

春秋における桑葉中のフェノール性成分,とくにクマリン類の 消長について

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	卯野, 忠子
巻/号	41巻2号
掲載ページ	p. 118-123
発行年月	1972年4月

春秋における桑葉中のフェノール性成分, とくにクマリン類の消長について

卯野忠子

東京都杉並区・農林省蚕糸試験場
(1971年7月19日受理)

夏秋期の桑葉が春期の桑葉にくらべて蚕の飼料として劣るとされている。桑樹は落葉樹であり、季節の変化および肥培にもなって葉の成分に変動がおこることは容易に想像される。本研究は、桑葉の二次成分の消長をしらべて、桑葉葉質解明の手がかりをえること、および葉質判定基準設定の基礎資料をえることを目的として行なった。今後、蚕の人工飼料による飼育が実用化され、飼料として桑葉粉末が市場に出廻ることを想定して、化学分析から桑葉の特長や品質を規定できるようにすることは重要であると考えられる。今回とりあつかった成分は、紫外線照射 (365m μ) によって検出しうる、かなり水溶性の蛍光物質である。これまでに桑葉から見出されている蛍光物質および試薬によって蛍光を発する植物二次成分には、クロロゲン酸¹⁹⁾およびその異性体¹¹⁾、クマリン類²⁰⁾ (ウンベリフェロン、スコポレチン¹⁷⁾、スコポレチン配糖体—スコポリン—¹⁸⁾、フラボン類 (イソクエルシトリン²⁴⁾、ルチンおよびクエルセチン²¹⁾、クエルセチン配糖体²²⁾ 等があるが、これらのフェニルプロパノイドは、いずれも芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路をへて生成され、リグニンの形成過程の中間物質であることが知られている^{12,15)}。なお桑葉および根皮²⁷⁾ から見出されている、これらクマリン類は、桑科植物ではイチヂク *Ficus carica* L. からプソラレン^{7,8,23)}、ベルガプテン⁸⁾ および微量の 4', 5'-ジヒドロプソラレンとウンベリフェロン⁴⁾ が見出されているにすぎず、かなり桑葉成分の特性を示している。

実験にあたり合成スコポリンを心よく恵与下さったアメリカン・タバコ会社の L. J. DEWEY 博士に厚くお礼申し上げます。

材料および方法

供試桑葉は、東京都日野市の春秋兼用桑園の壮蚕用桑の正常葉 (品種:一ノ瀬) を用いた。桑樹の葉位と蛍光物質の質的差異との間には、何らかの相関関係が存在することが報告されているので^{1,10,25)}、このために春秋間の差異が不明確になるおそれがある。1966年における試料採取にあたっては、この点を考慮して次の方法を講じた。植物生態学では葉の形は葉位によって規定されて、植物の生理的年齢と関係のあることがわかっており²⁾、桑でも一ノ瀬について生長段階別に葉の形の変化をしらべた成績はそれを裏づけする例を提供している²⁾。壮蚕用桑として多量に採取された葉の形をしらべたところ、春秋とも5裂葉がかなり多かったので、この葉形の葉のみを集めて試料とし、各種葉形混合の試料と比較を行った。試料として用いた5裂葉の葉長は、春では9cm前後、秋では15-20cmであった。なお1968年の試料は中位の5裂葉のみを集めた。桑葉の乾燥は熱風下 55°C 位で行い、粉末とした。

実験方法は、桑葉粉末のメタノール抽出物のクロロホルム可溶部および不溶部を薄層クロマトグラフィーによって半定量的に分別し、紫外線下蛍光物質を検索した。またそれらのうち既知クマリン類については、蛍光光度計により定量的に濃度を測定した。

試料調製および薄層クロマトグラフィーの条件は Chart I. および Fig. 1. に記載のようにして行った。なお展開剤 (II) の組成は、フラボン配糖体およびアントシアンの分離用に考案された組成⁹⁾ のギ酸をジオキサニンにおきかえて混合比も少しかえ、かなり

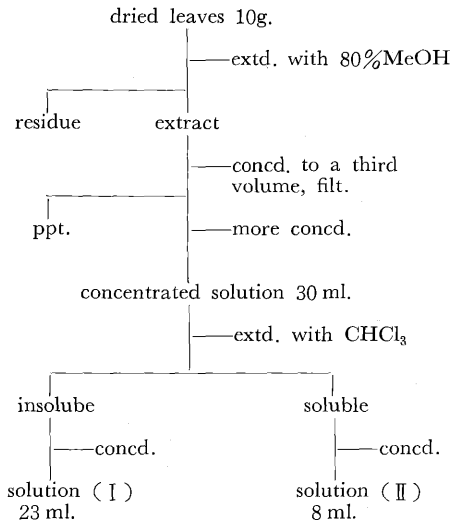


Chart I. Preparation of the samples for thin-layer chromatography. Each 1 gtt. (0.005ml.) of solutions(I) and (II) were dropped by micropipette on the starting point of silica gel G plate (thickness of thin-layer: 0.5mm.).

水溶性の物質の分離能を良くして中性系の展開剤としたものである。

また既知蛍光物質の確認は、Table I. に示すようにして行い、これらは標品と比較して同一価を示した。確認のために用いた試料は、ウンベリフェロン、スコボレチン、スコボリンは、検索の場合と同様にして、薄層クロマトグラフィーにより分離したものについて行い、クロロゲン酸は吸着層であるシリカゲル G により、吸着、分解されて溶離不能であるので、別に環状濾紙クロマトグラフィーにより分離したもの（東洋濾紙 No. 50 の四つ切りを用い、展開剤は水で行い、 R_f 0.92 の空色蛍光部分を切りとり、80%メタノールで溶離）について行なった。なおスコボレチン配糖体については、桑葉からのその紫外外部吸収スペクトルおよび赤外部吸収スペクトル¹⁸⁾が、合成スコボリンのスペクトル⁵⁾と一致すること、および薄層クロマトグラフィーによる R_f 値が合成スコボリンの R_f 値と一致することから桑葉中のスコボレチン配糖体はスコボリンであるとみなし、定量の標準物質として合成スコボリンを用いた。

Table I. Identification of known fluorescent substances

(A) Identification of chlorogenic acid

1) Paper chromatography (Toyo filter paper No. 50)

Developing solvent	R_f	Fluorescence under u.v. light
n-Butyl alcohol-acetic acid-water (12:3:5)	0.71	light blue
Potassium chloride-water (20 : 80)	0.45	light blue

2) Color reaction

1% $FeCl_3$ dark green

2N-NaOH yellow

3) Ultraviolet absorption spectrum

λ_{max} 324m μ (in methyl alcohol)

(B) Identification of umbelliferone and scopoletin

1) Paper chromatography (Toyo filter paper No. 50)

Developing solvent	Umbelliferone		Scopoletin	
	R_f	Fluorescence	R_f	Fluorescence
n-Butylalcohol-acetic acid-water (12:3:5)	0.89	greenish blue	0.82	bright blue
AcOEt saturated with 2N-NH ₄ OH	0.46	blue	0.16	bright blue

2) Color reaction

Reagent	Umbelliferone	Scopoletin
Diazotized benzidine	orange	yellow*
Diazotized p-nitroaniline (+AcONa) * in heat	—	yellow

(C) Identification of scopoletin glucoside (scopolin)

1) Paper chromatography (Toyo filter paper No. 50)

Condition of hydrolysis— for 3hr. on the steam bath in IN-HCl

Developing solvent	Glucoside		Hydrolyzate aglycon	
	Rf	Fluorescence	Rf	Fluorescence
n-Butyl alcohol-acetic acid-water (4:1:5)	0.48	bluish violet	0.85	bright blue
AcOEt saturated with 2N-NH ₄ OH			0.16	bright blue
Phenol saturated with water	0.86	violet		

また既知クマリン類の濃度測定は、MINAMIKAWA *et al.*¹⁶⁾ の方法を参照し、島津光電分光光度計 (QV-50型)、蛍光エネルギー分布測定装置で、U. V. D. フィルタを用い、内標準として硫酸キニンの0.3N-硫酸溶液を使用して、標品の標準曲線から算出して定量を行った。分別定量法は次のとおりである。なお1966年に採取した試料は、5裂葉の試料について行った。

ウンベリフェロンおよびスコポレチンの分別定量—それぞれ試料の桑葉粉末 10g を試料調製 (Chart 1.) に示した方法により分別し、クロロホルム可溶部を熱水で再抽出したのについて環状濾紙クロマトグラフィーを行った。東洋濾紙 No. 525 の四つ切りを用い、展開剤は水で行い、ウンベリフェロンは R_r 0.78 の帯黄緑色の蛍光部分、スコポレチンは R_r 0.55 の青色蛍光部分を切りとり、クロロホルム—メタノール (7.5 : 2.5) 混液で溶離し、減圧濃縮したものを、もう一度東洋濾紙 No. 50 で同様に展開、溶離し 5cc とした。これに同容の 0.15M-Na₂CO₃ を加えてアルカリ性とし、沈澱が生じれば濾過し、測定範囲内にくるようにアルコール—0.15M-Na₂CO₃ (1 : 1) 混液で稀釈して定量を行なった。ウンベリフェロンは 0.2-0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲を 420m μ で、スコポレチンは 0.2-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲を 430m μ で測定した。

スコポリンの分別定量—ウンベリフェロンおよびスコポレチンを分離した後のクロロホルム不溶液

について上記と同様にして環状濾紙クロマトグラフィーを行い、 R_r 0.90 附近の青紫色蛍光部分を切りとり、メタノールで溶離抽出し、減圧下に溶媒をとばしたものをさらに純エタノールに溶かして、エタノール不溶物を遠心分離して除去し濃縮して適量をさらに薄層クロマトグラフィーにより分別した。なおウンベリフェロンおよびスコポレチンを分離した際に、スコポリンの少量もクロロホルム層へ移行するので、展開濾紙からの該当溶離物も合して操作した。吸着層はシリカゲル G、展開剤は Fig. 1. に記載のとおりであって、 R_f 0.58 の青紫色蛍光部分をかきとり、純エタノールによりシリカゲルから溶離した抽出液を定容とし、2-12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲を 430m μ で測定した。

結 果

えられたクロマトグラムを Fig. 1. に示し、既知クマリン類についての定量結果を Table II. に示す。なお Fig. 1. は1966年の試料についてのみ記載したが、1968年の試料も同様なクロマトグラムであるので省略した。

1. 蛍光物質の検出

検出された蛍光物質はクロロホルム可溶部に 6 種類 (うち黄橙色蛍光物質 1 は春にのみ、紫色蛍光物質 h は秋に多い)、不溶部に 7 種類 (うち灰褐色 c および紫色蛍光物質 a' は秋にのみ検出) であり、そのうち青紫色蛍光物質 d (スコポリン) はクロロ

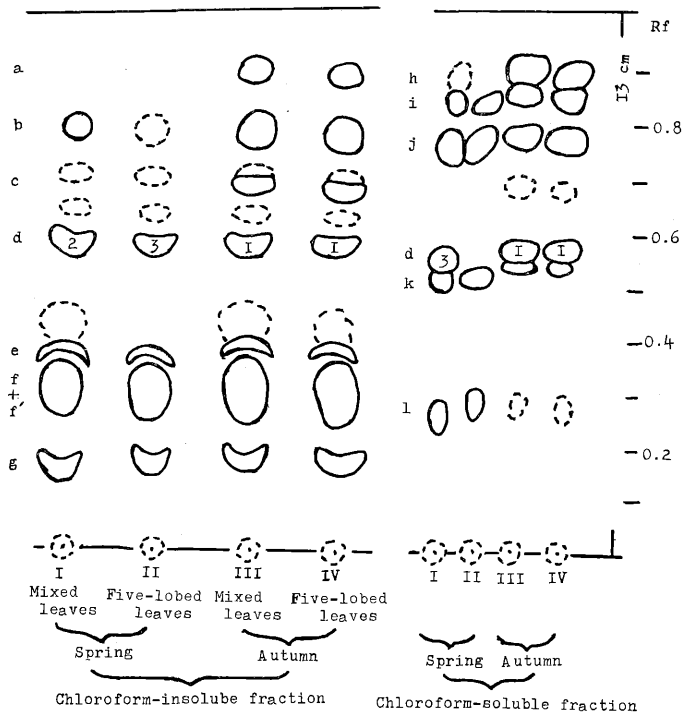


Fig. 1. Thin-layer chromatography of the phenolic constituents of mulberry leaves

Solvent: (I) n-Butyl alcohol-dioxane-water (6 : 1.5 : 2.5) (II) Ethyl acetate-methyl ethyl ketone-dioxane-water (5 : 3 : 3.5 : 1). The first half the developing distance was developed by solvent (I) and the second half was developed by solvent (II). Fluorescence under u. v. light: a=violet; b=violet; c=beige; d=bluish violet (scopolin); e=bright yellow; f=light blue (chlorogenic acid); f'=violet; g=orange; h=violet; i=greenish blue (umbelliferone); j=bright blue (scopoletin); k=red (chlorophyll?); l=yellowish orange.

Table II. Concentration of umbelliferone, scopoletin, and scopolin in mulberry leaves

Harvest	μg/g Dried weight		
	Umbelliferone	Scopoletin	Scopolin
26 May 1966	2.42	4.08	18.2
19 September 1966	3.10	7.94	138
5 June 1968	2.98	6.54	16.7
29 August 1968	3.03	11.3	104
19 September 1968	4.64	9.60	168
13 November 1968	5.19	18.0	261

ホルム部にも少量移行した。上記および精松¹⁾や佐藤および間²⁵⁾がえた結果から、桑葉では葉の老化が進むと蛍光物質の種類は増加する傾向があることが

わかる。

2. 蛍光物質の季節による違い

春秋の差異は、5 裂葉試料では明瞭にみられたが、

各種葉型混合試料では不明瞭だった。秋には両試料間に大差がなかったが、春には各種葉型混合試料に見出される紫色蛍光物質 b h が 5 裂葉では減少し、またクロマトグラムに蛍光の強さの順位を附したごとくスコポリンも減少していた。

既知物質のクロロゲン酸(ただし薄層クロマトグラフィーによる半定量の結果)、ウンベリフェロン、スコポレチンは春秋同程度に含まれていたが、スコポリンは薄層クロマトグラフィーからも、また定量値が示すように明らかに秋に増加した。

考 察

クマリン類の配糖体が増加する例は、タバコやヒマワリ葉でスコポリンの増加がホウ素欠乏^{28,29)}や紫外線照射¹³⁾、X線照射¹⁴⁾の場合にみられ、また桜においては、メリロトサイドの含量が春から秋にわたって増加し、落葉時に最大となるが、クマリンは微量で6月から11月の間はほとんど変わらないこと²⁶⁾が報告されている。桑は紅葉樹ではないが、桜におけると同様な結果となった。なお桜においてはクマリン酸グルコシドがクマリンの前駆物質である¹²⁾のに対し、タバコの組織培養ではスコポレチンがスコポリンの前駆物質である⁶⁾という。ここに矛盾もみられるが、植物組織のリグニン化過程の中間物質であるこれらクマリン類のうちでその配糖体が、葉が硬化するにともなって蓄積してくるものと考えられる。

摘 要

桑葉葉質解明の手がかりをえ、また葉質判定規準設定の基礎資料をえることを目的として行った。吐蚕用桑葉のメタノール抽出物のクロロホルム可溶部および不溶部を半定量的に薄層クロマトグラフィーによって分別し、紫外線下蛍光物質を検索して春秋間の比較を行った。また既知クマリン類については蛍光光度計により定量的に濃度を測定した。

1) 検出された蛍光物質はクロロホルム可溶部に6種類、不溶部に7種類であり、そのうち青紫色蛍光物質(スコポリン)はクロロホルム部にも少量移行した。そして蛍光物質の種類は秋に増加する傾向がみられた。

2) 春秋の差異は、5裂葉試料では明瞭にみられたが、各種葉型混合試料では不明瞭だった。これは春における両試料間の差異に基因していた。

3) 既知物質のクロロゲン酸、ウンベリフェロン、スコポレチンは春秋同程度に含まれていたが、配糖体であるスコポリンは明らかに秋に増加した。

文 献

- 1) 精松和子(1964): 東京都立大学卒業論文.
- 2) 有賀 孝 (1966): 日蚕雑, **35**, 365-369.
- 3) ASHBY, S.E. (1957): In "Plant life", Simon and schuster, N.Y. 手塚泰彦他訳 (1961) 植物の生活, pp 109-115, 白揚社, 東京.
- 4) DALL'ACQUA, F., S. MARCIANI, and G. CHIARELOTTO (1968): Atti 1st. Vento Sci., Lett. Arti, Cl. Sci. Mat. Natur., **126**, 103-115. (C.A., 1970, **72**, 28842m).
- 5) DEWEY, L.J., and W. STEPKA (1963): Arch. Biochem. Biophys., **100**, 91-96.
- 6) FRITIG, B., L. HIRTH, and G. OURISSON (1966): Compt. Rend. Acad. Sci., D **263**, 860-863.
- 7) 福士俊一・西面操・堀津浩章(1957): 農化, **31**, 593-595.
- 8) 福士俊一・田中浩 (1959): 農化, **33**, 376-378.
- 9) 古谷力 (1964): 化学の領域, 増刊 **59**, 90.
- 10) 原久寿雄 (私信)
- 11) 林紀良・山田弘生・加藤勝 (1970): 日蚕雑, **39**, 153-157.
- 12) 磯井広一郎 (1970): 植物成分の生合成, pp 31-51, 広川書店, 東京.
- 13) KOEPPE, D.E., L.M. ROHRBAUGH, and S.H. WENDER (1969): Phytochem., **8**, 889-896.
- 14) KOEPPE, D.E., L. M. ROHRBAUGH, E.L. Rice, and S.H. WENDER: (1970) Radiation Botany, **10**, 261-265.
- 15) 南川隆雄 (1967): 化学と生物, **5**, 310-316.
- 16) MINAMIKAWA, T., T. AKAZAWA, and I. URITANI (1963): Plant Physiol., **38**, 493-497.
- 17) 宮内潔・利根川和子・嶋万治郎(1965): 日蚕雑, **34**, 199 (講演要旨).
- 18) 宮内潔・利根川和子 (1966): 日蚕雑, **35**, 208 (要旨) および日蚕講要, 36, 118.
- 19) 内藤謙一, 林屋慶三(1965): 農化, **39**, 237-

- 238.
- 20) 内藤謙一・西田順, 浜村保次(1963): 農化, **37**, 449-452.
- 21) 内藤謙一 (1968): 農化, **42**, 423-425.
- 22) 内藤謙一 (1968): 農化, **42**, 450-453.
- 23) 小幡弥太郎・福士俊一 (1955): 農化, **29**, 451-454.
- 24) 奥正己 (1934): 農化, **10**, 1029-1038.
- 25) 佐藤光政・間和夫 (1964): 日蚕関東講要, **15**, 110.
- 26) 高石清和 (1968): 薬誌, **88**, 1467-1471.
- 27) 卯野忠子 (1970): 蚕試報, **24**, 437-442.
- 28) WATANABE, R., W. CHORNEY, J. SKOK, and S.H. WENDER (1964): *Phytochem.*, **3**, 391-393.
- 29) WATANABE, R., W.J. MCILRATH, J. SKOK, W. CHORNEY, and S.H. WENDER (1961): *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 241-243.

Summary

Seasonal changes of the contents of phenolic constituents especially coumarins in mulberry leaves

By

Tadako UNO

This report deals with the ways to find a key to evaluate the food value of mulberry leaves for silkworms and to obtain the basic information for establishing a chemical standard to discriminate quality of mulberry leaves.

The methanol-extracts of *Morus alba* L. (variety: Ichinose), both soluble and insoluble in chloroform, were separated semi-quantitatively by thin-layer chromatography, and the fluorescent substances in each fractions were detected under ultraviolet light. Moreover the concentrations of known coumarins were measured quantitatively by the fluorometer.

1. Six fluorescent substances were found in the chloroform-soluble fraction, among them yellowish orange colored one increased in the spring leaves, while violet colored one increased in the autumn leaves. On the other hand, seven fluorescent substances were found in the chloroform-insoluble fraction, among them a beige and two violet colored ones increased in the autumn leaves. One fluorescent substance (scopolin) in the chloroform-insoluble fraction were found slightly in the chloroform-soluble fraction, too.

2. Difference between the spring and autumn leaves was shown clearly in the five-lobed leaf samples, but not so in the samples mixed with the variously shaped leaves. In autumn both samples showed no large difference, but in spring the five-lobed leaf samples showed the decrease of some substances which were found in the other sample.

3. Whereas some of known substances, such as chlorogenic acid, umbelliferone and scopoletin, were contained both in the autumn and spring leaves in almost the same amount, scopolin, being a glycoside, was apparently increased in autumn.

(The Sericultural Experiment Station, Suginami-Ku, Tokyo)