

カラマツ当年生枝の成分に関する研究V

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	野村,一高
発行元	日本林學會
巻/号	59巻10号
掲載ページ	p. 372-381
発行年月	1977年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

カラマツ当年生枝の成分に関する研究(V)

生長期の茎葉中のフェノール性成分*

野村 一 高**

野村一高：カラマツ当年生枝の成分に関する研究(V) 生長期の茎葉中のフェノール性成分 日誌 59: 372~381, 1977 生長期の1976年6月19, 20日に採集した5年生カラマツ当年生枝から6種のフラボノイド化合物を単離し, それらをIR, UV, MS, NMR等の機器分析, 加水分解, 誘導体の調製等の結果から kaempferol-3-O-glucoside (Ⅲ), kaempferol-3-O-galactoside (Ⅵ), kaempferol-3-O-p-coumaroylglucoside (Ⅱ), isorhamnetin-3-O-glucoside (Ⅴ), taxifolin-3'-O-glucoside (Ⅳ), catechin (Ⅰ) と同定した。さらにアグリコンフラクション中に eriodictyol (Ⅶ), taxifolin (Ⅷ), epiafzelechin (Ⅸ) が, 配糖体フラクションの加水分解物中に quercetin (Ⅹ) の存在することを TLC 上で確認した。kaempferol-3-O-glucoside について IAA oxidase の co-factor としての作用を明らかにするため, kaempferol-3-O-glucoside と IAA のカラマツ稚苗根の生育に及ぼす効果を調べた。kaempferol-3-O-glucoside は低濃度で根の生長を促進したが, 高濃度の IAA も根の生長を促進したため, はっきりした結論は得られなかった。catechin と taxifolin について, カラマツ下胚軸と当年生枝のさし木における発根阻害作用を検討したが, 発根阻害作用はまったく認められなかった。

NOMURA, Kazutaka: Studies on the constituents of the annual shoots of *Larix leptolepis* GORDON (V) Phenolic compounds in the stems and leaves during the growing season J. Jap. For. Soc. 59: 372~381, 1977 Six flavonoid compounds were isolated from the annual shoots of 5-year-old *L. leptolepis* collected on June 19 and 20, 1976, during the growing season, the compounds were identified as kaempferol-3-O-glucoside (Ⅲ), kaempferol-3-O-galactoside (Ⅵ), kaempferol-3-O-p-coumaroylglucoside (Ⅱ), isorhamnetin-3-O-glucoside (Ⅴ), taxifolin-3'-O-glucoside (Ⅳ), catechin (Ⅰ), respectively, on the basis of the results of IR, UV, MS, NMR spectra, acid hydrolysis, preparation of derivatives and so forth. Furthermore, eriodictyol (Ⅶ), taxifolin (Ⅷ), epiafzelechin (Ⅸ) were determined in the aglycone fraction, and quercetin (Ⅹ) was determined in the hydrolysis products of glycoside fraction by TLC. The effects of kaempferol-3-O-glucoside and IAA upon the growth of the roots of the seedlings of *L. leptolepis* were investigated to clarify the function of kaempferol-3-O-glucoside as a co-factor of IAA oxidase. It was not prove that kaempferol-3-O-glucoside acted as a co-factor of IAA oxidase because IAA stimulated the growth of the roots in high concentration while kaempferol-3-O-glucoside stimulated the growth of the roots in low concentration. The effects of catechin and taxifolin upon the cuttings of the hypocotyles and the annual shoots of *L. leptolepis* as possible rooting inhibitor were studied, but no inhibition of rooting was observed with these substances in any respect.

I はじめに

筆者はこれまでカラマツ当年生枝中のフェノール性成分の生理作用を明らかにするため, 生長期の葉および生長休止期の当年生枝について成分検索を行ない, 前者には kaempferol-3-O-glucoside が, 後者には eriodictyol,

taxifolin, epiafzelechin, catechin が存在することを明らかにし(18, 19), また kaempferol-3-O-glucoside と catechin については季節的な量的変化を, そして他の成分については質的变化を調べてきた(20)。しかし筆者のこれまでの実験においては単離できなかった化合物も数種みられたので, 今回新たに生長期の当年生枝中のフェ

* この報告は1977年4月, 第88回日本林学会大会で発表した。

This paper was presented at the 88th annual meeting of the Japanese Forestry Society, April, 1977, Kyoto.

** 北海道大学農学部 Fac. of Agr., Hokkaido Univ., Sapporo 060

ノール性成分について検索を行なった。さらにこれらの化合物の生理作用を検討するために kaempferol-3-O-glucoside についてはカラマツ稚苗の根の生長に及ぼす効果を、また catechin と taxifolin についてはカラマツさし穂における発根阻害作用について実験を行なったのでここに報告する。

II 実験材料および方法

1. 試料

本実験においてフェノール性成分の検索に用いたカラマツ当年生枝は、札幌の北海道大学構内苗畑の約 50 本の 5 年生のカラマツの樹体の各部から、1976 年 6 月 19、20 日に採集し -20°C で保存した。抽出に際しては莖葉を分けることなく全枝を用いた。

2. 分析方法および分析機器

各成分の分離状態の追求や同定に用いた TLC, PPC の条件および各種発色試薬は前報(18~20)と同じであるが、PPC の展開溶媒は各種濃度の酢酸(AA), n-ブタノール:酢酸:水/3:1:1(BAW), 酢酸エチル:ピリジン:水/8:2:1(EPW), n-ブタノール:ピリジン:水/10:3:3(BPW) 等を、TLC の展開溶媒としてはトルエン:ギ酸エチル:ギ酸/5:4:1(TEF), 酢酸エチル:アセトン:水/10:10:1(EAW), 酢酸エチル:メチル

エチルケトン:ギ酸:水/15:13:1:1(EMFW) 等を用いた。各成分の分離に用いたカラムクロマトグラフィーの担体はシリカゲル(100~200メッシュ), 粉末セルロース-A(100~200メッシュ), ポリアミド C-200 で、また使用した分析機器は前報(18~20)と同様である。

3. 抽出および分離

化合物の抽出および分離は図-1 に示した。試料(4.0 kg)をメタノール(4l)中でホモジナイザーで粉碎し、さらにメタノール 20l を加え、冷蔵庫中(0°C)に 24 時間放置し抽出した。この抽出方法を 3 回くり返した。抽出液は濾過後減圧下で濃縮乾固し、4l の蒸留水に懸濁させた。懸濁液は濾過後酢酸エチル(6l)で 3 回および n-ブタノール(6l)で 3 回逐次抽出した。抽出液はそれぞれ減圧下で溶媒を蒸発乾固し、酢酸エチル抽出物(16.3g)および n-ブタノール抽出物(15.0g)を得た。

酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラム(450g, 4.5×60 cm)にのせ、n-ヘキサン:酢酸エチルの比率が 7:3(1l), 5:5(1.5l), 4:6(1l), 3:7(1l), 2:8(1l)の溶媒で順次溶出し、その後は 100%の酢酸エチルで溶出した。溶出液はそれぞれ濃縮し、フラクション I (溶出液 4.5l, 収量 3.5g), II (溶出液 2.5l, 収量 5.0g), III (溶出液 4l, 収量 2.7g)を得た。

フラクション I はシリカゲルカラム(50g, 3.5×50

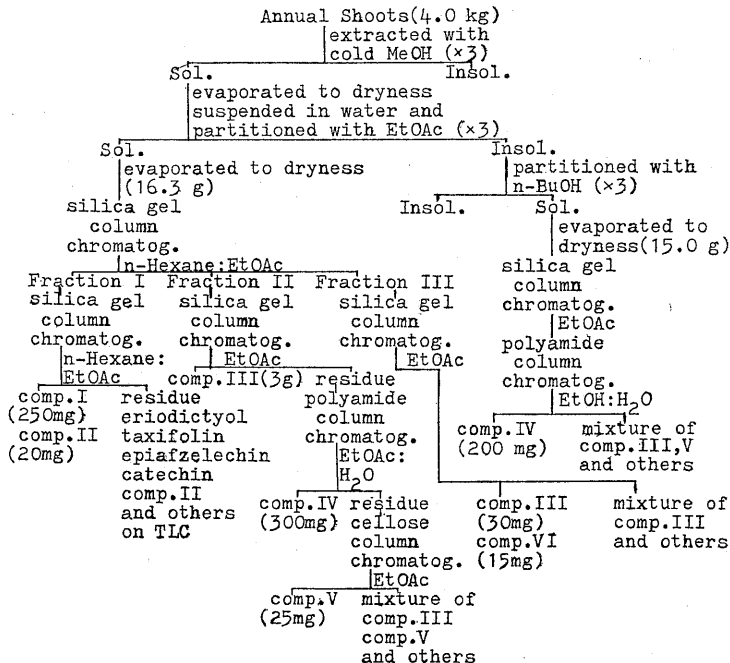


図-1. カラマツ当年生枝抽出物の分別

Separation of extractives of the annual shoots of *L. leptolepis*

cm)で、*n*-ヘキサンと酢酸エチルが5:5(1I)と3:7(1I)の溶媒で溶出し、溶出液は100mlずつ分取した。その結果No.7~12より無色結晶性物質、化合物I(250mg)を得た。mp 176~178°C(熱水、針状晶)。TLC Rf(TEF) 0.34, FeCl₃: 暗緑色, IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,350, 2,930, 1,625, 1,520。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 280, 232(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 292, 248(sh)。またNo.15~17より黄色結晶性物質、化合物II(20mg)を得た。mp 274~276(酢酸エチル、微結晶)。TLC Rf(TEF) 0.16, Rf(EMFW) 0.84。FeCl₃: 暗緑色, Mg-HCl: 濃黄色。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,470, 3,275, 1,685, 1,658, 1,633, 1,610, 1,508。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 360(sh), 316, 296(sh), 267, 226(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 380, 314(sh), 277, 232(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 400, 324(sh), 307, 277, 229(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 398, 322(sh), 306, 277, 228(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 357, 313, 277; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 370(sh), 315, 299(sh), 270。MS: *m/e* 286(M-308, base ion)。

フラクションIIはシリカゲルカラム(100g, 4×60cm)で酢酸エチルで溶出し、100mlずつ分取した。No.9~16の溶出液を濃縮後放置することにより黄色結晶、化合物III(3.0g)を得た。mp 175~180°C, TLC Rf(EAW)0.55, PPC Rf(15% AA)0.66, Rf(BAW)0.57。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,450, 3,160, 2,910, 1,660, 1,610, 1,510。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 353, 330(sh), 267; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 414, 330, 277; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 398, 348, 304, 276; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 398, 348, 304, 277; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 375, 304, 276; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 356, 304(sh), 268

化合物IIIを濾別した残渣は減圧下で乾固後(収量1.5g), ポリアミドカラム(30g, 3.5×30cm)で20, 30, 35, 40% エタノール各200mlおよび50% エタノール500mlで溶出した。溶出液はそれぞれ濃縮し、35% エタノールの溶出液から白色粉末、化合物IV(300mg)を得た。IVはその後シリカゲルカラムで数回精製し、各種溶媒を使って結晶化を試みたが成功しなかった。TLC Rf(EAW) 0.59, Rf(TEF) 0.07。FeCl₃: 赤紫色, Mg-HCl: 赤紫色, Molish: 陽性, IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,400, 2,930, 2,860, 1,648, 1,520。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 334(sh), 290; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 322, 246; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 377, 312, 280(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 380, 312, 278(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 329, 296(sh), 253(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 327(sh), 291。またポリアミドカラムの40, 50% エタノール溶出液は濃縮乾固し黄色粉末(1.0g)を得たが、そのうち200mgをセルロースカラム(8g, 1.5×30cm)にふし、酢酸エチルで溶出した。溶出液は20mlずつ分取し、No.2の溶出液を濃縮後放置することに

より黄色針状結晶、化合物V(25mg)を得た。mp 215~218°C, TLC Rf(EAW)0.50, PPC Rf(6% AA)0.23。FeCl₃: 暗緑色, Mg-HCl: 黄橙色, Molish: 陽性。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,530, 3,350, 2,925, 2,880, 1,650, 1,600, 1,512。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 357, 303(sh), 266(sh), 257; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 416, 330, 275; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 404, 362, 302, 273; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 402, 356, 301, 271; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 357, 322, 270; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 356, 310(sh), 267。

フラクションIIIはシリカゲルカラム(80g, 3.0×60cm)にふし、酢酸エチルで溶出した。溶出液は100mlずつ分取し、濃縮後放置することによりNo.8~20よりIRおよびPPC上のRf値が化合物IIIに一致する黄色針状結晶(30mg)を、No.21~23より黄色針状結晶、化合物VI(15mg)を得た。mp 265~266°C, PPC Rf(BAW) 0.29, FeCl₃: 暗緑色, Mg-HCl: 黄橙色, Molish: 陽性。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,450, 3,150, 2,960, 1,670, 1,660, 1,610, 1,500。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 353, 299(sh), 267; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 411, 329, 277, 231(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 400, 349, 304, 275, 232(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 402, 349, 303, 275, 233(sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 375, 305, 276; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 356, 301(sh), 267。

n-ブタノール可溶部についても同様に各種カラムを用いて化合物の単離を試みたが、化合物IV(200mg)を単離したのみで、それ以上の精査はしなかった。

4. 単離化合物の加水分解および誘導体の調製

化合物II 2mgを1%水酸化カリウム溶液0.2ml中で、湯浴上1時間還流し、部分加水分解を行なった。反応後0.1mlの5%塩酸を加え、その母液をTLC上で検索したところ、FeCl₃(5%メタノール溶液)で呈色する二つのスポットが見られた。ひとつはkaempferol-3-O-glucosideとRf値(EAW, 0.55; TEF, 0.10; EMFW, 0.59)が一致し、他のひとつは標品の*p*-coumaric acidとRf値(TEF, 0.51; EMFW, 0.93)が一致した。さらに化合物II 2mgを5%硫酸0.2ml中で、湯浴上1時間還流し酸加水分解したところ、アグリコンとしてはTLC上kaempferol(Rf: TEF, 0.49; EMFW, 0.96)と*p*-coumaric acidが、糖としてはPPC上D-glucose(Rf: EPW, 0.15; BPW, 0.25)が確認された。

化合物II 15mgを無水酢酸(0.2ml)とピリジン(0.2ml)中で一昼夜放置しアセチル化した。反応終了後、冷水中に投入し析出した白色沈殿(12mg)を得た。この物質は微量であったため再結晶させなかったが、TLC上ではひとつのスポットを呈した(Rf TEF 0.47)。NMR(in CDCl₃) δ (ppm): 2.02(6H, s, OAc×2, glucose),

2.13 (3H, s, OAc×1, glucose), 2.22 (3H, s, OAc×1, *p*-coumaric acid), 2.34 (6H, s, OAc×2, kaempferol), 2.46 (3H, s, OAc×1, kaempferol), 4.0~5.7 (7H, m, glucosyl residue), 6.27 (1H, d, $J=16.0$ Hz, *p*-coumaric acid α -H), 6.82 (1H, d, $J=2.2$ Hz, kaempferol 6-H), 7.14 (2H, d, $J=8.0$ Hz, *p*-coumaric acid 3', 5'-H), 7.21 (2H, d, $J=9.0$ Hz, kaempferol 3', 5'-H), 7.29 overlapped CHCl₃ signal (1H, d, $J=2.2$ Hz, kaempferol 8-H), 7.54 (2H, d, $J=8.0$ Hz, *p*-coumaric acid 2'', 6''-H), 7.56 (1H, d, $J=16.0$ Hz, *p*-coumaric acid β -H), 8.05 (2H, d, $J=9.0$ Hz, kaempferol 2', 6'-H)。

化合物Ⅳ 20mg を5%硫酸 2ml 中で、湯浴上2時間還流し酸加水分解した。反応終了後 8ml の水を加え、10ml のエーテルで3回抽出し、抽出液をボウ硝で脱水後濃縮し無色結晶性のアグリコン (7mg) を得た。mp 238~240°C (針状晶, メタノール), TLC R_f (TEF) 0.42, FeCl₃: 赤紫色, Mg-HCl: 赤紫色, IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3,450, 3,200, 1,620, 1,600, 1,480, UV ν_{\max}^{EtOH} nm: 333 (sh), 291; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 331, 248; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 382, 314, 279 (sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 380, 313; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 330, 291 (sh), 253 (sh), $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 334 (sh), 292。またエーテル抽出後の母液は濃縮後 PPC を用いて D-glucose の存在を確認した (R_f BPW, 0.25)。

化合物Ⅳ 30mg を無水酢酸 (0.3ml) とピリジン (0.3ml) 中で一昼夜放置しアセチル化した。反応終了後冷水中に投入し、生じた白色沈殿を濾別し、含水メタノールより再結し、無色針状晶 (16mg) を得た。mp 105~110°C, NMR (in CDCl₃) δ (ppm): 2.00 (3H, s, OAc×1), 2.05 (9H, s, OAc×3), 2.10 (3H, s, OAc×1), 2.29 (3H, s, OAc×1), 2.32 (3H, s, OAc×1), 2.38 (3H, s, OAc×1), 4.15~5.35 (7H, m, glucosyl residue), 5.41 (2H, d, $J=12.0$ Hz, 3-H), 5.74 (2H, d, $J=12.0$ Hz, 2-H), 6.61 (1H, d, $J=2.2$ Hz, 6-H), 6.78 (1H, d, $J=2.2$ Hz, 8-H), 7.12 (2H, s, 5', 6'-H), 7.18 (1H, s, 2'-H)。

化合物Ⅳ 100mg を 25ml の 15% 炭酸水素ナトリウム中で湯浴上4時間還流し、酸化した。反応終了後放冷し、生じた沈殿を濾別し、熱水にて再結を試みたが結晶化せず、黄色の沈殿物 (35mg) を得た。TLC R_f (EAW) 0.58, R_f (TEF) 0.11, FeCl₃: 暗緑色, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 370, 327 (sh), 296, 268 (sh), 253; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 428, 327, 282 (sh), 255 (sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 425, 350, 306 (sh), 262; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 425, 351, 306 (sh), 261; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 391, 323, 273, 257; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 372, 302 (sh), 268, 253。

上記の化合物Ⅳ 酸化物 5mg を 1ml の 5% 硫酸中で湯浴上1時間還流し酸加水分解した。反応終了後放冷し、生じた沈殿を濾別黄色物質 (2mg) を得た。TLC R_f (TEF) 0.45, FeCl₃: 暗緑色, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 376, 303 (sh), 273 (sh), 256; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 322, 252 (sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 437, 353, 305 (sh), 268; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 427, 359, 304 (sh), 263; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 392, 303 (sh), 262; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 386, 327, 274 (sh), 256。

化合物Ⅴ 3mg を 0.3ml の 5% 硫酸中で前述同様酸加水分解した。反応終了後放冷し、黄色沈殿を得た。TLC R_f (TEF) 0.48, FeCl₃: 暗緑色, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 371, 332 (sh), 303 (sh), 256; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOH}}$ nm: 424, 373 (sh), 326, 255 (sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 430, 357, 303 (sh), 263; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3\text{-HCl}}$ nm: 430, 357, 302 (sh), 262; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc}}$ nm: 380, 325, 304, 258; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-NaOAc-H}_3\text{BO}_3}$ nm: 373, 327 (sh), 306 (sh), 254。また母液を PPC を用いて検索し、D-glucose の存在を確認した。 R_f (BPW) 0.25。

化合物Ⅵ 2mg を前述と同様、0.2ml 5% 硫酸で酸加水分解し、黄色のアグリコンを得た。TLC R_f (TEF) 0.49, また糖部は PPC を用いて検索し、D-galactose の存在を確認した。 R_f (BPW) 0.22。

5. kaempferol-3-O-glucoside のカラマツ稚苗根の生長に及ぼす影響

1976年5月1日にウスプルン水溶液で2時間消毒したカラマツ種子を温室内の石英砂中に播種し、発芽後6月1日に径15、深さ18cmのワグネルポット中のパーミキュライトに7本ずつ植え付け、6月から7月まで(2日ごと)完全栄養の水耕液(26)を与え生育させた。8月5日より10月15日まで5日ごとに各処理液をポットあたり100mlずつ与え、10月25日温室外に出し、11月23日苗木の生長が完全に停止してから掘り取り、苗高、根長、地上部と地下部の生重量、乾重量を測定した。処理液は kaempferol-3-O-glucoside の 10⁻⁴M, 3×10⁻⁵M, 10⁻⁶M と IAA の 10⁻⁸M, 10⁻⁹M, 10⁻¹⁰M を与え、他に水のみのコントロール区を設け、各処理区あたりのポット数は四つとした。

6. catechin, taxifolin の発根阻害作用の検定

さし木の材料として特に発根しやすいと思われる本学苗畑の5年生カラマツの当年生枝と発芽種子の下胚軸を用いた。発芽種子下胚軸は、1976年5月4日にウスプルン水溶液で2時間消毒したカラマツ種子を播種、温室内で発芽させ、2~3cm に伸びた6月15日に長さを2cm にそろえて切りとった。ついで catechin, taxifolin の処

理液に 25°C の恒温器中暗黒下で 24 時間水ざしした後、6 月 16 日パーミキュライトでみたしたさし木箱に下胚軸全体をさし付け、本学農学部世代短縮ミスト室内に置いた。5 年生苗木当年生枝は 6 月 15 日に約 50 本の苗木の樹冠の各部から 6~8 cm のものを採集し、6 cm に切りそろえたものを下部 3 cm ほど葉を取り、上記と同様の方法で処理しさし付けた。処理したさし穂は基部 0.5~1.5 cm が褐変し、その濃さは処理液の濃度に比例していた。

処理液は catechin の 1,000, 100 ppm, taxifolin の 500, 100 ppm, catechin 500 ppm と taxifolin 250 ppm の混合液を調整し、他に水のみをコントロール区を設けた。さし付け本数は 1 区あたり 20 本で、すべての区について 2 回くり返しを行なった。発芽種子下胚軸と当年生枝はそれぞれさし付け後 70 日の 8 月 14 日と 110 日の 10 月 3 日に掘り取り、発根した数、根数、根長などを測定した。

III 実験結果

1. 単離化合物の同定

化合物 I は TLC 上の *R_f* 値、塩化鉄による発色等から、筆者が先に当年生枝から単離した *d*-catechin と推定され(19)、IR, UV スペクトルを比較したところすべての点で一致し、I は *d*-catechin と同定した。

化合物 II は FeCl₃, Mg-HCl による呈色、UV の値および IR (図-2) における 1,685 (エステル結合), 1,658, 1,633 (カルボニル基) 1,610, 1,508 (芳香環) の吸収などからフラボノイドの配糖体とフェニルプロパン型の有機酸とのエステルと考えられた。1%水酸化カリウムによる部分加水分解では、kaempferol-3-*O*-glucoside と *p*-coumaric acid が TLC 上で確認され、また 5% 硫酸に

よる酸加水分解では TLC, PPC 上で kaempferol, *p*-coumaric acid, D-glucose が確認された。このことから II は kaempferol-3-*O*-glucoside と *p*-coumaric acid のエステルと推定され、結合位置についてはアセテートの NMR (図-3) においてアルコール性アセチル基が 3 個分、フェノール性アセチル基が 4 個分見られることから、kaempferol-3-*O*-glucoside の糖の水酸基であると考えられた。そこで各種文献値(5, 22, 23)と比較したところすべての点で一致し、また標品と TLC 上で比較したところ完全に一致し、II は kaempferol-3-*O*-*p*-coumaroyl glucoside と同定した。

またフラクション I の残査を TLC (TEF) で検索し、eriodictyol (*R_f* 0.45), taxifolin (*R_f* 0.42), epiafzelechin (*R_f* 0.39), catechin (*R_f* 0.34), 化合物 II (*R_f* 0.16) を確認した。

化合物 III は 2 次元 PPC を用いて検索すると、化合物 IV, V を少量含んでいたが、PPC 上の *R_f* 値, IR, UV 等においては筆者が先に報告した kaempferol-3-*O*-glucoside とよく一致し(18)、III は kaempferol-3-*O*-glucoside と同定した。

化合物 IV は各呈色反応, IR (図-4), UV 等の結果よりフラボノイドの配糖体と推定され、酸加水分解では taxifolin と D-glucose が得られた。またその結合位置については UV における AlCl₃ と NaOAc 添加時のソフト値(8)、およびアセテートの NMR (図-5) においてフェノール性アセチル基が 3 個分、アルコール性アセチル基が 5 個分見られることから 3' あるいは 4' 位と考えられた。そこで IV を酸化し quercetin 配糖体に誘導し、UV を測定したところ、本化合物は kaempferol の場合(18) と非常に似たソフト値を示し、また IV 酸化物の加水分解

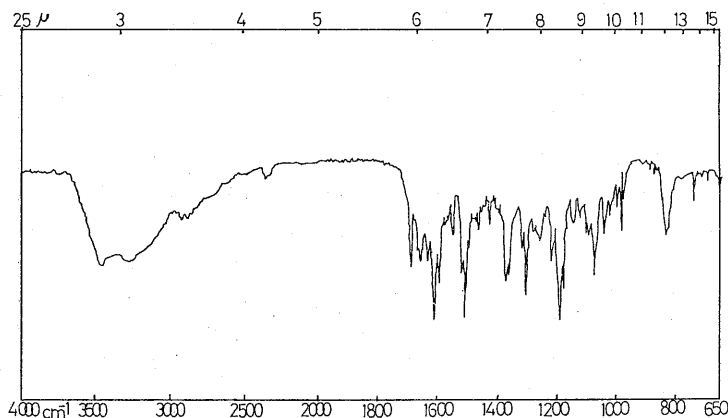


図-2. 化合物 II (kaempferol-3-*O*-*p*-coumaroylglucoside) の IR スペクトル
IR spectrum of compound II

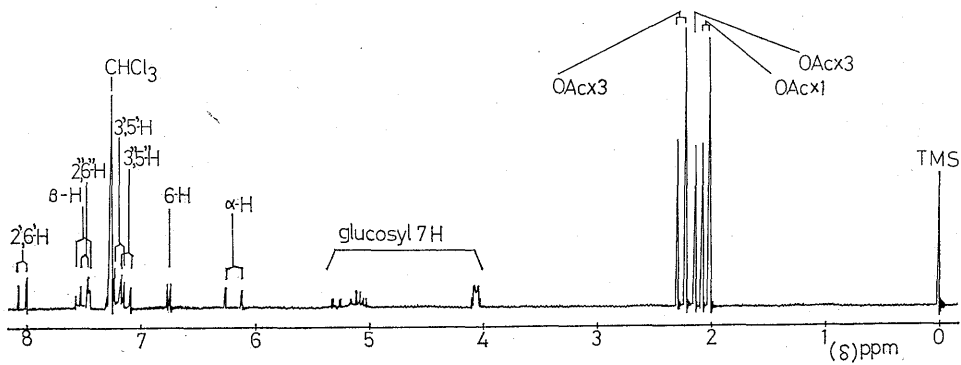


図-3. 化合物 II (kaempferol-3-O-p-coumaroylglucoside) acetate の NMR スペクトル
NMR spectrum of compound II acetate

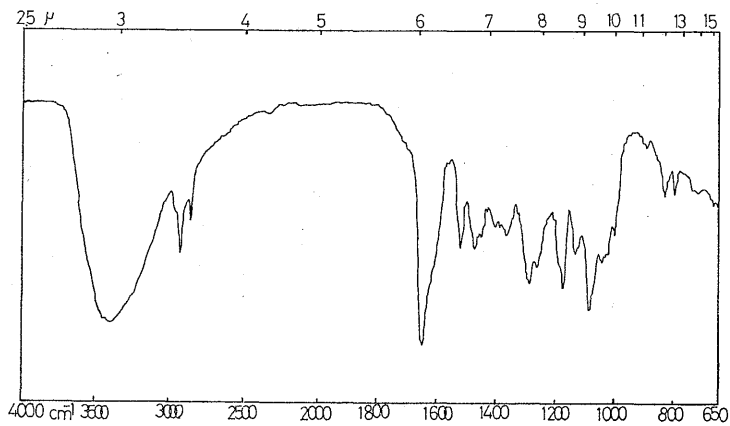


図-4. 化合物 IV (taxifolin-3'-O-glucoside) の IR スペクトル
IR spectrum of compound IV

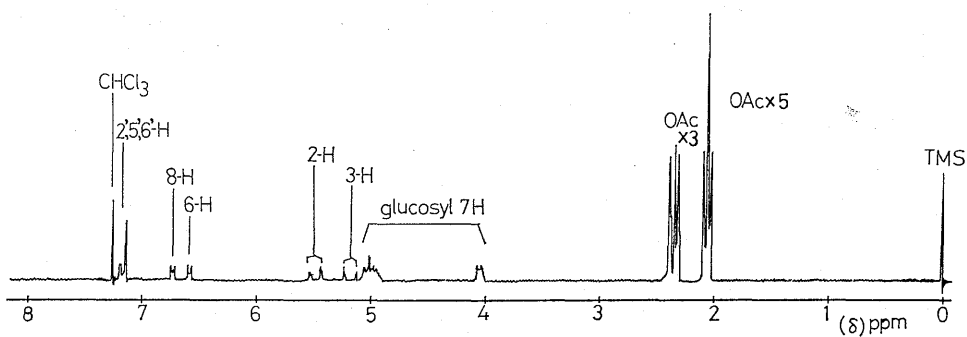


図-5. 化合物 IV (taxifolin-3'-O-glucoside) acetate の NMR スペクトル
NMR spectrum of compound IV acetate

物は TLC 上の R_f 値および UV スペクトルにおいて quercetin と完全に一致した。以上のことから IV は taxifolin-3-O-glucoside と推定され、文献値(6) (taxifolin-3'-O-glucoside, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 329 (sh), 292; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$

nm : 329, 249; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 377, 314, 224。 quercetin-3'-O-glucoside, UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 370, 325, 253; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-KOH}}$ nm: 432, 325, 240 (sh); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH-AlCl}_3}$ nm: 428, 352, 262) と比較したところ、IV と taxifolin-

3'-*O*-glucoside の IR スペクトルが一致し、また IV と taxifolin-3'-*O*-glucoside の UV および IV 酸化物と quercetin-3'-*O*-glucoside の UV スペクトルが非常に近似した値を示した。以上のことより化合物 IV は taxifolin-3'-*O*-glucoside と同定した。

化合物 V は各呈色反応、UV、IR (図-6) 等よりフラボノイドの配糖体と推定された。酸加水分解により得られたアグリコンの UV スペクトルは、3'-methoxy 3,5,4'-pentahydroxyflavone である isorhamnetin に近似し(8)、また糖は PPC 上で D-glucose と *R_f* 値が一致した。また糖の結合位置については V の UV より 3 位と推定されたので、標品との比較を行なったところ IR、UV スペクトルが完全に一致し、V は isorhamnetin-3-*O*-glucoside と同定した。

化合物 VI は UV スペクトル、各呈色反応が全て化合物

III に一致することから、kaempferol の配糖体と推定され、酸加水分解したところアグリコンとしては kaempferol が、糖としては D-galactose が TLC、PPC 上で確認された。このことから VI は kaempferol-3-*O*-galactoside と推定され、標品との比較を行なったところ IR (図-7)、UV スペクトルが完全に一致し、VI は kaempferol-3-*O*-galactoside と同定した。

またフラクション III から化合物 III、IV の結晶を単離した残渣について、乾固後 5% 硫酸で加水分解したところ、アグリコンとして kaempferol、isorhamnetin のほかに quercetin が TLC 上で確認された。

以上、生長期のカラマツ当年生枝から単離されたフェノール性成分はそれぞれ、catechin (I)、kaempferol-3-*O*-glucoside (III)、kaempferol-3-*O*-galactoside (VI)、kaempferol-3-*O*-*p*-coumaroylglucoside (II)、isorham-

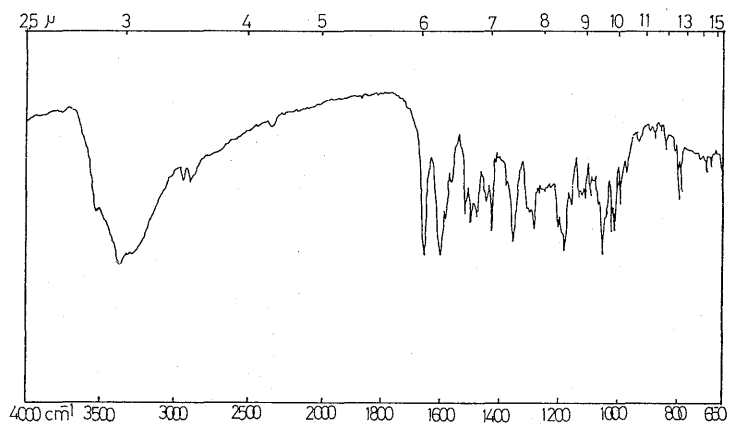


図-6. 化合物 V (isorhamnetin-3-*O*-glucoside) の IR スペクトル
IR spectrum of compound V

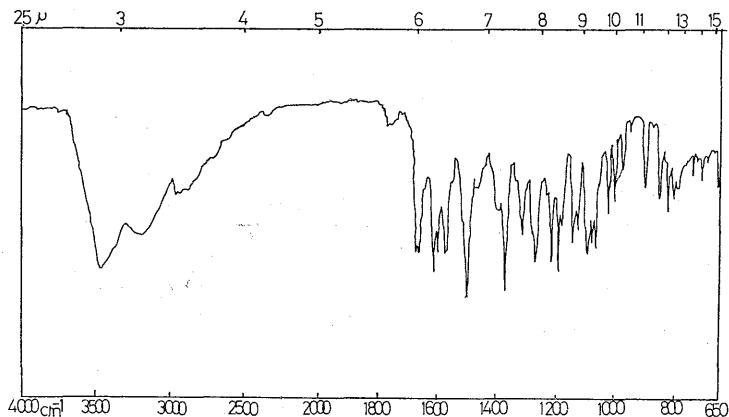


図-7. 化合物 VI (kaempferol-3-*O*-galactoside) の IR スペクトル
IR spectrum of compound VI

netin-3-O-glucoside(V), taxifolin-3'-O-glucoside (IV)と同定され、また他に quercetin(X), eriodictyol (VII), taxifolin(VIII), epiafzelechin(IX)の存在が TLC 上で確認された。本実験において単離、同定あるいは TLC 上で確認した化合物の構造を図-8に示す。

2. フェノール性成分の生物検定

kaempferol-3-O-glucoside と IAA の水溶液で処理後 掘り取ったカラマツ稚苗の地上部と地下部の各値を表-1 に示す。この表を見るとコントロール区の各値が他の処理区の値より全体的に小さくなっており、単純に比較することはできないが、それでも各処理区に間に若干の差が見られる。根長についてはさほどの差は見られないが、根生重量、根乾重量については、kaempferol-3-O-glucoside 投与区において濃度が低いほど値が大きくなっており、IAA 投与区においては逆に濃度が高くなるにつれて値が大きくなっている。

catechin, taxifolinの水溶液で処理後さし付けた下胚軸と当年生枝の発根状況を表-2 と表-3 に示した。下胚軸の発根率は 87.5~92.5% と良好であり、各処理区間

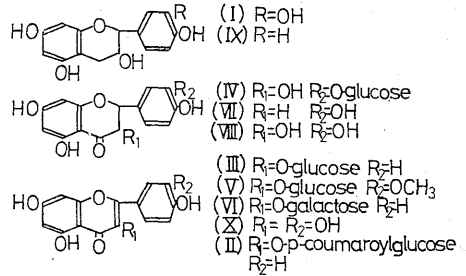


図-8. 生長期カラマツ当年生枝中のフラボノイド化合物の構造

Structure of the flavonoid compounds in the annual shoots of *L. leptolepis* during the growing season

表-1. kaempferol-3-O-glucoside と IAA のカラマツ稚苗根の生長に及ぼす影響

Effects of kaempferol-3-O-glucoside and IAA upon the growth of the roots of *L. leptolepis* seedlings

Treatment	Length of stem (cm)	Length of root (cm)	Fresh weight of top (g)	Fresh weight of root (g)	Dry weight of top (g)	Dry weight of root (g)
Control	14.4	34.2	0.85	1.01	0.39	0.47
kaempferol-3-O-glucoside 10 ⁻⁵ M	16.5	36.7	1.10	1.47	0.54	0.70
kaempferol-3-O-glucoside 3×10 ⁻⁵ M	17.1	35.2	1.30	1.43	0.61	0.70
kaempferol-3-O-glucoside 10 ⁻⁴ M	15.1	37.6	0.99	1.37	0.43	0.63
IAA 10 ⁻¹⁰ M	16.3	35.9	1.12	1.40	0.55	0.64
IAA 10 ⁻⁹ M	15.8	38.4	1.18	1.49	0.53	0.71
IAA 10 ⁻⁸ M	15.3	37.4	1.27	1.69	0.57	0.74

表-2. 発芽種子下胚軸を用いてのさし木試験

A study of the cuttings of the hypocotyl of *L. leptolepis* seedling

Treatment	Number of cuttings	Number of rooted cuttings	Percentage of rooted cuttings (%)	Number of dead cuttings after rooting	Number of dead cuttings without rooting	Number of callused cuttings without rooting	Number of roots per rooted cutting	Length of roots per rooted cutting (cm)
Control	40	35	87.5	0	3	2	2.5	3.3
Catechin 100ppm	40	35	87.5	0	2	3	2.6	3.9
Catechin 1000ppm	40	35	87.5	3	5	0	2.5	3.8
Taxifolin 100ppm	40	36	90.0	3	1	3	2.6	3.8
Taxifolin 500ppm	40	37	92.5	4	1	2	3.0	3.5
Catechin 500ppm	40	37	92.5	2	1	2	2.9	3.5

表-3. 5年生苗木当年生枝を用いてのさし木試験

A study of the cuttings of the annual shoot of 5-year-old *L. leptolepis*

Treatment	Number of cuttings	Number of rooted cuttings	Percentage of rooted cuttings (%)	Number of dead cuttings after rooting	Number of dead cuttings without rooting	Number of callused cuttings without rooting	Number of roots per rooted cutting	Length of roots per rooted cutting (cm)
Control	40	22	55.0	0	4	14	2.8	5.5
Catechin 100ppm	40	18	45.0	1	14	8	2.5	5.4
Catechin 1000ppm	40	19	47.5	0	8	13	1.9	6.0
Taxifolin 100ppm	40	32	80.0	2	2	6	2.5	5.0
Taxifolin 500ppm	40	20	50.0	0	8	12	2.6	5.4
Catechin 500ppm	40	23	57.5	2	8	9	2.7	6.9
Taxifolin 250ppm	40	23	57.5	2	8	9	2.7	6.9

での差はほとんど認められない。当年生枝の場合には、taxifolin 100 ppm 区において若干良い発根率を示し、また catechin 1,000 ppm 区において根数平均値が若干小さくなっているが、それ以外に差はあまり見られない。またこれらのさし穂の発根状況はほとんどが切り口からの発根で、特に異常な部位からの発根は見られなかった。以上のように本実験では catechin, taxifolin による発根阻害作用は認められなかった。

IV 考 察

カラマツ属のフェノール性成分についてはこれまで多くの研究があり、*L. leptolepis* やその他の材中に taxifolin, aromadendrin, quercetin, kaempferol の存在することが明らかにされ(2), *L. occidentalis* の樹皮からは dihydromyricetin, taxifolin, taxifolin-3'-O-glucoside, epigallocatechin, gallocatechin, epicatechin, catechin, leucodelphinidin が PPC により確認されている(7)。また *L. leptolepis* 樹皮中にはさらに aromadendrin(27)が、辺材中には aromadendrin と taxifolin の配糖体(21)の存在することが確認されている。葉中のフェノール性成分については、NIEMANNらがカラマツ属の各種について、PPC と UV を用いて検討しており(10~17), kaempferol, isorhamnetin, quercetin, myricetin, syringetin 等の各配糖体やその他多くの化合物の確認を報告している。

本実験において当年生枝の莖葉から単離、同定された化合物は前記の6種のフラボノイド化合物であるが、これらのうち kaempferol-3-O-glucoside, catechin, isorhamnetin-3-O-glucosideは筆者ら(18,19)と寺沢ら(28)により単離、同定されており、また taxifolin-3'-O-glucoside と kaempferol-3-O-p-coumaroyl-glucoside は HERGERT(7) と NIEMANN(14,16)により確認されている。しかしながら本実験においては、これらの化合物を結晶として単離しており、各種分析機器を使っての taxifolin-3'-O-glucoside と kaempferol-3-O-p-coumaroyl-glucoside の同定は今回が初めてであると思われる。また kaempferol-3-O-galactoside のカラマツ属からの単離、同定は今回が初めてである。

またこうしたフェノール性成分の生理作用についてはまだほとんど解明されていないが、筆者は先に kaempferol-3-O-glucoside が、他の報告(3,24,25)との関連において IAA oxidase の co-factor として働くのではないかと述べてきた(18,20)。しかし、近年さらに多くの研究により、これらの化合物が必ずしも生体内において IAA oxidase の co-factor あるいは inhibitor として最

適の濃度となっていないことなどから、この考え方は疑問視され始めている(4)。本実験においても kaempferol-3-O-glucoside をカラマツ稚苗根に与えた場合、低濃度で根の生長を促進する傾向が見られたが、高濃度の IAA も根の生長を促進したためはっきりした結論は得られなかった。今後は新規な生物検定法を開発したり、これらの化合物の細胞内における分布を明らかにするなどして、これらの生理作用について検討する必要がある。

さらにこれら筆者が扱っているフェノール性成分の作用としては、造林学的見地からさし木における発根阻害物質として働くのではないかという考えがある。塚本(29)は多くの樹種についてタンニンとデンプンの含量を調べ、前者が後者に比し多いものは発根しにくいと報告し、宮島(9)はヒノキについて、浅田(1)はカラマツについてタンニン含量の多いものは発根しにくいと述べている。しかし本実験においてはタンニンの前駆物質とされている(7) catechin, taxifolin の高濃度溶液を与え、しかもさし穂の基部が褐変していたにもかかわらず、阻害作用はまったく認められなかった。このことからタンニンが発根阻害作用を持たないとは断言できないが、少なくともその作用はかなり弱いものと思われ、カラマツにおいて発根困難な原因についてはさらに他の要因を考える必要があると思われる。

本研究を行なうにあたり、ご指導をいただいた北海道大学農学部造林学教室教授武藤憲由博士、さし木の方法について直接ご指導をいただいた本研究室の水野仁志氏、また quercetin の標品を供与して下さった本学農学部木材化学教室笹谷宜志博士、isorhamnetin-3-O-glucoside の標品を送って下さった帯広畜産大学農産化学科林産製造学教室寺沢実氏、kaempferol 配糖体の各標品を送っていただいた東京都立大学理学部代謝生理学教室の平岡厚氏、kaempferol-3-O-p-coumaroyl-glucoside および文献を送って下さったオランダ Utrecht 大学の Dr. G. J. NIEMANN の各位にお礼申し上げます。

引用文献

- (1) 浅田節夫・野笹多久男：林木のさし木困難樹種に関する研究(IX) 母樹齡と発根の難易について(2) 樹体養料の差異について。69回日林講：280~281, 1959
- (2) 出町秀也・寺沢実・笹谷宜志：カラマツの成分—心材のフェノール性物質について。日本木材学会北支講 1: 57~62, 1968
- (3) FURUYA, M., GALSTON, W. A. & STOWE, B. B.: Isolation from peas of co-factor and inhibitor of indolyl-3-acetic acid oxidase. Nature 193: 456~457, 1962
- (4) 古谷雅樹：フィトクローム。269 pp, 岩波書店, 東京,

- 1976
- (5) HARBORNE, J. B.: Plant polyphenols (XI) The structure of acylated anthocyanins. *Phytochem.* **3**: 151~160, 1964
- (6) HERGERT, H. L. & GORDSCHMID, O.: Biogenesis of heartwood and bark constituents (I) A new taxifolin glucoside. *J. Org. Chem.* **23**: 700~704, 1958
- (7) HERGERT, H. L.: Chemical composition of tannins and polyphenols from conifer wood and bark. *For. Prod. J.* **10**: 610~617, 1960
- (8) MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. & THOMAS, M. B.: The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1970
- (9) 宮島 寛: ヒノキ栄養系の育成に関する基礎研究. 九大演報 **34**: 1~161, 1962
- (10) NIEMANN, G. J.: Phenolic glucosides from needles of *L. laricina*. *Phytochem.* **8**: 2101~2103, 1969
- (11) NIEMANN, G. J. & BEKOBY, R.: Flavonoid constituents from *Larix* needles. *Phytochem.* **10**: 893, 1971
- (12) NIEMANN, G. J.: Phenolic glucosides from needles of *L. leptolepis*. *Phytochem.* **12**: 723~724, 1973
- (13) NIEMANN, G. J.: Flavonoids from needles of *L. leptolepis*. *Phytochem.* **12**: 2056, 1973
- (14) NIEMANN, G. J.: Phenolics from *Larix* needles. Flavonoids of *L. leptolepis*. *Planta medica* **26**: 101~103, 1974
- (15) NIEMANN, G. J.: Phenolics from *Larix* needles. Main flavonoids in needles of *L. decidua*. *Phytochem.* **14**: 1436~1437, 1975
- (16) NIEMANN, G. J.: Phenolics from *Larix* needles. Acylated flavonol glycosides from *Larix* needles. *Phytochem.* **14**: 1437~1438, 1975
- (17) NIEMANN, G. J.: Phenolics from *Larix* needles. Flavonoids of *L. gmelini*. *Acta. Bot. Neerl* **24**: 65~68, 1975
- (18) 野村一高・武藤憲由: カラマツ当年生枝の成分に関する研究(I) 生長期葉中のケンフェロール-3-O-グルコシド. 日林誌 **58**: 86~91, 1976
- (19) 野村一高・武藤憲由: カラマツ当年生枝の成分に関する研究(III) 生長休止期のフェノール性成分. 日林誌 **58**: 258~265, 1976
- (20) 野村一高: カラマツ当年生枝の成分に関する研究(IV) フェノール性成分の季節的变化. 日林誌 **58**: 379~382, 1976
- (21) 奥山 寛・寺沢 実・三宅基夫: カラマツの抽出成分に関する研究—主として辺材成分について. 22 回木材学会大会研究発表要旨集, 221, 1972
- (22) SIEGMUND, P., DULCE, H. J., KÖRBER, F. & SCHÜTTE, E.: Isolierung neuer Anthoxanthine aus Lindenblüten. *Naturwissenschaften* **46**: 358, 1959
- (23) STAUDE, M. & REZNIK, H.: Das Flavonoidmuster der Winterknospen und Laubblätter von *Corylus avellana* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **68**: 346~356, 1973
- (24) STENLID, G.: The effects of flavonoid compounds on oxidative phosphorylation and on the enzymatic destruction of indoleacetic acid. *Physiol. Plant.* **16**: 110~120, 1963
- (25) STENLID, G.: On the physiological effects of phloridzin, phloretin and some related substances upon higher plant. *Physiol. Plant.* **21**: 882~894, 1968
- (26) 田崎忠良・田口亮平: 実験植物生理生態学実習. 64 pp, 養賢堂, 東京, 1971
- (27) 寺沢 実・平 加司・田内 博・奥山 寛・三宅基夫: 樹木の生活組織のフェノール成分—カラマツ内皮のフェノール配糖体. 日本木材学会北支講 **4**: 57~60, 1972
- (28) 寺沢 実・米沢裕吉・奥山 寛・三宅基夫: カラマツ針葉中のフェノール配糖体. 日本木材学会北支講 **6**: 58~61, 1974
- (29) 塚本洋太郎: 挿木繁殖に関する研究(I) 発根の難易と含有物質との関係. 園芸学研究記録 **4**: 51~59, 1949

(1977年4月8日受理)