

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-238689
(P2001-238689A)

(43) 公開日 平成13年9月4日(2001.9.4)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード* (参考)

C 1 2 P 7/66

C 1 2 P 7/66

Z 4 B 0 6 4

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2000-58166(P2000-58166)

(22) 出願日 平成12年3月3日(2000.3.3)

(71) 出願人 591031360

農林水産省食品総合研究所長
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(71) 出願人 598026699

小野 裕嗣
茨城県つくば市吾妻1丁目1番1号603棟
805号

(71) 出願人 300020728

吉田 充
茨城県つくば市並木4丁目11番地915-303

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

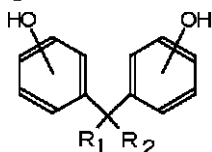
(54) 【発明の名称】 モノキノン化合物の製造方法

(57) 【要約】

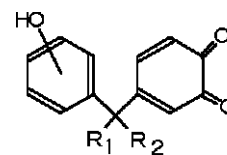
【課題】 環境汚染物質としてのビスフェノール類の低減化を図るため、当該物質を原料として、酵素反応を利用してモノキノン化合物を効率的に製造する方法を提供すること。

【解決手段】 一般式(1)で表されるビスフェノール化合物に、オキシゲナーゼの存在下、酸素を作用させることを特徴とする一般式(2)で表されるモノキノン化合物の製造方法。

【化1】



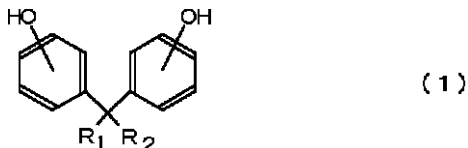
【化2】



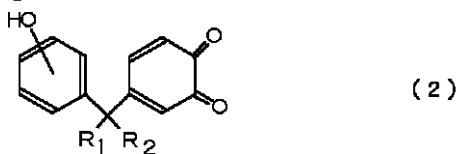
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (1) で表されるビスフェノール化合物に、オキシゲナーゼの存在下、酸素を作用させることを特徴とする一般式 (2) で表されるモノキノン化合物の製造方法。

【化 1】



【化 2】



【請求項 2】 環境ホルモン物質であるビスフェノール類を、請求項 1 記載の方法を利用して低減化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

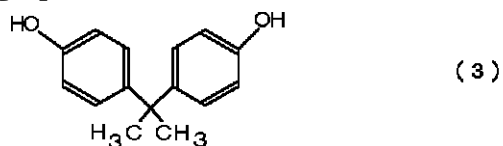
【発明の属する技術分野】本発明は、モノキノン化合物の製造方法に関し、詳しくは化学工業、食品産業、環境関連産業などの分野において有用なビスフェノール類を酸化してモノキノン化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】酸化試薬フレミー塩によって下記の式 (3) で表されるビスフェノール A を酸化すると、式 (4) で表されるモノキノン化合物の 1 種が低収率で生成することは知られている。

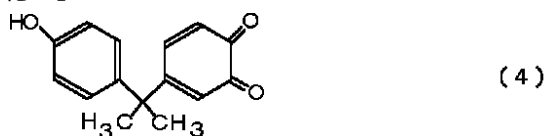
【0003】

【化 3】



【0004】

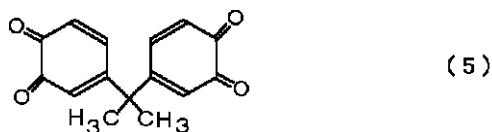
【化 4】



【0005】しかしながら、この反応は、有機溶媒を使用すること、試薬が爆発性を有すること等の理由から、工業的に不利であり、環境に対する負荷も大きいという問題がある。また、反応制御が困難で、酸化の進みすぎた式 (5) で表されるビスキノン化合物の生成が避けられないという問題も抱えている。

【0006】

【化 5】



【0007】モノキノン化合物は、その他の一般的な酸化試薬によっても合成することが可能であると考えられる。しかし、フレミー塩による結果から、ビスキノン化合物の副生を避けてモノキノン化合物のみを製造することは、試薬の量を変えたり、極めて精密な反応制御をもってしても困難であると考えられる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明において原料として用いることのできるビスフェノール A は、内分泌攪乱作用が指摘されながら大量に製造され、合成樹脂原料等として化学工業で利用されている物質である。そのため、環境中に既に大量のビスフェノール A が放出されており、湖沼水などを汚染している他、包装資材から食品へ移行することも報告されている。ビスフェノール A と類似の構造を有する化合物は種々知られており、いずれも生態系に対する影響が懸念されている。このような状況下、環境修復のための基盤技術として、このような低濃度で存在するビスフェノール類を原料として用い、新たな環境負荷を与えずに付加価値の高い物質を製造できる方法の開発が求められている。

【0009】ビスフェノール A は、2つのフェノール構造を有した化合物である。フェノール類の一般的な化学反応として、酸化反応が最も良く知られているが、ビスフェノール A の酸化反応性は必ずしも高くはない。例えば、アルカリ水溶液中、酸素雰囲気中で加熱しても、ほとんど変化せず、フェノールの酸化触媒として知られているサレンコバルト錯体存在下においても、酸素酸化をほとんど受けない。これは、化合物の立体障害や反応生成物による触媒の被毒によるためと考えられる。

【0010】本発明者らは、環境ホルモン物質が食品中でどのような化学反応を起こすのか研究する過程で、上記のような知見を得る一方で、ある種の食品中に含まれる酵素が効果的にビスフェノール A を消去することを発見した。この反応は、室温でほぼ中性の条件下で進行し、反応生成物の解析から、ビスフェノール A の一方のヒドロキシフェニル基が酸化を受けたモノキノン化合物 (前記式 (4) で表される) であることを明らかにした。

【0011】式 (4) で表されるモノキノン化合物は既知であり、一般的なフェノールの酸化剤であるフレミー塩によってビスフェノール A を酸化しても得られることが知られていた。そこで、本発明者らは、この物質の標品を得るために、同じ反応を試みたところ、試薬の量を変化させても反応収率が十分に上がらないという事実を見つけた。式 (4) で表されるモノキノン化合物は、フ

フェノール性水酸基を有していることから、さらに酸化反応が進んでいるのではないかと考え、反応生成物を詳細に調べたところ、文献未載のビスキノ化合物（前記の式（5）で表される）が副生していることを見出した。

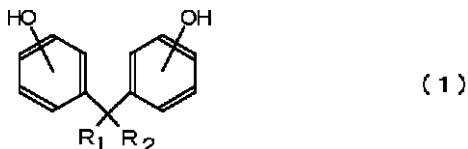
【0012】酵素反応においても、同様に反応時間の延長や酵素の追加によって上記のビスキノ化合物（5）が生成することが期待されたが、それ以上酸化反応は進行せず、常にモノキノ化合物（4）しか生成しなかった。本発明者らは、これらの知見を基に、酵素を用いた酸化反応がフェノール構造とキノ構造を併せ持つ化合物の製造に利用できるものと考えて、検討を重ね本発明に到達した。したがって、本発明の目的は、ビスフェノール構造を有する化合物の原料として、フェノール構造とキノ構造を併せ持つ化合物を酵素反応を利用して効率的に製造する方法を確立することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は一般式（1）で表されるビスフェノール化合物に、オキシゲナーゼの存在下、酸素を作用させることを特徴とする一般式（2）で表されるモノキノ化合物の製造方法に関するものである。

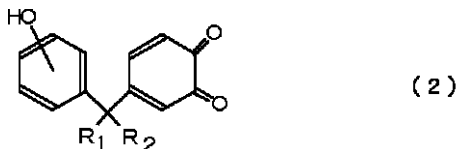
【0014】

【化6】



【0015】

【化7】



【0016】さらに、本発明は環境ホルモン物質であるビスフェノール類を、請求項1記載の方法を利用して低減化する方法に関する。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明で原料として用いる一般式（1）で表されるビスフェノール化合物は、分子内に反応点となるフェノール性水酸基を2つ有している。そこで、上記の課題を解決するためには、一方のフェノール構造がキノへ酸化した時点で、反応を終了させる必要がある。フェノールの酸化反応は、アルカリ存在下もしくはサレンコバルト錯体存在下の分子状酸素による方法が良く知られているが、ビスフェノール化合物の場合、反応が全く進行しなかったり、極めて初期の段階で停止してしまう。これは、化合物の立体的な要因や、生成したキノ体による触媒の強力な被毒が原因と見られる。

【0018】より強力な酸化剤として、フレミー塩として知られるニトロソ化合物が知られており、これを用いることにより酸化反応は進行する。しかし、この場合は、反応制御が困難であり、反応率を上げようとすると、分子内の両方のフェノールが酸化されたビスキノ体の生成が避けられなくなる。これは、原料であるビスフェノール化合物と生成物であるモノキノ化合物（前記式（2）で表され、これはモノフェノール化合物でもある）を試薬が区別することができないことが原因である。より詳細には、ビスフェノール化合物をモノキノ化合物へ酸化する反応速度と、モノキノ化合物をビスキノ化合物へ酸化する反応速度に大きな差がないためと言える。

【0019】本発明では、酵素を利用することによって、一見困難に見える上記課題を解決することに成功した。すなわち、酵素の存在下、酸素によってビスフェノール化合物を酸化すれば、ビスキノ化合物を全く生成することなく、モノキノ化合物のみを得ることができる。この理由としては、酵素が一般的に有している高い基質特異性を挙げることができる。すなわち、ビスフェノール化合物は酵素の基質となり得るが、モノキノ化合物は基質となり得ないためである。

【0020】本発明では、より一般化されたビスフェノール化合物を原料とすることができるが、このことを説明するためには、酵素の反応性を単なる基質特異性として片付けることはできない。原料であるビスフェノール化合物にも生成物であるモノキノ化合物にも、フェノール構造が含まれているのに、なぜ酵素がモノキノ化合物を基質とすることができないか明らかにする必要がある。本発明者らは、反応系に加える酵素の量が少ないと、原料が残っているのに反応が途中で停止してしまうこと、大過剰の酵素を用いたことにより原料が消失しても、モノキノ体はビスキノ体へと酸化されないこと等の知見から、本酵素反応の特異性について以下のように考察した。

【0021】まず、ビスフェノール化合物の一方のフェノール構造が酵素の反応中心に結合し、酵素による酸化を受けてキノ構造に変化する。生成したモノキノ体は、活性中心から離れるが、反応系内に蓄積することで、未反応のビスフェノール化合物に対し、拮抗的に酵素反応を阻害する。モノキノ体による酵素反応の阻害は、分子のキノ構造に由来するものと考えられ、反応速度の低下や、反応率の頭打ちをもたらす。しかし、キノ構造による阻害は、分子間においては不完全であるため、酵素の使用量を増やしたり、分割添加することによって、ほぼ全量のビスフェノール化合物をモノキノ体へと酸化することができる。

【0022】一方、モノキノ体の持っているフェノール構造が酸化されないのは、同一分子内のキノ構造による阻害が原因と考えられる。すなわち、モノキノ体

の持つフェノール構造が、たまたま酵素の活性中心に先に近付いて結合しても、同じ分子内でごく近傍に存在するキノン構造が、活性中心とのより強い結合能を持つため、活性中心との結合部位がキノン構造に置き換わってしまい、反応が進まないものと考えられる。

【0023】前記したように、本発明で用いることができる原料は、一般式(1)で表されるビスフェノール化合物である。この化合物において、水酸基の位置は、両方がパラ位もしくはメタ位、あるいはパラ位とメタ位の組み合わせである。また、 R_1, R_2 はアルキル基を指し、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基などの低級アルキル基である。

【0024】次に、酵素としては、モノフェノールを酸素によってキノンへ酸化することができるものであればよく、その由来や精製度を問わない。このような性質を持つ酵素としては、オキシゲナーゼがある。例えば、モノフェノールモノオキシゲナーゼ、チロシナーゼ、フェノラーゼ、クレゾラーゼ、モノフェノールオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼなどの名称で呼ばれているものがある。

【0025】本発明の方法は、酵素存在下、原料物質と酸素を接触させることができれば、いかなる形態で行っても良いが、例えば原料を溶解した緩衝液に酵素を添加して行う方法は好ましい方法の一つである。この場合、温度やpHは酵素が活性を保つ範囲であればよく、その範囲は用いる酵素の由来によって異なる。例えば、マッシュルーム由来の市販酵素であれば、pH6-7のリン酸緩衝液中で20-30程度の温度で行う方法は最も良好な条件である。しかし、概ね4-50、pH4-8の条件であれば、反応は進行する。

【0026】原料の濃度、酵素の濃度等については特に制限はないが、生成物が酵素反応を阻害する場合は、一般に酵素を徐々に添加したり、酵素を過剰に用いることが反応率を高める上で有効であることが知られている。したがって、本発明においても、反応率を高めるためには、原料濃度を減らして酵素量を増やすことは良い方法である。本発明は、酵素を利用することによって、低濃度の水溶液中の原料を変換できること、反応に際して副生成物が生じないこと等の大きな特色を有している。これらの特色を活かすならば、低濃度の原料に大過剰の酵素を作用させるような条件を設定することも可能である。例えば、数ppmという希薄な原料を含む水溶液に対して、反応を行うことも可能である。反応が進行する上で、酸素の存在は必須であるが、反応系を大気圧下で開放する場合、反応液の酸素濃度は空気中の酸素分圧(約0.2atm)と平衡にあるため、反応の進行によって一時的に反応液の酸素濃度が低下しても空気中の酸素が溶け込んで補われる。それ故、特に酸素を加える必要はない。しかし、反応速度を高めたい場合や、基質濃度が高く多量の酸素を消費する場合には、積極的に系内

の酸素濃度を高めることは有効である。例えば、反応液を酸素雰囲気下に置いて接する酸素分圧を高めたり、あらかじめ反応液に酸素を吹き込んで飽和させておくことは良い方法である。また、反応の進行中にたえず酸素を吹き込むことも有効である。

【0027】

【実施例】以下に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

実施例1

220 μ gのビスフェノールAを含むpH6.5の0.5mMリン酸緩衝液3mLに300unitのマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼ(別名:チロシナーゼ、フナコシ(株)製)を加え、酸素を5分間吹き込んだ後、室温で24時間静置した。クロロホルム3mLで油溶成分を抽出し、減圧濃縮後、NMRで生成物を分析した。その結果、70%のビスフェノールAが対応するモノキノン体(前記の式(4)で表される化合物)に変換された。ビスキノン体(前記の式(5)の化合物)は生成しておらず、未反応の原料が回収された。

【0028】モノキノン体のNMRデータ

^1H NMR(500.13MHz, CDCl_3)

1.54(6H, s)

4.89(1H, s)

6.23(1H, d, $J=10.3\text{Hz}$)

6.50(1H, d, $J=2.3\text{Hz}$)

6.64(1H, dd, $J=10.3, 2.3\text{Hz}$)

6.83(2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)

7.15(2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)

【0029】実施例2

91 μ gのビスフェノールAを含むpH6.5の0.5mMリン酸緩衝液3mLに300unitのマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼ(別名:チロシナーゼ、フナコシ(株)製)を加え、酸素を5分間吹き込んだ後、室温で1時間静置した。クロロホルム3mLで油溶成分を抽出し、減圧濃縮後、NMRで生成物を分析した。その結果、ほぼ100%のビスフェノールAが対応するモノキノン体に変換された。原料は回収されなかったがビスキノン体の生成も確認されなかった。

【0030】実施例3

91 μ gのビスフェノールAを含むpH6.5の0.5mMリン酸緩衝液3mLに300unitのマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼ(別名:チロシナーゼ、フナコシ(株)製)を加え、酸素を5分間吹き込んだ後、室温で2時間40分静置した。キノン構造に由来する378nmの紫外線スペクトル吸光度の変化を指標に計算すると、50%のビスフェノールAがモノキノン体に変換されていた。この反応液に150unitの酵素を追加し、さらに1時間40分静置した。クロロホルム3mLで油溶成分を抽出し、減圧濃縮後、NM

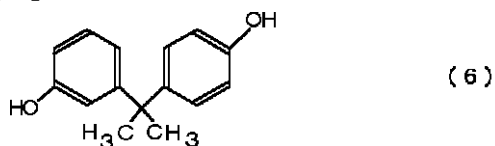
Rで生成物を分析した。その結果、80%のビスフェノールAが対応するモノキノン体に変換された。ビスキノン体の生成は確認されなかった。

【0031】実施例4

470 μ gの3,4'-イソプロピリデンジフェノール(式(6)の化合物)を含むpH6.5の0.5mMリン酸緩衝液60mLに6000unitのマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼ(別名:チロシナーゼ、フナコシ(株)製)を加え、酸素を5分間吹き込んだ後、室温で80時間静置した。クロロホルム30mLで油溶成分を抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮後、NMRで生成物を分析した。その結果、ほぼ100%のビスフェノール(式(6)の化合物)が対応するモノキノン体(式(7)の化合物)に変換された。ビスキノン体は生成していなかった。

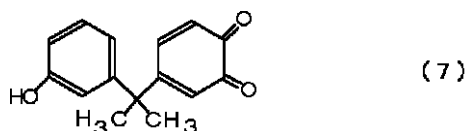
【0032】

【化8】



【0033】

【化9】



【0034】モノキノン体(式(7)の化合物)のNMRデータ

$^1\text{H NMR}$ (600.13MHz、 CDCl_3)

1.55(6H, s)
6.23(1H, d, $J=10.3\text{Hz}$)
6.50(1H, d, $J=2.2\text{Hz}$)
6.64(1H, dd, $J=10.3, 2.2\text{Hz}$)
6.75(2H, d, $J=7.9\text{Hz}$)
6.76(1H, brs)
6.84(1H, d, $J=7.9\text{Hz}$)
7.23(1H, dd, $J=7.9, 7.9\text{Hz}$)

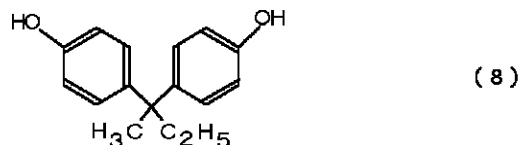
【0035】実施例5

4.6mgのビスフェノールB(式(8)の化合物)を含むpH6.5の0.5mMリン酸緩衝液60mLに6000unitのマッシュルーム由来のポリフェノールオキシダーゼ(別名:チロシナーゼ、フナコシ(株)製)を加え、酸素を5分間吹き込んだ後、室温で80時間静置した。クロロホルム30mLで油溶成分を抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮後、NMRで生成物を分析した。その結果、20%のビスフェノールB(式(8)の化合物)が対応するモノキノン体(式(9)の化合物)に変換された。ビスキノン体は生成し

ておらず、未反応の原料が回収された。

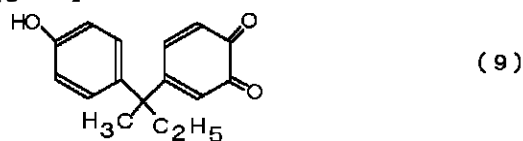
【0036】

【化10】



【0037】

【化11】



【0038】モノキノン体(式(9)の化合物)のNMRデータ

$^1\text{H NMR}$ (600.13MHz、 CDCl_3)

0.81(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$)
1.26(3H, s)
2.06(2H, q, $J=7.4\text{Hz}$)
6.21(1H, d, $J=10.4\text{Hz}$)
6.47(1H, d, $J=2.3\text{Hz}$)
6.60(1H, dd, $J=10.4, 2.3\text{Hz}$)
6.82(2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)
7.11(2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)

【0039】比較例1

リン酸二水素ナトリウム0.2gを水66gに溶解したものを分液漏斗に入れ、フレイム塩(ニトロソジスルホン酸カリウム)1.2gを加えて溶解させた。そこに、200mgのビスフェノールAをエーテル4mLに溶かしたものを加えて20分間振り混ぜた。その後、直ちにクロロホルム100mLで油溶成分を抽出した。抽出溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧で留去した。粗抽出物を $^1\text{H NMR}$ で分析したところ、モノキノン(前記式(4)で表されるもの)とビスキノン(前記式(5)で表されるもの)の混合物であった。次いで、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル=3/1)で精製し、モノキノン体式(4)の化合物を赤色アモルファスとして得た(収率15%)。また、原料の55%を回収した。副生したビスキノン体はシリカゲルカラムに強く吸着して回収されなかった。

【0040】比較例2

リン酸二水素ナトリウム1gを水330gに溶解したものを分液漏斗に入れ、フレイム塩(ニトロソジスルホン酸カリウム)6gを加えて溶解させた。そこに、500mgのビスフェノールAをエーテル10mLに溶かしたものを加えて約1時間振り混ぜた。その後、直ちにクロロホルム約500mLで油溶成分を抽出した。抽出溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去し、

茶色粉末を得た。粗抽出物を¹H NMRで分析したところ、主にビスキノン(式(5)の化合物)であったが、モノキノン(式(4)の化合物)も含まれていた。水素化カルシウムで乾燥・蒸留したクロロホルムから再結晶し、ビスキノン体の純品を赤色粉末として得た(再結晶後の収率7.7%)。

【0041】ビスキノン体(式(5)の化合物)のNMRデータ

¹H NMR(600.13MHz、CDCl₃)

1.54(6H, s)

6.44(2H, d, J=10.3Hz)

6.48(2H, d, J=2.4Hz)

6.86(2H, dd, J=10.3, 2.4Hz)

【0042】比較例3

水酸化カリウム25mgを水100mLに溶解したものに10mgのビスフェノールAを加えて溶かし、酸素雰囲気下100℃で一晩加熱攪拌した。この反応液を5日間室温に静置した後、油溶成分をクロロホルム50mLで抽出し、抽出溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られた成分のNMRとFABMSを測定したところ、主な成分は未反応のビスフェノールAであった。

【0043】比較例4

ジメチルホルムアミド10mLにビスフェノールA200mgを溶かした。そこに、コバルトサルコミン330mgを加え、キャピラリで酸素を吹き込みながら室温で

約24時間攪拌した。その後、油溶成分をエーテルで抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去したところ、白色固体が得られた。これを¹H NMRで分析したところ、未反応のビスフェノールAであった。

【0044】

【発明の効果】本発明によれば、ビスフェノール類を原料として、分子内にキノン構造とフェノール構造を併せ持ったモノキノン化合物を効率よく製造することができる。本発明により得られるモノキノン化合物の最も有利な原料の一つは、環境ホルモン様作用の疑いがあるビスフェノール類である。また、モノキノン化合物は、化学的な反応性が高いため、ビスフェノール類を原料として他の化学製品を製造するための有用な合成中間体とすることができる。

【0045】一方、ビスフェノール類は、大量に工業生産され合成樹脂等の原料として利用されているが、このものは化学的に極めて安定であるため、自然界にそのままの化学形態で長く残存したり、包装資材から食品へ移行して、生物の内分泌系を攪乱することが疑われている。本発明によれば、モノキノン化合物の製造原料として、排水や湖沼水、食品中に含まれる環境汚染物質としてのビスフェノール類を用いることが可能である。したがって、本発明は環境や食品を汚染しているビスフェノール類を低減化するための基礎技術としての利用、開発が期待される。

フロントページの続き

(71)出願人 598026688
忠田 吉 弘
茨城県つくば市吾妻1丁目1番1号603棟
520号

(71)出願人 300020717
森 美子
茨城県龍ヶ崎市小柴4-6-1-5-305

(72)発明者 小野 裕嗣
茨城県つくば市吾妻1丁目1番1号603棟
805号

(72)発明者 吉田 充
茨城県つくば市並木4丁目11番地915-303

(72)発明者 忠田 吉 弘
茨城県つくば市吾妻1丁目1番1号603棟
520号

(72)発明者 森 美子
茨城県龍ヶ崎市小柴4-6-1-5-305

Fターム(参考) 4B064 AD92 CA21 DA16