調理操作による食物中の抗酸化性配糖体の変化に関する研究

課題番号：07808002

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成10年4月

研究代表者　竹井　瑤子
（大阪教育大学教育学部　教授）

緒言

植物性食品に含まれる抗酸化性物質において、フラボノイドは生理活性物質として最近脚光を集めている物質の一つであり、摂取量も多い。日常、私たちは食品を生食するばかりでなく、煮る・焼く・揚げるなど種々の方法で調理して摂取している。しかしながら、実際の調理における食品中のフラボノイドの損失量をみた文献はまだまだ少なく、特にフラボノイド配糖体に関してはほとんどない。

そこで、食物中の抗酸化性配糖体のモデルとして、代表的なフラボノイドであるケルセチン配糖体を取り上げ、それらを多く含む食品（野菜）を種々の方法で調理することによって各ケルセチン配糖体の含有量の変化や加水分解して得られる総ケルセチンの量の変化、さらにフラボノイドを含む総フェノール量の変化を検討することにより野菜中のフラボノイド含有量の変化を考察することを本研究の目的とした。そのほかに代表的な抗酸化性物質のひとつであり、調理操作によって損失することが多いビタミンC（以下、AsAと略記する）の変化についても考察した。

研究組織

研究代表者	：	竹井瑤子（大阪教育大学教育学部　教授）
研究分担者	：	井奥加奈（大阪教育大学教育学部　助手）
研究協力者	：	青山ゆか、竹林カナ、中東万弓

研究経費

平成7年度	1.400千円
平成8年度	500千円
平成9年度	300千円
計	2.200千円

研究発表

（1）口頭発表

井奥加奈他、調理操作がタマネギ中のフラボノイド含有量に及ぼす影響

（第51回日本栄養・食糧学会大会、平成9年5月18日）

研究成果

＜研究目的＞

フラボノイドは野菜・果物に多く含まれている黄色色素の一つであり、代表的な抗酸化性物質である。タマネギの外皮など、特殊な場合をのぞいて、細胞中に種々の配糖体として存在しているため、フラボノイド摂取量を検討する場合は加水分解して糖を除去した後、アグリコンであるフラボノイドのうち、主たる化合物を定量するのが一般的である。しかしながら、その場合配糖体そのものの変化というのはわからない。そこで、今回野菜類の中でも日常摂取する機会の多い「タマネギ」「キャベツ」「ブロッコリー」をとりあげてそれらの中に含まれているフラボノイドが調理操作によって影響を受けるかどうかについて検討した。

§１　調理操作がタマネギ中のフラボノイドに及ぼす影響

1-1　タマネギ中のフラボノイドについて

タマネギに含まれているフラボノイドは主としてケルセチンである。津志田ら[1)]によると、Quercetin-3,4'-O-ß-D-glucoside(以下Q3,4'Gと略記する)、Quercetin-4'-O-ß-D-glucoside(Q4'G)、で全フラボノイド量の85%を占める。今回実験に使用したタマネギには他にQuercetin-3-O-ß-D-glucoside(Q3G)も含まれていた。他にRutin(Quercetin-3-O-ß-D-rutinoside)が含まれている場合もあるが、今回の分析条件ではアリル化合物とピークが重なったため分析できなかった。また、糖がはずれた遊離型のケルセチン(Quer)も含まれていた。ケルセチンはガンを予防したり生体内の脂質の酸化を防ぐ化合物としてよく知られている。

1-2　実験試料・試薬

1996年度6月上旬に収穫された兵庫県三原郡産の黄色タマネギ(*Alluim cepa* L.)を用いた。AsAは1997年度6月上旬に収穫された同じ産地の黄色タマネギを用いた。品種は「もみじ」「ターザン」であった。いずれも9月上旬に大阪市東部市場よりまとめて購入し、4℃で暗所保存しながら実験に用いた。

試薬はメタノール・酢酸エチル以外すべて特級を用いた。メタノールと酢酸エチルは1級を蒸留して用いた。Folin-Denis法に用いるFolin試薬は市販のフェノール試薬（ナカライ化学）を用いた。ＨＰＬＣに用いる蒸留水は蒸留した後、孔径0.2μmのメンブランフィルタを通してから使用した。ＨＰＬＣに注入する前にはいずれの分析でも孔径0.45μmのメンブランフィルタ（Dismic Filter, cellose acetate, ADVANTEC）を通した。

調理に用いたサラダ油はコーンサラダ油（味の素）であり、バターは有塩バター（雪印）であった。

1-3　実験方法

調理操作は「水煮」「炒め」「電子レンジ加熱」の3種類であり、これに「生」を加えた4種類に関して実験を行った。また、「炒め」操作に関しては「サラダ油を用いた油炒め（コーン油炒め）」「バターを用いた油炒め（バター炒め）」の2種類を「何も加えない炒め（炒め）」と比較しながら実験した。詳しい調理方法は図1に示した。

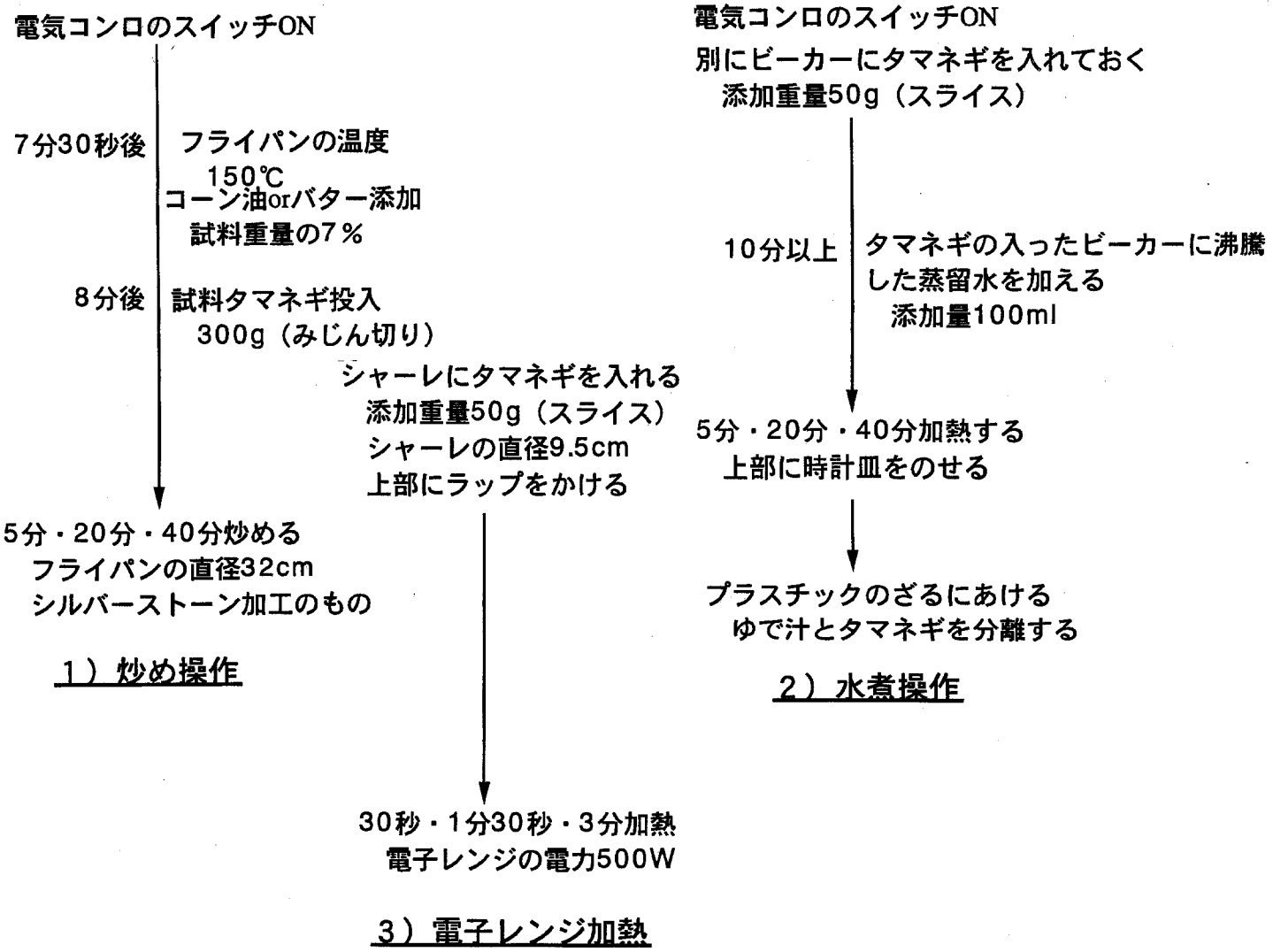


図1　調理操作の概要

調理されたタマネギは、凍結乾燥した後80％メタノールで30℃20時間抽出し、25mlに定容してAsA定量をのぞく各分析に用いた。AsAの分析は調理後すぐにタマネギを5％メタリン酸中で摩砕し、上清を50mlに定容して分析に用いた。ケルセチン配糖体、総ケルセチン量、総AsA量の分析には高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いた。分析条件は以下の通りである。なお、これと併せて総フェノール量の定量をFolin-Denis法[2)]にて没食子酸を標準物質として比色定量した。詳しい分析方法は図2に示した。

＜ＨＰＬＣ分析条件＞

ＨＰＬＣシステム(1)
ポンプ：GALLIVER Intelligent pump PU-980(Jasco)
検出器：GALLIVER Intelligent detector UV-970(Jasco)
インテグレータ：GALLIVER Intelligent integretor 807-IT(Jasco)
ＨＰＬＣシステム(2)
ポンプ：GALLIVER Intelligent pump PU-980(Jasco)
検出器：HITACHI 655 UV detector (HITACHI)
インテグレータ：GALLIVER Intelligent integretor 807-IT(Jasco)

＝ケルセチン配糖体＝
カラム：TSK-GEL ODS-80 Ts (4.6 x 150mm, pore size5μm, TOSOH)
溶出溶媒：メタノール：水：蟻酸＝39:60:1 v/v
流速：1.0ml/min
検出波長：370nm
＝総ケルセチン量＝
カラム：TSK-GEL ODS-80 Ts (4.6 x 150mm, pore size5μm, TOSOH)
溶出溶媒：メタノール：水：蟻酸＝49:50:1 v/v
流速：1.0ml/min
検出波長：370nm
＝総AsA量＝
カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 x 150mm, pore size5μm, GL Sciences)
溶出溶媒：64mM リン酸緩衝液 pH2.5
流速：0.5ml/min
検出波長：245nm

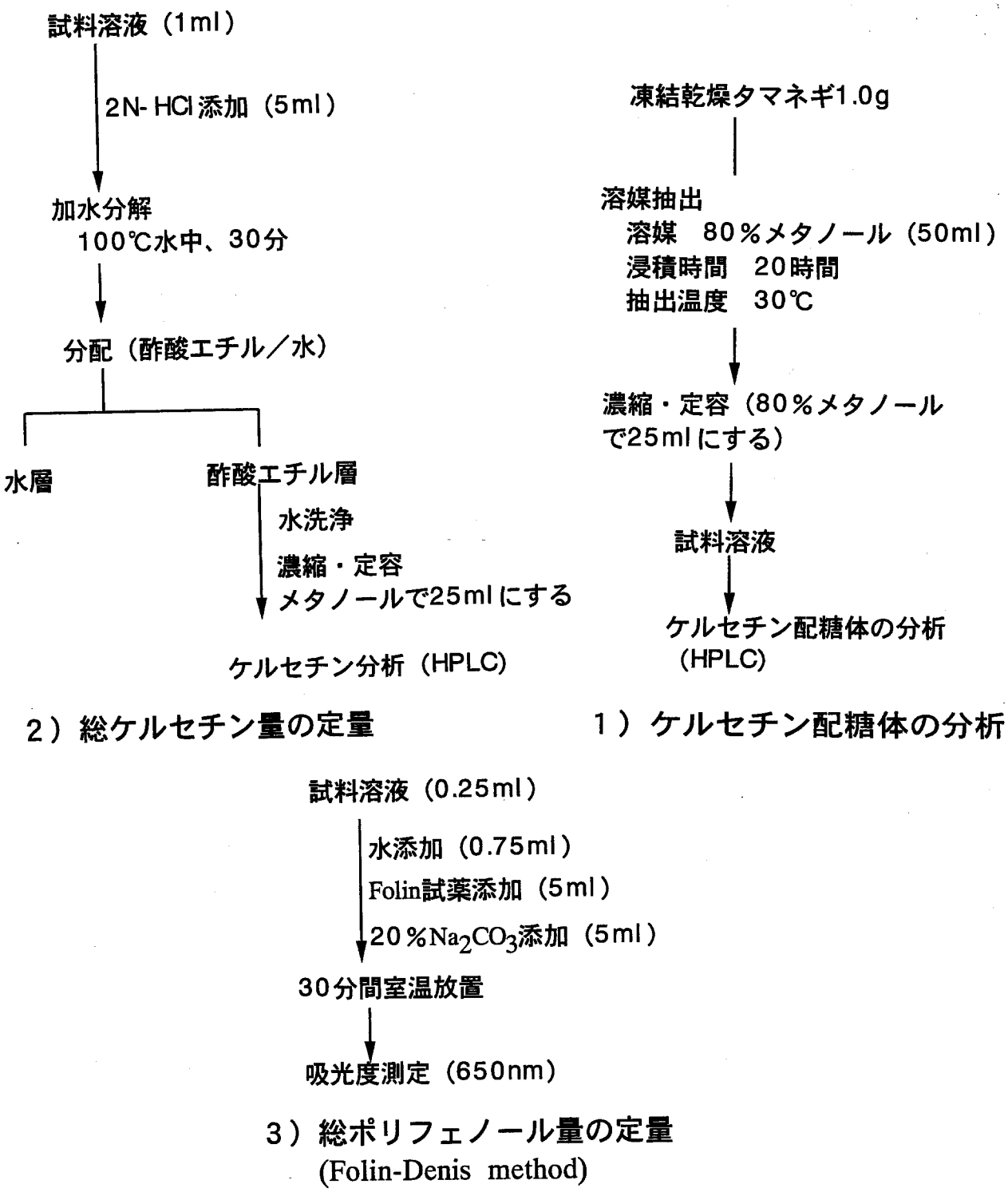


図2　分析方法の概要

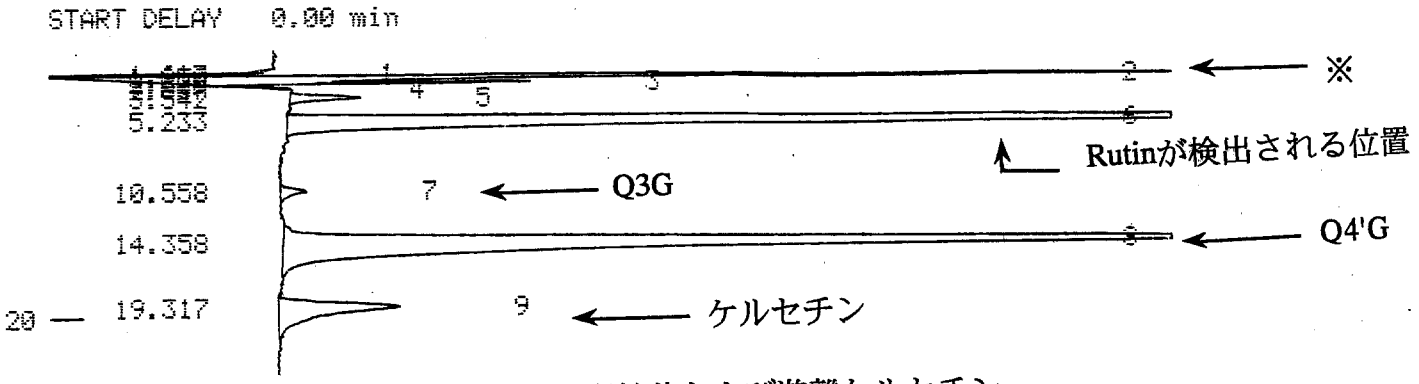
得られたデータは新鮮タマネギ重量100ｇあたりの相対値に換算した。この時、調理0分のタマネギを100として各時間の値を計算した。また、経時的な変化をみる場合、タマネギの個体差を考慮するために2～３個のタマネギをまとめてみじん切り（スライス）にし、一連の実験を行った。

ＨＰＬＣのピークの同定は、co-injection、および質量スペクトル（MS）測定で標準物質と比較した。MS測定にはJMS-AX505HA(日本電子)を用いた。

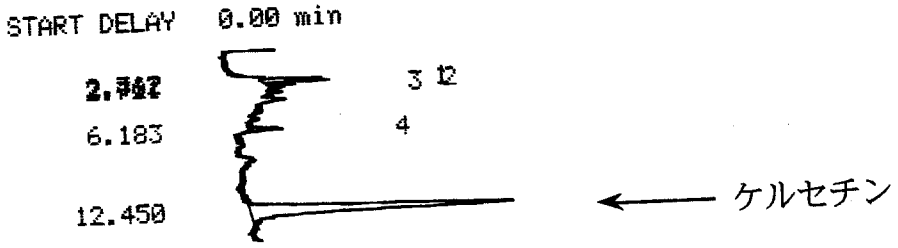
1-4　実験結果

＜各化合物のクロマトグラム＞

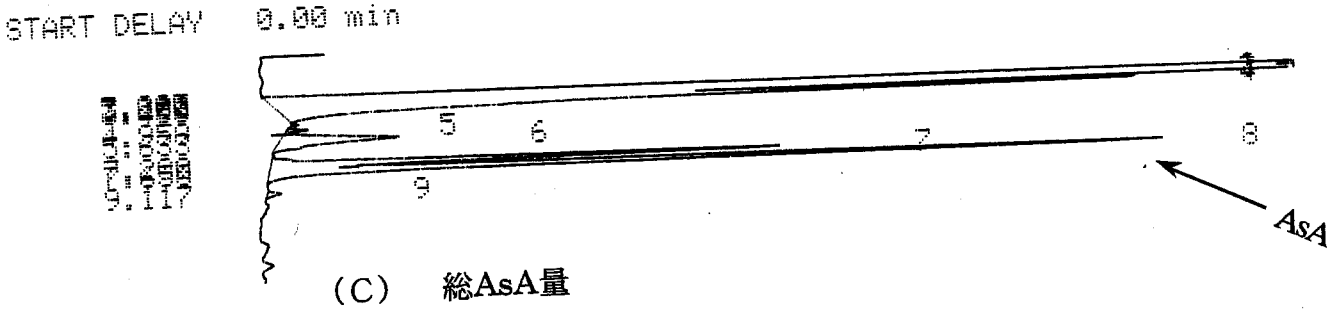
図3にケルセチン配糖体および遊離ケルセチンのクロマトグラム（A）、総ケルセチン量定量時のケルセチンのクロマトグラム（B）、および総AsA量定量時のAsAのクロマトグラム（C）を示した。今回の実験条件でQ3,4'Gを分析すると※印のピークになる。ピークの同定は可能でも定量分析は困難であったので配糖体分析の対象から除外した。今回用いたタマネギ中の抗酸化性物質の含有量は総フェノール量が新鮮タマネギ100あたり20～40mg没食子酸相当量（平均29.8mg）、総ケルセチン量が2～8mg（平均4.35mg）、遊離ケルセチンが0.3～0.7mg（平均0.5mg）、Q3Gが0.1～0.3mg（平均0.25mg）、Q4'Gが3～7mg（平均4.9mg）含まれていた。



（A）　ケルセチン配糖体および遊離ケルセチン



（B）　加水分解後の総ケルセチン量



（C）　総AsA量

図3　各化合物のクロマトグラム

＜各調理操作における総フェノール量の変動＞

表1に各調理操作における総フェノール量の変化を示した。数値はは0分を100とした相対値、標準偏差はn=3である。これより20分の調理ではどの調理でもほとんど変動がみられないが、40分調理すると調理操作間で差がみられた。炒め操作において、40分炒めるとタマネギはやや褐色を帯びる場合があり、本来Folin-Denis法によるフェノール性化合物の比色定量法では定量されない化合物が縮重合して反応する化合物が生成した可能性もある。バターで炒めると着色しにくく、40分炒めても他の2種類のように急激に上昇することはなかった。着色の程度については特に測定していないが、実験に使用したフライパンの材質（今回はシルバーストーン加工）や火力、油脂成分などが影響していると考えられる。火力に関してはフライパン中心部における表面温度を測定し、図4に示したが、どの炒め操作でも際だった差はみられない。従ってバター含有成分（例えばレシチンなど）の影響が大きいと考えられた。総フェノール量の定量分析で定量できる化合物を絞り込むと同時に、具体的にどの成分の影響が大きいかに関しては今後検討の余地がある。水煮に関しては、水煮タマネギ中の総フェノール量は徐々に減少し、水煮ゆで汁のほうは急激に増加した。これより、ゆで汁中への移行は少なくないことが分かった。

表1　各調理操作における総フェノール量の変化

調理時間（分）	油なしいため	標準偏差	コーン油炒め	標準偏差	バター炒め	標準偏差
0	100.0	12.7	100.0	5.2	100.0	7.6
5	89.7	8.5	87.8	14.6	87.4	4.4
20	87.8	11.6	92.7	4.5	89.0	8.8
40	122.6	14.4	122.8	5.6	91.5	4.8

調理時間（分）	水煮タマネギ	標準偏差	水煮ゆで汁	標準偏差
0	100.0	10.8	100.0	14.0
5	99.4	14.2	543.8	20.4
20	83.9	6.2	591.6	39.1
40	87.7	13.5	612.3	76.9

調理時間（分）	レンジ加熱	標準偏差
0	100.0	1.2
0.5	102.0	10.7
1.5	98.7	4.3
3.0	104.6	5.4

※値は0分を100としたときの相対値

標準偏差；n=3

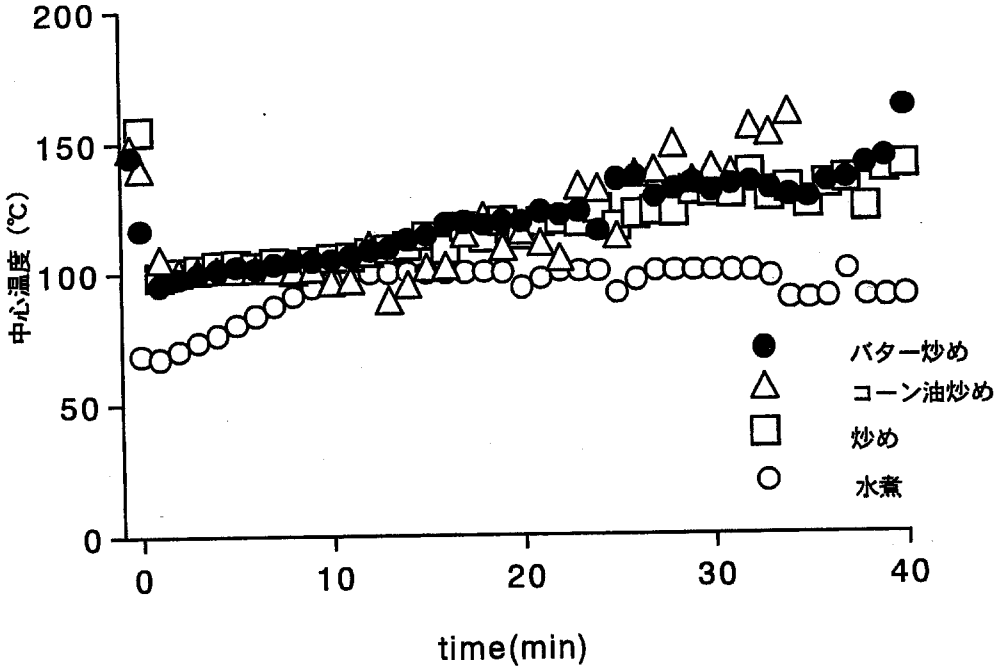


図4　フライパン中心部における表面温度

＜各調理操作における総AsA量の変動＞

図5に各調理操作における総AsA量の変動を示した。電子レンジ加熱をのぞくいずれの調理操作においても時間の経過とともに徐々に減少し、最終的にはもとの30～40％になった。調理操作間で有意な差はみられなかった。電子レンジ加熱は測定時間が異なるので数字で示したが、この場合総AsAはほとんど減少しなかった。AsAは水溶性の抗酸化性物質の代表であり、調理によって分解されやすいことが知られている。今回の結果もそれを裏付けるものであった。

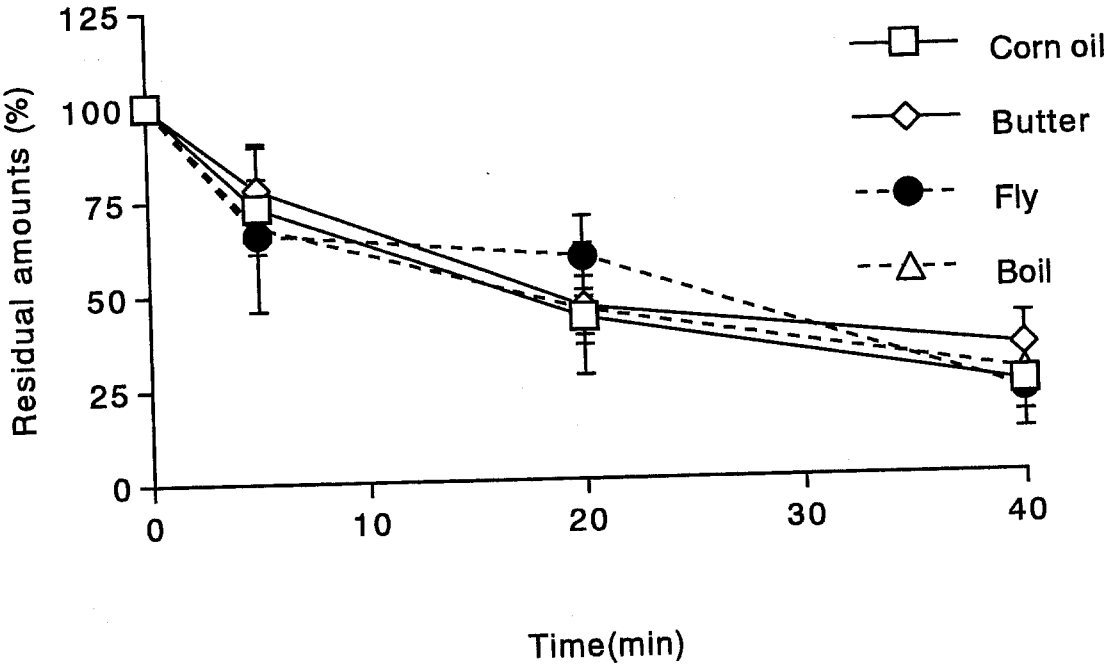


図5　各調理操作における総AsA量の変動

＜各調理操作における総ケルセチン量の変動＞

表2に加水分解して得られた総ケルセチン量の推移を各調理操作別に示した。炒め操作において5分後にやや増加する場合もあるが、いずれの場合も40分炒めてもほとんど減少しなかった。従って加熱ではタマネギ中の総ケルセチン量は変化しないと言える。電子レンジ加熱では逆にやや増加する傾向がみられた。水煮においては水煮タマネギ中の総ケルセチン量は時間の経過とともに半分程度にまで減少した。今回は、ゆで汁中の総ケルセチン量も定量し、ゆで汁と水煮タマネギをあわせた合計相対値を0分を100として示した。20分まではほとんど変化がなく、40経過後にやや減少したことからゆで汁への移行が確認された。

表2　各調理操作別の総ケルセチン量の変動

調理時間（分）	油なしいため	標準偏差	コーン油炒め	標準偏差	バター炒め	標準偏差
0	100.0	22.1	100.0	18.6	100.0	16.3
5	121.9	18.6	120.2	28.9	96.4	9.3
20	108.9	24.3	113.2	21.7	89.5	10.7
40	93.0	32.5	95.8	34.6	80.4	25.2

調理時間（分）	水煮タマネギ	標準偏差	水煮ゆで汁	標準偏差
0	100	18.8	100.3	47.4
5	119.5	9.9	333	148.7
20	60.8	9.4	566.5	124.4
40	46.1	42.1	541.3	165.1

調理時間（分）	レンジ加熱	標準偏差
0	100.0	17.8
0.5	159.0	35.8
1.5	144.2	30.4
3.0	132.1	34.2

※値は0分を100としたときの相対値

標準偏差；n=3

＜ケルセチン配糖体の変動＞

図6に炒め操作におけるQ4'Gと遊離ケルセチン含有量の変動を示した。今回、炒め操作に関しては、炒める際に用いる油脂の種類によってケルセチン配糖体含有量に差がみられるのではないかと予想されたが、コーン油炒め、バター炒め、油を用いない炒めの間に有意な差はみられなかった。これは炒める際に用いる油脂の種類とケルセチン配糖体に相関がないことを示しており、ケルセチン配糖体の極性が高く、油脂には溶解しないためではないかと考えられた。油脂には溶解しないが、高極性化合物であるので水には溶解しやすい。しかしながら今回水煮におけるゆで汁の分析がうまくいかなかったためケルセチン配糖体の分析は行えなかった。総ケルセチン量をみてもゆで汁中への移行は明らかであることから再度検討しなければならない。

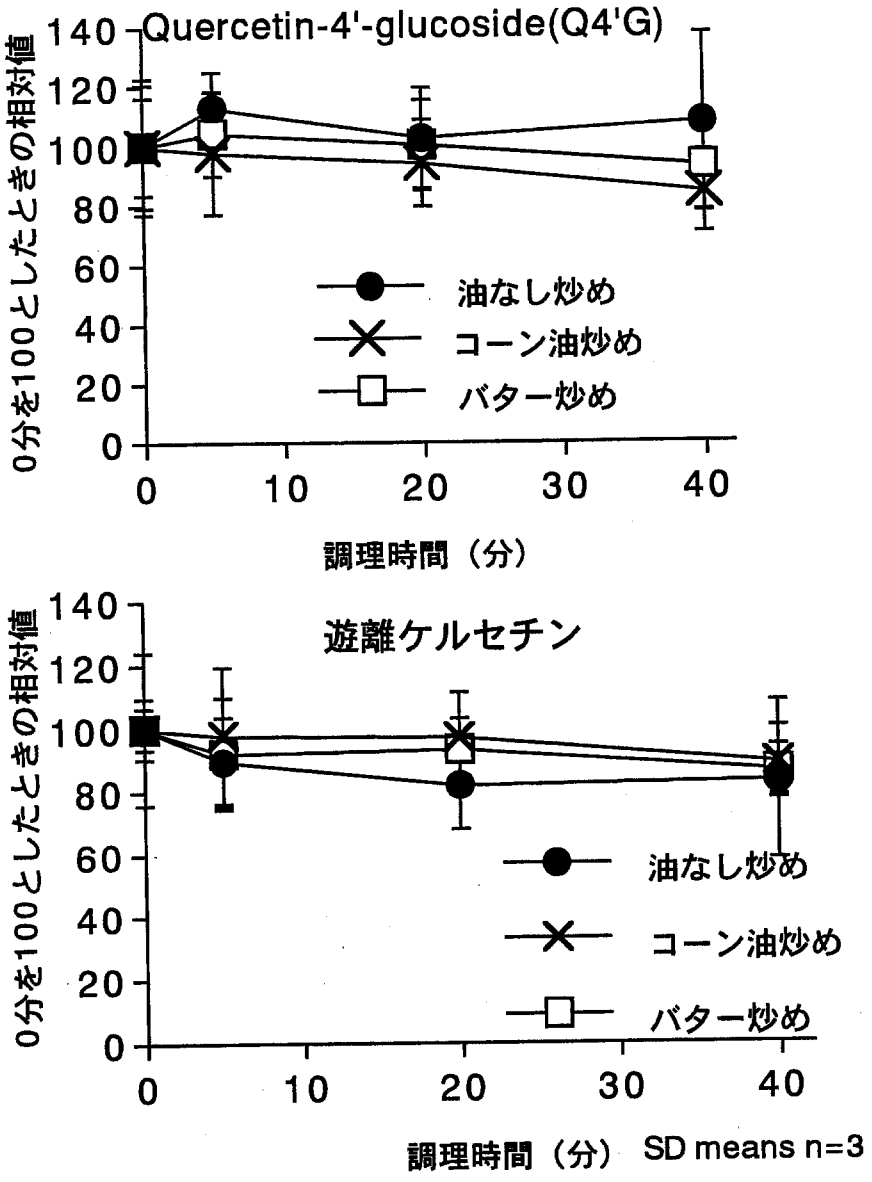


図6に炒め操作におけるQ4'Gと遊離ケルセチン含有量の変動

1-5　考察

たまねぎ（*Allium cepa* L.）は和・洋・中を問わず世界で幅広く用いられている野菜であり、タマネギ中に存在するアリル化合物は血小板凝集阻害効果などの生理活性を持つことが知られている[3)]。また、タマネギは地下に育つ鱗茎であるにもかかわらずケルセチンやその配糖体を非常に多く含んでいる。含有量は品種や栽培地域などにもよるが、今回でも含有量の多いQ4'Gで新鮮タマネギ100ｇあたり数ミリグラム含まれており、私たちが摂取するケルセチンの多くを占めるであろうと考えられる。Hertogらによる疫学調査[4)]でもタマネギはフラボノイド含有量の最も多い野菜の一つに数えられている。

今回、タマネギを調理する場合に、タマネギ中のフラボノイド配糖体やその他の抗酸化性物質含有量がどのように変化するのかについて、主としてＨＰＬＣを用いて定量分析した。その結果、「炒め」のように高温により野菜を調理する方法ではタマネギ中のケルセチン配糖体は変化せず、含有量にも変動がみられなかった。これは炒める時に油脂を添加しても同じであった。今回、「揚げる」操作を検討しなかったが、油脂を介した高温加熱処理ではフラボノイド含有量は減少しにくいのではないかと考えられた。これはケルセチン配糖体の極性の高さから考えて、油脂には溶解しないこと、また、高温の油脂と空気中の酸素以外にタマネギ中のフラボノイドを酸化させる原因が少ないことが考えられた。バターなどでは抗酸化性のあるレシチンが乳化して空気中の酸素を遮断し、タマネギ細胞を保護する役割を果たした可能性もある。Priceらは赤タマネギと黄色タマネギを炒めて含有量を比較し、品種間で含有量そのものに差はあっても時間の経過による差は顕著ではないという結果を得ていた[5)]ことからも、ケルセチン配糖体が高温調理に強いことがわかる。

電子レンジ加熱のようにマイクロ波を照射すると生タマネギの含有量よりも増える傾向にあった。これは細胞壁をマイクロ波が刺激することで生タマネギよりも化合物が抽出されやすくなった可能性が高い。AsA含有量も減少せず、微量成分を活かす調理方法としては最も有効であると考えられる。

水煮は水と接する調理方法で水溶性の化合物はゆで汁のほうへ移行し、熱に弱い化合物であれば酸化、分解する可能性がある。今回の結果よりケルセチン配糖体は酸化されることなくゆで汁中へ移行することが明らかになった。また、ゆで汁中の総ケルセチンと水煮タマネギ中の総ケルセチンを合計するとほとんど減少していないことから水煮によってケルセチン配糖体が分解する可能性は低いことが明らかになった。水煮タマネギの総フェノール量の減少傾向と総ケルセチン量の減少傾向を比較すると前者の方がゆるやかであることから、ケルセチン配糖体や遊離ケルセチン以外のフェノール性化合物の中にはゆで汁へ移行しない化合物も存在すると考えられた。

また、それぞれの調理操作でAsAを定量し、時間の経過とともに減少することを認めた。AsAは調理によって減少することが分かっているので、調理そのものが間違いなく行われていることを実証している。

以上のことから、タマネギ中のケルセチンおよびその配糖体は炒める・電子レンジ調理などでは分解せず、含有量も変化しないが、煮ることでゆで汁中に移行することがわかった。今後は「煮る」調理を中心にどのような要因によってフラボノイド含有量が減少するのかについて検討していきたい。

参考文献

1）津志田藤二郎他、日食科工誌、42、p100-108, (1995)

2）V.L. Singelton *et al.*, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, p144-158, (1965)

3）「香辛料成分の食品機能」岩井和夫・中谷延二責任編集、光生館、p165-197, (1989)

4）M. G. L. Hertog *et al.*, *Arch. Intern. Med.*, 155, p381-386, (1995)

5）K. R. Price *et al.*, *J. Agric.Food Chem.*, 45, p938-942, (1997)

§２　調理操作がキャベツ中の抗酸化性物質に及ぼす影響

タマネギはネギ科の根菜類であるが、今回は葉菜類の中で最も知名度が高く、家庭で幅広く調理に利用されるキャベツ（学名：*Brassica oleracea L.var.capitatal*）をとりあげ、各調理操作による抗酸化物質含有量の変化を検討した。また同じ調理操作におけるビタミンC量の変化との比較検討をおこなった。

2-1　実験機器および試薬

下記の分析機器を用いて、タマネギの方法に準じて総ポリフェノール量、総ケルセチン量、ケルセチン配糖体量、遊離ケルセチン量、ビタミンC量の定量を行った。なお、総ポリフェノール量の定量には分光光度計を、その他の定量にはＨＰＬＣを用いた。

ＨＰＬＣ
ポンプ　：　Jasco　PU-980 Intelligent HPLC Pump
検出器　：　HITACHI 638-41 VARIABLE WAVELENGTH UV monitor
インテグレーター　：　Jasco 807-IT Integrator

分光光度計　：　HITACHI　U-3000 型自記分光光度計
凍結乾燥機　：　TAITEC　VD-80 FREEZE DRYER
インキュベータ　：　SANYO　INCUBATOR MIR-152

キャベツの調理操作には以下の調理器具を用いた。

電気ヒータ（電気コンロ）　：　FUJIMARU　DR-100M (1050W)
温度計測センサー　：　ANRITU　DATA COLLECTOR AM-7002
フライパン　：シルバーストーン・デュポン社製；φ３２cm

2-2　実験試料

実験に用いた試料キャベツの概要を以下に示す。

＜使用したキャベツ＞
品種・・・　ＹＲ錦秋
産地・・・　長野県洗馬
収穫日　・・・１９９７.１０.５
購入場所　・・・大阪中央卸売東部市場

購入日　・・・１９９７.１０.６

品種・・・　ＹＲ若嶺
産地・・・　長野県浅間
収穫日・・・　１９９７.１０.２７
購入場所・・・　大阪中央卸売東部市場
購入日・・・　１９９７.１０.２８

若嶺の特徴

１０、１１月に収穫される冬キャベツの品種はＹＲ種がほとんどであることから、ＹＲ種について種苗会社に問い合わせた結果、ＹＲ種とは、萎黄病（FUSALIUM菌による土壌病害）を防ぐよう耐病育種した品種であることがわかった。若嶺は太りのよい早育種で、６５日前後で１.５Kg前後に育ち、ＹＲ種の中でも環境適応性が広く栽培しやすい特徴を持つ。

2-3　抽出方法

試料からの化合物の抽出は、調理後のキャベツを凍結乾燥した物を用い、以下のように行った。キャベツの調理方法は2-4に示した。

乾燥キャベツ１.００gを共栓付き三角フラスコに量りとり、７０％メタノールを５０ml加え３０℃のインキュベータの中に２５時間放置する。抽出溶液をろ紙でろ過した後、溶媒をエバポレータで濃縮して完全に除去し、７０％メタノールで２５mlに定容したものを試料溶液とした。試料溶液は褐色のスクリュー管に入れ、冷凍保存した。

2-4　調理方法

食物は調理操作を加えることによって、生食とは異なった食感や味わいを得ることができる。本実験では家庭でよく行われると考えられるキャベツの調理操作である、<水さらし>、<ゆでる>、<炒める>の３種類を選択した。炒める調理操作については、さらに油を添加しない「油なし炒め」と、家庭でよく行われる「油炒め」について検討した。

<キャベツの切り方>

１玉約１.５Kgのキャベツの外側３枚の葉を取り除いて４等分に切り分ける。芯を切り取った後葉を４～５枚ずつはがし繊維と反対方向に１センチ幅に切り、

全体をよく混ぜ合わせる。
幅１mmに切ったものでは、予備実験にて炒め操作を行った時に水分蒸発量が多かったため、本実験においては１センチ幅とした。

＜1＞水さらし
１玉約1.5Kgのキャベツを１センチ幅に切ってよく混ぜ合わせたもの１００gを採取し、水さらしを行った。　キャベツ１００gを蒸留水１０００mlに０分、１分、５分、２０分、４０分間常温で浸漬した。水の温度は平均して２２.０℃であった。０分は上から蒸留水をかけるのみとした。時間がきたらすぐプラスチック製のざるにうつし、キャベツとさらし水を分ける。さらし水とキャベツの重さを量る。キャベツ５０gをラップに包んで凍結乾燥したものを試料とした。１２～１８％重量増加していた。

＜2＞ゆでる
１玉約1.5Kgのキャベツを１センチ幅に切ってよく混ぜ合わせたもの１００gを採取し、ゆでる操作を行った。沸騰した蒸留水１０００mlをガラスなべに入れ、１００℃になった時点でキャベツ１００gをいれ、ふたを閉めて０分、１分、５分、２０分、４０分間ゆでる。０分は沸騰水をかけるのみとした。所定時間経過ののちすぐざるにあける。放置して冷却した。冷却後、ゆで汁とキャベツの重さを測定した。ゆでたキャベツ５０gをラップに包んで凍結乾燥したものをゆでキャベツの試料とした。

＜3＞油なし炒め
１玉約1.5～1.6Kgのキャベツ２玉を１センチ幅に切ってよく混ぜ合わせたものから３００gを採取し、炒め操作を行った。キャベツ炒めは１８０℃前後の高温で短時間調理するのがよいとされる。今回はシルバーストーン加工のフライパン（デュポン社；φ３２センチ）を電気ヒータにのせ、温度センサーをフライパンの中央に耐熱テープで貼り付け、ダイヤルを７に合わせて８分３０秒後、すなわち１８０℃になった時点で投入し、０分、３分、７分、１０分、２０分間菜箸でかき混ぜながら炒めた。
調理時間０分の試料は生キャベツである。３～２０分間炒めたキャベツの重量を測定し、その中から５０gを凍結乾燥した。この凍結乾燥物を「油なし炒め」の試料とした。水分蒸発量は３分で6.8％、７分で２1.4％、１０分で３1.3％、２０分で５3.5％であった。

＜4＞油炒め
＜3＞と同様、１センチ幅に切ったキャベツ３００gをサラダ油（日清製油株式会社；「日清サラダ油」賞味期限　９８.２.２７）で炒めた。フライパンを熱し、１８０℃になった時点でキャベツ重量の５％に相当するサラダ油１５gを入

れ、その３０秒後にキャベツを投入した。

調理時間０分のキャベツは油１５gを添加しよく混ぜたものとした、炒めたキャベツの重さを測定し、５０gをラップに包んで凍結乾燥した。水分蒸発量は３分で4.9％、７分で１５.７％、１０分で２５.８％、２０分で４２.１％であった。

凍結乾燥後乾燥物の油を除去するためにｎ－ヘキサン（和光純薬工業株式会社；試薬１級を蒸留したもの）で１回に５０mlのヘキサンを使用し３回洗浄した。

ヘキサンで洗浄した後のキャベツを再び乾燥させてヘキサンを完全に除去したものを「油いため」の試料とした。

2-5　試薬一覧

フェノール試薬		ナカライテスク株式会社
炭酸ナトリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
塩酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
酢酸エチル	試薬一級を蒸留したもの	片山化学工業株式会社
メタノール	試薬一級を蒸留したもの	片山化学工業株式会社
ギ酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
メタリン酸		
りん酸二水素ナトリウム（二水和物）	試薬特級	片山化学工業株式会社
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）		片山化学工業株式会社
ブチルハイドロキシトルエン(BHT)		和光純薬工業株式会社

2-6　総ポリフェノールの測定方法

キャベツにはフラボノイド以外の抗酸化性物質も含まれている。その多くはフェノール性の化合物であるのでそれらを総称して「総ポリフェノール量」と定義した。総ポリフェノール量を測定することによりフラボノイド及び他の抗酸化性物質の合計量を定量することができる。定量はタマネギと同様の方法によるフォリン-チオカルトー試薬を用いての総ポリフェノール量の定量法を用いた。

＜１＞操作方法

試料溶液0．25mlと水0．75mlを試験管に入れ、フォリンーチオカルト試薬（フェノール試薬と蒸留水（distilled water 以下 ＤＷと略記する）を１：１の割合で測定の度に調製した）と20％炭酸ナトリウムを5mlずつ順に加えタッチミキサーで混合し、室温で30分放置後分光光度計で波長650nmで吸光度を測定して生鮮キャベツ100g中に含まれるフェノール量を求める。検量線は毎回作成した。

＜1＞実験原理

アルカリ溶液中で酸化される物質（モノフェノール、フラボノイド、タンニン、ポリフェノールなど）と酸化されやすい物質（アスコルビン酸など）を検出するため、酸化還元反応により発色させ比較するのものである。

フォリン-チオカルトー試薬中のモリブデンユニットを持つリン酸複合体が酸化物質 により還元されてモリブデン-タングステンブルーとなる。

ブルーの発色は物質によりいろいろなところに極大吸収があるが、フォリン-チオカルトー試薬を使った場合は７５０nm前後に極大吸収があり、この極大吸収付近の波長で比色定量を行う。一般になだらかな吸光スペクトル カーブを有する。

＜2＞総ポリフェノール量の濃度の算出

ある厚さを持つ液層に強さ I_0なる単色光が入射し、透過して出てきた透過光の 強さがＩであったとすると、この I_0と Iの比は溶液毎に一定である。これをランベルの法則という。式で表すと

$$I / I_0 = t$$

となる。この tをその溶液の透過度といい、その百分率を透過率（ t）という。透過度の逆数の対数が吸光度（E）であり、式で表すと

$$E = \log_{10} I_0 / I = -\log_{10} t = k\,l$$

となる。このｋを比吸光係数と称し、その溶液固有の定数である。 lは液層の厚さ（cm）である。 lが１cmの場合は$E = k$となる。

多くの有色物質の希薄溶液においては、一定光線に対し、吸光度はその溶液の濃度Ｃに比例する。これをベールの法則といい、ランベルの法則とベールの法則を合わせ、ランベル・ベールの法則という。

今回は、種々の調理操作を加えているので、相対的な比較がしやすいように生鮮キャベツ１００ｇに換算した。没食子酸を標準物質として検量線を作成し、ランベル・ベール法則を用いてポリフェノール量の定量を行った。

得られたデータは没食子酸相当量mg／生鮮キャベツ１００ｇに換算した。

2-7　総ケルセチン量の定量

キャベツにどのくらいのケルセチン及びその配糖体が含まれているかを検討するために配糖体のグリコシド結合を切断し、アグリコンであるケルセチンに

変え遊離ケルセチンと合わせ総ケルセチン量を定量した。

＜１＞実験原理

エーテル結合であるグリコシド結合を２Ｎ－ＨＣ１で加熱することにより加水分解した。反応後の溶液中のケルセチンをＨＰＬＣにより分離定量した。

＜２＞総ケルセチン量の定量

ねじ口試験管に試料溶液１．０ml、２Ｎ－ＨＣ１５．０mlをオートピペッターで入れ、タッチミキサーで混和する。沸騰水中に１２０分置いた後氷冷して反応を止め、溶液をパスツールピペットで遠沈管にうつす。酢酸エチルでねじ口試験管を３回洗浄し全体で２５ml程度にする。タッチミキサーで３０秒間混合し、酢酸エチル層と水層を分配し、上層の酢酸エチル層をパスツールピペットで１００mlの分液漏斗にうつす。新たに５ml程度の酢酸エチルを加え、同じ操作を２回繰り返す。遠沈管内の全ての溶液を分液漏斗にうつし、分液漏斗を５０回ふり混ぜ、栓をあけてしばらく置き下層の水層を捨てる。

分液漏斗に５０mlの蒸留水を入れてふり混ぜ、同じく下層の水層を捨てる。エバポレーターで濃縮し、１００％メタノールで１０mlに定容した後、さらにDWにて２０mlに定容する。

＜３＞総ケルセチンの定量

ＨＰＬＣでケルセチンを分析して総ケルセチン量を求める。

総ケルセチン試料溶液は希釈せず、φ０.４５μmのメンブランフィルターでろ過したものをＨＰＬＣ用試料とした。測定は５０μlずつ、ひとサンプルにおいて３回ずつ測定した。ＨＰＬＣでの分析条件、溶出溶媒については表　に示す。ＨＰＬＣでの分析においては、正確なクロマトグラムを得るため溶出溶媒及びサンプル調製に使う蒸留水はφ０.２μmのメンブランフィルターで吸引ろ過してから用い、調製した溶出溶媒は３０分間脱気して用いた。

＜４＞総ケルセチン量の算出

標準物質をケルセチンとして検量線を作成し、生キャベツ１００ｇ当たりに含まれる総ケルセチン量を求めた。

2-8　遊離ケルセチン量及びケルセチン配糖体量の定量

Q3G、Q4'G及びケルセチンをＨＰＬＣにより定量分析した。また、次に述べるようなケルセチン配糖体の分析条件ではグルコースがはずれたケルセチンも定

量分析が可能であったため併せて分析した。このケルセチンは総ケルセチン量と区別するため遊離ケルセチン量とした。

＜１＞操作方法

孔径０.４５μmのメンブランフィルターでろ過したもの２００μlと蒸留水（以下DWと略記する）１５０μlを混合したものをケルセチン配糖体量測定用試料とした。ＨＰＬＣ測定は５０μlずつ、ひとサンプルにおいて３回ずつ測定した。ＨＰＬＣでの分析条件と溶出溶媒については表３に示す。

＜２＞ケルセチン配糖体量の定量

ＨＰＬＣで分析して、Ｑ３ＧとＱ４'Ｇ量を求める。Q3G、Q4'Gを標準物質として検量線を作成し、生キャベツ１００ｇ当たりに含まれる配糖体量を求めた。

表３　　ＨＰＬＣ分析条件及び溶出溶媒

	総ケルセチン	ケルセチン配糖体 遊離ケルセチン
カラム	TSK-GEL ODS 80Ts (TOSOH)	TSK-GEL ODS 80Ts (TOSOH)
溶出溶媒 （Ｖ／Ｖ）	ﾒﾀﾉｰﾙ：DW ：ｷﾞ酸 =49：50：1	ﾒﾀﾉｰﾙ：DW ：ｷﾞ酸 =39：60：1
流　速	2.0ml／min.	2.0ml／min.
検出波長	340nm	370nm

2-9　調理キャベツ中のAsA定量

＜１＞試料調製

試料キャベツを水にさらす、ゆでる、炒める、油で炒めるの４方法で調理した。各々の調理時間ごとに５g乳鉢にとり、酸化を抑えるため５％メタリン酸をかけ乳棒ですりつぶす。すりつぶした溶液をピペットで遠沈管に採取し、遠心分離を３０００回転で５分間３回繰り返し、上澄み液に終濃度EDTA溶液２mMを加え５０mlのメスフラスコで定容したものを試料溶液とした。

油炒めは、油を除去するために*n*－ヘキサン（和光純薬工業株式会社；試薬１級を蒸留したもの）で１回に５０mlのヘキサンを使用し３回洗浄した後、遠心分離を行った。残った油の酸化を抑えるために終濃度BHT溶液２mMを加えて定容した。白濁を防ぐためにEDTA溶液は加えなかった。

ゆで汁、水さらしのさらし水はそのまま褐色のスクリュー管に採取し試料とし

た。

＜２＞AsA測定方法

AsA試料測定用溶液１００μlと５％メタリン酸９００μlをスクリュー管にとって混合し、メンブランフィルターにてろ過した後、波長２４５mmを用いてＨＰＬＣにて定量分析した。

高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分析条件

ポンプ：Jasco PU-980 Intelijent HPLC Pump

検出器：Jasco UV-970 Intelijent UV/VIS Detector

インテグレーター：Jasco　807—IT Integrator

カラム：Inertsil　ODS-3 5um　4.6xl150mm　6EI85074

溶出溶媒：20mMりん酸Buffer　pH2.5

流速：0.5ml/min

2-10　実験結果

＜総ポリフェノール量の変化＞

炒め操作におけるポリフェノール量の変化を図７に示す。炒め操作において、総ポリフェノール量は「そのまま炒め」「油炒め」ともに増加傾向が見られた。「そのまま炒め」では７分まで緩やかな増加傾向が見られ、２０分まではほぼ一定であった。統計にかけた結果３分から２０分までは差がみられなかった。「油なし炒め」では７分までは徐々に減少した後増加した。20分と他の調理時間都の間に危険率５％で差が見られた。

ゆで操作におけるポリフェノール量の変化を図８に示す。ゆで操作では、「ゆで・実」では減少傾向、「ゆで・汁」では増加傾向にあり3分と7分の間で交差している。図では20分を境にして実ではやや増加、汁ではやや減少しているように見えるが、検定の結果、20分と40分の間にはどちらも差がなかった。各調理時間における「ゆで・実」と「ゆで・汁」の総ポリフェノール量の合計はほぼ等しく、フェノールは熱による変化をうけにくい物質であることがわかる。また、キャベツの上から沸騰した蒸留水をかけた試料の「ゆで汁0分」にもフェノール物質がみられた。よってフェノール物質の「ゆで・実」から「ゆで・汁」へ移行は裁断した面から、水に溶け出していると考えられる。

水さらし操作におけるポリフェノール量の変化を図９に示す。水にさらす操作では、「水さらし・実」「さらし水」共にやや減少している。統計処理した結果、「水さらし・実」の0分と20分、0分と40分及び「さらし水」の0分と20分に有意に差が認められた。

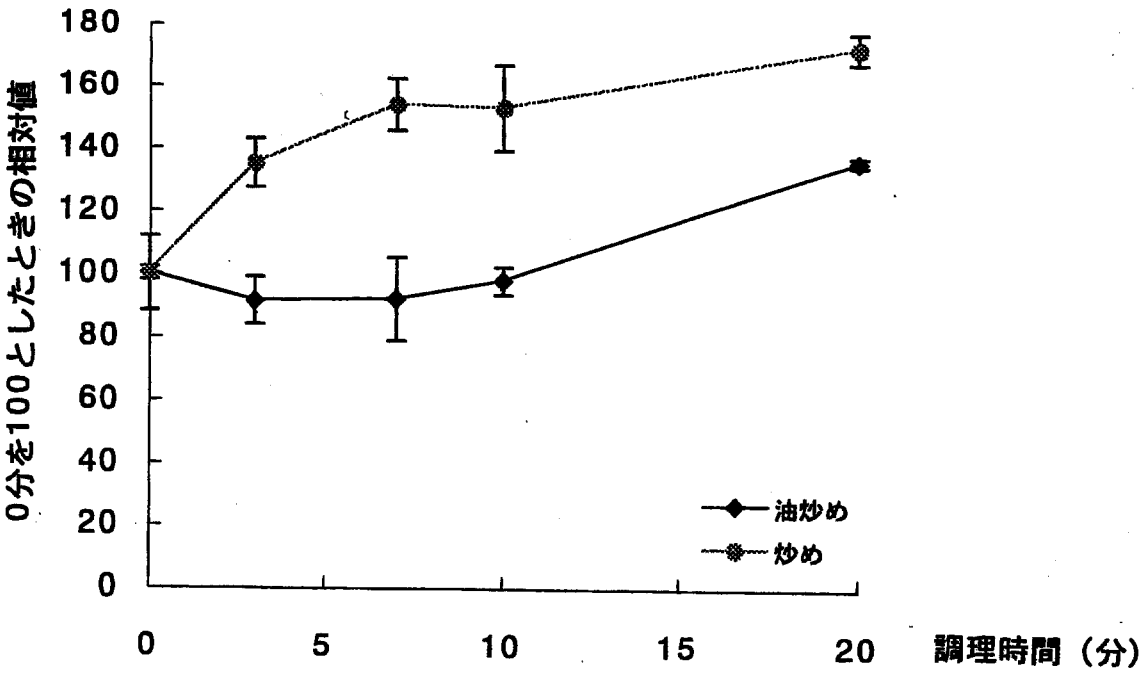


図７　炒め操作におけるポリフェノール量の変化

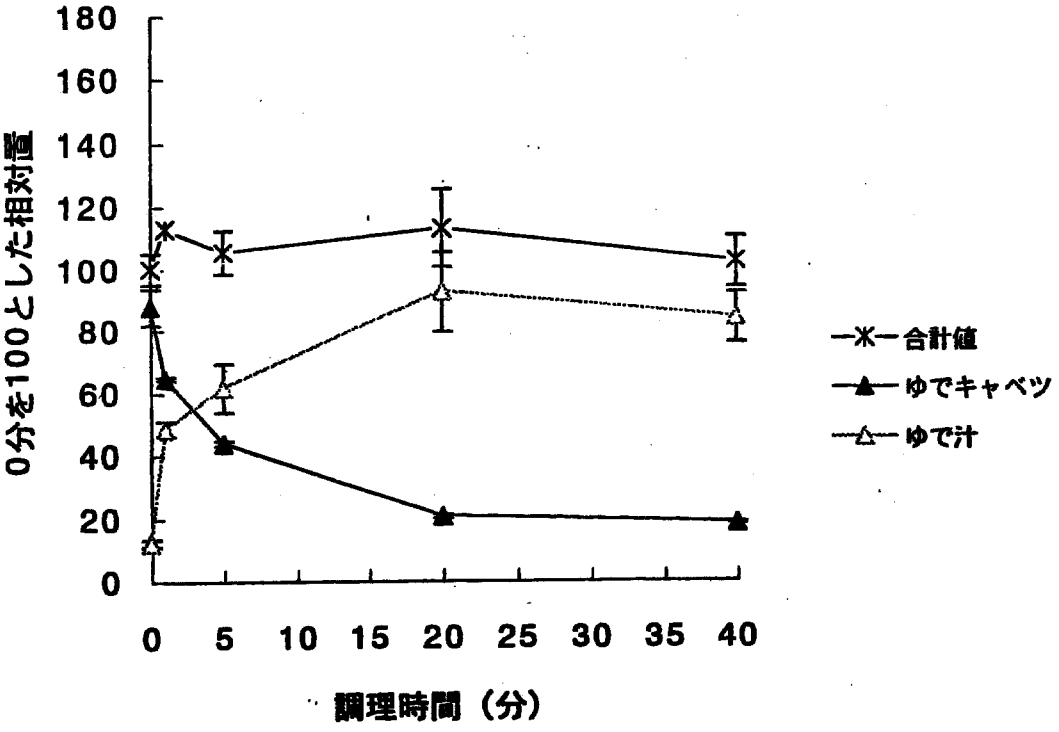


図８　ゆで操作におけるポリフェノール量の変化

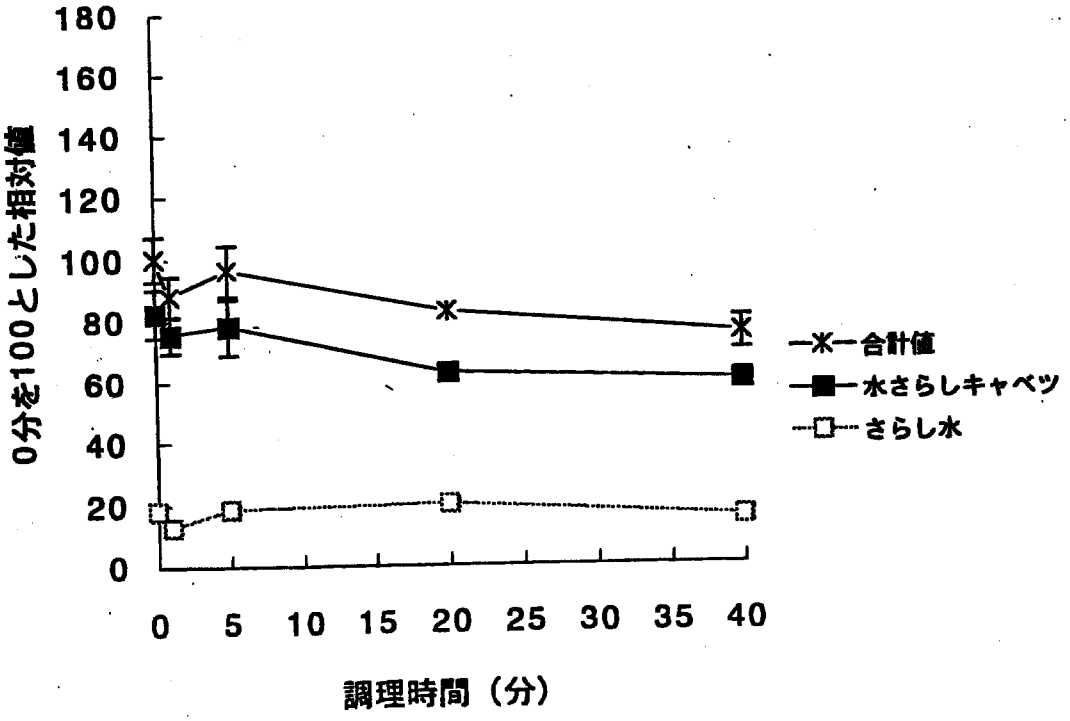


図９　水さらし操作におけるポリフェノール量の変化

＜配糖体化合物量の変化＞

図１０に試料キャベツを凍結乾燥した後７０％メタノールで抽出した溶液をＨＰＬＣにて分析したクロマトグラムを示す。化合物１，２は定量可能なピークであったので調理時間ごとの変動を検討した。その結果を図１１，１２に示した。ただし、化合物はケルセチン配糖体の加水分解条件で加水分解され、ピークが消失するが、加水分解してもアグリコンであるケルセチンは検出されず、ケルセチンを検出する条件では他にピークが検出されなかった。現在、この化合物を分取・精製してその構造を検討中である。炒め操作によって化合物１，２ともに減少したが７分炒めた段階で最高値を示した。また、化合物１は油を添加した方が残存率は高いようであるが、化合物２は似たような傾向を示した。ゆで操作に関しては図１３，１４に示すように化合物１，２ともに２０分で１０％近くまで減少した。このことより化合物１，２は水に弱い構造を有しているのではないかと推測することができる。図１５，１６には水さらし操作による化合物１，２量の変化を示したが、やはり２０分で４０％近くにまで減少し、さらし水にはほとんど残存していたかった。

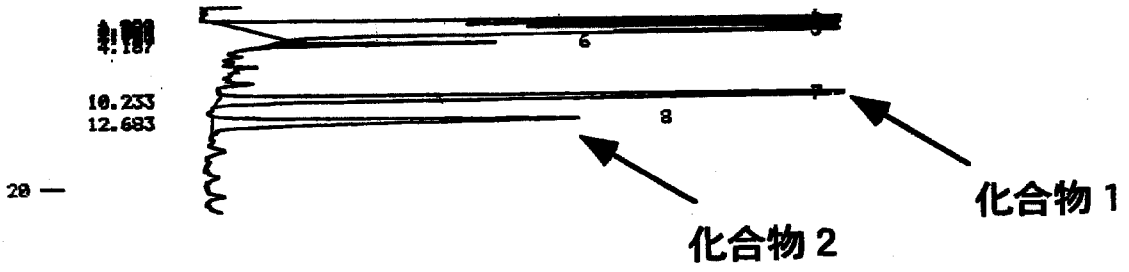


図１０　配糖体分析条件でキャベツ試料を分析したときのクロマトグラム

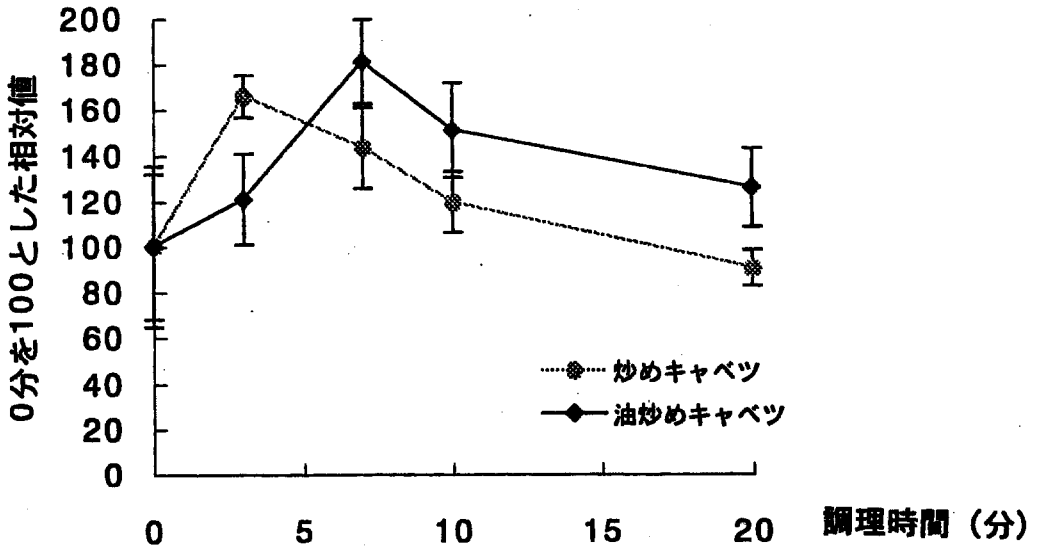


図１１　炒め操作による化合物１量の変化

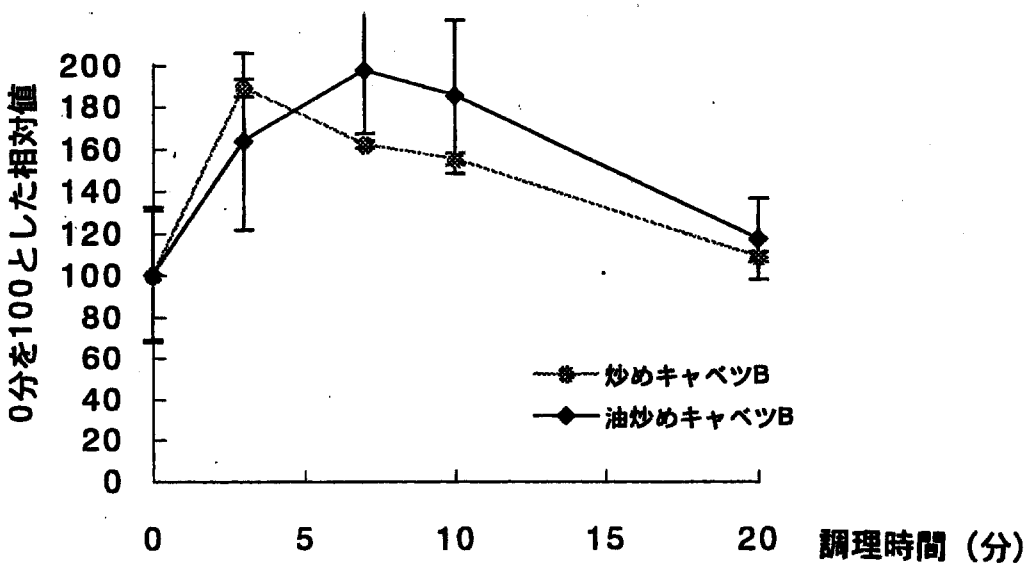


図１２　炒め操作による化合物２量の変化

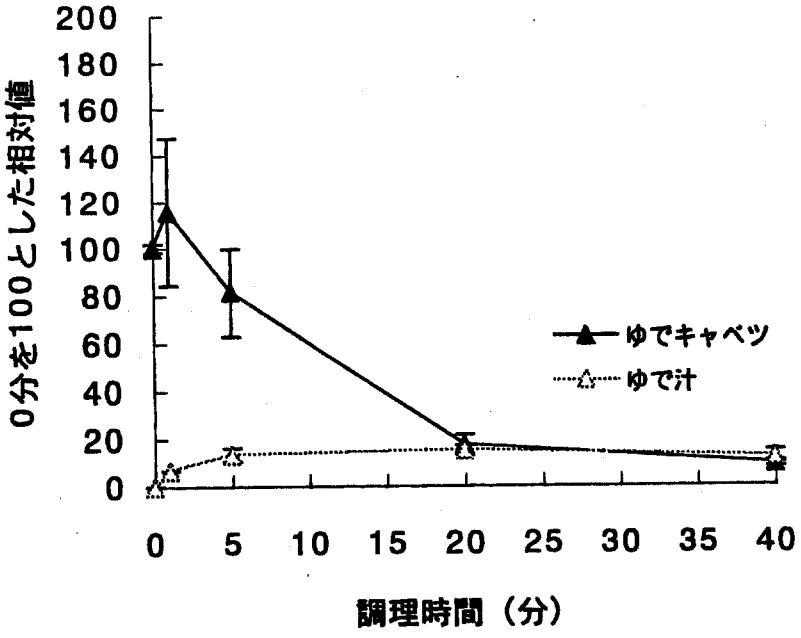


図１３　ゆで操作による化合物１量の変化

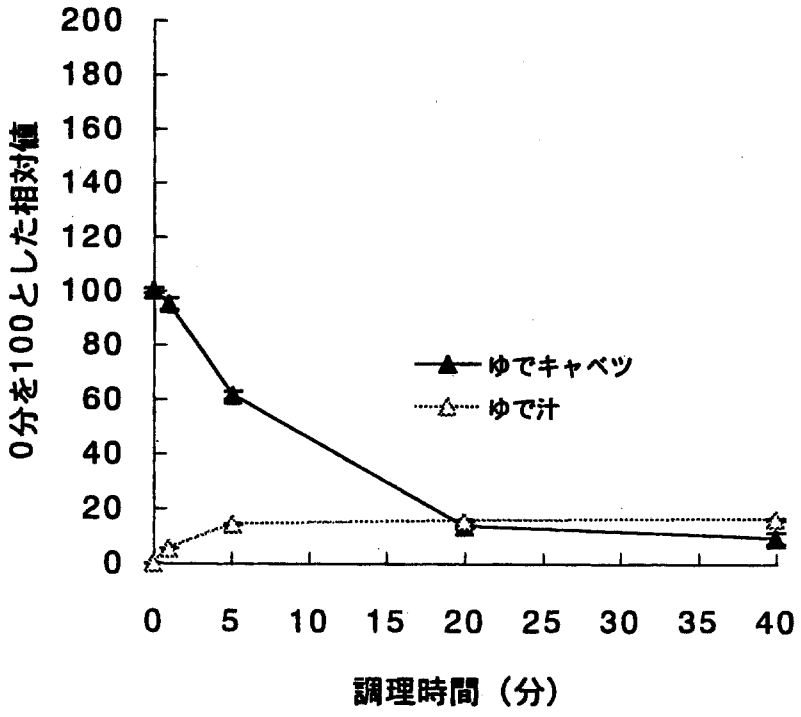


図１４　ゆで操作による化合物２量の変化

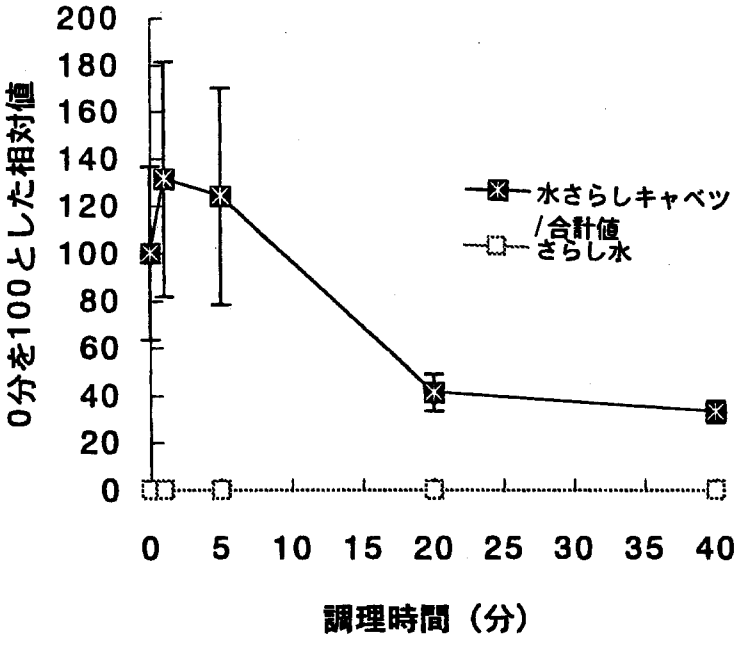


図１５　水さらし操作による化合物１量の変化

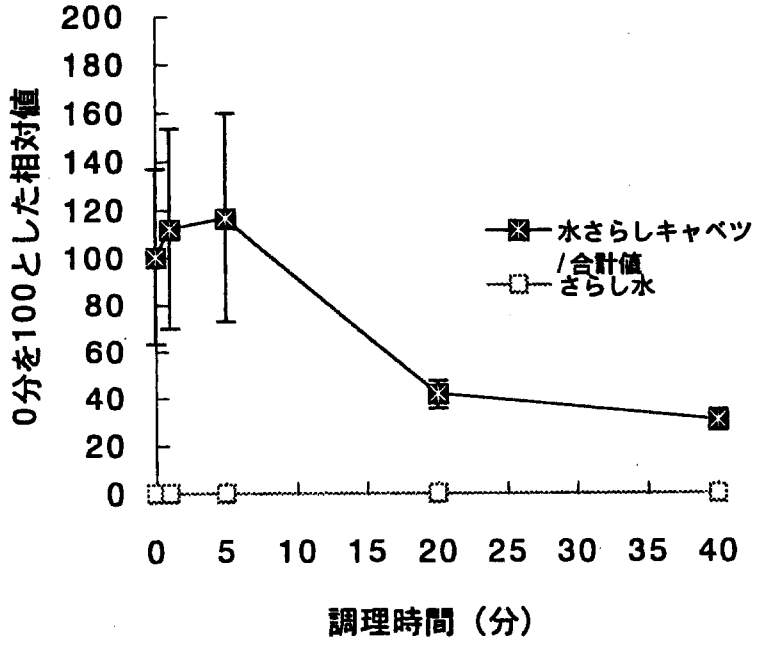


図１６　水さらし操作による化合物２量の変化

＜総AsA量の変化＞

調理キャベツ中の総AsA量の変動を図１７，１８，１９に示した。水さらしによる試料キャベツ中の総AsA量の減少は少ないが、ゆでたり炒めたりすることによってかなり減少した。また、炒め操作においては２０分炒めた場合、油炒めの方が総AsA量の残存率は有意に高くなった。炒める際に油をキャベツ重量の５％添加しているため、キャベツ表面に油の被膜ができ、キャベツが保護された結果、AsAも残存したのではないかと予想された。

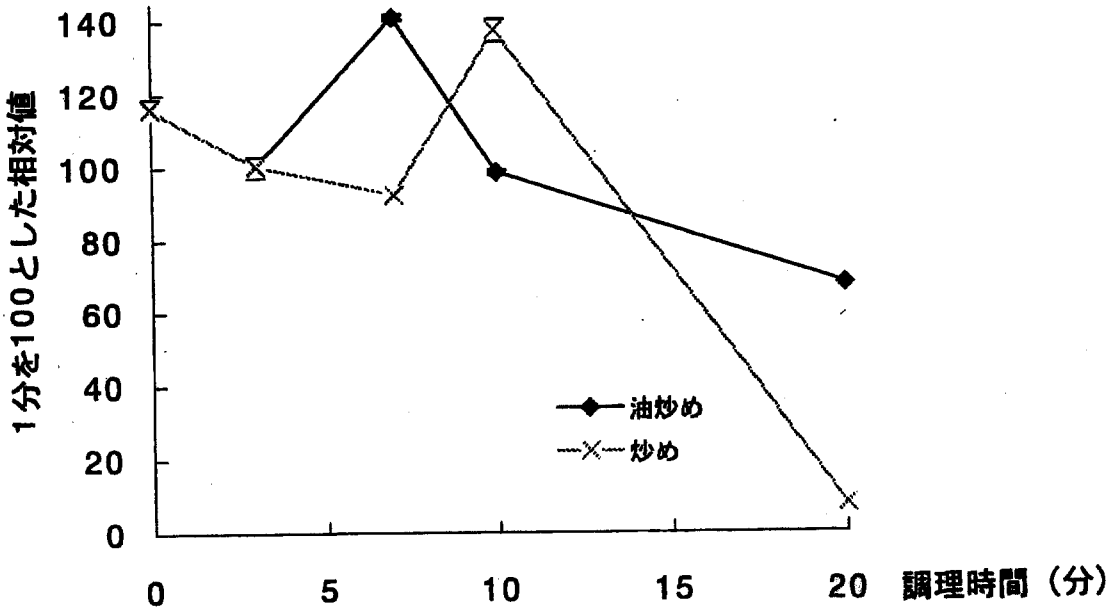


図１７　炒め操作による総AsA量の変化

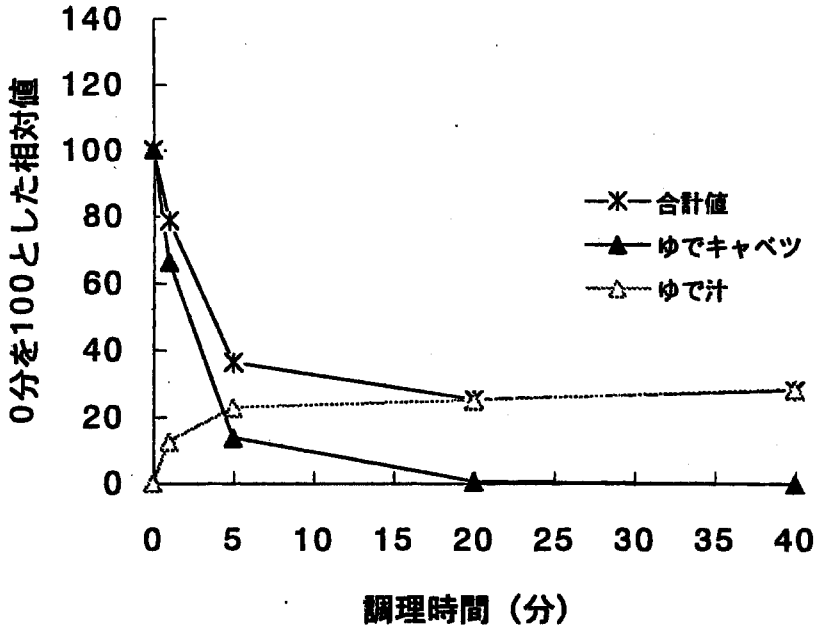


図１８　ゆで操作による総AsA量の変化

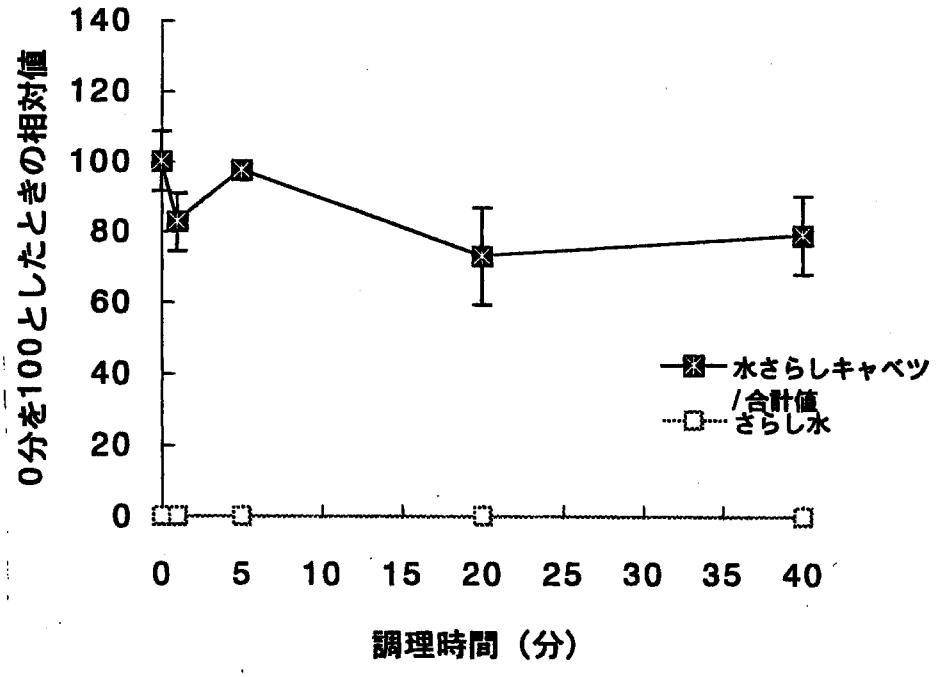


図１９　水さらし操作による総AsA量の変化

2-11　考察および検討課題

今回、葉野菜の中でも最もポピュラーなキャベツを取り上げ、調理操作による含有抗酸化性物質の変化を検討した。キャベツの場合、ケルセチンやケンフェロールの配糖体は含まれているという文献[1)]とあまり含まれていないという文献[2)]がある。予備実験においては試料キャベツ中に遊離のケルセチンの存在が確認されたが本実験のキャベツには遊離のケルセチンもケルセチン配糖体も含まれていなかった。今回、定量分析が可能な２種類の化合物を追跡したが、構造決定を行い、化合物の抗酸化性や生理活性を検討したい。370nmで検出可能なことから二重結合やベンゼン環を有するフェノール性化合物ではないかと考えている。

総ポリフェノール含有量は炒めることでゆるやかに増加するものの、そのほかの調理操作ではほとんど変化がみられなかった。タマネギの場合はゆでることでゆで汁中に移行したが、キャベツでは移行が見られなかった。これは、タマネギが幅1mmのスライスであるのに対しキャベツは1cm幅の手切りであるため、葉表面の細胞に内側の細胞が保護されている可能性が考えられる。また、キャベツ中に含まれるフェノール性化合物の極性も関与するであろう。

AsA量は調理時間が長くなるにつれて減少している。これはタマネギや他のキャベツのデータ[3-4)]と一致しているが、炒め調理において油を用いると7分、用いない場合で10分の時点で急激に上昇している。これはキャベツ中に含まれるアスコルビン酸オキシダーゼの失活によるものであるかどうかは本実験ではわからないので検討する必要はあると思われる。

以上のことから、キャベツを炒めたり、ゆでたりすると、総AsA量が減少するのに対して総フェノール量はほとんど変化しないことが明らかとなった。未知化合物の同定を含めて、キャベツに特有の成分であるメチルメチオニン、シニグリンといった化合物の追跡も興味深いことであると考えられる。

参考文献

1）岩科　司、食品工業、7月号、p67-79、 (1994)

2）M.G.L. Hertog *et al.*, *J. Agric.Food Chem.*, **40**, p2379-2383, (1992)

3）城野世津子、宇部短期大学学術報告書、**20**、p71-73、 (1983)

4）城野世津子、宇部短期大学学術報告書、**22**、p17-20、 (1985)