

## 緑色色素の化学的分析

3年9組 堤 絵美奈、吉積 悠子

### ● 概要

1年生の頃から化学コースで行われた色素についての実験に参加していたので、テーマに色素を選ぼうと思いました。その中でも手に入りやすく、処理が簡単で種類も豊富な植物の緑色色素を取り上げることにしました。主要な試料には徳島に関係の深く、常緑で1年を通して採取することの可能なスダチの葉を選んで実験し、どのような特性があるかを考察しました。

We participated in an experiment with pigments during the chemical course in 1st year, so we chose pigments as our topic. Among the pigments, we decided to choose the green pigment of the plant because we can get to it and deal with it easily, and many plants containing pigments. We choose the evergreen leaves of Sudachi, which Tokushima is famous for, as the main sample. We experimented with the leaves, and studied their properties.

### ● 実験内容

#### ・ 実験1

目的	植物の状態によって緑色色素にどのような変化が見られるか調べる。
試料	ハウレンソウ(生、ゆでたもの)
器具	ピペット(マイクロ、駒込)、乳鉢、乳棒、遠心管、遠心分離機、キャピラリー管、時計皿、クロマトグラフィー用ろ紙、セル(石英)、吸光度測定器、ゴム栓付き試験管、鍋、ガスバーナー
薬品	抽出液(エタノール：アセトン＝3：1)
方法	1. ハウレンソウ(生)をちぎって乳鉢に入れ、抽出液をピペット 2~3 ml 加えながら乳棒ですりつぶす。 2. 抽出液に緑が溶け出したら遠心管に液体の部分のみを入れ、遠心分離機にかける。 3. 分離したものの上澄みをとる。 4. 3. を薄めずにそのままろ紙にスポットし、展開液に浸けて展開する。 5. 3. の上澄み 500 $\mu$ l に 2.5 ml 抽出液を加えて再度遠心分離する。その後、抽出液を 1 ml 追加して薄め、セルに移して吸光度を測定する。 6. 鍋でゆでたハウレンソウも同様に操作する。

#### ・ 実験2

目的	植物の種類によって緑色に違いがあるか調べる。
試料	アオミドロ(学校産・緑藻類)、ワカメ(鳴門産・褐藻類) スダチ(吉積の自宅産・種子植物)
器具	ピペット、乳鉢、乳棒、遠心管、遠心分離機、キャピラリー管、時計皿、クロマトグラフィー用ろ紙、セル(石英)、吸光度測定器、ゴム栓つき試験管、はさみ
薬品	抽出液(エタノール：アセトン＝3：1) 展開液(石油エーテル：トルエン＝7：3)
方法	1. アオミドロは、水槽から取ったものを直接乳鉢に入れ、抽出液を加えながら乳棒ですりつぶす。 2. 抽出液に緑が溶け出したら遠心管に液体の部分のみを入れ、遠心分離にかける。 3. 分離したものの上澄みをとる。 4. 3を薄めずにそのままろ紙にスポットし、展開液につけて展開する。 5. 3の上澄み 500 $\mu$ l に 2, 5ml 抽出液を加えて再度遠心分離する。その後、抽出液を 1ml 追加して薄め、セルに移して吸光度を測定する。 6. ワカメはスーパーで購入したものをフードプロセッサーにかけてあらかじめ粉砕しておいたものを乳鉢に入れ、抽出液を加えながらさらにすりつぶす。後の操作は2~5と同様。 7. スダチははさみで細かく切り、それを乳鉢に入れて抽出液を入れながらすりつぶす。後の操作は2~5と同様。

・ 実験 3

目的	酸によって緑色色素に変化が起きるか調べる。
試料	スダチ(吉積の自宅産・種子植物)
器具	ピペット、乳鉢、乳房、遠心管、遠心分離機、キャピラリー管、時計皿、クロマトグラフィ用ろ紙、セル(石英)、吸光度測定機、ゴム栓つき試験管、はさみ、pH メーター
薬品	抽出液(エタノール：アセトン＝3：1)、 展開液(石油エーテル：トルエン＝7：3)、3.0 mol 硫酸(pH 0 以下)
方法	2. スダチの葉数枚を 3.0mol 硫酸(あらかじめ pH を測定しておく)に約 15 分間浸す。 3. 硫酸から葉を取り出し、それらを乳鉢に入れて抽出液を入れながらすりつぶす。 4. 抽出液に緑が溶け出したら遠心管に液体の部分のみを入れ、遠心分離機にかける。 5. 分離したものの上澄みをとる。 6. 4を薄めずにそのままろ紙にスポットし、展開液に浸けて展開する。 7. 4の上澄み 500 $\mu$ l に 2, 5ml 抽出液を加えて再度遠心分離する。その後、抽出液を 1ml 追加して薄め、セルに移して吸光度を測定する。

・ 実験 4

目的	スダチの葉のスペクトルが一般にどのようなものか調べ、標準値を定める。
試料	スダチ (吉積の自宅・阿南産/堤の実家・地藏橋産)
器具	電子上皿天秤、ピペット、乳鉢、乳棒、遠心管、遠心分離機、キャピラリー管、シャーレ、クロマトグラフィ用ろ紙、セル (石英)、吸光度測定器、ゴム栓つき試験管、はさみ
薬品	抽出液 (エタノール：アセトン＝3：1)、 展開液 (石油エーテル：トルエン＝7：3)
方法	1. 電子上皿天秤で、スダチの葉 (阿南産/地藏橋産) をそれぞれ 1.5g になるようにはさみで切るなどして調節する。 2. 1をはさみで細かくして乳鉢に入れ、抽出液 5ml を加えて乳棒ですりつぶす。 3. 抽出液に緑が溶け出したら遠心管に液体の部分のみを入れ、遠心分離にかける。 4. 分離したものの上澄みを取り、2000 $\mu$ l の抽出液を追加する。4をろ紙にスポットし、展開液につけて展開する。 5. 4をセルに移して吸光度を測定する。以上 1～6 を二回行った。

・ 実験 5

目的	スダチの葉から色素を抽出し、その色素を分溜する。
試料	スダチ (吉積の自宅・阿南産)

器具	電子上皿天秤、ピペット、乳鉢、乳棒、ビーカー、ガラス棒、はさみ、ろ紙、ナスフラスコ、エバポレーター、カラム用ガラス管、カラム台、パストゥールピペット、コニカルビーカー、セル（石英）、吸光度測定器
薬品	無水硫酸ナトリウム、ジエチルエーテル、石油エーテル、2-プロパノール、シリカゲル（Aldrich70-230mesh 60Å）
方法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 粉碎したスダチ葉 3g と 15g の無水硫酸ナトリウムを乳鉢に入れ、2 分間よくすり潰す。</li> <li>2. すり潰した混合物をコニカルビーカーに移し、ジエチルエーテル 50m l を加え、ガラス棒で 2 分間かき混ぜて、色素を抽出する。</li> <li>3. コニカルビーカーの中の混合物をろ過し、ナスフラスコに移す。</li> <li>4. エバポレーターでジエチルエーテルを凝縮する。</li> <li>5. ①ビーカーにシリカゲル 10g をとる。溶離液（展開溶媒）石油エーテル：2-プロパノール=20：1 を少しずつ加え、均一にする。 ②均一にしたシリカゲルをカラム用ガラス管に一気に流し込む。末端から溶離液を流下させる。 ③内壁を洗うように溶離液を静かに加える。約 5 分間程するとシリカゲルが降下しなくなる。溶離液 1m l に色素を溶かす。</li> <li>6. 溶離液の液面がシリカゲル面近くに下った時、パストゥールピペットで色素溶液をシリカゲル面の上方に内壁を伝わらせながら静かに注入する。シリカゲル面の一点に集中しないように注意する。シリカゲル面が乾かないうちに、1m l 溶離液を壁面に沿って注入し、壁に付着した色素を流し込む。この操作を数回繰り返して、全ての色素をシリカゲル表層に移す。溶離液をピペットで静かにカラム管いっぱいまで注入する。</li> <li>7. 溶離液が常時カラムいっぱいになるように注入していると、徐々に色素が分離してくる。分離した色素をそれぞれ吸光度計で測定する。</li> </ol>

・ 実験 6

目的	植物の葉から抽出した色素が光によってどのように変化するか調べる。
試料	ハッサク（城南高校敷地内・高木農園産）
器具	電子上皿天秤、ピペット、乳鉢、乳棒、ビーカー、ガラス棒、はさみ、ろ紙、ナスフラスコ、エバポレーター、パストゥールピペット、コニカルビーカー、セル（石英）、吸光度測定器
薬品	無水硫酸ナトリウム、ジエチルエーテル、石油エーテル、2-プロパノール、
方法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 粉碎したハッサク葉 3g と 15g の無水硫酸ナトリウムを乳鉢に入れ、2 分間よくすり潰す。</li> <li>2. すり潰した混合物をコニカルビーカーに移し、ジエチルエーテル 50m l を加え、ガラス棒で 2 分間かき混ぜて、色素を抽出する。</li> <li>3. コニカルビーカーの中の混合物をろ過し、ナスフラスコに移す。エバポレーターでジエチルエーテルを凝縮する。</li> <li>4. 凝縮した抽出液を溶解液で薄める。</li> <li>5. その後日当たりのいい窓際にナスフラスコに入れたまま放置し、10 分ごとに吸光度を測定する。</li> </ol>

● 実験結果

・ 実験 1

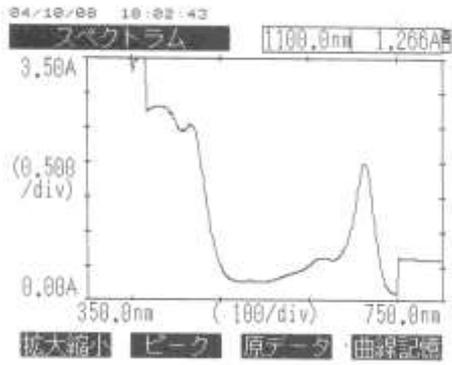


図 1 : ゆでたホウレンソウ

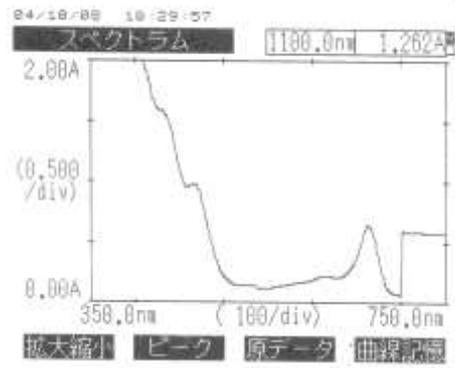


図 2 : ゆでたホウレンソウのゆで汁

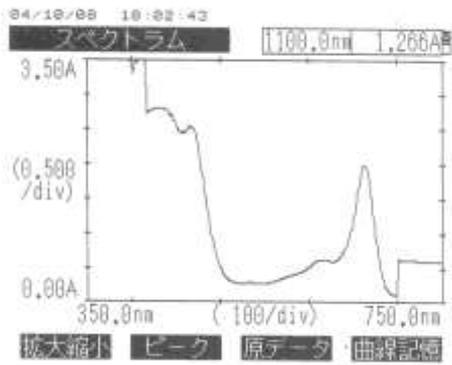


図 3 ; 生のホウレンソウ

・ 実験 2

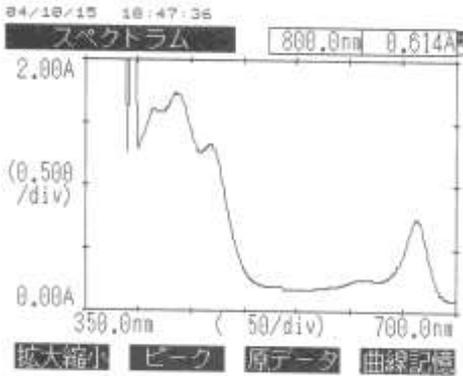


図 4 : 緑藻類

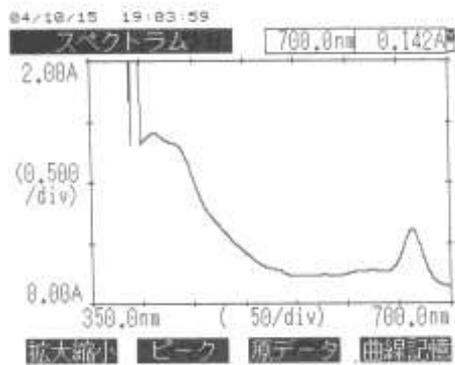


図 5 : ゆでられたワカメ

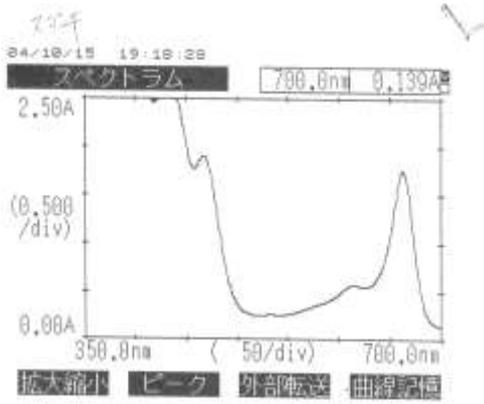


図 6 : スダチの葉①

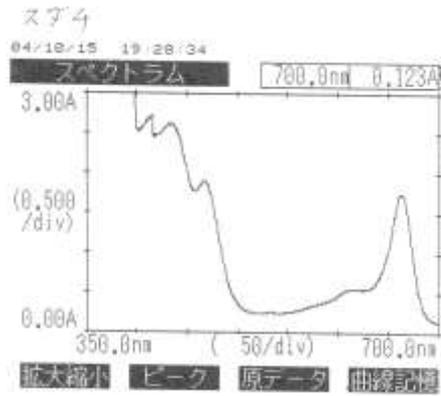


図 7 : スダチの葉②

・ 実験 3

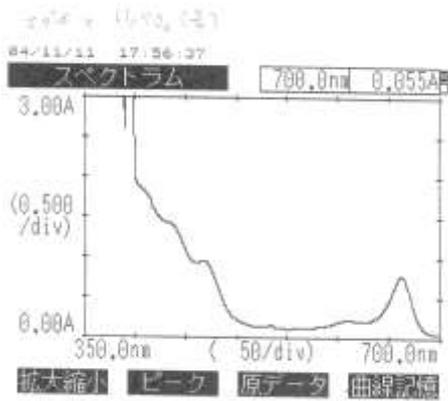


図 8 : スダチの葉と希硫酸との反応

・ 実験 4

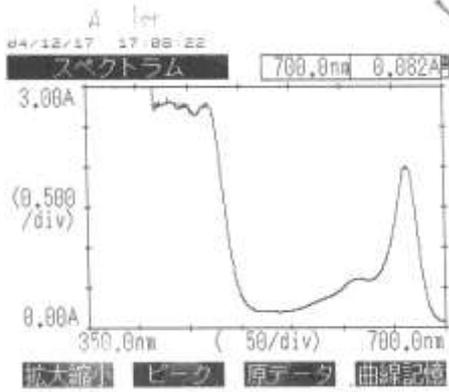


図 9 : 阿南産のスダチの葉①

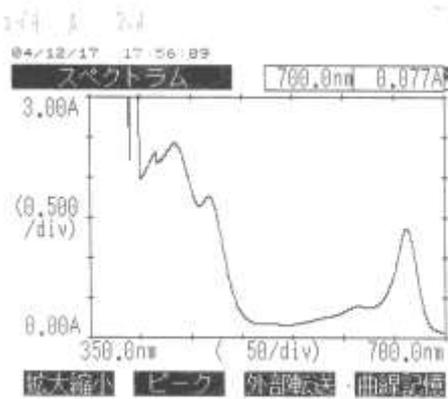


図 10 : 阿南産のスダチの葉②

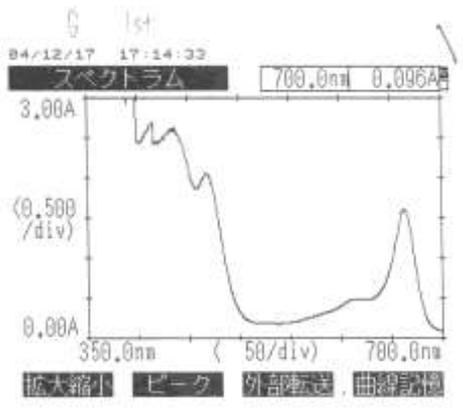


図 11：地藏橋産のスタチの葉①  
 ・ 実験 5

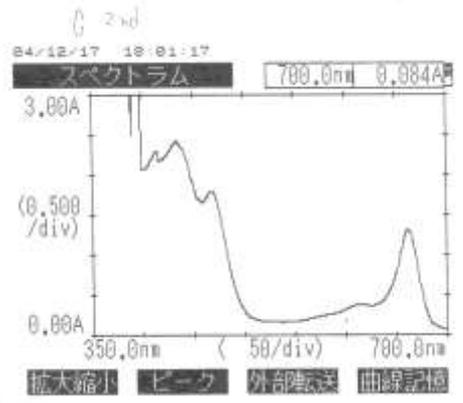


図 12：地藏橋産のスタチの葉②

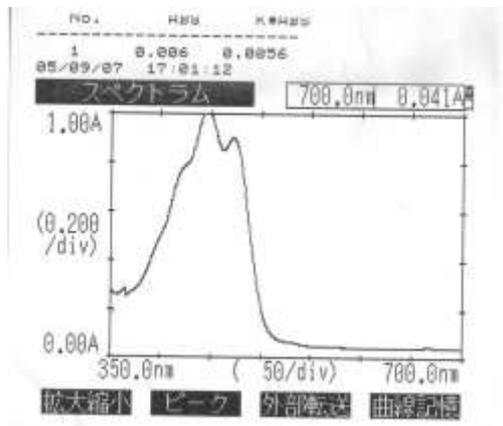


図 13：カラム下から 1 番目 濃い黄

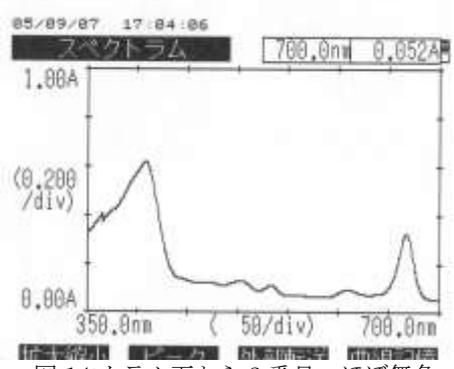


図 14:カラム下から 2 番目 ほぼ無色

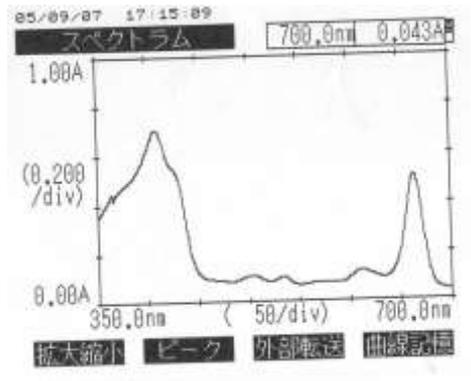


図 15:カラム下から 3 番目 青緑

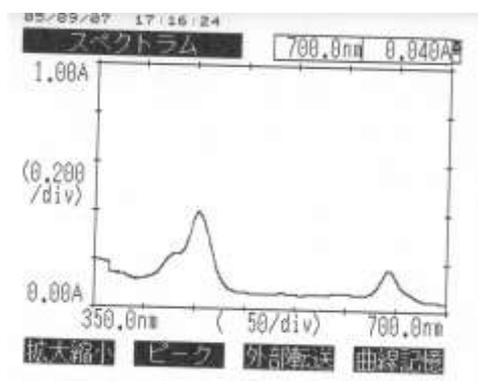


図 16：カラム下から 4 番目 黄緑

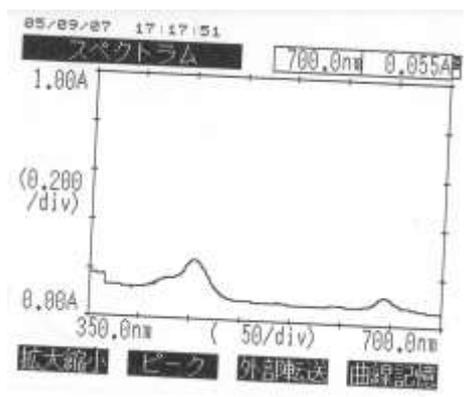


図 17: カラム下か 5 番目 淡黄

・ 実験 6

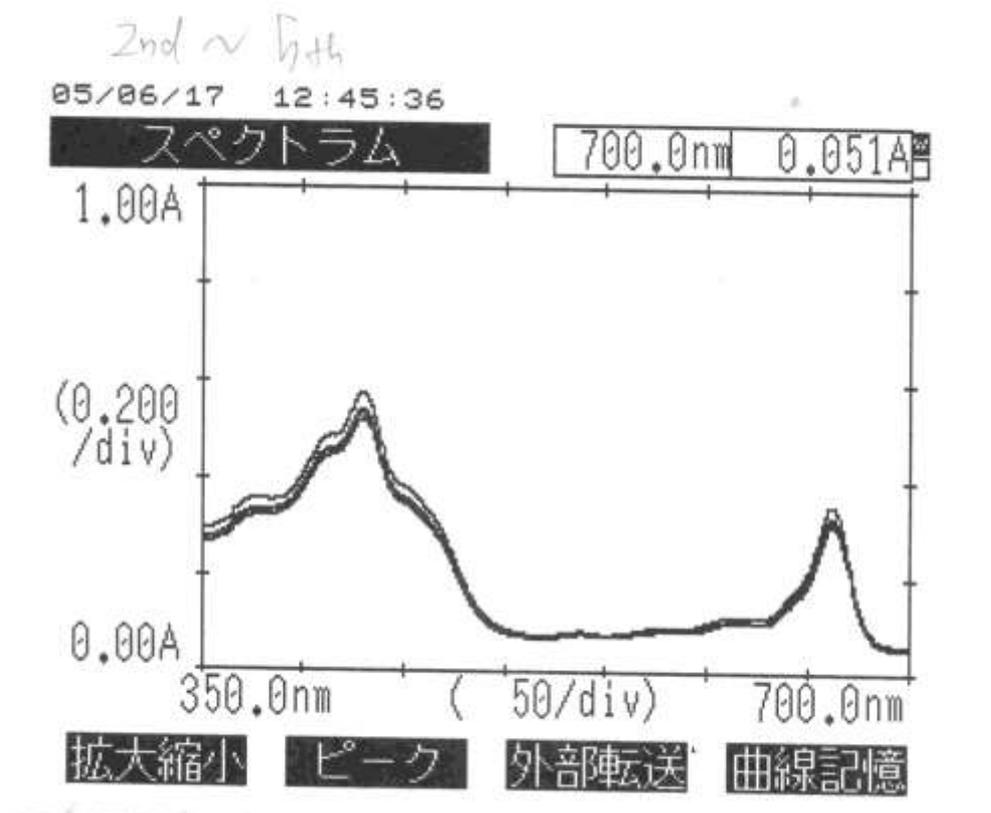


図 13: 重ね書き

・ 考察と感想

・ 実験 1

ホウレンソウとゆでたホウレンソウでは、色素を抽出した時点で見た目にも違いがわかった。おそらく、加熱したために色素が変性し、溶媒に溶け出さなくなったからだと考えられる。また、ゆで汁が緑色になっていたので、その吸光度も調べてみた。結果、有機溶媒で抽出したものは明らかに違うグラフとなった。ゆで汁についた緑色は、お湯で抽出できたことからカテキンが主成分であると考えられる。(確認はしていない。あくまでも考察。) 以上のことから、ホウレンソウの緑色にはクロロフィルとカテキンが含まれていると考えられる。また、クロロフィルは熱変性を起こすと思われる。

・ 実験 2

まず、この実験でもっとも失敗した点は、「生」ワカメだと思っていたものが実は生ではなかったという点である。市販されているワカメの「生」という表現は「乾燥」ワカメに対応したものであり、一般にゆでたものであるようだ。そのため、ワカメの抽出液を使った実験では有機溶媒にほとんど緑色が溶け出さなかった。前回の実験からクロロフィルが熱変性を起こしてしまっていると思われるので、この実験データは植物の種類ごとの比較をするには適していない。(本当に生のワカメは春先しか市場に出回らないらしいので、今回の研究では使用を断念せざるをえない。)

アオミドロ、スタチを使った実験はうまくいった。前記の二つのスペクトルを比較すると、アオミドロのものが若干赤みを帯びていた。また、ワカメの葉からの色素の抽出は、表面にクチクラ層があるために困難だと予想されたが、特に問題なく緑色が抽出できた。

・ 実験 3

クロロフィル a の構造は Mg (マグネシウム) を中心としたものである (数研出版:『視覚でとらえるフォトサイエンス 生物図録』より) ので、その Mg が酸の影響を受けると予想して、この実験を行った。が、よくよく考えてみると、化学 I で学習した金属の反応性は単体の場合で、その化合物であるクロロフィル a が酸による Mg の変化を受けて構造を変えるのではないかと、という考えは見当違いかもしれない。しかし、実験の結果、抽出液のスペクトルは通常時のスペクトルと違いが生じていた。このことは、構造の中心である Mg が変化したか否かは確認できないにせよ、酸の影響を受けて緑色色素に何らかの変化が起きたことを示している。硫酸以外に硝酸で実験を行うことによって、植物の葉に含まれる緑色色素が酸性雨からどのような影響を受けるかも調べることができそうである。また、塩基から受ける影響も調べることで、緑色色素の性質を調べることができると考えられる。

#### ・ 実験 4

今回の実験では「天然の緑色色素と人工の緑色色素を比較する」という研究テーマのひとつを踏まえて、『標準スダチ抽出液を作ろう!!』という目的で行った。と、いうのも、実験を行う度にスダチから色素を抽出していたのでは時間が足りず、効率も悪いからだ。(厳密には気温、湿度その他の条件が変わってくるのでその都度抽出するのが良いのだが) スダチのスペクトルが標準的にどのようなものかわかっているならば、比較するときそのデータで大体のことが判断できると考えた。

サンプルとして阿南産のものとは地蔵橋産のものを使用したのは、ある一地域のスダチの葉で実験を行うと、その土地に特別な条件 (降水量、土地の酸性度など) があつた場合に“一般的な”スダチから抽出した緑色色素のスペクトルと断言できないからである。結果、溶媒の揮発性のために濃度はまちまちになったものの、よく似たスペクトルが見られた。どのグラフも 350~500nm 付近と 700nm 付近に吸光が存在し、350~500nm 付近の吸光は 700nm 付近のもの 4/3 程度だった。この実験から一般的なスダチの緑色色素のスペクトルがどのようなグラフを描くかがわかった。今後の実験ではこのデータが活用されるだろう。

#### ・ 実験 5

今回の実験は、1~6 までの手順を暗室内で弱光下のもとで行った。光によってクロロフィルが変性することを考慮に入れてである。今後の研究でクロロフィルが光によってどのように変化するかを調べようと計画しているので、色素抽出の段階で光を遮った方がより正確な実験結果が得られると考えた。ただし、手順 7 では暗室の暗さでは色の判別が困難だったためにやむなく蛍光灯の光で実験を行った。

今回使用したスダチ葉は今までと同様に吉積の自宅から採取したものであつたが、季節柄かいつもと色合いが違つていた。(季節ごとに葉の色がどのように変化するかを調べても良いかもしれない。) それは分溜結果としてクロロフィル a の存在が認められなかったことから明らかである。これは、おそらく使用した葉が未成熟であつたためと考えられる。昨年度使用したスダチ葉はもっと青みをおびていて、葉の大きさも大きかつた。これまでの実験を通して、葉をさらに細かく粉砕することの必要性を感じている。スダチが柑橘系の植物であることから、葉にクチクラ層があるために色素の抽出に限界がある。次回、もし叶うならばフードプロセッサー等でさらに細かく粉砕した上で実験を行いたい。今回の実験で、今後の実験課題がいくつか考えられた。上記のように「光によるクロロフィルの変性」「季節による変化」、また「他の柑橘類との比較」「光が当たる条件の違う葉との比較」などである。

#### ・ 実験 6

前回の実験と同様にして 1~4 までの手順を暗室内で弱光下のもとで行った。

今回は急に実験をすることになったので、校内にあつたハッサクの葉を使用した。葉の色や質感はよく似ていたが、スペクトルのグラフの形には違いが見られた。(濃度が違つていたので厳密な比較はできなかったが) 実験の結果、日光に当てると時間がたつにつれて、グラフが全体に吸光度の低い値の方へ平行移動していった。これは、光によって緑色色素内のクロロフィルが変性 (分解?) したためと考えられる。しかし、今回の実験では熱を遮断しなかつたので、熱による変性の可能性もある。次回実験する時は純粋な、光に対する変性かどうか調べたい。また、今回はハッサクを使用したので、将来的にスダチとの比較も行いたい。吸光度測定器の新しい機能“重ね書き”を発見したので、これを使用することで今後の測定結果の比較はさらに微少な変化までわかるようになるだろう。