貝類缶詰の緑変に関する研究

(第9報) 缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの
酸化生成物の物理化学的性質の比較

長 田 博 光*

Studies on Greening of Canned Shellfishes

Part IX. Comparison between the physico-chemical property of the oxidation products of the green pigments of canned oysters and that of the oxidation products of copper chlorophyllin

HIROMITSU OSADA

In order to investigate whether the green pigments of canned oysters have a porphyrin ring such as chlorophyll or not, the physico-chemical property of the oxidation products of the green pigments of canned oysters was compared with that of the oxidation products of copper chlorophyllin which was oxidized by chromium trioxide-sulfuric acid mixture.

The oxidation products of the green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin could be separated into four components respectively. The results of the chemical reaction, absorption spectra, thin layer chromatographies, solubility examination, infra-red spectra and micro elemental analysis of the former showed the same behaviour as those of the latter indicating that the green pigments of canned oysters have a porphyrin ring. (Received Jan. 21, 1972)

缶詰かきの緑色色素はその物理化学的性質ならびに元素分析値より銅フェオフィチン、銅フェオホルバイドに近似していることが認められた¹⁾が、本報ではその緑色色素が果してポルフィリン環を有しているかどうかを確認するために緑色色素を酸化し、その酸化生成物の物理化学的性質を調べ、銅クロロフィリン²⁾の酸化生成物のそれと比較した。

実験方法 (1)

1. 実験材料

缶詰かきの緑色色素は広島県坂にて2月上旬に採取したかきを常法通り缶詰とし、その缶詰かきより第2報¹⁾に記した緑色色素の分離精製法に準じて精製し、石油エーテル、エーテル、アセトンおよびクロロホルムにて分別し(それぞれ P1, P2, P3, P4¹⁾と略称)、実験に供した。

銅クロロフィリンは和光純薬製品を用いた。

2. 缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化ならびにその生成物の分別³⁾⁴⁾

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化ならびにその生成物の分別方法は第1図に示したごとく、それぞれ5gずつ秤取し、少量のアセトンならびにクロロホルムに溶かし、50%の硫酸 300 ml と水 100 ml を加え、0~5°C に冷却し、三酸化クローム 36 g を水 150 ml に溶解した溶液を攪拌しながら約1時間かけて滴加し、さらに24時間攪拌して色素を酸化したのち酢酸エチルにて8回、エーテルにて2回抽出し抽出液を合わせて、芒硝を加え、脱水し、60°C にて減圧濃縮する。この濃縮液を50 ml の温湯に溶かし、2N の苛性ソーダーにて pH 10 に調整し、濾過する。濾液をエーテルにて5回抽出する。エーテル抽出液は芒硝にて脱水し、60°C にて減圧濃縮する(この濃縮液をA区と略称)。抽出残液は塩酸にて pH 4.0 調整し、酢酸エチルにて5回、エーテルにて2回抽出する。抽出液を合わせて芒硝にて

* 東洋食品工業短期大学(兵庫県川西市南花屋敷 4-23-2)

Toyo Junior College of Food Technology. Kawanishi-shi, Hyogo.

第1図 缶詰かき緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物の分別方法

脱水し, 60°Cにて減圧濃縮する(この濃縮液をB区と略称)。抽出残液は塩酸にて pH 2.0 に調整し, エーテルにて4回抽出し, さらにエーテルにて24時間連続抽出し, 抽出液を合わせて芒硝にて脱水し, 60°Cにて減圧濃縮する(この濃縮液をC区と略称)。このようにして得られた3区は苛性ソーダー入りデシケーターに入れ真空にして酢酸臭がなくなるまで放置する。

3. 分析方法

(1) 化学的反應

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のエールリッヒ反応⁵⁾およびニンヒドリン反応を調べた。

(2) 紫外吸収スペクトル

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物をそれぞれ酢酸エチルに溶かし, 200~400 nm における吸光度を測定した。

(3) 薄層クロマトグラフィー⁶⁾

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物を酢酸-n-ブタノール-水 (1:4:1) を展開剤とし, 薄層クロマトグラフィーを行ない, 風乾したのちブローム・クレゾール・グリーンにて発色し, R_f 値を求めた。

結 果 (1)

1. 緑色色素の酸化生成物の分別

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物はいずれも A, B, C の3区に分別でき, その量比はほぼ 1:20:4 であり, 全収量はいずれも約 1g であった。

2. 化学的反應

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物はいずれもエールリッヒ反応およびニンヒドリン反応は陰性であった。

3. 紫外吸収スペクトル

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物の紫外吸収スペクトルは第2, 3, 4図に示したごとく, いずれもAおよびB区は 255 nm に, C区は 254 nm に吸収極大を持っていることが認められた。

4. 薄層クロマトグラフィー

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物の薄層クロマトグラフィーの R_f 値は第1表に示したごとく, A区はいずれも明らかな R_f 値を与えなかった。

第2図 伍詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物 (A区)*の紫外吸収スペクトル
溶媒: 酢酸エチル, * pH 10.0 にてエーテル抽出区

第3図 伍詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物 (B区)*の紫外吸収スペクトル
溶媒: 酢酸エチル, * pH 4.0 にて酢酸エチル抽出区

第4図 伍詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物 (C区)*の紫外吸収スペクトル
溶媒: 酢酸エチル, * pH 2.0 にてエーテル抽出区

B区はいずれも 0.88 の R_f 値を示し、コハク酸のそれと類似していることが認められた。C区はいずれも 0.6 と 0.88 の 2つの R_f 値を示し、前者はシュウ酸の R_f 値に類似しており、後者はB区のそれと同一であることが認められた。

第1表 伍詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物の薄層クロマトグラフィーの R_f 値

緑色色素	分画区 R_f 値		
	A区*	B区*	C区*
かき P1	—	0.88	0.60, 0.88
かき P2	—	0.88	0.60, 0.88
かき P3	—	0.88	0.60, 0.88
かき P4	—	0.88	0.60, 0.88
銅クロロフィリン	—	0.88	0.60, 0.88

* A区は pH 10.0 にてエーテル抽出区
B区は pH 4.0 にて酢酸エチル抽出区
C区は pH 2.0 にてエーテル抽出区

実験方法 (2)

1. 緑色色素の酸化生成物のベンジルアミン塩の調製⁴⁾

伍詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のうちA区はベンジルアミン塩を作らないことが認められたので、B、C区についてベンジルアミン塩を調製した。

酸化生成物を少量の酢酸エチルに溶かし、ベンジルアミンを白色の沈澱が生成しなくなるまで加えたのち 60°C にて減圧濃縮する。濃縮液に石油エーテルを加え、過剰のベンジルアミンを石油エーテルとともに除去する。沈澱物を少量のメタノールに溶かし、少量のアセトンと過剰のエーテルを加え冷所に放置する。生成した結晶を集め、少量のメタノールに溶かし、エーテルにて再結する。

また、別に緑色色素を酸化し、エーテルのみで抽出し、pH 4.0 にてエーテルにて抽出調製した区分を苛性ソーダー入りデシケーターにて処理しないで、そのまま酢酸エチルに溶かし、ベンジルアミンを加え、さらに少量のメタノールを加えたのち冷所に放置する。生成した結晶を集め、少量のメタノールに溶かし、酢酸エチルにて再結する (酢酸区と仮称)。

2. 分析方法

(1) 紫外吸収スペクトル

伍詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩をメタノールに溶かし、200~350 nm における吸光度を測定した。

(2) 薄層クロマトグラフィー⁶⁾

伍詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩を酢酸-*n*-ブタノール-水 [(1:4:1) を展開剤として薄層クロマトグラフィーを行ない、風

乾したのちブローム・クレゾール・グリーンにて発色し、 R_f 値を求めた。

(3) 溶剤に対する溶解性

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の水、エタノール、メタノール、エーテル、ベンゼン、ブタノール、クロロホルム、アセトン、酢酸エチルおよびピリジンに対する溶解性を調べた。

(4) 赤外線吸収スペクトル

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩を KBr 錠剤法により赤外線吸収スペクトルを測定した。

(5) 元素分析

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩について C, H, N を測定した。

結 果 (2)

1. 紫外吸収スペクトル

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の紫外吸収スペクトルは第5, 6, 7図に示したごとく、B および C 区はいずれも 215, 257, 261 nm に、酢酸区は 219, 257, 261 nm に吸収極大が認められ、両者はそれぞれ同一の吸収スペクトルを持っていることが認められた。

2. 薄層クロマトグラフィー

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の薄層クロマトグラフィーの R_f 値は第2表に示したごとく、両者はそれぞれ同一の R_f 値

第5図 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物(B区)のベンジルアミン塩の紫外吸収スペクトル

溶媒: メタノール

を示し、B区は 0.50 (黄色), 0.61 (青色) と 0.78 (黄色) の3つの R_f 値を、C区は 0.35 (黄色), 0.61 (青色) と 0.78 (黄色) の3つの R_f 値を、また酢酸区は 0.61 (青色) の単一の R_f 値を示すことが認められた。

第6図 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物(C区)のベンジルアミン塩の紫外吸収スペクトル

溶媒: メタノール

第7図 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物(酢酸区)のベンジルアミン塩の紫外吸収スペクトル

溶媒: メタノール

第2表 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の薄層クロマトグラフィーの R_f 値

緑 色 色 素	酸化生成物分画区 R_f 値		
	B 区	C 区	酢酸区
かき緑色色素	0.50, 0.61, 0.78	0.35, 0.61, 0.78	0.61
銅クロロフィリン	0.50, 0.61, 0.78	0.35, 0.61, 0.78	0.61

* シェット酸ベンジルアミンの R_f 値 0.35, 0.61

第3表 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の溶剤に対する溶解性

溶 剤	酸 化 生 成 物 分 画 区					
	B 区		C 区		酢 酸 区	
	かき緑色色素	銅クロロフィリン	かき緑色色素	銅クロロフィリン	かき緑色色素	銅クロロフィリン
水	++	++	++	++	++	++
メタノール	++	++	++	++	++	++
エタノール	++	++	++	++	++	++
ブタノール	++	++	++	++	+	+
クロロホルム	±	±	±	±	++	++
ベンゼン	±	±	±	±	±	±
ピリジン	++	++	++	++	+	+
アセトン	+	+	+	+	+	+
酢酸エチル	-	-	-	-	-	-
エーテル	-	-	-	-	-	-

++ 可溶 + やや可溶 ± わずか可溶 - 不溶

第8図 缶詰かき緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物(B区)の赤外線吸収スペクトル

第9図 缶詰かき緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物(酢酸区)の赤外線吸収スペクトル

3. 溶剤に対する溶解性

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の溶剤に対する溶解性は第3表に示したごとく、両者はそれぞれ同一の溶解性を示し、BおよびC区は水、メタノール、エタノール、ブタノールおよびピリジンに可溶性、アセトンにはやや可溶性、クロロホルムおよびベンゼンにはわずかに可溶性であるが、酢酸エチルおよびエーテルには不溶性であることが認められた。

4. 赤外線吸収スペクトル

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩のうちB区ならびに酢酸区の赤外線吸収スペクトルは第8, 9図に示したごとく、両者はそ

第4表 缶詰かき緑色色素ならびに銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩の元素分析値(%)

	かき緑色色素		銅クロロフィリン	
	B区	酢酸区	B区	酢酸区
C	55.04	63.98	54.79	63.91
H	6.43	7.91	6.49	7.82
N	8.40	8.51	8.47	8.53

れぞれ同一のスペクトルを示し、N-H、C-H および O-H 伸縮が認められた。

5. 元素分析

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンの酸化生成物のベンジルアミン塩のうちB区ならびに酢酸区の元素分

析値は第4表に示したごとく、両者はそれぞれほぼ同一の元素分析値を示し、酢酸区は酢酸ベンジルアミン塩の計算値とほぼ同一であることが認められた。

考 察

缶詰かきの緑色色素が銅フェオフィチン、銅フェオホルバイドなどのクロロフィル誘導体であろうと推定したが、果してポルフィリン環を有するものであるかどうかを確認するために緑色色素を酸化し、その生成物とポルフィリン環を有し容易に入手できる銅クロロフィリンの酸化生成物との物理化学的性質を比較した結果、両者はいずれの性質も全く同一の挙動を示すことが認められ、酢酸区を含めた酸化生成物の4つのうち1つは酢酸であることが確認された。この酢酸は各ピロール核と結合しているメチル基の酸化に由来するものであると考える。いま1つはシュウ酸であろうと考えるが、これは第4ピロール核と結合しているプロピオン酸基に由来するものとする。酸化生成物の主成分であるB区は、薄層クロマトグラフィーのR_f値はコハク酸のそれと比較的類似しているが、ベンジルアミン塩にすると明らかに異なることが認められた。このベンジルアミン塩のNMRは7.5 δ と4.2 δ に化学シフトが認められ、シュウ酸ベンジルアミン塩のそれとよく類似しているため、B区はシュウ酸類似物であろうと考える。

缶詰かきの緑色色素を塩酸とスズにより還元分解するとその還元生成物はピロール反応陽性であることが認め

られている⁷⁾。これらの結果ならびに第2報において記述した結果と合わせ考えると、缶詰かきの緑色色素は銅フェオフィチン、銅フェオホルバイドなどのクロロフィル誘導体であると考えられる。

要 約

缶詰かきの緑変に関与している緑色色素がポルフィリン環を有するクロロフィル誘導体であるかどうかを確認するために、緑色色素を三酸化クロームと硫酸にて酸化し、その酸化生成物と銅クロロフィリンの酸化生成物の物理化学的性質について比較検討した結果、その酸化生成物はいずれも酢酸を含めて4成分に分かれ、そのうち3成分はベンジルアミン塩を形成し、それらの物理化学的性質はいずれも全く同一の挙動を示すことが認められた。また、4成分のうち1つは酢酸であり、いま1つはシュウ酸であることが判明した。

文 献

- 1) 長田博光・大塚 滋：食品工誌，17，237 (1970)。
- 2) 稲垣 勲：植物化学(医歯薬出版)，p. 239 (1968)。
- 3) WILLSTATTER, R.: *Annalen*, **373**, 227 (1910)。
- 4) FICKEN, G.E., JOHNS, R.B. and LINSTAD, R.P.: *J. Chem. Soc.*, 2272 (1956)。
- 5) 梶本五郎：栄養と食糧，16，60 (1963)。
- 6) 長田博光：東洋食品短大研報，6，54 (1964)。
- 7) 長田博光：未発表。

(昭和47年1月21日受理)