〔農化 第 42 巻, 第 12 号, p.731~734, 1968〕

温州みかん外果皮油の抗酸化性成分

稲垣長典, 五十嵐 脩*, 荒川信彦, 太田登茂江

(お茶の水女子大学栄養化学教室, *同大学食物化学研究施設)

昭和 43 年 5 月 31 日 受 理

Antioxidative Components in the Flavedo Oil from Unshu-orange

By Choten INAGAKI, Osamu IGARASHI*, Nobuhiko ARAKAWA and Tomoe OHTA

Department of Food and Nutrition, The Ochanomizu University

** Research Institute of Food Chemistry, The Ochanomizu University*

Antioxidative activity of the unsaponifiable matters from unshu-orange flavedo against autoxidation of limonene and identification of their effective components were examined. The unsaponifiable matters showed strong activity due to the presence of tocopherols, which were identified to be α - and γ -tocopherols by thin layer and gas-liquid partition chromatographies. Their contents in unshu-orange flavedo were determined by these chromatographies as follows; α -tocopherol, 100~160 $\mu\text{g/g}$, and γ -tocopherol, 60~70 $\mu\text{g/g}$ (fresh basis).
(Received May 31, 1968)

柑橘類の果汁および果皮油は貯蔵中に悪変してオフフレーバーを生ずることが知られている。しかし、果皮油の場合、冷圧油は蒸留油に比べ、貯蔵性が優れているといわれる⁽¹⁾。したがって、外果皮より圧搾法によって精油を搾油すると、不揮発性の抗酸化性物質が同時に得られることが推定される。Ting らは、米国産の種々のオレンジについて、部位別に果皮油をアセトン抽出し、抽出物についてリモネンの貯蔵性への効果を検討し、とくに Valencia orange, grapefruit の外果皮抽出物にその効力の大きいことを見出した。また、外果皮のうちでも外側に効力の大きいことを見出している⁽²⁾。Ting らは、この有効物質としてトコフェロール類の存在を推定しているが、同定および確認は行っていない。そこで、著者らはわが国特産の温州みかんの外果皮油についてその抗酸化力の検定と抗酸化性物質と考えられるトコフェロール類の同定を試みた。ここに若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験方法および試料

a. 試 料 温州みかん：市販の愛媛県産の早生温州みかんおよび市販の冷凍温州みかんを用いた。

b. 外果皮油の抽出方法 外果皮油の抽出方法とし

ては、①アセトン抽出法、②不ケン化物抽出法の二つを用い比較検討した。

i) アセトン抽出法

温州みかん外果皮 (20 g) にアセトン (60 ml) を加え、ホモゲナイザーにて 5 分間ホモゲナイズする。さらに 60 ml のアセトンを加え、1 夜フリーザー中で放置する。抽出液を濾別後、さらに 2 回抽出をくりかえす。抽出液を濃縮し、残渣をアセトン抽出物とする。

ii) 不ケン化物抽出法

温州みかん外果皮 (20 g) にエタノール (60 ml) を加え、ホモゲナイザーにて 5 分間ホモゲナイズする。エタノール (100 ml) にてケン化フラスコに洗い込み、ピロガロール (4 g) を加えて、冷却管をつけて 15 分間加熱還流する。次いで、50% カセイカリ溶液 (10 ml) を加えて 20 分間加熱還流する。冷却後、吸引濾過し、残渣を石油エーテル (bp 40°~60°C, 300 ml) で抽出し、さらに 2 回抽出をくりかえす。濾液全部を分液漏斗に移し、水を加えて不ケン化物を石油エーテル層に転溶せしめ、水洗して水溶性物質を除く。硫酸ナトリウムにて脱水後、減圧下で濃縮し、不ケン化物区分とする。

c. 薄層クロマトグラフィー (TLC と略す) Pen-nock らの方法により^(3,4)、吸着剤としてシリカゲル G

(E. Merk 社製)を用い, 次の溶媒系で一次元展開または二次元展開を行なった.

i) 一次元展開溶媒 クロロホルム

ii) 二次元展開溶媒 ジイソプロピルエーテル:石油エーテル (bp 40~60°C) (1:4 v/v)

発色剤としては,

i) エメリー・エンゲル試薬 (E-E 試薬と以下略す).

ii) 五塩化アンチモンのクロロホルム溶液 (20% w/w).

d. ワールブルグ検圧計による抗酸化力の測定 外果皮のアセトン抽出物または不ケン化物区分 (外果皮 0.02~0.05 g 相当抽出物) に *dl*-リモネン (2 ml または 5 ml) を加えたワールブルグ容器にマノメーターを取り付け, 35°C にて酸素置換後, 酸素の吸収量を測定し, 外果皮抽出物の抗酸化力を比較検討した.

e. 温州みかん外果皮中のトコフェロール類の定量

i) 薄層クロマトグラフィーによる定量

勝井らの方法により⁽⁵⁾, 不ケン化物抽出区分の一定量をクロマト板上にスポットし, 一次展開後 E-E 試薬陽性スポット相当部位を剥離する. エタノール (5 ml) にて抽出, 吸着剤を遠心分離して除く. 上澄液 5 ml を常法によりエメリー・エンゲル法で発色定量した. 標準物質として, α -トコフェロール, γ -トコフェロールを用いた. なお, TLC による回収率は回収実験より 85% として算出した.

ii) ガスクロマトグラフィー (以下 GLC と略す) による定量

上記不ケン化物区分 (外果皮 50 g 使用) を, 勝井らの方法⁽⁶⁾により, 無水酢酸 (0.5 ml), ビリジン (2 ml) を加え沸騰浴上で 30 分加熱してアセチル化し, アセチル化剤を留去して除いた後, アセトンに溶解し試料とした. なお, 定量のための標準物質として α -トコフェリルアセテート, 内部標準物質としてスクワレンを用いた.

GLC の条件は次のごとくである.

F & M ガスクロマトグラフ 402 型を使用し, カラムは, 2.8×1200 mm ガラスカラム, 充填剤は 2.5% SE-30 (クロモソープ W, 60~80 メッシュ) を用いた. カラム温度 230°C, 検出器温度 280~290°C, 試料注入部温度 270°C, 試料注入はオンカラム方式, 検出器は水素炎イオン化検出器を用いた. キャリアーガス He で流量は 25 ml/min で行なった.

実験結果および考察

1. 温州みかん外果皮油の抗酸化力と両抽出法の抗酸化力への影響

Fig.1 は, ワールブルグ検圧法でリモネンの酸化に対する温州みかん外果皮油 (アセトン抽出区分または不ケン化物区分) の抗酸化力を検討した結果である. この結果より, 外果皮油の両抽出区分には, リモネンの酸化に対し著しい抗酸化力を示す物質が含まれていることが認められた. また, 両抽出法の間には抗酸化力に差異は認められなかった. したがって, 以後抽出法として不ケン化物抽出法を用いることとした.

Fig.1. Antioxidative Activity of Flavedo Oil from Unshu-orange and the Effect of Extraction Methods (Acetone Extraction and Unsaponifiable Matters Extraction) upon Antioxidative Activity.

Oxidation Method: *dl*-limonene 2 ml, extracts from the flavedo of unshu-orange (0.05 g), temperature 35°C, using Warburg apparatus.

1. Blank, 2. Containing acetone extract, 3. Containing unsaponifiable matters.

この不ケン化物区分にはトコフェロール類も抽出されてくるので, トコフェロール類が温州みかん外果皮油の抗酸化力に関与しているのではないかと推定される. そこで, 不ケン化物区分のトコフェロール類の同定を TLC, GLC を用いて試みた.

2. 不ケン化物区分に存在するトコフェロール類の同定

i) 薄層クロマトグラフィー

一次元展開を行なうと, α -トコフェロールと β -または γ -トコフェロール相当 *R_f* 部位に E-E 試薬陽性物質が 2 つのスポットとして検出された. そこで, 二次元展

開を行なった結果, Fig. 2 に示す図が得られた。これらのスポットはいずれも E-E 試薬, SbCl_5 試薬両者に陽性なスポットのみを示してある。スポット 1 は SbCl_5 試薬で橙赤色, スポット 2 は灰色~緑色であった。スポット 1 は標準 α -トコフェロールと同一の R_f 値を持ち, 重ねて α -トコフェロールをスポットした後, 展開しても新たなスポットは生じなかった。スポット 2 は β -トコフェロールと SbCl_5 試薬での発色が異なり (β -トコフェロールは褐色), R_f 値も β -トコフェロールのそれとは幾分異なった値を示した。しかも, γ -トコフェロールと同一の R_f 値, 同一の発色を示した。また, β -トコフェロールまたは γ -トコフェロールを重ねてスポットした後, 二次元展開を行なった結果, β -トコフェロールをスポットした際は新たに β -トコフェロールのスポットを生ずるが, γ -トコフェロールをスポットした際には, 新たなスポットを生じなかった。

これらの結果より, 温州みかん果皮に含まれるトコフェロール類は α -および γ -トコフェロールの 2 種で β -トコフェロールは含まれていないことが明らかにされた。

ii) ガスクロマトグラフィー

次いで, GLC により, TLC の結果の追試と α -トコ

Fig. 2. Two-dimensional Thin-layer Chromatogram of Unsaponifiable Matters from Unshu-orange Flavedo.

Left: a mixture of α -, β -, γ - and δ -tocopherols, Right: unsaponifiable matters from unshu-orange flavedo.

Spot 1, α -tocopherol; spot 2, β -tocopherol; spot 3, γ -tocopherol; spot 4, δ -tocopherol. All the spots shown on the chromatograms were stained with Emmerie-Engel reagent and 20% SbCl_5 in CHCl_3 (showing only E-E reagent positive spots). Stained by SbCl_5 reagent, spot 1 colored to orangish red, spot 2 pale gray brown, spot 3 grayish green and spot 4 grayish brown.

Solvent system: solvent A CHCl_3 , solvent B 20% di-propyl ether in petroleum ether (bp 40~60°C).

Fig. 3. Gas Chromatogram of Acetate of the Unsaponifiable Matters from Unshu-orange Flavedo.

Apparatus; F & M Gas Chromatograph No. 402. Column; 2.5% SE-30 on Chromosorb W (60~80 mesh), length 120cm, internal diameter 2.8 mm (glass column), temperature 230°C; carrier gas He, flow rate 25 ml/min. Detector; HFID.

1. squalene, 2. γ -tocopheryl acetate, 3. α -tocopheryl acetate, 4. campesteryl acetate, 5. stigmasteryl acetate, 6. β -sitosteryl acetate.

フェロールおよび γ -トコフェロールの温州みかん果皮中の含量の定量を試みた。この結果を Fig. 3 に示す。GLC では, β -トコフェロールと γ -トコフェロールとの分離は不可能であるが, α -トコフェロールと γ -トコフェロールとは同含量で同一のピーク面積を持つことが知られているので⁽⁶⁾, Fig. 3 の結果より, 主成分は α -トコフェロールで, γ -トコフェロールが少成分であることが認められた。なお, δ -トコフェロールは試料によってはこん跡程度検出される場合があった。

3. 温州みかん果皮中のトコフェロール類の分別定量

市販温州みかん, 冷凍みかんの果皮について, GLC 法, TLC 法で定量を行なった結果を Table I に示す。

GLC 法では内部標準物質として用いたスクワレンとのピーク面積比より算出した。

Table I に示したごとく, 同一試料については GLC 法, TLC 法ともほぼ同一の結果を示した。この結果より, 新鮮物中には α -トコフェロール 100~160 r/g, γ -トコフェロール 60~70 r/g 程度が温州みかん果皮に含まれていることが認められた。

4. 温州みかん果皮中のトコフェロール含量と抗酸化力との関連性

温州みかん果皮のトコフェロール含量とはほぼ同程度の α -トコフェロール, γ -トコフェロールまたは両者の

Table I. Tocopherol Contents in Unshu-orange Flavedo

Sample	Method	α -Tocopherol ($\mu\text{g/g}$)*	γ -Tocopherol ($\mu\text{g/g}$)*
Fresh orange	I {	GLC 111	62
		TLC —	—
	II {	GLC 156	68
		TLC 153	67
Frozen orange	I {	GLC 101	58
		TLC 106	64

* Fresh basis.

混合物について, リモネンの酸化に対する抗酸化力を測定し, 温州みかん外果皮の不ケン化物の抗酸化力と比較した結果を Fig. 4 に示す。この結果より, 温州みかん外果皮の不ケン化物はそれと同程度の α -および γ -トコフェロール混合物とほぼ同一の抗酸化力を持つことが明らかにされた。したがって, 温州みかん外果皮油の抗酸化作用は, 外果皮に含まれている α -トコフェロールと γ -トコフェロールの作用に基づくものであることが認められた。

要 約

温州みかん外果皮に含まれる抗酸化性成分について検討した結果, 次の結果が得られた。

(1) 温州みかん外果皮の不ケン化物区分にはかなり強い抗酸化作用がある。

(2) この抗酸化作用は温州みかん外果皮に存在する α -および γ -トコフェロールに基づくものである。

(3) 温州みかん外果皮のトコフェロール類は α -トコフェロール, γ -トコフェロールで, β -トコフェロールは存在しない。そしてその含量は, α -トコフェロール 100~160 $\mu\text{g/g}$ (新鮮物量で), γ -トコフェロール 60~70 $\mu\text{g/g}$ (新鮮物量で) であった。

Fig. 4. Relationship between Tocopherol Content in Unshu-orange Flavedo and its Antioxidative Activity Comparing with that of the Same Levels of α - and/or γ -Tocopherols.

Oxidation method was the same as Fig. 1. besides 5 ml of *dl*-limonene was used.

1. Blank, 2. Contained 5.5 μg of α -tocopherol (α -toc.), 3. Contained 3.0 μg of γ -tocopherol (γ -toc.), 4. Contained unsaponifiable matters from unshu-orange flavedo (0.05 g) (α -toc. content 5.5 μg , γ -toc. 3.0 μg), 5. Contained 5.5 μg of α -toc. and 3.0 μg of γ -toc.

- (1) J. W. Kesterson and R. Hendrickson: *Fla. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.*, 521 (1953).
- (2) S. V. Ting and W. F. Newhall: *J. Food Sci.*, **30**, 57 (1965).
- (3) J. F. Pennock, F. W. Hemming and J. D. Kerr: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 542 (1964).
- (4) K. J. Whittle and J. F. Pennock: *Analyst*, **92**, 423 (1967).
- (5) 勝井五一郎, 市村陽二, 西本行雄: 薬剂学, **23**, 299 (1964).
- (6) 石川靖二, 沢田 勝, 勝井五一郎: ビタミン, **34**, 185 (1966).