



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

逆相TLCによるカキ葉フェノールからのIAAの分離

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 三夫, 福井, 博一, 大竹, 敏也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5679

逆相 TLC によるカキ葉フェノールからの IAA の分離

中村三夫・福井博一・大竹敏也

園芸学研究室

(1986年7月31日受理)

Separation of IAA from phenol in kaki *Diospyros kaki* leaf by reverse-phase TLC

Mitsuo NAKAMURA, Hirokazu FUKUI and Tosiya OHTAKE

Laboratory of Horticulture Science

(Received July 31, 1986)

SUMMARY

The mobile phase for high-performance liquid chromatography to separate indoleacetic acid (IAA) from a phenol in *Diospyros kaki* leaf was investigated by thin-layer chromatography (TLC) of ODS18. The materials for TLC were acid ether fraction from ethanol extracts of kaki leaf (100 g) in addition to 0.3 g IAA. The blue spot from IAA and the yellow or pink zone from phenol appeared by Ehrlich reaction after development in TLC. Developing by methanol-water for mobile phase, the blue spot from IAA was observed in 60% methanol, but this spot was into the yellow or pink zone. By methanol-acetate buffer, the blue spot from IAA in 60-80% methanol was also into the yellow or pink zone. These, too, were same at the addition 0.5M NaCl to mobile phase to keep structure of ODS18. Developing by the alcohol with higher polarity than methanol, the blue spot was separated from the yellow or pink zone at iso-propylalcohol or iso-butylalcohol+ethanol. Developing by methanol-citrate buffer, the blue spot from IAA was observed in pH 4.0-5.0 60% methanol, and this spot was separated from the yellow or pink zone.

要 約

ODS18担体による薄層クロマトグラフィーを用い、高速液体クロマトグラフィーによるカキ葉中の IAA の分離条件を検討した。カキの葉100gのエタノール抽出物に0.3g indoleacetic acid (IAA) を加え、酸性エーテル画分中の IAA と葉中のフェノール化合物との分離条件を検索した。展開後エーリッヒ反応を行った結果、IAA 由来の青紫色の呈色部位とフェノール由来と考えられる黄または桃色に呈色する部位が認められた。メタノール-水で展開した場合、メタノール60%において IAA の青紫色のスポットが認められたが、それは黄及び桃色の呈色部位と重なっており、IAA のみを分離することはできなかった。同様にメタノール-酢酸緩衝液においても、メタノール60%、80%で IAA の青紫色のスポットが認められたが、IAA のみを分離することはできなかった。これは、ODS18 の分解を防止するために0.5M の NaCl を添加した場合でも同じであった。展開溶媒としてメタノールより極性の高いアルコール系溶媒を用いた場合、iso-プロピルアルコール及び iso-ブチルアルコール+エタノールにおいて IAA の青紫色スポットが、黄及び桃色の呈色部位と分離した。また、展開溶媒中の水系溶媒の pH を変化させた場合、pH4.0-5.0でメタノール60%の濃度区において IAA スポットとそれ以外の呈色部位の分離が認められた。

緒 言

植物ホルモンの分離、定量に関する報告は多く、特に近年分析機器の発達により、それらによる定量が行われるようになった^{1,2)}。なかでも高速液体クロマトグラフィーは検出物質の変性を伴わず、また極めて微量な物質の定量もできることから^{3,4)}、今後大きな役割を占める機器分析手法であると考えられる。しかし、植物体内にはフェノール化合物をはじめとする多くの物質が含まれており、植物ホルモンとそれらとを分離する条件が明らかとなっていないため、生体中の植物ホルモンの定量に高速液体クロマトグラフィーを用いた例は極めて少ない^{5,6)}。

植物ホルモンの中のオーキシンは細胞肥大に大きな作用を持つことが明らかにされており、特に果実の発育には重要な働きをし⁷⁾、IAA はその中心的な物質であると言われている。カキ果実の発育には IAA が重要な役割を果たしており、なかでも“富有”、“平核無”では果肉中の IAA がその果実発育に大きな影響を及ぼすことが報告されている⁸⁾。この他、カキでは種子やヘタなどの器官が果実の発育に関与していることが言われており⁹⁾、これらにおいても同様に IAA が合成されていると考えられる。しかし、カキにはタンニンをはじめとするフェノール化合物含有量が高く、微量な IAA の定量を行うことは難しい。

本研究では IAA の高速液体クロマトグラフィーでの分離、定量を行うための分離条件を明らかにすることを目的として、高速液体クロマトグラフィーカラム担体として一般に用いられる Octadecyl Silane 18 (ODS18) の薄層を用い実験を行った。

材料及び方法

本学農学部附属農場に栽植されている3年生の“富有”の成葉100gを10月24日に採取し、供試材料とした。

供試材料に20倍量の0℃、80%エタノールを加えホモジナイズした後、48時間抽出し、n-ヘキサン可溶性物質の除去後、エーテルと水の層に分け、10mlの酸性エーテル画分を得、薄層クロマトグラフィー用試料とした。また、IAAの検出を容易にする目的でn-ヘキサン可溶性物質除去後、標品IAAを0.3g添加した。

薄層クロマトグラフィーはODS18担体プレート(Whatman社製KC18)を用い、各薄層あたり0.2—0.4 mlの試料をスポットとして付けた。

展開溶媒としては、一般に高速液体クロマトグラフィーで用いられているメタノールを中心としてエタノール、iso-ブチルアルコール、iso-ブチルアルコールのアルコール系有機溶媒と水、酢酸緩衝液(Gomori 1955)⁹⁾、クエン酸広域緩衝液(pH2.6—8.0)(McIlvaine 1921)⁹⁾の水系溶媒を用いた。

IAAの検出にはエーリッヒ反応を用い、スポットのRf値及びその範囲を求めた。

結 果

展開後エーリッヒ反応を行った結果、IAA由来の青紫色の呈色部位とフェノール及び芳香族アミンと考えられる黄または桃色に呈色する部位が認められた。

ODS18担体は溶媒含水率が40%を超えると担体自体が分解するため、メタノール濃度60%以上について検討を行い、その結果を第1図に示した。メタノール濃度60%において、エーリッヒ反応によるIAAの青紫色のスポットが認められ、そのRf値は0.76であった。しかし、これはIAA以外の物質由来する黄および桃色の呈色部位と重なり分離されなかった。メタノール濃度60%以外の濃度域では青紫色の呈色部位は全く認められなかった。

IAAは弱酸性物質でその溶媒のpHによってイオン化の状態が変化するため、水系溶媒としてpH4.0酢酸緩衝液(0.2M)を用い同様に展開した(第2図)。IAAのスポットは60%、80%の両濃度域で認められ、そのRf値はそれぞれ0.69、0.72であった。しかし、水系溶媒として水を用いた場合と同様黄及び桃色の呈色部位より分離されることはなかった。メタノール濃度60%未満におけるIAAの分離を行うため、ODS18担体の分解防止剤として水系溶媒中にNaClを0.5M添加し展開を行った(第3図)。80%以下のいずれの濃

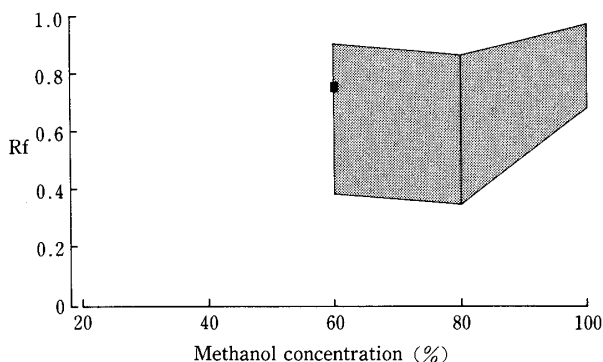


Fig. 1. Separation between IAA and Kaki leaf extracts.

Developer was solution of methanol and water in the several ratio.

■ red or yellow zone (phenol)
— purple zone (IAA)

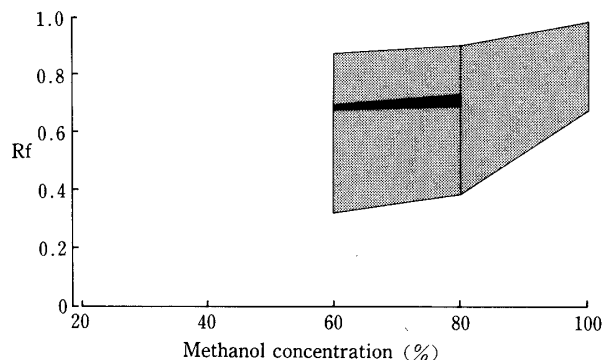


Fig. 2. Separation between IAA and Kaki leaf extracts.

Developer was solution of methanol and acetic acid buffer (pH 4.0) in the several ratio.

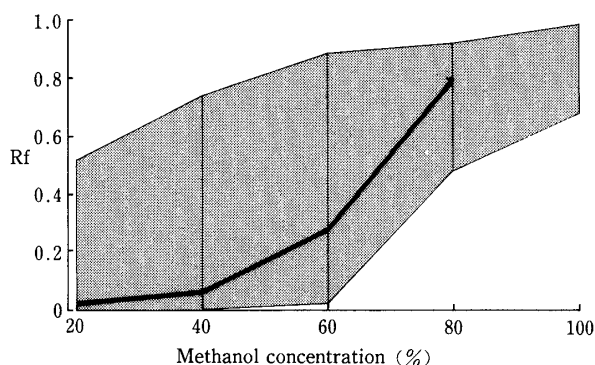


Fig. 3. Separation between IAA and kaki leaf extracts.

Developer was solution of methanol and water with 0.5M NaCl in the several ratio.

度においても IAA のスポットが認められたが、低濃度域での IAA の展開は極めて遅く、20, 40, 60%での Rf 値は各々 0.01, 0.06, 0.28 で、これらの IAA スポットは黄及び桃色の呈色部位より分離されなかった。

水系溶媒として pH4.0 酢酸緩衝液 (0.2M) を用い、これに NaCl を 0.5M 添加し展開を行った結果、水系溶媒として水を用いた場合と異なり低濃度域での IAA の展開は速く 20, 40% での Rf 値は 0.44, 0.46 であった (第 4-b 図)。また、60% 及び 80% での IAA の Rf 値は NaCl を加えない場合とほとんど同じであった。しかし、いずれの濃度においても IAA スポットは黄及び桃色の呈色部位から分離することはなかった。

薄層クロマトグラフィーにおける展開速度は溶媒の極性によって変化する。そこで、アルコール系有機溶媒の中でメタノール、エタノール、iso-プロピルアルコール、iso-ブチルアルコールを用い展開を行い、その結果を第 5 図に示した。IAA のスポットの検出ではメタノールが最も良く、100% 以外の全ての濃度域で青紫色の呈色部位が観察された。エタノールは IAA 検出濃度域が極めて低く、20, 40% の 2 濃度のみであった。極性の低い iso-プロピルアルコール、iso-ブチルアルコール+エタノールにおいては、IAA の Rf 値は小さい値となり、アルコール濃度が高くなるに従い IAA と黄及び桃色の呈色部位との分離が認められるようになった。

水系溶媒の pH を変化させ、展開を行ったものが第 4 図である。pH 値が高い場合、メタノール濃度を上げると塩が析出するため展開を行うことができなかった。展開を行ったいずれの pH においてもメタノール濃度変化に対する IAA の展開は水に NaCl を添加した場合とほとんど同じであった。しかし、黄及び桃

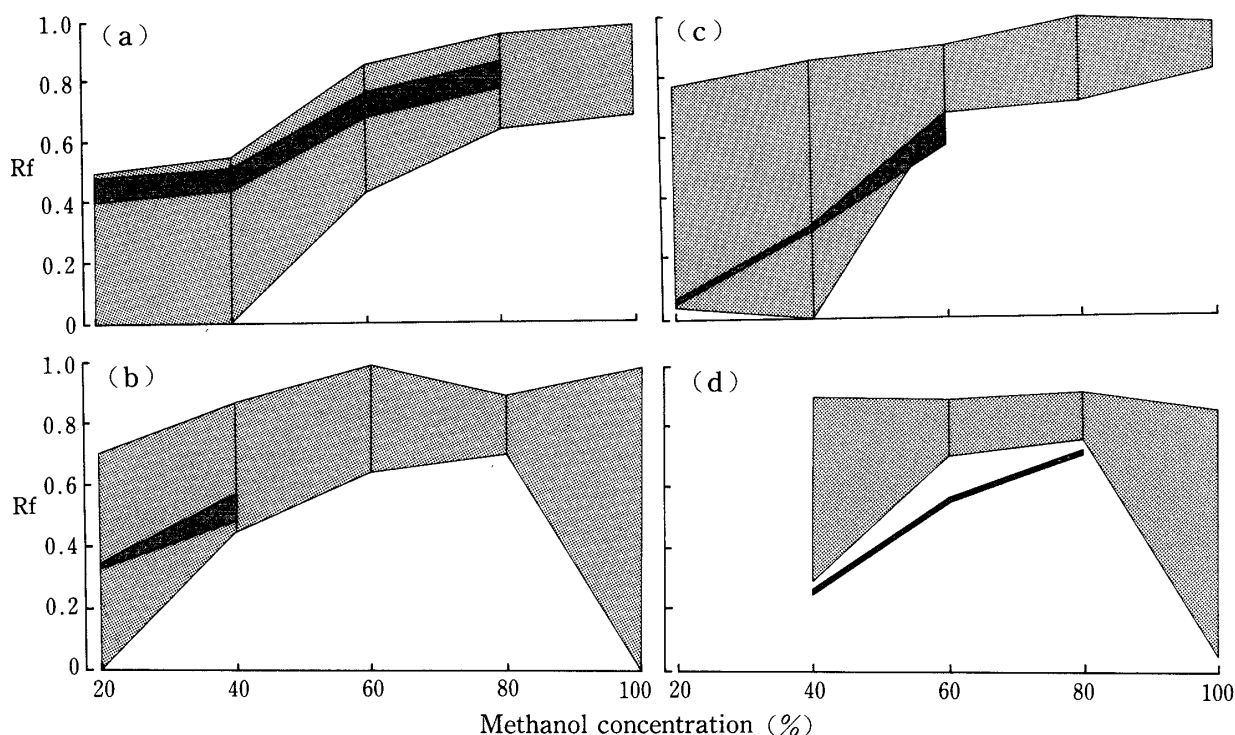


Fig. 4. Relation between separation of IAA and polar solvents in developer.

Developer was solution of several alcohol and acetic acid buffer (pH 4.0) with 0.5M NaCl in the several ratio.

(a) methanol (b) ethanol (c) iso-propyl alcohol (d) iso-butyl alcohol:ethanol (1:1)

色の呈色部位の展開速度が速くなったため60%メタノール濃度域でIAAと黄及び桃色の呈色部位との分離が認められた。

考 察

高速液体クロマトグラフィーは生理活性物質の定量には極めて有効な手法であると言われているが、植物ホルモンの分野においては標品の試料を用いた例が多く³⁾、植物体から抽出した試料を用いて良好な分離が認められた報告例は少ない^{5,6)}。この原因として、植物体粗精製物には様々な物質が含まれており、これらと植物ホルモンとを分離するための良好な条件が明らかになっていないことや、また、これがカラムに吸着されたまま溶出されずカラムの劣化が早まることが挙げられる。さらに高速液体クロマトグラフィーのカラムは高価であるため、高速液体クロマトグラフィー装置を用いて溶離条件を詳細に検討することがあまり行われないことも原因の1つとなっている。このため、機器分析を行う前にあらかじめ薄層クロマトグラフィーなどによって、より高い精度の精製を行う必要があるが、この操作によって目的とする物質の回収率が下がるため、出来る限りこれらの操作を行わないで粗精製物を直接機器分析にかけることが望ましく、このためには分離条件の詳細な検討が必要となる。本論ではODS18カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる分離・定量を念頭におき、その分離条件の検討を薄層クロマトグラフィーを用いて行った。

高速液体クロマトグラフィーで溶離液として一般に用いられるメタノールと水を展開溶媒としてクロマトグラフィーを行った結果、第1図に示すようにIAAはフェノール及び芳香族アミンに由来すると思われる黄及び桃色の呈色部位と分離することはなかった。また、第3図に示すようにNaClを加え低濃度で展開を行っても同様であった。同様に水系溶媒として酢酸緩衝液を用いた場合、いずれのメタノール濃度においてもIAAはフェノール類及び芳香族アミンと分離することはなく(第2, 4-a図)、酢酸緩衝液は水

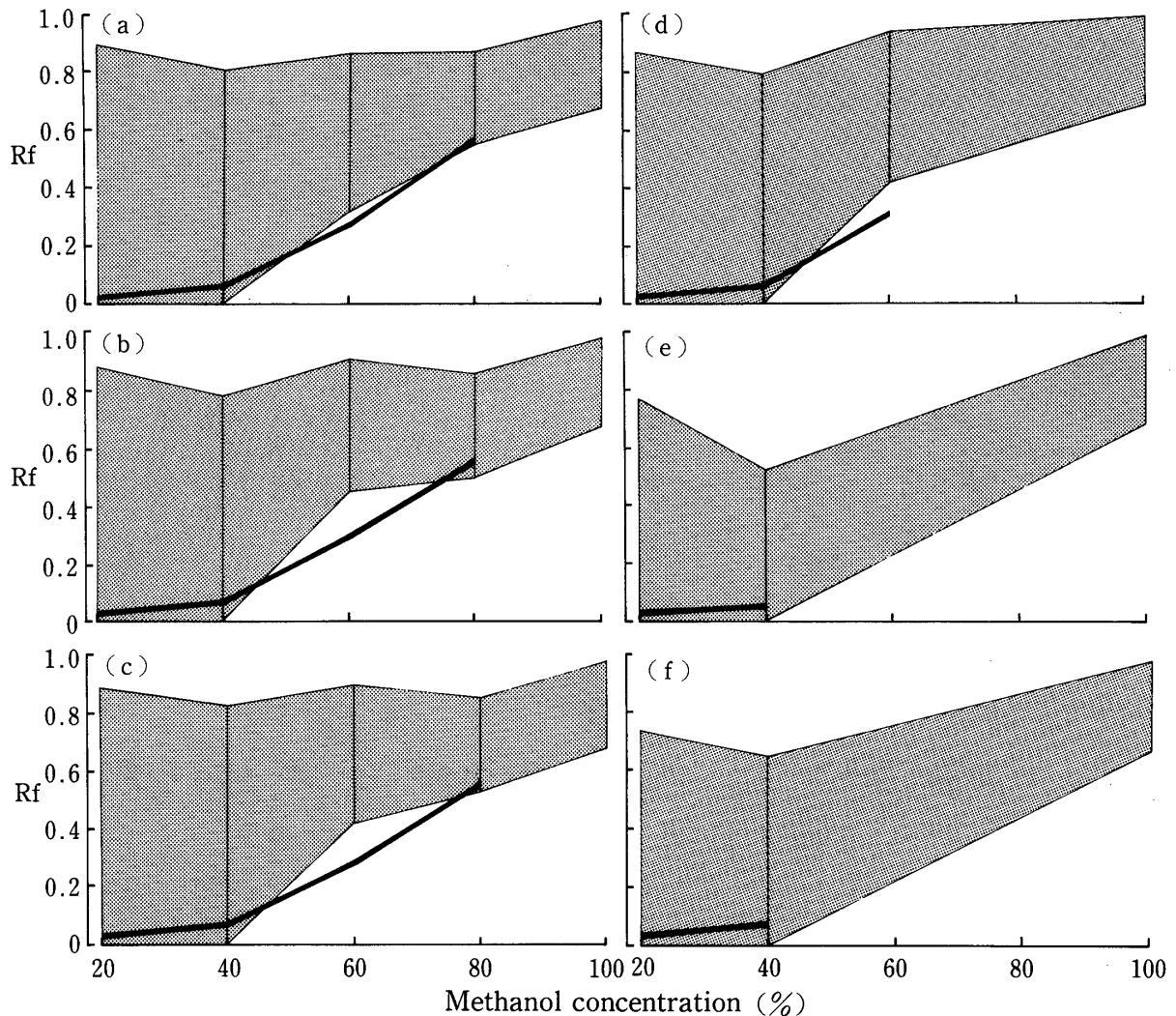


Fig. 5. Relation between separation of IAA and pH of buffer in developer.

Developer was solution of methanol and citric acid buffer with 0.5M NaCl in the several ratio.

(a) pH 3.0 (b) pH 4.0 (c) pH 5.0 (d) pH 6.0 (e) pH 7.0 (f) pH 8.0

系溶媒としては好ましくないものと思われる。したがって、Jensen ら⁵⁾が報告しているような条件では、カキの IAA を高速液体クロマトグラフィーで検出することは困難であると考えられる。しかし、水系溶媒としてクエン酸広域緩衝液を用いた場合には、メタノール濃度60%において IAA は黄及び桃色の呈色部位と良好な分離を示し(第5-b 図)、緩衝液の違いによって分離状態が変化することが明かとなった。この水系溶媒の違いによる差はその構成イオン及びイオン強度に基づくものと考えられるが、本論ではこれを明らかにすることは出来なかった。

IAA などの弱酸性物質はその溶媒の pH によってイオン化の状態が変化するため、採取時期が異なると同じ物質でも高速液体クロマトグラフでのピークのリテンションタイムにずれが生ずる現象が見られる。しかし、これは第5図に示すように水系溶媒として緩衝液を用いることによって防ぐことができるものと考えられる。

アルコール系有機溶媒を用いその極性を変化させたところ、極性が低くなるに従い IAA の Rf 値が低下し、iso-ブチルアルコール+エタノール・60%濃度域で IAA とフェノール類の分離が見られた(第4図)。これはフェノール類及び芳香族アミンの極性が低く、展開溶媒の極性が低下するに従い展開溶媒との分配率が高くなり展開速度が速くなったのに対し、IAA の分配率は低く展開が遅れたことによるものと思われる。

る。

高速液体クロマトグラフィーにおける溶離液はその組成が単純で、かつ高度な分離が可能であることが望ましい。したがって本実験結果から、溶媒液として60%メタノール・クエン酸広域緩衝液を用いることが望ましいと考えた。また、iso-ブチルアルコール+エタノール・60%濃度域でIAAとフェノール類及び芳香族アミンとの分離が見られ、特にこれはフェノール類及び芳香族アミンの展開が速まったことによると考えられることから、分離開始後にはiso-ブチルアルコール+エタノール・60%濃度で溶出し、その後60%メタノール・クエン酸広域緩衝液に溶離液を変更する方法が良いと考える。

今後、これらの結果を基に高速液体クロマトグラフィーを用いてカキの新梢及びヘタのオーキシンの定量を行なう予定である。

謝 辞

本研究は、1985年文部省科学研究費補助金（一般研究〈C〉59560026）の助成を受けて行ったものである。

引 用 文 献

- 1) Terry, P. H., L. H. Aung and A. A. Hertogh.: Identification of abscisic acid in *Tulipa gesneriana* L. by gas-liquid chromatography with electron capture and combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.* 70: 1574-1576, 1982.
- 2) Brenner, M. L.: Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 11-38, 1981.
- 3) Wurst, M., Z. Prikryl and V. Vancura.: High-performance liquid chromatography of plant hormones. *J. Chromatogr.* 191: 129-136, 1980.
- 4) Yamaguchi, T., K. Yokota and F. Uematsu.: Separation of indole metabolites from urine with an ODS type resin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 231: 166-172, 1982.
- 5) Jensen, E. and O. Junttila.: Indole-3-acetic acid from shoots of *Salix pentandra*. *Physiol. Plant.* 56: 241-244, 1982.
- 6) Mousdale, D. M. A.: Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography of the plant hormones indolyl-3-acetic and abscisic acid. *J. Chromatogr.* 209: 489-493, 1981.
- 7) 中川昌一: “果樹園芸原論” 東京: 養賢堂, 221-357, 1978.
- 8) 平田尚美・林真二・田辺賢二: カキ果実の発育ならびに成熟に関する生理学的研究. V. 果実の発育と内生のオーキシン, ジベレリン, サイトカイニン, アブシジン酸およびエチレン含量との関係, 鳥大農研報, 30: 26-37, 1978.
- 9) ベリン・デンプシー. “緩衝液の選択と応用 (辻啓一訳)” 東京: 講談社サイエンティフィク, 127-155, 1981.