

植物の揮発性物質の捕集・分析

京都大学生態学研究センター
戦略的基礎研究推進事業 (CREST)

お ざ お
小 澤 り 香

はじめに

1980年代初頭より、植物が害虫に被害されると揮発性物質を放出し、これによって害虫の天敵が誘引されるという現象が明らかにされてきた (TAKABAYASHI and DICKE, 1996; DICKE, 2000)。害虫の総合防除において、植物由来の揮発性天敵誘引物質も、フェロモン等の昆虫由来の生理活性物質とともに重要な役割を担っていくものと期待される。さて、昆虫のみならず、植物から空気中に放出される揮発性物質も微量であるため、その分析は困難が伴うものであった。しかし、「キャピラリーカラムガスクロマトグラフ」, 「ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-MS)」の開発とその飛躍的な分析感度の上昇ならびに気相中の揮発性物質を直接捕集する方法の発達により、これまで困難であった植物揮発性成分の微量分析が再現性よく行えるようになった。また、捕集した試料の分析機器への導入方法に関しても工夫が加えられている。

本稿では、植物の揮発性物質の捕集・分析方法について解説する。特に捕集法のうち、①ガラス管に吸着剤を詰めた捕集管を用いる方法について述べたあと、②簡便な方法として最近用いられるようになってきた固相マイクロ抽出法 (SPME 法) について紹介する。

I 捕集管を用いる方法

吸着剤を用いた固体捕集法による揮発性物質の分析は、①気相中の揮発性物質の吸着剤による捕集、②吸着剤からの揮発成分の脱離および分析機器 (GC-MS) への導入、③揮発性物質の分析 (同定) の3段階に分けられる。各段階について順を追って解説する。

1 捕集

(1) 捕集方法

固体捕集法とは、吸着剤に揮発性成分を強制的に通過させることで、それらの物質を捕集濃縮する方法である。捕集には、吸着剤を主にガラス管に充てんし、両端

を石英ウールなどで留めたもの (捕集管) を使用する。空気中の不純物の吸着および捕集した試料の拡散を防ぐため、このような捕集管は密閉ができるものがよい。捕集管としてすでに吸着剤が充てんされたものも市販されているが、自分で充てんすることも可能である。捕集管は、エージング (洗浄) を行うことにより、通常数十回以上の使用に耐える。

図-1に、捕集管を用いた筆者らの捕集方法の概略図を示す。生物試料をガラス製の容器に入れ、実験室の空気をポンプで押し出し、洗浄後容器へ導入する。容器の出口に捕集管を取り付け、空気とともに流出する揮発性物質を捕集する。空気中の揮発性の不純物を除去するために、容量 500 ml のガラス管などに入れたシリカゲル、モレキュラーシーブス、粒状活性炭の中に、順に空気を通す。モレキュラーシーブスと活性炭は不純物の吸着のために、シリカゲルは水分除去のために用いている。また、捕集管の出口には、ニードルバルブの付いた流量計を取りつけている。流速はポンプへの電圧と流量計のバルブで調節している。また、活性炭のみで不純物の除去を行っている例も見られる (TURLINGS et al., 1998)。このほか、ガス販売会社で販売されている純度の高い合成空気 (純空気: CO < 1.0 ppm, CO₂ < 1.0 ppm, CH₄ < 1.0 ppm) を洗浄空気として用いることも可能である。さらに、容器としてポリエチレンテレフタレート (PET) 製の袋を用いる方法や、ガラス容

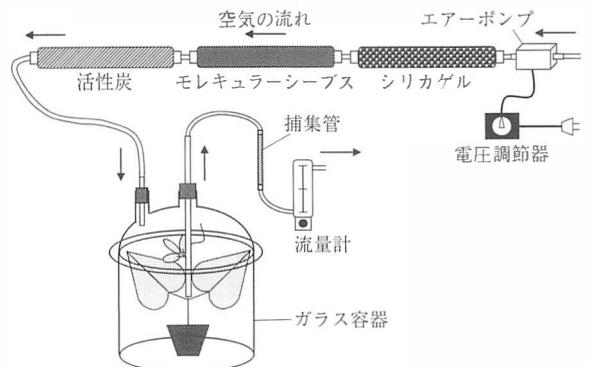


図-1 捕集管を用いた捕集方法の概略図

Methods for Collection and Analysis of Plant Volatiles.

By Rika Ozawa

(キーワード: 揮発性物質, GC-MS, 捕集, 機器分析)

器などにサンプルを入れ、空気の入り口に活性炭を詰めたフィルターを付け、出口に捕集管を取り付けポンプで吸引する方法も用いられている (RAGUSO and PELLMYR, 1998)。

(2) 吸着剤

気相中の低濃度の揮発性物質を捕集するために様々な吸着剤が利用されているが、植物の揮発性生理活性物質の捕集には、主として Tenax TA, Tenax GR, Porapak Q などのポリマー系の吸着剤が用いられている。Porapak Q は比較的熱に弱く、最高使用温度が 250°C である。このため、試料の脱離には溶媒抽出法が適しており、加熱脱着法を用いる場合は 180°C 以下で使用したほうがよい。これに対して、Tenax TA は比較的熱に強い (最高使用温度: 350°C) という特徴を持ち、加熱脱着法に適している。Tenax GR は、Tenax TA にグラファイトカーボンを 20~30% 混合したものである。

(3) 捕集の条件

捕集の際の条件としては、吸着剤の種類ほかに、捕集管の内径と長さ (吸着剤の量)、流速、試料の濃度、温度、湿度、捕集時間が挙げられる。固体捕集法は一種のガスクロマトグラフィーであり、捕集された物質は試料の捕集中にゆっくりと捕集管内を移動して、低分子量の物質の一部が捕集管を通過してしまう場合がある。このため、できるだけ高濃度の試料を短時間で捕集することが望ましい。上記の捕集条件はすべて試料の通過に影響を与える。後述する加熱脱着法では捕集管は規格化されたものとなるので、吸着剤の量は必ずと決定されるが、溶媒抽出法を用いる場合は、吸着剤の量を変化させることが可能である。ほかの条件が一定であるとき、一般に捕集管の長さが長いほど保持される物質の容量は大きくなる。試料の通過については、捕集管を 2 本直列に並べて捕集し、後方の捕集管に目的の揮発性物質がどのくらい検出されたかで検討することができる。筆者らは通常、Tenax TA (100 mg, 内径: 3 mm, 長さ: 11 cm) の捕集管を用いて毎分 100 ml の流速で 1 時間捕集を行っている。生物試料の量や質によって捕集時間などを変えることもある。

(4) 捕集における注意点

分析結果にサンプル以外のものに由来する不純物が検出されることがある。こうした不純物の混入は、捕集時と分析時の両方で起こる可能性があるが、捕集時に混入する不純物には、導入する空気、器具、吸着剤に由来するものが考えられる。分析した結果、不純物が検出された場合には、原因を一つずつ確認する。また、検出された成分が不純物か否かを確認するため、サンプルなし

(空気のみ) で捕集した対照区を設ける。

捕集時に不純物の混入を防ぐためには、①揮発性の不純物を放出しない器具を用いる (植物試料の場合、容器はガラス製、PET 製など光を通すものがよい)、②器具はよく洗浄する (溶媒での洗浄、加熱、水洗など)、③吸着剤の洗浄を行うことが重要である。③について具体的に説明を加えると、まず、購入した吸着剤や捕集管は、空焼き (コンディショニング) 済みでない場合、必ず洗浄する。吸着剤を捕集管に充てん前あるいは充てん後に有機溶媒により洗浄し、さらに不活性ガス (窒素ガスなど) を流しながら加熱 (空焼き) する。空気中での加熱や最高使用温度付近での長時間の加熱は、吸着剤の性質を変化させるため好ましくない。また、吸着剤は実験室内の揮発性物質も吸着するので、充てんは汚染のない環境で行いたい。

また、空焼きした捕集管を用いて捕集・分析したときに、必ずしもすべての試料が脱離するわけではなく、一部吸着したまま残る場合がある。分析に使用した捕集管をそのまま次の分析に用いると、残留した物質が検出される場合もあるので強制的に取り除く必要がある。この場合も十分な空焼きを行う。吸着剤の種類や量、また捕集の条件によって異なるが、筆者らは Tenax TA の捕集管を、市販の装置を用いて窒素ガスを毎分 40~50 ml 流しながら、300°C で 120~180 分間加熱している。加熱脱着の場合、1 度試料の脱離を行った捕集管を分析して何も検出されなければこのような処理は必要ではない。しかし、長期間使用しなかった捕集管を用いる場合は事前に空焼きすることが望ましい。

さらに、吸着させた試料はできるだけ早く分析する。すぐに分析できない場合は、捕集管のまま密閉し、冷暗所に保存するのが望ましい。

2 試料の導入

捕集した揮発性物質 (試料) の分析は、キャピラリー GC-MS のような分析機器を用いて行われる。試料は、分析機器に導入するため、吸着剤から脱離させるが、この脱離には主に二つの方法が用いられる。一つは、有機溶媒によって脱離する「溶媒抽出法」、もう一つは、吸着剤を加熱して脱離する「加熱脱着法」である。それぞれの方法の長所と短所を表-1 にまとめた。

溶媒抽出法では、有機溶媒を捕集管の一方より流し、吸着剤に吸着した試料を溶出させる。このとき溶出前あるいは溶出させた試料に内部標準物質を添加する。溶出用の有機溶媒としては、ヘキサン、ペンタン、ジエチルエーテル、ジクロロメタンなどが用いられている。クロロホルムを用いると、溶け出す吸着剤があるので注意が

表-1 固体捕集法の特徴

	捕集管法		SPME 法
	加熱脱着法	溶媒抽出法	
長所	<ul style="list-style-type: none"> 試料を全量分析機器に導入することが可能。 溶媒を用いないので溶媒由来の不純物による分析の妨害がない。 これらのため、微量成分が検出可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 特殊な分析装置や特殊な捕集管を必要としない。 溶出した試料の一部のみを分析に用いることができるため、複数回の分析や化学分析以外の目的に使用することが可能。ただしこの場合には、サンプル量を増やす必要がある。 	<ul style="list-style-type: none"> 操作が簡便である。 選択性を持つファイバーで、目的物質を捕集することができる。 試料は全量注入。 溶媒を用いないので溶媒由来の不純物による分析の妨害がない。
短所	<ul style="list-style-type: none"> 試料導入用の加熱脱着装置が必要であり、捕集管もこれにあわせてものが必要である。 熱分解する物質には適用することができない。 複数回の分析や多目的の使用が不可能。 感度が高いため、捕集量が多いと分析段階で飽和することがある。 	<ul style="list-style-type: none"> 溶媒を用いるため、分析結果が溶媒や溶媒中の不純物の影響を受ける。 試料の一部しか分析機器に導入できない。 これらのため試料中の微量成分の検出が困難。 	<ul style="list-style-type: none"> 捕集管を用いた方法と捕集された物質の比率が異なる。 複数回の分析や多目的の使用が不可能。

必要である。

加熱脱着法は、加熱脱着装置によって以下の順に試料が分析機器に導入される方法である (図-2)。①捕集管を加熱しながら、一定方向にキャリアガス (ヘリウムなど) を流し、吸着した揮発性物質を脱離させる。②脱離した物質を -100°C ~ -150°C に冷却したキャピラリー (細管) トラップで保持する。③次にキャピラリートラップを加熱し、揮発性物質をカラムに導入する。

AGELOPOULOS ら (1999) は、1枚の葉からの揮発性物質の捕集方法を考案し、溶媒抽出法と加熱脱着法の比較について述べている。彼らは揮発性物質の放出量の変化を見る場合、特に早い反応では、捕集時間が短時間で感度よく分析できる加熱脱着法を用いるのがよいとしている。さらに溶媒抽出法も併用すると、同定のための合成化合物との同時分析 (co-injection) や、電気生理学的試験・生物検定など化学分析とは異なる目的での使用もできるので有効であるとしている。

以上のように、それぞれの試料導入方法に特徴があるので、捕集方法 (吸着剤の種類や量、捕集時間、サンプル量) に合わせた試料導入方法の選択が可能である。捕集管を用いた固体捕集法に関しては、「有害大気汚染物質 測定の実際」(有害大気汚染物質測定の実際編集委員会, 1997) に詳細に記されている。

3 分析

揮発性物質の分析についてここではごく簡単に触れる。これに関しては数多くの解説や成書 (日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会, 1997; 日本分析

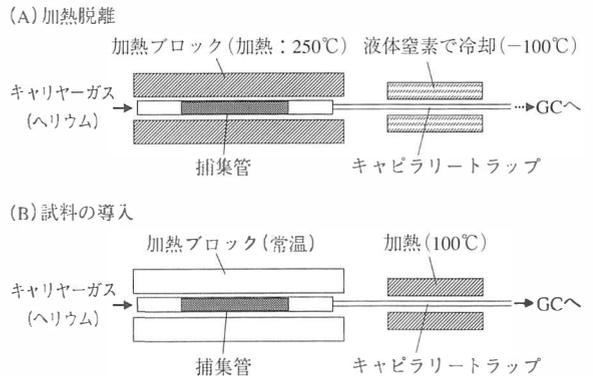


図-2 加熱脱着法の概念図

(A) 捕集管の部分を加熱し、揮発性の試料を脱離する。脱離された試料は冷却されたキャピラリートラップで保持・濃縮される。(B) キャピラリートラップを加熱し、試料をGCへ導入する。GCへの導入前にスプリットし、試料の導入量を調節できるタイプのものもある。

化学会, 2001) があるので、参考にされたい。

揮発性物質の分析には、検出器として質量分析計 (MS) を備えたキャピラリー GC-MS が最も信頼性のある検出・同定法として広く普及している。GC による物質の分離は、カラムの固定相 (液相) の種類、カラムの内径・長さ、液相の膜厚、キャリアーガスの流速、カラムの昇温条件に依存する。このうち、カラムの液相に関しては、その極性によって分析の対象となる物質が異なってくる。植物の揮発性物質の分析には一般に微極性または無極性の液相のカラムが用いられている。また、

カラムの初期温度は沸点の低い化合物の分析にも対応するため 30~40°C に設定されていることが多い。さて、GC-MS による定性分析において化合物同定の手がかりの一つは、化合物の保持時間（カラムから溶出される時間）である。分析の条件が一定である場合、分析結果の各成分のピークの保持時間は、化合物の固有値となるため、標準物質の保持時間との比較により成分の推定が可能である。ところが、保持時間の一致する異なる化合物が存在する場合もある。GC-MS の場合は、この保持時間に加えて質量スペクトルも同定の重要な手がかりとなる。捕集した揮発性物質の GC-MS 分析においては、主に化合物の質量スペクトルのライブラリー（データベース）が整っている電子イオン化 (EI) 法が利用されている。このライブラリーによって、パソコンで標準物質のスペクトルを検索して試料中に検出された物質のスペクトルと類似のものを選び出すことが可能である。この検索の際注意することは、この手法は試料成分のスペクトルと類似度の高いものを探し出すのであって、必ずしも同定に結びつかないことである。特に異なる化合物が極めてよく似た質量スペクトルを示す化合物群については、標準物質を分析し、その保持時間および質量スペクトルと比較することが必要となってくる。

II 固相マイクロ抽出法 (SPME 法)

固相マイクロ抽出法 (SPME 法) を用いたヘッドスペース捕集法とは、SPME ユニット (シグマアルドリッチジャパン) のファイバー部分を容器内の気相中に露出し、揮発性物質をファイバー部分へ分配・吸着させるものである。分配・吸着した試料の分析機器への導入は、このファイバーを GC の気化室 (インジェクションブロック) に露出することで行う。気化室で試料の拡散がないようにインジェクションブロック内に入れる専用のガラスインサートが市販されている。特に沸点の低い物質の分析には専用のインサートを用いることが好ましい。この方法の特徴は、捕集・分析操作が簡便なことである。また、極性或保持力の異なるファイバーがあり、目的とする化合物の性質に応じた選択性を持つファイバーを使用することができる。一例ではあるが、筆者らがファイバーとして低極性のポリジメチルシロキサン (PDMS, 膜厚 100 μm) と中~高極性のカーボワックス・ジビニルベンゼン (CW/DVB, 膜厚 65 μm) を用いて植物葉の揮発性物質の捕集・分析を行ったところ、PDMS に対して CW/DVB では低沸点化合物がよく検出される結果が得られた (図-3)。このほか、捕集した試料は分析機器に全量注入されるため、同じ試料での複

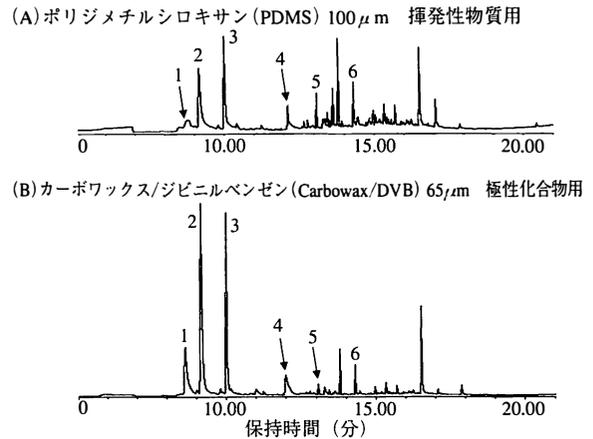


図-3 SPME法の異なるファイバーによる分析結果の違い

シロイチモジヨトウ幼虫に被害されたりマメ葉から放出される揮発性物質を異なるファイバー [(A) ポリジメチルシロキサン (100 μm), (B) カーボワックス・ジビニルベンゼン (65 μm)] を用いた SPME 法で同時に捕集し、GC-MS を用いて分析した。
 化合物: 1. (Z)-3-hexenyl acetate, 2. (E)- β -ocimene, 3. (E)-4, 8-dimethyl-1, 3, 7-nonatriene, 4. indole, 5. β -caryophyllene, 6. (E, E)-4, 8, 12-trimethyl-1, 3, 7, 11-tridecatetraene.

数回の分析や多目的の使用はできない (表-1)。

AGELOPOULOS and PIKETT (1998) は、吸着される物質の比率に注目し、炭素数 5 から 11 までの 10 種の揮発性生理活性物質について SPME 法とポリマー系の吸着剤 (Tenax TA, Porapak Q, Hayesep Q) を用いて分析結果の比較を行っている。その結果、ポリマー系の吸着剤はどれも、直接シリンジで気相を採取したものと比較して化合物の比率に差異はなかったが、SPME のファイバーとして PDMS (膜厚 100 μm) を用いた場合、10 種中 7 種の化合物の比率がポリマー系の吸着剤で捕集したものと異なっていた。彼らは、SPME 法ではファイバー上の物質の濃度に、化合物の化学的性質や実験条件などが部分的に影響すること、内部標準を加えることが困難なので定量性が確保できないことを指摘しており、SPME 法を用いた場合にほかの捕集分析方法も併用することを推奨している。

いくつかの批判はあるものの、SPME 法は捕集・分析操作が簡便であり、不純物の混入の可能性が低いことなどから、最近、特に PDMS を用いた SPME 法が注目を集めてきている (VERCAMMEN, 2002; W. BOLAND, 私信)。

おわりに

以上、簡単ではあるが、植物の揮発性物質の捕集方法

とその分析について紹介してきた。それぞれの方法に特徴があり、植物だけでなく幅広い生物試料に対応することが可能と思われる。近年、揮発性物質の捕集・試料導入方法の開発において操作の簡便性が図られているうえ、今後の分析機器の機能向上による分析感度の上昇も期待され、気相中の揮発性物質の捕集・分析という手法はますます利用しやすくなるであろう。本稿が揮発性生理活性物質を扱う際の一助となれば、幸いである。

謝辞

本稿は3月に行われた、第46回日本応用動物昆虫学会大会の小集会「操作実験における方法論」において口頭発表した内容をまとめたものである。本稿の掲載に当たりご尽力いただきました筑波大学戒能洋一博士、原稿につきましてご意見いただきました京都大学高林純示博士に深く感謝申し上げます。また、本稿に関連する研究は生物系特定産業技術推進機構(生研機構)ならびに科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業(CREST)の研究者として行ったものであり、両法人に感謝いたし

ます。

引用文献

- 1) AGELOPOULOS, N. G., et al. (1999): J. Chem. Ecol. 25: 1411~1425.
- 2) ——— and J. A. PIKETT (1998): ibid. 24: 1161~1173.
- 3) DICKE, M. (2000): The Ecology and Evolution of Inducible Defenses, Princeton University Press, Princeton, pp. 62~88.
- 4) 日本分析化学会 編 (2001): 分析化学便覧, 丸善, 東京, pp. 32~35, pp. 37~38, pp. 690~692.
- 5) 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会 編 (1997): キャピラリーガスクロマトグラフィー 基礎と応用, 朝倉書店, 東京, 159 pp.
- 6) RAGUSO, R. A. and O. PELLMYR (1998): OIKOS 81: 238~254.
- 7) TAKABAYASHI, J. and M. DICKE (1996): Tre. Plant Sci. 1: 109~113.
- 8) TURLINGS, T. C. J. et al. (1998): Planta 207: 146~152.
- 9) VERCAMMEN, J. (2002): Analytical Strategies for the Analysis of Volatiles Emitted by Living Organisms, Ph. D. thesis, Ghent Univ., 246 pp.
- 10) 有害大気汚染物質測定の実態編集委員会 編 (1997): 有害大気汚染物質測定の実態, (財)日本環境衛生センター, 川崎, 546 pp.

学 界 だ よ り

○第12回天敵利用研究会のご案内

■テーマ: 天敵利用の新しい潮流

■日時:

11月28日(木)13時~18時 (受付: 12時から)
懇親会: 18時~20時

11月29日(金) 9時~13時

■会場: キャンパスプラザ京都 TEL: 075-353-9111
京都市下京区西洞院通塩小路下る
JR 京都駅中央口前, 京都中央郵便局西側

■テーマ講演

- (1) 天敵を生かす農作物の虫媒ウイルス病対策を探る
一天敵利用を脅かす虫媒ウイルス病流行の新局面を迎えて— コーディネーター: 村井 保氏 (果樹研究所)
- ・施設害虫が媒介するウイルス病の流行が天敵利用に及ぼす影響 村井 保氏 (果樹研究所)
 - ・TYLCV 発生下での天敵利用の現状と問題点 杉山恵太郎氏 (静岡県農試)
 - ・天敵利用下でのウイルス病の防除をめざして— TYLCV を例に— 河合 章氏 (野茶研究所)
 - ・天敵利用技術と併用できる植物ワクチン(弱毒ウイルス) 技術の開発 津田新哉氏 (中央農総研セ)

総合討論

- (2) 新しい生物的防除素材を在来種に求める一天敵製剤, 輸入から輸出の時代へ—
- ・アリガタシマアザミウマの発見と製剤化 大石 毅氏 (沖縄県農試)
- (3) 天敵生物と複合交信攪乱剤との相互補完

—果樹園における IPM の新たな枠組み構築をめざして—

・複合交信攪乱剤を補完する害虫防除技術としての天敵利用 刑部正博氏 (京都大)

■一般講演 (約 20 題募集)

講演申込書に必要事項記載の上, 9月30日までに郵便, FAX または E-mail で大会事務局宛お送りください。講演要旨は要領にしたがって A4 版 1 枚におさまるように作成の上, 打ち出し原稿を郵便で, あるいは Windows 版ワープロソフト (一太郎または Word) の文書ファイルを E-mail で, 10月15日までに大会事務局宛お送りください。先着 20 題で締め切らせていただきます。

■参加申込

参加申込書に必要事項記載の上, 9月30日までに郵便, FAX または E-mail で大会事務局へお送りください。定員 (250 名) に達しましたら締め切らせていただきます。

■会費 (9月30日までに, 郵便振替で送金)

大会参加費: 3,000 円 (10月1日以降は 3,500 円),
懇親会費: 6,000 円, 郵便振替口座: 00980-0-178777,
天敵利用研究会京都大会事務局

■大会事務局と大会ホームページ

天敵利用研究会京都大会事務局 (代表: 高田 肇) 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1, 京都府立大学大学院農学研究科応用昆虫学研究室内, TEL: 075-703-5615, FAX: 075-703-5618, E-mail: h_takada@kpu.ac.jp (h の次は, アンダーラインです), 大会ホームページ: <http://homepage2.nifty.com/hiroshi-habikino/tentekiriyouthm>