

高速液体クロマトグラフィーによる ククモピン, ミキモピンの分析

合田幸広*・坂元史歩*

1. はじめに

植物病原菌である *Agrobacterium rhizogenes* が母植物に感染すると、菌由来の Ri プラスミドの T-DNA が植物体に挿入され一種の形質転換細胞である毛状根が誘導される。毛状根は、増殖が速いうえ、母植物で産生される有用二次代謝産物を生産する場合が多く、さらには、母植物と違った性質を持つ再生植物に再分化可能であり、近年各種分野でその利用が期待されている。*A. rhizogenes* の感染により生じた形質転換細胞は、通常 Fig. 1 で示すオパインと呼ばれる各種非タンパク性アミノ酸誘導体の特異的に産生し、*A. rhizogenes* の分類も、この産生オパインに従って行われている。得られた毛状根が、真に *A. rhizogenes* の感染により生じた形質転換植物細胞であることを確認するには、導入された T-DNA を検出することが最も確実であるが、簡便な方法として、産生されるオパインを分析検出することで代用できる。

オパインの検出には、従来より濾紙電気泳動法が一般的な方法として用いられてきており、本誌においても、その詳しい解説が田中により行われている¹⁾。しかし、濾紙電気泳動法は、電気泳動槽やパワーサプライといった装置を準備する必要があるうえ、高圧電流を利用するため、慣れない研究者にはいささか負担を感じる分析法でもあった。また同法は、定性的な分析法としては優れているが、正確な定量分析ができないという欠点も存在した。我々は、植物組織培養を応用した食品添加物の安全性確保の観点から研究を行っており、その過程でオパインであるククモピン, ミキモピンの定量分析に興味をもった。その際、濾紙電気泳動法に上述のような不便を

感じ、現代の研究室の必須設備である高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析出来ればと考え、各種カラムを用い検討を行った。その結果、従来 HPLC では困難とされていたこれらの化合物の分析が、簡便な逆相条件下で可能であることを確認したので紹介する。

2. 検討事項

逆相系 11 種, イオン交換系 4 種の計 15 種のカラムについて、各種分離モードを利用して、ククモピン, ミキモピンの標品及び、セイヨウワサビ及びニンジン各毛状根水抽出エキス中のククモピン, ミキモピンの分析について検討した。なお、流速は、1 ml/min., 検出波長は、220 nm を用いた。

3. 具体例

ククモピン, ミキモピンは、3つのカルボキシル基と2つのアミノ基を持つことから、親水性が高く、pH の状態によっては、zwitter 型イオンになるものと考えられる。このような構造を持つ化合物の分析は、通常、イオン交換クロマトグラフィーや、イオンペアクロマトグラフィーが優れている。事実、我々の検討でも、標品を使った実験では、下記のような系で分析可能であった。イオン交換クロマトグラフィー

例 1

カラム: Wakopak WA-SCX-10 H
(4.6×250 mm) (和光純薬)

溶 媒: 水 100%

例 2

カラム: TSKgel DEAE-2 SW
(4.6×250 mm) (東ソー)

溶 媒: 0.1 N 酢酸アンモニウム (pH 5.0)
イオンペアクロマトグラフィー

例 3

カラム: TSKgel ODS-80 Ts (4.6×150 mm) (東ソー)
溶 媒: 20 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に 5 mM tetra-butylammonium phosphate を加えたもの

Yukihiro GODA* and Shiho SAKAMOTO*

Analyses of Cucumopine and Mikimopine by High Performance Liquid Chromatography.

* 国立衛生試験所食品添加物部
(〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

* Division of Food Additives, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo, 158 Japan

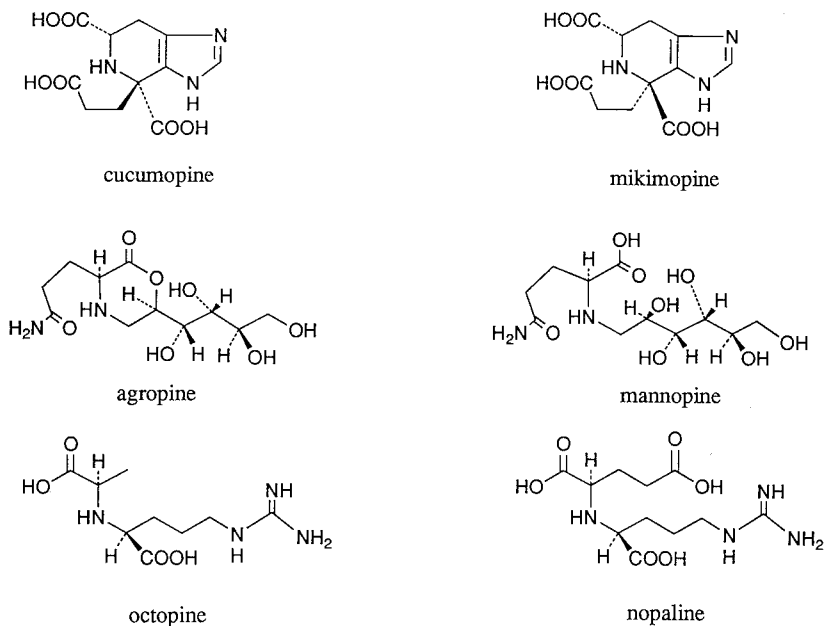


Fig. 1 Structures of opines.

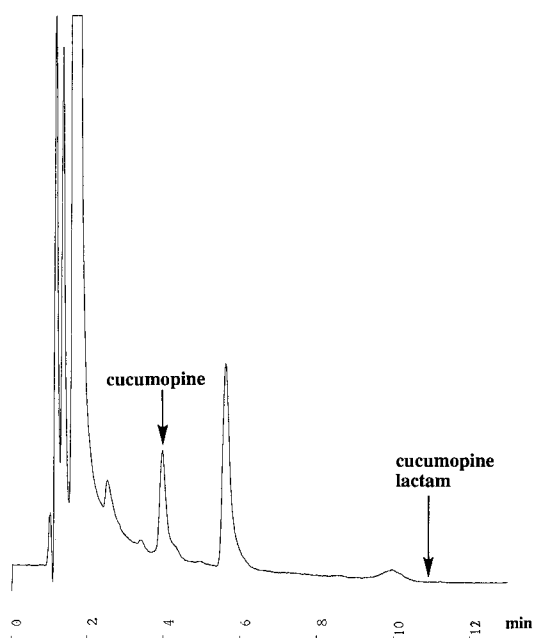


Fig. 2 High performance liquid chromatogram of the water extract (10 μ g) of horse-radish hairy root induced by *A. rhizogenes* (NCPBP 2659).

Column: TSKgel carbon-500 with TSK guard carbon-500, solvent: 0.1% TFA, flow rate: 1 ml/min., detection 220 nm.

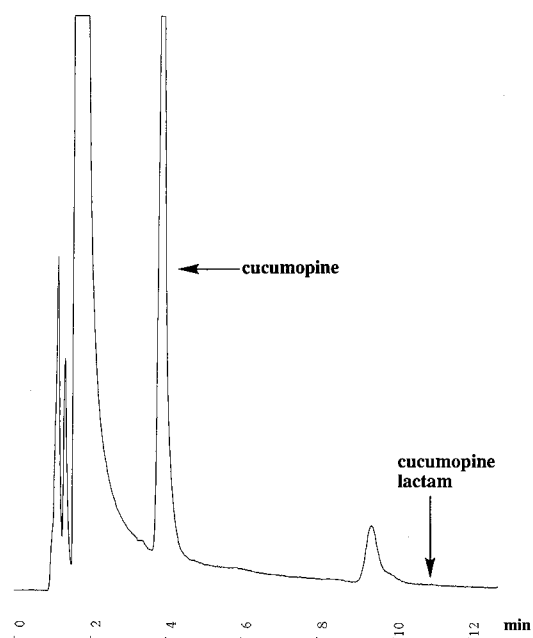


Fig. 3 High performance liquid chromatogram of the water extract (10 μ g) of carrot hairy root induced by *A. rhizogenes* (NCPBP 2659).

See footnotes for Fig. 2.

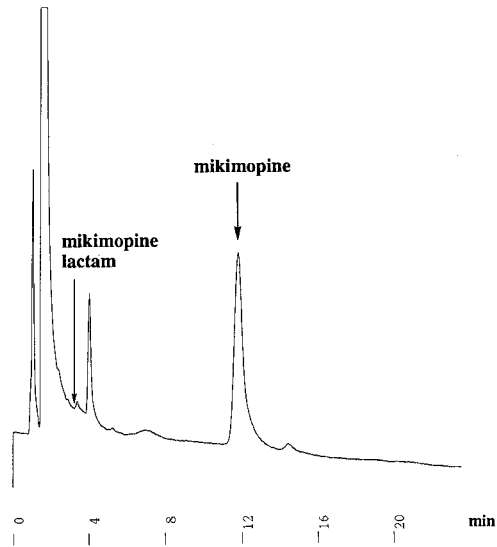


Fig. 4 High performance liquid chromatogram of the water extract (10 µg) of horse-radish hairy root induced by *A. rhizogenes* (MAFF 03-01724). Column: TSKgel carbon-500 with TSKguard carbon-500, solvent: H₂O/MeOH/TFA (94/6/0.1), flow rate: 1 ml/min., detection 220nm.

例 1, 2 では, 抽出物を用いた実験では, 標品と同じ保持時間に妨害ピークが現れ, 分析不能となった. また, 例 3 では, ラクトム体 (ミキモピン, ククモピンは酸性条件で保存すると非天然型であるラクタム体となりやすい) との分離があまりよくなく, さらに, 抽出物を用いた実験では, イオンペア状態にならず, 分析不能であった.

分配クロマトグラフィー

逆相系のカラムは, ククモピン, ミキモピン等, 親水性の高い化合物に対して, 保持力が弱く, 通常の分配クロマトグラフィーを行っていくことが知られている. 事実, ODS カラムだけでなく, アミノカラム, シアノカラム, C8 カラムを含めたすべてのカラム, 溶媒系でククモピンは全く保持されなかった. しかし, ミキモピンについては, 例 4 の系で若干保持された (温度 50 度で, 保持時間 2.5 分). しかし, 抽出物を用いた実験では, 妨害ピークとの分離が悪く, あまり良い結果は得られなかった.

例 4

カラム: TSKgel ODS-80 Ts (4.6×150 mm) (東ソー)
溶 媒: 0.1% トリフルオロ酢酸 (pH 1.9)

最近になって, シリカゲル基材以外の逆相系分配カラムとして, 高純度炭素を基材としたカラムが, いくつか

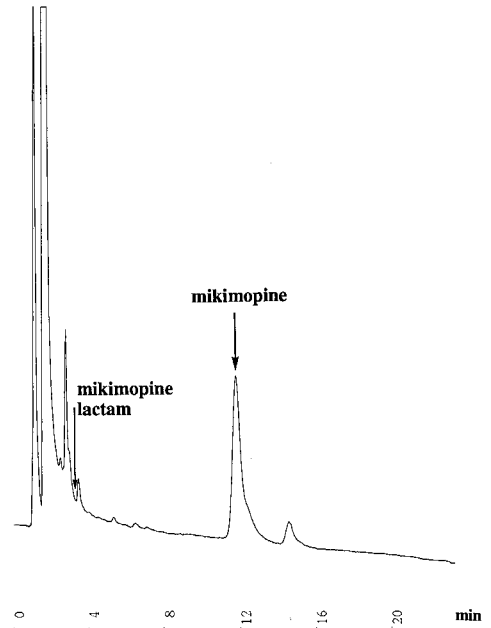


Fig. 5 High performance liquid chromatogram of the water extract (10 µg) of carrot hairy root induced by *A. rhizogenes* (MAFF 03-01724). See footnotes for Fig. 4.

のカラムメーカーからカーボンカラムの一般名で市販されるようになった. カーボンカラムは ODS カラムと比較して, カラム表面が π 電子で覆われていることからカルボニル基等の 2 重結合を持つ化合物に対して異なる分離能を示し, また, 一般に親水性の化合物に対しても保持力が強いことが知られている. そこで, 我々も 2 社の製品を入手して, ククモピン, ミキモピンの分析を検討した. その結果, 例 5 の条件で, ククモピンが保持され (保持時間: 4.0 min.), 毛状根抽出物についても Fig. 2, 3 に示すように, 妨害ピークなくうまく, ククモピンが分離定量出来ることが明らかとなった. また, 得られた定量値は, 濾紙電気泳動後, 標品との比色で推定した値と良く一致した. ミキモピンの場合この条件では, 保持されすぎ (保持時間: 60 min. 程度) で, 例 6 のように, 6% メタノールを加えた系でうまく溶出され (保持時間: 11.9 min.), Fig. 4, 5 に示すように, 毛状根抽出物についても, 妨害ピークなく分析することが出来た.

例 5 (ククモピン用)

カラム: TSKgel carbon-500 (4.6×100 mm) (東ソー)
(Fig. 2, 3 は TSKguard carbon-500 (4.6×5 mm) 付きで, 温度 50 度で分析した.)

溶 媒: 0.1% トリフルオロ酢酸 (pH 1.9)

例6 (ミキモピン用)

カラム: TSKgel carbon-500 (4.6×100 mm) (東ソー)

(Fig. 4, 5はTSKguard carbon-500 (4.6×5 mm) 付きで, 温度50度で分析した.)

溶媒: 水/メタノール/トリフルオロ酢酸 (94/6/0.1)

例5, 6の条件下, ククモピン, ミキモピンの定量限界は, ng程度であり, 毛状根として, 約50 μg (新鮮重量), 水抽出物として, 約1 μgあれば, 充分両オパインが定量出来ることになる.

我々は, 他のオパインの分析を行っていないが, アグロピン, マンノピンは, 毛状根由来の試料より, 70% アセトニトリルの系でアミノカラム (TSKgel LS-450 NH₂ 現 TSKgel NH₂-60) を用い, 1 ml/min. の流速, 203 nm の検出波長で, 分析可能 (アグロピンの保持時間: 25 min., マンノピンの保持時間: 33 min.) だそうである (東京大学薬学部の海老塚先生との私信).

4. おわりに

HPLCを使ったククモピン, ミキモピンの分析例を紹介した. 毛状根中のオパイン以外の含有物は, 各植物体により異なるので, 妨害ピークも, 当然各植物体毎に異なるはずである. もし, 妨害ピークが例5, 6の条件で出現する際には, ククモピンやミキモピンはカラム保

持力が弱いので, 前処理として, 逆相系の固相抽出ミニカラム (例えば, ボンドエリートや, セパックカラム) を使用し, 水で溶出される画分だけを分析すれば, 分析可能となる確率が高い. また, このような前処理を行えば, 例1, 2のイオン交換の条件でも, 試料由来の妨害ピークをうまく除ける可能性がある. また, 標品のククモピン, ミキモピンは, α-ケトグルタル酸と, ヒスチジンより合成される²⁾が, その際の確認用には, 例4の系も充分利用可能である. カーボンカラムは比較的高価 (1本, 15万-20万円程度) なので, まずは, お手持ちのカラムで, 本稿を参考にして頂いて, 目的にあった分析条件を決定するのがベストであろう.

最後に, 貴重なミキモピン, ククモピン及びラクタム体の試料を御恵与下さった国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場の下村講一郎博士に深謝する.

(1993年6月28日受理)

文 献

- 1) 田中伸和, 1990. 植物組織培養, 7: 45-47.
- 2) Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada, A. Suzuki, 1990. Phytochemistry, 29: 3131-3134.