

プロビタミンAに関する研究 (第2報)*

蚕フンよりクロロフィルおよびカロチノイドの抽出について

1960年10月5日受付

北村 光 雄**

緒 言

日本ではクロロフィルおよびカロチノイドの製造原料として蚕フンや海藻が用いられている。蚕フンからクロロフィルを抽出する特許¹⁾や抽出方法および成分についての報告²⁾があるが、これらはすべてアセトンを用いて抽出している。これは Willstätter³⁾ がクロロフィルを抽出するには78%アセトンがもつともよいと提唱しているからである。ところがアセトンによつて抽出した蚕フン抽出物(ペースト)はクロロフィルの収量は多いが、この中には種々の不純物が含まれているため、クロロフィルの純度が悪く、またこのペーストよりクロロフィルおよび不ケン化物を分離することが困難である。以上のことからして蚕フンよりクロロフィルの純度の高いペーストをつくるにもつともよい抽出溶媒および方法などを検討するためこの実験を行った。

実験の部

1. 試料の調製

蚕フン中の桑葉やその他の不純物を除き、乾燥した後粉砕機を用いて粉砕した。このうち500gをとり、20~

表1 試料の粒度分布

メ ッ シ ュ	g	数	%
20 以 下		2.0	0.4
20 — 40		119.0	23.8
40 — 60		111.0	22.2
60 — 80		73.0	14.6
80 — 100		59.0	11.8
100 — 120		29.0	5.8
120 — 140		14.0	2.8
140 — 160		10.0	2.0
160 — 180		4.0	0.8
180 — 200		3.5	0.7
200 以 上		68.0	13.6

200メツシユの篩を用いて振とう機で十分篩分けし、表1に示すような結果を得た。なほ原料蚕フンの水分は12.6%で、粉砕後の水分は12.0%であつた。

2. 実験の方法

調製した試料25gを300ml容の共栓三角フラスコにとり、溶媒100mlを加えてときどき振とうし、一定温度で、一定時間放置し、これをブフネルロートを用いて吸引濾過する。溶媒は試料に吸着されているので、これをメスフラスコにとり、正確に100mlとする。この溶液よりをとり、溶媒を留去し、乾燥して、恒量を求めこれを収量とした。残りの溶液についてクロロフィルおよびカロチノイドを測定する試料とした。クロロフィルおよびカロチノイドはベックマン型分光光度計を用いて測定したが、カロチノイドの吸引は400~480mにおいてクロロフィルの吸収と重なるので直接測定せず、上記の溶液2mlをとり、窒素気流中で減圧のもとに溶媒を除き、残留物を石油エーテルに溶かして活性アルミナのカラムを通し、アセトン1%を含む石油エーテルで溶出し、この溶出液を10mlのメスフラスコに入れ、この溶液を分光光度計で測定した。またクロロフィルについては上記の溶液を直接試料液とし、650~670mu間の吸収を測定した。

表2の吸光度はそれぞれの波長における吸収の読みで、これにそれぞれの吸光係数を乗ずればクロロフィルおよびカロチノイドの含有量を示すべきである。しかしこの表からわかるように最大吸収の波長は溶媒によつて少しずれるし、また吸光係数も変化すると考えられるので、この表ではそれぞれの含有量を特に記さなかつた。抽出物中にクロロフィルおよびカロチノイドのみでなくその他の物質も含まれているので、抽出物のクロロフィルおよびカロチノイドの純度を知るために吸光度/収量を用いた。この値は純度の尺度となるもので数値と純度とは比例するものである。

3. 溶媒を異にする抽出

クロロフィルおよびカロチノイドの収量と純度とは抽出溶媒の種類によつて、変化することが十分考えられるので表2に示す10種類の溶媒を選び、前記の実験法にし

* Studies on Provitamin A (Part II). On Extraction of Chlorophyll and Carotenoid from Silkworm Feces.

** Mitsuo Kitamura

表2 溶媒を異にする抽出の吸光度

溶媒の種類 (濃度)	浸出時間	クロロフィルの吸光度				カロチノイドの吸光度				収量 (%)	クロロフ イル 吸光度/ 収量	カロチノ イド 吸光度/ 収量
		650m μ	655m μ	660m μ	665m μ	410m μ	420m μ	430m μ	440m μ			
石油エーテル (1/10)	3	0.14	0.22	0.25	0.24	0.77	0.79	0.72	0.62	1.25	0.08	0.25
	6	0.23	0.34	0.40	0.38	1.10	1.20	1.00	0.86	1.52	0.11	0.32
	24	0.19	0.27	0.32	0.31	0.80	0.82	0.79	0.69	1.73	0.07	0.18
n-ヘキサン (1/100)	3	0.02	0.03	0.03	0.02	0.08	0.08	0.08	0.07	1.48	0.07	0.22
	6	0.02	0.03	0.03	0.02	0.09	0.09	0.08	0.08	1.64	0.06	0.22
	24	0.02	0.03	0.03	0.02	0.10	0.11	0.09	0.08	1.70	0.06	0.26
エーテル (1/100)	3	0.18	0.23	0.26	0.22	0.43	0.48	0.53	0.42	2.20	0.47	0.96
	6	0.21	0.27	0.29	0.26	0.49	0.55	0.63	0.48	2.40	0.48	1.05
	24	0.27	0.33	0.36	0.31	0.58	0.65	0.72	0.57	2.52	0.57	1.14
アセトン (1/100)	3	0.23	0.31	0.34	0.29	0.52	0.58	0.66	0.51	2.34	0.58	1.13
	6	0.23	0.33	0.37	0.31	0.61	0.68	0.78	0.60	2.62	0.57	1.19
	24	0.30	0.43	0.48	0.40	0.76	0.84	0.99	0.76	3.00	0.46	1.32
酢酸エチル (1/100)	3	0.19	0.27	0.31	0.28	—	0.63	0.62	0.49	2.31	0.54	1.08
	6	0.29	0.37	0.44	0.39	—	0.74	0.86	0.68	2.89	0.59	1.15
	24	0.32	0.42	0.48	0.42	0.70	0.78	0.86	0.72	3.61	0.53	0.95
メタノール (1/100)	3	0.18	0.22	0.23	0.20	0.39	0.46	0.45	0.40	2.04	0.44	0.90
	6	0.21	0.27	0.28	0.25	0.48	0.55	0.54	0.49	2.23	0.50	1.01
	24	0.26	0.32	0.35	0.31	0.58	0.66	0.65	0.60	2.77	0.50	0.97
エタノール (1/100)	3	0.22	0.25	0.26	0.23	0.44	0.49	0.46	0.44	2.01	0.52	0.97
	6	0.22	0.25	0.26	0.23	0.46	0.52	0.48	0.42	2.09	0.50	0.99
	24	0.27	0.30	0.32	0.28	0.59	0.66	0.61	0.53	2.59	0.50	1.02
ベンゼン (1/100)	3	0.04	0.04	0.06	0.07	0.18	0.20	0.21	0.18	1.97	0.14	0.43
	6	0.04	0.05	0.06	0.07	0.16	0.18	0.19	0.16	2.18	0.14	0.35
	24	0.07	0.09	0.13	0.14	0.26	0.29	0.33	0.27	3.08	0.19	0.43
クロロホルム (1/100)	3	0.16	0.20	0.24	0.24	0.47	0.53	0.56	0.50	2.81	0.34	0.80
	6	0.18	0.23	0.28	0.28	0.54	0.59	0.63	0.57	3.05	0.37	0.83
	24	0.27	0.33	0.41	0.42	0.73	0.80	0.86	0.72	3.41	0.49	1.04
四塩化炭素 (1/100)	3	0.01	0.02	0.02	0.02	0.08	0.08	0.07	0.07	1.76	0.05	0.17
	6	0.01	0.02	0.02	0.02	0.09	0.10	0.08	0.08	1.85	0.04	0.23
	24	0.01	0.03	0.03	0.02	0.14	0.16	0.16	0.13	1.97	0.09	0.31

たがって測定した。抽出温度は20°Cで、吸光度の測定濃度は石油エーテルの場合に1/10とし、その他の場合は1/100とした。

表2からわかるようにアセトンおよび酢酸エチルは収量も多く、クロロフィルの純度も高いが、石油エーテルn-ヘキサンおよび四塩化炭素は収量が少なく、クロロフィルの純度もまた低い。

なほベンゼン、クロロホルムおよび四塩化炭素の抽出溶液はクロロフィルの最大吸収が665m μ にずれ、カ

ロチノイドの場合も抽出溶媒の種類によつて少しずつ最大吸収の波長がずれている。

4. 温度を異にする抽出

(1)アセトンおよび酢酸エチルの場合

クロロフィルをもつともよく抽出するアセトンおよび酢酸エチルを用い、抽出温度を30°, 40°, 50°, 60°, 70°Cとして抽出した結果は表3の通りである。一定温度を保つために恒温水槽を用い、溶媒の沸点近くでは還流冷却器をつけて抽出を行つた。吸光度の測定濃度はク

表3 温度を異にする抽出の吸光度(1)

抽出温度 (溶媒の種類)	抽出時間	クロロフィルの吸光度				カロチノイドの吸光度				収量 (%)	クロロフ イル 吸光度/ 収量	カロチノ イド 吸光度/ 収量
		650m μ	655m μ	660m μ	665m μ	430m μ	440m μ	450m μ	460m μ			
30°C (アセトン)	3	0.22	0.29	0.34	0.30	0.51	0.61	0.65	0.53	2.49	0.55	1.04
	6	0.24	0.33	0.39	0.35	0.56	0.68	0.72	0.59	2.51	0.62	1.15
	24	0.25	0.34	0.40	0.36	0.64	0.75	0.80	0.64	2.89	0.55	1.10
30°C (酢酸エチル)	3	0.22	0.29	0.35	0.32	0.55	0.66	0.69	0.58	2.68	0.52	1.04
	6	0.25	0.34	0.40	0.37	0.61	0.72	0.76	0.63	3.12	0.51	0.97
	24	0.36	0.47	0.56	0.51	0.69	0.82	0.86	0.73	3.89	0.58	0.88
40°C (アセトン)	3	0.26	0.34	0.40	0.35	0.56	0.67	0.73	0.59	2.53	0.63	1.15
	6	0.27	0.37	0.43	0.38	0.63	0.76	0.82	0.66	2.68	0.64	1.22
	24	0.31	0.41	0.48	0.42	0.70	0.83	0.90	0.74	3.18	0.60	1.14
40°C (酢酸エチル)	3	0.26	0.35	0.41	0.35	0.55	0.68	0.73	0.59	2.88	0.57	1.01
	6	0.28	0.39	0.46	0.39	0.60	0.74	0.78	0.63	3.32	0.55	0.94
	24	0.34	0.46	0.55	0.47	0.73	0.88	0.94	0.76	4.34	0.51	0.87
50°C (アセトン)	3	0.28	0.38	0.45	0.39	0.47	0.59	0.66	0.53	3.04	0.59	5.87
	6	0.29	0.40	0.48	0.40	0.57	0.70	0.79	0.66	3.06	0.63	1.03
	24	0.32	0.43	0.51	0.44	0.64	0.79	0.90	0.74	3.62	0.56	1.00
50°C (酢酸エチル)	3	0.30	0.39	0.48	0.43	0.53	0.64	0.74	0.60	3.41	0.56	0.87
	6	0.31	0.42	0.51	0.46	0.55	0.68	0.77	0.63	3.69	0.55	0.83
	24	0.34	0.44	0.55	0.53	0.59	0.72	0.81	0.67	4.91	0.45	0.64
60°C (酢酸エチル)	3	0.35	0.45	0.51	0.43	0.53	0.65	0.70	0.58	3.78	0.54	0.75
	6	0.35	0.46	0.53	0.48	0.57	0.70	0.76	0.63	4.47	0.48	0.68
	24	0.38	0.49	0.56	0.49	0.63	0.75	0.80	0.66	5.25	0.43	0.61
70°C (酢酸エチル)	3	0.32	0.44	0.54	0.48	0.60	0.73	0.78	0.64	4.46	0.49	0.70
	6	0.34	0.46	0.56	0.52	0.65	0.79	0.85	0.69	5.10	0.44	0.67
	24	0.31	0.40	0.52	0.58	0.76	0.90	0.96	0.79	5.73	0.40	0.67

クロフィルの場合は1/100とし、カロチノイドの場合は1/5とした。

表3から蚕フンの抽出は温度が上れば上る程収量が上り、クロロフィルおよびカロチノイドの含有量も高い。しかしその純度から見ればアセトンの40°Cで3時間または6時間抽出がもつともよい。またカロチノイドもクロロフィルと同様アセトン40°Cで6時間がもつともよい。

(2)四塩化炭素の場合

クロロフィルの抽出量ももつとも少ないが、全体の収量が、比較的多い抽出溶媒、すなわち四塩化炭素を用いその抽出温度を変えて抽出を行った。この実験の目的はクロロフィル以外の脂溶性物質をあらかじめとり除き、ついでアセトンまたは酢酸エチルで抽出し、不純物の少ないペーストをとるためである。このためまもなく抽出

の最適温度をきめる必要がある。実験方法は(1)の場合と同様である。

表4から四塩化炭素による抽出は温度が上れば収量およびクロロフィルの含有量も上るので、もし四塩化炭素を用いて、あらかじめ蚕フンから脂溶性の物質をとり除く、すなわち前処理を行うとすればやはり抽出温度は40°C 近辺が妥当のように思われる。

5. 溶媒を組合せた抽出

この抽出法は四塩化炭素とアセトンを用い、試料をまず四塩化炭素で抽出し、さらに残渣をアセトンで抽出する方法である。表5の抽出方法で、ccl-3-3, Acetone-3hr. というのは同一試料を四塩化炭素で、3時間抽出を2度繰返した後、アセトンで3時間抽出した抽出溶液の性質を示すものである。また抽出温度は40°Cで、クロロフィルの吸光度測定濃度は1/100とし、カロチノイ

表4 温度を異にする抽出の吸光度（2）

抽出温度 (溶媒の種類)	抽出時間	クロロフィルの吸光度				カロチノイドの吸光度				収量 (%)	クロロフ イル 吸光度/ 収量	カロチノ イド 吸光度/ 収量
		660m μ	665m μ	670m μ	675m μ	430m μ	440m μ	450m μ	660m μ			
30°C (四塩化炭素)	3	0.04	0.05	0.05	0.04	0.31	0.38	0.41	0.35	1.77	0.12	0.93
	6	0.05	0.06	0.05	0.04	0.33	0.40	0.43	0.37	1.85	0.13	0.94
	24	0.06	0.07	0.06	0.04	0.30	0.38	0.40	0.35	1.92	0.14	0.84
40°C (四塩化炭素)	3	0.02	0.03	0.04	0.03	0.36	0.44	0.50	0.41	2.16	0.07	0.93
	6	0.02	0.03	0.04	0.03	0.42	0.50	0.57	0.47	2.24	0.07	1.02
	24	0.06	0.08	0.09	0.07	0.46	0.55	0.62	0.51	2.75	0.13	0.90
50°C (四塩化炭素)	3	0.07	0.08	0.09	0.07	0.41	0.51	0.55	0.45	2.52	0.14	0.87
	6	0.09	0.13	0.14	0.11	0.53	0.64	0.69	0.57	2.84	0.19	0.97
	24	0.17	0.25	0.29	0.21	0.54	0.66	0.71	0.58	3.24	0.36	0.88
60°C (四塩化炭素)	3	0.13	0.19	0.22	0.17	0.48	0.59	0.64	0.52	2.99	0.29	0.86
	6	0.13	0.22	0.26	0.10	0.45	0.57	0.62	0.51	3.17	0.33	0.78
	24	0.19	0.30	0.37	0.29	0.45	0.55	0.60	0.49	3.69	0.40	0.65
70°C (四塩化炭素)	3	0.15	0.22	0.27	0.22	0.44	0.54	0.58	0.47	3.10	0.35	0.75
	6	0.14	0.22	0.27	0.22	0.37	0.46	0.48	0.39	3.12	0.35	0.62
	24	0.22	0.33	0.40	0.32	0.28	0.33	0.35	0.28	3.80	0.42	0.37

表5 溶媒を組合せた抽出の吸光度

抽出方法	クロロフィルの吸光度				カロチノイドの吸光度				収量 (%)	クロロフ イル 吸光度/ 収量	カロチノ イド 吸光度/ 収量
	650m μ	655m μ	660m μ	665m μ	440m μ	445m μ	450m μ	455m μ			
ccl ₄ -3, Acetone-3 hr.	0.21	0.27	0.32	0.29	0.13	0.14	0.14	0.13	1.28	1.00	0.22
ccl ₄ -6, Acetone-3 hr.	0.19	0.25	0.31	0.28	0.38	0.42	0.43	0.40	1.21	1.02	0.71
ccl ₄ -3-3, Acetone-3 hr.	0.19	0.24	0.29	0.26	0.30	0.33	0.34	0.32	1.16	1.04	0.59
ccl ₄ -3-6, Acetone-3 hr.	0.18	0.24	0.28	0.26	0.25	0.27	0.27	0.26	1.00	1.12	0.54

表6 再抽出の吸光度

抽出方法	クロロフィルの吸光度				カロチノイドの吸光度				収量 (%)	クロロフ イル 吸光度/ 収量	カロチノ イド 吸光度/ 収量
	655m μ	660m μ	665m μ	670m μ	440m μ	445m μ	450m μ	455m μ			
Aceton-3-3 hr.	0.82	1.06	0.91	0.65	0.13	0.14	0.14	0.13	0.74	0.54	0.76
Aceton-3-3-3 hr.	0.27	0.30	0.27	0.17	0.04	0.04	0.04	0.04	0.30	0.40	0.53
ccl ₄ -3-3 hr.	0.08	0.09	0.12	0.12	0.13	0.14	0.14	0.12	0.45	0.11	0.63
ccl ₄ -6-3 hr.	0.07	0.08	0.11	0.11	0.14	0.16	0.14	0.13	0.41	0.11	0.78

ドは 1/25 とした。

上表によれば四塩化炭素で前処理した後アセトンで抽出したペーストは、アセトンで直接抽出したペーストに含まれるクロロフィルの純度の約2倍であることがわかる。

なほ前処理の溶媒として表2から、四塩化炭素の他に石油エーテル、ヘキサンなどが適当であると考えられる。

6. 再抽出

アセトンまたは四塩化炭素を用い、同一試料を2~3回抽出を行い、2回目、3回目の抽出溶液の性質は表6の通りである。抽出温度はいずれも40°Cで、クロロフィルの吸光度測定濃度は1/10で、カロチノイドは1/5である。

表6から試料をアセトンで繰返し抽出した場合、2回目は収量が約1/3に、3回目は約1/8減少し、クロロ

フィルの純度も約 1/11 と 1/15 に低下している。また四塩化炭素で2回処理し、その収量は約 1/5 以下に減少するので、1回の四塩化炭素処理で大部分が抽出されるものと考えられる。

要 約

1 乾燥蚕フンを粉碎し、これを試料として溶媒の種類による抽出効果、温度による抽出効果、時間による抽出効果、溶媒を組合せた抽出効果などについて実験を行った。

2 溶媒を異にする抽出において、アセトンおよび酢酸エチルがもつとも多くクロロフィルおよびカロチノイドを抽出し、石油エーテル、n-ヘキサンおよび四塩化炭素はクロロフィルの抽出が僅かである。

3 温度を異にする抽出では、温度が上昇すればする程クロロフィルの抽出はよいが、その抽出物の純度ももつとも高いところは 40°C である。

4 抽出時間による効果は、24時間をもつともよいが

クロロフィルの純度からすれば3~6時間がよい。

5 溶媒を組合せた抽出効果において、四塩化炭素でまず抽出した後、残渣をさらにアセトンで抽出する方法を行った。*この結果アセトンで直接抽出したペーストに比べクロロフィルの純度が約2倍となる。

6 再抽出において、アセトン抽出を繰返した場合、2回目の収量は約 1/3 に、3回目は約 1/8 に減少し、クロロフィルの純度も約 1/11、約 1/15 に低下する。また四塩化炭素の場合、2回目の収量は約 1/5 に減少する。

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および阿部昭吉氏に厚く御礼申し上げます。

- (1) 伊藤 ; 特許 No. 2478, 昭 26.5.19
- (2) 多田 ; 農産技研誌, 1, 36 (1953)
- (3) 小原, 野崎 ; 農化, 28, 246 (1953)
- (4) R. Willstätter ; Ann., 390, 269 (1912)

北村光雄 本学助教授 (食品学担当)