

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

273 184

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 H 17/00

(21) PV 2988-88.Y

(22) Přihlášeno 22 03 85

(30) Právo přednosti od 29 03 84

DE (P 34 11 574.9)

(40) Zveřejněno 12 07 90

(45) Vydáno 03 01 92

(72) Autor vynálezu

KLEIN CHRISTIAN dr., WEILHEIM, BATZ HANZ-
-GEORG dr., TUTZING, SERNETZ MANFRED prof.
dr., WETTENBERG, HOFMANN JÜRGEN dr.,
MARBURG (DE)

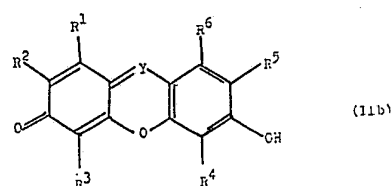
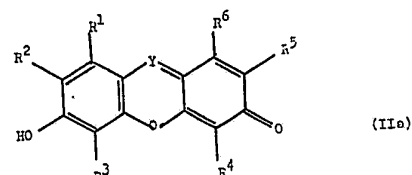
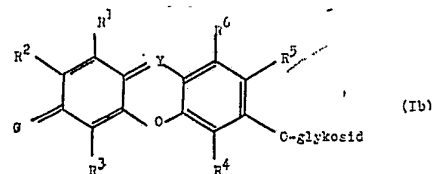
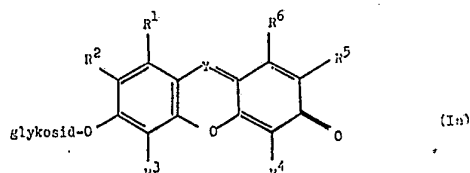
(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (DE)

(54)

Způsob výroby glykosidů derivátů
resorufinu

(57) Způsob výroby glykosidů derivátů resorufinu obecného vzorce Ia nebo Ib, kde R¹ = H, R², R³ a R⁵ je nezávisle H, halogen nebo C₁-C₅ alkyl, R⁴ a R⁶ je nezávisle H, halogen, kyano, alkyl, alkoxy, karboxy, alkoxykarbonyl, karboxyalkyl nebo alkoxykarbonylalkyl, kde všechny alkyly a alkoxyly obsahují 1 až 5 C-atomů nebo karboxamidorskupinu popřípadě jednoduše nebo dvojnásobně substituovanou alkylovou alkoxyalkylovou, karboxyalkylovou nebo alkoxykarbonylalkylovou skupinu, kde alkyl- a alkoxy skupiny obsahují vždy 1 - 5 C-atomů, přičemž v případě dvou substituentů mohou být tyto spojeny za vzniku kruhu popřípadě přerušného též O, N nebo S nebo skupinu -COO-(CH₂CH₂O)_n-R⁷, kde R⁷ = H, C₁-C₅ alkyl a n = 1 - 4 a dále R₆ je sulfonyl nebo nitro- a Y = N nebo N → O reakcí derivátů resorufinu tautomerních vzorců IIa a IIb s mono- nebo oligosacharidem s 2 až 10 monosacharidovými jednotkami nebo jeho halogenderivátem, kde všechny OH skupiny jsou chráněny a odštěpením ochranných skupin ze vzniklých per-O-substituovaných glykosidů. Sloučeniny obecného vzorce Ia a Ib se obzvláště hodí jako chromogenní a fluorogenní substráty pro určování aktivity odpovídajících glykosidáz nebo enzymů štěpících oligosacharidy.



Vynález se týká způsobu výroby glykosidů derivátů resorufinu, které nalézají použití při stanovení aktivity glykosidáz.

Glykosidázy splňují v lidském a zvířecím organismu mnohonásobné fyziologické funkce. Tak například β -D-galaktosidáza hraje důležitou roli při látkové výměně uhlohydrátů, poněvadž jejím působením dochází k hydrolýze laktózy. Kromě toho představuje β -D-galaktosidáza klíčový enzym při odbourávání glykolipidů, mukopolysacharidů a glykoproteinů. Jako další fyziologicky významné glykosidázy je třeba uvést α -D-galaktosidázu, α -D-a β -D-glukosidázu, jakož i α -D-mannosidázu.

Kromě toho, že mají fyziologický význam, nabývají glykosidázy v posledních letech na významu v oboru diagnostiky a biotechnologií. Tak se například těchto enzymů v rostoucí míře používá jako tzv. indikátorových enzymů při enzymatických imunostanoveních (enzymimmunoassay). Zvláštní přednost se v této souvislosti dává β -D-galaktosidáze (viz například *Annals of Clinical Biochemistry* **16**, 221 až 240 (1979)).

Určení aktivity glykosidáz hraje následkem toho narůstající úlohu jak v klinické chemii, tak i v diagnostice. Přitom se zcela obecně postupuje tak, že se vzorek obsahující glykosidázu smísí s vhodným substrátem. Substrát se působením enzymu rozštěpí. Pak se vhodným způsobem stanoví jeden z produktů štěpení. Může se stanovovat buď působením enzymu uvolněný glykon, nebo aglykon. Zpravidla se stanovuje aglykon.

Jako substráty se často hodí přírodní substráty dokazovaných enzymů. Obzvláštní přednost se však dává použití takových glykosidů, ve kterých představuje aglykon spektroskopicky snadno stanovitelný zbytek.

Je známa řada substrátů pro glykosidázy, u kterých je možno po rozštěpení glykosidázou stanovit aglykon spektroskopicky ve viditelné nebo ultrafialové oblasti spektra nebo fluorometricky.

Tak jsou jako substráty β -D-galaktosidázy popsány v *Biochem. Z.* **333**, 209 (1960) fenyl- β -D-galaktosid a některé jeho další, na aromatickém kruhu substituované, deriváty (například o-nitrofenyl a p-nitrofenyl- β -D-galaktosid). Fenoly uvolněné hydrolýzou se stanoví fotometricky v ultrafialové oblasti nebo v případě nitrofenolů v krátkovlnné viditelné oblasti vlnových délek spektra. Jako indikátorová reakce se může připojit oxidační kopulace a aminoantipyrinem (*Analytical Biochem.* **40**, 281 (1971)).

Pro histochemické zkoušky se používá naftyl- β -D-galaktosidu, tak například použití 1-naftylsloučeniny je popsáno v *Histochemie* **35**, 199 (1973), použití 6-brom-2-naftylderivátu v *J. Biol. Chem.* **195**, 239 (1952) a použití naftol- β -D-galaktosidu v *Histochemie* **37**, 89 (1973). Pro vizualizaci se přitom nechávají vzniklé naftoly reagovat s různými diazoniovými solemi na azobarviva.

Určení aktivity enzymu pomocí fluorogenních substrátů je široce rozšířené, poněvadž oproti fotometrickým metodám je citlivost fluorometrických stanovení vyšší o několik desetinných řádů. V mnohých případech se musí pracovat s fluorogenními substráty, například při stanovování enzymatické aktivity v buňkách pomocí automatických zařízení za účelem rozlišení buněk (cytofluorometrie) a při analýze immobilizovaných enzymů průtokovou mikrofluorometrií. V jiných případech, například při určování enzymatického značení zkoušených systémů (enzymatická imunostanovení), se multiplikační efekt enzymatické katalýzy za použití fluorogenních substrátů značně zesiluje.

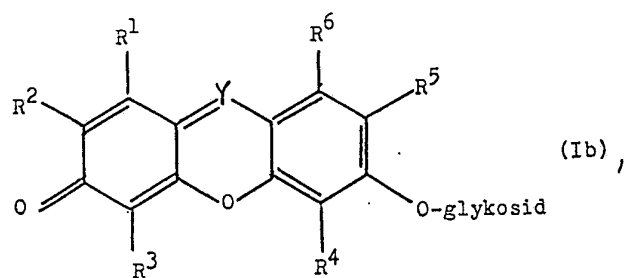
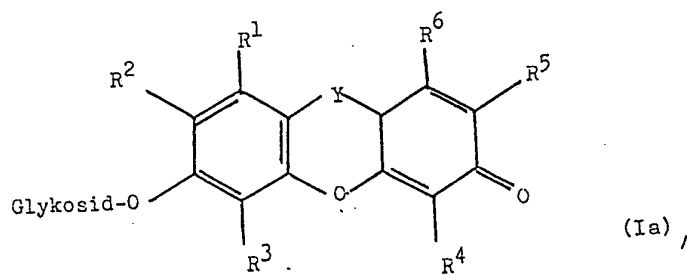
Až dosud známé fluorogenní substráty pro β -D-galaktosidázu a jiné glykosidázy obsahují jako fluorofory deriváty fluoresceinu, indoxylu nebo methylumbelliferonu. Pro kinetickou analýzu složitých systémů vykazují však tyto sloučeniny závažné nevýhody. Disubstituované deriváty fluoresceinu se při vícečetné řadě reakcí hydrolyzují. Monosubstituované fluorescein-glykosidy již samotné fluoreskují. Indoxylové deriváty podléhají po svém enzymatickém rozštěpení řadě chemických reakcí, které rovněž komplikují kinetickou analýzu.

Deriváty methylumbelliferonu se musí excitovat ultrafialovým zářením. Přitom může rušit vlastní fluorescence biologických nebo syntetických látek. Kromě toho je ultrafialová excitace, zejména v případě laserové optiky, nákladná. Většina fluorogenních substrátů poskytuje reakční produkty, které vykazují pouze nízkou rozpustnost, takže nejsou vhodné pro kinetickou analýzu aktivity enzymu, kde je právě potřebná dobrá rozpustnost substrátu a produktu.

Nadále proto existuje potřeba substrátů, pomocí kterých by bylo možno jednoduše, rychle a spolehlivě stanovit glykosidázy, přičemž takové substráty by, pokud možno, měly být použitelné jak pro fotometrické, tak pro fluorometrické metody stanovení. Úkolem vynálezu bylo uspokojit shora uvedenou poptávku.

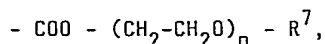
Úkol je vyřešen novými glykosidy derivátů resorufinu, které se pomocí glykosidáz štěpí na cukerný zbytek a derivát resorufinu. Posledně uvedené látky jsou sloučeniny s dobrou rozpustností ve vodě, které vykazují dobře měřitelnou absorpci ve viditelné oblasti spektra a lze je kromě toho snadno excitovat pro fluorescenci.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby glykosidů derivátů resorufinu obecného vzorce Ia, popřípadě Ib



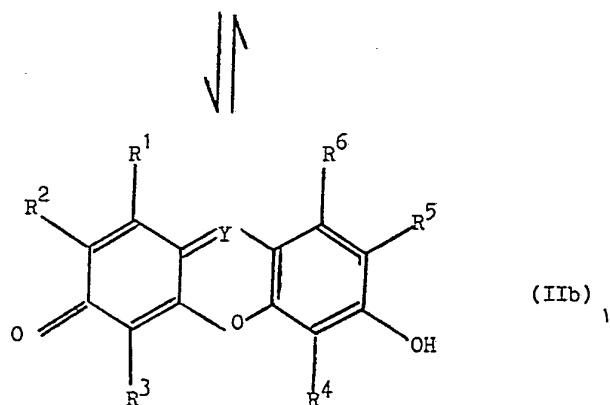
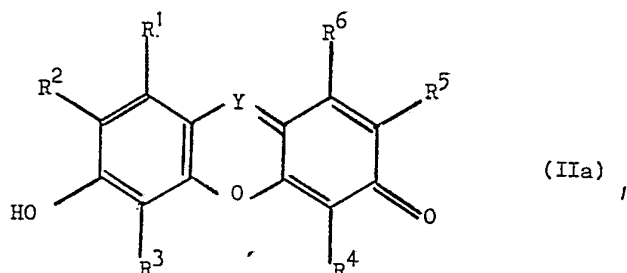
kde glykosid je glykosidový zbytek monosacharidu nebo oligosacharidu obsahující 2 až 10 monosacharidových jednotek, R¹ je vodík, každý ze symbolů R², R³ a R⁵, které jsou stejné nebo různé, je vodík, halogen nebo alkylskupina s 1 až 5 atomy uhlíku, každý ze symbolů R⁴ a R⁶, které jsou stejné nebo různé, je vodík, halogen, kyanoskupina, alkylskupina s 1 až 5 atomy uhlíku, alkoxykupina s 1 až 5 atomy uhlíku, karboxyskupina, alkoxykarbonyl, karboxyalkyl- nebo alkoxykarbonylalkylskupina, přičemž v posledně uvedených třech skupinách obsahují alkylové a alkoxylové zbytky vždy 1 až 5 atomů uhlíku, nebo karboxamidoskupina, popřípadě jednoduše nebo dvojnásobně substituovaná prostřednictvím alkylových, alkoxyalkylových, karboxyalkylových nebo alkoxykarbonylalkylových zbytků, v nichž alkylové a alkoxylové skupiny obsahují vždy 1 až 5 atomů uhlíku, přičemž v případě přítomnosti dvou substituentů, mohou být spolu spojeny za vzniku kruhu, který je popřípadě přerušen též kyslí-

kem, dusíkem nebo sírou, nebo skupina obecného vzorce



kde R^7 značí vodík nebo alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a n značí celé číslo 1 až 4, přičemž navíc R^6 značí sulfonyl- nebo nitroskupinu a Y značí dusík nebo skupinu $N-O$.

Glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce Ia, popřípadě Ib jsou nové sloučeniny. Podle vynálezu se mohou připravit tak, že se deriváty resorufinu obecných tautomerních vzorců IIa a IIb



kde R^1 až R^6 a Y mají význam uvedený shora, nechají reagovat s mono- nebo oligosacharidem obsahujícím 2 až 10 monosacharidových jednotek nebo jeho 1-halogenderivátem, přičemž všechny hydroxyskupiny jsou vždy substituovány ochrannými skupinami, obvyklými v chemii uhlohydrátů, za vzniku per-O-substituovaných glykosidů, ze kterých se získají glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce I o sobě známým způsobem odštěpením ochranných skupin.

Reakce sloučenin obecného vzorce II s per-O-substituovanými 1-halogensacharidy se přednostně provádí v přítomnosti látek vázajících kyseliny, jako je hydroxid nebo uhličitán alkalického kovu ve vodném acetonu nebo (za podmínek mezifázového přestupu) ve směsi voda/benzen nebo voda/chloroform.

Kromě toho se může tento postup provádět tak, že se nejprve deriváty resorufinu obecného vzorce II převedou prostřednictvím hydroxidu nebo alkoxidu alkalického kovu na alkalické soli nebo prostřednictvím popřípadě substituovaného aminu na amoniové soli a tyto se potom nechají reagovat s per-O-substituovanými 1-halogensacharidy v dipolárním aprotickém rozpouštědle, např. acetonu, dimethylsulfoxidu, dichlormethanu, tetrahydrofuranu nebo dimethylformamidu.

Při syntéze per-O-substituovaných glykosidů z derivátů resorufinu obecného vzorce II a per-O-substituovaných 1-halogensacharidů se dále osvědčily přísady jednotlivých solí stříbra nebo směsí solí stříbra (oxidu stříbrného, uhličitanu stříbrného, uhličitanu stří-

brného na Celitu, triflátu stříbrného, salicylátu stříbrného) a/nebo jednotlivých solí rtuti nebo směsí solí rtuti (bromidu rtuťnatého, kyanidu rtuťnatého, octanu rtuťnatého, oxidu rtuťnatého), popřípadě za použití sušidel, jako chloridu vápenatého, molekulárního síta nebo Drieritu, v rozpouštědlech, jako methylenchloridu, chloroformu, benzenu, toluenu nebo dioxanu. Při syntéze glykosidů vázaných v ω -poloze se účelně postupuje tak, že se sloučenina obecného vzorce II roztaví se sacharidem, jehož hydroxyskupiny jsou substituovány ochrannými skupinami, s výhodou acetylskupinami, v přítomnosti Lewisovy kyseliny, například chloridu ciničnatého, chloridu hlinitého a přednostně chloridu zinečnatého (srovnej Chem. Ber. 66, 378 až 383 (1933) a Methods in Carbohydr. Chem. 2, 345 až 347 (1967)). Teplota se přitom volí v rozmezí od 80 do 150 °C, přednostně v rozmezí od 110 do 130 °C.

Takto získané per-O-substituované glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce II jsou rovněž nové sloučeniny.

Odštěpování ochranných skupin s per-O-substituovaných glykosidů za vzniku glykosidů obecného vzorce I se provádí metodami, které jsou běžné v chemii uhlohydrátů (viz například Advances Carbohydrate Chem. 12, 157 (1975)), v případě acylových skupin například pomocí methoxidu sodného nebo methoxidu barnatého, nebo pomocí amoniaku v methanolu.

Pod pojmem "halogen" se v definici R^1 až R^7 rozumí fluor, chlor, brom a jod, přednostně chlor a brom.

Alkylskupina v definici R^1 až R^6 obsahuje přednostně 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž obzvláštní přednost se dává methylskupinám.

Alkoxykupina v definici R^4 a R^6 obsahuje s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž největší přednost se dává methoxykupinám.

Alkoxylové nebo alkylové zbytky alkoxykarbonylskupin, karboxyalkylskupin a alkoxykarbonylalkylskupin v definici substituentů R^4 až R^6 obsahují rovněž s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž zvláštní přednost se dává methoxykupinám nebo methylenovému zbytku.

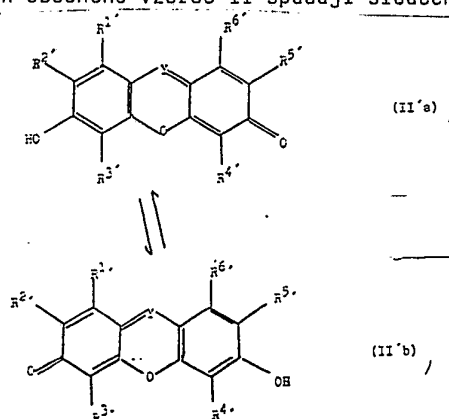
Jako ochranná skupina, která je obvyklá v chemii uhlohydrátů se hodí především acetyl-, benzoyl-, benzyl- nebo trimethylsilylskupina.

Alkyl-, alkoxyalkyl-, karboxyalkyl- a alkoxykarbonylalkylskupiny, přicházející v úvahu jako substituenty karboxamidoskupiny, obsahující s výhodou 1 až 3 atomy uhlíku.

Jako glykosidický zbytek, který je připojen k derivátům resorufinu obecného vzorce II za vzniku glykosidů obecného vzorce I, se hodí jakýkoliv mono- a oligosacharid obsahující 2 až 10 monosacharidových jednotek, který lze odpovídající glykosidázou opět odštěpit od základní kostry resorufinu. Jako příklady glykosidů, kterých lze použít podle vynálezu, je možno uvést β -D-galaktopyranosid, ω -D-galaktopyranosid, β -D-glukopyranosid, ω -D-glukopyranosid a ω -D-mannopyranosid.

Jako glykosidické zbytky jsou mj. vhodné oligosacharidové řetězce, které lze enzymy štěpícími sacharidové řetězce odbourat až na stupeň mono- nebo oligosacharidů, které pak lze pomocí odpovídajících glykosidáz odštěpit od základní kostry resorufinu. Jako tyto oligosacharidové řetězce se především rozumějí řetězce vybudované ze 2 až 10 a přednostně 2 až 7 monosacharidových jednotek.

Do rozsahu sloučenin obecného vzorce II spadají sloučeniny obecných tautomerních vzorců II'a a II'b

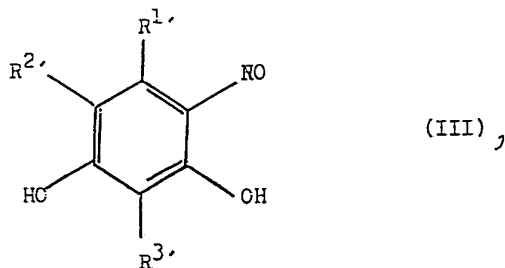


kde $R^{1'}$ až $R^{6'}$ mají stejný význam jako substituenty R^1 až R^6 , přičemž $R^{1'}$ až $R^{6'}$ nepředstavují všechny současně atomy vodíku a Y má shora uvedený význam.

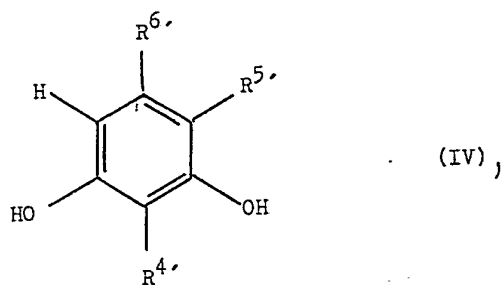
Tyto sloučeniny jsou nové a hodí se zejména jako meziprodukty pro výrobu glykosidů resorufinových derivátů podle vynálezu obecného vzorce I.

Sloučeniny obecného vzorce II' se mohou připravit analogickým způsobem, jako je způsob, který se hodí pro výrobu známého resorufinu (sloučenina obecného vzorce II, ve které všechny substituenty R^1 až R^6 značí atomy vodíku).

Sloučeniny obecného vzorce II' se výhodně vyrábějí reakcí derivátu nitroresorcínu obecného vzorce III



kde $R^{1'}$ až $R^{3'}$ mají shora uvedený význam, s derivátem resorcínu obecného vzorce IV



kde $R^{4'}$ až $R^{6'}$ mají shora uvedený význam,

v přítomnosti burelu a kyseliny sírové při nízkých teplotách. Přitom vznikají nejprve sloučeniny obecného vzorce II', ve kterých Y značí skupinu $N \rightarrow O$. Tyto látky je možno snadno převést na sloučeniny obecného vzorce II', ve kterých Y značí dusík, působením zinkového prachu v přítomnosti amoniaku.

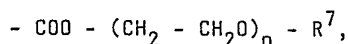
Reakce sloučenin obecného vzorce III se sloučeninami obecného vzorce IV se obvykle provádí při teplotě v rozmezí od -10 do 50°C , s výhodou od 0 do 30°C . Obzvláště šetrně probíhá reakce tehdy, když se sloučeniny obecného vzorce III a IV smísí při teplotě asi 0°C a reakční směs se potom nechá ohřát na teplotu místnosti. Koncentrace burelu by měla účelně ležet v rozmezí od asi 0,5 do asi 5, s výhodou od asi 1 do asi 2 mol/l. Koncentrace kyseliny sírové by měla ležet v rozmezí od 0,5 do 5, s výhodou od 1 do 3 mol/l.

Redukce sloučenin obecného vzorce II', ve kterých Y značí skupinu $N \rightarrow O$, na sloučeniny obecného vzorce II', ve kterých Y značí dusík, se provádí přednostně zinkovým prachem v amoniakálním roztoku (srovnej Nietzki a další, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 22, 3020 (1889)). Jako rozpouštědla se účelně používá směs vody a alkoholu, přednostně směs 1 dílu vody s 0 až 4 díly methanolu. Na 1 mol redukované látky se po částech přidává 1 až 20, přednostně 1 až 5 molů zinkového prachu. Teplota reakčního roztoku se přitom udržuje v rozmezí od -10 do $+35^\circ\text{C}$, přednostně od $+5$ do $+10^\circ\text{C}$. Pro jednoznačný průběh reakce je třeba

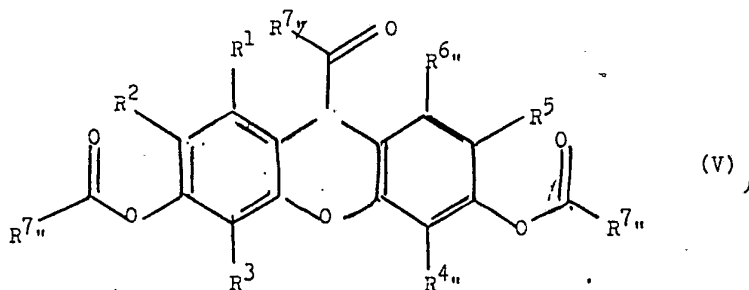
přesně dodržovat shora uvedené teplotní rozmezí. Bez chlazení vede exothermická reakce ke vzniku vedlejších produktů, které se obtížně oddělují.

Za zvolených mírných podmínek probíhá reakce mezi sloučeninou obecného vzorce III a sloučeninou obecného vzorce IV jednoznačně v dobrém výtěžku. Zvolený způsob syntézy je možno obměňovat. To otevírá četné možnosti syntézy zejména s ohledem na přípravu nesymetricky substituovaných derivátů resorufinu, popřípadě též resazurinu.

Deriváty resorufinu obecného vzorce II', ve kterých $R^{4'}$ a/nebo $R^{6'}$ značí nižší alkoxykarbonylskupinu, karboxamidoskupinu, která je popřípadě jednoduše nebo dvojnásobně substituovaná, nebo skupinu obecného vzorce



kde R^7 a n mají shora uvedený význam, se přednostně připravují přes triacylované dihydroresorufiny obecného vzorce V



kde R^1 , R^2 , R^3 a R^5 mají shora uvedený význam, $R^{4''}$ a $R^{6''}$ značí karboxyskupinu a $R^{7''}$ značí vodík nebo nižší alkylskupinu.

Funkční skupina karboxylové kyseliny se způsobem známým z literatury, například pomocí směsi oxalylchlorid/DMF nebo thionylchlorid/DMF převede na chlorid kyseliny ze kterého se reakcí s libovůlnými alkoholy a aminy získají odpovídajícím způsobem substituované estery karboxylové kyseliny nebo karboxamidy.

Zpracováním takto získaných acetylovaných derivátů obecného vzorce III louhem, přednostně 0,1 až 5 M hydroxidem sodným nebo draselným nebo 1 až 15 M amoniakem (vodný roztok) a oxidačním činidlem, přednostně hexakynoželezitanem draselným, za přídavku ve vodě rozpustných organických rozpouštědel jako 1,4-dioxanu nebo methanolu se získají odpovídající deriváty resorufinu obecného vzorce II.

Alkoholická složka může být principiálně tvořena jakýmkoliv alkoholem. Obzvláštní přednost se dává diethylenglykolmonoethyletheru, triethylenglykolmonoethyletheru, triethylenglykolmonoethyletheru nebo jednoduchým alkoholům, jako methanolu nebo ethanolu. Rovněž aminovou složku je možno volit z libovolných aminů. Obzvláštní přednost se dává aminům obsahujícím polární skupinu, jako je například morfolin, methoxyethylamin nebo glycinamid nebo amoniaku a primárním a sekundárním nižším alkylaminům. Dále se může použít aminokarboxylových kyselin, jejichž karboxyskupina je obvyklým způsobem chráněna, jako například terc.-butylesteru glycinu, benzylesteru glycinu nebo methylesteru N- ω -BOC-lysinu. Po odštěpení ochranných skupin se získají resorufiny obecného vzorce II nebo glykosidy resorufinu obecného vzorce I s alifaticky vázanou funkční skupinou karboxylové kyseliny.

Acetylované dihydroresorufiny obecného vzorce V se získají z odpovídajícího resorufinu nebo resazurinu reakcí se silným redukčním činidlem, jako například chloridem cínatým nebo octanem chromnatým nebo elektrochemickou redukcí a následující acetylací. Při redukcí se resorufin nebo resazurin po dobu 10 minut až jedné hodiny zahřívá se 2 až 10, přednostně 2 až 6 ekvivalenty chloridu cínatého v 5 až 35% vodné kyselině chlorovodíkové. Po ochlazení se dihydrosloučenina vysráží. Acetylace se provádí obvyklým způsobem pomocí acetanhydridu. Přednostně se sloučeniny obecného vzorce V připravují jednostupňovým postupem, reduktivní acetylací. Odpovídající resorufin nebo resazurin se zahřívá se 2 až 6 ekvivalenty chloridu cínatého po dobu 5 minut až 5 hodin, přednostně 10 minut až 3 hodiny, v acetanhydridu za varu pod zpětným chladičem nebo se směs míchá při teplotě místnosti po dobu 4 až 16 hodin.

Při syntéze glykosidů derivátů resorufinu obecného vzorce II vznikají nefluoreskující sloučeniny, ze kterých se uvolní fluoreskující deriváty resorufinu enzymatickým štěpením pomocí odpovídajících glykosidáz. Fluorogenní deriváty resorufinu podle vynálezu vykazují ve srovnání s až dosud známými glykosidy z jiných chromogenních nebo fluorogenních skupin velmi výhodné vlastnosti. Jako monosubstituované deriváty vykazují kinetiku enzymatické hydrolýzy, kterou lze velmi jednoduše popsat Michaelis-Mentonovým vztahem. Pro resorufin- β -D-galaktopyranosid platí například Michaelisova Konstanta $K_M = 0,38 \text{ mmol/l}$. Potlačení hydrolýzy přírodním substrátem laktózou je konkurenční, takže pro určité zkoušky je možno definovat a reversibilně měnit specifickou přeměnu glykosidů derivátů resorufinu přidávkou přírodních glykosidů, jako laktózy v případě β -D-galaktosidázy.

Glykosidy derivátů resorufinu podle vynálezu jsou ve vodném roztoku při teplotě $+4^\circ\text{C}$ prakticky neomezeně stálé. Již rozpustnost glykosidů resorufinu se základní kostrou je pro většinu kinetických účelů dostatečná. Zavedením esterů karboxylové kyseliny a derivátů karboxylové kyseliny s polárními skupinami nebo sulfoskupinami se rozpustnost odpovídajících glykosidů ještě podstatně zlepší.

Excitace a emise produktů podle vynálezu leží ve viditelné oblasti spektra při dostatečném kvantovém výtěžku. Maximální intenzity fluorescence resorufinu se dosahuje při hodnotách pH nad 7 a intenzita fluorescence klesá se snižujícím se pH jen pozvolna. Glykosidy resorufinu jsou ve vodném roztoku většinou žlutě zbarveny (λ_{max} při asi 470 nm). Po enzymatické reakci jsou produkty většinou zbarveny červeně (λ_{max} při asi 570 nm), takže se tyto látky rovněž výborně hodí pro fotometrická stanovení a pro neinstrumentální vizuální zkoušky.

Nové glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce I je možno použít pro určování aktivity odpovídajících glykosidáz, například α -D- a β -D-glukosidázy, a β -D-galaktosidázy a α -D-mannosidázy.

Deriváty resorufinu obecného vzorce I, ve kterých je glykosidický zbytek tvořen řetězcem oligosacharidu, se hodí zejména také pro důkaz přítomnosti enzymů štěpících sacharidové řetězce, například α -amylázy. Přitom se řetězec oligosacharidu dokazovaným enzymem charakteristickým způsobem rozštěpí, přednostně až do stupně monosacharidu, přičemž se mohou použít, pokud je to zapotřebí, další přídavné enzymy. Získaný produkt se potom působením odpovídající glykosidázy shora uvedeným způsobem rozštěpí na základní kostru resorufinu a monosacharid.

Použití glykosidů derivátů resorufinu obecného vzorce I jako substrátů pro glykosidázy vede k výrazně citlivějším zkušebním systémům ve srovnání s až dosud známými systémy. Nové substráty se mohou používat pro stanovení aktivity glykosidáz, s výhodou jak v biochemickém a biotechnologickém, tak i v klinicko-chemickém oboru. Jsou citlivější a v důsledku toho poskytují četné výhody:

- a) Mohou se měřit nižší aktivity enzymu.
- b) Jako vzorky se mohou používat menší množství látek.

- c) Určení aktivity proběhne za značně kratší dobu.
- d) Použití malého vzorku a příznivá vlnová délka měření snižují kromě toho náchylnost jiných složek vzorku pro rušení metody.
- e) Může se měřit přeměna v nosných maticích s immobilizovaným enzymem.

Ukázalo se, že substráty podle vynálezu se hodí pro určování aktivity glykosidáz libovolného původu. Diagnostické prostředky podle vynálezu obsahující substráty obecného vzorce I reagují mnohem citlivěji než až dosud známé zkušební prostředky.

Glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce I se rovněž hodí pro imunologická stanovení, při kterých se glykosidáz používá jako indikátorových enzymů, jejichž aktivitu po provedení imunologické reakce je třeba určit. Tyto imunologické metody stanovení za použití enzymatických indikátorových reakcí bývají označovány odborným termínem enzymimmunoassay (dále a shora česky enzymatická imunostanovení). Tyto metody slouží pro určování koncentrace proteinů, polysacharidů, hormonů, léčiv a jiných nízkomolekulárních látek přítomných v koncentraci v rozmezí od 10^{-5} do 10^{-12} mol/l. Podle požadavků na separaci fází se rozlišuje mezi homogenním a heterogenním provedením zkoušky. Další rozdělení zkoušek je podle toho, zda probíhají na konkurenčním nebo nekonkurenčním principu.

Všechny zkušební principy však pracují s konjugáty enzym-antigen nebo enzym-protilátka. Enzymatická indikátorová reakce je všem enzymatickým imunostanovením společná. Pro tyto účely jsou vhodnými indikátorovými enzymy například glykosidázy, zejména β -D-galaktosidáza. Stanovení glykosidáz při těchto enzymatických imunostanoveních se provádí obvyklým způsobem tak, že se přidá vhodný substrát, který se enzymaticky rozštěpí a potom běžným způsobem fotometricky nebo fluorometricky změní.

Zlepšení zkušebních systémů pro glykosidázy vede v důsledku toho rovněž k podstatným výhodám dosahovaným při těchto enzymatických imunostanoveních:

1. Vyšší citlivost umožňuje i zde dosáhnout dalšího snížení hranice dokazatelnosti, dále umožňuje zkrátit reakční dobu a zmenšit množství vzorku a tím rovněž dosáhnout menšího rušení metody jinými součástmi vzorku.
2. Příznivější vlnová délka snižuje při určitých provedeních reakce náchylnost k rušení metody nerozpustnými složkami, například zálaly.

Diagnostický prostředek obsahuje vedle jednoho nebo více substrátů obecného vzorce I vhodný tlumicí systém a popřípadě další přísady obvykle používané v takových diagnostických prostředcích, jako jsou například smáčedla, stabilizátory, atd. diagnostický prostředek může mít formu roztoku, lyofilizátu, práškové směsi, reagenční tablety nebo zkušebního proužku, ve kterém jsou látky nanесeny v savém nosiči.

Diagnostický prostředek ve formě roztoku obsahuje přednostně všechny reakční složky potřebné pro zkoušku. Jako rozpouštědlo přichází v úvahu voda nebo směs vody s organickými rozpouštědly rozpustnými ve vodě, jako je například methanol, ethanol, aceton nebo dimethylformamid. Z důvodu skladovatelnosti může být výhodné rozdělit reakční složky potřebné pro provedení zkoušky do dvou nebo více roztoků, které se spolu smísí teprve při vlastním provádění zkoušky.

Pro výrobu diagnostického prostředku ve formě lyofilizátu o celkové hmotnosti vždy 5 až 20 mg, přednostně asi 10 mg, se vysuší roztok, který vedle všech reakčních složek potřebných pro provedení zkoušky obsahuje též obvyklé nosiče, například polyvinylpyrrolidon, a popřípadě další nosiče, jako je mannit, sorbit nebo xylit.

Diagnostický prostředek ve formě práškovité směsi nebo reagenční tablety se může připravovat tak, že se složky potřebné pro provedení zkoušky smísí s obvyklými galenickými přísadami a směs se granuluje. Přísadami tohoto typu jsou například alkoholické cukry, jako mannit, sorbit nebo xylit nebo jiné rozpustné inertní sloučeniny, jako polyethylenglykoly nebo polyvinylpyrrolidon. Práškovité směsi nebo reagenční tablety vykazují obvykle konečnou hmotnost asi 30 až asi 200 mg, přednostně 50 až 80 mg.

Při výrobě diagnostického prostředku ve formě zkušebního proužku se savý nosič, přednostně filtrační papír, celulóza nebo rouno ze syntetických vláken, napustí roztokem požadovaných, pro výrobu zkušebních proužků obvykle používaných reakčních složek ve snadno těkavém rozpouštědle, například vodě, methanolu, ethanolu nebo acetonu. Napouštění se může provádět jednostupňově, často je však účelné provádět napouštění ve více stupních, přičemž se používá roztoků, které obsahují vždy část složek diagnostického prostředku. Tak se například může v prvním stupni provádět napouštění pomocí vodného roztoku obsahujícího tlu mič a jiné ve vodě rozpustné přísady a ve druhém stupni se napouští roztokem obsahujícím glykosidázový substrát. Hotových zkušebních popírků se může používat jako takových nebo se mohou známým způsobem vlepít do drážek nebo se mohou s výhodou vlepít mezi plastickou hmotu a jemnou síťovinu, jak je to popsáno v DE patentu č. 2 118 455.

Následující příklady ukazují několik z četných variant postupu, které vedou k syntéze sloučenin podle vynálezu. Příklady mají pouze ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Příklad 1

Resorufin- β -D-galaktopyranosid

a) Příprava resorufinu

Resorufin se připraví ze svého oxidačního produktu, resazurinu, který lze získat na trhu v dobré čistotě, způsobem, který je analogický způsobu popsanému v Nietzsche a další, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 22 (1889), str. 3020 až 3038. V kádince se 10 g (43 mmolu) resazurinu (Fluka, Bucha, Švýcarsko) po dobu 30 minut zahřívá na vroucí lázni s 50 ml 25% vodného roztoku amoniaku, 25 ml 37% vodného roztoku natriumhydrogensulfitu a 50 ml vody. Potom se přidá ještě 20 ml roztoku amoniaku, 7 ml roztoku hydrogensulfitu a 20 ml vody a směs se ještě dalších 30 minut zahřívá. Průběh reakce je možno sledovat na základě barevné změny z modré do červené barvy nebo chromatografií na tenké vrstvě. Po úplném proběhnutí reakce se přidá 10 ml 32% kyseliny chlorovodíkové, čímž se pH upraví na 5. Reakční roztok se nechá jeden den stát v lednici. Dále se odsaje hnědá usazenina, která se promyje ledem vychlazeným roztokem kyseliny chlorovodíkové o pH 4 a při 110 °C vysuší. Výtěžek je 7,8 g (36,7 mmolu; 85 % theorie).

b) Glykosylace resorufinu na resorufin- β -D-galaktopyranosid

Glykosylace fenolické hydroxyskupiny přes intermediální tetraacetát se provádí následujícím postupem: 2,13 g (10 mmolů) jemně práškovitého resorufinu, 4,12 g (10 mmolů) acetobrom- α -D-galaktózy (Sigma, Mnichov), 1,16 g (5 mmolů) oxidu stříbrného (Fluka, Bucha, Švýcarsko), 5 g síranu vápenatého semihydrátu ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$, Drierit), několik zrníček jodu a 50 ml μ l chinolinu se po dobu 40 hodin míchá při teplotě místnosti v 50 ml methylenchloridu. Přitom se 40 % resorufinu převede na resorufin- β -D-galaktopyranosid-tetraacetát. Sledování reakce se i v tomto případě může provádět chromatografií na tenké vrstvě. Po oddělení pevné složky na skládaném filtru a odstředění se v rotačním odpařovačce odtáhne methylenchlorid. Resorufin- β -D-galaktopyranosid-tetraacetát se získá jako hnědožlutý sirupovitý zbytek. Výtěžek asi 2 g (35 % theorie).

2 g resorufin- β -D-galaktopyranosid-tetraacetátu se bez dalšího čištění vyjmu do 80 ml suchého methanolu. Ve 20 ml suchého methanolu se v ledové lázni rozpustí po malých kouscích 0,5 g sodíku. Za míchání v ledové lázni se 6 až 8 ml roztoku methoxidu přidá v průběhu 30 minut po 1 ml dávkách k roztoku resorufin- β -D-galaktopyranosid-tetraacetátu a deacetylace se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Vysrážený oranžově zbarvený resorufin- β -D-galaktopyranosid se odsaje a promyje malým množstvím ledově chladného methanolu. Výtěžek je asi 1 g surové látky (70 % theorie). Překrystalováním z methanolu a následujícím vysušením při teplotě nepřesahující 60 °C se získá 0,2 g čistého produktu. Všechny zkoušky chromatografií na tenké vrstvě, prováděné za účelem sledování průběhu reakce, mohou probíhat za použití silikagelu 60 (Merck, Darmstadt) a směsi methylenchlorid/methanol

(9/1) jako elučního činidla. Pro tento systém platí následující hodnoty R_f :

resorufin	0,4
resazurin	0,35
resorufin- β -D-galaktopyranosid-tetraacetát	0,9
resorufin- β -D-galaktopyranosid	0,1

Příklad 2

Resorufin- β -D-glukosid

2,13 g (10 mmolů) resorufinu (vyrobeného podle příkladu 1a), 4,11 g (10 mmolů) aceto-brom- α -D-glukózy a 3,64 g (10 mmolů) hexadecyltrimethylamoniumbromidu se 4 hodiny vaří pod zpětným chladičem ve směsi 11,5 ml 1 N hydroxidu sodného a 50 ml chloroformu. Pak se směs odpaří dosucha a digeruje ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se znovu odpaří do sucha. Zbytek se vyjme 20 ml ethanolu. Tetraacetylresorufin- β -D-glukosid se překrystaluje z methanolu za přidání aktivního uhlí.

Na deacetylaci se shora uvedený produkt vyjme do 10 ml methanolu. Po dvou hodinách míchání při teplotě místnosti se vysrážený produkt odsaje a vysuší. Výtěžek: 50 mg.

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}]_6$ -DMSO): δ 3,15 až 3,80 (m, 6H), 4,5 až 6,5 (široký, 4H), 5,12 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,80 (dd, J = 9,6 a 2,0 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 8,5 a 2,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 8,5 Hz, 1H).

Příklad 3

Methylester resorufin-1-karboxylové kyseliny

V 500 ml methanolu se rozpustí či suspenduje 50 g nitroresorcinu, 53,3 g 3,5-dihydroxybenzoátu methylnatého a 28,0 g burelu. Za chlazení ledem se přikape při 5 až 10 °C 34,4 ml koncentrované kyseliny sírové. Po odstavení ledové lázně se směs ještě dvě hodiny dále míchá. Pak se za chlazení přidá 200 ml vodného roztoku amoniaku. Vysrážená usazenina se odfiltruje přes filtr ze skleněných vláken. K filtrátu se po částech přidá při 5 až 10 °C 10 g zinkového prachu. Směs se míchá při teplotě místnosti tak dlouho, dokud neproběhne redukce do konce (reakce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě za použití směsi ethylacetát/methanol 4 : 1, jako elučního činidla, reakční doba je asi 1,5 hodiny). Reakční směs se při teplotě 25 °C (teplota lázně) odpaří v rotačním odpařováku na 1/3 svého objemu. Požadovaný produkt se vysráží po okyselení koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou za chlazení až do proběhnutí barevné změny. Po promytí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a vysušení za vákua nad chloridem vápenatým se získá methylester resorufin-1-karboxylové kyseliny. Výtěžek: 30,9 g (36 % teorie).

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}]_6$ DMSO): δ 3,98 (s, 3H), 6,47 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,85 až 6,96 (m, 2H), 7,09 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 9,6 Hz, 1H),

Fluorescence: absorpce λ_{max} = 570 nm
emise λ_{max} = 588 nm.

Analogickým postupem se získá z

a) 3,5-dihydroxybenzoové kyseliny a nitroresorcinu přes resazurin-1-karboxylovou kyselinu resorufin-1-karboxylová kyselina UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5: λ_{max} = 569 nm,

b) methylesteru 4-0-methylgallové kyseliny a nitrosoresorcinu přes methylester 4-methoxyresazurin-1-karboxylové kyseliny methylester-4-methoxyresorufin-1-karboxylové kyseliny UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5): $\lambda_{\max} = 592 \text{ nm}$,

c) methylesteru 3,5-dihydroxybenzoové kyseliny a 4-chlor-6-nitrosoresorcinu přes methylester 8-chlorresazurin-1-karboxylové kyseliny methylester 8-chlor-resorufin-1-karboxylové kyseliny.

d) methylesteru 4-0-methylgallové kyseliny a 4-brom-6-nitrosoresorcinu přes methylester 8-brom-4-methoxyresazurin-1-karboxylové kyseliny methylester 8-brom-4-methoxyresorufin-1-karboxylové kyseliny.

e) 5-nitrosoresorcinu a nitrosoresorcinu přes 1-nitrosoresazurin 1-nitrosoresorufin a

f) resorcin-5-sulfonové kyseliny a nitrosoresorcinu přes resazurin-1-sulfonovou kyselinu resorufin-1-sulfonová kyselina.

Příklad 4

Reasazurin-4-karboxylová kyselina

1,60 g (10,5 mmolu) nitrosoresorcinu, 1,55 g (10 mmolu) 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny a 0,86 g (10 mmolů) burelu se vyjme do 200 ml methanolu a směs se ochladí na 0 °C. Ke směsi se přikape 1,06 ml koncentrované kyseliny sírové a vzniklá směs se další dvě hodiny míchá bez chlazení. Vysrážený červený produkt se odfiltruje, promyje methanolem a vysuší. Výtěžek 2,3 g (85 % teorie).

UV/VIS(0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$\lambda_{\max} = 614 \text{ nm}$ ($E = 48 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$),
po okyselení $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ($E = 32 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

Příklad 5

Resorufin-4-karboxylová kyselina

2,3 g resazurin-4-karboxylové kyseliny (připravené podle příkladu 4) se rozpustí ve 20 ml vody a 5 ml 25% roztoku amoniaku. K modrému roztoku se za míchání a chlazení ledem přidá 5 g zinkového prachu. Potom se ledová lázeň odstaví a roztok se nechá pozvolna ohřát na teplotu místnosti. Proběhnutí redukce lze rozeznat na základě barevné změny z modrého do tmavofialového odstínu. Pro sledování reakce se může rovněž použít chromatografie na tenké vrstvě (eluční činidlo methanol/ethylacetát 1 : 1). Přebytečný zinkový prach se odfiltruje. Reakční roztok se okyselí 5 ml ledové kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vysrážený produkt se odfiltruje, promyje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a za vakua vysuší nad chloridem vápenatým. Výtěžek: 1,8 g (82 % teorie).

UV/VIS: (0,1 kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$\lambda_{\max} = 579,4 \text{ nm}$ ($E = 48,6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$),
po okyselení: $\lambda_{\max} = 485,9 \text{ nm}$ ($E = 34,7 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

Fluorescence: absorpce: $\lambda_{\max} = 579 \text{ nm}$
emise: $\lambda_{\max} = 593 \text{ nm}$.

Příklad 6

1-methylresorufin-4-karboxylová kyselina

840 mg 2,6-dihydroxy-4-methylbenzoové kyseliny, 760 mg nitrosoresorcinu, 430 mg burelu a 0,53 ml kyseliny sírové se spolu nechá reagovat způsobem popsaným v příkladu 4 na

1-methylresazurin-4-karboxylovou kyselinu. Výtěžek: 0,8 g. Takto získaná 1-methylresazurin-4-karboxylová kyselina se redukuje analogicky jako v příkladu 5 na 1-methylresorufin-4-karboxylovou kyselinu.

Výtěžek: 0,4 g,

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5)

$$\lambda_{\max} = 571 \text{ nm.}$$

Příklad 7

Morfolid resorufin-4-karboxylové kyseliny

1) N,0,0-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylová kyselina

Varianta a)

5 g (19,4 mmol) resorufin-4-karboxylové kyseliny nebo 5,3 g (19,4 mmol) resazurin-4-karboxylové kyseliny se ve 100 ml 10% kyseliny chlorovodíkové 0,5 hodiny vaří pod zpětným chladičem v přítomnosti 7 g (38 mmol) chloridu cínatého. Přitom se roztok zabarví do zelena. Směs se nechá vychladnout a vysrážená dihydroresorufin-4-karboxylová kyselina se odfiltruje pod dusíkovou atmosférou a vysuší za vakua nad oxidem fosforečným. Takto získaný surový produkt se 30 minut vaří pod zpětným chladičem s 30 ml acetanhydridu a 20 mg octanu sodného. Reakční směs se nalije do 200 ml ledové vody a směs se míchá po dobu 14 hodin. Usazenina se překrystaluje ze směsi ethanol/voda. Získá se 4,8 g (65 %) požadované sloučeniny.

Teplota tání: 197 až 199 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě (silikagel, eluční činidlo chloroform/methanol/ledová kyselina octová 9 : 1 : 0,1).

$R_f = 0,33$.

Varianta b)

5,1 g (20 mmol) resorufin-4-karboxylové kyseliny se ve 20 ml acetanhydridu 1 hodinu míchá při 80 °C s 11 g (60 mmol) chloridu cínatého. Směs se vlije do 230 ml ledové vody, 1 hodinu se míchá, přefiltruje a zpracuje analogicky jako při variantě a).
Výtěžek: 5,4 g (71 %).

2) N,0,0-triacetyldihydroresorufin-4-karbonylchlorid

3,85 g (10 mmol) N,0,0-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny se smísí s 5,4 ml (60 mmol) oxalylchloridu a směs se vychladí na -10 °C. Potom se ke směsi přidá jedna kapka dimethylformamidu a reakční směs se za míchání ohřeje na teplotu místnosti. Přitom se adukt rozpustí za vývoje plynu. Po skončení vývoje plynu se směs míchá ještě 1/2 hodiny, odpaří se a vyjme se do 3 x 20 ml suchého methylenchloridu, načež se methylenchlorid odpaří do sucha. Získají se 4 g surového produktu, který se bez dalšího čištění použije na zpracování.

Chromatografie na tenké vrstvě (silikagel, eluční činidlo: chloroform/methanol/ledová kyselina octová 9 : 1 : 0,1).

$R_f = 0,42$,

bezbarvá skvrna, která se po několika hodinách zbarví do červená.

3) Morfolid N, 0, 0-triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny

11,3 g (31,4 mmol) surového chloridu kyseliny se rozpustí ve 150 ml suchého methylenchloridu. K roztoku se přikape 8,7 ml (63 mmol) triethylaminu a pak 3,3 ml (37,7 mmol) morfolinu. Směs se ještě dvě hodiny míchá, roztok se promyje 1% kyselinou citronovou, roztokem hydrogenuhlitanu sodného a vodou, organická fáze se vysuší nad síranem hořečnatým

a odpař. Zbytek se překrystaluje z ethanolu.

Výtěžek: 8,1 g (63 %), teplota tání: 133 až 135 °C (za rozkladu).

4) Morfolid resorufin-4-karboxylové kyseliny

3,7 g (9 mmolů) morfolidu triacetyldihydroresorufin-4-karboxylové kyseliny se vyjme do 250 ml methanolu a 250 ml vody. K roztoku se přidá 36 ml 1 N hydroxidu sodného a 6,0 g (18 mmolů) hexakynoželezitanu draselného a směs se míchá 14 hodin při teplotě místnosti. Po okyselení kyselinou chlorovodíkovou na pH 3 se směs odpaří do sucha a digeruje acetonem. Roztok barviva se přefiltruje přes 500 ml silikagelu za použití acetonu, jako elučního činidla. Po odpaření eluátu obsahujícího barvivo se získá 2,3 g (80 %) produktu.

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$$\lambda_{\max} = 575 \text{ nm } E = 55\,000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}.$$

Chromatografie na tenké vrstvě (eluční činidlo stejné, jako ve stupni 2).

$$R_f = 0,52.$$

¹H-NMR ([D]₆-DMSO): δ = 3,3 až 3,8 (m, 8H), 6,50 (d, J = 2 Hz, 1H), 6,64 (d, J = 10 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 10 a 2 Hz, 1H), 7,44 a 7,51 (vždy d, J = Hz, 2H).

Příklad 8

β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetylresorufin-1-karboxylové kyseliny a β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetylresorufin-9-karboxylové kyseliny

6,8 methylesteru resorufin-1-karboxylové kyseliny (vyrobeného podle příkladu 3), 5,75 g oxidu stříbrného, 6,75 g uhlíčitanu stříbrného, 15 g molekulového síta 4 Å a 10 g α -bromtetraacetylgalaktózy ve 250 ml absolutního chloroformu se 4 hodiny míchá při teplotě místnosti. Po přidání dalších 5 g α -bromtetraacetylgalaktózy se směs dále míchá přes noc. Reakční směs se přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken a filtrát se odpaří. Olejovitý surový produkt se chromatografuje na 2 l silikagelu za použití směsi chloroform/ethylacetát 2 : 1, jako elučního činidla. Eluuje se 2,5 g žluté frakce s R_f = 0,28 (HPTLC silikagel, stejné eluční činidlo). Po smíchání v methanolu se získá β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetylresorufin-9-karboxylové kyseliny ve formě oranžově zbarvených krystalů.

Výtěžek: 1,5 g.

¹H-NMR ([D]₆-DMSO): δ = 1,95, 2,03, 2,04 a 2,14 (vždy s, 12 H), 3,88 (s, 3H), 4,11 (d, J = 7 Hz, 2H), 4,51 (t, J = 7 Hz, 2H), 5,24 (m, 2H), 5,36 (m, 1H), 5,69 (m, 1H), 6,31 (d, J = 2 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,04 (dd, J = 8,8 a 2,4 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,78 (dd, J = 8,8 Hz, 1H).

Potom se eluuje 1,6 g rovněž žluté frakce s hodnotu R_f = 0,24. Z methanolu vykristaluje β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetylresorufin-1-karboxylové kyseliny ve formě žlutooranžových krystalů.

Výtěžek: 1,2 g.

¹H-NMR ([D]₆-DMSO): δ = 1,95, 2,02, 2,04 a 2,14 (vždy s, 12H), 3,90 (s, 2H), 4,09 (m, 2H), 4,51 (m, 1H), 5,24 (d, J = Hz, 1H), 5,25 (m, 1H), 5,36 (m, 1H), 5,71 (m, 1H), 6,50 (d, J = 2 Hz, 1H), 6,83 (dd, J = 10 Hz, a 2 Hz, 1H), 7,20 a 7,24 (vždy d, J = 2 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 10 Hz, 1H).

Mezi čistými produkty je rovněž možno eluovat směsnou frakci, ze které se po překrystalování z methanolu získá 2,5 g krystalů směsi obou isomerních sloučenin.

Analogickým způsobem se z α -bromtetraacetylgalaktózy a -

a) methylesteru 4-methoxyresorufin-1-karboxylové kyseliny získá β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetyl-4-methoxyresorufin-1-karboxylové kyseliny a β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetyl-6-methoxyresorufin-9-karboxylové kyseliny,

b) methylesteru β -chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny získá β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetyl-8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny a β -D-galaktopyranosid methylesteru tetraacetyl-2-chlorresorufin-9-karboxylové kyseliny.

Příklad 9

β -galaktopyranosid morfolidu tetraacetylresorufin-4-karboxylové kyseliny a β -galaktopyranosid morfolidu tetraacetylresorufin-6-karboxylové kyseliny

3,26 g (10 mmolů) morfolidu resorufin-4-karboxylové kyseliny se galaktosiduje způsobem popsaným v příkladu 8. Surový produkt se chromatografuje na 1 litru silikagelu za použití směsi ethylacetát/acetón, jako elučního činidla. Získá se tak 0,9 g β -D-galaktopyranosidu morfolidu tetraacetylresorufin-6-karboxylové kyseliny.

Chromatografie na tenké vrstvě (silikagel, eluční činidlo viz příklad 7).

$R_f = 0,71$.

Kromě toho se získá 0,4 g β -D-galaktopyranosidu morfolidu tetraacetylresorufin-4-karboxylové kyseliny.

Chromatografie na tenké vrstvě (silikagel, stejné eluční činidlo).

$R_f = 0,76$.

Rovněž se získá 1,2 g směsné frakce obou isomerních sloučenin.

Příklad 10

β -D-galaktopyranosid methylesteru resorufin-1-karboxylové kyseliny

1,2 g β -D-galaktopyranosidu methylesteru tetraacetylresorufin-9-karboxylové kyseliny se deacetyluje methoxidem sodným v methanolu způsobem popsaným v příkladu 2.

Výtěžek: 0,8 g.

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$\lambda_{\max} = 464 \text{ nm}$ ($E = 21,8 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

Po štěpení β -galaktosidázou se získá anion methylesteru resorufin-1-karboxylové kyseliny

$\lambda_{\max} = 572 \text{ nm}$ ($E = 65,3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}]_6\text{-DMSO}$): δ 3,20 až 3,80 (m, 6H), 3,91 (s, 3H), 5,09 (d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H), 6,30 (d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1H), 6,81 (dd, $J = 9,8$ a $2,1 \text{ Hz}$, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,51 (d, $J = 9,8 \text{ Hz}$, 1H), OH protony velmi široký při 5.

Analogickým způsobem se deacetylací odpovídajících tetraacetátů získají tyto látky:

a) β -D-galaktopyranosid methylesteru resorufin-1-karboxylové kyseliny

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}]_6\text{-DMSO}$): δ 3,4 až 3,7 (m, 6H), 5,09 (d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H), 6,34 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H), 6,97 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H), 7,08 až 7,17 (m, 2H), 7,75 (d, $J = 10 \text{ Hz}$, 1H), OH: velmi široký při 5 ppm.

b) β -D-galaktopyranosid methylesteru 4-methoxyresorufin-1-karboxylové kyseliny,

c) β -D-galaktopyranosid methylesteru 6-methoxyresorufin-9-karboxylové kyseliny,

- d) β -D-galaktopyranosid methylesteru 8-chlorresorufin-1-karboxylové kyseliny,
 e) β -D-galaktopyranosid methylesteru 2-chlorresorufin-9-karboxylové kyseliny,
 f) β -D-galaktopyranosid morfolidu resorufin-6-karboxylové kyseliny, $R_f = 0,3$
 (ethylacetát/isopropylalkohol/voda 9 : 4 : 2).

Po štěpení β -galaktosidázou:

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$$\lambda_{\max} = 574,6 \text{ nm}$$

Fluorescence emise $\lambda_{\max} = 593 \text{ nm}$ a

- g) β -D-galaktopyranosid morfolidu resorufin-4-karboxylové kyseliny, $R_f = 0,3$ (ethylacetát/isopropylalkohol/voda 9 : 4 : 2).

Po štěpení β -galaktosidázou:

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový pufr, pH 7,5):

$$\lambda_{\max} = 574,6 \text{ nm}$$

Fluorescence emise: $\lambda_{\max} = 593 \text{ nm}$.

Příklad 11

Triethylamoniová sůl β -D-galaktopyranosidu resorufin-9-karboxylové kyseliny

266 mg β -D-galaktopyranosidu methylesteru resorufin-9-karboxylové kyseliny se vyjme do 50 ml vody a 20 ml 1,4-dioxanu. K roztoku se přidá po dávkách 0,5 ml celkem 5 ml 0,1 N hydroxidu sodného, přičemž hodnota pH roztoku přitom nemá stoupnout nad 12,5. Reakční směs se nanese na 6 ml DEAE-Sephadexu v karbonátové formě. Sloupec se promyje 180 ml vody.

Dále se produkt eluuje 0,1 M triethylamoniumkarbonátovým tlumičem o pH 7,5. Eluát se za vakua odpaří a potom se několikrát odpaří s ethanolem.

Výtěžek: 110 mg triethylamoniové soli β -D-galaktopyranosidu resorufin-9-karboxylové kyseliny.

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$$\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$$

Po rozštěpení β -galaktosidázou:

$$\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}.$$

Příklad 12

Resazurin- β -D-galaktopyranosid

12,6 g sodné soli resazurinu se rozpustí v 65 ml 1 N hydroxidu sodného a 80 ml vody. K roztoku se přidá 20,6 g acetobrom- α -D-galaktózy a 18,2 g hexadecyltrimethylamoniumbromidu ve 150 ml chloroformu. Směs se 3 hodiny vaří pod zpětným chladičem, pak se odpaří do sucha a zbytek se digeruje ethylacetátem. Ethylacetátový roztok se znovu zahustí a chromatografuje se na 500 ml silikagelu (eluční činidlo: methylenchlorid/ethylacetát 3 : 1). Získá se 2,13 g tetraacetylresazurin- β -D-galaktopyranosidu s hodnotou $R_f = 0,5$ (HPTLC na silikagelu, stejné eluční činidlo).

Deacetylace se provádí tak, že se 2,13 g tetraacetylderivátu míchá 1 hodinu při teplotě místnosti s 0,1 g methoxidu sodného ve 100 ml absolutního methanolu. Vysrážený produkt se odsaje a za vakua vysuší nad chloridem vápenatým.

Výtěžek: 1,0 g.

$R_f = 0,62$ (HPTLC na silikagelu za použití elučního činidla ethylacetát/isopropylalkohol/voda 9 : 4 : 2).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}]_6\text{-DMSO}$): δ 3,30 až 3,90 (m, 6H), 4,54 (široký, d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,67 (široký t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,07 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 5,27 (široký d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,15 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 6,63 (dd, $J = 9,6$ a 2 Hz, 1H), 7,10 (dd, $J = 9$ a 2 Hz, 1H), 7,2 (m, 2H), 7,96 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 8,07 (d, $J = 9$ Hz, 1H).

Příklad 13

8-chlorresazurin-4-karboxylová kyselina

4,3 g (30 mmolů) 4-chlorresorcinu se rozpustí ve 20 ml ethanolu. K roztoku se přidá 2,4 g hydroxidu draselného a směs se ochladí na 5°C . Za chlazení se k této směsi přikape 2,81 ml isopentylnitritu a potom se směs dále přes noc míchá při teplotě místnosti. Usazenina se odfiltruje, rozpustí ve vodě a roztok se okyselí. Žlutá usazenina se znovu odfiltruje a vysuší za vakua při 40°C .

Výtěžek: 2,5 g (48 %) 4-chlor-6-nitrosoresorcinu

$R_f = 0,28$ (HPTLC na silikagelu, eluční činidlo methanol/ethylacetát 1 : 3).

1,83 g 4-chlor-6-nitrosoresorcinu, 1,55 g 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 0,86 burelu a 1,06 ml kyseliny sírové se přidá ke 20 ml methanolu a vzniklá směs se míchá 2 hodiny při 0°C a 14 hodin při teplotě místnosti. Získá se červená usazenina, která se odfiltruje a vysuší.

Výtěžek: 2,45 g (80 %) 8-chlorresazurin-4-karboxylové kyseliny.

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$\lambda_{\text{max}} = 621,5 \text{ nm}$.

Analogickým způsobem se

a) z 2-methylresorcinu přes 2-methyl-6-nitrosoresorcin získá 6-methylresazurin-4-karboxylová kyselina,

b) z 4-methylresorcinu přes 4-methyl-6-nitrosoresorcin získá 8-methylresazurin-4-karboxylová kyselina a

c) z 4-bromresorcinu přes 4-brom-6-nitrosoresorcin získá 8-bromresazurin-4-karboxylová kyselina.

Příklad 14

8-chlorresorufin-4-karboxylová kyselina

2 g 8-chlorresazurin-4-karboxylové kyseliny (vyrobené podle příkladu 10) se rozpustí ve 20 ml vody a 5 ml 25% roztoku amoniaku. Za chlazení ledem se k roztoku přidává zinkový prach tak dlouho, dokud nedojde k úplné barevné změně do červenofialového odstínu. Přebytečný zinek se odfiltruje, filtrát se okyselí, vysrážený produkt se odfiltruje a za vakua vysuší nad chloridem vápenatým při 40°C .

Výtěžek: 1,5 g (79 %) 8-chlorresorufin-4-karboxylové kyseliny.

UV/VIS (0,1 M kaliumfosfátový tlumič, pH 7,5):

$\lambda_{\text{max}} = 585,5 \text{ nm}$

Analogickým způsobem se

a) z 6-methylresazurin-4-karboxylové kyseliny získá 6-methylresorufin-4-karboxylová kyselina,

b) z 8-methylresazurin-4-karboxylové kyseliny se získá 8-methylresorufin-4-karboxylová kyselina a

c) z 8-bromresazurin-4-karboxylové kyseliny se získá 8-bromresorufin-4-karboxylová kyselina.

Příklad 15

 α -D-galaktopyranosid methylesteru resorufin-9-karboxylové kyseliny

3,2 g pentaacetylgalaktózy se smísí s 0,1 g bezvodého chloridu zinečnatého a směs se smísí s 0,1 g bezvodého chloridu zinečnatého a směs se zahřeje na 125 °C, načež se 20 minut míchá za tlaku 1,33 kPa. K tavenině se přidá 1 g methylesteru resorufin-1-karboxylové kyseliny. Směs se 1 hodinu míchá při 41 °C a pak se chromatografuje způsobem popsaným v příkladu 7 na silikagelu za použití směsi chloroform/ethylacetát 2 : 1, jako elučního činidla.

Výtěžek: 25 mg α -D-galaktopyranosidu methylesteru tetraacetylresorufin-9-karboxylové kyseliny (žlutý olej).

R_f = 0,22 (HPTLC na silikagelu, stejné eluční činidlo).

Deacetylace na α -D-galaktopyranosid methylesteru resorufin-9-karboxylové kyseliny se provádí způsobem popsaným v příkladu 10.

Příklad 16

 β -D-galaktopyranosid 3,6-dioxaoktylesteru resorufin-9-karboxylové kyseliny

0,6 g β -D-galaktopyranosidu methylesteru tetraacetylresorufin-9-karboxylové kyseliny se smísí a 50 ml diethylenglykolmonoethyletheru a na špičku špachtle natriumhydridu a směs se 15 minut míchá při teplotě místnosti. Pak se přidá 100 ml acetonu. Vysrážená usazenina se odfiltruje a vysuší.

Výtěžek: 56 mg β -D-galaktopyranosidu 3,6-dioxaoktylesteru resorufin-9-karboxylové kyseliny.

R_f = 0,54 (HPTLC na silikagelu za použití směsi ethylacetát/isopropylalkohol 9 : 4, jako elučního činidla).

Příklad 17

Maltoheptosid resorufinu

Amyláza (E.C.2.4.1.19), například amyláza získaná pomocí *Bacillus macerans*, vykazuje vedle hydrolytického a cyklizačního účinku také glykosyl-transferové vlastnosti, kterých je možno využít při syntéze oligosacharidů a jejich derivátů (Methods in Carbohydrate Chemistry II, 347).

680 mg amylázy získané pomocí *Bacillus macerans* DSM 24

(Liofilizát; 0,46 U/mg navážky; obsah proteinů v navážce 28,5 %).

500 mg resorufinglukosidu,

3,5 g α -cyklodextrinu a

70 ml Soerensenova fosfátového tlumiče (pH 6,2, 0,01 M),

se spolu smísí a ná sada se po dobu 24 hodin inkubuje při 37 °C. Za účelem přečištění se nejprve oddělí α - a vzniklý β -cyklodextrin přes tetrachlorethylenovou adiční sloučeninu. Po chromatografii na zasíťovaném dextranu (Sephadex LH 20) se získá 50 mg lyofilizátu resorufinylmaltoheptosidu, který při testu s amylázou vykazuje vysokou aktivitu.

Příklad 19

a) Peracetyl- β -D-maltopentosid

100 g (0,12 mol) maltipentosy a 81,8 g (1,0 mol) bezvodého octanu sodného se suspenduje v 1,1 litru (11,7 mol) acetanhydridu a směs se pomalu za vyloučení vlhkosti zahřívá až do začátku reakce (asi 110 °C). Potom se směs chladí ledovou vodou až do odeznění reakce a pro dokončení reakce se ještě 1 hodinu vaří pod zpětným chladičem. Reakční směs se ochladí na asi 70 °C a nalije se do 4 litrů ledové vody. Po 60 minutách míchání se supernatant slije a zbytek se rozpustí v 500 ml dichlormethanu. Dichlormethanová fáze se

postupně protřepe s vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou a vysuší se síranem sodným. Po oddestilování rozpouštědla za sníženého tlaku se zbytek překrystaluje z 1,5 litru směsi ethanol-isopropylalkohol(1 : 1) za přidání aktivního uhlí.

Výtěžek: 166,2 g (89,8 % teorie) ve formě bezbarvých krystalů o teplotě tání 120 až 125 °C, $\alpha_D^{20} = +123,5^\circ$.

Chromatografie na tenké vrstvě: silikagelové desky Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) toluen/acetone (7 : 4).

R_f = 0,52.

¹H-NMR (DMSO-d₆): 1,8 až 2,2 (s, 5H, COOCH₃),
3,8 až 5,5 (m, 35H, H-1, -H-6).

Literatura:

Herzfeld, Chem. Ber. 13 (1880), 267.

Následující peracetyl-β-D-maltosidy se syntetizují shora uvedeným způsobem, přičemž se místo maltopentosy použije stejného množství maltosy, maltotriosy, maltotetrosy, maltohexosy a maltoheptosy.

cukr	teplota tání °C	výtěžek %	α_D^{20} (CHCl ₃) °	R _f (Kieselgel 60 toluen/acetone, 7/4)
maltosa	159 až 160	90	+ 62,5	0,64
maltotriosa	-	85	+ 100,3	0,59
maltotetrosa	-	88	+ 109,7	0,56
maltopentosa	120 až 125	90	+ 123,5	0,52
maltohexosa	140 až 145	91	+ 130,0	0,49
maltoheptosa	160	82	-	0,46

b) Hydroxy-α-D-peracetylmaltopentosid

150 g (0,096 mol) peracetyl-β-D-maltopentosidu se rozpustí ve 200 ml absolutního tetrahydrofuranu. K roztoku se za míchání přidá 33 ml (0,3 mol) benzylaminu a směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti za vyloučení vlhkosti. Potom se směs za vakua odpaří do sucha, zbytek se rozpustí ve 400 ml dichlormethanu a dichlormethanová fáze se postupně promyje vždy 400 ml 5N kyseliny chlorovodíkové, vody, nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a vody. Organická fáze se vysuší síranem sodným a zahřeje s přísadou aktivního uhlí k varu pod zpětným chladičem. Po odfiltrování aktivního uhlí se filtrát za sníženého tlaku odpaří do sucha. Produkt se může bez dalšího čištění použít v následujícím stupni. Výtěžek: 140 g (97 % teorie)

Chromatografie na tenké vrstvě: silikagel 60 F₂₅₄ (Merck) toluen/acetone (7/4).

R_f = 0,42

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1,8 až 2,2 (s, 48H, COOH_3)
 3,8 až 5,5 (m, 35H, H-1, -H-6)
 5,7 (s, 1H, OH).

Literatura:

Helferich B., Portz W., Chem. Ber. 86 (1953), 604

Analogickým způsobem se syntetizují následující maltosidy:

cukr	výtěžek	R_f (Kieselgel 60, toluen/aceton (7 : 4))
maltosa	96 %	0,45
maltotriosa	96 %	0,40

c) Peracetylmaltopentosyl- α -D-trichloracetimidát

75 g (0,05 mol) hydroxy- α -D-peracetylmaltopentosidu a 25 ml (0,25 mol) trichlor-acetonitrilu se rozpustí ve 150 ml absolutního dichlormethanu. Roztok se ochladí na 0 °C, za míchání se po částech přidá 1,5 g (0,055 mol) natriumhydridu a směs se 2 hodiny míchá při teplotě místnosti za vyloučení vlhkosti. Přebytek natriumhydridu se oddělí na skleněné fritě, filtrát se přefiltruje přes sloupec silikagelu (Kieselgel 60, Merck, asi 200 ml, Ø 6 cm) a sloupec se promyje 2 litry ethylacetátu. Filtrát se s přísadou aktivního uhlí zahřeje k varu pod zpětným chladičem. Aktivní uhlí se odfiltruje a filtrát se za vakua odpaří do sucha.

Výtěžek: 72 g (87,5 % teorie), bezbarvého pěnovitého produktu

Chromatografie na tenké vrstvě: silikagel Kieselgal 60 F₂₅₄ (Merck).

R_f = 0,58.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1,8 až 2,2 (s, 48H, COOH_3),
 3,8 až 5,5 (m, 35H, H-1, -H-6),
 6,3 (s, 1H, NH).

Literatura:

Schmidt R., Stumpp M., Liebigs Ann. Chem. 1983, 1249 až 1256.

Analogicky se vyrobí ještě peracetyl-maltotriosatrachloracetimidát:

Výtěžek: 93 %

R_f = 0,45.

d) Resorufinyl- β -D-maltopentosid

72,0 g (0,044 mol) peracetylmaltopentosyl- α -D-trichloracetimidátu a 4,4 g (0,02 mol) resorufinu se suspenduje v 1 litru absolutního dimethylformamidu. K suspenzi se přikape při teplotě místnosti 6,3 ml (0,05 mol) etherátu fluoridu boritého ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) a směs se po dobu 8 hodin míchá při 60 °C vyloučení vlhkosti. Po ochlazení na teplotu místnosti se směs přefiltruje přes oxid hlinitý (asi 500 ml) a ten se dodatečně promyje 5 litry ethylacetátu. Filtrát se za sníženého tlaku odpaří dosucha, zbytek se rozpustí ve 100 ml abso-

lutního methanolu a deacetyluje pomocí 2 g methoxidu sodného v průběhu 3 hodin při teplotě místnosti za vyloučení vlhkosti. Suspenze se za vakua zahustí dosucha, zbytek se vyjme do 100 ml vody, pH roztoku se nastaví 2N kyselinou chlorovodíkovou na 6 a potom se roztok natáhne na sloupec Diaionu (asi 500 ml Ø 8 cm). Eluce se provádí nejprve 4 litry vody a pak 3 litry 20% roztoku isopropylalkoholu. Eluát se zahustí na asi 40 ml a pak chromatografuje na RP-18-Flasch-sloupci (Ø = 4 cm, h = 39 cm) pomocí 15% isopropylalkoholu jako elučního činidla v 50 ml dávkách. Frakce obsahující resorufinmaltopentosid se spojí, zahustí na asi 20 ml za sníženého tlaku a chromatografují na sloupci RP-18-MPLC v 10 ml dávkách za použití 15% isopropylalkoholu jako elučního činidla. Frakce obsahující produkt se spojí, za vakua zahustí a potom lyofilizují.

Výtěžek: 2,8 g (14 % teorie) oranžového lyofilizátu

HPLC: RP-18-sloupec, 1 ml/min., 17% isopropanol,

$R_f = 2,95$ min.

Obsah resorufin- G_5 : 97 %.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,0 až 6,0 (m, 51H, OH, H-1 -H-6)
6,2 až 8,0 (m, 6H, ArH)

Literatura:

Schmidt R., Grundler G., Synthesis 1981, 885 až 887.

Příklad 20

a) Br- ω -D-maltosid:

25 mmol peracetylovaného cukru se rozpustí v 50 ml ledové kyseliny octové. K roztoku se přikape 50 ml kyseliny bromovodíkové (30 %) v ledové kyselině octové a směs se míchá při teplotě místnosti za vyloučení vlhkosti. Pak se přidá 300 ml dichlormethanu a směs se vlije do 1 litru ledové vody. Organická fáze se oddělí a postupně protřepe s vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou. Organická fáze se vysuší síranem sodným a dále se za sníženého tlaku odpaří dosucha. Produkt se může bez dalšího přečištění použít při následující reakci.

cukr	výtěžek	R_f (Kieselgel 60, toluen/acetone, (7 : 4))
maltosa	88 %	0,72
maltotriosa	88 %	0,65
maltotetrosa	93 %	0,61
maltopentosa	91 %	0,57
maltohexosa	93 %	0,53
maltoheptosa	95 %	0,50

Literatura:

Brauns, J., Am. Chem. Soc. 51 (1929), 1830.

b) Resorifin- β -D-maltosid:

50 mmol resorufinu a 25 mmol oxidu stříbrného se suspenduje v 800 ml absolutního acetonitrilu spolu s molekulovým sítem (3A) a směs se po dobu 4 hodin vaří pod zpětným chladičem za vyloučení vlhkosti. Přidá se 62,5 mmol Br- α -D-peracetylmaltosidu ve 200 ml absolutního acetonitrilu a směs se nechá 6 hodin vařit pod zpětným chladičem. Potom se směs dalších 18 hodin míchá při teplotě místnosti, přidá se 10 g aktivního uhlí a směs se ještě krátce vaří pod zpětným chladičem. Směs se přefiltruje přes 100 g oxidu hlinitého (o stupni aktivity III/N) a ten se dodatečně promyje 5 litry ethylacetátu. Filtrát se za sníženého tlaku odpaří dosucha, zbytek se rozpustí v 1 litru absolutního ethanolu a 18 hodin míchá spolu s 5 g methoxidu sodného za vyloučení vlhkosti. Suspenze se za sníženého tlaku odpaří dosucha, zbytek se rozpustí ve 200 ml vody, pH roztoku se nastaví na 7 a roztok se nanese na 500 ml Diaion-HP-20-sloupec. Sloupec se promyje 15 litry vody a potom se provádí eluce 10 litry 15% roztoku isopropylalkoholu. Eluát se za sníženého tlaku zahustí na 100 ml a dále se tak jako při imidátové metodě chromatografuje na RP-18-MPLC-sloupce za použití roztoku isopropylalkoholu a nakonec se lyofilizuje.

cukr	výtěžek %	HPLC Rt/% iso- propanolu	R _f (silikagel) butanol/led.kys.octová) voda 50/15/25
maltotriosa a)	15	3,52 min/17 %	0,32
maltotetrosa	16	3,27 min/17 %	0,29
maltopentosa	14	2,95 min/17 %	-
maltoheptosa	10	2,60 min/17 %	-
maltosa b)	15	-	0,39

- a) Při eluci resorufinyl- β -D-maltotriosy z diaionového sloupce se používá 25% isopropanolu a při chromatografii na RP-18-sloupce 25% isopropanolu.
- b) Při eluci resorufinyl- β -D-maltosidu z diaionového sloupce se používá 40% isopropanolu. Produkt se za sníženého tlaku odpaří dosucha, potom se rozpustí v dimethylformamidu a vysráží vodou. Usazenina se odsaje a za vakua vysuší.

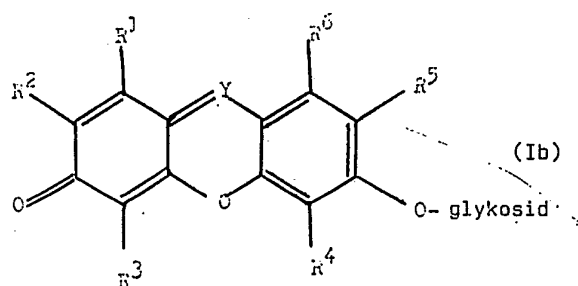
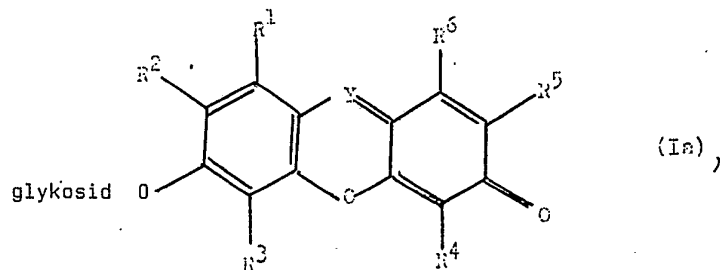
¹H-NMR (DMSO-d₆):

Maltosa: 3,1 až 3,9 (m, 11H, OH, H-6), 4,4 až 5,7 (m, 10H, H-1 - H-5), 6,2 až 8,0 (m, 6H-ArH),

Maltotriosa: 3,0 až 5,9 (m, 32H, OH, H-1 - H-6), 6,2 až 8,0 (m, 6H, ArH).

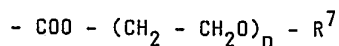
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby glykosidů derivátů resorufinu obecného vzorce Ia nebo Ib

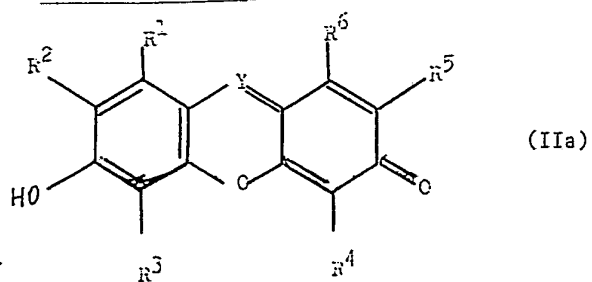


kde

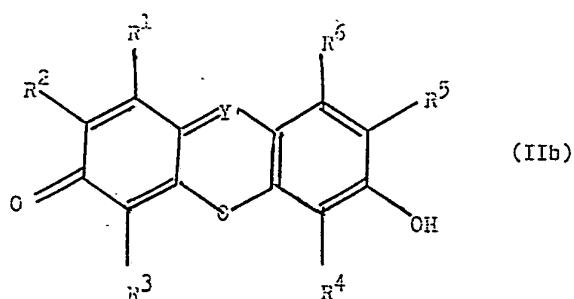
glykosid značí glykosidový zbytek monosacharidu nebo oligosacharidu obsahujícího 2 až 10 monosacharidových jednotek, R^1 značí vodík, každý ze symbolů R^2 , R^3 a R^5 , které jsou stejné nebo různé, značí vodík, halogen nebo alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, každý ze symbolů R^4 a R^6 , které jsou stejné nebo různé, značí vodík; halogen; kyanoskupinu; alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku; alkoxy skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku; karboxyskupinu; alkoxykarbonyl-, karboxyalkyl- nebo alkoxykarbonylalkylskupinu; přičemž v posledně uvedených třech skupinách obsahují alkylové a alkoxylové zbytky vždy 1 až 5 atomů uhlíku; nebo karboxamid skupinu, popřípadě jednoduše nebo dvojnásobně substituovanou prostřednictvím alkylových, alkoxyalkylových, karboxyalkylových nebo alkoxykarbonylalkylových zbytků, v nichž alkylové a alkoxylové skupiny obsahují vždy 1 až 5 atomů uhlíku, přičemž v případě přítomnosti dvou substituentů, mohou být spolu spojeny za vzniku kruhu, který je popřípadě přerušen také kyslíkem, dusíkem nebo sírou; nebo skupinou obecného vzorce



kde R^7 značí vodík nebo alkylskupinu s 1 až 5 atomy uhlíku a n značí celé číslo 1 až 4, přičemž navíc R^6 značí sulfonyl- nebo nitroskupinu a Y značí dusík nebo skupinu $\text{N} \rightarrow \text{O}$, vyznačující se tím, že se deriváty resorufinu obecných tautomerních vzorců IIa a IIb



//



kde R^1 až R^6 a Y mají shora uvedený význam,
 nechají reagovat s mono- nebo oligosacharidem obsahujícím 2 až 10 monosacharidových jednotek nebo jeho halogenderivátem, přičemž všechny hydroxyskupiny jsou vždy substituovány ochrannými skupinami, obvyklými v chemii uhlohydrátů, za vzniku per-O-substituovaných glykosidů, ze kterých se získají glykosidy derivátů resorufinu obecného vzorce Ia nebo Ib odštěpením ochranných skupin.