

県産農産品の機能性成分の調査研究

フクレミカンの機能性成分探索

坂井 祥平* 宇津野 典彦* 武田 文宣** 中川 力夫*

1. はじめに

カンキツ類のもつ生体調節機能（機能性）については、疫学研究を含めて既に多数の研究報告がある(1)。その中でも近年、カンキツ類の成分であるβ-クリプトキサンチン、ノビレチンやオーラプテンに発ガン抑制効果があることが明らかにされたことにより、カンキツが身近な機能性食品として認知されてきた。β-クリプトキサンチンは温州みかん、ノビレチンはシークワシャー、ボンカン、オーラプテンはカラタチなど、それぞれ既に経済栽培されている品種に比較的多く含まれていることが報告されており、機能性食品素材としてのカンキツに注目が集まっている(2)。

本県で昔から親しまれてきたカンキツにフクレミカン（福来みかん）がある。熟すと果皮が実と分離して、果皮が“ふくれ”て見えることからその名がついたといわれるこのカンキツは、古くは食用として、現在では、果皮を乾燥させて七味唐辛子の原料とするために一部地域で栽培されている。

地元では有名なフクレミカンも、多くのカンキツ中では地方品種の1つにすぎず、その機能性成分等についてこれまで詳細に検討されたことはなかった。そこで、フクレミカンの機能性食品素材としての可能性に着目し、フクレミカンに含まれているフラボノイド類を定量し、また ORAC 法により抗酸化性を評価したので報告する。

試料および実験方法

試薬類 ナリンジン（NRG）、エリオシトリン（ECR）、ネオエリオシトリン（NER）、ボンシリン（PON）、ノビレチン（NOB）、タンゲレチン（TNG）、ジオスミン（DSM）、ヘスペレチン（HPT）、ルテオリン（LTN）の HPLC スタンダード及びフルオロセインナトリウム塩、Trolox は Sigma-Aldrich 製を用いた。ナリルチン（NRT）、ネオジオスミン（NDM）、シネンセチン（SNT）、イソロイフォリン（IRF）、ロイフォリン（RFN）の HPLC スタンダードは Extrasynthese、ヘスペリジン（HSP）の HPLC スタンダード、HPLC 用メタノール及び 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ニ塩酸塩（AAPH）は和光純薬工業製を用いた。その他、記載のないものは全て特級試薬を用いた。

供試試料 フクレミカンの果実は、平成 19 年 11 月 13 日に桜川市で採集した。いずれの日程も同一の果

樹園の異なる 3 本以上の木からそれぞれ 3 個以上、合で 4 kg になるよう採取した。それぞれの果実は、収穫当日または貯蔵が終了した時点でナイフで粗く切って凍結乾燥（以下、FD）した。

FD 試料は果皮、じょうのう、じょうのう膜、種子に分別し、使用時まで-80℃で保存した。

貯蔵試験 貯蔵試験は貯蔵温度・日数を因子とし、採集日から 13 日間行った。すなわち、収穫した果実を 5℃、20℃に保った恒温器の中でそれぞれ 25 個程度、重ならないようにして貯蔵し、3 日ごとに 6 個または 7 個の果実を取り出して（3, 6, 9, 13 日）、HPLC 分析に供した。

抽出方法 フラボノイド定量用試料は、乳鉢で粉碎した FD 粉末 0.1g に対して、4mL の抽出溶媒を加えて 12 時間室温で回転振とうして抽出した。抽出溶媒の組成はメタノール：ジメチルスルホキシド=1：1（体積比）である。抽出後は遠心分離して上清を回収し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過して分析まで-80℃で保存した。

親水性 ORAC 測定用の試料は FD 粉末 0.1g に対して AWA を 4mL 加えて 12 時間回転振とうした。AWA はアセトン：蒸留水：酢酸=70：29.5：0.5（体積比）である。抽出後は遠心分離して上清を回収して分析まで-80℃で保存した。

HPLC 分析条件 フラボノイドの定量は野方の方法(3)により行った。すなわち、Agilent 1100HPLC システムを用い、フォトダイオードアレイで 200-450nm の吸収スペクトルを検出した。分離カラムはメルク製 LiChrospher100 RP-18(250mm×4.0mm)及びガードカラムを用いた。カラムオープン温度は 40℃とし、流速は 0.6ml/min、サンプルは 10 μL 注入した。分離は 0.01 M リン酸、メタノールの 2 液の 3 ステップによるグラジエントで、0.01M リン酸を(1)0-55 分 70-55% (2) 55-95 分 55-0% (3) 95-100 分 0%とそれぞれ線形的に変化させた。また 1 測定終了後は測定開始時の移動相組成で 15 分間流し、安定させる操作を行った。この 115 分を 1 サイクルとして、1 水準について 2 回測定を行った。

各スタンダードは 0.4mg/mL となるように抽出溶媒に溶解し、0.1mg/mL、0.05mg/mL 及び 0.025mg/mL となるように移動相によって希釈した。

溶出成分はリテンションタイム及び紫外可視吸収スペクトルをスタンダードと比較し同定した。定量は絶対検量線法により行った。

親水性ORAC法 親水性ORAC測定はグレーティングマイクロプレートリーダーSH-8000Labで行った。恒温器は37℃に設定し、一般的なORAC法の条件で測定を行った。すなわち、AAPHをペルオキシラジカル発生源としTroloxをスタンダードとするものである。

Trolox は 75mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で溶解し、50, 25, 12.5, 6.25 μ Mの各濃度となるよう用時調製した。分析試料もリン酸カリウム緩衝液で段階的に希釈した。また、フルオロセインナトリウム塩、AAPH は 75mM リン酸カリウム緩衝液で溶解し、それぞれ 81.6nM, 200mM となるよう用時調製した。

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 25 μ L のサンプルまたは Trolox 溶液またはブランク (リン酸カリウム緩衝液) を分注し、150 μ L のフルオロセインナトリウム塩溶液を加えた。

各ウェルに 25 μ L の AAPH を加えて攪拌したのち、直ちに蛍光強度を測定した。その後は各ウェル 60 秒ごとに蛍光強度を記録して、その減衰を観察した。

プレートリーダーのパラメーターは次のとおりである：測定法、カイネティック；励起波長、485nm；蛍光波長、528nm；半値幅、12nm；測定回数、40 回；測定間隔、60 秒；攪拌時間、9 秒間（初回のみ、直線）；分注間隔、1 秒

親水性 ORAC 値は試料濃度に対する蛍光強度の減衰曲線下面積 (netAUC) の回帰直線を用いて計算した。値はスタンダードとして用いる Trolox 相当量として得られ、その単位は μ molTE/g (TE：Trolox 相当量) である。netAUC は Trolox または試料の曲線下面積 AUC (Area Under the Curve) からブランクの AUC を減じて得た。

3. 実験結果および考察

フラボノイド組成について HPLC によるフクレミカンのフラボノイドの定量結果を表 1 に示した。ピークが小さく定量することが不適当であったものを除くと全部で 7 種類のフラボノイド類を同定することができた。4 つの部位ともに最も多く含まれているのは HSP であった。HSP はカンキツ類に含まれる代表的なフラバノンであり、表 2 に示した他の県産カンキツにも多く含まれている。

その他には果皮やじょうのう膜にフラバノンの NRT の含有量が比較的多かった。

そのなかでも、特徴的なのは果皮に含まれるポリメトキシフラボンの NOB, TNG で、これは他の県産カンキツと比べてもフクレミカンの果皮のみに特徴的に含まれている成分であることが明らかになった。

貯蔵による果汁中のフラボノイド含有量の変化について図 1, 2 に示した。5℃, 20℃ともに貯蔵により顕著な組成や量の変化は見られなかった。

NOB はシークワシャーやポンカンの果皮に大量に含まれていて、その機能性についても研究がすすんでいる。細胞試験や動物試験で優れた抗がん作用が示唆されており、利用が期待されているカンキツ機能性成分の一つである(2)。フクレミカン果皮にも NOB が多く含まれていることが明らかになったことで、今後は機能性食品素材として加工利用法を検討していく。

また、カンキツのフラボノイド類は果実の成熟過程において変化することが既に知られ、フラボノイド類が多く含まれる未成熟のカンキツ果実を加工原料として利用することが検討されている(4)。図 1, 2 で示した貯蔵試験の結果が示すとおり、貯蔵条件によりフラボノイド組成や量に大きな変化がなかったのは、試験に既に成熟した果実を使用したためだと思われる。今後は、未成熟の時期も含めて収穫時期と成分の関係を検討する必要がある。

表 1 フクレミカンの部位ごとのフラボノイド組成

	果皮	じょうのう	じょうのう膜	種
ECR	8.0	—	—	—
NER	3.3	—	4.5	—
NRT	5.0	—	48	—
HSP	400	65	320	10
SNT	4.8	—	—	—
NOB	56	—	—	—
TNG	56	—	—	—

(単位 mg/100g—乾燥重量)

表 2 県産カンキツのフラボノイド含有量

	フクレミカン	温州ミカン (宮川早生)	ユズ
ECR	2.9	1.4	—
NER	1.0	—	3.3
NRT	6.6	59	28
HSP	170	210	40
SNT	1.4	—	—
NOB	17	1.8	—
TNG	17	—	—

(単位 mg/100g—新鮮重量)

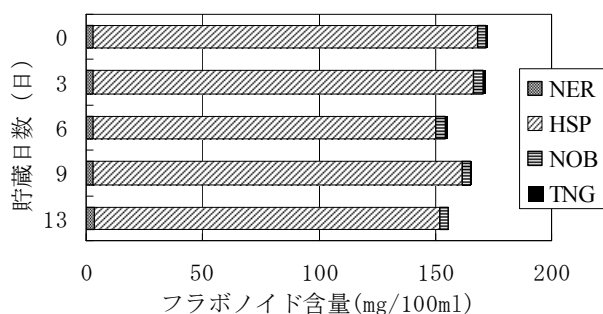


図 1 20℃で貯蔵した果実の果汁中のフラボノイド量の変化

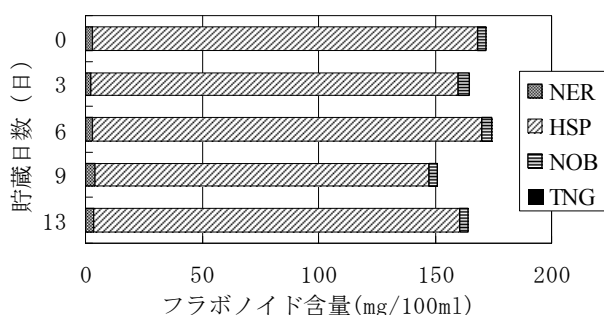


図 2 5℃で貯蔵した果実の果汁中のフラボノイド量の変化

フクレミカンの抗酸化性について 親水性 ORAC 法によるフクレミカンの分析結果は $30.5 \mu\text{molTE/g}$ —新鮮重量であった。部位ごとの測定結果を表 3 に示した。乾燥重量あたりでは ORAC 値は果皮で最も高く、次いでじょうのう膜で高かった。

表 3 フクレミカンの親水性 ORAC 値

部位	ORAC 値
果皮	320 ± 40
じょうのう	60.4 ± 20
じょうのう膜	170 ± 3.0
種	84.0 ± 17

(単位 $\mu\text{molTE/g}$ —乾燥重量)

一般のカンキツ類の抗酸化性については、文献によると、ネーブルオレンジの親水性 ORAC 値は 17.85 、タンジェリンは 16.13 、グレープフルーツは $15.13 \mu\text{molTE/g}$ —新鮮重量と報告されており (5)、これらと比較してもフクレミカンの親水性 ORAC 値はカンキツ類として高い部類に入るといえる。これはフクレミカンは果実が小さいことにより、単位重量当たりの果皮の占める割合が多く、結果として親水性 ORAC 値も高くなったためであると考えられる。

フクレミカンの果皮は現在でも陳皮に加工され、七味唐辛子の材料として用いられているが、今回の実験結果から果皮には有用なフラボノイド類が多く含まれ、また抗酸化性が高いことが明らかになったので、機能性食品素材として加工食品への新たな応用が期待できるものである。

謝辞 ORAC 法についてご教授くださいました食品機能性評価支援センターの皆様には感謝申し上げます。

参考文献

- (1) 食品の機能性分析. ㈱流通システム研究センター編. 2005. 144-151
- (2) 矢野昌充. カンキツによるガン予防. 日食工誌. 2002. 49. 139-144
- (3) 野方洋一. カンキツ果実の機能性成分の検索とそ

の有効利用に関する研究. 近中四農研報.

2005. 5. 19-84

- (4) 公開特許公報. ヘスペリジン高含有食品及びその製造方法. 特開 2005-27864
- (5) Xianli, Wu. ;Gray, R. B. ;Joanne, M. H. ;David, B. H. ;Suzan, E. G. ;Ronald, L. P. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in United States. *J. Agric. Food. Chem.* 2004, 52, 4026-4037