

簡便な植物色素の分析法と薬学部生薬系植物学実習での実践

薬学部 三巻 祥浩*, 加藤 哲太**, 黒田 明平***,
亀山 愛子***, 指田 豊****

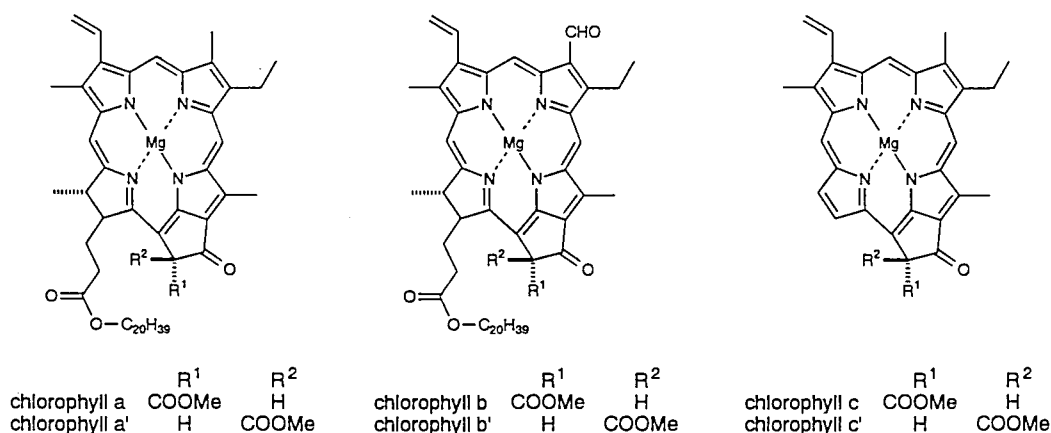
【はじめに】

生薬系植物学実習は、平成10年度まで、試験を含めて全7回2年前期に実施されてきた。本実習は生薬実習の前半を成しており、生薬の形態観察に必須である顕微鏡の扱い方や染色法、測微法などの技術、さらに、確認試験の基礎となる薄層クロマトグラフィー(TLC)の概要を学び、これらの技術を実際の生薬や生薬製剤に応用する実験を通して、日本薬局方の生薬に関する記述を正しく理解できる知識を身に付けることを基本目的とした。実際のカリキュラムの編成においては、低学年の基礎的な実習ではあるが毎回の内容が薬学分野に広く有機的に連結するように留意した。例えば、デンブンの項目では、日本薬局方に収載されている4種のデンブン(バレイショデンブン、トウモロコシデンブン、コムギデンブン、コメデンブン)の顕微鏡観察による性状の観察の他、実際にデンブンが賦形剤として配合されている生薬製剤についてもデンブンの確認を行い、デンブンが賦形剤として製剤上重要なものであることを認識させるようにした。内容の

詳細は授業計画(シラバス)に記載してあるので省略するが、6回目、最終日の実習においてはTLCによる植物色素の分析を行った。

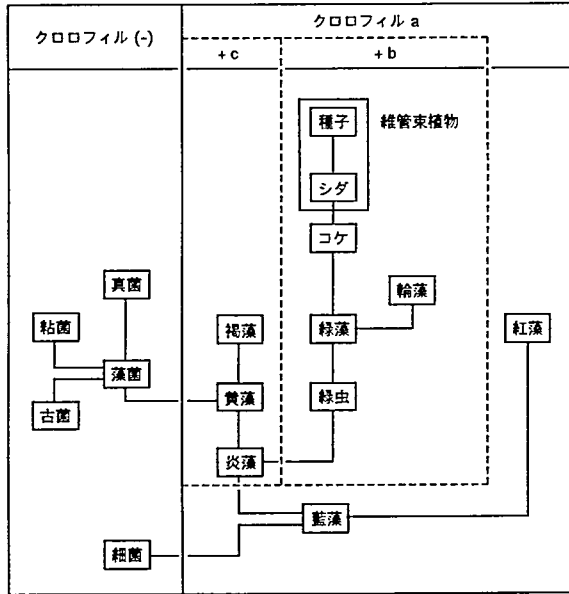
【植物色素分析の意義】

様々な植物色素のうち、本実習で取り上げたのは葉緑素とカロテノイド色素である。第4日目の葉類生薬の組織の観察の際には、単に生薬を同定するための組織の観察の他、葉肉部を構成する柵状組織は葉緑粒を豊富に含み、細胞間隙のある海綿状組織より供給される二酸化炭素を利用して光合成を行う機能についても併せて学び、6回目の実習で葉緑素をTLCにて分析するという関連を持たせた。葉緑素は中心にマグネシウムを持つ有機金属錯体であり、高等植物から下等な光合成細菌にいたるすべての光合成器官に含まれている最も分布の広い天然色素である。クロロフィルa, a', b, b', c, c'などが知られており、その分布は維管束植物と緑藻類では同じであるが、褐藻類、紅藻類とでは異なり、系統を反映している面がある。

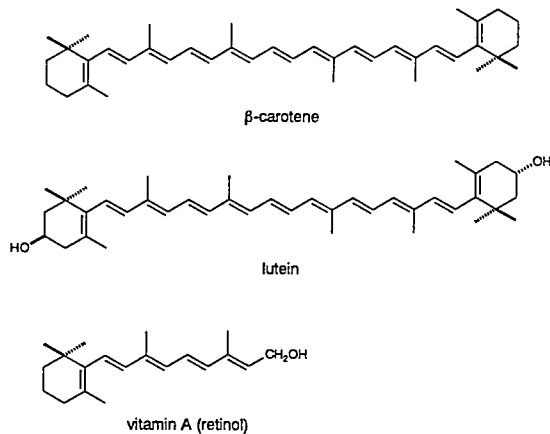


* 薬用植物学研究室・助教, ** 実習教育第8研究室・助教, *** 薬用植物学研究室・助手
**** 薬用植物学研究室・教授

図1 クロロフィルの分布と植物の進化



葉緑素を豊富に含むクロレラ等は健康食品として販売されているが、製品化する過程で生じたクロロフィルの分解物（フェオフォーバイドやパイロフェオフォーバイド）による光過敏性皮膚炎が問題となったことがある。この光過敏症のメカニズムは光励起されたフェオフォーバイドが酸素と反応してできる活性酸素による細胞傷害であることが明らかになっている一方、この作用を利用した癌の光化学療法の研究が進められている。カロテノイド色素は葉緑素を含む植物に共存し、光合成のための光エネルギーを吸収する他、余分な光を吸収し、葉緑素を光分解から保護する役割を演じている。代表的なカロテノイド色素であるβ-カロテンはヒト体内において酸化的に分解されてビタミンAとなる。ビタミンAの過剰摂取は問題となるが、こ



れをβ-カロテンとしてヒトが摂取する場合は必要な分だけビタミンAに変換され、ビタミンAの過剰摂取にはならないという。

以上、形態学的な4日目の実習との関連、薬学的な背景を実習説明にて学生に理解させた後、1回の実習で葉緑素とカロテノイド色素をTLCにて分析することは薬学部低学年での実習として意義あるものと考えられる。

【植物色素分析の問題点】

葉緑素とカロテノイド色素の分析法で最も簡便な方法はもちろんTLCによる分析であり、色素スポットを視覚的に確認できる。しかし、2年前期で大学に入学して初めて実習を体験する学生の技術を考えた場合、実習説明後、限られた時間内で安全に実習を終了し、TLC上きれいに分離した植物色素のクロマトグラムを得るためには様々な工夫が必要である。単に維管束植物の葉を有機溶媒で温浸したものを試料としてTLCで分析しても植物に含まれる様々な成分の混在によりきれいなスポットは得られない。そのため温浸液から色素のみを抽出することが必要となるが、分液ロートで分配する方法では実験のスケールが大きくなってしまい、さらに、濃縮の過程を含めると全員が各自1検体の実験を行うことは困難である。また、シリカゲルTLCの10cm程度の展開で、クロロフィルa, a', b, b', c, c', それに共存するフェオフィチン類、代表的なカロテノイド色素であるβ-カロテン、ルテインを分離するためには展開溶媒の工夫が必要である。

【植物色素分析の実験条件の検討】

本実習では、1) 4人1班で4種の検体、チャ *Thea sinensis* (維管束植物)、クロレラ *Chlorella* sp. (緑藻類)、ワカメ *Undaria pinnatifida* (褐藻類)、アサクサノリ *Porphyra* sp. (紅藻類) の調製を行い、各自1種の検体を担当して、抽出、分配、濃縮し試料を作製すること、2) そのために抽出、分配、濃縮のスケールをなるべく小さくすること、3) 最終的な試料溶液は他の夾雑物を含むことなく、ほぼ葉緑素、カ

簡便な植物色素の分析法と薬学部生薬系植物学実習での実践

ロテノイド色素のみを含むこと、4) シリカゲル TLC の 10 cm 程度の展開で葉緑素、カロテノイド色素を分離できること、5) 全体として操作が簡便で、初学者であっても失敗なく、きれいなクロマトグラムが得られること、の 5 点を達成、解決するべく、実験条件の検討を行った。

1) 抽出溶媒

抽出力の強さ、クロロフィルの分子変成の起こりにくさという観点からクロロホルムが最適な抽出溶媒であるという報告があるが、¹⁾ クロロホルムを用いる場合には環流抽出装置が必要であり、また、実習においては出来る限り塩素系有機溶媒は使用しないほうが望ましいと考えられる。そこで、いくつかのアルコール系溶媒を検討したところ、95%メタノールが適当であることが分かった。95%メタノール (6 mL) はチャ葉、クロレラはもとより、乾燥したアサクサノリやワカメを膨潤させ、低温度 (60°C)、短時間 (30 分) で各試料 1g から目的とする植物色素を 4 人分の TLC 分析に必要な量抽出できる。特別な器具を必要とせず、各試料を共栓付き試験管に入れ、軽く栓をし、温浴中で抽出する方法で十分である。

2) 分配、濃縮

95%メタノール抽出液から目的とする植物色素のみを簡便に効率よく抽出できる溶媒としてヘキサンを見出した。ヘキサンは 95%メタノール抽出液と混ざり合わず、かつ、上層に分離するため、ピペットで色素が移行したヘキサン層のみを容易に採取することができる。抽出後加えるヘキサンの量は 4 mL で、よく振り混ぜた後、遠心分離し、ヘキサン層約 2 mL を小試験管に移し、遠心エバポレーターでヘキサンを留去する。遠心分離は 1000 回転/分で 5 分で十分である。遠心エバポレーター (岩城硝子社製、VEC-310) では一度に試験管 48 本の溶媒留去ができ、各小試験管のヘキサン 2 mL を留去するに要する時間は約 10 分である。

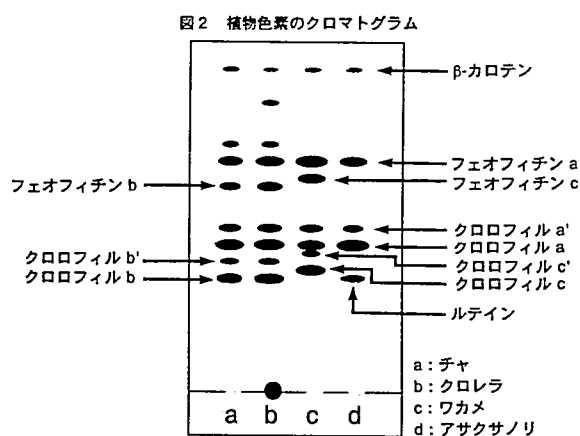
3) TLC 板へのスポット

ヘキサンを留去して得られた色素混合物を TLC 板にスポットする際に溶解させる溶媒として、ヘキサン-

アセトン混液 (1:1) を用いた。本溶媒は各検体の混合色素を完全に溶解し、また、適度な粘性と速乾性を有する。よって、初めて TLC 板に試料をスポットする初学者であっても、スポットが広がらず、色素混合物を薄め過ぎた場合でも、スポット濃度の調節が容易である。

4) 展開溶媒

シリカゲル TLC で葉緑素の分析をする際に用いる展開溶媒として様々なものが試みられているが、^{1, 2)} 本実習では、石油エーテル-アセトン混液 (3:1) を使用した。本展開溶媒は展開速度が速く、また、各試料に含まれる植物色素は 10 cm 以下の展開距離でもほぼ完全に分離される。



5) スポットの同定

全ての色素の標準品を市販で入手することはできず、また、入手できるものであっても高価で不安定であるため、各スポットの同定は、クロロフィル a とそれよりわずかに低極性のクロロフィル a' がほぼ R_f 0.5-0.6 の位置にすべての試料に共通に確認されることを基準に行った。クロロフィル b とそれよりわずかに低極性のクロロフィル b' はクロロフィル a より低い R_f 値で認められる。クロロフィル c とそれよりわずかに低極性のクロロフィル c' はクロロフィル b, b' とほぼ同じ位置に展開されるが、クロロフィル c, c' はワカメのみに含まれ、また、ワカメはクロロフィル b, b' を含まないため区別が可能である。また、スポット自体の色もクロロフィル a, c が緑色に対し、クロロフィル b はそれらより薄い黄緑色である。フェオフィチン

類はクロロフィル類より R_f 値が高い位置に対応するクロロフィルと共存して確認される。β-カロテンはほぼ溶媒先端まで展開される。ルテインはクロロフィル b よりわずかに低い位置に確認される。

【実習の実施】

以上、薬用植物学研究室、実習教育第8研究室での詳細な検討の結果、初心者でも容易に実験できる方法を確立したので、平成6年度からの薬学実験書に本法を記載し、学生実習に導入した。以下、実験書記載の、

1) 使用する検体、試薬、器具、2) 操作の手順、を示す。

1) 使用する検体、試薬、器具

食品用に加工されたチャ葉、クロレラ錠剤、ワカメ、アサクサノリ、石油エーテル、ヘキサン、アセトン、95%メタノール、展開槽、シリカゲル TLC 板 (5 cm × 9 cm, メルク社製)、キャピラリー、共栓付き試験管 (10 mL)、小試験管 (10 mL)、メスシリンダー (10 mL)、メートルガラス (20 mL)、こまごめピペット (2 mL)、パスツールピペット、ピペット栓、遠心分離器、遠心エバポレーター (岩城硝子社製、VEC-310)、水浴、温度計、上皿天秤、薬匙、乳棒、乳鉢、ハサミ、定規、薬包紙、色鉛筆

2) 操作の手順

- アサクサノリはハサミで細かく切り、チャ葉、クロレラ錠、ワカメは乳棒と乳鉢で粉末にする。
- 各試料の 1g (クロレラは 1 錠を粉末にしたもの、約 0.25 g) を共栓付き試験管 (10 mL) に取り、6 mL の 95%メタノールを加え、かるく栓をし、時々振り混ぜながら水浴中、60°C で、30 分間抽出する。
- 冷後、4 mL のヘキサンを加え、栓をして振り混ぜた後、毎分 1000 回転で 5 分間遠心分離する。
- 試料の上澄部分 (ヘキサン画分) の約半量 (2 mL) をパスツールピペットで下層 (メタノール画分) を吸い込まないように静かに取り、小試験管 (10 mL) に移し、減圧下濃縮乾固する。
- 各試料に少量のヘキサン-アセトン混液 (1:1,

v/v, パスツールピペットで 5-10 滴) を加え、TLC 板 (5 cm × 9 cm) にキャピラリーでスポットし、石油エーテル-アセトン混液 (3:1, v/v, 10 mL) で展開する。

- TLC 板をドラフトで風乾後、主要スポットを色鉛筆を使いスケッチする。

【実習の結果】

約 1 時間の実習説明の後実習を開始し、器具の洗浄も含めほぼ全員が 3 時間で実習を終了した。毎年 4 クラス (女子 2 クラス、男子 2 クラス) の学生は本実習が薬学部に入學して初めて体験する実習であるが、ほとんど失敗なく全員がきれいなクロマトグラムを得ている。また、提出されたレポートにおいては、本実習への興味をうかがわせる考察、感想が多く、学生からの評価も好評であったと思われる。

【おわりに】

ロシアの化学者ツヴェートが光合成色素をカラムクロマトグラフィーで分離して以後、様々な充填剤や固定相を用いた植物色素の分離法が考案され、基礎実験書にも掲載されている。しかし、簡単な実験器具で、初心者でも失敗無く行える方法は皆無であった。ここに示した方法は、薬学部生薬学基礎実習のみならず、初学者のクロマト分離実習の一教材として使用できるものと考えられる。

【文献】

- 1) 渡辺 正, 小林正美, 油化学, 38, 876-885 (1989).
- 2) 田村行弘, 西垣 進, 真木俊夫, 嶋村保洋, 直井家寿太, 食品衛生研究, 28, 753-759 (1978).