

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

柑橘のリモノイド配糖体

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（ β -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。近年柑橘の機能性成分の研究が進み、リモノイド配糖体に発ガン抑制作用のあることが報告され注目を集めている。リモノイド配糖体は、アグリコンのような苦味がなく、存在量もアグリコンよりかなり高濃度であることから、食品への利用が期待されている新しい機能性成分である。この配糖体は、果実成熟後期に、柑橘に存在するリモノイド・ラク톤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、それが苦味を呈さないことから注目されるようになってきた。この配糖体にリモノイドと同様の機能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。

1. 2. 1 リモノイド配糖体を含む食品

リモノイド配糖体を含む食品類は、柑橘類およびその加工品に限られる。果実の成熟後期に含量が増加していくことから、果汁等の柑橘加工品に含有されている。

米国で市販されているオレンジ、グレープフルーツ、レモン果汁にそれぞれ320ppm、190ppm、80ppm、日本の温州ミカン果汁で平均233ppmと、リモノイドに比べて高濃度に存在していることが報告されている。

<引用・参考文献>

1. 長谷川信, 伊福靖: 日食工誌, 41, 372-380(1994).
2. 尾崎嘉彦, 三宅正起, 稲葉伸也, 綾野茂, 伊福靖, 長谷川信: 果汁協会報, 443, 28-34(1994).
3. 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).



温州ミカン

清見

サンフルーツ

ユズ

写真 1 - 1 柑橘果汁

2. リモノイド配糖体についての説明

リモノイド配糖体には、リモニングルコシド (Limonin Glucoside) と、ノミリングルコシド (Nomilin glycoside)、オバクノングルコシド (Obacunon glycoside) が含まれ、これらは総称してリモノイド配糖体 (Limonoid glycosides) と呼ばれている。

これらの配糖体のうち標品が試薬として販売されているのは、リモニングルコシドのみで、本マニュアルでは、リモニングルコシドについて定量分析を行うこととする。

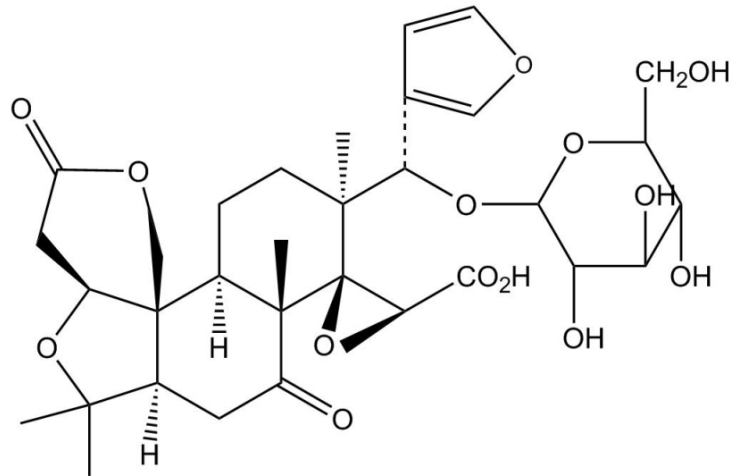


図 2 - 1 リモニングルコシドの構造式

3. 定量分析の方法について

柑橘果汁中のリモノイド配糖体を、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. 50ml 容遠沈管
3. ボルティックミキサー
4. エバポレーター
5. 200ml 容、及び 50ml 容ナス型フラスコ
6. 5ml 容メスフラスコ
7. 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)
8. 2液グラジェントの出来る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℃が保てるもの)が必須
9. C18 逆相カラム(Deverosil ODS-7($7\mu\text{m}$)、4.6×250mm、野村科学(株)製)

[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. リン酸(試薬特級)
4. 固相抽出器具(ボンドエリート C18 HF、500mg/3mL(ハリアン製))
5. リモノイド配糖体標品(リモニングルコシド(フナコシ(株)))

リモノイド配糖体標品原液は、各々10mg/10mlの濃度になるように精秤してメタノールで溶解する。ここの原液をメタノールで希釈して、20mg/1000ml、50mg/1000ml、100mg/1000ml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℃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) 試料の調製

1. 遠沈管に果汁試料10ml、メタノール25mlを入れて混合し、超音波発生器で5分間処理する。
2. 10,000rpmで10分間遠心分離する。
3. 上澄を200ml容ナス型フラスコに採る。
4. 沈殿に70%メタノールを20ml加えてボルティックミキサーで混合し、再度10,000rpmで10分間遠心分離する。
5. 上澄は、3.のナス型フラスコと併せる。さらに沈殿物に対して、70%メタノールを20ml加えてボルティックミキサーで混合し、再度10,000rpmで10分間遠心分離して上澄をナス型フラスコに併せて入れる。
6. 上澄をエバポレーターにかけ、メタノールを留去し、水で10mlとした後、10,000rpmで10分間遠心分離して不純物を除き抽出溶液とする。
7. 固層抽出器具（ボンドエルートHF(C18, 500mg)）を、メタノール3ml、水6mlで順次コンディショニングする。
8. コンディショニングした固層抽出器具に抽出液2mlを通液する。
9. 水15mlで洗浄した後、メタノール5mlで溶出する。
10. 50mlナスフラスコに入れ、エバポレーターで蒸発乾固する。
11. これに70%メタノールを加えて溶解し5mlに定容した後、メンブランフィルターに通す。
12. これを分析用試料とし、標品とともに HPLC で分析する。

3. 3 HPLC による分析方法

3. 3. 1 「グラジエントタイプ HPLC 装置の場合」

(1) 移動相の調製

移動相 A 及び移動相 B をアセトニトリル(HPLC 用)、超純水、リン酸を用いて以下のように調製する。

A 液：アセトニトリル-3mM リン酸 (15+85、v/v)

B 液：アセトニトリル-3mM リン酸 (26+74、v/v)

(2) 分析条件

- ① 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：210nm

恒温槽：40℃

流量：移動相 A、移動相 B の合計で毎分 1.0ml

試料注入量：10 μ l

- ② 移動相溶媒の混合比(グラジエント)は以下のように調整する。

0 分から 33 分：0 分の時点で A 液の割合が 100%(B 液 0%)、33 分の時点で B

液の割合が 100% になるように、B 液の割合を直線的に増加させる。

33 分から 50 分: B 液 100% の状態を保つ。

50 分から 60 分: A 液の割合を 100% (初期の状態) の状態にする。

(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 グラジエントタイプ 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。

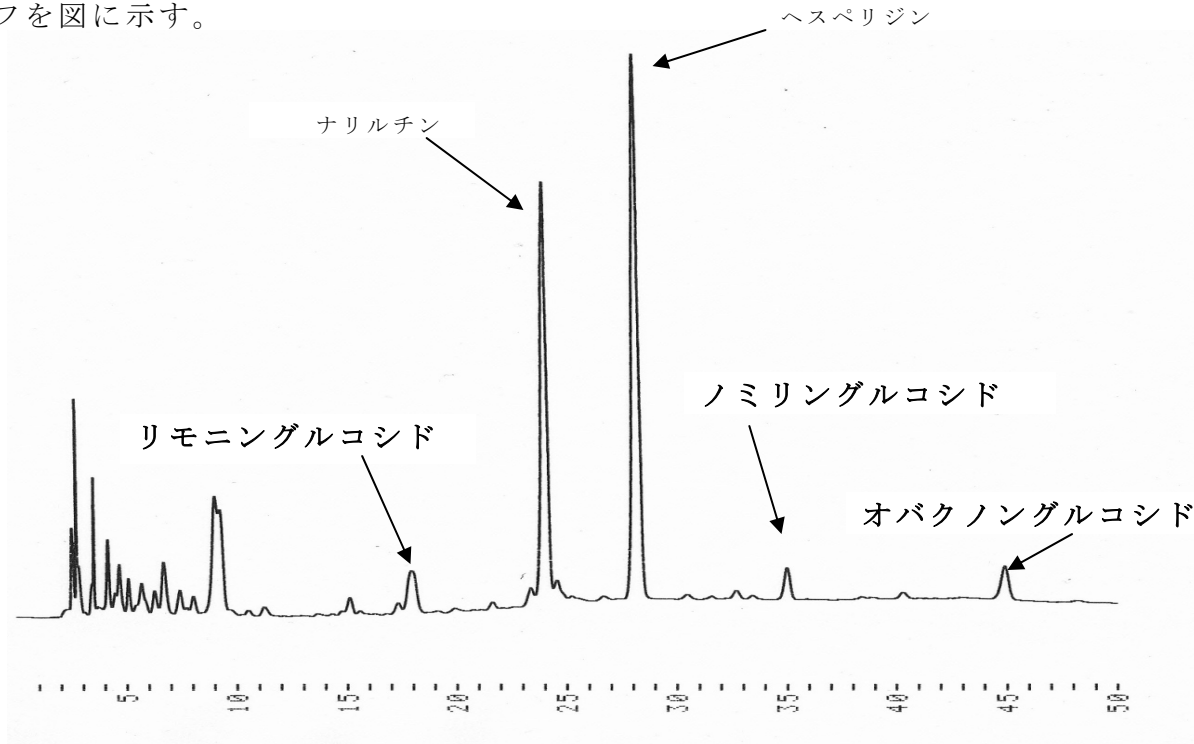


図 4. 1 - 1 温州ミカン果汁のクロマトグラフ

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、県産柑橘果汁中の含量について定量分析を行った。その結果を下記表に示す。

表5-1 県内産柑橘果汁中のリモノイド配糖体の定量結果

供 試 品	リモニングルコシド (ppm)
温州ミカン果汁	190
温州ミカン果汁	160
温州ミカン果汁	190
清見果汁	130
清見果汁	170
サンフルーツ果汁	60
ユズ果汁	9

(*注意) なおこの測定結果は柑橘果汁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。

試料が果皮の場合、共存物質が多く、目的成分のピークの分離が不十分となるので、今後、簡易で効率的な試料溶液の精製方法の検討が必要である。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 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 , J.Chromatogr. , 639, 295-302(1993).
2. 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)。

—以上—

[トップページに戻る](#)