

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3585552号
(P3585552)

(45) 発行日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(24) 登録日 平成16年8月13日(2004.8.13)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 2 5 B 11/06
C 0 7 D 219/06
C 0 7 D 219/08
C 0 7 D 267/18
C 0 7 H 17/02C 2 5 B 11/06
C 0 7 D 219/06
C 0 7 D 219/08
C 0 7 D 267/18
C 0 7 H 17/02

請求項の数 9 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-15025
 (22) 出願日 平成7年2月1日(1995.2.1)
 (65) 公開番号 特開平7-310194
 (43) 公開日 平成7年11月28日(1995.11.28)
 審査請求日 平成13年12月5日(2001.12.5)
 (31) 優先権主張番号 08/190855
 (32) 優先日 平成6年2月3日(1994.2.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 391007079
 バイエルコーポレーション
 アメリカ合衆国、インディアナ州、465
 14、エルクハート、マイルス・アベニュー
 - 1884
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100072279
 弁理士 渡邊 睦雄
 (72) 発明者 ポール・エフ・コーリー
 アメリカ合衆国、インディアナ州、465
 14、エルクハート、スプリングブルック
 ・ドライブ 1535

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NADH、NADPH又はその類似体の電気化学的再生に適した媒介物質

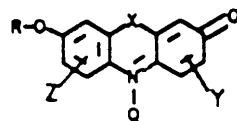
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

補酵素ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)、ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(NADPH)又はこれらの類似体の電気化学的再生に適した電極であって、置換又は非置換の9H-アクリジン-2-オン類からなる群より選択される、1種又はそれ以上の媒介化合物を含ませることによって、電極表面に媒介作用を与えることを特徴とする電極であって、

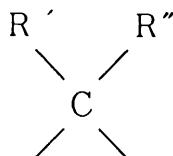
媒介化合物が式：

【化1】



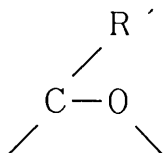
(式中、Xは式：

【化 2】



(式中、R' 及び R'' は、炭素数 1 ~ 6 の低級アルキルである) の基又は式：

【化 3】



10

の基(式中、R' は前記の通りである)であり、Y 及び Z はそれぞれ独立して水素又は別の 1 価の置換基であり、そして Q は (O)_n (ここで、n は 0 又は 1 である) である) で示されることを特徴とする、電極。

【請求項 2】

Y 及び Z が、それぞれ独立して水素、置換若しくは非置換アリール、アルコキシ、アリールオキシ、ハロ、ニトロ、置換アミノ、ケト、カルボキシ、アルコキシカルボニル又はアミドである請求項 1 記載の電極。

20

【請求項 3】

1 種又はそれ以上の酵素が電極表面に存在する請求項 1 記載の電極。

【請求項 4】

酵素が脱水素酵素である請求項 3 記載の電極。

【請求項 5】

電極材が、グラファイト、熱分解カーボン、ガラス質カーボン、プラチナ又は金からなる請求項 1 記載の電極。

【請求項 6】

媒介化合物が、7 - ヒドロキシ - 9 , 9 - ジメチル - 9 H - アクリジン - 2 - オンである請求項 1 記載の電極。

30

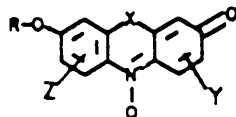
【請求項 7】

触媒として脱水素酵素及びエネルギー移動性酸化還元対として補酵素を用いて作働する生化学的燃料電池の性能を改善する方法であって、該燃料電池において陽極として請求項 1 記載の電極を使用することからなる方法。

【請求項 8】

媒介化合物が、式：

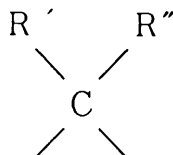
【化 4】



40

(式中、X は式：

【化 5】



(式中、R' 及び R'' は、炭素数 1 ~ 6 の低級アルキルである) の基又は式：

50

【化6】

の基(式中、R'は前記の通りである)であり、Y及びZはそれぞれ独立して水素又は別の1価の置換基であり、そしてQは(O)_n(ここで、nは0又は1である)である)で示される請求項7記載の方法。

【請求項9】

電極材が、グラファイト、熱分解カーボン、ガラス質カーボン、プラチナ又は金からなり、媒介化合物が7-ヒドロキシ-9,9-ジメチル-9H-アクリジン-2-オンである請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

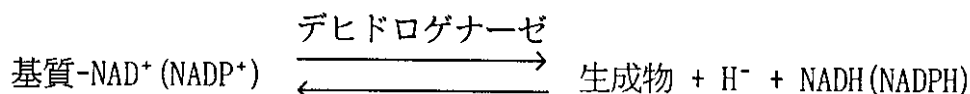
10

【従来の技術】

酵素の選択性と電流測定による検出の感度とを組み合わせた分析法は、診断に関する業界にとっては、興味深い方法である。ニコチンアミド補酵素(NAD及びNADP)の還元は、これらが脱水素酵素によって触媒される反応において産生されるため、特に重要である。以下の式:

【0002】

【化7】



20

【0003】

に基づき脱水素酵素によって触媒される反応は、生物細胞及び分析反応において、重要な役割を果たしている。様々の基質の生成物への変換を選択的に触媒する数百もの異なる脱水素酵素が知られている。基質が酸化されると、補酵素であるNAD⁺及びNADP⁺が還元されてそれぞれNADH及びNADPHとなる。これらの補酵素は、酵素と作用してエネルギー移動性酸化還元対を形成することができるため、この反応において必須な要素である。

30

【0004】

補酵素NAD⁺及びNADP⁺は、高価な化学物質であり、もし、低価格で使い捨て可能な分析具において経済的に使用するのであれば、これらを再酸化により元の状態に再生することが必要である。NADHは、様々なベースとなる電極物質において、1ボルトのオーダーの高過電圧によってのみ、直接酸化される。しかしこの過電圧は、NADHから電極への電子移動を媒介する機能を有する物質を電極表面において固定化することによって低下させることができる。このような媒介物質は、過剰な過電圧なしに電気化学的に再酸化される、電気化学的再生のための補助的システムとして有用である物質から典型的には選択される。本目的に適した様々な媒介化合物が公知である。米国特許4,490,464号においては、背景技術としてフェナジン-メトサルフェート(PMS)、フェナジン-エトサルフェート(PES)、チオニン(thionine)及び1,2-ベンゾキノンなどの媒介物質が記載されている。この特許は、電極表面に、ヘテロ原子を含んでも含まなくてもよい少なくとも3個、好ましくは4個又はそれ以上の縮合芳香族環からなる縮合芳香族環系化合物を媒介物質として付与することによって、NADH、NADPH又はその類似体の酸化を触媒するよう改変された電極に関して述べたものである。より詳細には、本引例は、アルキルフェナジニウムイオン、フェナジニウムイオン、フェナジノン、フェノキサジニウムイオン、フェノキサジノン、フェノチアジニウムイオン又はフェノチアジノンのいずれか1からなる構造成分による補酵素又はその類似体との電子交換について記載している。

40

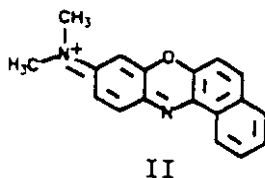
【0005】

50

フルティ (Fluty) らは、様々な媒介物質に関する文献のレビューを発表し、彼等は *Analytical Chimica Acta* 140 (1982) Pp . 1 - 18 において、この媒介物質を、電極と補酵素の酸化還元中心との間に酸化還元対をもたらす「電子シャトル」であると述べている。グラファイト電極に使用される最も良く知られた媒介物質は多分、式 I I :

【 0 0 0 6 】

【 化 8 】



10

【 0 0 0 7 】

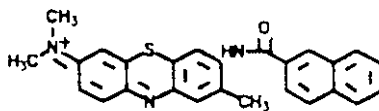
で示されるメルドラブルーなどのフェノチアジニウム及びフェノキサジニウム塩である。

【 0 0 0 8 】

J. Electroanal. Chem. , 287 (1990) Pp . 61 - 80 においては、式 I I I :

【 0 0 0 9 】

【 化 9 】



I I I

20

【 0 0 1 0 】

で示されるフェノチアジン誘導体である 3 - (1 - ナフトイル - トルイジンブルー O) に基づく還元型 NAD の酸化のための化学的に改変されたグラファイト電極が記載されている。パーソン (Persson) らは、*J. Electroanal Chem.* , 292 (1990) 115 - 138 において、NADH の電気触媒的酸化のためのいくつかの 3 , 7 - ジアミノフェノキサジン誘導体の比較研究について発表している。

30

【 0 0 1 1 】

米国特許第 4 , 810 , 636 号には、7 - ヒドロキシ基が酵素により開裂可能な基により保護され、9 位がアルキル又はアリール基により置換されている 7 - ヒドロキシ - 9 H - アクリジン - 2 - オン 色原体が記載されている。

【 0 0 1 2 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明は、補酵素ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)、ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADPH) 又はそれらの類似体の電気化学的再生に適した電極であって、その表面に、1 種又はそれ以上の、置換若しくは非置換の 9 H - アクリジン - 2 - オン又は 1 H - ジベンズ - [b , f] [1 , 4] オキサゼピン - 8 - オン化合物を含む、媒介機能を有している電極に関する。

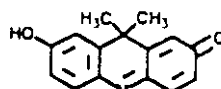
40

【 0 0 1 3 】

本発明は、式 I :

【 0 0 1 4 】

【 化 1 0 】



I

【0015】

で示される7-ヒドロキシ-9,9-ジメチル-9H-アクリジン-2-オン及びその誘導体が、電極におけるNADHの電気化学的再生(酸化)に有用な媒介物質であるとの発見に基づくものである。

10

【0016】

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(酸化型、 NAD^+ ;還元型、 NADH)は、多くの脱水素酵素に化学的酸化還元能を与える補因子である。本補因子は、基質分子が酸化される際の酵素反応の過程において還元される。基質濃度を測定するための手段としてこれらの酵素を用いる電流測定バイオセンサーは、基質濃度と、補因子が電気化学的に再酸化される際に生じる電流とを関連づけたものである。 NADH は、媒介物質がなくとも、グラファイト、熱分解カーボン、ガラス質カーボン、プラチナ又は金電極上で電気化学的に再酸化され得るが、この反応には、高い過電圧及び電極汚損など幾つかの問題がある。

20

【0017】

本発明は、 NADH 及び NADPH の補酵素又はこれらの誘導体の電気化学的再生において、アクリジノン類の色原体を初めて使用することを記載しており、従って広範囲のアクリジノン誘導体を含む。 NADH 及び NADPH の誘導体としては、ドラブドジアン(Dolabdjian)らにより、G. B. Brown及びG. Manecke編集のEnzyme Engineering Vol. 4、プレナムプレス(Plenum Press)社刊、ニューヨーク、1978年、Pp. 399-400に示された、補酵素がポリマーに付着しているもの、またはM. Perssonらにより、Biotechnology 9, Pp. 280-284 (1991)に示された、補酵素が脱水素酵素に共有結合しているもの、又は脱水素酵素の補因子として作用する限り、その他の置換基を有する合成類似体等がある。

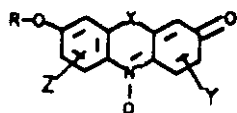
30

【0018】

本発明において媒介物質として好ましく使用されるアクリジノン類は、式A:

【0019】

【化11】



A

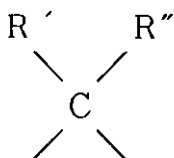
40

【0020】

で示される。これらの化合物は、以下に十分に述べる公知の方法によって調製される。上記の式においてXは、式:

【0021】

【化12】

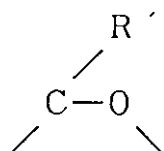


【0022】

の基（ここで、R'及びR''はそれぞれ独立して炭素数1～6の低級アルキルである）又は式：

【0023】

【化13】



【0024】

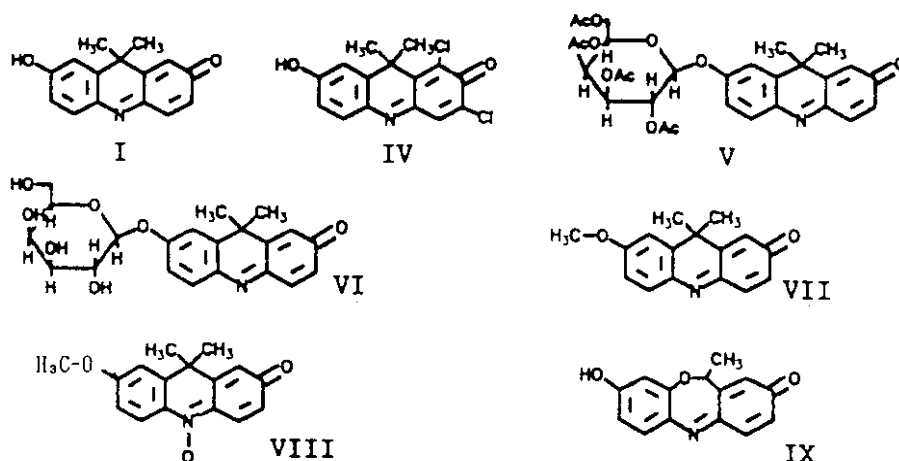
の基（ここで、R'は上述した定義を有する）であり、Y及びZはそれぞれ独立して水素又は別の1価の置換基であり、そしてQは $(O)_n$ （ここで、nは0又は1である）である。芳香族環が、その電子伝達性に悪影響を及ぼさないさまざまな置換基を、本発明の範囲から逸脱することなく有することができることは明らかであろう。このような置換基は、当業界における通常の技術を有する者の、電子伝達に必要な電気化学的特性を有する安定な化合物を調製する能力によってのみ制限されるものであり、置換又は非置換アリール、アルコキシ、アリーロキシ、ハロ（例えば、フッ素、塩素、臭素）、ニトロ、ジアルキルアミノなどの置換アミノ、ケト、カルボキシ、アルコキシカルボニル及びアミドが含まれる。

【0025】

化合物Aの7種類の類似体の構造は、式I及び式IV～IX：

【0026】

【化14】



【0027】

により示され、これらの合成法は、以下の実施例に記載する。

【実施例】

【0028】

10

20

30

40

50

実施例 I

本発明の化合物の合成操作又はその合成に関する記載は以下のとおりである。

【0029】

化合物 I 及び I V ~ V I

これらの化合物の合成法は、米国特許第 4, 810, 636 号に記載されており、その開示内容は、この引用をもって代えることとする。

【0030】

化合物 I X

文献中では「メチルパープル (Methyl Purple)」として知られているこの化合物の合成法は、ヒル (Hill) らによって *New Phytology* 77, 1-9 (1976) に記載されており、その開示内容は、この引用をもって代えることとする。

【0031】

化合物 V I I

7 - メトキシ - 9, 9 - ジメチル - 9 H - アクリジン - 2 - オンを、以下のように合成した。

まず、60% NaH 含有油 0.88 g (22 mmol, 1.1 等量) を、n - ペンタン 20 ml ずつで 2 回洗浄した。油分を除いた NaH を室温で無水ジメチルホルムアミド (DMF) 50 ml に懸濁させ、不活性ガス雰囲気下で 7 - ヒドロキシ - 9, 9 - ジメチル - 9 H - アクリジン - 2 - オン (I) 4.78 g (20 mmol, 1.0 等量) で少しずつ処理した。これを加えることにより混合物は暗青色に変色し、ガスを放出し、やや不透明になった。約 10 分後、CH₃I を 1.6 ml (25 mmol, 1.25 等量) 加え、その後反応物を室温で 70 分間攪拌した。反応混合物を、H₂O の 500 ml 及び酢酸エチル (EtOAc) の 100 ml と混合し、5% NaHCO₃ 水溶液により塩基性化して、相を分離させた。有機相を 5% NaHCO₃ 水溶液により 2 回、次いでブラインにより 2 回洗浄し、Na₂SO₄ により乾燥し、結晶が析出し始めるまで真空中で濃縮した。混合物を沸騰するまで加熱し、等量の n - ヘキサン (約 20 ml) で希釈し、放置して冷却した。析出した結晶をろ過により分離し、EtOAc / ヘキサン (1:1) で洗浄し、真空乾燥して、2 回の収穫により、標記の化合物 (4.8 g, 収率 94%) を、融点 140 ~ 141 の赤錆色のずんぐりしたプリズム状晶として得た。

【0032】

分析値

IR (CHCl₃) cm⁻¹ 1632, 1614, 1569, 1504, 1462, 1431, 1315, 1290, 1243, 1037, 898, 818; ¹H NMR (CDCl₃) 7.64 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.91 (d of d, J_A = 2.7 Hz 及び J_B = 8.7 Hz, 1H), 6.60 - 6.67 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.54 (s, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃) ppm 187.1, 161.9, 150.4, 147.6, 141.7, 139.6, 136.8, 133.8, 131.0, 127.3, 112.4, 112.3, 55.6, 37.4, 32.4.

解析値 C₁₆H₁₅NO₂ に関する計算値: C, 75.87; H, 5.97; N, 5.53

C₁₆H₁₅NO₂ に関する測定値: C, 75.91; H, 6.07; N, 5.47

【0033】

化合物 V I I I

7 - メトキシ - 9, 9 - ジメチル - 9 H - アクリジン - 2 - オン - N - オキシドを、以下のように合成した。

7 - メトキシ - 9, 9 - ジメチル - 9 H - アクリジン - 2 - オン (V I I) 0.253

3 g (1 mmol) を氷酢酸 (HOAc) 4.0 ml に溶解した溶液を、過剰 37% 過酢酸により処理し、60 の槽中で温めた。出発物質が消費され終わったとき、その反応物を、薄層クロマトグラフィ (アセトン/CHCl₃ [15:85、容積比] 溶媒により展開させるシリカゲルプレート) につけ、冷却した。反応物を真空中で蒸発乾固させ、残渣を、3 cm ID カラムに充填したシリカゲル 100 g (230~400 メッシュ ASTM) によるクロマトグラフィにより精製し、アセトン/CHCl₃ (4:96、容積比) 溶媒により展開した。主要生成物のバンドを集め、真空中で溶媒を除去し、最少量の沸騰している EtOAc から結晶させて、標記化合物 28.4 mg (10.5%) を、光沢のある黒色結晶として得た。

【0034】

10

分析値

IR (CHCl₃) cm⁻¹ 3001, 1611, 1594, 1488, 1468, 1445, 1411, 1371, 1294, 1248; ¹H NMR (CDCl₃) 8.27 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.00 (d of d, J_A = 9.1 Hz 及び J_B = 2.6 Hz, 1H), 6.8 - 6.77 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 1.69 (s, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃) ppm 185.9, 162.6, 147.2, 141.4, 136.1, 132.7, 130.7, 128.5, 123.7, 123.1, 113.1, 111.6, 55.8, 36.2, 32.9.

20

【0035】

実施例 II

媒介物質の評価

グラファイトの桿状電極 (直径 3 mm、マサチューセッツ州、ウードヒル、ジョンソン マッセーエレクトロニクス (Johnson Matthey Electronics) 社製) の表面を、まず微細グリットサンドペーパーにより、次いで粒子径 1 μm のアルミナ粒子の懸濁物により研磨して、電極を調製した。媒介物質の 1 mM メタノール溶液を調製し、電極を本溶液に 2 分間浸漬した。次に電極を水で濯ぎ、0.25 M のリン酸緩衝液 (pH 7) に短時間浸漬した。この時点で電流対電圧プロファイルを測定して、陰極及び陽極のピーク位置 対 Ag/AgCl 基準電極を求めた。次いで、酸化ピークよりも典型的には 100 mV 高い電位を用いて、20~100 μM の濃度で NADH を含む pH 7 の溶液中で電流を測定し、電流対 NADH 濃度データの最少自乗法より得られた直線の傾きにより、μA/μM NADH における各媒介物質の相対的感度を求めた。これらの相対的感度を、表 1 に示す。

30

【0036】

【表 1】

表1

媒介物質	相対的感度 $\mu\text{A}/\mu\text{M NADH}$
III (3-NTBO)	0.0095
I	0.0032
IV	0.0027
V	0.002
VI	0.0012
VII	0.0009
VIII	0.0022
IX	0.0030

10

20

【0037】

表1に記載した化合物の相対的感度は、媒介物質のNADH又はNADPHとの反応性の基準として解釈することができる。得られる値が高ければ、媒介物質はNADH又はNADPHとより反応する。これらの化合物は、有用であるための下限である $0.0009\mu\text{A}/\mu\text{M}$ を超える感度を示すため、いずれも、前述したバイオセンサー系において媒介物質として有用であろう。これより低いレベルでは、NADHに対する応答が、バックグラウンドと区別できないため、この値が下限となるのである。

【0038】

実施例III

化合物I、すなわち7-ヒドロキシ-9,9-ジメチル-9H-アクリジン-2-オン(DMA)を、その2mMのメタノール溶液から、実施例Iで用いた種類のグラファイト電極に吸収させた。2mMのDMAのメタノール溶液を含む2種類の試験溶液を調製し、次に電極をその溶液中に配置し、100mV/秒の周期性ボルタンメトリーを用いてスキャンを行い、接触波を探した。第一試験液では、3mMの濃度まで量を引き上げながらNADHを添加した。300~400mV対Ag/AgClの間で接触波が現れた。還元型媒介物質の酸化を示すこの接触波を、図1に示す。2番目の実験では、コントロールとして、4mMのNAD及び400mg/dlグルコースを用いた。次に少量のグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)(1mg/mlを添加した。NADHのみを用いた実験において出現したのと同じの接触波が観察された(図2)。酵素反応によって産生され

30

40

【0039】

実施例IV

グラファイト/炭素作用電極を有する印刷センサーカードと銀/塩化銀基準電極からなる印刷電極を用いた実験を行った。ピペットを用い、GDH75mg/gを含むポリマー溶液処方物(2%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液)を用いてGDH酵素により作用電極を処理し、5mMDMAのメタノール溶液を含む槽中に作用電極を4分間浸して、電極に媒介物質を導入し、次いで電極を槽から引き出し、乾燥した。電極をキャピラリーギャップを有するフォーマットで組み立て、1mMNAD⁺/グルコースの緩衝液溶

50

液 (1 0 0 m M P O ₄ = / 1 0 0 m M K C l) により処理し、 + 0 . 6 V 対 A g / A g C l の電位で電流を測定した。グルコース濃度の関数としての電流密度を、図 3 に図示するが、これにより、本発明の媒介物質を用いて調製されたセンサーが、検討中の種類のバイオセンサー系で用いられた場合、適切な濃度反応相関を示すと理解することができる。

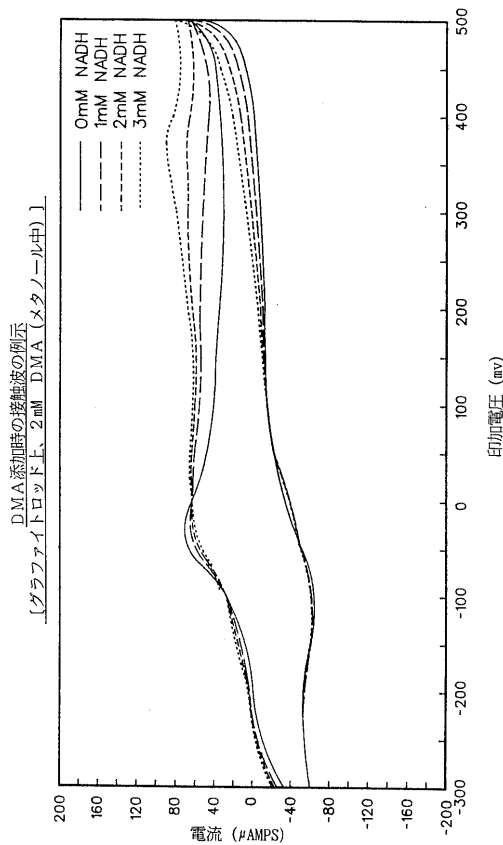
【図面の簡単な説明】

【図 1】 N A D H のみ系での、 D M A 添加時の接触波の観察を示す。

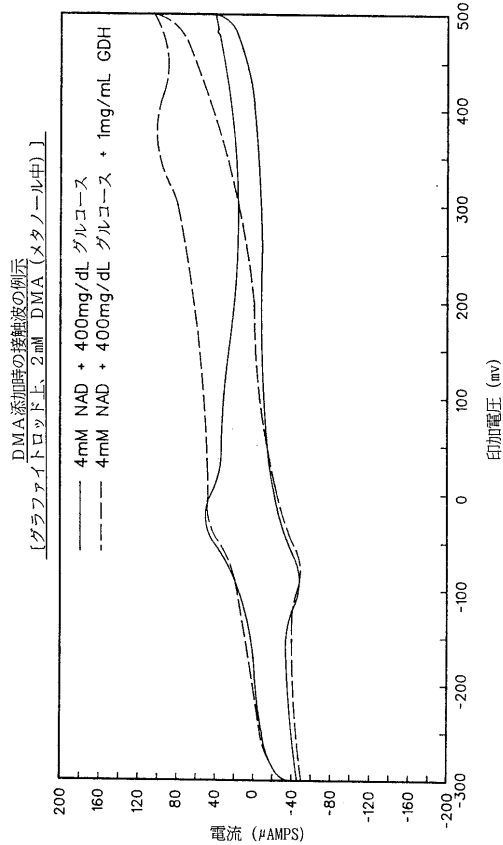
【図 2】 N A D + グルコース、及び N A D + グルコース + G D H の系での、 D M A 添加時の接触波の観察を示す。

【図 3】 グルコース濃度と電流密度との関係を示す。

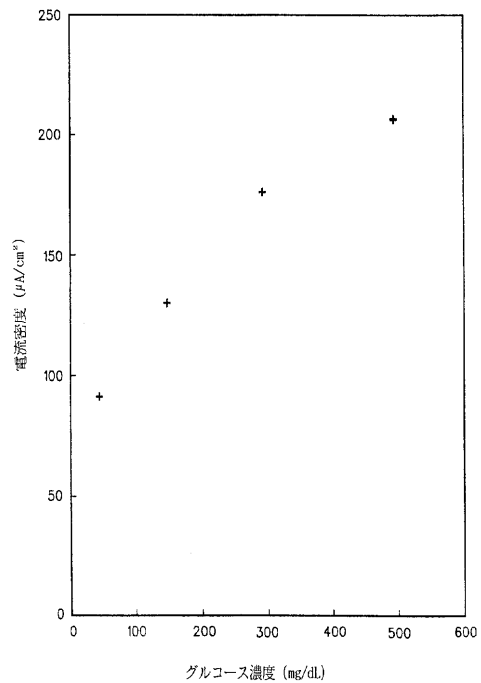
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I
C 0 7 H 19/207	C 0 7 H 19/207
C 0 7 H 21/02	C 0 7 H 21/02
C 2 5 B 3/04	C 2 5 B 3/04
C 2 5 B 11/12	C 2 5 B 11/12
G 0 1 N 27/327	H 0 1 M 4/90 Y
G 0 1 N 27/416	G 0 1 N 27/30 3 5 3 Z
H 0 1 M 4/90	G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

(72)発明者 マシュー・ケー・ムショー
 アメリカ合衆国、インディアナ州、4 6 5 3 0、グレンジャー、エヌ・フィーザント・コーブ・ド
 ライブ 1 0 6 4 8

審査官 斎藤 真由美

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12Q 1/00-70
 G01N 27/00-92
 C07D219/00-269/02
 C07H 17/00-21/04
 C25B 3/00-11/20
 CA(STN)、
 REGISTRY(STN)、
 MEDLINE(STN)
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 EUROPAT(QUESTEL)