

固相抽出法を用いるシークワシャー果汁中の ポリメトキシフラボン類の回収

山本健太¹⁾ 宮城一菜²⁾ 矢羽田 歩¹⁾ 太田英明²⁾

Recovery of Polymethoxylated Flavones from Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) Juice by Using Solid Phase Extraction

Kenta Yamamoto¹⁾ Kazuna Miyagi²⁾ Ayumi Yahada¹⁾ Hideaki Ohta²⁾

(2009年11月27日受理)

緒言

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は、沖縄本島北部地域で商業的に栽培されている特産カンキツである。近年、シークワシャーにポリメトキシフラボン類 (PMF) であるノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン (Fig.1) が高濃度含有されていることが明らかにされている^{1,2)}。特に、ノビレチンは発ガン抑制効果など、多くの生理的効果が報告されており³⁻⁷⁾、疾病予防や疾病の改善効果が期待されている。

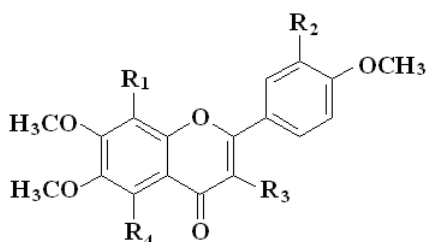


Fig. 1 Structures of polymethoxylated flavones
Nobiletin: R₁=R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=OCH₃
Tangeretin: R₁=OCH₃, R₂=R₃=H, R₄=OCH₃
Sinensetin: R₁=H, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=OCH₃

シークワシャー製品の需要は、昨今の健康志向の高まりの中で急増したことから、慢性的な原料不足に陥っている。このため、シークワシャーに一見類似した果実である外国産カラマンシー (*Citrus madurensis* Lour.) 果汁を「シークワシャー果汁」として使用する不正表示品 (偽和製品) が多数市販され、2003年に公正取引委員会から排除勧告が出されるなど、行政的にも問題となってきている。カ

ラマンシーは、PMF 含量がシークワシャーよりも少なく⁸⁾、その差を利用して両者を識別する方法⁹⁾がある。PMF の定量は、生理的効果の検証や偽和製品を識別するために、極めて重要と思われる。PMF の定量は、調製した試験溶液をろ過し、そのまま HPLC 分析に供する方法¹⁰⁾と試験溶液を固相抽出法により精製した後に HPLC により測定する方法⁸⁾が報告されている。

固相抽出法 (solid phase extraction method) は、試料の夾雑物を除去し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) カラムの汚れ防止、分析感度および再現性向上の点で分析に有用であり、近年では固相抽出カートリッジ (以下、カートリッジ) を用いた簡易な固相抽出法が広く用いられてきている。カンキツのリモニンの分析では、果汁中の防止物質の除去および感度向上を目的に、固相抽出法が活用され、果汁からのリモニン抽出・濃縮が可能となっている¹¹⁾。しかしながら、特にポリメトキシフラボン類のような他のカンキツ成分の分析に固相抽出法を用いた例はほとんど見られず、かつカートリッジを通した全ての溶液を対象とした報告は PMF の分析では見当たらない。

そこで本報では、PMF の分析精度の向上に従来使用してきた固相抽出法が有用であるか否かを明らかにすることを目的に、HPLC 分析で試料を直接分析する方法と固相抽出法を使用する HPLC 法を比較した。

実験方法

1. 供試試料および試薬

シークワシャー果汁は2004年10月上旬に沖縄県

名護市勝山地区から入手したものをを用いた。市販果汁飲料6種(A~F)は、一般に沖縄で流通しているシークワシャー果汁飲料を使用した。ノビレチンとタンゲレチンは和光純薬工業製を、シネンセチンはフナコシ製の特級試薬を用い、その他の試薬は特級試薬を用いた。供試した固相抽出カートリッジは、Sep-pak Plus C18 cartridge (充填量360mg, Waters製) および InertSep C18 (C18), InertSep C8 (C8), InertSep C2 (C2), InertSep CH (CH), InertSep PH (PH), InertSep CN (CN) (充填量200mg, GL Science製)を用いた。

2. 固相抽出法を用いた試験溶液(以下、固相抽出試験溶液)の調製

(1) 試験溶液負荷量と溶出用メタノール濃度の検討
試験溶液は、果汁試料3.0mlにエタノール7.0mlを添加し、超音波抽出(30min)を行い、遠心分離(5000rpm×5min, テーブルトップ遠心機4000, 久保田商事製)後の上清とした。試験溶液をコンディショニング(メタノール2.0ml, 次いで水3.0mlを通液)後のSep-pak plus C18 cartridgeに、それぞれ0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mlを通過させ、水2.0mlで洗浄した後、メタノール溶液(0, 25, 50, 75, 100%)4.0mlで溶出した。一方、試験溶液をマイクロシリンジフィルター(保留粒子径0.45 μ m, セルロースアセテート, Advantec製)で濾過したものを直接抽出試料溶液(以下、直接分析区)とした。

(2) 最適溶出溶媒の検討

抽出溶媒として濃度を変えたメタノールを用いること他に数種の溶媒についても回収率の比較を行った。各種濃度のメタノール溶液4.0mlで回収した以外は、前項(1)の固相抽出試験溶液の調製に従った。各種溶媒として、エタノール:水(6:4), エタノール:水(9:11), ジクロロメタン, ジクロロメタン:水(4:1), ジクロロメタン:メタノール(4:1), アセトン:ヘキサン(6:4), アセトン:ヘキサン:水(9:6:5), アセトン:ヘキサン:メタノール(9:6:5), イソプロピルアルコール, イソプロピルアルコール:水(4:1), ジメチルスルホキシド(DMSO), DMSO:水(4:1)を用いた。

(3) 最適固相の選定

固相抽出試験溶液は、各種固相カートリッジ(InertSep C18, C8, C2, CH, PH, CN)を用いて、試験溶液を2ml通し、最後の溶出操作にメタノール溶液100%4.0mlを用いた以外は、前項(1)の固相抽出試験溶液の調製と同様に行い、カートリッジに通液した各液とした。

(4) 最適固相を用いた定量試験

固相抽出試験溶液は、InertSep PHを用いて、市販果汁飲料6種の試験溶液を2.0ml通し、最後の溶出操作にメタノール溶液100%4.0mlを用いた以外は、前項(1)の固相抽出試験溶液の調製と同様に行い、カートリッジに通液した各液とした。

(5) 固相抽出と試料希釈の関係

固相抽出試験溶液は、市販果汁飲料6種を10倍希釈して前項(1)と同様に調製した試験溶液を2.0ml通した以外は、前述(4)の固相抽出試験溶液の調製と同様に行い、カートリッジに通液した各液とした。

3. HPLC 分析条件

LC-10AD_{VP} シリーズ(島津製作所製)を用い、逆相カラムにLiChrospher 100 RP-18(250×4.0mm i.d., 粒径5 μ m)を使用し、カラム温度40℃, 移動相はメタノール:10mMリン酸(7:3)を用い、流速0.6ml/min, 検出波長340nmで分析を行った。試験溶液中の各PMFの同定は標準溶液(0.5mg/ml)の保持時間との照合で行った。すべて分析結果は平均値±標準偏差値(n=3)で表した。

実験結果および考察

1. 試験溶液負荷量と溶出メタノール濃度の検討

PMFの固相抽出法において、適切な試験溶液負荷量とメタノール濃度を調査した。Table 1に試験溶液0.25, 1.0, 2.0ml負荷し、0, 50, 100%メタノールで溶出した際の各固相抽出試験溶液と直接分析区の含量を比較した結果を示した。

直接分析区のノビレチン, タンゲレチン, シネンセチン含量はそれぞれ24.2, 20.4, 2.4mg/100mlとなり、これらの値と各固相抽出試験溶液のPMF含量を比較した。試験溶液負荷量を0.25~2.0mlとした際に、カートリッジを通過させた試験溶液(以下、廃液)中にノビレチンは0~10.6mg/100ml含まれていた。その後カートリッジを洗浄した水(以下、洗浄水)中には0~1.7mg/100ml含有されていた。溶出操作を行ったメタノール100%溶液中には3.3~4.7mg/100ml含有が認められた。同様にタンゲレチンにおいて、廃液中には0~7.6mg/100ml, カートリッジ洗浄水中には0~1.2mg/100ml, 各種濃度のメタノール溶出液中には2.5~4.7mg/100ml含有され、シネンセチンにおいてはそれぞれ0~1.0mg/100ml, 0~0.2mg/100ml, 0.3~0.4mg/100ml含有が認められた。すなわち、試験溶液負荷量が増加するとPMF含量も増加する傾向を示した。溶出操作を

行ったメタノールの濃度が0~100%の範囲において、PMF 溶出率は0~20%程度まで増加した。シークワシャー果汁試料2.0mlの条件で、廃液中のPMF 含量の平均値は、ノビレチンで9.3mg/100ml (38.5%, 直接分析区と比較した際の各成分の割合), タンゲレチンで6.5mg/100ml (32.0%), シネンセチンでは0.9mg/100ml (31.1%) となり、カートリッジには直接分析区の各PMF 含量の61.5, 68.0, 68.9%保持されることが示された。同条件において、溶出液のPMF 含量が最も

高かったメタノール濃度は100%であり、PMF 含量はノビレチンで4.7mg/100ml (19.3%, 直接分析区と比較した際の各成分の割合), タンゲレチンで4.7mg/100ml (22.9%), シネンセチンでは0.4mg/100ml (15.6%) となり、洗浄水中のPMF 含量も考慮すると、約40%がカートリッジに吸着したままで、溶出することができないと考えられた。そこで、より多くのPMF を回収するため、溶出溶媒の検討を行った。

Table 1 Concentrations of polymethoxylated flavones with water-methanol concentration extraction solvent

Loaded Sample vol. (ml)	Methanol concentration for extraction (%)	Component	¹ Effluent	² Washed water	³ Elution solvent
2.0	100	Nobiletin	8.41 ± 0.06 (34.8)	1.70 ± 0.01 (7.0)	4.69 ± 0.18 (19.4)
		Tangeretin	5.86 ± 0.02 (28.8)	1.17 ± 0.00 (5.7)	4.66 ± 0.18 (22.9)
		Sinensetin	0.82 ± 0.00 (33.6)	0.16 ± 0.00 (6.6)	0.37 ± 0.01 (15.2)
2.0	50	Nobiletin	8.77 ± 0.04 (36.3)	1.69 ± 0.02 (7.0)	0.55 ± 0.01 (2.3)
		Tangeretin	5.97 ± 0.06 (29.3)	1.16 ± 0.01 (5.7)	0.32 ± 0.00 (1.6)
		Sinensetin	0.86 ± 0.00 (35.2)	0.17 ± 0.01 (7.0)	0.08 ± 0.00 (3.3)
2.0	0	Nobiletin	10.56 ± 0.07 (43.8)	1.57 ± 0.00 (6.5)	n.d.
		Tangeretin	7.66 ± 0.04 (37.6)	1.09 ± 0.00 (5.4)	n.d.
		Sinensetin	1.00 ± 0.01 (41.0)	0.16 ± 0.00 (6.6)	n.d.
1.0	100	Nobiletin	5.01 ± 0.32 (20.7)	1.50 ± 0.10 (6.2)	3.77 ± 0.01 (15.6)
		Tangeretin	2.86 ± 0.02 (14.0)	0.91 ± 0.01 (4.5)	2.88 ± 0.02 (14.1)
		Sinensetin	0.50 ± 0.01 (20.5)	0.14 ± 0.00 (5.7)	0.33 ± 0.00 (13.5)
1.0	50	Nobiletin	4.55 ± 0.29 (18.8)	1.71 ± 0.01 (7.1)	0.29 ± 0.00 (1.2)
		Tangeretin	2.50 ± 0.02 (12.3)	1.04 ± 0.00 (5.1)	0.12 ± 0.00 (0.6)
		Sinensetin	0.46 ± 0.01 (18.9)	0.16 ± 0.00 (6.6)	0.05 ± 0.00 (2.0)
1.0	0	Nobiletin	4.86 ± 0.32 (20.1)	1.55 ± 0.10 (6.4)	n.d.
		Tangeretin	2.76 ± 0.02 (13.6)	0.95 ± 0.00 (4.7)	n.d.
		Sinensetin	0.48 ± 0.01 (19.7)	0.15 ± 0.00 (6.1)	n.d.
0.25	100	Nobiletin	0.01 ± 0.00 (0.0)	0.07 ± 0.01 (0.3)	3.31 ± 0.01 (13.7)
		Tangeretin	n.d.	0.02 ± 0.00 (0.1)	2.48 ± 0.02 (12.2)
		Sinensetin	0.01 ± 0.00 (0.4)	0.01 ± 0.00 (0.4)	0.35 ± 0.09 (14.3)
0.25	50	Nobiletin	0.01 ± 0.00 (0.0)	0.04 ± 0.00 (0.2)	0.11 ± 0.00 (0.5)
		Tangeretin	0.01 ± 0.00 (0.0)	0.01 ± 0.00 (0.0)	n.d.
		Sinensetin	0.01 ± 0.00 (0.4)	0.01 ± 0.00 (0.4)	0.05 ± 0.01 (2.0)
0.25	0	Nobiletin	0.02 ± 0.01 (0.0)	0.10 ± 0.00 (0.4)	n.d.
		Tangeretin	0.02 ± 0.00 (0.1)	0.03 ± 0.00 (0.1)	n.d.
		Sinensetin	0.01 ± 0.00 (0.4)	0.02 ± 0.00 (0.8)	n.d.

Values are mean (mg / 100 ml) ± S.D. (n=3). Numbers in parentheses are percentage of each concentration of direct injection juice sample (nobiletin, tangeretin and sinensetin are 24.18, 20.36 and 2.44 mg/100 ml, respectively). n.d. : Not detected

1. Sample solvents that passed through Sep-pak plus C18 cartridge 2. Water that washed Sep-pak plus C18 cartridge 3. Each methanol solvents that eluted from Sep-pak plus C18 cartridge

2. PMFの最適溶出溶媒の検討

PMF 溶出率の改善を目的として、抽出溶媒に濃度を変えたメタノールを用いることの他に12種類の溶出溶媒を用いて溶出率の比較を行った結果をTable 2に示した。

前項と同様に、直接分析区のノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン含量はそれぞれ24.2, 20.4, 2.4mg/100mlとなり、これらの値と各固相抽出試験溶液のPMF含量を比較した。固相抽出試験溶液の溶出液と直接分析区のPMF含量を比較したとこ

ろ、エタノール:水(6:4)において、ノビレチンは3.7mg/100ml(15.2%, 直接分析区と比較した際の各成分の割合)、タンゲレチンは2.7mg/100ml(13.2%), シネンセチンでは0.3mg/100ml(14.9%)となり、3種のPMF含量の合計が用いた溶媒中で最も高い結果となった。また、それ以外の溶媒のPMF溶出率は、ノビレチンで5.8~14.8%, タンゲレチンで4.7~13.6%, シネンセチンでは8.8~14.3%となった。和田ら¹²⁾は、シークワシャー果汁のノビレチンを対象とした抽出溶媒と

Table 2 Concentrations of polymethoxylated flavones with extraction solvents from C18 cartridge

Extraction solvent	Component	¹ Effluent	² Washed water	³ Elution solvent
Ethanol-water (6:4)	Nobiletin	7.83 ± 0.08 (32.4)	1.14 ± 0.01 (4.7)	3.67 ± 0.04 (15.2)
	Tangeretin	4.26 ± 0.02 (20.9)	0.85 ± 0.01 (4.2)	2.68 ± 0.03 (13.2)
	Sinensetin	0.96 ± 0.01 (39.3)	0.14 ± 0.00 (5.7)	0.36 ± 0.00 (14.8)
Acetone-hexane-water (9:6:5)	Nobiletin	7.99 ± 0.18 (33.0)	1.30 ± 0.03 (5.4)	3.57 ± 0.03 (14.8)
	Tangeretin	3.63 ± 0.03 (17.8)	0.55 ± 0.00 (2.7)	2.77 ± 0.05 (13.6)
	Sinensetin	0.85 ± 0.04 (34.8)	0.14 ± 0.01 (5.7)	0.35 ± 0.00 (14.3)
Dimethyl sulfoxide	Nobiletin	6.66 ± 0.02 (27.5)	1.18 ± 0.02 (4.9)	3.54 ± 0.07 (14.6)
	Tangeretin	3.60 ± 0.03 (17.7)	0.63 ± 0.01 (3.1)	2.24 ± 0.02 (11.0)
	Sinensetin	0.57 ± 0.01 (23.4)	0.16 ± 0.00 (6.6)	0.31 ± 0.01 (12.7)
Isopropyl alcohol	Nobiletin	8.07 ± 0.10 (33.4)	1.41 ± 0.00 (5.8)	3.13 ± 0.03 (13.0)
	Tangeretin	3.63 ± 0.04 (17.8)	0.61 ± 0.00 (3.0)	2.06 ± 0.00 (10.1)
	Sinensetin	0.85 ± 0.00 (35.0)	0.14 ± 0.00 (5.9)	0.27 ± 0.00 (11.2)
Acetone-hexane-methanol (9:6:5)	Nobiletin	7.77 ± 0.17 (32.2)	1.31 ± 0.10 (5.4)	3.30 ± 0.08 (13.7)
	Tangeretin	3.49 ± 0.02 (17.1)	0.57 ± 0.04 (2.8)	2.14 ± 0.03 (10.5)
	Sinensetin	0.83 ± 0.04 (34.1)	0.14 ± 0.01 (5.6)	0.29 ± 0.01 (12.0)
Ethanol-water (9:11)	Nobiletin	7.70 ± 0.07 (31.8)	1.22 ± 0.01 (5.0)	3.18 ± 0.04 (13.2)
	Tangeretin	4.10 ± 0.03 (20.1)	0.64 ± 0.01 (3.1)	1.79 ± 0.03 (8.8)
	Sinensetin	0.94 ± 0.01 (38.5)	0.15 ± 0.00 (6.0)	0.34 ± 0.00 (13.8)
Dichloromethane	Nobiletin	7.61 ± 0.05 (31.5)	1.37 ± 0.01 (5.7)	3.10 ± 0.02 (12.8)
	Tangeretin	3.39 ± 0.00 (16.6)	0.60 ± 0.01 (2.9)	1.94 ± 0.01 (9.5)
	Sinensetin	0.77 ± 0.01 (31.8)	0.14 ± 0.00 (5.5)	0.27 ± 0.00 (10.9)
Isopropyl alcohol-water (4:1)	Nobiletin	7.64 ± 0.08 (31.6)	1.35 ± 0.01 (5.6)	3.04 ± 0.02 (12.6)
	Tangeretin	3.38 ± 0.03 (16.6)	0.59 ± 0.01 (2.9)	2.01 ± 0.01 (9.9)
	Sinensetin	0.80 ± 0.01 (32.9)	0.14 ± 0.00 (5.6)	0.27 ± 0.00 (10.9)
Dichloromethane-water (4:1)	Nobiletin	7.97 ± 0.03 (33.0)	1.35 ± 0.01 (5.6)	2.98 ± 0.01 (12.3)
	Tangeretin	3.59 ± 0.00 (17.6)	0.59 ± 0.00 (2.9)	1.89 ± 0.01 (9.3)
	Sinensetin	0.80 ± 0.02 (32.9)	0.13 ± 0.00 (5.4)	0.25 ± 0.00 (10.3)
Acetone-hexane (6:4)	Nobiletin	7.76 ± 0.19 (32.1)	1.33 ± 0.02 (5.5)	2.94 ± 0.07 (12.2)
	Tangeretin	3.50 ± 0.02 (17.2)	0.56 ± 0.00 (2.8)	1.81 ± 0.02 (8.9)
	Sinensetin	0.83 ± 0.04 (34.1)	0.14 ± 0.01 (5.7)	0.26 ± 0.01 (10.8)
Dichloromethane-methanol (4:1)	Nobiletin	7.86 ± 0.07 (32.5)	1.52 ± 0.01 (6.3)	2.62 ± 0.02 (10.8)
	Tangeretin	3.53 ± 0.02 (17.3)	0.65 ± 0.00 (3.2)	1.72 ± 0.01 (8.5)
	Sinensetin	0.79 ± 0.01 (32.5)	0.15 ± 0.00 (6.1)	0.22 ± 0.00 (9.1)
Dimethyl sulfoxide-water (4:1)	Nobiletin	6.64 ± 0.03 (27.5)	1.18 ± 0.01 (4.9)	1.39 ± 0.01 (5.8)
	Tangeretin	3.57 ± 0.05 (17.5)	0.62 ± 0.01 (3.0)	0.95 ± 0.01 (4.7)
	Sinensetin	0.80 ± 0.01 (32.7)	0.14 ± 0.00 (5.6)	0.21 ± 0.00 (8.8)

Values are mean (mg / 100 ml) ± S.D. (n=3). Numbers in parentheses are percentage of each concentration of direct injection juice sample (nobiletin, tangeretin and sinensetin are 24.18, 20.36 and 2.44 mg/100 ml, respectively).

1. Sample solvents that passed through Sep-pak plus C18 cartridge 2. Water that washed Sep-pak plus C18 cartridge 3. Each extraction solvents that eluted from Sep-pak plus C18 cartridge

して、メタノール:DMSO (1:1), DMSO, アセトン, エタノール, メタノールを検討した結果, メタノール抽出が最も適していると報告している。本研究では12種類の溶媒を用いて溶出率の向上を試みたが, 前項で検討したメタノール100%のPMF溶出率を上回る溶媒を見出すことはできなかった。前項と同様に溶出できない45~50%程度はカートリッジに吸着しているため, 溶出が困難であると推察された。そこで, C18以外の固相を用いて溶出率の向上を試みた。

3. 最適固相の選定

C18以外の固相5種類 (C8, C2, CH, PH, CN) を用いて, 固相抽出試験溶液の溶出液中のPMF含量を測定した結果をTable 3に示した。

直接分析区のノビレチン, タンゲレチン, シネンセチン含量はそれぞれ32.3, 15.2, 3.8mg/100mlとなり, 前項と同様にこれら値と各固相抽出試験溶液のPMF含量を比較した。C18と各固相を用いた際の溶出液中のPMF含量を比較したところ, PHを用いた際のノビレチンは2.8mg/100ml (8.6%, 直接分析区と比較した際の各成分の割合), タンゲレチンは1.67mg/100ml (11.0%), シネンセチンでは0.30mg/100ml (8.0%) となり, C18の溶出液中のPMF含量と比較するとそれぞれ1.92倍, 1.64倍, 2.31倍と増加した。また, 本結果から溶出率

は低いものの, 試験溶液2.0ml, メタノール100%溶液4.0mlを用いるPH固相抽出法において, 回収率から計算した補正係数にノビレチンで0.086, タンゲレチンで0.110, シネンセチンでは0.080を利用し, 以下の式 (直接分析した値) \div (実測値) / (補正係数) を用いた際に, 直接注入法で分析を行った値と変わらない値が算出できると考えられた。この値を用いて市販果汁飲料のPMF含量を調査し, 直接分析区と比較する試験を試みた。

4. 最適固相を用いた回収試験

前項で示した補正係数が使用可能か否かを調査するため, PH固相抽出を行い, 測定したPMF含量を補正して算出した値と直接分析区の含量との比較を行った結果をTable 4に示した。

直接分析区のPMF含量を100%とした際に, PH固相抽出法を用い, 補正して算出した値はノビレチンで98.9~110.3%, タンゲレチンで98.9~115.3%, シネンセチンでは100.7~110.1%となった。変動係数 (CV) は, ノビレチンで1.2~1.9%, タンゲレチンで1.9~2.9%, シネンセチンで1.3~2.6% となり, 良好な値であった。また, 直接分析区と固相抽出法を用い, 前項で求めた補正係数を使用して算出した値を比較したものをFig.2に示した。相関係数はノビレチンで0.9999, タンゲレチンで0.9997, シネンセチンは0.9999となり, 高い正の

Table 3 Concentration of polymethoxylated flavones in eluted methanol from sorbent cartridges

Sorbent	Component	*Elution solvent	ratio	Sorbent	Component	*Elution solvent	ratio
C18	Nobiletin	1.44 \pm 0.01 (4.5)	-	C8	Nobiletin	1.53 \pm 0.01 (4.7)	1.06
	Tangeretin	1.02 \pm 0.01 (6.7)	-		Tangeretin	1.06 \pm 0.01 (7.0)	1.04
	Sinensetin	0.13 \pm 0.00 (3.5)	-		Sinensetin	0.14 \pm 0.01 (3.7)	1.10
PH	Nobiletin	2.77 \pm 0.01 (8.6)	1.92	CN	Nobiletin	1.29 \pm 0.01 (4.0)	0.90
	Tangeretin	1.67 \pm 0.02 (11.0)	1.64		Tangeretin	0.62 \pm 0.00 (4.1)	0.61
	Sinensetin	0.30 \pm 0.00 (8.0)	2.31		Sinensetin	0.14 \pm 0.02 (3.7)	1.06
CH	Nobiletin	2.39 \pm 0.01 (7.4)	1.66	C2	Nobiletin	1.14 \pm 0.01 (3.5)	0.79
	Tangeretin	1.34 \pm 0.02 (8.8)	1.31		Tangeretin	0.67 \pm 0.00 (4.4)	0.66
	Sinensetin	0.26 \pm 0.00 (6.9)	1.93		Sinensetin	0.13 \pm 0.01 (3.5)	0.96

Values are mean (mg / 100 ml) \pm S.D. (n=3). Ratio of results from each sorbents / C18.

Numbers in parentheses are percentage of each concentration of direct injection juice sample (nobiletin, tangeretin and sinensetin are 32.31, 15.18 and 3.75 mg/100 ml, respectively).

* Methanol solvents that eluted from each solid phase extraction cartridges

Table 4 Recovery of polymethoxylated flavones from using direct injection and using PH solid phase extraction

Sample	Component	¹ Direct injection	² PH SPE	³ Ratio	⁴ Coefficient of variation
A	Nobiletin	96.07 ± 1.30	95.04 ± 1.31	98.9	1.4
	Tangeretin	43.44 ± 0.46	43.31 ± 0.85	99.7	2.0
	Sinensetin	12.11 ± 0.20	12.23 ± 0.22	101.0	1.8
B	Nobiletin	39.06 ± 0.64	38.61 ± 0.57	98.9	1.5
	Tangeretin	22.20 ± 0.19	21.96 ± 0.48	98.9	2.2
	Sinensetin	4.80 ± 0.07	4.83 ± 0.09	100.7	1.9
C	Nobiletin	31.03 ± 0.35	31.89 ± 0.59	102.8	1.9
	Tangeretin	13.64 ± 0.11	14.45 ± 0.34	105.9	2.4
	Sinensetin	3.66 ± 0.05	3.85 ± 0.09	104.9	2.2
D	Nobiletin	26.48 ± 0.34	26.59 ± 0.37	100.4	1.4
	Tangeretin	12.96 ± 0.10	13.27 ± 0.26	102.4	1.9
	Sinensetin	3.00 ± 0.05	3.05 ± 0.04	101.8	1.3
E	Nobiletin	14.13 ± 0.21	14.21 ± 0.17	100.6	1.2
	Tangeretin	6.66 ± 0.11	6.84 ± 0.16	102.7	2.3
	Sinensetin	1.68 ± 0.03	1.72 ± 0.05	102.7	2.6
F	Nobiletin	2.61 ± 0.03	2.88 ± 0.04	110.3	1.4
	Tangeretin	0.97 ± 0.02	1.12 ± 0.03	115.3	2.9
	Sinensetin	0.28 ± 0.00	0.31 ± 0.00	110.1	1.6

1, 2 : Values are mean (mg / 100 ml) ± S.D. (n=3). 3, 4 : Ratio (%)

1. Direct injection juice sample 2. Using PH solid phase extraction (SPE), and was calculated using correction coefficient 3. Ratio (%) of results from 2. / 1. . 4. Coefficient of variation (%) of the combination of PH sorbent-HPLC (n=3)

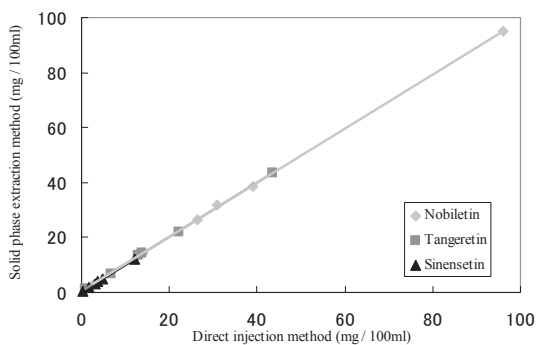


Fig.2 Relation between polymethoxylated flavones contents determined by direct injection method and solid phase extraction method. A liner regression is obtained at $y = 0.9851x + 0.4946$ for nobiletin, $y = 0.9887x + 0.3676$ for tangeretin, $y = 1.0066x + 0.0491$ for sinensetin, with correlation coefficients of 0.9999 for nobiletin, 0.9998 for tangeretin, 0.9999 for sinensetin, respectively.

相関 ($p < 0.01$) を示したため、これらの補正係数は実際の定量分析に使用可能であると推察された。

5. 固相抽出と試料希釈の関係

固相抽出法を用いて、より正確な直接分析区の値を算出するため、果汁試料を10倍希釈した溶液を使用し、固相抽出法と前項3の補正係数を使用して測定したものを Table 5に示した。

10倍希釈した果汁試料を直接注入法で求めた際の PMF 含量と PH 固相抽出法を用いて求めたものを比較したところ、PMF の溶出率はノビレチンで 8.7~9.9%、タンゲレチンで 10.9~13.7%、シネンセチンでは 8.5~9.8% となり、3. で求めた溶出率と大きな変化は見られなかった。果汁試料を10倍希釈し、PH 固相抽出法で求めた値に3. と同様の補正係数を用いて補正を行うと直接分析した値よりも10%程度増加した値が算出された。この結果が

Table 5 Recovery of polymethoxylated flavones from using direct injection and using PH solid phase extraction

Sample	Component	¹ Direct injection	² Direct injection 10-fold dilution	³ Tenfold dilution and PH SPE	⁴ Corrected value	⁵ Ratio	⁶ Ratio	⁷ Coefficient of variation
A	Nobiletin	82.72 ± 2.23	9.73 ± 0.25	0.91 ± 0.02	94.94 ± 2.50	9.4	115.1	2.6
	Tangeretin	37.78 ± 1.13	4.57 ± 0.12	0.57 ± 0.01	44.89 ± 0.83	12.6	118.8	1.8
	Sinensetin	10.62 ± 0.35	1.24 ± 0.04	0.11 ± 0.00	12.76 ± 0.58	8.9	120.1	4.5
B	Nobiletin	39.31 ± 0.83	4.00 ± 0.10	0.39 ± 0.01	40.46 ± 1.39	9.7	103.3	3.4
	Tangeretin	22.53 ± 0.53	2.28 ± 0.06	0.30 ± 0.00	23.21 ± 0.16	13.1	103.0	0.7
	Sinensetin	4.85 ± 0.09	0.49 ± 0.02	0.04 ± 0.00	5.18 ± 0.33	9.1	106.7	6.3
C	Nobiletin	29.35 ± 0.71	3.17 ± 0.08	0.28 ± 0.01	28.87 ± 0.75	8.7	98.7	2.6
	Tangeretin	12.83 ± 0.31	1.37 ± 0.03	0.15 ± 0.01	11.73 ± 0.70	10.9	91.4	5.9
	Sinensetin	3.52 ± 0.09	0.38 ± 0.01	0.03 ± 0.00	3.71 ± 0.11	8.5	105.4	3.1
D	Nobiletin	26.02 ± 0.68	2.64 ± 0.06	0.26 ± 0.00	26.64 ± 0.45	9.7	102.7	1.7
	Tangeretin	11.79 ± 0.30	1.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	12.63 ± 1.44	13.8	107.1	11.4
	Sinensetin	3.07 ± 0.10	0.31 ± 0.01	0.03 ± 0.00	3.49 ± 0.16	9.8	113.6	4.6
E	Nobiletin	14.28 ± 0.31	1.43 ± 0.04	0.14 ± 0.01	14.66 ± 0.77	9.8	103.0	5.2
	Tangeretin	6.84 ± 0.15	0.69 ± 0.02	0.09 ± 0.01	6.99 ± 0.59	13.0	102.2	8.4
	Sinensetin	1.71 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.02 ± 0.00	1.73 ± 0.06	8.8	101.3	3.5
F	Nobiletin	2.56 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.02 ± 0.00	2.60 ± 0.12	9.8	101.5	4.5
	Tangeretin	0.97 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.07 ± 0.10	13.7	110.1	9.6
	Sinensetin	0.27 ± 0.02	0.03 ± 0.00	-	-	-	-	-

1 - 4 : Values are mean (mg / 100 ml) ± S.D. (n=3). 5 - 7 : Ratio (%)

1. Direct injection juice sample 2. Direct injection tenfold dilution juice sample 3. Tenfold dilution juice sample using PH solid phase extraction (SPE) 4. 3. calculated using correction coefficient 5. Ratio (%) of results from 3. / 2. . (6) Ratio (%) of results from 4. / 1. . 7. Coefficient of variation (%) of the combination of PH sorbent-HPLC (n=3)

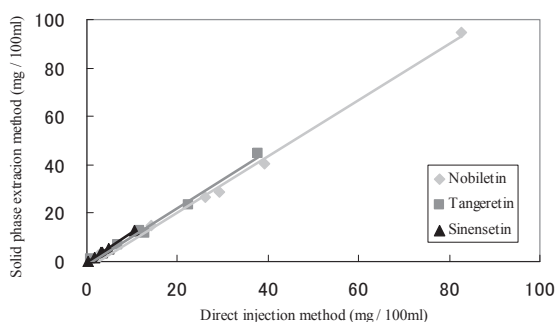


Fig.3 Relation between polymethoxylated flavones contents determined by direct injection method and tenfold dilution sample with solid phase extraction method. A liner regression is obtained at $y = 1.1592x - 2.816$ for nobiletin, $y = 1.1883x - 1.6142$ for tangeretin, $y = 1.2152x - 0.3494$ for sinensetin, with correlation coefficients of 0.9998 for nobiletin, 0.9948 for tangeretin, 0.9984 for sinensetin, respectively.

ら、分析の手法によって補正係数を求める必要があると考えられ、この条件ではノビレチンで0.096、タンゲレチンで0.128、シネンセチンでは0.087となった。直接分析区のPMF含量を100%とした際に、この値を使用して算出した値はノビレチンで98.4~114.8%、タンゲレチンで91.4~118.8%、シネンセチンでは93.9~120.1%となった。変動係数(CV)は、ノビレチンで1.7~5.2%、タンゲレチンで0.7~11.4%、シネンセチンで3.1~6.3%となった。また、直接分析した値と固相抽出法を用い、補正して算出した値を比較したものをFig.3に示した。相関係数はノビレチンで0.9998、タンゲレチンで0.9948、シネンセチンは0.9984となり、高い正の相関($p < 0.01$)を示したが、果汁試料を希釈しないPH固相抽出法の方が誤差は少なく、相関係数も高かったため、より正確な測定が可能であり、有用であると思われた。

以上の結果から、固相抽出法を用いるPMF含量

のHPLC分析を行ったところ、C18よりもPHのPMF溶出率の方が高いことが示された。また、同じカンキツ成分であるリモニンの固相抽出における回収率は95~105%と非常に高く、変動係数もほぼ5%以下で良好である¹¹⁾と報告されているが、本試験では溶出率は低いものの、変動係数は5%以下と良好であったため、補正係数を用いることで直接注入法に近い値を算出可能であった。しかしながら、シークワシャー果汁を対象とするもので、この補正係数を一般化することは難しいと考えられた。

要 約

C18固相抽出法を用いて、シークワシャー果汁中のポリメトキシフラボン類(PMF)を吸着し、アルコール系溶媒で脱着、回収し、HPLCで求めた含量と試料を直接HPLCに注入して求めた(直接注入法)含量を比較検討した。溶出液中のPMF含量が最も高かったメタノール濃度は100%であったが、直接注入法で求めた含量の20%程度にとどまった。12種類の抽出溶媒を用いて、PMF溶出率の向上を試みたがメタノール100%の条件以上の結果は認められなかった。C18以外の固相5種類(C8, C2, CH, PH, CN)を用いて溶出率の向上を検討したところ、PHが最も高い溶出率を示した。溶出率は、ノビレチンで8.6%(0.086, 補正係数)、タンゲレチンで11.0%(0.11)、シネンセチンでは8.0%(0.08)となり、以下の式(直接分析した値) \div (実測値) / (補正係数) を用いた際に、直接注入法で分析を行った値と変わらない値を算出できることを示した。変動係数は、ノビレチンで1.2~1.9%、タンゲレチンで1.9~2.9%、シネンセチンで1.3~2.6%となり、良好な値であった。

これらのことから、PMFにおけるPH固相抽出は、溶出率は低いものの、補正係数を用いることで直接注入法に近い値を算出可能であると考えられた。しかしながら、シークワシャー果汁を対象とするもので、この補正係数を一般化することは難しいと考えられた。

5. 文 献

- 1) Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M.: Quantification of flavonoid contents in Citrus fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3565-3571 (1999)
- 2) Kawaii, M., Tomono, Y., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito, C. and Furukawa, H.: Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3865-3871 (2000)
- 3) Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fuji, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A. and Kitajima, M.: The Citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice, *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 1322-1328 (2001)
- 4) Murakami, A., Nakaura, Y., Ohto, Y., Yano, M., Koshiba, T., Koshimizu, K., Tokuba, H., Nishino, H. and Ohigashi, H.: Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid, *Biofactors*, 12, 187-192 (2000)
- 5) Suzuki, R., Kohno, H., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Tanaka, T.: Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats, *Biofactors*, 22, 111-114 (2004)
- 6) Ishiwa, J., Sato, T., Mikami, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A.: A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9 / gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts, *J. Rheumatology*, 27, 20-25 (2000)
- 7) Sato, T., Koike, L., Miyata, Y., Hirata, M., Mikami, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A.: Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinase-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells, *Cancer Res.*, 62, 1025-1029 (2002)
- 8) Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. and Ohta, H.: Flavonoid composition of fruit citrus species, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 178-192 (2006)
- 9) Ozaki, K., Koga, N., Wada, K., Ogawa, K., Yano, M. and Ohta, H.: Detection of Shiikuwasha Juice (*Citrus depressa* HAYATA) adulterated by Calamondin Juice (*Citrus madurensis* LOUR.) using HPLC and TLC analyses of selected chalcones and polymethoxylated flavones. : The 9th International Symposium on Hyphanate Chromatography, 8-10 (2006)
- 10) 宮城一菜, 和田昌子, 藤瀬朋子, 古賀信幸, 和田浩二, 矢野昌充, 太田英明: イオン交換樹脂処理と不溶性パルプ添加の併用効果によるシークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 果汁の品質改善, 日食工誌, 56, 193-199 (2009)

- 11) Wilbur W. Widmer : Improvements in the quantitation of limonin in citrus juice by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1472–1476 (1991)
- 12) 和田浩二, 上原真紀子, 高良健作, 當銘由博, 矢野昌充, 石井利直, 太田英明 : シークワシャー果汁中ノビレチンの定量的分析, *日食保蔵誌*, 32, 29–33 (2006)