

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

柑橘のヘスペリジン

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 笹山新生

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、多くの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位の生産量を有する。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栽培されている。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）が生産され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て、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に役立つ成分（たとえば、 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、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。

フラボノイドは、一般的に、ルチンやケルセチンのような野菜・果実に一般的に見られるもの、ヘスペリジンやナリンギンのような柑橘特有のフラバノン、柑橘特有でポリメトキシル基を有するポリメトキシフラボンの3種類に分類される。柑橘を特徴

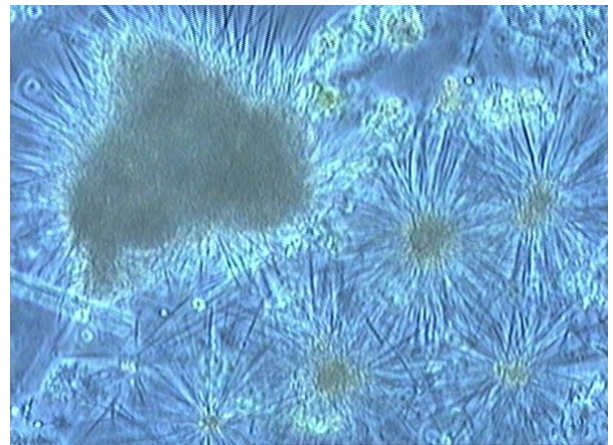
づけるフラボノイドは、フラバノンとポリメトキシフラボンである。

柑橘中ではフラバノンが多く含まれているが、その中でもヘスペリジンは温州ミカン可食部に100g中に100mgオーダーで含まれており、糖類、クエン酸に次ぐ主要成分となっている。ヘスペリジンはこれまで、温州ミカンシラップ漬、温州ミカン果汁製品の白濁物質として知られていた。これは、水に対する溶解性が低いため、加工直後は溶解していたヘスペリジンが経時的に針状結晶を成形して析出することから、加工上は除去すべき成分で、ヘスペリジン分解酵素やメチルセルロースの添加等が実用化され、白濁防止が図られている。

ところが、フラボノイドの機能性に関する研究が進展し、ヘスペリジンに血圧降下作用、抗アレルギー作用、脂質代謝改善作用、骨代謝改善作用等が相次いで報告されて、健康維持の面から注目されている。

最近では、ヘスペリジンに糖を転移させて水溶性を向上（約10万倍）させ、吸収効率を著しく向上させた製品も開発され、食品への利用も実用化している。

さらに、ビタミンP、抗酸化剤等として、食品添加物としても利用されている。



柑橘シラップ漬中の白色物質
の顕微鏡写真
(針状結晶の主成分は、ヘスペリジン)

温州ミカン

写真1-1 ヘスペリジンを豊富に含む温州ミカンと加工品中の結晶物

1. 2. 1 ヘスペリジン食品を含む食品

ヘスペリジンは柑橘類特有に含まれるフラボノイドで、ブタン、グレープフルーツ等を除くほとんどの柑橘全般に広く含まれており、特に果皮での含量が高い。

したがって、柑橘及びその加工品には豊富に含まれている。

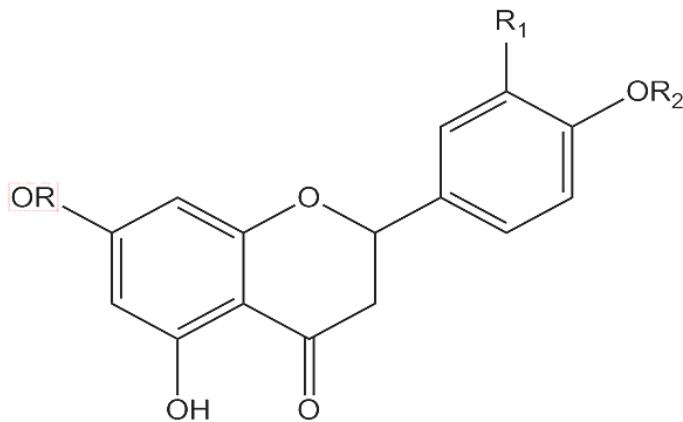
< 引用・参考文献 >

1. 矢野昌充：果実類の生理機能，農業および園芸，74, 113-118(1999).
2. 矢野昌充：地域農産物の品質・機能性成分総覧，315-318(2000).
3. 町田浩一、上田篠二、佐藤継男、大沢啓助、安藤隆一郎、久道周次：東北薬科大学研究年報，32, 135-142(1985).
4. 松田英秋、矢野真紀、久保道徳、飯沼宗和、大山雅義、水野瑞夫：薬学雑誌，111, 193-198 (1991) .
5. 関谷敬三：化学と生物，44 (7)，434-435(2006).
6. 杉浦 実：化学と生物，46 (7)，446-447(2008).

2. ヘスペリジンについての説明

柑橘類に含まれるフラボノンは、ヘスペリジン (Hesperidin)、ナリンギン (Naringin)、ナリルチン (Narirutin)、ネオポンシリン (Neoponcirin) でいずれも配糖体といわれる、糖が結合した化合物である。

フラバノンのうち、ヘスペリジンは、無味無臭で柑橘の風味に影響を与えることはないのに対して、ナリンギンは、ナツミカン、ブンタン、ハッサク、グレープフルーツ等に含まれる苦味成分で、果汁中では濃度 30mg/100mg が苦味を感じる限界となっているが、ナツミカン果肉中の濃度は、50~90mg/100g のものが多い。



Narirutin (NRT): R=rutinose, R1=R2=H

Naringin (NRG): R=neohesperidose, R1=R2=H

Hesperidin (HSP): R=rutinose, R1=OH, R2=Me

Neoponcirin (NP0): R=rutinose, R1=H, R2=Me

図 2 - 1 ヘスペリジン及び主要なフラバノンの構造式

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フラボノイドであるヘスペリジン、及び柑橘に含まれるフラボノイド配糖体（ナリルチン、ナリンギン）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. 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. 固相抽出器具（ボンドエルト C18 HF、500mg/3mL（ハリアン製））
7. 5ml 容メスフラスコ
8. 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 μ m、25mm 径：DISMIC、25HP020AN、アドバンテック社製）
9. 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
10. C18 逆相カラム（YMC-Pack Pro C18、S-5、4.6×150mm、株YMC製）

[試薬]

1. リン酸（試薬特級）
2. アセトニトリル（HPLC 用）
3. メチルアルコール（試薬特級）
4. ジメチルスルフォキシド（DMSO）（試薬特級）
5. ヘスペリジン標品（HPLC 用、フナコシ株）

ヘスペリジン標品原液は、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℃以下で冷凍保存する。

なお、他のフラボノイド配糖体（ナリルチン、ナリンギン）についても同様に調製する。

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¹⁾に若干改変を加えたもので、ポリメトキシフラボンと同様である。）

（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。
- ⑪ 10%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 「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-10mM リン酸 (20+80、v/v)

B 液：アセトニトリル-10mM リン酸 (70+30、v/v)

(この際 10nM リン酸はあらかじめ調製しておく。)

(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：285nm
 - 恒温槽：40℃
 - 流量：移動相 A、移動相 B の合計で毎分 0.6ml
 - 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 20 分 : A 液 100% を保つ。
 - 20 分から 25 分 : 25 分の時点で B 液の割合が 40% になるように、B 液の割合を直線的に増加する。
 - 25 分から 40 分 : A 液 60%、B 液 40% の状態を保つ。

40分から45分:45分の時点でB液の割合が100%になるように、B液の割合を直線に増加する。

45分から55分:A液0%、B液100%の状態を保つ。

55分から60分:60分の時点でA液の割合が100%になるように、B液の割合を直線に減少する。

初期の状態(A液100%、B液0%)に戻してから10分以上おいてから次の試料を分析する。

(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。

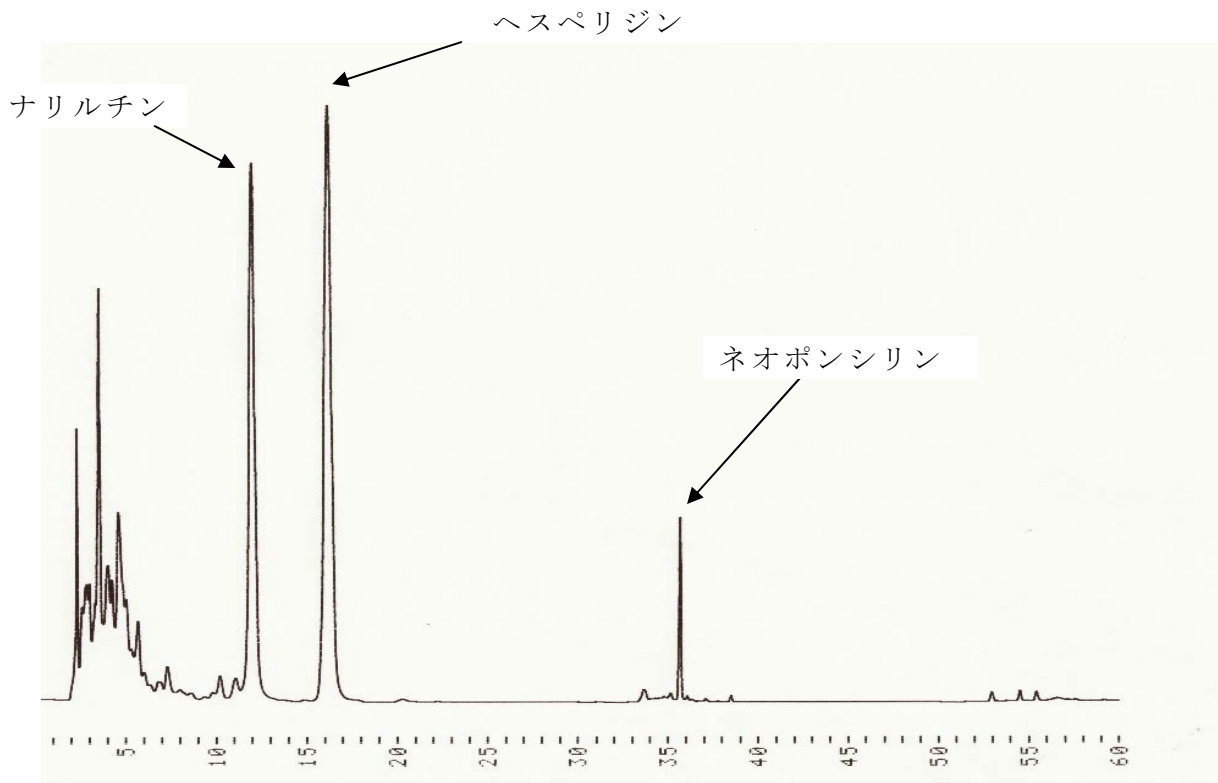


図4. 1-1 温州ミカン果汁のクロマトグラフ

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、柑橘の部位別、柑橘加工品中のヘスペリジン等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	ナリルチン (mg/100g)	ナリンギン (mg/100g)	ヘスペリジン (mg/100g)
イヨカン果皮	生鮮	53	ND	1,250
イヨカンじょうのう膜	生鮮	88	ND	372
イヨカンさじょう	生鮮	20	ND	351
温州ミカン果皮	乾燥粉末	1,460	ND	6,730
不知火果皮	乾燥粉末	872	ND	4,290
甘夏果皮	乾燥粉末	267	6,800	77
河内晩柑果皮	乾燥粉末	809	3,770	ND
日向夏果皮	乾燥粉末	1,240	ND	2,010
温州ミカン果汁	瓶詰	229	ND	426
清見果汁	瓶詰	85	ND	365
イヨカンマーマレード	瓶詰	189	ND	542
ミカン果皮乾燥粉末	瓶詰	2,290	ND	7,550
ギヤハ [®] 富化ミカンピュレー	袋詰	707	ND	1,100
ギヤハ [®] 富化ミカン残渣	袋詰	1,290	ND	3,930

ND (検出せず: 1mg/100g 以下)

(*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、一般の分析結果ではない。

6. 分析上の留意、注意点

ヘスペリジンは、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. 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](#)