

27 光合成色素の分離

目的

植物の葉に含まれている光合成色素をペーパークロマトグラフィーの手法を用いて分離し、光合成色素やクロマトグラフィーの技術について理解する。

準備

材料 お茶、乾燥ワカメ

器具 駒込ピペット、乳鉢・乳棒、毛細ガラス管、
TLCシリカゲルプレート(2cm×10cm)、
サンプル管(口径20mm以上、高さ10cm以上)

試薬 メタノール(抽出液)、ジエチルエーテル、10%食塩水、
石油エーテル：アセトン=65：35の混合液(展開液)

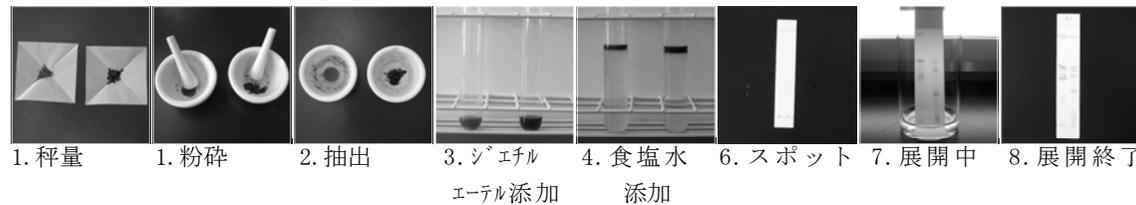


準備

1. TLCシリカゲルプレートの下面から1cmと9cmのところに鉛筆で薄く線を引いておく。強く書くと表面のシリカゲルをはがしてしまうので注意する。
2. サンプル管に展開液を深さ5mmほど入れ、よくふたを閉める。

方法

1. お茶と乾燥ワカメをそれぞれ0.5g量り取り、乳鉢に入れて細くなるまですりつぶす。
2. メタノールをそれぞれ2mL加え、さらに乳棒ですりつぶすようにして、色素を抽出する。
3. 抽出液を駒込ピペットで試験管に取り、ジエチルエーテルを各1mL加えてよく振る。
4. 10%食塩水を5mL加えてよく振る。色素はエーテル層に移る。さらに食塩水を加え、毛細ガラス管が届く液面の高さにする。
5. 少し静置するとエーテル層が液面にくるので、その色素液を毛細ガラス管に取る。
6. シリカゲルプレートの1cmの線を原線とし、その線上に各色素液を毛細ガラス管でつける。スポットはなるべく小さくなるようにし(3mm以内)、2つのスポットは約1cm離すようにする。濃いスポットになるように何度か(3~5回程度)つける。
7. サンプル管のふたを開け、ピンセットでシリカゲルプレートを静かに入れふたを閉める。シリカゲルプレートに展開液がしみ上がっていくにつれて、色素が分離されてくるので、その様子を観察する。
8. 展開液が上の線(この線が溶媒前線となる)まで浸みたら、素早くプレートを取り出す。各色素の輪郭を鉛筆でなぞり、中心に印をつける。
9. 原点(最初に色素をスポットした点)から各色素までの距離を定規で測る。



1. 秤量 1. 粉碎 2. 抽出 3. ジエチルエーテル添加 4. 食塩水添加 6. スポット 7. 展開中 8. 展開終了

結果と考察

各色素の色、原点からの距離を表にまとめよう。

原点から溶媒前線までの距離と原点から各色素までの距離より各色素のRf値を求める。

$$Rf \text{ 値} = \frac{\text{各色素の移動距離}}{\text{溶媒の移動距離}} \quad (Rf : \text{Rate of flow})$$

お茶の葉とワカメに同じ色素が含まれていれば、Rf値はほぼ同じになる。Rf値と色を比較しながら、同じ色素は同じ欄にまとめよう。

それぞれの色素は何か、教科書や資料集で調べよう。

| | 溶媒前線 | 色素1 | 色素2 | 色素3 | 色素4 | 色素5 | 色素6 | 色素7 | 色素8 |
|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 材料 | | | | | | | | | |
| 距離(mm) | | | | | | | | | |
| Rf値 | | | | | | | | | |
| 色 | | | | | | | | | |
| 色素名 | | | | | | | | | |

その他、気づいたことをまとめよう。

発展

茶(チャノキ)は種子植物、ワカメは褐藻植物で、それぞれ含まれている光合成色素が違う。ほかの植物(ノリ、ヒジキ、テングサなど)ではどのような色素が含まれているか調べてみよう。

直視分光器で色素抽出液を見てみよう。何色に見えるだろうか。それはなぜだろうか。(直視分光器では光のスペクトルが見える。吸収されている波長は見え、黒くなる。)

実験の反省・感想

クラス _____ 番号 _____ 氏名 _____

◆◇◆ 光合成色素の分離 ◆◇◆

1. 薄層クロマトグラフィーの原理

シリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィーは、濾紙を用いたペーパークロマトグラフィーよりも分離がよく、展開にかかる時間も短い(溶媒が8cm上昇するのに10~14分)。薄層クロマトグラフィーでは、シリカゲルの薄層が固定層、展開溶媒が移動層となる。一般に、混合物においては、移動層への溶解性や固定層への吸着性が物質によって異なるため分離できる。移動層に溶けやすいものほど移動層とともに移動し、固定層への吸着性が強いものほど移動しにくい。様々な物質を分離するため、移動層である展開溶媒は混合液を用いる。なお、石油エーテル自身も混合物であり、製薬会社によって若干組成が異なるらしい(今回用いたのは関東化学のものでn-ヘキサンを30~40%含む)。シリカゲルプレートはWhatman社のものを用いた。

2. 材料と抽出方法

今回は、材料が入手しやすく簡単なものとして、お茶の葉と乾燥ワカメを用いた。乾燥材料を用いるといつでも実験ができ、方法も簡便になる。また、2種以上を比較することで、分類の授業にもつなげやすい。

もちろん生物を扱うという観点から、生の材料の方が望ましい。また、カロテンやビオラキサンチンなどは、乾燥葉ではかなり少量しか抽出されない。緑葉は、ツバキ、サザンカなど常緑の葉の方が色素が濃くとれる。ホウレンソウもよく用いられる。生の材料を用いる場合には、葉を細かく粉砕するときにシリカゲルの粒を数粒入れ、これを粉砕してからすりつぶすと、滑りにくくてやりやすい。ホウレンソウのような柔らかい葉の場合は、シリカゲル粒を用いなくてもすりつぶせる。

色素の抽出については、メタノールは短時間では色素に変化がなく、強い抽出力を持っている^{*)}のでこれを用いた。ジエチルエーテルでも抽出可能だが、有毒ですぐに蒸発してしまうため、乳鉢を使って抽出する場合には用いない方がいい。メタノール：アセトン=3：1の混合液も試してみたが、メタノールで抽出した場合とほとんど変わりがなかった。

メタノールで抽出後、ジエチルエーテルを加えて振り、さらに食塩水を加えて振ると、メタノールで抽出された脂溶性の色素(親水基をあまり持たない)はエーテル層に移る。クロロフィル、カロテノイドともエーテル層に移るので、今回の抽出方法は、海藻類も含めた植物全般に汎用性がある。なお、エーテルを入れすぎると色素液が薄くなるので、なるべく少量(1mL)にとどめた方がいい(少なすぎると毛細管で採取しにくい)。

赤シソの赤い色素(アントシアニン)のように水溶性の色素(親水基を多数持つ)はシリカゲルに吸着されてしまうため、水溶性の色素を抽出する場合にはシリカゲルは用いない。また、水溶性の色素は有機溶媒には溶解しないため、抽出液をエーテル層に移さずにそのままプレートにつける。展開溶媒が有機溶媒だと原点に留まるので、分離する場合にはエタノールと水の混合液などを用いる(この場合脂溶性色素は分離されない)。

乾燥海苔(スサビノリ：紅藻)を水に浸しておくと水が赤くなるが、これはフィコエリスリンの色である。フィコエリスリンなどのフィコビルリンは、植物体内でタンパク質と共有結合しているものが多いため、そのままでは抽出されない。また、タンパク質が熱変性を起こすと、元の色を失ってしまう。^{*)}

乾燥ワカメを用いる場合、三陸産ワカメと中国産ワカメでは、三陸産ワカメの方がカロテンがよく抽出されることがわかった。

3. 展開溶媒

展開溶媒の組成は試行錯誤で決めるようである。今回は、なるべく簡単な組成で作ろうと考えたので、薄層クロマトグラフィーでよく用いられている石油エーテルとアセトンを使い、その混合比を変えて実験してみた。石油エーテル：アセトン=70：30の場合にはクロロフィルbとルテインが重なり、クロロフィルcがほとんど移動せず、全体にRf値が小さかった。60：40では各色素は重ならず分離できたが、

スポットが広がり薄くなる傾向があり、量の少ない色素の判別や移動距離の計測に苦労した。今回の実験からは石油エーテル：アセトン=65：35の混合液が最適であると思われるが、これ以外の有機溶媒についても種々試して、最適な溶媒を求めている。

4. Rf値

Rf値は同じ色素であっても溶媒の種類、温度、蒸気圧等によって変化するので、一概にこの値とは言えない。今回、温度を10℃、20℃、30℃の3段階、展開溶媒の混合比(体積比)を石油エーテル：アセトン=70：30、65：35、60：40の3段階で数回実験してみた。Rf値は次の通りである。なお、展開溶媒は1時間以上前にサンプル管に入れておき、蒸気を飽和状態にしておいた。

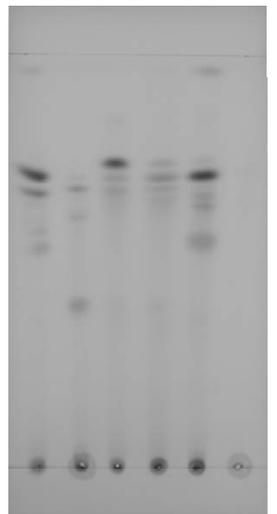
全体に温度が高い方が、また石油エーテルの割合が高い方がRf値は高い傾向があった。カロテンはどのような条件のときでもほぼ一定の値を得たが、それ以外の色素は試行ごとにRf値はばらついた。Rf値のばらつきが比較的小さかったのは65：35の展開溶媒であった。スポットの濃度が高いほどRf値は高くなるという報告もあるので、Rf値をもとに色素を同定するのは困難なようである。しかし、色素の順序は変わらないので、この順序と色をもとに同定するのがよい。なお、スポットが濃すぎると分離が悪くなるので注意したい。

| | 30℃ | | | 20℃ | | | 10℃ | | |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 60:40 | 65:35 | 70:30 | 60:40 | 65:35 | 70:30 | 60:40 | 65:35 | 70:30 |
| カロテン (茶・ワ) | 0.90~0.95 | 0.90~0.93 | 0.89~0.93 | 0.90~0.94 | 0.90~0.93 | 0.86~0.90 | 0.88~0.94 | 0.85~0.89 | 0.84~0.90 |
| クロロフィルa (茶・ワ) | 0.63~0.74 | 0.53~0.63 | 0.49~0.63 | 0.62~0.86 | 0.58~0.70 | 0.48~0.61 | 0.60~0.68 | 0.51~0.58 | 0.42~0.54 |
| クロロフィルb (茶) | 0.59~0.71 | 0.46~0.60 | 0.45~0.51 | 0.59~0.83 | 0.55~0.65 | 0.47~0.58 | 0.59~0.64 | 0.46~0.53 | 0.40~0.49 |
| ルテイン (茶) | 0.54~0.68 | 0.45~0.58 | 0.41~0.51 | 0.54~0.80 | 0.44~0.65 | 0.39~0.58 | 0.51~0.61 | 0.42~0.50 | 0.38~0.44 |
| フィコキサンチン (ワ) | 0.51~0.63 | 0.35~0.49 | 0.23~0.35 | 0.44~0.76 | 0.31~0.56 | 0.30~0.44 | 0.51~0.68 | 0.36~0.46 | 0.27~0.42 |
| ビオラキサンチン (茶) | 0.33~0.58 | 0.26~0.36 | 0.18~0.33 | 0.43~0.66 | 0.30~0.56 | 0.28~0.41 | 0.40~0.49 | 0.30~0.32 | 0.22~0.29 |
| ネオキサンチン (茶) | 0.25~0.51 | 0.20~0.34 | 0.17~0.24 | 0.29~0.62 | 0.21~0.45 | 0.20~0.35 | 0.24~0.40 | 0.17~0.25 | 0.16~0.25 |
| クロロフィルc (ワ) | 0.03~0.05 | 0.03~0.05 | 0.01~0.06 | 0.04~0.31 | 0.04~0.26 | 0.02~0.09 | 0.03~0.19 | 0.03~0.09 | 0.03~0.06 |

幅の広いプレートを使った時は、ピーカーに展開溶媒を入れてアルミホイルやラップでふたをしてみたが、十分時間をおいたにもかかわらず(40分程)、溶媒前線は8cmの位置までは上がらなかった。時間がたつと各色素が溶媒前線近くまで上がってしまい、きれいに分離できなかった。また、一昼夜放っておくと、展開溶媒はすべて蒸発していた。密閉度が不十分であったと考えられる。ピーカーにアルミホイルをかぶせた上に、直径の合うペトリ皿を逆さにかぶせておくときれいに分離できることがわかった。

右図は、左から順に、茶、乾燥ワカメ、乾燥ヒジキ、乾燥コンブ、乾燥ノリ、乾燥フノリから色素を抽出し展開したものである。

色素が薄い場合は、ライトボックスなどでプレートの裏から光を当てると見やすくなる。



5. クロロフィルdについて

クロロフィルdについては紅藻に含まれるとかつて学習したが、実際には一部の紅藻で抽出されただけで、本当に含まれるのか疑問視されていた。1996年に海洋バイオテクノロジー研究所の宮下らは、クロロフィルdを主要色素として持つシアノバクテリアを発見した。2004年に神戸大学の村上らは、クロロフィルdを含むシアノバクテリアが紅藻の表面に付着してコロニーを形成しているのを発見した。つまり、クロロフィルdは紅藻に含まれるのではなく、そこに付着したバクテリアが持っているものであったのである。^{*)}

*1 池森雅彦, 田島迪生, 奥田武男. 2002. 海藻に含まれている色素の新しい分析方法. Bull. Ishikawa Pref. Fish. Res. Center, 3, 13-18

*2 田島迪生. 2005. 海藻の色ー水産動植物の色調ーII. のと海洋ふれあいセンターだより. 23. 2-5

*3 A. Murakami, H. Miyashita, M. Iseki, K. Adachi, M. mimuro. 2004. Chlorophyll d in an epiphytic cyanobacterium of red algae. SCIENCE, 303, 1633