

## ワラビ成分のヒスタミン遊離活性に関する研究

### II. 活性画分に含まれる配糖体の検出

斎藤俊之\*・石井和彦\*・大久保吉啓\*

昭和53年8月31日受付

## Studies on the Histamine Releasing Activity of Bracken Fern

### II. Demonstration of Glucosides in the Active Extract

Toshiyuki SAITO\*, Kazuhiko ISHII\*, Yoshihiro OKUBO\*,

In an earlier paper dealing with the histamine releasing activity of bracken fern (*Pteridium aquilinum*), it was suggested that the active principle in the plant would be glycosides. Further studies have been developed to investigate glycosides in the active fraction by CC, PC, UV and IR.

The water extract(Bw) and the ethanol extract(Be) obtained from the rhizome of bracken released histamine from rat peritoneal mast cells. These extracts were chiefly composed of monosaccharides, amino acids, inorganic substances and glycosides. Five glycosides (Gl-a, -b, -c, -d and -e) were fractionated from the active extracts(Bw and Be) by the column gel chromatography on Sephadex G-10, respectively. It was determined that these glycosides were  $\beta$ -glucosides whose aglycones would be an aromatic compound. Furthermore, it was supposed that the two glucosides(Gl-a and Gl-b) were instable and identical. These glucosides seem to be active principles.

#### 結 言

ワラビを水で抽出した試料にヒスタミン遊離活性のあ  
ることが認められたので、これをゲルクロマトグラフィー  
によって検討したところ、活性物質は配糖体であるこ  
とが推察され、その成績を前報<sup>1)</sup>で報告した。

本報では、ワラビ根茎を水及びエタノールで抽出して  
作成した試料を用い、ワラビに含まれる配糖体について、  
ゲルクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、

紫外吸光スペクトル及び赤外吸光スペクトルによって研  
討したので、その成績について報告する。

#### 実験材料及び方法

##### 1. 試料の作成

ワラビ根茎を水で抽出した試料 (Bw) は前報<sup>1)</sup>と同じ  
手順で作成した。また、エタノールで抽出した試料(Be)  
は、Fig. 1 に示す手順で作成した。すなわちワラビ根茎  
から作成した凍結乾燥粉末を熱エタノールで抽出し、濾

\*鳥取大学農学部獣医学科家畜薬理学研究室

Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Agriculture, Tottori University

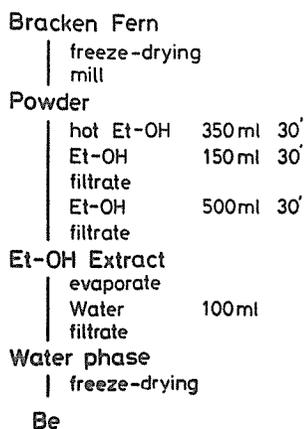


Fig. 1 A procedure for the separation of Be from bracken fern (rhizome).

縮したのち、蒸留水を加えて水に可溶の画分を得た。これを凍結乾燥して試料 (Be) とし、密栓して冷凍 (-20℃) 保存した。Beの収量は根茎末100 g 当り約3 g であった。

2. ゲルクロマトグラフィー (CC)

Sephadex G-10によるCCは、展開流速を変えた以外は前報と同様の操作で行った。溶出画分の糖質はフェノール硫酸法で定量し、グルコース換算量として求めた。

3. ペーパークロマトグラフィー (PC)

(1) 試料の調製

PCは東洋濾紙 No.50 (2×40cm) を用い、n-ブタノール：酢酸：水 (4 : 1 : 2) を展開溶媒として一次元上昇法によって行った。添加した試料は CC による分離画分のほか、グルコース及びフェノール配糖体であるサリシンを対照試料として用いた。試料溶液は  $1 \times 10^{-2}$  g/ml に調製し、5 μg を添加した。

試料の酸加水分解は、試料1mgにIN-HCl 1mlを加え、減圧下、100℃水浴中で2時間加熱して行った。分解した試料溶液は減圧乾燥した。また、酵素分解はβ-グルコシダーゼ (Sweet Almonds) (P-L Biochemicals, Inc.) を用いて行った。試料1mgを0.025%酵素液2mlに溶かし、30℃ 3時間作用させたのち、これを限外濾過 (pore size 15Å) した。得られた濾液は凍結乾燥して酵素分解の試料とした。

(2) 配糖体の検出

試料を展開した濾紙はTrevelyanらの方法<sup>2)</sup>に従って

処理し、硝酸銀反応スポットからRf値を求めた。また展開後の濾紙を1cm間隔で切り、各濾紙片を水で浸出した液について、糖質量及び260nmにおける吸光度を測定した。

4. 紫外吸光 (UV) スペクトル及び赤外吸光 (IR) スペクトルの測定

CC及びPCによって分離精製した配糖体について、UVスペクトルとIRスペクトルを測定した。UVスペクトルは分光光度計 (Hitachi 124) により、水、酸液 (0.1N-HCl)、アルカリ液 (0.1N-NaOH) 及びエタノールを溶媒として測定した。IRスペクトルはKBr錠剤法<sup>3)</sup>によって、赤外分光光度計 (Hitachi 215) で測定した。

5. ヒスタミン遊離活性の測定

ヒスタミン遊離活性の測定は、前報<sup>1)</sup>における方法に若干の改良を加えて行った (Fig. 2)。第一に、ラット

Incubation Method

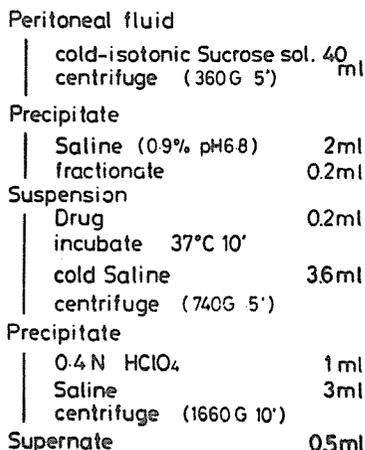


Fig. 2 A method for the incubation of rat peritoneal mast cells with drug.

から採取した腹水肥満細胞 (MC) を生理食塩水 2ml に再浮遊後、その0.2mlずつについて等量の試料と反応させた。これによって活性の測定に要する試料を節約することができた。第二に、前報では作用後の上清を用い、遊離ヒスタミン量からその遊離率を算定したが、本研究では非遊離のヒスタミン量から遊離率を算定した。Fig. 3はヒスタミン遊離物質Compound 48/80 (以下C48/80) を用いて、ヒスタミンの遊離率と非遊離率の関係を示したもので、両者の間には高い相関関係 ( $r = -0.986$ ) が

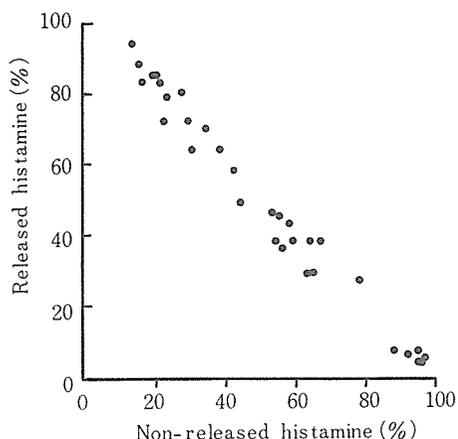


Fig. 3 Correlation between released histamine and non-released histamine on rat peritoneal mast cells by the administration of C 48 / 80 ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$  g / ml).

認められた。この改良法によって、蛍光定量に用いる試料はより均一化し、精度の向上をはかることができた。なお、ヒスタミンの蛍光定量は、前報と同様の操作で行った。

### 実験成績

#### 1. ヒスタミン遊離活性

ワラビから作成した水による抽出試料 (Bw) 及びエタノールから抽出した試料 (Be) のヒスタミン遊離活性について検討した。その成績はFig. 4 に示すとおりである。過塩素酸 ( $\text{HClO}_4$ ) による遊離ヒスタミン量を100%としたとき、対照 (生理食塩水) の遊離率が $6.0 \pm 0.9\%$  (Mean  $\pm$  S. E.) であるのに対して、C48/80は $1 \times 10^{-3}$  g/mlの濃度で $77.8 \pm 4.3\%$ 、Sinomenineでは $1 \times 10^{-2}$  g/mlの濃度で $66.8 \pm 4.3\%$ であった。これらに比較してBwは $1 \times 10^{-1}$  g/mlの濃度で $47.6 \pm 7.2\%$ 、Beでは $2.5 \times 10^{-3}$  g/mlの濃度で $58.8 \pm 2.7\%$ であった。BwとBeの活性はC48/80及びSinomenineには及ばないが、著明な活性が認められ ( $P < 0.01$ )、BeはBwに比べておよそ4倍の高い活性を示した。なお、CCによって得たG1-c、G1-d、G1-eの混合画分には活性が認められなかった。

#### 2. CCによる検討

ワラビに含まれる配糖体についての検討は、主として強い活性を示したBeを用いて行った。Fig. 5はBe 900 mgを水1.5mlに溶解し、流速 30ml/hで展開し、得られた

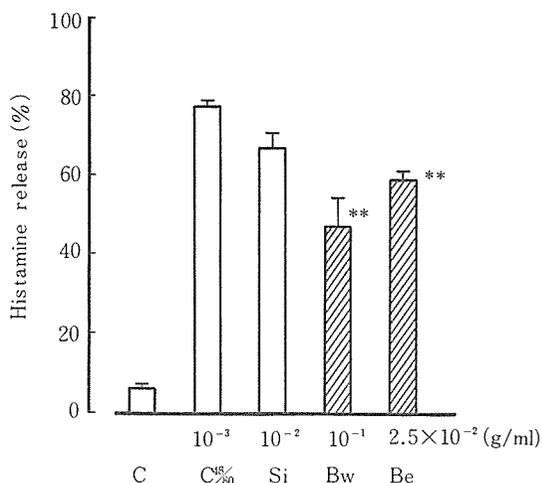


Fig. 4 Histamine release from rat peritoneal mast cells by the administration of saline (C), C48 / 80, sinomenine (Si), Bw and Be. Results show the mean  $\pm$  standard errors of 4 to 6 experiments. \*\*;  $P < 0.01$  when compared with control.

各フラクションについて260nmにおける紫外吸光度と糖質量をそれぞれプロットした1例である。同図で見ると

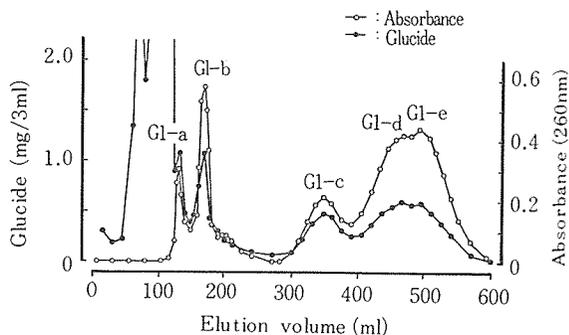


Fig. 5 Elution diagram of glucide and UV absorbance (260nm) of Be by the column chromatography on Sephadex G-10. Column:  $2.5 \times 100$  cm, Sample (Be) : 900mg, Eluate: distilled water, Flow rate: 30ml / h, Fraction volume: 3ml, Void volume: 174ml.

に、紫外吸光ピークに一致して5つの糖質ピークが認められたことから、Beに含まれる紫外吸光物質は、その構成成分として糖質を含む5種の配糖体であると考えられる。なお、BwにおいてもBeと同様の溶出パターンが認

められた。

そこでこれらの画分を溶出順にG1-a, G1-b, G1-c, G1-d及びG1-eとし、各画分を集めて凍給乾燥粉末とした。これをさらに精製するため再度CCを行い、得られた試料を用いてPC, UV, IRによって検討した。なお、これらの配糖体はその溶出位置から考えて、いずれも、Sephadexゲルに対する吸着性によって分離されたものと思われる。

### 3. PC による検討

CCによって十分に精製されたと思われる5種の画分(G1-a, G1-b, G1-c, G1-d, 及びG1-e)について、その未処理試料並びに塩酸及び $\beta$ -グルコシダーゼによる加水分解試料を用い、それぞれPCを行って検討した。なお、対照として、グルコース及びサリシンを用いた。

Fig. 6はBeから精製した配糖体の未処理試料についての成績である。

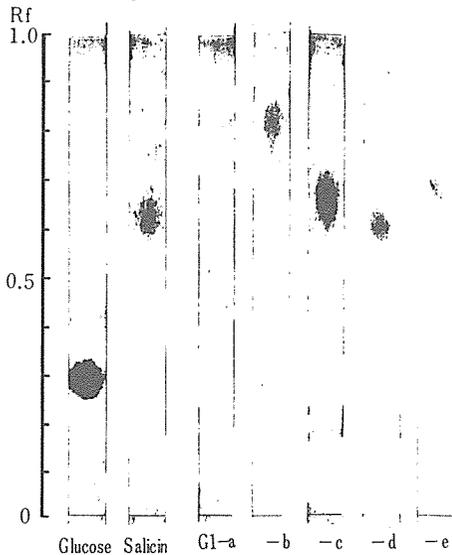


Fig. 6 Paper chromatogram of glucose, salicin and each fraction obtained by the column chromatography of Be. Glucide was detected with silver nitrate acetone.

まず、G1-aについて見ると、硝酸銀還元スポットは認められなかったが、展開後の濾紙片を水で抽出して検討したところ、Rf値0.50と0.73の位置で、紫外吸光及び糖質のピークがそれぞれ一致するのが認められた(Fig. 7)。Bwから得られたG1-aにおいても同様の傾向が認められ、Rf値0.59と0.73に2峰性のピークが認められた。

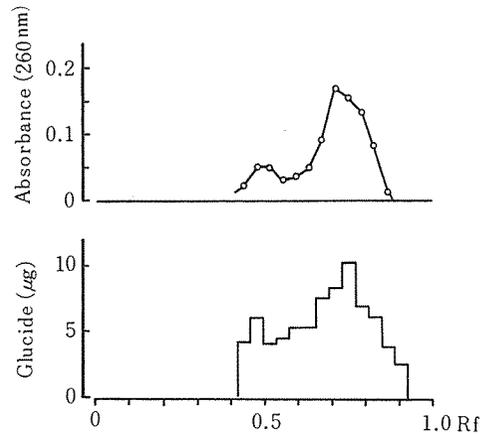


Fig. 7 Glucide and UV absorbance (260nm) detected from paper chromatogram of G1-a(Be).

なお、Rf値0.50と0.59のUVスペクトルは、BwのCCによって得られたG1-aのスペクトルに類似し、Rf値0.73のスペクトルはG1-bに類似していた(Fig. 12)。

一方、G1-b, G1-c, G1-d及びG1-eにおいては微弱な硝酸銀還元スポットが認められ、そのRf値はそれぞれ0.80, 0.66, 0.64及び0.75であった。また、濾紙片から水で抽出した試料について検討したところ、それぞれのRfの位置で、紫外吸光ピークと糖質のピークは一致するのが認められた。Bwから得られたG1-b, G1-c, G1-d及びG1-eについても同様の成績が得られた。

次にこれら配糖体の塩酸加水分解試料について行った成績はFig. 8に示すとおりである。G1-a, G1-b, G1-c, G1-d及びG1-eは、いずれもグルコースのRfの位置に鮮明な硝酸銀還元スポットを示し、G1-cではさらにRf値0.45の位置にも明瞭な1つのスポットが認められた。そこでこのRf 0.45のスポットについて、濾紙片から水で抽出した試料によりさらに検討したところ、この位置に糖質のピークが認められた(Fig. 9)。

Fig. 10は $\beta$ -グルコシダーゼによる加水分解試料について行った成績である。いずれの配糖体もグルコースのRfと一致する位置に明瞭なスポットが認められた。

以上の成績から、G1-a, G1-b, G1-c, G1-d及びG1-eはいずれも $\beta$ -グルコースを糖成分とする配糖体であることが分かった。

なお、G1-cは $\beta$ -グルコースのほかにもう1つの還元糖によって構成されているものと思われる。

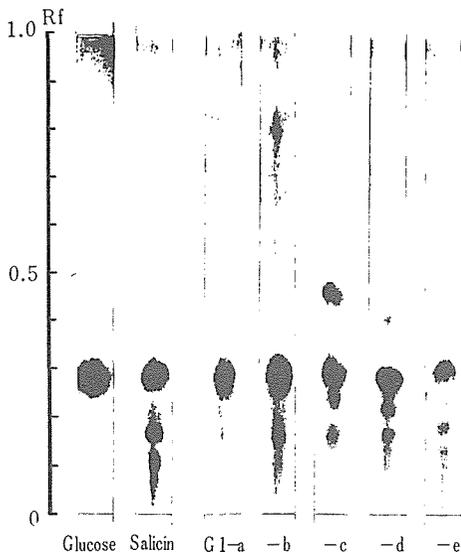


Fig. 8 Paper chromatogram of glucose, salicin, and each fraction (G1-a, -b, -c, -d, -e) obtained from Be. Each sample was hydrolysed by 1N-HCl for 2 h.

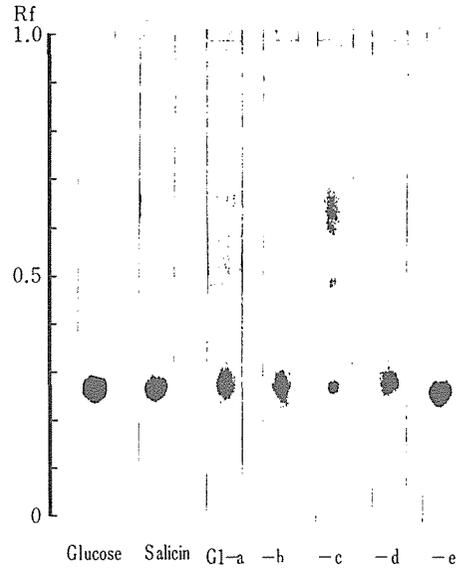


Fig. 10 Paper chromatogram of glucose, salicin and each fraction (G1-a, -b, -c, -d, -e) obtained from Be. Each sample was hydrolysed by  $\beta$ -glucosidase.

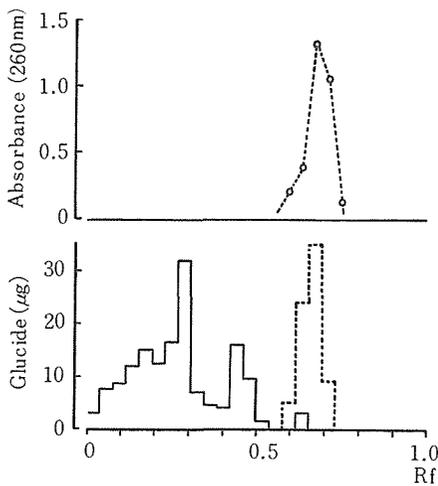


Fig. 9 Glucide and UV absorbance (260nm) detected from paper chromatogram of G1-c. Solid line shows glucide of G1-c hydrolysed by 1N-HCl. Dotted line shows non-hydrolysed sample.

4. UVスペクトルによる検討

Bw及びBeからCCによって分離した配糖体について、そのUVスペクトルを調べた。Beから得られた5種の配

糖体 (G1-a, G1-b, G1-c, G1-d及びG1-e) について、水及びエタノールを溶媒として測定したときのUVスペクトルはFig. 11に示すとおりである。それぞれ固有のスペクトルを示すが、いずれのスペクトルも260nm前後

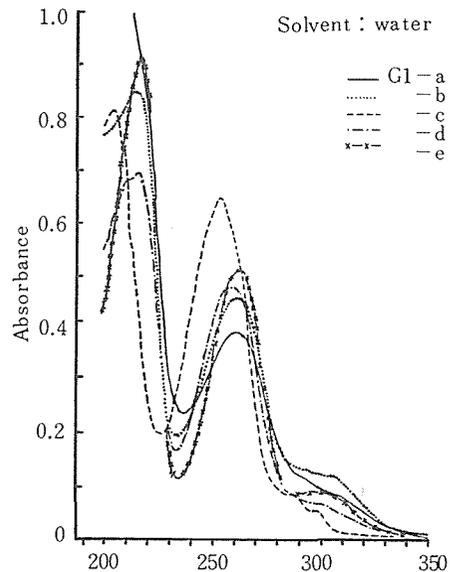


Fig.11a UV absorption spectra of each fraction obtained from Be.

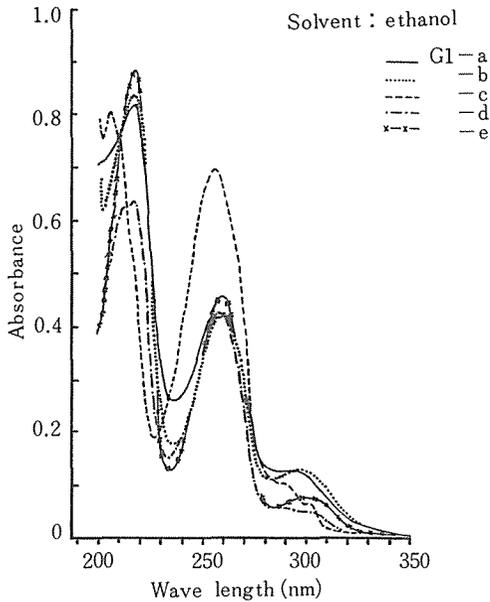


Fig.11b

に見られるやや強い吸収が特徴的である。また、溶媒を水からエタノールに変えることによって、各スペクトル

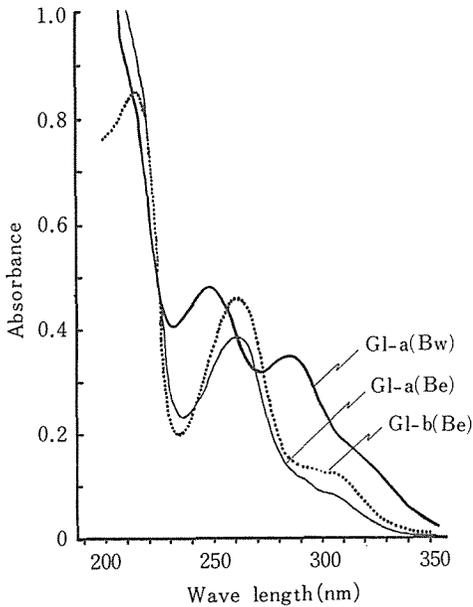


Fig. 12 UV absorption spectra of G1-a(Bw), G1-a(Be) and G1-b(Be). solvent:water.

の吸収強度に変化は認められなかったが、吸収極大においてそれぞれ2~15nmの青色移動が認められた。

また、G1-a及びG1-bのUVスペクトルを比較するとFig. 12で見ると、G1-aのスペクトルはBwとBeの由来で異なっており、一方、BeのG1-aとG1-bのスペクトルが類似していることが注目される。

なお、溶媒を酸液(0.1N-HCl)とした場合は、溶媒が水の場合とほぼ同様であったが、これをアルカリ液(0.1N-NaOH)とした場合、260nm以下に見られる吸収強度がいずれも増大し、その波長( $\lambda_{max}$ )は測定不能となった。

5. IRスペクトルによる検討

Bwから得られたG1-a、並びにBeから得られたG1-a、G1-b、G1-c、G1-d及びG1-eの各IRスペクトルについて検討した。その成績はFig. 13及びFig. 14に示すよ

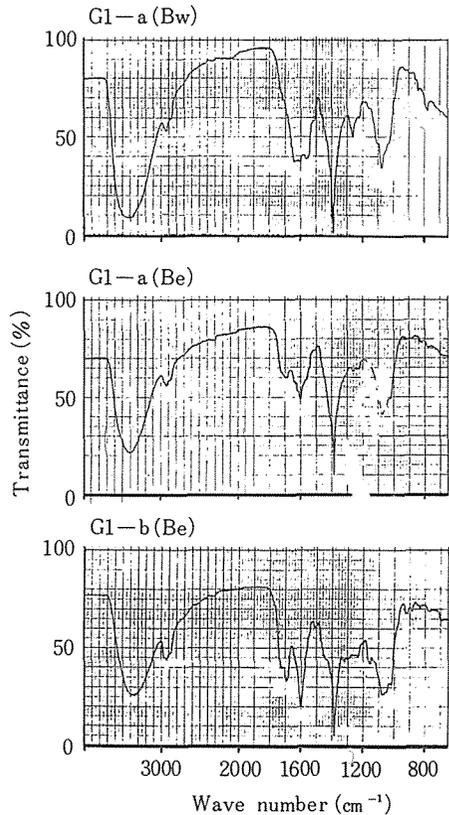


Fig. 13 IR spectra of G1-a(Bw and Be) and G1-b(Be).

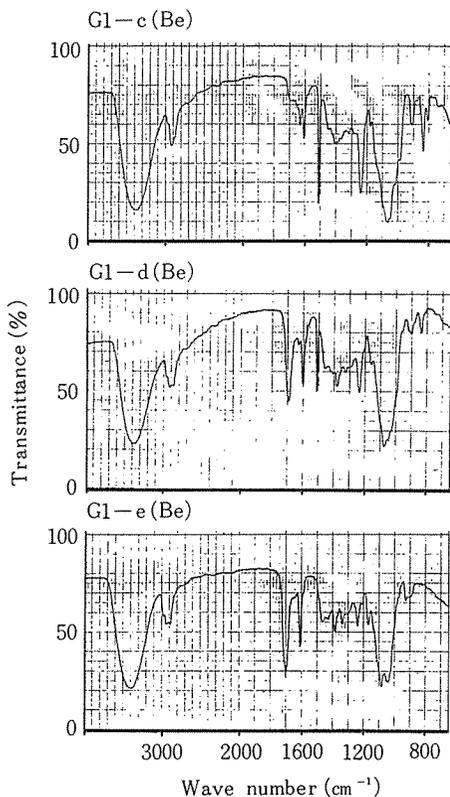


Fig. 14 IR spectra of G1-c, G1-d and G1-e obtained from Be.

うに、各IRスペクトルは $3400\text{cm}^{-1}$ 、 $2925\text{cm}^{-1}$ 及び $1200\sim 1000\text{cm}^{-1}$ の吸収帯において類似していることが認められた。

BwのG1-a、BeのG1-a及びG1-b (Fig. 13) について見ると、以上の吸収帯のほか、 $1385\text{cm}^{-1}$ のシャープな吸収帯が特徴的であった。また、G1-c及びG1-d (Fig. 14) についても $1500\text{cm}^{-1}$ 以下の領域における吸収が類似しており、特に $1510\text{cm}^{-1}$ の吸収が特徴的であった。

## 考 察

前報において、ワラビに含まれるヒスタミン遊離活性物質についてCCによって検討したところ、活性物質は配糖体であることが強く示唆された。本研究においては、活性を示す試料 (Bw及びBe) に含まれる配糖体について、CC、PC、UV及びIRによって検討した。

まずCCによる検討において、5つの糖質ピーク (G1-a、G1-b、G1-c、G1-d、G1-e) がそれぞれ260nmの紫外吸光ピークとよく一致することが認められた。一般に多くの芳香族化合物は紫外領域に吸収極大を有しているが、

水に易溶性の物質で紫外領域に吸収極大をもつ物質は極めて少なく、タン白質、核酸、一部のアミノ酸、配糖体などが知られており、これらの物質はいずれも芳香環を構成成分としている。ところでCCによって分離された5種の画分は、試料作成の過程でタン白質、核酸を含まず、またCCによる分離過程でアミノ酸を含んでいない。このことから5種の糖質画分 (G1-a、G1-b、G1-c、G1-d、G1-e) は芳香環を構成成分とする配糖体であることが推察された。

次にこれら各画分の未処理試料及び酸による加水分解試料をPCによって検討した成績から、これら5種の画分はいずれも配糖体であることが確認された。なお、このことは、それぞれのIRスペクトルが $200\sim 1100\text{cm}^{-1}$ に強い吸収を示すことから支持される (Fig. 13, 14)。さらに $\beta$ -グルコシダーゼによる加水分解の成績から、これらの配糖体はいずれも $\beta$ -グリコシドであることが推定された。なお、G1-cについては、糖成分として $\beta$ -グルコースのほかにもう1種の還元糖を含むものと思われる。

ここに検出された5種配糖体のアグリコンについてみると、これら配糖体がSephadexゲルに強い吸着性を示し、またUV吸収スペクトルでいずれも260nm前後に比較的強い吸収があり、300nm以上の長波長域には大きな吸収がないことから、これらのアグリコンは比較的簡単な芳香環、あるいは複素芳香環によって構成されているものと思われる。これらのうち、G1-a、G1-b、G1-d及びG1-eでは、UV310nm及びIR $1690\text{cm}^{-1}$ の吸収からカルボニル基を、またG1-c及びG1-dでは、UV255nm及び290nm、IR $1605\text{cm}^{-1}$ 及び $835\text{cm}^{-1}$ の吸収からインドール核などの複素芳香環をアグリコンとする配糖体であるように推察される。

なお、近年Hikinoら<sup>4-6)</sup>は、インダノン誘導体をアグリコンとする5種の配糖体をワラビから分離しているが、G1-a、G1-b及びG1-eは、それぞれのUV及びIRスペクトルから推量して、Hikinoらが分離した配糖体のいずれかに一致する可能性が強い。

これら5種の配糖体のうち、G1-c、G1-d及びG1-eの混合画分にはヒスタミン遊離活性が認められなかった。従って活性を有する配糖体はG1-a及びG1-bであることが推察される。

G1-a及びG1-bはUV吸収スペクトルの類似 (Fig. 12)、IRスペクトルの成績 (Fig. 13)、さらにPCで展開後の濾紙を水で抽出した試料についてのUVスペクトルの成績 (Fig. 12) などから、この両者は極めて近似した構造をもつ物質と考えられる。なお、G1-a及びG1-bのアグ

リコンはかなり不安定な化合物のように思われる。CCによって配糖体が溶出するとき、その溶出位置はアグリコンのSephadexゲルに対する吸着性によって影響を受けるが、G1-a及びG1-bをCCによって再分画した際、両者の溶出位置が通常的位置よりかなり前方に移動することが認められた。このことからそれぞれのアグリコンは精製の過程で何らかの変化を受けたものと解される。このように、活性をもつ配糖体のアグリコンが不安定な性状を示すことは、活性物質が比較的容易に失活することに関連して注目される。

以上挙げたことから、G1-aとG1-bは本来同一の物質であったものが、精製の過程で2つに分離した可能性が指摘され、今後、この点についてさらに検討を要するものと思われる。

### 総 括

フラビを水で抽出した試料 (Bw) 及びエタノールで抽出した試料 (Be) に含まれる配糖体について、CC, PC, UV 及びIRによって検討した。その結果、次のような成績が得られた。

1. Bw, Beはいずれも著明なヒスタミン遊離活性を示し、配糖体の含量が多いBeはBwに比べて約4倍強い活性を示した。

2. BwとBeに含まれる配糖体はCC (Sephadex G-10) によって、それぞれ5種の画分 (G1-a, G1-b, G1-c, G1-d及びG1-e) として分離することができた。

3. これら5種の配糖体は、PCによる成績からいずれも $\beta$ -グルコースを糖成分とする $\beta$ -グルコシドであることが確認された。また、これら配糖体の1つには、さ

らに1つの還元糖の存在が認められた。

4. これら5種の配糖体のアグリコンは、CC, UV及びIRによる検討の結果、いずれも比較的簡単な芳香族化合物であることが推定された。

5. 5種の配糖体のうち、ヒスタミン遊離活性を有すると思われる2種は、化学的性状が不安定であり、本来、同一の物質である可能性が示唆される。

稿を終えるにあたり、種々有益な御助言を頂いた本学農学部教授平野茂博博士に深く謝意を表する。

### 文 献

- 1) 石井和彦, 齋藤俊之, 小島晴雄: 鳥大農 研報 31 134 (1979)
- 2) 鈴木 恕 : 生化学研究法 I, 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫編, 朝倉書店, 東京 (1970) pp. 214
- 3) 鎌田仁, 中埜邦夫: 測定法の基礎 II, 大日本図書, 東京 (1977) pp. 351~353
- 4) Hikino, H., Takahashi, T., Arihara, S., Takemoto, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 18 1488 (1976)
- 5) Hikino, H., Takahashi, T., Takemoto, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 19 2424 (1971)
- 6) Hikino, H., Takahashi, T., Takemoto, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 20 210 (1972)