ノート

クロロフィル色素製剤中のクロロフィル分解物の測定

(平成8年9月17日受理)

平田恵子* 広門雅子* 植松洋子*
貞升友紀* 安田和男* 風間成孔*
鈴木助治*

Determination of Chlorophyll Degradation Products in
Chlorophyll Color Preparations

Keiko HIRATA, Masako HIROKADO, Yoko UEMATSU, Yuki SADAMASU,
Kazuo YASUDA, Masayoshi KAZAMA and Sukeji SUZUKI

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

Chlorophyll degradation products such as pheophorbides and pyropheophorbide are strong inducers of photosensitivity. Therefore, their contents in commercial chlorophyll color preparations for food processing were determined.

The maximum level of existing pheophorbide in preparations sold in 1988 and 1993 was 370 mg%. By subtracting existing pheophorbide from total pheophorbide, the activities of chlorophyllase (related to formation of chlorophyll degradation products) were obtained. The activities were present in the range of ND~620 mg% in the color preparations sold in 1988, but were undetectable in the preparations sold in 1993.

When the effect of solvent contained in color preparations on the chlorophyllase activity was investigated, it was found that solvents such as ethanol increased the rate of formation of chlorophyll degradation products.

Pheophorbide a,a',b,b' and pyropheophorbide a in commercially available color preparations were determined by HPLC with a photodiode array detector. The total contents of pheophorbide a,a',b,b' were in the range of ND~64 mg%, and the maximum contents were 41, 4.6, 8.3 and 15 mg% respectively. The contents of pyropheophorbide a were in the range of ND~51 mg%.

(Received September 17, 1996)

Key words: クロロフィル分解物 chlorophyll degradation product; フェオホルバイド a pheophorbide a; ピロフェオホルバイド a pyropheophorbide a; クロロフィル色素製剤 chlorophyll color preparation; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; フォトダイオードアレイ検出器 photodiode array detector

緒言

クロロフィル色素製剤はクロレラ (*Chlorella pyrenoides* CHIK) 及びコンフリー (*Symphytum officinale* LEDEB.) などを原料とし、それらから抽出されたクロロフィルを主成分としている。クロロフィルは分解酵素

クロロフィラーゼにより加水分解され、更に酸性条件下では脱マグネシウム反応を受けてフェオホルバイドなどの分解物を生成する。このような分解はクロロフィラーゼの残存活性と関係が深く、更に水分及び有機溶媒により分解が促進されるといわれている¹⁾。また、これら分解物であるフェオホルバイドは光過敏症の原因物質であり²⁾、特にフェオホルバイド a 及びピロフェオホルバイド

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

ド a は強い光過敏毒性をもつことが知られている³⁾。

したがって、市販クロロフィル色素製剤中にクロロフィル分解物が存在する可能性が考えられたため、既存フェオホルバイド含有量を測定したところ、クロレラ製剤における食品衛生法の規制値⁴⁾を上回る製品が認められた。そこで、食品衛生上問題であると考え、クロロフィル色素製剤中の総フェオホルバイド量を測定し、クロロフィルラーゼの残存活性を調べた。更に、分解物生成に及ぼす色素製剤中のエタノールなどの溶媒の影響を調査した。

フェオホルバイドの分析については HPLC を用いた方法が多く報告^{5)~8)}されているが、今回はフォトダイオードアレイ検出器を用いて確認を行い、市販クロロフィル色素製剤中のフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の含有量を HPLC により定量した。

これらの製品分析の結果から、クロロフィル色素製剤中のクロロフィル分解物に関する知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

市販クロロフィル色素製剤は販売元 4 社が 1988 年に製造した 5 製品及び 1993 年に製造した 6 製品の計 11 製品を試料として用いた。製品は製造後 1 年以内に入手し、当所においては暗所で冷蔵保存した。今回対象とした試料の起源、形態及び総クロロフィル、水及びエタノール含有量を Table 1 に示した。液状試料が 9 試料で、そのうち植物油を含有する油溶性試料は No. 1, 5,

6, 7 及び 8 の 5 試料、脂肪酸エステル類やグリセリンなどの溶媒を含有する水分散性試料は No. 2, 4, 9 及び 10 の 4 試料であり、その他粉末試料は No. 3 及び 11 の 2 試料であった。

2. 試薬及び標準品

(1) フェオホルバイド a 標準溶液: 和光純薬工業(株)製の食品分析用標準品フェオホルバイド a (純度約 90% 以上, ピロフェオホルバイドを約 7% 含有する)をひょう取し、クロロホルム 5 mL に溶解した後、最終濃度が 2~20 µg/mL となるようにメタノールで希釈したものを 0.45 µm のミリポアフィルターを通して調製した。

(2) ピロフェオホルバイド a 及びメチルフェオホルバイド a 標準溶液: タマ生化学(株)製標準品ピロフェオホルバイド a 及びメチルフェオホルバイド a (純度約 95% 以上)を用いて、それぞれフェオホルバイド a 標準溶液と同様に調製した。

(3) 混合標準溶液: 標準品フェオホルバイド a, ピロフェオホルバイド a 及びメチルフェオホルバイド a を用い、最終濃度がそれぞれ 2~20 µg/mL となるようにフェオホルバイド a 標準溶液と同様に調製した。

(4) その他の試薬は、いずれも市販の特級品を用いた。

3. 装置

水分測定器: 京都電子(株)製 MKS-210 型

分光光度計: (株)島津製作所製 UV-2200 型

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 GC-15A

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製ポンプ 880-PU 型, UV/Vis 検出器 870-UV 型, フォトダイ

Table 1. Contents of Total Chlorophyll, Ethanol and Water in Samples Used

Sample			Content (%)		
No. ¹⁾	Origin	Form	Total chlorophyll	Ethanol	Water
1	Confrey ²⁾	Liquid	3.7	ND ⁴⁾	ND ⁵⁾
2	Confrey	Liquid	1.7	ND	19
3	Chlorella ³⁾	Powder	0.5	ND	ND
4	Confrey	Liquid	3.5	36	8
5	Confrey	Liquid	7.8	ND	ND
6	Confrey	Liquid	3.7	ND	ND
7	Confrey	Liquid	7.6	ND	ND
8	Chlorella	Liquid	4.1	ND	ND
9	Confrey	Liquid	1.9	10	28
10	Confrey	Liquid	2.1	ND	20
11	Chlorella	Powder	0.4	ND	ND

Results were averages of three determinations.

¹⁾ No. 1~5: Sample sold in 1988

No. 6~11: Sample sold in 1993

²⁾ *Symphytum officinale* LEDEB

³⁾ *Chlorella pyrenoides* CHIK

⁴⁾ Not detected <0.1%

⁵⁾ Not detected <1%

オートアレイ検出器 MULTI-340 型

4. 既存フェオホルバイド、総フェオホルバイド及びクロロフィラーゼ活性度測定

(1) 色素抽出液の調製

既存フェオホルバイドについては試料の形態により、2 種の方法で調製した。

① 油溶性試料: 試料 0.2 g を量り、クロロホルム 5 mL を加えて溶解した後、エチルエーテル (Et₂O) 50 mL を加え、5% 硫酸ナトリウム溶液で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過し、ろ液に Et₂O を加えて 100 mL とし色素抽出液とした。

② 水分散性及び粉末試料: 試料 0.2 g を量り、エタノール又は水 10~20 mL を加えて溶解した後、更に水を同量加えて Et₂O 50 mL で 2 回抽出し、油溶性試料と同様に洗浄及び脱水して Et₂O で 100 mL とし色素抽出液とした。なお、製剤に脂肪酸エステル類やグリセリンなどが添加されている場合は、エーテル抽出の際に分離が困難なため、抽出は Et₂O を倍量用い、Et₂O で 200 mL とした。

総フェオホルバイドは、試料 0.2 g を量り、環食第 99 号 (1981)⁴⁾ に従って 37°C で 3 時間インキュベートした後、既存フェオホルバイドと同様に Et₂O 抽出して色素抽出液 100 mL を得た。

(2) 定量

既存フェオホルバイド及び総フェオホルバイドは、(1) の色素抽出液 50 mL 又は 100 mL を用い、以下環食第 99 号の方法⁴⁾ により試験溶液 20 mL を調製した

後、667 nm における吸光度を測定し、フェオホルバイド量を算出した。

クロロフィラーゼ活性度は総フェオホルバイド量から既存フェオホルバイド量を差し引いて求めた。

5. フェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の測定

(1) HPLC 用試験溶液の調製

既存フェオホルバイドの測定に用いた 4・(2) の試験溶液を 2 mL まで濃縮し、メタノールを加えて 5~10 mL とし試験溶液とした。

(2) HPLC 条件

衛生試験法・注解⁷⁾ の方法に準じた。

カラム: Lichrospher 100 RP-18 (4.0 mm i.d.×250 mm); 移動相: アセトニトリル-0.1% リン酸-テトラヒドロフラン (88:10:2); 流速: 0.8 mL/min; 検出波長: 410 nm; 注入量: 10 µL

6. 総クロロフィル含有量測定

4・(1) で得た色素抽出液の 642.5 及び 660 nm における吸光度を測定し、次式¹⁾ より算出した。

$$\text{総クロロフィル (mg/L)} = 7.12A_{660} + 16.8A_{642.5}$$

A = 吸光度

7. エタノール及び水分の測定

試料中のエタノールは GC⁹⁾ により、また、水分はカールフィッシャー法 (直接滴定) により測定した。

Table 2. Determination of Existing and Total Pheophorbide, and Chlorophyllase Activity in Chlorophyll Color Preparations

Sample No. ¹⁾	Existing pheophorbide (mg%)	Total pheophorbide (mg%)	Chlorophyllase activity (mg%)
1	38	63	25
2	29	59	30
3	8.2	11	ND ²⁾
4	370	990	620
5	82	200	120
6	13	16	ND
7	14	14	ND
8	47	45	ND
9	ND ³⁾	ND ⁴⁾	ND
10	ND	8.0	ND ⁵⁾
11	ND	ND	ND

Results were averages of three determinations.

¹⁾ See Table 1; ²⁾ Not detected <5 mg%; ³⁾ Not detected <5 mg%; ⁴⁾ Not detected <5 mg%

⁵⁾ The detection limits of existing pheophorbide and the activity of chlorophyllase were 5 mg% (gave footnotes 2 and 3).

As the existing pheophorbide of sample No. 10 was 4.4 mg%, the activity of chlorophyllase obtained by subtracting existing pheophorbide from total pheophorbide (8 mg%) was 3.6 mg%, so the activity was considered undetectable.

結果及び考察

1. 既存フェオホルバイド, 総フェオホルバイド及びクロロフィラーゼ活性度測定

(1) 色素抽出液調製法の検討

クロレラ製剤の公定分析法⁴⁾に記載された抽出法は, 溶解性などの違いによりクロロフィル色素製剤に対して直接適用できない場合があった. そこで, 色素抽出液の調製法を油性試料, 水分散性試料及び粉末試料に分けて検討し, 実験方法 4・(1) のような色素抽出液を得る方法に改良したところ良好な結果が得られた. ここに得た色素抽出液を用い, 以下公定法⁴⁾に従って試験溶液を調製し, 既存フェオホルバイド及び 総フェオホルバイドの測定を行った.

(2) 市販製剤中の含有量

Table 2 に測定結果を示した. 既存フェオホルバイド量は ND~370mg%, 総フェオホルバイド量は ND~990 mg% の範囲であった. そのうち試料 No. 4 は, 既存フェオホルバイド量 370 mg%, 総フェオホルバイド量 990 mg% と高く, それぞれ食品衛生法で定められたクロレラの基準値⁴⁾ 100 及び 160 mg% を超えていた. 総フェオホルバイドから既存フェオホルバイド量を差し引いて求めたクロロフィラーゼ活性度は 620 mg% であった. また, 試料 No. 5 は既存フェオホルバイド量が 82 mg% であったが, 総フェオホルバイド量は 200 mg% と基準値を超えており, クロロフィラーゼ活性度も 120 mg% と比較的高い値を示した.

このように総フェオホルバイド量が既存フェオホルバイド量より高いことは, クロロフィル色素製剤中に酵素が失活せずに残存していることを示しており, その差が大きいほど活性度が高いと考えられる. 1988 年製造の試料 No. 1~5 と, 1993 年製造の試料 No. 6~11 のクロロフィラーゼ活性度を比較すると, 両者の間で顕著な差が認められた. 前者では No. 3 を除いて 25~620 mg% と比較的高い残存活性がみられたのに対して, 後者では検出限界 (5 mg%) 以下の低い活性度であった. したがって, 試料 No. 6~11 については, 色素製剤中のクロロフィラーゼは失活しているものと判断できた. このことは加工時に不活化処理がなされたものと推測される. ただし, 既存フェオホルバイド量に関しては, No. 6~11 の試料の中にも最高 47 mg% を示すものがみられた. なお, 製剤中の総クロロフィル含有量 (Table 1) と既存フェオホルバイド量, 又は総フェオホルバイド量との間には特に相関はみられなかった.

2. クロロフィル分解物生成に及ぼす溶媒の影響

試料 No. 4 はクロロフィラーゼ活性度が 620 mg% と高く, Table 1 に示すようにエタノール 36% 及び水分 8% が含有されている. クロロフィラーゼはエタノールなどの有機溶媒によって活性化が促進されることが知られている¹⁾. また, 水分についてもクロロフィル

Fig. 1. Effect of solvents on formation of chlorophyll degradation products

■—■: 23% ethanol, ◇—◇: 50% glycerol, □—□: 33% ethanol, ▲—▲: 80% ethylether, ◆—◆: 43% ethanol, ●—●: control

Sample: No. 5 in Table 2

の分解に関与し⁹⁾, 分解物の生成に影響するものと考えられる. そこで, 今回は水分を除いた有機溶媒が分解物生成に及ぼす影響を調査した.

水分含量 1% 以下でクロロフィラーゼ活性が 120 mg% の試料 No. 5 に対してエタノール 23, 33 及び 43%, また, グリセリン 50% あるいは Et₂O 80% の濃度になるようにそれぞれ添加し, これらの溶媒添加試料と無添加試料を室温で遮光条件下で 10, 25 及び 35 日間保存したときの既存フェオホルバイド量を測定し, その結果を Fig. 1 に示した. エタノール 33% 添加の場合, 25 日目にフェオホルバイド量が無添加試料の約 3 倍に増加した. これに対して他の溶媒では影響が少なかった. また, エタノール 33% 添加の場合には, フェオホルバイド量は増加した後漸次減少する傾向がみられた. このような減少時には分解反応が更に進行していると考えられる.

以上の結果から, クロロフィラーゼ活性が残存する場合は, 色素製剤中に含有するエタノールなどの溶媒によってクロロフィル分解物の生成が促進されることが確認された.

3. HPLC によるフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の測定

(1) HPLC による定量法

Fig. 2A に, 混合標準溶液のクロマトグラムを示した. 標準品フェオホルバイド a を単独で分析すると 2~20 µg/mL の濃度範囲においては, 不純物であるピロフェオホルバイド a に対応するピークはほとんど観察されず, クロマトグラム上に 4 つのピークが認められた. これは Hu ら⁶⁾ の報告から推定するとフェオホルバイド b (ピーク 1), b' (ピーク 2), a (ピーク 3), a' (ピーク 4) であり, 4 種の混合物であることが分かった. なお, ピロフェオホルバイド a はピーク 5, メチル

Fig. 2. HPLC chromatograms of pheophorbide a, a', b, b', pyropheophorbide a and methylpheophorbide a in chlorophyll color preparations

A: standard (the concentration of pheophorbide a + a' + b + b', pyropheophorbide a and methylpheophorbide a were 3.2, 2.1, 2.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively); B: sample (No. 5); C: sample (No. 4)

HPLC conditions, column: Lichrospher 100 RP-18 (4.0 mm i.d. $\times$ 250 mm); eluent: acetonitrile-0.1% H_3PO_4 -tetrahydrofuran (88:10:2); flow rate: 0.8 mL/min; injection volume: 10 μL ; detection: 410 nm

Peaks: 1=pheophorbide b; 2=pheophorbide b'; 3=pheophorbide a; 4=pheophorbide a'; 5=pyropheophorbide a; 6=methylpheophorbide a; 7=unknown

フェオホルバイド a はピーク 6 に対応し、分析時間は 25 分以内で短時間に分析可能であり、ピーク形状もシャープであった。

Fig. 2B に示すように試料 No. 5 のクロマトグラムでは、ピーク 1~4 は標準溶液と同様の溶出パターンとして観察された。試料 No. 4 (Fig. 2C) ではこれらのピークの面積比は標準のそれと一致しなかった。このようなことから、フェオホルバイド a, a', b, b' をピーク 3 のみで定量することは困難であり、次のようにフェオホルバイド a, a', b, b' の含有量を個別に算出した。

標準品 フェオホルバイド a のクロマトグラム (Fig. 2A) よりピーク 1~4 の総面積を求めて検量線を作成した (各成分の分子吸光係数を同一と仮定して)。試料中のフェオホルバイド a, a', b, b' 含有量を対応する各ピーク面積よりそれぞれ算出した。

本法は、試料中のフェオホルバイド a がエノール化によって立体異性体 a' へ変化しやすいこと¹¹⁾ 及びフェオホルバイド a のみの高純度標準品が得られないという理由から、製品分析上実用的な方法であると考え。また、分解物としてメチルフェオホルバイド a^{2), 8)} も考えられるため、同時に分析できるかどうかを調べた。Fig. 2A に示すようにピロフェオホルバイド a との分離も良く、定量は可能であった。検出限界は、試料濃度でフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a とともに 2 mg% であった。

(2) フォトダイオードアレイ検出器を用いた確認

混合標準溶液のフェオホルバイド a, a', b, b', ピロフェオホルバイド a 及びメチルフェオホルバイド a についてフォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルを調べたところ、いずれも 410 nm に極大吸収を有した。

試料 No. 4 ではピーク 1, 2, 3 及び 5 は極大吸収波長 410 nm を有し標準溶液と一致した。ピーク 7 はピーク 4 に近い保持時間であったが、スペクトルが一致しなかったため、フェオホルバイド a' とは異なる分解物であることが分かった。このような疑似ピークがみられる場合には、フォトダイオードアレイ検出器はクロロフィル分解物の確認に有効であった。

(3) 市販クロロフィル色素製剤中のフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の含有量

色素製剤 11 製品についてフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の含有量を測定した結果を Table 3 に示した。

フェオホルバイド a, a', b, b' は試料 No. 2 及び 4~8 より検出され、それぞれの最大値は 41, 46, 8.3 及び 15 mg% であり、総量では 2~64 mg% であった。また、ピロフェオホルバイド a は試料 No. 4 及び 5 よりそれぞれ 51, 4.3 mg% 検出された。No. 4 はフェオホルバ

Table 3. Determination of Pheophorbide a,a',b,b' and Pyropheophorbide a in Chlorophyll Color Preparations by HPLC

Sample No. ²⁾	Pheophorbide a ¹⁾ (mg%)	Pheophorbide a' ¹⁾ (mg%)	Pheophorbide b ¹⁾ (mg%)	Pheophorbide b' ¹⁾ (mg%)	Pyropheophorbide a (mg%)
1	ND ³⁾	ND	ND	ND	ND
2	4	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND
4	41	ND	8.3	15	51
5	8.8	4.6	ND	ND	4.3
6	6.7	ND	ND	ND	ND
7	2.0	ND	ND	ND	ND
8	2.0	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND

Results were averages of three determinations.

¹⁾ A calibration curve was constructed with the total area of peaks 1~4 of standard pheophorbide a as shown in Fig. 2A, supposing that pheophorbide a, a', b and b' gave the same molecular extinction coefficient. The contents of pheophorbide a, a', b and b' in samples were obtained by using the calibration curve with each peak area of them.

²⁾ See Table 1; ³⁾ Not detected <2 mg%

イド総量とピロフェオホルバイド a の含有量の合計が 115 mg% となり、これは既存フェオホルバイド量の約 31% に相当し、同様に試料 No. 5 では約 22% であった。他の試料はすべて両者ともに 10 mg% 以下の微量であった。また、メチルフェオホルバイド a はいずれから検出されなかった。

Table 2 との比較から、フェオホルバイド a 及びピロフェオホルバイド a 含有量が高い製品は既存フェオホルバイド量も高い傾向にあることが明らかになった。また、分解物の成分を明らかにするために、公定法のみではなく HPLC を用いる必要があると考える。

結 論

1988 年及び 1993 年製造の市販クロロフィル色素製剤 11 製品についてクロロフィル分解物を測定した結果、既存フェオホルバイド量が最高値で 370 mg% 検出された。1988 年の製品は分解物生成に関与するクロロフィラーゼ活性度が ND~620 mg% であり、残存活性が高いものが認められた。これに対して、1993 年製造の製品はいずれもクロロフィラーゼ活性度が検出限界以下であり、分解酵素を失活させたものと推測された。

クロロフィル色素製剤中の有機溶媒がクロロフィル分解物生成に及ぼす影響を検討したところ、エタノールが分解を促進させることが明らかになった。

また、市販製品中のフェオホルバイド a, a', b, b' 及びピロフェオホルバイド a の含有量を HPLC により測定したところ、それぞれの最大値は 41, 4.6, 8.3, 15 及び 51 mg% であった。

1993 年製造のクロロフィル色素製剤は今回の調査結果からクロロフィラーゼ活性は低く、製造方法などの改善がみられた。しかし、既存フェオホルバイド量が 50 mg% に近い製品もあったことから、今後も市販クロロフィル色素製剤中の有害物含有量を極力少なくする努力が必要と考える。

文 献

- 1) 内山 充: 食品衛生研究 **31**(6), 423~436 (1979).
- 2) 田村行広, 真木俊夫, 島村保洋, 西垣 進, 直井家寿太: 食衛誌. **22**, 173~180 (1979).
- 3) 三木和保, 田島 修, 松浦栄一, 山田幸二, 富金原 孝: 農化誌. **54**, 721~726 (1980).
- 4) 厚生省環境衛生局: 環食第 99 号, 昭和 56 年 5 月 8 日.
- 5) Takeda, Y., Uchiyama, S., Saito, Y.: J. Food Hyg. Soc. Japan **26**, 56~60 (1985).
- 6) Hu L., Xu D.: Biomed. Chromatogr. **3**, 72~74 (1989).
- 7) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1990” p. 400~401 (1990) 金原出版.
- 8) 橋本清澄: 薬誌. **105**, 33~37 (1985).
- 9) 植松洋子, 広門雅子, 平田恵子, 中島和雄, 松井敬子, 風間成孔: 東京衛研年報 **40**, 183~186 (1989).
- 10) Lajolo, F. M., Lanfer Marquez, U. M.: J. Food Sci. **47**, 1995~1998 (1982).
- 11) Lim, C. K., Peters, T.J.: J. Chromatogr. **316**, 397~406 (1984).
- 12) Schwartz, S. J., Woo, S. L., Elbe, J. H.: J. Agric. Food Chem. **29**, 533~535 (1981).