

岡山大学農学報 (44), 44—46 (1974)

ホウレンソウ葉から Lutein の結晶単離について^{a)}

高 木 茂 明

(生物化学研究室)

Received June 27, 1974

Isolation of Crystalline Lutein from Spinach Leaves

Shigeaki TAKAGI

(Laboratory of Biological Chemistry)

Up to date, any precise reports on crystalline lutein, which was comprised at about 20 % in carotenoids of green leaves and at about 40 % in these xanthophylls, have not been found. In previous report¹⁾, the authors showed that the glyco-carotenoids containing galactose were existent in spinach leaves, and in the processes of these carotenoids purification lutein was found to be crystallized easily from cold acetone in considerably good yields.

This crystalline lutein had mp. 174—176°C, and $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ of 2344 at 446 nm. Furthermore, visible absorption spectrum, IR-spectrum, NMR-spectrum and Mass spectrum were also estimated for the identification of it.

Lutein は古く Between, Tswett 及び Willstätter らによって緑葉中に見出されて²⁾ 以来、よく知られている Carotenoid である。Lutein は緑葉 Carotenoid の約 20% を占め¹⁾、緑葉 Xanthophyll 類の約 40% を占めている^{6,11)} が、これまで緑葉からの結晶単離法については詳しい報告がない。著者らは先にほうれん草葉中に Galactose を含む糖 Carotenoid の存在を明らかにし、その構造を推定したが¹⁾、これら糖 Carotenoid を単離精製していく過程で Lutein を容易に結晶単離する方法を見出した。

Carotenoid の一般的単離法については Liaan-Jensen の綜説⁹⁾ があり、著者らも緑葉 Carotenoid についてすでに報告している¹⁾ ので詳しい方法についてはそれを参照されたい。ホウレンソウ生葉 (1973年11月収穫) 11 kg から Chloroform (Ch) : Methanol (MtOH) (2 : 1, v/v) 混液で総脂質を抽出し、Ch 層から減圧濃縮により可及的に溶媒を除去する。濃縮液を静置後上層を捨て下層 (Ch 層) を 4°C に放置すると多量の沈殿を生成するからこれを濾過し、沈殿を冷 Acetone で洗浄する。

濾液と洗液を合せて減圧濃縮後 Diethylether (Ether) と少量の水を加えて振り混ぜて静置し、分離した 2 層のうちの暗黒色の上層を分取する。

この色素溶液を飽和食塩水で数回水洗後、芒硝で脱水し減圧濃縮後 Column chromatography に供する。液量 670 ml, 溶質量 78 g.

Column chromatography の担体には Silica gel (Wakogel C-200 ; Wako chemicals Co. Ltd.) を用い、あらかじめ Benzene (Be) で平衡に達せしめた Column (6 × 20 cm) に上記

a) Carotenoid の生化学的研究 (IV) とする。

試料溶液の 70 ml をのせて少量の Be で Column を洗浄後溶媒として ① Be 1 l; ② Be : Ether (8 : 2)^{b)} 2 l; ③ Be : Ether (7 : 3) 1 l; ④ Be : Ether (6 : 4) 2 l; ⑤ Be : Ether (5 : 5) 2 l; ⑥ Be : EtAc^{c)} (5 : 5) 2 l; ⑦ Be : MtOH (8 : 2) 1 l を順に流し、色素を溶出させた。④ の溶媒によって溶出した画分から溶媒を完全に留去後約 50 ml の Acetone に溶かし、-25°C に放置すると約 48 時間で赤色の結晶が大量に析出する。引き続き 1 週間放置後、-25°C で遠沈して母液と分別した結晶を再度少量の Acetone に室温で溶解させた後 -25°C に放置して再結晶させる (Fig. 1)。柱状結晶の収量 730 mg. m. p. 176°C。室温では Ether, Acetone に易溶であるが, Petroleum ether, MtOH, Chloroform に難溶。

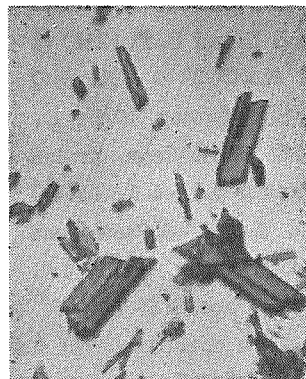


Fig. 1. Photomicrograph of lutein from acetone (×3,200)

Lutein 結晶の Ethanol (EtOH) 溶液の可視吸光 Spectrum は、 λ_{max} (423, 446, 474 nm) 及び Fine structure の点で文献値³⁾ とよく一致する。446 nm における $[E]_{1cm}^{1\%} = 2344$ であった (Fig. 2)。

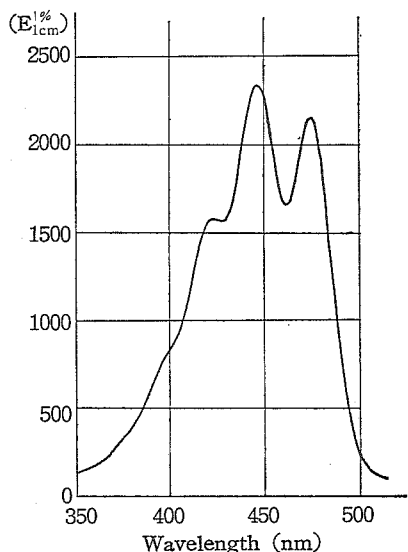


Fig. 2. Visible light absorption spectrum of lutein (in ethanol)

IR 分光分析 (KBr 錠剤) による ν_{max} は Bartlett¹⁾ 及び Eichenberger⁴⁾ らが示した値と比較的良好く一致しており (Table 1) 1030 cm^{-1} 附近の強い吸収は 3 か 4 位の sec-OH の存在を示し、967 cm^{-1} の鋭い単一 peak は all trans 共軛二重結合に由来している^{8,10)} ことを示している。

Table 1. ν_{max} of I. R. Spectrum of Crystalline Lutein (cm^{-1})

測定値	3400(broad), 3010, 2960, 2910, 2850, 1560,
文献値 ¹⁾	3460, , , 2960, 2920, 2860, 1572,
測定値	1440, 1380, 1360, 1035, 1017, 967
文献値 ¹⁾	1440, 1380, 1362, 1030, , 967

NMR Spectrum 分析による比較的高磁場の τ 値は次のようである。数値は $CDCl_3$ を溶媒にしたものであり、[] 内の数値は C_6D_6 と CD_3OH の混液を溶媒にしたものである。9.19 [9.11] (S.3 H); 9.03 [8.95] (S.3H); 8.95 [8.85] (S.6H); 8.80 [8.75] (S.2H); 8.76 [8.67] (S.2H); 8.40 [8.31] (S.3H); 8.29 [8.20] (S.3H); 8.13 [8.14] (S.3H); 8.07 [8.08] (S.9H)。以上の数値は文献値¹⁾ と良好一致を示しており、このうち Methyl proton を Fig. 3 のように帰属させることが出来る。

b) 比率は (v/v) である。

c) Ethyl acetate

さらに5.0から7.0 τ に至る Broad Peak (2H) は3および3'の-OH基の付根の proton に相当し、共軛 Methylene proton Peak が3.1~4.3 τ (14H) に、また非共軛 Methylene proton (4'位)と6'位の付根の proton 各1H (計2H) が4.3から5.0 τ に Broad Peak として認められる。

Mass spectrum 分析 (MS) によると供試結晶 Lutein は M^+ として m/e 568 を示し、さらに明瞭な Lutein fragment ion であるところの m/e 550 ($M-H_2O$), 532 ($M-2H_2O$), 476 ($M-92$), 458 ($M-92-H_2O$), 444 ($M-106-H_2O$), 410, 392, 91, 55, 43 を示している。これらの測定値は文献値^{1,2,5)}とも良い一致を示す。

以上の結果から得られた結晶 Carotenoid は Lutein であることは明らかであり、比較的単離が困難であった緑葉 Carotenoid のうちの一成分を容易に結晶として単離することが出来た。

実 験

すべての実験はなるべく暗所で行うようにした。可視分光分析は島津 MPS 型自記分光光度計を用いて測定した。IR 分析は日立 EPI 型赤外分光光度計を用い、KBr 錠剤法により行った。NMR 分析は Hitachi Perkin-Elmer R-24 型 NMR 測定装置 (60 MHz) を用いて測定した。溶媒には主として $CDCl_3$ を用いたが、難溶のため別の溶媒として C_6D_6 と CD_3OD との混液も用いた。MS 測定は島津 LKB-9000 型質量分析計を用いて測定した。

測定条件は Electron energy 70 eV; Ion source temp. 270°C; Probe heater の最低温度 150°C である。結晶の 0.1% Acetone 溶液 2.5 μl を直接導入した。

本研究を行うに際し、NMR 測定の労をわずらわし、また有益な御助言を頂いた本学農学部河津一儀助教授および MS 測定をして頂いた本学医学部薬学科奥田教授および岩藤氏に深謝します。さらに顕微鏡写真撮影に際し御指導頂いた本学農学部鳥海教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) BARTLETT L., W. KLYNE, W. P. MOSE, P. M. SCOPES, G. GALASKO, A. K. MALLAMS, B. C. L. WEEDON, J. SZABOLES and G. TOTH: J. Chem. Soc. (C) 2527 (1969)
- 2) BUDZIKIEWIEZ H., H. BRZEZINKA und B. JOHANNES: Monatshefte für Chemie 101, 579 (1970)
- 3) DAVIES B. H.: Chem. and Biochem. of Plant Pigments p.523, Acad. Press London & New York (1965)
- 4) EICHENBERGER W. und E. C. GROB: Helvetica Chimica Acta 46, 2411 (1963)
- 5) ENZELL C. R. and G. W. FRANCIS: Acta Chemica Scand. 23, 727 (1969)
- 6) GOODWIN T. W.: Chem. and Biochem. of Plant Pigments, p.128, Acad. Press, London and New York (1965)
- 7) ISLER O.: Carotenoids, p. 13. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart (1971)
- 8) LIAAEN-JENSEN S.: Acta. Chem. Scand. 13, 842 (1959)
- 9) LIAAEN-JENSEN S.: Carotenoids p. 63, Biskhäuser Verlag Basel und Stuttgart (1971)
- 10) SCHWIETER U., G. ENGLERT, N. RIGASSI and W. VETTER: Carotenoids Other Than Vitamin A p.365, Butterworths, London (1969)
- 11) TAKAGI S. and M. SHIROISHI: Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ. (40), 75 (1972)

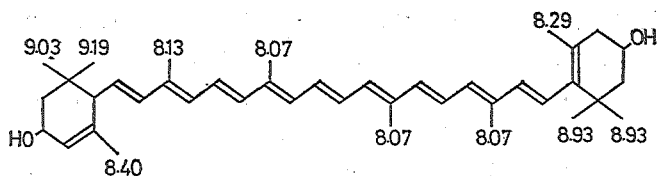


Fig. 3. τ values of methylproton from 60 MHz proton magnetic resonance spectrum of lutein (in $CDCl_3$)