HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	小豆種皮の着色性物質について
Author(s)	中村, 幸彦; 森, 量夫; 山本, 良三
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 3(2), 148-150
Issue Date	1959-06-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11683
Type	bulletin (article)
File Information	3(2)_p148-150.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

小豆種皮の着色性物質について

中村幸彦*
森量夫*
山本良三*

Studies on the coloring matters of seed coat of "Azuki" bean

By
Yukihiko NAKAMURA,** Kazuo MORI** and Ryozo YAMAMOTO**

黒田等[1]は小豆 (Phaseolus angularis Wight.) 種皮のメタノール抽出液及び水抽出液について研究を行い，その結果アルカリ分解によつて Phloroglucinol と Brenzcatechuic acid を生成する化合物と赤褐色のタンニン様物質及び Ergosterol と思われる物質の存在を報告しているが小豆種皮の着色主要物質の本態については未だに確認されていない。我々は小豆種皮の2% 塩酸酸性エチルアルコール冷抽出液が酸性では美麗な赤色を呈し，アルカリ性では青色を呈する事に着目し，又近年植物組織中に広く Anthocyanin 及び Leucoanthocyanin の存在する事が報告されているので，小豆種皮中にもその存在を予測し研究を進めた。その結果 aglycon として Cyanidin の存在を確認したので報告する。

実験及び結果

1) 色素の抽出及び精製

小豆を一夜水に浸漬し摩砕する。種皮を水に浮上させて集め風乾して試料とした。この風乾種皮 1 kg を 2% 塩酸酸性エチルアルコール 6 l で約一週間浸漬し，色素を抽出する。抽出液は濾過すると透明で僅かに紫をおびた美麗な赤色を呈する。アムモニアを加えてアルカリ性にすると青変する。この抽出液を炭酸ガス気流中で減圧濃縮し乾固状態にする。乾固物を 100 cc の無水エチルアルコールに溶解させ不溶物を濾過して除く。濾液に 5 倍容のエチルエーテルを添加すると着色物質が沈澱する。この沈澱を同様に再びアルコールに溶解させてエーテルを加えて沈澱させる。この操作を更に 3 回くり返して沈澱を精製する。乾燥して約 6.5 g の紫赤色の粉末を得た。この粉末約 5 g を 10 cc の無水エチルアルコールに溶解し，20 cc の 20% 塩酸を加えて重湯煎上で加熱してエチルアルコールの大部分を蒸発除去してから 3 分間沸騰を続け加水分解を行つた。加水分解液を 50 cc の isoamyl alcohol で抽出する。抽出液は若干紫をおびた美麗な赤色を呈する。水で洗い更に 1% 塩酸で洗つた後，250 cc の benzene を加えて着色部分を沈澱させ更に 1% 塩酸 50 cc を加えて振盪すると着色部分は 1% 塩酸層に転溶する。

この赤色の 1% 塩酸溶液を再び 50 cc の isoamyl-alcohol で抽出し，抽出液に benzene と 1% 塩酸を加えて振盪し，同じ転溶操作を 5 回くり返して精製する。最後に得た 1% 塩酸溶液 50 cc をエチルエーテル，石油エーテル，benzene. ethyl acetate で洗滌し，次の Anthocyanidin 類の試験に供した。

2) Anthocyanidin 類の定性反応

Anthocyanidin 類の定性反応については R. Robinson[2] 等が詳細な研究を行つて Anthocyanidin の個々の定性的確認が可能である事を報告している。結果は第一表，第二表に示した。表中太線より上の部分は R. Robinson[2] が 6 つの代表的な Anthocyanidin について得た結果であり太線より下の部分は我々の得た 1% 塩酸溶液とダリアの花より得た結晶 Cyanidin に

* 北海道大学 農学部農芸化学科
** Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

Table 1. Oualitative analysis of some anthocyanidins (The first)

	CH_3COONa–$FeCl_3$ reaction	$FeCl_3$ reaction	Color of CH_3OH–HCl sol.
Pelargonidin	violet red	no reaction	red
Cyanidin	red violet-blue	blue	violet red
Malvidin	red violet	no reaction	violet red
Petunidin	violet blue-blue	blue	
Delphinidin	blue	blue	blue red
Paeonidin		no reaction	violet red
1% HCl solution	red violet-blue	blue	violet red
Crystalline cyanidin	red violet-blue	blue	violet red

Table 2. Qualitative analysis of some anthocyanidins (The second)

	Oxidation	Cyanidin reagent	Delphinidin reagent
Pelargonidin	−	+	+
Cyanidin	−	+	−
Malvidin	−	−	+
Petunidin	+	−	+
Delphinidin	+	−	−
Paeonidin			
1% HCl solution	−	+	−
Crystalline cyanidin	−	+	−

ついて直接行つた結果である。

第一表の醋酸ソーダ—塩化鉄反応は 1% 塩酸溶液の一部を isoamyl alcohol で抽出し，醋酸ソーダを加え，更に塩化鉄溶液 1 滴を加えて色の変化を観察したものである。第二表の酸化試験は 1% 塩酸溶液の一部に空気をふきこみ，半量の 10% 苛性ソーダ溶液を加えて一回振盪し，直ちに濃塩酸を加えて酸性にもどし isoamyl alcohol で抽出し，抽出液中の色の recovery 即ち酸化されたか否かを試験したものである。表中，＋は酸化される事，－は酸化されなかつた事を示す。Cyanidin reagent は cyclohexanol とその 5 倍量の toluene を混合したもので，1% 塩酸溶液の一部をこの試薬と振盪して赤色が試薬に移行するか否かを試験したものである。

Delphinidin reagent は amyl-ethyl ether 1 容と anisol 4 容の混液で，5% ピクリン酸溶液と試料である 1% 塩酸溶液をこの試薬中で振盪し同様に色の移行を試験したもので Cyanidin reagent 及び Delphinidin reagent 何れの場合も＋は移行，－は移行しない事を示す。第一表，第二表の結果より小豆より得た 1% 塩酸溶液は塩化鉄反応は青で醋酸ソーダー塩化鉄反応は赤紫色から青に変化し，酸化試験では酸化されない事が分つた。又 1% 塩酸溶液の赤色は Cyanidin reagent に移行し，Delphinidin reagent に移行しない事も明らかになつた。これらの結果は結晶 Cyanidin について得た結果と全く一致し且つ又 R. Robinson[2] の Cyanidin について得た結果ともよく一致した。Paeonidin については，R. Robinson[2] は詳細な報告を行つていないが Paeonidin は塩化鉄反応を示さない事が既に知られているのでこの点で Cyanidin とは明らかに区別出来る。

3) Paper chromatography による実験

2) より得た結果をより一層明確にする為に Paper-chromatography を行つた。結果は第三表に示した。

溶媒は表に示した 3 種で濾紙は東洋濾紙 No. 50 を

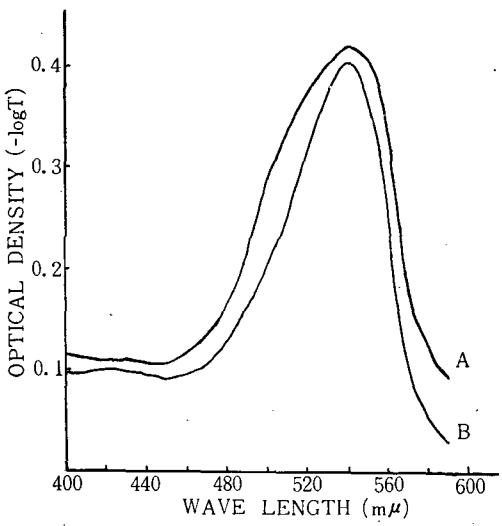
Table 3. Rf values of anthocyanidin from "Azuki" bean (1% HCl sol.)

Solvent system	Cyanidin	1% HCl sol.
Isoamyl alcohol-conc. HCl–H_2O (5:1:1, v/v)	0.64	0.66
n-Butanol–2nHCl (1:1, v/v)	0.70	0.71
Acetic acid–conc. HCl–H_2O (10:30:3, v/v)	0.51	0.51

使用し上昇法，一次元法で室温（20°～25°C）で行つた。試料は 1% 塩酸溶液を isoamyl alcohol で抽出しこれを点着した。R_f 値は，isoamyl alcohol–濃塩酸–水 5:1:1 v/v を使用した場合に結晶 Cyanidin と試料では 0.02 の差が生じた。しかし何れの溶媒を使用しても原点には何も残らず単一の spot を得る事が出来た。特に醋酸–水–濃塩酸 10:30:3 v/v は良好な溶媒で spot の整形もよく Rf 値は全く一致し，結晶 Cyanidin の isoamyl alcohol 溶液と，試料である 1% 塩酸溶液の isoamyl alcohol 抽出液を同時点着しても単一の spot を得る事が出来た。又 Bate-Smith[3] は各種の溶媒を使用して Anthocyanidin 類の paper chromatography を行い，Anthocyanidin 個々の Rf が異なる為に分離，同定が可能である事を報告している。

4) Spectrophotometer による吸収測定

小豆種皮より得た 1% 塩酸溶液の isoamyl alcohol 抽出液と，結晶 Cyanidin isoamyl alcohol の溶液（0.1 mg/cc）について吸収測定を行つた結果は第一図に示した。



Curve A : anthocyanidin from "Azuki" bean.
Curve B : crystalline cyanidin.

Fig. 1 Absorption spectra

両者何れも 545 mμ の波長で最大吸収を示した。此の事は (2), (3) の結果を更に支持するものである。Bate-Smith[3] は Anthocyanidin 類の吸収測定を行つて，その結果次の如き波長に最大吸収をもつと報告している。

Pelargonidin	530 mμ
Cyanidin, Paeonidin	545 mμ
Delphinidin, Petunidin, Malvidin	555 mμ

これによると Cyanidin の外に Paeonidin も 545 mμ に最大吸収を有している。しかし Paeonidin は塩化鉄反応を示さない既知の事実，又 Bate-Smith[3] によつて報告された Cyanidin と Paeonidin は Paper-chromatogram に於て明らかに異なつた Rf 値を示すという事実，又我々の小豆種皮より得た 1% 塩酸溶液は上記 (2), (3) の実験で結晶 Cyanidin と全く同一の結果を生じた事実から考えて Paeonidin ではないと容易に断定出来る。

以上小豆種皮の色素として塩酸加水分解の結果 Cyanidin の存在を確認したが，その本来の配糖体に於ては如何なる糖が如何なる位置に結合しているかという事が問題になるが，此の事は Cyanidin 配糖体を結晶として得なければ解決出来ない。又小豆種皮の着色物質の主要一成分として Cyanidin 配糖体が存在するのであつて外にいろいろの copigment と考えられる物質の存在も当然推測出来る事である。

終りに貴重なる結晶 Cyanidin を分譲して下さつた国立遺伝学研究所 林孝三氏に厚く謝意を表する次第である。

文　献

1) 黒田，和田；Proc. Imp. Acad., 10, 472 (1934)
2) G.M. Robinson, R. Robinson; Biochem. J., 26, 1687 (1931)
3) E.C. Bate-Smith; Biochem. J., 58, 123(1954)

Summary

1. The seed coat of "Azuki" bean was extracted with 2% HCl-ethanol. This extract is a briliant red colored solution. The coloring substance of the extract was prepared and purified in 1% HCl solution.

2. From results of various qualitative analysises, it was considered that the coloring substance was cyanidin

3. Above conclusion is supported by the results of paper chromatographic and spectrophotometric determinations.

4. Almost similar results were obtained with both pure crystalline cyanidin hydrochloride and our prepared coloring substance.