



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201892
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 493/10

(22) Přihlášeno 22 12 78
(21) (PV 8866-78)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 12 82

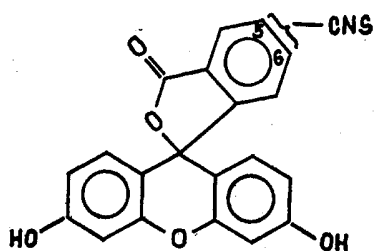
(75)

Autor vynálezu

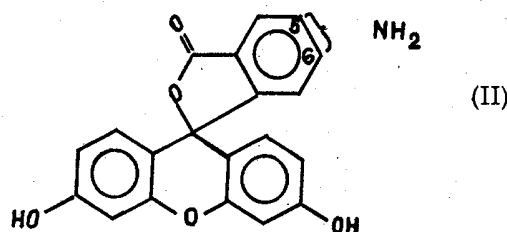
PITRA JOSEF ing. CSc. a ZOULA VÁCLAV, PRAHA

(54) Způsob přípravy fluoresceinylisothiokyanátů

Vynález se týká způsobu přípravy fluoresceinylisothiokyanátů vzorce I



(I),



(II)

které pod obchodním označením isomer I a směs isomerů slouží jako diagnostická fluorescenční činidla, například při imunofluorescenční analýze.

Pod pojmem isomer I se rozumí látka, která nese isothiokyanátovou funkční skupinu v poloze 5 fluoresceinového skeletu. Směsný preparát obsahuje kromě této látky ještě isomerní sloučeninu, analogicky substituovanou v poloze 6, jak je ze vzorce patrné.

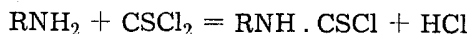
Přípravou uvedených činidel se zabývá například čs. autorské osvědčení č. 190 225, a to obecně známou reakcí thiofosgeny s primárními aminy v prostředí dimethylformamidu jako činidla usnadňující rozpouštění obtížně rozpustných aromatických aminů, v tomto případě 5- nebo 6-aminofluoresceinu vzorce II, resp. jejich solí.

Jak je uvedeno, reaguje dimethylformamid s thiofosgenem velmi energicky. Při tom převapivě nastává i reakce s aminem za vzniku příslušného isothiokyanátu. Reakce thiofosgeny s dimethylformamidem je provázána silným vývojem tepla a značná část thiofosgeny přichází touto cestou nazmar.

Silné tepelné zabarvení průvodní reakce a s ní spojené ztráty thiofosgeny omezují použitelnost zmíněného postupu na laboratorní měřítko. Tato okolnost byla podnětem ke hledání metody, které by nebyla zatížena uvedeným nedostatkem. Cílem bylo nalézt reakční podmínky pro technologii zpracování libovolně velkých násad, a to způsobem hospodárným a spolehlivě ovladatelným.

Soli 5-, resp. 6-aminofluoresceinu, především hydrochlorid, jsou dobře rozpustné v bezvodé nebo zředěné kyselině octové, například 80 až 85 %. Bylo zjištěno, že v tomto prostředí reagují s thiofosgenem za vzniku

meziprojektu, zřejmě fluoresceinylthiokarbamoylchloridu, ve smyslu obecné reakce



Látky tohoto typu, tj. substituované thio-karbamoylchloridy, jsou popisovány jako sloučeniny citlivé na styk s vodou (Dyson, George, J. Chem. Soc. **125**, 1702, 1924), která vyvolává jejich rychlou přeměnu na odpovídající isothiokyanáty podle vztahu



Proti očekávání se však výše zmíněný meziprojekt projevil jako značně stálý. Vlitím reakční směsi do vody nebo jejím rychlým zředěním vodou se vyloučil v nezměněném stavu. Teprve velice pomalým ředěním vodou za vydatného míchání se měnil na fluoresceinylisothiokyanát, který byl získán jako amorfni prášek. Protože se tato cesta ukázala pro preparativní účely jako nespolehlivá, byl hledán vhodnější způsob zpracování reakčního roztoku, především takový, který by vedl ke krystalické látce.

Studium stability fluoresceinylthiokarbamoylchloridu v prostředí zředěné kyseliny octové, obsahující chlorovodík, vedlo k poznatku, že k rychlé přeměně na žádaný isothiokyanát dochází působením octanu alkalického kovu nebo alkalické zeminy, například octanu sodného. V této souvislosti bylo prokázáno, že pro kvantitativní přeměnu je nutné, aby množství octanu bylo nejméně ekvivalentní množství chlorovodíku již přítomného i touto reakcí vznikajícího.

Osvědčila se dávka 1,8 až 2,0 ekvivalentu octanu sodného, čímž se současně dosáhne rychlého rozkladu nezreagovaného thiofosgeny, jehož se používá 40 až 80 % nadbytek, vztaheno na množství aminofluoresceinu. S výhodou se přidává octan rozpuštěný v takovém množství vody, aby se zředěním reakční směsi vyvolala krystalizace fluoresceinylisothiokyanátu. Takto získaná látka se snadno odsává nebo odstřeďuje a dobře promývá.

Jak z uvedeného vyplývá, je předmětem vynálezu způsob přípravy fluoresceinylisothiokyanátů vzorce I reakcí s aminofluoresceinem vzorce II, jehož podstata spočívá v tom, že se do roztoku soli aminofluoresceinu vzorce II v bezvodé nebo zředěné kyselině octové, s výhodou do roztoku hydrochloridu aminofluoresceinu v 80 až 85 % kyselině octové, vnáší thiofosgen, vytvořený fluoresceinylthiokarbamoylchlorid se zpracovává vodným roztokem octanu alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy, s výhodou vodným roztokem octanu sodného a vzniklý fluoresceinylisothiokyanát se z reakční směsi po vykrytalování izoluje.

Za popsanych podmínek se reakce projevuje nepatrným vývojem tepla a daří se

nejlépe při 15 až 30 °C; při nižších pracovních teplotách může dojít k vyloučení soli aminofluoresceinu z roztoku, popřípadě k vyloučení meziprojektu reakce. Vyšší teploty neprospívají citlivému fluoresceinylisothiokyanátu a zbytečně prodlužují dobu potřebnou k jeho vykrytalování. Výtěžky se pohybují u isomeru I v rozmezí 89 až 92 %, u směsi isomerů v rozmezí 85 až 87 % teorie. Obsah fluoresceinylisothiokyanátu v získaném produktu je nejméně 93 % hmotn.

Hlavní předností způsobu podle vynálezu je možnost provedení v neomezeném měřítku. Reakce je odstupňovaně vedena dávkováním thiofosgeny a roztoku octanu alkalického kovu nebo alkalické zeminy. Tím je dosaženo jejího jednoznačného průběhu za podstatného potlačení tvorby vedlejších látek, zejména odvozenin thiomocoviny. Současně se zamezí znečištění produktu příměsemi, které vyvolávají jeho rozklad při přechovávání. Až na nezbytnou opatrnost při práci s jedovatým thiofosgenem nevyžaduje způsob podle vynálezu techniky náročné aparaturní vybavení. Odpady neobsahují zdraví škodlivé látky, zejména thiofosgen, jsou cenově zanedbatelné a po jednoduché úpravě mohou být vypouštěny do kanalizace.

V příkladech provedení je uveden běžně dostupný octan sodný, čímž však není omezeno analogické použití jiných octanů alkalických kovů nebo alkalických zemin.

Příklad 1

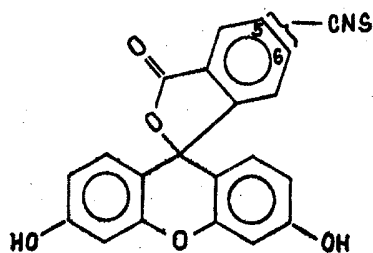
V 800 ml vody se suspenduje 120 g 5-aminofluoresceinu a převede přidavkem 44,5 ml konc. kyseliny chlorovodíkové na hydrochlorid. Při teplotě 45 °C se přidá 3600 ml kyseliny octové a získaný roztok se ochladí na 18 °C. Při této teplotě se za vydatného míchání postupně vnese 120 ml 42,7 % roztoku thiofosgeny v dichlorethanu a roztok 433 g trihydrátu octanu sodného v 800 ml vody. Vzniklá velmi řídká krystalická kaše se míchá 1 až 2 hodiny, látka se odsaje a promývá vodou do vymizení reakce filtrátu na chloridové ionty. Po vysušení do konstantní hmotnosti volně na vzduchu a poté ve vakuu se získá 122 g isomeru I, tj. 90,6 % teorie.

Příklad 2

Suspence směsi 60 g 5-aminofluoresceinu a 60 g 6-aminofluoresceinu v 800 ml vody se převede přidavkem 44,5 ml konc. kyseliny chlorovodíkové na směs hydrochloridů. Při teplotě 45 °C se přidá 3000 ml kyseliny octové a získaný roztok se ochladí na 28 °C. Při této teplotě se za vydatného míchání postupně vnese 120 ml 42,7 % roztoku thiofosgeny v dichlorethanu a roztok 433 g trihydrátu octanu sodného v 800 ml vody. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Výtěžek 116 g směsi isomerů, tj. 86,2 % teorie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

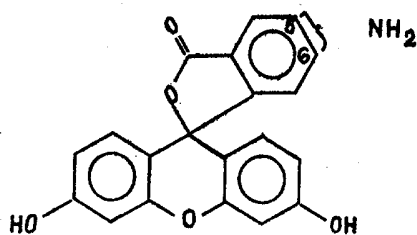
Způsob přípravy fluoresceinylisothiokyanátů
vzorce I



(I),

vyznačující se tím, že se do roztoku soli aminofluoresceinu vzorce II v bezvodé nebo zředěné kyselině octové, s výhodou do roztoku hydrochloridu aminofluoresceinu v 80 až 85% kyselině octové, vnáší thiofosgen, vytvořeny fluoresceinylthiokarbamoylchlorid se zpracovává vodným roztokem octanu alkalického kovu nebo kovu alkalické zeminy, s výhodou vodným roztokem octanu sodného a vzniklý fluoresceinylisothiokyanát se z reakční směsi po vykrystalování izoluje.

reakcí thiofosgenu s aminofluoresceinem
vzorce II



(II)