報 文

ファストセミマイクロ HPLC を利用した加工食品中のヘスペリジン、
ナリンジン及びそのアグリコンの同時定量

(平成9年1月17日受理)

寺田久屋* 宮部正樹*

Simultaneous Determination of Hesperidin, Naringin and Their Aglycones in
Processed Foods by Fast Semi-micro HPLC

Hisaya TERADA and Masaki MIYABE

(Nagoya City Public Health Research Institute: 1-11, Hagiya-cho,
Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan)

A fast semi-micro liquid chromatographic method for the simultaneous determination of hesperidin, naringin and their aglycones, *i.e.* hesperetin and naringenin, in processed foods was developed. The sample was refluxed with 60% aqueous methanol on a hot water bath at 90°C and cleaned up on a Sep-Pak C₁₈ cartridge. The sample solution was chromatographed on a semi-micro column (2.1 mm i.d.×80 mm) packed with 3 µm particles of Capcell Pak C₁₈-SG120 with a mobile phase of acetonitrile-water-0.2 mol/L phosphate buffer, pH 4.0 (18:77:5). Detection was achieved with a UV monitor set at 283 nm.

The recoveries from soft drinks, marmalade, candy, yogurt, cookies and salad dressing fortified with the standard mixture at levels of 4 to 100 µg/g were 82.6 to 100.4% (C.V. 1.6~5.2%) for hesperidin, 88.3 to 98.9% (C.V. 0.7~2.4%) for naringin, 88.3 to 93.4% (C.V. 1.3~3.9%) for hesperetin and 91.2 to 96.7% (C.V. 1.1~2.6%) for naringenin. The detection limit was 0.5 µg/g for each compound.

(Received January 17, 1997)

Key words: ヘスペリジン hesperidin; ナリンジン naringin; ヘスペレチン hesperetin; ナリンゲニン naringenin; 加工食品 processed foods; ファストセミマイクロ HPLC fast semi-micro HPLC

緒 言

近年、食生活と健康との関係が明らかにされるに伴い、食品中の生理活性成分に対する関心が高まっている。しかし、加工食品からの分析法が確立されていないものが多く、その含有量や加工過程における変化についても、ほとんど明らかにされていない。著者らは、これまでにお茶に含まれるカテキン類¹⁾、そばの実に含まれるルチン及びケルセチン²⁾のような成人病の予防効果の知られているフラボノイド類の定量法を開発し、各種の加工食品の分析に応用してきた。ところで、かんきつ類の果皮や果肉に含まれるフラボノイドであるヘスペリ

ジンには、抗アレルギー、抗ウイルス、毛細血管の強化などが、ナリンジンには、抗腫瘍、抗炎症などの作用が知られており³⁾、食品添加物としてもヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチン及び分解酵素のヘスペリジナーゼ、ナリンジナーゼとともに既存添加物名簿に収載されている。

ヘスペリジン及びナリンジンの定量法としては、タンデム質量分析計 (MS-MS)⁴⁾、高速液体クロマトグラフ^{5), 6)}を利用した方法が既に報告されている。しかしながら、MS-MS法は高価な装置を必要とするため日常分析に適した方法とは言い難く、HPLCについても、ジュースあるいは生薬といった特定の試料を分析対象として開発されたものであり、試料を水抽出した後、精製

* 名古屋市衛生研究所: 〒467 名古屋市瑞穂区萩山町 1-11

過程を経ず直接定量する方法を採用している。一方、加工食品は分析対象物質以外の種々の夾雑物質を含んでおり、試料抽出液の精製過程を省略した方法を適用することは困難である。そこで本報告では、試料からの抽出条件、固相抽出カートリッジを利用した精製方法、ファストセミマイクロ HPLC による分離定量方法について検討を加え、食品添加物として添加あるいはかんきつ類を含む加工食品中のヘスペリジン、ナリンジンとそれらのアグリコンのヘスペレチン、ナリンゲニンの同時定量法を検討した。

実験方法

1. 試料

平成5年に名古屋市内で購入したマーマレード、果汁入りの清涼飲料水、ゼリー、キャンディー、クッキー、ソース、ドレッシング、漬物及び無果汁のキャンディー（ナリンジン添加）を用いた。

2. 試薬

- 1) 標準溶液：ヘスペリジン、ヘスペレチン、ナリンジン、ナリンゲニン（フナコシ(株)製標準試薬）各 20 mg をメタノールに溶解して 100 mL とした (200 $\mu\text{g/mL}$).
 - 2) Sep-Pak Plus C₁₈ (日本ウォーターズ社製): 20 mL の注射筒に装着し、使用前にメタノール 20 mL、水 20 mL の順で洗浄した後使用した。
 - 3) Sep-Pak Plus C₁₈ 用洗浄溶媒：メタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (5:13:2)
 - 4) Sep-Pak Plus C₁₈ 用溶出溶媒：メタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (5:4:1)
- その他の試薬類は、すべて特級あるいは HPLC 用を用いた。

3. 装置

- 1) 高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-6A 型ポンプ、日本分光工業(株)製 870UV 型紫外可視分光検出器 (1 μL ミクロセル装着)、レオダイン社製 7125 インジェクター (40 μL ループ装着)、(株)島津製作所製 クロマトパック C-R4A データ処理装置。

4. HPLC 条件

- 1) カラム：Capcell Pak C₁₈-SG120 (3 μm) ((株)資生堂製) 2.1 mm i.d.×80 mm
- 2) 移動相：アセトニトリル-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (18:77:5)
- 3) カラム温度：40℃
- 4) 流速：0.3 mL/min
- 5) 検出波長：283 nm
- 6) 注入量：40 μL
5. ファストセミマイクロカラムと一般的な分析カラム (通常カラム) の分離条件の比較
- 1) カラム：ファストセミマイクロカラム：上記、通常カラム；Capcell Pak C₁₈-SG120 (5 μm) ((株)資生堂

製) 4.6 mm i.d.×250 mm

- 2) 移動相：アセトニトリル-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (X:95-X:5). X=15, 20, 25, 30
- 3) カラム温度：40℃
- 4) 流速：ファストセミマイクロカラム；0.3 mL/min, 通常カラム；1.5 mL/min
- 5) 試験液；各標準溶液 1.0 mL を 100 mL のメスフラスコ中にとり、水で全量 100 mL とした (2.0 $\mu\text{g/mL}$).
- 6) 注入量：ファストセミマイクロカラム；40 μL , 通常カラム；100 μL

6. 試験溶液の調製

粉碎した試料 1~5 g を 200 mL のナスフラスコ中にひょう量し、60% メタノール水 50 mL を加え 90℃ の水浴上で 60 分間加熱還流した。冷後 100 mL のメスフラスコ中に移し、60% メタノール水で全量 100 mL とし、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離した。上澄 20 mL を 100 mL のナスフラスコに採り、溶媒を約 5 mL まで減圧濃縮した後、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) 2 mL 及び水 10 mL を加え、Sep-Pak Plus C₁₈ に毎分約 2 mL の速度で注入した。続いて、使用した容器を水 10 mL で洗浄し、洗浄液を同じ速度で Sep-Pak Plus C₁₈ に注入した。更に Sep-Pak Plus C₁₈ 用洗浄溶媒 10 mL で洗浄し、Sep-Pak Plus C₁₈ 用溶出溶媒 10 mL で溶出した。溶出液を水で希釈し全量 25.0 mL とし、この溶液を HPLC 用試験溶液とした。

7. 検量線及び定量

各標準溶液を混合して 0.05~10.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲にメタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (2:7:1) の溶液で希釈し、その 40 μL を高速液体クロマトグラフに注入してピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成した。定量は HPLC 用試験溶液 40 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、出現するピークの高さから各検量線により求めた。各ピークは、異なった 2 波長以上の検出波長で測定し、定量値が一致することを確かめた。

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

ヘスペリジンやナリンジンの分離には、逆相分配型のカラムと水-メタノールあるいは水-アセトニトリル混液にフラボノイドのフェノール性水酸基の解離を抑制し、カラムへの保持力を高める目的でリン酸などを添加した移動相が一般的に用いられている。更に、極性の低いアグリコンとの同時定量にはグラジエント溶離法が採用されている^{5), 6)}。

ところで、内径 1~2 mm のカラムを用いるセミマイクロ HPLC は、既存の分析用高速液体クロマトグラフに簡単な改造を加えるだけで実行でき、マイクロ HPLC の移動相溶媒の節約、微量試料の高感度分析等の利点を生

Fig. 1. Relationships between acetonitrile concentration and capacity factor (k') of hesperidin, naringin and their aglycones on fast semi-micro column and conventional column

Operating conditions: mobile phase; acetonitrile–water–0.2 mol/L phosphate buffer pH 4.0 (X:100–X:5), column temperature; 40°C, flow rate; fast semi-micro column; 0.3 mL/min, conventional column; 1.5 mL/min, detector; UV photometer (283 nm)

Solid lines: fast semi-micro column (3 μ m of Capcell Pak C₁₈-SG120 2.1 mm×80 mm)

Broken lines: conventional column (5 μ m of Capcell Pak C₁₈-SG120 4.6 mm×250 mm)

●; naringin, ○; hesperidin, ▲; naringenin, △; hesperetin

かした分析を行うことができる。著者らは、これらの利点に注目して食品分析におけるセミマイクロ HPLC の実用性を検討してきた^{1), 2)}。そこで、今回は前報²⁾と同じく内径 2.1 mm 長さ 80 mm のショートカラムに、粒子径 3 μ m の Capcell Pak C₁₈-SG₁₂₀ を充てんしたファストタイプの逆相分配型分析カラムを使い、移動相溶媒の組成等の分離条件を検討した。その結果、水–アセトリル混液に pH 4.0 のリン酸緩衝液を添加した移動相において良好なピーク形状のクロマトグラムが得られた。

Fig. 1 は、通常カラムと今回の検討で用いたファストセミマイクロカラムでの各物質の分離挙動を移動相溶媒中のアセトリル濃度と保持比 (k') とで比較したものである。ファストセミマイクロカラムは、通常カラムに比べて短い保持時間で比較的大きな保持比が得られるため、通常カラムではグラジエント溶離法が必要な配糖体とアグリコンの同時定量をアイソクラティック溶離法で実施することが可能であった。更に、セミマイクロ

Fig. 2. Fast semi-micro liquid chromatogram of standard mixture

Operating conditions: mobile phase; acetonitrile–water–0.2 mol/L phosphate buffer pH 4.0 (18:77:5), column temperature; 40°C, flow rate; 0.3 mL/min, detector; UV photometer (283 nm), injection volume; 40 μ L

Peaks: 1; naringin, 2; hesperidin, 3; naringenin, 4; hesperetin

Concentration: 1.0 μ g/mL

HPLC の利点を生かし、溶媒使用量を約 1/20 に節約することができた。最適分離条件で得られた標準品のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

2. 抽出条件の検討

Lee らは、生薬中のヘスペリジンの抽出法として試料に 20 倍容量の水を加え 30 分以上沸騰する方法を採用している⁶⁾。そこで、抽出溶媒として水及びメタノール水を用いて抽出条件の検討を行った。Fig. 3 は、ヘスペリジンを含むオレンジ入りのヨーグルトにナリンジン、ヘスペレチン及びナリンゲニンの標準品を添加し、0~100% のメタノール水で 60 分間加熱還流抽出した場合の各物質の抽出性を示したものである。メタノール含量の低い抽出溶媒では、アグリコンのナリンゲニン、ヘスペレチンの抽出率が不十分であったが、60% メタノール水では、いずれも良好に抽出された。更に、加熱時間を 0 分から 90 分まで変化させたと、15 分以上の加熱時間で各物質の抽出率は一定となった。そこで、抽出溶媒を 60% メタノール水とし、加熱還流時間を 60 分とした。

3. 前処理法の検討

加工食品の抽出液は、定量の妨害となる種々の夾雑物質を含んでいる。この抽出液を直接高速液体クロマトグラフに注入した場合、クロマトグラム上に多くのピークが出現して定量を妨害したり、カラムなどを著しく汚染して定量操作が困難になるおそれがある。そこで、夾雑物質を除去する目的で、Sep-Pak Plus C₁₈ カートリッジによる前処理法を検討した。

Sep-Pak Plus C₁₈ の担体は、分析カラムの充てん剤と同様な性質を有するため、試料溶液の pH や有機溶媒濃度が目的物質の保持に大きな影響を与える。前項の方法で得られた抽出液は、60% のメタノールを含むため直接 Sep-Pak Plus C₁₈ に注入して目的物質を保持させることはできない。そこで、抽出液を減圧濃縮してメタノールを除去し、更に試料中の成分による pH の影響を

Fig. 3. Effect of methanol concentration in the extracting solvent on extractability of hesperidin, naringin and their aglycones ●; naringin, ○; hesperidin, ▲; naringenin, △; hesperetin

Sample: Orange yogurt containing hesperidin added 20 µg/g each of naringin, hesperetin and naringenin

Operating condition: Sample was refluxed with 0 to 100% aqueous methanol on a hot water bath at 90°C for 60 minutes.

軽減する目的で HPLC の移動相溶媒と同じ pH 4.0 のリン酸緩衝液を添加したものを試験溶液とした。Sep-Pak Plus C₁₈ の洗浄及び目的物質の溶出には、それぞれの条件設定を容易にするため、HPLC の移動相に採用したアセトニトリル系の溶媒よりも溶出力が小さいメタノール系の溶媒を用いた。Fig. 4 は、Sep-Pak Plus C₁₈ にヘスペリジン、ナリンジン、ヘスペレチン及びナリンゲニンの 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) 溶液 (各 2.5 µg/mL) 20 mL を注入した後、メタノール-0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 4.0) 混液 10 mL で溶出した場合、各フラボノイドの回収率と溶出溶媒中のメタノール濃度との関係を示したものである。メタノール濃度が 25% 以下ではいずれの物質も溶出されなかったが、50% 以上では各物質とも 100% 溶出した。そこで、洗浄にメタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (5:13:2) 10 mL を用い、メタノール-水-0.2 mol/L リン酸緩衝液 pH 4.0 (5:4:1) 10 mL を溶出液として用い

Fig. 4. Relationship between methanol concentration in eluting solution and recoveries of hesperidin, naringin and their aglycones from Sep-Pak C₁₈ cartridge ●; naringin, ○; hesperidin, ▲; naringenin, △; hesperetin

Table 1. Recoveries of Hesperidin, Hesperetin, Naringin and Naringenin from Processed Foods

	Added (µg/g)	Hesperidin		Hesperetin		Naringin		Naringenin	
		Rv.* (%)	C.V. (%)	Rv.* (%)	C.V. (%)	Rv.* (%)	C.V. (%)	Rv.* (%)	C.V. (%)
Soft drink (orange)	100	93.8	4.9	88.9	3.9	95.7	1.0	92.7	2.6
Marmalade	100	82.6	5.2	88.3	2.4	88.3	2.4	91.2	1.3
Candy	20	99.3	1.6	89.5	1.7	99.6	1.8	92.9	1.2
Yogurt	20	100.4	3.3	91.4	3.9	94.0	2.0	91.7	1.8
Cookie	20	98.3	1.6	93.4	1.3	98.2	0.8	92.9	1.1
Salad dressing	4	97.6	2.3	92.5	1.6	98.9	0.7	96.7	1.2

* Averages of five determinations

Table 2. Analytical Values of Hesperidin, Hesperetin, Naringin and Naringenin in Processed Foods ($\mu\text{g/g}$)

	Hesperidin	Hesperetin	Naringin	Naringenin
Candy #1 (added naringin)	nd	nd	129.5 $\pm$ 4.2	nd
Candy #2 (containing fruit juice)	9.7 $\pm$ 0.8	nd	328.0 $\pm$ 4.3	nd
Candy #3 (containing fruit juice)	4.8 $\pm$ 0.3	nd	nd	nd
Orange jelly #1	200.3 $\pm$ 1.6	nd	nd	nd
Orange jelly #2	110.6 $\pm$ 3.2	nd	5.0 $\pm$ 0.4	nd
Orange marmalade	372.8 $\pm$ 3.7	nd	213.4 $\pm$ 1.7	nd
Soft drink (grapefruit)	nd	nd	204.7 $\pm$ 2.6	nd
Soft drink (orange)	162.9 $\pm$ 2.6	nd	nd	nd
Canned orange (fruit)	383.1 $\pm$ 0.7	nd	nd	nd
Canned orange (syrup)	71.1 $\pm$ 0.4	nd	nd	nd
Cookie (containing lemon juice)	27.0 $\pm$ 0.1	nd	nd	nd
Radish pickles (containing yuzu orange)	44.7 $\pm$ 1.9	nd	17.4 $\pm$ 0.4	nd
Steak sauce	8.3 $\pm$ 0.6	nd	nd	nd
Salad dressing	1.4 $\pm$ 0.1	nd	nd	nd

Averages of three determinations of the same sample $\pm$ standard deviation

nd: Not detected

Fig. 5. Fast semi-micro high performance liquid chromatograms obtained from processed foods (A); soft drink (grapefruit), (B); orange jelly, (C); cookie (containing lemon juice), (D); orange marmalade
Operating condition and peaks; see Fig. 2

ることとした。

ところで、高速液体クロマトグラフに注入する試験溶液は、その溶媒が一時的に移動相として作用するため、pH や有機溶媒濃度が溶質の分離に影響を与える。特に、移動相溶媒よりも溶出力の大きな溶媒を大量に注入した場合には、ピークが広がったりゆがみを生じたりする。一方、移動相溶媒よりも溶出力の小さな溶媒では、溶質がカラム先端でいったん濃縮された後に移動相溶媒

で溶出するため、大量に注入しても分離はほとんど影響されない。今回の検討において高速液体クロマトグラフへの注入量を 40 μL とした場合、試験溶液中のメタノール濃度が 20% を越えると分離に明らかな影響が認められ、35% ではヘスペリジン及びナリンジンのピーク高は約 1/2 に低下した。一方、20% 以下では影響は認められなかった。そこで、Sep-Pak Plus C_{18} の溶出液をメタノール濃度が 20% になるように水で希釈し、

全量 25 mL としたものを HPLC 用試験溶液とした。

4. 定 量

定量は実験方法で示した方法に従い作成した検量線によって行った。検量線は各物質とも 0.05~10.0 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で原点を通る直線性を示した (相関係数 0.9999 以上)。

なお、本法の検出限界は、試料採取量を 1 g とした場合、いずれの物質とも 0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。

各物質に該当するピークは、より確かな結果を得るため異なった 2 波長以上の検出波長で測定し、定量値が一致することを確かめた。

5. 添加回収実験

清涼飲料水、マーマレード、キャンディー、ヨーグルト、クッキー及びフレンチドレッシングを用いて、4.0~100 $\mu\text{g/g}$ の標準品を添加し、各 5 回繰り返し定量し、回収率及び変動係数を測定した (Table 1)。回収率は、ヘスペリジンが 82.6~100.4%、ヘスペレチンが 88.3~93.4%、ナリンジンが 88.3~99.6%、ナリンゲニンが 91.2~96.7% であり、変動係数についても 5.2% 以下と良好な結果が得られた。

6. 市販の加工食品の測定結果

各種の加工食品の測定結果を Table 2 に示した。オレンジ及びレモンを用いた製品ではヘスペリジン、グレープフルーツを用いた製品ではナリンジンが主体で含まれていた。無果汁のキャンディーは、添加物としてナリンジン使用の表示がされていた。アグリコンのヘスペレチン及びナリンゲニンはいずれも検出限界以下であった。

各食品におけるクロマトグラムを、Fig. 5 に示した。

ま と め

加工食品中のヘスペリジン、ナリンジン及びそれらの

アグリコンであるヘスペレチン、ナリンゲニンの同時定量法を検討し、以下の結果を得た。

1) 分析カラムに内径 2.1 mm、長さ 80 mm、粒子径 3 μm の Capcell Pak C₁₈-SG120 を用いるファストセミマイクロ HPLC を利用し、配糖体とアグリコンをアイソクラティック溶離で同時分析できる測定条件を見出した。

2) Sep-Pak Plus C₁₈ カートリッジを利用し、簡便な前処理法を開発した。

3) 清涼飲料水、マーマレード、キャンディー、ヨーグルト、クッキー及びフレンチドレッシングを用いた添加回収実験では、各物質について回収率 80% 以上、変動係数 5.2% 以下と良好な結果が得られた。検出限界は、試料採取量を 1g とした場合、いずれも 0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。

4) 本法を市販の加工食品に適用した結果、夾雑成分による定量妨害もなく良好に測定することができた。

本研究の概要は、日本食品衛生学会第 65 回学術講演会 (1993 年 5 月、東京) で発表した。

文 献

- 1) 寺田久屋, 鈴木晃世, 田中治夫, 山本勝彦: 食衛誌, **33**, 347~354 (1992).
- 2) 寺田久屋, 宮部正樹: 同上 **34**, 385~391 (1993).
- 3) 岩科 司: 食品工業 **37**, 52~70 (1994).
- 4) Weintraub, R. A., Ameer, B., Johnson, J. V., Yost, R. A.: J. Agric. Food Chem. **43**, 1,966~1,968 (1994).
- 5) Ooghe, W. C., Ooghe, S. J., Detavernier, C. M., Huyghebaert, A.: *ibid.* **42**, 2,183~2,190 (1994).
- 6) Lee, Y-C., Huang, C-Y., Wen, K-C., Suen, T-T.: J. Chromatogr. A **692**, 137~145 (1995).