花粉の成分について (第 4 報¹⁾) *Alnus sieboldiana* MATSUM.
(オオバヤシヤブシ) について²⁾

大本太一, 二階堂保, 野崎照美, 幾瀬マサ
東邦大学薬学部³⁾

Studies on the Constituents of Pollen. IV.¹⁾ On the Constituents
of *Alnus sieboldiana* MATSUM.²⁾

TAICHI OHMOTO, TAMOTSU NIKAI, TERUMI NOZAKI
and MASA IKUSE

Faculty of Pharmacy, Toho University³⁾

(Received September 3, 1976)

Examination of chemical components of pollen grains of *Alnus sieboldiana* MATSUM. revealed the occurrence of several amino acids, hydrocarbons, β -sitosterol, quercetin, glucose, fructose, and organic acids such as formic acid and linoleic acid. A new flavone glucoside, quercetin-3- β -D-glucopyranosyl-4-O- β -D-glucopyranoside (1), was isolated and its structure was elucidated from chemical evidences and spectroscopic data.

Keywords—new flavone glucoside; pollen; *Alnus sieboldiana*; formic acid; linoleic acid; hydrocarbons; sugars; amino acids

Alnus sieboldiana MATSUM. はカバノキ科 (Betulaceae), ハンノキ属の落葉灌木または小喬木で本州 (関東以西, 紀伊) の沿海地方に生え, 春早く尾状花序をなした雄花が見られる。

花粉のタイプは 6—7 poroidate で表面に細かい網目状の模様がある。

オオバヤシヤブシ花粉の成分については渡辺により⁴⁾ acetylcholine が微量成分として含有されているとの報告があるのみである。花穂からは浅川により⁵⁾ flavonoids, stilbenes などが単離報告されている。

著者らは前報までの抽出, 分離方法に従って各成分を分離, 同定した (Chart 1, 2)。

Chart 1

- 1) 第 3 報: 大本太一, 二階堂保, 幾瀬マサ, 薬誌, **94**, 367 (1974).
- 2) 一部は日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月.
- 3) Location: Miyama-cho, Funabashi, Chiba.
- 4) 渡辺 武, 薬誌, **75**, 83 (1955).
- 5) Y. Asakawa, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 2761 (1971).

Chart 2

エーテル抽出物から炭化水素，ステロールを得た。炭化水素は花粉量に対して 0.13% の収率で得，ガスクロマトグラフィー（以下 GLC）を用いて標品との比較を行ない，pentacosane ($C_{25}H_{52}$), heptacosane ($C_{27}H_{56}$) を主とするいずれも飽和の C_{15} から C_{33} までの混合物であることを確認した (Fig. 1). 前報¹⁾で報告した同属のハンノキ花粉の炭化水素とその構成比ならびに収量の点でもほぼ一致することは興味深い。

ステロールは標品との比較により β -sitosterol を確認した。

水抽出物については Table I に示す様にアミノ酸を定量し，また遊離糖として glucose, fructose を確認した。

またエーテル抽出物の炭酸水素ナトリウム可溶部に強い刺激臭が感じられたため低級脂肪酸の存在を推定し，新たに花粉を水にてホモジナイザーによって破碎抽出を行なった。抽出液についてカルボン酸分析計により定量を試み，Table II の結果を得た。蟻酸，酢酸など，動物の粘膜を直接刺激する脂肪酸が含有されていることは興味深いことであり，今後花粉症との関連から，さらに多くの花粉についてこれら化合物を検討してゆく必要があると思われる。

Fig. 1. Gas Chromatogram of Hydrocarbons from Pollen Grains of *Alnus sieboldiana* MATSUM.

TABLE I. Amino Acids of Pollen Grains of *Alnus sieboldiana* MATSUM.

Amino acid	Content (mg/g)	Amino acid	Content (mg/g)
Alanine	0.517	Lysine	0.677
Arginine	0.630	Methionine	0.154
Aspartic acid	0.279	Phenylalanine	0.232
Glutamic acid	0.151	Proline	1.214
Glycine	0.182	Serine	0.455
Histidine	0.278	Threonine	0.721
Isoleucine	0.254	Tyrosine	0.286
Leucine	0.499	Valine	0.378

TABLE II. Organic Acids of Pollen Grains of *Alnus sieboldiana* MATSUM.

Organic acid	Content (w/w% in pollen)
Formic acid	0.007%
Acetic acid	0.007
Lactic acid	0.006
Succinic acid	0.299
Citric acid	0.017

アセトン抽出物にエーテルを加え、エーテル可溶部と不溶部とに分け、エーテル可溶部からは palmitic acid を 0.63%, linoleic acid を 2.22% (アセトン抽出物に対する収率は 35.4%) の高収率で得た。Linoleic acid はベニバナ *Carthamus tinctorius* L. の種子油 (safflower oil) 中に 70% 含有されており、血液中のコレステロール濃度を低下させる目的で動脈硬化予防薬として用いられる点からも興味をもたれる。

エーテル不溶部は薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) で Fig. 2 の結果を得た。スポット a の部分を preparative TLC で分離して quercetin を得、pentaacetylquercetin として同定した。次に主スポット b も同様に preparative TLC を行なって黄色結晶を得、エタノールより再結晶を行ない mp 193—195° の淡黄色針状晶 (QC-1) を得た。QC-1 は塩化第二鉄反応, Mg+HCl 反応, Tollens 試薬にいずれも陽性を示す。赤外線吸収 (以下 IR) スペクトルは水酸基, 共役カルボニル基およびベンゼン環の存在を示す。紫外線 (以下 UV) スペクトルは前報¹⁾ の quercetin-3-maltoside (QG-1) の値とはほぼ一致することなどから, QC-1 は quercetin 配糖体であると考えられる。QC-1 を 2.5% 硫酸で加水分解を行ない, aglycone として quercetin を同定した。分解後の糖フラクションは常法により処理し、ペーパークロマトグラフィー (以下 PPC), GLC により D-glucose を確認した。QC-1 を常法通りアセチル化を行ない, QC-1 acetate を得た。この acetate の核磁気共鳴 (以下 NMR) スペクトルは δ 1.9—2.2 に 7 ケの acetyl methyl proton に基づく signal が見られることから QC-1 は diglucoside であることを示している。さらに QC-1 を緩和な条件で加水分解を行ない, 水可溶の糖フラクションからは cellobiose のみを確認した。以上のことから QC-1 は quercetin cellobioside であると考えられる。

次に QC-1 をメタノール中 CH_2N_2 でメチル化し、酸加水分解後、非糖部より mp 186—187° の淡黄色針状晶を得、標品の 5,7,3',4'-tetramethylquercetin と完全に一致した。このことから QC-1 は quercetin の 3 位に糖が結合していると考えられる。結合様式については NMR における anomeric proton の J 値および酵素を用いた加水分解の結果などから β 結合と結論した。

以上の結果から QC-1 は quercetin-3- β -D-glucopyranosyl-4-O- β -D-glucopyranoside (1) である。

天然より 2, 3 の cellobioside が単離されているが quercetin の cellobioside は今回が初めてであり, QC-1 は文献未記載の新配糖体である。また前報¹⁾ の同属のハンノキ花粉からは quercetin-3-maltoside を単離しており, さらに今回, 同じ *Alnus* 属より quercetin を aglycone とし, glucose 間の結合配位のみを異にする

Fig. 2. Thin-Layer Chromatogram of the Acetone Extract (IIb-2) from Pollen Grains of *Alnus sieboldiana* MATSUM.

diglucoside が単離されたことは chemotaxonomy の点からも興味深い。

実験の部

測定装置・条件 融点——微量融点測定装置 (柳本) 未補正。

TLC——Wako-gel B-5, 110°, 60 分加熱, 展開溶媒: S-1 [ステロール; hexane-benzene (1:1)], S-2; [フラボン配糖体; AcOEt-EtOH (3:2), AcOEt-MeCOEt-HCOOH-H₂O (5:3:1:1)], S-3 [フラボン; BuOH-AcOH-H₂O (4:1:3)], S-4 [脂肪酸; hexane-benzene (1:3)], S-5 [リノール酸; benzene-CHCl₃ (1:1)]. 発色試薬 10%; 硫酸, 5% FeCl₃, 紫外線も併用。

PPC——東洋ろ紙 No. 2 (40×40cm), 展開溶媒: BuOH-pyridine-H₂O (6:4:3), 発色試薬; フタル酸アニリン。

GLC——日立 063 型, 1 m×3 mm stainless steel column, carrier gas N₂, detector FID. 炭化水素; 2% SE-30 on Chromosorb W (80—100 mesh), column temp. 110—260°, 10°/min, ステロール; 2% SE-30 on Chromosorb W (80—100 mesh), column temp. 260°, 糖; 10% SE-30 on Chromosorb W (80—100 mesh), column temp. 200—260°, 5°/min, 脂肪酸; 5% OV-17 on Chromosorb W (80—100 mesh), column temp. 200—260° 5°/min.

NMR スペクトル——日本電子 JNM4H-100 型 (内部基準は tetramethylsilane)。

質量分析 (以下 MS)——日本電子 JMS-01SG 2 型。

アミノ酸自動分析計——日立 KLA 3 型。

カルボン酸分析計——盛進製薬 S-603 型。

旋光度——Erma Lippich 大型旋光計三影式。

IR スペクトル——日立 EPI-G 3 型。

UV スペクトル——島津 QV-50 型。

抽出・分離 静岡県土肥町にて採取した花粉 3200 g をソックスレー抽出器を用いて 48 時間 ether 抽出, 濃縮, ether 抽出物 (I) 42.0 g を得た。抽出後の花粉を acetone にて 60° の水浴中 6 時間づつ 3 回, 加温抽出, 濃縮, acetone 抽出物 (II) 201 g を得た。次に 80% EtOH 中, 大型攪拌式擂潰器を用いて花粉を破碎後, 80% EtOH で還流 6 時間づつ, 3 回抽出, 濃縮, 80% EtOH 抽出物 (III) を得た。次に水にて 60°, 8 時間, 3 回抽出, 濃縮, 水抽出物 (IV) を得た。I を ether に溶解し 5% NaHCO₃, 5% Na₂CO₃, 5% NaOH で各 3 回抽出後の中性部分 15.0 g を 200 g のアルミナと 100 g のシリカゲルを用いたカラムクロマトを行ない hexane, benzene, CHCl₃, MeOH およびこれらの混合溶媒を用いて分離を行なった。

Hydrocarbons I の中性部分のカラムクロマトの hexane-benzene (9:1) の溶出部分より 4.10 g (0.13%) の無色針状晶を得, GLC にて標品との比較により Fig. 1 の結果を得た。

β -Sitosterol I の中性部分のカラムクロマトの CHCl₃-MeOH (1:1) 溶出部分より得た無色結晶をアセチル化後, アルミナにてカラムクロマトを行ない hexane-benzene (9:1) 溶出部分より得られた結晶を MeOH にて再結晶, mp 131—132° の無色針状晶を得, GLC にて標品との比較により少量の campesterol, stigmasterol を含む β -sitosterol を確認した。

III, IV に水を加え ether 抽出を行ない ether 不溶部は AcOEt ついで BuOH で振盪抽出 (6 時間×3 回) を行ない, それぞれの抽出物 V (3.85 g), VI (223 g) を得た。ether 可溶部は 5% NaHCO₃, 5% Na₂CO₃, 5% NaOH で抽出を行ない, それぞれの抽出物 VII, VIII; IX および中性部分 X を分離した。

Amino Acids IV の一部をとり PPC およびアミノ酸自動分析装置により定量を行ない Table I の結果を得た。

Free Sugars IV の一部について PPC および TMS 化後 GLC にて標品との比較により glucose, 少量の fructose を確認した。

Organic Acids 新鮮な花粉 5.0 g を水 50 ml と共にホモジナイザーに入れ破碎抽出 (30 分間) 後, 60° の水浴中 2 時間抽出, ろ過, ろ液についてカルボン酸分析計により定量を行ない Table II の結果を得た。

Palmitic Acid II に ether を加え, ether 可溶部 (IIa, 123 g) と ether 不溶部 (IIb, 78 g) とに分離。IIa は acetone に溶解, 冷却後析出した結晶をろ取, EtOH より再結晶を行ない mp 62° の無色針状晶 20.0 g (0.63%) を得, 標品との混融, TLC (S-4), IR, NMR, GLC にて同定。

Linoleic Acid 上記 IIa の palmitic acid ろ取後の母液をアルミナカラムクロマトを行ない, MeOH 溶出部分より得た無色油状物質を標品との TLC (S-5), IR, GLC, NMR, MS の比較により同定。

Quercetin 上記 IIb を CHCl₃, AcOEt にて, それぞれ 3 回づつ加温抽出し, CHCl₃ 抽出物 (IIb-1) 9.9 g, AcOEt 抽出物 (IIb-2) 4.1 g を得, IIb-2 につき preparative TLC (Wako-gel B-5, 厚さ 0.5 mm, S-3) を行ない, Fig. 2 のスポット a の部分をかきとり MeOH にて抽出, 黄色結晶を得, 含水 EtOH より再結晶, mp 309—312° (decomp.), 常法によりアセチル化, EtOH より再結晶, 無色針状晶, mp 194—197°, 標品の pentaacetyl-quercetin と混融, TLC (S-2), GLC にて同定。

Quercetin-3- β -D-glucopyranosyl-4-O- β -D-glucopyranoside (QC-1) 上記 IIb-2 の preparative TLC (S-3)

でスポット b の部分をかきとり, MeOH で抽出, 黄色結晶を得, EtOH より再結晶を行ない, mp 193—195° の淡黄色針状晶を得た. また茶褐色粉末 V を塩酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィーによっても同様に mp 193—196° の結晶を得た. *Anal.* Calcd. $C_{27}H_{30}O_{17}$: C, 51.76; H, 4.83. Found: C, 51.01; H, 4.74, $[\alpha]_D^{25}$ -9.29 ($c=1.4$, MeOH), $FeCl_3$ 反応陽性, $Mg+HCl$ 紅色, Tollens 反応陽性, UV λ_{max}^{MeOH} nm ($\log \epsilon$): 258 (6.69), 356 (6.83), IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3350 (OH), 1665 (conjugated CO), 1610, 1520, 1450 (aromatic C=C), NMR $\delta_{ppm}^{CD_3OD}$: 3.4—4.0 (m.), 4.89 (s. OH), 5.63 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.18 (1H, d, $J=2$ Hz, C_6-H), 6.38 (1H, d, $J=2$ Hz, C_8-H), 6.89 (1H, d, $J=7.5$ Hz, $C_5'-H$), 7.53 (1H, q., $J=2, 8$ Hz, $C_6'-H$), 7.68 (1H, d, $J=2$ Hz, $C_2'-H$).

QC-1 の酸加水分解-(1) QC-1 20 mg を 10 ml の EtOH に溶解し 10 ml の 5% H_2SO_4 で 1 hr 還流, 冷後析出した黄色結晶をろ取, 含水 EtOH から再結晶, mp 305—307° の黄色針状晶 (Va) を得, 標品の quercetin と混融, IR, NMR にて同定.

Va のアセチル化 Va を Ac_2O -Py にてアセチル化後, 得られた結晶を EtOH から再結晶, mp 193° の無色針状晶を得, 標品の pentaacetylquercetin と混融, IR, NMR にて同定.

QC-1 の糖 QC-1 加水分解物の糖フラクションを常法により処理し, PPC および TMS 化 (TMS-HT, 東京化成を使用) 後, GLC で標品との比較により glucose のみを確認.

QC-1 の酸加水分解-(2) QC-1 10 mg を 5 ml の EtOH に溶解, 2% H_2SO_4 5 ml を加え 1 hr 還流, 上記水解-(1) に準じて処理し quercetin のほか, 糖フラクションから PPC および TMS 化後 GLC で標品との比較により cellobiose を確認.

QC-1 のアセチル化 QC-1 40 mg を Ac_2O -Py にて一夜室温放置にてアセチル化後, シリカゲルカラムクロマトを行ない精製, mp 105—106°. NMR $\delta_{ppm}^{CDCl_3}$: 1.9—2.2 ($7 \times COCH_3$), 2.35—2.45 ($4 \times COCH_3$), 4.95 (1H, d, $J=10$ Hz), 5.86 (1H, d, $J=7.5$ Hz).

QC-1 Permethylete の酸加水分解 QC-1 20 mg を 2 ml の MeOH に溶解, CH_2N_2 の ether 溶液を加え一夜放置, さらに同様の操作をくり返し行ない完全メチル化を行なう. 溶媒留去後, シリカゲルカラムクロマトを行ない精製, 前記水解法 2 に準じて行ない, 冷後析出した黄色結晶を EtOH より再結晶, mp 185—187° の淡黄色針状晶を得, 標品の 5,7,3',4'-tetramethylquercetin と混融, TLC (S-3), IR にて同定.

QC-1 の酵素分解 QC-1 10 mg を acetate buffer (pH 4.8) 10 ml に溶解し, β -glucosidase (Miles Lab. Inc.) 10 mg を加え, 30° で振盪させ, 反応液について TLC (S-3), PPC および TMS 化後 GLC を行ない glucose, cellobiose を確認した. α -Glucosidase (半井化学) について acetate buffer (pH 5.2) で同様に行なったが TLC, PPC で糖のスポットは検出されなかった.

謝辞 本研究にあたり, 御指導御助言を頂いた本学 久内清孝名誉教授に深謝致します. またカルボン酸分析計の測定をして頂いた盛進製薬 小沢善徳氏, 谷地館仁治氏, NMR, MS スペクトル, 元素分析の測定をして頂いた本学中央機器室 坂本曜子嬢, 谷口優美子嬢, 森川鉄朗博士に感謝致します.