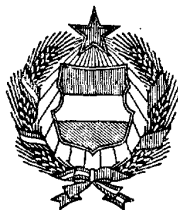


MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

179936

Bejelentés napja: 1979. VIII. 21.

(BO—1801)

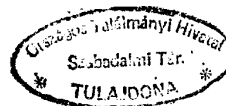
Elsőbbsége: 1978. VIII. 22. (P 28 36 644.1)
Német Szövetségi Köztársaság

Közzététel napja: 1982. V. 28.

Megjelent: 1984. V. 31.

Nemzetközi osztályozás:
NSZO₃

G 01 N 33/48
C 12 Q 1/44
C 07 C 107/04
C 09 B 43/18



Feltalálók:

Dr. Berger Dieter vegyész, Viernheim,
Dr. Braun Franz vegyész, Rimbach/Odw,
Frey Günter vegyészmérnök, Ludwigshafen,
Dr. Güthlein Werner vegyész, Mannheim-Neckarau,
Dr. Kuhr Manfred vegyész, Mannheim,
Német Szövetségi Köztársaság

Szabadalmas:

Boehringer Mannheim GmbH,
Mannheim,
Német Szövetségi Köztársaság

Leukociták testfolyadékokban való kimutatására szolgáló diagnosztikai eszköz és eljárás ehhez megfelelő kromogének előállítására

1

A leukociták testfolyadékokban, különösen vizeletben való kimutatása lényeges helyet foglal el a vese és az urogenitális traktus betegségeinek diagnosztikájában.

Ezt a kimutatást eddig a leukociták nem centrifugált vizeletben vagy vizeletüledékben való fáradságos számlálásával végezték. Természetesen mindkét módszerben közös, hogy csak intakt leukocitákat vesz figyelembe. Másrészt ismeretes, hogy a leukocita-lízis sebességét a vizelet tulajdonságai erősen befolyásolják, így például erősen lúgos vizeletben körülbelül 60 perces leukocita felezési idővel kell számolni. Túl alacsony leukocitaszámoknak, illetve hosszabb vizelet-állásidőnek hamis negatív leletek lehetnek a következményei.

A lízis-hibától eltekintve a leukociták centrifugálatlan, homogenizált vizeletben való kvantitatív mikroszkópiás meghatározása számlálókamrában eléggé megbízható eredményeket szolgáltat. A gyakorlatban azonban ezt a módszert csak ritkán alkalmazzák, mivel fáradságos, kimerítő és időt rabló, és iskolázott személyzet alkalmazását igényli.

A vizeletből történő leukocitameghatározások túlnyomó többségét az orvosi gyakorlatban az úgynevezett látóter-módszerrel végzik a vizeletüledékből. Ehhez először centrifugálással vizsgálati anyagot (üledéket) kell nyerni. Ennek során azonban a vizelet más alkotórészei is feldúsulnak, amelyek — így például sók és hámsejtek — a leukociták mikroszkópiás számlálását lényegesen megnehezítik. Kisebb üledéktartalom, az üledék inhomogenitási, valamint eltérő mikroszkópiás nagytartományok vagy a mikroszkóp eltérő optikai felépítése azt eredmé-

2

nyezheti, hogy az itt szokásos, mikroszkóp látóterére megadott leukocitaszám többszáz százalékos hibákat is takarhat.

A jelen találmány feladata ezért az volt, hogy olyan diagnosztikai eszközt bocsásson rendelkezésre, amellyel a leukociták testfolyadékokban egyszerű és könnyen kezelhető módon, valamint lehetőleg gyorsan és teljesen mutathatók ki.

Ilyen leukocitavizsgálat alapját egy enzim reakció szolgáltatja, mivel a leukociták széles enzimspektrummal rendelkeznek.

A 30 87 794 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban már közölnek és ajánlanak egy leukocita-meghatározást, amelyet a granulocita leukocitákban jelenlevő peroxidáz aktivitással végeznek. Egy hidrogén-peroxiddal és valamilyen szerves indikátorral, például o-tolidinnel impregnált szívóképes hordozó színes oxidációs termék képződésével mutatja a leukociták jelenlétét. Egy ilyen teszt azonban döntő hátrányokkal is rendelkezik. Egyrészt jelentős zavaró hatást jelentenek általában a vizeletben jelenlevő redukáló anyagokkal, például aszkorbinsavval végbemenő oxidációs reakciók. Másrészt több helyen található irodalmi hivatkozás [lásd például L. Mettler, Med. Welt 23, 399 (1972)] a leukocita-peroxidáz instabilitására vizeletben, ami hamis negatív leleteket eredményezhet.

Néhány éve a hisztó- és citokémiai enzimológiában tartósan teret hódítottak olyan kolorimetriás meghatározási módszerek, amelyek a meghatározandó rendszerekben jelenlevő enzimek észterolitikus aktivitásán ala-

179936

pulnak. (Lásd például A. G. E. Pearse, *Histochemistry, Theoretical and Applied*.) Lényegében szintelen vagy enyhén színes észtereket alkalmaznak, amelyek az enzim hasítás során legtöbbször szintelen sav- és ugyan-csak szintelen alkohol-(fenol)-komponensre esnek szét. Utóbbiakat azután az enzimes elszappanosítást követő reakcióban színes termékekkel reagáltatják (például diazóniumsókkal való kapcsolással vagy oxidatív reakciókkal).

F. Schmalzl és H. Braunsteiner például a *Klin. Wschr.* 46, 642 (1968)-ban leírtak egy specifikus citokémiai leukocita-észteráz kimutatást, ahol szubszt rátként Naphtol-AS-D-klór-acetátot és valamilyen diazóniumsót használtak a színes azovegyület képzéséhez.

Leukociták testfolyadékokban, így például vizeletben való gyors és egyszerű kimutatására szolgáló diagnosztikai eszközként ilyenfajta kétkomponensű rendszerek nem bizonyultak megfelelőnek, mivel a vizeletben előforduló sok egyéb vegyület, így urobilinogén, szterkobilinogén, bilirubin és egyéb szintén reagálnak diazóniumsókkal. Ebből eredően ez a kimutatási módszer túlságosan érzékeny. Például 5000 leukocita/ul esetében semmilyen reakciót nem mutatnak a minták.

Meglepő módon azt találtuk, hogy stabil és gyorsan jelző diagnosztikai eszközt kapunk, amellyel leukociták testfolyadékokban jól kimutathatók, ha a neutrofil leukocita-granulocitákban előforduló észterázok kimutatására szubszt rátként azoszínezék-észtereket használunk.

A jelen találmány tárgya leukociták testfolyadékokban való kimutatására szolgáló olyan diagnosztikai eszköz, amely egy színeképzővel (kromogénnel) és szokásos adalékanyagokkal impregnált szívóképes hordozóból áll, és az jellemzi, hogy a leukocitákban előforduló észterázok kimutatására I általános képletű azoszínezék-észtereket — a képletben

A jelentése 1 vagy 2 nitrogénatomot, kénatomot, oxigénatomot tartalmazó, öttagú vagy hattagú heterociklusos gyűrű, amely adott esetben halogénatommal vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal egyszeresen szubsztituált és amely egy, adott esetben rövidszénláncú alkil- vagy alkoxicsoporttal szubsztituált anellált benzolgyűrűt tartalmazhat, vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal, rövidszénláncú alkoxicsoporttal, nitrocsoporttal, szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel és/vagy benzoil-amino-csoporttal egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan szubsztituált fenilcsoport,

B jelentése adott esetben szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel, rövidszénláncú alkoxicsoporttal és/vagy rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilénoxi)-csoporttal egyszeresen vagy kétszeresen szubsztituált benzol-, naftalin-, vagy kinolin-maradék,

R jelentése benzoilcsoport vagy valamely 2—5 szénatomos alifás acilcsoport, vagy valamely, terc-butoxi-karbonil-, benziloxi-karbonil- vagy p-toluolszulfonil-védőcsoporttal védett, nem heterociklusos, élővilágban előforduló mono-amino-monokarbonsav-gyök vagy valamely 2—6 tagszámú, nem heterociklusos élővilágban előforduló monoamino-monokarbonsavakból álló peptid-gyök, és

n jelentése 1 vagy 2 —.

A találmány további tárgya eljárás az I általános képletű azoszínezék-észtereket tartalmazó, leukociták test-

folyadékokban való meghatározására szolgáló diagnosztikai eszközök előállítására.

Az összes I általános képletű azoszínezék-észter új vegyület.

5 A találmány tárgya továbbá eljárás az I általános képletű azoszínezék-észterek előállítására.

Az I általános képletű új azoszínezék-észtereket a fenilészterek szintézisére ismert módszerek szerint állíthatjuk elő. Előnyösen, önmagában ismert módon, valamely II általános képletű megfelelő azoszínezéket — ahol A, B és n jelentése az előbb megadottakkal azonos —, egy III általános képletű savval — ahol R jelentése az előbb megadottakkal azonos —, illetve ennek megfelelő reakcióképes származékával reagáltatunk.

15 A karbonsavészterek előállításánál reakcióképes származékokként főleg a megfelelő karbonsavanhidrideket, illetve karbonsavkloridokat használjuk, adott esetben tercier aminok hozzáadásával. Az aminosav- és peptid-észterek előállítására a peptidkémiaiban szokásos szintézismódszereket alkalmazzuk.

20 A II általános képletű azoszínezékek ismert anyagok [lásd például H. R. Hovind, *The Analyst*, 100, 769 (1975)], vagy ismert vegyületek analógiájára állíthatók elő.

25 Az A jelentésénél említett halogénatomon fluor-, klór- vagy brómatom, előnyösen brómatom értendő.

Az A jelentésénél említett „rövidszénláncú alkilcsoport” valamint az A és B jelentésénél említett „rövidszénláncú alkoxicsoport” 1—4, előnyösen 1—3 szénatomot tartalmaz. Különösen előnyös a metil-, metoxi- és etoxi-csoport.

30 A B jelentésénél említett „rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilénoxi)-csoport” 2—4, előnyösen 2—3 alkilén-oxi-csoportot tartalmaz, előnyösen etilén-oxi-csoportokat. Különösen előnyös „rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilén-oxi)-csoport” a 3,6-dioxa-heptiloxi-csoport.

35 Az A és B jelentésénél megadott szulfonsavgyökök vagy maga a szulfonsavgyök ($-\text{SO}_3\text{H}$) vagy ennek valamilyen alkálifém-sója. Különösen előnyös a nátriumsó.

Az R szubsztituenseknél említett 2—5 szénatomos alifás acilcsoportok közül előnyösek a 2—3 szénatomosak. Különösen előnyös az acetyl-csoport.

Az R szubsztituens jelentésénél említett monoamino-monokarbonsav-gyökök természetes L- α -aminosavak savgyökei. Főként a glicin, L-alanin és L-fenilalanin savgyöke előnyös.

40 Az R szubsztituens jelentésénél említett peptidgyököknél di-, tri-, tetra- és pentapeptidek, előnyösen di- és tripeptidek gyökei értendők, ahol aminosav-komponensekként az előbb említett aminosavak szerepelnek.

45 Az RO-oldalláncok bármely helyzetben kapcsolódhatnak a benzol-, naftalin-, illetve kinolin-gyűrűhöz. Az azocsoportok azonban az RO-szubsztituensekhez képest mindig orto- és/vagy para-helyzetben helyezkednek el.

A találmány szerint kromogénként használt I általános képletű azoszínezék-észtereket 10^{-4} — 10^{-1} mól/liter, előnyösen 10^{-3} — 10^{-2} mól/liter koncentrációban alkalmazzuk az impregnáló oldatban.

50 A leukociták kimutatására szolgáló diagnosztikai eszköz további alkotórésze valamilyen megfelelő pufferrendszer. Például foszfát-, barbiturát-, borát-, trisz-(hidroximetil)-amino-metán- (TRIS), 2-amino-2-metil-1,3-propándiol- (Amediol) vagy aminosav-pufferek

jönnek számításba, amelyek pH-értékét és kapacitását úgy kell megválasztani, hogy a tesztsíkknak a testfolyadékba való bemártása után ezen 6—10, előnyösen 7—9 közötti pH-érték álljon be.

Előnyös továbbá a leukociták testfolyadékokban való kimutatására szolgáló találmány szerinti diagnosztikai eszköz készítésénél adalékként tenzideket alkalmazni, mivel ezáltal rövidebb reakcióidők érhetők el. Előnyös kationaktív nedvesítőszereket, így például kvaterner ammónium-, piridinium- vagy imidazoliumsókat használni 0,05—2%, előnyösen 0,1—0,5% koncentrációban.

A leukocitakimutatásra szolgáló diagnosztikai eszköz további alkotórésze lehet valamilyen megfelelő komplexképző. Előnyösen fémsókat, például a vas, réz, króm, kobalt, nikkel, mangán és cink sóit használjuk, amelyek a leukocita-észterázoknak az I általános képletű aszinszinezék-észterekre való hatásakor keletkező o-hidroxiszinezékekkel színmélyülés közben megfelelő fémkelát-komplexokká reagálnak. Ezáltal rövidebb reakcióidők, és alacsonyabb kimutatási határok érhetők el. A komplexképzőket 10^{-4} — 10^{-1} mól/liter, előnyösen 10^{-3} — 10^{-2} mól/liter koncentrációban adjuk az impregnáló oldathoz.

A találmány szerinti diagnosztikai szer készítéséhez előnyösen szívóképes hordozókat, így például szűrőpapírt, cellulózt vagy műszálfilcet impregnálunk a szükséges, szokásosan a tesztsíkok készítéséhez használatos reagensek (szubsztrát, puffer, adott esetben tenzidek, komplexképzők stb.) könnyen illó oldószerekkel, így például vízzel, metanollal, etanollal vagy acetonnal készült oldataival. Ez célszerűen két külön lépésben történik: Először egy olyan vizes oldattal impregnálunk, amely a puffert és a többi vízoldható alkotórészeket tartalmazza. Utána az I általános képletű észteráz-szubsztrátok oldatával impregnálunk. Különleges esetekben fordított impregnálási sorrend is alkalmazható. A kész tesztapírok önmagukban is használhatók vagy ismert módon fogókra ragasztva vagy előnyösen műanyagok és finomlyukú hálók közé hegesztve a 2 118 455 sz. német szövetségi köztársaságbeli szabadalmi leírás szerint.

Így olyan diagnosztikai eszközöket kapunk, amelyek a vizsgálandó testfolyadékba való bemártás után gyorsan és egyszerűen kiértékelhető módon színátcsapással mutatják a leukociták jelenlétét. Mivel a neutrofil leukocita-granulocitákban jelenlevő észterázok aktivitása a leukociták lízise után is teljesen megmarad, a találmány szerinti diagnosztikai eszközzel mind intakt mind lízist szenvedett leukociták kimutathatók. Lízis-hiba következképp nem fordul elő.

1. példa

Szűrőpapírt (például Schleicher & Schüll 23 SL) egymásután a következő oldatokkal impregnálunk, és utána 60 °C-on megszártjuk.

1. oldat:

Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán 0,61 g,
Desztillált víz körülbelül 30 ml,
az oldatot 0,1 n sósavoldattal pH 7,0-re állítjuk, majd desztillált vízzel feltöltjük 100,0 ml-re.

2. oldat:

Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin} 46,1 mg,
Aceton, kiegészítve 100,0 ml-re.

Így gyengén rózsaszín tesztapírt kapunk, amely leukocitartartalmú vizeletbe merítéskor erősen vörösre színeződik.

A kimutatási idő a következő:

10 000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 1 perc;
5 000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 2 perc;
2 000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 5 perc.

A teszt érzékenysége körülbelül 2000 leukocita/μl.

Hasonló tulajdonságokkal (érzékenység: 2000—10 000 leukocita/μl) rendelkező tesztapírokat kapunk, ha tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin} helyett a következő szubsztrátokat használjuk, ahol a leukocitartartalmú vizeletbe való bemártásakor a tesztapírokon az alább megadott színátcsapás észlelhető.

- 1.1. Tiazol-2-azo-2'-{1'-acetoxi-4'-metoxi-benzol}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből ibolyába.
- 25 1.2. Tiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-4'-metoxi-benzol}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből ibolyába.
- 1.3. Tiazol-2-azo-1'-(2',4'-diacetoxi-benzol).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörös ibolyába.
- 30 1.4. Tiazol-2-azo-4'-{1',3'-di[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-benzol}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörös ibolyába.
- 35 1.5. Tiazol-2-azo-1'-(2'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.
- 1.6. Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(terc-butoxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.
- 40 1.7. Tiazol-2-azo-2'-{1'-acetoxi-naftalin}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörös ibolyába.
- 1.8. Tiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: rózsaszínből vörös ibolyába.
- 45 1.9. Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-7'-(nátrium-szulfonáto)-naftalin}-dihidrát.
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 50 1.10. 5-Bróm-tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.
- 1.11. Benzotiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 55 1.12. Benzotiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.
- 1.13. 6-Metoxi-benzotiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-naftalin}.
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 60 1.14. Piridin-2-azo-4'-{1',3'-di[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxil]-benzol}.
Színátcsapás: sárgás rózsaszínből vörös ibolyába.
- 65

- 1.15. Piridin-2-azo-1'-(2'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: sárgás rózsaszínből vörösbe.
- 1.16. Piridin-2-azo-1'-(2'-benziloiloxi-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 1.17. Piridin-2-azo-1'-(2'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: sárgás rózsaszínből vörösbe.
- 1.18. 2,4-Dinitro-benzol-azo-2'-(1'-benziloiloxi-3',6'-di-(nátrium-szulfonáto)-naftalin).
Színátcsapás: sárgás rózsaszínből kékbe.
- 1.19. Tiazol-2-azo-1'-(2'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-gliciloxi]-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.
- 1.20. Tiazol-2-azo-1'-(2'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-fenilalaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből vörösbe.

2. példa

Szűrőpapírt (például Schleicher & Schüll 23 SL) egy-
másután impregnálunk a következő oldatokkal, és
utána 60 °C-on megszáritjuk.

1. oldat:

Trisz(hidroxil-metil)-amino-metán 0,61 g,
Desztillált víz körülbelül 30 ml,
az oldatot 0,1 n sósavoldattal pH 7,0-re
beállítjuk, utána desztillált vízzel
feltöltjük 100,0 ml-re.

2. oldat:

Tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-
-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin) 46,1 mg,
Aceton feltöltve 100,0 ml-re.
Így rózsaszínre színeződött tesztpapírt kapunk, amely
leukocitartartalmú vizeletben erősen lilára színeződik.

A kimutatási idő a következő:

5000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 1 perc;
2000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 3 perc;
1000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 6 perc;
500 leukocita/μl vizelet, körülbelül 10 perc.

A teszt érzékenysége körülbelül 500 leukocita/μl.

Hasonló tulajdonságokkal (érzékenység: 500–5000
leukocita/μl rendelkező tesztpapírokat kapunk, ha ti-
azol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-
-naftalin) helyett a következő szubsztátokat használ-
juk, ahol a tesztpapírokon leukocitartartalmú vizeletbe
való bemártáskor az alább megadott színátcsapások
észlelhetők.

- 2.1. Tiazol-2-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből lilába.
- 2.2. Tiazol-2-azo-5'-(8'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-
-alaniloxi]-kinolin).
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 2.3. Tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-
-alaniloxi]-5'-metoxi-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 2.4. Tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-
-alaniloxi]-5'-(3',6'-di-oxa-heptiloxi)-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbe.
- 2.5. 5-Bróm-tiazol-1-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbo-
nil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből lilába.

- 2.6. Benzotiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-
-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből lilába.
- 2.7. 6-Metoxi-benzotiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-
-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből lilába.
- 2.8. Tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-ala-
nil-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: halvány rózsaszínből lilába.
- 2.9. Tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-ala-
nil-L-alanil-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből lilába.
- 2.10. 5-Metil-tiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbo-
nil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből lilába.
- 2.11. 6-Metil-benzotiazol-2-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-
-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: rózsaszínből lilába.

3. példa

Szűrőpapírt (például Schleicher & Schüll 23 SL) egy-
másután impregnálunk a következő oldatokkal, és utána
60 °C-on megszáritjuk.

1. oldat:

Dinátrium-tetraborát-dekahidráttal 1,91 g,
Desztillált víz körülbelül 30 ml,
az oldatot 0,1 n sósavoldattal
pH 8,0-ra állítjuk, és desztillált
vízzel feltöltjük 100,0 ml-re.

2. oldat:

2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-
-L-alaniloxi]-naftalin) 52,9 mg,
Aceton kiegészítve 100,0 ml-re.

Így világos narancssárga színű tesztpapírt kapunk,
amely leukocitartartalmú vizeletbe való bemártáskor erő-
sen vörösre színeződik. A kimutatási idő az alábbi:

5000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 1 perc,
2000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 3 perc,
1000 leukocita/μl vizelet, körülbelül 5 perc.

A teszt érzékenysége körülbelül 1000 leukocita/μl.

Hasonló tulajdonságú tesztpapírokat (érzékenység:
1000–5000 leukocita/μl kapunk, ha 2-metoxi-4-nitro-
-benzol-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-
-naftalin) helyett a következő szubsztátokat használjuk,
ahol a tesztpapírok leukocitartartalmú vizeletbe való
bemártáskor az alább megadott színátcsapásokat mut-
tatják.

- 3.1. 4-(Nátrium-szulfonáto)-benzol-azo-4'-(1'-[N-(ben-
ziloiloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: sárgából vörösbe.
- 3.2. 4-Nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: sárgából vörösbe.
- 3.3. 4-Nitro-benzol-azo-4'-(1'-[N-(benziloiloxi-karbonil)-
-L-alaniloxi]-naftalin).
Színátcsapás: sárgából vörösbe.
- 3.4. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-benzol).
Színátcsapás: sárgából vörösbe.

- 3.5. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-benzol}.
Színátcsapás: sárgából vöröses lilába.
- 3.6. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: sárgából lilába.
- 3.7. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: sárgából lilába.
- 3.8. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-benzol).
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.9. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin).
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.10. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-5'-{8'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-kinolin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vöröses lilába.
- 3.11. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-metoxi-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.12. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-(3'',6''-di-oxa-heptiloxi)-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.13. 4-Metoxi-2-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából lilába.
- 3.14. 2,5-Dimetoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából lilába.
- 3.15. 2,5-Dimetoxi-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.16. 2-Metoxi-4-(benzoiil-amino)-5-metil-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbé.
- 3.17. 2,5-Dimetoxi-4-(benzoiil-amino)-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: narancssárgából vörösbé.
- 3.18. 2,5-Dimetoxi-4-(benzoiil-amino)-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: rózsaszínből vörösbé.
- 3.19. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-gliciloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.20. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-fenilalaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.
- 3.21. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(p-toluolszulfonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Színátcsapás: narancssárgából vörösbé.
- 3.22. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(p-toluolszulfonil)-L-alaniloxi]-5'-(3'',6''-di-oxa-heptiloxi)-naftalin}.
Színátcsapás: világos narancssárgából vörösbé.

4. példa

Szűrőpapírt (például Schleicher & Schüll 23 SL) egymásután a következő oldatokkal impregnálunk, és utána 60 °C-on megszáritjuk.

1. oldat:

Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán	0,61 g,
Desztillált víz	körülbelül 30 ml,
Lauril-piridinium-klorid	0,2 g,
az oldat pH-ját 0,1 n sósavoldattal	
7,0-re állítjuk,	
desztillált vízzel	feltöltjük 100 ml-re.

2. oldat:

Tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}	46,1 mg
Aceton	kiegészítve 100 ml-re.

Így rózsaszín tesztapírt kapunk, amely leukocitá-tartalmú vizeletbe merítve erősen lilára színeződik. Emellett a 2. példában megadott recepthez képest körülbelül a felére lerövidült reakcióidők adódnak.

Az 1., 2. és 3. példa más szubsztrátjaival is készí-tünk nedvesítőszerekkel, így például az előbb alkalmaz-tott lauril-piridinium-kloriddal, vagy például (benzil-trimetil-ammónium)-kloriddal vagy N-palmitil-N-metil-benzimidazolium-kloriddal tesztapírokat, amelyek-nél a nedvesítőszerek nélküli hasonló tesztapírokhöz képest körülbelül felére lerövidült reakcióidők adódnak.

5. példa

Szűrőpapírt (például Schleicher & Schüll 23 SL) egy-másután a következő oldatokkal impregnálunk, és utána 60 °C-on megszáritjuk.

1. oldat:

Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán	0,61 g,
Desztillált víz	körülbelül 30 ml,
az oldat pH-ját 0,1 n sósavoldattal	
7,0-re állítjuk, és	
desztillált vízzel kiegészítjük	100 ml-re.

2. oldat:

Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}	46,1 mg,
Cink(II)-acetát-dihidrát	21,9 mg,
Aceton,	feltöltve 100 ml-re.

Így halvány rózsaszínű tesztapírt kapunk, amely leukocitá-tartalmú vizeletbe mártva erősen kékeslilára színeződik. Az 1. példa receptjében megadottakhoz képest körülbelül felére lerövidült reakcióidők adódnak, továbbá a teszt érzékenysége körülbelül 1000 leukoci-ta/μl-re javul.

Az 1. példa más szubsztrátjaival is készí-tünk fémsók-kal, így például az előbb alkalmazott cink(II)-acetáttal vagy például réz(II)-kloriddal vagy vas(III)-kloriddal is, tesztapírokat, amelyeknél a fémsók nélkül készült analóg tesztapírokhöz képest jelentősen lerövidült re-akcióidők és körülbelül 2—3-szor érzékenyebb kimuta-tási határidők adódnak.

6. példa

Tiazol-2-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin).

2,55 g (0,01 mól) 4-(2'-tiazolil-azo)-1-naftolt 100 ml ecetsavanhidriddel 1 ml piridin jelenlétében 1 órán át 80 °C-on melegítjük. Utána a fölöslegben levő ecet-

savanhidridet és a keletkezett ecetsavat vákuumban eldesztilláljuk, a desztillációs maradékhoz 50 ml metanolt adunk, és szárazra pároljuk. A maradékot 15 ml toluolból átkristályosítjuk, így 2,0 g (67%) tiazol-2-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin)-t kapunk világosbarna kristályos anyagként, amelynek olvadáspontja 137 °C.

A megfelelően szubsztituált azoszínékeket ecetsavanhidriddel reagáltatva hasonló módon nyerjük a következő vegyületeket.

- 6.1. Tiazol-2-azo-2'-(1'-acetoxi-4'-metoxi-benzol). Narancssárga, kristályos anyag. Olvadáspont: 111—113 °C.
- 6.2. Tiazol-2-azo-1'-(2',4'-diacetoxi-benzol). Okkerszínű kristályok. Olvadáspont: 101 °C.
- 6.3. Tiazol-2-azo-1'-(2'-acetoxi-naftalin). Sötétszínű, amorf por. Vékonyrétegkromatográfiás adatok: réteg: Fertigplatte Kieselgel, futtatószer: n-butanol : ecetsav : víz = 2 : 1 : 1, detektálás: ultraibolya fény, saját szín, R_f -érték: 0,50.
- 6.4. Tiazol-2-azo-2'-(1'-acetoxi-naftalin). Barna, kristályos anyag. Olvadáspont: 122 °C.
- 6.5. Piridin-2-azo-1'-(2'-acetoxi-naftalin). Sötétszínű, amorf por. Vékonyrétegkromatográfiás adatok: réteg: Fertigplatte Kieselgel, futtatószer: n-butanol : ecetsav : víz = 2 : 1 : 1, detektálás: ultraibolya fény, saját szín. R_f -érték: 0,72.
- 6.6. 4-Nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin). Barnás kristályos anyag. Olvadáspont: 160—162 °C.
- 6.7. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-benzol). Vörösesbarna kristályos anyag. Olvadáspont: 132 °C.
- 6.8. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin). Okkerszínű kristályos anyag. Olvadáspont: 173 °C.
- 6.9. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-benzol). Narancssárga színű kristályos anyag. Olvadáspont: 135 °C.
- 6.10. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-(1'-acetoxi-naftalin). Narancssárga színű kristályos anyag. Olvadáspont: 174—178 °C.

7. példa

Piridin-2-azo-1'-(2'-benziloxi-naftalin). 2,50 g (0,01 mól) 1-(2'-piridilazo)-2-naftolt feloldunk 50 ml vízmentes piridinben, 5,5 ml (0,05 mól) benzoil-kloriddal elegyítjük, és 1 órán át kevertetjük 70 °C-on nedvesség kizárása mellett. Utána lehűtjük szobahőmérsékletre, hozzáadunk 3 ml metanolt, és vákuumban szárazra pároljuk. A maradékot 100 ml metanoltól átkristályosítjuk. Így 2,54 g (72%) piridin-2-azo-1'-(2'-benziloxi-naftalin)-t kapunk vörös kristályos anyagként, amelynek olvadáspontja 153 °C.

Hasonló módon keletkezik 2,4-dinitro-benzol-azo-2'-[1'-hidrox-3',6'-di(nátrium-szulfonáto)-naftalin] és benzoil-klorid reagáltatásával:

- 7.1. 2,4-Dinitro-benzol-azo-2'-[1'-benziloxi-3',6'-di-

(nátrium-szulfonáto)-naftalin].

Világosbarna kristályok; olvadáspont > 250 °C.

Vékonyrétegkromatográfiás adatok:

réteg: Fertigplatte Kieselgel,

futtatószer: izopropanol : butil-acetát : víz =

= 5 : 3 : 2,

detektálás: ultraibolya fény, saját szín,

R_f -érték: 0,43.

10

8. példa

Tiazol-2-azo-1'-(2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.

1. oldat:

A savklorid egy lépéses módszer szerinti előállítás céljából 6,70 g (0,03 mól) N-(benziloxi-karbonil)-L-alanint feloldunk 50 ml vízmentes dimetil-formamidban, és lehűtjük -30 °C-ra. Utána keverés és hűtés közben hozzápipettázunk 2,4 ml (0,033 mól) tionil-kloridot, és a reakcióelegyet nedvesség kizárása mellett hűtőfürdőben -30 °C-on hagyjuk állni.

2. oldat:

3,83 g (0,015 mól) 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftolt feloldunk 75 ml vízmentes dimetil-formamidban, és -30 °C-ra hűtjük.

Reakció:

A 2. oldatot az 1. oldathoz öntjük, hozzáadunk sósavmegkötőként 4,8 ml (0,034 mól) trietil-amint, és hűtés nélkül 6 órát kevertetjük, miközben a hőmérsékletet 1,5 óra alatt hagyjuk 20 °C-ra emelkedni. Utána a reakcióelegyet ismét -30 °C-ra hűtjük, és ugyanilyen mennyiségű frissen készített savklorid-oldatot (1. oldat), valamint 4,8 ml trietil-amint adunk hozzá. A hőmérsékletet 1,5 óra alatt hagyjuk ismét 20 °C-ra emelkedni, és utána a reakcióelegyet 18 órán át szobahőmérsékleten reagáltatjuk. A reakciót célszerűen kromatográfiásan követjük, és a szükséges, fölös mennyiségű savklorid és trietil-amin hozzáadását ennek megfelelően végezzük.

Feldolgozás:

A reakcióelegyet vákuumban szárazra pároljuk (legfeljebb 50 °C fürdőhőmérsékleten). A maradékot 100 ml etil-acetáttal oldjuk, és egymásután kétszer 30 ml 1 n citromsavoldattal, 20 ml vízzel, 50 ml 5—10%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal és kétszer 25 ml vízzel mossuk. Az etil-acetátos fázist nátrium-szulfáton való szárítás után vákuumban bepároljuk. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítjuk szilikagélén toluol : dioxán (9 : 1) eleggyel eluálva. Az oldószeranyag vákuumban történt eldesztillálása és a maradék etil-acetáttal végzett eldörzsölése után 4,9 g (70,5%) tiazol-2-azo-1'-(2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin} kapunk sárga, kristályos anyagként, amelynek olvadáspontja 162 °C.

Hasonló módon kapjuk a megfelelően szubsztituált azoszínékekből és N-védett aminosavakból, illetve peptidekből a következő vegyületeket.

- 8.1. Tiazol-2-azo-2'-[1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-4'-metoxi-benzol}. Narancssárga kristályok, olvadáspont 148—150 °C.

- 8.2. Tiazol-2-azo-4'-{1',3'-di[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-benzol}.
Sárgás narancsszínű kristályok, olvadáspont 133—135 °C.
- 8.3. Tiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont 174—175 °C.
- 8.4. Tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont 132 °C.
- 8.5. Tiazol-2-azo-5'-{8'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-kinolin}.
Sárga kristályok, olvadáspont 134 °C.
- 8.6. Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-7'-(nátrium-szulfonáto)-naftalin}-dihidrát.
Narancssárga színű por.
Vékonyrétegkromatográfiás adatok:
réteg: Fertigplatte Kieselgel,
futtatószer: izopropanol : butil-acetát : víz = 5 : 3 : 2,
detektálás: ultraibolya fény, saját szín,
R_F-érték: 0,49.
- 8.7. Tiazol-2-azo-5'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-metoxi-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont 127 °C.
- 8.8. Tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-(3'',6''-di-oxa-heptiloxi)-naftalin}.
Vörösesbarna, amorf anyag.
Vékonyrétegkromatográfiás adatok:
réteg: Fertigplatte, Kieselgel,
futtatószer: kloroform : metanol = 50 : 1;
detektálás: ultraibolya fény, saját szín,
R_F-érték: 0,41.
- 8.9. 5-Bróm-tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga színű kristályok, olvadáspont: 192 °C.
- 8.10. 5-Bróm-tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 162 °C.
- 8.11. Benzotiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 190 °C.
- 8.12. Benzotiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga színű kristályok, olvadáspont: 148—150 °C.
- 8.13. Benzotiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 180—182 °C.
- 8.14. 6-Metoxi-benzotiazol-2-azo-2'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 148—150 °C.
- 8.15. 6-Metoxi-benzotiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Sárgás narancsszínű kristályok, olvadáspont: 194—196 °C.
- 8.16. Piridin-2-azo-4'-{1',3'-di[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-benzol}.
Barnás, amorf por.
- Vékonyrétegkromatográfiás adatok:
réteg: Fertigplatte Kieselgel,
futtatószer: toluol : dioxán (5 : 1) ecetsav atmoszférában,
detektálás: ultraibolya fény, réz(II)-acetát és ammónia,
R_F-érték: 0,34.
- 8.17. Piridin-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Barnás kristályok, olvadáspont: 117 °C.
- 8.18. 4-(Nátrium-szulfonáto)-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 264 °C.
- 8.19. 4-Nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vörösbarna kristályok, olvadáspont: 145 °C.
- 8.20. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-benzol}.
Okkerszínű kristályok, olvadáspont: 110 °C.
- 8.21. 2,4-Dinitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 154 °C.
- 8.22. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vörösesbarna kristályok, olvadáspont: 186—187 °C.
- 8.23. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-5'-{8'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-kinolin}.
Narancssárga színű kristályok, olvadáspont: 225—230 °C.
- 8.24. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-metoxi-naftalin}.
Narancssárga színű kristályok, olvadáspont: 165—167 °C.
- 8.25. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-5'-(3'',6''-di-oxa-heptiloxi)-naftalin}.
Narancssárga színű kristályok, olvadáspont: 118—120 °C.
- 8.26. 4-Metoxi-2-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vörösesbarna kristályok, olvadáspont: 140 °C.
- 8.27. 2,5-Dimetoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 198—201 °C.
- 8.28. 2,5-Dimetoxi-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 145 °C.
- 8.29. 2-Metoxi-4-(benzoil-amino)-5-metil-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vörösesbarna kristályok, olvadáspont: 128—130 °C.
- 8.30. 2,5-Dimetoxi-4-(benzoil-amino)-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 141—143 °C.
- 8.31. 2,5-Dietoxi-4-(benzoil-amino)-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vörösesbarna kristályok, olvadáspont: 173—174 °C.
- 8.32. Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-fenilalaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok, olvadáspont: 169 °C.

- 8.33. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-fenilalaniloxi]-naftalin}.
Vörösbarna kristályok; olvadáspont: 205—207 °C.
- 8.34. Tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alanil-L-alaniloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok; olvadáspont: 175 °C.
- 8.35. Tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alanil-L-alanil-L-alaniloxi]-naftalin}.
Világos narancssárga kristályok; olvadáspont: 201 °C.
- 8.36. 5-Metil-tiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
- 8.37. 6-Metil-benzotiazol-2-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
- 8.38. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(p-toluolszulfonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.
Vékonyrétegkromatográfiai adatok:
réteg: Fertigplatte Kieselgel,
futtatószer: toluol: dioxán = 6 : 1,
detektálás: ultraibolya fény, saját szín,
R_F-érték: 0,38.
- 8.39. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(p-toluolszulfonil)-L-alaniloxi]-5'-(3",6"-di-oxa-heptiloxi)-naftil}.
Narancssárga kristályok; olvadáspont: 61—63 °C.

9. példa

Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(terc-butoxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}.

1,89 g (0,01 mól) N-(terc-butoxi-karbonil)-L-alanin és 2,55 g (0,01 mól) 1-(2'-tiazolil-azo)-2-naftol (TAN) feloldunk szobahőmérsékleten 50 ml vízmentes piridinben, és 2,2 g (0,0107 mól) diciklohexil-karbodiimid (DCC) 20 ml piridinnel készült oldatával elegyítjük. Nedvesség kizárása mellett körülbelül 24 órát keverjük szobahőmérsékleten, utána még egyszer 1,89 g (0,01 mól) N-(terc-butoxi-karbonil)-L-alanin és 2,2 g (0,0107 mól) diciklohexil-karbodiimidet adunk a reakcióelegyhez, és további 24 órát kevertetjük szobahőmérsékleten. A már rövid idő elteltével kiváló N,N'-diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, az oldószert vákuumban eldesztilláljuk, és a maradékot 100 ml etil-acetáttal oldjuk. A további kiváló N,N'-diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, és a tiszta etil-acetátos oldatot egymásután kétszer 30 ml 1 n citromsavoldattal, 20 ml vízzel, 50 ml 5—10%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal és 25 ml vízzel mossuk. Nátrium-szulfáton való szárítás után az etil-acetátos fázist vákuumban bepároljuk. A ragacsos maradékot szilikagéllel töltött oszlopon toluol: dioxán (9 : 1) elegygel eluálva tisztítjuk. Így 2,65 g (62%) tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(terc-butoxi-karbonil)-L-alaniloxi]-naftalin}-t kapunk narancssárga színű, kristályos anyagként, amelynek olvadáspontja: 142—144 °C.

Hasonló módon kapjuk a megfelelő aminosavakból, a megfelelően szubsztituált azoszínékekből és diciklohexil-karbodiimidből a következő vegyületeket.

- 9.1. Tiazol-2-azo-1'-{2'-[N-(benziloxi-karbonil)-gliciloxi]-naftalin}.
Narancssárga kristályok; olvadáspont: 166 °C.
- 9.2. 2-Metoxi-4-nitro-benzol-azo-4'-{1'-[N-(benziloxi-karbonil)-gliciloxi]-naftalin}.
Sárgás narancsszínű kristályok; olvadáspont: 185—189 °C.

1. Kromogénnel és megfelelő pufferanyaggal, valamint adott esetben további, szokásosan alkalmazott segédanyaggal impregnált szívóképes hordozóból álló diagnosztikai eszköz leukociták kimutatására testfolyadékokban, azzal jellemezve, hogy kromogénként I általános képletű azoszínézék-észtert — a képletben
- A jelentése 1 vagy 2 nitrogénatomot, kénatomot, oxigénatomot tartalmazó, öttágú vagy hattágú heterociklusos gyűrű, amely adott esetben halogénatommal vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal egyszerűen szubsztituált és amely egy, adott esetben rövidszénláncú alkil- vagy alkoxi-csoporttal szubsztituált anellált benzolgyűrűt tartalmazhat, vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal, rövidszénláncú alkoxicsopottal, nitro-csoporttal, szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel és/vagy benzoil-amino-csoporttal egyszerűen, kétszeresen vagy háromszorosan szubsztituált fenilcsoport,
- B jelentése adott esetben szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel-, rövidszénláncú alkoxicsopottal és/vagy rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilénoxi)-csoporttal egyszerűen vagy kétszeresen szubsztituált benzol-, naftalin- vagy kinolin-maradék,
- R jelentése benzoilcsoport vagy valamely 2—5 szénatomos alifás acilcsoport, vagy valamely, terc-butoxi-karbonil-, benziloxi-karbonil vagy p-toluolszulfonil-védőcsoporttal védett, nem heterociklusos, élővilágban előforduló monoamino-monokarbonsav-gyök vagy valamely 2—6 tagszámú, nem heterociklusos, élővilágban előforduló monoamino-monokarbonsavakból álló peptid-gyök, és
- n jelentése 1 vagy 2 — tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti diagnosztikai eszköz kiviteli alakja, azzal jellemezve, hogy a hordozó további segédanyagként valamilyen nedvesítőszert és/vagy valamilyen komplexképzőt tartalmaz.
3. Eljárás leukociták testfolyadékokban való kimutatására szolgáló diagnosztikai eszköz előállítására, azzal jellemezve, hogy alkalmas szívóképes hordozót valamilyen I általános képletű azoszínézék-észterrel — a képletben
- A jelentése 1 vagy 2 nitrogénatomot, kénatomot, oxigénatomot tartalmazó, öttágú vagy hattágú heterociklusos gyűrű, amely adott esetben halogénatommal vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal egyszerűen szubsztituált és amely egy, adott esetben rövidszénláncú alkil- vagy alkoxi-csoporttal szubsztituált anellált benzolgyűrűt tartalmazhat, vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal, rövidszénláncú alkoxicsopottal, nitro-csoporttal, szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel és/vagy benzoil-amino-csoporttal egyszerűen, kétszeresen vagy háromszorosan szubsztituált fenilcsoport,
- B jelentése adott esetben szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel-, rövidszénláncú alkoxicsopottal és/vagy rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilénoxi)-csoporttal egyszerűen vagy kétszeresen szubsztituált benzol-, naftalin- vagy kinolin-maradék,
- R jelentése benzoilcsoport vagy valamely 2—5 szénatomos alifás acilcsoport, vagy valamely, terc-butoxi-karbonil-, benziloxi-karbonil vagy p-toluol-

szulfonil-védőcsoporttal védett, nem heterociklusos monoamino-monokarbonsav-gyök vagy valamely 2—6, nem heterociklusos, élővilágban előforduló monoamino-monokarbonsavakból álló peptid-gyök, és n jelentése 1 vagy 2 —

és megfelelő pufferanyaggal és adott esetben egyéb segédanyagokkal impregnálunk.

4. Eljárás az I általános képletű azoszinezék-észterek — a képletben

A jelentése a nitrogénatomot, kénatomot, oxigénatomot tartalmazó, öttagú vagy hattagú heterociklusos gyűrű, amely adott esetben halogénatommal vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal egyszeresen szubsztituált és amely egy, adott esetben rövidszénláncú alkil- vagy alkoxi-csoporttal szubsztituált anellált benzolgyűrűt tartalmazhat, vagy rövidszénláncú alkilcsoporttal, rövidszénláncú alkoxycsoporttal, nitrocsopottal, szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel és/vagy benzoil-amino-csoporttal egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan szubsztituált fenilcsoport,

B jelentése adott esetben szulfonsav-, illetve alkálifém-szulfonsav-gyökkel-, rövidszénláncú alkoxycso-

porttal és/vagy rövidszénláncú alkoxi-2-4 tagszámú (rövidszénláncú alkilénoxi)-csoporttal egyszeresen vagy kétszeresen szubsztituált benzol-, naftalin- vagy kinolin-maradék,

5 R jelentése benzoilcsoport vagy valamely 2—5 szénatomos alifás acilcsoport, vagy valamely, terc-butoxi-karbonil-benziloxi-karbonil vagy p-toluolszulfonil-védőcsoporttal védett, nem heterociklusos élővilágban előforduló monoamino-monokarbonsav-gyök vagy valamely 2—6 tagszámú, nem heterociklusos monoamino-minokarbonsavakból álló peptid-gyök, és

n jelentése 1, vagy 2 —

előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely II általános képletű vegyületet — ahol A, B és n jelentése az előbb megadottakkal azonos — előnyösen —30 és 80 °C közötti hőmérsékleten, adott esetben valamely bázis, előnyösen piridin vagy trietil-amin jelenlétében, egy III általános képletű savval — ahol R jelentése az előbb megadottakkal azonos — illetve ennek megfelelő reakcióképes származékával — előnyösen karbonsavanhidridjével, illetve karbonsavkloridjával — reagáltatunk.

1 db ábra

179936

Nemzetközi osztályozás:

G 01 N 33/48

C 12 Q 1/44

C 07 C 107/04

C 09 B 43/18

