

プロビタミン A に関する研究*

—蚕フンのカロチノイドについて—

1959年10月15日受付

北 村 光 雄**

緒 言

植物色素カロチンがビタミンAと同じ生理的効力をもっていることを最初に発表したのは Euler である。その後 Moore によってカロチンが動物体内でビタミンAに変化することを証明した。化学構造がカロチンに似ている色素をカロチノイドといて、広く動植物界に存在し、ビタミンA効果を有するものは α , β , γ -カロチンのほかにクリプトキサントニンおよび10数種のカロチン誘導体がある。これらのカロチノイド色素は人参、柑橘類をはじめ、クロロフィルを含む緑葉には必ず存在し、プロビタミンAのよい給源である。

人参および柑橘類のカロチノイド色素やその抽出については多数の報告^{1) 2) 3) 4) 5)}があり、また緑葉からクロロフィルおよびカロチノイドを分離^{6) 7) 8) 9)}することが多く行われている。クロロフィルおよびカロチンの製造原料として、アメリカではアルファルファという牧草が用いられ⁹⁾、日本では安価に得られる蚕フン¹⁰⁾や海藻が用いられている。

蚕は桑葉を食べて発育するが、桑葉のクロロフィルおよびカロチノイドの大部分が吸収されずに排せつされる。この蚕フン中には粗クロロフィル 2.4% を含み、その不ケン化物は 3644/g I.U. のビタミンA効力を有するカロチノイドが含まれている¹¹⁾。桑葉のクロロフィルおよびカロチン、キサントフィルの含有量については奥¹²⁾、吉田¹³⁾の報告があり、奥はさらに桑葉からルテインを分離¹⁴⁾している。稲垣¹⁵⁾は蚕フンより得た赤橙色油状の不ケン化物がビタミンA効力を有することを認め、外観 β -カロチンに類似した新カロチノイド ($C_{35}H_{52}O_3$), *mp.* 144~145° (結晶メタノール含有) の結晶を得たと報告している。小原等¹¹⁾は乾燥蚕フンのアセトン抽出物よりクロロフィルの含有量およびその不ケン化物から不明のカロチノイド *mp.* 179~180° の結晶とシトステリンについて報告している。

以上蚕フン中には元来桑葉中に存在する β -カロチン

及びルテインや少量存在する α , γ -カロチン、クリプトキサントニンが分離確認された報告がない。このことは桑葉のカロチノイドが蚕児の消化液、蚕フンの発酵や乾燥あるいは実験操作中に酸化分解または異性化したのではないかと考えられる。著者は以上のことから十分注意して実験を行ひ、乾燥蚕フンのエーテル抽出物から β -カロチンおよびタラキサントニンを分離確認し、さらにルテイン、 γ -カロチンの存在を認めた。キサントフィルとして蚕フン中からタラキサントニンを得たことは興味ある問題である。

なほ乾燥蚕フン 10kg より粗キサントフィルとして 540mg, 粗カロチンとして 380mg の結晶を得た。以上のように蚕フン抽出物の不ケン化物の中には酸化していないカロチンを多量に含有するのでプロビタミンA給源として有望である。

実験の部

1. 抽出およびケン化

乾燥粉砕した蚕フン 10kg にエーテルを加えて冷浸出し、浸出液はこれをろ過し、さらに残分にエーテルを加えて冷浸出することを数回くりかえした。エーテル浸出液は 40°C 以下で二酸化炭素気流中で減圧濃縮し、エーテル抽出物 371g (3.7%) を得た。

この抽出物をエーテルに溶解し、メタノール性飽和水酸化ナトリウム液を加えてよく振り、2日間冷ケン化する。ケン化後水を加えて、クロロフィルおよび油脂類を除いた。エーテル層はさらにメタノール性飽和水酸化ナトリウム液を加えて再ケン化し、完全に加水分解する。エーテル層は水でよく洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥してから二酸化炭素気流中でエーテルを留去し、濃赤色油状の不ケン化物 165g (44.5%) を得た。

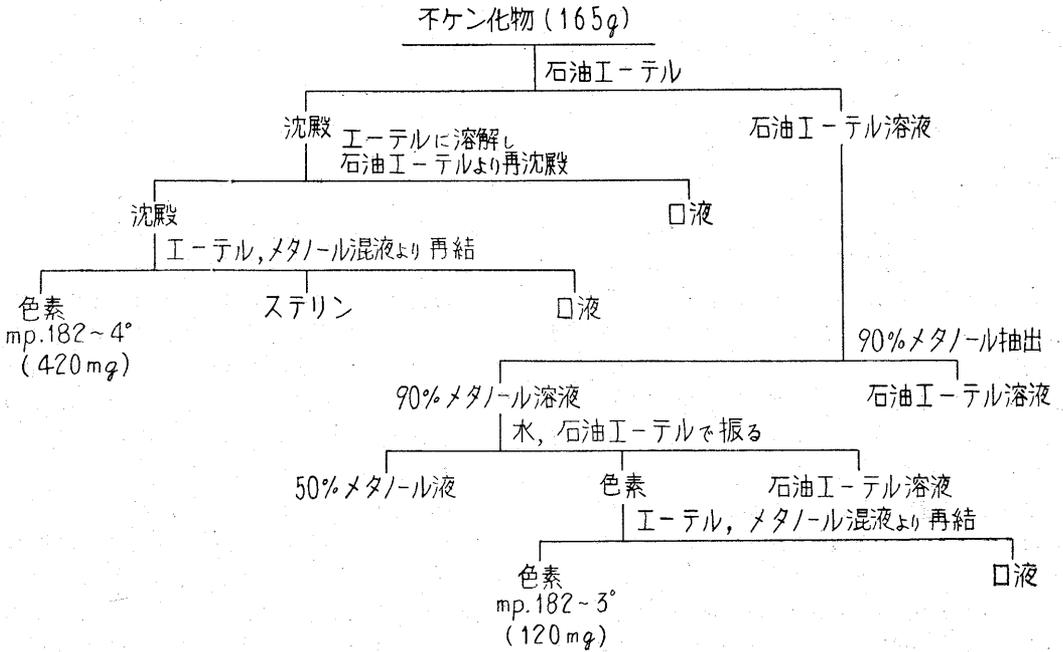
2. キサントフィルの分離

不ケン化物よりキサントフィルの分離概要は図1の通りである。不ケン化物に 600cc の石油エーテルを加えて振れば多量の赤褐色の沈澱とステリンが析出する。一夜冷蔵庫に放置した後これをろ別し、これを少量のエーテルに溶し、石油エーテルで再沈澱してろ過する。この結晶をエーテル、メタノール混液 (1:1) で再結晶すると、

* Studies on Provitamin A. (chiefly on Carotenoid of Silkworm Feces.)

** Mitsuo Kitamura.

図1. キサントフィルの分離概要



色素とステリンの混合結晶を得た。この結晶をメタノールにふゆうし、かきまぜて機械的に色素の結晶のみを集める。結晶は 420mg で mp. 182~184° である。これをさらにメタノール、エーテル混液 (1:1) より再結し、mp. 183~185° の結晶を得た。この結晶をベンゾールに溶解し、酸化アルミナを用い、クロマトグラフィを行い、展開溶媒として 40%アセトンを含む石油エーテルを用いて展開すると 3層に分かれる。上層は薄い褐色、中層は橙赤色の濃い部分で、下層は薄い橙黄色である。この中層をとり出し、メタノールを含むエーテルで溶出し、mp. 184~186° の結晶を得た。さらにこの結晶をエーテル、メタノール混液 (1:1) で数回再結晶を行い、mp. 185~186° の結晶を得た。この結晶は赤褐色稜柱状の結晶で次の呈色反応を示す。

(1) 検体のエーテル溶液に濃硫酸を加えると、はじめは緑色であるがやがて酸層が青色となる。

(2) 検体のエーテル溶液に濃硫酸を加えると緑色のリングを生じ、次第に退色する。

(3) 検体のエーテルおよびメタノール溶液に25%以上の塩酸を加えても青色とならない。この呈色反応はビオラキサントチン ($C_{40}H_{56}O_4$)、フコキサントチン ($C_{40}H_{56}O_6$) では青色を呈し、これらの色素と区別される¹⁵⁾¹⁶⁾。

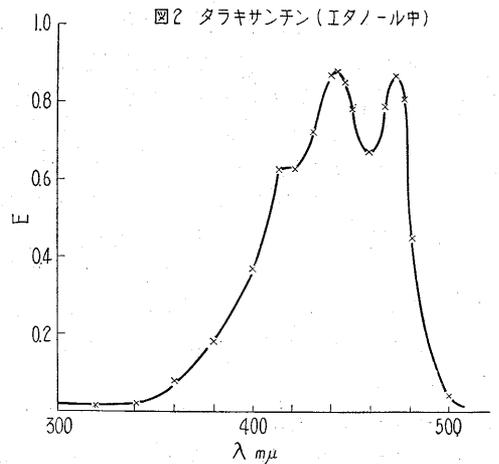
(4) 氷酢酸には黄金色にとける。ルテイン ($C_{40}H_{56}O_2$) は黄色、ビオラキサントチンは黄色から緑色に変わる。¹⁵⁾¹⁶⁾

(5) 検体のエーテル溶液にピクリン酸のエーテル溶液を加えれば黄色で変色しない。ビオラキサントチンは2分後にオリーブ色、10分後に黄緑色を呈する¹⁵⁾¹⁶⁾。

(6) 検体をエーテル、クロロホルム混液に溶解し、ギ酸を加えて放置すれば緑色から次第に濃緑色となる。ルテインはこの呈色反応を示さない。またビオラキサントチンは緑色から次第に濃青色となる。

(7) 検体のクロロホルム溶液に三塩化アンチモンのクロロホルム液を加えると強い青色を示す。

以上の呈色反応のうちでタラキサントチン特有の反応は



塩酸およびギ酸に対する反応である。したがってこの結晶はルテイン、ピオラキサントン、フコキサントンと明らかに区別される。この結晶をアルコールに溶解し、ベックマン型分光光度計で測定し、その最大吸収は 409 $m\mu$, 443 $m\mu$, 472 $m\mu$ でタラキサントンに一致する。

この結晶を元素分析し、その結果はタラキサントンに一致した。

分析物質(mg)	CO ₂ (mg)	H ₂ O(mg)	C(%)	H(%)
3.935	11.515	3.283	79.81	9.27
計算値	C ₄₀ H ₅₆ O ₄ として		79.95	9.40

上記カラムクロマトグラフィの分離のうちで、下層の吸着部分をメタノールを含むエーテルで抽出し、この残留物をベンゼン、メタノール混液 (2:1) より再結し、*mp.* 186~188° の終晶を得た。この結晶を前と同様カラムクロマトグラフィを行い、ベンゼン、メタノール混液より再結を試みたが結晶は得られなかった。この物質をとり前述の呈色反応を行い、氷酢酸およびギ酸に対する反応はタラキサントンと異なり、ルテインなることを示した。

キサントフィルとステリンの沈澱を除いた石油エーテル溶液はこれを 90% メタノール 100cc を加えて振り、抽出すること数回くりかえした。最後のメタノール抽出液は僅かに橙黄色を示した。メタノール抽出液はこれを合せ石油エーテルを加えて振り、メタノールに含まれるカロチンを除き、メタノール溶液はこれを石油エーテルでおおい、50% メタノールになるように水を加えて振り、2液のさかえに樹脂状に色素が析出する。しばらく放置した後吸引口過し、石油エーテルで樹脂状物質を洗い、完全に乾かないうちにメタノール、エーテル混液 (1:1) に溶解し、注意してエーテルを蒸発し、温時結晶が析出したときこれを冷所に放置する。この結晶は *mp.* 182~183° にして 120 mg を得た。この結晶をさらにメタノール、エーテル混液より再三再結し、*mp.* 184~185° の結晶を得た。この結晶を前述と同様カラムクロマトグラフィを行い、*mp.* 185~186° の結晶を得た。この結晶は結晶形、呈色反応、クロマトグラフィ等から上述のタラキサントンの結晶と同一物質なることを認めた。以上再結晶によりその母液を集めると残留物が 4.8g あり、濃赤色油状物質にして、種々の方法および溶媒により再結晶を試みたが成功しなかった。これはおそらく大部分が酸化分解したものと考えられる。50% メタノール可溶の色素はエーテルで回収したが少量でそれ以上調べなかった。

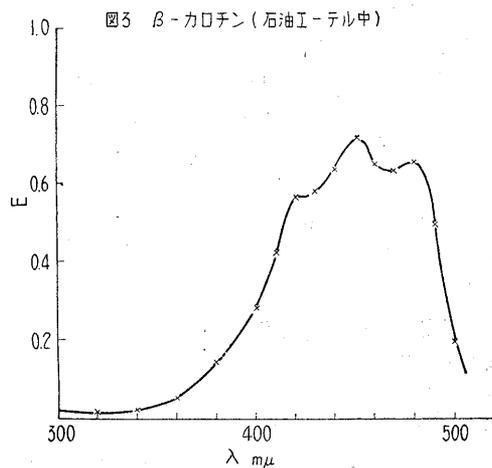
3. β-カロチンの分離

90% メタノールで抽出した石油エーテル溶液を水洗、

脱水した後、石油エーテルを留去し、3倍量の無水アルコールを加えて放置すると多量のステリンおよびロ様物質が析出する。これをろ別し、5倍量の無水アルコールの溶液とし、冷蔵庫に放置すれば多量のカロチンが析出する。このカロチンを石油エーテルから再結すれば *mp.* 174~175° の紫赤色の金属光沢を有する結晶 318mg を得た。

この結晶を藤田、青山¹⁷⁾の酸化アルミナによる α, β-カロチンの分別を行った。結晶を石油エーテルに溶解し、酸化アルミナに吸着せしめ、0.4% アセトンを含む石油エーテルで展開すると3層に分離した。α-カロチンの吸着帯がせまい薄い層にあらわれ、その上層にβ-カロチンの中の広い吸着帯があり、最上部に巾のせまいキサントフィルと思われる層がある。これらの層をそれぞれエタノールを含む石油エーテルで溶出し、石油エーテルから再結した。α-カロチンに相当する部分から、種々工夫したが結晶が得られず、β-カロチンの部分より *mp.* 174~175° の結晶を得た。この結晶をさらにベンゼン、メタノール混液 (3:1) で数回再結し、*mp.* 183° の紫赤色の結晶を得た。この結晶のクロロホルム溶液は濃硫酸で青色を呈し、三塩化アンチモンクロロホルム液を加えると濃青色を呈する。またこの結晶のエーテル溶液に塩酸を加えても変色しない。

この結晶を石油エーテルに溶解し、ベックマン型分光光度計で測定し、その結果は図3の通りで、その最大吸収は 426 $m\mu$, 452 $m\mu$, 483 $m\mu$ でβ-カロチンの文献値に一致する。



この結晶を元素分析した結果は次の通りでβ-カロチンに一致する。

分析物質(mg)	CO ₂ (mg)	H ₂ O(mg)	C(%)	H(%)
3.305	10.827	3.057	89.40	10.35
計算値	C ₄₀ H ₅₆		89.55	10.45

カロチンをロ別した濃赤色のアルコール溶液はこれを冷蔵庫に長く放置するとさらにカロチンが析出する。カロチンをロ別したアルコール溶液は水を加えてアルコールを除き、水洗、脱水してからこの残留物を少量のベンゼンに溶解し、メタノールを加えて放置すると少量のカロチンが析出する。この母液は濃赤色油状で少量のカロチンとカロチンの酸化物および液体不ケン化物が含まれていると考えられる。後から得られた粗カロチンの収量は $62mg$ であった。

要 約

1. 乾燥蚕フンをエーテル抽出し、これをケン化して、プロビタミンAの給源として有望な不ケン化物を得た。
2. この不ケン化物よりキサントフィルを分離し、これを精製してタラキサントニンであることを確認した。その収量は原料 $10kg$ から $450mg$ を得た。
3. キサントフィルを除いた不ケン化物よりカロチンを分離し、これを精製して β -カロチンであることを確認した。その収量は $380mg$ である。
4. 従来蚕フンのアセトン抽出物からカロチン、キサントフィルが結晶状にとり出されなかったが、十分注意して行えば収量もよく、結晶状になることを確かめた。

終りにのぞみ、本研究を行うにあたり御指導を頂いた東京教育大学教授小原哲二郎先生に厚く御礼申し上げます。

- (1) Barnett, H. M., U. S. Patents 2,348,443 (May 9, 1944); 2,412,707 (Dec. 17, 1946)
- (2) 稲垣, 笠原; ビタミン **3**, 216~218 (1950)
- (3) 塩入, 木村; 農産技研誌 **1**, 237, 268 (1854)
- (4) 山本亮; 理研 **12**, 437 (1933); 農化 **10**, 954 (1934)
- (5) 藤田, 青山; ビタミン **2**, 189 (1950)
- (6) Monroe E. Wall et al.; Ind. Eng. Chem.; **36**, 1057 (1944)
- (7) Monroe E. Wall et al.; **41**; 1465 (1949)
- (8) E. M. Burdick; Chemurgic Digest **12**, (6~7), 11 (1953)
- (9) Willk H. Shearon et al.; Modern Chemical Process (1950)
- (10) 多田靖次; 農産技研誌 **1**, 36 (1953)
- (11) 小原, 野崎; 農化 **28**, 246~250 (1953)
- (12) 奥正巳; 日蚕 **3**, 32~41 (1932)
- (13) 吉田徳太郎; 蚕糸試 **10**, 69~115 (1941)
- (14) 奥正巳; 農化 **8**, 655 (1932)
- (15) 奥正巳; 農化 **9**, 580 (1933)
- (16) R. Karrer and E. Jucker; Carotenoide 320(1950)
- (17) 藤田, 青山; ビタミン **3**, 86 (1950)

北村光雄 本学助教授 食品学担当