

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2～4年度総合分担報告書

試験法及び分析法の開発

～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 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が求められている。フォトダイオードアレイ（PDA）は広範囲の波長域における吸収を検出できるため、HPLCなどの分析機器の検出器として汎用されている。PDA検出器を用いた定量においては広範囲に吸収をもつ化合物を基準物質とした校正により利便性の向上が期待されるが、現状、PDA校正用として汎用的に使用されている化合物は無い。本研究では、PDA検出器の校正に利用可能な性質、すなわち広範囲における吸収や水溶性といった物理的性質を有する分子の探索を目的とした。具体的には、広波長範囲において吸収を有する分子の探索としてビスアリアルマレイミドやナフトキノンの誘導体合成と吸収スペクトルについて検討した。また、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簡便な設計・合成のための検討を行った。

研究協力者

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

A. 研究目的

食品添加物の試験では、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。フォトダイオードアレイ（PDA）は広範囲の波長域の吸収を一度に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。PDA検出器を利用したHPLCでの定量分析においては検出器の装置間校正が必要となる。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、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望ましい。しかしながら、現状、そのような化合物は設定されていない。

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について検討した。本研究における基本的な分子設計としては、異なる波長域に吸収を示すユニットや水溶性向上のためのビルディングブロックなどを複数連結させるという方針で機能化を目指した（Figure 1）。具体的には、①UV吸収を示す化合物の開発として、ビスアリアルマレイミド誘導体や1,4-ナフトキノンの効率的な合成法について検討した。また、②HPLC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の開発を目的とし、カロテノイド類を定量対象とした、ビスインドリルマレイミド誘導体の合成法について検討した。

B. 研究方法

B-1)ビスアリアルマレイミド誘導体の分子設計・合成経路

ビスアリアルマレイミド誘導体においては、マレイミド骨格に導入する芳香環の種類によって紫外可視吸収（UV-Vis）スペクトルが変化する。複数種類の芳香環を導入した誘導体を効

率的に合成するために、Scheme 1 および 2 に示すような、共通中間体 **3** を経由した鈴木-宮浦クロスカップリング反応^{1,2)}によってアリールボロン酸を導入する合成計画を立てた。

B-2) ナフトキノン誘導体の分子設計・合成経路

本研究で検討したナフトキノン誘導体については、寺山らが報告している、比較的長波長域に UV 吸収を示す 1,4-ナフトキノン誘導体 **21**³⁾ を基にして誘導体化を実施した。具体的には、基となる **21** 中の 1)ジメチルアミノ基を種々変更したタイプの化合物、また、2)クロロ基を別の官能基に変更したタイプの化合物を設計した。Scheme 3~7 にそれぞれの合成経路を示している。

C. 結果及び考察

C-1) ビスアリールマレイミド誘導体の合成 (各化合物データは R2 報告書に記載)

本研究においては効率的に多種類の誘導体を合成するため、共通の中間体を利用し、一つのカップリング反応の系中に複数種類のアリールボロン酸を共存させて反応を行った (Scheme 1, 2)。この手法により、生成した誘導体を分離することで、多種類の化合物を同時に得ることが可能となった (Figure 2, 3)。

化合物 **3** の合成

ムコブROM酸 (**1**) (4.64 g, 18.0 mmol) と 2-メチル-2-ブテン (9.5 mL, 90.0 mmol) のアセトン溶液 (73 mL) に亜塩素酸ナトリウム (80%) (3.9 g, 60.0 mol) のりん酸二水素ナトリウム (13.5 g, 72.0 mol) 水溶液 (73 mL) を 0°C にて滴下した。反応液を室温にて 3 時間攪拌した後、0°C にて 10%塩酸 (73 mL) を加えてジエチルエーテルで抽出した (150 mL x 4)。合わせた有機層を水、次いで飽和食塩水で洗浄後、溶液硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた粗生成物 **2** (6.2 g) はこれ以上精製せずに次の反応に用いた。

化合物 **2** (3.5 g, as 9 mmol) に塩化アセチル (6.8 mL, 90 mmol)、次いで硫酸をパスツールピペットで一滴加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、

反応液を減圧濃縮した後、残渣に対してトルエンで共沸を行った (10 mL x 2)。得られた粗生成物はこれ以上精製せずに次の反応に用いた。上記の粗生成物を酢酸 (18 mL) に溶解させ、ベンジルアミン (1.18 mL, 10.8 mmol) を加えた後、110°C にて 3 時間攪拌した。反応液を室温に冷却後、減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルに溶解させ、水で洗浄した。有機層を 2M 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、溶液硫酸ナトリウムで乾燥、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 1 : 3) することで、化合物 **3** を無色固体 (1.44 g, 46%) の収率で得た。

化合物 **4** の合成

化合物 **3** (137 mg, 0.40 mmol)、4-メトキシフェニルボロン酸 (182 mg, 1.2 mmol)、ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (58 mg, 0.10 mmol)、フッ化セシウム (365 mg, 2.4 mmol) の 1,4-ジオキサン (4 mL) /水 (1 mL) 溶液を 110°C にて 12 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、溶液硫酸ナトリウムで乾燥、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 **4** を 79% (126 mg) の収率で得た。

化合物 **5** の合成

化合物 **3** (345 mg, 1.0 mmol)、2-ナフタレンボロン酸 (413 mg, 2.4 mmol)、ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (35 mg, 0.05 mmol)、フッ化セシウム (810 mg, 4.8 mmol)、テトラブチルアンモニウムクロリド (28 mg, 0.1 mmol) のトルエン (6.7 mL) /水 (3.3 mL) 溶液を 80°C にて 12 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水で洗浄した。有機層を 2M 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、溶液硫酸ナトリウムで乾燥、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 = 10:0 to 8:2）することで、化合物 **5** を 97% (0.43 g) の収率で得た。

化合物 **6** の合成

化合物 **4** (63 mg, 0.16 mmol) のエタノール溶液 (1.5 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (1 mL) を加え、60°C にて 2 時間攪拌した。0°C に冷却後、反応液に 10% 塩酸を加えて酸性とした (pH ~2)。生じた沈殿をろ取して、水で洗浄、真空乾燥することで **6** を黄色固体 (45 mg) として得た。

化合物 **7** の合成

化合物 **5** (320 mg, 0.7 mmol) のエタノール溶液 (7.5 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (5 mL) を加え、60°C にて 5 時間攪拌した。0°C に冷却後、反応液に 10% 塩酸を加えて酸性とした (pH ~2)。生じた沈殿をろ取して、水で洗浄、真空乾燥することで **7** を淡黄色固体 (250 mg) として得た。

化合物 **10** の合成

4-ブロモアニリン (**8**) (1.72 g, 10.0 mmol) の 1M 塩酸溶液 (20 mL) に 0°C にて、亜硝酸ナトリウム (0.73 g, 10.5 mol) の水溶液 (2 mL) を 0°C にて滴下した。反応液をそのままの温度で 15 分間攪拌した後、*N,N*-ジメチルアニリン (1.33 g, 11.0 mmol)、次いで酢酸ナトリウム (1.33 g, 11.0 mmol) の水溶液 (10 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。反応液を室温にて 3 時間攪拌した後、水 (20 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。生じた沈殿をろ取して水 (50 mL)、次いでメタノール (5 mL) で洗浄し真空乾燥することで化合物 **9** を橙色粉末として得た (2.58 g, 85%)。

化合物 **9** (1.22 g, 4.0 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (40 mL) にビス(ピナコラート)ジボロン (1.42 g, 5.6 mmol)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィン)フェロセン]ジクロロパラジウム (II) -ジクロロメタン複合体 (0.33 g, 0.4 mmol)、酢酸カリウム (0.86 g, 8.8 mmol) を加えた後、90°C にて 14 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、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 (Φ = 8.5 cm, h = 3 cm, ヘキサン：酢酸エチル = 9:1 to 4:1) することで、化合物 **10** を 89% (1.23 g) の収率で得た。

C-2) ビスアリールマレイミド誘導体の一斉合成 (各化合物データは R3 報告書に記載)

化合物 **15-20** の合成

化合物 **3** (173 mg, 0.5 mmol)、フェニルボロン酸 (46 mg, 0.4 mmol)、6-メトキシナフチル-2-ボロン酸 (81 mg, 0.4 mmol)、化合物 **10** (140 mg, 0.4 mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (II) ジクロリド (18 mg, 0.025 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (0) (29 mg, 0.025 mmol)、フッ化セシウム (90%, 405 mg, 2.4 mmol) の 1,4-ジオキサン (4.5 mL) /水 (0.5 mL) 溶液を 100°C にて 15 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、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。得られた残渣のエタノール溶液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加え、40°C にて 4 時間攪拌した。0°C に冷却後、反応液に 10% 塩酸を加えて酸性とした (pH ~2)。生じた沈殿をろ取して、水で洗浄、真空乾燥することで暗紫色粉末 (300 mg) を得た。この化合物 (150 mg, as 0.25 mmol) と化合物 **13** (73 mg, 0.25 mmol) のトルエン (1.9 mL) /DMF (0.1 mL) 溶液 (1.9 mL) を 100°C にて 12 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、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で乾燥、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 (ヘキサン：酢酸エチル = 9:1 to 0:1) に付すことで、化合物 **14** を得た。この化合物 (70 mg, as 0.125 mmol) を 4M 塩酸-ジオキサン溶液 (2 mL) /メタノール (0.5 mL) に溶解させ、室温にて 12 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取 HPLC にて精製し、化合物 **15-20** を得た。

C-3) ナフトキノン誘導体の合成 (各化合物データは R4 報告書に記載)

ジメチルアミノ基を種々変更したタイプのナフトキノン誘導体は、共通の合成前駆体である2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**)に対して、アミンもしくはフェノール化合物を反応させることで合成した。また、クロロ基を変更したタイプのナフトキノン誘導体は、基本的にはクロロ基をそれぞれの置換基に置き換えた前駆体に対して *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミンを反応させることで調製することができた。

C-3-1) ジメチルアミノ基置換体の合成

化合物 **21** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (227 mg, 1.0 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (7 mL) に室温にて、*N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (143 mg, 1.05 mol) のテトラヒドロフラン溶液 (3 mL)、続いて炭酸ナトリウム (223 mg, 2.10 mmol) を加えた。反応液を18時間攪拌した後、減圧濃縮して大部分のテトラヒドロフランを除去し、酢酸エチル (40 mL) で希釈して水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、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 2 : 8) することで、化合物 **21** を黒色粉末として得た (190 mg, 58%)。

化合物 **22** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、アニリンを使用し、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 4 : 6) することで、化合物 **22** を淡赤色粉末として得た (収率 16%)。

化合物 **23** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、4-ニトロアニリンを使用し、得られた残渣をジクロロメタンで洗浄することで、化合物 **23** を赤茶色固体として得た (収率 43%)。

化合物 **24** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、*p*-アニシジンを使用し、水相中に生じた沈殿物を水、次いでジエ

チルエーテルで洗浄、真空乾燥することで化合物 **23** を暗褐色固体として得た (収率 76%)。

化合物 **25** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、*p*-メトキシフェノールを使用し、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 4 : 6) することで化合物 **25** を暗褐色固体として得た (収率 86%)。

化合物 **26** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、4-ジメチルアミノベンジルアミン二塩酸塩を使用し、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 **26** を暗褐色固体として得た (収率 49%)。

C-3-2) クロロ基置換体の合成

化合物 **27** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (1.14 g, 5.0 mmol) のメタノール懸濁液 (6.7 mL) に室温にて、亜硝酸ナトリウム (1.14 g, 16.5 mol) の水溶液 (8 mL) を滴下した。反応液を70°Cにて4時間、その後室温にて12時間攪拌した。反応液に水 (15 mL) を加え、生じた固体を濾取して水 (10 mL) で洗浄、真空乾燥した。一方、生じた水相を2M塩酸で酸性 (pH2) としてジエチルエーテル (30 mL) で抽出、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。それらを合わせて化合物 **33** を黄色固体として得た (1.01 g, 92%)。 **33** (440 mg, 2.0 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (20 mL) に、室温にて塩化オキサリル (343 μ L, 4.0 mmol)、次いで *N,N*-ジメチルホルムアミド (1 drop) を加えた。室温にて1時間攪拌後、反応液を0°Cに冷却した後、氷水 (10 mL) を加えて5分間攪拌することで反応を停止させた。反応液をジクロロメタン (20 mL) で抽出し、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮することで化合物 **34** を粗生成物として得た (淡黄色固体, 460 mg)。得られた化合物 **34** を用い、化合物 **1** と同様の方法にて反応させ、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 **27** を暗褐色固体として得た (収率 76% for 2 steps).

化合物 **28** の合成

1,4-ナフトキノン (**35**) (3.16 g, 20.0 mmol) の酢酸懸濁液 (30 mL) に室温にて、臭素 (6.39 g, 40.0 mol) の酢酸溶液 (20 mL) を加えた。反応液を 100°C にて 14 時間攪拌した後、0°C に冷却して氷水 (50 mL) を加えた。生じた沈殿物を濾取して水 (100 mL) で洗浄、真空乾燥することで化合物 **36** を黄褐色粉末として得た (5.94 g, 94%)。得られた化合物 **36** を用い、化合物 **21** と同様の方法にて反応させ、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 **28** を黒色固体として得た (収率 97%)。

化合物 **29** の合成

化合物 **28** (74 mg, 0.2 mmol)、フェニルボロン酸 (37 mg, 0.3 mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド (7 mg, 0.01 mmol)、炭酸セシウム (195 mg, 0.6 mmol) のトルエン (2.6 mL) / 水 (1.3 mL) 溶液を 100°C にて 15 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチル (26 mL) で希釈し、水、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。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 2 : 8) することで、化合物 **29** を濃紫色無定形固体として得た (29 mg, 39%)。

化合物 **30** の合成

化合物 **21** (227 mg, 1.0 mmol) のテトラヒドロフラン懸濁液 (2 mL) に室温にて、ナトリウムメトキシド (5M in MeOH, 0.8 mL, 4.0 mol) を加えた。反応液を 60°C にて 14 時間攪拌した後、室温に冷却して酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、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 1 : 2) することで、化合物 **30** を黒色粉末として得た

(76 mg, 26%)。

化合物 **31** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (1.14 g, 5.0 mmol) のメタノール懸濁液 (20 mL) に室温にて、ナトリウムメトキシド (5M in MeOH, 6 mL, 30.0 mol) を滴下した。反応液を 60°C で 5 時間攪拌した後、室温まで冷却後に減圧濃縮して大部分のテトラヒドロフランを除去した。得られた残渣を 0°C に冷却後、氷水 (20 mL) を加え、生じた沈殿物を濾取して水、次いで少量のメタノールで洗浄、真空乾燥することで化合物 **37** を黄金色粉末として得た (440 mg, 40%)。

化合物 **37** (109 mg, 0.5 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1 mL) に室温にて、*N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (136 mg, 1.0 mmol)、炭酸ナトリウム (212 mg, 2.0 mmol) を加えた。反応液を室温にて 7 日間攪拌した後、酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、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 2 : 8) することで、化合物 **31** を濃青色固体として得た (31 mg, 19%)。

C-4) シングルリファレンス候補化合物としてのビスインドリル誘導体の合成 (各化合物データは R4 報告書に記載)

化合物 **33** の合成⁴⁾

インドール (1.03 g, 8.8 mmol) のトルエン溶液 (14 mL) に、攪拌下、室温にてエチルマグネシウムブロミド (1M in THF, 8.8 mL, 8.8 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 **18** (690 mg, 2.0 mmol) のトルエン溶液 (14 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 (28 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル (56 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 **33** を赤色固体として得た (600 mg, 72%).

C-5)ビスインドリル誘導体の一斉合成の例

本研究における検討の途上において、Figure 8 に示すようなビスインドリル化合物 **33** がビキシンなどのカロテノイド化合物と類似の吸収帯 (460 nm 付近) を示すことが確認されたため、この分子を母骨格として選択した。対応する酸無水物 **34** と反応させるアミンを 1:1 の割合で脱水-閉環させることでイミド化合物を調製できた。またこの際、異なる複数種類のアミンを一度に反応させることで、一度の合成で異なる炭化水素側鎖を有する分子の混合物を得ることができた。これらの混合物は順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで全ての化合物を分離することは困難であった一方で、逆相 HPLC においては、各化合物を良好に分離することが可能であり、この合成法を利用することで、HPLC 上における保持時間の異なる分子をスクリーニング的に調製することができることが分かった (Scheme 8)。

化合物 **35a** および **35b** の合成

化合物 **33** (417 mg, 1.0 mmol) のエタノール懸濁液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加えて、40°C にて 4 時間攪拌した。反応液を 0°C に冷却し、10%塩酸 (8 mL) を加えて液性を酸性 (pH1~2) とした後、ジクロロメタン (20 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、濾液を減圧濃縮することで化合物 **34** を赤色固体として得た (300 mg)。この化合物はこれ以上精製せずに次の反応に使用した。化合物 **34** (33 mg, 0.1 mmol) のトルエン (0.9 mL) /酢酸溶液 (0.1 mL) に、室温にて *n*-オクチルアミン (8.3 μ L, 0.05 mmol)、ノニルアミン (9.1 μ L, 0.05 mmol) を加え、反応液を 110°C にて 12 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、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。残渣を逆相 HPLC にて精製し、化合物 **35a** (7 mg, 32%) お

よび **35b** (6.5 mg, 29%) を赤色無定形固体としてそれぞれ得た。

C-6) ビスアリアルマレイミド誘導体の UV-Vis スペクトル

合成したビスアリアル酸無水物のジメチルスルホキシド中の紫外可視吸光スペクトルを取得したところ、化合物に導入した芳香環、および芳香環上の置換基によってスペクトルが異なることが分かった。ナフチル基が導入されて共役系が拡大された化合物 **6** は、より長波長域に吸収を示すことを期待したが長波長化は確認されなかった (Figure 4B)。この結果から、ビスアリアル化合物は、芳香環の共役系を単純に拡大するのみでは吸収スペクトルの長波長化は困難であることが示唆された。一方、電子供与基であるメトキシ基を有する化合物 **7** においては吸収の強度は弱いものの、スペクトルにおける吸収の長波長化が確認された (Figure 4C)。このことから、今回合成したビスアリアル化合物は芳香環上への適切な置換基の導入によって吸収波長域を調節できることが予想された。この知見を基に他の官能基を有する芳香環が導入された誘導体についても合成を行い、そのスペクトルを確認した。その結果、Figure 5 に示すような 4-ジメチルアミノアゾベンゼンを有する誘導体 **18-20** においては 550 nm 付近まで吸収帯が延長していることが分かった。このことからビスアリアルマレイミド誘導体においては電子供与基を芳香環に導入することで吸収波長の長波長化が可能であることが分かった。

C-7) 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル

合成したナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (ジメチルスルホキシド中) を取得したところ、化合物に導入した芳香環上の置換基によりスペクトルが変化することが分かった。化合物 **21** においては、UV-Vis スペクトルにおいて 564 nm 付近に長波長側のピークトップがあることが確認された (Figure 6)。化合物 **21** の 4-ジメチルアミノ基を置換した **22** や **23** において

は、長波長域のピークトップがそれぞれ短波長側へとシフトすることが分かった。ジメチルアミノ基とは異なる電子供与基であるメトキシ基を有する **25** においても、**21** よりも短波長側にピークトップを示すことが確認された。また、アニリンではなくフェノール分子が導入された **25** や、ジメチルアニリンとナフトキノン骨格との間の共役系が途切れた構造の **26** との吸収スペクトルとの比較からも、長波長域における吸収にはジメチルアニリンとナフトキノンの直接の連結構造が重要であることが分かった。また、化合物 **21** のクロロ基を置換したタイプの誘導体においても一定の置換基効果が現れていることが確認された (Figure 7)。そのため、置換基のさらなる検討によってさらなるスペクトルの長波長化や機能化が可能であると予想される。

C-8) シングルリファレンス候補化合物の HPLC 上における分離

合成したビスインドリル誘導体を逆相 HPLC で分析したところ、導入した炭化水素鎖の長さに応じた順序にて溶出しており、クロマトグラム上でそれぞれを良好に分離することが可能であった。Figure 9 には、**33** と C8~C12 までの直鎖炭化水素側鎖を有する第一級アミンを反応させたビスインドリル誘導体 (**35a**–**35e**) の混合物の HPLC による一斉分析の結果を示している。この結果からも、本研究における合成法によって多種の化合物を一度に得ることが可能であり、定量の対象となる分子と異なる保持時間に溶出される分子を簡便に確認および取得できると考えられる。

D. 結論

本研究で開発する分子は PDA の装置間校正に利用可能な化合物であるが、相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity; RMS) 法による HPLC を用いた定量法などにも利用できる。RMS を用いた定量法に利用するためには、高純度、安定供給可能である他、①測定対象と物理的な特性 (極性、極大吸収波長) が類似していること、②HPLC クロマトグラム上で試料中の

夾雑物や測定対象の化合物と分離すること、等が要件となる。本研究で開発を検討する化合物においては導入する官能基やビルディングブロックの変更によって物理的特性の調整が可能であるため、①および②の条件を満たすことが可能であると考えられる。

本研究では、HPLC を用いた定量分析法において、PDA 検出器の装置間での校正に利用可能な化合物の開発を目的として検討を行った。広範囲に吸収を示す化合物として、誘導体化の容易さやスペクトルの長波長化の観点からビスアリアルマレイミド誘導体や 1,4-ナフトキノン誘導体を選択した。これら分子においては、共通の中間体に対して、それぞれ種々の芳香族化合物や様々なアミンやフェノール化合物を一段階で導入可能であるため、多種類の化合物を効率的に合成することができた。合成した誘導体の UV-Vis スペクトルを測定した結果、長波長域における吸収にはジメチルアミノ基の導入が有効であることが分かった。また、ビスアリアルマレイミド誘導体においてはイミドの側鎖として、1,4-ナフトキノン誘導体においてはクロロ基の置換によるポリエチレングリコール分子などの導入によって水溶性の向上などさらなる機能化を図ることもできる。

カロテノイド類の HPLC を用いた定量に利用可能なシングルリファレンス分子については、ビスインドリルマレイミド分子を母骨格として同時に複数種類の分子を合成し、それらを逆相 HPLC 上で分離することで、HPLC 上での保持時間の異なる他種類の化合物をスクリーニング的に得ることができた。今回検討した手法を発展させることで、化合物の母骨格と導入官能基の組み合わせによって、カロテノイド類以外の様々な分子についてもシングルリファレンス化合物を簡便に設計できると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Shorunova SV, Krayushkina MM, Stoyanovicha FM, Irie, M: A Convenient Synthesis of 3,4-Diaryl(hetaryl)-Substituted Maleimides and Maleic Anhydrides. *Russ. J. Org. Chem.*, 42, 1490-1497 (2006).

- 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) 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.*, 11, 5959-5968 (2020).
- 4) 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. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザインSR-HPLC法によるアナトー色素の定量評価の構築, 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11)(長崎).

2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

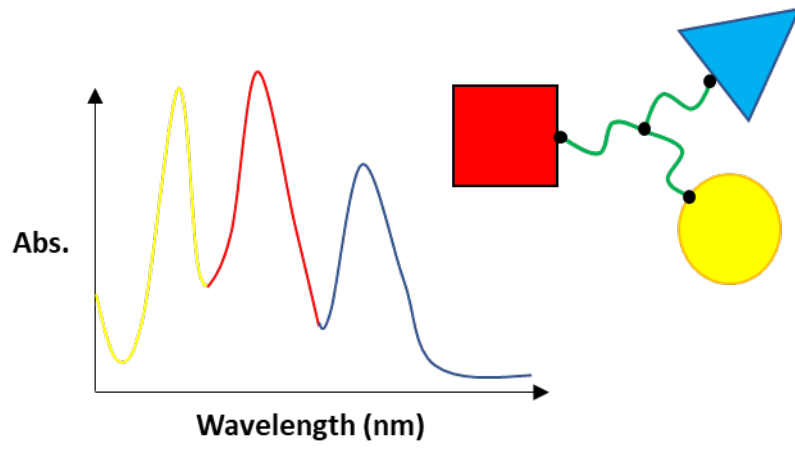
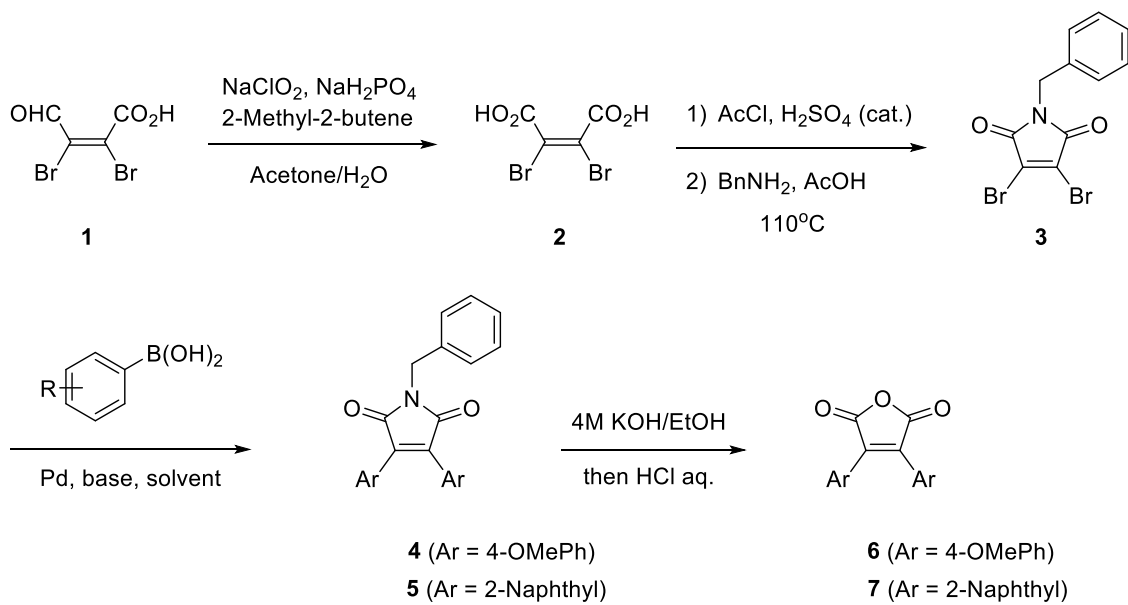
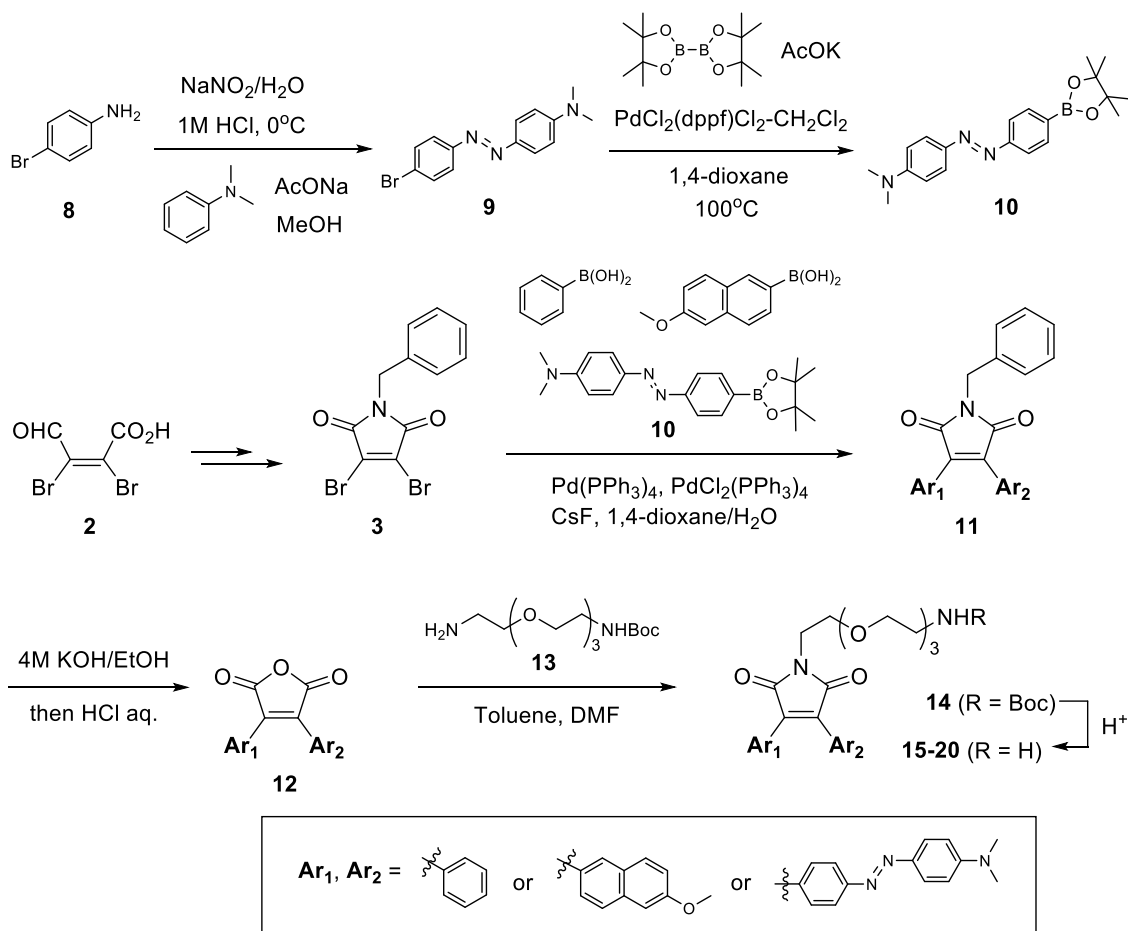


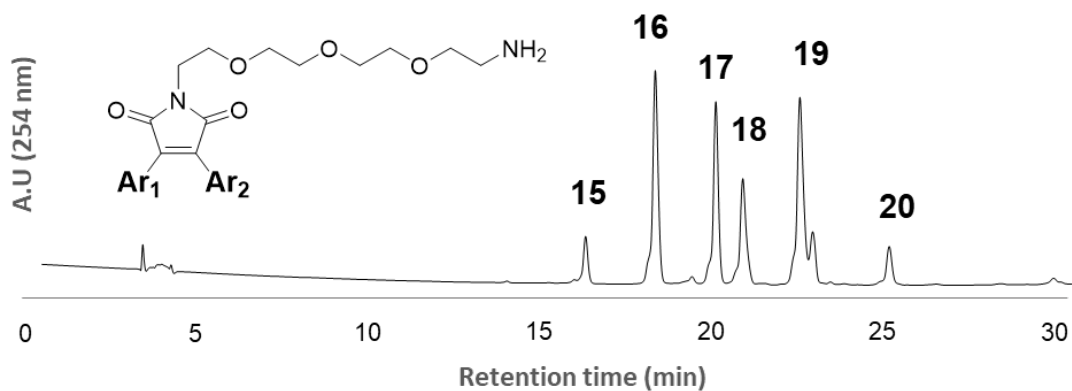
Fig. 1. 本研究における幅広い吸収波長を示す化合物の分子設計



Scheme 1. ビスアリアルマレイミド誘導体の合成



Scheme 2. 複数のアリアルボロン酸のカップリング反応によるビスアリアルマレイミド誘導体の合成



(HPLC conditions)

Column : CAPCEL PAK MG-II (C18, 4.6 I.Dx250 mm, 5 μm)(Osaka soda) flow rate : 1.0 mL/min, column temp. : 40 °C
 Mobile phase; A : 0.1% Formic acid in H₂O, B : 0.1% Formic acid in CH₃CN Gradient B% : 10-100% (30 min)

15 (Ar₁ = Ar₂ = Phenyl), **16** (Ar₁ = Phenyl, Ar₂ = 6-MeO-2-naphthyl), **17** (Ar₁ = Ar₂ = 6-MeO-2-naphthyl), **18** (Ar₁ = Phenyl, Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **19** (Ar₁ = 6-MeO-2-naphthyl, Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **20** (Ar₁ = Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl).

Fig. 2. 本研究の合成法で合成したビスアリアルマレイミド誘導体の HPLC 痕跡

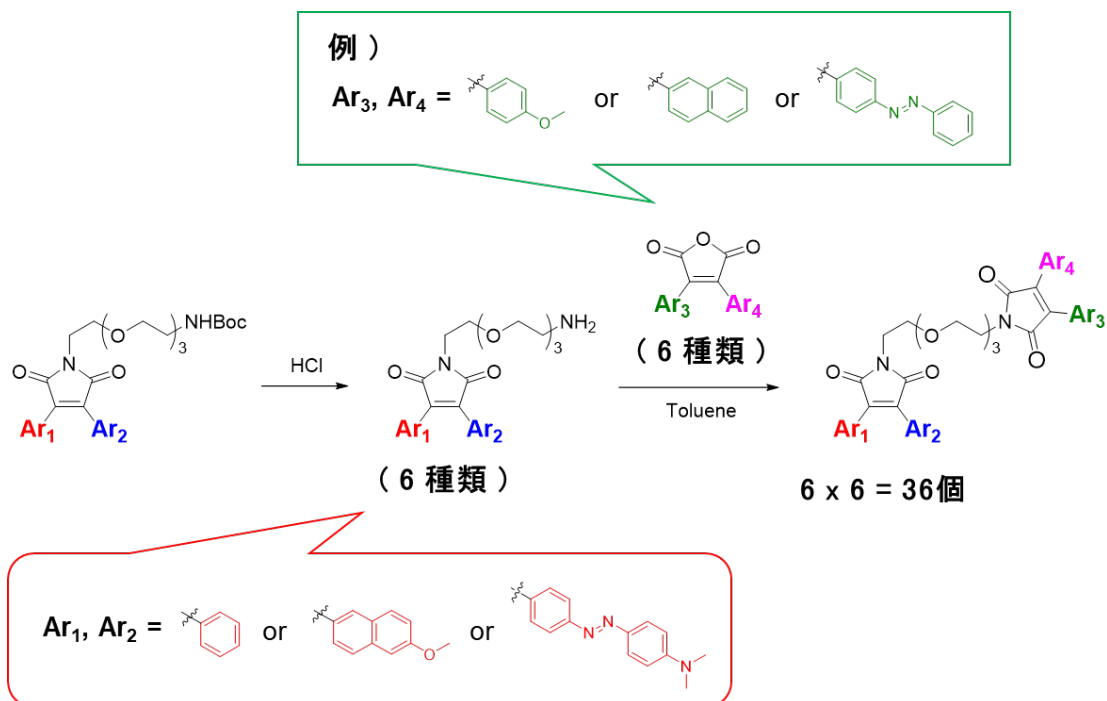


Fig. 3. 多種のビスアリアルマレイミド誘導体の同時合成

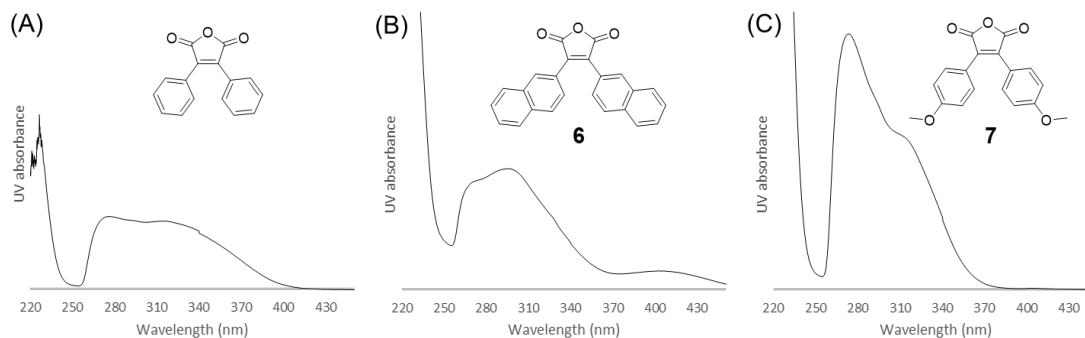


Fig. 4. ビスアリアルマレイン酸無水物の UV-Vis スペクトル(50 μ M in DMSO)

(A) Bisphenyl, (B) Bis(2-naphthyl), and (C) Bis(4-Methoxyphenyl).

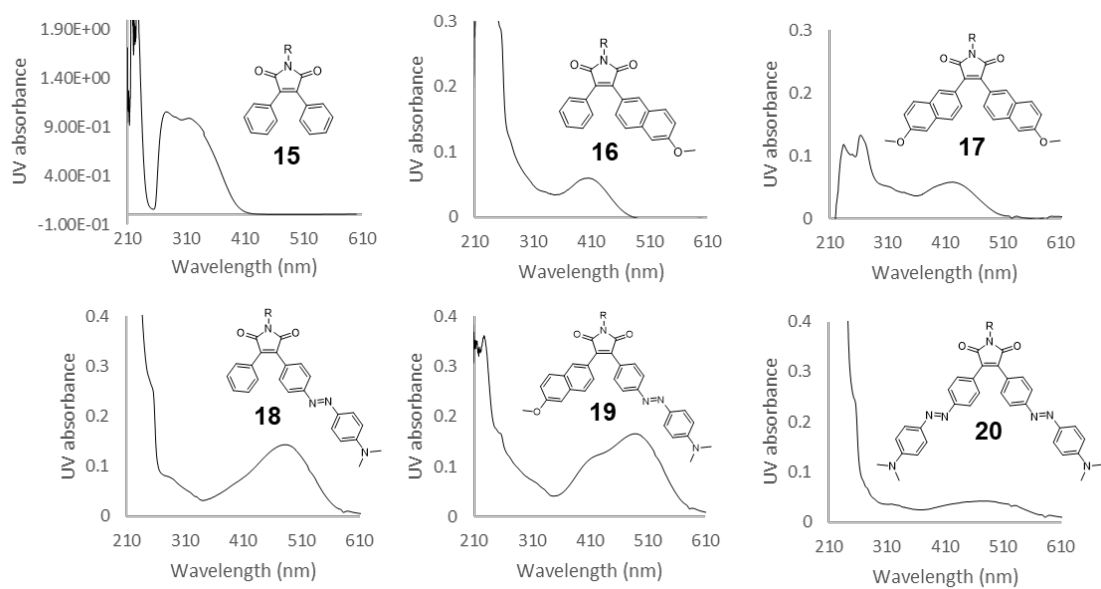
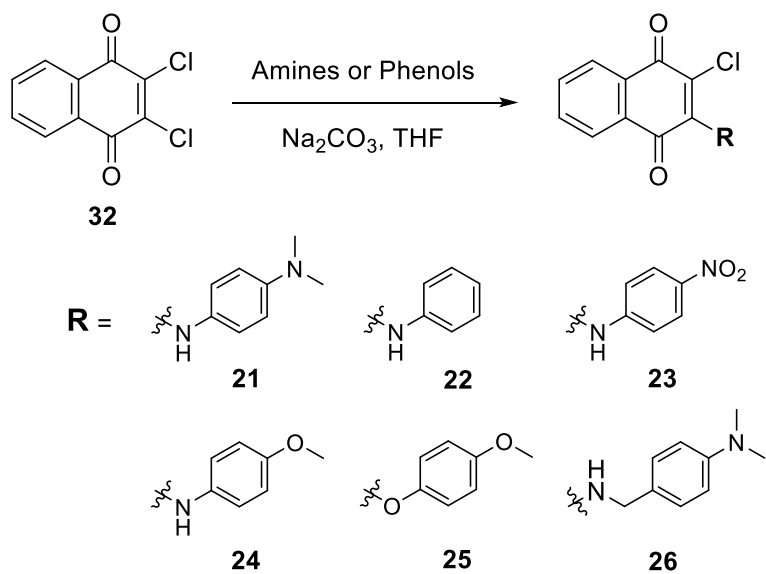
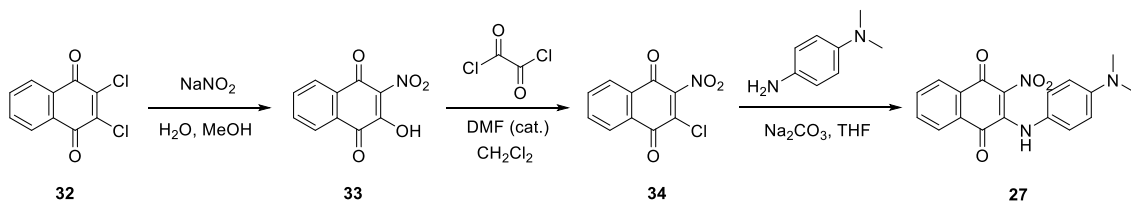


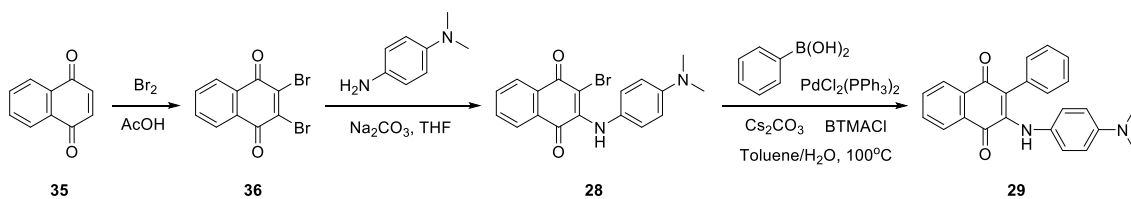
Fig. 5. ビスアリアルマレイミド誘導体 15-20 の UV-Vis 測定(DMSO 中)



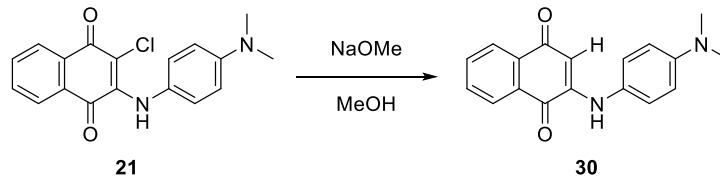
Scheme 3. *N,N*-ジメチルアミノ基を置換したナフトキノ誘導体 21-26 の合成



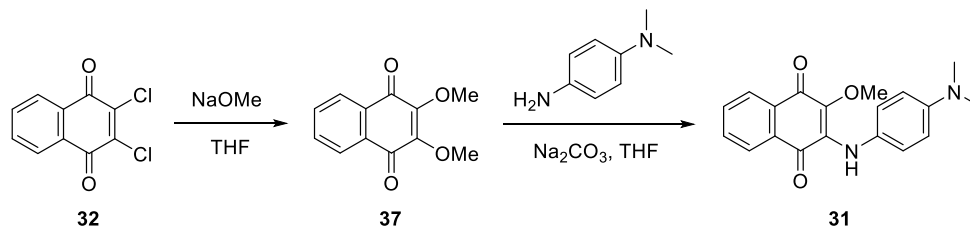
Scheme 4. ナフトキノ誘導体 27 の合成



Scheme 5. ナフトキノ誘導体 28 および 29 の合成



Scheme 6. ナフトキノ誘導体 **30** の合成



Scheme 7. ナフトキノ誘導体 **31** の合成

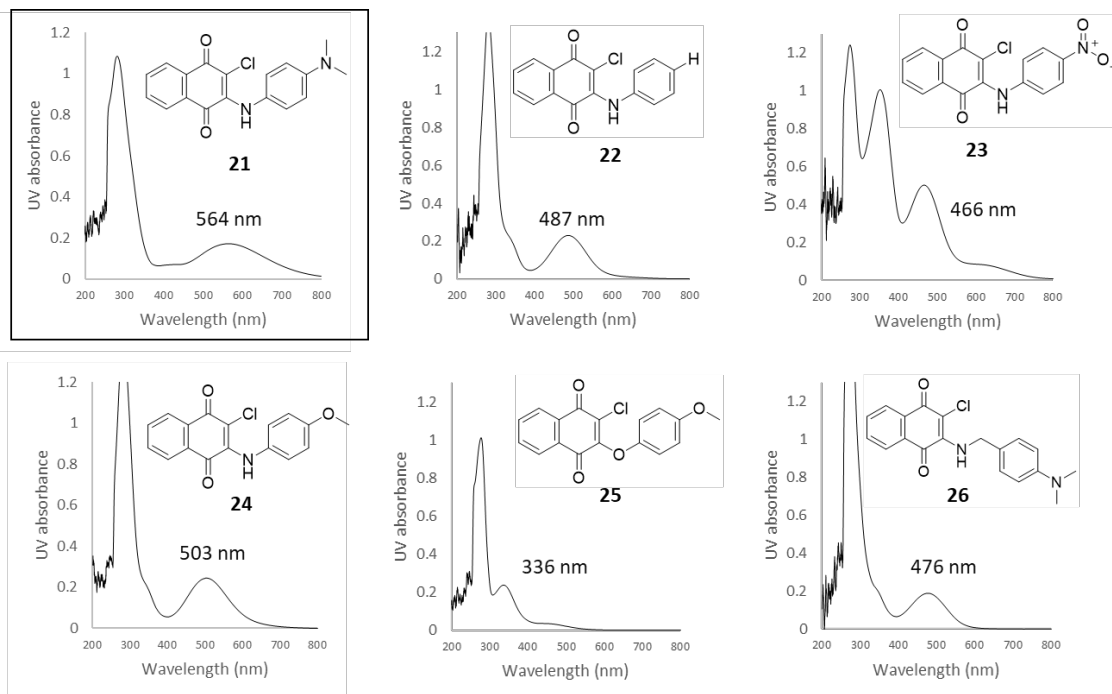


Fig. 6. ナフトキノ誘導体 **21-26** の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)

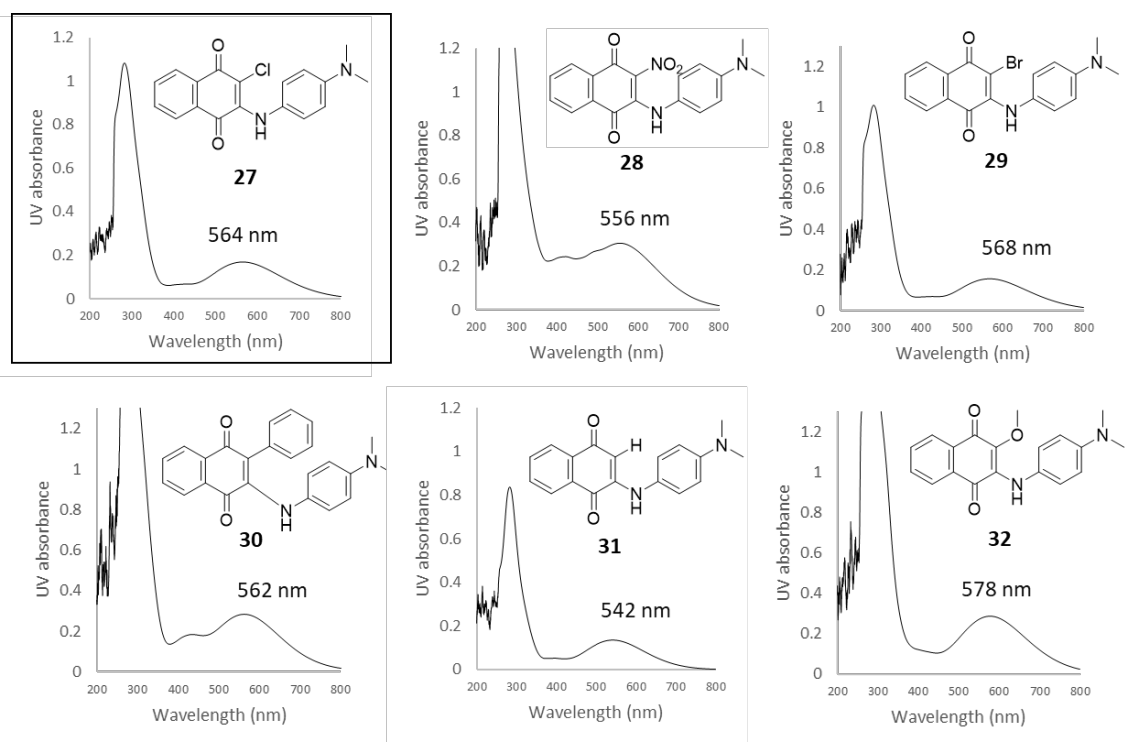


Fig. 7. ナフトキノン誘導体 27-32 の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)

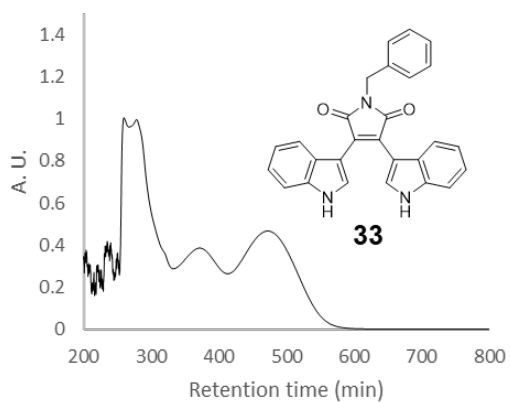
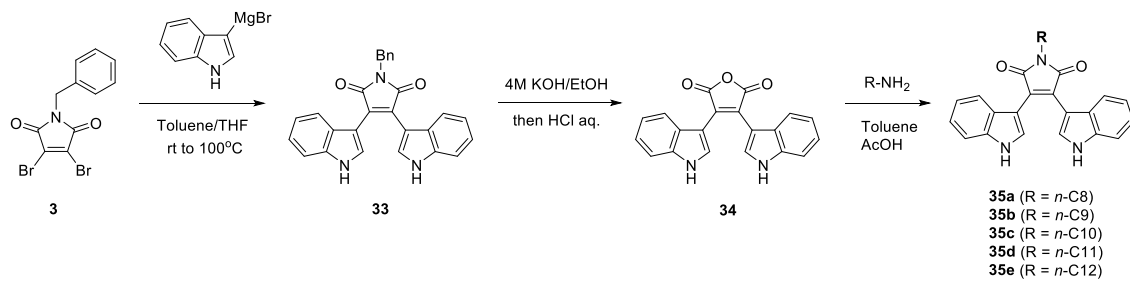


Fig. 8. ビスインドリルマレイミド誘導体 33 の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)



Scheme 8. ビスインドリルマレイミド誘導体 **35a-e** の合成

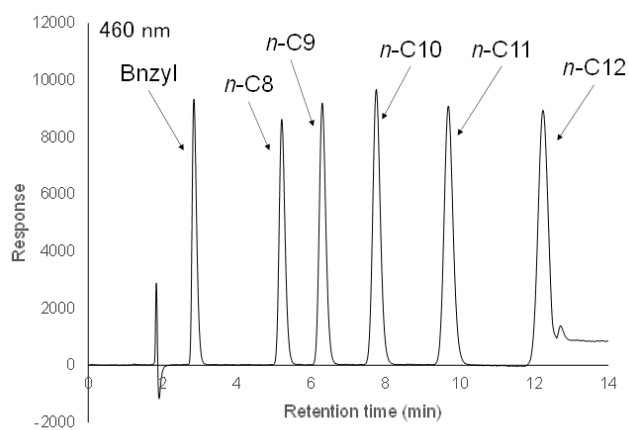


Fig. 9. ビスインドリルマレイミド誘導体 (**33** および **35a-e** の混合物) の HPLC 痕跡