

カンキツ類のリモノイドに関する研究 : I. ポンカン, タンカン, 早生ウンシュウ, ナツダイダイ果実のリモノイド組成の時期別変化

著者	橋永 文男, 江島 宏, 永浜 秀人, 伊藤 三郎
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	27
ページ	171-180
別言語のタイトル	Studies on the Limonoids in Citrus Fruits : I. Seasonal Changes of Limonoid Components in Ponkan, Tankan, Early Satsuma Mandarin and Natsudaidai Fruits
URL	http://hdl.handle.net/10232/2426

カンキツ類のリモノイドに関する研究

I. ポンカン, タンカン, 早生ウンシュウ, ナツダイダイ 果実のリモノイド組成の時期別変化

橋 永 文 男 ・ 江 島 宏*
永 浜 秀 人**・伊 藤 三 郎
(昭和 51 年 8 月 30 日 受理)

Studies on the Limonoids in Citrus Fruits

I. Seasonal Changes of Limonoid Components in Ponkan, Tankan, Early Satsuma Mandarin and Natsudaidai Fruits

Fumio HASHINAGA, Hiroshi EJIMA, Hideto NAGAHAMA
and Saburo ITOO

(Laboratory of Postharvest Physiology and Preservation of Fruits and Vegetables)

緒 言

カンキツ類の苦味は生食用はもとより加工製品においても味覚の上で重要な役割を果している。その主成分はグレープフルーツなどにみられるフラボノイド系のナリンギン¹⁴⁾ とネーブルオレンジなどに存在するトリテルペノイド誘導体のリモノイド¹⁵⁾ に代表される。鹿児島県特産であるポンカン, タンカン, 早生ウンシュウで搾汁して保存しておいたときの苦味及び早生ウンシュウで時々感じられる苦味はこれらの品種にナリンギンが見い出されていないことから²⁰⁾, リモノイド類に起因するものと推定されたので, 野村ら²²⁾ によって詳細に研究されたナツダイダイを対照にして比較検討した。

リモノイド類の定量は困難であり種々の分析方法が考案されているが^{2,4,16,19)} リモニンのみを対象にしたものが多い^{21,27)}。我々は比較的簡易に各リモノイド組成が定量できる方法として薄層クロマトグラフィー^{17,25)} と濃度計を使用し, 上記4種のカンキツについて経時的に果実を採収し, 各部位ごとに分けてそれらの消長を追跡するとともに単離したリモニンとノミリンの苦味を比較した。

本実験の材料を提供していただいた鹿児島県果樹試験場坂元三好栽培研究室長はじめ関係研究員および本

本報告の一部は昭和50年度園芸学会秋季大会で発表された。

*現在 福岡県園芸農業協同組合連合会

**現在 丸大食品株式会社

学唐湊果樹園串間俊文主任に深謝します。

実験材料及び方法

1) 供試材料 垂水市鹿児島県果樹試験場の42年生ポンカン (*Citrus reticulata* Blanco) と47年生タンカン (*Citrus tankan* Hayata) 及び本学農学部唐湊果樹園の早生ウンシュウ (*Citrus unshiu* Marc.) と川野ナツダイダイ (*Citrus natsudaidai* Hayata)

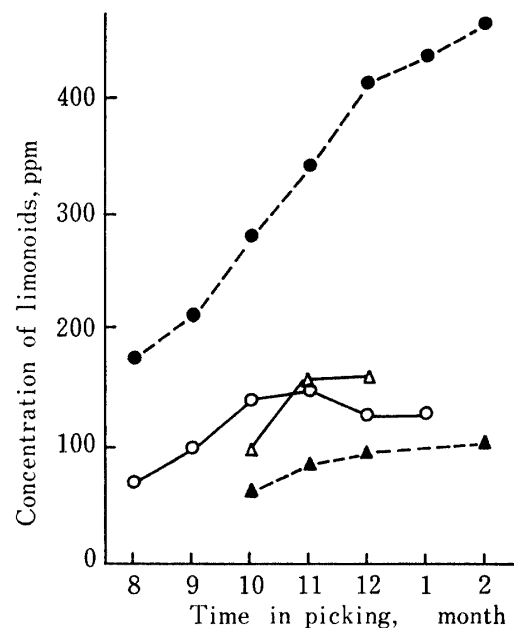


Fig. 1. Average weight of picking fruits
△—△ Ponkan, ▲—▲ Tankan
○—○ Early satsuma mandarin
●—● Natsudaidai

をそれぞれ 10~12 月, 10~3 月, 8~1 月, 8~2 月に採収した. 約 1 か月おきに M 級果実を 10 個ずつ使用し, 5 個ずつ 2 回測定した (第 1 図).

2) リモノイドの抽出 Scott の方法²⁴⁾ を改良して次のように行なった. 果肉は 50 g, じょうのう膜, 果皮, フラベド, アルベドは 10 g, 種子は 3~5 g を各果実から均一になるようにとり, 25%硫酸 マグネシウム-0.5%クエン酸溶液 10 ml と 1%ブチルヒドロキシトルエン (BHT) 2 ml と水 20 ml (果肉以外) を加えて (pH 3) ホモジナイズしたのち 5 分間煮沸した. 特に果皮, フラベド, 種子についてはあらかじめ石油エーテルで 2 回脱脂した. 次に 0.05% BHT 塩化メチレン溶液 20 ml で攪拌抽出し, さらに 10 ml で再処理した. ろ過した両液を合せて蒸発乾固したのち, アセトニトリル 2.0 ml に溶解して薄層クロマト用試料とした.

3) 標準物質の調製 ナツダイダイの種子 900 g を 60°C で熱風乾燥し, 塩化メチレンとイソプロパノールでリモニンを結晶化させた⁵⁾. 母液を濃縮後, 塩化メチレンでリモノイド類を数回抽出精製した. これを下記の薄層クロマトグラフィ (薄層の厚さ 1 mm) によって分離して, 主成分のリモニンとノミリンのバンドをそれぞれかき取って塩化メチレンで抽出した. 再クロマトと再結晶によって得られたリモニンは 366 mg (mp 282~289°C), ノミリンは 180 mg (mp 257~259°C) であり, クロマトグラフ的に純粋であった. またじょうのう膜からも同様にしてリモニンとノミリンを調製した.

4) 薄層クロマトグラフィと定量 シリカゲル G (メルク社製) の 250 μ の薄層を 20×20 cm のガラス板に作り, 110°C で活性化して使用した. リモニン標準液 (1 mg/ml) 5~60 μl を 8 個と各試料ごとに 5~100 μl の範囲内で異った量をマイクロピペットで

2 スポットずつ塗布した (第 2 図). 展開溶媒にはクロロホルム-アセトン (9:1)²²⁾ を用いた. また発色剤として 0.5% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液^{17,22)} (0.5% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドのエタノール溶液 90 ml に 10 ml の濃硫酸を添加) を噴霧して完全に乾燥させたのち, 塩酸気流中に入れた. 黄橙色から紫黒色に変色したスポットを島津二波長クロマトスキャナー (CS-900 型) で 600 nm の反射光を利用して積算し, リモニンの発色率を基準にして, 各リモノイドの濃度を求めた. ノミリンだけは別にリモニンとの発色率を比較して補正した.

5) 苦味の官能審査 3) の方法で得られたミカンの代表的な苦味成分であるリモニンとノミリンをホモジナイザーを使って溶解させ, ショ糖 0~10%, クエン酸 0~1.0% の混合溶液に 0.5~10.0 ppm の濃度になるように希釈した. 学生および教官の 10 人のパネルによって審査を行ない, 苦い: 100, かすかに苦い: 50, 苦くない: 0 として評価した.

実験結果

1. リモノイド定量法の検討

1) 回収率 本法にしたがってタンカン果汁 (リモニン含量 4.2 と 5.5 μg/ml の両者) にリモニンをそれぞれ 1 ml あたり 5, 10, 25 μg 添加して回収実験を行なった結果, 91~109% の回収率が得られた (第 1 表).

Table 1. Recovery of limonin added to citrus fruit juice

Limoinin in juice (μg/ml)	Limoinin added (μg/ml)	Observed Recovery (μg/ml)	Recovery (%)
4.2	5.0	8.9	97
4.2	10.0	15.4	109
4.2	25.0	29.4	101
5.5	5.0	10.3	98
5.5	10.0	15.5	100
5.5	25.0	28.0	91

2) 変動係数 リモニンの 10 及び 25 μg のスポットを 16 個ずつ作り, デンシトメーターで積分した記録紙上の値を第 2 表に示した. 変動係数は 10 μg のリモニンで 5.03%, 25 μg で 6.04% になった.

3) ノミリンの発色率 *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液による各リモノイドの発色率が異なるものと推定されるので, 含量が多く, 比較的少量に調製できるノミリンのみについて, リモニンの発色率と比較した. 第 3 図に示されているように 5~60 μg のリモニンとノミリンは直線関係になり, この範囲で定量

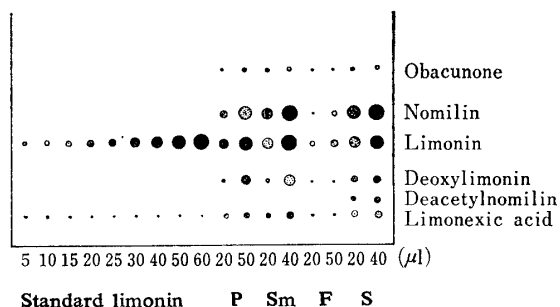


Fig. 2. Thin layer chromatography of limonoids in Takan

P: Peel, Sm: Segment membrane, F: Flesh, S: Seed

Table 2. Replicate analysis of limonin by densitometer

Amount of limonin spotted (μg)	Recorder response (mm)						Average	Coefficient of variation
10	10.0	10.5	11.0	11.7	11.5	12.0	11.45	5.03
	11.4	11.3	11.1	11.4	12.0	11.8		
	11.6	12.0	11.9	12.0				
25	22.5	23.9	23.4	23.5	22.7	23.1	20.08	6.04
	23.3	23.1	23.0	24.0	23.8	24.0		
	25.0	26.2	26.8	27.0				

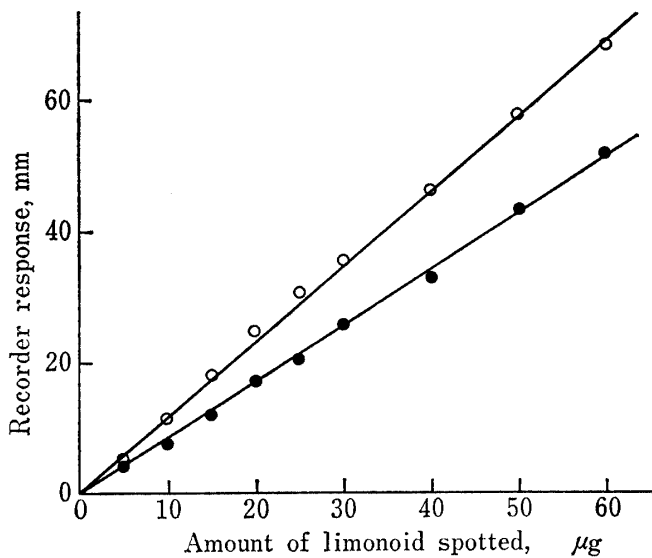


Fig. 3. Dependence of the densitometric spot area on the applied amount of limonin and nomilin

○—○ Limonin, ●—● Nomilin

可能であった。発色率を計算するとノミリンはリモニンの75%の発色率にとどまった。したがってノミリンについてはこの値で補正したが、他のリモノイド類はリモンinと同じ発色率であると仮定して濃度を算出した。

2. ポンカンのリモノイド

10, 11, 12月に採取したポンカンを果皮, じょうのう膜, 果肉, 種子に分けて測定した。第4図に示したようにポンカンにはリモンin, ノミリン, リモネキシ酸(果皮にはこん跡)の3種を含み, デアセチルノミリン, デオキシリモンin, オバクノンは検出されなかった。種子とじょうのう膜にはリモンin(12月の種子, 1,080 ppm)よりもノミリン(同, 1,210 ppm)が多く含まれていたが, じょうのう膜のノミリンは11月から12月にかけて657から153 ppmに急激に減少した。量的に少ないリモネキシ酸は成熟につれて増加した。一方果皮にはリモンinが最も多く検出され

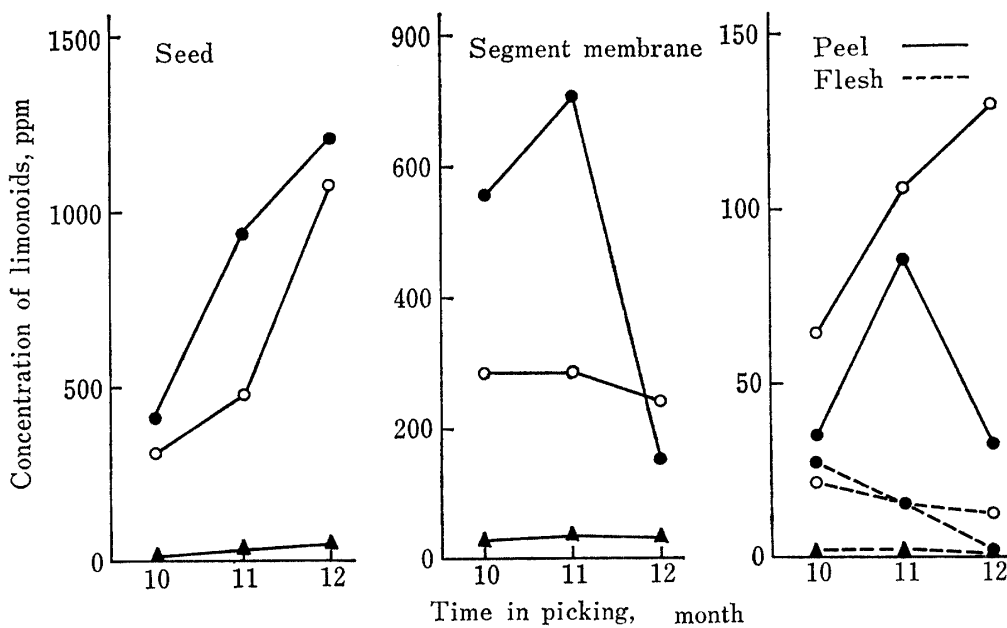


Fig. 4. Seasonal changes in limonoid composition of the component parts of Ponkan

○—○ Limonin, ●—● Nomilin, ▲—▲ Limonexic acid

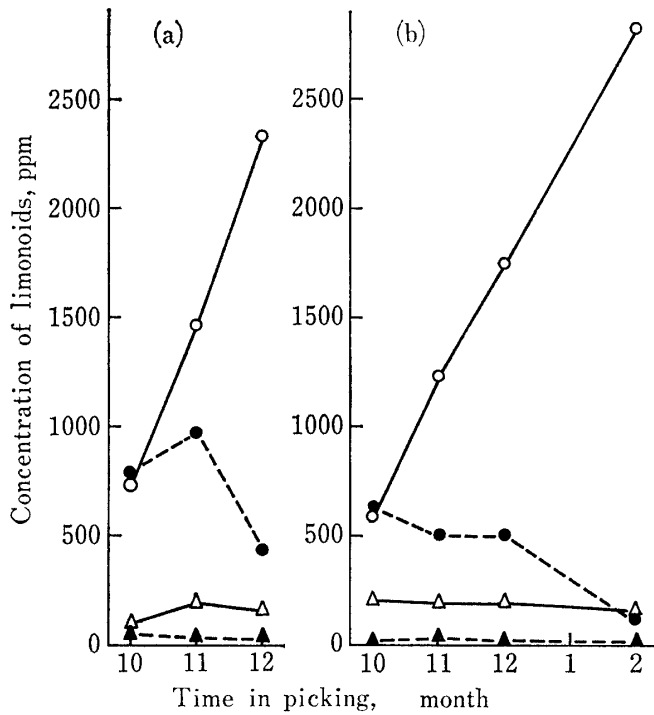


Fig. 5. Distribution of limonoid in the component parts of Ponkan and Tankan

(a) Ponkan, (b) Tankan
 ○—○ Seed, ●—● Segment membrane,
 △—△ Peel, ▲—▲ Flesh

た。果肉では10月時点でノミリンの方が多かったが、以後リモニンに比べて顕著に減少して(27→2 ppm)リモニンよりも少なくなった。

以上の結果、部位別に各リモノイド含量を合計した

ものを第5(a)図に示した。リモノイド含量は種子に最も多く、成熟につれて急速に増加した(730→2,340 ppm)。次にじょうのう膜に多く、11月がピークであった。果肉のリモノイド含量は最も少なく、成熟につれ50 ppm から15.2 ppmに減少することが認められた。

3. タンカンのリモノイド

タンカンはポンカンと同様に測定したが、熟期が遅いため2月まで行なった。薄層クロマトグラフィではオバクノン、ノミリン、リモニン、デオキシリモニン、デアセチルノミリン、リモネキシ酸の6種が検出され、比較的多いものを第6図に示した。種子ではノミリンが最も多く(2月に1,710 ppm)、つづいてリモニン(2月に785 ppm)、デオキシリモニン、リモネキシ酸、デアセチルノミリンの順であって、いずれも成熟につれて増加した。じょうのう膜では成熟に伴ってノミリンが顕著に減少した(10月の410 ppm から2月の15 ppm)。また果皮ではリモニン、ノミリン、デオキシリモニンの順であった。果肉においてはリモニン、ノミリン、リモネキシ酸の順に少なかったが、熟度にあまり影響されなかった。

総リモノイド含量を部位別にまとめたものが第5-(b)図である。成熟につれて種子のリモノイド含量が急増し、2月には2,800 ppmに達した。じょうのう膜と果皮では反対に減少し、特に12月から2月にかけて著しかった。果肉のリモノイド含量は相対的

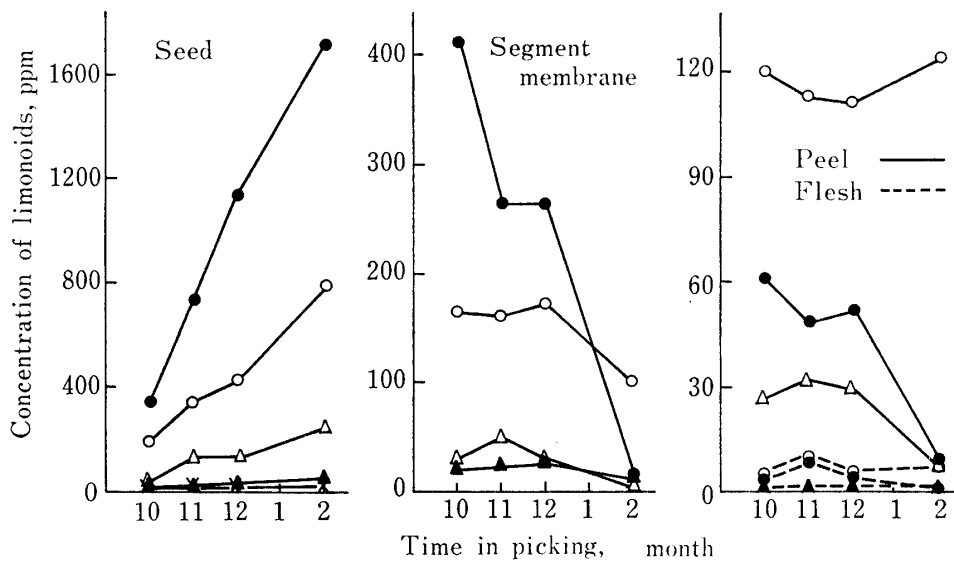


Fig. 6. Seasonal changes in limonoid composition of the component parts of Tankan

○—○ Limonin, ●—● Nomilin, △—△ Deoxylimonin,
 ▲—▲ Limonexic acid, ×—× Deacetylnomilin

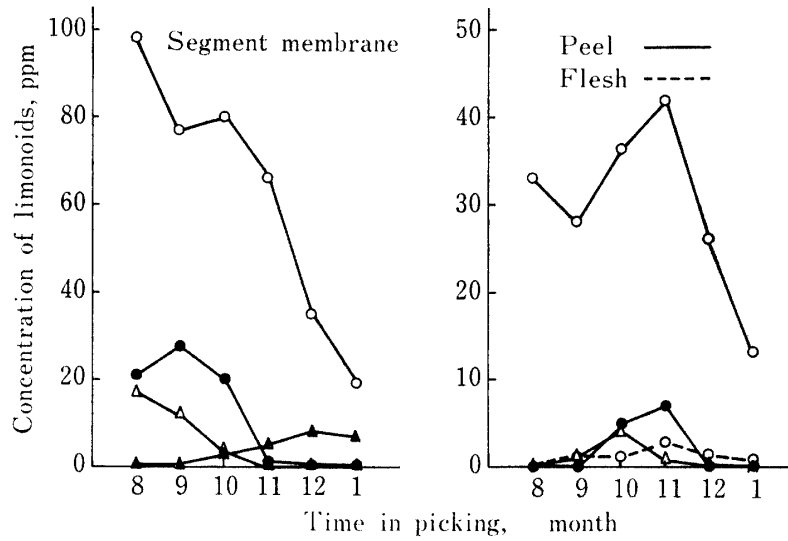


Fig. 7. Seasonal changes in limonoid composition of the component parts of Early satsuma mandarin

○—○ Limonin, ●—● Nomilin, △—△ Deoxylimonin, ▲—▲ Limonexic acid

にポンカンよりも低く、11月をピークに以後漸減した。

4. 早生ウンシュウのリモノイド

早生ウンシュウを果皮、じょうのう膜、果肉に分けて8月から1月まで測定した結果が第7図である。全体的にリモノイドの含量は少ないが、じょうのう膜ではリモンが大部分を占め、成熟につれ急激に少なくなった。微量のノミリンとデオキシリモンも同じ傾向を示したが、リモネキシ酸は反対に成熟につれて明

らかに増加した。果皮もリモンが主成分であり、11月が最大値を示した。極くわずかに含まれるノミリンとデオキシリモンは11月および10月にピークを示した。また果肉のリモンは0~2.8ppmであり、11月が最大であった。その他のリモノイド類はこん跡程度しか認められなかった。

第8図に示したように、早生ウンシュウのじょうのう膜のリモノイド含量は10月以降急に減少することが認められた。しかし果皮と果肉は11月にピークを示した。

5. ナツダイダイのリモノイド

アマナツとして知られている川野ナツダイダイを種子、果肉、じょうのう膜、アルベド、フラベドに分けて測定した。種子にはリモンとノミリンが特に多く含まれ、前者は12月まで、後者は11月まで同じような速度で増加し、それ以後あまり変化しなかった(第9図)。またデオキシリモン、リモネキシ酸、デアセチルノミリンは成熟するにつれてわずかに増加する傾向があった。じょうのう膜もリモンとノミリンが多かったが、ノミリンは8月から11月まで顕著に増加し、12月から1月にかけて急減した。デオキシリモンは測定期間中直線的に減少した。

第10図にフラベド、アルベド、果肉のリモノイド組成を示したが、いずれもリモンの含量が最も多く、つづいてノミリンであった。フラベドのリモンは12月まで急増したあとあまり変化しなかったが、ノミリンは10月にピークを示した。アルベドのノミ

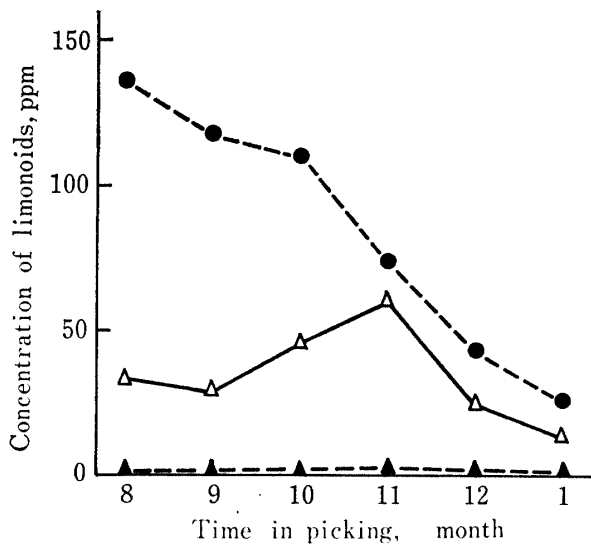


Fig. 8. Distribution of limonoids in the component parts of Early satsuma mandarin

●—● Segment membrane, △—△ Peel, ▲—▲ Flesh

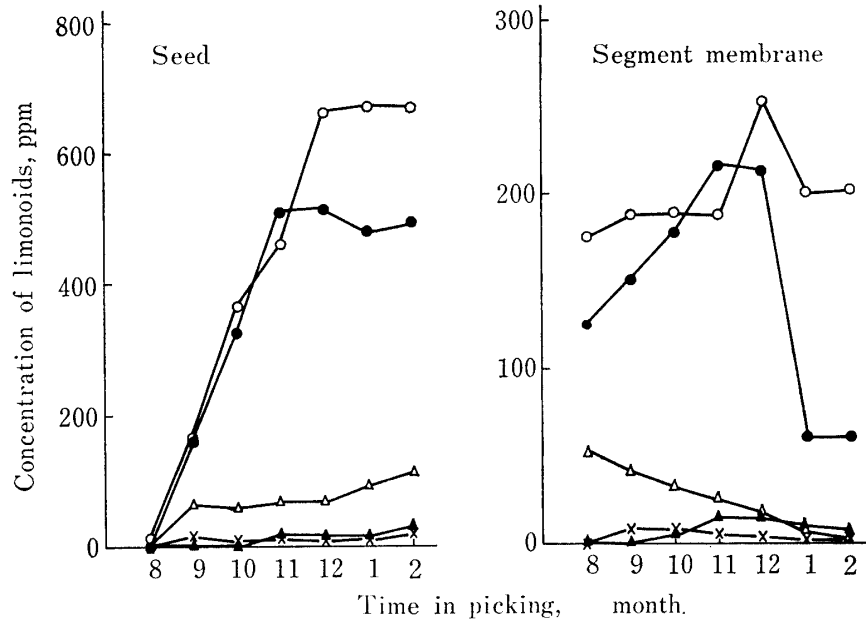


Fig. 9. Seasonal changes in limonoid composition of seed and segment membrane of Natsudaidai

○—○ Limonin, ●—● Nomilin, △—△ Deoxylimonin,
▲—▲ Limonexic acid, ×—× Deacetylnomilin

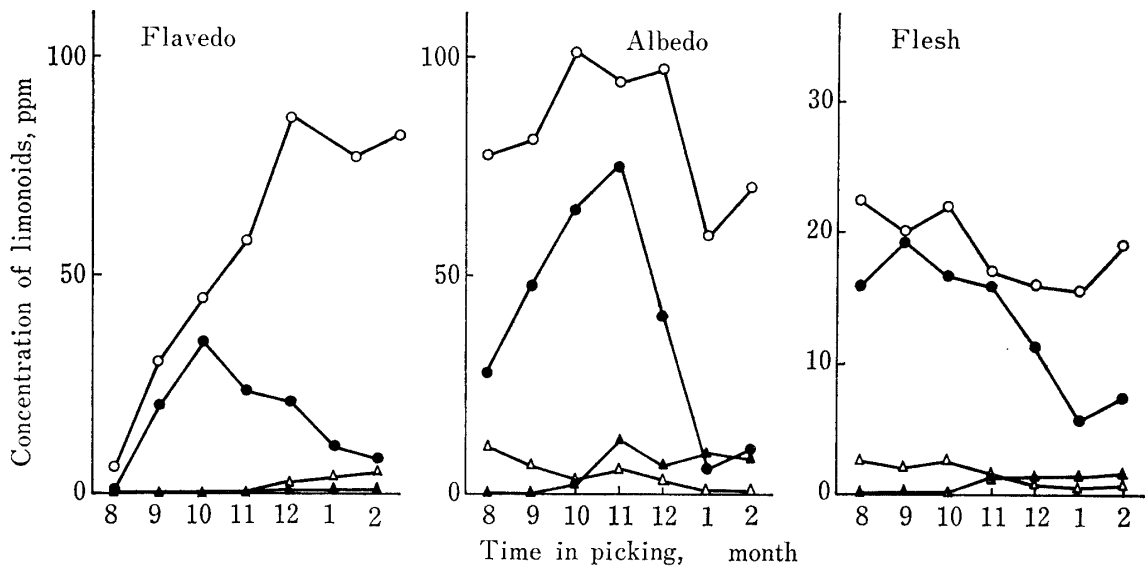


Fig. 10. Seasonal changes in limonoid composition of peel and flesh of Natsudaidai

○—○ Limonin, ●—● Nomilin, △—△ Deoxylimonin, ▲—▲ Limonexic acid

リンは11月が最も多く、それ以後1月まで急減した。デオキシリモニンは果実の成熟につれフラベドで徐々に増加したが、アルベドと果肉においては漸減した。

総リモニド含量を部位別にまとめたものが第11図である。種子のリモニド含量は8月には果肉よりも少なかったが、12月まで急速に増加し(1,280 ppm)、それ以後はゆるやかになった。他方じょうのう膜では12月まで徐々に増加し、1月になって急減

した。またアルベドは11月、フラベドは12月にピークを示すゆるやかな曲線になった。果肉は8~10月の41 ppmから1月の22 ppmに漸減することが認められた。

上記4種のカンキツのリモニド組成を第3表にまとめて比較した。いずれも収穫時のリモニド組成であって、成熟に伴って消失し、検出されなかったものがあった。

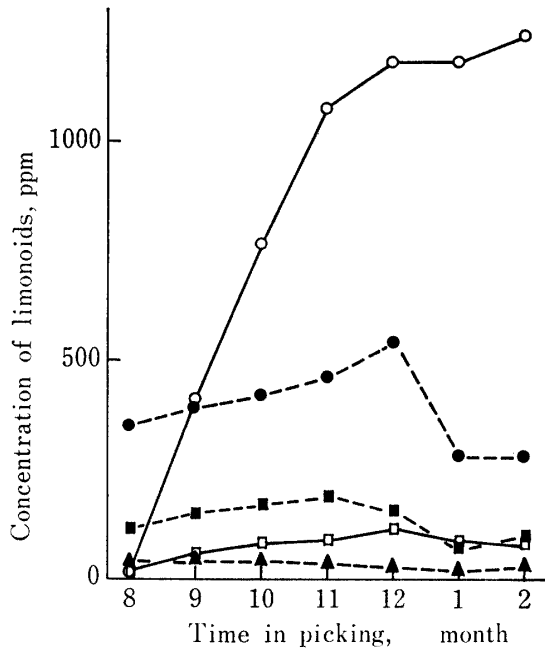


Fig. 11. Distribution of limonoid in the component parts of Natsudaidai

○—○ Seed, ●—● Segment membrane, □—□ Flavedo, ■—■ Albedo, ▲—▲ Flesh

6. リモニンとノミリンの苦味

カンキツ類の各部位において主成分として検出されたリモニンとノミリンの苦味を官能審査によって比較した。苦味を感じる場合を 100 として 10 人の平均値で表わしたものが第 4 表である。純水に溶かしたリモノイドを比較すると、リモニンの 1 ppm で 10 %、

5 ppm で 50 % の人が苦味を感じるが、ノミリンでは 0.5 ppm で 10 %、2 ppm で 45 % の値となり、強烈な苦味を有するといわれるノミリンの方がリモニンの約 2 倍の強さの苦味を示した。これらを 2 % のショ糖溶液に溶かすと苦味の程度は弱くなった。特にリモニンでは 1 ppm まで苦味を全く感じなかった。10 % ショ糖液にクエン酸を 0.5 または 1.0 % になるように調製したものはノミリンではショ糖液と大差がなかった。しかしリモニン溶液は希薄なものではショ糖液だけの場合よりも苦味を強く感じる結果が得られた。

考 察

リモノイド系苦味はミカン科及びセンダン科に広く分布し⁶⁾、多くのリモニン類似化合物が同定されているが^{1,14)}、定量法が困難であるため簡便で精度の良いものがリモノイドの研究に必要であった。したがって個々のリモノイドが測定できる薄層クロマトグラフィーを用い、しかも客観的に濃度が測定できる濃度計を使用した結果、回収率及び測定精度から本法によって定量可能であると考えられた。しかし各プレートのリモニン検量線は 30 μg 以上で曲線になる場合もあったので試料中のリモノイド含量は 5~30 μg が適当であろう。ノミリンの発色率はリモニンの 75 % であり、分別定量に関する報告¹⁹⁾ よりもわずかに低かった。対照として使用したナツダイダイのフラベドと果肉(及びタンカンのフラベド)に上記 6 種のリモノイドの他にさらに 1~2 個の小さいスポットが現われる

Table 3. Distribution of limonoid in the component parts of 4 citrus varieties

Variety	Parts	Limonexic acid	Deacetyl-nomilin	Deoxy-limonin	Limonin	Nomilin	Obacunone
Ponkan (Dec.)	Peel	±			≡	≡	
	S. M.	≡			≡	≡	
	Flesh	+			≡	+	
	Seed	≡			≡	≡	
Tankan (Feb.)	Peel	±	±	+	≡	+	±
	S. M.	≡		±	≡	≡	±
	Flesh	+			+	±	±
	Seed	≡	≡	≡	≡	≡	±
Early satsuma mandarin (Nov.)	Peel	±	±	±	≡	+	±
	S. M.	±	±	±	≡	+	±
	Flesh	±			+	±	±
Natsudaidai (Feb.)	Flavedo	±		+	≡	+	±
	Albedo	+		+	≡	≡	±
	S. M.	+	±	+	≡	≡	±
	Flesh	+	±	±	≡	+	±
	Seed	≡	≡	≡	≡	≡	±

S. M.: Segment membrane, ±: Trace~<1, +: 1~<10, ≡: 10~<100, ≡: 100~<1000, ≡: >1000 (ppm)

Table 4. Sensory test of the bitterness of limonin and nomilin

Sucrose (%)	Citric acid (%)	Bitterness (%)									
		Limonin (ppm)					Nomilin (ppm)				
		0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
0	0	0	10	30	50	80	10	25	45	65	85
2	0	0	0	5	15	65	5	15	40	50	70
10	0	0	0	5	10	60	5	15	25	25	60
10	0.5	5	25	30	40	45	10	15	25	25	65
10	1.0	5	35	45	50	55	10	20	30	30	60

こともあったが、リモノイド合計量には加えなかった。またフラベドには橙黄色のスポットが2~3個常に認められたが、リモノイド系以外の化合物と推定される。

リモニンの脱苦味法としてネーブルオレンジのアルベド^{3,13)}または微生物^{11,12)}中の酵素による分解あるいはエチレンによる代謝促進等¹⁸⁾が研究され、またノミリンにおいてもその分解酵素が認められている²³⁾。アルベド中の酵素は pH 5.6 で作用し、pH 3.2 で抑えられ、またリモニンがラクトンの形になるため³⁾、まず pH を 3 に調節してリモノイドを抽出した。

カンキツ類の加工品で最も多い果汁は、搾汁操作の差によって果肉以外の成分の混入割合が異なり、果汁品質が左右されるので、各部位別のリモノイド含量を測定した。ポンカンだけはリモニン、ノミリン、リモネキシ酸しか検出されず、その他のものは6種以上含まれていた。部位別のリモノイド合計量からみると果肉が最も少ないが、その中に含まれる種子が極端に多く、つぎにじょうのう膜の順であった。これらは果肉の20倍以上のリモノイドを含むことから、種子の多いポンカン、タンカンの搾汁には注意を要するであろう。

部位別リモノイド含量は果実の成熟に伴って著しく変化することが認められた。種子では成熟につれて顕著に増加し、ナツダイダイでは12月頃速度が低下した。ポンカン、タンカンでは12月または2月までしか測定しなかったが、種子の充実に伴ってナツダイダイと同じ曲線を描くものと推察される。他方じょうのう膜のリモノイド含量は完熟期または収穫適期直前に急に低下し、特にノミリンの減少が著しかった。また果肉のリモノイドは徐々に減少することが見いだされた。この傾向はグレープフルーツの測定結果²⁴⁾と類似していた。ナツダイダイの果肉のリモノイド含量は夏ミカン果汁の測定値²¹⁾よりかなり少ないが、これは系統間差または搾汁方法の差によるじょうのう膜からの溶出などが考えられる。

リモニン及びナリンギンの苦味はブリックスー酸²⁶⁾あるいは無味のフラボンであるネオジオスミン¹⁰⁾、甘味料であるショ糖やネオヘスペリジンジヒドロカルコン^{8,9)}などによって抑えられることが報告されている。またリモニンのいき値は純水中で約1 ppm⁷⁾、10%ショ糖溶液中で約2 ppm⁸⁾であることは本実験結果と一致しているようである。さらに第3表から明らかなようにノミリンのいき値は0.5 ppm以下と推定され、ノミリンはリモニンの約2倍の苦味を呈した。またポンカンとタンカンの種子とじょうのう膜はノミリンの含量がリモニンよりも多く、そのため強烈な苦味を呈するものと考えられる。他方早生ウンシュウの苦味については、果肉中のリモノイドが非常に少ないので、じょうのう膜に多く含まれるリモニンによって起こり、成熟につれて(10月以後)速やかに消失するものと推察される。

要 約

ポンカン、タンカン、早生ウンシュウ、ナツダイダイの苦味成分の1つであるリモノイド化合物を種子、果肉、じょうのう膜、果皮に分けて経時的に測定した。さらにナツダイダイ種子から単離したリモニンとノミリンの苦味を官能審査によって比較した。

1. 塩化メチレンで抽出したリモノイドを薄層クロマトグラフィーで分離し、エーリッヒ試薬で発色させたのち、リモニンを標準試料に用いて直接クロマトスキャナーによって測定した。本法は回収率91~109%、変動係数5~6%、ノミリンの発色率75%であり、比較的簡易迅速な定量法である。

2. ポンカンにはリモニン、ノミリン、リモネキシ酸の3種が含まれ、タンカン、早生ウンシュウ、ナツダイダイには上記3種の外にデオキシリモニン、デアセチルノミリン、オバクノンの6種が含まれていた。ポンカン、タンカンの種子とじょうのう膜にはノミリンが最も多く、つづいてリモニンであった。また種子のリモノイドはナツダイダイよりも多かった。

3. 果実の成熟に伴って種子ではすべてのリモノイドが顕著に増加したが、果肉では一定の割合で減少した。ポンカンの果肉中のリモノイドはタンカンより多かった。供試した4種のカンキツともじょうのう膜のノミリン含量が収穫適期直前に、リモニンよりも急激に低下することが見出された。また早生ウンシュウのじょうのう膜中にはリモニンが最も多く含まれ、成熟につれて速やかに減少した。

4. ノミリンは官能審査の結果、リモニンの約2倍の苦味を呈し、ポンカンとタンカンの種子と未熟じょうのう膜に多量に存在することから、これらの果実の苦味の主成分であると推定される。また早生ウンシュウの未熟時に多いじょうのう膜中のリモニンが時々苦味を呈するものと考えられる。

文 献

- 1) Bennett, R. D.: *Phytochemistry*, **10**, 3065-3068 (1971)
- 2) Chandler, B. V.: *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 473-476 (1971a)
- 3) ———: *ibid.*, **22**, 634-637 (1971b)
- 4) ——— and Kefford J. F.: *ibid.*, **17**, 193-197 (1966)
- 5) Dreyer, D. L.: *J. Org. Chem.*, **30**, 749-751 (1965)
- 6) ———, Pickering, M. V. and Cohan, P.: *Phytochemistry*, **11**, 705-713 (1972)
- 7) Guadagni D. G., Maier, V. P. and Turnbaugh, J. G.: *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1277-1288 (1973)
- 8) ———, ——— and ———: *ibid.*, **25**, 1199-1205 (1974a)
- 9) ———, ——— and ———: *ibid.*, **25**, 1349-1354 (1974b)
- 10) ———, ——— and ———: *J. Food Sci.*, **41**, 681-684 (1976)
- 11) Hasegawa, S., Maier, V. P. and Bennett, R. D.: *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 435-437 (1972)
- 12) ———, ———, ——— and King, A. D., Jr.: *ibid.*, **20**, 1031-1034 (1972)
- 13) ———, ——— and ———: *Phytochemistry*, **13**, 103-105 (1974)
- 14) Hulme, A. C. ed.: *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, **1**, 298, 339-343, **2**, 130-134, Acad. Press, N. Y. (1970)
- 15) Kefford, J. F. and Chandler, B. V.: *The Chemical Constituents of Citrus Fruits*, 150-164, Acad. Press, N. Y. (1970)
- 16) Kruger, A. J. and Colter, C. E.: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **85**, 206-210 (1972)
- 17) Maier, V. P. and Grant, E. R.: *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 250-252 (1970)
- 18) ———, Brewster, L. C. and Hsu, A. C.: *ibid.*, **21**, 490-495 (1973)
- 19) 三沢 豊・松原 良・土井信明: 食品工誌, **18**, 326-332 (1971)
- 20) 中林敏郎・木村 進・加藤博道: 食品の褐変とその化学, 21, 光琳書院, 東京 (1972)
- 21) 野村男次・三東崇昇: 食品工誌, **12**, 100-101 (1965a)
- 22) ———・—————: 山口大農学術報告, **16**, 635-640 (1965b)
- 23) 桜井芳人・杉山直儀・薮 花雄・松井 修・緒方邦安: 果実・蔬菜の加工・貯蔵ハンドブック, 410, 養賢堂, 東京 (1970)
- 24) Scott, W. C.: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **83**, 270-277 (1970)
- 25) Tatum, J. H. and Berry, R. E.: *J. Food Sci.*, **38**, 1244-1246 (1973)
- 26) ———, Lastinger, J. C., Jr. and Berry, R. E.: *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **85**, 210-213 (1972)
- 27) Wilson, K. W. and Crutchfield, C. A.: *J. Agric. Food Chem.*, **16**, 118-124 (1968)

Summary

The purpose of this study was to investigate the seasonal changes in limonoid composition (a principal bitterness in citrus fruits) of the component parts such as seed, flesh, segment membrane and peel of the following: Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), Tankan (*Citrus tankan* Hayata), Early satsuma mandarin: Wase (*Citrus unshiu* Marc.) and Natsudaikai (*Citrus natsudaikai* Hayata) during the various stages of growth and ripening. The bitterness of nomilin isolated from seeds of Natsudaikai was compared with that of limonin by a sensory test.

1. The limonoids extracted with methylene chloride were separated by a thin layer chromatography, and an individual compound visualized with Ehrlich's reagent was directly evaluated with a chromatoscanner, using limonin as a standard sample. This analysis which is of relatively simple and rapid method, showed 91-109 % of recovery and 5-6 % of coefficient of variation, nomilin showing 75 % of visualization to limonin.

2. Ponkan contained only three kinds of limonoid; limonin, nomilin and limonexic acid. On the other hand, Tankan, Early satsuma mandarin (Wase) and Natsudaikai contained six kinds of limonoid: deoxylimonin, deacetylnomilin and obacunone in addition to the above mentioned limonoids. In seeds and segment membranes of Ponkan and Tankan, the content of nomilin was most abundant and limonin was in the next in order of quantity. The amounts of limonoid in seeds of Ponkan and Tankan were bigger than that of Natsudaikai.

3. As the fruits matured, all limonoid constituents in seeds increased quite rapidly in quantity, but the content of limonoids in flesh decreased in a fixed rate. The flesh of Ponkan contained more limonoid than that of Tankan. The nomilin content in the segment membrane of all the fruits tested was found to be decreasing remarkably just before optimum harvest maturity. The segment membrane of Early satsuma mandarin (Wase) fruits contained limonoid in a greater quantity than in the others, which decreased markedly during fruit maturation.

4. As the results of sensory test, the bitterness of nomilin was proved to be approximately two times as much as that of limonin. Since it was contained abundantly in seed and in immature segment membrane of Ponkan and Tankan, it was presumed to be a major constituent of the bitterness of these citrus fruits. Early satsuma mandarin (Wase) appeared to show the bitterness sometimes, and it was assumed to be attributable to limonin in segment membrane observable at the immature time.