小笠原・島レモンに含まれるフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリン類の特徴

三宅義明^{1*}, 井藤千裕², 糸魚川政孝¹

¹ 東海学園大学スポーツ健康科学部

² 名城大学薬学部

Flavonoid, Phenylpropanoid and Coumarins Characteristics in Lemons from the Bonin Islands (Kikuchi Lemons)

Yoshiaki Miyake^{1*}, Chihiro Ito² and Masataka Itoigawa¹

¹ School of Sport and Health Science, Tokai Gakuen University, 21-233 Nishinohara, Ukigai, Miyoshi, Aichi 470-0207

² Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku, Nagoya, Aichi 468-8502

The characteristics of flavonoid, phenylpropanoid, and coumarins in Bonin Island lemons (Kikuchi lemons), ranging in maturing from low to high, were examined and subsequently compared to those of Meyer lemons, Eureka lemons, and Satsuma mandarins. A distinctive compound, 7-methoxy-5-prenyloxycoumarin, was isolated from the Kikuchi lemons. Hesperidin was the main flavonoid found in Kikuchi lemons. Meyerin was detected in Kikuchi, Meyer, and Eureka lemons. The flavedo of Kikuchi lemons had a higher content of both 5, 7-dimethoxycoumarin and 7-methoxy-5-prenyloxycoumarin than the flavedo of Eureka lemons. The flavonoid, phenylpropanoid, and coumarins characteristics in Kikuchi lemons were similar to those of Meyer lemons.

(Received Aug. 20, 2012; Accepted Sep. 14, 2012)

Keywords : Bonin Island lemons, Kikuchi lemons, flavonoid, phenylpropanoid, coumarins

キーワード : 小笠原・島レモン, 菊池レモン, フラボノイド, フェニルプロパノイド, クマリン類

カンキツ果実には生理活性を有するフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリン類などの機能性成分が含まれている^{1)~3)}。小笠原諸島で生産栽培されている“小笠原・島レモン”は別名“菊池レモン”ともいわれ、この地域では主に緑色果実の低熟度果実が飲料、調味料、食品に幅広く利用されており、わが国で一般に広く食べられているユーレカレモン (*Citrus limon*) と比べると、穏和な酸味と香りが特徴である⁴⁾。小笠原・島レモンの植物遺伝資源探索調査では、マイヤーレモン (*Citrus meyeri*) が最も近い種であり、別種とする根拠となる形質の違いが見いだせないが、マイ

ヤーレモンより種子数が少なく、果皮、果肉の色が淡く、香りもやや異なる果実もあり、栽培環境や熟度によるものか検討を要すると報告がある⁵⁾。マイヤーレモンはレモン類とマンダリン類の自然交配種とされており⁶⁾、著者らはマイヤーレモンのフラボノイド、クマリン類の特徴を調べ、比較的高含有なクマリン類の5,7-ジメトキシクマリンを単離し⁷⁾、最近、フェニルプロパノイドの新規抗酸化物質メイエリンを単離し報告した⁸⁾。一方、これまでに小笠原・島レモンの機能性成分に関する研究報告は無く、そこで、本研究では小笠原・島レモンのフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリン類の特徴を追究した。各カンキツは低熟度果実と高熟度果実について成分含量を調べ、小笠原・島レモンのこれら機能性成分の特徴を追究した。

1. 実験方法

小笠原・島レモン (低熟度緑色果実 126.7±15.9 g, *n*=9; 高熟度黄色果実 251.3±54.2 g, *n*=10) は東京都小笠原亜熱帯農業センターから分譲、マイヤーレモン (低熟度緑色果実 107.7±22.6 g, *n*=10; 高熟度黄色果実 170.9±29.4 g, *n*=6) は三重県南牟婁郡紀宝町農事組合法人紀宝マイヤーレモン生産組合から分譲、ユーレカレモン (低熟度緑色果実 108.1±9.8 g, *n*=8; 高熟度黄色果実 85.8±5.5 g, *n*=10) は愛媛県産宇和島市吉田町産を購入、温州みかん (低熟度緑色果実 43.8±8.8 g, *n*=10; 高熟度オレンジ色果実 123.3±10.9 g, *n*=10) は和歌山県紀の川市産果実を購入して入手した。各果実の構造部位はフラベド、アルベド、じょうのう膜、砂じょうをナイフで分離し、凍結乾燥後に粉碎した。フラボノイド、クマリン類の標準物質はフナコシ(株) (東京) より購入し、他試薬は和光純薬工業(株) (大阪) より購入した。6,8-*C*-ジグルコシルジオスメチン、メイエリンは既報告⁷⁾⁸⁾に従って単離し、標準物質とした。各標準物質はジメチルスホキシドに溶解して標準試料とした。

凍結乾燥した小笠原・島レモン果皮 (377 g) を 2.5 L ヘキサンで 3 日間室温抽出し、シリカゲル (ワコーゲル C-300, 300 g, (株)和光純薬工業), HPLC (900 シリーズ, 日本分光(株), 東京) を用いて物質 I (13.2 mg) を単離した。分取 HPLC の条件は逆相カラム (YMC-Pack ODS-A, Φ 20 × 250 mm, S-5 μm, YMC(株), 京都), カラム温度室温, 検出波長 280 nm, 移動相 60 % メタノール, 流速 8 ml/min とした。単離成分の¹H (500 MHz)-NMR スペクトルと¹³C (125 MHz)-NMR スペクトルは ECP-500 (日本電子(株), 東京) を MS スペクトルは JMS-700 (日本電子(株)) を用いて測定した。単離した物質 I は HPLC 分析 (下記定量分析条件) で 99 % 以上の純度であることを確認した。

フラボノイドのヘスペリジン, ナリルチン, エリオシトリン, 6,8-*C*-ジグルコシルジオスメチン, ジオスミンは既報告⁷⁾に従い HPLC にて定量した。乾燥粉末の果実構造部位試料 0.1 g にメタノール-ジメチルスホキシド溶液 (1 : 1, v/v) を 5 mL 添加し, 60 分間超音波処理にて抽出した。

¹ 〒470-0207 愛知県みよし市福谷町西ノ洞 21-233

² 〒468-8502 愛知県名古屋市中天白区八事山 150

* 連絡先 (Corresponding author), miyakeyo@tokaigakuen-u.ac.jp

図 1 小笠原・島レモン-フラベド抽出物の HPLC プロファイルと物質 I の化学構造式

HPLC 条件

移動相：メタノール 75%，検出波長：305 nm，逆相カラム：YMC-pack ODS-A，
Φ 4.6×150 mm，S-5 μm，カラム温度：40℃，流速：1 ml/min.

この抽出液を遠心分離（20627×*g*，5 分間）して得た上清を分析試料とした。HPLC 分析条件は，逆相カラム（YMC-pack ODS-A，Φ 4.6×150 mm，S-5 μm），カラム温度 40℃，検出波長 280 nm，流速 1 ml/min，移動相メタノール-5% 酢酸水溶液（30/70，v/v）とした。フェニルプロパノイドのメイエリンは，上記フラボノイド定量と同条件で定量した。クマリン類の 5,7-ジメトキシクマリン，5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリン，5-ゲラニロキシプソラレンは既報⁷⁾に従って HPLC にて定量した。果実構造部位の粉末 0.1 g にヘキサン 5 mL を加えて 1 日間室温抽出し，上記同条件の遠心分離により上清を得て分析試料とした。HPLC 条件は移動相と検出波長以外はフラボノイド定量分析と同条件とした。5,7-ジメトキシクマリンは移動相 60% メタノール，検出波長 326 nm，5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリンと 5-ゲラニロキシプソラレンは移動相 85% メタノール，検出波長 305 nm とした。物質 I（7-メトキシ-5-プレニロキシクマリン）の定量は移動相 75% メタノール，検出波長 305 nm とした。定量値は，果実構造部位の乾燥試料 1 g 当たりの重量（mg）を求め，平均値と標準偏差値で示した（*n*=3）。

2. 実験結果および考察

カンキツ果実フラベドのクマリン類定量（HPLC 分析）において，小笠原・島レモンに特徴的ピーク（保持時間 6.7 分）の他試料より大きいピーク，図 1 に示す）が認められたため，これを分取して物質 I を単離した。物質 I の¹H-，¹³C-NMR，HMBC スペクトル（表 1）および NOE 差スペクトルにおいて，δ 3.85（7-OMe）のシングレットシグナ

表 1 7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンの¹H，¹³C NMR，HMBC スペクトルデータ（CDCl₃）

	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	HMBC
2		161.7	H-3, H-4
3	6.15 (d, <i>J</i> =9.6 Hz)	110.8	
4	8.00 (d, <i>J</i> =9.6 Hz)	139.1	
4a		104.3	H-3, H-6, H-8
5		156.3	H-6, H-1'
6	6.28 (d, <i>J</i> =2.3 Hz)	95.8	H-8
7		163.6	H-6, H-8, 7-OCH ₃
7-OCH ₃	3.85 (3H, s)	55.8	
8	6.41 (d, <i>J</i> =2.3 Hz)	92.7	H-6
8a		156.8	H-4, H-8
1'	4.57 (2H, d, <i>J</i> =6.4 Hz)	65.7	
2'	5.48 (m)	118.7	H-1', H-4', H-5'
3'		139.0	H-1', H-4', H-5'
4'	1.82 (3H, d, <i>J</i> =0.5 Hz)	22.8	H-5'
5'	1.76 (3H, s)	18.3	H-4'

ルを照射すると，δ 6.41（H-8），6.28（H-6）のシグナルにそれぞれ 2%，17% の NOE が，δ 4.57（H-1'）のダブルットシグナルを照射すると，6.28（H-6）のシグナルに 18% の NOE が観測された。さらに MS スペクトルからは EI-MS：*m/z* 260（M⁺）の結果が得られ，物質 I は 7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンと同定された。同物質はシチリア産レモン精油から検出され⁹⁾，また，アセチルコリンエステラーゼ阻害作用が報告¹⁰⁾がされている機能性成分である。本研究では小笠原・島レモンから初めて単離された。

低熱度と高熱度のカンキツ果実（小笠原・島レモン，マ

イヤーレモン, ユーレカレモン, 温州みかん) の構造部位 (フラベド, アルベド, じょうのう膜, 砂じょう) に含まれるフラボノイド5成分 (ヘスペリジン, ナリルチン, エリオシトリン, 6,8-*C*-ジグルコシルジオスメチン, ジオスミン), フェニルプロパノイド1成分 (メイエリン), クマリン類4成分 (5,7-ジメトキシクマリン, 5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリン, 5-ゲラニロキシプソラレン, 7-メトキシ-5-プレニロキシクマリン) を定量した (表2). カンキツ果実のフラボノイドは抗酸化作用などの生理活性があ

り, 各種果実の構造部位の組成分布は既報がある¹⁾. 本研究では, 実験材料に小笠原・島レモン, マイヤーレモンを加えた点, 低熟度, 高熟度カンキツ果実を比較した点, 6,8-*C*-ジグルコシルジオスメチンを定量した点から新たに調べた. 小笠原・島レモンのフラボノイドは, ヘスペリジンが主成分で, 6,8-*C*-ジグルコシルジオスメチン, ジオスミンは少量であった. 抗酸化作用, 血中脂質低下作用があるヘスペリジン⁷⁾ は各果実の全部位に広く存在し, 高熟度果実と比べて低熟度果実の方が高含有で, 特に低熟度果実

表2 各種カンキツ果実

果実	熟度	果実部位	フラボノイド				
			ヘスペリジン	ナリルチン	エリオシトリン	6,8- <i>C</i> -ジグルコシル ジオスメチン	ジオスミン
			RT=9.2 ²⁾	RT=6.8	RT=4.6	RT=3.4	RT13.3
小笠原・島レモン	低	フラベド	13.8±0.04	tr ³⁾	tr	1.5±0.04	1.9±0.05
		アルベド	33.4±0.4	tr	tr	tr	1.1±0.1
		じょうのう膜	16.2±0.2	tr	tr	tr	tr
		砂じょう	9.2±0.1	tr	tr	tr	tr
	高	フラベド	1.2±0.1	tr	tr	0.9±0.1	tr
		アルベド	28.3±0.02	tr	tr	tr	tr
		じょうのう膜	14.7±0.1	tr	tr	tr	tr
		砂じょう	3.6±0.01	tr	tr	tr	tr
マイヤーレモン	低	フラベド	12.8±0.2	tr	tr	1.8±0.5	1.5±0.20
		アルベド	45.4±0.4	tr	tr	tr	1.2±0.08
		じょうのう膜	20.6±0.1	tr	tr	tr	tr
		砂じょう	6.8±0.03	tr	tr	tr	tr
	高	フラベド	2.2±0.01	tr	tr	1.4±0.02	tr
		アルベド	22.3±0.1	tr	tr	tr	tr
		じょうのう膜	11.2±0.1	tr	tr	tr	a
		砂じょう	4.7±0.01	nd	tr	tr	tr
ユーレカレモン	低	フラベド	1.6±0.1	0.3±0.01	4.3±0.05	1.6±0.01	1.7±0.1
		アルベド	30.8±0.2	0.4±0.03	11.2±0.27	1.2±0.17	1.6±0.1
		じょうのう膜	7.1±0.1	0.2±0.004	17.5±0.11	tr	1.0±0.01
		砂じょう	3.4±0.02	tr	2.2±0.02	tr	1.1±0.01
	高	フラベド	0.4±0.02	0.3±0.01	2.0±0.03	1.7±0.005	1.9±0.1
		アルベド	29.7±0.2	0.6±0.03	17.5±0.34	1.8±0.10	2.2±0.03
		じょうのう膜	8.2±0.1	0.3±0.0003	22.1±0.17	tr	1.2±0.02
		砂じょう	2.2±0.01	nd	3.3±0.01	tr	1.1±0.01
温州みかん	低	フラベド	61.8±0.7	3.0±0.10	tr	nd	1.6±0.1
		アルベド	55.2±0.2	19.2±0.22	tr	nd	nd
		じょうのう膜	21.2±0.1	7.9±0.04	tr	nd	tr
		砂じょう	8.7±0.02	0.9±0.01	tr	nd	tr
	高	フラベド	14.2±0.1	1.0±0.04	tr	nd	1.0±0.05
		アルベド	41.8±0.2	11.4±0.04	tr	nd	nd
		じょうのう膜	15.3±0.1	7.8±0.05	tr	nd	nd
		砂じょう	2.0±0.02	0.3±0.01	tr	nd	tr

¹⁾ 数値は成分 (mg)/乾燥試料 (g) で表した.

²⁾ HPLC 分析の保持時間 (分).

³⁾ 微量 (フラボノイド, フェニルプロパノイドは 0.1mg/g 以下, クマリン類は 0.01mg/g 以下).

⁴⁾ 検出されず.

のアルペドに多く含まれており、フラペドでは熟度が進むと顕著に減少していた。血圧降下作用や抗酸化作用がある6,8-C-ジグルコシルジオスメチン⁷⁾は小笠原・島レモンのフラペドに、ジオスミンは未熟果実のフラペド、アルペドに含まれていた。また、ユーレカレモンに多く含まれるエリオシトリン、温州みかんに多く含まれるナリルチンは小笠原・島レモンにはほとんど含まれていなかった。これら小笠原島レモンのフラボノイドの特徴は、マイヤーレモンに類似していた。

マイヤーレモンからフェニルプロパノイドの新規抗酸化物質メイエリンが単離されているが⁸⁾、これまでに他カンキツ分布の報告は無い。そこで、実験材料のカンキツについてメイエリンを定量した(表2)。メイエリンは温州みかんに含まれないが、ユーレカレモン、小笠原・島レモンのフラベド、アルベドに含まれ、特にアルベドが高含有であった。また、マイヤーレモンと小笠原・島レモンはユーレカレモンと比べて高含有であった。

カンキツ果実に含まれるクマリン類は、発がん抑制作用

構造部位の成分含量¹⁾[illegible]

などの生理作用が報告されている³⁾。マイヤーレモンから5,7-ジメトキシクマリンが単離され、ユーレカレモンから5-ゲラニロキシプソラレンと5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリンが単離されている⁷⁾。これらクマリン類に上述の小笠原・島レモンから単離された7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンを加えた4成分について、カンキツ果実構造部位の含有量を測定した(表2)。小笠原・島レモンのフラベドには、7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンと白血病細胞 HL-60 の分化誘導活性がある5,7-ジメトキシクマリン⁷⁾がマイヤーレモンと同様に含まれおり、ユーレカレモンに比べて高含有であり、これらは未熟果実フラベドに多く存在していた。7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンはレモン精油から単離されているが⁹⁾、マイヤーレモン、小笠原・島レモンのフラベドにも含まれ、ユーレカレモンには微量であった。また、ユーレカレモンに多く含まれる5-ゲラニロキシ-7-メトキシクマリンと5-ゲラニロキシプソラレンは含まれていなかった。これらクマリン類は果実構造部位のフラベドに検出され、高熟度より低熟度果実の方が高含有であった。

これまでに小笠原・島レモンに含まれる機能性成分のフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリン類に関する報告は無く、本研究では初めて小笠原・島レモンに含まれるこれら成分の特徴を明らかにした。小笠原・島レモンのこれら機能性成分の組成分布は、全般的にマイヤーレモンと類似していた。小笠原・島レモンは、栽培、育種の園芸学分野からマイヤーレモンの近種であるという報告⁶⁾があるが、本研究での機能性成分の含有量、組成分布の観点からもこれを支持する結果が得られた。

3. 要 約

小笠原・島レモンに含まれる機能性成分のフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリン類の特徴を調べることを目的に、低熟度、高熟度の小笠原・島レモン、マイヤーレモン、ユーレカレモン、温州みかんに含まれる各成分を定量分析し、比較検討した。小笠原・島レモンはフラボノイドのヘスペリジンが主成分であり、未熟果実のアルベドに多く含まれていた。マイヤーレモンから単離報告⁸⁾されているフェニルプロパノイドのメイエリンは小笠原・島レモンのアルベドに多く含まれ、ユーレカレモンより高含有であった。小笠原・島レモンに特徴的な物質を単離し、7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンと同定した。小笠原・島

レモンのクマリン類は、5,7-ジメトキシクマリンと7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンが低熟度果実フラベドにユーレカレモンに比べて高含有であった。小笠原・島レモンに含まれるこれら機能性成分の成分組成と含有量は全般的にマイヤーレモンと類似していた。

本研究の一部は、科学研究費補助金・基盤研究(C)(No. 23590026, No. 2350097)の助成を受けて行われた。小笠原・島レモンの分譲において、東京都小笠原亜熱帯農業センター近藤 健氏、窪田理美氏に感謝します。マイヤーレモンの分譲において、三重県南牟婁郡紀宝町農事組合法人紀宝マイヤーレモン生産組合に感謝します。

文 献

- 1) Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. and Ohta, H., Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 178-192 (2006).
- 2) 沢辺昭義, 松原義治, 有用植物資源 柑橘類果皮中の生物活性物質, *Foods & Food Ingred. J. Jpn.*, **169**, 37-44 (1996).
- 3) Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M., Isolation of furocoumarins from bergamot fruits as HL-60 differentiation-inducing compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4073-4078 (1999).
- 4) 近藤 健, 菅生信義, 菊池レモンの緑色保持における鮮度保持資材および貯蔵温度の影響, 園芸学研究, **9**, 別冊 1, 468 (2010).
- 5) 根角博久, 原島浩一, 和田 実, 菊池正人, 朝長信次, 吉田俊雄, 小笠原諸島におけるカンキツ遺伝資源の調査, 植物遺伝資源探索導入調査報告書, **18**, 57-75 (2002).
- 6) 岩堀修一, 門屋一臣, カンキツ総論(養賢堂, 東京), p.189 (1999).
- 7) 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝, マイヤーレモンに含まれるフラボノイド, クマリンの特徴, 日本食品科学工学会誌, **58**, 178-181 (2011).
- 8) Miyake, Y., Ito, C. and Itoigawa, M., A novel trans-4-hydroxycinnamic acid derivative from Meyer lemon (*Citrus meyeri*). *Food Chemistry*, **135**, 2235-2237.
- 9) Ziegler, H. and Spiteller, G. Coumarins and psoralens from sicilian lemon oil (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Flavour Fragr. J.*, **7**, 129-139 (1992).
- 10) Kang, S.Y., Lee, K.Y., Sung, S.H., Park, M.J. and Kim, Y.C., Coumarins Isolated from *Angelica gigas* Inhibit Acetylcholinesterase: Structure-Activity Relationships. *J. Nat. Prod.*, **64**, 683-685 (2001).

(平成24年8月20日受付, 平成24年9月14日受理)