

T L C を用いた光合成色素の分離

—生徒実験における指導上の留意点—

高 桑 純

これまで高等学校の生物では、光合成色素の分離はペーパークロマトグラフィーを用いる方法が一般的であった。しかし、データが不安定であり、1時間の授業の中で結果を分析することも難しかった。そこで、ここでは、短時間で結果が得られるT L Cを用い、安定したデータを求めるための諸条件について検討した結果、展開液としては石油エーテル：アセトン＝7：3 (v:v)が、温度は15～20℃が、展開槽としては植物培養試験管が適することがわかった。

【キーワード】 高等学校理科 T L C 薄層クロマトグラフィー 光合成色素

I はじめに

光合成色素の分離は高等学校生物 I Bにおいて普遍的な実験であり、これまで多くの場合ペーパークロマトグラフィーによって行われてきた。しかし、展開に時間がかかること、各色素のスポットの色が不明瞭であること、R f 値が不安定であることなどから、生徒に結果を分析させるところまで指導することが難しい実験であった。

ここでは、薄層アルミシートを用いて、試料の保存法、展開液の組成の影響、温度の影響、展開槽の形状の影響などについて調べた結果を示す。さらに、薄層クロマトグラフィーを用いるうえで、光合成色素の分離を効果的に指導するための方法について検討する。

II 準備

1. 材料

薄層アルミシート (Merk社製 20×20cm)、植物培養試験管 (φ25×120mm)、試験管 (φ30×200mm)、ゴム栓、ビーカー (300ml)、サランラップ、漬物用瓶 (スクリューキャップ付き)、アルミホイル、ガラス管 (先端を細く引き延ばしたもの)、エッペンドルフチューブ、カミソリ、乳鉢、乳棒、ピンセット、Bコート、アサガオ、カボック

2. 薬品

粉末シリカゲル (乳鉢と乳棒を使ってすりつぶしたもの)、ジエチルエーテル、石油エーテル、アセトン

III 方法

- (1) アサガオまたはカボックの葉0.6gをカミソリで細かく切り刻み、粉末シリカゲル1.5gを加えて乳鉢と乳棒で形がなくなるまですりつぶし、試料とする。
- (2) (1)で得られた試料0.4gをエッペンドルフチューブにいれ、ジエチルエーテル0.5mlを加えてふたをし、よく振って色素を抽出する。数分放置しておく、緑色の上澄み (抽出液) が得られる。
- (3) 薄層アルミシートを10×100mmに切りとり、端から20mmのところに、鉛筆で線を引いておく。
- (4) 抽出液にガラス管を浸して抽出液を吸い取り、(3)の線の中点にガラス管の先を押し当て抽出液をしみ込ませる。この操作を3回繰り返す。
- (5) あらかじめ石油エーテルとアセトンを一定の体積比で混合した液 (展開液) を、展開槽の中に底から5mmの深さまで入れる。(4)の薄層アルミシートをピンセットを使って静かに中へおろしふたをする。なお、展開液は実験

の10分前には容器に入れ、ふたをしておいた。



図1 展開のようす

(6) 展開液が薄層アルミシートの上端（高さ8 cm）まで達したらすぐにとりだし、表面にBコート張って、各色素のスポットの中心（もっとも色の濃い部分）と上端、下端にサインペンで印を付け、R f 値を計算する。

IV 試料の保存法について

カボックの葉で試料を作って抽出を行い、その直後と一週間後にそれぞれ展開を行った。なお、一週間後に使用した抽出液は、実験までエッペンドルフチューブに密封して冷凍庫で保存した。展開液として、石油エーテル：アセトン＝7：3（v：v）を、容器として植物培養試験管を用い、22℃の温度条件で行った。

1. 結果

図2に結果を示す。展開はそれぞれ3回行い、各色素のスポットの上端のうちもっともR f 値の値が大きいものと、下端のうちもっともR f 値が小さいものの幅を示した。色素の移動した範囲は、R f 値で示してほぼ0.1の幅におさまっており、条件をそろえることによりかなり安定した値が得られた。

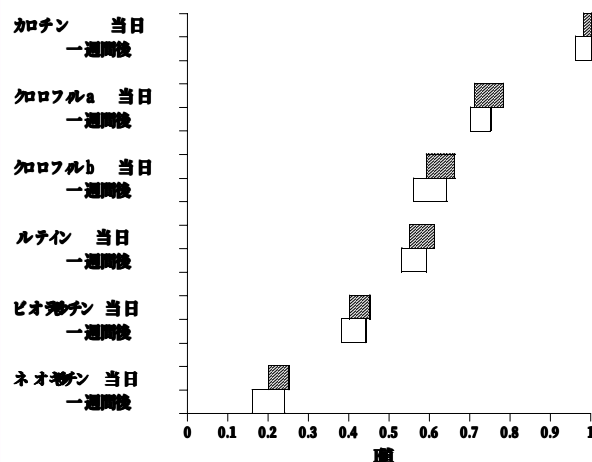


図2 各色素スポットの範囲

2. 考察

色素の抽出を行った段階で冷凍保存すると、ややR f 値が低下する傾向が見られる。しかし、生徒にR f 値から色素の種類を判定させるうえでは大きな支障はない。クロロフィルbとルテインの範囲が重なるが、この2種の色素は色調の違いで容易に区別できるので問題はない。実験が1時間の中で終了できない場合、抽出まで行って冷凍保存し、後日実験を継続することも可能である。

V 展開液の組成とR f 値

アサガオの葉で試料を作り、容器として試験管を用い、20℃の温度条件で展開した。展開液として、石油エーテル：アセトンの比率（v：v）が7.5：2.5，7：3，6.5：3.5の3種類の展開液を用いた。

1. 結果

それぞれの時の各色素のR f 値を図3に示した。なお、R f 値の値は、スポットの中心で求めた値であり、3回の実験値の平均である。また、X軸に示した展開液の組成の数値は、石油エーテルの割合を示している。なお、7.5では、クロロフィルaとbおよびルテインのスポット

が重なり測定できなかった。

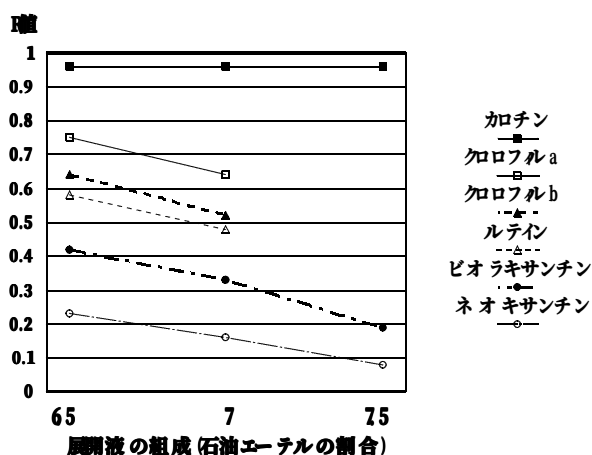


図3 R f 値に対する展開液の組成の影響

2. 考察

石油エーテルの割合が7.5の場合、クロロフィル a と b およびルテインのスポットが重なるため展開液としては使用できない。7 および 6.5 では、各スポットが分離し R f 値の測定が可能であった。しかし、R f 値が大きくなるにつれ、スポットの色調が薄くなるとともにスポットの範囲も広がる傾向があった。安定した数値を得るためには、石油エーテル：アセトン＝7：3 のほうが適していると思われる。なお、展開液の成分は揮発性の高いものが多く、使用するたびに蒸発して組成が変化する可能性があるため、毎回作ることが望ましいが、保存する場合は密閉した容器を用いる必要がある。

VI 温度と R f 値

カボックの葉で試料を作り、容器として植物培養試験管を用い、展開液として石油エーテル：アセトンの比率 (v : v) = 7 : 3 の展開液を用いて展開を行った。温度は 10, 15, 20, 25℃で行った。

1. 結果

10, 15, 20, 25℃それぞれの温度での各色素の R f 値を図 4 示した。R f 値の値は、スポットの中心で求めた値であり、3 回の実験値の平

均である。

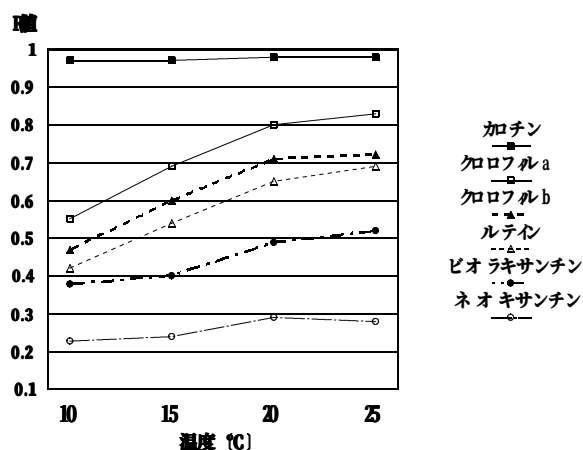


図4 R f 値に対する温度の影響

また、それぞれの温度でアルミシートの上端まで (80mm) 展開液が移動するのに要した時間を図 5 に示した。なお、25℃では 30 分を経過して展開液の移動が進まなくなったため展開を中止して、その時点での R f 値を求めた。

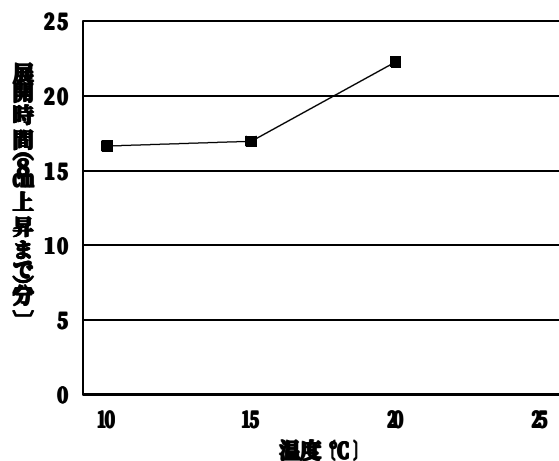


図5 展開時間に対する温度の影響

2. 考察

25℃では展開に要する時間がかかるだけでなく、著しいテーリングが生じた。全般に温度が高いほど R f 値が高くなり、テーリングが起こる傾向が見られた。実験を 50 分の授業の中で終了させるためには、展開にかかる時間は短いほ

うがよいが、実験室を15℃以下にするのは、たとえ冬季であっても生徒の健康上無理がある。したがって、実験を行うには高温になる夏季を避け、15～20℃の範囲で行うのが望ましい。

VII 展開槽

アサガオの葉で試料を作り、展開液として、石油エーテル：アセトン＝7：3（v：v）を用い、20℃で展開した。展開槽として、ゴム栓でふたをした植物培養試験管と試験管、サランラップでふたをして輪ゴムでとめたビーカー、ふたをした漬物用瓶を使用し、それぞれの時の展開の状態を比較した。

1. 結果

ビーカー・漬物用瓶ともにテーリングが起りやすく、各スポットの範囲が不明瞭になった。特にこの傾向は、クロロフィルaで顕著であった。植物培養試験管や試験管のように細い容器では比較的安定した結果が得られた。また、必ずしも密閉する必要はないが、ある程度、中の気体が逃げないようなふたは必要である。

2. 考察

学校では、専用の展開槽を入手する事は容易ではない。したがって、展開槽の代わりに用いるのであれば、試験管のように細くて容積が小さいものが適していると思われる。ただし、あまり細いものは、アルミシートの側面が試験管内壁に接触し、スポットが斜めに上昇していくことがあるため、ある程度内径に余裕がある方が望ましい。ふたはゴム栓で十分であるが、時々中の気圧により抜けるので、上に重いものを乗せておさえてやる必要がある。

VIII おわりに

以上の実験から、光合成色素のT L Cを生徒実験として行う場合、展開液として石油エーテルとアセトンを用いる場合は7：3の比率がもっとも適すること、温度は15～20℃の範囲が望

ましいこと、展開槽として使う容器は試験管が適することが結論として得られた。

また、そのほかの留意事項として、あまり明るいところで作業を行わないことと、換気のよい状態で行うことがあげられる。抽出・展開の操作を強い光のもとで行うと、クロロフィルの分解が起こり、分解産物であるフェオフィチンのスポットがクロロフィルaの上にあらわれる。また、石油エーテル・アセトン・ジエチルエーテルはできるだけ吸引しないように注意する。なお、これらの薬品は引火性が強いので、実験中は火気をさけること。

緑藻・褐藻・紅藻類の光合成色素と比較させることで、植物の分類体系に発展させることができる。これらの藻類も同様の方法で分離できる。

IX 参考文献

- 片山舒康・平田徹・倉島彰・太齋彰浩・横浜康継(1994) 藻類の光合成色素の簡単な定性分析 Jpn.J.Phycol.42:71-77
- 中島光博・笹栗佳織(1998) 薄層クロマトグラフィーによる光合成色素分離の研究Ⅱ 日本生物教育会 p33 (要約)
- 御園生拓・横浜康継(1986) 海藻の光合成色素遺伝 No40 11-16.
- 加賀友子(1998)) シリカゲルを利用した同化色素分離実験のいろいろ 遺伝別冊10号 113-116
- 長谷昭(1985) 薄層クロマトグラフィーによる海藻の色素の分析 生物教材 19・20 117-125
- 全国理科教育センター研究協議会(1986) T L Cプラスチックシートを用いた光合成色素の分離 186-187
- 新訂図解実験観察大事典 生物(1992) 薄層クロマトグラフィーによる分離 東京書籍 p97

(たかくわ まこと 生物研究室研究員)