

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-44756

(P2015-44756A)

(43) 公開日 平成27年3月12日(2015.3.12)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 D 237/32	(2006.01)	C O 7 D	237/32	C S P
G O 1 N 21/76	(2006.01)	G O 1 N	21/76	2 G O 5 4

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-175654 (P2013-175654)	(71) 出願人	504205521
(22) 出願日	平成25年8月27日 (2013. 8. 27)		国立大学法人 長崎大学
			長崎県長崎市文教町 1-14
特許法第30条第2項適用申請有り 平成25年3月6日 長崎大学薬学部 薬科学科 分野横断型卒業研究ポスター発表会において文書 (ポスター) をもって発表		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

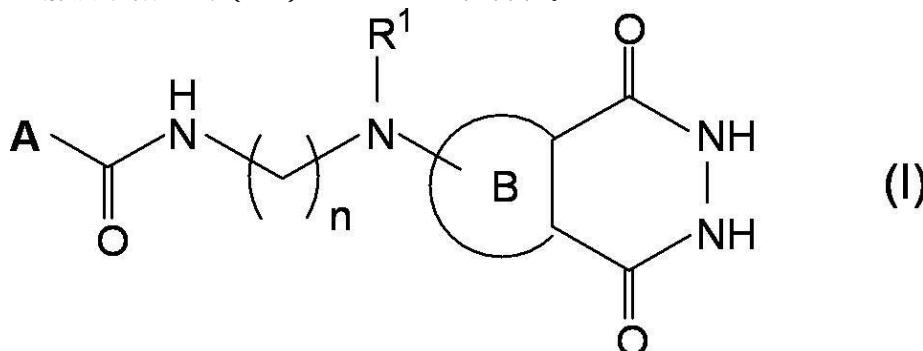
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キノンを検出するための化合物および該化合物を用いたキノンの検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 キノンを簡便かつ選択的に測定可能な化学発光分析試薬として有用な化合物、および該化合物を用いて、キノンを高感度で簡便かつ選択的に検出する方法を提供する。

【解決手段】 式(I)で表される化合物。



(Aは、-リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸又は葉酸からカルボン酸基を除いた残基、Bは、それぞれ置換されていてもよいベンゼン環又は5ないし6員芳香族複素環、R¹は、C₁-₆アルキル、nは、1~6の整数)

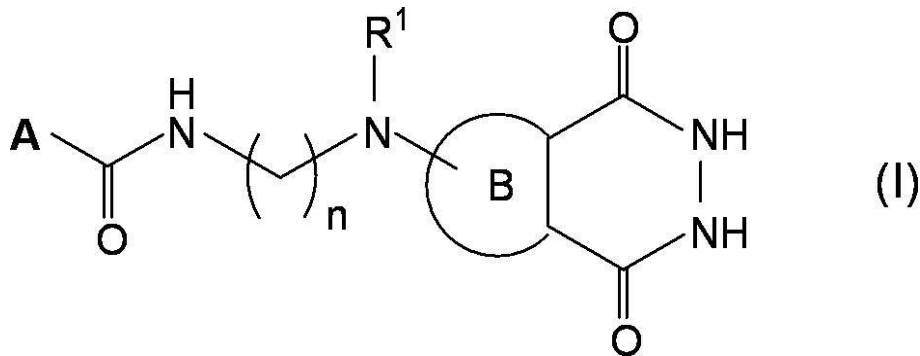
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】



10

(式中、

Aは、 α -リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸からカルボン酸基を除いた残基を示し、

Bは、それぞれ置換されていてもよい、ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環を示し、

R^1 は、 C_{1-6} アルキル基を示し、および

nは、1~6の整数を示す。)

20

で表される化合物。

【請求項 2】

Aが α -リポ酸またはジヒドロリポ酸からカルボン酸基を除いた残基であり、Bがベンゼン環であり、 R^1 がエチルであり、かつ、nが4である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

キノンの検出のために用いる、請求項1または2に記載の化合物。

【請求項 4】

請求項1または2に記載の化合物と被検試料とを塩基存在下で混合する工程、および

該混合により放出される化学発光を測定する工程

を含む、被検試料中のキノンの検出方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キノンを検出するための化合物および該化合物を用いたキノンの検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

キノンは生体にとって非常に重要な化合物である。例えば、ユビキノンやピロロキノリンキノンといったキノンは、数多くの酵素の電子伝達反応に大きく関与していることが知られている。また、ナフトキノン誘導体であるビタミンKは、血液凝固や骨硬化に関係している。さらに、ドキソルピシンのように医薬品として臨床的に用いられているキノンも存在する。

40

従って、キノンを簡便かつ選択的に測定可能な化学発光分析試薬として有用な化合物は、キノンの生体内での役割をより詳細に調査するためにも重要であると考えられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本願発明は、キノンを検出するための新規な化合物および該化合物を用いたキノンの検出方法を提供することを目的とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、キノンの酸化還元サイクルに伴って発生するスーパーオキシドアニオンラジカルを化学発光反応を利用して検出することにより、キノンを選択的に測定することができると考え、スーパーオキシドアニオンラジカル応答性化学発光試薬に還元部位を導入した化合物を設計し、合成を行い、本発明を完成するに至った。

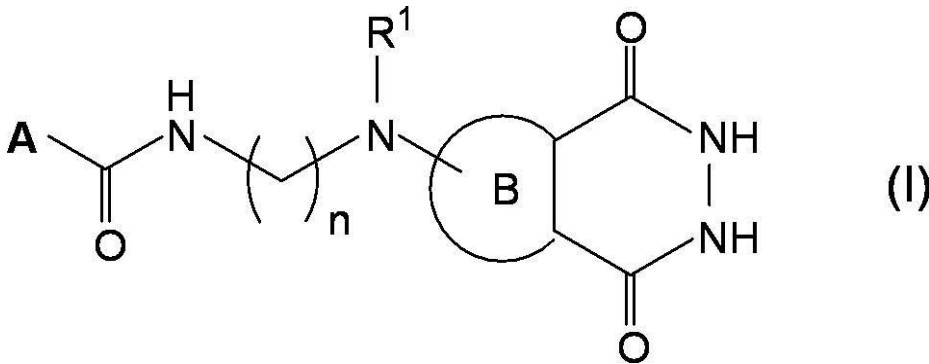
【0005】

即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 式(I)：

【0006】

【化1】



【0007】

(式中、

Aは、 α -リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸からカルボン酸基を除いた残基を示し、

Bは、それぞれ置換されていてもよい、ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環を示し、

R¹は、C₁ - 6アルキル基を示し、および

nは、1 ~ 6の整数を示す。)

で表される化合物(以下、本発明の化合物と称する場合がある)；

[2] Aが α -リポ酸またはジヒドロリポ酸からカルボン酸基を除いた残基であり、Bがベンゼン環であり、R¹がエチルであり、かつ、nが4である、[1]に記載の化合物；

[3] キノンの検出のために用いる、[1]または[2]に記載の化合物；

[4] [1]または[2]に記載の化合物と被検試料とを塩基存在下で混合する工程、および

該混合により放出される化学発光を測定する工程を含む、被検試料中のキノンの検出方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明の化合物は、一分子中に還元部位と化学発光部位とを持つ化合物である。具体的には、本発明の化合物は、 α -リポ酸部位、ジヒドロリポ酸部位、コーヒー酸部位、没食子酸部位または葉酸部位(還元部位)によりキノンの酸化還元サイクルを誘起するとともに、これにより発生するスーパーオキシドアニオンラジカルによってルミノール部位(化学発光部位)が酸化されて発光し、従って、キノンを簡便かつ選択的に測定可能な化学発光分析試薬として有用である。また、本発明の方法は、該化合物を用いて、キノンを高感度で簡便かつ選択的に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール- α -リポ酸(

10

20

30

40

50

A B E I - L A) の高速原子衝撃質量分析 (F A B - M S) スペクトルを示す。

【図 2】図 2 A は、キノンとしてメナジオンを用いた場合の、A B E I - L A 溶液およびブランク溶液の化学発光時間プロフィールを示し、図 2 B は、A B E I - L A 溶液の積分化学発光強度を示す。

【図 3】図 3 は、A B E I - L A 溶液および A B E I と L A との単なる混合物の溶液の化学発光時間プロフィールを示す。

【図 4】図 4 A は、キノンとして 9 , 1 0 - フェナンスレンキノンをを用いた場合の、A B E I - L A 溶液およびブランク溶液の化学発光時間プロフィールを示し、図 2 B は、A B E I - L A 溶液の積分化学発光強度を示す。

【図 5】図 5 は、キノンとしてフィロキノン、ドキソルピシンおよびユビキノンをを用いた場合の、A B E I - L A 溶液の化学発光時間プロフィールを示す。

10

【図 6】図 6 は、N - (4 - アミノブチル) - N - エチルイソルミノール - ジヒドロリポ酸 (A B E I - D H L A) のエレクトロスプレーイオン化質量分析 (E S I - M S) スペクトルを示す。

【図 7】図 7 A は、キノンとしてメナジオンを用いた場合の、A B E I - D H L A 溶液およびブランク溶液の化学発光時間プロフィールを示し、図 7 B は、A B E I - D H L A 溶液の積分化学発光強度を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

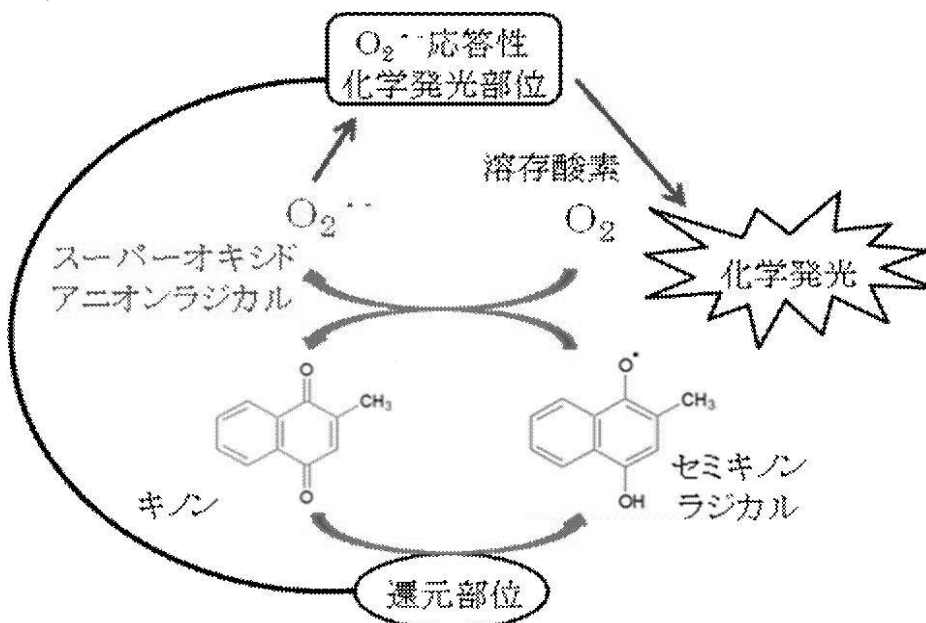
以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

20

キノンは還元物質により不安定なセミキノンラジカルへと還元され、これが溶存酸素により酸化される過程で、活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルが発生する。このスーパーオキシドアニオンラジカルを、本発明の化合物を用いて検出することができる。以下に、キノンの酸化還元サイクルを利用した測定原理を示す。

【 0 0 1 1 】

【化 2】



30

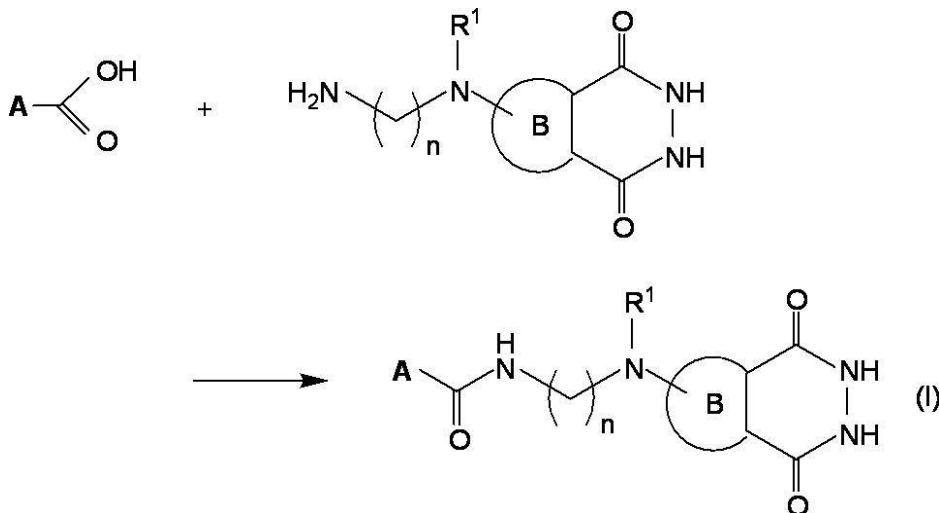
40

【 0 0 1 2 】

本発明では、還元部位として、構造中にカルボン酸を有し、様々な修飾が容易な抗酸化剤である - リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸を選択し、スーパーオキシドアニオンラジカル応答性化学発光部位として、スーパーオキシドアニオンラジカルをはじめとする活性酸素により酸化分解する過程で強い発光を生じるルミノール誘導体を選択した。すなわち、以下の反応により、式 (I) で表される化合物を合成した。

【 0 0 1 3 】

【化 3】



10

【0014】

Aは、 α -リポ酸、ジヒドロリポ酸、コヒー酸、没食子酸または葉酸からカルボン酸基を除いた残基を示す。

Aとしては、 α -リポ酸またはジヒドロリポ酸からカルボン酸基を除いた残基が好ましい。

20

【0015】

Bは、それぞれ置換されていてもよい、ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環を示す。

Bで示される「それぞれ置換されていてもよい、ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環」の「5-ないし6-員芳香族複素環」としては、環構成原子として炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれるヘテロ原子を1ないし3個含有する5-ないし6-員芳香族複素環、具体的には、フラン環、チオフェン環、ピロール環、オキサゾール環、イソオキサゾール環、チアゾール環、イソチアゾール環、イミダゾール環、ピラゾール環、ピリジン環、ピリダジン環、ピリミジン環、ピラジン環等が挙げられる。

30

Bで示される「それぞれ置換されていてもよい、ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環」の「ベンゼン環または5-ないし6-員芳香族複素環」は、置換可能な位置に1~3個の置換基を有していてもよい。このような置換基としては、ハロゲン（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、アミノ基、 C_{1-6} アルキル基（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル）、 C_{2-6} アルケニル基（例、ビニル、1-プロペン-1-イル、2-プロペン-1-イル、イソプロペニル、2-ブテン-1-イル、4-ペンテン-1-イル、5-ヘキセン-1-イル）および C_{6-14} アリール基（例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ピフェニル、3-ピフェニル、4-ピフェニル、2-アンズリル）が挙げられ、アミノ基、ハロゲン（特に、塩素）および C_{6-14} アリール基（特に、フェニル）が好ましい。置換基が2個以上である場合、各置換基は同一でも異なってもよい。

40

Bとしては、置換されていてもよいベンゼン環が好ましく、ベンゼン環がより好ましい。

【0016】

R^1 は、 C_{1-6} アルキル基を示し、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。

R^1 としては、エチルが好ましい。

nは、1~6の整数を示す。nは、好ましくは4である。

50

【0017】

式(I)で表される化合物としては、Aが - リポ酸またはジヒドロリポ酸からカルボン酸基を除いた残基であり、Bがベンゼン環であり、R¹がエチルであり、かつnが4である化合物が好ましい。すなわち、式(I)で表される化合物としては、 - リポ酸またはジヒドロリポ酸とN-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノールとの反応により合成される化合物が好ましい。

【0018】

本発明の化合物は、上記スキームの通り、 - リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸とルミノール誘導体との縮合反応によって合成することができる。

ルミノール誘導体の使用量は、 - リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸1モルに対し、通常0.1モル~50モル、好ましくは1モル~3モルである。

縮合反応は、常法に従って、例えば、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中、縮合剤を用いて行うことができる。

縮合剤としては、例えば、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド(DMT-MM)などのトリアジン系縮合剤；ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC、WSCなど)、またはその塩酸塩などのカルボジイミド系縮合剤；シアノリン酸ジエチル、アジ化ジフェニルホスホリルなどのリン酸系縮合剤；カルボニルジイミダゾール、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート、2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(HATU)などが挙げられる。

縮合剤の使用量は、 - リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸1モルに対し、通常0.1モル~50モル、好ましくは1モル~5モルである。

溶媒としては、例えば、アルコール類(メタノール、エタノール、プロパノール、2-プロパノール、ブタノール、イソブタノール、t-ブタノールなど)が挙げられる。

反応温度は、例えば、0~100、好ましくは30~60であり、反応時間は、ルミノール誘導体の種類、反応温度などによって異なり、例えば、1時間~72時間、好ましくは5時間~10時間である。

なお、原料化合物である - リポ酸、ジヒドロリポ酸、コーヒー酸、没食子酸または葉酸およびルミノール誘導体は、市販品をそのまま使用してもよく、あるいは、自体公知の方法またはこれらに準じた方法に従って製造することもできる。

【0019】

次に、本発明の被検試料中のキノンの検出方法を説明する。

本発明の方法は、式(I)で表される化合物と被検試料とを塩基存在下で混合する工程、および該混合により放出される化学発光を測定する工程を含む。

【0020】

本発明の方法における「被検試料」としては、例えば、ドキシソルピシン製剤あるいはキノン含有食品が挙げられる。

【0021】

本発明の方法における「塩基」としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の無機塩基類、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、炭酸水素ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化セシウム、リン酸三カリウム等の塩基性塩類、ピリジン、ルチジン等の芳香族アミン類、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、トリブチルアミン、シクロヘキシルジメチルアミン、4-ジメチルアミノピリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルピロリジン、N-メチルモルホリン等の第3級アミン類、金属ナトリウム等のアルカリ金属類、水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物類、ナトリウムアミド、リチウムジイソプロピルアミド、リチウムヘキサメチルジシラジド等の金属アミド類、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウム第三ブトキシド等の金属アルコキシド類等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0022】

塩基としては、塩基性の強さの観点から、水酸化ナトリウムが好ましい。

【0023】

塩基の使用量は、式(I)で表される化合物1モルに対し、通常、40モル～500モルであり、好ましくは、200モル～400モルである。塩基の使用量が40モル未満であると、ルミノール部位による化学発光反応が誘起されない問題があり、500モルを超えると、ルミノール部位の酸化分解過程で生成するアミノフタレート(Bがベンゼン環の場合)の蛍光量子収率が減少する問題がある。

【0024】

混合の方法としては、特に限定されるものではなく、例えば、塩基水溶液に式(I)で表される化合物を溶解し、これに被検試料を添加する方法等が挙げられる。

10

【0025】

上記混合により放出される化学発光は、例えば、ルミノメーターを用いて測定することができる。

【0026】

本発明の方法によって検出されるキノンとしては、特に限定されるものではなく、例えば、ユビキノン、ピロロキノリンキノン、9,10-フェナンスレンキノン、ナフトキノン誘導体(例、メナジオン(ビタミンK₃)、フィロキノン(ビタミンK₁)、ドキシルピシン等が挙げられる。

20

【実施例】

【0027】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例1：N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール- - リポ酸(ABEI-LA)の合成

- リポ酸(LA)(29mg, 0.14mmol)、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール(ABEI)(38mg, 0.14mmol)および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(26mg, 0.14mmol)をエタノール/2%ピリジン(100ml)に溶解し、常温で10時間攪拌した。エタノールを減圧留去し、残渣をエタノールで再結晶して、表題化合物を薄黄色結晶(30mg, 収率46.8%)として得た。

30

【0028】

得られた結晶の高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)スペクトルを、JEOL JMS-700N(日本電子製)を用いて測定した。その結果を図1に示す。FAB-MSスペクトル上に、ABEI-LAの[M+H]⁺に由来する分子イオンピークが検出された。なお、277.2のピークは、未反応のABEIの[M+H]⁺に由来する分子イオンピークである。

【0029】

実施例2：メナジオンの添加によるABEI-LAの化学発光の測定

200mMのNaOH水溶液(50μL)中の500μMのABEI-LA溶液を小試験管に入れ、ルミノメーター(Berthold LB-9507; Berthold Technologies製)にセット後、メナジオンの1、10、20および50μMアセトニトリル溶液(50μL)をインジェクターにより自動注入した。生じる化学発光を180秒間測定した。このとき、ブランク溶液としては、200mMのNaOH水溶液(50μL)にアセトニトリル(50μL)のみを添加したものをを用いた。その結果を図2に示す。

40

メナジオンを添加したABEI-LA溶液では、ブランク溶液と比較して有意に高い化学発光が観察された(図2A)。これは、ABEI-LAの - リポ酸部位によりメナジオンの酸化還元サイクルが誘起され、これに伴って発生したスーパーオキシドアニオンがABEI-LAのルミノール部位を酸化することにより、化学発光が生じたと考えられる

50

。また、化学発光の強度は、メナジオンの濃度の増加に伴って上昇することが観察された（図2B）。

【0030】

実施例3：ABEI-LAの構造に基づく化学発光検出反応の効率化

実施例2と同様にして、実施例2と同一のABEI-LA溶液と、200mMのNaOH水溶液（50μL）中のABEIとLAとの単なる混合物の溶液（ABEIおよびLAはそれぞれ750μM）とに、それぞれメナジオンの50μMアセトニトリル溶液（50μL）を添加して生じる化学発光を測定した。その結果を図3に示す。

ABEI-LA溶液は、ABEIとLAとの単なる混合物の溶液と比較して強い化学発光を与えた。これは、同一分子内に還元部位と化学発光部位とを併せ持つABEI-LAを用いた場合、化学発光検出反応の効率が上昇すると考えられる。

10

【0031】

実施例4：9,10-フェナンスレンキノンの添加によるABEI-LAの化学発光の測定

200mMのNaOH水溶液（50μL）中の500μMのABEI-LA溶液を小試験管に入れ、9,10-フェナンスレンキノンの1,5,10μMアセトニトリル溶液（50μL）を添加し、5秒間ボルテックス混合した。小試験管をルミノメーター（Berthold LB-9507; Berthold Technologies製）にセット後、生じた化学発光を300秒間測定した。このとき、ブランク溶液としては、200mMのNaOH水溶液（50μL）にアセトニトリル（50μL）のみを添加したものを

20

用いた。その結果を図4に示す。
9,10-フェナンスレンキノンを添加したABEI-LA溶液では、ブランク溶液と比較して有意に高い化学発光が観察された（図4A）。しかしながら、その化学発光強度は、メナジオンを用いて測定したときよりも低く、また、5μM以上の濃度ではフェナンスレンキン濃度に応じた発光の増強は見られなかった（図4B）。これは、今回測定を行った条件下では、ABEI-LAは、o-キノ（9,10-フェナンスレンキン）よりもp-キノ（メナジオン）に対して良好な化学発光検出反応を生じることが示唆される。

【0032】

実施例5：種々のキノンの添加によるABEI-LAの化学発光の測定

30

実施例2と同様にして、フィロキノ（50μM）、ドキシソルピシン（50μM）およびユビキノ（10μM）を用いて化学発光を測定した。その結果を図5に示す。

メナジオンおよび9,10-フェナンスレンキンと同様に、フィロキノ、ドキシソルピシンおよびユビキノを添加したABEI-LA溶液では、高い化学発光が観察された。

【0033】

実施例6：N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール-ジヒドロリポ酸（ABEI-DHLA）の合成

実施例1で合成したABEI-LAのメタノール溶液（7μM）に還元剤としてトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）（0.07mmol）を添加し、室温で5時間反応させた。その反応溶液のエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）スペクトルを、JEOL JMS-T100TDを用いて測定した。その結果を図6に示す。ESI-MSスペクトル上に、ABEI-DHLAの[M+H]⁺に由来する分子イオンピークが検出された。

40

【0034】

実施例7：メナジオンの添加によるABEI-DHLAの化学発光の測定

メナジオンの1,10,20および50μMアセトニトリル溶液（50μL）の代わりにメナジオンの1,20および50μMアセトニトリル溶液（50μL）を用いたこと以外は実施例2と同様にして、メナジオンの添加によるABEI-DHLAの化学発光を測定した。その結果を図7に示す。

50

メナジオンを添加した A B E I - D H L A 溶液では、ブランク溶液と比較して有意に高い化学発光が観察された (図 7 A)。これは、A B E I - D H L A のジヒドロリポ酸部位によりメナジオンの酸化還元サイクルが誘起され、これに伴って発生したスーパーオキシドアニオンが A B E I - D H L A のルミノール部位を酸化することにより、化学発光が生じたと考えられる。また、化学発光の強度は、メナジオンの濃度の増加に伴って上昇することが観察された (図 7 B)。

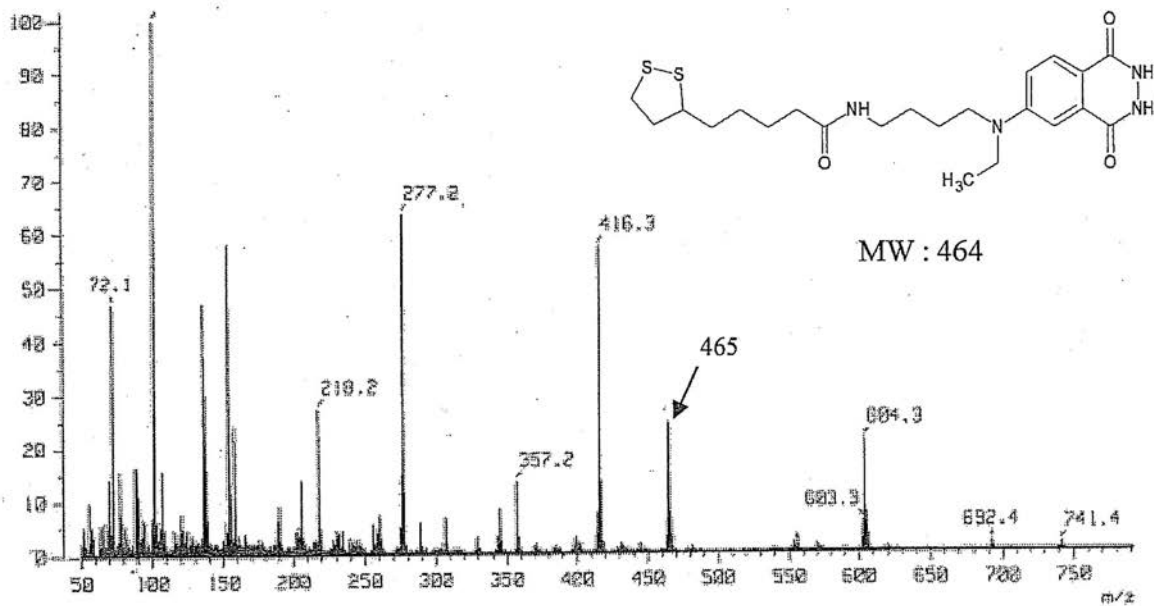
【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 5 】

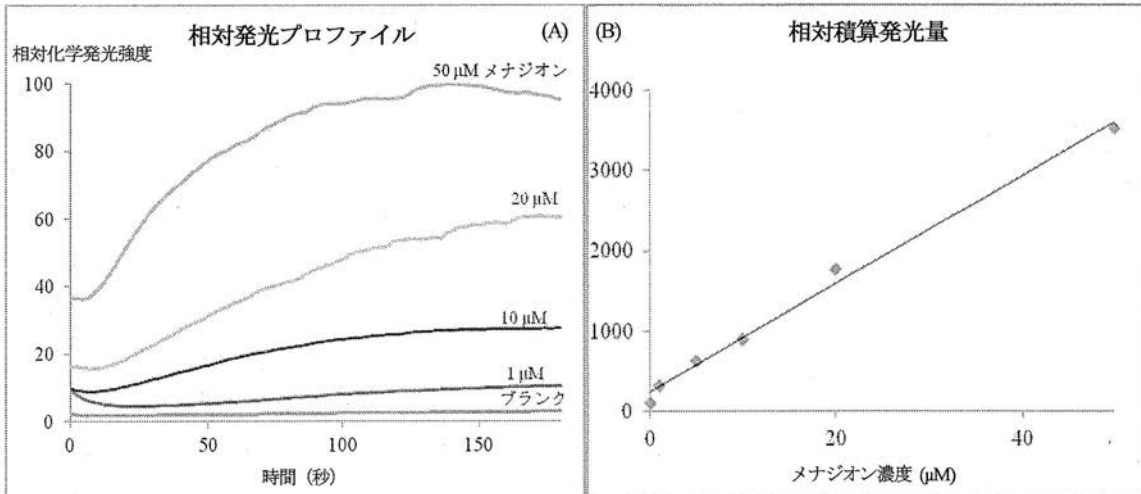
本発明の化合物は、キノンを簡便かつ選択的に測定可能な化学発光分析試薬として有用である。また、本発明の方法、該化合物を用いて、キノンを高感度で検出することができる。

10

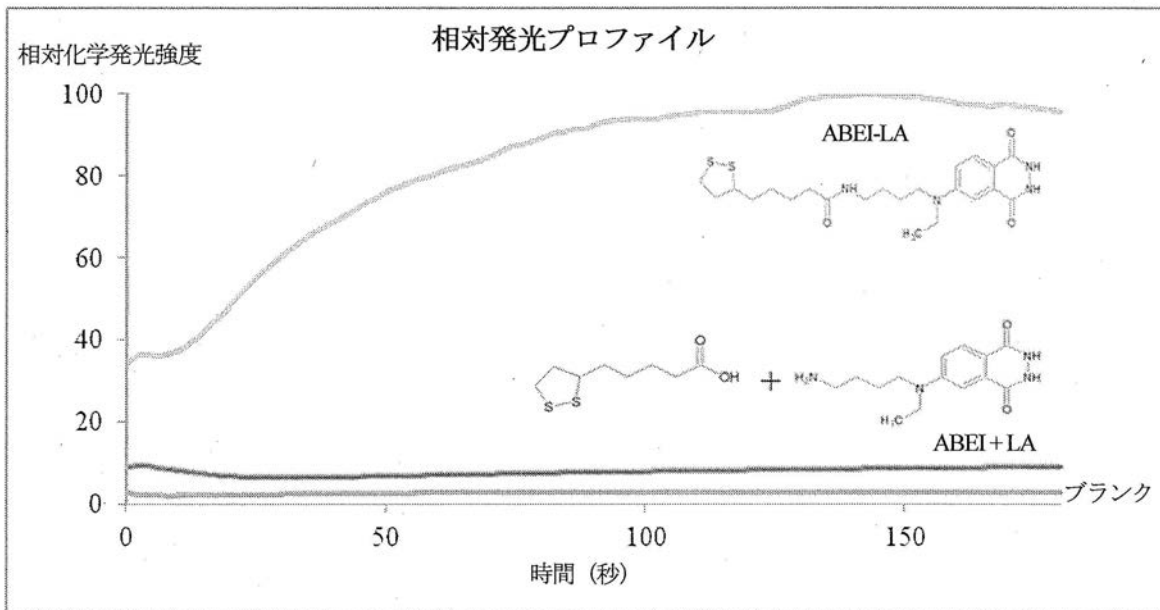
【 図 1 】



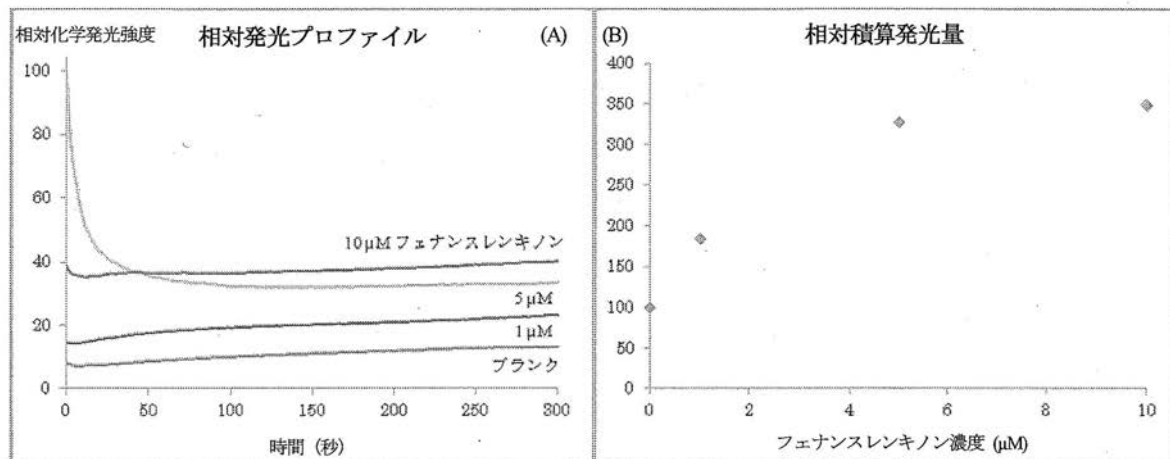
【 図 2 】



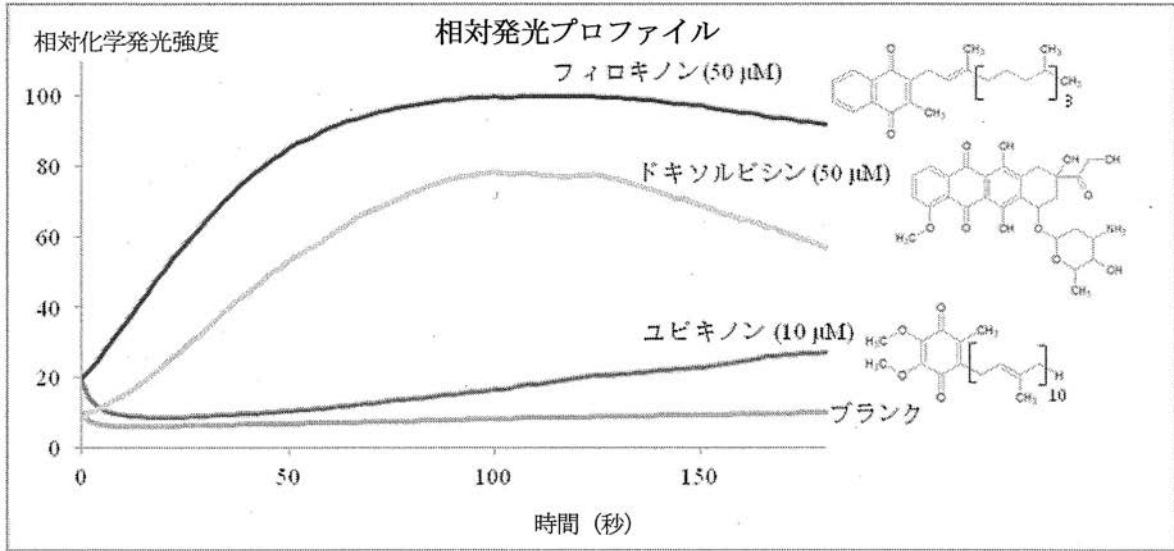
【 図 3 】



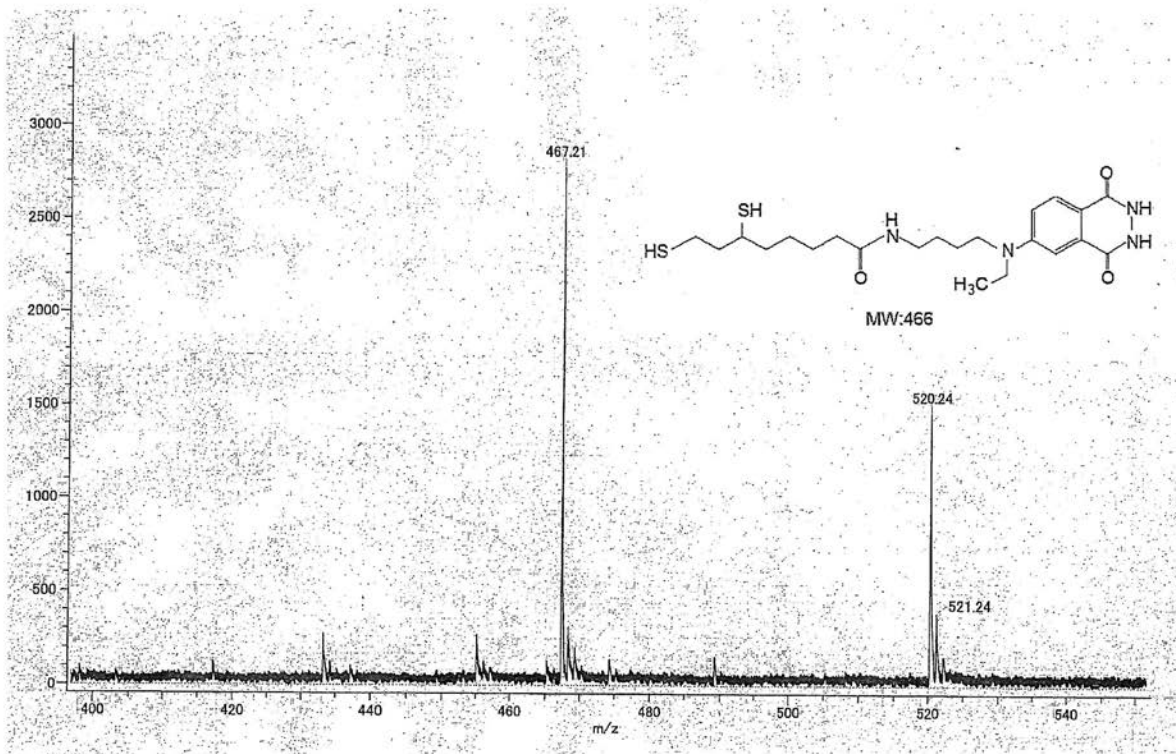
【 図 4 】



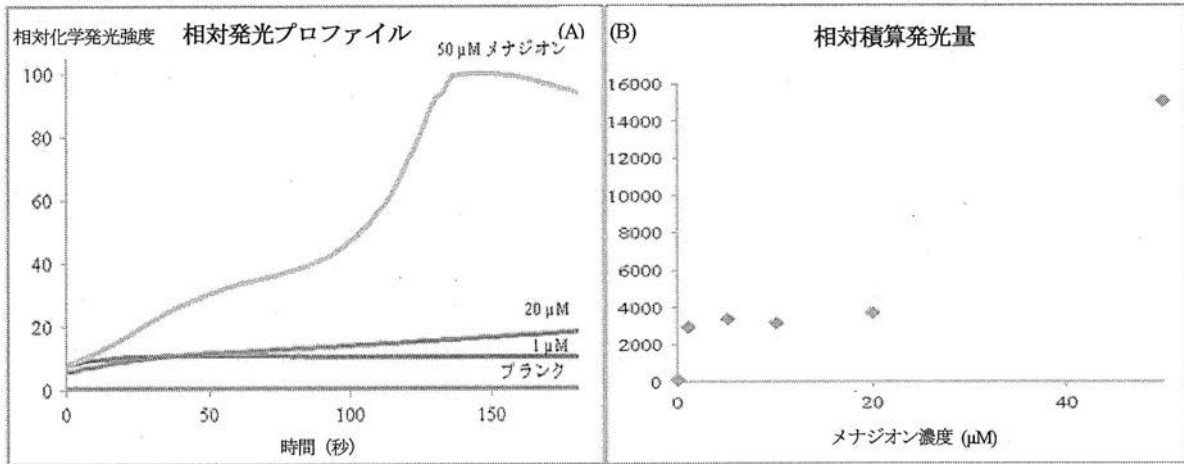
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 黒田 直敬

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 岸川 直哉

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 大山 要

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 上村 周平

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

Fターム(参考) 2G054 AA02 AB10 BB10 CA21 CB02 CB03 CE03 EA01 FA09 GB01