

トチュウ葉のアウクビン, ゲニポシド酸の季節変化

小池 勝也^{a)} 中村 英雄^{b)} 高橋 周七^{*a)}^{a)} 日本大学薬学部生化学教室, ^{b)} 株式会社常盤植物化学研究所製造部The seasonal changes of the aucubin and geniposidic acid concentrations in *Eucommia ulmoides* OLIVER leafKatsuya KOIKE^{a)} Hideo NAKAMURA^{b)} and Shushichi TAKAHASHI^{*a)}^{a)} Biochemistry Laboratory, College of Pharmacy, Nihon University,^{b)} Manufacturing Division, Tokiwa Phytochemical Co., LTD.

(Received April 17, 1998. Accepted August 11, 1998.)

Abstract

Eucommia ulmoides OLIVER, (*Eucommiaceae*, Du-Zhong) leaf contains compounds similar to those found in the bark and is expected to have the same pharmacological effects as the bark. However, it is well known that the concentration of compounds in Du-Zhong is influenced by the producing area, harvest time and treatment after harvesting. In this study, we investigated the seasonal changes of aucubin and geniposidic acid in Du-Zhong leaves. Du-Zhong leaves were collected in Funabashi or Nakasen between May 1996 and January 1997, dried immediately and kept in a desiccator. The dried leaves were extracted with methanol or water, and then the aucubin and geniposidic acid concentrations were analyzed using GC or HPLC. In Funabashi, the aucubin concentration was up to 2.5 % higher from June to September. Unexpectedly, the geniposidic acid concentration was 5.5 % higher in June and July. In Nakasen, the aucubin concentration was 5.5 % higher from July to August. The geniposidic acid concentration was 6.3 % higher in July. For marketing, Du-Zhong leaves are harvested from October to November, but our results showed that the aucubin and geniposidic acid concentrations were low at this time. According to the concentration of both compounds, we recommend that the leaves be harvested from June to July in Funabashi and from July to August in Nakasen.

Key words Du-Zhong, *Eucommia ulmoides* OLIVER, aucubin, leaf, geniposidic acid, seasonal-change.

緒 言

トチュウ (*Eucommia ulmoides* OLIVER, *Eucommiaceae*, Du-Zhong) は中国原産の落葉喬木で、樹皮 (杜仲) は神農本草経¹⁾ 本草綱目²⁾ に収載され、古来より生薬として用いられている。近年、トチュウの葉 (杜仲茶) は中国、韓国、日本などで滋養健康飲料とされている。トチュウ葉は樹皮と類似した成分 (アウクビン, ゲニポシド酸など) を含むことが報告されており^{3, 5)} 樹皮と同様な薬理効果が期待される。アウクビンは抗炎症作用⁶⁾ 抗

痙攣作用⁷⁾ 抗腫瘍作用⁸⁾ α -アマニチニン中毒の強力な解毒剤⁹⁾ 四塩化炭素肝臓障害に対する保護活性¹⁰⁾ が、ゲニポシド酸は性行動の低下予防¹¹⁾ 学習行動の低下予防¹¹⁾ 抗癌作用¹²⁾ 抗酸化作用¹³⁾ 利胆作用¹³⁾ 血圧降下作用¹³⁾ が報告されている。当研究室ではこれまでにトチュウ葉の薬理効果について報告してきた¹⁴⁻¹⁹⁾ トチュウの樹皮や葉の成分は、産地、収穫時期、収穫後の処理により含量が大きく変化することが報告されている^{20, 21)} 広島県産のトチュウ葉のゲニポシド酸は夏葉に多いとの報告があるが、詳細な検討はなされていない²¹⁾ 本稿ではトチュウ葉の主要なイリドイド配糖体であるアウクビン、

*〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1

7-7-1 Narashino-dai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan

ゲニポシド酸含量の季節変化および産地の違いによる変化を検討しそれら含量の多い時期を把握することにより、トチュウ葉の収穫適期を知る参考に供する。

材料と方法

(1) 試薬：特に記載する他、和光純薬工業（株）製の試薬特級を用いた。

(2) トチュウ葉の採集と保存方法：トチュウの葉は1996年5月から1997年1月まで8回に渡って日本大学薬学部薬草園（千葉県船橋市、以下船橋産と略）と、1997年6月から12月までの6回に渡って秋田県仙北郡中仙町（以下中仙町産と略）の樹齢10年のトチュウから長さ10 cm以上の葉を採集した。1997年1月および1997年12月は地上に落ちた枯れ葉を集めて試料とした。葉は採集後、直ちにドライオープンで乾燥（60℃, 24時間）し、遮光したデシケータ中に保存した。

(3) aucubinおよびゲニポシド酸の定量法：乾燥した葉はミキサーで粉碎後、日本薬局方準拠の篩（sieve No. 300）を通過したものを使用した。この粉末を乾燥（60℃, 24時間）後、約1 gを正秤し、20倍量のメタノールを加え、1時間水浴上で超音波処理した。抽出液を吸引ろ過し、ろ液を40℃以下で減圧濃縮し、メタノールエキスを得た。メタノールエキスを葉の10倍量の蒸留水を加え、1時間水浴上で超音波処理し、抽出液はフィルターろ過（dismic C-25, 東洋濾紙（株）製）した。aucubin定量用試料の調製はろ液100 μ lを凍結乾燥して得られた乾燥物にTMS化剤（Tri-Sil 'Z', Pierce, Rockford, Illinois, USA）を100 μ l加え、ドライオープン中で加温（60℃, 10分間）し、ガスクロマトグラフィー用の試料とした。

aucubin標準品を用いてあらかじめ作成した検量線から試料中のaucubinを3回定量した。²²⁾ aucubinの含量は乾燥トチュウ葉に対する重量百分率として表した。GCで得られたaucubinのピークは単一のピークであることをGC-MSで確認した。²³⁾

ゲニポシド酸の定量は前述のろ液1 μ lを日本薬局方一般試験法液体クロマトグラフ法に従って3回分析した。²⁴⁾ 生薬試験用ゲニポシド酸を用いてあらかじめ作成した検量線から試料中のゲニポシド酸を定量し、乾燥トチュウ葉に対する重量百分率で表した。

結果および考察

aucubin^{6 10)} およびゲニポシド酸^{11 13)} は様々な薬理作用が報告されており、トチュウ葉の有効成分の一つと

考えられる。今回の実験で船橋産のトチュウ葉のaucubin量は6月から9月までの比較的長期に渡って2.5%という高い値を示すことが明らかとなった（Fig. 1）。中仙町産のトチュウ葉では7月（5.5%）に極めて高い値を示し、約1ヶ月間維持した後、速やかに減少した（Fig. 2）。トチュウ葉のaucubin量は月平均気温が20℃を下回ると低下した。

船橋産のトチュウ葉に含まれるゲニポシド酸量は5月

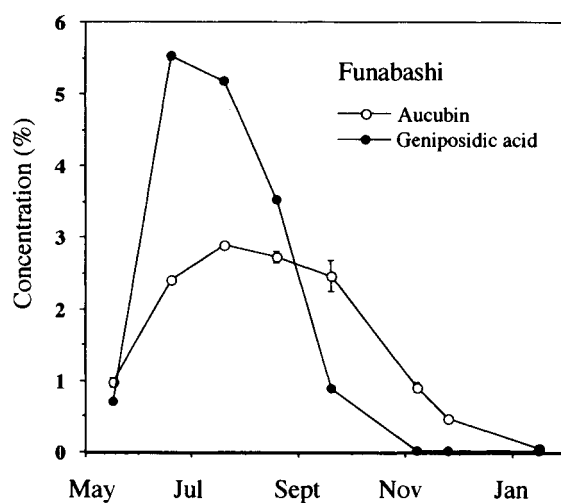


Fig. 1 The seasonal changes of the aucubin and geniposidic acid concentrations in *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf in Funabashi. Each value shows mean $\pm$ S.E. (n=3).

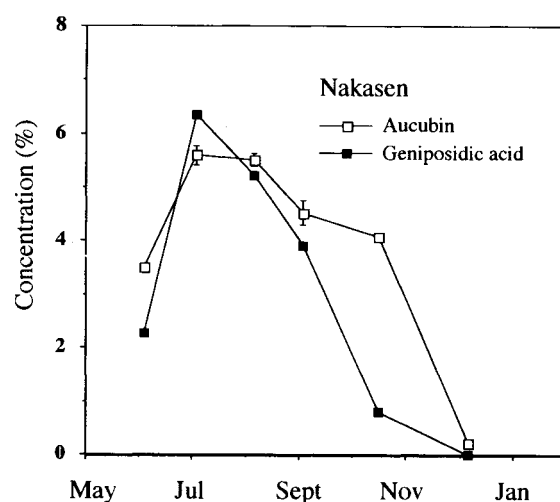


Fig. 2 The seasonal changes of the aucubin and geniposidic acid concentrations in *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf in Nakasen. Each value shows mean $\pm$ S.E. (n=3).

(0.7%) から 6 月 (5.5%) にかけて約 8 倍に急増し、約 1 ヶ月間維持された後、速やかに減少した (Fig. 1)。トチュウ葉にゲニポシド酸が多く含まれる時期が極めて短いことが明らかとなった。中仙町産では 7 月 (6.3%) に高い値を示した後、速やかに減少した (Fig. 2)。船橋産と同様にゲニポシド酸含量の高い時期は限られた期間であることが明らかとなった。トチュウ葉のゲニポシド酸量は船橋産より約 1 ヶ月遅れた変化を示した。

現在、市場のトチュウ葉は樹木の成長を考慮して秋 (10 月から 11 月) に収穫されているが両化合物の含量が少ない時期であることが明らかとなった。もし、アウクビン、ゲニポシド酸の作用を期待するならば船橋産では 6 月、7 月頃、中仙町産では 7 月、8 月頃が適していると考えられる。

謝 辞

本研究に御協力頂きました日本大学薬学部生化学研究室卒業生、小原健二、中島 相、山津美佐子氏、中仙町産のトチュウ葉を御供与下さいました株式会社物産中仙に深謝いたします。

References and Notes

- 1) Wu jin, Sun, X.X. and Sun, F. Y.: "Shen Nong Ben Cao Jing", 43, Shang Wu Yin Shu Guan, 1955.
- 2) Li, S. Z.: "Ben cao gang mu", Ren Min Wei Sheng Chu Ban She, 1987.
- 3) Sih, C. J., Rovikumar, P. R., Huang, F.-C., Buckner, C.B. and Whitlock, jr. H.: Isolation and Synthesis of Pinoresinol Diglucoside, a Major Anti-hypertensive Principle of Tu-chung (*Eucommia ulmoides*, OLIVER). *J. Am. Chem. Soc.* **98** (17), 5412-5413, 1976.
- 4) Deyama, T.: The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. I. Isolation of (+)Medioresinol Di-O- β -D-Glucoside. *Chem. Pharm. Bull.* **31** (9), 2993-2997, 1983.
- 5) Deyama, T., Ikawa, T. and Nishibe, S.: The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. II. Isolation and Structures of Three New Lignan Glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **33** (9), 3651-3657, 1985.
- 6) Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S., Rios, J. L.: Structural Considerations on the Iridoids as Anti-Inflammatory Agents. *Planta Med.* **60** (3), 232-234, 1994.
- 7) Ortiz-de-Urbina, A. V., Martin, M. L., Fernandez, B., San-Roman, L. and Cubillo, L.: In vitro Antispasmodic Activity of Peracetylated Pentamonoiside, Aucubin and Catalpol. *Planta Med.* **60** (6), 512-515, 1994.
- 8) Kapadia, G. J., Shekhar, S. C., Sharma, C.S. and Tokuda, H.: Inhibitory Effect of Iridoids on Epstein-Barr Virus Activation by a Short-Term in vitro Assay for Anti-Tumor Promoters. *Cancer Lett.* **102**, 223-226, 1996.
- 9) Chang, I. M., Yun, H., Kim, Y. S., Ahn, J. W.: Aucubin: Potential antidote for α -amanitin poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **22** (1), 77-85, 1984.
- 10) Chang, I. M., Ryu, J. C., Park, Y. C. and Yun (Choi), H. S.: Protective Activities of Aucubin against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Mice. *Drug Chem. Toxicol.* **6** (5), 443-453, 1983.
- 11) Imai, T., Kishi, T., Inoue, H., Nishiyama, N. and Saito, H.: Effects of Iridoides on Sex- and Learning- Behaviors in Chronic Stressed Mice. *Yakugaku Zasshi* **108** (6), 572-585, 1988.
- 12) Hsu, H. Y., Yang, J. J., Lin, S. Y. and Lin, C. C.: Comparisons of Geniposidic Acid and Geniposide on Antitumor and Radioprotection after Sublethal Irradiation. *Cancer Lett.* **113**, 31-37, 1997.
- 13) Nakazawa, Y.: Tochu-cha no kinoukenkyu no genjo to tembo (杜仲茶の機能研究の現状と展望). *Gekkan Food Chemical* (月刊フードケミカル), **1995** (9), 72-78.
- 14) Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S.: The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. III. Isolation and Structure of a New Lignan Glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* **34** (2), 523-537, 1986.
- 15) Nakasa, T., Yamaguchi, Y., Okinaka, Y., Metori, K. and Takahashi, S.: Effects of Du-Zhong Leaf Extract on Plasma and Hepatic Lipids in Rats Fed on a High Fat Plus High Cholesterol Diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **69** (11), 1491-1498, 1995.
- 16) Metori, K., Ohashi, S. and Takahashi, S.: Effects of Du-Zhong Leaf Extract on Serum and Hepatic Lipids in Rats Fed a High-Fat Diet. *Biol. Pharm. Bull.* **17** (7), 917-920, 1994.
- 17) Tanimoto, S., Koike, K. and Takahashi, S.: Improvement in Broiled Meat Texture of Cultured Eel by Feeding of Tochu Leaf Powder. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57** (2), 325-327, 1993.
- 18) Tanimoto, S., Ikuma, K. and Takahashi, S.: Improvement in Raw Meat Texture of Cultured Eel by Feeding of Tochu Leaf Powder. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57** (2), 205-208, 1993.
- 19) Yokogoshi, H., Hayase, K., Yamazaki, J., Koike, K. and Takahashi, S.: Effects of Administration of an Extract of Tu-chung Leaf (*Eucommia ulmoides*, Oliver) on Muscle Protein Synthesis in Mice. *Agric. Biol. Chem.* **55** (12), 3133-3134, 1991.
- 20) Takahashi, T., Matsumoto, N. and Oshio, H.: The Stability of Bio-Active Components in the Bark of *Eucommia ulmoides*: *Eucommiae Cortex*. *Shoyakugaku Zasshi* **42** (2), 111-115, 1988.
- 21) Shimoyama, A., Yamadaki, M., Nakazawa, Y., Yahara, S. and Nohara, T.: Studies on the Constituents of the Leaves of *Eucommia ulmoides*. *Shoyakugaku Zasshi* **47** (1), 56-59, 1993.
- 22) GC condition; apparatus: Shimadzu GC-9AM, N₂ flow rate: 50 ml/min, column: 5 mm $\times$ 2.6 mm $\times$ 2.1 m, 3% OV-1 on Chrom Sorb WAW-DMCS, injection temp.: 320°C, column temp.: 150-250°C (5°C/min), computer: Shimadzu Chromatopac C-R5A.
- 23) GC-MS condition; GC: apparatus: Hp 6890, column: 0.32 mm $\times$ 30 m, DB 17 (J & W Scientific), film coat: 0.25 μ m, initial temp.: 150°C, rate: 10°C/min, final temp.: 260°C, injection temp.: 300°C, He flow rate: 2.0 ml/min; MS: apparatus: JMS-AM II type 15, PM voltage: 750V, current: 300 μ A, ionization energy: 70eV, source temp.: 230°C, interface temp.: 240°C, mode: positive EI; *m/z*: 130 (M⁺-sugar-OH-TMSOH $\times$ 2), 221 (M⁺-sugar-O-TMSOH), 271 (M⁺-aucubigenin-TMSOH $\times$ 2), 310 (M⁺-sugar-OH), 361 (M⁺-aucubigenin-TMSOH).
- 24) HPLC condition; apparatus: Waters type 600 E, column: Mightsil RP-18 (5 μ m, Kanto Chemical Co., Inc. Tokyo Japan), 4.6 $\times$ 150 mm, detector: Waters type 486 (240 nm), column temp.: 35°C, mobile phase: CH₃CN/1% AcOH (5:95), 1.0 ml/min, computer: Shimadzu Chromatopac C-R4A.