

芳樟の栽培ならびに育種に関する研究

第4報. 収油率育種におけるガスクロマトグラフィーの利用

林 喜 三 郎

(農学部 作物・育種学研究室)

Studies on Cultivation and Breeding of Linalool Tree

IV. Application of Gaschromatography to Breeding of Oil Yield Percentage

Kisaburo HAYASHI

(Laboratory of Crop Science and Breeding, Faculty of Agriculture)

In order to increase breeding efficiency of oil yield percentage in linalool tree, it was investigated that linalool contents of leaf are measured by means of gaschromatography. The results are summarized as follows :

Linalool are extracted from leaf by methanol with isopropyl bezoate 0.5%, at 30°C for one night. Linalool contents of leaf are calculated from equation II using gaschromatogram recorded under the specification as shown in Table 1, but K is 0.533, calculated from equation I.

This present method have many promising points than the previous stream-distilling method in breeding of oil yield percentage, those are shown as the following.

(1). The labour and the times required for obtaining the sample are able to reduce to half or less of the previous method, because the required amount of sample for measuring linalool contents of leaf are very small, above 50 mg.

(2). The required times for mesurement of one sample which are about five minutes, are below 1/20 ~25 of that times in previous method.

(3). The linalool contents obtained by this present method are higher than oil yield percentage by previous method, but the error in the linalool contents, below 0.2%, are small.

(4). Essential oil obtained by steam-distilling commonly containe some amount of the other compound in addition to linalool and the deviation of that amount between individuals are largc. The individual with many amount of the other compound are able to easy select by this present method but are not by the previous method.

We must investigated successively where part are most suitable for obtaining the sample, because the deviation of linalool contents within individual are very large.

緒 言

第2報(1967)では、芳樟の収油率は季節的変動が著しく、しかもその傾向が個体によっても異なるために、個体選抜のための検定は収穫期に近い短期間に行なう必要のあることを指摘しておいた。また第3報(1969)では、ガンマー線照射によって誘起された形態の突然変異が比較的大きなセクターとなることを明らかにしたが、これは収油率突然変異の鑑別に、なお枝別の検定が必要なることを示すものと考えられる。しかしながら、従来の収油率の測定方法では、少なくとも80~100枚、30g以上の成葉と、2時間の蒸溜、放冷時間が必要なため、限られた期間内に多数の個体別、あるいは枝別の検定を行なうことは容易ではない。それゆえ、育種効率を高めるためには、微量迅速定量法の確立が不可欠である。幸い芳樟葉油中にはリナロールが大部を占め、また利用成分でもあるため、近年香料化学において開発応用の目覚ましいガスクロマトグラフィーを用いて、葉中のリナロールを簡便に定量することが出来れば、所期の目的が達成出来ると考えられる。

本報告は以上のような観点から収油率育種にガスクロマトグラフィーの適用の可否について検討

したものである。

なお、本研究の一部は昭和45年度文部省科学研究費によって実施した。

実 験 方 法

1. 装置および測定条件

装置には日立製ガスクロマトグラフィー、063型に、同社製の水素炎イオン化検出器を接続して用いた。測定条件は種々検討の結果、第1表のものを採用した。

Table 1. Specification of gaschromatography

Coloumn : Stainless steel, 2 m, ϕ 3 mm, Reoplex 400, Chromosob W, 60-80 mesh
Oven temperature : 170 °C
Injection temperature : 200 °C
Carrier gas : N ₂ , 2.1 kg/cm ² , 30 ml/min.
Feul gas : H ₂ , 0.6 kg/cm ² , 20 ml/min.
Attenuation : 5×10^2
Chart speed : 5 mm/min.
Sample volume : 3 μ l.

2. 検量線の作成

生葉からのリナロールの抽出には、その重量の約10倍量のメタノールが適当と思われ、この際のリナロール濃度は0.1~0.3%になるものと予想された。またこのような濃度のリナロールの定量のための内標準物質には、安息香酸イソプロピルの0.5%が適当と考えられた。そこで、メタノール中のリナロールおよび安息香酸イソプロピル濃度を上記の割合で混合した標準検液を作成して、第1表の条件で、第1図に示すようなガスクロマトグラムを記録し、次式によって補正係数 K を算出して、検量線を描いた。

$$\frac{C_i}{C_b} = K \frac{H_i}{H_b} \quad \dots\dots\dots (1)$$

C_i & C_b : Contents of linalool (0.1~0.3) and iso-propyl (0.5) benzoate in methanol in % (w/v),

H_i & H_b : Peak height of linalool and iso-propyle benzoate,

K : Coefficient for estimating contents of linalool in methanol.

なお、この場合のリナロールおよび安息香酸イソプロピルの保持時間は、それぞれ約2.5分および4.5分であった。

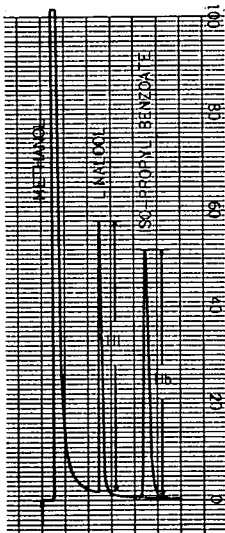


Fig. 1. Gaschromatogram of linalool (0.3%) and iso-propyl benzoate (0.5%) in methanol. Iso-propyl benzoate are placed as standard substance for determining of linalool contents in methanol.

3. 葉内リナロール含量の定量

生葉 w mg (50 mg 以上) を安息香酸イソプロピル 0.5%含有のメタノール v ml で抽出した

溶液について、ガスクロマトグラムを記録し、次式によってリナロール含量 C %を算出した。

$$C = \frac{10vKH_i/H_o}{w} \times 100 \quad \dots\dots\dots (II)$$

C : Linalool contents of leaf in % (w/w),
 w : Leaf weight in mg,
 v : Methnol volume in ml. ($=^{ca} \cdot 10 w/1000$)

実験結果および考察

1. 検量線およびその再現性

リナロール0.1, 0.2および0.3%の標準検液を、5日間に亘って1日2回ずつ記録したガスクロマトグラムについて、I式によって補正係数を計算した結果は第2表に、同表について分散分析した結果は第3表に示すとおりである。

Table 2. Variation of coefficient, K . *)

Date	Replication	Linalool contents in %			Means	
		0.1	0.2	0.3		
2/18	1	0.53	0.53	0.53	0.529	.527
	2	.53	.52	.53		
2/20	1	.53	.53	.54	.532	.538
	2	.53	.55	.55		
2/23	1	.53	.54	.55	.539	.538
	2	.52	.54	.55		
2/24	1	.51	.52	.55	.527	.529
	2	.52	.54	.54		
2/25	1	.53	.53	.53	.529	.533
	2	.52	.54	.55		
Means		.525	.534	.541		.533

*) K : Reference to equation I.

Table 3. Analysis of variance.

Factors	d. f.	s. s.	m. s.	F
Contents	2	1264.87×10^{-6}	632.44×10^{-6}	9.22**
Replication	1	80.04	80.04	1.17
Date	4	589.47	147.37	2.15
Error	22	1508.59	68.57	
Total	29	3442.97		

第2表によると、0.51~0.55にわたる変異が認められるが、リナロール濃度が同一の場合には、反復間および測定日間の差異は極めて僅かであり、第3表でも、これらの分散は有意ではない。しかし、リナロール濃度が異なれば、その増加にともない K も増加する傾向があり、第3表によるとこの分散は大きく、極めて高い有意性がある。これらの現象は、検量線が厳密には直線ではないか、その再現性は極めて高いことを物語るものである。

そこで、検量線を直線として取扱った場合、どの程度の誤差を生じるかを明らかにするために、第2表において、リナロール濃度毎に最高および最低の K の場合について、全平均値 0.533 を用い、I式によってそれらの濃度を計算すると第4表および第2図のとおりである。

Table 4. Contents of linalool in methanol and their value estimated by grand mean of K (=0.533)

Contents of linalool (A)	Value estimated		Difference (B)	Max. *) error
	Min.	Max.		
0.1 %	0.100 %	0.104 %	- 0.000 - + 0.004 %	4.0 %
0.2	0.194	0.205	- 0.006 - + 0.005	3.0
0.3	0.291	0.304	- 0.009 - + 0.004	3.0

*) Maximum error are shown as the following equation,

$$\frac{\text{the larger absolute value of (B)}}{\text{(A)}} \times 100$$

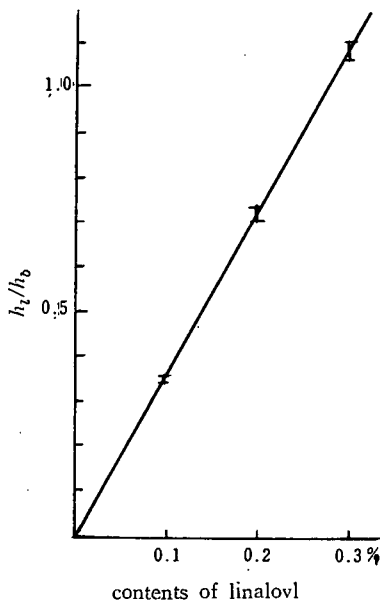


Fig. 2. Relation between linalool contents and H_i/H_b ratio.

これらの図表によると、検量線を直線とみなせば、その誤差は最大 0.009 %、被検濃度に対し $\pm 3 \sim 4$ % であり、一般の定量分析における場合よりやや大きいようである。しかし、育種の選抜手段として多数の試料について、相対的な比較、検討を行なう場合には充分適用可能と思われる。なお、実際には約10倍量のメタノールで抽出した液について測定するため、上記の誤差を葉内含量に直すと \pm 約 0.1 % である。

2. 葉内リナロール含量の定量

(1) 抽出時間

抽出温度と時間の関係を明確にするために、葉の中

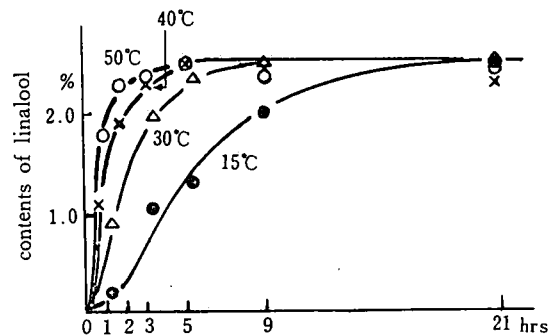


Fig. 3. Relation between temperature and the time required since the extraction is started.

中央中肋をさけた位置から径 12 mm のリーフパンチで打抜いた葉片 5 枚 (約 100 mg) を管瓶に入れ、メタノールを注入して密栓した後、15、30、40 および 50°C の恒温器中に静置し、そのリナロール量を経時的に測定した。この実験は 5 回反復し、それらの平均値を図示すると第3図のとおりである。

同図によると、何れの区でも抽出量は経時的にS字形のカーブを描いて増加するが、その増加傾向は温度の上昇とともに急速となり、抽出完了までの所要時間は、15°Cで約21時間、30°Cで約9時間、40および50°Cでは約5時間と考えられる。したがって実用的には、30°Cで1晩または40°Cで約5時間抽出すれば良いと考えられる。

(2) 収油率との比較

上記の最適条件で抽出されたリナロール量が、水蒸気蒸溜によって得られる収油率と、どの程度差異があるかを明らかにするために、成葉約20gを約1cm平方に切断した後、よく混合し、その半量はメタノール抽出によるガスクロマトグラフィー測定を、他の半量は第2報(1957)の方法で水蒸気蒸溜によって収油率を測定した。ただし、この蒸溜には、ハッカの油分測定装置を代用した(三井 1954)。以上の実験はそれぞれ2回反覆実施したが、それらの結果を示すと第5表のとおりである。

Table 5. Value obtained by means of gaschromatography and steam-distilling.

Replication	Value obtained by means of		Difference
	Gaschromatography	Steam-distilling	
1	2.39	2.13	0.26
2	2.35	2.05	0.30
Means	2.37	2.09	0.28

同表によると、ガスクロマトグラフィーによる測定平均値2.37%は水蒸気蒸溜によるそれ2.09%より、0.28%高い。ただし、蒸溜による精油中にはリナロール以外の成分も多少含まれ、その量は倉田(1952)あるいは筆者の経験によると個体間差異が著しい。したがってガスクロマトグラフィーによる測定値が収油率より、つねに特定割合高くなるとは云えない。また、上記の結果はメタノールによるリナロールの抽出効率が高いために、実際の収油率あるいはリナロール収量が、ガスクロマトグラフィー測定値よりかなり低くなるものと予想される。このように実際の値よりかなり高めに測定され易いが、個体あるいは枝間の相対的比較は可能と思われ、しかも、従来の収油率では、リナロール以外の成分が多く、油質としては劣悪な個体の発見、淘汰は容易でないか、ガスクロマトグラフィーでは容易となり、極めて優れた選抜手段と考えることが出来る。

(3) 測定誤差

以上の方法で測定した値か、どの程度の誤差をとまなうものかを明らかにしておくことは、測定値の判定に重要と考えられる。しかし、このような誤差を明らかにするための均一な試料を得ることは容易でないので、つぎの方法によって検討した。すなはち、同一の葉の中肋部を除いた左右葉身部のリナロール含量はほぼ同一と考えられるので、それぞれ別々に抽出、測定した後、両葉身部間の差異を調査した。この実験には15枚の葉について実施したが、その結果を差異の少ないものから順に並べて示すと第6表のとおりである。

同表によると、差異が0.1%以下の場合が9例、60%であり、0.1%以上の場合は6例、40%である。ただし最高の場合でも、0.17%である。また、第6表では、誤差の大小とリナロール含量の高低との間には、明確な関係がみとめられない。上記の誤差には、第1項で指摘の誤差0.1%も含まれるので、試料の秤量および抽出時に生じた誤差は比較的小さいものと考えられる。いずれにしても、実際の葉内リナロール含量の測定値は、最大±0.2%の誤差を見込めば充分と思われる。この

Table 6. Linalool contents in left and right half parts of the same leaf.

Observed value (%)		Difference
left	right	
1.57	1.57	+0.00
1.92	1.91	+0.01
1.36	1.34	+0.02
2.03	2.07	-0.04
1.74	1.79	-0.05
1.52	1.57	-0.05
1.34	1.39	-0.05
1.41	1.49	-0.08
1.57	1.66	-0.09
1.85	1.97	-0.12
1.55	1.68	-0.13
2.20	2.06	+0.14
1.79	1.64	+0.15
1.47	1.63	-0.16
1.16	1.33	-0.17
Average		
1.63	1.67	-0.04

値は1~3%の葉内含量に対し、やゝ大に過ぎるようであるが、従来の水蒸気蒸溜法の場合には、測定最小単位が0.145%であることを考慮すれば、決して大とは云えず、むしろ精度は高いと考えられる。

たゞし、収油率の個体内変動が著しいため(倉田 1952, 吉田 1968)、試料採取部位による測定値変異はかなり著しいと思われるので、この点に関する検討は今後の重要な課題と考えられる。

結 論 お よ び 要 約

芳樟における収油率の育種効率を高めるために、ガスクロマトグラフィーを利用して、葉内リナロール含量の迅速定量法について検討し、つぎの方法が最も適当と考えられた。

すなわち、生葉 w mg (50 mg 以上) に安息香酸イソプロピル0.5%含有のメタノール溶液 v ml (=約 10 w /1000 ml) を加え、30°C で1晩抽出した後、第1表の条件でガスクロマトグラムを記録し、Ⅱ式によって葉内リナロール含量を算出する。たゞし、Ⅱ式の K はメタノール中のリナロール(0.1~0.3%) および安息香酸イソプロピル濃度(0.5%) が、既知の溶液のガスクロマトグラムよりⅠ式で算出した値を用い、本実験では0.533である。

本法は、育種的に検討すればつぎのような優れた点を多数もつと云える。

(1) 試料が微量ですむために、採取および秤量に必要な労力および時間を、従来の1/2以下に節約出来る。

(2) 測定に要する時間は約5分であり、従来の20~25分の1に短縮できる。

(3) 測定値はやゝ高めに出来るが、誤差は±0.2%であり、水蒸気蒸溜法と同等あるいは以上の精度がある。

(4) リナロール含量を直接測定するため、リナロール以外の成分が多く、油質の劣悪な個体の判定淘汰が容易である。

以上の諸点から本法は育種の選抜手段として極めて有効に用いることが出来、所期の目的を充分達成することが出来るものと考えられる。ただし、収油率の個体内変動が著しいことが予想されるので、試料採取部位の決定に関して、今後さらに詳細な検討を行なう必要がある。

引用文献

1. 林喜三郎 他(1969) 芳樟の栽培ならびに育種に関する基礎的研究, 第3報, 高知大学研報 第18巻 農学 第20号
2. 三井哲夫(1950) 農芸化学実験書 下巻 第4版 p. 892-893, 産業図書 東京
3. 倉田 隆(1962) リナロールクスの育種学的ならびに造林学的基礎研究 しょう脳試験場報告 第2号
4. 山崎 力 他(1967) 芳樟の栽培ならびに育種に関する基礎的研究 第2報 高知大学研報 第16巻 農学 第8号
5. 吉田照雄 他(1967) 芳樟葉の精油含有組織と収油率について, 日作紀 37: 112-117

(昭和45年9月26日受理)

