

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 128731

(P2002 - 128731A)

(43)公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 C 59/66		C 0 7 C 59/66	4 C 0 6 9
59/13		59/13	4 H 0 0 6
69/712		69/712	Z
C 0 7 D207/46		C 0 7 D207/46	
// G 0 1 N 33/535		G 0 1 N 33/535	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 11数)			

(21)出願番号 特願2000 - 325513(P2000 - 325513)

(22)出願日 平成12年10月25日(2000.10.25)

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 丹羽 敏博

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(72)発明者 小林 久子

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(74)代理人 100098431

弁理士 山中 郁生 (外3名)

Fターム(参考) 4C069 AC30 AC36 BC06 CC13

4H006 AA01 AB81 BP30 BS10

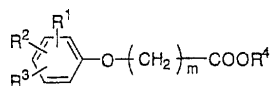
(54)【発明の名称】 フェノキシ化合物

(57)【要約】

【課題】 従来の煩雑なP C Bの測定法に替わる迅速且つ簡便、低コストのP C Bの酵素免疫測定法に用いられる化合物の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】

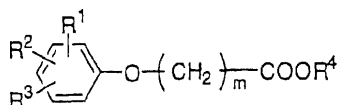


(式中、R¹は、塩素原子またはフェニル基、R²およびR³は、水素原子または塩素原子、R⁴は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、mは、5ないし7の整数である。)で表されるフェノキシ化合物は、B S Aなどと結合させて、P C Bを測定する際の酵素免疫測定試薬として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



で表されるフェノキシ化合物（式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子、 R^4 は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 m は、5ないし7の整数である。）。

【請求項2】 R^4 が水素原子である請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 R^4 がアルキル基である請求項1に記載の化合物。

【請求項4】 アルキル基が低級アルキル基である請求項3に記載の化合物。

【請求項5】 R^4 がスクシンイミジル基である請求項1に記載の化合物。

【請求項6】 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項7】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子である請求項1に記載の化合物。

【請求項8】 R^1 がフェニル基であり、 R^2 および R^3 が水素原子である請求項1に記載の化合物。

【請求項9】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子、 R^4 が水素原子であり、 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項10】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子、 R^4 がアルキル基であり、 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項11】 アルキル基が低級アルキル基である請求項10に記載の化合物。

【請求項12】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子、 R^4 がスクシンイミジル基であり、 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項13】 R^1 がフェニル基、 R^2 および R^3 が水素原子、 R^4 が水素原子、 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項14】 R^1 がフェニル基、 R^2 および R^3 が水素原子、 R^4 がアルキル基、 m が5である請求項1に記載の化合物。

【請求項15】 アルキル基が低級アルキル基である請求項14の化合物。

【請求項16】 R^1 がフェニル基、 R^2 および R^3 が水素原子、 R^4 がスクシンイミジル基、 m が5である請求項1に記載の化合物。

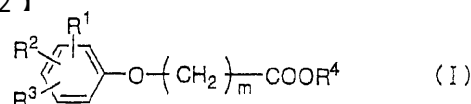
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【0002】

【化2】



【0003】（式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子、 R^4 は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 m は、5ないし7の整数である。）で表されるフェノキシ化合物であり、PCBを酵素免疫測定法で測定する際の試薬として使用できる。

【0004】

【従来の技術】フェノキシ化合物は、新規な化合物であり、かつ、この化合物を測定するための試薬として有用である、ということは全く知られていなかった。

【0005】従来、PCBは、ガスクロマトグラフィーとマススペクトロメトリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は酵素免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、酵素免疫測定法でなしえなかったPCBの測定に有用な試薬を提供することが課題である。

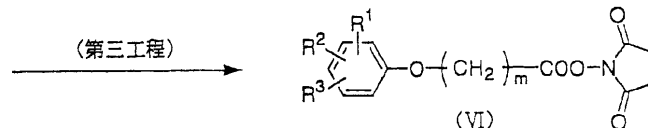
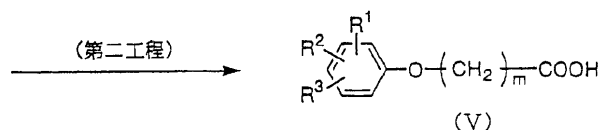
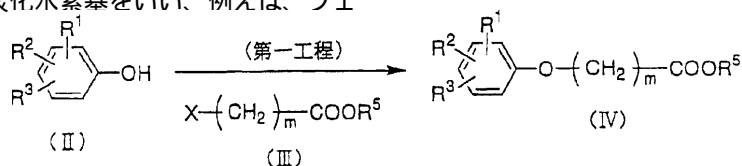
【0007】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（I）で表されるフェノキシ化合物を見出した。本発明の前記一般式（I）で表されるフェノキシ化合物は、PCBを酵素免疫測定法により広汎に測定できる化合物である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明するにあたって、「アルキル基」としては、炭素原子数1～12の直鎖状、分枝鎖状または環状のアルキル基のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、1-メチルエチル基、シクロプロピル基、 n -ブチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメチルエチル基、シクロブチル基、 n -ペンチル基、3-メチルブチル基、シクロペンチル基、2,2-ジメチルプロピル基、1-メチルシクロブチル基、シクロブチルメチル基、 n -ヘキシル基、4-メチルペンチル基、シクロヘキシル基、1-メチルシクロペンチル基、シクロペンチルメチル基、（1-メチルシクロブチル）メチル基、 n -ヘプチル基、5-メチルヘキシル基、4,4-ジメチルペンチル基、シクロヘプチル基、シクロヘキシルメチル基、（1-メチルシクロペンチル）メチル基、 n -オクチル基、6-メチルヘプチル基、5,5-ジメチルヘキシル基、（1-メチルシクロ

ヘキシル)メチル基、*n*-ノニル基、7-メチルオクチル基、6,6-ジメチルヘプチル基、*n*-デシル基、8-メチルノニル基、7,7-ジメチルオクチル基、*n*-インデカシル基、9-メチルデシル基、8,8-ジメチルノニル基、*n*-ドデカシル基、10-メチルウンデカシル基、9,9-ジメチルデカシル基等を挙げることできる。また、「低級アルキル基」としては、前記アルキル基のうち、炭素原子数1~6の直鎖状、分枝鎖状又は環状のアルキル基を挙げるることができる。

【0009】「アリール基」としては、単環式または多環式であり、さらに環上に1個以上の種々の置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基をいい、例えば、フェ*



【0012】(式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子、 R^5 は、アルキル基またはアリール基、 m は、5ないし7の整数である。Xは、ハロゲン原子である。)

(第一工程)本工程は、前記一般式(IV)で表わされるエステル誘導体を、一般式(II)で表される置換フェノールと一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

【0013】前記一般式(II)で表される置換フェノールとしては、たとえば、モノクロロフェノール、ジクロロフェノール、トリクロロフェノール、フェニルフェノール等を挙げるることができる。また、一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとしては、たとえば、6-ブロモヘキサン酸エチル、6-ブロモヘキサン酸メチル、6-ブロモヘキサン酸*t*-ブチル、7-ブロモヘプタン酸エチル、7-ブロモヘプタン酸メチル、7-ブロモヘプタン酸*t*-ブチル、8-ブロモオクタン酸エチル、8-ブロモオクタン酸メチル、8-ブロモオクタン酸*t*-ブチル、6-クロロヘキサン酸エチル、6-クロロヘキサン酸メチル、6-クロロヘキサン酸*t*-ブチル、7-クロロヘプタン酸エチル、7-クロロヘプタン

*ニル、メチルフェニル、ジメチルフェニル、メトキシフェニル、ジメトキシフェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、クロロフェニル、ジクロロフェニル、ブロモフェニル、ジブロモフェニル、ヨードフェニル、フルオロフェニル、トリフルオロメチルフェニル、アミノフェニル、ヒドロキシフェニル、メルカプトフェニル、-ナフチル、-ナフチル基等を挙げるることができる。【0010】本発明の前記一般式(I)で表されるフェノキシ化合物は以下の式に従い製造することができる。

【0011】
【化3】

酸メチル、7-クロロヘプタン酸*t*-ブチル、8-クロロオクタン酸エチル、8-クロロオクタン酸メチル、8-クロロオクタン酸*t*-ブチルなどを使用することができる。

【0014】本工程は、塩基の存在下に行うものである。使用できる塩基としては、たとえば、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウム*t*-ブトキシド、カリウム*t*-ブトキシドなどのアルカリ金属アルコキシド、ジエトキシマグネシウムなどのアルカリ土類金属アルコキシド、水素化リチウム、水素化ナトリウム、水素化カリウムなどのアルカリ金属水素化合物、水素化カルシウムなどのアルカリ土類金属水素化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩等を挙げるることができる。

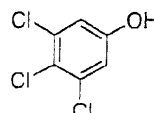
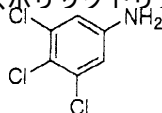
【0015】反応は、不活性溶媒中で行うことが望ましく、たとえばテトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリドン等のアミド類を挙げるることができる。反応温度は、-20~40℃で実施することができる。

(第二工程)本工程は、一般式(IV)で表わされる化合物に対し、塩基性条件下、酸性条件下または中性条件下

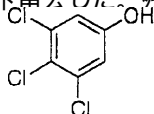
において加水分解を行い、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体を製造する工程である。

【0016】塩基性条件下で用いる試薬としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水素化合物、水酸化カルシウム、水酸化バリウムなどのアルカリ土類金属水素化合物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムt-ブトキシド、カリウムt-ブトキシドなどのアルカリ金属アルコキシド、トリエチルアミン、イミダゾール、アミジン、DBU (1,5-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-5-エン)、DBN (1,5-ジアザビシクロ[4,3,0]ノナ-5-エン)などの有機塩等を挙げることができる。塩基性条件下で用いる溶媒としては、エタノール、メタノール、エチレングリコール等のアルコール類、水、ジメチルスルホキシド等を挙げることができる。

【0017】また、酸性条件下で用いる試薬としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、燐酸などの鉱酸、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸、三臭化ホウ素、三塩化ホウ素などのルイス酸、陽イオン交換樹脂等を挙げることができ、中性条件下で用いる試薬としては、ヨウ化リチウム、臭化リチウム、シアン化ナトリウム、チオール類のアルカリ塩等を挙げることができる。酸性または中性条件下で用いる試薬としては、ピリジン、ルチジン、コリジン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリクトリアミドなどの*



【0022】0 で、3,4,5-トリクロロアニリン 1.00 g (5.6 mmol) を無水エタノール 100 ml に溶解し、42%フルオロホウ素酸 3.16 ml (15.1 mmol)、亜硝酸イソアミル 0.92 g (7.8 mmol) を加え、30分撹拌した。次いで、この溶液を 300 ml のエーテルに注ぎ、析出した結晶を集めた。得られた結晶に 300 ml の水を加え、硝酸銅(II)三水合物 100 g、酸化銅(I) 1.29 g を加え室温で 18 時間撹拌した。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲル



*アミド類、ジメチルスルホキシド、アルコール類、アセトン、水等を挙げることができる。反応温度は、20 から加熱還流することにより実施できる。

(第三工程)本工程は、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体に対し縮合剤の存在下、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させ一般式(VI)で表わされるスクシンイミジル誘導体を製造する工程である。

【0018】この工程で使用する縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩、ジソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾリル-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩、ジフェニルホスホリルアジド等を挙げることができる。反応は、不活性溶媒中で行うことが望ましく、たとえばジクロロメタン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアミド類等を挙げることができる。反応温度は、-10~40 で実施することができる。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細を説明をする。

【0020】参考例 1

3,4,5-トリクロロフェノールの合成

【0021】

【化 4】

クロマトグラフィ-(ヘキサン-酢酸エチル=5:1)で精製し、3,4,5-トリクロロフェノール 360 mg (収率 33.7%)を得た。

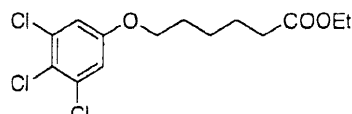
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 5.22 (bs, 1H), 6.92 (s, 2H) ppm.

実施例 1

6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0023】

【化 5】



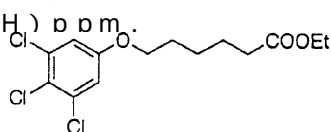
【0024】アルゴン気流下、3,4,5-トリクロロフェノール 50 mg (0.253 mmol) の無水ジメチルホルムアミド溶液 (5 ml) に 60%油性水酸化ナトリウム 11.0 mg (0.276 mmol) を加え、

室温で 15 分間撹拌した。続いて 6-ブロモヘキサン酸エチル 51 mg (0.23 mmol) を加え、室温で 18 時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素

7

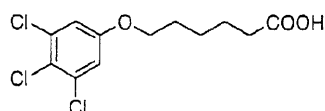
ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィ - (ヘキサン - 酢酸エチル = 20 : 1) で精製し、6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル 2.7 mg (収率 31.0%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.44 ~ 1.53 (m, 2H), 1.62 ~ 1.74 (m, 2H), 1.775 ~ 1.84 (m, 2H), 2.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.13 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 6.93 (s, 2H) ppm.



【0026】6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル 374 mg を酢酸 3 ml に溶解し、濃塩酸 1 ml を加え、2.5 時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル - ヘキサンから再結晶し標記化合物 162 mg (収率 46.8%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.47 ~ 1.56 (m, 2H), 1.67 ~ 1.76 (m, 2H), 1.76 ~ 1.85 (m, 2H), 2.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 6.93 (s, 2H) ppm. *



【0028】6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸 100 mg (0.32 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 ml) に N - ヒドロキシスクシンイミド 41 mg (0.35 mmol) 塩酸 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 68 mg (0.35 mmol) を加え、室温で 22 時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル - ヘキサンから再結晶し N - スクシンイミジル - 6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート 111 mg (収率 84.4%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.55 ~ 1.63 (m, 2H), 1.78 ~ 1.87 (m, 4H), 2.65 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.50

8

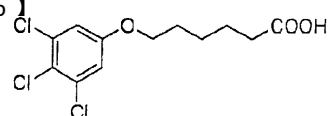
*IR (liquid film): 2944, 1738, 1588, 1440, 1292, 1250, 1144 cm^{-1}
 Mass (m/z, %): 342 ($\text{M}^+ + 4$, 5), 340 ($\text{M}^+ + 2$, 16), 338 (M^+ , 16), 200 (7), 198 (22), 196 (24), 143 (100), 115 (31), 97 (59), 69 (57).

実施例 2

6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0025】

【化6】



*mp: 87.0 ~ 88.0

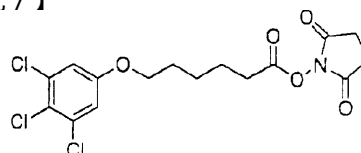
IR (KBr): 3085, 2950, 1712, 1585, 1555, 1440, 1254, 1145 cm^{-1}
 Mass (m/z, %): 314 ($\text{M}^+ + 4$, 10), 312 ($\text{M}^+ + 2$, 32), 310 (M^+ , 33), 200 (30), 198 (97), 196 (100), 115 (86), 97 (59), 69 (61).

実施例 3

N - スクシンイミジル - 6 - (3, 4, 5 - トリクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0027】

【化7】



84 (bs, 4H), 3.93 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 6.94 (s, 2H) ppm.

mp: 88.0 ~ 89.0

IR (KBr): 2947, 1811, 1787, 1749, 1583, 1555, 1213, 1079 cm^{-1}
 Mass (m/z, %): 411 ($\text{M}^+ + 4$, 13), 409 ($\text{M}^+ + 2$, 39), 407 (M^+ , 40), 297 (9), 285 (27), 293 (27), 200 (9), 198 (27), 196 (28), 97 (100), 69 (90).

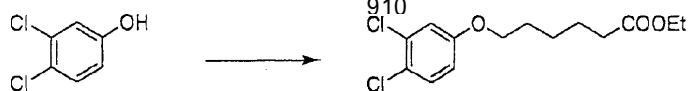
実施例 4

6 - (3, 4 - ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0029】

【化8】

(6)



【0030】アルゴン気流下、3,4-ジクロロフェノール500mg(3.07mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム455mg(3.3mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル382 μ l(2.15mmol)を加え、室温で19時間撹拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィ-(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3,4-ジ

*3Hz, 2H), 3.92(t, J=6.4Hz, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 2H), 6.74(dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.97(d, J=2.9Hz, 1H), 7.30(d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

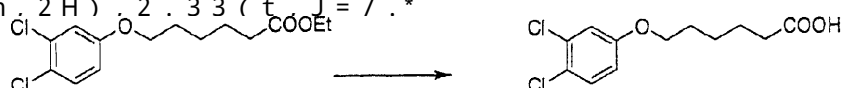
IR(liquid film): 2948, 1738, 1596, 1472, 1232, 1164 cm^{-1}
Mass(m/z, %): 306($M^+ + 2$, 15), 304(M^+ , 23), 164(29), 162(46), 143(100), 115(29), 97(56), 69(49).

実施例5

6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

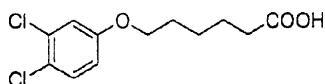
【0031】

【化9】



【0032】6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル2136mg(7.0mmol)を酢酸3mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、5時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、精製水、ヘキサンにて洗浄後減圧下乾燥し、6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1807mg(収率93.2%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.48~1.57(m, 2H), 1.67~1.76(m, 2H), 1.76~1.84(m, 2H), 2.40(t, J=7.4Hz, 2H), 3.93(t, J=6.3Hz, 2H), 6.74(dd, J=8.9 and 2.9Hz, 1H), 6.97(d, J=2.9Hz, 1H), 7.30(d, J=8.9Hz, 1H) *



20* ppm.

mp: 128.0~129.0

IR(KBr): 3100, 2952, 1716, 1594, 1472, 1284, 1252, 1124, 1050 cm^{-1}

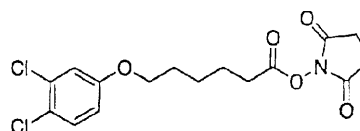
Mass(m/z, %): 278($M^+ + 2$, 16), 276(M^+ , 24), 164(64), 162(100), 115(61), 97(49), 69(50).

実施例6

N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0033】

【化10】



【0034】6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸800mg(2.89mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド365mg(3.17mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド608mg(3.17mmol)を加え、室温で24時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶

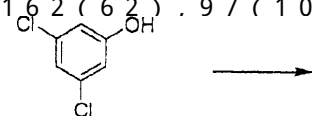
しN-スクシンイミジル-6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエート1048mg(収率97.0%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.57~1.64(m, 2H), 1.78~1.87(m, 4H), 2.65(t, J=7.3Hz, 2H), 2.85(bs, 4H), 3.94(t, J=6.3Hz, 2H), 6.74(dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.98(d, J=2.9Hz, 1H), 7.30(d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

11

12

mp: 96.0 ~ 96.5

IR (KBr): 2940, 1810, 1740, 1602, 1486, 1238, 1212, 1084 cm⁻¹Mass (m/z, %): 375 (M⁺ + 2, 37), 373 (M⁺, 56), 261 (21), 259 (33), 164 (40), 162 (62), 97 (100) *

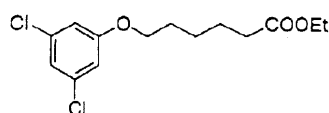
* 0), 69 (84).

実施例7

6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

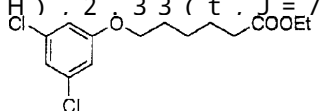
【0035】

【化11】



【0036】アルゴン気流下、3,5-ジクロロフェノール500mg (3.07mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム455mg (3.3mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル382μl (2.15mmol)を加え、室温で21時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィ-(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル591mg (収率90.1%)を得た。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.43~1.53 (m, 2H), 1.65~1.75 (m, 2H), 1.75~1.83 (m, 2H), 2.033 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.92 (t, J=6.4Hz, 2H), 4.13 (q, J=7.1Hz, 2H), 6.77 (d, J=1.8Hz, 2H), 6.93 (t, J=1.8Hz, 1H) ppm.



IR (liquid film): 2948, 1736, 1590, 1572, 1448, 1262, 1034 cm⁻¹

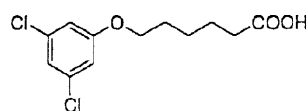
Mass (m/z, %): 306 (M⁺ + 2, 10), 304 (M⁺, 16), 164 (16), 162 (23), 143 (100), 115 (32), 97 (65), 69 (66).

実施例8

6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

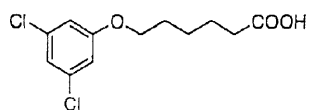
【0037】

【化12】



【0038】6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル2136mg (7.0mmol)を酢酸3mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、5時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、精製水、ヘキサンにて洗浄後減圧下乾燥し、6-(3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1933mg (収率99.6%)を得た。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 1.47~1.56 (m, 2H), 1.67~1.76 (m, 2H), 1.76~1.84 (m, 2H), 2.40 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.93 (t, J=6.3Hz, 2H), 6.78 (d, J=1.8Hz, 2H), 6.94 (t, J=1.8Hz, 1H) ppm.



mp: 57.0 ~ 58.5

IR (KBr): 3096, 2960, 1704, 1588, 1468, 1260, 1204, 1090, 1046 cm⁻¹

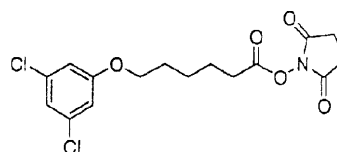
Mass (m/z, %): 278 (M⁺ + 2, 14), 276 (M⁺, 22), 164 (48), 162 (76), 143 (100), 115 (79), 97 (92), 69 (89).

実施例9

N-スクシンイミジル-6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

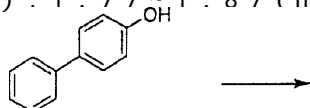
【0039】

【化13】



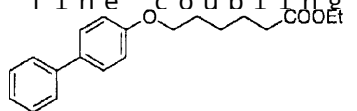
【0040】6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノ酸800mg(2.89mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド365mg(3.17mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド608mg(3.17mmol)を加え、室温で24時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶しN-スクシンイミジル-6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエート911mg(収率84.4%)を得た。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.55~1.64(m, 2H), 1.77~1.87(m, *



【0042】4-フェニルフェノ-ル851mg(5.0mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム1380mg(10.0mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル1171mg(5.25mmol)を加え、室温で3日間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エ-テル-ヘキサンから再結晶し6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチル1.06g(収率68.1%)を得た。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.26(t, J=7.1Hz, 3H), 1.48~1.57(m, 2H), 1.68~1.76(m, 2H), 1.79~1.87(m, 2H), 2.35(t, J=7.5Hz, 2H), 4.00(t, J=6.4Hz, 2H), 4.14(q, J=7.1Hz, 2H), 6.96(d with fine coupling, J=*



【0044】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチル630mg(2.0mmol)をエタノ-ル40mlに溶解し、4N水酸化ナトリウム水溶液0.8ml(3.2mmol)を加え室温で22時間撹拌した。反応終了後、溶媒を減圧下留去し、1N塩酸水溶液にて酸性とした後、クロロホルム、メタノ-ルの混合溶媒で抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル-エ-テル-ヘキサンから再結晶し6-(4-フェニルフェノキシ) 50

*4H), 2.65(t, J=7.3Hz, 2H), 2.85(bs, 4H) 3.94(t, J=6.3Hz, 2H), 6.78(d, J=1.8Hz, 2H), 6.94(t, J=1.8Hz, 1H) ppm.

IR(liquid film): 2952, 1814, 1784, 1746, 1590, 1448, 1374, 1212, 1070 cm⁻¹

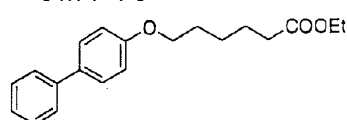
Mass(m/z, %): 375(M⁺+2, 31), 373(M⁺, 45), 261(36), 259(55), 97(100), 69(98).

実施例10

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0041】

【化14】



*8.8Hz, 2H), 7.30(t with fine coupling, J=7.4Hz, 1H), 7.42(t with fine coupling, J=7.7Hz, 2H), 7.51(d with fine coupling, J=8.8Hz, 2H), 7.55(d with fine coupling, J=8.2Hz, 2H) ppm.

mp: 53.5~54.0

IR(KBr): 2944, 1740, 1602, 1480, 1252, 1180, 1038 cm⁻¹

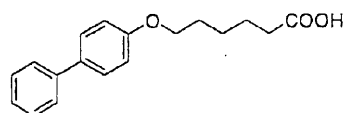
Mass(m/z, %): 312(M⁺, 75), 170(100), 143(70), 115(25), 97(22), 69(19).

実施例11

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0043】

【化15】



ヘキサン酸489mg(収率85.4%)を得た。

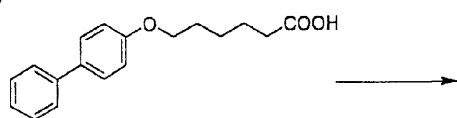
¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.52~1.61(m, 2H), 1.70~1.79(m, 2H), 1.80~1.88(m, 2H), 2.42(t, J=7.4Hz, 2H), 4.01(t, J=6.4Hz, 2H), 6.96(d with fine coupling, J=8.8Hz, 2H), 7.30(t with fine coupling, J=7.3Hz, 1H), 7.41(t with fi

15

ne coupling, $J=7.6\text{ Hz}$, 2H), 7.51 (d with fine coupling, $J=8.8\text{ Hz}$, 2H), 7.55 (d with fine coupling, $J=7.1\text{ Hz}$, 2H) ppm.

mp: 118.0 ~ 118.5

IR (KBr): 3040, 2944, 1702, 1616, 1494, 1292. 1250. 1204. 10



【0046】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸 489mg (1.72mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (15ml) に N-ヒドロキシルスクシンイミド 218mg (1.89mmol) 塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 362mg (1.89mmol) を加え、室温で2日間撹拌した。反応終了後、1N塩酸水溶液を加え、クロロホルム 20 で抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィ-(ヘキサン-酢酸エチル=3:1)で精製し、酢酸エチル-ヘキサンから再結晶し N-スクシンイミジル-6-(4-フェノキシ)ヘキサノエート 477mg (収率 72.6%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.58 ~ 1.67 (m, 2H), 1.81 ~ 1.90 (m, 4H), 2.67 (t, $J=7.4\text{ Hz}$, 2H), 2.84 (bs, 4H), 4.02 (t, $J=6.3\text{ Hz}$, 2H), 6.96 (d with fine coupling, $J=8.8\text{ Hz}$, 2H), 7.30 (t with fine coupling, $J=7.4\text{ Hz}$, 1H), 7.41 (t with fine coupling, $J=7.6\text{ Hz}$, 2H), 7.51 (d with fine coupling, $J=9.0\text{ Hz}$, 2H), 7.55 (d with fine coupling, $J=7.1\text{ Hz}$, 2H) ppm.

mp: 112.0 ~ 113.0

IR (KBr): 2948, 1814, 1782, 1730, 1612, 1488, 1386, 1252, 1202, 1066 cm^{-1}

Mass (m/z, %): 381 (M^+ , 45), 170 (100).

参考例 2

ウシ血清アルブミン (BSA) 結合 3, 4, 5-トリクロロフェノール (TCP-BSA) の合成

ウシ血清アルブミン 5.0mg を 0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 900 μl に溶解し、N-スクシン 50

16

52 cm^{-1}

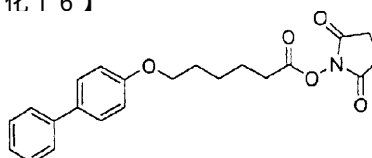
Mass (m/z, %): 284 (M^+ , 74), 170 (100).

実施例 12

N-スクシンイミジル-6-(4-フェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0045】

【化16】



イミジル-6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート 1.1mg の無水ジメチルホルムアミド溶液 100 μl を加え、室温で5時間撹拌した。その後反応液を PBS 中で透析し脱塩して、標記 TCP-BSA を得た。

【0047】参考例 3

ウシ血清アルブミン (BSA) 結合 ビフェニル (BP-BSA) の合成

BSA 5.0mg を 0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノエート 1.0mg の無水ジメチルホルムアミド溶液 100 μl を加え、室温で終夜撹拌した。その後反応液を PBS 中で透析し脱塩して、標記 BP-BSA を得た。

【0048】参考例 4

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成
カルボキシル化フェライト粒子 (日本ペイント社製) を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 5.0) にて 3回洗浄し、同緩衝液 1ml にて懸濁後、5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した参考例 3 で作成した BP-BSA 溶液 1ml を添加し 25 ~ 2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05M メス緩衝液 (pH 5.5) 1ml に懸濁し、80 mg/ml の塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (ナカライタスク社製) 水溶液を 50 μl 添加して、ローテーターで 25 ~ 30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を 2ml 添加しローテーターで 37 ~ 一晚回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を 1.5% に合わせて BP-BSA 感作粒子を得た。

【0049】また、前記 BP-BSA の代えてウシ血清アルブミン結合 PCB # 77 (PCB # 77-BSA; KRI 社製) を用いて PCB # 77-BSA 感作粒子を得た。

【0050】参考例 5

アルカリフォスファターゼ標識抗 PCB # 77 抗体の作成

抗PCB#77モノクローナル抗体(PCB77B抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP; オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#77抗体を得た。

【0051】参考例6

PCB#77(3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニル)の測定

PCB#77の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf; 富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例4で作成したBP-BSA感作粒子またはPCB#77-BSA感作粒子液各150μlにPCB#77の標準抗原液90μlとALP標識抗PCB#77抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質(AMPP*)

*D)液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0052】前記標準抗原液は、PCB#77(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解して作成した。PCB#77は0~100ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図1に示す。感作粒子について、PCB#77-BSA感作粒子とBP-BSA感作粒子とを比較したところ、BP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0053】

【表1】

表-1 PCB誘導体と代替誘導体の比較

	PCB#77測定系		PCB#126測定系		PCB#169測定系	
	BP-BSA*	PCB#77-BSA	TCP-BSA**	PCB#126-BSA	TCP-BSA	PCB#169-BSA
IC15%	1	3	0.2	0.6	0.3	1.0
IC50%	6.3	37.5	2.8	3.1	2.1	3.3

単位はng/ml
*BP:ビフェニル
**3,4,5-TCP:トリクロロフェノール

【0054】また、BP-BSA感作粒子を用いたPCB#77測定系に対するPCB#126とPCB#169の交叉反応性を確認したところ、PCB#126と16.3%の交叉反応性が認められたが、PCB#1

69との交叉反応性は認められなかった。

【0055】

【表2】

表-2 交叉反応性-1

	PCB#77測定系	PCB#126測定系	PCB#169測定系
PCB#77	-	7.1	6.3
PCB#126	16.3	-	100
PCB#169	-	<1	-

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位%)。

【0056】参考例7

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成
カルボキシル化フェライト粒子(日本ペイント社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、5~20μg/mlに調整した参考例2で作成したTCP-BSA溶液1mlを添加し25℃2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5)1mlに懸濁し、80mg/mlの塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(ナカライタスク社製)水溶液を50μl添加して、ローテーターで25℃30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37℃1晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせてTCP-BSA感作粒子を得た。

【0057】また、前記TCP-BSAに代えてウシ血清アルブミン結合PCB#126(PCB#126-BSA; KRI社製)を用いてPCB#126-BSA感作粒子を得た。

【0058】参考例8

アルカリフォスファターゼ標識抗PCB#126抗体の作成

抗PCB#126モノクローナル抗体(PCB77A抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP; オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#126抗体を得た。

【0059】参考例9

PCB#126(3, 3', 4, 4', 5-ペンタクロロビフェニル)の測定

PCB#126の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf; 富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例7で作成したTCP-BSA感作粒子またはPCB#126-BSA感作粒子液各150μlに標準抗原90μlと酵素標識抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0060】前記標準抗原液は、PCB#126(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド

溶液に溶解して作成した。PCB#126は0~10 ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図2に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子とPCB#126-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0061】また、TCP-BSA感作粒子を用いたPCB#126測定系に対するPCB#77とPCB#169の交叉反応性を確認したところ、PCB#77と7.1%の交叉反応性が認められたが、PCB#169とはほとんど交叉反応性は認められなかった。

【0062】参考例10

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成
参考例2のTCP-BSAに代えてPCB#169-BSA(KRI社製)を用いてPCB#169-BSA感作粒子を得た。

参考例11 アルカリフォスファターゼ標識抗体PCB#169抗体の作成

抗PCB#169モノクローナル抗体(PCB169E抗体;KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP;オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#169抗体を得た。

【0063】参考例12

PCB#169(3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロピフェニル)の測定

PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf;富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例7で作成したすなわち

TCP-BSA感作粒子または参考例10で作成したPCB#169-BSA感作粒子液各150μlに標*

*準抗原90μlと酵素標識抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0064】前記標準抗原液は、PCB#169(ジエールサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解して作成した。PCB#169は0~10 ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図3に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子とPCB#169-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0065】また、TCP-BSA感作粒子を用いたPCB#169測定系に対するPCB#77とPCB#126の交叉反応性を確認したところ、PCB#77と6.3%、PCB#126とは100%の交叉反応性が認められた。

20 【0066】

【発明の効果】本発明の一般式(I)で表されるフェノキシ化合物は、PCBを測定するための試薬として有用である。本発明の一般式(I)で表されるフェノキシ化合物は、例えばBSAと結合させて、酵素免疫測定法によるPCBの測定に用いることができる。

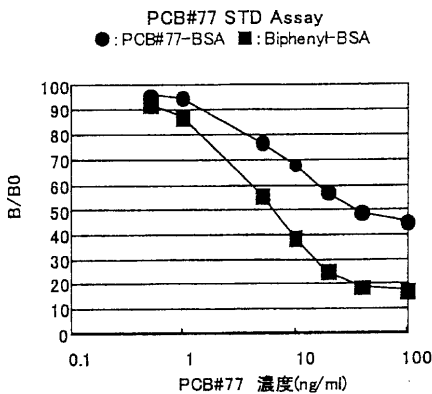
【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#77を測定したときの標準曲線を示す。

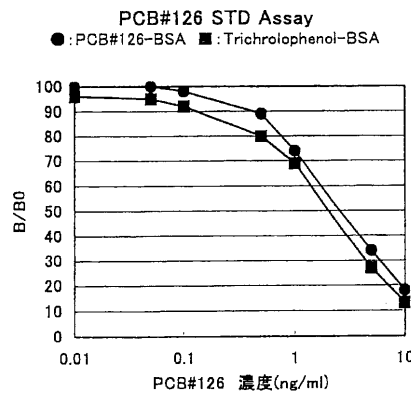
【図2】PCB#126を測定したときの標準曲線を示す。

【図3】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

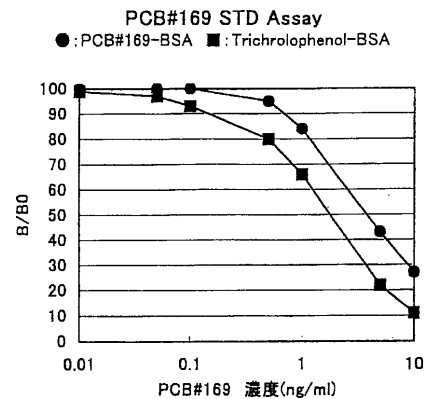
【図1】



【図2】



【図3】



专利名称(译)	苯氧基化合物		
公开(公告)号	JP2002128731A	公开(公告)日	2002-05-09
申请号	JP2000325513	申请日	2000-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	丹羽敏博 小林久子		
发明人	丹羽 敏博 小林 久子		
IPC分类号	G01N33/535 C07C59/13 C07C59/66 C07C69/712 C07D207/46		
FI分类号	C07C59/66 C07C59/13 C07C69/712.Z C07D207/46 G01N33/535		
F-TERM分类号	4C069/AC30 4C069/AC36 4C069/BC06 4C069/CC13 4H006/AA01 4H006/AB81 4H006/BP30 4H006/BS10		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于PCB的快速，简单且低成本的酶联免疫吸附测定的化合物，该化合物替代了常规的复杂PCB测定方法。 解决方案：通用公式（式中，R1为氯原子或苯基，R2及R3为氢原子或氯原子，R4为烷基，芳基，氢原子或琥珀酰亚胺基。 ，M为5至7的整数。） 可以用作通过与BSA等结合来测量PCB的酶免疫测定试剂。

