

植物ホルモン分析のための HPLC カラムの半値幅などの特性

児島清秀*・村田憲昭・MIN Wei**・千田佑子・付立新***

(平成13年11月30日受付)

要約 植物ホルモンの分析のために HPLC カラムの半値幅などの特性を試験した。ODS タイプのカラム(長さ25 cm)で溶離液(0.5 mL/分)のメタノール濃度の変更時(±20%)に、15分間で保持時間は安定した。6種類の植物ホルモンの標品に関して、溶離液のメタノール濃度と保持時間の関係をカラム毎に調べた。ODS タイプのカラムでは溶出パターンの共通の傾向が確認できた。カラムを2本接続しても、カラム1本と同じ溶出パターンで、問題は生じなかった。この溶出パターンをメタノール濃度と保持時間ともに対数軸にプロットすると、曲線のカーブがゆるやかになり、両者の関係の傾向が確認できた。注入 IAA 量(溶質量)とピーク面積をプロットすると高い相関でほぼ比例していた。注入 IAA 量に関わらず、注入メタノール量が一定ならば半値幅は一定であった。半値幅と溶離液のメタノール濃度を対数軸にプロットすると、両者はほぼ直線関係になった。さらに、標品の半値幅と保持時間を対数軸にプロットすると、植物ホルモンの4つの標品は直線的な狭い帯状に存在した。

キーワード：インドール酢酸、アブシジン酸、サイトカイニン、ODS、Ph カラム

結 言

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は定量性と再現性が高く生体成分を高性能に分離ができるので(横田、1983; 上田、1991)、植物ホルモンの分析において夾雑物の効果的な除去のために使用されてきた(KOJIMA、1995; KOJIMA ら、1995; KOJIMA ら、1999)。

使用するカラムにおける植物ホルモンの標品の保持時間などの基礎的試験により、HPLC を効率的に使用できる(KOJIMA、2001)。一方、理論段数が高いカラムの使用で夾雑物の分離が期待できる(波田野・花井、1988)。また、一般にカラムが長くなるに従って理論段数は向上する(日本分析化学学会関東支部、2000)。そこで、カラムを複数接続することで理論段数の向上が期待できる。

LC-MS の感度向上のための最適パラメーターは半値幅に関係することが報告されている(児島・田村、2001)。半値幅とはピーク高さの半分の位置の幅で、簡単にピーク面積を求める際に使われる(穂積・吉村、1995)。

そこで、植物ホルモンを分析する際に、HPLC を効率的に使用するために高い理論段数および2本接続のカラムにおける6種類の標品の保持時間や溶離液変更時の保持時間の安定に必要な時間の基礎的な特性、およびLC-MS の感度向上のために半値幅・保持時間・標品の関係を試験した。

材料および方法

試薬および分析機器とそれらの使用条件

試薬：植物ホルモンの標品として次の試薬を使用した；オーキシンの IAA (indole-3-acetic acid)・IPA (indole-3-propionic acid)、アブシジン酸の ABA ((±)-cis, trans-abscisic acid)・t-ABA ((±)-trans, trans-abscisic acid)、サイトカイニンの Z (trans-zeatin)・ZR (trans-zeatin-9-riboside)

Z および ZR は和光純薬から、他の標品は Sigma Chemical Co. (U. S. A.) から購入した。合成のラセミ体の ABA をメタノールに溶解させた溶液を太陽光下に一日置いておくことで、ABA と t-ABA がほぼ同じ比率の混合物を得た。これと ABA のみの溶液との比較で ABA と t-ABA を区別した。HPLC の溶離液は、蒸留水+メタノール(メタノール、HPLC グレード)であった。

*新潟大学自然科学研究科

**中国江西省科学院生物資源研究所

***中国黒竜江省農業科学院原子力利用研究所

Table 1 Various property for HPLC column

Name	Particle size (μm)	I. D.* (mm)	Length (mm)	N. T. P** (N/column)	Company
Cadenza CD-C18	3	4.6	250	48,000	Imtakt
Inertsil Ph-3	5	4.0	150	11,000	GL Sciences
Inertsil Ph-3	3	4.6	250	25,000	GL Science
Develosil ODS-5	5	10.0	150	12,000	Nomura Kagaku
Inertsil ODS-3	5	6.0	250	22,000	GL Sciences

*I. D., inner diameter; **N. T. P, number of theoretical plates

HPLC システム：使用したシステムは、低圧グラジエント HPLC システム(ポンプ LC-10AT、ミキサーFCV-10AT、デガッサー-DGV-12A、島津)、UV 検出器 (SPD-10A、島津)、カラムオープン (554、GL Sciences)、インテグレーター (D-2500、日立)、ベンチャートレコーダー (201、朝日科学) であった。

諸条件：UV 検出器の波長-280 (nm)；UV 検出器のレンジ-0.005；サンプルループ-1000 μl ；カラムオープン-40 $^{\circ}\text{C}$

実験方法

1. 溶離液のメタノール濃度の変更と保持時間の安定に要する時間

使用したカラムは Cadenza (Table 1) で、流量は 0.5 mL/分であった。溶離液のメタノール濃度の変更 (60 \rightarrow 40%、40 \rightarrow 60%) 後の、保持時間の変化を調べた (児島ら、2000)。メタノール濃度の変更時から 4 分間隔で 50 pmol ($10^{-5} \times 5 \mu\text{L}$) の IAA を注入して、保持時間をレコーダーで調べた。

2. 溶離液のメタノール濃度と保持時間の関係

使用したカラムは Cadenza、Inertsil Ph-3 および Inertsil Ph-3 の 2 本接続 (Table 1) で、流量は 0.5 mL/分であった。各メタノール濃度 (30・40・50・60・70%) の溶離液毎に、6 種類の標品の保持時間を試験した。 10^{-5} 濃度の標品を合計で 15 μL 以下になるようにして混合して注入した。溶離液の 10% の変更時には約 20 分間、新溶離液を流してから、試験を開始し、標品の保持時間をインテグレーターで調べた。

3. 注入メタノール量と半値幅の関係

使用したカラムは Develosil ODS-5 であった。10 種類の濃度の IAA 溶液 (メタノール) を調整した；1 \sim 10 $\times 10^{-6}$ M。この 10 種類の IAA 溶液のそれぞれについて、4 種類の量 (20、40、60、80 μL) を注入して、ピーク面積と半値幅への影響をインテグレーターで調べた。

4. 保持時間、標品および半値幅の関係

LC-MS で使用予定の Cadenza および Inertsil Ph-3 の 2 本接続のカラムの半値幅を試験した。標品は IAA、ABA、Z、ZR の 4 種類の 10^{-5} M 濃度のメタノール溶液を使用した。LC-MS (新潟大学分析センター所有) には 20 μL のサンプルループの使用が義務付けられているために、注入量は 18 μL にした。半値幅は適切なスピードでインテグレーターからチャートに印刷して、定規で測定した。試験は 2 回繰り返して確認した。

結果および考察

1. 溶離液のメタノール濃度の変更と保持時間の安定に要する時間

Cadenza カラム (流量、0.5 mL/分) の溶離液の変更後の保持時間の安定に必要な時間 (溶離液の流量) を調べた。メタノール濃度の 20% の変更後の保持時間の安定に要する時間は、15 分であった (Fig. 1)。同じ長さ 25 cm のカラムで流量のみ異なって 1 mL/分では同様な条件では、安定に要する時間はほぼ 10 分であった (児島ら、2000)。流量が半分では、安定に要する時間は 2 倍と推定していたが、それほどは必要ではなかった。25 cm のカラム (0.5 ml/分) の溶離液のメタノール濃度の 20% の変更時に、保持時間の安定には 15 分間を要するという目安が得られた。

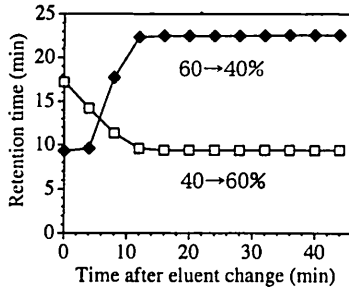


Fig. 1. Effect of eluent (mobile phase) change on retention time in Cadenza columns. Eluent; MeOH/water (40→60, 60→40%) with 20 mM acetic acid. Flow rate, 0.5 ml/min; Column, Cadenza

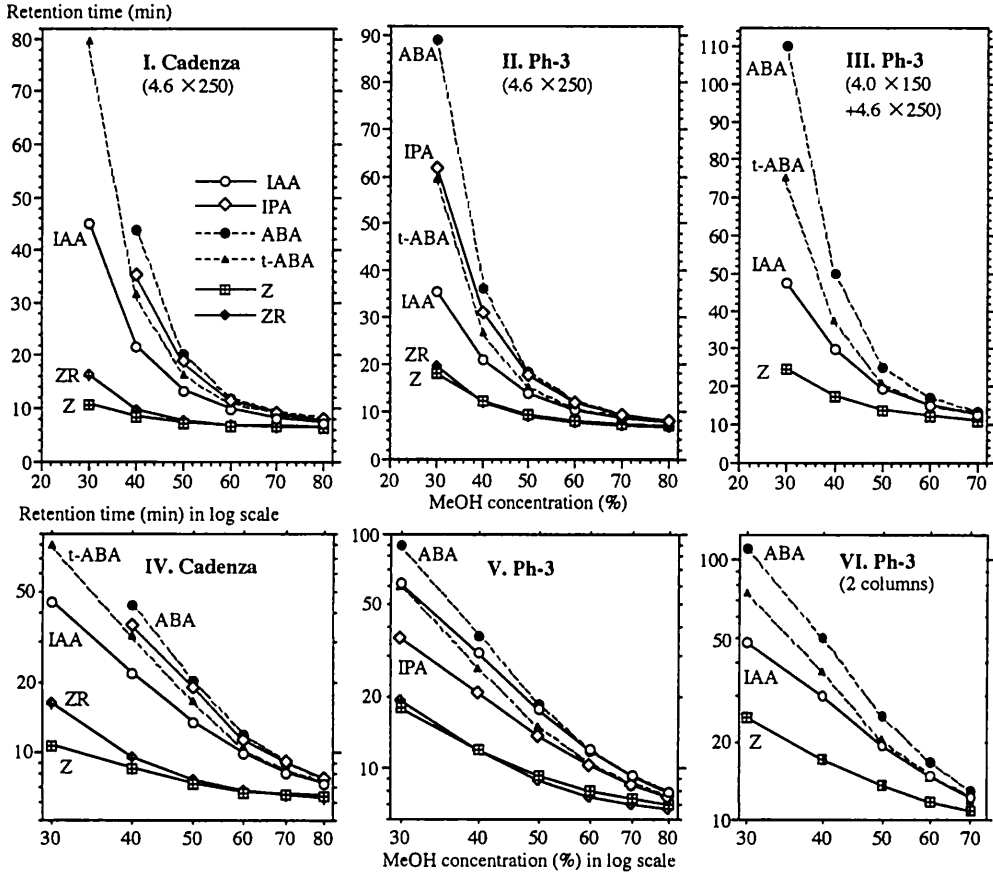


Fig. 2. Effects of methanol concentration (eluent) on retention time of 6 standards in 3 columns. Eluent, MeOH/water with 20 mM acetic acid; Flow rate, 0.5 ml/min; Column, I/IV. Cadenza, II/V. Ph-3 (4.6×250), III/VI. Ph-3 (4.0×150+4.6×250)

2. 溶離液のメタノール濃度と保持時間の関係

6種類の植物ホルモンの標品に関して、溶離液のメタノール濃度と保持時間の関係をカラム毎に調べた。ODSタイプのCadenzaカラムで保持時間は、ZとZR、およびt-ABAとIPAが接近(非分離)しており、Z・ZR IAA t-ABA・IPA ABAの順序であった (Fig. 2-I)。この傾向はODSタイプのカラムに共通している (児島ら, 2000)。このメタノール濃度(横軸)と保持時間(縦軸)ともに対数にすると、曲線のカーブがゆるやかになり、両者の関係の傾向が視覚的に確認できた (Fig. 2-IV)。

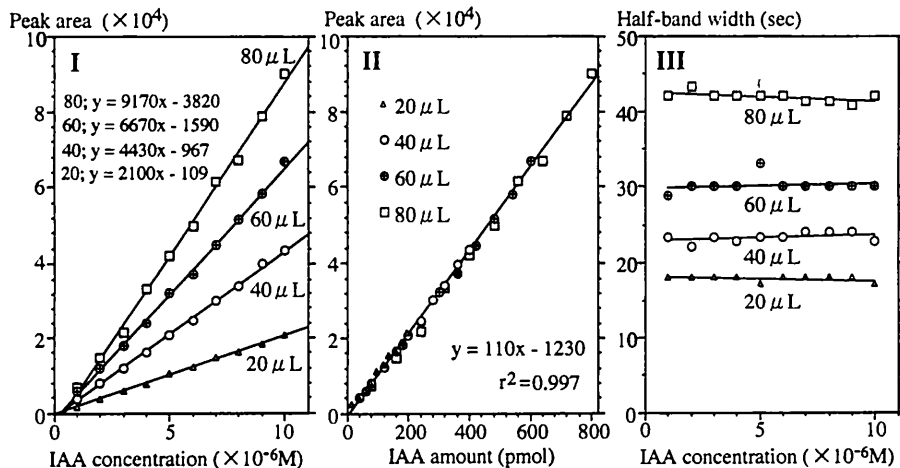


Fig. 3. Effects of injection volume and substance amount on peak area and half-band width. I, Effects of injection volume on peak area; II, Effects of IAA amount on peak area; III, Effects of injection volume on half-band width. Eluent, MeOH/water with 20 mM acetic acid; Flow rate, 2 ml/min; Column, Develosil ODS-5; Detector, UV (280 nm)

Ph タイプのカラムは ODS タイプのカラムとは分離パターンが異なることが期待したが、6 種類の植物ホルモンの標品の溶出の順序は ODS タイプと一致していた (Fig. 2-I, II)。Ph-3 のカラム (4.0 \times 150) の以前の報告 (児島ら, 2000) では、メタノール濃度と保持時間の関係がなめらかではなかった。しかし、本報告では両対数でもほぼなめらかな線になっていたので、本試験の方が信頼性は高いと考えられる (Fig. 2-V)。

一本のカラムでは得られない高い分離能を期待して、カラムを 2 本接続して試験した。カラム 1 本の結果と比較すると、溶出パターンはほぼ同じであった (Fig. 2-II, III)。保持時間が長くなったことから分離能が向上していることが示唆される。さらに両対数でもほぼなめらかな線になっていた (Fig. 2-VI)。本試験では内径の異なるカラムを使用したので、カラムの長さや保持時間との厳密な関係は論議できなかった。

3. 注入メタノール量と半値幅の関係

注入メタノール量が一定ならば半値幅が同じになるかどうかを試験した。同じ注入メタノール量で、IAA 溶液の濃度を高くする (言い換えると溶質量を増やす) と、ピーク面積は比例して増加した (Fig. 3-I)。また、注入メタノール量とは無関係に、注入 IAA 量 (溶質量) とピーク面積をプロットすると高い相関ではほぼ比例していた (Fig. 3-II)。注入メタノール量が一定ならば、注入 IAA 量に関わらず半値幅は一定であった (Fig. 3-III)。従って、標品を含む注入メタノール量の増加とともに標品の半値幅が増加して、溶質量の増加とともにピーク高さが増加すると考えられる。

4. 保持時間、標品および半値幅の関係

保持時間、標品および半値幅の関係を試験した。Cadenza カラムにおいては溶離液のメタノール濃度の上昇とともに保持時間は減少し (Fig. 2)、半値幅も減少した。半値幅を対数の縦軸に溶離液のメタノール濃度を対数の横軸にすると、植物ホルモンの 4 標品ともほぼ直線になった (Fig. 4-I)。また、半値幅と標品の保持時間を対数軸にプロットすると、植物ホルモンの 4 つの標品は直線的な狭い帯状に存在した (Fig. 4-II)。これらの関係から、未測定半値幅の推定が可能である。Inertsil Ph-3 の 2 本接続のカラムの結果を Table 2 に示す。これは、実用的に LC-MS で必要な値である。

謝 辞

本研究の開始にあたり、研究費に配慮頂いた環境管理科学専攻の方々に感謝します。本研究は大学院自然科学研究科の重点教育研究の推進補助金および科研費 (No. 12660021) で一部賄われた。実験スペース・機器など

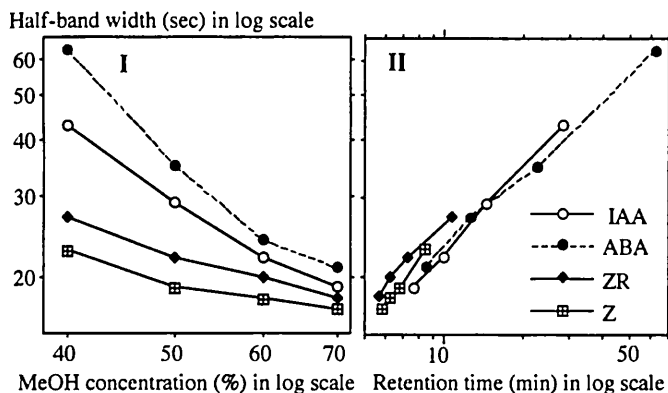


Fig. 4. Relationships between MeOH concentration, retention time and half-band width. Eluent; MeOH/water with 20 mM acetic acid. Flow rate, 0.5 ml/min; Column, Cadenza

Table 2 Relationship between MeOH concentration and half-band width for Ph-3 columns (4.0×150+4.6×250)

MeOH (%)	Z	ZR	IAA	ABA
	(sec)			
50			33	35
40	32	40	40	60
30	42		54	

Inject amount, $10^{-5}M \times 18\mu L$; Eluent, MeOH/water with 20 mM acetic acid; Flow rate, 0.5 ml/min.

の調達に配慮頂いた新美芳二教授・中野 優助教授、また中国語の通訳に助力頂いた馬 壘瑩修士に感謝します。

引用文献

- 波田野博行・花井俊彦. 1988. 新版実験高速液体クロマトグラフィー. 化学同人, PP.1-22.
- 穂積啓一郎・吉村菊子. 1995. 機器分析のとびら. さんえい出版, PP.16-44.
- KOJIMA, K. 1995. Simultaneous measurement of ABA, IAA and GAs in citrus-role of ABA in relation to sink ability. JARQ, 29 : 179-185.
- 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・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. 新潟大学農学部報告, 53 (1) : 9-16.
- KOJIMA, K. 2001. Property of HPLC column and mass spectrum of LC-MS for phytohormone analysis. JARQ, 35 : 149-154.
- 児島清秀・田村裕一. 2001. LC-MS-SIM の高感度の設定条件. 質量分析, 49(6) : 237-240.
- 日本分析化学学会関東支部編. 2000. 高速液体クロマトグラフィーハンドブック改訂 2 版. 丸善, PP. 216-222.
- 上田純一. 1991. 物理・化学的手法. 生物化学実験法 26 植物ホルモン研究法, 増田芳雄編, 学会出版センター, PP. 21-43.
- 横田孝雄. 1983. 植物ホルモンの精製と機器分析. 実験生物学講座15 植物生理学(I), 勝見弁行・増田芳雄編 : 丸善, PP. 3-68.

Various Properties such as Half-Band Width of HPLC Columns for Plant Hormone Analysis

Kiyohide KOJIMA*, Yoshiaki MURATA, Wei MIN**, Yuuko CHIDA and Lixin FU***

(Received November 30, 2001)

Summary

Various properties such as half-band width of HPLC columns for phytohormone analysis were examined. As methanol concentration ($\pm 20\%$) in eluent (0.5 mL/min) was changed using octadecylsilane (ODS) type column in 25 cm length, retention time became stable after 15 min. As to 6 standards of plant hormones, the relationship between methanol concentration in eluent and retention time was examined in each column.

In ODS type column, the general tendency of elution pattern was confirmed. As two columns were connected, elution pattern was same as that of one column and no problem occurred. As in the elution pattern both MeOH concentration and retention time were plotted in log scale, extent of curve was gentle and the tendency of relationship between the two was confirmed. As injected indole-acetic acid (IAA) amount (solute amount) and peak area were plotted, correlation was high and there was proportional relationship. Regardless of injected IAA amount, as amount of injected MeOH was constant, value of half-band width was constant. As half-band width and MeOH concentration of eluent were plotted in log scale, they had almost straight relationship. Moreover, as half-band width and retention time were plotted in log scale, 4 standards of phytohormone exist in straight narrow belt.

key words: indole-acetic acid, abscisic acid, cytokinin, gibberellin, ODS, Ph column

Abbreviations: IAA, indole-3-acetic acid; IPA, indole-3-propionic acid; ABA, abscisic acid; t-ABA, trans-abscisic acid; CK, cytokinin; Z, trans-zeatin; ZR, trans-zeatin-9-riboside; MeOH, methanol; HPLC, high performance liquid chromatography

*Graduate School of Science and Technology, Niigata University

**Biological Resources Institute, Jiangxi Academy of Science, P. R. China

***Atomic Power Utilization Institute, Hei Long-jiang Agricultural Academy of Science, P. R. China