

酸素官能基を有する芳香族化合物の酸化反応様式の解析

～ 生体類似型化学酸化系及びシトクロムP450の
反応特性評価への応用 ～

浦野 泰照

①

博士論文

酸素官能基を有する芳香族化合物の酸化反応様式の解析
～生体類似型化学酸化系及びシトクロムP450の反応特性評価への応用～

浦野 泰照

目次

| | ページ |
|--|-----|
| 序論 | 1 |
| 第1章 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるアルキルアリール エーテル類のO-脱アルキル化反応 | 5 |
| 第1節 メトキシフェノール、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応 | 5 |
| (1) O-脱メチル化反応収率、およびその選択性 | |
| (2) 反応機構の検討 | |
| 第2節 水素原子の引き抜き易さの異なる基質のO-脱アルキル化反応 | 9 |
| (1) <i>o</i> -ベンジルオキシアニソールを基質とした反応 | |
| (2) 1,2-メチレンジオキシベンゼン類を基質とした反応 | |
| 第3節 OHラジカルによる反応との機構の比較 | 17 |
| 第4節 O-脱メチル化反応に及ぼすアスコルビン酸の 還元的雰囲気の効果 | 21 |
| 第5節 その他の Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応 | 23 |
| (1) 種々の <i>o</i> -置換フェノールからのカテコール生成反応 | |
| (2) 基質の金属イオンへの配位の検討 | |
| 第2章 肝ミクロソーム-NADPH/ O_2 系によるアニソール類の O-脱メチル化反応 | 27 |
| 第1節 メトキシフェノール、ジメトキシベンゼン類のO-脱メチル 化反応 | 27 |
| (1) 分子内同位体効果を用いた検討 | |
| (2) O-脱メチル化生成物への酸化剤由来の酸素原子導入率を用いた検討 | |

| | |
|---|-----|
| (3) フェノール性OH基を有するアニソール類の新しいO-脱メチル化反応機構 | |
| 第2節 各種誘導肝ミクロソーム間でのO-脱メチル化反応機構の比較 | 3 1 |
| 第3章 アニソール類のO-脱メチル化反応機構を指標とした、各種鉄ポルフィリン錯体-酸化剤系及び肝ミクロソーム-NADPH/O ₂ 系の反応特性の比較 | 3 5 |
| 第1節 <i>p</i> -ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を指標とした各系の反応性の評価 | 3 7 |
| (1) 鉄ポルフィリン類-フェニル過酢酸系の酸化活性種の検討 | |
| (2) 分子内同位体効果を用いたO-脱メチル化反応機構の検討 | |
| (3) 酸化剤由来の酸素原子導入率を用いたO-脱メチル化反応機構の検討 | |
| 第2節 トリメトキシベンゼン、テトラメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を指標とした、各系の反応性の評価 | 4 5 |
| 第3節 酸化活性種の反応特性に及ぼす軸配位子の効果に関する考察 | 4 8 |
| 第4章 各種酸化系によるフェノール類水酸化反応に及ぼす置換基の効果 | 5 4 |
| 第1節 Cu ²⁺ -アスコルビン酸-O ₂ 系によるフェノール類水酸化反応 | 5 4 |
| (1) 各種フェノール性化合物を基質とした反応 | |
| (2) <i>m</i> -置換フェノール類を基質とした反応 | |
| (3) <i>p</i> -置換フェノール類を基質とした反応 | |
| (4) カテコール類を基質とした反応 | |
| (5) フェノール類芳香環水酸化反応の特徴のまとめ | |
| 第2節 ガンマラジオリシス法によるフェノール類水酸化反応 | 6 2 |
| (1) ガンマラジオリシス法について | |

| | |
|--|-----|
| (2) フェノール類水酸化反応及びその置換基効果 | |
| 第3節 特徴的な置換基効果を有するフェノール類水酸化反応機構の推定 | 67 |
| (1) 重水素ラベルしたフェノールを基質とした反応 | |
| (2) ニトロベンゼンを基質とした反応 | |
| (3) 異種フェノール間の競争反応 | |
| (4) Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるアニソール類の水酸化反応に及ぼす置換基効果の検討 | |
| (5) Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類の水酸化反応機構 | |
| 第4節 肝ミクロソームを用いた <i>in vitro</i> 代謝反応によるフェノール類水酸化反応 | 73 |
| 総括 | 75 |
| 実験の部 | |
| I. 機器分析 | 78 |
| II. 試薬・溶媒・カラム担体 | 79 |
| III. 各化合物の合成、およびその機器データ | 80 |
| IV. 各章の実験操作 | 91 |
| 参考文献 | 118 |
| 論文発表および学会発表 | 121 |
| 謝辞 | 123 |

序 論

序 論

生体内の各種の酵素は、化学的観点から見れば特異な反応を効率良く行なうことが多い。これら酵素反応の特異性は、主に以下の3つの理由により生じると考えられている。

- ① 基質を活性部位付近に固定する基質結合部位の存在
- ② 活性中心付近の特徴的な反応場環境の形成
- ③ 高い反応性を持つ活性種の生成

具体的には、ある特定の基質の特定の部位が活性中心に向けて固定されるように、活性部位近傍に、イオン性、求核性、その他の反応性基がうまく配置されている例が数多く知られている。さらに活性部位の比誘電率、疎水性などが、通常の溶液中とは大きく異なり得ることも、特別な反応性を引き出す要因の1つとされている。

このような特徴を持つ酵素の中で、シトクロムP450に代表される酸化酵素類は、比較的基質認識能が低いものが多い。特に動物で異物代謝を司るシトクロムP450は、基質認識能は低く、幅広い基質の酸化を行うことが知られている。すなわち、ある特定の基質にのみ特異的に、強固に結合する基質結合部位は存在しないと考えられる。ところがこのように上記①の理由がないにも関わらず、これらのシトクロムP450はオレフィン類のエポキシ化、脂肪族、芳香族化合物の水酸化、ヘテロ原子の酸化、脱アルキル化反応など、多種多様な酸化反応を効率良く行なうことが知られている¹⁾。よってこれらのシトクロムP450では主に②、③の理由のみで、化学的には実現困難な反応を含む幅広い酸化反応を効率良く実現していると考えられるため、その酸化活性種が何であり、どのような反応性を持つかと言う点に興味が集まっている。

さて、このような基質認識能の低い酵素類の反応機構解析には、活性中心の構造と類似した化学モデル系を用いることは、最も効果のあるアプローチの1つとなる。実際これまでに、生体類似型モデル化学酸化系として、Fenton系²⁾、Udenfriend系³⁾などOHラジカル様活性種を産生すると考えられる系から、鉄ポルフィリン-酸化剤系に代表される、より酸化酵素類に近い活性種を産生すると考えられる系まで、数多くの系が開発されてきた。ところが、その酸化活性種の構造が決定しているものはそう多くはない。また各モデル酸化系の化学的性質は、少数のモデル基質から得られる酸化生成物の分布、収量を指標として検討されることが多い。酸化反応機構を用いて、各酸化系の化学的性質を検討した例も数例知られているが^{4,5)}、基質として用いられる化合物はごく少数に限られている。そこで筆者は、ある特定の共通構造を持つ化合物群を基質として用い、そこから得

られる生成物の構造や生成量に加え、その反応様式も詳細に解析し、これを用いて各系の酸化活性種の反応特性を明確に表すことを目指した。また、これを各酸化酵素類と比較し、各活性種の構造と反応特性との相関を見出すことも目標とした。

具体的には、酸素官能基を有する芳香族化合物のO-脱アルキル化反応、芳香環水酸化反応に注目して、反応の解析を行った(Scheme P-1)。アルキルアリルエーテル類のO-脱アルキル化反応は、COMT (カテコールO-メチルトランスフェラーゼ) による不活化過程の逆反応であり、生理活性発現の制御反応として生体内で重要な意味を持つ反応である。また芳香環水酸化反応は、異物代謝、内在性物質合成のキーステップとなる反応であり、やはり生体内で重要な意味を持っている。前述したとおり、両反応ともシトクロムP450により効率良く進行することが知られている。

A. O-Dealkylation of alkyl aryl ethers



B. Aromatic hydroxylation of phenols



Scheme P-1.

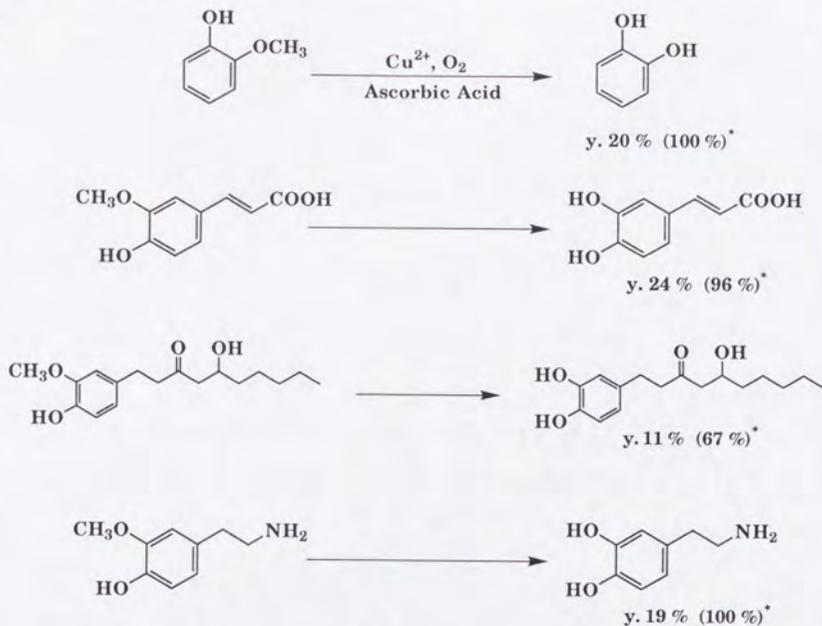
ところが、これらの反応はいずれもそのエネルギー障壁が高いため、化学酸化系で進行させるには、過酷な反応条件が必要であると推定される。また、一般の化学酸化系では、その反応が求電子反応であるため、生成物である水酸化体を二次的な酸化を起こさずに安定に得ることは非常に困難であることも予想される。実際に、強酸 (HI、HBr)、CANなどの酸化剤、ルイス酸 (BBr₃、AlCl₃) などを用いたO-脱アルキル化反応や、Fenton系、有機過酸、無機過酸などによる芳香環水酸化反応が現在までに知られているが、いずれも副反応や二次酸化反応をとらない、多くの場合選択性は非常に低い結果に終わっている⁶⁾。

この様な化学酸化系の中で、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は他の酸化系と大きく異なり、*o*-メトキシフェノールの*O*-脱メチル化反応、及びフェノール類の水酸化反応を非常に選択性良く起こすことが、当教室粟飯原らにより見いだされてきた⁷⁻¹⁰⁾。またこれらの反応は、他の酸化反応を受けやすいと考えられるアミノ基や、炭素-炭素2重結合を持つ基質においても、選択性良く進行することも見いだされている(Scheme P-2)。そこでまず、本反応系による種々のアルキルアリエーテル類の*O*-脱アルキル化反応収率、機構を詳細に検討し、その知見を基に Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応性の特徴を明らかにすることを目指した。また種々の基質の*O*-脱アルキル化反応機構を指標として、ガンマラジオリシス法によって発生させたOHラジカルとの反応性の比較を行い、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸化活性種を推定を試みた。さらに、*O*-脱アルキル化反応が非常に選択性良く進行するという、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の化学酸化系としては特異な反応性の要因を探る検討も行った(第1章)。

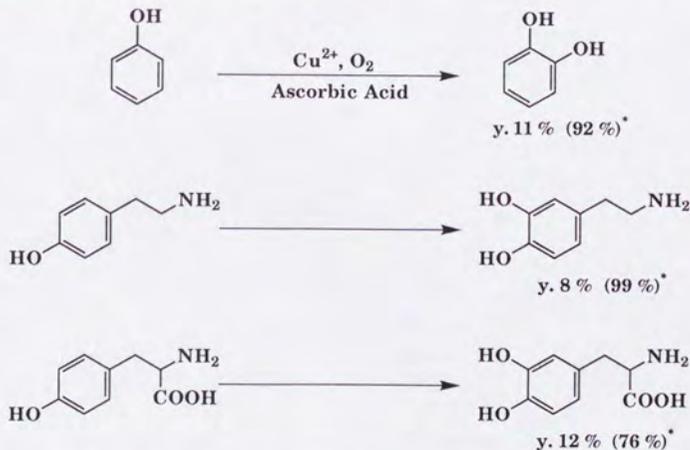
次にシトクロムP450酸化活性種の反応性の特徴を見いだすべく、肝ミクロソーム系による種々の基質の*O*-脱アルキル化反応機構を詳細に検討した。ここから、これまでに知られていなかった反応機構の基質依存的な変化が見いだされ、新たな*O*-脱アルキル化反応機構を提唱した(第2章)。さらに、ここまでに得られた知見を基に、シトクロムP450の化学モデル系として最もよく用いられる種々の鉄ポルフィリン類-酸化剤系の反応性の特徴を明らかにすることを試みた。また、各鉄ポルフィリンの構造と、その酸化活性種の反応特性との相関を見いだすことも試みた(第3章)。

第4章では、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系により効率よく進行する酸化反応の1つであるフェノールの水酸化反応に注目し、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による種々のフェノール類の水酸化反応効率を、主に置換基効果の観点から詳細に検討した。その結果、酸化反応系としては特異な置換基効果が見いだされた。またこの結果から、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によりフェノール類の水酸化反応が、高次酸化反応を起こさずに選択性よく進行する理由を推定した。さらに、ガンマラジオリシス法、肝ミクロソーム系によるフェノール類水酸化反応に及ぼす置換基効果も併せて検討し、各酸化系間の比較を行った。

A. *O*-Demethylation of *o*-methoxyphenols



B. Aromatic hydroxylation of phenols



Scheme P-2. *O*-Demethylation of *o*-methoxyphenols and aromatic hydroxylation of phenols by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

* The yields in parentheses are based on substrate consumed.

第1章

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による
アルキルアリールエーテル類のO-脱アルキル化反応

第1章 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるアルキルアリアルエーテル類のO-脱アルキル化反応

アルキルアリアルエーテル類のO-脱アルキル化反応機構として、主にScheme 1-1に示した2反応機構が考えられている。Aに示した水素原子引き抜き機構は、アルキル基の水素原子の引き抜きを初発反応とし、カーボンラジカルへ活性種がリバウンドして生成するヘミアセタールが分解してO-脱アルキル化生成物を与える機構である。Bに示した*ipso*置換機構は、アルコキシ基の付け根の位置 (*ipso*位) へ酸化活性種が付加する反応を初発とし、アルコールの脱離を経て生成するフェノキシラジカルが還元されてO-脱アルキル化生成物を与える機構である。なお*ipso*置換機構では脱離するのはアルコキシ基であるため、正確にはこの機構で進行する反応は脱アルキル化反応とは呼べないが、本論文では便宜上生成するフェノール類は反応機構によらず全て、脱アルキル化生成物と呼ぶことにする。

いずれの反応機構で反応が進行したかは、主に2つの実験から判断することができる。まず、活性種由来の酸素原子が生成物に導入されるか否かを、 ^{18}O ラベルした酸化剤を用いて検討することで、反応機構の推定ができる。以下本論文では、中を塗りつぶした酸素原子で、酸化活性種由来の酸素原子を表すこととするが、水素原子引き抜き機構では酸化剤由来の酸素原子はアルデヒドとなって脱離するため、生成物に導入されない(Scheme 1-1)。一方、*ipso*置換機構では、脱離分子はアルコールであり、よって活性種由来の酸素原子が生成物に導入される。第2の方法として、アルキル基の水素原子を重水素原子で置き換えた基質との反応速度比(同位体効果、 k_H/k_D)を用いて反応機構を推定する方法がある。水素原子引き抜き機構では、初発反応の水素原子を引き抜く過程が通常律速となるため、重水素ラベルした基質を用いると、C-H結合とC-D結合のエネルギー差に由来する反応速度の低下が見られ、 k_H/k_D 値は6以上の大きな値となると考えられている。一方*ipso*置換機構では、開裂するのはフェニル基の炭素原子と酸素原子とのエーテル結合であるため、同位体効果は表れず、 k_H/k_D 値はほぼ1に近い値が得られる。

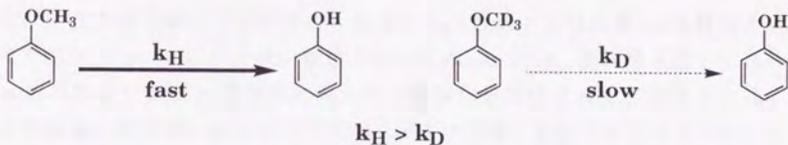
反応機構は、主に用いる酸化系によって決定すると考えられている。すなわちシトクロムP450関与の反応や、ヨードソベンゼンを酸化剤とする鉄ポルフィリン系などでは水素原子引き抜き機構で、Fenton系や、Udenfriend系などでは*ipso*置換機構で反応が進行すると考えられている¹¹⁾。

A. H[•] Abstraction Mechanism

- Cytochrome P-450, FeTPPCl - PhIO
- The oxygen atom of the active oxygen species *does not* incorporate into the *O*-dealkylation product.

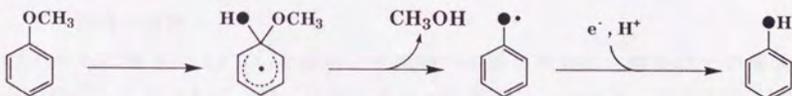


- $k_H/k_D > 6$

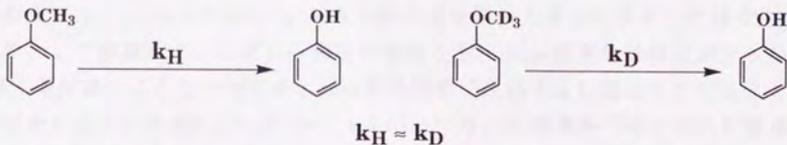


B. *ipso*-Substitution Mechanism

- $Fe^{2+} - H_2O_2$, $Fe^{2+} - EDTA - Ascorbic\ Acid - O_2$
- The oxygen atom of the active oxygen species *incorporates* into the *O*-dealkylation product.



- $k_H/k_D = 1 \sim 1.5$



Scheme 1-1. Two possible pathways of anisole *O*-demethylation

第1節 メトキシフェノール、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応

(1) O-脱メチル化反応収率、およびその選択性

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による、メトキシフェノール、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応を行った。いずれの構造の基質とも、その置換位置がo-又はp-の基質は、収率は20%程度ながら、原料消費量に対する生成物収量であるConversion yield (以下、選択性と呼ぶ)がほぼ100%でO-脱メチル化反応が進行した(Table 1-1; Runs 1,3,4,6)。 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるO-脱メチル化反応は序章で述べた通り、これまでo-メトキシフェノール類のみを基質としてきたが、本結果から本反応系によるO-脱メチル化反応には、フェノール性OH基は必須ではなく、メトキシ基もほぼ同様の効果を持つことが明らかとなった。

一方、m-置換体ではいずれの構造の基質ともO-脱メチル化収率は5%程度と低く、また選択性も40%以下と低い結果となった(Runs 2,5)。選択性が低下したのは、m-置換体からはo-,p-置換体と異なり、芳香環水酸化生成物がかなり生成したためである。例えば、m-ジメトキシベンゼンからは、2,4-ジメトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノールがそれぞれ3.1%、3.0%の収率で生成した(Run 5)。

さらに比較のため、アニソールを基質とした反応も行ったところ、O-脱メチル化収率は5%程度と低く、また芳香環水酸化体であるo-メトキシフェノールがやはり5%程度の収率で得られ、O-脱メチル化反応の選択性は低いことが明らかとなった(Run 7)。これは前述のm-メトキシフェノール、m-ジメトキシベンゼンとほぼ同様の結果である。

(2) 反応機構の検討

^{18}O ラベルした酸素分子($^{18}\text{O}_2$)を用い、生成物への酸化剤由来の酸素原子の導入率から、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるメトキシフェノール、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を検討した。 ^{18}O 導入率はGC/SIM法を用いて求めた。実際に実験に用いた酸化剤の ^{18}O コンテンツは、通常100%ではないので、以下本論文では、100%の ^{18}O コンテンツの酸化剤を用いた場合に換算した値を ^{18}O 導入率として掲載した。いずれの構造の基質とも、o-,p-置換体は酸化剤からの ^{18}O 導入率が高いこと見いだされ、*ipso*置換機構で反応が主に進行していることが明らかとなった(Table 1-2; Runs 1,3,4,6)。一方、m-置換体ではいずれの構造の基質とも ^{18}O 導入率は低い結果となった(Runs 2,5)。酸化剤由来の酸素原子の導入率が低かったm-置換体に関しては、 ^{18}O ラベルした水分子(H_2^{18}O)を用い、水分子由来の酸素原子のO-脱メチル化生成物への導入率も検討したが、導入率はほぼ0%であった(Runs 2,5)。よって、基質のアルコキシ基由来の酸素原子は多く保持

Table 1-1. Oxidative conversion of methoxyphenols, dimethoxybenzenes and anisole by the Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system

| Run | Substrate | Product | Reaction type | Conversion | |
|-----|----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|-------|
| | | | | Yield | yield |
| 1 | <i>o</i> -Methoxyphenol | Catechol | <i>O</i> -Demethylation | 20.0 % | 100 % |
| 2 | <i>m</i> -Methoxyphenol | Resorcinol | <i>O</i> -Demethylation | 5.7 | 25 |
| 3 | <i>p</i> -Methoxyphenol | Hydroquinone | <i>O</i> -Demethylation | 20.3 | 93 |
| 4 | <i>o</i> -Dimethoxybenzene | <i>o</i> -Methoxyphenol | <i>O</i> -Demethylation | 18.7 | 94 |
| 5 | <i>m</i> -Dimethoxybenzene | <i>m</i> -Methoxyphenol | <i>O</i> -Demethylation | 4.7 | 33 |
| | | 2,4-Dimethoxyphenol | Aromatic hydroxylation | 3.1 | 22 |
| | | 2,6-Dimethoxyphenol | Aromatic hydroxylation | 3.0 | 21 |
| 6 | <i>p</i> -Dimethoxybenzene | <i>p</i> -Methoxyphenol | <i>O</i> -Demethylation | 17.2 | 93 |
| 7 | Anisole | Phenol | <i>O</i> -Demethylation | 5.5 | 32 |
| | | <i>o</i> -Methoxyphenol | Aromatic hydroxylation | 5.2 | 30 |
| | | <i>p</i> -Methoxyphenol | Aromatic hydroxylation | 0.8 | 4 |

These reactions were carried out under the following conditions. A mixture of a substrate (50 mM), Cu(ClO₄)₂ (50 mM) and ascorbic acid (500 mM) in acetone-water was stirred under a pure O₂ atmosphere at room temperature for 24 h. Yields were determined by HPLC.

Table 1-2. ¹⁸O Incorporation from ¹⁸O₂ or H₂¹⁸O in the *O*-demethylation of methoxyphenols, dimethoxybenzenes and anisole by the Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system

| Run | Substrate | Product | ¹⁸ O Incorporation | |
|-----|----------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | | | from ¹⁸ O ₂ | from H ₂ ¹⁸ O |
| 1 | <i>o</i> -Methoxyphenol | Catechol | 90 % | n.d. ^{a)} |
| 2 | <i>m</i> -Methoxyphenol | Resorcinol | 33 | < 1 % |
| 3 | <i>p</i> -Methoxyphenol | Hydroquinone | 66 | n.d. |
| 4 | <i>o</i> -Dimethoxybenzene | <i>o</i> -Methoxyphenol | 77 | n.d. |
| 5 | <i>m</i> -Dimethoxybenzene | <i>m</i> -Methoxyphenol | 17 | < 1 |
| 6 | <i>p</i> -Dimethoxybenzene | <i>p</i> -Methoxyphenol | 65 | n.d. |
| 7 | Anisole | <i>o</i> -Methoxyphenol | 49 | n.d. |

Experimental conditions were identical to those described in Table 1-1, except that stirring under an ¹⁸O₂-Ar mixture for 2-4 h for determining the ¹⁸O incorporation from ¹⁸O₂, or that reactions were carried out in acetone-H₂¹⁸O medium for 2-4 h for determining the ¹⁸O incorporation from H₂¹⁸O. All the products were extracted with chloroform and trimethylsilylated before analysis. ¹⁸O Incorporation was determined by GC/SIM as M⁺ peak area ratio.

^{a)}not determined.

されており、*m*-置換体では水素原子引き抜き機構で反応が主に進行していることが明らかとなった。次に比較のため基質としてアニソールを用いた場合の酸化活性種からの¹⁸O導入率を検討したところ、49%という値が得られた(Run 7)。

酸化剤由来の酸素原子導入率は、Table 1-1に示した選択性とよく対応している。すなわち、*O*-脱メチル化反応が選択性良く進行したメトキシフェノール、ジメトキシベンゼンの*o*-,*p*-置換体では、酸化剤由来の酸素原子導入率も高い。選択性の低かったこれらの*m*-置換体およびアニソールでは、酸化剤由来の酸素原子導入率も、値に幅は見られるが全体的に低い結果となっている。

基質の構造に依存した*O*-脱メチル化反応機構の変化は、基質の*ipso*位電子密度を用いて説明することができる。水酸基、メトキシ基は*o*-,*p*-配向性の強い電子供与性基であり、*o*-,*p*-メトキシフェノールや*o*-,*p*-ジメトキシベンゼンのメトキシ基のついている芳香環電子密度(*ipso*位電子密度)は、もう一方の置換基によって高められている。よって、親電子的性質を持つ酸化活性種は*ipso*付加反応を起こしやすくなり、これがメチル基からの水素原子引き抜き反応よりも速いため、反応は主に*ipso*置換機構で進行すると説明できる(Scheme 1-2; A)。一方、*m*-置換体やアニソールでは*ipso*位電子密度は高められないため、*ipso*付加反応が*o*-,*p*-置換体に比べ遅く、よって相対的に水素原子引き抜き反応が優先し、活性種由来の酸素原子導入率が低下したと説明される(Scheme 1-2; B)。これらの*ipso*位電子密度の低い基質間で、¹⁸O導入率に差が見られることに関しては、本章第3節で詳しく議論する。

以上のように、Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系による*O*-脱メチル化反応機構は、用いる基質の*ipso*位電子密度によって大きく変化することが明らかとなった。

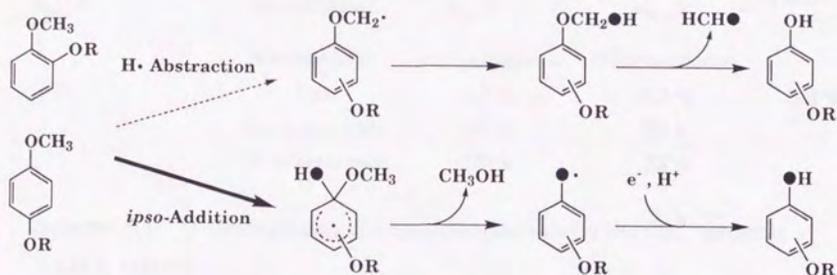
第2節 水素原子の引き抜き易さの異なる基質の*O*-脱アルキル化反応

前節の結果から、*O*-脱メチル化反応機構は基質の*ipso*位電子密度によって変化することが示唆された。そこで次にCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系による、メチル基以外のアルキル基を有するアルキルアリアルエーテル類の*O*-脱アルキル化反応を検討した。

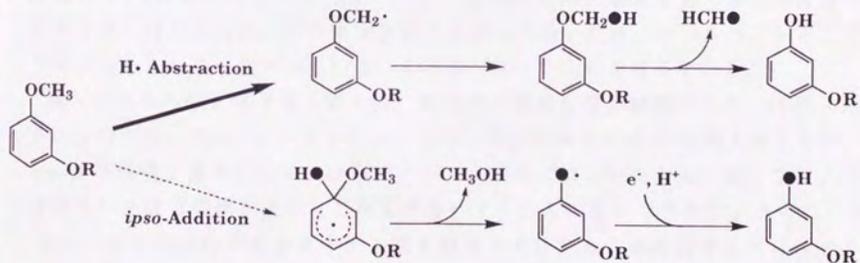
(1) *o*-ベンジルオキシアニソールを基質とした反応

まず、Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系による*o*-ベンジルオキシアニソールの*O*-脱アルキル化反応を検討した(Scheme 1-3)。この基質はメトキシ基とベンジルオキ

A. *o*-, *p*-isomers

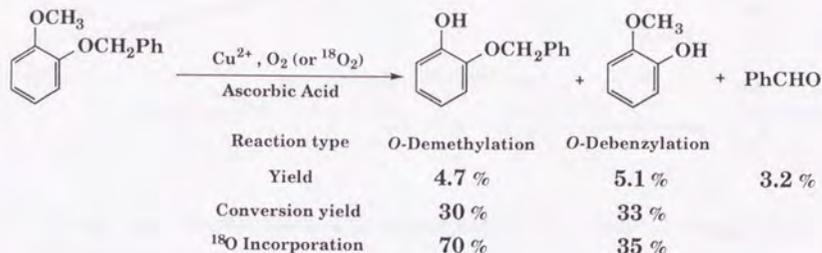


B. *m*-isomers



Scheme 1-2. Mechanisms of *O*-Demethylation of Methoxyphenols and Dimethoxybenzenes by the Cu^{2+} -Ascorbic Acid- O_2 System

シ基を併せ持つため、分子内でO-脱メチル化反応、O-脱ベンジル化反応の比較をすることが可能である。

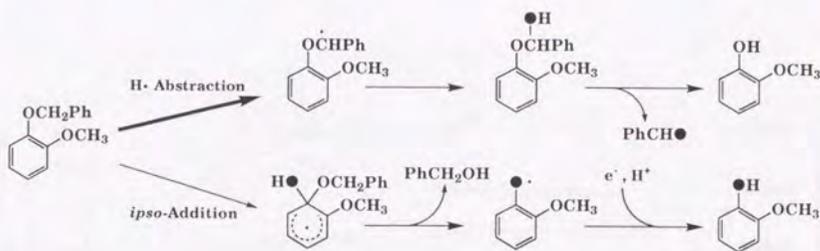


Scheme 1-3. O-Dealkylation of *o*-benzyloxylanisole by the Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system

O-脱アルキル化反応収率は、若干O-脱ベンジル化反応が優先したが、いずれの反応とも5%程度とあまり良くなく、また選択性も両反応を併せても65%程度とあまり高くはなかった。これは本基質の水溶性が低いため、コソルベントとしてアセトンをかなり（水と同量）用いる必要があったためと考えている。

酸化剤由来の酸素原子導入率では、両反応で顕著な差が観察された。O-脱メチル化反応では、70%と*o*-ジメトキシベンゼンとほぼ同じ程度の¹⁸O導入率となり、*ipso*置換機構が優先したが、O-脱ベンジル化反応では、35%と低い値となり、水素原子引き抜き機構が優先して反応が進行することが見いだされた。さらに、O-脱ベンジル化反応が水素原子引き抜き機構で進行するとき生成するベンズアルデヒドも定量したところ、収率は3.2%であった。これはO-脱ベンジル化収率の64%にあたり、ここから水素原子引き抜き機構の比率は64%であり、*ipso*置換機構の比率は残りの36%であると推測された。この結果は¹⁸O導入率から得られる*ipso*置換機構の比率と非常によく一致する。

本基質は、*o*-ジアルコキシベンゼンであることから、*ipso*位電子密度は*o*-ジメトキシベンゼンとほぼ同程度に高められていると考えられる。O-脱メチル化反応で*ipso*置換様式が優先したことは、前節と同様にこの*ipso*位電子密度から説明される。一方O-脱ベンジル化反応では、*ipso*付加速度は同程度に速いはずであるが、それ以上にベンジル基の水素原子が引き抜きやすいため、水素原子引き抜き機構が優先したのと考えられる(Scheme 1-4)。



Scheme 1-4. Mechanisms of *O*-debenzylation of *o*-benzyloxyanisole by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

(2) 1,2-メチレンジオキシベンゼン類を基質とした反応

1,2-メチレンジオキシベンゼンを基質とした反応を行ったところ、これまで用いた基質とは異なるタイムコースで反応が進行した。通常の Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応は、反応開始から6時間程度で反応液の色が黄緑色から茶色へと変化する、不溶物が析出しはじめ、反応はそれ以上進行しなくなる。ところが1,2-メチレンジオキシベンゼンを基質とした反応では、反応液の色が変化したところで原料の消費は止まるものの、*O*-脱メチレン化生成物であるカテコールはその後も生成し続け、反応開始5日後も収率の増加が見られた(Figure 1-1)。またカテコール以外にHPLC上で大きなピークが見られ(Chart 1-1)、これは反応開始4時間後に最大となり、その後は徐々に減少したが、5日後もこのピークは存在した(Figure 1-1)。このタイムコースから、このピークがカテコール生成の中間体であると考え単離を試みたが、カラム精製途中で分解し、カテコールへと変換されてしまうことがわかった。またこの中間体は、2N-HClの添加により容易に分解し、カテコールとなることも見いだされた。これらの結果は、1,2-メチレンジオキシベンゼンの*O*-脱メチレン化反応は、ある中間体を經由し、これがアスコルビン酸酸性下で徐々に加水分解されて進行することを示唆している。反応開始5日後のカテコール収率をScheme 1-5に示したが、まだこの時点でも中間体は残っており、これが全て加水分解されると仮定すると、カテコール収率は17.9%、選択性は77%となると予想される。

1,2-メチレンジオキシベンゼンの*O*-脱メチレン化反応における、酸化剤由来の酸素原子導入率を求めた結果をScheme 1-6にまとめた。まず反応液に2N-HClを加え、中間体を全てカテコールに加水分解した後に、GC/SIM法でカテコールの

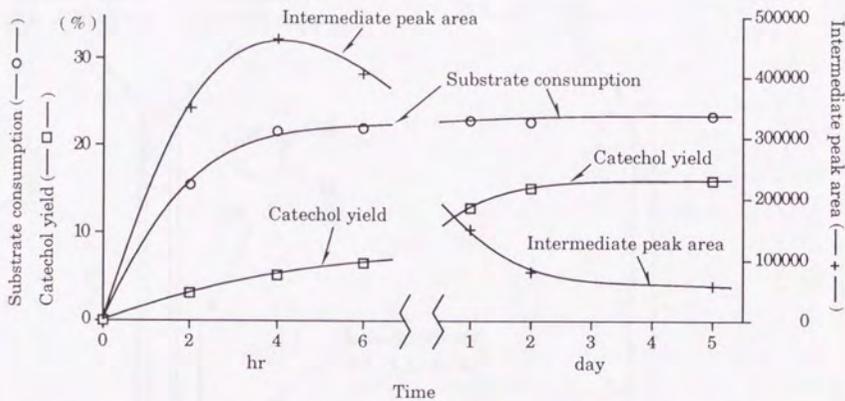
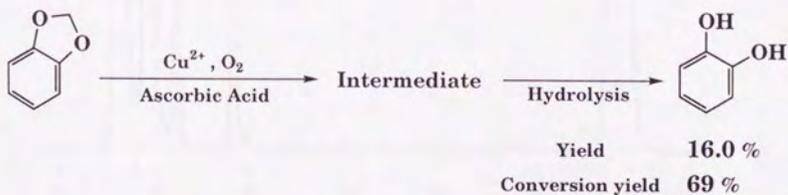


Figure 1-1. Time-course of *O*-demethylenation of 1,2-methylenedioxybenzene by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system



Scheme 1-5. *O*-Demethylenation of 1,2-methylenedioxybenzene by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

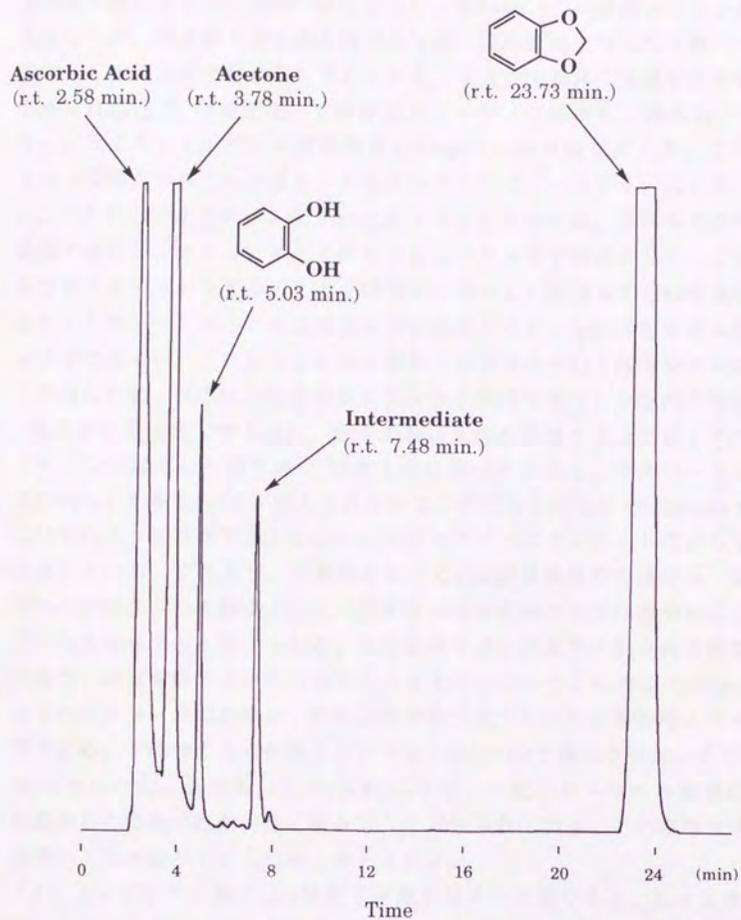


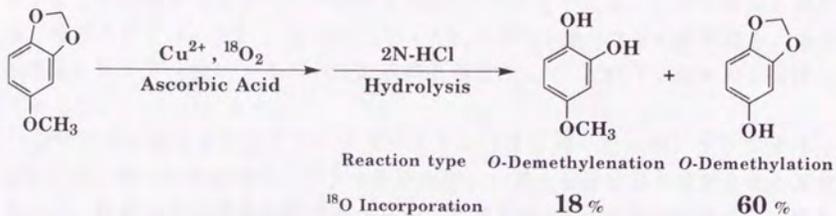
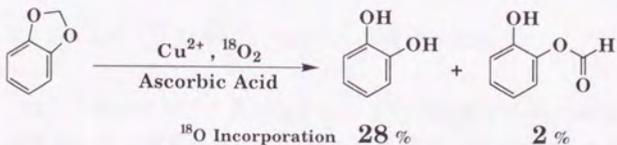
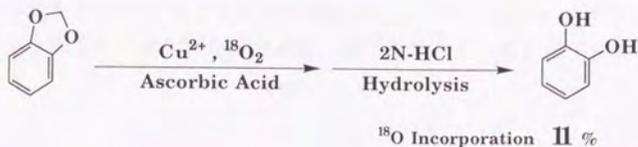
Chart 1-1. HPLC Profile of *O*-demethylation of 1,2-methylenedioxybenzene by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

^{18}O 導入率を求めたところ、11%と低い値が得られ、反応は主に水素原子引き抜き機構で進行することが明らかとなった。Scheme 1-7にO-脱メチレン化反応機構を示したが、水素原子引き抜き機構ならば、図中波線を付したギ酸エステルを中間体として反応が進行すると考えられる。前述の中間体の構造を決めるため、反応液を反応途中（4時間後）で直接塩化メチレンで抽出し、抽出物の $^1\text{H-NMR}$ をとったところ、 δ 8.33に中間体由来のSinglet peakが観察された。この化学シフトは一般的なホルミルプロトンの化学シフトとよく一致する。以上のことから、1,2-メチレンジオキシベンゼンのO-脱メチレン化反応は、主に水素原子引き抜き機構で進行し、カテコールモノホルミルエステルを中間体として、これが加水分解されてカテコールとなることが明らかとなった。本基質の*ipso*位電子密度は、*o*-ジメトキシベンゼンとはほぼ変わらないと考えられ、*ipso*付加速度も同程度に速いはずであるが、メチレンジオキシ基からの水素原子引き抜きがそれ以上になり容易なため、反応は主に水素原子引き抜き機構で進行したものと考えている。

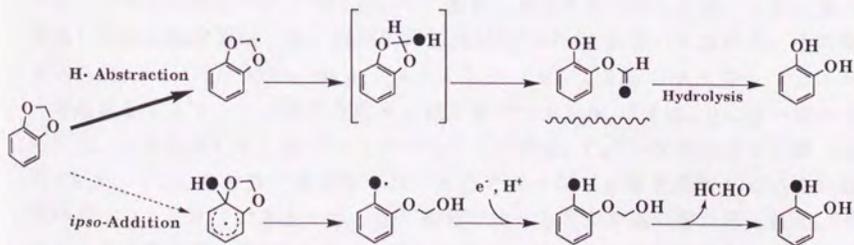
反応が完全に終了する前に、酸を添加して加水分解することなくそのまま塩化メチレンで抽出した抽出物の ^{18}O 導入率も調べたところ、カテコールに28%と前述の11%より多くの ^{18}O が導入されていることが見いだされた(Scheme 1-6)。これは以下のように説明でき、ここから反応のダイナミズムがより確からしくなったと考えている。すなわち、一部起きている*ipso*置換機構での反応は、中間体としてヘミアセタールを経由し、この中間体は本反応条件下では速やかに分解しカテコールを生成すると考えられる。反応途中では、水素原子引き抜き機構で反応した物の一部はギ酸エステルの形をとっており、よってこの時点での*ipso*置換機構由来のカテコールの比率は、加水分解が全て完了した反応終結時よりも高いと説明できる。中間体であるギ酸エステルも、GC/SIMで検出された。その ^{18}O 導入率は2%という低い値であったが(Scheme 1-6)、一般にカルボニル酸素は、水分子の酸素との交換が比較的速く起きることが知られており、このギ酸エステルでも同様の交換が起きているためと考えられる。

メチレンジオキシ基の*ipso*位電子密度を高めた基質である、4-メトキシ-1,2-メチレンジオキシベンゼンを基質とした反応を行い、O-脱アルキル化生成物への酸化剤由来の酸素原子導入率を検討した。その結果、O-脱メチレン化反応生成物への ^{18}O 導入率は18%と、1,2-メチレンジオキシベンゼンの場合に比べやや大きな値が得られた(Scheme 1-6)。これは*ipso*位電子密度が上昇したためと考えられるが、それでもなお水素原子引き抜き機構が多くを占めることには変わりなく、本結果はメチレンジオキシ基からの水素原子引き抜きがかなり容易であることを示唆している。

これまでの結果から、主に基質の*ipso*位電子密度とアルキル基の水素原子の引



Scheme 1-6. ^{18}O Incorporation into the *O*-dealkylation products by the Cu^{2+} -ascorbic acid- $^{18}\text{O}_2$ system



Scheme 1-7. Mechanisms of *O*-demethylation of 1,2-methylenedioxybenzene by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

き抜き易さの2つの化学的性質の比によって、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるO-脱アルキル化反応の選択性、反応機構とも大きく変化することが明らかとなった。

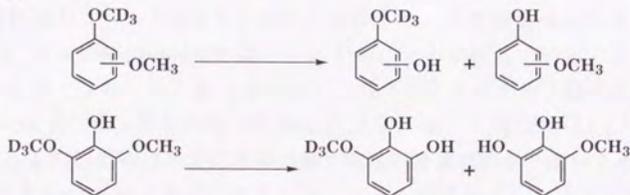
第3節 OHラジカルによる反応との機構の比較

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は、その構成要素からFenton系に類似した化学酸化系であると考えられ、その酸化活性種としてOHラジカルがまず挙げられる。しかし、Fenton系でもその真の活性種はOHラジカルではないとする論文も最近多く報告されている^{12,13)}。そこで Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応性を、様々な基質に対するO-脱アルキル化反応機構を指標として、OHラジカルの反応性と比較した。

OHラジカル産生系としてガンマラジオリシス法を用いた。ガンマラジオリシス法とは、種々の水溶液系にガンマ線を照射し、様々な活性種を発生させる方法である。詳細は第4章第2節で述べるが、亜酸化窒素(N_2O)飽和水溶液に γ 線を照射することで、反応性に富む活性種としてOHラジカルのみが存在する系を作ることができることが知られている。実験手法の特殊性から、 ^{18}O 導入率を求めることは困難であるため、O-脱アルキル化反応機構は分子内同位体効果を用いて検討した。ガンマラジオリシス法によるO-脱メチル化反応は、アスコルビン酸を基質の2倍量添加した条件下でも行った。

基質としては、ジメトキシベンゼン類および2,6-ジメトキシフェノールを検討した。いずれも分子内の1つのメトキシ基を、重水素ラベルした重メトキシ基に置換した化合物を用い、分子内同位体効果はGC/SIM法を用いて求めた。その結果をTable 1-3にまとめた。*o*-,*p*-ジメトキシベンゼン、2,6-ジメトキシフェノールを基質とすると、いずれの反応系、反応条件でも k_H/k_D はほぼ1.0に近い値が得られた。これに対して、*m*-ジメトキシベンゼンでは、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系で $k_H/k_D=2.2$ とやや高い値が得られ、またアスコルビン酸を添加していない通常のガンマラジオリシス法でも、他の基質に比べるとやや高い値が得られた。これは、本章第1節の ^{18}O 導入率から得られた知見と一致する結果であり、基質の*ipso*位電子密度により機構は変化し、*ipso*位電子密度の高い基質では主に*ipso*置換機構で反応が進行し、*ipso*位電子密度のあまり高くない*m*-ジメトキシベンゼンでは水素原子引き抜き機構の占める割合が増加することを示している。この点で両系はよく一致している。

Table 1-3. Kinetic isotope effects on the *O*-demethylation of dimethoxybenzenes and 2,6-dimethoxyphenol by the Cu²⁺-ascorbic acid(AA)-O₂ system and γ -radiolysis



| Substrate | k_H/k_D , Oxidizing system | | |
|--|--|----------------------|---------------------------|
| | Cu ²⁺ -AA-O ₂ system | γ -Radiolysis | γ -Radiolysis(+AA) |
| <i>o</i> -(OCD ₃)-Anisole | 1.0 | 1.0 | 0.8 |
| <i>m</i> -(OCD ₃)-Anisole | 2.2 | 1.3 | 1.1 |
| <i>p</i> -(OCD ₃)-Anisole | 1.3 | 1.1 | 1.0 |
| 2-(OCD ₃)-6-(OCH ₃)-Phenol | 1.4 | 1.1 | 1.0 |

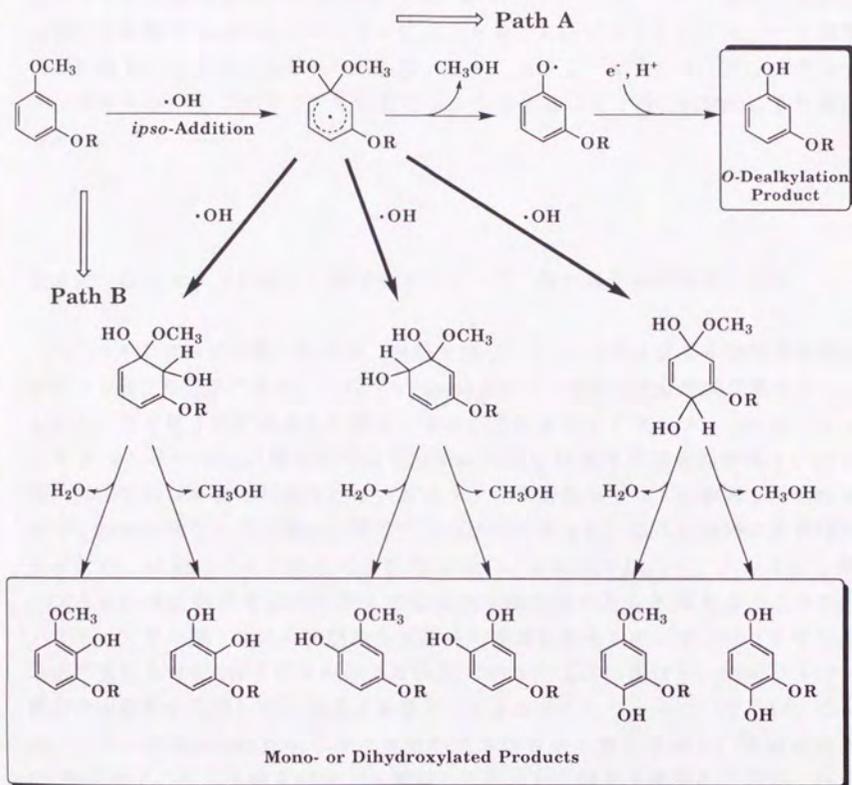
Reaction conditions for the Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system were identical to those described in Table 1-1. γ -irradiation was performed in N₂O-saturated 0.1 M phosphate buffer (pH 6) containing a substrate (5 mM) in the presence or absence of ascorbic acid (10 mM). Total radiation dose was 600 Gy. All the products were extracted with chloroform and trimethylsilylated before analysis. Kinetic isotope effects were determined by GC/SIM as M⁺ peak area ratio.

一方で、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系での k_H/k_D 値は、ガンマラジオリシス法による値に比べ若干大きくなる傾向も見られた。これは Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の活性種がフリーのOHラジカルとは異なり、やや水素原子引き抜きを起こしやすい、あるいは $ipso$ 付加を起こしにくいことを示唆している。しかし第2章で後述する肝ミクロソーム系と比べると、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応性はやはりOHラジカルの反応性に圧倒的に近い。よって現在では Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の活性種は、反応系中の銅2価塩の濃度がかなり濃いことも併せ考え、OHラジカルが金属イオンにバインドしている形である、クリプトタイプのOHラジカルなどのOHラジカル類似活性種であると考えている。

ガンマラジオリシス法によるO-脱メチル化反応機構に及ぼすアスコルビン酸の効果は、全体に k_H/k_D 値を下げる方向に表れている。例えば*m*-ジメトキシベンゼンでは1.3から1.1へと k_H/k_D 値は小さくなり、O-脱メチル化反応で $ipso$ 置換機構の占める割合が増加したことを示している。同じOHラジカルによる反応であっても、アスコルビン酸の共存により機構が $ipso$ 置換様式の方にやや傾く理由は以下のように推測される。すなわちScheme 1-8に示した $ipso$ 付加を初発反応としても、O-脱メチル化生成物とならず芳香環水酸化生成物を与える経路が存在すると考えている。活性種が $ipso$ 付加した形の間体は、アルコールの脱離、還元を経てO-脱メチル化生成物となる(Path A)が、これ以外に次の酸化を受け最終的に芳香環水酸化生成物となる経路(Path B)もあり、この経路をとると活性種が $ipso$ 付加してもO-脱メチル化反応は進行せず、よって相対的に水素原子引き抜き機構がO-脱メチル化反応で優先するようになる。アスコルビン酸の添加により還元過程を含むPath Aが速くなり、O-脱メチル化反応機構に占める $ipso$ 置換様式の割合が増え、 k_H/k_D 値が小さくなったと考えられる。

このアスコルビン酸の添加によるPath A,Bの比率の変化は、O-脱メチル化反応生成物と芳香環水酸化生成物の収量比に表れるはずである。詳しくは次節で述べるが、アスコルビン酸の添加によりO-脱メチル化反応の選択性は確かに向上することから、上記の推測は正しいものと考えている。

さらに、本章第1節で述べた Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるO-脱メチル化反応で、アニソールに比べ*m*-ジメトキシベンゼン、*m*-メトキシフェノールでの活性種由来の酸素原子導入率が低かった(Table 1-2; Runs 2,5,7)理由は、Scheme 1-8を用いて説明できる。すなわち、*m*-置換体では芳香環上の電子密度の偏りが大きく、 $ipso$ 付加中間体のラジカルが電子密度の高い芳香環炭素上に展開するため、Path Bが速いと考えられる。よって同程度の $ipso$ 位電子密度を持つ基質でも、*m*-置換体では相対的に水素原子引き抜き機構がO-脱メチル化反応で優先し、活性種由来の酸素原子導入率が低下したと推測できる。



Scheme 1-8. Proposed mechanism of aromatic hydroxylation of *m*-methoxyphenol and *m*-dimethoxybenzene whose initial step is *ipso*-addition

Scheme 1-8に述べた推測は酸化生成物の種類からも支持された。例えば Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による O -脱メチル化反応で m -ジメトキシベンゼンを基質とすると、 O -脱メチル化生成物である m -メトキシフェノール、通常の芳香環水酸化生成物である2,4-ジメトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール以外に、Path Bで生成すると考えられる3-メトキシカテコール、4-メトキシカテコール、メトキシハイドロキノンも比較的多く生成することがGC/SIM法により確認された。

第4節 O -脱メチル化反応に及ぼすアスコルビン酸の還元的雰囲気の効果

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は、前節で論じたようにOHラジカル類似活性種を生成する酸化反応系であり、この点でFenton系などに類似した化学酸化系である。しかし一方で第1節で詳述した様に、本反応系によるメトキシフェノール、ジメトキシベンゼンの o -, p -置換体の O -脱メチル化反応は非常に選択性が高く、芳香環水酸化反応はほとんど進行しないという、化学酸化系としては特異な反応性を持つ。Fenton系などでは様々な酸化反応が同時に進行し、酸化生成物が多数得られるため、 O -脱メチル化反応の選択性は低い。この点で Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は合成反応にも応用できる有用な化学酸化系であると言える。この Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の特徴的な反応性の要因を探るため、ガンマラジオリシス法で発生させたOHラジカルによる O -脱メチル化反応に及ぼす、アスコルビン酸の添加効果を検討した。反応は基質として o -ジメトキシベンゼンを用い、このバッファー水溶液(pH 6.6)に様々な量のアスコルビン酸を添加し、亜酸化窒素(N_2O)存在下これに γ 線を1500 Gy照射して行った。酸化生成物としては、 O -脱メチル化生成物と2種の芳香環水酸化生成物の収量をGC/SIM法を用いて定量した。

その結果、添加したアスコルビン酸の濃度依存的に、各生成物とも生成量は減少した(Figure 1-2)。これはより酸化されやすいアスコルビン酸の酸化が進行したためと考えられる。添加したアスコルビン酸濃度に依存した生成量の減少の仕方は、各生成物で異なることが見いだされた。例えば O -脱メチル化生成物はアスコルビン酸低濃度ではあまり減少しないが、水酸化生成物はかなり減少した(Figure 1-2)。この傾向は生成量比をとることでより明らかになる。 O -脱メチル化/芳香環水酸化比を、各アスコルビン酸濃度について計算した結果をFigure 1-3に示した。アスコルビン酸を添加していない場合、 O -脱メチル化/全芳香環

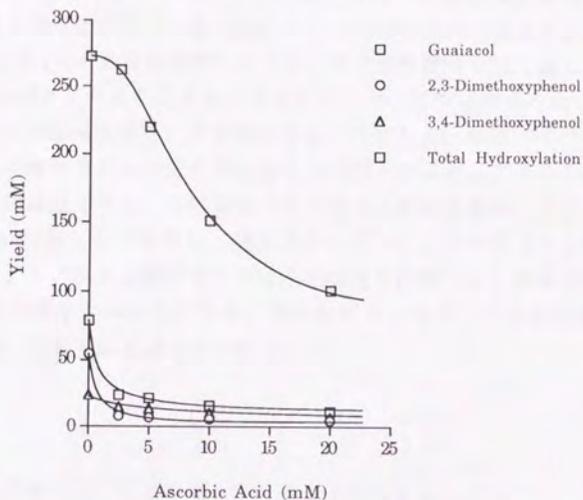
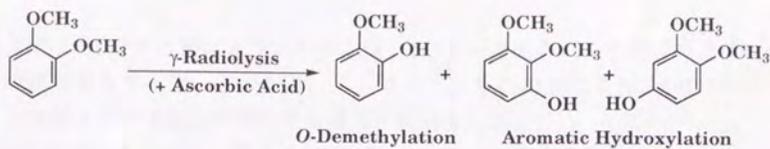


Figure 1-2. Effects of ascorbic acid on the *O*-demethylation and hydroxylation of *o*-dimethoxybenzene by the γ -radiolysis

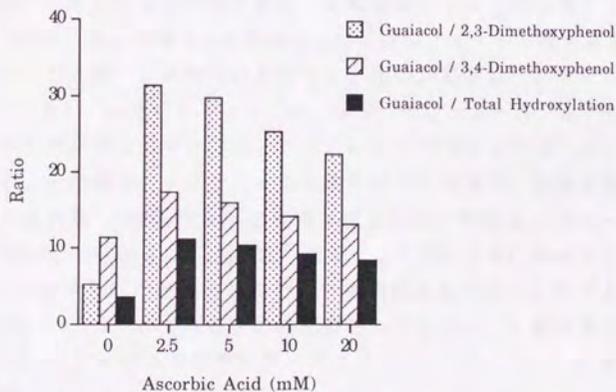


Figure 1-3. Effects of ascorbic acid on the selectivity of *O*-demethylation of *o*-methoxybenzene by the γ -radiolysis

水酸化比は約3であるが、アスコルビン酸を2.5 mM添加することでこの比は約11と3倍強の値となった。すなわち、アスコルビン酸の添加により、OHラジカルによるO-脱メチル化反応の選択性は飛躍的に向上した。

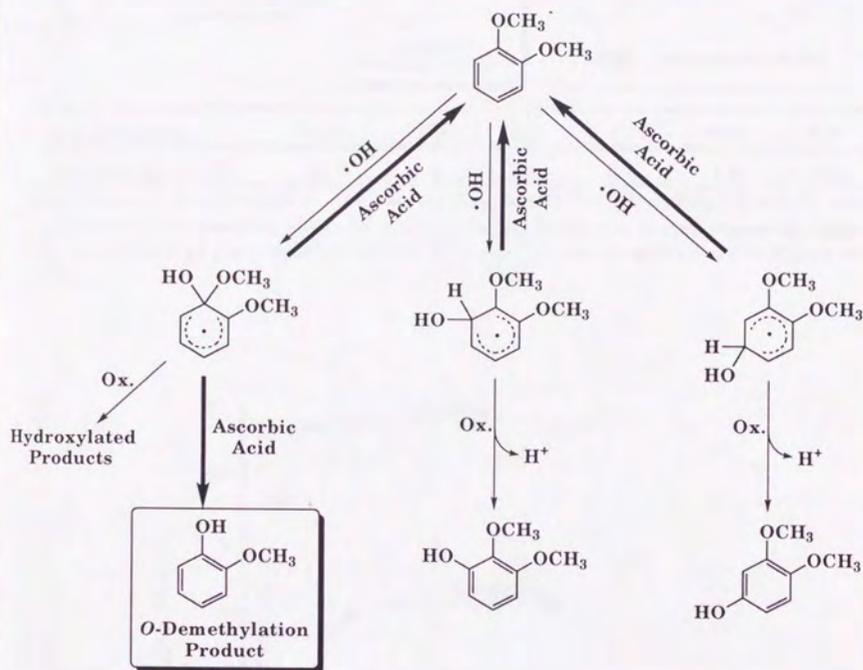
以上の結果から、 Cu^{2+} -アスコルビン酸-O₂系の特徴的な反応性は、アスコルビン酸の還元性雰囲気下での酸化反応という特殊な状況に由来すると推測している。Scheme 1-9にその推定機構を示した。酸化活性種（前節で論じた様にクリプトタイプのOHラジカルを活性種と考えているが、図では簡便のためOHラジカルとしている）が*ipso*位以外の芳香環炭素上に付加したシクロヘキサジエニル中間体は、さらに酸化されれば芳香環水酸化生成物となるが、アスコルビン酸が共存すると中間体は還元され、元の基質に戻り酸化生成物は生成しない。これに対し活性種が*ipso*付加した中間体は、還元されることによりO-脱メチル化生成物となる。よってアスコルビン酸存在下では、その還元作用によりO-脱メチル化反応のみが選択的に進行するようになると考えられる。また、この推定機構は前節のScheme 1-8にもあてはまるものである。

第5節 その他の Cu^{2+} -アスコルビン酸-O₂系の反応

(1) 種々のo-置換フェノールからのカテコール生成反応

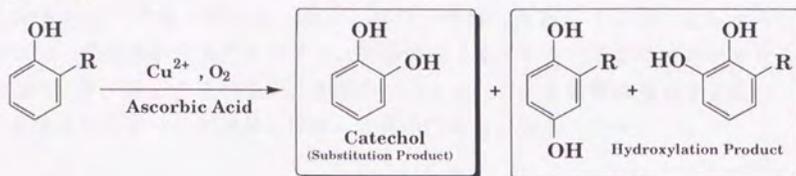
本章第1節では、 Cu^{2+} -アスコルビン酸-O₂系によるメトキシフェノール類、ジメトキシベンゼン類のO-脱メチル化反応を行ったが、その反応機構から考えれば、*ipso*位電子密度がある程度高ければ、脱離基はメトキシ基以外でも反応は進行するはずである。そこで様々な置換基をo-位に持つフェノール類を基質とした、 Cu^{2+} -アスコルビン酸-O₂系の反応を行った。用いた基質は、o-メチルフェノール（o-クレゾール）、o-クロロフェノール、o-ブロモフェノール、o-アセチルフェノール（o-ハイドロキシアセトフェノン）、o-ニトロフェノール、o-シアノフェノールである。その結果、o-クレゾールを除く全ての基質で、各置換基が水酸基に置換された生成物（OH置換反応生成物と以下呼ぶ）であるカテコールが生成した。（o-クレゾールからは、trace量（収率にして約0.2%）のカテコールの生成が、HPLC上観察されたが、きちんとした構造確認を行うことのできる量ではなかったため、カテコールであるかの確認は行っていない。）置換基による脱離のしやすさは、メトキシ>アセチル>ハロゲン>ニトロ>シアノの順であった（Table 1-4, Figure 1-4）。

この様に、メトキシ基以外でも数種の置換基でOH置換反応が起きることがわ



Scheme 1-9. Proposed mechanisms of the selective *O*-demethylation of *o*-dimethoxybenzene by the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

Table 1-4. OH Substitution reaction of *o*-substituted phenols by a Cu^{2+} - ascorbic acid - O_2 system



| <i>o</i> -Substituent | OCH_3 | COCH_3 | Br | Cl | NO_2 | CN |
|-----------------------|----------------|-----------------|-----|-----|---------------|-----|
| Catechol Yield (%) | 11.3 | 6.2 | 2.3 | 2.3 | 1.6 | 1.0 |

Conditions: A mixed solutions of a substrate (1 mmol), $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) and ascorbic acid (10 mmol) in water (20 ml) and acetone (6 ml) was stirred vigorously under O_2 atmosphere at room temperature for 24 hours and the products were analyzed by HPLC.

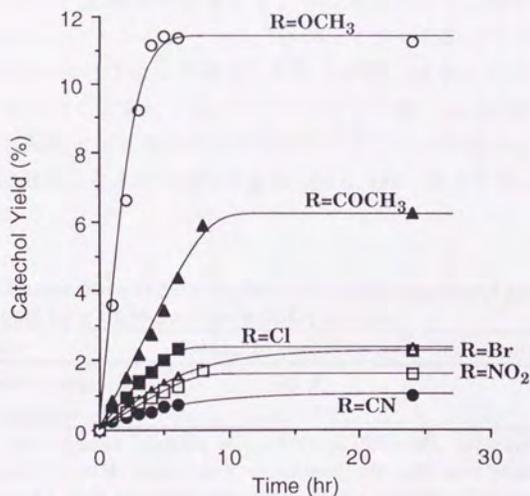


Figure 1-4. Time-course of the substitution reaction of *o*-substituted phenols by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

かった。その中でもアセチル基、シアノ基の場合は、C-C結合切断を伴う反応であり、代謝化学の観点からは、この反応性は興味深いものである。

OH置換反応効率の順には、様々な要因が複雑に作用していると思われる。すなわち、置換基の脱離のしやすさ、芳香環電子密度に及ぼす置換基の効果、さらには第4章で詳しく述べるが、本反応では水酸化反応も同時に進行するため、その置換基の効果などが複雑に作用した結果であると考えている。

(2) 基質の金属イオンへの配位の検討

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は、フェノールを o -位選択的に水酸化すること、及び o -メトキシフェノール類の O -脱メチル化反応を効率良く起こすことから、当初は Cu^{2+} イオンへ基質が配位し、その効果で近傍の o -位に酸化反応を起こすと考えられていた。しかし本章第1節で論じた、 p -置換体でも効率よく O -脱メチル化反応が進行するという結果からは、反応における配位の重要性は低いことが予想される。そこでこれをさらに確かめるため、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による o -メトキシフェノール、 p -メトキシフェノールの O -脱メチル化競争反応を行った。もし、フェノール性OH基の金属イオンへの配位が大きな意味を持つならば、配位作用の強い o -メトキシフェノールの O -脱メチル化反応の方が優先すると考えられる。結果はTable 1-5に示す通り、原料消費量、 O -脱メチル化生成物収率ともほぼ同じであったことから、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応では、基質は金属イオンには配位せずに酸化反応が起きていることが示唆された。(なお、フェノールの o -位選択的な水酸化反応の要因に関しては、第4章第2節に記述した。)

Table 1-5. Competitive O -demethylation of o -methoxyphenol and p -methoxyphenol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

| Substrate | Substrate consumption | O -demethylation yield |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|
| o -Methoxyphenol | 17.5 % | 13.1 % |
| p -Methoxyphenol | 18.0 % | 15.7 % |

Conditions: An aqueous solution of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (50 mM), ascorbic acid (500 mM), o -methoxyphenol (50 mM) and p -methoxyphenol (50 mM) was stirred under pure O_2 atmosphere at r.t. and the substrate consumption and the O -demethylation yield were determined by HPLC after 24 hr.

第2章

肝ミクロソーム-NADPH/O₂系による
アニソール類のO-脱メチル化反応

第2章 肝ミクロソーム-NADPH/O₂系によるアニソール類のO-脱メチル化反応

第1節 メトキシフェノール、ジメトキシベンゼン類のO-脱メチル化反応

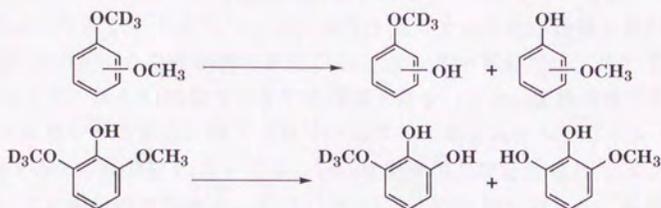
シトクロムP450によるアルキルアリアルエーテル類のO-脱アルキル化反応は、アニソールを基質とした検討などから水素原子引き抜き機構で進行すると一般には考えられている¹¹⁾。しかしこれまでに、広範な基質に対する機構を詳細に解析した例はない。そこで前章で見られたような基質の構造に依存した反応機構の変化が、シトクロムP450関与の反応でも見られるかどうか以下検討した。

(1) 分子内同位体効果を用いた検討

まず、反応機構を簡便に推測することが可能な分子内同位体効果を用い、肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝反応におけるジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を検討した。本節では以下、フェノバルビタールで誘導したラットより調製した肝ミクロソームを反応に用いている。 k_H/k_D はGC/SIM法によって求めた。その結果、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応では、その置換位置によらず10以上の高い k_H/k_D 値が得られ、水素原子引き抜き機構で反応が進行することが明らかとなった(Table 2-1; Runs 1-3)。アニソールよりも *ipso*位電子密度の高い基質である *o*-あるいは *p*-ジメトキシベンゼンでも、O-脱メチル化反応は水素原子引き抜き機構で進行する点がCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系やガンマラジオリシス法と大きく異なる。

同位体効果が、単純にC-H結合とC-D結合のエネルギー差によって生じるとすると、 $k_H/k_D=7.0$ が最大値となると計算できる¹⁴⁾。ところがこれまでも、水素原子引き抜きを律速段階とする酸化反応(例えば、脂肪族炭化水素の水酸化反応など)において、いくつかの酸化反応系で10を越える k_H/k_D 値が報告されている^{15,16)}。これらは、GC/SIM法による定量結果であり、GC/MS法を用い、あるスキャンナンバーのみから k_H/k_D 値を計算したときに見られがちな、重水素体と軽水素体の若干の保持時間の差から生じる誤差に由来するものではない¹⁷⁾。最近ではこの理論値を超える k_H/k_D 値は、その温度依存的变化の検討から、水素原子移動の際のトンネル効果に由来すると考えられている^{18,19)}。質量数1の軽水素原子と質量数2の重水素原子ではそのトンネル半径に大きな差があるため、基質と酸化活性種が非常に接近して反応する場合、この効果が顕著に現れ、10を越える大きな k_H/k_D 値が観測される。また、10を越える大きな k_H/k_D 値が観測されたことを逆に利用し、酸化反応の際の基質と活性種の距離および方向を推測している報告もある¹⁷⁾。本実験で得られた、肝ミクロソーム系によるO-脱メチル化反応の際の10を

Table 2-1. Kinetic isotope effects on the *O*-demethylation of dimethoxybenzenes and 2,6-dimethoxyphenol by the phenobarbital-treated rat liver microsomes-NADPH/O₂ system



| Run | Substrate | k_H/k_D |
|-----|---|----------------|
| 1 | <i>o</i> -(OCD_3)-Anisole | 6.2 ± 0.1 |
| 2 | <i>m</i> -(OCD_3)-Anisole | 12.6 ± 0.4 |
| 3 | <i>p</i> -(OCD_3)-Anisole | 11.9 ± 0.1 |
| 4 | 2-(OCD_3)-6-(OCH_3)-Anisole | 1.0 ± 0.0 |

The data represent the mean \pm S.E. of three experiments.

Experimental conditions were as follows. A mixture of substrate (500 nmol), cofactors, glucose-6-phosphate dehydrogenase (10 units) and phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) was incubated for 15 min under air. All the products were extracted with chloroform and trimethylsilylated before analysis. Kinetic isotope effects were determined by GC/SIM as M^+ peak area ratio.

越える大きな k_H/k_D 値は、GC/SIM法による値であり誤差によるものではない。酵素系であるため、同位体効果の温度依存性の検討は難しく、行っていないので推測の域を出ないが、本反応系によるジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応においても、基質と酸化活性種はかなり接近して水素原子引き抜き反応が起きており、よって10以上の大きな k_H/k_D 値が観測されたものと考えている。

次に、2,6-ジメトキシフェノールのO-脱メチル化反応機構を検討したところ、 $k_H/k_D=1.0$ と小さな値が得られた。ここからこの基質では、これまで考えられてきたシトクロムP450関与の反応の機構と異なり、*ipso*置換機構で反応が進行することが見いだされた。肝ミクロソーム系によるアルキルアリアルエーテル類のO-脱アルキル化反応においても、*ipso*置換機構で反応が進行することを示した例は、これが初めてである。そこでさらに、 $^{18}O_2$ を酸化剤とし、O-脱メチル化生成物への酸化剤由来の酸素原子導入率を用いて反応機構を詳細に検討した。

(2) O-脱メチル化生成物への酸化剤由来の酸素原子導入率を用いた検討

$^{18}O_2$ を用い、生成物への酸化剤由来の酸素原子の導入率から、肝ミクロソーム系によるメトキシフェノール、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を検討した。 ^{18}O 導入率はGC/SIM法によって求めた。その結果、*o*-および*p*-メトキシフェノールで高い ^{18}O 導入率が観測され、これらの基質のO-脱メチル化反応が*ipso*置換機構によって進行することが見いだされた(Table 2-2; Runs 1,3)。同じメトキシフェノールでも*m*-メトキシフェノールでは、活性種由来の酸素原子はほとんど生成物に導入されず、水素原子引き抜き機構で反応が進行した(Run 2)。ジメトキシベンゼンではその置換位置によらず生成物への ^{18}O 導入率は低かった(Runs 4-6)。また $H_2^{18}O$ を用いた検討から、水分子由来の酸素原子も生成物へは全く導入されないことが見いだされ(Runs 4-6)、よって水素原子引き抜き機構で反応が進行することが明らかとなった。これは、分子内同位体効果を用いた検討から得られた結論と一致する。

以上の結果より、肝ミクロソーム系によるO-脱メチル化反応においては、基質のフェノール性OH基の有無、およびその置換位置によって反応機構が大きく変化することが明らかとなった。

(3) フェノール性OH基を有するアニソール類の新しいO-脱メチル化反応機構

これまでの結果から、肝ミクロソーム系によるO-脱メチル化反応において、基質のフェノール性OH基が反応機構に大きく関与することが明らかとなった。ところが、これまでに知られている水素原子引き抜き機構、*ipso*置換機構の2反応機構では、フェノール性OH基は直接は関与しないため、前段までに得られた基

Table 2-2. ^{18}O Incorporation from $^{18}\text{O}_2$ or H_2^{18}O in the *O*-demethylation of methoxyphenols and dimethoxybenzenes by the phenobarbital-treated rat liver microsomes-NADPH/ O_2 system

| Run | Substrate | Product | ^{18}O Incorporation | |
|-----|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | from $^{18}\text{O}_2$ | from H_2^{18}O |
| 1 | <i>o</i> -Methoxyphenol | Catechol | > 99 % | n.d. ^{a)} |
| 2 | <i>m</i> -Methoxyphenol | Resorcinol | 3 | n.d. |
| 3 | <i>p</i> -Methoxyphenol | Hydroquinone | 84 | n.d. |
| 4 | <i>o</i> -Dimethoxybenzene | <i>o</i> -Methoxyphenol | 4 | < 1 % |
| 5 | <i>m</i> -Dimethoxybenzene | <i>m</i> -Methoxyphenol | < 1 | < 1 |
| 6 | <i>p</i> -Dimethoxybenzene | <i>p</i> -Methoxyphenol | 1 | < 1 |

Experimental conditions for determining the ^{18}O incorporation from $^{18}\text{O}_2$ were as follows. The standard incubation mixtures contained substrate (500 nmol), cofactors, glucose-6-phosphate dehydrogenase (10 units) and phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The reaction was initiated by the addition of microsomes (5 mg protein, 2.2 nmol P450 / mg protein) under an $^{18}\text{O}_2$ -Ar mixture, and was performed at 37°C under an $^{18}\text{O}_2$ -Ar mixture for 15 min. Experimental conditions for determining the ^{18}O incorporation from H_2^{18}O were identical to those described above, except that reactions were carried out in the medium containing H_2^{18}O under air. All the products were extracted with chloroform and trimethylsilylated before analysis. ^{18}O Incorporation was determined by GC/SIM as M^+ peak area ratio.

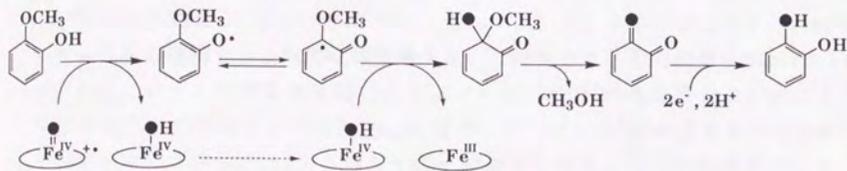
^{a)}not determined.

質のフェノール性OH基の有無、およびその置換位置に依存した反応機構の変化を説明することはできない。そこで、同じ*ipso*置換様式、すなわち生成物へ酸化剤由来の酸素原子が導入される機構であっても、経由する中間体の異なる新たな機構を考えた。それを、Scheme 2-1; Aに示した。この新反応機構はまず、活性種が基質のフェノール性OH基を酸化し、フェノキシラジカルを生成する反応を初発反応とする。次にこのラジカルが*ipso*位へと展開し、ここに活性種がリバウンドする。その後メタノールの脱離を経てキノン体を生じ、これがNADPH依存的に還元されて*O*-脱メチル化生成物となる。この経路でも活性種由来の酸素原子は生成物へ導入されるため、*ipso*置換様式の一つに数えられるが、*ipso*付加を初発とする従来の機構とは大きく異なる。肝ミクロソーム系では、基質のフェノール性OH基の酸化が速いと考えれば、*o*-および*p*-メトキシフェノールはこの反応機構で*O*-脱メチル化反応が進行し、生成物に活性種由来の酸素原子が導入される。一方*m*-メトキシフェノールでは、生成したフェノキシラジカルは*ipso*位へと展開できないため、この反応機構では*O*-脱メチル化反応は進行せず、よって従来の水素原子引き抜き機構で反応が進行したと説明される(Scheme 2-1; B)。以上のように、フェノキシラジカル生成を初発反応とする新反応様式を考えることで、肝ミクロソーム系による*O*-脱メチル化反応機構の、基質のフェノール性OH基の有無、およびその置換位置による変化が矛盾なく説明できた。ごく最近本研究とは独立に、アニリン類を基質としたシトクロムP450による酸化反応の検討から、ここに示した機構と同様にラジカルの*ipso*位への展開を含む機構を推定した報告がなされた²⁰⁾。しかし、これまで論じてきた様な反応機構の基質依存性の詳細な検討を基に機構を提唱した例は、本研究がはじめてである。

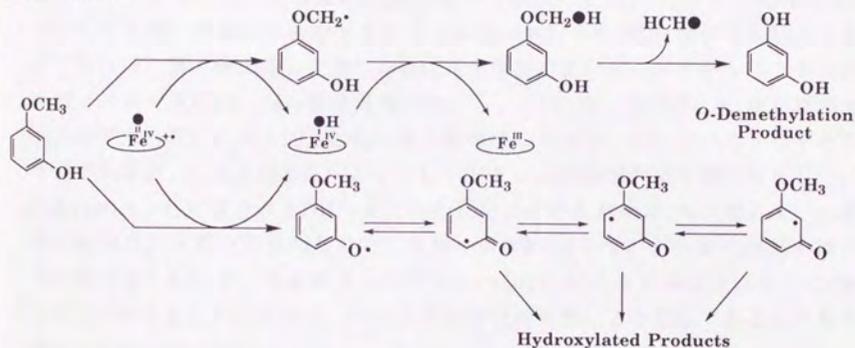
第2節 各種誘導肝ミクロソーム間での*O*-脱メチル化反応機構の比較

シトクロムP450の反応性には、アイソザイムによって大きな差がある。例えば1Aタイプのアイソザイムは芳香族性を持つ平面的な分子の酸化を得意とし、2Bタイプは非平面分子の酸化を得意とする。またシトクロムP4502E1は、エタノールなどの小分子の酸化を行うことが知られている¹⁾。さらに2E1による反応は、Compound Iなどのヘムを含む活性種によるものではなく、真の活性種はリークした過酸化水素由来のOHラジカルであるとする報告もある^{21,22)}。この様なアイソザイム間の反応性の違いが、アニソール類の*O*-脱メチル化反応機構に表れるかどうか検討するため、各種誘導剤で誘導したラットより調整した肝ミクロソーム

A. Newly proposed *O*-dealkylation mechanism (*o*-, *p*-isomers)



B. *m*-isomers

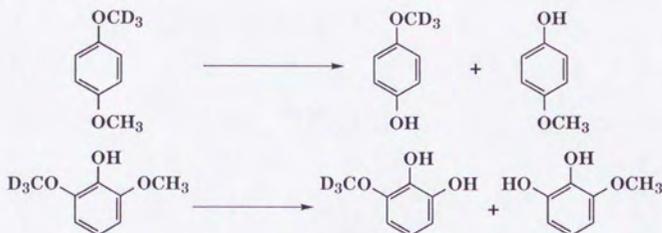


Scheme 2-1. Proposed mechanisms of *O*-demethylation of methoxyphenols by PB-treated rat liver microsomes-NADPH/O₂ system

を用いて、アニソール類のO-脱メチル化反応機構を検討した。誘導剤として、フェノバルビタール、3-メチルコランスレン、アセトンの3種の化合物を用いた。フェノバルビタールは2Bタイプを、3-メチルコランスレンは1Aタイプを、アセトンは2E1をそれぞれ誘導することが知られている。これらの誘導剤で誘導した肝ミクロソーム系による、*p*-ジメトキシベンゼン、2,6-ジメトキシフェノールのO-脱メチル化反応機構を分子内同位体効果を用いて検討した。その結果をTable 2-3にまとめた。いずれの誘導剤を用いても、フェノール性OH基を持たない*p*-ジメトキシベンゼンでは10以上の大きな k_H/k_D 値が、フェノール性OH基を有する2,6-ジメトキシフェノールでは1.0と小さな k_H/k_D 値が得られた。これらの結果から、シトクロムP450の活性種自体の反応性には、各アイソザイム間で大きな差はないことが示唆された。

アセトン誘導肝ミクロソーム系による*p*-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応においても10以上の大きな k_H/k_D 値が観測されたことは、シトクロムP4502E1の酸化活性種の議論に大きな知見をもたらす。もしこれがOHラジカルによる反応であれば、第1章で論じた通り *ipso*位電子密度の高い*p*-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応は、*ipso*置換機構で進行し、1.0に近い小さな k_H/k_D 値が観測されるはずである。 $k_H/k_D=10.9$ と他2種の誘導肝ミクロソームに比べると若干小さな値であるが、 $k_H/k_D=12.0$ をヘムを含むシトクロムP450酸化活性種の値として、 $k_H/k_D=10.9$ から計算されるOHラジカルの反応に占める割合は1%に満たない。詳細な議論は、特異的阻害剤を用いた実験や精製P450を用いた実験の結果を待たなければならないが、本結果はシトクロムP4502E1による反応はリークしたOHラジカルによるものではなく、ヘムを含む酸化活性種による反応であることを示唆している。

Table 2-3. Kinetic isotope effects on the *O*-demethylation of *p*-dimethoxybenzene and 2,6-dimethoxyphenol by various inducer-treated rat liver microsomes-NADPH/O₂ system



| Inducer | k_H/k_D , Substrate | |
|----------------------|--------------------------------------|--|
| | <i>p</i> -(OCD_3)-Anisole | 2-(OCD_3)-6-(OCH_3)-Phenol |
| Phenobarbital | 11.9 ± 0.1 | 1.0 ± 0.0 |
| 3-Methylcholanthrene | 12.0 ± 0.1 | 1.0 ± 0.0 |
| Acetone | 10.9 ± 0.1 | 1.0 ± 0.0 |

The data represent the mean \pm S.E. of three experiments.

Experimental conditions were identical to those described in Table 2-1.

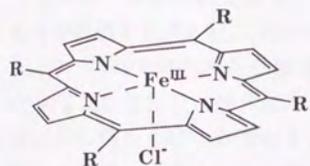
第3章

アニソール類のO-脱メチル化反応機構を指標とした、
各種鉄ポルフィリン錯体-酸化剤系及び
肝ミクロソーム-NADPH/O₂系の反応特性の比較

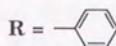
第3章 アニソール類のO-脱メチル化反応機構を指標とした、各種鉄ポルフィリン錯体-酸化剤系及び肝ミクロソーム-NADPH/O₂系の反応特性の比較

これまでに数多くのシトクロムP450のモデル酸化系が開発されてきたが、その中で最もよく用いられるものは、プロトヘムIXと類似した構造の各種鉄ポルフィリン類を触媒として用いる酸化系である。この酸化系は用いる酸化剤によりさらに2種に大別される。それは、酸化剤として過酸化水素、クメンヒドロパーオキシドなどのパーオキシド類、過酢酸、mCPBAなどの過酸類、及びヨードソベンゼン類を用い、いわゆる"Shunt pathway"により酸化活性種を生成するモデル酸化系と、酸化剤として酸素分子を用い、系中に水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤を共存させることにより酸素分子を還元的に活性化し、酸化活性種を生成するモデル系である。(Shunt pathwayについては、本章第3節のScheme 3-3に紹介した。)シトクロムP450関与の酸化反応は、通常の生体内反応であれば後者の反応であるが、前者のShunt系によっても活性種は生成することが知られている。ただし、前者の系で用いる酸化剤によっては、生成する酸化活性種が後者とは異なるとする報告もある¹⁷⁾。第2章で検討した、肝ミクロソーム系による*in vitro*代謝反応は、Electron sourceとしてNADPHを用いた後者の系の反応であるため、肝ミクロソーム系との反応性の比較を行う場合、鉄ポルフィリン類を用いた酸化系として、後者に属するものを用いる方が望ましい。しかし後者の系の反応は、触媒として用いる鉄ポルフィリンの種類によっては反応が進行しない場合もあり、また反応途中で様々な活性酸素種を生じる可能性があるため、前者の系に比べ複雑な反応となることが予想される。そこで、より単純な酸化反応が進行すると考えられる前者のShunt pathwayによって酸化活性種を生成する、種々の鉄ポルフィリン-酸化剤系の反応性を以下検討することとした。

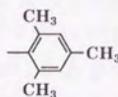
触媒として用いた鉄ポルフィリン類は、Figure 3-1に示した6種類である。まず最初は、メソ位にフェニル基を有するFeTPPCI、メシチル基を有するFeTMPCI、ペンタフルオロフェニル基を有するFeTPFPCCIの3種の鉄メソフェニルポルフィリン類で、これらは全てクロロアニオンを軸配位子として持つ。FeTPPCIは最も単純な鉄ポルフィリンとしてよく用いられる。フェニル基の2,6-位に置換基を持つFeTMPCI、FeTPFPCCIは酸化反応中に分解されにくく、酸化反応効率が良いとされる。またFeTPFPCCIはペンタフルオロフェニル基の電子吸引性の効果から強力な酸化能を有するという特徴を持つ。以上の3種の鉄ポルフィリンは、様々な研究に最もよく用いられている鉄ポルフィリン類である。次に、反応特性に及ぼす軸配位子の効果を検討するために2種の鉄ポルフィリン、ビス1-メチルイミダゾール配位鉄ポルフィリンであるFeTMP(1-MeIm)₂ClO₄、および当教室で開発



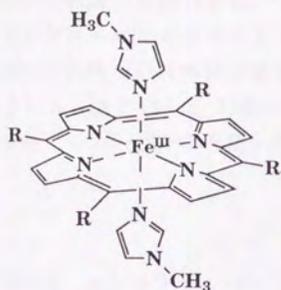
FeTPPCl



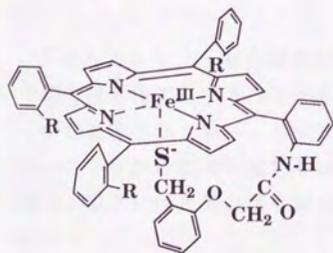
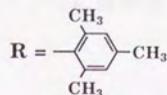
FeTMPCl



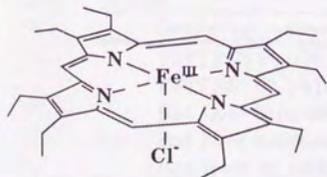
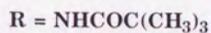
FeTPFPCCl



FeTMP(1-MeIm)₂ClO₄



S.R. Complex



FeOEPCl

Figure 3-1. Iron porphyrins

された分子内チオレート配位鉄ポルフィリンであるS.R.錯体を用いた。これらはそれぞれ、生体内酸化酵素であるパーオキシデース類、シトクロムP450の軸配位子の特徴をモデル化した鉄ポルフィリン類として用いた。このうちS.R.錯体は、シトクロムP450の大きな特徴である第5配位子としてのチオレートの配位をモデル化した錯体で、酸化に対して比較的安定であることがこれまでの当教室での検討から明らかにされており、酸化反応に用いることのできる、これまでに知られている唯一のチオレート配位鉄ポルフィリンである。最後にプロトヘムIXに最も近い構造を持つ鉄ポルフィリンとして、ピロールの β 位にエチル基を有するFeOEPCIを用いた。メソ位にフェニル基を有する鉄ポルフィリン類は、そのHOMO軌道の対称性が a_{1g} であり、これはプロトヘムIXのHOMO軌道の対称性と考えられる a_{1g} と異なることが知られている。鉄ポルフィリン系の反応性には、そのHOMO軌道の対称性が重要な意味を持つとする報告もあり²³⁾、この観点からプロトヘムIXと同じ a_{1g} 対称のHOMO軌道を有すると考えられる、メソ位に置換基を持たないFeOEPCIを用いた酸化系の反応性を検討した。

第1節 *p*-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を指標とした各系の反応性の評価

鉄ポルフィリン-酸化剤系の反応性は、脂肪族炭化水素の水酸化反応効率などの酸化能を指標とすることが多いが、酸化反応機構を検討した例もこれまでにいくつか報告されている。しかしO-脱アルキル化反応機構を検討した例は少なく、また用いられる基質の種類も限られており、アニソールを用いた例がほとんどである。以下に代表的な例を紹介した(Table 3-1)¹¹⁾。

Table 3-1.^{a)} Kinetic isotope effects on the O-demethylation of anisole

| Oxidizing system | k_H/k_D |
|--|----------------|
| FeTPPCL-PhIO ^{b)} | 9.0 ± 3.0 |
| FeTPFPCL-PhIO | > 8.0 |
| Rat liver microsomes-NADPH/O ₂ | 10.5 ± 0.7 |
| Rat liver microsomes- ^t BuOOH ^{c)} | 12.3 ± 2.5 |
| Rat liver microsomes-mCPBA ^{d)} | 8.4 ± 0.3 |

^{a)} Lindsay Smith, J. R. et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1983, 621. ¹¹⁾

^{b)} Iodosylbenzene. ^{c)} *t*-Butylhydroperoxide. ^{d)} *m*-Chloroperbenzoic acid.

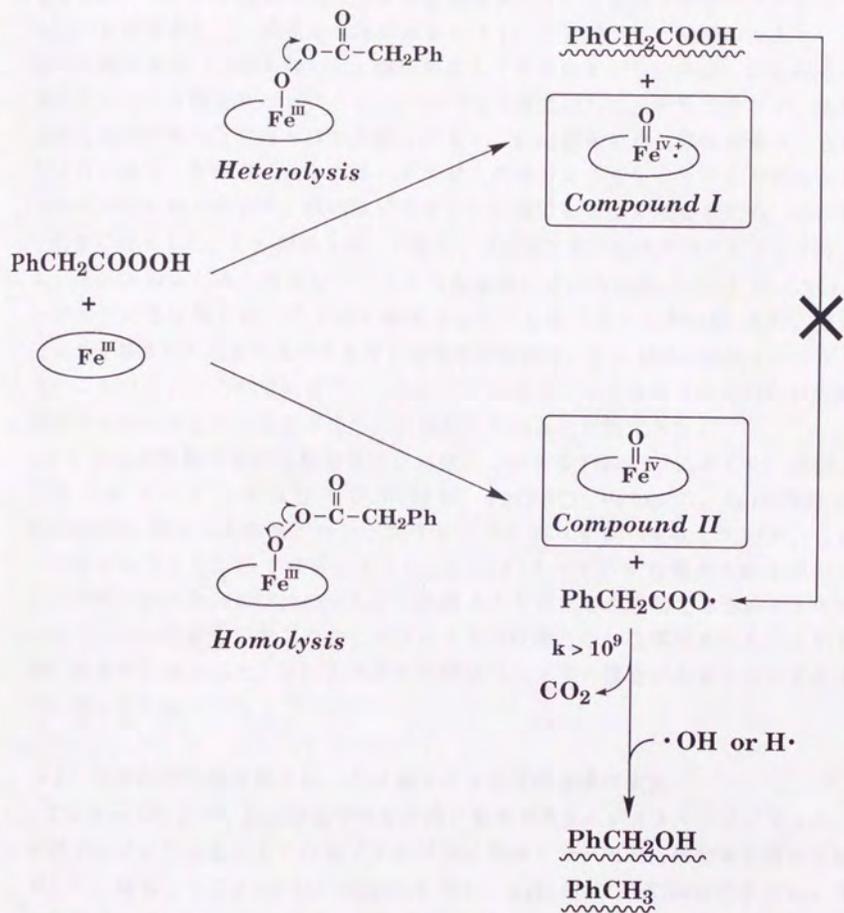
この報告ではFeTPPCCI-PhIO系、FeTPFPCCI-PhIO系、肝ミクロソーム系によるアニソールのO-脱メチル化反応機構を同位体効果を用いて検討し、全ての系で8以上の大きな k_H/k_D 値が得られたことから、これらの鉄ポルフィリン酸化剤系の反応性は、シトクロムP450の反応性に類似しており、良いP450モデル酸化系であると結論づけている。

さて第1章で論じた通り、OHラジカル様活性種によるアルキルアリルエーテル類のO-脱アルキル化反応機構は、基質の*ipso*位電子密度とH原子の引き抜き易さによって、大きく変化した。鉄ポルフィリン酸化剤系でこのような機構の基質依存的変化を検討した例はこれまでにはない。筆者は、鉄ポルフィリン系の反応性を評価するためには、アニソールを用いた検討のみでは不十分と考え、以下鉄ポルフィリン系でのO-脱アルキル化反応機構の基質依存的変化を検討した。具体的にはまず、*ipso*位電子密度のより高い基質である*p*-ジメトキシベンゼンの、各鉄ポルフィリン系によるO-脱メチル化反応機構を検討した。

(1) 鉄ポルフィリン類-フェニル過酢酸系の酸化活性種の検討

鉄ポルフィリン系の酸化剤として、パーオキサイド類、過酸類を用いると、そのO-O結合の開裂様式によって、酸化状態の異なる酸化活性種が生成すると考えられる。O-O結合がヘテロリティックに開裂すれば2電子酸化体であるCompound Iが、ホモリティックに開裂すれば1電子酸化体であるCompound IIが酸化活性種として生成する(Scheme 3-1)。当教室の島田らは、モデル錯体の酸化活性種の生成に関する研究を行い、酸化剤として過酸を用いると、生成する酸化活性種の種類を酸化剤由来の分解物から推定できることを示した²⁴⁾。例えばフェニル過酢酸を酸化剤とした場合、O-O結合がヘテロリティックに開裂すると、活性種としてCompound Iが生成し、酸化剤由来の分解物としてフェニル酢酸が生成する(Scheme 3-1)。O-O結合がホモリティックに開裂すると、活性種としてCompound IIが生成し、酸化剤由来の分解物としてアシルオキシラジカルが生成する。このラジカルは拡散律速で脱炭酸し($k > 10^9$)ベンジルラジカルとなり、最終的にベンジルアルコール又はトルエンとなる(Scheme 3-1)。ヘテロリティック開裂で生じたフェニル酢酸が、再酸化されることによりアシルオキシラジカルを生成する経路も考えられるが、島田らはこの経路の反応はほとんど起こらないことを確かめ、以上より酸化剤由来の分解生成物であるフェニル酢酸とベンジルアルコール及びトルエンの収量から、生成する酸化活性種の種類を推定できることを示した。本研究においてもこれを踏まえ、以下主にフェニル過酢酸を酸化剤として用いた。

p-ジメトキシベンゼンを基質としたときの、各種鉄ポルフィリン-フェニル過



Scheme 3-1. The O-O bond cleavage of peroxyphenylacetic acid catalyzed by iron porphyrins²⁴⁾

酢酸系で生成する酸化活性種の種類を、酸化剤由来の分解生成物から検討した。反応はベンゼンを溶媒とし、フェニル過酢酸をAr下滴下して開始し、室温で10分間行った。フェニル過酢酸由来の分解生成物として、フェニル酢酸とベンジルアルコールを定量した。酸化剤の量は鉄ポルフィリンに対して1当量のみとし、基質大過剰の条件で反応を行った。酸化剤量を1当量のみとしたのは、S.R.錯体は他のチオレート配位鉄ポルフィリンに比べると酸化に対して安定であるが、実際の酸化反応の条件下ではやはり分解しやすく、S.R.錯体に対し酸化剤量が1当量以上になると、反応終了後多くはハイスピン錯体となってしまうことが明らかにされているためである²⁴⁾。他の鉄ポルフィリン類でも条件を揃えるため、この酸化剤量に統一した。S.R.錯体を用いた場合、反応終了後にESRスペクトルをとり、ロースピン錯体が多く残存していることを確認している(g 値=2.31, 2.22, 1.96)。一部はやはり分解されハイスピン錯体となってしまうが(g 値=5.9)、過酸により分解されて生成するハイスピン錯体の反応性は、S.R.錯体に比べ1オーダー低いことが見いだされている²⁴⁾ことから、この条件下では分解されていないS.R.錯体そのものによって反応がほとんど進行していると結論できる。

フェニル過酢酸由来の分解生成物を定量した結果をTable 3-2に示した。検討した鉄ポルフィリン系は全て(S.R.錯体, FeTPPCL, FeTMPCL, FeTPFPCL, FeOEPCl)、フェニル酢酸がベンジルアルコールよりも多く生成しており、これらの鉄ポルフィリン系では全て主にCompound 1タイプの活性種が生成していることが明らかとなった(Scheme 3-2)。O-脱メチル化反応生成物である*p*-メトキシフェノールの収量も定量したが、いずれも数%程度と低い収率であった。これは酸化剤量が少ないこと、及び生成物が再酸化されやすい構造であることによるものと考えている。

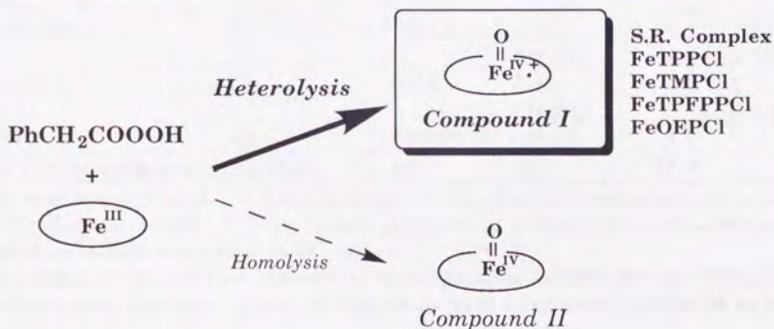
(2) 分子内同位体効果を用いたO-脱メチル化反応機構の検討

アニソールに比べ、*ipso*位電子密度の高い基質である*p*-ジメトキシベンゼンの、各鉄ポルフィリン系によるO-脱メチル化反応機構を分子内同位体効果を用いて検討した。基質として*p*-(OCD₃)-Anisoleを用い、 k_H/k_D 値はGC/SIM法で求めた。その結果をTable 3-3にまとめた。S.R.錯体を用いた系では、ベンゼン中の反応で k_H/k_D 値が10を越える大きな値となり、反応が水素原子引き抜き機構で進行していることが見いだされた。塩化メチレンを溶媒とすると k_H/k_D 値は4~6程度に小さくはなったが、それでも水素原子引き抜き機構で主に反応は進行していると考えられる値である。第2章第1節で検討した通り、肝ミクロソーム系による*p*-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応の際の k_H/k_D 値は11.9であり、水素原子引き抜き機構で反応が進行した。すなわち、S.R.系では、*ipso*位電子密度の高い*p*-ジ

Table 3-2. *O*-Demethylation of *p*-dimethoxybenzene by various iron porphyrin-peroxyphenylacetic acid systems

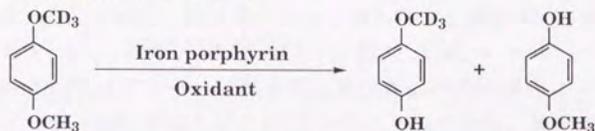
| Iron porphyrin | Yield | | | |
|----------------|---|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | PhCH ₂ COOH (Heterolysis) | PhCH ₂ OH (Homolysis) | <i>p</i> -Methoxy phenol | 2,5-Dimethoxy phenol |
| S.R. | > 97 % | 4 % | 1.8 % | 0.39 % |
| FeTPPCI | 66 | 10 | 2.8 | 0.20 |
| FeTMPCI | 65 | 16 | 1.7 | 0.22 |
| FeTPFPPCI | 59 | 21 | 8.0 | 0.37 |
| FeOEPCI | 74 | 7 | 2.4 | 0.30 |

Reaction was carried out as follows. To a mixed benzene solution of *p*-dimethoxybenzene (0.1 M) and iron porphyrin (1.0 mM), peroxyphenylacetic acid (1.0 eq. to iron porphyrin, benzene solution) was added dropwisely and stirred at r.t. under Ar for 10 min. All the products were trimethylsilylated and analyzed by GC/SIM.



Scheme 3-2. Heterolytic cleavage of O-O bond in the S.R., FeTPPCI, FeTMPCI, FeTPFPPCI and FeOEPCI-Peroxyphenylacetic acid (PPAA) system

Table 3-3. Kinetic isotope effects on the *O*-demethylation of *p*-dimethoxybenzene by various iron porphyrin-oxidant system



| Iron porphyrin | Axial ligand | Oxidant | Solvent | k_H/k_D^c |
|---|-----------------|--------------------|---------------------------------|-------------|
| S.R. | Thiolate | PPAA ^{a)} | C ₆ H ₆ | 11.7 (11.9) |
| | | | CH ₂ Cl ₂ | 5.5 (3.9) |
| FeTPPCL | Cl ⁻ | PPAA | C ₆ H ₆ | 1.0 (1.1) |
| | | | CH ₂ Cl ₂ | 1.0 (1.0) |
| FeTMPCl | Cl ⁻ | PPAA | C ₆ H ₆ | 1.2 (1.1) |
| | | | CH ₂ Cl ₂ | 1.0 (0.83) |
| FeTMP(1-MeIm) ₂ ClO ₄ | Imidazole | PPAA | CH ₂ Cl ₂ | 1.2 (1.1) |
| FeTPFPFPCl | Cl ⁻ | PPAA | C ₆ H ₆ | 1.1 (1.1) |
| | | | CH ₂ Cl ₂ | 1.0 (1.2) |
| FeOEPCl | Cl ⁻ | PPAA | C ₆ H ₆ | 1.1 (1.1) |
| | | | CH ₂ Cl ₂ | 0.59 (0.64) |
| FeTPPCL | Cl ⁻ | PhIO ^{b)} | CH ₂ Cl ₂ | 1.9 |
| Rat liver microsomes | Thiolate | O ₂ | H ₂ O | 11.9 |

^{a)} Peroxyphenylacetic acid. ^{b)} Iodosylbenzene. ^{c)} The data in parentheses were in the case of [substrate]=10 mM. ^{d)} 10 eq. (to iron porphyrin) of iodosylbenzene was added to a substrate solution in one portion as an oxidant.

Experimental conditions were identical to those described in Table 3-2 and Table 2-1 unless otherwise mentioned. Kinetic isotope effects were determined by GC/SIM as M⁺ peak area ratio.

メトキシベンゼンを基質としても、肝ミクロソーム系と同じ機構でO-脱メチル化反応が進行することが明らかとなった。

一方、その他の鉄ポルフィリン類(FeTPPCI, FeTMPCI, FeTPFPCCI, FeOEPCI)ーフェニル過酢酸系では、ベンゼン中でも、塩化メチレン中でも k_H/k_D 値はほぼ1に近い値となった。これは、肝ミクロソーム系と異なる機構で反応が進行したことを示している。ビスイミダゾール配位鉄ポルフィリンであるFeTMP(1MeIm)₂ClO₄はベンゼンに対する溶解性が低いため塩化メチレン中の検討のみを行ったが、 k_H/k_D 値はやはり1に近い小さな値となり、軸配位子としてイミダゾールを有する鉄ポルフィリンでも、肝ミクロソーム系の反応性とは大きく異なることが明らかとなった。次に、塩化メチレンを溶媒としたFeOEPCI系では、 $k_H/k_D=0.6$ 程度と1よりかなり小さな値が得られた。 $k_H/k_D=0.8$ 程度まではSecondary isotope effectとして観測された例が知られているが²⁵⁾、0.6まで小さな値が得られた例はこれまでには知られていない。興味深いデータではあるが、原因は現在のところ不明である。さらに、酸化剤としてヨードソベンゼンを用いたFeTPPCI系も検討した。その結果 $k_H/k_D=1.9$ とやや大きな値が得られたが、それでも水素原子引き抜き機構が優先しているとは言えない値であり、S.R.系や肝ミクロソーム系とは反応性が異なることが見いだされた。Table 3-1に示したLindsay Smithらの報告¹¹⁾によると、アニソールを基質とするとFeTPPCI-PhIO系では $k_H/k_D=9.0$ と大きな値となっていることから、鉄ポルフィリン系でも基質の*ipso*位電子密度に依存して機構が変化することが明らかとなった。

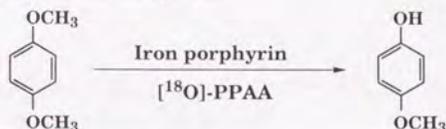
前段でも述べた通り、O-脱メチル化収率はいずれの反応系でもかなり低い。そこで、同位体効果を算出するのに用いているピークが、生成物由来のピークであることを示す必要があると考え、代表的な系(S.R.系、FeTPFPCCI系)でその生成物の高分解能GC/MSをとった。その結果、*p*-(OCH₃)-PhenolのTMS化体と考えているピーク(M⁺ 196)、*p*-(OCD₃)-PhenolのTMS化体と考えているピーク(M⁺ 199)ともに、理論値と許容誤差範囲内で一致した。よってこれまでに得られた同位体効果は、生成物由来の正しいピークをもとに計算されていることが確認された。

(3) 酸化剤由来の酸素原子導入率を用いたO-脱メチル化反応機構の検討

前段で同位体効果を用いて得られた結果をさらに確かめるため、酸化剤由来の酸素原子のO-脱メチル化生成物への導入率を用いて反応機構を検討した。K¹⁸O₂を¹⁸O源として合成した、[¹⁸O]フェニル過酢酸を酸化剤とした、各種鉄ポルフィリン系による*p*-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応を行った。生成物への¹⁸O導入率はGC/SIM法を用いて求めた。反応はベンゼンを溶媒として行った。そ

の結果をTable 3-4に示した。

Table 3-4. ^{18}O Incorporation in the *O*-demethylation of *p*-dimethoxybenzene by various iron porphyrin-oxidant system



| Iron porphyrin | Axial ligand | Oxidant | Solvent | ^{18}O Incorporation ^{b)} |
|----------------------|-----------------|--------------------|------------------------|---|
| S.R. | Thiolate | PPAA ^{a)} | C_6H_6 | < 1 % (< 1 %) |
| FeTPPCL | Cl ⁻ | PPAA | C_6H_6 | 90 (96) |
| FeTMPCl | Cl ⁻ | PPAA | C_6H_6 | 51 (62) |
| FeTPFPFPCl | Cl ⁻ | PPAA | C_6H_6 | 89 (98) |
| FeOEPCl | Cl ⁻ | PPAA | C_6H_6 | 66 (80) |
| Rat liver microsomes | Thiolate | O_2 | H_2O | 1 |

^{a)} Peroxyphenylacetic acid. ^{b)} The data in parentheses were in the case of [substrate]=10 mM.

Experimental conditions were identical to those described in Table 3-3. ^{18}O Incorporation was determined by GC/SIM as M⁺ peak area ratio.

S.R.系では、 ^{18}O 導入率はほぼ0%となり、水素原子引き抜き機構で反応が進行することが明らかとなった。肝ミクロソーム系では、第2章第1節で検討した通り ^{18}O 導入率は1%と低く、水素原子引き抜き機構で反応が進行したことから、S.R.系は肝ミクロソーム系と同じ反応機構であることが見いだされた。これは、前段の結論と一致する。

一方、その他の鉄ポルフィリン系(FeTPPCL, FeTMPCl, FeTPFPFPCl, FeOEPCl)では高い ^{18}O 導入率となった。前段でこれらの鉄ポルフィリン系では k_H/k_D 値が1に近く、肝ミクロソーム系と異なる機構で反応が進行することが示されたが、活性種由来の酸素原子が生成物に導入されることから、*ipso*置換様式で反応が進行したことがここから明らかとなった。

以上の結果より、肝ミクロソーム系と同じ反応機構で

-ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応が進行する系は、分子内でチオレートの配位しているS.R.錯体を用いた系のみであることが見いだされた。前述したように過酸由来の分解物の定量から、ここで検討した鉄ポルフィリン系ではいずれも、生成する酸化活性種は主にCompound Iタイプである。すなわち、同じCompound Iタイプの活性種であっても、軸配位子の効果によりその反応性が大きく異なることを本結果は示している。肝ミクロソーム系と同じ反応性を有する系が、S.R.系のみであるという

結果は、チオレート配位の配位自体がシトクロムP450の特徴的な酸化活性の要因となっていることを示唆しており、注目に値する。なお、チオレート配位の効果に関しては、第3節でさらに考察する。

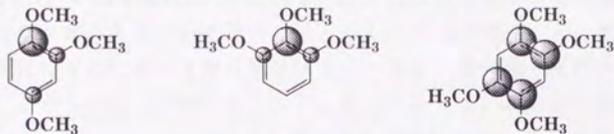
第2節 トリメトキシベンゼン、テトラメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応機構を指標とした、各系の反応性の評価

前節では、アニソールに比べ*ipso*位電子密度の高い*p*-ジメトキシベンゼンを基質とした、O-脱メチル化反応機構の検討を行った。その結果、鉄ポルフィリン系間で反応機構が大きく異なり、肝ミクロソーム系と同じ水素原子引き抜き機構で反応が進行するのは、分子内チオレート配位鉄ポルフィリン錯体であるS.R.のみであることが明らかとなった。そこで次に、特に*p*-ジメトキシベンゼンでも水素原子引き抜き機構でO-脱メチル化反応が進行したこれら2反応系について、さらに高い*ipso*位電子密度を持つと考えられるトリメトキシベンゼン、テトラメトキシベンゼンを基質とした反応を行い、反応機構の基質依存的な変化を詳細に検討し、各酸化系の反応特性をさらに詳細に評価することを試みた。また、FeTPPCIとFeTPFPCCIによるO-脱メチル化反応機構も、*p*-ジメトキシベンゼンで肝ミクロソーム系と異なる*ipso*置換様式で反応が進行した鉄ポルフィリン系の代表として、併せて検討した。

基質として、1,2,4-トリメトキシベンゼン、1,2,3-トリメトキシベンゼン、1,2,4,5-テトラメトキシベンゼンを用いた。1,2,4-トリメトキシベンゼンでは、1位の*ipso*位は2位、4位の2つのメトキシ基によって電子密度が高められているが、2位、4位の*ipso*位は1つのメトキシ基によってしか電子密度は高められておらず、*p*-ジメトキシベンゼンの*ipso*位とほぼ同じ電子密度であると考えられる。同様に1,2,3-トリメトキシベンゼンでは2位が、1,2,4,5-テトラメトキシベンゼンでは全ての*ipso*位が2つのメトキシ基によって活性化されていると考えられる。Table 3-5上部にこれらを模式的に示した図を付した。この図で大きな円は2つのメトキシ基によって、小さな円は1つのメトキシ基によって電子密度の高められている*ipso*位を模式的に表している。分子軌道計算プログラムであるSpartan 3.0.1を用いて、半経験的方法であるAMI法によりそれぞれの基質の分子軌道、電子密度を計算したところ、最終的な分子のGeometryにより若干の値のばらつきが見られるため定量的な数値を得ることはできなかったが、定性的には上記の模式図とほぼ同様の電子密度を得ることができた。

Table 3-5. ^{18}O Incorporation in the *O*-demethylation of tri- and tetramethoxybenzenes by rat liver microsomes-NADPH/ O_2 system and various iron porphyrin-peroxyphenylacetic acid (PPAA) systems

Electron densities at *ipso* positions of the substrates



| Substrate | Product | Electron density at <i>ipso</i> -position | ^{18}O Incorporation, Oxidizing system | | | |
|-----------|---------|---|---|------------|--------------------|-------------------|
| | | | Microsomes -NADPH/ O_2 | S.R. -PPAA | FeTPPCL -PPAA | FeTPFPPL -PPAA |
| | | ++ ^{a)} | 6 % | 43 % | 77 % | 86 % |
| | | + ^{b)} | 1 | < 1 | n.d. ^{c)} | n.d. |
| | | + | < 1 | 4 | n.d. | n.d. |
| | | + | < 1 | < 1 | (14) ^{d)} | (1) ^{d)} |
| | | ++ | 71 | 17 | 96 | 91 |
| | | ++ | 17 | 63 | 69 | 83 |

Experimental conditions were identical to those described in Table 3-4 and Table 2-2. ^{18}O Incorporation was determined by GC/SIM as M^+ peak area ratio.

^{a)} Two methoxy groups elevate the electron density at the *ipso*-position. ^{b)} One methoxy group elevates the electron density at the *ipso*-position. ^{c)} not detected. ^{d)} low yield.

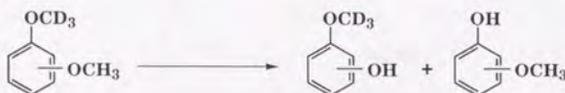
肝ミクロソーム系、S.R.-PPAA系によるO-脱メチル化反応では、1つのメトキシ基によってしか活性化されていない場所は全て、 ^{18}O 導入率はほぼ0%であり、水素原子引き抜き機構で反応が進行した。それに対して、2つのメトキシ基によって電子密度の高められている*ipso*位の反応では、値に幅はあるものの酸化剤由来の酸素原子が導入されることが見いだされ、*ipso*置換機構で反応が進行することが明らかとなった(Table 3-5)。このように、2つ以上のメトキシ基によって*ipso*位電子密度が高められている場所では、O-脱メチル化反応が*ipso*置換様式で進行するようになる点において両反応系はよく一致し、活性種の反応特性が類似していることがさらに強く示された。また、肝ミクロソーム系によるO-脱メチル化反応において、フェノール性OH基を持たない基質でも*ipso*置換機構で反応が進行しうることを示したのは本研究が初めてである。(第2章で論じた通り、フェノール性OH基を持つ基質に関しても、本研究により*ipso*置換機構で反応が進行しうることが示されている。)

一方で、その ^{18}O 導入率の絶対値は基質によって大きく異なる結果となった。これは、*ipso*位電子密度のみでは説明できない。特に肝ミクロソーム系ではこれが顕著で、1,2,3-トリメトキシベンゼンの2位のO-脱メチル化反応では、71%と他の2基質に比べて非常に高い ^{18}O 導入率を示した。すなわち本結果は、この場所でのO-脱メチル化反応は、電子密度から考えられる以上に*ipso*置換機構で起こりやすいことを示している。これは、立体的に込み合った場所であることが原因であると考えている。これは同様の傾向が、肝ミクロソーム系によるジメトキシベンゼン類のO-脱メチル化反応においても見られることから、ある程度一般性のある現象と考えられる。すなわち、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応の際の k_H/k_D 値は、*o*-置換体のみ6.2と他の2置換体に比べ小さい値となったこと(Table 2-1, 3-6)、酸化剤由来の酸素原子も*o*-置換体のみわずかではあるが生成物に導入されたこと(Table 2-2)がこれを示している。S.R.系ではこのような傾向は見られなかった。すなわち、ジメトキシベンゼンのO-脱メチル化反応の際の k_H/k_D 値は、いずれの置換位置であっても10以上の大きな値となった(Table 3-6)。以上の点で肝ミクロソーム系と、S.R.系は異なる結果を与え、これらの結果は肝ミクロソーム系で*o*-置換体などの立体的に込み合った基質を用いると、酵素反応の際の立体的な影響が反応機構に表れることを示唆している。酸化活性種自体の反応特性を議論するためには、このような点を考慮して基質を選ぶ必要があると考えられる。

FeTPPCI、FeTPFPCCI系ではまず、1つのメトキシ基によってしか活性化されていない場所のO-脱メチル化反応はほとんど進行しなかった(Table 3-5)。これは、より電子密度の高い2つのメトキシ基によって活性化されている場所への付加が速いためと考えられる。2つのメトキシ基によって電子密度の高められている場

所でのO-脱メチル化反応は、いずれも¹⁸O導入率は高い結果となった(Table 3-5)。これらの結果は、前節までの結果とよく一致し、酸化活性種が*ipso*付加しやすい性質を持つことがさらに確かめられた。(1,2,3-トリメトキシベンゼンの1位のO-脱メチル化反応における¹⁸O導入率が低い結果となったが、これはほとんど反応が進行せず、生成物収率が極端に低いため、基質中に含まれたわずかな不純物としてのO-脱メチル化体が、見かけ上¹⁸O導入率を低下させるためと考えている。)

Table 3-6. Kinetic isotope effects on the O-demethylation of dimethoxybenzenes by rat liver microsomes-NADPH/O₂ system and S.R.-peroxyphenylacetic acid(PPAA) system



| Substrate | k_H/k_D , Oxidizing system | |
|---------------------------------------|---|-------------------------|
| | Microsomes-NADPH/O ₂ ^{a)} | S.R.-PPAA ^{b)} |
| <i>o</i> -(OCD ₃)-Anisole | 6.2 ± 0.1 | 13.5 (11.1) |
| <i>m</i> -(OCD ₃)-Anisole | 12.6 ± 0.4 | 14.4 (12.2) |
| <i>p</i> -(OCD ₃)-Anisole | 11.9 ± 0.1 | 11.7 (11.9) |

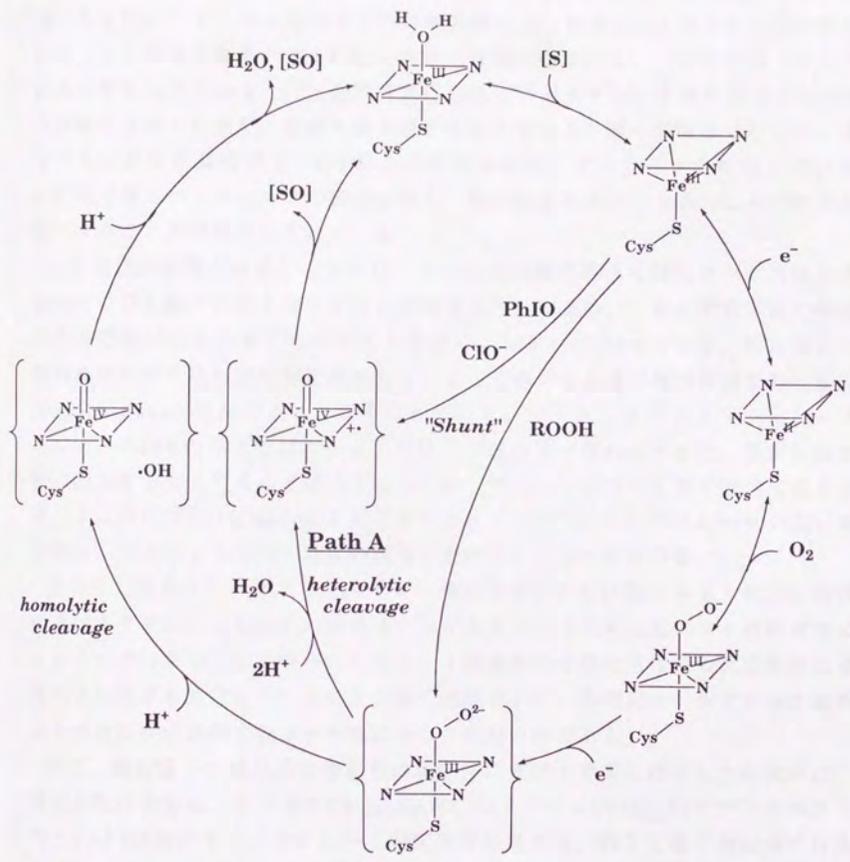
Experimental conditions were identical to those described in Table 2-1 and Table 3-3.

a) The data represent the mean ± S.E. of three experiments. b) The data in parentheses are in the case of [substrate]=10 mM.

第3節 酸化活性種の反応特性に及ぼす軸配位子の効果に関する考察

前節までの、様々なアニソール類のO-脱メチル化反応機構を指標とした酸化活性種の反応特性の検討で、チオレート配位鉄ポルフィリンであるS.R.錯体のみが、肝ミクロソーム系と同じ反応機構の基質依存性を示したことから、チオレートの配位自体が酸化活性種の反応特性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。そこで、このチオレート軸配位子の効果について以下考察した。

シトクロムP450は、酸化酵素のなかでも強力な酸化能を有し、また第5配位子としてチオレートを有する大きな特徴を持つ。そこで、これまでもチオレートの配位と酸化活性の相関を見出すことを目的とした研究が、当教室での研究を含め幾つか行われてきた^{24,26)}。これまでの研究は主に、シトクロムP450の触媒サイクル、特にO-O結合開裂ステップ(Scheme 3-3; Path A)に及ぼす軸配位子の効果に



Scheme 3-3. Catalytic cycle of cytochrome P450

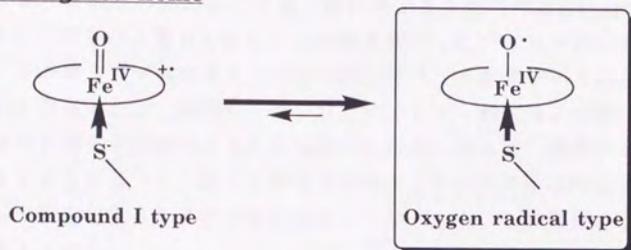
注目して行われてきた。それらの研究によれば、チオレート配位子はO-O結合開裂を起こりやすくさせる効果を持つとされている。すなわち、シトクロムP450の第6配位子側は非常に疎水的でO-O結合のヘテロリティック開裂には不利な環境であるが、チオレート配位子はその強い押し出し効果によりO-O結合のヘテロリティック開裂を促進させるため、酸化活性種の効率の良い生成が可能となっていると考えられている^{24,26)}。当教室島田らは、このチオレート軸配位子のO-O結合開裂に及ぼす効果を、過酸を酸化剤としたモデル系を用いて明確に示した。すなわち、非極性溶媒中でのO-O結合の開裂様式は、チオレートの配位しているS.R.系で最もヘテロリシスの割合が高く、他の鉄ポルフィリン系ではその割合が低下することが明らかにされている²⁴⁾。

一旦酸化活性種が生成したならば、その後の各酸化酵素の酸化能(どの様な基質のどの様な酸化反応を起こすことができるか)の違いは、第6配位子側の環境にその要因があると考えられることが多い。シトクロムP450では、第6配位子側の基質を取り込む空間が比較的広く、よって様々な基質の酸素移行型酸化反応(Oxygenation)が可能であると考えられている。一方ホースラディッシュパーオキシデース(HRP)などでは、ヘム上空はアポ蛋白質で覆われており、基質は活性種の酸素原子に近づくことはできないため、ヘムエッジでの1電子酸化反応を初発とする酸化反応(Oxidation)を起こすとされている²⁶⁾。シトクロムP450の高い酸化能は、以上のようなヘム近傍の環境に由来するとした報告が多い。

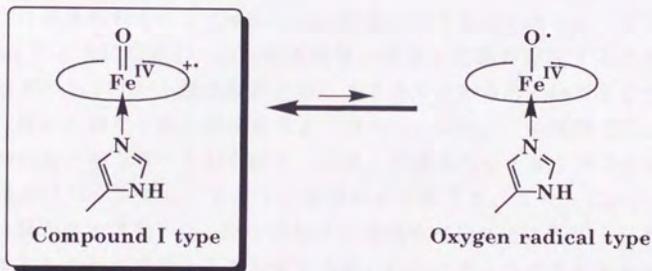
本研究で見られた、鉄ポルフィリン-酸化剤系によるO-脱アルキル化反応機構に及ぼすチオレート配位子の効果は、モデル系であるため上記のヘム近傍環境によるものではない。ここから、チオレート軸配位子は酸化活性種の反応特性に直接大きな効果を及ぼしていることが強く示唆された。本研究は、チオレート軸配位子の反応性に及ぼす効果を明確に示した最初の例である。

さて、軸配位子の酸化活性種自体の反応性に及ぼす効果に注目した研究例は、まだ非常に少ない。その中でChampionは、シトクロムP450_{cam}のラマンスペクトル、XAFSの解析から、チオレート軸配位子の効果は、同じ2電子酸化体ではあるが電子配置の異なる2種の酸化活性種間の平衡に表れていると推定した²⁷⁾。その概略をScheme 3-4に示した。チオレート軸配位子は、その強い電子の押し出し効果に併せ、第3周期の元素であるため空の3d軌道がエネルギー的に近い位置に存在し、この軌道に鉄原子上の電子がBack donationする事ができるという特徴を持つ。この強い配位子効果のために、Fe-O結合次数が低下し、Compound Iタイプのカチオンラジカル種から、酸素原子上にラジカルの存在する酸化活性種(Oxygen radical type)に平衡が移動する(Scheme 3-4; A)。一方、イミダゾール配位などのヘムでは、配位子効果はチオレートに比べると小さく、Compound Iタ

A. Thiolate-ligated heme



B. Imidazole-ligated heme



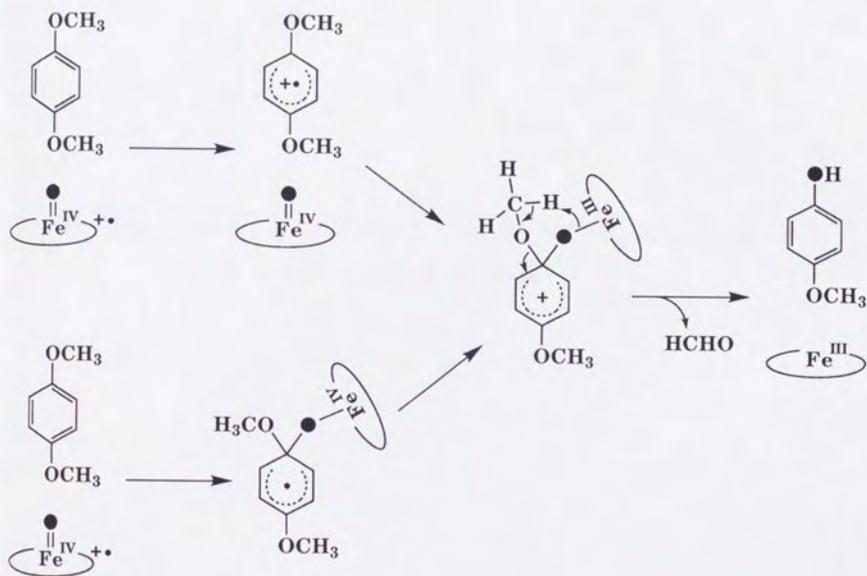
Champion, P. M. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3433.²⁷⁾

Scheme 3-4. Proposed scheme of the equilibrium between two isoelectric iron oxo structures involving thiolate- or imidazole-ligated heme

イブの活性種側に平衡が傾くと推測している(Scheme 3-4; B)。

このChampionの推測に基づいて考えるならば、S.R.系、肝ミクロソーム系では、そのチオレート配位のために、2電子酸化体である活性種はOxygen radical typeの構造をとりやすいと考えられる。この酸素原子上にラジカルの存在する酸化活性種は、カチオンラジカルタイプの活性種に比べて水素原子引き抜き反応を起こしやすいと仮定すれば、本研究で得られたチオレート軸配位子の酸化活性種の反応性に及ぼす効果を説明できる。基質酸化反応点に最も近い酸素原子上にラジカルがかなり局在すること、また生成する炭素ラジカル中間体はFe-Oの反結合性軌道を介して安定化することが可能であることなどから、この仮定はかなり確からしいと考えている。

最後に、S.R.系以外の鉄ポルフィリン系による*p*-ジメトキシベンゼンなどの*ipso*位電子密度の高い基質のO-脱アルキル化反応機構について以下考察する。これらの酸化系による反応は、生成物に酸化剤由来の酸素原子が導入され、また同位体効果がほぼ見られないことから、*ipso*置換様式で進行している。ところが第1章Scheme 1-1; Bに紹介した*ipso*置換機構には還元過程が存在するため、本章で用いた鉄ポルフィリン-酸化剤系にそのまま当てはめることはできない。そこで脱離基の異なる新たな反応機構を考えた(Scheme 3-5)。この機構では、まず酸化活性種が基質から1電子を引き抜き、生成した基質のカチオンラジカルの*ipso*位に活性種がリバウンドし、カチオン中間体が生成する。また、Compound 1タイプの活性種が直接基質の*ipso*位に付加する過程を初発反応としても、同じカチオン中間体となる経路を考えることができる。このカチオン中間体からホルムアルデヒドが協奏的に脱離し、O-脱アルキル化生成物となる。(最後のステップはメトキシカチオンの脱離と考えてもよく、これがホルムアルデヒドとプロトンとなる。)この機構は還元過程を含まず、また生成物に活性種由来の酸素原子が導入されるため、S.R.系以外の鉄ポルフィリン-酸化剤系による、*ipso*位電子密度の高い基質のO-脱アルキル化反応機構として妥当であると考えている。



Scheme 3-5. Proposed mechanisms of *O*-demethylation of *p*-dimethoxybenzene by various iron porphyrin-oxidant systems other than S.R.-PPAA system

第4章

各種酸化系によるフェノール類水酸化反応に及ぼす
置換基の効果

第4章 各種酸化系によるフェノール類水酸化反応に及ぼす置換基の効果

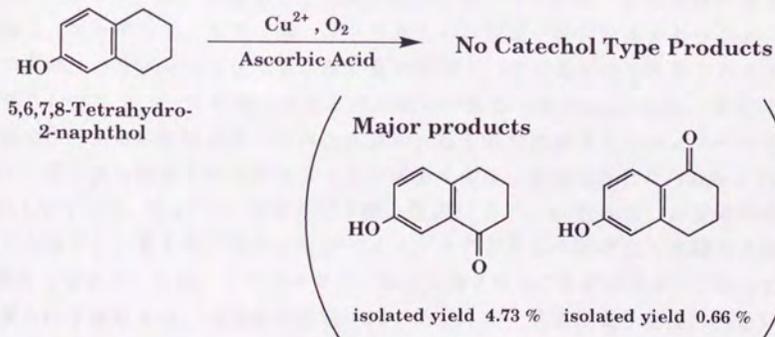
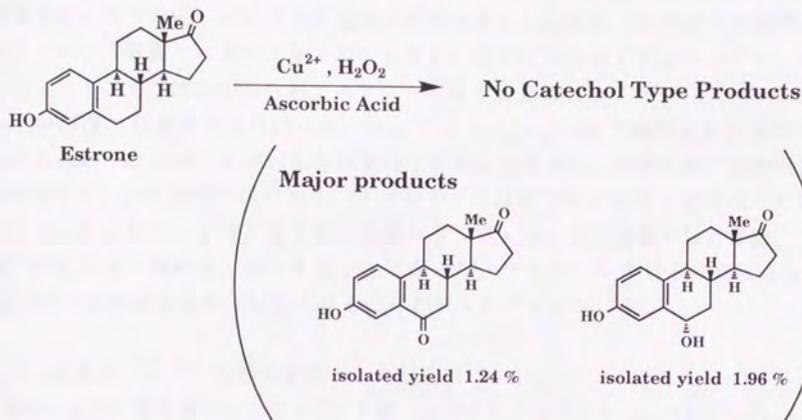
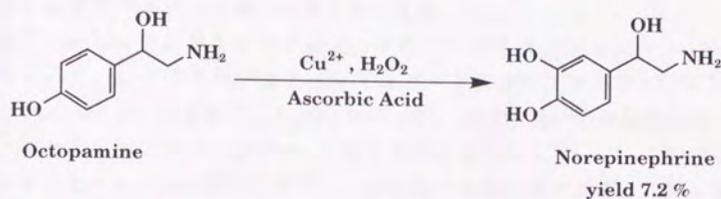
第1節 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類水酸化反応

(1) 各種フェノール性化合物を基質とした反応

序論で述べたように Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は、様々なフェノール類や、カテコール類をより生理活性の増強された形であるカテコール化合物に変換する化学酸化系である。そこで当初、これをフェノール性OH基を持つ生理活性物質に応用し、生成するカテコール化合物が新たな生理活性を獲得したり、活性が増強したりする例を見いだすことを目指して、数種の生理活性物質を基質とした反応を行った。

生体アミンであるオクトパミンは、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- H_2O_2 系により水酸化反応が選択性はあまり良くないが進行し、ノルエピネフリンが収率7.2%で生成した(Scheme 4-1)。(なお、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- H_2O_2 系は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸素の代わりにアルゴン下で過酸化水素を酸化剤として用いるものであり、反応性の面ではほとんど両者に差はなく、水酸化体収率は若干過酸化水素を用いた方がよいことが当教室で既に明らかとなっている⁷⁾。)次に、生体内で最も活性の強い卵胞ホルモンであるエストラジオールと可逆的に移行することが知られているエストロンを基質としたところ、フェノール性OH基をもつ化合物であるにも関わらず、カテコール体は全く生成せず、ベンジル位が酸化された構造の化合物が2種類、低収率で得られたのみであった(Scheme 4-1)。この原因として、エストロンは水溶性が低いため、コソルベントとして酢酸を溶媒である水の2倍量も加えたことが考えられたので、次に水溶性が比較的高く、かつエストロンと類似した構造をもつ5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフトールを基質とした Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応を行った。しかし、この場合もコソルベントを減らしたにも関わらず、カテコール体は生成せず、ベンジル位酸化体がわずかに生成したのみであった(Scheme 4-1)。

本結果は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類水酸化反応は、基質として用いるフェノール類によって、その効率が大きく異なることを示している。反応が効率良く進行するフェノールと、全く進行しなかった5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフトールの構造上の大きな差異は、水酸基の*m*-位、*p*-位にメチレン基を有するか否かである。そこで、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による水酸化反応の基質依存的な効率の変化を明らかにすべく、以下様々な置換基を有するフェノール類を基質とし、本反応系による芳香環水酸化反応に及ぼす置換基効果を検討した。



Scheme 4-1. Hydroxylation of various phenols by a Cu^{2+} -ascorbic acid- H_2O_2 system or Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

(2) *m*-置換フェノール類を基質とした反応

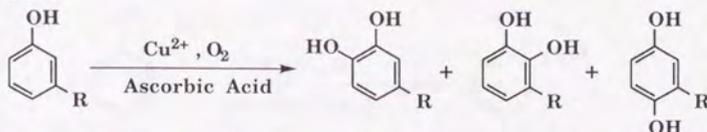
まず、*m*-位に置換基をもつフェノール類 (*m*-メトキシフェノール、*m*-ニトロフェノール、*m*-アセチルフェノール (*m*-ヒドロキシアセトフェノン)、*m*-シアノフェノール) を基質とした反応を行った。その結果、原料消費量は、シアノ基、アセチル基、ニトロ基といった電子吸引性基をもつフェノールの方が、フェノールに比べ2~4倍程度に増加し、逆に電子供与性基であるメトキシ基をもつフェノールは、2分の1程度に減少することが見いだされた(Figure 4-1)。原料消費量ばかりでなく、対応する水酸化生成物である3-置換カテコール、4-置換カテコール、2-置換ヒドロキノンの生成量も、電子吸引性基をもつフェノールでフェノールに比べ増加がみられ、カテコール体で約2倍、ヒドロキノン体で15~20倍程度の収率となった(Table 4-1)。ヒドロキノン体で劇的な収率増加がみられるが、これはフェノールを基質とした反応の場合、*o*-位選択的に水酸化反応が進行し、*p*-位水酸化体であるヒドロキノンはほとんど生成しなかったためである。すなわち、*m*-位に電子吸引性基をもつフェノールを基質とした場合、水酸化反応はより効率よく進行するようになるが、フェノールで見られたような*o*-位選択的な水酸化反応ではなくなるのが明らかとなった。

(3) *p*-置換フェノール類を基質とした反応

次に、*p*-位に置換基をもつフェノール類 (*p*-メチルフェノール (*p*-クレゾール)、*p*-ニトロフェノール、*p*-アセチルフェノール (*p*-ヒドロキシアセトフェノン)、*p*-シアノフェノール) を基質とした反応を行った。その結果、*m*-置換体の場合と同様に、アセチル基、シアノ基、ニトロ基といった電子吸引性基をもつフェノールの方が、フェノールに比べ原料消費量が増加し、逆に電子供与性基であるメチル基をもつフェノールで減少することが明らかとなった(Figure 4-2)。対応する水酸化体である4-置換カテコール生成量も、電子吸引性基をもつフェノールで増加し、電子供与性基をもつフェノールで減少することが確認された(Table 4-2)。

以上のように、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系により、*m*-置換体、*p*-置換体のいずれの場合も、電子吸引性基をもつフェノールの方がより効率良く水酸化され、対応するカテコール体、ヒドロキノン体に変換されることがあきらかとなった。通常の化学酸化系は、活性種が親電子的であるため、芳香環電子密度の大きい基質を好むが、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系は、酸化系であるにも関わらず、芳香環電子密度の低い基質をより効率よく水酸化するという特異な反応性を持つことがわかった。

Table 4-1. Hydroxylation of *m*-substituted phenols by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 System



| Run | <i>m</i> -Substituent | Substrate consumption | 4-Substituted catechol | 3-Substituted catechol | 2-Substituted hydroquinone |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | R=H | 12.0 % | | 11.0 % | 0.9 % |
| 2 | R=NO ₂ | 70.8 | 9.9 % | 11.9 % | 13.8 |
| 3 ^{a)} | R=CN | 66.7 | 10.0 | 13.8 | 21.2 |

Conditions: A mixed solutions of a substrate (1 mmol), $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) and ascorbic acid (10 mmol) in water (20 ml) was stirred vigorously under O_2 atmosphere at room temperature for 24 hours and the products were analyzed by HPLC.

^{a)} 2.0 ml of acetone was used as a cosolvent.

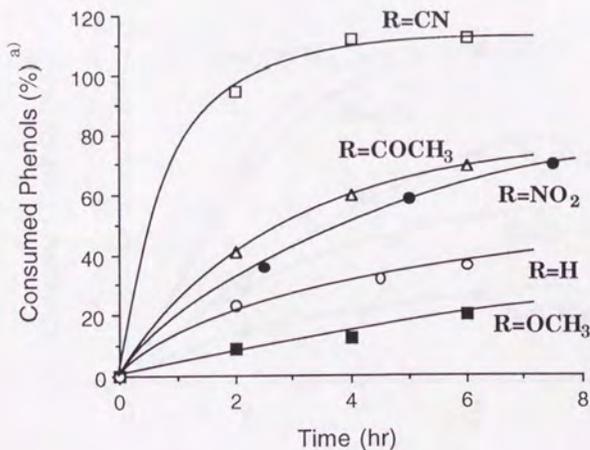
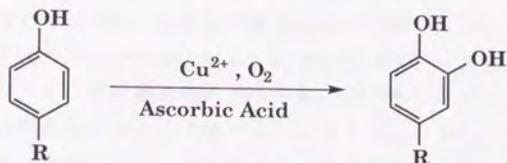


Figure 4-1. Time-course of consumed *m*-substituted phenols by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

Experimental conditions were identical to those described in Table 4-1 except that 2 mmol of substrate was used.

^{a)} Based on copper salt added.

Table 4-2. Hydroxylation of *p*-substituted phenols by a Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system



| Run | <i>p</i> -Substituent | Substrate Consumption | 4-Substituted Catechol | Conversion yield |
|----------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| 1 | R=H | 12.0 % | 11.0 % | 91.7 % |
| 2 ^a | R=NO ₂ | 51.7 | 25.1 | 48.5 |
| 3 ^a | R=CN | 49.1 | 29.2 | 59.5 |

Conditions: A mixed solutions of a substrate (1 mmol), Cu(ClO₄)₂·6H₂O (1 mmol) and ascorbic acid (10 mmol) in water (20 ml) was stirred vigorously under O₂ atmosphere at room temperature for 24 hours and the products were analyzed by HPLC.

^a) 2.0 ml of acetone was used as a cosolvent.

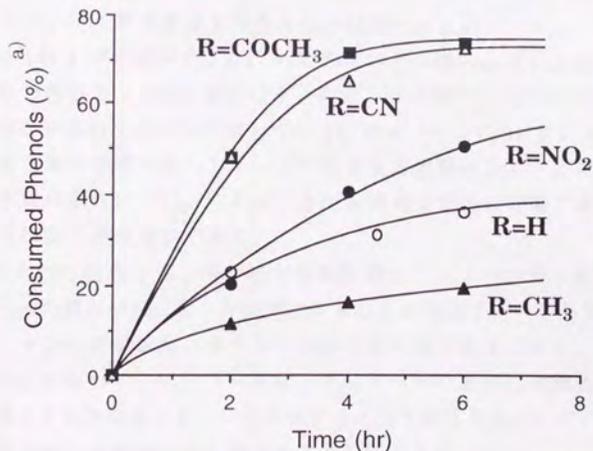


Figure 4-2. Time-course of consumed *p*-substituted phenols by a Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system

Experimental conditions were identical to those described in Table 4-2 except that 2 mmol of substrate was used.

^a) Based on copper salt added.

(4) カテコール類を基質とした反応

フェノールを基質とした場合、カテコール、ハイドロキノンを含むと、原料消費量に対して90%以上の収率で生成するのに対し、ニトロフェノールなど電子吸引性基を持つフェノールの場合、対応するカテコール類、ハイドロキノンの収率は合わせても、原料消費量の50%程度にしかならなかった(Table 4-1, 4-2)。前段までの結果からこれは、生成するニトロカテコールなどは、電子吸引性基であるニトロ基の効果により、再水酸化によるトリオール類の生成がカテコールに比べ容易なためではないかと考え、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の基質として、カテコール、4-ニトロカテコールを用いた反応を行った。

その結果、カテコールではほとんど原料消費が見られないのに対し、電子吸引性基を持つ4-ニトロカテコールでは、予想通り、かなりの消費が観察された(Figure 4-3)。また、4-ニトロカテコールからの主生成物の構造は、シリカカラムで精製後、400 MHz $^1\text{H-NMR}$ により、3種の芳香環水酸化生成物であるトリオール体と確認した(Scheme 4-2)。以上の結果から、カテコール類に関しても、フェノール類と同様に芳香環電子密度の低い方が、より効率良く水酸化されることがわかった。

(5) フェノール類芳香環水酸化反応の特徴のまとめ

本節でこれまでに述べた、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類水酸化反応の特徴を Scheme 4-3 にまとめた。この図で、矢印の太い方が、より効率よく反応が進行することを表している。フェノール性OH基を持つ基質ならば、その芳香環電子密度の低い方が、より効率良く水酸化され、逆に電子密度の高い基質は水酸化されにくい。これが、本反応系の反応性の特徴であり、通常の化学酸化系とは全く逆の傾向である。

この反応性の特徴から、電子吸引性基を持つフェノールで、原料消費量に対する水酸化体の収率が低いことが説明できることは前段で述べた通りである。また、フェノールから高選択的にカテコールを生成可能であることも、この傾向から説明される。すなわち、カテコールは、フェノールにさらに水酸基という電子供与性基が導入された形なので、一旦生成すると再水酸化されにくく、よってフェノールの水酸化反応は高選択的に進行すると説明できる。

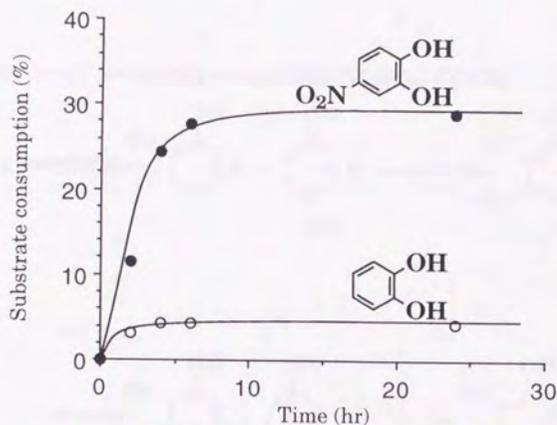
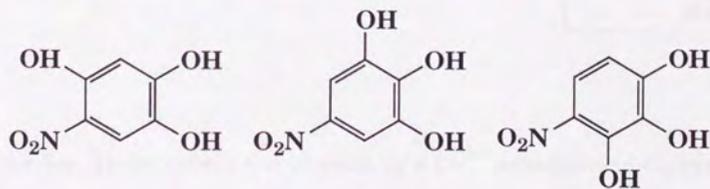


Figure 4-3. Time-course of the consumption of catechol or 4-nitrocatechol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

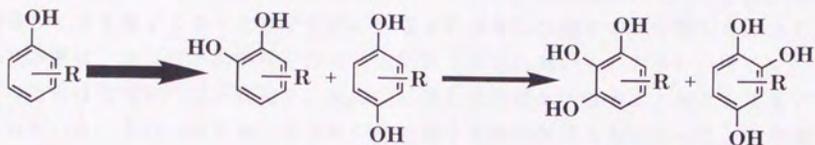
Conditions: An aqueous solution of substrate (25 mM), $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (25 mM) and ascorbic acid (250 mM) was stirred under O_2 atmosphere at room temperature and substrate consumption was determined by HPLC.



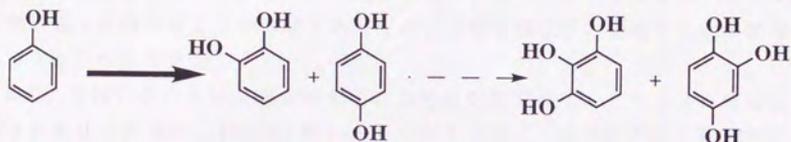
Scheme 4-2. Hydroxylated products^{a)} of 4-nitrocatechol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

^{a)} These structures were determined by 400 MHz $^1\text{H-NMR}$.

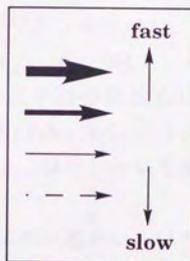
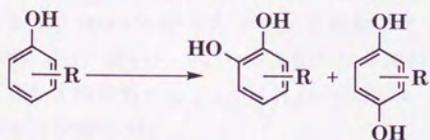
R=Electron-withdrawing groups (R=CN, NO₂, COCH₃)



Phenol



R=Electron-donating groups (R=CH₃, OCH₃)



Scheme 4-3. Hydroxylation of phenols by a Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ system

第2節 ガンマラジオリシス法によるフェノール類水酸化反応

(1) ガンマラジオリシス法について

X線や γ 線などの放射線は、大きなエネルギーを有するので、物質に作用すると、その構成成分の電子をたたき出すことができる。その結果、元の分子は、飛び出して自由電子となった電子と正に荷電した分子に分離する。分離したこれらの化学種は、ラジカル的性格を持ち、反応性が非常に高いものが多い。そこで、この方法は物理的には不安定な、反応性に富む活性種を生成する方法として用いられている。またこのとき、これらの放射線を電離放射線あるいはイオン化放射線と呼ぶ。

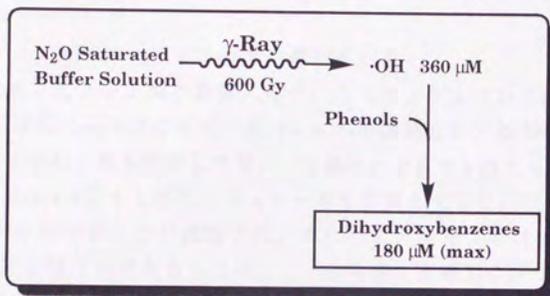
ガンマラジオリシス法とは、 γ 線を電離放射線として用い、種々の活性種を生成する方法の総称である。特に、各種水溶液に γ 線を照射することで、様々な活性酸素種を生成することが可能であるため、生物有機化学の領域でも近年繁用されるようになってきた。

まず、単純に水のみ γ 線が照射された場合を想定する。このときに最初に誘起される化学変化は、Scheme 4-4 eq.1 に示すように、 H_2O 分子から電子がたたき出される変化である。このとき、たたき出される電子はすぐに水で水和され、水和電子(e_{aq}^-)となる。また、正に荷電した H_2O^+ はすぐにプロトンを放出し、OHラジカルとなる(eq.2)。よって水の1次放射線分解種は、 e_{aq}^- 、 H^+ 、OHラジカルとなる。100 eVのエネルギーを照射したときに生成する化学種の個数をG値(G-value)といい、これら3種の化学種のG値は2.7である(Table 4-3)。また、これら3種以外にも、 $e_{aq}^- + H_2O \rightarrow OH^- + H\cdot$ の反応により、Hラジカルも生成する(G値0.55)。

この様に、水のみ γ 線を照射すると、反応性に富むラジカル種がいろいろと生成してしまう。ところが、亜酸化窒素(N_2O)を飽和させた水溶液に γ 線を照射すると、Scheme 4-4 eq.1,2は確かに起きるが、生成した e_{aq}^- はすぐにeq.3にしたがって、 N_2O と反応し、 O^- となり、この化学種もすぐに H_2O と反応してOHラジカルとなる(eq.4)。以上のeq.1-4を総合してみると、反応性に富む活性種としてOHラジカルのみが主に存在する系を実現することができる。(ただしpH<5の領域では、OHラジカル以外の活性種も無視できない程度に存在するようになるので、pH>5の条件下でのみ、OHラジカルが主に存在する系が実現できることになる。)また、この他にギ酸($HCOOH$)水溶液に γ 線を照射すると、スーパーオキシド(O_2^-)のみが存在する系を実現できることも知られている。

第1章第3節で論じた様に、様々な基質に対するO-脱アルキル化反応機構の検討から、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の活性種は、真のOHラジカルとは異なる

Under N_2O , at pH above 5



Scheme 4-4. γ -Radiolysis as a purely $\cdot OH$ generating system

Table 4-3. The yield of products from the excitation and ionization of H_2O by irradiation ²⁸⁾

| Product | G-Value ^{a)} |
|------------|-----------------------|
| e_{aq}^- | 2.7 |
| $H\cdot$ | 0.55 |
| $\cdot OH$ | 2.7 |
| H_2 | 0.45 |
| H_2O_2 | 0.7 |
| H_3O^+ | 2.7 |

^{a)} The number of molecules per 100 eV of Absorbed Energy

が、クリプトタイプのOHラジカルなどのOHラジカル類似活性種であることが推察された。そこで、これをさらに確からしいものにするため、OHラジカルのみを産生することのできるガンマラジオリシス法を用いて、各種フェノール類の水酸化反応を行い、その置換基効果などを Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系と詳細に比較した。

以下の実験では、 γ 線照射量を600 Gy (グレイ; 1 Gy=100 rad) に統一した。この線量から生成するOHラジカル量は、G値から計算して約360 μM である。また、フェノール類水酸化反応では、その反応に最低でもOHラジカル2分子が必要であるので、生成するカテコール類は最大で180 μM となる(Scheme 4-4)。

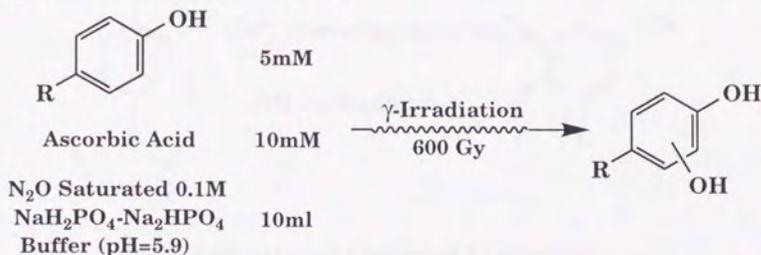
(2) フェノール類水酸化反応及びその置換基効果

様々な*p*-置換フェノール類を基質とした、ガンマラジオリシス法による酸化反応を行った。反応は、アスコルビン酸(10 mM)の溶解した、基質(5 mM)の N_2O 飽和水溶液(pH 5.9)に γ 線を照射して行い、生成物の分析はHPLCを用いて行った。その結果をTable 4-4にまとめた。フェノールを基質とすると、収率は良くないがカテコールが生成することが確認され、またハイドロキノンはtrace量であった(Run 1)。*m*-位水酸化体であるレゾルシノールは全く生成しなかった(Run 1)。これらの生成物のパターンは Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応に非常に類似している。特に、OHラジカルのみによる反応でも水酸化体の*o*-/*p*-比率が、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系と同様に高い点は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応機構を考える際に興味深い結果である。

p-位に電子吸引性基を有する*p*-ニトロフェノール、*p*-シアノフェノールを基質とすると、水酸化体である4-ニトロカテコール、4-シアノカテコールがそれぞれ90 μM 、169 μM 生成し、フェノールに比べ効率良く水酸化反応が進行することが明らかとなった(Runs 2,3)。逆に電子供与性基を有する*p*-メチルフェノール(*p*-クレゾール)を基質とすると、水酸化体である4-メチルカテコール(ホモカテコール)は5.7 μM しか生成せず、水酸化効率が低下することが見いだされた(Run 4)。この様に、芳香環電子密度の低いフェノール類の方がより効率良く水酸化されるといふ、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系で見られた特徴的な置換基効果が、ガンマラジオリシス法を用いた、アスコルビン酸共存下のOHラジカルによる反応においても見られることが明らかとなった。

p-置換フェノール類から生成する4-置換カテコール類の収率を用いて、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系とガンマラジオリシス法を比較した図をFigure 4-4に示した。この図では、左側の軸に Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応開始後6時間後の収率を、右側の軸にガンマラジオリシス法による収率をとってある。両者に

Table 4-4. Radiation yields of hydroxylated products of p-substituted phenols in the presence of 10 mM of ascorbic acid



| Run | Substrate | Product | Yield ^{a)} |
|-----|-----------------------|------------------|---------------------|
| 1 | Phenol | Catechol | 8.0 μM (4.4 %) |
| | | Resorcinol | < 0.1 |
| | | Hydroquinone | trace |
| 2 | <i>p</i> -Nitrophenol | 4-Nitrocatechol | 90 (50.1) |
| 3 | <i>p</i> -Cyanophenol | 4-Cyanocatechol | 169 (94.4) |
| 4 | <i>p</i> -Cresol | 4-Methylcatechol | 5.7 (3.1) |

Experimental conditions were as follows. An N₂O saturated buffer solution (0.1 M phosphate buffer, pH 5.9) containing a substrate (5 mM) and ascorbic acid (10 mM) was irradiated with ⁶⁰Co rod. The yields were measured by HPLC after a radiation dose of 600 Gy.

^{a)} The yield in parentheses is based on the half of theoretical amounts of OH radical after a radiation dose of 600 Gy.

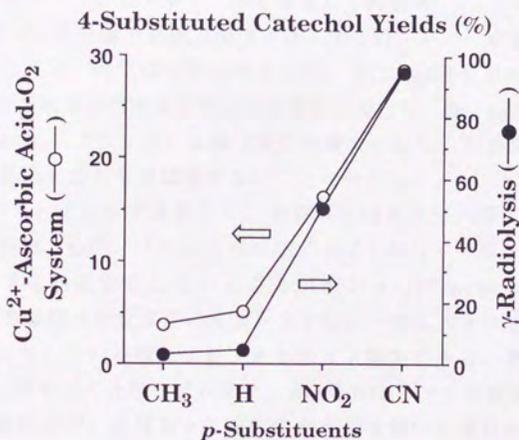
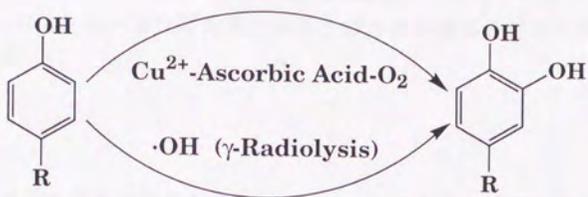


Figure 4-4. Substituent effects in the hydroxylation of *p*-substituted phenols either by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system or by γ -radiolysis in the presence of ascorbic acid

The open circles indicate 4-substituted catechol yields in the Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system after 6hr, and the filled circles represent the yields by γ -radiolysis in the presence of ascorbic acid (10 mM).

は非常に良い相関が認められ、ここから Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸化活性種は、OHラジカルに非常に類似した反応性を持つことが示された。以上の結果から、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸化活性種は、クリプトタイプのOHラジカルなどのOHラジカル類似活性種であるという第1章第3節での推定は、さらに支持された。

第3節 特徴的な置換基効果を有するフェノール類水酸化反応機構の推定

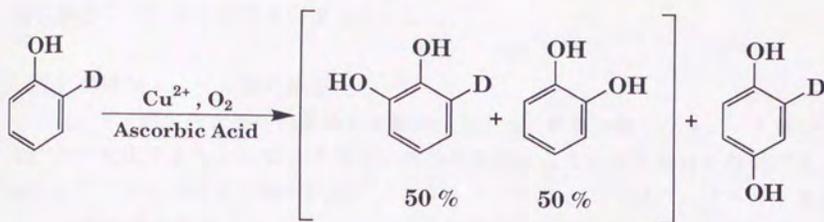
(1) 重水素ラベルしたフェノールを基質とした反応

フェノールの2位を重水素原子でラベルした2-Dフェノールを基質とし、*o*-位の水酸化反応に及ぼす同位体効果を検討した。GC/SIM法を用い、水酸化体であるカテコールの重水素保持率から同位体効果を求めたところ、 k_H/k_D はほぼ1.0であった(Scheme 4-5)。ここから、水酸化反応の様式として、芳香環から直接水素原子を引き抜く過程を含むものは適さないことがわかった。

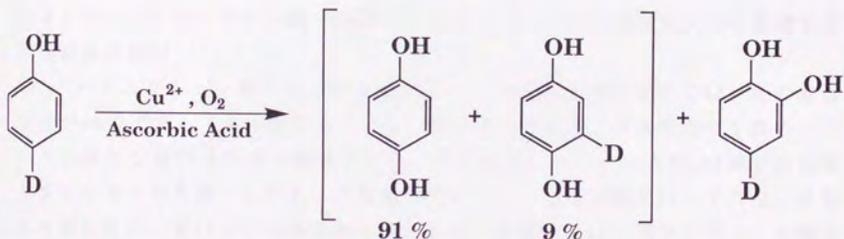
次に、4-Dフェノールを基質とし、芳香環水酸化反応の際のNIHシフトを測定した。その結果、Dがシフトした生成物である2-Dハイドロキノンが、全ハイドロキノンの9%程度生成していることがわかった(Scheme 4-6)。シトクロムP450による芳香環水酸化反応のNIHシフトは、一般に大きな値が観測されることが知られており、その機構はアレンオキサイド経由であると考えられている。しかし、Fenton系などの化学モデル系で、大きなNIHシフトが観測された例はなく、むしろ電解酸化など、生体系との類似性があまり無いと思われる系で、大きな値が観測されている。また、シトクロムP450による反応であっても、基質によってNIHシフトの大きさはまちまちで、フェノールの様なキノン型をとりうる基質では、一般に小さい値しか観測されないとも言われている²⁹⁾。よって、4-Dフェノールで観測された9%という値が、どの様な意味を持つのかは一概には言えない。しかしあまり大きな値ではないことは確かであり、ここから Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類水酸化反応は、アレンオキサイドを主たる中間体とするものではないことが示唆された。

(2) ニトロベンゼンを基質とした反応

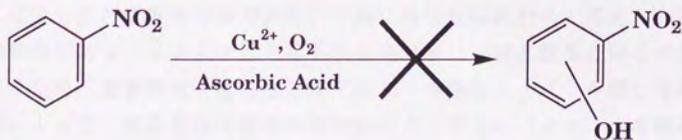
Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類水酸化反応で観察された特徴的な置換基効果が、置換基そのものが反応に関与しているためであるかどうかを検討するため、フェノール性OH基を持たないニトロベンゼンを基質とした反応



Scheme 4-5. ^2H -Catechol produced in the hydroxylation of 2- ^2H phenol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system



Scheme 4-6. NIH Shift observed in the hydroxylation of 4- ^2H phenol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system



Scheme 4-7. Hydroxylation of nitrobenzene by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

を行った。結果、全く水酸化反応は進行せず(Scheme 4-7)、置換基そのものが反応に関与している可能性は否定された。

(3) 異種フェノール間の競争反応

フェノール類水酸化反応の置換基効果が、電子吸引性基を持つフェノール類が、 Cu^{2+} 等に配位するなどして、より強い活性種を産生している可能性を検討するため、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノールと*m*-ニトロフェノールを基質とした競争反応を行った。Figure 4-5:Aには競争反応の、Bにはそれぞれの基質を単独で反応させた場合の、それぞれの基質消費量の時間変化を示した。競争反応の方に若干の減少が見られるが、両者に大きな差はなく、ここから電子吸引性基を持つフェノール類がより強い活性種を形成しているという可能性は否定された。

(4) Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるアニソール類の水酸化反応に及ぼす置換基効果の検討

Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類の水酸化反応では、その置換位置が*m*-位であっても*p*-位であっても、電子吸引性基がより反応効率を高めるとい特徴的な置換基効果が観察された。この反応にフェノール性OH基が直接関与するかどうかを調べるため、水酸基の代わりにメトキシ基を持つアニソール類の水酸化反応に及ぼす置換基効果を検討した。具体的には*m*-置換アニソール類を基質として用いた。電子吸引性基を有するアニソールとして*m*-アセチルアニソールを、電子供与性基を持つアニソールとして*m*-ジメトキシベンゼンを用い、アニソールとの原料消費量及び水酸化体収率の比較を行った。

その結果、電子吸引性基を持つ*m*-アセチルアニソールは、アニソールに比べ原料消費、水酸化体生成量共に減少し、逆に電子供与性基を持つ*m*-ジメトキシベンゼンではいずれも増加することが見いだされた(Table 4-5)。これは、フェノール類とは全く逆の置換基効果であり、一般に酸化反応において考えられる通常の置換基効果である。メトキシ基の電子供与性効果はほぼ水酸基と同じであると考えられるため、芳香環電子密度などはアニソール類とフェノール類ではほぼ同じである。よって、両基質間で置換基効果が大きく異なり、フェノール類にのみ、電子吸引性基が反応を活性化するという特徴的な置換基効果が見られるという事実は、フェノール類水酸化反応にはフェノール性OH基が直接関与していることを示唆していると考えられる。

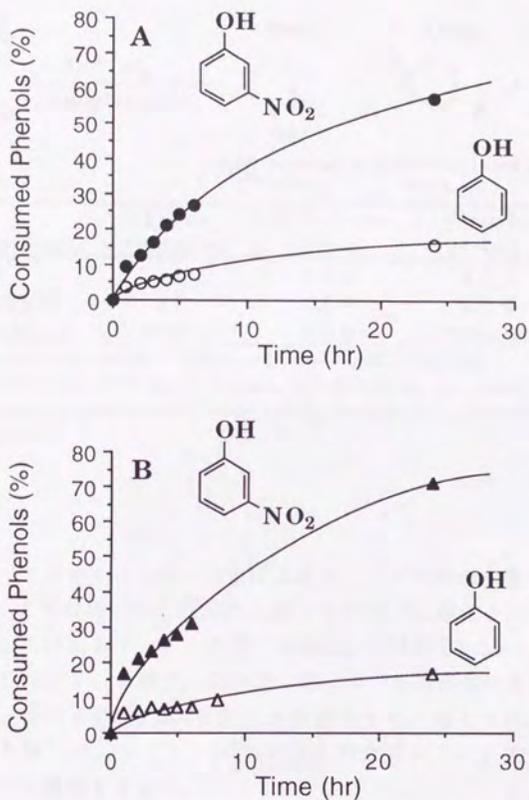


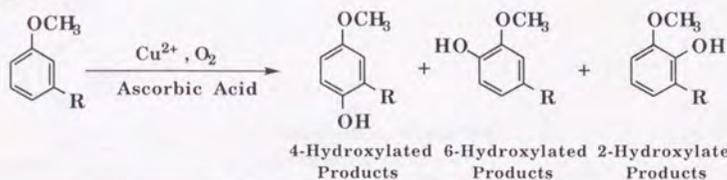
Figure 4-5. Time-course of competitive hydroxylation of *m*-nitrophenol and phenol by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

A. Competitive hydroxylation of *m*-nitrophenol and phenol.

B. Hydroxylation of *m*-nitrophenol or phenol.

Conditions: An aqueous solution of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (50 mM), ascorbic acid (500 mM) and (A) *m*-nitrophenol (50 mM) and phenol (50 mM), (B) *m*-nitrophenol (50 mM) or phenol (50 mM) was stirred under O_2 atmosphere at room temperature. Substrate consumption was determined by HPLC.

Table 4-5. Hydroxylation of *m*-substituted anisoles by a Cu²⁺-ascorbic acid-O₂ System



| Run | <i>m</i> -Substituent | Substrate consumption | 4-Hydroxylated product | 6-Hydroxylated product | 2-Hydroxylated product |
|-----|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | R=H | 10.0 % | 0.6 % | 4.5 % | (= 6-Hydroxylated) |
| 2 | R=CH ₃ CO | 5.6 | n.d. ^{a)} | 0.2 % | n.d. ^{a)} |
| 3 | R=OCH ₃ | 13.0 | 2.9 % | (= 4-Hydroxylated) | 3.0 % |

Conditions: A mixed solutions of a substrate (1 mmol), Cu(ClO₄)₂·6H₂O

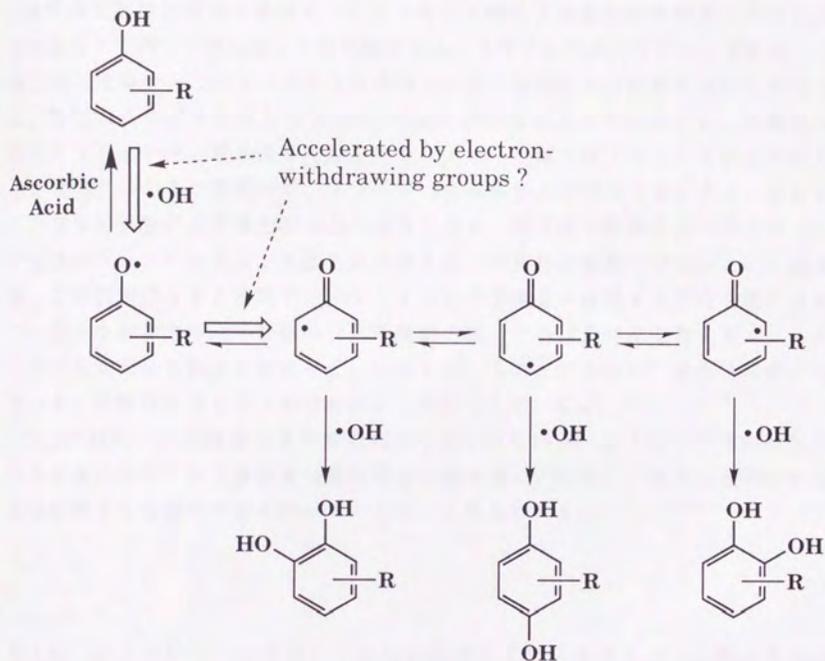
(1 mmol) and ascorbic acid (10 mmol) in water (20 ml)-acetone was stirred vigorously under O₂ atmosphere at room temperature for 6 hours and the products were analyzed by HPLC.

^{a)} not determined.

(5) Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系によるフェノール類の水酸化反応機構

本章でこれまでに得られた反応性に関する知見から推定される、Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系によるフェノール類の水酸化反応機構をScheme 4-8に示した。アニソール類とフェノール類で、水酸化反応における置換基効果が大きく異なることから、フェノール性OH基が反応に直接関与すると考えられ、よってメトキシ基では起こり得ない、フェノール性OH基が酸化されフェノキシラジカルとなる過程が含まれる機構を考えた。

この機構の初発反応であるフェノキシラジカル生成反応が、電子吸引性基により促進されると仮定すると、フェノール類水酸化の際の特徴的な置換基効果を説明することが可能となる。一般に芳香環への付加反応は電子供与性基によって促進されると考えられているが、フェノール性OH基のフェノキシラジカルへの酸化に及ぼす置換基の効果は未だ明らかではなく、上記の仮定の真偽を確かめることは現段階ではできていない。電子吸引性基を有するフェノール類は、pKaが小さいため、反応液中にごく少量ではあるが存在するフェノキシアニオンの量が多く、これが1電子酸化される反応が非常に速いため、特徴的な置換基効果が現れてくるという可能性も考えられる。しかし、同程度の電子吸引性効果を持つシアノ基とニトロ基で、水酸化効率が2倍程度違うことや、電子吸引性効果はこれらに比べると弱いアセチル基が、ニトロ基と同程度の水酸化効率を示すことなどが



Scheme 4-8. Proposed mechanism of the aromatic hydroxylation of phenols by a Cu^{2+} -ascorbic acid- O_2 system

ら考えると、この可能性はほぼ否定される。

特徴的な置換基効果の要因を、アスコルビン酸による還元的雰囲気下での反応であることを用いて考えることも可能である。まずフェノキシラジカルが生成し、電子吸引性基は、このラジカルを芳香環上に広く展開させる効果を持つと仮定する。展開したラジカルはもう1分子のOHラジカルとカップリングし、水酸化生成物となる。一方、電子供与性基を持つフェノール類では、フェノキシラジカルは芳香環上にあまり展開せず、ラジカルは酸素原子上に局在すると考え、これはアスコルビン酸により還元され元の基質に戻る。電子供与性基を持つフェノールや普通のフェノールでは、水酸化体収率も低い为原料消費量も少ないという結果を、この仮定はうまく説明する。ラジカルが芳香環上へ展開する証拠を得る目的で、様々な計算方法(半経験的、非経験的方法)で各種置換基を有するフェノキシラジカルの分子軌道を計算した。しかし用いる方法によって、結果は非常にばらつき、信頼性のあるデータは今のところ得られていない。

以上に様に、反応機構はまだ推定の域を出ていないが、電子吸引性基が酸化反応を促進させるという置換基効果は非常に興味深く、今後、上記推定機構の検証を含め様々な機構の検討を行っていきたいと考えている。

第4節 肝ミクロソームを用いた*in vitro*代謝反応によるフェノール類水酸化反応

第2章で論じたように、肝ミクロソーム系によるアルキルアリアルエーテル類のO-脱アルキル化反応機構の基質依存性は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系やガンマラジオリシス法のそれとは異なることから、酸化活性種の反応性の違いが明らかとなった。そこで次に、この反応特性の異なる活性種を生成する肝ミクロソーム系による、フェノール類水酸化反応に及ぼす置換基効果に興味を持ち、以下検討を行った。反応は、*p*-置換フェノール類を基質とし、37°C、15分間インキュベートして行い、水酸化体生成量はHPLCを用いて定量した。また、この反応がシトクロムP450関与であるかどうか検討するため、その特異的阻害剤と言われているSKF-525Aを添加した阻害実験も同時に行った。

具体的には、フェノール、電子吸引性基を有する*p*-ニトロフェノール、電子供与性基を持つ*p*-クレゾールを基質として用いた。それぞれの水酸化体である4-置換カテコール生成量を示したものが、Table 4-6である。ここで、括弧内の数字は系中に加えた基質量(500 nmol)に対する変換収率を示している。水酸化体生成量

は、ニトロ>>メチル>Hの順となり、電子吸引性基を導入することにより格段に水酸化体生成量が多くなることがわかった。また、ミクロソーム系の場合、電子供与性基であるメチル基を導入することでも若干水酸化体収率が上昇することがわかった。またSKF-525Aの添加により、70-90%とかなり阻害がかかったことから、この水酸化反応はシトクロムP450関与であることが示唆された。

これまでに*p*-ニトロフェノールを基質として、その水酸化活性からシトクロムP450量の定量を行った報告はあるが³⁰⁾、これは水酸化生成物である4-ニトロカテコールは可視領域に比較的強い吸収波長を持ち、定量に便利であることから用いており、置換基効果を意識したものではない。電子吸引性基を持つフェノールの方がより効率よく水酸化されると言う、特徴的な置換基効果が肝ミクロソーム系においても見られると言う本結果は新たな知見である。

第2章で詳述した通り、フェノール性OH基を持つ化合物を肝ミクロソーム系の基質とすると、フェノール性OH基の酸化が速いことが、*O*-脱メチル化反応機構の基質依存的変化から示唆された。Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系などで見られた特徴的な置換基効果が、肝ミクロソーム系でも同様に観察されたことは、上記の示唆をさらに支持するものと考えられる。すなわち、明らかに酸化活性種の異なる系であっても、フェノール類を基質とするとフェノール性OH基の酸化が起こりやすいため、ほぼ同じ置換基効果が観察されたと推測している。

Table 4-6. Amount of 4-substituted catechols obtained from *p*-substituted phenols by PB-treated rat liver microsome-NADPH/O₂ system

| <i>p</i> -Substituent | Amount of 4-substituted catechol (nmol/mg protein) | | |
|-----------------------|--|-----------------------------|---------------------|
| | Complete () ^{a)} | +SKF-525A () ^{a)} | SKF-525A Inhibition |
| R=H | 1.01 ± 0.05 (1.21 %) | 0.38 ± 0.06 (0.46 %) | 62.4 % |
| R=CH ₃ | 1.65 ± 0.08 (1.98) | 0.48 ± 0.01 (0.58) | 70.9 |
| R=NO ₂ | 6.38 ± 1.04 (7.66) | 0.63 ± 0.15 (0.76) | 90.1 |

The data represent the mean ± S.E. of three experiments.

^{a)} The number in parentheses represents the conversion yield based on substrate.

総括

総括

酸化酵素類、化学モデル酸化系の反応性はこれまで、少数の限られた化合物を基質とした反応を行い、その生成物の種類、収率から議論した例がほとんどであった。そこで筆者は、検討する基質を様々な特徴を持つ化合物群に拡張し、また生成物収率、選択性に加え、その反応機構も検討対象とし、これらの基質依存的な変化の仕方を指標として、より詳細な各系の反応性の評価を目指して研究を行ってきた。

まず種々の生体類似型酸化反応を高選択的に進行させることが知られている Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による、様々なアルキルアリールエーテル類の O -脱アルキル化反応の効率、選択性、及びその反応機構を詳細に検討した。その結果、主に基質の $ipso$ 位電子密度とアルキル基の水素原子の引き抜き易さの2つの化学的性質の比によって、選択性、反応機構とも大きく変化することが明らかとなった。 O -脱アルキル化反応機構は、これまでの少数の限られた基質を用いた議論からは、主に用いる酸化系によって決定され则认为されてきたが、本結果は同一の酸化活性種による反応でも、用いる基質によって機構は大きく変化することを明確に示している。

次にガンマラジオリシス法を用い、 OH ラジカルによるアニソール類の O -脱メチル化反応機構の基質依存性を、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系と比較した。ここから、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸化活性種は OH ラジカルに比べ、水素原子引き抜き反応がやや優先する、あるいは $ipso$ 付加反応がやや遅いという反応特性を持つことが明らかとなった。ここから、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の酸化活性種は、クリプトタイプの OH ラジカルなどの OH ラジカル類似活性種であると推定した。このような詳細な酸化活性種の反応性の違いを見出すことは、様々な特徴を持つ基質群を用いる本手法により初めて可能となると考えている。

さらにガンマラジオリシス法を用いた OH ラジカルによる O -脱メチル化反応の選択性、機構に及ぼすアスコルビン酸の添加効果を検討した。その結果、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系により、他の酸化系と大きく異なり高選択的に O -脱アルキル化反応が進行するのは、アスコルビン酸の還元的雰囲気下での酸化反応であることが大きな要因となっていることが示唆された。ここから、シトクロムP450による反応が高選択的に進行するのも、 NADPH に由来する電子による還元的雰囲気下での酸化反応であることがその大きな理由となっていると考えられた。シトクロムP450は、通常の化学酸化系では実現困難な種々の酸化反応を効率よく行うことが知られているが、上記の様な還元的雰囲気下での酸化反応という観点から、その酸化活性を見直すことは興味深いと考えている。

医薬品化学の観点からは、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系により o -置換フェノールの種々の置換基が脱離し、カテコールに変換されるという結果も大変興味深い。生体内薬物代謝反応においても本反応が起こることは十分に考えられ、特にニトロ基、シアノ基といった、これまであまり脱離することはないと考えられていた置換基を持つ薬物では、代謝経路の1つに本反応形式を入れる必要があることを示唆している。

次に、肝ミクロソーム系によるアニソール類の O -脱メチル化反応機構の基質依存的な変化を検討した。その結果、基質のフェノール性OH基の有無及びその置換位置によって機構が変化することが明らかとなった。これまでは、シトクロムP450関与の O -脱アルキル化反応は水素原子引き抜き機構で進行するとされてきたが、本結果は基質によっては $ipso$ 置換様式で反応が進行することを示した初めての例である。この機構の基質依存的な変化を説明するために、これまでに考えられている機構とは異なる新反応機構を提唱した。

ここまで得られた知見を応用し、シトクロムP450のモデル系として最もよく用いられる種々の鉄ポルフィリン-酸化剤系の反応性の検討、及びその肝ミクロソーム系との比較を行った。様々な鉄ポルフィリン系がこれまでに開発されてきたが、その反応性は主に基質酸化効率から議論されてきた。酸化反応機構から議論した例は少なく、また基質として用いられる化合物はごく少数であり、それらによれば、ほぼ全ての鉄ポルフィリン系はシトクロムP450と同じ反応性を持つとされている。本研究では、 $ipso$ 位電子密度の高い基質群を用いて、 O -脱メチル化反応機構の基質依存的な変化を詳細に検討し、その結果、分子内チオレート配位錯体であるS.R.のみが肝ミクロソーム系と同じ反応性を持ち、その他の鉄ポルフィリン系では異なる機構で反応が進行することを見いだした。すなわち、様々な基質群に対する機構の変化を指標とする本手法により、これまでには知られていなかった各鉄ポルフィリン系の反応特性の違いを、初めて明確に見いだすことができた。これまでもチオレートの配位は、シトクロムP450の強力かつ特徴的な反応性の1つの重要な要因であると考えられてきた。しかしそれらの研究の多くは、触媒サイクルの O - O 結合開裂ステップに及ばず軸配位子の効果に注目したものであった。本研究によって得られた知見は、生成した酸化活性種の反応特性そのものにも、チオレート配位子は大きく関与していることを示しており、今後シトクロムP450の反応性の研究に大きな影響を及ぼすものと考えている。

以上の結果から、現在までの多くの研究で各基質からの生成物収量を指標として酸化活性種の酸化力の強さを議論してきたのと同様に、各基質の酸化反応機構を指標として酸化活性種の反応性を詳細に議論することが可能であることを示したと考えている。 O -脱アルキル化反応に着目してこれまで研究を行ってきたが、

この反応は幅広い酸化酵素系、化学酸化系、酵素モデル系で進行することが知られており、各酸化系間の比較を行う意味で有用な反応である。生成物収量を指標とした場合は、生成物がさらに酸化されて生成する種々の高次酸化生成物の収量も定量しなければならず、反応選択性の低い酸化系ではこれは困難であり、正確な各系間での比較は難しい。一方でO-脱アルキル化反応機構の検討は、いずれの機構で反応が進行しても生成物は同じであるため、反応選択性が低い酸化系でも、高次酸化反応が進行するしないに関わらず、 ^{18}O 導入率などから信頼性の高いデータを得ることが可能である。このように、O-脱アルキル化反応機構の基質依存的な変化を指標として、各酸化系の反応性を評価する手法は様々な利点を持つ。今後、幅広い酸化酵素類（例えば、非ヘム酵素であるが高い酸化活性を持つメタンモノオキシゲナーゼなど）、化学モデル系に本手法を適用し、詳細な反応性の評価を行うことは、広範な酸化酵素類の機能解明に大きく貢献するものと期待される。

実験の部

実験の部

1. 機器分析

融点は、柳本微量融点測定基で測定し、その値は未補正值である。赤外吸収スペクトル (IR spectrum、以下IRと略記する) は、日本分光工業DS-701Gを使用し、 cm^{-1} 単位で表し、必要があればピークの形状を以下の略号を用い併記した《sh: shoulder、br: broad》。核磁気共鳴スペクトル (NMR spectrum、以下NMRと略記) は日立R-24B (60 MHz、CW型)、または日本電子JNM GSX-400 (400 MHz、FT型) の各NMR spectrometerで測定した。化学シフト値は、主にテトラメチルシラン (TMS) を内部標準物質として、 δ 値 (ppm単位) で示した。溶媒が重水、重アセトンの場合で、内部標準物質の表記がない場合は、それぞれHDO、 $(\text{CHD}_2)\text{COCD}_3$ に由来するピークを基準とした化学シフト値を用いている。また、分裂様式は以下の略号を用いた《s: singlet、d: doublet、t: triplet、q: quartet、m: multiplet、br: broad》。マススペクトル (Mass spectrum、以下MSと略記) は、日本電子DX-300、D-300、DX-303、またはSX-102Aを使用して測定した。元素分析 (Elemental analysis、以下Anal.と略記) は、東京大学薬学部中央分析室において行われた。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、ポンプとして日本分光工業 880-PU、またはTwinkle HPLC pumpを用い、検出器として日本分光工業 870-UV、またはUVIDEC 100-V Spectrometerを用い、定量は絶対検量線から、ピーク面積法で行った。2種類のポンプはその微妙な性能の違いからか、同じ溶媒流量でも、同一物質の保持時間が若干異なることが多かった。よってどちらのポンプを使用したかによって、IV. に掲載した各化合物の保持時間は多少異なる。

II. 試薬・溶媒・カラム担体

試薬は市販品をそのままか、あるいは必要に応じて再結晶や蒸留等による精製をした後に使用した。

溶媒は、特記しない限り、以下の通りに市販品をそのまま又は、精製したものを使用した。水は蒸留したものを用いた。メタノールとエタノールは、 Mg と I_2 存在下、還流後蒸留した。HPLC用メタノールは、乾燥剤なしに蒸留した。アセトニトリルは、市販の残留農薬試験用(Cica-Merck)をそのまま使用した。アセトンは、 $KMnO_4$ 存在下、必要最小限の温度で加熱還流後蒸留した。酢酸エチル、塩化メチレン、*n*-ヘキサンは、 $CaCl_2$ 存在下、還流後蒸留した。ピリジン、クロロホルム、ベンゼンは、 CaH_2 存在下、還流後蒸留した。ジエチルエーテルとジイソプロピルエーテル(IPE)は、 CaH_2 と少量の $Fe(ClO_4)_3$ 存在下、還流後蒸留した。テトラヒドロフランは、用時、 Na とベンゾフェノンケチル存在下、 Ar 気流下で還流後蒸留した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、蛍光指示薬のついたシリカゲル60-F254 (Merck No.5554)を用いた。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは、シリカゲルC-200 (和光純薬製) またはシリカゲルBW-300 (富士デヴァイットソン製)を用いた。

逆相HPLC用カラムは、主としてTSKgel ODS-120T (4.6x150 mmまたは250 mm) (東ソー)を用いた。

III. 各化合物の合成、およびその機器データ

以下に、各基質、生成物標品の合成法及びその機器データを示した。なお、特に合成の記述のないものは、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によって生成したものを、カラム等によって精製したものである。

・ *o*-ベンジルオキシアニソールの合成

グアヤコール 1.24 g (10 mmol)、無水炭酸カリウム 1.66 g (12 mmol) をテトラヒドロフラン (10 ml) - ジメチルスルホキシド (10 ml) 混合溶媒に懸濁させ、ここに Ar 気流下で臭化ベンジル 2.05 g (12 mmol) を滴下ロートより滴下し、Ar 下、50 °C で 5 時間反応させた。反応液に 40 ml の水を加え、これを塩化メチレンで 3 回抽出した。集めた有機層を、2 規定水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去した。得られた淡黄色油状物質をシリカゲルカラム精製 (50 g、塩化メチレン: *n*-ヘキサン = 1 : 2) し、無色固体 1.775 g を得た (収率 83 %)。*n*-ヘキサンより再結晶し、無色針状晶を得た。

m.p. 57.5-58.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.26-7.48 (m, 5H; Ar-H), 6.83-6.95 (m, 4H; Ar-H), 5.16 (s, 2H; Ph- CH_2 -), 3.89 (s, 3H; - OCH_3)

・ カテコールモノホルメート

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 8.33 (s, 1H; - $\text{O}(\text{CO})\text{H}$), 7.13-7.18 (d.d, t.d. の重なり 2H, Ar-H), 7.01 (d.d, 1H; Ar-H), 6.94 (t.d, 1H; Ar-H)

・ 2,4-ジメトキシフェノールの合成

2,4-ジメトキシベンズアルデヒド 1.66 g (10 mmol)、*m*-クロロ過安息香酸 3.45 g (20 mmol) を無水塩化メチレン 25 ml に懸濁させ、これを 2.5 時間加熱還留した。析出物をろ過し、また沈殿物は数回塩化メチレンで洗い、ろ液とこれらの塩化メチレン層を合わせ、溶媒を溜去し、(このとき、防爆フェンスをつけた) 黄橙色油状物質を得た。これを酢酸エチルに溶解し、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を溜去し黄色油状物質を得た。これをエタノール (50 ml) - 30% アンモニア水 (50 ml) 混合溶媒に溶解し、Ar 下、室温で遮光して 1 日攪拌した。反応溶液をそのままエバポレーターで減圧にし、未反応のアンモニア、およびエタノールの一部を除いた。ここに 2 規定塩酸を加え液性を酸性 ($\text{pH} < 1$) とし、これを酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、飽和食塩水で

1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。得られた暗橙色油状物質をシリカゲルカラム (BW-300; 70 g、塩化メチレン) で精製し、無色油状物質を得た。これをドライアイスで冷却し、無色固体 1.018 g を得た (収率 66%)。n-ヘキサンより -80 °C で再結晶し、無色板状晶を得た。

m.p. < 30 °C

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ 6.82 (d, 1H, J_o = 8.79 Hz; Ar(6)-H), 6.49 (d, 1H, J_m = 2.93 Hz; Ar(3)-H), 6.39 (d.d, 1H, J_o = 8.79 Hz, J_m = 2.93 Hz; Ar(5)-H), 5.20 (s, 1H; Ar-OH, D₂O Exchangeable), 3.87 (s, 3H; -OCH₃), 3.77 (s, 3H; -OCH₃)

・2,5-ジメトキシフェノールの合成

2,5-ジメトキシベンズアルデヒド 1.66 g (10 mmol)、*m*-クロロ過安息香酸 3.45 g (20 mmol) を無水塩化メチレン 25 ml に懸濁させ、これを 4 時間加熱還留した。析出物をろ過し、また沈殿物は数回塩化メチレンで洗い、ろ液とこれらの塩化メチレン層を合わせ、溶媒を留去し、(このとき、防爆フェンスをつけた) 黄橙色油状物質を得た。これを酢酸エチルに溶解し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去し橙色固体を得た。これをエタノール (50 ml) - 30%アンモニア水 (50 ml) 混合溶媒に溶解し、Ar 下、室温で遮光して 1 日攪拌した。反応溶液をそのままエバポレーターで減圧にし、未反応のアンモニア、およびエタノールの一部を除いた。ここに 2 規定塩酸を加え液性を酸性 (pH < 1) とし、これを酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。得られた暗橙色油状物質をシリカゲルカラム (C-200; 50 g、塩化メチレン) で精製し、淡黄色油状物質 1.172 g を得た (収率 76%)。これを n-ヘキサンより -80 °C で再結晶し、無色針状晶を得た。

m.p. < 30 °C

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ 6.77 (d, 1H, J_o = 8.79 Hz; Ar(3)-H), 6.56 (d, 1H, J_m = 2.93 Hz; Ar(6)-H), 6.37 (d.d, 1H, J_o = 8.79 Hz, J_m = 2.93 Hz; Ar(4)-H), 5.63 (s, 1H; Ar-OH, D₂O Exchangeable), 3.85 (s, 3H; -OCH₃), 3.75 (s, 3H; -OCH₃)

・3,4-ジメトキシフェノールの合成

ベラトルアルデヒド 2.49 g (15 mmol)、*m*-クロロ過安息香酸 5.18 g (30 mmol) を無水塩化メチレン 35 ml に懸濁させ、これを 3 時間加熱還留した。析出

物をろ過し、また沈殿物は数回塩化メチレンで洗い、ろ液とこれらの塩化メチレン層を合わせ、溶媒を留去し、(このとき、防爆フェンスをつけた)黄橙色油状物質を得た。これを酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で3回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去し暗橙色油状物質を得た。これをエタノール(20 ml)-25%アンモニア水(30 ml)混合溶媒に溶解し、Ar下、室温で遮光して1日攪拌した。反応溶液をそのままエバポレーターで減圧にし、未反応のアンモニア、およびエタノールの一部を除いた。ここに2規定塩酸を加え液性を酸性(pH < 1)とし、これを酢酸エチルで3回抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。得られた暗赤色油状物質をシリカゲルカラム(C-200; 60 g、塩化メチレン:n-ヘキサン = 9:1)で精製し、淡桃色固体1.709 gを得た(収率74%)。これをベンゼン-n-ヘキサンより再結晶し、淡桃色板状晶を得た。

m.p. 79.0-82.0 °C

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ 6.73 (d. 1H, J_o = 8.79 Hz; Ar(5)-H), 6.47 (d. 1H, J_m = 2.93 Hz; Ar(2)-H), 6.35 (d.d. 1H, J_o = 8.79 Hz, J_m = 2.93 Hz; Ar(6)-H), 4.71 (s. 1H; Ar-OH, D₂O Exchangeable), 3.84 (s. 3H; -OCH₃), 3.83 (s. 3H; -OCH₃)

・各種(OCD₃)-アニソールの合成

メトキシフェノール 1.24 g (10 mmol)、無水炭酸セシウム 6.52 g (20 mmol)、ヨウ化メチル-d₃ 1.0 g (6.9 mmol)をジメチルホルムアミド10 mlに懸濁させ、これを密栓し、室温で6時間攪拌した。反応溶液に飽和食塩水を加え塩析し、これを塩化メチレンで3回抽出し、合わせた有機層を2規定水酸化ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。得られた油状物質をシリカゲルカラム(C-200; 100 g、塩化メチレン:n-ヘキサン = 1:3)で精製し、*o*-(OCD₃)-アニソール、*m*-(OCD₃)-アニソールは無色油状物質として、*p*-(OCD₃)-アニソールは無色固体として得た。

・4-メトキシカテコールの合成

1,2,4-トリヒドロキシベンゼン(ヒドロキシヒドロキノン) 2.52 g (20 mmol)、borax(Na₂B₄O₇·10H₂O) 14.6 g (38 mmol)を水295 mlに溶解した水溶液を室温下攪拌し、ここに水酸化ナトリウム 4.79 g (120 mmol)を水18 mlに溶解した水溶液とジメチル硫酸 11.0 ml (115 mmol)をそれぞれ滴下ロートより20分かけて同時に滴下した。このまま1日攪拌を続けた。冷却しながら反応溶液に濃硫酸を

加え、液性を酸性(pH < 1)とし、これを酢酸エチルで3回抽出し、合わせ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で乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。これをシリカゲルカラム (C-200; 100g, 塩化メチレン : n-ヘキサン = 5 : 1) で2回精製し、淡橙色油状物質 1.782 gを得た(収率 64%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 6.77 (d, 1H, $J_o = 8.79$ Hz; Ar(6)-H), 6.51 (d, 1H, $J_m = 2.93$ Hz; Ar(3)-H), 6.35 (d.d, 1H, $J_o = 8.79$ Hz, $J_m = 2.93$ Hz; Ar(5)-H), 3.74 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$)

・ [^{18}O]フェニル過酢酸の合成

6 規定塩酸 400 μl (2.4 mmol as HCl) に K^{18}O_2 150 mg (2.0 mmol) を氷冷下加えた。このとき発泡が激しいので注意した。無水硫酸マグネシウム 2.8 mg (23 μmol)、水酸化ナトリウム 135 mg (3.4 mmol) を水 (1.35 ml) - ジオキサン (1.70 ml) 混合溶媒に溶解した溶液に、上記反応液を氷冷下加え、次にここにフェニルアセチルクロライド 175 mg (1.13 mmol) を加え、これを氷冷下5分間攪拌した。反応液に20%硫酸 1.13 ml、飽和食塩水 20 ml を加え、これを塩化メチレン 30 ml で3回抽出し、合わせた有機層を 0.2M NaPi (pH 6.7) 20 ml で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。さらにベンゼンで2回共沸しジオキサンを飛ばした。これを減圧乾燥し、無色固体 49.8 mg を得た。

^{18}O コンテントは、シクロヘキサノンの Baeyer-Villiger 反応を用い、GC/SIM 法で決定した。その結果、 [^{18}O] フェニル過酢酸の ^{18}O コンテントは 69.40% であった。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 11.284 (br.s, 1H; $-\text{OH}$), 7.28-7.38 (m, 5H; Ar-H), 3.74 (s, 2H; $-\text{CH}_2-$)

・ 2,4,5-トリメトキシフェノールの合成

2,4,5-トリメトキシベンズアルデヒド 2.94 g (15 mmol)、*m*-クロロ過安息香酸 5.18 g (30 mmol) を無水塩化メチレン 40 ml に懸濁させ、これを3時間加熱還留した。析出物をろ過し、また沈殿物は数回塩化メチレンで洗い、ろ液とこれらの塩化メチレン層を合わせ、溶媒を留去し、(このとき、防爆フェンスをつけた) 橙色固体を得た。これを酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で3回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去し黄橙色固体を得た。これをエタノール (75 ml) - 25% アンモニア水 (75 ml) 混合溶媒に溶解し、Ar下、室温で遮光して1日攪拌した。反応溶液をそのままエバポレーターで減圧にし、未反応のアンモニア、およびエタノールの一部を除いた。

ここに2規定塩酸を加え液性を酸性(pH < 1)とし、これを酢酸エチルで3回抽出し、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去した。得られた淡黄色固体をシリカゲルカラム (C-200; 150 g, 塩化メチレン : n-ヘキサン = 5 : 1) で精製し、淡桃色固体1.625 gを得た (収率 58%)。これをクロロホルム-n-ヘキサンより再結晶し、無色針状晶を得た。

m.p. 58.5-60.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 6.61 (s, 1H; Ar-H), 6.58 (s, 1H; Ar-H), 5.29 (s, 1H; Ar-OH, D_2O Exchangeable), 3.85 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$), 3.84 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$), 3.82 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$)

・1,2,4,5-テトラメトキシベンゼンの合成

2,4,5-トリメトキシフェノール 1.11 g (6.0 mmol)、ヨウ化メチル 1.70 g (12 mmol)、無水炭酸セシウム 3.91 g (12 mmol)をアセトン 10 mlに懸濁させた溶液を、密栓して室温下1日攪拌した。反応液に2規定塩酸を加え、これを塩化メチレンで3回抽出し、合わせた有機層を2規定水酸化ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後溶媒を留去し、淡黄色固体 1.161 gを得た (収率 97%)。これをn-ヘキサンより再結晶し、無色針状晶を得た。

m.p. 104-104.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 6.61 (s, 2H; Ar-H), 3.86 (s, 12H; $-\text{OCH}_3$)

・エストロン-6-ケト体

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.53 (1H; Ar(4)-H), 7.32 (1H; Ar(1)-H), 7.08 (1H; Ar(2)-H)

MS $m/z = 284$ (M^+)

・エストロン-6-ヒドロキシ体

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.21 (1H; Ar(1)-H), 6.86 (1H; Ar(4)-H), 6.78 (1H; Ar(2)-H), 4.80 (1H; Benzyl(6)-H)

MS $m/z = 286$ (M^+), 268 (M^+-16)

・5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフトール-8-オン

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.55 (1H; Ar(1)-H), 7.16 (1H; Ar(4)-H), 7.03 (1H; Ar(3)-H)

・5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフトール-5-オン

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.93 (1H; Ar(4)-H), 6.68 (1H; Ar(1)-H), 6.77 (1H; Ar(3)-H)

・4-ニトロカテコール

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.79-84 (d.d. 1H, $J_o = 8.79$ Hz, $J_m = 2.20$ Hz; Ar(5)-H), 7.78 (d. 1H, $J_m = 2.19$ Hz; Ar(3)-H), 6.95-97 (d. 1H, $J_o = 8.79$ Hz; Ar(6)-H)

・3-ニトロカテコール

m.p. 86.0-88.0 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.64-69 (d. 1H, $J_o = 8.79$ Hz; Ar(4)-H), 7.24-26 (d. 1H, $J_o = 8.42$ Hz; Ar(6)-H), 6.89-93 (t. 1H, $J_o = 8.42$ Hz; Ar(5)-H)
IR (KBr) cm^{-1} 1540 (ν_{as} -NO₂), 1355 (ν_s -NO₂)
MS m/z 155 (M⁺), 109 (M⁺-NO₂)

・2-ニトロヒドロキノン

m.p. 134.0-134.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.54 (d. 1H, $J_m = 2.93$ Hz; Ar(3)-H), 7.16-19 (d.d. 1H, $J_o = 9.16$ Hz, $J_m = 2.93$ Hz; Ar(5)-H), 7.07 (d. 1H, $J_o = 9.16$ Hz; Ar(6)-H)
IR (KBr) cm^{-1} 1525 (ν_{as} -NO₂), 1345 (ν_s -NO₂)

・4-シアノカテコールの合成

プロトカテキユアルデヒド 2.76 g (20 mmol)、ニトロメタン 3.00 g (40 mmol)、無水酢酸ナトリウム 3.28 g (40 mmol) を酢酸 4 ml に懸濁させ、これをAr気流下4時間加熱還流させた。反応液を100 mlの氷水に注ぎ入れ、これをエーテル抽出した。集めた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去した。得られた茶色残渣をシリカゲルカラム精製(150 g、塩化メチレン:酢酸エチル=4:1)し、無色固体 236 mg を得た(収率9%)。エーテル-n-ヘキサンより再結晶し、無色針状晶を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.15 (d.d. 1H, $J_m = 1.83$ Hz, $J_o = 8.06$ Hz; Ar(5)-H), 7.13 (d. 1H, $J_m = 1.83$ Hz; Ar(3)-H), 6.91 (d. 1H, $J_o = 8.06$ Hz; Ar(6)-H), 6.09 (br. s. 1H; Ar-OH), 5.93 (br. s. 1H; Ar-OH)

IR (KBr) 2240 cm^{-1} (-CN)

・2,4,5-トリハイドロキシニトロベンゼン

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 10.87 (s. 1H; Ar-OH), 8.73 (br.s. 1H; Ar-OH), 7.84 (br.s. 1H; Ar-OH), 7.56 (s. 1H; Ar(6)-H), 6.59 (s. 1H; Ar(3)-H)

・3,4,5-トリハイドロキシニトロベンゼン

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; Acetone- d_6) δ 8.81 (br.s. 3H; Ar-OH), 7.34 (s. 2H; Ar(2,6)-H)

・2,3,4-トリハイドロキシニトロベンゼン

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 10.86 (s. 1H; Ar-OH), 7.70 (br.s. 1H; Ar-OH), 7.66 (d. 1H, $J_{43} = 9.52$ Hz; Ar(4)-H), 7.07 (br.s. 1H; Ar-OH), 6.59 (d. 1H, $J_{34} = 9.16$ Hz; Ar(3)-H)

・5-メチルグアヤコールの3段階合成

① O-ベンゾイルグアヤコールの合成

グアヤコール 1.86 g (15 mmol)、トリエチルアミン 1.82 g (18 mmol)、ジメチルアミノピリジン 220 mg (1.8 mmol) を塩化メチレン 15 ml に溶解し、ナス型コルベンに入れ、これを0 °Cに保ちながら、ベンゾイルクロライド 2.53 g (18 mmol) をここに滴下した。塩化カルシウム管をつけた後、温度を徐々に室温まで上げ、1時間攪はんした。水2.0 ml を加え反応を止めた後、さらに1規定塩酸を50 ml加え、これを塩化メチレンで抽出した。集めた有機層を1規定塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去した。3.65 g の無色油状物質が得られた (収率 quant.)。

② 5-クロロメチルグアヤコールベンゾエートの合成

パラホルムアルデヒド 1.40 g を酢酸 18 ml に溶解し、これを還流冷却器をつけた2けいコルベンに入れ、攪拌しながら、20 °C以下で塩化水素ガスを30分間通じた。ここに、O-ベンゾイルグアヤコール 3.00 g を数回に分けて加え、(このとき、液温が20 °Cを越えないように氷浴で冷やしながらいった。) さらに5時間、塩化水素ガスを通じながら70 °Cで攪拌した。ガスを止め、さらに2時間80 °Cで攪拌を続けた。反応液を氷水に注ぎ入れ、これをベンゼンで抽出した。集めた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去した。得られた無色の残渣を、ベンゼン-n-ヘキサンより再結晶し、無色針状

晶 2.34 g を得た (収率 64 %)。

③ 5-メチルグアヤコールの合成

5-クロロメチルグアヤコールベンゾエート 2.3 g を酢酸 15 ml に溶解し、室温で攪拌しながら、亜鉛末 5 g を少しずつ加え、Ar気流下、80 °Cで4時間攪拌した。反応液を吸引ろ過し、ろ液から溶媒を減圧溜去し、この残渣にベンゼン 50 ml を加え、これを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去し、うす黄色の油状物質を得た。ここに、10%水酸化ナトリウムエタノール溶液を30 ml加え、Ar気流下、1.5時間加熱還流した。エタノールを減圧溜去した後、1規定塩酸 100 ml を加え、これをベンゼンで抽出した。集めた有機層を、飽和炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去し、うすオレンジ色の油状物質 900 mg を得た (収率 78 %)。これをカラム精製 (45 g、塩化メチレン : n-ヘキサン = 1 : 1) し、無色油状物質 799 mg を得た。冷蔵庫に入れ冷やすと、結晶化した。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 6.75 (br.s. (d.?) 1H; Ar(6)-H), 6.74 (d. 1H, $J_o = 8.06$ Hz; Ar(3)-H), 6.64 (d.d. 1H, $J_o = 8.32$ Hz, $J_m = 2.20$ Hz; Ar(4)-H), 5.54 (br.s. 1H; Ar-OH), 3.86 (s. 3H; $-\text{OCH}_3$), 2.26 (s. 3H; $-\text{CH}_3$)

・5-シアノグアヤコールの合成

イソバニリン 4.56 g (30 mmol)、ニトロメタン 4.50 g (60 mmol)、無水酢酸ナトリウム 4.92 g (60 mmol) を酢酸 6 ml に懸濁させ、これをAr気流下8時間加熱還流させた。反応液を100 mlの氷水に注ぎ入れ、これをエーテル抽出した。集めた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧溜去した。得られた茶色残渣を2回シリカゲルカラム精製 (100 g、塩化メチレン) し、無色固体 716 mg を得た (収率 16 %)。ベンゼン-n-ヘキサンより再結晶し、無色針状晶を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3/TMS) δ 7.20-23 (d.d. 1H, $J_o = 8.43$ Hz, $J_m = 2.20$ Hz; Ar(4)-H), 7.18 (d. 1H, $J_m = 2.20$ Hz; Ar(6)-H), 6.88 (d. 1H, $J_o = 8.43$ Hz; Ar(2)-H), 5.76 (br.s. 1H; Ar-OH), 3.96 (s. 3H; $-\text{OCH}_3$)

IR (KBr) 2225 cm^{-1} ($-\text{CN}$)

MS $m/z = 149$ (M^+), 134 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$)

・2-D フェノールの3段階合成

① O-ベンジル o-プロモフェノールの合成

o-プロモフェノール 5.19 g (30 mmol)、無水炭酸カリウム 4.98 g (36 mmol)をエタノール 15 ml に懸濁し、室温、Ar気流下激しく攪はんし、ここにベンジルプロマイド 4.28 g (25 mmol) を滴下した。これをさらに、50 °C で3時間激しく攪はんした。反応液に水 30 ml を加え (この時 pH = 13)、これをエーテルで抽出した。集めた有機層を1規定水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を溜去し、淡黄色油状物質 6.46 g を得た (収率 98%)。アルミナカラム精製 (アルミナ担体 50 g、*n*-ヘキサン) すると、無色油状物質となった。

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ 6.6-7.6 (m, 9H; Ar), 5.07 (s, 2H; ph-CH₂-O-)

IR (Neat) cm⁻¹ 3060, 3030, 2920, 2870 (-CH₂-)

② グリニヤル反応による*O*-ベンジル 2-D-フェノールの合成

マグネシウム 583 mg (24 mmol) を還流冷却器、滴下ロートをつけた2けいコルベンに取り、Ar気流下、120 °C で3時間激しく攪はんし、活性化させた。これを室温まで冷やした後、*O*-ベンジル *o*-プロモフェノール 5.26 g (20 mmol) を乾燥したテトラヒドロフラン 10 ml に溶解した溶液を滴下した。反応が始まるように、ドライヤーで少し暖めてやると激しく反応が開始し、1時間ほどで深緑色の懸濁液となった。ここに、重水 801 mg (40 mmol) を乾燥したテトラヒドロフラン 0.8 ml と混合した溶液を滴下した。30分ほどで反応は終結したので、ここに2規定塩酸を析出物が溶解するまで加え、これをエーテル抽出した。無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を溜去し、黄色の油状物質 3.71 g を得た (収率 quant.)。これをシリカゲルカラムで精製 (30 g、塩化メチレン : *n*-ヘキサン = 1 : 3) し、無色油状物質を得た。この物質はコルベン壁をこすると簡単に結晶化したが、再結晶はうまくいかなかったので、このまま次の反応に用いることにした。

③ 2-D フェノールの合成

O-ベンジル 2-D フェノール 3.43 g (18.5 mmol)、パラジウム-カーボン 1 g をメタノール 30 ml に懸濁させ、これを室温で水素気流下3時間攪はんした。2号ろ紙でろ過したろ液の溶媒を減圧溜去し、淡黄色油状物質を得た (収率 quant.)。これを、シリカゲルカラム精製 (40 g、塩化メチレン) し、無色油状物質を得た。冷蔵庫に入れ冷却すると、結晶化した。

m.p. ≤ 25 °C

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃/TMS) δ 7.22-27 (m, 2H; Ar(3)-H + Ar(5)-H), 6.93 (d.t. 1H, J_o = 7.33 Hz, J_m = 1.20 Hz; Ar(4)-H), 6.83 (d.d. 1H, J_o = 8.42 Hz,

$J_m = 0.8 \text{ Hz}$; Ar(6)-H

IR (KBr) cm^{-1} 1300, 1115, 625 (C-D)

MS $m/z = 95$ (M^+)

D Retention 94.2% (Calculated by intensities of MS fragments)

・4-D フェノールの3段階合成

① O-ベンジル*p*-プロモフェノールの合成

p-プロモフェノール 5.19 g (30 mmol)、無水炭酸カリウム 4.98 g (36 mmol) をエタノール 15 ml に懸濁し、室温、Ar気流下激しく攪拌し、ここにベンジルプロマイド 4.28 g (25 mmol) を滴下した。これをさらに、50 °C で3時間激しく攪拌した。反応液に水 30 ml を加え (この時 pH = 13)、これをエーテルで抽出した。集めた有機層を1規定水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を溜去し、淡黄色残渣を得た。n-ヘキサンから再結晶し、無色針状晶 3.47 g を得た。(収率 53 %)

② グリニヤル反応によるO-ベンジル 4-D-フェノールの合成

マグネシウム 365 mg (15 mmol) を還流冷却器、滴下ロートをつけた2けいコルペンに取り、Ar気流下、120 °C で2時間激しく攪拌し、活性化させた。これを室温まで冷やした後、O-ベンジル*p*-プロモフェノール 3.16 g (12 mmol) を乾燥したテトラヒドロフラン 6 ml に溶解した溶液を滴下した。反応が始まるように、ドライヤーで少し暖めてやると激しく反応が開始し、1時間ほどで深緑色の懸濁液となった。ここに、重水 481 mg (24 mmol) を乾燥したテトラヒドロフラン 0.8 ml と混合した溶液を滴下した。30分ほどで反応は終結したので、ここに2規定塩酸を析出物が溶解するまで加え、これを塩化メチレン抽出した。無水硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を溜去し、淡黄色の油状物質を得た。これをシリカゲルカラムで精製 (40 g、塩化メチレン:n-ヘキサン = 1:9) し、無色固体を得た (収率 95 %)。この物質は融点が室温付近らしく、少し暖かいとすぐに液体になった。

③ 4-D フェノールの合成

O-ベンジル 4-D フェノール 2.11 g (11.4 mmol)、パラジウム-カーボン 807 mg をメタノール 20 ml に懸濁させ、これを室温で水素気流下3時間攪はんした。2号濾紙で濾過した濾液の溶媒を減圧溜去し、淡黄色油状物質を得た (収率 quant.)。これを、シリカゲルカラム精製 (30 g、クロロホルム) し、無色油状物質を得た。冷蔵庫に入れ冷却すると、結晶化した。

m.p. $\leq 25^{\circ}\text{C}$

MS m/z 95 (M^+)

D Retention 61.9 % (Calculated by intensities of MS fragments)

IV. 各章の実験操作

【第1章の実験】

◇Cu²⁺-アスコルビン酸-O₂系◇

(1) 生成物収率、選択性を求める実験

〈反応〉

過塩素酸銅六水塩 (Cu(ClO₄)₂·6H₂O) (1 mmol)、アスコルビン酸(10 mmol)、および各基質(1 mmol)を蒸留水(20 ml)に溶解する。(水溶性が低い基質の場合、これに必要最低量のアセトンをコソルベントとして加え、均一相とした。コソルベントの量は、以下の各基質の項を参照のこと。)これをO₂雰囲気下、室温で一定時間激しく攪拌して行った。定量はHPLCで行った。

〈HPLCによる分析法〉

反応液2.0 μlをHPLCにそのままアプライして各生成物を分離し、その収量は絶対検量線法でピーク面積をもとに求めた。反応液に不溶物が認められるときは、メンブレンフィルターで濾過した濾液をHPLCにアプライした。カラム、溶出溶媒などは、各基質の項に特記なき限り以下の通りである。

Column : TSKgel ODS-120T (4.6 x 150 mm) (東ソー)

Detection : 280 nm

Eluent : CH₃CN - 0.1 % H₃PO₄aq. = 1 : 3

Flow rate : 1.0 ml/min

〈各基質の反応条件とHPLC条件〉

・o-メトキシフェノール (グアヤコール) の反応

(HPLC条件)

Column : Partisil-5 ODS-3 (4.3 x 150 mm)

Retention time : カテコール 3.0 min; 基質 5.5 min

・m-メトキシフェノールの反応

(HPLC条件)

Retention time : レゾルシノール 3.1 min; 基質 7.7 min

・p-メトキシフェノールの反応

(HPLC条件)

Retention time : ハイドロキノン 2.5 min; 基質 6.0 min

・ *o*-ジメトキシベンゼンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 12.0 ml

(HPLC条件)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 1 : 1$

Retention time : *o*-メトキシフェノール 5.2 min; 基質 7.0 min

・ *m*-ジメトキシベンゼンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 8.0 ml

(HPLC条件)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - \text{CH}_3\text{OH} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 45 : 55 : 150$

Retention time : *m*-メトキシフェノール 5.6 min; 2,4-ジメトキシフェノール 5.0 min; 2,6-ジメトキシフェノール 5.2 min; 基質 17.7 min

・ *p*-ジメトキシベンゼンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 12.0 ml

(HPLC条件)

Column : TSKgel ODS-120T (4.6 x 250 mm) (東ソー)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 1 : 2$

Retention time : *p*-メトキシフェノール 7.1 min; 基質 23.2 min

・ アニソールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 8.0 ml

(HPLC条件)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - \text{CH}_3\text{OH} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 45 : 55 : 150$

Retention time : フェノール 5.2 min; *o*-メトキシフェノール 5.5 min; *p*-メトキシフェノール 4.5 min; 基質 15.6 min

・ *o*-ベンジルオキシアニソールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 20.0 ml

(HPLC条件)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 1 : 1$

Retention time : *o*-ベンジルオキシフェノール 8.1 min; *o*-メトキシフェノール 3.2 min; ベンズアルデヒド 4.1 min; 基質 13.6 min

・ 1,2-メチレンジオキシベンゼンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 8.0 ml

(HPLC条件)

Column : TSKgel ODS-120T (4.6 x 250 mm) (東ソー)

Eluent : $\text{CH}_3\text{CN} - 0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.} = 1 : 2$

Retention time : カテコール 5.0 min; カテコールモノホルメート 7.5 min; 基質 23.8 min

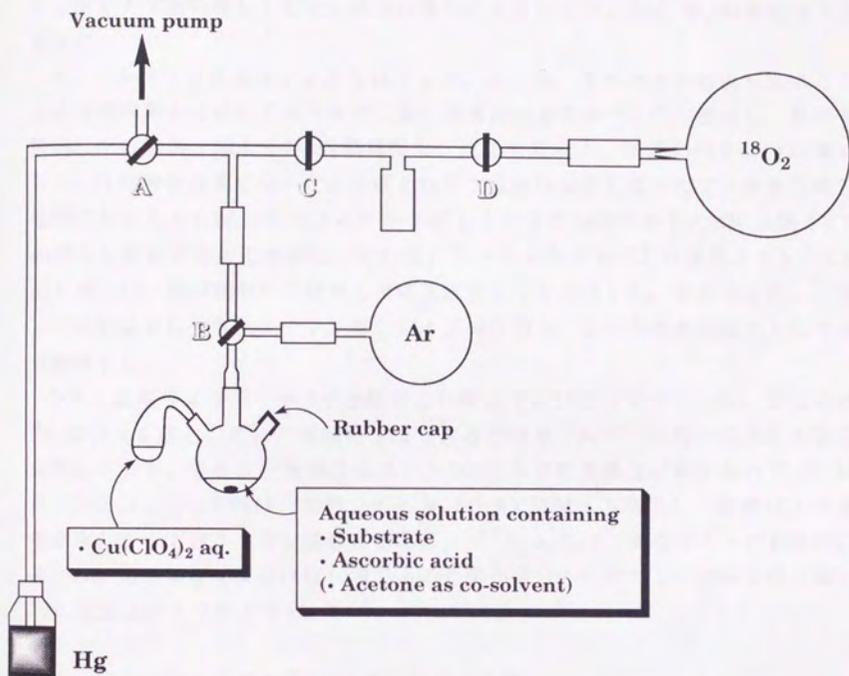
(2) ^{18}O 導入率を求める実験

〈反応〉

A. 酸化剤 ($^{18}\text{O}_2$) 由来の ^{18}O 導入率を求める実験

まず $^{18}\text{O}_2$ の封入されたガラス容器を、空気中の $^{16}\text{O}_2$ が混入しないように十分注意して(真空ライン内の脱気、Ar置換を数十回繰り返した。)真空ラインに接続した(Scheme E-1)。接続後もコックCより右側には空気中の $^{16}\text{O}_2$ が混入しないように十分注意した。実験は、3けいコルベンをScheme E-1に示したように真空ラインに接続して、以下の手順で行った。コルベン内には、アスコルビン酸(2.5 mmol)、および各基質(0.25 mmol)を蒸留水(3.0 ml)に溶解した(水溶性が低い基質の場合、上記(1)の各基質の項に示した量の4分の1量のアセトンをコソルベントとして用いた)溶液を入れ、また過塩素酸銅六水塩($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (0.25 mmol)を蒸留水(2.0 ml)に溶解した水溶液を図のようなすりガラス容器に入れ、これをコルベンに装着した。残りの1口にはシーラムキャップをつけた。

まず、全コックが閉じていることを確認してから真空ポンプのスイッチを入れ、Hg柱の高さで内部圧力をモニターしながら、コックA,Bを用いて脱気、Ar置換を繰り返し、コルベン内を十分にAr置換した。次に、コックA,Bを用いてコルベン内を真空(当然水蒸気圧があるため実際には真空にはならない。その温度の水蒸気圧程度まで内部圧を下げるということ)にし、その後コックAのみを閉じ、す



Scheme E-1. An apparatus for Cu^{2+} -ascorbic acid- $^{18}\text{O}_2$ system

ぐにコックCを開き $^{18}\text{O}_2$ をコルベン内に導入し、またすぐにコックCを閉じた。この時点ではコルベン内圧力は大気圧に達していないので、コックBを操作してArで全圧を大気圧に等しくした。以上の操作によりコルベン内は $^{18}\text{O}_2$ -Ar雰囲気下となった。

次にコルベンを真空ラインよりはずした。その後、すりガラス容器を回すことで過塩素酸銅水溶液とアスコルビン酸、基質溶液をコルベン内で混合し、反応を開始した。室温下激しく2-4時間攪拌し、反応を行った。溶液の色が徐々に薄くなり、ほぼ無色透明になったならばそれ以上反応は進行しないので、溶液が無色透明になったならば、シーラムキャップより十分にArバブルした2N-塩酸を3.0 ml注入し反応を完全に止めた。その後、シーラムキャップより塩化メチレン5.0 mlを注入し、数分間激しく攪拌し反応生成物などを抽出した。攪拌を止め、三方コックをはずし、塩化メチレン層をバイアルに移し、これを無水硫酸ナトリウムで乾燥した。

なお、真空ラインのコックC,D間はこの時点では引圧になっている。空気中の $^{16}\text{O}_2$ の混入を防ぐために、実験終了後できるだけ早くArでこの間の圧力を大気圧に等しくする。さらに、実験後はコックDの左右で酸素濃度が異なるので、しばらくの間コックDを開け（当然このときコックCは閉じてある）、拡散により濃度を等しくしておき、次の実験に備えた。（ $^{18}\text{O}_2$ -Ar比は、真空ラインの長さの計測から、実験開始直後はほぼ1:4であると算出された。ただし、実験を行う度に $^{18}\text{O}_2$ -Ar比は徐々に減少する。）

B. 水 (H_2^{18}O) 由来の ^{18}O 導入率を求める実験

反応溶媒として、蒸留水- H_2^{18}O 混合溶媒(3:1 (v/v))を用いた以外は、(1)に示した条件と同じ条件で反応を行った。（但し、使用する H_2^{18}O の量を減らすために10分の1にスケールダウンした。）反応は2-4時間行い、その後塩化メチレンを加えて反応生成物などを抽出した。塩化メチレン層をとり、これを無水硫酸ナトリウムで乾燥した。

この一部にはほぼ等量(v/v)のTMS化剤 (BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5:4:1) を加え、数分間室温で放置して生成物をTMS化させたものをGC/SIM法で分析した。

《GC/SIMによる分析、及び ^{18}O 導入率の算出》

上記の塩化メチレン抽出溶液に、TMS化剤 (BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5:4:1) を等量(v/v)加え、室温で数分間放置し、O-脱アルキル化生成物を誘導化後、これをGC/SIM法で分析した。GC条件、Mass条件は各基質の項に特記なき限り

以下の通りである。

<GC条件>

Column : RTX-5, Capillary, 30 m

Carrier gas : He

Flow rate : 33-35 He

Column head pressure : 9.5 psi

Injector temperature : 220 °C

Inlet temperature : 250 °C

Separator temperature : 250 °C

GC temperature : 80 °C (1 min) - 16 °C/min - 220 °C (2.5 min)

Purge on time : 0.50 min (splitless)

<Mass条件>

Mass : SX-102A (JEOL)

Collector slit : 400 μm

Ionizing volt : 70 V

Accel volt : 10.0 kV

Chamber temperature : 220-250 °C

^{18}O 導入率は、SIM法を用い、 ^{16}O 生成物のM'と ^{18}O 生成物のM'のピーク面積比から算出した。このとき、主にケイ素の天然同位体存在比に由来する ^{16}O 生成物のM'+2ピークも、 ^{18}O 生成物のM'のピークに含まれてしまうので、これを各基質の項に記した天然存在比をもとに補正して ^{18}O 導入率を算出した。

実験に用いた $^{18}\text{O}_2$ の ^{18}O コンテンツは、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノールの水酸化反応で生成するカテコールの ^{18}O 導入率から求めた。(当教室でのこれまでの検討により、フェノールを基質とした Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の反応で生成するカテコールに導入される酸素原子は、100%酸素分子由来であることが明らかにされている。) その結果、真空ラインを立ちあげた当初の ^{18}O コンテンツは90.6%であることがわかった。しかし、実験を重ねるごとに徐々にこの ^{18}O コンテンツは低下した。そこで、各基質から副生成物として若干量生成する水酸化体への ^{18}O 導入率を、各実験で用いた $^{18}\text{O}_2$ の ^{18}O コンテンツとして、O-脱アルキル化反応の*ipso*置換率を計算した。(ただし、全ての実験で水酸化体の ^{18}O 導入率は75-90%の範囲であったので、 ^{18}O コンテンツを90.6%に固定して*ipso*置換率を計算しても、値はほとんど変化しない。)

《各基質由来のO-脱アルキル化生成物の分析条件》

・ *o*-メトキシフェノール (グアヤコール) の反応

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 254.1158

[¹⁸O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 256.1201

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 9.6439 %

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 284.1264

[¹⁸O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 286.1307

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 10.127 %

Mass : DX-303 (JEOL)

Column : DB-5, Capillary, 25 m

Retention time : カテコール 7.18 min; 3-メトキシカテコール 8.65 min; メトキシハイドロキノン 9.12 min; 基質 6.13 min

・ *m*-メトキシフェノールの反応

(生成物(TMS化体)のM⁺は*o*-メトキシフェノールの項に同じ)

Column : DB-5, Capillary, 25 m

Retention time : レゾルシノール 8.26 min; 3-メトキシカテコール 9.19 min;

4-メトキシカテコール 9.54 min; メトキシハイドロキノン 9.66 min; 基質

7.32 min

・ *p*-メトキシフェノールの反応

(生成物(TMS化体)のM⁺は*o*-メトキシフェノールの項に同じ)

Column : DB-5, Capillary, 25 m

Retention time : ハイドロキノン 8.44 min; 4-メトキシカテコール 9.56 min;

基質 7.49 min

・ *o*-ジメトキシベンゼンの反応

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 196.0920

[¹⁸O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 198.0963

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 4.9336 %

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 226.1025

[¹⁸O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 228.1068

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 5.3296 %

Column : RTX-5, Capillary, 27 m

Retention time : *o*-メトキシフェノール 5.83 min; 2,3-ジメトキシフェノール 7.21 min; 3,4-ジメトキシフェノール 8.07 min; 基質 5.04 min

・ *m*-ジメトキシベンゼンの反応

(生成物(TMS化体)のM⁺は*o*-ジメトキシベンゼンの項に同じ)

Column : RTX-5, Capillary, 27 m

Retention time : *m*-メトキシフェノール 6.38 min; 2,4-ジメトキシフェノール 7.93 min; 2,6-ジメトキシフェノール 7.47 min; 基質 5.29 min

・ *p*-ジメトキシベンゼンの反応

(生成物(TMS化体)のM⁺は*o*-ジメトキシベンゼンの項に同じ)

Column : RTX-5, Capillary, 27 m

Retention time : *p*-メトキシフェノール 6.44 min; 2,5-ジメトキシフェノール 7.77 min; 基質 5.26 min

・ アニソールの反応

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 166.0814

[¹⁸O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 168.0803

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 4.5515 %

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 196.0920

[¹⁸O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 198.0963

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 4.9336 %

Column : RTX-5, Capillary, 22 m

Retention time : フェノール 5.21 min; *o*-メトキシフェノール 6.89 min; 基質 4.16 min

・ *o*-ベンジルオキシアニソールの反応

[¹⁶O]*o*-メトキシフェノール(TMS化体)のM⁺ : 196.1

[¹⁸O]*o*-メトキシフェノール(TMS化体)のM⁺ : 198.1

[¹⁶O]*o*-メトキシフェノール(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 4.93 %

[¹⁶O]*o*-ベンジルオキシフェノール(TMS化体)のM⁺ : 272.1

[¹⁸O]*o*-ベンジルオキシフェノール(TMS化体)のM⁺ : 274.1

[¹⁶O]*o*-ベンジルオキシフェノール(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 6.80 %

Mass : DX-303 (JEOL)

Column : NB-5, Capillary, 25 m

Retention time : *o*-ベンジルオキシフェノール 10.83 min; *o*-メトキシフェノール 5.70 min

・ 1,2-メチレンジオキシベンゼンの反応

[¹⁶O]カテコール(TMS化体)のM⁺: 254.1

[¹⁸O]カテコール(TMS化体)のM⁺: 256.1

[¹⁶O]カテコール(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比: 10.3 %

[¹⁶O]カテコールモノホルメート(TMS化体)のM⁺: 210.1

[¹⁸O]カテコールモノホルメート(TMS化体)のM⁺: 212.1

[¹⁶O]カテコールモノホルメート(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比: 4.23 %

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺: 210.1

[¹⁸O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺: 212.1

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比: 4.23 %

Mass : DX-303 (JEOL)

Column : NB-5, Capillary, 25 m

Retention time : カテコール 6.57 min; カテコールモノホルメート 6.35 min;
セサモール(4-ハイドロキシ-1,2-メチレンジオキシベンゼン) 7.15 min

・ 4-メトキシ-1,2-メチレンジオキシベンゼンの反応

[¹⁶O]4-メトキシカテコール(TMS化体)のM⁺: 286.1

[¹⁸O]4-メトキシカテコール(TMS化体)のM⁺: 284.1

[¹⁶O]4-メトキシカテコール(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比: 10.4 %

[¹⁶O]セサモール(TMS化体)のM⁺: 210.1

[¹⁸O]セサモール(TMS化体)のM⁺: 212.1

[¹⁶O]セサモール(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比: 4.23 %

Mass : DX-303 (JEOL)

Column : NB-5, Capillary, 25 m

Retention time : 4-メトキシカテコール 8.42 min; セサモール(4-ハイドロキシ-1,2-メチレンジオキシベンゼン) 7.15 min

・ フェノールの反応

(カテコール(TMS化体)のM⁺はo-メトキシフェノールの項に同じ)

Mass : DX-303 (JEOL)

Column : NB-5, Capillary, 25 m

Retention time : カテコール 6.55 min

(3) 分子内同位体効果(k_H/k_D)を求める実験

《反応、GC/SIMによる分析、及び k_H/k_D の算出》

重メトキシ基を持つ化合物を基質として用いた以外は、反応、生成物の抽出、誘導化、GC/SIM分析条件は全て(1)、(2)に既述した条件と同じである。基質として用いた化合物の D_3 化率は、GC/SIM法によりすべて99.5%以上であることを確認した。 k_H/k_D は、生成物の H_3 体、 D_3 体の存在比から算出した。以下、各基質の項に H_3 体、 D_3 体の M^+ 、及び主にケイ素の天然同位体存在比に由来する補正値を記した。

《各基質由来のO-脱アルキル化生成物の分析条件》

・ *o*-(OC_2D_5)-アニソール、*m*-(OC_2D_5)-アニソール、*p*-(OC_2D_5)-アニソールの反応

[H_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 196.0920

[D_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 199.1108

[H_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+3 / M^+ 比: 0.4988 %

Column, Retention time は、(2)の各基質の項を参照。

・ 2-(OC_2D_5)-6-(OCH_3)-フェノールの反応

[H_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 284.1264

[D_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 287.1452

[H_3]O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+3 / M^+ 比: 1.6819 %

Column: RTX-5, Capillary, 25 m

Retention time: 3-メトキシカテコール 7.58 min; 基質 6.88 min

(4) *o*-置換フェノールからのカテコール生成反応

《反応、HPLCによる分析法》

反応条件、HPLCによる分析法は、(1)を参照のこと。ただしHPLCカラムは、各基質の項に特記なき限り以下の通りである。

Column: TSKgel ODS-120T (4.6 x 250 mm) (東ソー)

《各基質の反応条件とHPLC条件》

・ *o*-クレゾールの反応

(反応条件)

コソルベント: アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 基質 22.4 min

・ *o*-クロロフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : カテコール 6.2 min; 基質 26.4 min

(水酸化生成物と思われるピーク : 7.2 min, 13.6 min)

・ *o*-プロモフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : カテコール 6.2 min; 基質 32.0 min

(水酸化生成物と思われるピーク : 8.1 min, 16.9 min)

・ *o*-ハイドロキシアセトフェノンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : カテコール 6.2 min; 基質 34.0 min

(水酸化生成物と思われるピーク : 8.8 min, 11.7 min)

・ *o*-ニトロフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : カテコール 6.2 min; 基質 29.1 min

(水酸化生成物と思われるピーク : 12.8 min)

・ *o*-シアノフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 6.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : カテコール 6.2 min; 基質 13.0 min

(水酸化生成物と思われるピーク: 5.8 min, 8.5 min)

◇ガンマラジオリシス法◇

(1) 分子内同位体効果(k_H/k_D)を求める実験

《サンプル調製、 γ 線照射条件》

サンプル調製のプロトコル、 γ 線照射条件などは第4章の実験に詳述した。ただし本章の実験では、以下の点に若干変更を加えた。

m-(OCD_3)-アニソール、*p*-(OCD_3)-アニソールは水溶性が低いため、第4章に示したプロトコルに従ってサンプルを調製することはできなかった。そこで、これらの基質では、基質をバッファー(10 ml)に飽和させ、これに N_2O をバブルすることでサンプルを調製した。

γ 線照射時間は、総照射量が600 Gyとなるように実験ごとに調整した。

《GC/SIMによる分析、及び k_H/k_D の算出》

反応終了後、サンプルの一部を塩化メチレンで抽出し、塩化メチレン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、TMS化剤(BSTFA-ピリジン-TMCS = 5:4:1)により誘導化し、これをGC/SIMで分析した。《各基質由来のO-脱アルキル化生成物の分析条件》は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の(3)を参照のこと。

(2) O-脱メチル化反応に及ぼすアスコルビン酸の還元的雰囲気の効果の検討

《サンプル調製、 γ 線照射条件》

サンプル調整のプロトコルは、第4章の実験を参照のこと。ただし、アスコルビン酸の添加によるpHの変化をできるだけ少なくするため、緩衝液として0.2 M, pH 6.6 のリン酸バッファーを用いた。

なお本実験では、 γ 線照射量を1500 Gyとした(照射時間は1hr 42min 44sec)。

《GC/SIMによる分析》

反応終了後、サンプル2.0 mlをとり、これにI.S. (ピフェニル)の溶解したクロロホルム3.0 mlを加え、よく振り混ぜて生成物を抽出した。クロロホルム層は無水硫酸ナトリウムで乾燥後、TMS化剤(BSTFA-ピリジン-TMCS = 5:4:1)により誘導化し、これをGC/SIMで分析した。《O-脱メチル化生成物、水酸化生成物の分析条件》は、 Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系の(2)を参照のこと。

【第2章の実験】

◇肝ミクロソーム-NADPH/O₂系◇

(1) 分子内同位体効果(k_H/k_D)を求める実験

《反応、GC/SIMによる分析、及び k_H/k_D の算出》

サンプル調製、反応条件は第4章を参照のこと。

反応を冷却して止め、冷クロロホルムで抽出、遠心分離、クロロホルム層の溶媒留去（完全にドライアップはしない）した後、これにTMS化剤（BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5 : 4 : 1）を加え誘導化し、GC/SIM法により分析、 k_H/k_D を算出した。 k_H/k_D の算出方法、および各基質からの生成物の分析に関しては、第1章の実験のCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系（3）項を参照のこと。

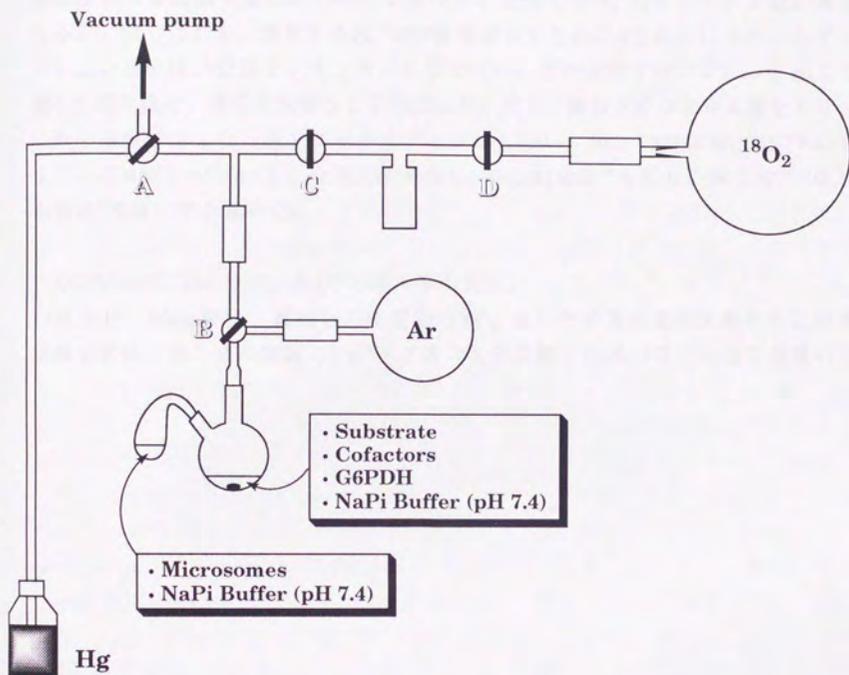
(2) ¹⁸O導入率を求める実験

《反応》

A. 酸化剤 (¹⁸O₂) 由来の¹⁸O導入率を求める実験

反応は、真空ラインに2ヶいコルベンをつけたScheme E-2に示す装置を用いて行った。コルベン内には、基質(500 nmol、NaOH_{aq}抽出又はアルミナカラムで精製したもの)、G-6PDH(10 unit)、Cofactor I set(1.0 ml、成分に関しては第4章の実験を参照)を入れ（全量は1.12 ml）、すりガラス容器には肝ミクロソーム(5 mg protein、シトクロムP450コンテンツ; 2.15 nmol / mg protein)、0.1M NaPi(pH 7.4, 0.78 ml)を入れた（全量は0.88 ml）。反応開始まではできるだけこれらの溶液を低温に保つように注意した。反応容器内を¹⁸O₂-Ar雰囲気とするプロトコルは、第1章の実験のCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系（2）項と同じとした。

次に反応容器を真空ラインよりはずした。反応容器を、温度を37 °Cに保った湯浴に浸け、その後すりガラス容器を回すことでミクロソームと、基質溶液をコルベン内で混合し、反応を開始した。反応時間は15分間とした。15分たったならば、速やかに反応容器を氷水に浸け、反応を停止させた。十分冷却した後、三方コックをはずし、直ちに冷クロロホルム5.0 mlを加え、数分間激しく攪拌して反応生成物などを抽出した。全液を試験管に移して遠心分離し、クロロホルム層をとり、これを溶媒留去した（完全にドライアップはしない）後、TMS化剤（BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5 : 4 : 1）を加え誘導化し、GC/SIM法で分析し、酸化剤 (¹⁸O₂) 由来の¹⁸O導入率を求めた。



Scheme E-2. An apparatus for microsomes-NADPH/ $^{18}\text{O}_2$ system

B. 水 (H_2^{18}O) 由来の ^{18}O 導入率を求める実験

H_2^{18}O コンテンツが50%のCofactor I溶液を1.0 ml用いた他は、第4章の実験に準じた。(反応液全量は2.0 mlとなるので、全体での H_2^{18}O コンテンツは25%となる。)但しこれを、使用する H_2^{18}O の量を減らすために4分の1にスケールダウンした。反応は15分間インキュベートして行い、その後冷クロロホルムを加えて激しく振り混ぜ、反応生成物などを抽出した。遠心分離後クロロホルム層をとり、これを溶媒留去した(完全にドライアップはしない)後、TMS化剤(BSTFA-ピリジン-TMSCl=5:4:1)を加え誘導化し、GC/SIM法で分析し、酸化剤($^{18}\text{O}_2$)由来の ^{18}O 導入率を求めた。

《GC/SIMによる分析、及び ^{18}O 導入率の算出》

GC条件、Mass条件、観測した生成物の M^+ 、主にケイ素由来の天然存在比の補正值などは、第1章の実験の Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系(2)の項を参照のこと。

【第3章の実験】

◇各種鉄ポルフィリン-酸化剤系◇

(1) O-脱メチル化反応収率、及び酸化剤のO-O結合開裂様式の検討 《反応》

反応を行う前に各基質はアルカリ水溶液で洗うか、アルミナカラムを通すことにより、O-脱アルキル化生成物であるフェノール類が含まれないように精製した。

1つの口にシーラムキャップを付した2けいコルベンに、基質(0.1 M又は10 mM)、鉄ポルフィリン(1.0 mM)のベンゼン溶液1.0 mlを入れ、脱気、Ar置換を数回繰り返し、コルベン内をAr雰囲気とした。コルベン内溶液をおだやかに攪拌し、ここにシリンジを用いシーラムキャップを通してフェニル過酢酸のベンゼン溶液(5.0 mM) 0.20 mlを滴下し、反応を開始した。反応はAr雰囲気、室温下、おだやかに攪拌して10分間行った。10分後、シリンジを用いシーラムキャップを通して、トリフェニルフォスフィン(20 mM) 0.50 mlを反応溶液に加え、未反応の酸化剤を分解して反応を停止させた。このままAr下でさらに5分間攪拌した。反応液0.50 mlにI.S. (安息香酸エチル)のベンゼン溶液を0.50 ml加え、これにTMS化剤(BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5 : 4 : 1)を加え誘導化し、GC/SIMでこれを分析し、各生成物を内部標準法で定量した。各生成物は、2つ以上の異なる質量数のピーク比が、Authenticと一致することを確認した。

《反応生成物の分析条件》

GC条件、Mass条件は、第1章の実験のCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系(2)の項に記した通りである。

・p-ジメトキシベンゼンの反応

(モニターした生成物(TMS化体)のM⁺及びフラグメンテーションは以下の通り)

p-メトキシフェノール(TMS化体) : 196.0920 (M⁺), 181.0685 (M⁺-CH₃)

2,5-ジメトキシフェノール(TMS化体) : 226.1025 (M⁺), 211.0790 (M⁺-CH₃)

フェニル酢酸(TMS化体) : 208.0920 (M⁺)

ベンジルアルコール(TMS化体) : 180.0970 (M⁺), 165.0736 (M⁺-CH₃)

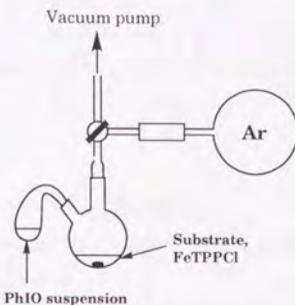
安息香酸エチル(I.S.) : 150.0681 (M⁺)

Retention time : p-メトキシフェノール 6.68 min; 2,5-ジメトキシフェノール 8.03 min; フェニル酢酸 6.75 min; ベンジルアルコール 5.35 min; 安息香酸エチル 5.57 min

(2) 分子内同位体効果(k_H/k_D)を求める実験
《反応》

鉄ポルフィリン-フェニル過酢酸系の反応は、塩化メチレンを反応溶媒とした反応も行った点以外は、上記(1)に記した通りである。(塩化メチレンは、実験に使用する直前に水素化カルシウム共存下で蒸留したものを用いた。)ヨードソベンゼンを酸化剤とした反応は、Scheme E-3に示した装置を用い、Ar下で基質(0.1 M)、鉄ポルフィリン(1.0 mM)の塩化メチレン溶液1.0 mlとヨードソベンゼンの塩化メチレン懸濁液(完全に溶解したと仮定すると20 mMとなる懸濁液)0.50 mlを混合させて行った。反応はAr雰囲気、室温下で1.5時間行った。

各反応液にTMS化剤(BSTFA-ピリジン-TMSCl = 5 : 4 : 1)を加え誘導化し、これをGC/SIM法により分析、 k_H/k_D を算出した。 k_H/k_D の算出方法、および各基質からの生成物の分析に関しては、第1章の実験の Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系(3)項を参照のこと。



Scheme E-3. An apparatus for FeTPPCL-PhIO system

(3) 酸化剤($[^{18}O]$ フェニル過酢酸)由来の ^{18}O 導入率を求める実験
《反応》

酸化剤として $[^{18}O]$ フェニル過酢酸を用いた点以外は、(1)に示した方法に準じた。

《GC/SIMによる分析、及び ^{18}O 導入率の算出》

GC条件、Mass条件、また以下に記した基質以外の基質のO-脱メチル化反応において観測した生成物の M^+ 、主にケイ素由来の天然存在比の補正值などは、第1章の実験の Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系(2)の項を参照のこと。

・1,2,4-トリメトキシベンゼンの反応

$[^{16}O]$ O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 226.1025

$[^{18}O]$ O-脱メチル化生成物(TMS化体)の M^+ : 228.1068

$[^{16}O]$ O-脱メチル化生成物(TMS化体)の $M^+ + 2 / M^+$ 比: 5.3296 %

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 256.1131

[¹⁸O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺ : 258.1174

[¹⁶O]水酸化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 5.7396 %

Retention time : 2,4-ジメトキシフェノール 8.28 min; 2,5-ジメトキシフェノール 8.15 min; 3,4-ジメトキシフェノール 8.40 min; 2,4,5-トリメトキシフェノール 9.43 min; 基質 7.80 min

・1,2,3-トリメトキシベンゼンの反応

(生成物(TMS化体)のM⁺は1,2,4-トリメトキシベンゼンの項に同じ)

GC temperature : 90 °C (1 min) - 16 °C/min - 220 °C (3 min) - 20 °C/min - 250 °C (2 min)

Retention time : 2,3-ジメトキシフェノール 6.93 min; 3,4-ジメトキシフェノール 7.17 min; 2,3,4-トリメトキシフェノール 8.07 min; 基質 6.53 min

・1,2,4,5-テトラメトキシベンゼンの反応

本基質は、Injector 内で触媒非関与でO-脱メチル化反応が進行してしまうため、Injector temperature を下げ、またSplit mode で測定を行った。

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 256.1131

[¹⁸O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺ : 258.1174

[¹⁶O]O-脱メチル化生成物(TMS化体)のM⁺+2 / M⁺比 : 5.7396 %

Injector temperature : 150 °C

Purge on time : 0.0 min (split)

Collector slit : 350 μm

GC temperature : 90 °C (1 min) - 16 °C/min - 220 °C (3 min) - 20 °C/min - 250 °C (2 min)

Column : RTX-5, Capillary, 27 m

Retention time : 2,4,5-トリメトキシフェノール 8.55 min; 基質 7.97 min

◇肝ミクロソーム-NADPH/O₂系◇

(1) ¹⁸O導入率を求める実験

《反応》

A. 酸化剤 (¹⁸O₂) 由来の¹⁸O導入率を求める実験

B. 水 (H_2^{18}O) 由来の ^{18}O 導入率を求める実験

いずれも第2章の実験の肝ミクロソーム-NADPH/ O_2 系(2)の項を参照のこと。

《GC/SIMによる分析、及び ^{18}O 導入率の算出》

GC条件、Mass条件、観測した生成物のM⁺、主にケイ素由来の天然存在比の補正值などは、上記の鉄ポルフィリン酸化剤系(3)の項を参照のこと。

【第4章の実験】

◇ Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系◇

(1) 生成物収率を求める実験

《反応》

以下の《各基質の反応条件とHPLC条件》の項に特記なき限り、次の条件で反応を行った。過塩素酸銅六水塩 ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (1 mmol)、アスコルビン酸 (10 mmol)、および各基質 (1 mmolまたは2 mmol、詳細は本文中のFigure、Tableを参照のこと) を蒸留水(20 ml)に溶解する。(水溶性が低い基質の場合、これに必要最低量のソルベントを加え、均一相とした。ソルベントの種類、量は、以下の各基質の項を参照のこと。) これを O_2 雰囲気下、室温で一定時間激しく攪拌して行った。定量は単離するか、HPLCで行った。

《単離操作》

反応液をそのままかあるいは塩析後、酢酸エチルで数回抽出し、合わせた有機層を1N塩酸と飽和食塩水で洗い、無水硫酸マグネシウム乾燥した。ろ過後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムで分離、精製した。

《HPLCによる分析法》

反応液2.0 μl をHPLCにそのままアプライして各生成物を分離し、その収量は絶対検量線法でピーク面積をもとに求めた。反応液に不溶物が認められるときは、メンブレンフィルターで濾過した濾液をHPLCにアプライした。カラム、溶出溶媒などは、各基質の項に特記なき限り以下の通りである。

Column : TSKgel ODS-120T (4.6 x 250 mm) (東ソー)

Detection : 280 nm

Eluent : CH_3CN - 0.1 % $\text{H}_3\text{PO}_4\text{aq.}$ = 1 : 3

Flow rate : 1.0 ml/min

《各基質の反応条件とHPLC条件》

・オクトバミンの反応

(反応条件)

酸化剤として過酸化水素(10 mmol)を用いた。

・エストロンの反応

(反応条件)

基質(0.35 mmol)、銅塩(0.35 mmol)、アスコルビン酸(3.5 mmol)、蒸留水(10.0 ml)

酸化剤として過酸化水素(7 mmol)を用いた。

コソルベント：酢酸 20.0 ml

・ 5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフトールの反応

(反応条件)

基質(0.3 mmol)、銅塩(0.15 mmol)、アスコルビン酸(1.5 mmol)、蒸留水(10 ml)

コソルベント：アセトン 5.0 ml

・ フェノールの反応

(HPLC条件)

Retention time：ハイドロキノシ 4.1 min; カテコール 6.4 min; 基質 11.8 min

・ *m*-メトキシフェノールの反応

(HPLC条件)

Column：Partisil-5 ODS-3 (4.3 x 150 mm)

Eluent：CH₃CN - H₂O = 1 : 3

Retention time：基質 11.5 min

・ *m*-ニトロフェノールの反応

(HPLC条件)

Retention time：4-ニトロカテコール 11.0 min; 3-ニトロカテコール 13.7 min;
2-ニトロハイドロキノシ 13.7 min; 基質 21.6 min

・ *m*-ハイドロキシアセトフェノンの反応

(反応条件)

コソルベント：アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Eluent：CH₃CN - H₂O = 1 : 3

Retention time：2,5-ジハイドロキシアセトフェノン 3.7 min; 3,4-ジハイドロ
キシアセトフェノン 5.3 min; 2,3-ジハイドロキシアセトフェノン 11.3 min;
基質 9.3 min

・ *m*-シアノフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 2-シアノヒドロキノン 5.3 min; 4-シアノカテコール 6.6 min; 3-シアノカテコール 7.7 min; 基質 12.1 min

・ *p*-クレゾールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 4-メチルカテコール 10.0 min; 基質 22.1 min

・ *p*-ニトロフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 4-ニトロカテコール 11.0 min; 基質 19.0 min

・ *p*-ヒドロキシアセトフェノンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 3,4-ジヒドロキシアセトフェノン 5.0 min; 基質 7.4 min

・ *p*-シアノフェノールの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 2.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 4-シアノカテコール 7.7 min; 基質 11.7 min

・ 4-ニトロカテコールの反応

(反応条件)

蒸留水 40.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : 3,4,5-トリヒドロキシニトロベンゼン 6.6 min; 2,3,4-トリヒドロキシニトロベンゼン 7.7 min; 2,4,5-トリヒドロキシニトロベンゼン 9.0 min; 基質 11.0 min

・ *m*-ニトロフェノールとフェノールの競争反応

(反応条件)

m-ニトロフェノール、フェノールともに1 mmol ずつを系中に共存させ、反応を行った。HPLC条件は上記各基質の項を参照のこと。

・ *m*-アセチルアセトフェノンの反応

(反応条件)

コソルベント : アセトン 5.0 ml

(HPLC条件)

Retention time : アセトバニロン (4'-ヒドロキシ-3'-メトキシアセトフェノン) 6.1 min; 基質 16.8 min

(2) 重水素ラベルしたフェノールを基質とした反応

《反応》

上記(1)に準じた。

《分析条件》

各反応液をそのままクロロホルムで抽出し、濃縮後TMS化し、GC/MS法により2-Dカテコールとカテコール、およびヒドロキノンと2-Dヒドロキノンの生成比を、それぞれのM⁺の強度比から求めた。

(GC/MS条件、生成物の分析条件)

Mass : DX-300

Column : DB-17 ワイドボア 25 m

Injector temperature : 200 °C

GC temperature : 80 °C (1 min) - 16 °C/min - 180 °C (2.5 min)

Retention time : カテコール 4.5 min; ヒドロキノン 5.3 min

◇ガンマラジオリシス法◇

《装置》

^{60}Co 線源、および照射装置は、東京大学原子力センター別館（浅野地区）のものを使用した。装置のおおまかな概略をScheme E-4に、外観写真をPhoto E-1に示した。照射実験は特殊コンクリートで囲われた子部屋内で行われる。 ^{60}Co 線源は、外部からの操作により上下し、照射時間にはこの上下の間の時間を補正した値も入っている。よって、5分以上の照射時間ならば照射線量と、照射時間はほとんど比例すると考えてよい。

《照射時間》

1991年10月17日現在の ^{60}Co 線源は、1986年3月31日に設置されたrodである。照射線量は、試料のrodからの距離、および台上の高さに大きく左右される。距離が離れるほど、時間当りの照射線量は減少する。台上の高さは、高すぎても、低すぎても照射効率が低くなるので、注意を要する。今回の実験は、その操作の簡便さなどから、rodからの距離10.0 cm、台上の高さ21.5 cmの条件で行った。この条件でのrod設置日現在の時間当りの線量は、 $2.25 \times 10^3 \text{ Gy/hr}$ である。 ^{60}Co の半減期は1921日であるから、rod設置日から2026日後である実験開始日には、同条件で、 $1.085 \times 10^3 \text{ Gy/hr}$ の時間線量となる。よって、照射線量を600 Gyにするには、33分12秒の γ 線照射を行えばよいことになる。以下の実験では、この照射時間を用いている。

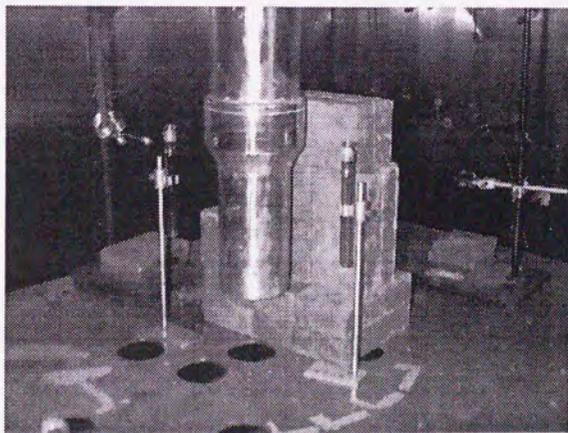
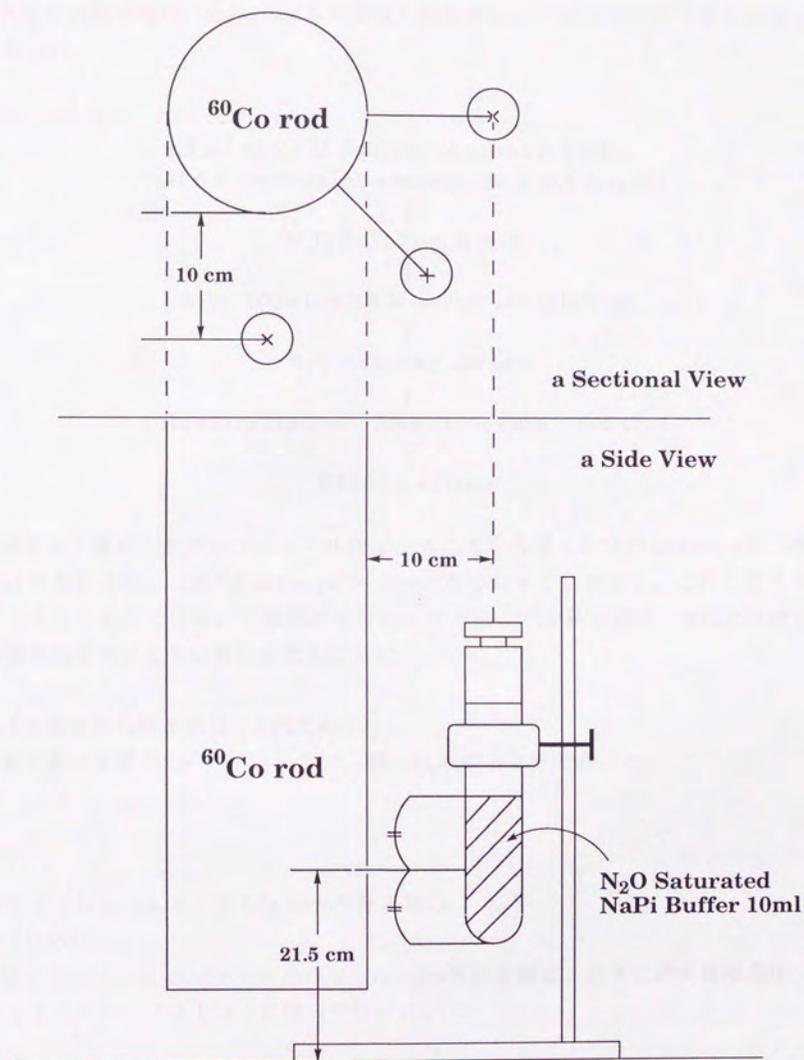


Photo E-1. An apparatus for γ -radiolysis



Scheme E-4. An Apparatus for γ -Radiolysis

《実験方法》

実際の実験操作は、Koppenolらの論文³¹⁾を参考にし、以下のプロトコルに従って行った。

<Protocol>

9.9 ml of 0.1 M Sodium phosphate buffer
(pH 5.9, containing ascorbic acid 0.1 mmol)
|
N₂O Bubbling 5 min
|
Add 100ml of 0.5 M substrate solution
|
N₂O Bubbling 30 sec
|
γ-Ray irradiation (Radiation dose = 600 Gy)
|
HPLC Analysis

基質が、揮発しやすいフェノール類であることを考慮し、N₂O Bubblingを二度に分けて行った。二度のBubblingが終わったならばすぐに密栓し、これを原子力センターにもって行き、γ線照射を行い、すぐにこれを持ち帰り、HPLCで絶対検量線法を用いて生成物の定量を行った。

《各基質からの生成物のHPLC条件》

第4章の実験のCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系の項を参照のこと。

◇肝ミクロソーム系による*in vitro*代謝実験◇

《反応》

肝ミクロソーム-NADPH/O₂系による*in vitro*代謝実験は、以下に示す反応条件、コファクター、プロトコルに従って行った。

<Protocol>

Reaction mixture (Microsome, Cofactor, G-6-PDH,
0.1M Phosphate Buffer) at 0°C
|
37°C Preincubation 30 sec

|
 Add SKF-525A solution (or Ethanol in case of Complete)
 |
 37°C Preincubation 30 sec
 |
 Add substrate solution
 |
 37°C Incubation 15 min
 |
 Add 6.0 ml CHCl₃, stopperd, shake, stored at 0°C
 |
 Extraction, Centrifugation (2000 r.p.m., 10 min)
 |
 Water layer vacuumed out, take 5.0 ml of CHCl₃ layer
 |
 Evaporation (≤ 25°C)
 |
 Add I.S. solution, analyzed by HPLC

| Microsome systems and reaction conditions | | Cofactor | |
|---|--------------|----------------------------------|--------|
| Substrate | 500 nmol | MgCl ₂ | 8.6 mM |
| Rat liver microsome (PB treated) | 6 mg protein | KCl | 17.0 |
| Cofactor | 1 ml | G-6-P | 2.6 |
| G-6-PDH | 20 unit | NADPH | 2.0 |
| (SKF-525A) | 2 mM | NADH | 2.2 |
| 0.1 M Phosphate buffer | 760 ml | Na ₂ HPO ₄ | 42.1 |
| Total volume | 2 ml | NaH ₂ PO ₄ | 10.3 |

All reactions were carried out at 37°C for 15 min.

《各生成物のHPLCによる分析、定量法》

各水酸化体の生成量は、内部標準法でHPLCを用いて定量した。内部標準物質 (I.S.) としては、フェノール、*p*-ニトロフェノールを基質とした場合は *p*-ヒドロキシアセトフェノンを、*p*-クレゾールを基質としたときはカテコールをそれぞれ用いた。生成物のHPLC条件は、第4章の実験のCu²⁺-アスコルビン酸-O₂系の項を参照のこと。

参考文献

参考文献

- 1) *Cytochrome P450*; Oritz de Montellano, P. R., Ed.; Plenum: New York (1986)
- 2) Stein, G. and Weiss, J. "Some Free-radical Reactions of Phenol. The Action of the Hydrogen Peroxide-Ferrous Salt Reagent and of X-Rays on Aqueous Solutions of Phenol" *J. Chem. Soc.* 3265-3274 (1951)
- 3) Udenfriend, S.; Clark, C. T.; Axelrod, J. and Brodie, B. B. "Ascorbic acid in aromatic hydroxylation" *J. Biol. Chem.* **208**, 731-739 (1954)
- 4) Hanzlik, R. P. and Ling, K. H. J. "Active Site Dynamics of Xylene Hydroxylation by Cytochrome P-450 As Revealed by Deuterium Isotope Effects" *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9363-9370 (1993)
- 5) Okazaki, O. and Guengerich, F. P. "Evidence for Specific Base Catalysis in *N*-Dealkylation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 and Chloroperoxidase" *J. Biol. Chem.* **268**, 1546-1552 (1993)
- 6) Bhatt, M. V. and Kulkarni, S. U. "Cleavage of Ethers" *Synthesis* 249-282 (1983)
- 7) 栗飯原 一弘、博士論文
- 8) Aihara, K.; Higuchi, T. and Hirobe, M. " O_2 - Cu^{2+} -Ascorbic Acid: A Novel Oxidation System for the Highly Selective O-Dealkylation of 2-Alkoxyphenols" *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 837-840 (1988)
- 9) idem. "3-Hydroxycoumarins: First Direct Preparation from Coumarins Using a Cu^{2+} -Ascorbic Acid- O_2 System, and Their Potent Bioactivities" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 169-175 (1990)
- 10) idem. "Increasing 5-Lipoxygenase Inhibitory Activities by Oxidative Conversion of *o*-Methoxyphenols to Catechols Using a Cu^{2+} -Ascorbic Acid- O_2 System" *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 842-844 (1990)
- 11) Lindsay Smith, J. R. and Sleath, P. R. "Model Systems for Cytochrome P450 Dependent Mono-oxygenases. Part 2. Kinetic Isotope Effects for the Oxidative Demethylation of Anisole and $[Me-^2H_3]$ Anisole by Cytochrome P450 Dependent Mono-oxygenases and Model Systems." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 621-628 (1983)
- 12) Sawyer, D. T.; Kang, C.; Llobet, A. and Redman, C. "Fenton Reagents (1:1 $Fe^{II}_x/HOOH$) React via $[L_xFe^II OOH(BH^+)]$ as Hydroxylases ($RH \rightarrow ROH$), not as Generators of Free Hydroxyl Radicals ($HO\cdot$)" *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5817-5818 (1993)
- 13) Yamazaki, I. and Piatt, L. H. "EPR Spin-Trapping Study on the Oxidizing Species Formed in the Reaction of the Ferrous Ion with Hydrogen Peroxide" *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7588-7593 (1991)

- 14) Isaacs, N. S. *Physical organic chemistry* Chapter 7; Longman: England (1987)
- 15) Hjelmeland, L. M.; Aronow, L.; Trudell, J. R. "Intramolecular Determination of Primary Kinetic Isotope Effects in Hydroxylations Catalyzed by Cytochrome P-450" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 541-549. (1977)
- 16) Groves, J. T.; McClusky, G. A.; White, R. E.; Coon, M. J. "Aliphatic Hydroxylation by Highly Purified Liver Microsomal Cytochrome P-450. Evidence for a Carbon Radical Intermediate" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 154-160 (1978)
- 17) Sorokin, A.; Robert, A.; Meunier, B. "Intramolecular Kinetic Isotope Effects in Alkane Hydroxylations Catalyzed by Manganese and Iron Porphyrin Complexes" *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7293-7299 (1993)
- 18) Kwart, H. "Temperature Dependence of the Primary Kinetic Hydrogen Isotope Effect as a Mechanistic Criterion" *Acc. Chem. Res.* **15**, 401-408 (1982)
- 19) Sorokin, A. B.; Khenkin, A. M. "The Contribution of Tunneling to High Values of Kinetic Isotope Effect in Aliphatic Hydroxylation by a Cytochrome P-450 Model" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 45-46 (1990)
- 20) Koymans, L.; Donne-op Den Kelder, G. M.; Te Koppele, J. M. and Vermeulen, N. P. E. "Generalized Cytochrome P450-mediated Oxidation and Oxygenation Reactions in Aromatic Substrates with Activated N-H, O-H, C-H or S-H Substituents" *Xenobiotica* **23**, 633-648 (1993)
- 21) Ingelman-Sundberg, M. and Johansson, I. "Mechanisms of Hydroxyl Radical Formation and Ethanol Oxidation by Ethanol-inducible and Other Forms of Rabbit Liver Microsomal Cytochrome P-450" *J. Biol. Chem.* **259**, 6447-6458 (1984)
- 22) Ekstrom, G.; Cronholm, T. and Ingelman-Sundberg, M. "Hydroxyl-radical Production and Ethanol Oxidation by Liver Microsomes Isolated from Ethanol-treated Rats" *Biochem. J.* **233**, 755-761 (1986)
- 23) Fujii, H. and Ichikawa, K. "Preparation and Characterization of an A_{10} Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation-Radical Complex" *Inorg. Chem.* **31**, 1110-1112 (1992)
- 24) 島田 神生、修士論文
- 25) 大饗 茂, 古川 尚道 *物理有機化学* 三共出版
- 26) Dawson, J. H. "Probing Structure-Function Relations in Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases" *Science* **240**, 433-439 (1988)
- 27) Champion, P. M. "Elementary Electronic Excitations and the Mechanism of Cytochrome P450" *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3433-3434 (1989)
- 28) *Free Radicals in Biology Vol. III*, pp. 1-51, Pryor, W. A., Ed.; Academic Press: New York (1977)

- 29) 松浦 輝男 酸素酸化反応 丸善
- 30) Koop, D. R. and Laethem, C. L. "Inhibition of Rabbit Microsomal P-450 2E1-Dependent *p*-Nitrophenol Hydroxylation by Substituted Benzene Derivatives" *Drug Metab. Dispos.* **20**, 775-777 (1992)
- 31) Maskos, Z.; Rush, J. D. and Koppenol, W. H. "The Hydroxylation of the Salicylate Anion by a Fenton Reaction and gamma-Radiolysis: A Consideration of the Respective Mechanisms" *Free Radical Biol. Med.* **8**, 153-162 (1990)

論文発表および学会発表

本研究は、以下の通りに発表している。

- Yasuteru Urano, Kazuhiro Aihara, Tsunehiko Higuchi, and Masaaki Hirobe; "A Novel Aromatic Hydroxylation of Phenolic Compounds with Cu^{2+} -Ascorbic Acid- O_2 System." *J. Pharmacobio-Dyn.* **15**, s-47 (1992)
- Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, and Masaaki Hirobe; "Unusual Substituent Effects in the Hydroxylation of Phenols by a Cu^{2+} -Ascorbic Acid- O_2 System, Γ -Radiolysis, and Microsomes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 568-574 (1993)
- 浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭 "ガンマラジオリシス法を用いた Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による新規フェノール類水酸化反応の解析" 総合研究部門年報 **19**, 71-74 (1992) 東京大学原子力研究総合センター刊
- Kazuhiro Aihara, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, and Masaaki Hirobe; "Mechanistic Studies of Selective Catechol Formation from *o*-Methoxyphenols using a Copper(II)-Ascorbic Acid-Dioxygen System." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 2165-2170 (1993)

本研究は、以下の通りに学会発表を行っている。

- 1 · ○浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類の高効率水酸化反応の機構解析
· 日本薬学会 第111年会 (東京) 1991年3月
- 2 · ○浦野 泰照、粟飯原 一弘、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系による新規フェノール類水酸化反応の解析
· 第17回反応と合成の進歩シンポジウム (福岡) 1991年11月
- 3 · ○浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系によるフェノール類の高効率水酸化反応の機構解析 (2)
· 日本薬学会 第112年会 (福岡) 1992年3月
- 4 · ○浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· Cu^{2+} -アスコルビン酸- O_2 系及びミクロソーム系によるアニソール類のO-脱アルキル化反応機構
· 日本薬学会 第113年会 (大阪) 1993年3月
- 5 · ○浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· 各種生体類似型化学酸化系および肝ミクロソーム系による、アルキルアリルエーテル類のO-脱アルキル化反応機構の比較
· 第26回酸化反応討論会 (東京) 1993年10月
- 6 · ○浦野 泰照、樋口 恒彦、廣部 雅昭
· アニソール類のO-脱アルキル化反応機構の多様性を利用した、各種酸化酵素モデル系の比較
· 日本薬学会 第114年会 (東京) 1994年3月
- 7 · Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, and Masaaki Hirobe
· Substrate-dependent Changes of Oxidative O-Dealkylation Mechanism of Several Chemical and Biological Oxidizing Systems
· The 6th North American ISSX Meeting (Raleigh, NC U.S.A.) Oct., 1994

謝 辞

本研究に当たって、終始御指導並びに御教授を賜りました東京大学薬学部薬品代謝化学教室 広部 雅昭 教授に深く心より感謝申し上げます。並びに、数多くの貴重な御指摘や御助力を頂きました同教室の諸先生方をはじめ、教室員の皆様に深謝致します。特に、樋口 恒彦 博士には、本研究を遂行するに当たり、常に的確な御助言、御鞭達を頂き、大変御世話になりましたので、重ねて御礼を申し上げます。

γ 線照射装置を使用するに当たり、御指導頂きました東京大学工学部原子力センター 川西 俊男 技官に厚く謝意を表します。

分子軌道計算法、およびワークステーション使用法を御教示頂きました、東京大学薬学部 富岡 伸夫 博士に深く感謝いたします。

元素分析、IRスペクトル、マススペクトル等を測定して頂きました東京大学薬学部中央分析室の皆様にも、心より御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を支えてくれた両親に感謝いたします。

1995年1月

浦野 泰照

