

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Billiński

Janusz KLIMEK, Sławomir WAWRZYCKI,
Jolanta WROŃSKA

O niektórych praktycznych aspektach syntezy dwusiarczku beta-hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowego (HEDD)

О некоторых практических аспектах синтеза дисульфида
бета-гидроксиэтило-2,4-динитрофенолового (HEDD)

Some Practical Aspects of Beta-Hydroxyethyl-2, 4-Dinitrophenyl-Disulfide Synthesis

Grupa tiolowa jest jednym z ważnych czynników struktury pierwszorzędowej peptydów i białek. Ze względu na polarne własności ma szereg cech determinujących nie tylko budowę, ale również wiele istotnych elementów określających biologiczne własności. Szereg dowodów wskazuje na to, że występuje ona w centrach aktywnych enzymów (12) i białek antygenowych (6). Skłania to wielu analityków do rozwiązania szeregu zagadnień metodycznych dotyczących określania grup tiolowych. Realizacji tego można dokonać na podstawie trzech sposobów: opierając się na różnych dwusiarczku utleniających grupy — SH (1, 4, 5, 10, 11, 14, 15), wykorzystując związki działające na zasadzie indywidualnych własności otrzymanych produktów reakcji (6, 8, 9, 12, 13, 16) oraz na podstawie pomiarów amperometrycznych (2). W naszym Zakładzie od szeregu lat rozwiązywany jest problem struktury pierwszorzędowej peptydów i niektórych antygenowych białek. Obecnie interesuje nas zagadnienie związane z określaniem grup tiolowych. Literatura, jak wspomniano, sugeruje szereg analitycznych propozycji. Zastanawiając się nad tym, można było dojść do wniosku, że najodpowiedniejsza będzie technika opracowana przez Bitnego (3, 4, 5) przy zastosowaniu dwusiarczku beta-hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowego (HEDD). Przypuszczano bowiem, że powyższy odczynnik może być łatwo dostępny na drodze syntezy. Jednak w trakcie syntezy HEDD spotkano się z wieloma trudnościami, ponieważ, niektóre wyjściowe związki otrzymywano opierając się na informacjach pochodzących sprzed kilkudziesięciu lat (18). Gdy pokonano źródłowe przeszkody okazało się, że niektóre przepisy są nieodtwarzalne. Zbierając całość zagadnienia przekonano się, że wobec dotychczasowego braku syntetycznego opracowania wskazane byłoby krótkie zestawienie wszystkich problemów związanych z syntezą HEDD, tym bardziej, że w trakcie realizacji wprowadzono szereg metodycznych usprawnień wiodących do zmniejszenia zużytych substancji wyjściowych oraz skrócenia czasu przeznaczanego do pełnej syntezy.

MATERIAŁY I METODY

Dwusiarczek beta-hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowy otrzymano z Wojakowskiego Instytutu Higieny i Epidemiologii (prof. dr Stanisław Bitny-Szlachto). Dalsze odczynniki pochodziły z Centrali Chemicznej — Gliwice i charakteryzowały się następującym stopniem czystości: wodorotlenek potasu cz.d.a., nadmanganian potasu cz.d.a., chlorek wapnia bezwodny cz.d.a., kwas siarkowy stężony cz.d.a., kwas solny stężony cz.d.a., pięciotlenek fosforu cz., pierwszorzędowy ortofosforan potasu cz.d.a., dwurzędowy ortofosforan sodu dwuwodny cz.d.a., parafina (brak danych), siarka krystaliczna cz., 2-merkaptoetanol cz., 2,4-dwunitrochlorobenzon cz.d.a., cysteiny chlorowodorek (brak danych) i alkohol etylowy 95% cz.d.a.

Pozostałe związki i odczynniki przygotowywano w następujący sposób: chlorek wapnia — każdorazowo przed bezpośrednim użyciem prażono na gazowym płomieniu w otwartym tyglu przez 6 godz. czterochlorek węgla — przed użyciem osuszano wyprazonym bezwodnym chlorkiem wapnia; siarkowódór — w kolbie płaskodennej ogrzewano gazowym palnikiem mieszaniną 300 g krystalicznej siarki i 100 g rozdrobnionej parafiny (17), a otrzymany siarkowódór przepuszczano przez płuczkę napełnioną wodą oraz rurkę z bezwodnym chlorkiem wapnia; kwaśny siarczek potasu — 5 g wodorotlenku potasu w 10 ml wody destylowanej i 190 ml 95% etanolu, nasycono siarkowodorem w temp. 0°C, kończąc ten proces z chwilą osiągnięcia stechiometrycznej równowagi wyrażającej się 3 g wzrostem ciężaru reagującej mieszaniny, chlor — do kolby ssawkowej zawierającej 100 g nadmanganianu potasu wprowadzano za pośrednictwem wkraplacza stężony kwas solny, po czym chlor oczyszczano i osuszano przepuszczając go kolejno przez stężony kwas siarkowy i pięciotlenek fosforu, bufor fosforanowy — pH — 6,85 — otrzymywano przez wymieszanie 52,2 ml 1/15 M drugorzędowego ortofosforanu sodu z 47,8 ml 1/15 M pierwszorzędowego ortofosforanu potasu, roztwór HEDD — 7 mg preparatu rozpuszczano w 1 ml 95% etanolu i uzupełniano buforem fosforanowym pH — 6,85 do 50 ml. Wysycenia siarkowodorem względnie chlorem dokonywano w szklanych zestawach zaopatrzonych w korki i węże gumowe. Do oddzielenia produktów stałych od płynnych stosowano lejek G-3, kolbę ssawkową oraz pompę wodną. Nadmiar rozpuszczalników organicznych usuwano pod próżnią na łaźni wodnej przy pomocy zestawu zaopatrzonego w szklane szlify. Temperaturę topnienia określano przy pomocy aparatu powszechnie stosowanego w laboratorium. Pomiarów absorbancji dokonano w 1 cm naczynkach kwarcowych przy pomocy spektrofotometru typ VSU-2P przy długości fali 408 nm.

BADANIA WŁASNE

S y n t e z a: 2,4-dwunitrotiofenol

7,5 g 2,4-dwunitrochlorobenzenu w 25 ml 95% etanolu o temp. 40°C wprowadzano do 200 ml świeżo otrzymanego alkoholowo-wodnego roztworu kwaśnego siarczku potasu. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie przenoszono ją do 500 ml wody destylowanej. Usuwano produkty uboczne nierozpuszczalne w wodzie poprzez sączenie pod próżnią. Roztwór zakwaszono stężonym kwasem solnym wobec papierka wskaźnikowego. 2,4-dwunitrotiofenol pod postacią żółtej drobno krystalicznej substancji oddzielano od rozpuszczalnika przy użyciu lejka i próżni. Po wysuszeniu przez 48 godz. nad pięciotlenkiem fosforu w temperaturze pokojowej 2,4-dwunitrotiofenol służył jako substrat do dalszej syntezy (wydajność 87,7%).

S y n t e z a: chlorek 2,4-dwunitrosulfeniowy

Nasycano gazowym chlorem 6,5 g 2,4-dwunitrotiofenolu zawieszonego w 100 ml czterochlorku węgla i ogrzewano do wrzenia na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Proces kończono po jednej godzinie, tj. najczęściej w momencie, gdy z mieszaniny reakcyjnej zaczął wydzielać się wolny chlor oraz gdy nastąpiło wyraźne roztworzenie substratu. Na gorąco przesączano odrzucając część nierozpuszczalną. Z roztworu usuwano pod zmniejszonym ciśnieniem nadmiar rozpuszczalnika. Destylację przerywano, gdy pojawiły się pierwsze kryształki chlorku 2,4-dwunitrosulfeniowego. Po oddzieleniu suszono produkt przez dwa dni w próżni nad pięciotlenkiem fosforu w temperaturze pokojowej (wydajność 40,7%).

S y n t e z a: dwusiarek beta-hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowy

2 g chlorku 2,4-dwunitrosulfeniowego zawieszano w 15 ml 95% etanolu i dodawano 0,8 g 2-merkaptioetanolu. Po 5 minutach reakcja przebiegała do końca. Krystalizację inicjowano przy pomocy szklanej bagietki. Po godzinie oddzielano surowy produkt z mieszaniny oziębionej do 0°C. W dalszej kolejności rozpuszczano go na gorąco w 25 ml 95% etanolu oraz dodawano 0,2 g węgla aktywnego i ogrzewano przez 15 min. Ostateczną krystalizację przeprowadzano z roztworu w temperaturze pokojowej po uprzednim usunięciu węgla. Otrzymane kryształki miały postać żółtych igieł (temperatura topnienia 105—106°C, wydajność 85,1%).

Porównawcze określenie przebiegu reakcji między cysteiną a otrzymanym — i wzorcowym — HEDD

1 ml wodnego roztworu cysteiny (5 µg/ml) mieszano z 3 ml roztworu HEDD — otrzymanego na drodze syntezy w buforze fosforanowym pH — 6,85. Jednocześnie przygotowywano w identyczny sposób mieszaninę składającą się z roztworu cysteiny i HEDD — wzorcowego. Odczytów adsorbancji dokonywano przy 408 nm w różnych odstępach czasu wobec ślepej próby składającej się z 1 ml wody i 3 ml roztworu kolejnych obu wspomnianych preparatów HEDD. Zmierzone absorbancje oraz okresy wykonywanych pomiarów ilustruje tab. 1.

Tab. 1. Przebieg reakcji pomiędzy cysteiną i HEDD ustalony na podstawie zmierzonej absorbancji w różnych okresach czasu. A_1 i A_2 — absorbancja dla: otrzymanego- i wzorcowego-HEDD, t — czas w minutach

The process of reaction between cysteine and HEDD ascertained on the basis of measured absorbances in various periods of time. A_1 and A_2 — absorbance for obtained- and standard-HEDD, t — time in minutes

t	A_1	A_2
1	0,40	0,40
2	0,48	0,48
4	0,55	0,55
6	0,58	0,58
8	0,59	0,59
10	0,59	0,59
12	0,59	0,59
20	0,59	0,59
30	0,59	0,59

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy poszczególnych etapach syntezy dwusiarczku beta-hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowego (HEDD) wprowadzono szereg zmian, które stanowią uzupełnienie cytowanych syntez tego odczynnika (3, 7, 18). Przy preparatyce kwaśnego siarczku potasu zastosowano siarkowódór, który pochodził z reakcji siarki krystalicznej i parafiny. Tą drogą wyeliminowano kłopotliwe w użyciu aparaty Kippa i trudno już dziś dostępny piryt. Ów sposób otrzymywania miał jeszcze tę dobrą stronę, że nie występowały pary chlorowodoru, które w mieszaninie reakcyjnej mogłyby tworzyć duże ilości chlorku potasu zanieczyszczającego główny produkt. Przy zastosowaniu siarkowodoru „parafinowego” eliminowano w zasadniczy sposób tworzenie się ubocznych produktów. Ten moment był istotny, bo gdy użyto kwaśnego siarczku potasu z chlorkiem potasu i bez, to zauważono, że wydajność procesu syntezy 2,4-dwunitrofenolu wzrastała z 62,2 do 87,7%.

Przy otrzymywaniu kwaśnego siarczku potasu zwrócono uwagę na dokładność ustalenia momentu ukończenia reakcji na zasadzie kontrolnych wazżeń. W przypadku zbyt długo trwałego nasycania tworzył się siarczek obojętny, a nawet zauważono siarkę koloidalną kłopotliwą do usunięcia. Przy zakwaszaniu bezpośrednio po otrzymaniu 2,4-dwunitrofenolu stwierdzono, że kwas siarkowy nie był odpowiedni do tego (18). Natomiast zastosowanie kwasu solnego pozwoliło szybciej i łatwiej oddzielić uboczne produkty. Zauważono, że sposób chlorowania miał wpływ na wydajność chlorku 2,4-dwunitrosulfoniowego. Zwrócono szczególną uwagę na odpowiedni moment ukończenia wysycania, bowiem zlekceważenie go na tym etapie syntezy prowadziło by do dużych strat.

Ostateczny produkt syntezy poddawano sprawdzeniu. Podstawą było porównanie go z wzorcowym — HEDD. W tab. 1 zilustrowano wyniki pomiarów. Okazało się, że gdy w tych samych warunkach przeprowadzone odczyty, miały identyczne wyniki. Ten moment stał się istotnym potwierdzeniem przydatności otrzymanego odczynnika do określania grup tiolowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Barnett R., Seligman A.: *Science*, **116**, 323—327, 1952.
2. Benesch R., Lardy H., Benesch R.: *J. Biol. Chem.*, **216**, 663—676, 1955.
3. Bitny-Szlachto S.: *Acta Pol. Pharm.*, **17**, 373—385, 1960.
4. Bitny-Szlachto S.: *Acta Pol. Pharm.*, **17**, 433—438, 1960.
5. Bitny-Szlachto S.; Kosiński J., Niedzielska M.; *Acta Pol. Pharm.*, **20**, 365—371, 1963.
6. Bizini B., Blass J., Turpin A., Raynaud M.: *Eur. J. Biochem.*, **17**, 100—105, 1970.
7. Boehme H., Stachel H.: *Zeit. Anal. Chem.*, **154**, 27—28, 1957.
8. Boyer P.: *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4331—4337, 1954.
9. Bresler S.: *Wstęp do biologii molekularnej*, 159—172, Warszawa 1972.
10. Ellman G.: *Arch. Bioch. Bioph.*, **74**, 443—450, 1958.
11. Ellman G.: *Arch. Bioch. Bioph.*, **82**, 70—77, 1959.
12. Kąkol J.: *Grupy tiolowe miozyny a jej struktura i funkcje*, 19—43, PWN, Warszawa 1972.
13. Kimnura M., Kielley W.: *Biochem. Zeitschr.*, **345**, 188—200, 1966.
14. Klotz J., Ayers J., Ho J., Hohorowitz M., Heiney H.: *Am. Chem. Soc.*, **80**, 2132—2141, 1958.
15. Robyt J., Ackerman R., Chittenden C.: *Arch. Bioch. Bioph.*, **147**, 262—269, 1971.
16. Spector A., Zorn M.: *Biol. Chem.*, **242**, 3594—3600, 1967.
17. Supniewski J.: *Preparatyka nieorganiczna*, 190—193, PWN Warszawa 1958.
18. Wilgerodt C.: *Ber.*, **17**, 352—353, 1884.

РЕЗЮМЕ

В сжатой форме собрано способы получения дисульфида бета-гидроксиэтило-2,4-динитрофенолового вместе с модификацией некоторых этапов синтеза этого явления. Конечный продукт проявил черты, которые дают возможность применить его к обозначению тиоловых групп.

SUMMARY

Short descriptions concerning the method of obtaining beta-hydroxyethyl-2,4-dinitrophenyl-disulfide have been gathered and some stages of the synthesis of this compound have been modified. The final product can be used to determine the sulfhydryl groups.

