

(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 - 193877

(P2002 - 193877A)

(43)公開日 平成14年7月10日(2002.7.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 C 59/68		C 0 7 C 59/68	4 C 0 6 9
69/736		69/736	4 H 0 0 6
C 0 7 D207/404		C 0 7 D207/404	
// G 0 1 N 33/00		G 0 1 N 33/00	D
33/53		33/53	S
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 数)			

(21)出願番号 特願2000 - 392185(P2000 - 392185)

(22)出願日 平成12年12月25日(2000.12.25)

(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 小林 久子

東京都中央区日本版浜町に丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(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

(74)代理人 100098431

弁理士 山中 郁生 (外3名)

Fターム(参考) 4C069 AA23 BC06

4H006 AA01 AB81 BJ50 BP30

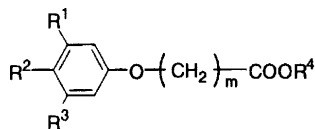
(54)【発明の名称】 置換フェノキシ誘導体

(57)【要約】

【課題】 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の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】

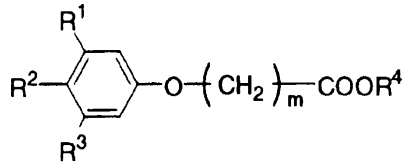


(式中、R¹は低級アルキル基、R²はハロゲン原子、R³は低級アルキル基または水素原子、R⁴はアルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、mは5ないし7の整数である。)で表される置換フェノキシ誘導体であり、PCBを酵素免疫測定法で測定する際の試薬として使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



で表される置換フェノキシ誘導体（式中、 R^1 は低級アルキル基、 R^2 はハロゲン原子、 R^3 は低級アルキル基または水素原子、 R^4 はアルキル基、アリアル基、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に記載の誘導体。

【請求項3】 R^4 が低級アルキル基である請求項1に記載の誘導体。

【請求項4】 低級アルキル基がエチル基である請求項3に記載の誘導体。

【請求項5】 R^4 がスクシンイミジル基である請求項1に記載の誘導体。

【請求項6】 m が5である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の誘導体。

【請求項7】 R^1 および R^3 がメチル基、 R^2 が塩素原子である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の誘導体。

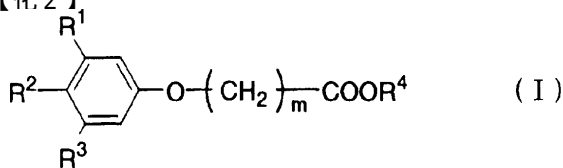
【請求項8】 R^1 がエチル基、 R^2 が塩素原子、 R^3 が水素原子である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の誘導体。

【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

【化2】



（式中、 R^1 は低級アルキル基、 R^2 はハロゲン原子、 R^3 は低級アルキル基または水素原子、 R^4 はアルキル基、アリアル基、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。）で表される置換フェノキシ誘導体であり、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。

【0002】

【従来の技術】前記一般式（I）で表される置換フェノキシ誘導体は、新規な化合物であり、かつ、この化合物がPCBを測定するための試薬として有用である、という事は全く知られていなかった。

【0003】従来、PCBは、ガスクロマトグラフィー

とマ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。

【0004】

【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。

【0005】

【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）で表される置換フェノキシ誘導体を見出した。本発明の前記一般式（I）で表される置換フェノキシ誘導体は、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。

【0006】

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、分枝鎖状または環状のアルキル基を挙げることできる。

【0007】

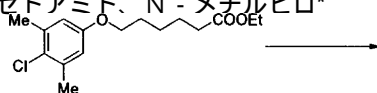
「アリアル基」としては、単環式または多環式であり、さらに環上に1個以上の種々の置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基をいい、例えば、フェニル、メチルフェニル、ジメチルフェニル、メトキシフェニル、ジメトキシフェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、クロロフェニル、ジクロロフェニル、ブロモフェニル、ジブロモフェニル、ヨードフェニル、フル

表わされるカルボン酸誘導体を製造する工程である。

【0015】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。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ックトリアミドなどのアミド類、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。

【0016】(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。

【0017】この工程で使用される縮合剤としては、たとえば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、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、ジイソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-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*



【0025】6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサ酸エチル1.49g(5.00mmol)を酢酸5mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、4.50

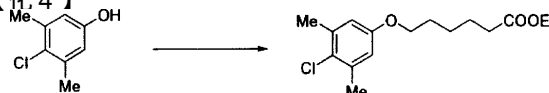
*リドンなどのアミド類等を挙げることができる。反応温度は、-10~40 で実施することができる。

【0018】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する。

【0019】実施例1 6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサ酸エチルの合成

【0020】

【化4】



【0021】アルゴン気流下、4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール783mg(5.00mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(15ml)に60%油性水酸化ナトリウム200mg(5.00mmol)を加え、室温で15分間攪拌した。続いて6-ブromoヘキサ酸エチル445μl(2.50mmol)を加え、室温で24.5時間攪拌した。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。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=15:1)で精製し、6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサ酸エチル538mg(収率72.0%)を得た。

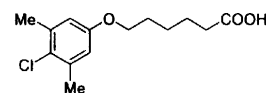
【0022】¹H-NMR(400MHz, CDC l₃): 1.26(t, J=7.1Hz, 3H), 1.44~1.53(m, 2H), 1.65~1.74(m, 2H), 1.74~1.81(m, 2H), 2.33(t, J=7.4Hz, 2H), 2.33(s, 6H), 3.90(t, J=6.4Hz, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 2H), 6.62(s, 2H) ppm.

IR(liquid film): 2948, 1738, 1592, 1472, 1324, 1168 cm⁻¹
Mass(m/z, %): 300(M⁺+2, 14), 298(M⁺, 40), 158(30), 156(92), 143(100), 115(21), 97(38), 69(30).

【0023】実施例2 6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサ酸の合成

【0024】

【化5】



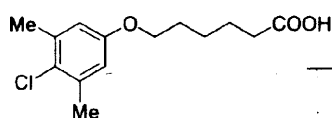
75時間加熱還流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、エーテル-ヘキサンから再結晶し、6-(4-クロロ-3,5-

-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1.02g(収率75.1%)を得た。

【0026】mp:93.0~94.0

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):1.47~1.56(m,2H),1.66~1.82(m,4H),2.33(s,6H),2.39(t,J=7.5Hz,2H),3.91(t,J=6.3Hz,2H),6.62(s,2H)ppm.

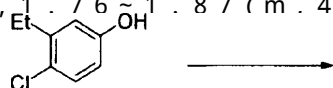
IR(KBr):3060,2956,1716,1588,1470,1326.1232.1172.10*10



【0029】6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸890mg(3.62mmol)の無水ジクロロメタン溶液(5ml)に、N-ヒドロキシスクシンイミド500mg(4.34mmol)、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833mg(4.34mmol)を加え、室温で5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。エーテル-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-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート925mg(収率76.5%)を得た。

【0030】mp:100.0~101.5

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):1.55~1.63(m,2H),1.76~1.87(m,4*



【0033】4-クロロ-3-エチルフェノール861mg(5.50mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(20ml)に炭酸カリウム828mg(6.00mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル1.82ml(10.2mmol)を加え、室温で21.75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ー(ヘキサン-酢酸エチル=30:1)で精製し、6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサン酸エチルを定量的に得た。

【0034】¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):1.22(t,J=7.5Hz,3H),1.26(t,J=7.1Hz,3H),1.47~1.54(m,2H),1.66~1.74(m,2

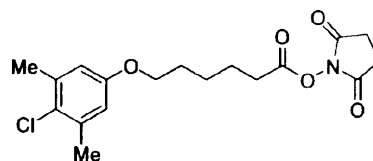
*44 cm⁻¹

Mass(m/z,%):272(M⁺+2,8),270(M⁺,23),158(31),156(100).

【0027】実施例3 N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0028】

【化6】



*H),2.34(s,6H),2.65(t,J=7.4Hz,2H),2.84(bs,4H),3.92(t,J=6.3Hz,2H),6.63(s,2H)ppm.

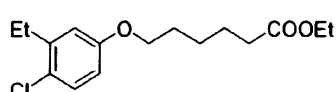
IR(KBr):2952,1814,1786,1754,1590,1472,1324,1218,1172,1074 cm⁻¹

Mass(m/z,%):369(M⁺+2,14),367(M⁺,44),255(8),253(23),158(32),156(100),97(57),69(54).

【0031】実施例4 6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0032】

【化7】



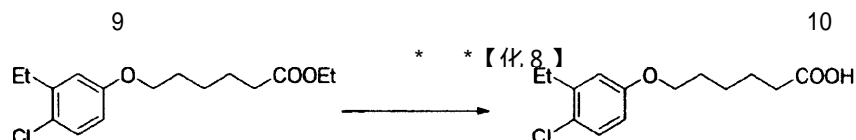
H),1.75~1.83(m,2H),2.33(t,J=7.5Hz,2H),2.70(q,J=7.5Hz,2H),3.92(t,J=6.4Hz,2H),4.13(q,J=7.1Hz,2H),6.65(dd,J=8.6and2.9Hz,1H),6.76(d,J=2.9Hz,1H),7.20(d,J=8.6Hz,1H)ppm.

IR(liquid film):2944,1738,1598,1574,1472,1242,1170 cm⁻¹

Mass(m/z,%):300(M⁺+2,12),298(M⁺,34),158(22),156(69),143(100),97(42),69(35).

【0035】実施例5 6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

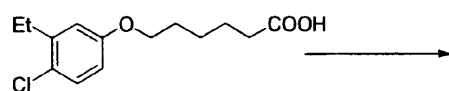
【0036】



【0037】6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル1.17g(3.91mmol)を酢酸5mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、2時間加熱還流した。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、エーテル-ヘキサンから再結晶することにより、6-(4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸566mg(収率53.5%)を得た。

【0038】mp: 75.5~76.0

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.21(t, J=7.5Hz, 3H), 1.49~1.57(m, 2H), 1.68~1.76(m, 2H), 1.76~1.84(m, 2H), 2.40(t, J=7.4Hz, 2H), 2.70(q, J=7.5Hz, 2H), 3.93(t, J=6.4Hz, 2H), 6.6*



【0041】6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサン酸271mg(1.00mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)に、N-ヒドロキシルスクシンイミド138mg(1.20mmol)、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230mg(1.20mmol)を加え、室温で20.25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ー(ヘキサン-酢酸エチル=5:1)で精製し、エーテル-ヘキサンから再結晶し、N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサノエート340mg(収率92.5%)を得た。

【0042】mp: 76.0~77.0

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.22(t, J=7.5Hz, 3H), 1.56~1.64(m, 2H), 1.78~1.88(m, 4H), 2.65(t, J=7.4Hz, 2H), 2.70(q, J=7.5Hz, 2H), 2.84(bs, 4H), 3.94(t, J=6.3Hz, 2H), 6.66(dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.77(d, J=2.9Hz, 1H), 7.20(d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

IR(KBr): 2960, 1818, 1784, 1732, 1606, 1574, 1472, 1280, 1206, 1070 cm⁻¹

*5(dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.76(d, J=2.9Hz, 1H), 7.20(d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

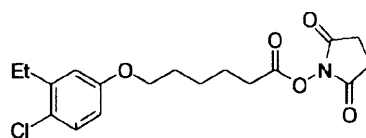
IR(KBr): 3050, 1712, 1602, 1574, 1470, 1294, 1252, 1150, 1068 cm⁻¹

Mass(m/z, %): 272(M⁺+2, 9), 270(M⁺, 25), 158(32), 156(100)

【0039】実施例6 N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3-エチルフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0040】

【化9】



Mass(m/z, %): 369(M⁺+2, 20), 367(M⁺, 58), 255(12), 253(36), 158(33), 156(100), 97(72), 69(58).

【0043】参考例1 ウシ血清アルブミン(BSA)結合4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ誘導体の合成

ウシ血清アルブミン5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液100μl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BSA結合4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ誘導体を得た。

【0044】参考例2 ウシ血清アルブミン結合4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子の作成

カルボキシル化粒子(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、5~40μg/mlに調整した参考例1で作成したBSA結合4-クロロ-3, 5-ジメチルフェノキシ誘導体溶液1mlを添加し252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1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(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 ウシ血清アルブミン結合 4 - クロロ - 3, 5 - ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子を得た。

【0045】参考例3 アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 PCB # 169 (3, 3', 4, 4', 5, 5' - ヘキサクロロピフェニル) 抗体の作成
 抗 PCB # 169 モノクローナル抗体 (PCB 169 E 10 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 (オリエンタル社製) を結合し ALP 標識抗 PCB # 169 抗体を得た。

【0046】参考例4 PCB # 169 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 ; 富士レピオ社製) を用いた 1 ステップ競合法にて行った。参考例 2 で作成したウシ血清アルブミン結合 4 - クロロ - 3, 5 - ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子 150 μl に PCB # 169 の標準*

*抗原液 90 μl と ALP 標識抗 PCB # 169 抗体液 50 μl を加え、37 20 分間免疫反応を行い、洗浄後基質 (AMPPD) 液 200 μl 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。

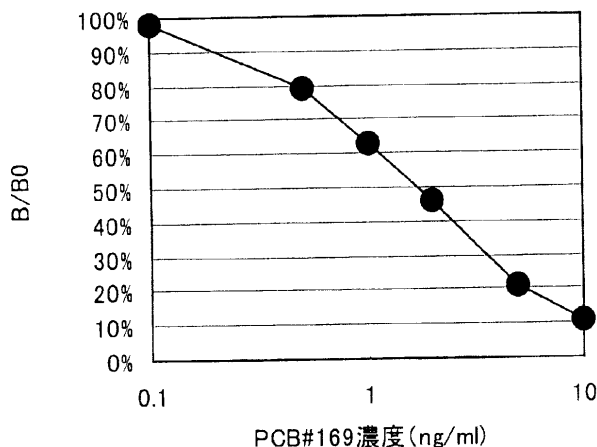
【0047】前記 PCB # 169 の標準抗原液は、PCB # 169 (ジーエルサイエンス社製) を 10% ジメチルスルホキシド溶液に溶解し、0 ~ 10 ng/ml の濃度に調整した。標準抗原 0 濃度のカウント値を 100% としたときの各標準抗原液の応答 (B/B0 (%)) で標準曲線を求めた。その結果を図 1 に示す。

【0048】
 【発明の効果】本発明の一般式 (I) で表される置換フェノキシ誘導体は、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) で表される置換フェノキシ誘導体は、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 # 169 を測定したときの標準曲線を示す。

【図 1】

PCB#169 STD Assay
 4クロロ-3,5,ジメチルフェノキシ誘導体-BSA



专利名称(译)	取代的苯氧基衍生物		
公开(公告)号	JP2002193877A	公开(公告)日	2002-07-10
申请号	JP2000392185	申请日	2000-12-25
[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	小林久子 丹羽敏博		
发明人	小林 久子 丹羽 敏博		
IPC分类号	G01N33/53 C07C59/68 C07C69/736 C07D207/404 G01N33/00		
FI分类号	C07C59/68 C07C69/736 C07D207/404 G01N33/00.D G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4C069/AA23 4C069/BC06 4H006/AA01 4H006/AB81 4H006/BJ50 4H006/BP30		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种可用于酶联免疫测定无法达到的测量PCB的试剂。 解决方案：通用公式（式中，R1为低级烷基，R2为卤原子，R3为低级烷基或氢原子，R4为烷基，芳基，氢原子或琥珀酰亚胺基，m是5到7的整数），在通过酶免疫法测量PCB时可用作试剂。

