

## 植物葉の低温灰化像におけるシュウ酸カルシウムの観察

星川玄児, 藤井正也\*

OBSERVATIONS OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS IN LOW-TEMPERATURE  
ASHED PATTERNS OF PLANT LEAVES

Genji HOSHIKAWA and Masaya FUJII

The low-temperature ashers (Model LTA-504) gently removed organic matrices from tomato leaves preserving mineral microstructures. Clustered crystals of calcium oxalate with diameter about 10~40 $\mu$  were observed in the ashed tomato leaves. This calcium oxalate was the monohydrate  $\text{Ca}(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Observations of calcium oxalate crystals in ashed leaves of several plants were also carried out. Clustered crystals were observed in spinach. White clover was characterized by solitary crystals deposited along the vein. No crystal found in lettuce, daikon-radish, Chinese cabbage, and leaf mustard.

トマト植物の乾燥葉粉末および新鮮葉を用いて、低温灰化装置による植物組織の最適灰化条件を検討した。4チャンパー当り高周波出力50W, 空気流量50ml/min, 圧力1mmHgで良好な灰化像が得られた。灰化像の顕微鏡観察によつて、トマト葉中にはシュウ酸カルシウムが直径10~40 $\mu\text{m}$ 程度の集晶をなして存在することを認めた。この結晶は1水塩であった。他の数種植物についても灰化像中のシュウ酸カルシウムを観察したが、ホウレンソウにはトマトと同じ集晶が、ホワイトクローバーには葉脈に沿って単晶が認められたが、レタス、ダイコン、ハクサイおよびカラシナにはいずれの結晶も認められなかった。

## 緒 言

植物組織中の各種無機成分の分布状態を明らかにするために、従来、オートラジオグラフィ、組織化学的方法、X線マイクロアナライザー法あるいは泳動エレクトログラフィー<sup>(1-5)</sup>などが目的に応じて使用されている。灰化法<sup>(6, 7)</sup>はこのうち組織化学的方法の一手法として、古くから植物分類学、生薬学などの領域で多く利用されてきたが、高温灰化法によるため、組織の微細構造が失われやすく、また組織中に散在する無機結晶も熱分解で化学組成あるいは結晶形が変化するなどの欠点が認められた。

最近、酸素を低圧下で高周波によつて励起した際に発生する低温のプラズマ酸素を利用して、有機物を酸化分解する低温灰化法が可能になり、本法による灰化像が穂積、梅本らによつて、主として生薬学的研究に応用されてきている<sup>(8-10)</sup>。植物組織の低温灰化像では組織の微細構造がよく保たれると同時に、多くの無機結晶の構造および組成も変化しないで残存する<sup>(20)</sup>。さらに、低温灰化法の著しい特徴は、高温灰化法では炭酸カルシウムあるいは酸化カルシウムに変化するシュウ酸カルシウムが、組織中に完全に保存されることである。他の有機物がすべて灰化されて消失する条件下で、シュウ酸カルシウムが保存される事実については、有機物の低温燃焼機構は原子状酸素の水素引き抜きを起動力としているが、シュウ酸カルシウムでは水素がカルシウムで置換されているため、不活性化しているものと考えられ

\* 現在勤務先：森下製薬KK

ている(8,21)。

著者らは植物のカルシウムの栄養診断の立場から、植物組織の低温灰化像中のシュウ酸カルシウムの分布を観察するために、分析用低温灰化装置(LFE社製LTA-504型)による植物葉の最適灰化条件を検討した。さらに、得られた条件によって数種植物葉の灰化像を光学顕微鏡によって観察した。以下にその結果を報告する。

## 実験および結果

### 1. 装置

LFE社製LTA-504型低温灰化装置を使用した。本装置は口径8cm,長さ20cmのパイレックス製のガラスチャンパー4本を有し、高周波出力は4チャンパー当りの合計W数が表示されるので、以下の実験では合計W数/4を1チャンパー当りの出力とした。ガス流量についても同様である。4チャンパーの灰化の均一性を予め検討したが、1チャンパーが異なる灰化速度を示したが、他の3チャンパーには有意の差が認められなかったので、以下の実験ではこの3チャンパーを平行して使用した。

### 2. 灰化条件の検討

高周波出力、ガス流量、減圧度、灰化時間を変えて、植物組織の微細構造が十分保持される条件を求めた。使用ガスは酸素のほかに空気を併用した。なお、チャンパー内の灰化試料位置は、灰化の穏やかなことと、灰化中の試料の観察が容易なことから、チャンパーの口から約5cmと定めた。

#### 2.1 植物粉末試料による灰化条件の検討

有機物の灰化パラメーターの測定に、元素分析用標準物質のしょ糖を用いた例があるが<sup>(21, 22)</sup>、本実験では灰分含量を考慮して、トマト葉の乾燥微粉末を調製して用いた。粉末試料100mgを4.5×7.5cmのガラス板上に、試料の厚さが約1mmになるように広げ、種々の灰化条件下での燃焼速度を求めた。得られた結果をFig.1~3に示す。

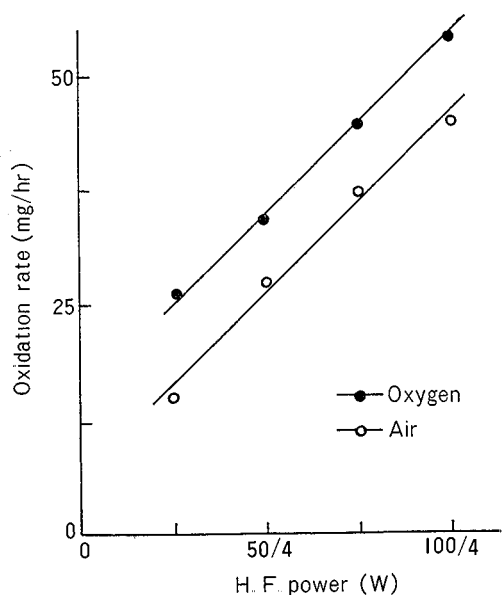


Fig. 1 Effect of H.F. power on the oxidation rate of ground tomato leaves  
Flow rate: 50/4 ml/min, Pressure: 1 mmHg, Sample location: 5cm from lid of chamber

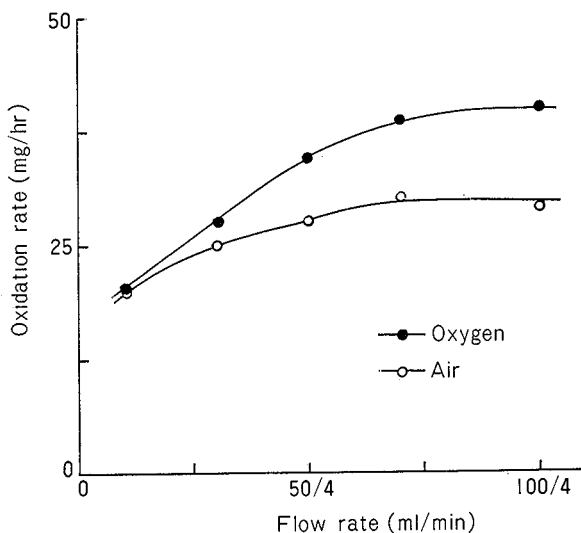


Fig. 2 Effect of gas flow rate on the oxidation rate of ground tomato leaves  
H.F. power: 50/4 W, Pressure: 1mmHg, Sample location: 5cm from lid of chamber

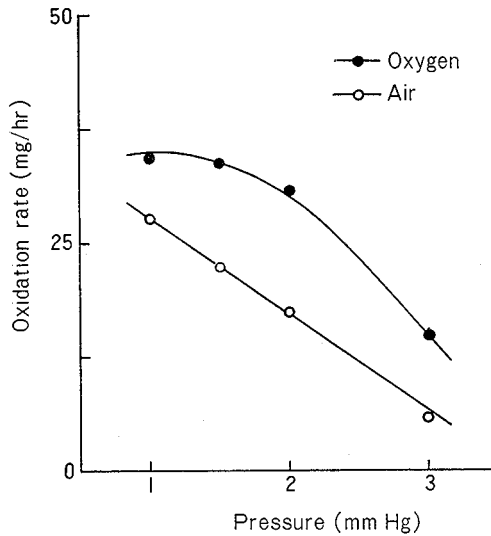


Fig. 3 Effect of gas pressure on the oxidation rate of ground tomato leaves  
 H.F. Power: 50/4 W, Flow rate:  
 50/4 ml/min, Sample location: 5 cm  
 from lid of chamber

Fig. 1は流量50/4 ml/min, 圧力1 mmHgとして高周波出力を変化させて燃焼速度をプロットしたものである。酸素を流した場合, 空気を流した場合ともに, 高周波出力と燃焼速度はよい直線性を示し, 且両直線は平行している。Fig. 2は高周波出力50/4 W, 圧力1 mmHgとしてガス流量と燃焼速度の関係を示したものである。酸素, 空気ともに流量の増加に従って燃焼速度は増大するが, 流量70/4 ml/min以上では燃焼速度はほぼ一定となる。Fig. 3は高周波出力50/4 W, 流量50/4 ml/minとして圧力と燃焼速度の関係を示したものである。本装置では流量50/4 ml/minで1 mmHg以下の圧力は調節不能であった。減圧度の高いほど燃焼速度は増大したが, とくに空気の場合にその効果が大きかった。以上の結果を総合して, 灰化が穏やかであると同時に, 実用的に灰化所要時間が極端に長くない条件として, 高周波出力50/4 W, 空気流量50/4 ml/min, 圧力1 mmHgを一応選定した。

上記の条件で試料100mgの灰化所要時間を求めた。なお, 対照として上記の実験で最も燃焼速度の大であった高周波出力100/4 W, 酸素流量100/4 ml/min, 圧力1 mmHgの場合についても灰化所要時間を求めた。得られた結果をFig. 4に示す。

対照の条件下での灰化はきわめて急激で, 4時間後には完全に灰化されて残存灰分量は一定になった。選定した条件下での灰化は穏やかであり, 50時間後に残存灰分量が対照の条件下の場合に一致した。

## 2.2 新鮮植物葉による灰化条件の検討

2.1の実験で選定された灰化条件で新鮮植物葉について好適な灰化像が得られるか否かを検討した。

トマト植物の葉をスライドガラスにセロテープで固定したものを一定条件で灰化し, カナダバルサム of キシロール溶液(2:3)を灰化試料に少しずつ浸透させ, 約12時間静置後, 上記溶液(6:1)を滴下し, カバーガラスをのせて検鏡する<sup>(11)</sup>。

まず, 空気流量50/4 ml/min, 圧力1 mmHgにして高周波出力を25/4~100/4 Wの範囲で変化させたと, 50/4 Wで6時間の灰化で良好な灰化像が得られた。つぎに, 高周波出力50/4 W, 圧力1 mmHgで空気流量を10/4~150/4 ml/minの範囲で変化させて灰化像を検討した。空気流量の影響は高周波出力ほどは著しくなかったが, 流量が少ないほど灰化像が良好であった。ただ, 低流量では灰化時間が著しく長くなり, 結局流量50/4 ml/minで5~6時間の灰化で良好

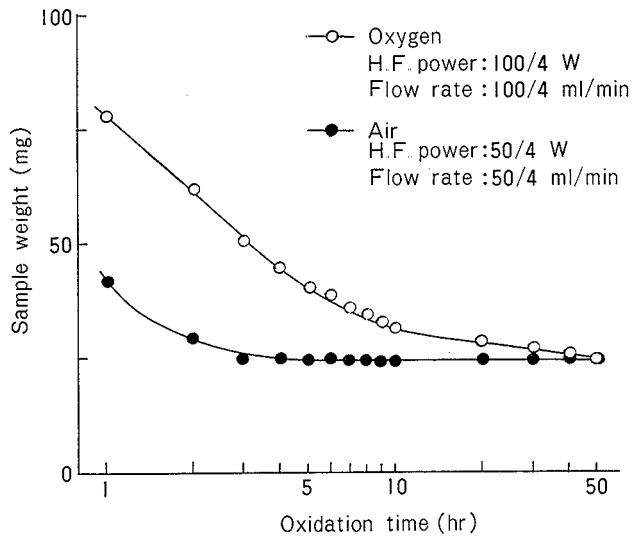


Fig. 4 Time Course of changes in the weight of ground tomato leaves  
 Initial sample weight: 100mg, Pressure: 1 mmHg, Sample location: 5 cm from lid of chamber

な灰化像が得られた。

以上から、2.1 で選定された灰化条件で6時間灰化を行えば、良好な灰化像が得られることが明らかになった。本条件下の灰化で得られたトマト葉の灰化像を Fig. 5 に示す。

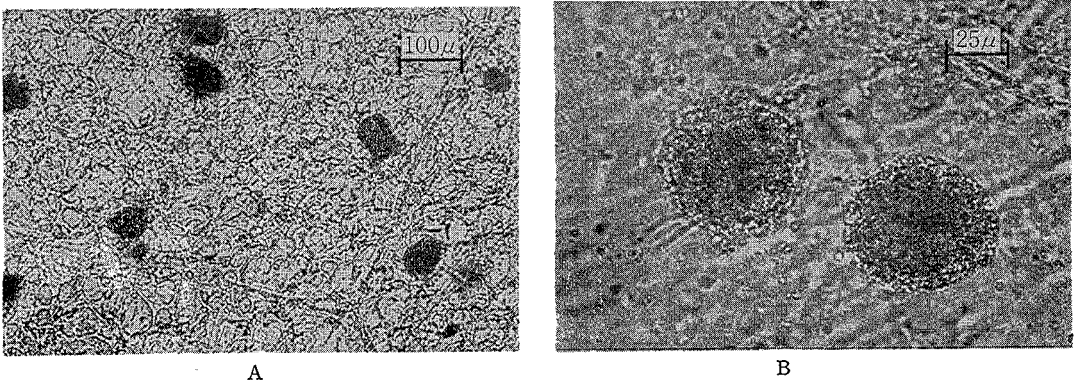
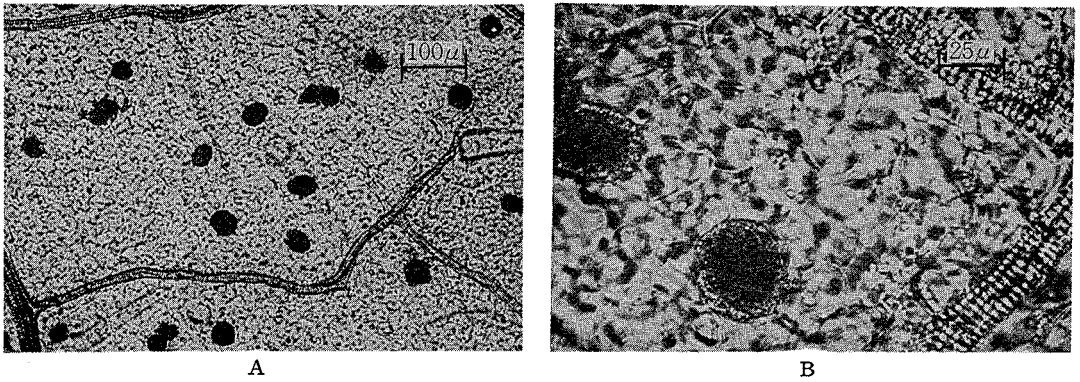


Fig. 5 Calcium oxalate crystals in ashed tomato leaves  
 H.F. power: 50/4 W, Flow rate of air: 50/4 ml/min, Air pressure: 1 mmHg, Sample location: 5 cm from lid of chamber

Fig. 5 Aにみられるように、葉の微細構造がよく保存されている。Fig. 5 BはAにみられるシュウ酸カルシウムの集晶を拡大したものであ。このような灰化像が新鮮葉での状態をそのまま保存したものか否かを確認するために、抱水クロラルで透明化した新鮮葉を Fig. 6 に示す。

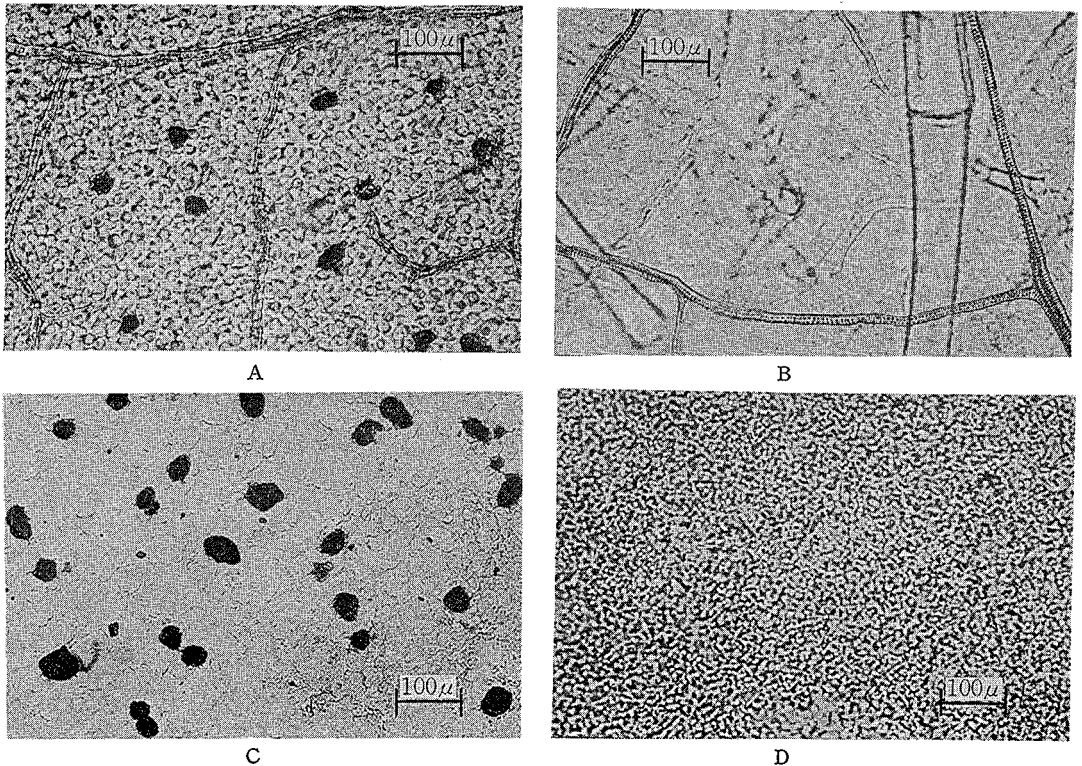


A  
B  
Fig. 6 Calcium oxalate crystals in fresh tomato leaves

Fig. 6のシュウ酸カルシウムの集晶の形態および分布状態は Fig. 5と同様であり、灰化による集晶の変化はないものと考えられる。

3. シュウ酸カルシウムの同定

Fig. 5, 6で認められた集晶がシュウ酸カルシウムであることを確認するために、トマトの新鮮葉および灰化葉を酢酸および塩酸でそれぞれ1時間処理した後に検鏡した。灰化葉の酸処理は、灰が移動しないように微細なポリエチレン管からの小滴を灰化葉の片すみから徐々に浸透させて行った。



A  
B  
C  
D  
Fig. 7 Identification of calcium oxalate crystals in tomato leaves  
Fresh leaves — A : After treatment with acetic acid  
                  B : After treatment with hydrochloric acid  
Ashed leaves — C : After treatment with acetic acid  
                  D : After treatment with hydrochloric acid

Fig. 7 にみられるように、葉中の集晶は新鮮葉、灰化葉とも酢酸処理では変化なく、塩酸処理で完全に溶解した。

さらに、トマト葉灰化物と試葉のシュウ酸カルシウム結晶  $\text{Ca}(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  の X 線回折図はよく一致した。多くの植物葉中のシュウ酸カルシウムの普通の結晶形は 1 水塩であり<sup>(23)</sup>、イチョウについても同様のことが確認されている<sup>(16)</sup>。

トマト葉中にはこのようなシュウ酸カルシウムの集晶が全面にわたって数多く存在し、 $0.44\text{mm}^2$  当り 20~30 個多い場合は 70~80 個に達する。また、その大きさはほぼ  $10\sim 40\mu\text{m}$  のものが多いようである。

#### 4. 数種植物の灰化像

トマト葉と同様の灰化条件で、ハウレンソウ、ホワイトクローパー、レタス、ダイコン、ハクサイおよびカラシナの葉について灰化像を観察した。

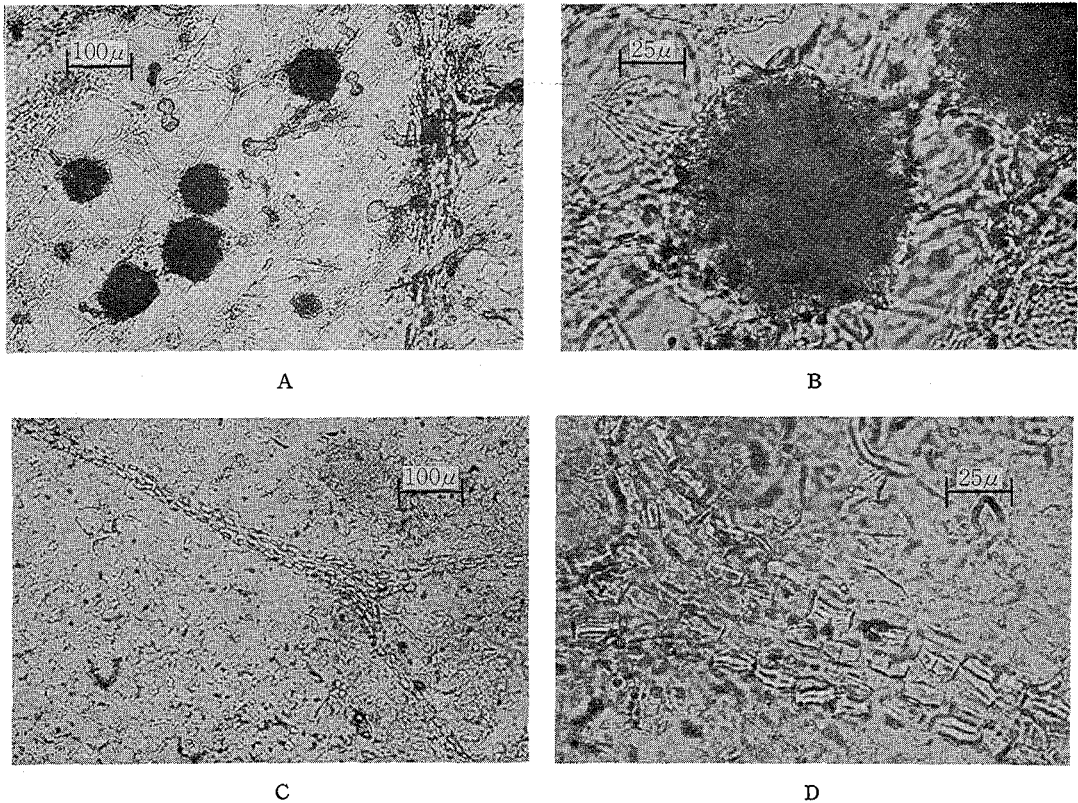


Fig. 8 Mineral microstructure of ashed leaves (1)

A, B: Clustered crystals of calcium oxalate in spinach

C, D: Solitary crystals of calcium oxalate in white clover

Fig. 8 にみられるように、ハウレンソウにはトマトと同様のシュウ酸カルシウムの集晶がみられ、その直径はトマトより一般に大であった。ホワイトクローパーでは葉脈に沿ってシュウ酸カルシウムの単晶が認められた。このような葉脈に沿ったシュウ酸カルシウムの分布は他でも認められており<sup>(12,15)</sup>、著者らもエノキの葉で同様の分布を観察した。

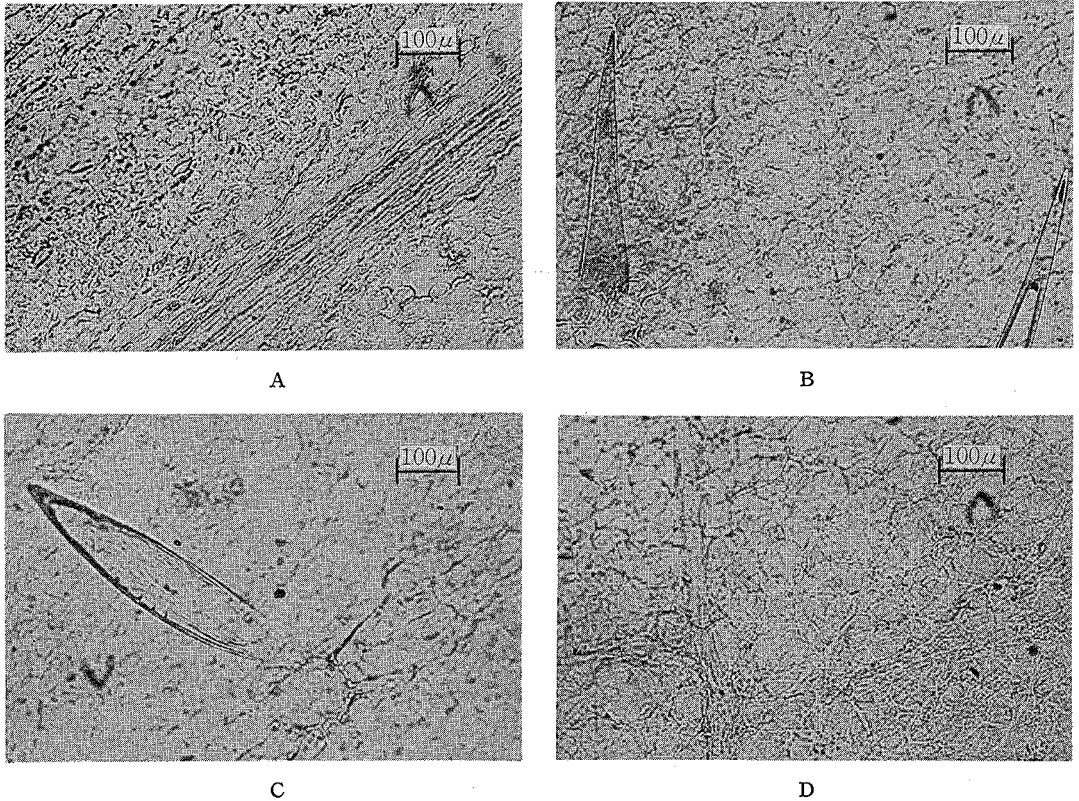


Fig. 9 Mineral microstructure of ashed leaves (2)

A: Lettuce, B: Daikon-radish,  
C: Chinese cabbage D: Leaf mustard

Fig. 9にみられるように、レタス、ダイコン、ハクサイおよびカラシナでは組織構造はよく保存されていたが、シュウ酸カルシウムの結晶はいずれの葉にも認められなかった。

X線回折については本学教育学部、谷山 穣助教授にご指導、ご便宜を賜わった。ここに厚く謝意を表する。

## 引用文献

- |   |   |
|---|---|
| (1) YAGODA, H.: <i>Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.</i> , 12, 698 (1940). | (8) 穂積啓一郎: 化学の領域, 25, 713 (1971).   |
| (2) 塩原ヤイ: 化学の領域, 15, 211 (1961).                                    | (9) HOZUMI, K., HUTOH, M., UMEMOTO, K.: <i>Microchem. J.</i> , 17, 173 (1972).    |
| (3) 武者宗一郎: 分析化学, 12, 649 (1963).                                    | (10) UMEMOTO, K., HOZUMI, K.: <i>Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)</i> , 19, 217 (1971). |
| (4) 武者宗一郎: 液体クロマトグラフィー 第1集, p. 77, 東京, 南江堂 (1964).                  | (11) 梅本光一郎, 穂積啓一郎: 薬誌, 91, 828 (1971).  |
| (5) 星川玄児: 日本土壤肥料学会講演要旨集 第12集, 16 (1966).                            | (12) 梅本光一郎, 穂積啓一郎: 薬誌, 91, 845 (1971).  |
| (6) 今泉 正訳: リゾン 組織化学および細胞化学—理論と方法—, p. 619, 東京, 白水社 (1962).          | (13) 梅本光一郎, 穂積啓一郎: 薬誌, 91, 850 (1971).  |
| (7) 木島正夫: 顕微鏡実験を主とする植物形態学の実験法, p. 62, 東京, 広川書店 (1965).              | (14) 梅本光一郎, 穂積啓一郎: 薬誌, 91, 890 (1971).  |
|   | (15) 梅本光一郎, 穂積啓一郎: 薬誌, 91, 1047 (1971).   |
|   | (16) UMEMOTO, K., HOZUMI, K.: <i>Microchem. J.</i> , 17, 689 (1972).              |

- (17) UMEMOTO, K., HUTOH, M., HOZUMI, K.: *Mikrochim. Acta*, **1973**, 301.
- (18) 梅本光一郎: 薬誌, **94**, 380 (1974).
- (19) 穂積啓一郎編: 低温プラズマ化学, p. 97, 東京, 南江堂 (1976).
- (20) MICHOTTE, Y., MASSART, D. L., PELSMAKERS, J.: *Talanta*, **23**, 691 (1976).
- (21) 穂積啓一郎, 松本守: 分析化学, **21**, 206 (1972).
- (22) 平岡賢三, 神丕志, 織田昌平, 江口洋英, 鎌田仁: 分析化学, **19**, 349 (1970).
- (23) 山田登, 丸尾文治訳: ボナー植物生化学, p. 144, 東京, 朝倉書店 (1956).

(1977年5月31日 受理)