



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

217 458
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 08 B 15/02

(22) Prihlásené 12 05 81

(21) (PV 3476-81)

(40) Zverejnené 26 02 82

(45) Vydané 15 05 84

(75)

Autor vynálezu

GEMEINER PETER ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy merkaptohydroxypropylcelulózy

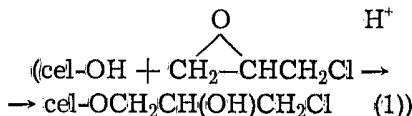
Podstata vynálezu spočíva v tom, že celulóza o 5 až 15 % vlhkosti sa v prvom stupni katalyticky éterifikuje epichlórhydrínom pri teplote 80 až 95 °C po dobu 2 až 4 hod pri mólových pomeroch anhydroglukózové jednotky celulózy: epichlórhydrín: kyselina chloristá alebo kyselina chlórnovodíková 1 : 3 až 5 : 0,03 až 0,04, načo v druhom stupni sa reakciou s tiosíranom sodným alebo reakciou s hydroxidom sodným a s tiosíranom sodným prevedie na tiosulfát hydroxypropylcelulózu, ktorá sa v treťom stupni redukuje tiolmi vo vodných tlmivých roztokoch.

Vynález má použitie pri izolovaní a čistení enzýmov a bielkovín obsahujúcich tiolové skupiny, purifikácii peptidov, syntetizovaní adsorbentov pre afinitnú chromatografiu, redukcii disulfidických väzieb v bielkovinách, reverzibilnom imobilizovaní enzýmov prostredníctvom ich cysteínových zvyškov a to v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

Vynález sa týka spôsobu prípravy merkaptohydroxypropylcelulózy, vhodnej pre viacúčelové použitie v enzýmovom inžinierstve.

O význame vodonerozpustných nosičov obsahujúcich tiolové skupiny sa pojednalo už pri príprave merkaptodeoxycelulózy. Ešte lepšie vlastnosti z hľadiska ich uplatnenia v enzýmovom inžinierstve môžu mať polytioly, u ktorých sú SH-skupiny naviazané na maticiu prostredníctvom „môstika“ (spacera), napr. v prípade merkaptohydroxypropylcelulózy by to bol hydroxypropylový môstik. Takýto derivát agarózy dodáva Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Švédsko) pod označením Thiopropyl-Sepharose 6B (v cene 357 švédskych korún za 10 g).

Postup prípravy tohto derivátu, vychádzajúci z prípravy oxiránového derivátu a používajúci väčšinu chemikálií z devízového dovozu, nie je vhodné u celulózy použiť (čs. AO č. 201 363). Lepšie možnosti dáva kyslo katalyzovaná éterifikácia celulózy 1-chlóro-2,3-epoxypropánom (epichlórhydrínom) za použitia fluoro-boritných katalyzátorov. Sú tu však určité obmedzenia z hľadiska možnosti výberu celulózy (P. Gemeiner, J. Zemek, Collect. Czech. Chem. Commun., V 46 (1981)). Tento nedostatok, pri zachovaní dobrých konverzií, odstraňuje použitie anorganických kyselín (HClO_4 , HCl) ako „kyslých“ katalyzátorov. Veľkým prínosom je tu hlavne možnosť použitia makro-



poréznej perlovej celulózy, ktorá má nesporné výhody oproti tradičným celulóзовým materiálom (čs. AO 201 363; čs. AO č. 206 346 a čs. AO č. 206 378).

V ďalšom postupe je najvýhodnejšou cestou cez tiosulfátové deriváty, v tomto prípade reakciou chlórhydroxypropylcelulózy s tiosíranom sodným (čs. AO č. 203 818) za vzniku tiosulfáthydroxypropylcelulózy. O niečo menšie konverzie dáva príprava tiosulfátového derivátu cez oxirán. Postup je však energeticky menej náročný. Redukcia tiosulfátových derivátov tiolmi sa používa tak pri príprave Thiopropyl-Sepharose 6B ako aj merkaptodeoxycelulózy.

Uvedené nevýhody odstraňuje predmetný vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že v prvom stupni sa katalyticky éterifikuje celulóza o 5 až 15 % vlhkosti epichlórhydrínom pri teplote 80° až 95 °C po dobu 2 až 4 hod pri mólových pomeroch anhydroglukózové jednotky celulózy: epichlórhydrín: kyselina chloristá alebo kyselina chlorovodíková 1:3 až 5 : 0,03 až 0,04, načo v druhom stupni sa reakciou s tiosíranom sodným alebo reakciou s hydroxidom sodným a s tiosíranom sodným prevedie na tiosulfáthydroxypropylcelulózu, ktorá sa v treťom stupni redukuje tiolmi vo vodných tlmivých roztokoch.

Uvedený spôsob kyslo katalyzovanej éterifikácie umožňuje použiť tak tradičné formy

celulózy (prášková, vláknitá či mikrokryštalická), ich sieťované modifikácie či makroporéznu perlovú celulózu. Najreaktívnejšou formou je epichlórhydrínom sieťovaná prášková celulóza (P. Gemeiner et al., Collect. Czech. Chem. Commun. 45, 2847 (1980)). U nej sa dosahuje pri najnižšej teplote (80 °C) najvyšší stupeň substitúcie ($\text{DS}_{\text{Cl}} = 0,67$). Perlová celulóza vyžaduje pred použitím odstránenie vody, najlepšie equilibráciou v acetóne a potom éteri (J. Peška et al., Cell. Chem. Technol. 21, 419 (1978)).

Výmena chlóru za tiosulfátové skupiny vyžaduje teplotu 95° až 105 °C po dobu 15 až 60 hodín a to podľa obsahu chlóru. Pri postupe „cez oxirány“ stačí izbová teplota a kratšie doby reakcií; v 1. stupni 1 hod., v 2. stupni 6 až 16 hod. Ak je maticiou napr. sieťovaná celulóza, pri priamej výmene sa zabuduje 8,74 % síry, pri postupe „cez oxirán“ 8,15 % síry. Z hľadiska celkovej konverzie na merkaptohydroxypropylcelulózu sú výhodnejšími maticiami perlová (29,3 %) a prášková (19,4 %) celulóza, u ktorých sa dosahuje aj vyšší obsah SH-skupín (0,43 resp. 0,33 mmólov SH/g).

Redukcia tiosulfátových derivátov tiolmi vo vodných tlmivých roztokoch je účinnejšia v alkalickesom prostredí (pH 9), tu je však potrebné použiť aj účinnú ochrannú reagentiu na tioly, napr. tri-n-butyfosfín. Pokiaľ nie sú vysoké nároky na obsah SH-skupín v konečnom produkte, stačí pracovať v pH 8 a použiť lacnejší Chelaton 3 a kys. tioglykolovú.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy merkaptohydroxypropylcelulózy je, že umožňuje vyrábať preparáty z domácich lacných surovín pomerne jednoduchým technologickým postupom.

Príklad 1

K 9 g vysušenej celulózy sa pridalo 1,6 ml vody a 17,6 ml epichlórhydrínu, 30 min sa miešalo pri izbovej teplote a pridalo sa po častiach 0,2 ml 60 % kyseliny chloristej. Suspenzia sa udržiavala 3 hod. pri teplote 95 °C za občasného premiešania. Produkt (8,6 g) sa premyl vodou a acetónom; obsahoval 4,6 % chlóru. 5 g tejto chlórhydroxypropylcelulózy sa resuspendovalo v 15 ml 4,4 M tiosíranu sodného a udržiavalo 15 hod pri teplote 100 °C za občasného premiešania. Po premytí vodou a acetónom produkt (4,95 g) obsahoval 4,05 % síry. Tento sa resuspendoval v 27 ml 50 mM tetraboritanu sodného obsahujúceho 1,15 % v/v tributylfosfín, pridalo sa 3,7 ml 2-merkaptóetanolu a po upravení pH na 9 sa 30 min suspenzia miešala pri izbovej teplote a pH 9. Produkt (4,3 g) sa rýchlo premyl 1 mM Chelatonom 3, vodou a acetónom; obsahoval 2,3 % síry a 0,33 mmólov SH-skupín/g.

Príklad 2

Chlórhydroxypropylcelulóza (11,9 g; 10,6 % chlóru) sa pripravila postupom podľa príkla-

du 1, s tým rozdielom, že sa použila sietovaná prášková celulóza stupeň sietovania = 10 napučiavací objem 3,6 ml vody/g a teplota 80 °C. 5 g tohto medziproduktu sa suspendovalo v 15 ml 20 M tiosíranu sodného a udržiavalo 40 hod pri teplote 100 °C za občasného premiešania. Po premytí vodou a acetónom produkt (5,25 g) obsahoval 8,74 % síry. Po jeho resuspendovaní v 51 ml 50 mM tetraboritanu sodného obsahujúceho 1,2 v/v tributylfosfínu sa pridalo 9 ml 2-merkaptóetanolu a po upravení pH na 9 sa suspenzia miešala 30 min pri izbovej teplote a pH 9. Produkt (4,45 g) sa premyl rýchlo 1 mM Chelatonom, vodou a acetónom: obsahoval 5,8 % síry a 0,19 mmólov SH-skupín/g.

Príklad 3

Chlorohydroxypropyl-sietovaná celulóza (5 g) pripravená postupom podľa príkladu 2 sa miešala s 5 ml 0,485 M hydroxidom sodným 1 hod pri izbovej teplote, premyla vodou, 50 ml 2,3 M tiosíranu sodného v 0,5 M fosfátovom pufri pH 6,3 a odsala. Po resuspendovaní v 2,3 M tiosírane sodnom v 0,5 M fosfátovom pufri pH 6,3 (25 ml) sa miešalo cez noc (16 hod) pri izbovej teplote, premylo vodou, acetónom a odsalo. Produkt (5,7 g) obsahujúci 8,15 % síry sa resuspendoval v 53 ml 50 mM tetraboritanu sodného obsahujúceho 1,2 % tributylfosfínu, pridalo sa 9,25 ml 2-merkaptóetanolu a po upravení pH na 9 sa suspenzia miešala 30 min pri izbovej teplote a pH 9. Produkt (4,45 g) sa rýchlo premyl 1 mM Chelatonom 3, vodou a acetónom: obsahoval 5,07 % síry a 0,16 mmólov SH-skupín/g.

Príklad 4

Chlórhydroxypropyl-perlová celulóza (32,6 g, 6,0 % chlóru) sa pripravila postupom podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že sa použilo 9,55 g vzduchoduchej perlovej celulózy, predtým vysušenej acetónom a éterom, pridalo sa 1,05 ml vody a teplota bola 90 °C. 14,5 g odsatého medziproduktu sa pomaly premylo

5,7 M tiosíranom sodným (250 ml), odsalo a resuspendovalo v 30 ml tohto istého roztoku tiosíranu. Suspenzia sa udržiavala 20 hod pri 100 °C za občasného premiešania, produkt (13,7 g) sa premyl vodou a odsal; obsahoval 7,8 % síry. Po rýchlom premytí 50 mM tetraboritanom sodným (200 ml) sa znovu odsal a resuspendoval v 50 mM tetraboritane obsahujúcom 1,2 % v/v tributylfosfín (38 ml), pridalo sa 7,5 ml 2-merkaptóetanolu a po upravení pH na 9 sa suspenzia 30 min miešala pri izbovej teplote a pH 9. Produkt (11 g) sa premyl 1 mM Chelatonom 3 a 0,1 M kyselinou octovou obsahujúcou 1 mM Chelaton 3, v ktorej sa aj skladoval pri 4 °C. Produkt obsahoval 5,1 % síry a 0,43 mmólov SH-skupín/g suchej váhy.

Príklad 5

Postup práce podľa príkladu 2, s tým rozdielom, že sa ako katalyzátor pridala konc. kyselina chlór vodíková (0,4 ml) a éterifikácia epichlórhydrínom sa viedla 4 hod. Merkaptóhydroxypropyl-sietovaná celulóza obsahovala 2,32 % síry a 0,075 mmólov SH-skupín/g.

Príklad 6

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že pri redukcii tiosulfátóhydroxypropyl-práškovkej celulózy sa použilo 4,2 ml 80 % kyseliny tioglykolovej, 50 mM tetraboritan sodný obsahoval 1 mM Chelaton 3 a pH sa udržiavalo na 8. Produkt obsahoval 2,4 % síry a 0,25 mmólov SH-skupín/g.

Vynález má uplatnenie všade, kde je potrebné izolovať alebo čistiť enzýmy a iné bielkoviny obsahujúce tiolové skupiny, izolovať nízkomolekulové tiolové zlúčeniny, purifikovať (syntetické) peptidy, syntetizovať adsorbenty pre afinitnú chromatografiu, redukovať disulfidické väzby v bielkovinách, reverzibilne imobilizovať enzýmy prostredníctvom ich cysteínových zvyškov a to či už v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy merkaptóhydroxypropyl-celulózy vyznačený tým, že celulóza o 5 až 15 % vlhkosti sa v prvom stupni katalyticky éterifikuje epichlórhydrínom pri teplote 80 až 95 °C po dobu 2 až 4 hod pri molových pomeroch anhydroglukózové jednotky celulózy: epichlórhydrín: kyselina chlo-

ristá alebo kyselina chlór vodíková 1 : 3 až 5 : 0,3 až 0,04, načo v druhom stupni sa reakciou s tiosíranom sodným alebo reakciou s hydroxidom sodným a s tiosíranom sodným prevedie na tiosulfátóhydroxypropylcelulózu, ktorá sa v treťom stupni redukuje tiolmi vo vodných tlmivých roztokoch.