報 文

ゲニステインのアルミニウム塩について

太 田 直 一*, 渡 辺 忠 雄**

* 熊本女子大学食物学科 ** 九州大学農学部

On the Aluminium Salt of Genistein

Naokazu OHTA,* Tadao WATANABE**

* *Department of Food Science, Kumamoto Women's University, Kumamoto*

** *Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka*

Aluminium chloride had been used as food additive in fermented soybeans to develop yellow pigments. In order to know the mechanism, the reaction of flavonoid compounds in soybeans with aluminium chloride was studied.

Daidzein did not react with aluminium chloride, but genistein formed a yellow pigment with it. The pigment was soluble in EtOH, Me₂CO, EtOAc and pyridine, but insoluble in CHCl₃, *n*-hexane, Et₂O and benzene. It was composed of 3 moles of genistein and 1 mole of Al, and melted at 276°C.

It was assumed that the hydroxy radical at 5-position and the carbonyl radical at 4-position of isoflavone participated in the chelation with Al³⁺.

EtOH solution at pH 4.5 of the pigment gave a fluorescence spectrum with an excitation maximum at 420 nm and an emission maximum at 480 nm.

(Received August 27, 1975)

味噌の着色安定剤*** として使用されていた塩化アルミニウムは、味噌に存在する成分とただちに反応して、鮮明な黄色化合物となる。これは、味噌の原料である大豆中のイソフラボン化合物と塩化アルミニウムとの反応に基づくものと考えられるが、この着色機作については、まだ十分に解明されていない。

大豆中のフラボノイド成分については、Walz¹⁾ が2種のイソフラボン化合物、すなわち、genistein および daidzein とその配糖体を分離している。また岡野²⁾ は満州大豆からイソフラボン化合物、すなわち、tatoin, methylgenistein, isogenistein, methylisogenistein の4種を分離報告したが、Baker ら³⁾ および Akluwalia ら⁴⁾ の合成的研究から、これらイソフラボン化合物の存在に対し否定的見解が出されている。

著者らは塩化アルミニウムが大豆中のどのようなイソフラボン化合物と反応するか、その結合比、結合位置などについて検討を行なったので報告する。

実験および結果

1. Daidzin, genistin の分離とその性状

フラボノイド化合物の分離は、Walz¹⁾ および岡野²⁾ の方法を改良して行なった。すなわち、脱脂大豆 3.5 kg をエタノール抽出し、このエタノール可溶部から、エーテル可溶部を除去し、酢酸鉛および塩基性酢酸鉛で処理してサポニン等を除去、脱鉛し、これから酢酸エチル可溶部を集めて、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより分別を行ない、Fig. 1 に示すように Fraction A から daidzin 24 mg, Fraction B から genistin 800 mg を分離した。Fraction A は塩化アルミニウムを加えても無色であったが、Fraction B は黄色を呈した。

Daidzin (C₂₁H₂₀O₉) の性状は、エタノールからの再結晶で無色針状晶、mp 233°C (decomp.) (文献値¹⁾ 235°C)、塩化第二鉄反応は黄褐色、Mg-HCl 反応は淡黄色、Zn-HCl 反応も淡黄色で、Fehling 溶液を還元する。これらの諸性質は、柴田⁵⁾ がクズの根から分離した daidzin と良く一致した。浮紙クロマトグラフィー (以下 PPC と略記) の *R_f* 値: 0.78 (*n*-ブタノール-酢酸-水, 4:1:5), 0.65 (15% 酢酸) であった。紫外線吸収スペクトルは、λ_{max}^{EtOH} nm (log ε): 256 (4.263) であった。この

* 〒 862 熊本市大江 2 丁目

** 〒 812 福岡市東区箱崎

*** 現在 (1975, 10) は、塩化アルミニウム、メヨウバシ等アルミニウム塩の添加は許可されていない。

Fig. 1. Fractionation procedure of daidzin and genistein from the defatted soybeans.

化合物のエタノール 10^{-3} M 溶液と塩化アルミニウム 10^{-3} M 溶液の 1:1 混合液の紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ 256 nm で吸収部位の移動は認められなかった (以下塩化アルミニウム添加の紫外線吸収スペクトル測定は、この混合比で行なった)。

Genistein ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$) の性状は、エタノールからの再結晶で無色薄板状晶、mp 254°C (decomp.) (文献値¹⁾ 254~256°C), 塩化第二鉄反応は赤褐色, Mg-HCl 反応は淡黄色, Zn-HCl 反応は桃色で, Fehling 溶液を還元する。PPC の R_f 値: 0.53 (n -ブタノール-酢酸-水, 4:1:5), 0.63 (15% 酢酸) であった。紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 260 (4.380) であり、この化合物に塩化アルミニウムを添加後の紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ nm (log ϵ): 270 (4.380), 365 (3.577) であった。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3420 (OH), 1655 (C=O), 1620, 1580, 1500 (C=C) であった。

2. Daidzein, genistein とその性状

Daidzin の結晶を 5% 硫酸溶液で分解して、daidzein の結晶を得た。糖成分としては D-glucose を認めた。

Daidzein ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$) の性状は、50% エタノールからの再結晶で無色針状晶、mp 315°C (decomp.) (文献値⁵⁾ 320°C), 塩化第二鉄反応は陰性, Mg-HCl 反応は橙黄色, Zn-HCl 反応は淡桃色で、柴田ら⁵⁾ が分離した daidzein に良く一致した。PPC の R_f 値: 0.87 (n -ブタノール-酢酸-水, 4:1:5), 0.36 (15% 酢酸) であった。紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 252 (4.263) であり、この化合物に塩化アルミニウムを添加しても、

着色が認められず、紫外線吸収スペクトルの $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ 252 nm の移動も認められないことから、この反応はないと考えた。

Genistin の結晶も、5% 硫酸溶液で分解して genistein の結晶を得た。糖成分としては D-glucose を認めた。

Genistein ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$) の性状は、70% エタノールからの再結晶で無色針状晶、mp 292°C (decomp.) (文献値¹⁾ 297~298°C), 塩化第二鉄反応は赤褐色, Mg-HCl 反応は橙黄色, Zn-HCl 反応は桃色であった。PPC の R_f 値: 0.85 (n -ブタノール-酢酸-水, 4:1:5), 0.35 (15% 酢酸) であった。紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 261 (4.213) であり、この化合物に塩化アルミニウムを添加すると黄色を呈し、蛍光を発する。紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ nm (log ϵ): 269 (4.230),

373 (3.367) であった。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (OH), 1655 (C=O), 1620, 1575, 1510 (C=C) であった。

3. Genistein-7, 4'-dimethyl ether と AlCl_3 との反応

Genistein のジアゾメタンでのメチル化から genistein -7, 4'-dimethyl ether, mp 138~140°C の無色針状晶を得た。塩化第二鉄反応は暗緑色であった。この結晶の元素分析値: C, 69.23; H, 5.12 で、 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ としての計算値は、C, 69.45; H, 5.48 であった。核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定の結果は、 $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ 12.55 に 5 位の OH 基のプロトンに相当するシグナルが認められ、3.83 (6H, -OCH₃) を認めた。紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 262 (4.525) であり、この化合物に塩化アルミニウムを添加すると黄色を呈し、紫外線吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ nm (log ϵ): 270 (4.429), 380 (3.336) であった。したがってこの化合物は、塩化アルミニウムとの反応が認められる。なお、この化合物の赤外線吸収スペクトル測定の結果は、Fig. 2 に示すと

Fig. 2. Infrared spectra of a: 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy isoflavone, and b: Al (genistein), (in KBr).

おりである。

4. Genistein-5, 7, 4'-triacetate と AlCl_3 との反応

Genistein はピリジンと無水酢酸でアセチル化して, genistein-5, 7, 4'-triacetate, mp 196~198°C の白色針状結晶を得た。塩化第二鉄反応は陰性であった。この結晶の元素分析値: C, 63.51; H, 3.99 で, $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_8$ としての計算値は, C, 63.63; H, 4.07 であった。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1780 (C=O), 1650, 1630 (C=C) であった。紫外線吸収スペクトルは, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 269 (4.230) (4.521) であり, この化合物に塩化アルミニウムを添加しても, 着色が認められず, 紫外線吸収スペクトルの移動も認められなかった。したがってこの化合物は, 塩化アルミニウムとの反応が認められない。

5. Genistein のアルミニウム塩調製

Genistein 500 mg をピリジン 20 ml に溶解し, この溶液に $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を 1.0 g 加え, 3時間沸騰水浴上で加熱, 反応混合液を濾過し, 濾液を水中に投入すると沈殿を生じるので, この沈殿を濾過, 水洗し, 乾燥した。この化合物は 70% エタノールから再結晶をくり返し, 無定形の淡黄色粉末を得た。収量は 450 mg で, mp 276°C であった。この化合物の溶解性は, エタノール, メタノール, アセトン, 酢酸エチルに可溶, ピリジンに易溶, 熱水に難溶, クロロホルム, *n*-ヘキサン, エーテル, ベンゼンに不溶であった。

このアルミニウム塩のアルミニウム定量は, 真空乾燥器で十分乾燥した化合物を, 東芝ベックマン (NF 型) 原子吸光分光光度計を用いて行なった。測定結果は Al = 3.36% であり, genistein 3 モルとしての計算値は Al = 3.42% であるので, この塩の Al: genistein の結合比は 1:3 であった。この化合物の紫外線吸収スペクトルは, Fig. 3 に示すとおりである。すなわち, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 269 (4.230), 373 (3.367) であり, 先の genistein のエタノール溶液に塩化アルミニウムを加えて測定した結果と良く一致した。また, このアルミニウム塩の赤外線吸収スペクトル測定の結果は, Fig. 2 に示すとおりである。

6. Genistein-Al 塩の蛍光について

先に調製した genistein のアルミニウム塩を 70% エタノールに溶解し, これに塩酸酸性の 70% エタノールを加えて pH 4.5 にすると溶液は強い黄色蛍光を発するので, この蛍光スペクトルを日立分光蛍光光度計を用いて測定した結果は, Fig. 4 に示すとおりである。すなわち, excitation spectrum 420 nm で, emission spectrum 480 nm に極大値を示すので, これによりこの化合物の微量定量が可能である。また, この黄色蛍光の強度と, pH との関係を知るために, 塩濃度を一定にして, pH を

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of genistein and Al (genistein)₃.
— genistein, - - - genistein- AlCl_3 .

Fig. 4. Fluorescent spectra of Al (genistein)₃.

7.0, 5.5, 4.5, 4.0, 3.0 と変化させ, 各 pH での蛍光強度を測定した結果, pH 4.5 で最大値を示し, pH 7.0 以上または pH 4.0 以下では小であった。

考 察

1) 大豆中に比較的多く存在する genistin が塩化アルミニウムと塩を形成し, この genistin-Al 塩が味噌の黄色を保持している一つの因子であることを確認した。この塩形成の機構としては, genistein の水酸基を部分的にマスクした genistein-7, 4'-dimethyl ether および水酸基を完全にマスクした genistein-5, 7, 4'-triacetate を合成し, この両化合物について塩化アルミニウムとの反応を検討した結果, 5 位に遊離の水酸基を有する genistein-7, 4'-dimethyl ether は, 塩化アルミニウムと反応して黄色化合物の形成が認められるが, genistein-5, 7, 4'-triacetate は塩化アルミニウムとの反応において塩の形成が認められなかった。genistein-7, 4'-dimethyl ether の紫外線吸収スペクトルからは, 塩化アルミニウ

ムを添加すると、262 nm の吸収が 270 nm にシフトし、新たに 380 nm の吸収が認められることから、5 位の水酸基に結合の生成が考えられた。また、この化合物の赤外線吸収スペクトルからは、 1655 cm^{-1} のカルボニル基の吸収が、アルミニウム塩になると 1620 cm^{-1} へと低波数側にシフトすることから、カルボニル基との結合が考えられた。以上の結果から、5 位の水酸基と 4 位のカルボニル基がキレート塩の形成に関与していることがわかった。さらにこの黄色化合物は、アルミニウム定量の結果から $\text{Al} : \text{genistein} = 1 : 3$ で、アルミニウムの 1 モルと genistein の 3 モルから成り立っていることを見いだした。

Daidzin については、Fraction A 溶液および daidzin, daidzein と塩化アルミニウムとの反応物が黄色を呈さないこと、紫外線吸収スペクトルの結果から、黄色化合物の生成はないと考えた。

最近 Naim ら⁶⁾ は大豆中から glycitein とその配糖体を分離しているが、このものは塩化アルミニウムを加えても紫外線吸収スペクトルのシフトが認められず、付加化合物を作らないことなどから、黄色化合物の生成には直接関係ないと考えられる。

2) Ballantine ら⁷⁾ は、6-methyl-3, 2'-dihydroxy flavone と塩化アルミニウムとの反応から、アルミニウムの結合位置について 2', 3 位間のキレート塩を考え、林屋⁸⁾ も morin と塩化アルミニウムの反応から 2', 3 位間のキレート塩を考えているが、イソフラボンである genistein にはジフェノールも存在せず、この実験からは、5 位の水酸基と 4 位のカルボニル基間でのキレート塩の形成が考えられた。

要 約

1) 味噌に塩化アルミニウムを加えると黄色を呈し、

かつて着色安定剤として使用されていた。この作用機作を知るために、大豆中に含まれるフラボノイド化合物である genistein と daidzein を分離し、塩化アルミニウムを反応させた結果、前者は黄色化合物を生成したが、後者は無のままであった。

2) Genistein は塩化アルミニウムと反応して $\text{Al}(\text{genistein})_3$ の組成を持つ mp 276°C の化合物を生成した。この化合物は、エタノール、メタノール、アセトン、酢酸エチルに可溶、ビリジンに易溶、熱水に難溶、クロロホルム、*n*-ヘキサン、エーテル、ベンゼンには不溶であった。

3) この塩は、genistein の 5 位の水酸基と 4 位のカルボニル基にアルミニウムがキレートした塩であると考えた。

4) この塩は、塩酸酸性 (pH 4.5) の 70% エタノール溶液中で強い蛍光を発し、excitation max 420 nm, emission max 480 nm であった。

本報告の概要は昭和 49 年 10 月 5 日、日本栄養・食糧学会西日本支部会において発表した。

文 献

- 1) Walz, E.: *Ann.*, **489**, 118 (1931)
- 2) 岡野公次, 別府 敏: 農化, **15**, 645 (1939)
- 3) Baker, W., Chadderton, J., Haborne, J.B. and Ollis, W.D.: *J. Chem. Soc.*, 1852 (1953)
- 4) Akluwalia, V.K., Bhassin, M.M. and Seshadri, T.R.: *Current Sci. (India)*, **22**, 363 (1953)
- 5) 柴田承二, 村上孝夫, 西川嘉広: 薬誌, **79**, 757 (1959)
- 6) Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y. and Bondi, A.: *Phytochem.*, **12**, 169 (1973)
- 7) Ballantine, J.A. and Whalley, W.B.: *J. Chem. Soc.*, 3224 (1956)
- 8) 林屋慶三: 農化, **33**, 174 (1959)

(昭和 50 年 8 月 27 日受理)