

## 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

### 柑橘のリモノイド

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

## 1. 柑橘について

### 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応して、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はなく、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

柑橘には、フラボノイドやリモノイドをはじめとして特有の成分が含まれている。

リモノイドは、ミカン科とセンダン科の植物に存在するトリテルペン誘導体の総称で、リモニン、ノミリン、ノミリン酸、イチャンギンが苦味を持っている。このうち柑橘加工にとって問題となっているのは、リモニンとノミリンで他のリモノイドは成熟果実における含量が低いためほとんど問題にはならない。リモノイドの苦味閾値は7～12ppmとされている。低い濃度で苦味を呈することから、これまでリモノイド含量の低い原料の使用や成分の除去、苦味緩和について様々な研究がなされている。

このように、リモノイドは加工分野では、好ましくないものであったが、機能性に関する研究の進展から、発ガン予防効果、解毒酵素の活性化、高コレステロールの抑制効果、中性脂肪の抑制効果等が認められその利用が注目されている。

最近の研究で、柑橘の成熟後期にラクトンの水酸基にグルコースが結合したリモノイド配糖体（リモノイドグルコシド）に変化し苦味を呈さない物質になることが分かってきた。この配糖体にリモノイドと同様の機能性が期待できることから、リモノイド、リモノイド配糖体の食品への利用研究が進められている。

さらに、リモノイドには昆虫に対する摂食阻害作用があることもわかり、食品以外の新たな分野への応用も期待されている。

### 1. 2. 1 リモノイドを含む食品

リモノイドはほとんどすべての柑橘に含まれており、果皮では、レモン、イヨカン、ライム、グレープフルーツで含量高く、レモンで 500ppm、イヨカンでも 400ppm 以上になることもある。

果肉については、イヨカンで 30～50ppm、レモンで 30～70ppm、ネーブルで 10 以下～40ppm、ハッサクで 40～50ppm 含有されており、品種によるばらつきも大きい。

#### <引用・参考文献>

1. 長谷川 信, 伊福 靖: カンキツリモノイドの生化学, 日食工誌, 41, 372-380(1994).



写真 1 - 1 リモノイドが含まれているイヨカン

## 2. リモノイドについての説明

柑橘特有の苦味成分であるリモノイド類 (Limonoids) には、主としてリモニン (Limonin) と、ノミリン (Nomilin) が含まれている。これらリモノイド含量の把握は、柑橘の品質評価や、果汁、ジャム類等の加工においては欠かせない重要な要素になっている。その含量は、品種・系統や生育環境等によって差がある。

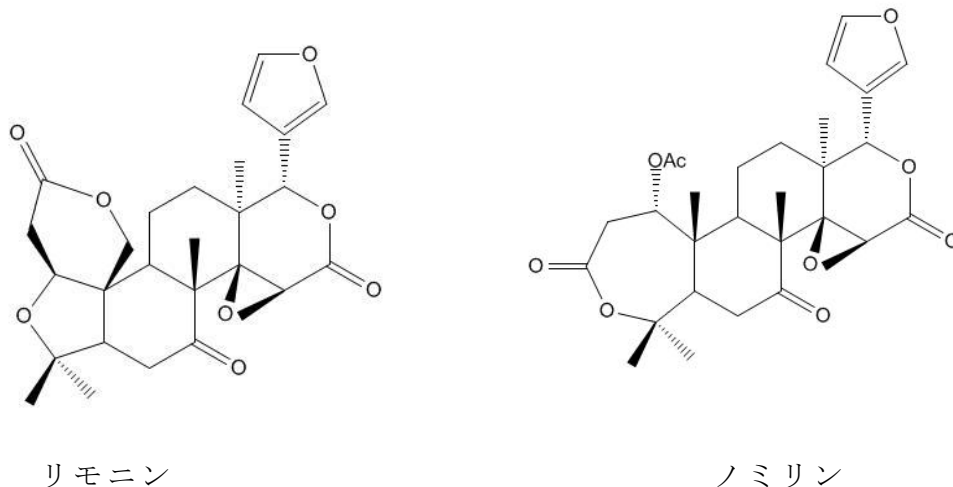


図 2-1 リノイドの構造式

## 3. 定量分析の方法について

柑橘類及びその加工品中の 2 種類のリモノイド (リモニン、ノミリン) 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. ホモジナイザー
2. 三角フラスコ
3. 分液ロート
4. ナス型フラスコ
5. エバポレーター
6. 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  $0.20\ \mu\text{m}$ 、25mm 径: D I S M I C、25HP020AN、アドバンテック社製)
7. 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 ( $40^\circ\text{C}$  が保てるもの) が必須
8. C18 逆相カラム (Deverosil ODS-7 ( $7\ \mu\text{m}$ )、 $4.6 \times 250\text{mm}$ 、野村科学(株)製)

### [試薬]

1. アセトニトリル (HPLC 用)
2. 硫酸マグネシウム (試薬特級)
3. B H A (試薬特級)
4. クロロホルム (試薬特級)

5. ヘキサン（試薬特級）
6. アセトン（試薬特級）
7. エタノール（試薬特級）
8. リモニン、ノミリン標品

リモノイド（リモニン、ノミリン）の標品原液は、各々10mg/10mlの濃度になるように精秤して80%メタノールで溶解する。この原液をメタノールで希釈して、50mg/1000ml、100 mg/1000ml、200 mg/1000mlの標品溶液を調製し、テフロンパッキン内装ネジ付き褐色サンプルビンに入れ、-20℃以下で冷凍保存する。

### 3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

#### (1) 果汁試料の調製

1. 果汁 50g に硫酸マグネシウム 2g、2%B H Aアルコール液 1ml を加えて混和後、10分間蒸煮する。
2. 冷却後、クロロホルム 25ml で3回抽出する。
3. 抽出液を減圧下に乾固後、アセトニトリルに転溶して同容のヘキサンと分配する。
4. アセトニトリル層を分け取り、ヘキサン層は少量のアセトニトリルで洗い、先のアセトニトリルと合わせて減圧乾固する。
5. これにアセトニトリル 2ml を加えて溶解し、検液として-20℃以下で保存する。

#### (2) 果皮、じょうのう膜試料の調製

1. 細切りしたもの 30g をとり、超純粋水 120g と共にホモジナイザーにかけ2分間処理する。
2. の三角フラスコ（200ml）に磨砕物 25g をとり、2%B H Aアルコール液 2ml、1%クエン酸 5ml を加え10分間蒸煮し、冷却後アセトン 75ml を加える。
3. ゆるやかに沸騰程度に加熱してリモノイドを抽出する。
4. 冷却後、ガラスフィルターで吸引濾過し、75%アセトンで残部を洗浄する。
5. アセトン液を減圧で濃縮後、クロロホルムと水で分液ロートに移し、クロロホルム層に転溶する。
6. クロロホルム層を集めて、以下、果汁の場合にしたがって処理する。

#### (3) 果肉(さじょう)試料の調製

1. 果肉 25g をホモジナイザーで磨砕したのち、2%B H Aアルコール液 2ml、硫酸マグネシウム 3g を加えて10分間蒸煮する。
2. 以後は、果皮、じょうのう膜と同様に処理する。

### 3. 3 HPLC による分析方法

#### (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、50：50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。

検出波長:210 nm

恒温槽:40℃

移動相流量:1.0ml/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 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。

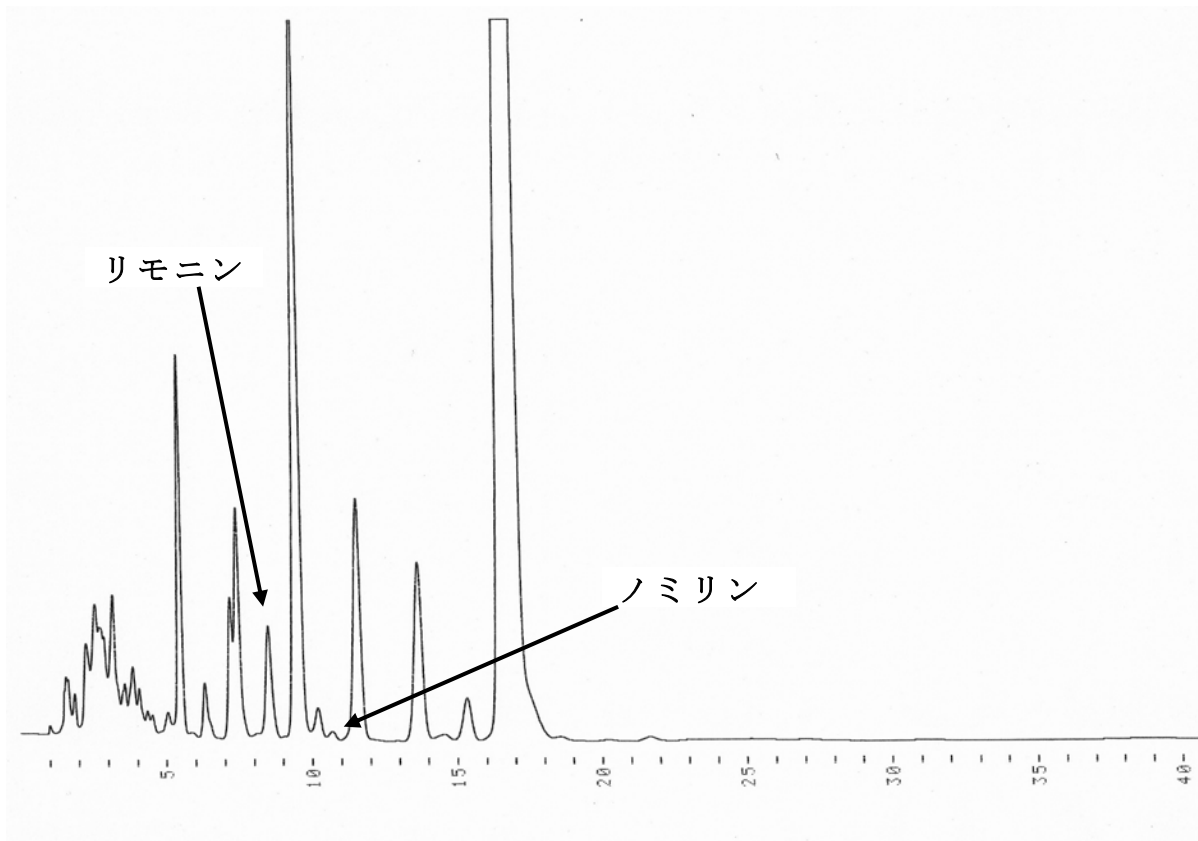


図 4. 1-1 イヨカン果皮のクロマトグラフ

## 5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、柑橘類及びその果汁中のリモノイドの定量分析を行った。その結果を下記表に示す。

イヨカン果実の部位別含量では、果皮とじょうのう膜での含量が高く、さじょうで低い結果であった。今回は貯蔵果実を分析したため、収穫直後よりも低い傾向にあり、特にノミリンでその傾向が明らかであった。

酸、糖を含む系におけるリモノイドの苦味閾値は 7~12ppm とされている。分析した果汁では、清見、ユズで閾値よりも高い含量で苦味を感じた。

リモノイドの水溶液での苦味閾値（官能検査パネル 50%が関知する濃度）は、リモニンで 0.8~1.2ppm、ノミリンで 1.3~1.6ppm であることから、イヨカンの果皮やじょうのう膜では、非常に高いリモノイド含量を有していることから、マーマレレードやピール糖果等の加工においては、脱苦味のためにブランシングや水晒が行われている。

表 5 - 1 柑橘類及び果汁の定量結果

供 試 品	リモニン (ppm)	ノミリン (ppm)
貯蔵イヨカン果皮	1 9 0	1 1
貯蔵イヨカンじょうのう膜	1 7 0	8 . 0
貯蔵イヨカンさじょう	1 1	0 . 0
温州ミカン果汁	5 . 7	0 . 3
温州ミカン果汁	5 . 3	0 . 1
温州ミカン果汁	5 . 0	1 . 3
清見果汁	2 2	2 . 5
ユズ果汁	1 5	4 . 9
スダチ果汁	1 0	9 . 1

(\*注意) なおこの測定結果は数多くの柑橘及び加工品のうちの一例であり、製品一般の分析結果ではない。

## 6. 分析上の留意、注意点

標準品及び分析用試料は、褐色ビンに入れて-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. 前田久夫, 尾崎嘉彦, 三宅正起, 伊福靖, 長谷川信: 農化, 64, 1231-1234(1990).

2. Hideaki Ohta, Chi H. Fong, Mark Berhow and Shin Hasegawa : Thin-layer and high-performance liquid chromatographic analyses of limonoids and limonoid glucosides in Citrus seeds, No. 39 2001 J. Chromatogr., 639, 295-302(1993).
3. 野村男次、三東崇昇：山口大学農学部学術報告、16、635-640(1965).
4. Maire, V.P and Grant, E.R. : J. Food Chem., 18, 250-252(1970).
5. 三沢豊、松原良、土井信明：日食工誌、18、326-332(1971).
6. 橋永文男、江島宏、永浜秀人、以東三郎：鹿児島大学農学部学術報告、27、171-180(1977).

—以上—

[トップページに戻る](#)