薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (5) 343-347 (1992)

キハダのリモノイド

三宅正起,^{*,a} 稲葉伸也,^a 綾野 茂,^a 尾崎嘉彦,^a
前田久夫,^a 伊福 靖,^a 長谷川 信^b
和歌山アグリバイオ研究センター,^a
米国農務省果実野菜化学研究所^b

Limonoids in *Phellodendron amurense* (Kihada)

Masaki MIYAKE,^{*,a} Nobuya INABA,^a Shigeru AYANO,^a
Yoshihiko OZAKI,^a Hisao MAEDA,^a Yasushi IFUKU,^a
and Shin HASEGAWA^b

Wakayama Agricultural Biological Research Institute,^a 396-1,
Tsukatsuki, Momoyama-cho, Naga-gun, Wakayama 649-61,
Japan and USDA, ARS, Fruit and Vegetable Chemistry
Laboratory,^b 263 S. Chester Ave., Pasadena,
California 91106, U.S.A.

(Received December 26, 1991)

Limonoids and their glucosides in the seeds and barks of *Phellodendron amurense* (Kihada) were analyzed. The seeds contained limonin (1950 ppm), obakunone (20 ppm), limonin 17- β -D-glucopyranoside (820 ppm) and obakunone 17- β -D-glucopyranoside (1360 ppm). The barks contained limonin (6760 ppm), obakunone (1240 ppm) and nomilin (270 ppm).

Keywords—limonoid; limonoid glucoside; limonin 17- β -D-glucopyranoside; obakunone; *Phellodendron amurense*

Limonoid はミカン科 (Rutaceae) とセンダン科 (Meliaceae) に存在する triterpene 誘導体の 1 群である。最近 C-17 位で 1 分子の β -D-glucose と結合した limonoid 配糖体も存在することが発見された。¹⁾ 著者らはカンキツ類及び他のミカン科の limonoid について研究を進めており、本研究ではキハダ (*Phellodendron amurense*) について、生薬として市販されているオウバク (キハダ又はその他同属植物の周皮を除いた樹皮) と、これまで報告例のない種子の limonoid 及びその配糖体について分析した。

キハダ種子の acetone 抽出液について薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を行った結果、Erlich 試薬発色反応で limonoid 特有の陽性スポット²⁾が 2 つ認められた。この 2 種の limonoid を 3 種の溶媒系を用いて TLC で標準物質と比較したところ、それぞれ limonin, obakunone の R_f 値と一致した。さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行った結果、それぞれ limonin, obakunone の保持時間と全く一致した。したがってこの 2 つの limonoid を limonin, obakunone と同定した。HPLC による定量分析の結果、Table I に示すように主要な limonoid は limonin (1950 ppm) であり、obakunone は微量 (20 ppm) であった。Limonin と obakunone は既にオウバクから単離されているが、³⁾ 本研究により種子の中にも存在し、特に limonin が豊富に含まれていることが分かった。

TABLE I. Limonoid Contents in the Seeds of *Phellodendron amurense*

Limonoids	ppm of dry weight ^{a)}		
	Acetone ext.	Methanol ext.	Total
Limonin	1902	52	1954
Obakunone	19	1	20
Limonin-G	—	820	820
Obakunone-G	—	1360	1360

a) average values from TLC and HPLC analyses.

G, 17- β -D-glucopyranoside.

次に acetone 抽出の済んだキハダ種子を methanol で抽出し、その抽出液を分取 HPLC によって分画、分取したところ、limonin, obakunone のほかに 2 種の limonoid glucoside が単離された。TLC 分析の結果、これらは limonin 17- β -D-glucopyranoside (limonin glucoside) と obakunone 17- β -D-glucopyranoside (obakunone glucoside) の R_f 値と一致した。HPLC 分析による保持時間の比較からも同様に同定された。さらにこれらを既報⁴⁾に従い土壌から単離したバクテリアの β -D-glucosidase で加水分解し、遊離した aglycone を TLC で定性したところ、それぞれ limonin と obakunone が検出された。また核磁気共鳴スペクトル (NMR) 分析¹⁾によっても limonin glucoside, obakunone glucoside であることが確認された。これら化合物の構造を Fig. 1 に示す。

HPLC による定量の結果、キハダ種子中には obakunone glucoside が 1360 ppm, limonin glucoside が 820 ppm 含まれていた。

次にオウバクについて同様の分析を行い、既に報告されている³⁾ limonin と obakunone のほかに新たに少量ではあるが nomilin が存在することを発見した (Table II)。この 3 種はすべてのカンキツ中に含まれる主要な limonoid である。したがってキハダにもカンキツ同様 nomilin→obakunone→obakunonoate→ichangin→limonin の生合成経路⁵⁾が存在する可能性があるものと推測される。

キハダの種子中より単離された limonin glucoside と obakunone glucoside はオウバクからは検出できなかった。これはカンキツ類と全く同じ結果である。すなわち limonoid glucoside はカンキツ類同様、葉、茎には存在せず果実の成長後期、成熟期に種子中で全く独立して合成されるものと思われる。⁶⁻⁸⁾

Limonin は強い苦味を有している。カンキツジュースにおける limonin の苦味の閾値は 6 ppm とされており、⁹⁾ それ以上含まれていると商品性は著しく低下する。また nomilin も limonin と同

Fig. 1. Structure of Limonoid Glucosides Isolated from Seeds of *Phellodendron amurense*TABLE II. Limonoid Contents in the Barks of *Phellodendron amurense*

Limonoids	ppm of dry weight ^{a)}		
	Acetone ext.	Methanol ext.	Total
Limonin	5640	1120	6760
Nomilin	162	108	270
Obakunone	1140	100	1240
Total	6942	1328	8270

a) average value from TLC and HPLC analyses.

等の苦味を有している。⁵⁾ 一方, limonin glucoside と obakunone glucoside を含めて 21 種の limonoid glucoside がカンキツ類より単離されているが, これらはすべて苦味を有さない。¹⁰⁾

ある種の limonoid がマウスやハムスターを用いた実験で抗ガン作用¹¹⁻¹³⁾のあることや, 昆虫に対する摂食阻害作用¹⁴⁻¹⁹⁾をもつことは既に報告されている. オウバク中の limonoid の生理活性についても報告されている.²⁰⁾ 本実験結果からオウバクには 0.83% の limonoid が含まれていることが分かったが, これは limonoid が漢方薬の薬効に何らかの役割を演じている可能性を示している. 最近さらに limonin glucoside が 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) で誘発される口腔内腫瘍の発生を抑制することがハムスターの buccal pouch (頬袋) を用いた実験で明らかとなった.²¹⁾ オウバクにはこれらの glucoside が含まれていないが, 種子中には高濃度で含有されており, また, これらの limonoid glucoside がカンキツ果実に多量に含まれていることに注目したい. 例えば米国で市販されているオレンジ, グレープフルーツ及びレモン果汁中にはそれぞれ 320 ppm (15 商品の平均値), 190 ppm (8 商品の平均値), 80 ppm (4 商品の平均値) 含まれている.²²⁾ またカンキツ種子はキハダ種子と同様, limonoid とその glucoside を多量に含んでおり,⁷⁾ これらの重要な資源である. 将来, limonoid の機能性利用法に期待がもたれる. 現在カンキツ類及び他のミカン科植物からの limonoid の抽出, 回収に関する研究を進めている.^{23,24)}

実 験 の 部

供試試料 1990 年 12 月, 和歌山市に野生するキハダから果実を採取した. これから種子を分離し, 55°C で 72 時間乾燥させた後, Retsch-mill (Brinkmann, Westbury, NY, U.S.A.) で摩砕, 粉末化処理を行い供試試料とした. オウバクは生薬として市販されているものを用いた.

抽出 既報^{7,22)}に準じて行った. 供試試料 92 g をソックスレー抽出器を用いて *n*-hexane で脱脂処理した後, acetone を一夜 (20 時間) 還流させて limonoid を抽出した. 次に methanol を一夜還流させて limonoid glucoside を抽出した.

TLC 分析 Limonoid はシリカゲル HLF 型プレート (Analtech, Newark, DE, U.S.A.) を次の 3 種の溶媒系を使って展開した. (A) EtOAc-cyclohexane (3 : 2), (B) CH₂Cl₂-MeOH (97 : 3), (C) EtOAc-CH₂Cl₂ (2 : 3). なお, 溶媒系 (A), (B), (C) における標準物質の *R_f* 値はそれぞれ limonin (0.32, 0.53, 0.55), obakunone (0.57, 0.74, 0.81), nomilin (0.23, 0.60, 0.58) であった. 一方, limonoid glucoside は EtOAc-MeCOEt-HCO₂H-H₂O (5 : 3 : 3 : 1) で展開した. 展開したプレートは Erhlich 発色試薬をスプレーした後, HCl ガス中で limonoid 特有の赤紫色を発色させた.

同定は標準物質と *R_f* 値を比較することにより, また定量は標準物質をプレートに 0.2 μg 間隔で 0.2 から 2.0 μg までスポットし, その発色強度と比較して行った. なお, 標準物質は米国農務省果実野菜化学研究所において単離し, NMR で構造決定したものである.

HPLC 分析 既報²⁵⁾と同様に行った. Limonoid の分析は高速液体クロマトグラフ SP 8750 型 (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, U.S.A.), カラムは C-18 逆相 (8.0×250 mm, Alltech Associates, Deerfield, IL, U.S.A.) を用いた. 水-acetonitrile-methanol (60 : 30 : 10) で出発し, 60 分後に (45 : 45 : 10) となる直線グラジエントを行い, 流速 0.8 ml/min で溶離した. 標準物質の保持時間は limonin 24.3 分, nomilin 32.4 分, obakunone 42.6 分であった. Limonoid glucoside の分析は C-18 逆相カラムを備えた高速液体クロマトグラフ 6000 A (Waters, Milford, MA, U.S.A.) を用いた. Acetonitrile-3 mm phosphoric acid (15 : 85) で出発し 33 分後に (26 : 74) となる直線グラジエントを行い, 流速 1.0 ml/min で溶離した. 検出波長はいずれも 210 nm とした.

Limonoid Glucoside の単離 Methanol 抽出液から次の方法で 2 つの limonoid glucoside を

単離した。Methanol を留去した後、残渣を水で溶解し XAD-2 (Sigma Chemical St. Louis, MO, U.S.A.) 充填カラム (3.0×75 cm) に移した。水でよく洗浄後、methanol で limonoid glucoside を溶出させた。この methanol を水で置換し、C-18 逆相カラム (4.6×250 mm) を備えた HPLC で分画した。送液条件は 15% methanol で始まり 75 分後に 55% methanol となる 6 ml/min の直線グラジエントとし、18 ml/fraction で分取した。本条件において limonin glucoside は Fr. 11, 12, obakunone glucoside は Fr. 22—25 で単離した。

Limonoid Glucoside の同定 TLC 分析の他に、先に示した HPLC 分析条件で標準物質と保持時間を比較することにより行った。Limonin glucoside は 17.2 min, obakunone glucoside は 35.2 min であった。さらに既報¹⁾の方法で NMR スペクトル分析によってもキハダ種子から単離した成分は、それぞれ limonin glucoside, obakunone glucoside であることを確認した。

引用文献

- 1) S. Hasegawa, R. D. Bennett, Z. Herman, C. H. Fong, P. Ou, *Phytochemistry*, **28**, 1717 (1989).
- 2) V. P. Maier, G. D. Beverly, *J. Food Sci.*, **33**, 488 (1968).
- 3) 近藤嘉和, 鈴木尚志, 野副重男, 薬誌, **105**, 742 (1985).
- 4) S. Hasegawa, L. K. T. Lam, C. H. Fong, Z. Herman, P. Ou, "Limonoid glucoside in Citrus, Biochemistry and Biological activity," Citrus Research Conference, Pasadena, CA, 1988, p. 2.
- 5) S. Hasegawa, "Quality Factors of Fruits and Vegetables," ed. by J. J. Jen, ACS Sym. Series 405, ACS, Washington, DC, 1989, p. 84.
- 6) C. H. Fong, S. Hasegawa, Z. Herman, P. Ou, *J. Sci. Food Agric.*, **54**, 393 (1991).
- 7) Y. Ozaki, C. H. Fong, Z. Herman, H. Maeda, M. Miyake, Y. Ifuku, S. Hasegawa, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 137 (1991).
- 8) S. Hasegawa, P. Ou, C. H. Fong, Z. Herman, C. W. Coggins, Jr., D. R. Atkin, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 262 (1991).
- 9) D. G. Guadagni, V. P. Maier, J. C. Turnbaugh, *J. Food Sci.*, **24**, 1277 (1973).
- 10) S. Hasegawa, C. H. Fong, Z. Herman, M. Miyake, 198th National Meeting of American Chemical Society, New York, August, 1991.
- 11) L. K. T. Lam, S. Hasegawa, *Nutr. Cancer*, **12**, 43 (1989).
- 12) L. K. T. Lam, Y. Li, S. Hasegawa, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 878 (1989).
- 13) E. G. Miller, R. Flanous, F. Rivera-Hidalgo, W. H. Binnie, S. Hasegawa, L. K. T. Lam, *Carcinogenesis*, **10**, 1535 (1989).
- 14) J. A. Klocke, I. Kubo, *Entomol. Exp. Appl.*, **32**, 299 (1982).
- 15) A. R. Alford, M. D. Bentley, *J. Econ. Entomol.*, **79**, 35 (1986).
- 16) A. R. Alford, J. A. Cullen, R. H. Stoch, M. D. Bentley, *J. Econ. Entomol.*, **80**, 575 (1987).
- 17) H. Kawaguchi, M. Kim, M. Ishida, Y. J. Ahn, T. Yamamoto, K. Goto, S. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2635 (1989).
- 18) M. D. Bentley, M. S. Rajab, M. J. Mendel, A. R. Alford, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1400 (1990).
- 19) M. Serit, M. Ishida, M. Kim, T. Yamamoto, S. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, **55**,

- 2381 (1991).
- 20) K. Wada, M. Yagi, A. Matsumura, K. Sasaki, M. Sakata, M. Haga, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2332 (1990).
- 21) E. G. Miller, A. P. Gonzales-Sanders, A. M. Couvillon, J. M. Wright, S. Hasegawa, L. K. T. Lam, *Nutr. Cancer*, **17**, 1 (1992).
- 22) C. H. Fong, S. Hasegawa, Z. Herman, P. Ou, *J. Food Sci.*, **54**, 1505 (1989).
- 23) 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).
- 24) 三宅正起, 綾野 茂, 尾崎嘉彦, 前田久夫, 伊福 靖, Z. Herman, C. H. Fong, 長谷川 信, 農化, **65**, 1347 (1991).
- 25) 三宅正起, 綾野 茂, 尾崎嘉彦, Z. Herman, 長谷川 信, 農化, **66**, 31 (1992).