

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

～化学合成による既存添加物の定量用標品の供給に関する研究～

研究分担者 出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長

**研究要旨** 既存添加物の品質確保のためには、高精度な分析・評価手法を開発することで成分規格試験を確立することが重要である。本研究では、従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について、指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立することで新たな分析法の開発を行い、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした。本年度は、クチナシ黄色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin) を対象とした合成ルートの確立を行った。

## A. 研究目的

本研究では、既存（天然）添加物の規格試験設定をおこなうために「化学合成による既存添加物の定量用標品および内部標準物質の供給に関する研究」を目的とした。特に、①食品添加物の着色料として広く使用され、機能性表示食品にも含有されるカロテノイド類を中心とした標品の合成を行う。カロテノイドは自然界に広く分布する天然色素であり、現在までに700種類以上が発見されている。これらの添加物は天然原材料から得られ分析用の標品入手が困難であり、定量分析法においてはクロマトグラフ法と比較して正確性に欠ける比色法、色価測定法が設定されている。また現在においても、解析が不十分な機能や未知の機能が多々あり、その有用性を研究するためにも化学合成によるカロテノイドの標品を高純度で供給することは重要である。さらに、②指標成分の部分骨格を持つ代替化合物の合成と、定性用又は定量用標準品としての分析法の開発を行い、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化する。本年度は、①のテーマに焦点を絞る、クチナシ黄

色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin) を対象とした合成ルートの確立を行った。

## B. 研究方法

クロセチン、カプサイシン、カピリンはそれぞれ Scheme 1～3 に示すルートで合成する計画を立てた。

## C. 結果及び考察

クロセチン、カプサイシン、カピリンを、それぞれ入手容易な出発原料から合成するルートを確立した。クロセチンとカピリンにおいては、低収率の工程を改善する必要があるが、反応条件（試薬、溶媒、反応温度など）を精査することでクリアできると考えている。以下に、それぞれの合成工程について記載する。

### C-1) クロセチンの合成 (Scheme 1)

化合物 **1** の合成

Trimethyl phosphonoacetate (0.3 mL, 2.2 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、0°Cにて水素化ナト

リウム (100 mg, 2.5 mmol) を加えた。0°Cにて15分間攪拌後、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-dimethylocta-2,4,6-trienedial (167 mg, 1.02 mmol) を加え、室温にて15時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、酢酸エチルで3回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=3:1) することで、化合物 **1** を 67% (189 mg) の収率で得た (Fig. 1)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.37 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.75 (2H, dd, *J* = 2.8, 7.6 Hz), 6.52 (2H, br d, *J* = 10.0 Hz), 5.95 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 3.77 (6H, s), 1.95 (6H, s); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 277.

#### 化合物 **2** の合成

化合物 **1** (149 mg, 0.54 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、-78°Cにて1M DIBAL-H トルエン溶液 (2.4 mL) を3分間かけて滴下した。-78°Cから-18°Cに1時間かけて昇温し、反応液にシリカゲル/水混合物 (6 g/2 mL) を加え1時間攪拌、炭酸カリウム (1.1 g)、硫酸マグネシウム (1.1 g) を加え30分攪拌した。反応液をセライト濾過し、ジエチルエーテルで3回洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮することで、還元アルコール体を得た。粗アルコール体を THF (10 mL) に溶解し、0°Cにて二酸化マンガン (743 mg, 8.5 mmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応液をセライト濾過し、ジエチルエーテルで3回洗浄後、濾液を濃縮することで、化合物 **2** (117 mg, quant.) を得た。得られた **2** は精製せず次の反応に用いた (Fig. 2)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.63 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.84 (2H, dd, *J* = 3.2, 8.0 Hz), 6.64 (2H, br d, *J* = 9.2 Hz), 6.26 (2H, dd, *J* = 8.0, 15.6 Hz), 2.02 (s, 6H); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 217.

#### 化合物 **3** の合成

Triethyl 2-phosphonopropionate (0.26 mL, 1.2

mmol) を THF (6 mL) に溶解し、0°Cにて水素化ナトリウム (50 mg, 1.2 mmol) を加えた。0°Cにて10分間攪拌後、化合物 **2** (117 mg, 0.54 mmol) を加え、室温にて22時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、ジクロロメタンで3回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=4:1) することで、化合物 **3** を 27% (57 mg) の収率で得た (Fig. 3)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.29 (2H, d, *J* = 10.8 Hz), 6.71 (2H, dd, *J* = 2.8, 8.0 Hz), 6.52-6.64 (4H, m), 6.36 (2H, br d, *J* = 10.4 Hz), 4.22 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 2.00 (12H, s), 1.32 (6H, t, *J* = 7.2 Hz); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 385.

#### クロセチンの合成

化合物 **3** (35.6 mg, 0.09 mmol) をメタノール (10 mL)、1M水酸化ナトリウム水溶液 (5.6 mL) に溶解し、50°Cにて5日間攪拌した。反応液に2M塩酸を加えpH = 2とした後、析出したオレンジ色の固体を濾取することで、crocetin を 37% (11.3 mg) の収率で得た (Fig. 4)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.2 (br s, 2H), 7.21 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 6.83 (2H, d, *J* = 10.8 Hz), 6.73 (2H, d, *J* = 14.8 Hz), 6.50 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.43 (2H, d, *J* = 14.8 Hz), 1.98 (6H, s), 1.92 (6H, s); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 329.

#### C-2) カプサイシンの合成 (Scheme 2)

4-(Aminomethyl)-2-methoxyphenol 塩酸塩 (313.7 mg, 1.65 mmol)、*N,N*-diisopropylamine (DIPEA) (0.94 mL, 5.5 mmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、室温にて *trans*-8-methyl-6-nonenoyl chloride (0.362 mL, 1.82 mmol) を3分間かけて滴下した。室温にて15時間攪拌、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え、ジクロロメタンにて3回抽出を行った。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=5:1) することで、capsaicin

を 89% (448 mg) の収率で得た (Fig. 5).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.96 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 6.89 (1H, s), 6.83 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 5.69 (br s, 1H), 5.29-5.44 (3H, m), 4.41 (2H, d,  $J = 5.6$  Hz), 3.80 (3H, s), 2.57 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz), 2.21 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz), 2.00-2.06 (2H, m), 1.35-1.80 (4H, m), 0.96 (6H, t,  $J = 9.2$  Hz); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  306.

### C-3) カピリンの合成 (Scheme 3)

Trimethylsilyl acetylene を出発原料としてカピリンを合成するルートを設定した.

#### 化合物 4 の合成

Trimethylsilyl acetylene (0.276 mL, 2.0 mmol) を THF (10 mL) に溶解し,  $-78^\circ\text{C}$  にて  $n\text{-BuLi}$  (1.5 mL) を 3 分間かけて滴下後, benzaldehyde (0.205 mL, 2.0 mmol) を加え, 室温まで昇温しながら 1 時間攪拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) を加え, ジクロロメタンで 3 回抽出後, 有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した. 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮した. 残渣をメタノール (20 mL) に溶解し, 炭酸カリウム (1.4 g, 10.1 mmol) を加え室温にて 14 時間攪拌した. 反応液を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 4:1) することで, 化合物 4 を 63% (168 mg) の収率で得た (Fig. 6).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35-7.58 (5H, m), 5.48 (1H, dd,  $J = 2.4, 6.0$  Hz), 2.67 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 2.20 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz).

#### 化合物 5 の合成

化合物 4 (168 mg, 1.3 mmol) をアセトン (5 mL) に溶解し,  $0^\circ\text{C}$  にて  $N\text{-bromosuccinimide}$  (NBS) (278 mg, 1.56 mmol), 硝酸銀 (29 mg, 0.17 mmol) を加え, 室温にて 2 時間攪拌した. 反応液を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) することで, 化合物 5 を 78% (210 mg) の収率で得た (Fig. 7).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33-7.54 (5H, m), 5.49 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz), 2.22 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz);

[ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  211.

#### 化合物 6 の合成

Propyne (3~4% in heptane) (1.5 mL) の THF (5 mL) 溶液に,  $0^\circ\text{C}$  にて  $n\text{-BuLi}$  (0.61 mL) を 3 分間かけて滴下し,  $0^\circ\text{C}$  にて 1 時間攪拌後, 反応液を室温に昇温し, CuI (193 mg, 1.0 mmol) を加えさらに 1 時間攪拌した. 次いで  $0^\circ\text{C}$  にて反応液に化合物 4 (105.6 mg, 0.5 mmol) および pyridine (0.72 mL) の THF (5 mL) 溶液を加え, 自然昇温しながら 50 分間攪拌した. 反応液に 2M 塩酸 (30 mL) を加え, 酢酸エチルで 3 回抽出した. 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 5:1) することで, 化合物 6 を 78% (210 mg) の収率で得た (Fig. 8).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33-7.53 (5H, m), 5.49 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz), 2.23 (1H, br s), 1.95 (3H, s); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  171.

#### カピリンの合成

化合物 6 (17.2 mg, 0.1 mmol) を THF (5 mL) に溶解し,  $0^\circ\text{C}$  にて二酸化マンガン (145 mg, 1.6 mmol) を加え, 室温にて 9 時間攪拌した. 反応液をセライト濾過し, ジエチルエーテルで 3 回洗浄後, 濾液を濃縮し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) することで, カピリン (11.2 mg, 66%) を得た (Fig. 9).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11-8.13 (2H, m), 7.62 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz), 7.47-7.51 (2H, m), 2.09 (3H, s); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  169.

## D. 結論

従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について, 指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確認することで新たな分析法の開発を行い, 簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした. 本年度は, クロセチン, カプサイシン, カピリンの簡便な合

成ルート確立を行った。今後は、クロセチンの合成において出発原料とした(2E,4E,6E)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial を共通骨格として利用できる、クチナシ黄色に含まれるクロシン(crocin)、アナトー色素に含まれるビキシン(bixin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン(capsaicin)、ファフィア色素に含まれるアスタキサンチン(astaxanthin)の合成を計画する。さらに、研究目的②では、Proof of Concept (POF) Study Design として、カピリンの部分骨格を持つ代替化合物を合成し、クロマトグラフ法による定性用又は定量用標準品としての規格設定を行う。POF 実証後は、多くのカロテノイド類に含まれる共通部分骨格のトリエン、ペンタエン骨格を持つカロテノイド代替化合物を合成し、同様に規格設定の検討を行う。

#### E. 参考文献

なし

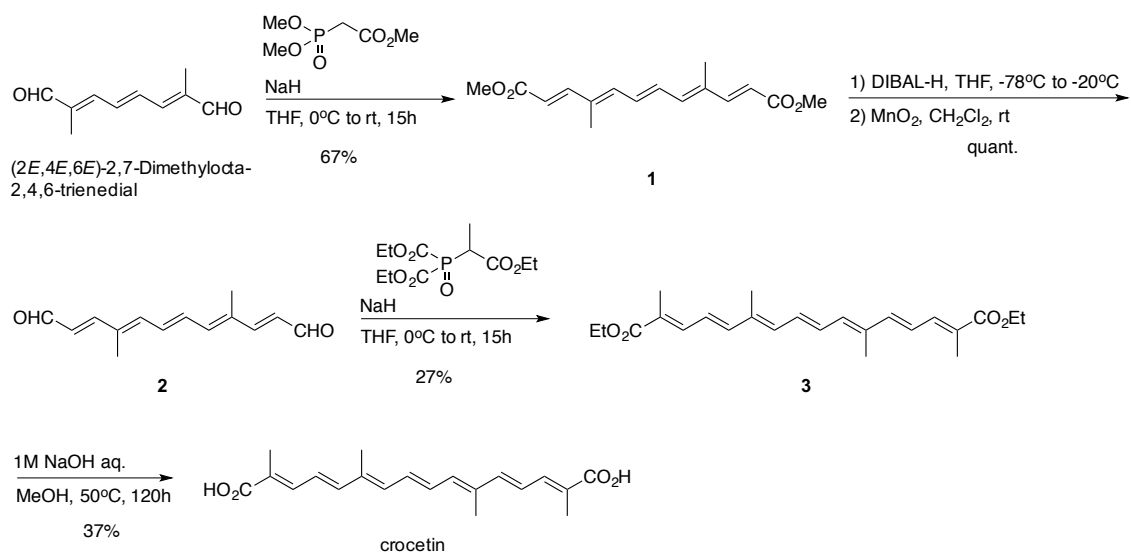
#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表

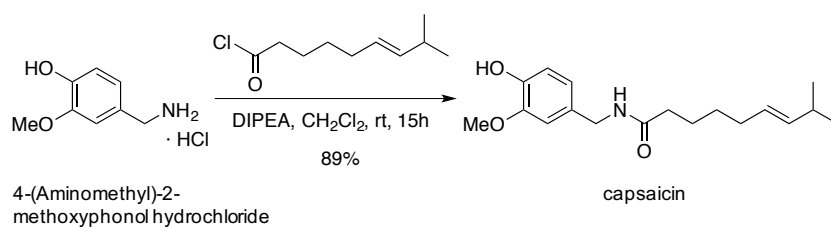
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

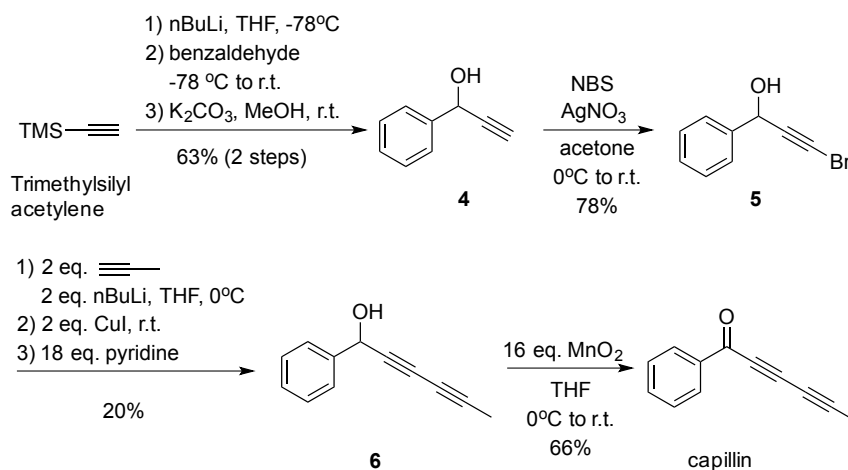
なし



Scheme 1. Synthetic route of crocetin.



Scheme 2. Synthetic route of capsaicin.



Scheme 3. Synthetic route of capillin.



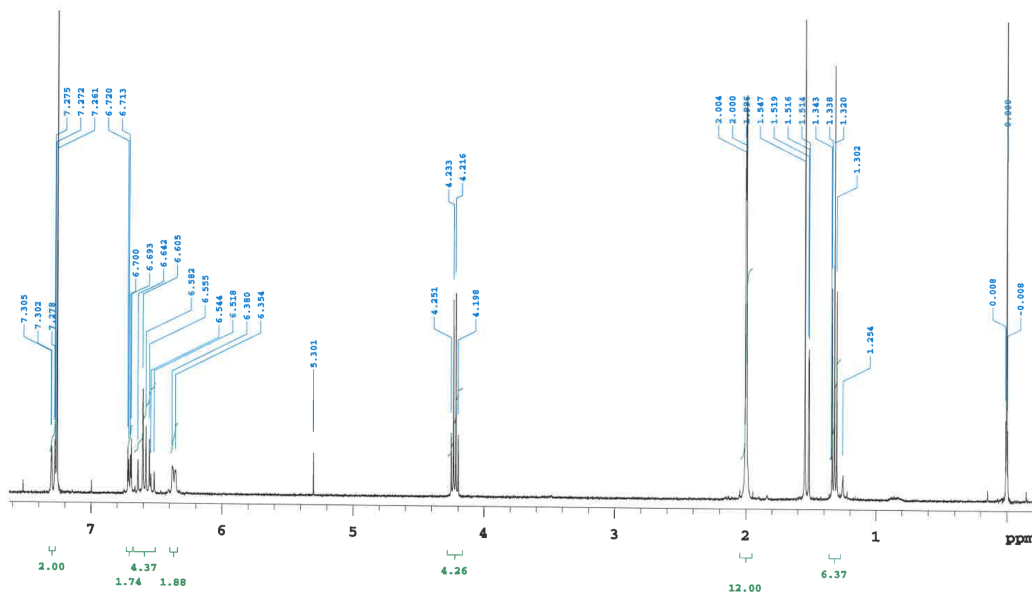
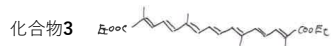


Fig. 3 <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound 3 in CDCl<sub>3</sub>.

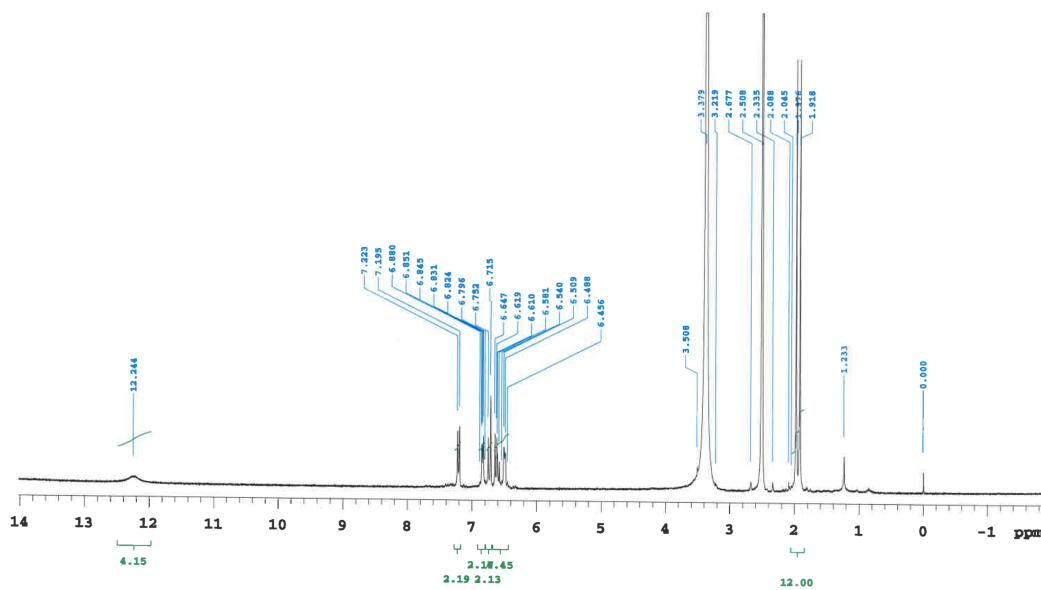
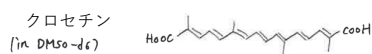


Fig. 4 <sup>1</sup>H NMR spectrum of crocetin in DMSO-d<sub>6</sub>.

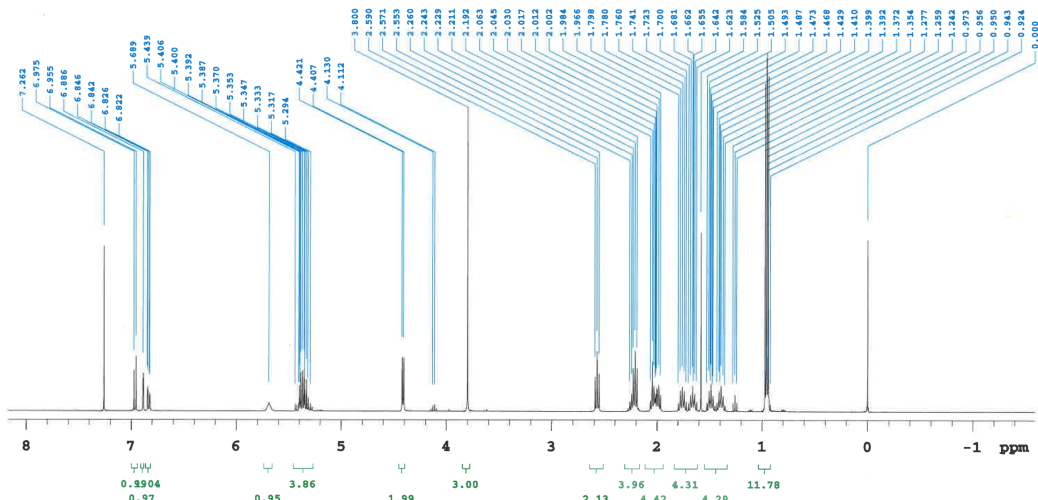
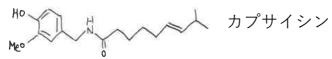


Fig. 5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of capsaicin in  $\text{CDCl}_3$ .

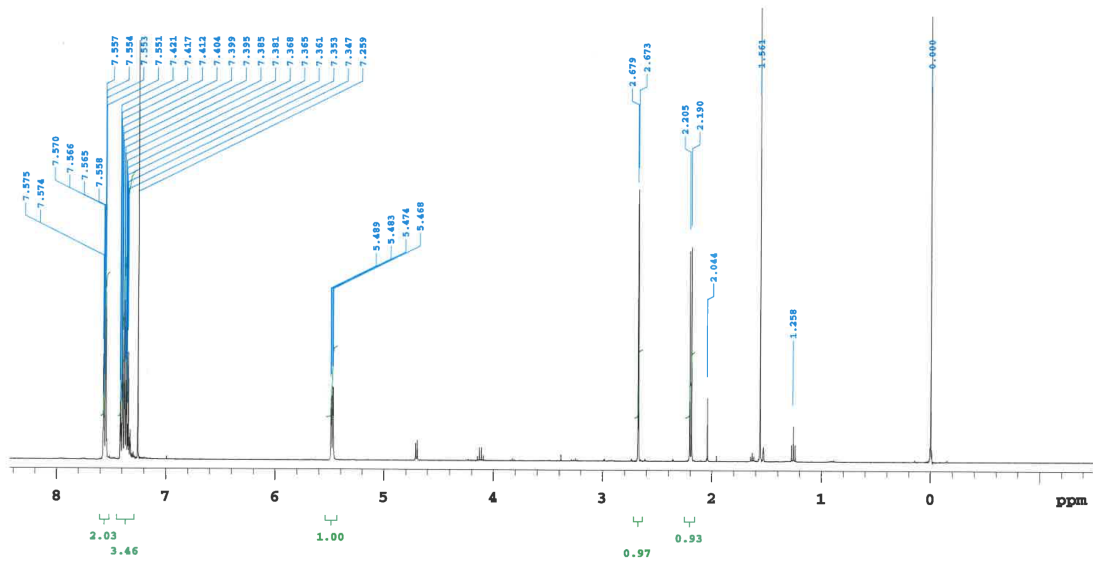
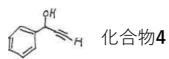


Fig. 6  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$ .



化合物5

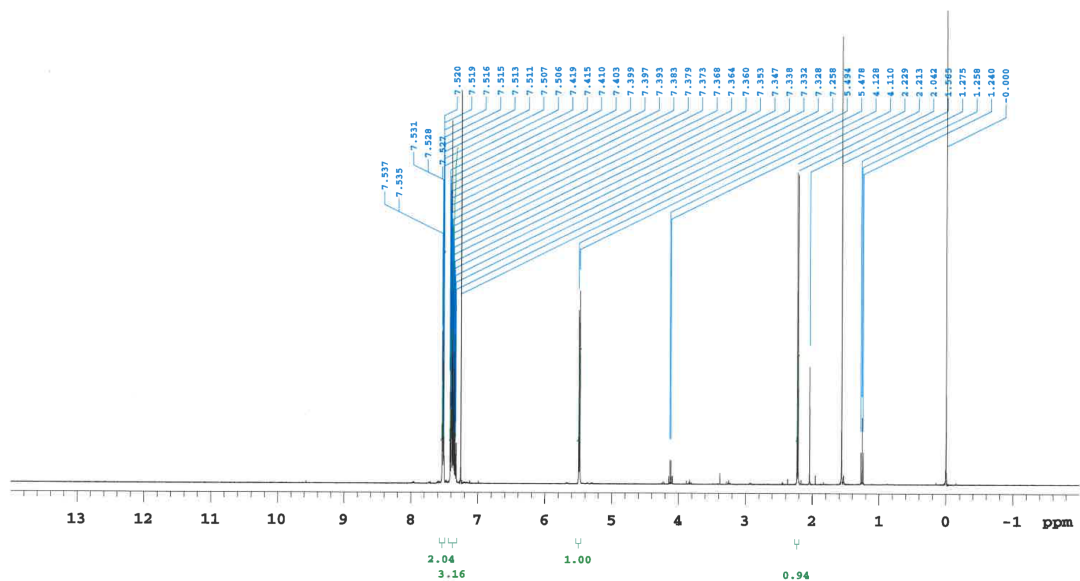


Fig. 7  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **5** in  $\text{CDCl}_3$ .



化合物6

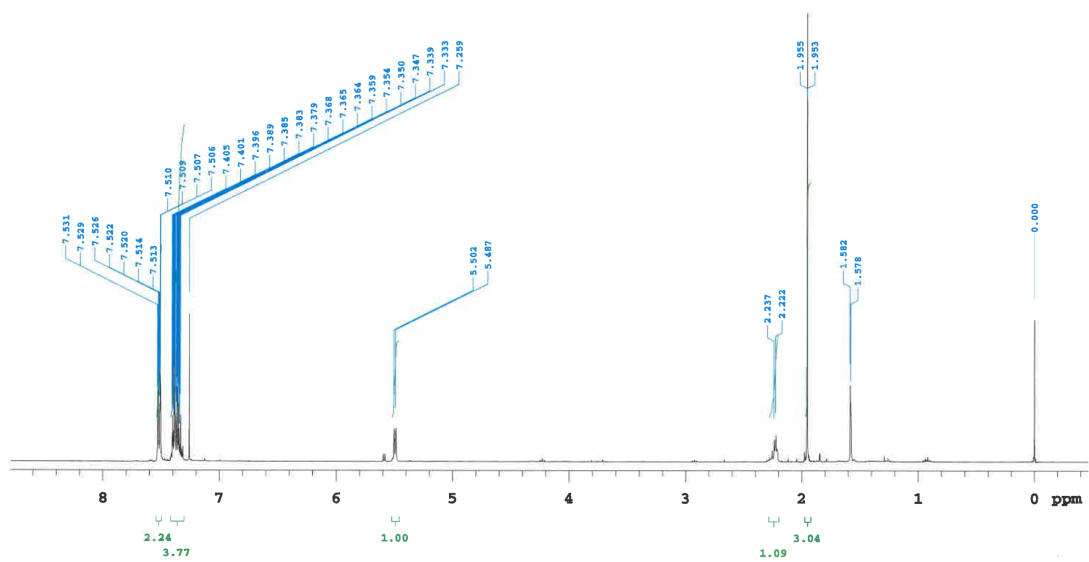
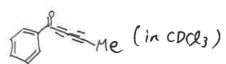


Fig. 8  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **6** in  $\text{CDCl}_3$ .



カピリン

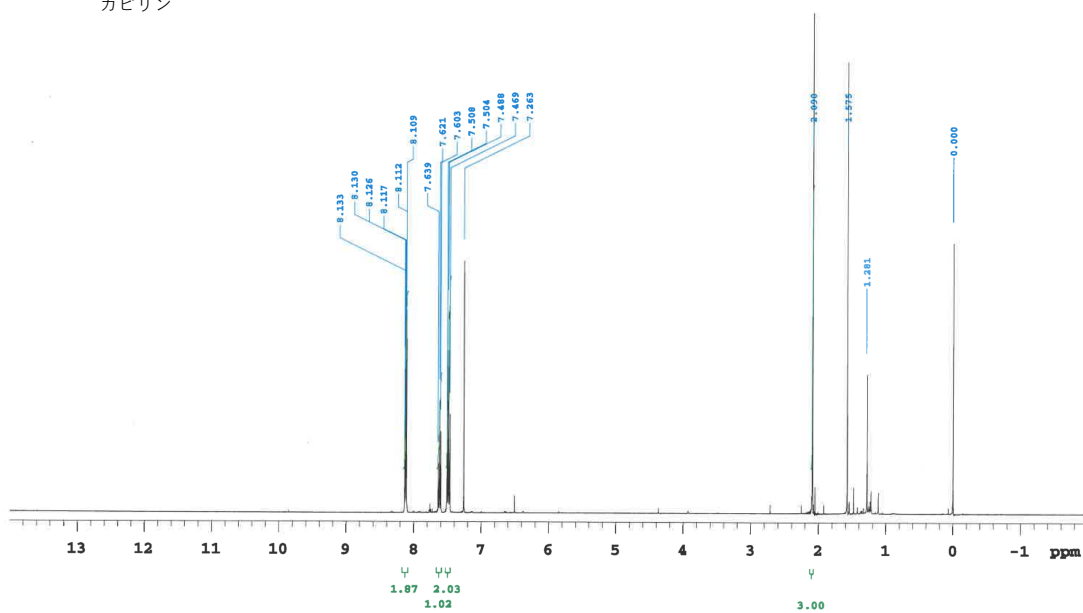


Fig. 9 <sup>1</sup>H NMR spectrum of capillin in CDCl<sub>3</sub>.