

## 海藻に含まれている色素の新しい分析方法

池森雅彦, 田島迪生, 奥田武男

(2001年8月30日受付)

### New Analytical Method of Photosynthetic Pigments in Algae

Masahiko Ikemori, \*<sup>1</sup> Michio Tajima, \*<sup>2</sup> and Takeo Okuda \*<sup>3</sup>

The typical thalli of *Ulva pertusa*, *Undaria pinnatifida* and *Porphyra pseudolinearis* were collected from subtidal zones in Noto town of Noto Peninsula, Ishikawa Prefecture. Pigments were extracted from vegetative part of those algae with absolute methanol containing MgCO<sub>3</sub>. The pigments in the methanol extracts were transferred into diethylether by adding 10% sodium chloride solution in a separatory funnel. Ether preparation was made by concentrating the ether solution of pigments under reduced pressure with a aspirator.

The pigments in this ether concentrate preparation were separated by new column chromatography employing cellulose powder as adsorbent and mixtures of n-hexane, chloroform, ether and methanol as solvents.

Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*,  $\beta$ -carotene, lutein, violaxanthin, neoxanthin and unknown green pigments from *U. pertusa*, chlorophyll *a*, chlorophyll *c*<sub>1</sub>, chlorophyll *c*<sub>2</sub>,  $\beta$ -carotene, fucoxanthin, neofucoxanthin, unknown carotenoids and green pigments from *U. pinnatifida*, and chlorophyll *a*,  $\beta$ -carotene, lutein, unknown carotenoids and green pigments from *P. pseudolinearis* were successfully separated.

**Key words** : analysis of pigments, *Ulva pertusa*, *Undaria pinnatifida*, *Porphyra pseudolinearis*, carotenoids, chlorophylls, new column chromatography on cellulose powder

海藻類のクロロフィルとカロチノイドを基礎とした化学的分類法は、海藻の分類のための有効な手段であるとして広く認められている。<sup>1)</sup>また海藻の色調は種類、生長、成熟および環境により大いに变化し、この色調の差はそれぞれに含まれている色素の種類や量が異なるためであることは良く知られている。<sup>2-4)</sup>従って海藻に含まれている色素を分析することは、海藻の分類のほか藻体の状況を知ることで大変重要なことである。

植物の色素の分離についてはこれまでペーパークロマトグラフィー、<sup>5-8)</sup>薄層クロマトグラフィー、<sup>9-11)</sup>カラムクロマトグラフィー<sup>12,13)</sup>によって行われてきた。これらの方法は分析中に色素が変化し易いもの、少量のサンプルしか処理できないもの、分離不十分のもの、あるいは

操作が複雑なものがみられる。そのため筆者らはより簡易で有効な色素の分析方法を開発するため、長年にわたり研究を行ってきた。

その結果、5時間内でクロロフィルとカロチノイドを殆ど分離できる新しい色素の分析方法を開発したので、ここに紹介する。

#### 実験方法

**材料** この研究に用いたアナアオサ、ワカメ、ウップルイノリについては、1994年12月から1995年3月に能登半島にある能都町沿岸の潮間帯で採集し、同町にある石川県水産総合センターの実験室に持ち帰った。藻体から

\*<sup>1</sup> 故人

\*<sup>2</sup> 石川県水産総合センター(〒927-0435 石川県鳳至郡能都町字宇出津新港3-7)

\*<sup>3</sup> (〒813-0043福岡市東区名島5-14-17)

栄養体部のみを鋏で切り取り, 付着しているゴミを取り除き, 清浄海水で洗浄した後, 濾紙で丁寧にふき取ったものを, 色素の抽出に供した.

色素の抽出 光合成色素の分析においては, 藻体中の全ての色素が材料から変質せずに抽出されることが重要である. メタノールは短時間では色素に変化が無く, 強い抽出力を持っている<sup>2)</sup>ので, 我々は海藻から色素を抽出するためにメタノールを用いた.

湿重量約5gの材料を100mL容の三角フラスコに入れ, 鋏で細かく切った後, 約0.5gの炭酸マグネシウムを添加した. その中に100%メタノールを注ぎ, メタノールに色素が着色しなくなるまで繰り返し抽出を行った. 抽出は薄暗い場所で, 室温下で行った.

藻体残渣は3G-2ガラスフィルターを用いて除去しメタノール抽出液を得た. この抽出方法により藻体に含まれているメタノール可溶性色素を完全に抽出した.

色素の転溶 メタノール抽出液とこの抽出液とほぼ同じ量のジエチルエーテルを分液ロート中に入れた. あらかじめ洗浄ビン中に作製しておいた10%食塩水を用い, 分液ロート中のメタノール抽出液とジエチルエーテルの混合液を洗浄することにより, メタノール抽出液中の色素をエーテル層に転溶した. このエーテル色素転溶液を吸引ピンに移し, 低温・暗所でアスピレータによって減圧濃縮した. 色素はガラス壁に付着し, エーテル中の僅かな水が水滴として残った.

エーテル濃縮試料は壁面についた乾固色素を僅かなジエチルエーテルで再溶解し作製し, 吸収スペクトルの測定とカラムクロマトグラフィーに使用した.

セルロースパウダーカラムの作製 (1) 吸着剤の調整 カラムクロマトグラフィーに用いた吸着剤は東洋濾紙製粉末濾紙 A (100~200メッシュ) と B (200~300メッシュ) であり, 海藻の種類に応じ, 単独あるいは両濾紙を適当な割合に混合し使用した. これらの粉末濾紙は一晚70°Cの乾燥器中で乾燥し, デシケーター内で室温に戻した.

(2) カラム管 カラムクロマトグラフィーには内径2cm, 長さ50cmのカラム管を用いた.

(3) 吸着剤の充填 アナアオサとワカメに含まれている色素の分析に際しては吸着剤として東洋濾紙 A を, またウップルイノリの色素については東洋濾紙 A と B を混合して用いた.

室温にもどした粉末濾紙を三角フラスコに20~30g入れた. アナアオサとワカメに含まれている色素の分析のために n-ヘキサン, クロロホルム, ジエチルエーテル (85/10/5, v/v/v) の混合液を, またウップルイノリの

色素には同(80/15/5, v/v/v)の混合液を, 粉末濾紙の約3倍量三角フラスコに注ぎ, 室温に馴染ませるために一晚放置した.

カラム管の下部にガラスウールを詰め, コックを閉めた後, この吸着剤と溶媒の混濁液を, カラム管の上部からゆっくりとカラム管に充填した. この際はあらかじめ溶媒のみをコック部分より2cm程度いれておくと, 充填が良好となる.

濃縮試料の作製と充填 濃縮試料は, 色素のエーテル濃縮試料1mL に n-ヘキサン4mL 加えることで作製した.

カラム管の下部から余剰な溶液を溶出させたのち, 下部のコックを閉じ, 濃縮試料をゆっくりカラム管へ充填することにより濃縮試料はカラムの上部に浮かんだ.

カラムクロマトグラフィーの展開 カラムクロマトグラフィーの組立様式を Fig. 1 に示す.

カラムクロマトグラフィーの上部に浮かぶ濃縮試料中の色素類を分離するときは, まず  $\beta$ -カロチンのみを分離するために第1展開溶媒として n-ヘキサンを用いた. その後, n-ヘキサン, クロロホルム, ジエチルエーテ

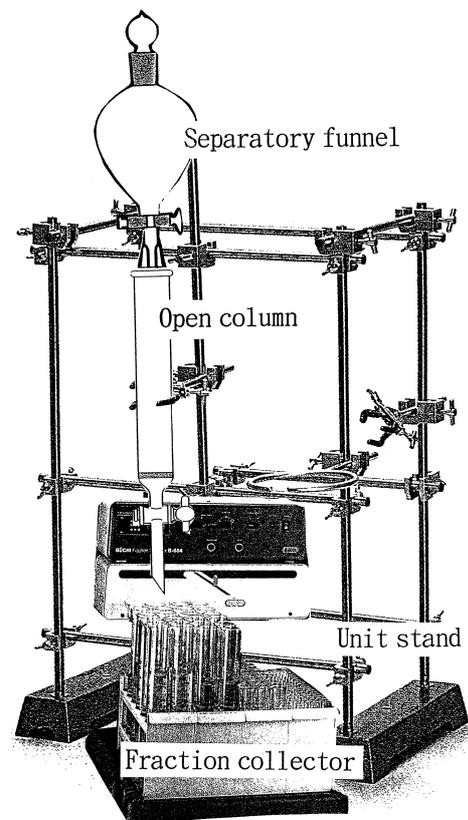


Fig. 1. System of cellulose powder column chromatography for analysis of the pigments extracted from algae.

ルの混合比を変えながら，カラムクロマトグラフィーを展開しクロロフィルとカロチノイドを分離した．この混合液で色素の全てを溶出できないので，その後ジエチルエーテル単独やジエチルエーテル・メタノール混合液ならびにメタノール単独と順次溶媒を変えてカラムクロマトグラフィーを展開していくと，カラムは元の白色になった．

後述するが，これらの展開溶媒の混合比やカラム管に注ぐ時期はそれぞれの海藻から抽出し作製した濃縮試料，すなわち色素の種類や量比により僅かに異なる．

溶出してくるクロロフィルやカロチノイドは，7mLづつフラクションコレクターで分取し，クロロフィル *a* 系色素は663nm，クロロフィル *b* 系色素は645nm，クロロフィル *c* 系色素は630nm，カロチノイド類は450nmの波長域の吸光値を測定し，溶出曲線で示した．

なお，主な色素の判定のため，代表的な色素分画のみを減圧下で濃縮，乾固した後に，ジエチルエーテルや *n*-ヘキサンに再溶解し，光化学的スペクトル測定を行った．吸光値およびスペクトルの測定には，島津製作所製マルチパーパス自記分光光度計 UV-2200を用いた．

## 結果

アナアオサに含まれている光合成色素の分離方法 東洋濾紙 A を *n*-ヘキサン，クロロホルム，ジエチルエーテル (85/10/5, v/v/v) で混濁しカラム管に充填した．その上にアナアオサの濃縮試料を注ぐとこの試料はカラム管上部に浮かんだ．そこへ静かに第1展開溶媒の *n*-ヘキサンをカラム管最上部まで注ぐと濃縮試料は2~3層に分かれた．この層が静止するのを待って下部のコックを開け，さらに *n*-ヘキサンを注入することによって， $\beta$ -カロチンのみがカラム管の下部へ下がった．

$\beta$ -カロチンがカラム管の底近くに着いたとき，第2展開溶媒を *n*-ヘキサン，クロロホルム，ジエチルエーテル (85/10/5, v/v/v) に変えた．ルテインとピオラキサンチンがカラム管の上部の色素群から分かれ，カラム管の下部へゆっくり落ちてきた．数本の無色透明な分画が溶出し，これらの色素類が底部に近づいたとき，それらはルテインとピオラキサンチンの2つのバンドに分かれ，カラム管から溶出した．

ピオラキサンチンが溶出した後すぐに，展開溶媒を同

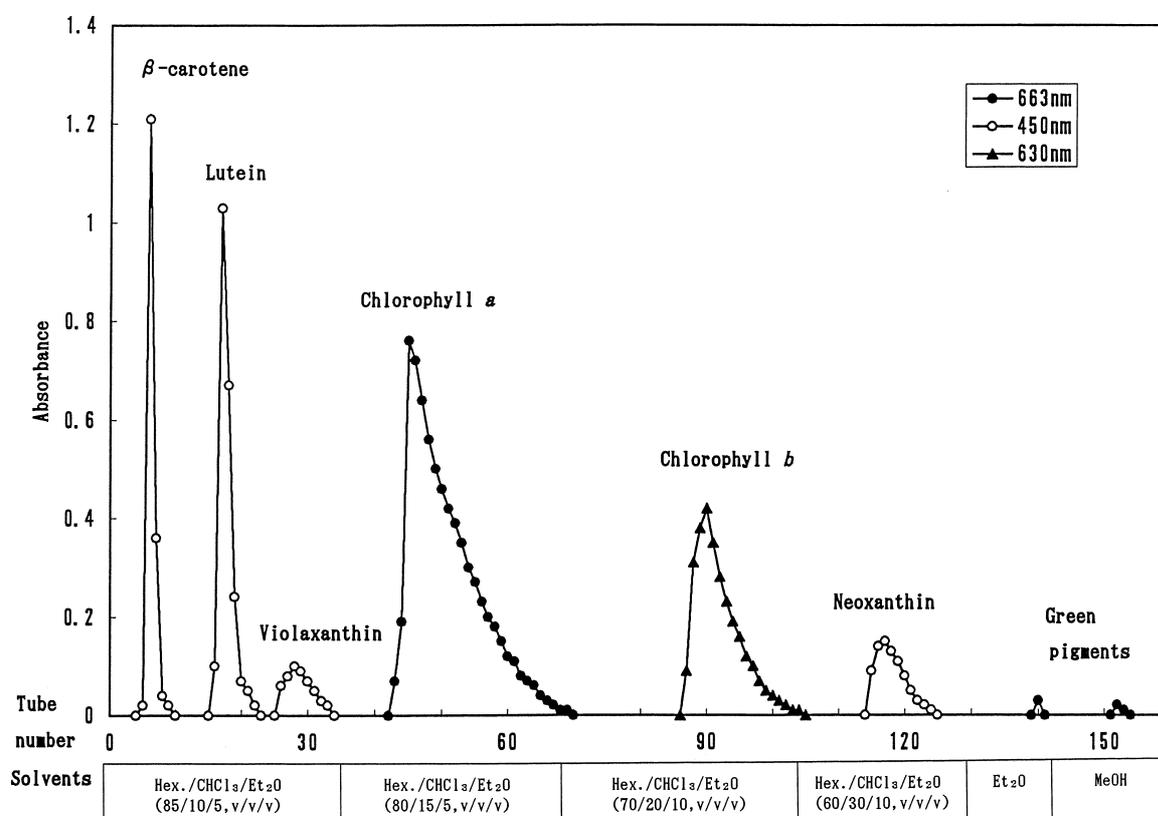


Fig.2. Column chromatography profile of the pigments in the vegetative area of *Ulva pertusa*. Hex., *n*-hexane; CHCl<sub>3</sub>, chloroform; Et<sub>2</sub>O, diethylether; MeOH, methanol.

(80/15/5, v/v/v) に変えると, クロロフィル *a* が溶出した. その後, 展開溶媒を同 (70/20/10, v/v/v) に変えるとクロロフィル *b* が, 同 (60/30/10, v/v/v) ではネオキサンチンが, ジエチルエーテルおよびメタノールで緑色色素類が溶出し, カラム管は白色となった. アナアオサに含まれていた色素の溶出曲線を Fig.2 に示す.

ワカメに含まれている光合成色素の分離方法 アナアオサの際と全く同じ方法でカラムクロマトグラフィーを準備した. 第1展開溶媒の *n*-ヘキサンは  $\beta$ -カロチンが完全に溶出するまでカラム管へ注いだ. 次に展開溶媒を *n*-ヘキサン, クロロホルム, ジエチルエーテル (85/10/5, v/v/v) に置き換えると, 未同定の2種類のカロチノイドが溶出した. 2番目のカロチノイドが溶出するとすぐに, 展開溶媒を同 (80/15/5, v/v/v) に交換すると, クロロフィル *a* とフコキサンチンが分離不十分に溶出した. フコキサンチンの色調が溶出によって薄くなったとき, 展開溶媒を同 (70/20/10, v/v/v) に変えると, ネオフコキサンチンがフコキサンチンと分離不十分に溶出した.

その後, 展開溶媒を同 (60/30/10, v/v/v) に, ジエチルエーテル, メタノール (80/20, v/v), メタノール単独に順次変えると, 未同定の色素とクロロフィル *c* 群がカ

ラム管から溶出し, カラムは元の白色に戻った.

ワカメに含まれていた色素の溶出曲線を Fig.3 に示す.

ウップルイノリに含まれている光合成色素の分離方法 ウップルイノリに含まれている色素の分離には東洋濾紙 A と B を6:4の比で混合したものを吸着剤として, *n*-ヘキサン, クロロホルム, ジエチルエーテル (80/15/5, v/v/v) を溶媒として用い, アナアオサやワカメの際と同じようにカラム管へ充填した. 第1展開溶媒の *n*-ヘキサンをアナアオサの際と同じように  $\beta$ -カロチンが完全に溶出するまでカラム管に注いだ. 続いて第2展開溶媒の *n*-ヘキサン, クロロホルム, ジエチルエーテル (80/15/5, v/v/v) に変えると, ルテインと未同定の2種類のカロチノイドが溶出した.

2番目の未同定のカロチノイドの色調が溶出によって薄くなった時, 展開溶媒を同 (70/20/10, v/v/v) に変えるとクロロフィル *a* が溶出した. その後, 展開溶媒を同 (60/30/10, v/v/v), *n*-ヘキサン, クロロホルム (50/50, v/v), ジエチルエーテル, メタノール (80/20, v/v), 最後にメタノールに変えると, カラム管からは未同定の緑色色素が順次溶出し, カラムは元の白色となった. ウップルイノリに含まれていた色素の溶出曲線を Fig.4 に示す.

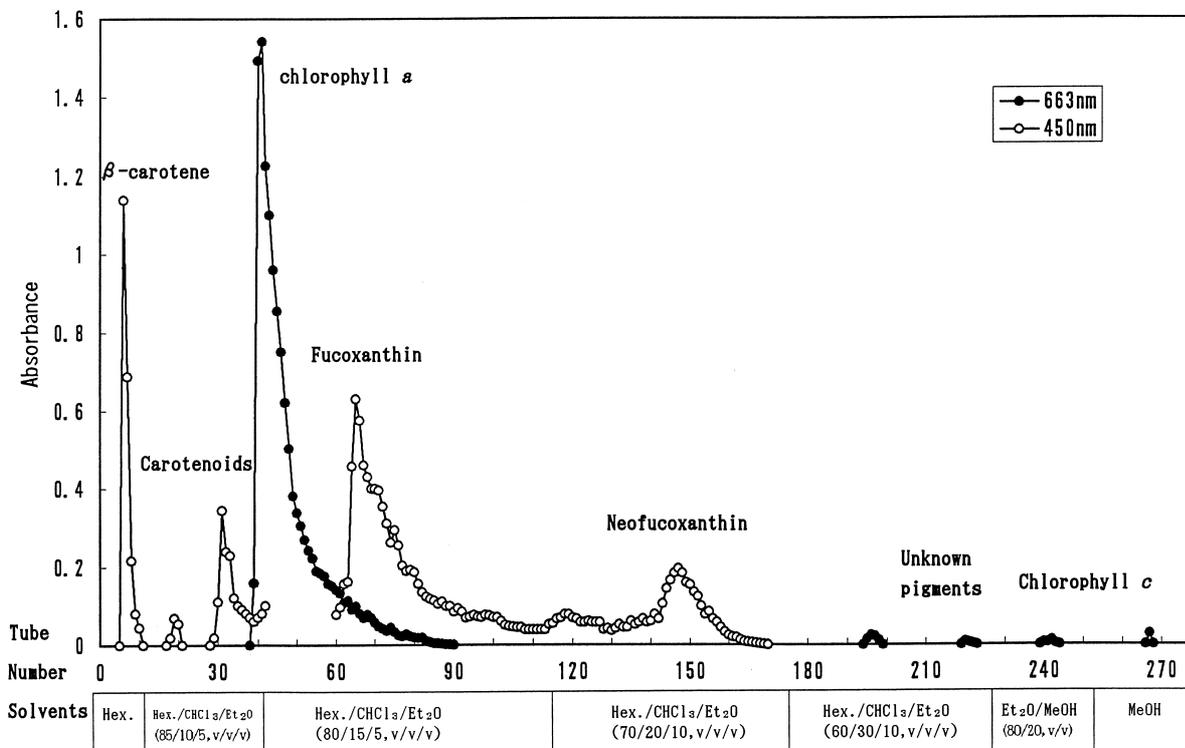


Fig.3. Column chromatography profile of the pigments in the vegetative area of *Undaria pinnatifida*. Abbreviations are the same as in fig.2.

## 海藻色素の新分析方法

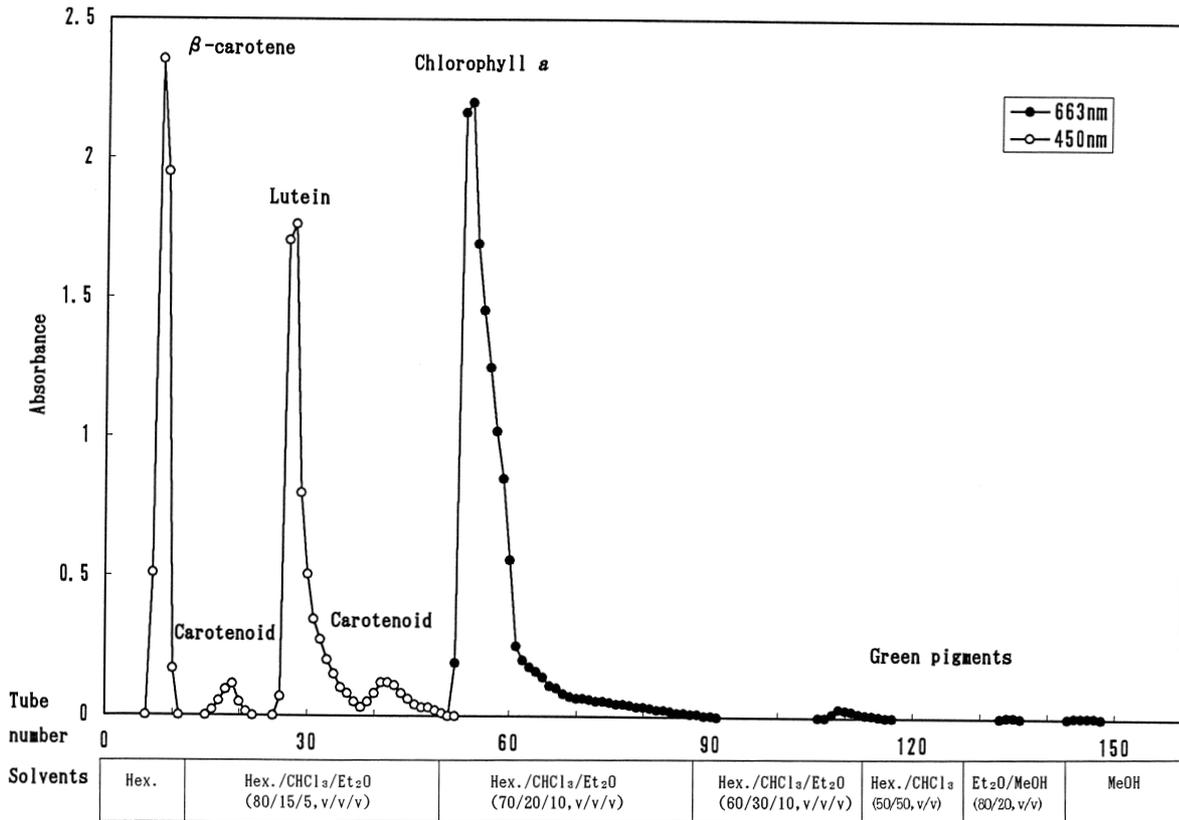


Fig.4. Column chromatography profile of the pigments in the vegetative area of *Porphyra pseudolinearis*. Abbreviations are the same as in fig.2.

### 考 察

色素を分析するためには、途中で異性体が生じたり、他の色素に分解することを極力避ける必要がある。色素は摩擦熱や酸によって敏感に分解され、分析に長い時間かけることはもとより、空気に直接広く接しているとき、容易に変化しやすい。

更に重要なことは、1回のクロマトグラフィーで全ての色素を単離出来ることは少なく、ある植物の色素組成を詳細に知るためには再カラムクロマトグラフィーが必要となり、これにはかなりの量の分画を確保することが重要となる。

今回、我々が開発したセルロースパウダーカラムクロマトグラフィーは過去の分析方法に比べ、短時間で分析でき、常に色素が有機溶媒液中にあることにより空気と直接触れることが少なくて分解されにくく、且つ、かなりの量の色素分画を得ることができる。

今回はアナアオサ、ワカメ、ウップルイノリに含まれている色素を分析したが、各々の海藻に含まれている色素組成が異なっているので、各々に適した方法を用いて分析すべきことは勿論である。基本的には東洋濾紙 A

と B を吸着剤として、*n*-ヘキサン、クロロホルム、ジエチルエーテル、メタノールを展開溶媒として用いる方法であるし、記載した手順で分析すればかなり正確に色素を分離することができる。しかしながら植物体中の色素の種類や量比は環境や成熟等により大いに変化する<sup>2-4)</sup>ことが知られており、このような場合の分析ではカラム中の色素のバンドの動きを見ながら、展開溶媒を変えていくことが重要である。

クロロフィル *a* やクロロフィル *c* に多くの種類があることが想定<sup>12,16,17)</sup>されており、今後はここで示したカラムクロマトグラフィーで溶出したクロロフィル *a* やクロロフィル *c* の分画を再濃縮し、再カラムクロマトグラフィーにより、このことを明らかにしていきたいと考えている。

### 謝 辞

稿を進めるに当たり、この研究の当初から有益な助言を与えられ、終始ご指導いただいた東京大学名誉教授新崎盛敏博士に心から感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) STRAIN, H. H. : *Manual of phycology*, (G. M. Smith, ed). 243, (Chronica Botanica Co., Walrham, Mass., U.S.A)(1951).
- 2) M. Ikemori: Study on the change in the forms of photosynthetic pigments in marine algae according to the environmental conditions as well as the ages. I. *Bull. of the Jap. sea research Institute, Kanazawa Univ.*, **5**, 25-87 (1973).
- 3) M. Ikemori: Study on the change in the forms of photosynthetic pigments in marine algae according to the environmental conditions as well as the ages. II. *Bull. of the Jap. sea research Institute, Kanazawa Univ.*, **5**, 25-87 (1973).
- 4) M. Tajima : Studies on chlorophylls and carotenoids in marine algae with aging and processing. *The Bull. of Ishikawa Prefectural Marine Culture Station*, **4**, 1-79 (1985).
- 5) J. Barrett and S. W. Jeffrey : Chlorophyllase and Formation of an Atypical Chlorophyllide in Marine Algae. *Plant Physiology, Institute of Medical Research Royal North Shore Hospital, Sydney*, 44-47 (1962).
- 6) J. Barrett and S. W. Jeffrey : A note on the occurrence of chlorophyllase in marine algae. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **7**, 255-261 (1971).
- 7) S. W. Jeffrey : Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.* **80**, 336-342 (1961).
- 8) M. Ikemori and S. Arasaki : Photosynthetic pigments in marine algae I. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, **25**, 58-66 (1977).
- 9) J. C. Goedheer : On the pigment system of brown algae. *Photosynthetica*, **4**(2), 97-106 (1970).
- 10) S. W. Jeffrey: Quantitative thin layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, **162**, 271-285 (1968).
- 11) C. A. Rebeiz, F. C. Belanger, G. Freyssinet and D. G. Saab: Chloroplast biogenesis, XXIX. The occurrence of several novel chlorophyll *a* and *b* chromophores in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **590**, 234-247 (1980).
- 12) S. W. Jeffrey : Properties of two spectrally different components in chlorophyll *c* preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 456-467 (1969).
- 13) N. Sato and N. Murata: Preparation of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and bacteriochlorophyll *a* by means of column chromatography with diethyl amino ethylcellulose. *Biochimica et Biophysica Acta*, **501**, 103-111 (1978).
- 14) M. Kobayashi : Study of precise pigment composition of photosystem I-type reaction centers by means of normal-phase HPLC. *J. plant Res.*, **109**, 223-230 (1996).
- 15) A. S. Mostaert and U. Karsten, Y. Hara and M. Watanabe : Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: A chemotaxonomic re-evaluation. *Phycological Research*, **46**, 213-220 (1998).
- 16) C. S. French, J. S. Brown and M. C. Lawrence: The forms of chlorophyll in chloroplast fractions of various algae. *Annual Report 05. the Director Department of Plant Biology, Carnegie Institution Year book*, **70**, 487-495 (1971).
- 17) C. S. French and J. A. Berry: Curve analysis of low-temperature spectra of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of Sorghum Sudanese in comparison to naturally and artificially separated pigment systems of higher plants. *Annual Report of the Director Department of Plant Biology, Carnegie Institution Year Book* **70**, 495-498 (1971).