

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6725144号
(P6725144)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月29日(2020.6.29)

(51) Int. Cl.		F I	
CO7D 209/44	(2006.01)	CO7D	209/44
CO7C 321/26	(2006.01)	CO7C	321/26
CO7C 321/10	(2006.01)	CO7C	321/10
GO1N 24/08	(2006.01)	GO1N	24/08

510Q

請求項の数 9 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-173792 (P2016-173792)
(22) 出願日	平成28年9月6日(2016.9.6)
(65) 公開番号	特開2018-39747 (P2018-39747A)
(43) 公開日	平成30年3月15日(2018.3.15)
審査請求日	令和1年5月17日(2019.5.17)

(73) 特許権者	504145283 国立大学法人 和歌山大学 和歌山県和歌山市栄谷930番地
(74) 代理人	110002332 特許業務法人 綾船国際特許事務所
(74) 代理人	100127133 弁理士 小坂橋 浩之
(72) 発明者	坂本 隆 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学 法人北陸先端科学技術大学院大学 先端科学 技術研究科内

審査官 水島 英一郎

最終頁に続く

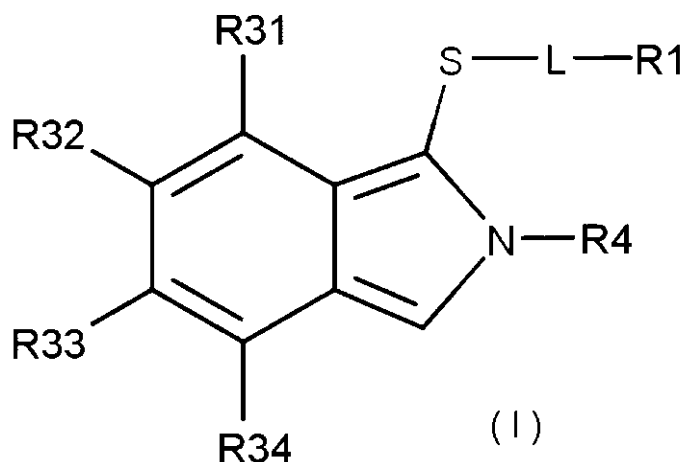
(54) 【発明の名称】 アミノ酸分析法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の式 I :

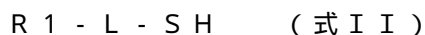
【化1】



(ただし、式 I 中、R1-L 基、R4 基、R31 基、R32 基、R33 基、R34 基は、それぞれ式 II、式 III、及び式 IV 中の基として以下に示す基である)

で表される含フッ素アミノ酸化合物を製造する方法であって、

次の式 I I :



(ただし、式 I I 中、

R 1 基が、以下から選択される基であり :

1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基 ;

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基 :
フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基 (ただし、置換されたアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む) ;

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、1 個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基 : フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基 (ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む)、

L 基が、- SH 基と R 1 基との間のリンカー部分であって、単結合、又は C 1 ~ C 3 のアルカンの 2 価基であり、L 基が単結合の場合には R 1 - L - SH の構造式は、R 1 - S H となる)

で表される含フッ素チオール化合物と、

次の式 I I I :



(ただし、式 I I I 中、R 4 基は、次の式 :

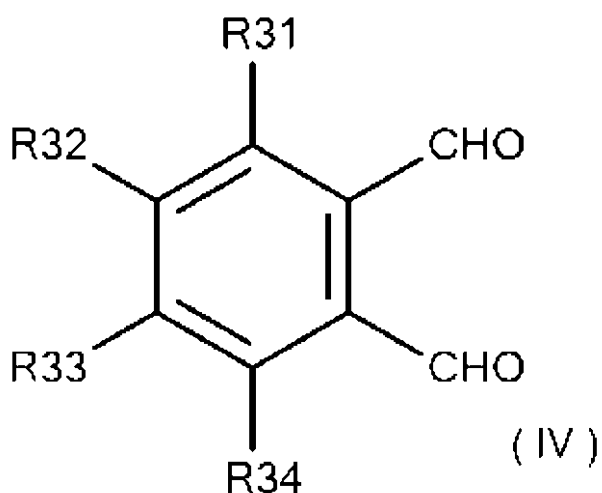


で表される基であり、R 4 基中、R 2 はアミノ酸の側鎖の基を表し、k は 1 ~ 3 の整数である)

で表されるアミノ酸と、

次の式 I V :

【化 2】



(ただし、式 I V 中、R 3 1、R 3 2、R 3 3、R 3 4 は、それぞれ独立に、以下から選択される基である :

水素原子、ハロゲン原子、C 1 ~ C 3 のアルキル基、水酸基、カルボン酸基、ニトロ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、シアノ基、ニトロ基、あるいは、例えば、R 3 1、R 3 2、R 3 3、R 3 4 の 2 個以上が一体となって、ベンゼン環構造あるいは複素環構造を形成してもよい)

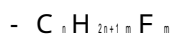
で表されるオルトフタルアルデヒド化合物を反応させる工程、を含む方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の製造方法によって製造された含フッ素アミノ酸化合物の 1 種又は 2 種以上を含む試料を、核磁気共鳴測定して、該 1 種又は 2 種以上の含フッ素アミノ酸化合物を検出する工程、を含む、アミノ酸分析方法。

【請求項 3】

1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基が、

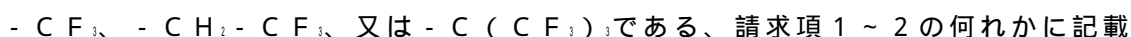


(ただし、n は 1 以上 4 以下の整数、m は 1 以上の整数、 $2n + 1 - m$ は 0 以上の整数である)

である、請求項 1 ~ 2 の何れかに記載の方法。

【請求項 4】

1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基が、



である、請求項 1 ~ 2 の何れかに記載の方法。

【請求項 5】

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基：フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基（ただし、置換されたアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）が、

1 個以上の水素原子が、水酸基、メチル基、フッ素原子、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ によって置換された、フェニル基又はナフチル基（ただし、置換されたフェニル基又はナフチル基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）である、請求項 1 ~ 4 の何れかに記載の方法。

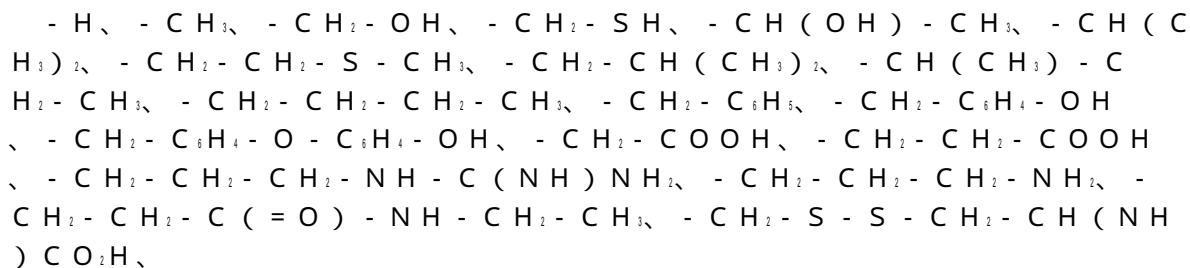
【請求項 6】

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、1 個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基：フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）が、

1 個以上の水素原子が、水酸基、メチル基、フッ素原子、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ によって置換された、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリジダジン、キノリン、イソキノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、インドール、イソインドール、インダゾールの 1 価基である（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）、請求項 1 ~ 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 7】

R 2 基が、以下から選択される基である、請求項 1 ~ 6 の何れかに記載の方法：



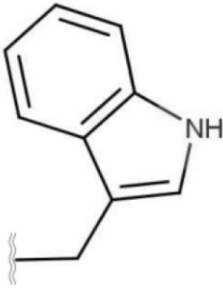
10

20

30

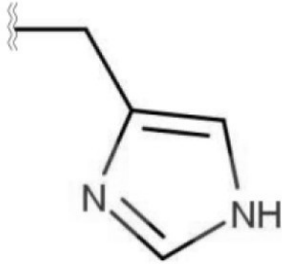
40

【化 3】



10

【化 4】

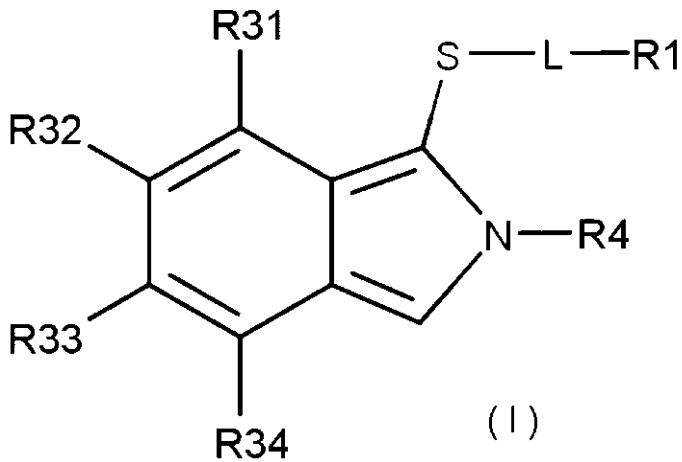


20

【請求項 8】

請求項 1 に記載の、 次の式 I :

【化 5】



(ただし、式 I 中、R 1 - L 基、R 4 基、R 3 1 基、R 3 2 基、R 3 3 基、R 3 4 基は、それぞれ式 II、式 III、及び式 IV 中の基として、請求項 1 に示される基である) で表される含フッ素アミノ酸化合物。

40

【請求項 9】

請求項 8 に記載の含フッ素アミノ酸化合物からなる、¹⁹F 核磁気共鳴測定マーカー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノ酸分析法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液や食品などの生物由来試料に含まれるアミノ酸含有量の分布は、汎用的な生体分子マーカーの 1 つである。アミノ酸含有量の分布の分析は、疾患や疾患リスクの診断、食品

50

の品質管理、生化学研究などに広く使用されている。

【0003】

アミノ酸分析（アミノ酸含有量分布の分析）は、通常、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて行われる（例えば、特許文献1）。この手法には、大別して、アミノ酸を蛍光性の化合物等で化学修飾（誘導体化）して、その後HPLCによる分離と検出を行う方法（プレカラム法）と、HPLCによるアミノ酸の分離の後に、蛍光性の化合物等で化学修飾（誘導体化）して検出する方法（ポストカラム法）がある。

【0004】

HPLCを用いたアミノ酸分析では、「誘導体化」、「分離」及び「検出」の工程が、逐次的に連続して行われるために、結果として、HPLCを用いたアミノ酸分析では、1つの試料の分析に少なくとも1時間以上の時間を要することが通常である。特に、分離の工程では、アミノ側鎖の化学的性質に依存するカラム担体との親和性の違いによる保持時間の遅延によって分離が行われるために、例えば30～50分などの大きなタイムロスを生じる。また、アミノ酸分析のHPLCとして逆相HPLCが広く使用されているが、この逆相HPLCを用いる場合には、アセトニトリルやメタノールなどの劇物指定の有機溶媒を移動相として流路に多量に使用することが必須であるので、保管や廃棄処理に要する負担が大きい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2003-083946号公開特許公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このように、劇物指定の有機溶媒の多量の使用を回避し、HPLCを使用することなく、短時間で分析結果を得ることができる、新しいアミノ酸分析の手段が、求められていた。

【0007】

したがって、本発明の目的は、HPLCの使用を必須としない、新しいアミノ酸分析の手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、アミノ酸分析技術について、鋭意研究してきたところ、HPLCによるアミノ酸分析のために使用されているオルトフタルアルデヒド法（OPA法）によるアミノ酸の蛍光誘導体化反応において、通常使用されるメルカプトエタノール（ME）に代えて、特定のフッ素含有チオールを用いてアミノ酸の誘導体化を行ったところ、このアミノ酸誘導体に対してNMRスペクトル測定を行うと、フッ素原子のNMR信号が近傍に位置するアミノ酸側鎖の化学的性質に応じてケミカルシフトが変化して、結果としてアミノ酸分析ができることを見いだして、本発明に到達した。

【0009】

したがって、本発明は次の（1）以下を含む。

（1）

次の式I：

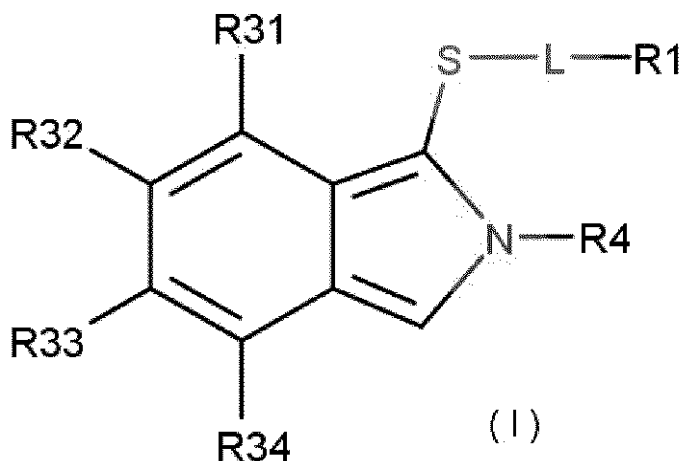
10

20

30

40

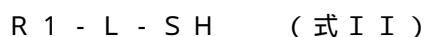
【化 1】



(ただし、式 I 中、R 1 - L 基、R 4 基、R 3 1 基、R 3 2 基、R 3 3 基、R 3 4 基は、それぞれ式 II、式 III、及び式 IV 中の基として以下に示す基である)

で表される含フッ素アミノ酸化合物を製造する方法であって、

次の式 II :



20

(ただし、式 II 中、

R 1 基が、以下から選択される基であり :

1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基 ;

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基 :

フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基 (ただし、置換されたアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む) ;

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、1 個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基 : フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基 (ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む)、

30

L 基が、- S H 基と R 1 基との間のリンカー部分であって、単結合、又は C 1 ~ C 3 のアルカンの 2 価基であり、L 基が単結合の場合には R 1 - L - S H の構造式は、R 1 - S H となる)

で表される含フッ素チオール化合物と、

次の式 III :



(ただし、式 III 中、R 4 基は、次の式 :



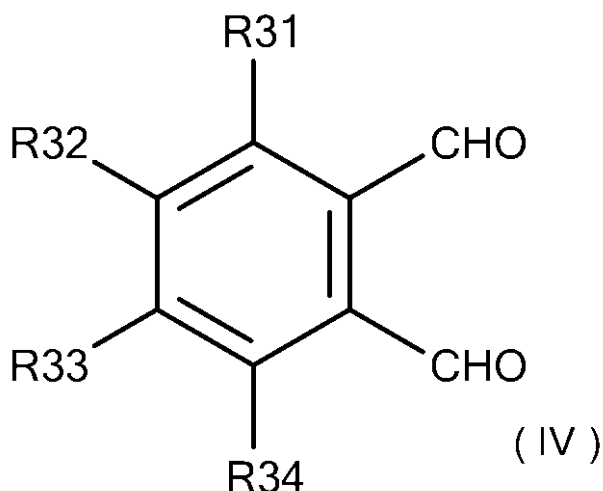
40

で表される基であり、R 4 基中、R 2 はアミノ酸の側鎖の基を表し、k は 1 ~ 3 の整数である)

で表されるアミノ酸と、

次の式 IV :

【化 2】



(ただし、式IV中、R31、R32、R33、R34は、それぞれ独立に、以下から選択される基である：

水素原子、ハロゲン原子、C1～C3のアルキル基、水酸基、カルボン酸基、ニトロ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、シアノ基、ニトロ基、あるいは、例えば、R31、R32、R33、R34の2個以上が一体となって、ベンゼン環構造あるいは複素環構造を形成してもよい)

で表されるオルトフタルアルデヒド化合物を反応させる工程、を含む方法。

(2)

(1)に記載の製造方法によって製造された含フッ素アミノ酸化合物の1種又は2種以上を含む試料を、核磁気共鳴測定して、該1種又は2種以上の含フッ素アミノ酸化合物を検出する工程、

を含む、アミノ酸分析方法。

(3)

1個以上の水素原子がフッ素原子で置換されたC1～C4のアルキル基が、

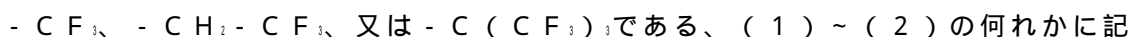


(ただし、nは1以上4以下の整数、mは1以上の整数、2n+1-mは0以上の整数である)

である、(1)～(2)の何れかに記載の方法。

(4)

1個以上の水素原子がフッ素原子で置換されたC1～C4のアルキル基が、



である、(1)～(2)の何れかに記載の方法。

(5)

1個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基：フッ素原子、又は1個以上の水素原子がフッ素原子で置換されたC1～C4のアルキル基、水酸基、C1～C2のアルキル基(ただし、置換されたアリール基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む)が、

1個以上の水素原子が、水酸基、メチル基、フッ素原子、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ によって置換された、フェニル基又はナフチル基(ただし、置換されたフェニル基又はナフチル基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む)である、(1)～(4)の何れかに記載の方法。

(6)

1個以上の水素原子が次の基で置換された、1個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基：フッ素原子、又は1個以上の水素原子がフ

20

30

40

50

フッ素原子で置換された C 1 ~ C 4 のアルキル基、水酸基、C 1 ~ C 2 のアルキル基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）が、

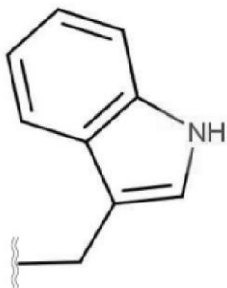
1 個以上の水素原子が、水酸基、メチル基、フッ素原子、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ によって置換された、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリジダジン、キノリン、イソキノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、インドール、イソインドール、インダゾールの 1 価基である（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）、(1) ~ (4) の何れかに記載の方法。

(7)

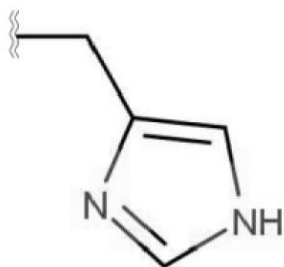
R 2 基が、以下から選択される基である、(1) ~ (6) の何れかに記載の方法：

- H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-OH$ 、 $-CH_2-SH$ 、 $-CH(OH)-CH_3$ 、 $-CH(C_6H_5)_2$ 、 $-CH_2-CH_2-S-CH_3$ 、 $-CH_2-CH(C_6H_5)_2$ 、 $-CH(C_6H_5)-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-C_6H_5$ 、 $-CH_2-C_6H_4-OH$ 、 $-CH_2-C_6H_4-O-C_6H_4-OH$ 、 $-CH_2-COOH$ 、 $-CH_2-CH_2-COOH$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-C(=O)-NH-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-S-S-CH_2-CH(NH)CO_2H$ 、

【化 3】



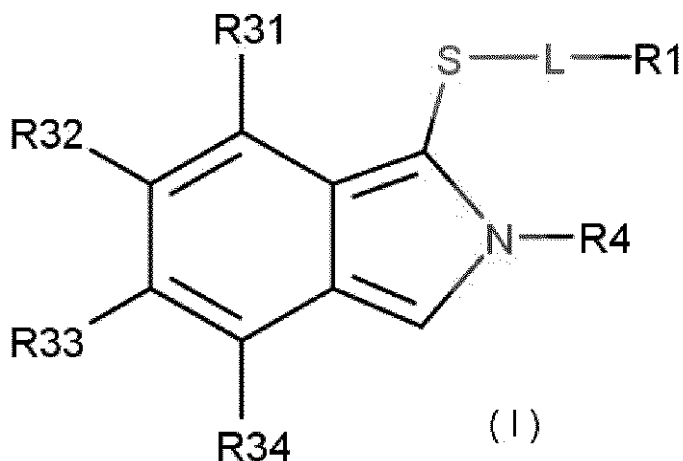
【化 4】



(8)

(1) に記載の、 次の式 I :

【化 5】



(ただし、式 I 中、R 1 - L 基、R 4 基、R 3 1 基、R 3 2 基、R 3 3 基、R 3 4 基は、それぞれ式 II、式 III、及び式 IV 中の基として、(1) に示される基である) で表される含フッ素アミノ酸化合物。

(9)

(8) に記載の含フッ素アミノ酸化合物からなる、¹⁹F 核磁気共鳴測定マーカー。

20

(10)

(1) に記載の、次の式 II :



(ただし、式 II 中、R 1 基、L 基は、それぞれ式 II 中の基として、(1) に示される基である)

で表される含フッ素チオール化合物。

(11)

(10) に記載の含フッ素チオール化合物からなる、¹⁹F 核磁気共鳴測定マーカー化用修飾剤。

(12)

(10) に記載の含フッ素チオール化合物を、オルトフタルアルデヒド及びアミノ酸と反応させて、含フッ素アミノ酸化合物を製造する方法。

30

【発明の効果】

【0010】

本発明は、HPLCの使用を必須としない、新しいアミノ酸分析の手段を提供する。本発明によれば、劇物指定の有機溶媒の多量の使用を回避できる。本発明によれば、アミノ酸分析において、アミノ酸の分離の工程を行うことなく、短時間で、アミノ酸分析の結果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1 A】図 1 A は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 OPA 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 1 B】図 1 B は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 OPA 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 1 C】図 1 C は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 OPA 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 1 D】図 1 D は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 OPA 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 2 A】図 2 A は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 OPA 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

40

50

【図 2 B】図 2 B は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 2 C】図 2 C は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 3 A】図 3 A は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 3 B】図 3 B は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 4 A】図 4 A は構造式に示されたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 4 B】図 4 B は構造式に示されたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 5】図 5 は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたアミノ酸 O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 6】図 6 は構造式に示された含フッ素チオールにより得られたテアニン O P A 誘導体化合物の¹⁹F NMRスペクトルである。

【図 7】図 7 は O P A、含フッ素チオール及び - アミノ酸からの式 V の含フッ素アミノ酸化合物の合成を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

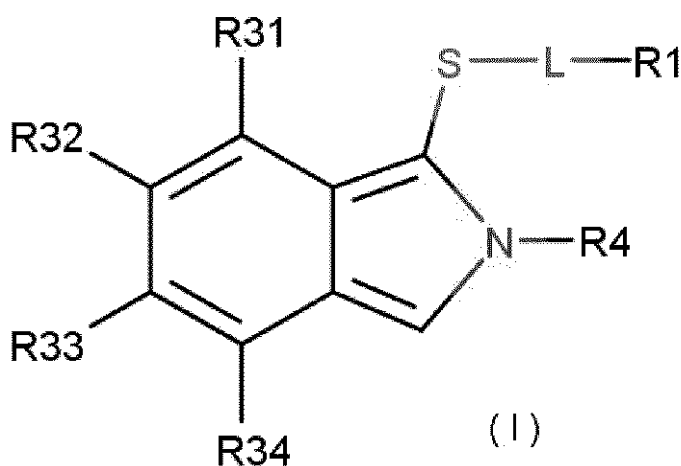
具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施の形態に限定されるものではない。

【0013】

[アミノ酸分析の方法]

本発明によるアミノ酸分析の方法は、試料中のアミノ酸から、次の式 I :

【化 6】



の含フッ素アミノ酸化合物を製造して、核磁気共鳴によって¹⁹Fケミカルシフトを測定することによって、行うことができる。上記式 I 中の R 1 基、L 基、R 4 基、R 3 1 基、R 3 2 基、R 3 3 基、R 3 4 基は、後述する式 I I で表される含フッ素チオール化合物、式 I I I で表されるアミノ酸、式 I V で表されるオルトフタルアルデヒド化合物の中の基に由来する。以下で含フッ素アミノ酸化合物を含フッ素アミノ酸誘導体ということがある。

【0014】

[含フッ素アミノ酸化合物の製造]

本発明において、含フッ素アミノ酸化合物の製造は、次の式 I I :

R 1 - L - S H (式 I I)

で表される含フッ素チオール化合物と、次の式 I I I :

10

20

50

$H_2N - R_4$ (式 I I I)

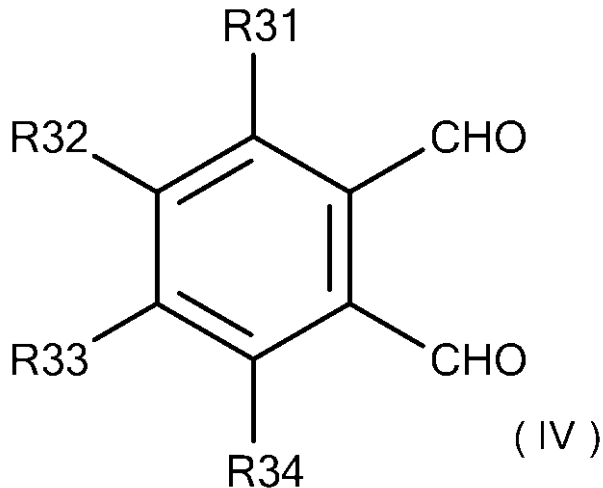
(ただし、式 I I I 中、 R_4 基は、次の式：



で表される基であり、 R_4 基中、 R_2 はアミノ酸の側鎖の基を表し、 k は 1 ~ 3 の整数である)

で表されるアミノ酸と、次の式 I V :

【化 7】

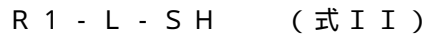


で表されるオルトフタルアルデヒド化合物を反応させることによって行われる。

【0015】

[含フッ素チオール化合物]

本発明における含フッ素チオール化合物は、次の式 I I :



で表される。

【0016】

[R_1 基]

式 I I において、 R_1 基は、以下から選択される基とすることができる：

1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された $C_1 \sim C_4$ のアルキル基；

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基：

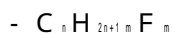
フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された $C_1 \sim C_4$ のアルキル基、水酸基、 $C_1 \sim C_2$ のアルキル基（ただし、置換されたアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）；

1 個以上の水素原子が次の基で置換された、1 個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基： フッ素原子、又は 1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された $C_1 \sim C_4$ のアルキル基、水酸基、 $C_1 \sim C_2$ のアルキル基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも 1 個のフッ素原子又は少なくとも 1 個のフルオロアルキル基を含む）。

【0017】

[フルオロアルキル基]

上記 R_1 基について、好適な実施の態様において、1 個以上の水素原子がフッ素原子で置換された $C_1 \sim C_4$ のアルキル基は、次の式：



(ただし、 n は 1 以上 4 以下の整数、 m は 1 以上の整数、 $2n + 1 - m$ は 0 以上の整数である)

で表されるフルオロアルキル基とすることができる。

【0018】

好ましいフルオロアルキル基としては、例えば、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、 $-C(CF_3)_3$ を挙げることができ、特に $-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ が好ましい。

【0019】

[フルオロアリール基]

上記R1基について、好適な実施の態様において、1個以上の水素原子が次の基で置換された、単環式、二環式又は三環式のアリール基：フッ素原子、又は1個以上の水素原子がフッ素原子で置換されたC1～C4のアルキル基、水酸基、C1～C2のアルキル基（ただし、置換されたアリール基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）としては、

例えば、1個以上の水素原子が、フッ素原子、水酸基、メチル基、エチル基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ で置換された、フェニル基又はナフチル基（ただし、置換されたアリール基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）を使用することができ、

例えば、1～3個の水素原子が、水酸基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ で置換された、フェニル基又はナフチル基（ただし、置換されたアリール基は、少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）を使用することができる。

【0020】

[フルオロヘテロアリール基]

上記R1基について、好適な実施の態様において、1個以上の水素原子が次の基で置換された、1個以上のヘテロ原子を環に有する、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基：フッ素原子、又は1個以上の水素原子がフッ素原子で置換されたC1～C4のアルキル基、水酸基、C1～C2のアルキル基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）としては、

例えば、1個以上の水素原子が、フッ素原子、水酸基、メチル基、エチル基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ で置換された、単環式又は二環式のヘテロアリール基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも1個のフッ素原子又は少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）を使用することができ、

例えば、1～3個の水素原子が、水酸基、 $-CF_3$ 、 $-CH_2-CF_3$ 、又は $-C(CF_3)_3$ で置換された、単環式又は二環式のヘテロアリール基（ただし、置換されたヘテロアリール基は、少なくとも1個のフルオロアルキル基を含む）を使用することができる。

【0021】

[ヘテロアリール基]

単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基のヘテロ原子としては、例えば、窒素原子(N)、硫黄原子(S)をあげることができる。好適な実施の態様において、単環式、二環式又は三環式のヘテロアリール基として、例えば、窒素原子をヘテロ原子として有する単環式又は二環式のヘテロアリール基をあげることができ、例えば、以下のアリールの1価基をあげることができる：イミダゾール、ピラゾール、トリアゾール、フラン、チオフェン、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリジダジン、トリアジン、オキサゾール、チアゾール、キノリン、イソキノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、インドール、イソインドール、インダゾール、ベンゾイミダゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾトリアゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン。

【0022】

[L基]

式IIにおいて、L基は、 $-SH$ 基とR1基との間のリンカー部分であって、単結合、又はC1～C3のアルカンの2価基とすることができる。好適な実施の態様において、L基は、例えば、単結合、メチレン基、エチレン基とすることができる。L基が単結合である場合とは、R1-L-SHの構造式が、R1-SHとなる場合である。

【0023】

[アミノ酸]

10

20

30

40

50

本発明におけるアミノ酸として、次の式 I I I :



(ただし、式 I I I 中、R₄ 基は、次の式 :



で表される基であり、R₄ 基中、R₂ はアミノ酸の側鎖の基を表し、k は 1 ~ 3 の整数である)

で表されるアミノ酸を使用できる。このアミノ酸として、天然又は非天然のアミノ酸を使用できる。アミノ酸は、それぞれの側鎖である R₂ 基の化学構造に対応して、それぞれ異なる含フッ素アミノ酸化合物 (式 I) を生成して、その構造に応じた¹⁸F ケミカルシフトを生じる。

10

【0024】

[R₄ 基]

R₄ 基において、k が 1 である場合には、式 I I I のアミノ酸は、 $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ を表し、k が 2 である場合には、式 I I I のアミノ酸は、 $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ を表し、k が 3 である場合には、式 I I I のアミノ酸は、 $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ を表す。 $\text{H}_2\text{N} - \text{R}_4$ アミノ酸としては、例えば、タンパク質を構成する天然のアミノ酸、タンパク質を構成しない天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸をあげることができる。 $\text{H}_2\text{N} - \text{R}_4$ アミノ酸としては、例えば、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、ヒドロキシリシン、ホスホセリン、サイロキシン、オルニチン、テアニン、イボテン酸をあげることができる。 $\text{H}_2\text{N} - \text{R}_4$ アミノ酸としては、例えば、 $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ アラニン、シトルリンをあげることができる。 $\text{H}_2\text{N} - \text{R}_4$ アミノ酸としては、例えば、 $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ アミノ酪酸 (GABA) をあげることができる。これらのアミノ酸は、それが検出の対象であるから、その構造に制限はなく、上記例示したアミノ酸に限られるものではない。

20

【0025】

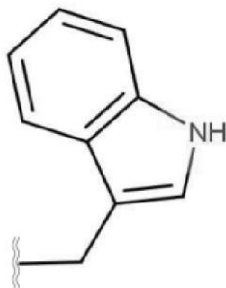
[R₂ 基]

式 I I I の R₄ 基において、R₂ 基は、アミノ酸の側鎖である基であって、それが検出の対象であるから、その構造に制限はない。典型的な側鎖として、R₂ 基は、例えば、以下の基とすることができる :

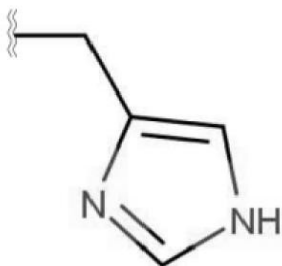
30

- H、- CH₃、- CH₂-OH、- CH₂-SH、- CH(OH)-CH₃、- CH(C₂H₅)₂、- CH₂-CH₂-S-CH₃、- CH₂-CH(CH₃)₂、- CH(CH₃)-CH₂-CH₃、- CH₂-CH₂-CH₂-CH₃、- CH₂-C₆H₅、- CH₂-C₆H₄-OH、- CH₂-C₆H₄-O-C₆H₄-OH、- CH₂-COOH、- CH₂-CH₂-COOH、- CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(NH)NH₂、- CH₂-CH₂-CH₂-NH₂、- CH₂-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-CH₃、- CH₂-S-S-CH₂-CH(NH₂)CO₂H、

【化 8】



【化 9】



。

10

【0026】

[オルトフタルアルデヒド化合物]

本発明において、式IVで表されるオルトフタルアルデヒド化合物を使用できる。式IV中、R31、R32、R33、R34は、それぞれ独立に、例えば、以下から選択される基とすることができる：

水素原子、ハロゲン原子、C1～C3のアルキル基、水酸基、カルボン酸基、ニトロ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、シアノ基、ニトロ基、あるいは、例えば、R31、R32、R33、R34の2個以上が一体となって、ベンゼン環構造あるいは複素環構造を形成してもよい。

好適な実施の態様において、R31、R32、R33、R34は、それぞれ独立に、水素原子又はメチル基とすることができる。

20

【0027】

好適な実施の態様において、R31、R32、R33、R34の2個以上が一体となって、環構造を形成してもよく、例えば、R32、R33が一体となって芳香環を形成してもよく、例えば、R32、R33が一体となって芳香環を形成して、式IVの環構造をナフタレン環、アントラセン環やピレン環としてもよい。

【0028】

好適な実施の態様において、オルトフタルアルデヒド化合物として、例えば、オルトフタルアルデヒド(OPA)を使用できる。

【0029】

[合成反応]

含フッ素アミノ酸化合物の合成の反応は、実施例に示すように、反応させるオルトフタルアルデヒド化合物、アミノ酸、含フッ素チオール化合物を、例えば、大気圧下、室温にて、溶媒中で混合することによって短時間、例えば20秒～120秒の時間で、進行させることができる。

30

【0030】

[複数種類のアミノ酸の混合試料]

含フッ素アミノ酸化合物の合成の反応にあたって、複数種類のアミノ酸の混合試料と、オルトフタルアルデヒド化合物、含フッ素チオール化合物を用いて合成反応を進行させて、複数種類の含フッ素アミノ酸化合物の混合試料を得ることができる。

40

【0031】

[核磁気共鳴測定]

含フッ素アミノ酸化合物は、そのR2基の構造に応じて¹⁹Fケミカルシフトが変化しており、これを核磁気共鳴法によって検出することができる。このために使用可能な手段、条件、装置等としては、公知の手段、条件、装置等を使用することができる。

【0032】

核磁気共鳴法(NMR法)による測定によって得られるNMR信号は、物質透過性が高いために、着色した試料や若干の濁りのある試料等でも検出ができる。また、検出核種が¹⁹Fであるために、生体分子由来のバックグラウンド信号が低い。

【0033】

50

[複数種類の含フッ素アミノ酸化合物の混合試料]

核磁気共鳴法（NMR法）による測定を行う試料中に、複数の含フッ素アミノ酸化合物が含まれている場合には、これらの含フッ素アミノ酸化合物をそれぞれ分離する必要はなく、複数の種類の含フッ素アミノ酸化合物の混合した試料を同時に測定して、それぞれの含フッ素アミノ酸化合物の含有量を測定して、その含有量の比率を求めることができる。ただし、所望により、複数の種類の含フッ素アミノ酸化合物を、それぞれ分離した後に、測定することもできる。

【 0034 】

[アミノ酸分析]

本発明によれば、複数種類のアミノ酸の混合試料に対して、オルトフタルアルデヒド化合物、含フッ素チオール化合物を用いて合成反応を進行させて、複数種類の含フッ素アミノ酸化合物の混合試料を得て、これに対してNMR測定を行って、混合試料中に含まれる含フッ素アミノ酸化合物の含有量を測定することによって、複数種類のアミノ酸の混合試料中に含まれていた各アミノ酸の含有量と含有量の比率を求めることができる。

【 0035 】

本発明のアミノ酸分析によれば、分析の対象となる複数種類のアミノ酸の混合試料として、生体由来の試料を使用することができ、着色した試料や若干の濁りのある試料等を使用することができる。

【 0036 】

本発明によれば、上記のアミノ酸分析は、合成反応の作業時間として例えば5分間、NMR測定の作業時間として例えば2分間としても、十分な精度の測定が可能であり、工程全体に要する時間は、例えば7分間程度とすることができる。従来のHPLCを使用したアミノ酸分析においては、HPLCによる分離と検出の工程だけでも60分程度を要していたので、本発明によれば、アミノ酸分析の所要時間を、約1/10へと短縮できたことになる。加えて、従来のHPLCを使用したアミノ酸分析においては、少なくとも分析あたり数十mL程度を必要としていた、アセトニトリルやメタノールなどの劇物指定の有機溶媒の使用量を、本発明ではほぼゼロにすることができた。

【 0037 】

[複数の種類の含フッ素チオール化合物の使用]

合成反応に使用する含フッ素チオール化合物を、異なる含フッ素チオール化合物へと変更すれば、同一のアミノ酸混合試料からも、異なった含フッ素アミノ酸化合物混合試料を得ることができ、NMR測定によって出現する¹⁹Fのピークも、異なった位置になる。そこで、複数の種類の含フッ素チオール化合物を使用することによって、同一のアミノ酸混合試料から、異なった位置に¹⁹Fのピークを有するNMR測定結果を得て、これを対比することによって、アミノ酸混合試料中に含まれていた各アミノ酸の含有量と含有量の比率を、より高精度で求めることができる。したがって、複数の種類の含フッ素チオール化合物を、組み合わせて使用すれば、1種類の含フッ素チオール化合物による使用だけでは、分離しにくい位置に¹⁹Fのピークを有するアミノ酸混合物であっても、より有利にアミノ酸分析を行うことができる。

【 0038 】

[¹⁹F核磁気共鳴測定マーカー]

本発明の含フッ素アミノ酸化合物は、¹⁹F核磁気共鳴測定マーカー、¹⁹F核磁気共鳴測定用アミノ酸分析マーカーとして使用できる。また、本発明の含フッ素チオール化合物は、¹⁹F核磁気共鳴測定マーカー化用修飾剤、¹⁹F核磁気共鳴測定マーカー化用アミノ酸修飾剤として使用できる。

【 実施例 】

【 0039 】

以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。

【 0040 】

10

20

30

40

50

[実施例 1]

[様々なフッ素含有チオールを用いたアミノ酸標準混合液の検出]

[OPA反応]

50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (50 μ L) にアミノ酸標準混合液H型 (Wako) (17種類のアミノ酸混合液 (各1 mM)) (50 μ L)、後述する含フッ素チオールのエタノール溶液 (100 mM, 50 μ L) およびオルトフタルアルデヒド (OPA) のエタノール溶液 (100 mM, 25 μ L) を添加し、室温で1分反応させた。

【 0 0 4 1 】

[使用した含フッ素チオール]

上記操作において、含フッ素チオールとして、以下の化合物を使用した。これらの含フッ素チオールの構造式を、図 1 A ~ 図 3 B の左側に示す。図 1 A ~ 図 3 B の中央に記載された構造式、すなわち各含フッ素チオールの構造式のそれぞれ右側に記載された構造式は、それぞれの含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式である。アミノ酸OPA誘導体化合物の構造式中のR基は、アミノ酸の側鎖であり、それぞれのアミノ酸に対応して異なるものとなる。

2 (trifluoromethyl)benzenethiol (図 1 A の左側の構造式)

3 (trifluoromethyl)benzenethiol (図 1 B の左側の構造式)

4 t(trifluoromethyl)benzenethiol (図 1 C の左側の構造式)

3,5 bis(trifluoromethyl)benzenethiol (図 1 D の左側の構造式)

2 (trifluoromethyl)phenylmethanethiol (図 2 A の左側の構造式)

3 (trifluoromethyl)phenylmethanethiol (図 2 B の左側の構造式)

4 (trifluoromethyl)phenylmethanethiol (図 2 C の左側の構造式)

2 Mercapto 5 (trifluoromethyl)pyridine (図 3 A の左側の構造式)

2 Mercapto 6 (trifluoromethyl) 4 pyrimidinol (図 3 B の左側の構造式)

【 0 0 4 2 】

[19 F NMR測定]

OPA反応後の反応液に50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (250 μ L)、トリフルオロ酢酸 (5 mM, 25 μ L (ケミカルシフトの内部標準))、重水 (50 μ L (溶媒シグナルロックのため)) を添加し、NMR試料管に移した後、NMR装置 (Bruker Avance III 500 MHz NMR system) にて 19 F NMRスペクトル (積算回数NT = 1024) を測定した。

【 0 0 4 3 】

[測定結果]

測定の結果、得られたスペクトルを、図 1 A ~ 図 3 B の右側のグラフとして示す。上述の通り、各図において、左側から順に、使用した含フッ素チオールの構造式 (各図左側)、含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式 (各図中央)、 19 F NMRスペクトル (各図右側) を示している。

【 0 0 4 4 】

[実施例 2]

[様々なフッ素含有チオールを用いたアミノ酸標準混合液の検出]

[OPA反応]

50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (50 μ L) に各アミノ酸溶液 (1 mM, 50 μ L)、含フッ素チオールのエタノール溶液 (100 mM, 50 μ L) およびオルトフタルアルデヒド (OPA) のエタノール溶液 (100 mM, 25 μ L) を添加し、室温で1分反応させた。

【 0 0 4 5 】

[使用した含フッ素チオール]

上記操作において、含フッ素チオールとして、以下の化合物を使用した。それぞれの含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式を、図 4 A 及び図 4 B へそれぞれ示す。

3 (trifluoromethyl)benzenethiol (図 4 A)

4 (trifluoromethyl)benzenethiol (図 4 B)

【 0 0 4 6 】

[¹⁹F NMR測定]

OPA反応後の反応液に50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (250 μL)、トリフルオロ酢酸 (5 mM, 25 μL (ケミカルシフトの内部標準))、重水 (50 μL (溶媒シグナルロックのため)) を添加し、NMR試料管に移した後、NMR装置 (Bruker Avance III 500 MHz NMR system) にて¹⁹F NMRスペクトル (積算回数NT = 1024) を測定した。

【 0 0 4 7 】

[測定結果]

測定の結果、得られたスペクトルを、図4A～図4Bのグラフとして示す。上述の通り、各図において、上段側から順に、含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式 (各図上段右側)、アミノ酸標準混合液 (H型) の¹⁹F NMRスペクトル (各図中段)、各アミノ酸溶液の¹⁹F NMRスペクトル (各図下段のAlaからValまで) を示している。

【 0 0 4 8 】

[実施例3]

[様々なフッ素含有チオールを用いたアミノ酸標準混合液の検出]

[OPA反応]

50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (50 μL) にアミノ酸標準混合液H型 (Wako) (17種類のアミノ酸混合液 (各1 mM)) (50 μL)、2,2,2 Trifluoroethanethiolのエタノール溶液 (100 mM, 50 μL) およびオルトフタルアルデヒド (OPA) のエタノール溶液 (100 mM, 25 μL) を添加し、室温で1分反応させた。

【 0 0 4 9 】

[使用した含フッ素チオール]

上記操作において、含フッ素チオールとして、以下の化合物を使用した。含フッ素チオールの構造式を、図5の左側に示す。図5の中央に記載された構造式、すなわち各含フッ素チオールの構造式の右側に記載された構造式は、含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式である。アミノ酸OPA誘導体化合物の構造式中のR基は、アミノ酸の側鎖であり、それぞれのアミノ酸に対応して異なるものとなる。

2,2,2 Trifluoroethanethiol (図5の左側の構造式)

【 0 0 5 0 】

[¹⁹F NMR測定]

OPA反応後の反応液に50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (250 μL)、トリフルオロ酢酸 (5 mM, 25 μL (ケミカルシフトの内部標準))、重水 (50 μL (溶媒シグナルロックのため)) を添加し、NMR試料管に移した後、NMR装置 (Bruker Avance III 500 MHz NMR system) にて¹⁹F NMRスペクトル (積算回数NT = 1024) を測定した。

【 0 0 5 1 】

[測定結果]

測定の結果、2,2,2 Trifluoroethanethiolを用いたアミノ酸OPA誘導体の¹⁹F NMRスペクトルを得た。得られたスペクトルを、図5の右側のグラフとして示す。上述の通り、図5において、左側から順に、使用した含フッ素チオールの構造式 (図5左側)、含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式 (図5中央)、¹⁹F NMRスペクトル (図5右側) を示している。

【 0 0 5 2 】

[実施例4]

[3 (trifluoromethyl)benzenethiol用いた有用アミノ酸 (テアニン) の検出]

[OPA反応]

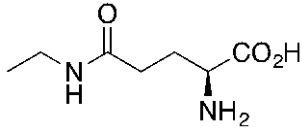
50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 (50 μL) にテアニンの水溶液 (1 mM, 50 μL)、含フッ素チオールのエタノール溶液 (100 mM, 50 μL) およびオルトフタルアルデヒド (OPA) のエタノール溶液 (100 mM, 25 μL) を添加し、室温で1分反応させた。

【 0 0 5 3 】

[使用した有用アミノ酸]

有用アミノ酸としてテアニンを使用した。テアニンの構造式を以下に示す。

【 化 1 0 】



【 0 0 5 4 】

[使用した含フッ素チオール]

上記操作において、含フッ素チオールとして、以下の化合物を使用した。含フッ素チオールの構造式を、図6の左側に示す。図6の中央に記載された構造式、すなわち各含フッ素チオールの構造式の右側に記載された構造式は、含フッ素チオールが反応して形成されたアミノ酸OPA誘導体化合物の一般構造式である。アミノ酸OPA誘導体化合物の構造式中のR基は、アミノ酸の側鎖であり、それぞれのアミノ酸に対応して異なるものとなる。

10

3 (trifluoromethyl)benzenethiol (図6の左側の構造式)

【 0 0 5 5 】

[¹⁹F NMR測定]

OPA反応後の反応液に50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液(250 μL)、トリフルオロ酢酸(5 mM, 25 μL(ケミカルシフトの内部標準))、重水(50 μL(溶媒シグナルロックのため))を添加し、NMR試料管に移した後、NMR装置(Bruker Avance III 500 MHz NMR system)にて¹⁹F NMRスペクトル(積算回数NT = 1024)を測定した。

20

【 0 0 5 6 】

[測定結果]

測定の結果、3 (trifluoromethyl)benzenethiolを用いたテアニン - OPA誘導体の¹⁹F NMRスペクトルを得た。得られたスペクトルを、図6の右側のグラフとして示す。上述の通り、図6において、左側から順に、使用した含フッ素チオールである3 (trifluoromethyl)benzenethiolの構造式(図6左側)、3 (trifluoromethyl)benzenethiolが反応して形成されたテアニン - OPA誘導体化合物の一般構造式(図6中央)、¹⁹F NMRスペクトル(

30

【 0 0 5 7 】

[含フッ素アミノ酸化合物(含フッ素アミノ酸誘導体)の合成反応のスキーム]

実施例において行った含フッ素アミノ酸化合物(含フッ素アミノ酸誘導体)の合成反応を説明するスキームを、図7にスキーム1として示す。図7に示すスキーム1では、OPA及び - アミノ酸から、式Vの含フッ素アミノ酸化合物が合成されている。ただし、本発明はこのスキーム1に限定されるものではない。

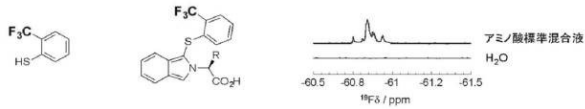
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 8 】

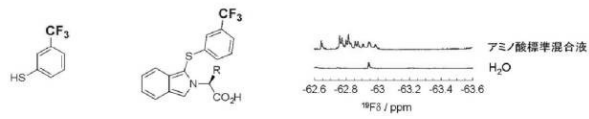
本発明によれば、劇物指定の有機溶媒の多量の使用を回避し、HPLCを使用することなく、短時間で、アミノ酸分析の分析結果を得ることができる。本発明は産業上有用な発明である。

40

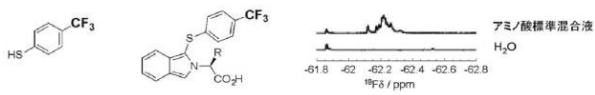
【図 1 A】



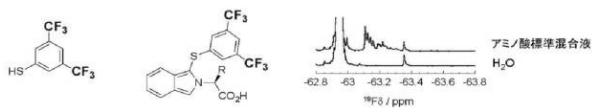
【図 1 B】



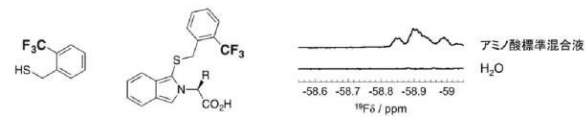
【図 1 C】



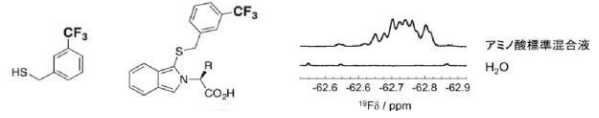
【図 1 D】



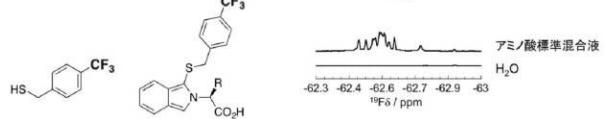
【図 2 A】



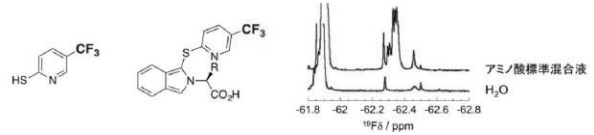
【図 2 B】



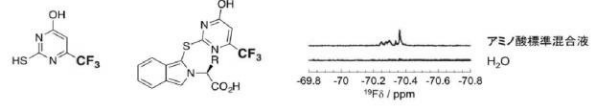
【図 2 C】



【図 3 A】

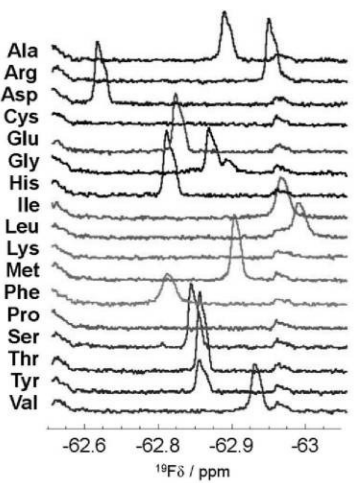
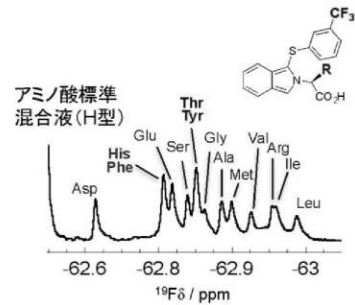


【図 3 B】

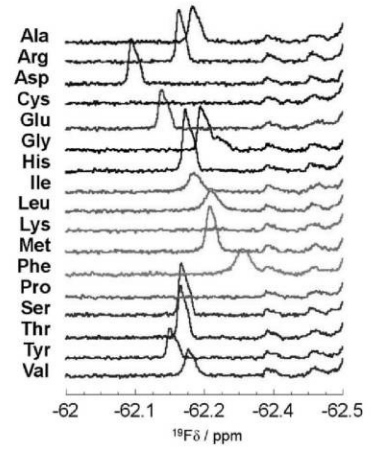
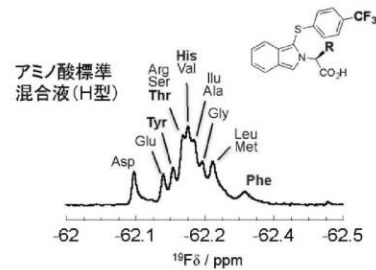


10

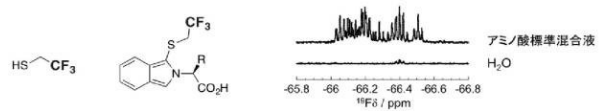
【図 4 A】



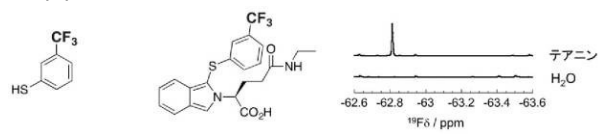
【図 4 B】



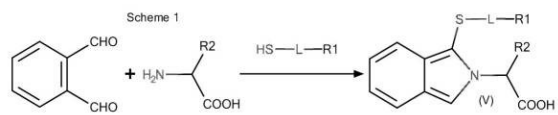
【図 5】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平02 - 164893 (JP, A)
米国特許第04238218 (US, A)
特開2003 - 238541 (JP, A)
特開平01 - 275562 (JP, A)
特開昭63 - 095240 (JP, A)
米国特許第02894991 (US, A)
国際公開第2008 / 094043 (WO, A1)
特開昭60 - 082967 (JP, A)
特開昭60 - 227164 (JP, A)
特開平04 - 027860 (JP, A)
Analytical Chemistry, 2019年12月30日, 92(2), 1669 1673

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D
CAplus (STN)
REGISTRY (STN)
JSTPlus (JDreamIII)
JMEDPlus (JDreamIII)
JST7580 (JDreamIII)