

高速液体クロマトグラフィー

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

202

放線菌の化学分類(3)

Chemotaxonomy of Actinomycetes (3)

メナキノンの分析

Analysis of Menaquinone (Vitamin K₂) Compounds

放線菌の分類学的指標として、菌体メナキノン組成は重要です。また、メナキノン分子種の分布は、広く研究されており、属レベルの分類、同定において非常に有効な手法となっているだけでなく、新種属命名のとき、メナキノン組成の記載は、不可欠となっています。

メナキノン分子種の同定、組成比の決定には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が有効な手段として用いられています。

Fig.1にメナキノンの構造を示します。メナキノンとは 2-methyl-3-multiprenyl-1,4-naphthoquinoneの構造をしており、イソプレレン単位の数、イソプレレン側鎖の水素飽和度、イソプレレン側鎖の水素飽和度から分子種の違いが生じます。

現在のところ水素飽和の位置については分類学的評価が与えられていないので、当面考慮すべき指標としてはイソプレレン単位の数、イソプレレン側鎖の水素飽和度ということになります。これをMK-n(Hm)と表記します。nはイソプレレン単位の数、mはイソプレレン側鎖の飽和に関わる水素原子の数を示します。

それぞれのメナキノン分子種は、構造の違いから、HPLCにより分離することが可能です。そこでメナキノン組成が既知の標準菌株を分析することで、各メナキノンの溶出時間がわかります。これをもとに未知菌体のメナキノン分子種を同定するとともに、各メナキノンの吸光度の比から組成比を知ることができます。

Table 1にメナキノン試料の前処理法を示します。

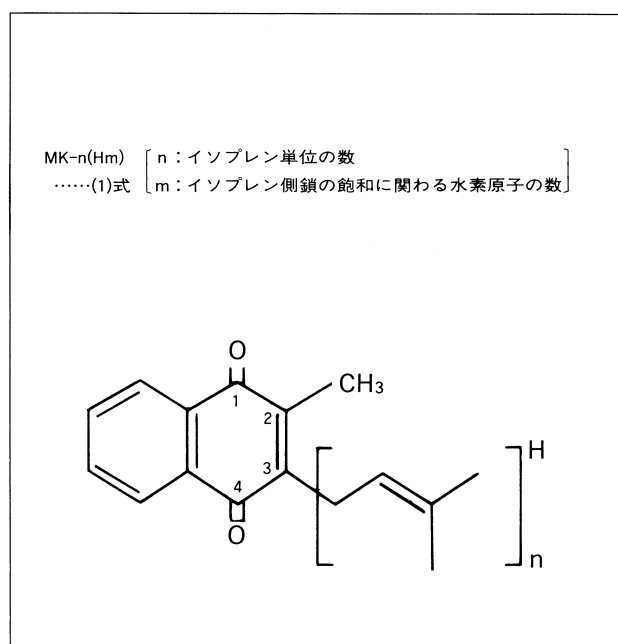


Fig.1 メナキノンの化学構造式
Chemical Structures of Menaquinones

Table 1 前処理方法
Pretreatment Method

Freeze-dried actinomycetes (100-300mg)	
← Chloroform/methanol = (2/1)	
Stir over night	
Filter	
(Filtrate)	
Concentrate	
(Residue) ← Remove Solvent	
← Acetone	
Silicagel TLC (Solvent : Benzene, 1hour)	
Menaquinone band	
← Acetone (5-10ml)	
Filter	
(Filtrate)	
Concentrate	
Dissolve in mobile phase (100 μ l)	
HPLC (5-20 μ l)	

Table 2に分析条件を示します。また、Fig.2~Fig.4に代表的な標準菌株の分析例を示します。

溶出したピークの同定には、a)標準菌株での各メナキノン保持時間と未知試料の溶出ピークの保持時間を比較する方法と、b)HPLCで分取後、質量分析計で分析する方法があります。実際にはこの両者の方法を適当に組合わせて同定しています。

(掲載したクロマトグラムは理化学研究所微生物系統保存施設 工藤卓二先生よりご提供いただきました。)

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

System	: Shimadzu LC-9A system
Column	: Shim-pack ODS (4.6mmI.D.×150cmL.)
Mobile phase	: Methanol/Isopropyl alcohol=3/2
Oven temp.	: 40°C
Flow rate	: 1.0ml/min.
Detector	: UV Detector (SPD-6A)
	Wavelength; 270nm

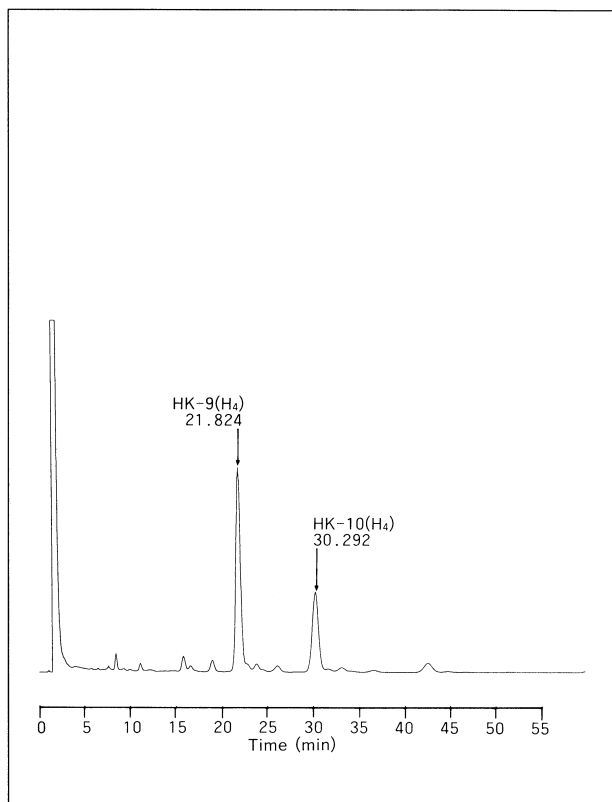


Fig.2 *Saccharothrix Australiensis* 抽出液のクロマトグラム
Chromatogram of *Saccharothrix Australiensis*
(JCM No.3370)Extract

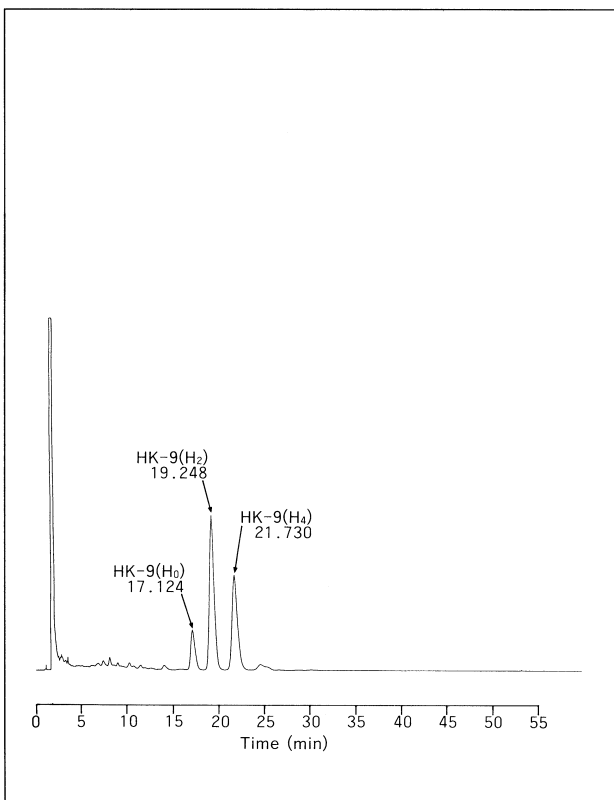


Fig.3 *Streptosporangium Vulgare* 抽出液のクロマトグラム
Chromatogram of *Streptosporangium Vulgare*
(JCM No.3028)Extract

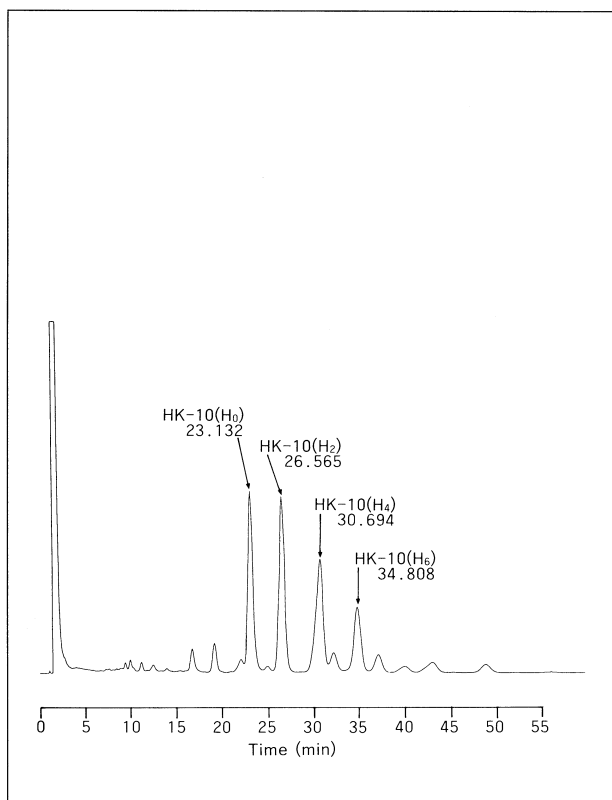


Fig.4 *Nocardioopsis Dassonvillei* Subsp. *Dassonvillei* 抽出液の
クロマトグラム
Chromatogram of *Nocardioopsis Dassonvillei* Subsp.
Dassonvillei (JCM No. 7437)Extract

参考文献

「放線菌の同定実験法」放線菌学術叢書 1
日本放線菌学会編

初版発行：1990年3月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。