Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

キャピラリーゾーン電気泳動法によるアイスプラント中の無機陰イオン，有機酸及びアミノ酸の定量

服部，考成
福士，惠一
早川，真
湊，太郎

(Citation)
分析化学,62(8):737-741

(Issue Date)
2013-08-05

(Resource Type)
journal article

(Version)
Version of Record

(Rights)
©2013 The Japan Society for Analytical Chemistry

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/90002791

BUNSEKI KAGAKU Vol. 62, No. 8, pp. 737–741（2013）

© 2013 The Japan Society for Analytical Chemistry

ノ ー ト

キャピラリーゾーン電気泳動法によるアイスプラント中の無機陰イオン，有機酸及びアミノ酸の定量

服部 考成[1]，福士 惠一®[1]，早 川 真[2]，湊 太 郎[3]

1 緒 言

近年，生活習慣病の予防，血糖値低下及び抗酸化作用を有するアイスプラント（*Mesembryanthemum crystallinum* L.）という野菜が注目されている．アイスプラントは塩味が強いという特徴があるが，アイスプラント中の呈味成分についてはほとんど報告がない．一般的に，野菜中の無機陰イオン，有機酸，アミノ酸を定量することにより，野菜の味の特徴を評価できる[1]．塩化物イオン（Cl^-）は塩味，シュウ酸はエグ味，クエン酸，リンゴ酸は酸味，アスパラギン酸，グルタミン酸は旨味に寄与する．また，野菜中の無機陰イオンを定量することは，健康影響を評価するために重要である．たとえば，硝酸塩の還元により生成する亜硝酸塩は，発ガン性物質であるニトロソアミン生成の原因となる[2]．したがって，アイスプラント中の亜硝酸イオン（NO_2^-），硝酸イオン（NO_3^-）を定量する必要がある．

現在，これらの成分はイオンクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーにより定量されているが[3)~5)]，野菜中の無機陰イオン，有機酸，アミノ酸の定量についての報告は少ない．一方，堀江[1]は，Soga らのキャピラリーゾーン電気泳動法（CZE）による無機陰イオン，有機酸，アミノ酸，糖の一斉分析法[6]に基づき，野菜中のこれら成分の同時定量について報告している．この方法では，紫外域に吸収をもつ 2,6-ピリジンジカルボン酸（PDC）を泳動液（background electrolyte: BGE）とした間接吸光法が用いられている．しかし，有機酸分析におけるベースラインの安定性[7]や紫外域において強い吸収[8]を有する NO_2^-，NO_3^- も定量することを考慮すると直接吸光法の方が望ましいと考えられる．

そこで本研究では，上述の長所を有する直接吸光法を用いた CZE によるアイスプラント中の無機陰イオン，有機酸，アミノ酸の定量法確立を試みた．

2 実 験

2·1 装 置

キャピラリー電気泳動装置としてフォトダイオードアレイ検出器を備えた大塚電子製 CAPI-3200 を用いた．キャピラリーはジーエルサイエンス製フューズドシリカ管（全長 112.35 cm，有効長 100 cm，内径 75 μm，外径 375 μm）である．pH 測定には，堀場製作所製カスタニー LAB pH メーター F-22 を用いた．

2·2 試 薬

試薬はすべて特級品を使用した．陽イオン界面活性剤である塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム（TTAC）は東京化成工業製，臭化ヘキサジメトリン（HDMB）はナカライテスク製，臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）は Sigma-Aldrich 製を使用した．BGE として，20 mmol L^{-1} リン酸水素二ナトリウム（1 mol L^{-1} NaOH で pH 10.6 に調整）に 0.001 %（w/v）HDMB を添加したもの（BGE（A））を用いた．pH を 10.6 としたのは，予備実験の結果，10.6 が再現性，感度の観点から最適であったためである．なお，間接吸光法との検出特性の比較のために，20 mmol L^{-1} PDC（1 mol L^{-1} NaOH で pH 12.1 に調整）に 0.5 mmol L^{-1} CTAB を添加した BGE（BGE（B））を使用した．標準溶液として，50 mg L^{-1} Cl^-，NO_2^-，NO_3^-，シュウ酸，クエン酸，リンゴ酸，アスパラギン酸，グルタミン酸溶液を調製した．本実験で使用した純水は，ヤマト科学製 WG220 型純水製造装置及びメルクミリポア製 Simpli Lab 超純水製造装置により得られたものである．なお，BGE，標準溶液，アイスプラント抽出液は使用前に 0.45 μm のメンブランフィルター（アドバンテック製）で沪過した．

2·3 アイスプラント抽出液の調製

分析に用いたアイスプラントは日本アドバンストアグリで栽培されたものを使用した．分析目的成分の抽出は，堀江の報告[1]に基づいて行った．すなわち，50 mL ビーカー

® E-mail : fukushi@maritime.kobe-u.ac.jp
[1] 神戸大学大学院海事科学研究科 : 658-0022 兵庫県神戸市東灘区深江南町 5-1-1
[2] 日本アドバンストアグリ株式会社 : 526-0829 滋賀県長浜市田村町 1281-8
[3] 青木マリーン株式会社 : 658-0026 兵庫県神戸市東灘区魚崎西町 3-4-3

Table 1 Effects of kinds of cationic surfactants on precision [a)]

Analyte	RSD [b)]/%			
	Time		Area	
	TTAC	HDMB	TTAC	HDMB
Cl^-	0.25	0.083	3.1	1.8
NO_2^-	0.26	0.081	31	3.8
NO_3^-	0.26	0.12	1.3	0.28
Oxalic acid	0.28	0.12	4.3	1.9
Citric acid	0.95	0.31	16	7.6
Malic acid	1.0	0.28	7.4	9.3
Aspartic acid	1.4	0.43	7.0	6.1
Glutamic acid	1.4	0.41	—	6.3

a) Electrophoretic conditions: capillary, $L_{tot.}$ = 112.35 cm, $L_{det.}$ = 100 cm, 75 µm I.D. × 375 µm O.D.; BGE, 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate adjusted to pH 10.6 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.6 mmol L^{-1} tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC) or 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide (HDMB); voltage, 25 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 190 nm for Cl^-, oxalic acid, citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid and 210 nm for NO_2^- and NO_3^-. b) Sample, 100 fold diluted extract from the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) for Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, and oxalic acid and non-diluted extract from the common ice plant for citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid; vacuum injection period, 1 s (*ca.* 40 nL); four determinations.

にアイスプラント試料 10.0 g をとり，これに対して 2 倍量となる純水 20 mL を加え，内生酵素を死活させるために，家庭用電子レンジで沸騰直前まで加熱した．次いで，乳鉢に移してすり潰した後，沪過した．他野菜の抽出液と比較し，アイスプラント抽出液中には高濃度の Cl^- が含まれる．そのため，Cl^-，NO_2^-，NO_3^-，シュウ酸定量及び添加回収実験時は，この抽出液を 100 倍に希釈した．また，クエン酸，リンゴ酸，アスパラギン酸，グルタミン酸定量時は希釈せず，添加回収実験時は 2 倍に希釈し分析した．

2・4 定量操作法

新しいキャピラリーの場合には，真空吸引法（50 kPa）によりキャピラリーを純水で 5 分，1 mol L^{-1} NaOH で 40 分，純水で 10 分，BGE で 15 分洗浄した．分析の際は，同様に BGE をキャピラリーに 3 分充填し，試料を真空吸引法（50 kPa）により 1 秒（約 40 nL）注入した．その後，試料注入側を陰極として 25 kV の電圧を印加した．検出（フォトダイオードアレイ検出器）に関しては，190～400 nm の波長範囲で行った．BGE（A）を用いた直接吸光法におけるピーク解析は，Cl^-，シュウ酸，クエン酸，リンゴ酸，アスパラギン酸，グルタミン酸については 190 nm，NO_2^-，NO_3^- については 210 nm の波長で行った．一方，BGE（B）を用いた間接吸光法では，270 nm の波長で全分析目的成分のピーク解析を行った．なお，恒温槽温度は 25 ℃ に設定した．

3 結果と考察

3・1 陽イオン界面活性剤

一般的に，CZE による陰イオン分析では分析時間短縮のため，BGE に陽イオン界面活性剤を添加し，電気浸透流（EOF）を反転させる．そこで，BGE（20 mmol L^{-1} リン酸水素二ナトリウム水溶液）に 0.6 mmol L^{-1} TTAC を添加した場合と 0.001 %（w/v）HDMB を添加した場合について比較した．標準溶液分析では，TTAC，HDMB いずれの場合も良い再現性が得られた．しかし，アイスプラント抽出液分析においては，TTAC の場合，分析回数が増すごとに泳動時間が徐々に長くなり，Table 1 に示すように泳動時間の再現性が低下した．これは，堀江[1)]や Roselló ら[9)]も同様の報告をしており，野菜中の成分とキャピラリー壁との相互作用によるものと考えられる．また，NO_2^-，クエン酸のピーク面積の再現性が悪く，グルタミン酸のピークが共存成分のピークと分離されなかった．一方，HDMB の場合，泳動時間の再現性は良好であった．これは，EOF 反転効果が大きい HDMB[10)]を低濃度で使用することで，上述の相互作用が抑制されたためと考えられる[9)]．したがって，陽イオン界面活性剤として，HDMB を BGE に添加することとした．

3・2 間接吸光法との検出特性の比較

直接吸光法による本法と間接吸光法による従来法[1)]との検出特性を比較した．標準溶液を分析した際のエレクトロフェログラムを Fig. 1 に示す．直接吸光法（Fig. 1（A））の場合，間接吸光法（Fig. 1（B））と比較し，ベースライン

が安定しており，NO_2^-，NO_3^-，シュウ酸のピーク高さは，それぞれ約 5.7，4.3，2.0 倍であった．直接吸光法及び間接吸光法における泳動時間，ピーク面積の相対標準偏差（RSD，%），検出限界（LOD，$S/N = 3$）を Table 2 に示す．泳動時間，ピーク面積の RSD は，全成分について直接吸光法の方が間接吸光法より小さく，LOD は直接吸光法の方が間接吸光法よりも 3.5～580 倍低かった．したがって，本法の優位性が明らかとなった．

3・3　アイスプラントの分析

本法により検量線を作成し，アイスプラント中の各成分を定量した．アイスプラント抽出液を分析した際に得られたエレクトロフェログラムを Fig. 2 に示す．Fig. 2（A-1）は試料として 100 倍希釈したアイスプラント抽出液を用い，190 nm の波長で Cl^-，シュウ酸のピークを解析した際のエレクトロフェログラムである．Fig. 2（A-2）は同様の試料を用い，210 nm の波長で NO_2^-，NO_3^-のピークを解析した際のエレクトロフェログラムである．波長 190 nm における Cl^-，シュウ酸のピーク高さは，210 nm の場合と比較し，それぞれ約 19，7.7 倍であった．一方，210 nm では，190 nm の場合と比較し，NO_3^-のピーク高さはほぼ同様であったが，ベースラインの変動が小さく，NO_2^-のピーク高さは，190 nm の場合の約 1.3 倍であった．また，Cl^-，

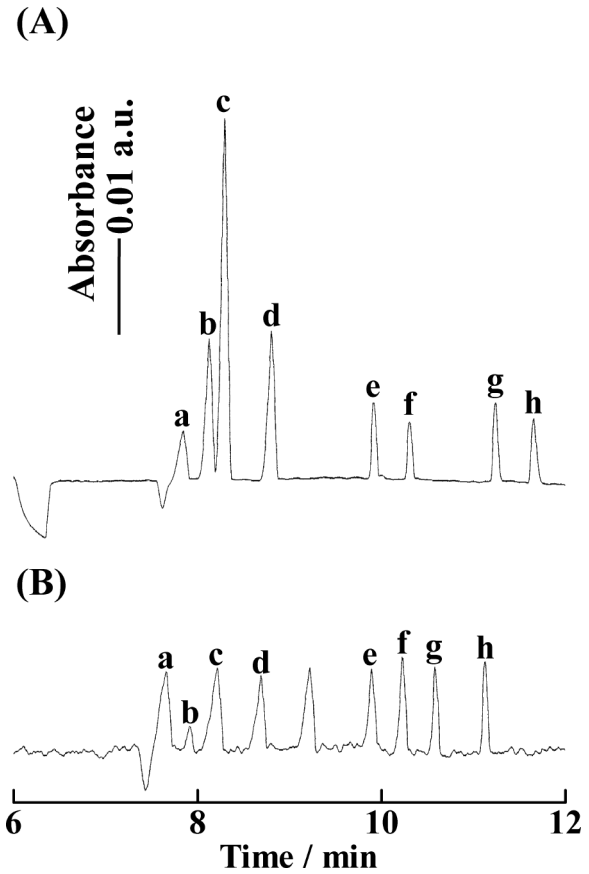

Fig. 1　Electropherograms of standard solution with direct UV and indirect UV detections

BGE: (A) 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate adjusted to pH 10.6 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide (HDMB); (B) 20 mmol L^{-1} 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) adjusted to pH 12.1 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.5 mM cetyltrimetylammonium bromide (CTAB). Wavelength for detection: (A) 190 nm; (B) 270 nm. Sample: (A) and (B) standard solution containing 50 mg L^{-1} Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, oxalic acid, citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid. Identification of peaks: a, Cl^-; b, NO_2^-; c, NO_3^-; d, oxalic acid; e, citric acid; f, malic acid; g, aspartic acid; h, glutamic acid.　Other conditions as described in Table 1.

Table 2　Precision and detection limits for direct[a)] and indirect[b)] detections

Analyte	RSD[c)]/%				LOD ($S/N = 3$)/mg L^{-1}	
	Time		Area			
	Direct	Indirect	Direct	Indirect	Direct	Indirect
Cl^-	0.21	0.44	2.9	5.2	2.9	11
NO_2^-	0.20	0.45	5.0	5.8	0.069	40
NO_3^-	0.24	0.42	0.80	2.5	0.040	10
Oxalic acid	0.23	0.43	0.53	7.0	0.96	11
Citric acid	0.20	0.47	0.36	12	1.9	9.8
Malic acid	0.23	0.54	0.67	3.9	2.5	8.7
Aspartic acid	0.13	0.56	0.11	6.5	1.8	9.7
Glutamic acid	0.15	0.63	0.61	7.2	2.2	9.2

a) BGE, 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate adjusted to pH 10.6 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide (HDMB); other conditions as described in Table 1.　b) BGE, 20 mmol L^{-1} 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) adjusted to pH 12.1 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.5 mM cetyltrimetylammonium bromide (CTAB); other conditions as described in Table 1 and Fig. 1.　c) Sample, standard solution containing 50 mg L^{-1} Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, oxalic acid, citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid; four determinations.

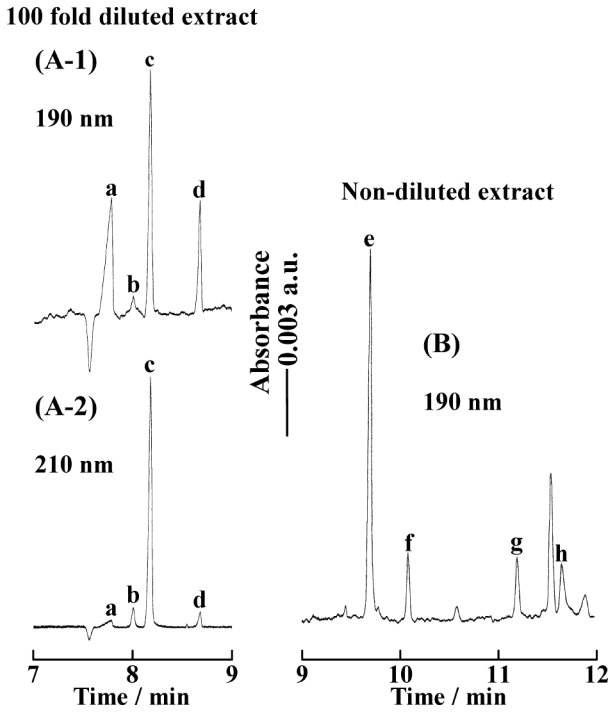

Fig. 2 Electropherograms of extract from the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)

BGE: 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate adjusted to pH 10.6 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide (HDMB). Sample: (A-1) and (A-2) 100 fold diluted extract from the common ice plant; (B) non-diluted extract from the common ice plant. Wavelength for detection: (A-1) and (B) 190 nm; (A-2) 210 nm. Identification of peaks: a, Cl^-; b, NO_2^-; c, NO_3^-; d, oxalic acid; e, citric acid; f, malic acid; g, aspartic acid; h, glutamic acid. Other conditions as described in Table 1.

NO_2^-，NO_3^-，シュウ酸の順で，それぞれのピークがベースライン分離され，9 分以内に検出された．なお，これら成分の泳動順は，電気泳動のシミュレーションソフトである Peakmaster 5.3[11]による結果と一致した．Fig. 2 (B) は，試料として希釈していないアイスプラント抽出液を用い，190 nm の波長でクエン酸，リンゴ酸，アスパラギン酸，グルタミン酸のピークを解析した際のエレクトロフェログラムである．クエン酸，リンゴ酸，アスパラギン酸，グルタミン酸の順で，それぞれのピークがベースライン分離され，12 分以内に検出された．これら成分の泳動順も Peakmaster 5.3 による結果と一致した．なお，Peakmaster 5.3 を用い，グルタミン酸ピークの直前のピークについて確認した．その結果，このピークは，その移動度からシスチンではないかと考えられたが，今後，実験により検証する必要がある．なお，グルタミン酸とシスチンと考えられたピークの分離度は 1.4 であり[12]，十分に分離が達成された．各成分のピーク面積を用いた検量線の回帰式，アイスプラント中の含有量，添加回収実験における回収率を Table 3 に示す．検量線の相関係数は 0.9980～0.9998 となり，直線性の良いものが得られた．また，回収率は 75～120 % であった．NO_2^-の回収率が 75 % と低いのは，アイスプラント抽出液中の NO_2^-濃度が低いためと考えられる．

4 結　　言

直接吸光法を用いた CZE によるアイスプラント中の無機陰イオン，有機酸，アミノ酸の定量法を確立した．本法は従来の間接吸光法[1]よりも再現性，感度とも優れており，アイスプラント中のこれら成分定量に有用であると考えられる．今回は野菜試料として Cl^-を多く含むアイスプラントを分析したため，無機陰イオン，有機酸，アミノ酸の同時定量が困難であったが，Cl^-含有量が少ない野菜につい

Table 3 Regression equations, analytical results of the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.), and recovery[a)]

Analyte	Concentration/ mg L^{-1}	Regression equation[b)] (correlation coefficient)	Content/ mg/100 g[c)]	Recovery[d)]/ %
Cl^-	0－60	$y = 0.683x + 0.358$ (0.9987)	460	120
NO_2^-	0－1.2	$y = 2.42x + 0.295$ (0.9980)	3.3	75
NO_3^-	0－12	$y = 3.33x + 0.135$ (0.9996)	230	120
Oxalic acid	0－18	$y = 1.48x + 0.319$ (0.9993)	230	110
Citric acid	0－90	$y = 0.566x + 0.394$ (0.9998)	6.4	93
Malic acid	0－30	$y = 0.421x + 0.128$ (0.9997)	1.8	110
Aspartic acid	0－12	$y = 0.621x + 0.0937$ (0.9988)	5.0	80
Glutamic acid	0－12	$y = 0.581x + 0.0173$ (0.9982)	7.6	100

a) BGE, 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate adjusted to pH 10.6 with 1 mol L^{-1} sodium hydroxide containing 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide (HDMB); other conditions as described in Table 1. b) In the regression equation, the x value is the concentration of analytes and the y value is the peak area. c) flesh weight. d) Sample, 100 fold diluted extract from the common ice plant adding 10 mg L^{-1} Cl^-, 0.20 mg L^{-1} NO_2^-, 2.0 mg L^{-1} NO_3^-, and 3.0 mg L^{-1} oxalic acid and 2 fold diluted extract from the common ice plant adding 15 mg L^{-1} citric acid, 5.0 mg L^{-1} malic acid, 2.0 mg L^{-1} aspartic acid, and 2.0 mg L^{-1} glutamic acid.

ては，本法により同時定量が可能であると考えられる．

謝　辞

本研究は，平成 23 年度第 2 回「研究成果最適展開プログラム（A-STEP）探索タイプ（課題番号 AS232Z01903E）」及び平成 23 年度公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団（助成番号 1111）による研究助成を受けて行われた．ここに記して謝意を表する．

（2012 年 9 月，日本分析化学会第 61 年会において一部発表）

文　献

1) 堀江秀樹：分析化学（*Bunseki Kagaku*），**58**，1063 (2009).
2) 大槻理美子，菊川清見：食品衛生学雑誌，**46**，58 (2005).
3) 安井明美，永井利郎，小泉英夫：日本食品工業学会誌，**39**, 722 (1992).
4) 浅野正博，木下恵子，小塚大生，木谷裕亮，安井義徳，田窪　健，斉藤春絵，森田正晶：農林水産消費技術センター調査研究報告，**22**, 77 (1998).
5) 小野里雅貴，川田邦明，杉崎千恵，浅田隆志，及川紀久雄：分析化学（*Bunseki Kagaku*), **54**, 979 (2005).
6) T. Soga, G. A. Ross : *J. Chromatogr. A*, **837**, 231 (1999).
7) I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano, M. T. Sancho : *Anal. Chim. Acta*, **565**, 190 (2006).
8) M. C. Gennaro, P. L. Bertolo, A. Cordero : *Anal. Chim. Acta*, **239**, 203 (1990).
9) S. Roselló, L. Galiana-Balaguer, J. M. Herrero-Martínez, A. Maquieira, F. Nuez : *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 1101 (2002).
10) M. T. Galceran, L. Puignou, M. Diez : *J. Chromatogr. A*, **732**, 167 (1996).
11) M. Jaroš, V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, B. Gaš : *Electrophoresis*, **25**, 3080 (2004).
12) 本田　進，寺部　茂編：キャピラリー電気泳動—基礎と実際—, p. 59 (1995), (講談社).

Determination of Inorganic Anions, Organic Acids, and Amino Acids in the Common Ice Plant (*Mesembryanthemum Crystallinum* L.) Using Capillary Zone Electrophoresis

Takanari HATTORI[1], Keiichi FUKUSHI®[1], Makoto HAYAKAWA[2] and Taro MINATO[3]

® E-mail : fukushi@maritime.kobe-u.ac.jp

[1] Kobe University Graduate School of Maritime Sciences, 5-1-1, Fukaeminami-machi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-0022
[2] Nihon Advanced Agri Corporation, 1281-8, Tamura-cho, Nagahama-shi, Shiga 526-0829
[3] Aoki Marine Co., Ltd., 3-4-3, Uozakinishi-machi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-0026

(Received February 19, 2013; Accepted March 28, 2013)

We developed a capillary zone electrophoresis method with direct UV detection for the determination of inorganic anions (Cl^-, NO_2^-, and NO_3^-), organic acids (oxalic acid, citric acid, and malic acid), and amino acids (aspartic acid and glutamic acid) in the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). As the background electrolyte, a 20 mmol L^{-1} disodium hydrogenphosphate dodecahydrate solution adjusted to pH 10.6 was used with the addition of 0.001 % (w/v) hexadimethrine bromide to reverse electroosmotic flow. The detection responses for the above analytes were improved by 3.5–580 fold in terms of the limits of detection (LODs, $S/N = 3$) in comparison with conventional indirect UV detection. The LODs for the analytes were 0.040–2.9 mg L^{-1}. The values of the relative standard deviation (RSD, $n = 4$, intra-day) of the migration time and the peak area were, respectively, 0.081–0.43 % and 0.28–9.3 % when extract from the common ice plant was analyzed. Using the proposed procedure, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, and oxalic acid in the common ice plant were detected within 9 min; citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid were detected within 12 min.

***Keywords*:** amino acids; capillary zone electrophoresis; common ice plant; inorganic anions; organic acids.