薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (12) 934-939 (1992)

杏仁及び桃仁に含有される抗変異原性成分について

山本和子,* 大崎好子, 加藤哲太, 宮崎利夫
東京薬科大学

Antimutagenic Substances in the Armeniaceae Semen and Persicae Semen

Kazuko YAMAMOTO,* Yoshiko OSAKI, Tetsuta KATO,
and Toshio MIYAZAKI

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi,
Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received August 5, 1992)

Using the Ames/Salmonella/microsome assay, we examined the anti-mutagenic effect of the hexane extract of Armeniaceae semen (apricot (*Prunus armeniaca* L.) seed), Persicae semen (peach (*P. persica* BAT.) seed), and seeds of cherry (*P. avium* L.), plum (*P. salicina* LINDLE) and almond (*P. dulcis* MILL). Hexane extracts of Armeniaceae semen and Persicae semen inhibited the mutagenicity of benzo[a]pyrene (B[a]P), but those of seeds of cherry, plum and almond did not. The mutagenicities of 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) and 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) were also inhibited by the extracts of Armeniaceae semen and Persicae semen. Inhibitory substances in Persicae semen were fractionated by silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography, and were identified as oleic acid and linoleic acid. The contents of oleic acid and linoleic acid were 0.7 and 0.4% in the hexane extract of Armeniaceae semen, and 1.5 and 0.5% in that of Persicae semen, respectively.

Keywords—antimutagenicity; oleic acid; linoleic acid; Armeniaceae semen; Persicae semen

杏仁は *Prunus armeniaca* L. ホンアンズ及び *P. armeniaca* L. var. *ansu* MAX. アンズ又はその近縁植物の種子で、古来、漢方の要薬とされ、鎮咳、去痰に用いられる。その成分については、amygdalin, emulsin, タンパク質, アミノ酸, 脂肪油及び脂肪酸組成, sterol 類などが報告されている。¹⁻⁴⁾

桃仁は *Prunus persica* BAT. モモ又は *P. persica* BAT. var. *davidiana* MAX. の種子で、杏仁と同じ *Prunus* 属に分類されているが、漢方医学では「瘀血の証」に適應され、用法及び薬理作用は杏仁と異なる。化学成分に関しては、amygdalin, emulsin, タンパク質, アミノ酸, 糖, 脂肪油及び脂肪酸組成, sterol 類などが報告されている。⁵⁻¹⁰⁾

著者らは先に、*Prunus* 属のウメ (*Prunus mume* SIEB. et ZUCC.) の種子である梅仁のヘキサン抽出画分に、抗変異原成分が含有されていることを報告した。¹¹⁾ 同じ *Prunus* 属に属する杏仁、桃仁は前述のように、漢方薬として広く用いられているが、これらの変異原性や発癌性に及ぼす作用につ

いてはまだ明らかでない。そこで杏仁、桃仁について、Ames 法を用いて抗変異原性を測定し、活性成分の解析を行った。さらに同族の桜仁 (*Prunus avium* L. の種子)、プラム (*Prunus salicina* LINDLE) 及びアーモンド (*Prunus dulcis* MILL) の種子についても同様の検討を行った。

実験材料及び方法

1. 材料 杏仁：中国貴州産 1991 年 3 月購入 (ウチダ和漢薬)。桃仁：中国貴州産 1991 年 7 月購入 (ウチダ和漢薬)。桜仁：北光，山形県天童産 1991 年 7 月購入。

プラム：大石早生，山梨県産 1991 年 7 月購入。アーモンド：カリフォルニア産 1991 年 8 月購入。

2. 試薬 変異原物質：Benzo[*a*]pyrene(B[*a*]P)，3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) 及び 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) は和光純薬工業 (株) 製の市販品を用いた。脂肪酸標品はナカライテスク (株) 及びジーエルサイエンス (株) の分析用標品を用いた。

3. 測定法 IR スペクトル：日立赤外分光光度計 260-10 形で測定した。¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトル：Bruker AM 400 FT NMR を用い CDCl₃ 溶液で測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC)：Merck 社の HPTLC Fertigplatten Kiesel gel 60 (10×10 cm) を用い，石油エーテル-エーテル-酢酸 (9:1:0.1, v/v) で展開した。発色試薬にはリンモリブデン酸エタノール溶液 (1→5) を用い，120°C で 2—3 分加熱した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC)：日本分光 800 システム (880 PV, 875 UV, 807 IT) を用い，カラム；Finepack Sil, C-18S (4.6 mm i.d.×150 mm)，溶出液；アセトニトリル-水 (80:20, v/v)，流速；0.7 ml/min，検出波長；214 nm で行った。ガスクロマトグラフィー (GLC)：FID 検出器付日立 164 ガスクロマトグラフを用い，ガラスカラム；15% DEGS, Chromosorb W (AW)，(3 mm i.d.×1.5 m)，カラム温度；240°C，キャリアガス；N₂，20 ml/min で行った。

4. 変異原性抑制試験 各種濃度の試料を含むジメチルスルホキシド (DMSO) 50 μl に，変異原物質の DMSO 溶液 50 μl を加えたものを検液として変異原性試験を行い，試料を加えないときの活性に対する比率から変異原性抑制率を求めた。変異原性試験は *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 を用い，¹²⁾ 37°C で 20 分間のプレインキュベーションを行う矢作ら¹³⁾の方法に基づいて行った。S9 mix は phenobarbital と 5,6-benzoflavone で処理したラット肝臓から分離した S9 (和光純薬 (株) 製) の 50 μl を含むものを用いた。試験は各サンプルにつき 2 枚以上のプレートで行い，His⁺ revertant 数はその平均値で示した。試料の細菌毒性の有無は生存する His⁻ 菌数を検鏡することにより確認した。

5. 抗変異原活性成分の分離 1) ヘキサン抽出——杏仁 (300 g) にヘキサン 600 ml を加え，ACE Homogenizer AM-10 を用い 10000 rpm，5 分間ホモジナイズした。静置後ヘキサン層を分取し，残渣にヘキサン 300 ml を加えて同様の操作を 2 回行った。ヘキサン層を合併し，無水 Na₂SO₄ を加えて脱水した後減圧下溶媒を留去し黄色油 (Ap-I, 99.20 g (収量：33.1%)) を得た。同様な方法で桃仁 (200 g)，桜仁 (230 g)，プラム種子 (110 g) 及びアーモンド種子 (100 g) からそれぞれ黄色油 (Pe-I, 73.1 g (収量：36.5%)，Che-I, 8.01 g (3.6%)，Pl-I, 0.93 g (0.8%) 及び Al-I, 45.9 g (45.9%)) を得た。

2) カラムクロマトグラフィー——Ap-I (杏仁) 15 g を石油エーテルに溶かし，シリカゲル (ワコーゲル C-100，和光純薬 (株) 製) 300 g を用いてカラムクロマトグラフィーによる分離を行った。溶出液：(a) 石油エーテル 200 ml，(b) 10% ジエチルエーテル/石油エーテル 3000 ml，(c) 20% ジエチルエーテル/石油エーテル 1000 ml，及び (d) ジエチルエーテル 1000 ml。抗変異原性活性成分

は 10% ジエチルエーテル/石油エーテル画分の 1000—3000 ml 溶出部に得られた (Ap-Ib, 0.33 g (収量: 2.2%)). 同様な方法で, Pe-I (桃仁) (15 g) から活性成分 Pe-Ib (0.43 g (収量: 2.9%)) が得られた.

3) HPLC—Pe-Ib 10 mg をメタノール 1.0 ml に溶かしその 50 μ l について逆層カラムを用いた HPLC を行った. 溶出液は 1.4 ml ずつ分取し, 溶媒留去後各画分の抗変異原性活性を測定した.

4) GLC—Ap-Ib, Pe-Ib 及び脂肪酸の標品をジアゾメタンでメチル化¹⁴⁾した試料をアセトンに溶かして行い, アセトンとの保持時間の差 (R_{tR}) で表示した. メチル化物の R_{tR} (分) は, palmitoleic acid, 2.45; palmitelaidic acid, 3.70; oleic acid, 6.10; linoleic acid, 7.40; γ -linolenic acid, 8.40; linolenic acid, 9.10; arachidonic acid, 14.6 であった. 含有率はピーク面積から求めた.

結果 及 び 考 察

杏仁, 桃仁, 桜仁, プラム及びアーモンドの種子からヘキサン抽出によりそれぞれ黄色の油状物質 Ap-I (収量: 33.1%), Pe-I (36.5%), Che-I (3.6%), Pl-I (0.8%) 及び Al-I (45.9%) が得られた. これらの油状物質について TLC を行った結果を Fig. 1 に示す. Ap-I 及び Pe-I からは R_f 0.56 及び 0.21 に 2 個の主スポットが, Che-I, Pl-I 及び Al-I からは R_f 0.56 の主スポットが認められた. 標品との比較から R_f 0.56 はトリグリセリド, 0.21 は脂肪酸と推定された. これらの油状物質について, B[a]P の変異原性に対する抗変異原活性を S9 mix 存在下, *S. typhimurium* TA-100 で測定した (Fig. 2). Ap-I 及び Pe-I は濃度依存的に B[a]P の変異原活性を抑制し, 50% 抑制率を示す濃度 ID_{50} はいずれも約 1 mg であった. これに対して Che-I, Pl-I 及び Al-I は 10 mg まで変異原活性抑制効果は認められなかった. 抗変異原活性は, TLC における R_f 0.21 のスポットが存在するもののみ認められ, 脂肪酸の画分がこの活性に関与していることが示唆された.

変異原活性抑制効果が認められた Ap-I 及び Pe-I についてはさらにカラムクロマトグラフィーで活性物質の分離を試みた. Ap-I 及び Pe-I をシリカゲルカラムに負荷し, 石油エーテル, 10% 及び 20% ジエチルエーテル/石油エーテル及びジエチルエーテルで順次溶出した結果, 10% ジエチ

Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of Hexane Extracts of the Seeds of Apricot (1), Peach (2), Cherry (3), Almond (4) and Plum (5)

TLC was developed with petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (9:2:0.1) using a silica gel plate (HPTLC 10 $\times$ 10 cm).

Fig. 2. The Effect of Hexane Extracts of the Seeds of Apricot (—○—), Peach (---○---), Cherry (.....○.....), Almond (-.-.-○-.-.-) and Plum (----○----) on the Mutagenicity of B[a]P (5.0 μ g) as Tested in *S. typhimurium* TA100 with S9 Mix

ルエーテル/石油エーテル画分 (Ap-Ib 及び Pe-Ib) に TLC において R_f 0.21 のスポットが検出された。各溶出画分について溶媒を留去後、B[a]P の変異原性に対する抑制効果を測定した結果、Ap-Ib 及び Pe-Ib においてのみ抗変異原性が認められた。B[a]P, Trp-P-1 及び AF-2 に対する Ap-Ib 及び Pe-Ib の抗変異原活性を Fig. 3 に示した。B[a]P の変異原活性は Ap-Ib 及び Pe-Ib の濃度に依存して低下しており、 ID_{50} はいずれも約 $80 \mu\text{g}$ であった。Ap-Ib 及び Pe-Ib の ID_{50} 及び収量 (2—3%) から算出すると、この画分の抗変異原活性はヘキサン抽出物 (Ap-I 及び Pe-I) の活性の $1/3$ — $1/4$ に相当する。このことは、Ap-I 及び Pe-I には他に活性のある画分が認められないことから、それ自体活性を示さないが、Ap-Ib 及び Pe-Ib の活性を増強する物質が含まれている可能性を示唆する。Trp-P-1 及び AF-2 に対しても Ap-Ib, Pe-Ib ともに B[a]P の場合と同程度の抗変異原活性を示した。

Ap-Ib の IR スペクトル (液膜法) では、 2930 cm^{-1} に O-H, $1720, 1465, 1290 \text{ cm}^{-1}$ に C=O, C-O- に基づく吸収が認められた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CDCl_3) は、 $\delta=0.88 \text{ ppm}$ (t) に末端 $-\text{CH}_3$ に由来する 2 組のシグナルが約 5:2 の強度で観察され、また 5.35 ppm に二重結合 $\text{CH}=\text{CH}$, 2.77 ppm (t) に $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ が認められた。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , complete decoupling) で 14.088 ppm に CH_3 , さらに CH_2 と CH の数から Ap-Ib は octadecenoic acid と octadecadienoic acid の混合物であると推定した。Pe-Ib の IR スペクトルにおいても、ほぼ同様な結果が得られた。

Pe-Ib に含まれる抗変異原物質の本体を明らかにするため HPLC による分離を試みた (Fig. 4)。逆層カラムを用いた HPLC で保持時間 8.68 分と 12.92 分に UV 吸収性の主ピークが認められた。溶出液を 2 分ずつ分取し溶媒留去後、各画分の抗変異原活性を測定した結果この 2 ピークのいずれにも活性が認められた。各種の脂肪酸の標品と HPLC における保持時間を比較した結果、この 2 ピークは linoleic acid と oleic acid に一致し、これらの不飽和脂肪酸が抗変異原物質の本体と推定された。

Ap-Ib 及び Pe-Ib について、さらにメチル化後 GLC により含まれる物質の同定を行った結果、

Fig. 3. The Effect of Hexane Extracts of the Seeds of Apricot (Ap-Ib) and Peach (Pe-Ib) Purified by Column Chromatography on the Mutagenicity of B[a]P ($5.0 \mu\text{g}$), Trp-P-1 ($0.05 \mu\text{g}$) and AF-2 ($0.05 \mu\text{g}$)

The mutagenicity was tested in *S. typhimurium* TA100 with S9 mix (B[a]P) (—), TA98 with S9 mix (Trp-P-1) (---) and TA100 without S9 mix (AF-2) (.....) in the presence of Ap-Ib and Pe-Ib.

Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of the Hexane Extract of Peach Seed (Pe-Ib) Purified by Column Chromatography

Pe-Ib was loaded to a Finepack Sil, C-18S column and eluted with acetonitrile-water (80 : 20, v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min. The mutagenicity of the mixture of each 1.4 ml fraction and B[a]P (5 μ g) was tested in *S. typhimurium* TA100 with S9 mix.

Retention times (min) of authentic fatty acids were 5.07 for palmitoleic acid, 6.60 for linolenic acid, 6.71 for γ -linolenic acid, 7.91 for arachidonic acid, 8.38 for palmitelaidic acid, 8.68 for linoleic acid, 12.92 for oleic acid, 13.49 for petroselinic acid, and 14.04 for elaidic acid.

主ピークは R_{tR} 6.10 min 及び 7.40 min に認められ、それぞれ oleic acid 及び linoleic acid の R_{tR} と一致した。GLC のピーク面積から求めた oleic acid 及び linoleic acid の含有百分率は Ap-Ib で 33.8% 及び 18.1%, Pe-Ib で 50.9% 及び 16.5% で、Ap-Ib 及び Pe-Ib に含まれる不飽和脂肪酸のほとんどがこの2種であることが分かった。

B[a]P を用いて Ap-Ib 及び Pe-Ib の抗変異原活性を oleic acid 及び linoleic acid と比較した (Fig. 5)。Ap-Ib 及び Pe-Ib の ID_{50} はいずれも同程度で、oleic acid 及び linoleic acid の 1.5—2.0 倍の値を示した。これら遊離脂肪酸の含量及び活性の結果から、Ap-Ib 及び Pe-Ib の抗変異原活性は、ほとんどが oleic acid 及び linoleic acid で説明でき、両者がほぼ同程度の寄与をしていると考えられる。

先に著者ら¹¹⁾は梅仁に抗変異原活性があり、その本体が oleic acid 及び linoleic acid であると推定した。今回、同じ *Prunus* 属に属する5種類の種子について抗変異原性を調べた結果、杏仁及び桃仁には活性が認められたが、桜仁、プラム及びアーモンドの種子には活性が認められなかった。この結果は、種子中の遊離脂肪酸の有無によく対応し、また活性の強さは、不飽和脂肪酸の oleic acid 及び linoleic acid の含量によく対応している。このことは、*Prunus* 属の抗変異原

Fig. 5. Comparison of the Antimutagenic Activity of Ap-Ib and Pe-Ib with Oleic and Linoleic Acid

The mutagenicity of B[a]P (5.0 μ g) was tested in *S. typhimurium* TA100 with S9 mix in the presence of Ap-Ib (—), Pe-Ib (---), oleic acid (.....) and linoleic acid (-.-.-).

作用は、含有される oleic acid 及び linoleic acid に由来することを示唆している。

Oleic acid, linoleic acid などの不飽和脂肪酸の抗変異原作用に関しては、早津ら¹⁵⁾による詳細なデータが報告されており、その抗変異原作用は代謝活性化の過程がブロックされることによると考えられている。また不飽和脂肪酸の抗腫瘍性や水酸化不飽和脂肪酸の抗腫瘍性についても報告されている。¹⁶⁻¹⁹⁾ 漢方薬として広く利用されている杏仁や桃仁中に遊離不飽和脂肪酸が相当量含まれていたことは、今後種子生薬の抗変異原性などの作用について検討を加える上で留意されるべきであろう。

引用文献

- 1) 江蘇新医学院編, “中葯大辭典,” 上海科学技術出版社, 上海, 1978, p. 1100.
- 2) O. Awad, *Phytochemistry*, **13**, 678 (1974).
- 3) 永本典生, 野口秀人, 難波健輔, 中村秀雄, 水野瑞夫, 生薬, **42**, 81 (1988).
- 4) D. L. Carpenter, J. Lehmann, B. S. Mason, H. T. Slover, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 713 (1976).
- 5) 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男編, “和漢薬物学,” 南山堂, 東京, 1982, p. 297.
- 6) T. Kosuge, H. Ishida, M. Ishii, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1496 (1985).
- 7) 有地 滋, 久保道德, 谿 忠人, 難波健輔, 永本典生, 野口秀人, 中村秀雄, 宇野 準, 西村温樹, 生薬, **40**, 129 (1986).
- 8) 有地 滋, 久保道德, 谿 忠人, 中村秀雄, 元吉 悟, 石井勝美, 今津千恵子, 世戸康弘, 門河敏明, 永本典生, 難波健輔, 西村温樹, 薬誌, **105**, 886 (1985).
- 9) 森重英明, 伊田喜光, 庄司順三, 生薬, **37**, 46 (1983).
- 10) 竹永章生, 伊藤真吾, 露木英男, 日食工誌, **29**, 724 (1982).
- 11) 堂ヶ崎知格, 村上 一, 西島基弘, 山本和子, 宮崎利夫, 薬誌, **112**, 577 (1992).
- 12) B. N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutation Res.*, **31**, 347 (1975).
- 13) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushita, T. Sugimura, M. Okada, *Mutation Res.*, **48**, 121 (1977).
- 14) F. Arndt, “Organic Syntheses,” Coll. Vol. II, ed. by A. H. Blatt, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1943, p. 165.
- 15) H. Hayatsu, S. Arimoto, T. Negishi, *Mutation Res.*, **202**, 429 (1988).
- 16) K. D. Ananta, D. K. Roy, *J. Antibiot.*, **35**, 92 (1982).
- 17) G. F. Townsend, J. F. Morgan, B. Hazlett, *Nature*, **183**, 1270 (1959).
- 18) Y. L. Ha, N. K. Grimm, M. W. Pariza, *Carcinogenesis*, **8**, 1881 (1987).
- 19) Y. L. Ha, N. K. Grimm, M. W. Pariza, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 75 (1989).