



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

241325
(11) (E1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/24

(22) Prihlášené 09 01 84

(21) (PV 180-84)

(40) Zverejnené 31 07 84

(45) Vydané 15 09 87

(75)

Autor vynálezu

MISLOVIČOVÁ DANICA ing. CSc.; TOMAN RUDOLF ing. CSc.;
BIELY PETER RNDr. CSc.; EBRINGEROVÁ ANNA ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy sodnej soli 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etylxlánu

1

2

Vynález sa týka spôsobu prípravy sodnej soli 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etylxlánu. Podstata spôsobu prípravy 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etylxlánu spočíva v tom, že xylán reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 1 až 3 % hydroxidu sodného alebo draselného za prítomnosti soli ako je octan sodný, síran sodný a chlorid sodný pri teplote 15 až 50 °C počas 1 až 2 h s dvojsodnou soľou 1-amíno-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoethylsulfonylanilíno)]-antrachinónu pri váhových pomeroch dvoj-sodná soľ 1-amíno-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoethylsulfonylanilíno)]antrachinónu : xylán : hydroxid sodný alebo draselný = 0,3 až 1,6 : 1 : 0,4 až 1,2, načo sa zafarbený xylán vyzráža 2 objemami etylalkoholu alebo metylalkoholu a nenaviazané farbivo a farebné nízkomolekulárne frakcie xylánu sa odstraňuje vymývaním roztokom obsahujúcim 0 až 1 objem 0,6 až 1 % vodného roztoku octanu sodného, síranu sodného alebo chloridu sodného a 2 objemy etylalkoholu alebo metylalkoholu až do bezfarebného filtrátu. Vynález má využitie v biochémii ako substrát pri identifikácii a stanovení aktivity xylanáz.

Vynález sa týka spôsobu prípravy sodnej soli 2-[4-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etylxlánu, pre kvantitatívne stanovenie xylanázovej aktivity.

Farebné deriváty polysacharidov, v ktorých je farbivo viazané kovalentnou väzbou na polymér, sa v poslednom čase s výhodou používajú ako substráty pre kvantitatívne stanovenie enzymovej aktivity príslušných polysacharid-hydroláz. Pre tieto účely boli pripravené farebné substráty z amylózy, hydroxyetylcelulózy, celulózy škrobu, manánu, chitínu aj pektínu [J. F. Kennedy: Advan. Carbohydr. Chem. and Biochem. 29, 305 (1974), B. V. McCleary: Carbohydr. Res. 67, 213 (1978), D. A. Friend, G. W. Chang: J. Agric. Food Chem. 30, 982 (1982)].

Najčastejšie sa na prípravu týchto farebných polysacharidov používajú dva typy farbív, a to triazínové a vinylsulfonylové, ktoré reagujú s hydroxylovou skupinou polysacharidu v alkalickom prostredí za vzniku éterickej väzby [J. F. Kennedy: Advan. Carbohydr. Chem. and Biochem. 29, 305 (1974)].

Uvedené farebné substráty pre stanovenie polysacharid-hydrolázovej aktivity sa pripravujú vo forme nerozpustnej alebo rozpustnej vo vode. Pri enzymovej hydrolýze vodонераzpustných substrátov sa odštiepujú farebné fragmenty polysacharidov, ktoré prechádzajú do roztoku, kde sa stanovia spektrofotometricky. Ak je však polysacharid vodorozpustný, je potrebné ho pred alebo po reakcii s farbivom previesť na nerozpustnú formu sieťovaním, alebo postupovať pri stanovení polysacharid-hydrolázovej aktivity iným spôsobom, t. j. previesť enzymatický atak polysacharidu v roztoku a vyzrážať nerozštiepený polysacharid organickým rozpúšťadlom. Farebný xylán vhodný pre stanovenie xylanázovej aktivity sa pripravil vo vodонераzpustnej forme sieťovaním farebného xylánu epichlórhydrínom [Čs. AO 192 202]. Nevýhodou tohto substrátu je spôsob jeho prípravy, pri ktorom treba xylán popri reakcii s farbivom podrobiť aj sieťovaniu s epichlórhydrínom. Ďalšou nevýhodou nerozpustného farebného sieťovaného xylánu ako substrátu je, že v inkubačných zmesiach, ktorých objem je väčší ako napúšťač objem substrátu, nedochádza k vytváraniu enzým-substrátového komplexu v celom objeme vzorky ak sa táto nemieša, keďže substrát nie je v zmesi homogénne suspendovaný.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy sodnej soli 2-[4-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etylxlánu podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že xylán reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 1 až 3 % hydroxidu sodného alebo draselného za prítomnosti solí ako je octan sodný, síran sodný a chlorid sodný pri teplote 15 až 50 °C počas 1 až 2 h s dvojsodnou soľou

1-amino-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilino)]antrachinónu pri váhových pomeroch dvojsodná soľ 1-amino-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilino)]antrachinónu : xylán : hydroxid sodný alebo draselný = 0,3 až 1,6 : 1 : 0,4 až 1,2, načo sa zafarbený xylán vyzráža 2 objemami etylalkoholu alebo metylalkoholu a nenaviazané farbivo a farebné nízkomolekulárne frakcie xylánu sa odstránia vymývaním s roztokom obsahujúcim 0 až 1 objem 0,6 až 1 % vodného roztoku octanu sodného, síranu sodného alebo chloridu sodného a 2 objemy etylalkoholu alebo metylalkoholu až do bezfarebného filtrátu.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy je, že sa získa jednoduchým, energeticky nenáročným spôsobom vodorozpustný substrát vhodný pre rýchle stanovenia aktivity xylanáz, ktorý nie je zatiaľ k dispozícii na našom a ani zahraničnom trhu. Ďalšou výhodou je, že tento substrát je zrážaný a vymývaný za prítomnosti octanu sodného t. j. za podmienok zhodných s podmienkami zrážania enzymaticky nerozštiepených farebných makromolekúl pri stanovení aktivity xylanáz. Výhodou je tiež to, že základné suroviny sú dostupné.

Príklad 1

1 g xylánu sa rozpustí za miešania v 20 mililitroch destilovanej vody pri teplote 20 stupňov Celsia. Potom sa postupne pridáva 0,3 g dvojsodnej soli 1-amino-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilino)]antrachinónu (Remazol Brilliant Blue R), 0,5 g síranu sodného rozpusteného v 10 ml destilovanej vody a nakoniec 10 ml 4 % vodného roztoku hydroxidu draselného.

Teplota reakčnej zmesi sa zvýši na 50 °C a mieša sa 2 h pri tejto teplote. Zafarbený xylán sa vyzráža 80 ml etylalkoholu za intenzívneho miešania. Zrazenina sa odfiltruje na nuči a premýva 60 % vodným roztokom etylalkoholu až do bezfarebného filtrátu. Potom sa zrazenina premyje 96 % etyl alkoholom a acetónom a nechá sa voľne vysušiť. Získa sa 0,95 g farebného xylánu s obsahom 4 % sodnej soli 2-[4-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]etyl-.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 1,6 g dvojsodnej soli 1-amino-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoetyl-sulfonylanilino)]antrachinónu, 0,5 g chloridu sodného a 10 ml 12 % vodného roztoku hydroxidu sodného. Reakcia prebieha 1 h pri 15 °C. Na vyzrážanie sa použije metylalkohol a na vymývanie roztok obsahujúci 1 objem 1 % vodného roztoku chloridu sodného a 2 objemy metylalkoholu. Získa sa 1,1 g farebného xylánu s obsahom 20 %

sodnej soli 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etyl-.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 100 g xylánu rozpusteného v 2 l destilovanej vody, 100 g dvoj-sodnej soli 1-amíno-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoethylsulfonylanilíno)]antrachinónu, 1 l 2,7 perc. vodného roztoku octanu sodného a 1 l 6 % vodného roztoku hydroxidu sodného. Reakcia prebieha 1,5 h pri teplote 25 stupňov Celsia. Zrážanie sa robí do 2 l e-

tylalkoholu. Zrazenina farebného xylánu sa prefiltruje cez nuč a premýva roztokom obsahujúcim 1 objem 0,6 % vodného roztoku octanu sodného a 2 objemy etylalkoholu do bezfarebného filtrátu, potom 80 % vodným roztokom etylalkoholu a nakoniec etylalkoholom a acetónom. Získa sa 110 g farebného xylánu s obsahom 13 % sodnej soli 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etyl-.

Vynález má využitie v biochémií ako substrát pri identifikácii a stanovení aktivity xylanáz.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy sodnej soli 2-[4-(1-amíno-2-sulfoantrachinón-4-ylamíno)fenylsulfonyl]etyl-xylánu, ktorý sa vyznačuje tým, že xylán reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 1 až 3 % hmot. hydroxidu sodného alebo draselného za prítomnosti solí ako je octan sodný, síran sodný a chlorid sodný pri teplote 15 až 50 °C počas 1 až 2 h s dvojsodnou soľou 1-amíno-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoethylsulfonylanilíno)]antrachinónu pri hmotnostných pomeroch dvojsodná soľ 1-

-amíno-2-sulfo-4-[4-(2-sulfátoethylsulfonylanilíno)]antrachinónu : xylán : hydroxid sodný alebo draselný = 0,3 až 1,6 : 1 : 0,4 až 1,2, načo sa zafarbený xylán vyzráža 2 objemami etylalkoholu alebo metylalkoholu a vymýva roztokom obsahujúcim 0 až 1 objem 0,6 až 1 % vodného roztoku octanu sodného, síranu sodného alebo chloridu sodného a 2 objemy etylalkoholu alebo metylalkoholu až do bezfarebného filtrátu.