大規模データセットの処理に適しており、保持時間、フラグメントイオンおよび/または分子イオン、質量許容幅を活用することで、処理時間を大幅に短縮します (図6)。トウモロコシおよび米のデータファイルでは、合計 22 種類の代謝物をターゲットとして設定しました (図7、図8)。TAF の処理結果は、統計解析などのさらなる解析のために、処理中に容易にエクスポートすることが可能です。

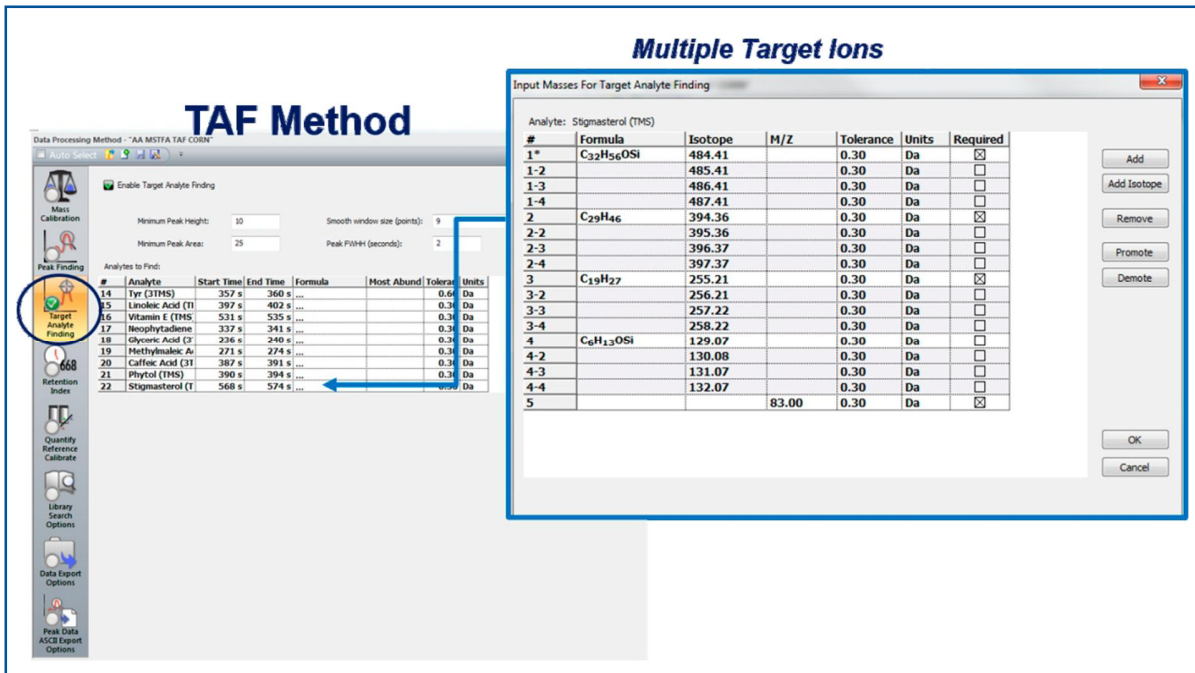


図6. ChromaTOF 5.0 における Target Analyte Finding (TAF) 処理手法。

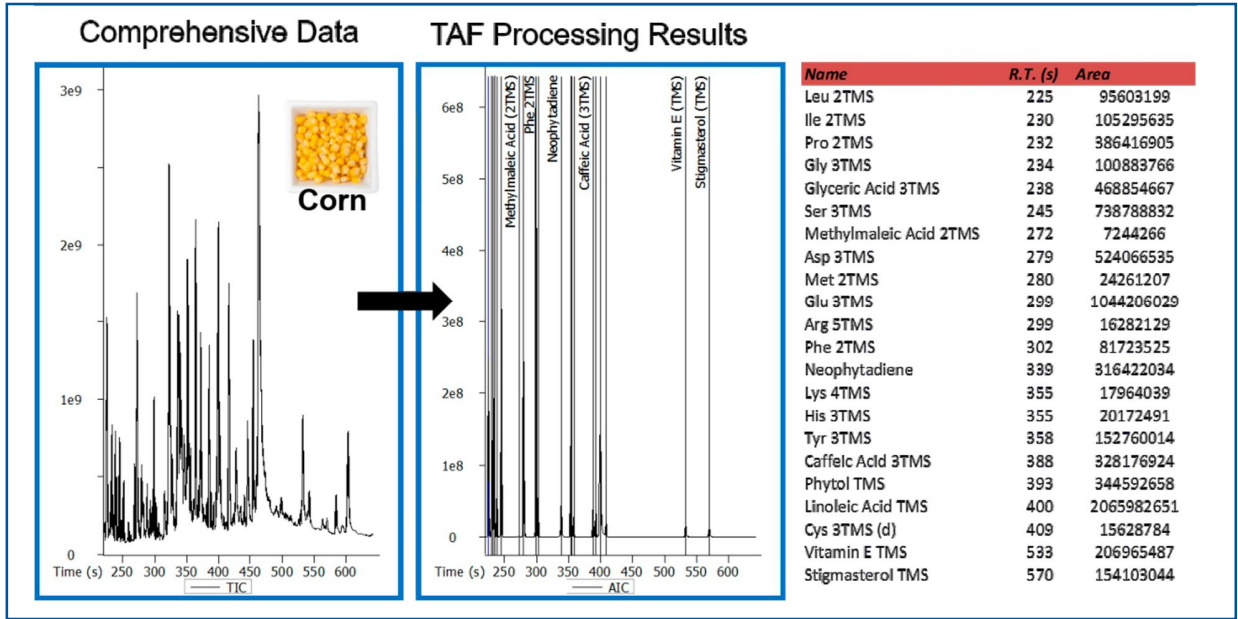


図7. TAF 処理結果 — トウモロコシ抽出物。

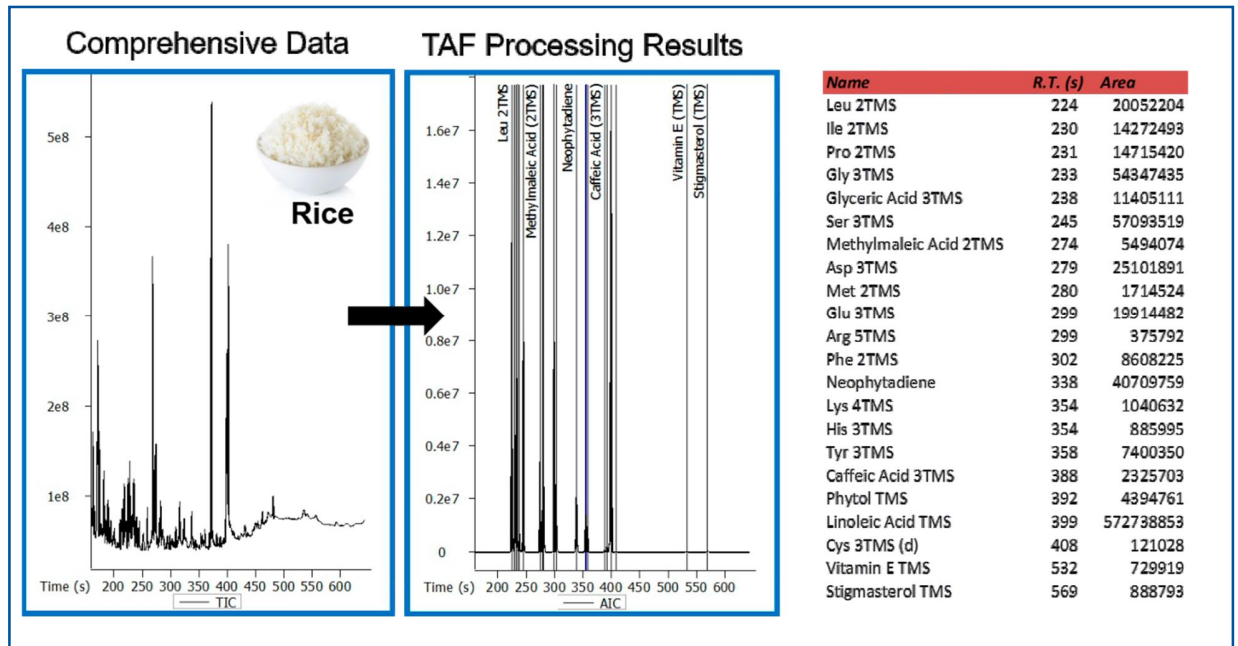


図8. TAF 処理結果 — 米抽出物。

4. Conclusion

LECO の Pegasus BT は、優れた感度と拡張された直線ダイナミックレンジを備えた、堅牢かつ高性能なベンチトップ型質量分析計です。Pegasus BT 本体と次世代 ChromaTOF ブランドソフトウェアを組み合わせることで、Peak Find による迅速な処理や、Target Analyte Finding を用いた後解析に対応可能な高品質データが得られました。Pegasus BT は、複雑な生体試料を迅速かつ効率的、かつ日常的に分析するための不可欠なツールです。

5. References

- ¹M. Chen, R.S.P. Rao, Y. Zhang, C. Zhong and J.J. Thelen, *The Crop Journal*, **2016**, 4, 177-187.
- ²M. Kusano, Z. Yang, Y. Okazaki, R. Nakabayashi, A. Fukushima and K. Saito, *Molecular Plant*, **2015**, 8, 58-67.
- ³Y. Okazaki and K. Saito, *Plant Biotechnol. Rep.*, **2012**, 6, 1-15.
- ⁴C. Simo, C. Ibanez, A. Valdes, A. Cifuentes and V. Garcia-Canas, *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, 15, 18941-18966.
- ⁵G. Astarita and J. Langridge, *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, **2013**, 6, 181-200.
- ⁶J.W. Allwood, A. Erban, S. De Koning, W.B. Dunn, A. Luedemann, A. Lommen, L. Kay, R. Loscher, J. Kopka, and R. Goodacre, *Metabolomics*, **2009**, 5, 479-496.



LECO, Pegasus, and ChromaTOF are trademarks of LECO Corporation.

LECO Corporation | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | 269-985-5496
info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2008 | HQ-Q-994 | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.