

夏ミカン類が含有するフラボノイド類およびクマリン類含量 の特徴

三宅 義明・大橋 真琴・河野 未来・菅野 友美

Characteristics of flavonoids and coumarins in natsumikan type

Yoshiaki MIYAKE, Makoto OHASHI, Mirai KONO and Tomomi
KANNO

夏ミカン類の甘夏, 新甘夏, 紅甘夏, ナツダイダイ, スルガエレガントの果皮, 果汁について, 11種フラボノイド類と3種クマリン類を高速液体クロマトグラフィーにて定量した。夏ミカン類の各果皮はナリンジン (NAN), ネオヘスペリジン (N-HES) が, 各果汁はNANが高含有であった。夏ミカン類にダイダイ, レモン, スダチ, ユズ, マンダリンを加えた計10種カンキツの定量値を多変量解析の主成分分析をした結果, 夏ミカン類の各カンキツのフラボノイド類, クマリン類の含量, 組成は類似しており, また, 果皮はタンゲレチン (TAN), シトロプテン (CIT), オーラプテン (AUR) が, 果汁はNAN, AURが特徴物質と推察された。甘夏の果実部位では, 外果皮にCIT, AURのクマリン類が, 中果皮, 内果皮, 果肉にNAN, N-HESなどフラボノイド類が比較的多く存在していた。夏ミカン類の各果皮の抗酸化活性は同程度で, 各果汁では新甘夏が低かったが他は同程度であった。

Keywords : 夏ミカン類, カンキツ, フラボノイド類, クマリン類, 抗酸化活性
Natsumikan type, Citrus, Flavonoids, Coumarins, Antioxidative activity

1. はじめに

食事と健康に関する栄養疫学研究が行われ, 果実摂取については総死亡リスク (がん, 心血管疾患, 脳卒中などの死亡リスク) 低下, また, 高血圧や糖尿病のリスク低下との関係性が示されている (Schwingshackl, 2017; 小川, 2018)。果物摂取が疾病リスク低下と関連する要因として, 微量栄養素や食物繊維の摂取量増加, 食事に占める脂肪摂取比の減少といった要因に加え, 植物に含まれる化学成分 (フィトケミカル) が関与すると考えられている。カンキツ果実にはフィトケミカルのフラボノイド類, クマリン類が含まれており, これらは抗酸化作用, 血圧上昇抑制作用, 抗がん作用が報告されている機能性物質である (Tripoli, 2007; 杉浦, 2014)。国内のカンキツ果実の消費量は低迷しており, カンキツは消費者向けに嗜好を改良した品種, 健康志向の消費者に合った機能性物質が高含有な品種, 高齢化が進む状況下で生産者向けの省力低コスト栽培の品種の開発が進められている (今井, 2011)。

愛知淑徳大学健康医療科学部健康栄養学科

* 本研究は愛知淑徳大学研究助成を受けたものである。

中晩柑の夏ミカンには明治時代から広く消費されてきた初夏の果物で、夏ミカンの国内年間収穫量はカンキツ内では温州ミカン、シラヌヒ（デコポン）、ハッサクに次ぐ第4位が多い（27,819.6 t；農林水産省，2017）。当初の夏ミカンは酸味が強い品種のナツダイダイ（普通夏ミカン，学名 *Citrus natsudaidai*）であったが、グレープフルーツ、オレンジの輸入自由化の影響もあり、消費者の嗜好に適した品種の育成が試みられた。そこで、ナツダイダイの枝変わり品種で、酸味が弱く甘味が強い甘夏（川野ダイダイ，*C. natsudaidai*）が育成され、栽培更新が急速に進められ、現在は栽培、流通している夏ミカンのほとんどが甘夏である（岩堀，1999）。さらに、甘夏の新品種も出てきており、甘夏の枝変わりで甘夏よりも糖度が高く皮が滑らかな新甘夏（岩堀，1999）がサンフルーツ、ニューセブン、田の浦オレンジとして市販されている。また、甘夏の枝変わり表皮の色が甘夏に比べ薄く紅色で、甘夏に比べて若干甘味が強い傾向の紅甘夏（磯田，1989）も市場に出ている。さらに、甘夏にブンタン（*C. maxima*）の花粉を交配し、甘夏より酸味が弱く、ブンタンの香りがある品種が育成され、スルガエレガントと商標登録された静岡地域特産品もある（山本，2017）。このように夏ミカン類は甘夏が主であるが新甘夏、紅甘夏、スルガエレガント、ナツダイダイなどの品種も市販されている。夏ミカン類の機能性物質の研究は、ナツダイダイと甘夏においてフラボノイド類とクマリン類の定量に関する研究報告があるが（Kawaii, 1999; Nogata, 2006; Dugrand-Judek, 2015）、その他の夏ミカン類の報告はない。そこで、本研究では夏ミカン類に含まれるフラボノイド類、クマリン類の特徴を調べることを研究目的とし、夏ミカン類と他カンキツのフラボノイド類、クマリン類を定量し、多変量解析の主成分分析による統計処理を行い、夏ミカン類の特徴物質を調べた。さらに、夏ミカン類の機能性評価として抗酸化性に着目し、他カンキツと比較した。

2. 材料と方法

2.1. 実験材料

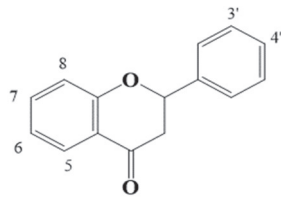
市販されている甘夏（*C. natsudaidai*，熊本産），新甘夏（*C. natsudaidai*，三重産），紅甘夏（*C. natsudaidai*，三重産），夏ダイダイ（*C. natsudaidai*，和歌山産），スルガエレガント（*C. natsudaidai* x *C. maxima*，静岡産），ダイダイ（*C. aurantium*，和歌山産），レモン（*C. limon*，カリフォルニア産），スダチ（*C. sudachi*，愛知産），ユズ（*C. junos*，和歌山産），マンダリン（*C. reticulata*，オーストラリア産）を購入入手した。

2.2. 試薬

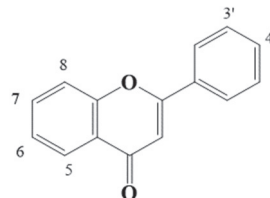
11 種フラボノイドのエリオシトリン（ERI；エリオジクチオール 7-*O*-ルチノシド），ネオエリオシトリン（N-ERI；エリオジクチオール 7-*O*-ネオヘスペリドシド），ナリルチン（NAR；ナリンゲニン 7-*O*-ルチノシド），ナリンジン（NAN；ナリンゲニン 7-*O*-ネオヘスペリドシド），ヘスペリジン（HES；ヘスペレチン 7-*O*-ルチノシド），ネオヘスペリジン（N-HES；ヘスペレチン 7-*O*-ネオヘスペリドシド），ジオスミン（DIO；ジオスメチン 7-*O*-ルチノシド），ネオジオスミン（N-DIO；ジオスメチン 7-*O*-ネオヘスペリドシド），シネンセチン（SIN；3',4',5,6,7-ペンタメトキシフラボン），ノビレチン（NOB；3',4',5,6,7,8-ヘキサメトキシフラボン），タンゲレチン（TNG；4',5,6,7,8-ペンタメトキシフラボン）と 3 種クマリン類の シトロプテン（CIT；5,7-ジメトキシクマリン），オーラプテン（AUR；7-ゲラニロキシクマリン），5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリン（GMC）はフナコシ(株)より購入入手した（図 1）。他試薬は特級品を富士フィルム和光純薬工業(株)より購入入手した。

1. フラボノイド類

		C-5	C-6	C-7	C-8	C-3'	C-4'
フラバノン	ERI : エリオシトリン	OH	H	<i>O</i> -ルチノース	H	OH	OH
	N-ERI : ネオエリオシトリン	OH	H	<i>O</i> -ヘスペリジオース	H	OH	OH
	NAR : ナリルチン	OH	H	<i>O</i> -ルチノース	H	H	OH
	NAN : ナリンジン	OH	H	<i>O</i> -ヘスペリジオース	H	H	OH
	HES : ヘスペリジン	OH	H	<i>O</i> -ルチノース	H	OH	OCH ₃
	N-HES : ネオヘスペリジン	OH	H	<i>O</i> -ヘスペリジオース	H	OH	OCH ₃
フラボン	DIO : ジオスミン	OH	H	<i>O</i> -ルチノース	H	OH	OCH ₃
	N-DIO : ネオジオスミン	OH	H	<i>O</i> -ヘスペリジオース	H	OH	OCH ₃
	SIN : シネンセチン	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
	NOB : ノビレチン	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
	TAN : タンゲレチン	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃



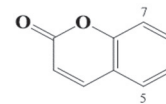
フラバノン



フラボン

2. クマリン類

		C-5	C-7
クマリン	CIT : シトロプテン	OCH ₃	OCH ₃
	AUR : オーラプテン	H	<i>O</i> -ゲラニル
	GMC : 5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリン	<i>O</i> -ゲラニル	OCH ₃



クマリン

図1 フラボノイド類, クマリン類の化学構造

2.3. フラボノイド類, クマリン類の定量

カンキツの果汁と果皮について、また、甘夏の果実部位であるフラベド（外果皮）、アルベド（中果皮）、ジョウノウ膜（内果皮）、果肉、種子について、これらに含まれるフラボノイド類、クマリン類を高速液体クロマトグラフィー（HPLC, Prominence, 株式会社島津製作所）にて定量した（三宅, 2018）。各種果皮と甘夏果実部位は、凍結後に凍結乾燥機（FDU-1200, 東京理化学器械株式会社）にて乾燥後、調理用ブレンダー（ミルサー800DG, 岩谷産業株式会社）を用いて粉砕して粉末を得た。粉末 0.1 g にエタノール 5 mL を添加し、超音波機器（ASU-20, アズワン株式会社）にて 1 時間処理し、その後、一夜室温で放置して抽出した。この抽出液を遠心分離（20,627×g, 5 分間）して得た上清をエタノールで 10 倍希釈して分析試料とした。各種果汁については、同条件の遠心分離をして得た上清をエタノールで 10 倍希釈して分析試料とした。フラボノイド類の ERI, N-ERI, NAR, NAN, HES, N-HES, DIO, N-DIO の定量における HPLC 分析条件は、逆相カラム（YMC-pack ODS-A, 4.6×150 mm, S-5 μm, 株式会社ワイエムシィ）、カラム温度 40℃、検出波長 280 nm、流速 1 mL/min で、移動相に

メタノールと5%酢酸水溶液を用いた。移動相については、メタノールを分析開始0分～10分は15%で、10分～30分は15%から40%、30分～40分は40%から100%へ直線的勾配変化させた。SIN, NOB, TAN, CIT, AUR, GMCの定量におけるHPLC分析条件は、検出波長は280nmに、移動相はメタノールと水とし、メタノールを分析開始0分～15分は50%から100%へ直線的勾配変化し、15分～20分は100%とした。他の条件はERIなどのフラボノイド分析と同様にした。標準試薬のフラボノイド類、クマリン類はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させて測定した。分析試料中の各物質の定量は標準試薬のピーク面積から比較算出し、測定値は2回測定の平均値から求めた。

2.4. 抗酸化活性測定

試料の抗酸化活性は、DPPHラジカル捕捉活性法により求めた(Miyake, 2006)。2.3.で調製されたカンキツ果皮抽出液、カンキツ果汁、標準物質のフラボノイド類とクマリン類を測定試料とした。0.13 mg/mL DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)のエタノール溶液100 μ L, 0.1 M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液(pH7.4) 90 μ L, 測定試料10 μ Lを96well-マイクロプレートで混合した。コントロールは測定試料の代わりに試料溶媒を添加した。室温放置で1時間放置後、吸光マイクロプレートリーダー(サンライズレインボーRC-R, テカンジャパン(株))にて517nmの吸光度を測定した。試料のDPPHラジカル捕捉活性値は、試料の測定値がコントロールの測定値に対する減少率(%)を求めた。標準抗酸化物質としてトロロックスを用い、トロロックス濃度(0~100 μ M)と減少率(%)の検量線を作成し、試料のDPPHラジカル捕捉活性値を標準抗酸化物質のトロロックスの当量に換算し、抗酸化活性値とした。抗酸化活性値については、果皮試料はトロロックス活性当量として乾燥果皮重量(g)当たりのトロロックス量(μ g)を、果汁試料はトロロックス活性当量として果汁(mL)当たりのトロロックス量(μ g)を求めた。フラボノイド類およびクマリン類の試料はトロロックス当量(mol)を求めた。3連測定(n=3)を行い、平均値と標準偏差(mean \pm SD)を求めた。

2.5. 統計処理

カンキツ果皮、果汁のフラボノイド類、クマリン類の定量値は、多変量解析の主成分分析を行った(EXCEL多変量解析ver.7.0ソフト, ㈱エスミ)(三宅, 2015; 三宅, 2018)。カンキツ果汁については、SIN, GMCを含有していないため、これらを除く12物質で解析した。抗酸化活性値は一元配置分散分析, 多重比較Fisherの最小有意差法(Fisher's LSD)にて行い(エクセル統計, ㈱社会情報サービス), 危険率5%以下($p<0.05$)を有意差ありとした。

3. 結果と考察

3.1. フラボノイド類, クマリン類の定量

フラボノイドは植物の二次代謝産物で、6炭素原子-3炭素原子-6炭素原子の計15個の炭素原子から成る基本骨格をもつ化合物の総称である。基本骨格の炭素原子には水酸基(-OH), メトキシ基(-OCH₃), 糖鎖などが結合している。フラボノイドは骨格中央の3個の炭素原子がつくり出している構造部分によりさらに細かく数種に分類され、その中でカンキツにはフラバノンとフラボンが特異的に多く存在している(図1)。先行研究(Nogata, 2006)を参考にして、本研究ではフラバノンに属するERI, N-ERI, NAR, NAN, HES, N-HESと、フラボンに属するDIO, N-DIO, SIN, NOB, TANの計11物質をフラボノイド類の定量分析に使用した。ERI, N-ERI, NAR, NAN, HES, N-HES, DIO, N-DIOについては、アグリコンにルチノースまたはネオヘスペリジオースの糖が結

合した配糖体である。ルチノースとネオヘスペリジオースは構造異性体であるため、ERI と N-ERI, NAR と NAN, HES と N-HES, DIO と N-DIO はそれぞれが構造異性の関係になる。SIN, NOB, TAN は糖が結合しておらず、複数のメトキシ基が結合しているのでポリメトキシフラボンといわれている (図 1) (Kawaii, 1999)。クマリンは、サクラヤスイートクローバーなどに含まれる二次代謝産物で、桜餅の香り物質としても知られる芳香を呈する化合物である。クマリン骨格を有した類縁体のクマリン類は、植物界に広く存在している。カンキツに含まれるクマリン類に関する先行研究 (Dugrand-Judek, 2015) から本研究ではクマリン骨格にメトキシ基やゲラニロキシ基 (*O*-geranyl) が結合している 3 種のクマリン類物質を定量分析に使用した (図 1)。夏ミカン類を含む 10 種カンキツの果皮および果汁に含まれるフラボノイド類とクマリン類の定量値を表 1 に示した。夏ミカン類の果皮は NAN, N-HES が、果汁は NAN が高含有であった。ナツダイダイと甘夏については既報告 (Kawaii, 1999; Nogata, 2006; Dugrand-Judek, 2015) と同様な物質組成の結果が示された。新甘夏, 紅甘夏, スルガエレガントのフラボノイド類, クマリン類の定量分析は本研究が初めての報告である。また, NAN, N-HES は, カンキツ果汁, 果皮に含まれる苦味物質として知られており (Horowitz, 1979), これらは夏ミカン類を食した時の苦味に関与している物質と思われた。

表 1 カンキツ果皮, 果汁のフラボノイド類, クマリン類含量

果皮	ERI	N-ERI	NAR	NAN	HES	N-HES	DIO	N-DIO	SIN	NOB	TAN	CIT	AUR	GMC
	(含量mg/乾燥果皮g)													
甘夏	0	0.26	0.56	17.15	0.17	5.51	0	0	0	0.04	0.08	0.65	0.78	0
新甘夏	0	0.34	0.50	19.85	0.17	3.64	0	0	0	0.79	0.08	0.34	0.49	0
紅甘夏	0	0.26	0.57	16.32	0.13	4.52	0	0	0.11	0.03	0.14	0.71	0.51	0
ナツダイダイ	0	0.27	0.70	19.57	0.19	5.37	0	0	0.05	0.05	0.15	0.76	0.75	0
スルガエレガント	0	0.39	0.80	23.03	0.18	6.15	0.08	0	0	0.02	0.17	0.88	0.64	0
ダイダイ	0	7.90	0	29.69	0	22.63	0.22	0.66	0.05	0.31	0.10	0.28	0.06	0
レモン	8.05	0.10	0.26	0.25	14.73	0.14	1.47	0	0	0	0	0.05	0.06	0.06
スダチ	2.07	0.42	3.32	2.85	4.09	3.74	0.20	2.10	0	0.34	0	1.28	0.05	0
ユズ	0	0.35	2.28	1.79	2.02	1.30	0	0.11	0	0	0	0	0.38	0
マンダリン	0	0.21	11.91	0	29.5	0.07	0.17	0	0.03	0.22	0.11	0.17	0.07	0
果汁	ERI	N-ERI	NAR	NAN	HES	N-HES	DIO	N-DIO	SIN	NOB	TAN	CIT	AUR	GMC
	(含量µg/果汁mL)													
甘夏	0	1.8	18.5	212.7	2.1	26.1	0	0	0	0.1	0.4	0	2.2	0
新甘夏	0	1.9	11.5	150.4	1.6	18.0	0	0	0	0	0	0	1.4	0
紅甘夏	0	2.4	21.0	205.8	2.2	22.7	0	0	0	0	0.3	0	1.9	0
ナツダイダイ	0	1.5	15.8	177.0	1.9	24.2	0	0	0	0	0.4	0	1.9	0
スルガエレガント	0	1.4	23.5	202.1	2.4	21.9	1.1	0	0	0	0	0	1.5	0
ダイダイ	0	68.2	0.0	94.3	0	103.5	5.1	3.9	0	0.9	0.7	49.2	1.3	0
レモン	161.1	0.7	10.1	6.1	97.7	0	7.3	0	0	0.4	0	0	1.4	0
スダチ	38.1	7.7	121.6	85.4	54.8	49.8	1.8	25.1	0	0.5	0	0	2.4	0
ユズ	0	0	34.2	16.6	14.9	7.2	0.0	1.5	0	2.2	0	0	11.6	0
マンダリン	0	7.8	177.6	0	152.1	0.0	6.3	0	0	0	0	0	1.1	0

カンキツ果皮の定量値について、多変量解析主成分分析を行い、主成分負荷量と主成分得点の散布図を図 2 に示した。主成分得点の散布図 (図 2 (2)) において、夏ミカン類の甘夏, 新甘夏, 紅甘夏, ナツダイダイ, スルガエレガントは近い位置関係であり、特にナツダイダイ, 紅甘夏, スルガエレガントは近接しており、含有するフラボノイド類とクマリン類の組成と含量が類似していることが示された。散布図 (図 2 (1)) において、夏ミカン類の果皮の主成分得点の数値に影響する物質は、主成分負荷量の数値から TAN, CIT, AUR, SIN であると示された。表 1 で甘夏, 新甘夏, スルガエレガント果皮には SIN は含有しなかったため SIN は除外し、よって TAN, CIT, AUR が夏ミカン類果皮の特徴物質と推察された。TAN はカンキツに含まれるポリメトキシフラボ

ンで, *in vitro* で細胞増殖抑制, 抗増殖, 抗酸化作用などの薬理作用を有しており, 薬剤で乳癌を誘発した実験動物に対して化学療法的効果が示され, 発がん抑制作用が報告されている (Lakshmi, 2014)。CIT はカンキツの果皮に含まれるクマリン類で, ヒト黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用が示され, 抗腫瘍効果が報告されている (Wolny, 2014)。AUR はカンキツに含まれるクマリン類で, 培養細胞と動物実験によりがん, 細胞増殖, アポトーシスを制御する細胞内シグナル伝達経路の調節作用が分かり, 抗炎症, 抗高血糖, 抗発がん, 降圧作用などの薬理効果により様々な疾患の予防と治療効果が期待されている (Bibak, 2019)。以上のように, 夏ミカン類果皮の特徴物質は有用な機能性物質であると思われた。

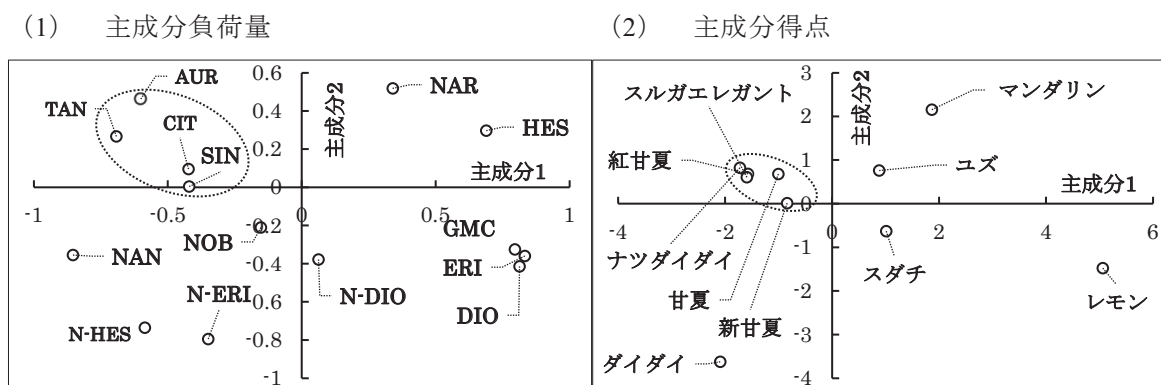


図2 甘夏等のカンキツ果皮に含まれるフラボノイド類, クマリン類の主成分分析 (散布図)

カンキツ果汁の定量値についても同様に多変量解析主成分分析を行い, 主成分負荷量と主成分得点の散布図を図3に示した。主成分得点の散布図 (図3 (2)) において, 夏ミカン類の甘夏, 新甘夏, 紅甘夏, ナツダイダイ, スルガエレガントは近い位置関係であり, 特にナツダイダイ, 甘夏, 紅甘夏が, 新甘夏とスルガエレガントは近接しており, フラボノイド類とクマリン類の組成と含量が類似していることが示された。主成分負荷量の数値 (図3 (1)) から夏ミカン類の果汁は NAN, AUR が特徴物質であることが推察された。NAN はグレープフルーツに多く含まれるフラボノイド類で, *in vitro* と *in vivo* の研究にて抗酸化作用, 抗炎症作用, 抗アポトーシス活性などの生理活性が見出されており, 抗発がんの薬理作用も報告されている機能性物質である (Bharti, 2014)。以上, 本研究では, 夏ミカン類では新甘夏, 紅甘夏, スルガエレガントの果汁中のフラボノイド類, クマリン類の定量値が明らかにされ, 夏ミカン類の各カンキツは同様な組成, 含有であることが示された。

カンキツでの他品種間の交配種では, フラボノイド類, クマリン類の組成はどちらか一方の品種の特性を継承するか, または, 両者特性が融合することが報告されている (三宅, 2011; 三宅, 2018)。スルガエレガントは, 甘夏とブンタンの交配種である (山本, 2017)。本研究結果では, スルガエレガントと甘夏の主成分分析の散布図 (図2 (2), 図3 (2)) は, 両者は近似の位置関係であった。また, ブンタンに含まれるフラボノイド類は NAN, アセチルナリンジンが主成分と報告されている (Zunying, 2017)。しかし, 本実験のフラボノイド類の HPLC 分析では, 甘夏とスルガエレガントのピークプロファイルは類似しており, アセチルナリンジンと推測されるピークは見当たらなかった。このことから, スルガエレガントのフラボノイド類, クマリン類の特徴は遺伝的に甘夏を引き継いでいると推測された。

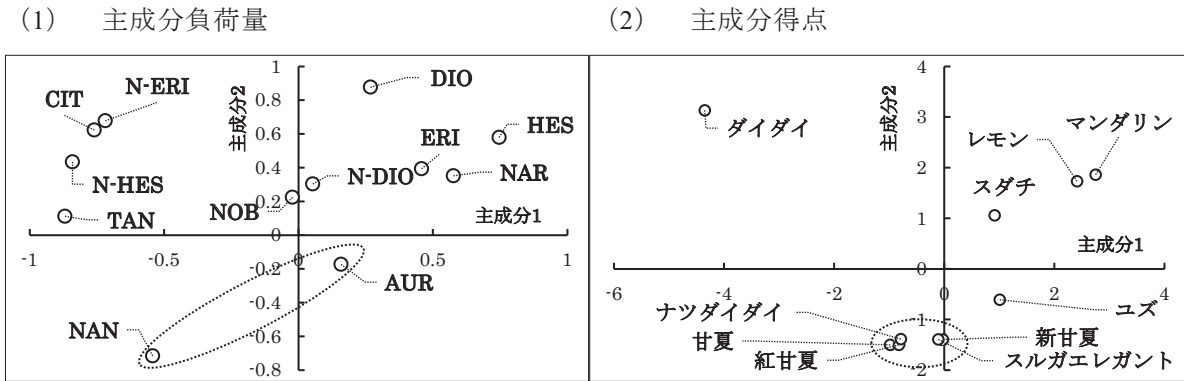


図3 甘夏等のカンキツ果汁に含まれるフラボノイド類、クマリン類の主成分分析（散布図）

甘夏の果実部位に含まれるフラボノイド類とクマリン類を定量した（表 2）。外果皮のフラベドに AUR, CIT が多く含まれ、中果皮のアルベドには NAN, N-HES が、内果皮のジョウノウ膜には NAN が多く含まれていた。カンキツの果皮のフラベドには精油（エッセンシャルオイル）が存在し、疎水性物質のクマリン類は精油中に存在している（Miyake, 1998）。甘夏においてもクマリン類の CIT と AUR はフラベドに多く含まれていた（表 2）。GMC はレモン果皮から単離されたクマリン類であるが（Miyake, 1998）、甘夏には含まれていなかった。また、カンキツに含まれるフラボノイド類は果汁よりは果皮に多く含まれ、果皮ではフラベドよりはアルベド、ジョウノウ膜に多く存在することが報告されている（Miyake, 1998）。本研究において、甘夏のアルベド、ジョウノウ膜に N-ERI, NAR, NAN, N-HES が多く含まれていた。甘夏は他のカンキツと同様にフラベドにクマリン類が、アルベド、ジョウノウ膜にフラボノイドが多く含まれていた。

甘夏の果肉には N-ERI, NOB, TAN は含有していなかったが（表 2）、これらは果汁に含まれていた（表 1）。果肉と果汁は類似試料であるが、果汁は、搾汁工程時に果皮のジョウノウ膜やアルベドがパルプとして混入するため、果皮由来の N-ERI, NOB, TAN が果汁に混入したと推測された。

表 2 甘夏果実部位のフラボノイド類、クマリン類含量

甘夏果実部位	ERI	N-ERI	NAR	NAN	HES	N-HES	DIO	N-DIO	SIN	NOB	TAN	CIT	AUR	GMC
	(含量mg/乾燥果実部位g)													
フラベド (外果皮)	0	0	0	1.15	0.04	1.74	0.30	0	0	0.28	0.57	2.25	2.40	0
アルベド (中果皮)	0	0.51	1.21	42.37	0.29	9.83	0	0	0	0.01	0.03	0.10	0.15	0
ジョウノウ膜 (内果皮)	0	0	0.58	20.32	0.07	2.29	0	0	0	0	0	0	0.08	0
果肉	0	0	0.31	4.46	0.03	0.46	0	0	0	0	0	0	0.08	0
種子	0	0	0	0.13	0	0	0	0.36	0	0	0	0	0.06	0

3.2. 抗酸化活性

カンキツ果皮と果汁の抗酸化活性の結果を図 4 に示した。夏ミカン類の各果皮の活性の有意差はなく、ほぼ同等であった（図 4 (1)）。夏ミカン類の抗酸化性は、果皮と果汁において他カンキツと比べて特段に高活性では無く、レモン、スダチ、ダイダイと比較して活性が低く、マンダリンと比べると高活性であった。夏ミカン類の各果汁については、新甘夏の活性が低かったが他はおよそ同等であった（図 4 (2)）。定量分析で用いた標準物質のフラボノイド類とクマリン類について、抗酸化活性を測定した結果を図 5 に示した。ERI と N-ERI は高活性であり、次に HES, N-HES, DIO, N-DIO に活性が高かった。

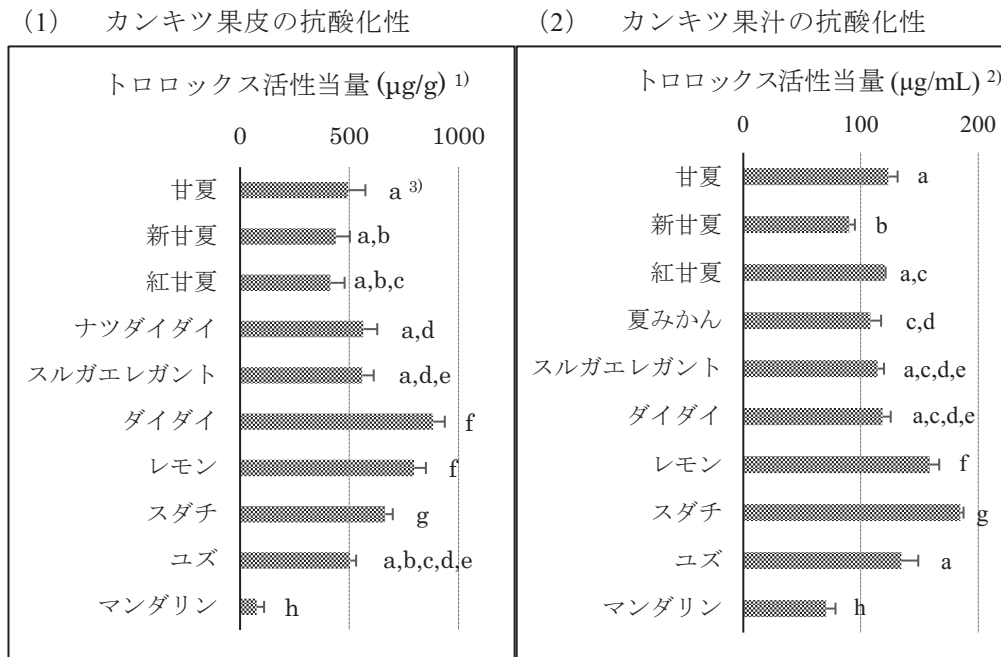


図4 夏ミカン類等カンキツ果皮, 果汁の抗酸化性

- 1) トロロックス (µg) / 乾燥果皮重量 (g)
- 2) トロロックス (µg) / 果汁 (mL)
- 3) アルファベットが異なる試料間で有意差あり (p<0.05)

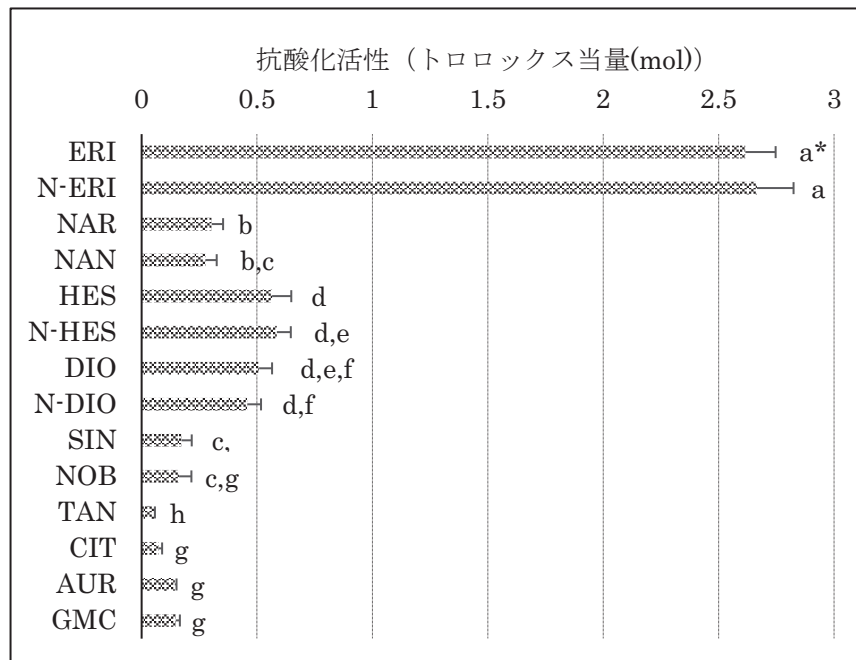


図5 フラボノイド類・クマリン類の抗酸化活性

*アルファベットが異なる試料間で有意差あり (p<0.05)

図4 (1) において, 夏ミカン類果皮は, ダイダイ, レモン, スダチの果皮と比較して抗酸化活

性が低値であった。夏ミカン類は高い抗酸化活性の ERI または N-ERI が低含有であったことが要因と思われた。図 4 (2) において、夏ミカン類の果汁も、レモン、スダチの果汁と比べて低活性であった。このことも夏ミカン類の果汁は、ERI または N-ERI が低含有であったことが起因していると考えられた。果汁において、レモン、スダチの高活性は ERI または N-ERI が高含有であったことも推察されるが、ユズの活性が高いことと、ダイダイの活性が低い結果はこれら物質の含有量では説明できない。果汁にはフラボノイド類以外のアスコルビン酸などの親水性抗酸化物質の活性への関与が考えられる。また、各果汁の抗酸化活性で、新甘夏が他に比べて低かったのは、NAR, NAN が低含有量であることや、果汁中の親水性抗酸化物質の含有量の影響も推測され、今後の追究が必要である。

甘夏の枝変わり品種の紅甘夏は、甘夏と比較して果皮と果肉に β -クリプトキサンチンや β -カロテンなどのカロテノイド類が多いため淡紅色を帯びている(岩堀修一, 1999)。疎水性が高いカロテノイド類は一重項酸素吸収能による抗酸化活性を有するが、親水性抗酸化物質の抗酸化活性評価系であるラジカル捕捉活性は低い(Mukai, 2019)。本研究はラジカル捕捉活性測定による抗酸化評価を行ったため、活性値にカロテノイド類の影響が見られなかったと思われた。今後は、一重項酸素吸収能の抗酸化評価から紅甘夏、甘夏などの抗酸化活性を測定する必要があると考えられた。

ポリフェノールは化学構造上で芳香環に 2 個以上の水酸基を有する物質の総称であり、植物界に多種類が存在し、抗酸化性や抗炎症性など機能性を有することが知られている(Joseph, 2016)。芳香環に水酸基を有することで抗酸化活性を生じ、その水酸基の数が増加することや水酸基が近接することで活性は高まる(Majo, 2005)。図 1 で示すように ERI, N-ERI, NAR, NAN, HES, N-HES, DIO, N-DIO は水酸基を 2 個以上有したポリフェノールであり、図 5 において抗酸化性が認められた。また、ERI と N-ERI, NAR と NAN, HES と N-HES, DIO と N-DIO は構造異性体の関係であり、糖鎖が構造異性でアグリコン(糖鎖以外の部分)は同一物質である。抗酸化活性はアグリコンが関与するため、例えば ERI と N-ERI の様な糖鎖が構造異性の物質は同等の活性となった。ERI と N-ERI の活性は 2.6~2.7 (トロロックス当量 (mol)) であることから、標準抗酸化物質のトロロックスより高活性な物質であった。ERI と N-ERI の抗酸化性は報告(Miyake, 1998)されており、ERI と N-ERI の化学構造は、フラボノイド骨格 B 環の C-3'位と C-4'位に近接する 2 つの水酸基を有するカテコール体が存在し(図 1)、この構造部位は電子授受が生じやすく、カテコール体からジケトン体への変換反応が生じやすいため、高い抗酸化活性(還元性)を有する(Miyake, 1998; Majo, 2005)。レモン、スダチ、ダイダイの果皮は ERI, N-ERI を多く含有するため、高活性であったと思われた。夏ミカン類にはこれら物質は含有せず、夏ミカン類に多く含まれるフラボノイド類の NAN, N-HES は、フラボノイド骨格 B 環にカテコール体構造ではないため、高い抗酸化性を有していなかったと思われる。しかし、NAN, N-HES はフラボノイド骨格の C-5 と C-3'位または C-4'位に水酸基を有するポリフェノールであるため、ERI, N-ERI よりは低い活性を有していた。また、夏ミカンに含まれる特徴物質の TAN, CIT, AUR は水酸基など酸化還元反応に関わる官能基を有していないため(図 1)、抗酸化活性が低かったと思われる。

4. まとめ

夏ミカンは国内消費量が比較的多い中晩柑であり、以前は酸味の強い品種のナツダイダイが主であったが、消費者の嗜好性から酸味が弱く、甘味が強い品種が求められ、甘夏が育種された。現在の夏ミカンは甘夏が主に栽培、流通、販売され、ナツダイダイはほとんど栽培されていない。また、甘夏からの枝変わり品種で甘味が比較的強い新甘夏や、果皮や果肉が少し赤く、甘味が比較的強い紅甘夏が作成され、販売されている。また、甘夏とブンタンの交配品種のスルガエレガントも

市場に出ている。本研究では夏ミカン類である甘夏、新甘夏、紅甘夏、ナツダイダイ、スルガエレガントに含まれる機能性物質のフラボノイド類、クマリン類の特徴を、他カンキツとの比較から調べた。また、夏ミカン類のナツダイダイ、甘夏に含まれるフラボノイド類、クマリン類の含有量に関する先行研究はあるが、新甘夏、紅甘夏、スルガエレガントのフラボノイド類、クマリン類の特徴は本研究が初めての知見である。以下に本研究の結果をまとめた。

1. 夏ミカン類の果皮はフラボノイドの NAN, N-HES が、果汁は NAN が高含有であった。これらは比較的強い苦味を呈する物質で、夏ミカン類を食した時の苦味に影響していると思われる。
2. カンキツのフラボノイド、クマリン定量値の多変量解析主成分分析により、夏ミカン類の果皮は TAN, CIT, AUR が、果汁は NAN, AUR が特徴物質と推察された。
3. 甘夏の果実部位の各物質の定量分析では、フラベドにクマリン類の CIT, AUR が、アルベドにフラボノイド類の NAN, N-HES が、ジョウノウ膜に NAN が多く存在していた。
4. 甘夏とブンタンの交配種のスルガエレガントは、甘夏のフラボノイド類、クマリン類の特徴を有していた。
5. 夏ミカン類の各果皮の抗酸化活性は同程度であり、果汁では新甘夏が低かったが他は同程度であった。
6. フラボノイド類、クマリン類の抗酸化活性は、ERI と N-ERI が最も活性が高かった。夏ミカン類の特徴物質の抗酸化活性は、フラボノイド類の NAN, N-HES はポリフェノールでもあり、ERI, N-ERI より活性は低いが、活性を有していた。ポリメトキシフラボンの TAN, クマリン類の AUR, CIT の活性は低かった。物質の化学構造での水酸基（-OH）数とその位置が活性の強さに関与することが推察された。

夏ミカン類の甘夏、新甘夏、紅甘夏、ナツダイダイ、スルガエレガントに含まれる機能性物質のフラボノイド類、クマリン類の含有特徴は類似しており、抗酸化活性もおおよそ同様であった。

引用文献

- Bharti, S., Rani, N., & Krishnamurthy, Arya, D.S. (2014). Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Med.*, 80 (6), 437-451.
- Bibak, B., Shakeri, F., Barreto, G.E., Keshavarzi, Z., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2019). A review of the pharmacological and therapeutic effects of auroaptene. *Biofactors*, 45 (6), 867-879.
- Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. & Bourgaud, F. (2015). The distribution of coumarins and furanocoumarins in citrus species closely matches citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. *PLoS One*, 10 (11), e0142757.
- Horowitz, R.M. & Gentili, B. (1979). Taste and chemical structure. Taste and structure relations of flavonoid compounds. *Int. Congr. Food Sci. Technol.*, 5, 384-389.
- 今井篤 (2011) 未来につなぐ農業技術 カンキツ育種の現状と今後の展望, 農耕と園芸, 66 (2), 59-62.
- 磯田 隆晴, 山田 一字, 岩崎 守光, 猪原 健一 (1989) カンキツウイルス病に関する研究 第5報 紅甘夏のステムピッチング発生について, 九州病害虫研究会報, 35, 54-57.

- 岩堀修一・門屋一臣 (1999) カンキツ総論, 養賢堂, 東京, 176-178.
- Joseph, S.V., Edirisinghe, I. & Burton-Freeman, B.M. (2016) . Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56 (3) , 419-444.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., & Yano, M. (1999) . Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (9) , 3565-3571.
- Lakshmi, A & Subramanian, S. (2014) . Chemotherapeutic effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone studied in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats. *Biochimie*, 99, 96-109.
- Majo, D.D., Giammanco, M., Guardia, M.L., Tripoli, E., Giammanco, S. & Finotti, E. (2005) . Flavanones in citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Res. Int.*, 38 (10) , 1161-1166.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Morimitsu, Y. & Osawa, T. (1998) . Characteristics of antioxidative flavonoid glycoside in lemon fruit. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 4 (1) , 48-53.
- Miyake, Y. (2006) . Characteristics of flavonoids in niihime fruit - a new sour citrus fruit. *Food Sci. Technol. Res.*, 12 (3) , 186-193.
- 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝 (2011) マイヤーレモンに含まれるフラボノイド, クマリンの特徴. 日本食品科学工学会誌, 58 (4) , 178-181.
- 三宅義明 (2015) 国内地域特産の香酸カンキツ果実に含まれるフラボノイドの特徴, 日本食生活学会誌, 26 (2) , 71-78.
- 三宅義明・菅野友美 (2018) レモン類が含有するフラボノイド, クマリン類の特徴, 日本食品化学学会誌, 25 (2) , 60-69.
- Mukai, K. Antioxidant activity of foods: development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. (2019). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 65 (4) , 285-302.
- Schwingshackl, L., Schwedhelm, C., Hoffmann, G., Lampousi, A., Knüppel, S., Iqbal, K., Bechthold, A., Schlesinger, S. & Boeing, H. (2017) . Food groups and risk of all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 105 (6) , 1462-1473.
- Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D., & Giammanco, M. (2007) . Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104, 466-479.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006) . Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 70 (1) , 178-192.
- 農林水産省, 平成29年産特産果樹生産動態等調査,
https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/
- 小川一紀 (2018) フルーツの力 果実の機能性と食品加工への可能性, 月刊フードケミカル, 34 (12) , 21-24.
- 杉浦 実 (2014) カンキツ産業の明日を考える カンキツ機能性研究の現状と今後の展望, 果実日本, 69 (1) , 86-90.

Wolny, D., Chodurek, E., & Dzierzewicz, Z. (2014) . Antiproliferative effect of valproic acid and 5,7-dimethoxycoumarin against A2058 human melanoma cells. 71 (6) , 1056-1059.

山本浩樹 (2017) 知ってる?しずおか柑橘 8) スルガエレガント, 柑橘, 69 (8) , 24-25.

Zunying, L., Yurong, P., Xiaoshuang, L., Jinxin, J., & Mingyong, Z. (2017) . Chemical composition, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of pummelo peel flavonoid extract. *Industrial Crops and Products*, 109, 862-868.

(2020年 10月 12日 受付)
(2020年 12月 25日 受理)