



Title	小豆の加熱に関する研究(第3報) : 小豆熱水抽出液の高速クロマトグラフィー
Author(s)	村上, 知子; 武井, 美智子; 中村, 一十三; 伊藤, 裕三
Citation	北海道教育大学紀要. 第二部. A, 数学・物理学・化学・工学編, 31(1) : 55-60
Issue Date	1980-09
URL	http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/6062
Rights	

小豆の加熱に関する研究 (第3報)

—— 小豆熱水抽出液の高速液体クロマトグラフィー ——

村上知子*, 武井美智子**, 中村一十三**, 伊藤裕三**

*北海道教育大学釧路分校家庭科教室

**北海道教育大学釧路分校化学教室

A Study on a Cooking Method of *Azuki* Beans (Part 3)

—— Separation of the Hot Water Extract of *Azuki* Beans ——

Tomoko MURAKAMI*, Michiko TAKEI**, Hitomi NAKAMURA**, Yasuzo ITO**

* Home Economics Laboratory, Kushiro College, Hokkaido University of Education,

** Chemical Laboratory, Kushiro College, Hokkaido University of Education,

Kushiro 085

Abstract

Separation of the hot water extract of *Azuki* beans was carried out by high liquid chromatography.

When we used 10% acetonitrile with acetic acid as eluent, all components of the hot water extract were well resolved and a component of them was identified as flavanol tannin.

緒 言

前報¹⁾で、小豆の加熱過程において洗切り時に捨てる、熱水抽出液中にフラバノール型タンニンが存在することを報告した。この報告では小豆熱水抽出液を二次元ペーパークロマトグラフィーで展開し、赤血塩-塩化第二鉄試薬、およびバニリン-塩酸試薬を発色剤として用いると数個のスポットが検出され、そのうち1個は標準D-カテキンの位置とほぼ一致し、その他については未検討であった。

今回、小豆熱水抽出液を高速液体クロマトグラフィーで分離を試み、前報¹⁾のペーパークロマトグラフィーの結果と比較した。即ち、高速液体クロマトグラフィーでは移動相としてメタノール-酢酸を用いると、この抽出液は全く分離しなかったが、移動相として酢酸酸性アセトニトリルを用いると3成分に分離した。これらの成分を高速液体クロマトグラフィーで分取し、再び高速液体クロマトグラフィー、およびペーパークロマトグラフィーを行なった。これらの結果について報告する。

実 験

試料；小豆は「アカネ大納言」（昭和54年北海道産）を用いた。小豆の選別は前報¹⁾に従った。

小豆熱水抽出液の調製；小豆の熱水抽出は前報¹⁾に従って行なった。即ち、15gの小豆に10倍量の蒸留水を加え92°Cに達するまで加熱した。その後直ちに熱水抽出液（ゆで汁）を分離した。この操作を50回行ない熱水抽出液7.5ℓを得た。その後抽出液は30°C以下で減圧濃縮し30ml以下とした。生成した沈殿をろ別し、ろ液を試料として用いた。またろ液に倍量のアルコールを加え一夜放置後、生成した沈殿をろ別し、沈殿区分とろ液区分（アルコール抽出液）とに分けた。ろ液区分はデシケータ中で減圧濃縮し、一方沈殿区分は再び蒸留水で溶かしデシケータ中で減圧濃縮し、それぞれ試料として用いた。

装置；装置は635日立高速液体クロマトグラフィーを使用した。カラムには長さ50cm、内径2.6mmを使用した。充填剤の日立ゲル#3010は市販品をそのまま使用し、移動相としてはメタノール-酢酸および酢酸酸性10%アセトニトリルの2種類を使用した。

ペーパークロマトグラフィー；ペーパークロマトグラフィーは前報¹⁾に従って行なった。ただし、二次元ペーパークロマトグラフィーでは展開溶媒の組合わせを酢酸酸性10%アセトニトリル-2%酢酸および60%酢酸-n-ブタノール-水（4：1：2.2v/v）-iso-プロパノール-水（22：78v/v）に変更した。発色は10%バニリン・エタノール-濃塩酸試薬および赤血塩-塩化第二鉄試薬を使用した。

試薬；D-カテキンはメルク製特級、アセトニトリル、酢酸、塩酸、メタノール、iso-プロパノール、n-ブタノール、赤血塩、塩化第二鉄およびバニリンはすべて和光純薬製特級を使用した。

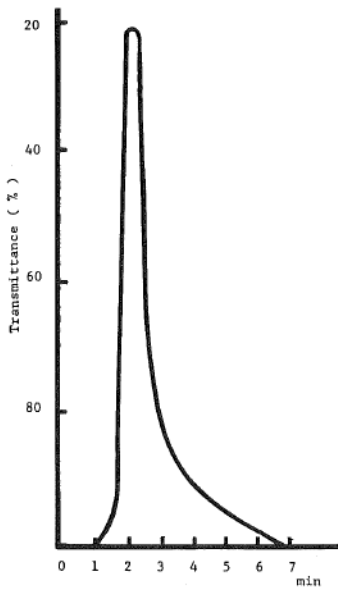
実験結果および考察

標準D-カテキンの高速液体クロマトグラフィーの結果は第1図a、およびbに示した。移動相としてはメタノール-酢酸（80：20v/v）、および酢酸酸性10%アセトニトリルを使用した。流速は1.0ml/min、検出は280nmで行なった。第1図a、およびbに示したように、標準D-カテキンはいずれの移動相でも単一のピークを示した。また、前述の溶媒の組合わせを用いて行なった二次元ペーパークロマトグラフィーでも単一のスポットを示した。

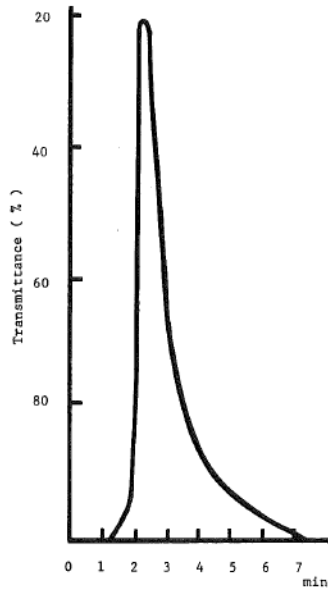
小豆熱水抽出液の高速液体クロマトグラフィーの結果は第2図、および第3図に示した。第2図は移動相としてメタノール-酢酸（80：20v/v）を用い、その他の条件は標準D-カテキンの場合と全く同じである。第2図に示したように小豆熱水抽出液は単一のピークを示し、その位置は標準D-カテキンのピークに近接していた。第3図は移動相を酢酸酸性10%アセトニトリルにした場合であって、図に示したように3成分に分離した。3成分のうち第2の成分は最大であって、標準D-カテキンのピークに類似した。第3の成分は最小であった。

小豆熱水抽出液の二次元ペーパークロマトグラフィーではバニリン-塩酸試薬で発色すると3つのスポットが検出され、赤血塩-塩化第二鉄試薬で発色すると2つのスポットが検出された。そのうち1つのスポットは互いに同じ位置であった。

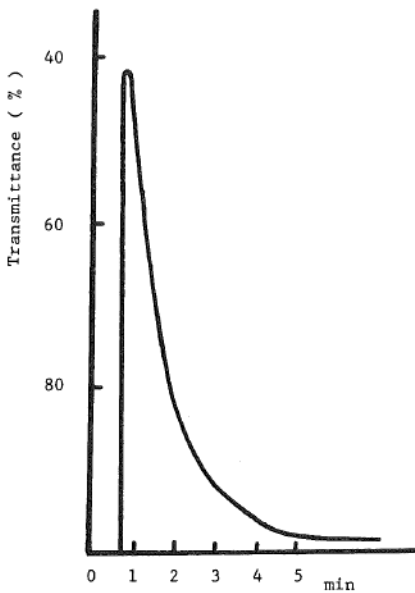
これらのことから、試料を繰り返し高速液体クロマトグラフィーに供し、それぞれの区分を分取した。分取した各区分をデシケータ中で減圧濃縮した後、各区分を再び高速液体クロマトグラフィー



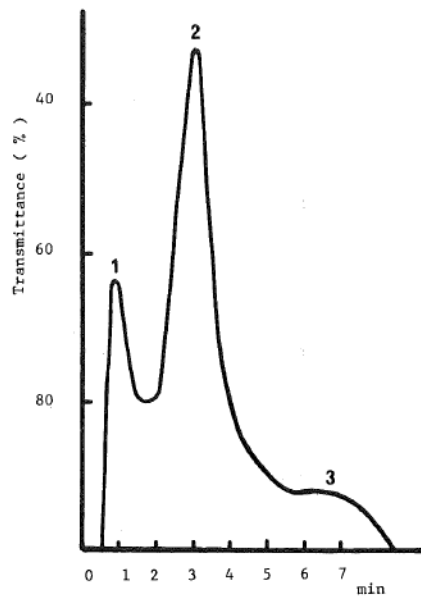
第1図a 標準D-カテキンの高速液体クロマトグラフィー
条件; 充填剤日立ゲル #3010, 移動相メタノール-酢酸 (80:20 v/v), 流速 1 ml/min, 圧力 50 kg/cm², 温度 20~25°C, 検出 UV 280 nm, 0.32 AUFS*



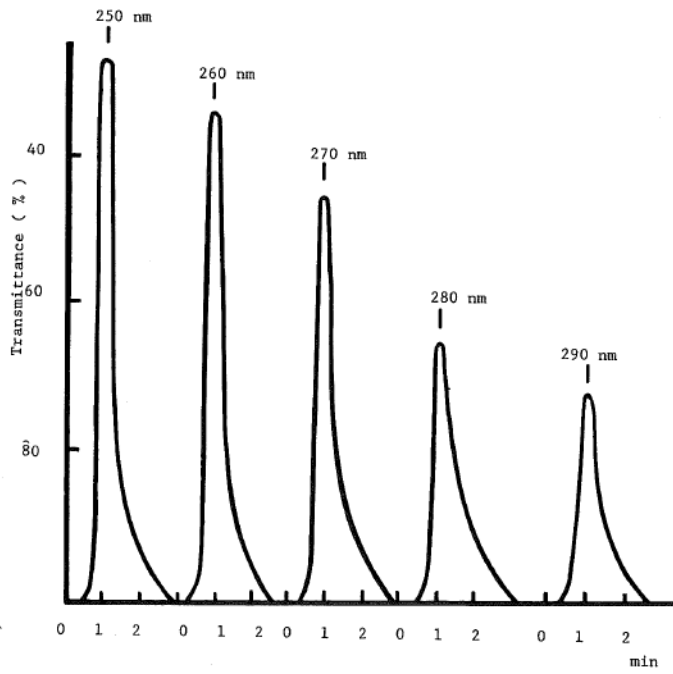
第1図b 標準D-カテキンの高速液体クロマトグラフィー
条件; 移動相酢酸酸性 10%アセトニトリル, その他はaと同じ。
*Absorbance Unit Full Scale の略



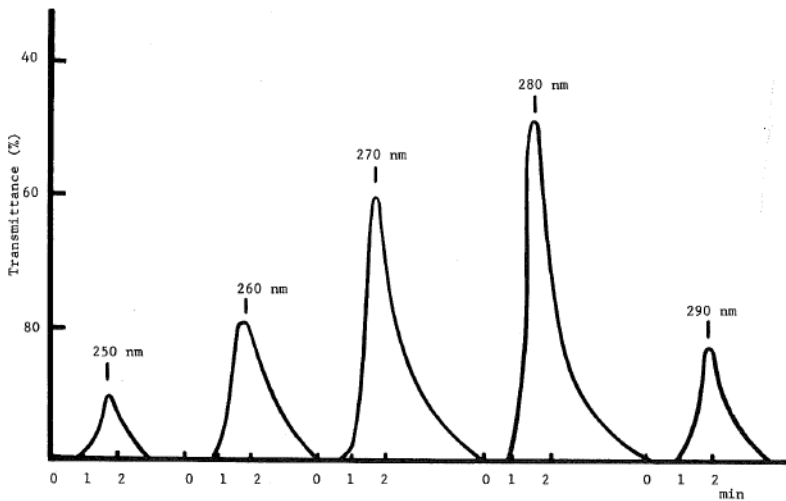
第2図 小豆熱水抽出液の高速液体クロマトグラフィー
条件; 第1図aに同じ。



第3図 小豆熱水抽出液の高速液体クロマトグラフィー
条件; 第1図bに同じ。



第4図a 沈殿区分の高速液体クロマトグラフィー
条件; 第3図に同じ, 但し検出は250 nm, 260 nm, 270 nm, 280 nm, 290 nm で行なった。



第4図b ろ液区分の高速液体クロマトグラフィー
条件; 第4図aに同じ。

に供した。その結果、第1、第2の区分はそれぞれ単一のピークとして現われたが、第3の区分は検出されなかった。一回の高速液体クロマトグラフィーに供しうる試料は最大で30 μ lなので、30mlの濃縮液を全部分離、分取する為には長時間を要する。そこで濃縮液に倍量の iso-プロパノールを加え、一夜放置後、ろ過を行ない沈殿区分とろ液区分とに分けた。ろ液区分 (iso-プロパノール抽出区分) をデシケータ中で減圧濃縮した。沈殿区分は再び蒸留水で溶かし、不溶性の部分を除いた後デシケータ中で減圧濃縮した。

それぞれの濃縮液を試料として高速液体クロマトグラフィーを行なった。その結果は第4図 a、および b に示した。第4図 a に示した沈殿区分は第3図の第1の成分にほぼ一致した。また、第4図 b に示したろ液区分は第3図の第2の成分にほぼ一致した。さらにまた、それぞれの試料の二次元ペーパークロマトグラフィーは前述の二種類の溶媒の組合わせで行なった。展開後、バニリン-塩酸試薬、および赤血塩-塩化第二鉄試薬で発色した。その結果、ろ液区分は共に同じ位置で呈色した。特にバニリン-塩酸試薬を噴霧後直ちに淡い桃色のスポットが現われ、これを 80°C~90°C で短時間加熱すると、より鮮明になった。また赤血塩-塩化第二鉄試薬では青緑色を呈した。沈殿区分はいずれの発色剤を噴霧しても全く呈色しなかった。また沈殿区分は 250 nm から 320 nm の間に全くピークを示さなかった。一方ろ液区分は 280 nm 付近にピークを示した (第4図 a および b 参照)。

以上のことから、前報¹⁾で報告したように小豆熱水抽出液にはフラバノール型タンニンを含んでいることが高速液体クロマトグラフィーによっても確かめることができた。

小豆熱水抽出液を高速液体クロマトグラフィーで分離した報告はまだない。しかしフラバノールと類似の構造をもつフラボン類の液体クロマトグラフィーについて Hori³⁾、中山⁴⁾等の報告がある。この報告によると水酸基の置換位置、その数、またメトキシ基の位置と数の相違による保持時間の差は殆んどないとされている。D-カテキンには6つの異性体が存在するが、今回標準として使用した D-カテキンは 3, 3', 4', 5, 7-Penta hydroxy flavan である。また類似の構造をもつガロカテキン、epi-ガロカテキンについては標準品を入手することができなかった。しかし文献⁵⁾によればガロカテキンは、赤血塩-塩化第二鉄試薬によって青色、バニリン-塩酸試薬では加熱によって深紅色とされている。

ろ液区分 (第2の成分) は高速液体クロマトグラフィー上では D-カテキンの結果と一致した。またペーパークロマトグラフィー上での呈色はガロカテキンに類似した。即ち、赤血塩-塩化第二鉄試薬で青緑色、バニリン-塩酸試薬で淡い桃色、そして加熱すると濃い鮮やかな桃色となった。

高速液体クロマトグラフィー、およびペーパークロマトグラフィーによって、小豆熱水抽出液にフラバノール型タンニンの存在を確認できたが、その種類を同定することはできなかった。また含まれるフラバノール型タンニンを D-カテキンと仮定すると小豆熱水抽出液には 0.003% 含まれることになる。今後、大量の小豆熱水抽出液を調製し、抽出液中に含まれるフラバノール型タンニンを結晶化し、その構造を機器分析によって明らかにし報告する。

要 約

高速液体クロマトグラフィーで小豆熱水抽出液の分離を試みた。移動相として酢酸酸性 10% アセトニトリルを用いると、抽出液は3成分に分離した。3成分のうち一番大きな成分は第2の成分であった。この成分は小豆熱水抽出液に iso-プロパノールを加えて得られたろ液の成分と高速液体クロマ

トグラフィー，および二次元ペーパークロマトグラフィー上で一致した。第1の成分は沈殿の成分と高速液体クロマトグラフィーでは一致したが，二次元ペーパークロマトグラフィーでは確認できなかった。第3の成分は高速液体クロマトグラフィーで分取濃縮した後，再び高速液体クロマトグラフィーを行なったが確認できなかった。

第2の成分はフラバノール型タンニンであることが確かめられたが，その種類を同定することができなかった。

小豆をご恵与下さった，十勝農業協同組合連合会種子センターに深謝する。

文 献

- 1) 村上知子，北教大紀要 II C，28(2)，31(1978)。
- 2) 中林敏郎，木村 進，加藤博通，“食品の変色とその化学”光琳書院・東京・(1972) p. 76-77。
- 3) M. Hori, *Bull. Chem. Soc. Japan.*, 42, 2333 (1969)。
- 4) 中山 充，平岡三津子，松尾昭彦，林 修一，鷹野重成，“日立ゲル応用例（学会，学会誌発表論文集）”日製産業株式会社・日立・(1975) p. 59-62。
- 5) A. H. Cook, H. M. Bunbury and D. H. Hey, "Dictionary of Organic Compounds" Vol. 1, Eyre & Spottiswoode Publishers LTD, London (1964) p. 572, Vol. 2, (1964) p. 1495。