温州ミカン搾汁粕からの粗ヘスペリジン 製造法の改良

三宅正起*・綾野 茂*・前田久夫*・伊福 靖*

A Modification of the Method of Manufacturing Crude Hesperidin from Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peel Residue

Masaki MIYAKE*, Shigeru AYANO*, Hisao MAEDA* and Yasushi IFUKU*

* Wakayama Agricultural Biological Institute Center, 396-1 Tsukatsuki,
Momoyama-cho, Naga-gun, Wakayama 649-61

In order to utilize Satsuma mandarin peel residue effectively, which contains many useful compounds, the method of extraction and recovery of hesperidin from dried Satsuma mandarin peel residue was studied. The results obtained were as follows; (1) The hesperidin content in a extracted solution was the highest, when the residue was extracted for 30 min with stirring at 20~40°C. (2) The optimum pH for crystallization of hesperidin from the extracted solution was around 5.0. And the recovery became much higher by heating the solution adjusted to pH 5.0 in the range of 70~90°C. (3) The recovery yields were remarkably influenced by the quantity of added water to the residue. The best result was obtained by adding 800 ml of water to 100 g of the sample. In this condition, the recovery and purity of hesperidin was 27.3% and 93.7%, respectively. (4) To recover hesperidin effectively, it is necessary to adjust the hesperidin content in the extracted solution to approximately 500 mg/100 ml. Also, a higher yield (53.0%) was obtained by recycling the secondary extracted solution after concentration.

(Received Nov. 20, 1989)

柑橘搾汁粕中の有効成分の一つであるヘスペリジンに関する研究は主として米国で行われており、オレンジ類からの抽出・回収条件についても詳細に検討が行われている¹⁾²⁾。わが国では温州ミカンのヘスペリジンに関する報告例^{3)~7)}はあるが、抽出・回収についての詳細な報告は少ない⁸⁾。最近、柑橘類のフラボノイド配糖体に関する研究が進められ^{9)~12)}、その中でヘスペリジンに強い血圧降下作用があることも報告されており¹²⁾、効率的なヘスペリジンの工業的抽出・回収方法の確立が急務であるとする。著者らは温州ミカン搾汁粕の有効利用を図るため、ヘスペリジンの抽出・回収条件について検討した。

実 験 方 法

1. 供試材料

1988年11月から1989年2月に和歌山県農協連桃山食品工場に入荷した和歌山県産の温州ミカンをインライン搾汁機で搾汁した。排出された搾汁粕に消石灰を0.3%の割合で添加混合し、20分間ライミングしたのち、ガルフマシナリ社製圧搾機を用い30~40 kg/cm²の圧力で圧搾後、ドラム式乾燥機で乾燥したものをミキサーで微細化処理を行って、供試試料とした。

2. ヘスペリジンの純度の測定

ヘスペリジンの分析方法は既報⁴⁾に従った。すなわち粗ヘスペリジン 100 mg を 0.1 N NaOH 10 ml に溶

* (株)和歌山アグリバイオ研究センター (〒649-61 和歌山県那賀郡桃山町調月 396-1)

解させ、蒸留水で 100 ml に定容した後、0.45 μ m フィルターを用いて濾過し、HPLC にて定量した。装置：(株)島津製作所製 LC-5 A, カラム：旭化成工業(株)製 Asahipak ODP-50, 移動相：水-アセトニトリル (80 : 20), 流速：1.5 ml/min, 検出器：島津 SPD-2 A (285 nm)。

3. ヘスペリジンの分離法

供試試料に水を加えた後、50% NaOH 溶液で pH 12 に調整し、0.5 時間攪拌後、遠心分離処理 (5 000 rpm, 5 min) によって抽出液 (上澄液) を得た。得られた抽出液を濃塩酸で pH 5.0 に調整し 70°C まで加温した後、一夜放置して析出した結晶物を遠心分離処理 (15 000 rpm, 10 min) によって集め、粗ヘスペリジンを得た。この粗ヘスペリジンを水で洗浄したのち、40°C で 30 時間熱風乾燥させ、粉末粗ヘスペリジンを得た。本実験で設定した抽出・回収方法を Fig. 1 に示す。

4. 二次抽出液の濃縮方法

供試試料 100 g に水を 4 000 ml 加え pH 12 に調整し、上記方法で粗ヘスペリジンを析出させた後の遠心分離上澄液 (以下、二次抽出液と示す) をロータリーエバポレーターを用い 70°C で濃縮倍率 2~10 倍まで順次濃縮した。

実験結果および考察

1. 抽出方法の検討

(1) 供試試料の検討

試料中のヘスペリジンの溶解に及ぼす pH の影響については、pH 11~12 で最も溶解度が高いことが報告されている¹⁾²⁾⁴⁾。また供試材料としてライミング後の温州ミカン搾汁生粕を用いた場合は、初期 pH を 12 に調整した場合でも試料中の有機酸に中和されて経時的に pH が酸性側に下がるため本実験の目的とするヘスペリジンの抽出条件を検討する場合は不適と考えられる。そこで本実験では比較的 pH 変動の少ない乾燥搾汁粕、特に微細化処理を行ったものを供試試料に選んだ。また、初期 pH は若干酸性側に下がることを考慮して pH 12 に設定した。

(2) 抽出時間

ヘスペリジンの抽出に及ぼす抽出時間の影響について検討するため、試料 10 g に水 100 ml を加え、pH 12 に調整後、攪拌区と放置区を設け、それぞれ 0.5, 1, 2, 3, 4 および 5 時間抽出を行った。結果は Table 1 に示す。ヘスペリジン濃度は、攪拌区では抽出時間 0.5 時間区で最高値 430.0 mg/100 ml を示し、その後抽出時間が長くなるにつれてヘスペリジン濃度は減少する傾向を

Fig. 1 Procedures for extracting and recovering hesperidin from dried Satsuma mandarin peel

示した。また、放置区では1時間区が最高値 427.0 mg/100 ml を示し、その後は攪拌区と同様、減少した。

以上の結果から、pH 12 に調整後の抽出時間は 0.5～1 時間の間で行うことが望ましく、それ以上抽出しても、ヘスペリジンの分解に伴ってヘスペリジン濃度は低下することが示された。

そこで本実験における抽出時間は、実際の抽出工程を考慮して、攪拌区のみで 0.5 時間に設定した。

(3) 加水量の検討

ヘスペリジンの抽出・回収に及ぼす試料への加水量を検討するため、試料 100 g に対し、水 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 2000 ml および 4000 ml をそれぞれ加え、ヘスペリジンの抽出・回収試験を行った。その結果を Table 2 に示す。

抽出液のヘスペリジン濃度は加水量が少ない試験区ほど高くなったが、試料からのヘスペリジンの抽出率は逆に加水量 4000 ml 区が最高となり 82.2% を示した。得られた粉末粗ヘスペリジン量としては、加水量 800

ml 区が 1.51 g と最高値を示し、次いで加水量 600, 1000 ml 区の 1.23 g, 1.22 g となった。また、純度を考慮したヘスペリジンの回収率（以下、回収率と示す）も同じ傾向を示した。

以上の結果、加水量としては、試料 100 g に対し 800 ml 程度が最適であると思われる。また、加水量 600 ml 区では、粘度が高く攪拌が困難となり、工業的な抽出・回収工程を考えた場合、問題が残る。

(4) 抽出温度

ヘスペリジンの抽出に及ぼす加熱の影響をみるため、試料 100 g に水 800 ml を加えた後、95℃ で 30 分まで加熱処理を行ったが、ヘスペリジンはほとんど抽出できなかった。そこで、供試試料 100 g に水 800 ml を加え、pH 12 に調整後、室温 (20℃), 40℃, 60℃, 80℃ および 95℃ でそれぞれ 0.5 時間抽出を行い、抽出液のヘスペリジン濃度を測定した。結果は室温区、40℃ 区はともに 537 mg/100 ml となり一致したが、60℃ 区、80℃ 区は室温区に比べそれぞれ 11.1%, 12.1% 減少し、更

Table 1 Effect of extraction time at pH 12.0 on extraction of hesperidin

Extraction time (h)	Hesperidin content in extract (mg/100 ml)	
	Stirring	No-stirring
0	375.8	375.8
0.5	430.0	394.4
1.0	418.9	427.0
2.0	394.4	407.7
3.0	381.0	380.2
4.0	381.0	397.3
5.0	366.1	384.4

Table 2 Effect of volume of added water on extraction of hesperidin

	Added water (ml)				
	600	800	1000	2000	4000
Hesperidin content ^{a)} (mg/100 ml)	686.0	505.9	423.9	224.2	111.3
Absolute quantity ^{a)} (g)	2.09	2.54	2.78	3.69	4.27
Yield (g) ^{b)}	1.23	1.51	1.22	0.63	0.29
Purity (%)	90.3	93.7	94.3	91.3	92.3
Recovery (%) ^{c)}	21.3	27.3	22.1	11.3	5.2

^{a)} In extracted solutions

^{b)} Powder of crude hesperidin (on a dry weight basis)

^{c)} Yield(g) × Purity(%) / 5.2(g)*

* Hesperidin content in 100 g of dried Satsuma mandarin peel

に 95℃ 区では 31.4% の減少となった。

以上のように、アルカリ溶液の状態で加熱処理を行うとヘスペリジンの分解が進み、結果として抽出液中のヘスペリジン濃度は減少した。すなわち、ヘスペリジンのアルカリ抽出は加熱処理を行うよりも室温で実施する方が効率がよく、実用性も高いことが示された。

2. 回収方法の検討

次に、ここではヘスペリジンの回収に係わる要因について検討を行った。

(1) pH の影響

上記方法で得たヘスペリジン抽出液から、ヘスペリジンを結晶化させるための pH について検討した。すなわち、抽出液をそれぞれ pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 および 7.0 に調整し、粉末粗ヘスペリジンを回収した。その結果を Table 3 に示す。

粉末粗ヘスペリジン量としては pH 3.0 区が最も多く 1.63 g に達したが、ヘスペリジン純度が 72.8% と低いため、回収率としては 22.9% と最も低くなった。それに対し、pH 5.0, 6.0 区では純度がそれぞれ 93.7%, 93.2% と高く、回収率も 25.9%, 26.8% と高くな

った。

また、粗ヘスペリジン採取後の上澄部におけるヘスペリジン濃度を測定した結果は、pH 5.0 区が 292.2 mg/100 ml と最も低い値を示し、結晶化のための最適 pH は 5.0 付近であると推察された。

(2) 温度の影響

ヘスペリジン抽出液を pH 5.0 に調整後、加熱処理を行うことは、ヘスペリジン不溶化速度、不純物の析出などが関与し、ヘスペリジンの収量、純度に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、加熱温度の違いによるヘスペリジン回収量について検討した。すなわち、ヘスペリジン抽出液を pH 5.0 に調整後、40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃ および沸騰 5 分間それぞれ加熱処理を行い、一夜室温で放置後ヘスペリジンを回収した。結果は Table 4 に示す。ヘスペリジンの回収率は、無加熱区に比べ加熱処理区の方が高い傾向を示し、なかでも 70℃ 区、80℃ 区および 90℃ 区が 25% 程度と最も高い値を示した。しかし、沸騰 5 分区では、90℃ 区に比べて約 2.4% 減少した。得られた粉末粗ヘスペリジンの純度は大差なかった。

Table 3 Effect of crystallizing pH on recovery of hesperidin

pH	Yield(g) ^{a)}	Purity(%)	Recovery(%) ^{b)}
3.0	1.63	72.8	22.9
4.0	1.57	85.0	25.7
5.0	1.44	93.7	25.9
6.0	1.49	93.2	26.8
7.0	1.43	90.4	24.9

^{a)} Powder of crude hesperidin (on a dry weight basis)

^{b)} Yield(g) × Purity(%) / 5.2(g)*

* Hesperidin content in 100 g of dried Satsuma mandarin peel

Table 4 Effect of heating temperature on recovery of hesperidin

Heating temperature(°C)	Yield(g) ^{a)}	Purity(%)	Recovery(%) ^{b)}
No-heating	1.22	93.0	19.1
40	1.22	93.0	20.9
50	1.25	93.6	20.9
60	1.34	93.5	23.1
70	1.45	93.5	24.9
80	1.44	93.0	24.7
90	1.46	93.6	25.2
Boiling(5 min)	1.33	93.0	22.8

^{a)} Powder of crude hesperidin (on a dry weight basis)

^{b)} Yield(g) × Purity(%) / 5.2(g)*

* Hesperidin content in 100 g of dried Satsuma mandarin peel

以上のように加熱温度によって、ヘスペリジンの回収率が異なるのは、加熱処理がヘスペリジンの不溶化、可溶化現象の重要なファクターであることを示唆するものである。

(3) 抽出液中のヘスペリジン濃度と結晶量の関係

抽出液中のヘスペリジン濃度と粗ヘスペリジン結晶量の関係を調べるために次の実験を行った。抽出液中のヘスペリジン絶対量は各区とも 2 500 mg とし、ヘスペリジン濃度をそれぞれ 100, 200, 300, 400, 500, 600 および 700 mg/100 ml になるようにヘスペリジンの純品(試薬)を溶解させモデル抽出液 (pH 12) を調整した。このモデル抽出液から、ヘスペリジン回収した結果を Fig. 2 に示す。モデル抽出液からのヘスペリジン回収率は、ヘスペリジン濃度が高いほど高くなったが、500, 600 および 700 mg/100 ml 区では大差なかった。また、前述したように抽出液中のヘスペリジン濃度を 600~700 mg/100 ml に調整するためには試料 100 g に対し加水量を 600 ml 以下にする必要があり、そのとき抽出液は高粘度で攪拌不十分の状態となり実用的な方法とは言い難い。

以上の結果、効率よくヘスペリジン回収するためには抽出液中のヘスペリジン濃度を 500 mg/100 ml 程度に調整することが望ましいと思われる。さらに回収率を上げるには、試料に対する加水量を増やし、ヘスペリジンの抽出効率を上げ、その抽出液をヘスペリジン濃度が 500 mg/100 ml 程度になるよう濃縮してリサイクルすることによって再度ヘスペリジンを結晶化させる方法が有効であると考えられる。

(4) 二次抽出液の濃縮

そこで、Table 2 で示した加水量 4 000 ml 区で得られた二次抽出液のリサイクルを目的としてこの二次抽出液を濃縮し、ヘスペリジン回収した。その結果を Fig. 3 に示す。濃縮液中のヘスペリジン濃度は濃縮倍率 4~5 倍のとき 451.6 mg/100 ml~566.0 mg/100 ml となり、そのときの回収率は 47.3~47.8% と最も高い値となった。一次回収分と合わせると 5 倍濃縮区で 53.0% に達した。また、濃縮液中のヘスペリジン濃度は濃縮倍率が上がるにしたがい高くなるが、回収率は逆に減少傾向を示した。この理由としては、濃縮倍率が 7 倍以上に上がると濃縮液の粘度が急激に高くなったこと、および純度が低下したことなどに起因するものと推察される。以上のように、抽出液を濃縮することはヘスペリジンの回収率を向上させる方法として有効であり、濃縮液のヘスペリジン濃度としては 500 mg/100 ml 程度に調

Fig. 2 Relationship between hesperidin concentration of the model solution and recovery of hesperidin

^{a)} Yield (g) × Purity (%) / 2.5 (g) *

* Absolute quantity of hesperidin in the model solution

Fig. 3 Effect of evaporation of secondary extracted solution on recovery of hesperidin

^{a)} Yield (g) × Purity (%) / 5.2 (g) *

* Hesperidin content in 100 g of dried Satsuma mandarin peel

整することが望ましく、それ以上に濃縮倍率を上げてヘスペリジンの回収率は減少することが示された。

要 約

温州ミカン搾汁粕(乾燥品)からのヘスペリジン抽出、回収条件について検討し、次の結果を得た。

(1) ヘスペリジンの抽出効率は、抽出時間 0.5 時間(攪拌区)、抽出温度 20℃ および 40℃ のとき最も高かった。

(2) 抽出液からヘスペリジンを結晶化させるための最

適 pH は 5.0 付近であると推察された。また、抽出液を 70~90℃ の範囲で加熱することにより回収率は高くなった。

(3) ヘスペリジンの回収に及ぼす試料への加水量を検討した結果、最適条件は試料 100 g に対し水を 800 ml 加えたとき得られ、回収した粉末粗ヘスペリジンの純度は 93.7%, 回収率は 27.3% であった。しかし、試料からのヘスペリジンの抽出効率は、加水量が多くなるほど高く、加水量 4 000 ml 区で最高 82.2% を示した。この二次抽出液を 5 倍濃縮することにより、高い回収率 (53.0%) が得られることが示された。

(4) このように回収工程に二次抽出液の濃縮処理を併用した場合、回収率は大幅に上がることがわかった。また、ヘスペリジンの回収率は抽出液中のヘスペリジン濃度が 500 mg/100 ml 程度のとき最も高い値を示した。

本研究の概要は、日本食品工業学会第 37 回大会 (1990 年 3 月 29 日, 東京) で発表した。

文 献

- 1) HENDRICKSON, R. and KESTERSON, J.W.: "Hesperidin in Florida Oranges", *Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 684, 3 (1964).
- 2) KESTERSON, J.W. and BRADDOCK, R.J.: "By-Products and Specialty Products of Florida Citrus", *Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 784, 1 (1976).
- 3) 森 大蔵・岩本善伴: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所報告書, 15, 68 (1982).
- 4) 前田久夫・高橋保男・三宅正起・伊福 靖: 日食工誌, 32, 202 (1985).
- 5) 前田久夫・高橋保男・三宅正起・伊福 靖: 日食工誌, 32, 344 (1985).
- 6) 前田久夫・高橋保男・三宅正起・伊福 靖: 日食工誌, 32, 759 (1985).
- 7) 小川浩史・福久一馬・福本治次・福谷敬三: 日食工誌, 37, 214 (1990).
- 8) 広田 致: 日食工誌, 9, 205 (1962).
- 9) 隅元浩康・松原義治・飯塚義富・村上哲男・岡本耕造・三宅英夫・横井勝美: 農化, 58, 137 (1984).
- 10) MATSUBARA, Y., KUMAMOTO, H., IZUKA, Y., MURAKAMI, T., MIYAKE, H. and YOKOI, K.: *Agri. Biol. Chem.*, 49, 909 (1985).
- 11) 隅元浩康・松原義治・飯塚義富・村上哲男・岡本耕造・三宅英夫・横井勝美: 農化, 59, 405 (1985).
- 12) 町田浩一・上田條二・佐藤継男・大沢啓助・安藤隆一郎・久道周次: 東北薬科大学研究年報, 32, 135 (1985).

(平成元年 11 月 20 日受理)