

# フリーラジカル系によるフラボノイドの分解

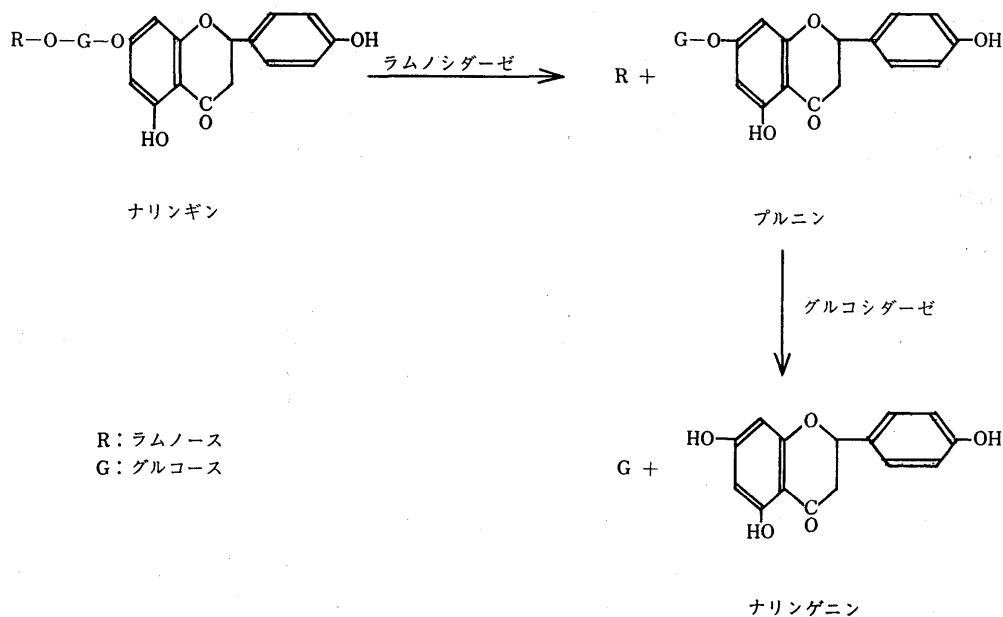
中原 満 子

## 〔緒 論〕

フラボノイド系色素配糖体は、植物界に広く存在し、そのアグリコン部の構造は有機化学的立場からよく解明されているが、配糖体の糖結合様式には疑問点が多々あり、配糖体の分解の研究は興味深いものである。筆者がフラボノイド配糖体「ナリンギン」の分解の研究を展開したのは、我国の柑橘類加工の最大の隘路が果汁工業における夏柑苦味の問題であるという点から発し、その原因と考えられるラムノース、グルコースより成る二糖類を構造として有するフラボノイド配糖体「ナリンギン」を分解することにある。

この苦味成分の本体であるナリンギンはラムノース、グルコースより成る二糖類を構造として有するフラボノイド配糖体のひとつであり、これをプルニンを経て、無味成分であるナリンゲニンにまで分解し、従来苦味のために僅かにしか用いらなかった夏蜜柑の加工を改善しようとするところに研究の目的がある。

柑橘類の主たる苦味成分であるフラボノイド配糖体ナリンギンを酵素で分解し、果汁や缶詰の加工に役立てようとして研究がなされている。すなわちフラボノイド配糖体加水分解酵素に関係する研究より<sup>1-8</sup> ナリンギンを加水分解する酵素ラムノシダーゼ、グルコシダーゼについての作用が次の通り報告されている。



夏蜜柑にはフラボノイド系とリモノイド系との2種の苦味が含まれている。そのためその加工がいろいろ問題になっており、加工も伸びなやんでいる。夏蜜柑を生食した場合はあまり苦味を感じないのに、これを缶詰にすると苦味がいちじるしく強くなってくる。その原因の一つとして夏蜜柑の苦味の主成分であるナリンギンには果汁に溶けている部分とパルプ質などに結合して不溶型になっている部分があり缶詰殺菌の際の加熱によって不溶型ナリンギンが可溶性となり、果汁中の溶解型ナリンギン量が増大するために苦味が強くなるのである。

このようにナリンギンを含む柑橘には特有の苦味があってかえって好まれる場合が多いが、ジュース、缶詰あるいはマーマレードにした場合は苦味が強く感じられるようになって嫌われるために、なんらかの方法でナリンギンを除くことが必要である。

現在ナリンギンを水解してその苦味を取り去ることのできる酵素ナリンギナーゼが製造されるようになり、夏蜜柑の脱苦味が行われている。しかしたとえば夏蜜柑ジュースの場合ナリンギン分解酵素を用いてナリンギンを完全に分解するとかえって夏蜜柑特有の風味が失われ、これに微量のナリンギンを添加するといちじるしく味が濃厚となってくるという報告もある<sup>9</sup>。

そこで筆者はこの分解反応を酵素によるのではなく、フリーラジカル系によるフラボノイドの分解として、過酸化水素系 ( $H_2O_2$  系) とアスコルビン酸系 ( $AH_2$  系)、特に食品として人体に有益である  $AH_2$  系による分解を最終目的として実験を開始した。その結果2、3の予報的な結果を得たのでここに報告する。

## 〔実験〕

### 1. Davis 変法<sup>10,11</sup> によるナリンギンの測定

ナリンギンの分解機作を正確に把握する測定方法が見出されていないため Davis 法と呼ばれる diethylene glycol-アルカリ性溶液中におけるフラボノイド配糖体の呈色による外に有効な定量方法がなく、特に苦味の消失に直接関係するナリンギンよりブルニンまでの分解を測定することができない。そこでナリンギンの定量には Davis 変法を用いた。

すなわち検液 1 ml と Diethylene glycol 10 ml 及び 1N NaOH 1 ml を混ぜ 30°C に 30 分保った後、420 nm の吸光度を測定する。なお Davis 法における呈色は Diethylene glycol の品質によって変動するので注意する。

### 2.(1) 薄層クロマトグラフィー<sup>12</sup> によるグルコース、ラムノースの分離

薄層プレートを 90 ~ 100°C の乾燥機に30分間保ち乾燥させる。プレートの下端より 2.0 cm の所に検体をつけ、酢酸エチル 65 ml およびイソプロパノール 2 容、水 1 容の混液 35 ml を展開溶媒とし、あらかじめ同じ溶媒で十分飽和した展開槽で展開する。

#### 呈色試薬

##### アニスアルデヒド-硫酸

新たに調製したアニスアルデヒド-硫酸試薬 (95 % エタノール 9 ml、濃硫酸 0.5 ml およびアニスアルデヒド 0.5 ml を混じて製する) の 10 ml を噴霧し、5 ~ 10 分間 90 ~ 100°C に加熱すると特異的な呈色を示す。

(2) ペーパークロマトグラフィー<sup>13</sup>によるナリンギン、プルニン、ナリンゲニンの分離

東洋汙紙 No. 51 (2×40 cm) にスポットし、ブタノール、酢酸、水 (6:1:2) で展開し、風乾後 1%塩化アルミニウムメタノール溶液を噴霧し、それぞれのフラバノンにより発する蛍光を紫外線下に調べる。

### 〔結果および考察〕

第 1 表の如く各種組成の溶液を作製し、40°C に 10 分間、恒温槽に保ち反応させたものを検液とした。

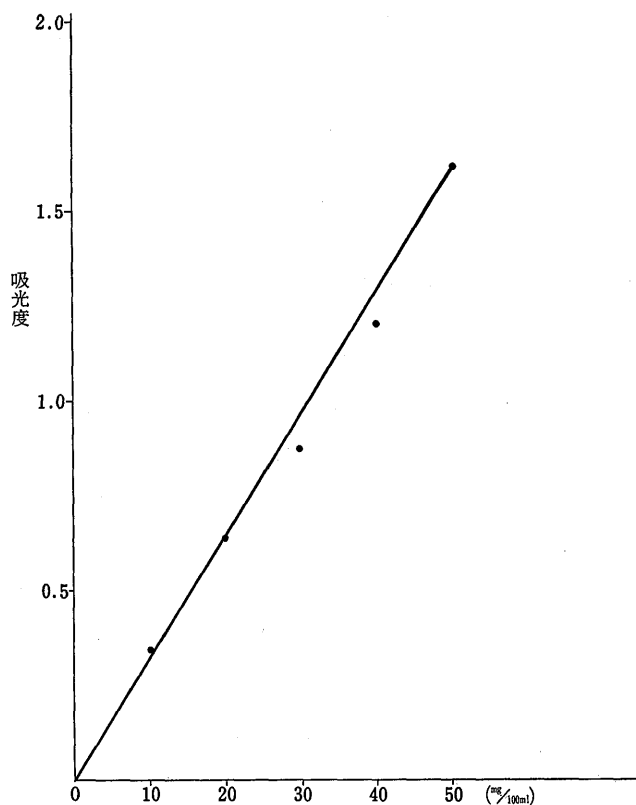
Davis 変法によるナリンギンの検量曲線は第 1 図の通りである。第 1 表のような反応条件によりナリンギンの分解程度を測定した結果は第 2 表の如くである。その結果、C, D, G, H の条件での吸光度がかなり低くなっていることから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系又は AH<sub>2</sub> 系で何らかの分解が起るのではないかと推定された。吸光度が低くなっているという事はナリンギンの残存量が少なくなっていると考えられるからである。

薄層クロマイドグラフィーによって、ナリンギンがフリーラジカル系により分解されて分離されたラムノースおよびグルコースの存在を確認しながら分解に最適の条件を追求した。その結果、反応検液より求められた Rf 値が標準液の Rf 値に近似しているのでナリンギンが分解されてラムノースおよびグルコースを分離したものと推定された。これらの検液のうち、最も有効な条件と思われるものは第 3 表・第 4 表・第 2 図に示す如く、ナリンギン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe 系でモル濃度比 [1:5:1] であった。

またナリンギン-AH<sub>2</sub>-Cu 系では第 5 表・第 6 表・第 3 図に示す如くモル濃度比 [1:1/2:1/2] であった。

第 1 表

検液	反応液組成	検液	反応液組成
A	0.1% ナリンギン 10ml H <sub>2</sub> O 50ml	E	0.1% ナリンギン 10ml 1/10M Cu 5ml H <sub>2</sub> O 50ml
B	0.1% ナリンギン 10ml 1% AH <sub>2</sub> 5ml H <sub>2</sub> O 50ml	F	0.1% ナリンギン 10ml 1% AH <sub>2</sub> 5ml 1/10M Cu 5ml H <sub>2</sub> O 50ml
C	0.1% ナリンギン 10ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5ml H <sub>2</sub> O 50ml	G	0.1% ナリンギン 10ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5ml 1/10M Cu 5ml H <sub>2</sub> O 50ml
D	0.1% ナリンギン 10ml 1% AH <sub>2</sub> 5ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5ml H <sub>2</sub> O 50ml	H	0.1% ナリンギン 10ml 1% AH <sub>2</sub> 5ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5ml 1/10M Cu 5ml H <sub>2</sub> O 50ml

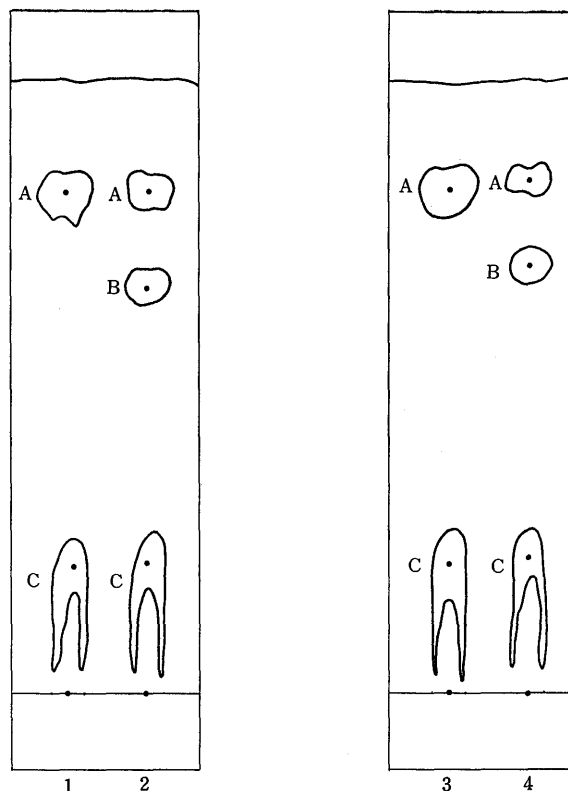


第1図 Davis 変法によるナリンギンの検量曲線

第2表

	吸 光 度		
	I	II	III
A	0.770	0.730	0.829
B	0.740	0.780	0.860
C	0.285	0.372	0.420
D	0.290	0.415	0.485
E	0.660	0.615	0.690
F	0.765	0.760	0.810
G	0.165	0.165	0.200
H	0.275	0.330	0.310

ペーパークロマトグラフィーによってナリンギンがフリーラジカル系により分解されて、分離したプルニン、ナリンゲニンの存在を確認しながら分解に最適の条件を追求した。その結果、反応検液より求められた Rf 値が標準液の Rf 値と近似しているので、ナリンギンが分解されてプルニンおよびナリンゲニンが分離したものと推定された。



第2図 分解物の薄層クロマトグラム  
Aはナリンギン  
Bはラムノース Cはグルコース

第3表

ナリンギン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe系[1:4:1][1:5:1]

ナリンギン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系[1:4][1:5]

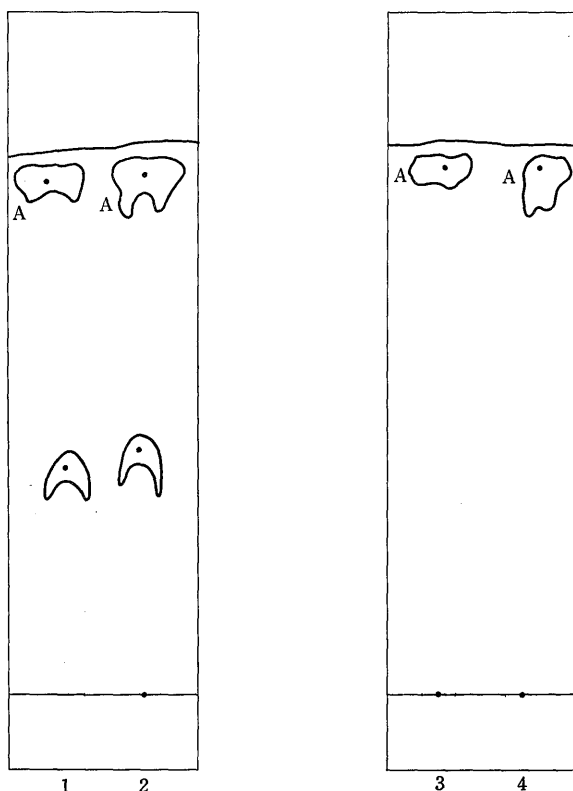
検液	反応溶液組成			検液	反応溶液組成		
1	0.002M ナリンギン	10ml		3	0.002M ナリンギン	10ml	
	0.008M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml			0.01M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			H <sub>2</sub> O	50ml	
2	0.002M ナリンギン	10ml		4	0.002M ナリンギン	10ml	
	0.008M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml			0.01M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml	
	0.002M Fe	5ml			0.002M Fe	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			H <sub>2</sub> O	50ml	

検液の作製 各種組成の溶液を作製し、40℃10分間恒温槽に保ち、反応させたものを検液とした。

(注) 1=0.002M

第4表

検液	Rf値A	Rf値B	Rf値C	検液	Rf値A	Rf値B	Rf値C
1	0.89	—	0.21	3	0.89	—	0.20
2	0.89	0.64	0.22	4	0.90	0.70	0.23



第3図 分解物の薄層クロマトグラム

第5表

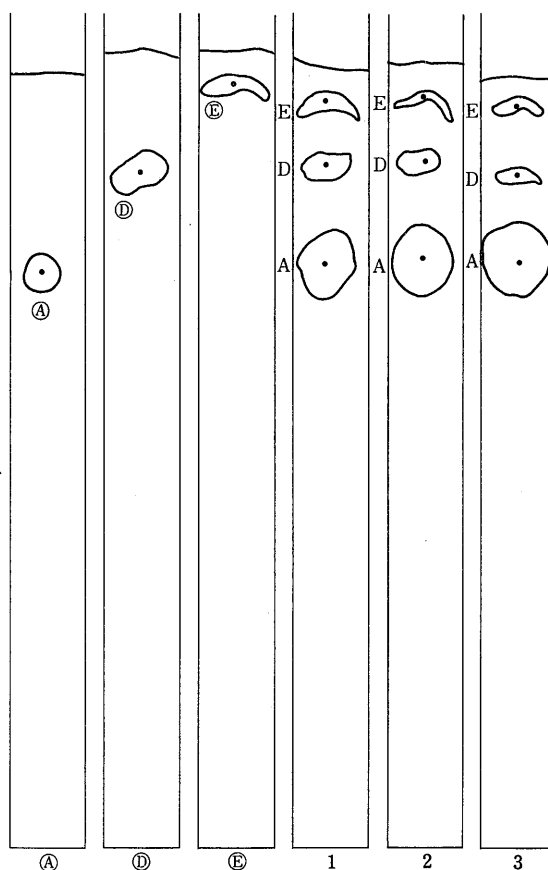
ナリンギン-AH<sub>2</sub>-Cu系[1:½:½][1:10:½]

検液	反応溶液組成			検液	反応溶液組成		
1	0.002M ナリンギン	10ml		3	0.002M ナリンギン	10ml	
	0.001M AH <sub>2</sub>	5ml			0.02M AH <sub>2</sub>	5ml	
	0.001M Cu	5ml			0.001M Cu	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			H <sub>2</sub> O	50ml	
2	0.002M ナリンギン	10ml		4	0.002M ナリンギン	10ml	
	0.001M AH <sub>2</sub>	5ml			0.02M AH <sub>2</sub>	5ml	
	0.001M Cu	5ml			0.001M Cu	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			H <sub>2</sub> O	50ml	

第6表

検液	Rf値A	Rf値B	Rf値C	検液	Rf値A	Rf値B	Rf値C
1	0.95	—	0.42	3	0.95	—	—
2	0.94	—	0.45	4	0.96	—	—

これらの検液のうち最も有効と推定された検液のモル濃度比はナリンギン-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe系では第7表・第8表・第4図に示す如く、[10:50:10]、ナリンギン-AH<sub>2</sub>-Cu系では第9表・第10表・第5図に示す如く、[10:5:5]であった。



第4図 分解物のペーパークロマトグラム  
Aはナリンギン Dはプルニン  
Eはナリンゲニン

第7表

ナリンギン— $\text{H}_2\text{O}_2$ —Fe系[10 : 50 : 10]

ナリンギン— $\text{AH}_2$ —Cu系[10 : 5 : 5]

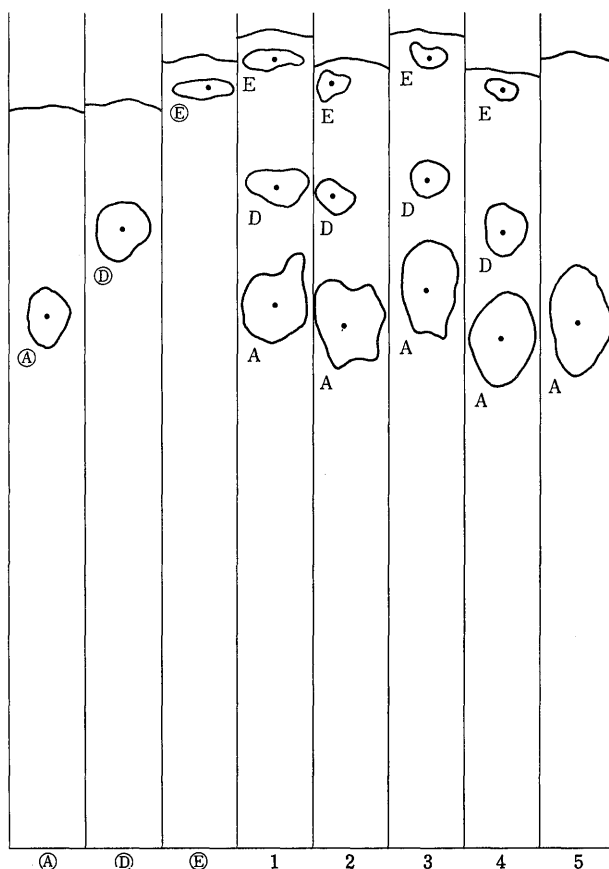
ナリンギン— $\text{AH}_2$ — $\text{H}_2\text{O}_2$ —Fe系[10 : 10 : 1 : 2]

標準液 (A) : ナリンギン (D) : プルニン (E) : ナリンゲニン

検液	反応液組成	検液	反応液組成	検液	反応液組成
1	0.02M ナリンギン 10ml	2	0.02M ナリンギン 10ml	3	0.02M ナリンギン 10ml
	0.1M $\text{H}_2\text{O}_2$ 5ml		0.1M $\text{AH}_2$ 5ml		0.02M $\text{AH}_2$ 5ml
	0.02M Fe 5ml		0.02M Cu 5ml		0.002M $\text{H}_2\text{O}_2$ 5ml
	$\text{H}_2\text{O}$ 50ml		$\text{H}_2\text{O}$ 50ml		0.004M Fe 5ml
					$\text{H}_2\text{O}$ 50ml

第8表

標準液	Rf値(E)	Rf値(D)	Rf値(A)	検液	Rf値E	Rf値D	Rf値A
(A)	—	—	0.75	1	0.96	0.88	0.75
(D)	—	0.85	—	2	0.95	0.88	0.75
(E)	0.96	—	—	3	0.97	0.87	0.78



第5図 分解物のペーパークロマトグラム

本条件において酸化剤である  $\text{H}_2\text{O}_2$  が第一鉄塩である  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  との共存によって、ナリンギン、プルニン、ナリンゲニンの蛍光の消光作用をすることはなかった。さらに  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Fe, ラムノース, グルコースは蛍光を発現しないと推定されたので、それらとナリンギン、プルニン、ナリンゲニンの蛍光の発現とを混同する可能性はないものと考えられる。

この研究に関して、有益御助言・御指導をいただいた本学八木一文教授に深謝する。また本実験に協力された乾 博子、前田嘉子、清水智子、田辺 薫の諸姉に感謝する。

### 〔要 約〕

ナリンギンがフリーラジカル系で、何らかの形で分解されていることが、ペーパークロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーによって判明した。しかし①フリーラジカル系によるナリンギンの分解産物ナリンゲニンの定量。②分離されたラムノースおよびグルコースが単独なのか、二糖類の形なのかなど、未解決の問題が多く残されているが、今後の究明にゆずりたい。



第9表

ナリンギン—AH<sub>2</sub>—Cu系[10:5:5][10:50:10]ナリンギン—AH<sub>2</sub>—H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—Fe系[10:50:5:5]

[10:10:1:2]

[20:20:2:4]

標準液 ④:ナリンギン ⑤:プルニン ⑥:ナリンゲニン

検液	反応液組成			検液	反応液組成		
1	0.02M ナリンギン	10ml		4	0.02M ナリンギン	10ml	
	0.01M AH <sub>2</sub>	5ml			0.02M AH <sub>2</sub>	5ml	
	0.01M Cu	5ml			0.002M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			0.004M Fe	5ml	
					H <sub>2</sub> O	50ml	
2	0.02M ナリンギン	10ml		5	0.04M ナリンギン	10ml	
	0.1M AH <sub>2</sub>	5ml			0.04M AH <sub>2</sub>	5ml	
	0.02M Cu	5ml			0.004M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml	
	H <sub>2</sub> O	50ml			0.008M Fe	5ml	
					H <sub>2</sub> O	50ml	
3	0.02M ナリンギン	10ml					
	0.1M AH <sub>2</sub>	5ml					
	0.01M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5ml					
	0.01M Fe	5ml					
	H <sub>2</sub> O	50ml					

第10表

標準液	Rf値④	Rf値⑤	Rf値⑥	検液	Rf値E	Rf値D	Rf値A
④	—	—	0.72	1	0.97	0.81	0.67
⑤	—	0.83	—	2	0.97	0.83	0.67
⑥	0.97	—	—	3	0.97	0.82	0.68
				4	0.98	0.80	0.65
				5		—	0.66

## 文 献

- 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本寿一郎: 農化, **37**, 84(1963)
- 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本寿一郎: 農化, **37**(3), 142(1963)
- 岡田茂孝, 岸清, 板谷公和, 福本寿一郎: 農化, **37**(3), 146(1963)
- 岡田茂孝, 板谷公和, 福本寿一郎: 農化, **38**(5), 242(1964)
- 岡田茂孝, 矢野真弓, 福本寿一郎: 農化, **38**(5), 246(1964)
- W. J. Dunlap, R. E. Hagen, S. H. Wender: J. Food Sci., **27**, 597(1962)
- D. W. Thomas, C. V. Smythe, M. D. Labbee: Food Res., **23**, 591(1958)
- F. P. Griffiths, B. J. Lime: Food Technol., **13**, 430(1959)
- 中林敏郎: 日本食品工業学会誌, **9**, 28(1962)
- 中林敏郎: 缶詰技術, **4**, 51, 62(1963)
- W. B. Davis: Anal. Chem., **19**, 476(1947)
- 石川正幸, 原昭二, 古谷力, 中沢泰男編: 薄層クロマトグラフィ—
- 大橋晋: 日本食品工業学会誌, **11**(9), 376(1964)

原稿受理 1981年4月28日

## Summary

# Degradation of Flavonoid by Free Radical Systems

Mitsuko Nakahara

Naringin, the 7-rhamnoglucoside of the flavanone naringenin, found in some varieties of citrus—mainly grapefruit and shaddock—is the characteristic bitter principle of these fruits. The degradation of naringin by free radical system containing ascorbic acid and hydrogen peroxide was observed chromatographically.