

キャピラリー電気泳動法による野菜中の糖分析

堀江 秀樹・伊藤 秀和

(平成 17 年 11 月 28 日受理)

Analysis of Sugars in Vegetables using Capillary Electrophoresis

Hideki HORIE and Hidekazu ITO

Synopsis

Sugars are one of the most important indexes of the quality of vegetables. An analytical method using capillary electrophoresis was investigated for the routine measurement of the contents of fructose, glucose and sucrose in vegetables. It was possible to measure these sugars in some raw and cooked vegetables every 20 min without tedious preparations of the samples using this method.

Key Words: capillary electrophoresis, fructose, glucose, sucrose, fried onion, quality

I 緒 言

野菜にとって甘味は重要な品質要素であり、従来から屈折計により得られる Brix 値を糖度と記載し、甘味の指標としてきた。しかしながら、Brix 値は糖濃度のみを表すものではなく、無機塩や有機酸、アミノ酸など野菜に含まれる多くの成分についても、濃度依存性を示す。したがって、可溶性成分に占める糖の割合の高いメロンのような野菜では、官能的な甘味と Brix 値の相関は高いものと推定されるが、キュウリのように糖含量の低い野菜については、Brix 値のみで甘味を評価することは困難と考えられる。

さらに野菜は、果糖、ブドウ糖、ショ糖を主に含むが、これらの糖の甘味の強さや味質は糖の種類によって異なり、甘味度は果糖>ショ糖>ブドウ糖の順とされる(北畑ら, 1999)。したがって、野菜の甘味を評価するには、従来用いられてきた全糖や還元糖よりも、個別の糖含量を測定することが望ましい。野菜中の個別の糖分析については、高速液体クロマトグラフィーによる方法がす

に確立されているものの、高価な専用カラムを使用する必要があり、多量に使用する移動相と、廃液処理のコストも含めればランニングコストが相当かかる。さらにカラムを長期間安定して使うには、分析用試料の煩雑な前処理操作が必須になる。

一方で、キャピラリー電気泳動法は安価なキャピラリー管を用い、廃液量も少なくランニングコストの安価な分析方法である。キャピラリー電気泳動法を用いた糖分析についてもいくつか報告は認められる(KLOCKOW ら, 1994; BAZZANELLA ら, 1998; SOGA ら, 2000; WARREN ら, 2000) が、野菜の成分分析に応用した例はほとんどない。さらに、野菜の場合は生で食べられる以外に、調理される場合も多い。そこで、生野菜および調理野菜のルーチン分析に適した分析条件を設定したので報告する。

II 材料および方法

トマト‘桃太郎’、キュウリ‘スライス’は、野菜茶業研究所のビニールハウスにおいて栽培し6月初旬に収

穫した果実を用いた。ホウレンソウ（群馬県産，ちぢみほうれんそう）は3月に，タマネギ（兵庫県産）は5月に，津市近郊で購入した。野菜ジュースは，ニンジン等複数の野菜と果実のジュースを混合し紙パックに充填された市販品である。

トマトおよびホウレンソウについては，そのまま破碎・抽出すれば酵素作用によりショ糖が加水分解される可能性がある（藤原ら，1999）ため，ビーカーに野菜とそれぞれ4倍量および9倍量の水を加えてラップしたものを，電子レンジで沸騰直前まで加熱した後，ホモジナイザーで破碎し，5号濾紙により濾過して抽出液を得た。キュウリについては，果実中央部を幅2cmで輪切りにして，胎座部分をコルクボーラーでくりぬいた。胎座部と残った果肉部は，それぞれニンク絞りで搾汁し，搾汁液を遠心分離した上澄液を抽出液とした。タマネギについては，半分に切断し，片側を油炒めに用いた。油炒めは，市販のサラダ油をひいた家庭用のフライパンを用いて，焦げ目が見えない程度まで攪拌しながら加熱した。これに5倍量の水を加え，ホモジナイザーで破碎抽出した。タマネギの残った半分については，トマトやホウレンソウと同様に5倍量の水を加えて加熱後，抽出液を得た。市販の野菜ジュースは遠心上清を試料とした。これらの抽出液は，水で最終的に10～60倍に希釈後，メンブレンフィルター（ $0.45\mu\text{m}$ ，アセチルセルロース，アドバンテック）に通し分析用試料とした。

分析には，キャピラリー電気泳動システム（アジレント）を用いた。電気泳動液として10mM 安息香酸ナトリウム（関東化学，特級），0.5mM テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド（TTAB，和光純薬，特級）を超純水（ミリQラボ，日本ミリポア）に溶解し，1M 水酸化ナトリウムでpHを12.0に調製したものを用いた。キャピラリー管は内径0.075mmのフューズドシリカ管（ジーエルサイエンス）を80.5cmに切断して調製した。有効長は72cmである。分析用試料は50mbarで2秒間注入し， -30kV を印加して分離した。検出波長を350nm（バンド幅10nm），対照波長を225nm（バンド幅10nm）とする間接吸光度法により検出した。試料によるキャピラリー管の汚染を防ぎ，分離の再現性を高めるため，試料注入前に0.1M水酸化ナトリウムで1分，蒸留水で0.1分，電気泳動液で3分キャピラリー管を洗浄し，さらに電気泳動終了後には，水：メタノール（1:1，V/V）混合液で1分，0.1M塩酸で2分，蒸留水で1分洗浄した。分析時のキャピラリー管の温度は25℃に設定した。分析時間は7分とし，キャピラリー管

の洗浄時間等も含めて，20分間隔での連続分析が可能であった。

III 結果および考察

キャピラリー電気泳動法による糖分析には，電気泳動液として今回用いた安息香酸，TTABの組み合わせ以外に，2,6-ピリジンジピコリン酸（PDC）とセチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を組み合わせたものも報告されている（SOGAら，2000）。予備実験の結果，PDCは溶解に時間がかかり，また低温で再結晶化しやすいため，操作性の面から安息香酸を選択した。安息香酸と組み合わせて使用する場合，CTABとTTABでは分離に大きな相違はないものの，後者を用いた方がショ糖のピークの形状が優れていたため，WARRENら（2000）同様，安息香酸，TTABを組み合わせた電気泳動液を用いることとした。本電気泳動液は室温下で1週間は安定に使用できた。

WARRENら（2000）はキャピラリー電気泳動法により，果糖，ブドウ糖，ショ糖を5分で分離できることを報告している。しかしながら，この方法では内部標準法を用いているにもかかわらず，泳動時間とピーク面積の変動係数がそれぞれ，約2%および4.5%であり，必ずしも再現性に優れるとはいえない。さらに，野菜試料の糖分析にこの方法を用いる場合には，彼らが内部標準として用いたフコースのピークと野菜成分由来の別の成分のピークが重なる可能性もある。そこで，本法を基に内部標準なしでも再現性が確保できるよう分析条件の改良を試みた。

まず，WARRENら（2000）の方法では36cmと極めて短いキャピラリー管を用いていることが分離と注入再現性の悪さにつながるものと考え，キャピラリー管は

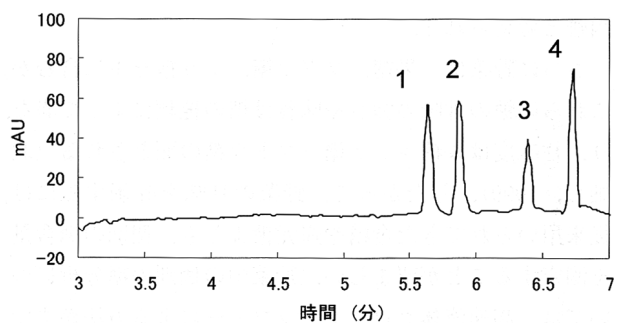


図-1 キャピラリー電気泳動法での糖標準品の分離

1：果糖，2：ブドウ糖，3：ショ糖，
4：分析システムに由来するピーク。
各標準品の濃度は1,000mg/l.

表-1 糖分析の直線性及び再現性

糖	直線性 r^2	定量可能範囲 mg/l	泳動時間 ¹ CV (%)	ピーク面積 ¹ CV (%)	回収率 ² %
果糖	0.9991	10-2,000	0.13	1.12	100.3
ブドウ糖	0.9996	10-2,000	0.14	1.51	102.9
ショ糖	0.9992	25-3,000	0.16	2.26	99.9

1: 野菜ジュース(果糖:3.27%,ブドウ糖:2.05%,ショ糖:2.56%)を試料として4反復で測定.
2: 野菜ジュースの1/20希釈液にそれぞれ500mg/lの糖を添加したときの回収率.

80.5cmと比較的長いものを用いた.さらに,油炒めなど調理された野菜も試料として用いることも考慮して洗浄液にメタノールを加えるなど分析操作の間の洗浄法を検討した.

改良した方法による標準品のフェログラムを図-1に示した.3種類の糖が問題なく分離されている.野菜ジュースにおける果糖,ブドウ糖,ショ糖の定量可能範囲と再現性,添加回収試験の結果を表-1に記載した.本法では0.1%以上の濃度まで直線性を示すことから,通常パーセントオーダーで含まれる野菜の糖を分析するには,10~100倍程度に希釈すれば十分定量範囲に収まるものと考えられる.WARRENら(2000)の方法に比べれば,分析時間は2分間長くなるものの,再現性の面では,野菜ジュースを試料とした場合,泳動時間で0.2%以下,ピーク面積値では果糖,ブドウ糖で1.5%以下,ショ糖についても2.3%以下の変動係数を示し,内部標準を使わなくとも,十分に使用に耐えるものであった.

一方,タマネギを油炒めした試料については,今回試みた試料の中では最もキャピラリー管の汚染が激しく,再現性が低くなると予想された.この場合は,分析毎に若干泳動時間が延長する傾向にあったが,それでも泳動時間の変動係数は0.6%以下であり,十分連続分析に耐えるものであった.表-2に示すその他の試料についても,泳動時間の変動係数は0.3%以下であり,泳動時間の変

動係数を2%とするWARRENら(2000)に比べて格段に改善されている.また,試料の連続分析の結果,泳動時間が初期の値とずれた場合についても,キャピラリー管をメタノールで5分,1M水酸化ナトリウムで5分,その後電気泳動液で20分と時間をかけて洗浄すれば,泳動時間は初期の状態まで回復できた.

油炒めしたタマネギ試料のフェログラムを図-2に示した.調理に使用した油については前処理で除去していないが,本条件では分離には問題はなかった.他の野菜試料においても,同一の方法で分離された.

本法での試料の定量値を表-2にまとめた.タマネギについては,油炒めにより見かけ上,糖含量が2倍以上に増加した.この原因は炒めることによりタマネギの重さが半分以下に低下していたことから,水分を失って成分が濃縮されたためと考えられる.すなわち,炒めたタマネギが甘く感じられるのは,10%もの高含量に濃縮された糖によるものと推定される.炒めたタマネギの甘味については,山西ら(1955)が加熱によって生成するプロピルメルカプタンが甘味成分であると報告して以来,甘味はプロピルメルカプタンによるものと長年信じられてきた.近年,時友ら(1993)はプロピルメルカプタン

表-2 キャピラリー電気泳動法による野菜の糖分析の結果

野菜	%*		
	果糖	ブドウ糖	ショ糖
タマネギ(生)	2.20	2.45	0.53
タマネギ(炒め)	4.71	5.29	1.28
キュウリ(胎座)	1.34	1.30	ND
キュウリ(果肉)	1.23	1.15	ND
ホウレンソウ	0.26	0.19	1.44
トマト	2.43	2.17	0.24
	0.02	0.01	0.02

上段は平均値,下段は標準偏差(n=3).

*生鮮物当たり,炒めたタマネギは調理品当たり.

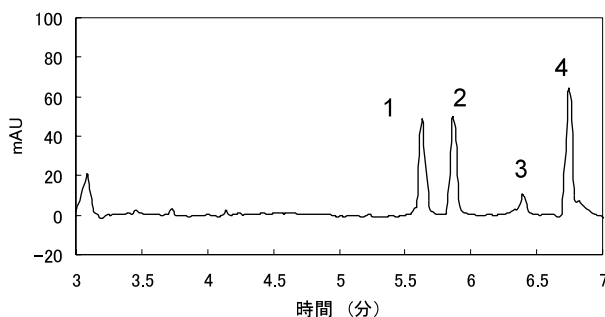


図-2 キャピラリー電気泳動法での炒めタマネギの分析

1:果糖,2:ブドウ糖,3:ショ糖,
4:分析システムに由来するピーク.
試料は水で60倍に希釈して測定.

が甘味を示さないことから、甘味は加熱に伴い濃縮される遊離糖によるものであると報告し、玉木ら(2003)もタマネギの油炒めによる糖濃度の増加を報告している。

このような調理による成分変化についての研究では、糖分析に高速液体クロマトグラフィーを用いているため、通常の糖分析用の前処理に加えて、脱脂の操作が必須であり、非常に煩雑で実験誤差を生じやすいものとなり、このことが甘味と糖含量の関係の解析が遅れた原因のひとつであると考えられる。一方本法では、炒めたタマネギを水で抽出しただけなので、前処理が非常に簡便であり、各種調理による糖組成変化の研究への利用が期待される。

キュウリについては、胎座部と果肉部では食感が全く異なり、噛んだときに口腔内に放出される果汁の量や内容成分放出のタイムコースなども異なるものと考えられる。しかしながら、果実全体の成分比較は行われても、胎座部と果肉部のような細かい部位間での成分比較の例は、中町ら(2002)が3本のキュウリ全体を分析用試料として比較した以外、分析例は少ない。煩雑で試料量を多く必要とする従来法では測定が容易ではなかったものと考えられるが、本法を用いれば、一口で食べられる大きさのキュウリ切片からでも、搾汁と除粒子だけの操作で十分に糖組成を測定することが可能であった(表-2)。野菜成分は各部位に均一に存在するわけではなく、さらに部位ごとの物性の相違により、咀嚼時の成分の溶出も異なるものと考えられる。今後、野菜の味の解析を進める上では、従来のように野菜全体を均一化して測定するだけでなく、微量な部位毎に成分の解析を進める必要がある。そのためには、前処理が簡単で、微量試料にも対応できる本法は有効な手段と成り得る。

ホウレンソウおよびトマト試料については、あらかじめ電子レンジで試料を加熱することにより、ショ糖を再現性よく分析できた(表-2)。ホウレンソウの糖含量については、還元糖として測定される場合もある(山田ら, 2003)が、とくに冬場には非還元等であるショ糖が増加する傾向が認められており(木矢ら, 2004)、甘味を評価するには、本法あるいはクロマトグラフィーにより糖組成を解明する必要がある。なお、表-2に示したトマトの値は、糖度6.6と比較的甘味の強いものの場合である。甘味の弱いトマトの場合には、ショ糖のピークが検出されない場合もみられた。

本法は、今回試みた試料については問題なく適用できたが、野菜の種類や調理法によっては粘性物質やオリゴ糖、あるいは妨害物質によりそのままの条件では適用で

きない場合も想定される。その場合は、前処理や分離条件およびキャピラリー管の洗浄条件等のさらなる改良が必要である。

本法においては電気泳動時に60 μ A程度の比較的大きな電流が流れる。そのため、連続分析にあたっては、10点に1回程度電気泳動液の交換が望まれる。それでも1日の電気泳動液の使用量は10ml程度であり、これらを合計した廃液量も十数mlと極めて少ない。さらに本法で用いたキャピラリー管は先に報告した有機酸分析(堀江ら, 2005)に用いたものと同一であるため、プログラムを組めば同一試料で糖と有機酸の連続分析も可能である。糖度および滴定酸度が従来から品質指標として用いられてきたが、これらに代わって今後は糖および有機酸の組成と味との関係についての解析が進むものと期待される。

IV 摘 要

糖類による甘味は野菜の重要な品質構成要素のひとつである。そこで、野菜の糖組成のルーチン分析を目的としたキャピラリー電気泳動法の分析条件の開発を行った。電気泳動液としてpH12.0に調製した10mM安息香酸ナトリウム、0.5mMテトラデシルトリメチルアンモニウム=ブロミド溶液を用い、印加電圧-30kVとした。キャピラリー管の長さは80.5cm(内径0.075mm)であった。本条件下でキュウリ、トマト、ホウレンソウ抽出液中の果糖、ブドウ糖、ショ糖が分離できた。本法は油炒めしたタマネギの糖分析についても脱脂操作なしに適用でき、20分間隔での連続分析が可能であった。試料調製が簡便であることから、本法は野菜の品質評価には非常に有効であると期待される。

引用文献

- 1) BAZZANELLA A. and K. BACHMANN (1998): Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper (II). *J. Chromatogr. A*, **799**, 283-288.
- 2) 藤原孝之・坂倉元・伊藤寿・本庄達之助(1999) : 高速液体クロマトグラフィーによる果実搾汁液の糖分析における簡易試料調整法. *日食科工誌*, **47**, 227-232.
- 3) 堀江秀樹・木矢博之・伊藤秀和・一法師克成・東敬子(2005) : 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. *園学研*, **4**, 95-98.
- 4) 北畑寿美雄・町並智也(1999) : 糖質. 日本化学会編, 味とにおいの分子認識, 50-60. 学会出版センター, 東京.
- 5) 木矢博之・浅野亨・堀江秀樹・東敬子・伊藤秀和・一法師克成(2004) : 冬季の栽培条件がホウレンソウの糖含量お

- よび抗酸化活性に及ぼす影響. 園学雑, **32**別2, 423.
- 6) KLOCKOW A., A. PAULUS, V. FIGUEIREDO, R. AMADO and H. M. WIDMER (1994): Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **680**, 187-200.
 - 7) 中町敦子・吉川光子・香西みどり・畑江敬子 (2002): キュウリ呈味成分の貯蔵変化および味との関係. 日調科誌, **35**, 234-241.
 - 8) SOGA T., and M. SERWE (2000): Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chem.*, **69**, 339-344.
 - 9) 玉木雅子・鶴飼光子 (2003): 長時間炒めたタマネギの味, 香り, 遊離糖, 色の変化. 家政誌, **54**, 69-76.
 - 10) 時友祐紀子・山西貞 (1993): 加熱タマネギの甘いフレーバーについて. 家政誌, **44**, 347-353.
 - 11) WARREN, C. R. and M. A. ADAMS (2000): Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1147-1157.
 - 12) 山田千佳子・岩崎泰史・吉田企世子 (2003): 秋期栽培における品種の異なるホウレンソウの還元糖, アスコルビン酸, シュウ酸および硝酸含量. 日本栄養・食糧学会誌, **56**, 167-173.
 - 13) 山西貞・織岡久乃 (1955): タマネギの煮熟による香味の変化について. 家政誌, **6**, 45-47.

Analysis of Sugars in Vegetables using Capillary Electrophoresis

Hideki HORIE and Hidekazu ITO

Summary

Sugars are one of the most important indexes of the quality of vegetables. We have developed a method for the routine measurement of sugar compositions in vegetables using capillary electrophoresis. The electrolyte used was pH 12.0, 10 mM sodium benzoate and 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide and the applied voltage was -30 kV. The length of the capillary was 80.5 cm (0.075 mm id). Fructose, glucose and sucrose in the extracts from cucumber, tomato and spinach were successfully separated under these conditions. This method could be applied for the analysis of the sugars in fried onions without removing the oils. It was possible for successive analysis every 20 min. This method should be very effective for the quality evaluation of vegetables because of the simple preparations of the samples.