

# アブラナ科スプラウトの HS-SPME/GC-MS を用いた香気成分分析

環境情報学部 1 年

西村光平

## 要旨

アブラナ科植物の持つ独特の匂い、辛みはイソチオシアネート (isothiocyanate; ITC) によるものである。ITC はアブラナ科を食草とする昆虫がアブラナ科であるか否かを判断するうえで用いる重要な香気成分である。草食生物による食害などで細胞が破壊されたときより多くの ITC が産生されるが、細胞が傷つかない状態でも微量の ITC が常に空気中に放出されている。しかし、細胞を破壊しない状態での香気成分の測定に関する研究は十分には行われていない。そこで本研究ではカイワレダイコン、ブロッコリー、クレス、マスタード、レッドキャベツの 5 品種のアブラナ科スプラウトにおける香気成分における ITC について、植物を出来るだけ傷つけない状態での分析を行うためヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (headspace solid phase micro extraction; HS-SPME) を用いたガスクロマトグラフ質量分析法 (gas chromatograph mass spectrometry; GC-MS) で解析した。マススペクトルのパターンから 4-methylpentyl isothiocyanate, Benzyl isothiocyanate, 4-(methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, 4-(methylthio)butyl isothiocyanate, 2-phenylethyl isothiocyanate の 5 種類の ITC が同定された。個々のアブラナ科植物で保有している ITC の種類に違いが見られた。ブロッコリーとレッドキャベツ、カイワレダイコンは共通の ITC を保有しており、また、マスタードと前述の 3 品種の間には共通している ITC は見られなかった。このことはアブラナ科の系統関係と符合していた。

キーワード： Brassicas, Isothiocyanate, Glucosinolate, HS-SPME/GC-MS

## 1. 序論

グルコシノレート (glucosinolate; GL) は植物の二次代謝物に属し、一般的に液胞に含まれる。GL は酵素と反応することでグルコースとアグリコンに分解される。アグリコンがさらに加水分解されて様々な分解産物を生じる。そうして出来た分解生成物の一つがイソチオシアネート (isothiocyanete; ITC) であり、アブラナ科の辛味の源である。ITC は揮発性がある物質でアブラナ科独特の匂いの元でもある (Yan and Chen, 2007)。

アブラナ科の匂いはアブラナ科を食草とする草食生物の誘引物質として働く (Wolfson, 1980)。アブラナ科に属するブロッコリー (*Brassica oleracea* Var. *italica*)での調査によると、ITC 濃度は生育初期に最も高く、成長が進むと低くなる。(Fernanda *et al.*, 2002)。

これまでにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)をはじめとした多くのアブラナ科植物で、GL とその分解産物に関する研究がなされてきた (Yan and Chen, 2007)。しかしながら、細胞破壊しない条件での香気成分に含まれる ITC の種類、濃度について調べられた論文は見当たらない。

本研究ではアブラナ科植物の発する香気成分に含まれる ITC の種類について種間の比較を行い、系統関係からその考察を行うことを目的とした。

## 2. 対象と手法

### 2.1. 対象

アブラナ科スプラウトの香気成分中に含まれている ITC をヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (headspace solid phase micro extraction; HS-SPME) を用いたガスクロマトグラフ質量分析法 (gas chromatograph mass spectrometry; GC-MS) で解析した。今回使用したサンプルは市販されているアブラナ科スプラウト、カイワレダイコン、ブロッコリースプラウト (海洋牧場) クレス、マスタード、レッドキャベツ (村上農園) を使用した。

### 2.2. 手法

市販のスプラウトは脱脂綿上に播種され、根の張った状態でパッケージされていた。スプラウトを傷つけずにこの綿を取り外すことは極めて困難であるため、根の部分は切り離して採取した。それぞれのスプラウトを 5 本採取し、重量と大きさを記録した。茎、葉に切り分けたのちもう一度秤量し、速やかに 50%エタノール 100  $\mu$ L を入れた別々の 20 mL ガラスバイアルに投入した。内部標準液 (internal standard ; IS) として 1 mM Cyclohexanone 10  $\mu$ L を加え、ただちに密栓して HS-SPME/GC-MS 分析を行った。スプラウト各種で葉 5 サンプル、茎 5 サンプルずつ用意した。抽出には SPME ファイバーに 50/30  $\mu$ m DVB/carboxen/PDMS (SUPELCO 社製)を用い、平衡化に 30°C・5 分、吸着に 5 分、脱着に 10 分の条件で行った。GC-MS 装置は Agilent 6890/5973 GC/MSD を用いた。GC の条件については、キャピラリーには高極性分子に適したポリエチレンコーティングを施した DB-Wax  $\phi$ 0.25 mm $\times$ 60 m, 0.25  $\mu$ m。検出器温度は 250°C、カラムオーブン温度は 50°C で 3 分間保

った後、5℃/分で加熱し、220℃で 6 分間維持した。キャリアガスはヘリウム、ガス流速：0.8 mL/分で行った。

検出されてきた物質の同定は、NISTマスマススペクトルライブラリーのデータを参照した。ダイコンに含まれるGLのアグリコンに着目したところ *o*-Glycosideの分解産物 4-Methylpentyl isothiocyanate, 5-(methylthio)-4-pentenitrile isothiocyanate, Benzenpropanenitrile, 3-(Methylthio)propyl isothiocyanate, Benzyl isothiocyanate, 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate, 2-Phenylethyl isothiocyanate, 5-(Methylthio)pentyl isothiocyanate, のマスマススペクトルデータとの比較を行い同定した。

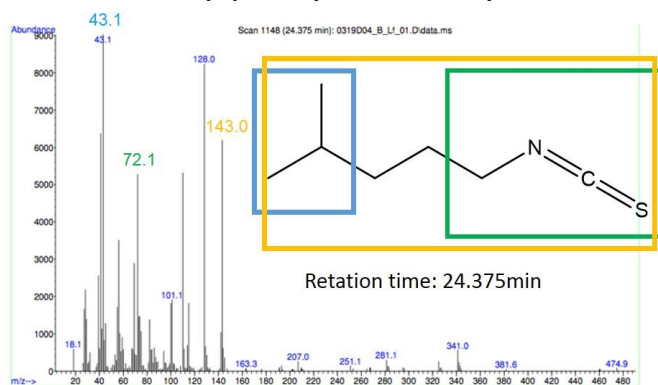
### 3. 結果と考察

*o*-Glycoside の分解産物のうち 4-Methylpentyl isothiocyanate, Benzyl isothiocyanate, 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate, 2-Phenylethyl isothiocyanate, の 5 つを同定した。NIST マスマススペクトルデータとの相同性を根拠として同定を行った。

各ピークのマスマススペクトログラムは以下の図 1 A～E に示した。物質の同定には NIST マスマススペクトルライブラリーのデータを元にピークの質量電荷比 ( $m/z$ ) から図中の色枠で示す構造的な特徴を考察し、確認を行った。黄色ではその分子の最大のマスマススペクトルを示している。緑は ITC に特徴的な  $\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}$  の分子が示す 72.1 のマスマススペクトルを表している。黄緑の破線は緑で示した分子がイオン化されたときにできるもう一つの分子のマスマススペクトルを表している。水色は各分子に特徴的なマスマススペクトルを示している。

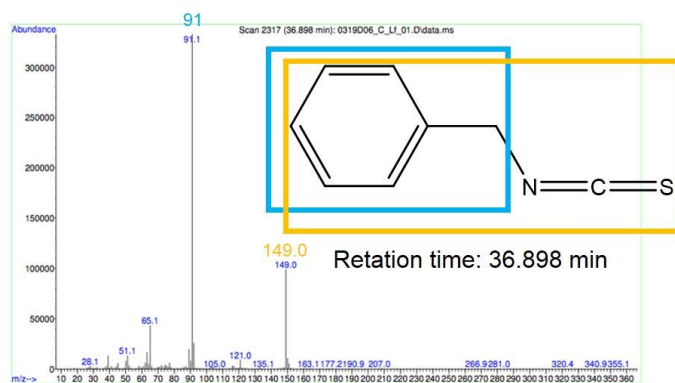
それぞれの分解産物とそれが検出できたアブラナ科スプラウトについて表 1 にまとめた。また、アブラナ科の系統樹を図 2 に示す。それぞれ、マスタードを黄色、キャベツとブロッコリーについては緑色、ダイコンは茶色で色分けし、系統関係と分解産物の関係性がわかりやすく示した。今回参考にした系統樹では 18S-25S rRNA(ribosome RNA)を用いた系統解析が行われている。キャベツ、ブロッコリーは種レベルでは同一の *Brassica oleracea* という学名であるが、この論文ではキャベツの rRNA を用いた解析が行われている (Yang *et al.*, 1999)。そのため、系統関係における考察ではキャベツとブロッコリーは同種として扱うが、他種間での比較を行うときはキャベツとの比較として述べる。なお、クレスについての記述はないため比較は行わなかった。

(A) 4-Methylpentyl isothiocyanate



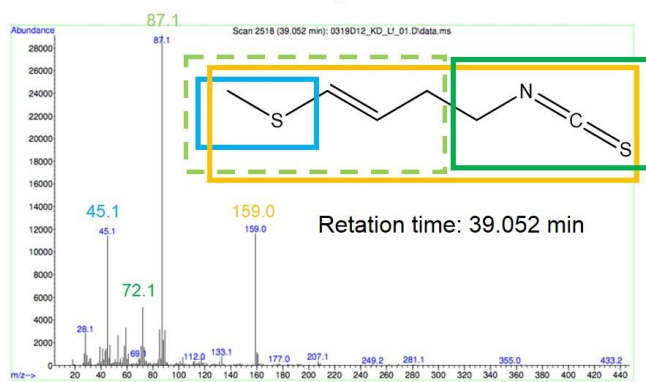
12

(B) Benzyl isothiocyanate



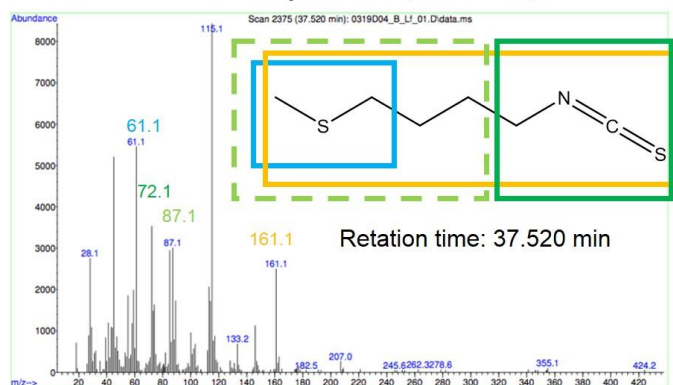
13

(C) 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate



14

(D) 4-(Methylthio)butyl  
isothiocyanate(erucin)



(E) 2-Phenylethyl isothiocyanate

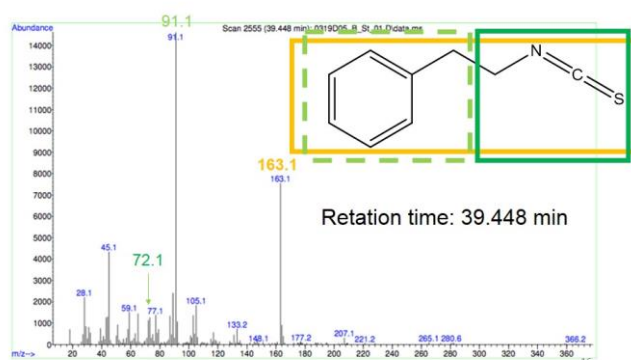


図1 アブラナ科スプラウトから同定されたマススペクトル。

物質の同定には NIST マススペクトルライブラリーのデータを元に質量電荷比 ( $m/z$ ) から図中の色枠で示す構造的な特徴を考察し、確認を行った。黄色はその分子の最大のマススペクトルを、緑は ITC に特徴的なマススペクトル、黄緑は緑がイオン化されたときにできるもう一つのマススペクトル、水色は上記以外でその分子に特徴的なマススペクトルを表す。それぞれ (A) 4-Methylpentyl isothiocyanate, (B) Benzyl isothiocyanate, (C) 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, (D) 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate, (E) 2-Phenylethyl isothiocyanate の同定について表した。

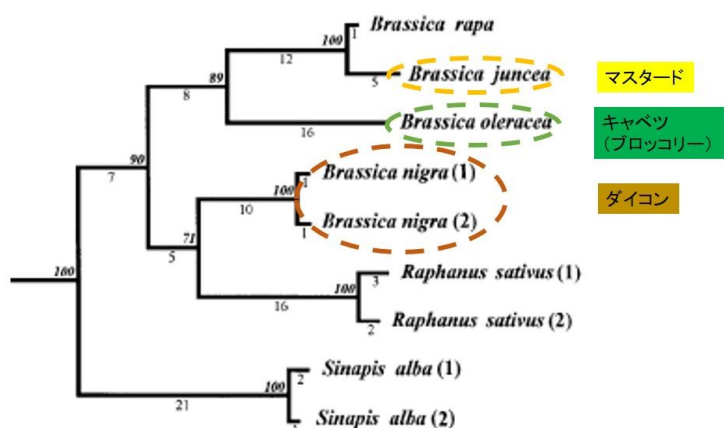


図2 アブラナ科植物の系統関係 (Yang *et al.*, 1999)

表1 HS-SPME-GC/MS 法で検出されたアブラナ科スプラウト各種における o-Glycoside の分解産物.

ITC\アブラナ科スプラウト	クレス	マスタード	レッドキャベツ	ブロッコリー	カイワレダイコン
4-Methylpentyl isothiocyanate				○	○
Benzyl isothiocyanate	○	○			
4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate				○	○
4-(Methylthio)butyl isothiocyanate			○	○	○
2-Phenylethyl isothiocyanate			○	△ (stem only)	

○は葉及び茎での物質確認を示し、△は茎のみでの物質確認を示す。

同種であるキャベツ・ブロッコリーでは 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate, 2-Phenylethyl isothiocyanate が、近縁であるキャベツ・カイワレダイコンの間では 4-Methylpentyl, 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate が共通する分解産物として確認された。ただし、キャベツ・カイワレダイコンよりも近縁であるキャベツ・マスタード間では共通の分解産物は確認できなかった。

## 4. 議論

### 4.1. 結論

アブラナ科スプラウトは細胞が細胞への大きなダメージがない状態でも ITC を生成し香気成分として放っていた。香気成分に含まれている ITC はキャベツ-ブロッコリーといった進化的に近い種間でも一定の相違がみられ、香気成分のみでこれらの品種の違いを見分けることも可能である。

### 4.2. 展望

進化的距離と ITC の保存度合いの相関関係について疑問が残った。今後より多くの種類の ITC について解析を行い、この相関について詳しい考察を行いたい。

## 5. 謝辞

本研究に取り組むにあたりアドバイザーの若山正隆氏には的確かつ熱心なご指導をいただきました。また、研究員の本間幸氏には実験の指導を行っていただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

そして、このような素晴らしい研究環境、機会を与えてくださった富田勝氏に感謝申し上げます。ありがとうございます。

## 6. 参考文献

Yan,X. and Chen,S. (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* **226**, 1343–1352.

Wolfson,J.L. (1980) Oviposition response of *Pieris Rapae* to environmentally induced variation in *Brassica Nigra*. *Ent, exp. & appl* **27**, 223-232.

Pereira,F.M.V. *et al.* (2002) Influence of temperature and ontogeny on the levels of Glucosinolates in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J. Agric. Food Chem* **50**, 6239-6244.

Yang,Y.W. *et al.* (1999) Molecular phylogenetic studies of *Brassica*, *Rorippa*, *Arabidopsis* and allied genera based on the internal transcribed spacer region of 18S–25S rDNA. *Mol. Phylo. and Evol* **13**, 455-462.