



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

242863

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 09 B 62/465

(22) Přihlášeno 01 03 78
(21) (PV 1880-80)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 02 03 77
(P 27 09 094.4) Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 22 08 85
(45) Vydáno 15 03 88

(72) Autor vynálezu

MÜLLER WERNER prof. dr., BIELEFELD, BÜNEMANN HANS dr.,
STEINHAGEN (NSR)

(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (NSR)

(54) Způsob výroby nových sloučenin typu akryloylaminobarviv

Řešení se týká způsobu výroby nových
sloučenin typu akryloylaminobarviv zejména
obecných vzorců I a II, ve kterých alespoň
jeden ze zbytků R^1 je akryloylový zbytek.
Způsob spočívá v tom, že se barvivo, které
nese skupinu $\oplus NR_2^1$ a alespoň jeden ze zbytků
 R^1 je vodík, nechá zreagovat s akrylchlor-
idem.

Vynález se týká způsobu výroby nových sloučenin typu akryloylaminobarviv.

Izolace jednotlivých genů nebo souboru stejných genů v opakovaném uspořádání z genomu eukaryotických buněk nemá pouze čistě vědecký význam, nýbrž i velký praktický význam z hlediska genové technologie. Až dosud byly možné izolace jen tehdy, jestliže se složení bází genu nebo genové skupiny svými spacery, tj. akupinami s molekulární hmotností až asi 4 000, působících prostorový odstup, lišilo alespoň o 6 až 7 % od průměrného složení bází celkového genomu.

Jako dělicí způsob se většinou používalo gradientové odstřeďování na základě hustoty iontů cesia s přísadami látek specifických k bázím desoxyribonukleových kyselin (DNA), jako například s přísadami iontů stříbra, rtuti nebo platiny nebo aktinomycinu nebo barviva Hoechst, což je 2-/4-hydroxyfenyl/-5-[5-/N-metyl-N'-piperaziny/-L,3/-benzodiazol-2-yl]-/1,3/-benzodiazol. Tyto způsoby mají jenom omezenou kapacitu, jsou drahé a náročné na čas.

Vývoj materiálů pro afinitní chromatografii biopolymerů velice zjednodušil v minulých letech izolaci mnoha biopolymerů nebo vůbec poprvé umožnil jejich přípravu v čistém stavu. Při těchto způsobech se vychází zpravidla z nosiče, který se po chemické aktivaci uvádí do reakce s látkou, která váže co nejspecifičtěji biopolymer, který se má izolovat. Na základě této specifičnosti lze v ideálním případě hledaný biopolymer selektivně adsorbovat ze směsi podobných sloučenin na chromatografický materiál a potom jej za vhodných podmínek desorbovat. Uvedený způsob je popsán P. Cus - trecasem a C. B. Anfinsenem, v Ann. Rev. Biochem. 40 (1971), 259 až 278.

Přes množství příkladů o úspěšném použití tohoto způsobu nepodařilo se až dosud vyvinout pro mnoho biopolymerů žádný chromatografický materiál, který by umožnil takové selektivní a programovatelné dělení i pro směsi nukleových kyselin. Vysoce rozlišovací frakcionace směsí nukleových kyselin v gramovém měřítku je ale předpokladem pro požadovanou izolaci jednotlivých genů nebo větví stejných genů.

U dosavadních způsobů dělení nukleových kyselin s nízkou molekulovou hmotností, například přenosových ribonukleových kyselin, se dosahuje dělení v různé druhy na adsorpčních činidlech, které kombinují vlastnosti iontoměničů s lipofilními interakcemi. - viz R. M. Kothari a V. Shankar, Journal of Chromatography 98 (1974) 449 až 475. Při tom se v podstatě využívá možností interakcí nosiče se vzácnými bázemi nukleových kyselin, které jsou k dispozici u různých přenosových ribonukleových kyselin v rozdílném množství.

Protože výšemolekulární ribonukleové kyseliny a desoxyribonukleové kyseliny neobsahují zpravidla žádné vzácné báze, mohou způsoby jejich dělení spočívat pouze v následujících rozdílných znacích:

poměru jednotlivého provazce k dvojitému provazci
rozdílu ve složení bází
rozdílu ve sledu bází
rozdílu v molekulových hmotnostech
rozdílu v terciárních strukturách

Všech těchto znaků se skutečně využívá dnes u obvyklých způsobů frakcionace - viz např. R. M. Kothari, Chromatograf. Rev. 12 (1970) 127 až 155.

U nejúčinnějšího způsobu, frakcionace v solném gradientu na ultraodstředivce, vedou rozdíly ve složení bází, rozdíly ve sledu bází, a rozdíly v molekulových hmotnostech k k rozdílu v hustotě vznosu pro jednotlivý druh desoxyribonukleové kyseliny, které lze ještě zvětšit přidávkem látek, specifických k bázím. Ostrosti dělení ubývá s ubývajícím

molekulovou hmotností, kapacity se vzrůstající molekulovou hmotností. Při absorpční chromatografii na hydroxyapatitu dochází ke frakcionaci v podstatě podle poměrů jednotlivého provazce ke dvojitému provazci nukleových a jenom v malé míře podle rozdílu ve složení bází, zatímco nukleové kyseliny bohatší obsahem guaninu a cytozinu jsou desorbovány již při o něco nižší koncentraci solí než složky bohatší adeninem a thyminem viz W. Pakroppa a W. Müller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71 (3) (1974) 699 až 703.

Zcela analogicky lze dvojprovazcové kyseliny nukleové frakcionovat na specifických adsorpčních činidlech proteinkřemelina, například metyl-sérový albumin- křemelina, podle rozdílu ve složení bází, přičemž se opět nejdříve eluují druhy desoxyribonukleových kyselin bohatší guaninem a cytozinem viz J. D. Mandell a A. D. Hershey, *Analytical Biochemistry* 1 (1960) 66 až 77; N. Sueoka a Ts'ai - Ying Chang, *J. Mol. Biol.* 4 (1962) 161 až 172. Vlastní mechanismus účinku těchto spíše náhodně nalezených adsorpčních činidel není znám. Proto nemohla být dodnes podstatně zlepšena malá ostrost dělení na těchto materiálech.

Teprve v posledních letech byly po systematickém studiu četných látek, které tvoří komplexy s nukleovými kyselinami, nalezeny sloučeniny, které se zdály být vhodnými k cílené syntéze materiálů pro afinitní chromatografii, viz W. Müller a D. M. Crothers, *Eur. J. Biochem.* 54 (1975) 267 až 277; W. Müller, H. Bünemann a N. Dattagupta, *Eur. J. Biochem.* 54 (1975) 279 až 291 a W. Müller a F. Gautier, *Eur. J. Biochem.* 54 (1975) 385 až 394.

Jaké výhody přináší použití takových dobře prostudovaných látek při dělení směsí nukleových kyselin mohlo být již ukázáno na příkladech kombinovaného použití hydroxyapatitu a ethidiumbromidu jako bazicky specifických přidávaných látek pro dělení superhelikálních a helikálních desoxyribonukleových kyselin - viz W. Pakroppa, W. Goebel a W. Müller, *Analytical Biochemistry* 67 (1975) 372 až 383 a hydroxyapatitu v kombinaci s deriváty fenyl-neutrální červeně jako komplexotvorných činidel specifických k bázím při dělení dvouprovazcových druhů desoxyribonukleových kyselin viz - W. Pakroppa a W. Müller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 (3) (1974) 699 až 703.

Rozlišovací schopnost těchto uvedených způsobů je srovnatelná s preparativním cesium-chloridovým gradientem hustoty, tzn. lze vzájemně oddělit frakce desoxyribonukleové kyseliny s rozdílným obsahem guaninu a cytosinu.

Přes vysokou kapacitu je způsob nevýhodný v tom, že se obtížně získávají směsi desoxyribonukleové kyseliny se střední molekulovou hmotností složek vyšší než 20×10^6 a že se dokonce musí připravovat speciální hydroxyapatit používaný jako absorbebs.

Delší dobu je známo, že směsi nukleových kyselin lze dělit v systému polyetylen-glykol-dextran za určitých podmínek jednak v jednovazcové desoxyribonukleové kyselině a jednak ve dvouprovazcové desoxyribonukleové kyselině.

Přitom v lehčí polyetylen-glykolové fázi se vždy obohacuje dvouprovazcová desoxyribonukleová kyselina, což znamená, že má vyšší rozdělovací koeficient než jednovazcové nukleové kyseliny. Absolutní hodnoty rozdělovacích koeficientů lze měnit přidáním draselných a lithných solí asi o 3 až 4 řády, frakcionace podle složení bází se však v tomto systému nedaří.

Je znám způsob výroby adsorpčních činidel, těchže autorů jako v případě tohoto vynálezu. Těmito adsorpčními činidly lze dosáhnout fázově nebo strukturně specifického dělení biopolymerů a zejména směsí jednovazcových a/nebo dvouprovazcových nebo tzv. super-coiled a/nebo lineárních nukleových kyselin, zejména směsí desoxyribonukleových kyselin, při současně vysoké kapacitě.

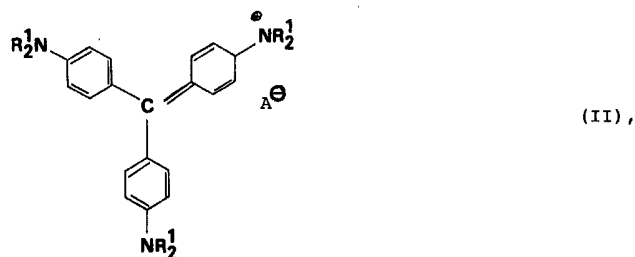
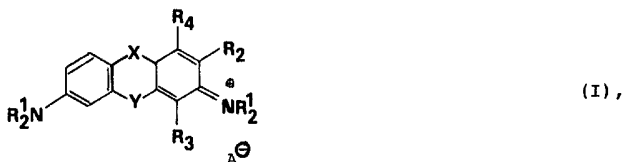
Afinitní specifickostí se rozumí především strukturní specifickost a bazická specifickost.

Shora zmíněné adsorpční činidlo obsahuje polymerní nosič, na který je přímo nebo přes další meziskupiny, zejména kovalentně vázán zbytek s afinitou k biopolymeru, popřípadě bazicky a/nebo strukturně specifická skupina.

Uvedené adsorpční činidlo pro afinitní specifické dělení makromolekulárních látek, zejména biopolymerů, jako nukleových kyselin se vyrobí postupem, při kterém se nejdříve vytvoří o sobě známým způsobem polymerací nebo polykondenzací alespoň jednoho monomeru, který obsahuje navíc jednu funkční skupinu, přes kterou lze vázat přímo nebo přes skupinu s molekulární hmotností až asi 4 000, působící prostorový odstup, zbytek s afinitou k nukleovým kyselinám, polymerní nosič, tento polymerní nosič se popřípadě rozmělní na požadovanou velikost částic a potom se naroubuje buď přímo nebo kopolymerací v přítomnosti alespoň jednoho dalšího monomeru jako kopolymeru, zbytek s afinitou k nukleovým kyselinám, nebo se o sobě známým způsobem vyrábějí perlovou polymerací částice požadované velikosti.

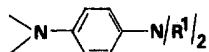
S výhodou se při výrobě uvedeného adsorbentu na polymerní nosič s malými póry, a malou stlačitelností, naroubuje kopolymer alespoň ze dvou směsně polymerovatelných monomerů, z nichž jeden nese zbytek s afinitou k nukleovým kyselinám.

Jako zbytků s afinitou k biopolymerům lze používat komplexotvorných látek bazicky a/nebo strukturně specifických, které jsou popsány v citované literatuře. Zejména vhodné jsou zbytky barviv, které nesou skupinu NR_2^+ . Jde o barviva obecného vzorce I a II.



kde znamenají

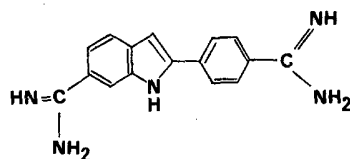
- X skupinu CH- nebo atom dusíku,
Y atom kyslíku, atom síry, skupinu NH- nebo skupinu obecného vzorce



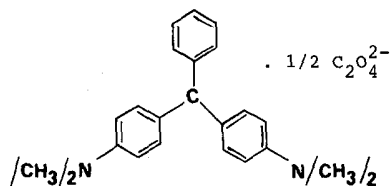
- R^1 nezávisle na sobě atomy vodíku nebo metylové skupiny,
 R^2 atom vodíku nebo metylovou skupinu,
 R^3 atom vodíku nebo metylovou skupinu,
 R^4 atom vodíku nebo metylovou skupinu,
 $A^\ominus$ anion, například chloridový anion, perchlorátový anion nebo oxalátový anion.

Zejména výhodné na polymerní nosič vázané komplexotvorné látky a/nebo strukturně specifické jsou zbytky následujících barviv:

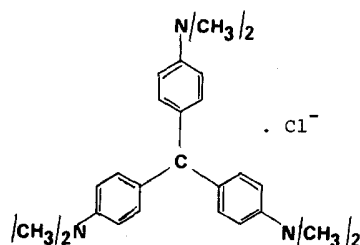
1. Diaminofenyлиндol (DAPI)



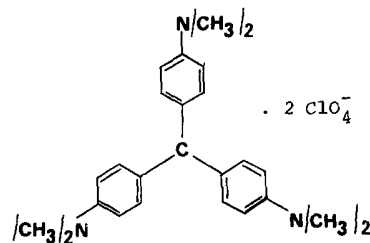
2. p-dimetylamínofuchsondimetyliminová sůl (Malachitová zeleň)



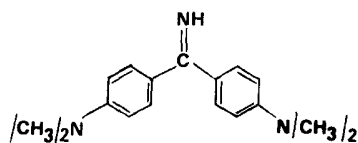
3. hexametyl-p-rosanilinchlorhydrát (krystalová violeť)



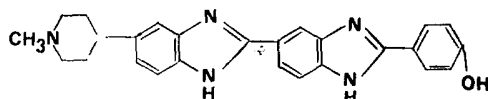
4. heptametyl-p-rosanilinchlorid (metylzeleň)



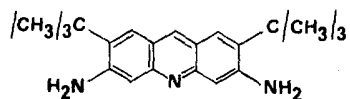
5. bazické difenylmetanové barvivo (auramin)



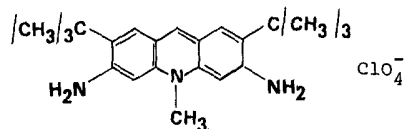
6. 2-/4-hydroxyfenyl/-5-[1-metylpiperazin-4-yl]-benzimidazol-2-yl-benzimidazol (barvivo Hoechst 33 258)



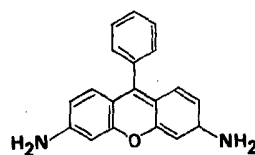
7. Di-terc. butylproflavin



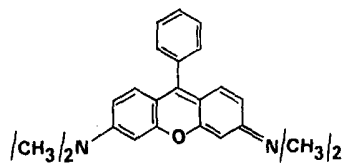
8. Di-terc.-butylakriflavin



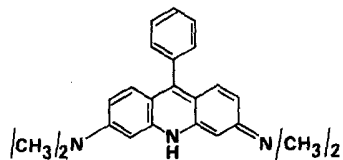
9. 3,7-diamino-10-fenyl-5-oxantracenová sůl



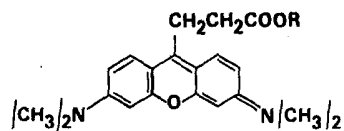
10. 3,7-tetrametyldiamino-10-fenyl-5-oxantracenová sůl



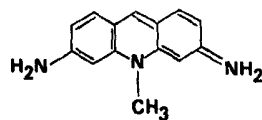
11. 3,6-tetrametyldiamino-9-fenalakridinová sůl



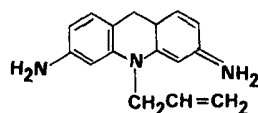
12. sůl esteru 3-/10/-3,7-tetrametyldiamino/-5-oxaanthyren/-propionové kyseliny



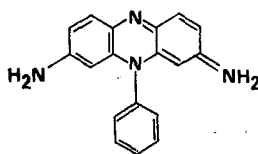
13. Aktiflavin



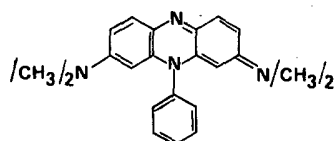
14. sůl 10-/propenyl/-proflavinu



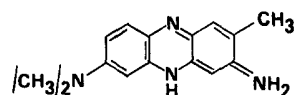
15. 3,7-diamino-3-fenylfenazinová sůl



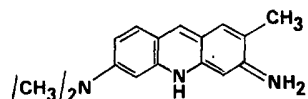
16. 3,7-tetrametyldiamino-5-fenylfenazinová sůl



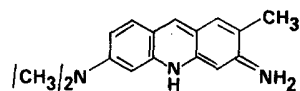
17. 2-metyl-3-amino-7-dimethylaminofenazinová sůl



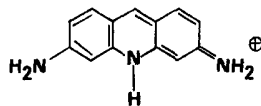
18. 2-metyl-3-amino-6-dimethylaminoakridinová sůl



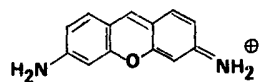
19. 2-metyl-3-amino-7-dimethylaminofenothiazinová sůl



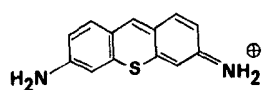
20. Proflavin



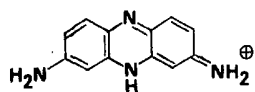
21. 3,7-diamino-5-oxaantracenová sůl



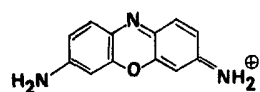
22. 3,7-diamino-5-thiaanthracenová sůl



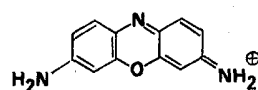
23. 3,7-diaminofenazinová sůl



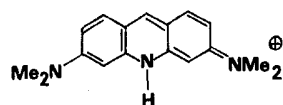
24. 3,7-diaminofenoxazinová sůl



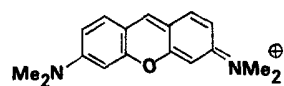
25. Thionin



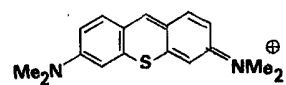
26. 3,6-tetrametyldiaminoakridin (akridinová oranž)



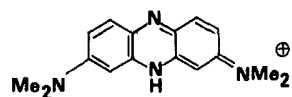
27. Pyronin G



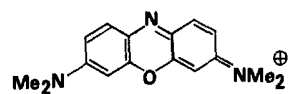
28. Thiopyronin



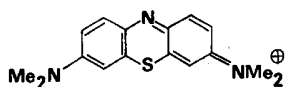
29. 3,7-tetrametyldiaminofenazinová sůl



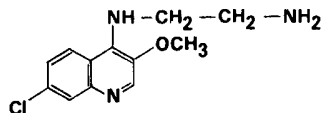
30. 3,7-tetrametyldiaminofenoxazinová sůl



31. chlorid zinečnatý, nebo chlorid dizinečnatý 2,7-bis-/dimethylamino/-fenthiazoniumhydrochlorid (metylenová modř)



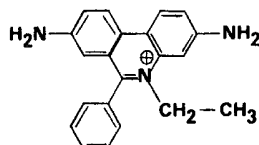
32. N-/3-metoxy-7-chlorochinolin-4-yl/-etylendiamin



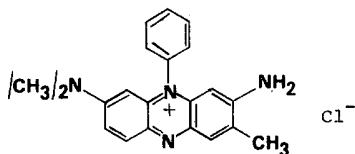
přičemž

Me ve výše uvedených vzorcích znamená metylovou skupinu

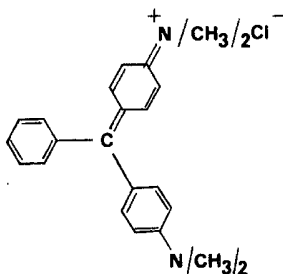
33. Ethidiumbromid



Výhodné komplexotvorné látky bazicky a/nebo strukturně specifické, jsou především fenylová neutrální červeň vzorce



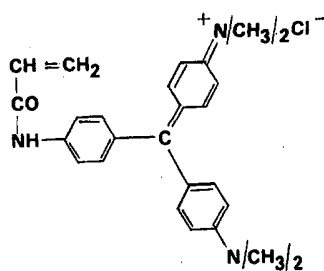
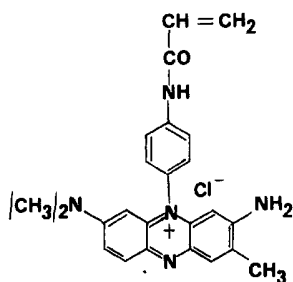
a p-dimethylaminofuchsondimethyliminová sůl (malachitová zeleň)



Tato barviva jsou o sobě známa a komerčně dostupná nebo je možné je připravovati způsoby, které jsou odborníkovi běžné a které jsou popsány ve výše uvedených publikacích W. Müller a D. M. Crothers Eur. J. Biochem. 54 (1975) 267 až 277, W. Müller, H. Bünemann a N. Dattagupta, Eur. J. Biochem. 54 (1975) 279 až 291 a W. Müller a F. Gautier Eur. J. Biochem. 54 (1975) 385 až 394.

Tyto komplexotvorné látky bazicky a/nebo strukturně specifické, popřípadě zbytky barviv, lze vázat kovalentně na nosič způsoby, známými odborníkovi, například esterifikací hydroxylových skupin, přítomných na nosiči přes karboxylovou skupinu zavedenou do molekuly barviva, tvorbou amidu, tvorbou uretanu a rovněž kopolymerací s výhodou v přítomnosti ale i v nepřítomnosti jiných kopolymerovatelných monomerů přes kopolymerovatelné dvojné vazby, které jsou zavedeny do molekuly barviva, například přes akrylamidoskupinu, jako je tomu v případě výhodných komplexotvorných látek v bazicky a/nebo strukturně specifických

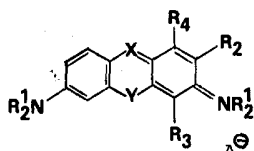
a to akrylphenylneutrální červeně a akrylmalachitové zeleně, následujících vzorců. Uvedená označení jsou triviální názvy, přesný název zní akryloylaminofenylneutrální červeně a akryloylmalachitová zeleň.



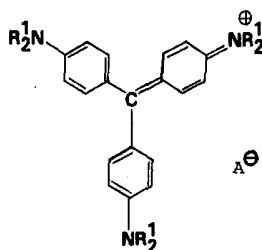
Tyto komplexotvorné látky bazicky a/nebo strukturně specifické lze vyrábět způsobem odborníkovi o sobě známým, zavedením akrylového zbytku do uvedených molekul barviv. To platí i pro molekuly výše uvedených barviv.

Označení akrylový zbytek je v uvedených případech ekvivalentní akryloylovému zbytku.

Předmětem vynálezu je způsob výroby nových sloučenin typu akryloylaminobarviv zejména obecných vzorců I a II.



(I),

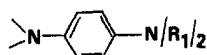


(II),

kde znamenají

X skupinu CH- nebo atom dusíku,

Y atom kyslíku, atom síry, skupinu NH- nebo skupinu obecného vzorce



R^1	nezávisle na sobě atomy vodíku nebo metylové skupiny,
R^2	atom vodíku nebo metylovou skupinu,
R^3	atom vodíku nebo metylovou skupinu,
$A^\ominus$	anion, například chloridový anion, perchlorátový anion nebo oxalátový anion, přičemž alespoň jeden ze zbytků R^1 znamená akryloylový zbytek,

Podstata způsobu výroby nových sloučenin typu akryloylaminobarviv, ve kterých alespoň jeden ze zbytků R^1 je akryloylový zbytek spočívá v tom, že se barvivo, které nese skupinu $\ominus NR_2^1$ a alespoň jeden ze zbytků R^1 je vodík, nechá zreagovat s akrylchloridem.

Vynález se týká zejména způsobu výroby následujících nových barviv: akryloylaminomalachitové zeleně, akryloylaminofenylneutrální červeně, derivátů akryloylaminookridinu a derivátů akryloylaminofenantridinu. Výroba se provádí o sobě známým způsobem obvyklými acylačními metodami s akrylchloridem. Způsob je blíže vysvětlen následujícími příklady provedení.

P ř í k l a d 1

Výroba akryloylaminomalachitové zeleně

1a) 15,1 g, což odpovídá 0,1 molu 4-nitrobenzaldehydu a 36,3 g tj. 38 ml, což odpovídá 0,3 molu / N,N-dimetylanilinu a 40,5 g chloridu zinečnatého bezvodého se smíchá a reakční směs se zahřeje na teplotu lázně 100 °C. Zpočátku snadno pohyblivá směs ztuhne v průběhu reakce na pevnou zelenou hmotu, kterou nelze více míchat. Reakční směs se nechá po uplynutí 5 hodin ochladit. Produkt se vyjme do 150 ml acetonu, přičemž po určité době se za míchání produkt rozpustí a vyloučí se zinečnatá sůl. Nerozpustná sůl se odsaje, promyje acetonem a k filtrátu se přidá tolik vody, až nastane krystalizace. Krystaly se odsají, promyjí vodou, isopropylalkoholem a éterem.

Výtěžek: 28,7 g, což odpovídá 76,6 % teorie, teplota tání: 168 °C, látka je citlivá na světlo.

1b) 3,75 g, což odpovídá 0,01 molu, nitrosloučeniny získané způsobem podle 1a), se rozpustí ve 200 ml 99% ledové kyseliny octové a 20 ml vody. Přidají se 4 g chloridu zinečnatého. Potom se přidá po částech za míchání a chlazení při 20 až 30 °C 20 g zinkového prachu. 30 minut se míchá při teplotě místnosti, potom se přebytný zinek odsaje a promyje ledovou kyselinou octovou. Filtrát se odpaří ve vakuu při teplotě 50 °C, zbytek se rozdělí mezi 150 ml chloroformu a 100 ml vody a oddělí, potom se chloroformová fáze protřepe 80 ml 2N roztoku uhličitanu sodného a 100 ml vody. Chlороformová fáze se oddělí a vysuší nad bezvodým síranem sodným a zfiltruje, potom se roztok zkoncentruje ve vakuu při teplotě 50 °C asi na 100 ml a použije se přímo k další reakci. Roztok je slabě fialový.

1c) 100 ml získaného chloroformového roztoku aminosloučeniny se zředí 50 ml metanolu. Přidá se 10 g uhličitanu sodného bezvodého a na špičku špachtle 1,3-dinitrobenzenu a potom za míchání a chlazení ledem na 0 až 5 °C se přikape 1,81 g = 1,65 ml, což odpovídá dvojnásobnému množství, akryloylchloridu. Suspenze se míchá přes noc při teplotě místnosti, potom se uhličitan sodný odsaje a filtrát se odpaří ve vakuu při teplotě 35 až 40 °C. Zbytek se vyjme do 100 ml chloroformu a 50 ml vody a protřepe, chloroformová fáze se oddělí, znovu extrahuje 50 ml vody, vysuší síranem sodným a odpaří ve vakuu při teplotě 35 až 40 °C. Olejovitý nazelenalý odparek se rozetře se 20 ml isopropylalkoholu a ochladí se ke krystalizaci. Krystaly se odsají, promyjí isopropylalkoholem a éterem a vysuší v exkátoru, výtěžek přes stupně 1b) a 1c): 2,9 g, což odpovídá 72,7 % teorie, teplota tání: 175 °C.

Analýza

Vypočteno: C 78,2, H: 7,27, N: 10,52 %,

Nalezeno: C 75,9, H: 7,21, N: 9,99 %.

NMR-spektrum (hexadeuterodimetylsulfoxid): CH_3 -/N-metyl/ S 2,83 PPM, =CH-/akryl/ Q 5,7 PPM, CH=akryl/ P 6,3 PPM, aromatické protony mezi 6,5 až 7,5 PPM.

1d) 250 mg, což odpovídá 0,001 molu chloranilu se rozpustí v 15 ml tetrahydrofuranu a přidá se 0,4 g, což odpovídá 0,001 molu akryloylsloučeniny, obdobně jako v případě 1c). Roztok okamžitě zmodrá a asi po dvou hodinách stání při teplotě místnosti přes noc, potom se krystaly odsají, promyjí tetrahydrofuranem a éterem a vysuší se v exikátoru. Při dalším čištění se látka opět rozpustí ve vodě, neutralizuje se kyselinou chlorovodíkovou a potom se roztok vytřepe etylacetátem. Čistý produkt se vysráží z vodného roztoku přidáním chloridu sodného.

Výtěžek: 0,335 g tj. 84,2 % teorie.

V NMR-spektru 1d) lze ve srovnání s 1c) pozorovat posun N-metylprotonového signálu na 3,3 PPM.

P ř í k l a d 2

Příprava akryloylaminofenylneutrální červeně

1a) 6,9 g = 0,05 molu 4-nitroanilinu se rozpustí ve směsi tetrahydrofuran/chloroform 1 : 1, přidá se na špičku špachtle 1,3-dinitrobenzenu a 8 ml triethylaminu. Za míchání se při teplotě 10 až 20 °C pomalu přikape 9 ml = 0,1 molu akryloylchloridu. Roztok se míchá při teplotě místnosti přes noc, přičemž vykristaluje hydrochlorid triethylaminu. Potom se směs tetrahydrofuran/chloroformu odpaří při teplotě 50 °C ve vakuu, zbytek se rozmíchá ve vodě, odsaje a promyje vodou, isopropylalkoholem a éterem. Produkt se vysuší ve vakuu při teplotě 50 °C.

1b) 2,5 g akryloylsloučeniny 2a) se rozpustí při teplotě 50 °C za míchání v 60 ml tetrahydrofuranu a zředí 60 ml 99% kyseliny ledové octové a ochladí na teplotu 30 °C. Potom se přidá po částech 10 g zinkového prachu, přičemž teplota za chlazení ledem vystoupí na 35 až 40 °C.

Potom se míchá ještě dalších 10 minut při teplotě místnosti, přebytečný zinek se odsaje a promyje koncentrovanou kyselinou octovou. Filtrát se odpaří ve vakuu při teplotě 45 °C. Olejovitý odparek je prakticky chromatograficky čistý a použije se tak do dalšího reakčního stupně.

1c) K roztoku 4,2 g = 0,02 molu N,N-dimetyl-p-fenylendiamoniumchloridu a 2,88 g tj. 0,02 molu o-toluidiniumchloridu ve 400 ml vody se přidá pomalu při teplotě místnosti a za míchání roztok 12 g chromanu sodného tj. 0,04 molu ve 100 ml vody. Vyloučený zelený produkt se po 15 minutách odsaje, promyje třikrát vodou, přičemž promývací roztok zůstává zelený, sraženina se potom ihned zpracuje dále tak, že se suspenduje v malém množství vody a homogenizuje.

Homogenní suspenze se zředí vodou na objem 1,6 litru. Po přidání 1,5 x 0,02 molu N-akryloyl-P-fenylendiamoneumacetátu ve 100 ml vody se hodnota pH reakční směsi nastaví 3 M roztokem octanu sodného na 4,9. Potom se směs zahřeje za míchání k varu. Roztok se přitom barví nejprve modře, potom za varu tmavě fialově. K dokončení reakce se směs ponechá po dobu 5 minut vařit. Potom se vroucí horký roztok odsaje přes nuč, filtrát, v množství asi 2 litry, se upraví přidáním 240 g chloridu sodného na 2 M roztok a ponechá se stát přes noc v lednici.

Vyloučené krystaly se odsají a vysuší v exikátoru. Nesmí se promývat vodou, protože látka je dobře rozpustná ve vodě.

Výtěžek: 2,4 g surového produktu.

K dalšímu čistění se 1,3 surového produktu rozpustí ve 25 ml metanolu a 0,1 M chloridu sodného v poměru 4 : 1 a nanese na sloupec silikagelu 60 (4 x 95 cm). Potom se eluuje stejným rozpouštědlem; objem frakcí = 20 ml. Frakce 22 až 25 se spojí a zahustí ve vakuu asi na 15 ml. Krystaly se odsají, promyjí malým množstvím 0,1 M chloridu sodného a vysuší v exikátoru.

Výtěžek: 0,665 g chromatograficky čistého barviva.

P ř í k l a d 3

Příprava 9-/akryloylaminoethylamino/-3-chlor-7-metoxyakridinu

854 mg 3,9-dichlor-7-metoxyakridinu se zahřívá s 1 ml atylendiaminu a 7,7 g fenolu po dobu 30 minut v olejové lázni na teplotu 60 °C. Tavenina se vyjme do 200 ml chloroformu a 150 ml vody a pH reakční směsi se nastaví a ekvilibruje na hodnotu 4 přidáním kyseliny octové. Organická fáze se znovu extrahuje 3 až 4krát 0,1 M pufrem z octanu sodného a potom se odstraní.

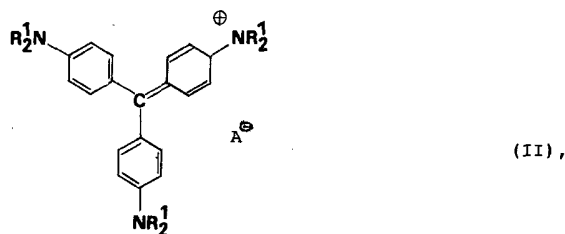
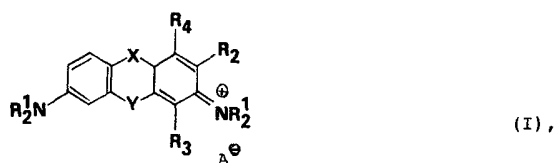
Vodné extrakty se upraví roztokem sody na hodnotu pH 9,5, extrahují směsí chloroformu a n-butanolu v poměru 20 : 1, organická fáze se zfiltruje přes silikonový papír a odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí v 0,1 M pufru z octanu sodného, zbytky dimérního produktu se odfiltrují a roztok se nastaví na hodnotu pH 10. Sraženina se po 1 hodině stání při teplotě místnosti odfiltruje, promyje malým množstvím zředěného roztoku amoniaku při 4 °C a vysuší.

Výtěžek: 50 až 80 % teorie.

206 mg získané aminosloučeniny se rozpustí za tepla ve 25 ml chloroformu a po ochlazení přidá 0,3 ml akryloylchloridu. Roztok okamžitě ztmavne. Po několika minutách se vylučuje akryloylderivát. Po odpaření a promytí malým množstvím chloroformu se získá 122 mg = 50 % teorie /9-akryloylaminoethylamino/-3-chlor-7-metoxyakridinu v chromatograficky čisté formě.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

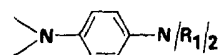
1. Způsob výroby nových sloučenin typu akryloylaminobarviv zejména obecných vzorců I a II



kde znamenají

X Skupinu CH- nebo atom dusíku,

Y atom kyslíku, atom síry, skupinu NH- nebo skupinu obecného vzorce



R^1 nezávisle na sobě atomy vodíku nebo metylové skupiny

R^2 atom vodíku nebo metylovou skupinu,

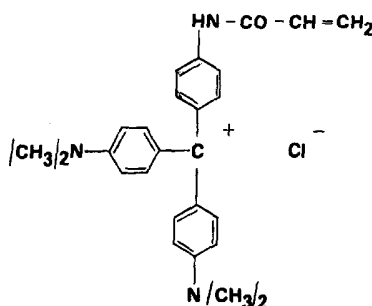
R^3 atom vodíku nebo metylovou skupinu,

R^4 atom vodíku nebo metylovou skupinu a

$A^\ominus$ anion, například chloridový anion, perchlorátový anion nebo oxalátový anion,

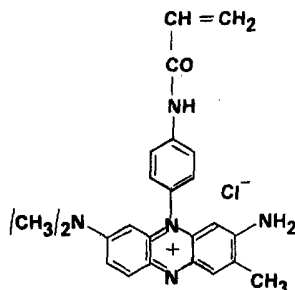
vyznačující se tím, že se barvivo, které nese skupinu NR_2^1 a alespoň jeden ze zbytků R^1 znamená vodík, nechá zreagovat s akrylchloridem.

2. Způsob výroby akryloylaminomalachitové zeleně obecného vzorce



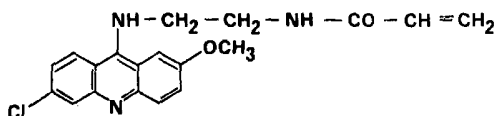
vyznačující se tím, že 4-nitrobenzaldehyd se uvádí do reakce s N,N-dimetylanilinem, nitro-skupina vzniklého trifenylmetanového derivátu se redukuje a acyluje akrylchloridem.

3. Způsob výroby akryloylaminofenylneutrální červeně vzorce



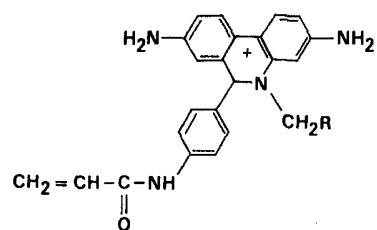
vyznačující se tím, že N,N-dimetyl-p-fenylendiamin se uvádí do reakce s o-toluidinem a získaný reakční produkt se uvádí do reakce s N-akryloyl-p-fenylendiaminem.

4. Způsob výroby derivátů akridinu vzorce



vyznačující se tím, že 3,9-dichlor-6-metoxiakridin se uvádí do reakce s etylendiaminem a získaná 9-aminoetylaminosloučenina se acyluje akrylchloridem.

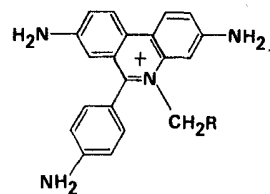
5. Způsob výroby derivátů akryoylfenantridinu obecného vzorce



ve kterém značí

R značí atom vodíku nebo metylovou skupinu,

vyznačující se tím, že fenantridinový derivát vzorce



se acyluje akrylchloridem.