差スペクトル法による温州ミカン果実のビタミン C 定量並びに果実発育過程におけるその含量変化[†]

東 野 哲 三*・藤 田 修 二*

Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) in Satsuma Mandarin Fruit by Difference Spectral Method and Change in Its Content of the Fruit during the Developmental Stage

(Determination of Ascorbic Acid by Spectrophotometric Method
Based on Difference Spectra Part VI)

Tetsuzo TONO and Shuji FUJITA

Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840

The test solution for estimating ascorbic acid (AsA) in the fruit of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) was prepared in the usual procedure except for containing the destruction of ascorbate oxidase in the fruit by the heating with micro wave and the removal of an interfering factor against total AsA analysis by the adsorption Japanese acid clay. Total AsA, AsA and dehydro AsA in the test solution were determined by the difference spectral method and the content of these compounds was surveyed at different growing stages of the fruit. Total AsA (mg%) in the peel of the fruit was comparatively high in an early growing stage (late in June) and then decreased toward the middle of August, when it showed a minimum value. Afterwards, the compound increased to the same level as a young fruit until the last stage of development. The amount of total AsA calculated per fruit slightly increased by late August and markedly rose after this period. This suggests that the compound may be stored in the peel as the fruit was ripened. The tendency in the change of its amount in the pulp was similar to that in the peel. Total AsA in both peel and pulp of the fruit was mostly AsA. Dehydro AsA was rarely found in developing fruits.

(Received Sep. 1, 1984)

カンキツ果実のビタミンC含量はその品種により相違し、また同一果実でも部位により異なる。例えば、果皮中のビタミンC含量は果肉のそれより数倍も高いことが知られている¹⁾。しかし、カンキツの発育過程における果皮および果肉中のビタミンC含量の変化を調査した報告例は少なく、温州ミカンについては、その果実成分の組織化学的研究の一環として行われた黒崎ら²⁾の報告がみられる程度に過ぎない。その報告において、彼等は発育初期のミカン果皮では、L-アスコルビン酸 (AsA) 含量は低い、デヒドロアスコルビン酸 (DAsA) 含量が高

く、成熟するにつれて AsA が増加するのに対して DAsA は減少すると記している。最近、著者ら³⁾は温州ミカンの発育過程におけるアスコルビン酸酸化酵素 (AAO, EC 1.10.3.3) 活性の変動を追跡したところ、その幼果の AAO 活性は著しく高かったが、果実の発育につれてそれが漸減することを認めた。これら二つの実験結果より、発育中のミカン果皮のビタミンC含量と AAO 活性の変動との間には密接な関係があるように思われる。すなわち、AAO 活性の強い幼果では DAsA 含量が高く、同活性の低い成熟果の果皮では AsA が多くなるというこ

[†] 差スペクトルに基礎を置く分光測光法によるアスコルビン酸の定量 (第6報) (前報, 文献 6))

* 佐賀大学農学部 (〒 840 佐賀市本庄町 1)

とである。しかし、幼果のこのような高い DAsA 値については、本来幼果に含まれていた AsA が分析用試験液の調製時に酵素的酸化を受けて変化した DAsA に由来したものではないかとの疑問が持たれる。この点を確認するために試験液調製法について検討し、既報⁴⁾で報告した差スペクトル法を用いて発育中のミカン果実のビタミンCを定量したところ、従来とはかなり相違する結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

材料の温州ミカン (*Citrus unshiu* Marc.) は、佐賀大学農学部附属農場で栽培中の三保早生の約20樹の果実を供試した。1982年および1983年の6月より11月にかけて12回にわたり果実を採取しそのつど分析に付した。一部は凍結保存し必要に応じて実験に供した。

2. 分析用試験液の調製

同一発育時期の果実3個を用い、いずれも果軸を中心として放射状に4~8等分に切断し、それぞれその1切片ずつを集め、全量が約100g(後記参照)となるように加減して果実重量を調整した。幼果の場合は、約100g相当量の果実(その大きさに応じ4~20個)をそのまま使用した。これを電子レンジ(シャープR-546, 定格高周波出力520W)を用いて加熱処理し、酵素を破壊した後に果皮部と果肉部とに分離した。果皮部は小型粉砕器(協立理工 SK-M2型)を用いて破砕した後、その10~20gを乳鉢中にとり、予想されるビタミンC含量に応じて4~10倍量の2%メタリン酸(HPO_3)および少量の石英砂を加えて磨砕抽出した。抽出液は遠心分離(3500rpm, 10分)し、その上澄液を果皮の分析用試験液とした。一方、果肉部は乳鉢中で乳棒を用いて圧碎し、木綿布を用いて搾汁後その汁液を遠心分離した。その上澄液に同量の4% HPO_3 を添加したものを果肉の分析用試験液とした。なお、発育初期(7月4日採取のものまで)の幼果は果汁分が少なかったため、全果を果皮部とみなして試験液を調製した。

3. 分析方法

果皮試験液中のビタミンC分析操作については実験結果の1(後記)に示した。また果肉試験液中のビタミンCは既報⁴⁾の差スペクトル法による分析操作にしたがって定量した。各試験液とも測定は2回行い、その平均値に試験液調製時の希釈倍率を乗じて果皮または果肉100g中のビタミンC量(mg%)を計算した。差スペクトルのピーク高(ΔE_{243})の測定には日立557型自記分光

光度計を使用し、液層10mmの石英セルを用いて測定した。

4. 試薬類

ジチオスライツール(DTT), HPO_3 および緩衝液用の試薬類はいずれも特級品を使用し、また酵素剤(AAO)は既報⁴⁾と同様キュウリのアセトン粉末より調製した。

実験結果および考察

1. 差スペクトル法による温州ミカン果皮のビタミンC定量

常法⁵⁾にしたがって、ミカンの幼果および成熟果皮を5% HPO_3 (チオ尿素は含まぬ、後記)中で磨砕抽出して試験液を調製し、これらを差スペクトル法により分析したところ、いずれも総C量の数10%がDAsAであった。前記したように、このDAsAがAsAの酵素的酸化に由来したものであるかどうかを知るためには、他の方法により試験液を調製し検する必要がある。しかし、分光光度法の一つである差スペクトル法では、その測定波長(243nm)付近での吸光度を高めるような試薬(例えば、硫化物や塩化物等)で処理することは、同法の分析精度を低下させるので望ましくない。そのような意味においては、加熱等の物理的方法で処理する方が有利であるように思われる。本実験では簡便さの点から、マイクロ波による急速加熱法を用いることとした。マイクロ波処理の要点としては処理時間と材料の使用量とが考えられるので、この2点について検討した。

(1) マイクロ波処理によるAAOの破壊

温州ミカン(1982年10月採取)の数個をそれぞれ8等分し、それら切片の約100gにつき、電子レンジ(調理加熱ダイヤル)で45, 90および135秒間処理した後、それぞれ果皮を分離し、前記(実験方法の2)のようにしてマイクロ波処理試験液を調製した。各処理試験液の分析結果をFig. 1に示した。総C値は45秒と90秒処理区間で大差はみられなかったが、135秒処理区ではやや低下の傾向が認められた。しかし、90秒と135秒処理区の総CのほとんどがAsAであったことから、これらの処理区ではAAOがほぼ完全に失活したものである。これに対して45秒処理区では総Cの約50%がDAsAであった。この区では加熱時間の不足でAAOの破壊が十分に行われなかったために、試験液調製中にAsAの一部が酵素的酸化を受けたものと思われる。したがって、本実験に用いた電子レンジでは処理時間は90秒程度が適当といえる。ただし、処理時間は電子レンジの機種等により相違することが考えられるので、あらか

Fig. 1 Relationship between time of micro wave heating and ascorbic acid contents in the peel of Satsuma mandarin fruit

About 100 g of the fruit was used in each test

▨ Total AsA ▤ AsA □ Dehydro AsA

じめ予備試験を行って決めておく必要があろう。

次に、処理時間を 90 秒とし使用する果実の重量について検討した。すなわち、前記果実切片を約 100 g, 200 g および 300 g とり 90 秒間マイクロ波処理後それぞれ果皮試験液を調製し、それらのビタミンCを定量した。Fig. 2 に示したように、材料の重量増につれて総C中の AsA 値は低下し、DAsA 値は逆に増加した。このことは同一処理時間では、重量の増加によりマイクロ波処理による材料全体の温度上昇率が低下し、そのため酵素の破壊が完全に行われなかったことを意味するのであろう。本実験では、分析用試験液調製には材料（果実切片）を約 100 g 使用することとした。なお、本実験の総C定量時にも後記のような試験液の酸性白土処理を行った。

(2) 差スペクトル法による分析操作の設定

上記のようにして調製した果皮試験液について、差スペクトル法により分析したところ、Table 1 の (1) に示したように総Cは AsA よりやや低い値となった。このような矛盾する結果は前報⁹⁾の青果物分析の場合にはみ

Fig. 2 Relationship between weight of sample fruit and ascorbic acid contents in the peel of Satsuma mandarin fruit

Sample was heated for 90 second with microwave

▨ Total AsA ▤ AsA □ Dehydro AsA

られなかった。前報までの差スペクトル法による総Cの定量においては、試験液中に存在する DAsA を DTT により還元した後に総C値を測定したが、ミカン果皮試験液中には、この DTT 処理により AsA の酵素的酸化反応の妨害物質に変化するような未知の因子が存在し、これが本実験でみられた総C値低下の原因となるのではないかと考えられる。このような考察についてはさらに検討を要するが、いずれにしてもミカン果皮中には総Cの定量に対する妨害因子の存在が考えられるので、あらかじめそれを除去しておくことが必要である。妨害因子の除去については、岡村⁷⁾もその必要性を認め、 α , α' -ジピリジル法による総C定量に際して活性炭による吸着除去処理を行っている。著者らはそれを含む二、三の吸着剤について検討したが、その結果、既報⁹⁾の動物性食品の AsA 分析時に使用した酸性白土による比較的温和な吸着処理が、上記妨害因子の除去にも好適であることを認めた。すなわち、果皮試験液 20 ml に酸性白土 0.25 ~ 0.5 g を添加し、数秒間振盪後東洋濾紙 (No. 2) で濾過した。それら濾液のビタミンCを定量したところ、

Table 1 Removal of interfering factors in the test solution of peel by adsorption of Japanese acid clay

Experiment	Concentration of Japanese acid clay	Total AsA (mg %)	AsA (mg %)	Dehydro AsA (mg %)
(1)	None	98.5	107.2	-8.7
(2)	0.25 g/20 ml*	109.4	107.2	2.2
(3)	0.50 g/20 ml*	109.4	107.2	2.2

* The test solution was prepared from Satsuma mandarin fruit picked on July, 4 (1983)

Table 1 の (2) および (3) に示したようにこれらの添加量で妨害因子を効率よく除去しうることを認めた。なお、酸性白土の添加量が 0.5 g より多い場合には総CおよびAsA 値とも低下する傾向がみられた。

以上のことから、ミカン果皮の総Cの分析操作を次のように設定した。すなわち、果皮試験液 20 ml に酸性白土 0.5 g を添加して処理した液を既報⁴⁾と同様に DTT を用いて還元した後、差スペクトル法により総Cを定量する。しかし、AsA の分析には酸性白土処理しない試験液を使用する (Table 1 参照)。DAsA 値は総C値とAsA 値との差で表わす。なお、果肉試験液の場合には上記のような総C定量に対する妨害が認められなかったため、既報⁴⁾の果汁分析の場合と同様に行った。

なお、本法によるミカン果皮のビタミンC分析値も、前報⁴⁾の青果物の場合と同様、ヒドラジン法によるそれよりいずれも低い値を示した。

2. 温州ミカンの果実発育過程におけるビタミンC含量の変化

(1) 果皮中のビタミンC含量の変化

温州ミカンの発育過程 (1982 年および 1983 年) における果皮中の総C濃度 (mg%) の変化を Fig. 3 に示した。両年度における果皮中の総C濃度はほぼ同一パターンを示して変動した。すなわち、発育初期 (6 月下旬) には総Cは 160~170 mg% とかなり高い濃度であったが、果皮の発育につれてそれは低下し、8 月中旬には最低値 (約 30 mg%) となった。その後は再び上昇し、成熟期 (11 月中旬) には初期とほぼ同レベルに達した。なお、Fig. 4 には 1983 年度におけるミカン果皮中の AsA および DAsA 濃度の変化を示したが、果皮の発育過程を通じて AsA と総Cとの濃度差は小さく、DAsA は極

Fig. 3 Change of total ascorbic acid content in the peel during fruit development

Test year ●—● 1982 ○—○ 1983

Fig. 4 Changes of L-ascorbic acid and dehydroascorbic acid contents in the peel during fruit development

●—● AsA ○—○ dehydro AsA

めて低濃度であった。このように、総Cのほとんどすべてが AsA の形で存在するという結果は、前記の黒崎ら²⁾のそれと比べて著しく相違する。すなわち、彼らの結果では、発育初期の果皮においては DAsA が総C値の大部分を占め、また成熟果の果皮でも少量ながら存在するという。彼らの実験と本実験との間でこのような結果の相違がみられたのは、ミカンの幼果および果皮中の高い AAO 活性に原因があるように思われる。本実験では、果皮の AAO をあらかじめマイクロ波処理により完全に破壊した後に試験液を調製したために、AsA の調製中での酸化はなく、ミカン果皮中の総Cのすべてが AsA として定量されたのであろう。黒崎らの報告には試験液調製に関する記載はないが、このような場合多くは、単に材料を濃い HPO_3 中で磨砕することにより酵素を失活させる方法がとられているようである。しかし、前記 (実験結果の 1) したように、このような試験液調製法による時は一部 AsA の酵素的酸化をうけることはまぬがれないであろう。したがって、ミカン果皮のような AAO 活性が強く組織が硬い食品材料については、あらかじめマイクロ波処理などの方法により、酵素を完全に破壊した後に磨砕抽出することが肝要であると思われる。

ミカン果皮中の総C濃度は Fig. 3 のような特徴的な変化を示すが、果実の発育に伴う総Cの変化を動的に把握するためには、その 1 果当りの変動を調査する必要がある。いま、両年度の実験に使用したミカンの果重を基礎として、平均 1 果当りの総C量 (mg) を計算し、その値と発育時期との関係を示したところ、Fig. 5 のような関係曲線が得られた。(Table 2 に 1 例として 1983 年度のミカンの平均果重および果汁成分含量の変化を示した。) この図のような発育中のミカン果実における総C量の増加速度の転換点に関する植物生理学的意義につ

Fig. 5 Changes of total ascorbic acid per a fruit in both peel and pulp during fruit development

Test year (peel) ○ 1982 ● 1983
(pulp) △ 1982 ▲ 1983

Table 2 Seasonal changes in average weight of Satsuma mandarin fruit and brix and acidity of the fruit juice

Date	Average weight (g)			Brix	Acidity*
	Fruit	Peel	Pulp		
(1983)					
6.20	6.9	5.8	1.1	—	—
7. 4	14.1	9.5	4.6	—	—
7.18	23.5	9.7	13.8	6.6	2.4
8. 1	44.8	13.9	30.9	6.3	2.5
8.16	49.9	13.9	36.0	7.4	2.3
8.26	61.1	14.4	46.7	7.2	1.9
9. 7	81.6	18.7	62.9	7.4	1.7
9.22	113.7	26.2	87.5	7.6	1.4
10. 6	112.1	21.7	90.4	8.4	0.9
10.17	113.0	27.5	85.5	9.2	0.7
10.31	121.5	21.6	99.9	9.4	0.7
11.12	136.0	28.8	107.2	9.6	0.6

* Acidity means citric acid content (%) determined by acilzyer

いては、本実験段階では十分説明し得ないが、糖、酸などの果汁成分含量とも関連して化学的な果実充実期への転換を示唆するものであろう。また、成熟期におけるミカン果皮中の AsA の蓄積については、AsA がフラベドの油胞の周辺細胞に多く分布するという黒崎ら⁹⁾の報告および温州ミカンの果皮に分布するトリヒドロキシベンゼン酸化酵素の活性が AsA により強く阻害されるという著者ら⁹⁾の報告等から、油胞中の油脂或いはフェノ

Fig. 6 Changes of ascorbic acid contents in the pulp during fruit development

●—● Total AsA ○—○ AsA
▲—▲ Dehydro AsA

ール化合物等の酸化に対する AsA の防御作用と関係があるものと考えられる。

(2) 果肉中のビタミンCの変化

1983 年における発育中の温州ミカン果肉中の総 C, AsA および DAsA の濃度変化を Fig. 6 に示した。果肉においても、果皮の場合と同様、総 C 濃度は発育初期 (7 月) には高かったが、その後減少し中期 (8~9 月) 以降再び増加する傾向がみられた。また総 C 中のほとんどが AsA であり DAsA は僅少であった。果肉についても両年度のミカンの平均 1 果当りの総 C 量を計算し、その発育過程における変動を Fig. 5 に併記した。果肉の場合も果皮と同様の総 C 量の変化、すなわち発育初期には増加は少なく、中期以降に増加する変動の傾向が認められた。

要 約

温州ミカンの果皮には、果実発育過程を通してアスコルビン酸酸化酵素 (AAO) の活性が認められる⁹⁾ので、まずミカン果皮の分析用試験液の調製条件について検討した。その結果、(1) 試験液調製前に果皮の AAO をマイクロ波処理により完全に破壊しておくこと、(2) 果皮試験液中に含まれる総 C 定量に対する妨害因子を、あらかじめ酸性白土処理により吸着除去することが必要であることを認めた。これらの前処理を行った後に調製した果皮および果肉試験液中の総 C, AsA および DAsA を差スペクトル法を用いて分析し、ミカン果実発育中のこれらビタミン C の変動を追跡した。

ミカン果皮中の総 C 濃度は果実発育の初期 (6 月下旬) には高かったが、その後 8 月中旬までは急速に低下し、成熟期に這入って再び増加するという特徴的な季節的変

化がみられた。この総Cのミカン果実中における動的変動を知るために、1果当りの総C量を計算したところ、その量は発育初期より8月下旬までは僅かな増加であったが、それ以降は急激な増加に転じて AsA が果皮内に急速に蓄積されて行くことが認められた。果肉中の総Cについても果皮の場合と同様の変動傾向がみられた。発育各段階におけるミカン果皮および果肉中の総Cのほとんどすべては AsA であり、DAsA は僅少であった。

本研究は昭和58年度文部省科学研究費補助金(課題番号57560034)の援助を得て行ったものである。本報告の大要は昭和59年4月、日本農芸化学会大会(東京)で発表した。

文 献

- 1) ERIKSON, L. C.: "The Citrus Industry II" (University of California, U.S.A.), p. 104 (1968).
- 2) 黒崎敏晴・川上いつゑ: 園学雑, **43**, 189 (1974).
- 3) 東野哲三・藤田修二: 日食工誌, **31**, 248 (1984).
- 4) 東野哲三・藤田修二: 日食工誌, **30**, 414 (1983).
- 5) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編: 食品分析法(光琳, 東京), p. 466, 474 (1982).
- 6) 東野哲三・藤田修二: 日食工誌, **31**, 665 (1984).
- 7) 岡村正人: 栄養と食糧, **35**, 223 (1982).
- 8) TONO, T. and FUJITA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2953 (1982).
- 9) 藤田修二・東野哲三: 農化, **53**, 233 (1979).

(昭和59年9月1日受理)