

固定化シュウ酸オキシダーゼを用いたホウレン草中のシュウ酸の
フローインジェクション分析

松本 清*, 樋口元信*, 高山聖史*, 塚谷忠之**

*九州大学大学院農学研究院食品バイオ工学講座：812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

**福岡県工業技術センター生物食品研究所：839-0861 久留米市合川町 1465-5

**Quantitation of oxalate in spinach by amperometric flow-injection
analysis with an immobilized oxalate oxidase reactor**

Kiyoshi MATSUMOTO*, Motonobu HIGUCHI*, Kiyofumi TAKAYAMA*,
Tadayuki TSUKATANI**

* Lab. of Food Biotechnology, Division of Agriculture, Graduate School of Kyushu University,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

** Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, 1465-5
Aikawa-cho, Kurume, Fukuoka 839-0861, Japan

Oxalate in spinach was rapidly determined by using flow injection analytical technique with immobilized oxalate oxidase reactor. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reaction was monitored amperometrically on a platinum electrode, which was coated with polylysine/polystyrene (polyion complex) membrane. Electroactive interferent substances for a platinum electrode were reduced by the polyion complex membrane. The carrier solution was 0.1 M succinate buffer (pH 4.0) adjusted by diluted sodium hydroxide. The detection limit was 0.01 mM and the range of determination was 0.02 - 0.20 mM. The relative standard deviation was 1.1% for 10 successive determinations at the 0.10 mM level. The determination frequency was about 20 tests per hour. The present system was applied to the determination of oxalate (free and total oxalate) in spinach from various areas of origin. The result showed good agreement with those obtained using a conventional HPLC method.

1 緒言

近年、消費者の健康志向の高まりに伴い、野菜等の農産物を原料に様々なスープや野菜ジュースが製造され、その消費は年々増加の傾向にある¹⁾。しかしながら、これらの原料農産物の中には植物性自然毒に分類されるシュウ酸を比較的高濃度で含むものがある。シュウ酸はカルシウムの体内吸収を阻害する作用や不溶性カ

ルシウム塩として腎臓結石をはじめとする腎臓障害を惹き起こす懸念も指摘されている²⁾⁴⁾。野菜類の中でもホウレン草はシュウ酸含量の高いものとして知られ⁵⁾、最近ではシュウ酸含量の低いホウレン草の栽培をめざした施肥開発も進められつつある。また、シュウ酸は食品衛生法で食品製造用剤として許可されているが、最終的に食品から除去することと規定されている⁶⁾。

従って、野菜中のシュウ酸含量を簡易・迅速・高感度に測定する方法の確立が望まれている。

シュウ酸の化学的定量法としては、過マンガン酸カリウム滴定法⁷⁾、インドール比色法⁸⁾等があるが分離操作が煩雑で長時間を要する。一方、GC法⁹⁾、HPLC法¹⁰⁾、細管式等速電気泳動法¹¹⁾は化学分析に較べ前処理など比較的簡便であるがなお長時間を必要とする。

酵素法によるシュウ酸の定量法としては、シュウ酸をシュウ酸デカルボキシラーゼによりギ酸に変換し、これを補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 存在下でギ酸デヒドロゲナーゼ反応と共役させ、最終的に生成する NADH の増加量を 340nm で分光学的にモニターするもの⁵⁾があり、測定キットも市販されている。しかしながら、この測定法はバッチ式であるため迅速性に欠けると共に酵素を使い捨てにせざるを得ないため不経済である。

固定化シュウ酸オキシダーゼを用いるセンサーは酵素反応で生成された過酸化水素をモニターするものや消費される酸素をモニターするものなど数種報告されているが¹²⁻¹⁷⁾、ほとんどがバッチ式でしかも尿や血清中のシュウ酸など臨床目的をめざしたものであり、農産物中のシュウ酸測定はきわめて少ない。そこで本研究では、シュウ酸の迅速かつ簡便な測定法としてシュウ酸オキシダーゼを担体に固定化し、酵素反応によって生じる過酸化水素を電気化学的に検出するシュウ酸定量用フローインジェクション分析法 (FIA) の開発を試みた。

2 実験

2.1 試薬

シュウ酸オキシダーゼ (OxOD, EC 1.2.3.4, 麦芽根由来, 0.25 U/mg-solid) 及びアスコルビ

ン酸オキシダーゼスパチュラ (ASOD-spatula, EC 1.10.3.3, カボチャ属由来, 約 17 U/spatula) は Boehringer 社製のものをを用いた。グルタルアルデヒド (GA, 25%水溶液, 電子顕微鏡用) はナカライテスク社製を、またアミノプロピル多孔性ガラスビーズ (APCPG, 平均孔径 700Å, 80~120 mesh) は Sigma 社製のものをを用いた。ポリ-L-リシンヒドロプロミドは Sigma 社製, ポリ-(4-スチレンスルホン酸ナトリウム) は Aldrich 社製を用いた。臭化テトラブチルアンモニウムは和光純薬製を用いた。シュウ酸標準液は片山化学社製特級結晶シュウ酸 (99.5%, 二水和物) を脱イオン水に溶解し 0.1 M 標準液を作製した後, FIA 測定ではキャリアー溶液で、また、HPLC 測定では移動相溶液で適宜希釈して用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま用いた。

2.2 リアクターの作製

APCPG への酵素の固定化は、既報^{18),19)}の方法に準じて次のように行った。APCPG (乾重量 0.12 g) をガラスフィルター (G-3) 上脱イオン水で洗浄した後, 0.2 M 炭酸塩緩衝液 (pH 10.0) で調製した 5% GA 溶液 2 ml に移し, 20°C で 2 時間反応させ APCPG にアルデヒド基を導入した (GA 活性化)。次に, GA 活性化された APCPG を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0, カップリング溶液) で洗浄し, OxOD を含む酵素溶液 (3 U/ml) 2 ml 中に移し, 5°C で 16 時間反応させ固定化担体を得た。反応後, 0.5 M 塩化ナトリウムを含むカップリング溶液及びカップリング溶液で洗浄し物理的に吸着している酵素を除去した。さらに, 15 mg/ml のグリシン溶液 2 ml に移し, 20°C で 2 時間反応させることにより未反応の活性基をブロックした。反応後, 再び 0.5 M 塩化ナトリウムを含むカップリング溶液及びカップ

リング溶液で洗浄した。得られた固定化酵素担体は内径3 mm、長さ6 cmのガラス管に充填しキャリアー溶液で置換してリアクターとした。なお、リアクターは5°Cで保存した。

2.3 フローシステム

シュウ酸測定用フローシステムを Fig. 1 に示す。キャリアー溶液には 0.1 M コハク酸緩衝液（水酸化ナトリウムにより pH 4.0 に調整）を用いペリスタ型マイクロチューブポンプ（東京理化器械製 MP-3 型）により送液した。試料は六方バルブ（ジエールサイエンス製 MPV-6）を回転させることによりライン中に注入され、酵素固定化リアクター内で反応しフローセルへと送液された。キャリアー溶液の流量は 2.0 ml/min とし、試料注入ループは 100 μ l を用いた。フローセルの白金電極には +0.65 V vs. Ag/AgCl を 3 電極方式で印加し、ピーエーエス社製 CV-1B 型ボルタモグラフ又は研究室試作機¹⁸⁾によって検出し、TOA 製記録計（FBR-252A 型）にて記録した。なお、フローセルは既報¹⁸⁾と同タイプのものを用いたが、白金電極表面上を Mizutani ら²⁰⁾によって報告されたポリリシン/ポリスチレンスルホネート膜（ポリイオンコンプレックス膜）で被覆した。すなわち、ポリ-L-リシン（モノマー単位で 20 mM）とポリ-4-スチレンスルホン酸塩（モノマー単位で 25 mM）をそれぞれ 20 μ l ずつ電極上にスポットし風乾させることによりポリイオンコンプレックス膜を作製した。なお、実試料についてわずかに到達する妨害物質の白金電極での直接酸化の影響は、同じサイズの酵素フリーカラム（ブランクカラム）からの信号を差し引くことにより補正した。

2.4 HPLC 測定条件

HPLC 測定装置は日立製作所製 D-7000 型ア

ドバンスト HPLC システムマネージャー、UV-VIS 検出器 L-7420、カラム恒温槽 L-7300 を用いた。カラムは関東化学製 Mightsil RP-18 (4.5 mm ϕ \times 250 mm) を 2 本直列に結合し、移動相として 5 mM テトラブチルアンモニウムイオンを含む 0.2 M リン酸-水素アンモニウム溶液 (pH 6.8) を用い流量 0.8 ml/min にて送液した。また、カラム恒温槽温度を 35°C とし 220 nm の吸光度をモニターした。

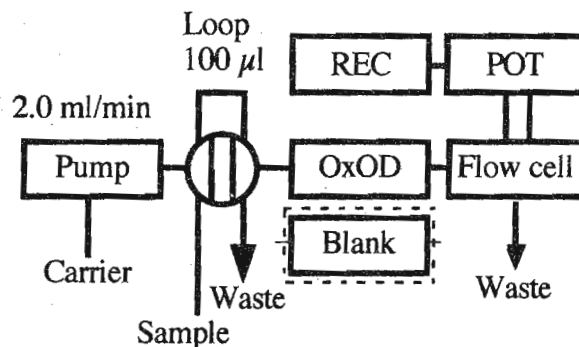


Fig. 1 Schematic representation of the FIA system for quantitation of oxalate
Carrier: 0.1 M succinate buffer (pH 4.0);
OxOD: immobilized OxOD reactor;
Blank: blank column;
POT: potentiostat; REC: recorder

2.5 実試料からの抽出及び前処理

総シュウ酸 (TOX)、遊離シュウ酸 (FOX) とも下記の処理を行った後、FIA 並びに HPLC それぞれの測定範囲に入るよう、各々のキャリアー溶液及び移動相溶液で希釈した。希釈溶液の一定量を ASOD-spatula で処理し、0.45 μ m のフィルターを通過させた後測定に供した。

(1) 総シュウ酸

細切りにしたホウレン草約 2 g を正確に秤り取り 3 M 塩酸 10 ml 中でホモジナイズし、60°C、30 分湯浴上で加熱した後、8000 rpm で遠心分離した。上清を取り、沈殿物にさらに 3 M 塩酸 10 ml を加え 60°C、30 分間加熱し、同様に 8000

rpm で遠心分離した。前述の上清と合わせ口過 (No. 2) し、イオン交換カラムによる処理を行った。イオン交換カラムは Dowex 50X8 (H 型, 20 mm ϕ \times 6 cm, 100~200 mesh) を用い全量を負荷した後、15 ml の脱イオン水で 3 回溶出させた。溶出液をエバポレーターで濃縮し減圧下で塩酸を除去・乾固した後、脱イオン水で 25 ml に定容した。

(2) 遊離シュウ酸

細切りしたハウレン草約 2 g を正確に秤り取り脱イオン水 10 ml を加え 0°C でホモジナイズした後、8000 rpm で遠心分離した。上清を取り、沈殿にさらに脱イオン水 10 ml を加え、同様の操作で上清を得、両者を合わせ口過 (No. 2) し脱イオン水で 25 ml に定容した。

3 実験結果及び考察

3.1 キャリアー溶液及び pH

OxOD 反応の緩衝液としてはコハク酸緩衝液が最も多く、一部 EDTA を含ませたものも使われている。本研究では緩衝液の種類は特に検討せず 0.1 M コハク酸緩衝液を用いることとし、pH によるセンサー応答の変化のみを検討した。Fig. 2 にみられるように遊離の OxOD の最適 pH は 3.5 付近に存在するが²¹⁾、センサー応答としては pH の増加と共に増加した。これは本測定では酵素反応によって生成する過酸化水素をモニターしているため過酸化水素そのものの pH による電極応答を反映しているものと考えられた。すなわち、Guilbault ら²²⁾も報告しているように、過酸化水素の電極酸化波は pH の増加と共に低電位側に移行するため、本実験のように +0.65 V の定電位印加では見かけ上応答が増加する。本研究では pH 4.5 以上で酵素の安定性が欠けることを考慮して、以後 pH 4.0 を用いることとした。

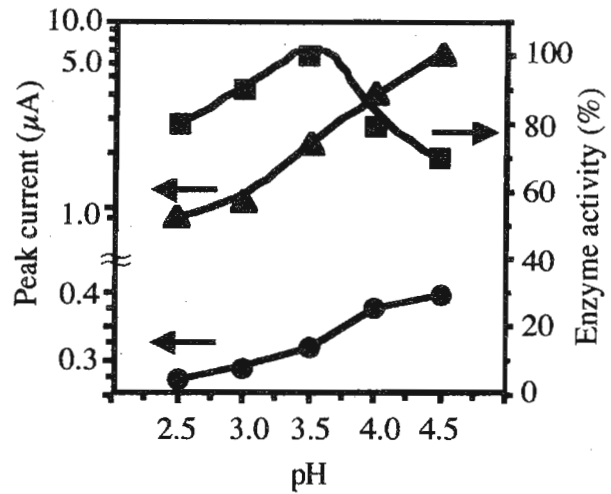


Fig. 2 Effect of pH on the sensor response for 1.0 mM H₂O₂ (▲), 0.1 mM oxalate (●) and on the activity of oxalate oxidase in free state (■)

3.2 流量

Fig. 3 にセンサー応答に及ぼす流量の影響並びに流量と応答ピークのベースラインへの復帰時間 (95%復帰) との関係を示す。センサー応答は流量の増加に伴い若干減少傾向にあるが流量の影響はさほど大きなものではなかった。一方、ベースラインへの復帰時間は 1 ml/min から 2 ml/min で約半減し流量の増加によって感度を減少させることなく測定時間の短縮を可能にすることが期待された。そこで、本研究では流量 2.0

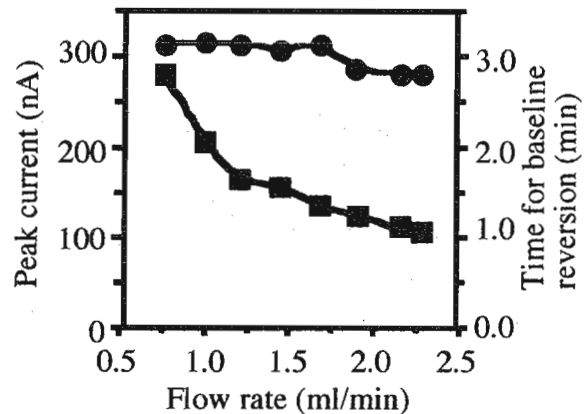


Fig. 3 Effect of flow rate on the peak current (●) and the time for baseline reversion (■)

ml/min を用いることとした。

3.3 無機イオンによる影響

OxOD は水銀イオン及びハロゲン化物イオンによって阻害されることが報告²³⁾されているが、水銀イオンは一般に農産物試料には含まれないので除外し、数種の陽イオン及び陰イオンについて OxOD 活性に及ぼす影響を検討した。Table 1 に示すように等モルの陰イオンに対し炭酸イオン及び塩化物イオンが若干の妨害を示した。ホウレン草には等モル相当の炭酸イオン、塩化物イオンは含まれておらずこれらの影響は無視し得るものと考えられた。また、シュウ酸抽出操作における塩酸は完全に減圧除去した。ホウレン草中に最も多量に存在する硝酸イオンはほとんど妨害しなかった。陽イオンでは大きく影響するものは存在しなかった。

Table 1 Effect of inorganic ions on the sensor response.

	Peak current (nA)	Interference (%)
0.1 mM oxalate	475.0	—
added anion		
SO ₄ ²⁻	477.5	0.53
CO ₃ ²⁻	435.0	-8.42
NO ₃ ⁻	477.5	0.53
Cl ⁻	445.0	-6.32
added cation		
Mg ²⁺	480.0	3.19
Ca ²⁺	485.0	-4.26

Each ion was added at 0.1 mM level.

3.4 低分子電極活性物質の妨害

農産物及び生体試料中に存在することが想定

される低分子電極活性物質として、アスコルビン酸、カテキン、尿酸の影響を検討した。ポリイオンコンプレックス膜で白金電極を被覆することによって大幅に妨害を減少させることが可能であったが、Table 2 に示すようにアスコルビン酸の影響は除去し得なかった。したがって、試料前処理として ASOD-spatula を使用して予め除去することとした。カテキン及び尿酸の影響は等モル程度まで無視し得るものであった。若干の影響はブランクカラムの設置により対処した。

Table 2 Effect of electroactive compounds on the sensor response.

Compound (0.1 mM)	Relative response (%)
Oxalate	100
Ascorbic acid	114
+ Oxalate	193
Catechin	18
+ Oxalate	114
Uric acid	37
+ Oxalate	127

3.5 検量線、再現性及び回収実験

典型的な FIA-gram を Fig. 4 に示す。濃度 0.02~0.20 mM の間で応答ピークとの間に相関係数 0.994 以上の直線関係が成立し検出下限は 0.01 mM (S/N = 3) であった。なお、回帰式は $Y = 5.60X - 0.13$; Y: ピーク電流(μ A); X: シュウ酸濃度(mM) であった。また、0.10 mM における 10 回の繰り返し測定の変動係数は 1.1% であった。センサー応答はピーク立ち上がりからベースライン復帰(完全復帰)まで約 2.5 分であり一時間に約 20 検体の分析が可能であった。酵素固定化リアクターは約 3 週間ほぼ同一の活性

を維持した。

既知量のシュウ酸をカルシウム塩として3段階の濃度で添加し、カラム処理を行った場合の回収率はいずれも98%以上と良好であった。

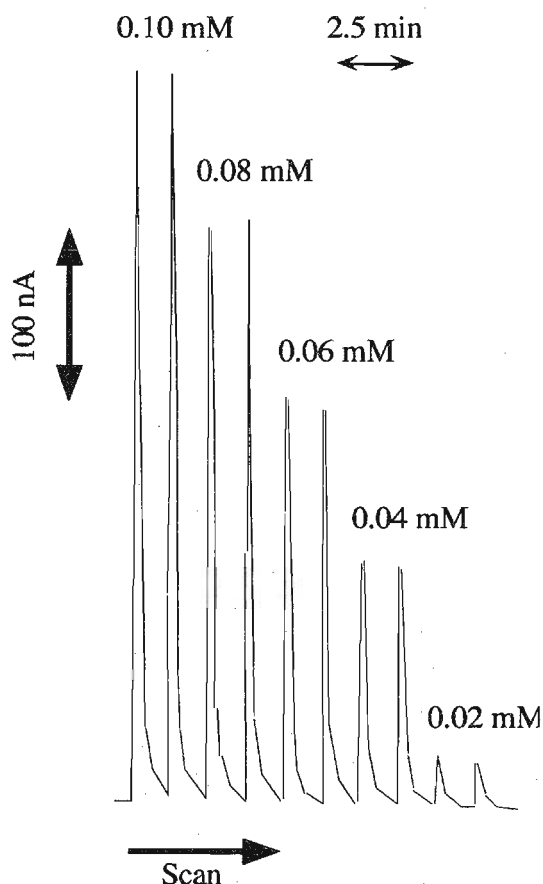


Fig. 4 Typical FIA responses for oxalate. Flow rate, 2.0 ml/min

3.6 実試料への適用とHPLC法との比較

産地の異なるハウレン草5種の総シュウ酸並びに遊離シュウ酸含量を本FIAシステムで定量しHPLC法による結果と比較した。Table 3から明らかのように両者は良好に一致し、対になったデータのt検定 (paired t test) を行った結果、 $t = 1.436$ となり $p < 0.05$ の危険率で両方法が与える平均濃度に有意な差はないと判定された。

Table 3 Comparison of the FIA method with the HPLC method

Sample		FIA (%)	HPLC (%)	Bias
Chikuzen	FOX	0.52	0.50	0.02
	TOX	1.21	1.15	0.06
Fukuoka 1	FOX	0.65	0.57	0.08
	TOX	0.78	0.73	0.05
Kumume	FOX	0.86	0.86	0.00
	TOX	1.13	1.18	-0.05
Nagasaki	FOX	0.70	0.67	0.03
	TOX	1.17	1.19	-0.02
Fukuoka 2	FOX	0.77	0.76	0.01
	TOX	0.96	0.97	-0.01

FOX: free oxalate; TOX: total oxalate

Data shown were mean value of three times.

4 結語

固定化シュウ酸オキシダーゼを用いる本FIAシステムは迅速かつ簡便に農産物中のシュウ酸含量を測定し得るものであり、野菜飲料などこれからますます需要の伸びる分野の品質管理に有用と考えられる。

文献

- 1) 前沢 勉: 食品工業, 1994(7/15), 56 (1994).
- 2) ピーター・クーバー: “薬物中毒必携” p.508, (医歯薬出版), (1978).
- 3) “医学大事典”, p.922, (南山堂), (1970).
- 4) 吉田 修: 日泌尿会誌, 70, 975 (1970).
- 5) 山中英明, 久能昌朗, 塩見一雄, 菊池武昭: 食衛誌, 24, 454 (1983).
- 6) 香川 彰: 農業及び園芸, 68, 906 (1993).

- 7) J. C. Andrews, E. T. Vviser: *Food Res.*, **16**, 306 (1951).
- 8) J. Bergerman, J. S. Elliot: *Anal Chem.*, **7**, 1014 (1955).
- 9) N. A. Turer: *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 171 (1980).
- 10) C. W. Wilson, P. E. Shaw, R. J. Knight: *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1106 (1982).
- 11) 菊永茂司, 高橋正侑: 日栄食学会誌, **38**, 123 (1985).
- 12) L. C. Clark, Jr., L. K. Noyes, T. A. Grooms, P. E. Moore: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434**, 512 (1984).
- 13) N. Potezny, R. Bais, P. D. O'Loughlin, J. B. Edwards, A. M. Rofe, R. A. I. Conyers: *Clin. Chem.*, **29**, 16 (1983).
- 14) C. R. Bradley, G. A. Rechnitz: *Anal. Lett.*, **19**, 151 (1986).
- 15) M. A. Nabi Rahni, G. G. Guilbault: *Anal. Chem.*, **58**, 523 (1986).
- 16) S. M. Reddy, S. P. J. Higson, I. M. Christie, P. M. Vadgama, *Analyst*, **119**, 949 (1994).
- 17) S. Yamamoto, H. Wakabayashi, M. Nakajima, K. Shimada,: *J. Chromatogr. B.*, **656**, 29 (1994).
- 18) K. Matsumoto, H. Kamikado, H. Matsubara, Y. Osajima: *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988).
- 19) K. Matsumoto, K. Sakoda, Y. Osajima: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 155 (1992).
- 20) F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata: *Denki Kagaku*, **63**, 1100 (1995).
- 21) J. Chiriboga; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 277 (1963).
- 22) G. G. Guilbault, G. J. Lubrano: *Anal. Chim. Acta*, **64**, 439 (1973).
- 23) M. Sugiura, H. Yamamura, K. Hirano, M. Sasaki, M. Morikawa, M. Tsuboi: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2003 (1979).

(Received March 28, 2000)

(Accepted April 6, 2000)