

青花菜(*Brassica oleracea* L., Italica Group) 芽硫酸鹽羅芬含量測定之研究

馮永富、吳展才¹⁾、許輔¹⁾

摘 要

本試驗目的為建立測定青花菜芽硫酸鹽羅芬含量之條件，及分析台灣地區常見青花菜品種青花菜芽之硫酸鹽羅芬(sulforaphane)含量。結果顯示，青花菜芽榨汁後，將pH調整為7單位，置於室溫中4小時，即可獲得硫酸鹽羅芬之最高萃取率。分析青花菜Packman等21個品種間硫酸鹽羅芬含量，結果得知，含量由0-7959 ppm，其品種變異係數(cv)高達103%。其中以Royal Green品種 7959 ppm含量最高，綠王二號5375 ppm居次，而慶農45天和50天二品種，均未能測得含量。由此可證，青花菜芽硫酸鹽羅芬含量與種原特性有關，篩選高含量之品種可作為日後育種材料。

關鍵詞：青花菜芽、硫酸鹽羅芬、育種。

前 言

近年流行病學的研究，食用蕓苔屬蔬菜可降低罹患肺癌、胃癌、大腸癌和直腸癌的機會⁽¹⁾。*Brassica oleracea*普遍存有抗癌物質，其中青花菜更能有效降低數種誘變劑的作用⁽²⁾。蕓苔屬蔬菜所特有硫化配糖體(gluconolates)之水解物被證實具抗癌能力，其中4-methyl-sulfinylbutyl (sulforaphane)，2-phenylethyl 和3-indolymethyl已被分離出來⁽³⁾。經動物試驗發現餵食硫酸鹽羅芬 (sulforaphane) 的老鼠得到肝癌機會是對照組之38.7-16.7%，它能誘導老鼠體內第二級去毒酵素 (Phase 2 detoxication enzymes) 的產生，例如quinone reductase，epoxide hydrolase，glucuronosyltransferase，oxidoreductase 及gutathion S-transferases等酵素，天然的硫酸鹽羅芬比人工合成的三個相似物有較高的活性⁽⁴⁾。青花菜三天齡芽菜硫酸鹽羅芬含量是成株的10-100倍⁽⁵⁾。

雖然硫化配糖體廣泛的分佈在蕓苔屬蔬菜，但不是所有的硫化配糖體對人體都有益的。在三十年代油菜育種家對硫化配糖體已有廣泛研究，一般認為它會阻礙碘的吸收，引起甲狀腺亢進，被視為一種有害物質⁽⁶⁾。

1) 國立台灣大學園藝學系博士班研究生及助理教授。

Studies on the Measure Method of Sulforaphane Content in Broccoli (*Brassica Oleracea* L., Italica Group) Sprouts

Wing-Fu Fung, Chang-Chai Ng ¹⁾ and Sheu Fuu ¹⁾

Summary

The purpose of this experiment was to develop a measure method for determining sulforaphane content in broccoli sprouts. The best conditions to measure sulforaphane content in broccoli sprouts were evaluated. It is revealed that the pH value of broccoli juice was 7, while incubation period was 4 hours in 25°C. Results of measurement of contents of sulforaphane for 21 cultivars showed that content of sulforaphane ranged from zero to 7959 ppm; the coefficient of variation (cv) was 103%. The highest content 7958 ppm was found in Royal Green. Second was King of Green II with the content of 5375 ppm. Sulforaphane was non-detectable for Ching Long 45 days and Ching Long 50 days cultivars. The sulforaphane concentration might be controlled by germplasm. Selection for broccoli cultivars with high content of sulforaphane is of primary importance to broccoli breeding.

Key words: broccoli, sulforaphane, breeding.

1) Ph. D. student and assistant professor, Department of Horticulture, National Taiwan University.

雖然硫化配糖體廣泛的分佈在蕓苔屬蔬菜，被證實硫化配糖體有90種以上，在植物亦具有10餘種，不同的蕓苔蔬菜所含硫化配糖體類型的分佈各異，具有抗癌作用的硫酸鹽羅芬主要存在於青花菜¹⁰。如果以芽菜方式食用，種子的花費相當高，市價一公斤的芽菜用種子為800元。因此，選育高硫酸鹽羅芬含量，採種容易的青花菜品種，為蔬菜育種人員的目標。若民間育種公司沒有氣相層析/質譜儀，可使用本尼迪克特溶液 (Benedict's solution) 推估種子中的硫配糖體含量，作為初步篩選¹¹。

參考文獻

- 1.許輔、徐源泰。1996。利用固相萃取及氣相層析法分析番木瓜中卞基異硫氰酯含量之研究。藥物食品分析 4(4): 327-334。
- 2.Beecher, C. W. W. 1994. Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: a review *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 1166S-70S.
- 3.Carlson, D. G., M. E. Daxenbichler, C. H. Vanetten, W. F. Kwolek & P. H. Williams. 1987. Glucosinolates in crucifer vegetables; Broccoli, Brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mustard greens, and kohlrabi. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112 (1): 173-178.
- 4.Chiang, W., C. K. Pusateri, D. J. and R. E. A. Letiz. 1998. Gas chromatograph/mass spectrum method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in broccoli. *J. Agri. Food. Chem.* 46: 1018-1021.
- 5.Fahey, J. W., Y. Zhang, & P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Soc. of U. S. A.* 94 (19): 10367-10372.
- 6.Farnham, M. W., K. K. Stephenson and J. W. Fahey. 2000. Capacity of broccoli to induce a mammalian chemoprotective enzyme varies among inbred lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125 (4): 482-488.
- 7.Li G., A. Riaz, S. Goyal, S. Abel, and C. F. Quiros. 2001. Inheritance of three major genes involved in the synthesis of aliphatic glucosinolates in *Brassica oleracea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126 (4): 427-431.
- 8.Liaquat, M. A., H. Khan, I. Ahmad, Javidullah, & S. Wahab. 1994. Qualitative determination of glucosinolate in cruciferae seeds. *Sarhad J. Agric.* 10(6): 629-631.
- 9.Stoewsand, G. S. 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassic oleracea* vegetables - a review. *Food Chem.Toxicol.* 33 (6): 537-543.
- 10.Verhoeven, D. T. H., R. A. Goldbohm, G. Van-Poppel, H. Verhagen, and P. A. Van-Den-Brandt. 1996. Epidemiological studies on *Brassica* vegetables and cancer risk. *Cancer Epid. Biomark. & Pre.* 5 (9): 733-748.
- 11.Zhang, Y. S., P. Talalay, C. G. Cho, and G. H. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli : Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 89: 2399-2403.
- 12.Zhang, Y. S., T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner and P. Talalay. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 91 (8): 3147-3150.

二、青花菜硫酸鹽羅芬含量之檢測

由表1分析結果得知，台灣地區常見之21個青花菜品種中硫酸鹽羅芬(sulforaphane)之含量，品種間差異性極大，含量在5000 ppm以上者有Royal Green和綠王二號，4000 ppm有嬌綠和艷綠，2000 ppm以上者有Packmanee □、2000-1000 ppm者有Takii's 814、芽菜用品種、常青早生、綠王、綠春、秋津等，低於1000 ppm者慶農70天、慶農80天、品綠、榮盛二號、綠冠、天綠等，其中慶農45天和慶農50天等兩個品種含量低於儀器之檢測水準，含量趨近於零。變異係數(cv)高達103%，與Farnham *et al*分析71個自交系的結果相似¹⁸。其中以韓國的Royal Green硫酸鹽羅芬含量最高為7959 ppm，農友種苗的綠王二號以5375 ppm居次。有本土的兩家種苗公司慶農和生生所培育的6個品種，顯著比其他公司品種的含量為低，由此可以推估硫酸鹽羅芬的含量受到遺傳因子的控制。據Li等的研究，青花菜脂肪族的硫化配糖體之遺傳受三個主效基因所控制¹⁹。農友種苗公司的9個品種，則有較廣泛高低含量分佈，可能是育種公司規模較大種原也相對較大的原故。高含量之品種可作為日後的育種材料。

表1. 不同品種青花菜芽中硫酸鹽羅芬之含量

Table 1. Sulforaphane content of broccoli sprouts of different cultivars .

品 種 Cultivar	來 源 Source	硫酸鹽羅芬 Sulforaphane (ppm)
Royal Green	Hung Nong International Co. Ltd.	7959 ^a
綠王二號	農友種苗公司	5375 ^{ab}
嬌綠	農友種苗公司	4049 ^{bc}
艷綠	農友種苗公司	4018 ^{bc}
	Takii & Co. Ltd	2912 ^{bcd}
秋綠	農友種苗公司	2454 ^{bcd}
Packman	Petoseed co. (美國)	2179 ^{bcd}
秋津	農友種苗公司	1723 ^{bcd}
綠春	農友種苗公司	1495 ^{bcd}
常青早生	興農種苗公司	1456 ^{cd}
綠干	農友種苗公司	1437 ^{cd}
芽菜用品種	穗耕種苗	1375 ^{cd}
Takii's 814	Takii & Co. Ltd	1253 ^{cd}
天綠	農友種苗公司	803 ^{cd}
榮盛二號	生生種子公司	761 ^{cd}
慶農 80 天	慶農種子公司	577 ^{cd}
慶農 70 天	慶農種子公司	361 ^{cd}
綠冠	農友種苗公司	323 ^{cd}
品綠	生生種子公司	168 ^{cd}
慶農 45 天	慶農種子公司	0 ^d
慶農 50 天	慶農種子公司	0 ^d

同行英文字母相同者表示鄧肯氏多變域測驗在 5%水準差異不顯著。

Mean separation in rows by Duncan's Multiple Range Test 5% level.

以不同濃度之硫酸鹽羅芬加入1000 ppm 硝基苯，依兩者在氣相層析儀之反應量，求取直線迴歸，作為推算青花菜品種硫酸鹽羅芬含量用(圖3)。

由以上之結果得知，青花菜芽硫酸鹽羅芬含量測定之條件，為果汁機進行均質後，將菜汁pH值調整為7.0，置於室溫下4小時，待芥子酵素進行硫化配糖體的水解反應，然後進行氣相層析/質譜儀之分析。

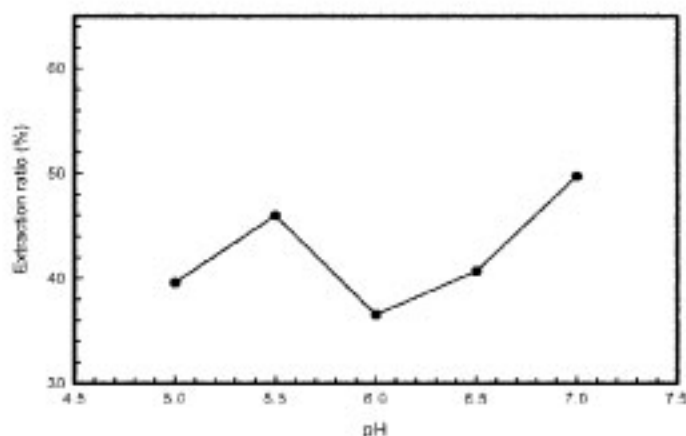


圖2. 不同pH值對芽菜硫酸鹽羅芬萃取率的影響

Fig. 2. Effect of different pH values on sulforaphane extraction ratio of broccoli sprouts.

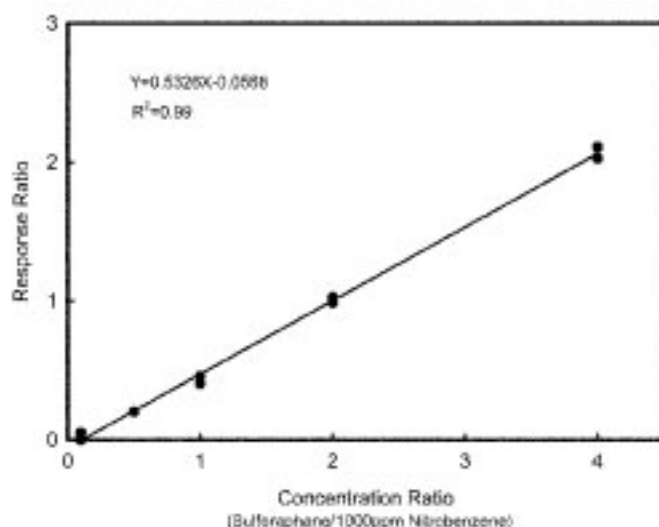


圖3. 硫酸鹽羅芬和硝基苯之檢量線

Fig. 3. The calibration curve of sulforaphane and nitrobenzene.

μl 的硝基苯。以同體積的二氯甲烷重複萃取二次，再合併萃取液，經減壓濃縮後裝瓶備用，送入氣相層析/質譜儀分析。裝瓶後的濃縮樣品經GC分析後，以目標離子的吸收峰面積為回應量，再與一系列由標準液製作的檢量線。樣品測定後比對檢量線，即可估算樣本中硫酸鹽羅芬的含量。氣相層析儀/質譜儀 (HP-5890 series 2 GC、HP 5971 質譜檢測器，HP 7673 自動注射器，HP Vectra 486/33 工作站，HP-Chemstation V.2.00 分析軟體)。分析條件：毛細層析管柱 0.25 mm \times 30 m (HP-5)；恆箱溫度 50 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 2 分鐘，以 10 $^{\circ}\text{C}$ /分鐘加溫至 100 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 1 分鐘，以 10 $^{\circ}\text{C}$ /分鐘加溫至 200 $^{\circ}\text{C}$ ；注射器 200 $^{\circ}\text{C}$ ；檢測器 250 $^{\circ}\text{C}$ ；氦氣流速 0.6 ml/min；注射容積 1 μl 。質譜分析條件：SIM 模式，掃描目標離子為 51, 77, 135 (sulforaphane)，每離子逗留時間為 10 msec, 0 volts 相對自動迴轉。結果以變方分析 (Analysis of variance) 測其顯著性，並以鄧肯氏多變域分析 (Duncan's multiple Range Test) 檢定各處理間 5% 的顯著性。

結果與討論

一、青花菜芽汁水浴時間、pH值對硫酸鹽羅芬萃取率之效應

青花菜芽汁在 25 $^{\circ}\text{C}$ 室溫下，經 2-26 小時芥子酵素進行硫化配糖體水解反應。如圖 1 顯示，硫酸鹽羅芬含量萃取率在水浴 2 小時即可獲得 11.6%，4 小時即達 16.7% 之高萃取率，隨之迅速下降萃取率，至 14 小時以後即是呈現無效萃取。

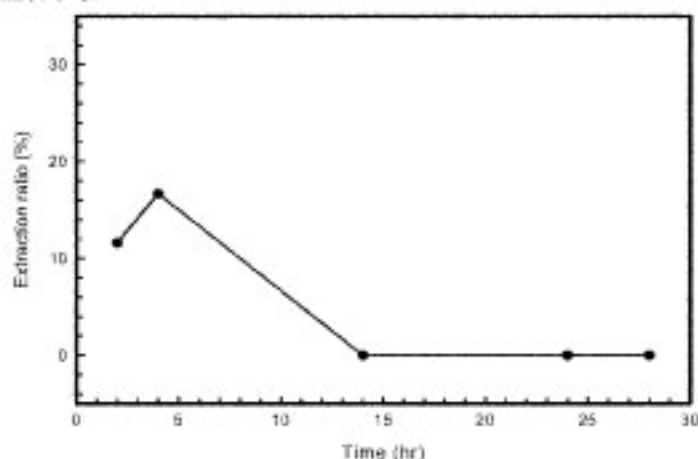


圖 1. 在室溫下，不同置放時間對芽菜硫酸鹽羅芬萃取率的影響

Fig.1. Effect of different incubation period under room temperature conditions on sulforaphane extraction ratio of broccoli sprouts.

將青花菜汁液調成 5.0 - 7.0 等 5 個 pH 值條件下，如圖 2 得知，雖然 pH 值對硫酸鹽羅芬之萃取率未達顯著影響，但以 pH 值在 7.0 單位萃取率為 49.7% 為最高，其次在 5.5 單位時之 46.0%，而 6.0 單位之 36.5% 為最低。

對人類健康來說硫化配糖體有好的和壞的分別，其中以硫代葡萄糖苷為低細胞毒性，具有活化第二級去毒酵素最高能力的天然物質^[10]。蕓苔屬蔬菜各種類間所含的硫化配糖體種類各有差異，如芥菜含有大量的硫化配糖體，卻不含硫代葡萄糖苷，而青花菜所含的硫化配糖體總量僅為芥菜之六分之一，其中就有三分之一為硫代葡萄糖苷^[9]。欲獲得含量有對人體健康有益的硫代葡萄糖苷之蕓苔屬蔬菜，應從青花菜著手研究。

Chiang等^[9]以青花菜加水均質後，離心去除菜渣。以二氯甲烷萃取及分配分離，有機層經脫水及濃縮後，再注射氣相層析儀/質譜儀 (gas chromatography-mass spectrometry) 分析。結果顯示約有80%硫代葡萄糖苷在300°C的注射器溫度下，會受熱分解而形成3-butenyl isothiocyanate^[9]。本試驗修改Chiang氏^[9]方法和許氏^[10]的方法，探討芥子酵素作用時間和pH值對硫代葡萄糖苷萃取率之影響，並分析台灣地區常見青花菜品種硫代葡萄糖苷的含量，作為蔬菜育種者篩選具有高硫代葡萄糖苷含量的青花菜品種。

材料與方法

一、青花菜芽汁水浴時間和pH值對硫代葡萄糖苷萃取率之影響

以農友種苗綠王品種為材料，取10 g種子於室溫下孵芽三天，加入樣品鮮重5倍的蒸餾水，在果汁機中進行均質，將菜汁倒取，置於室溫芥子酵素作用時間 (由2-26小時) 和pH值 (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 等條件下進行硫化配糖體的水解反應。待芥子酵素進行硫化配糖體的水解反應。將菜汁經過過濾後，以每1 ml的菜汁加入10 μ l 的硝基苯 (nitrobenzene) 作為內部標準品。以同體積的二氯甲烷重複萃取二次，再合併萃取液，經減壓濃縮後裝瓶備用，送入氣相層析/質譜儀分析。氣相層析儀/質譜儀 (HP-5890 series 2 GC, HP 5971 質譜檢測器, HP 7673 自動注射器, HP Vectra 486/33 工作站, HP-Chemstation V. 2.00 分析軟體)。分析條件：毛細層析管柱 0.25 mm \times 30 m (HP-5)；恆箱溫度 50°C，保持 2 分鐘，以 10°C/分鐘加溫至 100°C，保持 1 分鐘，以 10°C/分鐘加溫至 200°C；注射器 200°C；檢測器 250°C；氮氣流速 0.6 ml/min；注射容積 1 μ l。質譜分析條件：SIM 模式，掃描目標離子為 51、77、135 (sulforaphane)，每離子逗留時間為 10 msec，0 volts 相對自動迴轉。萃取率之計算方法是以硫代葡萄糖苷在質譜中波峰之面積與內部標準品面積之比值再換算成百分率。以去離子水稀釋硫代葡萄糖苷至不同濃度 (100、500、1000、2000、4000 ppm)，均加入1000 ppm內部標準品，製成不同濃度之模擬樣本。求取檢量線，作為樣品硫代葡萄糖苷含量推算用。

二、青花菜硫代葡萄糖苷含量之檢測

將台灣地區常見青花菜品種包括Packman、Royal Green、芽菜用品種、長岡 814e
e 1 □□[e E 5 45天、慶農 50天、慶農 70天、慶農 80天、榮盛二號、品綠、秋綠、綠春、秋津、綠冠、嬌綠、艷綠、天綠、綠王、綠王二號等 21個品種為供試材料。取10 g 種子於室溫下孵芽三天，加入樣品鮮重 5 倍的蒸餾水，在果汁機中進行均質，將菜汁倒取，pH值調整為 7.0，置於室溫下 4 小時，待芥子酵素進行硫化配糖體的水解反應。反應後將菜汁經過過濾後，以每 1 ml 的菜汁加入10