

## 橘の機能性成分の調査研究（第1報）

岡本 雄二<sup>\*1)</sup>, 首藤 明子<sup>\*2)</sup>, 清水 浩美<sup>\*2)</sup>

### Research of a Functionality Ingredient of Tachibana (1<sup>st</sup> Report)

OKAMOTO Yuji <sup>\*1)</sup>, SHUTO Akiko <sup>\*2)</sup>, SHIMIZU Hiromi <sup>\*2)</sup>

橘を利用した機能性食品の開発を目標に、橘に含まれる機能性成分の分析を行った。

フラボノイド類の分析結果から、橘にはウンシュウミカンの20倍以上のノビレチン及びタンゲレチンが含まれていることがわかった。これらの成分は主に果皮部に含まれており、6月の青果の含有量が高いことがわかった。一方、果皮の香り成分の主成分はD-リモネンであった。また、 $\beta$ -ピネン、 $\beta$ -フェランドレン、 $\gamma$ -テルピネン、 $\beta$ -オシメンなどのモノテルペン類及びリナロールの値が高く、これらの合計で80%以上の値となった。葉の香り成分は季節により構成比が異なっており、6月に採取した葉は $\beta$ -ピネン、3-カレン、リナロールで75%以上を占めていた。一方、9月と12月に採取した葉は $\beta$ -フェランドレン、 $\gamma$ -テルピネン、リナロール、ピペリトンの値が高かった。

#### 1. 緒言

近年、健康志向を背景に食品のもつ生体調整機能（機能性）への関心が高まっている。カンキツ類は身近な機能性食品として知られ、発がん抑制作用や生活習慣病との関連など様々な研究が進められている<sup>1)2)</sup>。

橘は別名ヤマトタチバナとも呼ばれ、日本に多くあるカンキツ類の中でも、沖縄のシークワサーと橘だけが日本原産種であることが遺伝子分析により判明している<sup>3)</sup>。また橘は、垂仁天皇が田道間守に不老不死の薬を持ってくるようにと命じた伝説の果物で、日本書紀などに登場する奈良県に縁のある植物である。しかし、経済栽培がないこと、生産性がきわめて低いことなどから、機能性成分の研究はあまりなされていない。

そこで本研究では、橘を利用した機能性食品の開発を目標に、機能性成分の分析を行ったので報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 供試試料

試料の橘果実及び葉は、平成26年度は奈良県河合町または明日香村で採取したものを、平成27年度は大和郡山市で採取したものをを用いた。

また、試料の一部は水洗いし、自然乾燥した後、日本真空技術製の凍結真空乾燥機(DF-01H)を用いて凍結乾燥(以下、FDと記す。)した。FD試料は、粉砕器を用いて粉砕し、ふるいで0.5mm以下に粒径をそろえ、使用時まで冷凍保存した。

##### 2.2 栄養成分分析

無機成分は、サーモエレクトロン社製IRIS Intrepid II XDLを使用し、プラズマ発光分析法により求め、その他の一般成分は常法により求めた。

また分析は、成熟果(全体)、外皮及び実部分(種子含む)の部位別に行った他、9月に採取した青果(全体)についても分析を行った。

##### 2.3 抗酸化能の検討

抗酸化能は、須田ら<sup>4)</sup>の方法に準じ、DPPHラジカル消去能を測定し、Trolox相当量として算出した。

分析試料は、各FD試料0.2gに抽出溶媒(80%エタノール)10mLを加え一晩室温で回転浸透した後、遠心分離(10,000rpm×10min)した上澄みを適宜希釈し用いた。

また、対象としてウンシュウミカンの成熟果についても同様の方法で測定を行った。

##### 2.4 ノビレチン及びタンゲレチンの分析

ノビレチン(以下、NOBと記す。)及びタンゲレチン(以下、TNGと記す。)の分析は、大野ら<sup>5)</sup>の方法を一部改変し行った。すなわち、FD試料0.1gに抽出溶媒(メタノール:ジメチルスルホキシド=1:1)5mLを加え、5分間超音波処理し1時間放置した後、遠心分離

(3,500rpm×15min)し、上澄みを回収した。さらに、沈殿物に抽出溶媒1mLを加えてボルティックスミキサーで混合後、遠心分離(3,500rpm×10min)し、上澄みを回収する操作を2回繰り返した。上記の上澄みを合わせた抽出液を0.2 $\mu$ mのメンブランフィルター(DISMIC-25JP)でろ過した後、抽出溶媒で7mLに定容し、分析試料とした。なお、分析試料は1試料あたり3検体とした。分析試料の定量は島津製作所製の高速液体クロマトグラフ(以下、HPLCと記す。)を用い、分析条件は表1のとおりとした。NOB及びTNGのスタンダードは和光純薬工業製を用いた。

\*1) リビングサイエンス先導的研究開発グループ \*2) バイオ・食品グループ

表 1 NOB 及び TNG の分析条件

カラム	Symmetry C18, 3.5 $\mu$ m, 2.1mm $\times$ 150mm
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流速	0.2 mL/min
試料注入量	10 $\mu$ L
移動相	蒸留水:アセトニトリル=6:4
検出器	UV-VIS検出器(360nm)
同定	リテンションタイム及びスペクトル
定量	絶対検量線法

## 2.5 ヘスペリジンの分析

ヘスペリジン (以下, HSP と記す.) の分析は, 大野ら<sup>9)</sup>の方法を一部改変し行った. 分析試料の抽出は「2.4 ノビレチン及びタンゲレチンの分析」と同様である. HPLC の分析条件は表 2 のとおりとした. HSP のスタンダードは和光純薬工業製を用いた.

表 2 HSP の分析条件

カラム	YMC-Pack C18, S-5, 4.6mm $\times$ 150mm
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流速	0.6 mL/min
試料注入量	10 $\mu$ L
移動相	10mMリン酸:アセトニトリル=8:2
検出器	UV-VIS検出器(285nm)
同定	リテンションタイム及びスペクトル
定量	絶対検量線法

## 2.6 香気成分の分析

香気成分の定性分析は, 大野ら<sup>7)</sup>の方法を一部改変し行った. すなわち, 各試料 0.1g をサンプル瓶に精秤し, 島津製作所製のガスクロマトグラフ質量分析計 (以下, GC/MS と記す.) を用い, ヘッドスペースガス中の成分について定性分析した. 分析条件は表 3 のとおりとした. 得られた Total Ion Chromatogram (以下, TIC と記す.) についてリテンションタイム及び MS スペクトルの比較により同定を行った.

表 3 香気成分の定性分析条件

カラム	HP-INNOWAX, 60m $\times$ 0.25mmID,0.25 $\mu$ m
カラム流量	Helium,0.62mL/min
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
注入モード	スプリット(スプリット比 1/5)
注入量	2mL
昇温条件	35 $^{\circ}$ C(5min) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$ C(5min)
イオン化法	EI
イオン源温	200 $^{\circ}$ C
イオン化電圧	70eV
スキャン質量範囲	50-500m/z
スキャン速度	1666

## 2.7 精油の分析

橘の成熟果実, 成熟果皮及び葉から精油の抽出を行い, その香気成分について定量分析を行った. 精油の抽出は, 東京製作所製ハーブオイルメーカー(スタンダードタイプ)を用いて水蒸気蒸留法にて行った.

精油の分析は, GC/MS を用い, 液体注入法により行った. 精油をエタノールで 1000 倍希釈した試料 0.8mL と内部標

準物質 (1-Dodecanol) 0.8mL をサンプル瓶に入れ, 分析条件は表 4 のとおりとした. また, SIM モードを利用し, 内部標準検量線法により定量分析を行った. スタンダードは  $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -Pinene, Linalool は和光純薬工業製を,  $\gamma$ -Terpinen, 1-Dodecanol は東京化成工業製を, Limonene については信和化工製の Limonene in Ethanol 1% (w/v) を用いた.

表 4 精油の定量分析条件

カラム	HP-INNOWAX, 60m $\times$ 0.25mmID,0.25 $\mu$ m
カラム流量	Helium,0.58mL/min
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
注入モード	スプリット(スプリット比 1/20)
注入量	1 $\mu$ L
昇温条件	50 $^{\circ}$ C(5min) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$ C(5min)
イオン化法	EI
イオン源温	200 $^{\circ}$ C
イオン化電圧	70eV

## 3. 結果及び考察

### 3.1 栄養成分

栄養成分の分析結果を表 5 に示す. H26 成熟果の外皮と実部分を比べると, 無機成分の多くは外皮に多く, 特にカルシウムの差に大きな差異が認められた. 外皮の無機成分はカリウムが最も多く, 以下カルシウム, マグネシウム, リンの順であった. H27 成熟果と H27 青果を比べると, 青果の脂質が成熟果に比べ高く, 無機成分も青果のほうが全体的に多く含まれていた. これは試料 100g あたりに含まれる外皮の割合が青果のほうが多いためと思われる.

表 5 橘果実の栄養成分

		各100gあたり				
		H27成熟果 全体	H27青果 全体	H26成熟果		
		全体	外皮	実部分		
エネルギー (kcal)		63	69	69	77	56
水分 (g)		82.9	81.6	80.5	78.1	84.1
たんぱく質 (g)		1.4	1.7	1.6	1.9	2.0
脂質 (g)		0.9	1.4	0.6	0.5	0.4
炭水化物 (g)		14.1	14.4	16.4	18.4	12.8
灰分 (g)		0.7	0.9	0.9	1.1	0.7
無機成分 (ミネラル)	Na (mg)	10	10	6	12	11
	K (mg)	100	130	180	200	150
	Ca (mg)	60	110	110	160	56
	Mg (mg)	14	27	28	34	21
	P (mg)	19	26	29	21	28
	Fe (mg)	0.4	0.6	0.5	0.7	0.4
	Zn (mg)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
	Cu (mg)	0.03	0.07	0.08	0.06	0.07
	Mn (mg)	0.09	0.18	0.17	0.13	0.13
	Si (mg)	1.0	1.4	0.5	1.0	0.4

### 3.2 抗酸化能

橘果実及び葉の季節別の抗酸化能を比較した結果を図 1 に示す. DPPH ラジカル消去能は, 季節別では果実及び葉ともに顕著な差異は見られなかった. また, ウンシュウミカンと比べると, 橘の成熟果 (12 月) (全体) の DPPH ラジカル消去能は 33.8 ( $\mu$ mol of TE / g-乾燥重量) で, ウンシ

ユウミカンの成熟果 (全体) の 17.3 ( $\mu\text{mol of TE/g-乾燥重量}$ ) と比べ 2 倍ほど高かった。しかし, 前年にそれぞれ別の場所で採取した橘の成熟果 (全体) について, 同様に DPPH ラジカル消去能を測定したところ 10.5, 17.4 ( $\mu\text{mol of TE/g-乾燥重量}$ ) であったことから, 同一品種であっても年度や栽培場所による差が大きいものと考えられる。

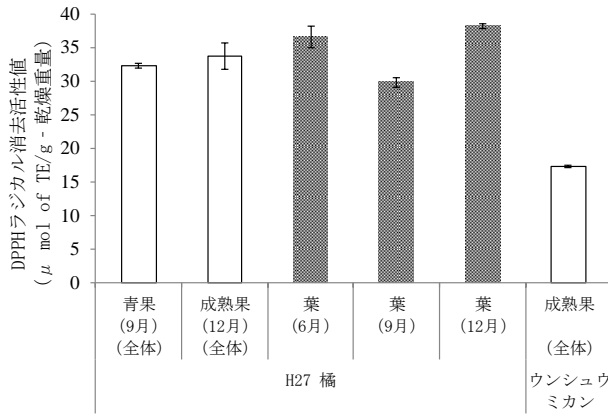


図 1 抗酸化能

### 3.3 ノビレチン及びタンゲレチンの含有量

橘及びユウシウミカン成熟果の部位別の NOB 及び TNG 含有量を表 6 に示す。橘の H26 成熟果 (全体) の含有量は, ユウシウミカン (全体) と比べると, NOB, TNG ともに 20 倍以上多かった。また, NOB 及び TNG は果皮部に多く含まれており, 果肉部や種子にはほとんど含まれていなかった。

表 6 NOB 及び TNG の部位別含有量

	橘 (H26成熟果)				ユウシウミカン		
	全体	果皮部	果肉部	種子	全体	果皮部	果肉部
NOB	202.3	531.3	0.7	Tr	8.4	19.6	Tr
TNG	185.5	467.6	Tr	0.7	4.2	9.8	Tr

次に, 橘果実及び葉の季節別の NOB 及び TNG 含有量を図 2 に示す。青果 (9 月) はそれぞれ 394.8, 349.3 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) で, 成熟果 (12 月) の 205.8, 121.8 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) と比べ高かった。葉は, 葉 (6 月) がそれぞれ 455.7, 413.0 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) と多かった。葉 (9 月) と葉 (12 月) の含有量に顕著な差はなかった。

また, 成熟果 (全体) の NOB 及び TNG 含有量は, DPPH ラジカル消去能と違い, 平成 26 年度試料と平成 27 年度試料で顕著な差は見られなかった。

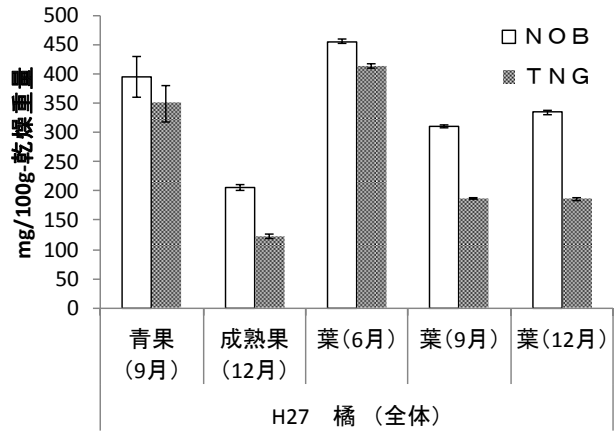


図 2 NOB 及び TNG の季節別含有量

### 3.4 ヘスペリジンの含有量

橘及びユウシウミカン成熟果の部位別の HSP 含有量を表 7 に示す。橘の H26 成熟果 (全体) の含有量は, ユウシウミカン (全体) の 6 割程度であった。また, HSP は果皮部に多く含まれているものの, 果肉部や種子にも含まれていた。

表 7 HSP の部位別含有量

	橘 (H26成熟果)				ユウシウミカン		
	全体	果皮部	果肉部	種子	全体	果皮部	果肉部
HSP	1813	2373	1218	98	3171	7154	784

次に, 橘果実及び葉の季節別の HSP 含有量を図 3 に示す。青果 (9 月) は 4011 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) で, 成熟果 (12 月) の 1813 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) と比べ 2 倍以上多かった。葉は, 葉 (6 月) には 2268 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) 含まれており, 葉 (9 月), 葉 (12 月) の 266, 217 ( $\text{mg}/100\text{g-乾燥重量}$ ) と比べかなり多かった。

また, 橘の成熟果 (全体) の HSP 含有量は, 平成 26 年度試料と平成 27 年度試料で顕著な差は見られなかった。

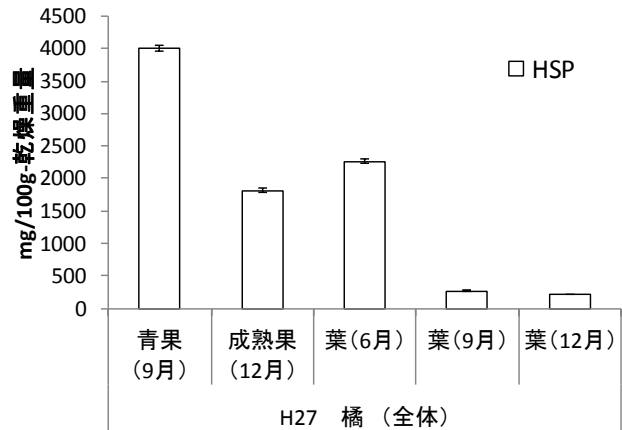


図 3 HSP の季節別含有量

### 3.5 香気成分の分析結果

図4に成熟果皮のTICを、図5に葉(6月)及び葉(12月)のTICを示す。また、香気成分の定性分析結果を表8に示す。定性分析結果には、各成分の面積比を示した。

果皮の香気成分は、青果及び成熟果ともに構成比は似ており、主成分はD-リモネンであった。その他、 $\beta$ -ピネン、 $\beta$ -フェランドレン、 $\gamma$ -テルピネン、 $\beta$ -オシメンなどのモノテルペン類及びリナロールの値が高く、これらの合計で80%以上の値となった。

葉は、9月と12月の構成比は似ていたが、6月の構成比は違った。葉(6月)は $\beta$ -ピネン、3-カレン、リナロールで75%以上を占めていた。一方、葉(9月)と葉(12月)は $\beta$ -フェランドレン、 $\gamma$ -テルピネン、リナロール、ピペリトンの値が高かった。ピペリトンは葉の老化と共に増加する含酸素成分であるため、若葉である葉(6月)からは検出されなかったと思われる。

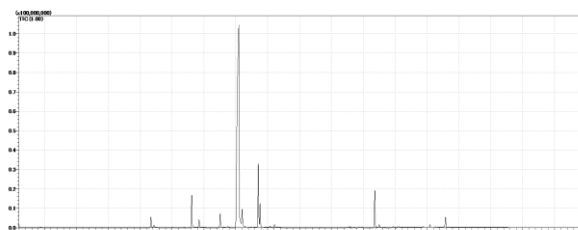


図4 成熟果皮のTIC

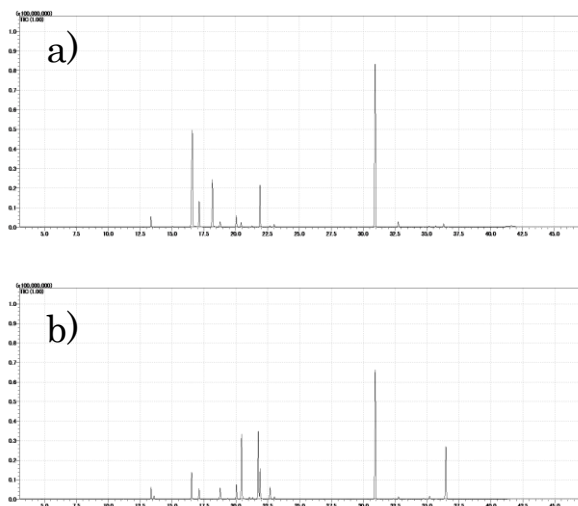


図5 a) 葉(6月)のTIC, b) 葉(12月)のTIC

表8 香気成分の定性分析結果

	青果(9月)		成熟果(12月)		
	外皮	外皮	葉(6月)	葉(9月)	葉(12月)
$\alpha$ -Pinene	2.0	1.4	2.1	2.8	2.5
$\alpha$ -Thujene	0.5	0.3	Tr	0.8	0.7
$\beta$ -Pinene	5.4	4.2	27.8	6.5	5.6
Sabinene	1.0	1.0	4.8	2.4	2.1
3-Carene	-	-	9.2	Tr	Tr
$\beta$ -Myrcene	1.7	1.8	1.4	2.9	2.8
D-Limonene	56.4	67.5	2.1	3.6	2.9
$\beta$ -Phellandrene	3.1	3.2	0.9	15.3	14.7
$\gamma$ -Terpinene	10.6	8.4	Tr	15.9	14.3
$\beta$ -Ocimene	3.9	3.1	7.5	8.4	6.0
$\gamma$ -Cymene	1.2	0.2	0.3	3.9	2.4
(+)-4-Carene	0.4	0.4	0.6	0.6	0.5
Linalool	9.3	4.5	39.1	22.0	29.1
Linalyl anthranilate	0.4	0.4	-	Tr	-
Terpinen-4-ol	0.4	0.3	-	-	-
Caryophyllene	-	-	1.2	1.2	0.7
L- $\alpha$ -Terpineol	-	-	0.3	0.7	0.7
$\alpha$ -Terpineol acetate	0.5	0.4	-	-	-
$\gamma$ -Elemene	-	-	0.7	-	-
Piperitone	1.5	1.6	-	10.3	12.6

### 3.6 精油の定量分析結果

精油の抽出量は、成熟果実(全体)及び葉は約0.1%、成熟果皮は約0.3%だった。しかし、成熟果実(全体)を約3ヶ月間冷凍保存した後、果皮から精油を抽出すると、その抽出量は約0.15%と低く、香りも弱く感じた。

図6に成熟果皮から抽出した精油(1000倍希釈)のTICを、表9に成熟果皮及び葉(3月)から抽出した精油の主要成分の含有量を示す。果皮から抽出した精油には、D-リモネンが、葉から抽出した精油にはリナロールが多く含まれており、表8の定性結果の面積比に近い値を示した。

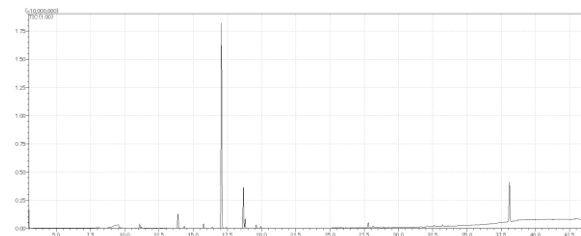


図6 精油(成熟果皮)のTIC

表9 精油に含まれる含有量

	含有量 (%)	
	成熟果皮	葉(3月)
$\alpha$ -Pinene	0.6	0.3
$\beta$ -Pinene	2.9	1.8
D-Limonene	59.3	1.2
$\gamma$ -Terpinene	5.8	7.5
Linalool	6.0	34.0

#### 4. 結言

178-184, 四国地域イノベーション創出協議会, 2010

橘を利用した機能性食品の開発を目標に, 橘に含まれる機能性成分等の分析を行った. 分析項目は, 栄養成分, 抗酸化能, フラボノイド類 (NOB, TNG, HSP) 及び香気成分とし, 以下の結果を得た.

- (1)抗酸化能は, 果実及び葉の DPPH ラジカル消去能について季節別に分析したが, 果実及び葉ともに季節間で差は見られなかった.
- (2)NOB 及び TNG の含有量はウンシュウミカンと比べると, 20 倍以上多かった. 部位別では果皮部に多く含まれており, 果肉部や種子にはほとんど含まれていなかった. また, 季節別では, 青果及び葉 (6 月) の含有量が多かった.
- (3)HSP の含有量はウンシュウミカンの 6 割程度であった. HSP は果皮部に多く含まれているものの, 果肉部や種子にも含まれていた. 季節別では, 青果及び葉 (6 月) の含有量が多かった.
- (4)香気成分は果実及び葉について季節別に分析した. 果実の構成比は似ており, 主成分はD-リモネンであった. その他,  $\beta$ -ピネン,  $\beta$ -フェランドレン,  $\gamma$ -テルピネン,  $\beta$ -オシメンなどのモノテルペン類及びリナロールの値が高く, これらの合計で TIC の面積比で 80%以上の値となった. 葉は, 9 月と 12 月の構成比は似ていたが, 6 月の構成比は他と違った. 葉 (6 月) は  $\beta$ -ピネン, 3-カレン, リナロールで TIC の面積比が 75%以上を占めていた. 一方, 葉 (9 月) と葉 (12 月) は  $\beta$ -フェランドレン,  $\gamma$ -テルピネン, リナロール, ピペリトンの値が高かった.

#### 謝辞

本研究を進めるにあたり, 橘試料を提供頂いたなら橘プロジェクト推進協議会の城会長をはじめ, 関係者に深謝いたします.

#### 参考文献

- 1) 矢野昌充, カンキツによるがん予防, 日食工誌, Vol.49, No.3, 139-144, 2002
- 2) 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, 5, 19-84, 2005
- 3) 吉武利文, 橘の香りー古代日本人が愛した香りの植物ー, フレグランスジャーナル社, 2008
- 4) 須田郁夫, 抗酸化機能, 食品機能研究法, 218-223, 光琳, 2000
- 5) 大野一仁, 明賀久弥, 柑橘中のポリメトキシフラボン, 農水産物・加工食品中の健康機能性成分類の分析マニュアル集, 193-199, 四国地域イノベーション創出協議会, 2010
- 6) 大野一仁, 笹山新生, 柑橘のヘスペリジン, 農水産物・加工食品中の健康機能性成分類の分析マニュアル集, 213-219, 四国地域イノベーション創出協議会, 2010
- 7) 大野一仁, 明賀久弥, 市川亮一, 柑橘の精油, 農水産物・加工食品中の健康機能性成分類の分析マニュアル集,

