

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-141642  
(P2014-141642A)

(43) 公開日 平成26年8月7日(2014.8.7)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>CO9K</b> 11/07 (2006.01)		CO9K	11/07	2G054
<b>GO1N</b> 21/78 (2006.01)		GO1N	21/78	C
<b>GO1N</b> 33/532 (2006.01)		GO1N	33/532	B

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 12 頁)

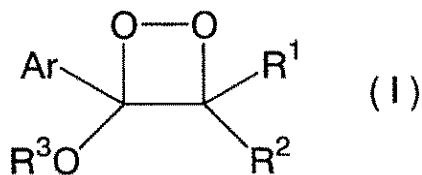
(21) 出願番号	特願2013-242565 (P2013-242565)	(71) 出願人	000003300
(22) 出願日	平成25年11月25日 (2013.11.25)		東ソー株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2012-283330 (P2012-283330)		山口県周南市開成町4560番地
(32) 優先日	平成24年12月26日 (2012.12.26)	(72) 発明者	山田 雅士
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ ー株式会社東京研究センター内
		Fターム(参考)	2G054 AA06 BB10 CA21 CA28 CE01 CE02 CE08 EA01 EA03 EB02 FA33 GA03 GA09 GB02

(54) 【発明の名称】 1, 2-ジオキセタンの化学発光方法および化学発光用材料

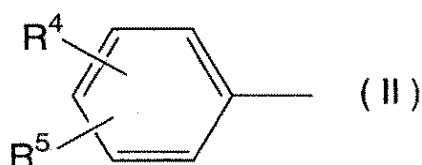
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 1, 2-ジオキセタン誘導体の化学発光方法及び酵素免疫測定用基質試薬として使用可能な、熱安定性に優れた化学発光用材料の提供。

【解決手段】 式(I)



で表される 1, 2-ジオキセタン誘導体(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>はH、アルキル基等；R<sup>3</sup>はアルキル基、アリール基；R<sup>3</sup>とR<sup>1</sup>又はR<sup>2</sup>とが一体となってジオキセタン環とヘテロ原子を含む縮合環を形成してもよい。Arは式(II))



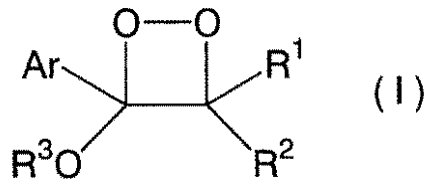
であり、R<sup>4</sup>はリン酸塩基等；R<sup>5</sup>はH等である。)を、化学発光させる際に、臭化トリ

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式 (I)

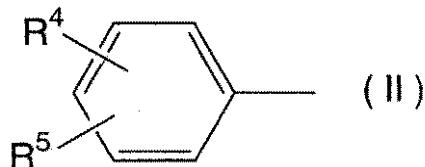
## 【化 1】



で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基である。また、 $R^1$ 、 $R^2$  は一体となり、ジオキセタン環にスピロ結合する環式又は多環式有機環基を形成することもできる。 $R^3$  はアルキル基又はアリール基であり、 $R^3$  と  $R^1$  又は  $R^2$  とが一体となってジオキセタン環と酸素原子を含む縮合環を形成してもよい。Ar は一般式 (II)

10

## 【化 2】



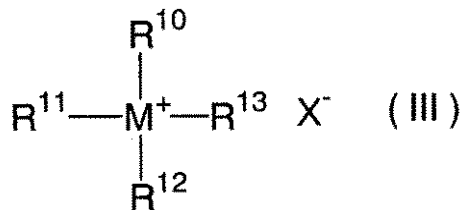
であり、 $R^4$  はヒドロキシル基、アルコキシル基、アラルキルオキシ基、 $-OSi(R^6R^7R^8)$  (ただし、 $R^6$ 、 $R^7$  および  $R^8$  は互いに独立にアルキル基又はアリール基である。) で表される基、リン酸塩基または  $S(C=O)R^9$  (ただし、 $R^9$  はアルキル基またはアリール基である。) で表される基であり、 $R^5$  は水素原子、ハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシル基である。) の溶液、並びに、カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を含有する溶液、を有することを特徴とする、化学発光用材料。

20

## 【請求項 2】

カチオン性界面活性剤が、一般式 (III)

## 【化 3】



(式中、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  のうち、一つは炭素数 8 ~ 20 のアルキル基または炭素数 8 ~ 20 のアリール基であり、他の三つは互いに独立に炭素数 1 ~ 8 のアルキル基、ベンジル基またはフェニル基である。M は窒素原子またはリン原子を示す。X はハロゲン原子を表す。) で示される第 4 級アンモニウム塩または第 4 級ホスホニウム塩

40

## 【請求項 3】

カチオン性界面活性剤が臭化トリ - n - ブチルヘキサデシルホスホニウムである、請求項 1 または 2 に記載の化学発光用材料。

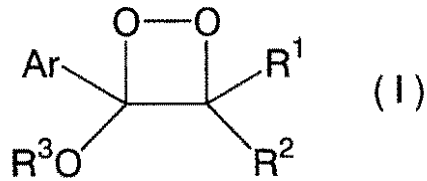
## 【請求項 4】

カチオン性界面活性剤が塩化ベンザルコニウムである、請求項 1 または 2 に記載の化学発光用材料。

## 【請求項 5】

一般式 (I)

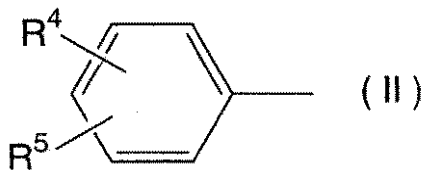
## 【化 4】



で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体（式中、 $R^1$ 、 $R^2$  はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基である。また、 $R^1$ 、 $R^2$  は一体となり、ジオキセタン環にスピロ結合する環式又は多環式有機環基を形成することもできる。 $R^3$  はアルキル基又はアリール基であり、 $R^3$  と  $R^1$  又は  $R^2$  とが一体となってジオキセタン環と酸素原子を含む縮合環を形成してもよい。Ar は一般式 (I I) )

10

## 【化 5】



であり、 $R^4$  はヒドロキシル基、アルコキシル基、アラルキルオキシ基、 $-OSi(R^6R^7R^8)$  (ただし、 $R^6$ 、 $R^7$  および  $R^8$  は互いに独立にアルキル基又はアリール基である。) で表される基、リン酸塩基または  $S(C=O)R^9$  (ただし、 $R^9$  はアルキル基またはアリール基である。) で表される基であり、 $R^5$  は水素原子、ハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシル基である。) を、

20

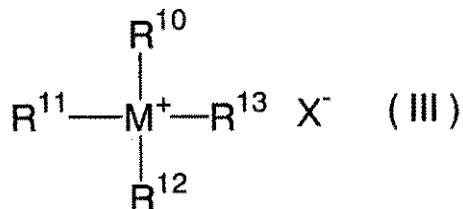
塩基、酸、塩、フッ素化合物、酵素、触媒およびアミン化合物からなる群から選択される活性化剤により化学発光させる際に、

カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を添加することを特徴とする、化学発光方法。

## 【請求項 6】

カチオン性界面活性剤が、一般式 (I I I) )

## 【化 6】



30

(式中、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  のうち、一つは炭素数 8 ~ 20 のアルキル基または炭素数 8 ~ 20 のアリール基であり、他の三つは互いに独立に炭素数 1 ~ 8 のアルキル基、ベンジル基またはフェニル基である。M は窒素原子またはリン原子を示す。X はハロゲン原子を表す。) で示される第 4 級アンモニウム塩または第 4 級ホスホニウム塩である、請求項 5 に記載の化学発光方法。

40

## 【請求項 7】

カチオン性界面活性剤が臭化トリ - n - ブチルヘキサデシルホスホニウムである、請求項 5 または 6 に記載の化学発光方法。

## 【請求項 8】

カチオン性界面活性剤が塩化ベンザルコニウムである、請求項 5 または 6 に記載の化学発光方法。

## 【請求項 9】

化学発光させる際に、塩基、酸、塩、フッ素化合物、酵素、触媒およびアミン化合物からなる群から選択される活性化剤にカチオン性界面活性剤および蛍光性物質を添加し、次いで一般式 (I) で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体を添加する、請求項 5 ~ 8 いずれかに記載の化学発光方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は1, 2 - ジオキセタンの化学発光方法および化学発光用材料に関する。本発明による方法は生体成分、酵素、化学品などの高感度分析に有用であり、かつ熱安定性が非常に高く、本発明による化学発光用材料は酵素免疫測定用基質試薬として好適に使用することができる。

## 【背景技術】

## 【0002】

1, 2 - ジオキセタン構造を有する水溶性化学発光物質は、生体成分の分析などのようにプロトン性溶媒を用いる条件下で極めて有用な化合物であり、近年ますますその需要は高まっている。しかしながら、プロトン性溶媒中において1, 2 - ジオキセタンを単独で用いた場合、非常に低い発光効率しか得られず、臨床検査のための免疫測定に使おうとしても、実用に耐えうる程の化学発光強度を得ることが出来なかった。このため、水溶性化学発光性ジオキセタンの化学発光を増強する必要があった。さらに、これまでの溶液状態での1, 2 - ジオキセタンは非常に不安定であり、熱安定性を高くすることが必要であった。本願明細書では、化学発光性化合物の発光強度を高めるのに有用な物質を、電子エネルギーの移動に直接関わるか否かによらず、広く増感剤またはエンハンサーと呼ぶこととする。

10

## 【0003】

従来、2個のカルボニル含有化合物に分解すると共に電子エネルギーを放出して光を発生する1, 2 - ジオキセタンに対するエンハンサーとして、カチオン性界面活性剤（例えば特許文献1参照）、カチオン性界面活性剤と蛍光性物質の混合物（特許文献2参照）、ビニルベンジル4級アンモニウム塩ポリマー（例えば特許文献3参照）およびポリカチオン性の高分子ホスホニウム塩（特許文献4参照）が提案されてきた。また、アクリジニウムエステルの化学発光系に第4級ホスホニウム塩を添加した例（特許文献5参照）がある。

20

## 【0004】

一方、フラン環を有する1, 2 - ジオキセタン誘導体（例えば特許文献6参照）は、発光の際に2つの化合物に分解しない化学発光物質であるが、その化学発光強度を高める増感剤についても報告されている（例えば特許文献7参照）。しかしながら、1, 2 - ジオキセタン誘導体については、保存安定性のさらなる向上が求められていた。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

【特許文献1】特公平7 - 121237号公報

【特許文献2】特公平7 - 91536号公報

【特許文献3】特公平7 - 31201号公報

【特許文献4】特許第2648423号公報

【特許文献5】特開平5 - 79985号公報

【特許文献6】特開平9 - 216887号公報

【特許文献7】特開2005 - 77142号公報

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明は、1, 2 - ジオキセタン誘導体の化学発光に最適な発光方法を提供することを目的とする。また本発明は、酵素免疫測定用基質試薬としても使用可能な、熱安定性に優れ、高感度測定を可能にする化学発光用材料を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

50

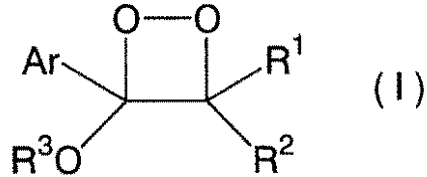
本発明者らは上記課題について鋭意検討した結果、本発明に到達した。すなわち本発明は、以下の通りである。

【0008】

(1) 一般式(I)

【0009】

【化1】

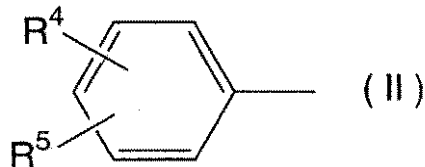


10

で表される1,2-ジオキセタン誘導体(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基である。また、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は一体となり、ジオキセタン環にスピロ結合する環式又は多環式有機環基を形成することもできる。R<sup>3</sup>はアルキル基又はアリール基であり、R<sup>3</sup>とR<sup>1</sup>又はR<sup>2</sup>とが一体となってジオキセタン環と酸素原子を含む縮合環を形成してもよい。Arは一般式(II)

【0010】

【化2】



20

であり、R<sup>4</sup>はヒドロキシル基、アルコキシル基、アラルキルオキシ基、-OSi(R<sup>6</sup>R<sup>7</sup>R<sup>8</sup>) (ただし、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>は互いに独立にアルキル基又はアリール基である。)で表される基、リン酸塩基またはS(C=O)R<sup>9</sup> (ただし、R<sup>9</sup>はアルキル基またはアリール基である。)で表される基であり、R<sup>5</sup>は水素原子、ハロゲン原子、アルキル基またはアルコキシル基である。)の溶液、並びに、カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を含有する溶液、を有することを特徴とする、化学発光用材料。

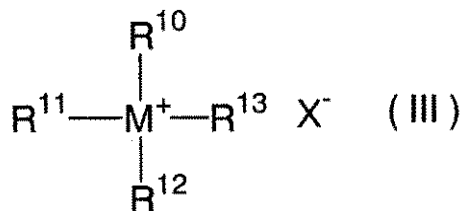
30

【0011】

(2) カチオン性界面活性剤が、一般式(III)

【0012】

【化3】



40

(式中、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>およびR<sup>13</sup>のうち、一つは炭素数8~20のアルキル基または炭素数8~20のアリール基であり、他の三つは互いに独立に炭素数1~8のアルキル基、ベンジル基またはフェニル基である。Mは窒素原子またはリン原子を示す。Xはハロゲン原子を表す。)で示される第4級アンモニウム塩または第4級ホスホニウム塩である、(1)に記載の化学発光用材料。

【0013】

(3) カチオン性界面活性剤が臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウムである、(1)または(2)に記載の化学発光用材料。

(4) カチオン性界面活性剤が塩化ベンザルコニウムである、(1)または(2)に記載の化学発光用材料。

50

## 【0014】

(5) 一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体を、塩基、酸、塩、フッ素化合物、酵素、触媒およびアミン化合物からなる群から選択される活性化剤により化学発光させる際に、カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を添加することを特徴とする、化学発光方法。

## 【0015】

(6) カチオン性界面活性剤が、一般式(III)で示される第4級アンモニウム塩または第4級ホスホニウム塩である、(5)に記載の化学発光方法。

(7) カチオン性界面活性剤が臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウムである、(5)または(6)に記載の化学発光方法。

(8) カチオン性界面活性剤が塩化ベンザルコニウムである、(5)または(6)に記載の化学発光方法。

(9) 化学発光させる際に、塩基、酸、塩、フッ素化合物、酵素、触媒およびアミン化合物からなる群から選択される活性化剤にカチオン性界面活性剤および蛍光性物質を添加し、次いで一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体を添加する、(5)~(8)いずれかに記載の化学発光方法。

## 【0016】

以下、本発明を更に詳細に説明する。はじめに、一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体について説明する。

## 【0017】

置換基のアルキル基としては、炭素数1~20個の直鎖状、分枝鎖状、または環状のアルキル基をいい、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコサニルなどの直鎖の基、又はこれらのアルキル基が適宜分枝状に結合した基(例えばi-プロピル基、i-ブチル基、t-ブチル基等)、または環状になった基を例示することができる。これらのアルキル基は、さらに置換基を有していてもよく、例えば、ヒドロキシル基、アルコキシル基、アリール基等が置換していてもよい。

## 【0018】

アリール基としては、例えばフェニル、ナフチル基等の炭素数6~20個の芳香族炭化水素基、および、フリル、チエニル、ピリジル基等のように環内に1~5個の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を有するヘテロアリール基等を挙げることができる。アルコキシル基としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、メトキシエトキシ、メトキシプロポキシ、エトキシエトキシ、エトキシプロポキシ、メトキシエトキシエトキシ基等の炭素数1~20個のアルコキシル基が直鎖状または分枝状に1~5個結合したものを挙げることができる。アラルキルオキシ基としては、ベンジルオキシ、フェネチルオキシ基等の炭素数7~20の基が例示でき、ハロゲン原子としてはフッ素、塩素、臭素等が例示できる。

## 【0019】

またR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>が一体となり、ジオキセタン環にスピロ結合する環式又は多環式有機環基としては、例えばアダマンチル基をあげることができる。R<sup>3</sup>とR<sup>1</sup>又はR<sup>2</sup>とが一体となってジオキセタン環と酸素原子を含む縮合環としては、例えばフラン環、ピラン環をあげることができる。またR<sup>4</sup>のリン酸塩基としては、例えばPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>のナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等をあげることができる。

## 【0020】

このような置換基の中で、好ましくは、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は炭素数1~20個の分枝鎖状アルキル基であり、R<sup>4</sup>はヒドロキシル基またはリン酸塩基であり、R<sup>5</sup>は水素原子またはハロゲン原子である。またR<sup>1</sup>が炭素数1~20個の分枝鎖状アルキル基であり、R<sup>2</sup>とR<sup>3</sup>とが一体となってジオキセタン環と酸素原子を含む縮合環を形成し、R<sup>4</sup>がリン酸塩基であり、R<sup>5</sup>が水素原子であることも好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0021】

このような置換基を有する一般式 (I) で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体として、具体的には、リン酸 3 - [ 3' - メトキシスピロ [ アダマンタン - 2, 4' - [ 1, 2 ] ジオキセタン ] - 3' - イル ] フェニル、5 - t - ブチル - 4, 4 - ジメチル - 1 - ( 3' - ホスホリルオキシ ) フェニル - 2, 6, 7 - トリオキサビシクロ [ 3.2.0 ] ヘプタンジナトリウム塩、リン酸モノ - [ 5 - ( 5 - t - ブチル - 4, 4 - ジメチル - 2, 6, 7 - トリオキサビシクロ [ 3.2.0 ] ヘプト - 1 - イル ) - 2 - クロロフェニル ] エステル ジナトリウム塩などがあげられる。中でもリン酸 3 - [ 3' - メトキシスピロ [ アダマンタン - 2, 4' - [ 1, 2 ] ジオキセタン ] - 3' - イル ] フェニル、5 - t - ブチル - 4, 4 - ジメチル - 1 - ( 3' - ホスホリルオキシ ) フェニル - 2, 6, 7 - トリオキサビシクロ [ 3.2.0 ] ヘプタンジナトリウム塩が好ましく、5 - t - ブチル - 4, 4 - ジメチル - 1 - ( 3' - ホスホリルオキシ ) フェニル - 2, 6, 7 - トリオキサビシクロ [ 3.2.0 ] ヘプタンジナトリウム塩が更に好ましい。

10

## 【0022】

本発明で使用されるカチオン性界面活性剤としては、後述の蛍光性物質と共に一般式 (I) で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体の化学発光を増強する効果をもつものであれば特に限定はない。好適なカチオン性界面活性剤として、例えば市販の Emerald - I I<sup>T M</sup> ( T R O P I X 社製 ) に含有されるポリ ( ベンジルトリブチル ) アンモニウムクロリドや、一般式 ( I I I ) で示される第 4 級アンモニウム塩または第 4 級ホスホニウム塩があげられる。

20

## 【0023】

一般式 ( I I I ) において、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基としては、炭素数 8 ~ 20 個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基をいい、例えばオクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコサニルなどの直鎖の基、又はこれらのアルキル基が適宜分枝状に結合した基を例示することができる。炭素数 1 ~ 8 のアルキル基としては、炭素数 1 ~ 8 個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基をいい、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどの直鎖の基、又はこれらのアルキル基が適宜分枝状に結合した基を例示することができる。炭素数 8 ~ 20 のアリール基としては、例えばナフチル基等の炭素数 8 ~ 20 個の芳香族炭化水素基、又は環内に 1 ~ 5 個の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を有するヘテロアリール基等を挙げることができる。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子等が例示できる。

30

## 【0024】

以上のような置換基を有する、一般式 ( I I I ) で表される第 4 級アンモニウム塩の好適な例として、臭化セチルトリメチルアンモニウム ( C T A B )、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムがあげられる。また第 4 級ホスホニウム塩の好適な例は、臭化トリ - n - ブチルヘキサデシルホスホニウム、臭化エチルトリフェニルホスホニウム、臭化トリヘプチルフェニルホスホニウムおよび臭化テトラデシルトリフェニルホスホニウムがあげられる。その中でも、臭化トリ - n - ブチルヘキサデシルホスホニウムがきわめて望ましい。

40

## 【0025】

本発明で用いられる蛍光性物質としては、カチオン性界面活性剤と共に一般式 (I) で表される 1, 2 - ジオキセタン誘導体の化学発光を増強する効果を持つものであれば特に限定はないが、例えばフルオレセインおよびフルオレセイン誘導体 (フルオレセインナトリウム、アミノフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) 等)、ボディピー ( B O D I P Y ) 色素、オレゴングリーン 488、オレゴングリーン 514、Rhodol green (登録商標)、Alexa Fluor 488 (登録商標) およびヒドラジド、5 - ( および - 6 ) - カルボキシ - 2', 7' - ジクロロフルオレセインが挙げられる。その中でも、フルオレセイン、フルオレセインナトリウム、フルオレセインイソチオシアネートが好ましく、フルオレセインが特に望ましい。

50

## 【0026】

本発明の化学発光用材料は、前述の溶液を有するものである。その溶媒としては、例えば水や水性緩衝液などのプロトン性溶媒が用いられる。また溶液中の1, 2-ジオキセタン誘導体、カチオン性界面活性剤、蛍光性物質の濃度は特に限定されるものではないが、酵素免疫測定の前質として使用する場合には、後述のように使用時にその好適な濃度範囲をとれるものであることが好ましい。また1, 2-ジオキセタン誘導体の溶液は、実質的にカチオン性界面活性剤および蛍光性物質を含有せず、これによって1, 2-ジオキセタン誘導体の高い保存安定性が得られる。一方、pH調整剤や、保存安定性を確保するためにアジ化ナトリウムなどの保存剤を適宜含有していてもよい。

## 【0027】

本発明では、一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体を、活性化剤により化学発光させる際に、カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を添加する。これにより従来法と同等以上の発光量を得ることができる。この時、本発明の化学発光用材料を用いることができる。

## 【0028】

またここで使用される活性化剤は、塩基、酸、塩、フッ素化合物、酵素、触媒およびアミン化合物からなる群から選択されるものである。この活性化剤は、一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体を発光させるために使用するが、一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体の基 $R^4$ に作用して不安定なオキシド中間体を経てカルボニル化合物に変化させると同時に化学発光を生じさせることのできるものである。例えば $R^4$ がヒドロキシル基ならば塩基が、また $R^4$ が $-OSi(R^6R^7R^8)$ (ただし、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ は互いに独立にアルキル基又はアリアル基である。)で表される基ならばテトラブチルアンモニウムフルオライドが活性化剤として好適に使用できる。一般式(I)で表される1, 2-ジオキセタン誘導体を酵素免疫測定の前質として使用する場合は、活性化剤として各種酵素たとえば、アルカリ性ホスファターゼ、アリアルエステラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、ペルオキシダーゼおよびガラクトシダーゼなどが好適に使用できる。特に $R^4$ がリン酸塩基の場合は、アルカリ性ホスファターゼが好適に使用できる。

## 【0029】

本発明の方法において、使用する1, 2-ジオキセタン誘導体の濃度は、特に限定はないが、酵素免疫測定の前質として使用する場合は、測定対象のゼロ濃度およびポジ(陽性)濃度の標準溶液に対する測定値が濃度対測定値の略直線関係が成り立つ範囲で適宜決定することが好ましい。好適にはその濃度は0.1~3.0mMの範囲に設定することができる。この範囲より低い濃度領域では、ポジ濃度に対する測定値が頭打ちの状態になり測定範囲の上限が低下してしまう恐れがある。逆にこの範囲より高い濃度領域では、ゼロ濃度に対する測定値のバックグラウンドが上がり、測定対象の低濃度領域の検出感度が悪化する恐れがある。

## 【0030】

使用するカチオン性界面活性剤の濃度は0.1mM~10.0mMの範囲とするのが好適である。最適な発光量を得るためには0.5~4.0mMとするのが特に好ましい。使用する蛍光性物質の濃度は、1, 2-ジオキセタン誘導体の濃度が高ければそれにつれて高くする必要はあるが、約0.1~4.0mMとすることが増感効果を高める点で好ましい。

## 【0031】

化学発光のさせ方には限定はなく、1, 2-ジオキセタン誘導体を活性化剤により発光させる際に、カチオン性界面活性剤及び蛍光性物質を添加すればよい。添加の順序には特に限定はなく、適宜、順次添加すればよく、また同時に添加してもよい。活性化剤にカチオン性界面活性剤及び蛍光性物質を添加し、次いで1, 2-ジオキセタン誘導体を添加してもよい。その反応溶液を一定時間後に発光検出器に導入し、化学発光を検出することができる。発光検出器としては、シングルフォトンカウンターを装備したルミノメーターが

10

20

30

40

50

好適に使用できる。増感剤等により強度の高い発光が得られるときは、シリコンフォトダイオードや写真フィルムが使用できる。活性化剤として酵素を用いるときは、反応溶液を発光検出器に導入する前に酵素反応停止剤を添加してもよい。

#### 【0032】

また、酵素反応の進行と同時に進行する化学発光反応を連続的にモニターし、発光量の増加率を測定することができる。増加率が一定の時間領域であれば、酵素反応開始時すなわち化学発光反応開始時と発光検出時との間の時間を厳密に規定する必要がなくなる。化学発光反応を連続的にモニターする場合、化学発光基質との酵素反応の至適pHと、それに引き続いて起こる化学発光反応の至適pHとは、できるだけ一致していることが好ましい。例えば活性化剤がアルカリ性ホスファターゼのときは、酵素反応の至適pHと化学発光反応の至適pHとはほぼ一致し、pH約10の2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝液またはジエタノールアミン緩衝液を使用することが好適である。

10

#### 【発明の効果】

#### 【0033】

本発明の化学発光用材料は、従来のものよりきわめて高い保存安定性を有する。また本発明の化学発光方法によれば、高い発光量を得ることができる。

#### 【実施例】

#### 【0034】

次に、実施例を示して本発明を具体的に説明する。しかし本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

20

#### 【0035】

##### [実施例1]

リン酸3-[3'-メトキシスピロ[アダマンタン-2,4'-[1,2]ジオキセタン]-3'-イル]フェニルを0.8mM、及びアジ化ナトリウム0.1%を含む、50mMの2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝溶液(pH10)を調製した。蛍光性物質としてフルオレセインを0.3mM、カチオン性界面活性剤として臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウムを2.0mM、及びアジ化ナトリウム0.1%を含む、500mMの2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝溶液(pH10)を調製した。この調製したそれぞれの溶液を、4又は40に7日間保管した。各溶液を25 $\mu$ Lとり混合したのちに、アルカリ性ホスファターゼ0.005 $\mu$ g/mL、0.1%ゼラチン加水分解物、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.15M NaClおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む50mM Tris-HCl緩衝溶液10 $\mu$ Lと反応させ、その発光量を測定した。発光測定にはベルトールド社製ルミノメーターLB96V(検出器:シングルフォトンカウンター;測定波長領域:380~630nm)を使用し、測光条件は上述のように化学発光用材料と酵素の溶液とを混合した5分後の1秒間の発光量(カウント数)を測定した。4保管品の発光量は1,736,658であった。40保管品の発光量は1,621,793であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は93.4%であった。

30

#### 【0036】

##### [実施例2]

1,2-ジオキセタン誘導体を5-t-ブチル-4,4-ジメチル-1-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-2,6,7-トリオキサビシクロ[3.2.0]ヘプタンジナトリウム塩とした以外は、実施例1と同様の方法にて実施した。4保管品の発光量は2,204,741であった。40保管品の発光量は2,147,331であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は97.4%であった。

40

#### 【0037】

##### [実施例3]

カチオン性界面活性剤を塩化ベンザルコニウムとした以外は、実施例2と同様の方法にて実施した。4保管品の発光量は1,005,651であった。40保管品の発光量は1,004,293であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は9

50

9.9%であった。

【0038】

[実施例4]

アルカリ性ホスファターゼ0.005 μg/mL、0.1%ゼラチン加水分解物、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.15 M NaClおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む50 mM Tris-HCl緩衝溶液10 μLに、蛍光性物質としてフルオレセインを0.3 mM、カチオン性界面活性剤として臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウムを2.0 mM、及びアジ化ナトリウム0.1%を含む、500 mMの2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝溶液(pH 10)(4又は40に7日間保管したもの)を25 μL添加し、次いで5-t-ブチル-4,4-ジメチル-1-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-2,6,7-トリオキサピシクロ[3.2.0]ヘプタンジナトリウム塩を0.8 mM、及びアジ化ナトリウム0.1%を含む、50 mMの2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝溶液(pH 10)(4又は40に7日間保管したもの)を25 μL添加し、その発光量を実施例1と同様にして測定した。4 保管品の発光量は2,102,103であった。40 保管品の発光量は2,055,818であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は97.8%であった。

10

【0039】

[比較例1]

リン酸3-[3'-メトキシスピロ[アダマンタン-2,4'-[1,2]ジオキセタン]-3'-イル]フェニルを0.4 mM、蛍光性物質としてフルオレセインを0.15 mM、カチオン性界面活性剤として臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウムを1.0 mM、及びアジ化ナトリウム0.1%を含む、500 mMの2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝溶液(pH 10)を調製した。この調製した溶液を、4又は40に7日間保管した。この溶液50 μLと、アルカリ性ホスファターゼ0.005 μg/mL、0.1%ゼラチン加水分解物、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.15 M NaClおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む50 mM Tris-HCl緩衝溶液10 μLと、を反応させ、その発光量を測定した。発光測定にはベルトールド社製ルミノメーターLB 96 V(検出器:シングルフォトンカウンター;測定波長領域:380~630 nm)を使用し、測光条件は上述のように化学発光用溶液と酵素の溶液とを混合した5分後の1秒間の発光量(カウント数)を測定した。4 保管品の発光量は1,610,086であった。40 保管品の発光量は1,429,536であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は88.8%であった。実施例1と比較して、4.6%安定性が低下した。

20

30

【0040】

[比較例2]

1,2-ジオキセタン誘導体を5-t-ブチル-4,4-ジメチル-1-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-2,6,7-トリオキサピシクロ[3.2.0]ヘプタンジナトリウム塩とした以外は、比較例1と同様の方法にて実施した。4 保管品の発光量は2,127,835であった。40 保管品の発光量は1,960,655であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は92.1%であった。実施例2と比較して、5.3%安定性が低下した。実施例4と比較して、5.7%安定性が低下した。

40

【0041】

[比較例3]

カチオン性界面活性剤を塩化ベンザルコニウムとした以外は、比較例2と同様の方法にて実施した。4 保管品の発光量は1,125,122であった。40 保管品の発光量は1,048,659であった。40の発光量は4の発光量と比較して、残存率は93.2%であった。実施例3と比較して、6.7%安定性が低下した。

【0042】

以上の結果から、1,2-ジオキセタン誘導体の溶液と、カチオン性界面活性剤および蛍光性物質を含有する溶液とは、別々の溶液として保存することにより、熱安定性に優れ

50

た化学発光基質溶液を提供することができる。

---

フロントページの続き

【要約の続き】

- n - ブチルヘキサデシルホスホニウム及びフルオレセインを添加する化学発光方法。

【選択図】なし

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014141642A5</a>	公开(公告)日	2016-11-24
申请号	JP2013242565	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	山田雅士		
发明人	山田 雅士		
IPC分类号	C09K11/07 G01N21/78 G01N33/532		
FI分类号	C09K11/07 G01N21/78.C G01N33/532.B		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/BB10 2G054/CA21 2G054/CA28 2G054/CE01 2G054/CE02 2G054/CE08 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/EB02 2G054/FA33 2G054/GA03 2G054/GA09 2G054/GB02		
优先权	2012283330 2012-12-26 JP		
其他公开文献	JP2014141642A		

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种1,2-二氧杂环丁烷衍生物的化学发光方法以及一种化学发光的材料，该材料可用作酶免疫测定的底物试剂，并且具有出色的热稳定性。式(I)的通式(I)包括在引起化学发光时加入三正丁基十六烷基溴化物和荧光素。式中，Rand Rare H，烷基等；烷基或芳基；Rand Ror R可以整体形式构成包含二氧杂环丁烷环和杂原子的稠环；Ar为式(II)；磷酸磷酸酯等；和Ris H等