

## 短 報

# -シクロデキストリンを酸化的二量化反応の制限媒体として用いた 2,2'-ジヒドロキシ-5,5'-ジアセチルアミノビフェニルの選択的合成

池浦太莊

無蛍光の p-アセトアミドフェノール (AAP) がオゾンと定量的に反応して酸化縮合し、強い蛍光を発する 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl (Dimer) を生成する反応は、オゾンや過酸化水素の高感度測定法として利用されている。しかし、Dimer が市販されていないことが、使用上のネックとなっていた。そこで、Dimer の簡単な合成法を検討した結果、AAP を  $\beta$ -シクロデキストリンで包接した後酸化すると、副反応が抑えられ高い収率で Dimer が得られることを見いだした。

AAP は医薬品名をアセトアミノフェンと称し、鎮痛剤として広く利用されており、Dimer の簡単な合成法の開発は、医薬品の品質管理の分野においても意義あるものと考えられる。

[キーワード： オゾン, p-アセトアミドフェノール, アセトアミノフェン, 二量体]

## 1 はじめに

無蛍光の p-アセトアミドフェノール (AAP) が、オゾンと定量的に反応して酸化縮合し、強い蛍光を発する 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl (Dimer) を生成する反応を見だし、大気中オゾン濃度の測定法および高感度オゾン簡易捕集器として報告<sup>1-5)</sup>した。この方法は測定感度に優れているが、Dimer が市販されておらず、絶対蛍光強度の測定も通常困難なため、オゾン計と並行測定した試料の相対蛍光強度とオゾン濃度との検量線より、他試料のオゾン濃度を求める必要があり、利用範囲が限定されていた。純度の高い Dimer を簡単に合成できれば、Dimer の標準溶液の蛍光強度を元にオゾン濃度を求めることが可能になり、応用範囲は大きく広がると考えられる。

AAP の酸化縮合により、強い蛍光を発する Dimer が生成する反応は、過酸化水素の測定においても優れた性能を有することが報告<sup>6)</sup>されている。また、AAP は医薬品名をアセトアミノフェンと称し、解熱沈痛剤として広く使用されているが、AAP の分解反応は中性付近では酸化縮合反応が主である。従って、Dimer の簡単な合成法の開発は、過酸化水素の測定が関与する分野や AAP を含有する医薬品の品質管理の分野においても意義あるものと考えられる。

Dimer の合成法としては、海東らが酸化剤としてフェリシアン化カリウムを使用した方法を既に報告<sup>7)</sup>しているが、副反応が多く単離操作が煩雑で収率が低いのが欠

点<sup>8)</sup>である。過酸化酵素存在下での過酸化水素による AAP の酸化反応を検討した David W. Potter らは、水酸基の2箇所のオルト位と酸アミド結合の窒素部分の3箇所まで重合反応が起こり、図1のような多くの副反応が生じることを報告<sup>9-11)</sup>している。そこで、AAP を  $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CD) で包接した後、フェリシアン化カリウムで酸化する方法を検討したところ、酸アミド結合の活性部分が  $\beta$ -CD に包接されて重合反応が制限され、 $\beta$ -CD を使用しない方法<sup>7)</sup>と比較し約1.5~2倍の高収率で Dimer を合成できることを見いだした。

## 2 実験

### 2-1 試薬類

AAP は東京化成(株)の特級試薬(H0190)を使用し、その他の試薬類はすべて和光純薬工業(株)の分析用試薬特級を使用した。なお、シリカゲルには和光純薬工業(株)のワコーゲル C-200を用いた。

### 2-2 装置類

蛍光光度計には、日立製作所製 F2000を、高速液体クロマトグラフ装置 (HPLC) には、島津製作所製 LC-4A型を使用した。

### 2-3 試料溶液の調製

100ml メスフラスコに AAP 溶液30ml とトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) 1.21g (0.01M) を加えて混合し、酸化液4ml を加えて直ちに振り混ぜ、30 のウオーターバス中で2分間反応させた後、停止液5ml を

加えて純水で100mlにメスアップし、試料溶液とした。

AAAP 溶液：AAP2gを純水300mlに溶かした後、-CD 15gを加え40℃で2時間攪拌した。

緩衝液：ホウ酸 9.9gと塩化カリウム 11.9gを純水 800mlに溶かし、0.2M 炭酸ナトリウム溶液 約200mlを加え、pH8.5に調整した。

酸化液：フェリシアン化カリウム10.0gを純水100mlに溶かした。

停止液：L-アスコルビン酸4.0gを純水100mlに溶かした。

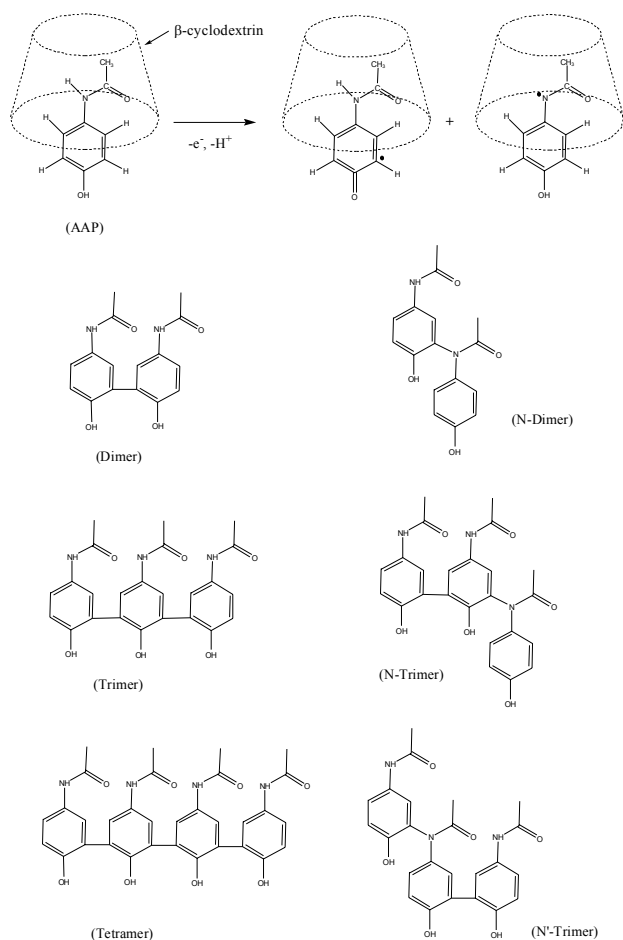


図1 AAPの酸化縮合反応

## 2.4 分析方法

試料溶液1mlを50mlメスフラスコに移し、蛍光光度計による測定の際には緩衝液で、HPLCによる測定の際には純水でメスアップした。分析条件は次のとおりである。

蛍光光度計

励起波長：308nm

蛍光波長：405nm

HPLC

試料量：20  $\mu$ l

Column：Inertsil ODS-2, 5  $\mu$  m, 250  $\times$  4.6mm I.D. ジーエルサイエンス製

Eluent：A 純水78%, メタノール20%, 酢酸2%  
B メタノール100%

Gradient：0 - 1min. A = 100%, B = 0%  
1 - 26min. A = 0%, B = 100%  
26 - 31min. A = 0%, B = 100%  
31 - 36min. A = 100%, B = 0%  
36 - 45min. A = 100%, B = 0%

Flow rate：1.0ml / min.

Detector：UV 254nm

Oven Temp.：40

## 3 結果

### 3.1 アルカリ性物質の影響

フェノール類の C-C coupling はアルカリ性条件下でおこりやすく、フェリシアン化カリウムによる反応も主にアルカリ性溶液中で行われる<sup>1,2)</sup>。そして、Dimer の反応収率は使用するアルカリ性物質に影響されると考えられる。そこで、2・3節で使用した Tris の代わりに、アンモニア水、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、トリエタノールアミン、酢酸バリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素カリウム、リン酸二ナトリウムおよび pH8.5Tris/HCl 緩衝液を約0.01 M 添加し、2・3節に従い試料溶液の調製を行った。そして、試料溶液の pH と2・3節に従い測定した相対蛍光強度を比較した結果、図2に示すように相対蛍光強度は主に pH に依存し、アルカリ性物質の違いによる影響は見られないことから、Dimer の収率は主に pH に依存していると考えられる。

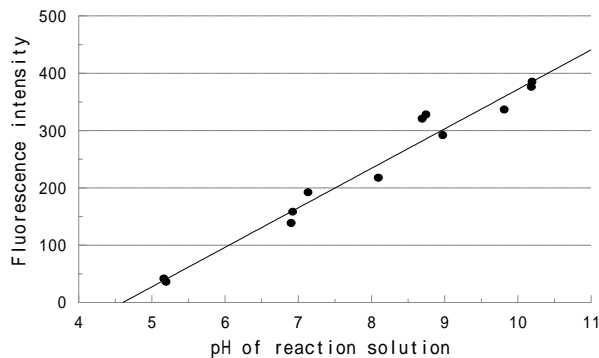


図2 pHと相対蛍光強度の関係

### 3・2 Tris濃度の影響

Dimer の収率は主に pH に依存し、アルカリ性物質の違いによる影響は見られないことが3・1節の実験から明らかとなったが、添加するアルカリ物質の濃度によっても反応収率が変化する事が予想される。そこで、Tris の添加量を0.30g(0.0025M)から4.84g(0.04M)の範囲で変化させ、2・3節に従い試料溶液の調製を行い相対蛍光強度を測定した。

その結果、図3に示すとおり相対蛍光強度は Tris の添加量が増えるに従い増加するが、1.21g(10mM)を超えると増加の程度が緩やかになる事が明らかとなった。

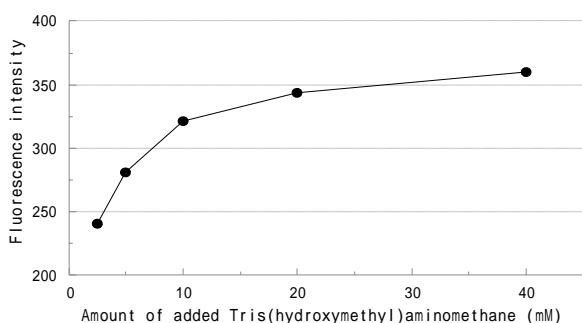


図3 Tris 添加量と相対蛍光強度の関係

### 3・3 酸化液添加量の影響

Dimer の合成に最適な酸化液の添加量を調べるため、酸化剤の添加量を1~8mlの間で変化させ、2・3節に従い試料溶液の調製を行い相対蛍光強度を測定した。

その結果、図4に示すとおり相対蛍光強度は酸化剤の添加量が3~4mlで最大となる事が明らかとなった。

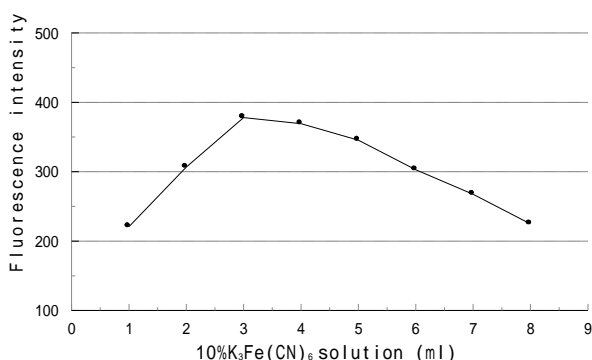


図4 酸化剤添加量と相対蛍光強度の関係

### 3・4 反応時間の影響

反応時間と Dimer の収率の関係を調べるため、30に保ったウォーターバス中で2・3節に従い反応を行い、時間をおって相対蛍光強度を測定した結果を図5に示す。

相対蛍光強度は2分で最大となり、その後徐々に減少してゆく事がわかった。

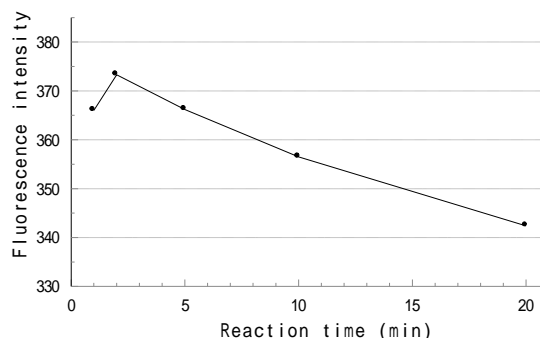


図5 反応時間と相対蛍光強度の関係

### 3・5 -CD包接化の効果

AAP を -CD で包接した効果を確認するため、AAP を -CD で包接した AAP 溶液と -CD を添加しなかった溶液について、2・3節に従い試料溶液の調製を行い HPLC により分析した。その結果、図6に示すように AAP をそのまま酸化した場合と比較して AAP を -CD で包接して酸化した場合には、副生成物のピーク高さが全体的に低くなっている。特に N-Dimer および N-Trimer のピーク高が顕著に低くなっており、酸アミド結合のN位での反応が阻害されたためと考えられる。

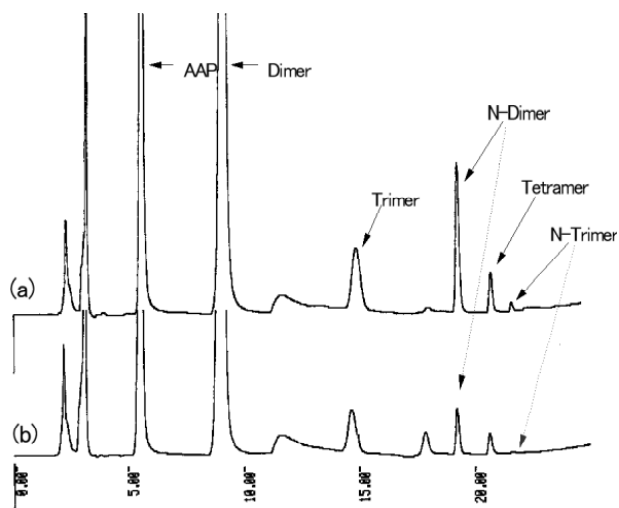


図6 HPLC クロマトグラフの比較  
(a: -CD 無添加, b: -CD 添加)

なお、N-Dimer, Trimer, Tetramer などの副生成物については、標準物質が手に入らないため、David W. Potter らの文献<sup>9・11)</sup>に記載された分析条件に従い分析し、溶出順序などから類推した。

### 3・6 合成法

3・1～3・5節の検討結果より次のように Dimer を合成した。AAP10.0g を2000ml ビーカーに取り純水1000ml に溶かした後、-CD75g と Tris65g を加え、さらに純水を追加して1500ml とし25～30 で2～3時間攪拌する。次に10% フェリシアン化カリウム溶液180ml を加えて素早く攪拌し、2分間反応させた後、10% L-アスコルビン酸溶液100ml を加えて反応を停止する。酢酸50ml を加えて pH を約5.0 に調整し、トルエン50ml を加えビーカーをサランラップ等で覆って2時間ほど攪拌し、沈殿物をろ取る。沈殿物を500ml ビーカーに移してメタノール300ml を加え、十分に攪拌後ろ過し Dimer を抽出する。この操作をあと二度繰り返し、ろ液を1000ml ナスフラスコに合わせ、ロータリーエバポレータで溶媒を留去し残留物を得る。

残留物に純水250ml と25% アンモニア水10ml を加えて溶かした後、酢酸を加えて pH を約5.0 に調整し、一晚沈澱を熟成しろ取る。ろ取した沈澱を風乾するか105

で乾燥し、沈澱物1g 当たり30～40ml の2-プロパノールを加え少し加温して溶かし(完全に溶解しなくて良い)、2-プロパノールを溶離液としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、Dimer を含む分画を分取し、500ml ナスフラスコに合わせ、ロータリーエバポレータで溶媒を留去し粗生成物を得る。

粗生成物をメタノール：水(2：1)混液に粒状活性炭を数粒加えて加温して溶かし吸引ろ過する。ろ液に当容量の熱水を加え一晚沈澱を熟成させた後、結晶をろ取る。さらに1～2度の再結晶を行い、白色針状結晶(mp 約220 )を得る。収量約1.5～2g (収率15～20%)。

### 4 考 察

AAP を -CD で包接して酸化すると、立体障害のためトリマーやテトラマーなどへのさらなる重合反応もある程度抑制されると考えられる。実際、図6を見るとトリマーやテトラマーのピーク高さが、-CD で包接せずに酸化した場合と比較して若干低い。しかし、逆に -CD で包接する事によりピーク高さが大きくなる副生成物も見られる。

-シクロデキストリン(-CD)も -CD と同様に AAP と包接化合物を形成することを確認したが、-CD はかなり高価なので、本研究では安価な -CD についてのみ検討を加えた。-CD は空洞の内径が4.5 と -CD の7.0 よりもかなり小さい<sup>1,3)</sup>ので、-CD よりも強く副反応を抑制する可能性が高く、また、溶解度も -CD より大きく合成に都合が良いので、将来、価格が下がれば検討する価値が出てくると思われる。

### 謝辞

本研究は、財団法人住友財団の研究助成を受け、実施したものであり、ここに謝意を表します。

### 文献

- 1) T. Ikeura: Fluorometric Determination of Atmospheric Ozone, J. Japan Soc. Air Pollut., 24(2), 160～162 (1989) [in Japanese].
- 2) 池浦太莊：高感度オゾン簡易測定器 - オゾン簡易測定器の開発とその実測例 -, 環境技術, 19(4), 232～237 (1990).
- 3) T. Ikeura, Tsuguo Mizoguchi: Sensitive Passive Sampler for Ozone, J. Cem. Soc. Jpn., 6, 811-819 (1991) [in Japanese].
- 4) Tasoh Ikeura, Tsuguo Mizoguchi: Performance Test of Ozone Diffusive Sampler, J. Cem. Soc. Jpn., 9, 819-824 (1996) [in Japanese].
- 5) 池浦太莊：オゾン測定法, 日本国特許第1660602号.
- 6) 青山正明：ペルオキシダーゼおよびそれと同等な触媒作用を有する物質の定量方法, 日本国特許第2079720号.
- 7) Tsunetoshi Kaito, Kazuhiko Sagara, Tsuguchika Yoshida, Yuji Ito : Studies on Fluorometric Analysis of Phenol Derivatives. . Fluorometric Determination of Acetaminophen. (1), Yakugaku Zasshi, 94(5), 633-638 (1974) [in Japanese].
- 8) 池浦太莊, 溝口次夫：2, 2'-dihydroxy-5, 5'-diacetylaminobiphenyl の単離 - 蛍光光度法による大気中オゾン濃度測定 -, 第32回大気汚染学会講演要旨集, p477 (1991).
- 9) David W. Potter, Dwight W. Miller, Jack A. Hinson: Identification of Acetaminophen Polymerization Products Catalyzed by Horseradish Peroxidase, J. Biol. Chem., 260, 12174-12180 (1985).
- 10) David W. Potter, Dwight W. Miller, Jack A. Hinson: Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Acetaminophen to Intermediates that Form Polymers or Conjugate with Glutathione, Mol. Pharmacol., 29, 155-162 (1985).
- 11) David W. Potter, Jack A. Hinson: The 1- and 2-Electron Oxidation of Acetaminophen Catalyzed by Prostaglandin H Synthase, J. Biol. Chem., 262, 974-980 (1987).
- 12) 亀谷哲治, 福本圭一郎：フェノールオキシダーゼ, 技法堂, pp.11-15 (1970).
- 13) 戸田不二緒, 上野昭彦：シクロデキストリン, 産業図書, pp.1 (1995).

# **Selective Synthesis of 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl using $\beta$ -cyclodextrin as constrained medium for oxidative dimerization**

**Tasoh IKEURA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*

*39, Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka, 818-0135 Japan*

The reaction of an oxidative dimerization of p-acetamidophenol(AAP), which gave a strongly fluorescent Dimer (2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl), is used as an highly sensitive measuring method for atmospheric ozone and hydrogen peroxide. However, it is a problem in practical use that Dimer is not marketed. Then, the convenient synthetic method of Dimer was surveyed. As a result, it was found that Dimer was obtained with high yield, when AAP was oxidized after inclusion to  $\beta$ -cyclodextrin.

Since AAP, also called Acetaminophen as a drug name, is used widely as an analgesic, this convenient synthetic method will be useful in the field of the quality control of the drugs.

[Key Words : Ozone, p-acetamidophenol, acetaminophen, dimer]