



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 819

(21) PV 1656-88.U
(22) Prihlásené 14 03 88

(40) Zverejnené 13 12 89
(45) Vydané 04 07 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 08 B 37/00

(75) Autor vynálezu ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE,
ZELENAYOVÁ EVA ing., PIEŠŤANY

(54) Spôsob prípravy sieťovaných kyslých
polysacharidov

(57) Riešenie sa týka prípravy sieťovaných kyslých polysacharidov postupom, kedy na 1 mol použitej anhydroglykozylovej jednotky kyslého polysacharidu sa aplikuje 0,1 až 1,5 mólu homo- alebo heterobifunkčného činidla, ako 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éteru alebo 2-chlórometylooxiránu v prostredí 0,4 až 1,2 mólu hydroxidu sodného alebo draselného pre 2-chlórometyloxirán alebo pri pH nad 11,2 pre 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éter po dobu 1 až 3 hodín pri 40 až 80 °C. Riešenie má uplatnenie v analytickej biochémií v preparatívnej bioorganickej chémii, v klinickej biochémií, v enzýmovom inžinierstve a v technológiách využívajúcich rekombinantnú dezoxyribonukleovú kyselinu.

Vynález sa týka spôsobu prípravy sieťovaných kyslých polysacharidov pre využitie v analytickej biochémii, dioorganicznej syntéze a enzýmovom inžinierstve.

Aj keď v dôsledku rozvoja biotechnológií dochádza k dynamickému rozvoju nových analytických a preparatívnych metód, založených na použití ionexov anorganického a organického syntetického pôvodu, biopolyméry, predovšetkým však polysacharidy kyslého a bazického pôvodu si ponechávajú svoj význam a to predovšetkým s ohľadom na vysokú čistotu východiskových surovín - izolovaných prečistených biopolymérov, ich pravidelnú štruktúru a vysoké zastúpenie funkčných skupín, karboxylových (pektín, kyselina pektová, kyselina alginová, kyselina hyaluronová, chondroitín, heparín a proteíny kyslého typu), sulfónových (chondroitín 6-sulfát, keratan sulfát, dermatan sulfát, heparín) a primárnych aminoskupín (chitozan, bazické proteíny). Ionexy pripravené z prírodných polymérov sa nevyznačujú vysokými nešpecifickými sorpciami a vzhľadom k vysokej čistote použitých surovín nedochádza k negatívnemu ovplyvneniu vlastností stanovovaných alebo izolovaných biologicky aktívnych látok.

Prípravou pektínového katexu sa zaoberá čl. patent 140 713, kde východiskovou surovinou pre reakciu sieťovania je kyselina pektová (deesterifikovaný pektín). Približne ekvimolárne zastúpenie jednotlivých zložiek v reakčnej zmesi (pektín, hydroxid sodný a 2-chlórometyloxiran) neumožňuje prípravu sieťovaného gélu o vhodných hydrodynamických vlastnostiach. Pri príprave sieťovaného gélu kyseliny pektovej podľa A.O. 218 702 sa síce vychádza priamo z citrusového pektínu a deesterifikačná reakcia spolu s reakciou sieťovania prebiehajú v jednom reakčnom stupni, pripravený gél, vhodný po ďalšej aktivácii i imobilizácii enzýmov, nevyhovuje však k použitiu ako katex a to pre nízky stupeň sieťovania a vysoký napučací objem. Je potrebné však súčasne zdôrazniť, že podmienky sieťovania 2-chlórometyloxiránom vyhovujú len pre alkalistabilnejšie biopolyméry, zatiaľ čo alkalilabilné sa v prítomnosti vysokej koncentrácie hydroxidov rozkladajú.

Uvedené nedostatky odstraňuje postup podľa vynálezu, podstata ktorého spočíva v tom, že kyslý polysacharid sa sieťuje homo- alebo heterobifunkčným činidlom, s výhodou 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éterom alebo 2-chlórometyloxiránom v pomere na 1 mól substituovanej anhydroglykozylovej jednotky kyslého polysacharidu 0,1 až 1,5 mólu 2,2'-bis(oxiranylmetyl) éteru alebo 2-chlórometyloxiránu pri pH nad 11,2 pre sieťovanie 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éterom alebo v prítomnosti 0,4 až 1,2 mólu hydroxidu sodného alebo draselného na 1 mól substituovanej anhydroglykozylovej jednotky polysacharidu, pri sieťovaní 2-chlórometyloxiránom a 5 až 20 mólov destilovanej vody, pri teplote 40 až 80 °C po dobu 1 až 3 hodín.

Po zosietení sa reakčná zmes zaleje nadbytkom destilovanej vody, rozvolní, neutralizuje pomocou kyseliny octovej alebo chlór vodíkovej, prípadne vybieli účinkom zriedeného chlórnanu sodného, odvodní postupným účinkom nadbytku 50% a potom 96 - 100% etanolu alebo acetónu a vysuší vo vákuovej sušiarňi. Vysušený gél sa vytriedi na sitách na frakcie o potrebnom zrnení a upraví na vhodnú hodnotu pH pre ďalšie použitie.

Výhodou uvedeného postupu je skutočnosť, že základný materiál, kyslý polysacharid je poväčšine ľahko dostupný a lacný, stupeň substitúcie DS kyslými funkčnými skupinami v prípade kyseliny pektovej, alginovej, chondritín 6-sulfátu a dermatan sulfátu je okolo 1, v prípade keratan sulfátu a hyaluronovej kyseliny je okolo 0,5 a u heparínu je okolo 2. Pri sieťovaní esterifikovaných kyslých polysacharidov predovšetkým pomocou 2-chlórometyloxiránu dochádza aj k súčasnej deesterifikácii. V prípade sieťovania pomocou 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éteru možno reakciu sieťovania zabezpečiť aj bez deesterifikácie. Zostavou reakčnej zmesi možno regulovať stupeň sieťovania gélu a jeho napučací objem v rozsahu od 3,8 až po 25 ml.g⁻¹.

Príklad 1

Ku kyseline pektovej (176 g; 1 mól anhydrogalakturónovej kyseliny) sa pridalo za miešania 40 ml destilovanej vody a potom postupne v priebehu ďalších 30 minút za stáleho miešania 1 mól NaOH, rozpustený v 50 ml destilovanej vody. Po dokonalom zvlhčení a zhomogenizovaní reakčnej zmesi za stáleho miešania a chladenia sa pridávalo postupne 0,5 mólu 2-chlórometyloxiránu a po dôkladnom premiešaní sa zvýšila teplota reakčnej zmesi na 40 °C. Po 3 hodinách priebehu sa vybielil účinkom 200 ml 0,5% chlórnanu sodného, znovu vymyl v destilovanej vode a adjustoval do H⁺ cyklu účinkom 400 ml 2% kyseliny fosforečnej. Nadbytok voľnej kyseliny fosforečnej sa vymyl opakovane 500 ml destilovanej vody a vysušil postupným odvodnením pomocou 50% etanolu alebo acetónu (1000 ml) a 96 až 100% etanolu alebo acetónu a dosušil vo vakuovej sušiarňi. Získaný sieťovaný gél kyseliny pektovej (204 g) mal výmennú kapacitu 5,2 mól.g⁻¹ a napučací objem 12,5 ml.g⁻¹.

Príklad 2

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto kyseliny pektovej sa použije 187 g jablčného pektínu o stupni esterifikácie 62%. Reakčným produktom bolo 205 g gélu sieťovanej kyseliny pektovej o výmennej kapacite 5,2 mól.g⁻¹ a napučacom objeme 12 ml.g⁻¹.

Príklad 3

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto 40 ml destilovanej vody sa ku zvlhčeniu kyseliny pektovej použije 100 ml a 1,2 móly NaOH sa rozpustí v ďalších 100 ml destilovanej vody. K sieťovaniu sa použilo 1,5 mólu 2-chlórometyloxiránu. Reakcia sieťovania prebiehala pri 80 °C po dobu 1 hodiny. Získaný gél kyseliny pektovej (211 g) mal výmennú kapacitu 4,6 mól.g⁻¹ a napučací objem 6,0 ml.g⁻¹.

Príklad 4

Postupuje sa tak, ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa k sieťovaniu použije 0,1 mól 2-chlórometyloxiránu a 0,4 mólu KOH. Získaný gél sieťovanej kyseliny pektovej (145 g) mal výmennú kapacitu 5,4 mól.g⁻¹ a napučací objem 25 ml.g⁻¹.

Príklad 5

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto kyseliny pektovej sa použije kyselina alginová. Získaný gél sieťovanej kyseliny alginovej (145 g) mal výmennú kapacitu 4,8 mól.g⁻¹ a napučací objem 23 ml.g⁻¹.

Príklad 6

Postupuje sa tak, ako v príklade 1 s tým rozdielom, že kyselina pektová sa rozpustí v 150 ml borátového pufru (pH 11,2; 0,05 mol) a k sieťovaniu sa použije 1 mól 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éteru. Získaný gél sieťovanej kyseliny pektovej (218 g) mal výmennú kapacitu 5,1 mól.g⁻¹ a napučací objem 15,6 ml.g⁻¹.

Príklad 7

Postupuje sa tak ako v príklade 6, s tým rozdielom, že namiesto kyseliny pektovej sa použije 0,01 mólu substituovaných anhydroglykozylových skupín heparínu. Získaný gél sieťovaného heparínu (210 g) mal výmennú kapacitu 7,1 mól.g⁻¹ (SO₃⁻) a 2,1 mól.g⁻¹ karboxylových skupín. Napučací objem získaného gélu bol 18,5 ml.g⁻¹.

Príklad 8

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 6, s tým rozdielom, že namiesto kyseliny

ny pektovej sa použije kyselina hyaluronová (2 g; tj. cca 0,01 mol). Pri zachovaní ostatných molárnych proporcií tak, ako je uvedené v príklade 6 sa získal gél sieťovanej kyseliny hyaluronovej v množstve 2,1 g o výmennej kapacite $2,8 \text{ mol.g}^{-1}$ (karboxylová skupina) a napučacom objeme $17,7 \text{ ml.g}^{-1}$.

Príklad 9

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 8, s tým rozdielom, že sa namiesto kyseliny hyaluronovej použije chondroitín 6-sulfát. Získaný gél 2,4 g sieťovaného chondroitín 6-sulfátu mal výmennú kapacitu $2,4 \text{ mol.g}^{-1}$ (karboxylová skupina) a $2,1 \text{ mol.g}^{-1}$ ($-\text{SO}_3^-$).

Príklad 10

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 8, s tým rozdielom, že namiesto kyseliny hyaluronovej sa použije keratan sulfát. Získaný gél, 1,6 g sieťovaného keratan sulfátu mal výmennú kapacitu $1,6 \text{ mol.g}^{-1}$ ($-\text{SO}_3^-$) a napučací objem $14,1 \text{ ml.g}^{-1}$.

Príklad 11

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 8, s tým rozdielom, že sa namiesto kyseliny hyaluronovej použije dermatan sulfát. Získaný gél, 1,8 g sieťovaného dermatanu mal výmennú kapacitu $2,4 \text{ mol.g}^{-1}$ (karboxylová skupina) a $2,2 \text{ mol.g}^{-1}$ ($-\text{SO}_3^-$) a napučací objem $19,2 \text{ ml.g}^{-1}$.

Vynález má široké uplatnenie predovšetkým v analytickej biochémií, v bioorganickej chémii, v enzýmovom inžinierstve a v technológiách využívajúcich rekombinantnú dezoxiribonukleovú kyselinu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy sieťovaných kyslých polysacharidov vyznačený tým, že kyslý polysacharid sa sieťuje homo- alebo heterobifunkčným činidlom, s výhodou 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éterom alebo 2-chlórometyloxiránom v pomere na 1 mól substituovanej anhydroglykozylovej jednotky kyslého polysacharidu 0,1 až 1,5 mólu homo- alebo heterobifunkčného činidla pri pH nad 11,2 pre sieťovanie 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éterom alebo v prítomnosti 0,4 až 1,2 mólu hydroxidu sodného alebo draselného na 1 mól substituovanej anhydroglykozylovej jednotky polysacharidu, pri sieťovaní 2-chlórometyloxiránom a 5 až 20 mólov destilovanej vody pri teplote 40 až 80 °C po dobu 1 až 3 hodín.