

3) カンキツ果実のフラバノン配糖体の分析

果樹研究所 小川 一紀

はじめに

カンキツは *Citrus* (ミカン) 属, *Fortunella* (キンカン) 属, *Poncirus* (カラタチ) 属の総称として使われる。ミカン属, キンカン属の果実は食用とされる他, 未熟果実あるいは成熟果実の果皮は, 枳実, 枳殻, 陳皮, 橘皮の名で古来より薬用として用いられている。カンキツ類は表 1 に示す様に多様な成分を含んでいる。この中でもフラ

バノン配糖体およびフラボ
ン配糖体を主とするフラボ
ノイド配糖体の含有量は高
い。フラバノン配糖体はア
グリコン部分として, ヘス
ペレチン, ナリンゲニン,
イソサクラネチン, エリオ
ジクチオール, 糖部分とし
てルチノースとネオヘスペ
リドースが知られており,

表 1 カンキツ類に含まれる成分

グループ名	具体的な成分名
カロテノイド	β -カロチン, β -クリプトキサンチンなど
フラボノイド	ヘスペリジン, ナリンジン, ノビレチンなど
クマリン	オーラブテンなど
リモノイド	リモニン, ノミリンなど
フェニルプロパノイド	クロロゲン酸など
アクリドン	
抗酸化ビタミン	アスコルビン酸, トコフェロール
テルペノイド	リモネンなどの精油, 植物ステロール
アミン, アミノ酸	シネフリン, 環状ペプチド
脂質	グリセログリセロールエステルなど
ペクチン	

これらの組み合わせから 8 種類の配糖体ができる。ネオヘスペリドースをもつフラバノン配糖体のナリンジンとネオヘスペリジンは苦味を有しており, グレープフルーツの苦みはナリンジンによる。このようにカンキツに含まれるフラバノン配糖体は食味に関係するフラボノイドであり, また後述する様に機能性も期待される成分であることから, 品種間差異や栽培条件が含有量におよぼす影響など, その評価は重要である。本項では高速液体クロマトグラフ法によるフラバノン配糖体分析方法を紹介する。

準備するもの

1. 装置

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置: 送液ポンプ (2 液グラジェントの可能な機種), デガッサー (あるいは背圧装置), オートサンプラー, カラム恒温槽, 紫外線検出器のぞましくはダイオードアレイ検出器, データ処理装置。
- ・カラム: オクタデシル基化学結合型シリカを充填した逆相系カラム (製品名に ODS あるいは C18 が含まれる場合が多い) を使用する。本分析例では YMC ODS-M80 を用いているが, 各社から販売されている標準的な製品であれば, 条件設定にさほど大きな差を生じないと考える。

- ・ホモジナイザー (ポリトロンなど)
- ・遠心分離器 (10000rpm, 1.5ml, 50ml のチューブが使用出来ると都合が良い)
- ・器具: 分液ろうと, メスフラスコなどのガラス器具
- ・凍結乾燥機

2. 試薬

- ・溶媒: 特級アセトン, 特級メタノール, 特級ジメチルスルホキシド (DMSO), 特級酢酸エチル, 特級エタノール, HPLC 用メタノール, HPLC 用アセトニトリル, 高純度精製水, 特級リン酸. これらの試薬類に関しては, 化学物質安全性データシート (MSDS) を参照し取扱には十分に配慮する.
- ・標品: 主要なフラバノン配糖体については市販品がある. これらの純度は, HPLC 分析用として保証されていない場合があることを考慮する必要がある.

3. 消耗品

- ・分析試料濾過用シリンジフィルター (ポアサイズ: 2.0 μ m). 細胞壁の破砕物を多く含む場合, 通常のフィルターではすぐ濾過不能になるので, 植物抽出液をそのまま濾過できるように特殊処理されたフィルターが市販されているのでそれを用いると良い.

プロトコール

1. 試料

試料として, 果汁, 生の試料, 乾燥試料など目的に応じて使い分ける.

- 1) 果汁試料: 果汁は, レモン搾り器や果汁搾り器, ミキサーなどで得る. この時不溶性成分を取り除くために超高速遠心機に付すと後の濾過処理がしやすい. この時沈殿物に目的とする成分が吸着されている場合もある. 沈殿物を DMSO あるいは DMSO/メタノール (1:1) 等で抽出し, 再抽出が必要かどうかを確認しておく必要がある.
- 2) 生試料: 果皮, じょうのう膜, 果肉を生状態で抽出する場合は, 適切な抽出溶媒を加えて十分にホモジネートし成分を抽出する. ホモジナイズ後, 不溶物を超遠心機にて可能な限り沈殿させ, 沈殿物を抽出液で洗った後, 合わせて試料の 10 倍程度の定容とする. ホモジナイズしたものをそのまま定容とし, 分析試料とする方法もある. 固形物が含まれるが通常大きな誤差にはならない.
- 3) 凍結乾燥試料: 試料の保存を考えると乾燥試料が便利である. また成分が微量な場合, 水分を除去できるので 10 倍程度の濃縮が行える. 加熱乾燥より凍結乾燥法の方が成分の分解が少ないので望ましい. 以下に例を示す. カンキツは, じょうのう膜 (内果皮) で包まれたままだと乾燥しにくいので, 全果をナイフで荒切りした後凍結乾燥を行う. 乾燥前に果皮を剥く操作は油室を破壊し, 精油に含まれ

る成分を失う可能性があるため、乾燥後、果皮と果肉と種子にわけ各々を細切する方がよい場合もある。乾燥試料の場合、乾燥状態によって分析値にばらつきが出る。秤量直前まで乾燥機、デシケーター中に保存しておくことが望ましい。また凍結乾燥では、減圧操作により果皮精油中の低沸点の成分が揮発することを考慮する必要がある。乾燥試料の一定量を精密に量るが、量り取る量が少ない場合、十分に粉末化した試料を用いないとサンプリングに偏りがでる可能性がある。抽出の方法は、生の試料に準ずる。

- 4) 加工品：ジャム、ゼリー、アメ、菓子類等の場合、水を加えホモジナイズ後定容とし、フィルター濾過を行い分析試料とする。凍結乾燥できる場合は、乾燥後抽出の方が成分の濃縮ができるので扱いやすい。糖が多い場合は、非極性の抽出溶媒で抽出すると糖が試料表面に析出し、分析対象成分の抽出効率が低くなる場合があるので注意する。
- 5) 抽出溶媒：配糖体は、一般的に水あるいは含水アルコールに易溶であるが、カンキツに含有されるヘスペリジンは水や含水アルコールに難溶性であるため、水系の溶媒ではなく、DMSO あるいは DMSO/メタノール (1:1) で抽出する。

2. 分析条件

カラム：YMC ODS-M80 (粒子径 4 μ m, 150mm \times 4mm i.d., ワイエムシィ社), 溶媒系：メタノール/20mM リン酸, 溶出液組成：最初の 5min 間メタノール濃度 20%, その後 45min 間で 20%から 45%まで直線的に組成を変化させる。溶媒組成、濃度勾配等はカラムの種類によっては若干の修正が必要となる場合がある。カラム温度：40 $^{\circ}$ C, 注入量：5.0 μ l, 流量：1.2ml, 検出：UV 波長 286nm. 定量法：絶対検量線法で定量を行う。あらかじめ試料に予測される最高濃度と何段階かに希釈した濃度の標準液を作成し、直線性を確認しておく。通常は原点を通過する。フラボノイドなどフェノール基を持つ物質の分析の場合、解離を抑えるために溶出液を酸性条件とする。リン酸緩衝液を用いる場合が多いが、リン酸酸性でも問題のない分離を得ることが出来る。フラバノン₂は、2S 体として生合成されるが、生成後自然にあるいは加工処理によりラセミ化し 2R 体と 2S 体の混合物となる。特に 4'位が遊離の水酸基である場合ラセミ化しやすい。糖が結合しているためジアステレオマーとなるが、通常のカラムでは分離はしない。溶出液で用いるリン酸溶液は、微生物の繁殖を起こしやすいので毎日交換することが望ましい。また、フラボノイドの種類、共存する成分との分離状態、カラムの種類によっては、溶媒系をメタノールからアセトニトリルに変えると分離等が良好になる場合もある。なお、アセトニトリルは溶出力が強いので、アセトニトリルの組成比を下げる必要がある。

プロトコールのポイント

1. 水で抽出する場合は、微生物の繁殖に注意が必要である。抽出後は凍結しておき用時解凍し分析すると良いだろう。またオートサンプラーは冷却機能のあるものが望ましい。
2. 抽出溶媒にメタノール/ジメチルスルホキシド (1:1) で抽出すると、配糖体からアグリコンまで抽出可能である。本溶媒の場合、HPLC 装置への試料注入量が多いとピーク形状が分裂したりブロードになったりするの、注意が必要である。
3. 内部標準法は、複雑な成分組成に重ならない物質を選ぶのが困難な場合もあり、また抽出方法も単純なため、取り入れる必要はないであろう。
4. カンキツの場合、特にじょうのう膜にはペクチンが多く含まれるので、水を加えてホモジナイズするとゲル状になり、かなり希釈しないと濾過ができない。じょうのう膜のフラバノン含有量は多いことから分析上の問題はないと思われる。
5. 分析方法の妥当性は、変動係数 $CV(\%) = (\text{標準偏差}/\text{平均}) \times 100$ で判断する。CV 値がどの程度なら実験の精密さ(ばらつき, 精度)が確保できているかは目的による。同一サンプルを同じ装置で繰り返し測定した際の CV 値は通常数%以下であるが、数値が大きい場合は装置に問題がある。オートサンプラーの不具合(吸引部の異常, ニードルの先端がサンプル瓶の底にあっているなど), サンプル瓶中の溶液の不均一(凍結サンプルを解凍した場合)などが考えられる。同一試料から複数回抽出した分析試料の CV 値が大きい場合は、多くの場合抽出方法に問題があると考えられる。植物成分の場合、組織中からの抽出になるため、残渣を何回か抽出しないと完全に抽出されない可能性がある。複雑な植物成分の分析では、共存成分が種ごとに異なる可能性があり、妨害ピークとして対象ピークと重なる可能性もあるので、純度確認のためにフォトダイオードアレイ検出器で標準品のスペクトルと比較することが望ましい。

正確さ(真の値からのずれ, 真度)の評価は難しいが、精密さが良い分析であれば、迅速分析, 管理分析として利用価値がある。

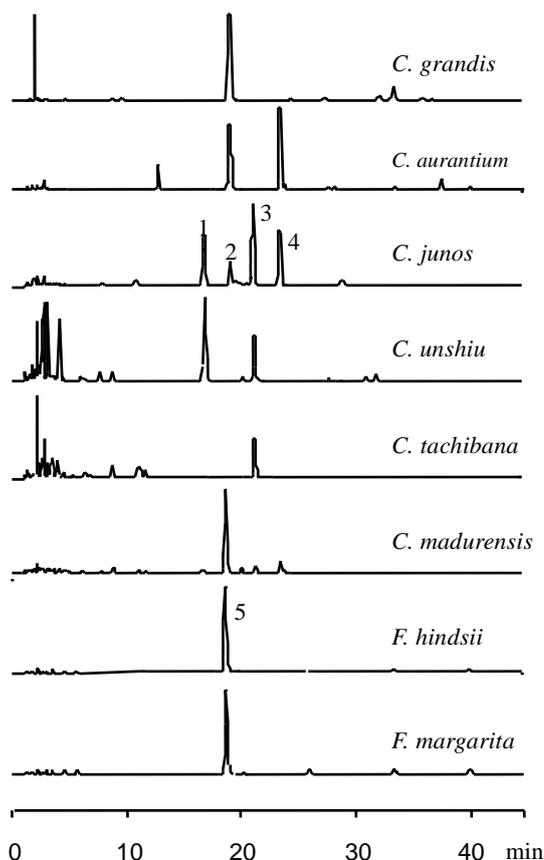


図1 カンキツフラバノン配糖体の分離例
1, ナリルチン; 2, ナリンジン; 3, ヘスペリジン;
4, ネオヘスペリジン; 5, 3',5'-ジ-C-グルコピラ
ノシルフロレチン。

多くの植物成分の分析は、これにあたるといえる。フラボノイドやカロテノイドなどの植物成分の分析では、栽培法や栽培地、収穫時期などによって異なるだけでなく、分析方法の正確さが異なることも含まれている可能性もあるので、他のデータと数値を比較する際には注意が必要である。

分析例

カンキツ中のフラバノン配糖体を分析し、キンカン属とキンカン属とミカン属の雑種と考えられる *C. madurensis* (シキキツ) がミカン属と異なるフラボノイド組成を持つことを明らかにした例を示す¹⁾。ミカン属は図 1 に示すように、ナリンジンを含む *C. grandis* (ブンタン)、ナリンジン、ネオヘスペリジンを含む *C. aurantium* (サワーオレンジ)、4 種をすべて含む *C. junos* (ユズ)、ナリルチンとヘスペリジンを含む *C. unshiu* (ウンシュウミカン)、ヘスペリジンを含む *C. tachibana* (タチバナ) の 5 つのパターンに分けられる。キンカンにはナリルチンが含まれるとする報告が多かったが、ピーク 5 は 3',5'-ジ-C-グルコピラノシルフロレチンであり、キンカン属はミカン属に含まれるフラバノン配糖体を含まないことを示している。また、シキキツは、3',5'-ジ-C-グルコピラノシルフロレチンを含み、同時にフラバノン配糖体も含むことから、ミカン属とキンカン属の雑種である可能性を植物化学分類学的に示している。

おわりに

毎日果物 200 グラム運動や 5-A-Day 運動は、果実は健康維持に重要であり積極的に食べることを推奨している。多くの疫学研究で、果物の摂取量と心臓病・脳卒中の罹患率に負の関連があることが示されているからである^{2,3,4)}。血管の病変が関係する疾病の要因の一つとして、LDL-コレステロールの増加があげられる。カンキツ果汁の摂取と生化学指標の改善との関係に関する研究で、グレープフルーツあるいはオレンジジュースを高コレステロール血症ウサギに与えると、血清中の LDL-コレステロールおよび肝コレステロール濃度が低下することが示されていること⁵⁾、またコレステロール投与ラットにおいて、血清中のコレステロールの減少や、コレステロール合成系酵素の活性が低下していることが示されている⁶⁾。ヒトでのオレンジジュース摂取試験では、HDL-コレステロールの増加作用が認められている⁷⁾。カンキツ中のどの様な成分が、このような効果に結びついているのか興味あることであるが、フラバノン配糖体の含有量が高いことから、その作用について研究が行われており、たとえば、肝細胞を用いた実験において、ヘスペリジンやナリンジンのアグリコンであるヘスペレチンおよびナリンゲニンはコレステロール合成系を抑制することが知られている⁸⁾。このようにカンキツに含まれるフラバノン配糖体は、健康機能性と大きく関わると考えられ、それらの含有量は重要な評価項目である。フラバノン配糖体の分布と含量は、

カンキツ類の品種・系統間で大きな違いがある。田中長三郎は形態学的な特徴から *Citrus* 属をいくつかのグループに分けているが⁹⁾、この分類とフラバノン配糖体の分布はよく一致していることから、由来不明な地方品種のフラバノン配糖体の分布や含有量による類縁関係の推定にも応用可能である。田中長三郎の分類をもとに、田中諭一郎は、日本産あるいは導入されたカンキツを詳しい記載とともに図譜としているので参考にされたい¹⁰⁾。

参考文献

- 1) Ogawa, K., Kawasaki, A., Omura, M., Yoshida, T., Ikoma, Y. and Yano, M., 3',5'-Di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, **57**,737-742 (2001).
- 2) Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S. and Dallongeville, J., Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *J. Nutr.*, **136**, 2588-2593 (2006).
- 3) Dauchet, L., Amouyel, P. and Dallongeville, J., Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Neurology*, **65**, 1193-1197 (2005).
- 4) He, F.J., Nowson, C.A. and MacGregor, G.A., Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet*, **367**, 320-326 (2006).
- 5) Kurowska, E.M., Borradaile, N.M., Spence, J.D. and Carroll, K.K., Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr. Res.*, **20**, 121-129 (2000).
- 6) Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S. and Choi M.S., Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.*, **129**, 1182-1185 (1999).
- 7) Kurowska, E.M., Spence, J.D., Jordan, J., Wetmore, S., Freeman, D.J., Piché, L.A. and Serratore, P., HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1095-1100 (2000).
- 8) Borradaile, N.M., Carroll, K.K. and Kurowska, E.M., Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, **34**, 591-598 (1999).
- 9) Tanaka, T. Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture Series B Agriculture and Biology*, **21**, 139-145 (1946).
- 10) 田中諭一郎, 「日本柑橘図譜」, (養賢堂, 東京), 上(1946), 下(1948), 続(1980).

2) カンキツのクマリン・ポリメトキシフラボノイド分析

(独) 農研機構 果樹研究所 小川 一紀

はじめに

カンキツ類 (*Citrus* 属, *Fortunella* 属, *Poncirus* 属) は多様な成分を含んでおり、しかもいずれの成分も含量が高いことから、普段の食生活での摂取と健康への寄与に関心が持たれている。また、カンキツ類の未熟果実あるいは成熟果実の果皮は、古来より薬用として用いられている。たとえば枳実、陳皮、橘皮などがその例である。カンキツ類に含まれる主要成分として、ヘスペリジンやナリンジン等のフラバノン配糖体の他に、注目される成分としてクマリン類、ポリメトキシフラボン類があげられる。カンキツ類の果皮には、油室があり精油とともにクマリン類が存在している。単純クマリン骨格を持つオーラプテン、フロクマリン (フラノクマリン) 骨格をもつベルガプテン、ベルガモチンなどが代表的な成分である。クマリン類は、主にブンタン (*Citrus grandis*) やその雑種と考えられるグレープフルーツ (*C. paradisi*)、ハッサク (*C. hassaku*) などに含まれている。クマリン類と同時に分析可能な成分として、ポリメトキシフラボノイドがある。ノビレチンとタンゲレチンが主となる成分であるが、水酸基、メトキシ基の置換様式が異なる類縁体が存在している。ポンカン (*C. reticulata*)、ウンシュウミカン (*C. unshiu*)、オレンジ (*C. aurantium*) などに含まれている。

オーラプテンやノビレチンに関しては、発がん抑制作用、抗炎症作用が試験管内試験、動物試験で明らかになっている^{1,2,3)}。フロクマリン、特に 6',7'-ジヒドロキシベルガモチンは、薬物代謝酵素阻害作用を有することから注視されている⁴⁾。カンキツ類に含まれるこれらの成分の含量は、重要な分析項目であるが、カンキツ類の品種・系統間で大きな違いがあり、カンキツ類としてひとくくりに扱うことはできない。これらの成分の高速液体クロマトグラフ法による分析方法を紹介する。

準備するもの

1. 装置

- 1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置：送液ポンプ (2 液グラジェントの可能な機種)、デガッサー、オートサンプラー、カラム恒温槽、紫外線検出器のぞましくはフォトダイオードアレイ検出器、データ処理装置。
- 2) カラム：オクタデシル基化学結合型シリカを充填した逆相系カラム (製品名に ODS あるいは C18 が含まれる場合が多い) を使用する。本分析例では YMC 社製を用いているが、各社から販売されている標準的な製品でも、条件設定にさほ

ど大きな差を生じないと考える。

- 3) ホモジナイザー (ポリトロンなど)
- 4) 遠心分離器 (10000rpm, 15ml, 50ml のポリプロピレン性遠沈チューブが使用出来ると都合が良い)
- 5) 器具: メスシリンダー, メスフラスコなどのガラス器具
- 6) 凍結乾燥機

2. 試薬

- 1) 溶媒: 特級エタノール, 特級ジメチルスルホキシド, HPLC 用メタノール, HPLC 用アセトニトリル, 高純度精製水, 特級リン酸。
- 2) 標準品: カンキツ類に含まれるクマリン類として市販されているものは限られる。オーラプテンは市販されていない。フロクマリン類では, ベルガモチン, ベルガトール, ベルガモッチンなどが市販されているが, 6,7-ジヒドロキシベルガモチンは市販されていない。ポリメトキシフラボノイド類については, ノビレチン, タンゲレチンは市販品があるがナツダイダイの市販品はないようである。市販されていない成分の場合, 自ら標品の調製を行うか, 標品の恵与を受ける必要がある。これらの標品の純度は, 保証されていない場合があることを考慮する必要がある。

3. 消耗品

- 1) ディスポーザブルのプラスチックシリンジ。
- 2) 分析試料濾過用シリンジフィルター (ポアサイズ: 2.0 μ m)。細胞壁の破砕物を多く含む場合, 通常のフィルターではすぐ濾過不能になるので, 抽出液をそのまま濾過できるように特殊処理されたフィルターがワットマン社等から市販されている。

プロトコール

1. 分析試料調整

- 1) 生試料: すぐに分析できないときは, あらかじめ分析する部位 (じょうのう, 砂じょう, 砂じょうのみ, じょうのう膜のみ, アルベド, フラベドなど) を分けて凍結保存しておく。ホモジナイズし, プラスチックバッグに入れて凍結保存しておいても良い。あるいは, 液体窒素中で乳鉢・乳棒で粉碎し冷凍保存しておく。試料中の成分が分解しやすい時は, 液体窒素中での処理が良いであろう。凍結試料は, 解凍し, よく混和した後, 約 1~2g を精密に測り, 50mL のポリエチレンチューブあるいは腰高ビーカーなどにとる。等量のエタノールを加えホモジナイズする (いきなり多量のエタノールを加えないのは, 糖などの水溶性成分の急な析出により, 非極性成分の組織からの抽出が妨げられ, 抽出量が減るからであ

る)。さらに、エタノールを総量が 9mL になる様に 2 回に分けて、加えながらホモジナイズする。場合によっては加温，超音波処理を組み合わせる。メスフラスコ (10mL) に移し，エタノールにて 10mL の定容とする (細胞膜等の不溶性物質が混ざっているため，溶液としての体積ではないが，影響はほとんどない)。アセトニトリルを用いて抽出すると，糖類やペクチンがホモジナイザーのジェネレーターに附着し厄介である。ジメチルスルホキシド/メタノール (1:1) で抽出すると⁵⁾，フラバノン配糖体も同時に抽出可能である。抽出液は，PTFE フィルター (0.2 μ m) を通し，HPLC 用試料とする。この時，最初の 1mL ほどは，HPLC サンプルびんに取らず捨て，それ以降の濾過液を入れる方が望ましい場合もある (フィルター表面に吸着される成分がある可能性もあるため)。本方法は成分含量が低いため，超高速 HPLC 分析法などによる高感度化が必要となる場合もある。

- 2) 乾燥試料：生試料を凍結乾燥する方法がよい。じょうのうをそのまま乾燥すると，じょうのう膜のため，長時間かけても水分が揮散しにくい。あらかじめ液体窒素中で粉砕してから凍結乾燥すると乾燥が早く進む。加熱乾燥は，成分の分解等を起こす場合もある。また，常温での風乾も，組織の崩壊に伴う細胞内からの酵素の漏出により，成分によっては分解を起こす場合がある。乾燥試料は，吸湿によって重量が大きく変動するので，乾燥デシケータ中で保存するなど，注意を払う必要がある。乾燥試料は，水分を失う分濃縮されるため，生試料に比べ 10 倍程度検出量を高めることができるので，生試料の 1/10 程度の秤量で良いが，あまり少ないとサンプリング時の偏りがでる。多めに秤量し，最終段階で適宜希釈を行う。乾燥試料の場合も数回に分けてエタノールを加えながらホモジナイズするが，最初の抽出は，含水エタノールで行う方が非極性成分の抽出効率が高い。以降の操作は，生試料に準ずる。

2. HPLC 分析条件

標準的な ODS カラムを使用した分析条件を示す。カラムは，特に指定したものでなくとも，若干の溶媒系の変更 (初期濃度，濃度勾配) で分析可能と考える。

1) 分析条件

カラム：YMC J'sphere ODS-M80 (150mm x 3.0mm i.d., 3 μ m, 8nm)。溶媒系：A：20mM H₃PO₄；B，アセトニトリル。濃度勾配：B 液，30%で 2min 間流した後，18 min で 70%まで直線勾配で増加。流量：1.2mL/min。カラム温度：40°C。検出波長：254, 310, 330nm，注入量：5.0 μ L。

- 2) ピークの同定：クマリン類，ポリメトキシフラボノイドは，単一の条件だけでは分離分析が困難な場合がある。フォトダイオードアレイ検出器であれば，各ピー

クのオンラインスペクトルを確認し、同定をより確実にする。ピークの重なりが考えられる場合は、カラム、溶媒（アセトニトリルをメタノールに変更するなど）を変更し、複数の条件で分析することが必要になる場合がある。図 1 は、上記の分析条件での、標準試料、かんきつ中間母本農 6 号果皮およびマーシュグレープフルーツ果皮のクロマトグラムである。

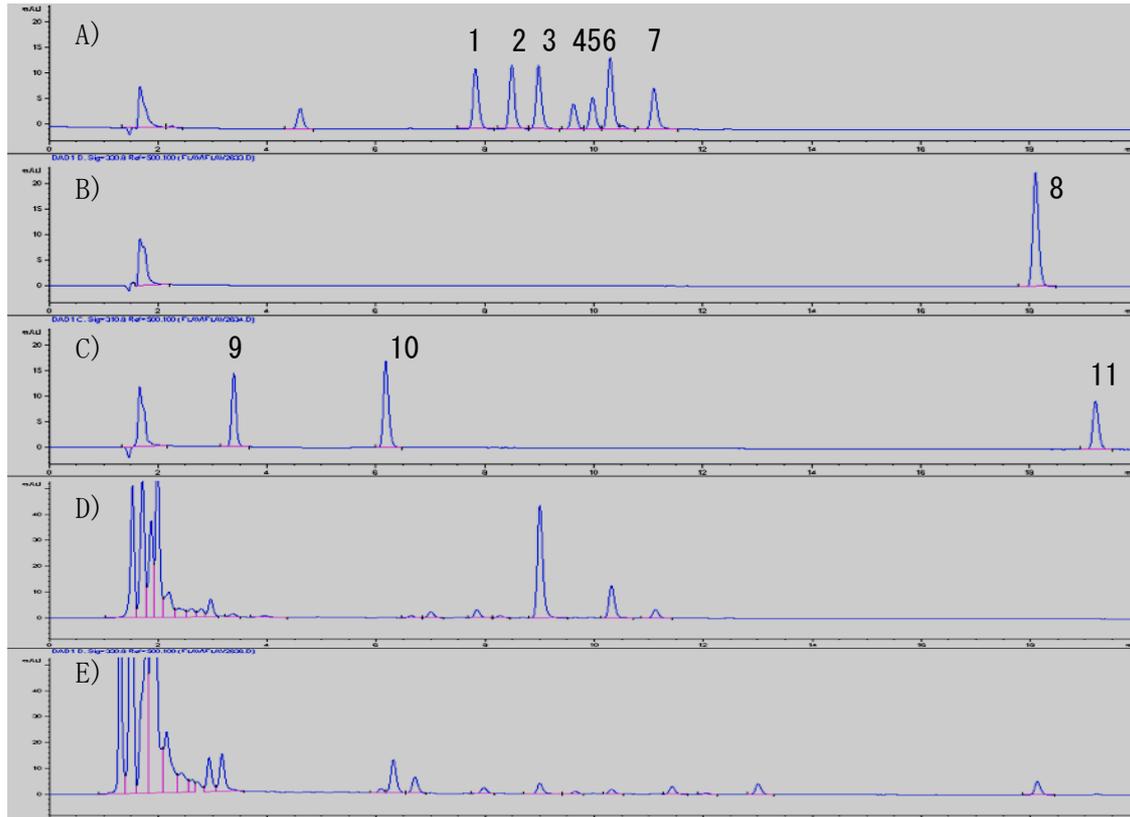


図 1. 標準試料、カンキツ中間母本農 6 号およびマーシュグレープフルーツの分析例。

A) ポリメトキシフラボノイド. 1, sinennctin; 2, acacetin; 3, nobiletin; 4, heptamethoxyflavone; 5, natsudaidain; 6, tangeretin; 7, 5-dmetylnobiletin. B) クマリン類. 8, auraptin. C) フロクマリン類. 9, bergaptol; 10, bergapten; 11, bergamottin. D) かんきつ中間母本農 6 号果皮. E) マーシュグレープフルーツ果皮.

プロトコールのポイント

1. 抽出溶媒の極性が、溶出溶媒の初期値より低い場合、HPLC 装置への試料注入量が多いとピーク形状が分裂したりブロードになったりするので、注意が必要である。なお、溶媒の毒性等取扱に注意を払う。
2. 内部標準法は、複雑な成分組成をもつ場合、溶出時間が重ならない物質を選ぶの

が困難であり、また抽出方法も単純なため、取り入れる必要はないと考える。

3. クマリン類、ポリメトキシフラボノイドは精油中にも含まれている。果皮が容易に剥けるカンキツ類ではあまり問題にならないが、剥きにくい場合には果皮表面の油細胞がつぶれて精油が飛び散る。カッターで粗く切って、ていねいに部位ごとに分けてから、溶媒抽出をした方が良い場合もある。凍結乾燥を行うと精油も揮散するので含量を多めに見積もる可能性がある。アルベド（白い部分）の薄い果皮をもつカンキツでは、レモン絞り器で搾汁する場合、アルベド側からも精油がかなり混入する。
4. 分析方法の妥当性は、変動係数 $CV(\%) = (\text{標準偏差}/\text{平均}) \times 100$ で判断する。CV 値がどの程度なら実験の精密さ（ばらつき、精度）が確保できているかは目的による。同一サンプルを同じ装置で繰り返し測定した際の CV 値は通常数%以下であるが、数値が大きい場合は装置に問題がある。オートサンプラーの不具合（吸引部の異常、ニードルの先端がサンプル瓶の底にあたっているなど）、サンプル瓶中の溶液の不均一や成分の析出（凍結サンプルを解凍した場合）などが考えられる。同一試料から複数回抽出した分析試料の CV 値が大きい場合は、多くの場合抽出方法に問題があると考えられる。植物成分の場合、組織中からの抽出になるため、試料をいかに細かくするかが重要であるが、上述のように精油を失うことは、分析対象の成分も失う可能性があるので注意を要する。残渣を何回か抽出しないと完全に抽出されないが、合わせた抽出液により濃度が薄まる可能性があるため、濃縮等の操作が必要になる場合がある。
5. 複雑な植物成分の分析では、共存成分が種ごとに異なる可能性があり、妨害ピークとして対象ピークと重なる可能性もあるので、純度確認のためにフォトダイオードアレイ検出器で標準品のスペクトルと比較することが望ましい。植物成分の分析の場合、正確さ（真の値からのずれ、真度）の評価は難しいが、精密さが良い分析であれば、迅速分析、管理分析として利用価値がある。多くの植物成分の分析は、これにあたるといえる。

おわりに

毎日果物 200 グラム運動や米国の Fruit & Veggie More Matters 運動は、果実は健康維持に重要であり積極的に食べることを推奨している。多くの疫学研究で、果物の摂取量と心臓病・脳卒中の罹患率に負の関連があることが示されている^{6,7)}。カンキツ中のどの様な成分が、このような効果に結びついているのか興味あることである。田中長三郎⁸⁾は形態学的な特徴から *Citrus* 属をいくつかのグループ分けているが、この分類とクマリン類、ポリメトキシフラボノイドの分布はよく一致していることから、由来不明な地方品種のこれら成分の含有量による類縁関係の推定にも応用可能である。

田中諭一郎は、田中長三郎の分類をもとに、日本産あるいは導入されたカンキツを詳しい記載とともに図譜としているので参考にされたい⁹⁾。

参考文献

- 1) Middleton, E.Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C., The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-751 (2000).
- 2) 十一元晴, カンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究, 薬学雑誌, **125**, 231-254 (2005).
- 3) Benavente-Garica, O. and Castillo, J., Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J.Agric.Food Chem.*, **56**, 6185-6205 (2008).
- 4) Guo, L.-Q., Fukuda, K. Ohta, T. and Yamazoe, Y., Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 766-771 (2000).
- 5) Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M. and Hasegawa, S., High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiode array detector. *J. Chromatogr. A.*, **667**, 59-66 (1994).
- 6) Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S. and Dallongeville, J., Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies. *J. Nutr.*, **136**, 2588-2593 (2006).
- 7) He, F. J., Nowson, C. A. and MacGregor, G. A., Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet*, **367**, 320-326 (2006).
- 8) Tanaka, T., Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B*, **21**, 139-145 (1969).
- 9) 田中諭一郎, 「日本柑橘図譜」, (養賢堂, 東京), 上(1946), 下(1948), 続(1980).