

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年2月25日 受理

産技連四国食品健康産業分科会
食品機能成分分析研究会 編

s-food@m.aist.go.jp

スイートスプリングのヘスペリジン

作成者：香川県産業技術センター 主席研究員 田村 章
主任技師 藤川 護

1. スイートスプリングについて

1.1 概要

スイートスプリングは、温州ミカンとハッサクとの交配により誕生した柑橘で、寒さに強く、さわやかな甘みを持つことを特徴とする品種である。

最新の農林水産省特産果樹生産出荷実績調査によると、18年産スイートスプリングの出荷量は全国で約520t、そのうち香川県の出荷量は87tと全国第4位であったが、13年産から16年産までは全国第1位、17年産では第3位であり、現在も主要な産地となっている。その中でも小豆島地区では約20年前からスイートスプリングの栽培を行っており、毎年約50tを出荷し、全国でも有数の産地となっている。



図1. 1-1 スイートスプリング

1.2 食品あるいは含有成分の機能性

柑橘類の機能性成分についてはこれまで多くの研究¹⁾がなされており、クマリン化合物のオーラプテンによるがんの抑制効果やノビレチンなどの各種フラボノイドによるがん細胞の増殖抑制効果や抗アレルギー活性など様々な効果が知られている。

1. 2. 1 ヘスペリジンを含む食品

ヘスペリジンは、温州ミカン、ハッサク、ダイダイ、バレンシアオレンジ、レモン、ライムなどの柑橘系の果物に多く含まれている。

2. ヘスペリジンについての説明

ヘスペリジンは、ポリフェノールの一種であり、ビタミン様物質である。みかん由来のポリフェノールの一種がヘスペリジンであり、みかんの実の部分よりも皮や袋、スジに多く含まれている。図 2-1 にヘスペリジンの構造式を示す。

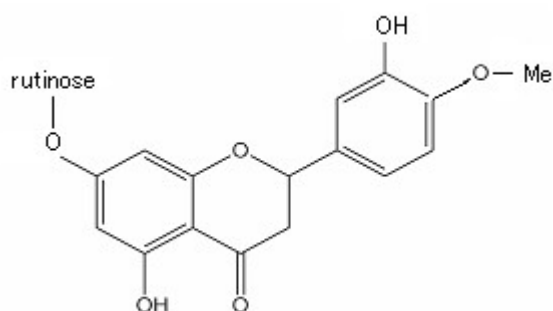


図 2-1 ヘスペリジンの構造式

3. 定量分析の方法について

ヘスペリジンを農水産物機能成分分離測定装置により定量する方法について述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 冷凍庫
2. 電子天秤
3. 凍結乾燥機
4. ブレンダー
5. 蓋付き試験管 (10ml 容)
6. マイクロピペット
7. 遠心分離機
8. Sep-Pak C18 カートリッジ
9. 0.45 μ m メンブランフィルター
10. 農水産物機能成分分離測定装置 (日本分光)
(超高速液体クロマトグラフシステム)
11. カラム (X-PressPak V-C18 2.0 \times 50mm、粒径 2 μ m)
12. ホモジナイザー

[試薬]

1. メタノール (特級)

2. DMSO (ジメチルスルホキシド)

3. リン酸

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

3. 2. 1 フラベド、アルベド

1. 果実は、収穫後、フラベド (外果皮)・アルベド (中果皮)・果肉に分け、重量測定後にフラベド (外果皮)・アルベド (中果皮) は -20°C で保存する。
2. フラベド・アルベドをそれぞれに凍結乾燥する。
3. ブレンダーを用いて遠心ミルにより破砕し、 -20°C で保存する。
4. 製粉サンプル 100mg を蓋付き試験管に取る。
5. 5ml の抽出溶媒 (メタノール : DMSO 1 : 1) を加え、往復振とうさせながら、室温で 12 時間抽出する。
6. 3,000xg で 10 分間遠心し、上清を回収する。
7. 沈殿に 1ml の抽出液を加え、3,000xg で 10 分間遠心し、上清を回収する操作を 2 回繰り返す。
8. 合わせた抽出液を水で 10 倍に希釈する。
9. 5ml のメタノールおよび 5ml の 10%メタノールでプレコンディショニングした Sep-Pak C18 カートリッジに添加する。
10. カートリッジを 10ml の 10%メタノールで洗浄する。
11. 4.5ml の抽出溶媒 (メタノール : DMSO 1 : 1) を通し、5ml に定容し、 $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し分析サンプルとする。

3. 2. 2 果肉

1. 果肉は生鮮物をホモジナイザーで破砕し、 -20°C で保存する。
2. 室温で解凍後、5g を採取し、15,000xg で 20 分間遠心分離する。上清を回収後、0.25ml の抽出溶媒 (メタノール : DMSO 1 : 1) を添加する。
3. 沈殿を懸濁させ、3,000xg で 10 分間遠心分離後、上清を回収する操作を 2 回繰り返す。
4. 5ml のメタノールおよび 5ml の 10%メタノールでプレコンディショニングした Sep-Pak C18 カートリッジに添加する。
5. カートリッジを 10ml の 10%メタノールで洗浄する。
6. 4.5ml の抽出溶媒 (メタノール : DMSO 1 : 1) を通し、5ml に定容し、 $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し分析サンプルとする。

3. 3 農水産物機能成分分離測定装置による分析方法

3. 3. 1 移動相の調製

りん酸、メタノールを用いて以下のように調製する。

A 液 : 0.01M のりん酸

B 液 : メタノール

3. 3. 2 分析条件

多波長検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。

検出波長：200～360nm

恒温槽：40℃

流量：0.2ml/分

注入量：5 μ l

グラジエントの時間

(1) 0～2.75 分間：70～55%A 液、30～45%B 液

(2) 2.75～4.75 分間：55～0%A 液、45～100%B 液

(3) 4.75～5 分間：0%A 液、100%B 液

3. 3. 3 定性および定量

(1) 分離された物質の定性は、保持時間により行う。多波長検出器を使用する時は、スペクトルを定性の補助およびピークの純度確認に用いることが望まれる。

(2) 定量は標準試料を用いた絶対検量線法による。通常は、クロマトグラムの面積から計算するが、微量物質の場合は、ピーク高を用いる方が精度良く定量できる場合もあるので、計算に用いる装置の特性に注意を払って選択することが必要である。

4. 分析例

4. 1 分析例と定量分析結果

分離されたヘスペリジンは、保持時間から特定する。定量には、標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。以下に、検出波長 285nm での検量線、ヘスペリジン標準のクロマトグラム及びスイートスプリングのクロマトグラムを図に示す。

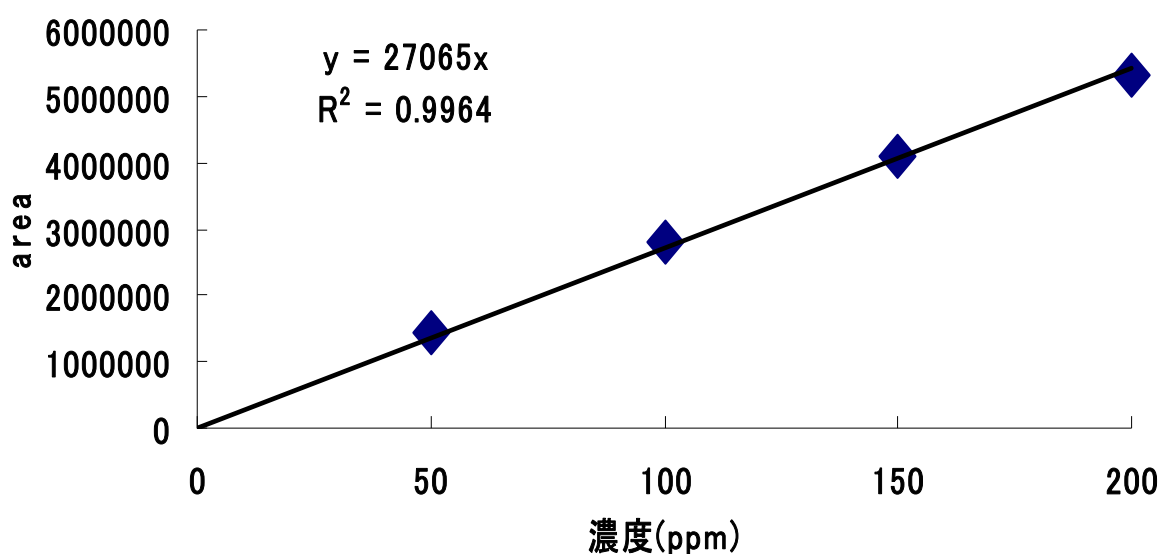


図 4. 4. 1 - 1 検量線

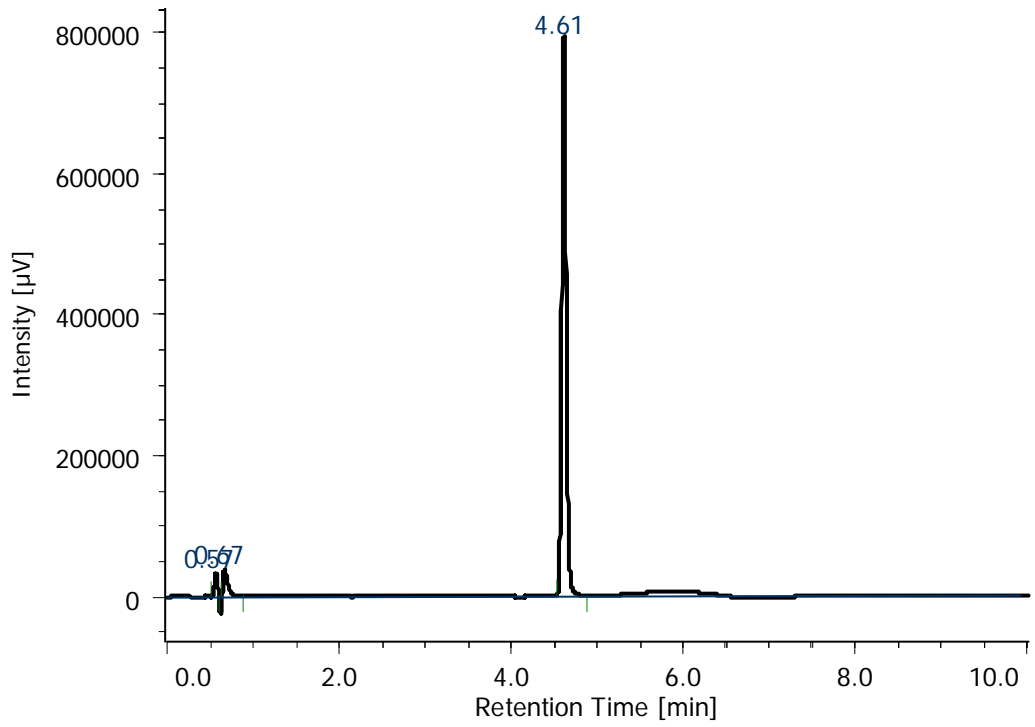


図 4. 4. 1-2 ヘスペリジン標準のクロマトグラム

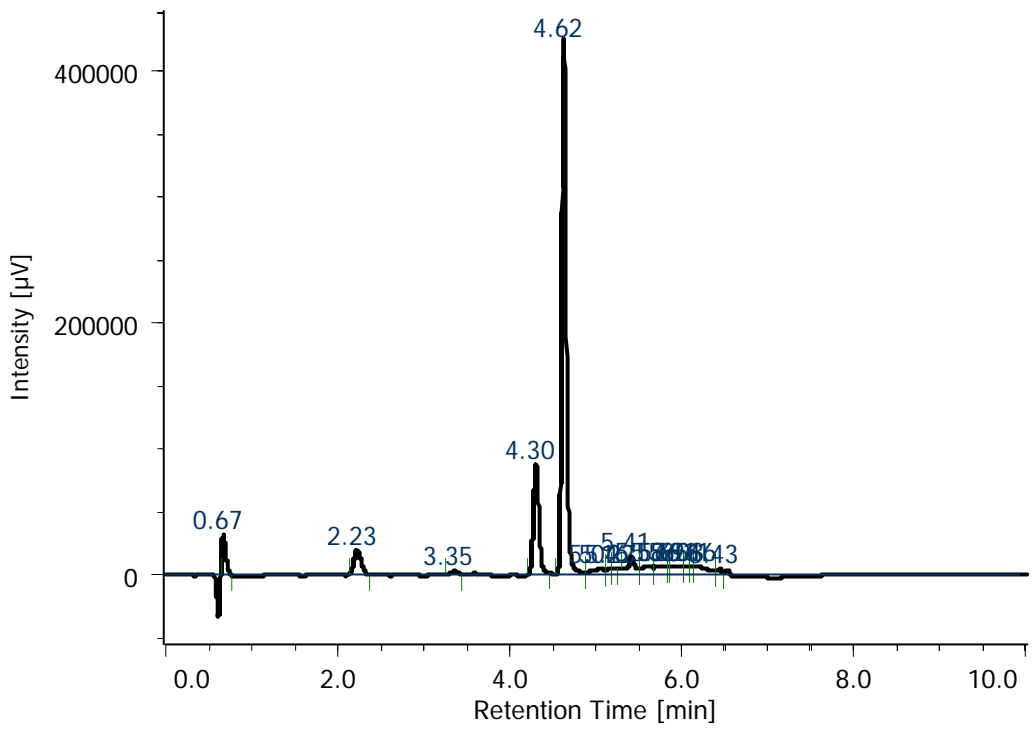


図 4. 4. 1-3 スイートスプリングのクロマトグラム

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、完熟果実（2010年1月購入）および摘果果実（7月下旬から8月上旬にかけて採取）の含有ヘスペリジン（新鮮物100gあたり）の定量分析を行った。完熟スイートスプリングはLサイズ（約250g）のものを、摘果果実は全て緑色で、スイートスプリング（約20g）、ハッサク（約45g）、温州（約20g）を分析に用いた。

新鮮物100gあたりのヘスペリジン含有量は、各部位ごとに処理・分析を行った後、各部位の重量比に応じ合算し、算出した。その結果、完熟スイートスプリング 331mg/100g、摘果スイートスプリング 1,694mg/100g、摘果ハッサク 73mg/100g、摘果温州 964mg/100g のヘスペリジン含有量であった。

6. 分析上の留意、注意点

7. その他

ヘスペリジンの保持時間は、4.6分である。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 野方洋一：近畿中国四国農業研究センター研究報告、5、19～84（2005）