



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

237101
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/50

(22) Prihlášené 06 09 83
(21) [PV 6474-83]

(40) Zverejnené

(45) Vydané 15 03 87

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc.,
LEHNICE

(54) Spôsob prípravy vodorozpusťných chromolytických polysacharidových enzýmových substrátov

1

Spôsob prípravy vodorozpusťných chromolytických polysacharidových enzýmových substrátov.

Účelom vynálezu je príprava vodorozpusťných chromolytických polysacharidových substrátov vhodných na meranie enzýmových aktivít.

Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že nerozpustné polysacharidy sa najpr derivatizujú alkyláciou na vodorozpusťné produkty, ktoré sa v druhom stupni vyfarbujú farbivom Remazol brilliant blue R a po vyfarbení sa zbavia fyzikálne viazaného farbiva premývaním alebo extrakciou metanolom.

Prípravený chromolytický substrát s obsahom kovalentne viazaného farbiva 3 až 8 % hmot. sa veľmi dobre rozpúšťa vo vode a tým môže slúžiť ako vodorozpusťný substrát pre meranie polysacharid-hydrolázových enzýmových aktivít.

Vynález má využitie všade, kde je potrebné merať presne a rýchlo aktivitu polysacharid-hydrolázových enzýmov, či už pri medzioperačnej kontrole výroby enzýmov, alebo pri meraní enzýmovej aktivity pre diagnostické účely.

2

Vynález sa týka spôsobu prípravy vodorozpustných chromolytických polysacharidových enzýmových substrátov, vhodných pre stanovenie príslušných polysacharid-hydrolázových enzýmových aktivít.

K veľmi efektívnym a preto najviac v posledných rokoch rozšíreným spôsobom stanovenia polysacharid-hydrolázových enzýmových aktivít je spôsob fotokolorimetrický. Spočíva na tom, že sa enzým nechá reagovať s nerozpustným polysacharidovým gélom, na ktorom je kovalentne viazané vhodné farbivo. Počas hydrolýzy účinkom prítomných príslušných polysacharid-hydroláz prechádza farebný polysacharid postupne do roztoku, pričom intenzita zafarbenia roztoku je úmerná aktivite enzýmu.

Pochopiteľne toto platí iba za predpokladu, že polysacharidový chromolytický gél je dokonale prístupný molekule enzýmu a že kovalentne viazané farbivo na polysacharide nemá inhibičný účinok na samotnú enzýmovú reakciu [J. Kennedy: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 29, (1974) str. 350 až 357].

Reakcia viazania farbiva na polysacharide musí byť vedená tak, aby distribúcia molekúl farbiva bola homogenná na makromolekule polysacharidu, čo možno dosiahnuť správnou voľbou reakčných podmienok pri vyfarbovaní polysacharidu.

Známe sú postupy, keď reakcia viazania farbiva najmä na rozpustný polysacharid sa robí v roztoku a po vyfarbení sa rozpustný polysacharid prevedie sietovaním do nerozpustnej formy, resp. v niektorých prípadoch sa môže použiť aj v rozpustnej forme. V takom prípade sa polysacharid oddelí z reakčného roztoku dialýzou a vyzrážaním s organickým rozpúšťadlom [Mäkinen K. K., Paunio I. K.: *Anal. Biochem.* 39, 202, (1971)]. Uvádzaný spôsob sa použil pri vyfarbovaní „Blue Dextran 2000“, používaný ako farebný štandard pre testovanie gélov pri gélovej permeačnej chromatografii.

Pre diagnostické účely je známy spôsob stanovenia aktivity alfa amylázy v biologických tekutinách pomocou farbeného rozpustného amylopektínu pod názvom DY-AMYL [Babson S. R., Babson A. L.: *Clinica Chimica Acta* 44, 193 (1973)]. Ako farbivo sa v tomto chromolytickom substráte používa farbivo Reaction Rot 2M-Geigy, s maximom absorpcie 546 nm.

Vo väčšine prípadov pre stanovenie enzýmových aktivít sa doposiaľ používali nerozpustné chromolytické substráty, sietované rôznymi sietovacími reagentami a rôzneho stupňa napúčania vo vode.

Určitou obecnou nevýhodou takýchto substrátov bolo, že pre jednotlivé analýzy bolo potrebné použiť značný prebytok substrátu, ktorý sa pohyboval v medziach 50 až 150 miligramov na jedno stanovenie. Pochopiteľne, že ak sa použije substrát rozpustný je možné stanoviť enzýmovú aktivitu príslušného enzýmu i s použitím 5 mg rozpust-

ného chromolytického substrátu, t. j. s množstvom substrátu minimálne 10krát nižším. Táto skutočnosť je obzvlášť dôležitá pri stanovení takých enzýmov, ktorých substráty sú pomerne ťažko dostupné, cenovo náročné alebo v prípadoch, kde v rutinej diagnostickej praxi je potrebné prevádzkať denne pomerne vysoký počet analýz enzýmovej aktivity.

Pri rozpustných polysacharidoch akými sú napr. glykogén, α -manan, pululan, pektová kyselina a iné, obyčajne nebýva problémom pripraviť vodorozpustný chromolytický substrát, nakoľko správnou voľbou stupňa substitúcie farbiva sa rozpustnosť i zafarbeného polysacharidu zachová.

Zložitejšie to býva ako ukázali naše výskumné práce u nerozpustných polysacharidov ako sú celulóza, škrob, lichenan, chitín, xylan, β -manan a iné. Ani opakovanou substitúciou aplikovaného farbiva sa nepodarí obyčajne získať chromolytický, dobre rozpustný polysacharid. Navyše pri vyššom stupni prefarbenia polysacharidu možno takmer pravidelne pozorovať značný inhibičný účinok viazaného farbiva na enzýmovú hydrolýzu, čo by podstatnou mierou znížovalo citlivosť enzýmovej reakcie.

Uvedené nedostatky prípravy rozpustných chromolytických polysacharidových substrátov vhodných na stanovenie polysacharid-hydrolázových aktivít rieši nová prihláška vynálezu na základe ktorej je možné z nerozpustného polysacharidu pripraviť rozpustný enzýmový substrát, ktorý spĺňa všetky podmienky pre meranie príslušnej enzýmovej aktivity.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa nerozpustný polysacharid alkyluje v alkalickom prostredí s etylénoxidom a/alebo kyselinou monochlóroctovou, a/alebo propylénoxidom, a/alebo alkylhalogenidom s počtom uhlíkov 1 až 2 a/alebo β -chlortylsulfonátom sodným na taký stupeň substitúcie, pri ktorom je už polysacharid vo vode rozpustný, načo sa v druhom stupni na alkyl-polysacharid naviaže remazolové farbivo Remazol brilliant blue R [dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino] 6-antrachinonsulfonovej] v množstve 3 až 10 % hmotnostných na hmotnosť polysacharidu pri teplote 15 až 25 °C a koncentrácii hydroxidu sodného 0,7 až 1,0 % hmotnostných po dobu 30 až 90 minút, a v treťom stupni sa alkylovaný chromolytický polysacharid vyzráža z roztoku alkoholom okyseleným kyselinou octovou na neutralizáciu voľných alkálií v reakčnej zmesi a nakoniec sa vyfarbený polysacharid zbaví fyzikálne viazaného farbiva premývaním, alebo extrakciou s metanolom.

Pokiaľ sa týka výšky stupňa substitúcie, ktorý podmieňuje dobrú rozpustnosť polysacharidu vo vode, tá závisí od typu polysacharidu a od alkylačného reagentu. Tak napr. karboxymetylcelulóza sa stáva roz-

pustnou vo vode pri stupni substitúcie 0,4, zatiaľ škrob je rozpustný už pri stupni substitúcie 0,2. Pri alkylácii polysacharidov s etylénoxidom na dosiahnutie rozpustnosti vo vode je potrebné substituovať polysacharidy len na stupeň substitúcie 0,2 až 0,3, a pri alkylácii β -chloretyl-sulfonátom sodným len na 0,1 až 0,2.

Alkylácia sa prevádza v prítomnosti hydroxidu sodného o koncentrácii 20 až 40 % hmot. pri teplotách 50 až 60 °C po dobu 2 až 4 hodín. Po potrebnej alkylácii sa reakčná zmes zriedi vodou tak, aby koncentrácia hydroxidu sodného dosahovala hodnotu 0,8 až 1,0 % hmot., pri ktorej koncentrácii sa pridáva po častiach farbivo tak, aby dávkovanie farbiva sa ukončilo v priebehu 20 minút a po pridaní celkového množstva farbiva sa nechá reakčná zmes reagovať ešte 60 minút pri teplote 15 až 20 °C. Potom sa vyfarbený polysacharid vyzráža s okyseleným alkoholom. Množstvo kyseliny sa volí tak, aby postačila len na neutralizáciu voľného hydroxidu sodného. Vyzrážaný chromolytický polysacharid sa potom vypiera, alebo extrahuje najlepšie metanolom, prípadne zmesou metanol-aceton až do kvantitatívneho odstránenia fyzikálne viazaného farbiva na polysacharid.

U polysacharidov, ktoré sú už rozpustné i bez alkylácie možno farbivo viazať priamo v alkalickom prostredí. Treba však voliť také množstvo farbiva, ktoré ešte neznižuje rozpustnosť hotového produktu, čo je asi 3 až 10 % hmot. na hmotnosť suchého polysacharidu.

Výhodou navrhovaného spôsobu je predovšetkým skutočnosť, že umožňuje aj z nerozpustných polysacharidov predchádzajúcou alkyláciou s nasledovným kovalentným viazaním farbiva na polysacharid pripraviť vodorozpustné chromolytické substráty spĺňajúce všetky kritériá enzýmových substrátov vhodných na meranie príslušných enzýmových aktivít. Ďalšie výhody sú v tom, že pripravené substráty sú pre enzýmové reakcie citlivejšie ako substráty nerozpustné a preto na analýzu je potrebné 10krát menej substrátu pri rovnakej citlivosti stanovenia. Podstatnou výhodou je možnosť stanovenia aktivity v podstatne menšom objeme vzorky, ako v prípade nerozpustných sieťovaných substrátov.

Ďalšie výhody a presnejší popis nového spôsobu sú evidentné v nasledovných príkladoch, ktoré nie sú vyčerpávajúce, ale len ilustratívne.

Príklad 1

17 g práškovej celulózy o polymeračnom stupni 650 sa suspenduje v 600 ml isopropanolu, do ktorého sa predom emulgovalo 20 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 25 % hmot. Reakčná zmes sa mieša pri laboratórnej teplote 1 hodinu, načo sa

pridá 8 g chloroctanu sodného a reakčná teplota sa za stáleho miešania zvyšuje postupne počas 1 hodiny na 60 °C, pri ktorej sa nechá reagovať 3 hodiny. Nerozpustná karboxymetylcelulóza sa na filtri odsaje a premyje alkoholom. Dobre odsatá karboxymetylcelulóza sa zaleje v kadičke 300 až 400 mililitrov destilovanej vody, v ktorej sa celulóza rozpustí a po rozpustení sa pridáva po častiach, celkom 1,3 g farbiva Remazol brilliant blue R a nechá sa za miešania reagovať celkovo 1 hodinu za postupného pridávania octanu sodného celkovo 8 g. Po ukončení reakcie sa roztok pomaly nalieva do 4 litrov alkoholu (za intenzívneho miešania) okyseleného takým množstvom kyseliny octovej, aby práve stačilo na neutralizáciu voľného hydroxidu sodného v reakčnom roztoku chromolytickej karboxymetylcelulózy. Vyzrážaný produkt sa odfiltruje a premyje na filtri metanolom, resp. extrahuje metanolom v Soxlethovom extraktore.

Hotový chromolytický produkt, vodorozpustná hydroxyetylcelulóza obsahuje 5 % viazaného farbiva a stupeň substitúcie s monochloroctovou kyselinou 0,42.

Príklad 2

Postup ako v príklade 1 len namiesto celulózy ako polysacharid použijeme chitín.

Výsledný produkt chromolytický karboxymetylchitín má 5,5 % viazaného farbiva a stupeň substitúcie s kyselinou monochloroctovou 0,48.

Príklad 3

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako polysacharid použijeme lichenan a množstvo farbiva 1,7 g.

Výsledný produkt chromolytický karboxymetyllichenan má 6,2 % viazaného farbiva a stupeň substitúcie kyselinou monochloroctovou 0,44.

Príklad 4

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije xylán.

Výsledný produkt chromolytický karboxymetylxylán obsahuje 4 % hmot. viazaného farbiva a stupeň substitúcie monochloroctovou kyselinou 0,38.

Príklad 5

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije zemiakový škrob a množstvo chloroctanu sodného len 4,5 g a množstvo farbiva 1,7 g.

Výsledný produkt chromolytický karboxymetylškrob obsahuje 7 % hmot. viazaného farbiva a stupeň substitúcie s kyselinou monochloroctovou 0,25.

Príklad 6

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako alkylačné reagens sa použije 2,5 g etylénoxidu a reakcia sa vedie pri 40 až 50 °C po dobu 2 hodín.

Vzniknutý derivát hydroxyetylcelulózy sa ďalej modifikuje naviazaním farbiva podľa príkladu 1.

Hotový produkt, chromolytický vodorozpustný derivát hydroxyetylcelulózy, so stupňom substitúcie 0,3 vzhľadom na hydroxyetyl a obsahom viazaného farbiva 4,3 % je vhodný ako rozpustný substrát pre stanovenie celulózovej aktivity.

Príklad 7

Postup podľa príkladu 6 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije β -manan.

Rozpustný chromolytický substrát má podobné vlastnosti z hľadiska stupňa substitúcie a množstva viazaného farbiva ako v príklade 6 a je vhodný na meranie mananázovej aktivity.

Príklad 8

Postup podľa príkladu 6 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije lichenan.

Výsledný produkt hydroxyetyllichenan s kovalentne viazaným farbivom je vhodným rozpustným substrátom na stanovenie lichenázovej aktivity.

Príklad 9

Postup podľa príkladu 6 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije zemiakový alebo kukuričný škrob.

Výsledný produkt chromolytický hydroxyetylškrob je vhodným rozpustným substrátom na stanovenie aktivity alfa amylázy.

Príklad 10

17 g sodnej soli kyseliny pektovej sa suspenduje v 200 ml izopropanolu a za stáleho miešania sa pridá 5 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 5 % hmot. Po 30 minútach sa pridá 0,8 g farbiva Remazol brilliant blue R a mieša sa 1 hodinu pri teplote 15 až 20 °C.

Výsledný produkt, vodorozpustný chromolytický pektát sodný je dobrý substrát na stanovenie endopolygalakturonázovej aktivity.

Príklad 11

Postup ako v príklade 10 s tým rozdielom, že ako polysacharid sa použije α -manan.

Výsledný produkt, chromolytický vodorozpustný α -manan je vhodný enzýmový

substrát na stanovenie α -mananázovej aktivity.

Príklad 12

20 g metylcelulózy s obsahom metoxylu 28 % hmot. sa suspenduje v 100 ml etanolu a za miešania sa pridá 5 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 2 % hmot. a reakčná zmes sa nechá miešať 30 minút pri izbovej teplote, potom sa pridá po častiach 1,0 g farbiva Remazol brilliant blue R a nechá sa reagovať za miešania pri teplote 15 až 20 °C 1 hodinu. Po 1 hodine sa prítomné alkálie neutralizujú s kyselinou octovou a nezreagované farbivo sa vymýva alebo extrahuje ako v príklade 1. Výsledný produkt, vodorozpustná chromolytická metylcelulóza je veľmi dobrým substrátom pre meranie celulózovej enzýmovej aktivity.

Príklad 13

17 g zemiakového škrobu sa suspenduje do 100 ml izopropanolu v ktorom sa predom rozpustilo 8 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 40 % hmotnostných. Po zhomogenizovaní reakčnej zmesi sa pridá 3,5 g β -chloretylsulfonátu sodného a reakčná zmes sa vyhreje na 55 °C, pri ktorej teplota sa nechá reagovať 90 minút. Potom sa reakčná zmes ochladí na 20 stupňov Celsia a pridá sa 1,7 g farbiva Remazol brilliant blue R a nechá sa za miešania reagovať 1 hodinu. Potom sa chromogénny vodorozpustný sulfoetylškrob odfiltruje a premýva, alebo extrahuje metanolom od nezreagovaného farbiva.

Hotový substrát je veľmi dobrý na stanovenie alfa amylázovej enzýmovej aktivity.

Príklad 14

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako alkylačné reagens sa použije 3,0 g propylénoxidu a reakčná zmes sa nechá reagovať pri teplote 55 °C po dobu 2 hodín.

Vzniknutý derivát hydroxypropylcelulózy sa ďalej modifikuje naviazaním farbiva podľa príkladu 1.

Hotový produkt, chromolytický vodorozpustný derivát hydroxypropylcelulózy, so stupňom substitúcie 0,35 a obsahom viazaného farbiva 5,2 % hmotnostných je vhodný ako rozpustný substrát pre stanovenie celulózovej aktivity.

Príklad 15

20 g vodorozpustnej etylcelulózy so stupňom substitúcie 0,58 sa suspenduje v 100 ml metanolu, v ktorom sa predom rozpustilo 5 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 2 % hmotnostných.

Reakčná zmes sa nechá miešať 30 minút

pri laboratórnej teplote, potom sa pridá po častiach 1,0 g farbiva Remazol brilliant blue R a nechá sa reagovať za miešania pri teplote 15 až 20 °C po dobu 1 hodiny. Po 1 hodine sa prítomné alkálie neutralizujú s kyselinou octovou a nezreagované farbivo sa vymýva, alebo extrahuje ako v príklade 1.

Výsledný produkt, vodorozpustná chromolytická etylcelulóza je veľmi dobrých

substrátom pre meranie celulózovej enzýmovej aktivity.

Vynález má široké využitie všade, kde je potrebné stanoviť enzýmové polysacharid-hydrolázové aktivity, či už v medzioperačnej kontrole pri výrobe jednotlivých enzýmov, alebo pri diagnostickom stanovení enzýmových aktivít v biologických tekutinách.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy vodorozpustných chromolytických polysacharidových enzýmových substrátov vyznačený tým, že v prvom stupni sa nerozpustný polysacharid alkyluje v alkalickom prostredí s etylénoxidom a/alebo kyselinou monochlóroctovou, a/alebo propylénoxidom, a/alebo alkylhalogenidom s počtom uhlíkov 1 až 2, a/alebo β -chlór-etyl-sulfonátom sodným na taký stupeň substitúcie, pri ktorom je už polysacharid vo vode rozpustný, načo sa v druhom stupni na alkyl-polysacharid naviaže remazolové farbivo Remazol brilliant blue R [dvojsodná

soľ kyselina 8-amino-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino] 6-antrachinonsulfonovej] v množstve 3 až 10 % hmotnostných na hmotnosť polysacharidu pri teplote 15 až 25 °C a koncentrácie hydroxidu sodného 0,7 až 1,0 % hmotnostných po dobu 30 až 90 minút, a v treťom stupni sa alkylovaný chromolytický polysacharid vyzráža z roztoku alkoholom okyseleným kyselinou octovou na neutralizáciu voľných alkálií v reakčnej zmesi a nakoniec sa vyfarbený polysacharid zbaví fyzikálne viazaného farbiva premývaním, alebo extrahovaním s metanolom.