



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

229094

(11) (B1)

(22) Prihlásené 20. 01. 83
(21) (PV 391-83)

(40) Zverejnené 15. 09. 83

(45) Vydané 15. 04. 86

(51) Int. Cl.³
C 07 D 251/26
C 08 B 31/12

(75)

Autor vynálezu

GEMEINER PETER ing. CSc., MISLOVIČOVÁ DANICA ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Trojsodná soľ 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)]-anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylškrobu a spôsob jeho prípravy

1

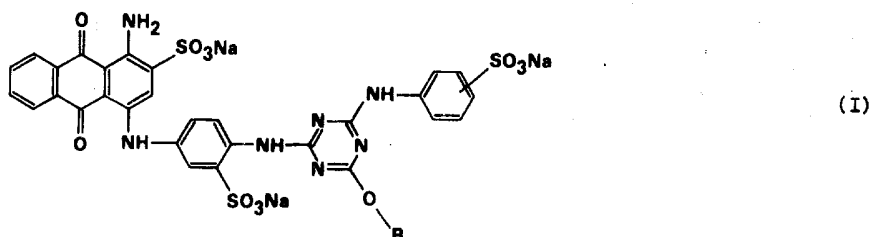
Vynález sa týka trojsodnej soli 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)]-anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylškrobu a spôsobu jeho prípravy.

Trojsodná soľ 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)]anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazín-2-yl-dextránu je vodorozpustná látka a slúžila v afinitnej chromatografii ako prostriedok na štúdium afinity enzýmov a proteínov vôbec k antrachinón-triazínovým farbivám, ktoré sú jedným z typov generálnych afinantov (E. Stellwagen: Accounts Chem. Res. 10, 92 /1977/). Chromolytické dextrány o priemernej molekulovej hmotnosti $5 \cdot 10^3$ až $2 \cdot 10^6$ sa vyznačovali výraznou afinitou k enzýmom, ktorá je závislá nielen od typu chromofóru, ale aj od molekulovej hmotnosti polysacharidu. Zo skúšaných antrachinón-triazínových farbív najväčšiu účinnosť vykazovala trojsodná soľ 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)]anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu (P. Gemeiner, D. Mislovičová, J. Zemek, Ľ. Kuniak: Collect. Czech. Chem. Commun. 46, 419 /1981/). Vplyv charakteru polysacharidu na afinitu jeho chromolytického derivátu ku enzýmom a albumínu bol zatiaľ dokázaný z rozpustných polysacharidov iba u dextránu, rozpustného škrobu a glykogénu a z nerozpustných polysacharidov u sietovaných dextránov, sietovanej agarózy a celulózy (S. Angal, P. D. G. Dean: Biochem. J. 167, 301 /1977/).

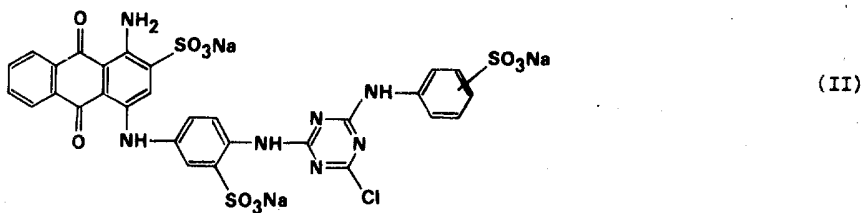
Hydroxyetylškrob je ďalší typ vodorozpustného polysacharidu vhodného na tieto účely. Je to vetvený alfa-glukán (99 % amylopektín) vo forme jeho hydroxyetylderivátu so stupňom substitúcie 0,63 až 0,67. Frakcionáciou tohto vodorozpustného polysacharidu sa získali frakcie hydroxyetylškrobu s priemernou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí $5 \cdot 10^4$ až $2 \cdot 10^6$. Pri vypracovaní podmienok reakcie hydroxyetylškrobu s trojsodnou soľou 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)]anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínom sa vychádzalo z podmienok farbenia dextránov (P. Gemeiner a kol.: Collect. Czech. Chem. Com-

mun., 46, 419 /1981/). Aby sa dosiahol jednotný stupeň substitúcie dextránov s trojsodnou soľou 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu (65 umól/g), používali sa hmotnostné pomery trojsodná soľ 2-chlór-6-2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino) anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu : dextrán : uhličitan sodný = 0,5:1:2 s tým, že reakcia prebiehala po dobu 2 h pri teplote 80 °C. Za týchto podmienok sa viazalo len 10 % trojsodnej soli 2-chlór-6-2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino) anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu, čo je ekonomicky nákladné.

Uvedenú nevýhodu odstraňuje v podstatnej miere tento vynález. Podstatou vynálezu je trojsodná soľ 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylškrobu, kde x je poloha substituenta 2 alebo 4 vzorca I



kde R predstavuje hydroxyetylškrob so stupňom substitúcie 0,63 až 0,67 a o priemernej molekulovej hmotnosti $5 \cdot 10^4$ až $2 \cdot 10^6$. Ďalej podstatou vynálezu je spôsob prípravy týchto derivátov, ktorý sa vyznačuje tým, že jednotlivé frakcie hydroxyetylškrobu sa po dobu 30 min aktivujú vodným roztokom trojsodnej soli 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu vzorca II pri teplote 60 °C a po pridaní chloridu sodného a uhličitanu sodného reagujú s trojsodnou soľou 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu po dobu 2 h pri teplote 70 °C pri hmotnostných pomeroch trojsodná soľ 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu : hydroxyetylškrob : uhličitan sodný = 0,18 až 0,25:1:0,2 v prostredí 3,5 % vodného roztoku chloridu sodného.



Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy oproti doterajšiemu spôsobu prípravy chromolytických dextránov je, že pri 2 až 5násobne nižšej spotrebe trojsodnej soli 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu, 10násobne nižšej spotrebe uhličitanu sodného a pri znížení teploty o 10 °C sa dosahuje rovnaký stupeň substitúcie ako pri farbení dextránov a že uvedený postup je jednoduchý a nenáročný na použité chemikálie a prístroje.

Pr í k l a d 1

25 mg hydroxyetylškrobu (HES) o priemernej molekulovej hmotnosti 53 500 a 4,9 mg trojsodnej soli 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfo-anilino)-1,3,5-triazínu (Cibacron Blue 3G-A ďalej Blue) sa rozpustí v 1,25 ml destilovanej vody pri teplote 60 °C a mieša sa po dobu 30 min. Potom sa pridá 43,75 mg chloridu sodného a zmes sa zohreje na teplotu 70 °C. Po pridaní 5 mg uhličitanu sodného sa reakčná zmes mieša ešte po dobu 2 h. Potom sa reakčná zmes ochladí, zneutralizuje zriedenou kyselinou chlorovodíkovou na pH 7 a prečistí na kolone naplnenej dextránom sieťovaným epichlórhydrínom (Sephadex G-25 fine). Objem náplne kolony je 100 ml, výška 21,5 cm a priemer 2,5 cm. Eluuje sa destilovanou vodou, pri prietoku eluátu kolonou 30 až 35 ml/h.

Prvá modrá frakcia obsahujúca vodný roztok trojsodnej soli 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylškrobu (Cibacron Blue-HES, ďalej Blue-HES) sa odparí na rotačnej vákuovej odparke do sucha pri tlaku 5 kPa; po pridaní a znovu odparení etanolu a potom acetónu sa získa suchý Blue-HES (23,1 mg) s obsahom 65,4 umólu Blue/g.

Pr í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použije hydroxyetylškrob o priemernej molekulovej hmotnosti 127 000 a 4,63 mg Cibacron Blue 3G-A. Získa sa Blue-HES (22,5 mg) o obsahu 65,4 umól Blue/g.

Pr í k l a d 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použije hydroxyetylškrob o priemernej molekulovej hmotnosti 402 000 a 6,23 mg Blue. Suchý Blue-HES (22,2 mg) obsahuje 68,7 umól Blue/g.

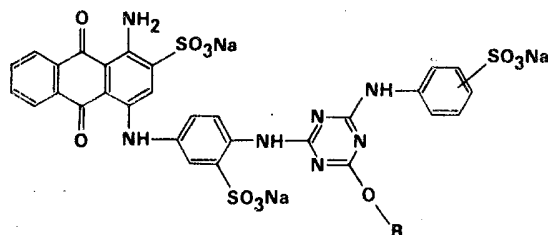
Pr í k l a d 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použil hydroxyetylškrob o priemernej molekulovej hmotnosti 1 920 000 a 6,23 mg Blue. Suchý Blue-HES (21,7 mg) obsahuje 72,08 umól Blue/g.

Vynález má použitie v enzýmovom inžinierstve a v biochémií, a to pri izolácii a purifikácii enzýmov alebo ako substráty a inhibítory enzýmami katalyzovaných reakcií.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

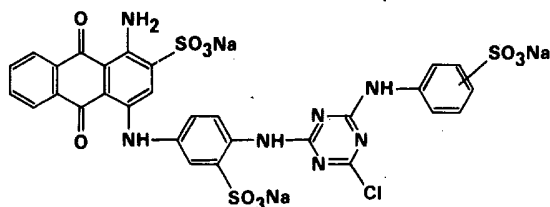
1. Trojsodná soľ 6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfo-anilino)-1,3,5-triazín-2-yl-hydroxyetylškrobu, kde x je poloha substituenta 2 alebo 4 vzorca I



(I)

kde R predstavuje hydroxyetylškrob so stupňom substitúcie 0,63 až 0,67 a priemernou molekulovou hmotnosťou $5 \cdot 10^4$ až $2 \cdot 10^6$.

2. Spôsob prípravy podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že frakcionovaný vodorozpustný hydroxyetylškrob sa po dobu 30 min aktivuje vodným roztokom trojsodnej soli 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu vzorca II



(II)

pri teplote 60°C a po pridaní chloridu sodného a uhličitanu sodného reaguje s trojsodnou soľou 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu po dobu 2 h pri teplote 70°C pri hmotnostných pomeroch trojsodná soľ 2-chlór-6-[2-sulfo-4-(4-amino-3-sulfo-1-antrachinón-amino)] anilino-4-(x-sulfoanilino)-1,3,5-triazínu : hydroxyetylškrob : uhličitan sodný = 0,18 až 0,25:1:0,2 v prostredí 3,5 % vodného chloridu sodného.