

### Ⅲ 研究事業報告

## 第1課題 栄養成分評価に関する研究

### (1) ルバーブ、桑葉及び鶏卵中の機能性成分等について

谷 孝之 (衛生研究所)  
 中岡 正吉 (衛生研究所)  
 岸 美智子 (衛生研究所)  
 成松 次郎 (農業総合研究所)  
 有賀 勲 (蚕業センター)  
 岸井 誠男 (畜産試験場)

神奈川県産の食品素材として、ルバーブ、桑葉及び鶏卵を取り上げ、機能性成分等を分析調査した。1) ルバーブ：ミネラル類は他の野菜に比べて特に特長は認められず、ビタミン類も特に高濃度のもはなかった。食物繊維量は、ダイコン葉程度であり、遊離シュウ酸含量は、ホウレンソウより少なかった。瀉下作用に関係のあるアントラキノン誘導体は食用にされる茎よりも根に大部分存在していた。2) 桑葉：ミネラル類及びビタミン類につき、せん茶に比べて高かったのは、カルシウム、鉄、ナトリウム及びビタミンB<sub>1</sub> (V.B<sub>1</sub>) のみでV.A効力及びV.Cはそれ以下であった。食物繊維量は多く、乾重量当りではゴボウに近かった。3) 鶏卵：5品種間で卵黄中のコレステロール、リン脂質及び12種類の脂肪酸量では有意差は認められなかった。また、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 高濃度含有魚油精製粉末の8%添加飼料での飼育2週間目において卵黄中へのEPA、DHAの移行量は最大となった。

#### 1 はじめに

成人病予防の点からも食品中の一般的な栄養成分の他に生理的に有用な作用を示す機能性成分に対する関心が現在高まっている。そこで、神奈川県産の食品素材としてルバーブ、桑葉及び鶏卵を取り上げ、機能性成分等の食品成分を分析調査し、それらについて、栄養学的に評価し、健康維持・増進、成人病予防に役立つものを見出すことを目的とした。

## 2 方法

### 2.1 試料及び試験方法

ルバーブ、桑葉及び鶏卵につき生の状態、あるいはそれぞれの凍結乾燥粉末を作成し、各機能性成分等につき、一部を除き、主として日本薬学会編「衛生試験法」<sup>1)</sup>等の一般的試験法に従って測定した。

### 2.2 測定項目

#### 2.2.1 ルバーブ及び桑葉中の機能性成分等

無機質 (ミネラル) 類 (カルシウム <Ca>、リン <P>、鉄 <Fe>、ナトリウム <Na>、カリウム <K>)、ビタミン類 (レチノール、カロチン、V.B<sub>1</sub>、V.B<sub>2</sub>、ナイアシン、V.C) は科学技術庁資源調査会編「四訂日本食品標準成分表」の成分項目に従って測定した。さらに、食物繊維<sup>2)</sup>、有機酸 (抽出法<sup>3)</sup>、高速液体クロマトグラフ

法<sup>4)</sup>及びアントラキノン誘導体 (試験法等の詳細は本共同研究事業報告で別途報告) について測定した (なお、水分等の一般成分も本共同研究事業報告で別途報告)。ここでルバーブは他の野菜類と、桑葉は茶としての用途を考慮して、せん茶との比較を行った。

#### 2.2.2 鶏卵中の機能性成分等

##### 1) 品種別卵中の栄養成分の差異

5品種 (白色レグホン、ロード、名古屋、烏骨鶏、ホロホロ鳥) の鶏卵の凍結乾燥粉末を作成し、この卵黄粉末につきコレステロール<sup>5)</sup>、総脂質、リン脂質 (基準油分析試験法のアセトン法<sup>6)</sup>) 及び12種類の脂肪酸<sup>5)</sup> (ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA)) を測定した。また、生卵黄中の一般成分 (水分、粗蛋白質、粗脂肪、灰分、炭化水素) 及びミネラル (Ca、P、マグネシウム (Mg)、K) も測定した。

##### 2) 機能性成分添加卵 (EPA添加卵)

通常の飼料にEPA及びDHAを高濃度含有する魚油精製粉末 (商品名：マリンオイルパウダー) を1、2、4及び8%添加した強化飼料で鶏 (ロードホン) を飼育し、EPA及びDHAの卵中への移行の程度を他の脂肪酸 (10

種類)と共に調べた。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 ルバーブ及び桑葉中の機能性成分等

機能性成分等の含量の測定結果は表1に示した。ミネラル類では、ルバーブは他の野菜類に比べて、特に特長は認められなかった。桑葉は、せん茶に比べて、カルシウム、鉄、ナトリウムの含量が高かった。ビタミン類では、ルバーブは特に高濃度のものはなかった。桑葉がせん茶に比べて高かったのはV.B<sub>1</sub>のみで、V.B<sub>2</sub>、ナイアシンは同程度、V.A効力及びV.Cはそれ以下であった。

食物繊維は、ルバーブ、桑葉ともに可溶性より不溶性繊維の方の比率が大きかった。ルバーブの食物繊維含量は生換算で2.8%となるが、地方衛生研究所共同研究の食物繊維測定結果<sup>2)</sup>によると、これに近いものに次の食品がある。ダイコン葉(2.7%)、ブロッコリー(2.7%)、ホウレンソウ(2.5%)及びニンジン(2.6%)。一方、桑

葉の食物繊維量は52.9%と多く、これは、乾重量当りの食物繊維量としてみると、他の野菜類では、ゴボウ(51.0%)及びゼンマイ(53.5%)に近かった。

有機酸では、ルバーブ中の遊離シュウ酸、クエン酸及びリンゴ酸につき測定したが、そのうち問題となる遊離シュウ酸含量は生換算では100g中0.42gであった。この値は中村の報告<sup>7)</sup>によると、一般の野菜類の中では多い方であるが、ホウレンソウ(100g中0.65g)より少なく、ミョウガ(100g中0.45g)に近かったので、特に問題となる程の含量ではないと考える。

次に、アントラキノン誘導体の測定結果を表2及び表3に示した。ルバーブに存在するアントラキノンの大部分は根にあり、食用にされる茎には根の約100分の1の濃度であった。すなわち、茎中の結合型アントラキノン は生重量1g中に0.04mg、遊離型アントラキロンは0.01mgであった。遊離型の構成成分はエモジンを主としてアロエエモジン、フィシオンの3成分であった。エモジン、

表1 ルバーブ(茎)及び桑葉中の成分含量(100g中)

機能性成分等	ルバーブ (生換算)	他の野菜 (四訂版)	桑葉 (乾燥粉末)	せん茶 (四訂版)
Ca	44mg	キハチ43mg	2699mg	440mg
P	25mg	カブ24mg	238mg	280mg
Fe	0.3mg	カブ0.3mg	44.1mg	20.0mg
Na	0.4mg	サトウ1mg	39.9mg	3mg
K	288mg	サトウ280mg	3101mg	2200mg
V.A(レチノール) 加チン	0 74μg	アブラナ80μg	670IU 7440μg	0 13000μg
V.A効力	41IU	アブラナ44IU	4130IU	7200IU
V.B <sub>1</sub>	0.02mg	セブチ0.02mg	0.59mg	0.35mg
V.B <sub>2</sub>	0.02mg	ブチ0.02mg	1.35mg	1.40mg
ナイアシン (ニコチン酸)	0		4.0mg	4.0mg
V.C	6.7mg	ダイコン7mg	31.6mg	250mg
食物繊維	不溶性 1.9g 可溶性 0.9g	ダイコン葉2.7mg	不溶性 45.0g 可溶性 7.9g	粗繊維 10.6g
有機酸	シュウ酸 遊離型 0.42g クエン酸 0.24g リンゴ酸 0.89g	ホウレンソウ0.65g	-	-
アントラキノ誘導体	遊離型 1mg 結合型 4mg	-	-	-

表2 ルバーブ茎、根及び葉のアントラキノン含量 (mg/g)

	遊離型アントラキノン		結合型アントラキノン	
	生	乾燥	生	乾燥
茎	0.01	0.2	0.04	0.5
根	0.93	3.1	1.71	5.7
葉	0.28	4.0	0.06	0.8

表3 ルバーブ茎及び根の凍結乾燥粉末中のアントラキノン含量 (μg/g)

	アロエエモジン	エモジン	フィシオン	クリソファノール
90-茎	6.7(33.5)	103.5(517.7)	9.7(48.5)	--
90-根	--	239.9	399.9	1125.7
91-茎				
(赤色)	1.6(15.4)	24.5(234.2)	1.7(16.7)	--
(緑色)	6.9(42.3)	103.3(630.3)	1.4(8.5)	--

[注] ( )内は生換算値、μg/100g

表4 品種別卵中の栄養成分 (卵黄凍結乾燥粉末中の成分含量%)

成分名	白レ(VL)若	白レ(VL)老	ロト(SR)若	ロト(SR)老	名古屋(N)若	鳥骨鶏	オオオ鳥	鳥骨鶏(卵白)	四打飯換算値
コレステロール	2.37	2.21	2.44	2.48	2.83	2.15	2.54	0.01	2.58
総脂質	58.75	58.42	57.94	59.05	59.44	58.74	57.73	-	-
リン脂質	21.79	22.56	22.94	25.27	25.28	22.27	22.55	-	-
【脂肪酸】									
ミリスチン	0.17	0.20	0.22	0.21	0.23	0.25	0.31	ND	0.15
パルミチン	0.13	ND	ND	0.17	0.12	ND	ND	ND	0.05
ステアリン	9.76	9.28	9.78	10.18	9.26	12.48	10.20	ND	12.55
オレフィン	1.76	1.84	2.01	2.14	2.05	2.62	1.89	ND	1.80
アラキジン	4.21	3.28	3.83	4.62	3.20	5.01	4.63	ND	4.30
リノール	26.05	23.57	25.69	29.64	21.19	30.05	18.07	ND	21.80
リノール	5.77	5.69	5.97	6.00	4.42	6.90	6.12	ND	6.70
γ-リノール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
α-リノール	0.18	0.19	0.22	ND	ND	0.14	0.13	ND	0.15
アラキジン	0.56	0.47	0.49	0.58	0.50	0.68	0.45	ND	0.85
EPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	0.64	0.51	0.73	0.63	0.57	0.57	0.39	ND	0.90

[注] ND : 不検出

表5 品種別卵中の栄養成分(生卵黄中の成分含量%)

成分名	白レグ	ロード	名古屋	鳥骨鶏	ホロホロ鳥	四訂版
[一般成分]						
水分	49.7	50.9	50.5	51.3	52.4	51.0
粗蛋白質	16.0	15.5	15.6	15.8	15.1	15.3
粗脂肪	31.9	31.4	32.3	31.1	30.8	31.2
灰分	1.7	1.6	1.4	1.5	1.5	1.7
炭水化物	0.7	0.6	0.2	0.3	0.2	0.8
[ミネラル]						
Ca	0.114	0.092	0.103	0.109	0.165	0.140
P	0.440	0.388	0.437	0.428	0.511	0.520
Mg	0.014	0.010	0.013	0.012	0.013	-
K	0.090	0.090	0.087	0.113	0.111	0.095

アロエモジンは茎の部位により存在量に差があり、根に近い赤色部ではより含量が少なかった。なお、エモジン、アロエエモジン、フィシオン等の遊離型アントラキノン誘導体は実際上瀉下効果は認められず、瀉下効果の主体は配糖体となった結合型アントラキノンであるという報告<sup>8)</sup>があるので、結合型アントラキノンの構成成分については今後の検討課題である。

### 3.2 品種別卵中の栄養成分の差異

コレステロール、総脂質、リン脂質及び脂肪酸(12種類)では5品種間での有意差は認められなかった(表4)。また、生卵黄中の一般成分及びミネラルでは、ホロホロ鳥でカルシウムが幾分多い傾向を示した(表5)。

なお、5品種については、さらに別の機能性成分等を分析調査していくことにより差異の認められる可能性が考えられる。

### 3.3 機能性成分添加卵(EPA添加卵)

図1から、魚油精製粉末の8%添加飼料による飼育2週間目において卵黄中へのEPA及びDHAの移行量は、ともに最高値が得られたが、それ以降は濃度が一定とならずに、減少しており、この原因については不明である。なお、EPA、DHAとも最高値の場合でもイワシ、サバに比べると少ない値であった。また、他の主な脂肪酸の移行状態であるが、 $\alpha$ -リノレン酸の変化はわずかであっ

たが、アラキドン酸は1週間目以降は初めのほぼ半分量に減少する傾向がみられた。ここで、EPAについて、魚油精製粉末8%添加飼料での飼育1週間目から11日目までの平均で卵黄粉末100g当り約0.3g程度の移行がみられた。このことは、もともと卵黄中にEPAは含有していないことを考慮すると、脂肪酸組成に新たに1成分追加されたという点から注目される。

## 4 まとめ

1) ルバーブ：ミネラル類、ビタミン類ともに他の野菜類に比べて特長は認められなかった。食物繊維はダイコン業程度であり、遊離シュウ酸含量はホウレンソウより少なく、また、アントラキノン誘導体は茎より根に大部分含有されていた。

2) 桑葉：ミネラル類、ビタミン類でせん茶より高かったのは、カルシウム、鉄、ナトリウム及びV.B<sub>1</sub>のみであった。食物繊維量は多く、乾重量当りではゴボウに近かった。

3) 鶏卵：5品種間で、コレステロール、リン脂質、脂肪酸(12種類)については有意差が認められなかった。また、魚油精製粉末を8%添加した強化飼料での飼育2週間目において卵黄中へのEPA、DHAの移行量は最大となった。

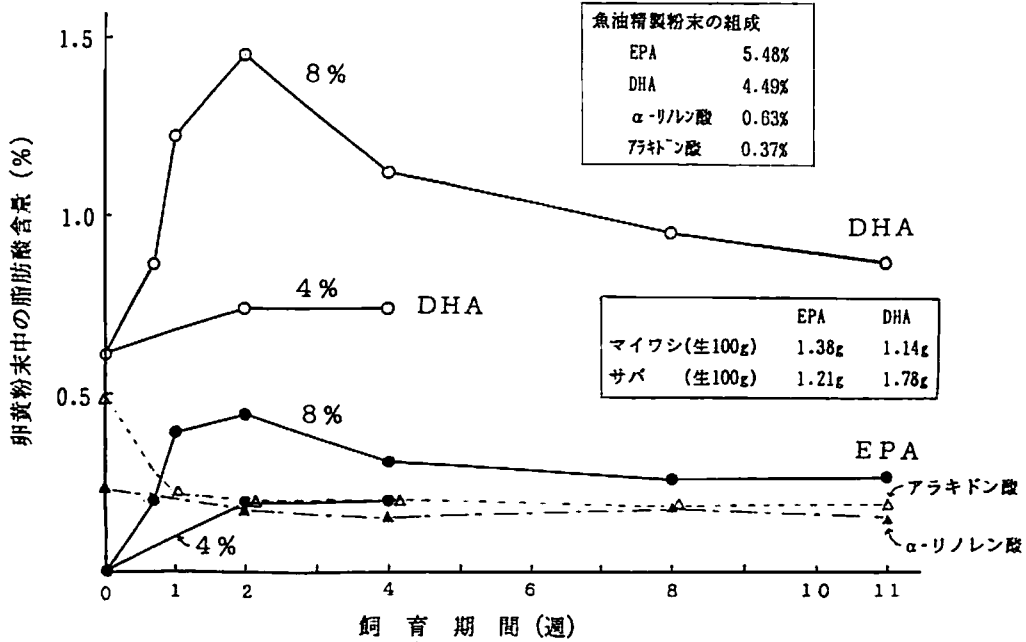


図1 EPA, DHA強化飼料による飼育期間と卵中へのEPA, DHA移行量との関係

今回、測定したのは各食品素材中の成分の一部であり、今後、さらに生理活性を有することの予想される機能性成分等を引き続き分析調査していく必要がある。ルバーブは結合型アントラキノン、桑葉はフラボノイド、タンニン類を、また、鶏卵は卵中への移行成分として鉄分及びV.C等を検討する計画である。

## 5 謝辞

本研究における各食品素材の成分分析は衛生研究所食品薬品部各員の協力によりますので、感謝いたします。

## 6 文献

1) 日本薬学会編「衛生試験法・注解」(1990), 金原出版

- 2) 地方衛生研究所全国協議会編「主要食品の食物繊維量測定に関する研究」(昭和63年度, 地研協健康報告 1989)
- 3) 菊水茂司, 高橋正祐; 栄食誌, 38, 123 (1985)
- 4) 天川映子, 大西和夫, 西島基弘, 坂井千三; 食衛誌, 29, 267 (1988)
- 5) 地方衛生研究所全国協議会編「日本国民の栄養摂取量の地域差に関する研究Ⅲ」(昭和59年度)
- 6) 日本油化学協会編「基準油脂分析試験法」
- 7) 中村径子; 栄養と食糧, 27, 33 (1974)
- 8) 第12改正日本薬局方解説書(1991), 広川書店

## (2) 桑葉中植物ステロールについて

岸 美智子 (衛生研究所)  
有賀 勲 (蚕業センター)

桑葉乾燥粉末から脂溶性成分を抽出し、キャピラリーガスクロマトグラフィにより分離し、植物ステロールの定性定量を行ったところ、シトステロールおよびスチグマステロールが検出され、含有量はそれぞれ0.046%、0.003%であった。

### 1 はじめに

植物葉中にその存在が知られている植物ステロール(フィトステロール)は、腸管においてコレステロールの吸収抑制効果を持つこと<sup>1)</sup>から、高コレステロール血症の改善に有効であると期待され、すでにその一種の $\beta$ -シトステロールを主成分とする医薬品も製造が許可されている。又、発ガンの誘導を阻害するという報告<sup>2)</sup>もある。

桑葉中脂質、不けん化物含有量は一般の植物の葉と同様の傾向にあるが、ステロール系脂質の主成分はシトステロールである<sup>3)</sup>ことから、桑葉摂取により生体の機能性に及ぼす影響が期待される。

蚕試料に適切な植物ステロール含量として0.2%<sup>4)</sup>の報告があり、桑葉中の含量として参考とされているが、多成分からなる植物ステロールからシトステロールを分離するのは困難さが伴うため、その含有量については明らかではない現状にある。

桑葉の機能性食品としての評価を行うに当たって、桑葉中の植物ステロールの定性を行い、その含有量を測定した。

### 2 試験方法

#### 2.1 植物ステロールの定性

通常の製法に従って製造した桑茶(一の瀬)を粉碎機で粉末とし桑葉粉末を作成し、ジエチルエーテルおよびメタノールにより成分を抽出する。抽出成分をヘキサン溶液とし、カートリッジ式シリカゲルカラム(Waters, SEP-PAK, SILICA CARTRIDGE)に吸着し、ヘキサン、ヘキサン、酢酸エチルエステル混液(98:2)、(90:10)、(50:50)、(20:80)および酢酸エチルエステルにより固液抽出を行った。各フラクションについて薄層クロマトグラフィ(TLC)を行い、ステロール性の呈色が観察された酢酸エチルエステル混液(98:2)、および(90:10)の溶出画分およびヘキサン溶出画分についてキャピラリーガスクロマトグラフィ(CGC)により

成分分離を行い、カラム保持時間およびマススペクトルの標準品との比較によって定性を行った。

#### TLCの条件

薄層板;シリカゲル60F<sub>254</sub>(MERCK)

展開液;ジエチルエーテル

検出;50%硫酸エタノール溶液噴霧後加熱

#### CGCの条件I

機種;シマズ14A

カラム;DB-1(25m × 0.2mm, 0.25 $\mu$ m)

注入量;1 $\mu$ l, 50℃1分トラップ後パージ

温度;60~270℃

検出;FID

#### CGCの条件II

機種;ヒュレットパッカーD5971Aシステム

カラム;HP-1(12m × 0.2mm, 0.33 $\mu$ m)

注入量;スプリットレス, 1 $\mu$ l

温度;60~270℃

検出;トータルイオン(TIC)およびマススペクトル(MS)

#### 標準品

$\beta$ -シトステロール;タマ生化学工業、

スチグマステロール;シグマ、

コレステロール;和光純薬

#### 2.2 $\beta$ -シトステロール及びスチグマステロールの含有量

上記と同じ桑葉粉末2.000gを還流冷却管をつけた容器に入れジエチルエーテル100mlを加え、40℃の水浴中で30分抽出する操作を3回繰り返し、ジエチルエーテルを留去する。残留物をヘキサンに溶かし、全量をカートリッジ式シリカゲルカラムに吸着させる。ヘキサン50mlで洗浄後、ヘキサン、酢酸エチルエステル(96:4)混液10mlおよびヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)混液15mlで溶出した画分について溶媒留去後2mlのヘキサン溶液とし、条件IによりCGCを行い、 $\beta$ -シトステロール及びスチグマステロールのピーク面積値による内部標準法(内部標準;コレステロール)により定

量した。

### 3 試験結果

#### 3.1 植物ステロールの定性

桑葉粉末から抽出した脂溶性成分をカートリッジ式シリカゲルカラムで分離したヘキサン、ヘキサン、酢酸エチルエステル混液および酢酸エチルエステルにより溶出した画分についてTLCにより分離し、ステロール成分の検出を行ったところ、ヘキサン、酢酸エチルエステル(98:2)画分およびヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)画分のRf値0.8付近に紅色を示すスポットが

また、酢酸エチルエステル画分のRf値0.1付近に紫色を呈するスポットが検出された。ヘキサンおよびヘキサン、酢酸エチルエステル(98:2)画分、ヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)画分のトータルイオンクロマトグラフ(TIC)は図の様であった(図1)。

TICで得られたピークについて質量分析を行い、ライブラリー検索を行ったところ、ヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)溶出画分(A)では14.8分のピークはシトステロールが、13.4分のピークはスチグマステロールが検索されたが、その他のピークからはステロール類は検索されなかった。ヘキサン、酢酸エチルエステル

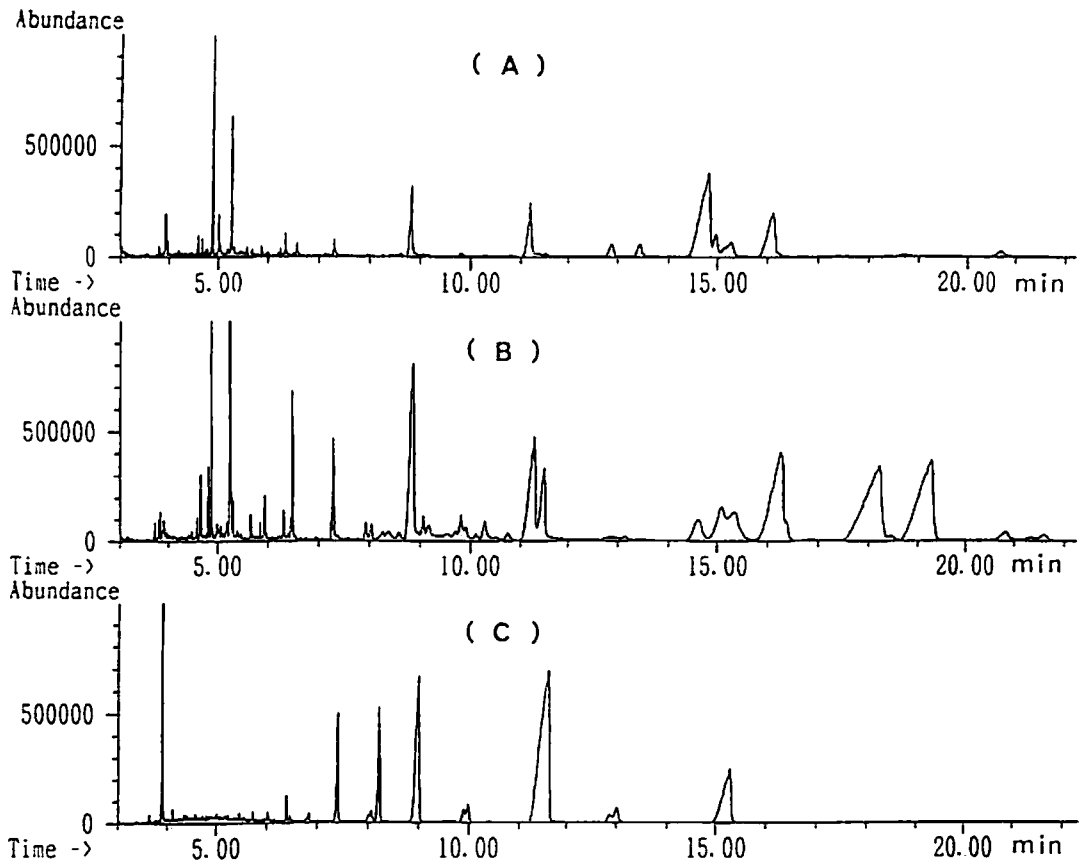


図1 桑葉の脂溶性成分のキャピラリガスクロマトグラフ  
(TICによる検出)

- (A): ヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10) 溶出画分
- (B): ヘキサン、酢酸エチルエステル(98:2) 溶出画分
- (C): ヘキサン 溶出画分



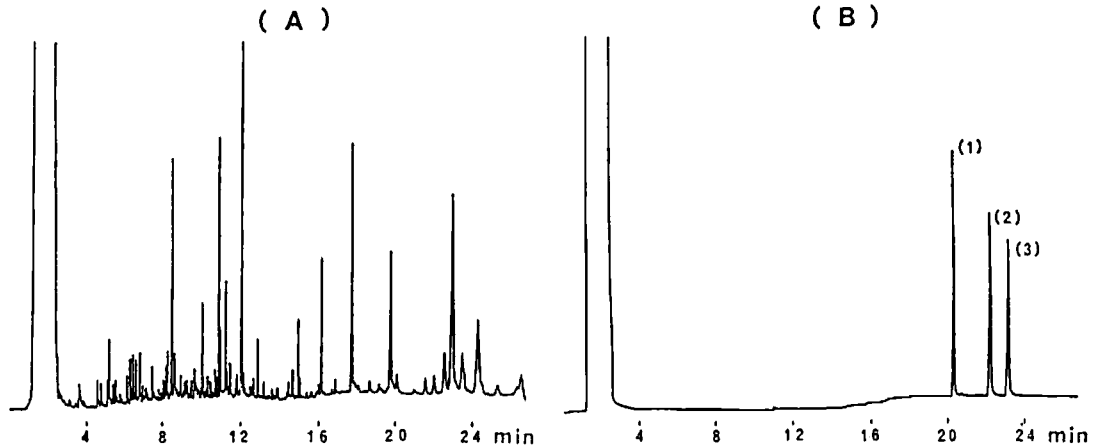


図2 桑葉の植物ステロールのキャピラリガスクロマトグラフ

(FIDによる検出)

(A): 桑葉ヘキサン、酢酸エチルエステル (90:10) 溶出画分

(B): 標準品(1)コレステロール(2)スチグマステロール(3) $\beta$ -シトステロール

(98:2) 溶出画分においても14.8分のピークは同じくシトステロールが検索されたが、その他のピークからはステロール類は検索されなかった。またヘキサン溶出画分のいずれのピークからもステロール類は検索されなかった。

シトステロールおよびスチグマステロールのピークについてカラム保持時間およびMSを標準品と比較したところ完全に一致していた。酢酸エチルエステル画分の紫色スポットは加水分解により消失し $\beta$ -シトステロール該当スポットが出現した。

以上により、桑葉中の植物ステロールは遊離の $\beta$ -シトステロール及びスチグマステロールおよびそれらの糖結合体であることが確認された。尚一般的植物ステロールとして知られているカンベステロールは、今回検出されなかった。

### 3.2 シトステロール及びスチグマステロールの含有量

シトステロール及びスチグマステロールのカートリッジシリカゲルカラムからの溶出を検討したところ、ヘキサンでは溶出は無いが、ヘキサン、酢酸エチルエステル(98:2)混液では溶出はあるものの幅広い溶出曲線を描き、酢酸エチルエステルの比率の増加に伴い溶出曲線はシャープとなった。両成分とも約1mgの吸着ではヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)混液20mlにより完全に溶出される。しかし、桑葉抽出物ではFIDでは検出されない緑色成分の溶出がヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)混液により開始された。

桑葉抽出物に約1mgずつ添加して、ヘキサンで洗浄後、ヘキサン、酢酸エチルエステル(96:4)混液10mlおよ

びヘキサン、酢酸エチルエステル(90:10)混液15mlで溶出した際の添加回収率は92.0%を示した。

本定量方法により行った桑葉中のシトステロールの含有量は $0.046 \pm 0.005\%$  ( $n=3$ )、スチグマステロールの含有量は $0.003 \pm 0.001$  ( $n=3$ )であった。

## 4 考察

今回試験した桑葉1g中にはシトステロールが $460 \mu\text{g}$ 含まれ、スチグマステロールは $30 \mu\text{g}$ 含まれていた。緑茶(伊藤園、ティパック入り)について、同様に定量したところ緑茶葉1g中にはシトステロールが約 $130 \mu\text{g}$ 含まれ、スチグマステロールはほとんど含まれていなかった。緑茶葉に比べ、桑茶葉中の植物ステロールは多いことが明らかであったが、桑茶および緑茶中にはいずれの遊離植物ステロールも検出されなかった。桑茶中には結合型シトステロールの存在が考えられるが、今回定量は行なわなかった。

人が通常の食事から一日に摂取するコレステロールは340mgであり、シトステロールは140mg、スチグマステロールは $14 \text{mg}^5)$ と考えられている。桑葉を1日10g食べるとすればそれぞれ4.5mg、0.3mgであり、全食事量中では寄与率が高いが、そのみで1日摂取量の改善にはつながらないと思われる。

尚、桑葉の脂溶性成分のヘキサン溶出画分中にはシクロオクタコサン等の炭化水素系化合物、トコフェロール等がTICおよびMSにより検出され、また多量の $\beta$ -カロテンが、TLCおよび吸光度測定により検出された。

## 5 謝 辞

キャピラリガスクロマトグラフィの使用に際して便宜をはかっていただいた当所伊藤伸一氏並びに藤巻照久氏に深謝致します。

## 6 文 献

- 1) I. Ikeda, M. Sugano : J. Lipid Res, **29**, 1573 (1988)
- 2) N. Niguro et al. : Natl. Cancer Inst., **69**, 103 (1982)
- 3) 遠藤節子ら : 東京学芸大紀要, 自然科学, **29**, 129 (1977)
- 4) 堀江保宏, 渡辺喜二郎 : 蚕試報, **20**, 393 (1983)
- 5) 森田邦正他 : 福岡県衛生公害センター年報, **11**, 73, (s 59)
- 6) 柳川弘明ら : 蚕試報, **30**, 569 (1988)

### (3) ルバーブ中のアントラキノン類の定量

大森 清美 (衛生研究所)

岸 美智子 (衛生研究所)

成松 次郎 (農薬総合研究所)

ルバーブ中に含有される成分の中で、ルバーブに特徴的であり生理活性を有する成分である、アントラキノン類について、薄層クロマトグラフ法(TLC法)及び液体クロマトグラフ法(HPLC法)により定性及び定量を行った。

#### 1 はじめに

ルバーブは、生薬大黄と同属の植物であり、大黄中の薬効(しゃ下)成分は、結合型アントラキノンであるセンノサイド類及びレイノサイド類である。大黄には結合型のほか遊離型アントラキノンであるエモジン、アロエエモジン、フィシオン、クリソフェノール、レインが検出され、それらにはしゃ下作用は認めないが<sup>1)2)</sup>、静菌作用<sup>3)</sup>、抗ウイルス作用<sup>4)</sup>、免疫複合体クリアランス促進作用<sup>5)</sup>、及び肝細胞障害抑制作用<sup>6)</sup>を有することが報告されている。

食用大黄とよばれるルバーブにも、これら結合型及び遊離型アントラキノン類の含有が考えられたため、定性及び定量を行った。

#### 2 方法

##### 2.1 結合型及び遊離型アントラキノン量の定量

ルバーブ茎、葉及び根を凍結乾燥後粉末とし、その約1gを精密に量り、メタノールを加えて超音波抽出した。遠心分離後、得られた上澄液に水及び塩酸を加え酸性とした後、エーテル抽出し、エーテル可溶性画分と水溶性画分とに分離した。

##### 2.1.1 結合型アントラキノン量

水溶性画分は塩酸及び塩化第二鉄を加え、1時間加熱した後エーテルで抽出し、得られたエーテル層を水酸化ナトリウム試液で抽出した。水酸化ナトリウム層を塩酸酸性とした後再びエーテル抽出し、エーテル層の溶媒を減圧留去した後、水酸化ナトリウム試液に溶解し、510nmで1, 8-ジヒドロオキシアントラキノンを標準品として比色定量を行った。

##### 2.1.2 遊離型アントラキノン量

エーテル可溶性画分は水酸化ナトリウム試液で抽出し、得られた水酸化ナトリウム層を塩酸酸性とした後、再びエーテル抽出した。エーテル層の溶媒を減圧留去した後、水酸化ナトリウム試液に溶解し、510nmで1, 8-ジヒドロオキシアントラキノンを標準品として比色定量を

行った。

##### 2.2 遊離型アントラキノン類の定性及び定量

##### 2.2.1 遊離型アントラキノン類の定性(TLC法)

##### 2.2.1.1 試料溶液の調整

ルバーブ茎の凍結乾燥粉末約5gにメタノール160mlを加え、30分間ずつ2回抽出を行った。遠心分離後、得られたメタノール層の溶媒を減圧留去し、メタノールエキスとした。メタノールエキスに水70mlを加え、エーテル70ml3回抽出し、得られたエーテル層の溶媒を減圧留去した後メタノール1mlに溶解し、TLCの試料溶液とした。

##### 2.2.1.2 TLC測定条件

薄層板; Precoated HPTLC Silicagel F254

(MERCK) (10cm×10cm)

展開溶媒; ベンゼン・酢酸エチル・酢酸 (75:24:0.2)

検出法; 366nmの紫外線照射及び5%水酸化ナトリウム溶液噴霧

##### 2.3 遊離型アントラキノン類の定性及び定量(HPLC法)

##### 2.3.1 試料溶液の調整

ルバーブ茎の乾燥粉末約1.0gをメタノール30mlで30分間振とう抽出しこれを3回繰り返した。遠心分離により得られたメタノール層の溶媒を減圧留去し、水を加えて溶解した後、エーテル抽出して得られたエーテル可溶性画分をアセトニトリルに溶解し正確に25mlとし、次のHPLC条件で定性及び定量を行った。

##### 2.3.2 HPLC測定条件

カラム; Lichrosphere RP-18, 4mm×250mm (MERCK)

移動相; A; 2%酢酸溶液

B; アセトニトリル

検出波長; 280nm

溶媒混合比及び流量;

条件-1 (レイン、アロエエモジン、エモジン)

0 min→15min; B; 30%, Flow; 1.0ml/min→0.7ml/min

15min→30min; B: 30%→50%, Flow; 0.7ml/min  
 30min→60min; B: 50%→60%, Flow; 0.7ml/min  
 条件-2 (クリソファノール、フィシオン)

A・B (40:60)

Flow; 1.0ml/min

検量線; エモジン; 5~20mg/mlのエモジンを含む標準液20μlを注入して得られたクロマトグラムのピーク面積値により検量線を得た。

アロエエモジン; 0.16~1.6mg/mlのアロエエモジンを含む標準液20μlを注入して得られたクロマトグラムのピーク面積値により検量線を得た。

フィシオン; 0.2~0.8mg/mlのフィシオンを含む標準液20μlを注入して得られたクロマトグラムのピーク面積値により検量線を得た。

### 3 結果

ルバーブ茎中の結合型アントラキノン量は、生重量1gあたり、1, 8-ジヒドロオキシアントラキノン量として0.04mgであり遊離型アントラキノン量は0.01mgであった。(表1)

TLC法による定性では、エモジンは標準液と同一スポットが確認されたが、アロエエモジンについては試料液でのスポットがあまり鮮明でなかった。フィシオン及びクリソファノールについては、TLCではRf値がほぼ同一であるため、定性が困難であったが、HPLC法によりフィシオンであることが確認された。(図1)

レインは、TLC法においては類似スポットが検出されたが、HPLC法においては標準液と同一ピークは認められなかった。

また、ルバーブ中の遊離型アントラキノン類をHPLC法により定量した結果、エモジンは生重量1gあたり6μg、アロエエモジンは0.4μgであった。(表2)

表1 ルバーブ中の結合型及び遊離型アントラキノン量

部位	結合型アントラキノン (μg/g)	遊離型アントラキノン (μg/g)
茎(乾燥)	0.5	0.2
(生)	0.04	0.01
葉(乾燥)	0.8	4.0
(生)	0.06	0.28
根(乾燥)	5.7	3.1
(生)	1.71	0.93

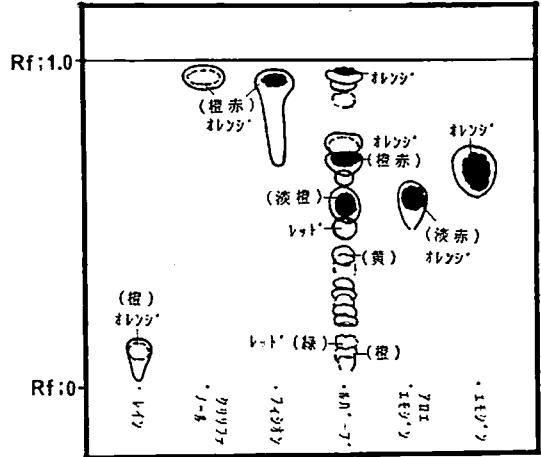


図1 遊離型アントラキノン及びルバーブ抽出エキスの薄層クロマトグラム

カタカナ; UV366nm照射(5% NaOH噴霧後の発色)

○; UV254nmにおける吸収

表2 各種遊離型アントラキノンの定量結果

Sample	Emodin (μg/g)	Aloeoemodin (μg/g)	Physcion (μg/g)
1990(乾燥)	103.5±2.0	6.7±0.9	9.7±0.2
(生)	6.3±0.1	0.4±0.1	0.6±0.0
1991(乾燥)	103.3±11.7	6.9±0.8	1.4±0.2
(生)	6.3±0.7	0.4±0.0	0.1±0.0

### 4 むすび

ルバーブ茎中のアントラキノン量は、1, 8-ジヒドロオキシアントラキノンに換算して、生重量1gあたり結合型アントラキノン量は0.01mgで根の約100分の1、また遊離型は0.04mgで根の約40分の1であった。

また、ルバーブ中の遊離型アントラキノン類の構成成分は、エモジンを主としてアロエエモジン、フィシオンの3成分が確認された。エモジンは生重量1gあたり6μg、アロエエモジンは0.4μgであった。

### 5 文献

- 1) 松岡俊郎; 生薬 15, 113 (1961)
- 2) 鶴見介登ら; 日薬理誌 65, 649 (1969)
- 3) 陳涼華ら; 薬学学報 11, 258 (1964)
- 4) May, G., et al; Arzneim.-Forsch. 28, 1 (1978)
- 5) Tanaka, M., et al; 和漢医薬誌 4, 1 (1987)
- 6) Yang, L. L., et al; 和漢医薬誌 7, 28 (1990)

## (4) ルバーブの一般成分の分析

廣部 誠\* (農業総合研究所)

吉田 誠 (農業総合研究所)

新食品素材として期待されるルバーブの一般成分の分析調査を無機成分を中心に行った。本報告では、品種間差と採集時期による、また、施肥条件と採集時期による一般成分の変動を無機成分を中心に検討した。その結果、カリウム、窒素、リン、カルシウム、マグネシウムが多量に含まれていた。また、それぞれの成分含量に要因による変化が認められた。

### 1 はじめに

県内で生産され、また新たに地域特産物となる可能性を有する野菜のうち、生体調節機能を有する可能性の高いルバーブを対象に、一般成分の解明、評価を行うための基礎調査として無機成分の分析調査を行ったので、その結果を報告する。

### 2 方法

#### 2.1 品種・収穫時期による一般成分の変化

平成2年に農業総合研究所葉根菜科で栽培された“マイアッツ・ビクトリア”と“SNO4142”の2品種を供試した。採集は4月25日、5月9日、5月28日、6月12日、6月25日の5回とした。

採集後、葉身を切除し葉柄部のみを分析に供した。試料の一部を水分測定用に用い、その他の試料は-30℃で凍結後、凍結乾燥機により乾燥を行い、ウイレーの粉砕機で粉砕し、2mmのふるいを通した試料について分析を行った。

分析項目は、水分(105℃、24時間乾燥)、窒素(ケルダール法)、リン(パナドモリブデン酸アンモニア法)、カリウム、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、鉄、マンガン、銅、亜鉛(原子吸光法)について分析を行った。

#### 2.2 施肥量・収穫時期の違いによる一般成分の変化

平成3年に農業総合研究所葉根菜科で追肥の施肥量試験が行われた“マイアッツ・ビクトリア”を供試した。施肥量試験は、追肥で年間0、10、20、40kg/10aの4区。肥料はNK化成で、1回当たり5kgを4～6月に2～8回に分け施用した。採集は4月23日、5月21日、6月26日の3回とした。

採集後の処理、分析は2.1に準じた。

### 3 結果

#### 3.1 品種・収穫時期別の一般成分の変化

品種・収穫時期による成分変動を第1図に示した。

##### 1) 外観

分析に供した葉柄の長さは40～70cmで、葉身部に対する葉基部の割合は、“マイアッツ・ビクトリア”が58.4%、“SNO4142”62.2%であった。また、時期によって“SNO4142”はス上がりがかかなり認められたが、“マイアッツ・ビクトリア”はほとんどみられなかった。

##### 2) 乾物率

乾物率は、品種間に差がみられ“マイアッツ・ビクトリア”が4.92%であったのに対して、“SNO4142”は6.20%と高く推移した。また、収穫時期別の経時変化については両品種ともに収穫中期に乾物率が高まる傾向がみられた。

##### 3) 多量要素

カリウム、カルシウムについてみると、“マイアッツ・ビクトリア”が高く、窒素、リン、マグネシウムは“SNO4142”が高い傾向にあった。経時変化について、窒素、カリウムは収穫初期が高く、中期に低下して以後増加傾向にあった。他の成分については含有率が低く、一定の傾向はみられなかった。

多量要素のなかで、最も多い成分はカリウムで(2.64～4.27%)、次々が窒素(1.12～2.25%)、リン(0.28～0.47%)、カルシウム(0.19～0.63%)、マグネシウム(0.12～0.33%)、ナトリウム(0.02～0.03%)の順であった。

##### 4) 微量要素

微量要素のうち鉄は17.9～33.5ppm、マンガンが15.7～35.5ppm、亜鉛が9.6～16.4ppm、銅が2.67～4.78ppmで概して低かった。

品種間差は、“マイアッツ・ビクトリア”が“SNO4142”に比べてマンガンが高く、亜鉛が低い傾向がみられたが鉄、銅には差がみられなかった。経時変化につ

\*現 園試根府川分場

いては“SNO4142”のマンガンが収穫2回目の5月9日が最低濃度となり、以後高まる傾向がみられた他は一定の傾向はみられなかった。

### 3.2 施肥量の違いによる一般成分の変化

施肥量の違いによる成分変動を第2図に示した。

#### 1) 乾物率

乾物率について、無追肥区は収穫期の遅い時期ほど高まったが、10、20、40kg区は5月の収穫で最も高く、6月収穫ではやや低下した。

#### 2) 多量要素

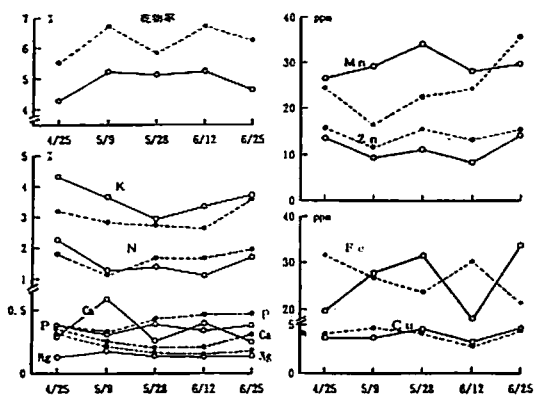
窒素含有率について、無追肥区は5、6月の作物体が、4月の作物体に比べて低い値を示したが、10~40kg区は経時的に濃度が高まり、また追肥回数が多い区ほど高かった。

カリウムの含有率は経時的に低下し、無追肥区ほど低下が大きかった。

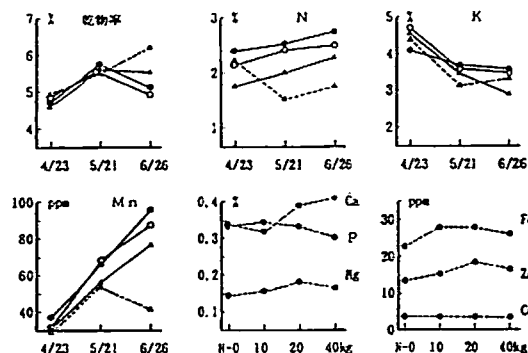
4) リン、カルシウム、マグネシウムの含有率は低いが、リンは追肥回数が少ない区ほど経時的に高まる傾向がみられたが、追肥回数が多い区での変化は少なかった。カルシウム、マグネシウムは追肥回数が少ない区で経時的に低下し、追肥回数が多い区では高まる傾向がみられた。

#### 3) 微量要素

微量要素のうち、マンガンは無追肥区の含有率が低く、濃度の変化も少なかったが、追肥区は経時的に濃度が高まり、また追肥回数が多い区ほど高まった。



第1図 品種別ルバーブ葉柄中の無機成分含量  
(○---○ M・B, ●---● SNO)



第2図 施肥量別ルバーブ葉柄中の無機成分含量  
(△---△ N-0kg, ▲---▲ N-10kg, ○---○ N-20kg, ●---● N-40kg)

鉄は17.1~43.8ppm、亜鉛は12.6~23.2ppmの範囲であったが、5月収穫時で高く、追肥回数が多い区ほど高い傾向がみられた。銅は1.81~5.31ppmで低く、追肥回数の影響は少なかった。

## 4 考察

一般成分の変化を調査した結果、各要因により成分に変化が見られた。

品種、追肥による比較試験ともに乾物率に特徴が認められた。食品素材として用いる場合、原料の水分状態がその保存、加工処理に影響を与える。各要因による乾物率の変動をおさえることが重要である。

無機成分は、多量要素としてカリウム、窒素、カルシウム、微量要素としてマンガン、亜鉛、鉄、銅が含まれることがわかった。一定の傾向は確認できなかったがそれぞれの要因により変動があった。これは、栽培上の変動要因が多くあるためである。必要な因子については、条件を絞って検討する必要がある。

## 5 むすび

ルバーブの一般成分の検討を進めているが、利用に当たり各成分の状態を把握することは重要である。さらに検討する項目を加え、ルバーブを用いる基礎資料とした。

## 6 文献

- 1) 神奈川県農業総合研究所；流通技術試験成績，38，39-40
- 2) 神奈川県農業総合研究所；流通技術試験成績，39，23-24

(5) 桑葉の一般成分の乾燥方法による差異

高橋 恭一 (蚕業センター)  
 鈴木 誠 (蚕業センター)  
 有賀 勲 (蚕業センター)

桑葉は古来より生葉として用いられており、その成分には各種の機能性物質が含有されている可能性が高く、機能が明らかにされ、適切な加工・調理法が確立されれば、高付加価値型食品素材として有望であると考えられる。桑葉を素材とした食品を創製する場合、お茶のように浸出液を飲用するか、乾燥粉末として食品に添加することが考えられる。桑葉は乾燥体が生葉に比べて保存が容易であることから、天日で乾かす自然乾燥、熱風乾燥機を用いた熱風乾燥、製茶機を用いた製茶機乾燥、凍結乾燥機を用いた凍結乾燥法で乾燥し、それぞれの乾燥方法別に一般成分(粗蛋白質、粗脂肪、粗灰分、水分率)を分析したところ、大差は認められなかった。製茶機乾燥法は1工程(約2時間)で30kgの生桑葉から、約6kgの乾燥桑葉を生産することが可能で、この方法で大量の乾燥粉末の生産が可能となり、桑葉を食品素材として利用する調整法として一つの有望な手段であると考えられる。

1 はじめに

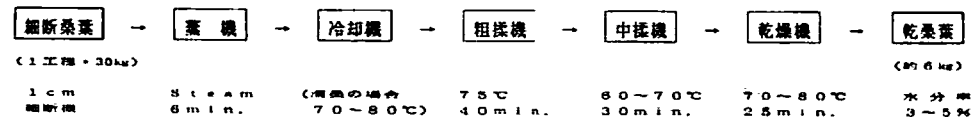
桑葉の成分には各種の機能性物質が含有されている可能性が高く、その機能が明らかにされ、適切な加工・調理法が確立されれば、高付加価値型食品として有望であると考えられる。桑葉を素材とした食品としては、お茶のように浸出液を飲用する形態のほか、乾燥粉末として食品に添加することが考えられる。また、桑葉を保存するには生葉よりも乾燥した形態が適当であると思われる。そこで桑葉を異なる方法(4方法)で乾燥し、品種別(3品種)、時期別(2時期)、採取部位別(2部位)に一般成分を分析し、栄養評価をするとともに、最適な乾燥方法を見出すための資とした。

乾燥工程を図1に示した。

この方法は約1cmの幅に細断した桑葉を蒸機で蒸し、粗揉機で75℃、40分間、中揉機で60~70℃、30分間、それぞれ処理した後、透気式乾燥機で60~70℃、25分間乾燥するもので1工程は約2時間である。供試した桑品種は本県で多く栽培されているカラヤマグワ系の「一ノ瀬」、「一ノ瀬」と同じ系統で近年品種登録された「しんいちのせ」、この2つの品種とは系統が異なり、積雪・寒冷地向け品種であるヤマグワ系の「しんけんもち」の3品種である。葉の採取時期は春(6月11日)、秋(9月18日)の2時期とし、枝条の全部位からくまなく採取した。また、採取部位別の一般成分を検討するため、3品種のそれぞれの枝条に着生している葉を枝のほぼ中間部から上を上葉位、下を下葉位とし、部位別に採取した。採取部位別の乾燥方法については、熱風乾燥法、凍結乾燥法の2方法で検討した。それぞれの一般成分についての分析方法は、粗蛋白質についてはケルダール法により測定した。粗脂肪についてはソックスレー脂肪抽出器を用い、

2 方法

乾燥方法は天日で48時間乾かす自然乾燥法、熱風乾燥機を80℃に設定し、24時間乾燥する熱風乾燥法、製茶機を用いた製茶機乾燥法、-80℃で真空凍結乾燥する凍結乾燥法の4方法である。供用した製茶機(伊達式)の乾



(参考) 製茶(煎茶)の製造工程

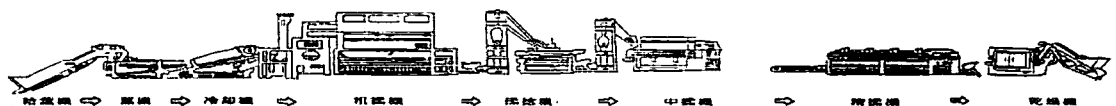


図1 製茶機(伊達式)による桑葉の乾燥工程

桑葉の一般成分の乾燥方法による差異

エチルエーテルで15時間抽出した。粗灰分については電気マッフル炉を550℃に設定し、試料を6時間燃焼させ、燃焼前後の重量差から求めた。水分率については熱風乾燥機を80℃に設定し、試料を12時間乾燥して乾燥前後の重量差から求めた。

3 結果

乾燥方法を異にした一般成分分析結果を表1に、採取部位を異にした分析結果を表2にそれぞれ示した。

春における粗蛋白質含量は、品種間の差異は認められなかったが、自然乾燥法で24%を超えていたのに対し、他の乾燥方法では21~23%であった。秋においては、品種間で若干の差が認められ、「しんけんもち」が高い傾向を示し、自然乾燥法で約26%、他の乾燥方法では24~25%であったのに対し、その他2品種ではそれぞれ1~2%少なかった。粗脂肪は各品種とも、春において製茶機乾燥法は2%に満たなかったのに対し、他の乾燥方法はそれぞれ2~4%であった。秋においてはそれぞれ3~4%程度に対し、4~6%であった。粗灰分は各

品種とも、春においては自然乾燥法は13~15%台であったのに対し、他の乾燥方法では11~13%台であり、秋ではいずれの乾燥方法でも、それぞれ15~16%台に対し、14~15%台であったが、品種間での差異は認められなかった。水分率は春において自然乾燥法と凍結乾燥法は8~12%であったのに対し、熱風乾燥法は5~6%、製茶機乾燥法は3~4%程度であった。秋において自然乾燥法は9%前後であったのに対し、他の乾燥方法では3~6%程度であった。

採取時期別にみると、粗蛋白質、粗脂肪、粗灰分は春より秋が多く、水分率は逆に秋より春が高い傾向を示した。

品種別では、粗蛋白質が秋の「しんけんもち」で約24~26%と多い結果が得られたが、他は明瞭な差は認められなかった。

葉の採取部位別においては粗蛋白質は「しんいちのせ」を除いて春、秋ともに上葉位が23~25%であったのに対し、下葉位は17~22%であった。一方、粗脂肪と粗灰分は下葉位が上葉位より多い傾向を示した。

表1 乾燥方法を異にした桑葉の一般成分

桑 品 種	採取時期	採取部位	自然乾燥				熱風乾燥				製茶機乾燥				凍結乾燥			
			粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率
一ノ瀬	春	全葉位	24.52	2.50	13.61	10.9	22.71	2.94	12.31	5.7	21.74	1.89	12.07	2.9	22.02	2.23	11.65	8.5
しんいちのせ	"	"	24.36	2.31	14.09	11.3	22.61	2.57	12.95	5.3	21.59	1.56	12.23	4.0	21.43	2.51	12.47	10.4
しんけんもち	"	"	24.11	2.28	15.14	10.7	22.27	3.34	13.53	5.3	22.25	1.72	13.05	3.0	22.05	2.06	13.10	11.3
一ノ瀬	秋	全葉位	24.38	4.45	15.71	9.5	23.35	5.20	15.51	5.2	23.98	3.97	14.55	4.0	23.58	4.52	15.41	6.2
しんいちのせ	"	"	24.63	4.68	15.46	9.5	23.28	5.17	14.82	4.9	23.72	3.53	14.15	3.7	23.99	4.77	14.58	4.9
しんけんもち	"	"	26.01	4.71	15.11	8.9	25.06	4.55	14.00	4.7	24.87	4.04	14.34	3.3	24.36	4.94	15.43	3.7

表2 採取部位を異にした桑葉の一般成分

桑 品 種	採取時期	採取部位	熱風乾燥				凍結乾燥			
			粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	水分率
一ノ瀬	春	上葉位	23.72	3.22	10.67	6.5	25.54	2.14	10.44	6.4
"	"	下葉位	21.12	3.05	13.70	6.8	17.44	2.67	11.77	6.0
しんいちのせ	"	上葉位	20.55	2.65	10.03	6.6	23.65	2.56	10.00	9.0
"	"	下葉位	22.16	2.88	13.79	6.1	19.87	2.46	13.36	7.1
しんけんもち	"	上葉位	24.12	3.16	9.88	7.5	25.02	2.03	10.58	4.7
"	"	下葉位	20.96	3.36	13.91	7.7	20.93	2.34	14.26	7.2
"	秋	上葉位	26.61	4.93	12.50	5.2	26.25	4.25	12.11	5.3
"	"	下葉位	21.00	6.27	15.69	4.8	21.95	6.50	16.52	4.9

採取日 春：6月11日 秋：9月18日



#### 4 考察

桑葉の乾燥方法については、蚕の人工飼料を調整する際に桑葉粉末を添加することから、以前から検討されている。葉が十分に乾燥すると平衡水分が低下し、比較的吸湿し難くなるので桑葉粉末の含水率は少ないほうが望ましい<sup>1)</sup>。製茶機乾燥法で調整した蚕の人工飼料原料としての適性は蚕の飼育経過、虫質、繭重、繭層歩合等、いずれの点においても熱風乾燥法に劣らないことが報告されている<sup>1)2)</sup>。また、製茶機乾燥法は乾燥粉末調整の第1段階に「蒸す」という工程があるが、それと同様な方法で沸騰水中に5分間浸漬した後、熱風乾燥した桑葉は単なる熱風乾燥処理より蚕に対して飼料価値が高い結果が得られたという報告例もある<sup>3)</sup>。製茶機乾燥法は他の乾燥方法と比較して水分率が低く、粗蛋白質、粗灰分は大差がなかった。粗脂肪については若干他の乾燥方法より低かったが、これは「蒸す」という工程で脱脂されたことに起因するものと思われる。供用した製茶機では1工程(約2時間)で30kgの生葉から、約6kgの乾燥桑葉を生産することが可能であった。この方法によって得られた乾燥葉は水分率(保存性)、栄養面で他の乾燥方法

のものと遜色がなく、乾燥効率の点でも適していると思われる。

#### 5 むすび

製茶機(伊達式)を用いて1日7時間運転を行うと、10工程、300kgの生葉が処理され、約60kgの乾燥桑葉が得られる。この方法は、桑葉を機能性食品素材として利用するために適した一つの有効な乾燥方法であるが、今後は、乾燥方法別に粗繊維、ミネラル等、他成分を分析し、これらの結果と併せてさらに検討することが課題である。

#### 6 文献

- 1) 松田基一, 藤野 昭, 遊佐富士雄; 蚕糸試験場彙報, 96, 67-75 (1973)
- 2) 三好健勝, 宮沢福寿; 日本蚕糸学会講演要旨集, (39); 30 (1969)
- 3) 伊藤智夫, 堀江保宏, 田中元三, 渡辺喜二郎; 蚕糸試験場報告, 18, 251-265 (1963)