

アイスプラント栽培におけるクラゲ上澄み液の有用性： 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有機酸等の定量

福士 恵一

神戸大学大学院海事科学研究科

概要 厄介者扱いされているクラゲは肥料として有用な成分を含むが、植物の生長を阻害する Na^+ も多く含む。一方、生活習慣病の予防等に効果のある成分を含むアイスプラントという野菜が注目されている。アイスプラントは、栽培時に NaCl 溶液を必要とする。我々は、 NaCl 溶液の代わりにクラゲ上澄み液を用いてアイスプラントを水耕栽培してきた。本研究では、クラゲ上澄み液の有用性を評価するために、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)によるアイスプラント中の有機酸、アミノ酸、金属イオンの定量法を確立する。ついで、光照射時間等を変化させ栽培したアイスプラント中のこれら成分を定量し、クラゲ上澄み液の有用性について検討する。

【実験】 (1)有機酸及びアミノ酸定量用泳動液として、pH 10.6に調整した20 mM リン酸水素二ナトリウムに0.001% 臭化ヘキサジメトリンを添加した溶液を用い、 Cl^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸の検量線を作成した。アイスプラント中の各成分は、純水を加えて乳鉢ですりつぶし抽出した後、CZEにより定量した。(2)金属イオン定量用泳動液として、75 mM ホウ酸ナトリウムに2 mM 1,2-シクロヘキサンジアミン四酢酸一水和物を添加した溶液を用い、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} の検量線を作成した。乾燥させたアイスプラントを乳鉢ですり潰した粉末に硝酸を添加し、超音波抽出により金属イオンを抽出し、CZEにより定量した。

【結果と考察】 (1)ピーク面積を用い、検量線を作成したところ、直線性の良いものが得られた($r=0.9980-0.9997$)、また、検出限界(LOD, $S/N=3$)は0.035-2.6 mg/lであった。アイスプラント抽出液を分析したところ、泳動時間、ピーク面積の相対標準偏差(RSD, $n=3$)はそれぞれ0.26-0.58%、2.4-13%であった。また、アイスプラント中の Cl^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸の含有量はそれぞれ460、3.3、230、230、6.4、1.8、5.0、7.6 mg/100 g (flesh weight)であった。(2)ピーク面積を用い、上記成分の検量線を作成したところ、直線性の良いものが得られた($r=0.9970-0.9985$)。また、LODは0.051-0.16 mg/lであった。アイスプラント抽出液を分析したところ、泳動時間、ピーク面積のRSD($n=4$)は、それぞれ、0.42-0.50%、1.5-5.3%であった。また、アイスプラント中の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} の含有量は9.0、15、0.51、0.61、0.21 mg/100 g (flesh weight)であった。現在、クラゲ上澄み液を用い、栽培期間中の光照射時間等を変化させ栽培したアイスプラントの分析を行っている。

1. 研究目的

厄介者扱いされているクラゲは肥料として有用な成分を含むが、植物の生長を阻害する Na^+ も多く含む。一方、生活習慣病の予防等に効果のある成分を含むアイスプラントという野菜が注目されている。アイスプラントは、栽培時に NaCl 溶液を必要とする。我々は、 NaCl 溶液の代わりにクラゲ上澄み液を用いてアイスプラントを水耕栽培して

きた。本研究では、クラゲ上澄み液の有用性を評価するために、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)によるアイスプラント中の有機酸、アミノ酸、金属イオンの定量法を確立する。ついで、光照射時間等を変化させ栽培したアイスプラント中のこれら成分を定量し、クラゲ上澄み液の有用性について検討することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 キャピラリー電気泳動法の概要

Fig. 1 にキャピラリー電気泳動装置の概略を示す。まず左右の泳動液 (BGE) 容器と内径 50~100 μm のフューズドシリカ製キャピラリー (capillary) に BGE を満たす。次いで、右側のキャピラリー端を試料容器に挿入し、左側の BGE 容器側を減圧し、試料をキャピラリー内に吸引する。試料導入法としては、試料容器を左側 BGE 容器より一定時間高く保ち、重力により導入する重力法、左側 BGE 容器を真空にする真空吸引法、試料容器内電極と左側 BGE 容器内電極 (electrodes) との間に電圧を印加して分析目的イオンを導入する電氣的導入法がある。ついで、右側のキャピラリー端を再び BGE 容器に戻し、高電圧電源 (high voltage) により、左右の BGE 容器中の電極に高電圧を印加する。試料中の各成分は、キャピラリー内で発生する電気浸透流 (EOF) および電気泳動によりキャピラリー内を移動し、電気泳動移動度の違いによって分離され、一般的には吸光検出器 (UV-VIS detector) により検出される。なお、他の検出器としては、電気伝導度検出器、レーザー励起蛍光検出器等がある。通常、EOF は陽極から陰極に向かって流れ、その大きさは電気泳動移動度より大きい。従って、電気泳動移動度の大きい陰イオン分析の場合、通常の EOF の向きでは検出できない、あるいは泳動時間が長くなるという現象が見られる。そこで、BGE に陽イオン界面活性剤を添加し、EOF を陰極から陽極に反転することが行われる。本法は、キャピラリー断面における EOF の速度がほぼ均一であるため、高い分離能を有する。一

方、キャピラリー内径が光路長となるため、濃度感度が十分でないが、これを補うため、各種オンライン濃縮法が提案されている。

2.2 検出法

吸光検出器を用いる検出法として、直接吸光法 (direct detection) と間接吸光法 (indirect detection) がある。前者は、吸収を持たない BGE を用い、吸収を持つ成分を検出する方法である。後者は、吸収を持つ間接吸光試薬と呼ばれる試薬を BGE に添加し、吸収を持たない成分を間接的に検出する方法である。

2.3 アイスプラントとは

アイスプラントは、南アフリカのナミム砂漠を原産地とするツルナ科マツバギク属の植物である。乾燥に強く耐塩性が高く、塩水を与えて栽培される。生活習慣病の予防や血糖値低下作用・抗酸化作用を有する成分を含む。

2.4 これまでの研究成果

我々は、貴財団からの助成を受け、ミズクラゲ及び大型クラゲ (エチゼンクラゲ) の野菜の肥料としての有用性に関する研究を行ってきた¹⁾⁻⁵⁾。その結果、クラゲを静置して得られるクラゲ上澄み液は、野菜の肥料としての有用性を有することを明らかにした。ついで、上澄み液中に含まれる高濃度 Na^+ は植物の生長を抑制するが、これを減少するために、真空加熱法を提案した⁶⁾⁷⁾。

さらに、2010 年夏、クラゲ上澄み液を用い、土耕及び水耕によりアイスプラントを栽培した。すなわち、ミズクラゲ及び大型クラゲ上澄み液を一週間に一回の割合でアイスプラント苗に施し、収穫されたアイスプラントの重さを測定す

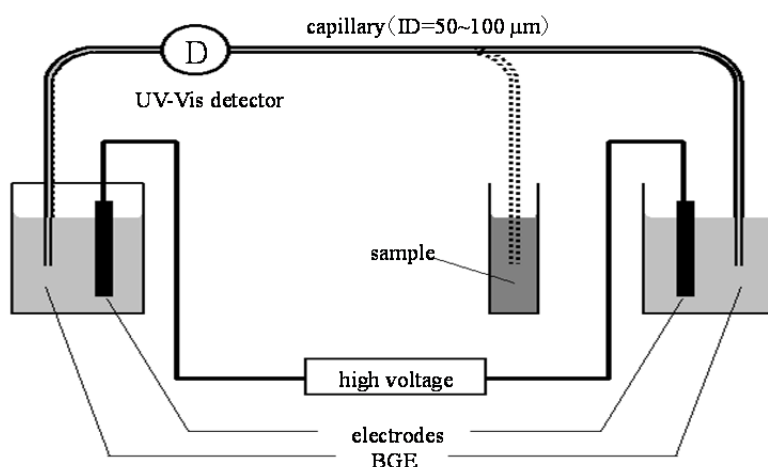


Fig. 1. Basic schematic of capillary electrophoresis (CE) instrument. BGE, background electrolyte.

るとともに、有用成分濃度を定量することによりその効果を調べた。処理区はコントロール(NaCl 溶液)、ミズクラゲ、大型クラゲ処理区である。以下に得られた結果を示す。

- ①収穫後のアイスプラント重量平均値は、土耕栽培の場合、大型クラゲ処理区ではコントロールの約 1.2 倍であった。
- ②収穫後のアイスプラント中 Ca^{2+} 濃度は、土耕栽培の場合、ミズクラゲ処理区ではコントロールの約 1.3 倍であった。一方、水耕栽培の場合、ミズクラゲ処理区ではコントロールの約 1.8 倍であった。
- ③収穫後のアイスプラント中 Fe^{3+} 濃度は、土耕栽培の場合、ミズクラゲ処理区ではコントロールの約 1.6 倍であり、大型クラゲ処理区では約 1.2 倍であった。一方、水耕栽培の場合、ミズクラゲ処理区ではコントロールの約 1.5 倍であった。
- ④収穫後のアイスプラント中 Zn^{2+} 濃度は、土耕栽培の場合、ミズクラゲ及び大型クラゲ処理区ではコントロールの約 1.1 倍であった。一方、水耕栽培の場合、ミズクラゲ処理区ではコントロールの約 1.1 倍であった。
- ⑤味覚センサーにより、土耕栽培の場合、ミズクラゲ及び大型クラゲ処理区では酸味が抑えられ、コク、旨味、塩味が強いことが示唆されたが、明確な差異は見られなかった。
- ⑥土耕アイスプラントを 10 人に試食してもらったところ、一番おいしいと答えた人数は、ミズクラゲ処理区 6 人、大型クラゲ処理区 3 人、コントロール 2 人であった。

2. 5 装置

2. 5. 1 アイスプラント中の有機酸、アミノ酸の定量

大塚電子製キャピラリー電気泳動装置 CAPI3200 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(内径 75 μm , 外径 375 μm , 全長 112.35 cm, 有効長 100 cm)である。pH 測定には、堀場製カスター-LAB pH メーター F-22 を使用した。溶液調製の際に使用した純水は、ヤマト科学製 WG220 型純水製造装置および日本ミリポア製 Simpli Lab 超純水製造装置により得られたものである。

2. 5. 2 アイスプラント中の金属イオンの定量

キャピラリー電気泳動装置はベックマン・コールター製 P/ACE MDQ System である。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(内径 75 μm , 外径 375 μm ,

全長 59.6 cm, 有効長 49.3 cm)である。高周波誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析(AES)装置として、島津製 ICPS-7510 を用いた。

2. 6 試薬

2. 6. 1 アイスプラント中の有機酸、アミノ酸の定量

試薬はすべて特級品を用いた。直接吸光法における BGE は、1.0 M NaOH で pH 10.6 に調整した 20 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液に、陽イオン界面活性剤として 0.001% 臭化ヘキサジメトリン(HDB)あるいは 0.6 mM 塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム(TTAC)を添加したものである。また、間接吸光法における BGE は、1.0 M NaOH で pH 12.1 に調整した 20 mM 2,6-ピリジンジカルボン酸水溶液に、陽イオン界面活性剤として 0.5 mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)を添加したものである。標準溶液として、50 mg/l Cl^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸混合溶液を調製した。なお、BGE、標準溶液は使用する前に 0.45 μm のメンブランフィルター(アドバンテック製)で濾過した。

2. 6. 2 アイスプラント中の金属イオンの定量

BGE として、20 mM 四ホウ酸ナトリウムに 2 mM 1,2-シクロヘキサジアン四酢酸一水和物(CyDTA)及び 0-25% メタノールを添加したもの、20-75 mM 四ホウ酸ナトリウムに 2 mM CyDTA を添加した溶液を用いた。また、標準溶液として、5 mg/l Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、2 mM CyDTA 混合溶液を調製した。

2. 7 試料調製法

2. 7. 1 アイスプラント中の有機酸、アミノ酸の定量

アイスプラント可食部を純水で洗浄し、キッチンペーパーで水分を除去した。10.0 g を量り取り、純水 20 ml を加え、電子レンジで沸騰直前まで加熱した。乳鉢ですりつぶし、5 種 A 濾紙及び 0.45 μm メンブランフィルターで濾過し、抽出液とした。

2. 7. 2 アイスプラント中の金属イオンの定量

アイスプラント可食部を約 15 g 量り取り、純水で洗浄した。約 60°C で約 30 時間乾燥した。乾燥したアイスプラント約 0.45 g を乳鉢ですりつぶした。この操作を 2 回行い、得られた粉末をあわせ、その内 0.30 g を量り取り、13 mM HNO_3 を 15 ml 加え、10 分超音波抽出した。0.45 μm メンブランフィルターで濾過し、濾液 3 ml を 10 ml のメスフラス

コに移し、10 mM CyDTA を 2 ml 添加後、純水で標線をあわせた。また、粉末 0.33 g を量り取り、硝酸と過塩素酸を用いて加熱分解操作を行い、ICP 発光分光分析法用試料とした。

2. 8 定量操作法

2. 8. 1 アイスプラント中の有機酸、アミノ酸の定量

新しいキャピラリーは、使用前に 1.0 M NaOH で 40 分、純水で 10 分洗浄し、以下の操作法により分析を行った。まず、恒温槽温度を 25°C に設定した。検出波長として、190 nm 及び 210 nm (NO_2^- , NO_3^-) を用いた。BGE として、0.001% HDB を含む 20 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH 10.6) をキャピラリーに 3 分間充填した。ついで、分析用試料を真空吸引法 (50 kPa) により 1 s (70 nl) 注入し、試料注入側を陰極として 25 kV の電圧を印加した。なお、アイスプラント抽出液は、 Cl^- , NO_2^- , NO_3^- 、シュウ酸を定量する場合には 100 倍に希釈したものを分析用試料とした。クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸を定量する場合には、希釈しないでそのまま分析し、添加回収実験時は 2 倍に希釈した。

2. 8. 2 アイスプラント中の金属イオンの定量

まず、恒温槽温度を 25°C、検出波長を 200 nm に設定した。ついで BGE として、2 mM CyDTA を含む 75 mM ホウ酸ナトリウム水溶液をキャピラリーに 3 分間充填した。分析用試料を真空吸引法 (3.4 kPa) により 10 s (50 nl) 注入し、試料注入側を陽極として 20 kV の電圧を印加した。

3. 結果と考察

3. 1 アイスプラント中の有機酸、アミノ酸の定量

3. 1. 1 検出法

直接吸光法と間接吸光法について比較した。検出波長として、直接吸光法の場合は 190 nm 及び 210 nm (NO_2^- , NO_3^-)、間接吸光法の場合は 270 nm を用いた。直接吸光法及び間接吸光法を用いた場合の各分析目的成分の検出限界 (LOD)、泳動時間、ピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を Table 1 に示す。Table 1 から明らかのように、感度、再現性とも、直接吸光法の方が良い結果が得られた。したがって、今後は直接吸光法を用いることとした。

Table 1. Detection limits and precision for direct and indirect detections

Analyte	LOD, mg/l ($S/N=3$)		RSD, % (n=4)			
	Direct	Indirect	Time		Area	
			Direct	Indirect	Direct	Indirect
Cl^-	3.1	25	0.16	0.45	2.5	4.7
NO_2^-	0.10	39	0.17	0.47	11	26
NO_3^-	0.065	31	0.17	0.48	4.7	11
Oxalic acid	1.1	31	0.16	0.51	4.9	15
Citric acid	1.4	21	0.14	0.64	4.1	12
Malic acid	1.7	18	0.14	0.69	5.1	1.8
Aspartic acid	1.4	16	0.12	0.68	4.8	11
Glutamic acid	2.2	15	0.04	0.72	4.9	11

Electrophoretic conditions: capillary, $L_{\text{tot}}=112.35$ cm, $L_{\text{det}}=100$ cm, 75 μm I.D. \times 375 μm O.D.; BGE, 20 mM sodium hydrogenphosphate containing 0.001% hexadimethrine bromide adjusted to pH 10.6 with 1.0 M sodium hydroxide (direct) and 20 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid containing 0.5 mM cetyltrimethylammonium bromide adjusted to pH 12.1 with 1.0 M sodium hydroxide (indirect); voltage, 25 kV with the sample inlet side as the cathode; wave length for detection, 190 and 210 nm (direct) and 270 nm (indirect). Sample, a standard solution containing 50 mg/l Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , oxalic acid, citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid; vacuum injection period 1 s (ca. 70 nl).

3. 1. 2 陽イオン界面活性剤の種類

EOF を反転するための陽イオン界面活性剤の種類の影響について検討した。陽イオン界面活性剤として、0.001% 臭化ヘキサジメトリン(HDB)あるいは0.6 mM 塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム(TTAC)を用いた場合の各分析目的成分のLOD、泳動時間、ピーク面積のRSDをTable 2に示す。Table 2から明らかのように、TTACの場合には、クエン酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸の泳動時間の再現性がHDBと比較して悪かった。また、クエン酸のピーク面積の再現性も悪かった。さらに、

グルタミン酸については、共存成分との分離が十分でなかった。分析目的成分とTTACとの間で、何らかの相互作用があるのではないかと考えられるが、今後、詳細に検討する必要がある。なお、LODについては、両界面活性剤について、差はみられなかった。従って、今後は陽イオン界面活性剤として、HDBを用いることとした。

3. 1. 3 検量線

本法により、分析目的成分のイオンの検量線を作成した。検量線の回帰式及び相関係数をTable 3に示す。各成分について、直線性の良い検量線が得られた。

Table 2. Effects of kinds of cationic surfactants on the detection limits and precision

Analyte	LOD, mg/l (S/N=3)		RSD, % (n=4)			
	HDB ^{a)}	TTAC ^{b)}	Time		Area	
			HDB	TTAC	HDB	TTAC
Cl ⁻	3.1	—	—	—	—	—
NO ₂ ⁻	0.10	0.074	—	—	—	—
NO ₃ ⁻	0.065	0.049	—	—	—	—
Oxalic acid	1.1	0.82	—	—	—	—
Citric acid	1.4	1.9	0.31	0.95	7.6	16
Malic acid	1.7	2.0	0.28	1.0	9.3	7.4
Aspartic acid	1.4	1.4	0.43	1.4	6.1	7.0
Glutamic acid	2.2	1.8	0.41	—	6.3	—

a) Hexadimethrine bromide; b) *n*-tetradecyltrimethylammonium chloride Electrophoretic conditions as in Table 1 for direct detection except for use of two kinds of cationic surfactant, HDB and TTAC. Sample, an extract from ice plant; vacuum injection period 1 s (ca. 70 nl).

Table 3. Regression equations of the analytes

Analyte	Regression equation (r, correlation coefficient)		x, concentration (mg/l)
	y, peak area	y, peak height	
Cl ⁻	y=0.630x-0.717 (r=0.9978)	y=0.123x+0.535 (r=0.9874)	0–50
NO ₂ ⁻	y=2.58x+0.210 (r=0.9996)	y=1.42x+0.116 (r=0.9995)	0–1.6
NO ₃ ⁻	y=2.98x-0.496 (r=0.9993)	y=1.27x+0.436 (r=0.9980)	0–16
Oxalic acid	y=1.31x+0.168 (r=0.9995)	y=0.531x+0.665 (r=0.9884)	0–16
Citric acid	y=0.539x+0.917 (r=0.9996)	y=0.132x+4.08 (r=0.9686)	0–350
Malic acid	y=0.421x-0.501 (r=0.9985)	y=0.233x-0.217 (r=0.9987)	0–60
Aspartic acid	y=0.594x-0.129 (r=0.9991)	y=0.316x-0.0848 (r=0.9987)	0–20
Glutamic acid	y=0.541x-0.104 (r=0.9994)	y=0.250x-0.0104 (r=0.9987)	0–20

Electrophoretic conditions as in Table 1 for direct detection.

3. 1. 4 アイスプラント分析結果

Fig. 2は、塩化ナトリウム水溶液を用いて栽培したアイスプラント抽出液を本法により分析した際のエレクトロフェロ

グラムである。Table 4は、アイスプラント抽出液を本法により分析した際の分析目的成分の泳動時間及びピーク面積の再現性、回収率、含有量を示す。

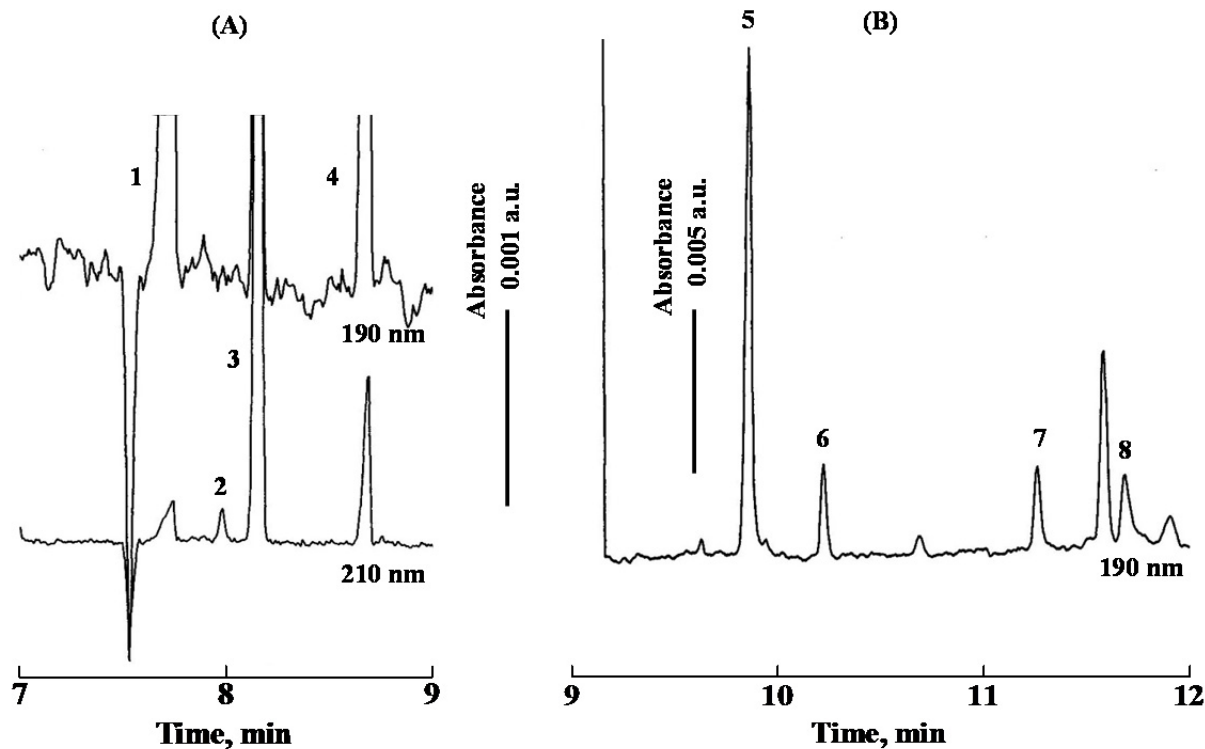


Fig. 2. Electropherograms of an extract from ice plant cultivated using sodium chloride solution. (A) Sample, an extract from ice plant that was diluted 100-fold. (B) Sample, non-diluted extract from ice plant. Identification of peaks: 1, Cl⁻; 2, NO₂⁻; 3, NO₃⁻; 4, oxalic acid; 5, citric acid; 6, malic acid; 7, aspartic acid; 8, glutamic acid. Electrophoretic conditions as in Table 1 for direct detection.

Table 4. Analytical results of extract from ice plant cultivated using sodium chloride solution

Analyte	RSD, % (n=4)		Recovery, %	Content, mg/100 g (flesh weight)
	Time	Area		
Cl ⁻	0.46	5.5	120	770
NO ₂ ⁻	0.40	5.8	75	5.7
NO ₃ ⁻	0.45	4.0	120	110
Oxalic acid	0.47	4.1	110	160
Citric acid	0.31	7.6	93	76
Malic acid	0.28	9.3	110	10
Asparatic acid	0.43	6.1	80	3.0
Glutamic acid	0.41	6.3	100	1.9

Electrophoretic conditions as in Table 1 for direct detection.

3. 2 アイスプラント中の金属イオンの定量

3. 2. 1 BGE 中のメタノール濃度

BGE 中のメタノール濃度を 0、5、15、25%と変化させたところ、25%の場合、 Mg^{2+} と Mn^{2+} との分離が改善されたが、泳動時間が約 30 分と長くなった (Fig. 3)。これは、メタノールが共存することにより、これら金属イオンと CyDTA との相互作用の強さが変化し、その結果、実効移動度に差が

生じたためであると考えられる。

3. 2. 2 BGE 中のホウ酸ナトリウム濃度

BGE 中のホウ酸ナトリウム濃度を 20、50、75、100 mM と変化させたところ、75 mM の場合、 Mg^{2+} と Mn^{2+} との分離が改善され、約 25 分以内ですべての金属イオンを検出できた (Fig. 4)。これは、試料ゾーンと BGE ゾーンにおける電場の差が大きくなり、各成分ピークがスタッキングされ、

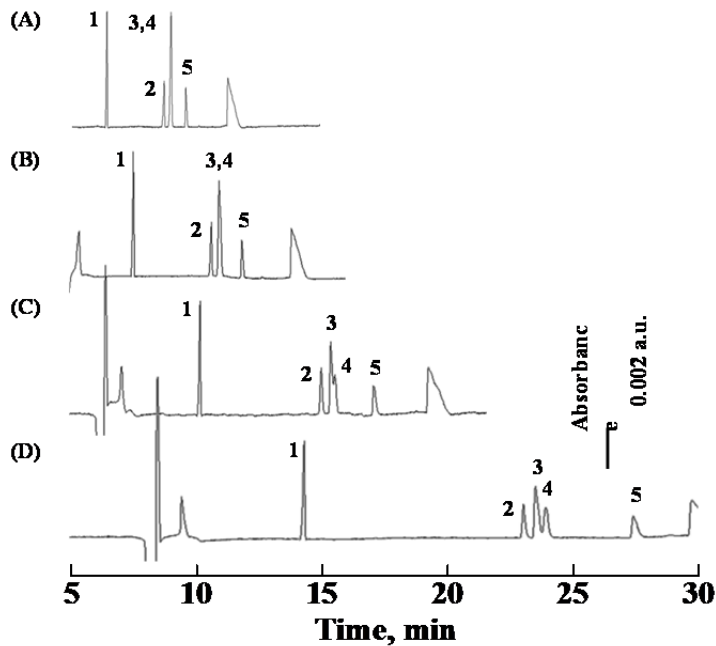


Fig. 3. Effects of concentration of methanol in the BGE on the separation of metal ions. (A) Without methanol. (B) 5% methanol. (C) 15% methanol. (D) 25% methanol. Electrophoretic conditions: capillary, $L_{tot}=59.6$ cm, $L_{det}=49.3$ cm, 75 μ m I.D. \times 375 μ m O.D.; BGE, 20 mM sodium borate containing 2 mM *trans*-cyclohexane-1,2-diaminetetraacetic acid (CyDTA); voltage, 20 kV with the sample inlet side as the anode; wave length for detection, 200 nm. Sample, a standard solution containing 10 mg/l Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , and 2 mM CyDTA; vacuum injection period 10 s (ca. 50 nl). Identification of peaks: 1, Fe^{3+} ; 2, Ca^{2+} ; 3, Mg^{2+} ; 4, Mn^{2+} ; 5, Zn^{2+} .

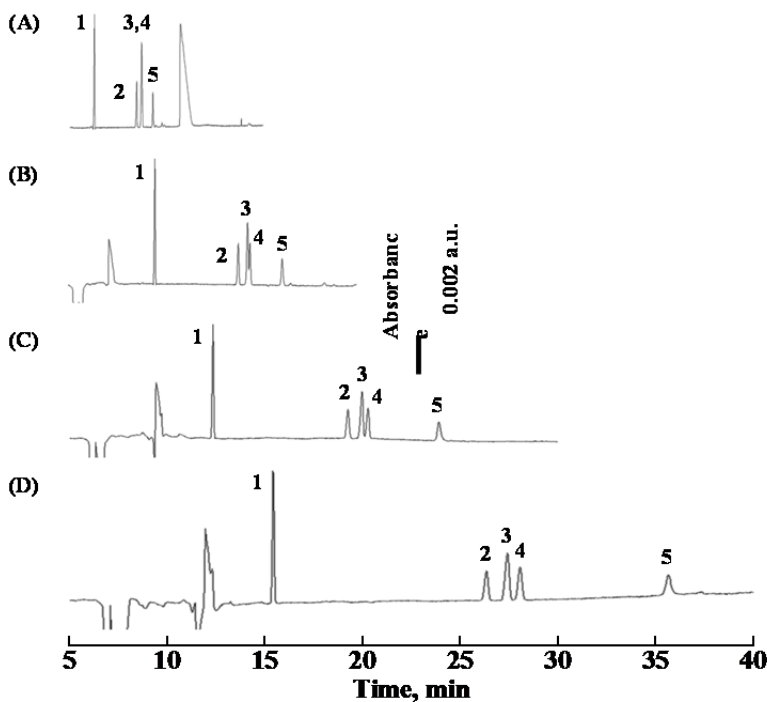


Fig. 4. Effects of concentration of sodium borate in the BGE containing 2 mM CyDTA on the separation of metal ions. (A) 20 mM sodium borate. (B) 50 mM sodium borate. (C) 75 mM sodium borate. (D) 100 mM sodium borate. Sample, a standard solution containing 5 mg/l Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , and 2 mM CyDTA. Electrophoretic conditions and identification of peaks as in Fig. 3.

分離が改善されたためであると考えられる。

3. 2. 3 検量線

本法により、BGE を用い、金属イオンの検量線を作成した。検量線の回帰式及び相関係数を **Table 5** に示す。各成分について、直線性の良い検量線が得られた。

3. 2. 4 アイスプラント分析結果

Fig. 5 は、塩化ナトリウム水溶液を用いて栽培したアイスプラント抽出液を本法により分析した際のエレクトロフェログラムである。**Table 6** は、アイスプラント抽出液を本法により分析した際の分析目的成分の泳動時間及びピーク面積の再現性、回収率、含有量を示す。

Table 5. Regression equations of the analytes

Analyte	Regression equation (r, correlation coefficient)		x, Concentration (mg/l)
	Peak area	Peak height	
Mg ²⁺	y=0.897x-0.187 (0.9985)	y=0.971x-0.0151 (0.9999)	0–10
Ca ²⁺	y=0.503x-0.0205 (0.9984)	y=0.594x+0.0636 (0.9994)	0–10
Mn ²⁺	y=0.564x-0.0866 (0.9979)	y=0.700x-0.112 (0.9977)	0–5.0
Fe ³⁺	y=1.06x-0.176 (0.9974)	y=2.44x-0.249 (0.9986)	0–5.0
Zn ²⁺	y=5.20x-0.0181 (0.9970)	y=3.99x+0.00452 (0.9961)	0–1.0

BGE, 75 mM sodium borate. Other electrophoretic conditions as in Fig. 3.

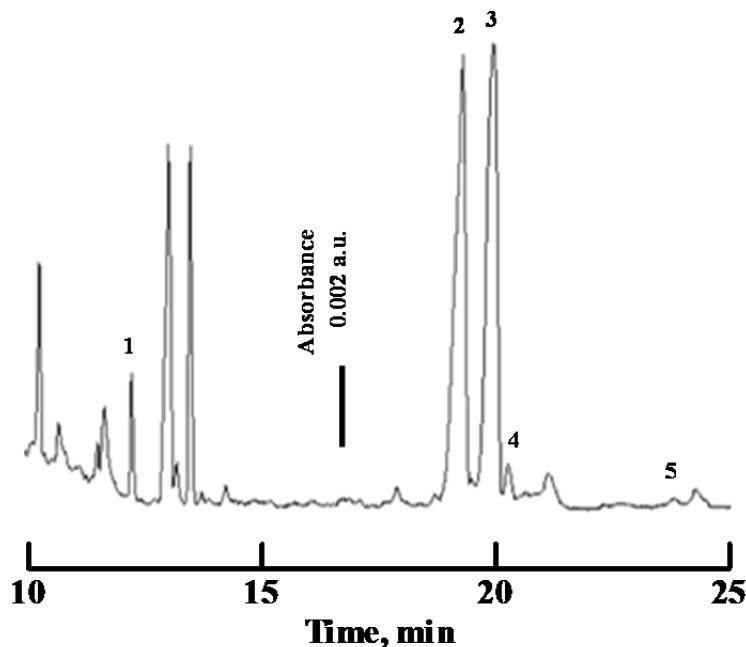


Fig. 5. Electropherograms of an extract from ice plant cultivated using sodium chloride solution. Electrophoretic conditions and identification of peaks as in Table 5.

Table 6. Analytical results of extract from ice plant cultivated using sodium chloride solution

Analyte	RSD, % (n=4)		Recovery, %	Content, mg/100 g (flesh weight)	
	Time	Area		CZE	ICP-AES
Mg ²⁺	0.50	1.5	90	9.0	8.4
Ca ²⁺	0.48	3.1	93 ^{a)}	15	19
Mn ²⁺	0.50	3.5	120	0.51	0.57
Fe ³⁺	0.42	3.3	110	0.61	0.29
Zn ²⁺	0.46	5.3	87	0.21	0.077

a) The sample was diluted two times. Electrophoretic conditions as in Table 5.

4. 結論と今後の課題

CZE によるアイスプラント中の有機酸、アミノ酸、金属イオン定量法を確立できた。現在、クラゲ上澄み液を用い、照射する光の色、照射時間を変化させてアイスプラントを栽培中である。収穫後、本法により、アイスプラント中の有機酸、アミノ酸、金属イオンを定量し、クラゲ上澄み液の効果、光照射の影響について検討する予定である。

謝 辞

本研究に助成頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス財団法人にお礼申し上げます。また、本実験に協力頂いた、日本アドバンスアグリ(株)の早川 真氏及び本学の博士前期課程の服部考成学生及び日高祐一郎学生に感謝申し上げます。

文 献

1) K. Fukushi, N. Ishio, J. Tsujimoto, K. Yokota, T. Hamatake, H. Sogabe, K. Toriya, T. Ninomiya: *Bull. Soc.*

Sea Water Sci., Jpn., **58**, 209 (2004).

2) K. Fukushi, K. Kimura, J. Tsujimoto: *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, **61**, 337 (2007).

3) K. Fukushi, S. Minami, M. Kitakata, M. Nishijima, K. Yokota, S. Takeda, S. Wakida: *Anal. Sci.*, **22**, 1129 (2006).

4) 福士恵一, 有田 翼, 南 伸哉, 北方基一, 辻本淳一, 山下 雄: *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, **60**, 173-180 (2006). (助成番号: 03)

5) 福士恵一, 辻本淳一, 横田久里子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 175 (2005). (助成番号: 03)

6) "特許第 3843305 号, クラゲから肥料を製造する方法", 発明者: 福士恵一・石尾暢宏・辻本淳一, 特許権者: 福士恵一・吉本農産(株)・(株)マリックス・石尾暢宏 (2006).

7) "特許第 4842649 号, クラゲから肥料を製造する方法", 発明者: 福士恵一, 特許権者: 国立大学法人神戸大学・(株)マリックス・吉本農産(株) (2002).

Usefulness of Supernatant Solutions of Jellyfish for Cultivation of Ice Plant: Determination of Organic Acids in Ice-Plant Using Capillary Zone Electrophoresis

Keiichi Fukushi

Kobe University, Graduate School of Maritime Sciences

Summary

We developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method with direct UV detection for the determination of Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , organic (oxalic acid, citric acid, and malic acid) and amino acids (aspartic acid and glutamic acid) in ice plants (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). As the background electrolyte, a mixture of 20 mM disodium hydrogenphosphate adjusted to pH 10.6 and 0.001% hexadimethrine bromide (HDB) was used for the direct detection of the analytes. Calibration graphs for the analytes were linear using both the peak area (correlation coefficient, $r=0.9980-0.9997$) and peak height ($r=0.9834-0.9998$) as analytical response. The limits of detection (LODs) were 0.035-2.6 mg/l at a signal-to-noise ratio of three. The values of the relative standard deviation (RSD, $n=3$, intra-day) of migration time, peak area, and peak height were, respectively, 0.26-0.58%, 3.1-16%, and 2.4-13% when extracts from ice plant were analyzed. The concentrations of Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , oxalic acid, citric acid, malic acid, aspartic acid, and glutamic acid in ice plant were 460, 3.3, 230, 230, 6.4, 1.8, 5.0, and 7.6 mg/100 g (flesh weight), respectively. The proposed method determined the above analytes for 12 min. We also developed a CZE method with direct UV detection for the determination of metal ions such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} in ice plants. The following optimum conditions were established: capillary, $L_{\text{tot.}}=59.6$ cm, $L_{\text{det.}}=49.3$ cm, 75 μm I.D. \times 375 μm O.D.; BGE, 75 mM sodium tetraborate containing 2 mM *trans*-cyclohexane-1,2-diaminetetraacetic acid (CyDTA) (pH 9.2); applied voltage, 20 kV with the sample inlet side as the anode; detection wavelength, 200 nm; pressure injection period of a sample, 10 s (50 nl). Calibration graphs for the analytes were linear using both the peak area (correlation coefficient, $r=0.9970-0.9985$) and peak height ($r=0.9961-0.9999$) as analytical response. The LODs were 0.051-0.16 mg/l. When extracts from ice plant were analyzed, the RSDs for migration time were 0.42-0.50%; the RSDs of peak area were 1.5-5.3%; the RSDs of peak height were 2.2-12%. The proposed method determined the above analytes for 25 min. The concentrations of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} in ice plant were 9.0, 15, 0.51, 0.61, and 0.21 mg/100 g, respectively. We intend to analyze ice plants cultivated with different irradiation time and different color of light using supernatant solutions of jellyfish.