

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

知野秀次¹・児島清秀^{1*}・小式澤一博¹・太田祐樹¹・中島正男²・大竹憲邦³・大山卓爾³

(平成19年1月10日受付)

要 約

本研究は、HPLCのみで植物ホルモンを精製するために、容量の多いカラム(粗精製カラム)の次に容量の少ないカラム(本精製カラム)で溶離させる精製方法(2段階精製法)を検討した。両カラムにおいて5つの標準物質は、GA₁、IAA、t-ABA、ABA、GA₄の順に溶出した。本精製カラムの分離能は粗精製カラムより高く、2段階精製法によって精製能が向上した。さらに、GC-MSにおける標準物質(IAA、ABA、GA₁、GA₄)および内部標準物質(¹³C₆-IAA、d₆-ABA、[²H₂]-GA₁、[²H₂]-GA₄)のマススペクトルを示した。2段階精製法によって精製した休眠期のニンニクの内生ABA(52.5 pmol/g生重量)をGC-MSによって定量した。

新大農研報, 59:82-86, 2007

キーワード: 植物ホルモン、内部標準物質、保持時間、マススペクトル

鱗形球根の休眠の導入と打破の生理的制御には植物ホルモンのインドール-3-酢酸(IAA)、アブシジン酸(ABA)およびジベレリン(GA₅)が関与していると考えられている(加藤, 1988)。タマネギは、休眠中にオーキシン類が増加し、萌芽時にGA₅が増加する(Thomas, 1969)。さらに、萌芽時にABAが減少する(Teamworkら, 1969)と報告されている。これらの植物ホルモンは、質量分析計(MS)によって信頼性の高い定量が可能であるが、極めて低い濃度でしか存在しないため、様々な精製のステップが必要である。特に、GA₅の精製には様々なカラムクロマトグラフィーが使用されてきたが、これらの精製ステップは熟練が必要である。一方、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、分析条件が開発できればマニュアル通りの操作で精製ができる。近年、HPLCは性能が向上するとともに安価になったため、研究室レベルで複数台の使用が可能になった。一般に、HPLCのカラムは同じ長さであれば、容量が大きい(カラムの断面積が広い)と分離能は低く、容量が少ない(カラムの断面積が狭い)ほど分離能が高い。また、同じ容量のカラムであれば、長いカラムほど分離能が高い。そこで、HPLCによる植物ホルモンの精製能は、容量が多いカラム(以後、粗精製カラム)で分取し、次に容量は少ないが分離能が高いカラム(以後、本精製カラム)で分取する方法(以後、2段階精製法)によって、精製効率と分離能が向上すると考えられる。

本研究は、植物ホルモンのIAA、ABA、GA₁およびGA₄に関して、HPLCのみによる精製を目的として、粗精製と本精製カラムの保持時間を示し、これまで植物ホルモンの分析に使用されてないタイプのガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)の分析条件を検討し、標準物質および内部標準物質のマススペクトルを示した。さらに、この精製方法によってニンニクの球根における内生ホルモンの定量を試みた。

材料および方法

1. 植物材料

植物材料は、青森県の生産者から入手したニンニク(*Allium sativum* L. '福地ホワイト')を使用した。

2. IAA、ABAおよびGA₅の抽出・精製

試料(352 g生重量)には、ポリビニルピロリドン(0.6 g/L)と2,6-Di-t-butyl-4-met-hylphenol(0.22 g/L)を含む等量の80% MeOHを加え、-30℃で24時間浸漬した。その後、試料をホモジナイザーで破碎し、再度、-30℃で24時間浸漬した。浸漬後、ハイガーゼおよび濾紙(ADVANTEC 2、東洋濾紙)を使用して試料残渣を取り除いた。さらに、濾液をメンブレンフィルター(0.2 μm、日本ミリポア)で濾過した。得られた1000 mLの濾液は抽出・精製まで-30℃で保存した。

IAAおよびABAの分配抽出は、Kojima(1995)の報告に従った。抽出に使用した濾液は、30 mL(約10 g生重量)とした。濾液には、内部標準としてd₆-ABAと¹³C₆-IAAをそれぞれ4000 pmol添加し、減圧濃縮した。得られた水層は、pH 2.8に調整し、等量のジエチルエーテルで2回分配抽出した。回収したジエチルエーテル層は減圧濃縮し、残渣を500 μLの100% MeOHで4回溶解した。回収した残渣溶液はシリンジフィルター(0.2 μm、日本ミリポア)に通した。濾液は、HPLCによる精製と分取まで-30℃で保存した。

GA₅の分配抽出は、Kojimaら(1996)の報告に従った。GA₁とGA₄の抽出は、得られた濾液の300 mL(約100 g生重量)を使用し、内部標準として[²H₂]-GA₁と[²H₂]-GA₄をそれぞれ2000 pmol添加し、減圧濃縮した。得られた水層は、pH 8.0に調整し、等量のヘキサンで1回分配した。回収した水層は、pH 2.5に調整し、等量の酢酸エチルで3回分配抽出した。その後、回収した酢酸エチル層に含まれる水分を除去するため、1/10量(20 g)の無水硫酸ナトリウムを加え、一時間後に濾過(ADVANTEC 2、東洋濾紙)した。回収した酢酸エチル層は、

¹新潟大学大学院 自然科学研究科

²(株) 日本電磁測器

³新潟大学 農学部

* 代表著者 kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

表1. HPLC カラムにおける IAA, ABA および GA₅ の保持時間

カラム	MeOH (%)	保持時間 (分)				
		IAA	t-ABA	ABA	GA1	GA4
粗精製カラム (10.0×250 mm)	40	41.1±0.3	57.8±0.3	76.5±0.5	39.5±0.6	-
	50	21.1±0.3	26.6±0.2	32.0±0.3	20.1±0.0	125.2±0.1
	60	13.9±0.0	15.2±0.0	17.0±0.0	13.9±0.0	47.9±0.1
本精製カラム (6.0×250 mm ×2)	50	57.3±0.4	68.8±0.8	81.4±1.0	53.1±0.3	-
	60	38.6±0.1	42.3±0.1	46.6±0.1	36.0±0.2	126.5±0.5
	70	29.4±0.1	31.5±0.1	33.4±0.1	29.1±0.1	62.5±0.3

±は測定値の標準偏差 (n=3) を示す。

減圧下の遠心乾燥器内で乾固させた。その後は、IAA および ABA の抽出と同様に行った。

精製および分取は、日立 (Diode Array 検出器; L-7455) および島津 (UV-VIS 検出器; SPD-10Avp) システムを使用した。Diode Array 検出器および UV 検出器の波長は、280 nm (IAA)、254 nm (ABA) および 210 nm (GA₅) に設定した。カラムは、Inertsil ODS-3 (粒径 5 μm、内径 10.0 mm × 長さ 250 mm、GL Science) カラム (以後、粗精製カラム) と 2 本の Inertsil ODS-3 (粒径 5 μm、内径 6.0 mm × 長さ 250 mm; GL Science) カラムを直列につないだカラム (以後、本精製カラム) を使用した。分取した画分は、減圧下で乾燥させ、五酸化ニリンを適量入れた容器内で保管した。

3. GC-MS 分析

誘導体化は Livier ら (1977) の方法に従い、ジアゾメタンによってメチル化した。IAA、ABA、GA₁ および GA₄ の定量は GC-MS (M-9000 形 GC/3DQMS、日立) を使用し、測定試料のイオン化は電子衝突 (EI) 法で行った。カラムは CP-SIL 8 (0.25 mm × 30 m、J & W) を使用した。キャリアガスは、高純度ヘリウムガスを使用し、1.0 mL/min の流量に設定した。注入口と 3 DQ の温度は 230°C および 250°C とし、エミッション電流は 20 μA に設定した。エレクトロンマルチプライアは、IAA および ABA 分析は 1400 eV、GA₅ 分析は 1500 eV に設定した。

結果および考察

1. HPLC カラムの標準物質の保持時間と溶離パターン

一般的に、溶離液のメタノール濃度を下げると分離は良くなるが、分析時間は長くなる。そこで、使用する材料に含まれる夾雑物の程度と分析時間を考慮し、実用的なメタノール濃度の範囲で試験した。表1は粗精製と本精製カラムにおける保持時間の結果であり、5種類の標準物質は GA₁、IAA、t-ABA、ABA、GA₄ の順に溶出した。

粗精製カラムにおいて、60% MeOH で溶離した時の GA₅ とニンニク抽出液のクロマトグラムを図1の A および B に示した。ニンニク抽出液 (図1の B) のクロマトグラム上に、夾雑物によって図1の A のような明瞭な GA₁ および GA₄ のピークを確認することができなかった。そこで、標準物質と少量のサンプルを混合して重ね打ちした (図1の C)。その結果、図1の B で確認することができなかった GA₁ および GA₄ のピークを図

1の C で確認することができた。さらに、図1の C で検出されたピークは、図1の A の GA₁ および GA₄ の保持時間と一致した。手動で分取を行う場合、標準物質による保持時間の確認と同様に、試料の溶離パターンの把握は重要である。そのため、試料の溶離パターンの把握には、重ね打ちが有効な手段と考えられる。

しかし、粗精製カラムでは、溶離液の MeOH 濃度を下げても、目的の植物ホルモンと夾雑物を分離させることができなかった。そこで、本精製カラムによる溶離を試み、60% MeOH で溶離した時の GA₅ とニンニク抽出液のクロマトグラムを図1の D および E に示した。粗精製カラムと同様に、ニンニク抽出液 (図1の E) のクロマトグラム上に GA₁ および GA₄ のピークを確認することができなかったため、重ね打ちをした。その結果、図1の E で確認することができなかった GA₁ および

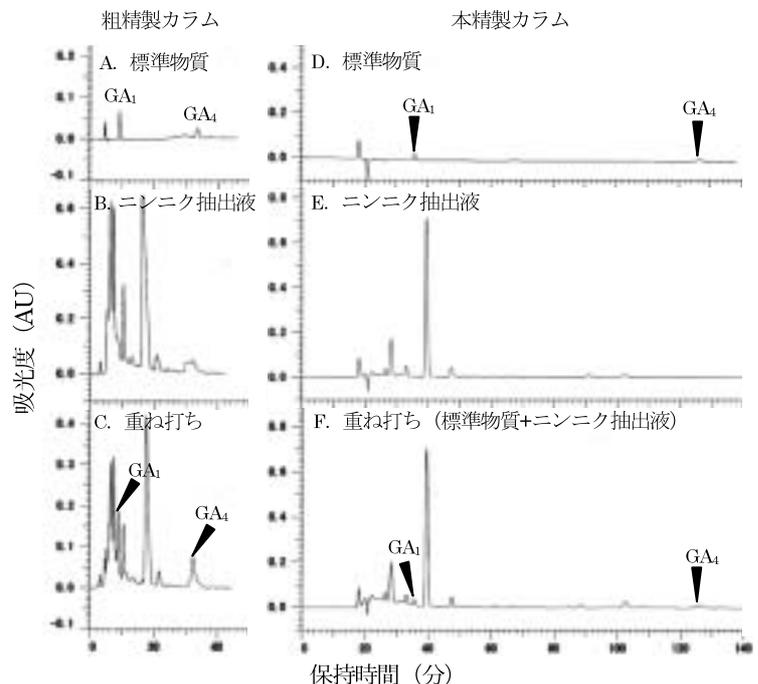


図1. 粗精製および本精製カラムにおける標準物質 (GA₅) とニンニク抽出液のクロマトグラム
溶離液は60% MeOH を使用した。

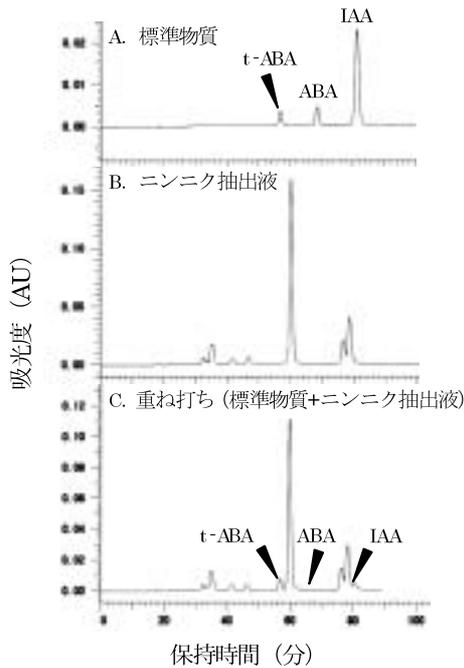


図2. 本精製カラムにおける標準物質 (IAA, t-ABA および ABA) とニンニク抽出液のクロマトグラム
溶離液は60% MeOH を使用した.

GA₄のピークを図1のFでは確認することができた。

図1の重ね打ちのクロマトグラムにおいて、粗精製カラム(図1のC)では波長210nmで見えるGA₁と夾雑物のピークは分離していないが、本精製カラム(図1のF)では完全に分離していた。これは、粗製カラムより本精製カラムの分離能が高いことを示している。

IAA, t-ABA および ABA において、粗精製カラム(データ略)では夾雑物との分離が困難であったが、本精製カラム(図2のA, B および C)では分離し、GA₅と同様に保持時間とクロマトグラムのパターンを確認することができた。しかしながら、IAA に関しては、60% MeOH の溶離液濃度では夾雑物と分離してないため、溶離液の濃度を下げる必要があった。

2. IAA, ABA および GA₄ のマススペクトル

IAA および ¹³C₆-IAA を GC-MS に注入した時、189 m/z に分子イオン、130 m/z に特徴的なフラグメントイオンが検出された(図3のA)。さらに、IAA に内部標準物質である ¹³C₆-IAA を加えて GC-MS に注入した時、IAA の分子イオンとフラグメントイオンのほかに ¹³C₆-IAA の分子イオン(195)とフラグメントイオン(136)が検出された(図3のB)。これらの結果は、以前の Livier と Saugy (1986) の報告と一致した。

ABA および d₆-ABA のマススペクトルでは、それぞれの特徴的なフラグメントイオンは検出されたが、分子イオンが検出されなかった(図3のD および E)。この原因は不明であるが、分析機器の性質かもしれない。しかし、検出された ABA および d₆-ABA は特徴的なフラグメントは、Cohen ら (1986) および Rivier ら (1977) の報告と一致した。

GA₁, [²H₂]-GA₁, GA₄ および [²H₂]-GA₄ のマススペクトルでは、ABA と同様に特徴的なフラグメントイオンは検出されたが、分子イオンが検出されなかった(図4のA および B、図5)。

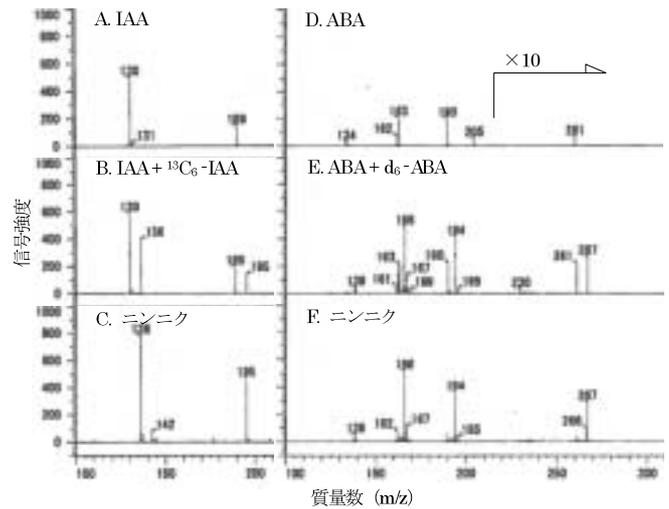


図3. 標準物質 (IAA, ABA), 内部標準物質 (¹³C₆-IAA, d₆-ABA) およびニンニク抽出液のマススペクトル

しかし、検出された GA₁, [²H₂]-GA₁, GA₄ および [²H₂]-GA₄ の特徴的なフラグメントは、Binks ら (1969) と Rivier ら (1981) の以前の報告とほぼ一致した。

この GC-MS において、定量用の最適な標準物質と内部標準物質のイオン対は、IAA が 130/136 (IAA/¹³C₆-IAA) m/z と 185/195 m/z (図3のB)、ABA は 190/194 (ABA/d₆-ABA) m/z と 261/267 m/z (図3のE)、GA₁ は 330/332 (GA₁/²H₂-GA₁) m/z と 312/314 m/z (図4のA および B)、GA₄ は 225/227 (GA₄/²H₂-GA₄) m/z と 284/286 m/z であった。

3. ニンニクの IAA, ABA および GA₄ の定性および定量

ニンニク抽出液において、ABA の保持時間に分取した画分には ABA と d₆-ABA の特徴的なフラグメントイオンが検出され(図3のF)、ニンニク抽出液と混合試料(図3のE)のマススペクトルがほぼ一致した。よって、ニンニクの内生 ABA を定性することができた。さらに、ABA と d₆-ABA の特徴的なフラグメントイオン対 (190/194 m/z と 261/267 m/z) から内生 ABA 量を算出したところ、休眠状態のニンニクにおける ABA は 52.5 pmol/g 生重量であった。

ニンニク抽出液における IAA および GA₄ の画分では、内部

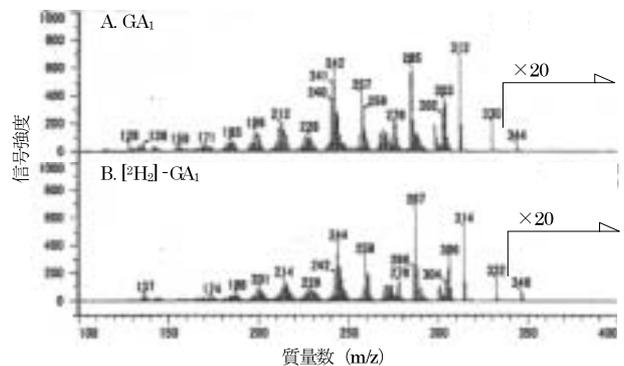


図4. 標準物質の GA₁ および内部標準物質の [²H₂]-GA₁ のマススペクトル

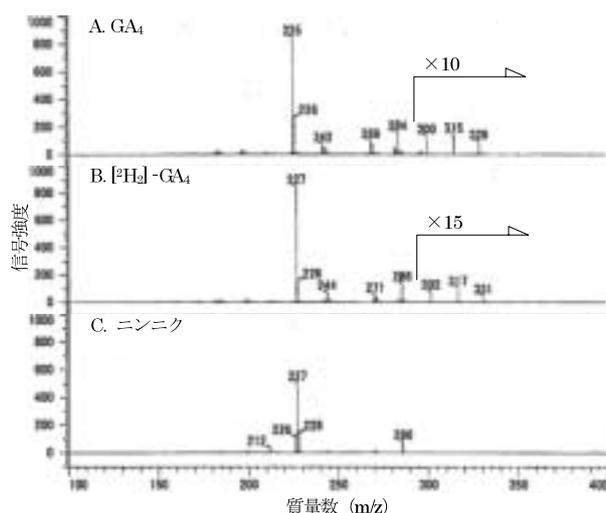


図5. 標準物質のGA₄, 内部標準物質の[²H₂]-GA₄およびニンニク抽出液のマススペクトル

標準物質の分子イオンおよびフラグメントイオンが検出されたが、内生 IAA および GA₄ のイオンピークの強度はベースライン以下であった (図3のC および図5のC)。しかしながら、前述のそれぞれのフラグメントイオン対から内生量を計算したら、内生 IAA は1.1 pmol/g 生重量以下、内生 GA₄ は0.24 pmol/g 生重量以下と推定された。

以上の結果から、粗精製カラムと本精製カラムを併用した精製方法でニンニクの内生 ABA を定量することができた。さらに、IAA および GA₄ の正確な内生量は示すことはできなかったが、内部標準物質の特徴的な分子イオンまたはフラグメントイオンが検出されたことから、本方法で植物ホルモンの精製が可能であることが示された。

引用文献

- Binks, R., J. MacMillan and R. J. Pryce. 1969. Plant hormones-Ⅷ. *Phytochemistry*, **8**: 271-284.
- Cohen, J. D., Bruge G. Baldi and Janet P. Slovin. 1986. 13C6-[benzene ring]-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.*, **80**: 14-19.
- 加藤 徹. 1988. 野菜の生育調節. 257-286. 博友社. 東京.
- Kojima, K., Y. Yamada and M. Yamamoto. 1995. Effects of abscisic acid injection on sugar and organic acid contents of citrus fruit. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **64**: 17-21.
- Kojima, K., M. Yamamoto, A. Goto and R. Matumoto. 1996. Changes in ABA, IAA and GAS Contents in reproductive organs of Satuma Mandarin. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **65**: 237-243.
- Thomas, T. H. 1969. The role of growth substances in the regulation of onion bulb dormancy. *J. Exp. Bot.*, **20**: 124-137.
- Tsukamoto, Y., M Fujita, T. Inada and T. Asahira. 1969. Changes of growth promoting substances and abscisic acid during the dormancy in onion. *Memo. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto Univ.*, **30**: 24-34.
- Rivier, L., H. Milon, and P. E. Pilet. 1977. Gas chromatography-

mass spectrometric determinations of abscisic acid levels in the cap and the apex maize roots. *Planta*, **134**: 23-27.

Rivier, L., P. Gaskin, K. S. Albone and J. MacMillan. 1981. GC-MS identification of endogenous gibberellins and gibberellins conjugates as their permethylated derivatives. *Phytochemistry*, **20**: 687-692.

Rivier, L., and M. Saugy. 1986. Chemical ionization mass spectrometry of indole-3-yl-acetic acid and cis-abscisic acid: evaluation of negative ion detection and quantification of cis-abscisic acid in growing maize roots. *J. Plant Growth Regul.*, **5**: 1-16.

GC-MS Analysis of Indole-3-Acetic Acid, Abscisic Acid and Gibberellins in Garlic (*Allium sativum* L.) Purified by Two HPLC Columns

Shuji CHINO¹, Kiyohide KOJIMA^{1*}, Kazuhiro KOSHIKIZAWA¹, Yuki OHTA¹,
Masao NAKAJIMA², Norikuni OHTAKE³ and Takuji OHYAMA³

(Received January 10, 2007)

Summary

In this study, the refinement method (two stage refinement method) that is eluted by a column on a few of capacity (purification column) through a column on a lot of capacity (coarse column) was examined to refine plant hormones only with a high performance liquid chromatography (HPLC). Five authentic standards in both columns were eluted in order of Gibberellin A₁ (GA₁), Indole-3-acetic acid (IAA), trans-Abscisic acid (t-ABA), Abscisic acid (ABA) and Gibberellin A₄ (GA₄). The separation capacity in the purification column was higher than the coarse column, and the refining capacity was progressed by the two stage refinement method. In addition, the mass spectrum of four authentic standards (IAA, ABA, GA₁ and GA₄) and four internal standard substances (¹³C₆-IAA, [²H₆]-ABA, [²H₂]-GA₁ and [²H₂]-GA₄) in a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were shown. The internal ABA level in the dormant garlic (*Allium sativum* L.), that had refined by two stage refinement method, was determined by GC-MS (52.5 pmol/g FW).

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 59:82-86, 2007

Key words : internal standard substance, mass spectrum, plant hormone, retention time

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Nihon Denji Sokki Co., Ltd.

³Faculty of Agriculture, Niigata University

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