

キャピラリー電気泳動法によるホウレンソウ中の硝酸イオンおよび 主要有機酸の同時分析

堀江秀樹^{1*}・木矢博之²・伊藤秀和¹・一法師克成¹・東 敬子¹

¹ 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所 514-2392 三重県安芸郡安濃町大字草生 360

² 奈良県農業技術センター奈良県高原農業振興センター 663-0227 奈良県宇陀郡榛原町三宮寺 125

Simultaneous Analysis of Nitrates and Major Organic Acids in Spinach Using Capillary Electrophoresis

Hideki Horie^{1*}, Hiroyuki Kiya², Hidekazu Ito¹, Katsunari Ippoushi¹ and Keiko Azuma¹

¹ National Institute of Vegetable and Tea Science, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization, Ano, Mie, 514-2392

² Hillside Branch, Nara Agricultural Experiment Station, 125, Sanguji, Haibara, Uda, Nara, 633-0227

Summary

It is necessary to decrease the concentrations of nitrate and oxalate in spinach for human health. This analytical method was developed to simultaneously determine nitrate, oxalate and other major organic acids in spinach using capillary electrophoresis. The essence of the analytical conditions were as follows; the electrolyte used was a mixture of methanol and buffer (pH 5.6, 10 mM 2, 6-pyridinedicarboxylic acid, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt and 0.5 mM cetyltrimethylammonium bromide) at a ratio of 8:92 (V/V) and non-absorbing analytes were detected indirectly at 275 nm. The time needed for the analysis of one sample was 15 min. It was possible to separate nitrate, oxalate, malate, citrate and succinate from the spinach extract. This method could be applicable to tomatoes and other vegetables.

キーワード： キャピラリー電気泳動法, 硝酸, シュウ酸, 野菜, 有機酸

緒 言

近年、食品の安全性への消費者の関心は非常に高まり、野菜に関してもより安全なものが求められている。中でも硝酸については、メトヘモグロビン症や発ガン性を持つニトロソアミン生成との関連が指摘されている(山下, 2002)。ホウレンソウは主要な野菜の中でも、硝酸含量の高い部類に属し(孫・米山, 1996)、その上エグ味成分として知られるシュウ酸までも含む。シュウ酸は食味を低下させるだけでなく、尿路結石の原因やカルシウムの吸収を阻害する可能性もある(香川, 1993)。シュウ酸蓄積の要因として、硝酸還元に伴う細胞のアルカリ化を中和するために有機酸を生成するメカニズムがあり、シュウ酸を蓄積しない植物では、代わりにリンゴ酸などの有機酸を蓄積すると考えられている(米山・建部, 1992)。これらのことから、ホウレンソウにおいて安全性に関わる成分である硝酸・シュウ酸の低減化のためには、これら2成分のみならず、他の有機酸も同時に分析できればさら

に有効な情報が得られるものと期待される。

安井ら(1992)はイオンクロマトグラフィーにより、亀野ら(1990)は高速液体クロマトグラフィーにより野菜中の硝酸・シュウ酸の同時分析を行っているが、他の有機酸も含めた同時分析法についての報告はない。そこで、イオン分析法として比較的新しい手法であるキャピラリー電気泳動法による分析を試みた。シュウ酸を含む有機酸の同時分析法はすでに報告されており(Soga・Ross, 1997)、分析用キットとして販売されている。この方法をホウレンソウの硝酸・有機酸の分析に適用してみたところ、このままではホウレンソウの硝酸と有機酸の同時分析はできなかった。そこで、ホウレンソウにおいて目的成分の同時分析ができるよう改良したので報告する。

材料および方法

分析用の試料としてホウレンソウやその他の野菜は2004年3月に津市周辺の小売店より購入した。可食部全体を洗浄後、キッチンタオルでふきとり、生重を測定した。生重の9倍量の蒸留水を加え、これを電子レンジで沸騰直前まで加熱して内生酵素を失活させた。その後家庭用ミキサーで破碎後、濾過(アドバンテック, 5A)した。

2004年4月23日 受付。2004年8月17日 受理。

* Corresponding author. E-mail: horie@affrc.go.jp

濾液をメンブレンフィルター(孔径 $0.45 \mu\text{m}$, セルロースアセテート製, アドバンテック)に通したものを分析に供した。

キャピラリー電気泳動法による分析にはフォトダイオードアレイ検出器を搭載したキャピラリー電気泳動装置 3D-CE (Hewlett Packard (現 Agilent)) を用い, キャピラリー管の温度は 25°C に設定した。ジーエルサイエンスより購入したフューズドシリカキャピラリー管(内径 $75 \mu\text{m}$)を 80.5 cm (有効長 72 cm) に調製して実験に供した。2, 6-ピリジンジカルボン酸 (PDC) 10 mM , エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA-2Na) 5 mM , セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 0.5 mM を超純水に溶解し, 水酸化ナトリウムで pH を 5.6 に合わせた混合液と特級メタノールとを $92:8$ (V:V) で混合したものを電気泳動液として用いた。試料は 50 mbar の圧力で 2 秒間注入し, -30 kV 印加して分離した。キャピラリー管の温度は 25°C に設定した。検出は間接吸光度法により行い, 350 nm と 275 nm の差を信号とした (Soga・Serwe, 2000)。また, 各分析の間には, 高圧をかけて 0.1 M 塩酸で 1.5 分, 0.1 M 水酸化ナトリウムで 1.5 分および分析用緩衝液で 2.0 分の順にキャピラリー管の洗浄を行った。

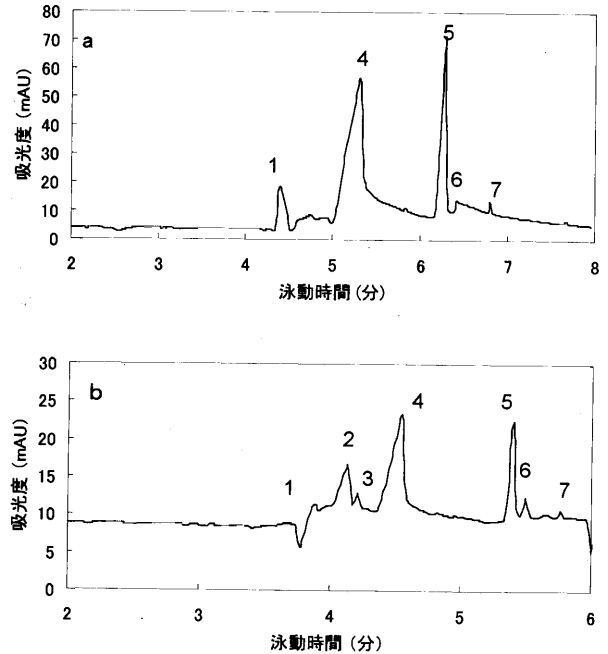
なお, 比較のため市販の有機酸分析用電気泳動液 (Agilent) を購入し, 元となる論文 (Soga・Ross, 1997) の条件での分析も行った。キャピラリー管と注入時間は先に記した通りであるが, 文献に従い, キャピラリー管の温度を 20°C , キャピラリー管の洗浄は電気泳動液で 4 分のみとした。また検出には, 350 nm と 200 nm の吸光度の差を用いた。

結果および考察

ホウレンソウについて, 市販の有機酸分析用電気泳動液を用い元となる論文 (Soga・Ross, 1997) 通りに分析した結果を第 1 図 a に示した。ホウレンソウには多量の硝酸が含まれるにもかかわらず, 硝酸に由来すると考えられる明瞭なピークは得られなかった。さらにシュウ酸・クエン酸に由来するピークについて著しいテーリングが観察された。その上, 泳動時間も安定性を欠き, 同一試料を 5 回連続分析したとき, 泳動時間は徐々に長くなる傾向を示し, リンゴ酸の泳動時間の変動係数は 0.76% であった。

本法は紫外部に吸収を有する PDC をバックグラウンドとし, 200 nm に吸収を持たない成分を, 間接的に検出する手法である。硝酸は 200 nm に比較的強い吸収を示すため, この方法での検出は困難と考えられる。そこで, 検出のための波長を 200 nm から 275 nm に設定し直した。

第 1 図 a のピークのテーリングに関しては, クエン酸やシュウ酸は金属イオンと相互作用しやすく, ホウレンソウ抽出液に含まれるカルシウム, マグネシウム, 鉄などのイオンとこれらの有機酸が相互作用した結果と考えら



第 1 図 ホウレンソウ抽出液の電気泳動グラム

a: 市販の緩衝液を用いて分析, b: 開発した方法で分析

1: 塩化物, 2: 硝酸, 3: 硫酸, 4: シュウ酸, 5: リンゴ酸, 6: クエン酸, 7: コハク酸

れる。Nelsonら (1997) はキャピラリー電気泳動法における金属と有機酸の相互作用に言及し, 電気泳動液中にキレート試薬である EDTA-2Na を加えることによりこれを回避している。そこで, EDTA-2Na の電気泳動液への添加を試みた。その結果, 各ピークの形状は改善されたものの, 硝酸と硫酸の分離が不十分であった。そこで, さらにメタノールを添加することにより, 分離の改善を図った。メタノールの添加量が増加すれば, ピーク相互の分離は改善されるものの, 再現性が低下した。そのため, メタノールの添加量は体積比で 8% とした。このことにより, 硝酸, シュウ酸と硫酸の分離が可能となった。

キャピラリー電気泳動法においては泳動時間が長くなるほどピーク面積が増大することが知られ, 泳動時間の変動が直接分析誤差に結びつくため, できるだけ泳動時間の変動を小さくすることが望ましい。泳動時間の変動は試料に由来するキャピラリー管の汚染にあると考え, 電気泳動液を流す前に, 酸とアルカリで洗浄する操作を加えた。このことにより 5 回繰り返し分析した時のリンゴ酸の泳動時間の変動係数は 0.34% と半減できた。

また, 本報では印加電圧を本機の最大値である -30 kV に設定した。印加電圧については値が大きいくほど分析時間は短縮され, その結果, キャピラリー管の洗浄等を含めても 1 試料につき 15 分のサイクルで分析可能となった。また, 各有機酸および硝酸の標準品を用いて, $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1} \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度の間で, 相関係数 0.99 以上の検量線が作成できた。

このように設定した改良法によるホウレンソウ分析時

のエレクトロフェログラムを第1図bに示した。硝酸、硫酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸の分離が確認された。また、ホウレンソウの抽出液に各成分を既知濃度添加したときの回収率は95~107%であった(第1表)。

最近、野菜中の硝酸と塩化物および硫酸をイオンクロマトグラフィーにより分析する手法が報告された(Zhou・Guo, 2000)。彼らの方法では、硝酸の検出限界は1 mg・liter⁻¹以下と本法よりもやや高感度であるが、直線範囲は100 mg・liter⁻¹以下までと、本法に劣る。また、彼らの方法での硝酸分析値の変動係数が1.5%とされ、本法でもほぼ同等の再現性を示している(第1表)。有機酸に関しては、Lee (1993)が高速液体クロマトグラフィーを用いてオレンジジュース中の有機酸を分析する手法を開発しており、クエン酸やリンゴ酸などの分析値の変動係数を1.1~6.4%と第1表とほぼ同等の再現性を報告している。本法はホウレンソウ中の硝酸および有機酸を分析する上では、高速液体クロマトグラフィーやイオンクロマトグラフィー等既存の手法には劣らないものと考えられる。

実際にホウレンソウなどの野菜を分析した結果を第2表に示した。本法は、ホウレンソウの分析が目的で開発されたが、そのままの方法で、ミズナを除く他の野菜にも適用可能であった。ミズナについては硝酸含量が高く、硫酸との分離が不十分であったので、試料液をさらに2倍希釈したところ測定可能になった。第2表は市場で購入したごく少量の試料での分析値なので、データそのものを一般化することはできないが、ホウレンソウ、コマツナ、ミズナ等葉菜類には数百 mg/100 g以上の硝酸が検出

された。シュウ酸はホウレンソウにのみ認められた。ミニトマトではリンゴ酸に比べてクエン酸の含量が著しく高いのが特徴的であった。また、ホウレンソウとコマツナは代表的な葉菜類であるが、うま味成分であるコハク酸は前者に多く含まれていた。

キャピラリー電気泳動法を用いた硝酸や有機酸の分析方法としては、野菜中のシュウ酸含量をTrevaskis・Trenerry (1996)が、電気泳動液としてクロム酸塩を用いて定量している。この方法ではリンゴ酸など他の主要有機酸が分析できず、また可視領域にも吸収のあるクロム酸塩は、フォトダイオードアレイ検出器搭載のキャピラリー電気泳動装置では電気泳動液として利用が困難である。いっぽうで、キャピラリー電気泳動法による野菜中の硝酸の分析法についても報告されているが(Marshall・Trenerry, 1996; Öztekinら, 2002)、これらの方法では硝酸・亜硝酸以外の成分については分析できない。また、最近植物抽出液中の有機酸分析法が報告されたが(Wangら, 2003)、この方法ではクエン酸やリンゴ酸は分析できるものの、実試料中のシュウ酸の分離は困難と考えられる。

植物中の硝酸と複数の有機酸を同時に分析しようという試みについては、Dingら(1997)が茶をイオンクロマトグラフィーにより分析している。彼らの方法では分析に45分以上要するだけでなく、茶の主要有機酸であるシュウ酸についてはピークが検出されず、手法そのものに疑問が残る。Arellanoら(1997)はキャピラリー電気泳動法により無機酸と有機酸の同時分析を試みているが、硝酸やシュウ酸を含む試料には応用されていない。本法は、ク

第1表 ホウレンソウ抽出液での添加試験と分析値の変動係数

分析対象	抽出液中濃度 mg/l	添加量 mg/l	添加後の濃度 mg/l	回収率 %	変動係数* %
硝酸	207.2	100	365.8	95.6	1.7
シュウ酸	575.3	100	674.5	99.2	1.9
リンゴ酸	249.2	50	300.2	102.1	3.1
クエン酸	59.2	20	78.7	97.6	2.5
コハク酸	7.8	5	13.1	106.2	3.8

*抽出液中濃度分析値の変動係数 (n=5)

第2表 各種野菜中の硝酸および有機酸含量

野菜	表示	mg/100gFW				
		硝酸	シュウ酸	リンゴ酸	クエン酸	コハク酸
ホウレンソウ		286	533	171	127	5
ホウレンソウ	水耕・サラダ用	360	439	115	50	8
コマツナ		544	ND	166	81	trace
ミズナ	水耕・サラダ用	934	ND	131	154	5
ミニトマト		35	ND	30	682	ND

ND:ピークが認められない

trace:ピークは認められるが定量下限以下(< 2mg/100g)

ロマトグラフィーに匹敵する精度で野菜中の硝酸とシュウ酸を含む主要有機酸を同時分析できる唯一の方法といえる。

野菜中の硝酸・シュウ酸を分析する場合、安井らのイオンクロマトグラフィーによる方法(1992)では、分析に30分以上要するが、キャピラリー電気泳動法に基づく本法では1試料あたり15分と短く、さらにシュウ酸蓄積のメカニズムにも関与すると考えられるリンゴ酸などの有機酸も同時定量できるのが利点である。また、高価な分析用カラムや試薬類を必要とせず、経済的なこともキャピラリー電気泳動法に基づく本法の利点としてあげられる。本法を用いることにより、低硝酸・低シュウ酸品種の選抜や栽培技術の開発が加速化するものと期待される。

摘 要

ヒトの健康の観点から、ハウレンソウの硝酸とシュウ酸の含量を低減化する必要がある。そこで、キャピラリー電気泳動法によるハウレンソウ中の硝酸、シュウ酸と他の主要有機酸の同時分析法を開発した。分析条件の主要部分は次のようである。電気泳動液として、メタノールと緩衝液(pH 5.6, 10 mM PDC, 5 mM EDTA-2Na, 0.5 mM CTAB)を8:92の体積比で混合したものをを用い、吸収を持たない成分を275 nmで間接的に検出した。一試料の分析に要する時間は15分で、ハウレンソウ抽出液中の硝酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸が定量できた。本法は、ハウレンソウだけでなくコマツナやトマトにも適用可能であった。

引用文献

- Arellano, M., J. Andrianary, F. Dedieu, F. Couderc and Ph. Puig. 1997. Methods development and validation for the simultaneous determination of organic acid and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 765: 321-328.
- Ding, M. Y., P. R. Chen and G. A. Luo. 1997. Simultaneous determination of organic acids and inorganic anions in tea by ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 764: 341-345.
- 香川 彰. 1993. ハウレンソウのシュウ酸をめぐる諸問題 (1)品質向上のための低シュウ酸化を中心として. *農及園*. 68: 797-803.
- 亀野 貞・木下隆雄・楠原 操・野口正樹. 1990. ハウレンソウの栽培条件及び品種と品質関連成分の変動. *中国農研報*. 6: 157-178.
- Lee, H. S. 1993. HPLC method for separation and determination of nonvolatile organic acids in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1991-1993.
- Marshall, P. A. and V. C. Trenerry. 1996. The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. *Food Chem.* 57: 339-345.
- Nelson, B. C., P. C. Uden, G. F. Rockwell, K. M. Gorski and Z. B. Aguilera. 1997. Determination of oxalate in parenteral nutrition solutions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 771: 285-299.
- Öztekın, N., M. S. Nutku and F. B. Erım. 2002. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chem.* 76: 103-106.
- Soga, T. and G. A. Ross. 1997. Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2, 6-pyridinedicarboxylic acid: Effects of electrolyte's complexing ability. *J. Chromatogr. A* 767: 223-230.
- Soga, T. and M. Serwe. 2000. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chem.* 69: 339-344.
- 孫 尚穆・米山忠克. 1996. 野菜の硝酸:作物体の硝酸の生理, 集積, 人の摂取. *農及園*. 71: 1179-1182.
- Trevaskis, M. and V. C. Trenerry. 1996. An investigation into the determination of oxalic acid in vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chem.* 57: 323-330.
- Wang, M., F. Qu, X. Q. Shan and J. M. Lin. 2003. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*: 989, 285-292.
- 山下市二. 2002. 野菜の硝酸. *食衛誌*. 43: 12-14.
- 安井明美・永井利郎・小泉英夫. 1992. ノンサプレッサイオンクロマトグラフィーによる野菜中の硝酸イオン, 硫酸イオンおよびシュウ酸イオンの定量. *食科工*. 39: 722-725.
- 米山忠克・建部雅子. 1992. アスコルビン酸(ビタミンC)・シュウ酸・硝酸の代謝と相互関係. *農及園*. 67: 1055-1062.
- Zhou, M. and D. Guo. 2000. Simultaneous determination of chloride, nitrate and sulphate in vegetable samples by single-column ion chromatography. *Microchem. J.* 65: 221-226.