

キャピラリー電気泳動法による野菜成分分析マニュアル

(2006年12月版)

野菜茶業研究所 堀江秀樹

キャピラリー電気泳動法は、使用する機器本体は500万円以上と高額ではありますが、分析に要するランニングコストは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に比べて格段に安く、慣れてしまえば非常に使いやすい分析法だと考えます。特に農業研究の現場では、様々な成分の分析が求められます。いっぽうで、所有する分析機器の台数には制限があり、例えば一つの野菜について1台のHPLCで糖と有機酸を定量する必要がある場合、糖の分析に1日、それからシステムを組み替えてカラムも交換し翌日に有機酸分析ということになります。HPLCをアミノ酸専用分析装置、有機酸専用分析装置、糖専用分析装置と複数台使えば最も簡単ですが、多くの試験研究機関はそれほど裕福ではないと思われます。これに対して、キャピラリー電気泳動法を用いた場合、各分析項目を共通のキャピラリー管で分析できる条件さえ選んでおけば、分析項目に応じて交換する必要があるのは電気泳動液だけになります。したがって、朝試料をセットすれば、機械に手を触れることなく、お昼には糖と有機酸の分析結果が得られます。研究費が潤沢でない大多数の農業研究機関においては、キャピラリー電気泳動法は非常に有効な分析手段だと考えます。

にもかかわらず現実にはキャピラリー電気泳動法の利用は農業分野において普及しておりません。この点についてHPLCと比較しながら次のように考えます。HPLCではカラムメーカーなどが新しいカラムとそれを用いたアプリケーション開発を積極的に行っています。多くのアプリケーションはネット検索等可能なので、装置をいじった経験のある人なら学术论文をあたらくとも、目的成分が分析できるカラムをインターネットやメーカーのカタログで探して購入でき、目的成分の測定は比較的簡単に達成できる場合が多いと思われれます。さらに、「虎の巻」シリーズなどのようなすぐれたトラブルシューティングのための入門書、解説書が充実しています。これに対して、キャピラリー電気泳動法については、カラムメーカーに当たるものが存在せず、機器メーカーが機器のおまけ程度にアプリケーションを公開しているに過ぎません。装置は持っても、目的成分を分析するためには学术论文を読んでこれに習って自分の機種にあうように条件を設定しなければならないのですが、一度つまづくと入門書のようなものもなく、教えを請う師も近くにいないため、なかなか分析法の設定ができないというのが農業の研究現場の実情ではないかと思えます。

キャピラリー電気泳動法は使いやすく、ランニングコストも安い分析装置であるにもかかわらず利用者が少ないのは、アクセスしやすいアプリケーションが乏しいのが大きな原因であると考えています。この問題については、汎用な分析法をマニュアルとして公開すれば克服でき、キャピラリー電気泳動法の広範な普及につながるものと考え、本マニュアル

ルを作成しました。なお、本マニュアルはアジレント社（旧ヒューレットパッカード社製）のキャピラリー電気泳動装置を元に記載しております。他社のシステムについては、条件等の変更が必要です。また他の消耗品当についても便宜上特定メーカーのものを記載しておりますが、同等品があればこだわる必要はありません。

本マニュアルに関するご質問、ご意見は下記のアドレスまでお願いします。Q & Aなどの形も付加しながら本マニュアルを充実させていきたいと思えます。

horie@affrc.go.jp

1. キャピラリー管の調製

1-1 キャピラリー管の購入

キャピラリー管をメーカーから購入すると1本1万円程度とHPLCのカラムなみの価格になります。分析によって汚染されるのはHPLCのカラムも同様ですが、キャピラリー管は物理的に破損したり緩衝液が乾燥して詰まったりすることも多く（特に慣れない頃にはトラブルによる消耗が激しいと思われまます）、キャピラリー管の価格が経済的に負担になります。著者らは、ジーエルサイエンス株式会社より不活性処理をしていないフューズドシリカ管（外径0.375mm）を10m単位で購入し、適時必要な長さに切断し使用しています。

（例えばカタログ番号1010-31942、31,000円）そうすれば1本当たりの価格は数千円になるので、値段を気にすることなく実験できます。ただし、光学検出のためのウインドウは下記に従い自分で作製しなければなりません。

1-2 キャピラリー管の調製

巻かれたキャピラリー管を目的とするよりやや長めにセラミックのカッターで切断します。全面がコーティングされていますので、ウインドウを開ける必要があります。端から9cmのところ油性ペンで印をつけ（機種によってこの長さは異なります）、この部分をマッチの火であぶります。このとき、十分に加熱しないとコーティングが完全にはがれませんし、加熱した面積が広がりすぎると折れやすくなります。マッチであぶって焦げたところを、エタノールを染みこませたティッシュペーパーで拭き取れば透明なウインドウができます。これを、機器付属のマニュアルに従ってキャピラリーカートリッジにセットします。最後に、キャピラリー管の両端の長さを切りそろえます。（厳密には、キャピラリー管の調製毎に管の長さが異なることにはなりますが、同じ要領でセットすれば分析条件を変更するほど大きな問題は生じません。）

なお、キャピラリー管を交換して保管する際、管の中に電気泳動液が残っていると乾燥して塩が析出しつまってしまうことがあります。これを防ぐため、キャピラリー管の交換の際には水をFlushして、管の中を水で満たしておくことよさそうです。

2. キャピラリー電気泳動法による野菜の有機酸及び硝酸の分析

園芸学研究 (2005) 4,95-98 をお持ちとの前提で記載します。もし入手が困難な場合は著者まで請求ください。

野菜の酸味に関係するのは、クエン酸、リンゴ酸が主です。さらに、ホウレンソウなどの野菜ではエグ味やミネラル吸収の関係でシュウ酸が問題です。また、硝酸の過剰な蓄積についても近年、葉根菜類で注目されています。そこで、これらの成分の同時分析法を開発しました。なお、キャピラリー管は内径 $75\mu\text{m}$ のフューズドシリカ管を 80.5cm に調製しました。

2-1 電気泳動液の調製

緩衝液 A

2,6-ピリジンジカルボン酸(PDC)	10mM
エチレンジアミン4 酢酸ナトリウム	5mM
セチルトリメチルアンモニウムブロミド	0.5mM

になるように超純水に溶解し、pH を 5.6 に合わせます。このとき PDC は酸性側では溶解しがたいので、pH は 5 以上に上げてから完全に溶解します。

この緩衝液 A 46ml に対して 4ml の割合で特級メタノールを混合したものを、電気泳動液とします。本電気泳動装置は室温に放置しておいても少なくとも 1 週間は使えます。

2-2 装置の立ち上げ

キャピラリー電気泳動装置及びワークステーションを立ち上げます。著者らは次のようにバイアルを配置しています。

- 1 : 電気泳動液
- 2 : 電気泳動液
- 3-8 : 終夜運転等連続分析する場合には電気泳動液
- 10: 電気泳動液 (キャピラリー管内を平衡化するため)
- 11 : メタノール
- 12 : 1M 水酸化ナトリウム
- 13 : 水
- 14 : 0.1M 水酸化ナトリウム
- 15 : 0.1M 塩酸
- 20 : 廃液用の空ビン
- 21 以降 : 分析用試料及び標準試料

なお 1-20 のバイアルは 2ml (部品番号 5182-9697) を使用し、サンプル用にはマイクロバイアル (部品番号 9301-0978) を主に使用しています。1 及び 2 の電気泳動液は分析点数が増えると劣化するので、例えば 10 試料ごとに交換等頻繁に行う必要があります。3 及び 4 のバイアルにも同じ電気泳動液をいれておき、Home Vials を 3 及び 4 に設定したメソッド

を作っておけば、さらに長時間連続運転可能になります。

キャピラリー管を交換した時やしばらく使用しなかった時、あるいは連続分析の後、泳動時間等に変化が生じた場合には、11 と 12 を各 5 分以上流した後、10 を流して平衡化します。通常立ち上げ時、及び分析終了時、及び連続分析の合間には 15 と 14 を 5 分以上流して、キャピラリー管を洗浄します。

キャピラリー管の温度は通常 25°C に設定しております。この温度なら空調のききが悪い場合でも年間を通じて設定温度になるのが比較的早いと経験しております。

2-3 分析用試料の調製

HPLC 分析においては、メタノールやエタノール等アルコールで抽出した試料を用いることもありますが、キャピラリー電気泳動法においては有機溶媒や試料中の塩濃度が高い場合分析の障害となります。従って、簡易に成分を抽出したい場合には水抽出となります。ただし、生の野菜を水で抽出したとき、生体内の酵素も同時に抽出され、酵素作用による成分変化が生じる場合があります。このようなことに対応して、例えばホウレンソウなら生体重に対して 9 倍あるいは 19 倍量の水を加え(それぞれ 10 倍、20 倍希釈と考えます)、直ちに電子レンジで加熱します。沸騰が始まった時に加熱を終え(家庭用のラップで蓋をしておけば水の気化は無視できる程度です。)、家庭用のミキサーなどで十分ホモジナイズします。これを濾紙で濾過した後室温までさまし、必要に応じて水で希釈したものを、水系のメンブレンフィルター(例えばアドバンテックのセルロースアセテート膜、孔径 0.45 μm)に通したものを試料とします。試料は、マイクロバイアルに気泡が残らないように 50 μl 程度分注します。気泡が残る場合には、バイアルをたたけば消えます。

2-4 分析

試料用のバイアルを本体のオートサンプラーにセットした後、ワークステーションにプログラムしたメソッドに従い分析します。

メソッドの概要を記載します。

Home Values:

Lift Offset 4

Cassete Temperature 25.00°C

Inlet Home Vial 1:

Outlet Home Vial 2:

*夜間等連続分析したい場合には、ここを 3 と 4 にするなど、電気泳動液の劣化に備えて別のメソッドとして保存します。

Replenishment Entries

No Replenishment used

同一条件でのルーチン分析を何千点もすることはないので、本体下の大型の容器は使用しません。

Preconditioning Entries

分析前の平衡化

1 FLUSH 1.50 min, I:14, O:20:

バイアル 14 の水酸化ナトリウムをバイアル 20 の廃液ビンまで 1.5 分流す。

2 FLUSH 0.10 min, I:13, O:20:

バイアルの先端が水酸化ナトリウムで汚染されると、次の 10 番の液の pH が変化してしまうかもしれませんので、念のため水を流しました。

3 FLUSH 2.00 min, I:10, O:20:

Postcondition Entries

分析後のキャピラリー管の洗浄、再現性よくデータを取るには、キャピラリー管の内部の汚染度を常に一定の状態に置く必要があるため、この操作は重要。

1 FLUSH 0.20 min, I:13, O:20:

2 FLUSH 1.50 min, I:15, O:20

3 FLUSH 1.00 min, I:13, O:20:

この状態で分析を休止してもよいよう、キャピラリー管内を水で満たしました。

Electric

Electric On

Polarity Negative(有機酸分析の場合は negative にすることを忘れないこと)

Voltage 30.00 kV (最大)

Injection

Inject by PRESSURE 50.00 2.00 sec

注入時間を長くすると信号は大きくなる。

Time entries

Stoptime 6.00 min

Posttime Off

分析時間を入力、キャピラリー管の長さや分析項目によって調整。

DIODE ARRAY DETECTOR

Settings

Stop Time as HPCE: 6.00 min

Post Time Off

Signals

A: Yes 350 10 275 10

350nm と 275nm の吸光度の差をとるというメソッドです。

仮に 275 10 Off とすると、275nm には電気泳動液の PDC 由来の吸収があり、有機酸には 275nm には吸収がありませんので、ピークがマイナス側に出ます。マイナス側のピークはワークステーションで面積を計算しがたいので、プラス、マイナスを逆転するために、便宜上 275 nm を reference、350nm (PDC の吸収がない) を signal としています。

他社製品の場合はキャピラリー管の長さが異なるので、電圧、分析時間、注入方法等修正が必要と思われます。

あとは Sequence Table に必要な事項を入力すれば、連続分析可能です。どのようなシグナルが得られるかは、園芸学研究 3 巻 96 ページ (2005) をごらんください。得られたシグナルについては高速液体クロマトグラフィーの場合同様、データ処理を行います。単一に見られたピークも実は複数のピークが重なっている可能性もあります。同定に際しては、pH を少し変えた電気泳動液なども準備し、pH が変化しても目的のピークにショルダー等が出ないことを確認する必要があります。

1 日の分析が完了したら、キャピラリー管を水、0.1M塩酸、水、0.1M 水酸化ナトリウム、水の順に流した後、電源を落とすようにしています。

3. キャピラリー電気泳動法による野菜中の糖分析

野菜茶業研究所研究報告第 5 号 (2006) 1-6
http://vegetea.naro.affrc.go.jp/print/bulletin/5/5_001-006.PDF にデータが記載されています。

野菜のおいしさを表現する場合「甘くておいしい」と言葉に表される場合が多いようですが、野菜の場合「甘味」は主に糖類によるものと考えられ、糖分析は野菜のおいしさを評価する上で鍵となります。屈折計によって測定された値 (Brix 値、糖度) によって甘味を推測することは、トマト、メロン、スイカなどのように比較的糖を多く含む野菜においては可能ですが、キュウリのように糖含量の低い野菜には不向きです。そこで糖組成の分析評価が重要になります。高速液体クロマトグラフィーによる糖分析法はすでに確立され

ていますが、カラムが高価であり、またアセトニトリルなど高価で廃液処理が必要な溶媒を多量に使用しなければなりません。また示差屈折検出器の安定化に時間を要するため、興味がある野菜試料がたまたま入手できたとしても、その場ですぐに分析を開始することはできません。キャピラリー電気泳動法であれば、ウオームアップに時間も要さず分析できますし、ここで示す方法では、緩衝液と設定電圧、検出波長を除けば先に示した有機酸分析法と大きく違いませので、連続分析することも可能です。劇物のメタノールはごく少量しか使用しません。分析に要する時間も 20 分程度ですので、官能評価と平行して測定可能です。

3-1 電気泳動駅の調製

安息香酸ナトリウム 10 mM

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド 0.5 mM

になるよう超純水に溶かし、水酸化ナトリウムで pH を 12.0 に調製します。

* 安息香酸ナトリウムはピリジンジカルボン酸と異なり水によく溶けるため調製は容易です。

3-2 装置の立ち上げ

基本的に有機酸分析の場合と同様です。油いためしたタマネギを分析する後には、水・メタノール混合液で洗浄しました。そのため 16 番の位置に水、メタノールを等量混合した液を配置しました。

キャピラリー管は内径 75 μ m、長さ 80.5cm としました。

3-3 分析試料の調製

2-3 と同様です。炒めた野菜も脱脂操作なしで分析可能です。糖含量が高い場合には、それぞれの糖濃度が 2000 mg/l を越えないよう希釈する必要があります。生の野菜をそのまま破碎すると、内生の酵素の影響でショ糖が分解される可能性があります。野菜に一定割合の水を加えて電子レンジ加熱することは、生の状態の糖組成を維持するのに有効です。

3-4 分析

有機酸分析からの変更点を赤にしました。

Home Values:

Lift Offset 4

Cassete Temperature 25.00°C

Inlet Home Vial 1:

Outlet Home Vial 2:

*夜間等連続分析したい場合には、ここを3と4にするなど、電気泳動液の劣化に備えて別のメソッドとして保存します。

Preconditioning Entries

分析前の平衡化

1 FLUSH 1.00 min, I:14, O:20:

バイアル 14 の水酸化ナトリウムをバイアル 20 の廃液ビンまで 1 分流す。

2 FLUSH 0.10 min, I:13, O:20:

バイアルの先端が水酸化ナトリウムで汚染されると、次の 10 番の液の pH が変化してしまうかもしれませんので、念のため水を流しました。

3 FLUSH 3.00 min, I:10, O:20:

Postcondition Entries

1 FLUSH 1.00 min, I:16, O:20:

試料由来の油汚れに対応して水・メタノールで洗浄しました。

2 FLUSH 2.00 min, I:15, O:20

3 FLUSH 1.00 min, I:13, O:20:

この状態で分析を休止してもよいよう、キャピラリー管内を水で満たしました。

Electric

Electric On

Polarity Negative(有機酸分析の場合は negative にすることを忘れないこと)

Voltage 30.00 kV (最大)

Injection

Inject by PRESSURE 50.00 2.00 sec

注入時間を長くすると信号は大きくなる。

Time entries

Stoptime 7.00 min

Posttime Off

分析時間を 7 分としました。

DIODE ARRAY DETECTOR

Settings

Stop Time as HPCE: 7.00 min

Post Time Off

Signals

A: Yes 350 10 225 10

350 nm と 225 nm の吸光度の差をとるというメソッドです。

3-5 糖分析における問題点

ネギなどユリ科野菜にはフラクトオリゴ糖が含まれます。このピークは、ブドウ糖とショ糖の間に現れ、場合によってはショ糖のピークと重なる懸念があります。その場合は、直径 50 μ m で 1 m 程度のキャピラリー管を用いて、さらなる分離の改善をはかる必要があります。詳細は著者までお問い合わせください。