

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3814314号

(P3814314)

(45) 発行日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(24) 登録日 平成18年6月9日(2006.6.9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/327 (2006.01)  
 C 2 5 B 3/00 (2006.01)  
 CO 7 D 265/38 (2006.01)  
 CO 7 D 279/18 (2006.01)

GO 1 N 27/30 3 5 3 R  
 C 2 5 B 3/00  
 CO 7 D 265/38  
 CO 7 D 279/18

請求項の数 17 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平7-250433  
 (22) 出願日 平成7年9月28日(1995.9.28)  
 (65) 公開番号 特開平8-100284  
 (43) 公開日 平成8年4月16日(1996.4.16)  
 審査請求日 平成14年7月31日(2002.7.31)  
 (31) 優先権主張番号 08/314718  
 (32) 優先日 平成6年9月29日(1994.9.29)  
 (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  
 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仲介物質

(57) 【特許請求の範囲】

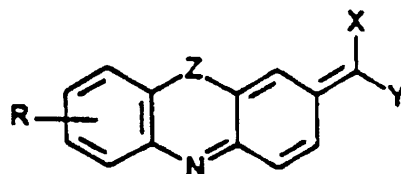
【請求項1】

補酵素である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ァート(NADPH)又はその類似体の電気化学的再生に適した電極であって、その電極表面が、置換若しくは非置換3-メチレン-3H-フェノチアジン及び3-メチレン-3H-フェノキサジン化合物からなる群より選択される1個又はそれ以上の仲介化合物からなる仲介機能を有していることを特徴とする電極。

【請求項2】

仲介物質が、式：

【化1】



(式中、Zは、酸素又は硫黄であり、Rは、仲介物質の見掛電位( $E^\circ$ )若しくは溶解性を調節する目的、又は仲介物質がそれにより他の分子と共有結合できるように官能基を提供する目的で、芳香族環に結合された置換基であり、そしてX及びYは、電子吸引基である

)で示されることを特徴とする、請求項1記載の電極。

【請求項3】

Rが、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、ハロゲン、ニトロ、置換若しくは非置換アミノ、ケト、カルボキシ、又はアルコシカルボニルである、請求項2記載の電極。

【請求項4】

アリール基が、フェニル、ナフチル又はピリジルであり；ハロゲンが、フッ素、塩素又は臭素であり、そしてアルコキシ基の炭素数が1～6である、請求項3記載の電極。

【請求項5】

X及びYが、独立して、シアノ、脂肪族若しくは芳香族ケト、脂肪族若しくは芳香族エステル、置換若しくは非置換アミド、トリフルオロメチルスルホニル、トリフルオロメチルケト、ニトロ、低級アルキルスルホニル、トリフルオロメチルスルフィニル、アリールスルホニル、低級アルキルケト、低級アルキルスルフィニル、アリールスルフィニル、ポリハロアルキル、ペルフルオロフェニル、2-ベンゾオキサゾリル、2-ベンゾチアゾリル、又は5-C1-テトラゾリルである、請求項3記載の電極。

10

【請求項6】

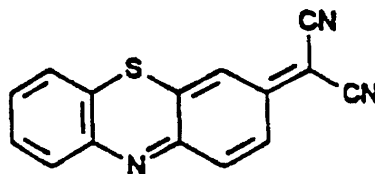
X及びYが一緒になって、環状1,3-ケトン；環状エステル又は環状アミドを形成する、請求項3記載の電極。

【請求項7】

仲介物質が、式：

20

【化2】

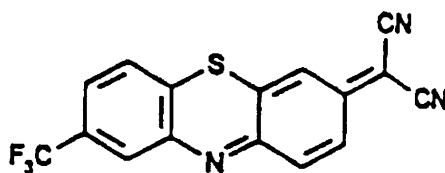


で示される、請求項2記載の電極。

【請求項8】

仲介物質が、式：

【化3】



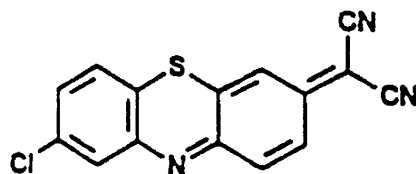
30

で示される、請求項2記載の電極。

【請求項9】

仲介物質が、式：

【化4】



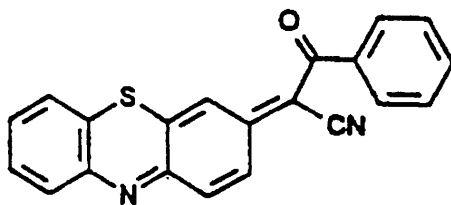
40

で示される、請求項2記載の電極。

【請求項10】

仲介物質が、式：

【化 5】



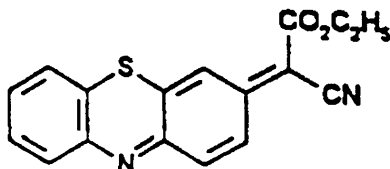
で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 1】

仲介物質が、式：

10

【化 6】



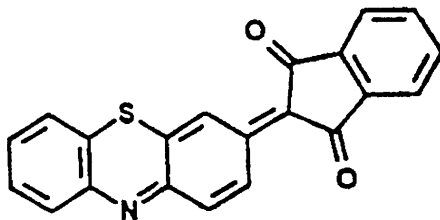
で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 2】

仲介物質が、式：

20

【化 7】



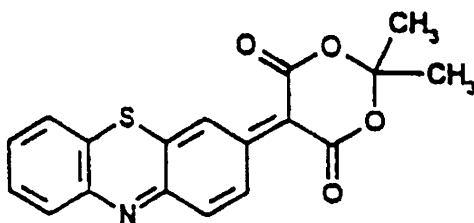
で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 3】

仲介物質が、式：

30

【化 8】



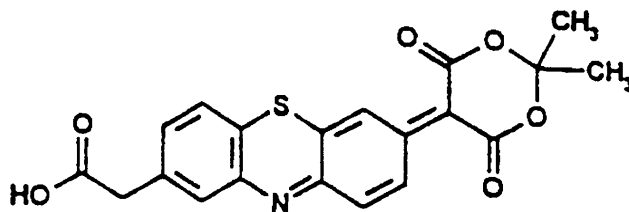
で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 4】

仲介物質が、式：

40

【化 9】



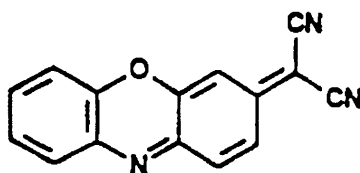
で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 5】

50

仲介物質が、式：

【化 1 0】

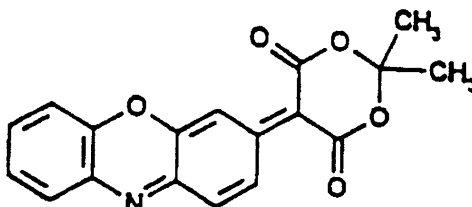


で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 6】

仲介物質が、式：

【化 1 1】



で示される、請求項 2 記載の電極。

【請求項 1 7】

電極材料が、黒鉛、熱分解炭素、ガラス状炭素、プラチナ、又は金である、請求項 1 記載の電極。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、補酵素である NADH、NADPH 又はその類似体の電気化学的再生に適した電極に関する。

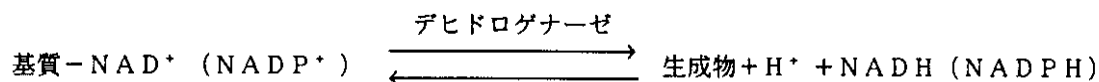
【0002】

【従来の技術】

酵素の選択性を、電流測定（アンペロメトリー）による検出の感受性と組み合わせた分析法は、診断産業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）は、デヒドロゲナーゼにより触媒される反応において生成されるため、その還元は、特に重要である。以下の式：

【0003】

【化 1 2】



【0004】

によりデヒドロゲナーゼにより触媒される反応は、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。数百もの異なるデヒドロゲナーゼが、異なる基質の生成物への変換を選択的に触媒することが知られている。基質、例えば、グルコースを酸化すると、補酵素 NAD<sup>+</sup> 及び / 又は NADP<sup>+</sup> は、それぞれ NADH 及び NADPH に還元される。これらの補酵素は、酵素であるデヒドロゲナーゼと作用して、エネルギー移送酸化還元対を形成する能力を有するため、この反応において、必要な要素である。ピリジン結合デヒドロゲナーゼは、基質から、酸化型ピリジンヌクレオチドに、2 還元性当量を、可逆的に移送するが、この 2 還元性当量のうち一つは、還元されたピリジンヌクレオチドに水素原子として現れ、もう一方は、電子として現れる。基質から除去されたもう一方の水素原子は、媒質中に、遊離の H<sup>+</sup> として現れる。

10

20

30

40

50

## 【0005】

補酵素  $\text{NAD}^+$  及び  $\text{NADP}^+$  は、高価な化学物質であり、これらを低コストの、使い捨ての分析装置で経済的に使用するためには、これらを再酸化によりその本来の状態に再生することが必須である。 $\text{NADH}$ は、異なる基礎電極材料において、1ボルトのオーダーの高過電圧により直接酸化される。しかし、 $\text{NADH}$ から電極への電子移送を仲介する電極の表面に、官能基を固定化することによって、この過電圧を引き下げることができる。このような仲介物質は、代表的には、過剰の過電圧がなくとも電気化学的に再酸化されうるために電気化学的再生の補助システムとして有用である物質から選択される。この目的に適した各種仲介化合物が公知である。米国特許第4,490,464号(以下、特許'464号という)には、背景技術として、フェナジンメトスルファート(PMS); フェナジンエトスルファート(PES); チオニン及び1,2-ベンゾキノンの仲介物質が記載されている。この特許は更に、仲介物質として、電極表面に、ヘテロ原子を含んでいても含んでいなくてもよい、少なくとも3、好ましくは4若しくはそれ以上の縮合芳香環からなる縮合芳香環系を付与することによって、 $\text{NADH}$ 、 $\text{NADPH}$ 又はその類似体の酸化を触媒するように改変された電極を記載している。より詳細には、この特許は、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若しくはフェノチアジノンのいずれか1個からなる構造要素による、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。

10

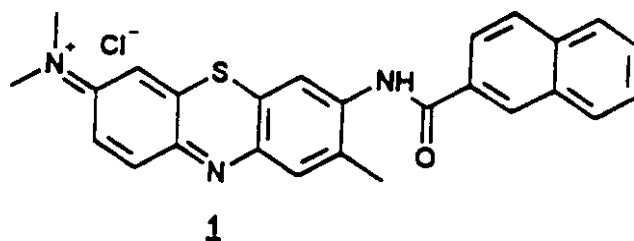
## 【0006】

J. Electroanal. Chem. 287, 61-80 (1990) には、一般式1:

20

## 【0007】

## 【化13】



30

## 【0008】

で示される3-メチル-10-ナフトイル-トルイジニウムイオンが開示されており、これは、特許'464号に開示されているフェノチアジニウム仲介物質のうち、最もよく知られたものである。

## 【0009】

J. Electroanal. Chem. 292, 115-138 (1990) には、特許'464号にカバーされる各種仲介物質が比較されている。

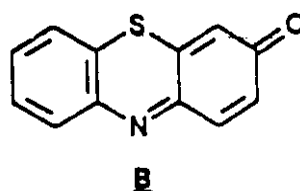
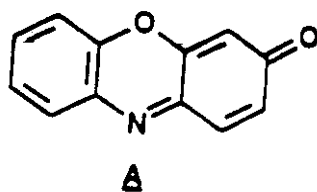
## 【0010】

特許'464号に開示されているフェノキサジニウム及びフェノチアジニウムイオンは、式1の化合物など、正に荷電した種であり、本発明において有用な化合物とはまったく異なる。特許'464号において、有用な仲介物質として開示されているフェノキサジノン及びフェノチアジノンは、式A及びB:

40

## 【0011】

## 【化14】



## 【 0 0 1 2 】

により示される 3 H - フェノキサジン ( A ) 及び 3 H - フェノチアジン ( B ) であり、その 3 位は、カルボニル酸素基を有している。これらは、A 及び B における酸素原子が、2 個の電子吸引置換基を有している炭素原子と置き換わっている点で、本発明の仲介物質と構造的に似ているが、これらは化学的にはまったく異なるものであり、式 A 又は B の化合物のカルボニル酸素を、置換基を有する炭素原子と置き換えることによって、有効な仲介物質が得られることは示唆されていない。

10

## 【 0 0 1 3 】

仲介物質としての有用性がここに開示されている化合物のあるものは、米国特許第 4 , 7 1 0 , 5 7 0 号に、ロイコ又は還元型である場合、「感圧性、サーモグラフィー、光サーモグラフィー及び写真造影システムにおける染料形成剤」として有用であると記載されている。

20

## 【 0 0 1 4 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

補酵素 N A D H 、 N A D P H 又はその類似体の電気化学的再生に適した電極を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

## 【 課題を解決するための手段 】

本発明は、補酵素であるジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド ( N A D H ) 、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ァート ( N A D P H ) 又はその類似体の電気化学的再生に適した電極であって、その電極が、その表面に、置換若しくは非置換 3 - メチレン - 3 H - フェノチアジン及び 3 - メチレン - 3 H - フェノキサジン化合物からなる群より選択される 1 個又はそれ以上の仲介化合物からなる仲介機能を有している電極に関する。

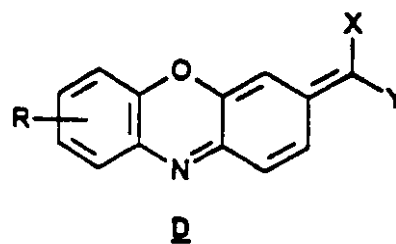
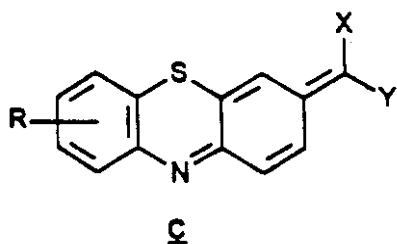
30

## 【 0 0 1 6 】

本発明は、3 - メチレン - 3 H - フェノチアジン及び 3 - メチレン - 3 H - フェノキサジン化合物が、燃料電池の電極における N A D H の電気化学的再生 ( 酸化 ) に有用な仲介物質であるとの発見に基づくものである。本発明の仲介物質は、一般式 C 及び D :

## 【 0 0 1 7 】

## 【 化 1 5 】



40

## 【 0 0 1 8 】

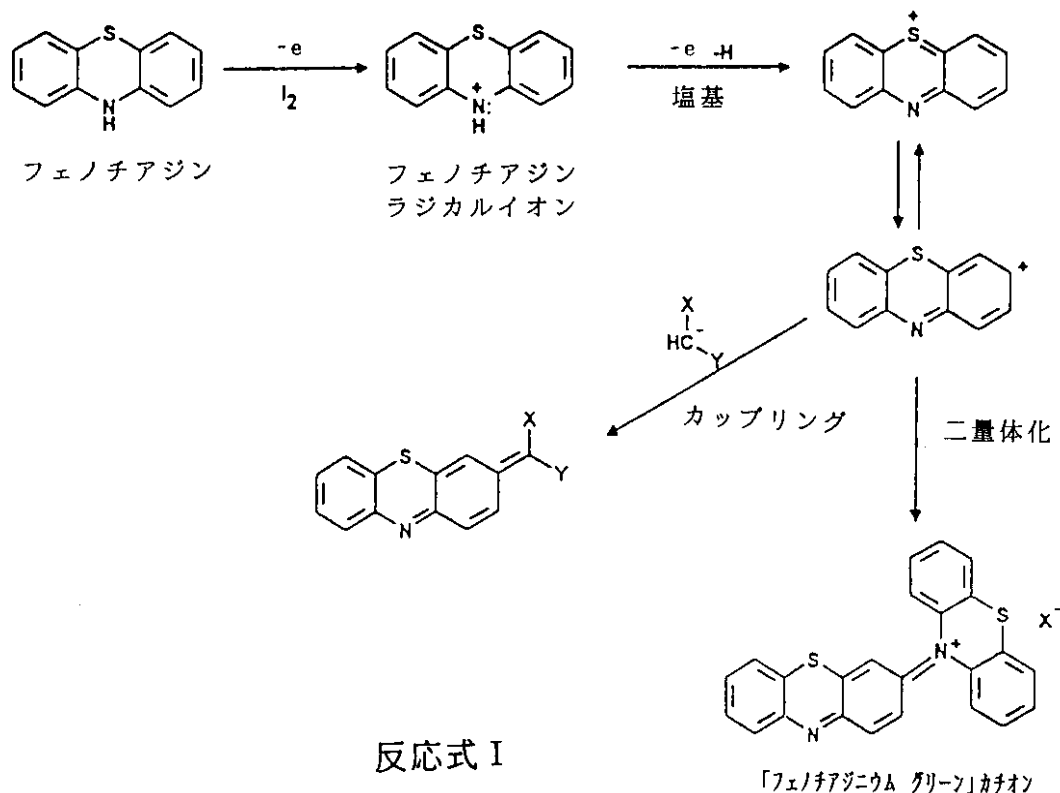
( 式中、R は、仲介物質の見掛電位 ( E ° ) 若しくは溶解性を調節する目的、又は仲介物質がそれにより他の分子と共有結合することができるよう官能基を提供する目的で、芳香族環に結合された置換基であり、そして X 及び Y は、電子吸引基である ) により示すこと

50

ができる。より詳細には、Rは、水素、置換若しくは非置換アリール（例えば、フェニル、ナフチル、ピリジル）、アルコキシ（好ましくは炭素数1～6のもの）、アリールオキシ、ハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素）、ニトロ、置換若しくは非置換アミノ、ケト、カルボキシ、又はアルコキシカルボニルを示すことができる。置換基X及びYは、炭素酸又は活性メチレン化合物のフェノチアジン及びフェノキサジンとの酸化的カップリングの化学反応を簡略に示した以下の反応式I：

【0019】

【化16】



10

20

30

【0020】

に基づいて、本発明化合物の調製を可能とするのに十分な電子吸引能を両方で有するよう  
に選択される。

【0021】

X及びYの電子吸引特性を合わせても十分に大きくない場合、この合成法により、これら  
の化合物を調製することはできない。反応式Iによると、フェノチアジンは、ヨウ素（I  
<sub>2</sub>）などの酸化剤/電子受容体と反応して、ラジカルカチオンを形成し、これは、アルカリ  
条件下で、プロトンを失い、フェノチアジンカチオン（右上の構造式）を形成する。これ  
は、共鳴により、3位に + 特性を有し、X - CH<sub>2</sub> - Yなどの求核剤と反応して、初期  
付加物を形成し、これが酸化されて（2Hを失う）、仲介物質Cとなる。フェノキサジン  
化合物Dの調製のための化学反応も、類似している。Thien 特許（米国特許第4,710  
,570号）は、これを、酸化性カップリングと述べている。

40

【0022】

この反応を起こすには、X - CH<sub>2</sub> - Yのプロトンは、代表的には、メタノール中で酢酸  
カリウムを使用する反応条件下で、X - CH<sup>-</sup> - Yを形成するのに十分に酸性でなければ  
ならない。X - CH<sub>2</sub> - Yが十分に酸性でない場合、不安定な二量体を得られるが、これ  
は、Diudea [Tet. Letters 23, 1367-1370 (1982)] により「フェノチアジニングリーンカ  
チオン」として特徴づけられ、過塩素酸塩としてTsuji no [Nippon Kagaku Zasshi 91(11  
, 1080-5 (1970); Chem. Abs. 74, 125598k (1971)] により単離されている。X - CH  
<sub>2</sub> - Yを省略した場合、又はX - CH<sub>2</sub> - Yが十分に酸性でない場合、反応式Iの条件下

50

で、この物質が高収率で形成される。当業界の技術者であれば、反応式 I のカップリング反応を行うことによって、X 及び Y の電子吸引力が、合せても不十分であるかどうかを、容易に決定することができよう。生成物が、フェノチアジニウムグリーンである場合は、X 及び Y は、合せても必要な電子吸引能を有さない。

【0023】

適当な X 及び Y 残基としては、シアノ、脂肪族及び芳香族ケト、脂肪族及び芳香族エステル、置換又は非置換アミド、トリフルオロメチルスルホニル、トリフルオロメチルケト、ニトロ、低級アルキルスルホニル、トリフルオロメチルスルフィニル、アリアルスルホニル、低級アルキルケト、低級アルキルスルフィニル、並びにアリアルスルフィニルが挙げられるが、これに限定されるわけではない。その他の適当な電子吸引基としては、ポリハロアルキル、ペルフルオロフェニル、2 - ベンゾオキサゾリル、2 - ベンゾチアゾリル及び 5 - C1 - テトラゾリルが挙げられる。X 及び Y が 1, 3 - ジケトン形成する構造もまた、適当である。例えば、X 及び Y は、インダン - 1, 3 - ジオン若しくは 5, 5 - ジメチル - 1, 3 - シクロヘキサジオン (ジメドン) などの環状 1, 3 - ジケトン、メルドラム (Mel drum) 酸などの環状エステル、又は N, N - ジアルキルバルピツール酸などの環状アミドを形成することができる。

10

【0024】

用いる X 及び Y 置換基の組み合わせが、必要な電子吸引能を有するかどうかを決定するために、日常的な実験が必要であるかもしれないが、Bordwell の論文 [Acc. Chem. Res. 21, 456-463 (1988) 及びそこに引用されている参考文献] には、多くの X - CH<sub>2</sub> - Y 化合物を含む、各種炭素酸のジメチルスルホキシド (DMSO) における平衡酸性度が開示されている。X 及び Y の電子吸引力が大きいほど、pKa は小さくなる。一般的には、平衡酸性度が (DMSO 中、25 で)、13.1 である化合物 X - CH<sub>2</sub> - Y が良好に反応し；pKa が、約 13.1 ~ 約 15.8 の間である化合物は、それほど反応せず、pKa が、15.8 である化合物は、まったく反応しないであろう。

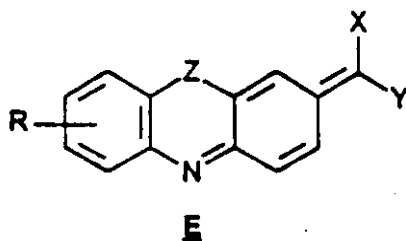
20

【0025】

化合物 C 及び D は、単一の式 E :

【0026】

【化 17】



30

【0027】

(式中、記号 Z は、酸素又はイオウを示すために用いられる) によって示すことができる。

40

【0028】

これらの化合物の環が、それに結合している脂肪族又は芳香族基と同様に、本発明の範囲を超えることなく、その電子移送特性に悪影響を及ぼさない各種置換基を有することができるのは、明らかである。このような置換基は、当業界における技術者が、所要の電子移送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。

【0029】

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型、NAD<sup>+</sup> ; 還元型、NADH) は、多くのデヒドロゲナーゼ酵素にとって、化学的酸化還元能を提供する補因子である。酵素反応の過程において、基質分子が酸化される際に、この補因子は還元される。基質濃度を測

50

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、この濃度と、この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るものである。NADHは、黒鉛、熱分解炭素、ガラス状炭素、プラチナ又は金電極上では、仲介物質がなくとも電気化学的に再酸化されうるが、この反応には、過電圧が大きい、電極が汚れるなど、いくつかの欠点がある。

【0030】

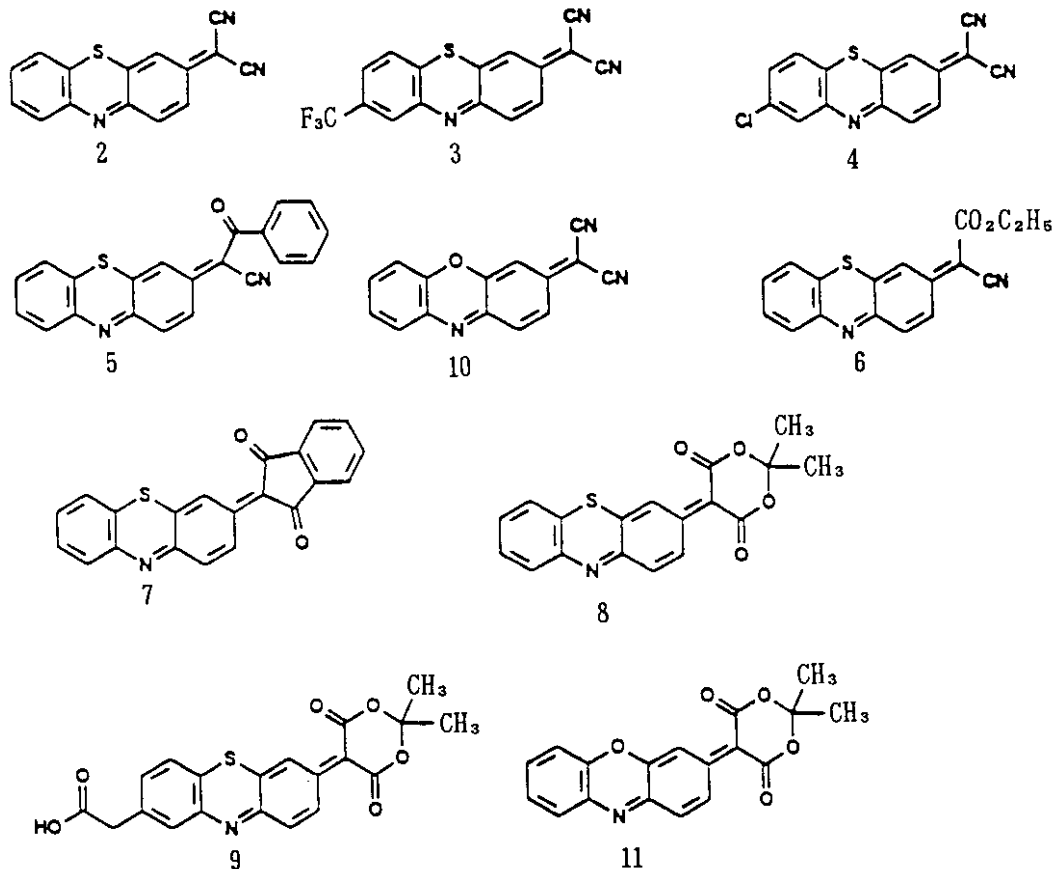
本発明は、NADH及びNADPH補酵素又はその誘導体の電気化学的再生に、3-メチレン-3H-フェノチアジン(C)及び3-メチレン-3H-フェノキサジン(D)を使用することを初めて記載しており、したがって、各種フェノチアジン及びフェノキサジン誘導体を広く包含するものである。本発明の仲介物質は、NADH及びNADPH誘導体の電気化学的再生にも、使用することができる。補酵素が重合体に結合しているようなNADH及びNADPH誘導体は、Dolabdjianらにより、Enzyme Engineering Vol. 4, G.B. Brown and G. Manecke, eds., Plenum Press, New York, 1978, pp. 399-400に記載されており、また、補酵素がデヒドロゲナーゼ酵素に共有結合しているような誘導体は、M. Perssonらにより、Biotechnology 9, pp. 280-284 (1991)に記載されており、また、デヒドロゲナーゼ酵素の補因子として作用する範囲において、そのほかの置換基を有する合成類似体も記載されている。これらの参考文献は、参照によりここに包含されるものとする。

【0031】

本発明の仲介化合物は、一般構造式C及びDにより示されてもよい。仲介物質として、異なる10種類の類似体について、黒鉛のロッド状電極を用いて評価を行った。これらの化合物の構造は以下のとおりである。

【0032】

【化18】



【0033】

10

20

30

40

50

## 【実施例】

これらの化合物は、以下の実施例により調製した。

## 【0034】

## 実施例 I

## 仲介物質の合成

化合物 2、3、5、6、10 及び 11 の合成は、米国特許第 4,710,570 号に開示されており、その開示内容は、ここに参照により包含されるものとする。化合物 4、7、8 及び 9 は、以下のように調製した。

## 【0035】

3 - ジシアノメチレン - 8 - クロロ - 3 H - フェノチアジン (4) :  
2 - クロロフェノチアジン (1.0 g ; 4.26 mmol) 及び酢酸カリウム (KOAc) (2.5 g) の沸騰メタノール (MeOH) (70 mL) 溶液を、40 に冷却するまで放置し、次にマロノニトリル (0.42 g ; 1.5 当量) により処理した。この溶液を、I<sub>2</sub> (2.16 g) の MeOH (25 mL) 溶液により直ちに処理し、周囲温度で 3.5 時間攪拌した。分離した暗緑色の固体をろ過により集め、MeOH により洗浄し、真空中で乾燥して、化合物 4 (0.33 g、26%) を得た。MS (70 eV) m/e (相対強度) 295 (100), 260 (26)。

10

## 【0036】

3 - (1,3 - ジオキソ - インダニリデン - (2)) - 3 H - フェノチアジン (7) :  
フェノチアジン (2.0 g ; 10 mmol) 及び KOAc (4.0 g) の沸騰 MeOH (60 mL) 溶液を、53 に冷却するまで放置し、次に 1,3 - インダンジオン (2.2 g ; 1.5 当量) により処理した。この溶液を 30 に冷却するまで放置し、I<sub>2</sub> (3.0 g) の MeOH (50 mL) 溶液で処理し、周囲温度で 18.5 時間攪拌した。分離した暗色の固体をろ過により集め、MeOH により洗浄し、真空中で乾燥して、化合物 7 (0.13 g、3.8%) を得た。MS (70 eV) m/e (相対強度) 341 (100), 284 (36)。

20

## 【0037】

3 - (2,2 - ジメチル - 4,6 - ジオキソ - 1,3 - ジオキサニリデン - (5)) - 3 H - フェノチアジン (8) :  
フェノチアジン (1.02 g ; 5.13 mmol) 及び KOAc (3.0 g) の沸騰 MeOH (40 mL) 溶液を 24 に冷却するまで放置し、次に 2,2 - ジメチル - 1,3 - ジオキサン - 4,6 - ジオン (2.0 g ; 2.7 当量) により処理した。この溶液を 21 に冷却するまで放置し、I<sub>2</sub> (2.6 g) の MeOH (50 mL) 溶液で処理し、周囲温度で 3 時間攪拌した。分離した暗色の固体をろ過により集め、MeOH により洗浄し、真空中で乾燥して、化合物 8 (0.62 g、35%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz) (CDCl<sub>3</sub>) 8.85-8.95 (m, 2H), 7.95-8.05 (m, 1H), 7.67 (d, J=9.96Hz, 1H), 7.50-7.60 (m, 3H), 1.77 (s, 6H); MS (70 eV) m/e (相対強度) 339 (12), 281 (65), 253 (19), 237 (56), 209 (100)。

30

## 【0038】

3 - (2,2 - ジメチル - 4,6 - ジオキソ - 1,3 - ジオキサニリデン - (5)) - 3 H - フェノチアジン - 8 - 酢酸 (9) :  
フェノチアジン - 2 - 酢酸 [J. Org. Chem. 21, 1006 (1956) 記載の Massie らの方法により調製した] (0.33 g ; 1.28 mmol) 及び酢酸リチウム 2 水和物 (0.66 g、5 当量) の MeOH (7 mL) 溶液を、周囲温度で、2,2 - ジメチル - 1,3 - ジオキサン - 4,6 - ジオン (0.5 g ; 2.7 当量) 及び追加の MeOH (1.5 mL) により処理した。この溶液を I<sub>2</sub> (0.65 g、2 当量) の MeOH (5 mL) 溶液で処理し、2.3 時間攪拌し、氷浴中で冷却した。分離した暗色の固体を集め、氷冷 MeOH で洗浄し、真空中で乾燥して、化合物 9 (60.8 mg、12%) を得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz) (CDCl<sub>3</sub>) 8.87 (d of d, J<sub>1</sub>+2.0Hz 及び J<sub>2</sub>=9.96Hz, 1H), 8.83 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.91 (d, J=1.3Hz, 1H), 7.59 (d, J=9.96Hz, 1H), 7.45-7.55 (M, 2H), 3.80 (s, 2H), 1.77 (s, 6H)。

40

50

## 【0039】

## 実施例II

## 仲介物質としての評価

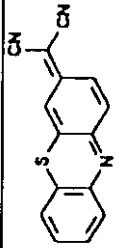
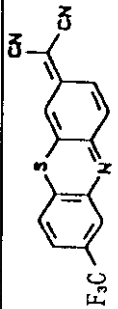
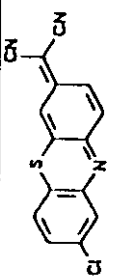
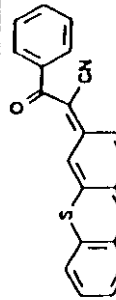
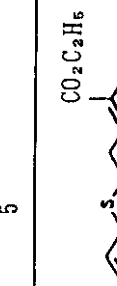
黒鉛ロッド状電極〔直径3mm、ジョンソン・マセー電子(Johnson Matthey Electronics)社、ワードヒル(Ward Hill)、マサチューセッツ〕を、最初に微細なグリット・サンドペーパーを用い、次に、 $1\ \mu$ のアルミナ粒子の懸濁液を用いて、電極表面を研磨することによって調製した。仲介物質の1mMメタノール溶液を調製し、電極をこの溶液に2分間浸した。次に、電極を水ですすぎ、 $0.25\ \text{M}$ リン酸緩衝液( $\text{pH}=7$ )に短時間浸した。この時点で、電流対電圧プロフィールを測定して、陰極及び陽極のピーク位対Ag/AgCl参照電極を求めた。次に、NADHを $20\sim 200\ \mu\text{M}$ の濃度で含む $\text{pH}=7$ の溶液中、代表的には、酸化ピークよりも $100\ \text{mV}$ 高い電位を用いて電流を測定し、電流対NADH濃度のデータの最小二乗法により得られた直線の傾きから、各仲介物質の相対的感受性を $\mu\text{A}/\mu\text{M NADH}$ として求めた。これらの傾きを、試験を行った仲介物質の構造(カラム1)及びその酸化電位( $E^{\circ}_{\text{ox}}$ )(カラム2)と共に、第1表(カラム4)に示す。傾きが大きければ仲介物質の感受性はより高い。

10

## 【0040】

## 【表1】

第1表

化合物	NADH E° <sub>ox</sub>	滴定 電位	GREを用いた 場合の傾き	グルコース E° <sub>ox</sub>	滴定 電位	センサーを用いた 場合の傾き
 2	-68mv		0.0020			
 3	-17mv		0.0032			
 4	+2mv		-			
 5	+77mv		0.0037			
 6	-74mv		0.0039			

【0041】

【表2】

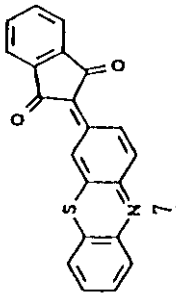
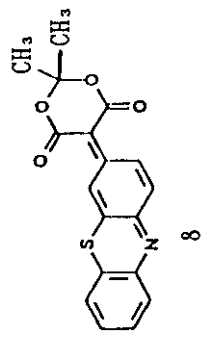
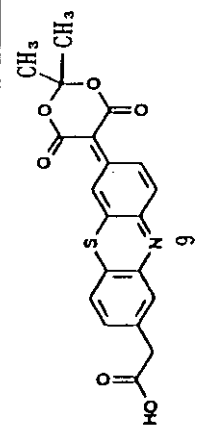
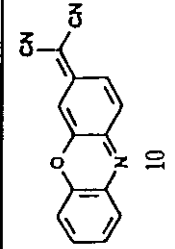
10

20

30

40

第1表 (続き)

化合物	NADH $E^{\circ}_{ox}$	滴定 電位	GR Eを用いた 場合の傾き	グルコース $E^{\circ}_{ox}$	滴定 電位	センサーを用いた 場合の傾き
	-41mV		0.0026			
	+55mV		0.0074			
				+5mV	200mV	0.01918
	-126mV		0.0025			

【 0 0 4 2 】

【 表 3 】

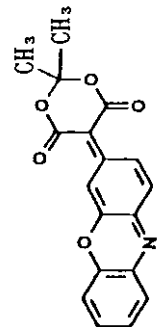
10

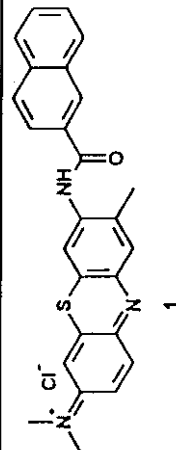
20

30

40

第1表 (続き)

化合物	NADH $E^{\circ}_{ox}$	滴定 電位	GREを用いた 場合の傾き	グルコース $E^{\circ}_{ox}$	滴定 電位	センサーを用いた 場合の傾き
 II	-2 mV		0.0061			



+60 mV 0.010

## 【0043】

## 実施例III

## 印刷電極上での仲介物質の評価

黒鉛/炭素の作用電極及び銀/塩化銀の参照電極を有する印刷されたセンサーカードからなる印刷電極を用いた実験を行った。黒鉛/炭素電極に用いたインクは、No. 423SS [エークソン・コロイド(Acheson Colloids)社、ポート・ヒューロン (Port Huron)、ミシガン]、及び銀/塩化銀参照電極については、15~25% AgClと混合した、No. 427S S シルバーインク(同じ会社による)であった。電極の表面域は、 $0.03 \text{ cm}^2$  であった

10

20

30

40

50

## 【0044】

代表的なグルコースバイオセンサーは、以下のように調製してもよい。27 mM KCl を含む 100 mM の PIPES 緩衝液 (pH 7.0) に 4 mM 化合物 9 を溶解した溶液を調製し、0.5% FC-170C 界面活性剤〔3M社；セントポール (St. Paul)、ミネソタ〕1.96 g、NAD 0.142 g、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) (東洋紡社；大阪、日本) 0.626 g、147 mM KCl を含む pH 7.0 の 0.5 M PIPES 緩衝液 1.44 g、及び DI H<sub>2</sub>O 5.83 mL からなる溶液の等量により希釈した。混合物 3.0 μL をセンサー域に適用し、室温で約 20 分間乾燥した。電極を、小さい毛細管ギャップを有するフォーマット (型) に組み立て、グルコース水溶液により処理し、電流を 200 mV の電位で測定した。これを、0、50、100、200 及び 500 mg/dL のグルコースを含む試料について行い、電流対グルコース濃度のデータの最小二乗法により得られた直線の傾きを求めたところ、グルコース応答は、 $0.01918 \mu\text{A}/\text{mg dL}^{-1}$  であった。

10

## 【0045】

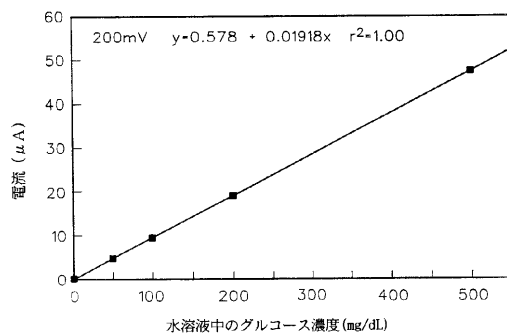
図 1 には、化合物 9 の、200 mV の電位における電流対グルコース濃度のプロットを示す。これは、異なる濃度のグルコースを測定した完全センサーの、用量応答プロットを示している。図 1 からは、ここで述べたように組み立てられたセンサーが、生理学的に関連するグルコース範囲にわたって、直線的に応答することを理解することができる。適用電位が低い状態 (200 mV) で作用しながらも、グルコースに対する感受性が高いこと (mg/dL 当たり 19 μA) 及び切片値が小さいことは、臨床的に有用な機器を組み立てるのに重要である。適当な検量線を用いれば、センサーから測定した電流を、未知の溶液中のグルコース濃度と相関させることが可能である。

20

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】化合物 9 の、200 mV の電位における電流対グルコース濃度のプロット。

## 【図 1】



---

フロントページの続き

(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、46530、グレンジャー、エヌ・フィーザント・コーブ・ド  
ライブ 10648

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特開平7 - 310194 ( J P , A )  
特開平8 - 304329 ( J P , A )  
特開平6 - 281613 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 27/26-27/49  
C12P 1/00-41/00  
H01M 8/00-8/24  
C25B 3/00  
C25B 11/00-11/20  
C07D265/38  
C07D279/18  
JSTPlus(JDream2)