

# 高速クロマトグラフィーによるクロロフィル分解物の同時分析法

著者名(日)	山本 直子, 今井 亮輔, 大内 麻友, 眞木 俊夫
雑誌名	紀要
巻	VOLN2
ページ	1-6
発行年	2010-03-01
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1345/00003463/">http://id.nii.ac.jp/1345/00003463/</a>

## 高速液体クロマトグラフィーによるクロロフィル分解物の同時分析法

山本直子、今井亮輔、大内麻友、眞木俊夫

Simultaneous Determination of Chlorophyll Degradation Pigments  
by High Performance Liquid Chromatography

Naoko YAMAMOTO, Ryousuke IMAI, Mayu OHUCHI, and Toshio MAKI

A simple and rapid method for quantitative determination of four chlorophyll degradation pigments (pheophorbide-a, pyropheophorbide-a, chlorin-e<sub>6</sub>, methylpheophorbide-a) in green vegetables has been developed, using high performance liquid chromatography. Their pigments in green vegetables were extracted with methanol containing 1%-acetic acid by using a homogenizer. The methanolic extract was centrifuged and the supernatant solution was cleaned up by using a Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge with methanol-0.025M ammonium acetate mixture and acetone (90:10 v/v) as an eluant. The eluate was separated on Ascentis Express C<sub>18</sub> reversed phase column, with methanol-0.025M ammonium acetate (95:5 v/v) as a mobile phase. Their pigments were determined at 360nm and calibration curves showed linearity at 0.5~30µg/mL. The determination limit of their pigments was 0.5µg/g in the sample. The recovery rates of their pigments from green vegetables at 1.0 and 50µg/g ranged from pheophorbide-a 82%~85%, pyropheophorbide-a 93~99%, chlorin-e<sub>6</sub> 64~79%, and methylpheophorbide-a 88~101%, respectively.

The above proposed method was applied to the rapid monitoring of chlorophyll degradation pigments in green vegetables. Although no chlorin-e<sub>6</sub> was detected, pheophorbide-a, pyropheophorbide-a, and methylpheophorbide-a were obtained at the levels of n.d.~194µg/g, 0.71~427µg/g, n.d.~39.3µg/g, respectively in ten commercially available Nozawanazuke and Takanazuke.

## 緒言

クロロフィル分解物であるフェオフォルバイド a (以下 PB-a)、ピロフェオフォルバイド a (以下 PyPB-a)、クロリン e<sub>6</sub> (以下 Chl-e<sub>6</sub>) およびメチルフェオフォルバイド a (以下 MePB-a) は、太陽光線に曝された皮膚だけに強い光過敏症毒性を発症させることが知られている<sup>1-9)</sup>。これらクロロフィル分解物は PyPB-a が動物性、PB-a が植物性に生成・蓄積することが通説になっていたが、天野ら<sup>10-11)</sup>は高菜に PyPB-a を含むという従来の

考察を覆す内容を報告した。その後、三橋<sup>12)</sup>も植物性加工食品中に PB-a および PyPB-a が含有していることを報告した。わが国では古くからクロロフィルを高濃度に含む葉物が喫食されており、光過敏症皮膚炎を発症する危険性が指摘されていた。

これまで PB-a の分析には薄層クロマトグラフィー、分光光度計が、確認には直接導入型質量計が用いられ定性分析が主であった。その後、Schwartz ら<sup>13)</sup>、Takeda ら<sup>14)</sup>、橋本<sup>15)</sup>、Kohata ら<sup>16)</sup>、Gauthier-Jaques ら<sup>17)</sup>、

Keywords: pheophorbide-a, methylpheophorbide-a, pyropheophorbide-a, chlorin-e<sub>6</sub>, HPLC, Nozawanazuke, Takanazuke

Hwang ら<sup>10)</sup>は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分析法の開発ならびに海産物、クロレラおよび塩漬野菜類からの含有量調査を報告している。しかしながら、いずれの分析法も光過敏症の主な原因物質である PB-a に PyPB-a を加えた2種の分析法に止められている。植物性加工食品は複雑な代謝経路を経ることも考えられることから、衛生学的な安全性評価が行える多成分同時分析法が望まれるところである。しかしながら、現在までのところ、PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub> および MePB-a の同時分析法を検討した報告は見当たらない。そこで、食中毒発生未然防止に着目し、簡便かつ迅速な HPLC による4成分同時分析法を検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

野沢菜漬 6 試料および高菜漬 4 試料を平成 21 年 7 月から 9 月にかけて都内の小売店で購入した。いずれの試料も抽出を行うまで冷蔵庫に保存し、開封後は遮光部屋で直ちに分析を行った。

### 2. 試薬

フェオフォルバイド a (95.0%) (和光純薬株式会社)、ピロフェオフォルバイド a (97.7%)、クロリン e<sub>6</sub> (98.7%) およびメチルフェオフォルバイド a (98.7%) (タマ生化学株式会社) の標準溶液：それぞれ 1mg を、アセトンを含むメタノールに溶解して、全量を 10.0mL として標準原液とした。その他の試薬は和光純薬 (株) 特級品または HPLC 用を用いた。

Sep-Pak C<sub>18</sub>：予め 70%メタノールで洗浄したものを用いた。

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ：SHIMADZU LC-10Ai 型  
検出器：SPD-10Avp 型

### 4. HPLC の測定条件

カラム：Ascentis Express C<sub>18</sub> HPLC (Supelco)  
4.6mm i.d.×150mm 2.7μm  
移動相：メタノール：0.025M 酢酸アンモニウム水溶液 (95：5 v/v)  
流速：0.6mL/min  
測定波長：360nm  
カラム温度：40℃

注入量：10μL

### 5. 標準溶液の調製

標準原液から PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub> および MePB-a を同量混合し、適宜メタノールで希釈して標準溶液を調製した。

### 6. 試験溶液の調製

野沢菜漬および高菜漬を水洗いし、葉と茎の部分に分けた。各 1g を精秤し、メタノール 20mL と 1%酢酸 8.5mL を加えホモジナイズした後、3000rpm で 5 分間遠心分離した。得られた上澄み液は試料ビンに移し、残留物について同様の操作を一回繰り返した後、全上澄み液を Sep-Pak C<sub>18</sub> に負荷した。次に水 10mL、次いで 70%メタノール 5mL で Sep-Pak C<sub>18</sub> を洗浄後、メタノール：0.025M 酢酸アンモニウム (95:5 v/v) 18mL とアセトン 2mL を混合した溶離液でクロロフィル分解物を溶出し、ナスフラスコに採取した。得られた画分をエバポレーターで 3mL 程度まで濃縮した後、同溶離液で洗いこみを数回繰り返し、正確に 10mL としたものを HPLC 試験溶液とした。

## 実験結果

PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub> および MePB-a の4種類の標準試薬を混合した標準溶液を使用し、HPLC により分析したクロマトグラムを Figure 1 に示した。クロロフィル

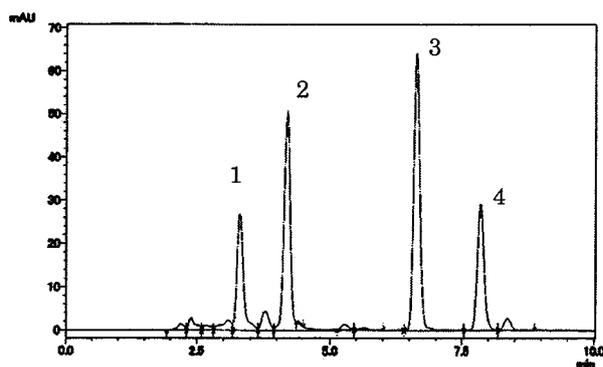


Figure 1 High Performance Liquid Chromatogram of Standard Solution.

Operating conditions: column; Ascentis Express C<sub>18</sub> (4.6mm i.d.×150mm 2.7μm), mobile phase; methanol-ammonium acetate (95:5 v/v), flow rate; 0.6mL/min, detection wavelength; 360nm.

Peaks; 1, PB-a; 2, PyPB-a; 3, Chl-e<sub>6</sub>; 4, MePB-a.

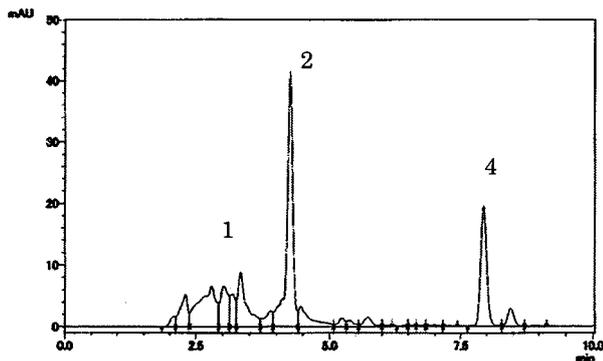


Figure 2 Typical Chromatogram of Extract from Nozawanazuke.

Operating conditions were the same as described in Figure 1.

Peaks; 1, PB-a; 2, PyPB-a; 4, MePB-a.

分解物 4 成分の分離は良好で、保持時間 3.3 分に PB-a のピークを得た。次に 4.3 分に PyPB-a、6.7 分に Chl-e<sub>6</sub>、最後に 7.8 分に MePB-a のピークが溶出した。4 成分あるいはその近辺に妨害ピークは認められなかった。本法を用いて検量線を作成したところ、4 成分とも 0.5 $\mu$ g $\sim$ 30 $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性を示した。

代表的な野沢菜漬試料(4)のクロマトグラムを Figure 2 に、高菜漬試料(2)のクロマトグラムを Figure 3 に示した。

1 $\mu$ g 及び 50 $\mu$ g/mL の各成分を野沢菜漬および高菜漬に添加して回収率を求めたところ、PB-a は 82 $\sim$ 85%、PyPB-a は 93 $\sim$ 99%、Chl-e<sub>6</sub> は 64 $\sim$ 79%、MePB-a は 88 $\sim$ 101% の範囲であった。

Table 1 に市販の野沢菜漬 6 試料、高菜漬 4 試料中の PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub> および MePB-a の分析結果を示した。なお、得られた濃度は、回収率で補正を行っていない。

野沢菜漬、高菜漬は葉と茎の部分に分けて分析を行った。その結果、野沢菜漬の葉は PB-a が 10.3 $\sim$ 81.4ppm (平均 30.0ppm) (以下 ( ) 内は平均)、PyPB-a は 17.8 $\sim$ 174ppm (68.4ppm)、MePB-a は n.d. $\sim$ 39.3ppm (15.3ppm) であった。茎の PB-a は n.d. $\sim$ 4.53ppm (2.49ppm)、PyPB-a は 0.71 $\sim$ 3.92ppm (1.67ppm)、MePB-a は n.d. $\sim$ 1.21ppm (0.52ppm) であった。

一方、高菜漬の葉は PB-a が 109 $\sim$ 194ppm (139ppm)、PyPB-a は 189 $\sim$ 427ppm (330ppm)、MePB-a は n.d. であった。特に高菜漬の葉に 427ppm と高濃度の PyPB-a が含有していた。茎の PB-a は 4.77 $\sim$

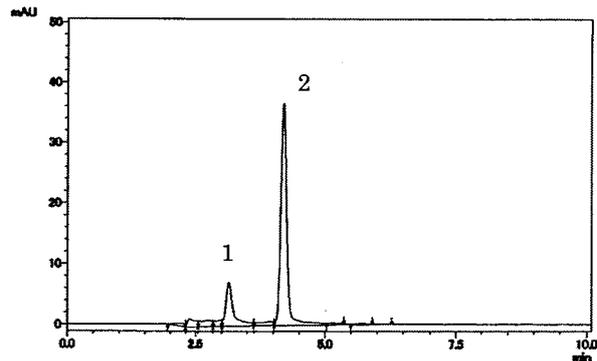


Figure 3 Typical Chromatogram of Extract from Takanazuke.

Operating conditions were the same as described in Figure 1.

Peaks; 1, PB-a; 2, PyPB-a.

12.5ppm (7.30ppm)、PyPB-a は 6.14 $\sim$ 17.8ppm (14.1ppm)、MePB-a は n.d. であった。Chl-e<sub>6</sub> はいずれの試料も n.d. であった。

## 考察

### 1. 分析条件の検討

PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub> および MePB-a の HPLC による同時分析法を検討し、その分析条件を確立した。カラムは Ascentis Express C<sub>18</sub>、移動相はメタノールと 0.025M 酢酸アンモニウム水溶液 (95:5 v/v) の混合液、流速は 0.6mL/min. で測定するのが最適であることを確認した。

本法を作成するにあたり Schwartz ら<sup>13)</sup> や橋本<sup>15)</sup> の分析条件を参考にして Nucleosil C<sub>18</sub>、LiChrosorb C<sub>18</sub> および Ascentis Express C<sub>18</sub>、3 種のカラムを用いて、移動相の混合比、流速、測定波長による有効性を検討した。すなわち橋本が報告している移動相、メタノール: 0.025M 酢酸アンモニウム水溶液 (88:12v/v)、測定波長 405nm、流速を 2.5mL/min. に設定し、4 成分標準溶液の測定を試みた。その結果、Nucleosil C<sub>18</sub>、LiChrosorb C<sub>18</sub> の 2 種カラムとも 4 成分標準溶液は、溶出時間が近似し不純物と思われるピークが主要ピークに多数重なり、十分な分離には至らないことが分かった。Ascentis Express C<sub>18</sub> は他の 2 種に比較して分離能に多少違いが認められたが実用的には不十分であった。そこで改めて移動相の混合比の検討を行った。メタノールと 0.025M 酢酸アンモニウム水溶液の混合比を 80:20 (v/v) とした場合と、酢酸アンモニウム濃度を高めた場合の分析を試

**Table 1** Four chlorophyll degradation pigments contents of commercially available Nozawanazuke and Takanazuke

sample		PB-a ( $\mu\text{g/g}$ )	PyPB-a ( $\mu\text{g/g}$ )	Chl-e <sub>6</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )	MePB-a ( $\mu\text{g/g}$ )
nozawanazuke	1 leaf	81.4	174	n.d.*	n.d.
	stem	2.68	1.38	n.d.	n.d.
nozawanazuke	2 leaf	30.8	91.2	n.d.	8.66
	stem	4.53	2.44	n.d.	0.70
nozawanazuke	3 leaf	22.5	17.8	n.d.	39.3
	stem	1.79	0.71	n.d.	1.21
nozawanazuke	4 leaf	21.1	55.0	n.d.	35.5
	stem	1.79	0.71	n.d.	1.21
nozawanazuke	5 leaf	14.0	45.7	n.d.	n.d.
	stem	4.14	3.92	n.d.	n.d.
nozawanazuke	6 leaf	10.3	26.7	n.d.	8.56
	stem	n.d.	0.84	n.d.	n.d.
takanazuke	1 leaf	113	325	n.d.	n.d.
	stem	4.77	14.7	n.d.	n.d.
takanazuke	2 leaf	139	378	n.d.	n.d.
	stem	5.66	17.8	n.d.	n.d.
takanazuke	3 leaf	109	189	n.d.	n.d.
	stem	12.5	6.14	n.d.	n.d.
takanazuke	4 leaf	194	427	n.d.	n.d.
	stem	6.25	17.6	n.d.	n.d.

※ n.d. means less than 0.5 $\mu\text{g/g}$

みた。混合比 88:12 (v/v) で測定したとき以上に多数の妨害ピークが出現し、各成分の特定が出来ず、分析を行うには殆ど不可能であった。0.025M 酢酸アンモニウム水溶液の割合が多ければ多いほど、このような現象が見られることが判明した。しかしながら、逆に酢酸アンモニウムの混合比を下げると、その割合の減少に応じて分離に改善が見られるようになった。そこで酢酸アンモニウムの混合比を下げ、99:1 (v/v) で試みた。その結果、PB-a が完全に溶出しきらないうちに PyPB-a のピークが出現するクロマトが得られた。極端に酢酸アンモニウムの割合を下げることも4成分の分離に支障を来すことが分かり、このことは酢酸アンモニウム水溶液が、逆相カラム内で、特に PyPB-a のイオン化を強く抑制するように働いているためと推定した。再度、移動相の混合比を種々検討した結果、Ascentis Express C<sub>18</sub>カラムを用いてメタノールと 0.025M 酢酸アンモニウム水溶液

(99:5v/v)の混合液が良好に分離することが判明した。Ascentis Express C<sub>18</sub>ではPB-aとPyPB-aを完全に分けることができたにもかかわらず、Nucleosil C<sub>18</sub>やLiChrosorb C<sub>18</sub>ではなお分離が不十分であった。

光過敏症皮膚炎の原因物質を迅速に解明するために分析時間の短縮が求められる。また定量分析を目的とすることから、溶出するピークの半値幅が十分にとれることが必要である。Ascentis Express C<sub>18</sub>は0.7mL/min.以上では高圧になりすぎ装置に負荷がかかり過ぎることから、流速を2.5mL/min.から0.5mL/min.まで減速させた結果、0.6mL/min.を採用することにした。Nucleosil C<sub>18</sub>やLiChrosorb C<sub>18</sub>では平均的な流速である1.0mL/min.でも、なお4成分を完全に分けられず、流速をさらに下げても本質的な解決策には至らなかった。Schwartzら<sup>13)</sup>、Kohataら<sup>16)</sup>の方法ではgradient法を採用しても15分以上の時間を要する結果となり、試料

間の繰り返し洗浄時間をも考慮すると迅速性に欠けるのではないと思われる。その点、本法は isocratic による分離法であり 10 分以内に 4 成分を測定し終えることが可能であった。

次に測定波長について検討した。クロロフィル分解物の吸収スペクトルから最も高いモル吸光係数を示すのは 400nm 付近であることが示されている。この波長は高感度な分析が可能であるが、多数の不純物も検出してしまうことがあった。橋本は<sup>15)</sup> PB-a や PyPB-a 標準溶液でさえも合計 5 本のピークを示すクロマトを得ている。そこで可能な限り妨害ピークを抑え、4 成分が十分に検出できる波長を検討し 360nm に設定した。

本法を用いたときの検量線は、4 成分とも良好な直線性を示した。また回収率も満足する結果が得られた。検出限界は試料に換算して 0.5 $\mu$ g/g であり、実際の食中毒事件での発症量 25~130mg/man/day からみても十分に実用に耐えうる分析法と考える。

## 2 市販漬物中のクロロフィル分解物の測定

PB-a や PyPB-a は野沢菜漬および高菜漬双方から高濃度に検出された。これは三橋<sup>12)</sup>、Takeda ら<sup>14)</sup>の含有量調査と近似しているが、あらためて毒性の強い PyPB-a が植物性加工品に存在していることも確認できた。これら PB-a、PyPB-および MePB-a は、野沢菜漬や高菜漬中のクロロフィルが何らかの原因で分解され生成したものと考える。

これらの分解物の代謝過程の一つとしてクロロフィラーゼが加熱などによって活性化すると、フィトール基を加水分解的に切断し、光増感作用をもつクロロフィライドとなり、さらに酸性下で脱 Mg 化が起きて PB-a を生成する。さらに PB-a のメチルエステル基の脱炭酸反応により PyPB-a が生じる。この二つの物質は、発酵が進んだ野沢菜漬や高菜漬あるいはアワビの中腸腺でも生成が認められると報告されている<sup>7,12)</sup>。野沢菜漬や高菜漬などの漬物で、クロロフィル分解物が多いのは、塩漬けにすることによって、乳酸発酵による pH の低下により Mg が外れ、またフィトール基を切断する酵素が活性化するからと考えられている<sup>10)</sup>。

MePB-a の含有量に関する報告はなく、今回、試料中 4 試料の野沢菜漬だけから検出されたことは新発見である。しかし何故、高菜漬からは検出されなかったのか理由は不明である。双方の発酵過程や代謝経路に違いがあるのか、今後の研究が待たれる。また、Chl-e<sub>6</sub>はいずれ

の試料も検出限界であった。Chl-e<sub>6</sub>は PB-a からの分解により生じるとされているが、漬け込み期間の長短により PB-a から Chl-e<sub>6</sub>が生成する差が生じるのではないかと考える。

一方、漬け物の葉と茎を分けて定量した調査はこれまでなく、茎中の含有量に関する情報もなかった。いずれからの試料とも葉の部分の方が茎の部分より PB-a と PyPB-a が高濃度であった。これは葉と茎に存在するクロロフィル含有量の違いや光線などによる物理的影響があるからと思われる。クロロフィル分解物 4 成分の HPLC 同時分析法を確立したことから、今後、植物性加工食品の継続的な含有量調査がなされれば、食中毒発生の未然防止に役立ち、光過敏症食中毒が発生した場合でも迅速に原因物質を特定することが可能である。このことは衛生学的に安全性評価が可能になり意義があるものとする。

## 要約

クロロフィル分解物のうち PB-a、PyPB-a、Chl-e<sub>6</sub>および MePB-a の 4 成分について HPLC による同時分析法を確立した。HPLC の分析条件は Ascentis Express C<sub>18</sub>カラム、移動相はメタノール:0.025M 酢酸アンモニウム水溶液(99:5 v/v)、測定波長 360nm、カラム温度 40°C、流速 0.6mL/min とした。Isocratic な分離法で、4 成分を 10 分以内に測定が完了することが可能であった。

検量線は 0.5~30 $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。また、回収率も良好であった。検出限界は各成分とも 0.5 $\mu$ g/g であった。野沢菜漬、高菜漬など植物性加工品中の 4 成分を分析したところ、検出限界~427ppm の範囲で含有していた。漬物の MePB-a や Chl-e<sub>6</sub>の含有量、それに漬物の茎のクロロフィル分解物の含有量に関する調査はこれまでではなく、今回の分析法は今後の衛生的な安全性評価に寄与することが分かった。

## 参考文献

- 1) 橋本芳郎、堤 淳三：動物の食餌性光過敏症、食衛誌、4(4),185-191 (1963).
- 2) Clare, N. T. : Work of the biological sections, Ruakura animal research station, J. New Zealand Inst. Chem., 17,57-76 (1953).
- 3) Clare, N. T. : Photosensitization in animals, Advance in Vet. Sci., 2,182-211 (1955).
- 4) Jitsukawa, K., Suzuo, R. and Hidano, A. : Chlorella Photosensitization, International J. of Dermatology,

- 23,263-268 (1984).
- 5) Hashimoto, Y., Natou, K. and Tsutsumi, J. : Photosensitization of Animals by the Viscera of Abalones, *Haliotis Spp.*, Bull. of Japanese Soc. Scientific Fisheries, 26 (12),1216-1221 (1960).
  - 6) Hashimoto, Y. and Tsutsumi, J. : Isolation of a photodynamic agent from the Liver of Abalone, *Haliotisi discus hannai*, Bull.of Japanese Soc. Scientific Fisheries, 27 (9),859-866 (1961).
  - 7) Tsutsumi, J. and Hashimoto, Y. : Isolation of Pyropheophorbide a as a Photodynamic Pigment from the Liver of Abalone, *Haliotis discus hannai*, Agri. Biol. Chem., 28(7),467-470 (1964).
  - 8) 田村行弘、西垣 進、眞木俊夫、嶋村保洋、直井家寿太 : 光過敏症皮膚炎をおこしたクロレラ錠に対する生物・化学的試験について、食品衛生研究、28,753-759 (1978).
  - 9) 田村行弘、眞木俊夫、嶋村保洋、西垣進、直井家壽太 : クロレラ錠過剰摂取による光過敏性皮膚炎の原因物質とその生成過程について、食衛誌、20,173-180 (1979).
  - 10) 内山 充 : フェオフォルバイドの生成、生体影響および試験法について、食品衛生研究、31(6),29-42 (1981).
  - 11) 天野立爾、池慶子、内山充 : クロレラ中のクロロフィル分解物に関する化学的試験、食品衛生研究、28,739-745 (1978).
  - 12) 三橋隆夫 : 植物性加工食品中のクロロフィル分解物含有量、兵庫県立衛生研究所研究報告第 24 号、116-119 (1989).
  - 13) Schwartz, J. S., Woo, I. S. and Elbe, H. V. J. : High Performance Liquid Chromatography of Chlorophylls and Their Derivatives in Fresh and Processed Spinach, J. Agric. Food Chemistry 29,533-535 (1981).
  - 14) Takeda, Y., Uchiyama, S. and Saito Y. : High Performance Liquid Chromatography of Pheophorbide a and Pyropheophorbide a in Salted Vegetables and Chlorella., J. Food Hyg. Soc.Japan 26(1),56-60 (1985).
  - 15) 橋本清澄 : 高速液体クロマトグラフィーによるクロレラ錠中のフェオフォルバイド a の定量、薬学雑誌 105(1),33~37 (1985) .
  - 16) Kohata K., Horie, H. and Hanada, K. : High Performance Liquid Chromatographic Determination of Pheophorbide-a and its Related Chlorophyll Derivatives in Tea Leaves., Food Sci. Technol Int. Tokyo,4(1) 80-84 (1998).
  - 17) Gauthier-Jaques, A., Borltik, K., Hau, J. and Fay, L. B. : Improved Method to Track Chlorophyll Degradation, J. Agric. Food Chemistry, 49, 1117-1122 (2001).
  - 18) Hwang, D.F., Tsai, Y.S., Chou, S.S., Liu, S.M., Wu, J.T., Lin, S.J. and Tu, W.C. : HPLC Determination of Pheophorbide a and Pyropheophorbide a in Dried laver Product Implicated in Food Poisoning, J.Food Hyg. Soc.Japan, 46(2),45-48 (2005).