

青切り桜島小みかんを利用した新商品の開発 - フラボノイドの成分分析 -

安藤浩毅*, 古川郁子*, 西元研了*, 中島孝子**

Development of New Products Utilizing a Green Sakurajima Komikan - Components Analyses of Flavonoides -

Hiroki ANDO, Ikuko FURUKAWA, Kenryo NISHIMOTO and Takako NAKASHIMA

青切り桜島小みかんに含まれる機能性成分の中で、特にフラボノイドを中心に成分分析を行った結果、フラバノンのエリオシトリン(ECR), ナリルチン(NRT), ナリンジン(NRG), ヘスペリジン(HSP), ポリメトキシフラボンのシネンセチン(SNT), ノビレチン(NOBI), タンゲレチン(TNG)の7種類のフラボノイドが確認された。また、それらの成分について生育過程における含有量(7~12月の経時変化)を測定した結果、7~8月にかけての未熟果のフラボノイド含量が比較的高いことがわかった。

Keyword: 桜島小みかん, 未熟果, フラボノイド

1. 緒言

桜島小みかんは、鹿児島ブランドに指定されている柑橘類の1つであり、主に桜島地方で栽培されている。紀州みかんとはほぼ同じ品種であり¹⁾、完熟果実は20~50gとやや小ぶりであるが、強い甘みが特徴的である。

完熟した柑橘の機能性成分としては、フラボノイド、カロチノイド、クマリン、テルペン、リモノイドが知られ、特にフラボノイドの種類は多く、健康維持や疾病予防を図るための様々な研究開発が進められている²⁾。

桜島小みかんのフラボノイドに関しては、すでに紀州みかんとして報告されている²⁾が、青切り(未熟摘果)の桜島小みかんに関しては詳細なデータが少ない。このため、フラボノイドの機能性成分に着目した青切り桜島小みかんの新商品の開発における重要な課題となっている。

そこで本研究では、青切り桜島小みかんに含まれる機能性成分について、フラボノイドを中心にその種類を調べ、同定された成分については生育過程における含有量(経時変化)を測定し、機能性成分を高濃度で含有する時期を検証した。

2. 実験方法

2.1 供試試料

供試試料は、鹿児島県鹿児島市桜島白浜町の生産農家で栽培されている桜島小みかんの木(4月20日開花)から、7月7日, 7月22日, 8月5日, 8月17日, 9月4日, 10月19日(比

較: 12月14日)に摘果し、摘果後-80℃で保存したものをを用いた。なお、解凍は冷水にて行った。

2.2 試料の調製

未熟果を丸ごと(ホール)分析する場合、未熟果10~15個を1サンプルとし、1個当たり5~6等分にしたものを凍結乾燥し、破碎後、粒径を0.425mm以下にそろえた。調製した粉末100mgを蓋付き試験管に計り取り、5mLの抽出溶媒[メタノール(MeOH) - ジメチルスルホキシド(DMSO), (1:1)]を加え、往復振盪(250spm)させながら室温で12時間抽出し、遠心分離(3,000rpm×10min)した後、上澄液を回収した。上澄液を超純水で10倍に希釈した液10mLを、あらかじめ5mLのメタノールおよび10mLの10vol%メタノールで洗浄したSepPak C18カートリッジに吸着させ、10mLの10vol%メタノールで洗浄した後、4.5mLの溶出液[MeOH - DMSO, (1:1)]を通してフラボノイド画分を溶出した。溶出液は5mLに定容し、HPLCの分析試料とした。なお、分析試料は1試料当たり3検体(n=3)とした。

また、未熟果を果肉と皮(ピール)に分けた皮についても同様に、凍結乾燥粉末100mgからフラボノイド分析用の試料を調製した。

一方、果汁の試料調製は、未熟果を丸ごと、または果肉のみをジューサーミキサーで粉碎した後、ガーゼを用いて搾り、さらに搾汁液を遠心分離(15,000rpm×10min)した上澄液1mLを凍結乾燥粉末試料と同様にSepPak C18カートリッジで処理した。

調製サンプルはHPLCで分析する前に、0.2μmのメンブランフィルターで濾過した。

*化学・環境部

** (有)さくらじま旬彩館

2.3 分析方法

フラボノイドの分析には種々の方法があるが、本報告では野方の方法²⁾に準じて分離条件を最適化し、標準試薬を用いてフラボノイドの同定および一括分析を行った。すなわち、マルチUV検出器を有するHPLC(Agilent 1100 series)を用いて200~360nmの吸収スペクトルでフラボノイドを測定した。カラムはHypersil-C18(Agilent ODS 4mm ×150mm)を用い、カラムオープン温度は35℃、流速は0.6mL/min、サンプル注入量は5μLとした。分離条件は、2段階からなる2液のグラジエント、すなわち、A液を0.01M-リン酸水溶液、B液を0.01M-リン酸メタノール水溶液とし、(1)0-70分:90%-0%A、(2)70-90分:0%Aとした。溶出成分は、保持時間と200~360nmのUV吸収波長を標準試薬と比較することにより同定した。成分の定量は所定の吸収スペクトルで、標準試薬のピーク面積値との比

により計算した。

なお、同定に用いた標準試薬は、フラバノン、フラボン、フラボン-3-オール、ポリメトキシフラボンの27種、クマリンの一種であるオーラプテン(AUR)、カロチノイドの一種である-クリプトキサンチン(β-CRY)の計29種であり、すべてフナコシ(株)より購入した。

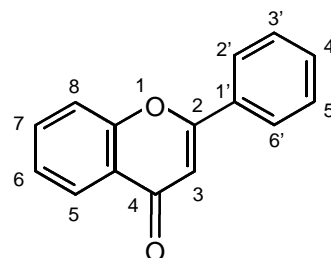


図1 フラボンの骨格

表1 分析に使用したフラボノイドの構造²⁾

化合物名	略号	置換基					max ^{b)}	
		R	R1	R2	R3	R4		
 フラバノン (Flavanone)	エリオシトリン (Ericicitrin)	ECR	rutinoside ^{a)}	OH	H		285	
	ネオエリオシトリン (Neoericicitrin)	NER	neohesperidose ^{a)}	OH	H		285	
	ナリルチン (Narirutin)	NRT	rutinoside	H	H		282	
	ナリンゲニン (Naringenin)	NGN	H	H	H		289	
	ナリンジン (Naringin)	NRG	neohesperidose	H	H		284	
	ヘスペレチン (Hesperetin)	HPT	H	OH	Me		287	
	ヘスペリジン (Hesperidin)	HSP	rutinoside	OH	Me		285	
	ネオヘスペリジン (Neohesperidin)	NHP	neohesperidose	OH	Me		284	
	ポンシリン (Poncirin)	PON	neohesperidose	H	Me		284	
	イソサクラネチン (Isosakuranetin)	ISA	H	H	Me		282	
 フラボン (Flavone)	イソリフォリン (Isorhoifolin)	IRF	rutinoside	H	H		267, 336	
	ロイフォリン (Rhoifolin)	RFN	neohesperidose	H	H		268, 336	
	ディオスミン (Diosmin)	DSM	rutinoside	OH	Me		253, 268, 345	
	ネオディオスミン (Neodiosmin)	NDM	neohesperidose	OH	Me		255, 268, 345	
	ルテオリン (Luteolin)	LTN	H	OH	H		242, 256, 351	
	アピゲニン (Apigenin)	APG	H	H	H		269, 335	
	ディオスメチン (Diosmetin)	DMT	H	OH	Me		252, 268, 347	
	アカセチン (Acasetin)	ACT	H	H	Me		269, 301, 329	
	 フラボン-3-オール (Flavone-3-ol)	ロビネチン (Robinetin)	RBT	H	OH	H	OH	H
ルチン (Rutin)		RTN	H	OH	H	H	rutinoside	258, 360
ケルセチン (Quercetin)		QCT	H	OH	H	H	H	256
ケンフェロール (Kaempferol)		KFR	H	H	H	H	H	253, 266
イソラムネチン (Isorhamnetin)		IRA	H	OMe	H	H	H	253
ラムネチン (Rhamnetin)		RMT	Me	OH	H	H	H	256
 ポリメトキシフラボン (Polymethoxylated flavone)	シネンセチン (Sinensetin)	SNT	H	OMe	H			240, 265, 326
	ノビレチン (Nobiletin)	NOB	OMe	OMe	H			248, 270, 333
	タンゲレチン (Tangeretin)	TNG	OMe	H	H			271, 322

a) フラボノイド配糖体を構成する糖

b) UV最大吸収波長

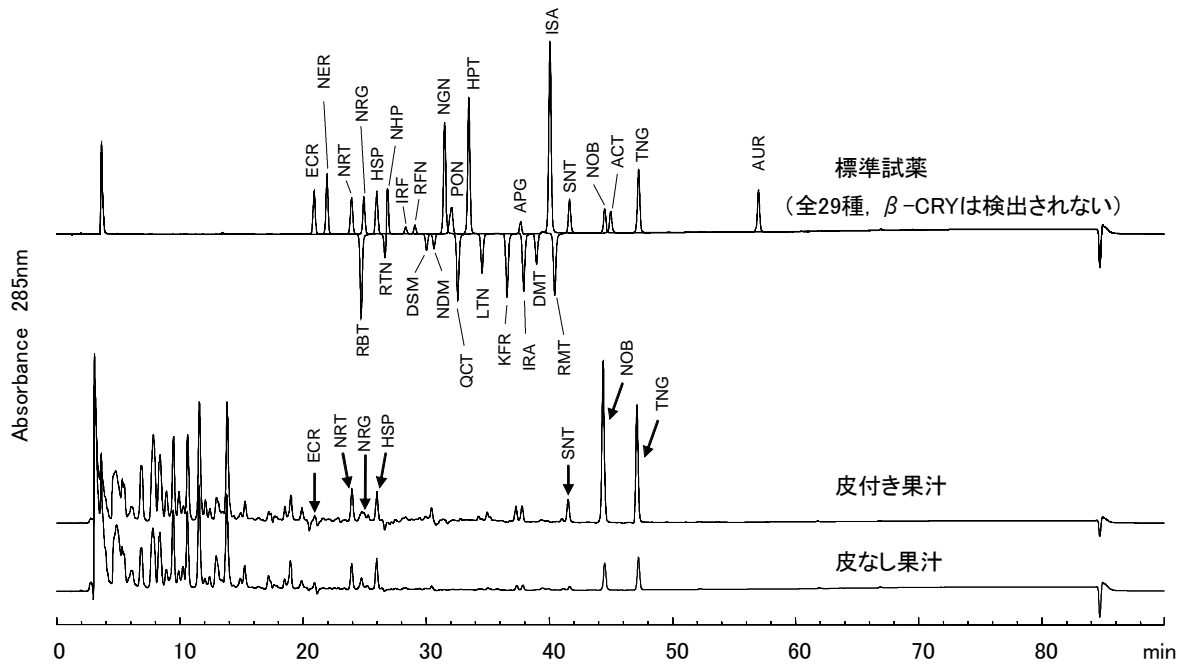


図2 フラボノイドの分析結果（一例）

表2 成長過程におけるフラボノイド含有量の変化（凍結乾燥物）

成分\摘果日	丸ごと（ホール）						
	7/7	7/22	8/5	8/17	9/4	10/19	12/14
ECR	0.8±0.2	0.3±0.1	0.4±0.0	0.3±0.0	0.4±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0
NRT	5.9±1.2	4.0±1.1	4.4±1.2	3.3±0.4	3.0±0.6	1.3±0.2	1.0±0.1
NRG	1.4±0.3	0.3±0.1	0.3±0.0	0.2±0.1	0.2±0.1	0.1±0.0	-
HSP	113.1±24.9	80.7±7.5	102.4±5.2	78.3±6.8	83.9±10.8	40.6±4.7	28.1±1.9
SNT	0.7±0.1	0.7±0.3	1.2±0.0	1.2±0.0	1.3±0.0	1.1±0.1	0.3±0.0
NOB	6.0±0.5	7.6±0.5	8.5±0.1	7.5±0.4	7.9±0.3	5.9±0.5	2.8±0.1
TNG	3.9±0.5	3.8±0.5	4.2±0.3	3.9±0.1	3.6±0.1	2.3±0.1	1.6±0.1
合計	131.9	97.3	121.6	94.6	100.2	51.6	34.1

成分\摘果日	皮（ピール）						
	7/7	7/22	8/5	8/17	9/4	10/19	12/14
ECR	0.7±0.1	0.3±0.0	0.6±0.2	0.2±0.0	0.3±0.0	0.2±0.1	0.2±0.1
NRT	0.7±0.9	0.3±0.4	0.6±1.2	0.2±0.4	0.3±0.0	0.2±0.9	0.2±0.2
NRG	3.7±0.6	3.0±0.0	4.5±0.1	2.3±1.4	2.5±0.1	1.6±0.0	1.0±0.2
HSP	125.7±29.5	90.3±4.3	177.7±37.9	93.7±11.9	105.5±4.7	73.1±14.7	43.2±6.1
SNT	0.8±0.3	1.2±0.1	1.8±0.6	1.5±0.1	1.6±0.1	1.2±0.2	0.8±0.2
NOB	9.9±4.1	11.5±1.0	22.1±7.5	14.9±2.9	16.8±1.3	13.1±1.4	8.4±1.0
TNG	7.2±3.3	5.7±0.3	12.2±4.8	8.0±1.4	7.8±0.4	5.8±1.2	4.1±0.8
合計	150.1	112.3	219.3	121.7	134.9	95.3	58.2

- : 検出せず

3. 結果及び考察

3.1 標準試薬の一括分析および成分の同定

分析に使用したフラボノイドの基本骨格を図1に、分析に用いたフラボノイドの構造を表1に示す。フラボノイドは大きくフラボンとフラバノンに分類され、3位にヒドロキシル基 (-OH)を持たないものがフラボン、2-3位のC=Cが

C-Cになったものがフラバノンである。

標準試薬により同定された成分を図2に示す。標準試薬の種類によっては、285nmに吸収波長を持たない成分もあることから、それらの成分に関しては285nm以外の吸収波長253nmおよび360nmで確認した。

標準試薬を用いた保持時間の比較により、29成分中でフ

表3 成長過程におけるフラボノイド含有量の変化(果汁)

		皮付き果汁					単位: mg/果汁100mL	
成分\摘果日	7/7	7/22	8/5	8/17	9/4	10/19	12/14	
ECR	3.5±1.1	1.4±0.1	2.2±0.3	1.3±0.3	2.2±0.5	1.8±0.4	1.1±0.3	
NRT	9.0±2.3	12.7±1.9	12.0±3.3	8.1±0.9	6.4±2.0	5.4±0.9	7.3±1.4	
NRG	13.8±4.8	3.2±0.2	4.4±0.9	1.4±0.5	1.5±0.5	1.0±0.2	1.8±0.1	
HSP	9.6±7.5	9.8±1.4	9.2±2.8	9.8±3.0	9.1±1.6	18.6±6.7	35.3±20.2	
SNT	4.2±1.1	5.2±1.4	5.1±1.1	3.4±0.4	3.0±0.3	2.2±0.1	1.5±0.4	
NOB	43.4±11.6	54.4±13.2	56.6±12.1	31.5±4.5	27.0±6.1	17.7±0.5	15.9±2.3	
TNG	14.0±2.6	13.2±3.5	13.5±3.4	6.9±1.0	6.6±1.7	3.9±0.2	3.2±0.2	
合計	97.5	99.9	103.1	62.5	55.8	50.7	66.0	

		皮なし果汁					単位: mg/果汁100mL	
成分\摘果日	7/7	7/22	8/5	8/17	9/4	10/19	12/14	
ECR	2.5±0.6	1.0±0.1	1.8±0.4	1.3±0.2	2.7±1.2	0.9±0.0	0.9±0.0	
NRT	5.4±0.7	8.5±1.0	12.3±0.9	5.8±1.9	6.1±2.4	2.5±0.1	4.8±0.4	
NRG	6.3±0.9	1.0±0.5	2.2±0.3	0.5±0.2	1.3±0.4	0.5±0.1	0.9±0.3	
HSP	4.8±2.6	7.3±0.6	9.2±3.7	13.2±4.8	10.6±4.8	12.6±6.1	20.0±0.5	
SNT	0.6±0.2	0.2±0.1	0.9±0.1	0.3±0.0	-	-	-	
NOB	5.4±1.1	3.2±0.0	4.3±1.0	2.3±0.6	1.3±0.4	0.8±0.1	0.9±0.2	
TNG	2.1±0.5	0.6±0.1	1.7±0.3	0.9±0.0	0.6±0.1	0.4±0.0	0.6±0.3	
合計	27.0	21.8	32.0	24.2	22.5	17.8	28.1	

- : 検出せず

ラバノンのECR, NRT, NRG, HSP, ポリメトキシフラボンのSNT, NOB, TNGの計7種を同定した。

3.2 成長過程におけるフラボノイド含有量の変化 (凍結乾燥物, 果汁)

生育過程における各種フラボノイドの含有量について、凍結乾燥粉末の丸ごと(ホール)および皮(ピール)の分析結果を表2に示す。また、丸ごと果汁(皮付き果汁)および果肉からの果汁(皮無し果汁)の分析結果を表3に示す。

本抽出条件では、7~8月にかけて摘果した未熟果の凍結乾燥粉末からは、HSPが最も多く抽出され(最大110mg/凍結乾燥物1g)、次いでNOB, TNG, NRTが多く抽出された。

生育過程の含有量の変化は、成長とともにフラボノイド成分は徐々に減少するという同様の傾向を示した。

一方、果汁については、HSPが9月4日以降に増加傾向を示した(原因は不明)が、7~8月をピークに凍結乾燥物粉末と同様にフラボノイドは果実の成長と共に減少する傾向を示した。

また、丸ごと果汁(皮付き果汁)と果肉からの果汁(皮無し果汁)を比べると、皮付き果汁のフラボノイド含有量が高った。特にNOB含有量が最も多く、7~8月の未熟果で100mL当たり50~60mg含まれていた。

このことから、フラボノイドは皮に多く含まれることが示唆された。

4. 結 言

青切り桜島小みかんに含まれる機能性成分についてフラボノイドを中心に調べた結果、7種類のフラボノイドが同定された。また、それらの成分について生育過程における含有量(経時変化)を定量した結果、7~8月にかけての未熟果がフラボノイドを多く含んでいることが明らかになった。

この結果から、7~8月の未熟果を利用すると、機能性成分の効果を生かした商品化が可能になると考えられる。

謝 辞

本研究は、(財)かごしま産業支援センター平成21年度研究開発助成金の支援を受けて行った。

また、フラボノイドの分析を行うに当たり、鹿児島大学農学部富永茂人教授および(独)農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点の尾崎嘉彦主任研究員(現、果樹研究所本所)にご指導いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 田中諭一郎: "日本柑橘図譜", 養賢堂(1946) p447-451
- 2) 野方洋一: 近畿中国四国農業研究センター研究報告第5号, 19-84(2005)