

メタノール濃度およびカラム温度がアブシジン酸、インドール-3-酢酸およびゼアチンの保持時間におよぼす影響

太田祐樹¹・村田憲昭²・知野秀次¹・児島清秀^{1*}

(平成19年12月28日受付)

要約

HPLCによって植物ホルモンを効率的に精製するために、ODSタイプのカラムにおけるアブシジン酸(ABA)、トランス-アブシジン酸(t-ABA)インドール-3-酢酸(IAA)およびゼアチン(Z)の保持時間を測定し、メタノール濃度またはカラム温度がこれらの保持時間におよぼす影響を示した。30℃のカラム温度で35% MeOHの溶離液での分析条件において、4つの標準物質はZ(8.0分)、IAA(44分)、t-ABA(60分)、ABA(93分)の順に溶出した。35% MeOHでカラム温度を30℃から50℃に上昇させたとき、4つの標準物質の溶出の順序は変化しなかったが、温度が増加するにつれてABA、t-ABAおよびIAAが早く溶離した。しかしながら、Zの保持時間はカラム温度が30℃から50℃に増加してもほとんど変化しなかった。45% MeOHおよび50% MeOHの溶離液において、標準物質の溶出の順序(Z→IAA→t-ABA→ABA)は35% MeOHと同様であり、MeOH濃度が上昇するにつれてZ、ABA、t-ABAおよびIAAが早く溶離した。標準物質の保持時間はカラム温度と高い相関があり、全標準物質における回帰直線のR²値は全てのメタノール濃度で高かった。全標準物質において、MeOH濃度が高くなると、保持時間とカラム温度の間の回帰直線の傾きは減少した。これらの結果から、HPLCカラムにおける植物ホルモンの保持時間とカラム温度およびMeOH濃度の組み合わせの関係が示された。

キーワード：アブシジン酸、インドール-3-酢酸、HPLC、カラム温度、ゼアチン

新大農研報, 60(2):119-122, 2008

植物ホルモンの研究において、きわめて低い濃度でしか存在しないホルモンの定量・定性には夾雑物の分離、精製など多くのステップが必要である(高橋, 1989)。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は分離が高性能で定量性と再現性が高いことから(波多野・花井, 1988)、植物ホルモンの分析における試料の精製に利用されている(Kojimaら, 1995; Kojimaら, 2002; 知野ら, 2007)。

精製のためのHPLCの利用には、カラム(固定相・粒子径・長さ・官能基)、溶媒(溶離液・濃度)、流速、pH、温度などから最適な条件を決定する必要がある。

これら条件のうち、分析時の温度(本試験ではカラムの温度)は試料の溶出挙動に影響を与える要因である。一般的には、加温により、試料の保持時間が小さくなり、カラムの理論段高さ(HETP: Height Equivalent of a Theoretical Plate)の低下による理論段数の上昇が起こる(中村, 2000)。しかし、物質によっては加温により保持時間が大きくなる報告もある(Morin, 1998)。

HPLCを用いた植物ホルモンの分析において、児島ら(2000)により、最適な試料注入量、溶離液のメタノール濃度と保持時間の関係、カラムタイプにおける植物ホルモンの溶出順序が報告された。しかしながら、温度と保持時間の関係についての報告はない。

そこで、カラム温度と保持時間の関係を調査するため、様々なメタノール濃度および温度における、植物ホルモンのインドール-3-酢酸(IAA)、アブシジン酸(ABA)、ゼアチン(Z)の保持時間へ影響を試験した。

分析条件

試薬

植物ホルモンの標準品として、IAA(indole-3-acetic acid)、cis-ABA(cis-abscisic acid)およびサイトカイニンのZ(trans-zeatin)を用い、ABA溶液は太陽光下に数時間置くことで、約半分をt-ABA(trans-abscisic acid)に変換させた。ホルモンの濃度はすべて10⁻⁶Mで、それらを混合し試料薬品とした(IAA:ABA:Z=2:1:1)。

HPLC

UV検出器(UV波長280nm; L-7100、日立)を装備したHPLCシステム(ポンプ; L-7100、日立; カラムオープン; 554、GL Sciences; インテグレーター; D-7500、日立; デガッサー; KT-27、Shodex)、カラムInertsil ODS-3(5μm、6.0mm i.d. × 250mm、GL Sciences)を用いた。試料薬品はリーディング(HPLCのクロマトグラムで示される、ピークが広がる現象)の出ない量の40μlを注入し(児島ら, 2000)、流量1ml/minで0.1%酢酸を含む50%、40%、35%のメタノール濃度でイソクラティック溶離した。カラム温度は、30から50℃まで5℃ごとに変化させ保持時間を試験した。

結果および考察

それぞれの植物ホルモンにおける、溶離液のメタノール濃度とカラム温度の関係をFig. 1に、それぞれの傾きと決定係数(R²: 寄与率)をTable 1に示す。温度による、溶出順序の変化は示されず、溶離液のいずれの濃度でも、Z→IAA→

¹新潟大学自然科学研究科

²新潟大学農学部

* 代表著者: kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

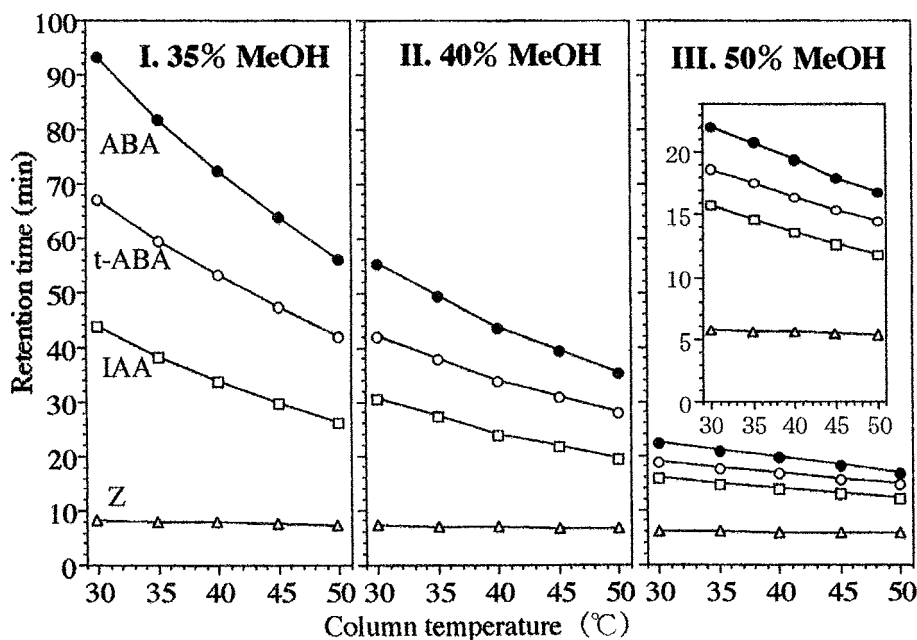


Fig.1. Effect of column temperature (oven) on retention time of four standards in three MeOH concentration of eluent Column, Inertsil ODS-3 (6x250) ; Flow rate, 1 ml/min; Inject volume, <40 μ l.

Table1. Inclination and R2 of retention time of four standards in three MeOH concentration of eluent and column temperature

MeOH conc	35%		40%		50%	
	Inclination*	R ²	Inclination	R ²	Inclination	R ²
Z	0.043	0.953	0.031	0.998	0.015	0.998
IAA	0.867	0.991	0.547	0.995	0.197	0.999
t-ABA	1.244	0.995	0.701	0.996	0.211	1.000
c-ABA	1.851	0.994	0.988	0.996	0.271	1.000

* Inclination was absolute value.

t-ABA → c-ABA の順であった。

ゼアチン

カラム温度およびメタノール濃度の変化に関わらず、保持時間の変化は示されなかった。したがって、本実験の試験範囲 (30-50℃) では温度の影響はほぼ無いことが示唆される。

IAA および ABA

それぞれの保持時間は、溶離液の3つのメタノール濃度の全てで、温度上昇にともなって早くなった。溶離液のメタノール濃度 35% と 50% を比較すると、IAA、t-ABA および c-ABA それぞれの保持時間の差は、30℃ で 28 分、48 分および 72 分であるが、50℃ では、10 分、24 分および 35 分と差が小さくなった。

標準物質の保持時間はカラム温度と高い相関があり、全標準物質における回帰直線の R² 値は全てのメタノール濃度で高かった。全標準物質において、MeOH 濃度が高くなると、保持時間とカラム温度の間の回帰直線の傾きは IAA (0.867 → 0.197)、t-ABA (1.244 → 0.211)、c-ABA (1.851 → 0.271) と減少した。

カラム温度と保持時間

カラムの分離性能は理論段数が大きいほど分離能が高く、理

論段数は次の式で表される (中村, 2006)。

$N=L/(H \cdot dp)$ (N; 理論段数, L; カラムの長さ, H; 理論段高さ, dp; 粒子径)

この場合、カラムの長さ (L) と粒子径 (dp) は一定であるので、簡略化すると

$N=1/H$ (式 1) となる。

したがって、理論段高さ (H) を小さくすれば、理論段数 (N) は高くなる。

理論段高さは van-Deemer 式で表され、温度による影響を示す Wilke-Chang 式とあわせると次の式で表される。

$H=\eta/(kt \cdot T) \cdot d^2 \cdot v$ (η ; 溶媒の粘度, k; 溶媒の分子量, T; 温度, d; 粒子径, v; 線速度)

この場合、溶媒の分子量 (k)、粒子径 (d)、線速度 (v) は一定であるので、簡略化すると

$H=\eta/T$ (式 2) となる。

式 2 より、温度 (T) の上昇もしくは溶媒の粘度 (η) の低下によって理論段高さの値が小さくなる (中村, 2000)。

本実験の結果は、カラム温度の上昇により保持時間が低下した。式 1 および 2 から、温度上昇 → 理論段高さの低下 (理論段数の上昇) → 保持時間の縮小が起きていると考えられる。

カラム温度と移動相粘度

本実験で用いた水-メタノール混合系の移動相の粘度は、濃度 50% で最大値を示す (中村, 2002)。式 2 から、粘度の影響はメタノール濃度 50% で最大となり、理論段高さも最大値を示すと考えられるが、保持時間の変化が示されなかった、したがって粘度の保持時間への影響はほとんど無い。これは植物ホルモンの保持時間が、メタノール濃度が上昇するにつれて小さくなるためであろう (児島ら, 2000)。

また、カラムの圧力損失 (背圧の減少) には溶媒の粘度が関係し、次の式で表される (中村, 2006)。

$P=k(\eta \cdot L \cdot v / d^2)$ (P; 圧力, k; 定数, η ; 溶媒の粘度, L; カラムの長さ, v; 線速度, d; 粒子径)

この場合、カラムの長さ (L) 線速度 (v)、粒子径 (d) は一定であるので、簡略化すると

$P=k \cdot \eta$ (式 3) となる。

水およびメタノールの粘度は温度上昇に伴って低下する。したがって、式 3 より温度上昇にともなって背圧の低下が起こる。

式 2 および式 3 より、温度の上昇による移動相の粘性の低下が起こり、温度上昇と粘度低下による理論段高さの低下 (理論段数の上昇) がおこることで分離能が向上する。したがって、背圧の減少とあわせ、効果的な分析時間の短縮が可能になる。

しかしながら、一般的には、温度上昇に伴ってホルモンの分解が起こると示唆されていることから、それぞれのホルモンに対する適切な温度の選択が必要である。

謝辞

本研究に協力いただいた、植物生産学コースの皆様には感謝申し上げます。

引用文献

- 知野秀次・児島清秀・小式澤一博・太田祐樹・中島正男・大竹憲邦・大山卓爾. 2007. 2種類の HPLC カラムで精製したニンニク (*Allium Sativum* L.) のインドール-3-酢酸, アブシジン酸およびジベレリンの GC-MS 分析. *新大農研報*, **59**: 82-86.
- 波多野博行・花井俊彦. 1988. *新版実験高速液体クロマトグラフィ*: pp. 1-22. 化学同人. 東京.
- Kojima, K., A. Goto and Y. Yamada. 1995. Simultaneous measurement for ABA, IAA and GAs in citrus fruits. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.*, **27**: 1-10.
- 児島清秀・鈴木さより・韓東生. 2000. 植物ホルモンの分析に用いる HPLC カラムの諸特性. *新大農研報*, **53**: 9-16.
- Kojima, K., E. Ohtake and Yu, Z. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. *Plant Growth Regul.*, **37**: 249-254.
- Morin, N., Y. C. Guillaume, E. Peyrin and J. C. Roland. 1998. Retention Mechanism study of imidazole derivatives on a β -cyclodextrin-bonded stationary phase. *Thermal Analysis Contributions. Anal. Chem.*, **70**: 2819-2826.
- 中村 洋. 2000. *高速液体クロマトグラフィ*ハンドブック. pp.217-219. 丸善. 東京.
- 中村 洋. 2002. *液クロ 龍の巻*. p.72. 丸善. 東京.
- 中村 洋. 2006. *液クロ 文の巻*. pp.102-107. 丸善. 東京.
- 高橋 信孝. 1989. *植物化学調節実験法*. 植物化学調節学会. 東京.

Effects of Methanol Concentration and Temperature on Retention Time of Abscisic Acid, Indole-3-acetic Acid and Zeatin

Yuuki OHTA¹, Yoshiaki MURATA², Syuuji CHINO¹ and Kiyohide KOJIMA^{1*}

(Received December 28, 2007)

Summary

These results showed the relationship between the retention times of plant hormones in a HPLC column and combination of column temperature and MeOH concentration. In all standard substances, as MeOH concentration was increased, inclination values of liner regression between retention time and column temperature were decreased. The retention times of standard substances have a correlation with column temperature, and R^2 values of liner regression in all standard substances were high in all MeOH concentrations. In the eluent of 40% and 50% MeOH, the orders of retention times of authentic standards (Z → IAA → t-ABA → ABA) were identical to 35% MeOH, as MeOH concentration increased, Z, ABA, t-ABA and IAA were eluted rapidly. However, the retention time of Z has hardly changed when the column temperature was increased from 30°C to 50°C. When the column temperature was increased from 30°C to 50°C with 35% MeOH, the order of elution of four standard substances did not change, but as the column temperature increased, ABA, t-ABA and IAA were eluted rapidly. In the analysis condition with eluent of 35% methanol (MeOH) and column temperature at 30°C, four authentic standards were eluted in order of Z (8.0 min), IAA (44 min), t-ABA (60 min), ABA (93 min). The retention times of Abscisic acid (ABA), trans-Abscisic acid (t-ABA), indole-3-acetic acid (IAA) and zeatin (Z) in a column of ODS type were determined to refine plant hormones efficiently by a HPLC (high performance liquid chromatography), which showed the effects of methanol concentration or temperature on retention times of these standards.

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 60(2):119-122, 2008

Key words : abscisic acid, column temperature, HPLC, indole-3-acetic acid, zeatin

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Niigata University

*Corresponding author : kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp