

阿波藍に含有される有用微量成分の有効利用に関する研究

河村 保彦^{1*}, 西内 優騎¹

Research on Development of Utilization of Active Fine Ingredients Containing in Awa Indigo Plant (Awa-ai)

by

Yasuhiko KAWAMURA, Nishiuchi MASAKI

This study is aiming at development of the synthetic methods of the active fine ingredients containing in Awa indigo Plant (Awa-ai). The long tradition of the indigo dyeing is prevailing over a thousand year here in the Tokushima Prefecture, and historically the Ai-leaf had been sold in Kansai area about 550 years ago. Although our concern on the Ai-leaf used to be centered on a dyeing stuff, several biologically active ingredients have been reported recently contained in the Awa Indigo Plant. We have, therefore, been interested in these fine ingredients and here wish to develop the efficient and ecofriendly synthetic methods of such remarkable ingredients. The synthetic methods reported here are the methods activated by microwave (MW) irradiation and photoirradiation of the ultraviolet light (UV).

Key words: Awa Indigo Plant, Active Fine Ingredients, Synthesis, Microwave Reaction, Photochemical reaction

1. まえがき

本研究では、徳島県特産の阿波藍中の微量有用成分に着目し、これらの物質の医薬リード化合物ならびに機能性有機分子としての可能性を探る。藍は染料としての利用以外に、巷間では経験的に健康上の利点が謳われてきたが学術的根拠は乏しいものであった。しかし最近藍成分

の分子化学研究が進み、その関係の情報が集積されつつある。それらには発ガン抑制、対ピロリ菌活性、アトピー抑制、抗炎症作用等があり、主として藍含有の芳香族含窒素複素環化合物の作用によることが明らかにされている。¹本研究では、阿波藍を地場産業振興の鍵として染料としての利用はもとより、その中に含まれる微量有用成分に着目し、それらをより多量かつ安価に、しかも多種類が供給できる合成化学の手法開発に取り組んだ。それらの有用成分が簡便に得られるようになれば、医薬リード物質および機能性材料の基礎化合物等としての利用促進につながると期待される。

2. マイクロ波による反応活性化

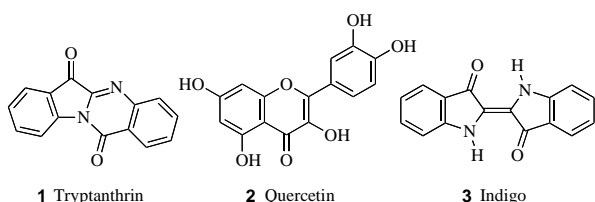
藍染めは徳島の文化の一つとして全国的に広く知られている。藍色の主成分はインジゴによ

¹ 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門物質変換化学大講座
Institute of Technology and Science, Department
of Chemical Science and Technology, The
Universtiy of Tokushima

*連絡先：〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門物質変換化学大講座

るものだが、近年藍にはインジゴだけでなく様々な有用成分が含まれることが明らかにされている。それらには、トリプタンスリン、カフェイン酸、没食子酸やケルセチン、ケンフェロールといったフラボノイドも含まれる。これら有用成分には、抗がん、抗酸化、抗炎症などの作用があることが明らかにされている。全国的にはこれらの成分に着目した商品開発も進んでいる。

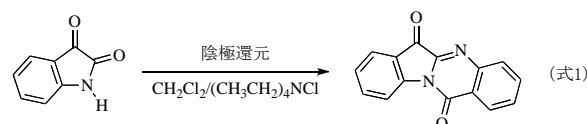
本研究では阿波藍に含まれる微量有用成分の中でも、トリプタンスリン (Tryptanthrin, **1**) とポリヒドロキシフラボンであるケルセチン (Quercetin) 等のフラボン類 (**2**) ならびにインジゴ (Indigo, **3**) の3種に注目した。例えばトリプタンスリンは試薬としての純粋品の市場価格は 10,000 円 / mg 程度と非常に高価だが、大量生産が可能となれば、安価に市場供給できる。またフラボン類については有用な生理活性が知られているものの、市場供給すらされていない物質も多い。あわせてこの研究の途上見出される有機合成化学の手法は、様々な関連の複素環化合物の合成にも有用と期待される。また近年のトリプタンスリンの論文発表件数は、一様ではないものの増加傾向にあり、有機合成化学の観点においても興味深い研究対象と考えられる。



2-1. トリプタンスリンの合成

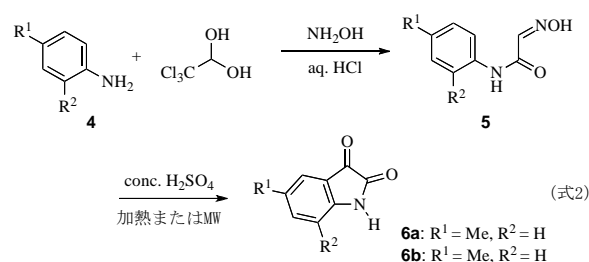
トリプタンスリン **1** の合成は、これまで 10 例ほど報告されている。そのうち、出発物質の利用し易さや反応の取り扱い易さを考慮し、有機電解合成法ⁱⁱとマイクロ波 (MW) 法ⁱⁱⁱに焦点を絞った。本研究ではまずそれらの方法の再現性確認とコンビナトリアル合成法への展開の可能性を検討した。

まず有機電解合成法について検討したところ、目的としたトリプタンスリン **1** の収率が低く、また反応前後の処理も煩雑で様々な置換基を有したトリプタンスリン誘導体の一般的合成法として展開するには困難と考えられた (式 1)。

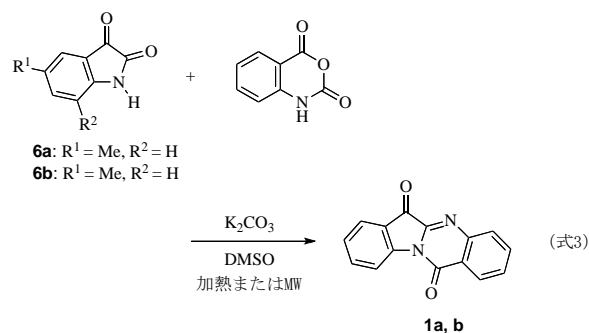


そこで次にマイクロ波法^{iv}を検討した。

原料となるイサチンおよびその誘導体 (**6a, b**) の合成には、改良サンドマイヤー法を用いた。市販のアニリン (**4**) と抱水クロラルから中間体イソニトロソアセトアニリド (**5**) を合成し、**5** を濃硫酸中閉環させてイサチン誘導体 (**6a, b**) を得た (式 2; 加熱 60~80 °C, 10 min または MW, 2.5 min)。続いて、別途合成したイ



サト酸無水物 (**7**) と **6** を MW 加熱下カップリングさせ、目的のトリプタンスリン **1** を良好な収率 (65~85%収率) で得ることができた (式 3)。



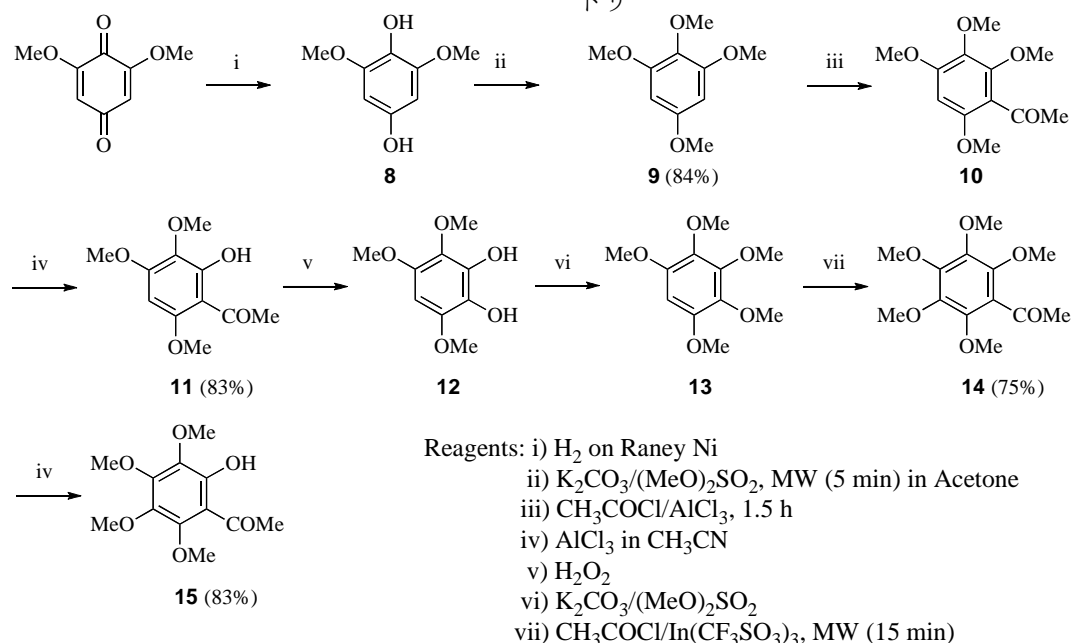
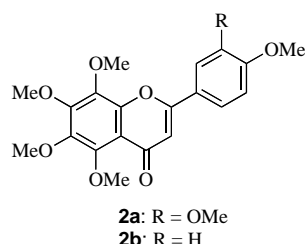
この方法は、主要な2段階の反応 (加熱閉環によるイサチン **6** の合成ならびにイサト酸無水物 **7** とのカップリング) に MW 加熱を用いた。この方法により、数種の出発物から短時間 (約 3 分) かつ良好な収率でトリプタンスリン **1** が合成できた。適切な前駆体をデザインすることで、多品種の合成をねらいとしたコンビナトリアル法へ展開できると考えられる。MW 加熱による反応活性化法はエネルギー効率が従来の加熱法に比べると格段に高い (約 5 分の 1 のエネルギー消費) ので、グリーンケミストリーの観点から評価できる合成法であると考えられる。

マイクロ波を活性化に用いる合成反応は、短時間・高収率で反応過程が進行し、グリーンケ

ミストリーの観点から熱エネルギーを反応混合物に効率良く伝達できる点で評価できる優れた方法であるといえよう。今後は、実験室スケールでの合成法からどれほどのスケールまで拡大できるか検討する必要がある。

2-2. ポリアルコキシフラボンの合成

フラボンをはじめフラボノイドや大豆イソフラボンなどイソフラボノイドは、広く自然界に分布している。特に柑橘類に含まれるフラボノイドは、抗しゅよう、抗酸化、ならびに抗炎症作用があることが知られる。^vこうした観点から、フラボノイドは、予防医学や薬学の分野のみならず、食品科学や化粧品分野でも大いに関心を集めている。従来この種のフラボノイドの合成には様々な合成法が用いられてきたが、必ずしも収率、操作、反応時間や試薬コスト等の観点から不満足な例も少なくない。本研究では、特にケルセチン、ケンフェロール等の藍含有生理活性フラボンの合成前駆体となるポリメトキシフラボン (**2**) の合成について、従来法に代わり得る合成法としてマイクロ波 (MW) 加熱を用いた合成法について検討した。



Scheme 1. Syntheses of the key intermediates.

まず 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノ^{vi}をラネーニッケルを触媒とした接触還元で、2,6-ジヒドロキシ-1,3-ジメトキシベンゼン (**8**) とした。このベンゼン誘導体 **8** をマイクロ波 (MW) 照射下、5 分間炭酸カリウム-ジメチル硫酸によりメチル化したところ、目的のテトラメトキシベンゼン (**9**) が 84% の収率で得られた。続いて **9** を塩化アルミニウム存在下塩化アセチルによりアセチル化してテトラメトキシアセトフェノン (**10**) とした後、塩化アルミニウムを作用させ部分脱メチル化により、2'-ヒドロキシアセトフェノン (**11**) を 83% の収率で得た。他方この一連の反応を MW 照射下行ったところ、ベンゼン **9** はインジウムトリフレート (2%) 存在下、塩化アセチルにより無溶媒、6 分間の反応で所要のアセトフェノン **11** を主生成物に、また 2'-アセトキシ-3',4',6'-トリメトキシアセトフェノンを副生成物として得た。^{vii}後者のアセトフェノンは、同様に MW 照射下 2'-ヒドロキシアセトフェノン **11** に容易に誘導することができた。さらにアセトフェノン **11** は、6% 過酸化水素水による酸化転位で 2,3-ジヒドロキシベンゼン (**12**) を生成し、^{viii}さらにジメチル硫酸-炭酸カリウム法により容易にメチル化され、ペンタメトキシベンゼン (**13**) に誘導できた。さらにこの **13** を前者と同様 MW 法により、インジウムトリ

プレート (0.5%) 存在下, 塩化アセチルにより無溶媒, 15 分間の反応で所要のペンタメトキシアセトフェノン (**14**) に 75% 収率で誘導できた。この際副生成物の生成は認められなかった。続いてアセトフェノン **14** をアセトニトリル中, 塩化アルミニウムにより部分脱メチル化し, 83% の収率で 2'-ヒドロキシアセトフェノン (**15**) とした (Scheme 1)。

さらに少量のピリジン存在下アセトフェノン **15** を MW 照射条件下, 塩化ベンゾイル (**16**: $R^1 = R^2 = H$) によりベンゾイルエステル化したところ, 4 分間の反応で 75% の収率で目的のベンゾエート **17** を得た。こうして得られた **17** を同じく MW 照射下, 少量のピリジンを共存させ水酸化カリウムの作用で Baker-Venkataraman 転位反応を起こし, 所要の 1,3-ジケトン **18** に誘導した。最後に再び MW 照射下, 少量の酢酸共存のもと濃硫酸を作用させ目的のテトラメトキシフラボン (**2**: $R^1 = R^2 = H$) を 81% の収率で得た。

これらの化学変換過程と同様に, まずポリメトキシアセトフェノン **14** を塩化 4-メトキシベンゾイルを作用させ, 2.5 分間マイクロ波を照射することで所要の 4-メトキシベンゾエート **19** とした。さらに上記と同じく MW 照射下, 5 分間ピリジン中水酸化カリウムと反応させ粗製のベンゾエート **19** を転位させてジケトン **20** とした。再度 MW 照射下, 少量の酢酸中濃硫酸を作用させジケトン **20** を環化させ目的のペンタメ

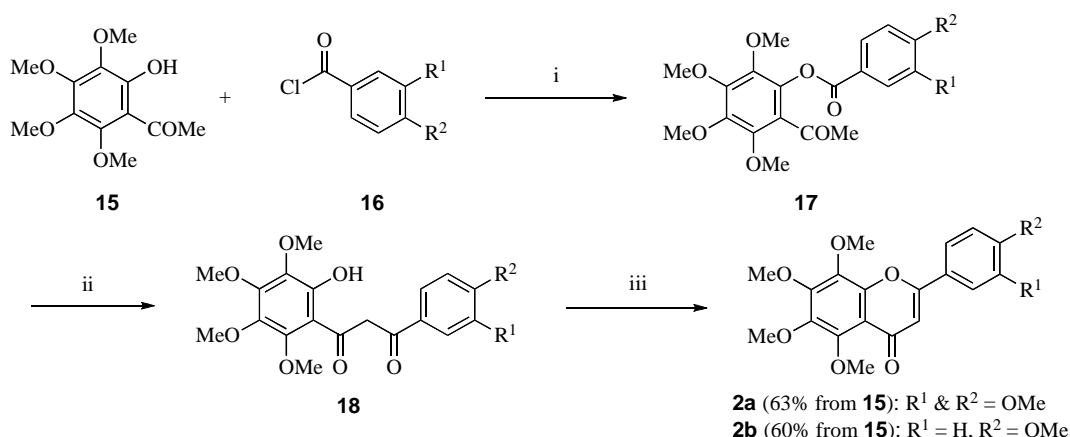
トキシフラボン (**2b**) をアセトフェノン **15** から総収率 60% で得られた。

ヘキサメトキシフラボン (**2a**) の合成も, 基本的に上記の反応と同様な手法により容易に合成できた。まず, 中間体アセトフェノン **15** を MW 照射条件下, 塩化 3,4-ジメトキシベンゾイルにより 2 分間ベンゾイルエステル化したところ, 目的の 3,4-ジメトキシベンゾエート **21** を得た。次に化合物 **21** をジケトン **22** に誘導した後, MW 反応 (3 分) によりアセトフェノン **15** から総収率 63% でフラボン **2a** に誘導できた (Scheme 2)。

以上の二つの例から, 複素環化合物の合成における各ステップにマイクロ波照射を用いることにより, 環境適合型合成反応が短時間かつ良好な収率で進行することが示された。

3. 光片道異性化によるインジゴ様多置換アルケンの合成

アルケン (炭素-炭素二重結合を有した化合物) の光異性化に関する研究は数多く行われており, 乳幼児の黄疸を治療する光療法^{ix}やナノメカトロニクス分子モーターなど医薬から機能性材料にいたる幅広い分野で利用されている。藍に含まれる染料成分のインジゴ [**3**: 2,2'-Bis(2,3-dihydro-3-oxoindolylidene)] も特徴あるアルケン構造を有している。アルケンは二重結合周りの幾何異性体 (*cis*-及び *trans*-体または (*Z*)-及び (*E*)-体) が存在し, 例えばイ



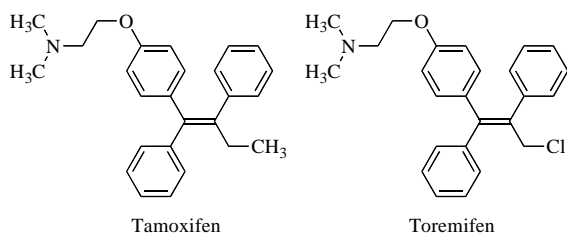
Scheme 2. Syntheses of polymethoxyflavones.

Reagents and conditions:

- i) MW (2 min) in the presence of minimal amount of pyridine
- ii) KOH, MW (4 min) in minimal amount of pyridine
- iii) concd. H_2SO_4 , MW (3 min) in minimal amount of acetic acid

ンジゴ **3** では *trans*-体のみが存在する。また後述するが、医薬においても一方の幾何異性体だけが効能を示すといった例は少なくない。従って、こうした幾何異性体の一方だけを簡便に生成する方法は、学術的にもまた実用面においても価値あるものと考えられる。一般に熱エネルギーによる異性化では、炭素-炭素二重結合を一旦開裂する必要があるため、起こり得ないとされる。他方、炭素-炭素二重結合は光を吸収しいわゆる励起状態となると、二重結合が開裂した様な状態になるため、*cis-trans* 幾何異性化が起こる得る。しかし、種々の条件からその異性化の方向性は *cis* → *trans*, *trans* → *cis*, (片道異性化) であつたり、*cis* ⇌ *trans* (双方向異性化) であつたりといった現象が起こる。通常純粋な片道異性化はまれで、大多数は多少とも双方向異性化である。

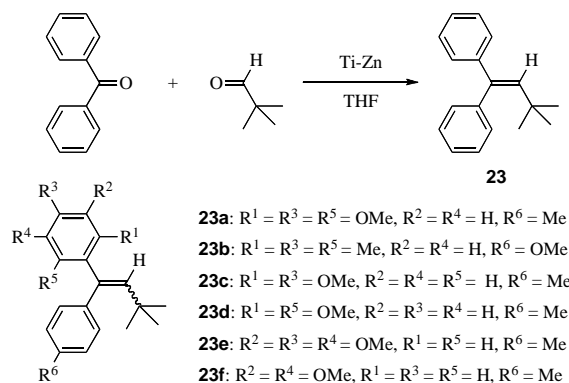
以上のように学術的側面とならんで光異性化を実用的に発展させるためには、反応機構、分子構造、さらに光照射条件等の解明が必須である。本研究では、1,1-ジアリールエテン (**23**) を対象物質とし、医薬などの合成に有益な片方の異性体のみが得られる「片道異性化」の実現を目標として研究を行った。アルケン **23** は藍の天然染料成分として旧知のインジゴ **3** と同じく多置換アルケンであり、また乳癌の抗がん剤として使用される Tamoxifen や Toremifen (非ステロイド系抗エストロゲン薬：エストロゲン受容体をブロックしてがん細胞の増殖を抑制する) の類似物質である。これらの医薬を製造する際には炭素-炭素二重結合周りの *cis-/trans*-異性体 ((*Z*)-/(*E*)-異性体：以降こちらの標記を用いる。) の混在が常につきまとい、一方だけを特異的に生成する化学反応の開発や、混合物から所要の異性体だけを分離精製する方法は現在も重要な課題となっている。



ジアリールエテン **23** のアリール基ベンゼン

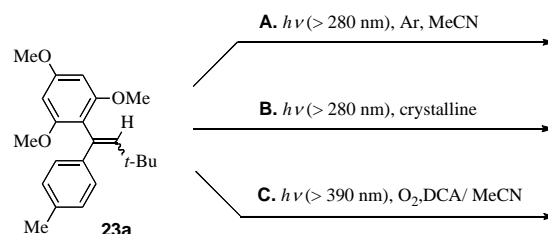
環上の置換基をメトキシ基とメチル基に固定し、固相における直接光照射反応、液相における光増感電子移動 (PET; Photosensitized Electron Transfer) 反応といった様々な光照射条件下における光異性化反応について検討した。

対象としたエテン類 **23** は、対応するベンゾフェノン合成とアルデヒドによるカルボニルカップリング (McMurry) 反応を用いて合成した (Scheme 3)。続いてエテン **1** を固体状態 (結晶



Scheme 3. 1,1-Diarylethenes **23**.

試料の微粉末)あるいはアセトニトリル溶液中、9,10-ジシアノアントラセン (DCA) を光増感剤として共存させた溶液を酸素雰囲気下、それぞれ Scheme 4 の条件で光照射した。



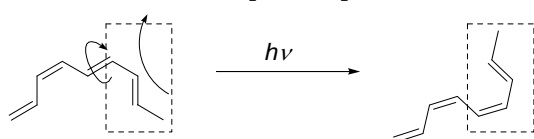
Scheme 4. Reaction conditions of the photoreactions of the ethenes **23** (the ethene **23a** as a typical example).

一般的に考えられている McMurry カップリング反応のメカニズムでは異性体比に選択性は出現しないが、オルト位に置換基を所持するエテン **23a-23d** においては *Z* 体が優先的に得られた (*E/Z* = 2/98 ~ 12/88)。これは、中間体として存在するアニオンラジカルの構造が特異的であるあることが要因となって異性体選択性が出現したと考えられる。エテン **23a** については単結晶 X 線構造解析によって異性体を決定することができた。その他のエテン類についても ¹H NMR は異なった異なったピークを示し、**23b**,

23f を除いては HPLC による分離が可能であったため、これらを用いて上記の光反応 (Scheme 4) における異性体比を決定した。

A. 結晶状態のエテン **23a**, **23d**, **23e** の直接光照射では、**23e** は無反応であったものの **23d** は異性化が進行し、特に **23a** では *Z* 体から *E* 体への片道異性化が進行した。結晶状態やポリエテンといった分子周辺の空間が狭い系では、溶液系とは異なった異性化機構となると考えられる (Figure 1)。

Conventional one-bond-flip (OBF) process



The hula-twist (HT) process

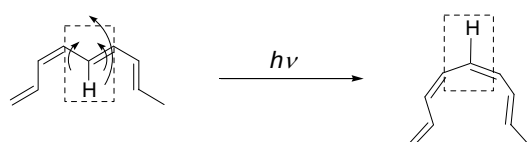


Figure 1. Plausible reaction mechanisms.

これまでの研究によれば、溶液系では分子の半分が回転する one-bond-flip (OBF) 機構、結晶系では分子の大半は平面を保ち、二重結合とそれに結合する水素部分がスライドするような遷移状態を経由する Hula-Twist (HT) 機構で進行すると考えられている。

エテン **23a** では単結晶が得られたため、HT 機構で重要となる分子構造とパッキングについての情報を得ることができた。その結果、エテン **23a** の *E* 体と *Z* 体にはアリール基の傾き方

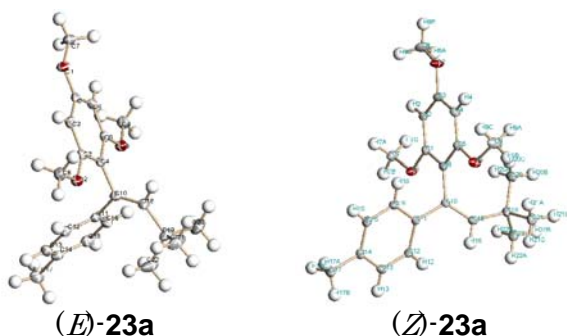


Figure 2. Crystal structures of the ethenes

(E)- and (Z)- 23a.

に大きな違いがみられた (Figure 2)。

結晶パッキングの観点からは、一般的にいわれているように込みいった系 (*Z* 体) から空いた系 (*E* 体) への異性化であった。しかし、大きな質量を有した置換基を伴って Hula-twist 機構で進行するとは考え難い。さらにこれまで HT 経路での異性化が報告された物質を検討すると、これらすべての共通点としてビニル水素のみならず、その α 位炭素が二重結合を所持していることが分かった。つまり、今回対象としたエテン類は特殊な例であり、一般的な HT 機構とは異なった機構を経由する可能性が高いと考えている。

B. 9,10-ジシアノアントラセン (DCA) を増感剤とした酸素雰囲気下での PET 反応では、エテン **23a**, **23c**, **23e** において直接光照射とは反対向きの *E* 体から *Z* 体への片道異性化が進行した。これはこれまでに報告されているように、光照射によって生成したカチオンラジカルの構造が、*E* 体が直交構造、*Z* 体がプロペラ型をとることに因ると考えられる (Figure 3)。

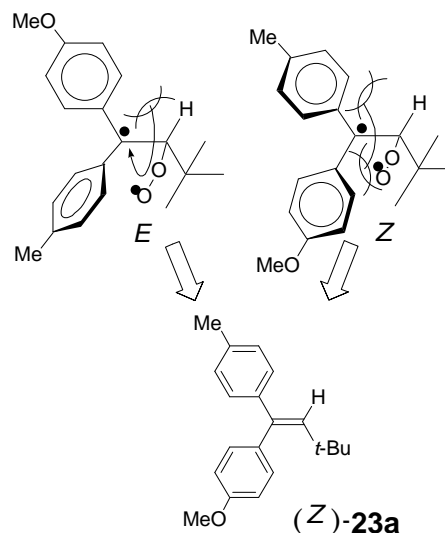


Figure 3. Discrete structures of the key intermediates, diradicals of **23a**.

特にエテン **23a** では、*E* 体から *Z* 体あるいは *Z* 体から *E* 体へという両方向への片道異性化が光反応の条件により制御される初めての例が見出された。これは置換フェニル基のパラ位の電子的大約びオルト位の立体的な要素によって、異性体の構造が大きく異なっている事によると

考えられる。二重結合の幾何異性体の一方のみが有用性を示す実際例は多い。本研究はそうした化合物の幾何異性体の生成制御の新しい方法を呈示するものと考えられる。

6. おわりに

本研究では、阿波藍に含まれ発ガン抑制、抗ピロリ菌活性、アトピー等炎症抑制作用等で注目されているトリプタンスリン及びフラボン成分ならびにインジゴ関連分子のマイクロ波照射および光反応による有用合成法を検討し、医薬リード及び機能性リード化合物合成法の開発に資することを目標とした。成果を以下にまとめる。

1. 藍の中に含まれる稀少有用成分の安価かつ低環境負荷な合成法の開発を目的として、近年環境に優しい合成法の一つとして脚光を浴びているマイクロ波反応活性化法 (MW 法) を適用した。入手容易な原料から短時間かつ良好な収率でトリプタンスリン、その誘導体ならびにフラボン類が得られることを見出した。トリプタンスリンは、特に抗アレルギー特性を示すとともにケイ光性を示すことから、機能性材料の素材としても注目される興味深い分子である。

2. 藍の染料成分であるインジゴなど多置換アルケンを機能性リード分子とし、関連分子を巾広く合成する方法として、マクマリーカップリングが知られる。しかし生成物は *cis* すなわち (*Z*)-アルケンとなる理由は未知だった。多数の反応例を解析し、その理由を検討した。

3. インジゴの関連化合物であり制がん剤として市場に出回る物質の基本骨格分子 (かさ高い置換基を有した 1,1-ジアリールエテン) の光幾何異性化について検討した。その結果、固体状態 (結晶微粉末) の光照射及び電子不足型色素を共存させた光誘起電子移動反応 (PET 反応) のそれぞれで、反応条件に応じて炭素-炭素二重結合の幾何異性化の方向が全く逆転するという新規な光異性化を見出した。こうした二重結合を有した化合物で、医薬や機能性素材として利用されている分子は少なくないので、特に固体状態で片道異性化する現象を詳しく解析することで、基礎化学のみならず物質合成にも寄与できると考えられる。

謝辞

本研究は、平成 21 年度大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究プロジェクトによる研究結果の一部をまとめたものである。研究助成を賜りました関係各位に深く感謝の意を表します。

参考文献

- ⁱ H. Kitahara, S. Sato, D. Ishikawa, K. Kumasawa, A. Nakane, and K. Hanada: Tryptanthrin and its salts from *Polygonum tinctorium* as type-IV allergy inhibitors, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 2006241080 A 20060914 (2006); H. Kitahara, K. Hanada, and T. Fukui: Tryptanthrin as antibacterial and antifungal agent useful in the treatment of skin diseases, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 2004189732 A 20040708 (2004).
- ⁱⁱ B. Batanero, F. Barba: Electrosynthesis of tryptanthrin, *Tetrahedron Lett.*, 47(47), 8201- 8203 (2006).
- ⁱⁱⁱ J. Azizian, M. R. Mohammadzadeh, S. Zomorodbakhsh, A. A. Mohammadi, A. R. Karimi: Microwave-assisted one-pot synthesis of some dicyanomethylene derivatives of indenoquinoline and tryptanthrin under solvent-free conditions, *Arkivoc*, 2007 (15), 24-30 (2007).
- ^{iv} R. S. Varma: Solvent-free accelerated organic syntheses using microwaves, *Pure Appl. Chem.*, 73 (1), 193-198 (2001) ; *Microwaves in Organic Synthesis*, ed. by A. Loupy, Wiley-VCH, New York, 2002; *Microwave-Enhanced Chemistry*, ed. by H. M. Kingstone and S. J. Haswell, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1997.
- ^v J. B. Harborne: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, New York (1994); O. Benavente-Garcia, J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuno, and J. A. Del Rio: Uses and properties of citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (12), 4505 (1997); Y. Chun and U. Sankawa: Screening of Antiallergic Effect in Traditional Medicinal Drugs and Active Constituents of *Aurantii Fructus Immaturus Syoyakugaku Zasshi*, 43 (4), 314-323 (1989); Y. Satoh, S. Tashiro, M. Satoh, Y. Fujimoto, J.-Y. Xu, and T. Ikekawa: Studies on the bioactive constituents of *Aurantii Fructus Immaturus*, *Yakugaku Zasshi*, 116 (3), 244-250 (1996).
- ^{vi} W. Baker: Derivatives of pentamethoxy benzene and a synthesis of pedicellin, *J. Chem. Soc.*, 662-670 (1941).
- ^{vii} H. Koshima and M. Kubota: High-throughput

synthesis of alkylbenzophenone with indium triflate in the absence of solvent using microwave, *Synth. Commun.*, 33 (22), 3983-3988 (2003).

viii T. Horie, T. Kitou, Y. Kawamura, and K. Yamashita: Studies of the selective *O*-alkylation and dealkylation of flavonoids. XXI. A Convenient method for synthesizing 3,5,7-trihydroxy-6,8-dimethoxy flavones and 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavones, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69 (4), 1033-1041 (1996).

ix D. A. Lightner, and A. F. McDonagh: Molecular mechanism of phototherapy for neonatal jaundice, *Acc. Chem. Res.* 17 (12), 417-424 (1984); R. S. H. Liu: Photoisomerization by hula-twist. Photoactive biopigments, *Pure Appl. Chem.*, 74 (8), 1391-1396 (2002).