

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4年度研究分担報告書

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 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。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が向上すると考えられるが、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。本年度は、広波長範囲において吸収を有する分子としてナフトキノ誘導体の合成と吸収スペクトルについて検討した。その結果、対象としたナフトキノ誘導体の長波長域の吸収における置換基の効果が確認された。また、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化合物の設計・合成を検討した。その結果、カロテノイド類に類似の吸収波長をもち、HPLC上における保持時間を調整可能な分子の設計が可能であることが分かった。

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

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。今年度は昨年度に引き続き、①UV吸収を示す化合物の開発として、ナフトキノ誘導体について検討した。また、②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の開発として、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) ナフトキノ誘導体の分子設計・合成経路

寺山らは既知化合物のライブラリに対して計算機科学を利用したUV吸収波長域の予測を行っており、その中で見出されたナフトキノ誘導体 **1** は比較的長波長域にUV吸収を示してい

る。¹⁾この分子を基にして、構造中の官能基について種々置換した分子を設計・合成し、それらの紫外可視吸光 (UV-Vis) スペクトルを取得することとした。ナフトキノン誘導体としては、基となる分子 **1** 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 1~5 にそれぞれの合成経路を示している。

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 (**12**) 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。以下、本研究において使用した市販試薬等の情報を示す。

B-2) 試料及び試薬

2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone : 東京化成工業, Cat. D0384, *N,N*-dimethyl-1,4-phenylenediamine : 東京化成工業, Cat. D0779, 4-nitroaniline : 東京化成工業, Cat. N0119, 1,4-naphthoquinone : 東京化成工業, Cat. N0040, 4-dimethylaminobenzylamine dihydrochloride : 東京化成工業, Cat. D1620, *n*-octylamine : 東京化成工業, Cat. O0045, nonylamine : 東京化成工業, Cat. N0297, aniline : FUJIFILM 和光純薬, Cat. 019-03996, *p*-anisidine : FUJIFILM 和光純薬, Cat. 017-05192, *p*-methoxyphenol : FUJIFILM 和光純薬, Cat. 084-01282, 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, 重アセトン (Acetone-*d*₆) : 関東化学, Cat. 01053-43, 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, 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-3) 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。HPLC のシステムには EXTREMA (日本分光) を使用した。HPLC 分取条件 ; カラム: COSMOSIL AR-II (C18, 20 I.D x 250 mm, 5 μm) (ナカライテスク), 流速: 10 mL/min, 移動相: A = water, B = CH₃OH, 移動相グラジエント (B%): 90 (isocratic), 検出波長: 254 nm. ¹H および ¹³C-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 (ppm) はテトラメチルシラン (TMS) (CDCl₃: 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 (CDCl₃: 77.0 for ¹³C-NMR; Acetone-*d*₆: 2.05 for ¹H-NMR, 29.84 for ¹³C-NMR, DMSO-*d*₆: 2.50 for ¹H-NMR, 39.52 for ¹³C-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), triplet of triplets (tt), multiplet (m), broad (br)).

B-3) 化合物の紫外可視吸光スペクトル

得られた化合物については UV スペクトルを取得して、吸収波長を確認した。それぞれの化合物はジメチルスルホキシド (分光分析用) に溶解させて 10 mM の溶液としたものをストック溶液とした。これを段階的に希釈することで 50 μM のジメチルスルホキシド溶液とした。スペクトルの測定には、V-730 (日本分光) を使用し、石英セル (1 x 1 cm) を用いて室温にて測定を行った。

B-4) ビスインドリル誘導体の HPLC 分析

化合物の混合物を試料として、下記の HPLC 条件にて分析を実施した。カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5 μ m) (東ソー)
流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 460 nm, 移動相; A: 0.1 vol% AcOH in H₂O, B: 0.1 vol% AcOH in MeOH, 移動相グラジエント (B%): 90% (isocratic)

C. 結果及び考察

C-1) 化合物の合成

本研究では、幅広い波長領域に吸収をもつ化合物の合成として、1,4-ナフトキノンを母骨格として有する化合物 **1** を基にした誘導体 **1-11** を合成した。**1** のジメチルアミノ基を置換したタイプの化合物については、2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノンを対してアミンもしくはフェノール化合物を導入することで合成した (Scheme 1)。この際、導入するアミンやフェノール類の求核性の違いによって、反応時間や収率に違いがあることがわかった。具体的には導入するアニリンやフェノールの芳香環上に電子供与基があれば反応が速く、電子供与基が無いものや電子吸引基を持つものでは反応が遅かった。また、**1** のクロロ基を置換したタイプの誘導体は、それぞれ対応する前駆体に対して *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合成した (Scheme 2~5)。基本的にはいずれの誘導体も同様の合成法で合成することができたが、誘導体 **11** においては、クロロ基からメトキシ基への置換反応によって調製を試みたものの目的の置換生成物を得ることができず、クロロ基が脱離して水素に置換された化合物 **10** が得られた (Scheme 4)。そのため、合成経路を変更し、中間体 **16** を経由した合成経路によって調製した (Scheme 5)。各化合物の NMR データを Figure 5~32 に示す。

ピキシンなどに代表される、カロテノイド類のシングルリファレンス物質としては、類似の波長域に吸収を有する化合物を選択することが望ましい。前年度までの検討から、Figure 3 に示すようなビスインドリル化合物 **19** がカロテノイド化合物と類似の吸収帯を示すことを確

認していたため、この分子を母骨格として選択した。ビスインドリルマレイミド化合物の合成では、既報²⁾に従ってジブロモマレアルデヒド酸を出発原料とし、化合物 **17** を調製した。化合物 **17** に対し、別途調製したインドールの Grignard 試薬を反応させることで 3-インドリル基が 2 つ導入された化合物 **18** を得た。化合物 **18** をアルカリ加水分解、続く酸処理により酸無水物 **19** へ変換することでアミン化合物との反応点をもつ中間体とした。反応させるアミン化合物としては様々な構造が利用可能であるが、本研究では HPLC 上での保持時間の調整のため、疎水性を変化させることを目的として、異なる長さの直鎖炭化水素鎖を有するアミンを選択した。中間体 **19** 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した。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る。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 6)。単離した化合物の NMR データを Figure 33~38 に示す。

C-1-1) ナフトキノンを誘導体の合成

C-1-1-1) ジメチルアミノ基置換体の合成

化合物 **1** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノンを (**12**) (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 **1** を黒色粉末として得た（190 mg, 58%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.17 (s, 1H), 8.02-8.00 (m, 2H), 7.85 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.77 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.8, 176.7, 148.6, 143.7, 135.4, 133.4, 132.8, 130.6, 128.1, 127.0, 126.5, 126.3, 112.0, 111.7, 40. (2C).

化合物 **2** の合成

化合物 **1** 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、淡赤色粉末として得た（収率 16%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.32 (s, 1H), 8.05-8.03 (m, 2H), 7.87 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.81 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.4, 7.2$ Hz, 2H), 7.14-7.13 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.2, 176.7, 143.2, 138.8, 134.8, 133.2, 132.0, 130.3, 127.9, 126.6, 126.1, 124.4, 124.0, 114.2.

化合物 **3** の合成

化合物 **3** 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、赤茶色固体として得た（収率 43%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.08-8.06 (m, 2H), 7.89 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.85 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.08 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 179.8, 177.2, 146.2, 142.3, 141.7, 134.7, 133.8, 131.7, 130.7, 126.7, 126.3, 124.1, 121.8, 121.1.

化合物 **4** の合成

化合物 **1** 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暗褐色固体として得た（収率 76%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.22 (s, 1H), 8.03-8.01 (m, 2H), 7.86 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.79 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 9.0, 2\text{H}$), 6.89 (d, $J = 9.0, 2\text{H}$), 3.76 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$

(151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.2, 176.5, 156.7, 143.5, 134.9, 133.1, 132.2, 131.7, 130.2, 126.5, 126.1, 126.0, 113.2, 112.2, 55.3.

化合物 **5** の合成

化合物 **1** 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）することで暗褐色固体として得た（収率 86%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.96 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 2H), 7.92-7.87 (m, 2H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 178.3, 178.0, 155.4, 153.0, 150.3, 134.6, 134.5, 132.9, 131.4, 130.7, 126.6, 126.5, 117.4, 114.7, 55.5

化合物 **6** の合成

化合物 **1** 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、暗褐色固体として得た（収率 49%）。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.97-7.95 (m, 2H), 7.82 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.76 (brs, 1H), 7.73 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.84 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.2, 176.0, 149.6, 142.4, 135.0, 134.7, 132.8, 131.0, 127.9, 127.1, 126.9, 126.6, 125.9, 122.4, 46.6, 40.2.

C-1-1-2) クロロ基置換体の合成

化合物 **7** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**12**) (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 **13** を黄色固体として得た (1.01

g, 92%). この化合物 (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 **14** を粗生成物として得た (淡黄色固体, 460 mg). この化合物はこのまま次の反応に使用した. 得られた化合物 **14** 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 **7** を暗褐色固体として得た (収率 76% for 2 steps).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.11 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=7.8$, 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.83 (ddd, $J=7.8$, 7.8, 1.2 Hz, 1H), 6.98 (d, $J=9.3$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J=9.3$ Hz, 2H), 3.34 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.8, 173.3, 149.0, 139.0, 135.7, 133.2, 131.7, 129.9, 127.7, 126.6, 126.2, 125.8, 124.5, 111.5, 40.3 (2C).

化合物 **9** の合成

1,4-ナフトキノン (**15**) (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 **16** を黄褐色粉末として得た (5.94 g, 94%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J=7.8$, 7.2 Hz, 1H), 7.66 (d, $J=7.8$, 7.2 Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 184.6, 170.9, 163.7, 136.6, 134.6, 133.8, 131.6, 130.7, 125.9, 125.9.

得られた化合物 **16** 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 **8** を黒色固体として得た (収率 97%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.17 (s, 1H), 8.02

(d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.84 (ddd, $J=7.8$, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.77 (ddd, $J=7.8$, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.00 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 179.9, 176.2, 1348.2, 145.6, 134.8, 132.8, 132.1, 130.0, 127.6, 126.6, 126.3, 126.1, 111.5, 103.9, 40.3 (2C).

化合物 **9** の合成

化合物 **8** (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 **9** を濃紫色無定形固体として得た (29 mg, 39%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 7.77-7.76 (m, 1H), 7.75 (ddd, $J=7.8$, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (ddd, $J=7.2$, 1.2 Hz, 1H), 6.99-6.96 (m, 5H), 6.48 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 6.24 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.80 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl₃) δ 183.6, 182.4, 148.1, 141.3, 134.9, 133.8, 132.9, 132.2, 130.8 (2C), 130.5, 129.0, 128.8, 127.1, 127.0 (2C), 126.9, 126.2, 124.0 (2C), 112.3 (2C), 41.0.

化合物 **10** の合成

化合物 **1** (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 **10** を黒色粉末として得た (76 mg, 26%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.09 (s, 1H), 8.04

(dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.84 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.76 (ddd, $J = 7.8, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.91 (s, 1H), 2.91 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 182.0, 181.9, 148.5, 146.9, 135.0, 133.0, 132.4, 130.5, 126.5, 126.1, 125.3, 125.2, 112.7, 100.5, 40.3 (2C).

化合物 11 の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (12) (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 17 を黄金色粉末として得た (440 mg, 40%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (dd, $J = 5.7, 5.7$ Hz, 2H), 7.70 (dd, $J = 5.7, 5.7$ Hz, 2H), 4.12 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 182.1, 147.6, 133.9, 133.9, 130.9, 126.4, 61.6.

化合物 17 (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 11 を濃青色固体として得た (31 mg, 19%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.69 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.61 (ddd, $J = 7.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.03 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.95 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 183.6, 179.2, 148.1, 137.8, 135.3, 134.6, 132.6, 132.3, 130.2, 128.2, 126.2 (1C overlapped), 124.5, 112.2, 60.3, 40.9.

C-1-2) ビスインドリル誘導体の合成

化合物 20 の合成³⁾

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 19 を赤色固体として得た (600 mg, 72%)。化合物 19 (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、濾液を減圧濃縮しすることで化合物 20 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 19

^1H NMR (600 MHz, 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}C NMR (151 MHz, 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 21a および 21b の合成

化合物 20 (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 μL , 0.05 mmol), ノニルアミン (9.1 μL , 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 **21a** (7 mg, 32%) および **21b** (6.5 mg, 29%) を赤色無定形固体としてそれぞれ得た.

化合物 **21a**

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (s, 2H), 7.72 (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), 6.76 (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), 1.40-1.32 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 6H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 135.9, 128.4, 127.6, 125.6, 122.7, 122.1, 120.5, 111.3, 107.4, 38.5, 32.0, 29.4, 29.3, 29.0, 27.1, 22.8, 14.3.

化合物 **21b**

$^1\text{H NMR}$ (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); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 135.9, 128.4, 127.6, 125.6, 122.7, 122.1, 120.5, 111.3, 107.5, 38.5, 32.0, 29.6, 29.4, 29.3, 29.0, 27.1, 22.8, 14.3.

C-2) 化合物の紫外可視吸光スペクトル測定

合成したナフトキノ誘導体のジメチルスルホキシド中の紫外可視吸光 (UV-Vis) スペクトルを取得したところ, 化合物に導入した芳香環上の置換基によってスペクトルが変化することが分かった (Figure 1, 2). 化合物 **1** においては, 溶液の色調は紫~黒紫色を呈しており, 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. 化合物 **1** の 4-ジメチルアミノ基を水素に置換した **2** や電子求引性基のニトロ基を有する **3** においては, 長波長域のピークトップがそれぞれ 487 nm, 466 nm と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 **4** においても, **1** よりも短波長側にピークトップ (503 nm) 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 **5** や, ジメチルアニリンとナフトキノ骨格との間の共役系が断絶される構造の **6** 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の直接の連結構造が重要であることが分かる. これらのことから, おそらく化合物 **1** の長波長域の吸収は分子内の電荷移動に起因するものと予想される. また, 化合物 **1** のクロロ基を置換したタイプの誘導体においては, 今回検証した構造においてはそれほど顕著な吸収波長域のシフトは観測されなかったものの, 電子吸引基であるニトロ基を導入した **7** や水素置換体である **10** においては, 短波長側へのシフトが確認された (それぞれ 556 nm, 542 nm). また, 電子供与基であるメトキシ基を導入した **11** においては長波長側へのシフト (578 nm) が観測されており, 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と考えられる. 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と予想される.

C-3) 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 4 には, **19** 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 (**21a**–**21e**) 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。

本研究では昨年度に引き続いて、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。本年度は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 1,4-ナフトキノ誘導体を選択した。この分子においては、共通の中間体に対して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。合成したナフトキノ誘導体の 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が重要であることが分かった。また、化合物 **1** のクロロ基の置換による長波長化やポリエチレングリコール分子の導入による水溶性の向上といった機能化も期待できる。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、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。今後はカロテノイド類であるビキシンなどの HPLC 法を用いた定量法への応用を検討する。今回はビスインドリル

マレイミド分子を母骨格とし、炭化水素鎖を導入することで HPLC 上での保持時間の調整が可能となったが、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) 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).
- 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

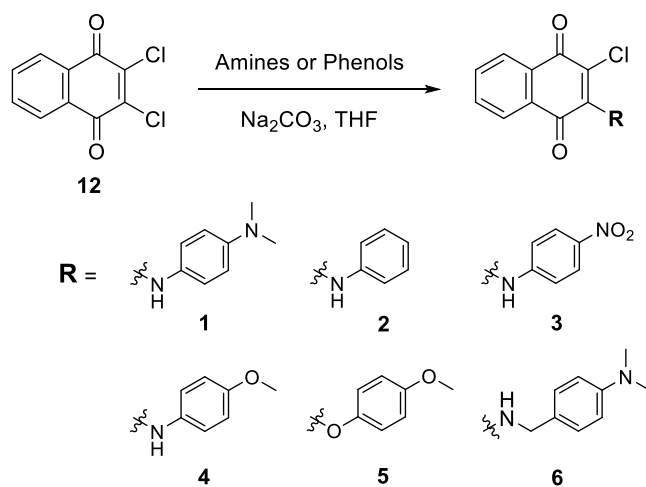
- 1) 中森洋紀、布目真梨、辻巖一郎、出水庸介、増本直子、杉本直樹、井之上浩一：デザインSR-HPLC法によるアナト一色素の定量評価の構築，日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11)(長崎).

2. 論文発表等

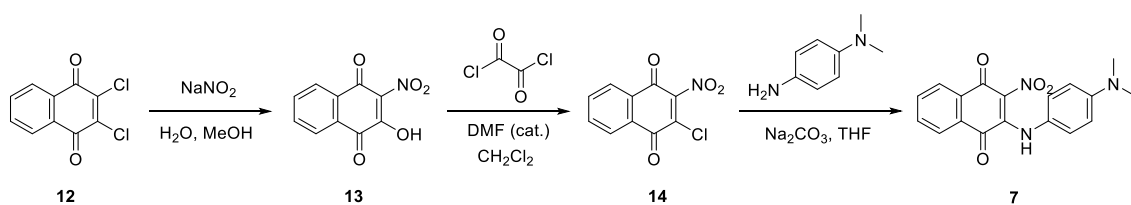
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

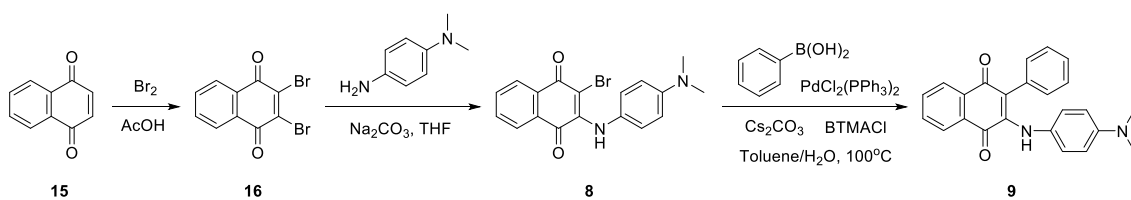
なし



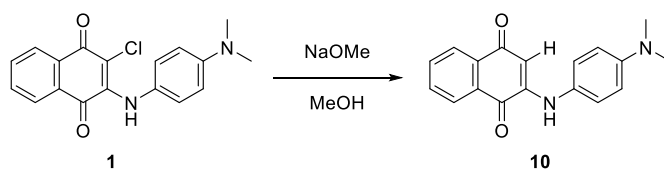
Scheme 1. *N,N*-ジメチルアミノ基を置換したナフトキノン誘導体 1-6 の合成



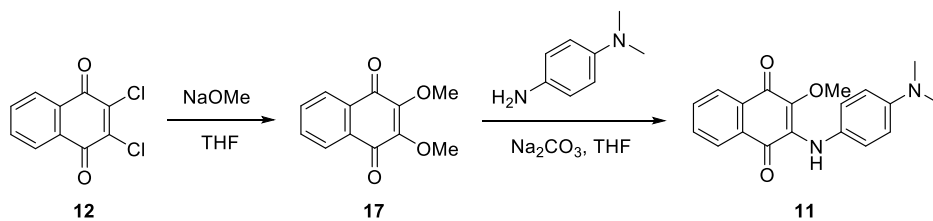
Scheme 2. ナフトキノン誘導体 7 の合成



Scheme 3. ナフトキノン誘導体 8 および 9 の合成



Scheme 4. ナフトキノン誘導体 10 の合成



Scheme 5. ナフトキノ誘導体 11 の合成

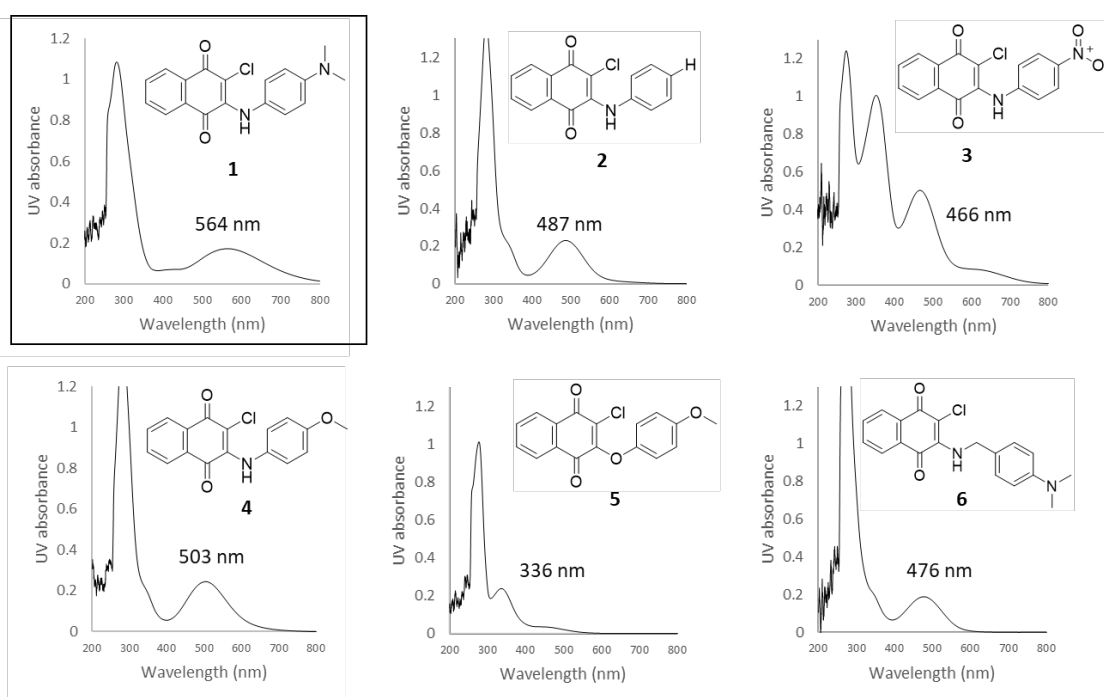


Fig. 1. ナフトキノ誘導体 1-6 の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)

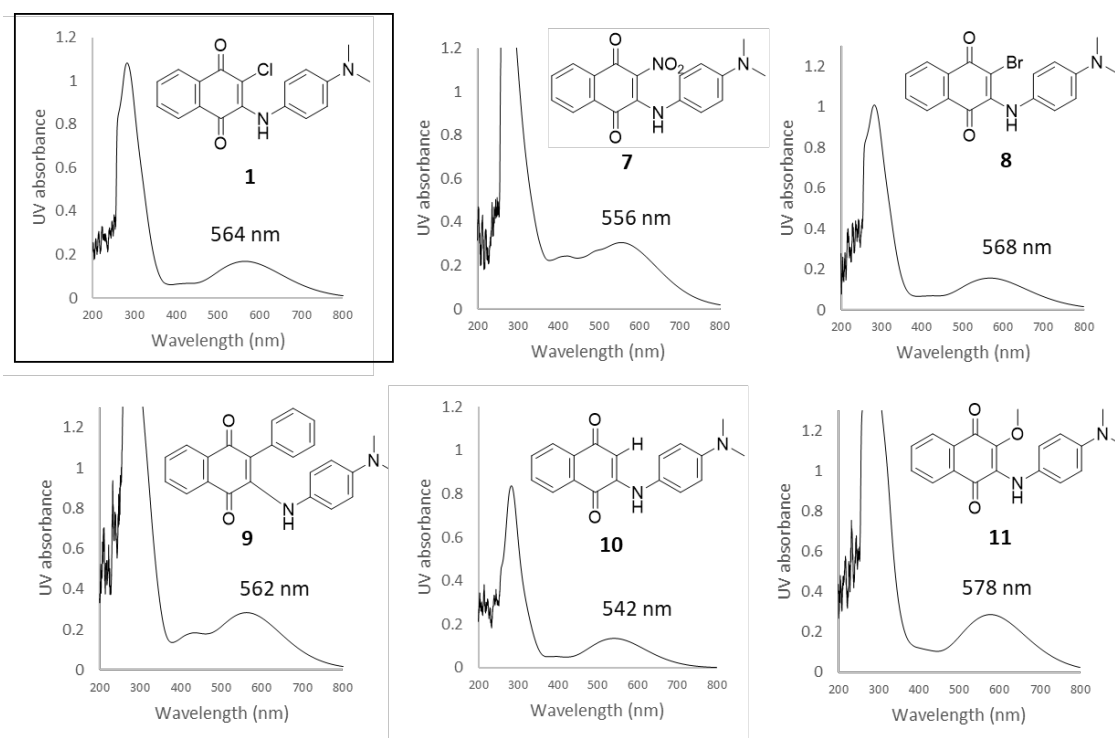


Fig. 2. ナフトキノ誘導体 7-11 の UV-Vis スペクトル (50 μ M in DMSO)

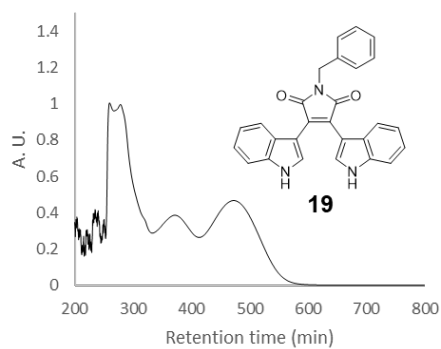
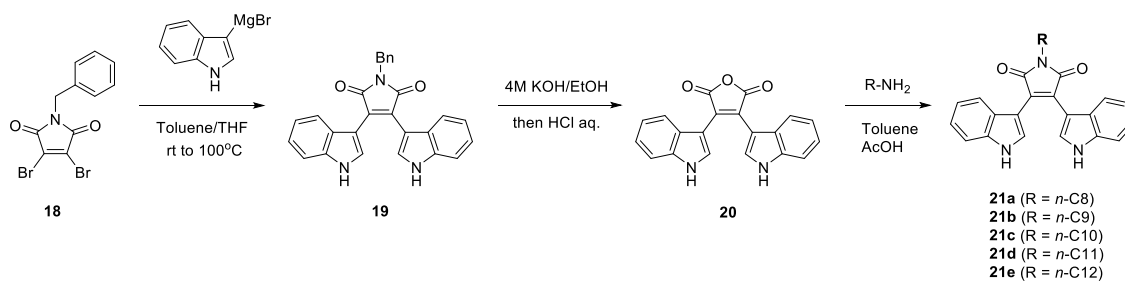


Fig. 3. ビスインドリルマレイミド誘導体 19 の UV-Vis スペクトル (50 μ M in DMSO)



Scheme 6. ビスインドリルマレイミド誘導体 21a-e の合成

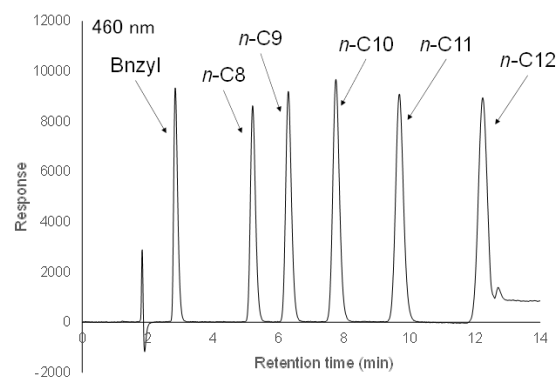


Fig. 4. ビスインドリルマレイミド誘導体(19 および 21a-e の混合物)の HPLC 痕跡

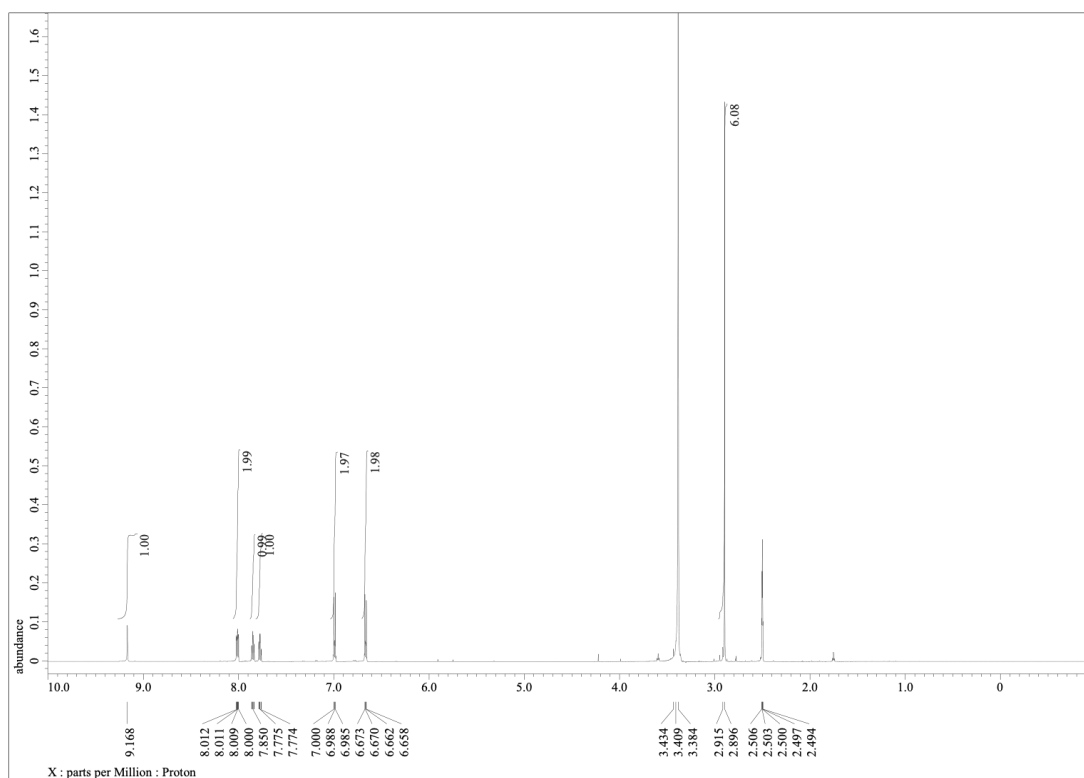


Fig. 5. 化合物 1 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

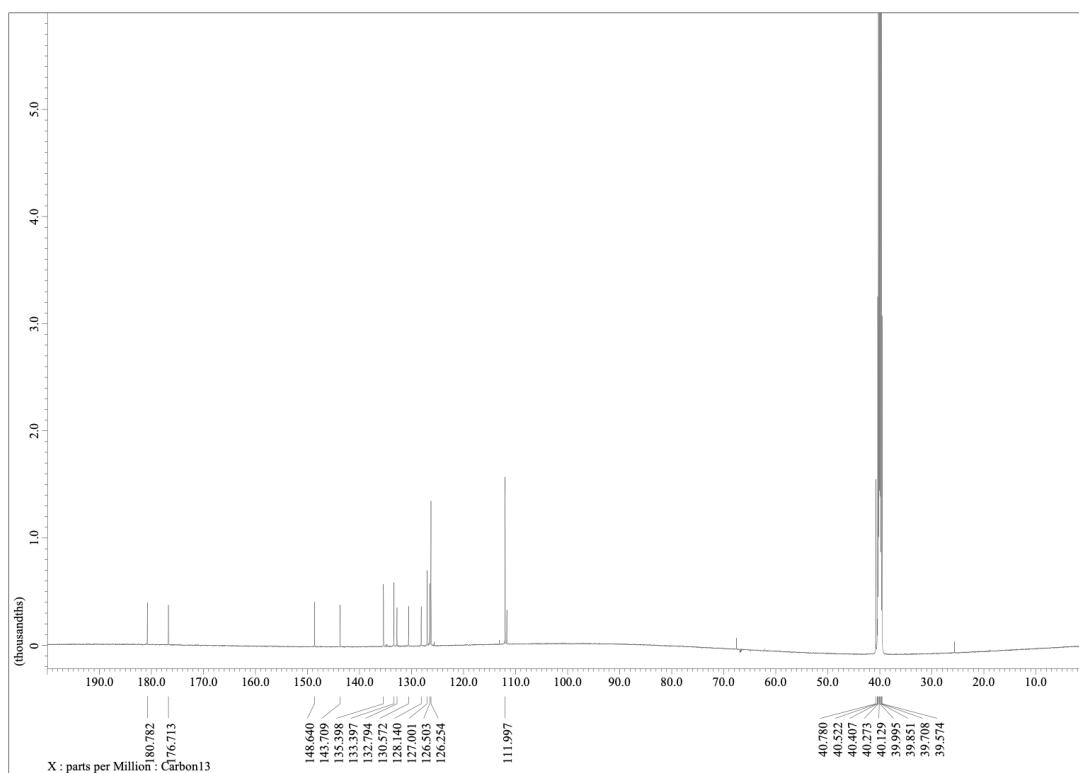


Fig. 6. 化合物 1 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

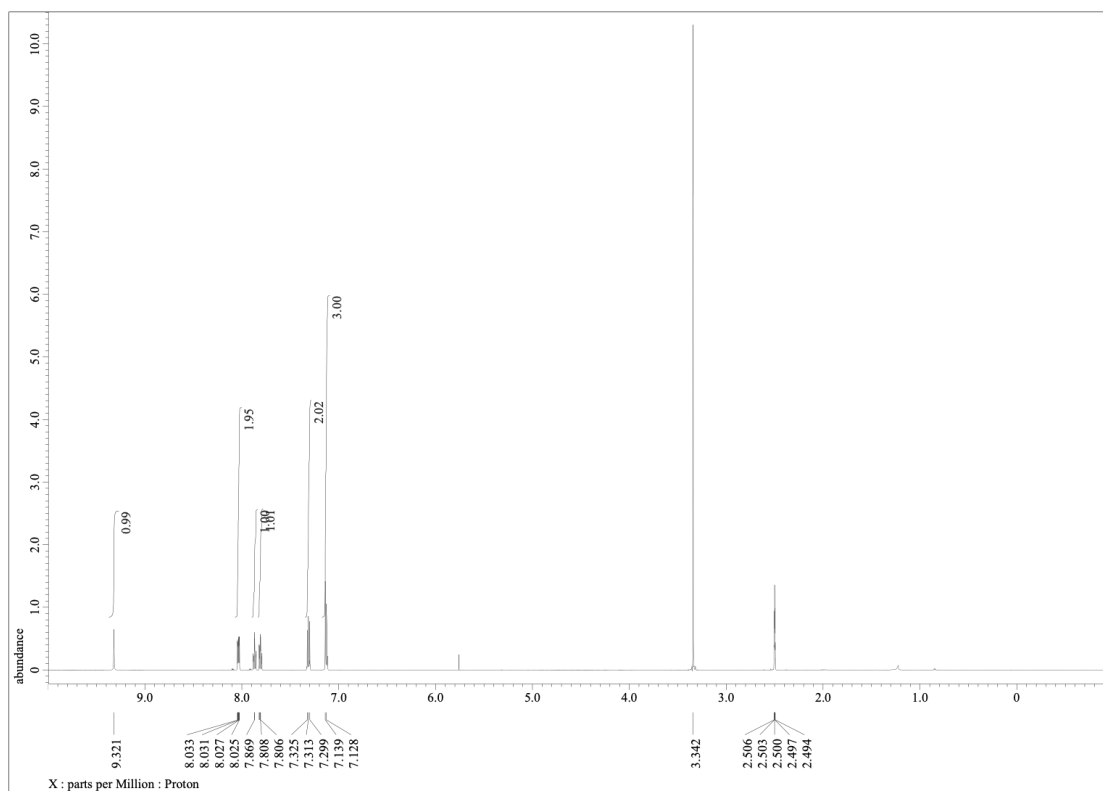


Fig. 7. 化合物 2 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

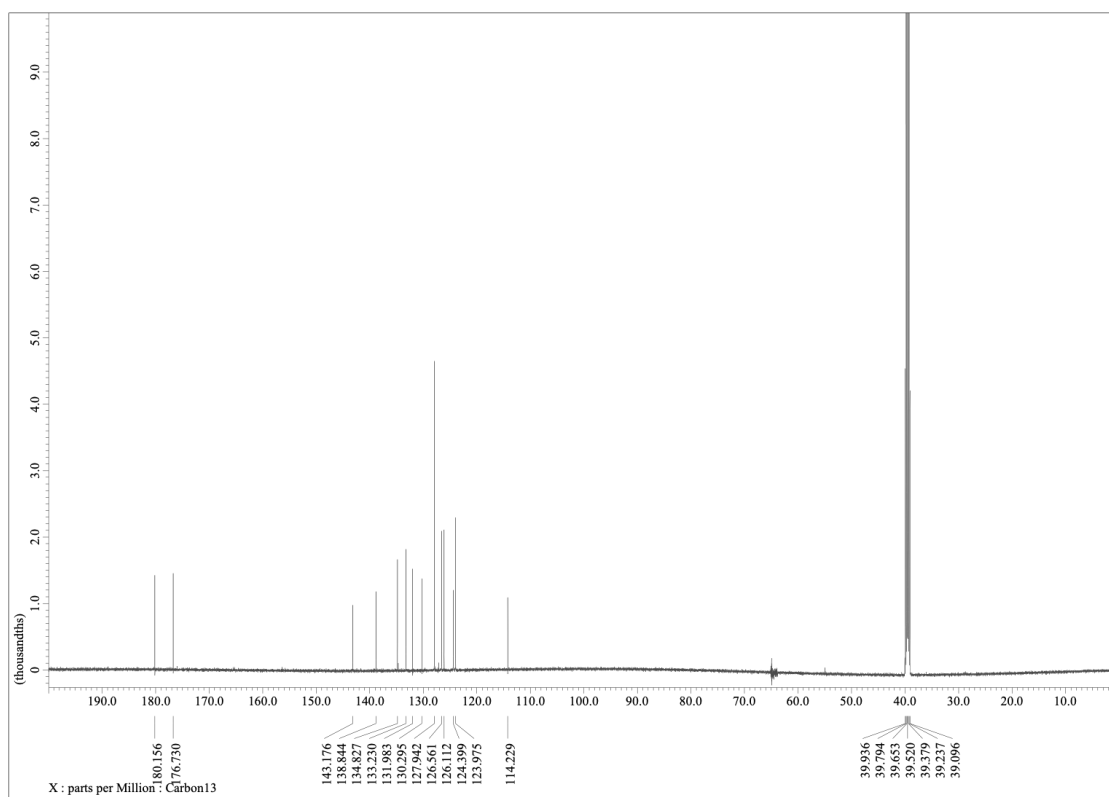


Fig. 8. 化合物 2 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

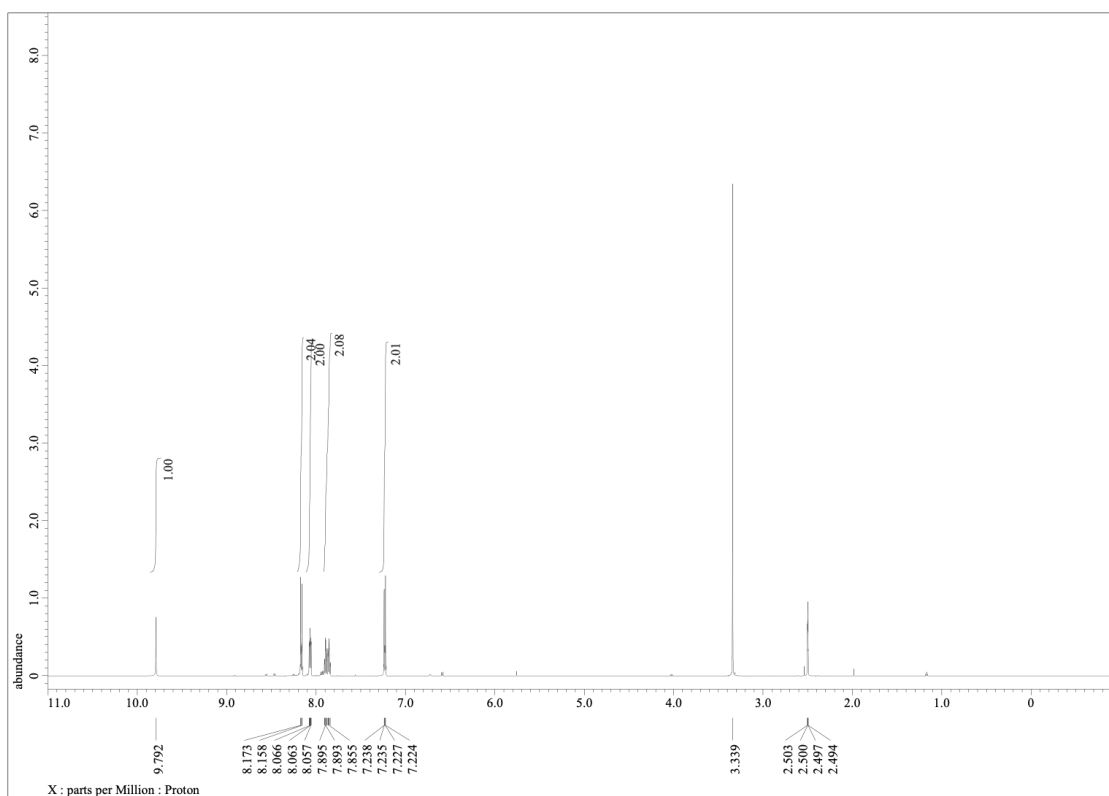


Fig. 9. 化合物 3 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

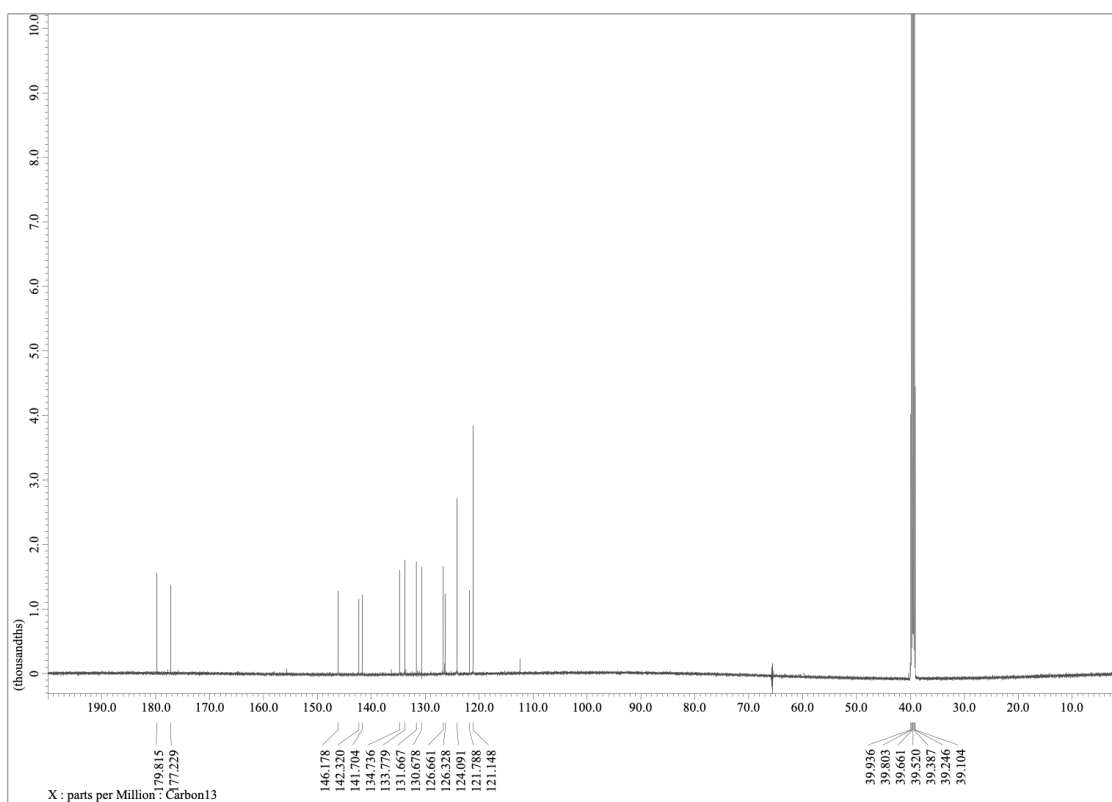


Fig. 10. 化合物 3 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

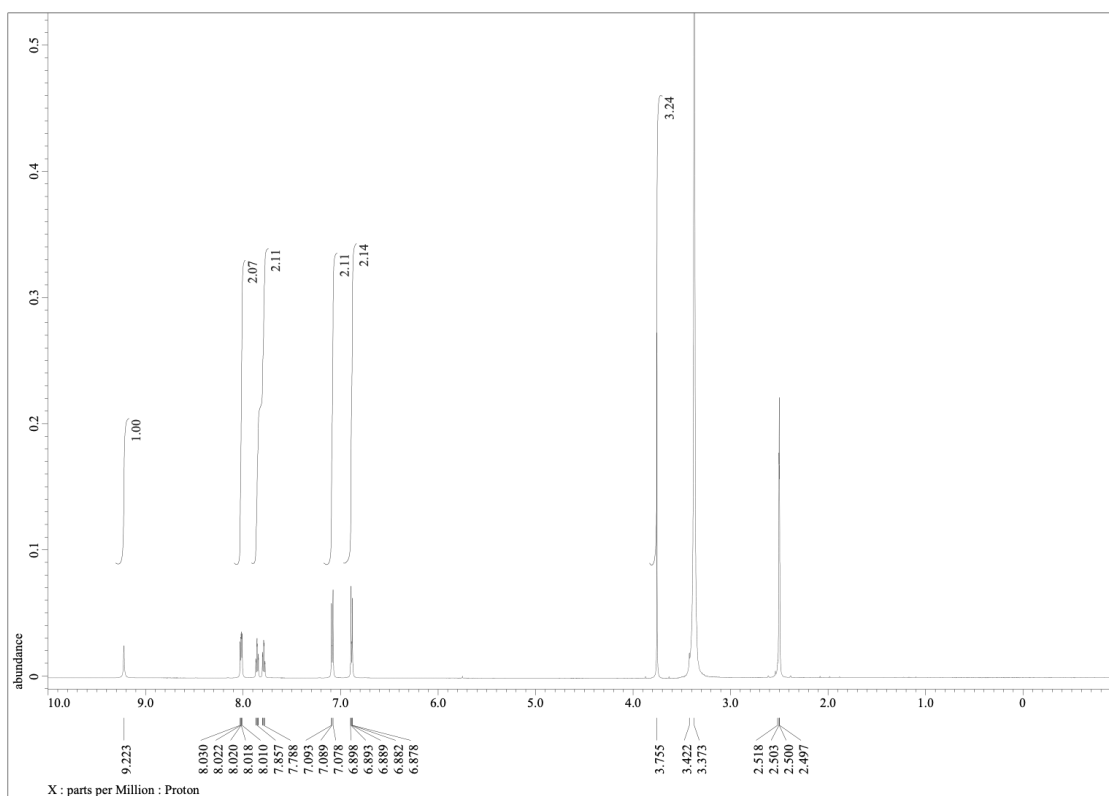


Fig. 11. 化合物 4 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

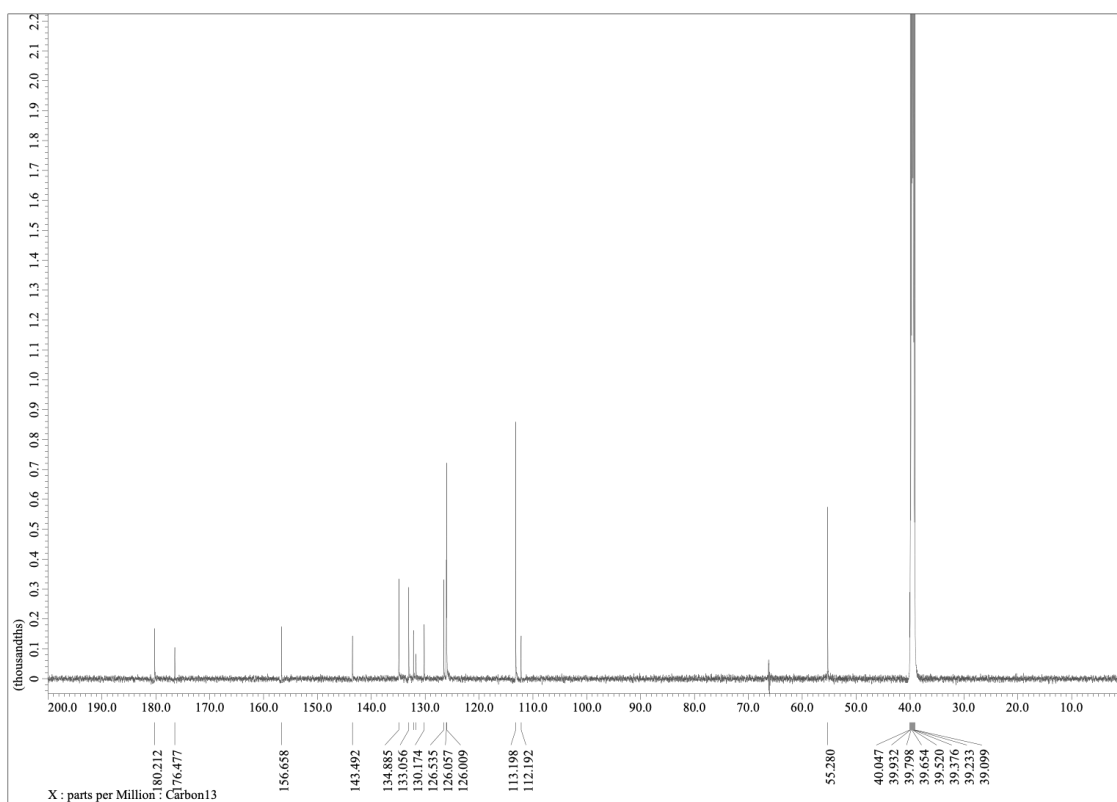


Fig. 12. 化合物 4 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

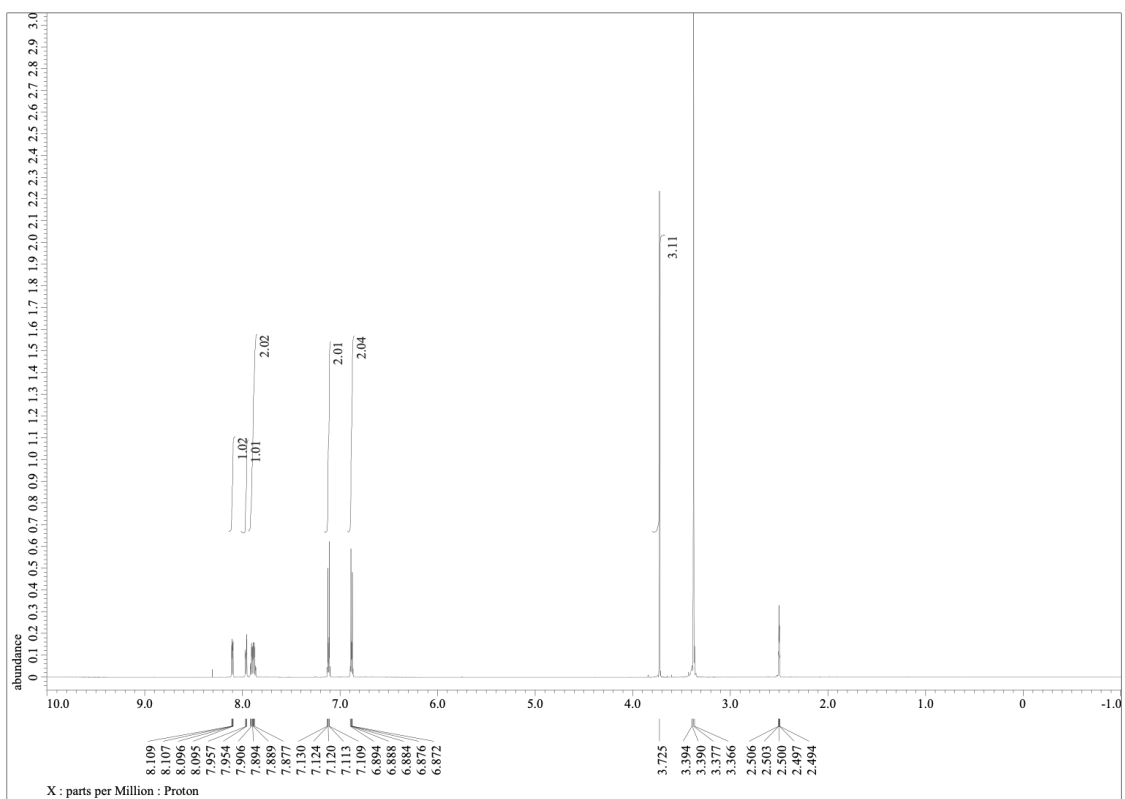


Fig. 13. 化合物 5 の ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

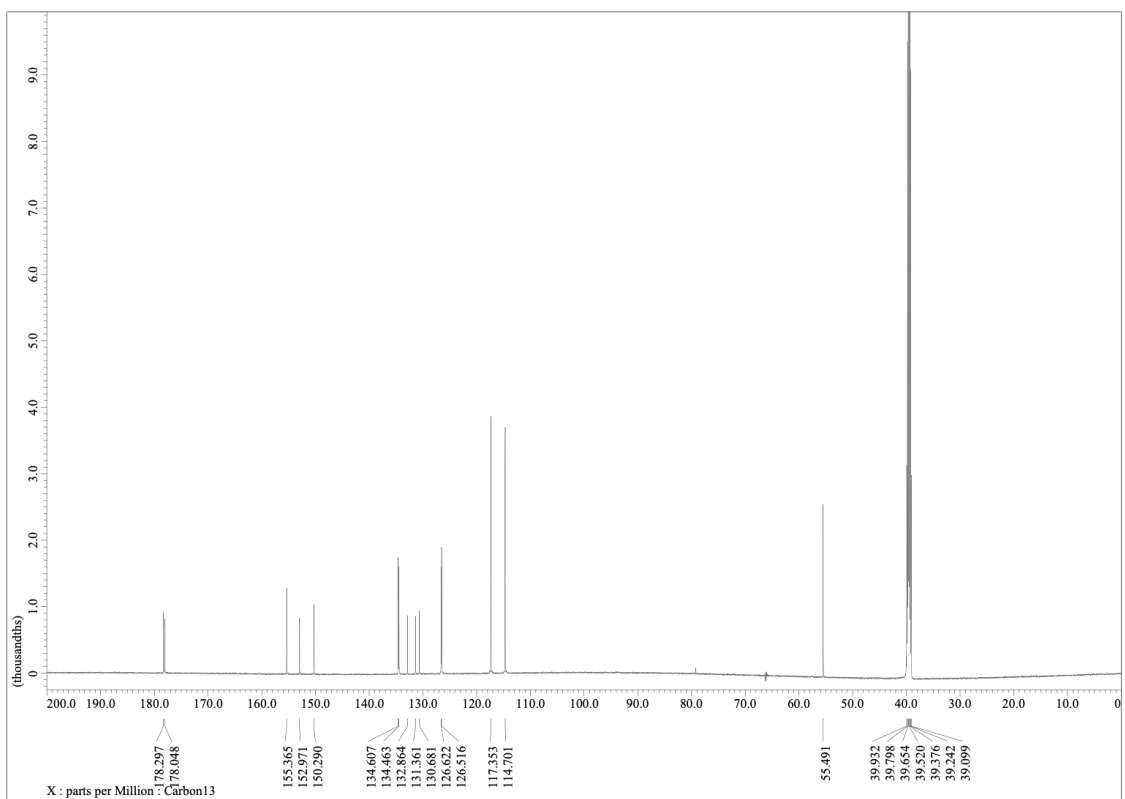


Fig. 14. 化合物 5 の ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

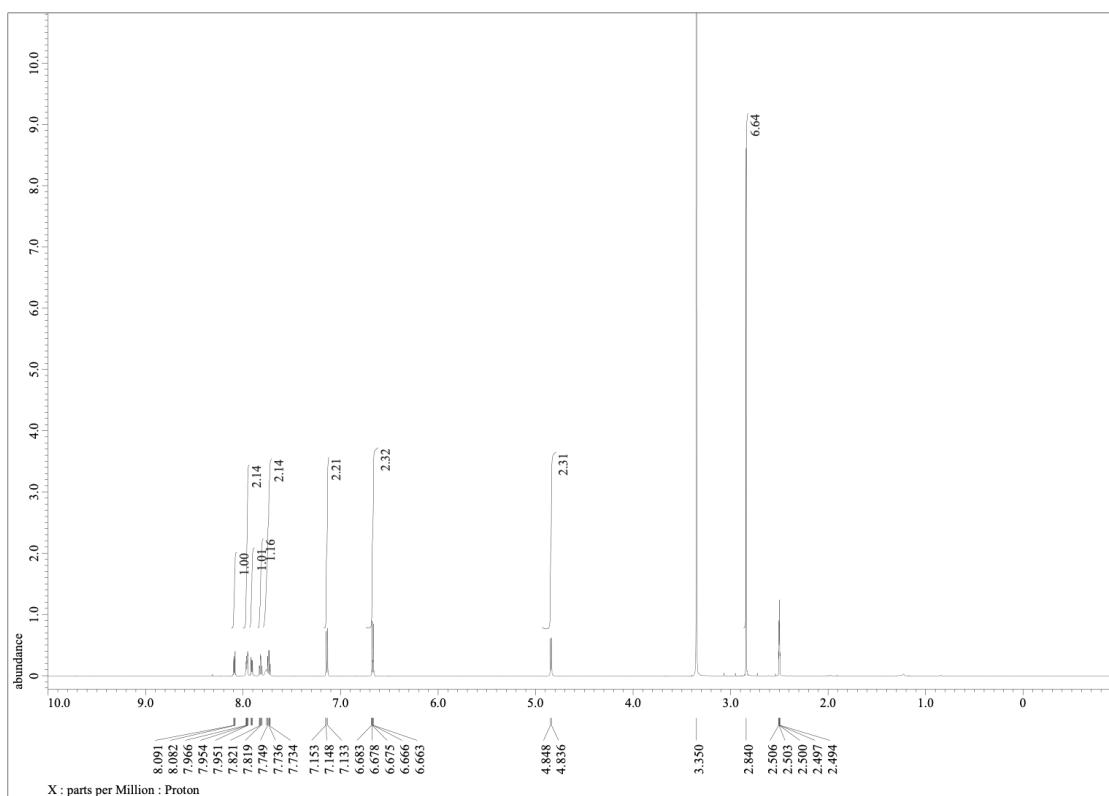


Fig. 15. 化合物 6 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

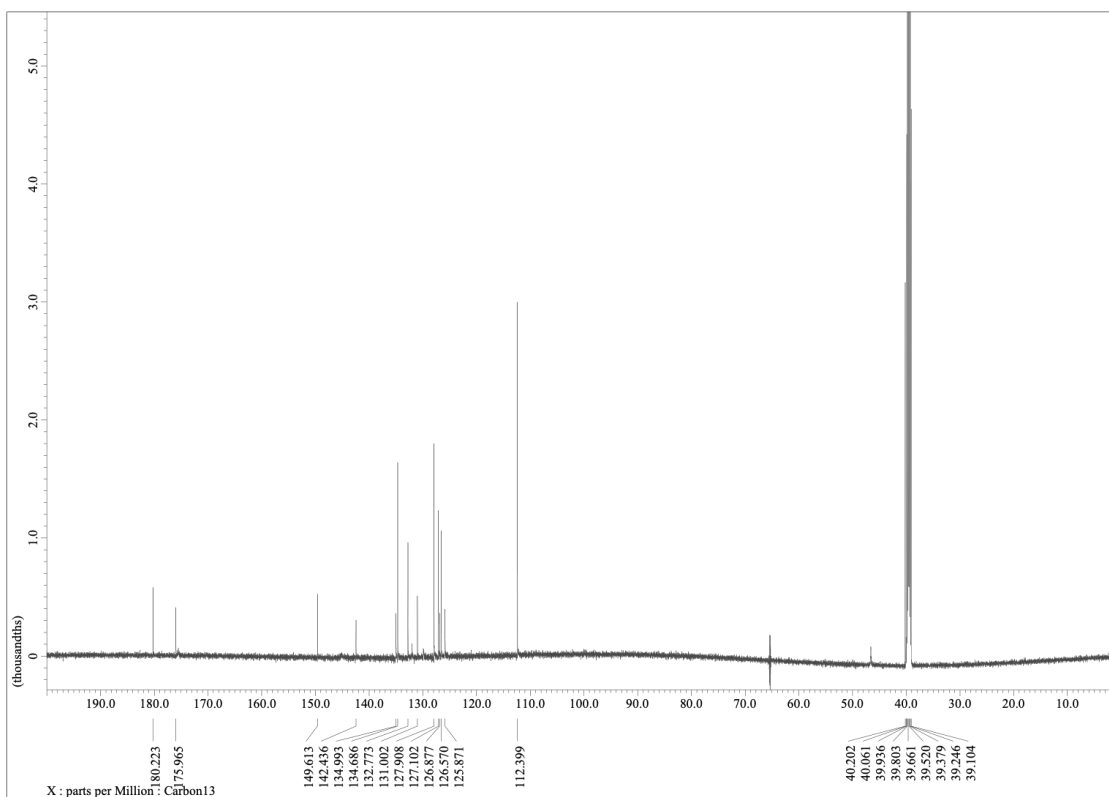


Fig. 16. 化合物 6 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

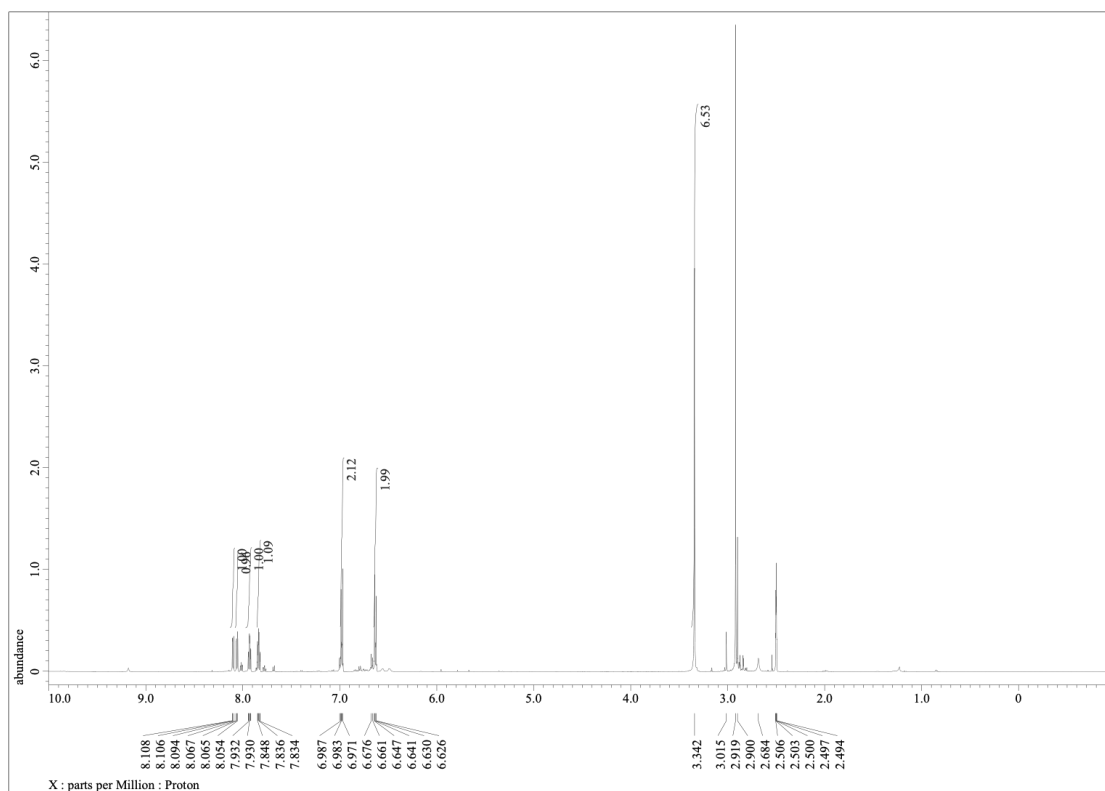


Fig. 17. 化合物 7 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

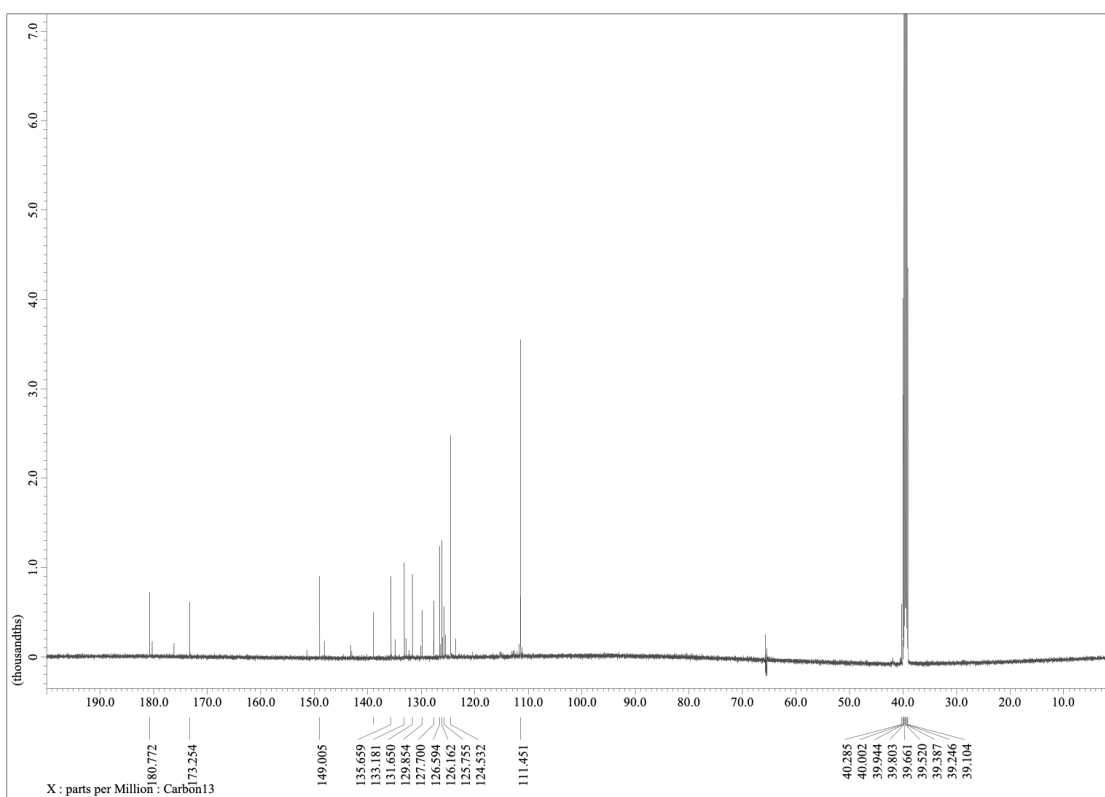


Fig. 18. 化合物 7 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

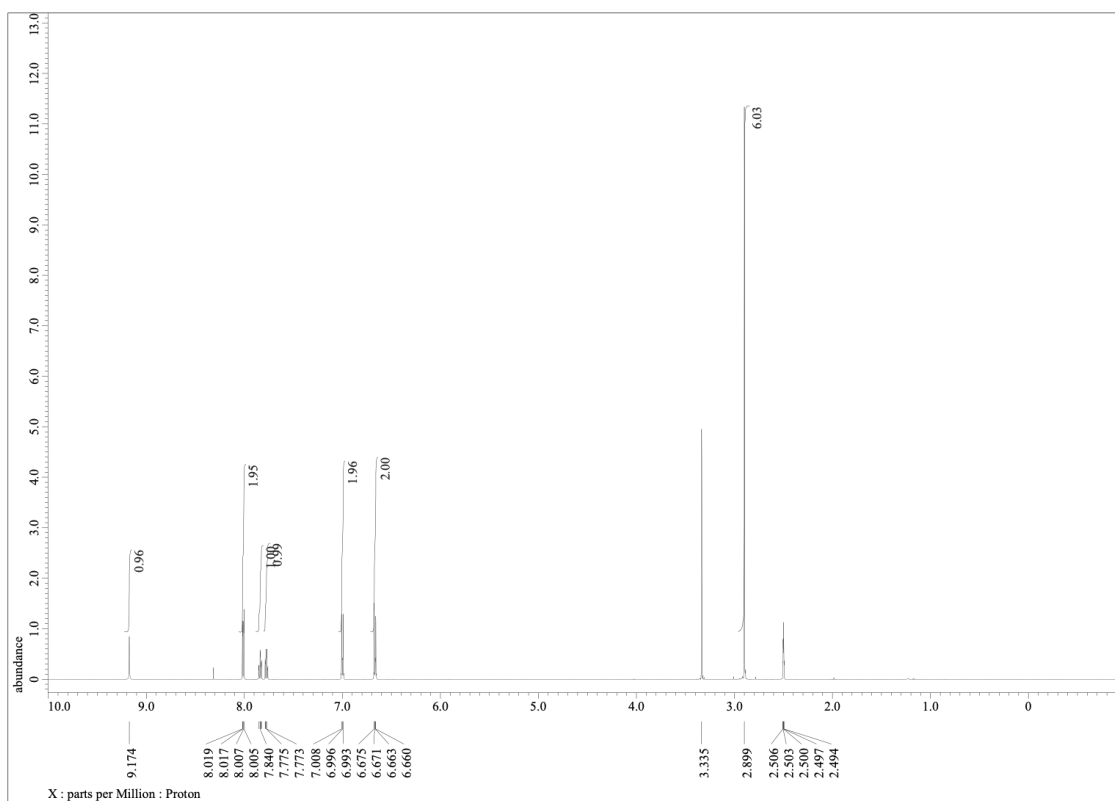


Fig. 19. 化合物 8 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

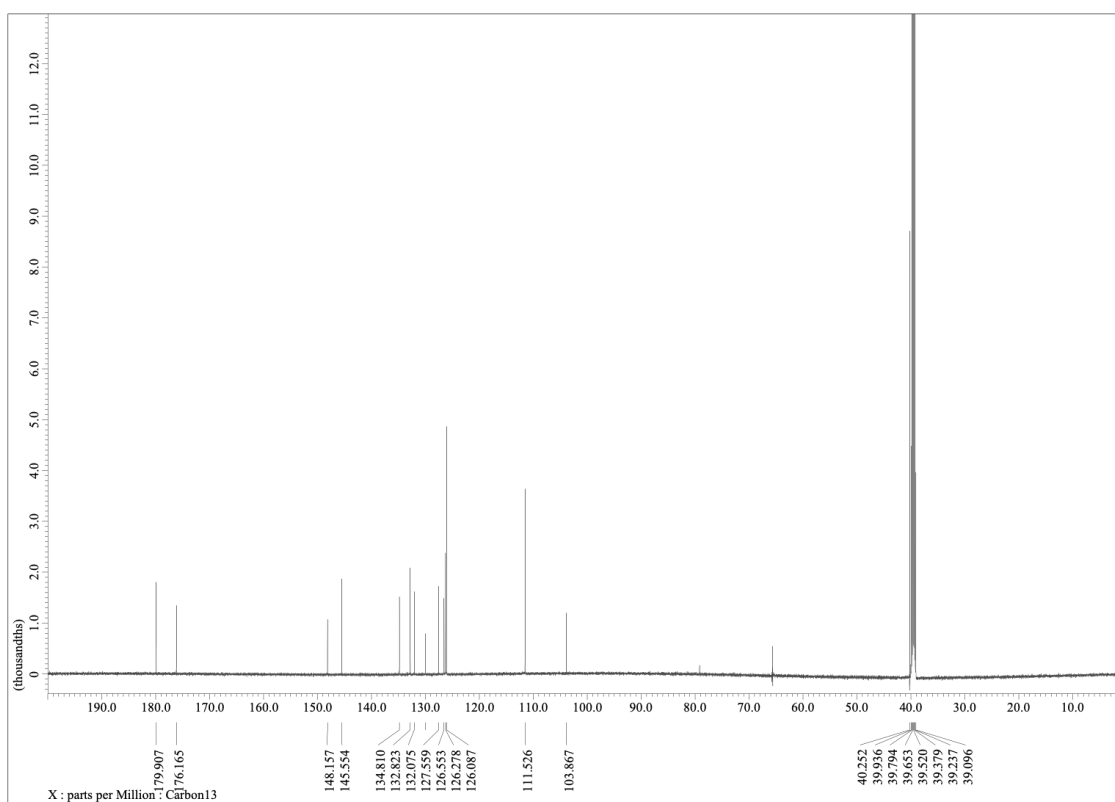


Fig. 20. 化合物 8 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

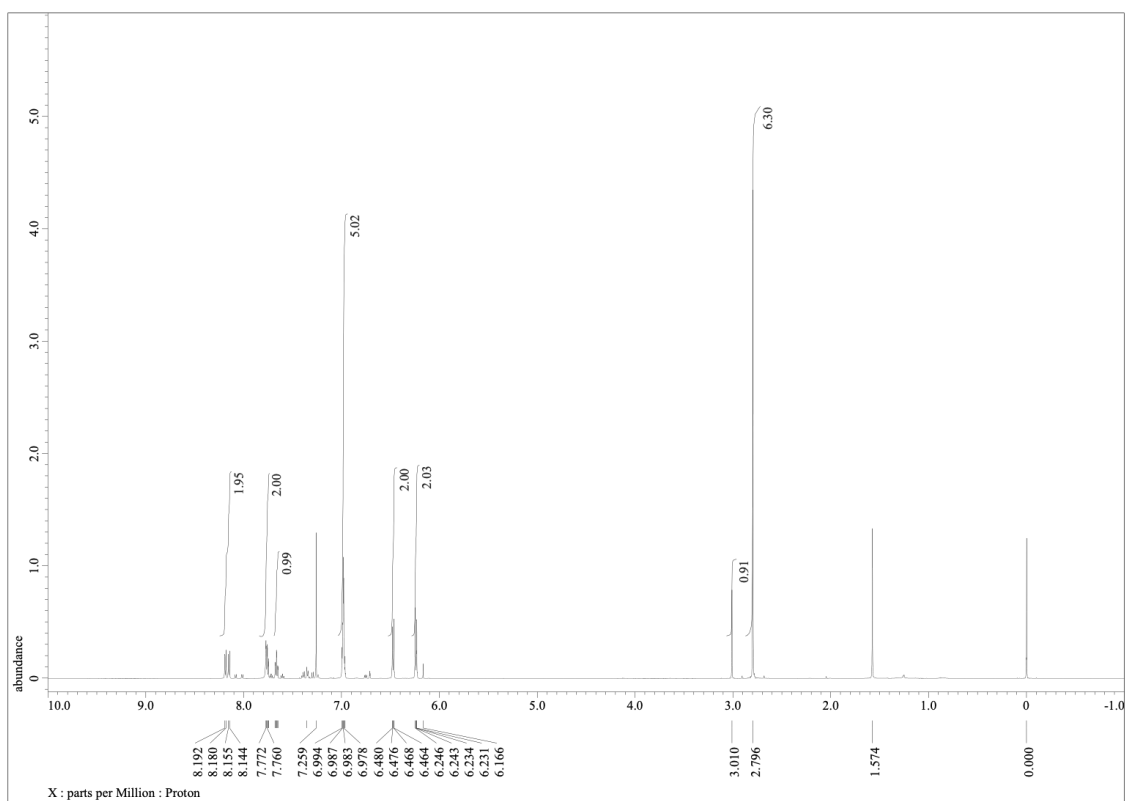


Fig. 21. 化合物 9 の ¹H NMR (CDCl₃)

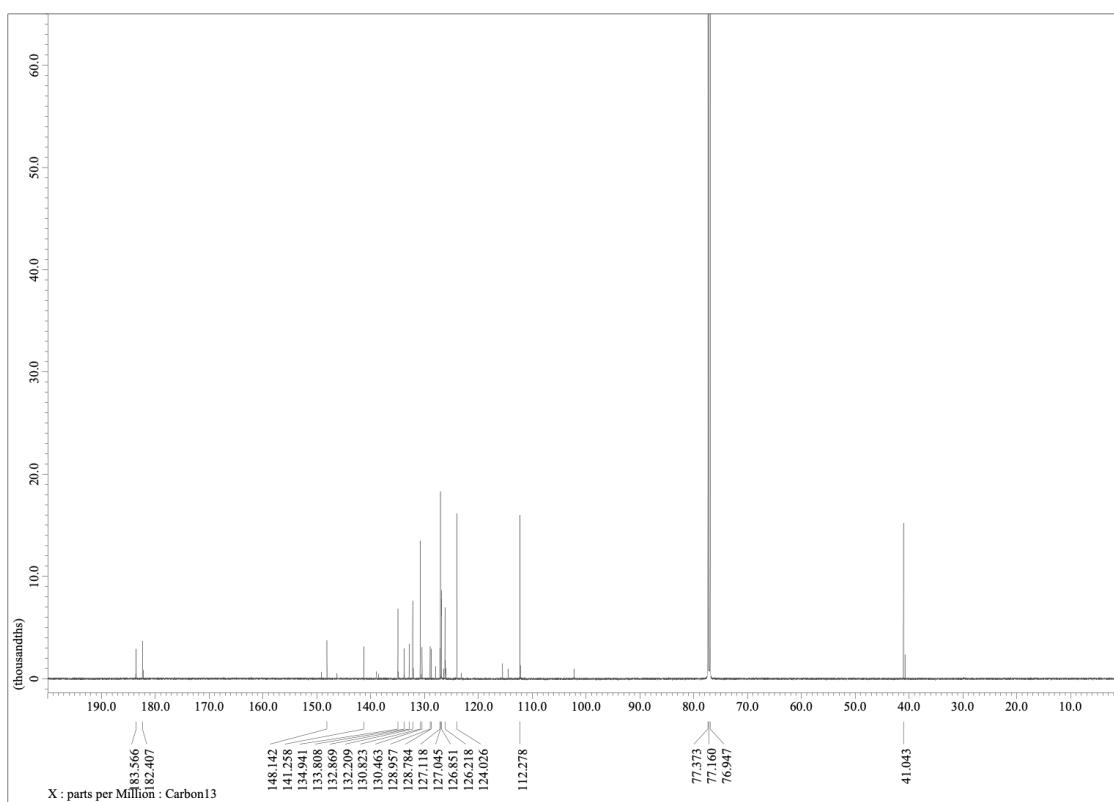


Fig. 22. 化合物 9 の ¹³C NMR (CDCl₃)

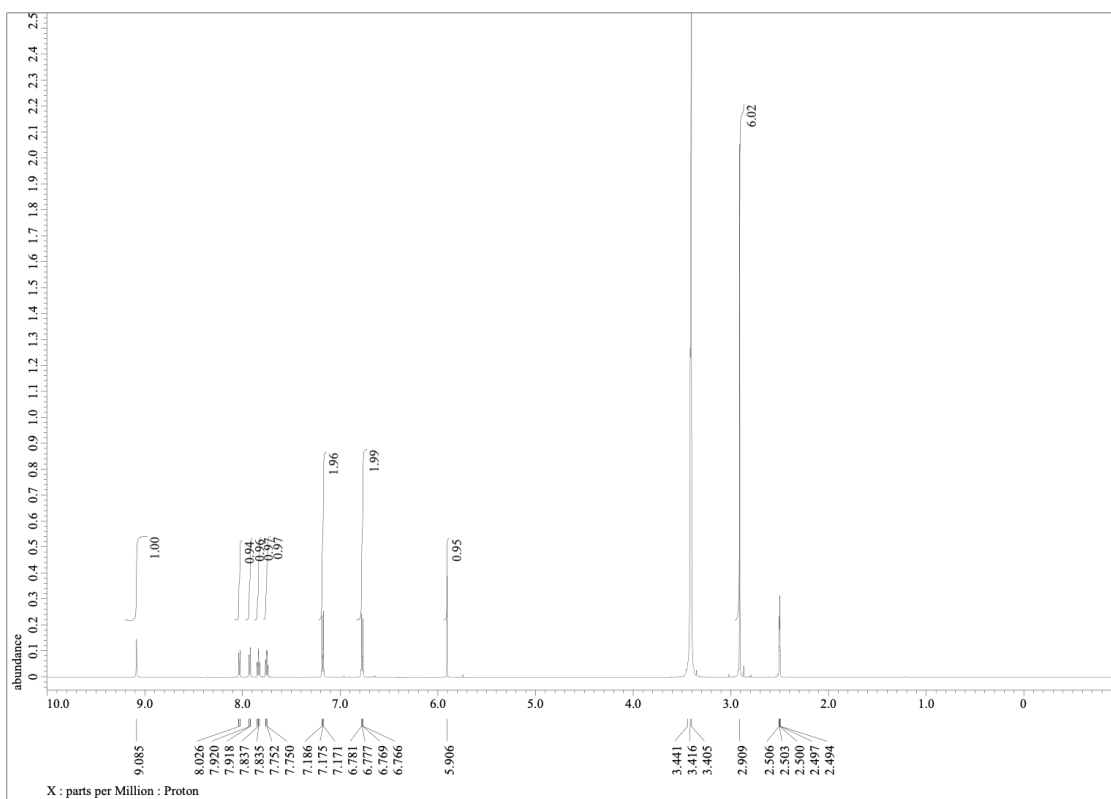


Fig. 23. 化合物 10 の ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

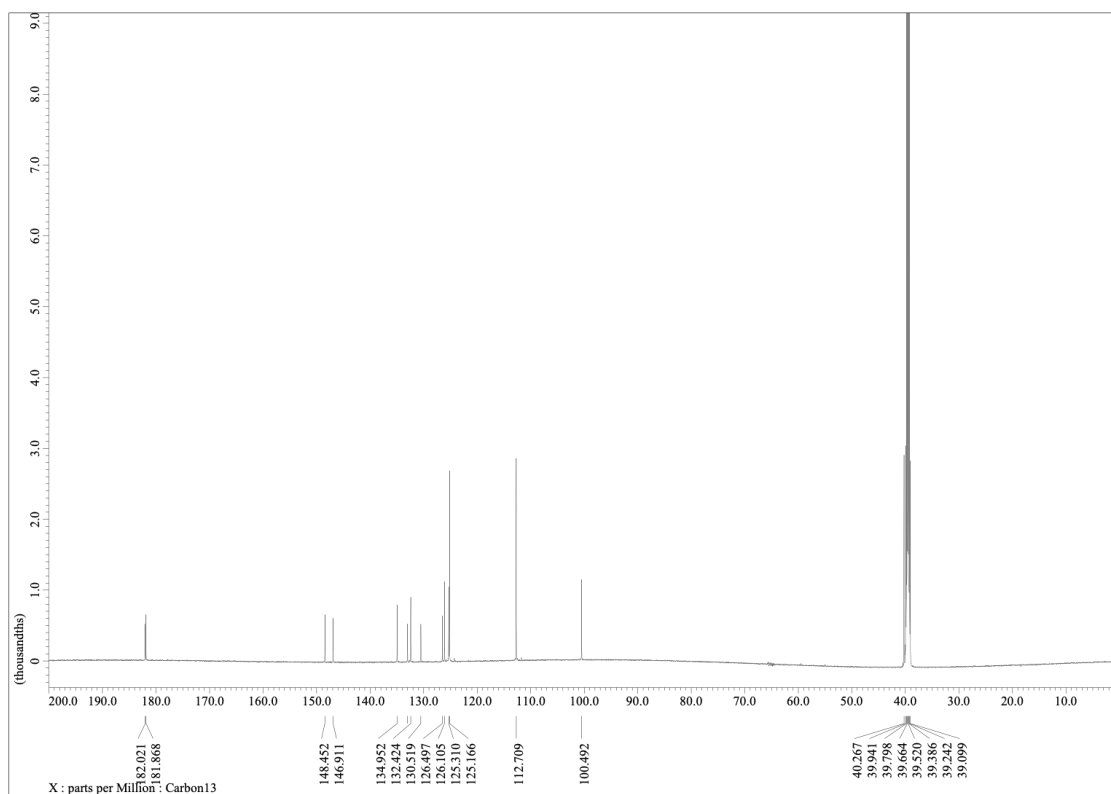


Fig. 24. 化合物 10 の ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

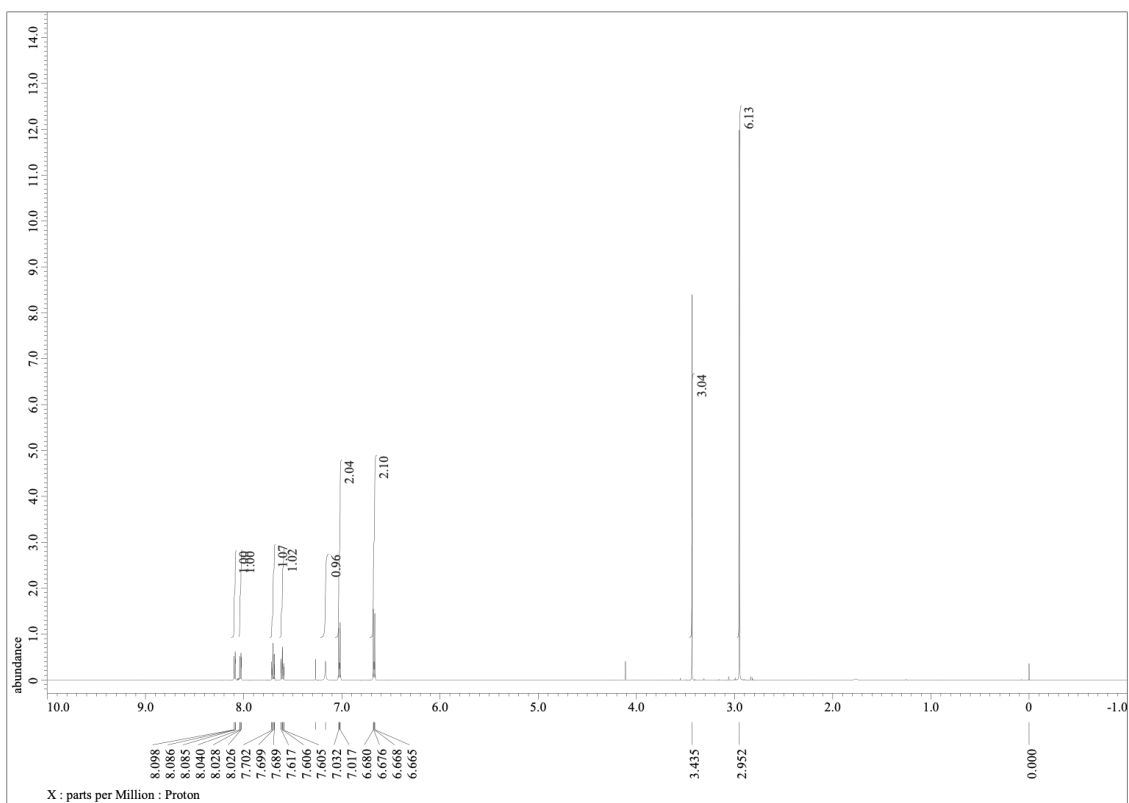


Fig. 25. 化合物 11 の ¹H NMR (CDCl₃)

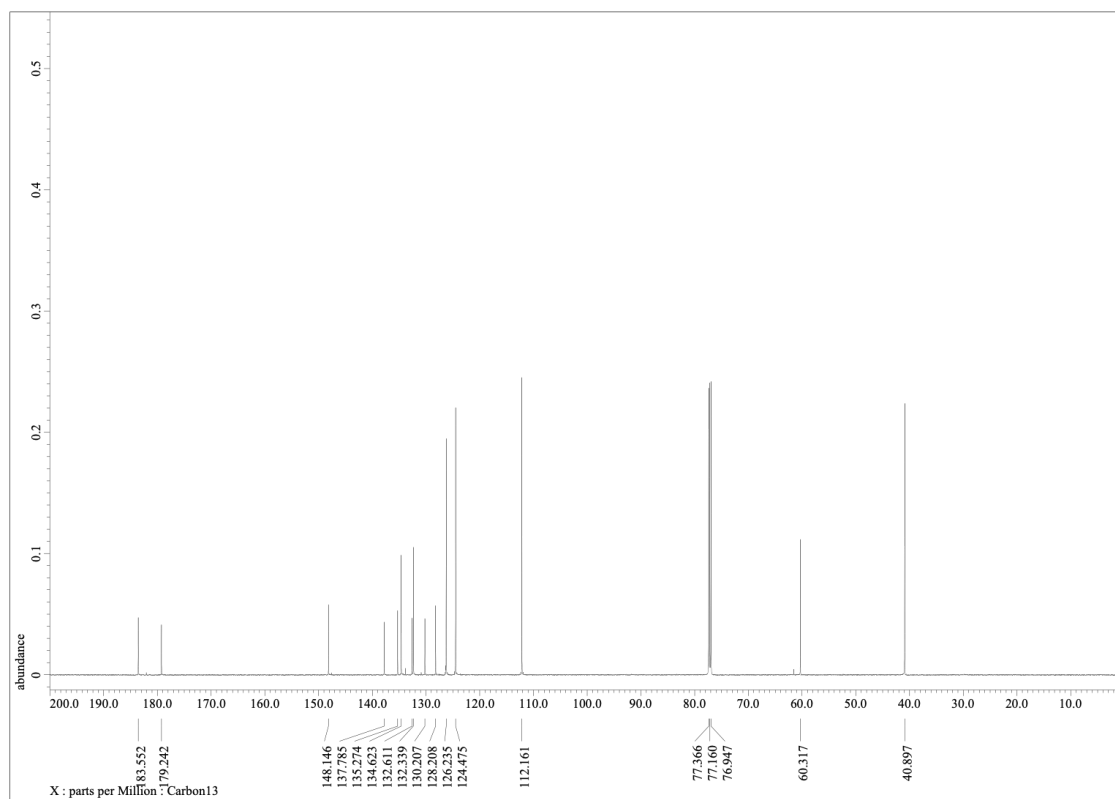


Fig. 26. 化合物 11 の ¹³C NMR (CDCl₃)

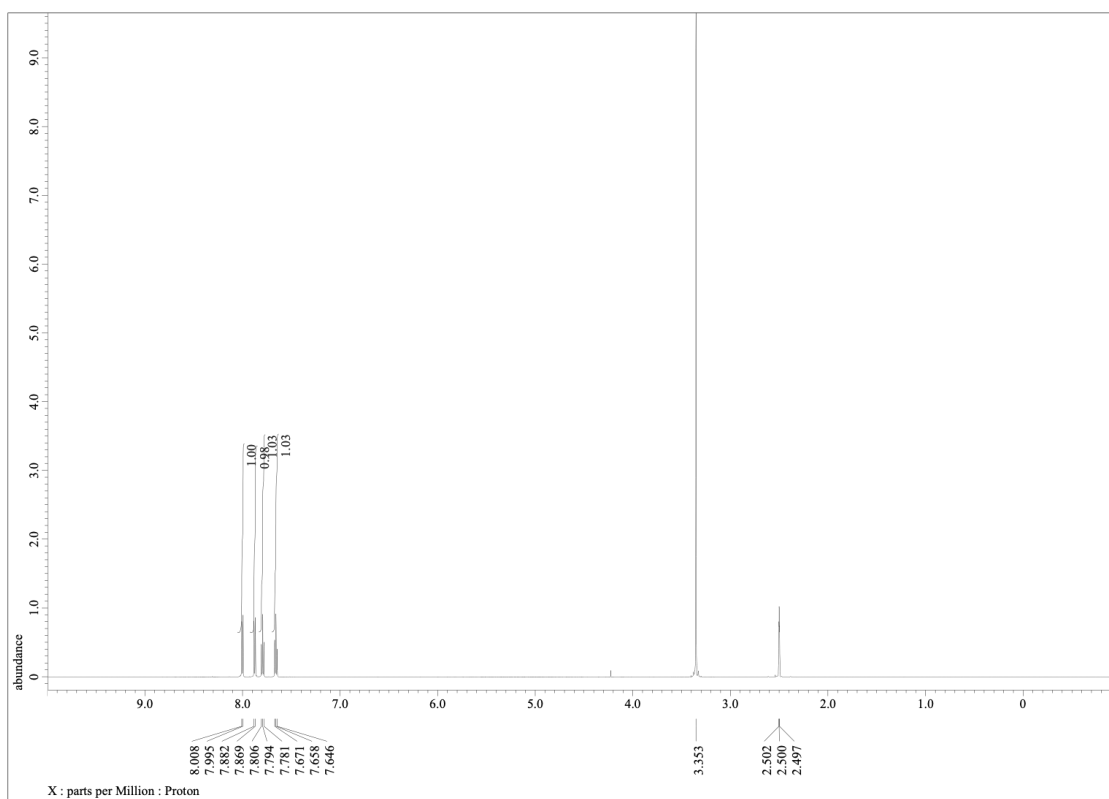


Fig. 27. 化合物 13 の ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

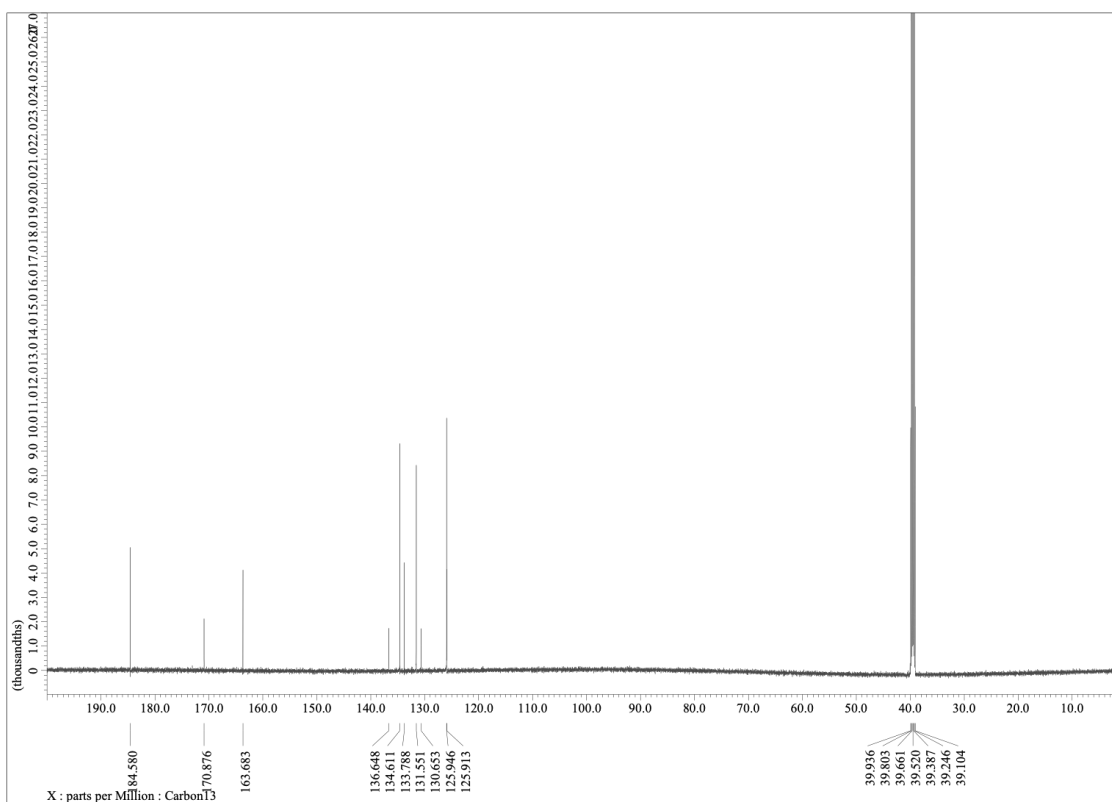


Fig. 28. 化合物 13 の ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$)

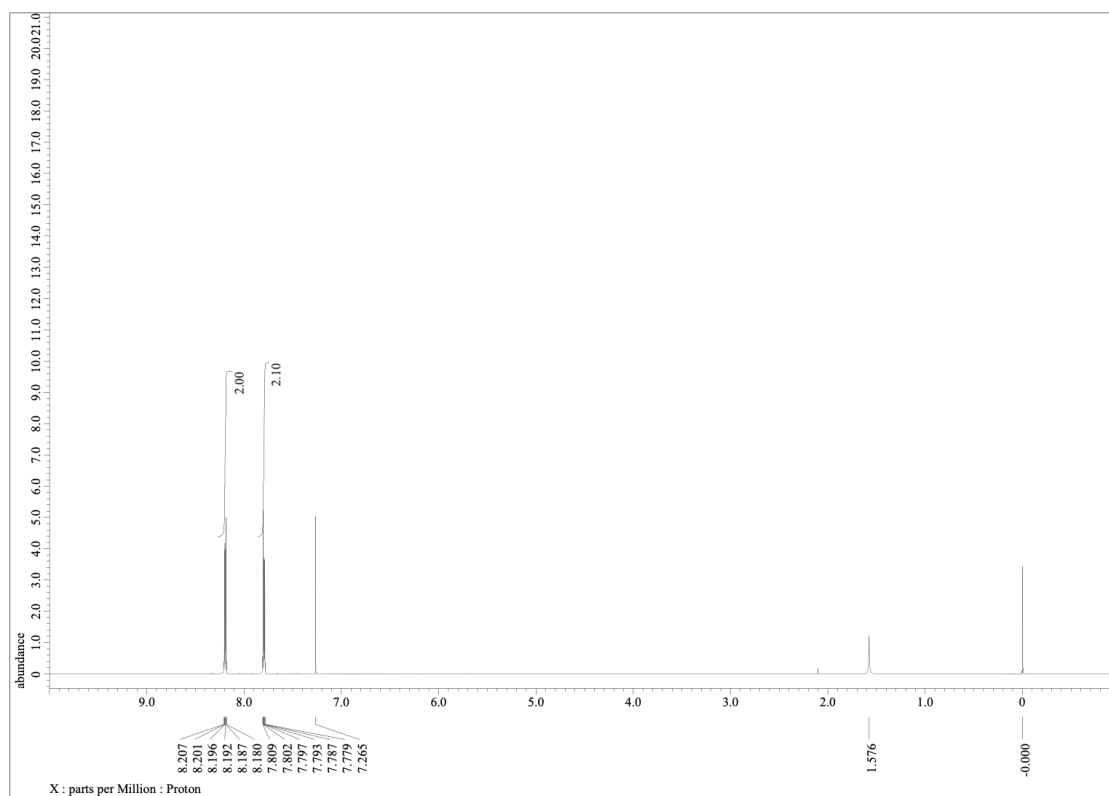


Fig. 29. 化合物 16 の ¹H NMR (DMSO-d₆)

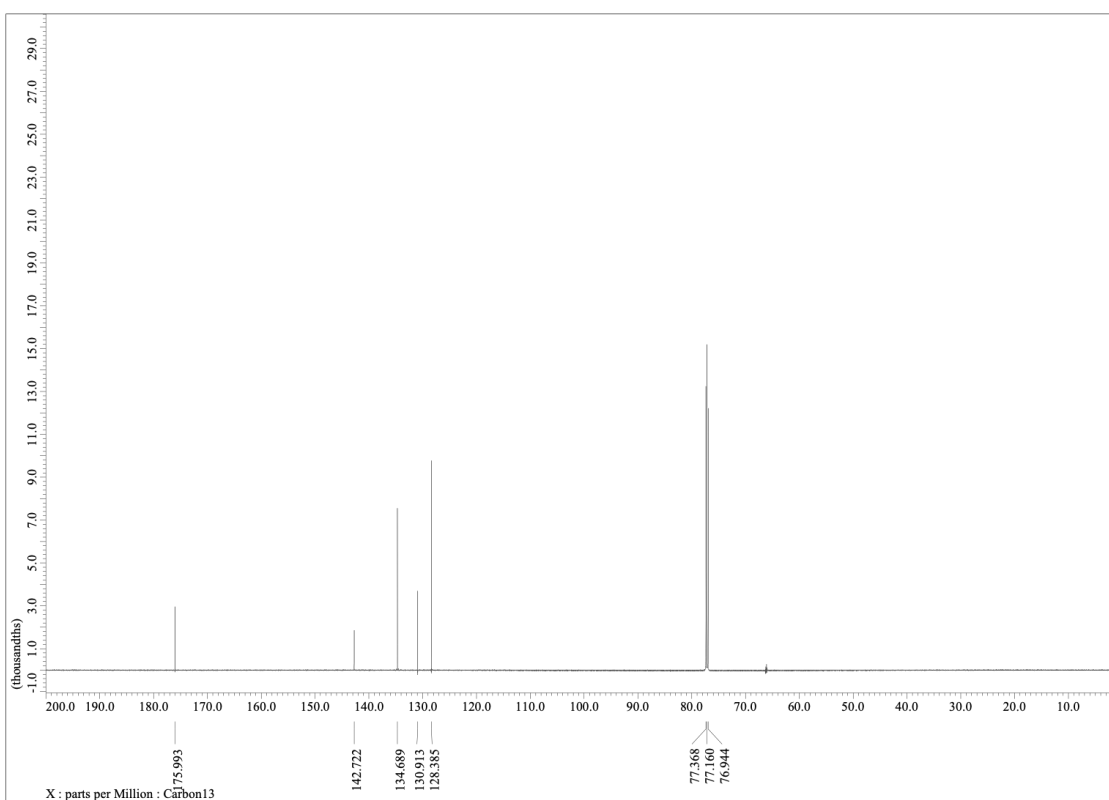


Fig. 30. 化合物 16 の ¹³C NMR (DMSO-d₆)

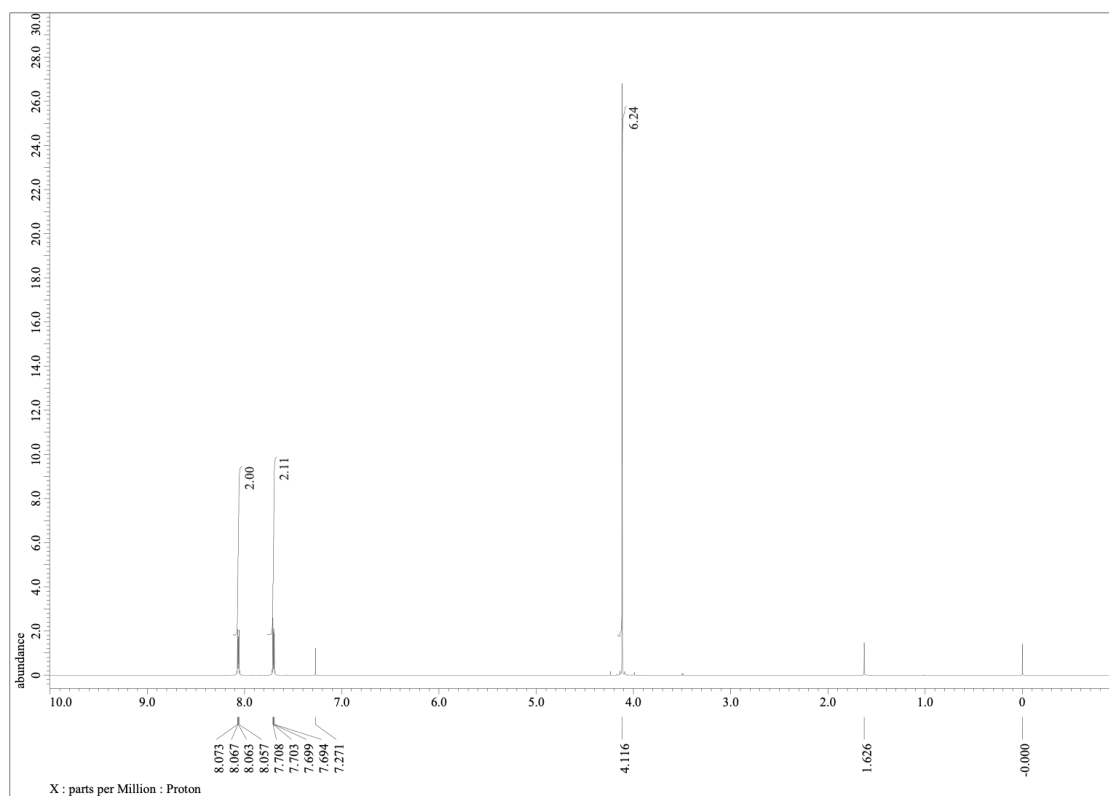


Fig. 31. 化合物 17 の ¹H NMR (CDCl₃)

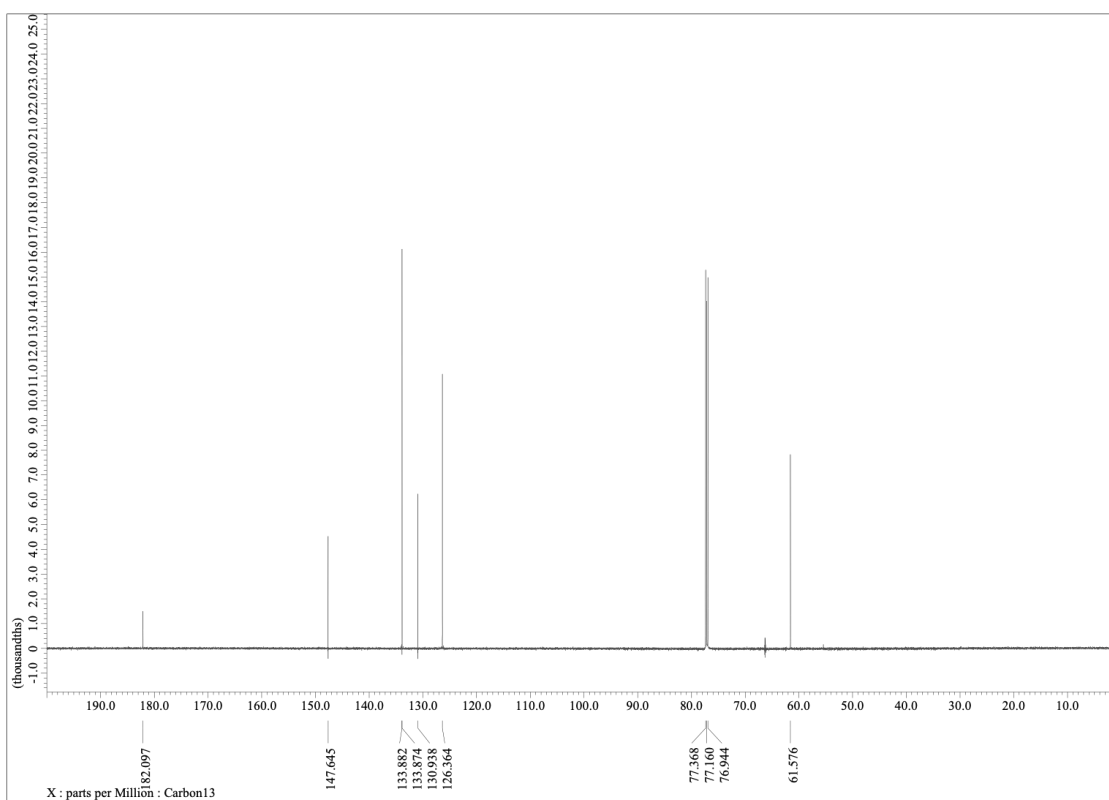


Fig. 32. 化合物 17 の ¹³C NMR (CDCl₃)

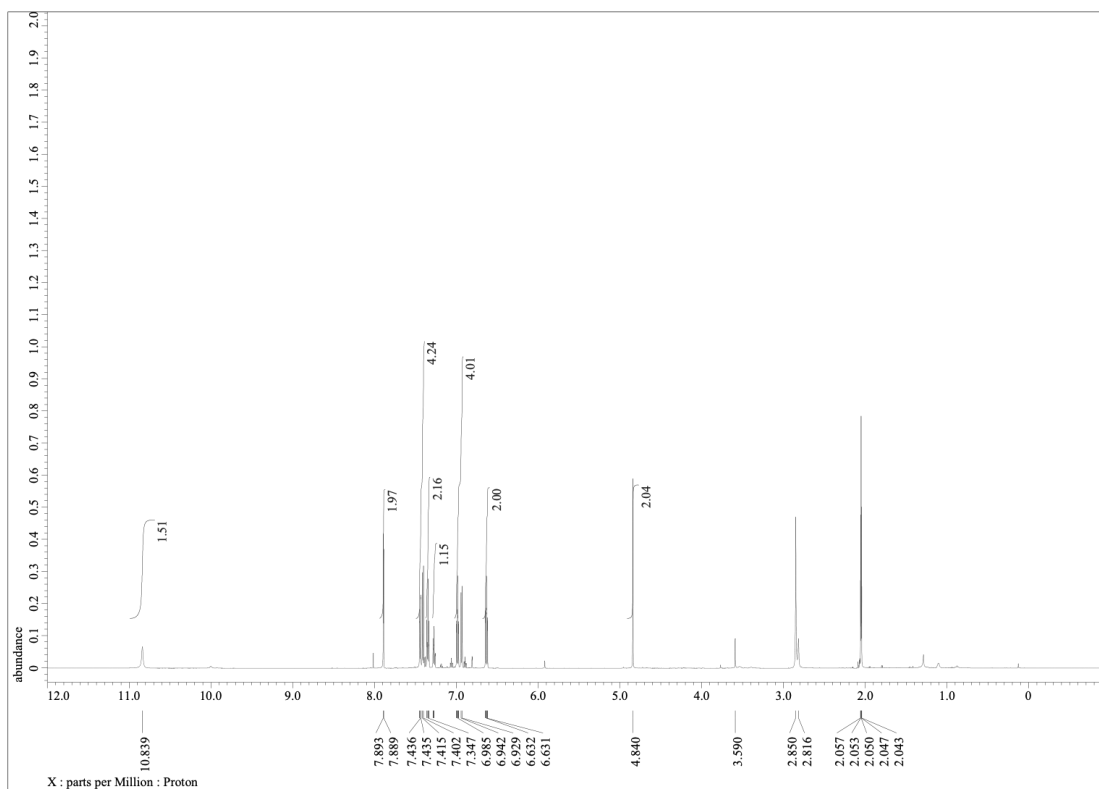


Fig. 33. 化合物 19 の ¹H NMR (Acetone-d₆)

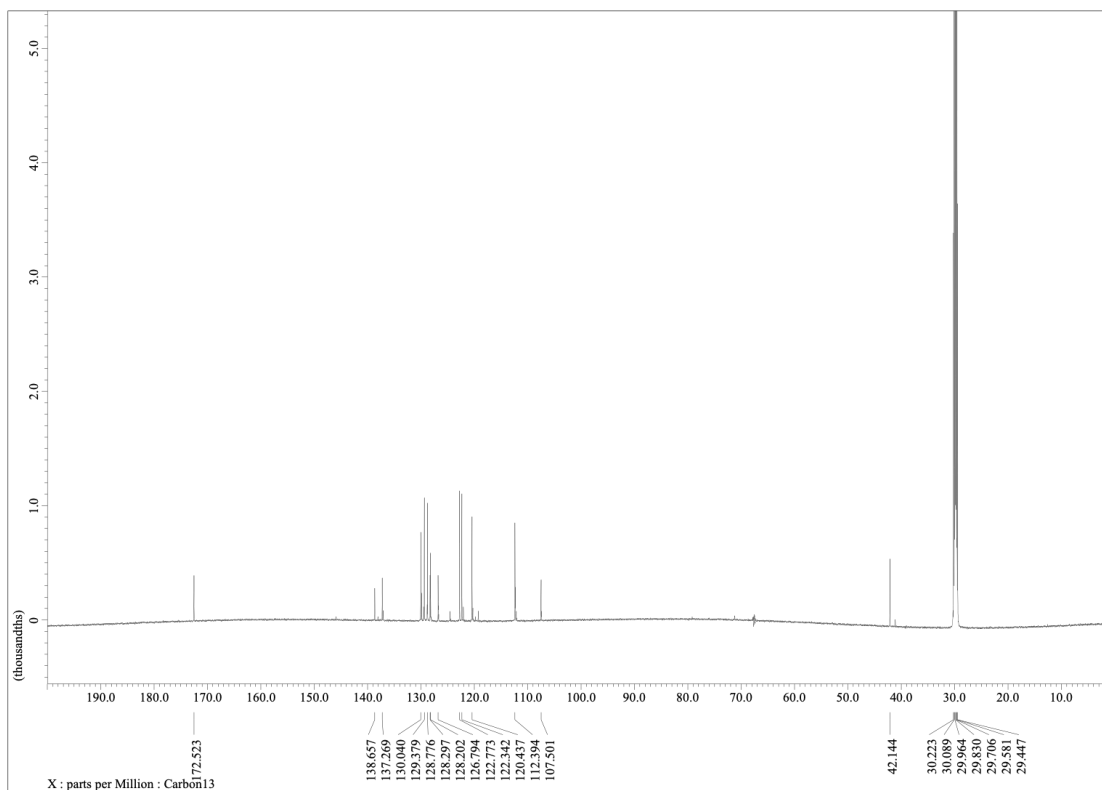


Fig. 34. 化合物 19 の ¹³C NMR (Acetone-d₆)

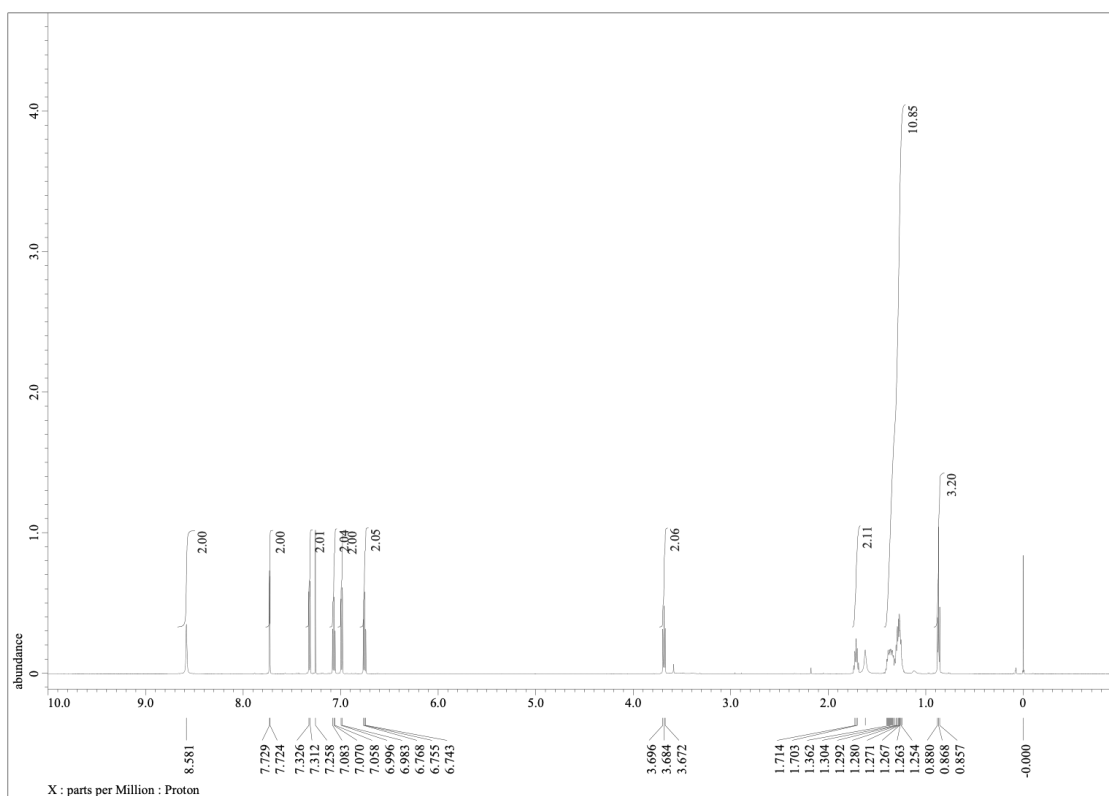


Fig. 35. 化合物 21a の ¹H NMR (CDCl₃)

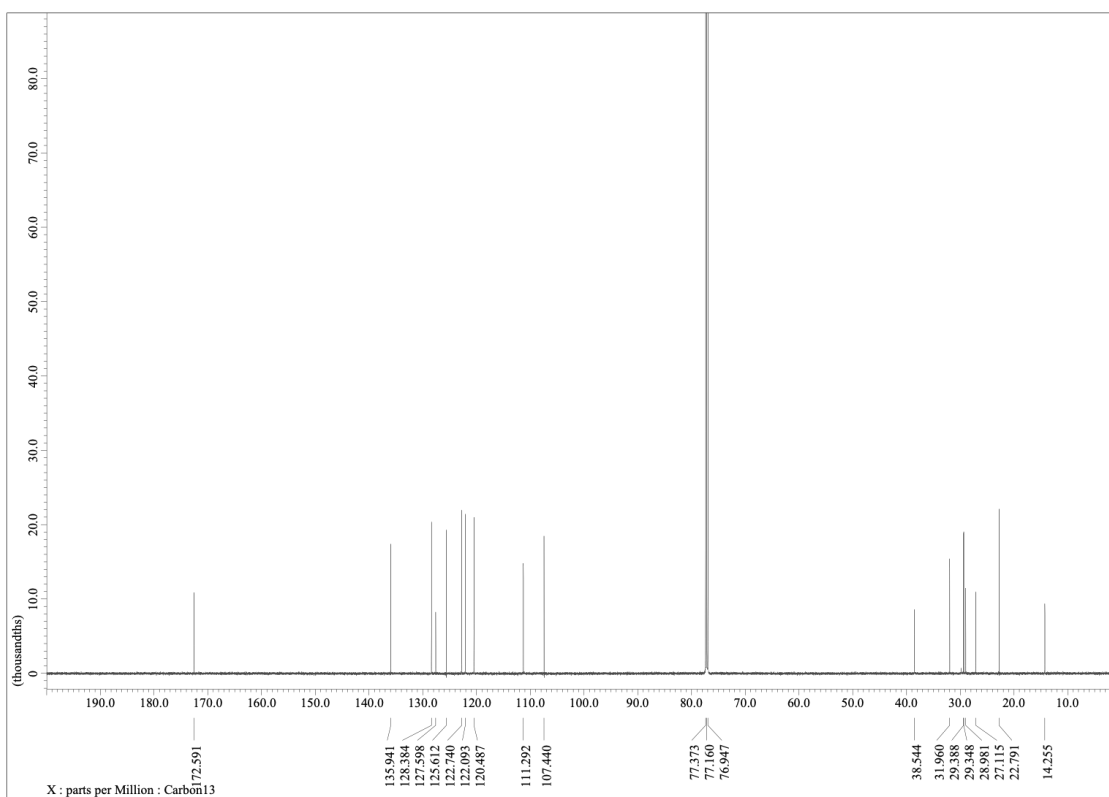


Fig. 36. 化合物 21a の ¹³C NMR (CDCl₃)

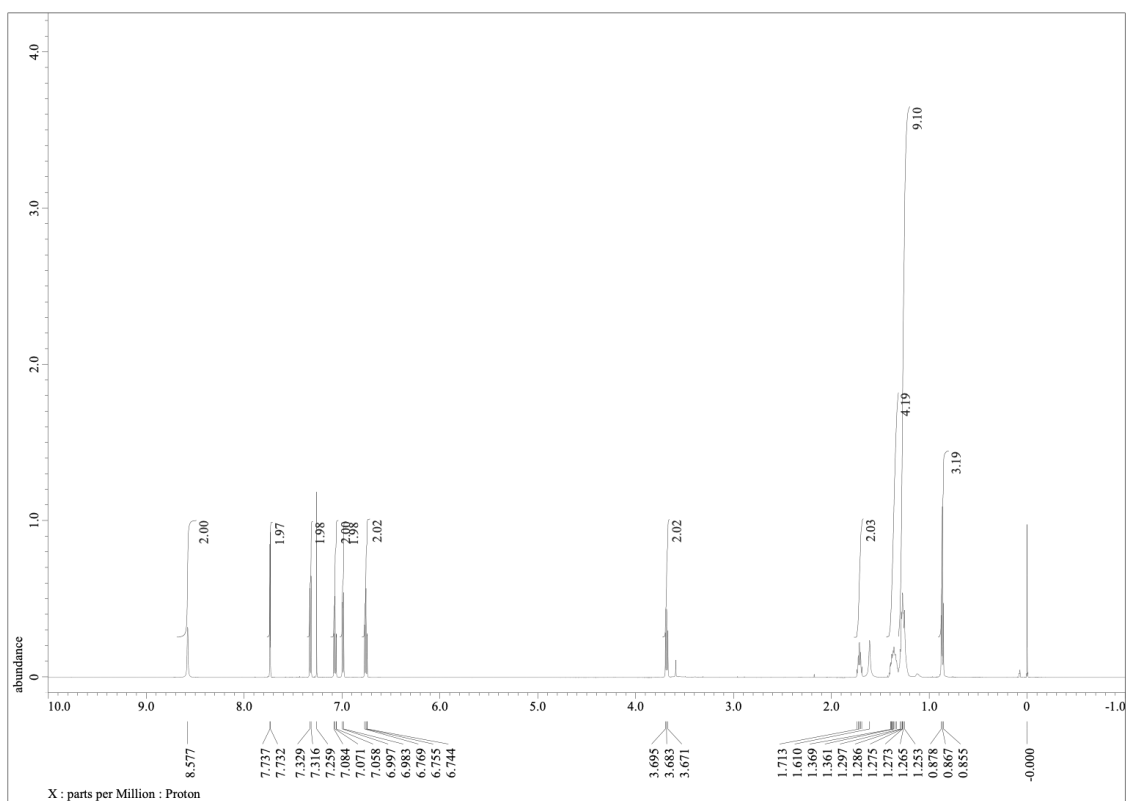


Fig. 37. 化合物 21b の ¹H NMR (CDCl₃)

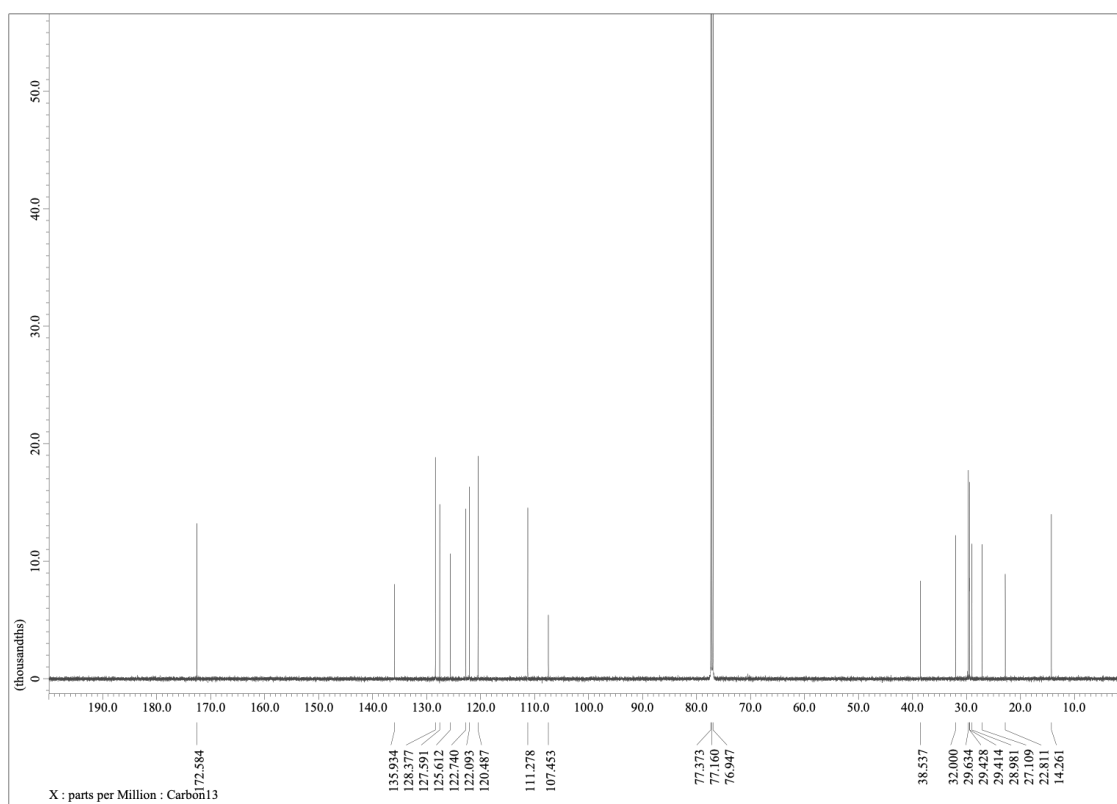


Fig. 38. 化合物 21b の ¹³C NMR (CDCl₃)