

カンキツ果実の機能性成分の検索と その有効利用に関する研究

野方洋一

Key words : カンキツ, フラボノイド, リモノイド, アラキドン酸, リポキシゲナーゼ, シクロオキシゲナーゼ, フェニルプロパノイド, エリオジクチオール

目 次

緒 論	19	4 ルミー果実由来リポキシゲナーゼ阻害成分の単離と同定	58
カンキツ果実のフラボノイドおよびリモノイド組成と品種の特性評価	22	5 ヒドロキシケイ皮酸誘導体のリポキシゲナーゼに及ぼす影響	62
1 緒 言	22	6 エリオジクチオール誘導体のリポキシゲナーゼに及ぼす影響	64
2 カンキツ果実に含まれるフラボノイドの一括分析法の設定	22	7 小 括	67
3 カンキツ果実のフラボノイド組成と品種の評価・判別	28	機能性成分を高濃度に含有するポンカン果実の搾汁法の検討	67
4 イヨ, シークワサー, およびハナユ種子のリモノイドの分析	44	1 緒 言	67
5 小 括	47	2 搾汁方法の異なる果汁の製造	68
カンキツ成分のアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響	49	3 製造果汁のポリメトキシフラボン, -クリプトキサンチン濃度, およびアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響	70
1 緒 言	49	4 小 括	74
2 カンキツ果実抽出物のアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響	49	総 括	74
3 ポンカン果実由来血小板リポキシゲナーゼ阻害成分の単離と同定	55	引用文献	77
		Summary	82

緒 論

近年, 動脈硬化性疾患や糖尿病等の生活習慣病やアレルギー性疾患の急速な増加が大きな社会問題となっている。1997年秋に行われた厚生省の実態調査によれば, 「日本の糖尿病患者数の推計は690万人」という結果が出された。この推計糖尿病患者数を

1990年に行われた調査結果と比較すると, 患者数はこの7年間で130万人も増加したことになる。また, 主な死亡原因として1981年以来第一位を占めているのは悪性新生物(ガン)であるが, 第二位, 第三位には心疾患, 脳血管疾患といった「動脈硬化性疾患」が並び, 両者を合計すると, 第一位に肉薄する死亡率になる。動脈硬化性疾患の主な原因が糖尿病や高脂血症・高コレステロール血症, 喫煙であることが

(平成17年3月11日受理)

作物開発部

ら、これらの成人病を予防するためには食生活や生活様式の改善が必要であると考えられる。

このような背景をもとに、食品のもつ生体調節機能(三次機能)への関心も高まっている。最近、私たちが普段に食べている農産物や食品の中にも病気を予防・治療する効果のある成分が炭水化物、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラルといった栄養学の対象物以外に見いだされている。そして、これらの微量成分によって知らず知らずのうちに病気が予防され健康な体に保たれていることが次第に明らかにされつつある。農産物・食品の各々のもつ機能性を科学的に解明していけば健康的な食生活を実行するための指針として役立つものと考えられる。

循環器系疾患やアレルギー性疾患には一部のアラキドン酸代謝産物が関与していることが知られている^{1,2)}。アラキドン酸は生体内において細胞膜のリン脂質の脂肪酸構成成分として存在し、組織、細胞がある刺激を受けるとホスホリパーゼの作用によってリン脂質より遊離してくる。遊離されたアラキドン酸はただちに酵素によって代謝され、各組織特有の生理活性物質であるプロスタグランジン(PG)、トロンボキサン(TX)、ロイコトリエン(LT)、リポキシン(LX)等になる³⁾。アラキドン酸を代謝する酵素のうち、1つはシクロオキシゲナーゼ(COX)でありPGやTXはこの酵素を経て代謝される。もう1つの酵素はリポキシゲナーゼ(LOX)であり、アラキドン酸の12位を酸化する酵素は12-LOX、また5位を酸化する酵素は5-LOXと呼ばれている⁴⁾。血小板にはCOXと12-LOXが存在し、アラキドン酸を代謝する。COXの経路からは血小板凝集を引き起こし血栓を作るTXA₂が、またLOXの経路からは中膜平滑筋を遊走させたり5-LOXを活性化させて動脈硬化やアレルギー性疾患の原因となる12-hydroxyl-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid(12-HETE)が作られる⁵⁾。また、白血球には5-LOXが存在し、その代謝物であるLT類は白血球遊走の亢進、気管支収縮、血管透過性の亢進等、主にアレルギー反応を誘発させる。従って、酵素活性を阻害することによりこれらの代謝物の生成を抑制すれば、血栓、動脈硬化、アレルギー性疾患の予防や改善に有効であると考えられる^{6,7)}。

カンキツ類は国内で生産される主要な果実であり、フラボノイド、カロチノイド、クマリン、テルペン、リモノイド等の機能性成分を含有する。最近、フラボノイドのポリメトキシフラボン(PMF)^{8,9,10)}、カロチノイドの-クリプトキサンチン(-CRY)¹⁰⁾、クマリンのオーラプテン¹¹⁾に新たな機能性が見出されており、健康維持や疾病の予防に有効な食品素材と考えられる。一方、果汁関係資料によると、その生産量は漸減の一途を辿っており、主要カンキツであるウンシュウの平成4年における生産量が168万トンに対し、平成13年の生産量は128万トンである。他の国産カンキツをみると、ナツミカン、ネーブルオレンジ、ハッサク等、主要品種に属するものが減少傾向であり、イヨ、ボンカン、ユズ、カボス等、生産量が少なく地域性や特産性のある品種は横ばいないしは若干の増加傾向にある。原果汁の国内生産量の低下は果実の生産量よりも著しく、ウンシュウの場合、平成元年の39.3万トンに対し、オレンジ果汁の輸入自由化が始まった平成4年には28.1万トン、平成12年では8.6万トンとなっている。果汁飲料の消費量低下傾向は、オレンジ果汁に限らず、リンゴ、ブドウ等の果汁でも同様の傾向にある。

カンキツ類の生産、消費の減少傾向に歯止めをかける解決策の1つとして、国産カンキツに特有の生理機能を見出し、新たな需要を創出することが考えられる。ここ数年、消費者の食に対する志向も健康、機能性、安全性へと変化し、食品産業界ではこのようなニーズを主眼においた商品開発や広報活動が活発になっている。例えば、茶系飲料にはノンカロリー、カテキンの機能性に基づく健康イメージがあり、これらの特徴が消費者のニーズに沿うものと思われる。農林水産省でも、平成3年から10年計画で国産農産物を生理機能という観点で評価し、その優位性を見出すとともに、国民の健康増進を図る「新需要創出計画」という研究プロジェクトを立ち上げた。本研究は新需要創出計画において、カンキツ果実、果汁を研究対象とし、カンキツ果実の生理機能を評価することにより、主として国産カンキツの生産・消費の拡大を目指すことを目的とした。生理機能としては、先に述べた循環器系疾患やアレルギー性疾患に関係するアラキドン酸代謝系に及ぼすカンキツ成分の影響を中心に研究を進めた。農産物の機能性

を評価する場合、有効な機能を発揮する成分の特定が最も重要であるが、食用部位の選別や加工・調理といった段階を経て摂取されるので、機能性成分の分布や加工処理による損失、変性が起きる。カンキツ果実では、生食の場合、じょうのう膜と果肉、或いは果肉のみを摂取するのが一般的である。果汁製造においては、果肉の利用を主体とするが、じょうのう膜や果皮の一部も搾汁するので、果皮成分の果汁への移行が考えられる。本研究では、このような要素にも配慮した。

本論文では以下の項目について検討を行った。

では、カンキツの主要な機能性成分であるフラボノイドおよびリモノイドの品種別組成を明らかにし、各成分の有効利用や品種分類への応用等が可能な基礎資料を得ることを目的とした。

まず始めに、フラボノイドの部位別、品種別の組成・含量を簡易・迅速に定量できるHPLCによる分析手法を設定した。続いて、設定した手法を用いてフラボノイド組成・含量に関する基礎データを集め、種の特徴や分類への応用可能性を検討した。カンキツのフラボノイド類の機能性研究が進展するなか、フラボノイドの代表的なアグリコンであるナリンゲニン（NGN）やヘスペレチン（HPT）にガン細胞のアポトーシス誘導作用¹²、脂質代謝改善作用¹³、抗炎症作用¹⁴が報告されている。将来的にも、フラボノイドの機能性研究の進展が見込まれることから、各品種の部位別フラボノイド組成・含量に関する基礎データをまとめれば、フラボノイドの利用に際し、品種の選定や加工法選定の参考資料として役立つと考えられた。さらには、発ガン抑制効果や昆虫の摂食抑制効果^{15, 16}等の機能を持ち、主に種子に分布するリモノイド成分について、シークワサー、イヨ、ならびにハナユ果実の種子についてその組成と含量を調べた。

では、動脈硬化、アレルギー性疾患、血栓の形成に關与するアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす果皮抽出物の影響を中心に検討した。これまでに、天然のLOXの阻害成分として、ケルセチン、ケンフェロール、ミリセチン、ルテオリン等のフラボノイド類^{17, 18}、コーヒー酸やその誘導体^{19, 20}、エスクレチン等のクマリン類⁷が報告されている。カンキツ類はこれらの成分を含有することから、LOXおよ

びCOXの阻害効果が期待された。

まず始めに、カンキツ45種の果皮抽出物の血小板アラキドン酸代謝酵素に及ぼす影響を検討し、田中の分類²¹と照らし合わせて、種による阻害の傾向を明らかにした。阻害効果の強い種については、部位別・熟度別の阻害効果についても検討した。続いて、12-LOX阻害効果の強い種として、後生カンキツ亜属・ミカン区に属するポンカン果実を選定し、果皮からLOX阻害成分を単離し、その構造を明らかにした。一方、ポンカンとは遠縁の初生カンキツ亜属・シトロン区に属するルミー果皮に存在するLOX阻害成分を単離し、その構造を明らかにした。さらには、同定した阻害成分の構造類縁体を用いて、LOX阻害効果の構造活性相関について検討した。

では、種々の果汁搾汁法で調製した果汁における各機能性成分の含量、ならびに阻害活性の相違を調べることにより、各搾汁法における各成分の抽出傾向を把握し、各成分の抽出に効率的な搾汁法を明らかにした。供試品種として、-CRYに加えて、NOBやTNG等のPMF、さらにはアラキドン酸代謝系酵素阻害成分をもつポンカンを用いた。

まず始めに、2種類のインライン（IL）搾汁法、チョッパーパルパー（CP）搾汁法、ハンドプレス圧搾法（HP）の各方法により果汁を製造し、果汁の一般的な評価項目について検討した。IL搾汁法は果皮の一部とじょうのう膜を含めた果肉、CP搾汁法は果皮を剥皮後処理するため、じょうのう膜を含めた果肉、圧搾法は果実全体を搾汁する。続いて果汁の製造工程段階および製品について機能性成分の各製造法における抽出の効率を調べた。-CRYは果皮表面の着色部位であるフラベドおよび果肉のさのう膜内に分布し、PMFならびにCOX阻害成分はフラベドの油胞内に存在する。また、12-LOX阻害成分は果皮内側の白い部分であるアルベドを主体に果実全体に存在する。このため、これらの製造果汁中における濃度は搾汁法によって異なることが予想された。

最後に、で本研究の成果を総括した。

本研究において、カンキツフラボノイドの有効利用に資する種・系統に基づくフラボノイド組成データを得た。また、カンキツ果実に含まれるアラキドン酸代謝系LOX阻害成分を特定した。さらに、カ

ンキツ果実の機能性成分の効率的な搾汁法開発に寄与する結果を示した。これらの成果は、カンキツ機能性成分の有効利用の端緒を開き、カンキツの消費拡大に貢献するものである。

カンキツ果実のフラボノイドおよびリモノイド組成と品種の特性評価

1 緒 言

カンキツ類の機能成分として、フラボノイド、カロチノイド、クマリン、テルペン、リモノイドが知られている。このうち、フラボノイド類は多様であり、ルチンやケルセチン等野菜や果実一般にみられるもの、ヘスペリジン (HSP) やナリンギン (NRG) といったカンキツに特有のフラバノン類、ロイフォリン (RFN)、ディオスミン (DSM) 等のフラボン類、および NOB や TNG 等の PMF に分類できる。フラボノイドの機能性に関する研究例は多く、HSP や NRG にガン細胞に対するアポトーシス誘導作用¹²⁾、脂質代謝改善作用¹³⁾、抗炎症作用¹⁴⁾、等が報告され、TNG や NOB 等の PMF ではガン細胞の浸潤・転移抑制作用^{8, 9, 22)}、血漿 VLDL (very low density lipoprotein) 濃度の低下作用²³⁾、さらには関節リウマチや関節破壊症に關与するマトリックスメタロプロテアーゼの産生を阻害することが明らかにされている²⁴⁾。

フラボノイドは一般的に果皮内側の白い部分であるアルベドに高い濃度で分布するが、果実における分布状態は種により異なる。しかし、各フラボノイド組成・含量の種間差は系統立てて検討されていない。そこで、カンキツ45種の部位別フラボノイド組成を明らかにすることを目的として、HPLCとフォトダイオードアレー検出器を用いた25種類のフラボノイドの一括定量法を開発し、アルベド、フラベド、果皮、じょうのう膜、果肉における含量を定量した。続いて、各部位の組成データを基に主成分分析を行い、分類区や品種判別への適用性を検討した。一方、リモノイド類はリモニンおよびノミリンが果汁や加工品の苦みの主要因となるので、製品価値を下げる成分としてみなされてきた。研究例は少ないが、最近アグリコンにマウスやハムスターの発ガン抑制効果¹⁶⁾、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)

の誘導作用^{15, 25)}、昆虫類の摂食抑制効果^{26, 27)}、またリモニン17-O-β-D-グルコシドにハムスターの発ガン抑制効果²⁸⁾等が報告され注目を集めつつある。そこで、果汁生産量が第2位であるイヨ、沖縄原産でその健康機能が注目されているシークワサー、ならびに特異的なリモノイド組成をもつユズ区に属するハナユ種子のリモノイドを分析し、組成・含量を評価した。

2 カンキツ果実に含まれるフラボノイドの一括分析法の設定

1) 序

カンキツのフラボノイドはその呈味性²⁹⁾に加え、前節で述べたような多様な医薬的な効果をもつ。また、フラボノイドの構造は多岐にわたるため、その組成を種や系統の分類への適用に検討した報告もある^{30, 31, 32)}。これらの研究の発展やフラボノイドの有効利用のためには、種ごとの正確なフラボノイド組成データが不可欠である。フラボノイドのHPLC分析に関しては、多くの研究報告がある^{33, 34, 35, 36)}。WolfとNagelはC₁₈カラムを用いたメタノール-酢酸-水(30:5:65)の溶離液で十数種類のフラボノイドを分離した³⁷⁾。DaigleとConkertonは、C₁₈カラムを用い、水-酢酸溶液(495:5)とメタノールのアイソクラティック溶出で、34種類のフラボノイドを分離した³⁸⁾。また、Van de Casteleらは、C₁₈カラムを用いたギ酸-水(5:95)メタノール溶媒系による141種のフラボノイドの保持時間を報告した³⁹⁾。しかしながら、カンキツのフラボノイドを定量するためには、分離能が不十分であったり、同定が困難であったりして、これまでに報告された手法の適用範囲は限られている。一方、カンキツに含まれるフラボノイドに関する報告は、主要なフラバノン配糖体^{40, 41)}やPMF^{42, 43)}等、極性の近い成分の分離に限られている。そこで、カンキツの含有する高極性のフラバノン配糖体から低極性のPMFまで一括して正確に定量できるフォトダイオードアレー検出器⁴⁴⁾を用いた分析法を設定することを目的とした。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

ウンシュウ (*Citrus unshiu*) とヒラドブンタン

(*C. grandis* cv. Hirado) の各果実は、果樹研究所カンキツ研究部より提供を受けた。果実は収穫後、直ちにフラベド、アルベド、じょうのう膜、果肉に分けて -20℃ で保存した。

(2) 供試試薬, 機器

フラボノイドのHPLC用スタンダードとして用いたエリオシトリン (ECR), ネオエリオシトリン (NER), ロピネチン (RBT), ナリルチン (NRT), NRG, ルチン (RTN), HSP, ネオヘスペリジン (NHP), イソロイフォリン (IRF), RFN, DSM, ケルセチン (QCT), ポンシリン (PON), ルテオリン (LTN), ケンフェロール (KFR), アピゲニン (APG), イソラムネチン (IRA), ディオスマチン (DMT), ラムネチン (RMT), イソサクラネチン (ISA), シネンセチン (SNT), アカセチン (ACT), TNGはフナコシから購入した。ネオディオスミン (NDM) は、USDAのFruit and Vegetable Chemistry研究室 (Pasadena, CA) から提供を受けた。これらの構造をFig. 1に示す。SepPak Plus C₁₈カートリッジは、Waters (Milford, MA) から購入した。

HPLCは、L-6210およびL-6010ポンプ, AS-2000オートサンプラー, L-3000フォトダイオードアレー検出器, D-6100インターフェース, カラムオープン, デガッサーで構成される日立製システムを用いた。分離カラムは、メルク製のLiChrospher 100 RP-18 (250mm x 4.0mm) およびガードカラムを用いた。

(3) サンプル調製

果肉以外の3つの部位は、重量測定後に凍結乾燥し、0.5mmのスクリーンを用いて遠心ミル (Ultra Centrifugal Mill, 三田村理研工業) により破碎後、再び -20℃ で保存した。製粉サンプル100mgを蓋付き試験管に取り、5 mLの抽出溶媒 [メタノール:DMSO, (1:1)] を加え、往復振とうさせながら室温で12時間抽出した。その後、3,000xgで10分間遠心し、上清を回収した。沈殿に1 mLの抽出溶媒を加え、上記条件で遠心分離し、上清を回収する操作を2回繰り返した。合わせた抽出液を水で10倍に希釈し、5 mLのメタノールおよび5 mLの10%メタノールでプレコンディショニングしたSepPak C₁₈カートリッジに添加した。カートリッジを10mLの10%

メタノールで洗浄後、4.5mLの溶出液 [メタノール-DMSO, (1:1)] を通し、フラボノイド画分を得た。溶出液は5.0mLに定容し、HPLCの分析サンプルとした。ジュース用のサンプル調製は、果肉をホモジナイザーで破碎し、15,000xgで20分間遠心分離した。上清を回収後、沈殿に1/20容の抽出溶媒を添加した。沈殿を懸濁させ、3,000xgで10分間遠心分離後、上清を回収する操作を2回繰り返した。合わせた上清は、上記のようにSepPak C₁₈カートリッジで処理した。サンプルはHPLCで分析する前に、孔径0.5 μmのメンブランフィルターで濾過した。

(4) HPLC条件

検出器は200 - 360nmの吸収スペクトルを記録した。カラムオープンの温度は40℃とし、流速は0.6 mL/minとした。また、サンプルの注入量は10 μLとした。運転中のカラム圧は、1,000 - 1,550 p.s.i.であった。分離は3つのステップからなる2液のグラジエント法を用いた。すなわち、A液を0.01Mリン酸、B液をメタノールとし、(1)0 - 55分: 70 - 55% A, (2)55 - 95分: 55 - 0% A, (3)95 - 100分: 0% Aとした。溶出成分は、保持時間と200 - 360nmのUV吸収波長をスタンダードと比較することにより同定した。成分の定量は、スタンダードのピーク面積値との比により計算した。

(5) 回収率試験

回収率は、ECR, NRG, HSP, TNGについて、アルベドおよびジュースで検討した。アルベドでは、終濃度が100ppmになるようにスタンダードを抽出液に添加し、上記と同様のサンプル調製を行った。ジュースでは、ホモジナイズ液に抽出液を加え、同様に調製した。回収率は、HPLCにより定量した比較値から計算した。すなわち、スタンダードを添加したサンプルの各フラボノイドの濃度からコントロールサンプルの濃度を差し引いた値と、スタンダードの添加濃度の比較値から求めた。試験は5回反復で行い、平均値と標準偏差を求めた。

3) 実験結果および考察

(1) 分離と同定

25種類のフラボノイドのHPLCクロマトグラムをFig. 2に示す。また、分離状態に関して、Table 1に各スタンダードの5回反復試験の保

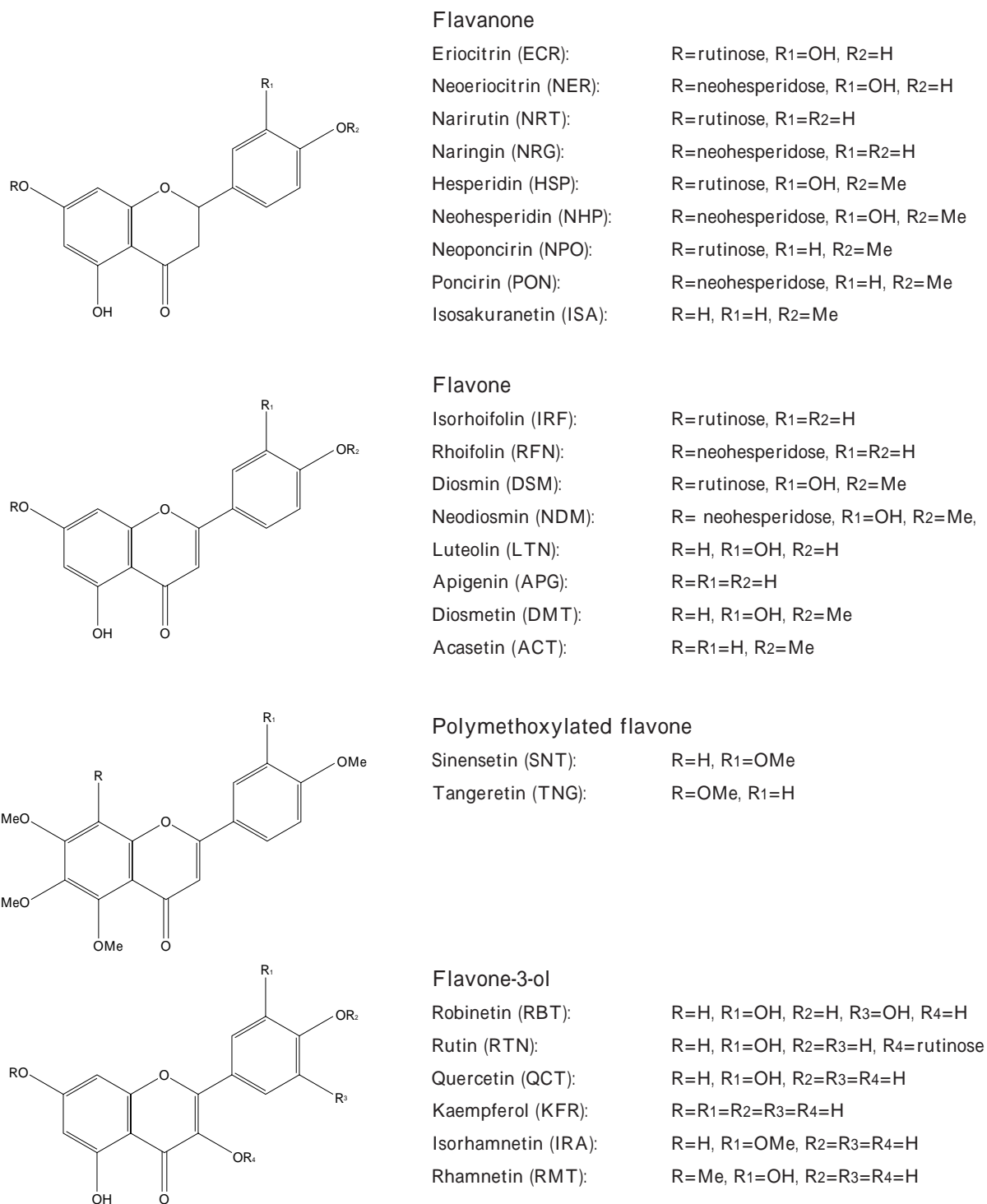


Fig. -1 Structures of flavonoids investigated.

保持時間 (t_R) とその標準偏差 (S. D.), キャパシティーファクター (k'), 比保持値 (k''), 吸収極大波長 (λ_{max}) を示す. パラメーターの k' と k'' は保持時間の値より以下のように求められる.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0, \quad k'' = k' / k'_1$$

ここで, t_R = 成分の保持時間, t_0 = 保持されない

溶媒ピークの出現時間, k'_2 = 成分2のキャパシティーファクター, k'_1 = 成分1のキャパシティーファクターである. 一般的に, 比保持値が大きければピークトップの分離状態が良いと判断されるが, 保持時間の長短やピーク形状にも依存する.

フラボノイドの保持時間の標準偏差は, いずれも

0.02 - 0.10分の範囲に収まっており、保持時間には依存しなかった。従って、各スタンダードの保持時間に対する標準偏差の比は、保持時間が長くなればなるほど減少した。例えば、最初に溶出する ECR では0.284%であり、最後に溶出する TNG では0.047%であった。この結果から、保持時間が長くなればなるほど成分の同定はより正確になる傾向にあること意味した。成分のピーク幅に関して、60分以降に溶出する成分はそれ以前のものよりも狭くなる傾向であった。60分よりも前に溶出する成分、例えば RTN と HSP のベースライン分離には比保持値が少なくとも1.05は必要であった。一方、ACT と TNG は、比保持値が1.03であったが、定量のために十分な程度に分離した (Fig. -1)。

スタンダードの溶出順は、RTN が HSP の直後に溶出することを除き、Daigle と Conkerton の報告³⁸⁾と同じであった (Table -1)。Van de Castele の分析手法³⁹⁾では、NRG, RTN, HSP, そして NHP の保持時間が15.71, 15.76, 16.3, 16.62であり分離は不十分であった。我々の条件では、これら主

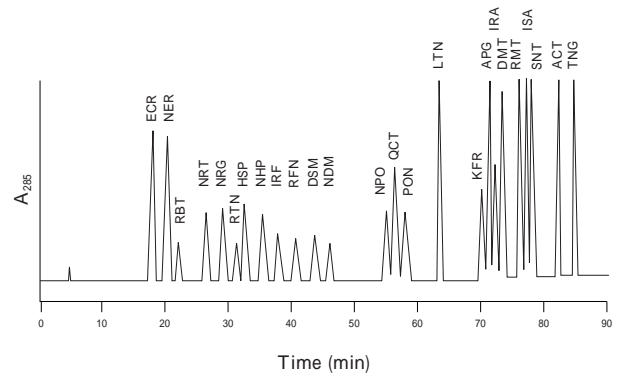


Fig. -2 Separation profiles of flavonoid standards.

要なフラボノイド分離状態は定量のためには十分であった (Fig. -2, Table -1)。

この実験で検討した各フラボノイドスタンダードのメタノール中における UV 吸収の極大値はすでに報告されている^{45, 46)}。分離中のそれぞれのスタンダードの吸収極大値とメタノール溶液での極大値との差は 3 nm 以下であった。それゆえ、近接するピークの同定は保持時間と UV スペクトルの比較で、より確実なものとなった。

Table -1 Retention times (t_R), capacity factors (k'), relative retentions () and UV absorbance maxima (λ_{max}) of the flavonoids investigated

No.	Common name	Systematic name	$t_R \pm S.D.^a$	k'		λ_{max}^b
1	ECR	Eriodictyol-7_-rutinoside	17.59 \pm 0.05	2.84		285
2	NER	Eriodictyol-7_-neohesperidoside	19.85 \pm 0.05	3.33	1.17	285
3	RBT	3,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavone	21.81 \pm 0.07	3.76	1.13	251, 318
4	NRT	Naringenin-7_-rutinoside	25.97 \pm 0.07	4.67	1.24	282
5	NRG	Naringenin-7_-neohesperidoside	28.81 \pm 0.07	5.29	1.13	284
6	RTN	Quercetin-3_-rutinoside	30.81 \pm 0.07	5.73	1.08	258, 360
7	HSP	Hesperetin-7_-rutinoside	32.09 \pm 0.08	6.01	1.05	285
8	NHP	Hesperetin-7_-neohesperidoside	34.95 \pm 0.08	6.63	1.10	284
9	IRF	Apigenin-7_-rutinoside	37.33 \pm 0.08	7.15	1.08	267, 336
10	RFN	Apigenin-7_-neohesperidoside	40.27 \pm 0.08	7.79	1.09	268, 336
11	DSM	Diosmetin-7_-rutinoside	43.17 \pm 0.07	8.43	1.08	253, 268, 345
12	NDM	Diosmetin-7_-neohesperidoside	46.11 \pm 0.06	9.07	1.08	255, 268, 345
13	NPO	Isosakuranetin-7_-rutinoside	54.64 \pm 0.06	10.93	1.21	284
14	QCT	3,3',4',5,7,-Pentahydroxyflavone	56.32 \pm 0.10	11.30	1.03	256
15	PON	Isosakuranetin-7_-neohesperidoside	57.65 \pm 0.06	11.59	1.03	284
16	LTN	3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone	62.93 \pm 0.06	12.74	1.10	242, 256, 351
17	KFR	3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone	70.02 \pm 0.02	14.29	1.12	253, 266
18	APG	4', 5,7-Trihydroxyflavone	71.55 \pm 0.06	14.62	1.02	269, 335
19	IRA	3,4',5,7-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavone	72.01 \pm 0.08	14.72	1.01	253
20	DMT	3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavone	73.25 \pm 0.04	14.99	1.02	252, 268, 347
21	RMT	3,5,3',4'-Tetrahydroxy-7-methoxyflavone	76.51 \pm 0.03	15.71	1.05	256
22	ISA	5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavone	77.28 \pm 0.05	15.87	1.01	282
23	SNT	3',4',5,6,7-Pentamethoxyflavone	77.84 \pm 0.06	16.00	1.01	240, 265, 326
24	ACT	5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavone	82.19 \pm 0.04	16.95	1.06	269, 301, 329
25	TNG	4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone	84.88 \pm 0.04	17.53	1.03	271, 322

^a Mean values and standard deviations of retention times for five replications.

^b Measured in the eluate, the composition of which varies with t_R

Table -2 Relationships between flavonoid levels and peak areas of flavonoids investigated

Flavanones					Flavones					Flavon-3-ols				
No.	Compound	$a \times 10^6 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	$b \times 10^3 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	r^b	No.	Compound	$a \times 10^6 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	$b \times 10^3 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	r^b	No.	Compound	$a \times 10^6 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	$b \times 10^3 \text{ } ^\circ \text{ } ^\circ$	r^b
1	ECR	2.89	2.50	0.999	9	IRF	1.27	-0.73	0.999	3	RBT	0.74	-3.22	1.000
2	NER	2.41	-3.56	0.999	10	RFN	1.01	-0.36	0.999	6	RTN	0.65	-13.63	0.988
4	NRT	2.37	2.36	0.999	11	DSM	1.23	-1.82	0.997	14	QCT	1.11	-8.32	1.000
5	NRG	2.20	-2.30	0.999	12	NDM	1.04	-3.69	1.000	17	KFR	1.47	-1.64	1.000
7	HSP	2.21	-9.31	1.000	16	LTN	2.00	10.82	0.999	19	IRA	1.63	-15.79	1.000
8	NHP	1.54	5.13	0.999	18	APG	3.22	0.72	1.000	21	RMT	1.41	-8.00	0.999
13	NPO	1.54	5.13	0.999	20	DMT	2.23	-1.82	0.997					
15	PON	1.46	5.75	0.999	23	SNT	2.40	9.27	0.999					
22	ISA	3.17	8.29	1.000	24	ACT	3.39	-4.63	1.000					
					25	TNG	3.12	-0.73	0.999					

^a Coefficients of the regression equation $y = ax + b$, where x is flavonoid concentration (ppm) and y is peak area for concentrations ranging from 10 to 100 ppm.

^b Correlation coefficients of the regression equation.

(2) 定量分析

フラボノイドの濃度とピーク面積の直線性を確かめるために、各スタンダードを10, 25, 50, 100, 200ppmで調製し、285nmの吸収値から得られるピークの面積値との回帰を解析した。Table -2に a , b , r 値を示す。ここで、 a および b は回帰式 $y = ax + b$ の係数であり、 x はフラボノイドの濃度(ppm)、 y はピーク面積、そして r は相関係数である。10 - 200ppmの範囲において、全てのスタンダードの直線性は良く($r = 0.988 - 1.000$)、Beerの法則に従った。検出限界はノイズピークの最大面積値とその面積値におけるスタンダード濃度を比較することで求めた。最も低いものはAPGやACTの0.5ppmであり、最も高いものはRTNとRBTの2.5ppmであった。これらの結果、設定した方法はフラボノイドの定量性や感度において十分に信頼できるものと考えられた。

(3) 回収率

既知濃度の4種類のフラボノイドスタンダードを

用いて、ウンシュウとヒラドブントンのアルベド、ならびにジュースについて回収率を調べた。抽出溶媒としてメタノール-DMSO(1:1)を用いたが、これはHSPやその他のフラボノイドの溶解性が低いためである。例えば、HSPは室温でメタノールには200ppmの濃度で溶解しない。また、DSMやDMTはメタノールにはほとんど溶解しない。一方、メタノール-DMSO(1:1)溶媒は、HSPを3,000ppm、DMTを400ppmで溶解する。

添加したスタンダードの回収率をTable -3に示す。ECRに関しては、回収率が101.9 - 102.8%で標準偏差は2.2 - 2.5%、TNGでは、回収率が99.7 - 103.1%で標準偏差が2.9 - 3.3%であることから、両者ともにセブパックに残存することは無いと判断された。HSPはウンシュウの、NRGはヒラドブントンの主要なフラボノイドである³¹⁾。HSPの回収率は、ウンシュウのアルベドおよびジュースがヒラドブントンの場合よりもバラツキが大きく、逆にNRGの場合、ヒラドブントンのアルベドおよびジュースがウンシ

Table -3 Recoveries of eriocitrin, naringin, hesperidin and tangeretin from albedo and juice samples of Satsuma (*C. unshiu*) and Hirado buntan (*C. grandis* cv. Hirado)

Compound	Mean recovery \pm S.D. ^a (%)			
	Satsuma		Hirado buntan	
	albedo	juice vesicle	albedo	juice vesicle
ECR	102.5 \pm 2.4	102.8 \pm 2.5	101.9 \pm 2.3	102.7 \pm 2.2
NRG	97.5 \pm 3.7	96.9 \pm 3.8	98.5 \pm 4.1	98.2 \pm 3.9
HSP	101.6 \pm 5.7	104.9 \pm 6.0	98.5 \pm 4.1	98.2 \pm 3.9
TNG	103.1 \pm 3.1	103.0 \pm 3.3	99.7 \pm 2.9	102.3 \pm 3.1

For operating conditions, see text.

^a Mean values and standard deviations for five replications.

ユウよりも大きかった。この結果は、添加濃度に対して内在成分の濃度が同等または高いために、回収率が内在成分濃度の定量誤差に影響されたものと推察された。以上の結果、フラボノイドの回収率には特に問題がないことが明らかになった。

(4) 適用

設定した分析条件の応用として、ウンシュウとヒラドブントンのフラボノイド含量を分析した。果実の各部位および葉における生重量グラムあたりの含量を Table 4 に示す。UV 吸収スペクトルが計測できないほど小さいピークは、スタンダードと保持時間が一致しても定量しなかった。ウンシュウに関して、西浦らは TLC で数種のカンキツ果実の 5 つの部位における 10 種類のフラバノングルコシドの存在と分布を分析した^{30, 31)}。それによると、当果実の主要なフラボノイドは HSP と NRT であった。我々の HPLC 分析でも同様の結果であり、これらは保持時間と UV 吸収スペクトルパターンで同定、定量された。葉における NRT 含量は果実の含量よ

りも極めて低い値となったが、西浦らも同様の結果を報告している³¹⁾。フラベドには極性の低いフラボノイドがより高濃度に分布する傾向が認められた。また、主要なフラボノイドであるフラバノンをはじめとして、フラボノイドが最も高濃度に分布する部位はアルベドであり、濃度の低いジュース部位の約 100 倍多く含まれた。葉は、他の部位と比べてフラボンやフラボノール類を高濃度に含有した。一方、ジュースやじょうのう膜におけるこれらの存在は極微量であった。

ヒラドブントンに関しては、NRG, RFN, NHP が主要なフラボノイドであった³⁰⁾。フラボンやフラボノールはウンシュウと同じく葉における存在量が大きかった。フラベドにおけるフラボノイドの濃度はウンシュウと比較して極めて低い値であったが、逆に、じょうのう膜や果汁における含量は、より豊富であった。このように、フラボノイド組成や各組織における分布および含量が種により大きく異なることが、数値化されることで明白になった。RBT,

Table 4 Contents of flavonoids in flavedo, albedo, segment membrane, juice vesicle, and leaf samples of Satsuma and Hirado buntan

No.	Compound	Content ^a (mg/g fresh weight)									
		Satsuma					Hirado buntan				
		flavedo	albedo	segment membrane	Juice vesicle	Leaf	flavedo	albedo	segment membrane	Juice vesicle	Leaf
1	ECR	0.020	0.028	0.018	0.002	0.123	- ^b	-	-	-	-
2	NER	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	0.130
4	NRT	0.745	4.938	2.896	0.154	0.084	0.026	0.015	0.014	-	0.141
5	NRG	-	-	-	-	-	1.363	13.952	11.187	0.785	4.013
6	RTN	0.126	<i>tr</i> ^c	<i>tr</i>	0.029	1.170	0.053	-	-	-	0.975
7	HSP	9.452	21.030	4.225	0.087	9.155	-	0.011	0.013	0.017	-
8	NHP	-	-	-	-	-	0.074	0.120	0.060	0.015	0.671
9	IRF	0.048	0.029	-	-	0.681	-	-	-	-	-
10	RFN	0.101	0.026	-	-	0.441	0.105	0.161	0.061	0.056	2.323
11	DSM	0.044	0.020	-	0.014	0.775	0.036	-	-	0.006	0.119
12	NDM	0.019	0.023	-	-	0.282	-	0.028	0.023	0.011	-
13	NPO	0.195	0.871	0.343	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0.015	0.064	0.052	<i>tr</i>	-
15	PON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>tr</i>
16	LYN	-	-	-	-	-	0.019	0.011	-	<i>tr</i>	0.058
17	KFR	0.017	-	-	-	<i>tr</i>	-	-	-	-	-
18	APG	0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	DMT	0.057	-	-	-	-	0.017	-	-	-	-
23	SNT	0.022	-	-	-	0.031	0.021	-	0.014	<i>tr</i>	-
24	ACT	0.025	<i>tr</i>	<i>tr</i>	-	0.076	-	-	-	-	-
25	TNG	0.076	0.019	-	-	0.117	0.078	-	-	-	-
	Total	10.955	7.482	0.286	0.286	12.935	1.807	14.362	11.424	0.910	8.430

^a Mean values for four replications.

^b not detected.

^c *tr*, trace amount, not measurable in UV spectra.

QCT, IRA, RMT, そしてISAは, 検討した果実品種には含まれなかった。

3 カンキツ果実のフラボノイド組成と品種の評価・判別

1) 序

一般にカンキツ類は, ミカン科・ミカン亜科のカンキツ属 (*Citrus*), キンカン属 (*Fortunella*), そしてカラタチ属 (*Poncirus*) に含まれる種を指し, これら以外も含めてミカン亜科植物は33属から成り立つ。このうち, 食用に用いられているのはカンキツ属とキンカン属の一部である。カンキツ属にはレモン類, プンタン類, マンダリン類やこれらの相互交雑種が含まれて多様な品種群を構成している。種の分類に関して, 田中はカンキツ属を初生カンキツ亜属と後生カンキツ亜属とに二大別し, 28の分類区とこれに属する159種に分類番号を付する方式を提唱した²¹⁾。また, Swingleはカンキツ属をパペダ亜属と真生カンキツ亜属とに二大別し, カンキツ属を16の種と8つの変種に分類する大種的な分類法を提唱した⁴⁷⁾。近年, DNA マーカー技術の進展に伴い, RAPD (random amplified polymorphic DNA)⁴⁸⁾, ISSR (inter-simple sequence repeat)⁴⁹⁾ ならびにRFLP (restriction fragment polymorphism)⁵⁰⁾等の手法がカンキツの分類, 系譜解析に利用されてきた。最近では, ISSR⁵¹⁾やCAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)⁵²⁾法により品種を判別する手法も報告されている。しかし, 検定の対象品種が明らかな場合は優れた判別能力をもつが, 品種が想定できない場合は判別に困難を要するのが現状である。一方, カンキツ類の特徴として, 多様なフラボノイド成分を含有することが挙げられる。これに着目し, フラボノイド組成と品種との関係が検討されてきた^{31), 53), 54)}。しかし, パターンの比較や限られた成分の解析に留まっており, 品種判別には十分とは言えない。近年, 分析機器の発達により, 多数のフラボノイドを精度良く定量することが可能になった。また, 緒言で述べたようにカンキツのフラボノイドに様々な生理機能が報告されている。それゆえ, 種や系統におけるフラボノイド組成のデータベースを構築すれば, 品種判別に加え, 特定成分の有効利用や育種への応用にも役立てられる

と考えられる。本節では, カンキツ45種のフラボノイド組成を明らかにするとともに, その主成分分析に基づく品種判別の可能性について考察した。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

カンキツの各果実は, 果樹研究所カンキツ研究部より提供を受けた。果実は適熟期に収穫後, 直ちに果皮, フラベド, アルベド, じょうのう膜, 果肉に分けて -20℃ で保存した。

(2) 供試試薬, 機器

フラボノイドはフラバノン8種, フラボン9種, このうちPMF4種の計17種を測定した。これらの構造をFig. 3に示す。ノビレチン (NOB) は和光純薬から購入した。ヘプタメトキシフラボン (HPM) は果樹研究所カンキツ研究部品質機能研究室より提供を受けた。その他の試薬, 機器は前節に準じた。

(3) サンプル調製, HPLC条件

サンプルの調製および実験方法は前節に準じた。果実当たりの含量は, フラベド, アルベド, じょうのう膜, および果汁含量と各部位の重量から算出した。

(4) 主成分分析

主成分分析にはStatistica ver.4.5 (Stat Soft社)を用い, 相関行列に基づいて行った。各部位について主成分スコアを平面プロットし種の分布状態を調べた。樹形図は組成データを標準化後, 群平均法 (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) により作成した。

3) 実験結果および考察

(1) 分類区の組成

供試したカンキツ45種を田中の手法で分類したものをTable 5に示す。また, 定量分析の結果をTable 6 ~ 11に示す。部位による含量差はあるものの, 同一種の各部位における組成は果肉を除いて概ね共通した。アルベドにおける含量 (Table 7) をみると, カブヤオ (#1), ベルガモット (#4), サワーオレンジ (#17), カラタチ (#45)等のフラボノイド組成は特殊であり, シトロン (#6) は例外的に含量が少なかった。各分類区の特徴は, ライム区 () に属する種はHSPおよびNDMを含み, シトロン区 () に属する種はHSPを含

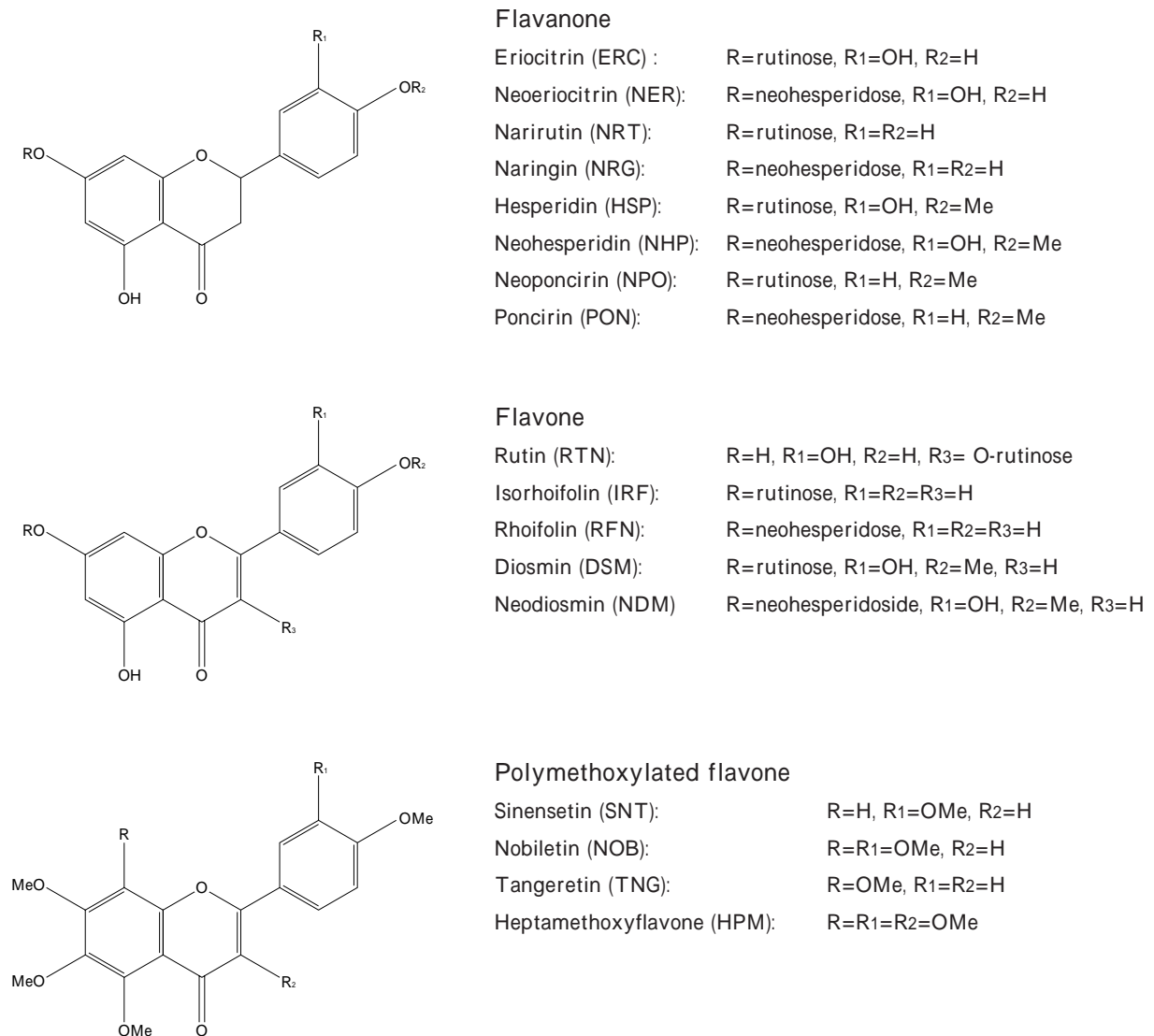


Fig. -3 Structures of flavonoids investigated.

むが NDM を含まなかった。ザボン区 () の各種は NRG, NHP, および RFN を含んだ。ユズ区 () の各種は NRG, HSP, および NHP をそれぞれ 50 mg 以上含むことが特徴的であった。ミカン区 () の各種は, HSP, NOB, および TNG に富んだ。一方, ダイダイ区 () の種は, いずれの種も若干量の NOB および TNG を含んだが, NRG, HSP, NHP の有無により, ザボン区のパターンに近いもの (# 15, 17), ミカン区のそれに近いもの (# 18 ~ 22), いずれにも当てはまらないもの (# 16) に分かれた。アルペドにおいて 7 種類のフラボノイド成分の有無により各分類区を分けたところ, ミカン区 () とダイダイ区 () およびライム区の一部の種が同一グループに分類され, また, 他のダイ

ダイ区およびライム区品種は異なるグループに分類された。一方, 他の分類区品種は比較的良好に分類された (Fig. -4)。この結果から, ミカン区と重なるダイダイ区の一部 (# 18 ~ 22) やシトロン区の一部 (# 3, 5) 等を除き, アルペドのフラボノイド組成で分類区や特異的組成をもつ種のおおまかな識別は可能であった。

(2) 部位別の含量

フラバノンの総量は, カブヤオ (# 1), キンカン属 (102), カラタチ (# 45) ではじょうのう膜において最も多かったが, その他の分類区ではアルペドにおける含量が大きい傾向にあった (Table - 12)。ミカン区 () では, アルペド, フラベド, じょうのう膜, 果肉の順であり, シトロン区 ()

Table 5 Classification of citrus plants investigated for flavonoid content^a

specimen	Tanaka's no.	ref. #	common name	scientific name
<i>Citrus-Archicitrus</i>				
<i>Papeda</i>				
<i>Acutifolia</i>	I-1-1	1	Cabuyao C. macroptera	<i>C. macroptera</i>
<i>Obtusifolia</i>			^b	
<i>Longipetiolata</i>				
<i>Limonellus</i>				
<i>Eulimonellus</i>	II-4-13	2	Mexican lime	<i>C. aurantifolia</i>
	II-4-14	3	Tahiti lime	<i>C. latifolia</i>
<i>Megacarpa</i>	II-5-17	4	Bergamot	<i>C. bergami</i>
<i>Pseudopapeda</i>	II-6-29	5	Biroro	<i>C. montana</i>
<i>Citrophorum</i>				
<i>Citroides</i>	III-7-31	6	Citron	<i>C. medica</i>
<i>Limonioides</i>	III-8-36	7	Eureka lemon	<i>C. limon</i>
	III-8-38	8	Sweet lemon	<i>C. limetta</i>
<i>Decumanooides</i>	III-9-48	9	Lumie	<i>C. lumia</i>
<i>Cephaecitrus</i>				
<i>Decumana</i>	IV-10-56	10	Hirado buntan	<i>C. grandis</i> cv. <i>Hirado</i>
	IV-10-61	11	Shaten yu	<i>C. grandis</i> cv. <i>Shytian you</i>
<i>Intermedia</i>				
<i>Flavicarpa</i>	IV-11-62	12	Marsh grapefruit	<i>C. paradisi</i>
	IV-11-63	13	Kinukawa	<i>C. glaberrima</i>
<i>Aureocarpa</i>	IV-12-74	14	Hassaku	<i>C. hassaku</i>
<i>Aurantium</i>				
<i>Medioglobosa</i>	V-13-78	15	Natsudaikai	<i>C. natsudaikai</i>
	V-13-84	16	Sanbokan	<i>C. sulcata</i>
<i>Aurantioides</i>				
<i>Racemosa</i>	V-14-93	17	Sour orange	<i>C. aurantium</i>
<i>Contracta</i>				
<i>Sinensoides</i>	V-16-100	18	Valencia	<i>C. sinensis</i> cv. <i>Valencia</i>
	V-16-100	19	Morita navel	<i>C. sinensis</i> var. <i>Brasiliensis</i> cv. <i>Morita</i>
	V-16-105	20	Iyo	<i>C. iyo</i>
<i>Osmocitroides</i>				
<i>Tenuicarpa</i>	V-17-107	21	Hyuganatsu	<i>C. tamurana</i>
<i>Compacta</i>				
<i>Paranobilis</i>	V-19-111	22	Shunkokan	<i>C. shunkokan</i>
<i>Citrus-Metacitrus</i>				
<i>Osmocitrus</i>				
<i>Protosmocitrus</i>				
<i>Euosmocitroides</i>	VI-21-113	23	Yuzu	<i>C. junos</i>
	VI-21-115	24	Sudachi	<i>C. sudachi</i>
	VI-21-121	25	Kabosu	<i>C. sphaerocarpa</i>
<i>Pseudoacrumen</i>				
<i>Acrumen</i>				
<i>Euacrumen</i>	VII-23-123	26	King	<i>C. nobilis</i> var. <i>Knep</i>
	VII-23-124	27	Satsuma	<i>C. unshiu</i>
	VII-23-125	28	Yatsushiro	<i>C. yatsusiro</i>
<i>Microacrumen</i>				
<i>Anisodora</i>	VII-24-126	29	Keraji	<i>C. keraji</i>
	VII-24-127	30	Oto	<i>C. oto</i>
<i>Citroidora Megacarpa</i>	VII-25-130	31	Ponkan	<i>C. reticulata</i>
	VII-25-133	32	Dancy tangerine	<i>C. tangerine</i>
	VII-25-134	33	Clementine	<i>C. clementina</i>
	VII-25-136	34	Jimikan	<i>C. succosa</i>
	VII-25-140	35	Shikaikan	<i>C. suhuiensis</i>
<i>Microcarpa Angustifolia</i>				
	VII-26-143	36	Tachibana	<i>C. tachibana</i>
	VII-26-144	37	Kobenimikan	<i>C. erythroa</i>
	VII-26-145	38	Kishu	<i>C. kinokuni</i>
<i>Latifolia</i>				
	VII-27-148	39	Sunki	<i>C. sunki</i>
	VII-27-153	40	Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>
	VII-27-154	41	Koji	<i>C. leiocarpa</i>
<i>Pseudofortunella</i>	VIII-28-159	42	Shikikitsu	<i>C. madurensis</i>
<i>Fortunella-Eufortunella</i>	102-302	43	Meiwa kumquat	<i>F. crassifolia</i>
	102-304	44	Nagami kumquat	<i>F. margarita</i>
<i>Poncirus</i>	103-401	45	Trifoliolate orange	<i>P. trifoliata</i>

^a The classification and the nomenclature of Citrus plants were based on Tanaka's system.

^b; not investigated.

では、シトロン(# 6)を除き、アルベド、じょうのう膜、フラベド、果肉の順であった。その他の分類区では、統一した傾向は認められなかった。フラボンの総量は、フラバノンの場合とは異なり、全体を通してフラベドにおいて多い傾向にあった。ダイ

ダイ区()ならびにミカン区()果実はNOB、TNG等のPMFをフラベドに多く含み、ライム区()やシトロン区()果実は、IRF、DSM、NDM等のフラボン配糖体をアルベドおよびフラベドに多く含有した。ミカン区()果実では各部位

Table -12 Flavanone and flavone contents in each tissue and fruit

ref. #	name	flavanones					flavones				
		flavedo	albedo	segment membrane	juice vesicle	fruit	flavedo	albedo	segment membrane	juice vesicle	fruit
1	Cabuyao	165 (4)	786 (3)	1720 (1)	1010 (2)	954	458 (1)	66.8 (4)	105 (2)	90.3 (3)	146
2	Mexican lime	173 (3)	432 (2)	521 (1)	47.6 (4)	213	75.1 (2)	80.8 (1)	27.2 (3)	9.9 (4)	29.8
3	Tahiti lime	6892 (2)	2040 (1)	0.0 (-)	110 (3)	439	119 (2)	154 (1)	0.0 (-)	21.1 (3)	48.3
4	Bergamot	476 (4)	2590 (2)	612 (3)	3580 (1)	2580	314 (1)	45.7 (4)	76.0 (2)	116 (3)	124
5	Biroro	698 (3)	1770 (1)	975 (2)	8.9 (4)	894	127 (1)	110 (2)	21.3 (4)	73.1 (3)	63.6
6	Citron	0.6 (4)	4.9 (3)	10.2 (2)	26.7 (1)	9.8	9.2 (2)	2.8 (4)	8.7 (3)	21.5 (1)	8.0
7	Eureka lemon	265 (3)	1100 (1)	629 (2)	146 (4)	469	56.0 (2)	92.8 (1)	26.5 (3)	7.7 (4)	38.2
8	Sweet lemon	254 (3)	876 (1)	588 (2)	63.3 (4)	281	56.1 (2)	81.7 (1)	24.6 (3)	6.5 (4)	24.8
9	Lumie	152 (3)	1040 (1)	483 (2)	95.2 (4)	265	88.4 (1)	73.7 (2)	15.8 (3)	8.9 (4)	28.5
10	Hirado buntan	150 (3)	1420 (1)	1130 (2)	83.7 (4)	628	32.3 (1)	19.8 (2)	7.5 (4)	15.6 (3)	38.8
11	Shaten yu	26.6 (4)	414 (2)	676 (1)	187 (3)	302	8.5 (4)	22.5 (3)	37.9 (2)	122 (1)	63.0
12	Marsh grapefruit	1310 (4)	3600 (1)	1580 (3)	1810 (2)	1870	66.5 (1)	25.3 (3)	13.3 (4)	30.6 (2)	34.3
13	Kinukawa	320 (3)	987 (1)	575 (2)	194 (4)	438	87.6 (1)	33.5 (2)	12.6 (4)	23.9 (3)	30.9
14	Hassaku	172 (4)	1030 (2)	1260 (1)	354 (3)	613	38.5 (1)	16.9 (3)	11.9 (4)	22.7 (2)	21.2
15	Natsudaidai	270 (4)	1360 (1)	1220 (2)	429 (3)	653	25.3 (2)	31.0 (1)	1.0 (4)	22.3 (3)	21.4
16	Sanboku	403 (4)	2430 (2)	948 (3)	245 (1)	936	78.8 (1)	35.7 (2)	23.6 (3)	0.0 (-)	22.3
17	Sour orange	1910 (2)	4030 (1)	1510 (3)	1490 (4)	2180	185 (2)	229 (1)	22.2 (4)	74.1 (3)	113
18	Valencia	527 (3)	2490 (1)	1450 (2)	176 (4)	1200	149 (1)	9.2 (3)	6.6 (4)	22.2 (2)	38.2
19	Morita navel	1260 (3)	3240 (1)	1450 (2)	230 (4)	866	122 (1)	10.2 (3)	6.2 (4)	15.4 (2)	26.4
20	Iyo	442 (3)	1680 (1)	1050 (2)	309 (4)	667	87.8 (1)	9.9 (2)	0.0 (-)	0.0 (-)	10.9
21	Hyuganatsu	155 (4)	764 (1)	414 (2)	198 (3)	368	153 (1)	16.3 (2)	1.8 (3)	0.5 (4)	21.6
22	Shunkokan	1300 (3)	2620 (2)	2810 (1)	864 (4)	1860	344 (1)	129 (2)	35.1 (4)	60.9 (3)	93.2
23	Yuzu	258 (4)	772 (1)	304 (3)	766 (2)	411	20.7 (1)	4.9 (2)	3.5 (3)	0.0 (-)	10.6
24	Sudachi	138 (3)	730 (1)	83.4 (4)	334 (2)	300	19.8 (2)	235 (1)	3.5 (4)	10.7 (3)	66.6
25	Kabosu	82.3 (3)	811 (1)	280 (2)	81.0 (4)	279	28.1 (2)	252 (1)	20.6 (3)	0.0 (-)	68.1
26	King	3550 (1)	2300 (2)	1000 (3)	481 (4)	988	88.1 (1)	14.0 (3)	2.7 (4)	19.9 (2)	23.1
27	Satsuma	1040 (2)	2690 (1)	748 (3)	24.3 (4)	562	59.8 (1)	15.2 (2)	0.0 (-)	1.4 (3)	18.0
28	Yatsushiro	364 (3)	1440 (1)	478 (2)	14.0 (4)	312	121 (1)	17.4 (2)	0.0 (-)	1.6 (3)	16.3
29	Keraji	104 (3)	626 (1)	318 (2)	39.7 (4)	256	278 (1)	98.8 (2)	8.8 (4)	12.0 (3)	79.7
30	Oto	241 (3)	1330 (1)	454 (2)	20.0 (4)	264	61.8 (1)	9.3 (2)	0.0 (-)	0.0 (-)	11.5
31	Ponkan	839 (3)	1930 (1)	1540 (2)	155 (4)	682	470 (1)	94.6 (2)	18.7 (3)	4.0 (4)	77.4
32	Dancy tangerine	2750 (2)	5150 (1)	988 (3)	32.7 (4)	674	922 (2)	182 (2)	33.3 (3)	0.9 (4)	65.3
33	Clementine	1770 (2)	2600 (1)	1290 (3)	41.7 (4)	703	370 (1)	30.6 (2)	3.2 (3)	1.2 (4)	38.2
34	Jimikan	1650 (2)	3390 (1)	677 (3)	80.6 (4)	750	586 (1)	68.4 (2)	2.8 (3)	1.0 (4)	82.0
35	Shikaikan	768 (2)	3010 (1)	749 (3)	44.7 (4)	579	106 (1)	77.7 (2)	10.1 (3)	4.7 (4)	25.8
36	Tachibana	590 (2)	1320 (1)	403 (3)	0.0 (-)	346	433 (1)	97.9 (2)	3.2 (4)	33.7 (3)	116
37	Kobenimikan	430 (3)	1734 (1)	653 (2)	27.9 (4)	431	332 (1)	118 (2)	7.6 (3)	5.7 (4)	61.4
38	Kishu	1850 (2)	2780 (1)	873 (3)	32.1 (4)	782	341 (1)	179 (2)	39.4 (3)	2.5 (4)	90.0
39	Sunki	1270 (2)	2110 (1)	1260 (3)	280 (4)	810	319 (1)	168 (2)	22.5 (4)	30.8 (3)	87.9
40	Shiikuwasha	622 (2)	1600 (1)	345 (3)	21.1 (4)	422	226 (1)	76.5 (2)	5.9 (3)	3.3 (4)	55.7
41	Koji	724 (2)	2210 (1)	402 (3)	334 (4)	459	294 (1)	65.9 (2)	2.4 (3)	0.8 (4)	27.5
42	Shikikitsu	360 (3)	544 (2)	326 (4)	610 (1)	480	74.6 (1)	21.4 (2)	4.3 (4)	17.4 (3)	23.2
43	Oval kumquat	379 (3)	347 (4)	822 (1)	685 (2)	451	4.7 (3)	1.9 (4)	6.8 (1)	6.7 (2)	3.9
44	Meiwa kumquat	233 (3)	223 (4)	377 (1)	484 (2)	318	1.5 (4)	14.9 (1)	3.3 (2)	2.5 (3)	4.6
45	Trifoliate orange	274 (4)	3500 (2)	4300 (1)	1490 (3)	2860	58.4 (1)	31.1 (3)	24.9 (4)	43.4 (2)	48.6

mg/100 g fresh weight. Number in parenthesis represents the order of concentration of flavonoid in fruit tissues.

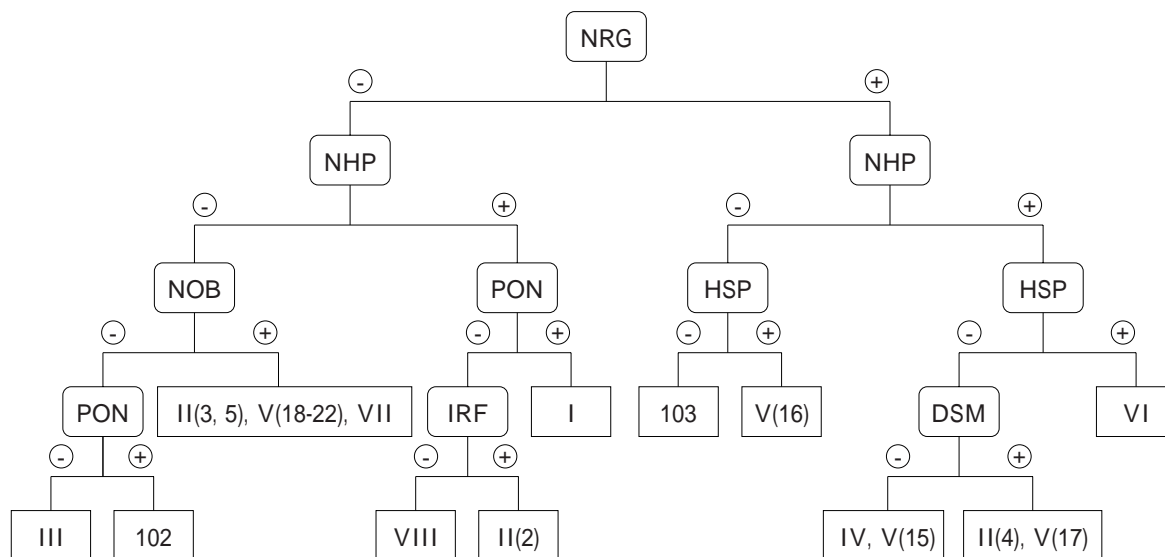


Fig. -4 Classification of Citrus species by inclusion pattern of seven flavonoids in albedo tissue. Species containing not less than 1 mg/100 g for each flavonoid was judged as positive except NRG and HSP, both of which were judged at the level of 50 mg/100 g. For the identity of species, see Table - 5.

におけるフラボン含量においても統一した傾向が認められ、フラベド、アルベド、じょうのう膜、果肉の順に多かった。ミカン区果実の果肉におけるフラ

ボノイド総含量は他区果実よりも低い傾向にあり、ERC, NER, NRT, NRG等水溶性の高いものが含有されていた。

(3) 主成分分析

各部位における主成分の固有値と因子負荷量を Table 13および Table 14に示す。因子負荷量の絶対値が0.6以上の因子をみると、アルベドと果皮のパターンは類似しており、果皮のフラボノイド組成はアルベドの影響をより強く受けることが判った。また、フラベド、じょうのう膜、および果実においても第1主成分はアルベドのパターンと類似す

る因子が多く、アルベドの組成が主成分分析の主体になることが考えられた。第1主成分において因子負荷量の絶対値の大きい成分は、NER、NRG、NHP、PON、RFNなどネオヘスペリドースをもつフラボノイドであり、各部位で共通した。一方、果肉では、第2主成分以下で他の部位と異なる因子負荷量をもつ成分が多くみられた。この理由として果肉のフラボノイド組成は、他部位と比較して水溶性

Table 13 Principal components and factor loadings for the flavonoids of flavedo, albedo, and peel tissues

	flavedo principal component					albedo principal component					peel principal component				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
eigenvalue	4.25	2.84	1.76	1.63	1.42	4.33	2.57	1.80	1.36	1.24	4.70	2.56	1.89	1.29	1.14
%	25.01	16.74	10.32	9.60	8.34	25.50	15.15	10.61	7.99	7.27	27.62	15.04	11.15	7.60	6.69
cum %	25.01	41.75	52.08	61.68	70.02	25.50	40.64	51.25	59.24	66.51	27.62	42.66	53.81	61.41	68.09
factor loading															
ERC	-0.06	0.10	-0.19	-0.41	0.57	-0.21	-0.34	-0.55	-0.17	0.42	-0.18	0.02	-0.52	-0.51	-0.38
NER	0.82	0.39	-0.05	0.29	0.10	0.68	0.23	-0.25	-0.17	0.10	0.72	-0.40	-0.07	-0.17	0.10
NRT	-0.14	-0.16	-0.80	-0.10	0.23	-0.22	-0.25	0.00	0.78	0.03	-0.16	0.23	0.00	-0.75	-0.07
NRG	0.59	0.04	-0.29	-0.09	-0.27	0.73	0.10	0.03	-0.02	-0.15	0.71	-0.10	0.15	-0.06	0.05
HSP	-0.49	0.57	0.17	0.16	-0.24	-0.66	0.46	-0.21	-0.18	-0.14	-0.66	-0.55	-0.01	-0.08	0.24
NHP	0.81	0.24	-0.12	-0.20	-0.33	0.83	0.24	-0.20	-0.14	0.21	0.82	-0.35	0.05	-0.11	0.02
NPO	-0.42	0.40	-0.63	-0.04	0.10	-0.43	0.40	-0.03	-0.46	0.27	-0.47	-0.40	0.24	-0.43	-0.14
PON	0.75	0.25	-0.15	-0.38	-0.40	0.55	0.12	-0.03	0.07	-0.33	0.65	-0.22	0.02	0.05	-0.04
RTN	0.70	0.33	0.03	0.32	0.21	0.16	-0.12	0.13	0.13	0.70	0.33	0.06	-0.02	0.02	-0.53
IRF	-0.16	0.51	0.35	-0.36	0.13	-0.23	-0.36	-0.64	-0.09	-0.27	-0.22	-0.17	-0.81	0.12	0.17
RFN	0.64	0.21	-0.07	0.56	0.25	0.77	0.28	-0.22	-0.24	0.08	0.84	-0.38	0.04	-0.19	0.18
DSM	-0.04	0.73	0.28	0.14	0.48	-0.24	-0.28	-0.82	0.27	-0.12	-0.24	-0.43	-0.77	0.12	0.07
NDM	0.34	0.30	0.30	-0.69	0.09	0.66	0.42	-0.28	-0.12	-0.19	0.59	-0.46	-0.20	-0.04	0.05
SNT	-0.03	0.12	0.12	-0.22	0.14	-0.10	0.43	-0.04	0.26	0.03	-0.10	-0.29	0.13	0.38	-0.41
NOB	-0.50	0.71	-0.17	0.09	-0.31	-0.48	0.79	-0.12	0.07	0.03	-0.53	-0.71	0.32	0.01	-0.02
TNG	-0.51	0.65	-0.19	0.09	-0.30	-0.47	0.77	-0.11	0.06	0.02	-0.53	-0.68	0.31	0.00	-0.03
HPM	-0.15	-0.24	0.38	0.21	-0.24	-0.14	-0.11	0.31	-0.41	-0.41	-0.18	0.28	0.15	-0.15	0.61

Table 14 Principal components and factor loadings for the flavonoids of segment membrane, juice vesicle, and fruit tissues

	segment membrane principal component					juice vesicle principal component					fruit principal component				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
eigenvalue	3.56	2.63	1.86	1.58	1.46	4.21	3.22	2.38	1.52	1.10	4.47	2.51	2.13	1.70	1.33
%	22.25	16.41	11.61	9.87	9.11	24.77	18.96	14.00	8.98	6.48	26.27	14.78	12.53	9.98	7.80
cum %	22.25	38.66	50.27	60.15	69.26	24.77	43.72	57.72	66.71	73.19	26.27	41.05	53.58	63.56	71.36
factor loading															
ERC	0.18	-0.18	-0.64	0.08	-0.44	0.03	0.12	0.19	-0.06	-0.40	-0.10	0.20	-0.50	-0.22	0.34
NER	-0.65	-0.11	0.14	-0.47	-0.34	-0.86	0.17	-0.16	0.21	0.06	0.81	-0.06	0.06	-0.42	-0.09
NRT	0.28	-0.17	-0.66	-0.46	0.13	0.13	0.05	0.47	0.68	-0.16	-0.24	0.21	-0.54	-0.16	-0.66
NRG	-0.63	-0.11	0.03	-0.08	0.15	-0.64	0.26	-0.07	0.17	-0.05	0.71	0.16	0.10	-0.03	-0.19
HSP	0.76	0.05	0.12	-0.27	-0.13	0.17	-0.62	0.42	0.33	0.21	-0.63	-0.33	-0.11	-0.33	-0.16
NHP	-0.66	0.41	0.01	-0.22	-0.32	-0.93	-0.04	-0.05	0.16	0.01	0.87	-0.15	0.02	-0.31	-0.03
NPO	0.46	0.49	0.00	-0.42	0.33	-0.23	-0.73	0.37	-0.19	-0.20	-0.15	-0.66	-0.14	0.35	-0.38
PON	-0.19	0.60	-0.11	-0.03	0.36	-0.78	-0.14	0.06	-0.07	-0.21	0.53	-0.40	-0.13	0.20	-0.23
RTN	-0.49	-0.15	0.14	-0.33	-0.20	-0.29	0.20	-0.09	-0.07	0.60	0.52	0.21	0.01	0.09	0.13
IRF	0.45	-0.08	-0.41	-0.53	-0.29	0.12	-0.05	0.39	0.72	0.06	-0.25	0.07	-0.65	-0.53	-0.27
RFN	-0.68	-0.22	-0.01	-0.27	-0.08	-0.87	0.26	-0.13	0.21	0.05	0.86	0.11	0.16	-0.35	-0.14
DSM	0.13	0.28	-0.19	0.53	-0.63	-0.17	-0.77	0.30	-0.22	-0.05	-0.07	-0.38	-0.48	-0.39	0.58
NDM	-0.15	0.93	-0.16	-0.07	0.05	-0.74	-0.45	0.16	-0.19	-0.09	0.54	-0.74	-0.24	0.14	-0.02
SNT	-0.15	0.84	-0.11	0.04	-0.24	-0.03	-0.58	-0.01	0.02	0.57	0.07	-0.77	-0.20	0.20	0.17
NOB	0.48	0.03	0.61	-0.12	-0.29	0.20	-0.33	-0.83	0.24	0.01	-0.43	-0.39	0.60	-0.47	-0.09
TNG	0.42	0.19	0.57	-0.27	-0.26	-0.01	-0.85	-0.46	0.10	-0.04	-0.41	-0.40	0.62	-0.42	-0.06
HPM	-	-	-	-	-	0.12	-0.32	-0.76	0.31	-0.29	-0.26	0.17	0.08	0.23	-0.14

-; not analyzed.

のフラバノン類の含量が高く、かつフラボン類の含量が低いことが考えられた (Table -10)。

主成分スコアを2次元でプロットしたグラフを Fig. -5 ~ 10 に示す。田中の分類法に基づき、同一区に属し、かつ互いに分布位置の近い種をグルー

プ化した。フラベドでは、カブヤオ (# 1), ベルガモット (# 4), シトロン (# 6), マーシュグレープフルーツ (# 12), キヌカワ (# 13), ナツダイダイ (# 15), サワーオレンジ (# 17), シュンコウカン (# 22), ダンシータンゼリン (# 32), シキキ

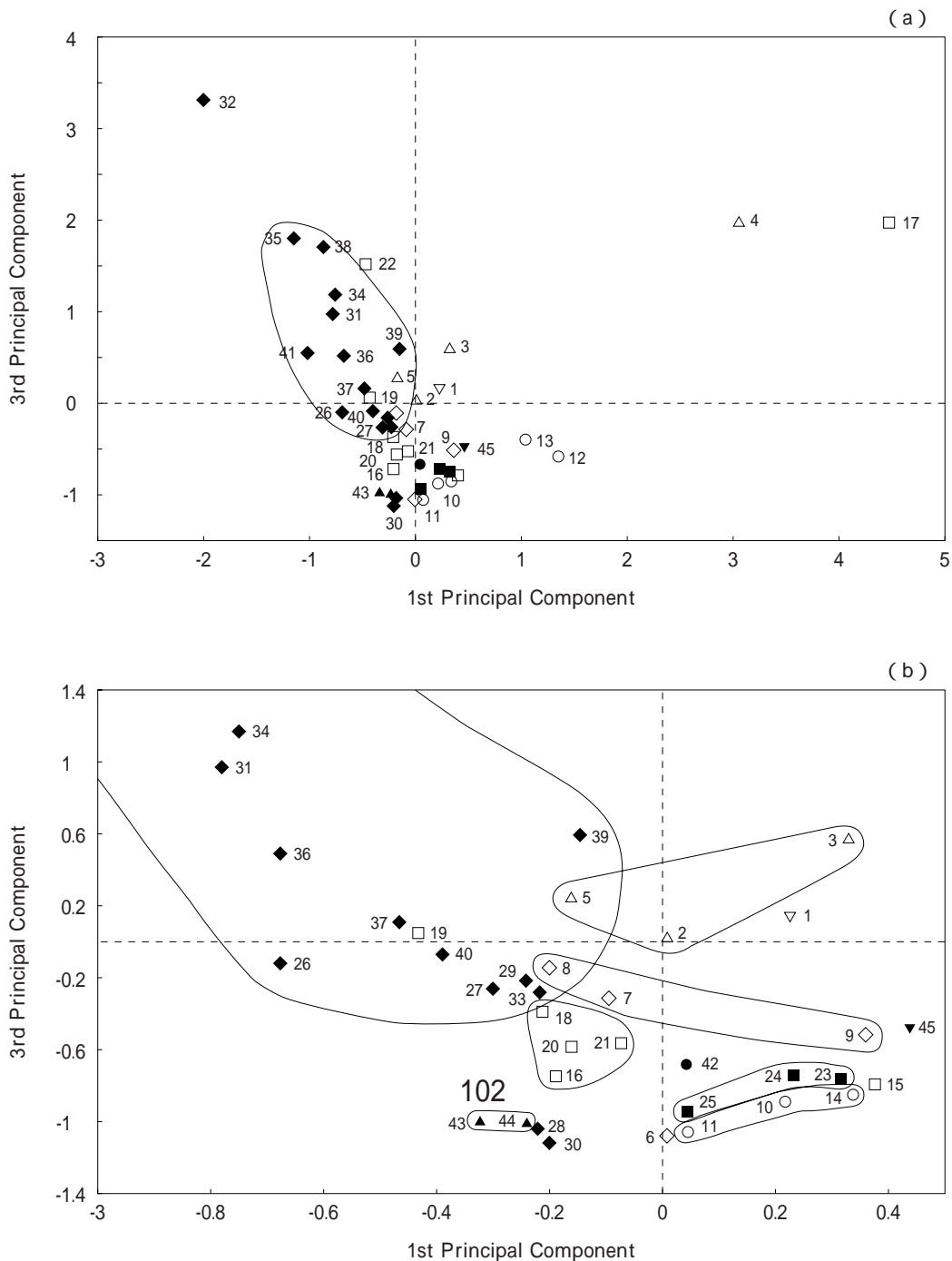


Fig. -5 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in flavedo tissue (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \blacklozenge , *Papeda* (); \blacktriangle , *Limonellus* (); \triangle , *Citrophorum* (); \blacklozenge , *Cephacitrus* (); \blacklozenge , *Aurantium* (); \blacklozenge , *Osmocitrus* (); \blacklozenge , *Acrumen* (); \blacklozenge , *Pseudofortunella* (); \blacklozenge , *Fortunella* (102); \blacklozenge , *Poncirus* (103).

ツ (#42), カラタチ (#45) が他区, あるいは同一区の種と離れた位置に分布した (Fig. -5). ライム区 () とシトロン区 () との重なりはなく, キンカン属は他種と離れた位置に分布した. ダイダイ区 () の一部 (#16, #18~21) はミカン区

() と重なり, ユズ区 () とザボン区 () も近接した. Swingle は, ヒラドブタン (#10) やシャテンユ (#11) 等のブタン類とグレープフルーツ類を別種とし, パレンシアオレンジ (#18) やモリタネーブル (#19) 等のスイートオレンジ類と

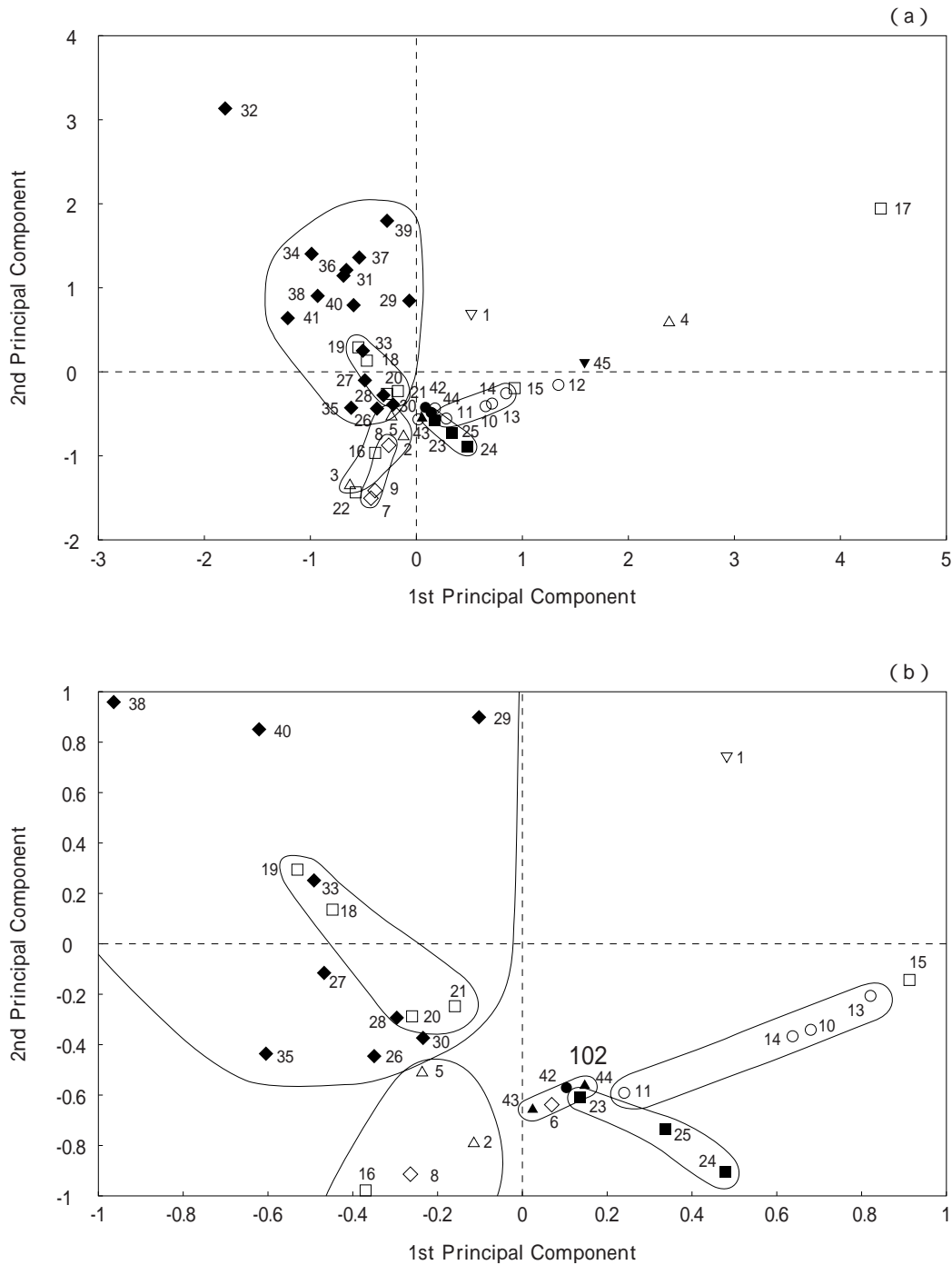


Fig. -6 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in albedo tissue (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \square , *Papeda* (); \blacklozenge , *Limonellus* (); \blacktriangle , *Citrophorum* (); \blacktriangle , *Cephacitrus* (); \blacklozenge , *Aurantium* (); \blacktriangle , *Osmocitrus* (); \blacktriangle , *Acrumen* (); \square , *Pseudofortunella* (); \blacktriangle , *Fortunella* (102); \blacktriangle , *Poncirus* (103).

サワーオレンジ (#17) についても別種に分類したうえで、ナツダイダイ (#15) をサワーオレンジ (#17) の育成品種とした⁴⁷⁾。また、Webber はベルガモット (#4) がサワーオレンジ (#17) の変異種であることを示唆した⁵⁵⁾。また、RAPD および

SCAR 分析の結果ベルガモット (#4) はサワーオレンジ (#17) とポンカン (#31) などのマンダリン類の交雑種であることが示唆されている⁴⁸⁾。これらの点は田中の分類と異なるが、フラボノイド組成から得られた解析値とは矛盾しない結果であった。

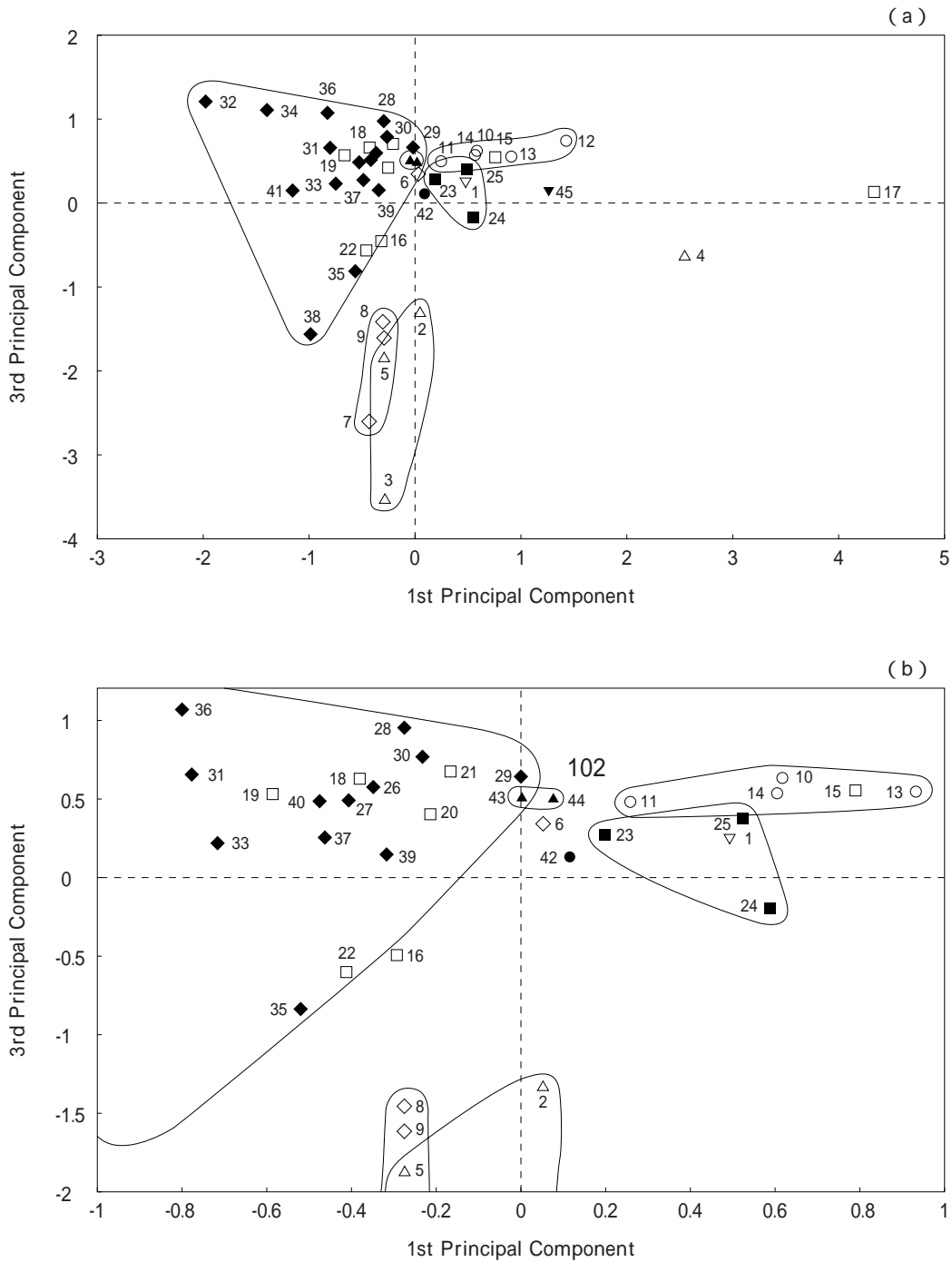


Fig. -7 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in peel tissue (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \square , *Papeda* (); \blacklozenge , *Limonellus* (); \circ , *Citrophorum* (); \blacktriangle , *Cephastrus* (); \blacklozenge , *Aurantium* (); \blacktriangle , *Osmocitrus* (); \blacklozenge , *Acrumen* (); \blacktriangle , *Pseudofortunella* (); \blacktriangle , *Fortunella* (102); \blacklozenge , *Poncirus* (103).

次に、アルペドでは、カプヤオ（# 1）、ベルガモット（# 4）、シトロン（# 6）、マーシュグレープフルーツ（#12）、ナツダイダイ（#15）、サワーオレンジ（#17）、ダンシータンゼリン（#32）、カラタチ（#45）等が他区、あるいは同一区の種と離れ

た位置に分布した（Fig. -6）。ダイダイ区（ ）は広範囲に分布し、ミカン区と重なるもの（#18~21）、ライム区と重なるもの（#16, 22）、そしてナツダイダイ（#15）やサワーオレンジ（#17）等のように分布位置がかけ離れるものに分かれた。また、

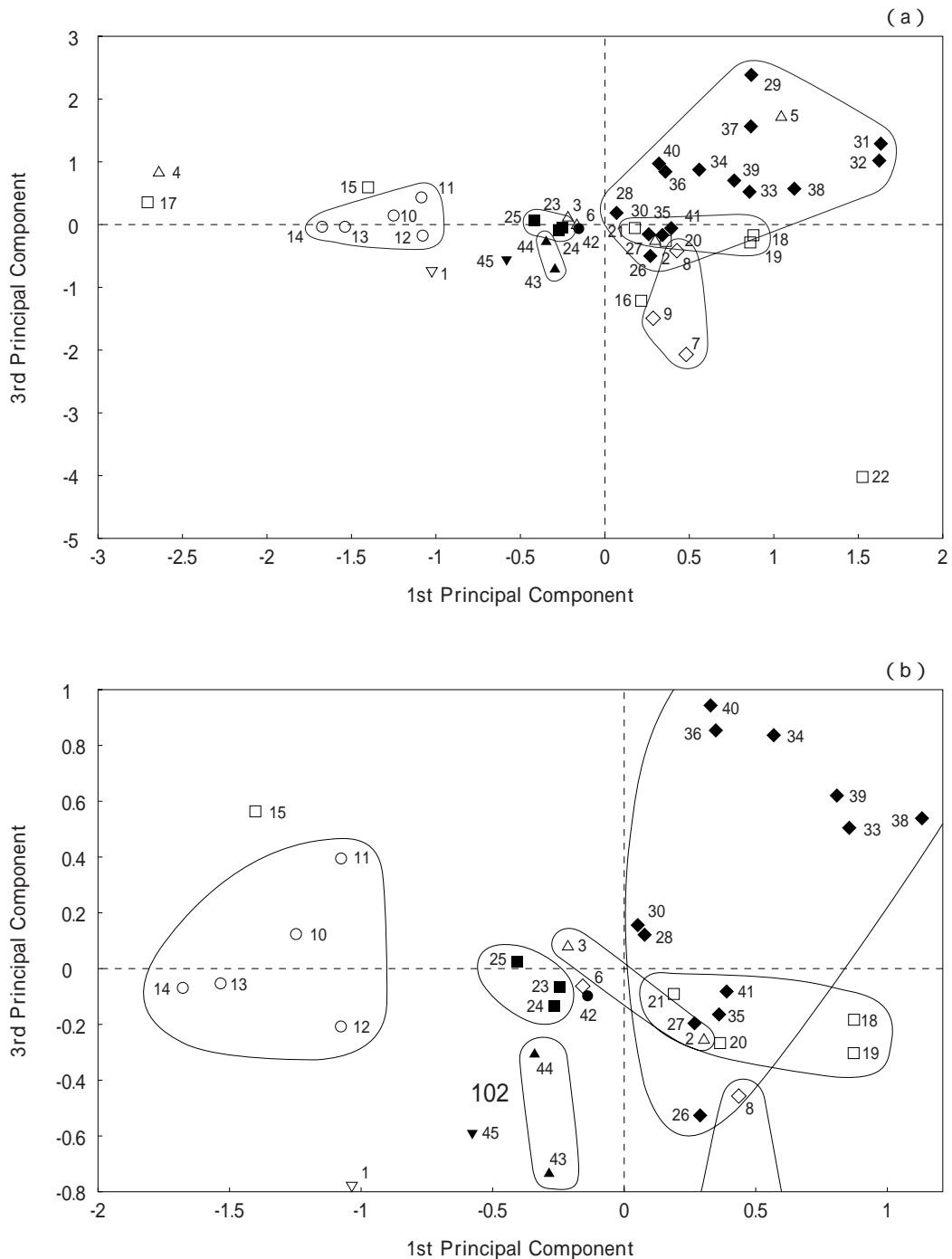


Fig. -8 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in segment membrane tissue (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \square , *Papeda* (); \circ , *Limonellus* (); \triangle , *Citrophorum* (); \blacklozenge , *Cephacitrus* (); \blacktriangledown , *Aurantium* (); \blacksquare , *Osmocitrus* (); \blacktriangle , *Acrumen* (); \blacktriangle , *Pseudofortunella* (); \blacktriangledown , *Fortunella* (102); \blacktriangle , *Poncirus* (103).

ライム区()とシトロン区()に重なりが認められ、ユズ(#23), シキキツ(#42), ならびにシトロン(#6)がキンカン属(102)と重なった。ミカン区()はダイダイ区()の一部と重なりがあるものの、他区とはほぼ乖離した。その他の部

位では、果皮の散布状態はアルペドのものと比較的類似し(Fig. -7), じょうのう膜では、ザボン区(), ユズ区(), シトロン区()の各種が他区の種と離れて分布した(Fig. -8)。一方、果肉の主成分分析では、カブヤオ(#1), ベルガモツ

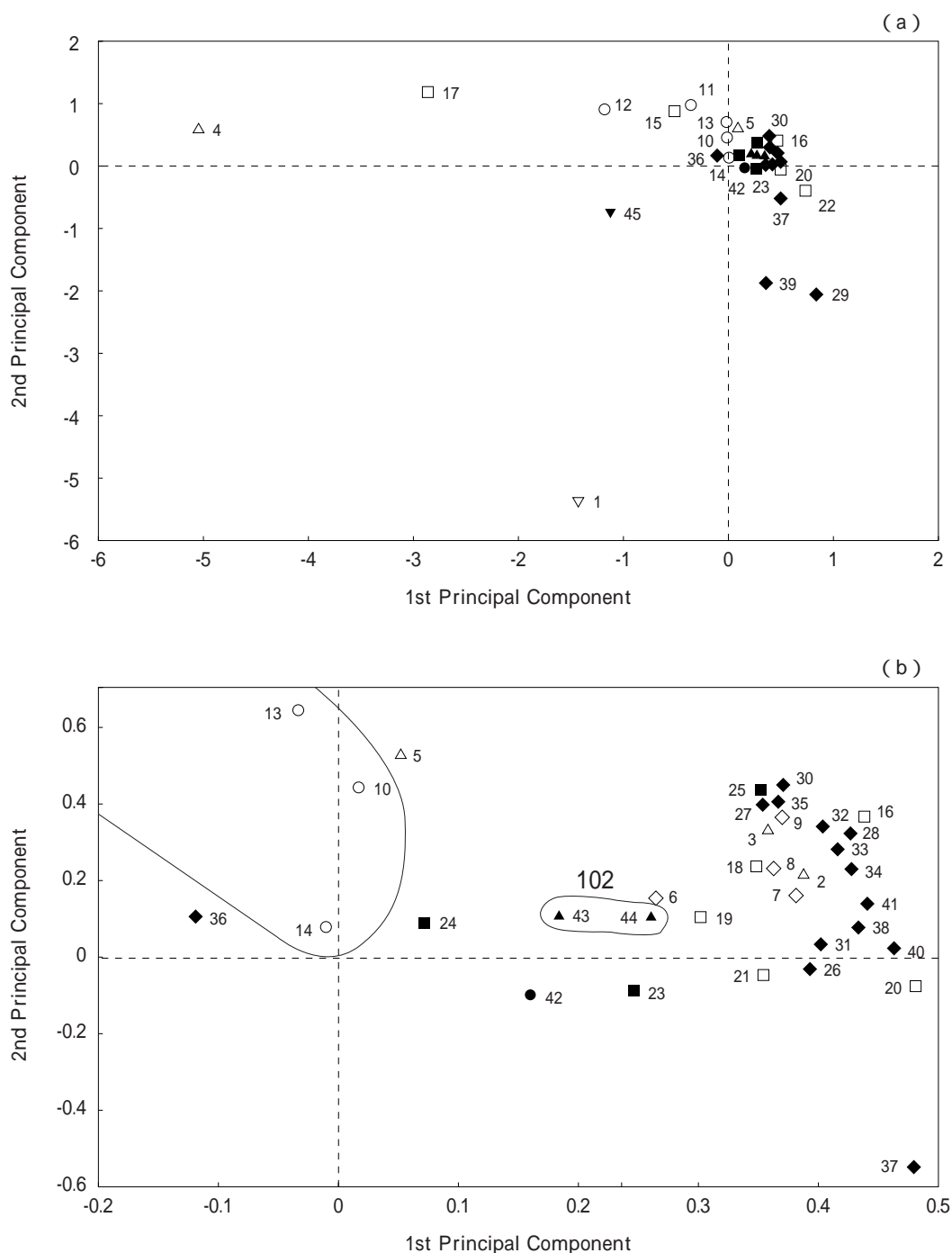


Fig. -9 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in juice vesicle tissue (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \square , *Papeda* (); \circ , *Limonellus* (); \triangle , *Citrophorum* (); \blacklozenge , *Cephacitrus* (); \blacksquare , *Aurantium* (); \blacktriangle , *Osmocitrus* (); \blacklozenge , *Acrumen* (); \blacklozenge , *Pseudofortunella* (); \blacklozenge , *Fortunella* (102); \bullet , *Poncirus* (103).

ト (# 4), シャテンユ (# 11), マーシュグレープ
 フルーツ (# 12), ナツダイダイ (# 15), サワーオ
 レンジ (# 17), シュンコウカン (# 22), ケラジ
 (# 29), コベニミカン (# 37), サンキツ (# 39),
 カラタチ (# 45)等の個々の種は離れて分布したが、

各分類区は重なりが大きかった (Fig. -9). 河合
 らは可食部位 (果肉およびじょうのう膜) のフラボ
 ノイド組成に基づく主成分分析を検討し、同様に各
 分類区が重なることを報告した⁵⁶⁾. このように、果
 実部位により散布のパターンは異なる特徴をもつ

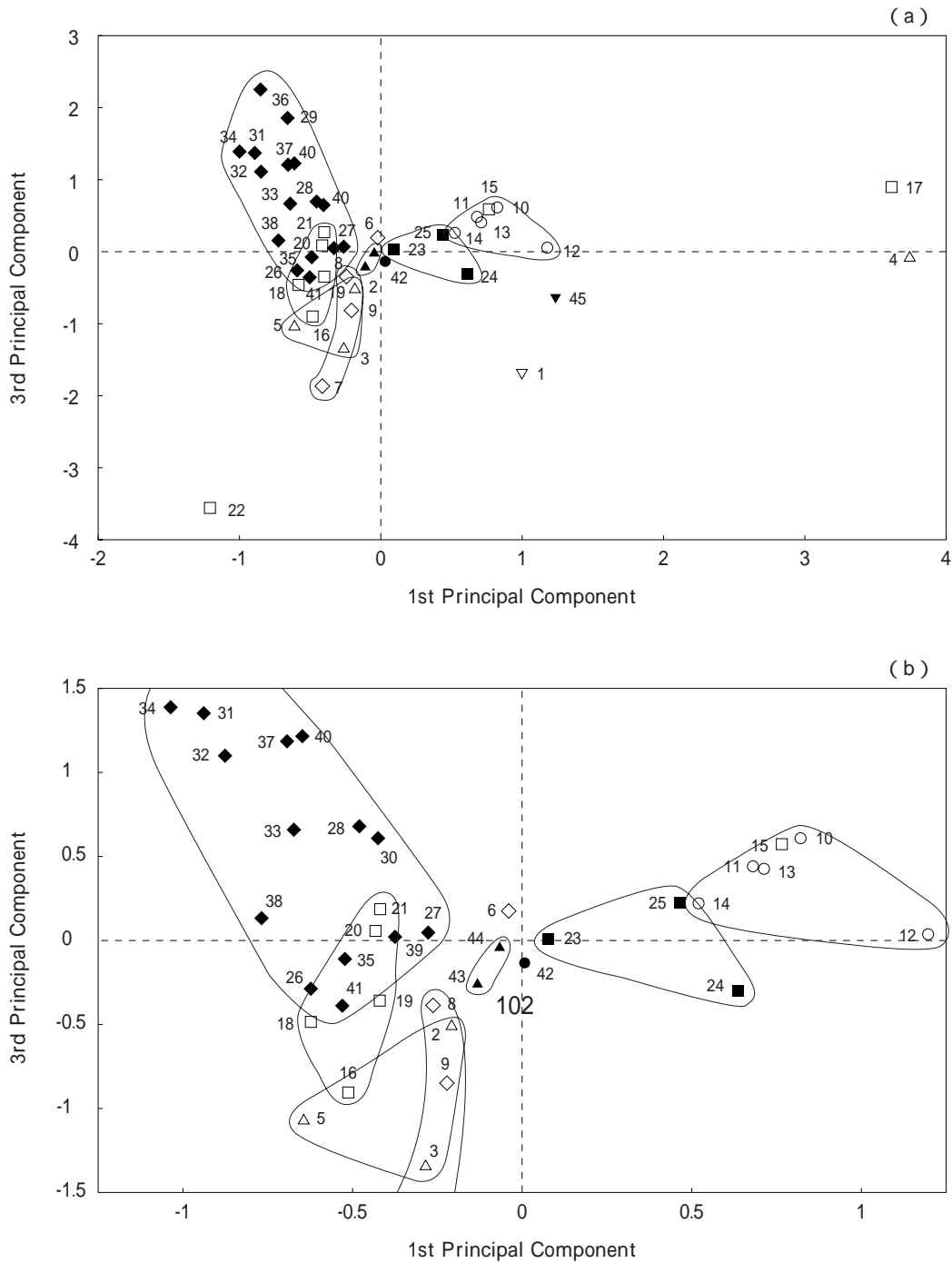


Fig. -10 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in fruit (a) and zoom of the plot (b). Symbols: \square , *Papeda* (); \diamond , *Limonellus* (); \circ , *Citrophorum* (); \triangle , *Cephacitrus* (); \square , *Aurantium* (); \triangle , *Osmocitrus* (); \blacktriangle , *Acrumen* (); \circ , *Pseudofortunella* (); \bullet , *Fortunella* (102); \blacktriangle , *Poncirus* (103).

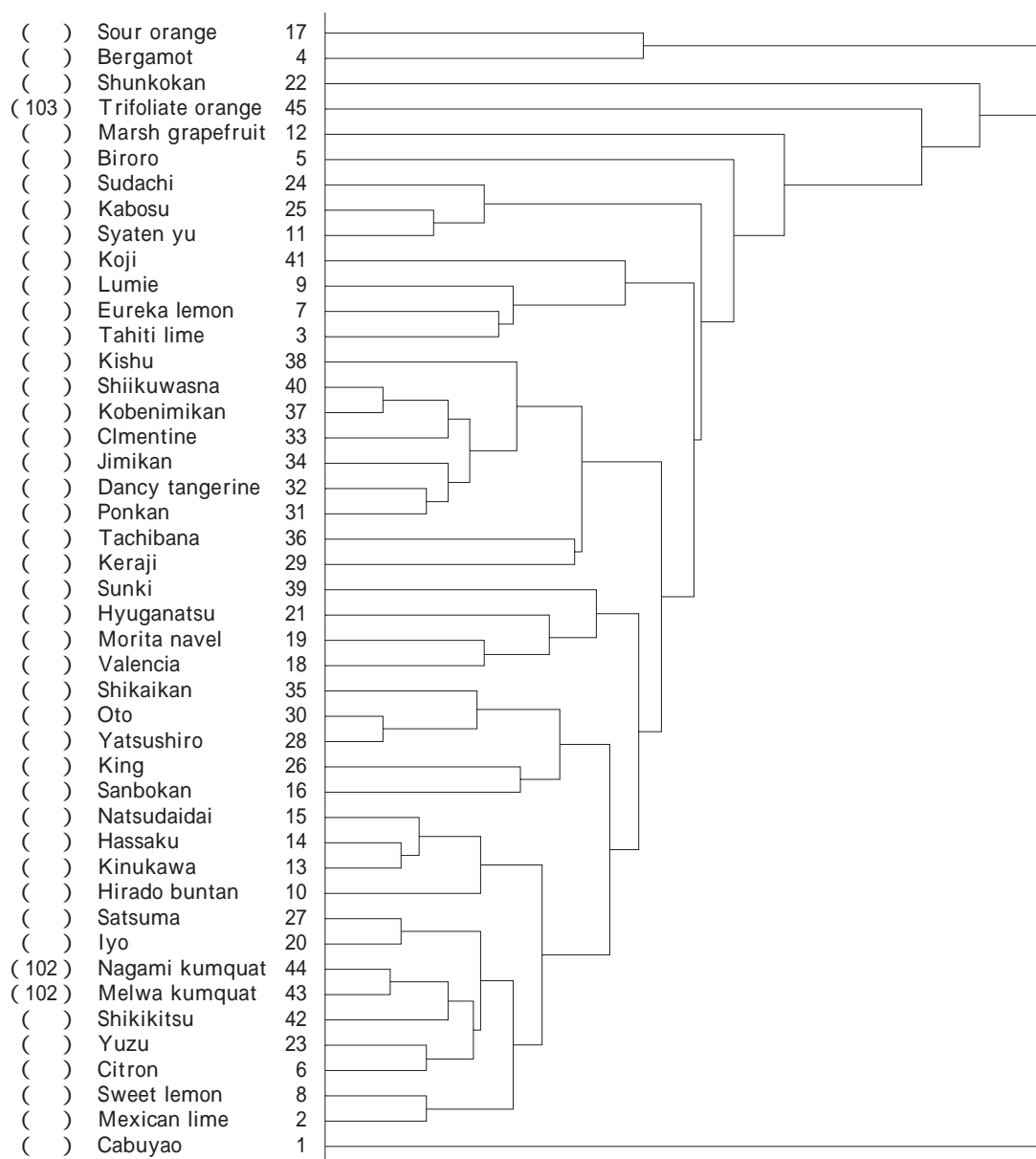


Fig. -11 Dendrogram calculated using the UPGMA based on the concentration of flavonoids in *Citrus fruits*. Roman numerals and numbers in parentheses indicate Tanaka's categorical number. For the identification of numbers, see Table -5.

た。果実のフラボノイド組成に基づくクラスター解析より得られた樹形図をFig. -11に示す。サワーオレンジ(#17), ベルガモット(#4), カブヤオ(#1), シュンコウカン(#22), カラタチ(#45), マーシュグレープフルーツ(#12), ビロロ(#5)などが他品種と大きく分離した。ライム区()ならびにシトロン区()の各品種は組成に共通性が少ないため, ルミー(#9)やユレカレモン(#7)など一物品種を除いて分離する傾向が認められた。ザボン区()品種では, マーシュグレープフ

ルーツ(#12)およびシャテンユ(#11)を除く各品種がダイダイ区のナツダイダイ(#15)とともに近接した。また, キンカン属(102)とトウキンカン区(), ユズ区()はお互いに近接した。ミカン区品種()は大まかに2つのグループに分かれた。田中はこの区の品種を詳細に分類したが(Fig. -9) 樹形図のパターンとは一致しなかった。品種の定義については形態学的な特徴の違いをどのレベルで判断するかによって違ってくるが, 試験した品種はダイダイ区品種を除き, おおまかに田

中の分類したグループに組成の共通性が認められた。今後、遺伝子解析による種・系統の解明により、フラボノイド組成に基づく樹形図がどの程度系統の分類に関係するのか明らかにされることが望まれる。

(4) 品種判別の可能性

品種の判別に関して、Fig. 10-5 ~ 10-10の散布状態から、1つの散布図を基にして品種判別を行うことは難しいと考えられた。例えば、Fig. 10-6のミカン区内において、#31と#36、#18、#19、および#33、#20、#21、#28、および#30等が近接した。従って、判別の信頼性を高めるために同一部位で別の主成分データや、例えばFig. 10-8のじょうのう膜等、他の部位の主成分データを併用して検討する必要があった。一方、アルベドのフラボノイド組成から分類区の推定が可能であるため（Fig. 10-4）、特定の分類区に的を絞った主成分分析を行うことで判別が容易になることも考えられた。一例としてダイダイ区（#18~22）およびミカン区果実のアルベドのフラボノイド組成について主成分分析し、因子スコアを2次元プロットした（Fig. 10-12）。この結果、45種の散布図（Fig. 10-6（a））と比較すると各品種の分散スケールが拡大し、ダイダイ区品種に収束が認められた。その一方、ミカン区内において

分布が近接する種（#31、#36、#37、#40など）が依然として存在した。交雑品種や栽培変種については検討していないが、他品種との交雑によりフラボノイド組成に若干の差異が生じることが報告されている⁵⁷⁾。以上のことから、果実のフラボノイド組成は、データの使い分けや想定となる品種の絞り込みにより、ある程度の品種判別に応用可能であると考えられた。

(5) 品種判別の問題点

フラボノイド含量・組成の個体差、成熟・貯蔵に伴う変化、年度変化、ならびに産地間における差異は品種判別における影響要因である。土田らの報告によると、フラボノイド含量の個体差は20%以下であり、同一試験場内で地形、日当たりの異なる近地間変動は個体差と同等かむしろそれ以下であった⁵⁸⁾。また、成熟に伴う変化量は、PMF類では小さく、フラバノン配糖体でも組成パターンは季節を通じて維持されたものの、各成分は成熟に伴い減少した⁵⁸⁾。但し、適熟期は減少変化の最終段階であり、変動の小さい時期であった。また、産地間における差異は報告がないため不明である。これらの要因がフラボノイド組成や品種判別の再現性に及ぼす影響には不明な点が多く、検討の余地がある。

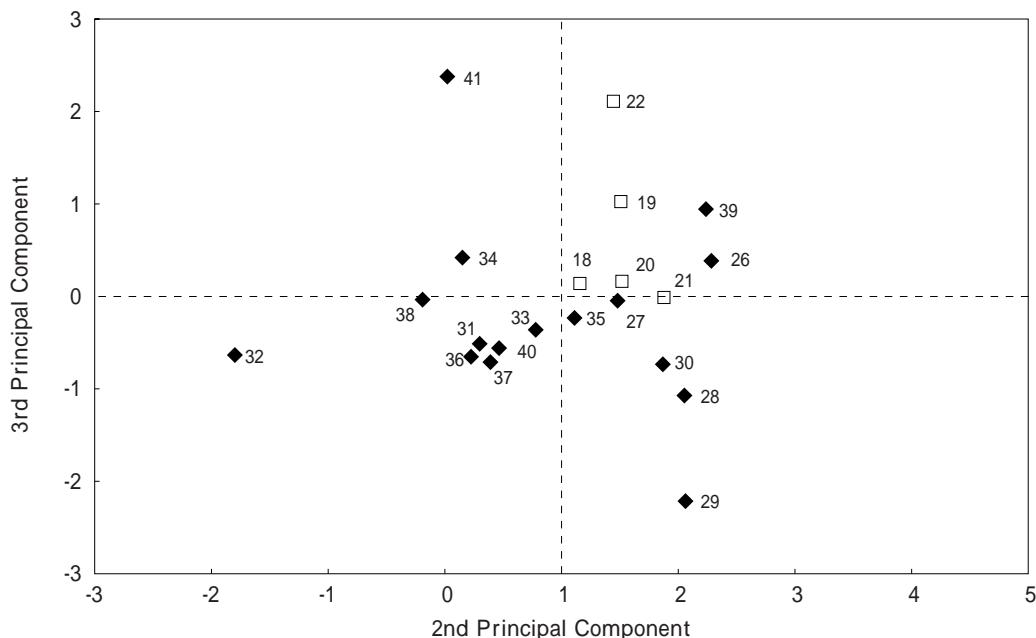


Fig. 10-12 Scatter diagram from a principal component analysis based on the concentration of flavonoids in albedo tissue Symbols: □, Aurantium (); ◆, Acrumen ().

4 イヨ, シークワサー, およびハナユ種子のリモノイドの分析

1) 序

リモノイド類はミカン科およびセンダン科植物に存在し, トリテルペノイドが高度に酸化されたノルテルペノイドに属する化合物の一群である。カンキツ類においては, 配糖体またはアグリコンとして存在するが, リモニンやノミリン等のアグリコンはフラボノイドのナリンギンとともに苦み成分として位置づけられてきた。最近, リモノイドに緒言で述べたような生理機能性のあることが明らかになるに従い, その需要が増加しつつある。とりわけ, リモノイドの天然資源として, カンキツの果汁加工副産物が注目されている。そこで本節では, 我が国で第2の果汁生産品種であるイヨ(*C. iyo*), 最近健康機能性が注目されているシークワサー(*C. depressa*), ならびに強いGST誘導作用をもつイーチャンジン²⁵⁾を含むユズ区に属するハナユ(*C. hanaju*)の種子におけるリモノイド類の組成や特徴を明らかにした。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

シークワサー果実は沖縄農業協同組合連合会の農産物加工工場から提供して頂いた。ハナユならびにイヨ果実は佐賀県果樹試験場で栽培された果実を提供して頂いた。

(2) 供試試薬, 機器

薄層クロマトグラフィー(TLC)用シリカゲルプレートおよび高速液体クロマトグラフィー用C18分析カラムのpartisil ODS-3(4.6x 250mm)はAnaltec(Newark, DE)から購入した。リモノイド配糖体の標準品はUSDAの農業研究所・西部研究センターにおいてカンキツ種子および果汁から単離し, NMRで構造を決定したものをを用いた(Fig. -13⁹⁾。

(3) リモノイドの抽出

種子は60℃で3日間乾燥させ, 高速粉碎ミルで粉碎した。ソックスレー抽出器を用いて, 100gの粉碎物から最初にヘキサンで油性物を除去した。続いて, アセトン, メタノールの順で抽出した。アセトン抽出物(画分1)はリモノイドアグリコンのほとんどを含んでおり, メタノール抽出物(画分2)はリモノイド配糖体と一部のアグリコンを含んでいた。画分2をエバポレーターで乾固し, ジクロロメ

タン:水(1:1)に懸濁した。水画分(画分3)は配糖体を含み, ジクロロメタン画分(画分4)はアグリコンを含んでいた。

(4) リモノイドアグリコンの分析

アセトン画分(画分1)とジクロロメタン画分(画分4)を合わせて乾固後, リモノイドアグリコンの分析に供した。まず, 調製した画分をTLCで分析し, リモノイドアグリコンを同定した。展開溶媒は次の3種類を用いた。1)シクロヘキサン-酢酸エチル(2:3), 2)ジクロロメタン-メタノール(49:1), 3)酢酸エチル-ジクロロメタン(2:3)。プレートを乾固後, Ehrlich試薬を噴霧し, HClガスチャンバー中で発色させた⁶⁰⁾。発色したスポットは, スタンダードとの移動度の比較で同定した。HPLCによる分析では, 乾燥物をメタノールに溶解し, ODS逆相カラムで分析した。移動相にはアセトニトリル-メタノール-水(10:41:49)を用いた。経時的に210nmの吸光度の変化を測定し, 溶出時間と併せてピークを同定した⁶¹⁾。

(5) リモノイド配糖体の分析

種子中のリモノイド配糖体についてもTLCおよびHPLCで分離・定量した。TLC分析は, サンプルを少量のメタノールに溶解し, シリカゲルプレートにスポット後, 酢酸エチル-メチルエチルケトン-ギ酸-水(5:3:3:1)で展開した⁶²⁾。

HPLC分析では, まず混在するフラボノイド配糖体をアグリコンに分解した。すなわち, 画分3を減圧乾固し, ナリンギナーゼおよびヘスペリジナーゼを含む0.1Mギ酸ナトリウムバッファー(pH3.8)に溶解し, 室温で20時間放置した。その後, SepPakで処理し, HPLC分析に供した。サンプルはメタノールに溶解し, ODSの逆相カラムで分析した。溶出速度は1 mL/minで, 3 mMリン酸水溶液におけるアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出した。アセトニトリルの初期濃度は15%で, 33分後に26%まで増加させた。検出はアグリコンと同様に210nmの吸光度で行い, 検量線に基づきピーク面積から定量した⁶³⁾。

3) 実験結果および考察

(1) イヨ種子

イヨ種子のリモノイドアグリコン画分, ならびに配糖体画分のHPLCクロマトグラムをFig. -14

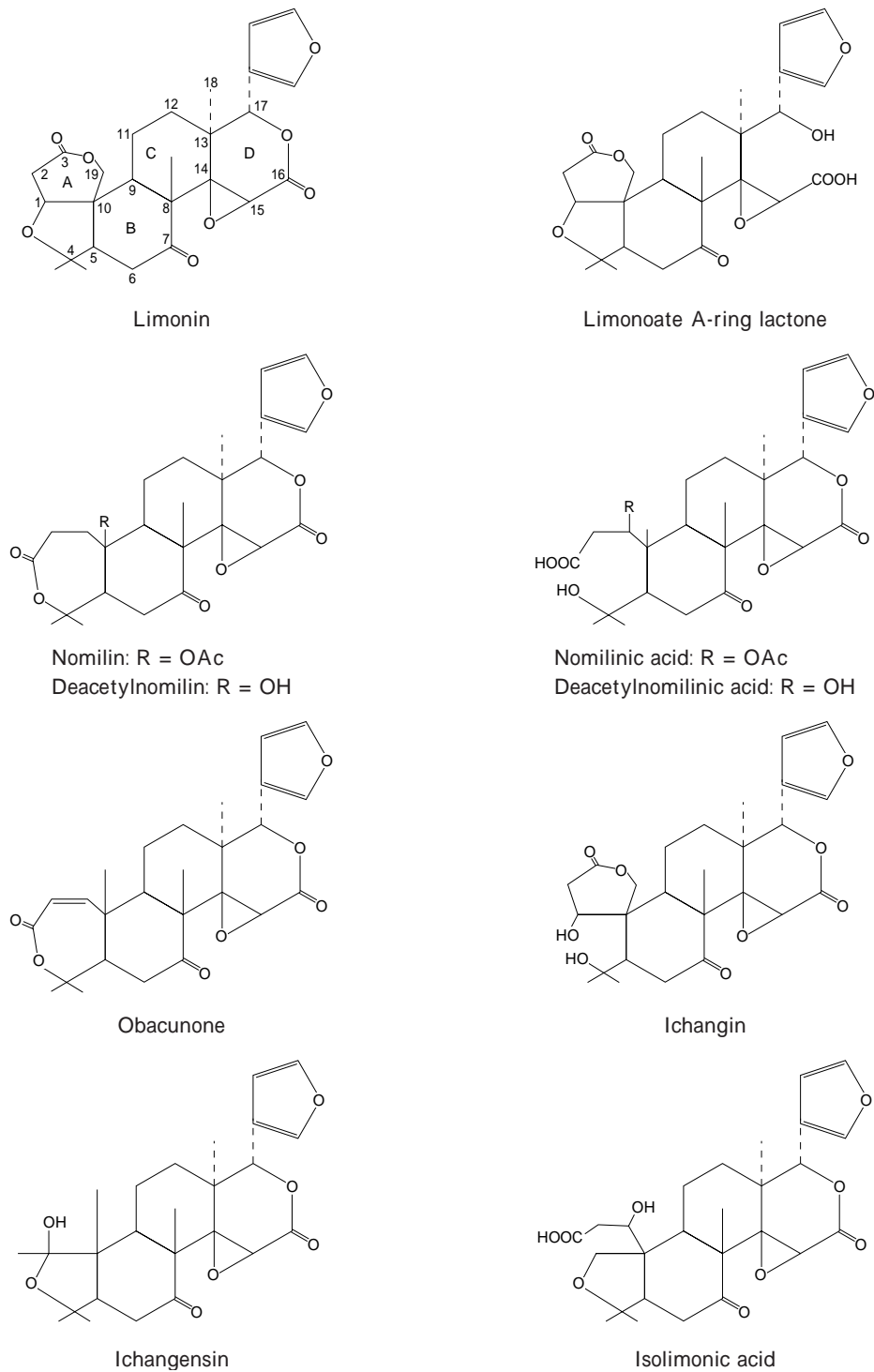


Fig. -13 Structures of common limonoid aglycone in citrus fruit.

(a) および (b) に示す．イヨ種子にはリモニン，ノミリン，オバクノン，デアセチルノミリンの4種のアグリコンが存在することが確認された．リモニン(457mg/100g)に続いてノミリン(253mg/100g)含量が多いことは，他の果実種子と同じ一般的な傾向であった (Table -15)^{64, 65)}．また，総アグリコ

ン含量(873mg/100g)はカンキツ種子含量として中程度であった⁶⁶⁾．リモノイドの配糖体については，ノミリン，オバクノン，リモニン，デアセチルノミリン，ノミリン酸の5種の17-O-β-D-グルコシドが存在することが示された．このうち，ノミリングルコシド含量(224mg/100g)は配糖体総含量の50%

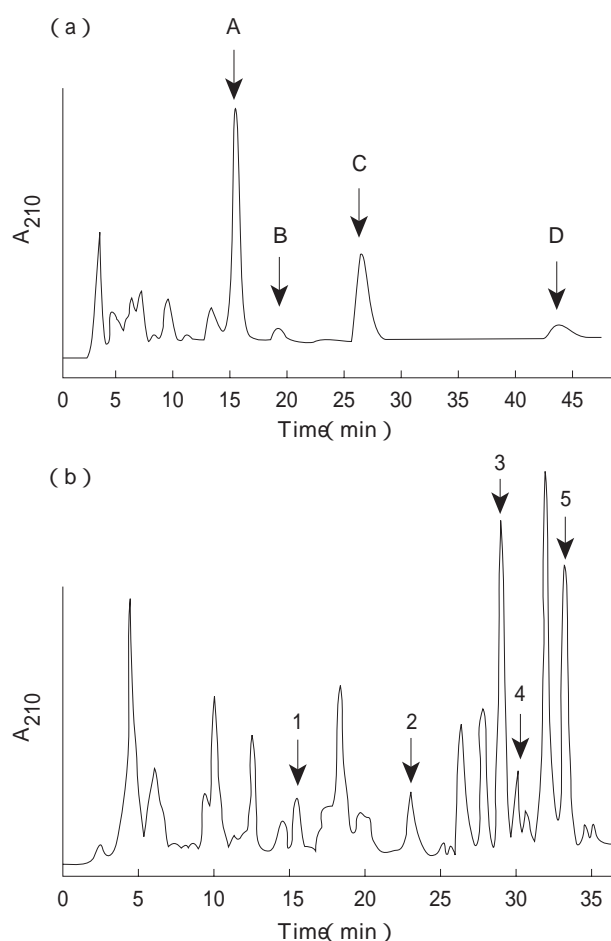


Fig. 14 High-performance liquid chromatograms of acetone and dichloromethane extract (a) and water extract (b) from Iyo tangor seeds. Peaks in (a): limonin, A; deacetyl-nomilin, B; nomilin, C; obacunone, D. Peaks in (b): 17- β -D-glucopyranoside of limonin, 1; deacetyl-nomilin, 2; nomilin, 3; nomilinic acid, 4; obacunone, 5.

程度を占め、比較的多量であった。この結果、イヨ種子のリモノイド組成、ならびに含量は、カンキツ果実における一般的な傾向と同様であるが、加工副産物の生産量が高いという点で、イヨ種子はリモノイド類全般の有効な供給源であるということが考えられた。田中の分類法によると、イヨはダイダイ区()に属する。イヨ種子のリモノイド組成ならびに含量は、同属種のバレンシアオレンジ (*C. sinensis* Osbeck), サンボウカン (*C. sulcata* hort. ex Tanaka), およびヒユウガナツ (*C. tamurana* hort. ex Tanaka) 種子のものと類似しており、これらの種と同属であることを支持する結果であった²¹⁾。

但し、他区種との組成を比較するには報告データに制限がある。

(2) シークワサー種子

シークワサー種子中のリモノイドアグリコンと配糖体含量を Table 15 に示す。TLC と HPLC 分析では 3 種類のリモノイドアグリコン、ならびに 5 種類のリモノイド配糖体の存在を確認した。リモノイドアグリコン含量は、他の果実と同様にリモニン含量が最も高かったが、アグリコンの合計量は 328mg/100g と一般的な含量のおよそ半分であった。一方、配糖体はリモニン、デアセチルノミリン、ノミリン、ノミリン酸、そしてオバクノンの 17- β -D-グルコピラノシドであった。乾燥種子 100g 当たり、配糖体の合計量は 1.274g であり、この値は、一般的なカンキツ種子における含量のおよそ 2 倍であった⁶⁷⁾。ノミリングルコシド含量が最も高く、続いてオバクノン、ノミリン酸、リモニングルコシド、デアセチルノミリンの各グルコシドの順であった。この含量組成は、多くのカンキツ種子で認められる傾向と同じであった⁶⁷⁾。リモノイドアグリコンの D 環へのグルコースの付加は、果実、種子、葉においてそれぞれ独立して UDP-D-グルコーストランスフェラーゼによって触媒される⁶⁸⁾。種子におけるグルコシル化は、果実の成長の後期段階から始まり、収穫期まで続く⁶⁹⁾。シークワサーでは、この酵素活性が高いためにグルコシド含量が高く、逆にアグリコン含量が低くなることが推察された。リモニン-17- β -D-グルコピラノシドはヒトにおいて抗癌活性を発現することが報告されている²⁰⁾。リモノイド配糖体は無味であり、かつ水溶性であることから、食材としての利用が容易である。この結果、シークワサー種子は癌予防のための天然食品添加物の有望な供給源であることが推察された。

(3) ハナユ種子

ハナユ種子にはアグリコンとして、量の多い順にデアセチルノミリン、リモニン、ノミリン、オバクノンの 4 種が存在した (Table 15)。他種とは異なり、デアセチルノミリンが主要なアグリコンであった⁶⁶⁾。アグリコンの総含量は、他種 (300 - 900mg/100g) と比較して、極めて低い値 (159mg/100g) であった⁵⁹⁾。次に、リモノイドグルコシドとして 7 種類の存在を確認した。配糖体は含量の多い順にデ

Table 15 Limonoid aglycones and glucosides in seeds of Iyokan, Shiikuwasha, and Hanaju

Limonoid	Content(mg/100 g dry seed)		
	Iyo	Shiikuwasha	Hanaju
Aglycone			
Limonin	457 ^a	187	54
Deacetylномилin	72	-	86
Nominlin	253	96	12
Obacunone	91	45	7
Total	873	328	159
Glucoside			
Ichangin	-	-	75
Isolimononic acid	-	-	45
Limonin	53	116	-
Deacetylномилin	48	18	620
Deacetylномилinonic acid	-	-	470
Nomilin	224	759	130
Nomilinic acid	34	185	110
Obacunone	87	196	140
Total	446	1274	1590
aglycones / glucosides	2.0	0.3	0.1

^a Numbers are average values of three replications.

アセチルノミリン (620mg/100 g), デアセチルノミリン酸 (470mg/100 g) であり, ノミリン配糖体濃度が低く, 逆にデアセチルノミリンやデアセチルノミリン酸含量が高いことは特異的な傾向であった (Table 15). 総アグリコン濃度に対する総配糖体の比は, イヨ種子でみられるように一般的には2.0前後であるが⁶⁶⁾, ハナユでは0.1と大きく異なる値であった. ハナユ種子は, シークワサー種子と同様に, UDP-D-グルコーストランスフェラーゼ活性が高いことが推察された. 田中の分類によると, ハナユはユズ区 ()・真生ユズ亜区に属し, 他にユズ (*C. junos*), スダチ (*C. sudachi*), カボス (*C. sphaerocarpa*), ユコウ (*C. yuko*) 等が同一区に分類されている. ユズ区の原始ユズ亜区にはリモノイドのイーチャンジェンシンを蓄積するイーチャンジー (*C. ichangensis*) が分類されており, 真生ユズ亜区果実は, イーチャンジーと他の果実の交雑種と考えられている. これらのうち, ハナユを除くユズ, スダチ, カボス, ユコウはいずれもイーチャンジェンシンを含むことが報告されている^{60, 69)}. ラジオアイソトープのトレーサー試験から, イーチャンジェンシンはノミリンからデアセチルノミリン, デアセチルノミリン酸を経て代謝されることが証明されている (Fig. 15⁷⁰⁾. ハナユは比較的高濃度のデアセチルノミリンおよびデアセチルノミリン酸の配糖体を蓄積するが, イーチャンジェンシンを持た

ない. このことから, ハナユではデアセチルノミリン酸をイーチャンジェンシンに変換する酵素が欠損することが推察される. これらの結果, ハナユ種子のリモノイド組成は他種と比べて特異的であることが明らかになり, ユズ区の他種とは異なる交雑を経たか, 或いは無性的繁殖の中で突然変異が生じた種であることが示唆された. デアセチルノミリンおよびデアセチルノミリン酸配糖体の生理的有効性の試験が待たれる.

5 小 括

カンキツの機能性成分の1つであるフラボノイドの組成による品種の特性を把握し, 有効に活用するために, 詳細な組成データベースを構築することを目的とした. また, それを基にして分類区・品種判別への応用を試みた. まず, フラボノイドの抽出, 分析法を検討し, 25種の成分を一括定量する手法を開発した. この手法を用いて主要な45種の適熟果実の6つの部位における主要な17成分を定量し, 組成を明らかにした. 判別に関して, アルベドのフラボノイド組成データから, 各分類区や一部の種はダイダイ区およびライム区の一部の種を除き7つのフラボノイド成分の含有パターンの比較により判別可能であることを明らかにした. また, 組成データを基に主成分分析を行った結果, 解析部位によって種の分散パターンが異なることを見出した. フラベドで

はライム区, シトロン区, キンカン属, アルペドではミカン区, じょうのう膜ではザボン区の判別に適することが判明した. フラボノイド組成パターンから, 分類区の推定ができるので, それに応じた部位や主成分を選択することにより, 品種判別は可能であると考えられた. 今後, データベースを充実させ

ることにより, 交雑品種の判別や組成予測等, 育種への応用が期待される. 一方, 産地間差異が品種判別の再現性にどの程度の影響を及ぼすのか, 逆に産地判別の可能性も含めて検討の余地がある.

リモノイドに関しては, イヨ, シークワサー, ならびにハナユ種子の分析を行った. イヨの含量・組

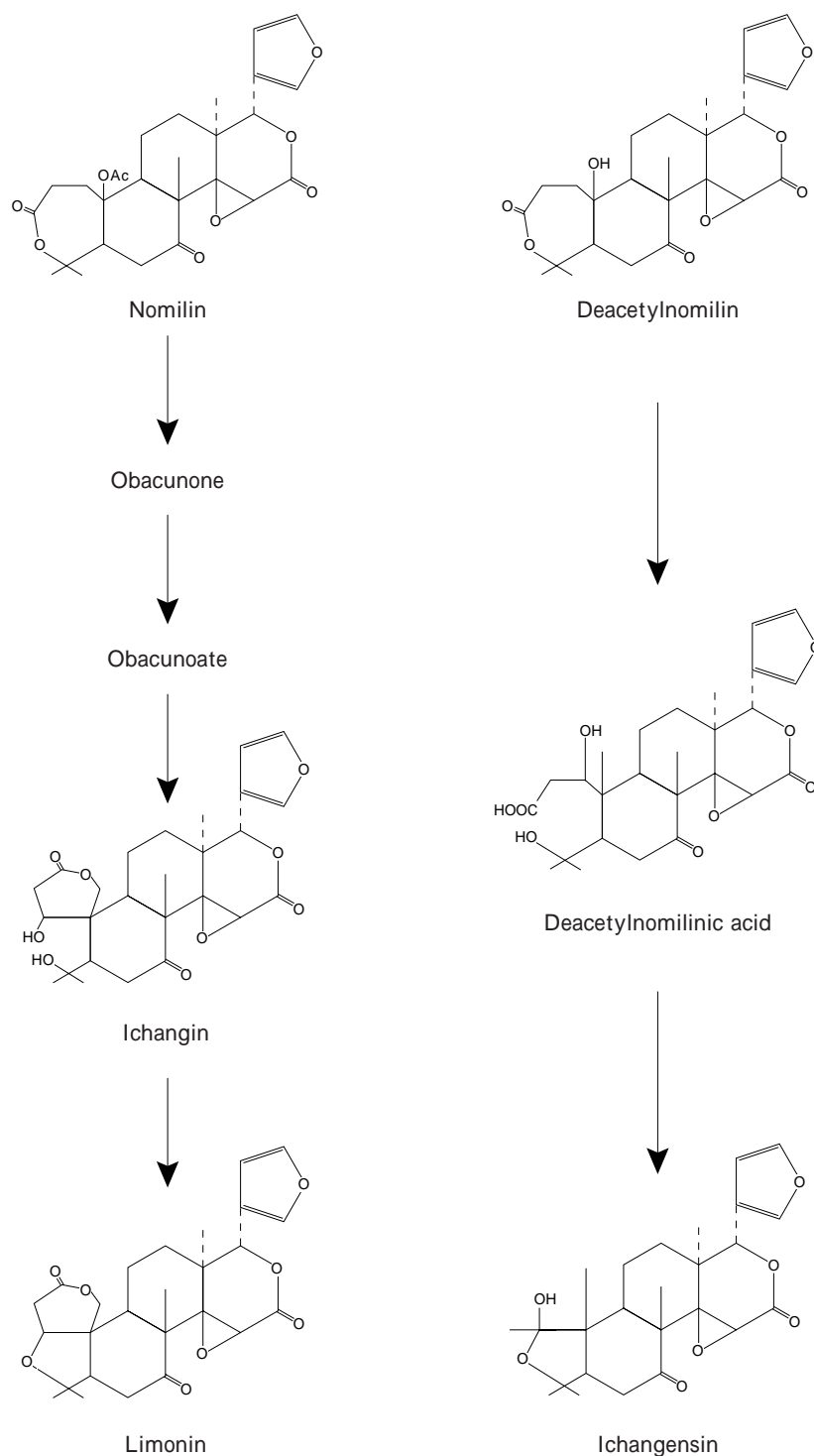


Fig. -15 Possible biosynthetic pathways for the formation of limonoids in *C. ichangensis* and its hybrids.

成はカンキツ一般に共通するものであり，加工副産物の量が多いこともあり，リモニン，ノミリン，およびオバクノン等の一般的なリモノイドの供給源として有効であることが示された．シークワサーおよびハナユでは，ともに配糖体濃度が高く，シークワサーではノミリン，ハナユではデアセチルノミリンおよびデアセチルノミリン酸を高濃度に含有していた．シークワサーは沖縄特産の健康食品として注目されていることから，リモノイド類の機能性研究の発展が望まれる．

カンキツ成分のアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響

1 結 言

アラキドン酸は，生体内ではリン脂質に多く含まれており，細胞が刺激（神経，免疫，ホルモン，化学的，物理的）を受け活性化するとリン脂質から遊離され，速やかに代謝されてPG，TX，LT，LX等の生理活性物質を生成する¹⁾．COX経路では，アラキドン酸からCOXによりPGG₂を経てPGH₂が産生され，細胞によって種々のPGおよびTX類とその類縁物質が産生される³⁾．TXA₂およびD₂は，強力な血小板凝集作用および血管収縮作用を有しており，血栓症および動脈硬化症の発生促進因子の1つと考えられる．一方，これらとは正反対にPGE₂，I₂，F₂は血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を有しており，これらの平衡は血管系の恒常性の維持に重要な役割を果たしている．LOXは，アラキドン酸に酸素を添加する部位により5-，12-，15-の各酵素に分けられる⁴⁾．5-LOXは主に白血球に存在し，その代表的な代謝物はLT類である．LTB₄は白血球の凝集，遊走等強力な炎症作用を有し，LTC₄，D₄，E₄は気管支収縮，血管透過性促進，血管収縮等炎症反応やアレルギー反応に関わっている⁵⁾．12-LOXは主に血小板に存在し，アラキドン酸は12-HPETE（hydroperoxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid）を経てトリオキシシン類や12-HETE等に代謝される．12-HPETEは，5-LOX活性化作用や白血球遊走作用等の機能を有し，12-HETEは白血球の凝集，遊走作用，血管平滑筋遊走および気管支粘液分泌促進作用等を有する⁷⁾．従って，これらの代謝産

物の産生を抑制すれば，血栓症，動脈硬化症およびアレルギー性疾患の予防につながると考えられる⁷²⁾．関谷らは，12-LOXの特異的な阻害成分として，フラボン類のバイカレイン⁶⁾やクマリン類のエスクレチン⁷⁾を報告した．フラボノイドやクマリン類はカンキツ果実にも含まれているので，カンキツ成分にも代謝酵素の阻害効果が期待される．そこで，主要なカンキツ45種について，果皮抽出物の阻害効果を検索し，有効な品種については阻害成分を特定することで，カンキツ果実に新たな付加価値を見出すことを試みた．

2 カンキツ果実抽出物のアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響

1) 序

農作物に含まれるケルセチン^{73, 74)}や漢方植物にふくまれるバイカレイン⁶⁾などのフラボノイド類はアラキドン酸代謝系のLOX阻害効果を有すると報告されている．一方，カンキツ成分のアラキドン酸代謝に及ぼす影響はこれまでに検討されていない．そこで，45種の果皮抽出物が血小板アラキドン酸代謝に及ぼす影響を検討し，阻害効果をもつ品種ならびにその阻害傾向を把握した．

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

果実は果樹研究所カンキツ部で栽培された45種の適熟果実5～15個を採集した．内訳は，-3でフラボノイド組成を検討した種（Table -5）と同一とした．収穫後，直ちにフラベド，アルベド，じょうのう膜，果肉の4部位に分け，-20で保存した．

(2) 供試試薬，機器

[1-¹⁴C]アラキドン酸および[³H]TXB₂はNew England Nuclear（Boston, MA）から購入した．シリカゲルTLCプラスチックシートはメルク（Darmstadt, Germany），SepPak C₁₈カートリッジ（5.0g）はWaters（Milford, MA）から購入した．その他の試薬は特級品を使用した．放射活性の定量は，Model BAS 1000レーザーイメージ分析システム（Fujix, Japan）を用いた．

(3) サンプル調製

果実部位のうち，アルベドを代謝阻害試験に供試

した．アルベドを凍結乾燥後，0.5mmのスクリーンを装着した遠心ミルで破碎した．破碎物（1.5 g）に25mLの抽出溶媒（メタノール-DMSO（1：1））を加え12時間室温で振とう抽出した．抽出液は3,000xgで10分遠心分離し，上清を回収した．沈殿物に少量の抽出溶媒を加えて短時間攪拌後，同様に遠心分離し，上清を回収する操作を3回繰り返した．回収した抽出液は水で10倍に希釈し，SepPak C₁₈（5.0 g）に通した．カートリッジは予め50mLのメタノールを通した後，50mLの10%メタノールで平衡化したものを用いた．その後，50mLの10%メタノールでカラムを洗浄し，保持された化合物を50 mLのメタノールで溶出させた．溶出液は遠心エバポレーターで乾固させ，少量の水に懸濁後，凍結乾燥し，-80℃で保存した．ルミー（*C. lumia*）とポンカン（*C. reticulata*）のフラベドおよびじょうのう膜の抽出は，アルベドと同様に実施した．果肉抽出物は，果肉をミキサーでホモジナイズし，15,000 xgで20分遠心分離後，上清を回収した．沈殿に少量の抽出液（メタノール-DMSO（1：1））を添加し，3,000xgで10分遠心分離し，上清を回収する操作を3回繰り返した．回収液を合わせ，抽出液の濃度が10%以下になるように水で希釈後，SepPakで処理し，同様の操作でサンプルを調製した．

(4) 血小板アラキドン酸代謝酵素の阻害試験

ラットの血液は通常に摂食させた Wistar-King 系ラット（200 - 300 g）から採取した．血小板の遠心操作による洗浄は，関谷らの方法で行った⁶⁾．反応用の緩衝液として，25mM Tris, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4を用いた．反応液は，130 μLの破碎血小板（2 mgタンパク質/mL），20 μLのサンプル液，そして50 μLの [1-¹⁴C] アラキドン酸（0.05mCi）で構成された．試験する抽出物の終濃度は0.1 - 1,000 μg/mLとした．まず，破碎血小板とサンプル液を37℃で5分間ブレインキュベートした．続いて，基質である [1-¹⁴C] アラキドン酸溶液（0.9nmole）を加え，37℃で5分間酵素反応させた．その後，0.2mLの0.5Nギ酸を添加することにより反応を終了させた．サンプル液に何も加えないコントロールを毎試験時に設け，コントロールで代謝されてくるTXB₂と12-HETEの量を100%とした．代謝物は3 mLの酢酸エチルで抽出し，窒素気

流で乾固させた．乾固物に少量の酢酸エチルを加え，シリカゲル60プラスチックプレートにスポットした．シリカゲル60プレートは，クロロホルム-メタノール-酢酸-水（90：8：1：0.8）で展開した．プレートを乾燥後，レーザーイメージ分析システムで放射活性成分を定量した．TXB₂はスタンダードの [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H] TXB₂とプレート上で移動度の比較により同定し，12-HETEは，GCMSにより同定した⁷⁵⁾．

3) 実験結果および考察

(1) アルベド抽出物の血小板アラキドン酸代謝酵素阻害活性

血小板にはCOXと12-LOXが存在する．これらの酵素により，アラキドン酸はPG，TX，12-HETE等に代謝される（Fig. 1）．測定するTXB₂は血栓形成，血小板凝集，ならびに血管収縮等の作用をもち，12-HETEは，5-LOXの活性化，白血球遊走，血管平滑筋遊走，気管支粘液分泌促進等の作用をもつ．なお，5-LOXは主に白血球に，そして15-LOXは主に赤血球に存在する．結果の一例をFig. 2(a)および(b)に示す．ルミーおよびポンカンのアルベド抽出物は，両者ともCOXおよび12-LOXを阻害した．ルミー抽出物の場合，実験した濃度（0.1 - 1000 μg/mL）では，12-HETEよりもTXB₂の生成をより強く阻害した．これとは逆に，ポンカンの抽出物はTXB₂よりも12-HETEの生成を強く阻害した．この結果から，これらの酵素に対する阻害効果は，種により異なることが明らかになった．田中の分類²¹⁾に従って分類した種の阻害効果をTable 1に示す．全体的な傾向として，アルベド抽出物は12-LOXよりもCOXを阻害する傾向が強かった．試験した種の中では，ルミー（#9），シカイカン（#34），スイートレモン（#8），シトロネ（#6），コベニミカン（#37），およびピロロ（#5）の各抽出物はCOXを強く阻害し，IC₅₀（50% inhibition concentration）値は，それぞれ24，50，66，67，71，90 μg/mLであった．一方，シュウトウ（#17），ヤツシロ（#28），タチバナ（#36），コウジ（#41），ポンカン（#31）はLOXに対して強い阻害効果を持ち，IC₅₀値は，それぞれ56，75，80，89，93 μg/mLであった．初生カンキツ亜属（*Archicitrus*）に属する種は，全般的に

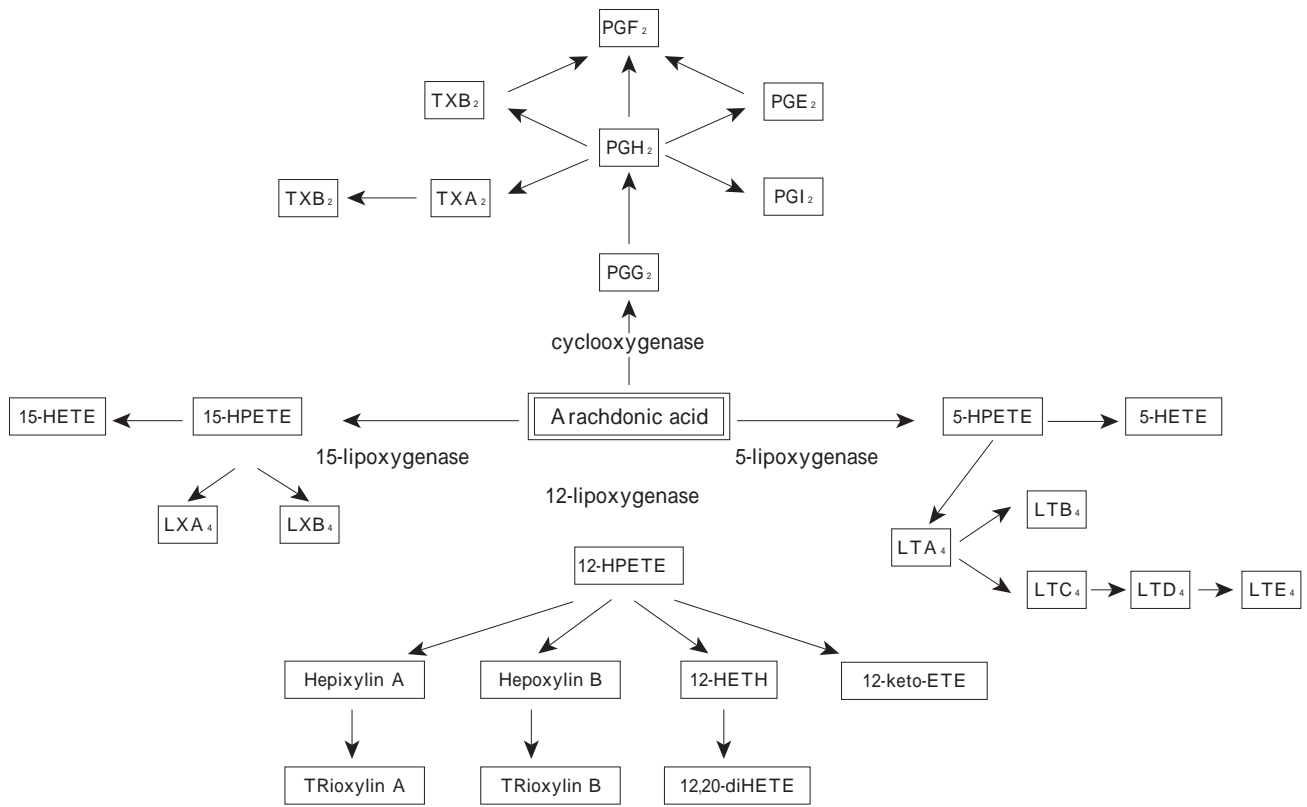


Fig. -1 Arachidonic acid cascade.

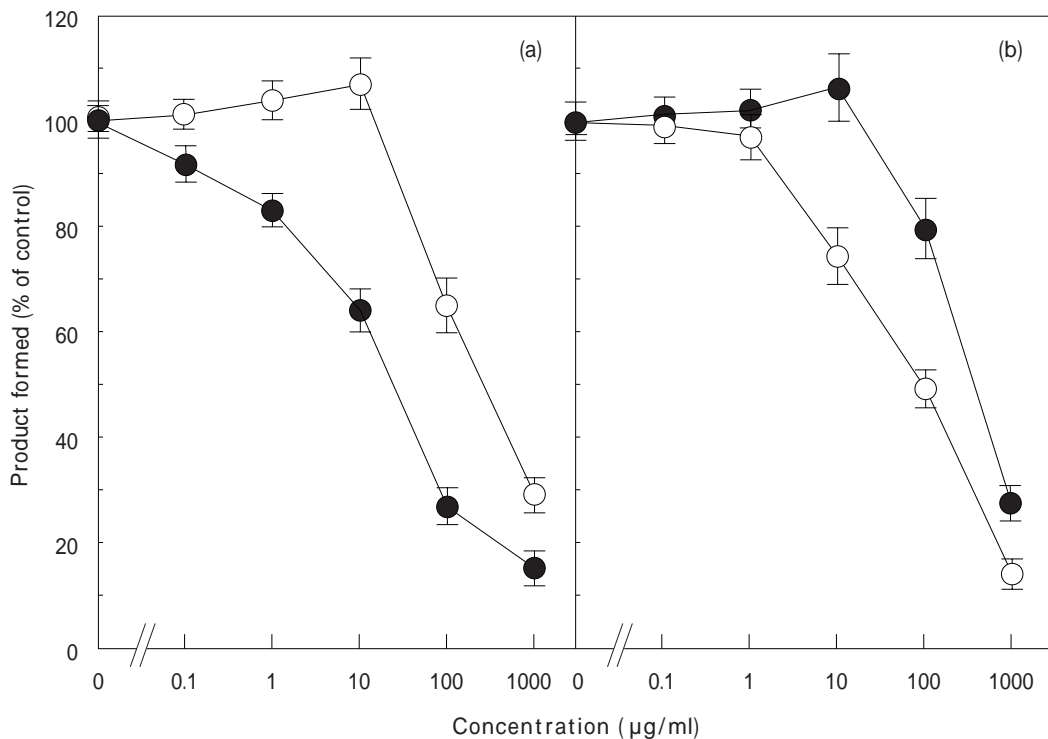


Fig. -2 Dose-response curves of the albedo extract of (a) Lumie (*C. lumia*) and (b) Ponkan (*C. reticulata*) for cyclooxygenase (○) and lipoxygenase (●) in platelets. Platelet cyclooxygenase activity was assayed by measuring the formation of TXB₂ from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Platelet lipoxygenase activity was assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were mean ± SE of three replications.

COXを阻害したが、LOXに対する影響は小さかった。例えば、パペダ区(*Papeda*)、ライム区(*Limonellus*)、シトロロン区(*Citrophorum*)、ザボン区(*Cephalocitrus*)、そしてダイダイ区(*Aurantioides*)のアマダイダイ近似亜区(*Sinensoides*)およびユズ近似亜区(*Osmocitroides*)の各種は選択的にCOXを阻害した。これとは異なり、後生カンキツ亜属(*Metacitrus*)の種は、両者を阻害するものや、阻害効果を有しないもの等、分類区によって阻害傾向が異なった。キャベツ、キュウリ、ナス、ニンニク、タマネギ、シソ、トマト等の抽出物は、COX或いはLOXの一方を選択的に阻害するという報告がある⁷⁶⁾。カンキツ由来の酵素阻害成分は、野菜由来の成分とは異なることが予想される^{77), 78)}、カンキツ果実にも2つの酵素の阻害成分が存在することが明らかになった。

(2) カンキツのシクロオキシゲナーゼ阻害効果およびリポキシゲナーゼ阻害効果と分類区との関係

阻害活性のパターンは、大まかに、TXB₂および12-HETEの生成を阻害するタイプ、どちらか一方の生成を阻害するタイプ、そして阻害活性を持たないタイプの4種類に分けられた。Fig. 3に抽出物100 μ g/mL当たりのTXB₂および12-HETEの生成量比を示す。ベルガモット(#4)、シトロロン果実(#7~#9)、ミカン区・コミカン亜区・柑香類・大果亜類果実(#31~#35)、およびシュウトウ(#17)、コベニミカン(#37)、キシウカン(#38)はTXB₂および12-HETEの生成を阻害した。一方、いずれの酵素に対しても阻害活性を持たない種として、ダイダイ区・ユズ近接亜区(#21, #22)、ユズ区(#23, #25)、ミカン区・真正ミカン亜区(#26, #27)、キンカン区(#43, #44)の各果実、ならびにイヨ(#20)が挙げられた。コントロールよりも12-HETEの生成を増加させる一方でTXB₂の生成を抑制させるような抽出物、例えば、パペダ区(#1)、ライム区(#2~#3, #5)、ダイダイ区・アマダイダイ近似亜区(#18, #19)の種やシトロロン(#6)、シャテンユ(#11)等の抽出物は、COXに対する選択的阻害物の例である。インドメタシンはCOXの特異的な阻害剤であるが、これはTXB₂の生成を抑制するために基質であるアラ

キドン酸が過剰に残り、結果として、LOXの基質となり12-HETEの生成を増加させることになる¹⁾。同様なことが、LOXの阻害にも当てはまり、ザボン区(#10, #13, #14)、ダイダイ区・中果中間亜区(#15, #16)、ミカン区・コミカン亜区・柑香類・小果亜類・広葉品類(#40, #41)、トウキンカン区(#42)の各種、および、カラタチ(#45)、スタチ(#24)、ヤツシロ(#28)、タチバナ(#36)、サンキツ(#39)等の抽出物は、選択的にLOXを阻害する傾向が強いと判断される。カンキツの分類とアルベド抽出物のCOXおよびLOX代謝物の生成との間には、一部例外も含まれたが、良い相関が得られた。Fig. 3において、同一区で阻害パターンの類似するものを囲った。例外としては、シトロロン区(#6~#9)に属するシトロロン(#6)は他と比べてCOX阻害の選択性が強く、ユズ区(#23~#25)のスタチ(#24)、ならびに、真正ミカン亜区(#26~#28)のヤツシロ(#28)は、選択的にLOXを阻害した。また、コミカン亜区・柑香類・小果亜類・狭葉品類(#36~#39)の果実は2つのグループに分かれた。さらには、ダイダイ区果実(#15~#20)は、3つの亜区、すなわち中果中間亜区(#15, #16)、ダイダイ近似亜区(#17)、アマダイダイ近似亜区(#18~#20)が存在するが、亜区内における種の阻害傾向は類似するものの、亜区間では阻害傾向が全く異なるという特異的な傾向が認められた。ダイダイ区が複数に分割される現象は、-2のフラボノイド組成分析においても観察された(Fig. 4およびFig. 5, Table 6およびTable 7)。これらの知見から、2つの酵素の阻害成分の組み合わせは、カンキツ種の化学分類に関する情報をも提供することが示唆された。

(3) 果実の部位別、熟度別のルミーとポンカンの阻害活性

阻害活性の強さと商品性を考慮して、COX阻害活性の強い種としてルミー(#9)、LOX阻害活性の強い種としてポンカン(#31)を選び、これらの熟度別および部位別の阻害効果を調べた。未熟および適熟果実のフラベド、アルベド、じょうのう膜、ジュースの阻害活性データをTable 2に示す。ルミーでは、未熟、適熟果のフラベド抽出物はアルベド抽出物と同程度のCOX阻害効果を有した。じ

Table 1 Inhibitory activities of albedo extracts of citrus plants against platelet cyclooxygenase and lipoxigenase activities^a

Specimen ^b	ref. #	common name	scientific name ^b	IC ₅₀ ^c (µg/ml)	
				cyclooxygenase	lipoxigenase
<i>Citrus-Archicidrus</i>					
<i>Papeda</i>					
<i>Acutifolia</i>	1	Cabuyao	<i>C. macroptera</i>	153	>1000
<i>Obtusifolia</i>	- ^d	-	-		
<i>Longipetiolata</i>	-	-	-		
<i>Limonellus</i>					
<i>Eulimonellus</i>	2	Mexican	<i>C. aurantifolia</i>	124	>1000
	3	Tahiti	<i>C. latifolia</i>	134	>1000
<i>Megacarpa</i>	4	Bergamot	<i>C. bergamia</i>	398	275
<i>Pseudopapeda</i>	5	Biroro	<i>C. Montana</i>	91	>1000
<i>Citrophorum</i>					
<i>Citroides</i>	6	Citron	<i>C. medica</i>	67	>1000
<i>Limonoides</i>	7	Eureka	<i>C. limon</i>	155	500
	8	Sweet	<i>C. limetta</i>	66	302
<i>Decumanooides</i>	9	Lumie	<i>C. lumia</i>	24	275
<i>Cephaicitrus</i>					
<i>Decumana</i>	10	Hirado buntan	<i>C. grandis</i> cv. Hirado	470	>1000
	11	Shtaten yu	<i>C. grandis</i> cv. Shtatian you	305	>1000
<i>Intermedia-Flavocarpa</i>	12	Marsh	<i>C. paradisi</i>	>1000	>1000
	13	Kinukawa	<i>C. glaberrima</i>	>1000	560
<i>-Aureocarpa</i>	14	Hassaku	<i>C. hassaku</i>	890	>1000
<i>Aurantium</i>					
<i>Medioglobosa</i>	15	Natsudaikai	<i>C. natsudaikai</i>	700	530
	16	Sanbokan	<i>C. sulcata</i>	590	230
<i>Aurantioides</i>					
<i>Racemosa</i>	17	Shuto	<i>C. aurantium</i>	360	56
<i>Contracta</i>	-	-	-		
<i>Sinensoides</i>	18	Valencia	<i>C. sinensis</i> cv. Valencia	186	>1000
	19	Morita navel	<i>C. sinensis</i> var. Brasiliensis cv. Morita	470	>1000
	20	Iyo	<i>C. iyo</i>	>1000	>1000
<i>Osmocitroides</i>					
<i>Tenuicarpa</i>	21	Hyuganatsu	<i>C. tamurana</i>	490	>1000
<i>Compacta</i>	-	-	-		
<i>Parabonilis</i>	22	Shunkokan	<i>C. shunkokan</i>	980	>1000
<i>Citrus-Metacitrus</i>					
<i>Osmocitrus</i>					
<i>Protpmocitrus</i>	-	-	-		
<i>Euosmocitroides</i>	23	Yuzu	<i>C. junos</i>	>1000	>1000
	24	Sudachi	<i>C. sudachi</i>	>1000	170
	25	Kabosu	<i>C. sphaerocarpa</i>	>1000	>1000
<i>Pseudoacrumen</i>	-	-	-		
<i>Acrumen</i>					
<i>Euacrumen</i>	26	King	<i>C. nobilis</i> var. <i>Knep</i>	>1000	>1000
	27	Satsuma	<i>C. unshiu</i>	>1000	>1000
	28	Yatsushiro	<i>C. yatsushiro</i>	720	75
<i>Microacrumen-Anisodora</i>	29	Keraji	<i>C. keraji</i>	442	>1000
	30	Oto	<i>C. oto</i>	580	>1000
<i>Microacrumen -Citroidora</i>					
<i>-Megacarpa</i>	31	Ponkan	<i>C. reticulata</i>	298	93
	32	Dancy tangerine	<i>C. tangerina</i>	322	302
	33	Jimikan	<i>C. succosa</i>	120	158
	34	Shikaikan	<i>C. suhuiensis</i>	50	592
	35	Clementine	<i>C. clementia</i>	770	>1000
<i>-Microcarpa-Angstifolia</i>	36	Tachibana	<i>C. tachibana</i>	810	80
	37	Kobenimikan	<i>C. erythroa</i>	71	420
	38	Kishu	<i>C. kinokuni</i>	300	880
	39	Sunki	<i>C. sunki</i>	593	930
<i>-Latifolia</i>	40	Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>	>1000	>1000
	41	Koji	<i>C. leiocarpa</i>	>1000	89
<i>Pseudofortunella</i>	42	Shikikitsu	<i>C. madurensis</i>	>1000	830
<i>Fortunella-Eufortunella</i>	43	Oval kumquat	<i>F. margarita</i>	643	>1000
	44	Neiwa kumquat	<i>F. crassifolia</i>	680	>1000
<i>Poncirus</i>	45	Trifoliate orange	<i>P. trifoliana</i>	>1000	>1000

^a Values for lipoxigenase were measured as 12-HETE formation from [1-¹⁴C]arachidonic acid; those for cyclooxygenase were measured as thromboxane B₂ formation from [1-¹⁴C]arachidonic acid.

^b The classification and the nomenclature of Citrus plants were based on Tanaka's system.

^c Values were average of three replications.

^d; not investigated.

よのう膜抽出物の阻害効果は、フラベド、或いは、アルベド抽出物より低く、果実の成熟に伴い低下の程度が大きい傾向であった。ジュース抽出成分の阻

害効果は全く認められなかった。適熟果実1個当たりの抽出物重量は、フラベド、アルベド、じょうのう膜で、それぞれ、70.57、102.35、25.63mgであり、

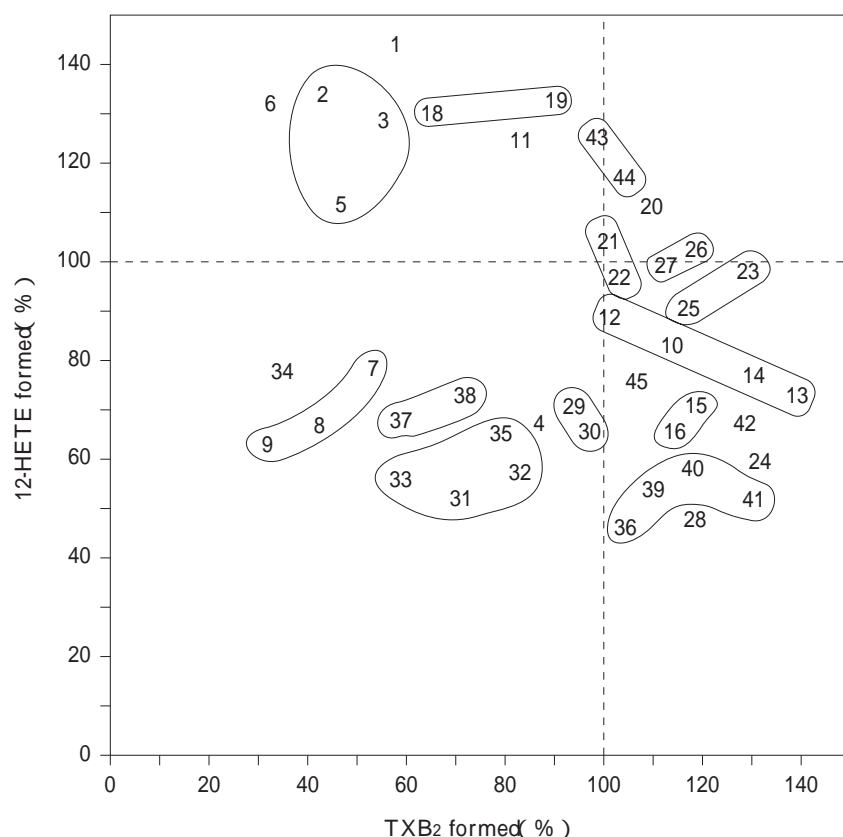


Fig. -3 Correlation between the classification of citrus plants and the influences of their albedo extracts on the formation of TXB₂ and 12-HETE. Values were percent formation versus control of TXB₂ and 12-HETE in the presence of each extract at 100 μg/ml (mean of three replications). For the identity of numbers, see Table -1. Encircled numbers showed similar levels of influence on each other among the same group based on Tanaka's classification system.

Table -2 Effects of tissue type and ripeness of Lumie (*C. lumia*) and Ponkan (*C. reticulata*) on the inhibitory activity of extracts on platelet cyclooxygenase and lipoxygenase

Tissue	Inhibition ^a (%)			
	Lumie ^b (cyclooxygenase)		Ponkan ^c (lipoxygenase)	
	unripe	ripe	unripe	ripe
flavedo	59.5 ± 4.9	58.0 ± 4.1	49.0 ± 6.7	56.5 ± 7.3
albedo	56.8 ± 4.5	56.5 ± 4.3	53.1 ± 6.9	54.6 ± 7.0
segment membrane	47.8 ± 4.8	29.4 ± 3.8	42.3 ± 6.4	13.9 ± 3.9
juice vesicle	<i>nd</i> ^d	<i>nd</i>	54.3 ± 6.8	34.5 ± 6.2

^a Values were percent formations versus control of TXB₂ or 12-HETE in the presence of each extract at 100 μg/ml.

^b Mean ± SE weights of unripe and ripe Lumie were 38.4 ± 2.6 and 51.8 ± 4.1 g, respectively.

^c Mean ± SE weights of unripe and ripe Ponkan were 41.7 ± 4.9 and 109.6 ± 6.6 g, respectively.

^d *nd*, not detected.

果皮（フラベドおよびアルベド）の合計重量は阻害効果を示す画分重量のおよそ87%を占めた。一方、ポンカンでは、未熟および適熟果の4つの部位全てにおいてLOXの阻害効果が認められた。フラベド

およびアルベド抽出物の阻害活性は、成熟に伴い若干増加したが、逆に、じょうのう膜およびジュースの阻害活性は成熟に伴い、著しく減少した。適熟果実1個当たりの抽出物重量は、フラベド、アルベド、

じょうのう膜，ジュースで，それぞれ，268.91 (36.1%)，265.02 (35.6%)，167.29 (22.5%)，43.85 (5.9%)であり，阻害成分の供給源には果皮（フラベドおよびアルベド）が優れると判断された．以上の結果，血小板アラキドン酸代謝に關与するCOXと12-LOXに対して阻害効果を持つカンキツ種および分類区を特定することができた．2つの酵素に対する阻害成分は，共に果皮を主体に分布した．阻害成分の構造は未知であるが，LOX阻害成分はジュースにも分布することから，比較的極性の高い構造が予想された．

3 ポンカン果実由来血小板リポキシゲナーゼ阻害成分の単離と同定

1) 序

前節でラット血小板アラキドン酸代謝に及ぼすカンキツ果皮抽出成分の影響をスクリーニングした結果，血栓等に関与するCOX阻害効果の高い種にルミー (*C. lumia*)，シカイカン (*C. suhuiensis*)，スイートレモン (*C. limetta*)，シトロソ (*C. medica*)，コベニミカン (*C. erythrosa*)，ピロ口 (*C. montana*)等，また動脈硬化やアレルギーに関与する12-LOX阻害効果の高いものにシュウトウ (*C. aurantium*)，ヤツシロ (*C. yatsushiro*)，タチバナ (*C. tachibana*)，コウジ (*C. leiocarpa*)，ポンカン (*C. reticulata*)等の種を見出した⁷⁹⁾．本節では，LOX阻害効果の強い種のうち，経済栽培されているポンカン果実より阻害成分を単離し，その構造を決定することを目的とした．

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

適熟したポンカン果実10kgは，果樹研究所カンキツ部で栽培したものを提供して頂いた．

(2) 供試試薬，機器

旋光度の測定は日本分光のDIP-360ポーラリメータを用いた．分子量の測定はPerSeptive Biosystems社のESI-TOF-MS装置を用いた．IRスペクトルはNicolet社の550システムを用いた．NMRスペクトルは，日本電子製Lambda500スペクトロメーター (^1H ; 500MHz, ^{13}C ; 125.65MHz)を用いた．HPLC装置は島津SPD-M10AVPダイオードアレー検出器を装備したLC6ADシステムを用いた．

(3) リポキシゲナーゼ阻害試験

血小板アラキドン酸代謝阻害試験は前節の手法に準じた．5-LOX阻害効果の測定にはラット多核白血球を用いた．Wistar-King系ラットの腹腔に5%グリコーゲン (20mL/kg)を注射し，2時間放置した．エーテルで麻酔後，腹腔より多核白血球を採取し，50mMのリン酸カリウムバッファー (pH7.4)で洗浄した．セルフリーの測定系では，細胞を破碎し，4℃で1時間遠心分離 (100,000xg)後，上清を酵素液 (2 mg protein/mL)とした．反応溶媒には50mMリン酸カリウム (pH7.4)，3 mM CaCl_2 ，2 mM ATPを用いた．試験液 (20 μL)と酵素液 (130 μL)を37℃で5分間プレインキュベート後，50 μL の [$1\text{-}^{14}\text{C}$]アラキドン酸 (0.05mCi)を添加し，5分間反応させた．反応は0.2mLの0.5Nギ酸を添加することにより終了させた¹⁸⁾．サンプル液に何も加えないコントロールを毎試験時に設け，コントロールで代謝されてくる5-HETEの量を100%とした．代謝物は3 mLの酢酸エチルで抽出し，窒素気流で乾固させた．乾固物に少量の酢酸エチルを加え，シリカゲル60プラスチックプレートにスポットした．シリカゲルプレートは，4℃でエーテル-石油エーテル-酢酸 (50:50:1)で展開した⁸⁰⁾．

(4) 阻害成分の抽出および精製

ポンカン果実10kgより果皮を調製し，凍結乾燥後，遠心ミルで破碎した．破碎物 (550 g)はソックスレー抽出機を用い，*n*-ヘキサン，クロロホルム，エタノール，メタノールの順に抽出した．このうち，エタノール抽出物を減圧乾固し，Amberlite XAD-2カラム (2.0kg)にかけた．カラムを水で洗浄後，メタノール濃度が20%ずつ増加するステップワイズグラジエント法で吸着成分を溶出させた．メタノールで溶出後，最後にアセトンで溶出した．60%および80%メタノール水溶液の溶出画分を合わせ濃縮乾固した．これをメタノールで平衡化させたSephadex LH-20カラム (1.0L)にかけ，メタノールで溶出させた．活性画分を集め，YMC-Pak ODS AL (250 x 20mm)を装備したHPLCで精製した．流速は5.0mL/minとし，検出は220 - 360nmの吸収波長をモニターした．溶出条件は，0.1% TFA (trifluoroacetic acid)を含むメタノール-水のリニアグラジエント法とし，1時間でメタノール濃度を40%

から80%に増加させた。これにより、5つの阻害活性をもつ画分を得た。活性画分はさらに0.1% TFAを含む45%メタノール水溶液のアイソクラティックの溶離条件で精製し、2.16mgの化合物(1)および3.11mgの化合物(2)が単離された。

3) 実験結果および考察

(1) 抽出および精製

ポンカン果皮の各抽出溶媒による抽出画分のLOX阻害活性は、*n*-ヘキサンおよびクロロホルム抽出物では100 μ g/mL当たり0%，10 μ g/mL当たりのエタノール抽出物が51%，メタノール抽出物が37%であった。このうち、最も阻害効果の強いエタノール抽出物(112g)をAmberlite XAD-2、続いてSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーで分画し、それぞれ3.3g、1.0gの活性画分を得た。これらの活性画分は、10 μ g/mL当たり、それぞれ63%、68%酵素阻害した。続いて、活性画分(1.0g)を調製用ODSカラムを用いたHPLCで精製した。この結

果、5つの活性画分が得られた。これらの10 μ g/mL当たりの阻害活性は、順に44%、48%、37%、55%、38%であった。画分4をさらに精製し、純粋な化合物(1)と(2)を得た。フォトダイオードアレー検出器によるこれらのUV吸収極大波長は330、230、220nm付近にあることから、フラボノイド類⁸¹⁾とは異なり、フェニルプロパノイド類⁸²⁾であることが予測された。

(2) 構造決定

a 化合物(2)の構造および特性

化合物(2)のプロトンとカーボンシグナルは、¹H-¹H COSY (correlation spectrometry), ¹H-detected HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity) のスペクトルを基に決定した (Table -3)。¹Hおよび¹³C NMRスペクトルから、化合物(2)は、キナ酸、フェルロイル基、カフェオイル基を1:1:1の割合で構造中に含むことが判明した。キナ酸部分のH₃, H₄, H₅プロトンシグナルは、

Table -3 ¹H and ¹³C NMR spectral data for (2) in (CD₃OD)

	¹³ C NMR	¹ H NMR	H coupled with C ^a
<i>Quinic acid moiety</i>			
1	81.1		
2	38.7	2.10, 2.33 (each 1H, <i>m</i>)	H _{2eq} , H _{2ax} , H ₅
3	69.2	4.36 (1H, <i>m</i>)	H _{2eq} , H _{2ax} , H ₄ , H ₅ , H ₆
4	75.0	5.13 (1H, <i>m</i>)	H ₆
5	75.9	5.55 (1H, <i>m</i>)	
6	38.4	2.25 (2H, <i>m</i>)	H _{2eq} , H ₆ , COOCH ₃
CO	175.3		
CH ₃	53.2	3.73 (3H, <i>s</i>)	
<i>4-Feruloyl group</i>			
1'	127.8		H ₅ , H ₇ , H ₈
2'	111.8	7.14 (1H, <i>d</i> , 1.9Hz)	H ₆ , H ₇
3'	149.4		OCH ₃ , H ₅
4'	150.8		H ₂ , H ₅ , H ₆
5'	116.6	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2 Hz)	H ₂ , H ₆
6'	124.3	7.05 (1H, <i>dd</i> , 8.1, 1.8 Hz)	H ₂ , H ₆
7'	147.7	7.66 (1H, <i>d</i> , 15.9 Hz)	H ₇
8'	115.2	6.39 (1H, <i>d</i> , 15.8 Hz)	H ₄ , H ₇ , H ₈
9'	168.5		
CH ₃	56.5	3.86 (3H, <i>s</i>)	
<i>5-Caffeoyl group</i>			
1''	127.6		H ₅ , H ₇ , H ₈
2''	115.2	7.01 (1H, <i>d</i> , 1.9 Hz)	H ₆ , H ₇
3''	146.9		H ₅
4''	149.8		H ₂ , H ₅ , H ₆
5''	116.5	6.76 (1H, <i>d</i> , 8.3 Hz)	H ₂ , H ₅ , H ₇
6''	116.5	6.91 (1H, <i>dd</i> 8.2, 1.9 Hz)	H ₂ , H ₆
7''	147.7	7.51 (1H, <i>d</i> , 15.9 Hz)	
8''	114.6	6.17 (1H, <i>d</i> , 15.9 Hz)	H ₅ , H ₇ , H ₈
9	168.0		

^a in HMBC spectrum

遊離のキナ酸と比較して、低磁場側にそれぞれ0.27, 1.74, 1.56ppmシフトしていた。カフェオイル基がキナ酸の水酸基とエステル結合すると、プロトンのケミカルシフトは低磁場側に1.1 - 1.7ppmシフトすると報告されている⁸³⁾。また、4, 5-O-ジカフェオイルキナ酸のH₃, H₄, H₅シグナルは、低磁場側に0.34, 1.68, 1.53ppmシフトするという報告もある⁸⁴⁾。キナ酸部分のH₄, H₅とカルボニル基のC_{9'}, C_{9''}とのHMBC相関から、フェルロイルおよびカフェオイル基は、それぞれC₄-OH, C₅-OHと結合していることが判明した。メチルプロトン(3.73ppm)とキナ酸部分のカルボニルカーボンとのHMBC相関から、メチルエステル基の存在が確認された。これらのNMRスペクトルデータとESI-TOF-MSデータから、化合物(2)の構造は、4-O-フェルロイル-5-O-カフェオイルキナ酸メチルと決定した(Fig. -4)。一方、化合物(1)のプロトンとカーボンシグナルは、メチルエステルシグナル(3.73ppm)を除き、化合物(2)のシグナルと一致した。それゆえ、化合物(1)の構造は、4-O-フェルロイル-5-O-カフェオイルキナ酸と決定した(Fig. -4)。

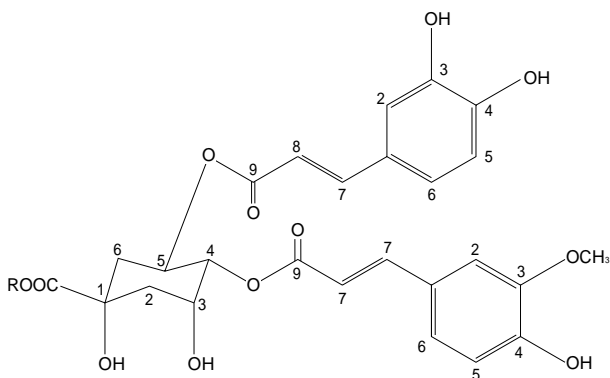


Fig. -4 Structures of inhibitory compounds against rat platelet lipoxygenase from Ponkan (*C. reticulata*) fruit.

無色の結晶，旋光度：[α]_D²⁰-171.0° (c0.1, メタノール)，UV吸収スペクトル： λ _{max} (エタノール)：328, 236, 219nm, ESI-TOF-MS：[M-H]⁻の実測値；543.1489, 計算値C₂₇H₂₇O₁₂ (543.1502), IR (λ _{max}) cm⁻¹：3367, 1162, 1131, 987, 817。

b 化合物(1)の構造および特性

黄色の結晶，旋光度：[α]_D²⁰-24.7° (c0.1, メタノール)，UV吸収スペクトル： λ _{max} (エタノール)：328, 233, 216, 206nm, ESI-TOF-MS：[M-H]⁻の実測値；529.1332, 計算値；C₂₆H₂₅O₁₂ (529.1346), IR (λ _{max}) cm⁻¹：3372, 1698, 1631, 1600, 1518, 1456, 1435, 1379, 1276, 1188, 1162, 1131, 987, 817

ール)，UV吸収スペクトル： λ _{max} (エタノール)：328, 233, 216, 206nm, ESI-TOF-MS：[M-H]⁻の実測値；529.1332, 計算値；C₂₆H₂₅O₁₂ (529.1346), IR (λ _{max}) cm⁻¹：3372, 1698, 1631, 1600, 1518, 1456, 1435, 1379, 1276, 1188, 1162, 1131, 987, 817

¹H NMR (CD₃OD) シグナル： 2.13および2.32 (H_{2eq}, H_{2ax}, 1H, m), 2.29 (H₆, 2H, m), 3.84 (OCH₃, 3H, s), 4.39 (H₃, 1H, m), 5.14 (H₄, 1H, m), 5.64 (H₅, 1H, m), 6.19 (H_{8'}, 1H, d, 15.9), 6.38 (H_{8''}, 1H, d, 15.8), 6.74 (H_{5'}, 1H, d, 8.3), 6.78 (H_{5''}, 1H, d, 8.2), 6.90 (H_{6'}, 1H, dd, 8.2, 1.8), 7.00 (H_{2'}, 1H, d, 1.8), 7.04 (H_{6''}, 1H, dd, 8.2, 1.8), 7.12 (H_{2''}, 1H, dd, 1.8), 7.52 (H_{7'}, 1H, d, 15.9), 7.65 (H_{7''}, 1H, d, 15.8)。

¹³C NMR (CD₃OD) シグナル： 38.4 (C₆), 39.4 (C₂), 56.5 (OCH₃), 69.1 (C₃), 75.8 (C₄), 76.1 (C₅), 81.1 (C₁), 118.8 (C_{2'}), 114.8 (C_{8'}), 115.2 (C_{2''}), 115.3 (C_{8''}), 116.5 (C_{5'}), 116.8 (C_{5''}), 123.1 (C_{6'}), 124.2 (C_{6''}), 127.7 (C_{1'}), 127.7 (C_{1''}), 146.8 (C_{3'}), 147.6 (C_{7'}), 147.6 (C_{7''}), 149.4 (C_{3''}), 149.7 (C_{4'}), 150.7 (C_{4''}), 168.3 (C_{9'}), 168.6 (C_{9''}), 176.8 (CO)。

¹H-¹H COSY correlations (CD₃OD)： H_{2eq}/H_{2ax}, H_{2eq}/H₃, H₆/H_{5'}, H_{2ax}/H_{3'}, H₄/H_{3'}, H₄/H_{5'}, H_{8'}/H_{7'}, H_{8''}/H_{7''}, H_{5'}/H_{6'}, H_{5''}/H_{6''}, H_{6'}/H_{2'}, H_{6''}/H_{2''}。

(3) 化合物(1)および(2)の阻害活性

コーヒー酸は12-LOXの阻害剤として広く知られており⁸⁵⁾，これをポジティブコントロールとして，化合物(1)および(2)の阻害効果と比較した(Fig. -5)。化合物(1)および(2)は，コーヒー酸よりも強い阻害活性を有した。化合物(1)ならびに(2)のIC₅₀値は，それぞれ5.5, 1.9 μMであり，比較的阻害活性の強い部類の化合物であった。化合物(1)よりも(2)の阻害活性が強いという結果は，5-および12-LOXの阻害成分において構造中のカルボキシル基がメチルエステル化すると阻害効果が増加するという報告と一致した^{20, 86)}。また，これらは5-LOXに対しても阻害効果を有し，化合物(1)ならびに(2)のIC₅₀値は，それぞれ，2.67, 0.70 μMであった。コーヒー酸やフェルラ酸等のケイ皮酸誘導体は植物界に広く分布することから，これらの構造とLOX阻害との相関関係

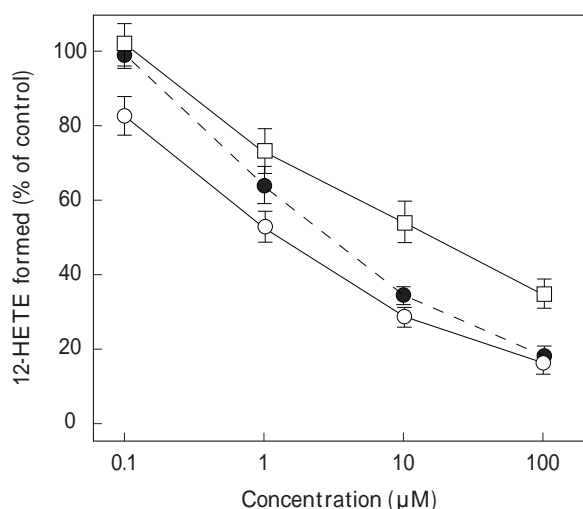


Fig. 5 Dose-response curves of purified caffeoylquinic acid derivatives and caffeic acid for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [14 C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \square , methyl-4-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid; \circ , 4-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid; \bullet , caffeic acid.

を明らかにすれば天然資源の新たな利用につながることを期待される。

4 ルミー果実由来血小板リポキシゲナーゼ阻害成分の単離と同定

1) 序

カンキツ果皮抽出成分のラット血小板アラキドン酸代謝系に及ぼす影響を検討した結果、12-LOX、またはCOXを選択的に阻害する種、両者を阻害する種、阻害効果をもたない種が存在することを確認した⁷⁹⁾。前節では、12-LOXの阻害成分として、ミカン区のポンカン (*C. reticulata*) 果皮から4-O-フェルロイル-5-O-カフェオイルキナ酸とそのメチルエステルを単離した⁸⁸⁾。本節では、ルミー (*C. lumia*) 果皮を材料にしてLOX阻害成分を単離し、その構造を決定することを目的とした。ルミー果実は、シトロン区に属することから、ポンカンとは異なる阻害成分の同定が期待された。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

適熟したルミー、ユーレカレモン (*C. limon*)、

スタチ (*C. sudachi*)、コウジ (*C. leiocarpa*) 果実は、果樹研究所カンキツ部で栽培したものを提供して頂いた。

(2) 供試試薬、機器

NMRスペクトルは、日本電子製Lambda400スペクトロメーター (^1H ; 400MHz, ^{13}C ; 100MHz) を用いた。単糖の分析は、ダイオネクス社のHPAEC (high performance anion exchange chromatography) システムを用いた。その他の装置は前節に準じた。

(3) リポキシゲナーゼ阻害試験

前節の手法に準じた。

(4) 阻害成分の抽出および精製

ルミー果実10kgより果皮 (700g) を調製し、凍結乾燥後、遠心ミルで破碎した。破碎物 (502.2g) に3Lのn-ヘキサンを添加し、室温で2時間攪拌後、懸濁液を減圧下で濾過した。残渣を回収し、同様の操作をさらに2回繰り返した。残渣を減圧乾燥後、同様の方法でジクロロメタン、熱エタノールで抽出した。各抽出液を減圧乾固し、エタノール抽出画分は80%メタノール水溶液に懸濁後、n-ヘキサンと二層分配した。メタノール水溶液画分を減圧乾固後、少量の40%メタノールに溶解し、Amberlite XAD-2カラム (2kg) に添加した。カラムを水で洗浄後、メタノール濃度が20%ずつ増加するステップワイズグラジエント法で吸着成分を溶出させた。40%および60%メタノール水溶液の溶出画分を合わせ濃縮乾固した。HPLCによる精製は、0.2%のギ酸を含むメタノール濃度が20から60%の濃度によるメタノール-水のリニアグラジエント法で行った。精製用のカラムとして、YMC-Pak ODS AL (250 x 20mm) とガードカラム (50 x 20mm) を用いた。インジェクション用量は500 μL 、流速は5.0mL/minとし、検出は220 - 360nmの吸収波長をモニターした。

(5) 構成糖の加水分解分析

精製した化合物を2M TFA水溶液に溶解し、120 $^{\circ}\text{C}$ で75分間加水分解した。遊離した単糖は、ダイオネクス社のCarbo Pac PA1カラム (250 x 4mm) を装備したHPAECシステムにより水を移動相にして分析した⁸⁹⁾。

(6) フラボノイドの定量分析

-2の手法に準じた⁹⁰⁾。

3) 実験結果および考察

(1) 抽出および精製

ルミー果皮から阻害成分の抽出、単離の概略を Fig. -6 に示す。果皮は約70%の水分を含むため、凍結乾燥処理は抽出段階において、精油成分の除去に有効であった。*n*-ヘキサンならびにジクロロメタン抽出画分は、12-LOXに対する阻害効果をもたなかった。これに対し、エタノール抽出画分は100 μ g/mLで酵素活性を42.5%阻害した。この抽出成分を減圧乾固し、*n*-ヘキサンとメタノール水溶液の二層分配処理により油成分を除去した。メタノール水溶液画分(102.62 g)の阻害効果は、45.6%であった。Amberlite XAD-2(2 kg)カラムによる吸着クロマトグラフィーでは、水、20%メタノール、40%メタノール、60%メタノール、80%メタノール、メタノール画分が得られ、100 μ g/mLにおける阻害活性は、それぞれ0、33.2、86.4、73.9、26.8、20.5%であった。活性の強い40%および60%画分を合わせ(7.73 g)、さらに分取用HPLCにより精製した。精製した化合物(1.62 g)は薄黄色の固体で、水およびエタノールに可溶であり、100 μ g/mLで酵素活性を77.9%阻害した。

(2) 構造決定

ESI-TOF-MS測定による化合物の分子量は595.16623:[M-H]⁻であり、元素組成はC₂₇H₃₁O₁₅と

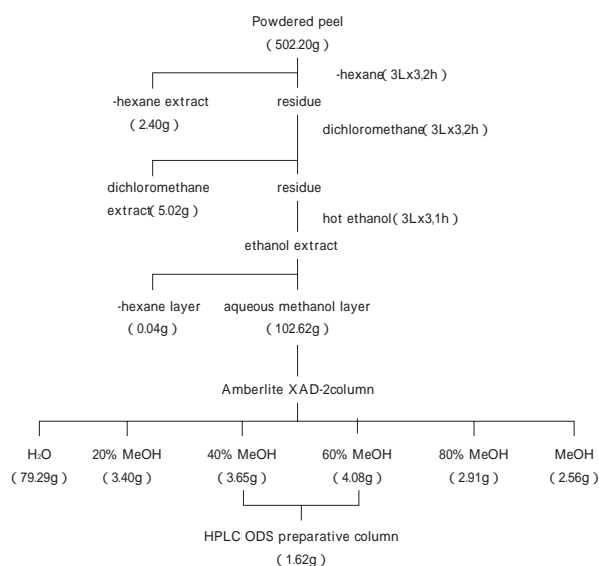


Fig. -6 Extraction and isolation of inhibitory compounds against platelet lipoxigenase from the peel of Lumie.

推定された。エタノール溶媒中におけるUV吸収の極大値は285および330 μ gであった。フラバノン類の定量で利用される還元反応は陽性の赤色を呈した⁹¹⁾。加水分解による単糖の分析でグルコースとラムノースがモル等量比で存在することが確認された。阻害成分ならびにそのアグリコンの¹Hおよび¹³C NMRのケミカルシフト値をTable -4に示す。フラバノンに特徴的なケミカルシフト値である¹H NMRスペクトルの2.77(1H, dd), 3.12(1H, dd), および5.35(2H, dd), そして¹³C NMRスペクトルの44.2(C-3)および80.7(C-2)が観察された⁹²⁾。¹H NMRスペクトルにおける6.79(2H, s, H-5'およびH-6')および6.93(1H, s, H-2')のシグナル、および¹³C NMRスペクトルにおける114.8(C-2'), 116.3(C-5'), および119.3(C-6')の各シグナルは、3',4'-ジヒドロキシフェニル基の存在を意味した⁹³⁾。また、個々の¹Hおよび¹³Cシグナルは三宅らがECRとエリオジクチオール(5, 7, 3', 4'-テトラヒドロキシフラバノン; EDC)の測定で報告した値とほぼ一致した⁹⁴⁾。加えて、HPLCの保持時間も一致することから、阻害化合物はECRと判断された(Fig. -1)。

(3) エリオシトリンおよびそのアグリコンの代謝阻害活性

これまでにECRには、抗酸化活性⁹⁴⁾、ラット肝臓の酸化傷害防止効果⁹⁵⁾が報告されている。そのアグリコンであるEDCは、抗酸化活性⁹⁶⁾に加えて、ハムスター胚培養細胞におけるベンツピレン代謝阻害効果⁹⁷⁾等が報告されている。しかし、アラキドン酸代謝系におけるこれらのLOX阻害効果に関しては報告されていない。ECRとEDCのラットLOXに対する阻害効果をFig. -7およびFig. -8に示す。ECRは12-LOX(IC₅₀: 22.3 μ M)ならびに5-LOX(IC₅₀: 29.1 μ M)に対して、ほぼ同じ程度に阻害した。一方、EDCは2つの酵素に対して極めて強い阻害活性をもっており、12-ならびに5-LOXに対するIC₅₀値は、それぞれ0.07, 0.20 μ Mであった。ECRは、腸内細菌によりEDCおよび3, 4'-ジヒドロキシシキミ酸に変換され、血漿中では、それぞれEDC, ホモエリオジクチオール(5, 7, 4'-トリヒドロキシ3'-メトキシフラバノン), およびヘスペレチン(5, 7, 3'-トリヒドロキシ4'-メトキシフラ

Table 4 ^1H and ^{13}C NMR data for inhibitory compound and its aglycone in CD_3OD

atom	inhibitory compound		aglycon	
	^1H (ppm) Δ (Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm) Δ (Hz)	^{13}C (ppm)
2	5.35 (dd, 13.2, 2.3)	80.7	5.28 (dd, 13.0, 2.9)	80.5
3 cis	2.77 (dd, 17.1, 7.3)	44.2	2.70 (dd, 17.3, 7.4)	44.1
3 trans	3.12 (dd, 17.1, 13.5)		3.07 (dd, 17.4, 13.2)	
4		198.5		197.8
5		165		165.5
6	6.18 (d, 2.4)	98	5.88 (d, 2.0)	97
7		166.9		168.4
8	6.19 (d, 2.4)	97.1	5.89 (d, 2.4)	96.2
9		164.5		164.9
10		105		103.4
1'		131.6		131.8
2'	6.93 (s)	114.8	6.91 (s)	114.7
3'		146.6		146.5
4'		147		146.9
5'	6.79 (s, br)	116.3	6.78 (s, br)	116.3
6'	6.79 (s, br)	119.3	6.78 (s, br)	119.2
7-O-rutinoside				
G1	4.93 (d, 6.9)	101.2		
G2	3.0-4.01 (m)	74.7		
G3	3.0-4.01 (m)	77.9		
G4	3.0-4.01 (m)	71.4		
G5	3.0-4.01 (m)	77.2		
G6	3.0-4.01 (m)	67.5		
R1	4.69 (s, br)	102.2		
R2	3.0-4.01 (m)	72.1		
R3	3.0-4.01 (m)	72.5		
R4	3.0-4.01 (m)	74.1		
R5	3.0-4.01 (m)	69.8		
R6	1.19 (d, 6.0)	18.0		

バノン)とグルクロン酸との抱合体, ならびに3, 4-ジヒドロキシシキミ酸が検出される⁹⁸⁾. 下井らは, 炎症反応の局部において, フラボノイドとグルクロン酸の抱合体からグルクロン酸の脱離が起きる可能性を報告している⁹⁹⁾. 従って, EDCは炎症反応において, 生体内でLOXの阻害効果を発現する可能性がある. 加えて, コーヒー酸は12-および5-LOXの阻害能を有しており⁸⁵⁾, コーヒー酸の脱水素誘導体である3, 4-ジヒドロキシシキミ酸も同様にこれらの阻害能を有することが推測される.

(4) カンキツのエリオシトリン含量とトリポキシゲナーゼ阻害効果

ECRはカンキツ果実に広く分布しており (Table -11), とりわけライム区およびシトロン区果実では, スイートレモンを除き, 高濃度に含有される. 果皮含量の高い種として, コウジ, ルミー, ユーレカレモン, ならびにタヒチライムが挙げられ, 100

g当たりそれぞれ165.2, 146.0, 131.6, 104.8mg含有した (Table -8). 経済栽培されていて含量の高い品種には, ユーレカレモンならびにスタチがあり, 果汁中の含量も高い (Table -10) ことから, 当化合物の有効な供給源であると考えられた. 果皮抽出物の12-LOX阻害効果に関して, コウジ, ルミー, ユーレカレモン, およびタヒチライム抽出物の IC_{50} 値は, それぞれ89, 275, 500, および $>1000 \mu\text{g}/\text{g}$ であり (Table -1), ECR含量と12-LOXに対する阻害効果の順位は一致した. しかし, タヒチライムは104.8mg/100gのECRを含むにも拘わらず, 12-LOXの実質的な阻害活性をもたなかった. この理由として, 血小板には1つの基質を触媒するCOXと12-LOXが存在するためであると考えられる. 一方の酵素が選択的に阻害されると, もう一方の代謝物の生成量は増大することが報告されている¹⁾. 従って, COXの強力な阻害成分が存在すれば, 代謝

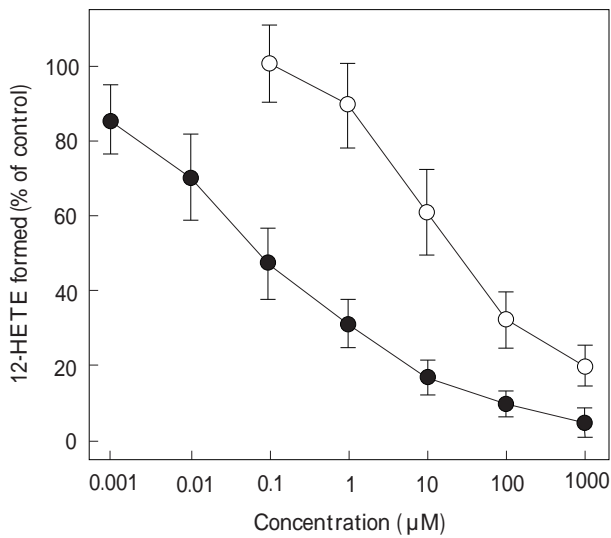


Fig. -7 Dose-response curves of eriocitrin and eriodictyol for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C] arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , eriocitrin; \circ , eriodictyol.

の流れはLOXに偏り、LOXの代謝物である12-HETEの生成量はコントロール値よりも大きくなる。タヒチライムでは、抽出物のCOX阻害に対するIC₅₀値は134 μg/gと強いので (Table -1), COX阻害成分の影響を受けた結果、ECRによる12-LOXの阻害効果が測定系の性質上表現されなかったものと推察された。一方、スイートレモンはECRを含有しない (Table -8) が12-LOX阻害活性をもつことから (Table -1), 異なる阻害成分を含むことが考えられた。

- (5) エリオシトリン高含有品種の果実における分布
ユーレカレモン, ルミー, スダチ, ならびにコウ

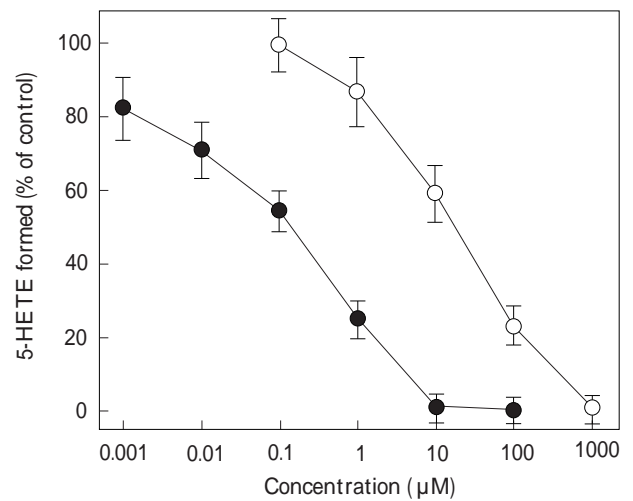


Fig. -8 Dose-response curves of eriocitrin and eriodictyol for platelet PMNL 5-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 5-HETE from [1-¹⁴C] arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , eriocitrin; \circ , eriodictyol.

ジ果実の各部位におけるECRの濃度および含量割合をTable -5に示す。これらの果実において最も濃度の高い部位はアルベドであった。アルベドはまた、ユーレカレモン (42.5%), ルミー (40.1%), およびスダチ (54.6%) において最も含量割合の高い部位でもあった。逆に、コウジでは果汁における含量割合が最も高く (67.5%), ユーレカレモン, ルミー, そしてスダチでは, それぞれ35.8, 32.4, および24.3%であった。一般的にカンキツ果実におけるフラボノイド濃度および部位別含量はアルベドが最も高く, 果汁においてはかなり少ない (Table -7およびTable -10)。例えば, ユーレカレモンの主要なフラボノイドであるヘスペリジンとディ

Table -5 Concentration of ECR in selected fruit tissues

	Eureka		Lumie		Sudachi		Koji	
flavedo	69.4 ^a \pm 1.6	(7.5) ^b	81.0 \pm 1.8	(14.5)	26.9 \pm 0.4	(13.4)	155.5 \pm 3.9	(14.6)
albedo	156.4 \pm 4.0	(42.5)	205.8 \pm 4.7	(40.1)	99.5 \pm 1.9	(54.6)	180.0 \pm 4.2	(11.0)
segment membrane	128.9 \pm 2.0	(14.2)	109.7 \pm 1.9	(13.0)	12.9 \pm 0.2	(7.7)	45.5 \pm 0.7	(6.9)
juice vesicle	81.5 \pm 1.9	(35.8)	37.9 \pm 0.8	(32.4)	39.9 \pm 0.8	(24.3)	80.3 \pm 1.5	(67.5)
fruit	101.6 \pm 1.9		71.8 \pm 1.8		41.5 \pm 0.8		84.2 \pm 1.8	

^a Values were averages (mg/100 g fresh weight) of three replications.

^b Values in parentheses were % total amount in fruit.

オスミンのアルペドにおける含量割合は、それぞれ70.6%および60.1%であるのに対し、果汁ではそれぞれ8.0%および13.2%である。このようなECRの分布特性は、特に果汁製造等の加工においても有効活用されることが期待される。

5 ヒドロキシケイ皮酸誘導体のリポキシゲナーゼに及ぼす影響

1) 序

ポンカン (*C. reticulata*) 果皮からリポキシゲナーゼ阻害成分としてフェニルプロパノイド誘導体の一種である4-*O*-フェルロイル-5-*O*-カフェオイルキナ酸とそのメチルエステルを単離した⁸⁸⁾。ヒドロキシケイ皮酸誘導体は植物界に広く分布しており^{100, 101, 102)}、抗酸化性¹⁰³⁾、肝臓障害防止効果^{104, 105)}、メラニン生成抑制¹⁰²⁾、血小板凝集抑制やTX合成抑制¹⁰⁶⁾、糖尿病の併発症に關与するアルドース還元酵素の阻害効果¹⁰⁷⁾、HIVウイルスの増殖抑制効果¹⁰⁸⁾等、多様な生理機能性をもつ。また、コーヒー酸はLOX阻害効果をもち^{19, 85)}、水酸基¹⁹⁾やカルボキシル基の置換体^{19, 109)}の構造活性相関が検討されている。一方、コーヒー酸がキナ酸と結合したクロロゲン酸誘導体も一般的な植物の成分であり、コーヒー酸の結合数や結合位置が異なる異性体も存在する¹¹⁰⁾。そこで、幾つかの誘導体について構造活性相関を調べ、機能発現に重要な役割を担う構造の知見を得ることを目的として実験を行った。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

p-coumaric acid (pCA), caffeic acid (CA), ferulic acid (FA), 5-*O*-caffeoyl-quinic acid (5CQA) はSigma Japanから購入した。3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid (3pCQA), 3-*O*-caffeoylquinic acid (3CQA), 3-*O*-feruloylquinic acid (3FQA), 4-*O*-*p*-coumaroylquinic acid (4pCQA), 4-*O*-caffeoylquinic acid (4CQA), 4-*O*-feruloylquinic acid (4FQA) は、タチバナ (*C. tachibana*) 由来精製品を国際農林水産業研究センター沖縄支所の小川和紀博士より提供して頂いた。3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid (3, 5DCQA) はサツマイモ (*Ipomea batatas* Poir C.V. Beniotome) 由来精製品を鹿児島県農産物加工研究指導センター

の下園英俊博士より提供して頂いた。

(2) 供試試薬, 機器

前節に準じた。

(3) 血小板アラキドン酸代謝酵素の阻害試験

前節に準じた。

3) 実験結果および考察

供試した化合物の構造をFig. 9に示す。ヒドロキシケイ皮酸誘導体として3種類、これらとキナ酸とのエステル結合体の10種類について阻害活性を調べた。まず、ヒドロキシケイ皮酸誘導体の12-LOX阻害活性をFig. 10に示す。阻害活性を示したものはCA (IC₅₀: 58 μM)のみであった。CAの阻害活性発現のためにはカテコール基の存在が活性発現に必要であると報告されている^{19, 109, 111, 112)}。LOX阻害成分の作用発現機構については、活性中心に存在し触媒反応に關与するferric ion (Fe³⁺)を還元し、非活性型のferrous ion (Fe²⁺)にすることや¹¹³⁾、ferric ionとキレート結合する¹¹⁴⁾こと等が示唆されている。カテコール基をもつ化合物では、そのキレート作用によると考察する報告が多いが^{115, 116, 117)}、還元作用によるとする報告もあり¹¹⁸⁾、明確ではない。CAは還元作用ももつことから、その作用機作の解明は今後の課題である。次に、キナ酸に1分子のヒドロキシケイ皮酸誘導体が結合した化合物の阻害効果では、3pCQA, 3FQA, 4pCQA, 4FQAは100 μM以下では阻害活性をもたなかった(図示なし)。一方、コーヒー酸との結合体は結合部位により、異なる阻害活性を示した(Fig. 11)。4CQAの阻害作用(IC₅₀: 87 μM)が最も強く、5CQA (IC₅₀: 100 μM)が続き、3CQAはほとんど阻害効果をもたなかった。また、これらの阻害効果は、いずれもCAよりも低かった。この原因として、キナ酸の極性や分子量の違いが考えられる。内藤らは、コーヒー酸類縁体である3, 4-dihydroxystyreneの位炭素に様々な官能基をもつ化合物を合成し、その5-LOX阻害活性を調べた¹¹⁹⁾。報告によると、官能基の大きさは3, 4-dimethoxyphenylethylamino基程度の大きさでは阻害活性に大きな影響を及ぼさなかった。これらの結果から、CAのQAへの結合による阻害効果の低下要因は、QAの高極性に起因することが推察された。キナ酸に2分子のヒドロキシケイ皮酸誘導体が結

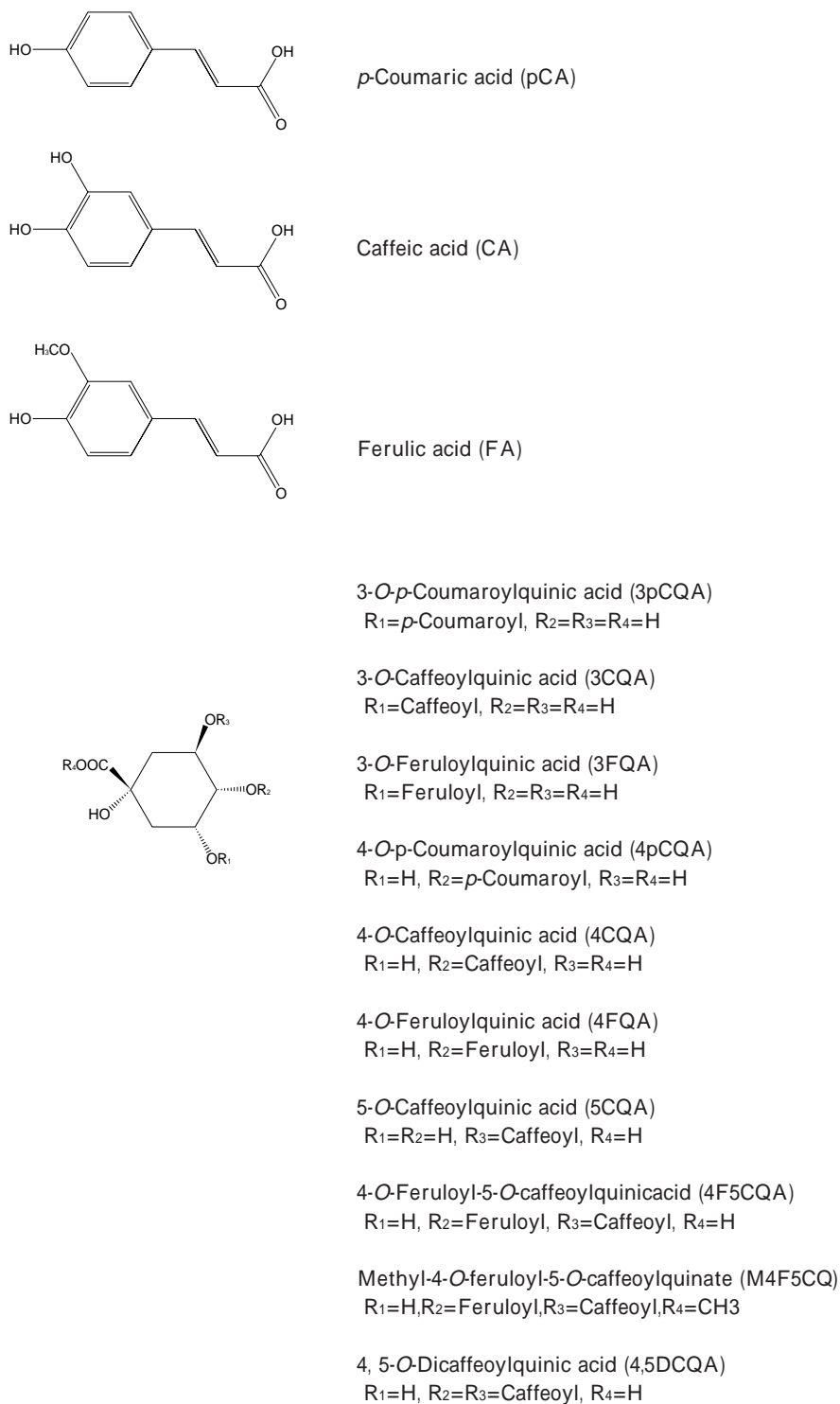


Fig. -9 Structures of phenylpropanoid derivatives investigated for lipoxygenase inhibition.

合した化合物の阻害活性を Fig. -12 に示す。阻害活性の強い順に M4F5CQ (IC₅₀: 1.9 μM), 3,5DCQA (IC₅₀: 5.1 μM), 4F5CQA (IC₅₀: 5.5 μM) であり, 3, 5DCQA と 4F5CQA に有意差は認められなかった。これらの阻害活性はCAなら

びにそのキナ酸との結合体よりもはるかに強い値であった。西沢らは4, 5-*O*-dicafeoylquinic acidおよび4-*O*-sinapoyl-5-*O*-caffeoylquinic acidは5-LOXに対して, クロロゲン酸(5CQA)よりも極めて強い阻害活性をもつことを報告している²⁰⁾。彼らの

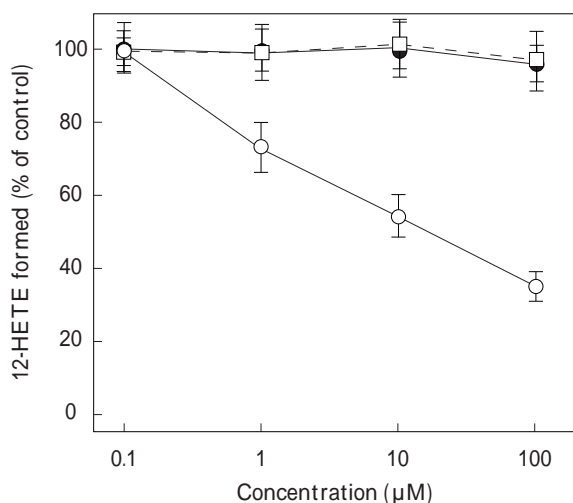


Fig. -10 Dose-response curves of caffeic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \circ , CA; \square , pCA; \triangle , FA.

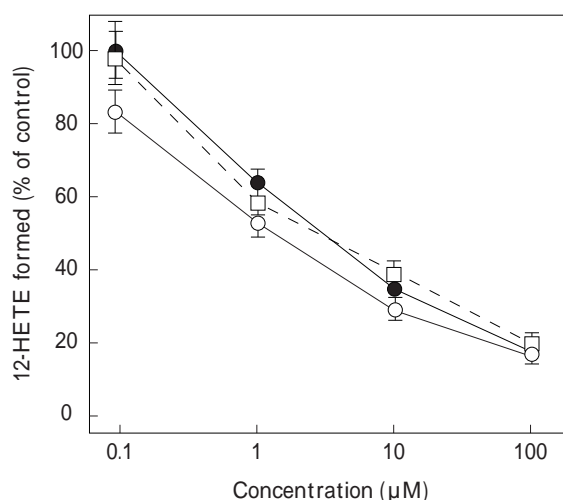


Fig. -12 Dose-response curves of caffeoylquinic acid derivatives for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , M4F5CQ; \square , 4F5CQA; \circ , 3,5DCQA.

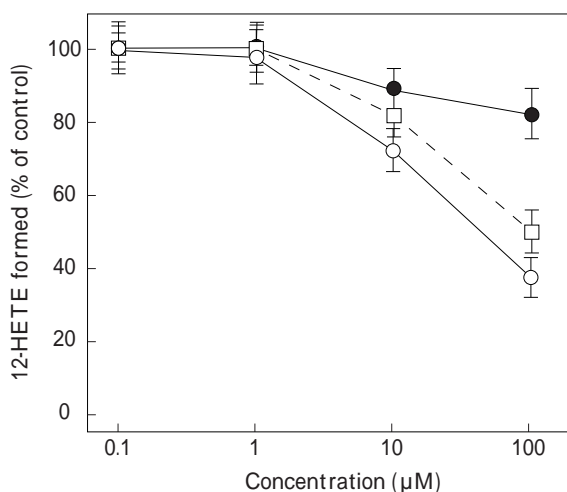


Fig. -11 Dose-response curves of caffeoylquinic acids for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , 4CQA; \square , 5CQA; \circ , 3CQA.

報告を併せて考慮すると, CA 1 分子と CA 或いは他のヒドロキシケイ皮酸 1 分子がキナ酸に結合すると, キナ酸の活性低下作用をうち消すと同時に, カテコール基の Fe³⁺ との反応性を強めると推察される. 一方, 3, 5 DCQA と 4 F 5 CQA ではキナ酸と

の結合位置は異なるが阻害効果がほぼ等しいことから, 阻害に関するカテコール基は 1 分子であることが推測される. しかし, ヒドロキシケイ皮酸と CA との組み合わせやこれらの結合位置と阻害活性との関係は未だ明らかではない. 今後, これらのデータを充実させれば, 阻害分子と活性中心との結合に関する立体構造の情報が得られ, 阻害効果の発現機構の解明に寄与することが予測される.

6 エリオジクチオール誘導体のリポキシゲナーゼにおよぼす影響

1) 序

-4 で, ECR が 12-および 5-LOX の阻害効果をもつこと, ならびにそのアグリコンである EDT は強力な阻害成分であることを報告した. 本節では, 活性発現に関与すると考えられる B 環のカテコール基の修飾および構造中の糖鎖が LOX 阻害効果に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした.

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

EDT, NER, HPT, homoeriodictyol (HED), ならびに eriodictyol 7-O-glucoside (E7G) はフナコシから購入した.

(2) 供試試薬, 機器

前節に準じた。

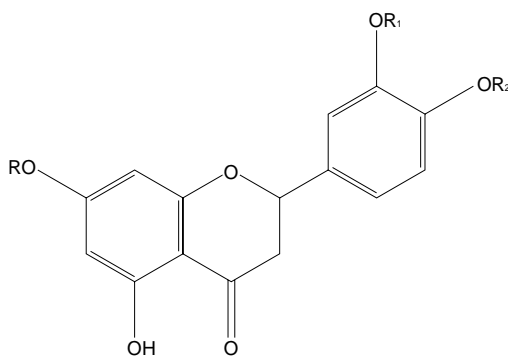
(3) アラキドン酸代謝の阻害試験

12-および5-LOXの阻害試験は前節に準じた。細胞内5-LOX測定系では、反応溶媒としてCa²⁺およびMg²⁺を含むHank's balanced solution (NaCl, 8.0 g/L; KCl, 0.4 g/L; glucose, 1.0 g/L; KH₂PO₄, 60mg/L; Na₂HPO₄, 47.5mg/L, pH6.9)を用いた。Wistar-King系ラット由来の多核白血球(6 × 10⁶個/tube)を試験液と共にプレインキュベートし、10 μMとなるようにA23187および[1-¹⁴C]アラキドン酸を加え反応を行った⁸⁵⁾。5分間の反応後、0.5 Nのギ酸で反応を停止させ、代謝物を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル-イソオクタン-酢酸-水(11:5:2:10)を展開溶媒に用いて代謝物をTLCで分離し¹²⁰⁾、LTB₄の放射活性を測定した。

3) 実験結果および考察

(1) 血小板12-リポキシゲナーゼの阻害効果

実験に供した化合物の構造をFig. -13に示す。EDTのカテコール基の3位がメトキシ化したもの(HED)、4位がメトキシ化したもの(HPT)、7位の水酸基にグルコース(E7G)、ルチノース(ECR)、ならびにネオヘスペリドース(NER)が結合したものをを用いた。実験の結果、12-LOX阻害活性は強い順にEDT(IC₅₀: 0.07 μM)、E7G(IC₅₀: 6.2 μM)、NER(IC₅₀: 13.1 μM)、ECR



Eriodictyol (EDT)	: R=R ₁ =R ₂ =H
Homoeriodictyol (HED)	: R=H, R ₁ =CH ₃ , R ₂ =H
Hesperetin (HPT)	: R=R ₁ =H, R ₂ =CH ₃
Eriodictyol 7-O-glucoside (E7G)	: R=glucose, R ₁ =R ₂ =H
Eriocitrin (ECR)	: R=rutinose, R ₁ =R ₂ =H
Neoeriocitrin (NER)	: R=neohesperidose, R ₁ =R ₂ =H

Fig. -13 Structures of EDT and structurally related compounds.

(IC₅₀: 22.3 μM), HPT (IC₅₀: 232 μM), HED (IC₅₀: 640 μM)であった (Fig. -14)。フラボノイドの12-LOX阻害に関して、Weltonらは3, 7, 3', および4'位の水酸基が必要であり、このようなものにfisetin (3, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone) (IC₅₀: 10-100 μM), myricetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahydroxyflavone) (IC₅₀: 1 - 10 μM), quercetin (3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone) (IC₅₀: 1 - 10 μM)を挙げた¹⁷⁾。しかし、EDT, LTN (5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone)⁸⁾、ならびにcirsiolol (5, 3', 4'-trihydroxy-6, 7-dimethoxyflavone)²¹⁾は3位の水酸基を持たないにもかかわらず酵素阻害効果をもち、12-LOXに対するIC₅₀値は、それぞれ0.07, 0.02, 1.0 μMであった。これらに共通する官能基は5, 3', および4'の水酸基であることから、3および7位の水酸基は必要でなく、HED、ならびにHPTの阻害活性が低いことから、B環のカテコール基は活性発現に必要であることが考えられた。一方、7位における糖の影響では阻害効果の強度は、アグリコン>グルコース>ネオヘスペリドース(2-O-β-L-rhamnopyranosil-D-glucopyranose) ルチノース(6-O-β-rhamnopyra-

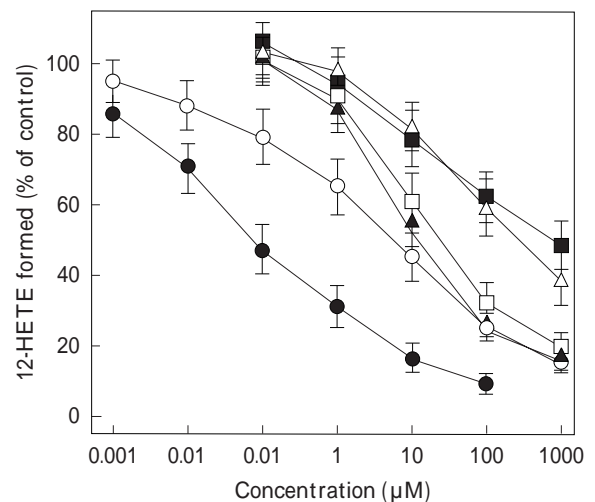


Fig. -14 Dose-response curves of EDT and structurally related compounds for platelet 12-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean ± SE of four replications. Symbols: ●, EDT; ○, E7G; ■, NER; □, ECR; ▲, HED; ▲, HPT.

nosil-D-glucopyranose)の順であった。この結果、糖の存在は活性低下要因であり、単糖よりも二糖の影響が大きいことが明らかになった。前節では、キナ酸との結合が活性低下要因であり、高極性成分の活性低下に及ぼす影響が大きいことが本節でも示された。一方、ラムノースとネオヘスペリドースの阻害活性に及ぼす影響の相違は小さく、有意な差は認められなかった。

(2) 白血球5-リポキシゲナーゼの阻害効果

阻害活性は強い順にEDT (IC_{50} : $0.20 \mu M$), E7G (IC_{50} : $7.1 \mu M$), NER (IC_{50} : $17.2 \mu M$), ECR (IC_{50} : $29.2 \mu M$)であり、HPT, ならびにHEDは阻害効果をもたなかった (Fig. -15)。各成分の5-LOXの阻害活性は、12-LOXに対する活性よりもやや低かったが、活性の強さは12-LOXの場合と同傾向であった。Weltonらの報告によると、5-リポキシゲナーゼの阻害には3, 7, および4'の水酸基が必要であった¹⁷⁾。このようなものにフラボンとして、kaempferol (3, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavone), fisetin (3, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone), morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone), myricetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahydroxyflavone), およびquercetin (3, 5, 7, 3', 4'-

pentahydroxyflavone)があり、これらの IC_{50} 値は $0.1 - 1.0 \mu M$ の範囲にあること、そしてフラボンとしてtaxifolin (3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone) (IC_{50} : $1 \mu M$)の例を挙げた。しかし、EDTならびにLTN (5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone) (IC_{50} : $0.1 \mu M$)⁸⁾は5-LOXに対する強力な阻害効果を持つ。これらの事実から、3'および4'位に水酸基をもつフラボノイドか、kaempferol や morin 等のようにカテコール基をもたず3, 5, 7, および4'に水酸基をもつフラボンが阻害効果を有することが推察された。

(3) 多核白血球アラキドン酸代謝に対する阻害効果

阻害効果の強い3成分について LTB_4 に対する産生抑制効果を調べた (Fig. -16)。この結果、抑制効果をもつものはEDTのみであり (IC_{50} : $12.7 \mu M$)、そのグルコース配糖体 (E7G) ならびにネオヘスペリドース配糖体 (NER) は活性をもたなかった。データは示さないが、4F5CQA ならびに4,5DCQA も細胞中の5-LOX阻害活性を有さなかった。これら事実から、単糖および二糖との配糖体形成やキナ酸との結合は阻害成分の細胞膜透過性を阻害することが明らかになった。一方、配糖体の腸

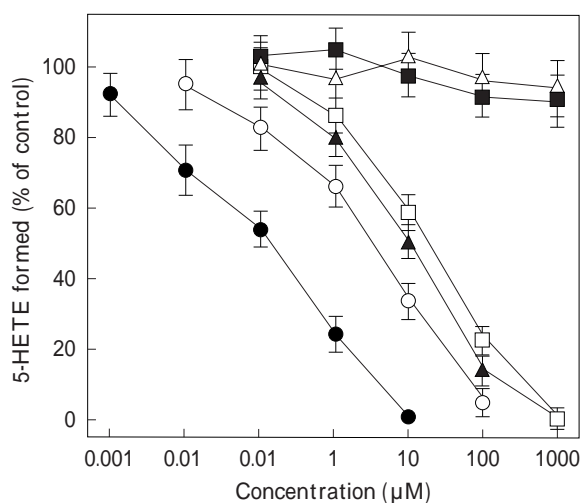


Fig. -15 Dose-response curves of EDT and structurally related compounds for PMNL 5-lipoxygenase. Activities were assayed by measuring the formation of 5-HETE from [$1-^{14}C$]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , EDT; \circ , E7G; \blacktriangle , NER; \square , ECR; \triangle , HED; \blacksquare , HPT.

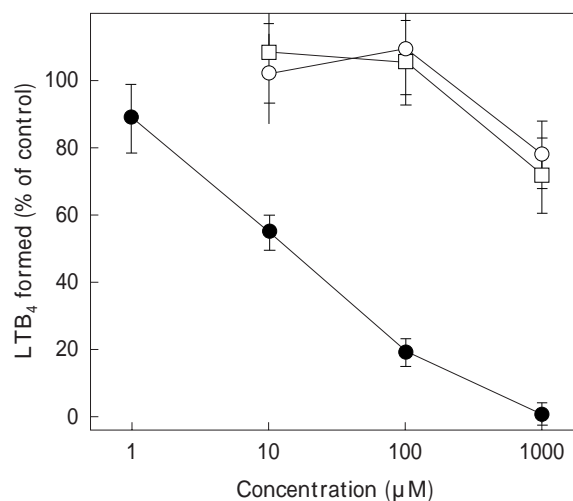


Fig. -16 Dose-response curves of EDT and its 7-O-glycosides for 5-lipoxygenase in intact PMNL. Activities were assayed by measuring the formation of TXB_2 from [$1-^{14}C$]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \bullet , EDT; \circ , E7G; \square , NER.

管からの吸収は、糖部分の切断後に起きること¹²²⁾や単糖の配糖体であれば直接吸収されるが、二糖の配糖体では吸収されないことが報告されている¹²³⁾。細胞透過性と腸管からの吸収はメカニズムが異なるが、糖部分が機能性成分の生理的な利用効率に及ぼす影響は大きいことが考えられた。

7 小 括

カンキツ果実の生理機能性成分を探索することを目的とし、アレルギーや動脈硬化、血栓に關与するアラキドン酸代謝系酵素のうち12-LOXならびにCOXの阻害効果を調べた。この結果、阻害パターンは分類区ごとに特徴的であり、パペダ区、ライム区、シトロン区の各果実、ならびにミカン区・コミカン亜区に属する一部の果実はCOX阻害活性を有し、ボンカン (*C. reticulata*) やコウジ (*C. leio-carpa*) 等のミカン区・コミカン亜区の一部果実に12-LOX阻害活性を持つことを確認した。また、阻害成分は果皮のフラベドおよびアルベドに高濃度で分布した。阻害活性の高い品種のうち、経済栽培されているボンカン果皮から12-LOX阻害成分を抽出し、その構造を検討したところ、フェニルプロパノイド誘導体の4F5CQAとそのメチルエステル体であった。これらのLOX阻害活性はメチルエステル体の方が強く、12-LOXに対するIC₅₀値は、それぞれ5.5, 1.9 μM、また5-LOXに対しては、それぞれ2.67, 0.70 μMであった。一方、シトロン区果実もLOX阻害活性をもつ分類区であったので、ルミー (*C. lumia*) から12-LOXの阻害成分を抽出し、構造を調べたところ、フラバノン配糖体のECRであった。ECRの12-LOXおよび5-LOXに対するIC₅₀値は、それぞれ22.3, 29.2 μMと強力ではなかったが、そのアグリコンであるEDCは強力な阻害活性をもち、12-LOXおよび5-LOXに対するIC₅₀値は、それぞれ0.07, 0.20 μMであった。続いて、ヒドロキシケイ皮酸誘導体の12-LOX阻害活性に関する構造活性相関を調べた。この結果、CAは比較的強い阻害効果をもつが、キナ酸と結合すると阻害活性が減少すること、そして結合位置により阻害活性が異なることが明らかになった。さらに、CAと他の1分子のヒドロキシケイ皮酸がキナ酸に結合すると、CAよりも阻害活性が増加することが判明し

た。CAのカルボキシル基がエステル化すると阻害活性が増加することも併せて考えると、疎水性基が活性の制御に重要な役割を果たすと考えられた。EDC誘導体の構造活性相関を調べた結果、B環のカテコール基が活性発現に必須であり、7位における糖の結合は活性低下要因になり、単糖よりも二糖の低下の程度が強かった。ルチノースとネオヘスペリドースの影響では、ルチノース結合体の活性が弱いものの、有意な差ではなかった。また、細胞を用いた5-LOX阻害試験では、単糖、二糖にかかわらず糖が結合すると、ほとんど阻害活性を有さなかった。さらに、4F5CQAおよび3,5DCQAも阻害効果を持たなかった。これらの結果、構造中の糖やキナ酸等の極性基は、化合物の細胞透過性の阻害要因になることが明らかになった。一方、腸管からの吸収についてはフラボノイドのモノグリコシドは吸収されるとの報告もあり、今後の検討が必要である。

機能性成分を高濃度に含有するボンカン果実の搾汁法の検討

1 緒 言

ボンカン果実はマンダリンタイプのカンキツ品種で、我が国における生産量はウンシュウ、イヨ、ナツミカン、ハッサクに続き第5位である。当果実はカンキツ品種の中でも多様な生理機能性成分を豊富に含有するという特徴を持つ。これまでに含有を確認されている成分として、-CRY, PMFのNOB, TNG, およびSNT, そしてLOXの阻害剤である4F5MQAとそのメチルエステル体、さらには構造が不明ながらCOX阻害成分も含有する。機能性成分の分布に関して、-CRYは、フラベドおよび果肉に分布し、ミカン区やトウキンカン区果実の含量が高いことが知られている。ボンカンは、ウンシュウ、クネンボに次いで最も含量の高い品種の1つであり、フラベドおよび果肉に、それぞれ5.07, 0.82mg/100g含有されている¹²⁴⁾。PMF類は果皮表面のアルベドにおける濃度が高く、NOBとTNGの濃度は、それぞれ198および218mg/100gであり、経済栽培品種の中では最も高濃度の部類である (Table 7)。また、ボンカンのフラベドおよびアルベド抽出成分は高いLOX阻害効果をもつ

(Table 2). このように、ポンカン果実はこれら機能性成分の供給源として好ましい品種であるが、その多くは果皮に分布する割合が高く、搾汁液における濃度は低いことが予測される。他方、機能性成分の搾汁工程における果汁への移行に関する系統的な研究例は見あたらない。そこで、では、果皮に由来する機能性成分の果汁加工工程中における挙動を調べることにより、各機能性成分の有効な搾汁法を見出すことを目的として、異なる搾汁法で製造した果汁中の含量や活性を比較検討した。

2 搾汁方法の異なる果汁の製造

1) 序

カンキツ果実の主な搾汁法として、インライン式、チョッパーパルパー式、圧搾式、ベルトプレス式、遠心式等が挙げられる。それぞれの搾汁方式が独自の特徴をもつため、製造したジュースの内容成分も異なることが予測される。これまで、可溶性固形物、酸含量、色調、パルプ、ならびに精油含量等一般的なジュースの品質成分が比較検討されてきたが^{125, 126, 127, 128, 129, 130}、機能性成分の挙動については検討されていない。そこで、多様な機能性成分を豊富に含有するポンカン果実を材料として、インライン搾汁法、チョッパーパルパー搾汁法、および圧搾法で搾汁、製造したジュースについて機能性成分の含量や活性を評価し、有効な搾汁法を見出すことを目的に、本節では、各搾汁法でジュースを製造し、一般的な品質特性を比較検討した。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

ポンカン果実は南宇和農業協同連合組合から購入した。

(2) 供試試薬、機器

果実の搾汁には、インライン搾汁機 (FMC Co., Lakeland), チョッパーパルパー搾汁機 (CP-180, Seikensya Co., Tokyo, Japan), ハンドプレス搾汁機 (ITO, Co., Tokyo, Japan) を用いた。

(3) サンプル調製

ジュースの製造は、愛媛県農業協同組合連合会に依頼した。果汁はインライン搾汁、チョッパー搾汁、圧搾の各方法で製造した (Fig. 1)。インライン搾汁は、ピールクリアランスが 5/64 および 8/64 イ

ンチの 2 区を設けた。搾汁後、0.5mm のフィニッシャースクリーンでパルプを篩別し、遠心分離 (5,400x g, 25 秒) 後、上清をそれぞれ IL (5/64) ジュース, IL (8/64) ジュースとした。なお、ピールクリアランスについては、5/64 インチの方が 8/64 インチよりもより高い圧力で搾汁する。チョッパーパルパー搾汁は、湯通し後剥皮したものを搾汁した。搾汁液は 1mm のスクリーン、続いて 0.5mm のフィニッシャースクリーンでパルプを篩別後、インライン搾汁と同様に遠心処理し果汁を得た (CP ジュース)。圧搾は半切り後、ハンドプレスで搾汁し、20メッシュ (約 1mm) でパルプを篩別した (HP ジュース)。

(4) ジュースの品質評価

可溶性固形物は、20 における Abbe 屈折計の示度を Brix で表した。酸度、ならびにアスコルビン酸含量 (還元型) は、JAS に定める分析法¹³¹) を用いて行った。パルプ含量は、果汁を 3,000x g で遠心分離して得られた沈殿物容積の果汁に対する容積比から算出した。精油含量は、AOAC 法¹³²) で求めた。

3) 実験結果および考察

(1) 製造ジュースの品質特性

ポンカン果実の搾汁法と品質との関係については、生産規模が小さいためか、これまでに報告例は見あたらない。従って、ウンシュウの報告を参考に、各搾汁法における品質特性を検討した。製造したジュースの一般的な品質を Table 1 に示す。可溶性固形物 (Brix) をみると、HP および CP ジュースは IL (5/64), および IL (8/64) ジュースよりも多くを含むものの、あまり差はみられなかった。ウンシュウで、IL と CP ジュースを比較した場合も同様の傾向が認められた¹²⁵)。酸度についても、大きな差は認められないものの IL (8/64), IL (5/64), HP, CP ジュースの順に高い傾向であった。ウンシュウでは、IL ジュースと CP ジュースには差が認められなかった¹²⁵)。また、pH の値、滴定酸含量、およびアスコルビン酸含量は、各ジュース間で特に特徴的な傾向はみられなかった。パルプ含量は各ジュース間で大きな差が認められ、HP ジュース (4.5%) が最も低く、最も高い CP ジュース (9.2%) の半分であり、IL ジュースは、6.4 および 7.1% であり、これらの中間の含量であった。ウンシ

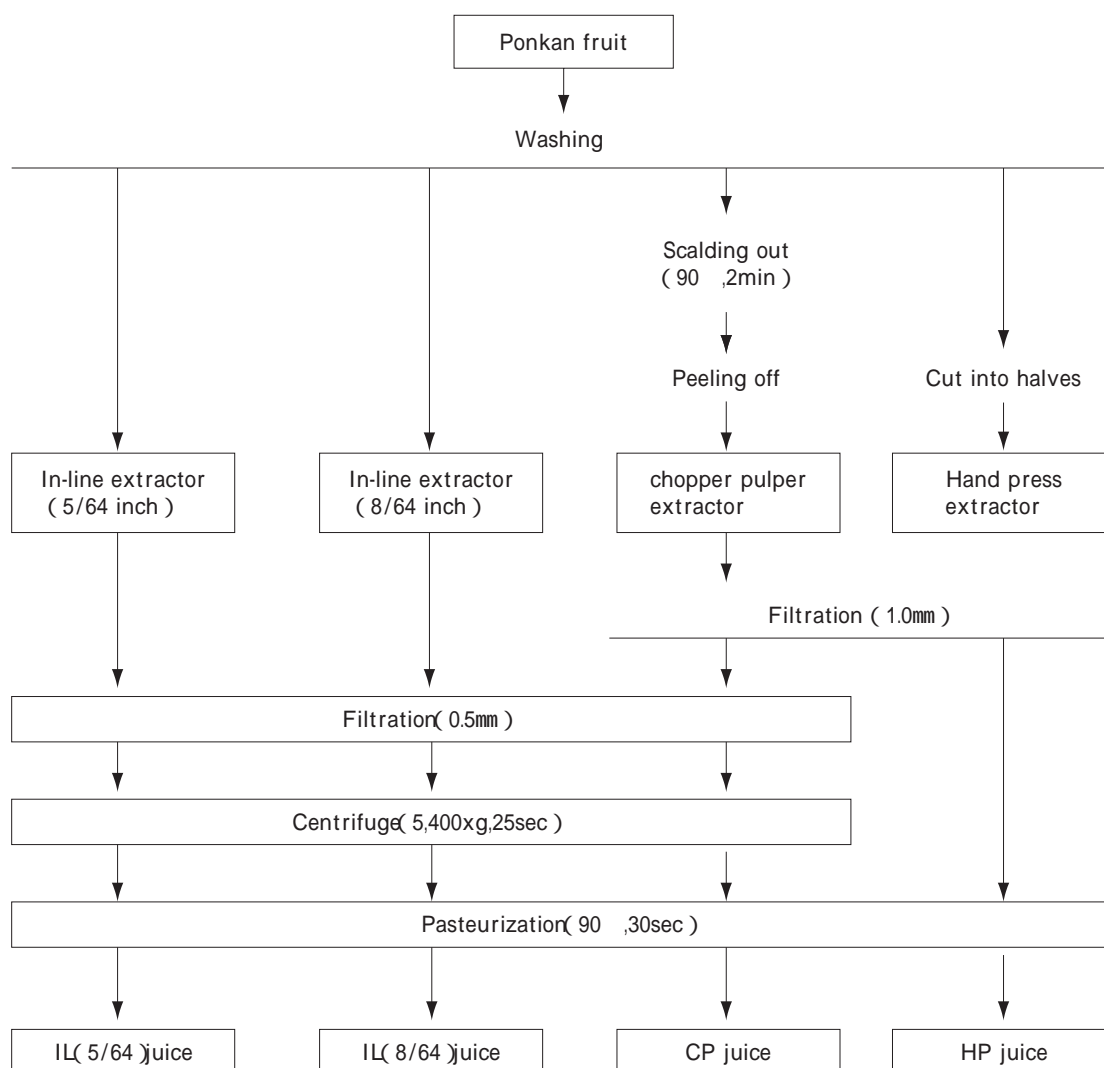


Fig. -1 Processing of juice samples from Ponkan fruit.

Table -1 General quality characteristics of processed juices from Ponkan fruit

Extraction method	Soluble solids (Brix)	Acid as citric acid (g/100 ml)	pH	Ascorbic acid (mg/100 ml)	Pulp (v/v %)	Oil (v/v %)
IL (5/64)	Crude extract	13.7	4.13	- ^a	21.3	0.052
	Filtrate (0.5 mm)	13.7	4.13	-	15.2	0.045
	Centrifugate	13.7	0.48	4.13	33.6	0.036
IL (8/64)	Crude extract	13.7	4.13	-	17.7	0.042
	Filtrate (0.5 mm)	13.7	4.12	-	13.6	0.036
	Centrifugate	13.7	0.49	4.12	31.3	0.028
CP	Crude extract	14.2	4.21	-	-	<i>nd</i> ^b
	Filtrate (0.5 mm)	14.2	4.21	-	24.3	<i>nd</i>
	Centrifugate	14.1	0.45	4.20	34.3	<i>nd</i>
HP	Crude extract	-	-	-	-	-
	Filtrate (1.0 mm)	14.7	0.47	4.14	33.2	0.137

^a, not examined.^b *nd*, not detected.

ユウでも同様に、ILよりもCPジュースのパルプ含量が高い結果であった¹²⁵⁾。この違いは、IL方式では、果実組織を破碎することなく圧搾するが、CP方式では、じょうのう膜やさのう膜を破碎するために、これらの断片物が濾過や遠心処理後も残存するからだと考えられる。精油に関して、CPジュースでは果皮を利用しないために検出されず、HPジュースの精油含量は0.137%と最も高かった。ILジュースでは、それぞれIL(5/64)が0.036、IL(8/64)が0.028%であり、圧力の高い方が含量は大きかった。これらの結果、各搾汁法により製造したジュースの特徴は、パルプおよび精油含量に明確に反映された。パルプはジュース中でカロチノイド¹³³⁾やフラボノイド¹³⁴⁾と会合するという報告があることから、CPジュースでは-CRY濃度が高く、逆にHPジュースでは低いことが予測された。また、PMFはフラベドの油胞中に存在することから、HPジュースにおける含量が高く、逆に果皮を搾汁しないCPジュースでは含量が低いことが予想された。

3 製造果汁のポリメトキシフラボン、-クリプトキサンチン濃度、およびアラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響

1) 序

前節では、インライン搾汁、チョッパーパルパー搾汁、圧搾の各搾汁法によりジュースを製造した。ボンカン果実は、PMF、-CRY、アラキドン酸代謝系のLOXおよびCOX阻害成分等の機能性成分を含有する。本節では、新しい試みとして各製造法で調製したジュースにおける機能性成分の含量および活性を評価することにより、各機能性成分の抽出に適した搾汁法を見出し、有効利用の指針を得ることを目的とした。

2) 実験材料および方法

(1) 供試材料

前節に記載したIL(5/64)、IL(8/64)、CP、HPの各ジュースを材料にした。

(2) 供試試薬、機器

PMFおよび-CRYはHPLCで定量した。HPLCは島津のLC10ADシステムを用い、PMFの分離には、LiChrospher 100RP-18(Merck, Darmstadt, Germany)カラム(250x 4.6mm i.d., 5 μm)、-

CRYの分離には、YMC Carotenoid S5(Waters, Milford)カラム(150x 4.6mm i.d., 5 μm)を用いた。TNG、SNT、ならびに-CRYはフナコシより購入した。NOBは和光純薬より購入した。

(3) ポリメトキシフラボンの分析

a ポリメトキシフラボンの調製

ジュースをヒスコトンホモジナイザー(三田村理工工業)で破碎し、5 mLを3,000x gで10分間遠心分離した。上清を回収し、沈殿に0.5 mLのメタノール/DMSO(1:1)を加え、同様に遠心分離した。上清を回収し、沈殿を抽出する操作をさらに2回繰り返した。抽出物を合わせ、水の濃度が90%を越えるように水を添加後、-2と同様にSepPak C18カラム(0.36 g)で処理した。吸着したPMFを4 mLのメタノール/DMSO(1:1)で溶出させた後、溶出液を5 mLに定容した。HPLCに添加する際に、PTFE製のメンブランフィルター(0.5 μg)で濾過した。

b ポリメトキシフラボンのHPLC

分析手法はHeimhuberらの方法に従った¹³⁵⁾。移動相にアセトニトリル/水(40:60)を用いた。検出は285 nmで行い、200-360 nmのスペクトルを記録した。カラムは40 に保ち、流速は0.6 mL/min、サンプル注入量は10 μLとした。各PMFは保持時間および吸収スペクトルパターンを基に同定し、スタンダードの検量線から濃度を算出した。

(4) -クリプトキサンチンの分析

a -クリプトキサンチンの調製

ジュース(10 g)に1.0 gのセライト545および10 mLのエタノールを添加し、ブフナー漏斗(medium porosity)で吸引濾過した。残滓にエタノールを加え、ガラス棒で攪拌しながら50 mLで抽出濾過した。濾液を分液漏斗に移し、60 mLのジエチルエーテルおよび水を加え、30秒間振とう後、5分間静置し、水層を除去した。続いて、ジエチルエーテル層に分離されたカロチノイド類をGoodnerらの方法に従いケン化した¹³⁶⁾。まず、ジエチルエーテル画分をロータリーエバポレーターで乾固後、5 mLのジエチルエーテルに再溶解し、12 mLのねじ蓋付き試験管に移した。これに5 mLの10% KOHメタノール溶液を添加し、窒素置換した。蓋をして室温下暗所で1時間反応させた。その後、分

液漏斗に移し、20mLのジエチルエーテルと100mLの水を添加した。ジエチルエーテル層を中性になるまで水で洗浄し、水を分離除去した。ジエチルエーテル層を回収し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、不溶物を濾過した。ジエチルエーテル層をロータリーエバポレーターで乾固し、残滓を10mLのHPLC溶媒であるメタノール/メチルtert-ブチルエーテル(MTBE)(92:8)、0.1%酢酸アンモニウムに溶解した。

b -クリプトキサンチンのHPLC分析

移動相は、メタノール/メチルtert-ブチルエーテル(MTBE)(92:8)、0.1%酢酸アンモニウムの固定層とした¹³⁷⁾。カラム温度は28とし、流速は1mL/min、検出は450nm、サンプル注入量は20μLとした。-CRYは、保持時間との比較により同定し、定量はスタンダードの検量線を用いて行った。

(5) アラキドン酸代謝系酵素の阻害実験

阻害活性測定用のサンプル調製は、-2に従った。ラット血小板由来12-LOXおよびCOX活性、ならびにラット多核白血球由来5-LOX活性に対する阻害効果の測定は、-4に準じた。

3) 実験結果および考察

(1) ポリメトキシフラボン含量

搾汁法の効率性を適切に評価するために、まずポンカン果実の各部位におけるPMF含量を分析した。ポンカン果実は、主要なPMFであるNOBおよびTNGに加え、少量のSNTを含有した(Table -2)。これらのPMFは、フラベドに局在した(Table -6およびTable -7)。各部位の果実における重量組成は、フラベド、アルベド、じょうのう膜、果肉が、それぞれ12.6、14.3、13.1、58.1%であった。この値より、フラベドはNOB、TNG、そしてSNTを、それぞれ82.4、81.3、82.5%含んでいると計算された。また、果皮内側のアルベドは、これらを16~18%含んでいた。一方、じょうのう膜および果肉におけるPMF含量は、それぞれ1.5%以下と0%であった。このため、フラベドからの抽出効率がいずれのジュース中における含量に大きく影響を及ぼすことが予測された。Table -3に結果を示すが、HPジュースにおける含量が突出しており、NOB、TNG、SNTの濃度は、それぞれ3.56、4.10、0.13mg/100mLであった。この結果は、それぞれ

Table -2 Concentrations of PMFs in Ponkan fruit tissues

Tissue	mg/100 g fresh weight		
	NOB	TNG	SNT
flavedo	197.79(3.41)	217.91(3.72)	11.56(0.32)
albedo	34.24(1.92)	41.51(1.53)	2.17(0.17)
segment membrane	3.25(0.19)	2.74(0.14)	tr ^a
juice vesicle	nd ^b	nd	nd
whole fruit	30.25(1.82)	33.76(1.76)	1.77(0.24)

Values were the mean of four replications. Values in parentheses are standard deviations.

^a tr, less than 0.01 mg/100g.

^b nd, not detected.

Table -3 Concentrations of PMFs in processed juices from ponkan fruit

Extraction method	mg/100 ml		
	NOB	TNG	SNT
IL(5/64)	0.62(0.06)	0.68(0.08)	tr ^a
IL(8/64)	0.60(0.04)	0.67(0.09)	tr
CP	nd ^b	nd	nd
HP	3.56(0.26)	4.10(0.43)	0.13(0.02)

Values were the mean of four replications. Values in parentheses are standard deviations. ^a tr, less than 0.01mg/100 g.

^b nd, not detected.

11.8, 12.2, および7.3%のNOB, TNG, およびSNTがジュース中に移行したことを意味する。バレンシアオレンジ, ならびにハムリンオレンジからヘスペリジンの回収をハンドプレス搾汁法で検討した結果, 抽出圧が高いほど回収率も上がると報告されている¹³⁸⁾。本実験で抽出圧は測定していないが, 抽出要因の1つであることが考えられ, 抽出方法を至適化する際には圧力の検討も必要になってくる。CPジュースではPMFは検出されなかった。これらの成分はフラベドに局在するので, 然るべき結果であった。ILジュースでは, IL(5/64), IL(8/64)ともに含量は同じであり, NOBおよびTNGをそれぞれ0.62, 0.68mg/100mL含有し, SNTは痕跡程度の含量であった。これらの値は, NOB, TNGともに果実の2.0%がジュースに移行したことを意味する。これらの結果, PMFの抽出にはHP法が最も適し, IL法もある程度有効であることが明らかになった。

(2) -クリプトキサンチン含量

ポンカンやウンシュウ等のマンダリン果実は, -CRY含量が高いことが知られており^{139, 140)}, 主な分布部位はアルベドおよび果肉のさじょうである¹²⁴⁾。実験に用いたポンカンの -CRY含量は, フラベド, 果肉, 果実において, 100g当たりそれぞれ6.3, 1.2, 1.6mgであり, フラベドに54%, 果肉に46%が分布した。搾汁工程における -CRYの濃度をFig. -2に示す。CPジュースの濃度が最も高く(0.66mg/100mL), IL(5/64)(0.59mg/100mL), IL(8/64)(0.55mg/100mL), HP(0.50mg/100mL)ジュースの順であった。CPジュースにおける -CRYは果肉由来であり, 従ってこの部位からの抽出効率が優れているものと判断される。果肉の濃度は1.2mg/100gであり, 果実における, じょうのう膜および果肉の重量割合は, それぞれ13.1, 58.1%であるゆえ, 果皮を除去した搾汁用サンプルの -CRY濃度は, およそ0.98mg/100g(1.2×58.1/(13.1+58.1))である。CP搾汁法による粗搾汁液の -CRY濃度は0.84mg/100mLであり, 抽出部位の約86%の成分を抽出したことになる。搾汁後, 2度の濾過処理と遠心処理により, 粗抽出液に含まれる成分も約21%が損失した。この結果は, 多田らがウンシュウを用いてインライン搾汁, ならびにチョッ

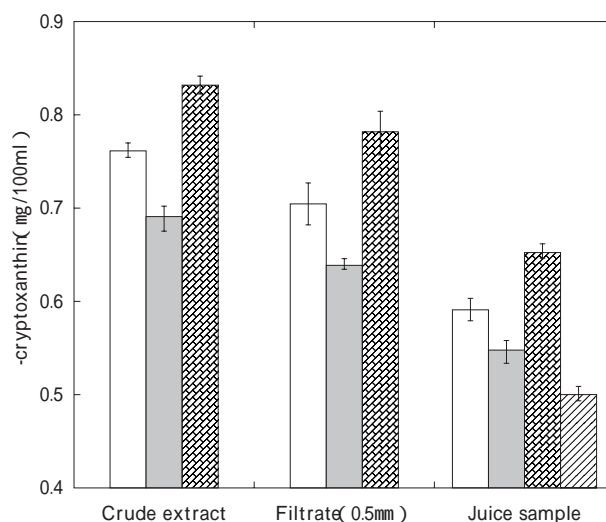


Fig. -2 -CRY content of crude extracts, filtrates (0.5mm), and final juice products of Ponkan fruit. Symbols: □, IL (5/64); ■, IL (8/64); ▨, CP; ▩, HP.

パーパルパー搾汁で製造したジュースにおけるカロチノイドの濃度パターンと類似した¹⁴¹⁾。また, カロチノイドの損失は遠心分離操作段階が濾過段階よりも大きかった¹⁴¹⁾。本実験でも, -CRYの損失は, 0.5mmの濾過操作, 遠心操作で, それぞれIL(5/64)が9.1, 15.7%, IL(8/64)が7.2, 14.1%, CPが6.0, 16.5%と同様の傾向であった。一方, 果汁中の精油成分は, パルプ層のカロチノイドを抽出する作用をもつとの報告がある¹⁴²⁾。-CRYを高濃度でジュース中に保持するためには, 遠心操作における何らかの工夫が必要であり, -CRYのパルプとの親和性やミセル状態の解析も必要になると考えられる。HPジュースでは, -CRYがアルベド由来か, 果肉由来か不明であるが, いずれにせよ抽出効率は最も低かった。HP法では, 果実組織の破断程度が低いことがその理由として推測される。IL法においては, IL(5/64)ジュースの方がIL(8/64)ジュースよりも高濃度含有した。ピールクリアランスが小さくなると, 搾汁圧力は増加する。このため, IL(5/64)法が, より強く果肉組織を搾汁し, 結果として果肉部からの抽出度合いが増加したものと推察される。

(3) アラキドン酸代謝系酵素に及ぼす影響

ジュース抽出物の血小板COX活性に及ぼす影響をFig. -3に示す。各搾汁法の中で, HPジュース

ス抽出物が最も阻害効果が強く、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ まで阻害活性を保持した。他をみると、 $1,000\mu\text{g}/\text{mL}$ ではいずれも30%程度の阻害を示したが、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ では阻害効果をほとんど持たなかった。この結果は、阻害成分が外果皮から抽出されたことを示唆する。農作物抽出物によるCOX阻害試験によると、阻害成分は、裸麦を除きブタノール/エーテル分配でエーテル層に回収された⁷⁶⁾。阻害成分が類似した化合物であるとすれば、極性が低いものであり、カンキツにおいては、フラベドの油胞に局在する成分であることが推察された。血小板12-LOXの阻害に関しては、阻害活性の強い順にIL(5/64)、IL(8/64)、CP、HPサンプルの順であり、 $1,000\mu\text{g}/\text{mL}$ における阻害率は、それぞれ39、29、15、0%であった(Fig. -4)。IL(8/64)よりもIL(5/64)サンプルの阻害活性が強かったが、抽出圧の違いによるものと推察された。フェニルプロパノイドのキナ酸誘導体である4-O-フェルロイル-5-O-カフェオイルキナ酸、ならびにそのメチルエステルがポンカン果皮より12-LOXの阻害成分として単離され、この成分は水溶性であり、果皮にはフラベドおよびアルベドにほぼ均等に分布する⁷⁹⁾。それゆえ、IL法による搾汁は、果皮に分布する水溶性成分の抽出には好適

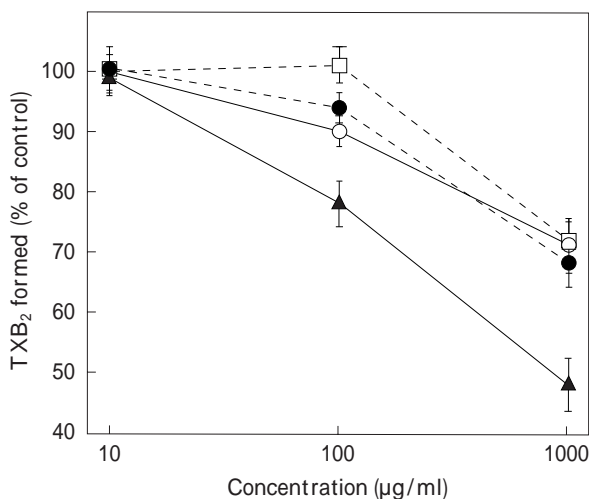


Fig. -3 Dose-response curves of the extract of processed juices for platelet COX. Activities were assayed by measuring the formation of TXB₂ from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \square , IL (5/64); \circ , IL (8/64); \bullet , CP; \blacktriangle , HP.

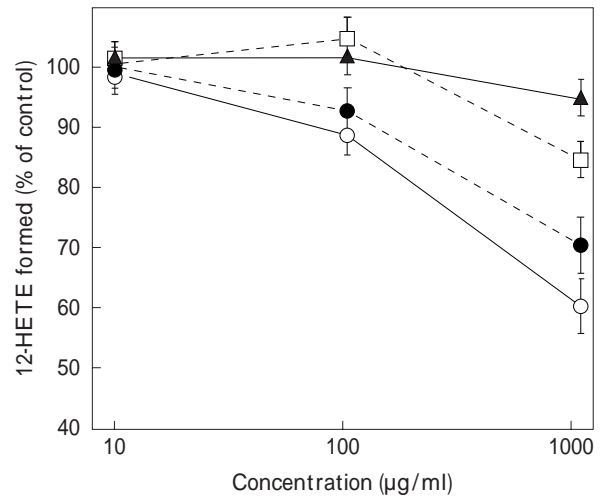


Fig. -4 Dose-response curves of the extract of processed juices for platelet 12-LOX. Activities were assayed by measuring the formation of 12-HETE from [1-¹⁴C]arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \square , IL (5/64); \circ , IL (8/64); \bullet , CP; \blacktriangle , HP.

であると判断される。白血球5-LOXの阻害に関して、上記キナ酸誘導体は5-LOXに対しても、12-型酵素と同様の阻害強度を有する(-3)。従って、5-LOXの阻害効果は、ILジュースサンプルが他サンプルよりも強いことが予測されたが、いずれのサンプルも同程度に12-LOXに対するよりもはるかに強い阻害効果を示した(Fig. -5)。この結果から、果肉中には5-LOXに対する強い阻害成分が存在することが示唆された。

以上の結果をまとめると、HP法はPMFやCOX阻害成分の抽出に効果的であった。これらはアルベドの油胞を主体に分布することから、他の香気成分の抽出にも有効であると考えられた。CP法は、-CRYの抽出に有効であった。CP法は、他のカロチノイド成分の富化にもその有効性が予測される。IL法は、PMFならびに-CRYの抽出には、HP法、或いはCP法に及ばなかったが、両性分をある程度抽出した。従って、IL法において、果実全体から多様な成分を抽出するのに好適であると考えられた。また、IL(5/64)がIL(8/64)よりも各成分の抽出効率が良好であった。このように成分により好適な搾汁法は異なるため、さらなる富化のためには個々の成分について、搾汁圧、濾過処理、遠心

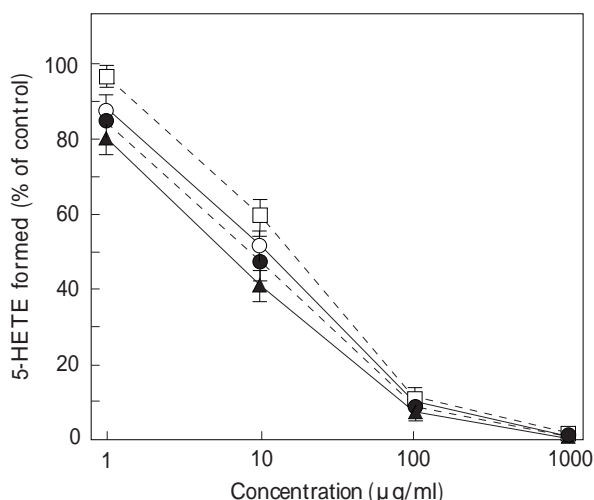


Fig. 5 Dose-response curves of the extract of processed juices for PMNL 5-LOX. Activities were assayed by measuring the formation of 5-HETE from $[1-^{14}C]$ arachidonic acid. Values were the mean \pm SE of four replications. Symbols: \square , IL (5/64); \circ , IL (8/64); \bullet , CP; \blacktriangle , HP.

処理等の検討が必要である。

4 小 括

ポンカン果実の含有する機能性成分をジュース中に高濃度に移行させるような搾汁法を見出すために、2種類のインライン搾汁 (IL (5/64), IL (8/64)), チョッパーパルパー搾汁 (CP), 圧搾 (HP) によりジュースを製造し、各成分の含量および活性を調べた。ジュースの一般的な品質は、パルプ含量および精油含量に大きな差が認められた。パルプ含量は、最も高いCPジュースの9.2%に対し、IL (8/64), IL (5/64), HPジュースが、それぞれ7.1, 6.4, 4.5%であった。また、HPジュースは精油含量に富み (0.137%), IL (5/64) および IL (8/64) の含量は、それぞれ0.036, 0.028%であったが、CPジュースには含有されなかった。

PMFのNOB, TNG, SNT含量はHPジュースにおいて際立っており、それぞれ3.56, 4.10, および0.13mg/100gであり、果実の11.8, 12.2, および7.3%を含有した。ILジュース間では、濃度差はみられず、NOBおよびTNGは、0.62および0.68mg/100gであり、それぞれ果実の約2.0%を含有した。CPジュースは果皮を除去後搾汁するために、PMF

の存在は確認されなかった。以上の結果、HP法はIL法と比較して、およそ5~6倍のPMFの抽出効率であることが明らかになった。その要因として、存在部位であるフラベドが直接の加圧部位であることが推察された。-CRY含量は、CPジュースが果皮を搾汁しないにもかかわらず100mL当たり0.66mgと最も高く、続いてIL (5/64) (0.59mg), IL (8/64) (0.55mg), HP (0.50mg) の各ジュースの順であった。CP法では搾汁部位の約86%もの成分が抽出され、その要因としてさのう膜の破碎効率の高さが挙げられた。しかし、-CRYは、パルプ除去過程における損失が大きく、特に遠心処理段階で14~17%の濃度低下が観察された。製造工程で本成分の濃度を保つために、新たな検討が必要と考えられた。ラット血小板のCOX活性の阻害効果はHPジュース抽出物が最も高く、ILおよびCPサンプル間での差は小さく、阻害活性も弱かった。HP法の抽出傾向から推察すると、阻害成分は果皮表面の油胞に局在することが考えられた。ラット血小板の12-LOX活性に対する阻害効果は2種類のILジュース抽出物で強く、強い順にIL (5/64), IL (8/64), CP, HPサンプルであった。阻害成分は果皮を主体に分布することから、IL法は、果皮に分布する極性の高い水溶性成分等の抽出に有効であることが示唆された。白血球5-LOX活性に対しては、各ジュース抽出物が強い阻害活性を示した。以上の結果より、インライン搾汁法は、果皮に分布する12-LOX阻害成分の富化に適するとともに、他の搾汁法よりも対象とした機能性成分をバランス良く抽出すること、インライン搾汁法の間では、ピールクリアランスは8/64インチよりも5/64インチが効果的であること、圧搾法はフラベドに分布するCOX阻害成分や油胞に局在するPMFの抽出に適すること、チョッパーパルパー法は-CRYの富化に有効であることが明らかになった。

総 括

平成3年のオレンジ果実輸入自由化に続き、平成4年に始まったオレンジ果汁の輸入自由化、加えて消費者の志向変化に伴うカンキツ離れの結果、我が国のカンキツ生産・消費量は漸減の一途を辿ってい

る。この傾向を打開するための方策として、生理機能性成分という付加価値を強くアピールすることにより、カンキツの生産・消費の増大に結びつけることが挙げられる。カンキツの含有する有機成分として従来、フラボノイド、カロチノイド、クマリン等が知られている。最近、生理機能性の研究が進展するなか、これらの成分に発がん抑制効果を中心に新しい生理機能性が報告されつつある。近年、動脈硬化症や糖尿病等の成人病やアレルギー疾患の患者が急増し、大きな社会問題となっている背景がある。本研究は、多様な生理機能性をもつフラボノイドの各種における組成を明らかにし、各成分の有効利用や品種評価に向けた基礎資料を作成するとともに、循環器系疾患やアレルギーに関与するアラキドン酸代謝系に及ぼす影響を調べることにより、これらの疾病を予防するうえでカンキツに有効性を見出すことを目的とした。その大要は次のとおりである。

まず では研究の概要や目的を述べた。

では、カンキツのフラボノイドのHPLCによる分析法を開発し、45種の各部位における組成を明らかにするとともに、フラボノイド組成の品種分類への適用を検討した。また、数品種の種子についてリモノイドの定量分析を実施した。

開発したフラボノイドの分析法に従えば、25成分の定量が可能であった。カンキツのフラボノイド組成は、ナリングニンおよびヘスペレチンのそれぞれ2種類の配糖体を主体とし、その他のフラバノンやフラボンの配糖体およびポリメトキシフラボンは微量であった。各部位におけるフラボノイド濃度は、配糖体では高い順にアルベド、フラベド、じょうのう膜、果肉という並びであり、ポリメトキシフラボンはフラベドにおける濃度が最も高く、アルベドにも分布したが、じょうのう膜や果肉ではほとんど存在しない傾向であった。フラボノイド組成を田中の形態学的分類法と対比させると、ダイダイ区やライム区の一部種を除き、各分類区は7成分の含有パターンから判別することが可能であった。フラボノイド組成を基にして主成分分析を行った結果、2つの主成分を用いた各種の散布状態は解析する部位により異なっていた。フラベドではライム区、シトロン区、キンカン属、アルベドではミカン区、じょうのう膜ではザボン区の判別に有効であった。しかし、

単独の部位データでは品種判別に不十分であり、これらの部位を複合的に用いることや、分類区を絞り込んだ解析データを用いることが必要と考えられた。一方、果肉では各種の分散が収束するため、品種分類のために適当な部位ではないと判断された。また、ダイダイ区はバレンシアオレンジ、モリタネーブル、およびイヨ等ミカン区の分布に近いものやサワーオレンジやナツダイダイ等全く組成が異なるものに分かれ、田中の分類法とは相容れない結果であり、DNA解析による系譜の検討が必要と考えられた。今後、データベースを充実させることにより、交雑品種の判別や組成予測等、成分を考慮した育種への応用が期待される。一方、産地間差異は交雑や変異の可能性もあるが、品種判別の再現性にどの程度の影響を及ぼすのか検討の余地がある。

リモノイドに関しては、イヨ、シークワサー、ならびにハナユ種子の分析を行った。イヨのリモノイド含量・組成はカンキツ一般に共通するものであり、加工副産物の量が多いこともあり、リモニン、ノミリン、およびオバクノン等一般的リモノイドやその配糖体の供給源として有効であることが示された。シークワサー、およびハナユでは、ともに配糖体濃度が高く、シークワサーはノミリン、ハナユではデアセチルノミリン、およびデアセチルノミリン酸を高濃度に含有した。シークワサーは沖縄特産の健康食品として注目されていることから、リモノイド類の機能性研究の発展が望まれる。

では、カンキツ45種について果皮抽出物の血小板アラキドン酸代謝系酵素のCOXおよびLOXに対する阻害効果を調べた。このうち、ミカン区のボンカンおよびシトロン区のルミー果皮よりLOX阻害成分を単離し構造を決定した。また、単離した化合物の構造類縁体を用いてLOX阻害に対する構造活性相関を調べた。

抽出物の阻害効果は、2つの酵素を阻害する種、どちらか1つを阻害する種、阻害効果をもたない種があり、分類区の阻害パターンは、ダイダイ区を除いて、概ね田中の分類に従った。分類区の特性として、パペダ区、ライム区、シトロン区等の初生カンキツ亜属の各種およびミカン区・コミカン亜区の各種はCOX阻害効果が強く、一方、LOXに対する阻害効果は、シトロン区およびミカン区・コミカン亜

区の各種が強い傾向であった。個別にみると、COX 阻害活性の強い種として、ルミー、シカイカン、スイートレモン、シトロン、コベニミカン、およびピロ口等、また LOX 阻害活性の強い種としてシュウトウ、ヤツシロ、タチバナ、コウジ、およびポンカン等が挙げられた。COX 阻害成分は、果皮を主体にして、果肉を除く部位に存在し、LOX の阻害成分は果皮を主体にして果実全体に分布した。

ポンカン果皮より LOX 阻害成分を単離した結果、これらは 4-O-feruloyl-5-O-caffeoylquinic acid (4F5CQA) とそのメチルエステルであり、12-LOX に対する IC₅₀ 値は、それぞれ 5.5, 1.9 μM、また 5-LOX に対する IC₅₀ 値は、それぞれ 2.67, 0.70 μM と比較的強い効果を有していた。ルミー果皮より LOX 阻害成分として、フラボノイドの eriocitrin (ECR) を単離した。12-および 5-LOX に対する阻害の IC₅₀ 値は、それぞれ 22.3, 29.1 μM であり、コーヒー酸 (IC₅₀: 58 μM) よりも若干強い程度であった。このアグリコンである eriodictyol (EDT) の阻害効果は強力であり、12-および 5-LOX に対する阻害の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.07, 0.20 μM であった。

ポンカン果皮由来阻害成分の構造類縁体について 12-LOX 阻害の構造活性相関を調べた結果、活性発現には構造中にコーヒー酸をもつことが必要であり、カテコール基がメチル基等で修飾されると阻害活性を喪失した。コーヒー酸がキナ酸とエステル結合すると、阻害活性が低下し、低下の度合いは結合位置により異なることが判明した (IC₅₀: 87 μM 以上)。また、コーヒー酸に加えてケイ皮酸誘導体がキナ酸に結合すると、阻害活性が飛躍的に増加することが明らかになった。ケイ皮酸の種類とコーヒー酸との結合位置やケイ皮酸の種類等と阻害効果についてはさらに検討が必要である。一方、4F5CQA や 3,5DCQA は多核白血球内の 5-LOX を阻害せず、その原因として細胞膜の透過性が障害になることが推察された。EDT 誘導体を用いた構造活性相関では、B 環のカテコール基がメトキシ化すると、阻害活性は著しく低下することを確認した。また、糖の結合も活性低下を招き、低下度合いは単糖よりも二糖の方が高かった。加えて、構造中の糖残基の存在は白血球細胞内 5-LOX 活性阻害の障害になっ

た。これらの結果、フラボノイド構造では、B 環にカテコール基をもつアグリコンが LOX を有効に阻害することが明らかになった。

では、-CRY, PMF 類, LOX, ならびに COX 阻害成分をもつ等、機能性成分の種類、含量に富むポンカン果実を材料にして、搾汁法の違いによるジュースの阻害成分濃度、ならびに阻害効果を調べた。

搾汁法として、インライン搾汁法 (IL 8/64 および IL 5/64 インチの 2 種)、チョッパーパルパー搾汁法 (CP)、および圧搾法 (HP) を検討した。これらの搾汁法により製造した果汁の一般的品質はパルプおよび精油含量の差異が大きく、パルプ含量は多い順に CP, IL (8/64), IL (5/64), HP の順であり、精油含量は HP, IL (5/64), IL (8/64) の順であり、CP 果汁は精油を含有しなかった。PMF の NOB, TNG, SNT 含量は HP ジュースが際立っており、果実の 11.8, 12.2, および 7.3% を含有した。IL ジュース間では、濃度差はみられず、NOB, および TNG は、ともに果実の約 2.0% を含有した。CP ジュースは果皮を除去後搾汁するために、PMF の存在は確認されなかった。この結果、HP 法は IL 法と比較して、およそ 5 ~ 6 倍の PMF の抽出効率であることが明らかになった。-CRY 含量は CP ジュースが 100mL 当たり 0.66mg と最も高く、続いて IL (5/64) (0.59mg), IL (8/64) (0.55mg), HP ジュース (0.50mg) の順であった。CP 法は果肉部位の約 86% もの成分を抽出したが、その要因としてさじょう膜の破碎効率の高さが挙げられた。一方、-CRY はパルプ除去過程における損失が大きく、特に遠心処理段階で 14 ~ 17% の濃度低下が観察された。製造工程において本成分の濃度を保つためには、新たな検討が必要と考えられた。COX 活性の阻害効果は HP ジュース抽出物が最も高く、IL および CP サンプル間での差は小さく阻害活性も弱かった。12-LOX 活性の阻害効果は 2 種類の IL ジュース抽出物が強く、強い順に IL (5/64), IL (8/64), CP, HP サンプルであった。5-LOX 活性の阻害では、各ジュース抽出物が強い阻害効果を示した。これらの結果、インライン搾汁法は、果皮に分布する 12-LOX 阻害成分の富化に適するとともに、他の搾汁法よりも対象とした機能性成分をバランス良く抽出

すること、インライン搾汁法の間ではピールクリアランスは8/64インチよりも5/64インチが効果的であること、圧搾法はフラベドに分布するCOX阻害成分および油胞に局在するPMFの抽出に適すること、チョッパーパルパー法は、-CRYの富化に有効であることが明らかになった。

本研究成果では、カンキツフラボノイド成分のデータベース構築に必須となる分析データを示し、カンキツのLOX阻害成分を特定した。さらに、カンキツ果実の機能性成分の効率的な抽出法開発に寄与する結果を示した。これらの成果は、カンキツ機能性成分の有効利用の端緒を開き、カンキツの消費拡大に大きく貢献するものである。

引用文献

- 1) Hamberg, M. and Samuelsson, B. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71 : 3400 - 3404 .
- 2) 関谷敬三 1993 . 食品工業 , 36 : 20 - 31 .
- 3) Hamberg, M, Sevansson, J. and Samuelsson, B. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72 : 2994 - 2998 .
- 4) 鈴木啓史, 吉本谷博, 山本尚三 1994 . 化学と生物 , 32 : 298 - 306 .
- 5) 吉本谷博, 上田夏生, 山本尚三 1988 . 蛋白質核酸酵素 , 33 : 136 - 149 .
- 6) Sekiya, K. and Okuda, T. 1982. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105 : 1090 - 1095 .
- 7) Sekiya, K., Okuda, T. and Arichi, S. 1982. Biochim. Biophys. Acta., 713 : 68 - 72 .
- 8) Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Ito, A. and Kitajima, M. 2001. Jpn. J. Cancer. Res., 92 : 1322 - 1328 .
- 9) Sato, T., Koike, L., Miyata, Y., Hirata, M., Minami, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A. 2002. Cancer Res., 62 : 1025 - 1029 .
- 10) Kurowska, E. M. and Manthey, J. A. 2004. J. Agric. Food Chem., 52 : 2879 - 2886 .
- 11) Narisawa, T., Fukuhara, Y., Oshima, S., Inakuma, T., Yano, M. and Nishino, H. 1999. Jpn. J. Cancer Res., 90 : 1061 - 1065 .
- 12) Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Nakamura, Y., Ohto, Y., Ohhigashi, H. and Koshimizu, K. 1997. Jpn. J. Cancer Res., 88 : 4443 - 4452 .
- 13) Kanno, S., Shoji, A., Asou, K. and Ishikawa, M. 2003. J. Pharmacol. Sci., 92 : 166 - 170 .
- 14) Kim, H. K., Jeong, T. S., Lee, M. K., Park, Y. B. and Choi, M. S. 2003. Clin. Chim. Acta, 327 : 129 - 137 .
- 15) Miller, E. G., Fanous, R., Hidalgo, F. R., Binnie, W. H., Hasegawa, S. and Lam, L. K. T. 1989. Carcinogenesis, 10 : 1535 - 1537 .
- 16) Lam, L. K. T., Li, Y. and Hasegawa, S. 1989. J. Agric. Food Chem., 37 : 878 - 880 .
- 17) Welton, A. F., Tobias, L. D., Fielder-Nagy, C., Anderson, W., Hope, W., Meyers, K. and Coffey, J. W. 1986. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships, 231 - 242 .
- 18) Yamamoto, H., Sakakibara, J., Nagatsu, A. and Sekiya, K. 1998. J. Agric. Food Chem., 46 : 862 - 865 .
- 19) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Lao, A., Fujimoto, Y. and Tatsuno, T. 1984. Biochim. Biophys. Acta, 792 : 92 - 97 .
- 20) Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., Koshihara, Y. and Fujimoto, Y. 1988. Chem. Pharm. Bull., 36 : 87 - 95 .
- 21) Tanaka, T. 1969. Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B, 21 : 139 - 144 .
- 22) Bracke, M. E., Bruyneel, E. A., Vermeulen, S. J., Vennekens, K., Marck, V. V. and Mareel, M. M. 1994. Food Technology, 48 : 121 - 124 .
- 23) Manthey, J. A. 2000. Microcirculation, 7 : 829 - 834 .
- 24) Ishiwa, J., Sato, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A. 2000. J. Rheumatol., 271 : 20 - 25 .
- 25) Lam, L. K. T. and Hasegawa, S. 1989. Nutr. Cancer, 12 : 43 - 47.

- 26) Alford, A. R., Cullen, J. A., Stoch, R. H. and Bentley, M. D. 1987. *J. Econ. Entomol.*, 80 : 575 - 578 .
- 27) Ishigaki, S. and Kawaguchi, J. 1989. *Kankyo Kanri Gijutsu*, 7 : 255 - 259 .
- 28) Miller, E. G., Gonzales-Sanders, A. P., Couvillon, A. M., Wright, J. M. and Hasegawa, S. 1992. *Nutr. Cancer*, 17 : 1 - 7 .
- 29) Dubios, G. E. and Stephenson, R. A. 1982. *J. Agric. Food Chem.*, 30 : 676 - 681 .
- 30) Nishiura, M., Esaki, S. and Kamiya, S. 1969. *Agric. Biol. Chem.*, 33 : 1109 - 1118 .
- 31) Nishiura, M., Esaki, S. and Kamiya, S. 1971. *Agric. Biol. Chem.*, 35 : 1691 - 1706 .
- 32) Tatum, J. H. and Berry, R. E. 1974. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 87 : 75 - 81 .
- 33) Court, W. A. 1977. *J. Chromatogr.*, 130 : 287 - 291 .
- 34) Strack, D. and Krause, J. 1978. *J. Chromatogr.*, 156 : 359 - 361 .
- 35) Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastre, R. 1980. *J. Chromatogr.*, 187 : 255 - 260 .
- 36) Treutter, D. 1988. *J. Chromatogr.*, 436 : 490 - 496 .
- 37) Wulf, L. W. and Nagel, C. W. 1976. *J. Chromatogr.*, 116 : 271 - 279 .
- 38) Daigle, D. L. and Conkerton, E. J. 1982. *J. Chromatogr.*, 240 : 202 - 205 .
- 39) Van de Castele, K., Geiger, H. and Van Sumere, C. F. 1982. *J. Chromatogr.*, 240 : 81 - 94 .
- 40) Ting, S. V., Rouseff, R. L., Dougherty, M. H. and Attaway, J. A. 1979. *J. Food Sci.*, 44 : 69 - 71.
- 41) Rouseff, R. L. and Ting, S. V. 1979. *J. Chromatogr.*, 176 : 75 - 87 .
- 42) Fisher, J. F. and Wheaton, T. A. 1976. *J. Agric. Food Chem.*, 24 : 898 - 899 .
- 43) Rouseff, R. L., Martin, S. F. and Youtsey, C. O. 1987. *J. Agric. Food Chem.*, 35 : 1027 - 1030 .
- 44) Kanés, K., Tisserat, B., Berhow, M. and Vandercook, C. 1993. *Phytochemistry*, 32 : 967 - 974 .
- 45) Anis, M. and Aminuddin, M. 1981. *Plant Biochem. J.*, 8 : 56 - 60 .
- 46) Wollenweber, E. and Jay, M. 1988. in *The flavonoids, advances in research since 1980*, Harbone, J. B. ed, Chapman and Hall Ltd, NY, 292 - 294 .
- 47) Swingle, W. T. 1943. In *The Citrus Industry Vol. I History, Botany, and Breeding*, Webber, H. J. and Batchelor, L. D., Eds, University of California Press, Berkley, CA, p386 - 444 .
- 48) Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., Malfa, S., Continella, G. and Tribulato, E. 2000. *Theror. Appl. Genet.*, 100 : 1155 - 1166 .
- 49) Fang, D., Krueger, R. R. and Roose, M. L. 1998. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 123 : 612 - 617 .
- 50) Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W. and Roose, M. L. 1998. *Theror. Appl. Genet.*, 96 : 812 - 822 .
- 51) Fang, D. Q. and Roose, M. L. 1997. *Theror. Appl. Genet.*, 95 : 408 - 417 .
- 52) 大村三男 2004 *農業および園芸*, 79 : 142 - 145 .
- 53) Gaydou, E. M., Bianchini, J. P. and Randriamiharisoa, R. P. 1987. *J. Agric. Food Chem.*, 35 : 525 - 529 .
- 54) Kanés, K., Tisserat, B., Berhow, M. and Vandercook, C. 1993. *Phytochemistry*, 32 : 967 - 974 .
- 55) Webber, H. J. 1943. In *The Citrus Industry Vol. I History, Botany, and Breeding*, Webber, H. J. and Batchelor, L. D., Eds, University of California Press, Berkley, CA, p485 - 500 .
- 56) Kawai, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M. 1999. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 3565 - 3571 .
- 57) Tsuchida, T., Yamamoto, T., Yamamoto, K., Hitomi, N., Kosaka, N., Okada, M., Komatsu, K. and Namba, T. 1997. *Nat. Med.*, 51 : 84 - 91 .
- 58) Tsuchida, T., Yamamoto, T., Yamamoto, K.,

- Hitomi, N., Kosaka, N., Kano, E., Okada, M., Komatsu, K. and Namba, T. 1996. *Nat. Med.*, 50 : 114 - 127 .
- 59) Hasegawa, S., Bennett, R. D. and Verdon, C. P. 1980. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 922 - 925 .
- 60) Dreyer, D. (1965) : *J. Org. Chem.*, 30 : 749 - 751 .
- 61) Hashinaga, F., Herman, Z. and Hasegawa, S. 1990. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37 : 380 - 382 .
- 62) Ohta, H., Berhow, M., Bennett, R. D. and Hasegawa, S. 1992. *Phytochemistry*, 31 : 3905 - 3907 .
- 63) Herman, Z., Fong, C. H., Ou, O. and Hasegawa, S. 1990. *J. Agric. Food Chem.*, 38 : 1860 - 1861 .
- 64) Ohta, H., Nogata, Y., Yoza, K., Kusumoto, K. and Hasegawa, S. 1995. *Food Sci. Technol. Int.*, 1 : 74 - 76 .
- 65) Ohta, H. and Hasegawa, S. 1995. *J. Food Sci.*, 60 : 1284 - 1285 .
- 66) Ozaki, Y., Fong, C. H., Herman, Z., Maeda, H., Miyake, M., Ifuku, Y. and Hasegawa, S. 1991. *Agric. Biol. Chem.*, 55 : 137 - 141 .
- 67) Fong, C. H., Hasegawa, S., Coggins, C. W. Jr., Atkin, D. R. and Miyake, M. 1992. *J. Agric. Food Chem.*, 40 : 1178 - 1181 .
- 68) Hasegawa, S., Ou, P., Fong, C. H., Herman, Z., Coggins, C. W. Jr., and Atkin, D. R. 1991. *J. Agric. Food Chem.*, 39 : 262 - 265 .
- 69) Ozaki, Y., Miyake, M., Maeda, H., Ifuku, Y., Bennet, R. D., Herman, Z., Fong, C. H. and Hasegawa, S. 1991. *Phytochemistry*, 30 : 2659 - 2661 .
- 70) Herman, Z., Hasegawa, S., Fong, C. H. and Ou, P. 1989. *J. Agric. Food Chem.*, 37 : 850 - 851 .
- 71) Turner, S. R., Tainer, J. A. and Lynn, W. S. 1975. *Nature*, 257 : 680 - 681 .
- 72) 平山愛山 1994 . *和漢医薬学雑誌* , 11 : 16 - 28 .
- 73) Hope, W. C., Welton, A. F., Fielder-Nagy, C., Batula-Bernard, C. and Coffey, J. W. 1983. *Biochem. Pharm.*, 32 : 367 - 371 .
- 74) Welton, A. F., Tobias, L. D., Fielder-Nagy, C., Anderson, W., Hope, W., Meyers, K. and Coffey, J. W. 1986. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine : Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Cody, V., Middleton, E. Jr., Harbone, J. B., Eds., Liss, New York, 231 - 242 .
- 75) Busse, W. W., Kopp, D. E., Middleton, E. Jr. 1984. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73 : 801 - 809 .
- 76) Sekiya, K., Fushimi, T., Kanamori, T., Ishikawa, N., Itoh, M., Takita, M. and Nakanishi, T. 1993. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 : 670 - 671 .
- 77) Bayer, T., Wagner, H., Wray, V. and Dorsch, W. 1988. *Lancet*, 15 : 906 .
- 78) Morimitsu, Y. and Kawakishi, S. 1991. *Agric. Biol. Chem.*, 55 : 889 - 890 .
- 79) Nogata, Y., Yoza, K., Kusumoto, K., Kohyama, N., Sekiya, K. and Ohta, H. 1996. *J. Agric. Food Chem.*, 44 : 725 - 729 .
- 80) Vanderhoek, J. Y., Bryant, R. W. and Bailey, J. M. 1980. *J. Biol. Chem.*, 255 : 10064 - 10065 .
- 81) Grayer, R. J. 1993. *Methods in Plant Biochemistry vol.1, Plant Phenolics*, Dey, P. M. and Harbone, J. B. (Eds.) , Academic Press, New York, 283 - 320 .
- 82) Ibrahim, R. and Barron, D. 1993. *Methods in Plant Biochemistry vol.1, Plant Phenolics*, Dey, P. M. and Harbone, J. B. (Eds.) , Academic Press, New York, 76 - 106 .
- 83) Murata, M., Okada, H. and Homma, S. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1887 - 18911 .
- 84) Morishita, H. (1984) : *J. Chromatogr.*, 315 : 253 - 260 .
- 85) Kohyama, N., Nagata, T., Fujimoto, S. and Sekiya, K. 1997. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 : 347 - 350 .
- 86) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Lao, A., Fujimoto, Y. and Tatstuno, T. 1984. *Biochim.*

- Biophys. Acta, 792 : 92 - 97 .
- 87) Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J. and Ju, Y. 1990. *Free Radical Biol. Med.*, 9 : 19 - 21 .
- 88) Nogata, Y., Sekiya, K., Ohta, H. and Ishizu, T. 2001. *Phytochemistry*, 56 : 729 - 732 .
- 89) De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Volagen, A. G. and Rombouts, F. M. 1992. *Anal. Biochem.*, 207 : 176 - 185 .
- 90) Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M. and Hasegawa, S. 1994. *J. Chromatogr. A*, 667 : 59 - 66 .
- 91) Rowell, K. M. and Winter, D. H. 1959. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 48 : 746 - 749 .
- 92) Marais, C., Rensburg, W. J., Ferreira, D. and Steenkamp, J. A. 2000. *Phytochemistry*, 55 : 115 - 119 .
- 93) Tahara, S., Katagiri, Y., Ingham, J. L. and Mizutani, J. 1994. *Phytochemistry*, 36 : 1261 - 1271 .
- 94) Miyake, Y., Yamamoto, K. and Osawa, T. 1997. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 3 : 84 - 89 .
- 95) Minato, K., Miyake, Y., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Shimomura, Y. and Osawa, T. 2003. *Life Sci.*, 72 : 1609 - 1616 .
- 96) Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Letyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P. and Venskutonis, R. 2002. *J. Nat. Prod.*, 65 : 892 - 896 .
- 97) Liu, Y. L., Ho, D. K., Cassady, J. M., Cook, V. M. and Baird, W. M. 1992. *J. Nat. Prod.*, 55 : 357 - 363 .
- 98) Miyake, Y., Shimoi, K., Kumazawa, S., Yamamoto, K., Kinae, N. and Osawa, T. 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 3217 - 3214 .
- 99) Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T. and Kinae, N. 2001. *Drug. Metab. Dispos.*, 29 : 1521 - 1524 .
- 100) Harbone, J. B. 1980. In *Encyclopedia of plant physiology*, vol.8, Bell, E. A. and Charlwood, B. V. eds, Springer, Berlin, pp329 - 402 .
- 101) Murata, M., Okada, H. and Homma, S. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 : 1887 - 1890 .
- 102) 下園英俊, 小堀真珠子, 新本洋士, 津志田藤二郎 1996. *日食工誌*, 43 : 313 - 317 .
- 103) Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. and Taniguchi, H. 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 2161 - 2168 .
- 104) Adzet, T., Camarasa, J. and Laguna, C. 1987. *J. Nat. Prod.*, 50 : 612 - 617 .
- 105) Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. 1996. *Biol. Pharm. Bull.*, 19 : 1479 - 1484 .
- 106) Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., Koshihara, Y. and Fujimoto, Y. 1988. *Chem. Pharm. Bull.*, 36 : 87 - 95 .
- 107) Terashima, S., Shimizu, M., Horie, S. and Morita, N. 1991. *Chem. Pharm. Bull.*, 39 : 3346 - 3347 .
- 108) Robinson, W. E., Reinecke, M. G., Abdel-Malek, S. and Chow, S. A. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 6326 - 6331 .
- 109) Sugiura, M., Naito, Y., Yamaura, Y., Fukaya, C. and Yokoyama, K. 1989. *Chem. Pharm. Bull.*, 37 : 1039 - 1043 .
- 110) Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. and Mitani, T. 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 5512 - 5516 .
- 111) Sogawa, S., Nihro, T., Ueda, H., Izumi, A., Miki, T., Matsumoto, H. and Satoh, T. 1993. *J. Med. Chem.*, 36 : 3904 - 3909 .
- 112) Iwakami, S., Shibuya, M., Tseng, C. F., Hanaoka, F. and Sankawa, U. 1986. *Chem. Pharm. Bull.*, 34 : 3960 - 3963 .
- 113) Abeyasinghe, R. D., Roberts, P. J., Cooper, C. E., MacLean, K. H. Robert, C. H. and Porter, J. B. 1996. *J. Biol. Chem.*, 271 : 7965 - 7972 .
- 114) Nelson, M. J., Batt, D. G., Thompson, J. S. and Wright, S. W. 1991. *J. Biol. Chem.*, 266 : 225 - 8229 .
- 115) Nelson, M. J., Brennan, B. A., Chase, D. B., Cowling, R. A., Grove, G. N. and Scarrow, R. C. 1995. *Biochemistry*, 34 : 15219 - 15229 .
- 116) Galpin, J. R., Tielens, L. G. M., Veldink, G. A.,

- Vliedenthart, J. F. G. and Boldingh, J. 1976. FEBS Lett., 69 : 179 - 182 .
- 117) Sappen, L. J. M., Veldink, G. A., Liefkens, T. J., Vliedenthart, J. F. G. and Kay, C. M 1979. Biochim. Biophys. Acta., 574 : 301 - 311 .
- 118) Kemal, C., Louis-Flamberg, P., Krupinski-Olsen, R. and Shorter, A. L. 1987. Biochemistry, 26 : 7064 - 7072 .
- 119) Naito, Y., Sugiura, M., Yamaura, Y., Fukaya, C., Yokoyama, K., Nakagawa, Y., Ikeda, T., Senda, M. and Fujita, T. 1991. Chem. Pharm. Bull., 39 : 1736 - 1745 .
- 120) Hamberg, M. and Samuelsson, B. 1966. J. Biol. Chem., 241 : 257 - 263 .
- 121) Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T. and Watanabe-Kohno, S. 1983. Biochem. Biophys. Res. Commun., 116 : 612 - 618 .
- 122) Walle, T., Otake, Y., Walle, U. K. and Wilsont, F. A. 2000. J. Nutr., 130 : 2658 - 2661 .
- 123) Hollman, P. C. H., Bijman, M. N. C. P., van Gameren, Y., Cnossen, E. P. J., de Vries, J. H. M. and Katan, M. B. 1999. Free Rad. Res., 31 : 569 - 573 .
- 124) 根角博久, 中野睦子, 吉田俊雄 1998 . 園学雑, 67 (別 2) : 108 .
- 125) 伊福 靖, 前田久夫 1974 , 日食工誌 , 22 : 19 - 24 .
- 126) 太田英明, 殿原慶三, 幸野憲二, 伊福 靖 1983 . 日食工誌 , 30 : 629 - 635 .
- 127) 飯野久栄, 太田英明, 渡辺敦夫, 大谷敏郎, 木村 進 1982 . 日食工誌 , 29 : 283 - 289 .
- 128) 柴田 萬, 中原三智男 1967 . 佐賀果試研報 , 6 : 85 - 100 .
- 129) 柴田 萬, 岩切 徹, 中原三智男 1980 . 佐賀果試研報 , 7 : 63 - 80 .
- 130) Shddappa, G. S. and Bhatia, B. S. 1959. Food Technol., 13 : 349 - 351 .
- 131) 農林水産省消費経済課 1971 . 日本農林規格品質表示基準 (食品編), 1121 - 1155 .
- 132) Horowitz, W. 1970. Methods of Analysis of the A. O. A. C., 11th Ed., 385 - 392 .
- 133) 多田幹郎, 梅田圭司, 平野裕二, 白石正英 1974 . 日食工誌 , 21 : 25 - 31 .
- 134) 前田久夫, 高橋保男, 三宅正起, 伊福 靖 1985 . 日食工誌 , 32 : 302 - 207 .
- 135) Heinhuber, B., Galensa, R. and Herrmann, K. 1988. J. Chromatogr., 439 : 481 - 483 .
- 136) Goodner, K. L., Rousef, R. L. and Hofsommer, H. J. 2001. J. Agric. Food Chem., 49 : 1146 - 1150 .
- 137) Emenhiser, C., Sander, L. C. and Schwartz, S. J. 1995. J. Chromatogr. A, 707 : 205 - 216 .
- 138) Vanderhoek, J. Y., Bryant, R. W. and Bailey, J. M. 1980. J. Biol. Chem., 255 : 10064 - 10065 .
- 139) Stewart, I. 1977. J. Agric. Food Chem., 25 : 1132 - 1137 .
- 140) Philip, T., Chen, T. and Nelson, D. B. 1988. J. Chromatogr., 442 : 249 - 265 .
- 141) 多田幹郎, 梅田圭司, 平野裕二, 白石正英 1973 . 日食工誌 , 21 : 25 - 31 .
- 142) 伊福 靖, 前田久夫, 甲木 功 1977 . 日食工誌 , 24 : 166 - 170 .

Studies on Biologically Active Compounds in Citrus Fruits and Their Effective Utilization

Yoichi NOGATA

Summary

Citrus fruits are the most principal fruits cultivated in Japan but their yearly production and consumption are decreasing in these days. Compounds occurring in citrus fruits such as flavonoid, carotenoid, coumarin, terpenoid, and limonoid have been vigorously studied for their biological activities and many reports have been published in recent years. The aim of the present work was to generate an increased commercial interest in citrus fruits and expand their production in terms of biological compounds included in them.

In chapter 2, a quantification method of analyzing flavonoid constituents in citrus fruits was developed, and the flavonoid compositions of 45 citrus fruits in different tissues were determined. Based on the flavonoid compositions, discrimination of citrus species was investigated. Limonoids in the seeds of selected fruits were also analyzed.

Firstly, high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet-visible spectrophotometry using a photodiode array detector was developed as a method for the simultaneous separation and determination of 25 kinds of naturally occurring citrus flavonoids. The separation system consisted of a C₁₈ reversed phase column, a gradient system of 0.01 M phosphoric acid (A) and methanol (B), and a photodiode array detector. Each of the 25 flavonoids was eluted from the column with a gradient system composed of three periods; (1) 0-55 min, 70-55% (v/v) A in B, (2) 55-95 min, 55-0% A in B, (3) 95-100 min, isocratic, 100% B, and quantified by spectrophotometric detection at 285 nm. Identification of specific flavonoids was made by comparing their retention times (t_R) and UV spectra with those of authentic standards. The relative standard deviations of t_R values were 0.029-0.321%. The recoveries of flavonoids added to tissues were 97.47-103.03% from albedo and 96.87-104.93% from juice vesicle with standard deviations of 2.32-5.72% and 2.18-5.96%, respectively.

Secondly, it was possible to discriminate the section of genus *Citrus* based on Tanaka's system by the inclusion pattern of seven flavonoid constituents except for part of *Aurantium* and *Limonellus* group species. Principal component analysis based on the composition showed that the scattered diagrams obtained from fruit tissues had different separation conditions each other. Flavedo was suitable for discrimination of individual species in *Limonellus*, *Citrophorum*, and *Fortunella* group, whereas albedo was so for those in *Acrumen* group and segment membrane was for those in *Cephacitrus* group. Unfortunately, scattering in each diagram didn't spread well enough to differentiate 45 species. One approach to solve this problem was to use data of several tissues in judgment. Another approach was to carry out the analysis focusing a certain section to perform more precise discrimination; a section of a sample is known by its flavonoid composition. On the other hand, the effect of the production area on the flavonoid compositions should be clarified in the future.

Thirdly, limonoids in the seeds of Iyo tangor (*C. iyo* hort. ex Tanaka), Shiikuwasha (*C. depressa* HAYATA),

and Hanaju (*C. hanaju* hort. ex. Shirai) was examined. The composition and quantities of limonoids in Iyo seed were similar to those of species in *Acrumen* group. Since Iyo has a large quantity of seeds as by-products, this fruit was considered to be an effective source of limonin, nomilin, and obacunone. Both Shiikuwasha and Hanaju seeds had larger amount of limonoid glucosides than aglycones. In the seeds of Shiikuwasha, 17- β -D-glucopyranoside of nomilin occurred at 759 mg/100 g dry weight, and in that of Hanaju, 17- β -D-glucopyranosides of deacetylnomilin and deacetylnomilinic acid did at 620 and 470 mg/100 g dry weight, respectively. As these 17- β -D-glucopyranoside derivatives are not general in citrus species, detection of some biological activities unique to them might add values to them.

In chapter 3, inhibitory activities of citrus fruit constituent against platelet lipoxygenase, cyclooxygenase, as well as polymorphonuclear leukocyte 5-lipoxygenase were studied.

Firstly, inhibitory activities of the albedo extract of 45 citrus species against rat platelet cyclooxygenase and lipoxygenase were screened. Among the species investigated, the extract of Lumie (*C. lumia*) was shown to possess the highest inhibitory activity against cyclooxygenase (IC_{50} : 24 μ g/mL), and that of Shuto (*C. aurantium*) was the highest against lipoxygenase (IC_{50} : 56 μ g/mL). The albedo extracts of citrus classified in the same taxonomic group appeared to have similar inhibitory activities toward these enzymes. The flavedo extract of ripe Lumie inhibited cyclooxygenase to the same degree as the albedo, more than the pulp extract. The flavedo, pulp, and juice extracts of ripe Ponkan (*C. reticulata*) also inhibited lipoxygenase in addition to the albedo extract. Both the flavedo and albedo tissues were shown to be abundant in inhibitory compounds against cyclooxygenase and lipoxygenase.

Secondly, an activity-guided separation for inhibitors of rat platelet lipoxygenase was carried out. This approach led to the isolation of two compounds, 4-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid (IC_{50} : 5.5 μ M) and methyl 4-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquininate (IC_{50} : 1.9 μ M) from the peel of Ponkan fruit, and eriocitrin (IC_{50} : 22.3 μ M) from Lumie fruit. Their structures were determined by NMR and MS spectroscopic and sugar analyses. These compounds also had inhibitory activities toward rat polymorphonuclear leukocyte 5-lipoxygenase. The IC_{50} values were calculated to be 2.67, 0.70, and 29.1 μ M for 4-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, methyl 4-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquininate, and eriocitrin, respectively. Although eriocitrin had lower activities to these enzymes, its aglycone had much stronger inhibitory activities; the IC_{50} values were 0.07 and 0.20 μ M for 12- and 5-lipoxygenase, respectively.

Thirdly, the inhibitory activities of chlorogenic acid and eriodictyol derivatives were studied to clarify a structure-activity relationship of these structures toward platelet lipoxygenase. Concerning chlorogenic acid derivatives, following evidence was known; 1) catechol residue was indispensable to exhibit the inhibitory activity, 2) binding of caffeic acid with quinic acid results in the loss of inhibitory activity, 3) the rate of loss differs with binding position, and 4) binding of caffeic acid and another cinnamic acid derivative with quinic acid leads to the gain of potent inhibitory activity. Also, the presence of catechol group on B ring in eriodictyol derivatives was necessary. In this structure, sugar moiety caused the loss of the activity and dimer of sugar subjected to the lower activity than that of monomer. In case of the inhibition for 5-lipoxygenase in intact polymorphonuclear leukocyte, only eriodictyol had the inhibitory activity (IC_{50} : 12.7 μ M) among chlorogenic acid derivatives and eriodictyol derivatives, suggesting that hydrophilic moieties such as sugar and quinic acid could be an obstacle to the permeation through the cell membrane.

In chapter 4, effects of extraction methods on the concentrations of selected bioactive compounds in Ponkan juice were investigated. Ponkan fruit was processed by either in-line (5/64 and 8/64 inch), chopper pulper, or hand-press extractions. Concentrations of polymethoxylated flavones (tangeretin, nobiletin, and

sinensetin) and γ -cryptoxanthin in juice, and inhibitory activities against arachidonate cyclooxygenase and lipoxygenases of the juice extract were analyzed. The juice processed by hand-press extraction contained the largest amounts of nobiletin (3.56 mg/100 mL), tangeretin (4.10 mg/100 mL), and sinensetin (0.13 mg/100 mL). The concentrations of γ -cryptoxanthin were 0.66, 0.59, 0.55, and 0.50 mg/100 mL, in chopper pulper, in-line (5/64 inch), in-line (8/64 inch) and hand-press juices, respectively. Both extracts of in-line juices showed greater inhibitory activity toward platelet 12-lipoxygenase than the others. The inhibitory effect of hand-press juice extract on platelet cyclooxygenase activity was remarkable among the juice extracts. All juice extracts effectively inhibited polymorphonuclear 5-lipoxygenase activity to nearly the same extent.