



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 944

(11) (B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 23 01 78

(21) PV 434-78

(51) Int. Cl.³ C 07 C 69/035

(40) Zverejnené 30 11 79

(45) Vydané 30 09 82

(75)

Autor vynálezu ZÁMOCKÝ JURAJ ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICE,
KUČÁR ŠTEFAN RNDr. CSc. a AUGUSTÍN JOZEF PhMr., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy chromogénnych substrátov ester-hydroláz esterifikáciou fenolov

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy chromogénnych substrátov ester-hydroláz esterifikáciou fenolov.

Ester hydrolázy esterov karbónových kyselín s fenolmi ako napr. naftol AS-D acetát (James, D. J. a Smith, A. R. W., Histochem. J., 6, 23 1974), p-nitrofenylacetát (Stoops, J. K. a Bender, M. L., Anal. Biochem., 63, 543 1975), indoxylacetát, resp. butyrát (Holt, S. J., Nature, 169, 271 (1952), Li, C. Y., Lam, L. T. Histochem. Cytochem., 21, 1 (1973) a indofenylacetát a jeho deriváty (Kramer, N. N., Gamson, R. M. a Miller, F. M., J. Org. Chem., 24, 1942 (1959)) sa používajú ako substráty karboxyl-ester hydroláz E. C. 3.1.1.1., aryl-ester hydroláz E. C. 3.1.1.2 alebo acetylcholin hydrolázy E. C. 3.1.1.7, prípadne acylcholin hydrolázy E. C. 3.1.1.8 v klinickej a biochemickej praxi, a to jednak pri stanovení uvedených enzýmových aktivítach v biologických tekutinách a jednak pri histochemickom vyšetrení biologického materiálu.

Na prípravu esterov fenolov s karbónovými kyselinami sa používajú buď acylchloridy (Spasov A. B., 75, 779 (1942)), alebo menej často acylanhydridy (Glidden Co., U.S.P. 2 212 509 (1935), Böhme H. a Schran H. B., 82, 460 (1949)) ako esterifikačných činidiel. V prípade zložitejších štruktúr vznikajúcich esterov, vyznačujúcich sa acidolabilitou, sa nedosahujú želané výťažky, a to aj za použitia pyridínu ako reakčného prostredia (Mills, J. A., Soc., 1951, 2332).

Esterifikácie fenolov s karbónovými kyselinami pri použití polyfosforečných kyselín ako kondenzačného činidla (Nakazawa K. a Matsuura S., J. Pharm. Soc. Japan., 74, 69 (1954)) poskytuje nízke výťažky esteru (30 % v prípade acetylácie fenolu). Esterifikácia fenolov za použitia karbónovej kyseliny a tionylchloridu (Purr A., Naturwiss. 43, 497 (1956)) predstavuje obdobu esterifikačných reakcií za použitia acylhalogenidov. Táto reakcia prebieha v silne kyslom prostredí, takže sa hodí len na prípravu acidostabilných esterov.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že na halogénové deriváty indofenolu, alebo sulfónové deriváty fenolu sa pôsobí anhydridom karbónovej kyseliny, výhodne kyseliny octovej alebo maslovej, za prítomnosti bezvodovej sodnej alebo draselnej soli príslušnej karbónovej kyseliny v prostredí benzénu, chloroformu, etylacetátu, dichlórmetánu, éteru alebo chloridu uhličitého po dobu 30 minút až 12 hodín pri teplote od 15 °C do 80 °C, pričom vedľajšie produkty sa odstraňujú azeotrópnou destiláciou a kryštalizácia esterov derivátov indofenolu sa prevedie výhodne metanolom.

Výhodou navrhovaného postupu prípravy spomínaných esterov je jej jednoduchosť, zvýšenie výťažkov v porovnaní so známymi metódami aspoň o 20 %, ako aj nižšie náklady.

Príklad 1

Acetylácia 2,6-dichlórindofenolu: Do suspenzie 14,5 g sodnej soli 2,6-dichlórindofenolu (0,05 mólu) a 1 g bezvodého octanu sodného v 300 ml benzénu sa za intenzívneho miešania prikvapkalo pri izbovej teplote 7,7 g (ca 7,15 ml) anhydridu kyseliny octovej (50 %-ný nadbytok ekvivalentného množstva). Reakčná zmes sa miešala po dobu 4 hodín pri uvedenej teplote. Po skončení reakcie sa pridalo do reakčnej zmesi 2 ml metanolu a po rozložení nadbytkového anhydridu sa z reakčnej zmesi odstránili azeotrópnou destiláciou benzénom za zníženého tlaku vedľajšie produkty najmä kyselina octová. Kryštalizáciu finálneho produktu sme po odfiltrovaní soli previedli nasledovne: Po viacnásobnom znovorozpustení a odparení surového produktu v benzéne (ca 5-krát) sa v poslednej operácii zahustila reakčná zmes na veľmi malý objem, ku ktorému sa pridalo 50 ml metanolu a obsah sa ihneď silne pretrepával, až pokiaľ nevypadol kryštalický produkt, k čomu dochádza veľmi rýchlo. Získané kryštály, resp. kryštalická masa sa čo najskôr oddelili od rozpúšťadla, nakoľko dochádza k ich rýchlemu znovorozpusteniu. Po vysušení sa získa cca 8 g 2,6-dichlórindofenylacetátu s teplotou tavenia 84 až 86 °C, ktorá sa prakticky nezmenila ani po 1-ročnom prechovávaní. Rekryštalizácia takto získaného produktu uvedeným spôsobom sa deje s veľkou stratou, bez toho, aby došlo k zlepšeniu teploty tavenia. Elementárna analýza pre $C_{14}H_9NO_3Cl_2$ (310,1): $C_{\text{vyp}} = 54,22 \%$, $C_{\text{stan}} = 54,12 \%$, $H_{\text{vyp}} = 2,89 \%$, $H_{\text{stan}} = 3,08 \%$ a $N_{\text{vyp}} = 4,47 \%$, $N_{\text{stan}} = 4,21 \%$.

Príklad 2

Acetylácia 3',5'-dibromindofenolu: Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že reakcia sa prevádzala s polovičným množstvom (0,025 mólu) sodnej soli 3',5'-dibromindofenolu pri 80 °C po dobu dvoch hodín. Výťažok 5 g látky s teplotou tavenia 108 až 111 °C.

Príklad 3

Esterifikácia 2,6-dichlórindofenolu anhydridom kyseliny maselnej: Tak ako je uvedené

v príklade 1, s tým tozdielom, že reakcia sa prevádzala v 100 ml éteru po dobu 12 hodín pri teplote 18 °C. Výťažok 4 g látky s teplotou tavenia 74 °C.

Príklad 4

Acetylácia chromotropovej kyseliny: Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že reakcia sa prevádzala s 0,03 mólu sodnej soli kyseliny chromotropovej v 100 ml benzénu pri teplote 80 °C po dobu 4 hodín. Kryštalizácia sa previedla nasledovne: Získaný odparok reakčnej zmesi sa rozpustí v 50 ml vody, prečistil cez aktívne uhlie a zahustil na malý objem (10 ml). K získanému roztoku sa pridalo 10 ml nasýteného roztoku chloridu sodného. Stá-
ním cez noc vykryštalizoval žiadaný produkt, ktorý sa sfiltroval, premyl etanolom a vysušil sa. Výťažok 3 g látky, ktorá nedáva s roztokom chloridu železitého žiadne zafarbenie. Elementárna analýza pre $C_{14}H_{10}Na_2O_{10}S_2$ (448,4): $C_{vyp} = 37,50 \%$, $C_{stan} = 37,32 \%$, $H_{vyp} = 2,25 \%$, $H_{stan} = 2,14 \%$ a $S_{vyp} = 14,3 \%$, $S_{stan} = 14,05 \%$ potvrdzuje zloženie žiadaného produktu.

Príklad 5

Acetylácia 2-naftol-6-sulfónovej kyseliny: Tak ako uvedené v príklade 5, s tým rozdielom, že reakcia sa prevádzala v 100 ml chloroformu pri 60 °C. Výťažok 4 g látky vo forme ihličiek, ktoré nedávajú s roztokom chloridu železitého žiadne zafarbenie.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy chromogénnych substrátov ester-hydroláz esterifikáciou fenolov, vyznačujúci sa tým, že na halogénové deriváty indofenolu alebo sulfónové deriváty fenolu sa pôsobí anhydridom karbónovej kyseliny, výhodne kyseliny octovej alebo maslovej, za prítomnosti bezvodnej sódnej alebo draselnej soli príslušnej karbónovej kyseliny v prostredí benzénu, chloroformu, ecylacetátu, dichlórmétanu, éteru alebo chloridu uhličitého po dobu 30 minút až 12 hodín pri teplote od 15 °C do 80 °C, pričom vedľajšie produkty sa odstraňujú azeotropnou destiláciou, a kryštalizácia esterov derivátov indofenolu sa prevedie výhodne metanolom.