

黒豆の色素について

若 泉 美 智 子*

On the pigments of Kuromame (Black Soy bean).

Michiko Wakaizumi

緒 言

黒豆は豆科の大豆 (*Glycine Max Merrill*) の一種で、黒大豆とも呼ばれている。大豆の原産地は東亜で、原種はツルマメ (*G. Soja Sieb. et Zucc*) と考えられている。黒豆は煮豆として食用に供し、正月料理の代表的甘味の一つとなっており、特別には声楽界で薬として使用されている。

黒豆の種皮は暗紫色を呈し、Anthocyaninに属する。色素に関する研究は Willstätter, Robinson., Karrer 氏等により、その構造が明らかにされて以来著しく発展し、最近では呈色反応、Paper Chromatography, Column Chromatography, Thin Layer Chromatography, 吸収スペクトル法等により微量の検出も可能になっている。

Anthocyaninは植物の花、葉、果実、種子等に含まれ、紅、青、紫を呈する。天然には配糖体として存在し、アグリコンである。Anthocyanidin と糖より構成されている。Anthocyanin は数多いが、Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin^{注1)} の3種と、そのメチルエーテル誘導体で、糖の種類、糖、メチル基の結合の位置と数により色々の Anthocyanin を生じる。遊離の状態では極めて不安定で、単離するには塩酸、過塩素酸、硫酸、ピクリン酸等の塩としてしなければならない。植物の部分により、Anthocyanin を抽出するに難易がある。新鮮な花卉からは最も抽出純製しやすく、果実、葉、種子からは繁雑である。Anthocyanin の結晶

は、多くは黒紫色、赤褐色を呈し金属光沢を有し、融点は極めて高く、著色のため通常測定は不可能とされている。酸により紅色、アルカリにより紫青色を呈する。また 3', 4' の炭素に 2 個の水素基を有する Anthocyanin は、塩化第二鉄により紫青色を呈する。

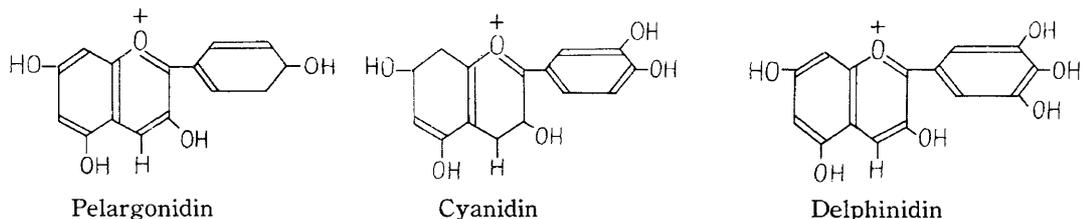
黒豆の種皮の色素に関する研究は、1933~1935年に黒田チカ、和田水氏等が緑色金属光沢の結晶を分離し、塩酸による加水分解の結果、Cyanidin chloride の Monoglucoside. $C_{21}H_{21}O_{11}Cl \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$ であることが判明し Kuromamin と命名した。さらに同氏等は、この Chloride から生成した Picrate の融点、Chloride の呈色反応、分配数、吸収スペクトル及び Karrer 氏法による糖の結合位置の確認により、Kuromamin は Chrysanthemine であることを確認した。

私は黒豆の種皮の色素を究明するために、Thin Layer Chromatography を使用した。この方法は、Izmailov, Shraiber により創始され、Egon Stahl²⁾ により初めて数量的表現と再現性が備えられ、吸着剤、装置等の標準化、簡易化がなされた。Thin Layer Chromatography を Paper Chromatography, Column Chromatography と比較すると、

- (1) 微量の混合物を短時間に分離する。
- (2) 吸着帯が開放されているため、吸着帯の発色、検出が容易である。
- (3) 吸着剤の粒子が細いので分離能が増大する。等の利点を持っている。

私は、黒豆の種皮中の Anthocyanin を Paper Chro-

註1)



* 昭和38年卒業生

matography, Thin Layer Chromatography, 吸収スペクトル等により分離同定を試み、色素の種類と、それに結合する糖について究明するため本実験を開始した。

実験の部

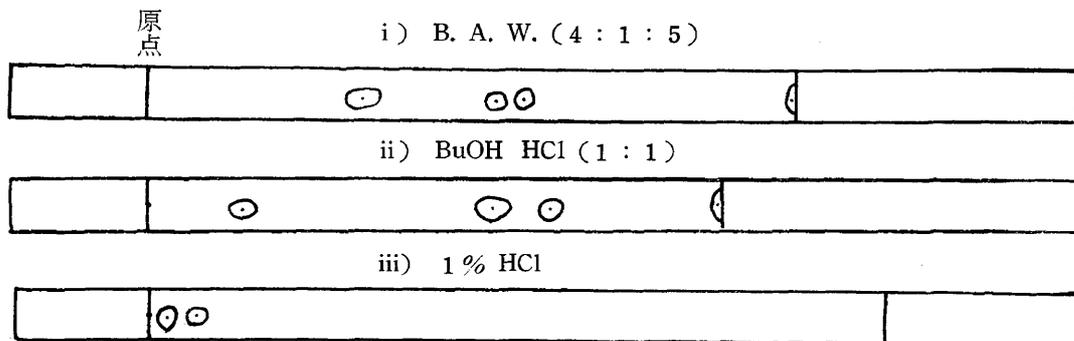
[1] 黒豆の種皮の色素の Paper Chromatography による検索

- a) 試料の調製; 北海道産の黒豆を水に浸してむいた種皮を 2% Methanol-HCl に浸し、一昼夜放置し減圧濃縮したもの。
- b) 展開方法; 一次元上昇法

- c) 濾紙; 東洋濾紙 No. 50 (40×2cm)
- d) 展開溶媒;
 - i) n-Butanol : 氷酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 の上層 (B. A. W).
 - ii) n-Butanol : 2N-塩酸 = 1 : 1 の上層 (BuHCl)
 - iii) 1% 塩酸 (水 : 12N 塩酸 = 97 : 3)
- e) 展開時間;
 - i) は17時間,
 - ii) は15時間,
 - iii) は4時間。
- f) 展開温度; 30°C の恒温器中。
- g) 結果; 第1図参照。

第 1 表

溶 媒		B. A. W. (4:1:5)		BuOH HCl (1:1)		1% HCl	
		Rf 値	色	Rf 値	色	Rf 値	色
実 験 値	Spot 1	0.32	紅 紫 色	0.15	淡 紅 紫 色	0.02	紅 紫 色
	Spot 2	0.55	淡 桃 色	0.60	淡 桃 色	0.07	淡 桃 色
	Spot 3	0.60	淡 黄 色	0.69	淡 桃 色		
	Spot 4	0.99	淡 黄 色	0.99	淡 黄 色		
文 ¹⁾ 献 値	Peonin	0.31	桃 色	0.10	桃 色	0.17	桃 色
	Mecocyanin	0.33	紅 色	0.22	紅 色	0.34	紅 色
	Chrysanthemim	0.38	紅 色	0.25	紅 色	0.07	紅 色



第 1 図

以上の結果から、溶媒 i), ii) によると、Spot 1 溶媒 iii) による Spot 2 は Chrysanthemim, Peonin の文献値に近い Rf 値を示した。

[2] Thin Layer Chromatography による検索

1) 黒豆の種皮の色素の Thin Layer Chromatography による分離

- a) 試料の調製; 北海道産の黒豆を水に浸してむいた種皮を、2% Methanol-HCl に浸し1昼夜放置し、種皮を除去し減圧濃縮したもの。これは変化し易く、T. L. C. の展開状態が変り易いので、度々少量ずつ調

製した。

- b) 吸着剤; ガラスプレート (20×20 cm) 1枚につき用いた吸着剤の原料の配合は次のとおり。

- i) { Alumina woelm acid 7g (Made in Germany)
焼石こう 1g
蒸留水 10cc
- ii) { Silica Gel G 7g (Made in Germany)
蒸留水 16cc

展開溶媒の選択に用いる場合は、上記の割合で、厚さ約 0.25 mm の薄層を作り、色素の分離に用いる場合

は、上記の2倍量を用いて、厚さ約0.50mmの薄層を作った。

i) または ii) の原料を乳鉢にてよく混合し、Desaga社製のセットを用いて Stahl の考案した方法により薄層を作り、しばらく風乾した後、100°Cの乾燥器中に30分～1時間、放置して活性化した。

c) 展開溶媒の選択

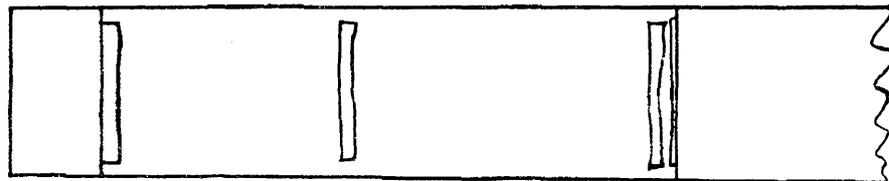
まず Anthocyanin Chloride を Paper Chromatography によって検索する場合、使われる展開溶媒から試みた。n-Butanol:氷酢酸:水=4:1:5の上層, 2N-HCl:n-Butanol=1:1の上層, 氷酢酸:conc HCl:水=5:1:5の上層, 1% HCl により分離したが好ましい結果は得られなかった。

Stahl は洋種シャクヤク (*Paeonia officinalis*) より得た Anthocyanidin を分離するのに、酢酸エチル:

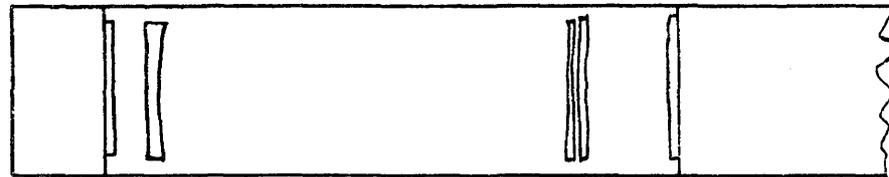
メチルエチルケトン:蟻酸:水=5:3:1:1を溶媒として T.L.C. にかけた報告があるので、この溶媒を用いた。(第2図参照) 展開前線に出る黄色の Carat-inoid らしい band を離すため ii) 酢酸エチル:メチルエチルケトン:蟻酸:水:ベンゼン:石油エーテル=5:4:1:1:1:1を用いた。(第2図) 又、吸着剤 i) は ii) より鮮明に分離するので、以後、吸着剤 i) のみ使用することにした。今1つ黄色の Band が分離してきたので再び変えた。溶媒 iii) 酢酸エチル:メチルエチルケトン:蟻酸:水:ベンゼン:石油エーテル=3:5:1:1:2:1 で分離した。(第2図) これ以上割合を変えても好ましい結果が得られなかったため、以後の実験は展開溶媒 iii) を用いた。

吸着剤 i), 展開溶媒 iii) を用いて展開させ結果、6つの Band を得た。

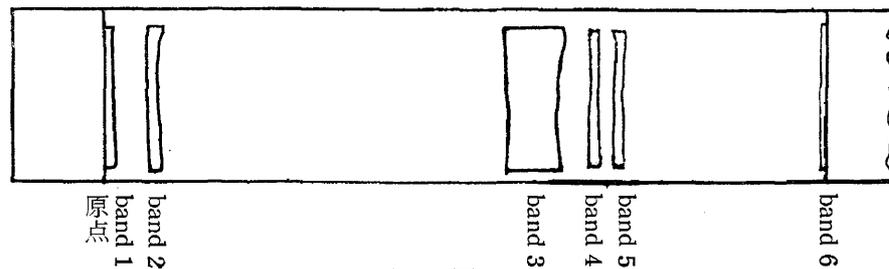
① 展開溶媒 i) による



② 展開溶媒 ii) による



③ 展開溶媒 iii) による



第2図

第2表

band	色	band	色	band	色
band 1 (点)	淡茶色	band 3	赤紫色	band 5	淡黄色
band 2	紫色	band 4	淡桃色	band 6	淡黄色

2) T.L.C. によって分離した各 Band が単離できているか否かの検索

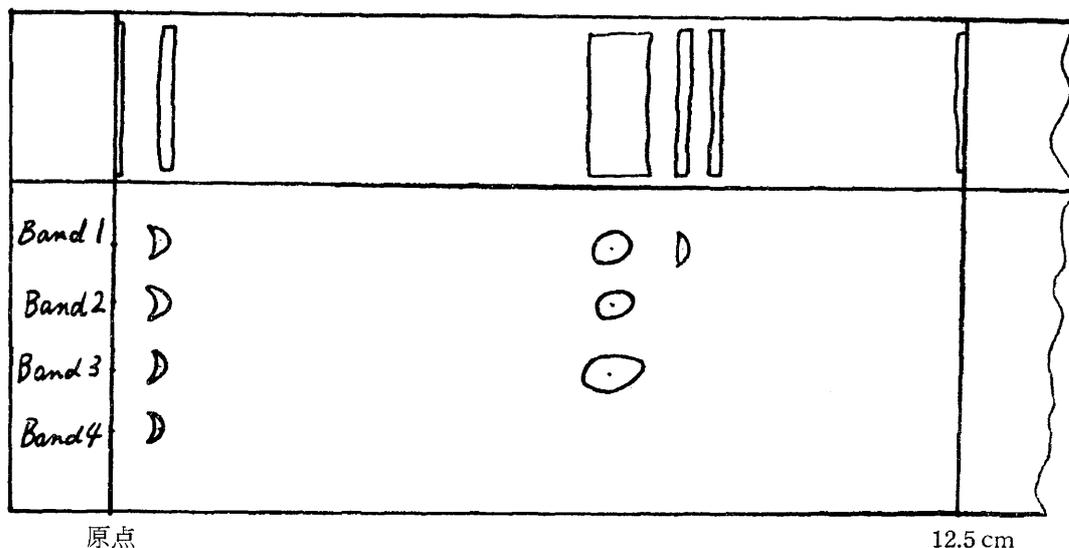
a) 試料の調製; 黒豆の種皮の 2% Methanol-HCl

抽出濃縮液を、T.L.C. によって分離し得られた Band 1~Band 4 をスパーテルでかき取り、2% Methanol-HCl に浸出させ薄層を別し減圧濃縮したもの。

b) 吸着剤; Alumina woelm acid 14 g
 焼石こう 2 g
 蒸留水 20 cc

c) 展開溶媒; 酢酸エチル:メチルエチルケトン:蟻酸:水:ベンゼン:石油エーテル = 3:5:1:1:2:1

展開溶媒 iii) による展開状態と比較する。



第 3 図

d) 展開時間; 45分

e) 結果; 第3図の如く, Band 1 (原点)を展開させたものは, Band 2に相当する Spot (淡茶色)と, Band 3に相当する Spot (淡桃色)と, Band 4に相当する Spot (淡桃色)が得られた。Band 2を展開させたものは Band 2に相当する Spot (茶褐色)と, Band 3に相当する Spot (淡桃色)が得られた。Band 3を展開させたものは, Band 2に相当する Spot (淡茶色)と, Band 3に相当する Spot (桃色)が得られた。Band 4を展開させたものは, Band 2に相当する Spot (淡茶褐色) 1つを得, 淡桃色の Spot 1つが上昇していたが, 途中で消滅した。以上, すべての Band は他の Band に相当する Spot を含んでいるが, 本来の Band に相当する Spot が一番濃厚であったので, 一応単離できているとみなした。

3) Anthocyanin Chloride の加水分解

a) 試料の調製; 黒豆の種皮の 2% Methanol-HCl 抽出濃縮液を, 20×20 cm, 30枚のガラスプレートの T. L. C. にて分離し得られた Band 1~4 を 20% 塩酸

に溶かし, 吸着剤を滌去した溶液。

b) 操作; 試料を砂浴上で 3 分間沸とうさせ急に氷冷した後, 冷蔵庫に放置した。底部に生じた暗紅紫色沈澱を遠心分離器で分離し陶土板で乾燥した。

c) 結果; いずれの Band からも, 粗アグリコンの赤紫色粉末を得た。Band 1 から 30.5 mg, Band 2 から 11.0 mg, Band 3 から 5.0 mg, Band 4 から 2.0 mg 得られた。

4) アグリコンの Paper Chromatography による検索。

a) 試料; 加水分解により得られた粗アグリコンをアミルアルコールに溶かしたもの。

b) 展開方法; 一次元上昇法。

c) 滌液; 東洋滌紙 No. 50 (40×2 cm)

d) 展開溶媒;

i) n-Butanol : 氷酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 の上層 (B. A. W.)

ii) 氷酢酸 : 濃塩酸 : 水 = 30 : 3 : 10

e) 展開時間; 10時間

第 3 表

Band	展開溶媒		氷酢酸 : 濃塩酸 : 水 = 30 : 3 : 10		
	B. A. W. (4:1:5)	Rf 値	色	Rf 値	色
Band 1 のアグリコン	Spot は途中で消滅した。	0.55	紫 色	0.55	紫 色
Band 2 のアグリコン					
Band 3 のアグリコン				0.54	紫 色
Band 4 のアグリコン					
				Spot は途中で消滅した。	

f) 展開温度; 室温

g) 結果

展開溶媒 ii) により Band 1, 2 から分離したアグリコンは Peonidin の Rf 値 (文献値) 0.63 に近い値を示した。Band 3, 4 から分離したアグリコンは途中で消滅した。

5) 結合糖の Paper Chromatography による検索

a) 試料; 加水分解により得られた糖を含む酸性母液は、橙赤色を呈しているのので、iso-Amyl alcohol で振り、色素を Amyl alcohol へ移し、Ether で振り取り、残存する Ether は湯浴上で蒸発させた後、濃縮する。この濃縮液は Fehling 液を還元したので、Paper Chromatography にかけた。

b) 展開方法; 一次元上昇法

c) 濾紙; 東洋濾紙 No. (5040×2 cm)

d) 展開溶媒; n-Butanol : 氷酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 の上層

e) 展開時間; 18時間

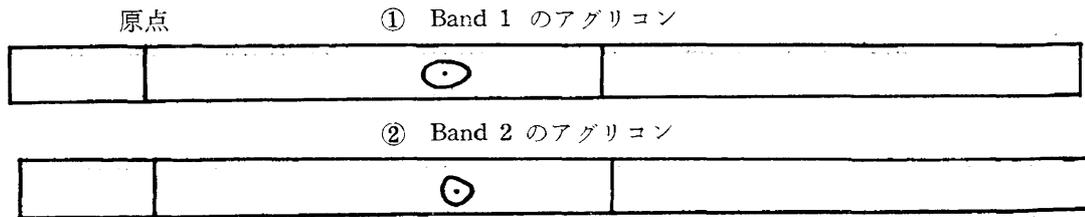
f) 発色法; アンモニア性硝酸銀溶液を噴霧して、100°C の乾温器中で10分間、加熱発色させた。

g) 結果; 第5図の如く、Band 1~3 より得た糖の溶液からは、対象物の glucose と同じ位置に、明瞭な黒褐色の Spot 1 個を認めた。Rf 値は0.19であった。

6) アグリコンの紫外部、および可視部吸収スペクトルによる検索

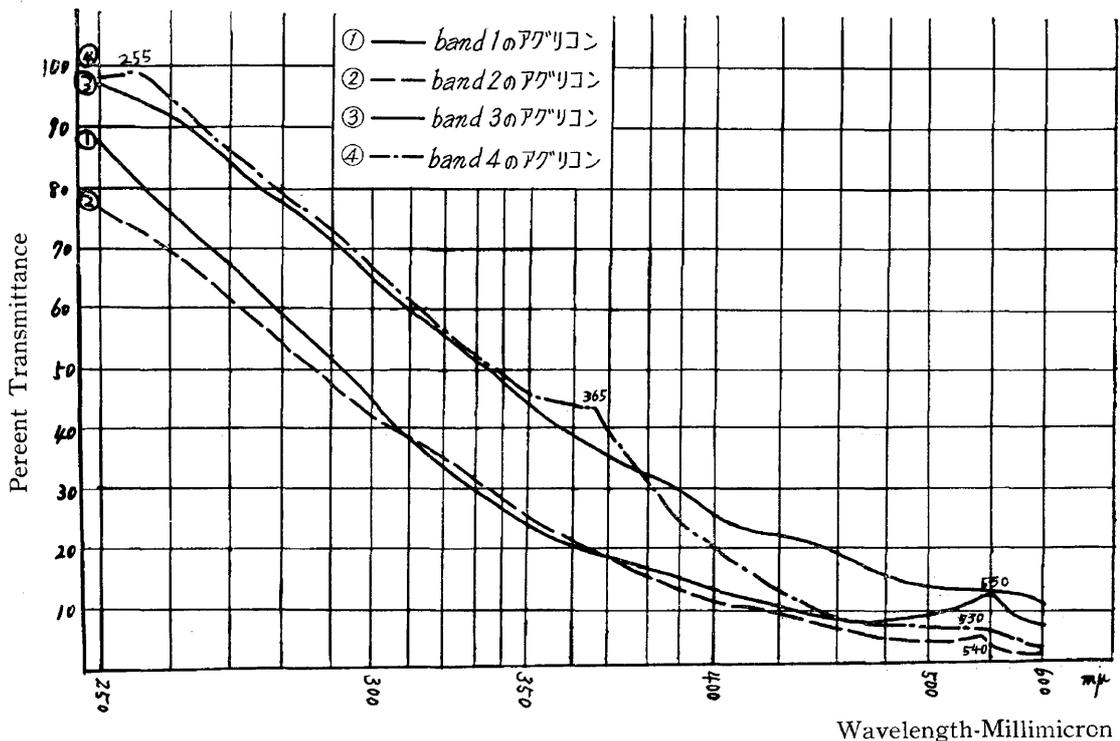
a) 試料および操作; 3) により得た4つの粗アグリコンを、微塩酸性アルコール溶液に溶かし、武田薬品 KK のベックマン自記分光光度計 DU 型にかけていただいた。

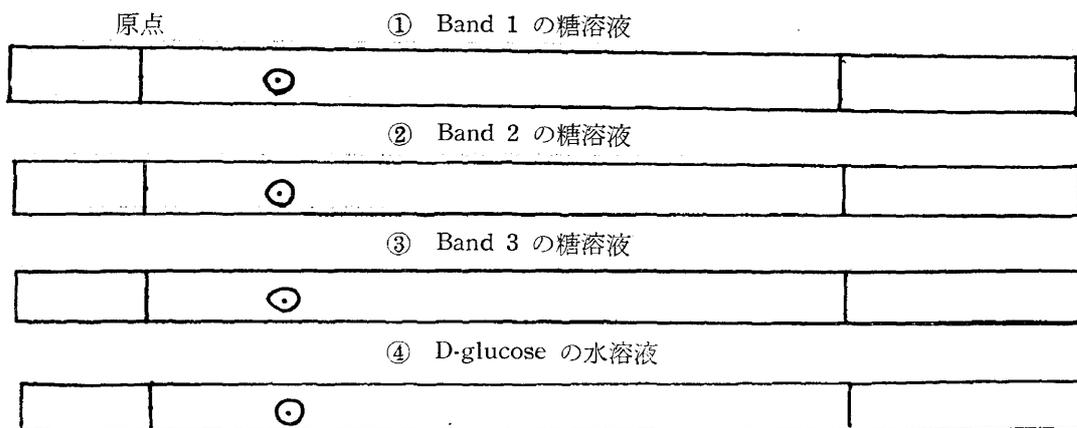
b) 結果および考察; グラフ I を参照。Band 1~4 の粗アグリコンは、535~545 mμ の間に小さな peak を示した。Band 4 は、この他に255, 365 mμ に小さな peak を示した。これはCyanidin の254, 338, 511 mμ の peak (文献値) に最も近い値である。



第 4 図

[グラフ I]





第 5 図

はっきりした peak が得られなかった原因は配糖体が十分に加水分解されていなかったのではないかと、アグリコンを精製しなかったことが考えられるので、今後の研究に期待する。

〔Ⅲ〕 黒豆の種皮の Anthocyanidin Chloride の生成、分離、同定。

1) Anthocyanin Chloride の生成

a) 試料の調製：黒豆 1.4 kg を水にしばらく浸し、むいた種皮を自然乾燥させたもの。

b) 操作および結果：

i) Anthocyanin chloride の鉛塩の生成

試料を 2% Methanol-HCl に 2 日間、浸漬する。得られた紅紫色溶液を濾過し飽和酢酸鉛メタノール溶液を加えた。はじめは塩化鉛の白色沈澱を生じ、次第に碧青色の Anthocyanin Chloride の鉛塩を生じた。この 2 つの沈澱は別け難いので、沈澱を共に吸引濾過してとり出し、陶土板に塗りつけてデシケーター中で乾燥した。

ii) Ether による Anthocyanin chloride の精製

i) で得られた乾燥物を、2% Methanol-HCl に溶かし（青色溶液になる。）底部の不溶解物を濾別し（この不溶解物はまだ青色を帯びていたので、iii) にて酢酸で処理した。）濾液に 5 倍の Ether を加え、一日放置した。暗紅紫色不定形なものが器底に浮遊していたので、これをガラスフィルターで濾取し、ガラスフィルターのまま、デシケーター中で乾燥させると、暗紅紫色粉末の Anthocyanin chloride の粗結晶が得られた。この粗結晶を再び 2% Methanol-HCl に溶かし、5 倍の Ether を加え 1 日放置すると、暗紅紫色粉末の Anthocyanin chloride が得られた。

iii) 酢酸による Anthocyanin chloride の精製

ii) から得られた青色を帯びた不溶解物を乳鉢に

入れ、冷水酢酸と共にすりつぶし、得られた紫色溶液を濾過する。この溶液に 5 倍容の Ether を加え 1 日放置した。暗紅紫色の不定形沈澱が生じたため濾別し、デシケーターで乾燥した。この乾燥物を 2% Methanol-HCl に溶かして得られた紅色溶液に 5 倍容の Ether を加えると器底に暗紅紫色の沈澱を生じたので濾取しデシケーター中で乾燥した。

2) Anthocyanin Chloride の Paper Chromatography による検索

a) 試料：

① 操作 ii) により得られた Anthocyanin Chloride を iso-Amyl alcohol に溶かしたもの。

② 操作 iii) により得られた Anthocyanin Chloride を iso-Amyl alcohol に溶かしたもの。

b) 展開方法：一次元上昇法

c) 濾紙：東洋濾紙 No. 50 (40×2 cm)

d) 展開溶媒：

i) n-Butanol : 氷酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 の上層

ii) n-Butanol : 2N-HCl = 1 : 1 の上層

e) 展開時間；展開溶媒 i) は 12 時間, ii) は 12 時間

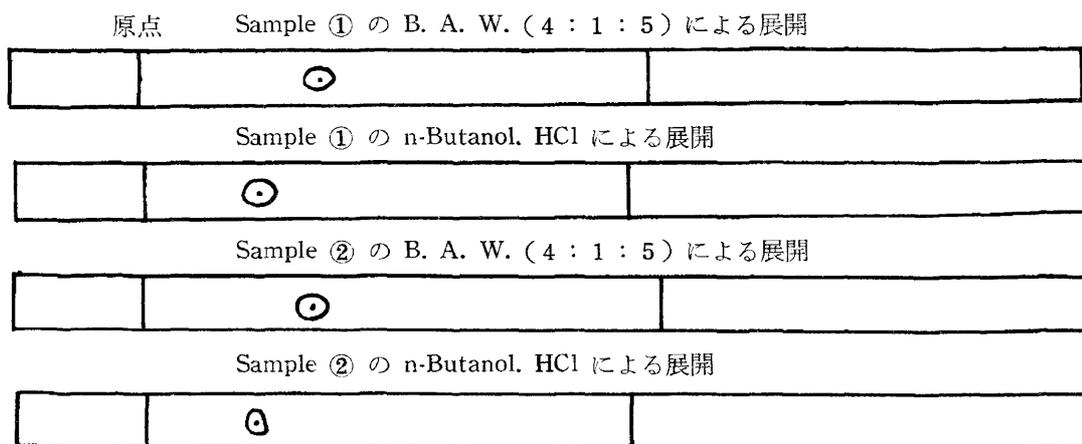
f) 展開温度；室温

g) 結果；第 6 図参照。

第 4 表の如く、Chrysanthemine (Cyanidin-3-glucoside), Mecocyanin (Cyanidin-3-diglucoside) に近

第 4 表

		B. A. W. (4:1:5)		BuOH HCl (1:1)	
		Rf 値	色	Rf 値	色
実験値	試料 ①	0.35	淡紅紫色	0.24	淡紅紫色
	試料 ②	0.34	淡紅紫色	0.24	淡紅紫色
文献値	Chrysanthemine	0.38	紅色	0.25	紅色
	Mecocyanin	0.33	紅色	0.22	紅色



第 6 図

い値を示した。

3) 紫外部, および可視部吸収スペクトルによる検索。

a) 試料;

① 黒豆の種皮の色素の 0.1% Methanol-HCl 抽出液。

② 鉛塩より得た Anthocyanin Chloride を T. L. C. により分離した Band 2 の 0.1% Methanol-HCl 抽出液。

③ 鉛塩より得た Anthocyanin Chloride を T. L. C. により分離した Band 3 の 0.1% Methanol-HCl 抽出液。

④ Ether により精製した Chloride の 0.1% Methanol-HCl 溶液。

⑤ 酢酸により精製した Chloride の 0.1% Methanol-HCl 溶液。

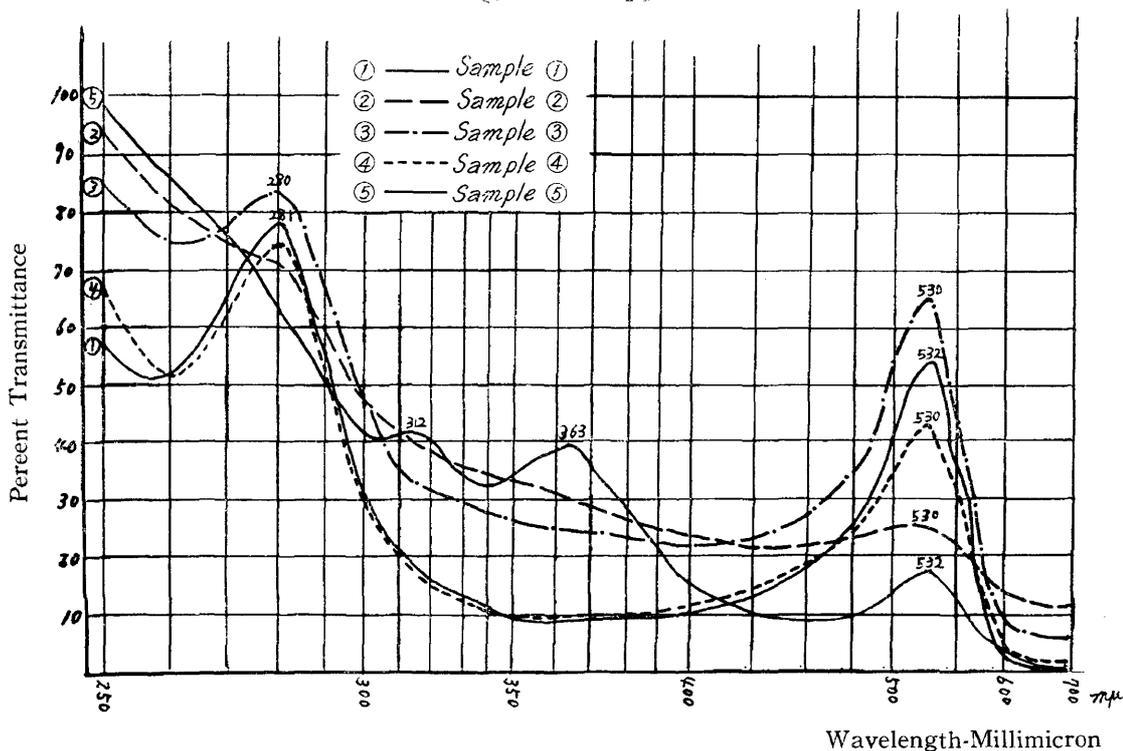
b) 実験操作;

以上の試料を島津自記光電分光光度計を使用し, 波長 250~700 m μ の間で測定した。

c) 結果および考察; グラフ II を参照。

第 5 表の如く, 試料⑤の 312, 363 m μ の peak 以外は, よく似た値を示した。Anthocyanin としては, Mecocyanin, Chrysanthemine の peak の波長に近い値を示し, Anthocyanidin としては, Cyanidin, Peo-

[グラフ II]



第5表

	試料	Peak の波長		
		m μ	m μ	m μ
実験値	試料 ①	281		532
	試料 ②			530
	試料 ③	280		530
	試料 ④	281		530
	試料 ⑤		312. 363	532
文献値	Cyanidin	254. 270	338	511
	Peonidin	253. 274	335	511
	Mecocyanin			530
	Chrysanthemim			525

nidin の peak の波長文献値に近い値を示した。

4) Anthocyanin の加水分解

a) 試料; Ether で精製して得た Anthocyanin Chloride と, 酢酸で精製して得た Anthocyanin Chloride をあわせ用いた。

b) 実験操作; 試料を20%塩酸溶液に溶かし, 砂浴上で1時間沸とうさせ, 急に氷冷し冷蔵庫に放置した。

c) 結果; アグリコンと思われる暗紅紫色沈澱を得た。沈澱を濾取し陶土板で乾燥させた。

5) Anthocyanidin の Paper Chromatography による検索

a) 試料; 加水分解により得た Anthocyanidin の粉末を, 2% Methanol-HCl により再結した暗紅紫色

粉末を Methanol に溶かしたものを。

b) 展開方法; 一次元上昇法

c) 濾紙; 東洋濾紙 No. 50 (40×2 cm)

d) 展開溶媒;

i) 水酢酸:濃塩酸:水=30:3:10

ii) 蟻酸:濃塩酸:水=5:2:3

e) 展開時間; 16時間

f) 展開温度; 室温

g) 結果; 第7図参照

第6表

	展開溶媒 i)		展開溶媒 ii)	
	Rf 値	色	Rf 値	色
実験値	0.49	淡桃色	0.21	淡桃色
Cyanidin の文献値	0.49	桃色	0.22	桃色

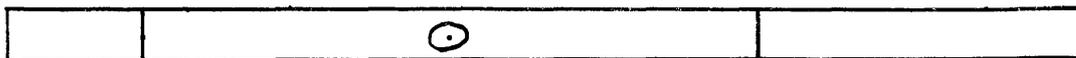
第6表の如く Cyanidin の Rf 値に匹敵するので, 黒豆の Anthocyanidin は Cyanidin であることを確認した。

6) Anthocyanidin の呈色反応

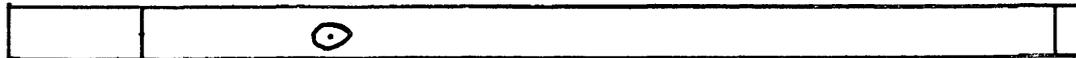
a) 実験操作; Anthocyanidin の粉末を, Methanol に溶かし, 第7表に示す如き試薬を加えて色の変化をみた。

6) 結果; 第7表の如く Cyanidin の呈色反応をしめた。

展開溶媒 i) による展開



展開溶媒 ii) による展開



第7図

第7表

試薬	カセインソーダー	塩酸	炭酸ソーダー	酢酸ソーダー	塩化カルシウム	酢酸鉛	塩化第二鉄
色	青	紅紫	青	紫	青沈澱	青沈澱	黄青

総括および考察

1) 黒豆の種皮の色素は, 3種類の溶媒を使った Paper Chromatography を行なった結果, 少なくとも2個の Anthocyanin よりなることが判明した。Spot 1 は Chrysanthemim, Peonin, Mecocyanin に近い値を示した。

2) ① 黒豆の種皮の色素は, T. L. C. により6つの Band に分離した。

② Band 1~4 の加水分解を行ない, 粗アグリコンの粉末を得た。(収量は Band 1 から 30.5 mg, Band 2 から 11.0 mg, Band 3 から 5.0 mg, Band 4 から 2.0 mg を得た。)

③ Band 1 と 2 のアグリコンは Paper Chroma-

tography により, Peonidin^{註2)} の Rf 値 (文献値) に近い値を示した。Band 4 のアグリコンは, 吸収スペクトルにより Cyanidin の peak (文献値) に最も近い値を示した。

④ 結合糖は Paper Chromatography の対照実験により, すべて Glucose であることを確認した。

3) 黒豆 (1.4 kg) から Anthocyanin Chloride を得, Paper Chromatography と, 吸収スペクトルにより, Anthocyanidin は Cyanidin^{註1)} であり, Anthocyanidin は Chrysanthemine, Mecocyanin のいずれかであると考えられる。

4) 鉛塩から得た Anthocyanin Chloride を加水分解してアグリコンの暗紅紫色粉末を得た。このアグリコンは, Paper Chromatography により Cyanidin であることを確認した。またアグリコンの呈色反応は Cyanidin の呈色反応を示した。

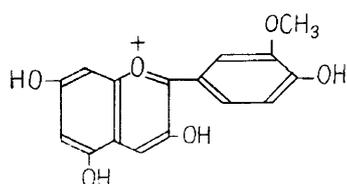
以上のように, 黒豆の Anthocyanidin は Cyanidin であり, Anthocyanin は, 黒田チカ, 和田水氏等が確認した Chrysanthemine 又は Mecocyanin^{註2)} であろうと推定した。

研究を終るにあたり, 終始親切に御指導下さいました平友垣教授, 並びに代谷, 井口先生に深く感謝致します。

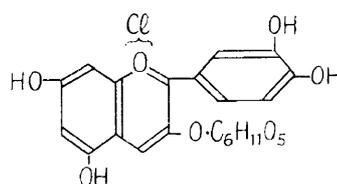
引用文献

- 1) 黒田チカ, 和田水: 日本化学会誌, **57**, 272~278. (1936)
- 2) 石川正幸, 原昭二, 古谷力, 中沢泰男: 薄層クロマトグラフィー, 基礎と応用 (1963)
- 3) Michael Iederer: *Chromatographic Reviews*, **1**, 209~215, (1959)
- 4) 原昭二, 田中治, 滝谷昭司: 薄層クロマトグラフィー, 第1集, 化学の領域増刊, **110**, 59, (1964)
- 5) Michael Iederer: *Chromatographic Reviews*, **1**, 219, (1959)
- 6) Klein: *Handbuch der Pflanzanalyse*, **III/2**, 956~957, (1932) Gillam, Stern: *An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry*, **II ed**, 157, (1958)

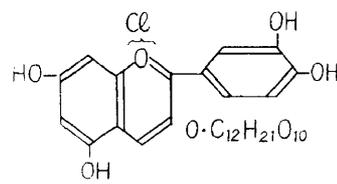
註2)



Peonidin



Chrysanthemine
(Cyanidin-3-glucoside)



Mecocyanin
(Cyanidin-3-diglucoside)