

## 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

**四国地域イノベーション創出協議会**  
**地域食品・健康分科会 編**

s-food@m.aist.go.jp

### 柑橘中のポリメトキシフラボン

作成者：愛媛県産業技術研究所

食品産業技術センター主任研究員 大野一仁

主任研究員 明賀久弥

## 1. 柑橘類について

### 1. 1 概要

四国は全国有数の柑橘生産地域である。柑橘栽培に適した温暖な気候風土を背景に、多種類の柑橘が栽培されている。

愛媛県においては、温州ミカンが戦後特に昭和30年代～40年代にかけて需要の拡大に適應して、栽培面積・生産量が急増し、昭和43年には、全国1位の生産量を誇った。その後、需要の低迷もあり生産量は減少したが、現在でも和歌山について全国2位の生産量を有している。その他、イヨカン（全国1位）、夏ミカン（全国2位）、ハッサク（全国3位）、ネーブル（全国4位）、ポンカン、清見、不知火、河内晩柑等種々の柑橘が生産されている。また、徳島県ではスダチ（全国1位）、高知県ではユズ（全国1位）が、それぞれ地域の重要な特産果実となっている。

これらの柑橘は生果として販売されているだけでなく、加工品としても利用されている。地元の加工業者が、特産柑橘類を原料とした果汁、シラップ漬、果皮加工品、菓子素材、ジャム類等多品種の加工品を製造している。これまでは、製品の品質（外観や食味、香りがよいこと、つまり、収穫直後の生果実に近い高品質の製品開発）に力が注がれてきた。しかし、消費者の健康志向を背景に、柑橘類に含まれている健康維持成分（ $\beta$ -クリプトキサンチン、ノビレチンやヘスペリジン等）の機能性や作用機構が解明され、これらの成分を生かした商品が開発されるようになり、柑橘加工品製造業者も柑橘の機能性成分を生かした商品作りへの関心が高まってきている。

### 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として、フラボノイド、テルペン、リモノイド、カロテノイド、クマリン等が含まれている。最近の研究によってそれらの機能性が明らかになってきており、柑橘類の有効性が消費者にも注目されている。このうち、フラボノイドと呼ばれる物質群には様々なものがあり、ヘスペリジンやナリンギンといった柑橘類に特有なフラバノン類、ポリメトキシフラボン類が含まれている。

このうちポリメトキシフラボンは、フェノール水酸基がすべてメチル化された特殊

な構造を持つフラボノイドの一種である。さらに他のフラボノイドと異なり、カンキツにだけ存在するという特徴を持っている。最近、ポリメトキシフラボンのノビレチンやタンゲレチン等に発ガン抑制作用等の機能を有することが報告され注目を浴びている。

特に、ポリメトキシフラボンが沖縄県特産の柑橘であるシークワサーに豊富に含まれていることから、その機能性の研究が推し進められてきた。

ポリメトキシフラボンの機能性としては、発ガン予防効果、血糖値抑制、血圧抑制、抗潰瘍性、アルツハイマー病の予防等が明らかにされている。

例えば、食品への成分強化、食品添加物、医薬品等の多方面への応用が期待されており、近年その需要が高まっている。

愛媛県産業技術研究所では、柑橘類のポリメトキシフラボンに着目して、加工副産物から効率的に抽出する方法を研究開発している（「カンキツ機能性成分高含有組成物の製造方法（特許出願中）」）。この方法は、大量の有機溶媒を必要とせず、食品工場の副産物（ピールジュース、廃糖蜜）を原料として、1回の樹脂処理でポリメトキシフラボンを濃縮できる効率的な技術である。さらに、用いる樹脂、エタノールともに食品衛生法で使用が認められており、果汁をはじめとする食品への応用が容易であるため、今後食品分野への利用が期待される。



写真1-1 ポリメトキシフラボンを豊富に含むポンカン

### 1. 2. 1 ポリメトキシフラボンを含む食品

ポリメトキシフラボンは、柑橘類だけに含まれるフラボノイドであり他の食品には含まれていない。

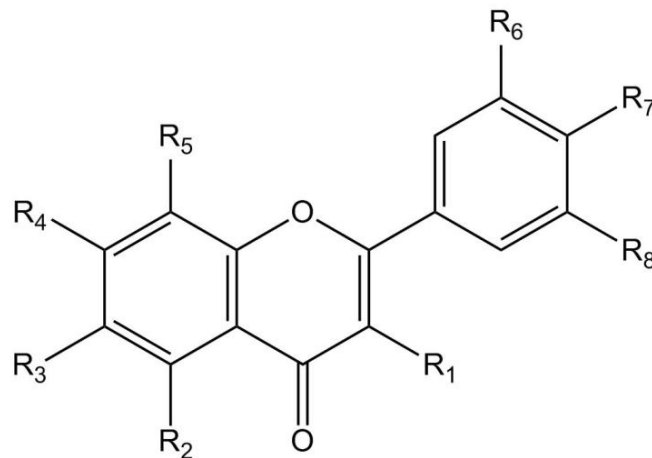
<引用・参考文献>

1. 矢野昌充：農業および園芸，74, 113-118(1999)．
2. 矢野昌充：食品工業，45, 18-25(2002)．
3. 矢野昌充：日食工誌，49, 139-144(2002)．
4. 村上明：フードスタイル 21, 10, 93-95 (2006) ．

**2. ポリメトキシフラボンについての説明**

柑橘類中の含まれるフラボノイドの一群であるポリメトキシフラボンには、ノビレチン (Nobiletin)、シネンセチン (sinensetin)、タンゲレチン (Tangeretin) がある。

これらポリメトキシフラボンの含量は、柑橘の種類により異なっており、柑橘の特性を把握するための指標となっている。またその含量は、種類、収穫時期等により差はあるが、果皮に局在しており、じょうのう膜や砂じょうには少ない。



ポリメトキシフラボン	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
ノビレチン (NOB)	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
タンゲレチン (TAN)	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe	H
シネンセチン (SIN)	H	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	H

図 2-1 主要なポリメトキシフラボンの構造式

**3. 定量分析の方法について**

柑橘類及びその加工品の機能性を知る上で必要なポリメトキシフラボン 3 種 (ノビレチン (NOB)、タンゲレチン (TAN)、シネンセチン (SIN)) を同時に高速液体クロマトグラフィーにより定量する方法を述べる。

### 3. 1 準備する器具など

1. 超音波発生器
2. 遠心分離機
3. 磨砕装置
4. ボルテックスミキサー
5. 200ml 容ビーカー
6. 遠沈管 (15ml 容プラスチック製、50ml ガラス製共栓)
7. 固相抽出器具 (ボンドエルト C18 HF、500mg/3mL (ハリアン製))
8. 5ml 容メスフラスコ
9. 試料濾過用メンブランフィルター (親水性テフロン膜を使用したもの、ポアサイズ 0.20  $\mu$ m、25mm 径: D I S M I C、25HP020AN、アドバンテック社製)
10. 高速液体クロマトグラフシステム紫外検出器、カラム恒温槽 (40°C が保てるもの) が必須
11. C18 逆相カラム (LiChrospher RP-18、5  $\mu$ m、4×250mm、関東化学株)

#### [試薬]

1. アセトニトリル (HPLC 用)
2. メチルアルコール (試薬特級)
3. ジメチルスルフォキシド (DMSO) (試薬特級)
4. ポリメトキシフラボン標品 (HPLC 用、フナコシ株)

ポリメトキシフラボン標品原液は、各々 10mg/10ml の濃度になるように精秤して抽出溶媒 (メタノール/ ジメチルスルフォキシド (DMSO) の 1 : 1 混液) で溶解する。ここの原液を抽出溶媒で希釈して、20mg/100ml、50 mg/100ml、100 mg/100ml の標品溶液を調製し、ネジ付き褐色サンプルビンに入れ、-20°C 以下で冷凍保存する。

### 3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

(試料の抽出法は野方らの方法<sup>1)</sup>に若干改変を加えたもので、ヘスペリジンと同様である。)

#### (1) 凍結乾燥粉末試料の調製

- ① 試料約 0.1g を 15ml 容遠沈管に精秤する。
- ② 抽出溶媒 5ml を加えて、遠沈管を超音波発生装置に浸漬して 5 分間超音波処理をする。そのまま、30 分～1 時間放置する。
- ③ 遠心分離 (10,000rpm-10min) を行う。
- ④ 上澄を 200ml 容ビーカーにとる。
- ⑤ 沈澱に抽出溶媒 1ml を加えて、ボルテックスミキサーで混合する。
- ⑥ 遠心分離 (10,000rpm-5min) を行う。
- ⑦ 上澄を④のビーカーにとり、沈澱に抽出溶媒 1ml を加えて再び沈澱から抽出する。
- ⑧ 遠心分離 (10,000rpm-5min) を行い、上澄を④のビーカーにとる。
- ⑨ 上澄を併せた抽出液に、溶媒濃度が 10% になるように蒸留水を加える。
- ⑩ メタノール 3ml、10%メタノール 6ml で順次コンディショニングした固層抽出 (ボンドエルト HF (C18, 500mg)) にサンプルを通液する。

⑪10%メタノール15mlで洗浄後、抽出溶媒5mlで溶出し、5mlに定容する。

⑫調製した溶液をHPLCに注入して分析する。

### (2) 生鮮試料の調製

①試料約0.5gを精秤してガラス製遠沈管にとる。

②抽出溶媒10mlを加えてで磨砕装置で均質化する。

③超音波発生装置にして同様に振盪して5分間超音波処理をする。

④これから溶媒を5mlとり、以下、凍結乾燥粉末試料と同様に抽出・調製する。

### (3) 果汁・果肉(さじょう)試料の調製

①果汁はそのまま、果肉はホモジナイズ後試料約3gを15ml容遠沈管に精秤する。

②遠心分離(10,000rpm-10min)を行う。

③上澄を200ml容ビーカーにとる。沈殿はさらに抽出溶媒1mlで2回超音波処理により抽出し遠心分離して、各上澄と合わせ抽出液とする。以下、凍結乾燥粉末試料と同様に抽出・調製する。

## 3. 3 HPLCによる分析方法

### 3. 3. 1 「アイソクラティックタイプ HPLC 装置の場合」

#### (1) 移動相の調製

移動相は、蒸留水(超純水):アセトニトリルを、60:40の割合(容量)で混合して調製する。

#### (2) 分析条件

検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。

検出器:UV-VIS 検出器

検出波長:360 nm

恒温槽:40℃

移動相流量:0.9/min

試料注入量:10 $\mu$ l

#### (3) 定性及び定量

① 分離された物質の定性は保持時間により行う。

② 定量は標準試料を用いた、内標を用いない絶対検量線法による。通常はクロマトグラムから計算するが、微量物質の場合はピーク高を用いる方が精度良く定量出来る場合もあるので、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 アイソクラティックタイプ HPLC 装置による分析例と定量分析結果

分離された物質は保持時間から(標準物質と比べ)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。以下に典型的なクロマトグラフを図に示す。

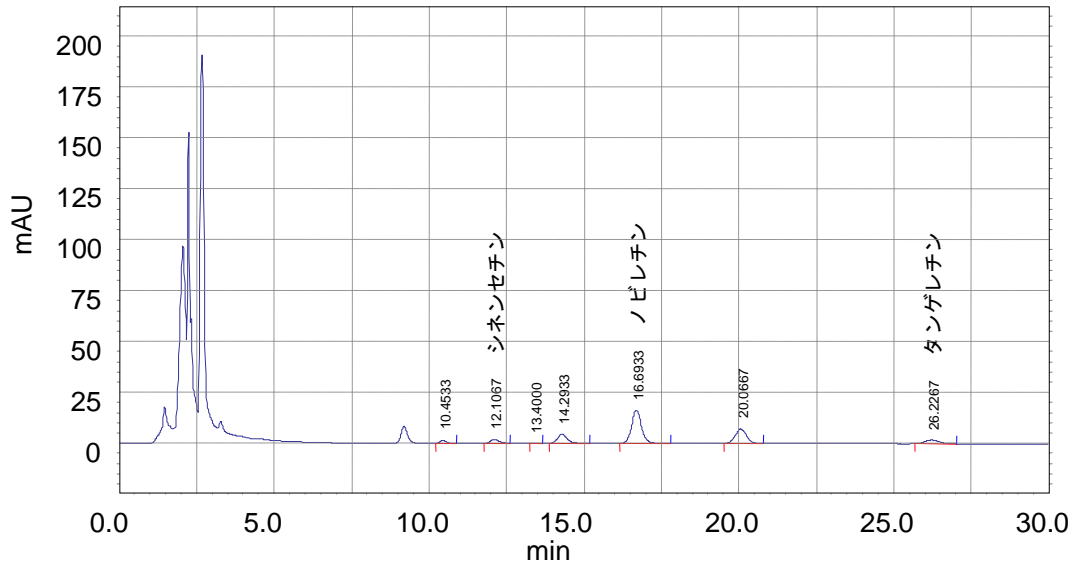


図 4. 1-1 イヨカン果皮のクロマトグラフ

#### 5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、柑橘の部位別、柑橘加工品中のポリメトキシフラボンの定量分析を行った。その結果を下記表に示す。

表 5-1 柑橘類及び加工品の定量結果

供 試 品	性 状	シネンセチン (mg/100g)	ノビレチン (mg/100g)	タンゲレチン (mg/100g)
イヨカン果皮	生鮮	2.2	19.3	5.6
イヨカンじょうのう膜	生鮮	ND	ND	ND
イヨカンさじょう	生鮮	ND	ND	ND
ポンカン果皮	生鮮	6.1	85.1	62.2
温州ミカン果皮	乾燥粉末	2.4	35.2	13.6
不知火果皮	乾燥粉末	50.1	49.3	12.6
甘夏果皮	乾燥粉末	ND	5.6	6.7
河内晩柑果皮	乾燥粉末	7.9	8.8	12.9
日向夏果皮	乾燥粉末	3.2	60.9	43.0
温州ミカン果汁	瓶詰	ND	0.1	0.1
温州ミカン果汁	瓶詰	ND	0.5	0.2

清見果汁	瓶詰	0.4	0.6	0.2
イヨカンマーマレード	瓶詰	ND	0.5	ND
温州ミカン果皮乾燥粉末	瓶詰	1.1	14.7	5.4
ギョハ <sup>®</sup> 富化ミカンピュレー	袋詰	ND	ND	ND
ギョハ <sup>®</sup> 富化ミカン残渣	袋詰	1.7	24.4	7.1

ND（検出せず：0.1mg/100g以下）

（\*注意）なおこの測定結果は数多くの柑橘果実及び加工品うちの一例であり、一般の分析結果ではない。

## 6. 分析上の留意、注意点

ポリメトキシフラボンは、果皮中に局在していることから、部位別含量を分析するためには、調理中に果皮の精油等がじょうのう膜や果肉（さじょう）に付着しないように注意を払う必要がある。

また、ポリメトキシフラボンは、比較的安定性は高いものの、試料調製・分析にあたっては、抽出試料を褐色ビンに入れて、できれば-20℃以下で冷凍貯蔵することが望ましい。

## 7. その他

特になし。

## 8. 定量法に関する引用・参考文献

1. Yoichi Nogata, Hideaki Ohta, Koh-Ich Yoza, Mark Berhow and Shin Hasegawa : J. Chromatogr., 667, 59-66(1994).
2. Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. : Biosci Biotechnol Biochem., 70(1), 178-192(2006).
3. B. Heimhuber, R. Galensa and K. Herrmann : J. Chromatogr., 439, 481-483(1988).
4. 門家重治, 明賀久弥, 児玉雅信, 松本恭郎 : 愛媛県工業系研究報告書, 39, 31-36(2001).
5. 町田浩一, 福田正枝, 大沢啓助 : 東北薬科大年報, 35, 143-146(1988).

—以上—

[トップページに戻る](#)