

ダイオードアレイ検出器による拡散性 IAA の解析

太田祐樹¹・児島清秀^{1*}・菊地寛子¹・知野秀次¹・新美芳二²

(平成16年5月25日受付)

要 約

タケノコから得られた拡散性 IAA を、ダイオードアレイ (DA) 検出器、UV 検出器および蛍光検出器を接続した HPLC で解析した。UV 検出器では、IAA の保持時間に相当するピーク (推定ピーク) は検出されたが、IPA の推定ピークは検出されなかった。蛍光検出器では、IAA と IPA とも推定ピークは検出された。IAA の推定ピークから算出した IAA 量は、溶解液のメタノール濃度30%の場合と比べ、50%では約25倍であった。DA 検出器では、50%メタノールの場合に IAA 推定ピークに重なっていたピークが、30%メタノールでは分離された。30%メタノールの IAA の保持時間に相当するスペクトル (相当スペクトル) と IAA 標品のスペクトルの2つの極大波長は一致した。さらに、解析ソフトの解析においても、IAA 推定ピークの純度は0.9902で、IAA 相当スペクトルと標品のスペクトルの相関は0.9771であった。本報告の諸条件で、IAA と夾雑物の分離が DA 検出器で示された。

新大農研報, 57(1):9-14, 2004

キーワード : 拡散性 IAA、DA 検出器、UV 検出器、蛍光検出器、HPLC

オーキシンのインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid; IAA) は、生理的現象に関与する相関的なシグナルとして機能する植物ホルモンである (Lomax ら、1995)。

IAA の HPLC による分析において、紫外線吸収を利用した UV 検出器による単波長の測定では、選択性に乏しく夾雑物も見え、ほかの物質との区別が困難である (Crozier ら、1980; Sandberg ら、1981)。一方、IAA には蛍光性があり (片山、1994)、この蛍光性を利用した蛍光検出器で、インドールプロピオン酸 (IPA) を内部標準として定量できる簡便な方法が開発された (Akiyama ら、1983)。そして、この方法で抽出性 IAA がリング (Sanyal and Bangerth, 1998) やトマト (Kojima, 1995; Kojima ら、2002) などで定量された。さらに、拡散性 IAA がセイヨウナシ (知野、2004) や、様々な園芸作物 (菊地ら、2003) で定量された。しかし、菊地ら (2003) は IAA のピークが単一のピークではなく、ほかの物質のピークと重なっている可能性を示唆した。

現在、紫外・可視線吸収の検出にダイオードアレイ技術を応用したダイオードアレイ (DA) 検出器が開発され実用化されている。これは、多波長を同時に測定することで、3次元的に全波長のスペクトルを視覚化できる検出器である。さらに、検出されたピークの純度と、ピークと標品のスペクトルの相関を算出できる。

カラムの特性としては長く、内径が細く、充填粒子の粒径が小さいほど分離能が上がり、さらにカラムの充填剤は高性能なものが開発されている (中村)。

本研究は、IAA の分離および分析を目的として、分離能の高いカラムと DA 検出器を用いて拡散性 IAA の解析を行った。

材料および方法

1. 植物材料

2004年4月に、タケノコを地元のスーパーマーケットで購入して分析に使用した。

2. サンプルング

タケノコを購入後直ちに切断面を容器の底に密着しない状態で、1時間水に浸漬した。基部側を切断し (切断済みの場合は切り口を再度約5 mm 切断)、生重量と基部側の直径などを測定後、基部を蒸留水に浸漬し、約10分後に水を捨てた。そして、酸化防止剤として1 Lあたり50mg のL (+)-アスコルビン酸 (和光純薬) を加えた蒸留水 (以下、採取溶液とする) に浸漬して、インキュベーター (25°C、照度5000lux) に入れた。採取溶液は、常にマグネチックスターラーで攪拌した。48時間を採取時間とし、約8時間毎に採取溶液を回収し、回収毎に切断面を5 mm 更新した。回収した採取溶液は、次の操作まで冷凍保存した。

3. 抽出、精製

保存していた採取溶液を約30ml になるまで、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。次に、この採取溶液に内部標準としてインドールプロピオン酸 (IPA) 5000pmol を加えた。その後、pH メーターで希塩酸を用いて pH2.8 に調整し、サンプル溶液と同量のジエチルエーテルで3回分配抽出を行った。ジエチルエーテル層は、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。その後、0.5ml の50%メタノールで3回溶かし、マイクロチューブに移した。その後、遠心濃縮機で再度減圧濃縮し、50%メタノール50 μ l で溶かし、サンプルとした。

蛍光および UV 検出器の分析には、このサンプルを10倍に希釈し使用した。

4. 検出器による分析

蛍光検出器 (励起波長280nm、蛍光波長350nm; L-7480、日立)、UV 検出器 (UV 波長280nm; L-7100、日立) および DA 検出器 (モニター波長280nm、測定波長190~450nm; L-7455、日立) を装備した高速液体クロマトグラフィー (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)

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

で分析した。カラムは、CD-C18 (3.0mm i.d. ×250mm, Imtakt) を2本つなぎ、使用した。カラムには、ガードカラム (Imtakt) を取り付け、カラム温度は40℃、流量は0.1 ml/min で1%酢酸を含むメタノールでイソクラティック溶離した。メタノール濃度は50%および30%に設定した。サンプルの注入量は、DA 検出には15 μ l、蛍光およびUV 検出には1 μ lとした。ピークの純度およびスペクトルの相関は、D-7000DAD マネージャー (日立) を用いて解析した。

結果および考察

1. UV と蛍光検出器

図1と2は、タケノコ材料からの拡散性 IAA のクロマトグラムである (ピーク検出感度 (SENS ; 50) 以下のピークは検出されない)。UV 検出器では、溶離液の50%および30%メタノールにおけるクロマトグラムにおいて、IAA 標品の保持時間に相当するピーク (以下、IAA 推定ピークとする) は検出され、IPA 保

持時間に相当するピーク (以下、IPA 推定ピークとする) は検出されなかった (図1-A、2-A)。なお、菊地ら (2003) の報告では、サンプル中の IAA と IPA の推定ピークは検出されなかった。本実験において、IAA 推定ピークが検出されたのは、採取時間が48時間と長く、サンプル中の拡散性 IAA 量がピークとして検出するに十分な量であったからと考えられる。

蛍光検出器では、50%および30%メタノールのクロマトグラムにおいて、IAA と IPA の推定ピークは共に検出された (図1-B、2-B)。菊地ら (2003) の報告では、溶離液のメタノール濃度を30%に下げると IPA 推定ピークは検出されなかった。しかし、本実験ではカラムの理論段数が48,000段と分離能が高く、しかも内径が3.0mm で感度も高かったため、溶離液のメタノール濃度を下げても IPA 推定ピークは検出できたと考えられる。

Akiyama ら (1983) の方法で算出したタケノコ材料の IAA 量は、50%メタノールで 13×10^5 pmol/48h/ 個体、30%メタノールで 5.7×10^3 pmol/48h/ 個体であり、IAA 量の差は約25倍であった。また、30%のクロマトグラムで50%メタノールでの IAA 推定

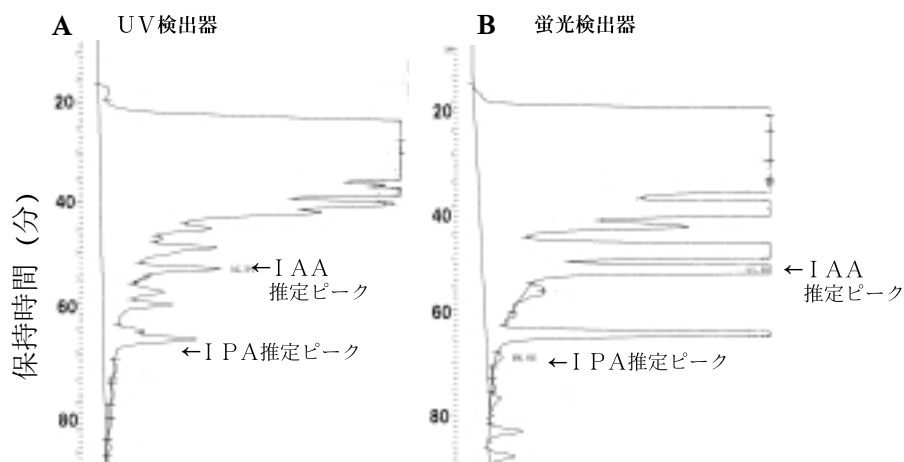


図1 タケノコ材料の溶離液50%メタノールによるクロマトグラム

A ; UV 検出器 (ATT, 8) ; B ; 蛍光検出器 (ATT, 8) ; クロマトグラム上には、IAA と IPA の推定ピークを示す ; 注入量 ; 1 μ l

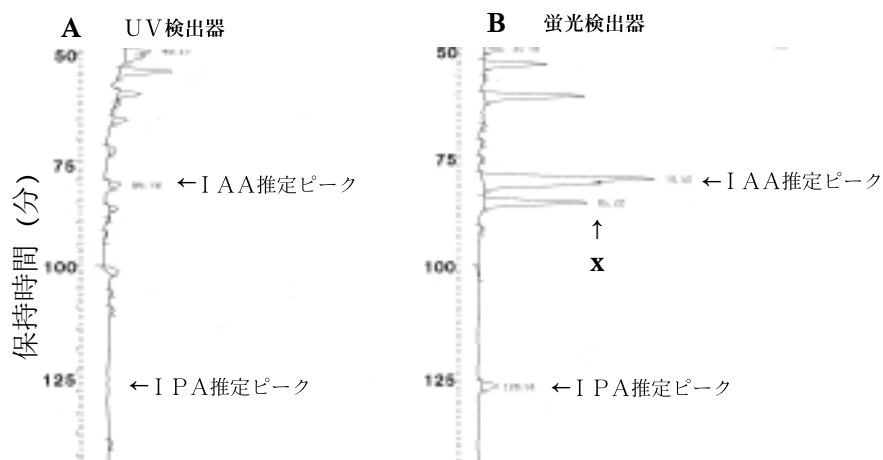


図2 タケノコ材料の溶離液30%メタノールによるクロマトグラム

A ; UV 検出器 (ATT, 3) ; B ; 蛍光検出器 (ATT, 10) ; クロマトグラム上には、IAA と IPA の推定ピークを示す ; 注入量 ; 1 μ l

ピークから分離したと考えられるピークが検出された（以下 x ピークとする、図 2-B）。50%と30%メタノールでの IAA 量の差および x ピークが検出されたことで、50%メタノールでの IAA 推定ピークは 2 つ以上のピークが重なっていると示唆される。

2. DA 検出器

DA 検出器の解析用に注入した $15\mu\text{l}$ のサンプル中の拡散性 IAA 量は、30%メタノールのクロマトグラム（図 2-B）から算出すると $1.9 \times 10^4 \text{ pmol}$ であった。図 3 の左半分は 3 次元クロマトグラムであり、右半分は 2 次元クロマトグラムである。50%メタノールで IAA 推定ピークに重なっていたと考えられるピーク（図 3-B、3-b）が、30%メタノールで分離された（図 3-C、3-c、x）。

図 4 は波長-吸光度スペクトルである。IAA 標品に特徴的な吸光度の極大波長 (λ_{max}) は 217 と 276 (nm) であった（図 4-A）。

50%メタノールでの IAA の保持時間に相当するスペクトル（以下、IAA 相当スペクトルとする）に特徴的な波長は 205、215 および 260 (nm) であった（図 4-B）。一方、30%メタノールでは、IAA 相当スペクトルに特徴的な波長は 215 と 275 (nm) であり（図 4-C-1）、x ピークのスペクトルに特徴的な波長は 205 と 260 (nm) であった（図 4-C-2）。50%メタノールのスペクトルは、30%メタノールでの IAA 推定ピークおよび x ピークの両方に特徴的な波長を示した。したがって、50%メタノールの IAA 推定ピークは、最低限この 2 つのピークが重なっていたと考えられる。本実験での IAA に特徴的な UV 吸収スペクトルの極大波長は 275 と 215 であり、以前の報告とほぼ一致した（Mollan ら、1973；室伏、1989）。

ピーク純度に関して、解析ソフト（D-7000DAD マネージャー）で算出した値（200～360nm の平滑クロマト使用）でも、50%メタノールの IAA 推定ピーク（0.9314）より 30%メタノール

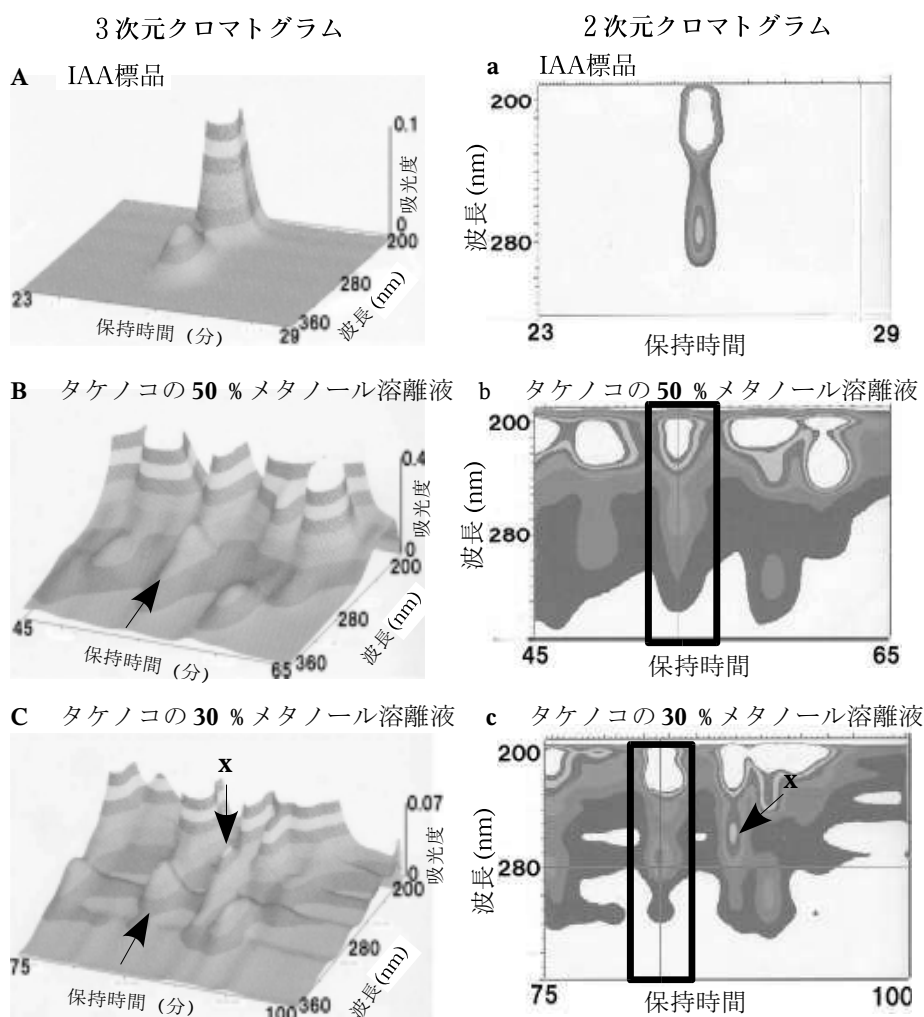


図 3 DA 検出器による 3 次元クロマトグラムおよび 2 次元クロマトグラム

A；IAA 標品；a；A と同じ IAA 標品の 2 次元クロマトグラム；B；50%メタノールで溶離したタケノコ材料；b；B の 2 次元クロマトグラム；C；30%メタノールで溶離したタケノコ材料；c；C の 2 次元クロマトグラム；A、B および C の横軸；保持時間（分）；縦軸；波長（nm）；高さ；吸光度；矢印；IAA 標品の保持時間；□は IAA 推定ピークを示す；注入量； $15\mu\text{l}$ （B、C）；スペクトルデータ収集条件；スリット幅；4 nm、バンド幅；4 nm；IAA 標品の条件；カラム；ODS-3；流量；1 ml/分；メタノール濃度；40%；注入量； $10^4 \text{ M} \times 20\mu\text{l}$

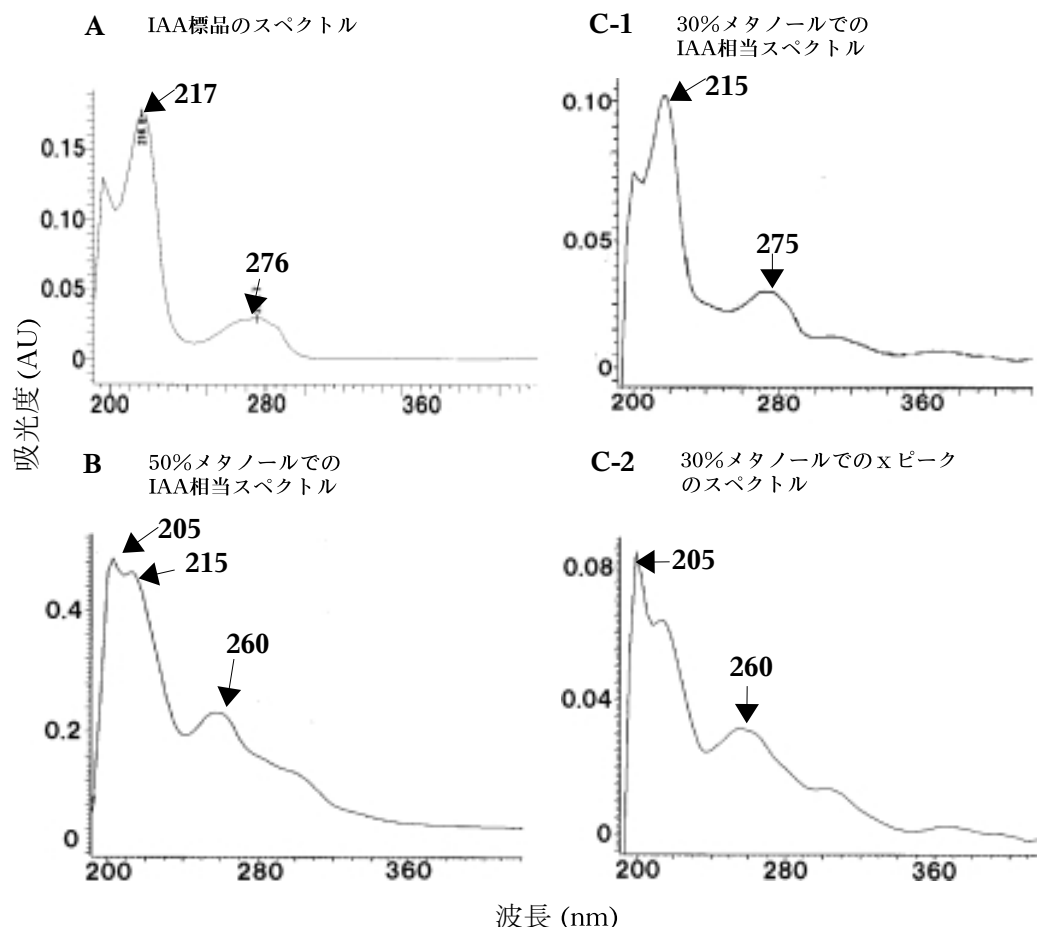


図4 DA 検出器による波長-吸光度スペクトル

A; IAA 標品: B; 50%メタノールでの IAA 保持時間に相当するスペクトル (IAA 相当スペクトル): C; 30%メタノールでの IAA 相当スペクトル: D; 30%メタノールでの x ピークのスペクトル: 矢印; 特徴的な波長: 測定条件; 図3と同条件

の IAA 推定ピーク (0.9902) の方が高かった。

波長-吸光度スペクトルに関して、解析ソフト (D-7000DAD マネージャー) で算出した IAA 標品のスペクトルとの相関の値でも、50%メタノールの IAA 相当スペクトル (0.9091) より30%メタノールの IAA 相当スペクトル (0.9771) の方が高かった。

本条件下で、IAA と夾雑物の分離が DA 検出器によって示された。HPLC での植物ホルモンのモニタリングに DA 検出器は有用である。

謝 辞

本研究に御協力いただいた園芸学研究室の小式澤一博氏・長谷川健氏・菅田美緒氏ならびに植物生産コースの皆様にご感謝申し上げます。

引用文献

Akiyama, M., N. Sakurai and S. Kuraishi. 1983. A simplified method for the quantitative determination of indoleacetic acid by high performance liquid chromatography with a

fluorometric detector. *Plant Cell Physiol.*, 24: 1431-1439.

Crozier, A., J. B. Zaerr. and R. O. Morris. 1980. High-performance steric exclusion chromatography of plant hormones. *J. Chromatogr.*, 198: 57-63.

知野秀次, 児島清秀. 2004. セイヨウナシの新梢における拡散性インドール-3-酢酸 (IAA) の分析. *新潟大学農学部研究報告*. 56: 51-57.

Horgan, R. 1995. Instrumental methods of plant hormone. In *Plant Hormones*, P. J. DAVIES (ed.): 415-432, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

片山正人. 1994. 植物ホルモン・ハンドブック [上], 高橋信孝・増田芳雄編: 258. 培風館.

菊地寛子, 太田祐樹, 児島清秀. 2003. 園芸作物からの拡散性 IAA の分析. *新潟大学農学部報告*. 56: 9-15.

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.

Kojima, K., K. Shiozaki, Y. Koshita and M. Ishida. 1999. Changes of endogenous levels of ABA, IAA and GA-like substances in fruitlets of parthenocarpic persimmon. *J.*

- Japan. Soc. Hort. Sci., 68: 242-247.
- 児島清秀. 1998. カンキツの果実生長と内生植物ホルモン〔1〕・〔2〕. 農業および園芸, 73 (8・9): 871-877・967-970.
- Kojima, K., E. Ohtake and Yu, Z. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. Plant Growth Regul., 37 (3): 249-254.
- Lomax, T. L., Muday, G. K. and Soressi, G. P. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. Plant Cell Physiol., 19: 1281-1288.
- Mollan, R. C., M. A. Harmey, and D. M. X. Donnelly. 1973. UV spectra of indoles in strong sulphuric acid. Phytochemistry, 12: 447-450.
- 中村 洋. 高速液体クロマトグラフィーハンドブック. 日本分析化学関東支部編, 丸善.
- 室伏 旭, 1989. 植物化学調節実験法. 高橋信孝編, 植物化学調節学会, PP. 183-191.
- Sanberg, G, Andersson, B and Dunberg, A. 1981. Identification of 3-indoleacetic acid in *pinus sylvestris* L. by gas chromatography-mass spectrometry, and quantitative analysis by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. J. Chromatogr., 205: 125-137.
- Sanyal, D and F. Bangerth 1998. Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees., 24: 127-134.

Analysis of Diffusible IAA by Diode Array Detector

Yuuki OHTA¹, Kiyohide KOJIMA^{1*}, Hiroko KIKUCHI¹, Syuuji CHINO¹ and Yoshiji NIIMI²

(Received May 25, 2004)

Summary

Diffusible IAA obtained from bamboo shoot was analyzed in HPLC which connected a diode array (DA) detector, UV detector and fluorescent detector. At the UV detector, the peak which correspond to retention time (assumed peak) of IAA was detected, but assumed peak of IPA wasn't detected. At the fluorescence detector, assumed peaks of both IAA and IPA were detected. IAA quantity which was calculated from the assumed peak of IAA was about 25 times at 50% compared with 30% of methanol concentration of eluent. At the DA detector, the peak which overlapped with IAA assumed peak in case of 50% methanol was separated in 30% methanol. Maximum wavelength of spectrum which correspond to retention time (correspond spectrum) of IAA of 30% methanol and spectrum of IAA standard coincident. Further, in analyzed with the analysis software, too, purity of IAA assumed peak was 0.9902 and correlation of the IAA correspond spectrum and spectrum of standard was 0.9771. In conditions of this report, separation of IAA and impurity was shown with the DA detector.

Bull.Facul.Agric. Niigata Univ., 57(1):9-14,2004

Key words : Diffusible indole-acetic acid, Diode Array detector, UV detector, Fluorescent detector, HPLC

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Niigata University

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