

貝類缶詰の緑変に関する研究—XI

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 — XI 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.

1. 緒 言

缶詰かきの緑変に関与している緑色色素はこれまでの研究¹⁾、即ち、その物理化学的性質ならびに元素分析値よりクロロフィル a とその誘導体からなるものと推察されるが、さらにこれを別の面、即ち、その色素の構造が示すポルフィリン環の有無から確認してみようとした。そのため色素を酸化して、その酸化生成物の物理化学的性質を調べると同時にクロロフィルの誘導体である銅クロロフィリン²⁾の酸化生成物のそれを比較検討したので、以下にその結果を報告する。

2. 実験材料ならびに方法

2・1 実験材料

缶詰かきの緑色色素は広島湾で養殖され、2月上旬に採取されたかきについて常法通り缶詰とし、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で分別し(それぞれP1, P2, P3, P4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・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%硫酸300mlと水100mlを加え、0~5°Cに冷却し、三酸化クローム36gを水150mlに溶か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時間攪拌したのち200mlの酢酸エチルで8回、200mlのエーテルで2回抽出する。未分解物は同様に硫酸と酸化クロームで分解し、酢酸エチルならびにエーテルで抽出する。このようにして得られた抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、60°Cで減圧濃縮する。

この濃縮液を50mlの温湯に溶かし、2Nの苛性ソーダ溶液でpH10に調整し、濾過する。濾液を100mlのエーテルで5回抽出する。エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、60°Cで

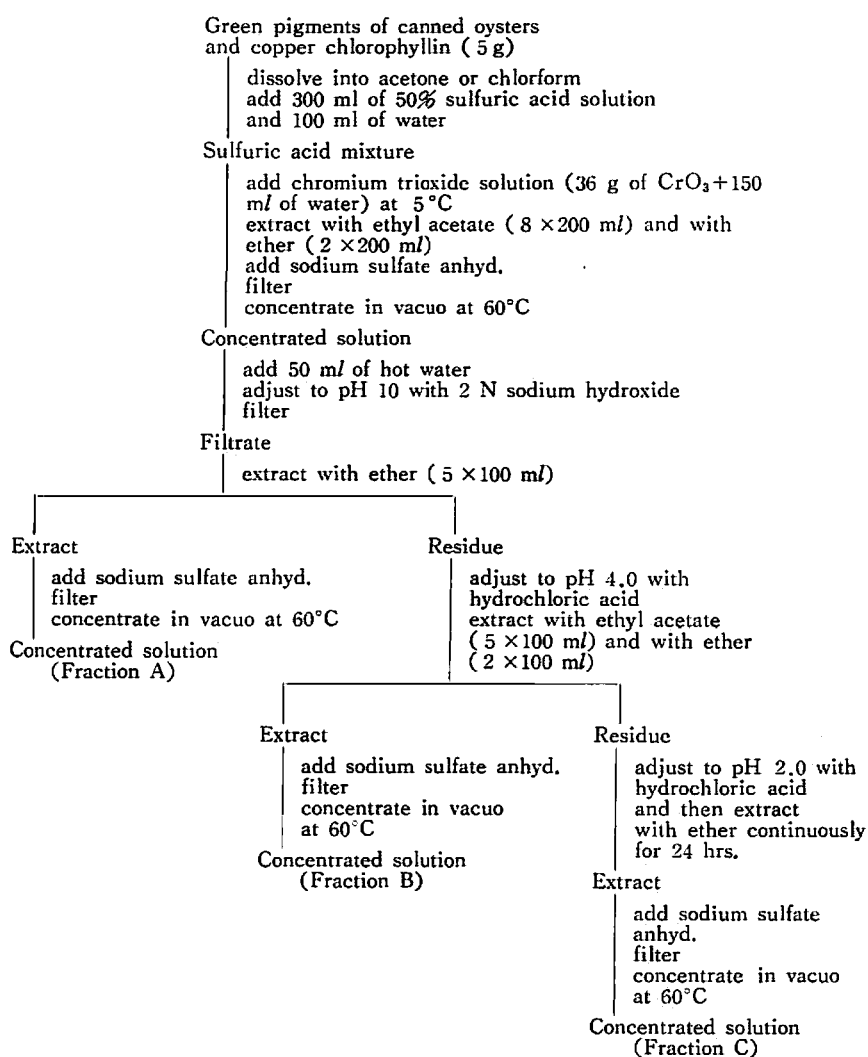


Fig. 1 Procedure for separating the oxidation products of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.

減圧濃縮する（A区とする）。抽出残液は塩酸で pH 4.0に調整し、100ml の酢酸エチルで5回、100ml のエーテルで2回抽出する。抽出液を合わせて、無水硫酸ナトリウムで脱水し、60°Cで減圧濃縮する（B区とする）。抽出残液はさらに塩酸で pH 2.0に調整し、100ml のエーテルで4回抽出し、次いでエーテルで24時間連続抽出し、抽出液を合わせて、無水硫酸ナトリウムで脱水し、60°Cで減圧濃縮する（C区とする）。このようにして得られた3区は苛性ソーダを入れたデシケーターに入れて、真空にして酢酸臭がなくなるまで放置する。

2・3 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調製⁴⁾

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区およびC区についてベンジルアミン塩を調製した。即ち、両者をそれぞれ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、60°Cで減圧濃縮する。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共に除去する。残渣を少量のメタノールに溶かし、少量のアセトンを加えたのち過剰のエーテルを加え、冷所に保存する。生成した結晶を集め、少量のメタノールに溶かし、エーテルで再結する。

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でエーテルによって抽出調製した区分を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、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、酢酸エチルで再結する（酢酸区と仮称）。

2・4 緑色色素の酸化生成物の化学的反応

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ツヒ反応⁵⁾ およびニンヒドリン反応について調べた。

2・5 緑色色素の酸化生成物の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、日立パーキンエルマ139型分光光度計で 200~350m μ における吸光度を測定した。

2・6 緑色色素の酸化生成物の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 v/v/v）を展開剤として、薄層クロマトグラフィーを行ない、風乾後ブローム・クレゾール・グリーンで発色し、R_f 値を求めた。

2・7 緑色色素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

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それぞれメタノールに溶かし、日立パーキンエルマ139型分光光度計で 200~350m μ における吸光度を測定した。

2・8 緑色色素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のベンジルアミン塩を酢酸-n.ブタノール-水（1:4:1 v/v/v）を展開剤として薄層クロマトグラフィーを行ない、風乾後ブローム・クレゾール・グリーンで発色し、R_f 値を求めた。

2・9 緑色色素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

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について調べた。

2・10 緑色色素の酸化生成物のベンジルアミン塩の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区と酢酸区をKBr 錠剤として、日立赤外分光光度計 EPI-G₂型で測定した。

2・11 緑色色素の酸化生成物のベンジルアミン塩の元素分析

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区と酢酸区のC, H, Nを日立CHN分析計で測定した。

3. 結 果

3・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区ならびに酢酸区の4区に分別でき、その量比はほぼ1:20:4:10であり、収量は全体で約1.5gであった。

3・2 緑色色素の酸化生成物の化学的反応

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ツヒおよびニンヒドリン反応はいずれも陰性であった。

3・3 緑色色素の酸化生成物の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および4図に示したごとく、両者はそれぞれ同一のスペクトルを持っており、A区とB区は255m μ に、C区は254m μ に吸収極大が認められた。

3・4 緑色色素の酸化生成物の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

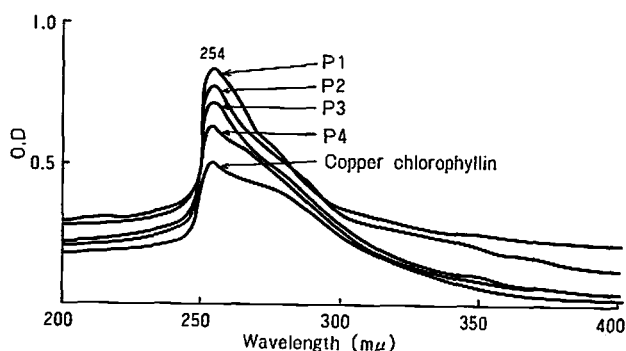


Fig. 2 Ultraviolet spectra of oxidation product (fraction A) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin. Solvent: Ethyl Acetate.

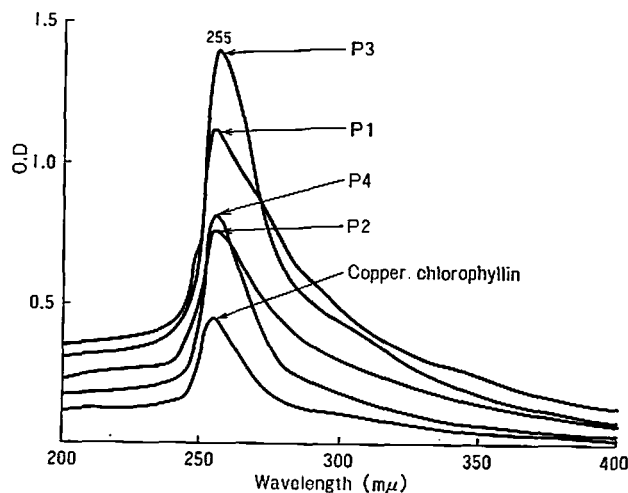


Fig. 3 Ultraviolet spectra of oxidation product (fraction B) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin. Solvent: Ethyl Acetate.

フィーの Rf 値は第 1 表に示したごとく、A 区はいずれも明らかな Rf 値を与えなかった。B 区はいずれも 0.88 の Rf 値を示し、コハク酸の Rf 値とほぼ一致した。C 区はいずれも 0.6 と 0.88 の 2 つの Rf 値を示し、前者はシュウ酸の Rf 値とほぼ一致しており、後者は B 区と同一でコハク酸のそれを示し、B 区の一部が混合していることが認められた。

3・5 緑色色素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

缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィル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 および 7 図に示したごとく、両者はそれぞれ同一のスペクトルを示し、B および C 区は 215、257、261 μ に、酢酸区は 219、257、261 μ

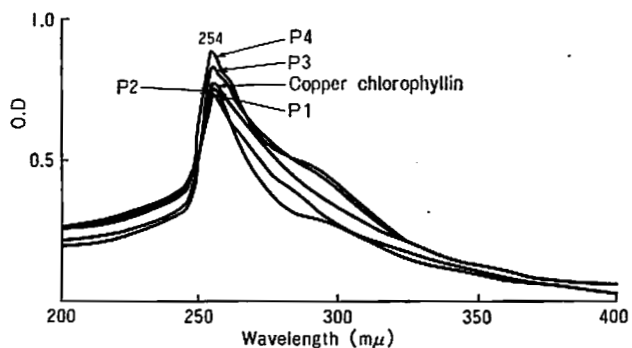


Fig. 4 Ultraviolet spectra of oxidation product (fraction C) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.
Solvent: Ethyl Acetate.

Table 1 Rf values in thin layer chromatography of oxidation products of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.

Green pigment	Rf value		
	Fraction A	Fraction B	Fraction C
p 1 *	—	0.88	0.60, 0.88
p 2 *	—	0.88	0.60, 0.88
p 3 *	—	0.88	0.60, 0.88
p 4 *	—	0.88	0.60, 0.88
Copper chlorophyllin	—	0.88	0.60, 0.88

* Green pigment of canned oysters

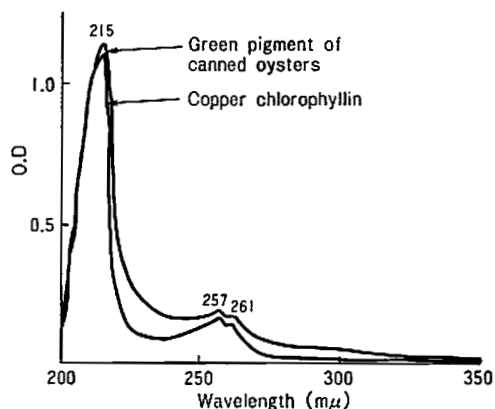


Fig. 5 Ultraviolet spectra of benzylamine salt of oxidation product (fraction B) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.
Solvent: Methanol.

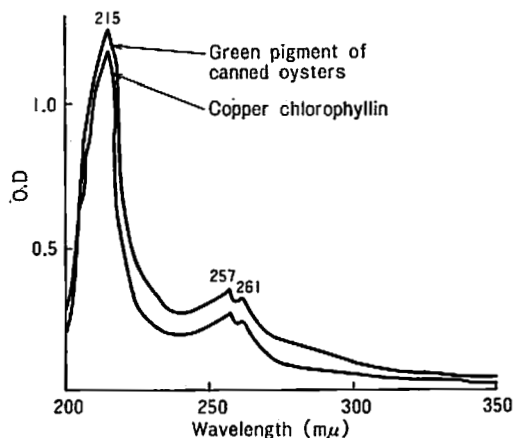


Fig. 6 Ultraviolet spectra of benzylamine salt of oxidation product (fraction C) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.
Solvent: Methanol.

に吸収極大を持っていることが認められた。

3・6 緑色色素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

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 Rf 値は第2表に示したごとく、両者はそれぞれ同一の Rf 値を示し、B区は0.61 (青色スポット)と0.78 (黄色スポット)の2つの Rf 値を示した。C区は0.35 (黄色スポット)、0.61 (青色スポット)と0.78 (黄色スポット)の3つの Rf 値を示した。また、酢酸区は0.61 (青色スポット)の単一の Rf 値を示した。

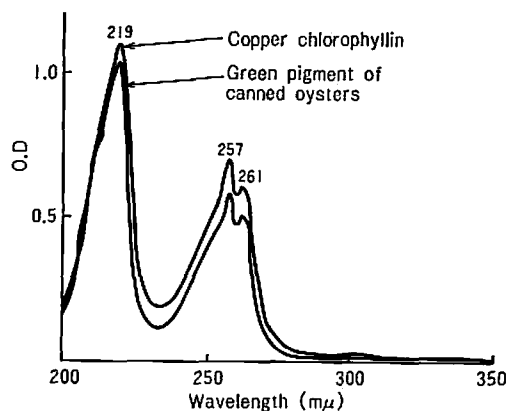


Fig. 7 Ultraviolet spectra of benzylamine salt of oxidation product (fraction acetic acid) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.
Solvent : Methanol

Table 2 Rf values in thin layer chromatography of benzylamine salts of oxidation products of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.

Green pigment	Rf values of oxidation products of green pigments						
	Fraction B			Fraction C			Fraction Acetic acid
Green pigment of oyster	0.50,	0.61,	0.78	0.35,	0.61,	0.78	0.61
Copper chlorophyllin	0.50,	0.61,	0.78	0.35,	0.61,	0.78	0.61

* Rf values of benzylamine oxalate are 0.35 and 0.61

3・7 緑色色素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

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

Table 3 Solubilities of benzylamine salts of oxidation products of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.

Solvent	Fraction of oxidation products of green pigment					
	Fraction B		Fraction C		Fraction Acetic acid	
	Pigment of oyster	Copper chlorophyllin	Pigment of oyster	Copper chlorophyllin	Pigment of oyster	Copper chlorophyllin
Water	++	++	++	++	++	++
Methanol	++	++	++	++	++	++
Butanol	++	++	++	++	+	+
Ethanol	++	++	++	++	++	++
Chloroform	±	±	±	±	++	++
Benzene	±	±	±	±	±	±
Pyridine	++	++	++	++	+	+
Acetone	+	+	+	+	+	+
Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-
Ether	-	-	-	-	-	-

++ Soluble + Fairly soluble ± Slightly soluble - Insoluble

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、ベンゼンおよびクロロホルムにはわずかに可溶性であるが、エーテルおよび酢酸エチルには不溶性であることが認められた

酢酸区は水、メタノール、エタノールおよびクロロホルムに可溶性、ブタノール、ピリジンおよびアセトンにはやや可溶性、ベンゼンにはわずかに可溶性であるが、エーテルおよび酢酸エチルには不溶性であった。

3・8 緑色色素の酸化生成物のベンジルアミン塩の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区と酢酸区の赤外線吸収スペクトルは第8および9図に示したごとく、両者はそれぞれ同一のスペクトルを示し、N—H、C—HおよびO—H伸縮を持っていることが認められた。

3・9 緑色色素の酸化生成物のベンジルアミン塩の元素分析値

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区と酢酸区の元素分析値は第4表に示したごとく、両者はいずれもほぼ同一の値を示し、酢酸区は標準試料の酢酸ベンジルアミン塩の元素分析値とよく一致した。

このように缶詰かきの緑色色素と銅クロロフィリンを酸化すると全く同一の物理化学的性質を有する生成物を得ることができた。

この分析法によると銅クロロフィリンからシュール酸、酢酸とコハク酸類似物がとれるが、それと同一の物質が缶詰かきの緑色色素から分離された。

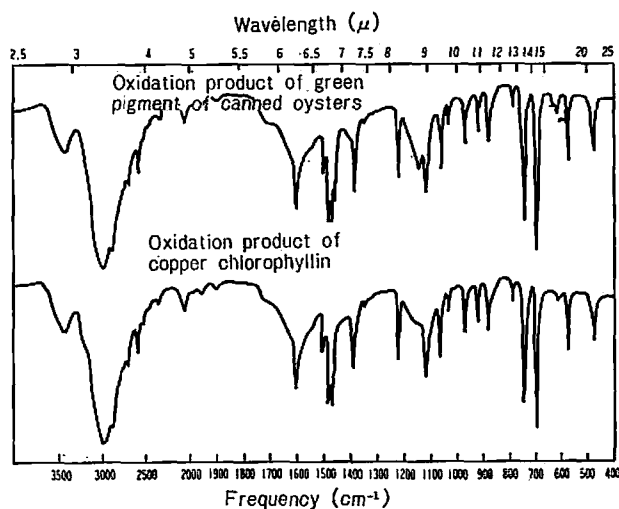


Fig. 8 Infrared spectra of benzylamine salt of oxidation product (fraction B) of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin.

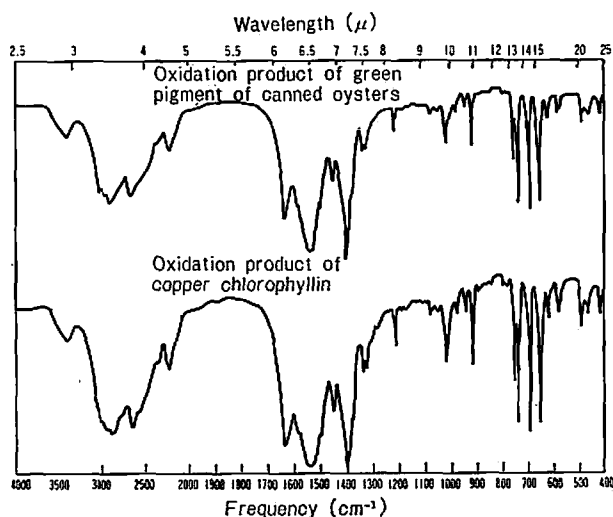


Fig. 9 Infrared spectra of benzylamine salt of oxidation product (fraction acetic acid) of green pigment of canned oysters and copper chlorophyllin.

4. 考 察

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等のクロロフィル誘導体であろうと推定されたが、果してポルフィリン環を有するものか否かを確認するために緑色色素を

Table 4 Micro elemental analysis values of benzylamine salts of oxidation products of green pigments of canned oysters and copper chlorophyllin (%)

	Green pigments of canned oysters		Copper chlorophyllin	
	Fraction B	Fraction acetic acid	Fraction B	Fraction acetic acid
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

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ルの酸化生成物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が、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区の薄層クロマトグラフィーのRf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ことから、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錫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⁾。以上の結果ならびに第2報に記載した結果と合わせ考えると、缶詰かきの緑色色素はポルフィリン環を有する銅フェオフィチン、銅フェオホルバイド等のクロロフィル誘導体であると考えられる。

5. 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否かを確認するために、緑色色素を三酸化クロームと硫酸で酸化し、その酸化生成物と銅クロロフィルの酸化生成物の物理化学的性質を比較検討した結果、その酸化生成物はいずれも酢酸を含めて4成分に分けられ、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：日食品工会誌，17，237 (1970)。
- 2) 稲垣勲：植物化学 (医歯薬出版)，p.239 (1968)。
- 3) Willstätter, R. : Annalen, 373, 227 (1910)。
- 4) Ficken, G. E., Johns, R. B. and Linstead, 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：本誌，6，5 (1964)。
- 7) 長田博光：未発表