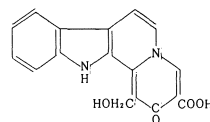


# Separation of Flazin from Shoyu and the Chemical Structure by Instrumental Analysis

Kiyoshi KIHARA, Mitsuru YAMAZAKI

木原 清・山崎 満

醤油のエチルエーテル抽出物より黄緑色、融点 220°C の針状結晶を得て元素分析の結果古く東が酒粕より分離命名した Flazin に一致することを認めた。硫酸、硝酸による呈色反応より Norharman 骨格をもつことを推定し、さらに<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C-NMR による解析の結果次式に示す化学構造を推定した。



## 1 緒言

東は酒粕より黄色蛍光物質を分離<sup>1)</sup>、これを Flazin と名づけた。続いて田所らは食酢よりこのものを分離した<sup>2)</sup>。著者らはこれを醤油より分離し<sup>3)</sup>、さらに味噌などにも存在することを確かめた<sup>4)</sup>。しかしこれの化学構造についてはまだまだほとんど知られていないので著者らは NMR その他の機器分析によるスペクトル解析を行い化学構造への手がかりとした。

## 2 装置および測定条件

装置：日立製自記分光光度計、 $\kappa$  203型蛍光光度計、 $\kappa$  215型赤外分光光度計、日本電子JMS-01SG 質量分析計、Varian XL-100-15型およびVFT-100X型NMR 分光計

測定条件：特にNMR スペクトルはVarian社XL-100-15 VFT-100X型Fourier変換NMR分光を使用してプロトンスペクトルは 100MHzとし定常法で測定し、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは試料を天然存在比のままDMSO-d<sub>6</sub>を溶媒として12mm管に封入し、2KHzのノイズバンドを照射した完全プロトンデカップリングの条件下で25.2MHzの<sup>13</sup>Cスペクトルを測定した。r.fパルスは800回以上くり返し照射し積算したFID信号をFourier変換した。<sup>13</sup>Cスペクトルの帰属のために off Resonance Decouplingの条件下の<sup>13</sup>Cスペクトルを測定した。磁場ロックは溶媒の重水素シグナルに内部ロックし、内部標準はTMSのプロトンあるいは<sup>13</sup>Cシグナルを用いた。

## 3 分離と測定

### 3.1 分離と性状

磁気スターラー付大型液体抽出器に約2ℓの生揚醤油を入れ連続滴下の状態でエチルエーテル抽出を2時間行なった。その後大部分のエーテルを回収して一昼夜放置したところ黄緑色の結晶を析出した。ほとんど純粋と見なし得るのでエチルエーテルにより傾しゃ法を用い数回洗滌後デシケーター中に放置乾燥した。m. p 220°C, 収

率は1~2×10<sup>-3</sup>%であった。これを硫酸に溶解し硝酸を加えると美しい緑色となる。水、エチルエーテルには難溶であるが酢酸には易溶である。また重曹および塩酸にも溶解することより酸基と塩基をもつことが考えられる。元素分析の結果をTable 1に示した。後述Massスペクトル、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>CNMRの結果より考えて分子式をC<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>とすれば実測値と一致しないがこの相異は試料中に不純物として酢酸が含まれていたためであると考えている。

Table 1 Elementary Analysis of Flazin

	C	H	N
calc*	66.23	3.91	9.08%
found	64.14	4.40	8.36

\* as C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

### 3.2 各種スペクトルの測定

#### 3.2.1 蛍光、紫外、赤外、質量スペクトル

これらをそれぞれFig. 1, 2, 3, 4に示した。特にUVスペクトルにおいてはPH5.6付近を境にしてスペクトルパターンに変化を来すことにより塩基の存在は明かである。また1Rにおける750cm<sup>-1</sup>の吸収は隣接H4個の面外交角振動によるものと考えられる。また質量スペクトル測定によりParent peak 308を得たことより分子量が明らかになった。

#### 3.2.2 <sup>1</sup>HNMRスペクトル

<sup>1</sup>HNMRスペクトルの測定結果をFig. 5に示した。シグナル1~9までの強度比の測定結果は1:1:1:2(シグナル4, 5):2(シグナル6, 7):1:2であった。これらシグナルの全積分強度を10とすると、上記の強度比はプロトンの数の比に対応すると考えられる。測定した化学シフト値をTable 2に示した。文献値を参考に帰属すると、-1.60ppmシグナルは-NH-に帰属でき、1.16ppmはニコチンアミドの化学シフト値を参考に

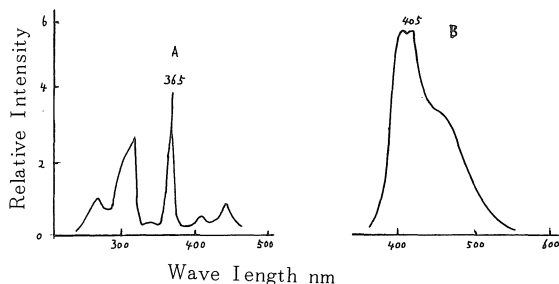


Fig. 1 Fluorescence Spectra of Flazin

$5.0 \times 10^{-3}$  mg/ml  $C_2H_5OH$

A: Excitation spectrum

Emis 0

S  $5 \times 10$

B: Emission spectrum

Ex. 366nm

S  $3 \times 1$

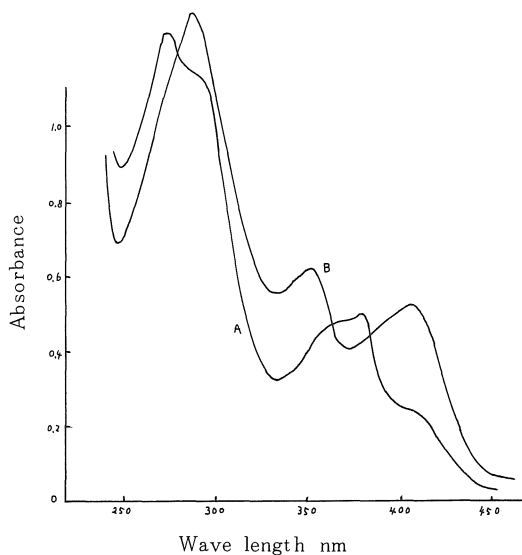


Fig. 2 Change of UV Absorption

Pattern by pH

A: pH 5.6 0.1 M Acetic acid


B: pH 4.0 0.1 M Citric acid

すると、含窒素ヘテロ環の

$$\begin{array}{c} | \\ -N-C-H \\ || \\ -C-CO- \end{array}$$
 のプロトンに帰属できる。2.56ppm,

$$-C-CO-$$
 の二重線 ( $J=3.5\text{Hz}$ ) と 3.37ppm

の二重線 ( $J=3.5\text{Hz}$ ) はスピン結合定数の値から推定

して  の2個のプロトンに帰属できる。これにつ

いてはさらに Spin Decoupling の手法により確めた。

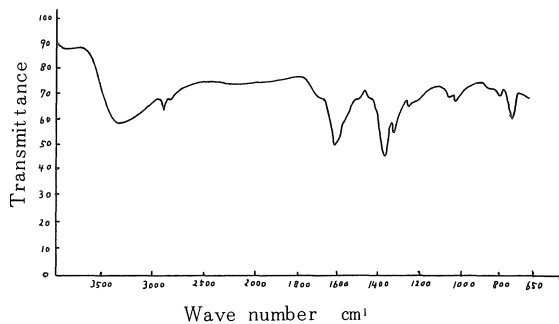


Fig. 3 IR Spectrum of Flazin

1% KBr

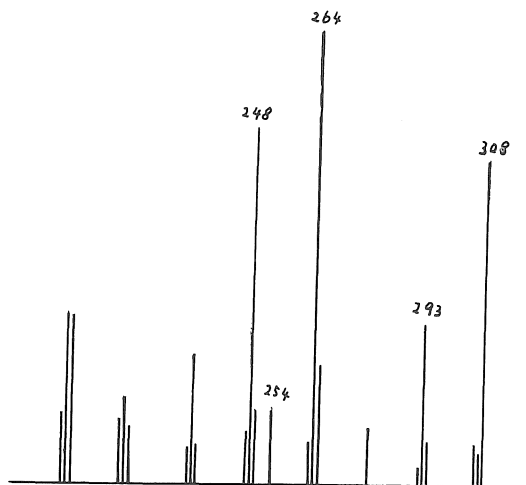


Fig. 4 Mass spectrum of Flazin

Nihon Denshi JMS-01SG

Ion Multi. 20ev

Temp. of Ionization chamber 200°C

Temp. of Sample heating 145°C

Scan time 20 sec

Chart sp. 4 cm/sec

つまり2.56ppmを照射したとき3.37ppmに単一線が観測され3.37ppmを照射したとき2.56ppmのシグナルは単一線として観測された。1.60ppmの二重線 ( $J=7.5\text{Hz}$ ) および2.20, 2.35, 2.66ppmのそれぞれの三重線 ( $J=7.5\text{Hz}$ ) は化学シフト値とスピン結合定数の値を考慮すると、ベンゼン環上連続4個のプロトンに相当すると推定できる。5.30ppmの単一線は面積強度と化学シフト値から考慮して  $-CH_2O-$  プロトンに帰属できる。その他スペクトル中に6.2ppmに振りをもつOH基と推定できるシグナルが観測された。また最高磁場8ppm付近のシグナルは試料に混入した酢酸によるものと考えられる。

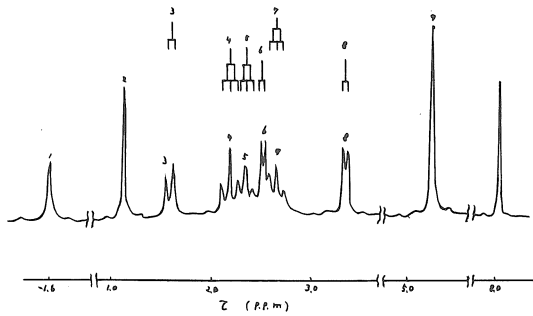


Fig. 5 <sup>1</sup>H NMR spectra of Flazin in DMSO-d<sub>6</sub> at 100 MHz

Table 2 <sup>1</sup>H chemical shifts of Flazin

Signal No.	Peak	Chemical shifts (τ-value)	coupling constant (Hz)	Assignments
1	Singlet	-1.60	—	=NH
2	"	1.16	—	=CH
3	doublet	1.16	7.5	=CH
4	triplet	2.20	7.5	=CH
5	"	2.35	7.5	=CH
6	doublet	2.56	3.5	=CH
7	triplet	2.66	7.5	=CH
8	doublet	3.37	3.5	=CH
9	singlet	5.30	—	-CH <sub>2</sub> O-
*		6.2	—	-OH

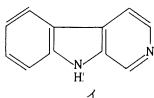
\* observed as a broad signal width about 35Hz as line width

### 3.2.3 <sup>13</sup>C NMR スペクトル

プロトンDecoupling <sup>13</sup>C NMR スペクトルをFig. 6に示した。化学シフトの測定値をTable 3に示した。off Resonance decoupling 手法でのNMRスペクトルはピーク 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16は二重線として観測され、ピーク17は三重線が観測され、残りのピーク1~8, 11は単一線として観測された。これらの事実からピーク1~8, 11は骨格の4級Cに帰属でき、ピーク17は-CH<sub>2</sub>-のCに帰属でき残りのピークは=C-H-のCに帰属できる。低磁場のピーク1, 2は-CO-O-およびC=OのCに基づくシグナルと考えられる。これらの結果から化合物は炭素数17個であることが確定できた。

### 4. 化学構造式の推定

硫酸と硝酸によるFlazinの呈色はHarminと同様の色調であることよりNorharman骨格イ、を想定することは



可能と考える。この構造はUVおよび<sup>1</sup>H NMR測定結果と一致しない。さらに<sup>13</sup>C NMR

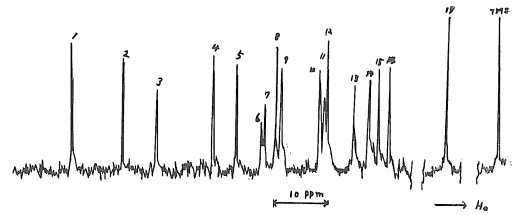


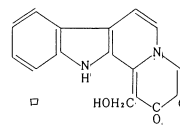
Fig. 6 <sup>13</sup>C NMR spectra of Flazin in DMSO-d<sub>6</sub> at 25.2 MHz

Table 3 Carbon-13 chemical shifts of Flazin

Peak No.	<sup>13</sup> C Chemical shift *	Assignment
1	166.15ppm	O-   -C=O
2	157.02	=C=O
3	151.07	=C-
4	141.15	"
5	136.79	"
6	132.22	"
7	131.75	"
8	129.64	"
9	128.65	=CH-
10	121.71	=CH-
11	120.83	=C-
12	120.32	=C-
13	115.48	"
14	112.58	"
15	110.91	"
16	108.93	"
17	55.95	-CH <sub>2</sub> -

\* down field from TMS

の測定結果を合せ考えることによりFlazinに対し、ロに示す化学構造式を推定することができた。



ただし-COOH, -CH<sub>2</sub>OHの位置については左右いずれか未定である。

最後に<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR撮影ならびに解析は北陸大薬学部山崎教授による、種々助言をいただいた名大農学部後藤教授に感謝します。

### 文 献

- (1) 東 恒人：理研彙報 15 1060 (1936)
- (2) 田所, 高杉：日化誌 59 815 (1938)

- (3) 木原 他：日本化学会第30春季年会講演要旨集  
P 1431 (1974)
- (4) 木原 他：〃 第31秋季 〃 〃  
P 353 (1974)