

含フッ素ベンズアルデヒド類を用いた
アミノ酸と生体アミンの
キラル分析および一斉分析手法の開発

2018 年度

同志社大学大学院 生命医科学研究科
医工学・医情報学専攻 博士課程 (後期課程)

濱口 尚斗

目次

序論.....	1
第一章	
$^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体のキラル分析.....	12
第二章	
$^{19}\text{F-NMR}$ による第一級アミン類の一斉分析.....	37
第三章	
$^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸の一斉分析.....	72
第四章	
第一級アミン類の二次元的な一斉分析.....	91
総括.....	108

序論

1. はじめに

アミノ酸は、自然界に豊かに存在し、タンパク質の構成原料であるだけでなく、各種の情報伝達を担うなどさまざまな生理機能をもつ。同様に、生体アミン類は、生体内に広く存在し、細胞増殖や、神経伝達物質であるとともに、ときに生体に害をなすことが知られている。そのためこれらの物質は、化学はもとより医学、薬学、食品衛生学等の幅広い分野において、現在においても重要な研究対象であり、あらゆる側面からの興味は尽きない。先人らの努力により、新たな蛍光、化学発光等の高感度検出法や新たな分離技術の開発や質量分析等の網羅的分子検出法の発展とともに、アミノ酸および生体アミンの生理機能が明らかにされてきたが、さらなる生命機能の解明に向けて、アミノ酸および生体アミンさらにはそれらの代謝産物も含む網羅的な分析手法の開発が望まれる。

一方で、有機合成化学の分野では、L-アミノ酸をビルディングブロックとした光学異性体の合成や、生体内で異なった生理活性を示す可能性をもった光学活性化合物の合成など医薬品等のファインケミカルの開発にとっては欠かすことはできない。また、そのような開発の過程において、最終生成物や中間体の光学純度の決定は非常に重要である。

2. アミノ酸と生体アミン

アミノ酸は同一分子内にアミノ基とカルボキシ基を有する化合物の総称で、同じ炭素に二つの官能基をもつアミノ酸を α -アミノ酸とよぶ (Figure 1)。 α -アミノ酸は多くの場合、 α -炭素が不斉炭素原子であり、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、グリシンを除くすべてが光学異性体を有している。現在、地球上の生物において、 α -アミノ酸の光学異性体の含量は例外なくL体に偏っている。しかし、1980年代にD体のアスパラギン酸とセリンが哺乳類の体内で発見されて以降、さまざまな微量のD体アミノ酸が発見され、その機能が明らかにされてきた¹⁾。それに伴い、近年ではD-アミノ酸はバイオマーカーとして急速に注目を集めている²⁾。このような背景から、光学異性体の識別を含んだアミノ酸類の網羅的な分析技術開発の必要性が高まってきている。また、生理機能が解明されるとともに、アミノ酸を体外から摂取することの重要性が示されてきた³⁾。したがって、食品や飲料中のアミノ酸含量率への関心が高まり、サプリメントをはじめとする含アミノ酸食品なども数多く販売されている。

一方、動植物・微生物を問わず、広く生体内に存在するアミン類を生体アミンという。生体アミンはその構造から、カテコール骨格をもつカテコールアミン、インドール骨格をもつインドールアミン、モノフェノール骨格をもつモノフェノールアミン、またアミノ基を二つ以上もつポリアミンに分類される (Figure 1)。生体アミンの多くは、神経伝達物質として、あるいは体液中に分泌されて神経ホルモンとし

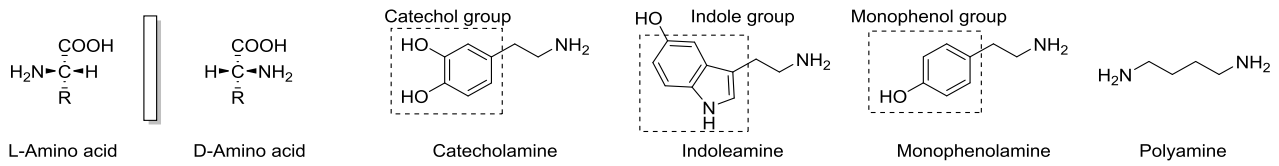


Figure 1 Structure of amino acid and biogenic amine.

て様々な生理機能の調整にかかわっている⁴⁾。これら生体アミンの多くはアミノ酸を前駆物質とする代謝過程を経て生体内で産生される。したがって、生体アミンの生理機能の解明には生体アミンそのものだけでなく、その前駆物質であるアミノ酸も含めた一斉分析が求められる。また、ヒトに限らず、生体内で産生される生体アミンは魚類や食品の腐敗の指標として扱われるだけでなく、アレルゲンとして人体に害をなすこともあるため、それらの定量的な分析はとくに食品を扱う場合には重要である⁵⁾。

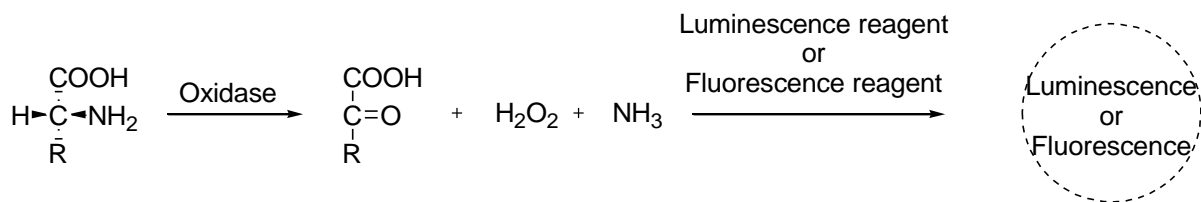
3. アミノ酸のキラル分析

従来のアミノ酸およびアミノ酸誘導体の構造決定法として、酵素の特異性を利用した酵素法⁶⁾、キラルな試薬を用いてジアステレオマーに誘導させるキラル誘導体化法⁷⁾、さらには、光学異性体を認識できる固定相を用いた方法⁸⁾が挙げられる。

簡便な D-アミノ酸の分析法としては、古くから酵素を利用する分析法が用いられてきた。酵素法は、D-アミノ酸を特異的に代謝する酸化酵素によって酸化反応を引き起こし、 α -ケト酸とアンモニア、過酸化水素が生成され、これらの生成物と発色試薬もしくは蛍光試薬との反応から定量するという手法である (Scheme 1)⁹⁾。これらの酵素の基質特異性が広いことは D-アミノ酸の総量を決定するには好都合であるが、逆に特定の D-アミノ酸に標的を絞って定量することは難しい。それを改善する目的で、近年では、酵素法とクロマトグラフィーなどの分離手法を組み合わせた分析方法が開発されている¹⁰⁾。

キラル誘導体化法では、ガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーによる分離分析が一般的である¹¹⁾。ガスクロマトグラフィーによる分離分析では、キラル誘導体化試薬として、キラルアルコールや光学活性な酸クロリドが用いられ、アミノ酸に対し誘導体化を行い揮発性化合物として分析する¹²⁾。液体クロマトグラフィーによる分離分析では、Fmoc-Cl に光学中心をもたせた FLEC¹³⁾や Marfey 試薬¹⁴⁾などが用いられ、ジアステレオマーに誘導化することで分析を行う。高感度かつ高選択的に分析が可能となる一方で、キラル誘導体化試薬は非常に高価であり、分析コストが高いのは難点である (Figure 2)。また、クロマトグラフィーの分離条件の決定も重要で、その十分な検討には時間を要する。

キラルな固定相を用いた手法では、シクロデキストリン¹⁵⁾やキラルクラウンエーテル¹⁶⁾、アミノ酸誘導体¹⁷⁾などを固定化したキラルカラムが用いられ、ダンシル修飾アミノ酸や芳香族アミノ酸などの分析が可能である (Figure 3)。しかし、誘導体化を含まない直接的なアミノ酸分析には適さず、さまざまな前処理が必要となるとともに、詳細な分離条件の検討も必要である。



Scheme 1 Amino acid analysis by an enzymatic method.

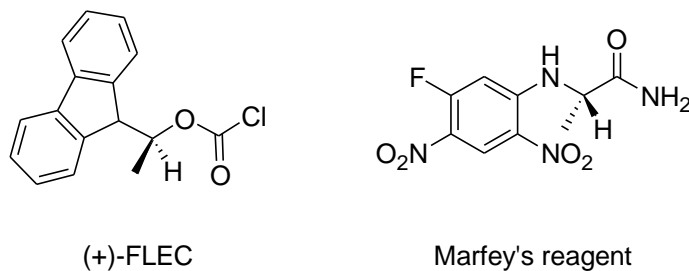


Figure 2 Structure of chiral derivatization reagents for amino acid analysis.

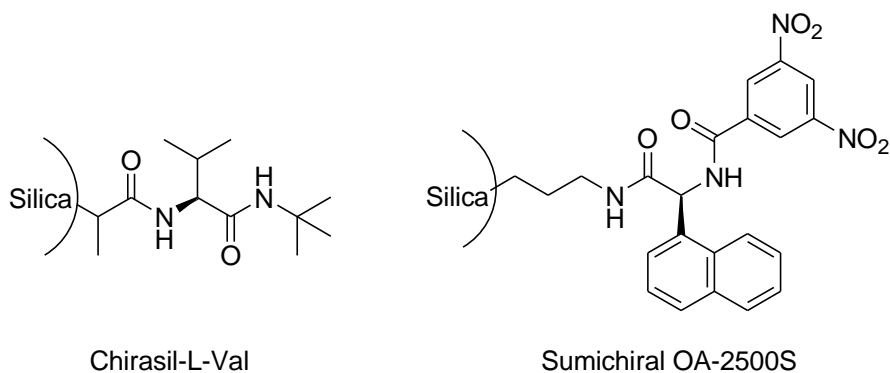
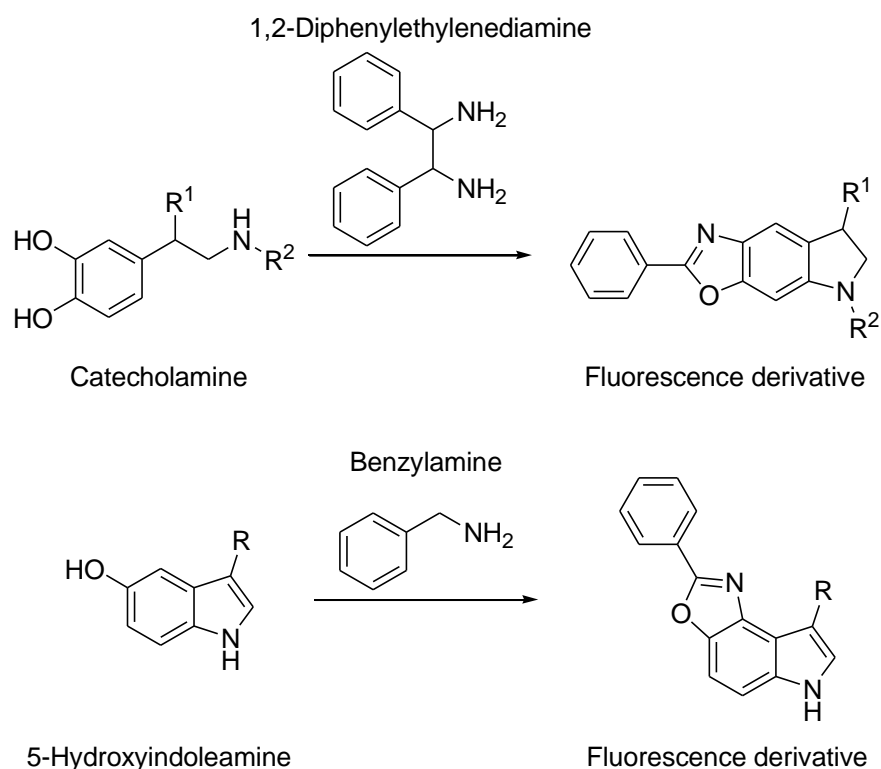


Figure 3 Structure of chiral stationary phase.

4. アミノ酸および生体アミンの定量分析

アミノ酸および生体アミンの一斉分析法としては、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC, RP: Reversed Phase)による分離と電気化学検出法 (ECD: Electrochemical Detector)を組み合わせた HPLC-ECD 分析¹⁸⁾や、蛍光プレラベル化 HPLC 分析法¹⁹⁾が広く利用されている。HPLC-ECD 分析では、固定相に疎水性の炭化水素を結合したものをを用いた RP-HPLC によりアミノ酸および生体アミンを分離した後、ECD 分析する。この ECD 法は電気化学的に活性な物質が電極表面で酸化還元反応を受けた時に流れる電流を測定するため高感度の測定が可能である。特に生体アミン類を分析する上では選択性が非常に高



Scheme 2 Biogenic amine analysis by fluorescence derivatization.

いために有用である。一方で、RP-HPLC の分離能はクロマトグラフィーの条件により非常に左右されるため、分離するアミノ酸や生体アミンの種類が多いほど最適な分離条件を見つけることが困難となる。

蛍光プレラベル化 HPLC 法では、分析対象化合物を蛍光誘導体へと変換した後、HPLC で分離し、蛍光分光高度計により蛍光を分析する。誘導体化試薬としては、試薬自身が蛍光をもたない 1,2-diphenylethylenediamine¹⁹⁾をはじめ、benzylamine²⁰⁾や benzoïn²¹⁾などが使用され、カテコールアミンやインドールアミンの分析に用いられる。近年では、蛍光体であるピレンを有した試薬²²⁾が用いられ、histamine やポリアミン類の分析が可能になった。強い蛍光を有する生成物が得られるため、高感度の検出が可能であるが、分析対象化合物に適する誘導体化試薬が異なるため、全生体アミンの一斉分析への適用は難しい。

5. ¹⁹F-NMR と生体関連分子の分析への応用

化学の分野で非常に有用な分析ツールの一つが核磁気共鳴装置 (NMR: Nuclear Magnetic Resonance) である。NMR の発展により、化合物の構造決定は飛躍的に向上し、今や化学者には欠かせないツールとなっている。NMR では、¹H、¹³C、¹⁹F および ³¹P などさまざまな核種を測定することが可能であるが、

^1H や ^{19}F は特に感度が高い。そのため、それらの核種の NMR 分析の新たな利用価値として、キラル化合物の構造決定²³⁾や生体関連分子の分析²⁴⁾に関する研究が数多く報告されている。

キラル化合物の ^1H , ^{19}F -NMR による構造決定法は、光学活性な対象化合物にキラル誘導体化試薬を反応させ、ジアステレオマーを生成し、これらの化学シフト値の変化を分析し光学純度の決定を行う手法である。Mosher らにより開発された Mosher 法²⁵⁾を皮切りに、柿沢・楠見による Mosher 法の変法²⁶⁾, Trost 法²⁷⁾などが報告されている。これらの手法は NMR により容易に光学純度の決定とともに、絶対立体配置の決定が可能となるが、3 節にも述べたとおりこれらのキラル誘導体化試薬は非常に高価である。それに対し、James, Bull らは対象とするキラル化合物と *o*-formylphenylboronic acid および安価なキラル源を用いた三成分の自己集合的な NMR 分析による光学純度の決定法²⁸⁾を報告しており、高い注目を集めている。

一方で、 ^{19}F -NMR を用いた生体関連分子の一斉分析法に関しても盛んに研究されている。 ^{19}F -NMR は幅広いシフト領域を有しており非常に分離能が良いのが特徴で、同位体の影響もなく ^1H と同等の感度を有している。また生体内は ^1H を含む有機分子で溢れているが、 ^{19}F をもつ有機分子は基本的に存在していない。このような利点は、生体試料の分析を行う上で非常に好ましい。その観点から、Swager らはフッ素を有するピンサー型の Pd 錯体を利用したアミン類や含窒素ヘテロ環類の一斉分析²⁹⁾, キラルなアミン類の一斉分析³⁰⁾を開発した。この手法は錯体の Pd 中心にアミン類の窒素原子が配位することで、アミン類とフッ素をともに有する Pd 錯体へと変化し、アミンの種類により Pd 錯体内のフッ素原子の化学シフト値が変化することを測定の原理としている。様々なアミン類に適用でき、汎用性が高い一方で、パラジウムという高価な金属を必要とすることや分析の定量性に関しては現在も課題を残している。

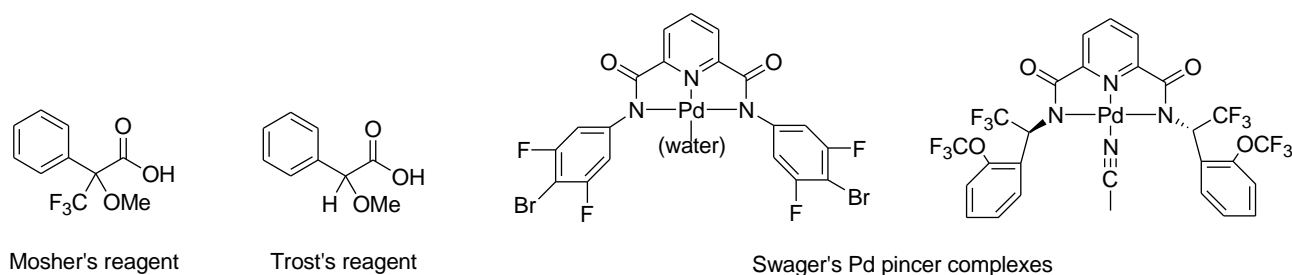


Figure 4 Structure of chiral derivatization reagents and Pd pincer complexes.

6. 本論文の概説

以上に述べた経緯から、本論文には、生命機能の解明だけでなく、新たな創薬合成の一助となるような ^{19}F -NMR によるアミノ酸と生体アミンのキラルおよび一斉分析手法の開発に取り組んだ結果を記した。

本論文は、本序論に続く全四章から構成されている。第一章では、含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸類を用いたキラルアミンおよびアミノ酸誘導体の $^{19}\text{F-NMR}$ によるキラル分析手法の検討と一斉分析への応用について述べた³¹⁾。第二章および第三章では、含フッ素ベンズアルデヒド類を用いた生体アミンおよびアミノ酸の $^{19}\text{F-NMR}$ による一斉定量分析の検討について述べた。最終の第四章では、二つのフッ素リポート基をもつ *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide を分子プローブとして用いる、アミン類の $^{19}\text{F-NMR}$ による二次元的な一斉分析について報告する。

6.1. $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体のキラル分析 (第一章)

複数のキラルなアミン類やアミノ酸誘導体の光学純度を混合物中から $^{19}\text{F-NMR}$ により一斉に決定した例はこれまでに報告されていない。第一章では、そのような新たな分析手法として、James, Bull らの分析手法に基づき、キラル誘導化剤として安価で入手容易な(*S*)-BINOL、フッ素誘導体化剤として *o*-ホルミルフェニルボロン酸類を用いたキラルなアミン類およびアミノ酸誘導体の $^{19}\text{F-NMR}$ による一斉キラル分析を報告する。

本手法は、5-fluoro-2-formylphenylboronic acid, (*S*)-BINOL, triethylamine および 4A シーズ存在下、 CDCl_3 中で室温、10分を対象化合物と攪拌することで、対象化合物のイミノボロン酸エステル化が進行し、その混合物を $^{19}\text{F-NMR}$ により分析することで13種のアミノ酸誘導体のキラル分析を可能とした。また、本手法により3種のアミノ酸誘導体の光学純度を一度に決定することが可能であった (Figure 5)³¹⁾。

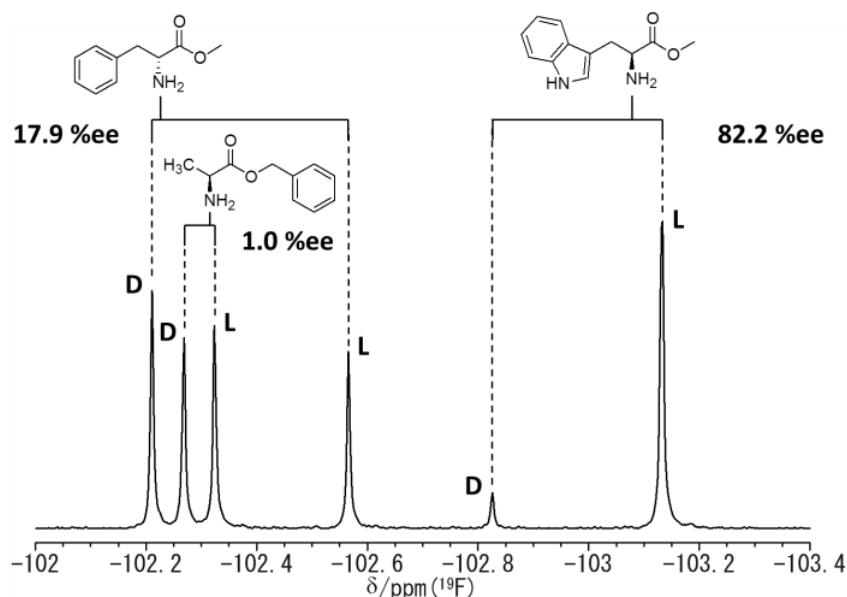


Figure 5 Quantitative chiral analysis of the mixture of three amino acid derivatives by using $^{19}\text{F-NMR}$.

6.2. ^{19}F -NMR による第一級アミン類の一斉分析 (第二章)

これまでに報告されている生理活性化合物の ^{19}F -NMR による一斉分析手法のほとんどは金属錯体を用いた手法である。そのような高価な遷移金属錯体を用いずとも、簡単な有機反応的なアプローチにより実現しないかという観点から、イミン形成によるフッ素の導入に基づいた ^{19}F -NMR による一斉分析手法の開発に取り組んだ。その結果として、第二章では、含フッ素ベンズアルデヒド類を利用したアミン類の ^{19}F -NMR による一斉分析手法について報告する。

本手法では、最も良い分離能を示した 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde をプローブ分子として用い、転化率向上のための triethylamine および内部標準である 4-bromofluorobenzene 存在下、6 種の生体アミン類を CD_3OD 中、室温で 1.5 時間反応させた後、この混合物を ^{19}F -NMR により分析する。その結果、6 本の異なる ^{19}F -NMR シグナルが現れ、それらのシグナルとの対応から 6 種の生体アミンを一度に定性的に判別することができた (Figure 6)。また、測定対象の生体アミンの検量線を予め作成しておくことにより、定量分析も可能であることを明らかにした。

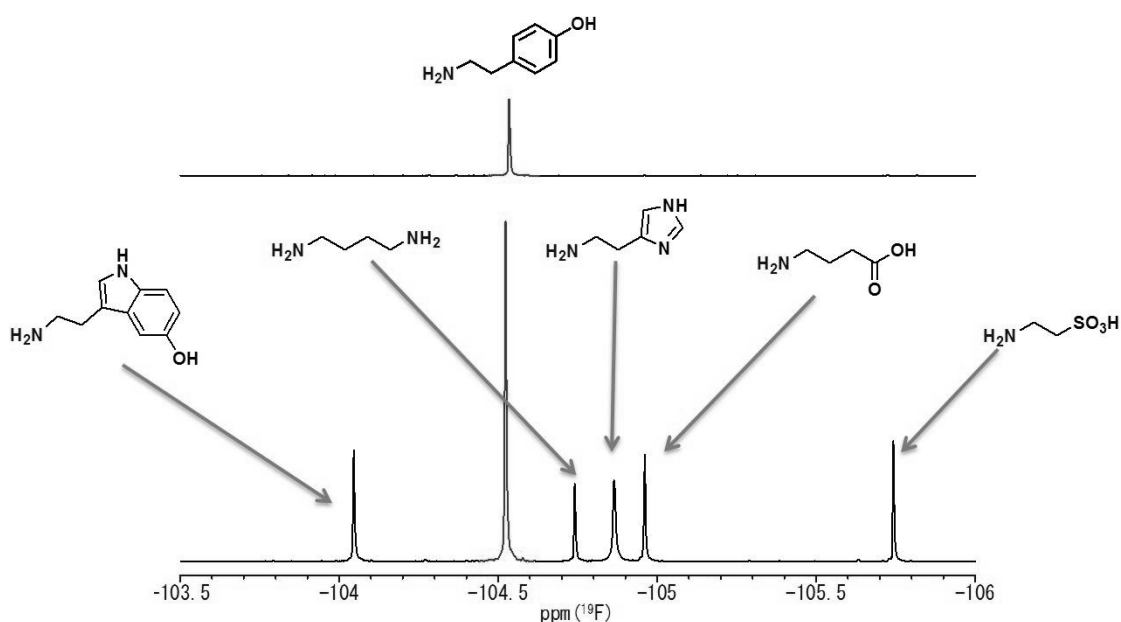


Figure 6 Simultaneous analysis biogenic amines (serotonin, histamine, GABA, taurine, tyramine and putrescine) by using ^{19}F -NMR.

6.3. ^{19}F -NMR によるアミノ酸の一斉分析 (第三章)

第三章では、第二章で報告した手法のアミノ酸への適用について報告する。さらにその分析法を食品や飲料中に含まれるアミノ酸などの定性分析に関しても検討したので、その結果も合わせて報告する。

概略としては、前章と同様に、プローブ分子である 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde, triethylamine および内部標準である 4-bromofluorobenzene と 4 種のアミノ酸を $\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaHCO}_3\cdot\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) 混合溶液中、室温で 1.5 時間攪拌すると対応するイミン類が効率よく生成し、 ^{19}F -NMR により分析することで 4 種のアミノ酸を一度に定性することを可能とした (Figure 7)。これにより、水系溶液中での分析が可能になったことから、実際の食品などのような含水サンプルの測定に展開できる期待がもたれる。

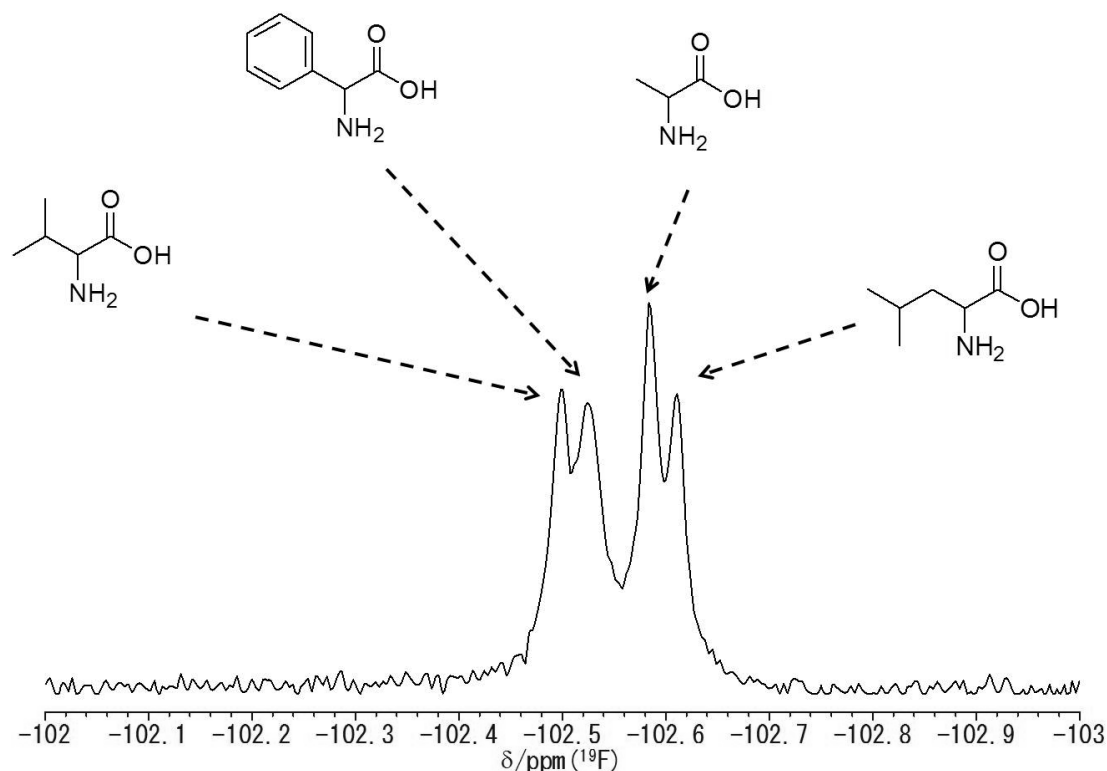


Figure 7 Simultaneous analysis of amino acids in aqueous sample by using ^{19}F -NMR.

6.4. 第一級アミン類の二次元的な一斉分析 (第四章)

第二章、第三章で報告した手法は概ね良好な分離を見せるため、本法がアミン類の一斉分析に十分に使用でき得ることを示せた。その一方で、課題も残されている。例えば、直鎖状の脂肪族アミン類である *n*-butylamine と *n*-hexylamine のように構造が非常によく似ており、側鎖のわずかな鎖長の差しかないようなアミン類の識別は十分ではない。ここで著者は、この NMR 分析で用いるプローブ分子が一種類

ではなく二種類の含フッ素基を分子中に有し、各々のフッ素原子がアミンの構造的な特徴を別々に伝えることができれば、より詳細な構造情報が得られ、わずかな違いも捉えられると考えた。そのような着想のもと、第四章では異なるフッ素基をもつプローブ分子の $^{19}\text{F-NMR}$ スペクトルの二次元的な解析によってアミン類の判別を行う独自の解析戦略に基づいた含フッ素ベンズアルデヒドの合成とその利用について報告する。

まず、二つの含フッ素基をもつプローブ分子として *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide をデザイン・合成した。続いて、そのプローブ分子とアミン類を CD_3OD 中、室温で 6 時間反応させ、対応するイミン類へと変換し、これらを $^{19}\text{F-NMR}$ により分析した。得られた $^{19}\text{F-NMR}$ シフトの二次元プロットを展開すると、アミン類の大まかな構造上の特徴のみならず鎖長や分岐・芳香族基の有無などを含む非常に詳細なアミンの構造的情報が抽出できることがわかり、これにより、上述の手法では困難であった非常に似た構造をもつアミン類の分類が可能であることがわかった (Figure 8)。

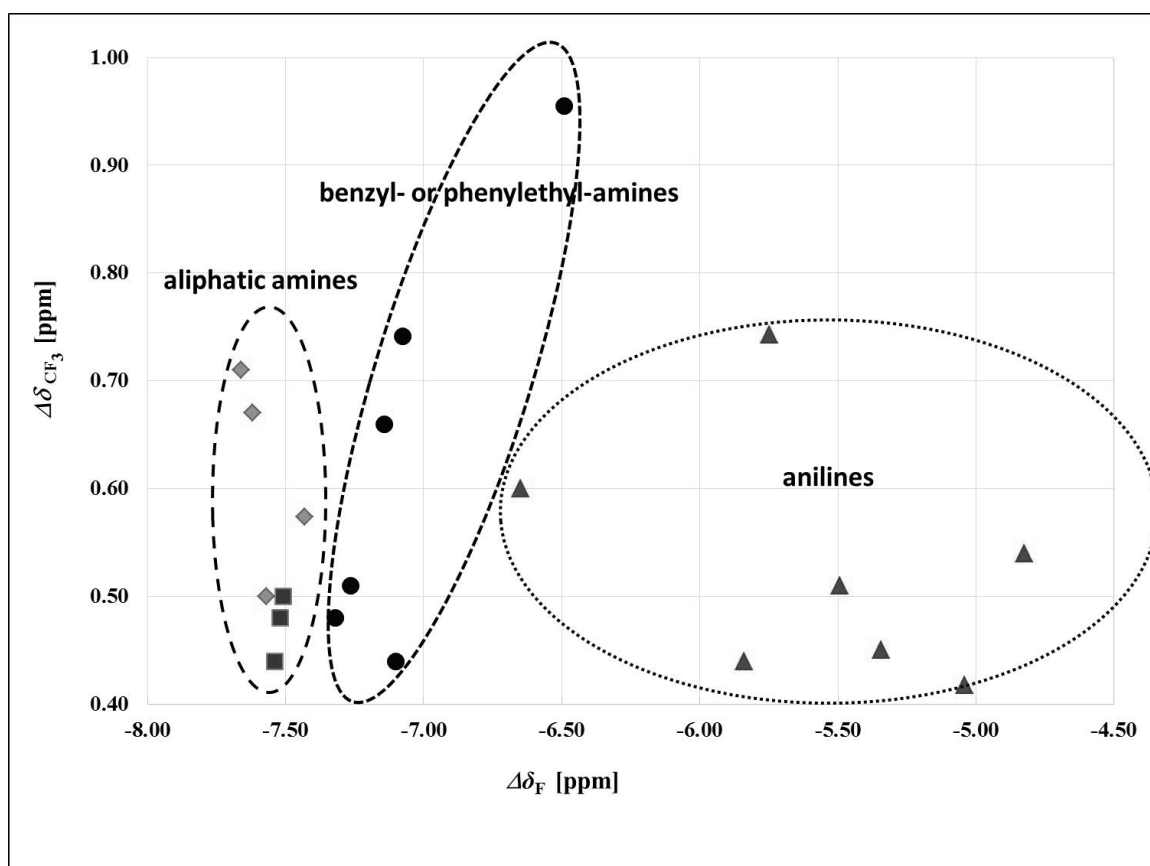


Figure 8 Discrimination of various amines by 2D plot of $^{19}\text{F-NMR}$ shifts.

7. 参考文献

1. a) M. Katane, H. Nomma, *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 3108. b) T. Nishikawa, *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 3169.
2. a) T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka, *scientific reports*, **2016**, 6 (26137), 1. b) K. Hamase, A. Morikawa, K. Zaitso, *J. Chromatogr. B*, **2002**, 781, 73.
3. a) E. Blomstrand, P. Hassmen, B. Ekblom, E. A. Newsholme, *Eur. J. appl. Physiol.* **1991**, 63(2), 83. b) J. S. Coombes, L. R. Mcnaughton, *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **2000**, 40, 240.
4. a) A. Rechtschaffen, *Perspect. Biol. Med.* **1998**, 41, 359. b) J. M. Fellous, *Newroscientist*, **1991**, 5, 283. c) D. A. Lewis, J. A. Lieberman, *Neuron*, **2000**, 28, 325. d) J. E. LeDoux, *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, 23, 155.
5. a) S. E. Lopes, J. J. Rodrigues, M. H. Hernandez, M. V. Mora, *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, 28(3), 411. b) Silvia. T, Marlene. R, M. C. Marti, *Lat. Am. appl. res.* **2002**, 32(2), 205.
6. S. D. Aniello, P. Spinelli, G. Ferrandino, K. Peterson, M. Tsesarskia, G. Fisher, A. D Aniello, *Biochem. J.* **2005**, 386, 331.
7. H. Hasegawa, T. Matsukawa, Y. Shinohara, T. Hashimoto, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 735, 141.
8. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka, K. Takahashi, *FEBS Lett.* **1992**, 296, 33.
9. Y. Nagata, T. Akino, K. Ohno, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 238.
10. S. Kato, Y. Kito, H. Hemmi, T. Yoshimura, *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 3190.
11. a) R. Konno, H. Bruckner, A. D. Aniello, G. Fisher, N. Fujii, H. Homma, *Nova Science Publishers* **2009**. b) R. Bhushan, H. Brukner, *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 3148.
12. V. Schurig, *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 3122.
13. S. Einarsson, B. Josefsson, P. Moller, D. Sanchez, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1191.
14. P. Marfey, *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, 49, 591.
15. T. Shindo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura, *J. Chromatogr. B*, **1987**, 405, 145.
16. D. W. Armstrong, X. Yang, S. M. Han, R. A. Menges, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2594.
17. C. J. Welch, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 666, 3
18. a) T. Nagao, T. Tanimura, *J. Chromatogr.* **1989**, 496, 39. b) T. Nagao, T. Tanimura, *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 33. c) P. T. Kissinger, K. Bratin, G. C. Davis, L. A. Pachla, *J. Chromatogr.* **1987**, 2(1), 9.
19. a) A. Mitsui, H. Nohta, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.* **1985**, 344, 61. b) H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae, Y. Ohkura, *Anal. Sci.* **1986**, 2, 303.
20. H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae, Y. Ohkura, *Biomed. Chromatogr.* **1987**, 2(1), 9.
21. a) T. Yoshitake, R. Iizuka, K. Fujino, O. Inoue, K. Yamagata, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Sci.* **1986**, 2, 303. b) T. Yoshitake, J. Kehr, S. Yoshitake, K. Fujino, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 807,

177.

22. a) H. Yoshida, H. Harada, Y. Nakano, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18*(9), 687. b) H. S. Marks, C. R. Anderson, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1094*(1-2), 60. c) T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*(8), 509. d) F. Ichinose, T. Yoshitake, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatographia*. **2009**, *70*(3-4), 575.
23. a) T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 2451. b) J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17.
24. a) H. Chen, S. Viel, F. Ziarelli, L. Peng, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7971. b) R. N. Rao, K. Santhakumar, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 8408.
25. a) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512. b) G. R. Sullivan, J. A. Dale H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1973**, *338*, 2143.
26. I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
27. B. M. Troste, J. L. Belletire, S. Godleski, P. G. McDougal, J. M. Balkovec, J. J. Baldwin, M. E. Chirsty, G. S. Ponticello, S. L. Varga, J. P. Springer, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370.
28. Y. Pérez-Fuertes, A. M. Kelly, A. L. Johnson, S. Arimori, S. D. Bull, T. D. James, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 609-612.
29. a) Y. Zhao, L. Chen, T. M. Swager, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 917. b) Y. Zhao, L. Chen, T. M. Swager, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 929.
30. a) Y. Zhao, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3221.
31. N. Hamaguchi, Y. Okuno, Y. Oe, T. Ohta, *Chirality* **2019**, *31* (1), 34.

第一章

$^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体のキラル分析

概要

生体内にはアミノ酸をはじめ、糖や生体アミンなど不斉炭素原子を有するキラルな化合物が数多く存在している。こういったキラル化合物は立体選択性を除く化学反応性や旋光性を除く物理的物性は等しいが、生体内での作用が大きく異なる場合がある。このことから、キラル化合物の容易な光学純度の決定は、創薬合成や現代の有機合成分野さらには医学において非常に重要である。一方で、近年、新たな生体試料の分析法として $^{19}\text{F-NMR}$ を利用した分析手法が盛んに研究されているが、複数のキラルなアミン類やアミノ酸誘導体の光学純度を混合物中から $^{19}\text{F-NMR}$ により一斉に決定した例はこれまでに報告されていない。

本章では、*o*-ホルミルボロン酸、キラルジオールおよびキラル第一級アミンを用いた三成分の自己集会的な NMR 分析による光学純度の決定法 (James-Bull 法) を $^{19}\text{F-NMR}$ 分析に適用し、未開拓な分野であった James-Bull 法に基づく $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体の光学純度の決定手法の開発および、一斉分析への適用について報告する。

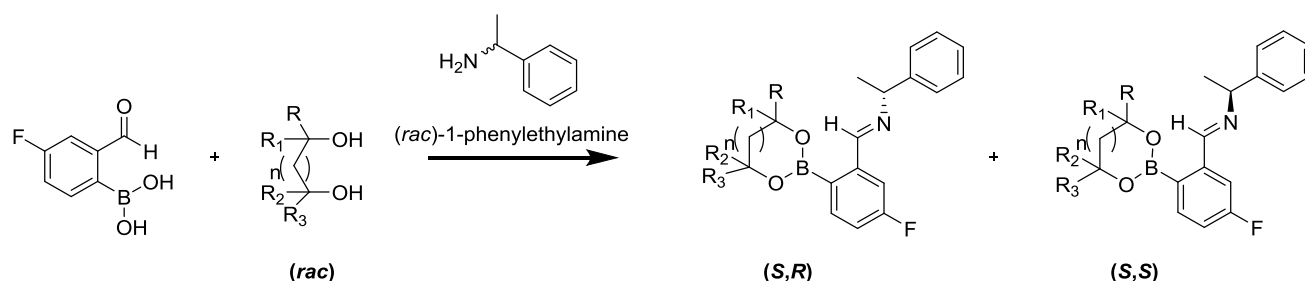
本手法は、キラル誘導化剤として安価で入手容易な (*S*)-BINOL、フッ素誘導体化剤として 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid を用い、triethylamine および 4A シーブス存在下、 CDCl_3 中で室温、10 分で対象化合物と攪拌することで、対象化合物のイミノボロン酸エステル化が進行し、その混合物を $^{19}\text{F-NMR}$ により分析することで 13 種のアミノ酸誘導体の光学純度の決定が可能となり新たなキラル分析手法を確立した。また、本手法により初めて混合物中から $^{19}\text{F-NMR}$ により 3 種のアミノ酸誘導体の光学純度を一度に決定することを可能とした。

1.1. 緒言

生体内にはアミノ酸をはじめ、糖や生体アミンなど不斉炭素原子を有するキラルな化合物が数多く存在している。こういったキラル化合物は立体選択性を除く化学反応性や旋光性を除く物理的物性は等しいが、生体内での作用が大きく異なる場合がある。とりわけ、序論 2 節で述べたとおりアミノ酸は通常 L-体として自然界に存在しているが、加齢や疾病により D-体のアミノ酸が生成されることが明らかになってきた。そのため、近年、バイオマーカーとして注目されている¹⁾。また、創薬合成および現代の有機化学合成分野ではキラル化合物の片方の光学異性体を作り分けることが大きな研究テーマの一つであり、簡単に入手可能な L-アミノ酸はキラルビルディングブロックとして非常に有用である²⁾。これらの理由から、医学の分野に限らず、合成化学の分野においても、アミノ酸やアミノ酸誘導体の容易な光学純度決定法の開発は望まれる。

一方、序論 5 節にも述べたとおり新たな生体試料の分析法として $^{19}\text{F-NMR}$ を利用した分析手法が盛んに研究されている³⁾。これは、 $^{19}\text{F-NMR}$ が生体試料中のバックグラウンドに影響を受けにくく、感度が良いこと、さらには誘導体化された分析目的物のシグナルのみ得られるシンプルな解析ができることに起因している。Swager らは、ピンサー型の Pd 錯体を用いた $^{19}\text{F-NMR}$ によるキラルアミン類の一斉分析を可能とし、食品や飲料中での分析を報告している⁴⁾。他方、James, Bull らはキラルアミン類の光学純度の決定手法として *o*-ホルミルフェニルボロン酸、キラル誘導体化剤として安価で入手容易なキラルジオールおよび対象のキラルアミンの三成分を利用した $^1\text{H-NMR}$ での分析法を報告している⁵⁾。この James-Bull 法は、キラルなヒドロキシルアミンやジオールにも適用可能で非常に有用であるため、キラル分析の教材としての利用もされ始めている。しかしながら、この James-Bull 法を $^{19}\text{F-NMR}$ に適用した報告はほとんどない。2009 年に James, Bull ら自身によって報告されたキラルジオールの光学純度の決定手法は、(*R*)-1-phenylethylamine に対する一例のみであり⁶⁾、2012 年に Chaudhari, Suryaprakash らによって報告された手法では定性的な分析のみが報告されており、光学純度の決定には至っていない⁷⁾。

本章では、そのように未開拓な分野であった James-Bull 法に基づく $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸誘導体の光学純度の決定手法の検討および、一斉分析への適用について報告する⁸⁾。



Scheme 1 Reported analytical method of chiral diol by James-Bull.

1.2. 結果と考察

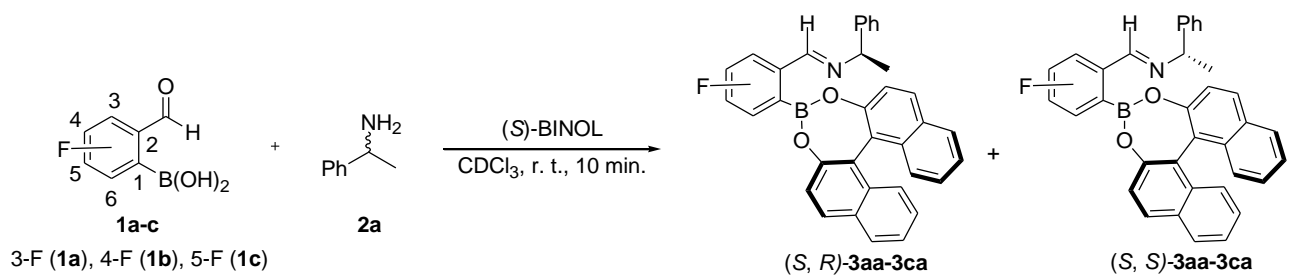
1.2.1. 分析手法の確立

まず、James-Bull 法を利用した ^{19}F -NMR によるキラルアミン類の光学純度決定手法の確立を目指し、以下に示すように種々の条件検討を行った。

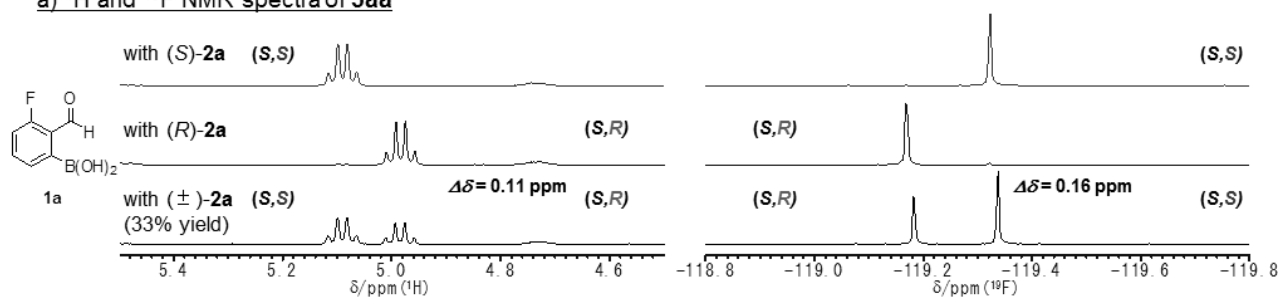
1.2.1.1. 含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸の選定

含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸のフッ素の位置が、生成されるイミノボロン酸エステル **3** のジアステレオマーの ^{19}F -NMR スペクトル上での化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)にどのように影響するか検討すべく、異なる位置にフッ素原子を有する含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸 **1a-c** を用いた検討を行った。本検討では、James, Bull らの報告から、キラルジオールとして BINOL を用いた時、生成されるイミノボロン酸エステル **3** の $\Delta\delta$ が最大を示すことが明らかになっていることから⁶⁾、キラル誘導体化剤として (*S*)-BINOL を用い、分析標的アミンとして (\pm)-1-phenylethylamine (**2a**) を用いることとした (Figure 1)。

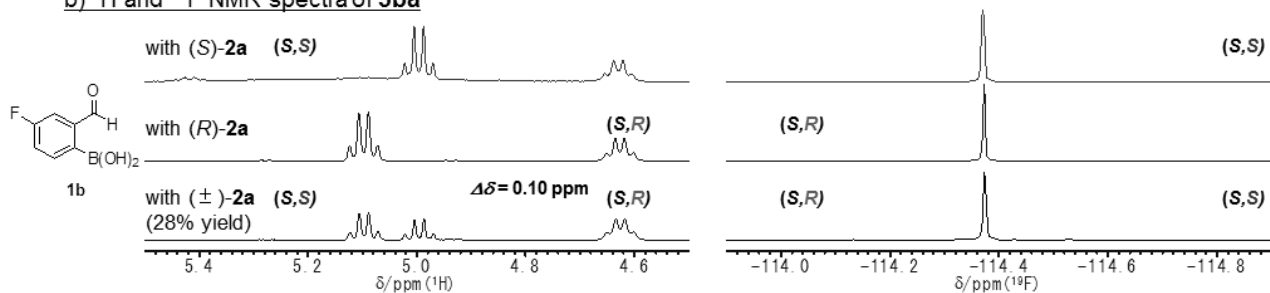
3-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) を用いた時、 ^{19}F -NMR スペクトル上で二つのシグナルを得る事を確認した。同様の反応を光学的に純粋な (*R*)-**2a** および (*S*)-**2a** に適用したところ、この二つのシグナルは、(*S,R*)-**3aa** と (*S,S*)-**3aa** のシグナルであり、ジアステレオマーによる化学シフト値に差が生じることが明らかとなった。この時の $\Delta\delta$ は、0.16 ppm であった (Figure 1a)。次に、C4-の位置にフッ素を有する 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1b**) を用いた時では興味深いことに、 ^1H -NMR スペクトル上では、対応する二つのジアステレオマーである (*S,R*)-**3ba** と (*S,S*)-**3ba** のシグナルが得られたにもかかわらず、 ^{19}F -NMR スペクトル上で一つのシグナルしか得られなかった (Figure 1b)。また、5-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) を用いた時は、**1a** の場合と同様、ジアステレオマーの良い分離を示した (Figure 1c)。分離能の点では、**1a** において最も良好な $\Delta\delta$ を得たが、**3aa** の収率は 33% であり非常に低い値を示した。一方で、**3ca** の収率は、93% と良好であった。これらの反応性の違いは、**3ba** の収率が 28% であることも考慮すると、おそらく立体障害の影響もしくは電子的効果に寄与していると考えられる。この反応の低収率は以降の定量分析には不都合であることもあり、以上の結果から、本手法で用いる含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸として、5-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) を採用することとした。



a) ¹H and ¹⁹F NMR spectra of 3aa



b) ¹H and ¹⁹F NMR spectra of 3ba



c) ¹H and ¹⁹F NMR spectra of 3ca

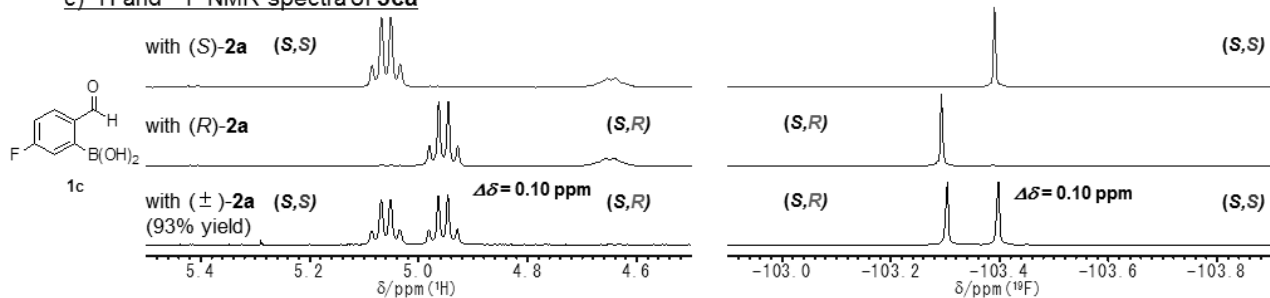


Figure 1 Effect of fluorinated *o*-formylphenylboronic acid **1a-c** and NMR spectra.

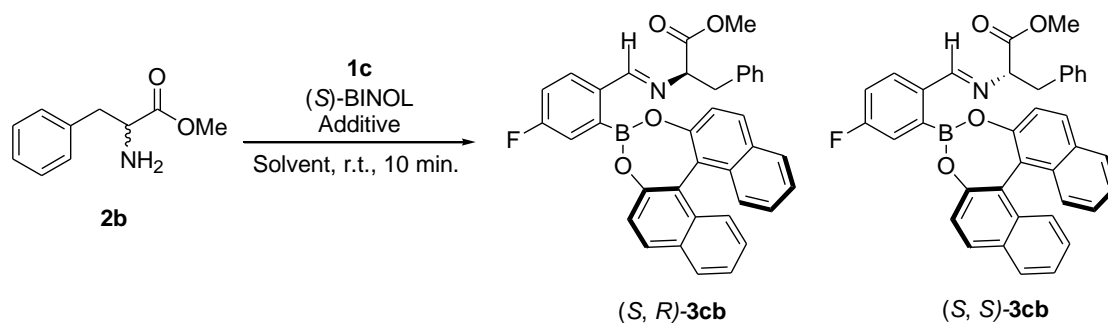
1.2.1.2. 分析条件の検討

5-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**)をフッ素誘導体化剤として、アミノ酸エステル体の定量的な¹⁹F-NMRによる光学純度の決定に向けた分析条件の精査を行った (Table 1). 即ち、重溶媒中に**1c**と(S)-BINOL, (±)-phenylalanine methyl ester (**2b**)を加え、10分後その混合物を¹Hおよび¹⁹F-NMRを用いて分析することとした。条件検討としては、重溶媒の効果、添加物の有無およびモル比について検討した。

初めに、CDCl₃を用いて検討すると、シグナルが¹⁹F-NMRスペクトル上に現れ、その積分比が1:1.40であった (entry 1). この二つのシグナルは、光学的に純粋な(R)-**2a**および(S)-**2a**を用い同様に分析したところ、生成される二つのジアステレオマー(S,R)-**3cb**と(S,S)-**3cb**であることが確認された。本条件において定量的に反応が進行した場合に得られるジアステレオマーの比(dr)は1:1であることから、定量的に反応が進行していないことがわかる。一方、¹H-NMRスペクトル上から未反応の(±)-phenylalanine methylester (**2b**)が確認され、生成される**3cb**は77%でしか得られなかった。このことから、(S,S)-**3cb**が優先的に生成される速度論的分割がおきていると示唆された。

そこで、**3cb**の収率向上をめざし、さまざまな反応条件を検討することとした。まず、重溶媒をtoluene-d₈およびCD₂Cl₂に変更したが、**3cb**の収率はそれぞれ73%, 58%と収率の向上は見られなかった (entries 2, 3). Toluene-d₈では、**2b**の残存が確認されたが、CD₂Cl₂ではほとんど消費されていた。しかしながら、(S)-BINOLが関与しない**1c**と**2b**のみから生成されるイミンが副生成物として確認された。この結果は、定量的な分析には好ましくない。これらを鑑みて、**2b**の残存を防ぎ、かつ(S)-BINOLを十分に反応させる必要があると考え、フッ素誘導体化剤である**1c**および(S)-BINOLの**2b**に対するモル比を変更した検討を行うこととした。モル比を**1c** (1.1 eq), (S)-BINOL (1.2 eq)としたところ、**3cb**の収率は88%となり、そのときのdrは1:1.14を示した (entry 4). さらに、(S)-BINOLを増やしたところ、drは1:1.09まで向上した (entries 5, 6). 次に、さらなる収率向上を目指し、添加物の効果について検討した。イミン生成およびボロン酸エステル生成は脱水反応であり、かつ加水分解を伴う平衡反応である。そこで、反応系中から水を除去する事で加水分解を防ぐ事が可能であると考えられるため、クロロホルムの脱水に良く用いられる4A Molecular sieves (MS4A)の添加を試みた。その結果、顕著なdrおよび収率の向上は見られなかったものの、**2b**はほとんど消費されていた (entries 7, 8). しかし、CD₂Cl₂での検討時と同様の副生成物が確認された。このことから、(S)-BINOLと**1c**とのボロン酸エステル化をより効率的に進行させることでさらなる収率の向上が期待できる。ボロン酸エステルは塩基条件下で安定であることが広く知られているため、塩基を添加することを考えた。また、塩基としては、¹⁹F-NMRスペクトルに影響のない有機塩基であるtriethylamine (TEA)を用いた。TEAを添加することにより、収率の向上とともに、drの大幅な改善が見られた (entries 9, 10).

したがって、最も良い分析条件としては、CDCl₃中、5-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) (1.1 eq), (S)-BINOL (1.5 eq), TEA (0.5 eq)およびMS4Aを添加した条件であった。

Table 1 Optimization of analytical conditions for phenylalanine methyl ester (**2b**). ^a

entry	1c (eq)	(S)-BINOL (eq)	solvent	additive	dr (S,R:S,S)	yield (%)
1	1.0	1.0	CDCl ₃	-	1:1.40	77
2	1.0	1.0	Toluene-d ₈	-	1:1.95	73
3	1.0	1.0	CD ₂ Cl ₂	-	1:1.14	58
4	1.1	1.2	CDCl ₃	-	1:1.18	88
5	1.1	1.5	CDCl ₃	-	1:1.24	92
6	1.1	2.0	CDCl ₃	-	1:1.09	88
7	1.1	1.2	CDCl ₃	MS4A	1:1.13	88
8	1.1	1.5	CDCl ₃	MS4A	1:1.16	72
9	1.1	1.2	CDCl ₃	MS4A TEA (0.5 eq)	1:1.13	>99
10	1.1	1.5	CDCl ₃	MS4A TEA (0.5 eq)	1:1.05	>99

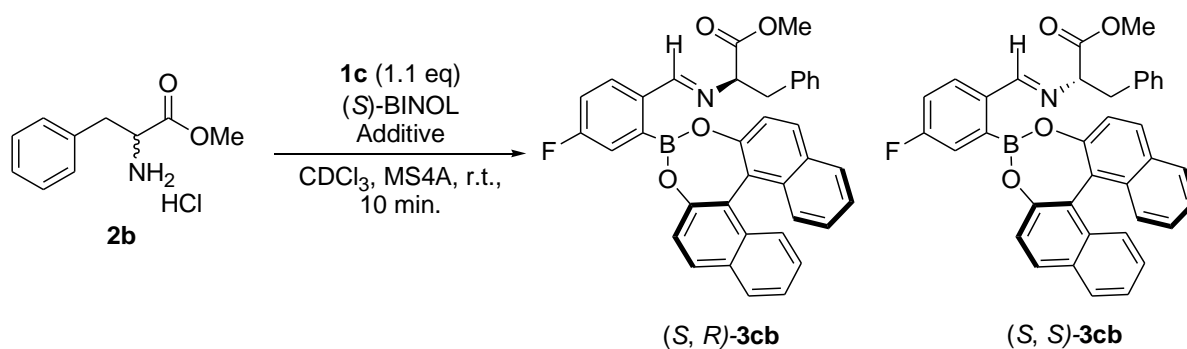
^aReaction conditions: Phenylalanine methyl ester (**2b**) was treated with **1c**, (S)-BINOL in the presence of additive in solvent at room temperature for 10 min. The reaction mixture was analyzed by NMR.

1.2.1.3. アミノ酸エステル体塩酸塩での検討

アミノ酸をアミノ酸エステル体に誘導する場合、 SOCl_2 などの塩素化により行う手法が一般的である。こういった場合にはアミノ酸エステル塩として生成される。そこで、アミノ酸エステル塩からの直接的な光学純度の決定に向け、アミノ酸エステル塩を用いた時の分析条件について検討した (Table 2)。本検討では、(±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl)を用いることとした。

これまでの James, Bull らの報告では、 Cs_2CO_3 により酸塩基的にアミノ酸エステル塩酸塩の塩酸を取り除き濾過により、不溶物を除去する手法を用いていたが、過剰の Cs_2CO_3 により予期せぬアミノ酸エステル体のラセミ化を引き起こしていた^{6, 9)}。また、このラセミ化は Cs_2CO_3 を K_2CO_3 にすることで抑制されることがわかっている⁹⁾。そこで、本検討では、まずこれらの炭酸イオンを塩基として用いた検討から始めた。 K_2CO_3 を用いた場合では、収率とジアステレオマーの比 (dr)が共に芳しくない (entry 1)。また同様に、 Cs_2CO_3 を用いた場合においても良好な結果は得られなかった (entry 2)。一方で、塩基として有機塩基である TEA を用いると 89%と良好な収率で **3cb** が得られ、dr も向上した (entry 3)。さらに、1.2.1.2の結果を考慮したとき、**2b**·HCl の塩酸を取り除き **2b** におきかえるために使用される TEA は当量であり、その後の反応を促進させるためには、量論的に不十分であると考えられる。そこで、TEA の量を 1.5 当量へと変更すると、**3cb** は定量的に生成され、最も良いジアステレオマーの比 (1:1.06)を与えた。

したがって、アミノ酸エステル塩に対して最も良い分析条件としては、 CDCl_3 中、5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) (1.1 eq), (*S*)-BINOL (1.5 eq), TEA (1.5 eq)および MS4A を添加した条件であった。

Table 2 Optimization of analytical conditions for phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl). ^a

entry	(S)-BINOL (eq)	additive (eq)	dr (S,R:S,S)	yield (%)
1	1.2	K ₂ CO ₃ (1.1)	1:1.79	45
2	1.2	Cs ₂ CO ₃ (1.1)	1:1.55	63
3	1.2	TEA (1.1)	1:1.18	89
4	1.5	TEA (1.5)	1:1.06	>99

^aReaction conditions: Phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl) was treated with **1c** (1.1 eq), (S)-BINOL in the presence of additive and MS4A in CDCl₃ at room temperature for 10 min. The reaction mixture was analyzed by NMR.

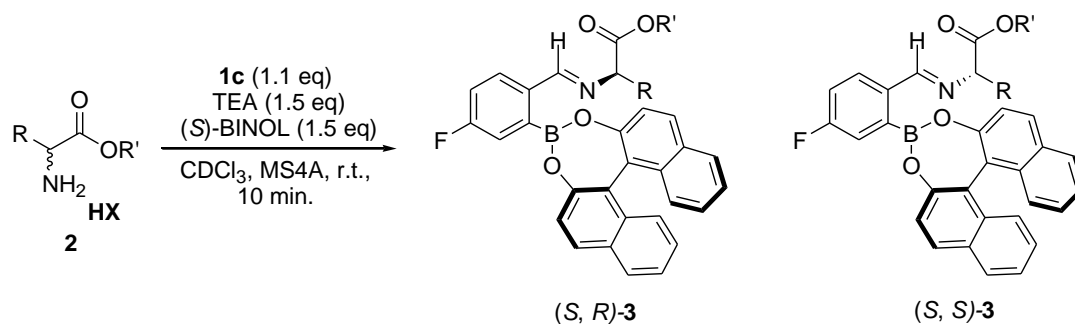
1.2.2. 各アミノ酸エステル塩でのキラル分析

1.2.1.で見出された分析条件を用い、各アミノ酸エステル体塩 (**2b-n·HX**) に対しての検討を行った (Table 3). 即ち, CDCl_3 に 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) と (*S*)-BINOL, 各アミノ酸エステル体塩 (**2b-n·HX**), triethylamine (TEA), MS4A を加え, 10 分後その混合物を ^1H および ^{19}F -NMR を用いて分析することとした.

その結果, (±)-phenylalanine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid (PTSA) salt (**2c·PTSA**) や (±)-phenylalanine allyl ester (**2d**) においても, ^{19}F -NMR スペクトル上で良好なシグナルの分離が見られ, ジアステレオマーの比はそれぞれ 1:1.06, 1:1.04 とラセミ体を示した (entries 2, 3). (±)-Tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e·HCl**) や (±)-tryptophan methyl ester hydrochloride (**2f·HCl**) を用いた場合にも, 対応するイミノボロン酸エステル **3ce**, **3cf** は良好に生成され, とともに 1:1.07 のジアステレオマーの比を示した (entries 4, 5). 一方で, このようなアリアルアラニン誘導体に比べ, 他のアミノ酸エステル類においては, イミノボロン酸エステル **3** のジアステレオマーの化学シフト値の差 ($\Delta\delta$) は小さい値を示した. 例えば, (±)-aspartic acid methyl ester hydrochloride (**2g·HCl**) では, 0.12 ppm であり (entry 6), (±)-valine methyl ester hydrochloride (**2h·HCl**), (±)-leucine methyl ester hydrochloride (**2i·HCl**) ではそれぞれ 0.04 ppm, 0.08 ppm とさらに小さな値を示した (entries 7, 8). (±)-Alanine methyl ester hydrochloride (**2j·HCl**) では, 0.01 ppm の差しか得られず, ジアステレオマーの比を決定することは困難であった (entry 9). しかし, 溶媒を CD_2Cl_2 に変更することで, $\Delta\delta$ の値は 0.07 ppm と向上し (entry 10), エステルをベンジル基に変更した (±)-alanine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid salt (**2k·PTSA**) では CDCl_3 においても 0.06 ppm の差が得られ, ジアステレオマーの比を決定することが可能であった (entry 11). 最後に, (±)-phenylglycine methyl ester hydrochloride (**2l·HCl**) では CDCl_3 , CD_2Cl_2 のどちらの場合においても良好な化学シフト値の差は得ることができなかった (entries 12, 13). (±)-phenylglycine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid salt (**2m·PTSA**) を用いた場合においては, $\Delta\delta$ の値は 0.03 ppm と CDCl_3 中での (±)-phenylglycine methyl ester hydrochloride (**2l·HCl**) の値と同値を示したが, ^{19}F -NMR スペクトル上でシャープなシグナルを与えたためジアステレオマーの比を決定する事が可能であった (entry 14). (±)-phenylglycine allyl ester (**2n**) においては, ジアステレオマーによる化学シフト値の差は確認されなかった (entry 15).

このように, 本手法を用いることで, ^{19}F -NMR スペクトル上でさまざまなアミノ酸エステル体の光学純度を定量的に分析できることが示唆された.

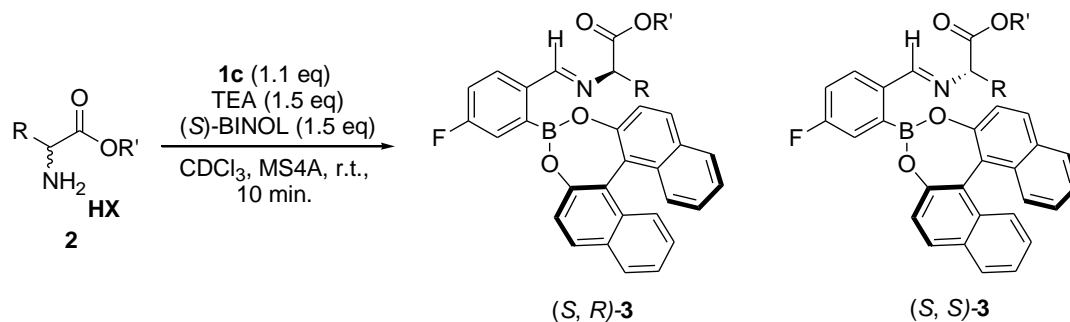
Table 3 Scope of amino acid ester. ^a



entry	amino acid ester 2	HX	¹⁹ F NMR shifts $\Delta\delta$	dr (S,R:S,S)
1		HCl	0.36	1:1.06
2		PTSA	0.41	1:1.06
3 ^b		-	0.39	1:1.04
4		HCl	0.35	1:1.07
5		HCl	0.34	1:1.07
6		HCl	0.12	1:1.08
7		HCl	0.04	1:1.07
8		HCl	0.08	1:1.08

^a Reaction Conditions: Amino acid derivatives **2** was treated with **1c** (1.1 eq.), (S)-BINOL (1.5 eq) in the presence of TEA (1.5 eq) and MS4A in CDCl₃ at room temperature for 10 min. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b TEA (0.5 eq) was used. ^c CD₂Cl₂ was used instead of CDCl₃. ^d Not determined. ^e Not distinguished.

Table 3 Scope of amino acid ester. ^a (continued)



entry	amino acid ester 2	HX	¹⁹ F NMR shifts $\Delta\delta$	dr (S,R:S,S)
9	R' = Me (2j)	HCl	0.01	n.d. ^d
10 ^c		HCl	0.07	1:1.04
11	R' = Bn (2k)	PTSA	0.06	1:1.05

12	R' = Me (2l)	HCl	0.03	n.d. ^d
13 ^c		HCl	0.00	n.d.
14	R' = Bn (2m)	PTSA	0.03	1:1.01
15 ^b	R' = Allyl (2n)	-	n.d. ^e	n.d. ^d

^a Reaction Conditions: Amino acid derivatives **2** was treated with **1c** (1.1 eq.), (S)-BINOL (1.5 eq) in the presence of TEA (1.5 eq) and MS4A in CDCl₃ at room temperature for 10 min. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b TEA (0.5 eq) was used. ^c CD₂Cl₂ was used instead of CDCl₃. ^d Not determined. ^e Not distinguished.

1.2.3. 本手法のキラル分析能の検討

1.2.2.の結果から、さまざまなアミノ酸エステル体に対して本手法が適用であることがわかった。そこで光学純度の異なる tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**·HCl)を用い、一般的に光学純度の決定に使用される HPLC 分析での結果と比較し、本手法の光学純度の決定における有用性について検討した (Figure 2)。即ち、エナンチオマー過剰率 (ee)を 75, 50, 20, 0, -20, -50, -75%にそれぞれ調整した tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**·HCl)を用い、本手法から得られる ee および HPLC 法で得られる ee を求めた。

その結果、各プロットは傾き 1 の線形性を十分に示し、HPLC 法との最大誤差が 5%以下で本手法での光学純度の決定が可能であった。

このことは、本手法が光学純度の決定における手法として十分に有用であることを裏付けた。また、HPLC 法においては、アミノ酸エステル体の種類により最適な分離分析条件を精査する必要があることや、検出器に UV 分光光度計を用いるため紫外吸収をもたない脂肪族アミノ酸エステル類では分析が困難であることから、アミノ酸エステル類の簡便な光学純度の決定や脂肪族アミノ酸エステル類の光学純度の決定を可能とする点においても本手法は有用であるといえる。

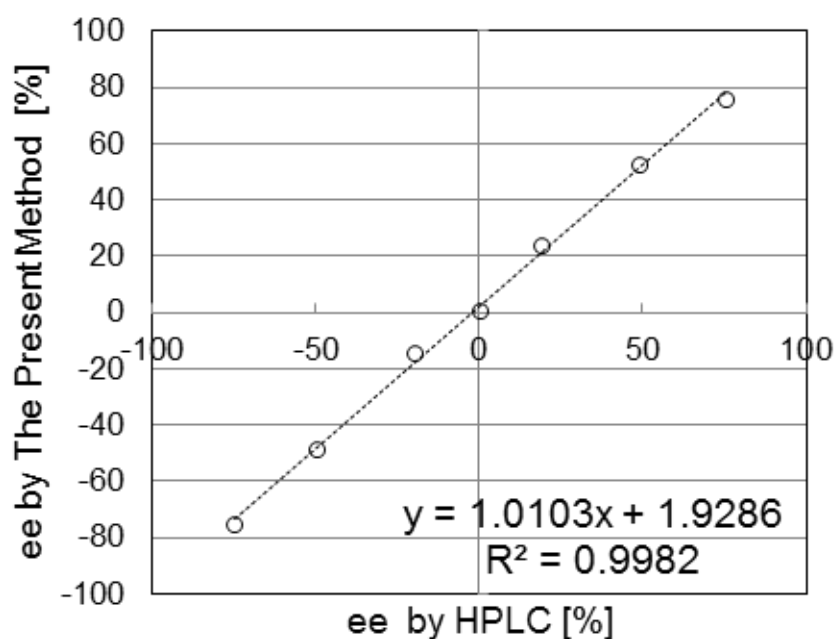


Figure 2 Comparison of ee values of tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**·HCl) between HPLC and the present method.

1.2.4. キラルアミノ酸エステルの一斉光学純度の決定

1.2.2.での検討において、生成するイミノボロン酸エステル**3**の化学シフト値はアミノ酸の種類によって異なる値を示していた。このことから ^{19}F -NMRを用いることで多種のアミノ酸エステル類の光学純度を一度の測定から決定することが可能となると考えられる。そこで、三種類のアミノ酸エステル類の混合物に対して、本手法を適用し、光学純度の決定を試みた (Figure 3)。即ち、20%ee (D)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl), 80%ee (L)-tryptophan methyl ester hydrochloride (**2f**·HCl)および(DL)-alanine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid salt (**2k**·PTSA)の混合物に対し、本手法を適用した。

その結果、6つのシグナルが確認された。1.2.2.より得られた化学シフト値から6つのシグナルがそれぞれ対応する**3cb**, **3cf**, **3ck**であることを確認した。さらにその積分値からeeを算出し光学純度を決定するとD-**2b**, L-**2f**および**2k**はそれぞれ17.9%ee, 82.2%ee, 1.0%ee(ラセミ体)であった。

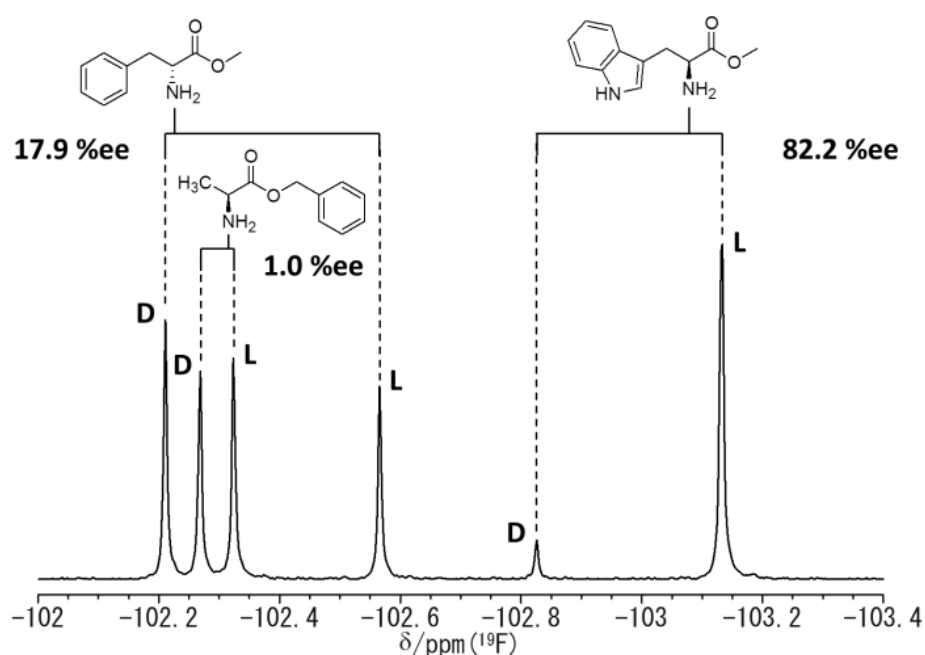


Figure 3 ^{19}F -NMR spectrum of a mixed solution of (D)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl, 20%ee), (L)-tryptophan methyl ester hydrochloride (**2f**·HCl, 80%ee) and (DL)-alanine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid salt (**2k**·PTSA).

1.2.5. 新奇キラルアルデヒドの合成と本手法への適用

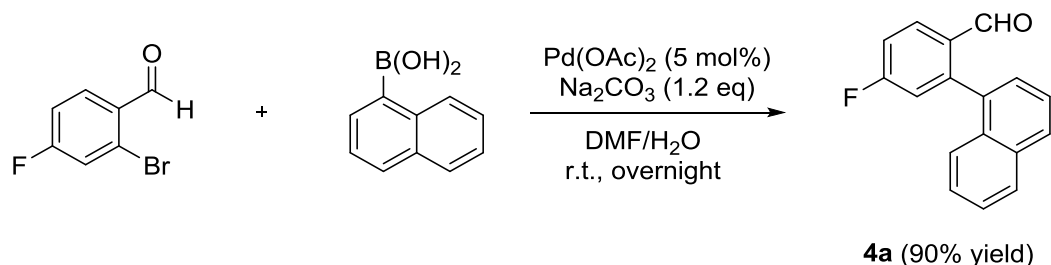
これまで、James, Bull らの光学純度の決定法に基づいて検討してきたが、本反応系では、ボロン酸とキラルジオールによるキラル誘導体化が必要となる。アミノ酸の直接的なキラル分析を目指す上で、溶媒系を親水性の溶媒へと展開することは欠かせない。そういった場合において、ボロン酸とジオールによる脱水的なボロン酸エステル化反応は極めて困難となると想定できる。そこで、キラル誘導体化剤を使用する事なく、分子内にキラルを有する含フッ素ベンズアルデヒドを用いることでアミノ酸の光学純度の決定が可能となると考えた。

1.2.5.1. 新奇キラルアルデヒドの合成

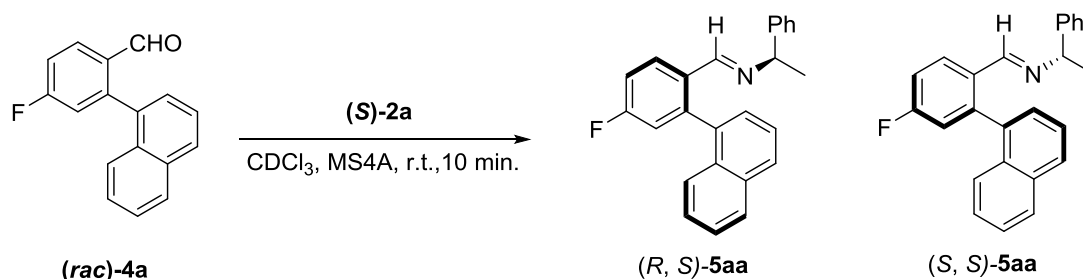
これまでの検討結果から、*p*-位のフッ素と *o*-位にキラル源をもつことが良いジアステレオマーの分離を ^{19}F -NMR スペクトル上でひきおこすために必要であると考えられる。そこで *o*-位に軸不斉を有するキラルアルデヒド **4a** の利用を考えた。このキラルアルデヒドのアキラル体は、鈴木・宮浦カップリングにより容易に合成可能であり、初期検討として、その合成に着手した (Scheme 2)。

結果として、**4a** が 90% の収率で得られた。

次に、合成したアキラルアルデヒド **4a** を用いて、(*S*)-1-phenylethylamine (**2a**) に対して、誘導体化を試みた。しかしながら、結果としてイミン **5aa** の生成は確認されなかった (Scheme 3)。これは、*o*-位に直接ナフチル基を有することにより立体障害が大きくなり反応が進まないと考えられる。



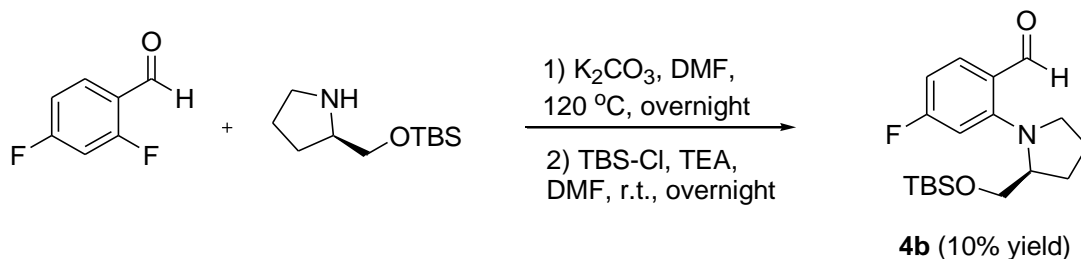
Scheme 2 Synthesis of 4-fluoro-2-(1-naphthyl)benzaldehyde (**4a**).



Scheme 3 Derivatization of (±)-aldehyde **4a** to (*S*)-1-phenylethylamine (**2a**).

このことから、軸不斉ではなく、単純な不斉炭素をもつキラルアルデヒドの設計を行った。キラル源としては、比較的安価なプロリノールを用いることを考え、プロリノールのヒドロキシ基の反応性による系中の反応阻害を抑えるため保護基を利用することを想定し設計した。

新たに設計したキラルアルデヒド **4b** は L-プロリノールの TBS 保護体と 2,4-difluorobenzaldehyde との二段階の反応により合成可能であった (Scheme 4)。



Scheme 4 Synthesis of 4-fluoro-2-{1-[2-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)pyrrolidinyl]}benzaldehyde (**4b**).

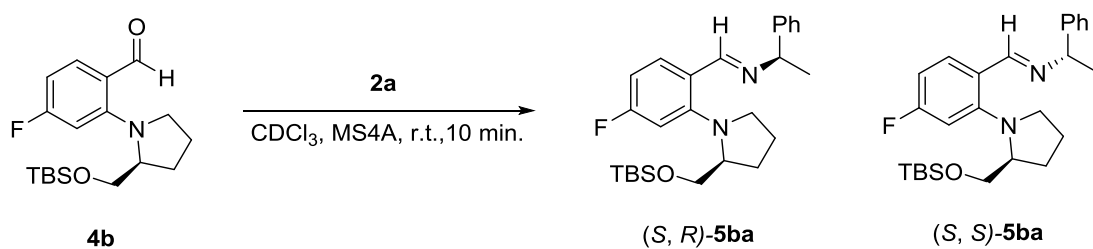
1.2.5.2. 新奇キラルアルデヒドの利用

合成した新奇キラルアルデヒド **4b** を用いて、(±)-1-phenylethylamine (**2a**), (±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl) に対して検討した。即ち、 $CDCl_3$ 中、アルデヒド **4b**, アミン **2**, MS4A および TEA を加え、10 分攪拌した後、 1H および ^{19}F -NMR を用いて分析することとした (Scheme 5, 6)。

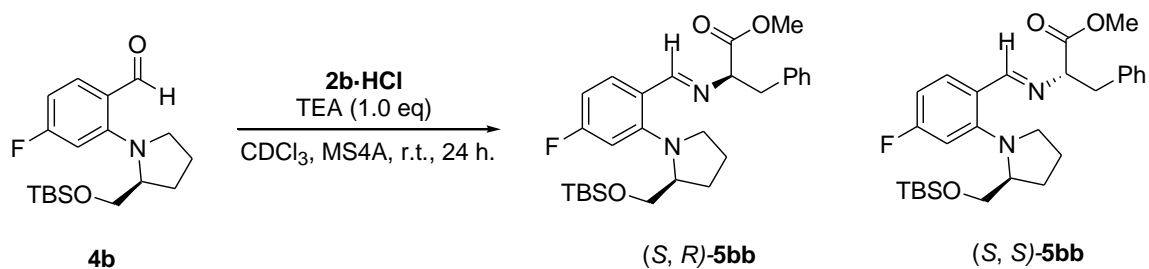
その結果、**2a** では収率 23% で **5ba** の生成が確認され、 ^{19}F -NMR スペクトル上での化学シフト値の差は 0.02 ppm で積分比の決定は困難であった (Figure 4)。一方、**2b** では、反応時間が 10 分では反応の進行が見られず、反応時間を 24 時間にするこで反応の進行が確認され、収率は 95% であった。生成されたイミン **5bb** のジアステレオマーの ^{19}F -NMR スペクトル上での化学シフト値の差は 0.05 ppm であり、そのジアステレオマーの比は 1:1.07 と良好な値を示した (Figure 5)。

さらなる検討として、溶媒を親水性溶媒である CD_3OD に変更し、同様の反応条件で検討した。しかしながら、 1H -NMR スペクトル上から 65% の収率でイミン **5bb** の生成が確認されたものの、 ^{19}F -NMR スペクトル上では、化学シフト値の差が見られなかった。

この結果、新奇キラルアルデヒド **4b** での親水性溶媒中でのキラル分析には至らなかったものの、これまでと同様の $CDCl_3$ を用いた場合には(±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl)の二成分でのキラル分析が可能であると示唆された。



Scheme 5 Derivatization of chiral aldehyde **4b** to (±)-1-phenylethylamine (**2a**).



Scheme 6 Derivatization of chiral aldehyde **4b** to (±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b·HCl**).

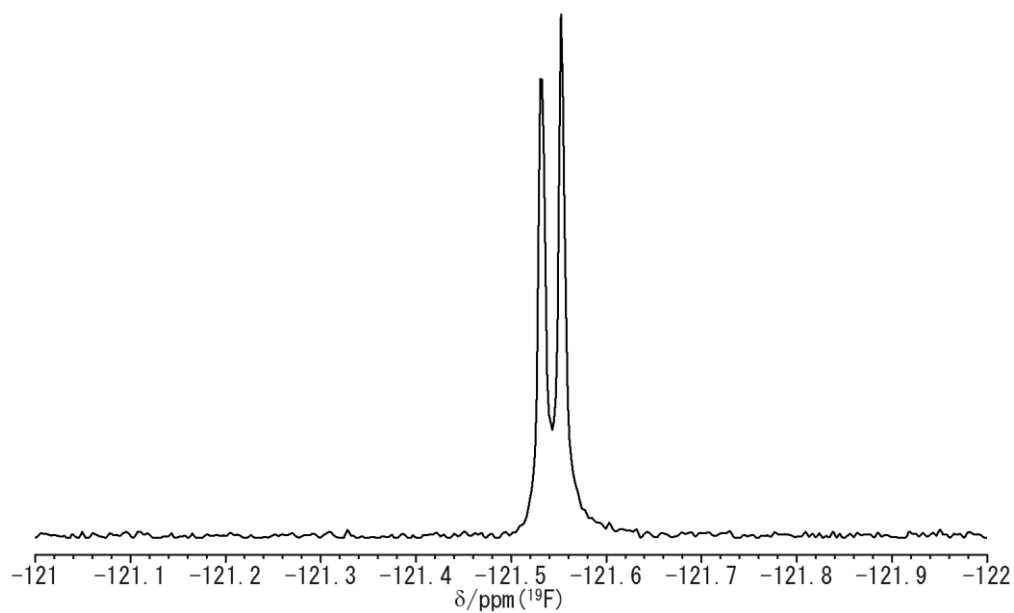


Figure 4 ¹⁹F-NMR spectrum of imine **5ba**.

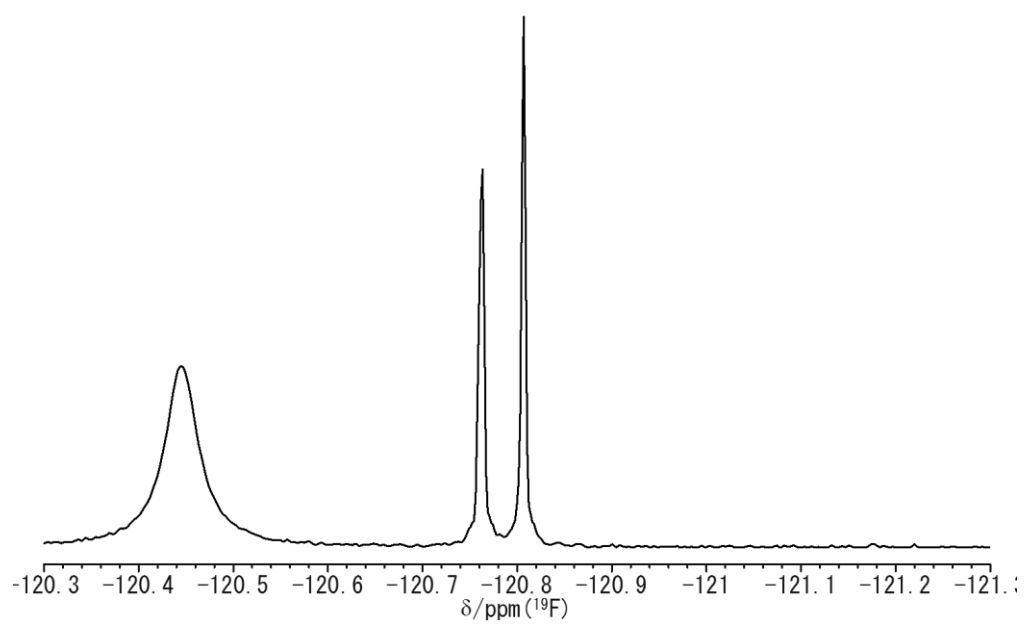


Figure 5 ^{19}F -NMR spectrum of imine **5bb**.

1.3. まとめ

著者は、アミンおよびアミノ酸エステル体塩の $^{19}\text{F-NMR}$ による 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) および(*S*)-BINOL を用いた光学決定手法の開発に成功した。本手法の手順を以下に示す。

i. キラルアミンおよびアミノ酸エステルの光学純度の決定法

- ① CDCl_3 (1 mL) に目的生成物 (0.03 mmol), MS4A および TEA (0.5 eq) を加え, そこに, 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**, 1.1 eq) と(*S*)-BINOL (1.5 eq) を加え, 10 分撹拌する。
- ② 調整した混合液をサンプルチューブに移し, $^{19}\text{F-NMR}$ 分析する。
- ③ 得られる二つのシグナルの積分比から光学純度を算出する。

II. アミノ酸エステル塩の光学純度の決定法

- ① CDCl_3 (0.3 mL) に目的生成物 (0.03 mmol), および TEA (1.5 eq) を加え事前に撹拌する。そこに, CDCl_3 (0.7 mL), MS4A、5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**, 1.1 eq) と(*S*)-BINOL (1.5 eq) を加え, 10 分撹拌する。
- ② 調整した混合液をサンプルチューブに移し, $^{19}\text{F-NMR}$ 分析する。
- ③ 得られる二つのシグナルの積分比から光学純度を算出する。

また, 本手法により 3 種のアミノ酸エステル塩の光学純度を $^{19}\text{F-NMR}$ によって一度に決定することが可能となった。さらに, 新たなキラルベンズアルデヒド **4b** を用いることで, phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b·HCl**) との二成分での $^{19}\text{F-NMR}$ によるキラル分析が可能であることを見出した。著者は, この知見が $^{19}\text{F-NMR}$ によるアミノ酸の直接的な光学純度の決定法の開発への足掛かりとなると期待する。

1.4. 実験方法

1.4.1. 分析機器

(a) フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR)

Bruker 社製 AVANCE-III-HD 型 (400 MHz)

(b) 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (HPLC)

株式会社日立製作所社製 L-7000 シリーズ

株式会社ダイセル社製 CHIRALCEL OJ-H

(c) 高分解能質量分析装置 (FAB-HRMS)

JEOL 社製 JMS-700 Mstation

1.4.2. General method

溶媒及び試薬は、それぞれ東京化成工業、和光純薬工業、ナカライテスク、Aldrich から購入し、特に精製せずにそのまま使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、300 mesh のシリカゲル (Wakogel C-300 Silicagel) を用いて行った。TLC は、シリカゲル 60 F₂₅₄ をガラスシートの上にプレコートしたものを Merck 社から購入し、そのまま使用した。¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹⁹F-NMR スペクトルは、それぞれ 400 MHz, 100 MHz, 376 MHz で測定した。測定用の重溶媒として CDCl₃, DMSO-d₆, CD₃OD, toluene-d₈, CD₂Cl₂ を使用し、化学シフト値 δ は CDCl₃ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CDCl₃ (δ 77.0 ppm for ¹³C), DMSO-d₆ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₃OD では CH₃OH (δ 3.31 ppm for ¹H), toluene-d₈ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₂Cl₂ では CH₂Cl₂ (δ 5.3 ppm for ¹H) を基準とし、その相対値で決定した。また、¹⁹F-NMR の測定は、プロトン完全デカップリング法および以下のパラメーターを用いた (Table 4)。質量分析は、*m*-NBA をマトリックスとして、PEG200, PEG400, ウルトラマーク 1621 を質量校正物質として使用し FAB-HRMS により測定した。エナンチオマー過剰率は HPLC により決定した。

Table 4 Measurement parameters of ¹⁹F-NMR.

F2 - Acquisition Parameters =====		AQ	0.7340032 sec
INSTRUM	spect	RG	202.39
PROBHD	5 mm PABBO BB/	DW	5.600 usec
PULPROG	zgfhighqn.2	DE	6.50 usec
TD	131072	TE	296.9 K
NS	16	D1	1.00000000 sec
DS	4	D11	0.03000000 sec
SWH	89285.711 Hz	D12	0.00002000 sec
FIDRES	0.681196 Hz	TD0	1
CHANNEL f1 =====		PLW2	12.00000000 W
SFO1	376.4607164 MHz	PLW12	0.34228000 W
NUC1	19F	F2 - Processing parameters =====	
P1	15.00 usec	SI	65536
PLW1	16.00000000 W	SF	376.4977312 MHz
CHANNEL f2 =====		WDW	EM
SFO2	400.1316005 MHz	SSB	0
NUC2	1H	LB	0.30 Hz
CPDPRG[2	waltz16	GB	0
PCPD2	90.00 usec	PC	1.00

1.4.3. 分析手法の確立

本検討で用いる **1a**⁷⁾, **1b**⁶⁾, **1c**⁹⁾および **2b**・HCl¹⁰⁾は既報の合成手法により合成した。また、**2b** は **2b**・HCl を飽和 NaHCO₃ 水溶液で処理することで得た。MS4A は 300℃で 3 時間乾燥させてから使用した。

1.4.3.1. 含フッ素 *o*-ホルミルフェニルボロン酸の選定

テストチューブ中, CDCl_3 (1 mL)と *o*-ホルミルフェニルボロン酸 **1** (0.03 mmol, 0.0050 g), (*S*)-BINOL (0.03 mmol, 0.0087 g)および(±)-1-phenylethylamine (**2a**) (0.03 mmol, 0.0038 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ^1H および ^{19}F -NMR により分析した.

(*S, R*)- **3aa** ^1H -NMR : $\delta = 8.48$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -119.13$ ppm (s, 1F, Ar-F).

(*S, S*)- **3aa** ^1H -NMR : $\delta = 8.30$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -119.29$ ppm (s, 1F, Ar-F).

(*S, R*)- **3ba** ^1H -NMR : $\delta = 8.23$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -114.39$ ppm (s, 1F, Ar-F).

(*S, S*)- **3ba** ^1H -NMR : $\delta = 8.03$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -114.39$ ppm (s, 1F, Ar-F).

(*S, R*)- **3ca** ^1H -NMR : $\delta = 8.23$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -103.30$ ppm (s, 1F, Ar-F).

(*S, S*)- **3ca** ^1H -NMR : $\delta = 8.03$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -103.40$ ppm (s, 1F, Ar-F).

1.4.3.2. 分析条件の決定

テストチューブ中, 各溶媒 (1 mL)と 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**), (*S*)-BINOL, 各添加物および(±)-phenylalanine methyl ester (**2b**) (0.03 mmol, 0.0054 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ^1H および ^{19}F -NMR により分析した.

1.4.3.3. アミノ酸エステル体塩酸塩での検討

テストチューブ中, CDCl_3 (1 mL)と 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**), (*S*)-BINOL, 各添加物, MS4A および(±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl) (0.03 mmol, 0.0065 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ^1H および ^{19}F -NMR により分析した.

1.4.4. 各アミノ酸エステル体塩での検討

本検討で用いるアミノ酸エステル体塩酸塩 **2c-n·HX**¹⁰⁾は既報の手法で合成した。

テストチューブ中, CDCl₃ (1 mL)と 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) (0.033 mmol, 0.0055 g), (*S*)-BINOL (0.045 mmol, 0.0130 g), TEA (0.045 mmol, 6.23 μL), MS4A およびアミノ酸エステル体塩酸塩 **2b-n·HX** (0.03 mmol)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した. **2d·HX**, **2n·HX** での検討では, TEA (0.015, 2.08 μL)で行った.

(*S*, *R*)- **3cb** ¹⁹F-NMR : δ = -102.20 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cb** ¹⁹F-NMR : δ = -102.56 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3cc** ¹⁹F-NMR : δ = -102.22 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cc** ¹⁹F-NMR : δ = -102.63 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3cd** ¹⁹F-NMR : δ = -102.18 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cd** ¹⁹F-NMR : δ = -102.56 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3ce** ¹⁹F-NMR : δ = -102.43 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3ce** ¹⁹F-NMR : δ = -102.78 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3cf** ¹⁹F-NMR : δ = -102.71 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cf** ¹⁹F-NMR : δ = -103.05 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3cg** ¹⁹F-NMR : δ = -101.81 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cg** ¹⁹F-NMR : δ = -101.93 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3ch** ¹⁹F-NMR : δ = -102.43 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3ch** ¹⁹F-NMR : δ = -102.47 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3ci** ¹⁹F-NMR : δ = -102.40 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3ci** ¹⁹F-NMR : δ = -102.48 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *R*)- **3cj** ¹⁹F-NMR : δ = -102.29 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S*, *S*)- **3cj** ¹⁹F-NMR : δ = -102.30 ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3cj** (CD₂Cl₂) ¹⁹F-NMR : $\delta = -103.46$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3cj** (CD₂Cl₂) ¹⁹F-NMR : $\delta = -103.53$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3ck** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.26$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3ck** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.32$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3cl** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.00$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3cl** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.03$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3cl** (CD₂Cl₂) ¹⁹F-NMR : $\delta = -103.09$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3cl** (CD₂Cl₂) ¹⁹F-NMR : $\delta = -103.09$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3cm** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.01$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3cm** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.04$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, R*)- **3cn** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.00$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

(*S, S*)- **3cn** ¹⁹F-NMR : $\delta = -102.00$ ppm (s, 1F, Ar-*F*).

1.4.5. 本手法のキラル分析能の検討

エナンチオマー過剰率の異なるサンプルは L-tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**•HCl)および D-tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**•HCl)を用いて調製した。

テストチューブ中, CDCl₃ (1 mL)と 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) (0.033 mmol, 0.0055 g), (*S*)-BINOL (0.045 mmol, 0.0130 g), TEA (0.045 mmol, 6.23 μ L), MS4A およびキラル純度の異なる tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**•HCl) (0.03 mmol, 0.0070 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

キラル純度の異なる tyrosine methyl ester hydrochloride (**2e**•HCl)を飽和 NaHCO₃ 水溶液で処理することで得た tyrosine methyl ester (**2e**)を HPLC で測定した (column: OJ-H, eluent: Hexane / 2-propanol = 90 / 10, 0.5 mL/min., wave length: 220 nm, retention time: 23.4 min (L), 25.1 (D)).

1.4.6. キラルアミノ酸エステルの一斉光学純度の決定

エナンチオマー過剰率の異なるサンプルは、D-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl), DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2e**·HCl), L-tryptophan methyl ester hydrochloride (**2f**·HCl), DL-tryptophan methyl ester hydrochloride (**2f**·HCl)およびDL-alanine benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid salt (**2k**·PTSA)を用いて CDCl₃ に任意の比率で溶かすことで溶液を調整した。

テストチューブ中、CDCl₃ (0.8 mL)と 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1c**) (0.066 mmol, 0.0110 g), (S)-BINOL (0.09 mmol, 0.0260 g), TEA (0.09 mmol, 12.46 μL), MS4A および先に調整した溶液 (0.2 mL) を加え、室温で 10 分攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

(S, R)- **3cb** ¹⁹F-NMR : δ = -102.21 ppm (s, 1F, Ar-F).

(S, S)- **3cb** ¹⁹F-NMR : δ = -102.57 ppm (s, 1F, Ar-F).

(S, R)- **3cf** ¹⁹F-NMR : δ = -102.83 ppm (s, 1F, Ar-F).

(S, S)- **3cf** ¹⁹F-NMR : δ = -103.13 ppm (s, 1F, Ar-F).

(S, R)- **3ck** ¹⁹F-NMR : δ = -102.27 ppm (s, 1F, Ar-F).

(S, S)- **3ck** ¹⁹F-NMR : δ = -102.33 ppm (s, 1F, Ar-F).

1.4.7. 新奇キラルアルデヒドの合成

1.4.7.1. 4-Fluoro-2-(1-naphthyl)benzaldehyde (**4a**)の合成¹¹⁾

アルゴン下のシュレンク管, DMF (1.4 mL), H₂O (0.7 mL)中, 2-bromo-4-fluorobenzaldehyde (1.0 mmol, 0.2032 g), 1-naphthalene boronic acid (1.2 mmol, 0.2064 g), Pd(OAc)₂ (0.05 mmol, 0.0112 g)および Na₂CO₃ (1.2 mmol, 0.1272 g)を加え、室温で一晩攪拌する。その後、セライトろ過し、得られた溶液から Et₂O で希釈し、飽和 NaHCO₃ 水溶液と brine で洗浄する。有機層を減圧留去した後、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 9 : 1)で単離精製し透明液体である 4-fluoro-2-(1-naphthyl)benzaldehyde (**4a**)を得た (0.2251 g, 90%)。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.53 (s, 1H), 8.15 (dd, *J* = 8.8, 6.0 Hz, 1H), 7.95 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.58-7.40 (m, 5H), 7.30-7.25 (m, 1H), 7.16 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 190.39, 165.67 (d, *J*_{CF} = 255.7 Hz), 147.15 (d, *J*_{CF} = 9.3 Hz), 134.18, 133.43, 132.38, 131.56 (d, *J*_{CF} = 2.8 Hz), 130.08 (d, *J*_{CF} = 10.0 Hz), 129.14, 128.49, 128.05, 127.08, 126.40, 125.44, 125.03, 118.53 (d, *J*_{CF} = 21.7 Hz), 115.78 (d, *J*_{CF} = 21.8 Hz) ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -103.56 (1F) ppm. HRMS: calcd. for C₁₇H₁₁FO ([M]⁺) 250.0794 ; found 250.0789.

1.4.7.2. 4-Fluoro-2-{1-[2-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)pyrrolidinyl]}benzaldehyde (4b)の合成

アルゴン下のシュレンク管, DMF (4 mL)中, 2,4-difluorobenzaldehyde (5 mmol, 0.7105 g), (*S*)-2-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]pyrrolidine¹²⁾ (5.25 mmol, 1.1309 g)および K₂CO₃ (5.25 mmol, 0.7256 g)を 150°Cで一晩攪拌した後, 室温に冷やし, 溶媒を減圧留去する. その後 H₂O によりクエンチし, EtOAc で希釈した後, 飽和 NaHCO₃ 水溶液で洗浄する. 有機層を減圧留去した後, DMF (10 mL), TBDMS-Cl (5.5 mmol, 0.8250 g), imidazole (22 mmol, 1.4960 g)を加え, 室温で一晩攪拌する. 溶媒を減圧留去した後, CH₂Cl₂ で抽出し, 飽和 NaHCO₃ 水溶液と brine で洗浄する. 有機層を減圧留去し, 得られた液体をリサイクル GPC により単離精製することで, 赤色液体である 4-fluoro-2-{1-[2-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)pyrrolidinyl]}benzaldehyde (**4b**)を得た (0.1683 g, 10%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.04 (s, 1H), 7.69 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.23 (dd, *J* = 14.4, 2.0 Hz, 1H), 3.95-3.90 (m, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.4, 4.0 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 10.4, 3.2 Hz, 1H), 3.47-3.42 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 1H), 2.14-2.02 (m, 4H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (s, 6H) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 185.26, 166.79 (d, *J*_{CF} = 253.7 Hz), 153.59 (d, *J*_{CF} = 12.8 Hz), 130.11 (d, *J*_{CF} = 4.6 Hz), 113.22 (d, *J*_{CF} = 8.7 Hz), 108.56 (d, *J*_{CF} = 1.2 Hz), 97.79 (d, *J*_{CF} = 25.0 Hz), 62.76, 60.38, 48.75, 28.21, 25.86, 23.03, 18.24, -5.43 ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -120.47 (1F) ppm. HRMS: calcd. for C₁₈H₂₉FO₂NSi ([M+H]⁺) 338.1951; found 338.1943.

1.4.8. 新奇キラルアルデヒドの利用

Scheme 3

テストチューブ中, CDCl₃ (1 mL)と 4-fluoro-2-(1-naphthyl)benzaldehyde (**4a**) (0.03 mmol, 0.0075 g), MS4A および(*S*)-1-phenylethylamine (**2a**) (0.03 mmol, 0.0038 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した.

Scheme 5

テストチューブ中, CDCl₃ (1 mL)と 4-fluoro-2-{1-[2-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl)pyrrolidinyl]}benzaldehyde (**4b**) (0.03 mmol, 0.0101 g), MS4A および(±)-1-phenylethylamine (**2a**) (0.03 mmol, 0.0038 g)を加え, 室温で 10 分攪拌した後, その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した.

Scheme 6

テストチューブ中, CDCl_3 (1 mL) と 4-fluoro-2-{1-[2-(1-*tert*-butyldimethylsiloxymethyl)pyrrolidinyl]}benzaldehyde (**4b**) (0.03 mmol, 0.0101 g), MS4A および(±)-phenylalanine methyl ester hydrochloride (**2b**·HCl) (0.03 mmol, 0.0065 g)を加え, 室温で24時間攪拌した後, その混合溶液を ^1H および ^{19}F -NMR により分析した.

1.5. 参考文献

1. a) T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka, *scientific reports*, **2016**, 6 (26137), 1. b) K. Hamase, A. Morikawa, K. Zaitso, *J. Chromatogr. B*, **2002**, 781, 73.
2. For a review, see: S. M. Paek, M. Jeong, J. Jo, Y. M. Heo, Y. T. Han, H. Yun, *Molecules* **2016**, 21, 951.
3. a) H. Chen, S. Viel, F. Ziarelli, L. Peng, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7971. b) R. N. Rao, K. Santhakumar, *New J. Chem.* **2016**, 40, 8408.
4. a) Y. Zhao, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3221.
5. Y. Pérez-Fuertes, A. M. Kelly, A. L. Johnson, S. Arimori, S. D. Bull, T. D. James, *Org. Lett.* **2006**, 8, 609-612.
6. S. L. Yeste, M. E. Powell, S. D. Bull, T. D. James, *J. Org. Chem.* **2009**, 74 427-430.
7. S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 6410.
8. 奥野雄太, 同志社大学卒業論文, **2017**.
9. K. Kowalska, A. Adamczyk, W. Zniakb, P. Gajowiecb, B. Gierczyk, E. Kaczorowskab, Ł. Popendad, G. Schroederc, A. Sikorskia, A. Sporzynski, *Journal of Fluorine Chemistry* **2016**, 187, 1.
10. a) S. Chen, Y. Zhang, K. Wang, H. Zhou, W. Zhang, *Polym. Chem.* **2016**, 7, 3509. b) Y. Li, F. Yang, L. Wang, Z. Cao, T. Han, Z. Duan, Z. Li, W. Zhao, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 112, 196. c) C. F. D. Costa, A. C. Pinheiro, M. V. D. Almeida, M. C. S. Lourenc, M. V. N. D. Souza, *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, 79, 216. d) M. Hervé, A. Kova, C. Cardoso, D. Patin, B. Brus, H. Barreteau, D. M. Lecreulx, S. Gobec, D. Blanot, *Biochimie*, **2013**, 95, 1120. e) C. C. Hanna, S. S. Kulkarni, E. E. Watson, B. Premdjee, R. J. Payne, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 5424.
11. G. Liao, Q. J. Yao, Z. Z. Zhang, Y. J. Wu, D. Y. Huang, B. F. Shi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 3661.
12. M. Kim, K. Gajulapati, C. Kim, H. Y. Jung, G. Goo, K. Lee, N. Kaur, H. J. Kang, S. J. Chung, Y. Choi *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 11443-11445.

第二章

^{19}F -NMR による第一級アミン類の一斉分析

概要

動植物・微生物を問わず、広く生体内に存在するアミン類を生体アミンという。生体アミンはその構造から、カテコール骨格をもつカテコールアミン、インドール骨格をもつインドールアミン、モノフェノール骨格をもつモノフェノールアミン、またアミノ基を二つ以上もつポリアミンに分類される。生体アミンの多くは、神経伝達物質として、あるいは体液中に分泌されて神経ホルモンとして様々な生理機能の調整にかかわっている。また、ヒトに限らず、生体内で産生される生体アミンは魚類や食品の腐敗の指標として扱われるだけでなく、アレルゲンとして人体に害をなすこともあるため、それらの定量的な分析はとくに食品を扱う場合には重要である。一方で、生理活性化合物の ^{19}F -NMR による分析手法では、分離を必要とせず、簡便な前処理での一斉分析が可能となる。しかしながら、報告されている生理活性化合物の ^{19}F -NMR による一斉分析手法のほとんどは金属錯体を用いた手法である。

本章では、そのような高価な遷移金属錯体を用いない有機反応的なアプローチとして生体アミン類のアミノ基をイミノ基に変換するとともに、フッ素を導入することでの化学シフト値の変化を利用した ^{19}F -NMR による一斉定性分析手法および一斉定性分析への適用について報告する。

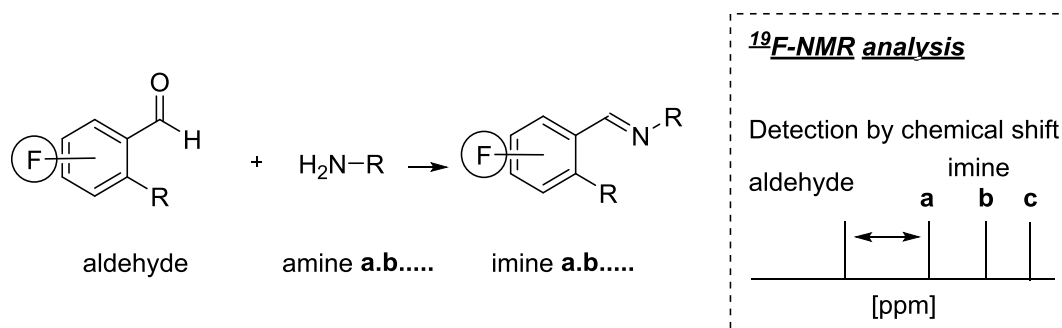
本手法は、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde をプローブ分子として用い、triethylamine および内部標準である 4-bromofluorobenzene 存在下、対象アミン類を CD_3OD 中、室温で 1.5 時間反応させた後、この混合物を ^{19}F -NMR により分析する。本手法を用いることで、6 種の生体アミンを一度に定性的に判別することを可能とした。また、測定対象の生体アミンの検量線を予め作成しておくことにより、混合物中から対象の生体アミンの定量分析も可能であることを明らかにした。

2.1. 緒言

生体アミンは生体中で様々な役割を担う重要な分析対象化合物である。序論 2 節でも述べたとおり、特に神経伝達物質としての役割を果たし、生体内の様々な生理機能にかかわっている¹⁾。さらには魚類や食品の腐敗の指標となり食品衛生上でも重要な分析対象化合物となる²⁾。これまでに生体アミンの一斉分析手法としては、序論4節でも述べたとおり、様々な高感度で実用的な手法が報告されている³⁾⁻⁷⁾。しかしながら、RP-HPLC 法では、分離するアミノ酸や生体アミンの種類が多いほど最適な分離条件を見つけることが困難であり、蛍光プレラベル HPLC 法では、分析対象化合物に適する誘導体化試薬が異なるため、全生体アミンの一斉分析への適用は難しいといった課題も少なからず含まれている。したがってより簡便な前処理で分離を必要としない分析手法の開発が重要となる。一方で、生理活性化合物の¹⁹F-NMR による分析手法では、分離を必要とせず、簡便な前処理での分析が可能であり、先に示した課題を解決しうる手法の一つである。しかし、Swager らのピンサー型 Pd 錯体⁸⁾をはじめとして、報告されている生理活性化合物の¹⁹F-NMR による一斉分析手法のほとんどは金属錯体を用いた手法である。

そこで、そのような高価な遷移金属錯体を用いずとも、簡単な有機反応的なアプローチにより生体アミンの一斉分析が実現できないかと考えた。第一章において、著者は、アミノ酸誘導体のアミノ基をイミノ基に変換するとともに、フッ素を導入することで¹⁹F-NMR において化学シフト値に差が生じることが明らかとなった。この結果はアミノ酸誘導体の構造の違いにより、生じていることに疑う余地はなく、イミン形成によるフッ素の導入に基づいた¹⁹F-NMR による一斉分析手法の開発が可能であると示唆される (Scheme 1)。また、NMR において生体試料を一斉に定量分析をする上で留意すべき点がいくつか挙げられる。①生体試料は水を含むため、重溶媒に親水性の溶媒を使用する必要がある。②シグナルが重なることなく分離する必要がある。③定量分析する上では、目的の誘導体化を 100%進行させる必要がある。これらの留意点を解決することで、より実用的な分析手法が確立される。

これらのことを鑑みて、本章では、含フッ素ベンズアルデヒド類を用い、第一級アミンに対しイミン形成を伴いながらフッ素原子を導入することで、¹⁹F-NMR による第一級アミン類の一斉分析が可能であると期待し、反応条件および含フッ素ベンズアルデヒドの選定などの基礎的な研究と、生体アミンである tyramine の一斉定量分析への応用について報告する⁹⁾。

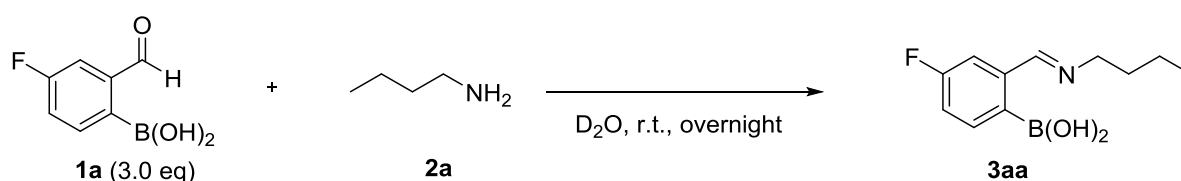


Scheme 1 Strategy of simultaneous analysis of amine by ¹⁹F-NMR.

2.2. 結果と考察

2.2.1. 初期検討

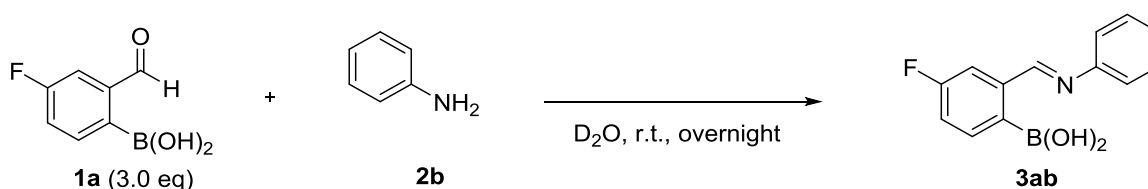
まず、初めにアミノ基に対して、水中で安定なイミンを形成することが知られている *o*-ホルミルフェニルボロン酸骨格を有する含フッ素化合物である 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)をプローブとして利用し、単純な第一級アミンである *n*-butylamine (**2a**)における反応性および、 ^{19}F -NMR における化学シフトについて検討した (Scheme 2). 即ち、 D_2O 中に 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)と *n*-butylamine (**2a**)を加え、一晩攪拌し、得られた混合溶液を ^1H -NMR および ^{19}F -NMR 分析した.



Scheme 2 Derivatization of 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) to *n*-butylamine (**2a**).

目的とするイミン **3aa** は転化率 11%で得られ、4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)とイミン **3aa** との ^{19}F -NMR における化学シフト値の差 $\Delta\delta$ ($\delta_{1a}-\delta_{3aa}$)は 3.31 ppm であり期待通り、大きな高磁場シフトを観測した.

次に、第一級アミンに aniline (**2b**)を用いて、先ほどと同様に検討した (Scheme 3).



Scheme 3 Derivatization of 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) to aniline (**2b**).

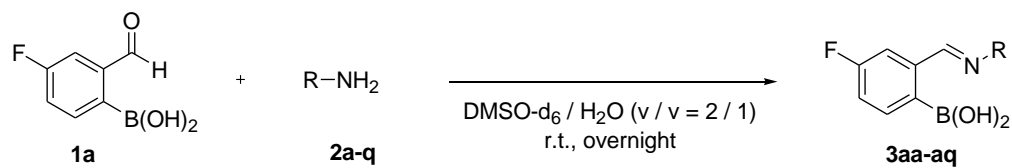
目的とするイミン **3ab** は、転化率は算出できないものの、 ^1H -NMR スペクトル上にイミン **3ab** の特徴的なシグナルが見られ、4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)とイミン **3ab** との $\Delta\delta$ ($\delta_{1a}-\delta_{3ab}$)は 2.70 ppm であり、イミン **3aa** とイミン **3ab** において、 ^{19}F -NMR における化学シフト値に 0.61 ppm の差異が生じる事を確認した. 一方で、どちらのアミンを用いた場合も転化率は低い. これは、脱水を伴うイミン形成反応とイミンの加水分解が平衡状態であることに起因すると考えられる. このことから、溶媒を変更し、種々のアミン類での化学シフトについて検討を行うこととした.

2.2.2. 4-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (1a)による第一級アミン類での検討

溶媒を D₂O から DMSO-d₆ と H₂O の混合液 (v/v = 2/1)に変更し, 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)を用いて, さまざまな第一級アミン類での $\Delta\delta$ 値について検討した (Table 1). 即ち, DMSO-d₆/H₂O (v/v = 2/1)中に 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)と第一級アミン **2**を加え, 一晩攪拌し, 得られた混合溶液を ¹H-NMR および ¹⁹F-NMR 分析した.

脂肪族の第一級アミン類である *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**), isopropylamine (**2e**)および cyclohexylamine (**2g**)では, ¹H-NMR スペクトル上で対応するイミン **3aa**, **3ac-3ae**, **3ag** のシグナルが確認され, ¹⁹F-NMR スペクトル上にはアルデヒド **1a** とは異なる新たなシグナルが現れた. この時の $\Delta\delta$ 値は 3.60-3.61 ppm で, ほとんど同様の化学シフト値を示した (entries 1-4, 6). 一方で, 脂肪族の第一級アミン類である *tert*-butylamine (**2f**)では, イミン **3af** の生成は確認できず, 未反応であった (entry 5). 次に, 芳香族第一級アミン類である aniline (**2b**)では, イミン **3ab** の生成は可能であり, 脂肪族アミン類とは異なる化学シフト値の差 (2.40 ppm)を観測し, 初期検討 (2.2.1.)での **3aa** と **3ab** の化学シフト値の差 (0.61 ppm)より大きな差である 1.21 ppm を与えた (entry 7). この aniline (**2b**)に置換基を有した第一級アミン類では, *m*-位, *p*-位にクロロ基を有する **2k**, **2l** ではそれぞれ対応する **3ak**, **3al** が生成し, $\Delta\delta$ 値は 1.81 , 2.11 ppm と異なる化学シフト値の差を示したが, *o*-位に置換基をもつアミン **2h-j**, **2n**, **2m** ではイミンの生成は進行しなかった (entries 8-14). これは, *tert*-butylamine (**2f**)での結果も考慮すると, 置換基による求核性の低下よりもアミノ基近傍の立体障害による影響が大きいと推察される. 最後に benzylamine (**2o**)およびそのベンジル位にメチル基を有する 1-phenylethylamine (**2p**)と cumylamine (**2q**)について検討した. その結果, 立体障害の小さい **2o**, **2p** ではイミン **3ao**, **3ap** の生成が可能であり, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 3.35, 3.01 ppm となり, 脂肪族アミンと芳香族アミンの $\Delta\delta$ 値の間の値を示した (entries 15, 16). 一方, アミノ基近傍が立体的に混み合った cumylamine (**2q**)では予想通り反応の進行は見られなかった (entry 17).

本検討から, 第一級アミン類の種類の違いにより異なる化学シフト値の差を得ることが可能であったが, 立体障害による反応性の低下や脂肪族アミン類の識別能に課題が見られた. したがって, 反応性が高く, イミン形成後に ¹⁹F-NMR スペクトル上で良い分離能を有した含フッ素ベンズアルデヒドの選択と反応条件の決定が必要となる.

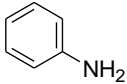
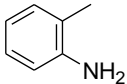
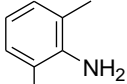
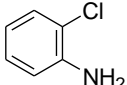
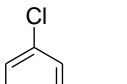
Table 1 Scope of primary of amine using **1a** in DMSO-d₆/H₂O. ^a

entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_{\mathbf{1}}-\delta_{\mathbf{3}})$	imine on ¹ H-NMR ^b
1	 2a	3.61	+
2	 2c	3.60	+
3	 2d	3.59	+
4	 2e	3.60	+
5	 2f	-	-
6	 2g	3.60	+

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1a** (3.0 eq.), in DMSO-d₆/H₂O (v/v = 2/1) at room temperature for overnight. The reaction mixture was analyzed by NMR.

^b Determined by ¹H-NMR (+ = Detected, - = Not detected)

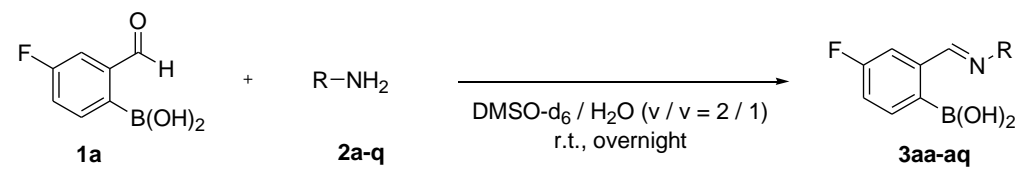
Table 1 Scope of primary of amine using **1a** in DMSO-d₆/H₂O. ^a (continued)

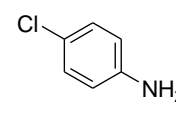
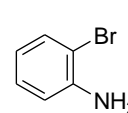
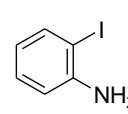
entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$	imine on ¹ H-NMR ^b
7	 2b	2.40	+
8	 2h	-	-
9	 2i	-	-
10	 2j	-	-
11	 2k	1.81	+

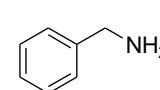
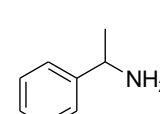
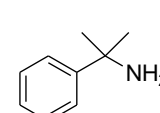
^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1a** (3.0 eq.), in DMSO-d₆/H₂O (v/v = 2/1) at room temperature for overnight. The reaction mixture was analyzed by NMR.

^b Determined by ¹H-NMR (+ = Detected, - = Not detected)

Table 1 Scope of primary of amine using **1a** in DMSO-d₆/H₂O. ^a (continued)



entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$	imine on ¹ H-NMR ^b
12	 2l	2.11	+
13	 2m	-	-
14	 2n	-	-

15	 2o	3.35	+
16	 2p	3.01	+
17	 2q	-	-

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1a** (3.0 eq.), in DMSO-d₆/ H₂O (v/v = 2/1) at room temperature for overnight. The reaction mixture was analyzed by NMR.

^b Determined by ¹H-NMR (+ = Detected, - = Not detected)

2.2.3. 含フッ素ベンズアルデヒド類の分離能

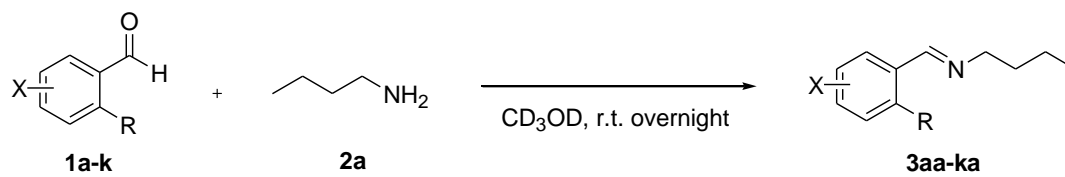
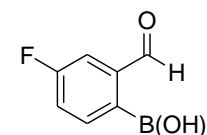
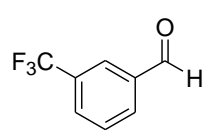
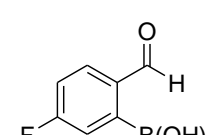
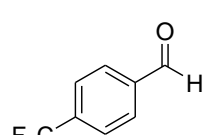
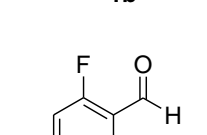
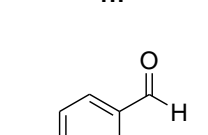
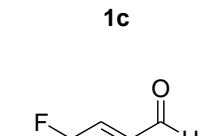
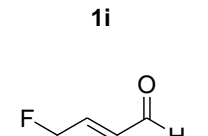
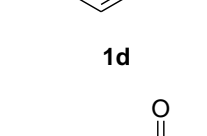
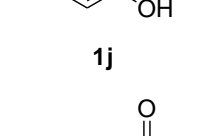
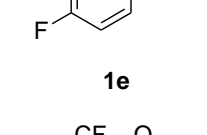
2.2.3.1. *n*-Butylamine (2a)での検討

より良い ^{19}F -NMR スペクトル上での分離を目指し、11種の異なる含フッ素ベンズアルデヒド類 **1a-k** を用い、*n*-butylamine (**2a**)との反応におけるイミン **3aa-ka** の化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)について検討した (Table 2). ここで、ベンズアルデヒド **1j**, **1k** は DMSO- d_6 に不溶であったため、全ての反応は CD_3OD 中で行った。即ち、 CD_3OD 中に含フッ素ベンズアルデヒド **1** と *n*-butylamine (**2a**)を加え、一晚攪拌し、得られた混合溶液を ^1H -NMR および ^{19}F -NMR 分析した。

結果として、4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)では、 ^1H -NMR スペクトル上で対応するイミン **3aa** のシグナルが確認され、 ^{19}F -NMR スペクトル上での、 $\Delta\delta$ 値は 2.65 ppm であった。**1a** とはフッ素の位置が異なる 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1b**)では、 $\Delta\delta$ 値が 2.88 ppm となり **1a** より少し大きな差を与えた (entry 2). これは、ベンゼン環上の電子効果によると考えられ、ホルミル基とフッ素の位置関係が化学シフト値の差に影響を与えると示唆される。そこでホルミル基に対して、*o*-, *m*-, *p*-位にそれぞれフッ素を有しているベンズアルデヒド **1c-e** を用いた検討を試みた結果、4-fluorobenzaldehyde (**1e**)において、最大の $\Delta\delta$ 値 (6.14 ppm)が観測され、2-fluorobenzaldehyde (**1c**, $\Delta\delta = 1.72$ ppm), 3-fluorobenzaldehyde (**1d**, $\Delta\delta = 0.94$ ppm)の順に化学シフト値の差は小さくなる (entries 3-5). 一方でフッ素源としてトリフルオロメチル基を用いた場合でも同様の傾向を示し、*p*-位にトリフルオロメチル基をもつ 4-trifluoromethylbenzaldehyde (**1h**)がより大きな $\Delta\delta$ 値 (1.49 ppm)を与えた (entries 6-8). 4-Fluorobenzaldehyde (**1e**)のホルミル基に対し *o*-位にブromo基を有する 2-bromo-4-fluorobenzaldehyde (**1i**)では、**1e** と同様の $\Delta\delta$ 値を示した (entry 9). 最後にホルミル基の *o*-位に対してヒドロキシ基を有する 5-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1j**), 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)で検討したところ、 $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 2.44, 3.34 ppm となり、ホルミル基に対して *p*-位にフッ素をもつ **1k** がより大きな化学シフト値の差を示した (entries 10, 11).

本検討により、ホルミル基に対して *p*-位にフルオロ基を有するベンズアルデヒド類がより良い分離能を示すのではないかと考えられる。一方で、*o*-位の置換基効果については化学シフト値の差に影響を及ぼすものの、さらなる検討が必要である。

Table 2 Effect of fluorinated benzaldehyde **1a-k** using **2a**.^a

					
entry	aldehyde 1	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$	entry	aldehyde 1	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$
1	 1a	2.65	7	 1g	0.15
2	 1b	2.88	8	 1h	1.49
3	 1c	1.72	9	 1i	6.14
4	 1d	0.94	10	 1j	2.44
5	 1e	6.14	11	 1k	3.34
6	 1f	0.32			

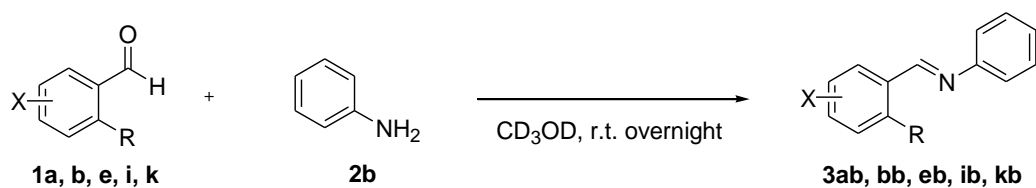
^a Reaction Conditions: *n*-Butylamine (**2a**) was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for overnight. The reaction mixture was analyzed by NMR.

2.2.3.2. Aniline (2b)での検討

一斉分析をする上では、プローブとして扱うベンズアルデヒド類のシグナルと分析対象のアミンから成るイミンのシグナルが重なることは芳しくないため、より大きな化学シフト差を与えるベンズアルデヒド類が好ましい。また、この性質とともに構造の異なるアミン類から成るイミンのシグナルも十分に分離する必要がある。したがって、次に、比較的良好な化学シフト値の差を示した5種のベンズアルデヒド類 **1a**, **1b**, **1e**, **1i**, **1k** に対して、aniline (**2b**)との反応におけるイミン **3ab**, **3bb**, **3eb**, **3ib**, **3kb** の化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)について検討した (Table 3)。即ち、CD₃OD 中に含フッ素ベンズアルデヒド **1** と aniline (**2b**)を加え、一晚攪拌し、得られた混合溶液を ¹H-NMR および ¹⁹F-NMR 分析した。

4-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)において、¹H-NMR スペクトル上で対応するイミン **3ab** のシグナルが確認され、¹⁹F-NMR スペクトル上での $\Delta\delta$ 値は 1.99 ppm であった (entry 1)。一方で、5-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1b**)では、 $\Delta\delta$ 値は 1.11 ppm となり、**1a** に比べ小さな化学シフト値の差を示した (entry 2)。次に 4-fluorobenzaldehyde (**1e**)および 2-bromo-4-fluorobenzaldehyde (**1i**)を用いた場合では、 $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 4.98, 4.92 ppm と同等の値を示した (entries 3, 4)。最後に、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)を用いて検討したところ、興味深いことに $\Delta\delta$ 値は 5.37 ppm となり、*n*-butylamine (**2a**)から誘導されるイミン **3ka** より高磁場にシフトした (entry 5)。

これらの結果からベンズアルデヒド類を変更することで、*n*-butylamine (**2a**)から誘導されるイミンと aniline (**2b**)との化学シフト値の差においても変化が確認されることがわかる。

Table 3 Effect of fluorinated benzaldehyde **1a, b, e, i, k** using **2b**.^a

entry	aldehyde 1	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$
1	<p>1a</p>	1.99
2	<p>1b</p>	1.11
3	<p>1e</p>	4.98
4	<p>1i</p>	4.92
5	<p>1k</p>	5.37

^a Reaction Conditions: Aniline (**2b**) was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for overnight. The reaction mixture was analyzed by NMR.

2.2.3.3. 分離能のより良いベンズアルデヒドの選択

n-Butylamine (**2a**)および aniline (**2b**)での検討結果から、用いる含フッ素ベンズアルデヒドと生成される二つのイミンとの化学シフト値の差を纏めた (Figure 1). ここでは、各含フッ素ベンズアルデヒドの化学シフトを 0 としたときの生成される二つのイミンの化学シフト値を示した.

まず、全ての生成されるイミンは含フッ素ベンズアルデヒド類より高磁場シフトしていることがわかる. 通常、ホルミル基は芳香族に対して、電子求引性を示す. 一方、O 原子が N 原子に置き換わったイミノ基も電子求引性を示すが、電気陰性度は O 原子の方が N 原子より高い. したがって、ベンズアルデヒドでのベンゼン環内の電子密度よりもイミンでのベンゼン環内の電子密度の方がより高い. 即ち、ベンゼン環上のフルオロ基はより多くの電子を引き込むことが可能となり、高磁場シフトを示す.

次に、**1k**を除いた4つのベンズアルデヒド類では、aniline (**2b**)から誘導されるイミンが *n*-butylamine (**2a**)から誘導されるイミンよりも低磁場にシフトする. この結果は、イミノ基の N 原子に置換するブチル基とフェニル基に着目した場合、ブチル基は N 原子に対して弱い電子供与を示すがフェニル基では N 原子が共鳴効果の影響を受けフェニル基に対して強い電子供与を示す. したがって、フルオロ基を有するベンゼン環上の電子密度が低下することに起因していると推察される. これらを鑑みると、**1a** と **1b** において、**1b** を用いた場合に、より二つのイミンの化学シフト値の差 (1.76 ppm) が大きくなることは、このような電子的な環境の違いに対し *p*-位がより影響を受けることを示唆している.

また、ホルミル基の *o*-位の置換基効果については、**1e** および **1i** において生成される二つのイミンの化学シフト値の差に顕著な差が見られないことから、単純な置換基の誘起効果や立体的な影響はあまり受けないと考えられる. 一方で、*o*-位にボロン酸をもつ **1b** においては大きな化学シフト値の差を与えることから、イミンの N 原子との相互作用に起因していることが示唆される.

さらに、二つのイミンの化学シフト値の差が最も大きくなった 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**) においてのみ、aniline (**2b**)から誘導されるイミン **3kb** が最も高磁場シフトを示した. これは、**1k** の *o*-位のヒドロキシ基は水素供与体であり、イミン **3kb** の N 原子は水素受容体であることから、水素結合を形成することによる効果であると考えられる. しかし、水素結合した ¹H はヒドロキシ基の ¹H が容易に D と置き換わるため、CD₃OD 中では観測できない. そこで、CDCl₃ を用いて確認したところ、水素結合性の ¹H が観測された. この結果、水素結合による構造の安定や電子的影響により、分離能が向上したことが示唆された.

本検討から、本手法に用いる含フッ素ベンズアルデヒドとして 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**) を選定した.

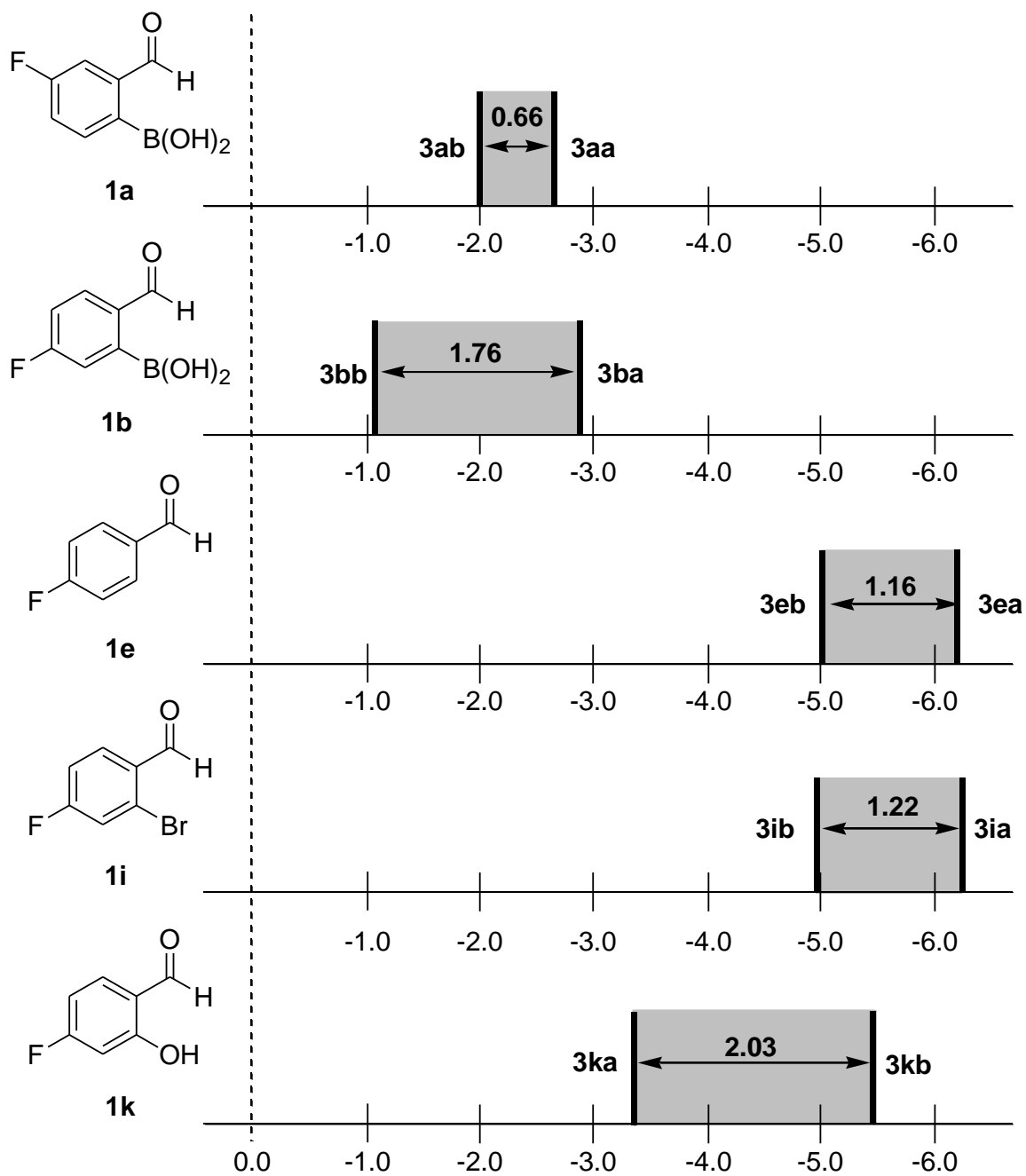


Figure 1 Differences of chemical shift differences ($\Delta\delta$) of imines.

2.2.4. 反応時間の検討

4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)とアミン類の中でも反応性の低い aniline (**2b**)を用いて、反応時間の検討を行った (Figure 2). 即ち、 CD_3OD 中、**2b**, **1k** を加えた後、各時間において $^1\text{H-NMR}$ 分析することで収率を決定した.

その結果、6 時間後に aniline (**2b**)のシグナルは消失し、量論的にイミン **3kb** が生成可能であった. 一方で長時間反応させることで、過剰にある 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)が溶媒である CD_3OD と反応し、アセタールを与えることが確認された.

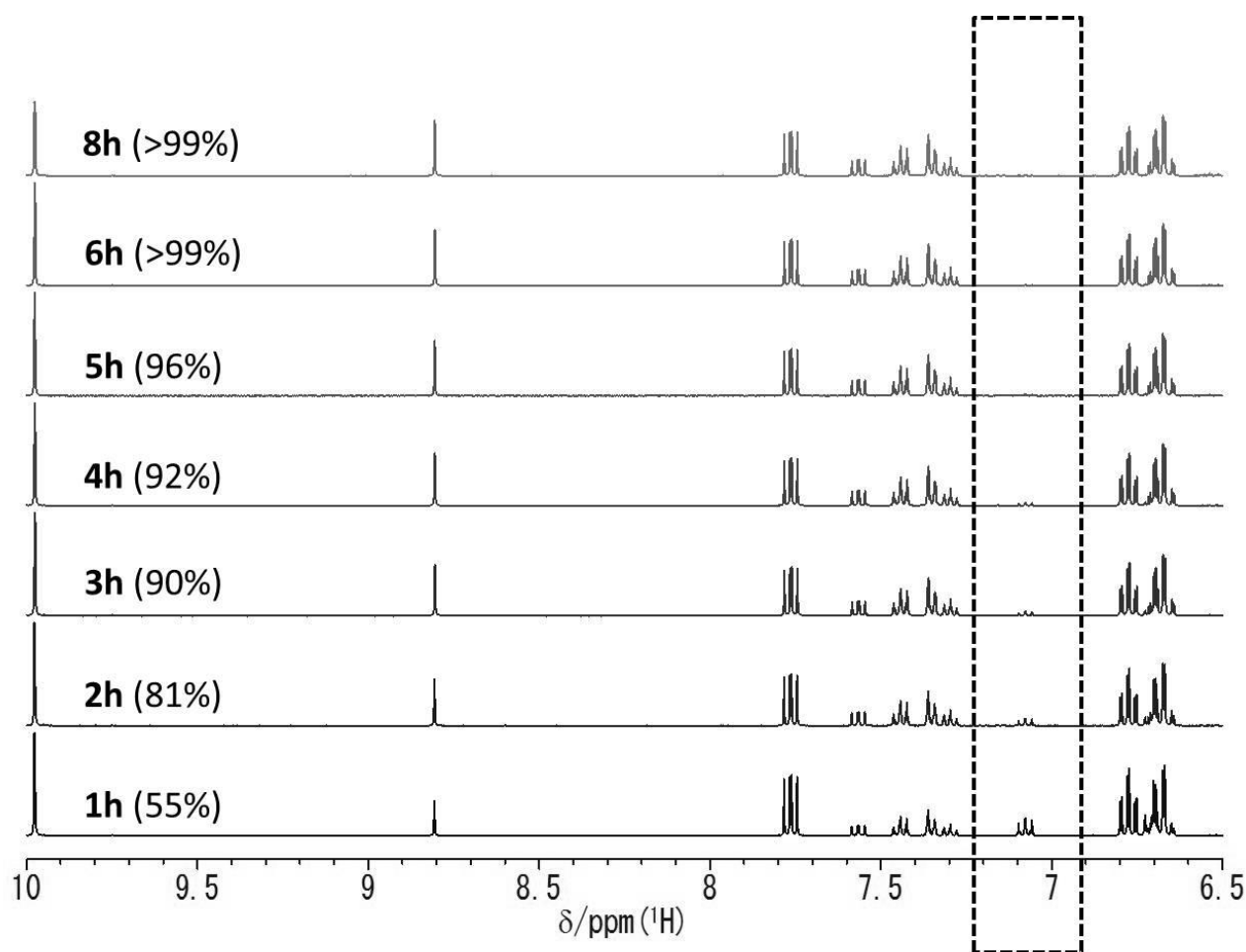


Figure 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of reaction mixture of aniline (**2b**) with aldehyde **1k**.

2.2.5. 4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (2k)での各アミン類の化学シフト値

4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)を用いて、第一級アミン類 **2a-B** から誘導されるイミン **3ka-kB** の $^{19}\text{F-NMR}$ における化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)と収率について検討した (Table 4). 即ち, CD_3OD 中に 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)と第一級アミン **2** を加え, 一晚攪拌し, 得られた混合溶液を $^1\text{H-NMR}$ および $^{19}\text{F-NMR}$ 分析した.

アルキルアミン類 **2a**, **2c-2g** では, *tert*-butylamine (**2f**)を除いた全てのアミン類で定量的に対応するイミンの生成が可能であった (entries 1, 3-7). しかしながら, *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)および cyclohexylamine (**2g**)では同一の $\Delta\delta$ 値 (3.35 ppm)を観測した (entries 1, 3, 4, 7). Isopropylamine (**2e**)や *tert*-butylamine (**2f**)では, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ, 3.77, 2.41 ppm と特徴的なシフトを示した (entries 5, 6). アニリン類 **2b**, **2h-n** では, aniline (**2b**)では良好な収率で対応するイミン **3kb** の生成が見られたものの, 他のアニリン類 **2h-n** では収率にばらつきが見られた (entries 2, 8-14). 特に *o*-位に置換基を有するアニリン類に着目すると 2,6-dimethylaniline (**2i**), 2-chloroaniline (**2j**), 2-bromoaniline (**2m**)の収率は著しく低下することがわかるが *o*-toluidine (**2h**)では中程度の収率, 2-iodoaniline (**2n**)では比較的高収率であり, 顕著な傾向は見られない (entries 8, 9, 10, 13, 14). $\Delta\delta$ 値を *o*-位に置換基を有するアニリン類と比較すると, 電子供与性基を有する **2h**, **2i** ではそれぞれ 5.15, 5.38 ppm と大きくなる一方, 不活性基であるハロゲンを有した **2j**, **2m**, **2n** ではそれぞれ 4.63, 4.66, 4.73 ppm と電気陰性度の低いヨード基ほど大きくなる傾向が見られた (entries 8-10, 13,14). さらに, クロロ基を有するアニリン類と比較すると, *o*-, *m*-, *p*-位の順に大きな差を示した (entries 10-12). このように化学シフト値の差はアニリン類においては, 電気的な効果がイミン **3** のフッ素原子に影響を与えることが示唆される. ベンジルアミン類 **2o-r** では, 全てのアミン類でイミンは良好な収率で生成され, $\Delta\delta$ 値は benzylamine (**2o**)で 4.50 ppm となり, ベンジル位にメチル基をもつ **2p** では 5.00 ppm, フェニル基をもつ **2r** では 5.60 ppm とベンジル位の置換基により差が大きくなる傾向が得られた (entries 15, 16, 18). しかしながら, ベンジル位に二つのメチル基を有する cumylamine (**2q**)では, $\Delta\delta$ 値 3.38 ppm と小さくなる (entry 17). このような傾向は isopropylamine (**2e**)と *tert*-butylamine (**2f**)での結果を考慮すると, アミノ基をもつ炭素が第四級炭素になることに起因していると考えられる. フェニルエチルアミン類 **2s-u** では, イミンは良好に生成され, $\Delta\delta$ 値は 2-phenylethylamine (**2s**)で 3.79 ppm を示し, フェニル基に異なる置換基もつ tyramine (**2t**)と homoveratrylamine (**2u**)においてもそれぞれ 3.46, 3.55 ppm と異なる値を示した (entries 19-21). この結果は, **2s**, **2t** が生体アミンであり, **2u** は dopamine 誘導体であることを考えると生体アミン分析に向けた大きな前進である. そこで, 挑戦的ではあるが, アミノ酸を用いた検討を行った. 結果として, L-alanine (**2v**), L-phenylalanine (**2w**)では中程度の収率ではあるが目的のイミンの生成が確認され, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 4.27, 4.58 ppm と差が見られた (entries 22, 23). 一方で, L-tyrosine (**2x**)は CD_3OD に溶解せず分析が難しく, そのエステル誘導体である L-tyrosine methyl ester (**2y**)は良好に反応が進行し, $\Delta\delta$ 値は 5.32 ppm を示した (entries 24, 25). 最後にさらなる生体アミンとしてポリアミン類 **2z-2B** での検討を試みた. こ

これらのポリアミンは分子内にイミン形成が可能な二つのアミノ基を有することから、目的生成物としてはジイミン体 **3kz-3kB** を想定するが、いくつかの副生成物も考えられる (Figure 3). しかしながら、全てのポリアミン類 **2z-2B** で良好な収率でジイミン体のみが生成され、異なる $\Delta\delta$ 値を示すことが明らかとなった (entries 26-28).

本検討から、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)は ^{19}F -NMR による第一級アミン類の一斉分析法において十分に機能を果たすことが可能であると考えた.

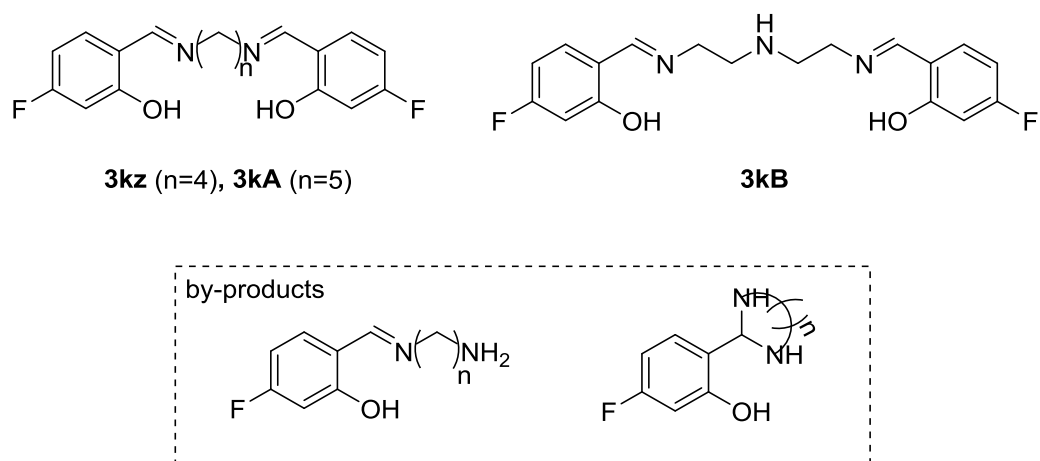
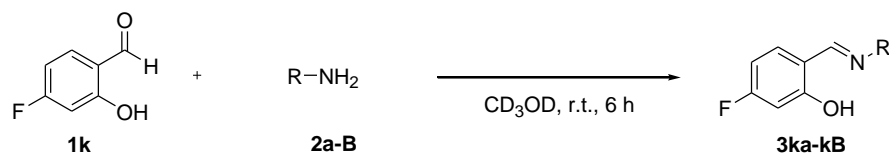
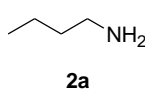
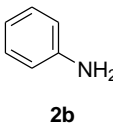
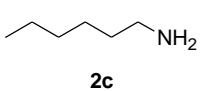
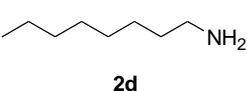
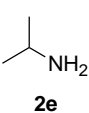
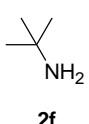
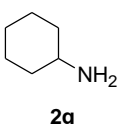


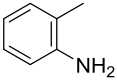
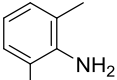
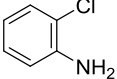
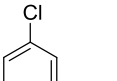
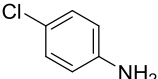
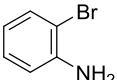
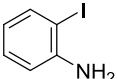
Figure 3 Chemical structure of diimine and by-product derived from amine **2z-B**.

Table 4 Scope of primary of amine using **1k** in CD₃OD. ^a

			
entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_{1-\delta 3})$	yield (%)
1	 2a	3.35	>99
2	 2b	5.42	>99
3	 2c	3.35	>99
4	 2d	3.35	>99
5	 2e	3.77	>99
6	 2f	2.41	71
7	 2g	3.35	>99

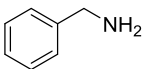
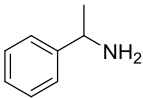
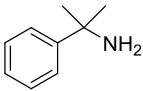
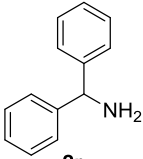
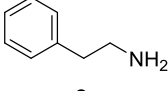
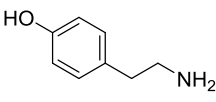
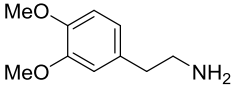
^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1k** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b For 24 h. ^c Not dissolved.

Table 4 Scope of primary of amine using **1k** in CD₃OD. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_1-\delta_3)$	yield (%)
8	 2h	5.15	46
9	 2i	5.38	7
10	 2j	4.63	16
11	 2k	4.83	62
12	 2l	5.09	74
13	 2m	4.66	12
14	 2n	4.73	71

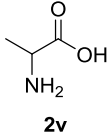
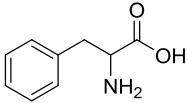
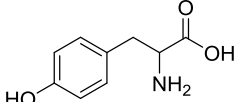
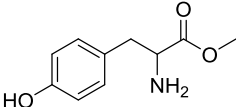
^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1k** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b For 24 h. ^c Not dissolved.

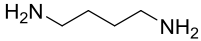
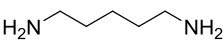
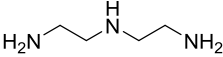
Table 4 Scope of primary of amine using **1k** in CD₃OD. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta^1-\delta^3)$	yield (%)
15	 2o	4.50	>99
16	 2p	5.00	>99
17	 2q	3.38	>99
18	 2r	5.60	>99
19	 2s	3.79	>99
20	 2t	3.46	>99
21	 2u	3.55	>99

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1k** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b For 24 h. ^c Not dissolved.

Table 4 Scope of primary of amine using **1k** in CD₃OD. ^a (continued)

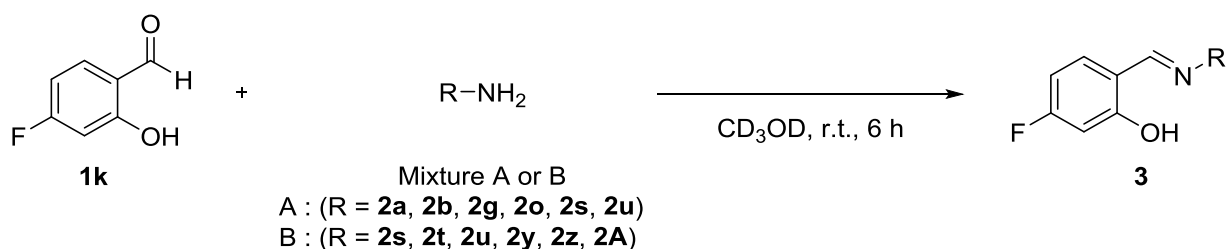
entry	amine 2	$\Delta\delta(\delta_{1-3})$	yield (%)
22	 2v	4.27	43 ^b
23	 2w	4.58	63 ^b
24	 2x	-	n.d. ^c
25	 2y	5.32	>99

26	 2z	3.90	>99
27	 2A	3.51	>99
28	 2B	4.05	>99

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1k** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b For 24 h. ^c Not dissolved.

2.2.6. 一斉分析へのデモンストレーション

6種の第一級アミン類の混合条件下において、実際に一斉分析が可能であるか検討することとした。6種の第一級アミン類の混合条件としては、mixture A [*n*-butylamine (**2a**), aniline (**2b**), cyclohexylamine (**2g**), benzylamine (**2o**), 2-phenylethylamine (**2s**), homoveratrylamine (**2u**)]および mixture B [2-phenylethylamine (**2s**), tyramine (**2t**), homoveratrylamine (**2u**), L-tyrosine methyl ester (**2y**), putrescine (**2z**), cadaverine (**2A**)]を用いて検討した (Scheme 4)。



Scheme 4 Derivatization of **1k** to Mixture A and B.

Mixture A では ¹⁹F-NMR スペクトル上で5つの新たなシグナルが確認され、先の検討により得られた各アミンでの結果と照らし合わせることで、第一級アミン類を同定した。その結果、*n*-butylamine (**2a**)と cyclohexylamine (**2g**)が同一のシグナルとして得られていることが明らかとなった (Figure 4)。Mixture B では ¹⁹F-NMR スペクトル上で6つの新たなシグナルが確認され、上記と同様の手法により、第一級アミン類の同定が可能であった (Figure 5)。Mixture B において生体アミンである **2t**, **2z** および **2A** が識別されたことは本手法が生体アミンの一斉分析に応用できると後押しする結果である。

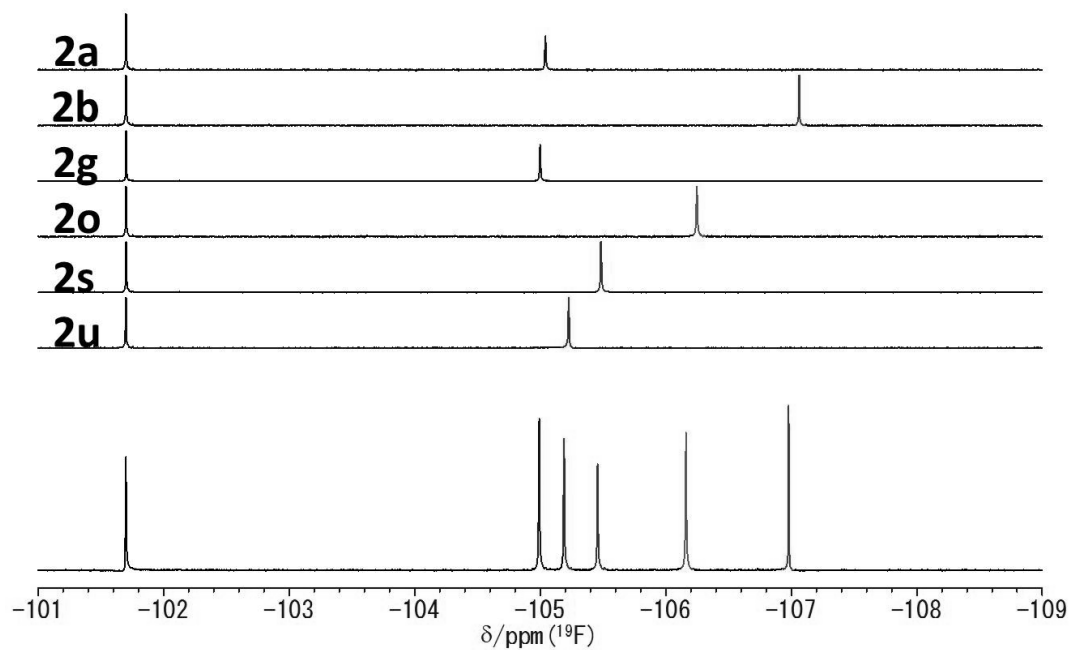


Figure 4 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of mixture A (**2a**, **2b**, **2g**, **2o**, **2s**, **2u**) with aldehyde **1k**.

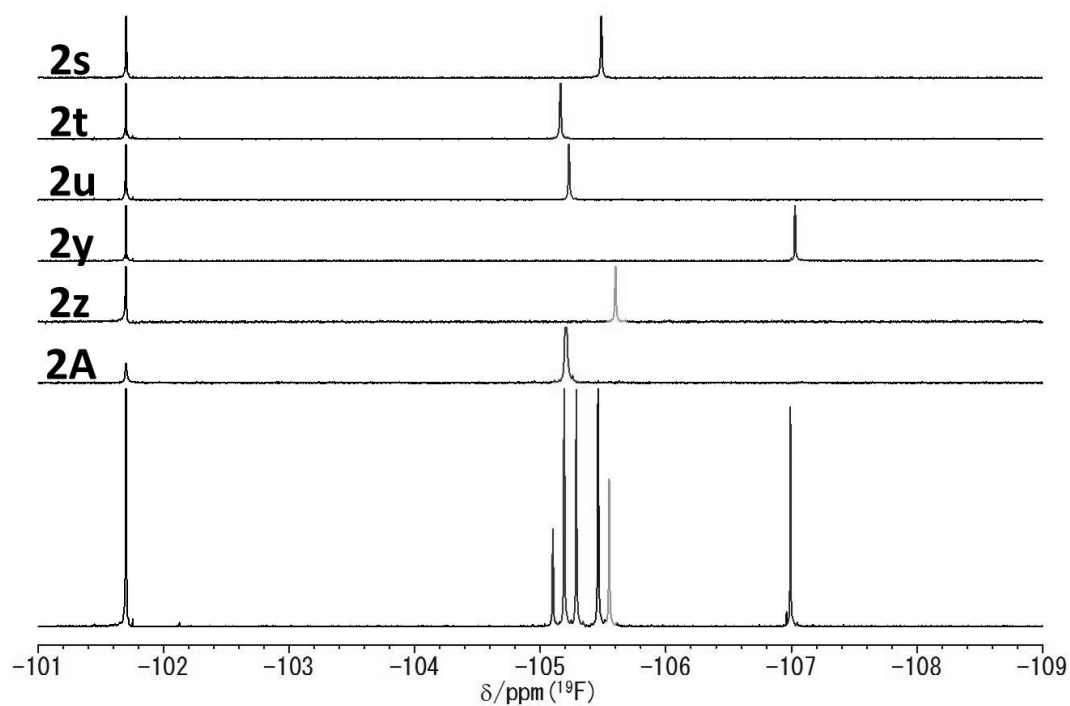


Figure 5 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of mixture A (**2s**, **2t**, **2u**, **2y**, **2z**, **2A**) with aldehyde **1k**.

2.2.7. 4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde での生体アミンの化学シフト値

本手法が、生体アミンの一斉分析に適応可能であることが示唆されたため、生体アミン **2t**, **2z**, **2A**, **2C-F** における化学シフト値の差 ($\Delta\delta$) について検討した (Table 5). ここで, serotonin・hydrochloride (**2C**), histamine・dihydrochloride (**2D**) は塩酸塩として分析することを鑑みて triethylamine (TEA) を添加し, 攪拌時間を 1.5 時間とした. また塩基添加により, 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**) は分子内のフェノール性ヒドロキシ基の影響により $^{19}\text{F-NMR}$ 上の化学シフト値がシフトするため, 内部標準として 4-bromofluorobenzene を用い, その化学シフト (-117 ppm) を基準として $\Delta\delta$ 値を決定した.

アミノ酸の脱炭酸により生体内に代謝されるアミン類である tyramine (**2t**), serotonin・hydrochloride (**2C**) および histamine・dihydrochloride (**2D**) では, 良好に対応するイミンの生成が可能であり, またその化学シフト値の差は全て異なる値を示した (entries 1-3). ポリアミン類である putrescine (**2z**) と cadaverine (**2A**) では, 先の検討と同様に対応するジイミンが 99% 以上の収率で生成され, $\Delta\delta$ はそれぞれ 12.03, 12.29 ppm を示し, **2t**, **2C**, **2D** と同差が見られた (entries 4, 5). 最後に, アミノ酸類縁体である分子内にカルボキシ基を有した GABA (**2E**) やスルホニル基を有した taurine (**2F**) での検討では, 興味深いことに良好なイミン **3kE**, **3kF** の生成が確認された (entries 6, 7). また **3kF** の $\Delta\delta$ は 11.20 ppm と他のアミン類とは異なる低磁場領域にシグナルが確認された. 一方で, **3kE** は cadaverine (**2A**) と同値を示した.

本検討により, cadaverine (**2A**) と GABA (**2E**) に対しては, $^{19}\text{F-NMR}$ 上のシグナルは同値を示すものの, 生体アミンの識別は十分に可能であることがわかる. また, カルボキシ基やスルホニル基を有する生体アミンにおいてもイミンの生成が可能であることは, アミノ酸の一斉分析に向けて興味深い結果である.

Table 5 Scope of biogenic amine using **1k** in the presence of TEA in CD₃OD. ^a

entry	amine 2	$\Delta\delta^b$	yield (%)
1	<p>2t</p>	12.53	>99
2	<p>2C</p>	13.01	>99
3	<p>2D</p>	12.19	>99

4	<p>2z</p>	12.03	>99
5	<p>2A</p>	12.29	>99

6	<p>2E</p>	12.29	>99
7	<p>2F</p>	11.20	>99

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1k** (3.0 eq.) in the presence of TEA (6.0 eq) and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in CD₃OD at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_{4\text{-bromofluorobenzene}}$.

2.2.8. Tyramine の検量線を用いた定量分析の検討

生体アミンの一斉分析が可能であることが示唆されたため、実際に ^{19}F -NMR による一斉分析および検量線を用いる定量分析が可能であるかを検討することとした。そこで、定量分析の対象化合物を tyramine (**2t**)とし、まず検量線を作成した (Figure 6)。即ち、 CD_3OD 中に異なる濃度 (20 mM, 40 mM, 60 mM) に調整した tyramine (**2t**), 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)および triethylamine (TEA)を 10 mM の濃度に調整した内部標準である 4-bromofluorobenzene 存在下で 1.5 時間攪拌した。 ^{19}F -NMR 分析から得られた 4-bromofluorobenzene の積分値を 1 としたときのイミン **3kt** の積分値を横軸に、濃度を縦軸として、三点のプロットをとり、その近似直線 ($y = 4.9641x + 7.5348$)を検量線として扱うこととした。

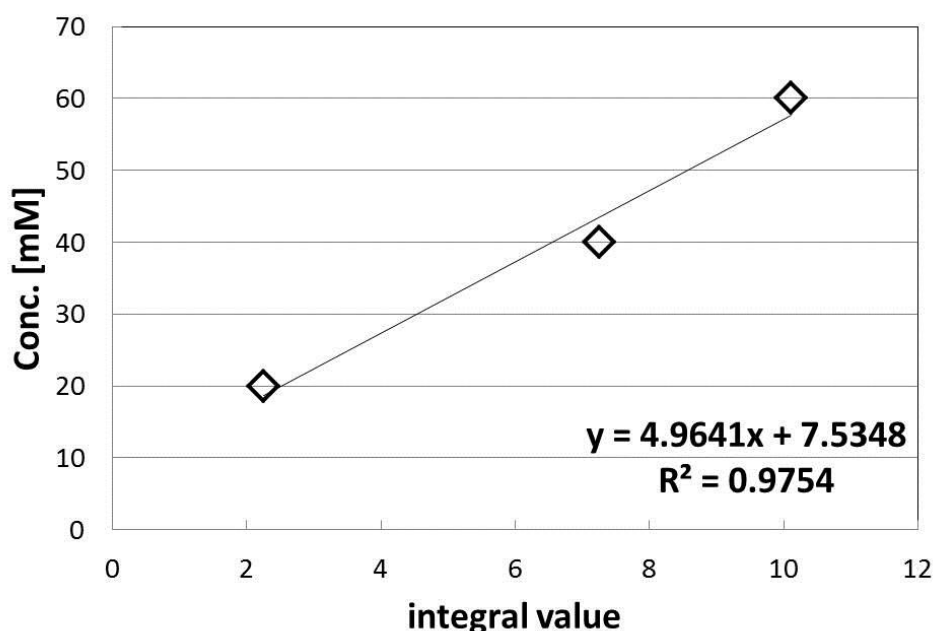


Figure 6 The relationship between concentration (mM) and integral value of tyramine (**2t**).

次に、生体アミン混合条件下での tyramine (**2t**)の検量線による定量分析を試みた (Figure 7)。即ち、 CD_3OD 中に 30 mM に調整した tyramine (**2t**)と任意の濃度の serotonin·hydrochloride (**2C**), histamine·dihydrochloride (**2D**), putrescine (**2z**), GABA (**2E**), taurine (**2F**)に 過剰の 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)および triethylamine (TEA)を加え、内部標準である 4-bromofluorobenzene 存在下で 1.5 時間攪拌した。得られた混合溶液を ^{19}F -NMR 分析した。

結果として、先に得られた各生体アミンでの化学シフト値の差を利用することで、6 種の生体アミンの同定が可能であり、さらに、内部標準の積分値を 1 としたときの tyramine (**2t**)に対応するイミン **3kt** のシグナルの積分値を検量線に代入することで、27.14 mM の濃度を算出した。絶対誤差 2.86 mM, 相対

誤差は9.53%となった。このことから、混合条件下においても、検量線を利用することで相対誤差は10%以内で目的化合物の濃度を算出することが可能であることが示唆された。測定誤差に関しては、NMRの機器的特性を鑑みると測定パラメーターの最適化が必要となると考えられる。

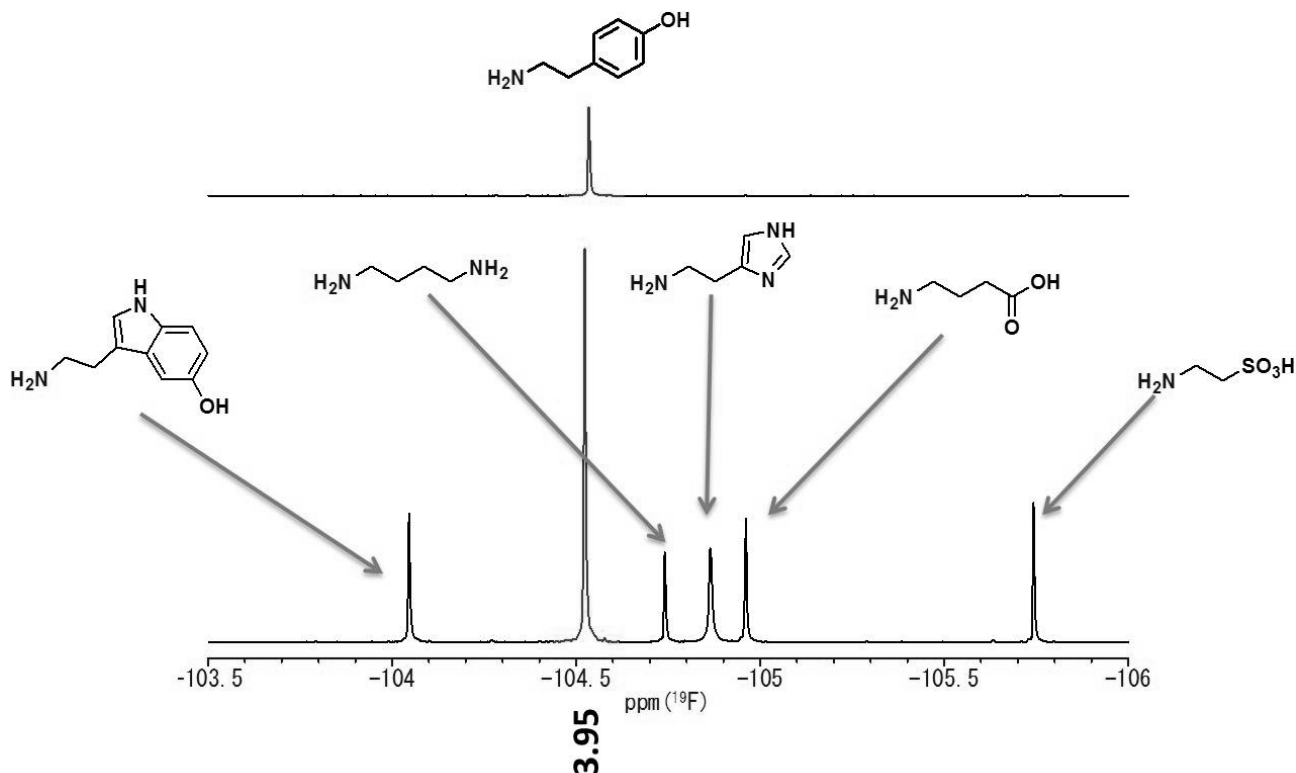


Figure 7 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of **2t**, **2z**, **2C**, **2D**, **2E** and **2F** with benzaldehyde **1k**.

2.3. まとめ

本章では、第一級アミンおよび生体アミンの ^{19}F -NMR による含フッ素ベンズアルデヒドを用いた一斉分析において、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**)が良好な分離能および反応性を示すことを明らかにした。また、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1k**), triethylamine および内部標準である 4-bromofluorobenzene と 6 種の生体アミン類を CD_3OD 中、室温で 1.5 時間攪拌することで、対応するイミン類が効率よく生成し、この混合物を ^{19}F -NMR により分析することで、6 種の第一級アミン [2-phenylethylamine (**2s**), tyramine (**2t**), homoveratrylamine (**2u**), L-tyrosine methyl ester (**2y**), putrescine (**2z**), cadaverine (**2A**)]を一度に定性可能とする新たな同時定性分析法を確立した。本手法は生体アミンに対しても適応可能であり、6 種の生体アミンの同時定性分析とともに、予め、検量線を作成しておくことで tyramine (**2t**)を相対誤差 10%以内で定量することに成功した。

2.4. 実験方法

2.4.1. 分析機器

(a)フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR)

Bruker 社製 AVANCE-III-HD 型 (400 MHz)

2.4.2. General method

溶媒及び試薬は、それぞれ東京化成工業、和光純薬工業、ナカライテスク、Aldrich から購入し、特に精製せずにそのまま使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、300 mesh のシリカゲル (Wakogel C-300 Silicagel)を用いて行った。TLC は、シリカゲル 60 F₂₅₄ をガラスシートの上にプレコートしたものを Merck 社から購入し、そのまま使用した。¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹⁹F-NMR スペクトルは、それぞれ 400 MHz, 100 MHz, 376 MHz で測定した。測定用の重溶媒として CDCl₃, DMSO-d₆, CD₃OD, toluene-d₈, CD₂Cl₂ を使用し、化学シフト値 δ は CDCl₃ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CDCl₃ (δ 77.0 ppm for ¹³C), DMSO-d₆ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₃OD では CH₃OH (δ 3.31 ppm for ¹H), toluene-d₈ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₂Cl₂ では CH₂Cl₂ (δ 5.3 ppm for ¹H)を基準とし、その相対値で決定した。また、¹⁹F-NMR の測定は、第一章と同様の手法で行った。

2.4.3. 初期検討

本検討で、使用した **1a**¹⁰⁾は既報の手法により合成した。

Scheme 2

テストチューブで、D₂O (1 mL)中、4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) (0.03 mmol, 0.0050 g) と *n*-butylamine (**2a**) (0.01 mmol, 0.0021 g)を室温で一晩攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

Scheme 3

テストチューブで、D₂O (1 mL)中、4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) (0.03 mmol, 0.0050 g) と aniline (**2b**) (0.01 mmol, 0.0021 g)を室温で一晩攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

2.4.3. 4-Fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**)による第一級アミン類での検討

テストチューブで, DMSO- d_6 (0.6 mL)と H₂O (0.3 mL)中, 4-fluoro-2-formylphenylboronic acid (**1a**) (0.03 mmol, 0.0050 g) と第一級アミン類 **2a-q** (0.01 mmol)を室温で一晩攪拌した後, その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した.

imine **3aa** ¹H-NMR : δ = 8.72 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.28 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ab** ¹H-NMR : δ = 8.71 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -114.05 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ac** ¹H-NMR : δ = 8.31 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.26 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ad** ¹H-NMR : δ = 8.27 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.26 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ae** ¹H-NMR : δ = 8.61 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.27 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ag** ¹H-NMR : δ = 7.91 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.28 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ak** ¹H-NMR : δ = 8.72 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -113.52 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3al** ¹H-NMR : δ = 8.71 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -113.76 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ao** ¹H-NMR : δ = 8.31 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -115.01 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ap** ¹H-NMR : δ = 8.27 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -114.67 ppm (s, 1F, Ar-F).

2.4.4. 含フッ素ベンズアルデヒド類の分離能

本検討で新たに使用した含フッ素ベンズアルデヒド類 **1b-k** は, **1c**, **1d**, **1e**, **1f**, **1g**, **1h**, **1i** においては市販品を用い, **1b**¹¹⁾, **1j**¹²⁾, **1k**¹³⁾は既報の手法により合成した.

2.4.4.1. *n*-Butylamine (**2a**)での検討

テストチューブで, CD₃OD (1.0 mL)中, 含フッ素ベンズアルデヒド類 **1a-k** (0.03 mmol) と *n*-butylamine (**2a**) (0.01 mmol, 0.0021 g)を室温で一晩攪拌した後, その混合溶液を ¹Hおよび¹⁹F-NMRにより分析した.

imine **3aa** ¹H-NMR : δ = 8.72 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -116.93 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ba** ¹H-NMR : δ = 8.71 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -108.41 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ca** ¹H-NMR : δ = 7.91 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -123.93 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3da** ¹H-NMR : δ = 8.33 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -114.92 ppm (s, 1F, Ar-CF₃).

imine **3ea** ¹H-NMR : δ = 8.34 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -111.45 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3fa** ¹H-NMR : δ = 8.16 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -59.55 ppm (s, 3F, Ar-CF₃).

imine **3ga** ¹H-NMR : δ = 8.23 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -64.45 ppm (s, 3F, Ar-CF₃).

imine **3ha** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.13$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -64.69$ ppm (s, 3F, Ar- CF_3).

imine **3ia** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.65$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -114.21$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ja** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.31$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -127.57$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ka** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.27$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -104.94$ ppm (s, 1F, Ar-F).

2.4.4.2. Aniline (2b)での検討

テストチューブで、 CD_3OD (1.0 mL)中、含フッ素ベンズアルデヒド類 **1a-k** (0.03 mmol) と aniline (**2b**) (0.01 mmol, 0.0028 g)を室温で攪拌し、各時間でその混合溶液を ^1H および $^{19}\text{F-NMR}$ により分析した。

imine **3ab** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 9.11$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -116.23$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3bb** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 9.17$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.63$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3eb** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.63$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -110.27$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ib** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.26$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -108.66$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kb** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.71$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.96$ ppm (s, 1F, Ar-F).

2.4.5. 反応時間の検討

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.03 mmol, 0.0042 g) と aniline (**2b**) (0.01 mmol, 0.0028 g)を室温で一晩攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

2.4.6. 4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**2k**)での各アミン類の化学シフト値

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.03 mmol, 0.0042 g) と第一級アミン類 **2a-B** (0.01 mmol)を室温で6時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

imine **3ka** ¹H-NMR : $\delta = 8.27$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -106.50$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kb** ¹H-NMR : $\delta = 8.27$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -107.02$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kc** ¹H-NMR : $\delta = 8.61$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -106.93$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kd** ¹H-NMR : $\delta = 8.41$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -106.94$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ke** ¹H-NMR : $\delta = 8.27$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -106.95$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kf** ¹H-NMR : $\delta = 8.40$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -105.80$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kg** ¹H-NMR : $\delta = 8.37$ ppm (s, 1H, -N=CH).

¹⁹F-NMR : $\delta = -104.96$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine 3kh	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.47 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -108.54 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3ki	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.37 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -108.54 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kj	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.27 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -106.50 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kk	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.45 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -107.96 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kl	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.77 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -108.21 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3km	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.69 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -107.78 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kn	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.71 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -107.84 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3ko	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.51 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -106.12 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kp	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.47 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -108.13 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kq	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.83 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -105.02 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.
imine 3kr	$^1\text{H-NMR} : \delta = 8.47 \text{ ppm (s, 1H, -N=CH)}$. $^{19}\text{F-NMR} : \delta = -108.54 \text{ ppm (s, 1F, Ar-F)}$.

imine 3ks	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.15$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.93$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kt	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.12$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -105.06$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3ku	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.46$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.69$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kv	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.35$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -105.86$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kw	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.89$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.16$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3ky	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.03$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -106.93$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kz	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.30$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -105.54$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kA	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.39$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -105.24$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kB	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.15$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -105.83$ ppm (s, 1F, Ar-F).

2.4.7. 一斉分析へのデモンストレーション

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.10 mmol, 0.0140 g) と Mixture A [**2a**, **2b**, **2g**, **2o**, **2s**, **2u** (0.01 mmol)]もしくは Mixture B [**2s**, **2t**, **2u**, **2y**, **2z**, **2A** (0.01 mmol)] を室温で 6 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

2.4.8. 4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde での生体アミンの化学シフト値

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.03 mmol, 0.0042 g) , 生体アミン **2t**, **2z**, **2A**, **2C-F** (0.01 mmol), TEA (0.06 mmol, 8.3 μL)および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μL)を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。4-bromofluorobenzene の化学シフト (-117 ppm)を基準としてΔδ値を決定した。

imine **3kt** ¹H-NMR : δ = 8.13 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -104.47 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kz** ¹H-NMR : δ = 8.30 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -104.97 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kA** ¹H-NMR : δ = 8.36 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -104.71 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kC** ¹H-NMR : δ = 8.01 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -103.99 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kD** ¹H-NMR : δ = 8.23 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -104.81 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kE** ¹H-NMR : δ = 8.39 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -104.71 ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kF** ¹H-NMR : δ = 8.43 ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : δ = -105.80 ppm (s, 1F, Ar-F).

2.4.9. Tyramine の検量線を用いた定量分析

2.4.9.1. 検量線の作製

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.10 mmol, 0.0140 g) , 各濃度に調整した tyramine (**2t**), TEA (0.20 mmol, 27.7 μL)および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μL)を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。得られた積分値を横軸に、その時の濃度を縦軸にプロットした。

2.4.9.2. 一斉定量分析

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde **1k** (0.10 mmol, 0.0140 g) , 30 mM に調整した tyramine (**2t**), 他の生体アミン **2z**, **2C**, **2D**, **2E**, **2F** (各 0.01 mmol), TEA (0.20 mmol, 27.7 μL) および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μL)を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

2.5. 参考文献

1. a) A. Rechtschaffen, *Perspect. Biol. Med.* **1998**, *41*, 359. b) J. M. Fellous, *Newroscientist*, **1991**, *5*, 283. c) D. A. Lewis, J. A. Lieberman, *Neuron*, **2000**, *28*, 325. d) J. E. LeDoux, *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 155.
2. a) S. E. Lopes, J. J. Rodrigues, M. H. Hernandez, M. V. Mora, *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *28(3)*, 411. b) Silvia. T, Marlene. R, M. C. Marti, *Lat. Am. appl. res.* **2002**, *32(2)*, 205.
3. a) T. Nagao, T. Tanimura, *J. Chromatogr.* **1989**, *496*, 39. b) T. Nagao, T. Tanimura, *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 33. c) P. T. Kissinger, K. Bratin, G. C. Davis, L. A. Pachla, *J. Chromatogr.* **1987**, *2(1)*, 9.
4. a) A. Mitsui, H. Nohta, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.* **1985**, *344*, 61. b) H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae, Y. Ohkura, *Anal. Sci.* **1986**, *2*, 303.
5. H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae, Y. Ohkura, *Biomed. Chromatogr.* **1987**, *2(1)*, 9.
6. a) T. Yoshitake, R. Iizuka, K. Fujino, O. Inoue, K. Yamagata, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Sci.* **1986**, *2*, 303. b) T. Yoshitake, J. Kehr, S. Yoshitake, K. Fujino, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **2004**, *807*, 177.
7. a) H. Yoshida, H. Harada, Y. Nakano, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18(9)*, 687. b) H. S. Marks, C. R. Anderson, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1094(1-2)*, 60. c) T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17(8)*, 509. d) F. Ichinose, T. Yoshitake, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatographia*. **2009**, *70(3-4)*, 575.
8. a) Y. Zhao, L. Chen, T. M. Swager, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 917. b) Y. Zhao, L. Chen, T. M. Swager, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 929.
9. a) 宮本 柁希, 同志社大学卒業論文, **2016**. b) 横山 実希, 同志社大学卒業論文, **2017**. c) 多々羅 健太, 同志社大学卒業論文, **2018**.
10. S. L. Yeste, M. E. Powell, S. D. Bull, T. D. James, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 427-430.
11. K. Kowalska, A. Adamczyk, W. Zniak, P. Gajowiec, B. Gierczyk, E. Kaczorowski, Ł. Popendad, G. Schroederc, A. Sikorskia, A. Sporzynski, *Journal of Fluorine Chemistry* **2016**, *187*, 1.
12. R. Nouch, M. Cini, M. Magre, M. Abid, M. Diguez, O. Pmies, S. Woodward, W. Lewis, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 17195.
13. W. Chen, Z. H. Zhou, H. B. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 1530.

第三章

^{19}F -NMR によるアミノ酸の一斉分析

概要

生体アミンの多くはアミノ酸を前駆物質とする代謝過程を経て生体内で産生される。したがって、生体アミンの生理機能の解明には生体アミンそのものだけでなく、その前駆物質であるアミノ酸も含めた一斉分析が求められる。また、尿中や血液中の特定のアミノ酸の定量分析は、アミノ酸代謝異常疾患などの早期治療に導くことが可能で、医学の分野でもアミノ酸の定量分析は非常に重要となる。

本章では、第二章で報告した手法のアミノ酸への適用について報告する。さらにその分析法を食品や飲料中に含まれるアミノ酸などの定性分析に関しても検討したので、その結果も合わせて報告する。

本手法は、前章と同様に、プローブ分子である 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde を triethylamine および内部標準である 4-bromofluorobenzene と 4 種のアミノ酸を $\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaHCO}_3\cdot\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) 混合溶液中、室温で 1.5 時間攪拌すると対応するイミン類が効率よく生成し、CsCl を加えた後、 ^{19}F -NMR により分析することで 4 種のアミノ酸を一度に定性することを可能とした。また、本手法は飲料や食品中の他の成分に影響することなくイミン類が生成され、本手法を用いることで、taurine 含有飲料中の taurine の定性分析や GABA 含有食品中の GABA の定性分析を可能とした。

3.1. 緒言

第二章では、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde を用いた ^{19}F -NMR による 6 種の生体アミンの一斉分析が可能であった。また、興味深いことに GABA や taurine といった分子内に酸性官能基を有する化合物群に対しても、triethylamine 添加条件において効率良くイミンを生成し、 ^{19}F -NMR による定性分析に成功した。このことから、これらの化合物と同様に酸性官能基を分子内に有するアミノ酸においても適用できると期待される。しかし、これらのアミノ酸は、水溶性が高く、含水条件下での分析手法が不可欠である。

本章では、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde を用いた ^{19}F -NMR による含水条件下での生体アミンおよびアミノ酸の一斉分析にむけての諸検討とともに、食品および飲料からの定性分析への応用について報告する。

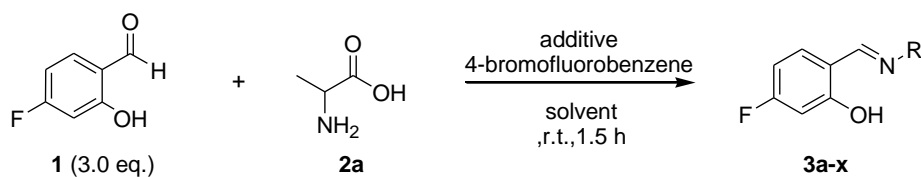
3.2. 結果と考察

3.2.1. 反応条件の検討

まず初めに、溶媒および添加物の添加効果について検討した (Table 1)。即ち、各溶媒に alanine (**2a**), 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), 添加物および 4-bromofluorobenzene を加え、1.5 時間攪拌したのち、 ^1H -NMR 分析により収率を決定した。

その結果、溶媒に D_2O を添加物として triethylamine (TEA) を加えた条件では、収率が 87% と良好であった (entry 1)。一方で、さらに TEA を増加させると、収率は少し低下する (entry 2)。次に添加物を imidazole に変更し、検討すると収率は 40% となり、添加物としては TEA の方が良いことが確認された (entry 3)。続いて、溶媒を塩基性の緩衝液にすることでさらなる収率の向上が見られると期待し、緩衝液での検討を試みた。pH 10.0 の緩衝液では、89% とこれまでで最もよい収率が得られ、溶媒比を 9 / 1 にすると収率が低下した (entries 4, 5)。また緩衝液の塩基性を高めて検討したが、さらなる収率の向上は見られなかった (entry 6)。

これらの結果から溶媒を $\text{CD}_3\text{OD} / \text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) (v/v = 4/1) とし、TEA (6.0 eq) 存在下、1.5 時間でアミノ酸分析を行うこととした。

Table 1 Optimization of analytical conditions for alanine (**2a**).^a

entry	solvent	additive	yield (%)
1	CD ₃ OD / D ₂ O (v/v = 0.8 / 0.2)	TEA (6.0 eq)	87
2	CD ₃ OD / D ₂ O (v/v = 0.8 / 0.2)	TEA (15 eq)	80
3	CD ₃ OD / D ₂ O (v/v = 0.8 / 0.2)	imidazole (6.0 eq)	40
4	CD ₃ OD / pH 10.0 100 mM NaHCO ₃ •Na ₂ CO ₃ buffer (v/v = 0.8 / 0.2)	TEA (6.0 eq)	96
5	CD ₃ OD / pH 10.0 100 mM NaHCO ₃ •Na ₂ CO ₃ buffer (v/v = 0.9 / 0.1)	TEA (6.0 eq)	76
6	CD ₃ OD / pH 10.6 100 mM NaHCO ₃ •Na ₂ CO ₃ buffer (v/v = 0.8 / 0.2)	TEA (6.0 eq)	78

^a Reaction Conditions: Alanine (**2a**) was treated with **1** (3.0 eq.) in the presence of additive and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in solvent (1.0 mL) at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_{4\text{-bromofluorobenzene}}$

3.2.2. 緩衝液混合溶液中での生体アミンおよびアミノ酸の化学シフト値

次に、様々なアミノ酸 **2a-q** および生体アミン **2r-x** における反応性と化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)について検討した (Table 2). 即ち, $\text{CD}_3\text{OD} / \text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) (v/v = 4/1)中, 各アミノ酸および生体アミン **2**, 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), TEA および 4-bromofluorobenzene を加え, 1.5 時間攪拌した後, $^1\text{H-NMR}$ 分析し収率を算出し, $^{19}\text{F-NMR}$ 上での内部標準からの化学シフト値の差を決定した.

脂肪族アミノ酸である alanine (**2a**), valine (**2b**)および leucine (**2c**)では, 良好にイミン **3a-c** の生成が確認され, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ12.29, 12.36, 12.29 ppmとなり, **2a** および **2c**において同値を示した (entries 1-3). 次に, β 位にヒドロキシ基およびメルカプト基を有する serine (**2d**), cysteine (**2e**)で検討した. **2d** では, 79%の収率で, 対応するイミン **3d** の生成が確認され, $\Delta\delta$ 値は 14.21 ppm となり脂肪族アミノ酸とは異なる化学シフト値を与えた (entry 4). ここで, 収率の低下は, ヒドロキシ基を β 位に有することによる副反応が考えられるが, $^1\text{H-NMR}$ 分析から副生成物は確認されておらず, ヒドロキシ基の影響によるものと推測した. 一方で, cysteine (**2e**)においては, $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上にイミン **3e** の特徴的なシグナルは確認されないが, 副生成物である **3e'**が定量的に得られ, その $\Delta\delta$ 値は, 2.35 ppm となり他のアミノ酸とは全く異なる化学シフト値を示した (entry 5, Figure 1 : **3e'**). 続いて, 芳香族環を有するアミノ酸である 2-phenylglycine (**2f**), phenylalanine (**2g**), tyrosine (**2h**), tryptophan (**2i**)および histidine (**2j**)について検討した. **2g-j** においては, 良好な収率で対応するイミン **3g-j** の生成が確認された. しかしながら, **2f** においてはイミン **3f** の特徴的なシグナルは見られるものの, α 炭素上のHは溶媒中の水と重なり, 芳香族環上の H は **1** と内部標準のシグナルと重なるため収率の決定は困難であった. $\Delta\delta$ 値は **2f** で 12.34 ppm であり **2g**, **2h**, **2i**, **2j** では, それぞれ順に, 14.10, 14.18, 14.14, 14.09 ppm となり **2f** を除く芳香族アミノ酸では, 脂肪族アミノ酸より高磁場シフトが見られる (entries 6-10). 酸性アミノ酸である aspartic acid (**2k**), glutamic acid (**2l**)では, 他のアミノ酸に比べ多少の収率低下がみられるが, イミン **3k**, **3l** の生成が可能であり, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 14.09, 14.21 ppm とイミノ結合からの距離により化学シフト値が異なる結果を得た (entries 11, 12). **2k**, **2l** のカルボキシ基がカルバモイル基に変わる asparagine (**2m**), glutamine (**2n**)では, 良好な収率でイミン **3m**, **3n** を与え, $\Delta\delta$ 値は **2k**, **2l** と同様の傾向を有しているが, これらと比べると化学シフト値の高磁場シフトが観測された (entries 13, 14). また, asparagine (**2m**)においては他のアミノ酸とは大きく異なる化学シフト値の差を与えた. さらに, グアニジン骨格を有する arginine (**2o**)でも同様に, 良好に目的生成物が生成され, 化学シフト値の差を得られた (entry 15). Lysine-dihydrochloride (**2p**)では, $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上にいくつかのイミンのシグナルが確認された. **2p** 末端はアミノ基であることから, 類似の副生成物の存在がいくつか考えられる (Figure 1 : **3p'**, **3p''**, **3p'''**). このことから, **3p** の同定は難しく, 収率および $^{19}\text{F-NMR}$ スペクトル上でのイミンのシグナルを決定できなかった (entry 16). 最後のアミノ酸として glycine (**2q**)では, 良好な収率で生成物を与え, $\Delta\delta$ 値は 14.35 であった (entry 17). この値は脂肪族アミノ酸や 2-phenylglycine (**2f**)と似た値であることがわかる. 次に生体アミン **2r-x** で検討した. アミノ酸の脱炭酸化合物である tyramine (**2r**), serotonin-hydrochloride (**2s**),

histamine (**2t**)ではアミノ酸と同様に良好に対応するイミンの生成が可能であり、 $\Delta\delta$ 値を得られた (entries 18-20). 前駆体のアミノ酸と比較すると, **2h** と **2p** で 0.11 ppm, **2j** と **2t** で 0.04 ppm の差を示した (entry 8 vs entry 18, entry 10 vs entry 20). ポリアミンである putrescine (**2u**)では, 生成するジイミンが本溶媒系に不溶であり分析できないものの, cadaverine (**2v**)においては良好にジイミンを生成し, $\Delta\delta$ 値を与えた (entries 21, 22). 最後に GABA (**2w**)と taurine (**2x**)においては, どちらも良好にイミン **3w**, **3x** を生成し, $\Delta\delta$ 値はそれぞれ 14.14, 13.34 ppm であった (entries 23, 24). Taurine (**2x**)はどのアミノ酸よりも化学シフト値は小さくなり特徴的なシグナル領域を有していることがわかる.

これらの結果を纏めると, ほとんどのアミノ酸および生体アミンの $\Delta\delta$ 値は, 14.05-14.37 ppm の間に分布しており, アミノ酸の種類による傾向は見られない. 一方で, cysteine (**2e**)では異なる生成物を得ることにより別の化学シフトを示し, asparagine (**2m**), arginine (**2o**), cadaverine (**2v**)および taurine (**2x**)では特徴的な化学シフト値の差を与えることがわかる. これらの特性を利用し, 本手法を用いることでアミノ酸の一斉分析が可能であると示唆される.

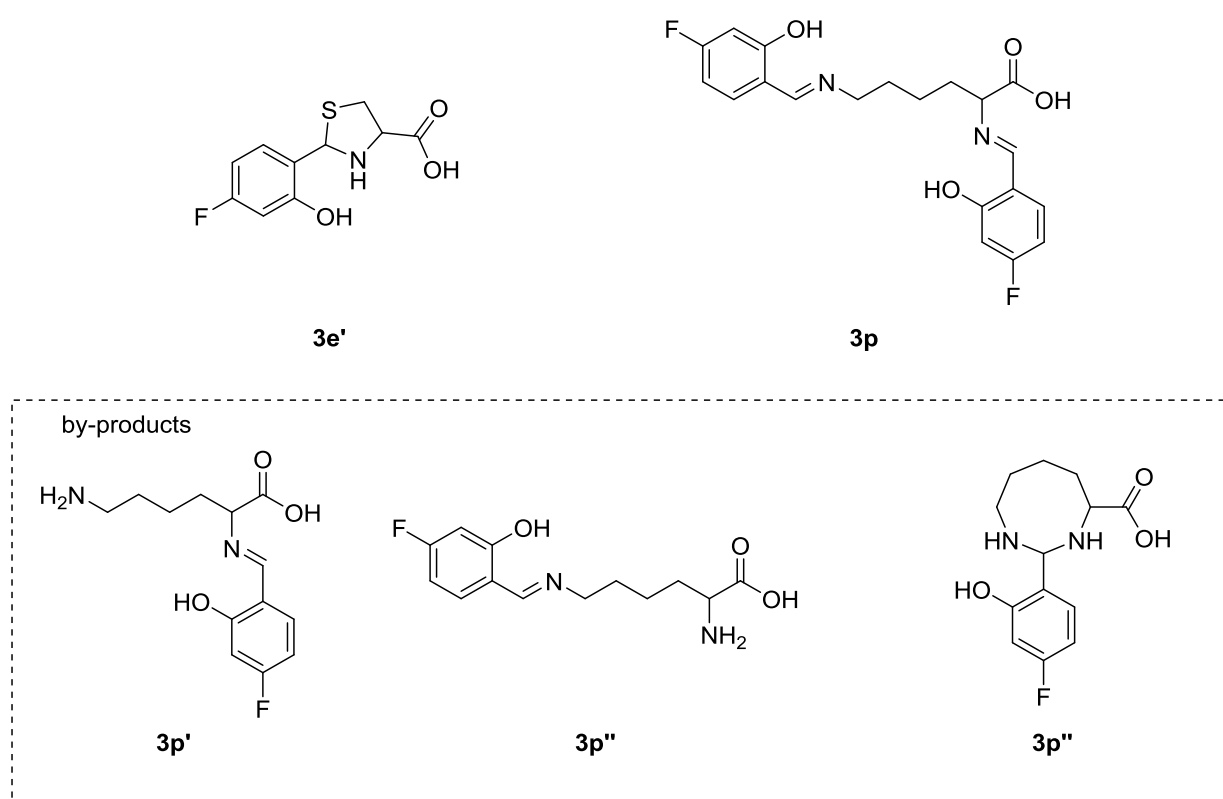
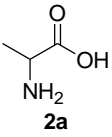
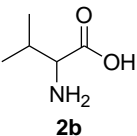
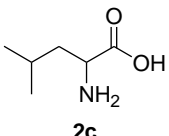
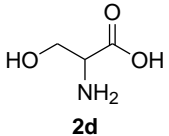
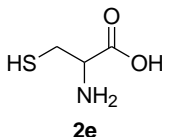
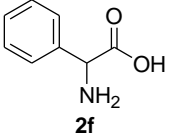


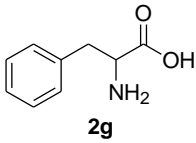
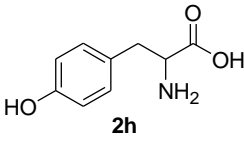
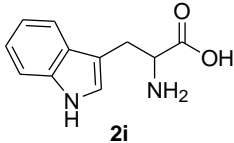
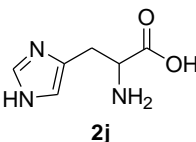
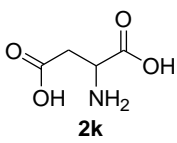
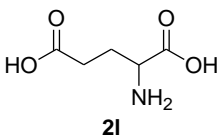
Figure 1 Chemical structure of product and by-product derived from cysteine (**2e**) and lysine (**2p**).

Table 2 Scope of amino acid and biogenic amine using **1** in CD₃OD / buffer. ^a

entry	amine 2	$\Delta\delta^b$	yield (%)
1	 2a	14.29	96
2	 2b	14.36	>99
3	 2c	14.29	>99
4	 2d	14.21	79
5	 2e	2.35	>99
6	 2f	14.34	n.d. ^{c)}

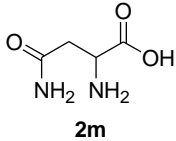
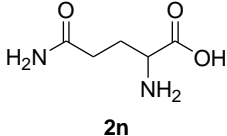
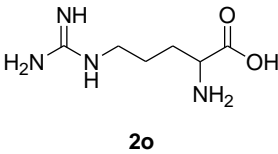
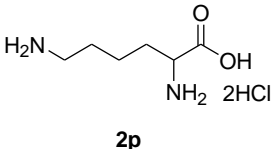
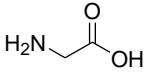
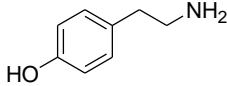
^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in the presence of TEA (6.0 eq) and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in CD₃OD (0.8 mL) and NaHCO₃•Na₂CO₃ buffer (pH 10.0, 0.2 mL) at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_{4\text{-bromofluorobenzene}}$. ^c Not determined. ^dNot dissolved.

Table 2 Scope of amino acid and biogenic amine using **1** in CD₃OD / buffer. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta^b$	yield (%)
7	 2g	14.10	>99
8	 2h	14.18	>99
9	 2i	14.14	>99
10	 2j	14.09	95
11	 2k	14.09	82
12	 2l	14.21	90

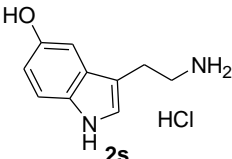
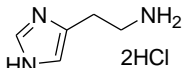
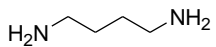
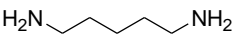
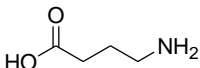
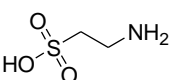
^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in the presence of TEA (6.0 eq) and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in CD₃OD (0.8 mL) and NaHCO₃•Na₂CO₃ buffer (pH 10.0, 0.2 mL) at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_4$ -bromofluorobenzene. ^c Not determined. ^dNot dissolved.

Table 2 Scope of amino acid and biogenic amine using **1** in CD₃OD / buffer. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta^b$	yield (%)
13	 2m	13.51	95
14	 2n	14.10	>99
15	 2o	13.91	>99
16	 2p	n.d. ^c	n.d. ^c
17	 2q	14.35	>99
18	 2r	14.07	>99

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in the presence of TEA (6.0 eq) and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in CD₃OD (0.8 mL) and NaHCO₃·Na₂CO₃ buffer (pH 10.0, 0.2 mL) at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_{4\text{-bromofluorobenzene}}$. ^c Not determined. ^d Not dissolved.

Table 2 Scope of amino acid and biogenic amine using **1** in CD₃OD / buffer. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta^b$	yield (%)
19	 2s	14.37	>99
20	 2t	14.05	>99
21	 2u	-	n.d. ^d
22	 2v	13.97	>99
23	 2w	14.14	>99
24	 2x	13.34	>99

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in the presence of TEA (6.0 eq) and 4-bromofluorobenzene (1.0 eq) in CD₃OD (0.8 mL) and NaHCO₃•Na₂CO₃ buffer (pH 10.0, 0.2 mL) at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b $\Delta\delta = \delta_3 - \delta_4$ -bromofluorobenzene. ^c Not determined. ^d Not dissolved.

3.2.3. 食品, 飲料への応用

先の検討結果を受け, 食品, 飲料中のアミノ酸を本手法により定性可能であるか検討することとした. ここでは, 特徴的なシグナル領域を有していたや arginine (**2o**), taurine (**2x**)含有飲料や, GABA (**2w**)含有食品, および多種のアミノ酸含有サプリからの定性分析を行った.

3.2.3.1. 飲料での検討

まず, taurine (**2x**)含有飲料として広く知られている大正製薬のリポビタミン D および arginine (**2o**)も有するリポビタミン D super での検討を試みた. 即ち, CD₃OD / NaHCO₃·Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10.0) (v/v = 4/1) 中, 分析試料, 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), TEA および 4-bromofluorobenzene を加え, 1.5 時間攪拌した後, ¹⁹F-NMR での分析を行った (Figure 2, 3).

その結果, リポビタミン D では ¹⁹F-NMR 上に 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**)と 4-bromofluorobenzene (-117 ppm)のシグナルと別に新たなシグナルが確認された. そのシグナルと taurine (**2x**)での結果を比較すると 0.04 ppm の差が見られた. そこで, この混合溶液に積極的に taurine (**2x**)を加えると先ほどのシグナルの強度が増加した. この結果から, 新たなシグナルは想定通り, taurine (**2x**)から生成されるイミン **3x** であると考えられる.

リポビタミン D super では, ¹⁹F-NMR 上に 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**)と 4-bromofluorobenzene (-117 ppm)のシグナルと別に新たな二つのシグナルが確認された. 先ほどと同様に, taurine (**2x**)と arginine (**2o**)での結果と比較するとそれぞれ, 0.12, 0.32 ppm と大きな差を生じた. 一方で, この混合溶液に積極的に taurine (**2x**)と arginine (**2o**)を加えると新たな二つのシグナルの強度が増加し, taurine (**2x**)と arginine (**2o**)から生成されるイミンのシグナルであった.

この結果から, 飲料中のアミノ酸および生体アミンを簡便に定性分析が可能となる一方で, 飲料中の他の成分により化学シフト値に変化が生じることが確認された.

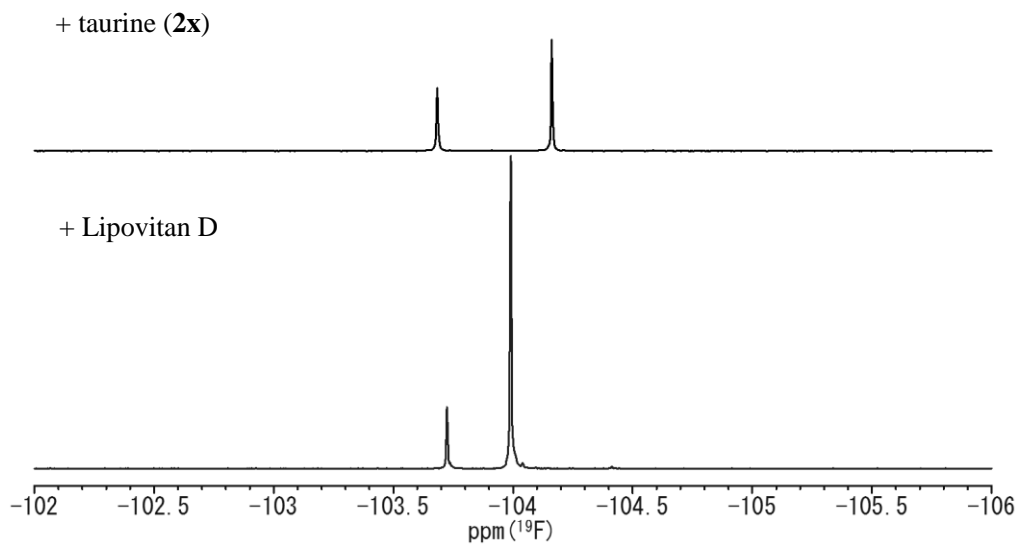


Figure 2 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of Lipovitan D with **1**.

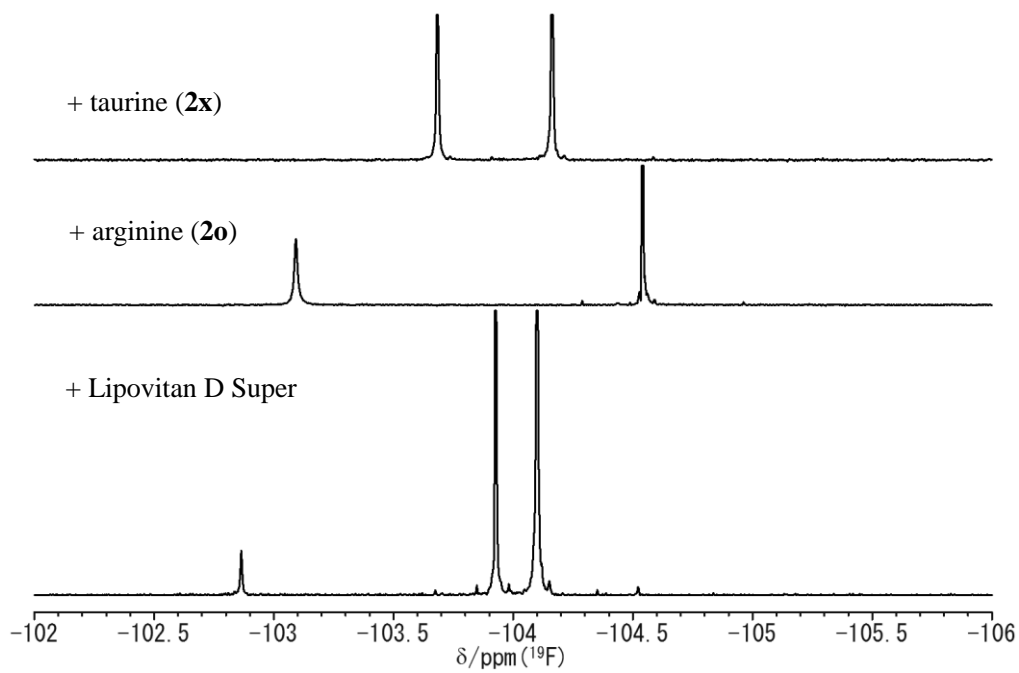


Figure 3 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of Lipovitan D Super with **1**.

3.2.3.2. 食品での検討

次に、GABA 配合の食品である江崎グリコのメンタルバランスチョコレート GABA での検討を試みた。即ち、前処理として MeOH により抽出した抽出物に $\text{CD}_3\text{OD} / \text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) (v/v = 4/1), 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), TEA および 4-bromofluorobenzene を加え、1.5 時間攪拌した後、 ^{19}F -NMR での分析を行った (Figure 4)。結果として ^{19}F -NMR 上に 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) と 4-bromofluorobenzene (-117 ppm) のシグナルと別に新たなシグナルが確認された。また、そのシグナルと GABA (**2w**) での結果を比較すると 0.02 ppm の差が見られた。この混合溶液に積極的に GABA (**2w**) を加えると先ほどのシグナルの強度が増加した。この結果から、新たなシグナルは想定通り、GABA (**2w**) から生成されるイミン **3w** であった。このように抽出のみの簡便な前処理でアミノ酸を定性分析できることが可能となった。

さらなる検討として 17 種のアミノ酸を含む明治の SUPER VAAM スーパーヴァーム[®] 顆粒を用いて検討した (Figure 5)。その結果、 ^{19}F -NMR 上に 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) と 4-bromofluorobenzene (-117 ppm) のシグナルと別に新たな 11 種のシグナルが確認された。先の検討で明らかとなっているアミノ酸領域にシグナルがあらわれたことから、アミノ酸由来のシグナルであると考えられるが、本手法で測定可能なアミノ酸は本商品に 15 種含まれており、いくつかのアミノ酸のシグナルが重なることがわかる。

この結果から、本手法による多種のアミノ酸を含む食品においての一斉定性分析は、困難であったが、特徴的な化学シフト領域を有するアミノ酸においては十分に定性可能であると示唆される。

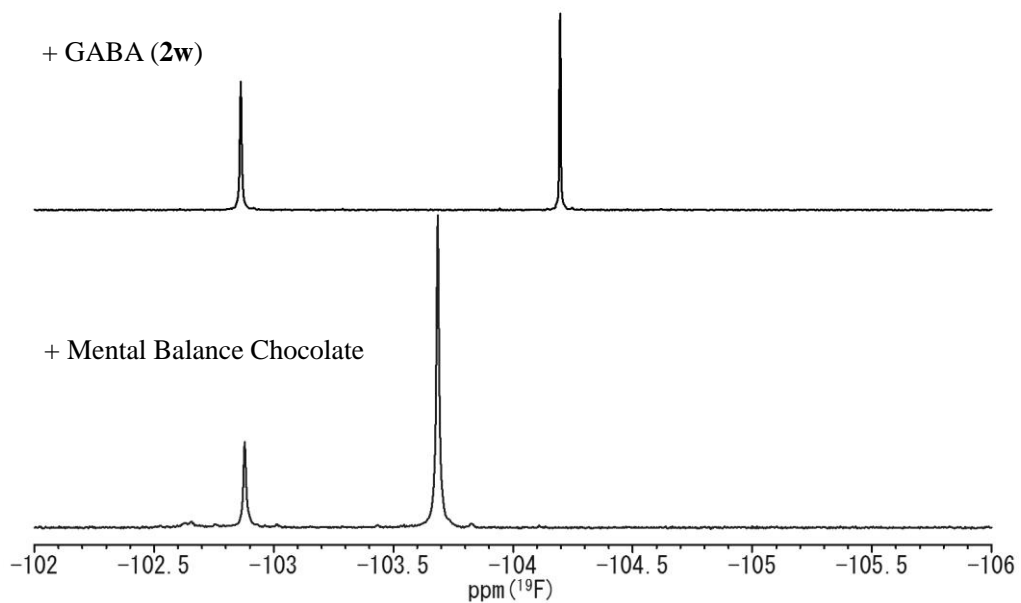


Figure 4 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of Mental Balance Chocolate with **1**.

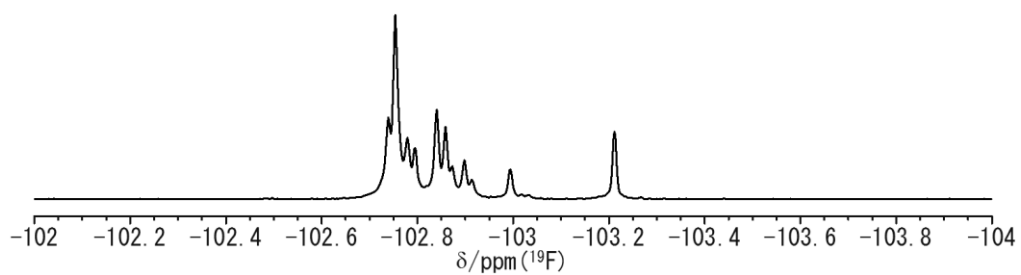


Figure 5 ^{19}F -NMR spectrum of reaction mixture of SUPER VAAM Super Vaam[®] Powder with **1**.

3.2.4. カチオン性イオンの添加効果

先の検討から、同様の化学シフト値の差を示すアミノ酸を分析するためには、さらなる分離能の向上が必要であることが考えられる。生成されるイミンの構造を鑑みた時、ヒドロキシ基のOとイミン上のNはカチオン性イオンと配位することが可能である¹⁾。そこで、カチオン性イオンの効果について検討することとした (Figure 6)。即ち、CD₃OD / NaHCO₃・Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10.0) (v/v = 4/1)中、4種のアミノ酸[alanine (**2a**), valine (**2b**), leucine (**2c**), 2-phenylglycine (**2f**)], 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), TEA および 4-bromofluorobenzene を加え、1.5 時間攪拌した後、添加物を加え、上澄み液を ¹⁹F-NMR 分析した。

その結果、添加なしの条件では、3種のシグナルしか得られなかったが、NaCl, KCl, CsClを加えることで4種に分離可能となった。また、得られた溶液に積極的に各アミノ酸をそれぞれ加えアミノ酸の同定が可能となった。化学シフト値の差は小さいものの、本手法の分離能を向上させるさらなる展開が期待できる結果を得た。

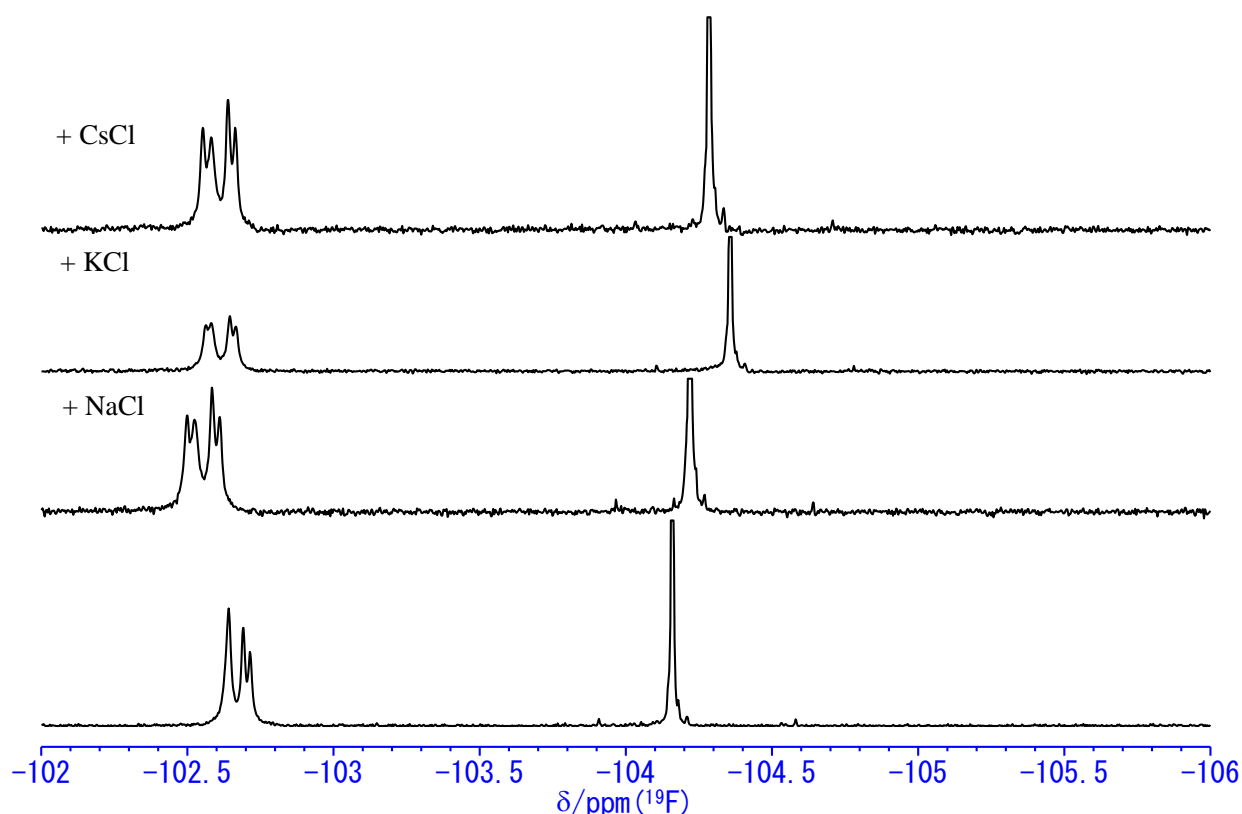


Figure 6 ¹⁹F-NMR spectra of reaction mixture of **2a**, **2b**, **2c** and **2f** with **1**.

3.3. まとめ

本章では、アミノ酸および生体アミンの ^{19}F -NMR による 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**)を用いた一斉分析において、 $\text{CD}_3\text{OD} / \text{pH } 10.0 \text{ } 100 \text{ mM } \text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ aq.}$ ($v/v = 4/1$)を溶媒とすることで良好な誘導体化が可能であることを見出した。本手法では、cysteine (**2e**), asparagine (**2m**), arginine (**2o**), cadaverine (**2v**)および taurine (**2x**)で特徴的な化学シフト値の差を与える。また、 $\text{CD}_3\text{OD} / \text{pH } 10.0 \text{ } 100 \text{ mM } \text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ aq.}$ ($v/v = 4/1$)中、分析対象物と 4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**), TEA および 4-bromofluorobenzene を加え、1.5 時間攪拌した後、 ^{19}F -NMR 分析する手法により、飲料中の taurine (**2x**)や arginine (**2o**)の定性が可能となり、同様の手法で食品中の GABA (**2w**)の定性分析にも成功した。さらに、類似のアミノ酸である alanine (**2a**), valine (**2b**), leucine (**2c**), 2-phenylglycine (**2f**)においては、CsCl を添加することで分離能を向上させることに成功した。

3.4. 実験方法

3.4.1. 分析機器

(a)フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR)

Bruker 社製 AVANCE- III-HD 型 (400 MHz)

(b)卓上型 pH メータ

HORIBA 社製 F-71S 型

3.4.2. General method

溶媒及び試薬は、それぞれ東京化成工業、和光純薬工業、ナカライテスク、Aldrich から購入し、特に精製せずにそのまま使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、300 mesh のシリカゲル (Wakogel C-300 Silicagel)を用いて行った。TLC は、シリカゲル 60 F₂₅₄ をガラスシートの上にプレコートしたものを Merck 社から購入し、そのまま使用した。¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹⁹F-NMR スペクトルは、それぞれ 400 MHz, 100 MHz, 376 MHz で測定した。測定用の重溶媒として CDCl₃, DMSO-d₆, CD₃OD, toluene-d₈, CD₂Cl₂ を使用し、化学シフト値 δ は CDCl₃ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CDCl₃ (δ 77.0 ppm for ¹³C), DMSO-d₆ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₃OD では CH₃OH (δ 3.31 ppm for ¹H), toluene-d₈ では TMS (δ 0.0 ppm for ¹H), CD₂Cl₂ では CH₂Cl₂ (δ 5.3 ppm for ¹H) を基準とし、その相対値で決定した。また、¹⁹F-NMR の測定は、第一章と同様の手法で行った。

3.4.3. 反応条件の検討

4-Fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**)は既法の手法において合成した²⁾。

3.4.3.1. 緩衝液の調整

0.1 M NaHCO₃水溶液と 0.1 M Na₂CO₃水溶液を用いて、卓上型 pH メータにより pH 調整を行いながら、NaHCO₃·Na₂CO₃緩衝液を調整した。

3.4.3.2. 条件検討

テストチューブで、各溶媒 (1.0 mL)中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) (0.03 mmol, 0.0042 g) , alanine (**2a**), 添加物および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μ L)を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

3.4.4. 緩衝液混合溶液中での生体アミンおよびアミノ酸の化学シフト値

テストチューブで， CD_3OD / $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) (0.8 / 0.2 mL) 中，4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) (0.03 mmol, 0.0042 g)，アミノ酸 **2a-q** および生体アミン類 **2r-x**，TEA (0.06 mmol, 8.3 μL) および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μL) を室温で 1.5 時間攪拌した後，その混合溶液を ^1H および ^{19}F -NMR により分析した。

imine **3ka** ^1H -NMR : $\delta = 8.34$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.71$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kb** ^1H -NMR : $\delta = 8.28$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.64$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kc** ^1H -NMR : $\delta = 8.37$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.71$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kd** ^1H -NMR : $\delta = 8.29$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.79$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ke'** ^{19}F -NMR : $\delta = -114.65$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kf** ^1H -NMR : $\delta = 8.26$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.66$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kg** ^1H -NMR : $\delta = 7.64$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.90$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kh** ^1H -NMR : $\delta = 7.63$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.82$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3ki** ^1H -NMR : $\delta = 7.36$ ppm (s, 1H, -N=CH).

^{19}F -NMR : $\delta = -102.86$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine 3kj	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.86$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.91$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kk	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.33$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.91$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kl	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.34$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.79$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3km	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.30$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -103.49$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kn	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.34$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.90$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3ko	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.34$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -103.09$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kq	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.26$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.65$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kr	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.09$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.93$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3ks	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.95$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.63$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kt	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.19$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -102.95$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3kv	$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.37$ ppm (s, 1H, -N=CH). $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -103.03$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kw** ¹H-NMR : $\delta = 8.38$ ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : $\delta = -102.86$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3kx** ¹H-NMR : $\delta = 8.40$ ppm (s, 1H, -N=CH).
¹⁹F-NMR : $\delta = -103.66$ ppm (s, 1F, Ar-F).

3.4.5. 食品、飲料への応用

本検討で使用する飲料および食品は市販で購入したものである。

3.4.5.1. 飲料での検討

テストチューブで、CD₃OD / NaHCO₃·Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10.0) (0.8 / 0.1 mL) 中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) (0.03 mmol, 0.0042 g)、分析対象飲料 (0.1 mL)、TEA (0.06 mmol, 8.3 μ L) および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μ L) を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

3.4.5.2. 食品での検討

メンタルバランスチョコレート GABA での検討

メンタルバランスチョコレート GABA (2.5 g) をすり潰したのち、MeOH (50 mL) で 1 時間抽出した。その後、不溶物をろ過で取り除き、ろ液を減圧留去した後、30 分真空乾燥させた。得られた抽出物に CD₃OD / NaHCO₃·Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10.0) (1.6 / 0.4 mL)、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) (0.03 mmol, 0.0042 g)、TEA (0.12 mmol, 16.6 μ L) および 4-bromofluorobenzene (0.02 mmol, 2.2 μ L) を加え、1.5 時間攪拌し、上澄み液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

SUPER VAAM スーパーヴァーム[®]顆粒での検討

テストチューブで、CD₃OD / NaHCO₃·Na₂CO₃ 緩衝液 (pH 10.0) (0.8 / 0.2 mL) 中、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde (**1**) (0.15 mmol, 0.0210 g)、分析対象固体 (0.02 g)、TEA (0.30 mmol, 41.5 μ L) および 4-bromofluorobenzene (0.01 mmol, 1.1 μ L) を室温で 1.5 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

3.5. 参考文献

1. a) M. Kang, A. Sen, *Organometallics* **2005**, *24*, 3508-3515. b) F. M. G. Valle, R. Estivill, C. Gallegos, T. Cuenca, M. E. G. Mosquera, V. Tabernerero, J. Cano, *Organometallics* **2015**, *34*, 477.
2. W. Chen, Z. H. Zhou, H. B. Chen, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1530.

第四章

第一級アミン類の二次元的な一斉分析

概要

^{19}F -NMR による一斉分析手法において用いられるフッ素誘導体試薬の多くはフッ素基に対称性を有している。これは、シグナルが煩雑にならないように同じ化学シフト値を与え、かつ感度を向上させるためである。一方で、 ^{19}F -NMR による分析において二種の異なる化学シフト領域を用いたフッ素誘導体試薬を用いる例はほとんどない。また、第二章、第三章で報告した手法では概ね良好な分離を見せるため、本法がアミン類の一斉分析に十分に使用でき得ることを示せた。その一方で、直鎖状の脂肪族アミン類である *n*-butylamine と *n*-hexylamine のように構造が非常によく似ており、側鎖のわずかな鎖長の差しかないようなアミン類の識別は十分ではない。この NMR 分析で用いるプローブ分子が一種類ではなく二種類の含フッ素基を分子中に有し、各々のフッ素原子がアミンの構造的な特徴を別々に伝えることができれば、より詳細な構造情報が得られ、わずかな違いも捉えられると考えた。さらに、 ^{19}F -NMR による一斉分析手法でこのように二次元的な解析アプローチを用いる例は報告されていない。

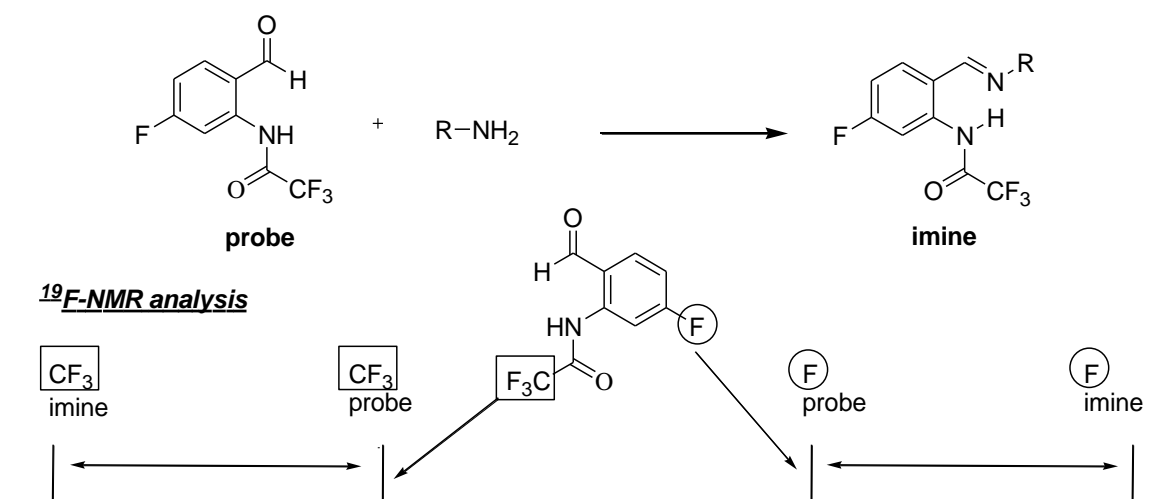
本章では、異なるフッ素基をもつプローブ分子の ^{19}F -NMR スペクトルの二次元的な解析によってアミン類の判別を行う独自の解析戦略に基づいた含フッ素ベンズアルデヒドの合成とその利用について報告する。

まず、二つの含フッ素基をもつプローブ分子として *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide をデザイン・合成した。続いて、そのプローブ分子とアミン類を CD_3OD 中、室温で 6 時間反応させ、対応するイミン類へと変換し、これらを ^{19}F -NMR により分析した。得られた ^{19}F -NMR シフトの二次元プロットを展開すると、アミン類の大まかな構造上の特徴のみならず鎖長や分岐・芳香族基の有無などを含む非常に詳細なアミンの構造的情報が抽出できることがわかり、これにより、第二章、第三章で報告した手法では分析が困難であった 4 種のアルキルアミン類の分類が可能であった。

4.1. 緒言

第二章、第三章において、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde を用いた ^{19}F -NMR による生体アミン類およびアミノ酸の一斉分析法について論じてきたが、概ね良好な分離を見せるため本手法がアミン類の一斉分析に十分に使用でき得ることを示す一方、例えば、直鎖状の脂肪族アミン類のように構造が非常によく似ているアミン類の識別能力が十分ではない場合も散見された。そこで、この NMR 分析で用いる分子が一種類ではなく二種類のフッ素原子を分子中に有し、各々のフッ素原子がアミンの構造的な特徴を別々に伝えれば、より詳細な構造情報が得られると考えた。即ち、二種の異なる化学シフト領域を有する F-と CF_3 -を分子内にもつ含フッ素誘導体試薬を用い、アミン類に二種のフッ素源を導入し、得られる化学シフト値の差を二次元的に解析することでアミン類の一斉分析が可能となると期待する (Scheme 1)。また、このような二種の異なる化学シフト領域を用いた二次元的な解析アプローチは、これまで例がなく、NMR 分析を用いた二次元的解析は異なる試薬を使用し、得られたデータに基づくものに限られている¹⁾。

本章では、二種の異なる化学シフト領域を有する F-と CF_3 -をとともに分子内にもつベンズアルデヒドの合成と二次元的解析に基づいたアミン類の一斉分析について報告する²⁾。



Scheme 1 Strategy of 2D simultaneous analysis of amine by ^{19}F -NMR.

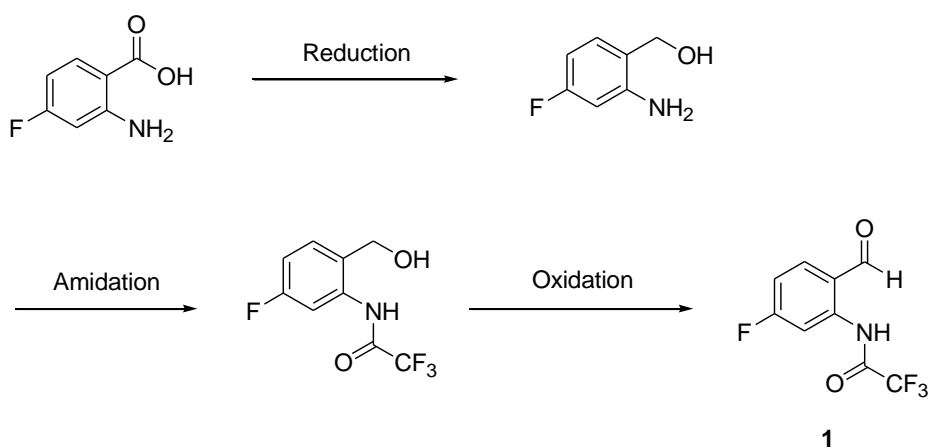
4.2. 結果と考察

4.2.1. *N*-(5-Fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)の設計と合成戦略

これまで、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde において、イミン形成時の化学シフト差に良好な差異が見られた。これは、*o*-位のヒドロキシ基がイミンの窒素原子と水素結合することでイミンを安定していると考えられる。そのため、本検討に用いるプローブでは、同様にイミン形成時に水素結合が期待できる *o*-アミド基を導入し、その部分にフッ素置換基をもつ *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を設計した。

CF₃-と F-は ¹⁹F-NMR 上でのシフト差が大きく、その判別は容易であるため、これらとともに有する *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を用い、第一級アミン類と反応させることで、得られる CF₃-と F-の化学シフト差から二次元の情報が得られ、¹⁹F-NMR シフトの二次元バーコード様の分析が可能になると期待される。

プローブ **1** の合成は、2-amino-4-fluorobenzoic acid (**2**)を原料として、還元により 2-amino-4-fluorobenzylalcohol (**3**) を合成し、アミド化により *N*-[5-fluoro-2-(hydroxymethyl)phenyl]trifluoroacetamide (**4**)、最後に酸化により、目的のプローブ **1** の合成が達成される (Scheme 2)。

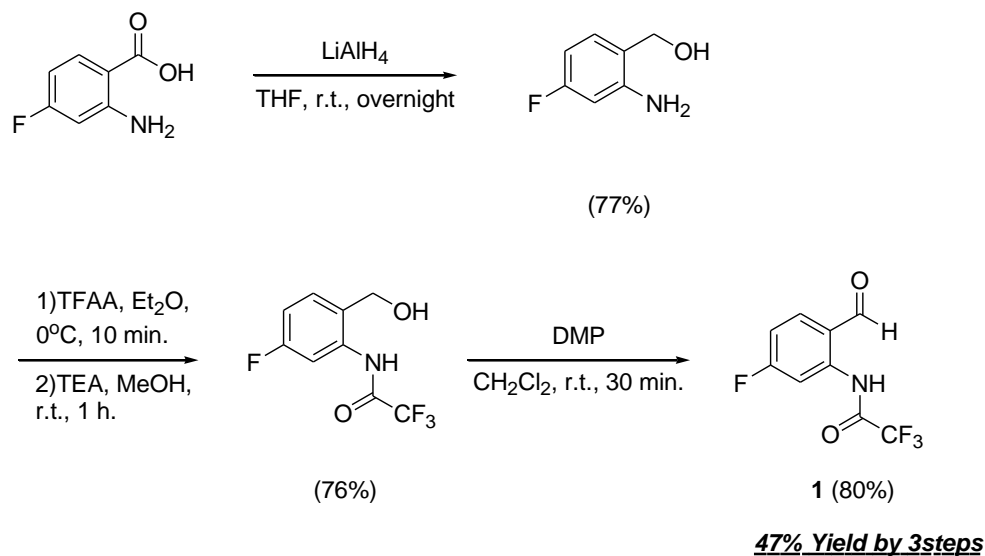


Scheme 2 Synthesis plan of *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**).

4.2.2. *N*-(5-Fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1)の合成

2-Amino-4-fluorobenzoic acid を出発原料とし、*N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1)を三段階、収率 47% で合成した (Scheme 3).

^1H , ^{13}C , ^{19}F -NMR および HRMS により *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1)を同定した.



Scheme 3 Synthesis of *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1).

4.2.3. 二次元プローブ 1 による第一級アミン類の識別能の検討

4.2.3.1. 各第一級アミン類における化学シフト変化の検討

N-(5-Fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を用いて、第一級アミン類 **2a-w** から誘導されるイミン **3a-w** の ^{19}F -NMR における化学シフト値の差 ($\Delta\delta$)と収率について検討した (Table 1). 即ち、各第一級アミン類 **2a-w** と *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を CD_3CD 中で 6 時間攪拌し、 ^1H -NMR, ^{19}F -NMR により分析した (Table 1).

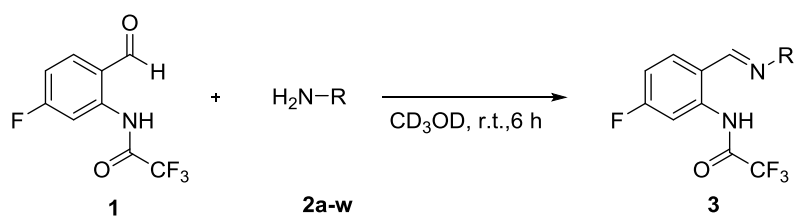
まず、直鎖アルキルアミン類である *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)では対応するイミン **3a**, **3c**, **3d** が良好に生成され、*N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)の F-由来の化学シフト差 ($\Delta\delta\text{F}$)は 7.54 ~ 7.51 ppm と鎖長が長くなるにしたがって低磁場シフトを観測する. 一方で、イミン **3** と *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)の CF_3 -由来の化学シフト差 ($\Delta\delta\text{CF}_3$)は 0.44 ~ 0.50 ppm の高磁場シフトを観測する (entries 1, 3, 4). 分枝アルキルアミン類 **2d-h** においても、良好な収率で生成物が確認され、その $\Delta\delta\text{F}$, $\Delta\delta\text{CF}_3$ 値は異なることが確認された (entries 5-8). 一方、アニリン類 **2b**, **2i-n** では、aniline (**2b**), *p*-methoxyaniline (**2n**)では比較的良好に目的のイミンの生成が確認されるものの、他の *o*-位に置換基を有するアニリン **2i**, **2j** や不活性基をもつアニリン **2k-m** では収率が 1-22% と著しく低下した (entries 2, 9-14). これは、*o*-位の立体障害による影響と不活性基によるアミノ基の求核性の低下が起因していると考えられる. またこれらの $\Delta\delta\text{F}$ 値はアルキルアミン類に比べ、低磁場シフトを観測することがわかるが、 $\Delta\delta\text{CF}_3$ 値には特徴的な傾向は見られない. フェニルエチルアミン類 **2o**, **2t** およびベンジルアミン類 **2p-s** では、アルキルアミン類と同様に良好な収率で目的のイミン **3** が生成され、 $\Delta\delta\text{F}$ 値はアルキルアミン類とアニリン類の間に分布することが確認された (entries 15-20). またアニリン類同様に $\Delta\delta\text{CF}_3$ 値には特徴的な傾向は見られない. 最後に、ポリアミン類 **2u-2w** ではすべてにおいて白色固体の析出が見られ、この固体は目的生成物のジイミン体であり、 CD_3OD には不溶であることが明らかとなった (entries 21-23).

各第一級アミン類に対し、本プローブが有効にイミンを生成し 2 種の異なる化学シフト値の差を得られることから、当初の想定通り二次元解析へ展開できると期待される.

Table 1 Scope of primary of amine using **1** in CD₃OD. ^a

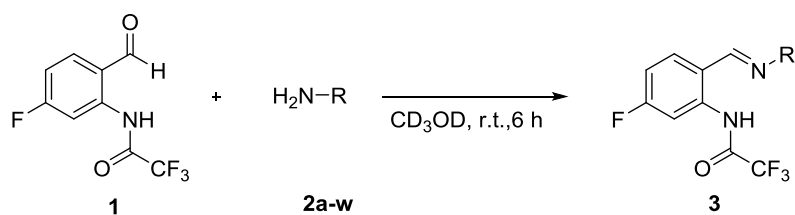
entry	amine 2	$\Delta\delta_{\text{CF}_3}$ ($\delta_1-\delta_3$)	$\Delta\delta_{\text{F}}$ ($\delta_1-\delta_3$)	yield (%)
1	 2a	-0.44	7.54	>99
2	 2b	-0.44	5.84	>99
3	 2c	-0.48	7.52	>99
4	 2d	-0.50	7.51	>99
5	 2e	-0.50	7.57	>99
6	 2f	-0.71	7.66	92

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b Not dissolved.

Table 1 Scope of primary of amine using **1** in CD₃OD. ^a (continued)

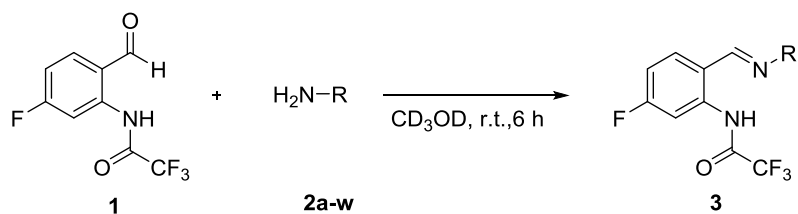
entry	amine 2	$\Delta\delta_{\text{CF}_3}$ (δ_1 - δ_3)	$\Delta\delta_{\text{F}}$ (δ_1 - δ_3)	yield (%)
7	 2g	-0.57	7.43	>99
8	 2h	-0.67	7.62	>99
9	 2i	-0.74	5.75	14
10	 2i	-0.51	5.49	2
11	 2k	-0.54	4.83	1
12	 2l	-0.42	5.04	13

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b Not dissolved.

Table 1 Scope of primary of amine using **1** in CD₃OD. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta_{CF_3}$ ($\delta_1-\delta_3$)	$\Delta\delta_F$ ($\delta_1-\delta_3$)	yield (%)
13	 2m	-0.45	5.34	22
14	 2n	-0.60	-6.65	94
15	 2o	-0.48	7.32	>99
16	 2p	-0.44	7.10	>99
17	 2q	-0.74	7.08	>99
18	 2r	-0.66	7.14	84

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b Not dissolved.

Table 1 Scope of primary of amine using **1** in CD₃OD. ^a (continued)

entry	amine 2	$\Delta\delta\text{CF}_3$ ($\delta\mathbf{1}$ - $\delta\mathbf{3}$)	$\Delta\delta\text{F}$ ($\delta\mathbf{1}$ - $\delta\mathbf{3}$)	yield (%)
19	 2s	-0.96	6.49	>99
20	 2t	-0.51	7.26	>99
21	 2u	-	-	n.d.
22	 2v	-	-	n.d.
23	 2w	-	-	n.d.

^a Reaction Conditions: Amine **2** was treated with **1** (3.0 eq.) in CD₃OD at room temperature for 6 h. The reaction mixture was analyzed by NMR. ^b Not dissolved.

4.2.3.2. 二次元プロットによる評価

先の検討より得られた化学シフト値の差である $\Delta\delta F$, $\Delta\delta CF_3$ 値を用い二次元プロットを展開することとした。即ち、横軸に $\Delta\delta F$ の絶対値、縦軸に $\Delta\delta CF_3$ の絶対値として各データをプロットした (Figure 1)。

その結果、 $\Delta\delta F$ 値によって、アルキルアミン類、フェニルエチルアミン類およびベンジルアミン類、アニリン類の種類によりまとまりを示すことがわかる。一方で $\Delta\delta CF_3$ 値は、アルキルアミン類の立体的な嵩高さや鎖長の違いにより大きくなる傾向が明らかとなった。またベンジルアミン類においても立体的な嵩高さにより違いが確認された。

これらの結果から、二次元的に解析する本戦略はアミン類の構造情報を有効に反映した一斉分析手法になりうることが示された。

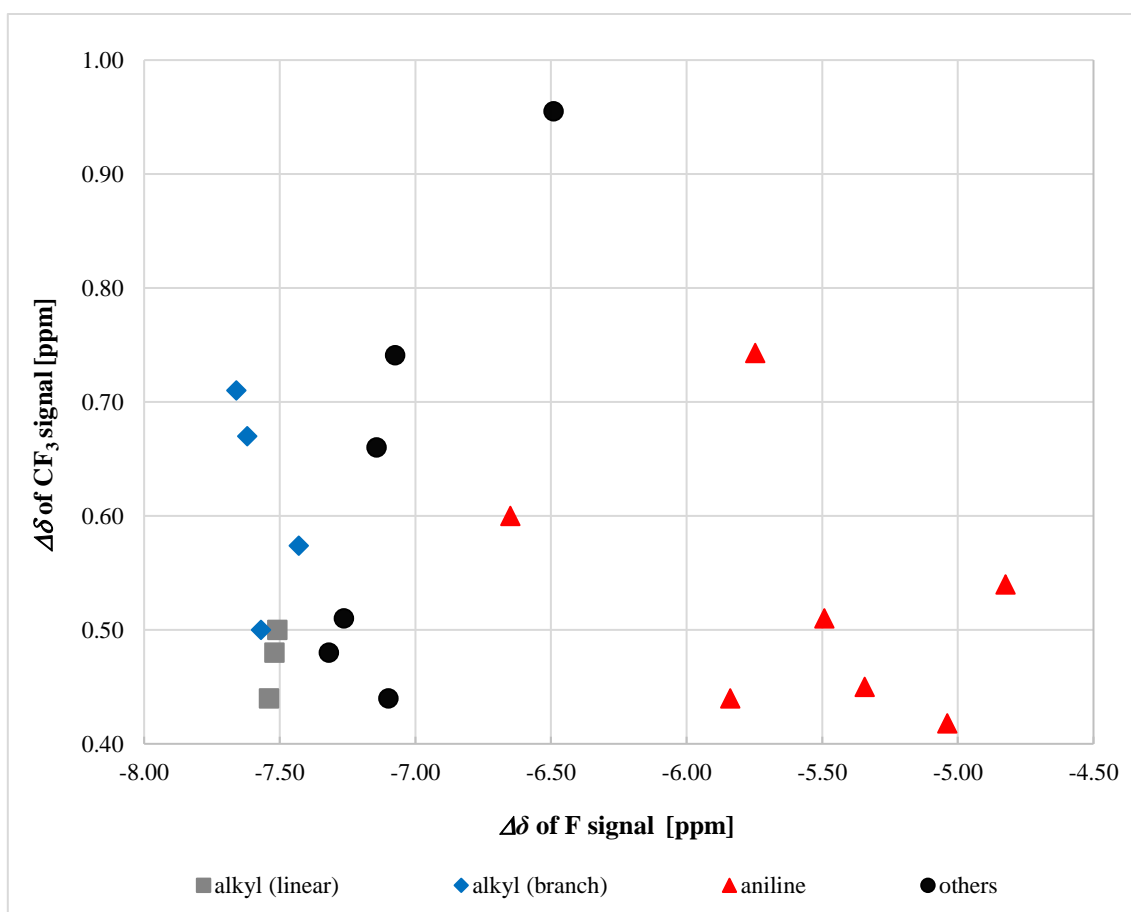
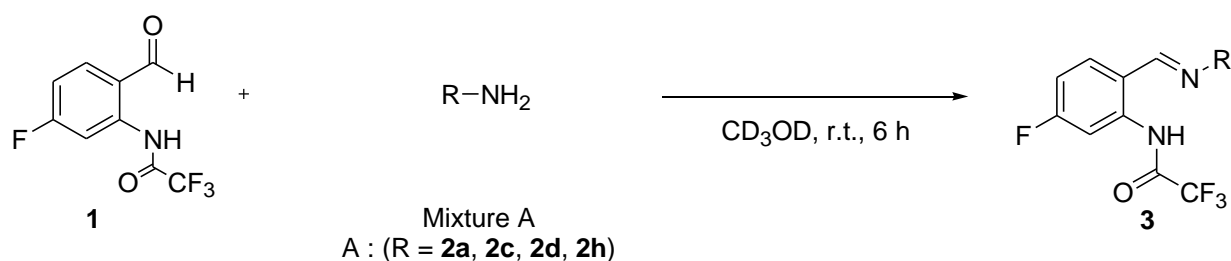


Figure 1 Discrimination of various amines by 2D plot of ^{19}F NMR shifts.

4.2.3.3. 一斉分析への応用

上述の結果から、本プローブの識別能力が非常に高いと考え、識別が困難であった脂肪族アミン類の一斉分析について検討した (Scheme 4). 即ち, *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)および cyclohexylamine (**2h**)の混合物と *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を CD₃OD 中で6時間攪拌し, ¹⁹F-NMR により分析した (Figure 2, 3).

その結果, F-領域においては3種の新たなシグナルが確認され, 各アミン類での結果と比較すると, *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)のシグナルに重なりが生じていることがわかる. 一方で, CF₃-領域においては, 4種のシグナルが確認され, *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)および cyclohexylamine (**2h**)を同定することが可能となった.



Scheme 4 Derivatization of **1** to Mixture A.

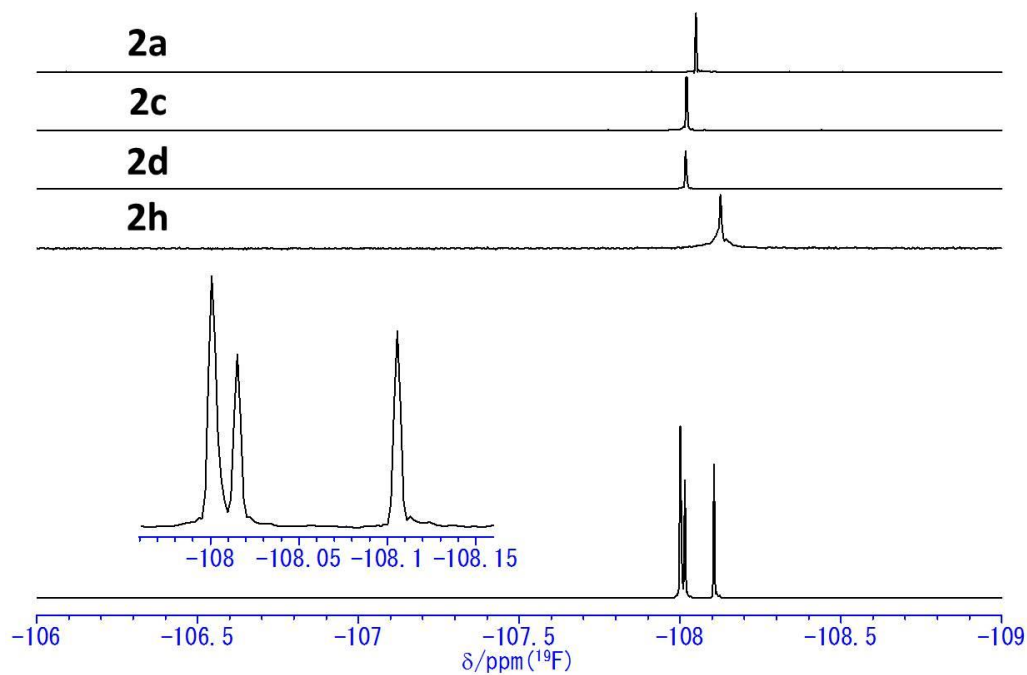


Figure 2 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of **2a**, **2c**, **2d** and **2h** with aldehyde **1** (F-region).

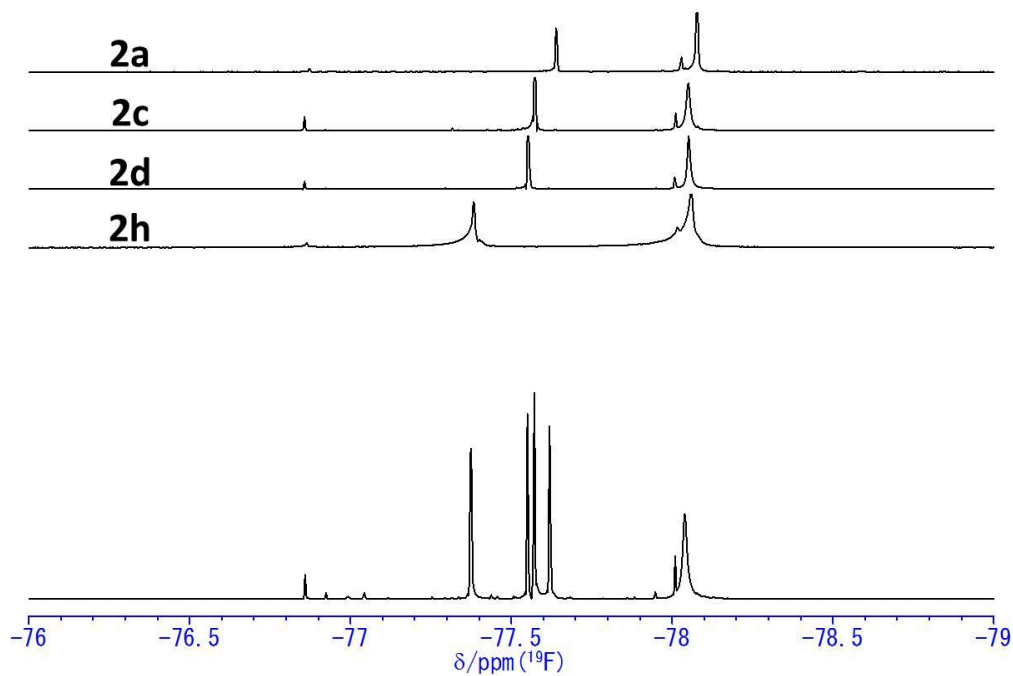


Figure 3 ^{19}F -NMR spectra of reaction mixture of **2a**, **2c**, **2d** and **2h** with aldehyde **1** (CF_3 -region).

4.3. まとめ

本章では, 第一級アミンの ^{19}F -NMR による一斉分析への新たな戦略として二種の異なる化学シフト領域を用いた二次元的な解析アプローチを提案した. その解析に際して, 二次元情報を与える役割を担うプローブ分子 *N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**)を合成した. また, 本プローブを用い, 種々の第一級アミン類での ^{19}F -NMR 分析を行うことで二次元解析プロットの作製が可能となり, 第一級アミン類の種類だけでなく, アルキルアミン類の立体的嵩高さや鎖長の違いなどの詳細な情報を認識し判別を可能とした. さらに, 本プローブを用いることでこれまで困難であった脂肪族アミン類 *n*-butylamine (**2a**), *n*-hexylamine (**2c**), *n*-octylamine (**2d**)および cyclohexylamine (**2h**)の ^{19}F -NMR による一斉定性分析に成功した.

4.4. 実験方法

4.4.1. 分析機器

(a) フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR)

Bruker 社製 AVANCE- III-HD 型 (400 MHz)

(b) 高分解能質量分析装置 (FAB-HRMS)

JEOL 社製 JMS-700 Mstation

4.4.2. General method

溶媒及び試薬は, それぞれ東京化成工業, 和光純薬工業, ナカライテスク, Aldrich から購入し, 特に精製せずにそのまま使用した. シリカゲルカラムクロマトグラフィーは, 300 mesh のシリカゲル (Wakogel C-300 Silicagel)を用いて行った. TLC は, シリカゲル 60 F₂₅₄ をガラスシートの上にプレコートしたものを Merck 社から購入し, そのまま使用した. ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR スペクトルは, それぞれ 400 MHz, 100 MHz, 376 MHz で測定した. 測定用の重溶媒として CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_3OD , toluene- d_8 , CD_2Cl_2 を使用し, 化学シフト値 δ は CDCl_3 では TMS (δ 0.0 ppm for ^1H), CDCl_3 (δ 77.0 ppm for ^{13}C), DMSO-d_6 では TMS (δ 0.0 ppm for ^1H), CD_3OD では CH_3OH (δ 3.31 ppm for ^1H), toluene- d_8 では TMS (δ 0.0 ppm for ^1H), CD_2Cl_2 では CH_2Cl_2 (δ 5.3 ppm for ^1H)を基準とし, その相対値で決定した. また, ^{19}F -NMR の測定は, 第一章と同様の手法で行った. 質量分析は, *m*-NBA をマトリックスとして, PEG200, PEG400, ウルトラマーク 1621 を質量校正物質として使用し FAB-HRMS により測定した. エナンチオマー過剰率は HPLC により決定した.

4.4.3. *N*-(5-Fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1)の合成

4.4.3.1. 2-Amino-4-fluorobenzylalcohol の合成³⁾

アルゴン雰囲気下、三口反応容器に 2-amino-4-fluorobenzoic acid (5.0 mmol, 0.7778 g), THF (10 mL)を加え、0°C に冷やし、Lithium aluminium hydride (12.5 mmol, 0.4750 g)を少しずつ加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、0°C に冷やし、H₂O (1 mL), 10% NaOH aq. (3 mL), H₂O (1 mL)を加えた。析出した固体をセライト濾過により除去し、溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。その後シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 1 : 1)により単離精製を試み、目的物である黄色固体を得た (収率 0.5423 g, 収量 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.02 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.40 (m, 2H), 4.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.31 (brs, 2H), 1.48 (t, J = 5.6 Hz, 1H) ppm.

4.4.3.2. *N*-[5-Fluoro-2-(hydroxymethyl)phenyl]trifluoroacetamide の合成

アルゴン雰囲気下、シュレンク管に 2-amino-4-fluorobenzylalcohol (4.0 mmol, 0.5644 g), Et₂O (4 mL)を加え、0°C に冷やししながら、trifluoroacetic anhydride (12.0 mmol, 1.68 mL)をゆっくり添加し、攪拌した。10 分後 TLC により原料の消失を確認し、飽和 NaHCO₃ aq. による洗浄後、Na₂SO₄により脱水し、濾過した。溶媒を減圧留去した後、真空乾燥し、得られた黄色液体に MeOH (5 mL), trimethylamine (1 mL)を加え、1 時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、EtOAc に再度溶解させ、1M HCl aq., 飽和 NaHCO₃ aq.による洗浄後、Na₂SO₄により脱水し、濾過した。溶媒を減圧留去した後、真空乾燥し、目的物である黄色液体を得た (収量 0.7207 g, 収率 76%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.08 (brs, 1H), 8.05 (dd, J = 10.8, 2.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.4, 6.0 Hz, 1H), 6.87 (ddd, J = 8.0, 8.0, 2.4 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.13 (t, J = 5.2 Hz, 1H) ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -76.19 (3F), -110.18 (1F) ppm.

4.4.3.3. *N*-(5-Fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (1)の合成

アルゴン雰囲気下, 三つ口反応容器に *N*-[5-fluoro-2-(hydroxymethyl)phenyl]trifluoroacetamide⁴⁾ (1.0 mmol, 0.2371 g), Dess-Martin periodinane (DMP) (1.5 mmol, 0.6362 g), CH₂Cl₂ (15 mL)を加え, 室温で 30 分攪拌した. その後, Na₂S₂O₆ (4.5 mmol, 0.7115 g)を加え, クエンチし, 飽和 NaHCO₃ aq. により洗浄し, CH₂Cl₂ で抽出した後, 溶媒を減圧留去し, 真空乾燥した. その後シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 5 : 1)により単離精製を試み, 目的物である黄色固体を得た (収量 0.1879 g, 収率 80%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 12.39 (brs, 1H), 9.93 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 10.8, 2.4 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.8, 6.0 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 8.0, 8.0, 2.4 Hz, 1H) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 194.11, 167.10 (d, *J*_{CF} = 257.5 Hz), 156.04 (d, *J*_{CF} = 38.6 Hz), 140.54 (d, *J*_{CF} = 12.9 Hz), 138.48 (d, *J*_{CF} = 11.5 Hz), 119.40 (d, *J*_{CF} = 2.7 Hz), 115.34 (d, *J*_{CF} = 286.7 Hz), 112.61 (d, *J*_{CF} = 22.6 Hz), 108.49 (d, *J*_{CF} = 28.7 Hz) ppm. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -76.21 (3F), -95.98 (1F) ppm. HRMS: calcd. for C₉H₆F₄O₂N ([M+H]⁺) 236.0334; found 236.0329.

4.4.4. 各第一級アミン類における化学シフト変化の検討

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、*N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**) (0.03 mmol, 0.0100 g) と第一級アミン類 **2a-w** (0.01 mmol)を室温で 6 時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

imine **3a** ¹H-NMR : $\delta = 8.47$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -77.63$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -108.04$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3b** ¹H-NMR : $\delta = 8.48$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -79.09$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -109.56$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3c** ¹⁹F-NMR : $\delta = -79.06$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -109.65$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3d** ¹H-NMR : $\delta = 8.49$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -78.83$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -109.92$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3e** ¹H-NMR : $\delta = 8.45$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -77.50$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -107.95$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3f** ¹H-NMR : $\delta = 8.52$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -77.39$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -108.13$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine **3g** ¹H-NMR : $\delta = 8.84$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 ¹⁹F-NMR : $\delta = -79.13$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -107.88$ ppm (s, 1F, Ar-F).

- imine **3h** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.45$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -79.11$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -109.56$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3i** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.84$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -77.64$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -105.57$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3j** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.79$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -79.20$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -107.43$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3k** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.59$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -77.33$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -106.26$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3l** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.45$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -78.07$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -106.00$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3m** $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -79.01$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -108.69$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3n** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 8.85$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -79.62$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -106.92$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3o** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 9.74$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -78.92$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -109.49$ ppm (s, 1F, Ar-F).
- imine **3p** $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 9.72$ ppm (s, 1H, -N=CH).
 $^{19}\text{F-NMR}$: $\delta = -77.59$ ppm (s, 3F, -CO-CF₃).
 $\delta = -107.84$ ppm (s, 1F, Ar-F).

imine 3q	¹ H-NMR : $\delta = 8.58$ ppm (s, 1H, -N=CH). ¹⁹ F-NMR : $\delta = -77.30$ ppm (s, 3F, -CO-CF ₃). $\delta = -107.62$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3r	¹ H-NMR : $\delta = 8.62$ ppm (s, 1H, -N=CH). ¹⁹ F-NMR : $\delta = -79.20$ ppm (s, 3F, -CO-CF ₃). $\delta = -109.20$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3s	¹ H-NMR : $\delta = 8.70$ ppm (s, 1H, -N=CH). ¹⁹ F-NMR : $\delta = -78.65$ ppm (s, 3F, -CO-CF ₃). $\delta = -115.18$ ppm (s, 1F, Ar-F).
imine 3t	¹⁹ F-NMR : $\delta = -77.55$ ppm (s, 3F, -CO-CF ₃). $\delta = -107.79$ ppm (s, 1F, Ar-F).

4.5. 一斉分析への応用

テストチューブで、CD₃OD (1.0 mL)中、*N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide (**1**) (0.03 mmol, 0.0100 g)と Mixture A [**2a**, **2c**, **2d**, **2h** (0.01 mmol)]を室温で6時間攪拌した後、その混合溶液を ¹H および ¹⁹F-NMR により分析した。

4.6. 参考文献

1. J. Axthelm, H. Görls, U. S. Schubert, A. Schiller, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15402.
2. 池田茉佑, 同志社大学卒業論文, **2017**.
3. G. Zhan, M. L. Shi, Q. He, W. Du, Y. C. Chen, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4750.
4. Y. Q. Xie, Z. L. Huang, H. D. Yan, J. Li, L. Y. Ye, L. M. Che, S. Tu, *Chem Biol Drug Des* **2015**, *85*, 743.

総括

本研究において、著者は含フッ素ベンズアルデヒド類を用いた ^{19}F -NMR による生体アミンおよびアミノ酸のキラルおよび一斉分析手法の開発に向け、検討した。以下、各章を総括する。

第一章

^{19}F -NMR の幅広い化学シフト幅と分離能の良さおよび誘導体化した目的物のみのシンプルなシグナルが得られる利点を生かし、アミノ酸誘導体の一斉光学純度の決定に成功した。本手法のフッ素誘導体化試薬としては 5-fluoro-2-formylphenylboronic acid がより良い反応性を示し、かつよいジアステレオマーの ^{19}F -NMR シフトを誘発した。さらに、triethylamine を添加物として加えることでさらなる反応性を促進させ定量的に目的生成物への誘導体化が行える。本手法により、速度論的分割反応を起こすことなく、13 種のアミノ酸誘導体塩に対し誘導体化が可能となり、定量的な光学純度の決定が達成された。さらに ^{19}F -NMR の特徴を最大限に生かし、 ^{19}F -NMR による 3 種のアミノ酸誘導体の同時光学純度決定手法を初めて実現した。本手法は新たな第一級アミン類のキラル分析手法として非常に有効であり、新たなアミノ酸のキラル一斉分析手法の開発への土台となると期待する。

第二章

第一章で得られた知見をもとに、イミン形成によるフッ素の導入に基づいた ^{19}F -NMR による一斉分析手法を提案し、生体アミンの定性分析および定量分析に成功した。本手法に用いるフッ素誘導体化試薬としては、4-fluoro-2-hydroxybenzaldehyde がより良い反応性および生成する誘導体の ^{19}F -NMR での分離能を高めた。また、本手法を用いることで 6 種の第一級アミン類の定性分析を達成した。さらに、triethylamine を添加することで、酸性官能基を有する GABA や taurine への適用が可能となり、この 2 種を含む 6 種の生体アミンを一度に定性することに成功し、 ^{19}F -NMR による新たな定性手法を確立した。定量分析としては、予め分析対象化合物の検量線を作製しておくことで、6 種の生体アミン混合条件において、1 種の生体アミン濃度を相対誤差 10% 以下で決定することを実現した。本手法は金属錯体を用いない低コストな分析手法であるとともに、分離を必要とせず簡便な操作での定性分析手法である。また、これまでにない新たな一斉定量分析手法への足掛かりとなると確信している。

第三章

第二章で確立した手法を改善し、アミノ酸においてもイミン形成によるフッ素の導入が可能となり、アミノ酸の定性分析および飲料、食品での定性分析に成功した。本手法では、誘導体化反応溶媒を $\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaHCO}_3\cdot\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 10.0) とすることで定量的に誘導体化は進行することを見出した。さらに、cysteine, asparagine, arginine, putrescine および taurine では特徴的な化学シフト値を与えることを明らかにした。本手法では飲料、食品中の他の成分に反応が阻害されることなく簡便に誘導体化が可

能であり，標品添加サンプルと比較することで定性分析が達成された．また，同様の化学シフト値を示すアミノ酸類においても，CsCl を添加することで分離が可能となり，上述と同様の操作をすることで4種のアミノ酸の定性を実現した．この知見が，新たなアミノ酸一斉分析手法の開発の一助となることを期待する．

第四章

第二章，第三章の知見から，これまで例のない二種の異なる化学シフト領域を用いた二次元的な解析アプローチを提案し，一斉分析が困難であった脂肪族アミンの一斉定性分析を達成した．本手法で用いる二つの含フッ素基をもつプローブ分子として，*N*-(5-fluoro-2-formylphenyl)trifluoroacetamide を設計し，その合成に成功した．このプローブ分子を用いることで，¹⁹F-NMR シフトから新たな二次元解析プロットの作製を可能とし，第一級アミン類の詳細な構造的情報が抽出できることを見出した．また，これまで一斉分析が困難であった *n*-butylamine, *n*-hexylamine, *n*-octylamine および cyclohexylamine の4種のアルキルアミン類の一斉定性分析に成功した．本手法の戦略は，NMR 分析からの情報抽出法に新たな一歩を踏み出す画期的な戦略であり，NMR 分析の価値をさらに高めるものであると確信している．

以上，様々な機能をもつ含フッ素ベンズアルデヒド類を用いることで¹⁹F-NMR による生体アミンおよびアミノ酸のキラル分析および一斉分析手法が確立された．本研究成果は，生体アミンおよびアミノ酸を中心とした幅広い研究分野の更なる発展に繋がるものであると確信している．

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導御鞭撻を賜りました太田 哲男教授に深謝いたします。学部四回生時から現在に至るまで、極めて自由な研究環境を提供して頂きながらも温かく見守って下さったおかげで、研究者として大きく成長できたと実感しております。

学部生時から現在に至るまで、始終御指導御鞭撻を賜りました大江 洋平准教授に深謝いたします。研究者としての在り方から、人としての在り方までさまざまなご指導を頂いたおかげで、研究者としての今の自分があると痛感しております。

HRMS 分析による化合物の同定において、始終御世話になりました大岡 孝治修士に厚く御礼申し上げます。

様々な場面において、多数の御助言頂き、公私共に御世話になりました井上 善一大先生に厚く御礼申し上げます。

活発な討論、及び数々の貴重な助言等、様々な協力を頂いた、中村祐士博士に感謝いたします。

最後に、研究生活を陰ながら支え、また、研究者の道に進むことを理解し応援し続けてくれた両親に心から感謝致します。