



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dimethyl Sulfoxide(DMSO)を用いたクロロフィル抽出法の検討
Author(s)	浦山, 勝
Description	技術部職員研修の研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告, 2, 12-15
Issue Date	1995-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35287
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_p12-15.pdf



Dimethyl Sulfoxide(DMSO)を用いた

クロロフィル抽出法の検討

生物機能化学科 作物栄養学講座 浦山 勝（作物・分析系 共同利用班）

はじめに

クロロフィルは光合成によって光エネルギーを受け取る色素である。光合成はこのクロロフィルが結合した集光性タンパク質と、二酸化炭素を固定するリブコース-1、5-ビスフォスフェート カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) が中心となって機能していると考えられる。特にクロロフィルに関しては光強度が弱いような葉や、そのような環境に滴応している植物では Rubisco に対しての比率が増大し、少ない光をより有効に利用するという機能が発達する事が知られることからその重要性は大きい。クロロフィルは図1のように脂溶性の色素であり、これを可溶化するために現在用いられている主な溶媒をまとめると表1のようになる。従来80%アセトンによる抽出が広く用いられておるが、樹木の葉のように極めて組織が硬い場合等に視覚的に抽出が完全に終わっていないことが指摘されており、この問題を解消するために、ジメチルスルフォキシド (DMSO) を利用する事が適しているとして、最近特に生態学の分野では広く使われるようになってきている。DMSO法は、従来の方法に比べて簡便であるうえに（実験方法参照）、安定性が高いことが指摘されており、抽出後の溶液は冷暗所で保存すれば3日間でも分解しないことが知られている。問題となるのはDMSO試薬が皮膚に毒性があるので取り扱いに注意が必要な点である。これまでこの方法を通常の作物に応用した例はわずかにサイトウに関して一例あるのみであり、この場合もクロロフィル a と b の両方の抽出効率が高まることが 報告されている。

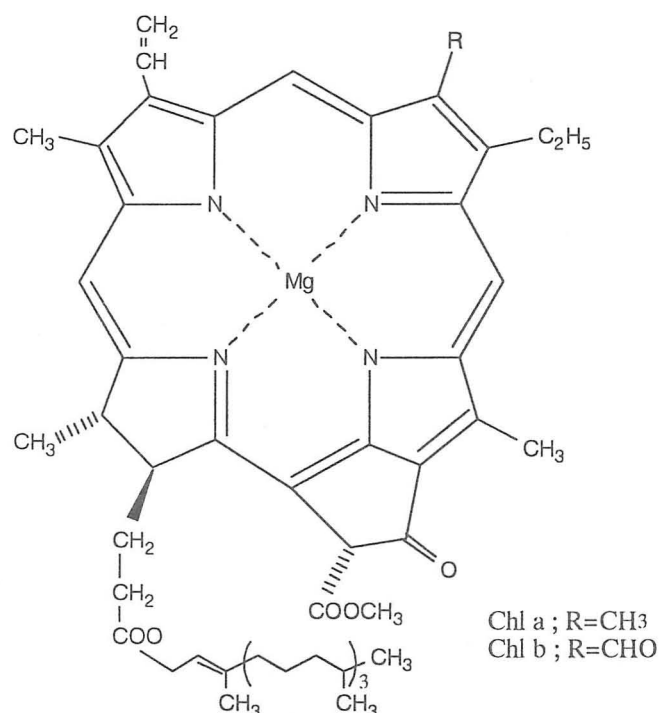


図1 クロロフィル化学式

表1 クロロフィル抽出の主な溶媒

エタノール
メタノール
80% アセトン
ジメチル ホルムアミド
ジメチル スルフォキシド
メタノール/クロロフォルム
ジエチル エーテル

実験方法

コムギ、スギナ、イネ科雑草、タンポポ、フキを供試してEtOH法とDMSO法を比較した。EtOH法は新鮮試料1g精秤したものを100% EtOH中でポリトロンを用いて磨砕後、抽出しNo5Aのろ紙でろ過してから定容し吸光度665nmと649nmで測定した。

DMSO標準法は新鮮試料約25～50mgを2mm×2mmの細片にし10mlの小試験管にとり、DMSOを5ml オートピペットで加えパラフィルムでシールし暗所（直射日光の当たらない程度）で65℃の恒温槽で振とう培養し組織が透明になった後に（約1時間）、室温まで放冷後5mlの新鮮なDMSOを加え、良く攪拌しNo5Aのろ紙でろ過後吸光度664.9nmと648.2nmで測定した。

DMSO 改良法として新鮮試料25～50mgをDMSO 中でポリトロンを用いて磨砕後、65℃で1時間抽出を行い No5A のろ紙でろ過してから定容し、DMSO 標準法と同じ吸光度で測定した。クロロフィルの量は次式により求めた。

EtOH法

$$\text{クロロフィル a} = 13.70 \times A_{665} - 5.76 \times A_{649}$$

$$\text{クロロフィル b} = 25.80 \times A_{649} - 7.60 \times A_{665}$$

DMSO法

$$\text{クロロフィル a} = 14.85 \times A_{664.9} - 5.14 \times A_{648.2}$$

$$\text{クロロフィル b} = 25.48 \times A_{648.2} - 7.36 \times A_{664.9}$$

結果および考察

EtOH法とDMSO法の比較結果を表2に示した。DMSO法は樹木において報告されている法に準じており。視覚的には抽出残渣に緑色は残っていなかった。EtOH 法に比べてDMSO 法では全般的な傾向としてクロロフィル a の抽出効率が高まり、クロロフィル b の抽出効率が低下していた。この結果クロロフィル a/b はDMSO 法で著しく高まった。しかしながらこの方法がそのまま草本に適用できないと考えられた。

表2 EtOH法とDMSO法の比較

		(mg/g FW)					
植物		反復 I		反復 II		反復 I a/b	反復 II a/b
		クロロフィルa	クロロフィルb	クロロフィルa	クロロフィルb		
スギナ	EtOH	0.375	0.032	0.429	0.043	11.7	10.0
	DMSO	0.565	0.075	0.671	0.087	7.5	7.7
タンポポ (サンプルI)	EtOH	0.940	0.345	0.888	0.234	2.7	3.8
	DMSO	0.998	0.183	1.508	0.257	5.5	5.9
タンポポ (サンプルII)	EtOH	1.849	0.726	1.684	0.618	2.5	2.7
	DMSO	1.253	0.213	1.481	0.211	5.9	7.0
イネ科雑草	EtOH	2.134	0.676	2.202	0.738	3.2	3.0
	DMSO	2.589	0.319	2.491	0.273	8.1	9.1
フキ	EtOH	1.297	0.740	1.251	0.828	1.8	1.5
	DMSO	1.958	0.581	1.952	0.346	3.4	5.6

これらの結果はDMSO法では抽出効率に何らかの問題が存在することを指摘している。DMSO法のクロロフィル抽出への妥当性を確認したBarnes et al(1992)らのデータを再検討した結果を図2に示した。

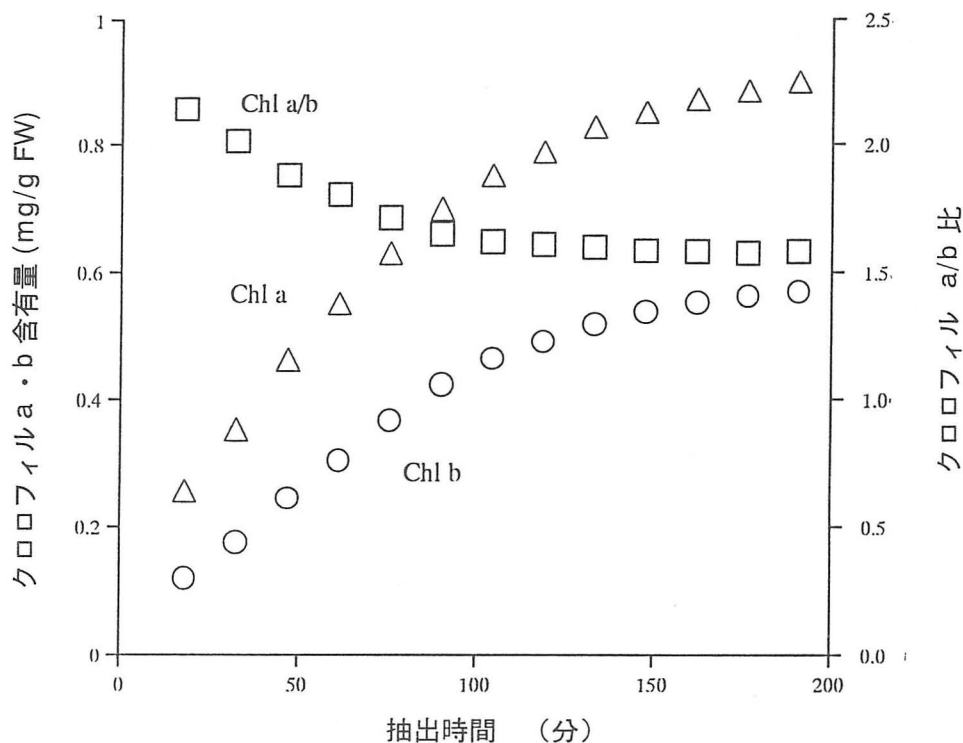


図2 DMSO標準法によるノルウェーウヒのクロロフィル抽出

供試されている植物はノルウェーウヒというマツの1種であるが、この結果からクロロフィル a/b 比は抽出時間に伴ってクロロフィル a とクロロフィル b は必ずしも同調して抽出はされていないことが示されている。つまり、先の実験でクロロフィル a/b 比が EtOH 法と DMSO 法で異ったのは抽出時間の影響があったためとも考えられた。

次に、DMSO法の問題点を確認するために、コムギを使い時間を追ってクロロフィル a とクロロフィル b の抽出効率を調査した。結果を図3に示した。しかしコムギの葉の場合、振とう抽出による抽出はほぼ 5分程度で一定に達し

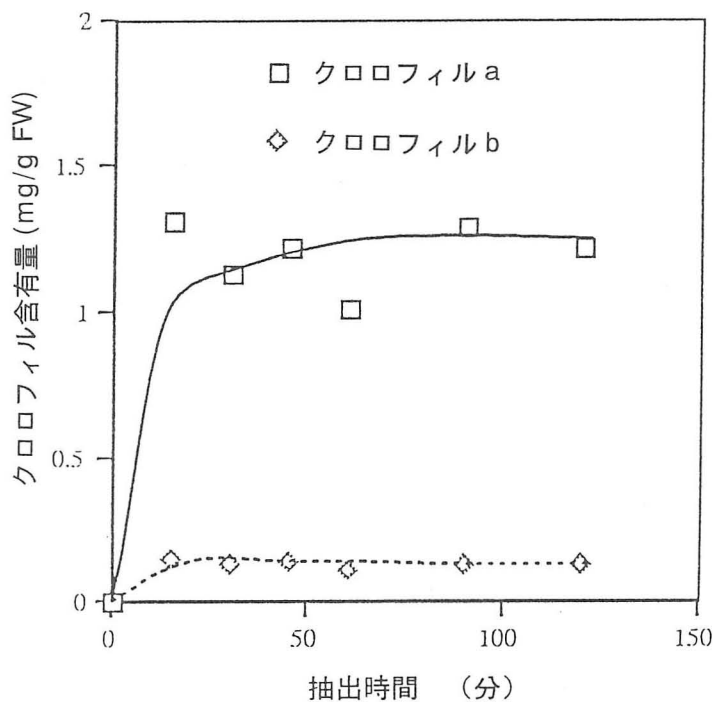


図3 DMSO標準法によるコムギのクロロフィル抽出

ておりクロロフィル a のみならずクロロフィル b の抽出効率も時間によって変化しておらず、葉を裁断しただけの標準法では抽出時間を延長しても抽出効率には影響が認められなかった。

そこで、コムギを供試して組織の磨砕の影響を調査した。80%アセトンと 100% DMSO を用いた。DMSO 法に関しては標準法のように2mmの正方形に裁断した試料とポリトロンを用いて磨砕した試料を供試した。なお、ポリトロンで磨砕後さらに65℃で1時間抽出を行った。表3の結果から明らかなように、ポリトロンを用いることにより、特にクロロフィル b の抽出効率が著しく高まった。しかしこの結果は DMSO 法の利点の一つとして挙げられている簡便さを大きく損なう結果となった。

表3 コムギのクロロフィル抽出法の比較(mg/gFW)

	80%アセトン	DMSO標準	DMSO+ポリトロン
クロロフィルa	2.44 ±0.07	2.71 ±0.09	2.97 ±0.05
クロロフィルb	0.716±0.013	0.352±0.016	0.661±0.001
a/b比	3.41	7.73	4.49

まとめ

DMSOのクロロフィル抽出を検討し次の結果を得た。DMSOを加えた試験管中の植物体組織は視覚的に色素が完全に抽出されているように見えるが、ポリトロンによる磨砕によって、クロロフィル b の抽出が著しく高まり、全体のクロロフィル a + b 抽出量も高まることから、ポリトロン磨砕の後に65℃で振とう抽出するという方法を用いることがコムギにおけるクロロフィルの抽出に適していると結論された。

謝辞

この論文をとりまとめるに当たり、作物栄養学講座の信濃 卓郎先生には多大なるご援助をいただきました。深く感謝申し上げます。並びに作物栄養学講座の修士1年渡部 敏裕君、4年目学生川向 剛史君にも色々ご援助いただき併せて感謝いたします。

参考文献

- 1) 作物生理実験法 農業技術協会
- 2) 大橋 敬子 作物栄養学講座 卒業論文
- 3) Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW(1992)A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany 32:85-100