

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31年度(令和元年度)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、カロテノイド類縁化合物を対象とした合成ルートの確立を行った。また、カロテノイド系色素であるクロシン (crocin) の立体選択的な化学合成に関しても検討した。

研究協力者

辻厳一郎 国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部 主任研究官

年度は、②のテーマに焦点を絞り、クチナシの果実などに含まれるクロシン (crocin) およびカロテノイド類縁化合物を対象とした合成ルート確立に関して検討を行った。

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

B. 研究方法

クロシンにおいては、入手容易な出発原料 **1** を利用した合成ルートを計画した。カロテノイド類縁化合物およびクロシンはそれぞれ Scheme 1～6 に示すルートで合成する計画を立てた。Scheme 1 のルートでのクロシン合成を目標として前年度に引き続き、立体選択的なクロシン合成のためのモデル反応を検討した。同時に別の合成法として、ジカルボン酸を中間体とした縮合反応によるクロシンおよびその類縁化合物の合成に関しても検討した。

C. 結果及び考察

1 を出発原料として、アルデヒド部を還元することでジアルコール体である **2**、酸化することでジカルボン酸 **3** をそれぞれ1段階で得ることができた。さらに **3** からは縮合剤を用いたカップリング反応によってメチルエステル体 **4** を得た (Scheme 2)。 **3** からは対応する多種のカルボニル化合物を容易に合成することができ

るため、カロテノイド化合物の代替物質の合成に有用であると考えられる。

一方、立体選択的なクロシンのモデル反応に関して、試薬等の反応条件を検討した。検討の結果、ルイス酸として $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ を用いてモデル化合物 **7** を合成できることがわかった (Scheme 3)。次に上記の検討で得られた条件を用いて化合物 **8** の合成を試みた。すなわち、化合物 **6** とクロセチンのモデル化合物 **3** を、 $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ を用いて反応させることで化合物 **8** を合成できると考えた。しかしながら化合物 **3** の反応溶媒に対する溶解性が低いために、反応が進行せず目的物を得ることはできなかった (原料回収)。そこで化合物溶解のために DMSO などの溶媒を使用して反応を実施したが、この場合には反応そのものが進行しなかった (Scheme 4)。これは使用した溶媒がルイス酸を使用した反応には不適であるためと考えられた。そこで次に、ジカルボン酸化合物である **3** から縮合剤を用いた反応によって **8** を合成することを検討した。DCC を縮合剤としてアセチル基で保護した糖化合物 **9** を **3** に対してカップリングすることで **8** の前駆体である化合物 **10** を得た (Scheme 5)。縮合剤を利用した反応でモデル化合物が合成できたため、同様にしてクロセチンに対しても単糖 **9**、もしくは二糖 **13** を用いた縮合反応を行うことで、それぞれクロシン誘導体 (アセチル保護体) **14** およびクロシン前駆体 (アセチル保護体) **15** を合成することができた (Scheme 6) 本研究において今回単離できたクロシン前駆体の構造を Figure 1 に示す。構造の決定は論文で報告されているクロシンおよびクロシン類縁体³の $^1\text{H NMR}$ との比較により行った。得られた化合物 **15** のカロテノイド部に近い 2 つの糖 (A-1' および C-1') のアノマー位における立体は、それぞれ β , α であった。反応に用いた二糖 **13** のアノマー位水酸基の立体は α と β の混合物であり、反応はその立体を保持したまま進行したものと予想される。このことから、今回実施した縮合剤を使用した反応においては、アノマー位に関して立体の規定された糖をカップリングさせることで、所望の立体を有するクロシン誘導体を得ることが可能であると考えら

れる。

以下に、それぞれの合成工程について記載する。

C-1) カロテノイド誘導体の合成 (Scheme 2-6) 化合物 **2** の合成

(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-dimethylocta-2,4,6-trienedial (**1**) (82 mg, 0.50 mmol) の THF (1 mL) / MeOH (1 mL) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (57 mg, 1.50 mol) をゆっくりと加えた。室温にて 8 時間攪拌した後、反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 2: 1 to 0: 1) することで、化合物 **2** を 52% (44 mg) の収率で得た。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ 6.45 (dd, $J=7.2, 6.6$ Hz, 2H), 6.13 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.00 (s, 4H), 1.78 (s, 6H)。

化合物 **3** の合成

化合物 **2** (0.82 g, 5.0 mmol) と 2-メチル-2-ブテン (5.3 mL, 50 mmol) のアセトン溶液 (15 mL) に、 0°C にて亜塩素酸ナトリウム (2.26 g, 20.0 mmol) のリン酸二水素ナトリウム (3.36 g, 28.0 mmol) 水溶液 (15 mL) を滴下した。反応液を室温で 12 時間攪拌した後、 0°C にて反応液に 2M 塩酸を加えて反応を停止させた。反応液をジエチルエーテル (30 mL) にて 3 回抽出し、合わせ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。残渣にジエチルエーテルに懸濁させ、生じた固体をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄、高真空下で乾燥させることで、化合物 **3** を 72% (710 mg) の収率で得た。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ 7.24 (d, $J=9.9$ Hz, 2H), 6.99 (dd, $J=9.9, 7.8$ Hz, 2H), 1.91 (s, 6H); [ESI(-)-TOF]: m/z [M-H]⁻ 195。

化合物 **4** の合成

化合物 **3** (39 mg, 0.2 mmol) のジクロロメタン (1 mL) / THF (0.5 mL) 溶液に *N,N*-ジクロ

ヘキシルカルボジイミド(DCC) (90 mg, 0.44 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) (4.9 mg, 0.04 mmol) を加えて, 室温で10分間攪拌した. 反応液にメタノール (81 μ L, 2.0 mmol) を加えた. 室温で8時間攪拌した後, 沈殿物を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 3:7) することで, 化合物 **4** を 52% (51 mg) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.79 (dd, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H), 3.78 (s, 6H), 2.01 (s, 6H); [ESI(+)-TOF]: m/z [M+H] $^+$ 225.

化合物 **7** の合成

trans-2-Methyl-2-pentanoic acid (**5**) (18 μ L, 0.12 mmol) と化合物 **6** (46 mg, 0.10 mmol) のジクロロメタン溶液 (1.4 mL) に三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 ($\text{BF}_3\text{-OEt}_2$) (18 μ L, 0.11 mmol) を加えて室温で1時間攪拌した. 反応液をジクロロメタンで希釈し, 有機層を水, 1M 塩酸, 水で洗浄した. 硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ジクロロメタン: メタノール = 100:0 to 83:17) することで, 化合物 **7** を 20% (8.7 mg) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6.87 (dtd, $J = 24.6, 7.4, 1.4$ Hz, 2H), 5.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.30-5.21 (m, 2H), 5.15 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.11 (dd, $J = 12.4, 2.1$ Hz, 1H), 3.87 (qd, $J = 4.9, 2.2$ Hz, 1H), 3.87 (qd, $J = 4.9, 2.2$ Hz, 1H), 2.24-2.17 (m, 2 H), 2.08-2.01 (m, 12H), 1.81 (s, 3H), 1.04 (t, $J = 7.6, 3\text{H}$).

化合物 **10** の合成

化合物 **3** (49 mg, 0.25 mmol) と化合物 **9**¹ (183 mg, 0.53 mmol) のジクロロメタン (1.2 mL) /*N,N*-ジメチルホルムアミド (0.6 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) (113 mg, 0.55 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) (6 mg, 0.05 mmol) を加えた. 反応液を室温で8時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物を濾過して濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 2:8) することで,

化合物 **10** を 44% (95 mg) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.33 (m, 2H), 6.97-6.84 (m, 2H), 6.45-6.44 (1'- β)(m, 1.2H), 5.81-5.79 (1'- α)(m, 0.8H), 5.55-5.51 (3'- α)(m, 1.2H), 5.33-5.23 (4'- $\alpha, 4'$ - β)(m, 2H), 5.20-5.14 (2'- $\alpha, 2'$ - $\beta, 3'$ - α)(m, 2H + 0.8H), 4.33-4.29 (6'- $\alpha, 6'$ - β)(m, 2H), 4.18-4.10 (6'- $\alpha, 6'$ - $\beta, 5'$ - β)(m, 2H + 1.2H), 3.91-3.89 (5'- α)(m, 0.8H), 2.12-2.01 (m, 30H).

化合物 **12** の合成²

酢酸ナトリウム (53 mg, 0.65 mmol) と無水酢酸 (473 μ L, 0.65 mmol) の混合物に室温にて Gentiobiose (**11**) (86 mg, 0.25 mmol) を加えた後, 反応液を 120°C にて 6 時間攪拌した. 反応液を 0°C に冷却後, 氷水 (15 mL) を加えて室温にて 30 分間攪拌した. 生じた沈殿物をろ取り, 水で洗浄, 高真空下にて乾燥することで, 化合物 **12** (1'- α : 1'- β = 8:2 の異性体混合物) を 94% (160 mg) の収率で得た. 化合物 **12** はそのまま次の反応に用いた.

化合物 **13** の合成

化合物 **12** (136 mg, 0.20 mmol) との無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.4 mL) 溶液に酢酸アンモニウム (31 mg, 0.40 mmol) を加えた. 反応液を室温で 24 時間攪拌した後, 酢酸エチル (15 mL) で希釈し, 水, 飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した. 硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ジクロロメタン: メタノール = 99:1 to 90:10) することで, 化合物 **13** (1'- α : 1'- β = 7:3 の異性体混合物) を 72% (92 mg) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ 5.53 (dd, $J = 10.2$ Hz, 0.7H), 5.44 (dd, $J = 3.6$ Hz, 0.7H), 5.24-5.19 (m, 1.3H), 5.13 (dd, $J = 9.6$ Hz, 0.3H), 5.09 (dd, $J = 9.6$ Hz, 0.7H), 4.99-4.96 (m, 1H), 4.91 (dd, $J = 9.6$ Hz, 0.7H), 4.87-4.84 (m, 1H), 4.71 (dd, $J = 10.2$ Hz, 0.3H), 4.61-4.57 (m, 1H), 4.27-4.23 (m, 1.7H), 4.21-4.15 (m, 1H), 4.08 (d, $J = 9.0$ Hz, 0.3H), 4.00 (d, $J = 3.6$ Hz, 0.7H), 3.94 (dd, $J = 10.8, 2.4$ Hz, 0.3H), 3.86 (dd, $J = 10.8, 2.4$ Hz, 0.7H), 3.73-3.69 (m, 1.3H), 3.63-3.58 (m, 1H), 2.10-1.98 (m, 21H).

化合物 14 の合成

Crocetin (33 mg, 0.10 mmol) と化合物 9¹ (73 mg, 0.21 mmol) のジクロロメタン (0.75 mL) / *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.25 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (46 mg, 0.22 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (2.5 mg, 0.02 mmol) を加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物をアミノシリカゲルカラム (Chromatorex NH-DM1020, 富士シリシア, $\Phi = 2$ cm, $h = 2$ cm) で濾過, ジクロロメタンにて洗浄することで化合物 9 を除去し, 濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 8) することで, 化合物 14 を 8% (8 mg) の収率で得た.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (d, $J = 12.0$, Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 6.76-6.73 (m, 2H), 6.67 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 6.61-6.52 (m, 2H), 6.46-6.42 (m, 4H), 5.78 (1'- α)(d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.54 (3'- α)(d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 5.32-5.25 (4'- α , 4'- β)(m, 2H), 5.20-5.15 (2'- α , 2'- β , 3'- α)(m, 2H + 1H), 4.31 (6'- α , 6'- β)(dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, 2H), 4.15-4.10 (6'- α , 6'- β , 5'- β)(m, 2H + 1H), 3.90-3.89 (5'- α)(m, 1H), 2.10-1.99 (m, 36H).

化合物 15 の合成

Crocetin (16 mg, 0.05 mmol) と化合物 13 (67 mg, 0.11 mmol) のジクロロメタン (0.4 mL) / *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.2 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (23 mg, 0.11 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (1.2 mg, 0.01 mmol) を加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物をアミノシリカゲルカラム (Chromatorex NH-DM1020, 富士シリシア, $\Phi = 2$ cm, $h = 2$ cm) で濾過, ジクロロメタンにて洗浄することで化合物 9 を除去し, 濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 8) することで, 化合物 15 を 3% (2.4 mg) の収率で得た.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (d, $J = 11.4$

Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 6.75-6.73 (m, 2H), 6.79 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 6.60-6.52 (m, 2H), 6.46-6.43 (m, 2H), 6.39 (C-1')(d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.75 (A-1')(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.51 (C-3')(t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.28 (A-3')(t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.23-5.17 (D-3', A-2', B-3')(m, 3H), 5.11-4.96 (C-2', C-4', D-2', D-4', A-4', B-2', B-4')(m, 7H), 4.55 (B-1')(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.55 (D-1')(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.26 (B-6', D-6')(td, $J = 12.0, 4.8$ Hz, 2H), 4.13-4.07 (B-6', D-6', C-5')(m, 3H), 3.94 (A-6', C-6')(br. d, 2H), 3.85-3.82 (A-5')(m, 1H), 3.70-3.68 (D-5')(m, 1H), 3.66-3.62 (B-5')(m, 1H), 3.61-3.56 (A-6', C-6')(m, 2H), 2.09-1.98 (m, 54H).

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, 立体選択的なクロシン合成のためのモデル反応用化合物を合成し, 反応の検討を行った. 今回は基質の溶解性の問題で立体選択的な合成法に適用することはできなかったが, 均一な成分の含量規格の設定のためには, 立体化学を制御可能な合成法は重要であるため, 継続して検討を行う必要がある. またクロシンの化学合成のための別の方法として, クロセチンの部分構造を有するジカルボン酸化合物に対して, 縮合剤を用いたカップリング反応による種々のカロテノイド誘導体の合成も検討した. 検討した方法を利用することで, クロシンの前駆体としての類縁体を合成することができた. 化合物の立体化学の制御や反応条件の検討による収率などに改善の余地があるものの, この方法においては, 試薬の当量数などの反応条件を調節することで Figure 2 に示すようなクロシンの類縁化合物の他, 様々な誘導体も合成が可能と考えられる.

完全化学合成によるカロテノイドの安定供給ルートが確立された後は, 研究目的②に関する Proof of Concept (POF) Study Design として,

トリエン，ペンタエン骨格を持つカロテノイドの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。

E. 参考文献

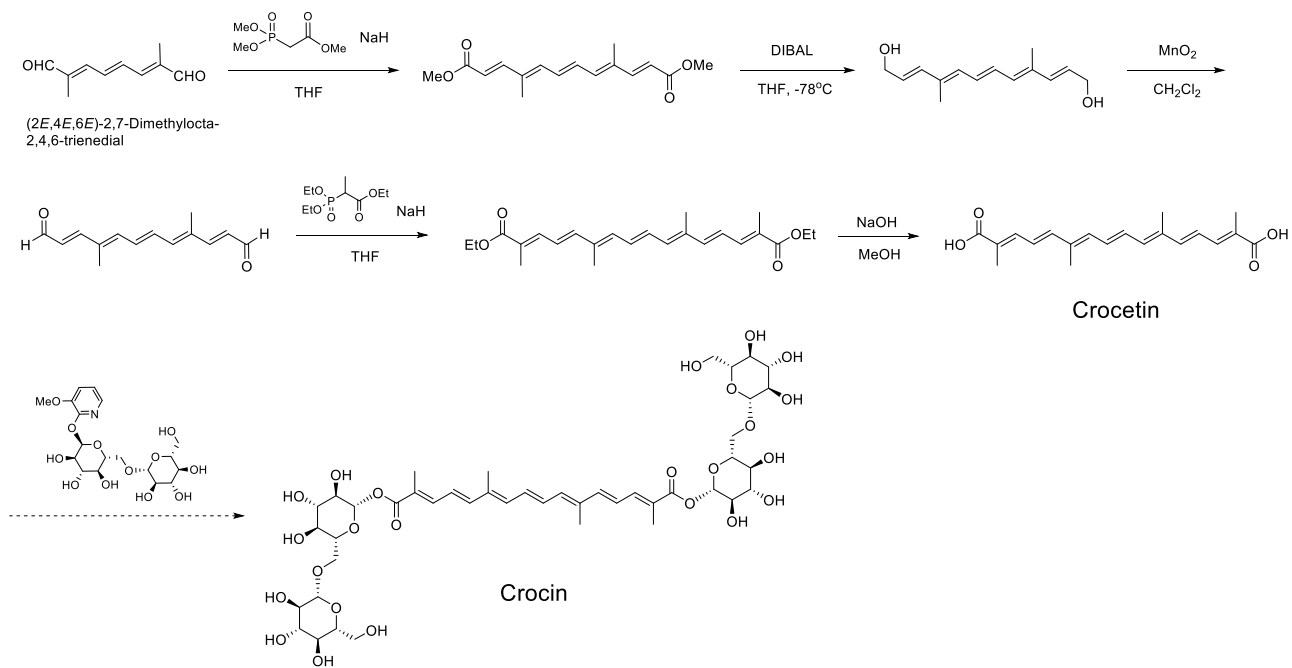
- 1) Chittaboina S, Hodges B, Wang Q: *Lett. Org. Chem.*, **2006**; 3, 35-38.
- 2) Chatterjee S, Moon S, Hentschel F, Gilmore K, Seeberger P-H: *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**; 140, 11942-11953.
- 3) Uekusa Y, Sugimoto N, Sato K, Yun Y-S, Kunugi A, Yamazaki T, Tanamoto K: *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**; 55, 1643-1646.

F. 研究業績

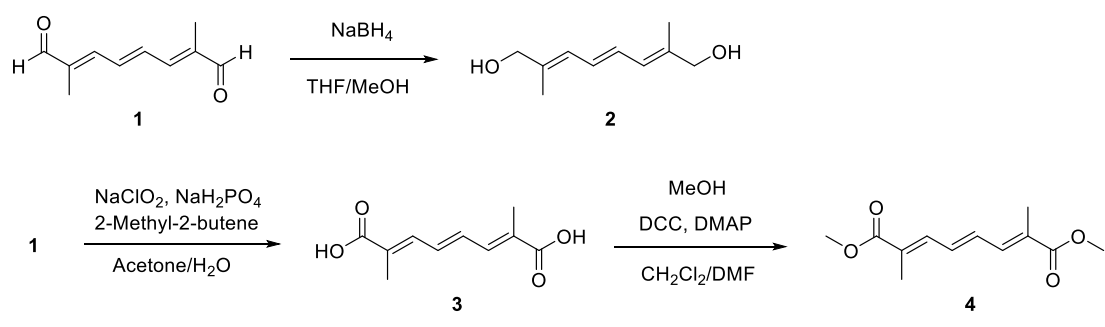
1. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

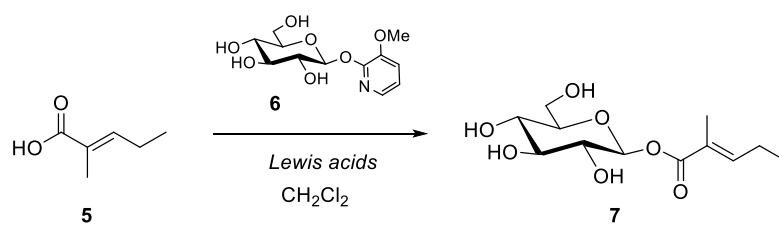
なし



Scheme 1. Chemical synthetic route of crocin.

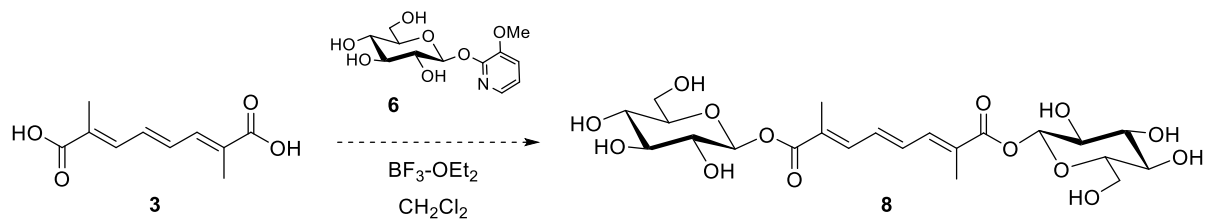


Scheme 2. Synthetic route of carotenoid compounds.

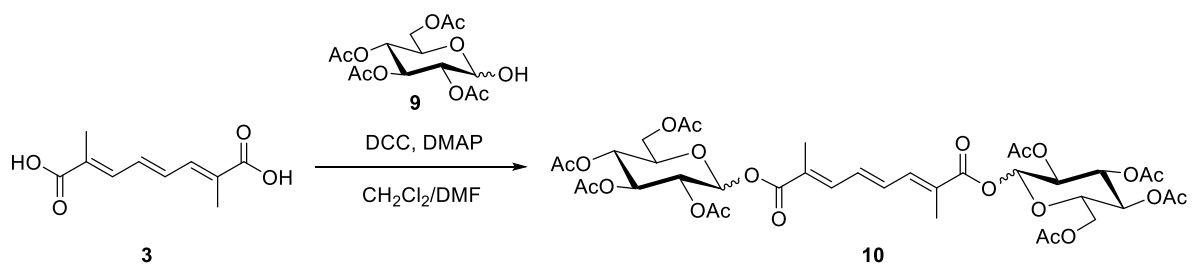


Lewis acids = AlCl₃, TiCl₄, HBF₄-OEt₂, BF₃-OEt₂ etc.

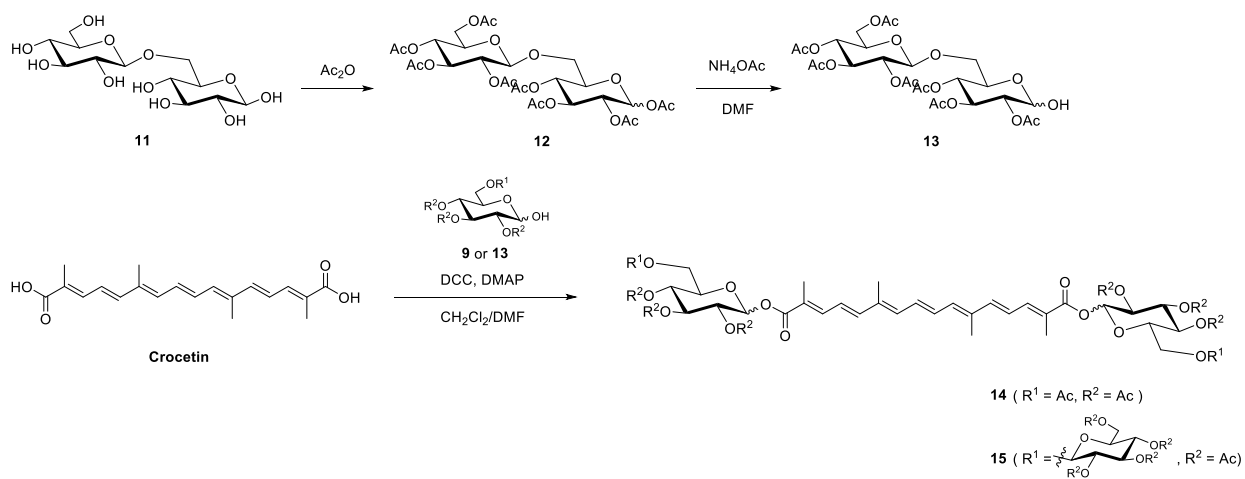
Scheme 3. Model reaction 1 for a stereoselective synthesis of crocin.



Scheme 4. Model reaction 2 for a stereoselective synthesis of crocin.



Scheme 5. Synthesis of carotenoid derivatives.



Scheme 6. Synthesis of crocin and crocin derivatives.

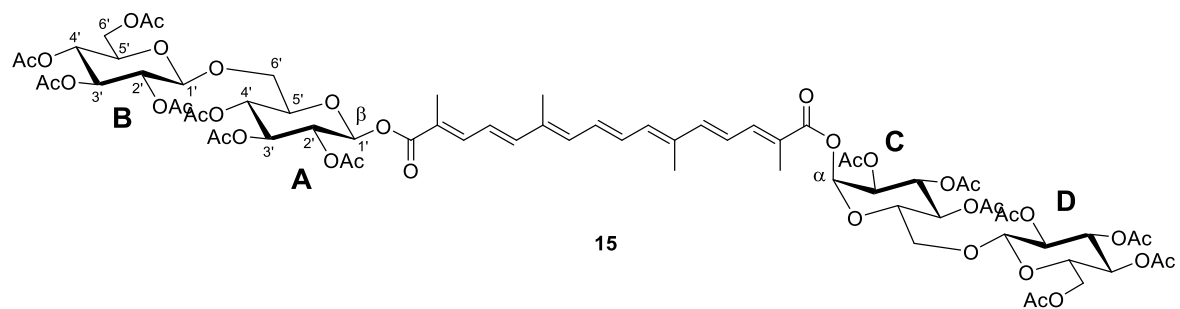
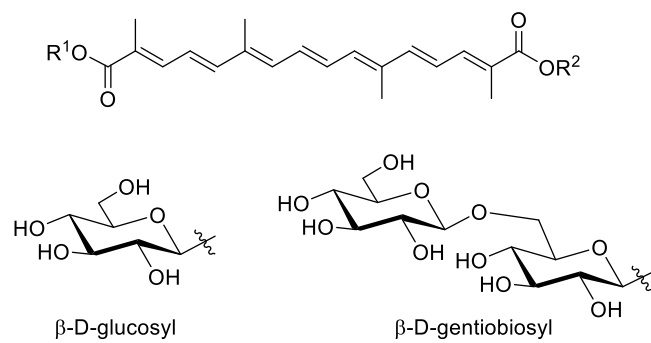


Figure 1. Structure of acetylated crocin derivative **15** obtained in this study.



Crocetin : $R^1 = \beta\text{-glucosyl}$, $R^2 = H$
 Crocin-1 : $R^1 = \beta\text{-D-gentiobiosyl}$, $R^2 = \beta\text{-D-gentiobiosyl}$
 Crocin-2 : $R^1 = \beta\text{-D-gentiobiosyl}$, $R^2 = \beta\text{-glucosyl}$
 Crocin-3 : $R^1 = \beta\text{-D-gentiobiosyl}$, $R^2 = H$
 Crocin-4 : $R^1 = \beta\text{-D-gentiobiosyl}$, $R^2 = CH_3$

Figure 2. Crocin and crocin derivatives.

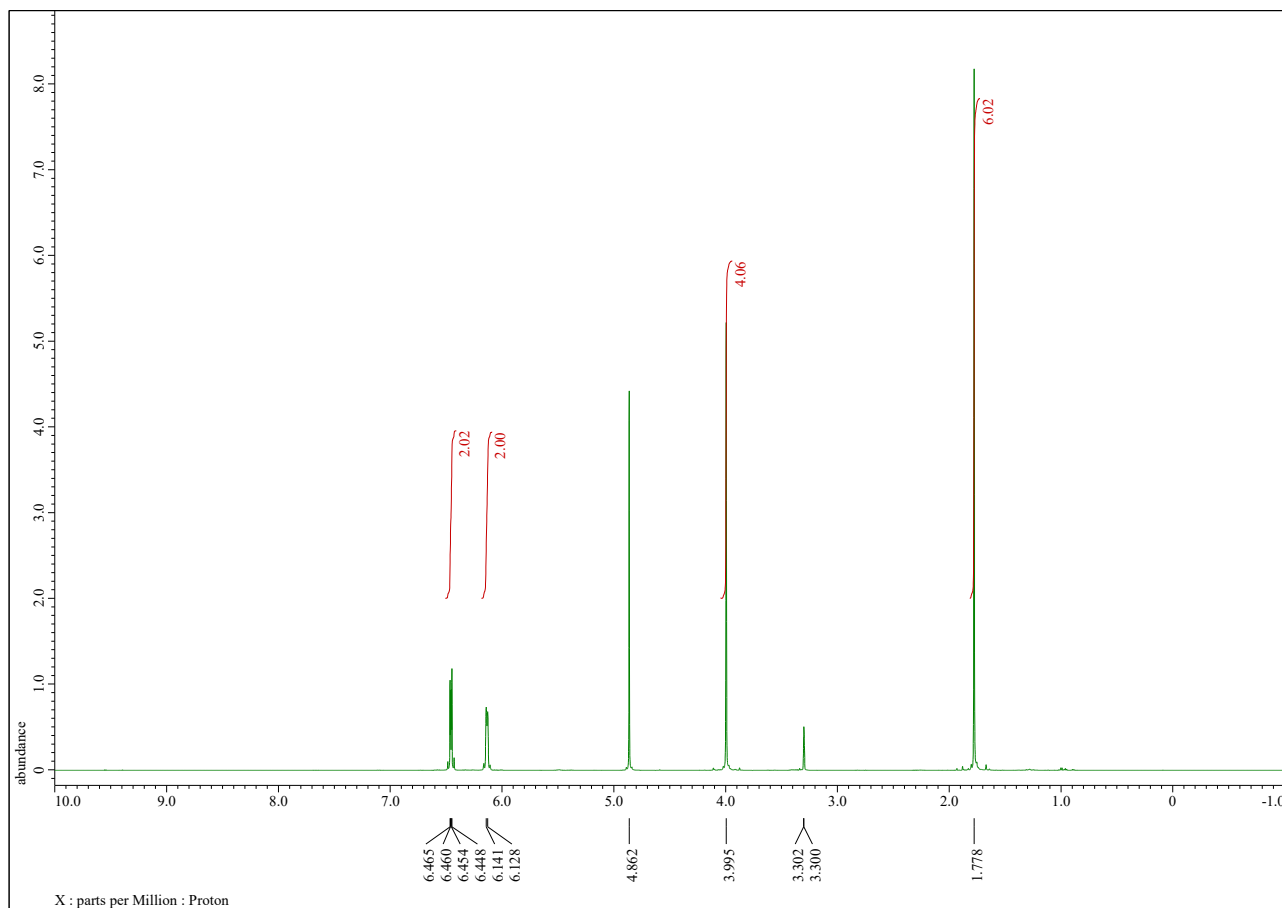


Fig. 1 ¹H NMR spectrum of compound 2 in CD₃OD.

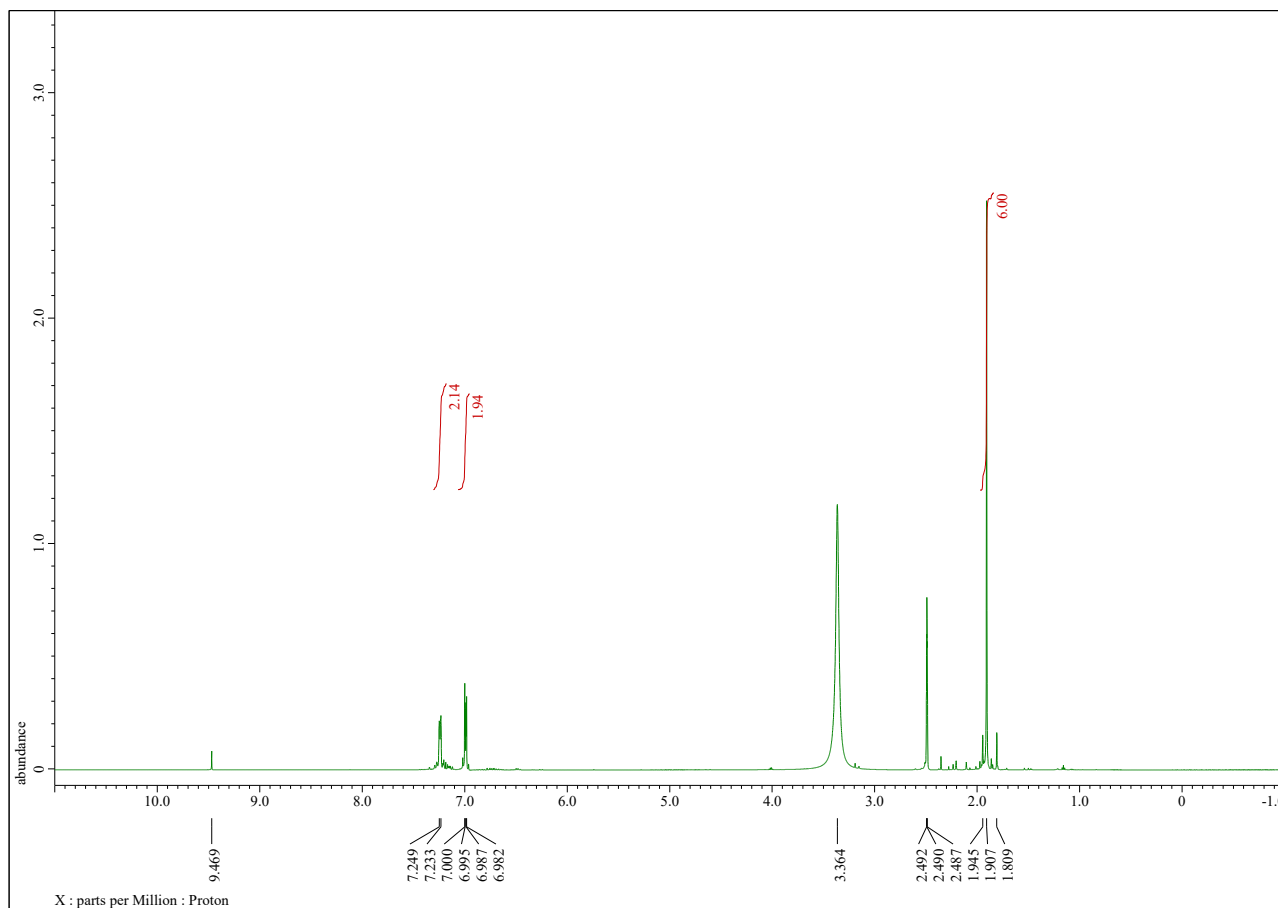


Fig. 2 ^1H NMR spectrum of compound **3** in DMSO-d_6 .

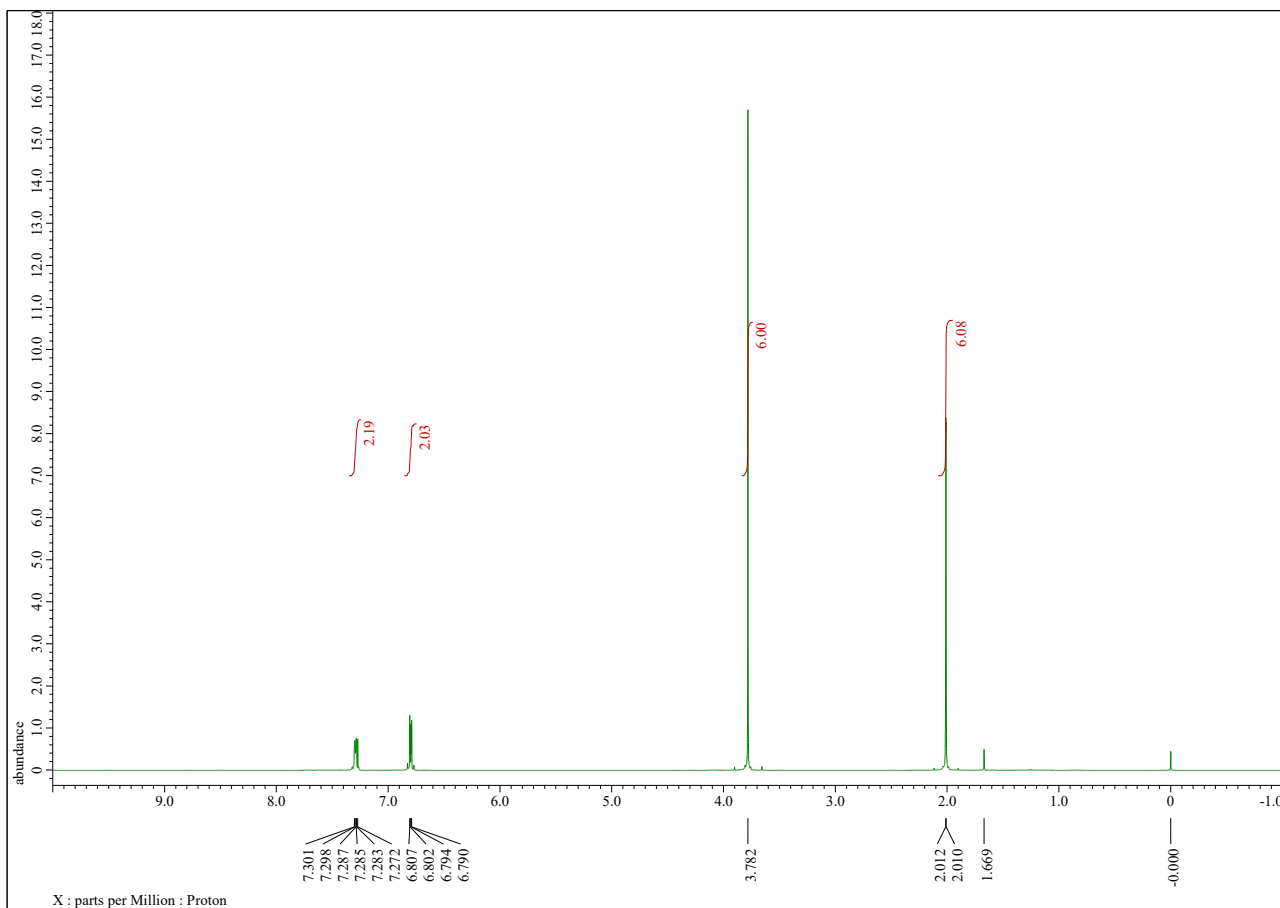


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

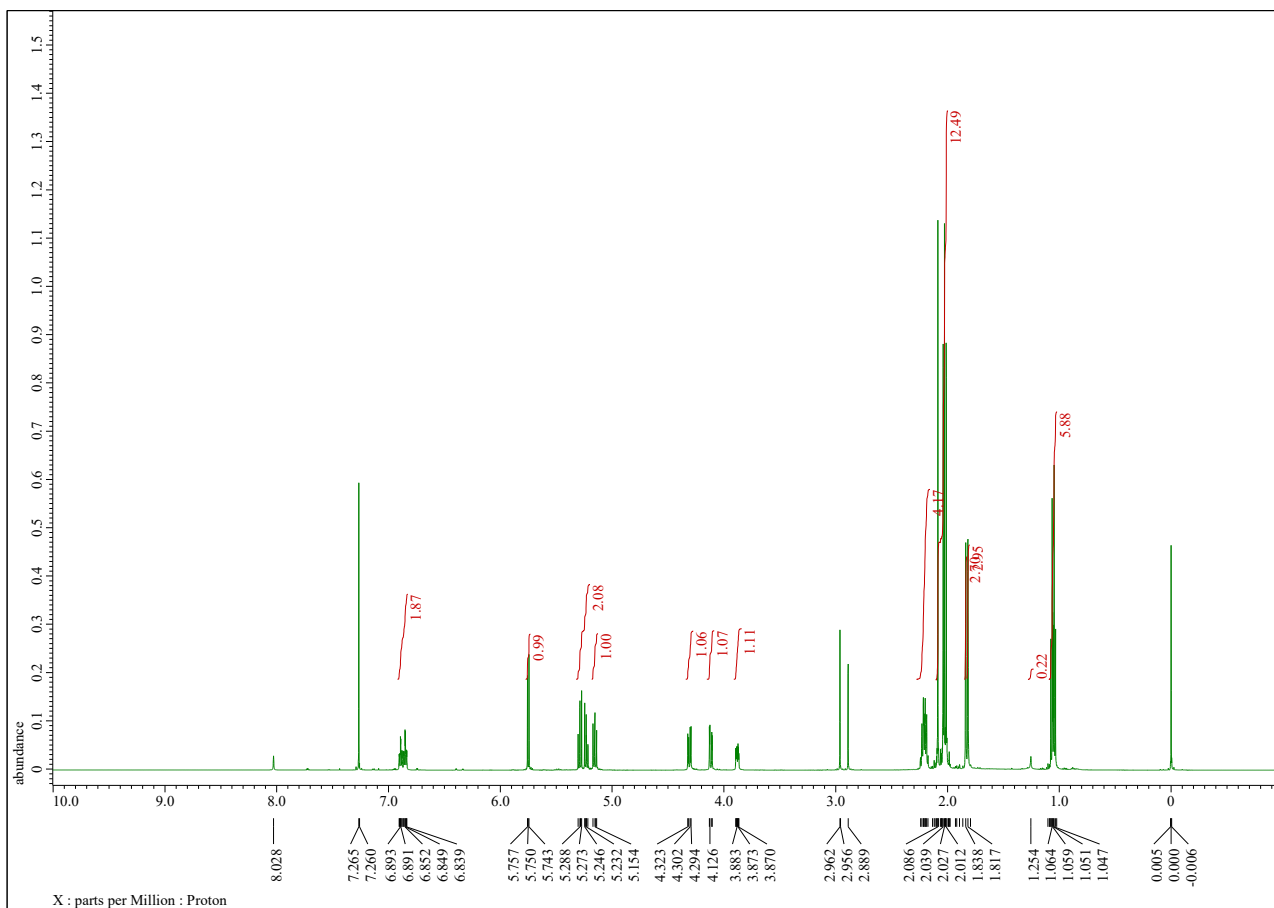


Fig. 4 ^1H NMR spectrum of compound **7** in CDCl_3 .

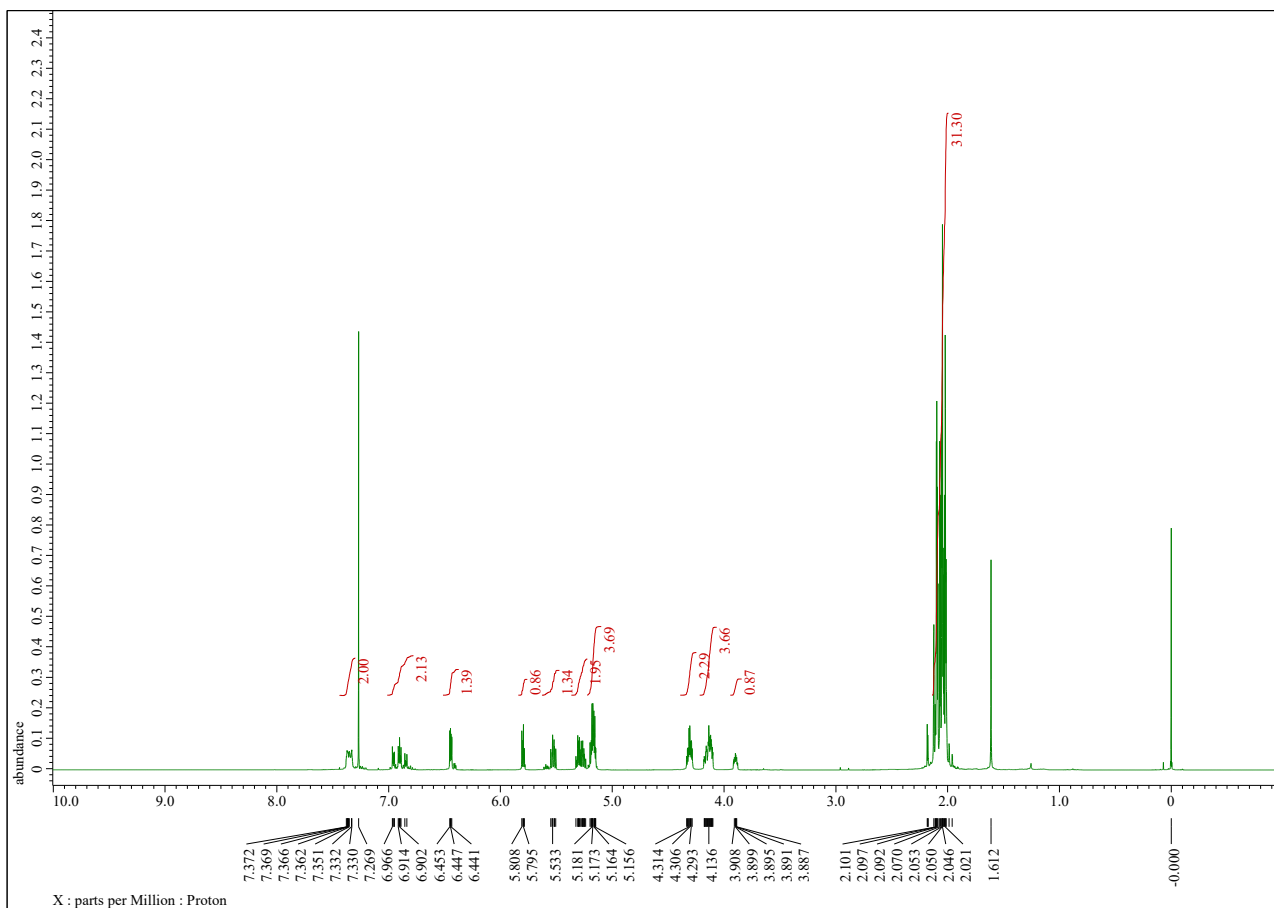


Fig. 5 ^1H NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

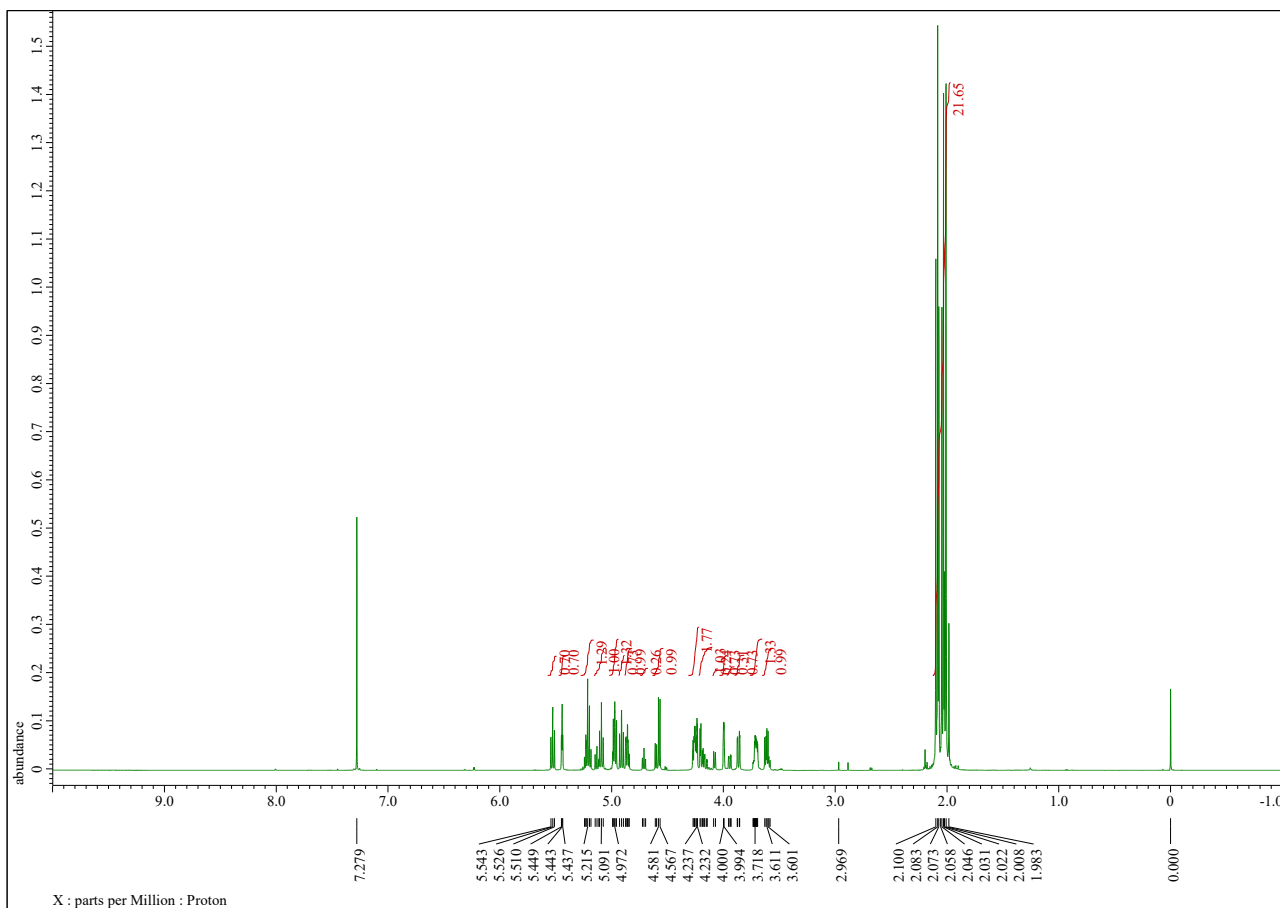


Fig. 6 ^1H NMR spectrum of compound **13** in CDCl_3 .

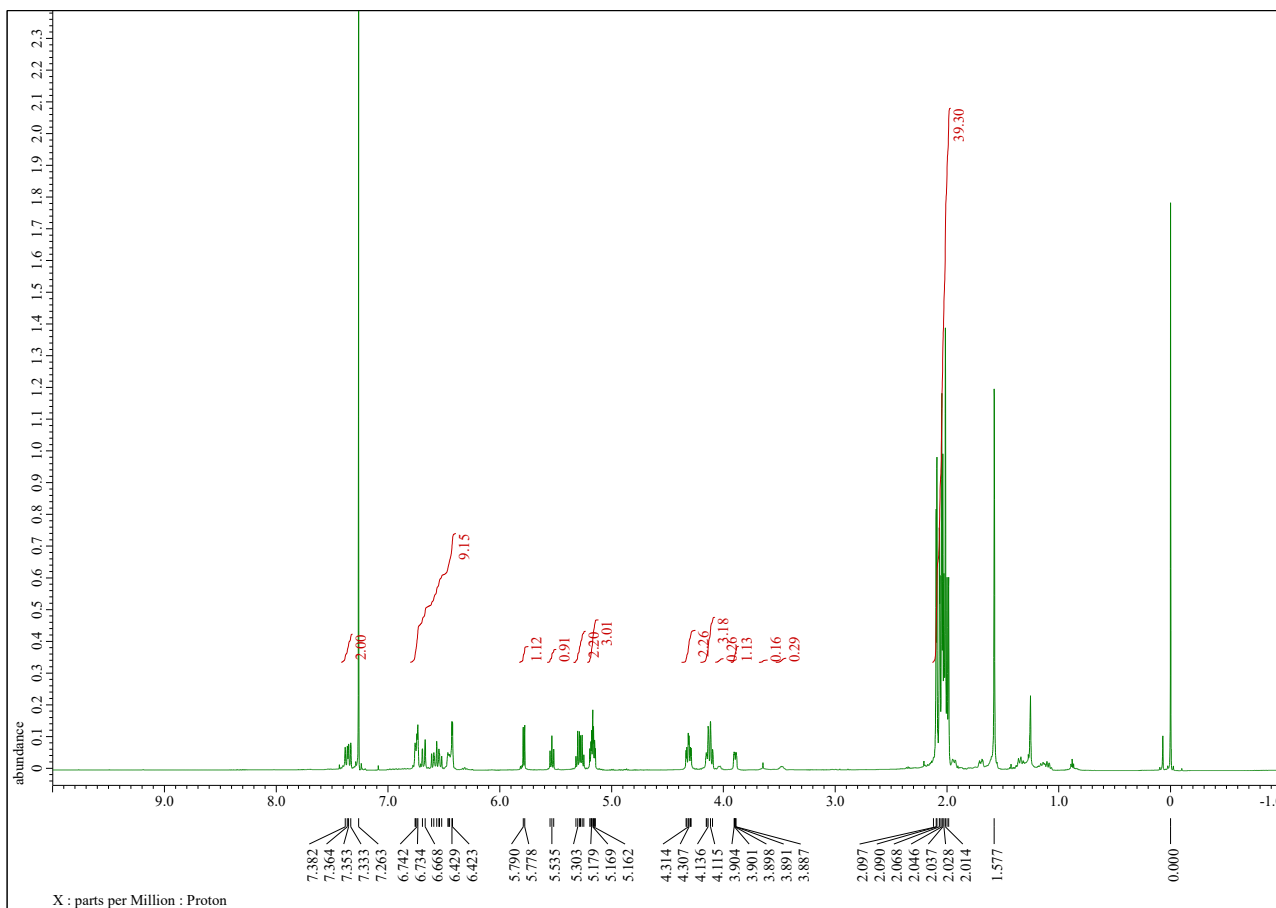


Fig. 7 ^1H NMR spectrum of compound **14** in CDCl_3 .

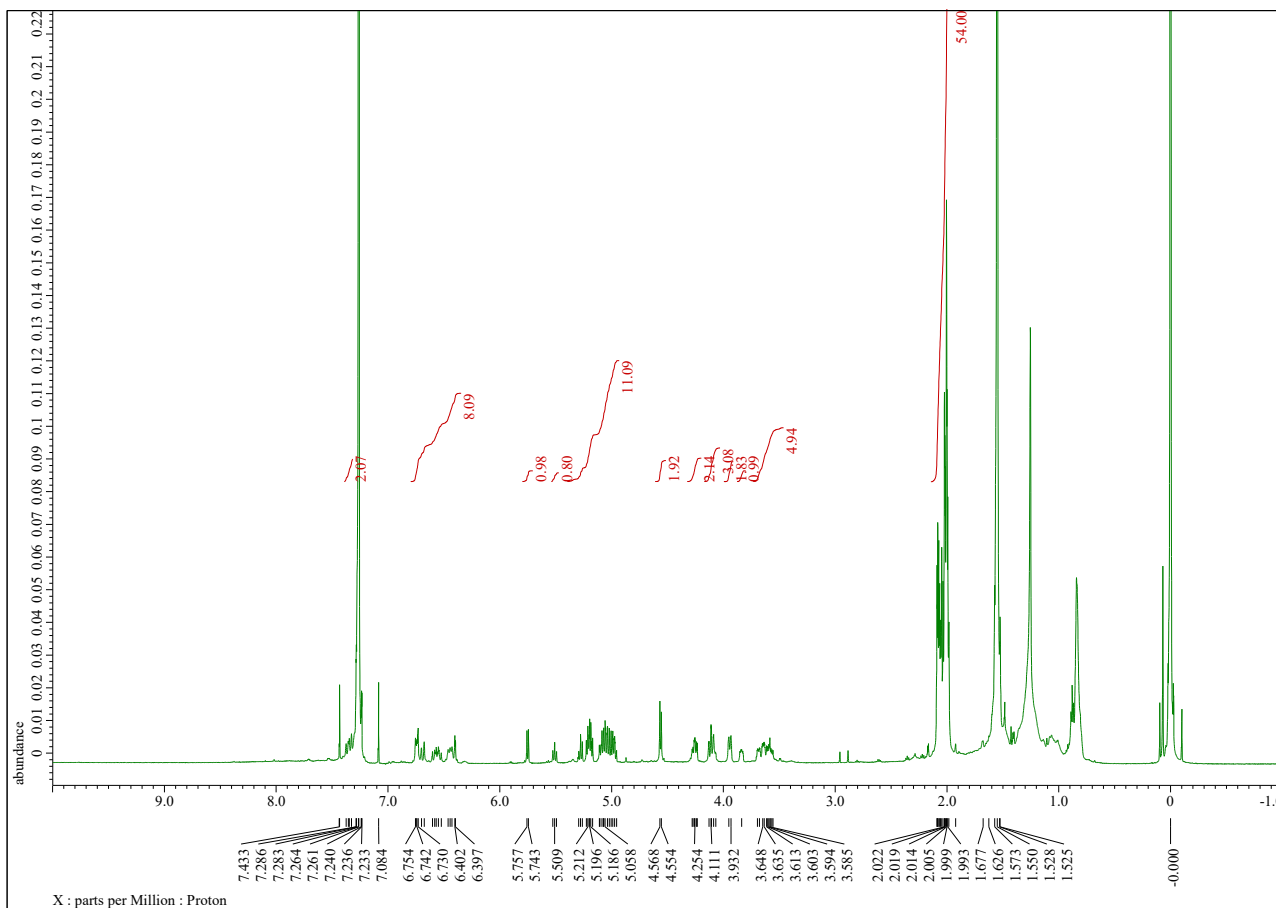


Fig. 8 ^1H NMR spectrum of compound **15** in CDCl_3 .