

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5～7年度 総合分担研究報告書

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

研究要旨

本研究では、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た。具体的には、HPLCの検出器として汎用されるPDAの校正用化合物や既存添加物の定量法に利用可能なシングルフアレンス(SR)用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した。検討した分子としては、広範囲の波長域にUVスペクトル吸収を有する化合物として、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を確認した。また、既存添加物であるアナトー色素の定量用SR候補化合物の誘導体として、ビスアリールマレイミド化合物の設計および効率的な合成法の確立を行った。

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を利用した定量法が設定されているものが多く、異なる装置間での定量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規定されていない。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。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(図1)についてその誘導体のUV吸収の波長変化を確認し、また、アナトー色素の一種であるビキシンのシングルフアレンス化合物について、HPLCクロマトグラム上における溶出位置を制御するための誘導体を合成した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

試薬類についてはSigma-Aldrich、東京化成工業、富士フイルム和光純薬、関東化学、ナカライテスク、Ambeed社製を使用した。「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。

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、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), もしくは残留溶媒シグナルを内部標準として補正した。質量分析は LCMS-9050 (島津)にて行った。

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度計には V-730 (日本分光)を使用した。化合物は DMSO 溶液とし、光路長 10 mm の石英セルを用いて測定した。青色 3 号 (Disperse Blue 3)は Aldrich 社製 (21,565-1, Dye content ~20%)を使用した。

C. 結果及び考察

C-1) 1,4-ナフトキノン誘導体の合成

本研究では、既報¹⁾の 1,4-ナフトキノン誘導体 **1** に対して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 (図 1)ことから、UV-Vis スペクトルの長波長化を目的として本分子の吸収スペクトルについての構造活性相関を行った。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経路を計画した (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-ナフトキノン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、想定していたように反応が進行しない場合もあり、誘導体 **4** が得られると想定していた経路では、実際には化合物 **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る。また、誘導体 **5** の

合成では化合物 **5'** が主生成物として得られた (Scheme 3)。これは化合物の構造上、分子内環化が進行してしまうため、望みの構造 **5** が得られないものと考えられた。**1** の構造中の 2 位および 5 位にアミノ基を導入した誘導体 **1'** の合成については Scheme 4 に示す経路にて行った。

C-1-1) 化合物 **2** の合成 (各化合物の NMR データは R6 報告書に記載)

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン (200 mg, 0.74 mmol) の濃塩酸溶液 (12M, 6 mL) に塩化スズ二水合物 (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, 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); ^{13}C 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, $\text{DMSO}-d_6$) 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); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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, 真空中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) および 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, 真空中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, CDCl_3) 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); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

化合物 4-2 (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, $\text{DMSO}-d_6$) 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. 反応液を真空中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, 真空中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, $\text{DMSO}-d_6$) 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 時間撹拌した．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 (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 時間撹拌した．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, $\text{DMSO}-d_6$) 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, $\text{DMSO}-d_6$) 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 時間撹拌した．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, $\text{DMSO}-d_6$) 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, $\text{DMSO}-d_6$) 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-ナフトキノン誘導体の UV 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 付近に吸収を示した (図 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た．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 吸収を示した (図 2b)．図 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 (図 2d)．これはおそらく環化したことで，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．

これまで 1,4-ナフトキノン誘導体の UV 吸収の長波長に寄与していると考えられた構造を組み合わせた構造である **1'** においては，**1** と比較して顕著な UV 吸収の長波長化は観察されなかったが，長波長域における吸収強度は増加しており，特に 500–700 nm 付近における吸収強度が増加していることが分かった．この点について，参照物質として青色 3 号 (DB3) の UV スペクトルを比較として測定したところ，500–700 nm 付近におけるスペクトルの形状に類似性がみられた．これらの化合物の分子構造の共通点として，5 位および 8 位にアミノ基を有している．この位置のアミノ基上の水素

原子は 1,4-ナフトキノンの 2 つのカルボニル酸素と分子内で水素結合を形成できるため、おそらくこの構造が両化合物の UV スペクトルの類似性に寄与しているものと考えられた。

C-3) アナトー色素定量用シングルフアレンス (SR)候補化合物の探索

立命館大学薬学部 井之上博士らとの共同により、HPLC 法で使用可能な SR 候補化合物を検討した。すなわち、図 4 に示すようなコンセプトのもと、極大吸収波長 450~500 nm で検出でき、HPLC クロマトグラム上における保持時間を制御可能な化合物の設計・合成を検討した (Scheme 5)。

C-3-1) シングルフアレンス (SR)候補化合物の探索

本研究にて、これまでにビスアリアルマレイミド分子の芳香環置換誘導体を合成している中で、2 つのインドールを芳香環として導入したビスインドリルマレイミド誘導体 **6** の吸収波長がビキシンに対する SR 化合物として有望であることが示唆された。図 5 にビスインドリルマレイミド誘導体 (赤色化合物) の UV-Vis スペクトルとビキシンの UV-Vis スペクトルの重ね合わせを示した。吸光度の強度に差はあるが、吸収波長域は類似しており、ビキシンに対する SR 化合物として適した性質を有することが示唆された。また、この誘導体については、インドール環の窒素原子をアルキル基で置換しても吸収波長の変化が軽微であるため、さらなる分子修飾による構造展開や高機能化が可能であると期待される。

C-3-2) HPLC クロマトグラム保持時間の制御

本研究におけるシングルフアレンス分子の設計方針においては、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。この方針に従い、いくつかの化合物を設計・合成した。図 6 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も試みた。図 7 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四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。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。図 8 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 分子の創出も可能であることが示唆された。C-3-2-1 の項に各分子の合成について示した。

C-3-2-1) 化合物の合成

化合物 **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℃ 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，濾液を減圧濃して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℃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.）。

化合物 **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℃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.）。

化合物 **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．

C-3-3) アナトー色素用 SR 化合物の一斉合成

本研究で検討したアナトー色素用 SR 化合物としては，ビスインドリルマレイミド骨格の分子について，HPLC クロマトグラム上における保持時間を変化させるための官能基として，直鎖炭化水素アミンを導入した誘導体（**C5-C12**）を合成した（Scheme 6）．化合物の合成については各鎖長に対応するアミンを個別に反応させて調製することが可能である．一方で，各鎖長に対応するアミンの混合物と化合物 **6** を反応させることで複数種類の化合物を一挙に合成することも可能であった．この混合物は順相シリカゲル上における極性はそれほど差がないためにそれぞれを分離することは困難であるが，逆相の充填剤（C18）においては，その疎水性の違いによって容易に分離できる．そのため，複数化合物の混合物として調製し，逆相 HPLC によって分離するという方法によって，多種の分子を一挙に合成することが可能である．この方法によってスクリーニング的に SR 候補分子を合成し，その HPLC クロマトグラム上における溶出位置を確認・比較することが可能であった（図 9）。

C-3-3-1) SR 候補分子の個別合成例

化合物 **10** の合成

化合物 **9**（Bn）（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，60℃にて 3 時間攪拌した．反応液を 0℃に冷却し，10%塩酸（8 mL）を加えて液性を酸性（pH 1~2）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 **10** を暗赤色固体として得た（275 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 C11 の合成

化合物 **10** (200 mg, 0.609 mmol) のトルエン (5.5 mL)/酢酸溶液 (0.6 mL) に、室温にて 1-アミノウンデカン (156 μ L, 0.73 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 4 : 6) することで、化合物 **C11** を赤色無定形固体として得た (115 mg, 60%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.60 (s, 2H), 7.67 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.06 (dd, $J = 8.1, 7.8$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.74 (dd, $J = 8.1, 7.8$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.74–1.70 (m, 2H), 1.40–1.32 (m, 4H), 1.29–1.24 (m, 12H), 0.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 135.8, 128.3, 127.5, 125.4, 122.6, 121.9, 120.3, 111.2, 107.2, 38.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2$ 482.2802, found 482.2807 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C5–C12 (C11 を除く) の一斉合成

化合物 **10** (120 mg, 0.365 mmol) のトルエン (3.3 mL)/酢酸溶液 (0.34 mL) に、室温にてアミルアミン、ヘキシルアミン、ヘプチルアミン、*n*-オクチルアミン、ノニルアミン、1-アミノデカンおよびドデシルアミン (それぞれ 0.052 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 (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パッド ($\Phi = 2$ cm, $h = 2$ cm, ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 1) に付し、ろ液を濃縮して回収した。得られた残渣を逆相 HPLC (Column : XBridge BEH C18 OBDTM (19 I.D x 250 mm, 5 μ m) (Waters), Flow rate : 10

mL/min, Detection : UV254 nm, Column temp. : rt, Mobile phase : 90% MeOH aq. (isocratic)) で分離精製することで、目的化合物をそれぞれ赤色無定形固体として得た (**C5**: 7 mg, 4.8%; **C6**: 6.8 mg, 4.5%, **C7**: 6 mg, 3.9%; **C8**: 9 mg, 5.6%; **C9**: 7.5 mg, 4.5%, **C10**: 7 mg, 4.2%; **C12**: 7.5 mg, 4.1%)。

化合物 C5

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 2H), 7.72 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.08 (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), 3.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.39–1.38 (m, 4H), 0.91 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.3, 29.1, 28.5, 22.3, 14.0. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ 398.1863, found 398.1859 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C6

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.08 (dd, $J = 8.4, 7.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.76 (dd, $J = 8.4, 7.8$ Hz, 2H), 3.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.31 (m, 6H), 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.4, 28.8, 26.6, 22.5, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$ 412.2020, found 412.2017 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C7

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (s, 2H), 7.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.08 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.76 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.40–1.33 (m, 4H), 1.32–1.27 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 122.0, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.7, 28.9, 28.8, 26.9, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ 426.2176, found 426.2179 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C8

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (s, 2H), 7.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 3.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.37–1.31 (m, 4H), 1.32–1.27 (m, 6H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.5, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.8, 29.2, 29.2, 28.8, 27.0, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₈H₃₀N₃O₂ 440.2333, found 440.2329 [M+H]⁺.

化合物 C9

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 8.1, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.33 (m, 4H), 1.30–1.22 (m, 8H), 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.8, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₉H₃₂N₃O₂ 454.2489, found 454.2482 [M+H]⁺.

化合物 C10

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, 2H), 7.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 8.1, 7.2 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J* = 8.1, 7.2 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.32 (m, 4H), 1.30–1.22 (m, 10H), 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₃₄N₃O₂ 468.2646, found 468.2650 [M+H]⁺.

化合物 C12

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.07 (ddd, *J* = 8.4, 7.8, 1.2 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.76 (ddd, *J* = 8.4, 7.8, 1.2 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.40–1.32 (m, 4H),

1.30–1.25 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₂H₃₈N₃O₂ 496.2959, found 496.2954 [M+H]⁺.

C-3-4) アナトー色素の調製

本研究において定量対象とした既存添加物のアナトー色素であるビキシシ (*cis*-Bx) およびノルビキシシ (*cis*-NBx) にはそれぞれ *trans* 異性体が存在する。これらを測定対象とするため、*cis* 体の Bx および NBx それぞれを異性化させることで *trans* 体を調製することを試みた。得られた化合物は共同研究者に提供した。以下に方法を記載した。

C-3-4-1) ビキシシの異性化による *trans*-ビキシシへの変換

ビキシシ (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℃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*-ビキシシの粗精製物を暗赤色固体として得た (165 mg)。

C-3-4-2) ノルビキシシの異性化による *trans*-ノルビキシシへの変換

ノルビキシシ (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℃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*-ノルビキシシの粗精製物を暗赤色固体として得た (220 mg)。

HPLC 分析条件 (図 10)

(HPLC conditions)

Column : TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 x 150 mm, 5 μm)(Tosoh), flow rate : 1 mL/min, Detection :

UV460 nm, column temp. : 40°C, Mobile phase; 0.1vol% AcOH in H₂O/ 0.1vol% AcOH in MeOH = 10 / 90, v/v.

D. 結論

PDA 校正用の標準物質の開発においては、長波長域に吸収を有する化合物として 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。基の分子である **1** の 2 位にニトロ基を有する誘導体において UV スペクトルの長波長化がみられた。また、複数の置換基を組み合わせた誘導体 **1'** について UV-Vis スペクトルを測定した。誘導体 **1'** は基の分子である **1** と比較して顕著な長波長化は観測されなかったが、500–700 nm 付近の吸収強度が増加した。この誘導体 **1'** は既存の色素分子である青色 3 号の分子構造に共通した構造を有しており、UV スペクトルの類似性がみられたことから、500–700 nm 付近の吸収強度の増加はこの部分に起因することが示唆された。今後はこの化合物構造をベースとし、構造情報を蓄積するとともに偶然や経験に頼るだけでなく、理論的に吸収スペクトルの制御できる設計指針を立てることが重要と考えられる。

既存添加物の SR 候補化合物の開発については、「1) 比較対象と類似の UV 吸収を示す構造を選択し、2) 導入する炭化水素基で HPLC クロマトグラム上の保持時間を調整する」という方針のもと、複数の誘導体の一斉合成法を確立した。HPLC 法によって定量を行うことを想定した場合のデザインとしては、設計コンセプトの成立がなされたと考えている。今後は定量対象であるアナトー色素類との HPLC クロマトグラム上における保持時間を比較して候補となる誘導体を選定、定量 NMR による候補化合物の純度の値付けを行い、定量への応用に向けた検討を進める予定である。

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 .

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. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会 (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

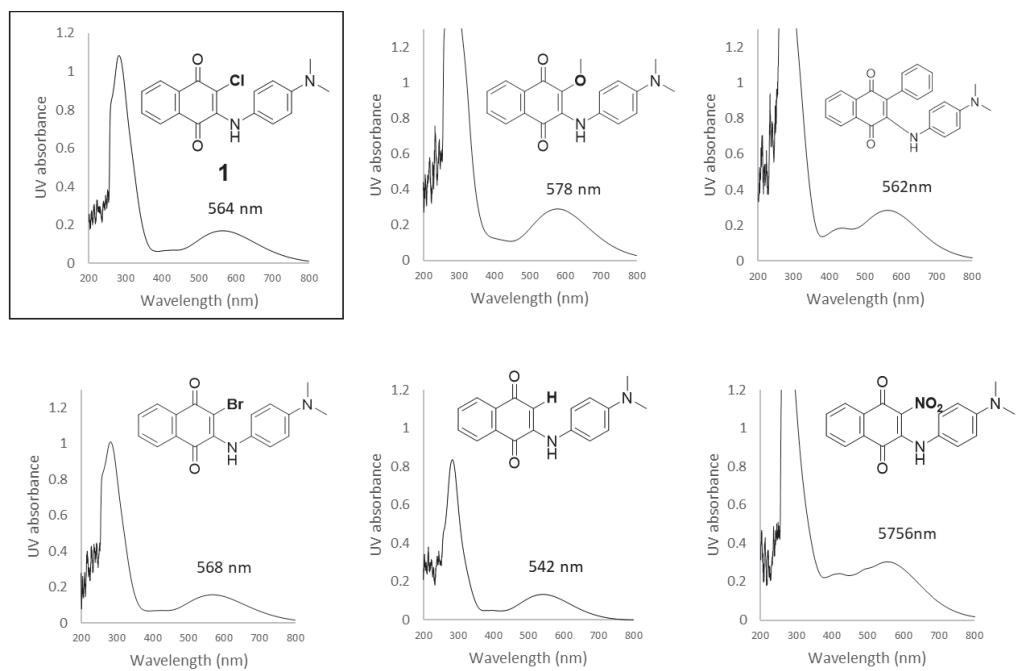
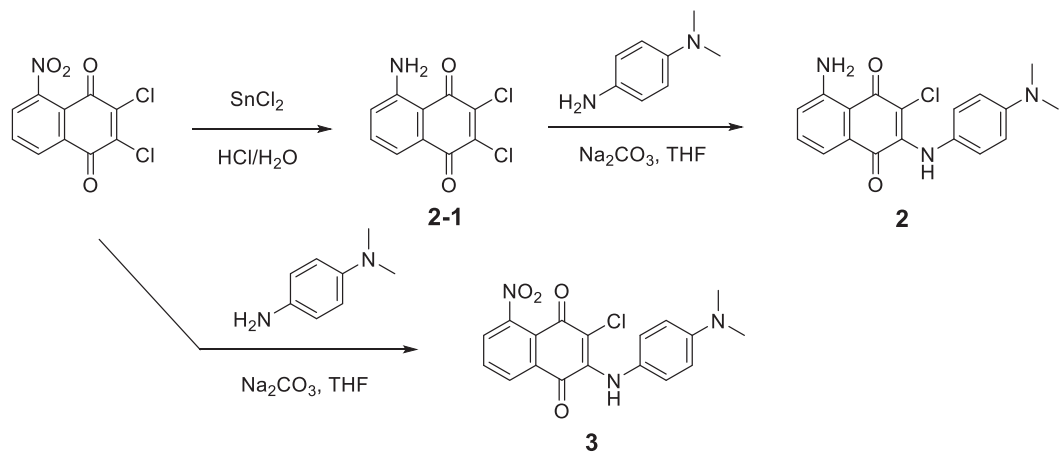
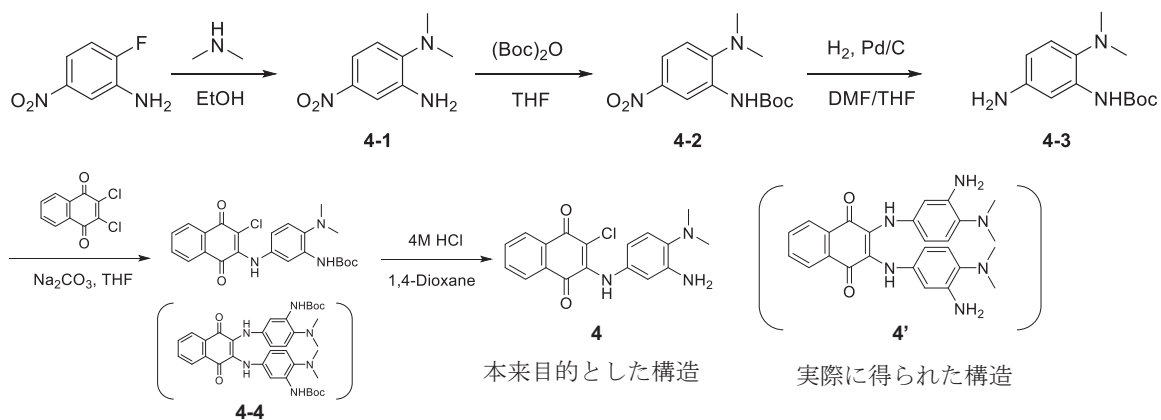


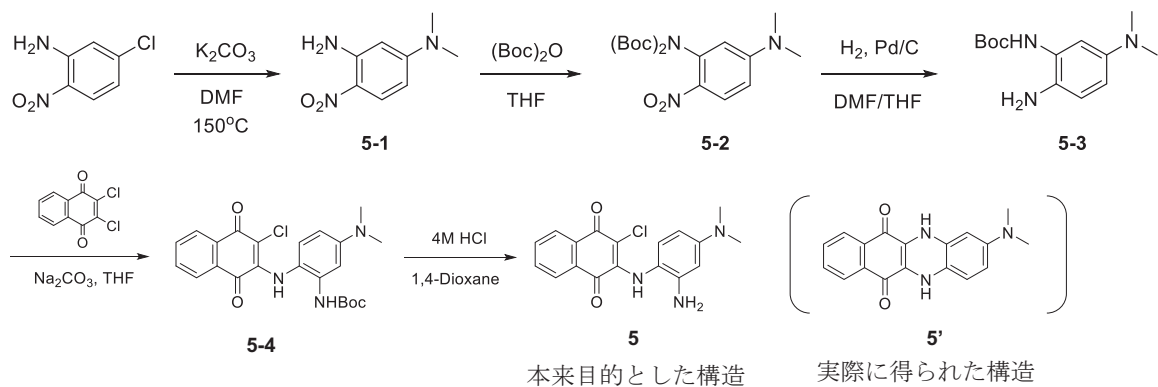
図 1. 1,4-ナフトキノ誘導体の UV-Vis スペクトル (1)



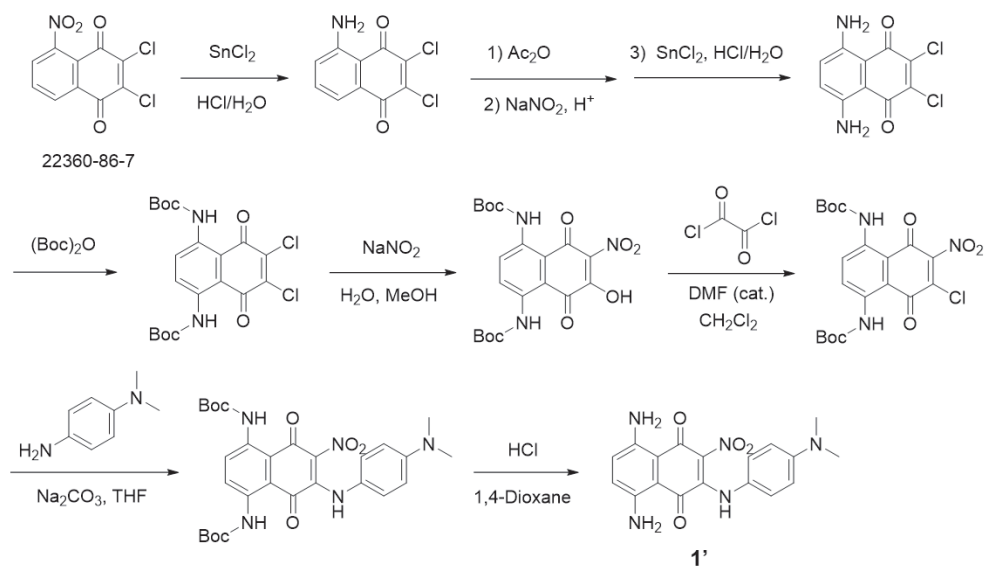
Scheme 1. 1,4-ナフトキノ誘導体 **2** 及び **3** の合成



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



Scheme 4. 1,4-ナフトキノン誘導体 1' の合成

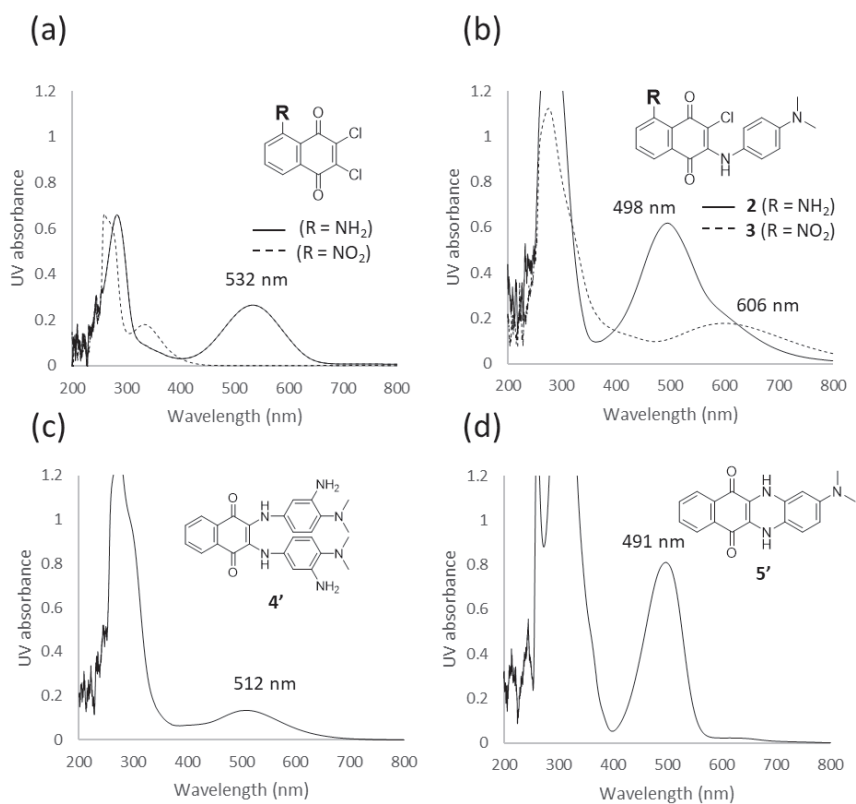


図 2. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (2)

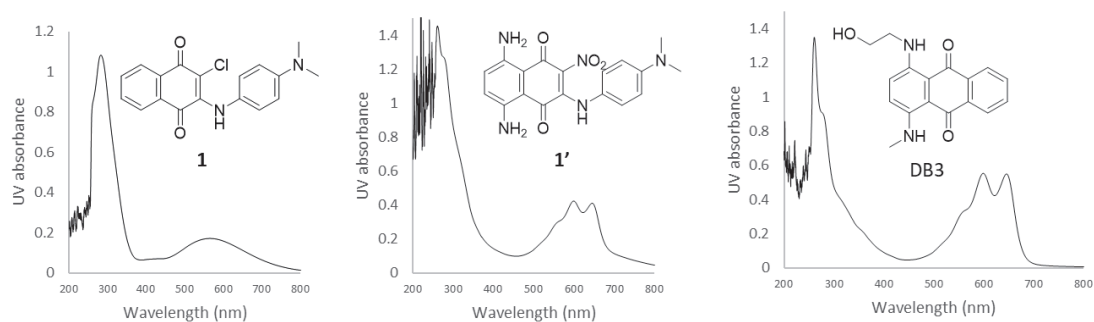


図 3. 1,4-ナフトキノ誘導体および青色 3 号(DB3)の UV-Vis スペクトル

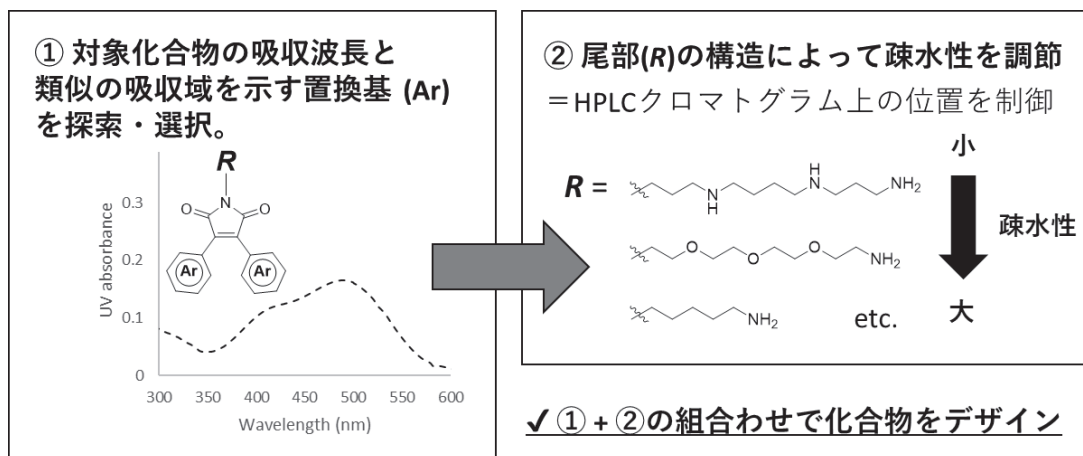
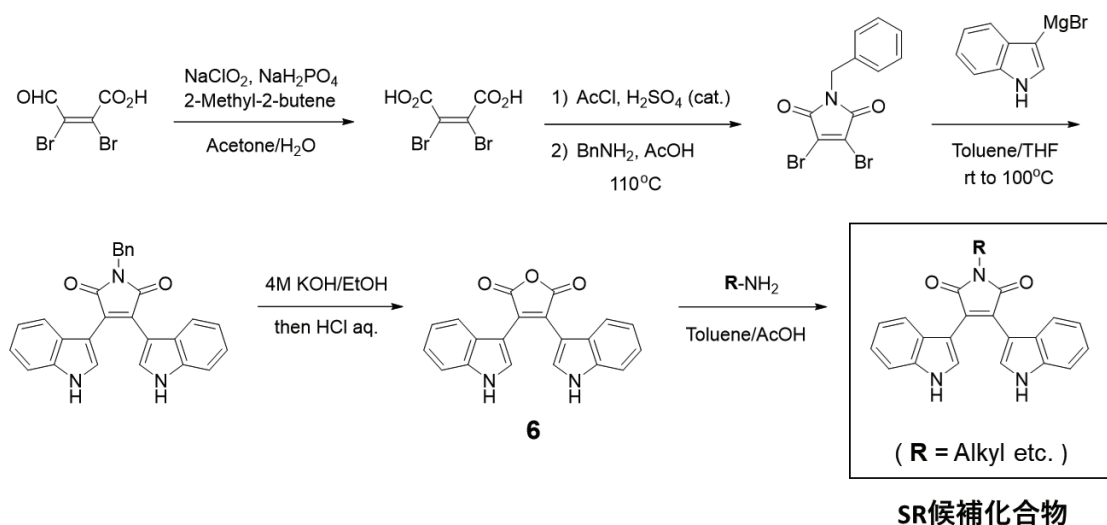


図 4. 本研究における SR 化合物のデザイン



Scheme 5. SR 候補化合物(ビスインドリルマレイミド誘導体)の合成

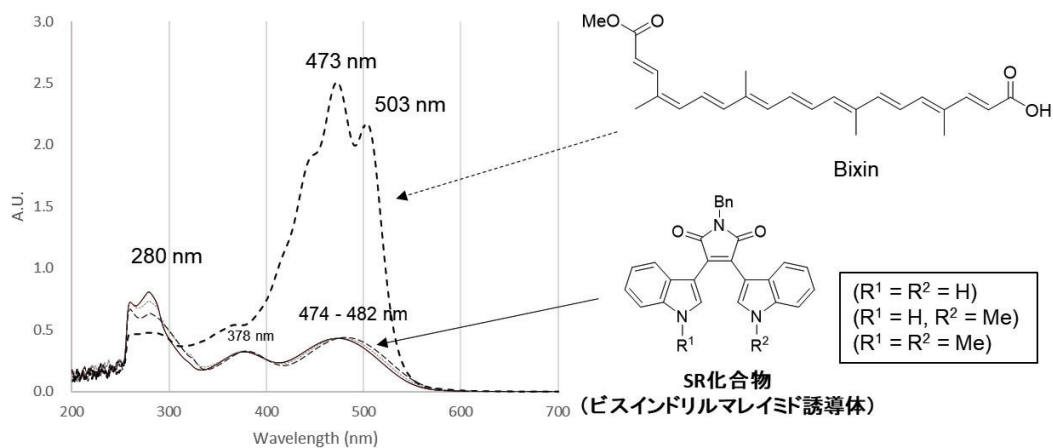


図 4. ビキシシと SR 化合物との UV スペクトルの重ね合わせ

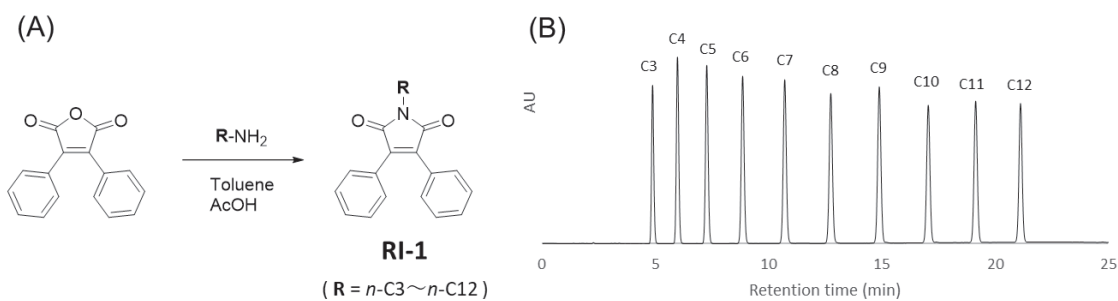


図 5. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-1(C3-C12 の混合物)の合成(A)とその HPLC 痕跡(B)

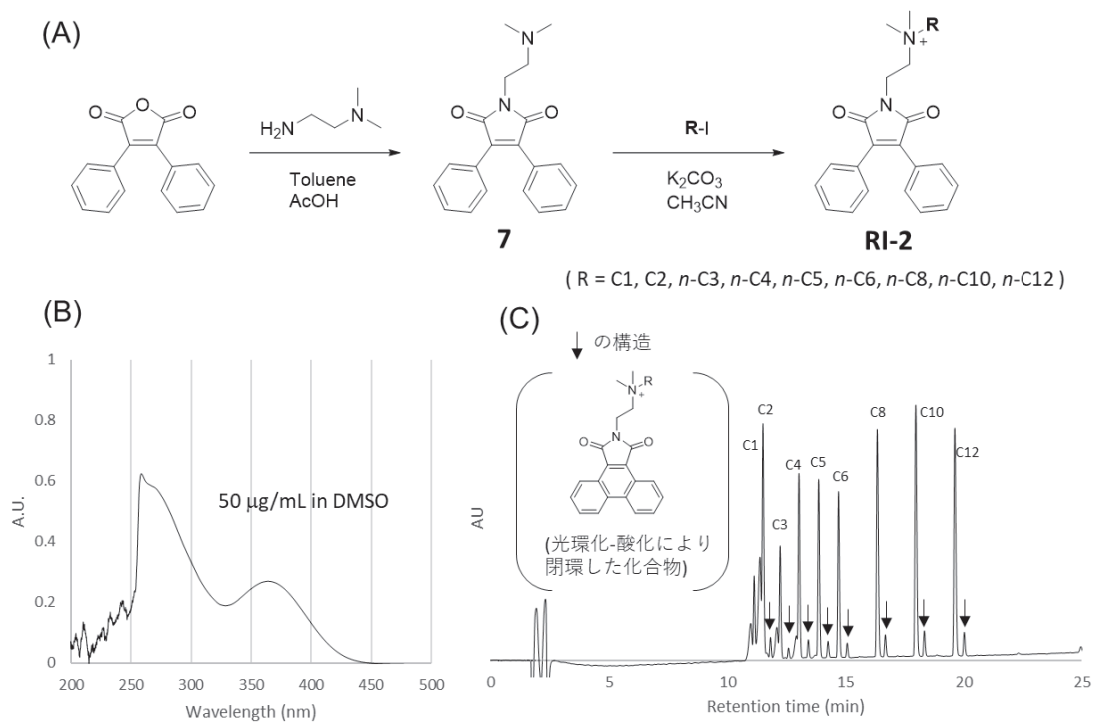


図 6. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-2(C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10 および C12 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B), HPLC 痕跡(C)

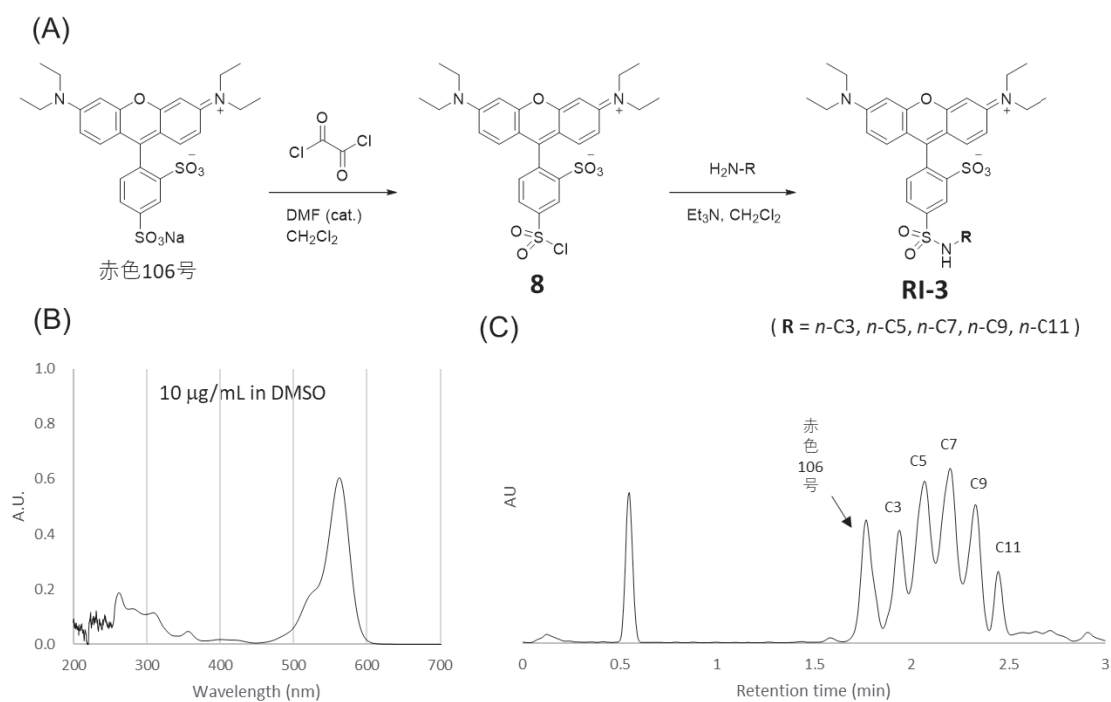
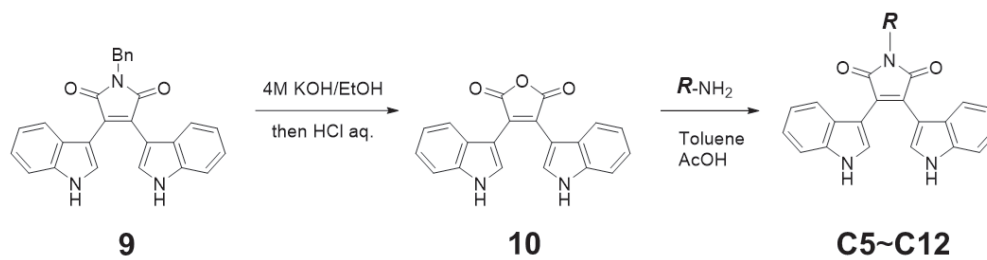


図 7. 赤色 106 号誘導体 RI-3(C3, C5, C7, C9 および C11 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B), HPLC 痕跡(C)



Scheme 6. ビスインドリルマレイミド誘導体の一斉合成

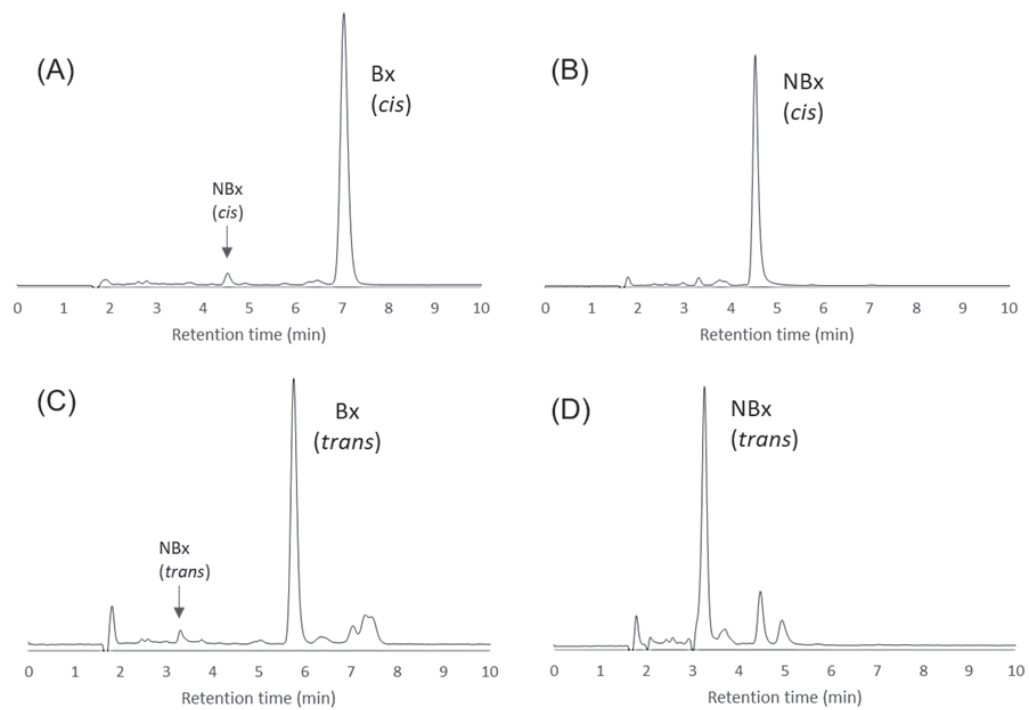


図9. ビキシシ (Bx)およびノルビキシシ (NBx)の異性化のHPLC痕跡
 (A) *cis*-Bx単独, (B) *cis*-NBx単独, (C) Bxの異性化反応物, (D) NBxの異性化反応物