ノ ー ト

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 65, No. 9, pp. 1347~1349, 1991]

カラタチ種子のリモノイド

三宅正起, 綾野 茂, 尾崎嘉彦
前田久夫, 伊福 靖, Zareb HERMAN*

Chi H. FONG*, 長谷川信*

((株)和歌山アグリバイオ研究センター,

*米国農務省青果化学研究所)

平成 3 年 2 月 20 日 受 理

Limonoids in Seeds of Karatachi

(*Poncirus trifoliata*)

Masaki MIYAKE, Shigeru AYANO,

Yoshihiko OZAKI, Hisao MAEDA, Yasushi IFUKU,
Zareb HERMAN*, Chi H. FONG* and Shin HASEGAWA*

Wakayama Agricultural Biological Research
Institute, 396-1, Tsukatsuki, Momoyama-cho,
Naga-gun, Wakayama 649-61, Japan

*USDA, ARS, Fruit and Vegetable Chemistry
Laboratory, 263, S. Chester Ave., Pasadena,
California 91106, U. S. A.

Neutral and acidic limonoids in seeds of Karatachi (*Poncirus trifoliata*) were quantitatively analyzed. The seeds contained ichangin (20 ppm), deacetylnomilin (230 ppm) and limonin (390 ppm). They also contained acidic limonoids, such as deacetylnomilinic acid (2 ppm), isolimoninic acid (2 ppm) and isoobacunoic acid (a trace amount). The concentration of total limonoids was quite low as compared to that of citrus seeds.

(Received February 20, 1991)

リモノイドはミカン科とセンダン科に存在する化学的に類似したトリテルペン誘導体のグループである。現在まで 39 種類のリモノイドがカンキツおよびそのハイブリッドから単離されている。最近, ある種のリモノイドにはマウスの肝臓, 小腸粘膜中で解毒酵素 glutathione S-transferase を誘発することによって腫瘍形成を抑制する効果や^(1,2), ハムスターの口内腫瘍形成の抑制効果が見出され⁽³⁾, さらに昆虫に対する摂食阻害作用につい

ても報告されている⁽⁴⁻⁷⁾。このような背景の下, 著者らはリモノイドを高濃度で含有するカンキツ種子からの回収を検討する過程で種子中のリモノイドはモノラクトン, ダイラクトンの両型で存在することを明らかにし, 効率的な回収方法を示唆した⁽⁸⁾。

著者らは最近カンキツ類以外のミカン科植物のリモノイドについても研究を始め, 本実験ではこれまで報告例のないカラタチ (*Poncirus trifoliata*) 種子中のリモノイドを分析したので報告する。

実験方法

1. 供試試料 1990 年 12 月カリフォルニア大学リバーサイド校付属農場にて栽培されているカラタチの木から成熟後期の果実をサンプリングした。Table I に果実特性を示す。

果実から種子を採取し 60°C で 48 時間乾燥させた後, Ret-sch-mill (Brinkmann, Westbury, NY, USA) で摩砕, 粉末化処理を行い供試試料とした。

2. 抽出 試料 2000 g をソックスレー抽出器を用いて *n*-hexane で一夜 (20 時間) 脱脂処理し, つづいてアセトンを一晩還流させてリモノイドの抽出を行った。

この抽出液を脱水, 減圧濃縮した後アセトニトリル 150 ml で定容とし, 粗リモノイド抽出液を得た。

(1) 中性リモノイド: 粗リモノイド抽出液を中性リモノイド抽出液とし, TLC および HPLC 分析に供した。

(2) 酸性リモノイド: 酸性リモノイドの抽出は Hasegawa らの方法⁽⁹⁾に従った。粗リモノイドの抽出液 4 ml に 10% KHCO_3 水溶液を 30 ml 加え抽出操作を 3 回行い, 酸性画分を KHCO_3 層に移した。次に D 環を閉環させるために KHCO_3 水溶液に濃塩酸を加え pH 2 に調整し, 塩化メチレンで 3 回抽出した。抽出液は, 減圧濃縮し 2 ml 定容とした。これを酸性リモノイド抽出液とし, この 1 ml をジアゾメタンでメチル化して最終アセトニトリル 1 ml とし TLC および HPLC 分析に供した。また残りの酸性リモノイド抽出液 1 ml はメチル化の確認に用いた。

3. TLC 分析 3 種の溶媒系を用いて TLC 分析を行った。プレートはシリカゲル HLF 型 (Analtech, Newark, DE, USA) を用い, 溶媒で展開後エーリッヒ試薬を噴霧し塩酸ガス中で発色させた。リモノイドの同定は標準物質と *R_f* 値を比較することによって行い,

Table I. Characteristics of Karatachi Fruit*

Weight (g)	Size (mm)		Seed number	Seed weight (g)	Seed/Fruit (wt%)
	Vertical	Horizontal			
21.0	33.0	33.7	29	5.0	23.8

* Average value of 50 fruits.

Table II. Concentration of Limonoids in Karatachi Seeds

Limonoids	Concentration* (ppm)	R _f values of limonoids on TLC			Retention time of limonoids on HPLC (min)
		(A)	(B)	(C)	
Ichangin	20	0.14	0.23	0.27	12.9 ^{a)}
Deacetylnomilin	230	0.12	0.33	0.38	19.1 ^{a)}
Limonin	390	0.34	0.53	0.56	14.8 ^{a)}
Deacetylnomilinic acid	2	0.32	0.39	0.40	23.9 ^{b)}
Isolimononic acid	2	0.48	0.56	0.66	26.2 ^{b)}
Isoobacunoic acid	trace	0.63	0.82	0.85	45.6 ^{b)}
Total	644				

* Average values from TLC and HPLC analysis on a dry weight basis.

(A) EtOAc-cyclohexane (3:2).

(B) CH₂Cl₂-MeOH (97:3).(C) EtOAc-CH₂Cl₂ (2:3).^{a)} Condition for neutral limonoids analysis.^{b)} Condition for acidic limonoids analysis.

また標準物質と発色強度を比較して定量した。用いた溶媒系は次のとおりである。(A) EtOAc-cyclohexane (3:2), (B) CH₂Cl₂-MeOH (97:3), (C) EtOAc-CH₂Cl₂ (2:3)。

4. HPLC 分析 装置は高速液体クロマトグラフ SP 8750 型 (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA), カラムは C-18 逆相 (8.0×250 mm, Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) を用いた。中性リモノイドの測定には移動相として水-アセトニトリル-メタノール (49:10:41) を用い、流速 0.8 ml/min で溶離した。保持時間はアイチャンゲン 12.9 分、リモニン 14.8 分、デアセチルノミリン 19.1 分であった。酸性リモノイドの測定は水-アセトニトリル-メタノール (60:30:10) で出発し 50 分後に (45:45:10) となる直線濃度勾配をかけ、流速 0.8 ml/min で溶離した。保持時間は Me-deacetylnomilinate 23.9 分, [Me-isolimononate 26.2 分, Me-isobacunoate 45.6 分であった。検出波長はいずれも 210 nm で測定した。

5. 標準物質 リモノイドの標準物質は米国農務省青果化学研究所で単離され、NMR で構造決定されたものである。

実験結果および考察

本研究に用いたカラタチ果実は Table I に示すように種子数が果実 1 個当たり 29 個と多く、果実重量の 23.8% を占める。それゆえリモノイドの回収源として期待がもたれることから、本実験ではリモノイドアグリコン濃度を測定した。

種子中の中性、酸性リモノイドの構造および定量結果を Fig. 1, Table II に示す。中性リモノイドとしてアイチャンゲン (20 ppm), デアセチルノミリン (230 ppm) およびリモニン (390 ppm), また酸性リモノイドとしてデアセチルノミリン酸 (2 ppm), イソリモニン酸 (2 ppm) およびイソオバクノン酸 (trace) が検出された。これらのリモノイドは既にカンキツより単離されており、新しいリモノイドは発見できなかった。カラタチ種子中の総リモノイド濃度は 644 ppm で、この値は供試試料の採取時期、また種子からの抽出方法を考慮してもかなり低いレベルといえる。これまで報告されている同じミカン科植物のゴシュユ (*Tetradium rutaecarpa*)⁽¹⁰⁾, また各種カンキツ類種子 (福岡オレンジ, 日向夏, 三宝柑, 鳥ミカン, グレープフルーツ, レモン, バレンシア, タンジェリン) 中の総リモノイド濃度の平均値⁽¹¹⁾と

Fig. 1. Structures of Limonoids Isolated from Karatachi Seed.

比べるとおよそ 20 分の 1 の値である。それゆえカラタチ種子はリモノイドの工業的回収原料としては不向きであると思われる。

主要なリモノイドはリモンin、デアセチルノミリンでそれぞれ総リモノイドの 61%、36% を占めた。酸性リモノイドとしてはイソリモンin酸とデアセチルノミリン酸が主なものであったが、濃度はきわめて低く、酸性リモノイドの比率は総リモノイドの約 0.6% であった。一般に酸性リモノイドはリモノイド生成における中間化合物であり、濃度は中性リモノイドに比べ低いことが報告されているが⁽¹²⁾、その中で Hasegawa らが TLC によって算出した各種カンキツ種子の総リモノイドに対する酸性リモノイドの比率は 12~45% の範囲である。HPLC による酸性リモノイドの定量値としてはこれまでスタチ種子⁽¹³⁾ (総濃度 280 ppm/fresh wt) とユズ種

子⁽¹⁴⁾ (総濃度 267 ppm/fresh wt) について報告されている。

また、最近リモノイドは 17 位の炭素に 1 分子のグルコースが β -グリコシド結合したリモノイドグルコサイドとして存在していることが明らかになっている⁽¹⁵⁾。現在、カラタチ種子中のリモノイドグルコサイドについて検討中である。

- (1) L. K. T. Lam and S. Hasegawa : *Nutrition and Cancer*, **12**, 43 (1989).
- (2) L. K. T. Lam, Y. Li and S. Hasegawa : *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 878 (1989).
- (3) E. G. Miller, R. Flanous, F. Rivera-Hidalgo, W. H. Binnie, S. Hasegawa and L. K. T. Lam : *Carcinogenesis*, **10**, 1535 (1989).
- (4) J. A. Klocke and I. Kubo : *Entomol. Exp. Appl.*, **32**, 299 (1982).
- (5) A. R. Alford and M. D. Bentley : *J. Econ. Entomol.*, **79**, 35 (1986).
- (6) A. R. Alford, J. A. Cullen, R. H. Stoch and M. D. Bentley : *J. Econ. Entomol.*, **80**, 575 (1987).
- (7) M. D. Bentley, M. S. Rajab, M. J. Mendel and A. R. Alford : *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1400 (1990).
- (8) 三宅正起, 綾野 茂, 尾崎嘉彦, 前田久夫, 伊福 靖, 長谷川信 : 農化, **65**, 987 (1991)
- (9) S. Hasegawa, R. D. Bennett and V. P. Maier : *Phytochemistry*, **23**, 1601 (1984).
- (10) Y. Ozaki, M. Miyake, H. Maeda, Y. Ifuku, R. D. Bennett and S. Hasegawa : *Phytochemistry*, **30**, 2365 (1991)
- (11) Y. Ozaki, C. H. Fong, Z. Herman, H. Maeda, M. Miyake, Y. Ifuku and S. Hasegawa : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 137 (1991).
- (12) S. Hasegawa, R. D. Bennett and C. P. Verdon : *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 922 (1980).
- (13) 橋永文男, 長谷川信 : 園学雑, **58**, 55 (1989).
- (14) 橋永文男, Z. Herman, 長谷川信 : 日食工誌, **37**, 380 (1990).
- (15) S. Hasegawa, R. D. Bennett, Z. Herman, C. H. Fong and P. Ou : *Phytochemistry*, **28**, 1717 (1989).