

乾のりに含まれるクロロフィルaとその変性誘導体の簡易分離・定量法

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	荒木,繁 小川,廣男 大房,剛 鹿山,光 村田,紀夫
発行元	日本水産學會
巻/号	50巻11号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1925-1928
発行年月	1984年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



乾のりに含まれるクロロフィル *a* とその変性誘導体の 簡易分離・定量法

荒木 繁・小川廣男・大房 剛
鹿山 光・村田紀夫

(1984 年 3 月 29 日受理)

A Simple and Practical Method for Separation and Determination of Chlorophyll *a* and Its Derivatives in Dried Laver, “Nori”, *Porphyra yezoensis*

Shigeru ARAKI,*¹ Hiroo OGAWA,*¹ Tuyosi OOHUSA,*¹
Mitsu KAYAMA,*² and Norio MURATA*³

Chlorophyll *a* and its derivatives extracted from the dried laver, “Nori”, *Porphyra yezoensis*, which had been stored under high humidity conditions, were separated in a short time by anion exchange column chromatography with DEAE-TOYOPEARL 650 M. Fractions successively eluted with acetone, acetone/H₂O (99:1, v/v), acetone/H₂O/CH₃COONH₄ (98:2:0.1, v/v/w) and acetone/H₂O/CH₃COONH₄ (95:5:0.2, v/v/w) contained, respectively, pheophytin *a* plus carotenoids, chlorophyll *a*, pheophorbide *a*, and chlorophyllide *a*. The pigments in the fractions were quantitatively determined by spectrophotometric method. The results suggest that this chromatographic method is effective in determination of chlorophyll *a* and its derivatives in fresh as well as stored algal thalli.

筆者らは、既報¹⁾において各種水分活性下に保蔵した乾のりの色素成分の経時変化について報告した。その際に、DEAE-Sepharose CL-6B を担体としたイオン交換クロマトグラフィーを用いて、クロロフィル *a* とその分解産物とを分離して調べた結果、高水分活性下においては、クロロフィル *a* の分解産物としてフェオフォルバイド *a* に極めて類似する物質 (フェオフォルバイド *a* 類似物) が多量に蓄積することを認めた。

従来、クロロフィルやその変性誘導体を分離するためには、セルロースや蔗糖、ポリエチレンなどの粉末担体を用いられ、それぞれ良い結果が得られている。²⁾ しかし、これらの方法では、いずれもカラムの調整や分離操作に長時間を要するという難点があり、多くの試料を短時間で処理し、分析する必要のある場合には適用し難く、このような目的に適した分離・定量法の確立が望まれる。

筆者らは、フェオフォルバイド *a* 類似物の性質を調べる目的で、DEAE-Sepharose CL-6B カラムの溶出条件

について検討を加えた結果、展開溶媒に添加する酢酸アンモニウムの濃度を調節することにより、フェオフォルバイド *a* 類似物を2つの画分に分離しうることを見出した。³⁾

その後、DEAE-Sepharose CL-6B と特性が類似する DEAE-TOYOPEARL 650 M (東洋曹達製) を用いたところ、前者に比べてより短い操作時間で、まったく同様の分離結果が得られること、およびその取り扱いがさらに簡便であることなどがわかった。

一方、クロロフィル *a* の変性誘導体のうち、フェオフォルバイド *a* は、光過敏症皮膚炎の原因物質として知られている。⁴⁾ すでに報告したように、¹⁾ 乾のりでは業者が通常保蔵している製品の水分含量 (5% 前後) では、フェオフォルバイド *a* などのクロロフィル *a* 変性誘導体は、まったく生成されない。しかし、乾のりの安全保蔵のためには、そのような物質の生成の有無をチェックしておくことが肝要で、そのためにもルーチンで利用できる分離・定量法が望まれる。

*¹ 山本海苔研究所 (Yamamoto Nori Research Laboratory, 5-2-12, Oomori-Higashi, Oota, Tokyo 143, Japan).

*² 広島大学生物生産学部 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama 720, Japan).

*³ 東京大学教養学部・生物 (Department of Biology, University of Tokyo, Komaba, Meguro, Tokyo 153, Japan).

この報告は、上記のような DEAE-TOYOPEARL 650 M の利点を利用して、乾のりに含まれるクロロフィル *a* およびその変性誘導体をカラムクロマトグラフィーで分離・定量する方法、とくにルーチンワークで使用する方

実験方法

カラムの調製 使用したカラム担体は、東洋曹達製の DEAE-TOYOPEARL 650 M で、カラムの調製法は OMATA and MURATA⁹⁾ による DEAE-Sepharose CL-6B の場合と同様である。すなわち、担体を純水に数回懸濁、汙過して洗浄し、つぎに 1 M 酢酸ナトリウム (pH 7.0) で酢酸型にしたのち、純水で過剰の酢酸ナトリウムを洗浄、除去する。ついで、アセトンに懸濁、汙過を数回繰り返えし、最後にアセトンに懸濁して使用する。

このように調製された担体を 10 mm (内径) × 100 mm のガラス管に 20 mm の高さになるように充填してカラムを作成した。

分画試料の調製 本実験に用いる試料液には、適量のクロロフィル *a* およびその変性誘導体が含まれていることが望ましい。そのような試料を短期間で入手する方法について検討した結果、20°C 相対湿度 (RH) 100% 下に 2 日間放置された乾のりの抽出液が適当であることがわかった。なお、色素の抽出方法は、抽出液として 95% メタノールを用いた以外、すべて既報¹⁾ にしたがった。また、各色素の定量のために用いた吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は、VERNON⁸⁾ によって求められたクロロフィル *a* (クロロフィル *d*) およびフェオフィチン *a* (フェオフィル *d*) の値 92.6 (663 nm), および 56.6 (666 nm) を用いた。全カロテノイド量は 2340 (448 nm)⁷⁾ を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) カラムクロマトグラフィーから得られた各溶出画分の純度は TLC によって検討した。

クロロフィル *a* およびフェオフィチン *a*, カロテノイド類は、それぞれの溶出液を減圧下に適量に濃縮したのち、HAGER³⁾ らの方法にしたがい、Kieselguhr G (Merck 製) を主体とした担体を 0.25 mm 厚にガラス板上に塗布したプレートを用いた。展開はイソオクタノン-イソプロパノール (20:1, v/v) 混液で行なった。⁹⁾

フィトール基を欠いたクロロフィル *a* 変性物の溶出液には少量の酢酸アンモニウムを含む。そこでこれを除去するため溶出液中の色素をジエチルエーテルに転溶した。このジエチルエーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で適当な濃度に濃縮した。これを SCHNEIDER¹⁰⁾ の方法にしたがい、市販のセルロースプレート (Merck 社製, 5716) を用いた TLC にかけた。

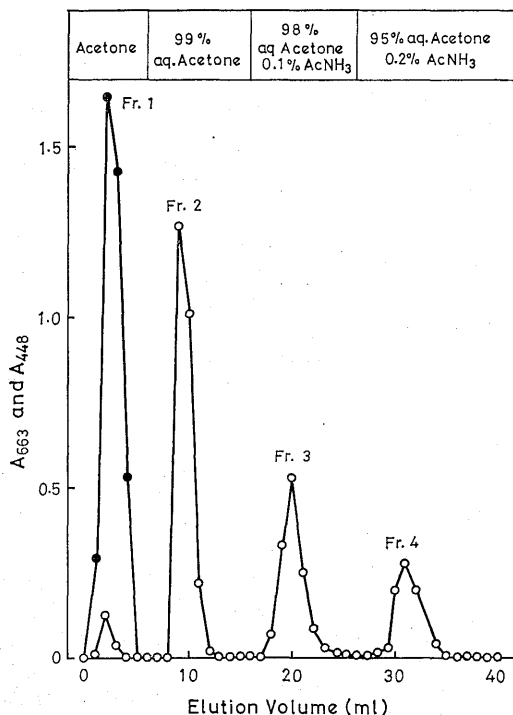


Fig. 1. Column chromatography with DEAE-TOYOPEARL 650 M of a crude pigment preparation from the dried laver, "Nori" which contained pheophytin *a*, chlorophyll *a*, chlorophyllide *a*, pheophorbide *a* and carotenoids. Flow rate was 2.0 ml/min.

○—○ Absorbance at 663 nm, ●—● Absorbance at 448 nm.

展開溶媒としては、メタノール-ジクロロメタン-水 (100:18:20, v/v) の混液を用いた。

フィトール基の分析 カラムからの各溶出画分についてフィトール基の有無の確認を、SHIMIZU ら¹¹⁾ の方法にしたがって実施した。

結果と考察

カラム操作と溶出パターン 試料液をアセトン 1 ml にとりかしてカラム上面にのせ、アセトン 5 ml, アセトン-水 (99:1 v/v) 10 ml, 0.1% 酢酸アンモニウムを含むアセトン-水 (98:2 v/v) 10 ml, 0.2% 酢酸アンモニウムを含むアセトン-水 (95:5 v/v) 10 ml で、カラムに吸着されている色素成分を順次展開、溶出させた。溶媒の流出速度はいずれも 2 ml/min であった。Fig. 1 は各溶出液を 1 ml ずつ分取して得られた試料液のクロマトグラムを示したもので、4 つの各溶出画分 (以下 Fraction 1, 2, 3, 4 と呼ぶ) はそれぞれ相互によく分離していた。

各溶出画分の性質と同定 Fig. 2 はカラムから得られ

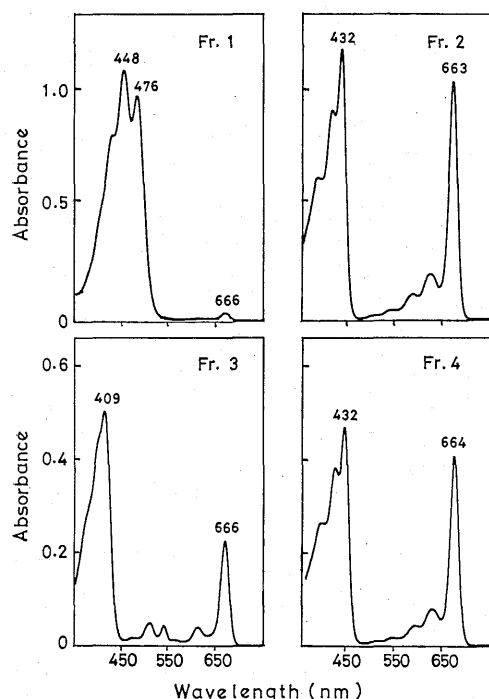


Fig. 2. Absorption spectra of the four fractions separated by column chromatography with DEAE-TOYOPEARL 650 M. Solvent, acetone/H₂O (9:1, v/v).

た各溶出画分の吸光スペクトルを示したものである。Fraction 2 と 4 では、長波長側の極大波長に僅かな差異が認められたが、相互によく似た吸光スペクトルを示した。また、Fraction 3 はフェオフィチン *a* のそれと全く同様であった。なお、各画分の性質と TLC および フィートール・テストの結果をまとめて Table 1 に表示した。

Table 1 と吸光スペクトルの結果から、各画分は次のように同定される。

まず、Fraction 2 は OMATA and MURATA の報告から、クロロフィル *a* と同定される。つぎに、Fraction 3 と 4 は、いずれもフィートール基を欠いているが、そ

れぞれの吸光スペクトルが前者ではフェオフィチン *a* のものと、後者ではクロロフィル *a* のものと極めてよく似ている。このことから、Fraction 3 はフェオフォルバイド *a*, Fraction 4 はクロロフィル *d* と同定される。

Fig. 2 の Fraction 1 にみられる 666 nm に小さな極大値をもつ色素は、次の諸点からフェオフィチン *a* と同定される。すなわち、1) OMATA and MURATA⁶⁾ によれば、フェオフィチンは DEAE-Sephadex CL-6B に吸着されずカロテノイド類とともにアセトンで溶出されるという。2) WILSON らの方法¹²⁾にしたがって、Fraction 2 に tetracyanoethylene を添加 (0.25 mg/ml) したとき、カロテノイド類の吸光スペクトルと重なって明瞭でなかった 533, 500 nm のフェオフィチン *a* に特徴的なピークが認められた。3) クロロフィル *a* (Fraction 2) を酸処理して得られたフェオフィチン *a* をこのカラムにかけた場合も、同じようにアセトンで溶出された。

色素の定量 以上の事実から Fraction 1 を除いた各溶出画分は、それぞれ単一の色素成分を含むものと考えられ、これらの溶出画分から色素を定量することが可能である。

また、Fraction 1 についても既報¹⁾のように、666 nm の吸光値からカロテノイド類による妨害なしにフェオフィチン *a* 量を定量することができる。さらに、448 nm の吸光値に一定の補正を加えれば、全カロテノイド量の定量も可能である。すなわち、あらかじめフェオフィチン *a* の 448 nm と 666 nm における吸光値の比を求め、この値 (0.09) によりフェオフィチン *a* の 448 nm における吸光値の影響を補正する。

なお、各色素の定量値の誤差範囲を調べた結果、いずれの色素についても 2~3% の範囲におさまっていた。各色素の回収率も 95% 以上の値が得られた。

DEAE-TOYOPEARL 650 M では、蔗糖やセルロース粉末より吸着能が大きいため、カラムサイズを小さくすることができ、使用する溶媒量を少なくすることがで

Table 1. Characteristics of the four fractions separated by column chromatography with DEAE-TOYOPEARL 650 M

Fraction No.	Absorption Max. Blue nm	Red nm	Blue-Red* Ratio	Phytol Test	TLC Test
1	—	666	—	—	a pale grey & 3 yellow spots
2	431	663	1.15	positive	a blue green spot
3	409	666	2.20	negative	a grey spot
4	431	664	1.15	negative	a green spot

* Blue-Red ratio represents the ratio of blue to red absorption maxima (A_{431}/A_{663} or A_{409}/A_{666}).

きるとともに、目的とする色素の分離に要する時間を短縮することができた。

つぎに、DEAE-TOYOPEARL 650 M ではフェオフィルバイド *a* やクロロフィル *a* をカラムから溶出する際に用いる 溶出液へ添加する酢酸アンモニウムの量を、DEAE-Sepharose CL-6B カラムのそれよりさらに少なくすることができた。その結果、展開液の主溶媒として用いたアセトンへ酢酸アンモニウムを溶解させるために加える水の量を少なくすることができ、分離時間をさらに短縮することができた。なお、添加される酢酸アンモニウムが定量値に及ぼす影響は、ここに用いられた濃度範囲 (0.1~0.2%) ではほとんど無視しうる程度であった。

このような事実から筆者らの方法によりクロロフィル *a* およびその変性誘導体をより迅速に分離・定量することができ、ルーチンワークにも十分適用しうるもので、筆者らの所期の目的に合致するものである。

文 献

- 1) 荒木 繁・小川 廣男・大房 剛・上野 順士・斎藤 実・今吉純司・鹿山 光: 日水誌, **48**, 647-651 (1982).
- 2) M. HOLDEN: in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" IInd edition (ed. by T. W. GOODWIN), Vol. 2. Academic Press, New York, 1976, pp. 18-26.
- 3) S. ARAKI, T. OOHUSA, T. OMATA, and N. MURATA: *Plant & Cell Physiol.*, **25**, 841-843 (1984).
- 4) 駒井嘉明・大貫憲一・山岸 宏・白鳥憲行: 食品衛生研究, **28**, 747-752 (1978).
- 5) T. OMATA and N. MURATA: *Photochem. Photobiol.*, **31**, 183-185 (1980).
- 6) L. P. VERNON: *Analyt. Chem.*, **32**, 1144-1150 (1960).
- 7) B. H. DARVIES: in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" IInd edition, (ed. by T. W. GOODWIN), Vol. 2, Academic Press, New York, 1976, pp. 150-153.
- 8) A. HAGER and T. MEYER-BERTHENRATH: *Planta*, **69**, 198-217 (1966).
- 9) T. OMATA and N. MURATA: *Plant & Cell Physiol.*, **24**, 1093-1100 (1983).
- 10) H. A. W. SCHNEIDER: *J. Chromatogr.*, **21**, 448-453 (1966).
- 11) S. SHIMIZU, H. FUKUSHIMA, and E. TAMAKI: *Phytochemistry*, **3**, 641-645 (1964).
- 12) J. R. WILSON, M.-D. NUTTING, and G. F. BAILEY: *Anal. Chem.*, **34**, 1331-1332 (1962).