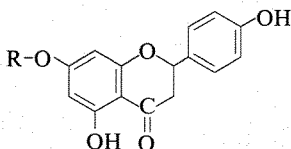


107 ナリンジン及びヘスペリジン

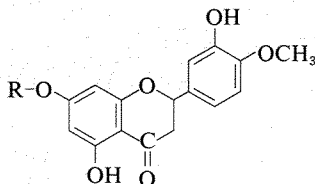
Naringin and Hesperidin

ナリンジン



ナリンゲニン R: H
 ナリンジン R: neohesperidose

ヘスペリジン



ペスペレチン R: H
 ヘスペリジン R: rutinose
 ネオヘスペリジン R: neohesperidose

1. 試験法の概要

食品中のナリンジン及びヘスペリジンは、希釈又は固相抽出法により精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製¹⁾

① かんきつ類

試料 2~4g を精密に量り、50%エタノール約 50ml を加え、超音波で 2 分間抽出する。50%エタノールで約 80ml にして、ときどき振とうしながら 20 分間超音波抽出した後、50%エタノールで正確に 100ml とする。上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

② 液状食品

試料約 1g を精密に量り、メタノールを加えて 2ml とし、遠心して上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

③ 固形食品 (固相抽出法)²⁾

試料 1~5g を精密に量り、10 倍量の水を加えて³⁾加温溶解する。チューインガムなど溶けな

いものは、加温下で超音波抽出する。油状物質がある場合は添加した水と同量のヘキサンで洗浄する。固相カートリッジをメタノール 10ml, 続いて水 10ml でコンディショニングし、試料抽出液を負荷する。カートリッジを水 5ml で水洗した後、メタノール 10ml で溶出する。溶出液を濃縮し、濃縮物に移動相 A 液を加え溶解し正確に 2ml とし、これを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする⁴⁾。

(3) 検量線用標準液の作成

ナリンジン及びヘスペリジン 0.010g を正確に量り、メタノールを加えて溶かし正確に 20ml とし、標準原液とする。それぞれの標準原液 10ml を正確に採り、メタノールを加えて正確に 50ml とし、標準溶液とする（この液 1ml はナリンジン及びヘスペリジン 100 μ g を含む）。

標準溶液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、移動相 A 液を加えてそれぞれ正確に 10.0ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれナリンジン及びヘスペリジン 0, 10, 20, 30, 40 μ g 及び 50 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル⁵⁾

カラム管：内径 4.6mm, 長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A 液 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル・水混液 (20 : 80)

B 液 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル・水混液 (40 : 60)

リニアグラジエントの条件（測定後 A 液で 10 分洗浄）

A (%) : 0 分 100, 10 分 100, 20 分 0, 30 分 0

B (%) : 0 分 0, 10 分 0, 20 分 100, 30 分 100

流速：1.0ml/分

測定波長：285nm

② 検量線

検量線用標準液 20 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からナリンジン及びヘスペリジンの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 20 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線により試料液中のナリンジン及びヘスペリジンの濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のナリンジン及びヘスペリジン含量 C (g/kg) を計算する⁶⁾。

$$C(\text{g/kg}) = \frac{A \times V}{W \times 1,000}$$

A：試料液中のナリンジン及びヘスペリジン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

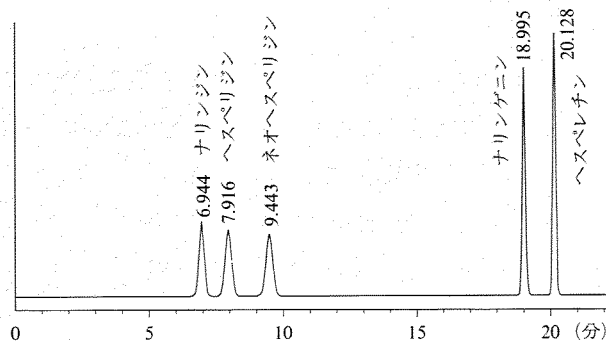
V：試料液の全量 (ml)

試薬・試液等

1. エタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
2. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
3. *n*-ヘキサン：[高速液体クロマトグラフ用]
4. 1-ブタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
5. 固相カートリッジ：C₁₈
6. TFA：トリフルオロ酢酸 [特級]
7. 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル：アセトニトリル 1L に TFA 770 μl を添加し、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過する (用時調製)。

[注]

- 1) 本法は果実類、清涼飲料水、キャンデー、ゼリーに適用できる。また、本法によりナリンジン及びヘスペリジンのほか、ネオヘスペリジン、ナリンゲニン、ヘスペレチンも測定できる。クロマトグラムを図に示した。



注図 107-I ナリンジン、ヘスペリジン類の液体クロマトグラム

- 2) 固相抽出法による精製はメーカーやロットにより、溶出条件が異なるため、あらかじめ溶出量をチェックしておく必要がある。
- 3) ゼリーは目詰まりを起こしやすいため、100倍量の水に溶解するとよい。
- 4) 固相抽出法のほか、1-ブタノールによる抽出法でも精製できる。試料抽出液を同量の1-ブタノールで2回抽出する。抽出液を合わせ、減圧下に溶媒を留去し、濃縮物にメタノール 2ml を加え、溶解して試料液とする。
- 5) 市販の充てんカラムとして Inertsil ODS-2, Wakosil II-5C18HG, TSKgel ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4~6mm, 長さ 150~250mm 等が使用できる。
- 6) 本法による定量限界は、0.010g/kg である。