技術報告

オクラのクロロフィル, カロテノイド色素の系統間差異

渡辺慶一*・廣田才之**・高橋文次郎**

Determination of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in
Okra (*Abelmoschus esculentus* Moench)

Keiichi WATANABE*, Saishi HIROTA** and Bunjiro TAKAHASHI**

* Junior College, Nihon University, 1866, Kameino,
Fujisawa-shi, Kanagawa 252** College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University,
1866, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252

The composition of pigments in two different colored okra cultivars was studied. The carotenoids were separated by column, thin layer and high performance liquid chromatography and identified by order of absorption affinities on the column and by their absorption spectra. The contents and kinds of pigments were as follows: (1) The green colored okra cultivar 'Better five' contained chlorophyll *a* (470 $\mu\text{g/g}$) and chlorophyll *b* (190 $\mu\text{g/g}$) as the major pigment; a small amount of α -carotene (0.2 $\mu\text{g/g}$), β -carotene (11.4 $\mu\text{g/g}$) and xanthophylls (43.2 $\mu\text{g/g}$) were also present. (2) The reddish purple colored okra cultivar 'Benney' contained chlorophyll *a* (120 $\mu\text{g/g}$) and chlorophyll *b* (60 $\mu\text{g/g}$) as the major pigment; a small amount of α -carotene (tr.), β -carotene (4.2 $\mu\text{g/g}$) and xanthophylls (27.6 $\mu\text{g/g}$) were present, and anthocyanins were detected. (3) From the above results, it was found that the 'Better five' of high chlorophyll contents paralleled with high carotenoid contents and the 'Benney' of low chlorophyll contents paralleled with low carotenoid contents. (4) Xanthophylls were consisted neoxanthin, violaxanthin, lutein epoxide and lutein. (Received July 20, 1995)

筆者らはこれまで、トマト¹⁾、スイカ²⁾、ニンジン³⁾、メロン⁴⁾およびキウイフルーツ⁵⁾の色調とカロテノイドとの関係を明らかにする目的で、これらのカロテノイド色素組成について一連の報告を行ってきた。引き続いて今回はオクラについて同様の研究を行った。

わが国でのオクラの生産は比較的新しいこともあって、諸成分はもとよりカロテノイド色素についての報告はほとんどみあたらない⁶⁾。近年オクラの消費は定着してきており、栄養的にプロビタミンAとして重要な給源となるカロテノイド組成について、その実態を把握しておくことは重要であると考えられる。そこで、本報ではオクラ果実のクロロフィルとカロテノイド組成の基礎

的資料を得る目的で、外観的に異なる色調の2点の試料を用いて品種間差異について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 試料

供試材料は緑色系として「ベターファイブ」(Better five)、紫色系として、「ベニー」(Benney)の2品種を用い、開花4日目の長さ約7cmの若いさやの果肉と種子を分析した。

2. 分析方法

(1) アントシアニンの検出

オクラ果実を1%塩酸メタノールで一夜冷浸して抽出

* 日本大学短期大学部 (〒252 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

** 日本大学農獣医学部 (〒252 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

した液を自記分光光度計(島津 UV-240)で吸収曲線を調べた。また、アントシアニンとベタシアニンを識別するために呈色反応も行った⁷⁾。

(2) カラムクロマトグラフィー

カロテノイドの定量分析はこれまでと同様の方法で行った^{1)~5)}。すなわち、試料 20~50 g をアセトンを用いて抽出し、これを石油エーテルに転溶、脱水、減圧濃縮して乾固した後、少量の石油エーテルに溶解した。また、一部についてはケン化処理をしてクロロフィルを除いた。カラムクロマトグラフィーは酸化マグネシウム、ハイフロスーパーセル(1:2.5)カラムで分画し、石油エーテル、2% アセトン石油エーテル、メタノールなどを用いて順次溶出した。溶出された各液は自記分光光度計で各々のカロテノイドの吸収曲線を調べ、それぞれのもつ特有の極大波長を照合して同定した。

標準品としては α -カロテン(シグマ社製)、 β -カロテン(メルク社製)を用いた。カロテノイド含量は α -カロテン 445 nm、 β -カロテン 450 nm、キサントフィル類 440 nm における吸光度を測定し、ともに $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 2500 の吸光係数を用い、次式より $\mu\text{g/g}$ (新鮮重)として算出した⁸⁾⁹⁾。

$$C(\mu\text{g/g}) = \frac{A}{K} \times \frac{V_o(l)}{Wt(g)} \times 10^4$$

C=Concentration

A=Optical density

K=Absorption coefficient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)

V_o =Solvent volume

Wt=Weight of fresh fruit

なお、炭化水素系のカロテノイド(カロテン類)に重点をおいて分析し、酸化型カロテノイド(キサントフィル類)は一括して定量した。

(3) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

カロテノイド同定のため TLC も併用した。キーゼルゲル 60F(メルク社製)のプレートを用い、石油エーテル、アセトン(7:3 v/v)で展開した。

(4) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

okra 果実からの抽出した画分を石油エーテルに溶かし、HPLC(島津 LC-6AD)分析を行った。HPLC の分析条件は以下のとおりである。

カラム: Inertsil ODS-80A (GL Science Inc. Tokyo 4.6 mm i.d.×25.0 cm), 移動相: メタノール, アセトニトリル, 塩化メチレン, ヘキサン, 15:75:5:5, 検出器: UV 検出, 440 nm, 感度: 0.001 AUFS, カラム温度: 40°C, 流量: 0.5 ml/min., 注入試料量: 20 μl 。

これらは KHACHIK ら¹⁰⁾の分析方法を参考にして行った。

(5) クロロフィルの定量分析

クロロフィルの分析は試料 10 g を冷アセトンを用いて抽出し、これをジエチルエーテル層に移行し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、分光光度計で 660 nm 及び 642.5 nm の吸光度を調べ COMAR ら¹¹⁾の方法によって算出した。

実験結果および考察

1. アントシアニンの検出

okra 果実の 1% 塩酸メタノールによる抽出液の吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 1 に示した。紫色系の‘ベニー’は 530 nm 付近にピークがみられアントシアニン特有の吸収曲線を示した。緑色系の‘ベターファイブ’はクロロフィルの吸収曲線であることがみとめられた。さらに、ベタシアニンと識別するための呈色反応の結果、okra 果実の赤紫色はアントシアニンであることが確かめられた。

2. カラムクロマトグラフィーによる分画

okra のカロテノイド抽出液およびカロテノイドの標準品として用いた α 、 β -カロテンをカラムクロマトグラフィーで分画した結果、両系統とも 3 種類の吸着帯が得られた。それらは Fr. No. 1 から Fr. No. 3 まで吸着帯の色調の差異により識別することができた。

カラムクロマトグラフィーにより分離した吸着帯を各種溶媒を用い溶出・分取し、それぞれの吸収スペクトル

Fig. 1 Absorption spectra of pigments extracted from okra (in 1% HCl-methanol)
—, Better five; ----, Benney

を測定した (Table 1).

Fr. No. 1 は石油エーテル, Fr. No. 2 は 2% アセトン石油エーテル, Fr. No. 3 はメタノールを用いて溶出して分取した. 個々のカロテノイドの吸収スペクトルは, 3 個の吸収極大をもつ吸収曲線を示した. これらはカラム分画の吸着帯の位置並びに各画分の吸収極大値を従来の報告^{1) 2) 3)}と比較照合すると, Fr. No. 1 は α -カロテン, Fr. No. 2 は β -カロテン, Fr. No. 3 はキサントフィル類と推定された.

3. クロロフィル, カロテノイド含量

オクラ果実のクロロフィルとカロテノイド含量を Table 2 に示した.

果肉においてクロロフィルは緑色の 'ベターファイブ' に多く, 紫色系の 'ベニー' では少なかった. 全カロテノイド含量についてみても 'ベニー' の約 32 $\mu\text{g/g}$ に対し 'ベターファイブ' は 55 $\mu\text{g/g}$ と高い値を示した. またその組成は 'ベターファイブ' では α -カロテン 0.2 $\mu\text{g/g}$, β -カロテン 11 $\mu\text{g/g}$ であったが, キサントフィル類が 43 $\mu\text{g/g}$ と多く, これが全カロテノイドの 79% 近くを占めていた. 一方, 'ベニー' では構成カロテノイドの種類は 'ベターファイブ' と同様であったが, 含量は 32 $\mu\text{g/g}$ と少なく 'ベターファイブ' の 1/2 程度でキサ

ントフィル類の割合も 87% と高かった. 未熟種子では両品種とも総カロテノイド含量は低く, 1.0~1.3 $\mu\text{g/g}$ 程度であった.

これまで, オクラのカロテノイド色素について, BUREAU ら⁶⁾ は α -カロテン 0.28 $\mu\text{g/g}$, β -カロテン 4.3 $\mu\text{g/g}$ と報告しており 'ベニー' の β -カロテンと 'ベ

Table 2 Chlorophyll and carotenoid contents of okra

	(μg/g)			
	Better five		Benney	
	Flesh	Seed	Flesh	Seed
Chlorophyll <i>a</i>	470.0	—	120.0	—
Chlorophyll <i>b</i>	190.0	—	60.0	—
<i>α</i> -carotene	0.2	—	tr.	—
<i>β</i> -carotene	11.4	0.4	4.2	0.3
Xanthophylls	43.2	0.9	27.6	0.7
<div> <div>Neoxanthin</div> <div>Violaxanthin</div> <div>Lutein epoxide</div> <div>Lutein</div> </div>				

Table 1 Carotenoid fractions extracted from okra by column chromatography

Fr. No.	Zone color	Solvent	Absorption maxima in petroleum ether (nm)			Carotenoid identified
1	Light yellow	Petroleum ether	420	443	472	α -carotene
2	Orange	2% acetone-p.e.	425	449	478	β -carotene
3	Yellow	Methanol	423	442	464	Xanthophylls

p.e. : petroleum ether

Table 3 Wave-lengths of absorption maxima of okra pigments separated by thin layer chromatography

Pigment		Color (Rf)	Max. (nm)									
			Petroleum ether*		Benzene		Ethanol		Ethyl ether			
No. I	Yellow	(0.17)	(414)	436	464	(425)	449	478	(416)	440	468	—
II	Yellow	(0.35)	(422)	444	465	(432)	455	480	(424)	445	466	—
III	Yellow	(0.43)	(423)	445	468	(433)	455	480	(424)	446	468	—
IV	Yellow	(0.52)	(415)	440	469	(429)	455	485	(420)	444	471	—
V	Yellowish green	(0.55)	452		643	458		647	462		647	451
VI	Bluish green	(0.64)	428		663	415		667	414		665	427
VII	Gray	(0.84)	409		669	415		671	410		667	408
VIII	Orange	(0.99)	(420)	446	474	(434)	461	488	(425)	450	475	—

* bp. 30-70°C

ターファイブ'の α -カロテンはほぼ同等の値を示した。品種間差異については検討された事例はないが、外観の色調によりかなり変化することが判明した。また、クロロフィル含量とカロテノイド含量には両者とも光合成色素であるため相関性が認められている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。本実験におけるオクラ果実のカロテノイドはその色調により含量に差異が認められ、クロロフィル含量の多い'ベターファイブ'でカロテノイド含量は高く、クロロフィル含量の少ない'ベニー'ではカロテノイド含量も低いことが認められた。

4. TLC による定性分析

オクラ果実より抽出した色素液を石油エーテル、アセトンを展開溶媒としてTLCを行った結果、8つのス

ポットが検出された。各スポットを石油エーテル、ベンゼン、エタノールおよびエチルエーテルに溶かし、吸収スペクトルを測定した結果をTable 3に示した。

これら各スポットの位置およびピークを従来の報告⁽⁸⁾⁽⁹⁾と比較すると、No. Iはネオキササンチン、No. IIはビオラキササンチン、No. IIIはルテイン様物質、No. IVはルテイン、No. Vはクロロフィル*b*、No. VIはクロロフィル*a*、No. VIIはフェオフィチン、No. VIIIは β -カロテンと推定された。

5. HPLC による定性分析

緑色系および紫色系オクラ果実の抽出液のHPLCクロマトグラムをFig. 2に示した。

標準 β -カロテンと比較した結果、9は β -カロテンと

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of pigments in green (A) and reddish purple (B) colored okra

Chromatographic condition : methanol : acetonitrile : methylene chloride : hexane 15 : 75 : 5 : 5

1, Neoxanthin ; 2, Violaxanthin ; 3, Lutein epoxide ; 4, Lutein ; 5, Chlorophyll *b* ; 6, Chlorophyll *b'* ; 7, Chlorophyll *a* ; 8, Chlorophyll *a'* ; 9, β -carotene.

同定された。また、KHACHIK ら¹⁰⁾の結果と照合すると1はネオキサンチン、2はビオラキサンチン、3はルテインエポキシド、4はルテイン、5はクロロフィル b 、6はクロロフィル b' 、7はクロロフィル a 、8はクロロフィル a' 、9は β -カロテンと推定あるいは同定することができた。

要 約

オクラの果色が異なる2品種を供試し、果実のクロロフィルとカロテノイド組成をカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。カロテノイドはカラムの吸着順位、吸収曲線を参考として同定した。その結果、緑色系と紫色系のオクラ果実ではクロロフィル、カロテノイド含量に相違があることがわかった。クロロフィルとカロテノイドの種類は以下のとおりである。

(1) 緑色系の‘ベターファイブ’は主要な色素としてクロロフィル a 470 $\mu\text{g/g}$ および b 190 $\mu\text{g/g}$ を含有していた。カロテノイドは β -カロテンを11 $\mu\text{g/g}$ 、キサントフィル類を43 $\mu\text{g/g}$ 程度含有していた。そのほか少量の α -カロテンが検出された。

(2) 紫色系の‘ベニー’ではクロロフィルは a 120 $\mu\text{g/g}$ 、 b 60 $\mu\text{g/g}$ を含有していた。カロテノイドは β -カロテンを4 $\mu\text{g/g}$ 、キサントフィル類27 $\mu\text{g/g}$ 程度含有していた。そのほか痕跡程度の α -カロテンが検出された。また、紫色系の‘ベニー’ではアントシアニンが検出された。

(3) クロロフィル含量の多い‘ベターファイブ’でカロテノイド含量は高く、クロロフィル含量の少ない‘ベニー’ではカロテノイド含量が低いことが認められた。

(4) キサントフィル類はネオキサンチン、ビオラキサ

ンチン、ルテインエポキシドおよびルテインと推定された。

本報告を作成するに当たり御教示を賜った食品総合研究所垣内典夫部長に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 広田才之：日食工誌, 22, 521 (1975).
- 2) 渡辺慶一・斎藤忠雄・広田才之・高橋文次郎：園学雑誌, 56, 45 (1987).
- 3) 渡辺慶一・斎藤忠雄・広田才之・高橋文次郎：日食工誌, 35, 315 (1988).
- 4) 渡辺慶一・斎藤忠雄・広田才之・高橋文次郎・藤下典之：日食工誌, 38, 153 (1991).
- 5) 渡辺慶一・広田才之・高橋文次郎：日食工誌, 33, 616 (1986).
- 6) BUREAU, J.L. and BUSHWAY, R.J.: *J. Food Sci.*, 51, 128 (1986).
- 7) 林 孝三：植物色素, (養賢堂, 東京). p. 83 (1980).
- 8) MACKINNEY, G. and JENKINS, J.A.: *Genetics*, 35, 284 (1949).
- 9) GOODWIN, T.W.: *Chemistry and biochemistry of plant pigment*. volume 2, (Academic press New York) p. 38 (1976).
- 10) KHACHIK, F., BEECHER, G.R. and WHITTAKER, N. F.: *J. Agric. Food Chem.*: 34, 603 (1986).
- 11) COMAR, C.L. and ZSCHELE, F.P.: *Plant Physiol.* 17, 198 (1942).
- 12) 井崎やゑ子・吉田宏三・日高公雄・戸田和子：栄養誌, 39, 485 (1986).
- 13) 北田善三・玉瀬喜久雄・佐々木美智子・山添 胖・前田有美恵・山本政利・米谷 力：日食工誌, 36, 927 (1989).

(平成7年7月20日受理)