

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に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和5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

研究分担者らは、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。本年度は、カロテノイド類であるビキシンおよびノルビキシンの HPLC を用いた定量に利用可能なシングルリファレンス化合物の大量供給のための合成、また、定量用標品として利用するためのビキシンおよびノルビキシンの *trans* 異性体の合成を行った。また、HPLC のリテンションインデックス (RI) 化合物として利用可能な分子のデザインについても検討し、疎水性および親水性構造の RI 化合物の合成を行った。

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

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 を用い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。HPLC を利用した化合物の定量においては、対象とする分子に対して適切な基準物質（シングルリファレンス）を個別に設定することで対応が可能であるが、HPLC クロマトグラム上における定量対象物質との溶出位置が重なってしまうと分析ができず、極端に離れていることも好ましくない。これまでの検討から、定量対象と類似の吸収スペクトルを示す化合物を母骨格とし、官能基導入によってその疎水性を制御することによりクロマトグラム上におけるピーク位置を調整するという分子デザイン手法が利用できることが分かった。

本研究では、上記のデザイン分子のうち、カロテノイド類の HPLC を用いた定量法に利用

可能なシングルリファレンス物質として利用可能な、ビスインドリルマレイミド誘導体の大量スケール合成について検討した。また、カロテノイド類であるビキシンおよびノルビキシンの異性体として *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンについて、HPLC での定量法検討のための合成を試みた。さらに、HPLC クロマトグラム上における溶出位置の基準物質、すなわちリテンションインデックスとして利用可能な分子のデザインについても疎水性および親水性分子を基にした分子の設計・合成を検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「ビキシン」および「ノルビキシン」は三栄源エフ・エフ・アイ社製の製品を用いた。直鎖第一級アルキルアミン（それぞれ、C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12）は FUJIFILM 和光純薬社製の試薬を用いた。直鎖第一級ヨウ化アルキル（それぞれ、C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, C12）は東京化成工業社の試薬を用いた。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 (CDCl_3): 関東化学, Cat. 07663-23, 重アセトン ($\text{Acetone-}d_6$): 関東化学, Cat. 01053-43, 重ジメチルスルホキシド ($\text{DMSO-}d_6$): 関東化学, Cat. 11560-96. その他, ジクロロメタン, エタノール, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), トルエン, 酢酸エチル, ヘキサン, アセトン, 塩酸, 水酸化カリウム (KOH), 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, および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), およ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 および ^{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, ECZ 600 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 : 77.0 for ^{13}C -NMR; $\text{Acetone-}d_6$: 2.05 for ^1H -NMR, 29.84 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), triplet (t), double of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), broad (br)). 合成した化合物の NMR データは Figure 6-13 に示した.

B-3) 装置

HPLC のシステムには EXTREMA (日本分光) もしくは Prominence (島津) を使用した.

B-3) 測定条件

B-3-1) HPLC 測定条件

ビキシン, ノルビキシンおよびそれぞれの異性化反応追跡における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5 μm) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40 $^\circ\text{C}$, 検出波長: 460 nm, 移動相; A: 0.1 vol% AcOH in H_2O , B: 0.1 vol% AcOH in MeOH, 移動相グラジエント (B%): 90% (isocratic)

RI-1 における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5 μm) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40 $^\circ\text{C}$, 検出波長: 254 nm, 移動相; A: H_2O , B: CH_3CN , 移動相グラジエント (B%): 80-100% (20 min), linear gradient.

RI-2 における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5 μm) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40 $^\circ\text{C}$, 検出波長: 254 nm, 移動相; A: H_2O , B: CH_3CN , 移動相グラジエント (B%): 10-100% (30 min), linear gradient.

RI-3 における分析条件;

カラム: CAPCEL PAK MG-II (2.0 I.D x 35 mm, 5 μm) (大阪ソーダ), 流速: 0.4 mL/min, column temp.: 40 $^\circ\text{C}$, 検出波長: 254 nm, 移動相; A: 0.1 vol% HCO_2H in H_2O , B: 0.1 vol% HCO_2H in CH_3CN , 移動相グラジエント (B%): 30-100% (1 min), linear gradient.

C. 結果及び考察

C-1) *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンの調製

ビキシン (bixin) やノルビキシン (norbixin) はベニノキの種子から抽出されるアナトー色素であり, 黄色~赤色の着色料として食品添加物として用いられる. ビキシンは化合物構造としてはカロテノイドに類するもので構造の二重結合の一つが *Z* 配座 (*cis* 体) をとるモノエステルである. ノルビキシンはビキシンのエステルが加水分解されて生じる水溶性カロテノイドである (Figure 1). ビキシンやノルビキシンは徐々に 9' 位の二重結合において異性化を起し, それぞれ対応する *E* 体構造である *trans*-ビキシンと *trans*-ノルビキシンへと変化する. 本研究では, カロテノイド類である

ビキシンやノルビキシンの HPLC を用いた定量法確立の検討で使用するサンプルとして、*trans*-ビキシンと *trans*-ノルビキシンの調製を実施した。文献情報として触媒量のヨウ素の存在下、加熱によって *cis* 体から *trans* 体へのビキシンおよびノルビキシンの異性化が起こるという記載¹⁾がある。具体的な異性体の調製方法は参照できなかったため、化合物を溶解し、一定温度以上での加熱が可能かつヨウ素と反応しない溶媒を使用して反応条件を検討した。その結果、トルエンもしくはテトラヒドロフランが適用できることが分かった (Scheme 1)。ビキシンにおいてはトルエン単独を溶媒として使用し、0.1~0.2 モル当量のヨウ素存在下、110°C で加熱攪拌することで大部分の *cis*-ビキシンを *trans*-ビキシンへと異性化できた (Figure 2A))。一方、ノルビキシンにおいては加熱時においてもトルエン単独への溶解性が低かったため、共溶媒としてテトラヒドロフランを使用することで溶解性を向上させることができ、*trans*-ノルビキシンへの変換率を向上させることができた (Figure 2B)。C-1-1 および C-1-2 の項に実施例を示している。また、反応で使用するヨウ素量については、触媒量を逸脱して使用すると原料および目的物であるビキシンの回収量が顕著に減少することが分かった。この時、溶解性の極めて悪い沈殿物が反応系中において生じており、分析の結果からこの沈殿物は原料のビキシンや異性体での *trans*-ビキシンではないことが分かったため、何かしら重合体のようなものが生じた可能性が考えられた。

C-1-1) ビキシンの異性化による *trans*-ビキシンへの変換

ビキシン (167 mg, 0.36 mmol) のトルエン溶液 (100 mL) にヨウ素 (18 mg, 0.073 mmol) を加え、100°C にて 12 時間加熱攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、15%チオ硫酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄後、得られた有機層を減圧濃縮することで *trans*-ビキシンの粗精製物を暗赤色固体として得た (165 mg)。

C-1-2) ノルビキシンの異性化による *trans*-ノルビキシンへの変換

ノルビキシン (205 mg, 0.54 mmol) のトルエン/THF (1:1) 溶液 (125 mL) にヨウ素 (27 mg, 0.108 mmol) を加え、90°C にて 12 時間加熱攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を減圧して THF の半分量程度を留去してから酢酸エチル (50 mL) で希釈し、15%チオ硫酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄後、得られた有機層を減圧濃縮することで *trans*-ノルビキシンの粗精製物を暗赤色固体として得た (220 mg)。

C-2) ビスインドリルマレイミド誘導体 6 の合成

カロテノイド類のシングルリファレンスとしてのビスインドリルマレイミド誘導体は Scheme 2 に示す経路によって合成した。大量に安価に合成するためには化合物の変換率が高く、精製法も簡便なものが望ましい。本経路では極力シリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用せずに工程を進めることで、迅速かつ簡便に目的とする中間体 5 を得ることができ、複数種類のシングルリファレンス化合物 (6-1~6-3) の合成に利用できた。C-2-1 の項に実施例を示す。

C-2-1) 化合物の合成

化合物 2 の合成²⁾

ムコブロム酸 (1) (10.0 g, 38.8 mmol)、2-メチル-2-ブテン (20.5 mL, 194.0 mmol) のアセトン溶液 (160 mL) を 0°C に冷却し、攪拌しながら亜塩素酸ナトリウム (80%) (12.3 g, 136.3 mol) のリン酸水素二ナトリウム (29.1 g, 186.5 mol) の水溶液 (160 mL) を滴下して加えた。反応液を 6 時間攪拌した後、1M 塩酸 (160 mL) を加えて pH2.0 以下とし、酢酸エチル (160 mL) で 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣 (化合物 2) はそのまま次の反応に使用した (16.8 g)。

化合物 3 の合成

化合物 2 (22 g, 80.3 mmol) に室温にて塩化アセチル (57 mL, 803 mmol) を加え、触媒量の

硫酸（パスツールピペットにて 15 滴）を加えて反応を開始させた。反応液を 1.5 時間攪拌した後、真空下にて減圧濃縮して液体成分を除去した。得られた残渣（化合物 **2'**）に対して真空下、トルエンによる共沸操作を行った後、酢酸（160 mL）に溶解させ、室温にてベンジルアミン（10.5 mL, 96.4 mmol）を加えた後、110°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を減圧濃縮して酢酸を除去した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、濾過し、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 = 9 : 1 to 3 : 1）することで、化合物 **3** を無色粉末として得た（4.9 g, 18%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 4.76 (s, 2H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

化合物 **4** の合成³⁾

インドール（1.03 g, 63.8 mmol）のトルエン溶液（112 mL）に、攪拌下、室温にてエチルマグネシウムブロミド（3M in Et_2O , 21.3 mL, 63.8 mmol）を 5 分間かけて滴下した後、50°Cにて 1 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、化合物 **3**（5.0 g, 14.5 mmol）のトルエン溶液（70 mL）を滴下し、反応液を 100°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を 0°Cに冷却し、2M 塩酸（140 mL）を加えて反応を停止させ、酢酸エチル（280 mL）で抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン/メタノール混液（19 : 1, v/v）に懸濁させ、沈殿物を濾取して真空乾燥することで化合物 **4** を赤色固体として得た（6.05 g, 70%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.71 (brs, 2H), 7.79 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.38-7.34 (m, 6H), 7.29-7.28 (m, 1H), 6.97 (ddd, $J = 7.5, 7.5, 1.2$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.62 (ddd, $J = 7.5, 7.5, 1.2$ Hz, 2H), 4.77 (s, 2H).

化合物 **5** の合成

化合物 **4**（1.25 g, 3.0 mmol）のエタノール懸濁液（12 mL）に 4M 水酸化カリウム水溶液（6 mL）を加えて、60°Cにて 3 時間攪拌した。反応液を 0°Cに冷却し、10%塩酸（24 mL）を加えて液性を酸性（pH1~2）とした後、ジクロロメタン（60 mL x 2）で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮しすることで化合物 **5** を暗赤色固体として得た（1.1 g）。この化合物はこれ以上精製せずに次の反応（化合物 **6-1**~**6-3** の合成）に使用した。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ 10.84 (s, 2H), 7.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.99 (ddd, $J = 7.2, 7.2, 0.6$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.63 (ddd, $J = 7.5, 7.2, 0.6$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ 172.5, 138.7, 137.3, 130.0, 129.4, 128.8, 128.3, 128.2, 126.8, 122.8, 122.3, 120.4, 112.4, 107.5, 42.1.

化合物 **6-1** の合成

化合物 **6**（328 mg, 1.0 mmol）のトルエン（9 mL）/酢酸溶液（1 mL）に、室温にてノニルアミン（218 μL , 1.2 mmol）を加え、反応液を 110°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル（40 mL）で希釈し、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。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 = 9 : 1 to 5 : 5）することで、化合物 **6-1** を赤色無定形固体として得た（170 mg, 38%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (s, 2H), 7.73 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.07 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.76 (dd, $J = 8.4, 7.8$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.71 (tt, $J = 7.8, 7.2$ Hz, 2H), 1.40-1.33 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 8H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

化合物 **6-2** の合成

1-アミノウンデカンを使用し化合物 **6-1** と同様の手順にて合成することで、化合物 **6-2** を赤色無定形固体として得た（190 mg, 39%）。

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ 10.82 (s, 2H), 7.87 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (ddd, *J* = 7.2, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.64 (ddd, *J* = 7.2, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.70 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.40-1.35 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 14H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).
化合物 **6-3** の合成

1-アミノヘキサデカンを使用し化合物 **6-1** と同様の手順にて合成（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 7 : 3））することで、化合物 **6-3** を赤色無定形固体として得た（10 mg, 36%）。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.39-1.33 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 135.9, 128.4, 127.6, 125.6, 122.8, 122.1, 120.5, 111.3, 107.5, 38.5, 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.5, 29.5, 29.0, 27.1., 22.8, 14.3.

C-2-3) RI インデックス用化合物の合成

RI インデックス候補分子の合成では、本研究におけるシングルリファレンス分子の設計方針、すなわち UV 吸収を示す共通化合物ユニットに官能基として直鎖炭化水素基などを導入することで疎水性を変化させ、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御することとした。Figure 3 には黄色色素の骨格に対して、長さの異なる直鎖アルキルアミンを導入した化合物 **RI-1** の HPLC クロマトグラム上における溶出位置を示している。この化合物においては C3~C12 までのアルキル基に応じて溶出位置が異なっており、設計通り、溶出位置を制御することができたと考えられる。しかしながら、**RI-1** においては全体的に疎水性が非常に高く、溶出も遅いことから、親水性型の分子の合成を試みた。Figure 4 には第 3 級アミン構造を導入した類似の化合物を中間体として、各鎖長のアルキル化試薬を反応させて第 4 級アンモニウム塩とすることで極性や親水性の向上を狙った分子 **RI-2** の結果を示してい

る。第 4 級アンモニウム塩としたことで、HPLC クロマトグラム上における溶出位置は **RI-1** と比較して明らかに早くなることが分かった。また、詳細なデータは得られていないものの、一定の水溶性を獲得していることも分かった。一方で、HPLC チャート上において各鎖長に対応するマイナーなピーク（矢印で示している）が確認された。質量分析の結果から、これらは芳香環部分が酸化されて閉環構造となった分子であることが示唆された。これはおそらくアルキル化試薬由来のヨウ化物イオンからヨウ素が生成したことにより酸化的な閉環反応が促進されたものと予想される。この副反応については、反応系の遮光やヨウ素の補足剤の使用、またアルキル化剤の脱離基を臭素など他の元素のものを使用することで抑制できると考えられる。最後に、Figure 5 にはよりシンプルなコンセプトとして、水溶性分子である赤色 106 号をベースに、長さの異なるアルキルアミンを導入した例 (**RI-3**) を示している。この結果からも、本分子設計による極性や親水性を高めた RI 分子の創出が可能であることが示唆された。C-2-4 の項に各分子の合成について示している。

C-2-4) 化合物の合成

RI-1 の合成

2,3-ジフェニルマレイン酸無水物（125 mg, 0.5 mmol）のトルエン（1.8 mL）/酢酸溶液（0.2 mL）に、室温にて直鎖アルキルアミン（C3~C12; それぞれ 0.05 mmol）を加え、反応液を 110°C にて 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、酢酸エチル（20 mL）で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃した

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 = 9 : 1 to 7 : 3）することで、**RI-1** を黄色油状物質として得た（170 mg）。

化合物 7 の合成

2,3-ジフェニルマレイン酸無水物（125 mg, 0.5

mmol) のトルエン (1.8 mL) /酢酸溶液 (0.2 mL) に、室温にて 2-(ジメチルアミノ)エチルアミン (54 μ L, 0.5 mmol) を加え、反応液を 100°Cにて 15 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮することで、化合物 **7** を黄色固体として得た (165 mg, quant.).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.47 (m, 4H), 7.37-7.33 (m, 6H), 3.77 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 136.3, 130.0, 129.9, 128.8, 128.6, 57.3, 45.7, 36.5.

RI-2 の合成

ヨウ化アルキル試薬 (ヨウ化メチル, ヨウ化エチル, 1-ヨードプロパン, 1-ヨードブタン, 1-ヨードペンタン, 1-ヨードヘキサン, 1-ヨードオクタン, 1-ヨードデカンおよび 1-ヨードドデカン; それぞれ 0.022 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) に、**7** (32 mg, 0.1 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) および炭酸カリウム (30 mg, 0.22 mmol) を室温にて加えた後、80°Cにて 12 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、セライト濾過してメタノールで洗浄、濾液を減圧濃縮して得られた残渣をサンプルとし、HPLC に導入して分析した。

化合物 **8** の合成

赤色 106 号 (1.5 g, 2.58 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (40 mL) に、室温にて塩化オキサリル (1.11 mL, 12.9 mmol), 次いで *N,N*-ジメチルホルムアミド (50 μ L) を加えた。室温にて 14 時間攪拌した後、反応液を真空下にて減圧濃縮し、得られた残渣をジエチルエーテル (50 mL) に懸濁させ、生じた沈殿物を濾取して真空乾燥することで化合物 **8** を茶色固体として得た (1.48 g, quant.).

RI-3 の合成

化合物 **8** (mg, 0.2 mmol), トリエチルアミン (56 μ L, 0.4 mmol) のジクロロメタン溶液 (1 mL) に直鎖第一級アルキルアミン (C3, C5, C7, C9 および C12; それぞれ 0.04 mmol) を室温に

て加えて、12 時間攪拌した。反応液をメタノールで 1000 倍希釈して HPLC に導入して反応生成物 (**RI-3**) の分析を行った。

D. 結論

カロテノイド類の HPLC 法による定量で利用可能なシングルリファレンス分子として、ビスインドリルマレイミド誘導体の簡便な大量合成経路を確立した。アナトー色素であるビキシンおよびノルビキシンの定量用サンプルとして、異性体である *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンの合成における反応条件を検討することで供給した。今後はこれらのシングルリファレンス分子および標品を利用してビキシンおよびノルビキシンの HPLC による定量法の確立を行う。また、HPLC におけるリテンションインデックスとして利用可能な分子のデザインを検討した結果、これまでの研究で用いていた、UV 吸収を示す共通化合物ユニットへの官能基導入により、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御する、という戦略が利用可能であることが示唆され、疎水性および親水性分子についても適用できることが分かった。ただし、現状の HPLC 分析では移動相のグラジエントを適用した条件であるため、今後はアイソクラティックな移動相条件にて検討を行い、化合物構造のさらなる最適化を行う必要があると考えられた。

E. 文献

- 1) Scotter MJ, S. A. Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR, Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. Food Addit. Contam. 11, 301-315 (1994).
- 2) Doi I, Tsuji G, Kawakami K, Nakagawa O, Taniguchi Y, Sasaki S: The spermine-bisaryl conjugate as a potent inducer of B- to Z-DNA transition. Chem. Eur. J., 16, 11993-11999 (2010).
- 3) Lin Z, Chen HC, Sun S-S, Hsu C-P, Chow TJ: Bifunctional maleimide dyes as selective anion

sensors. Tetrahedron, 65, 5216-5221 (2009).

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. 2023 AOAC Japan Section Meeting (2023.7).

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

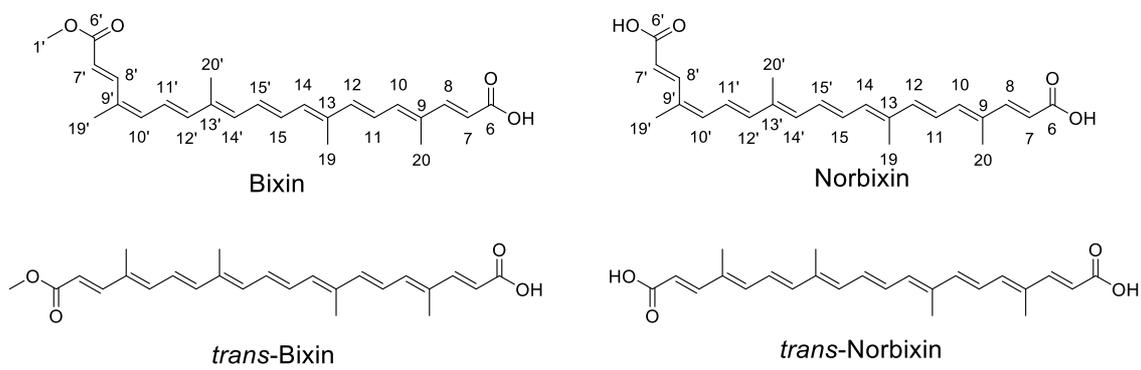
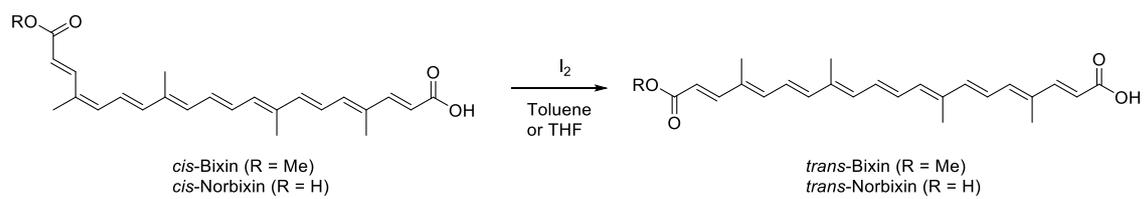


Fig. 1. Bixin, norbixin とその *trans* 異性体の化学構造



Scheme 1. Bixin および norbixin の異性化反応

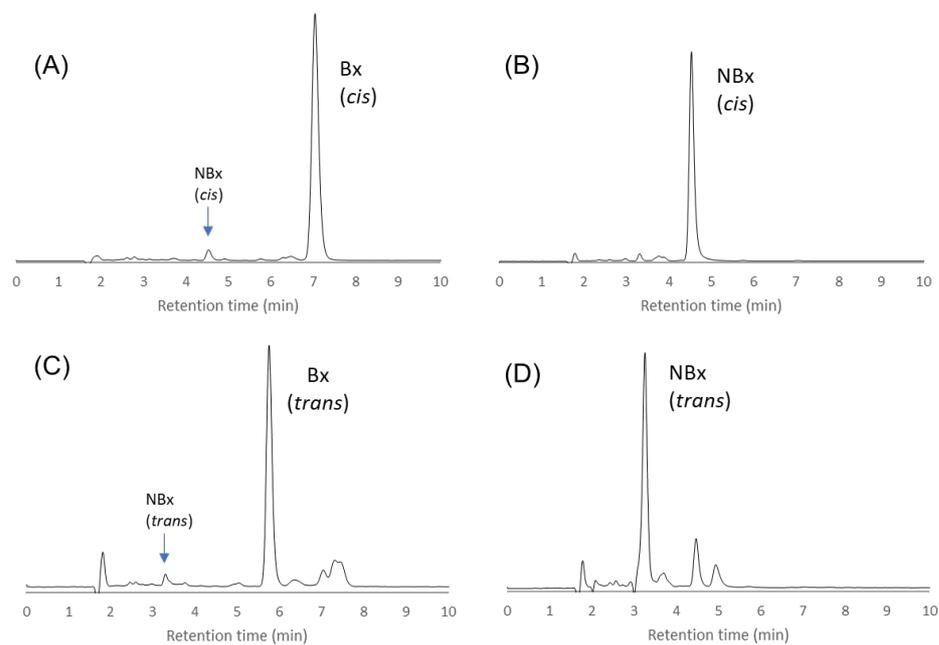
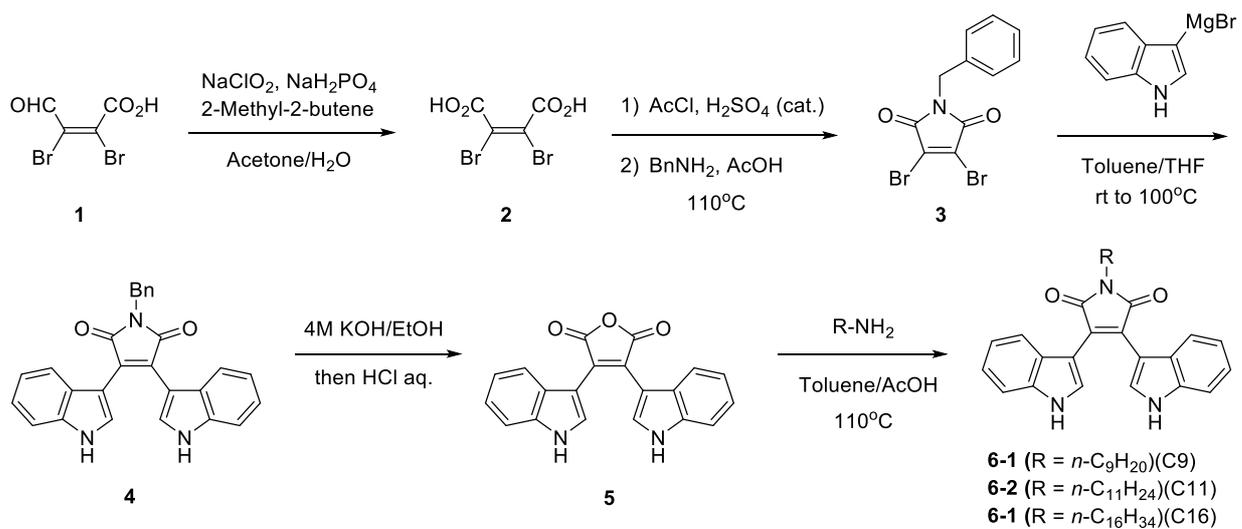


Fig. 2. ビキシシ (Bx)およびノルビキシシ (NBx)の異性化の HPLC 痕跡
 (A) *cis*-Bx 単独, (B) *cis*-NBx 単独, (C) Bx の異性化反応物, (D) NBx の異性化反応物



Scheme 2. ビスインドリルマレイミド誘導体 6 の合成

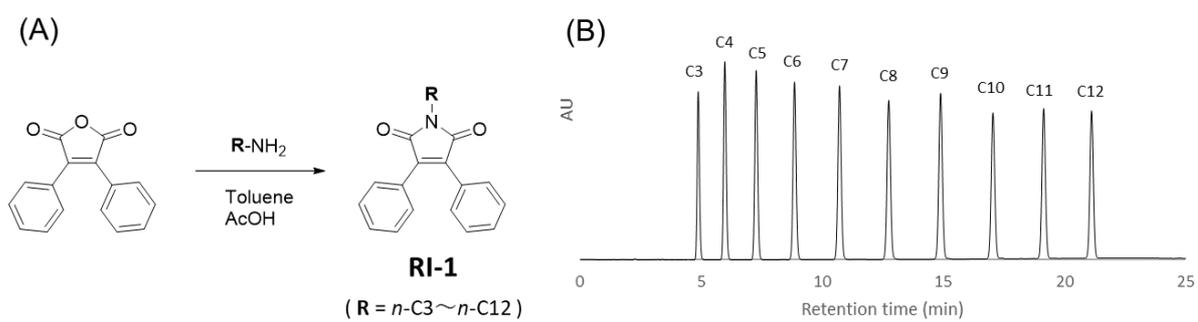


Fig. 3. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-1 (C3-C12 の混合物) の合成(A)とその HPLC 痕跡(B)

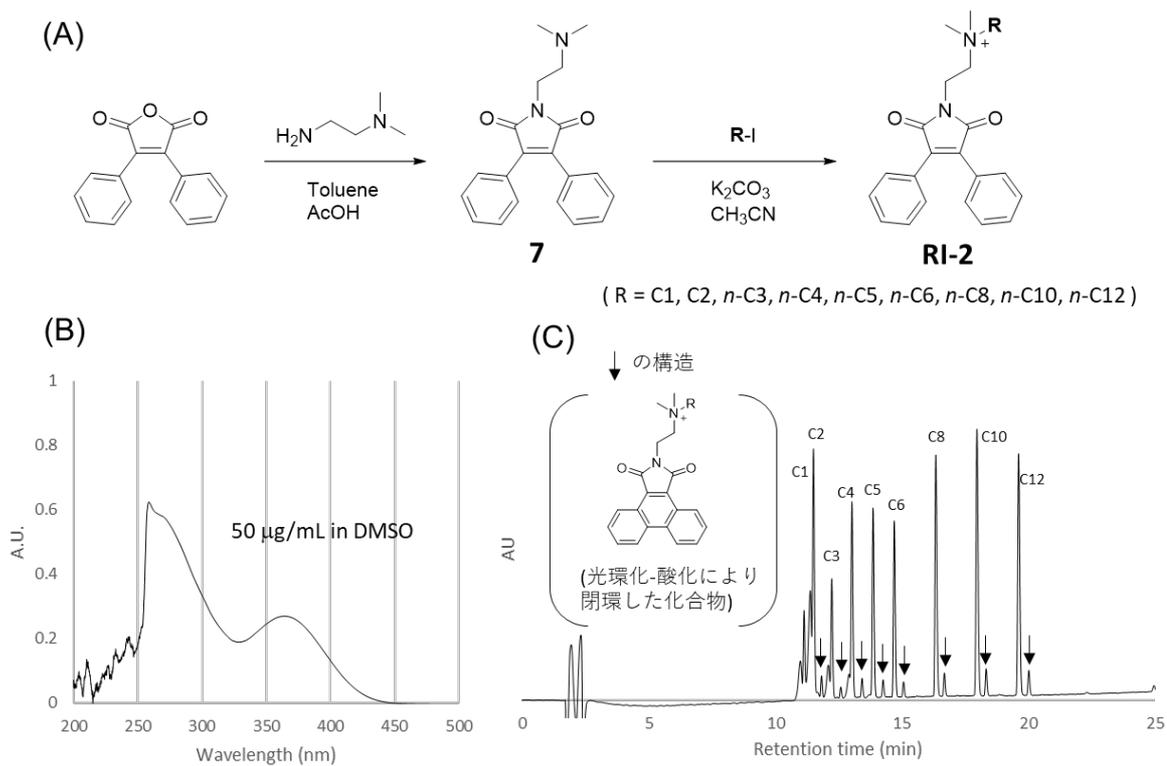


Fig. 4. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-2 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10 および C12 の混合物) の合成(A)とその吸収スペクトル(B)、HPLC 痕跡(C)

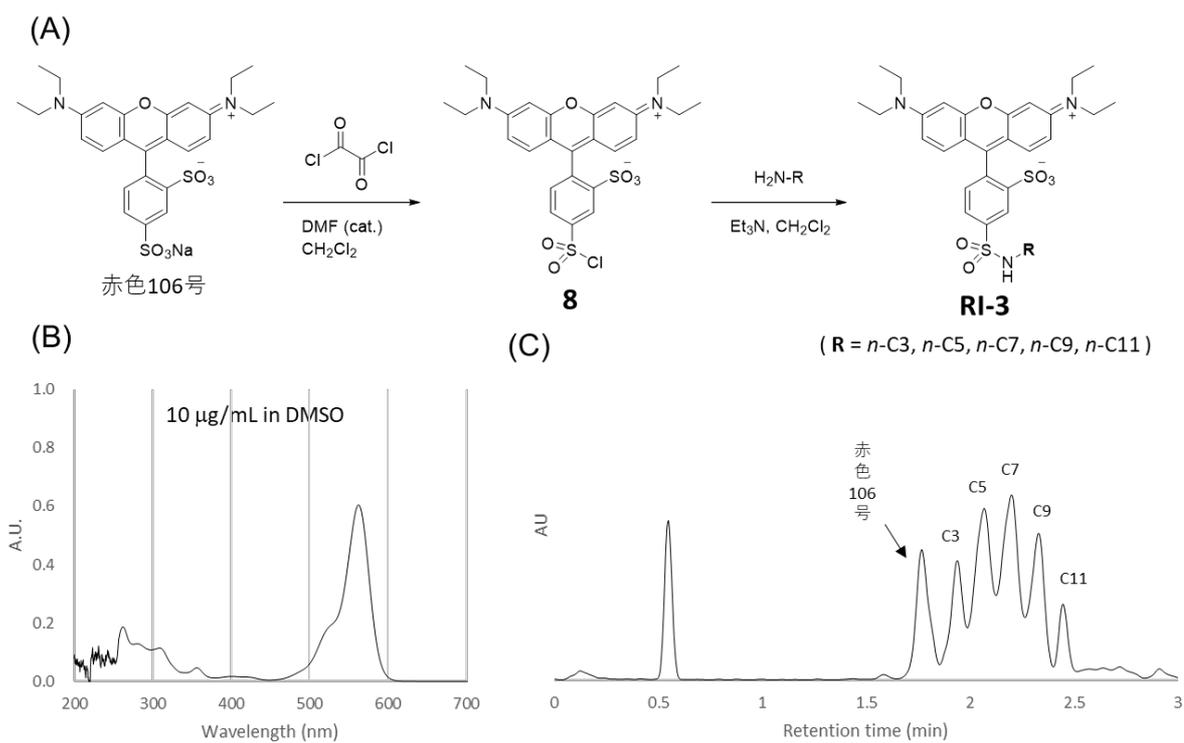


Fig. 5. 赤色 106 号誘導体 RI-3(C3, C5, C7, C9 および C11 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B)、HPLC 痕跡(C)

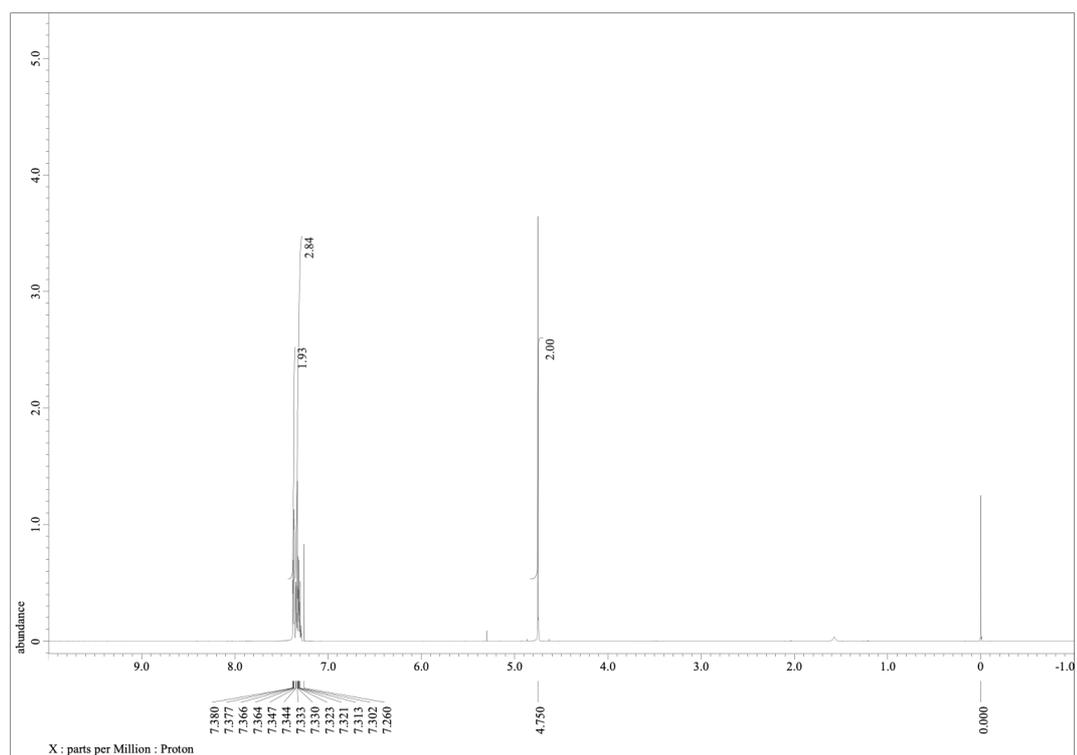


Fig. 6. 化合物4の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

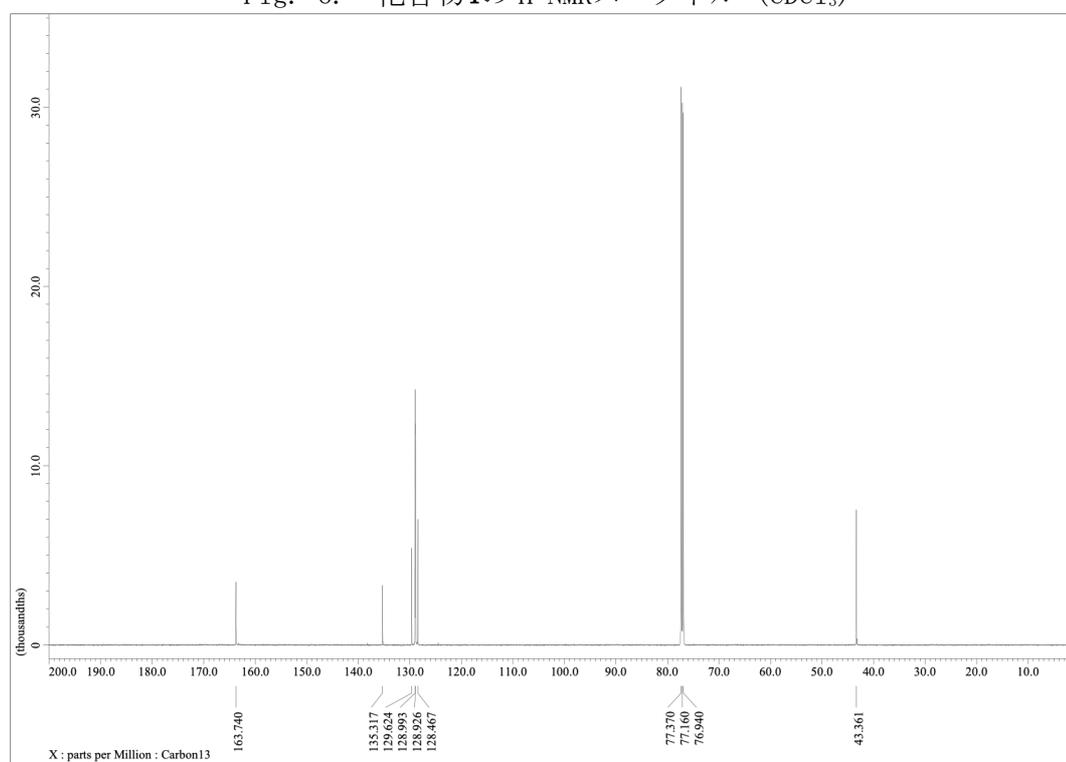


Fig. 7. 化合物4の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

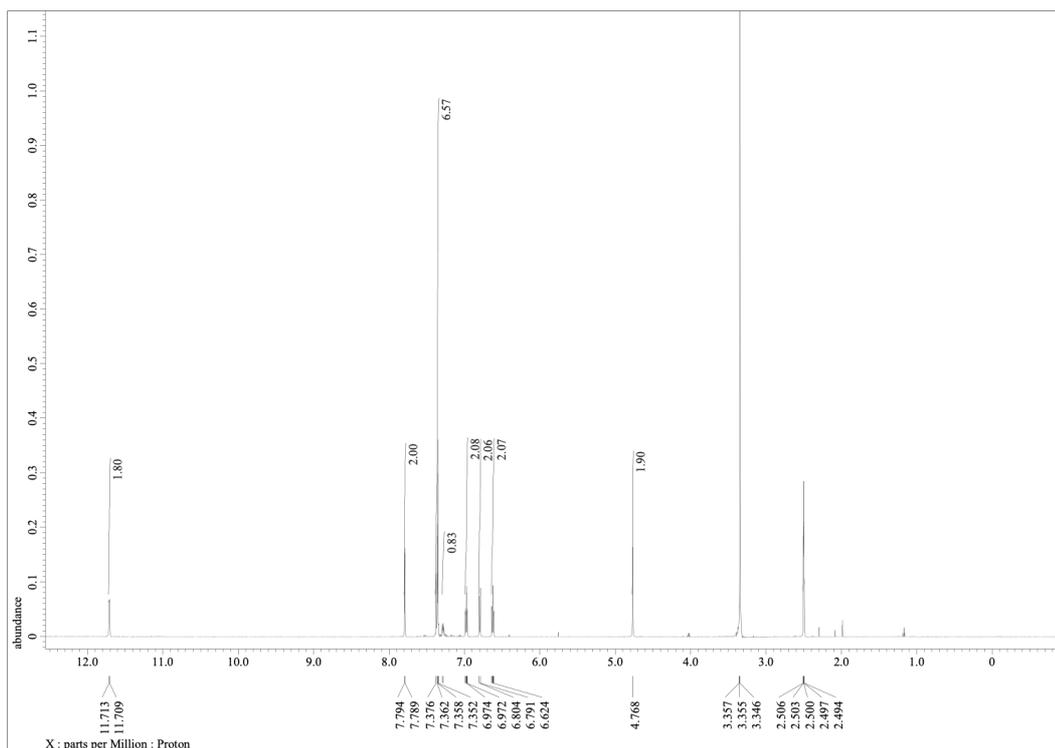


Fig. 8. 化合物5の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

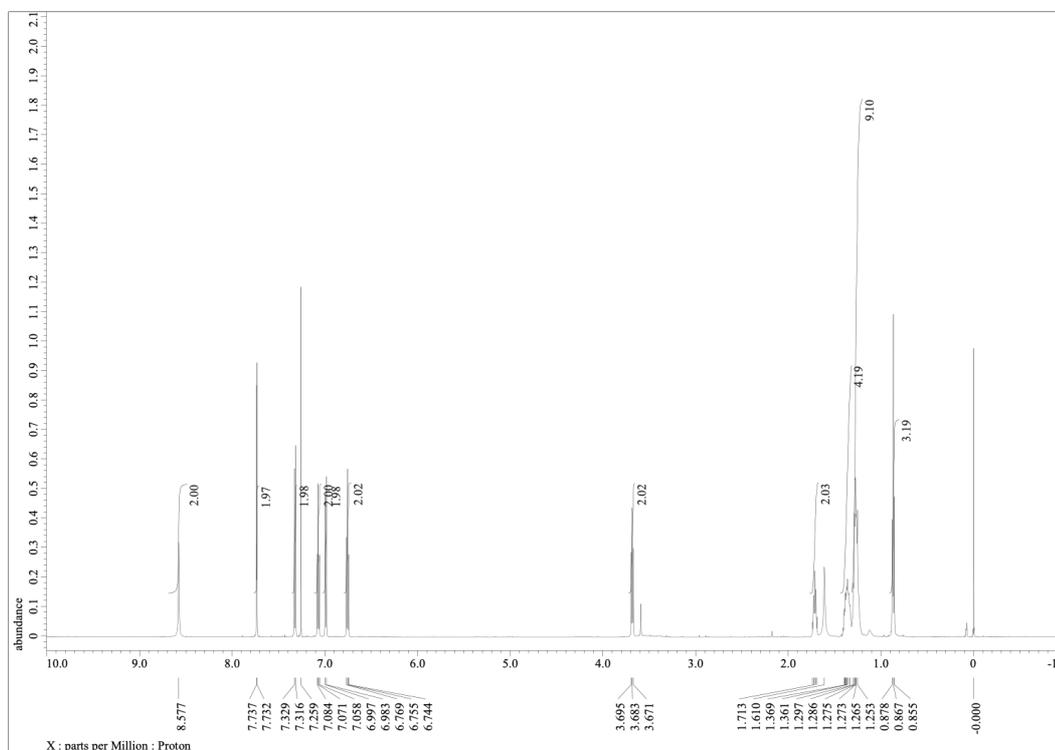


Fig. 9. 化合物6-1の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

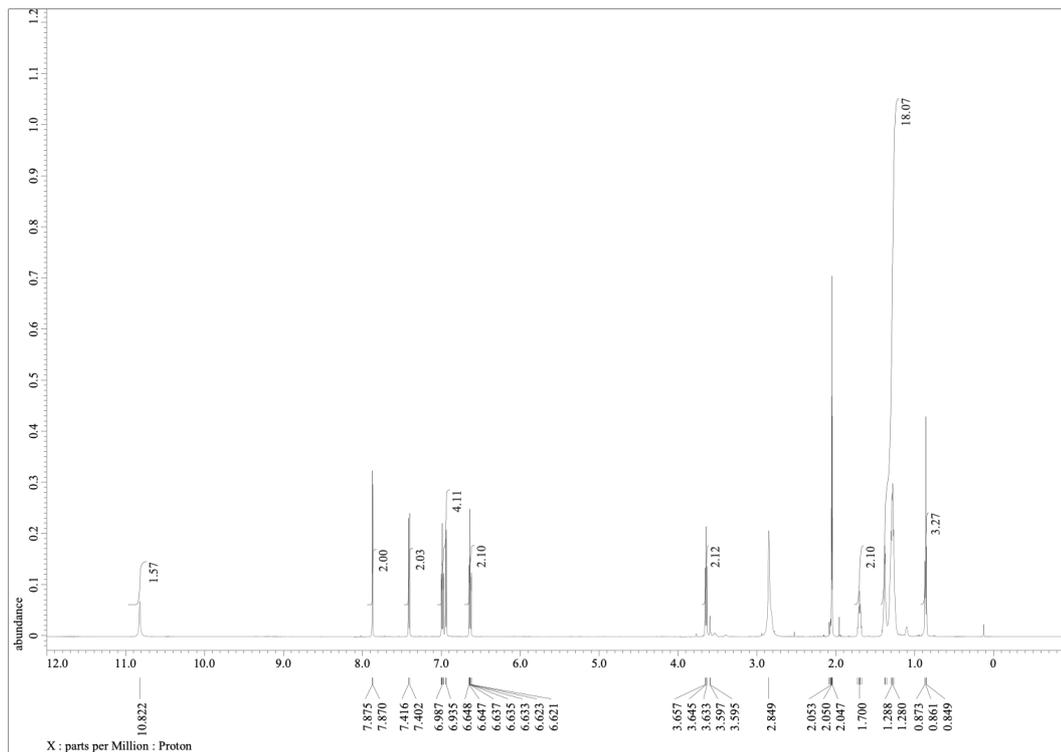


Fig. 10. 化合物6-2の¹H NMRスペクトル (Acetone-*d*₆)

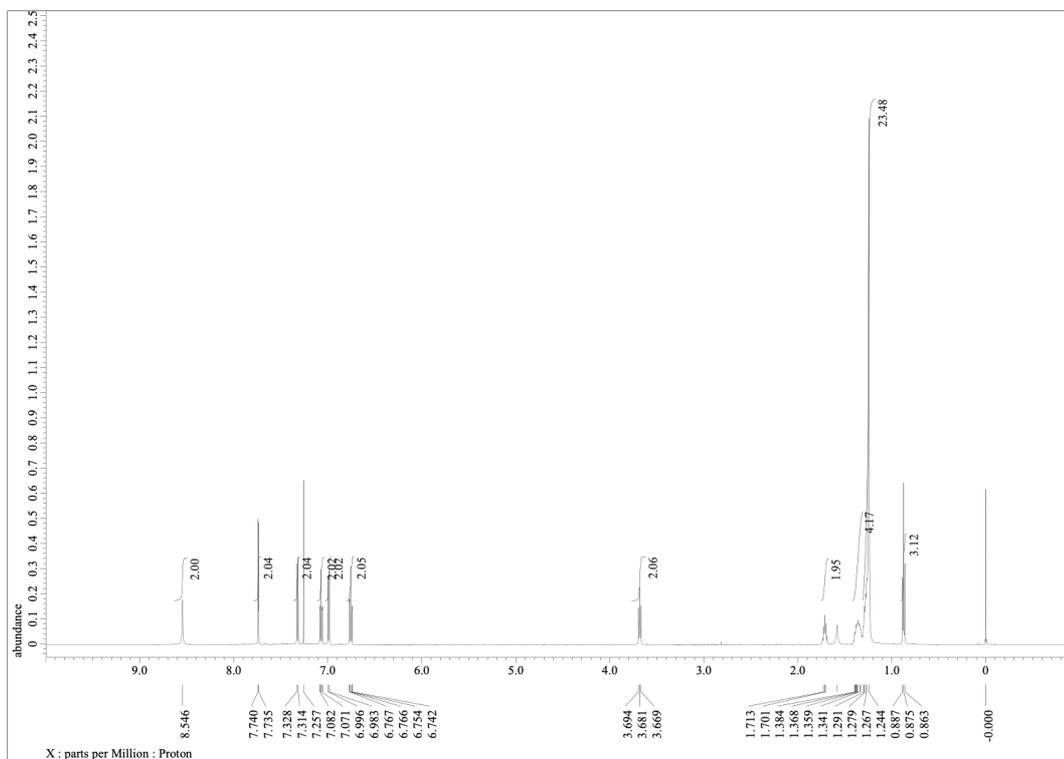


Fig. 11. 化合物6-3の¹H NMRスペクトル (CDCl₃)

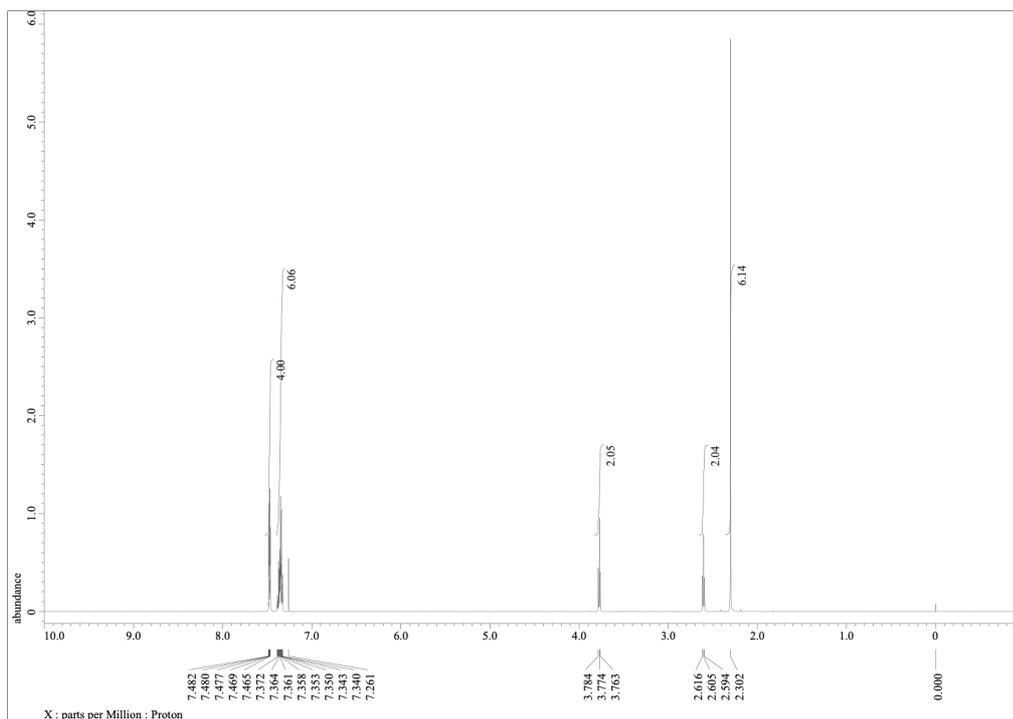


Fig. 12. 化合物7の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

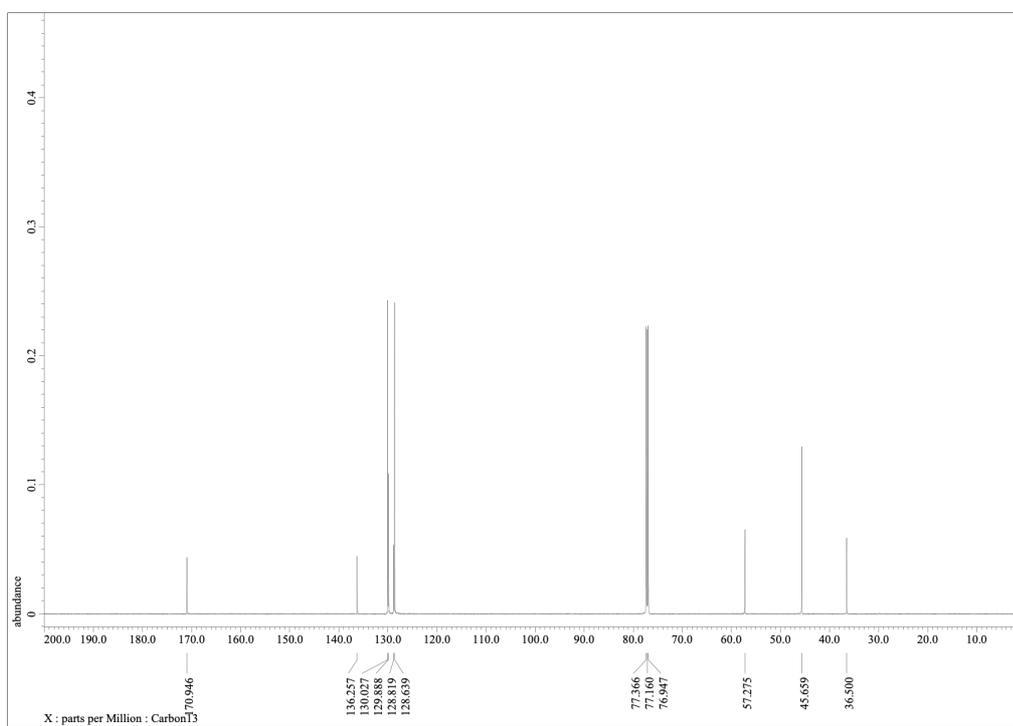


Fig. 13. 化合物7の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)