



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

220789
(11) (B2)

- (22) Přihlášeno 20 06 79
(21) (PV 4243-79)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 06 78
(P 28 26 965.0)
Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 27 08 82
(45) Vydáno 15 12 85

(51) Int. Cl.³
C 07 D 327/04
G 01 N 33/54

- (72) Autor vynálezu BERGER DIETER dr., VIERNHEIM, BRAUN FRANZ dr., RIMBACH,
FREY GÜNTER, LUDWIGSHAFEN/RHEIN, GÜTHLEIN WERNER dr.,
MANNHEIM-NECKARAU, WERNER WOLFGANG dr., MANNHEIM-
-VOGELSTANG (NSR)
(73) Majitel patentu BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (NSR)

(54) Diagnostický prostředek k důkazu leukocytů v tělesných tekutinách

1

2

Diagnostický prostředek k důkazu leukocytů v tělesných tekutinách sestávající ze svého nosiče, který je impregnovaný chromogenem a vhodným puřem. Jako chromogen se použije sulfonftaleinový ester.

Důkaz leukocytů v tělesných tekutinách, obzvláště v moči, zaujímá přední místo v diagnostice onemocnění ledvin a urogenitálního traktu.

Dříve se prováděl tento důkaz těžkopádným spočítáním leukocytů v neodstředěné moči nebo v močovém sedimentu. Obě metody jsou povahou obecné, protože zachycují jen intaktní leukocyty. Na druhé straně je známo, že rychlost rozpadu leukocytů je podle prostředí moči enormě kolísavá, takže se musí počítat například v silně alkalické moči s poločasem rozpadu leukocytů jen 60 minut. U nízkého počtu leukocytů nebo u delšího stání moči jsou následkem i zkresleně negativní nálezy.

Nehledě k chybě způsobené rozkladem leukocytů, poskytuje kvantitativní mikroskopické stanovení leukocytů v neodstředěné, nehomogenizované moči v počítací komůrce velmi spolehlivé hodnoty. V praxi se používá tato metoda však jen zřídka, protože je obtížná, únavná a zabírající mnoho času a podmiňuje nasazení školního personálu.

Převládající počet stanovení leukocytů v moči se provádí v lékařské praxi podle tak zvané metody zorného pole v sedimentu moči. Pro toto stanovení se musí nejprve získat odstředěným sediment. Přitom se však koncentrují také ostatní složky moči, které — jako například epithelové buňky a soli — mohou značně ztěžovat mikroskopické počítání leukocytů. Kolísající obsah sedimentu, nehomogenizovaný sediment a různá mikroskopická zvětšení nebo různé optické vybavení mikroskopu vede k tomu, že obvyklé „kvantitativní“ stanovení počtu leukocytů na mikroskopické zorné pole může být zatíženo chybami několika set procent.

Úkolem vynálezu je proto připravit diagnostický prostředek, se kterým se může jednoduchým a snadno zvládnutelným způsobem a pokud možno rychle a úplně dokázat leukocyty v tělesných tekutinách.

Principem důkazu pro tyto zkoušky leukocytů může být enzymatická reakce, protože leukocyty mají široce rozvětvené enzymatické spektrum.

V US patentu č. 3 087 794 je již popsán a nárokován důkaz leukocytů, který byl veden přes peroxidickou aktivitu granulocytických leukocytů. Savý nosič, který je impregnován peroxidem vodíku a organickým indikátorem, například o-tolidinem, ukazuje přítomnost leukocytů vytvořením barevného oxidačního produktu. Tato zkouška má však podstatné nevýhody. Na jedné straně mají peroxidické reakce zcela obecně oproti redukujícím látkám v moči, jako například oproti kyselině askorbové, značnou poruchovost. Na druhé straně jsou v literatuře (viz například L. Mettler, Med. Welt 23, 399 /1972/) zmínky o nestabilitě peroxidázy leukocytů v prostředí moči, která dává podnět k nesprávným nálezům.

Kolorimetrické průkazní metody, které

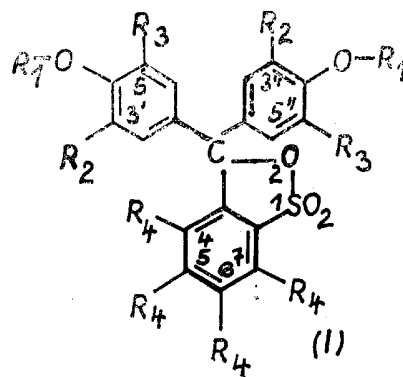
spočívají na esterolytické aktivitě enzymů přítomných ve stanovených systémech, mají několik let své stálé místo v histochemické a cytochemické enzymologii (srov. například A. G. E. Pearse, Histochemistry, Theoretical and Applied). V principu se použijí při této metodě bezbarvé nebo slabě zbarvené estery, které se rozloží enzymatickým štěpením většinou na bezbarvou kyselinovou a případně bezbarvou alkoholovou (fenolovou) složku. Posledně jmenovaná složka se potom nechá reagovat po enzymatickém zmýdelnění na barevné produkty (například kopulace s diazoniovými solemi nebo oxidační reakce).

F. Schmalzl a H. Braunsteiner popisují v Klin. Wschr. 46. 642 (1968) specifický cytochemický důkaz leukocytoesterazy naftolem-AS-D-chlor-acetátem jako substrátem a diazoniovou solí pro vytvoření barevné azosloučeniny.

Pro diagnostický prostředek k rychlému a jednoduchému důkazu leukocytů v tělesných tekutinách, jako například v moči, nejsou dvousložkové systémy tohoto druhu vhodné, protože jak známo reaguje mnoho sloučenin přítomných v moči, jako urobilinogen, sterkobilinogen, bilirubin aj. s diazoniovými solemi. Kromě toho je tento důkaz příliš málo citlivý, například vzorky s 5000 leukocyty/ μ l neukazují žádnou reakci.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že se získá stabilní a rychle ukazující diagnostický prostředek, se kterým se dobře dokáží leukocyty v tělesných tekutinách, když se použije jako substrát k důkazu esterázy přítomné v neutrofilních leukocytech granulocytech sulfonftaleinový ester.

Předmětem vynálezu je diagnostický prostředek k důkazu leukocytů v tělesných tekutinách, sestávající ze svého nosiče, který je impregnovaný chromogenem a vhodným puforem, který se vyznačuje tím, že jako chromogen se použije sulfonftaleinový ester obecného vzorce I



ve kterém

R₁ znamená zbytek alifatické karboxylové kyseliny s 1 až 4 atomy uhlíku nebo benzo-yl, případně substituovaný halogenem, s vý-

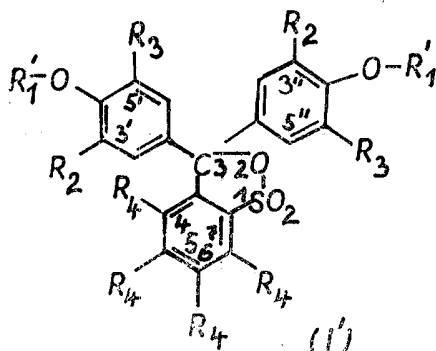
hodou chlorem a bromem, nebo alkokyskupinou s 1 až 5, s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku, zbytek přírodní L- α -aminokyseliny nebo dipeptidový zbytek opatřený na dusíku ochrannou skupinou jako acylovým zbytkem,

R₂ znamená atom halogenu, s výhodou chloru a bromu, nebo alkylovou skupinu s 1 až 5, s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku,

R₃ a R₄, které mohou být stejné nebo rozdílné, znamenají vodík nebo atom halogenu, s výhodou chlor nebo brom.

Sulfonftaleinové estery obecného vzorce I jsou většinou nové sloučeniny. Z literatury je pouze známý diacetyl-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein (= bromfenolová modř — diacetát) a dibenzoyl-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein (= bromfenolová modř — dibenzoát), viz W. R. Orndorf, F. W. Sherwood, J. Amer. Chem. Soc. **45**, 486 (1923).

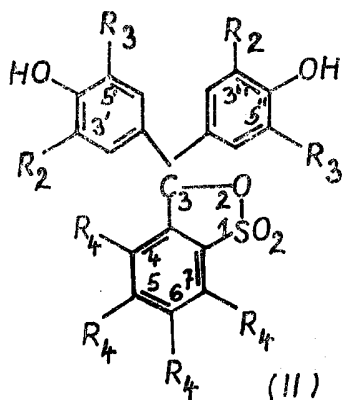
Nové sulfonftaleinové estery mají obecný vzorec I'



ve kterém

R₂, R₃ a R₄ mají výše uvedený význam a R₁' má stejný význam jako R₁, avšak pro případ, že R₂ a R₃ představuje atom bromu a R₄ atom vodíku, neznámá acetyl nebo benzoyl.

Příprava sloučenin se může provádět podle známých metod tak, že se nechají reagovat příslušné, známé sulfonftaleiny obecného vzorce II



ve kterém,

R₂, R₃ a R₄ mají výše uvedený význam, s kyselinami obecného vzorce III



ve kterém

R₁' má výše uvedený význam, nebo s vhodným reaktivním derivátem.

Jako reaktivní deriváty se použijí zvláště příslušné anhydridy kyseliny karboxylové nebo chloridy kyseliny karboxylové, případně za přídavku terciárních aminů. K přípravě esterů aminokyseliny a peptidu se použijí syntézní metody obvyklé v chemii peptidů, jako například metody založené na použití směsného anhydridu a chloridu kyseliny.

Jako halogen v substituentu R₁, R₁', R₂, R₃ a R₄ se rozumí fluor, chlor a brom, s výhodou chlor a brom.

„Alkokyskupina“ v substituentu R₁ nebo R₁' a „alkylová skupina“ substituentu R₂ obsahuje 1 až 5, s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž je obzvláště výhodná methoxyskupina nebo methylová skupina.

Jako zbytky karboxylové kyseliny substituentu R₁ nebo R₁' přicházejí v úvahu zbytky alifatických karboxylových kyselin s 1 až 4 atomy uhlíku, nebo také aromatických karboxylových kyselin, jako například benzoové kyseliny. Obzvláště výhodné jsou acetylové, propionylové a benzoylové zbytky.

Jako zbytky aminokyseliny substituentu R₁ nebo R₁' jsou výhodné zbytky přírodních L- α -aminokyselin, obzvláště L-alaninu, L-fenylalaninu, L-lysinu, L-tyrosinu, L-argininu, které mohou být substituované nitroskupinou, a jejichž eventuálně přítomná hydroxylová skupina má na kyslíku ochrannou skupinu, například acetylovou skupinu.

Jako peptidový zbytek v definici substituentu R₁ nebo R₁' se rozumí dipeptidy, přičemž jako aminokyselina se použijí výše uvedené aminokyseliny.

Sulfonftaleinové estery vzorce I použité podle vynálezu jako chromogeny se použijí v koncentraci 10⁻⁴ až 10⁻¹ mol/l, s výhodou 10⁻³ až 10⁻² mol/l impregnačního roztoku.

Další složkou diagnostického prostředku k důkazu leukocytů je vhodný pufrový systém. Jako pufr přichází například v úvahu fosforečnan, barbiturát, boritan, tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-amino-2-methylpropan-1,3-diol nebo aminokyselina, přičemž hodnota pH a kapacita se musí zvolit tak, aby se po ponoření zkušebního proužku do tělesné tekutiny upravilo pH na hodnotu 6 až 10, s výhodou 7 až 9.

Dále je výhodné použít při přípravě diagnostického prostředku podle vynálezu k důkazu leukocytů v tělesných tekutinách ještě tensidy, protože se tak může dosáhnout kratší reakční doby.

S výhodou se použijí kationaktivní smáčecí prostředky, jako například kvartérní pyridiniové soli v koncentraci 0,05 až 2 %, s výhodou 0,1 až 0,5 %.

Pro přípravu diagnostického prostředku podle vynálezu se s výhodou impregnuje savý nosič, jako například filtrační papír, celulóza nebo viskózní rouno, roztokem potřebných reagentů, obvykle používaných k přípravě zkušebních proužků (substrát, pufr, případně tensidy nebo také zahušňovadlo, jako například polyvinylpyrolidon, karboxymethylcelulóza a škrob, stabilizační prostředek, například aminokyseliny, barvivo pozadí, například tartrazin atd.) v snadno těkavých rozpouštědlech, jako například vodě, methanolu, ethanolu nebo acetonu. Toto se provádí ve dvou oddělených stupních. Nejprve se impregnuje vodným roztokem, který obsahuje pufr. Potom se impregnuje roztokem substrátu k důkazu esterázy obecného vzorce I. Ve speciálních případech se může také použít opačný postup impregnace. Hotové zkušební papírky se použijí jako takové nebo se známým způsobem přilepí na držáky nebo se podle DE patentu č. 2 118 455 naváží s výhodou mezi plastickou hmotu a jemnou mřížku.

Získá se diagnostický prostředek, který po ponoření do zkoumané tělesné tekutiny ukáže rychle a jednoduchým způsobem pomocí barevné reakce přítomných leukocytů. Protože zůstane aktivita esterázy přítomné v neutrofilních leukocytech — granulocytech plně zachována také po rozkladu leukocytů, mohou se diagnostickým prostředkem stanovovat jak intaktní, tak rozložené leukocyty. Chyba rozpadem nepřichází v úvahu.

Příklad 1

Filtrační papír (například Schleicher + Schüll 23 SL) se postupně impregnuje následujícími roztoky a potom se suší při 60 °C:

Roztok 1

tris-(hydroxymethyl)aminomethan	0,61 g
kyselina solná, 0,1 N	cca 5 ml
destilovaná voda do	100 ml

Roztok se upraví 0,1 N kyselinou solnou na hodnotu pH 9,0.

Roztok 2

diacetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5'''-oktabromfenolsulfonftalein (= tetrabromfenolová modř diacetát)	0,107 g
aceton, do	100 ml

Získá se bílý zkušební papír, který po ponoření do moči obsahující leukocyty se zabarví modře.

Může dokázat:

5000 leukocytů/μl moči v cca	2 minutách,
2000 leukocytů/μl moči v cca	5 minutách,
1000 leukocytů/μl moči v cca	10 minutách,
500 leukocytů/μl moči v cca	15 minutách.

Citlivost zkoušky leží asi při 500 leukocytů/μl:

Zkušební papírky s podobnými vlastnostmi (citlivost 300 až 1000 leukocytů/μl) se získají, když se použijí místo diacetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5'''-oktabromfenolsulfonftaleinu (= tetrabromfenolové modři-diacetátu) následující substráty:

a) Diacetyl-3',3''-dichlorfenolsulfonftalein
(= chlorfenolová červeň diacetát) poskytuje při ponoření do moči obsahující leukocyty červený reakční produkt.

b) Diacetyl-5',5''-dibrom-o-kresolsulfonftalein
(= bromkresolový purpur diacetát) poskytuje purpurově zbarvený reakční produkt.

c) Diacetyl-3',5',3'',5'''-tetrabromfenolsulfonftalein
(= bromfenolová modř diaceton) poskytuje modrý reakční produkt.

d) Diacetyl-3',3''-dibrom-5',5''-dichlorfenolsulfonftalein
(= bromchlorfenolová modř diacetát) poskytuje modrý reakční produkt.

e) Diacetyl-4,5,6,7-tetrabrom-3',5',3'',5'''-tetrachlorfenolsulfonftalein
(= tetrabromtetrachlorfenolová modř diacetát) poskytuje modrý reakční produkt.

f) Dichloracetyl-3',3''-dibrom-5',5''-dichlorfenolsulfonftalein
(= bromchlorfenolová modř dichloracetát) poskytuje modrý reakční produkt.

g) Dichloracetyl-3',5',3'',5'''-tetrabromfenolsulfonftalein
(= bromfenolová modř dichloracetát) poskytuje modrý reakční produkt.

h) Dichloracetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5'''-oktabromfenolsulfonftalein
(= tetrabromfenolová modř dichloracetát) poskytuje modrý reakční produkt.

i) Di-(2-methoxypropionyl)-4,5,6,7,3',5',3'',5'''-oktabromfenolsulfonftalein
(= tetrabromfenolová modř di-(2-methoxypropionát)/ poskytuje modrý reakční produkt.

j) Dibenzoyl-4,5,6,7,3',5',3'',5'''-oktabromfenolsulfonftalein
(= tetrabromfenolová modř dibenzoát) poskytuje modrý reakční produkt.

Příklad 2

Filtrační papír (např. Schleicher + Schüll 23 SL), se postupně impregnuje následujícími roztoky a potom se suší při 60 °C:

Roztok 1

di-natrium-tetraborát-dekahydrát	1,91 g
kyselina solná, 0,1 N	cca 20 ml
voda destilovaná, do	100 ml

Roztok se upraví 0,1 N kyselinou solnou na hodnotu pH 9,0.

Roztok 2

di-(N-benzyloxykarbonyl-L-fenylalanyl)- -3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein /= di-(N-benzyloxykarbonyl-L-fenylalanyl)bromfenolová modř/ acetón, do	0,123 g 100 ml
---	-------------------

Získá se bílý zkušební papír, který se při ponoření do moči obsahující leukocyty po cca 10 minutách modře zbarví. Citlivost zkoušky je asi při 1000 leukocytech/ μ l.

Zkušební papírky, s podobnými vlastnostmi (citlivost: 800 až 3000 leukocytů/ μ l) se získají, když se použijí místo di-(N-benzyloxykarbonyl-L-fenylalanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftaleinu následující substráty, přičemž se získají ve všech případech při ponoření do moči obsahující leukocyty modře reakční produkty.

a) Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-bromfenolová modř/

b) Di-(N α ,N ω -dibenzyloxykarbonyl-L-lysyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N α ,N ω -dibenzyloxykarbonyl-L-lysyl)-
bromfenolová modř/

c) Di-(N-benzyloxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N-benzyloxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)bromfenolová modř/

d) Di-(N-benzyloxykarbonyl-N-ethoxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N-benzyloxykarbonyl-N-ethoxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)bromfenolová modř/

e) Di-(N α -benzyloxykarbonyl-N ω -nitro-L-arginyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N α -benzyloxykarbonyl-N ω -nitro-L-arginyl)bromfenolová modř/

f) Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl-L-alanyl)-
-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein

/=
di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl-L-alanyl)bromfenolová modř/

g) Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-
-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenolsulfonftalein
/=
di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)tetrabromfenolová modř/

Příklad 3

Filtrační papír (například Schleicher + Schüll 23 SL), se postupně impregnuje následujícími roztoky a potom se suší při 60 °C:

Roztok 1

tris(hydroxymethyl)aminomethan	0,61 g
kyselina solná, 0,1 N	cca 5 ml
laurylpyridiniumchlorid	0,2 g
destilovaná voda do	100 ml

Roztok se upraví 0,1 N kyselinou solnou na hodnotu pH 9,0.

Roztok 2

Diacetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenol-sulfonftalein (= tetrabromfenolová modř diacetát)	0,107 g
acetón, do	100 ml

Získá se bílý zkušební papír, který se při ponoření do moči obsahující leukocyty asi po 1 minutě zbarví modře. Citlivost zkoušky je asi při 500 leukocytech/ μ l.

Také s dalšími substráty příkladu 1 a 2 se získají se smáčedlem, jako například výše použitým laurylpyridiniumchloridem, zkušební papírky, které mají oproti analogickým zkušebním papírkům bez smáčedla o polovinu kratší reakční dobu.

Příklad 4

Diacetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenol-sulfonftalein (= tetrabromfenolová modř diacetát)

5,0 g (5 mmol) tetrabromfenolové modři se rozpustí při zahřívání v 54 g [tj. 50 mililitrů (0,45 mol)] čerstvě destilovaného acetanhydridu a zahřívá se 3 h pod zpětným chladičem. Po zahuštění roztoku ve vakuu se rozmíchá olejovitý zbytek s malým množstvím isopropanolu a překrystaluje se z toluenu. Získaný diacetát taje při 166 až 167 °C a obsahuje 2 moly krystalické kyseliny octové, které se odstraní sušením při 60 °C za přítomnosti kysličníku fosforečného. Získá se 4,2 g = 77,4 % tetrabromfenolové modři diacetátu, bezbarvé krystaly, t. t. 174 °C (rozkl.).

Analogickým způsobem se získají z příslušně substituovaných fenolsulfonftaleinů následující sloučeniny:

a) Diacetyl-3',3''-dichlorfenolsulfonftalein
(chlorfenolová červeně diacetát), bezbarvé krystaly, t. t. 132 °C (rozkl.)

b) Diacetyl-5',5''-dibrom-o-kresolsulfonftalein
(= bromkresolový purpur diacetát), bezbarvé krystaly t. t. 117 °C (rozkl.)

c) Diacetyl-3',3''-dibrom-5',5''-dichlorfenolsulfonftalein
(= bromchlorfenolová modř + diacetát), bezbarvé krystaly, t. t. 217 °C (rozkl.)

d) Diacetyl-4,5,6,7-tetrabrom-3',5',3'',5''-tetrachlorfenolsulfonftalein
(= tetrabromtetrachlorfenolová modř diacetát), bezbarvé krystaly, t. t. 253 až 254 stupňů Celsia (rozkl.).

Příklad 5

Dichloracetyl-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenolsulfonftalein

(= tetrabromfenolová modř dichloracetát)

K roztoku 5,0 g (5 mmolu) tetrabromfenolové modři ve 100 ml absolutního tetrahydrofuranu se přidá za míchání 0,81 ml (10 mmolu) absolutního pyridinu a za chlazení se přikape při 10 °C roztok 1,18 g [tj 0,79 ml (10,5 mmolu)] čerstvě destilované chloracetylchloridu ve 3 ml absolutního tetrahydrofuranu. Po 2 hodinách míchání při teplotě místnosti se vytvořený pyridinhydrochlorid odsaje a filtrát se odpaří ve vakuu při 50 °C. Získá se 6,1 g olejovitého zbytku; tento zbytek se vaří s 50 ml isopropanolu, nerozpustné částky se oddělí. Po ochlazení v ledové lázni se izoluje 3,9 g (68,7 %) tetrabromfenolové modři dichloracetátu, slabě nažloutlých krystalů, t. t. 226 až 227 °C (rozkl.).

Analogickým způsobem se získají z příslušně substituovaných fenolsulfonftaleinů a příslušných chloridů kyseliny následující sloučeniny:

a) Dichloracetyl-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
(= bromfenolová modř dichloracetát), bezbarvé krystaly, t. t. 206 až 207 °C (rozkl.)

b) Dichloracetyl-3',3''-dibrom-5',5''-dichlorfenolsulfonftalein
(= bromchlorfenolová modř dichloracetát), bezbarvé krystaly, t. t. 172 °C (rozkl.)

c) Di-(2-methoxypropionyl)-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenolsulfonftalein
(= tetrabromfenolová modř di-(2-methoxypropionát)/, bezbarvé krystaly, t. t. 214 až 216 °C (rozklad).

d) Dibenzoyl-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenolsulfonftalein
(= tetrabromfenolová modř dibenzoát), bezbarvé krystaly, t. t. 196 až 197 °C (rozkl.).

Příklad 6

Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
(= di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-bromfenolová modř/

Roztok 1

Pro přípravu směsného anhydridu se rozpustí 3,13 g (14 mmol) N-benzyloxykarbonyl-L-alaninu v 50 ml absolutního tetrahydrofuranu, přidá se 1,93 ml (14 mmolu) triethylaminu a ochladí se na -15 až -20 °C. Potom se připepituje za míchání 1,34 ml (14 mmolu) ethylesteru kyseliny chlorovodíkové a reakční směs se nechá za vyloučení vody 20 až 30 minut v chladné lázni.

Roztok 2

4,69 g (7 mmolu) bromfenolové modři se rozpustí v 45 ml absolutního tetrahydrofuranu a ochladí se na -10 až -15 °C.

Reakce

Triethylaminhydrochlorid vyloučený z roztoku 1 při tvorbě směsného anhydridu se rychle odsaje a filtrát se přidá k roztoku 2. Přidají se ještě 2 ml pyridinu a za nepřístupu vlhkosti se míchá při -15 °C, přičemž pomalu uniká kysličník uhličitý.

Asi po 2 hodinách se přidá podruhé, asi po 16 hodinách potřetí, stejné množství čerstvě připraveného odsátého směsného anhydridu (roztok 1) a míchá se potom ještě asi 5 hodin při -15 °C.

Potom se reakční směs zpracuje tak, že se přidá několik kapek vody (k rozkladu přebytečného anhydridu) a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu. Zbytek se rozpustí ve 100 ml octanu a postupně se promyje 30 ml 1 N roztoku kyseliny citrónové, 20 ml vody, 70 ml 7% roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 2 × 25 ml vody. Po sušení síranem sodným se octanová fáze odpaří ve vakuu. Získá se 11,3 g nažloutlého, lepkaového surového produktu, který se čistí sloupcovou chromatografií na sílikagelu za použití směsi toluen-dioxan-octan (9:2:1).

Získá se 5,5 g (68 %) di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftaleinu jako bezbarvého, amorfního prášku, $\alpha_D^{20} = -33,6^\circ \text{C}$ ($c = 1 \%$, methanol).

Podle analýzy obsahuje sloučenina ještě 0,39 molu vody, 0,19 molu dioxanu, 0,60 molu toluenu.

Analogickým způsobem se získají následující sloučeniny reakcí příslušně substitovaných fenolsulfonftaleinů s různými aminokyselinami:

a) Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-fenylalanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N-benzyloxykarbonyl-L-fenylalanyl})$ -bromfenolová modř/, bezbarvý amorfni prášek, $\alpha_D^{20} = -33,5^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$, ethylacetát)

b) Di-(N α ,N ω -dibenzyloxykarbonyl-L-ly-syl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N}\alpha,\text{N}\omega\text{-dibenzyloxykarbonyl-L-ly-syl})$ bromfenolová modř/, bezbarvý amorfni prášek, $\alpha_D^{20} = -15^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$, ethylacetát)

c) Di-(N-benzyloxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N-benzyloxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl})$ bromfenolová modř/, bezbarvý, amorfni prášek, který obsahuje 0,6 ml octanu, $\alpha_D^{20} = -35,3^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$, ethylacetát)

Jako vedlejší produkt přitom ještě vznikne:

Di-(N-benzyloxykarbonyl-N-ethoxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N-benzyloxykarbonyl-N-ethoxykarbonyl-O-acetyl-L-tyrosyl})$ bromfenolová modř, bezbarvý, amorfni prášek, $\alpha_D^{20} = -19,5$ stupňů Celsia ($c = 1\%$, ethylacetát)

d) Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-4,5,6,7,3',5',3'',5''-oktabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl})$ tetrabromfenolová modř/, bezbarvý, amorfni prášek, $\alpha_D^{20} = -28,7^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$ methanol).

Příklad 7

Di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl-L-alanyl})$ bromfenolová modř/

Roztok 1

Pro přípravu chloridu kyseliny se podle jednostupňové metody rozpustí 1,18 g (4 mmolů) N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl-L-alaninu v 10 ml absolutního dimethylformamidu a ochladí se na -30°C . Potom se za míchání a chlazení připipetuje 0,32 ml (4,4 mmolu) thionylchloridu a reakční směs se nechá 30 minut za vyloučení vody v chladicí lázni (-30°C).

Roztok 2

1,34 g (2 mmolu) bromfenolové modři se rozpustí 10 ml absolutního dimethylformamidu a ochladí se na -10 až -20°C .

Reakce 2

Roztok 2 se přidá k roztoku 1, přidá se 1 ml pyridinu a 2 hodiny se míchá při -10 až -20°C , potom 2 hodiny při teplotě místnosti. Stejná množství čerstvě připraveného chloridu kyseliny (roztok 1) a pyridinu se přidají celkem ještě 3X, přičemž se vždy zachovávají výše uvedené reakční podmínky.

Reakční směs se potom odpaří ve vakuu do sucha a potom se dále zpracuje jak uvedeno v příkladu 6.

Získá se 2,67 g amorfniho surového produktu, který se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití směsi heptan-ethyl ester kyseliny octové v poměru 1:2.

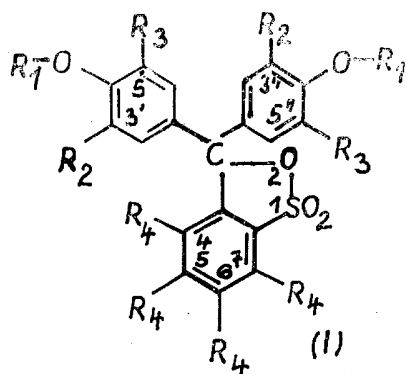
Získá se 1,4 g (57 %) di-(N-benzyloxykarbonyl-L-alanyl-L-alanyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftaleinu jako bezbarvého, amorfniho prášku, který obsahuje 0,6 molu ethylesteru kyseliny octové; $\alpha_D^{20} = -5,9^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$, ethylacetát).

Analogickým způsobem se získá následující sloučenina:

a) Di-(N α -benzyloxykarbonyl-N ω -nitro-L-arginyl)-3',5',3'',5''-tetrabromfenolsulfonftalein
/= $\text{di}-(\text{N}\alpha\text{-benzyloxykarbonyl-N}\omega\text{-nitro-L-arginyl})$ bromfenolová modř/, bezbarvý, amorfni prášek, který obsahuje 0,6 molu chloroformu, $\alpha_D^{20} = -12,0^\circ\text{C}$ ($c = 1\%$, ethylacetát).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Diagnostický prostředek k důkazu leukocytů v tělesných tekutinách sestávající ze svého nosiče, který je impregnovaný chromogenem a vhodným pufrům, vyznačený tím, že jako chromogen se použije sulfonftaleinový ester obecného vzorce I



ve kterém

R₁ znamená zbytek alifatické karboxylové kyseliny s 1 až 4 atomy uhlíku nebo benzoyl, případně substituovaný halogenem, s výhodou chlorem a bromem, nebo alkoxy skupinou s 1 až 5, s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku, zbytek přírodní L- α -aminokyseliny nebo dipeptidový zbytek opatřený na dusíku ochrannou skupinou, jako acylovým zbytkem,

R₂ znamená atom halogenu, s výhodou chloru a bromu, nebo alkylovou skupinu s 1 až 5, s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku,

R₃ a R₄, které mohou být stejné nebo rozdílné, znamenají vodík nebo atom halogenu, s výhodou chlor nebo brom.