

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 9 日(09.09.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/139786 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/02 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C07D 251/26 (2006.01) *G01N 31/00* (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/056416
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 4 日(04.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP). 静岡県公立大学法人 (SHIZUOKA PREFECTURE PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒4228021 静岡県静岡市駿河区小鹿二丁目 2 番 1 号 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: 大垣内 誠(OGAITO, Makoto); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 内田 あずさ(UCHIDA, Azusa); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 轟木 堅一郎(TODOROKI, Kenichiro);

〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5 2 - 1 静岡県立大学内 Shizuoka (JP). 中野 達基(NAKANO, Tatsuki); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5 2 - 1 静岡県立大学内 Shizuoka (JP). 豊岡利正(TOYO'OKA, Toshimasa); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5 2 - 1 静岡県立大学内 Shizuoka (JP).

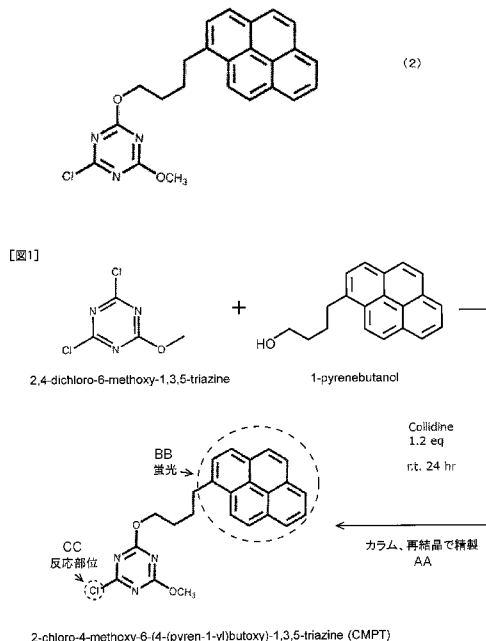
(74) 代理人: 特許業務法人京都国際特許事務所 (KYOTO INTERNATIONAL PATENT LAW OFFICE); 〒6008091 京都府京都市下京区東洞院通四条下ル元悪王子町 3 7 番地 豊元四条烏丸ビル Kyoto (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENCE DERIVATIZATION REAGENT AND AMINE ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 蛍光誘導体化試薬及びアミン分析方法



(57) Abstract: The present invention is a method for analyzing a polyamine having multiple amino groups in the molecule or a monoamine having an amino group and a phenolic hydroxy group in the molecule on the basis of the measurement result of the intensity of excimer-forming fluorescence emitted as a result of the derivatization of the polyamine or the monoamine with a fluorescence derivatization reagent having a pyrene group, said method being characterized in that the fluorescence derivatization reagent comprises 2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-1-yl)butoxy)-1,3,5-triazine represented by formula (2).

(57) 要約: 本発明は、同一分子内に複数のアミノ基を有するポリアミン又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有するモノアミンを、ピレン基を有する蛍光誘導体化試薬で誘導体化することにより発せられるエキシマー蛍光の強度の測定結果に基づき前記ポリアミン又はモノアミンを分析する方法であって、前記蛍光誘導体化試薬が、式(2)で表される、2-クロロ-4-メトキシ-6-(4-(ピレン-1-イル)ブトキシ)-1,3,5-トリアジンを含むことを特徴とする。

AA Purified with column or by recrystallization
BB Fluorescent
CC Reaction site



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 蛍光誘導体化試薬及びアミン分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を利用したヒスタミンやチラミン等の不揮発性アミン類の分析に用いられる蛍光誘導体化試薬及び該蛍光誘導体化試薬を用いたアミン分析方法に関する。

背景技術

[0002] ヒスタミン（Him）やチラミン（Tym）などの不揮発性アミン類は、タンパク質やアミノ酸が微生物によって分解されることにより産生される生理活性物質であり、これらアミン類の過剰摂取はアレルギー様食中毒の原因となることが知られている。そのため、世界の多くの国において食品中に含まれる不揮発性アミン類の量が規制されている。

[0003] 上記不揮発性アミン類を含む食品の一つに日本の伝統的な発酵食品（調味料）である醤油がある。醤油は、大豆及び小麦を乳酸菌、酵母等の微生物により発酵させて製造されるため、その製造過程において大豆タンパク質由来のヒスタミンやチラミンが産生される。従って、醤油に含まれるヒスタミンやチラミンの量を把握しておくことは品質管理の点で重要である。醤油の製造工程において不揮発性アミンの量を簡便に且つ高感度に測定する方法が求められている。

[0004] 食品中の不揮発性アミン類の分析法としては、食品衛生検査指針に示されているダンシル蛍光誘導体化－HPLC分析法や、HPLC－タンデム質量分析法（LC-MS/MS）が一般的である。しかし、ダンシル蛍光誘導体化－HPLC分析法は煩雑な前処理操作が必要であり、しかも感度や選択性に劣るといった問題がある。一方、LC-MS/MSは、感度や選択性は優れるものの、高額且つ大掛かりな装置を使用するため、中小規模の食品工場等で実施することが難しい。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平10-142228号公報

特許文献2：特開2001-242174号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hideyuki Yoshida, et al., "Simultaneous Determination of Histamine and Histidine by Liquid Chromatography Following Intramolecular Excimer-forming Fluorescence Derivatization with Pyrene-labeling Reagent", Analytical Sciences, March 2004, Vol.20, pp.557-559

非特許文献2：Heidi S. Marks (Rupp), and Collin R. Anderson, "Determination of putrescine and cadaverine in seafood (finfish and shellfish) by liquid chromatography using pyrene excimer fluorescence", Journal of Chromatography A, 1094(2005), pp.60-69

非特許文献3：Hideyuki Yoshida, et al., "A simple liquid chromatography method based on intramolecular excimer-forming derivatization and fluorescence detection for the determination of tyrosine and tyramine in urine", Journal of Chromatography B, 821(2005), pp.88-93

非特許文献4：Kenichiro Todoroki, et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62, pp.6206-6211

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 近年、ピレン基を有する化合物を含む試薬（ピレン試薬）を用いたエキシマー蛍光誘導体化－HPLC法が開発されている（特許文献1、2）。この分析法では、1分子内に2個以上のアミノ基を有するポリアミンをピレン試薬で蛍光誘導体化することにより該ポリアミン1分子中に複数のピレン基を導入し、その結果形成される励起二量体（excited-state dimer、以下「エキシマー」という。）を有するポリアミン（つまり、ラベル化されたポリアミン）をHPLCを用いて分離し、その蛍光（エキシマー蛍光）の強度を測定する。エキシマー蛍光の波長とピレン単体（モノマー）から発せられる蛍光波長とは異なるため、分取した試料中にモノアミンやピレン試薬が含まれている場合

でも、ポリアミンを選択的に且つ高感度で分析することができる。

[0008] ピレン試薬として4-(1-ピレン)酪酸クロリドや活性エステル型の 4-(1-ピレン)酪酸N-ヒドロキシコハク酸イミド等が用いられているが、これらはいずれも吸湿性が高く、容易に加水分解するため、長期保存に適さない。また、ポリアミンを蛍光誘導体化する際は粉末状のピレン試薬を溶媒に溶かした溶液が用いられるが、従来のピレン試薬は、溶媒に溶かした状態では数日間しか保存できない（非特許文献1～3）。このため、ポリアミンを蛍光誘導体化する都度、ピレン試薬を調製しなければならず、作業性が悪かった。さらに、従来のピレン試薬は反応性のロット間差が大きく、分析再現性の点で問題があった。

なお、ここではピレン試薬を用いてポリアミンを分析する場合について説明したが、最近では、1分子中にアミノ基とフェノール性水酸基を有するチラミン等のモノアミンもピレン試薬で蛍光誘導体化されることによりエキシマーを形成することが分かっている。従って、上述したピレン試薬を用いてモノアミンを分析する場合にも同様の問題が生じる。

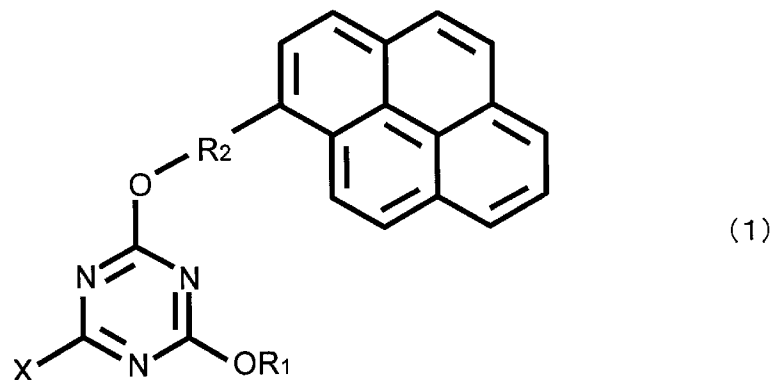
[0009] 本発明が解決しようとする課題は、高感度で且つ選択的なアミンの分析方法を提供することであり、該分析方法に用いられる蛍光誘導体化試薬の保存安定性、分析再現性を高めることである。

課題を解決するための手段

[0010] アミンの蛍光誘導体化試薬として用いられる化合物は、ピレンを基本とし、これにアミノ基又はフェノール性水酸基との反応性官能基が結合したものである。本願発明者は、蛍光誘導体化試薬の保存安定性を高めるために加水分解しにくい反応性官能基の構造を探索した結果、2-クロロ-4-メトキシ-6-置換-1, 3, 5-トリアジン等を反応性官能基とするピレン誘導体が有効であることを見出した。

具体的には、本発明に係る蛍光誘導体化試薬は、以下の一般式（1）

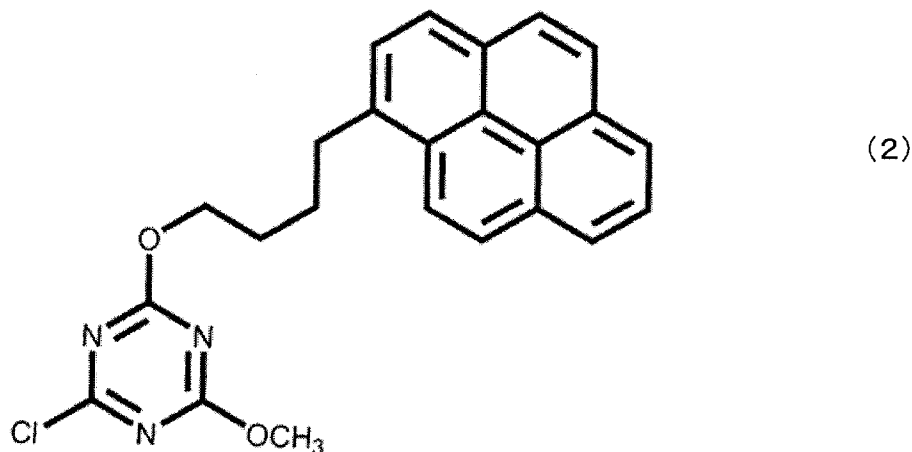
[化1]



で表される新規化合物を含むことを特徴とする。

[0011] ここで、Xはハロゲン元素を、R₁はアルキル基を、R₂はアルキル鎖を表しており、特にXは、アミノ基やフェノール性水酸基との反応性が優れるC I（塩素）が好ましい。また、アルキル基及びアルキル鎖の炭素数が多いと、蛍光誘導体化試薬で誘導体化したモノアミンやポリアミンがH P L Cのカラムから溶出され難くなるため、R₁は炭素数1～4のアルキル基、R₂は炭素数1～4のアルキル鎖であることが好ましい。なお、ピレンアルコールは一般式（1）で表される化合物の原料化合物の一つであるが、アルキル鎖の炭素数が1～4のピレンアルキルアルコールは市販されており入手しやすい。従って、この点からも、アルキル鎖の炭素数は1～4であることが好ましい。さらに、本発明に係る蛍光誘導体化試薬は、XがC I（塩素）、R₁がメチル基、R₂がブチル鎖である下記式（2）で表される化合物（2-クロロ-4-メトキシ-6-（4-（ピレン-1-イル）ブトキシ）-1, 3, 5-トリアジン）を含むことが好ましい。

[化2]



[0012] 一般式（１）で表される化合物のハロゲン基は、アミノ基又はフェノール性水酸基に選択的に結合する。従って、目的物質が同一分子内に複数のアミノ基を有する物質（ポリアミン）又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有する物質（モノアミン）の場合、該目的物質と前記化合物が反応することによりピレンのエキシマーが形成され、エキシマー蛍光を発する。従って、このエキシマー蛍光の強度を測定することにより、目的物質を検出することができる。

[0013] なお、同一分子内に１個のアミノ基のみを有する物質や同一分子内に１個のフェノール性水酸基のみを有する物質も、前記化合物と反応して蛍光を発する物質となる。従って、本発明に係る蛍光誘導体化試薬は、このような物質の蛍光誘導体化（ラベル化）にも用いることができる。この場合、エキシマー蛍光の波長（475nm）とピレン単体から発せられる蛍光の波長（375nm）が異なるため、それぞれの波長の蛍光強度を測定することにより、両者を区別して検出することができる。

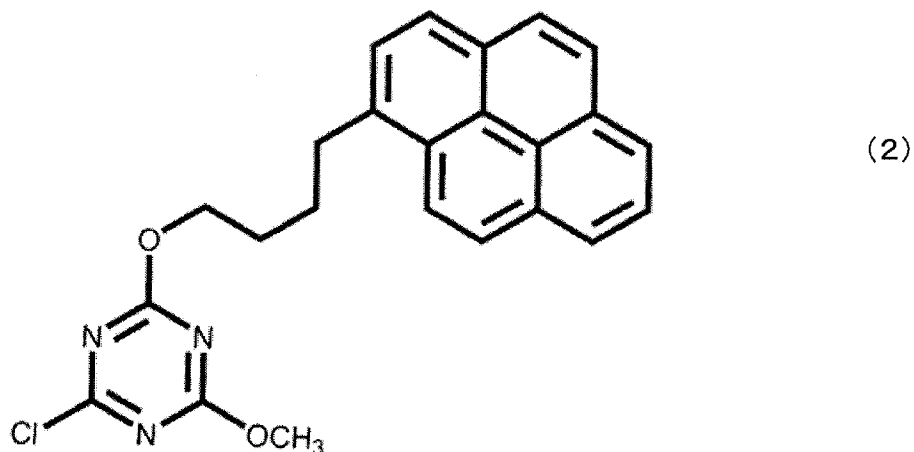
[0014] また、本発明に係るアミン分析方法は、

同一分子内に複数のアミノ基を有するポリアミン及び／又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有するモノアミンを、ピレン基を有する蛍光誘導体化試薬で誘導体化することにより発せられるエキシマー蛍光の強度の測定結果に基づき前記ポリアミン及び／又はモノアミンを分析する方法で

あって、

前記蛍光誘導体化試薬が、下記の式（２）

[化２]



で表される、２－クロロ－４－メトキシ－６－（４－（ピレン－１－イル）ブトキシ）－１，３，５－トリアジンを含むことを特徴とする。

発明の効果

[0015] 本発明に係る蛍光誘導体化試薬はアミノ基やフェノール性水酸基に選択的に結合し、しかも、同一分子内に複数のアミノ基又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有する物質に結合したときにエキシマー蛍光を発するため、該エキシマー蛍光の強度を測定することにより、前記物質の量を選択的に且つ高感度に測定することができる。また、本発明に係る蛍光誘導体化試薬は吸湿性が低いため保存安定性に優れ、また、溶媒に溶かした状態でも、従来の蛍光誘導体化試薬に比べると長期間、反応性を維持することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図１]本発明の一実施例であるCMP Tの合成例を示す、２，４－ジクロロ－６－メトキシ－１，３，５－トリアジンと１－ピレンブタノールの反応式。
[図２]ヒスタミンのACN溶液をピリジンとCMP Tを含むDMF溶液に溶解してヒスタミンの蛍光誘導体化した後、エキシマー蛍光強度を検出したときの、反応時間と蛍光強度との関係を示すグラフ。

[図3]ヒスタミンのACN溶液をピリジンとCMP Tを含むDMF溶液に溶解してヒスタミンの蛍光誘導体化した後、エキシマー蛍光強度を検出したときの、CMP Tの濃度と蛍光強度の関係を示すグラフ。

[図4]CMP Tの濃度を20 mM、反応時間を20分に設定してヒスタミンをCMP Tで蛍光誘導体化したときのHPLC分析結果度(a)及びHPLCの条件(c)並びにMSの結果(b)を示す。

[図5]エキシマー蛍光強度と保存時間の関係を示すグラフ。

[図6]醤油を水層とアセトニトリル層に分離した状態を示す画像(a)、水酸化ナトリウムの濃度と回収率の関係を示すグラフ(b)、加熱ACNと非加熱ACNを用いたときの回収率の違いを示すグラフ(c)。

[図7]本実施例に係るヒスタミン分析法の前処理条件。

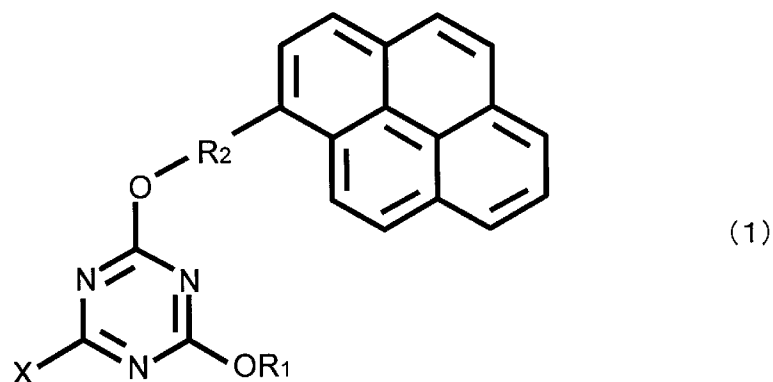
[図8]本実施例に係るヒスタミン分析法を用いてヒスタミンを検出した結果を示すクロマトグラム。

[図9]ヒスタミンとCMP Tの反応を示す図。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明に係る化合物は以下の一般式(1)で表される、エキシマー蛍光誘導体化試薬として有用な化合物である。

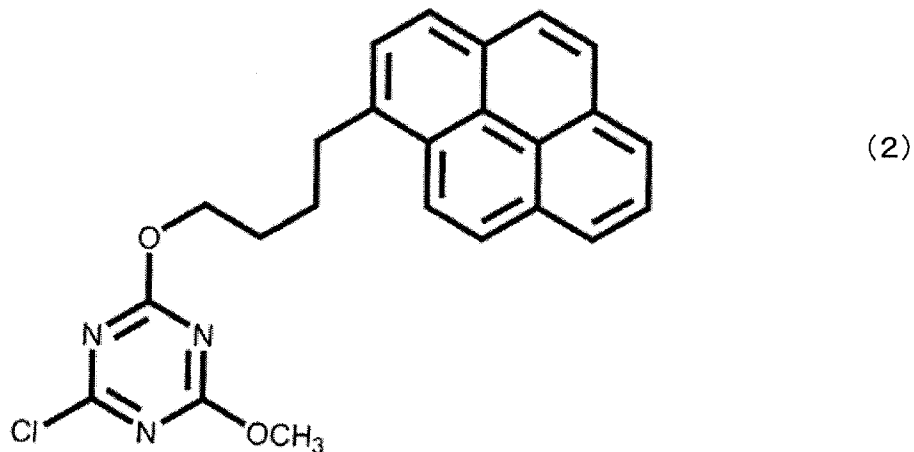
[化1]



[0018] 一般式(1)において、Xはハロゲン元素を、 R_1 はアルキル基を、 R_2 はアルキル鎖を表しており、特にXがCl(塩素)、 R_1 がメチル基、 R_2 がブチル鎖である下記の式(2)で表される2-クロロ-4-メトキシ-6-

4-((ピレン-1-イル)ブトキシ)-1,3,5-トリアジン (2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-1-yl)butoxy)-1,3,5-triazine (CMP T)) は、ポリアミン類との反応性、保存安定性の点で優れている。

[化2]



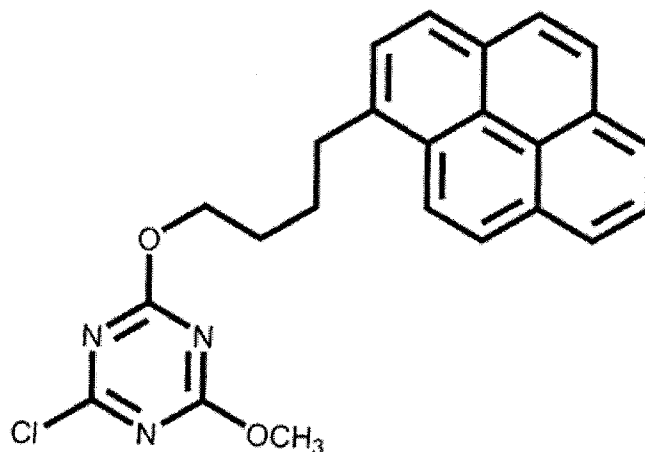
以下、CMP Tを用いたポリアミン分析方法の実施例について説明する。なお、以下では、ヒスタミンを分析対象とする場合を中心に説明するが、ヒスタミン以外のポリアミン、或るいはチラミン等の同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有するモノアミンでも同様である。

実施例

[0019] (1) CMP Tの製造方法

図1に示すように、2,4-ジクロロ-6-メトキシ-1,3,5-トリアジン (2,4-dichloro-6-methoxy-1,3,5-triazine) 1当量と1-ピレンブタノール (1-pyrenebutanol) 1当量に、コリジン (Collidine) 1.2当量を加え、室温で24時間放置した。この溶液を高速液体クロマトグラフ (HPLC装置) で分離した後、再結晶化して精製した。得られた生成物をNMR分析及び質量分析 (MS) で確認したところ、以下の式で表される化合物 (CMP T) であると同定された。

[化2]



(2)

CMP Tは、ピレン基が蛍光部位であり、Cl基が反応部位である。

[0020] (2) CMP Tの溶媒の検討

CMP Tを用いたヒスタミンのエキシマー蛍光誘導体化反応に適した塩基及び溶媒を探索するために3種類の塩基（炭酸カリウム、コリジン (Collidine)、ピリジン(Pyridine)）と、7種類の溶媒（DMF (N,N-dimethylformamide)、DMSO (Dimethyl sulfoxide)、THF (tetrahydrofuran)、ACN (acetonitrile)、酢酸エチル、クロロホルム、アセトン)にCMP Tを溶かしたときの溶液の状態を観察した。その結果を表1に示す。表1中「×」は、CMP Tが完全に溶解しなかった塩基と溶媒の組み合わせを示す。

[表1]

塩基／溶媒	DMF	DMSO	THF	ACN	酢酸エチル	クロロホルム	アセトン
炭酸カリウム	○	×	×	×	×	×	×
Collidine	○	×	×	×	×	×	×
Pyridine	○	×	×	×	×	×	×

[0021] 表1から、CMP Tの溶媒としてはDMFが優れていることが分かる。また、炭酸カリウム、コリジン、及びピリジンのいずれの塩基もCMP Tの溶解性に違いはなかったが、炭酸カリウムを用いた溶液では水を加えたときにCMP Tの析出が見られた。後述するように、醤油中のヒスタミンを分離するための前処理で水が添加されることを考慮すると、炭酸カリウムを用いる

ことは好ましくない。また、塩基としてピリジンを用いた溶液及びコリジンを用いた溶液でヒスタミンを蛍光誘導体化したときのエキシマー蛍光強度を測定したところ、ピリジンの方がコリジンよりもエキシマー蛍光の強度が大きかった。そこで、本実施例では、ヒスタミン分析に用いる塩基としてピリジンを採用した。

[0022] (3) エキシマー蛍光誘導体化の反応時間及びCMP Tの濃度の検討

図2及び図3は、ヒスタミンのACN溶液10 μ Lをピリジン3 μ L、CMP TのDMF溶液20 μ Lに溶解し、ヒスタミンを蛍光誘導体化した後、HPLCで蛍光誘導体化ヒスタミンを分離してそのエキシマー蛍光強度を検出した結果を示す。図2は、CMP Tの濃度を20mMに、反応温度を50 $^{\circ}$ Cに設定したときの、反応時間と蛍光強度（面積）との関係を示す。また、図3は反応温度を50 $^{\circ}$ Cに、反応時間を20分に設定したときの、CMP Tの濃度と蛍光強度の関係を示す。図2から分かるように、反応時間が20分までは蛍光強度が徐々に増加したが、20分以降は蛍光強度はほとんど変化しなかった。また、図3から分かるように、20mMまでの濃度範囲では蛍光強度が徐々に増加したが、20mMよりも大きい濃度範囲では蛍光強度はほとんど変化しなかった。ヒスタミン分析に要する時間の短縮、ヒスタミン分析に使用するCMP T量の低減の観点から、本実施例に係るヒスタミン分析におけるエキシマー蛍光誘導体化の反応時間を20分に、CMP T濃度を20mMに設定した。

[0023] この条件で行ったヒスタミン（50ppmの標準品）のHPLC分析結果を図4（a）に、このときのHPLCの条件を図4（b）に示す。また、HPLC分析によりエキシマー蛍光が検出された物質のMS分析を行った結果を示す図4（c）から、ヒスタミン1分子にCMP T2分子が結合した物質が生成されていることが確認された。

[0024] (4) CMP Tの溶液状態での保存安定性の確認

CMP TをDMFに溶解して溶液を作製し、この溶液を室温で保存した後、この溶液を用いてヒスタミンを蛍光誘導体化した。得られた蛍光誘導体化

ヒスタミンをHPLCを用いて分離し、そのエキシマー蛍光の強度を求めた。その結果、エキシマー蛍光強度と保存時間の関係は図5に示すようになった。図5から分かるように、CMPTはDMF溶液の状態でも40日以上、ヒスタミンとの反応性が低下せず、蛍光誘導体化することができた。このことから、CMPTは従来のエキシマー蛍光誘導体化試薬に比べると、溶液状態での保存安定性に優れることが分かる。

[0025] (5) 前処理条件の検討

醤油に含まれるアミン類をLC-MS/MSで分析する場合、アミン類とその他の成分（塩分、有機酸、タンパク質、メラノイジン、アミノ酸等）を分離する前処理が必要である。この前処理法として、非特許文献4に記載された方法が知られている。この方法では、醤油（20 μ L）に0.1Mの硫酸マグネシウム（20 μ L）、1Mの水酸化ナトリウム（20 μ L、pH10）、及びアセトニトリル320 μ Lを添加し、遠心処理によりアミン類を含むアセトニトリル層とそれ以外の成分を含む水層に分離する（図6（a）参照）。硫酸マグネシウムはタンパク質等の塩析のために、水酸化ナトリウムはpHを調整して分子型のヒスタミン量を増やすために添加される。本発明者は、この前処理法を参考に、ヒスタミンをCMPTで蛍光誘導体化する場合に適した前処理条件を検討した。

具体的には、濃度が既知のヒスタミンを含む試料をアセトニトリル層と水層に分離したときに該アセトニトリル層に回収されたヒスタミンの割合（回収率（%））を、水酸化ナトリウムの濃度を1～4Mに変化させたとき（図6（b））、非加熱のアセトニトリルと加熱したアセトニトリルを用いたとき（図6（c））の両方について調べた。

[0026] 図6（b）から分かるように、水酸化ナトリウムの濃度が1Mではヒスタミンの回収率は25%であったが、2M～4Mの範囲ではヒスタミンの回収率は45%であった。以上より、醤油の前処理に用いる水酸化ナトリウムは、2M～4Mの濃度範囲が適切であると思われる。

[0027] また、図6（c）から分かるように、加熱ACNを用いると、蛍光誘導体

化ヒスタミンのピーク形状が左右対称な形状であったが、非加熱 A C N を用いると、蛍光誘導体化ヒスタミンは左右非対称な形状であった。これは、非加熱 A C N を用いたときに試料中のタンパク質を十分に除くことができず、タンパク質由来の物質の蛍光ピークがヒスタミン由来の蛍光ピークと重複したためだと思われる。従って、醤油の前処理には非加熱 A C N よりも加熱 A C N を用いる方が好ましいと思われる。

[0028] 上記（１）～（６）の結果に基づき、本実施例に係るヒスタミン分析における醤油の前処理条件を図 7 に示す内容に決定した。ここでは、内部標準物質（Internal standard（I.S.））としてオクタンジアミンを用いた。また、この前処理により水層と分離されたアセトニトリル層に、C M P T の D M F 溶液（20mM）を添加してアミン類（ヒスタミン）を蛍光誘導体化した後、H P L C 分析によりエキシマー蛍光強度を検出した結果を図 8 に示す。この結果から、図 9 に示す反応によりヒスタミンが蛍光誘導体化され、ピレンエキシマーが形成されたことが確認された。さらに、このときのヒスタミン分析の検出限界（Limit of detection、L O D）、定量下限（Limit of quantitation、L O Q）、直線性、検量線範囲を表 2 に示す。表 2 より、本実施例に係るヒスタミン分析は、醤油中のヒスタミンを分析するのに十分な直線性と感度を得られることが分かった。

[表2]

Compound	LOD S/N=3 (ppm)	LOQ (ppm)	Linearity	Calibration curve range (ppm)
Histamine	7.5	25	0.9993	25-500

[0029] 次に、ヒスタミン濃度が異なる複数の試料について、上記のヒスタミン分析の日内変動、日間変動を調べた。この結果を表 3 に示す。

[表3]

添加濃度		Precision (%)	Accuracy (%)
25 ppm	Intra-day	2.05	120.7
	Inter-day	6.01	123.5
50 ppm	Intra-day	4.85	98.0
	Inter-day	—	—
100 ppm	Intra-day	2.76	96.0
	Inter-day	3.07	92.6
250 ppm	Intra-day	5.61	95.1
	Inter-day	—	—
500 ppm	Intra-day	3.26	96.9
	Inter-day	5.04	93.1

Intra-day n=6 , Inter-day n=2×6 days

表3から分かるように、日内変動は2.05～5.61%であり日間変動は3.07%であった。また、確度（真度）は92.6～123.5%であった。以上より、上述の前処理条件によるヒスタミン分析は再現性、正確性共に優れていることが分かった。

[0030] 次に、非特許文献4に記載されている醤油と同じ種類の醤油を試料として、本実施例に係るヒスタミン分析法によりヒスタミンの定量分析を行った。その結果を表4に示す。表4の右端の欄は非特許文献4に掲載されている、MS分析装置で求められたヒスタミン定量値を示す。

[表4]

サンプルNo.	種類	製造会社	Him定量値	Him定量値 (文献値)
1	こいくち	A	1.34	2.0
2	こいくち	B	241.0	234.5
3	こいくち	C	11.0	14.1
4	こいくち	D	34.1	32.6
5	こいくち	E	768.5	774
6	こいくち	F	1.45	1.2
7	うすくち	B	362.1	363.7
8	うすくち	G	1.24	1.9
9	うすくち	H	9.91	11.1
10	さいしこみ	B	65.7	62.5
11	さいしこみ	I	172.3	173
12	さいしこみ	G	47.0	46.2
13	たまり	J	138.9	131.1

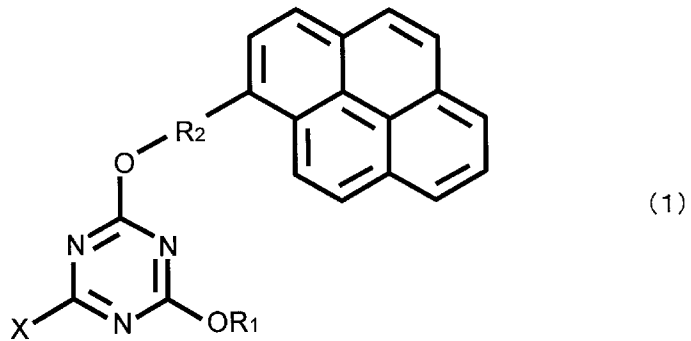
[0031] 表4から分かるように、本実施例に係るヒスタミン分析法でも、MS分析法と同程度の定量値が得られた。このことから、本実施例に係るヒスタミン分析法は醤油中のヒスタミン量の測定に有効な方法であることが分かった。

[0032] なお、上記した実施例は、本発明の一例に過ぎず、本発明の趣旨の範囲内で適宜変更、追加を行っても、本願の請求の範囲に包含される。

請求の範囲

[請求項1] 一般式 (1)

[化1]

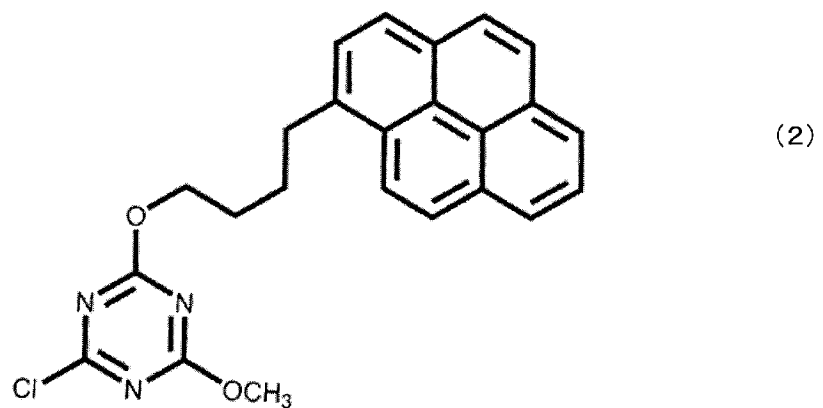


で表される化合物を含む、同一分子内に複数のアミノ基を有するポリアミン又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有するモノアミンを蛍光誘導体化するための蛍光誘導体化試薬。

ここで、Xはハロゲン元素を、R₁はアルキル基を、R₂はアルキル鎖を表す。

[請求項2] 前記化合物が、式 (2)

[化2]



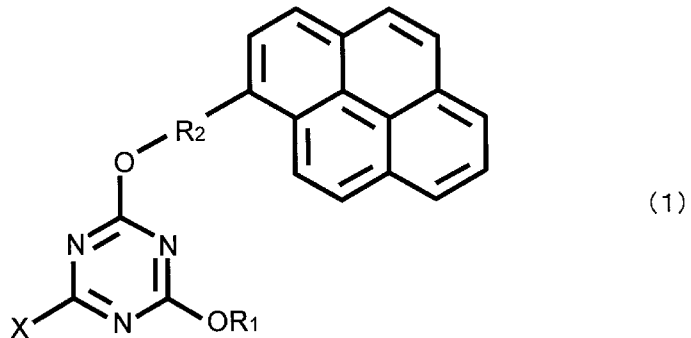
で表される、2-クロロ-4-メトキシ-6-(4-(ピレン-1-イル)ブトキシ)-1,3,5-トリアジンであることを特徴とする請求項1に記載の蛍光誘導体化試薬。

[請求項3] 同一分子内に複数のアミノ基を有するポリアミン又は同一分子内にアミノ基とフェノール性水酸基を有するモノアミンを、ピレン基を有

する蛍光誘導体化試薬で誘導体化することにより発せられるエキシマ一蛍光の強度の測定結果に基づき前記ポリアミン又はモノアミンを分析する方法であって、

前記蛍光誘導体化試薬が、一般式（１）

〔化１〕



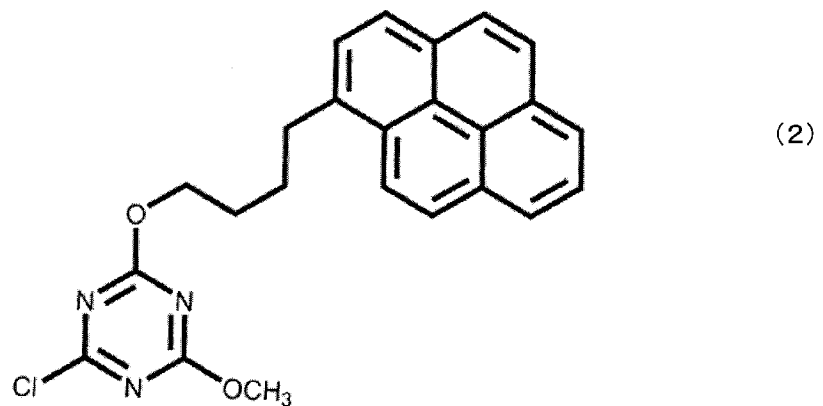
で表される化合物を含むことを特徴とするアミン分析方法。

ここで、Xはハロゲン元素を、R₁はアルキル基を、R₂はアルキル鎖を表す。

〔請求項４〕

前記蛍光誘導体化試薬が、式（２）

〔化２〕

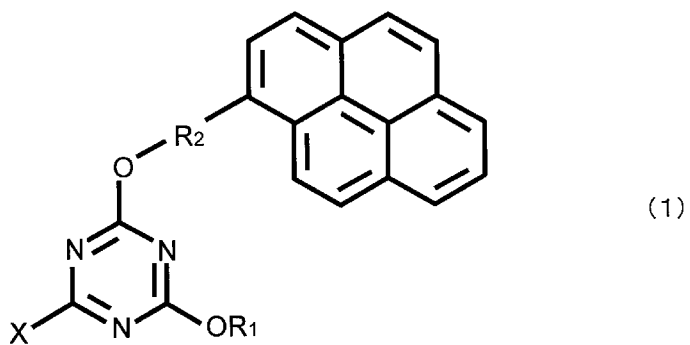


で表される、２－クロロ－４－メトキシ－６－（４－（ピレン－１－イル）ブトキシ）－１，３，５－トリアジンを含むことを特徴とする請求項３に記載のアミン分析方法。

〔請求項５〕

下記の一般式（１）

[化1]

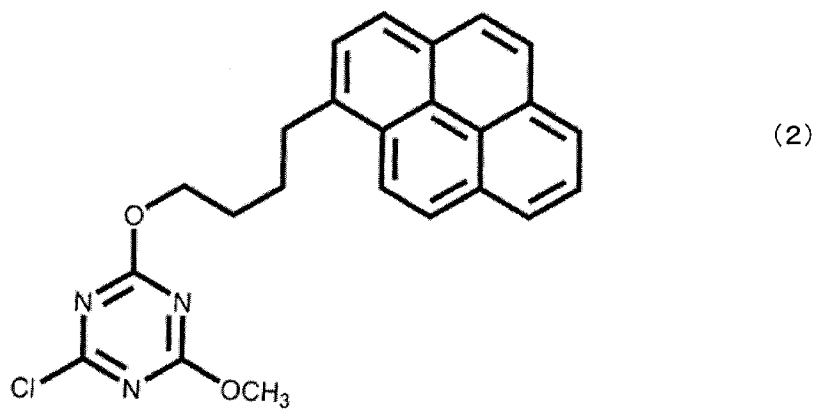


で表される化合物。

ここで、Xはハロゲン元素を、R₁はアルキル基を、R₂はアルキル鎖を表す。

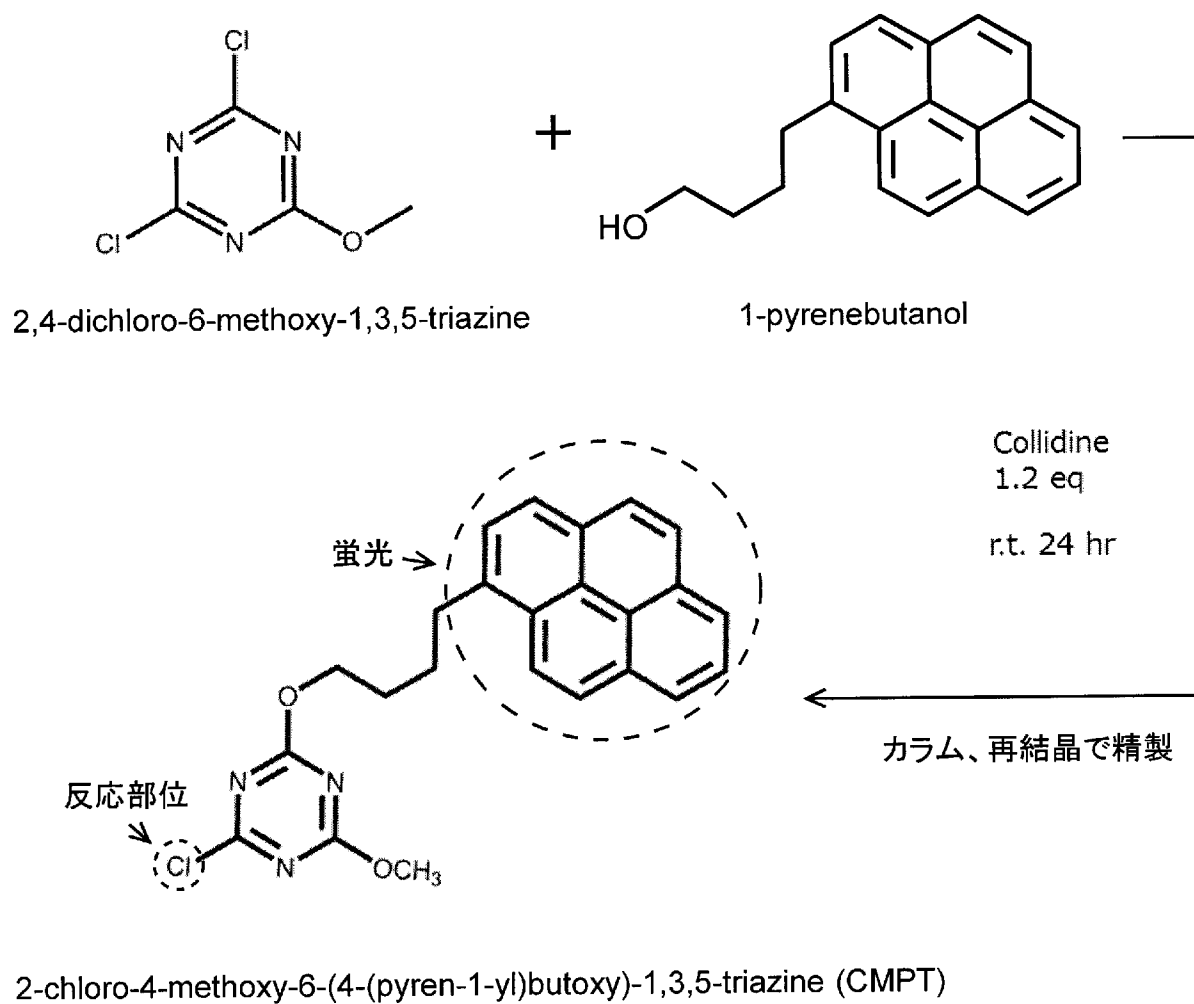
[請求項6] 式(2)

[化2]

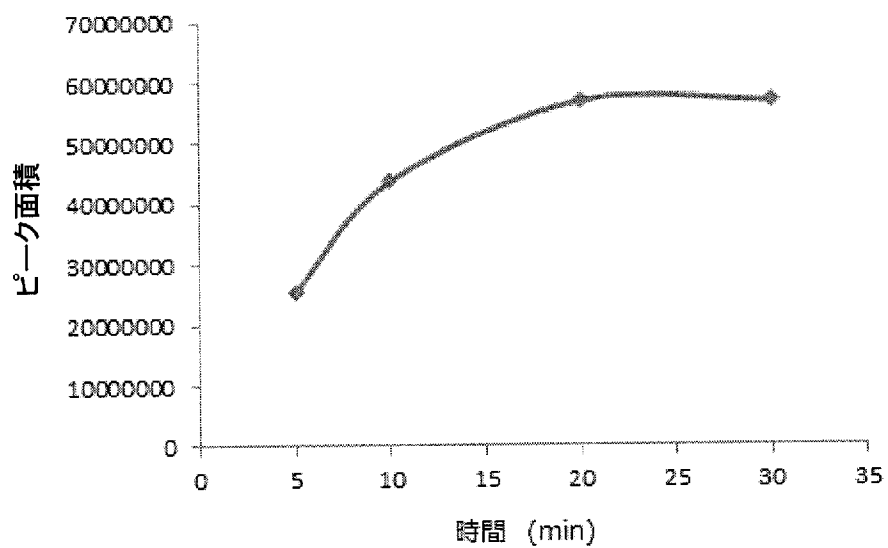


で表されることを特徴とする請求項5に記載の化合物。

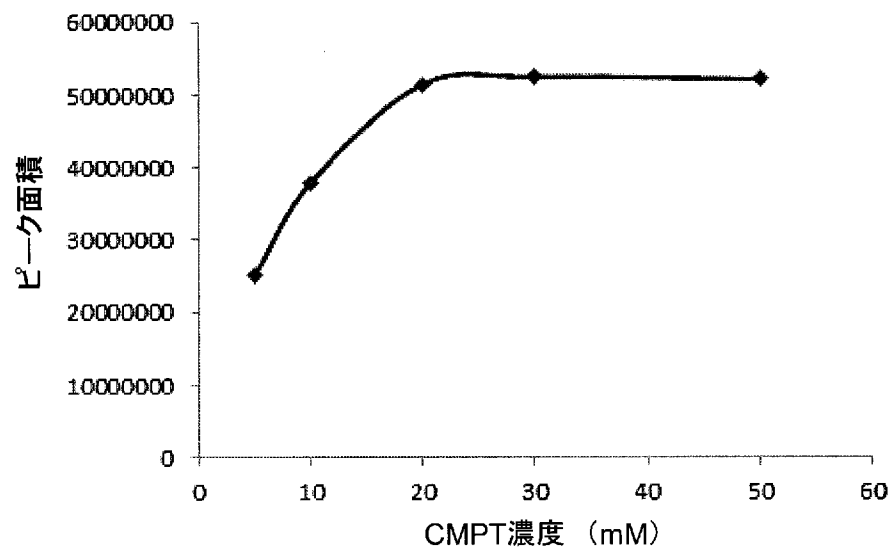
[図1]



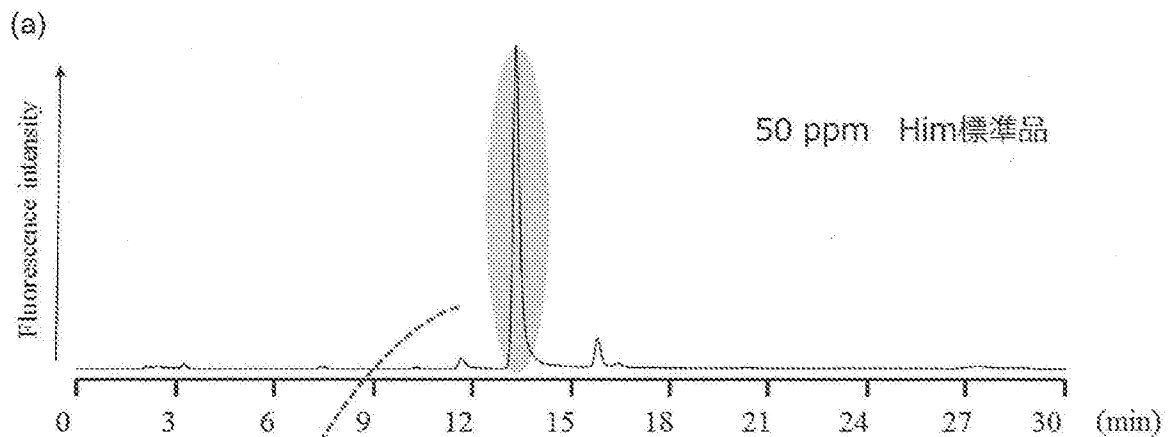
[図2]



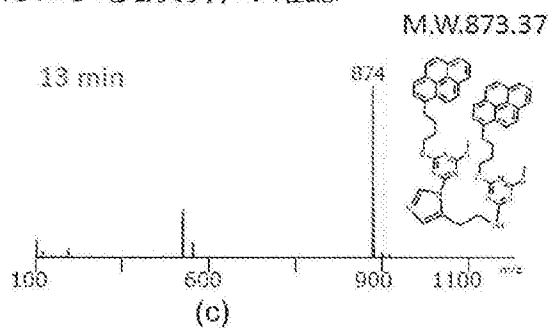
[図3]



[図4]



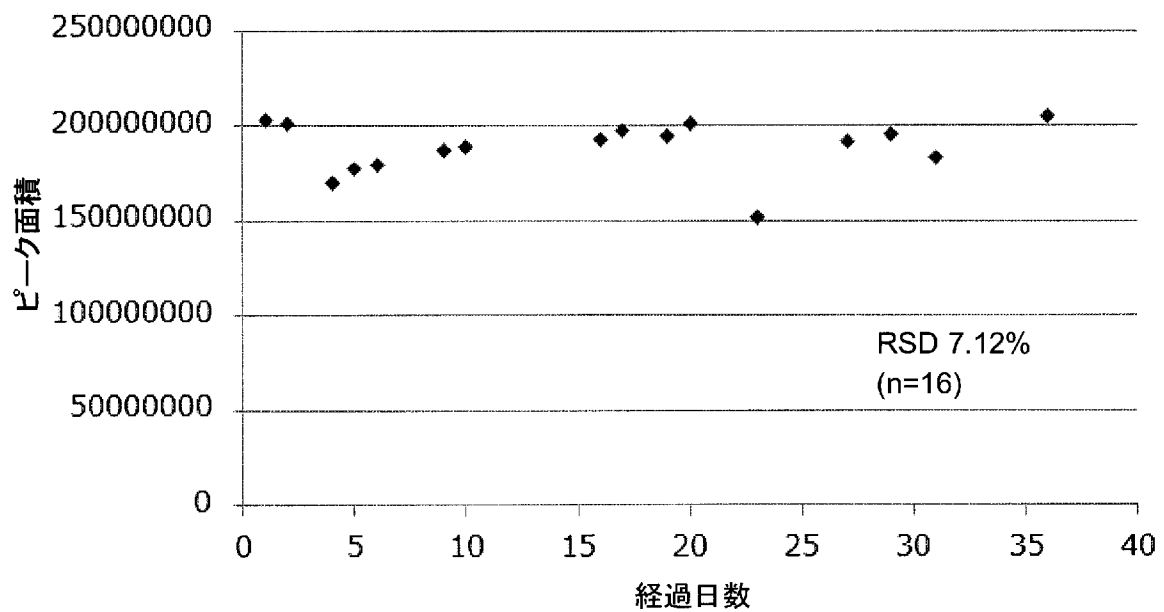
MSによる誘導体の確認



HPLC	Shimadzu Nexera UHPLC system
column	L-column2 CDS (5 μm, 150×2.1 mm; CERI)
Mobile phases	A: 0.1% FA in H ₂ O, B: 0.1% FA in ACN
Gradient	80%-94% 0-14 min, 94%-98% 14-24 min 26min 98%, 80% 26.01-30 min
Others	Flow rate: 0.2 mL/min, Column temp: 50°C, Ex. 325 nm, Em. 475 nm, Injection 2 μL

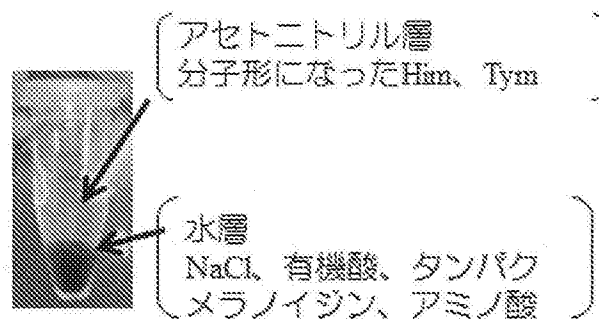
(b)

[図5]

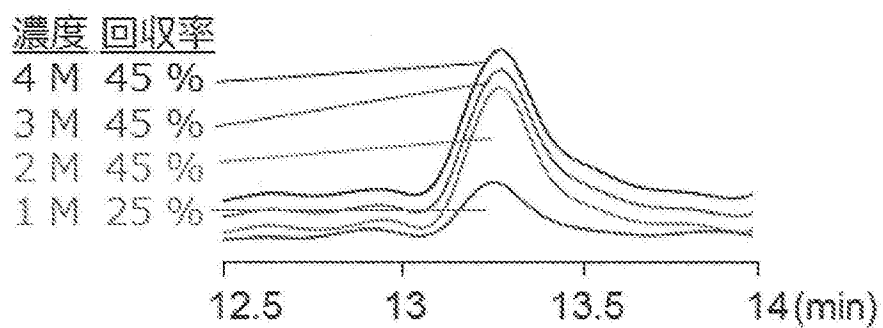


[図6]

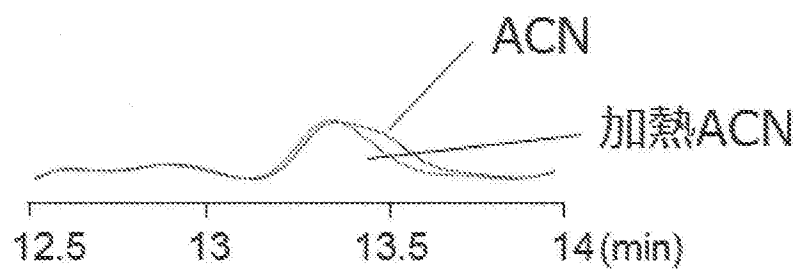
(a)



(b)



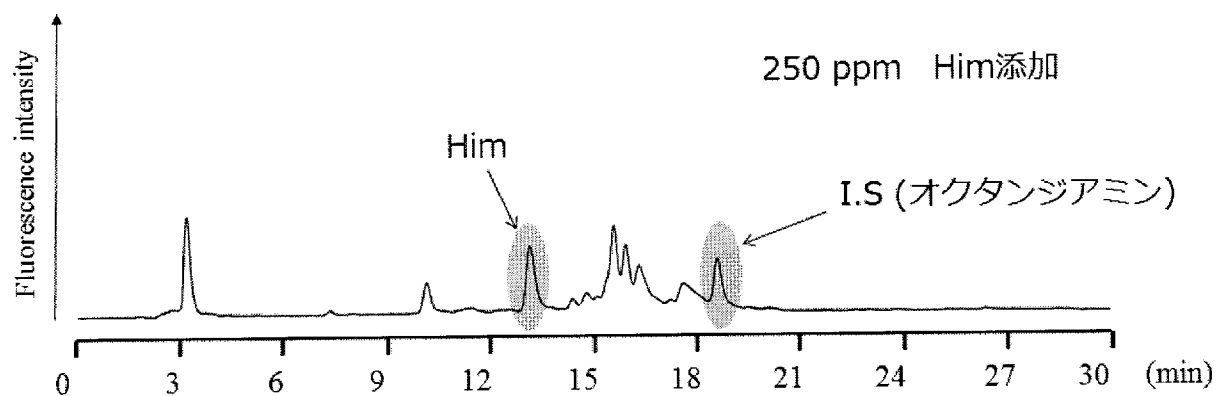
(c)



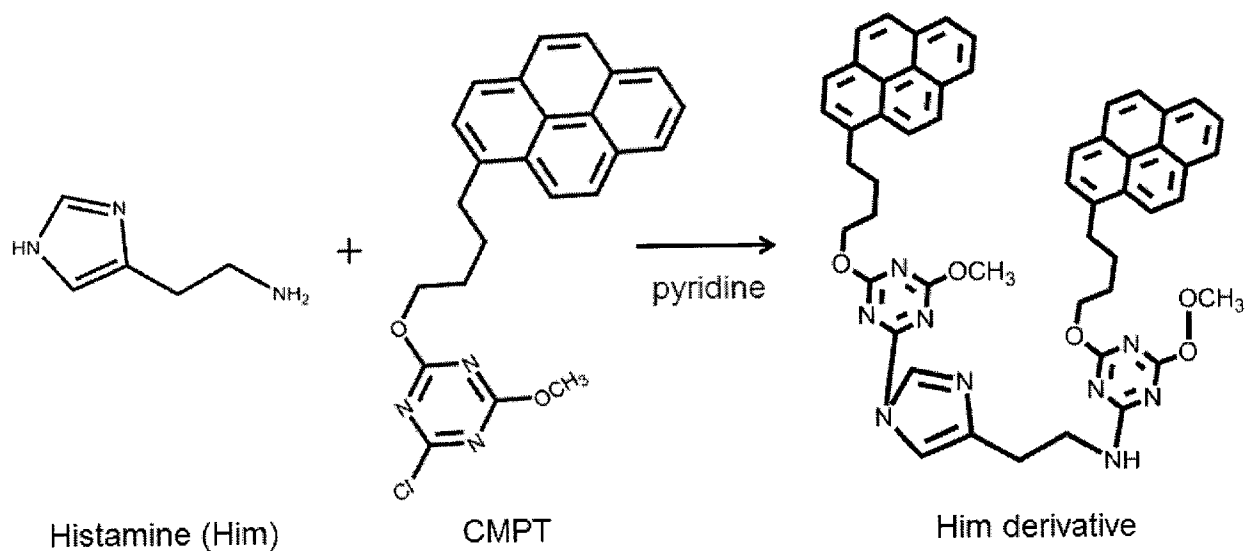
[図7]

醤油 (40 μ L)
 ↓
 Water 40 μ L
 I.S. (オクタンジアミン) 40 μ L
 加熱Acetonitrile 280 μ L
 2 M 水酸化ナトリウム 40 μ L (pH 13)
 ↓
 遠心分離 (6000 rpm 15 s)
 上清 (10 μ L)
 ↓ 誘導体化反応
 分析装置へ

[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/02(2006.01)i, C07D251/26(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/02, C07D251/26, C09K11/06, G01N21/64, G01N31/00, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tatsuki NAKANO, "Shinki Excimer Keiko Yudotaika Shiyaku ni yoru Shoyuchu Histamine no Kokando Kosentakuteki Bunsekiho no Kaihatsu", The Pharmaceutical Society of Japan Dai 135 Nenkaï Happyo Yoshi, 26W-pm04S, 02 February 2015 (02.02.2015)	1-6
A	Hideyuki YOSHIDA, "Highly Selective Derivatization Method Based on Intramolecular Excimer-Forming Fluorescence", Journal of Japan Society for Analytical Chemistry, 55, 26 May 2006 (26.05.2006), 213 to 221	1-6
A	JP 2009-143821 A (Fukuoka University), 02 July 2009 (02.07.2009), claims 1 to 5 (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 May 2015 (18.05.15)

Date of mailing of the international search report
02 June 2015 (02.06.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/056416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-170514 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 26 June 1998 (26.06.1998), claims 1 to 11 (Family: none)	1-6
A	JP 2001-242174 A (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan), 07 September 2001 (07.09.2001), claims 1 to 6; paragraph [0039] (Family: none)	1-6
A	JP 2005-160399 A (Kikkoman Corp.), 23 June 2005 (23.06.2005), claims 1 to 4 (Family: none)	1-6
A	JP 10-142228 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 29 May 1998 (29.05.1998), claims 1 to 3 (Family: none)	1-6
A	US 2008/0227116 A1 (Missbichler Albert), 18 September 2008 (18.09.2008), Abs. & WO 2007/056788 A1 & EP 1948819 A1	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/02(2006.01)i, C07D251/26(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/02, C07D251/26, C09K11/06, G01N21/64, G01N31/00, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	中野 達基, 新規エキシマー蛍光誘導体化試薬による醤油中ヒスタミンの高感度・高選択的分析法の開発, 日本薬学会第135年会発表要旨, 26W-pm04S, 2015.02.02	1 - 6
A	吉田 秀幸, 分子内エキシマー蛍光の発現に基づく誘導体化分析法の開発, 分析化学, 55, 2006.05.26, 213-221	1 - 6
A	JP 2009-143821 A (学校法人福岡大学) 2009.07.02, 請求項 1-5 (ファミリーなし)	1 - 6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

伊藤 裕美

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

9 5 1 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 10-170514 A (旭化成工業株式会社) 1998. 06. 26, 請求項 1-11 (ファミリーなし)	1 - 6
A	JP 2001-242174 A (財団法人化学物質評価研究機構) 2001. 09. 07, 請求項 1-6, [0039] (ファミリーなし)	1 - 6
A	JP 2005-160399 A (キッコーマン株式会社) 2005. 06. 23, 請求項 1-4 (ファミリーなし)	1 - 6
A	JP 10-142228 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 1998. 05. 29, 請求項 1-3, (ファミリーなし)	1 - 6
A	US 2008/0227116 A1 (Missbichler Albert) 2008. 09. 18, Abs. & WO 2007/056788 A1 & EP 1948819 A1	1 - 6