

## 実験5. 緑葉に存在する脂質の抽出・カラムクロマトグラフィー 植物油のアニシジン価の測定

### (1) 緑葉に存在する脂質の抽出

- 1) 試験管(中サイズ、外径 16 mm) を 4 本用意する。そのうちの 3 本について、それぞれ油性ペンで A、B、C と書く (この試験管 C は、実験 7 で使用する)。また、ネジ付試験管を 1 本用意し、油性ペンで Gr と書く。
- 2) 乳鉢と乳棒を 1 セット用意する。凍結乾燥試料 A または B (どちらか一つ) 0.8 g(800 mg) を乳鉢に入れ、シリコン製の安全ピペッター (白色) を使ってヘキサン 5 mL を加えてよくすりつぶす。
- 3) その抽出液を、何も書いていない試験管にうつし、3 mL の脱イオン水を加えて約 30 秒ボルテックスする。
- 4) スイングバケットローターの装着してある遠心分離機で 1,000rpm、5 分間遠心分離する。
- 5) ここで、試料は 2 層に分かれている。上層のおよそ 4/5 を注意深く 吸い取り、試験管 A にうつす (下層を吸わないように！)。
- 6) 試料を窒素ガスで蒸発乾固させる。
- 7) 4 mL のヘキサンを試験管 A に加えてボルテックスした後、この試料を 1 mL ずつ試験管 B とネジ付き試験管 Gr に移す (別の実験に使用するので、そのままにしておく)。試験管 A にある 2 mL の試料は、以下の「(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー」の実験に使用する

### (2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

- 1) 試験管(中サイズ、外径 16 mm) を 9 本用意する。そのうちの 4 本 (試験管#01 から#04、油性ペンで書く) について、以下の溶媒をそれぞれの試験管に入れる。また、別の試験管 4 本についても#11 から#14 として油性ペンで書いておく。残りの試験管 1 本については、「廃」と書いておく。1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使って、下記の試薬を計り取る。

#01 ヘキサン 4 mL

#02 ヘキサン/アセトン = 4:1 を 2 mL (ヘキサン 1.6 mL とアセトン 0.4 mL)

#### ボルテックスして、溶媒を混合する

#03 アセトンを 2 mL

#04 メタノールを 2 mL

- 2) Sep-Pak Silica カートリッジ 1 個、5 mL 容の注射筒 (ガラス製) 1 個、スタンド 1 個、クランプ 1 個を用意する。Sep-Pak silica カートリッジをクランプで固定する。
- 3) 注射筒のプランジャー (指などで押したり引いたりする部分) を外し、シリンジ (筒) を Sep-Pak silica カートリッジに装着する。カートリッジの下部に「廃」と書いてある試験管を置く。
- 4) 2 mL のヘキサン (#01 の試験管中のヘキサンを使う) をシリンジ (筒) に注ぎ、プランジャーを再びつけてで静かにヘキサンをカートリッジ内に通す。

- 5) 注射筒をカートリッジから外してから注射筒内のプランジャーを取り出す(抜く)。再びシリンジ(筒)を Sep-Pak Silica カートリッジに装着し、新しい試験管(#11)をカートリッジの下部に置く(「廃」の試験管と交換する)。
- 6) 1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使って、(1)-7)の試験管 A (ヘキサン試料 2 mL)の一部 (**1 mL**)をシリンジ(筒)に注ぎ、プランジャーを再びつけて、静かに試料をカートリッジ内に通す。  
**(残りの 1 mL の試料は、別の実験に使用するので、そのままにしておく)**
- 7) 注射筒をカートリッジから外し、注射筒内のプランジャーを取り出す(抜く)。再びシリンジ(筒)を Sep-Pak Silica カートリッジに装着し、#01 の試験管中のヘキサンをすべてシリンジ(筒)に注ぎ、プランジャーを再びつけて、静かにヘキサンをカートリッジ内に通す。
- 8) 注射筒をカートリッジから外し、注射筒内のプランジャーを取り出す(抜く)。再びシリンジ(筒)を Sep-Pak Silica カートリッジに装着し、新しい試験管(#12)をカートリッジの下部に置く(#11 の試験管と交換する)。
- 9) シリコンスポイト(小)の付いたパスツールピペットを使って、#02 の試験管中のヘキサン/アセトン = 4:1 を 2 mL をすべてシリンジ(筒)に注ぎ、プランジャーを再びつけて、静かにこの溶媒をカートリッジ内に通す。
- 10) 8)と 9)の操作を繰り返して、試験管#03~#04 までの溶媒を番号順にカートリッジに通して、それぞれの溶離液を試験管#13~試験管#14 に回収する。
- 11) 試料 7 個【試験管#11 から#14、試験管 A、B とネジ付き試験管 Gr の試料】をヒートブロックにセットし、窒素ガスで蒸発乾固させる。
- 12) 乾固させた試料が入っている試験管 6 本ついて、試験管の口にアルミホイルを被せ実験台の上に置き、次の日の実験に備える。また、ネジ付き試験管 Gr については、冷蔵庫に置く。「廃」の試験管内の液は、廃液として、指定のポリタンクに捨てる。

### (3) 植物油のアニシジン価の測定

#### 既成の試薬

- 0.25%アニシジン溶液 (100%酢酸に溶けている)
- 2,2,4-トリメチルペンタン

- 1) 電子天びんの上に 20 mL 容のメスフラスコをおき、1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使って、植物油をメスフラスコの中に滴下させて 0.45 g~0.50 g を計り取る(実際の値を記録する)。
- 2) 20 mL 容メートルグラスを用意し、2,2,4-トリメチルペンタンを試薬瓶から 20 mL+3 mL 程度をこのメートルグラスに移す。
- 3) メスフラスコに 10 mL 程度の 2,2,4-トリメチルペンタンをメートルグラスから注ぎ入れ、メスフラスコの蓋をして、軽くフラスコの上下を 2~3 回ひっくり返す(激しく振ると破裂する恐れあり)。メスフラスコの蓋を少し開け、ガス抜きをし、再び蓋をしめて軽く 2~3 回ひっくり返す。この操作を繰り返して、植物油を完全に溶かす。完全に溶けたことを確認したら、2,2,4-トリメチルペンタンをメスフラスコの 20 mL の印のところまで注ぎ、蓋をして軽くフラスコの上下を 2~3 回ひっくり返して溶液を均一化させる。メートルグラス中に余った 2,2,4-トリメチルペンタンは、捨てないで、次の操作に使用する(試薬瓶に戻さない)。

4) 試薬瓶の 2,2,4-トリメチルペンタンを 3) で使用したメートルグラスに移す (8 mL の目盛りのあたりまで)。試験管(中サイズ、外径 16 mm) を 3 本用意する。それぞれ油性ペンで「Blank」、「2.5」、「5」と書く。1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使って、メートルグラス中の 2,2,4-トリメチルペンタンを 2 本の試験管に注ぎ入れる(「Blank」の試験管には 5 mL、「2.5」の試験管には 2.5 mL)。メートルグラス中に余った 2,2,4-トリメチルペンタンは、廃液ポリタンクに捨てる(試験瓶に戻さない)。

5) 分光光度計の電源を ON にし、セットアップする。メスフラスコ中の試料溶液を 20 mL 容のビーカーに 10 mL 程度移し、1,000 mL のマイクロピペットを使って、試験管に入れる(「2.5」の試験管には 2.5 mL、「5」の試験管には 5 mL)。

6) 3 本の試験管それぞれに、1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使って、1 mL の 0.25%アニシジン溶液を加え、ボルテックスをしてよく混ぜる。

7) 10 分後に「Blank」を対照として、「2.5」および「5」の試料の吸光度を 350 nm の波長で測定する。測定には、3mL の試料をガラス製のセルをに入れて行う。廃液は指定のポリタンク「有機廃液」に捨てる。アニシジン価は、以下の計算式から求める。

$$\text{アニシジン価 (「5」の試料)} = 24 (A-B) / C$$

$$\text{アニシジン価 (「2.5」の試料)} = 48 (A'-B) / C$$

A または A': アニシジンと反応させた試料溶液の吸光度

B: 試料溶液のみ(Blank)の吸光度

C: 1)で計り取った油脂量 (g)

## 実験6. 緑葉に存在する脂質のシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

### 緑葉に存在する脂質と植物油の脂肪酸のガスクロマトグラフィー

#### (1) 緑葉に存在する脂質のシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

1) 2次元 TLC (1次展開): ドラフト内に展開槽を置く。展開槽に 13 mL のクロロフォルム (10 mL のメスピペットとシリコン製 (白色) の安全ピペットを使う)、3.2 mL のメタノール (5 mL のメスピペットとシリコン製 (白色) の安全ピペットを使う)、0.4 mL (400  $\mu$ L) の脱イオン水 (1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使う) を入れる。サランラップ (小型サイズ 幅 15 cm) を展開槽の上部に被せた後、ふたをして両手でしっかりと持ち、**展開槽を実験台に置いた状態で左右に (少し激しく) 振って、展開液をよく混合させる**。展開槽を 28°C のインキュベーター内に置く。

2) 手袋をはめる。シリカゲル TLC プレート (10 cm  $\times$  10 cm) を準備する。図 1 のように、手袋をはめたまま、鉛筆でシリカゲル TLC プレートに印を付ける (3カ所)。

3) 手袋をはめる。前日に乾固させた試料が入っている試験管 7 本のうち、試験管 A について、パスツールピペットを使って、クロロフォルム/メタノール = 2 : 1 を 2~3 滴加え、ボルテックスをして試料を溶かす。手袋をはめて、毛細管を用いて、試料を 1.5  $\times$  1.5 cm の印をつけたところにスポットする (図 1 参照)。このとき、ドライヤーの冷風を当てて溶媒の蒸発をはやめるとよい。使用済みの毛細管はエタノールの入った指定の試験管内に回収する。

4) プレートに試料をスポットしたら、溶媒が蒸発したことを確認し、手袋をはめて、展開槽のふたとラップを開け、シリカゲル TLC プレートを、スポットした試料が右下 になるように展開槽の中に立てかけ (図 1 参照)、ふたを閉じる (注: 展開槽の中の蒸気が逃げってしまうので、ふたをあまり大きく開けないこと)。展開 (1回目) は 30~45 分程度で終了する。

**この待ち時間を利用して、8)~9)の操作を行う。**

5) 溶媒がプレートの上端から 0.5 cm のところまで (鉛筆で印をつけたところまで) 上昇したら、手袋をはめて、プレートを展開槽から取り出し、ドラフト内でドライヤーの冷風を 1 分間当てた後、真空ポンプが装着されたデシケーター内にプレート置く。真空ポンプの電源を ON にし、デシケーター内でプレートを乾燥させる。

デシケーター内で 15 分間、プレート乾燥させている間に、2次展開の溶媒を調製する操作を行う。

6) 展開槽内の移動相溶媒 (クロロホルム、メタノール、水の混液) を捨てるために、指定の廃液ポリタンクをドラフト内に置き、移動相溶媒をポリタンクに移す。ドライヤーの温風 (熱風) を使って展開槽内の溶媒を蒸発させる。

7) ドラフト内に展開槽を置く。展開槽に 10 mL のクロロフォルム (10 mL のメスピペットとシリコン製 (白色) の安全ピペットを使う)、4 mL のアセトン (5 mL のメスピペットとシリコン製 (白色) の安全ピペットを使う)、1 mL のメタノール (1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使う)、1 mL の酢酸 (1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使う)、0.2 mL (200  $\mu$ L) の脱イオン水 (1,000  $\mu$ L のマイクロピペットを使う) を入れる。サランラップ (小型サイズ 幅 15 cm) を展開槽の上部に被せた後、ふたをして両手でしっかりと持ち、**展開槽を実験台に置いた状態で左右に (少し激**

**しく) 振って、展開液をよく混合させる。** 展開槽を 28°C のインキュベーター内に置く。

8) 手袋をはめる。シリカゲル TLC プレート (10 cm × 5 cm) を準備する。図 2 のように、手袋をはめたまま、鉛筆でシリカゲル TLC プレートに線を引き (下端から 1.5 cm)、8 mm 間隔に印を付ける (5 カ所)。さらに、上端から 0.5 cm のところに鉛筆で印を付ける (1 カ所)。

9) 手袋をはめる。前日に乾固させた試料が入っている残りの試験管 (試験管 #11 から #14 と試験管 B) について、手袋をはめて、クロロフォルム/メタノール = 2 : 1 をパスツールピペットを使って 2 ~ 3 滴加え、ボルテックスをして試料を溶かす。毛細管を用いて、TLC プレートの印をつけたところにスポットする (#11 は①、#12 は②、#13 は③、#14 は④、試験管 B は⑤。図 2 参照)。このとき、ドライヤーの冷風を当てて溶媒の蒸発をはやめるとよい。使用済みの毛細管はエタノールの入った指定の試験管内に回収する。

10) 9) の TLC プレート (5 cm × 10 cm) に試料をスポットしたら、5) の真空ポンプを止めて、手袋をはめて、TLC プレート (10 cm × 10 cm) を取り出す。

11) 手袋をはめて、展開槽のふたとラップを開け、2 枚のシリカゲル TLC プレートを、重ならないように展開槽の中に立てかけ、ふたを閉じる (注: 展開槽の中の蒸気が逃げってしまうので、ふたをあまり大きく開けないこと)。**TLC プレート (10 cm × 10 cm) については、2 次展開の操作になるので、溶媒を展開する方向を確認 (試料をスポットした位置が左下になる) してから、プレートを展開槽の中に立てかけること (図 1 参照)。** 展開は 30 ~ 45 分程度で終了する。

12) 溶媒がプレートの上端から 0.5 cm のところまで (鉛筆で印をつけたところまで) 上昇したら、手袋をはめて、プレートを展開槽から取り出し、ドラフト内でドライヤーの冷風を 1 分間当てる。

13) ドラフト内に段ボールを開口部がこちらに向くように置き、手袋をはめて、TLC プレート 2 枚を段ボールの奥側に立てかけるように横に並べて置く。噴霧器 (ゴム球付) を用いてアントロン硫酸試薬を薄く均一に噴霧する (注: この操作は、**必ず教員または今井研の学生の立ち会いで行うこと**。また、**アントロン試薬は 66% 硫酸を含んでいる**。誤ってドラフト内に飛散させたり、霧状の試薬を吸入、皮膚や衣類に付着させたりしないよう十分注意する)。息を止めた状態で、プレートを 1 枚ずつ、準備室に運び、オーブン中 (150 °C) に置く (オーブン内の温度が下がらないように、オーブンの扉の開け閉めは機敏に行う)。加熱開始から 5 分間隔でプレート上の呈色を観察し記録する。(具体的には、プレートの外側に定規をピッタリとあててスマートホンのカメラ等で撮影する。この時、プレートの近くに顔を寄せたまま息を吸い込まないように注意すること。加熱開始後 20 分程度まででよい)。最後にプレートをさらに 10 分加熱して、試料を完全に炭化させ、記録する。画像をもとに各脂質の R<sub>f</sub> 値を求める。

## (2) 緑葉に存在する脂質と植物油の脂肪酸のガスクロマトグラフィー

まず、各班で「ガスクロマトグラフィー」の説明番組を視聴し、ガスクロマトグラフィーの原理について学習する。

### 1. メタノリシス

1) 冷蔵庫に保管している「実験 5-(2)-12」のネジ付き試験管 Gr を実験台に置き、室温になるまで放置する。また、新しいネジ付試験管を 1 本用意し、油性ペンで「OIL」と書く。これらの試験

管の下端から 2.0 cm のところに油性ペンでしるしを付ける

2) シリコンスポイト (小) の付いたパスツールピペットを使って、それぞれのネジ付試験管の油性ペンでしるしを付けたところまでヘキサンを入れる。

3) OIL と書いたネジ付試験管には、100  $\mu$ l 用のマイクロピペットを使用して、植物油を 50  $\mu$ l とり、入れる (粘性があるので、ピペッティングはゆっくりと行う)。

4) 2 つの試料が入ったねじ付き試験管それぞれに、1,000  $\mu$ l 用のマイクロピペットを使用して、2 M KOH 溶液 (メタノール溶液) を 200  $\mu$ l を注ぐ。

5) それぞれのネジ付試験管のキャップをしっかりと締めて、3 分間激しくボルテックスする。

6) 2 つの試料が入ったねじ付き試験管それぞれについて、以下の操作を行う。

ネジ付試験管のキャップを開けて、1 ml の脱イオン水を加えた後 (1,000  $\mu$ l 用のマイクロピペットを使用する) シリコンスポイト (小) の付いたパスツールピペットを使って、ヘキサンを試験管の高さ約 1cm 程度 (スポイトで強く 1 回吸い込んだ量) 加える。ネジ付試験管のキャップをしっかりと締めて、1 分間激しくボルテックスする。

7) 上皿天秤でバランスを合わせる。バランスが合っていない時は、軽い方のネジ付試験管のキャップを外し、キャップを上皿天秤の中に置き、シリコンスポイト (小) の付いたパスツールピペットを使って、ヘキサンを注意深く滴下してバランスを合わせる。スイングバケットローターの装着してある遠心分離機で 2,000rpm、5 分間遠心分離する。

8) ここで、試料は 2 層に分かれている。OIL と書いたネジ付試験管については、上層 (約 1.5~2 cm) の上部約 1/3 をシリコンスポイト (小) の付いたパスツールピペットを使って注意深く吸い取り、ガスクロマトグラフィー用のサンプルバイアル (セプタムキャップ付、ガラスインサートなし) に移す (サンプルバイアルには、油性ペンで「O班 OIL」と書く)。セプタム (キャップのシール) の上下を確認し (白色が上面、薄茶色が下面)、キャップをしっかりと締める。

Gr と書いてあるネジ付試験管についても、上層 (約 1.5~2 cm) の上部約 1/3 をシリコンスポイト (小) の付いたパスツールピペットを使って注意深く吸い取り、試験管 C (実験 5 で準備済) に移す。残った液体は、廃液として「脂肪酸分析の廃液」と表示のある容器に捨てる。

9) 試験管 C をヒートブロックにセットし、窒素ガスで蒸発乾固させる (。

## 2. 試験管 C の試料のシリカゲルカラムクロマトグラフィー

1) 試験管 (中サイズ、外径 16 mm) を 4 本用意する。そのうちの 2 本 (試験管 #01、#02、油性ペンで書く) について、以下の溶媒をそれぞれの試験管に入れ、よく混ぜる。また、別の試験管 2 本についても #3、「廃」と油性ペンで書いておく。1,000  $\mu$ l のマイクロピペットを使って下記の試薬を計り取る。

#01 ヘキサン 4 mL

#02 ヘキサン/ジエチルエーテル = 8:2 2 mL

2) 蒸発乾固させた試料が入った試験管 C にヘキサンを 1 mL 加え、15 秒間ボルテックスする。

3) Sep-Pak Silica カートリッジ 1 個、5 mL 容の注射筒 (ガラス製) 1 個、スタンド 1 個、クランプ 1 個を用意する。Sep-Pak Silica カートリッジをクランプで固定する。

4) 注射筒のプランジャー (指などで押したり引いたりする部分) を外し、シリンジ (筒) を Sep-Pak Silica カートリッジに装着する。カートリッジの下部に「廃」と書いてある試験管を置く。

- 5) 2 mL のヘキサン（#01 の試験管中のヘキサンを使う）をシリンジ（筒）に注ぎ、プランジャーを再びつけてで静かにヘキサンをカートリッジ内に通す。
- 6) 注射筒をカートリッジから外してから注射筒内のプランジャーを取り出す（抜く）。再びシリンジ（筒）を Sep-Pak Silica カートリッジに装着し、新しい試験管(#3)をカートリッジの下部に置く（「廃」の試験管と交換する）。
- 7) 2)の試料（試験管 C、1 mL）をシリンジ（筒）に注ぎ、プランジャーを再びつけて、静かに試料をカートリッジ内に通す。
- 8) 注射筒をカートリッジから外し、注射筒内のプランジャーを取り出す（抜く）。再びシリンジ（筒）を Sep-Pak Silica カートリッジに装着し、1,000  $\mu$ L 用のマイクロピペットを使用して、#02 の試験管中のヘキサン／ジエチルエーテル = 8:2 の 2 mL をすべてシリンジ（筒）に注ぎ、プランジャーを再びつけて、静かにこの溶媒をカートリッジ内に通す。
- 9) 試験管#3 をヒートブロックにセットし、窒素ガスで蒸発乾固させる。
- 10) 100  $\mu$ L 用のマイクロピペットを使用して、ヘキサンを 100  $\mu$ L 加え（#01 の試験管中のヘキサンを使う）、5 秒間ボルテックスした後、ガスクロマトグラフィー用のサンプルバイアル（ガラスインサート付、セプタムキャップ付）に移す。セプタム（キャップのシール）の上下を確認し（白色が上面、薄茶色が下面）、キャップをしっかり締める。

### 3. 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィー

島津ガスクロマトグラフ（GC-18A、2 階植物細胞工学実験室奥に設置）で脂肪酸メチルエステルを分析する。次回の実験日までに、生データをノートパソコン（生物学科）のフォルダに保存するので、各班でデータを解析する。データの解析は、ノートパソコン（生物学科）にインストールされているアプリケーションソフト「ChromatoPRO」で解析する。脂肪酸メチルエステル標品（3 種類）のデータ（ピークの保持時間）と比較することで、それぞれの検出ピークを同定・定量する。

<設問> 今回分析した植物油の脂肪酸組成を mol%を用いて求めよ。