

アブラナ属葉菜のイソチオシアネート類の 分析条件の検討

阿部 誠

1. はじめに

イソチオシアネート類は野菜などの辛味成分として嗜好上重要であるとともに、抗がん性¹⁾ や抗菌性^{2,3)}、抗酸化性⁴⁾ など健康に関する様々な機能が近年報告され、注目されている。

辛味成分としてのイソチオシアネートとしては、ワサビのアリルイソチオシアネート (allyl isothiocyanate)、ダイコンの 4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアネート (4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate) が代表的で様々な研究がなされているが、カラシナや高菜などの辛味を特徴とするアブラナ属葉菜類についての研究は少ない。辛味葉菜類はワサビやダイコンとは食用部位が異なり、加工・調理の手法も異なることから、そのイソチオシアネート類について食品化学的に新たな検討が必要であると考えられる。

イソチオシアネート類は配糖体の形で植物組織に存在し、細胞が破壊されると内在する分解酵素のミロシナーゼとの反応がおこり、配糖体から糖が分離されイソチオシアネートが遊離される。発生するイソチオシアネートの定量には酵素反応の条件面からの検討も必要であることに加え、イソチオシアネートそのものが不安定な化合物であるため、抽出・分析条件におけるイソチオシアネートの安定性や変化を確認することも重要となる。

本研究ではこれらの点に重点を置いて、葉菜から発生したイソチオシアネート類を直接HPLCで定量分析する方法とその諸条件について葉カラシナを用いて検討した。

2. 実験方法

(1) 試薬

標準のイソチオシアネートとして、allyl isothiocyanate (和光純薬)、isobutyl isothiocyanate (和光純薬)、1-propyl isothiocyanate (Alfa Aesar)、2-phenylethyl isothiocyanate (Alfa Aesar) の4種を用いた。HPLC溶出液としては、HPLC用アセトニトリル (和光純薬) およびHPLC用の蒸留水 (和光純薬) を用いた。

(2) 分析試料と栽培

試料として葉カラシナを用いた。ハカラシナ（サカタのタネ）の種子を市販園芸用土を用いたプランターで栽培した。栽培は、Shimadzu BITEC-500L中で、昼温/夜温：28℃/23℃、12時間日長（照度約3000Lx）で行い、約3ヶ月間栽培し地上部位の高さ25～30cm程度の株からの葉を試料として用いた。

(3) HPLCによるイソチオシアネートの分離条件

HPLCの分離条件は、小島と橋本⁵⁾ および安井⁶⁾ の方法に基づき設定した。HPLCはShimadzu LC-9Aを用い、検出は244nmで行った。カラムはPEGASIL ODS SP100(4.6mm i.d.×250mm) (Senshu Scientific Co. Ltd.)を用いた。標準とした4種のイソチオシアネートをHPLC用アセトニトリルに溶解、希釈して4種混合液を調製し、これをHPLC用標準サンプル液として分離条件を検討した。

(4) HPLC用試料の調製

葉カラシナの葉身部 0.10gを切り取り1.5mlマイクロチューブの底部に入れ、直ちにペンシル型ホモゲナイザー Iuchi Homogenizer S-203 ((株) 井内盛栄堂)を用いて最大回転数で5秒間の粉碎処理を行った。キャップをして室温に一定時間放置後、270μlのアセトニトリルを加え十分に振動攪拌して混合後12000rpmで2分間4℃下で遠心分離した。上澄みを0.45μm フィルターで処理したものを5μlをHPLC分析に供した。

(5) 葉カラシナのイソチオシアネートの分離・同定

HPLCで分離したピークを分取し、ヘキササン抽出した後濃縮したものをGC-MS分析し、マススペクトルのフラグメント解析より構造を推定した。GC-MS分析は新成化学(有)(大阪府茨木市)に依頼してRtx-5MS 30mのカラムを装着したShimadzu GCMS-QP2010により行った。

(6) アリルイソチオシアネートの水中での挙動の検討

i) アセトニトリルと水の混合系における安定性

アリルイソチオシアネート（以下AITCと略す）のアセトニトリル溶液（11.3 mg/ml）を各種比率に混合したアセトニトリル-水混合液で50倍に希釈したものを25℃に1時間保ち、3倍容量のアセトニトリルを加え混合したものを10μlをHPLC分析してAITCの定量を行った。

ii) 水中に混合した際の回収率

AITCのアセトニトリル溶液（11.3mg/ml）を予め所定の温度に保った水で50倍に希釈し、液量の3倍のヘッドスペースがある状態で1.5mlマイクロチューブ容器に密閉し所

定の温度に保ったものを経時的に100 μ l採取し、それぞれ300 μ lのアセトニトリルと混合したものを10 μ lをHPLC分析してAITCの水中の残量の定量を行った。

また、AITCを水に混合した液を1.5mlマイクロチューブ中にヘッドスペースがほとんどない状態にまで満たして密閉し揮発によるロスを最小にしたものについて同様の操作を行い、AITCの水中の残量の定量を行った。

(7) 成長段階の異なる葉からのAITC発生量の定量と辛味

全長15cm以上の各ステージの葉を先端に近い方から順に葉柄の付け根付近で切断し、中心葉脈を境に左右に分割切断し、半分を辛味の測定に供した。辛味は著者1名で行い、葉を咀嚼して辛味強度を5段階に評価した。他の半分から0.10gずつ4つの断片を切り出し、各々を方法(4)によりHPLC用試料を調製して分析を行い、発生するAITC量を測定した。AITC発生量については一元配置分散分析と多重比較(Tukey法)により有意差判定を行った。

3. 結果および考察

(1) 葉カラシナ中のイソチオシアネートのHPLC分離と同定

まずイソチオシアネートのHPLCによる分離条件を検討した。標準4種混合液の最も良い分離が得られたのは、アセトニトリル-水混液(60:40)で、流速0.5 ml/minであった。分析温度は30 $^{\circ}$ Cに設定した。HPLCのクロマトグラムを図1に示す。

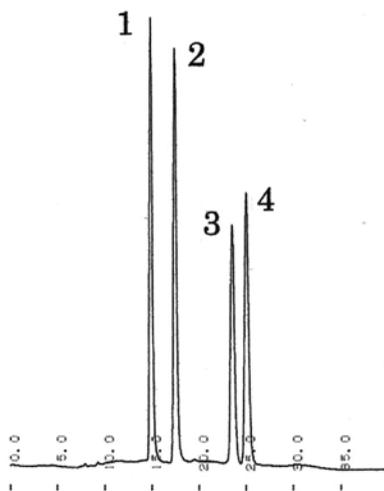


図1. 標準イソチオシアネートのHPLCクロマトグラム
1 : allyl isothiocyanate 2 : 1-propyl isothiocyanate
3 : isobutyl isothiocyanate 4 : 2-phenylethyl isothiocyanate

葉カラシナの抽出液を同条件のHPLC分析に供したところ、図2に示すように、HPLCの溶出位置からイソチオシアネートと考えられるピーク (P-1) がひとつ分離された。その溶出時間からAITCと予想された。図3にP-1のマススペクトルを示す。分子イオン (M+) がm/z 99にありフラグメンテーションのパターンも標準品と一致したことから、AITCであることが確認された。HPLCでイソチオシアネートの溶出位置付近には他のピークはほとんど存在せず、葉カラシナの辛味成分であるイソチオシアネートはAITCのみであると考えられた。

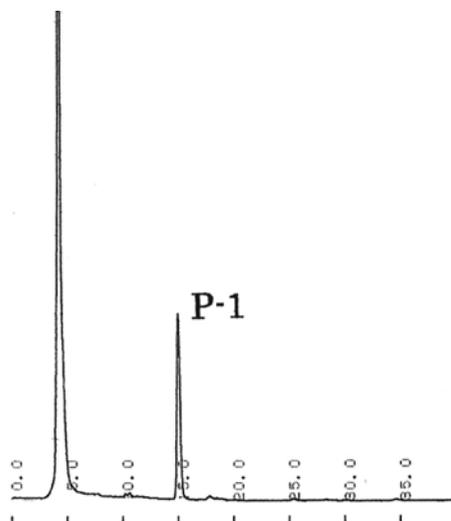


図2. カラシナ抽出物のHPLCクロマトグラム

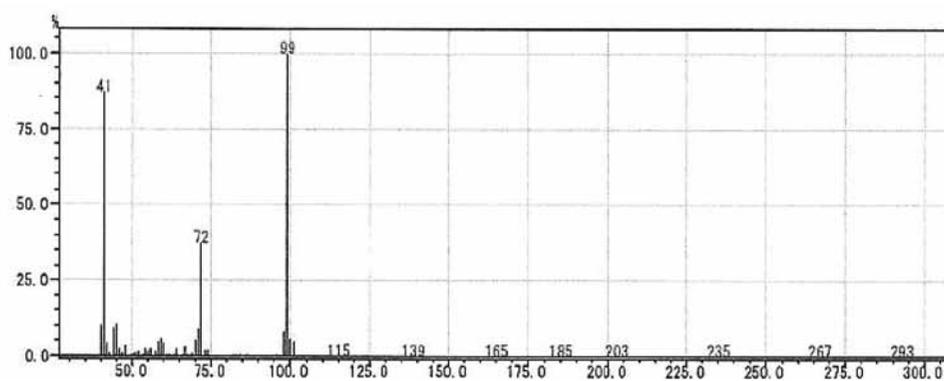


図3. P-1のマススペクトル

(2) 葉カラシナ抽出液のAITCの挙動

葉をラップで包み電子レンジで170W、30秒の加熱処理を行ったものではAITCは全

く生じなかった。また、エタノールに10分間浸漬した葉カラシナからの抽出液にもAITCは検出されなかった。これらの条件下ではミロシナーゼが熱変性や溶媒変性を起こして失活していると考えられることから、葉カラシナで検出されたAITCは全て配糖体がミロシナーゼにより加水分解されることにより生じると考えられ、遊離態のAITCは存在しないと考えられた。なお、電子レンジ処理した加熱葉に生葉からの抽出液を少量加えて保温したものからはAITCが生じた。

ミロシナーゼの反応により生じたAITCは反応直後は生体細胞中の水と接触し保持されると考えられる。しかし、イソチオシアネートそのものはアセトニトリルなどの有機溶媒にはよく溶けるが水にはわずかししか溶けず、また揮発性でもある。さらに水と反応性がある^{7,8)} ことから、試料からの抽出操作中や分析操作中、サンプルの保存中に水が共存する場合には、生じたイソチオシアネート量の変動することが予想される。そこで、葉菜サンプルでの定量分析に先立ち、標準品のAITCを用いて分析で用いるアセトニトリル-水の溶媒系および水中における挙動を検討した。

(3) アセトニトリルと水の比率について

まず、アセトニトリル-水混合液において両者の混合比率を変えた溶液中に溶解させた場合のAITCの残存量について検討した。

表1に示すように、アセトニトリル中ではAITCは25℃で72時間放置しても安定であった。アセトニトリルと水の混合物中においては、水の比率が50%以下であればAITCは3時間経過後も混液中にはほぼ90%以上残存していた。水の比率75%以上では25℃で1時間程度放置されると大幅に減少した。

以上の結果、AITCの分析については、抽出試料は75%アセトニトリル濃度にすれば25℃でも1時間は全く変化しないことから、分析前にはこれを冷蔵保存（5℃以下）することで数日間の保存は可能であると考えられる。また、HPLCの分析中は60%アセトニトリル濃度になるが分析時間は20分であるのでこの間の減少は生じないと考えられた。

表1. 各種比率のアセトニトリル-水混液中からのAITCの回収
(25℃でのAITC残存率、%)

溶媒組成	放置時間 (時間)				
	1	3	24	48	72
アセトニトリル 100 : 水 0	98.6	100.0	99.1	99.8	100.0
アセトニトリル 75 : 水 25	97.1	93.3	92.4	87.3	87.5
アセトニトリル 50 : 水 50	100.0	91.0	79.9	79.0	72.9
アセトニトリル 25 : 水 75	79.0	74.6	50.1	36.7	28.2
アセトニトリル 0 : 水 100	62.3	40.0	19.0	12.7	9.5

(4) 水中における挙動

次に、配糖体からミロシナーゼにより生じた直後からAITCが細胞液に接することになるので、その際のモデルとして4段階の温度条件における水中でのAITCの残存を検討した。各温度における水中での残存量と残存率を表2に示す。

この結果から、AITCは水中に曝されてヘッドスペースが空いている場合、低温の方が回収率は高く、15℃以下であれば放置時間が5分以内であれば100%、10分ではほぼ90%が残存することが明らかになった。一方、25℃の室温や酵素反応に適した37℃では10分ではほぼ80%になる。通常の抽出を室温（25℃）で行うとすると、粉碎・抽出によりミロシナーゼの反応により発生し水中に曝されたAITCの損失を最小にするには1分以内にアセトニトリルを加えるなどしてアセトニトリル濃度を75%程度にすることが必要であると考えられた。

水中におけるAITCの減少がAITCの水との反応による分解のためか、AITCそのものの揮発によるものかを示すためにヘッドスペースを無くして揮発が起らない条件でAITCの残存状況を検討した結果が表2の下段の数値である。水中に曝されたAITCの減少は揮発によるものが大きく、例えば25℃に1時間放置した場合、最低でも約40%が揮発により失われるが揮発以外では10%が失われるに過ぎないことが示された。

表2. AITCの水中での残存状況（残存率、%）*

水温	水中放置時間（分）					
	0	1	5	10	60	180
5℃	100.0	100.0	100.0	88.5	68.7	59.4
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
15℃	100.0	100.0	100.0	89.3	74.7	55.3
	100.0	100.0	100.0	100.0	98.1	91.7
25℃	100.0	94.9	90.3	86.2	62.3	40.0
	100.0	99.0	96.1	92.0	91.1	80.3
37℃	100.0	89.9	85.6	76.0	51.4	32.3
	100.0	98.7	95.7	91.5	82.8	62.6

*各温度における数値は、上段の数値はヘッドスペースがある場合、下段の数値はヘッドスペースが無い場合のものを示す。

(5) 粉碎により発生するAITCの定量法の検討

葉カラシナ中ではAITCはほとんど全てが配糖体で存在するため、AITCを定量するには、抽出操作時にミロシナーゼの酵素反応を起こさせると同時に、生じたAITCの分解や揮発によるロスをも最小にすることが必要となる。

AITCの定量に関する既報^{6,9,10)}では、試料を粉碎後溶媒抽出するなどしてHPLC分析を行っている。ダイコンやワサビなどでは組織が硬く十分に粉碎しないと酵素反応が起こりにくいため粉碎にある程度の時間がかかり、イソチオシアネートの揮発性や水との化学反応によるロスも大きくなると考えられる。葉菜類の場合は組織が薄く粉碎しやすいためその特性を生かした条件設定を行った。

試料に水を加えて高速切断型のホモゲナイザーで処理する方法や、乳鉢で摩擦する方法を検討したが、いずれも粉碎が十分でないことや抽出時の揮発によるロスが大きいいためか、生じるAITCの回収率が低くまた再現性も低いため定量法としては不十分であった。加水することで葉の粉碎が不均一になりがちな点を克服するためと、実際に葉を噛んだとき生じる辛味に近い状態を再現することを意図して、加水せず葉そのものを直接ペースト状に摩擦したものからAITCを抽出する方法の条件を検討して、実験方法(4)の試料調製法を開発した。

この方法により極短時間での粉碎を行った後室温での放置時間を変えたものについてAITCの回収量を測定したところ表3のようになった。AITCは葉の粉碎により極めて短時間で生じ、1分以上の室温放置では定量されるAITC量は減少し、揮発等による減少が起こっていると考えられた。生じたAITCを定量するには粉碎後30秒以内にはアセトニトリルを加えて生じたAITCを溶解させ安定化することが好ましいと考えられたため、以下のAITC発生量の測定では、粉碎5秒、室温放置30秒と設定した。

表3. AITC定量への粉碎後放置時間の影響

粉碎後放置時間 (秒)	AITC発生量 (mg AITC / g葉乾物)
0	0
15	1.06
30	1.10
60	0.95
180	0.60

(6) 成長段階の異なるカラシナ葉のAITC発生量の測定

カラシナは同一株で中央部から新芽が生じ、ステージの異なる根生葉が10枚程度存在して古くなったものから黄色化し枯れていく。各ステージの葉について前項で開発した方法でAITC発生量の定量を行い、実際の辛味との関係を検討し、定量法の辛味予測への有効性を検討した。

同一株から得た葉8枚の辛味強度とAITC発生量を表4に示す。辛味強度はAITC発生量と良い相関性を示している。スピアマンの順位相関による相関係数は0.9271となり、

表4. 同一株の各ステージの葉の辛味とAITC発生量

葉No.	長さ (cm)*	辛味強度	AITC発生量** (μg AITC / g 葉乾物)
1	15	+++++	1354.0 ± 121.9 a
2	20	+++++	909.8 ± 142.4 b
3	20	++++	756.9 ± 112.8 bc
4	25	++++	687.6 ± 108.1 c
5	28	+	228.6 ± 30.3 d
6	30	++	262.0 ± 27.8 d
7	32	++	170.1 ± 21.2 d
8	30	+	76.8 ± 12.8 d

* 葉柄の付け根から葉身の先端までの長さ。

** 平均値 ± 標準偏差 (n=4) で示す。bとcの間は5%危険率で、その他の異なるアルファベット記号の着いた数値の間では1%危険率で、有意差あり。

危険率1%で有意差ありとなった。また、AITC発生量はカラシナの株の若い葉で高く、辛味も強い。サイズが30cm以上になって成長し過ぎたものではAITC発生量が低下し辛味も弱くなる。今後株間の比較や栽培環境差を検討する際に考慮しなければならない点である。

今回開発した分析方法では必ずしもカラシナ葉から発生しうる全量が測定できているものではないと考えらえるが、分析中のAITCのロスを最小限に留めており、実際の咀嚼条件に近く、食べたときに感じる辛味とよい相関を示すため、従来のAITC量の測定法の欠点を改善するものとなろう。また、AITCのグルコース配糖体であるシニグリンの定量値やミロシナーゼ活性量と合わせてさらに検討することで、アブラナ属葉菜の辛味発生のメカニズム解明や食味の改善、イソチオシアネートの食品成分としての価値評価の研究に利用されることが期待される。

4. おわりに

本研究により、辛味葉菜類のカラシナについてのイソチオシアネートの分析条件を検討し、次の結論を得た。

- (1) 葉カラシナのイソチオシアネートはAITCのみからなり、遊離態では存在せず配糖体であるシニグリンとして存在する。
- (2) AITCは水中では不安定で、水の比率の大きい条件で抽出すると主に揮発によるロスが起こる。アセトニトリル75%以上では安定した溶液となる。
- (3) 実際の咀嚼した際の変化に近づけた極短時間の粉碎により発生するAITCを定量

する方法を検討したところ、粉碎後室温30秒の放置ではほぼ最大量のAITCが定量された。この発生量は実際の辛味と良い相関を示し、葉菜の辛味のマーカーとして本分析法によるAITCの発生量の測定は有用であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は平成22年度学習院女子大学特別研究費の助成により行ったものである。ここに報告するとともに謝意を表する。

参考文献

- 1) 川岸舜郎：がん予防食品の開発（大澤俊彦編）、シーエムシー、pp.110-117 (1995).
- 2) S. Inouye, H. Goi, K. Miyauchi, S. Muraki, M. Ogihara and Y. Iwanami : *J. Antibact. Antifung. Agents*, **11**, 609-615 (1983).
- 3) H. Goi, S. Inouye and Y. Iwanami : *J. Antibact. Antifung. Agents*, **13**, 199-204 (1985).
- 4) 越智宏倫、ナラシマン・ラマラツナム、竹内征夫、杉山裕之：日本栄養・食糧学会誌、**48**、236-238 (1995).
- 5) 小島均、橋本俊郎：茨城県工業技術センター研究報告第17号、149-152 (1989).
- 6) 安井陽子：食品衛生学雑誌、**39**、213-217 (1998).
- 7) 川岸舜郎：日本食品工業学会誌、**32**、836-848 (1985).
- 8) S. Kawakisi and M. Namiki : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 452-459 (1969).
- 9) Katsunari Ippoushi, Masahiko Ishida, Atsuko Takeuchi and Keiko Azuma : 野菜茶業研究所研究報告、**12**、61-66 (2013).
- 10) 荒川博、伊奈健宏、松浦英之、大場聖司、種石始弘、中根健：静岡県農事試験場研究報告、**46**、35-42 (1992).

(本学教授)