

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究
PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

研究分担者 辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 主任研究官

研究要旨

本研究において研究分担者は、既存添加物の有効成分または指標成分の定量用標品の供給問題を解消するため、分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析法の開発を行っている。具体的には、HPLC の検出器として汎用される PDA の校正用化合物として利用可能な化合物の探索を行い、有望な化合物を見出すことを目的とする。本年度は、広範囲の波長域に UV スペクトル吸収を有する化合物の合成として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基導入による吸収波長の変化について検討した。その結果、特定の位置へのニトロ基の導入によって吸収波長を長波長化できることが分かった。

研究協力者
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学物部長

A. 研究目的

食品添加物の成分規格に設定される試験には、HPLC を利用した分析法が設定されているものが多く、異なる装置間での分析における正確さを担保することは重要である。フォトダイオードアレイ(PDA)検出器は広範囲の波長域の吸収を一度の分析で検出できることから、HPLC をはじめとした分析機器の検出器として汎用的に利用されている。先述したように、PDA 検出器を利用した HPLC での定量分析において正確さを担保するためには、検出器の装置間校正ができることが重要となる。特定波長の吸収における装置間校正は、対象とする波長に対して適切な基準物質(シングルフアレンス)を個別に設定することで対応が可能であるが、PDA のカバーする広範囲の波長域において一種の化合物を使用して校正を実施できることがより望ましい。しかしながら、そのような化合物は現状設定されていない。本

研究では、PDA の校正用化合物として利用可能な分子創出を目的とし、広範囲の波長域において UV 吸収を示す化合物の開発を行う。本年度は広範囲の波長域に UV 吸収を示す化合物の開発として、既報の 1,4-ナフトキノン誘導体 **1** (Fig. 1)についてその置換基位置について検討し、その UV 吸収波長の変化を確認した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (製品コード：D0384)及び2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン (製品コード：D2428)は東京化成工業社の製品を用いた。5-フルオロ-2-ニトロアニリン (製品コード：356-17761)及び 5-クロロ-2-ニトロアニリン (製品コード：323-56772)はFUJIFILM 和光純薬社の製品を用いた。分光分析用ジメチルスルホキシド：FUJIFILM 和光純薬, Cat. 045-28335. 重クロロホルム (CDCl₃)：関東化学, Cat. 07663-23, 重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆)：関東化学, Cat. 11560-96. その他、ジクロロメタン, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), テトラヒドロフラン (THF), 酢

酸エチル，ヘキサン，アセトン，塩酸，水酸化ナトリウム，無水硫酸ナトリウムはすべて市販特級品を用いた。

B-2) 化合物の合成

特に断りがない限り，全ての試薬は試薬会社から購入したものをそのまま使用した．反応の追跡は薄層クロマトグラフィー (TLC) (60 F254, Merck 社)を使用し，スポットの可視化はハンディ UV ランプ (254/365 nm) (UVP 社)による紫外線照射，またはヨウ素蒸気によって行った．化合物精製のためのカラムクロマトグラフィー用のシリカゲルには，中圧カラムクロマトグラフィー装置 (Smart Flash) (山善)，及び中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Hi-Flash column / Inject column (山善)を使用した． ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルは NMR 測定用の重水素化溶媒を使用して，ECZ600R spectrometer (JEOL)にて測定した．化学シフト値 δ (ppm)はテトラメチルシラン (TMS) (CDCl_3 : 0 for ^1H -NMR)，もしくは残留溶媒のシグナルを内部標準として補正した (CDCl_3 : 77.16 for ^{13}C -NMR; $\text{DMSO}-d_6$: 2.50 for ^1H -NMR, 39.52 for ^{13}C -NMR). シグナルの分裂様式は以下に示す通りである (singlet (s), doublet (d), double of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), broad (br)). 合成した化合物の NMR スペクトルを Fig. 3–15 に示した．

B-3) 装置・測定条件

UV-Vis スペクトル測定のための紫外可視吸光光度計には V-730 (日本分光)を使用した．化合物の濃度は 50 μM の DMSO 溶液とし，光路長 10 mm の石英セルを用いて測定した．

C. 結果及び考察

C-1) 1,4-ナフトキノ誘導体の合成

本研究ではこれまでに既報¹の 1,4-ナフトキノ誘導体 **1** の構造中の 2 位の置換基を変更した誘導体の合成及び UV スペクトルの比較を行っており，様々な構造の導入が容易に行えること，構造の変更によりスペクトルの波長域が変化することを確認している (Fig.1). 今年度

はこの 1,4-ナフトキノ誘導体 **1** を基とし，UV-Vis スペクトルの長波長化を目的として，各種置換基の導入や置換位置の違いによる吸収波長域の変化を確認することとした．

この検討においては各構成ユニットにおいて置換位置の異なる化合物を準備し，それらを組み合わせることで多種の誘導体を効率的に合成することを計画した (Scheme 1–3). 置換基を導入した誘導体の合成経路においては，基本的に置換基としてアミノ基を導入した中間体化合物 **4-3** や **5-3** を調製し，1,4-ナフトキノ骨格へと導入することで化合物の合成を行うことができた．しかしながら，本来では **4-3** が 1 つ導入された誘導体 **4** が得られると想定していたが，実際には 2 つ導入された化合物 **4'** が得られた (Scheme 2). これはおそらく置換基としてのアミノ基の電子的効果によって反応性 (求核性) が上がったためと考えられた．また，誘導体 **5** の合成では化合物 **5'** のみが生成していることが分かった (Scheme 3). これは化合物の構造上，分子内での環化が進行してしまい望みの構造 **5** が得られないものと考えられた．各化合物の調製について，詳細な手順と NMR データを以下に記載した (C-1-1 ~ C-1-5).

C-1-1) 化合物 **2** の合成

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノ (200 mg, 0.74 mmol) の濃塩酸溶液 (12M, 6 mL) に塩化スズ二水和物 (829 mg, 3.68 mmol) を加え，80°C にて 1 時間加熱攪拌した．反応液を室温に冷却後，反応液を 2M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 10 付近に調整し，ジクロロメタンで抽出後，得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し，無水硫酸ナトリウム上で乾燥後，減圧濃縮した．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 = 90 : 10 to 66 : 34) することで，化合物 **2-1**² を暗紫色固体として得た (43 mg, 24%).

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.50 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H).

化合物 **2-1** (10 mg, 0.04 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (160 μL) に N,N -ジメチル-1,4-フェニレ

ンジアミン(6.2 mg, 0.045 mmol), 炭酸ナトリウム(9.6 mg, 0.091 mmol)を加え, 室温にて12時間加熱攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 減圧濃縮した. 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 = 90 : 10 to 66 : 34)することで, 化合物 **2** を暗紫色固体として得た(10 mg, 73%). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (s, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.4, 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.9, 176.2, 152.0, 148.1, 143.6, 135.2, 133.0, 127.6, 125.8, 122.2, 115.6, 111.5, 109.5, 108.5, 40.3.

C-1-2) 化合物 **3** の合成

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン(68 mg, 0.25 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン(37.5 mg, 0.275 mmol), 炭酸ナトリウム(58 mg, 0.55 mmol)を加え, 室温にて12時間加熱攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 減圧濃縮した. 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 = 90 : 10 to 34 : 66)することで, 化合物 **3** を暗紫色固体として得た(58 mg, 62%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.39 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.6, 174.4, 148.2, 147.8, 143.6, 135.8, 133.3, 128.4, 127.5, 126.4, 125.6, 121.4, 111.5, 111.2, 79.2, 40.3.

C-1-3) 化合物 **4** の合成

2-フルオロ-5-ニトロアニリン(2.26 g, 14.5 mmol)のDMF溶液(20 mL)に50%ジメチルアミン水溶液(3.7 mL, 41.0 mmol), 炭酸カリウム(3.6 g, 26.0 mmol)を加え, 130°Cで15時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 攪拌しながら氷冷水(40 mL)を加えた. 生じた固体をろ取して, 蒸

留水で洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **4-1** を橙色粉末固体として得た(2.53 g, 96%). 化合物 **4-1**(906 mg, 5.0 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(10 mL)に二炭酸ジ-*tert*-ブチル(2.4 g, 11.0 mmol), トリエチルアミン(1.53 mL, 11.0 mmol)及び4-ジメチルアミノピリジン(30 mg, 0.25 mmol)を加えて室温にて12時間攪拌した. 反応液をジエチルエーテル(20 mL)で希釈し, 沈殿物をろ取してジエチルエーテルで洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **4-2** を淡黄色固体として得た(290 mg, 21%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.07 (br. s, 1H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.08 (s, 6H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

化合物 **4-2** (140 mg, 0.5 mmol)のテトラヒドロフラン/DMF (1:1)(5 mL)溶液にパラジウム炭素(10%, 25 mg)を加え, 水素雰囲気下にて40°Cで16時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 酢酸エチルで希釈してセライトろ過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた残渣(化合物 **4-3**)はそのまま次の反応に使用した(150 mg).

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン(23 mg, 0.10 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に化合物 **4-3**(38 mg, 0.15 mmol), 炭酸ナトリウム(32 mg, 0.3 mmol)を加え, 室温にて12時間攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 減圧濃縮した. 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 = 80 : 20 to 25 : 75)することで, 化合物 **4-4** を赤紫色非晶質固体として得た(16 mg, 24%). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.39 (br.s, 0.7H), 8.07 (br. s, 1H), 8.06 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 2H), 7.89 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.83 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.12–7.04 (m, 2H), 6.91–6.89 (m, 2H), 6.52–6.51 (m, 2H), 4.97 (br. s, 1.3H), 2.77 (s, 6H), 2.51 (s, 6H), 1.38–1.33 (m, 18H).

化合物 **4-4** (12 mg, 0.018 mmol)に4M塩酸・ジオキサン溶液(1.8 mL)を加え, 室温にて12時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮することで, 化合物 **4** を赤茶色非晶質固体として得た(10 mg, quant.).

C-1-5) 化合物 5 の合成

5-クロロ-2-ニトロアニリン(2.50 g, 14.5 mmol)の DMF 溶液 (20 mL)に 50%ジメチルアミン水溶液(3.7 mL, 41.0 mmol), 炭酸カリウム(3.6 g, 26.0 mmol)を加え, 130°Cで 15 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 攪拌しながら氷冷水(40 mL)を加えた. 生じた固体をろ取して, 蒸留水(30 mL), 次いでジエチルエーテル(30 mL)で洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **5-1**を黄色粉末固体として得た(1.91 g, 73%). 化合物 **5-1**(906 mg, 5.0 mmol)のテトラヒドロフラン懸濁液(10 mL)に二炭酸ジ-*tert*-ブチル(2.18 g, 10.0 mmol), トリエチルアミン(1.4 mL, 10.0 mmol)を加えて室温にて 18 時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮した後, 残渣をジエチルエーテルに再懸濁させて沈殿物をろ取して真空下で乾燥することで, 化合物 **5-2**を黄色粉末固体として得た(500 mg, 36%).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J=9.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 3.07 (s, 6H), 1.33 (s, 18H).

化合物 **5-2** (191 mg, 0.5 mmol)の THF/DMF (1:1)(5 mL)溶液にパラジウム炭素 (10%, 25 mg)を加え, 水素雰囲気下にて 40°Cで 16 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 酢酸エチルで希釈してセライトろ過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた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 = 80:20 to 20:80)することで, 化合物 **5-3**を暗紫色固体として得た(88 mg, 70%).

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノンの(23 mg, 0.10 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に化合物 **5-3**(38 mg, 0.15 mmol), 炭酸ナトリウム(32 mg, 0.3 mmol)を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 減圧濃縮した. 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 = 90:10 to 34:66)することで, 化合物 **5-4**を赤紫色非晶質固体として得た(28 mg, 63%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (br.s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.03–7.80 (m, 2H), 7.85 (ddd, $J=7.2,$

7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (ddd, $J=7.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J=8.7, 3.0$ Hz, 1H), 2.90 (s, 6H), 1.44 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.0, 176.3, 153.5, 148.9, 143.8, 134.9, 133.7, 132.9, 132.2, 130.0, 127.9, 126.5, 126.0, 19.9, 111.0, 107.5, 106.1, 79.5, 79.2, 40.2, 28.1.

化合物 **5-4** (28 mg, 0.063 mmol)に 4M 塩酸・ジオキサン溶液(1.2 mL)を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮することで, 化合物 **5**を茶色粉末固体として得た(20 mg, quant.).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.18 (dd, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H), 8.33 (dd, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.88–7.82 (m, 2H), 7.71 (dd, $J=9.6, 3.0$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 3.16 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 150.1, 141.2, 138.9, 137.2, 136.7, 130.1, 129.1, 128.5, 128.4, 124.8, 123.0, 122.2, 109.4, 103.9.

C-2) 1,4-ナフトキノ誘導体の合成の UV-Vis スペクトル

合成した誘導体の UV-Vis スペクトルを測定した結果, 特定の位置への置換基の導入によって UV-Vis スペクトルの一定の長波長化が観測された. *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミン構造の導入前の分子においては, 5 位の置換基をアミノ基とすることで 532 nm 付近に吸収をもつようになることがわかった(Fig. 2a). これはおそらく 5 位アミノ基の水素と 1 位のアルボニル酸素との間に形成される分子内水素結合の寄与のためと予想される. 一方, *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミン構造の導入後の分子においては, 5 位にニトロ基を有する誘導体 **3**においてピークトップの長波長化が観測され, 800 nm 以上の部分にも UV 吸収をもつことが分かった(Fig. 2b). Figure 2c のスペクトルから, *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミンの 2 位へのアミノ基の導入はおそらく長波長化には寄与しないものと考えられた. **5'**のように環化した構造においてはピークトップの短波長側へのシフトが観測された(Fig. 2d). これはおそらく環化した構造とな

ったことで、1,4-ナフトキノン誘導体 **1** でみられるような電荷分離状態をとらなくなったことによるものと考えられた。

D. 結論

PDA 校正用の標準物質の開発として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基位置の違いがおよぼす UV-Vis スペクトルの変化について検討した。本検討により、複数の誘導体の合成経路を確立し、また置換基の位置と種類によっては別の化合物構造が得られて、望みの構造を得ることが極めて困難となることが分かった。今回検討したうち、1,4-ナフトキノン誘導体の5位にニトロ基を導入した化合物で UV-Vis スペクトルの長波長化が観測された。この化合物構造をベースとし、導入する置換基の個数や位置を検討することで、さらなる吸収波長の長波長化が可能と考えられる。合成予定の化合物として、今回検討した5位に加えて8位にアミノ基等の置換基を有する化合物を設計しており、今後はこれら誘導体の合成も行い、UV-Vis スペクトルの長波長化に有用な情報の蓄積を進めていく。

E. 文献

- 1) Terayama K, Sumita M, Tamura R, Payne DT, Chahal MK, Ishihara S, Tsuda K: Pushing property limits in materials discovery via boundless objective-free exploration. Chem. Sci. 2020; 11(23): 5959-5968.

- 2) Aaron WT, Susan R-H, Christopher W: Probe for selectively characterizing enzymes involved in xenobiotic metabolism and method of making and using the same. US Patent. US20190100792A1 (Apr. 4, 2019).

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

なし

F-1-2) シンポジウム等

なし

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

なし

F-2-2) 総説等

なし

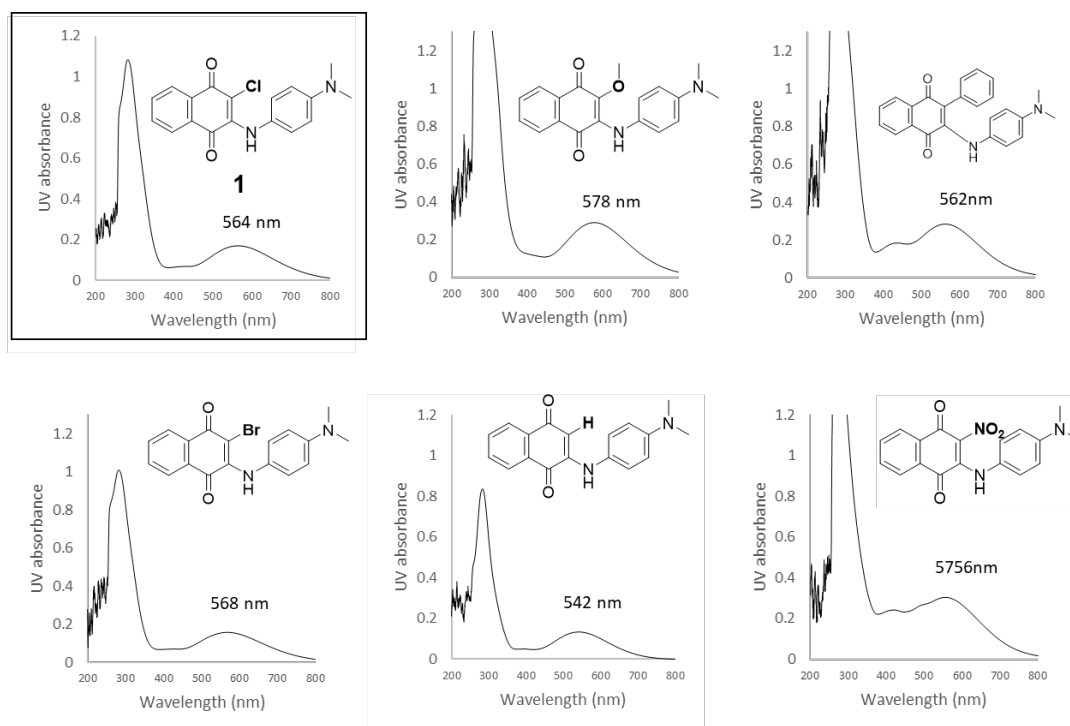
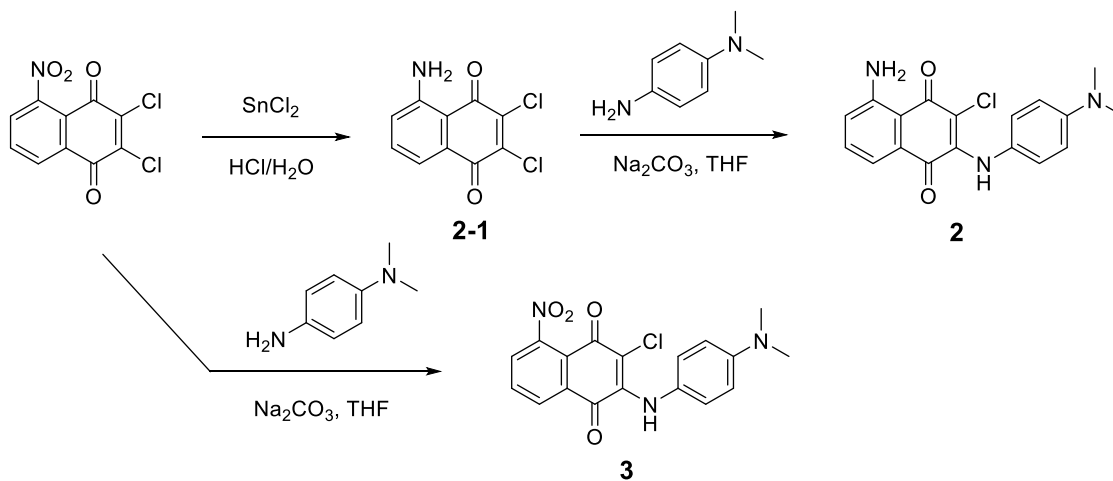
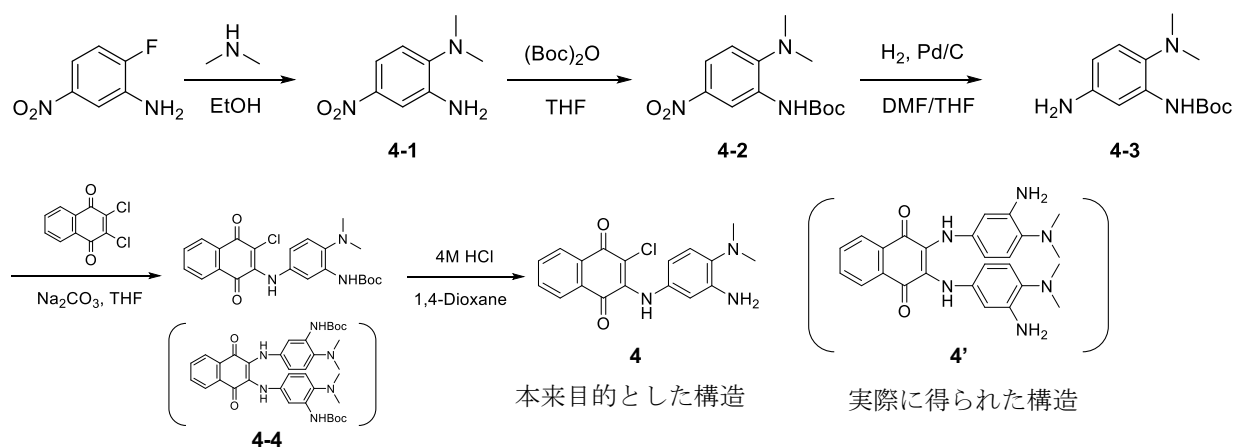


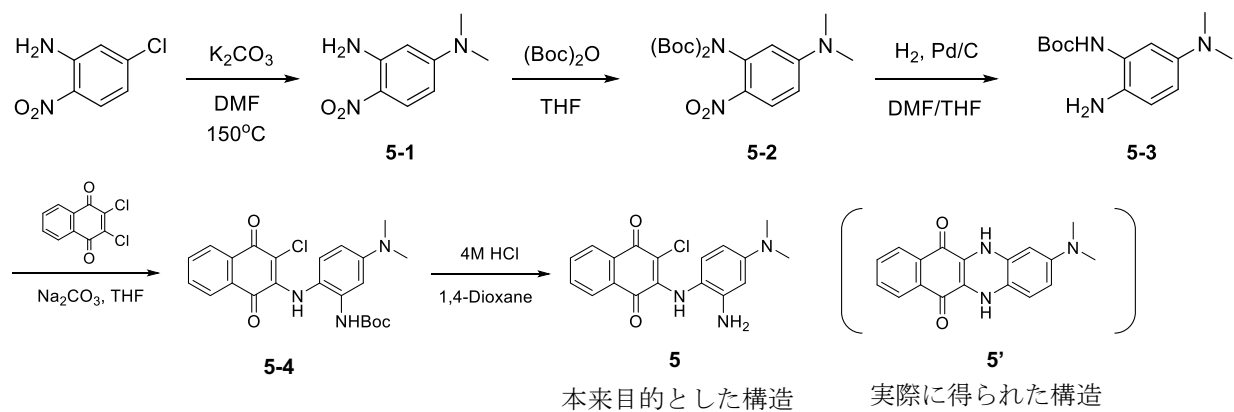
Fig. 1. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (1)



Scheme 1. 1,4-ナフトキノン誘導体 **2** 及び **3** の合成



Scheme 2. 1,4-ナフトキノ誘導体 4 の合成



Scheme 3. 1,4-ナフトキノ誘導体 5 の合成

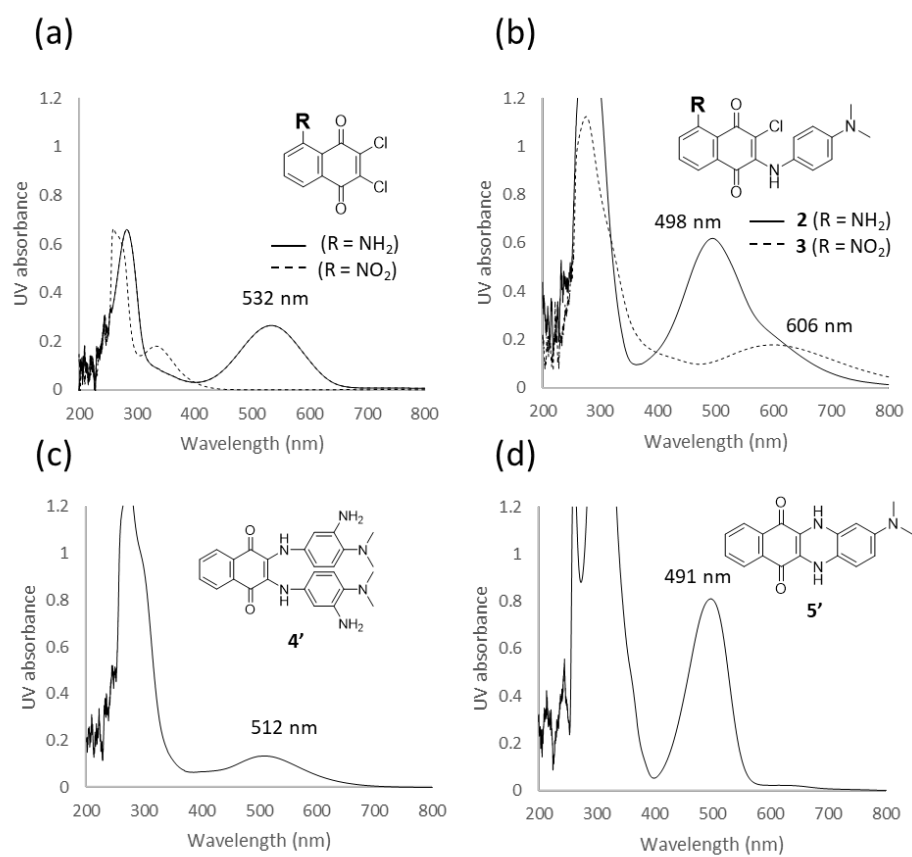


Fig. 2. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (2)

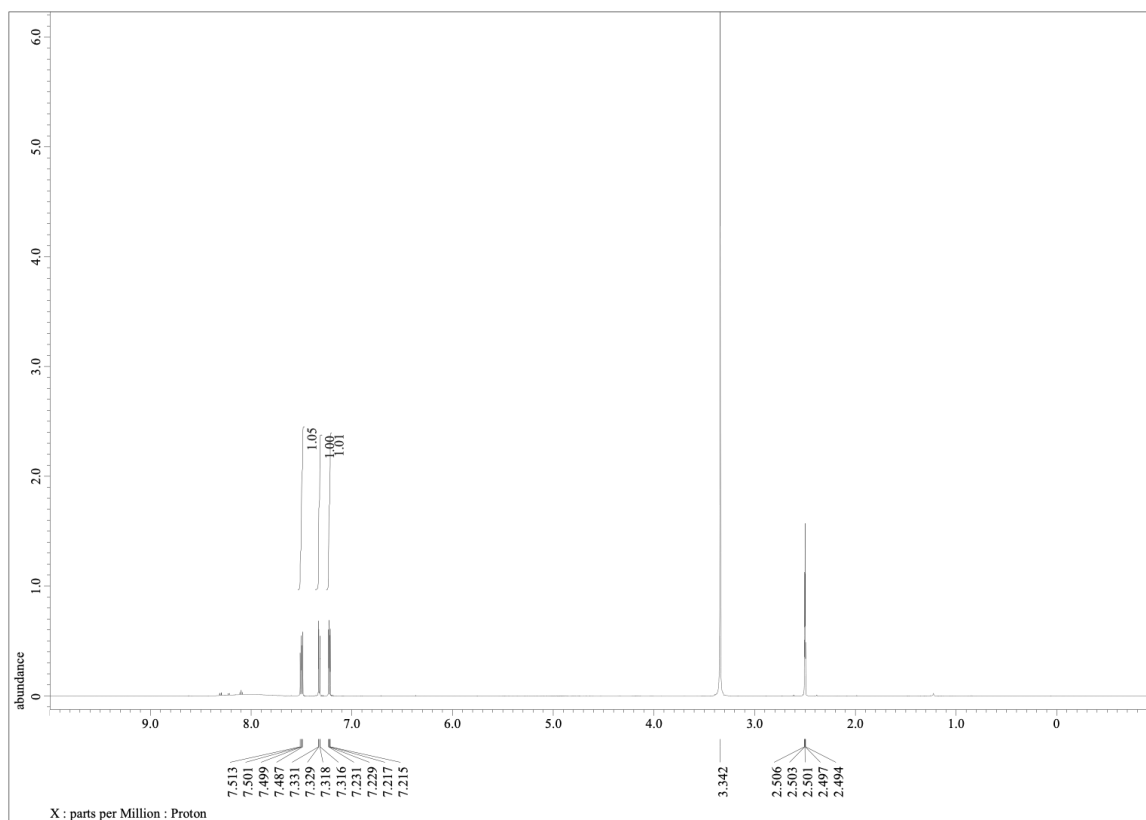


Fig. 3. 化合物2-1の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

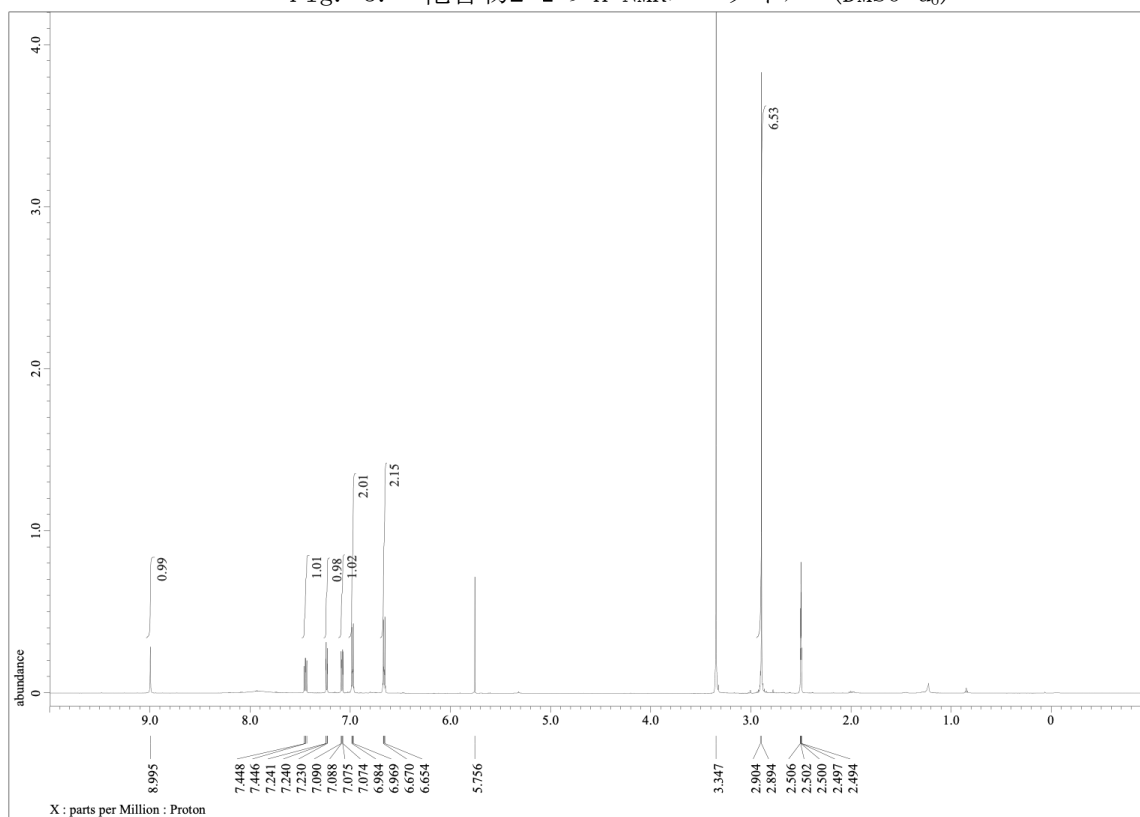


Fig. 4. 化合物2の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

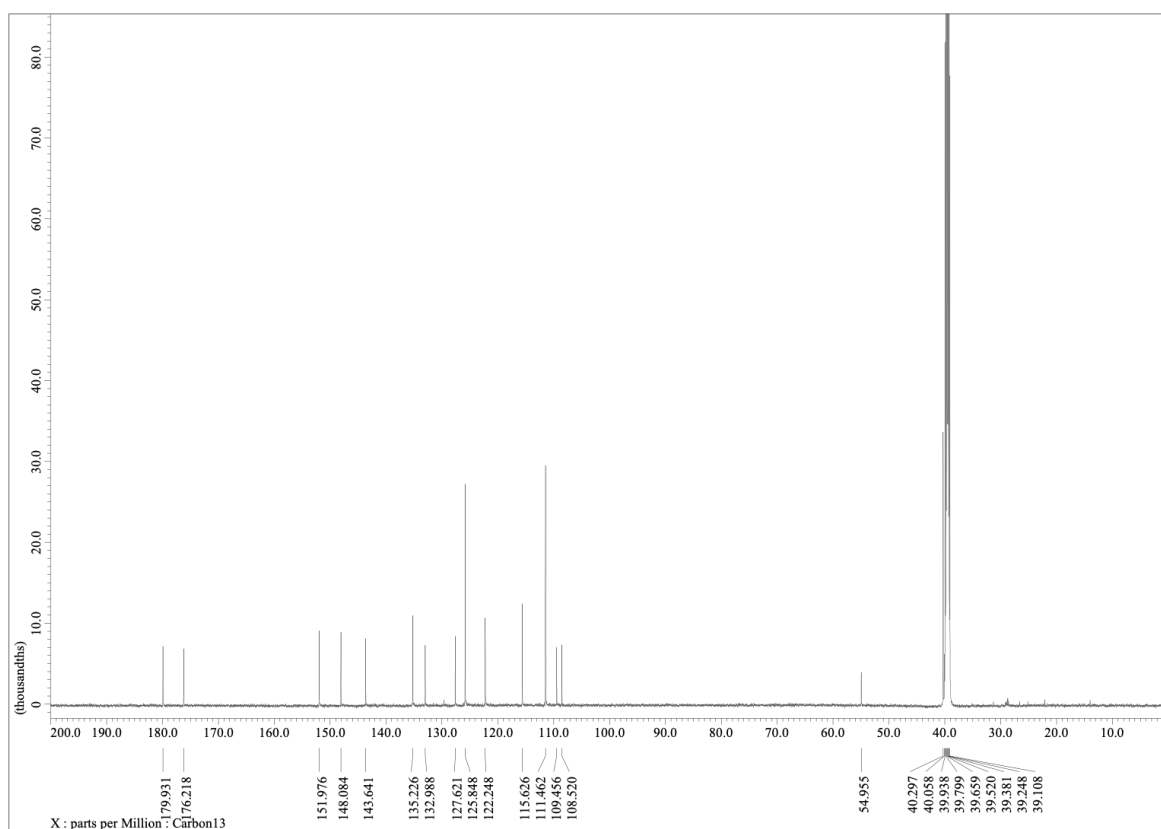


Fig. 5. 化合物2の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

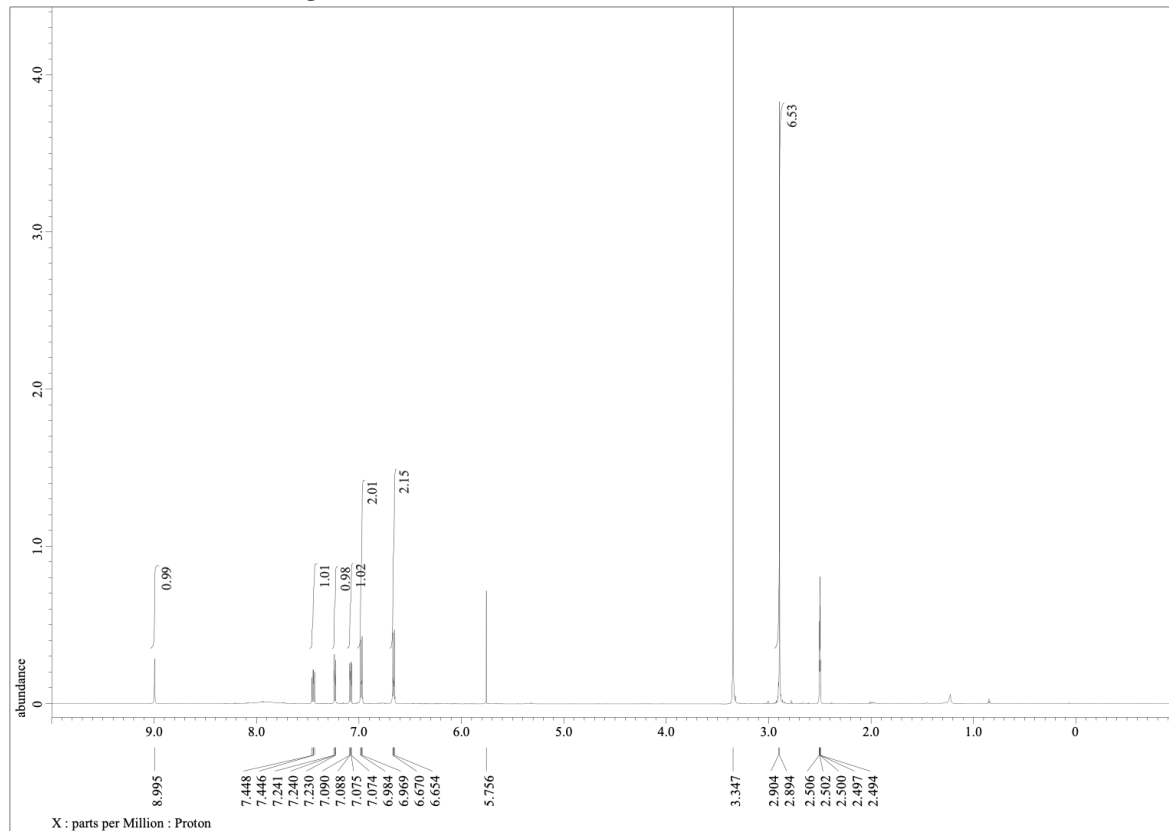


Fig. 6. 化合物3の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

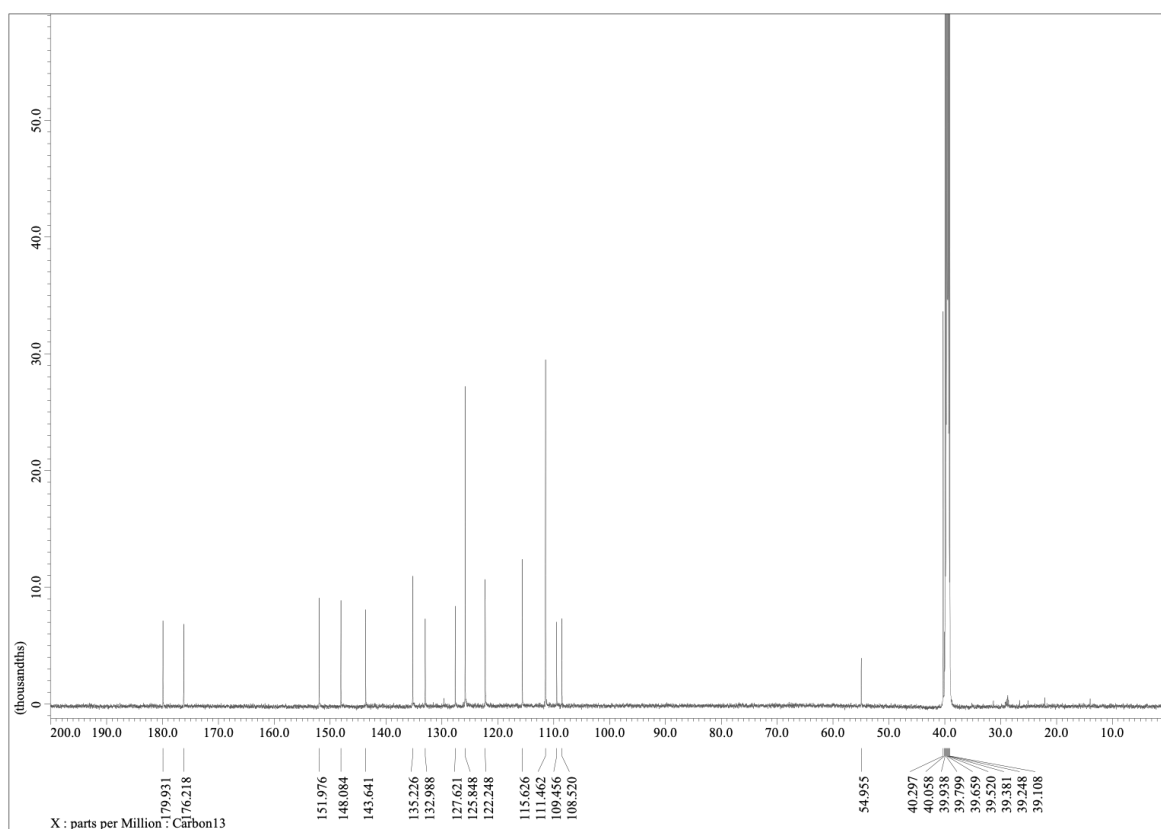


Fig. 7. 化合物**3**の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

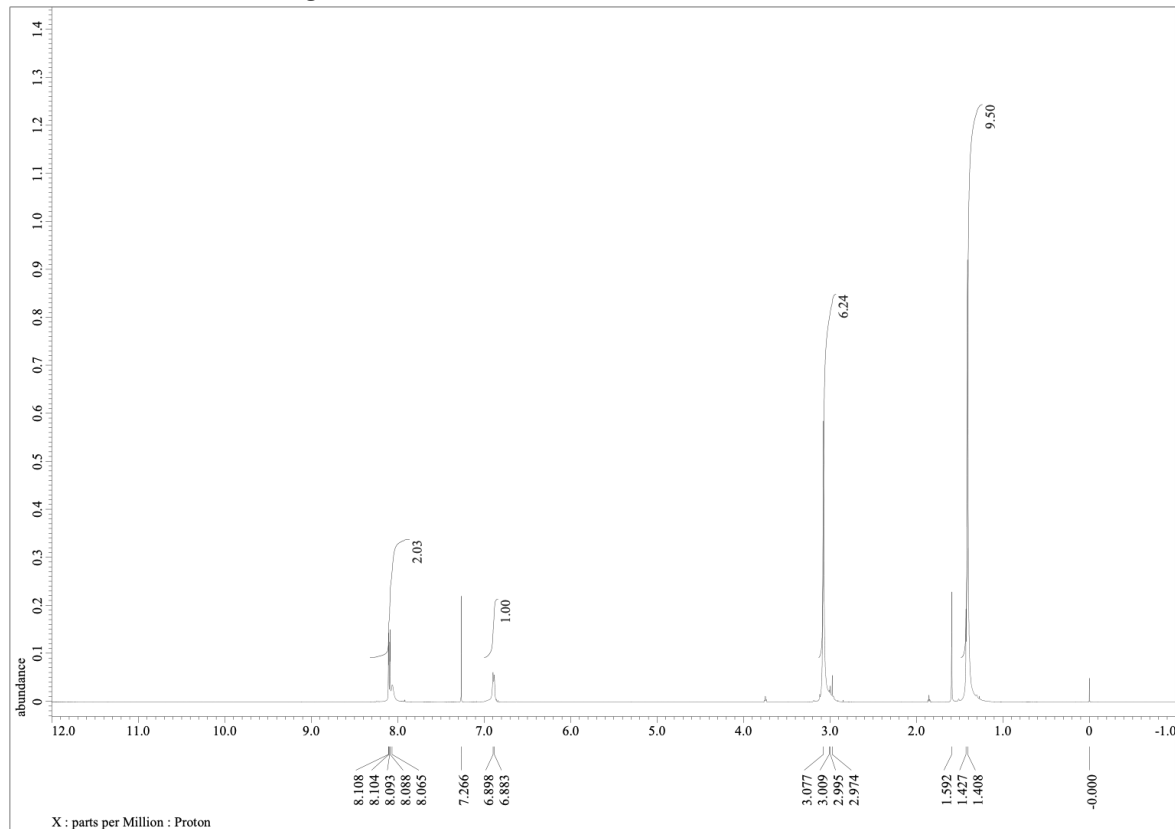


Fig. 8. 化合物**4-2**の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

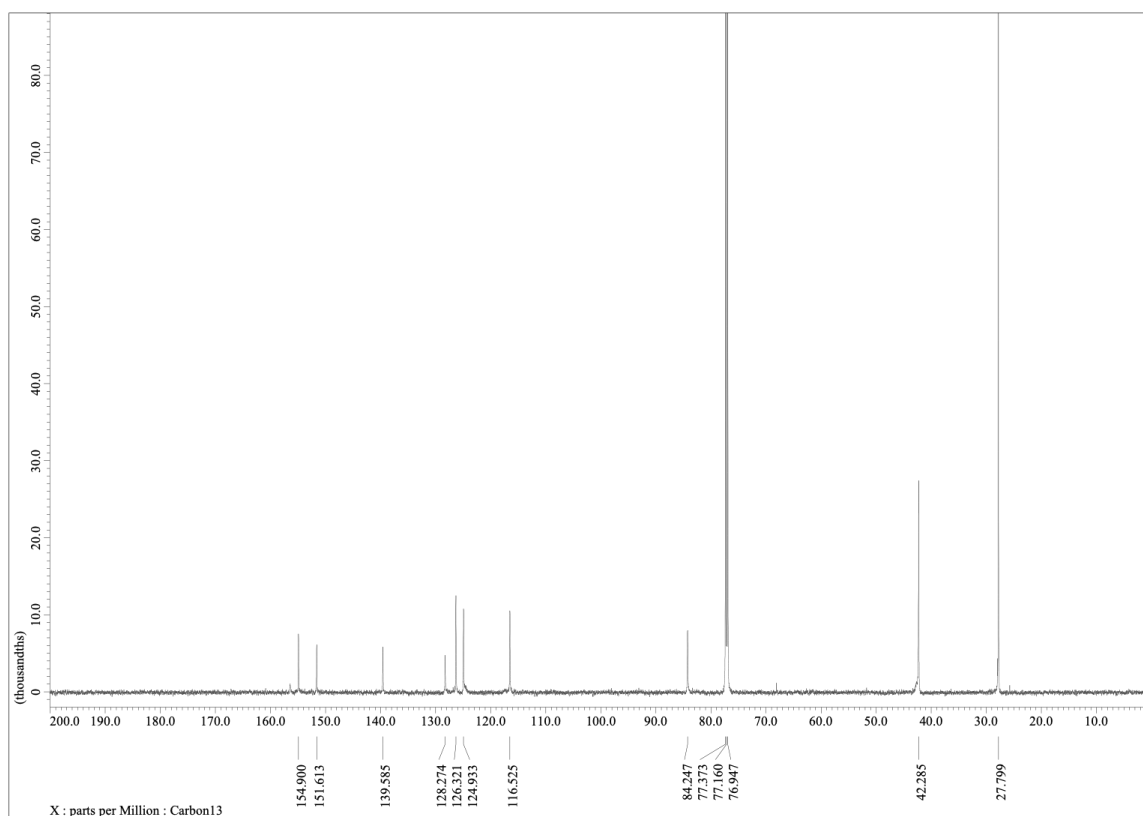


Fig. 9. 化合物4-2の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

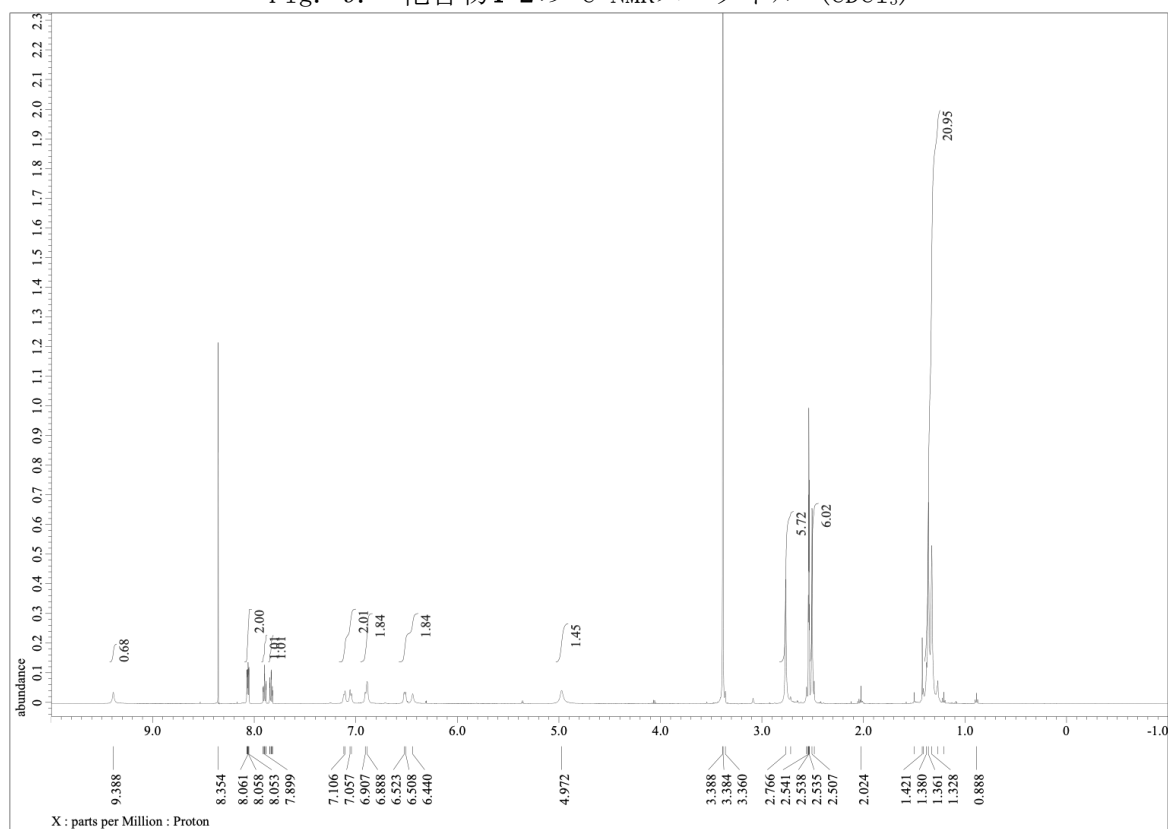


Fig. 10. 化合物4-4の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

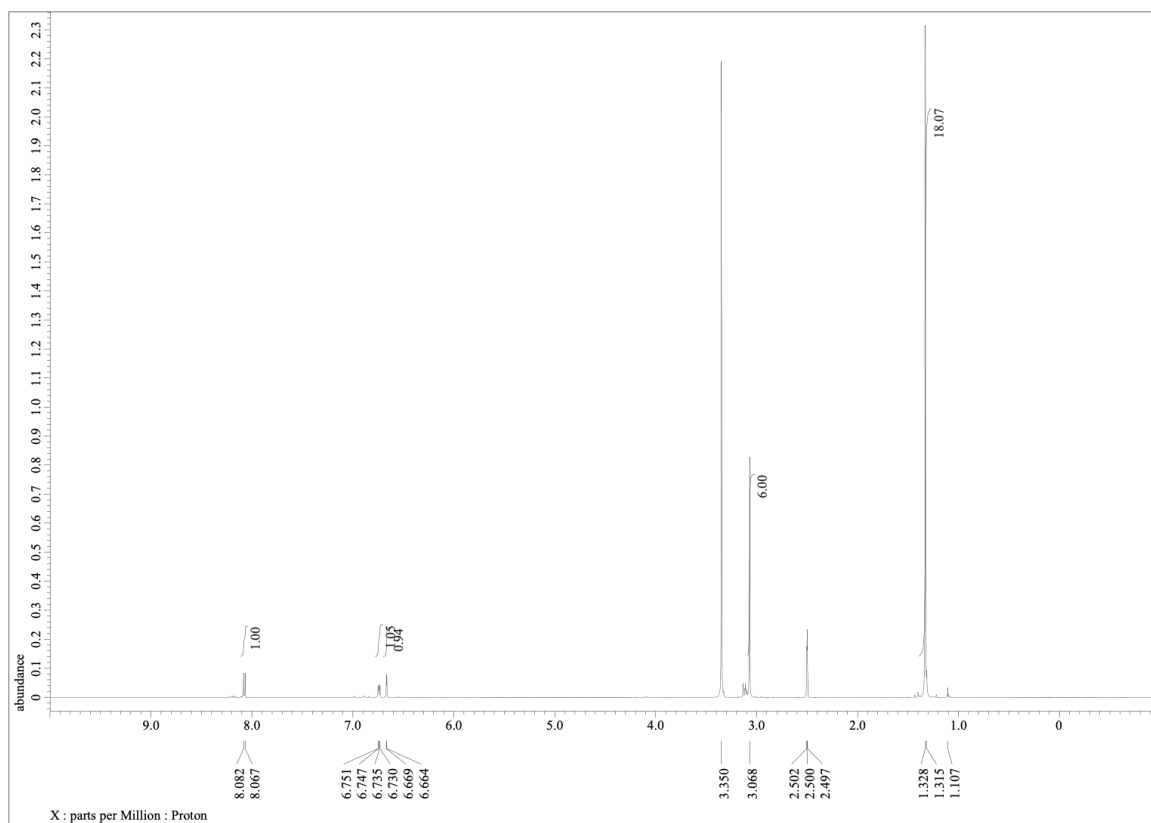


Fig. 11. 化合物5-2の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

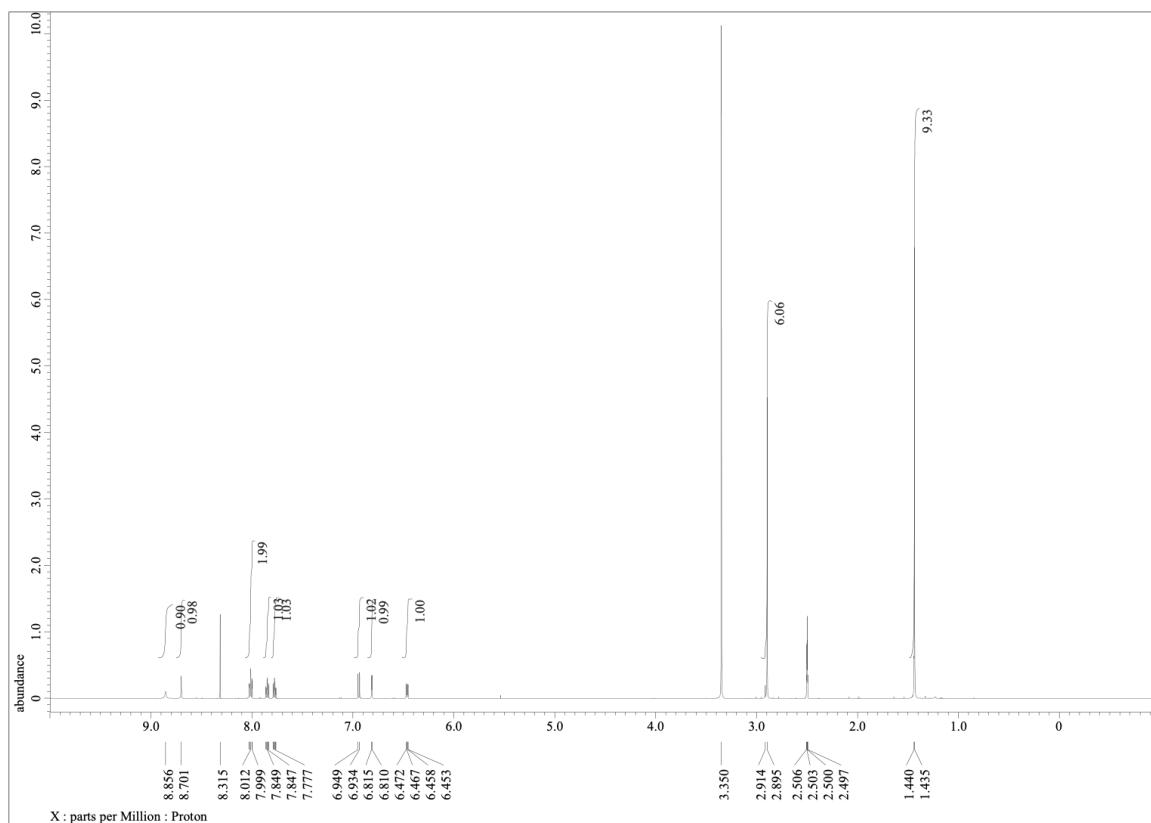


Fig. 12. 化合物5-4の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

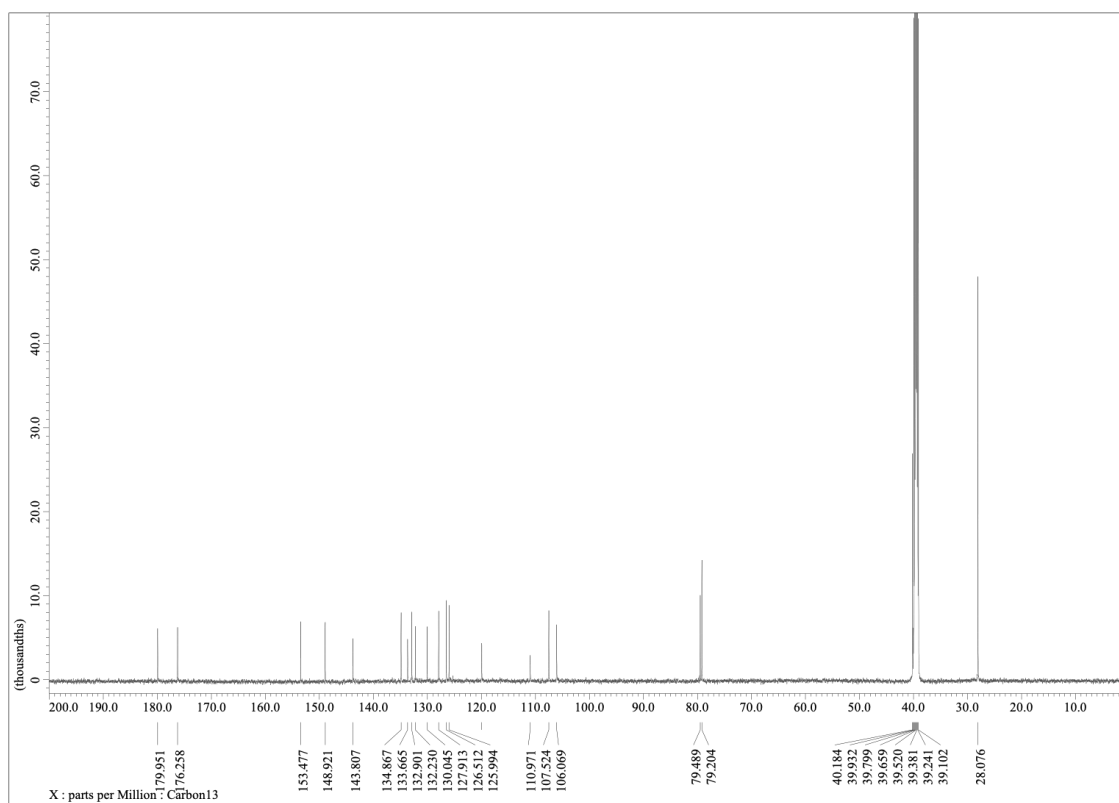


Fig. 13. 化合物5-4の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

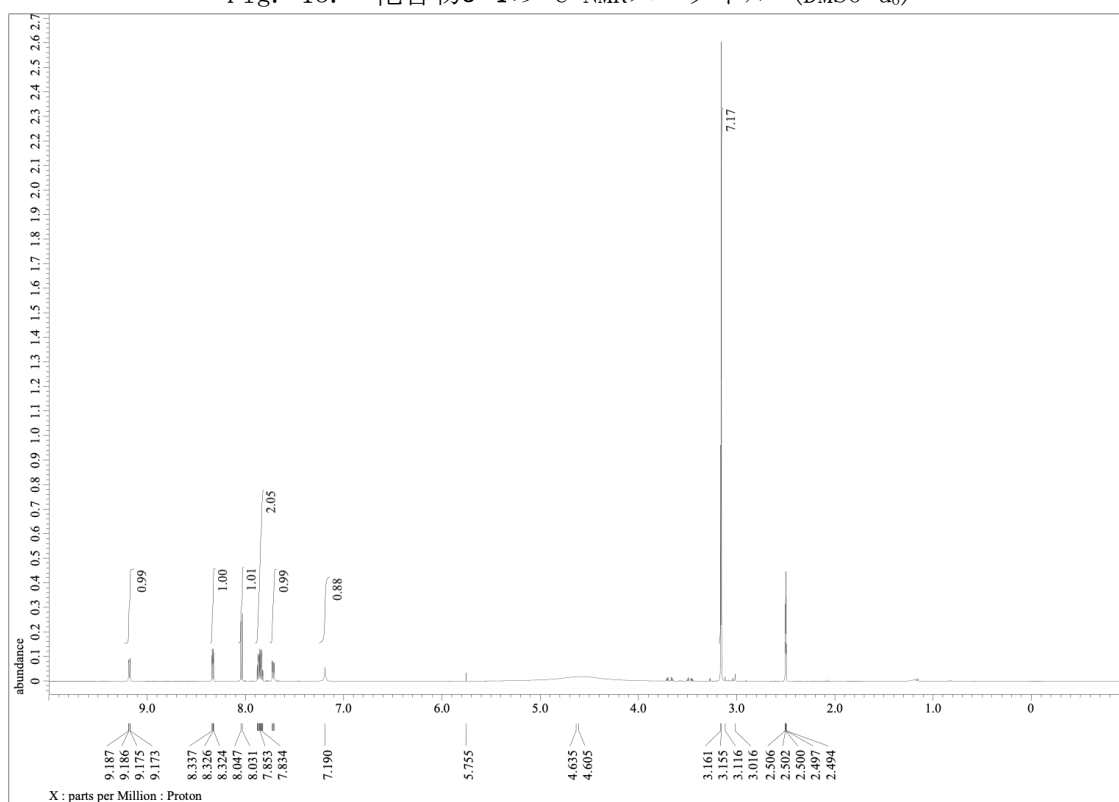


Fig. 14. 化合物5の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

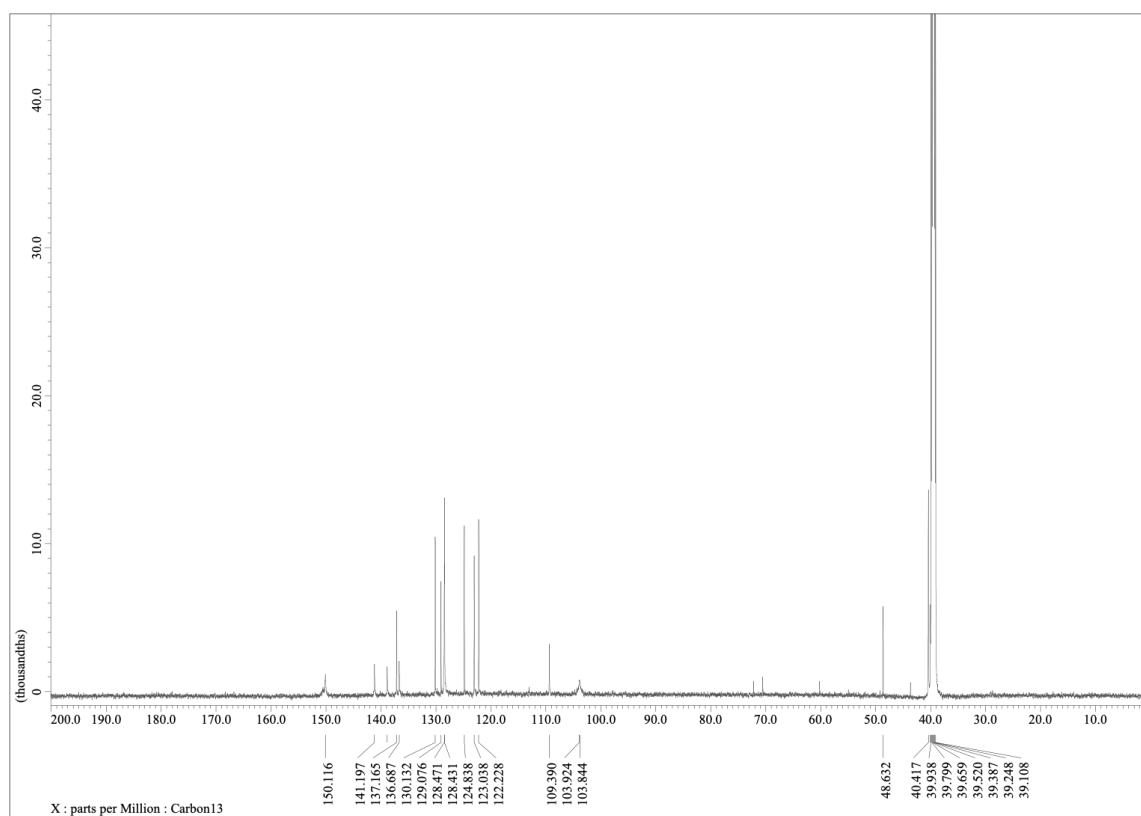


Fig. 15. 化合物5の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)