

藍の葉に含まれるクロロフィルの抽出操作について

浜松日体高等学校

科学研究部 2年 松本結衣 石原太智

1. 動機・目的

2021年、私達は光環境の違いで藍の葉に含まれる indigo の量が異なるかを調べた。結果、光環境による明確な差は確認することは出来なかった。さらに、クロロフィルと indigo の吸収波長が近く、正確な indigo の量を測れなかった。私たちは、“タデアイの葉からクロロフィルのみ抽出することができれば、タデアイの葉から得られる正確な indigo の量を求めることができるのではないか”という疑問をもった。

2022年は、タデアイの葉からクロロフィルだけを抽出することと葉から得られる indigo の量を正確に測る方法を確立させ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葉は、昨年実験室内で水耕栽培した葉を冷凍した。その後、二週間自然乾燥を行い、水分を飛ばした。ミキサーで葉を刻み、乳鉢と乳棒で葉を粉碎した。冷凍を行うために使用した冷凍庫は、家庭用冷蔵庫に属している冷凍庫を使用した。以後、冷凍したタデアイの葉は「冷凍葉」と表記する。

吸収スペクトルは、島津分光光度計 Sefi IUV1240 を用いて測定をした。

3. 実験方法

(1) indigo の検量線の作成

indigo 標準溶液として、0.010g の indigo を秤量し、0.10mg/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、0.0010 から 0.0050mg/mL に調整した。吸光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、溶液の調整から測定を4回繰り返し、これらの平均値から検量線を作成した。

(2) 99.5%エタノールでクロロフィルを抽出

溶媒をエタノールとして、ソックスレー抽出器で1回、2回、3回、4回と抽出を行う回数を変えて冷凍葉からクロロフィルを抽出した。クロロフィルを抽出した葉に DMSO を 2mL 加え、5分間 indigo を抽出した。1.5mL 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 倍希釈し、吸収スペクトルを測定した。

(3) 60%アセトン～40%アセトンでクロロフィルを抽出

500mL ビーカーに 50mL 水を入れ、水の温度を 60℃に保った。丸底フラスコに 80%アセトンと冷凍葉 0.10g を入れ、60℃に保った水に浸け5分間湯煎した。（今回の実験では全体溶液を 20mL とし、60%アセトン：12mL 水 8mL とした。）1.5mL のマイクロチューブに溶液を入れ、5分間遠心分離した。この溶液の吸光度を測定した。この操作を 50%アセトン（アセトン：10mL 水 10mL）と 40%アセトン（アセトン：8mL 水 12mL）に変えて行った。

(4) 80%DMSO～40%DMSO でクロロフィルを抽出

300mL ビーカーに 50mL 水を入れ、水の温度を 80℃に保った。コニカルビーカーに 80%DMSO と冷凍葉 0.10g を入れ、80℃に保った水に浸け5分間湯煎した。（今回の実験では全体溶液を 20mL とし、80%DMSO：16mL 水：4mL とした。）1.5mL のマイクロチューブに溶液を入れ、5分間遠心分離した。この溶液の吸光度を測定した。この操作を 70%DMSO（DMSO：14mL 水：6mL）、60%DMSO（DMSO：12mL 水：8mL）、50%DMSO、（DMSO：10mL 水：10mL）、40%DMSO（DMSO：8mL 水：12mL）

(5) indigo の定量

300mL ビーカーに 50mL 水を入れ、水の温度を 80℃に保った。コニカルビーカーに 100%DMSO と冷凍葉 0.50g を入れ、80℃に保った水に浸け 15 分間、30 分間、45 分間、60 分間湯煎した。(今回の実験では全体溶液を 100mL とし、100%DMSO : 100mL 水 0mL とした。) 1.5mL のマイクロチューブに溶液を入れ、5 分間遠心分離した。この溶液の吸光度を測定した。この操作を 60%DMSO (DMSO : 60mL 水 : 40mL) の水溶液に変えて行った。

4. 実験結果

(1) indigo の検量線の作成

表 1 indigo 標準溶液の 618nm 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	0.2770	0.3658	0.4546
サンプル 3	0.0983	0.1866	0.2935	0.3652	0.4800
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

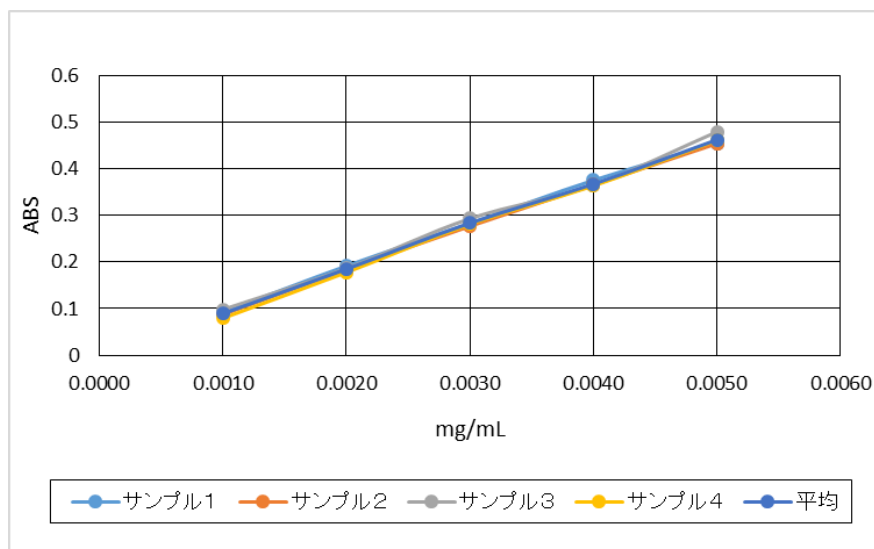


図 1 indigo 標準溶液の濃度と吸光度の関係 (618nm)

表 1 のサンプルを使用して検量線を作成した (図 1)。作成した検量線には、高い直線性があった。私たちが使用した電子天びんは、0.001g 量り取れる。4 回計測した結果ほぼ同じ検量線を得られた。

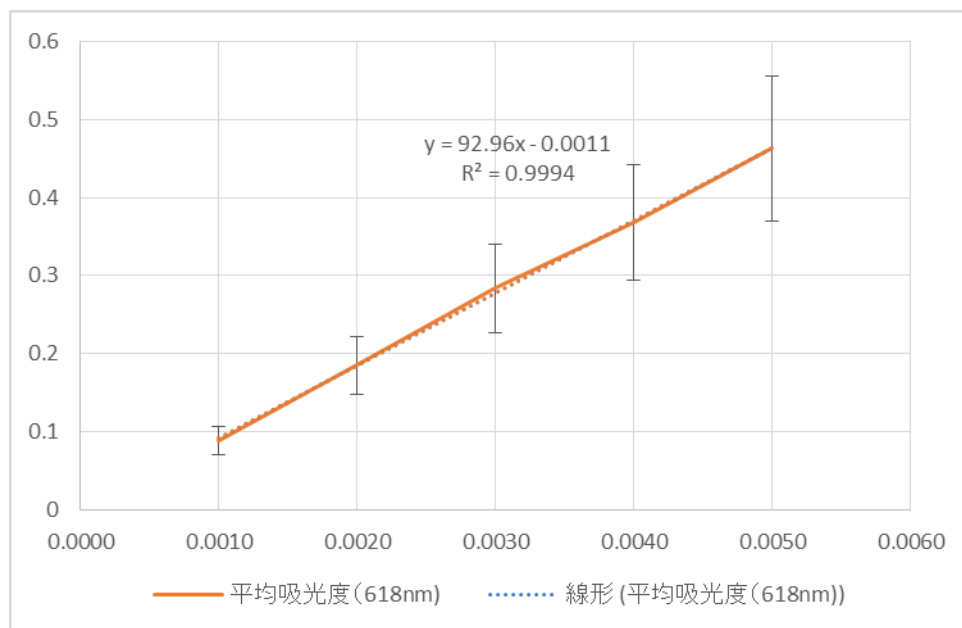


図2 indigo 溶液の検量線 (エラーバーは20%)

私たちが使用した電子天びんは± 2mg までの誤差が生じるものである。これにより、最大20%の誤差が生じている可能性がある。そのため、± 2mg、すなわち20%の誤差が生じる場合の検量線を作成した(図2)。

(2)100%エタノールでクロロフィルを抽出

ソックスレー抽出器で1回、2回、3回、4回と抽出を行う回数を変えたスペクトルを示した(図3)。665nm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。99.5%エタノールではクロロフィルを溶かし出すと indigo も溶け出た。また、抽出を行う回数を増やすとクロロフィルと indigo が徐々に減少した。

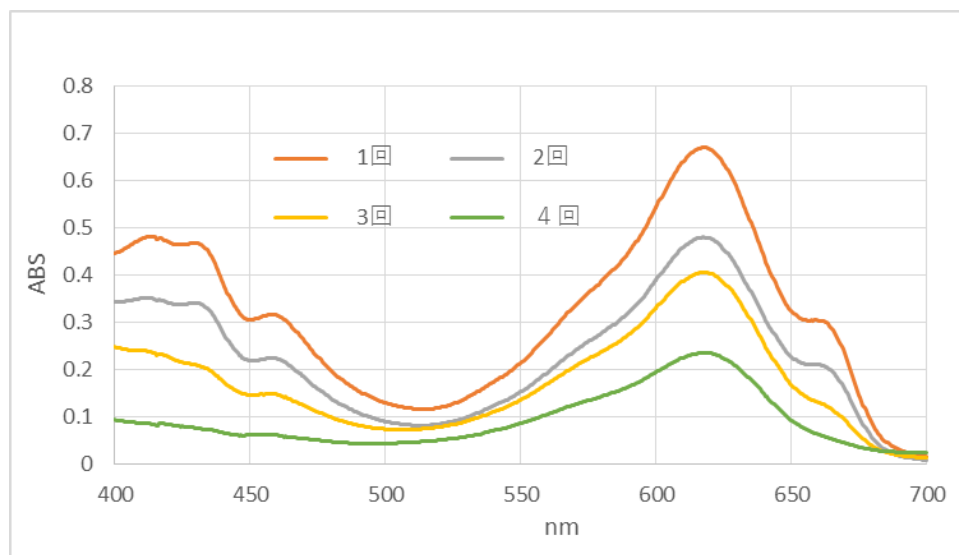


図3 10倍希釈した抽出液の吸収スペクトル (溶媒 DMSO)

(3) 60%アセトン～40%アセトンでクロロフィルを抽出

60%アセトン、50%アセトン、40%アセトンでクロロフィルを抽出したスペクトルを示した(図5)。665nm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。40%アセトンではクロロフィルを抽出することができなかった。50%アセトンではクロロフィルだけ抽出することができたが、冷凍葉に含まれるクロロフィルをすべて抽出することができなかった。60%アセトンでは50%アセトンよりも多くクロロフィルを抽出することができたが、同時に indigo も抽出されてしまった。

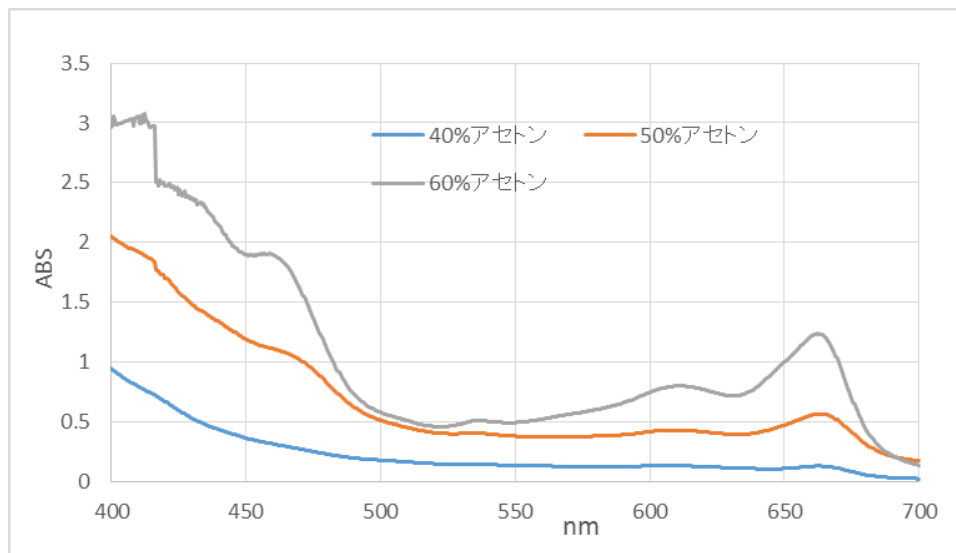


図4 抽出液の吸収スペクトル (溶媒 アセトン)

(4) 80%DMSO～40%DMSO でクロロフィルを抽出

80%DMSO～40%DMSO でクロロフィルを抽出したスペクトルを示した (図5)。80%DMSO ではクロロフィルを抽出することができたが、同時に indigo も抽出されてしまった。80%DMSO と 70%DMSO～60%DMSO で抽出を行った時を比べるとクロロフィルは、ほとんど抽出されず、indigo だけを抽出することができた。特に、60%DMSO ではクロロフィルがほぼ溶けていなかった。50%DMSO～40%DMSO ではクロロフィルと indigo は抽出されなかった。

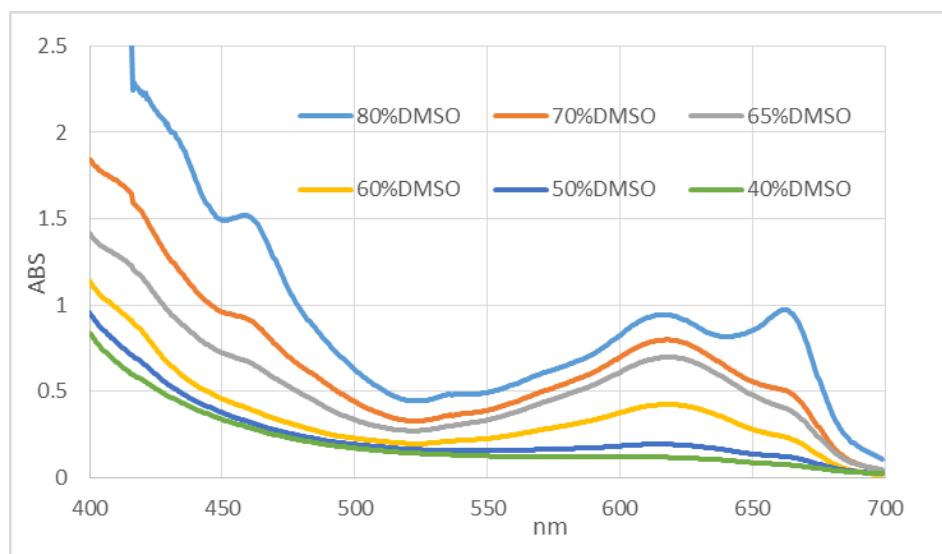


図5 抽出液の吸収スペクトル (溶媒 : DMSO)

(5) indigo の定量

60%DMSO、100%DMSO でクロロフィルを抽出した吸収スペクトルを示した (図6、図7)。indigo の極大吸収である 618nm の吸光度は、100%DMSO から indigo を抽出した試料には多く indigo が含まれていた。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。

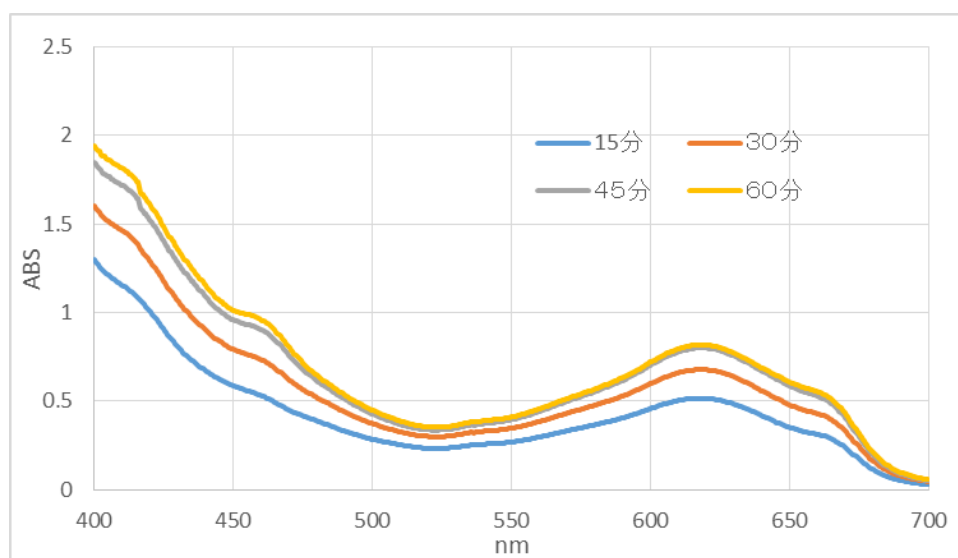


図6 60%DMSO で冷凍葉 0.50g 抽出

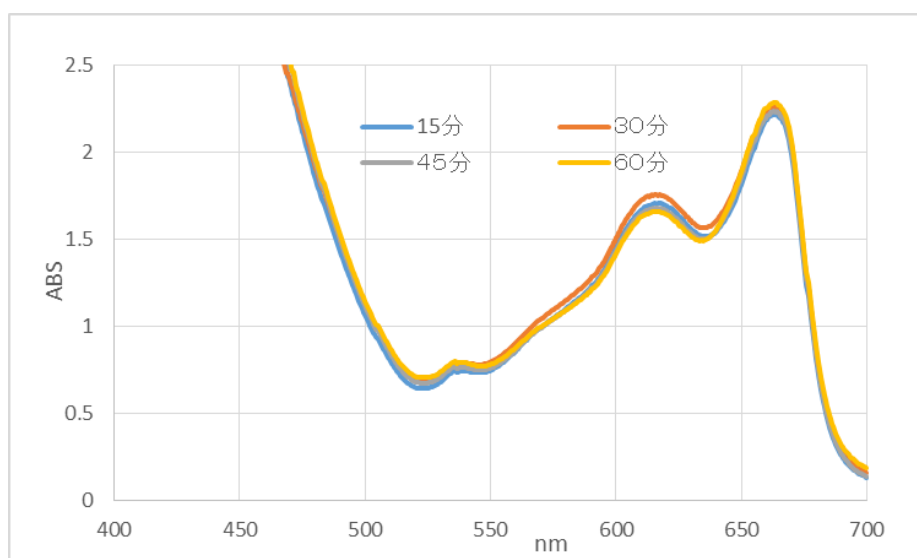


図7 100%DMSO で冷凍葉 0.50g 抽出

次に 618 nm の吸光度が冷凍葉 1.0 g あたりから得られる indigo の量を算出し、表にまとめた(表 2、表 3)。60%DMSO の場合と 100%DMSO の場合で抽出した indigo の量を比べると 30 分以降は 2.0 倍程度の差があった。

表 2 冷凍葉 1.0g あたりから得られた indigo 量 (溶媒の濃度：60%DMSO)

試料名	15 分	30 分	45 分	60 分
indigo 量 [mg/g-冷凍葉]	1.11	1.46	1.73	1.77

表 3 冷凍葉 1.0g あたりから得られた indigo 量 (溶媒の濃度：100%DMSO)

試料名	15 分	30 分	45 分	60 分
indigo 量 [mg/g-冷凍葉]	3.68	3.77	3.60	3.56

5. 考察

(1) 99.5%エタノールでクロロフィルを抽出

99.5%エタノールからはクロロフィルだけを抽出することはできなかった。今回の実験では、ソックスレー抽出器を使用したため、毎回純粋なエタノールでクロロフィルを抽出することができる。しかし、有機溶媒であるエタノールにはクロロフィルと indigo が溶解する。そのため、毎回純粋なエタノールでクロロフィルを抽出すると、同時に多くの indigo も抽出されてしまったと考える。このことから、ソックスレー抽出器を使用し、溶媒を 99.5%エタノールでクロロフィルを抽出すると indigo も抽出されると推測される。

(2) 60%アセトン～40%アセトンでクロロフィルを抽出

アセトンは両親媒性であり、アセトンのメチル基は親油性である。クロロフィルは親油性であるため、アセトンのメチル基と溶媒性し、アセトンに溶けると考えられる。また、アセトンの濃度を低くすると、クロロフィルはアセトンに溶けにくくなる。このことから、アセトンのメチル基とクロロフィルが、溶媒和する割合が減少していることが考えられる。indigo はアセトンにわずかに溶けた。また、アセトンの濃度が低くなるにつれて indigo はアセトンにほとんど溶けなくなった。このことから、アセトンの濃度を低くすると、indigo の H 原子とアセトンの O 原子が溶媒和する割合が減少するためアセトンに溶けにくくなると考えることが出来る。

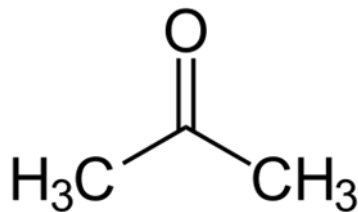


図8 アセトンの構造式 引用：wikipedia

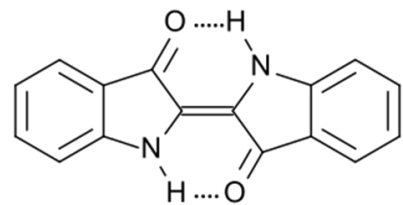


図9 indigo の構造式 引用：wikipedia

(3) 80%DMSO～40%DMSO でクロロフィルを抽出

クロロフィルは DMSO のメチル基と溶媒和し、溶液中に溶け出る。アセトンと同様に DMSO の濃度を低くすると、クロロフィルが溶液中に溶け出る量が減少する。このことから、DMSO の濃度を低くすると、DMSO のメチル基とクロロフィルが溶媒和する割合が減少していくと考えられる。

また、DMSO の O 原子は負に偏り、S 原子は正に偏っている。このことから、indigo の H 原子は DMSO の O 原子と溶媒和し、indigo の O 原子は DMSO の S 原子と溶媒和すると考えられる。また、DMSO の濃度を低くすると indigo は DMSO に溶けにくくなる。このことから、DMSO の濃度が低くなると、DMSO と indigo が溶媒和する割合が減少するためであると考えられる。

indigo 中の N 原子と H 原子が近く分子内で水素結合が起こっていると考えられる。加えて、分子間でも水素結合していることが報告されている。そのため、水素結合を切断する溶媒を見つけることが出来れば、藍の葉からより多くの indigo を抽出することが出来ると考えられる。

私達は、indigo を溶かし出す時、酸を加えると、水素結合が切断され、溶液中により多く溶け出ると考えている。

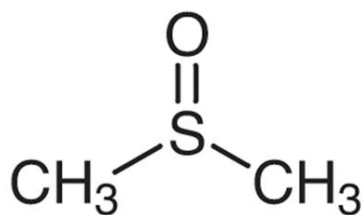


図10 DMSO の構造式 引用：東京化成工業株式会社

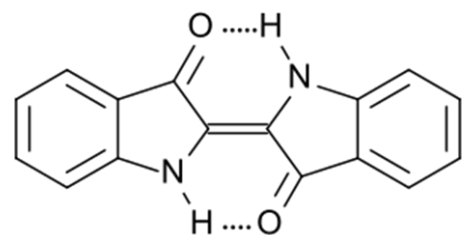


図11 indigo の構造式 引用：wikipedia

(5) indigo の定量

100%DMSO と 60%DMSO では indigo の量に 2.0 倍差があった。この原因について、100%DMSO と 60%DMSO では溶ける indigo の量に差があると考えられる。indigo の性質として、水に不溶で DMSO には溶解するため、DMSO に水が含まれると indigo を溶解する能力が低下する。このことより、60%DMSO には水が含まれるため 100%DMSO よりも indigo が溶解しないため、2.0 倍の差が生まれたと推測される。

6. 結論

今回の実験からは 100%エタノール、60%アセトン～40%アセトン、80%DMSO～40%DMSO の溶液を使用してクロロフィルだけを抽出することができなかった。しかし、60%DMSO で冷凍葉を抽出すると indigo だけを抽出することができた。また、100%DMSO と 60%DMSO で indigo を抽出すると 2.0 倍の差が生まれた。

7. 今後の展望

今年、100%DMSO で indigo を抽出した量と、去年行った光環境の違いによる indigo の量を比べると約 3.0mg/g 差があった。このことから、去年使用した藍の葉に含まれている indigo がすべて抽出されていない可能性がある。よって、去年と同様に育てた藍の葉でもう一度 indigo の量を計測する必要がある。

8. 参考文献

- (1) 浦山, 勝 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) を用いたクロロフィル抽出法の検討 北海道大学農学部技術部研究・技術報告, 2, 12-15 (1995-03)
- (2) 佐藤武雄 ジメチルスルホキシドの有機反応における溶媒および試薬としての応用 (その1) 有機合成化学 第23巻第9号 1965年
- (3) 水口仁・遠藤彩映・松本真哉 分子間水素結合を形成したインジゴ顔料の電子構造—キナクリドンならびにピロロピロール顔料と比較— 日本画像学会誌 第39巻 第2号 (2000)
- (4) 國藤勝士・前田進悟・本行暉・三島健司 綿・ポリエステルに染着したインジゴ染料の分光反射