

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14652

研究課題名(和文)加水によりトウガラシ果実から発散される新規の揮発性咳嗽成分

研究課題名(英文)A novel volatile coughing compound emitted from capsicum fruit after spraying with water

研究代表者

土井 元章(DOI, Motoaki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40164090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの辛味性トウガラシ果実は、水を噴霧することで咳嗽成分が放出される。この成分を特定するために、GC分析を進めた。水噴霧の前後の‘日光’乾燥果実からの揮発性成分をSPME法とTenax TAカラムによる全量吸着法により採取し、熱脱着してGC分析した。その結果、水噴霧前にはリテンションインデックス(RI)の大きな5つのピークが検出されたものの、水噴霧後にはこれらのピークがすべて消失し、RIの小さな4つの大きなピークが検出された。ただし、これらの揮発性成分の保持時間が近いことから、匂い嗅ぎによって咳嗽性を判別することはできなかった。この4つのピークに絞り込みを行って、今後の解析を進める。

研究成果の概要(英文)：Some pungent capsicum fruits emit a coughing volatile compound after being sprayed with water. To identify this compound, gas chromatography (GC) analysis of capsicum volatiles was carried out. Using the solid phase micro-extraction (SPME) and the head space absorption by Tenax TA methods, volatile compounds emitted from dried 'Nikkou' fruit were collected before and after water spray, heat-adsorbed and analyzed by GC. Although five peaks having large retention index (RI) were detected from the fruit before water spray, these were all disappeared after water spray and four large peaks having smaller RI were newly detected. However, the retention times of these volatiles are too close to sniff the coughing characteristic. We are going to analyze the coughing characteristic focusing on these four compounds.

研究分野：園芸科学

キーワード：香気成分 トウガラシ 咳嗽性 加水分解 クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

トウガラシ (*Capsicum*) 属果実は重要な野菜であるとともに、世界中で香辛料として広く利用されている。ピーマンに代表される野菜としてのトウガラシは、バニルルアミンと8-メチル-6-ノナノイル CoA を縮合する酵素である Pun1 が欠損しており、辛味成分であるカプサイシンを全く合成しない(Stewart ら, 2005)。青臭い香り成分の発散はあるものの、香氣成分の発散量自体が少なく、このような果実を食した場合、咳き込むことはない。一方、辛味品種では、スパイシーな香りが特徴で、メチル酪酸、メチルプロパン酸およびペンタン酸のエステル、特にヘキシルエステルが多く含まれる (Wahyuni ら, 2013)。また、いくつかのテルペン類が発散されている。特に、*C. chinense* ではこれらの香氣成分の発散量が多く、そのスパイシーでフルーティな香りの特徴づけている。研究代表者は、これらの果実の中には切断して水をかけると、食さなくとも激しい咳き込みを起す成分が発散される品種があることを見出した。とりわけ、*C. chinense* の激辛品種において、このような咳嗽成分が強く発散されており、水をかけると激しく咳き込む。

トウガラシの咳嗽成分は辛味成分であるカプサイシンやジヒドロカプサイシン等のカプサイシノイドであるとされ、これらの成分が気道粘膜の痛覚を刺激することで咳き込みをもたらすと考えられている。しかし、カプサイシノイドやその類似物質であるカプシノイドについては不揮発性であり、口に入れた場合には咳嗽性をもつことはあっても、近くに果実があるだけでは咳嗽成分とはならないと考えられる。すなわち、水と反応して生成される咳嗽成分は揮発性であり、香氣成分中に発散される物質であると考えられる。また、加水分解により揮発性となってこの物質が発散される可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究では、トウガラシにおける辛味成分以外の揮発性咳嗽成分の存在を GC 分析により明らかにすることを第一の目的とした。この場合、*C. chinense* の激辛品種のような 100 種類を超える多数の揮発性成分を発散している材料を選ぶと、咳嗽成分の絞り込みが難しくなることから、水をかけた場合に咳嗽性を示すとともに、揮発性成分ピークが少ない品種を選ぶことで、咳嗽成分のピークの絞り込みが容易になると考えられる。次に、いくつかの品種を用いて加水による咳嗽性の有無と成分ピークの有無から咳嗽成分を特定する。また、GC-MS 等のデータから、咳嗽成分のピークの定性を行う。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と栽培

実験材料としては、咳嗽成分が多く発散されると予想される *Capsicum chinense* ではな

く、*C. annuum* の品種を選定した。これは、これまでの香氣成分の分析結果から、*C. chinense* の果実において、100 種類を超える揮発性成分が検出されており、クロマトグラムのピークの判別が困難であることが予想されたためである。

実験材料には、ピーマンの非辛味品種で加水により咳嗽成分が発散してこない‘京みどり’ (タキイ種苗) をネガティブコントロールとし、赤熟果の果実断面に水を吹きかけると咳嗽成分が発散されて咳き込みが起ることが分かっている辛味性品種の‘福耳’ (サカタのタネ) および‘日光’ (タキイ種苗) を供試した。播種後育苗して、赤玉土:ピートモス:腐葉土を 1:1:1 で混合した培養土を用い 7 号ポットに植え付けて、ポリカービネート被覆の温室で栽培した。1/3 強度の園試処方培養液を灌水として与えた。冬季の最低気温は 17℃として、慣行の栽培法で管理した。果実がおおむね最大サイズに達した緑色の果実を緑熟果、果実が完全に赤くなった段階を赤熟果とし、赤熟果を収穫して日陰で乾燥させた果実を乾燥果とした。ただし、‘京みどり’ および‘福耳’ は乾燥中に腐敗しやすく、乾燥果は得られなかった。

(2) 咳嗽性の評価

トウガラシ果実を縦に半分に切断し、内側を上に向けて 500 mL マヨネーズ瓶に入れた。そこに霧吹きで脱塩水を 1 mL 程度噴霧し、直ちにキッチンラップ (ポリ塩化ビニリデン製) で封じるとともに、軽く振った上で隙間から匂いを嗅ぎ、咳き込むかどうかを判定した。果実に咳嗽性がある場合には、水を噴霧した時点で多くの場合咳き込みが起った。

(3) 揮発性成分の捕集

咳嗽性の判定に用いる手順で水を噴霧した果実の入ったマヨネーズ瓶をキッチンラップで封じて 30℃の条件に置き、キッチンラップに SPME のシリンジ針を差し込み、ファイバーを露出させて 20 分間揮発性成分を吸着させた。SPME にはなるべく広範な成分が吸着するよう、DVB/CAR/PDMS (50/30 μm, Gray, SPELCO) を使用した。水を噴霧しないで同様に捕集を行った場合を、加水前とした。

多くの揮発性成分を捕集することが必要な場合には、Tenax TA (60/80 メッシュ) 100 mg を充填した捕集管を用いてヘッドスペース吸着法により全量捕集を行った。上記のトウガラシ果実を入れたマヨネーズ瓶を 3L のデシケータに封入し、活性炭とモレキュラーシーブ 5A を充填したカラムを通したボンベ空気をデシケータ内に送り込んだ。デシケータからの空気の出口部分に Tenax TA カラムを装填して揮発性成分を捕集した。加水の必要のある場合には、デシケータ内のトウガラシ果実に対して水を噴霧した後直ちに蓋をして、Tenax TA による捕集を開始した。なお、Tenax TA カラムは 250℃で窒素ガスを流しながら 1

時間以上エージングしたものを用いた。

(4) GC 分析

検出器として FID を備えたガスクロマトグラフィ (GC-2014、島津製作所) で分析した。GC のカラムには膜厚 0.25 μm のポリエチレングリコール被覆のシリカキャピラリーカラム (DB-Wax, 長さ 60 m \times 内径 0.25 mm; J&W Scientific) を用いた。カラムの温度は 70 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分保持後, 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ で 220 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇させ, 220 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間保持した。気化室温度および検出器温度はともに 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。キャリアガスにはヘリウムを使用した。水素は水素発生機 (OPGU-2100S、島津製作所) によって供給した。また燃焼用の空気には窒素に酸素 20% を混合したボンベガスを用いた。これは、実験室の空気からのコンタミネーションを防止するためである。

SPME については、インジェクションに針を注入後、ファイバーを露出させて揮発性成分を脱着させた。分析はスプリットレスとした。使用後の SPME は再使用する直前に、250 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分以上のエージングを行った。

(5) 匂い嗅ぎ GC 分析

匂い嗅ぎ GC 分析を行うため、ポリエチレングリコールのパックドカラムを装填したガスクロマトグラフィ (GC-15A、島津製作所) の流路を改変して使用した。ポリエチレングリコールカラムを通過後の流路を分岐させ、片方を FID 検出器側に他方を TCD 側に接続した。TCD のベントにマスク状の匂い嗅ぎ装置を取り付け、そこから放出されるガスの匂いを嗅ぐことができるようにした。

インジェクションには熱脱着装置 (FLS-3、島津製作所) を取り付け、Tenax TA 捕集管を 250 $^{\circ}\text{C}$ に加熱することで揮発性成分を脱着し、キャリアガスのヘリウムによりカラムに導入した。なお、上記 GC キャピラリーカラムへの捕集管からの導入には、加熱導入装置 (TD-4J, LC サイエンス) を用いた。250 $^{\circ}\text{C}$ までの加温による Tenax TA からの脱着と -50 $^{\circ}\text{C}$ でのクライオトラップによる導入手法を採用した。なお、導入の際のスプリット比は 1/2~1/10 とした。

(6) GC-MS 分析

絞り込みを行ったサンプルについては、FID 検出器と質量分析計を装備した GC-MS (GCMS-QP2010、島津製作所) により質量分析を行った。カラム、オープン、キャリアガス条件は GC 分析と同じとし、質量分析計のイオン化電流は 70 eV、質量範囲は 20~300 m/z、検出器電圧は 1.4 kV に設定した。

4. 研究成果

(1) 咳嗽性の評価

縦割りにした果実に水をスプレーして咳き込みが起こるかを、まず研究代表者がチェックし、咳嗽性が認められた果実については、数名の被験者に匂い嗅ぎを依頼して咳嗽性の

有無を再確認した。その結果を表 1 に示した。いずれの品種のいずれの成熟段階の果実とも、縦に切断しただけでは咳嗽性は認められなかった。‘京みどり’ では、切断後水をスプレーしても咳き込むことはなかった。‘福耳’ の緑熟果では果実によって咳嗽性がみとめられる場合があり、赤熟果にまで達すると例外なく咳嗽性が認められた。一方、‘日光’ では、緑熟果、赤熟果、乾燥果いずれであっても咳嗽性が認められた。

表 1 加水によるトウガラシ品種の咳嗽性

品種	成熟段階	咳嗽性	
		切断	切断+加水
京みどり	緑熟	-	-
	赤熟	-	-
福耳	緑熟	-	±
	赤熟	-	+
日光	緑熟	-	+
	赤熟	-	+
	乾燥	-	+

(2) GC 分析

まずは‘福耳’ 緑熟果を用いて、縦に切断後発散される揮発性成分と、切断後水をスプレーして発散されてくる揮発性成分を SPME によって捕集し、GC 分析した。その結果、GC のピークはメジャーピーク (面積 10000 以上) だけでもリテンションタイム (RT) 5 分以降 60 分まで約 40 ピークが検出された (データ省略)。水をスプレーした後のクロマトグラムにもほぼ同数のピークが検出された。両者のクロマトグラムを比較したところ、いくつかのピークについて増減が見られたものの、水をスプレーして得たクロマトグラムのピークで変動したピークは、すでにあったピークが増大するケースが多く、この結果から咳嗽成分を絞り込むことは困難であった。

そこで、水をスプレーすると確実に咳嗽性を示す‘日光’ の赤熟果において同様の比較を行った。まず、切断しただけの果実のクロマトグラムは個体によって大きな差があり、20~30 のメジャーピークが得られた。これは、赤熟果の熟度がまちまちであることに起因していると考えられたが、成熟が進むほど揮発性成分のピーク数が減るよう思われた。また、水をスプレーして得られたクロマトグラムには、明らかに新しいピークがいくつか出現していた。特に RT12~15 分の間 (RI: 1100~1200) に大きなピークが 4 つ現れた。

そこで、より安定したクロマトグラムを得るために、‘日光’ の乾燥果を用いて GC 分析を行った。咳嗽性のない縦に切断しただけの乾燥果のクロマトグラムでは、メジャーピークは 12 程度あり (図 1)、特に大きなピークは RT42 分~54 分 (RI: 1800~2200) の間にある 5 つのピークであった。水をスプレーした後では、これらの高 RI のピークはほぼ完全に消滅し、赤熟果でも現れた RI が 1100~1200 の

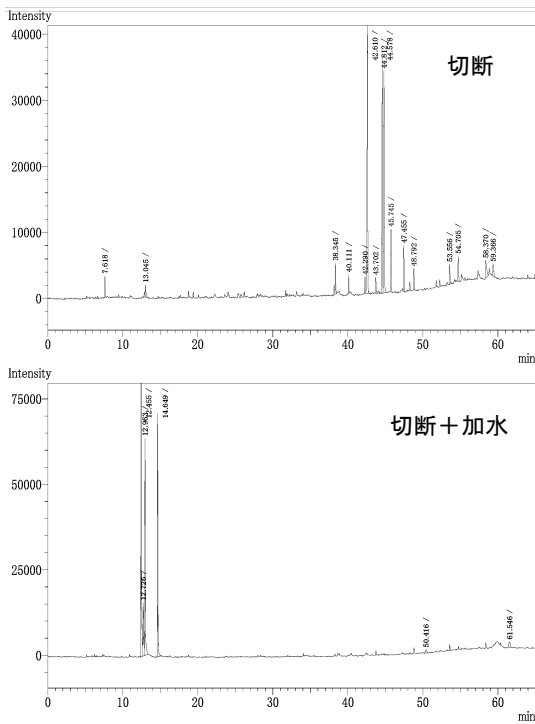


図1 ‘日光’乾燥果への水スプレーによる発散揮発性成分の変化

表2 ‘日光’乾燥果への加水による揮発性物質の発散特性の変化

RT (分)	発散量 (ピーク面積)	
	切断	切断+加水
12.5	-	983818
12.7	7873	136170
12.9	24707	477415
14.6	-	495999
38.3	15148	18793
42.6	182908	9860
44.6	122526	-
44.8	121554	4896
45.7	34166	-
47.5	15741	-
48.8	23172	11928
53.6	23799	12351
58.4	17583	7466
59.4	15248	7595

間に4つの大きなピークが出現した(図1, 表2) このうちRT12.7分と12.9分のピークは、水をスプレーしないでも検出されていたが、スプレー後には大きく発散量が増加した。

(3) 匂い嗅ぎGC

GC分析の結果から、水をスプレーすることで新たに出現したピークの中に咳嗽性を示す成分がないかどうかを確認するため、Tenax TA捕集管で捕集したヘッドスペース中の揮発性物質をパックドカラムにより分離を試みた。しかし、4つのピークは近接した2つのピークにしか分離できず、RTも非常に近くなったことから、匂い嗅ぎGCによって咳嗽性を判別することはできなかった。キャピラリーカラムによる分離が必要と考えられ、この場合咳

込みを引き起こすだけ十分な量を分離できるかを検討する必要がある。

(4) GC-MS

水をスプレーした乾燥果からの揮発性物質をGC-MS分析により同定しようとした。その結果、RT12.9分のピークが酢酸イソアミルであるとのデータベースからの結果を得た。ただし、酢酸イソアミルには咳嗽性は認められない。また、エステルである酢酸イソアミルが水スプレー後にどのようにして生成されたのかも不明であり、別の物質である可能性も否定できない。ただし、‘日光’の赤熟果や乾燥果で加水しない果実からの香気成分にもこのピークが比較的大きく検出される場合があり、このピークが咳嗽成分である可能性は低い。

(5) 考察

トウガラシを食べて咳き込んだ経験のある人は多い。これは、その辛味成分のカプサイシノイドによると考えられがちであるが、乾燥したトウガラシ粉末の咳嗽性はそれほど強くはない。野菜や香辛料をはじめとして食品成分の咳嗽性の研究は皆無であり、本研究では加水によって揮発性の咳嗽物質が生成されるという点に着目したことが特色で、カプサイシンとは異なる新たな咳嗽成分を見つけ出すことが目標である。ここで、発散される揮発性成分の種類が少ない‘日光’乾燥果に直目して分析を進めた結果、可能性のあるピークを4つにまで絞り込むことができた。今後はこれらの成分に焦点を当てて咳嗽性の解明に取り組む予定である。ただし、これらの化合物の中に咳嗽性のある物質が含まれるかどうかは、匂い嗅ぎGCによる確認ができていないことから確実ではなく、これ以外のマイナーピークが原因物質である可能性は否定できない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 元章 (DOI, Motoaki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号： 40104090