

藍の葉に含まれる色素成分について

浜松日体高等学校
科学研究部 1年 松本結衣 他3名

1 動機

令和2年の夏に小学生対象の科学実験講座に補助員として参加し、「染色」をテーマに「藍染め」の実験をした。その準備として、顧問の先生が、藍染めの原料となるタデアイを種子から育てていた。タデアイの生葉は緑色であるが、すり潰すと徐々に indigo が生成し、青みがかっていく様子がとても不思議であった^①。実験講座のあと、私たちは“栽培条件を変えることで得られる indigo の量がどれくらい異なるのか”という疑問をもった。

本研究では、タデアイの生葉から得られる色素成分を明らかとすることと、光環境の違いとタデアイの生葉の単位質量あたりから得られる indigo の量の関係を明らかとすることを目的とした。

2 実験準備

(1) 試料および機器

試料となるタデアイの生葉は、次の(2)に示した栽培条件で種子(藤田種子会社より購入)から自家栽培した^②。吸収スペクトルは、島津分光光度計 Sefi IUV-1240 を用いて測定した。保存用冷蔵庫は、家庭用冷蔵庫を用いた。検量線作成時の indigo の秤量には、島津電子天びん TW223N を用いた。

(2) 栽培条件

栽培条件を表に示した。液肥は、協和液体ハイポニカを使用 방법에示された量を施した。

表1 栽培条件

試料名	栽培場所	栽培方法	肥料	備考
補助光源あり	実験室内	水耕栽培	液肥	植物育成用 LED 光源を1日あたり12時間照射した。
補助光源なし	実験室内	水耕栽培	液肥	窓辺の明るい場所に設置した。
学校	校地内の 明るい場所	プランター 栽培	液肥	
自宅	自宅の庭先	プランター 栽培	家庭用園芸肥料	対照実験用
露地栽培	自宅の畑の 一画	露地栽培	家庭用園芸肥料	対照実験用

3 実験方法

(1) タデアイの生葉から得られる色素のスペクトル測定

顧問の先生が栽培したタデアイの葉を、令和2年3月と令和2年8月に摘み取った。3月に採取した葉は臨時休業期間となってしまったため、冷凍保存した。(この葉を冷凍藍の葉と呼ぶ。)摘みたて葉、冷凍藍の葉を5分間すりつぶし、クロロホルムで5分間抽出した。これらに加えて、市販の天然藍染料(大和藍)、indigo を同時に TLC (展開溶媒:クロロホルム)した。つぎに indigo と同じと考えられる色素や特徴のある色素を TLC プレート上のシリカゲルを削り取り、クロロホルムで再抽出した。最後に得られた抽出液の吸収スペクトルを測定した。

(2) indigo の検量線の作成

indigo 標準溶液として、0.010 g の indigo を秤量し、0.10 mg/mL のジメチルスルホキシド（以下、DMSO）溶液 100 mL を調整した。この標準溶液を希釈し、様々な濃度で溶液の吸収スペクトルを測定した。各スペクトルから波長 618 nm の検量線を作成した。微量の indigo を秤量するため、溶液の調製から測定を 4 回繰り返して、これらの平均値から検量線を作成した。

(3) 試料から得られる indigo の定量

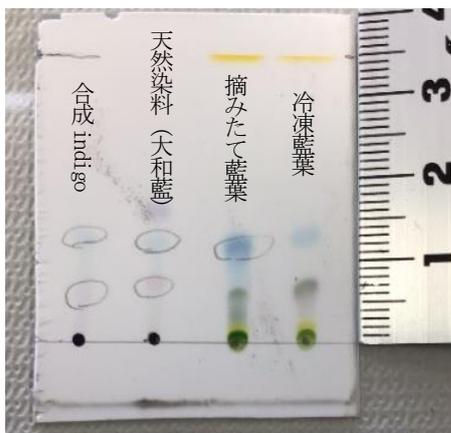
補助光源あり、補助光源なし、学校、自宅、露地栽培の各試料から、タデアイの生葉を無作為に摘み取った。葉を刻み、0.20 g にはかり分けた。8 分間乳鉢ですり潰し、DMSO を 2.0 mL 加え、5 分間抽出した。1.5 mL のマイクロチューブに溶液を入れ、10 分間遠心分離した。上澄み液を 10 倍に希釈し、吸収スペクトルを測定した。この実験は 3 回行った。

3 回の平均吸光度と検量線を用いて、生葉 1.0 g あたりから得られる indigo の量を算出した。

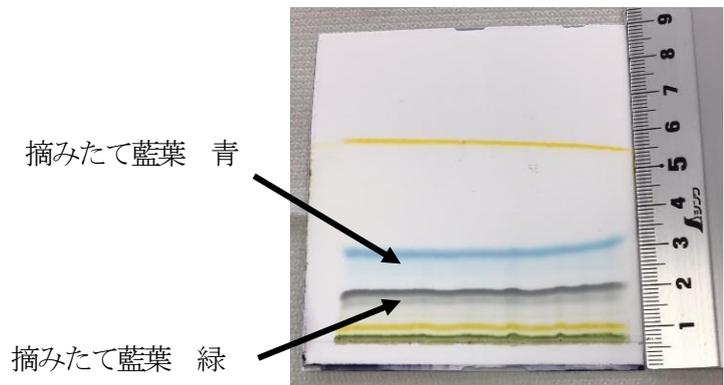
4 実験結果

(1) タデアイの生葉から得られる色素のスペクトル測定

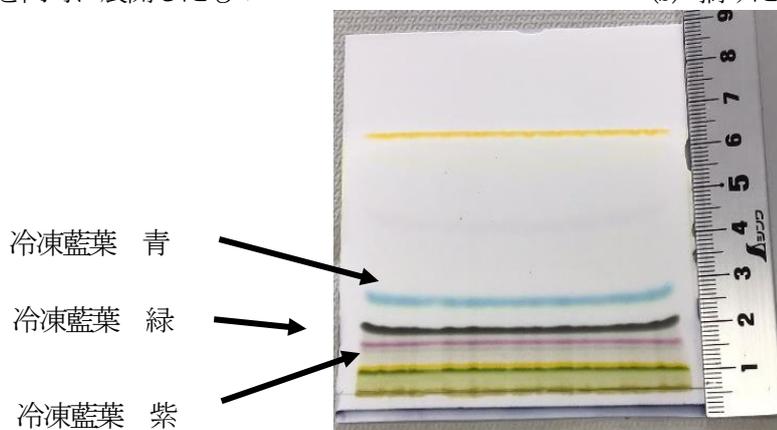
抽出液から色素を成分ごとに分離できた（図 1）。摘みたての葉と冷凍の葉から分離した色素、天然藍染料、indigo の 5 種類の吸収スペクトルを得た（図 2）。大和藍、摘みたて藍の青色素、冷凍藍の葉の青色素は、indigo の吸収スペクトルと一致したため、indigo が生じていると判断した（図 3）。一方で、摘みたて藍の葉の緑色素、冷凍藍の葉の緑色素は、indigo の吸光スペクトルと一致しなかったため、indigo ではないと判断した（図 4）。また、冷凍藍の葉からは紫色の色素を確認した。文献調査により、indirubin の吸光度と一致したため紫の色素は、indirubin と決定した（図 5）。



(a) 4 つの試料を同時に展開したもの



(b) 摘みたて藍葉



(c) 冷凍藍葉

図 1 TLC の結果

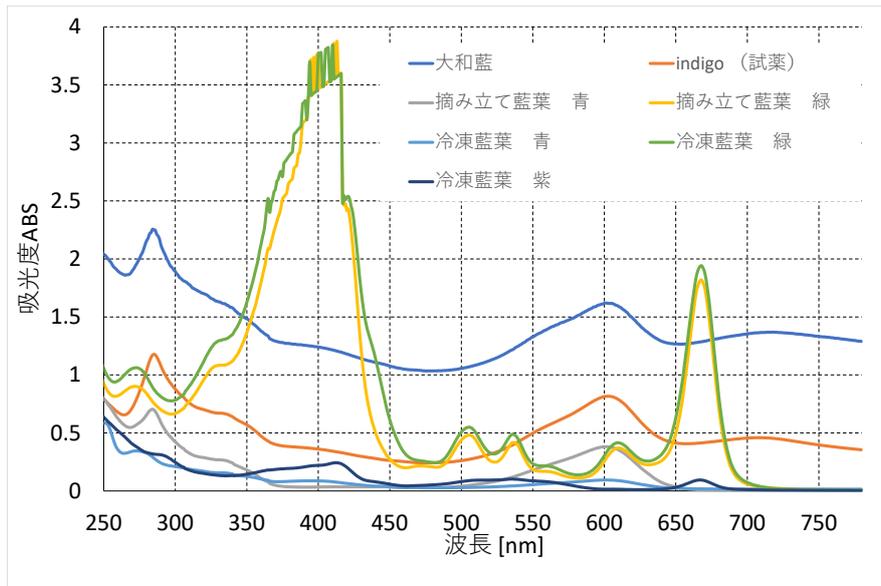


図2 葉から得られた色素の吸収スペクトル

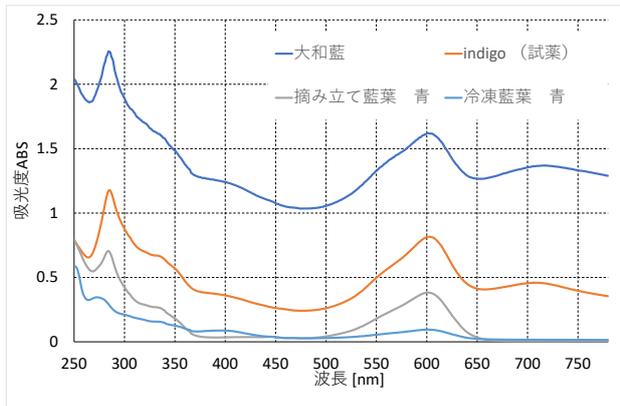


図3 青色素の吸収スペクトル (比較)

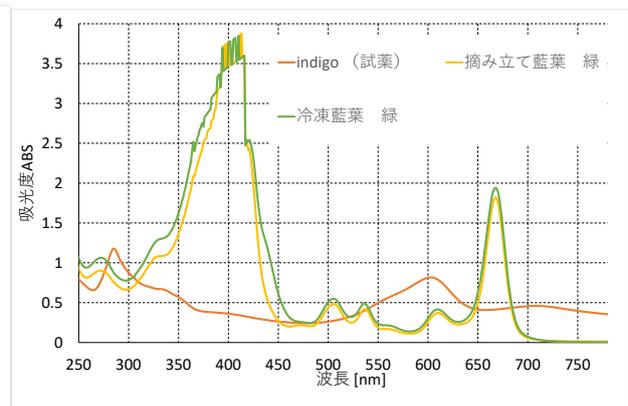


図4 indigo とその他色素の吸収スペクトル (比較)

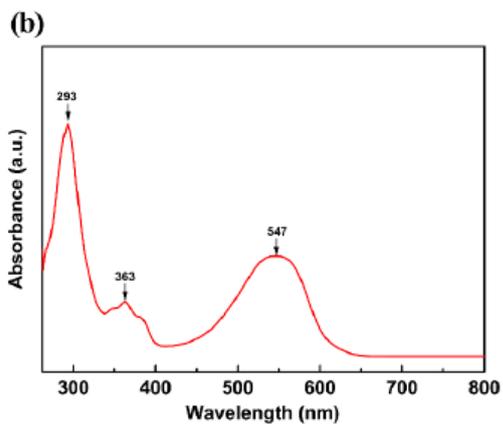
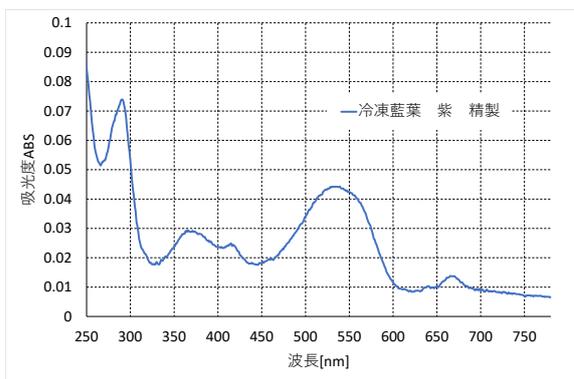


図5 (左) 紫色素の吸収スペクトル (右) indirubin の吸収スペクトル Molecules 2019, 24, 3831 より引用⁽³⁾

(2) indigo の検量線の作

様々な濃度の indigo の吸収スペクトルを示した (図6)。可視光領域では 618 nm に極大吸収を持っていた。618 nm の吸光度を用いて、検量線を作成した (図7)。

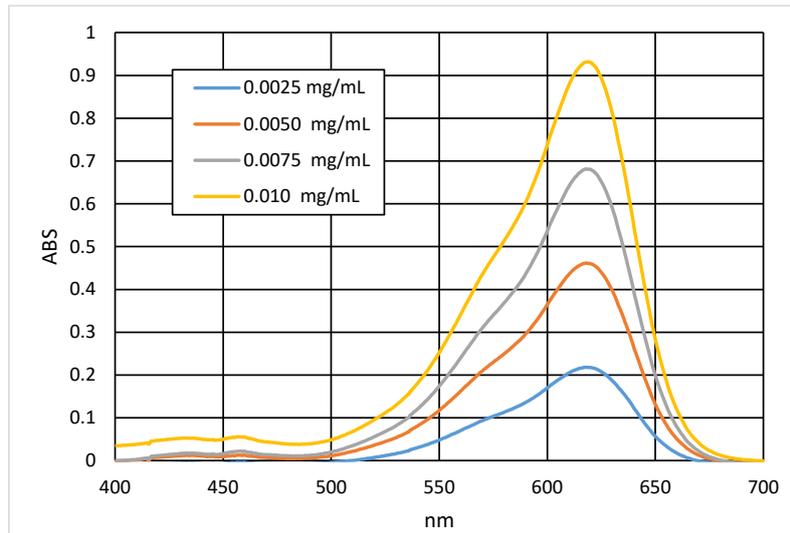


図6 各濃度における吸収スペクトル (溶媒 : DMSO)

表2 波長 618 nm における吸光度

濃度 [mg/mL]	0.0010	0.0020	0.0030	0.0040	0.0050
サンプル 1	0.0923	0.1919	0.2832	0.3759	0.4554
サンプル 2	0.0874	0.1844	0.277	0.3658	0.4546
サンプル 3	0.0983	0.1866	0.2935	0.3652	0.48
サンプル 4	0.0795	0.1779	0.2815	0.3639	0.4617
平均	0.0894	0.1852	0.2838	0.3677	0.4629

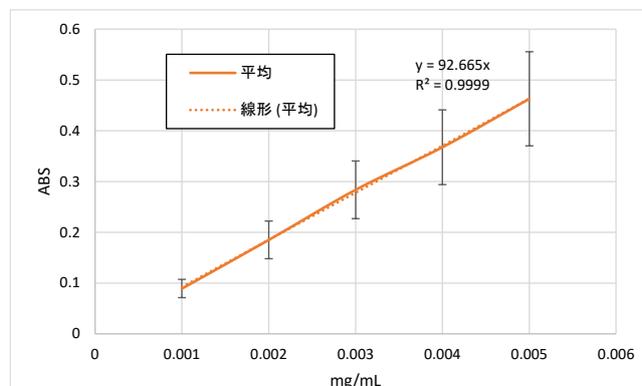
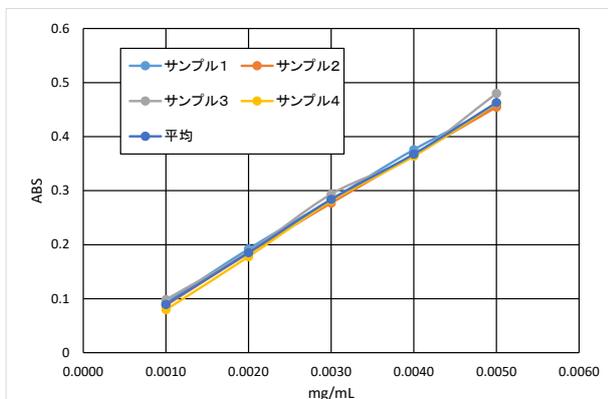


図7 (左) indigo の DMSO 溶液の濃度と吸光度の関係 (618 nm)
(右) 平均吸光度から作成した検量線

作成した検量線には、高い直線性があった ($y = 93x$)。私たちが使用した電子天びんは ± 2 mg 測定誤差を含んでいる。この実験では 0.010 g の indigo を秤量しているため、最大 20% の誤差が生じている可能性がある。20% の誤差範囲を示した検量線を作成した。

(3) 試料から得られる indigo の定量

補助光源あり、補助光源なし、学校、自宅、露地栽培の各試料 (図8、図9) から得られた平均の吸収スペクトルを示した (図10)。indigo の極大吸収である 618 nm の吸光度は、自宅プランター栽培していた試料を除き、ほぼ一致した。665 nm の吸収は、葉中に含まれるクロロフィルによるものである。補助光源ありの吸光度が特に大きかった。



図8 8分間乳鉢ですり潰し、DMSOを2.0mL加えた抽出液
(左から学校、補助光源なし、補助光源あり)

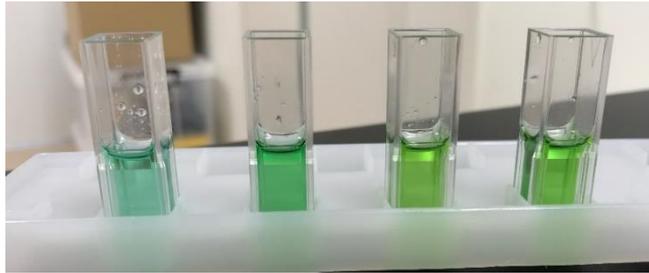


図9 10分間遠心分離した試料の上澄みを10倍希釈した抽出液
(左から補助光源あり、補助光源あり、補助光源なし、自宅)

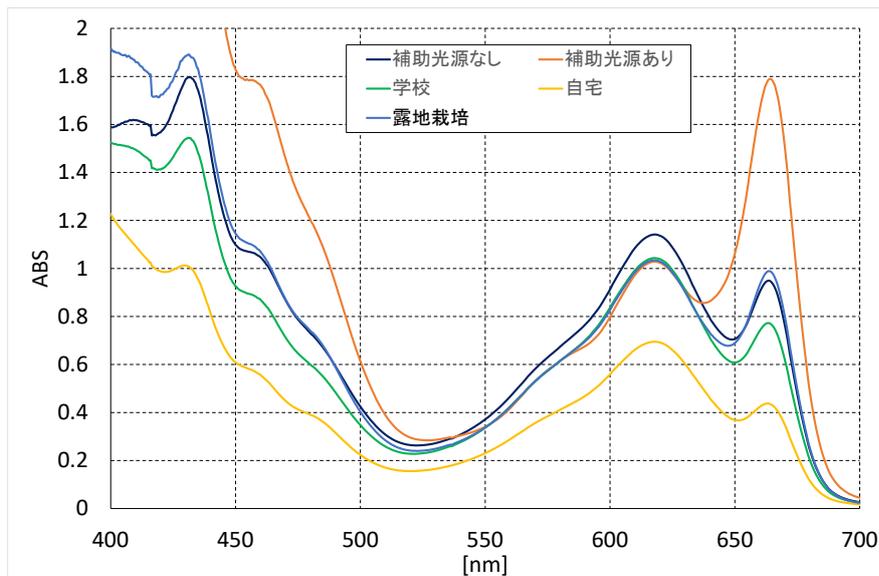


図10 10倍希釈した抽出液の吸収スペクトル (溶媒DMSO)

次に618 nmの吸光度から、タデアイの生葉1.0 gあたりから得られたindigoの量を算出し、表にまとめた(表3)。自宅でプランター栽培した試料を除き、ほぼ同じ量のindigoを得ることができた。

表3 生葉1.0 gあたりから生じるindigo量

波長[618 nm]	補助光源なし	補助光源あり	学校	自宅	露地栽培
吸光度	1.14	1.03	1.04	0.69	1.03
濃度[mg/mL]	0.0123	0.0111	0.0113	0.0075	0.0112
インジゴ量[mg/g-生葉]	1.2	1.1	1.1	0.8	1.1

5 考察

(1) タデアイの生葉から得られる色素のスペクトル測定

タデアイの生葉をすり潰すと、葉中に含まれるインジカンが酵素により分解され、インドキシルが生じ、indigoに変化していく様子が確認できた。

また、冷凍藍の葉では、紫色色素としてindirubinを確認した。indirubinは、インドキシルとイサチンの反応により生じることが分かっている。イサチンは、インドキシルの酸化によって生じる物質である。⁽⁴⁾つまり、葉を冷凍したことにより、細胞が壊れ、インジカンが徐々にインドキシルに変化し、低温下であったため、indigoの生成が遅くなり、イサチンへの変化が優先され、葉中に蓄積され、すり潰し操作により、インジカンとイサチンが反応し、indirubinが生じた、と考えられる。

(2) 試料から得られる indigo の定量

今回の実験では、自宅でプランター栽培した試料以外は、ほぼ同じ結果となり、光環境の違いによる明確な差を確認することはできなかった。この違いについて、2つの原因を推測している。

まず、葉に含まれる水分量やその他構成成分の違いが考えられる。補助光源ありと補助光源なしの試料は、葉が薄く、とても柔らかかった。一方で、屋外で栽培していた試料は、屋内で栽培した試料に比べ、葉が厚く、丈夫さを感じる感触であった。このことから、自宅でプランター栽培した試料には indigo に関連しない物質が、他の試料より多く含まれていたため、違いが生じたのではないかと推測している。

次に、クロロフィルの吸収の影響である。クロロフィルの極大吸収は、indigoの極大吸収の近くにあり、indigoの極大吸収を底上げしているのではないかと推測している。特に、補助光源ありの試料については、クロロフィル量が他の試料に比べ多いので、indigoの極大吸収への影響は大きいものと考えられる。

6 結論

自家栽培したタデアイの葉から得られる色素成分の吸収スペクトルを得ることができた。また、冷凍保存したタデアイの葉をすり潰すと indirubin が生じることが分かった。低温では、indigoの生成は遅くなり、インドキシルの酸化が優先されることがわかった。

今回の実験からは、光環境が違って、葉から得られる indigo の量に影響しないことが強く示唆された。しかし、葉に含まれる他の成分の影響が排除できていないため、色素抽出操作を改善していく必要がある。

7 今後の展望

indigoを定量する際、試料中に含まれる水分やクロロフィルなどの indigo 生成に関わらない成分の影響を考えている。この課題を解決するために次の2つの実験を行う予定である。

①試料の形状の観察（葉の大きさや厚さの測定）や水分量計測を行い、栽培条件との関係を調べる。

②自然乾燥させ葉内で indigo をつくり、エタノールに浸漬し、indigo だけを乾燥した葉内にとどめた試料を作成する。

8 参考文献

- (1) ウィキペディアの執筆者. “アイ (植物)”. ウィキペディア日本語版. 2019-09-04. [https://ja.wikipedia.org/w/index.php?title=%E3%82%A2%E3%82%A4_\(%E6%A4%8D%E7%89%A9\)&oldid=74106228](https://ja.wikipedia.org/w/index.php?title=%E3%82%A2%E3%82%A4_(%E6%A4%8D%E7%89%A9)&oldid=74106228), (参照 2020-10-16).
- (2) タデアイの育て方に関して、富士見市立難波田城資料館 (2018年3月版) を参考にした。
- (3) Zixin Ju; Jie Sun; Yanping Liu. Molecular Structures and Spectral Properties of Natural Indigo and Indirubin: Experimental and DFT Studies. *Molecules* 2019, **24**, 3831;

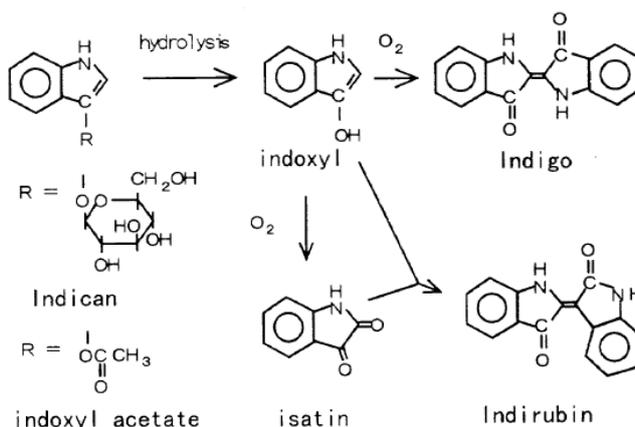


図11 indigo と indirubin の生成過程

[参考文献(4)より引用]

doi:10.3390/molecules24213831

(4) 牛田智、谷上由香、太田真祈 藍の生葉染めの過程におけるインジルビン生成の条件 日本家政学会誌
Vol. 49 No. 4 389 ~395 (1998)