



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

240463
(11) (B1)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 N 9/42

(22) Prihlášené 14 05 84
(21) (PV 3540-84)

(40) Zverejnené 16 07 85

(45) Vydané 15 08 87

[75]

Autor vynálezu

MISLOVIČOVÁ DANICA ing. CSc.; BIELY PETER RNDr. CSc.,
BRATISLAVA

[54] Trojsodná soľ 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-(4-metyl-2-sulfobenzén-1-
-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino)-1,3,5-triazín-
-2-ylhydroxyetylcelulózy a spôsob jej prípravy

1

Vynález sa týka trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-(4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-1-yl)amino)-1,3,5-triazín-2-ylhydroxyetylcelulózy a spôsobu jej prípravy.

Stanovenie aktivity glukonáz s endo-spôsobom ataku polymérnych substrátov sa v posledných rokoch značne zjednodušuje používaním tzv. chromogénnych substrátov, t. j. polysacharidov s kovalentne naviazaným farbivom. V prípade celuláz (endo-1,4- β -glukonáz) sa používa niekoľko typov chromogénnych substrátov. Firma Calbiochem vyrába substrát, ktorý predstavuje vo vode nerozpustnú, čiastočne amorfnú celulózu s kovalentne naviazaným modrým farbivom. E. Kuniak a J. Zemek pripravili preparát založený na báze sodnej soli 2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-yl-amino)fenyl-sulfonyl] etyl - mikrokryštalickej celulózy upravený vo forme tabletiiek (čs. AO 219 575).

Podobne M. Linko a M. Leisola pripravili mikrokryštalickú celulózu s tým istým naviazaným farbivom ako substrát vhodný predovšetkým pre stanovenie aktivity celuláz, ktoré atakujú kryštalické oblasti celulózy [M. Linko, M. Leisola: Anal. Biochem. 70, 592 (1976)]. Ďalším chromogénnym substrátom na stanovenie aktivity je vodone-

2

rozpustná O-(2,4,6-trinitrofenyl)celulóza, ktorej príprava ale vyžaduje pomerne drahé a toxické chemikálie a samotný substrát sa vyznačuje nestálosťou [J. S. Huang, J. Tang.: Anal. Biochem. 73, 369 (1976)]. Farebný substrát na báze hydroxyetylcelulózy bol pripravený sieťovaním hydroxyetylcelulózy epichlórhydrínom a potom reakciou s dvojsodnou soľou 1-amino-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátoethylsulfonylanilino)] antrachinónu (čs. AO 192 202).

Vo všetkých vyššie uvedených prípadoch ide o substráty nerozpustné vo vode, pričom princípom stanovenia aktivity celuláz ich prostredníctvom je spektrofotometrické meranie množstva farbiva uvoľneného do roztoku vo forme rozpustných fragmentov polysacharidu s kovalentne naviazaným farbivom. Nevýhodou nerozpustných substrátov sú ťažkosti s ich dávkovaním (tabletovaním sa tieto ťažkosti odstraňujú) ako i heterogenita inkubačných zmesí s enzýmom, keďže nerozpustný substrát nedovoľuje bez miešania rovnomerné vytváranie enzým-substrátového komplexu v celom objeme zmesi. Nerozpustné substráty nie sú tiež vhodné na sledovanie aktivity enzýmov viazaných na nerozpustné štruktúry, či už nosiče alebo bunkové organely. Z tohto hľadiska je preto výhodnejšie použiť ďalší typ

chromogénnych substrátov, ktoré sú rozpustné vo vode a predovšetkým v tlmivých roztokoch, v ktorých sa stanovenie enzýmovej aktivity uskutočňuje. Sú to chromogénne deriváty modifikovanej celulózy, ktorá je vo vodorozpustnej forme.

Na tieto účely je vhodná karboxymetylcelulóza alebo hydroxyetylcelulóza. Nevýhodou doteraz pripravených chromogénnych substrátov na uvedenej báze je, že karboxymetylcelulóza sa musí upraviť čiastočnou enzymatickou depolymerizáciou, aby sa zvýšila jej rozpustnosť [B. V. McCleary: Carbohydr. Res. 86, 97 (1980)] a vodorozpustná hydroxyetylcelulóza po naviazaní dvojsodnej soli 1-amíno-2-sulfo-4-[3-(2-sulfátotetylsulfonylanilino)] antrachinónu sa stáva nerozpustnou v tlmivých roztokoch, v ktorých sa uskutočňuje stanovenie enzýmovej aktivity.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje tento vynález. Podstatou vynálezu je vodorozpustný chromogénny substrát trojsodná soľ 4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylcelulózy. Ďalej podstatou vynálezu je spôsob prípravy tohto substrátu, ktorý sa vyznačuje tým, že vodorozpustná hydroxyetylcelulóza reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 1 až 3 % hmot. hydroxidu sodného alebo hydroxidu draselného za prítomnosti solí ako octan sodný, síran sodný a chlorid sodný pri teplote 20 až 50 °C počas 1 až 2 h s trojsodnou soľou 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazínu pri hmotnostných pomeroch hydroxyetylcelulóza : trojsodná soľ 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazínu : hydroxid sodný alebo hydroxid draselný = 1 : 0,2 až 0,8 : 0,4 až 1,2; načo sa zafarbená hydroxyetylcelulóza vyzráža 3 objemami roztoku obsahujúceho 1,5 až 2 objemu 96 % obj. etylalkoholu a 1 až 1,5 objemu acetónu a nenaviazané farbivo a farebné nízkomolekulárne frakcie hydroxyetylcelulózy sa odstránia vymývaním s roztokom obsahujúcim 1 objem 0,6 až 1 % hmot. vodného roztoku octanu sodného a 3 objemy roztoku obsahujúceho 1,5 až 2 objemy 96 % obj. etylalkoholu a 1 až 1,5 objemu acetónu až do bezfarebného filtrátu.

Výhodou navrhovaného nového substrátu a spôsobu jeho prípravy je, že sa získa jednoduchým spôsobom farebný substrát rozpustný v tlmivých roztokoch, v ktorých sa uskutočňuje stanovenie enzýmovej aktivity. Ďalšou výhodou je, že tento substrát je zraňaný a vymývaný za prítomnosti octanu sodného, t. j. za podmienok zhodných s podmienkami zrážania enzymaticky nerozštiepených farebných makromolekúl pri stano-

vení aktivity endo-1,4- β -glukanáz. Výhodou je tiež to, že základné suroviny sú dostupné.

Príklad 1

1 g hydroxyetylcelulózy sa rozpustí v 30 mililitroch dest. vody, potom sa pridá 0,3 gramov trojsodnej soli 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazínu (Ostazinová červená bril. H-3B) rozpustenej v 5 ml dest. vody. Po dôkladnom premiešaní sa pridá 5 ml 6 % hmot. vodného roztoku chloridu sodného a 10 ml 15 % hmot. vodného roztoku hydroxidu draselného. Mieša sa 2 h pri teplote 20 °C. Po zneutralizovaní reakčnej zmesi 3 mol. l⁻¹ kyselinou chlorovodíkovou na pH 7 sa zafarbený produkt vyzráža s roztokom 93 ml 96 % obj. etylalkoholu a 93 ml acetónu.

Vzniknutá zrazenina sa filtruje na nuči a premýva roztokom obsahujúcim 1 diel 0,6 perc. hmot. vodného roztoku octanu sodného, 1,5 dielu 96 % obj. etylalkoholu a 1,5 dielu acetónu do bezfarebného filtrátu. Potom sa zrazenina premyje roztokom 96 % obj. etylalkoholu a vody 3 : 1. Ešte vlhká zrazenina sa rozpustí v 50 ml vody a lyofilizuje. Získa sa 1 g farebnej hydroxyetylcelulózy s obsahom 2,5 % hmot. trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazín-2-yl.

Príklad 2

10 g hydroxyetylcelulózy sa rozpustí v 200 mililitroch dest. vody pri teplote 40 °C. Potom sa pridá 8 g trojsodnej soli 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazínu rozpustenej v 50 ml dest. vody a ďalej 50 ml 6 % hmot. vhodného roztoku octanu sodného a nakoniec 100 ml 4 % hmot. vodného roztoku hydroxidu sodného. Mieša sa 1 h pri teplote 40 °C. Reakčná zmes sa zneutralizuje s 3 mol. l⁻¹ kyselinou octovou na pH 7 a vyzráža za intenzívneho miešania s 860 ml 96 % obj. etylalkoholu a 430 ml acetónu.

Zrazenina sa prefiltruje na nuči a premýva roztokom obsahujúcim 1 diel 1 % hmot. vodného roztoku octanu sodného, 2 diely 96 % obj. etylalkoholu a 1 diel acetónu do bezfarebného filtrátu. Potom sa zrazenina premýva roztokom 96 % obj. etylalkoholu a vody 3 : 1 a ešte vlhká sa rozpustí v 400 ml vody a lyofilizuje. Získa sa 10 g farebnej hydroxyetylcelulózy s obsahom 13 % hmot. trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamíno)-6-[4-metyl-2-sulfo-benzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amíno]-1,3,5-triazín-2-yl.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že sa použije miesto octanu sodného 5 % hmot. vodný roztok síranu sodného a 6,5 g trojsodnej soli 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu. Reakcia prebieha pri teplote 50 °C po dobu 1 h. Získa sa 10 g farebnej hydroxyetylcelulózy s obsahom 20 perc. hmot. trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl-.

Príklad 4

60 g hydroxyetylcelulózy sa rozpustí v 1 200 ml dest. vody počas 24 h. Potom sa pridá postupne 24 g trojsodnej soli 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu rozpustenej v 300 ml dest. vody, potom 50 ml 30 % hmot. vodného roztoku octanu sodného a nakoniec 600 ml 4 % hmot. vodného roztoku hydroxidu sodného. Teplota sa zvýši na 50 stupňov Celsia a reakčná zmes sa mieša pri tejto teplote 1 h. Po ukončení sa zneutrali-

zuje s 5 mol. l⁻¹ kyselinou octovou na pH 7 a zráža s 4 600 ml 96 % obj. etylalkoholu a 2 300 ml acetónu. Vyzrážaná zafarbená hydroxyetylcelulóza sa premýva roztokom obsahujúcim 1 diel 0,6 % hmot. roztoku octanu sodného, 2 diely 96 % obj. etylalkoholu a 1 diel acetónu do slabého sfarbenia filtrátu. Zrazenina sa ešte vo vlhkom stave rozpustí v 1 500 ml 0,6 % hmot. vodného roztoku octanu sodného a prezráža zmesou rozpúšťadiel obsahujúcou 3 000 mililitrov 96 % obj. etylalkoholu a 1 500 ml acetónu. Zrazenina sa prefiltruje cez nuč a premýva roztokom obsahujúcim 1 diel 0,6 % hmot. vodného roztoku octanu sodného, 2 diely 96 % obj. etylalkoholu a 1 diel acetónu do bezfarebného filtrátu a nakoniec s roztokom 96 % obj. etylalkoholu a vody 3 : 1. Vlhká zrazenina sa rozpustí v 1 500 ml vody a lyofilizuje. Získa sa 55 g farebnej hydroxyetylcelulózy s obsahom 15 perc. hmot. trojsodnej soli 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl-.

Vynález má použitie v biochémií pre detekciu a kvantitatívne stanovenie aktivity endo-1,4-β-glukanáz ako zložiek celulózo-vých enzýmových systémov.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Trojsodná soľ 4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylcelulózy.

2. Spôsob prípravy zlúčeniny podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že vodorozpustná hydroxyetylcelulóza reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 1 až 3 % hmot. hydroxidu sodného alebo hydroxidu draselného za prítomnosti solí ako octan sodný, síran sodný a chlorid sodný pri teplote 20 °C až 50 stupňov Celsia počas 1 až 2 h s trojsodnou soľou 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu

pri hmotnostných pomeroch hydroxyetylcelulóza : trojsodná soľ 2-chlór-4-(N-etyl-N-fenylamino)-6-[4-metyl-2-sulfobenzén-1-azo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-1-yl)amino]-1,3,5-triazínu : hydroxid sodný alebo hydroxid draselný = 1 : 0,2 až 0,8 : 0,4 až 1,2; načo sa zafarbená hydroxyetylcelulóza vyzráža zmesou rozpúšťadiel obsahujúcou 1,5 až 2 objemy 96 % obj. etylalkoholu a 1 až 1,5 objemu acetónu a zrazenina sa premýva roztokom obsahujúcim 1 objem 0,6 až 1 % hmot. vodného roztoku octanu sodného, 1,5 až 2 objemy 96 % obj. etylalkoholu a 1 až 1,5 objemu acetónu až do bezfarebného filtrátu.