



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

233 134

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 11 07 83

(21) (PV 5254-83)

(51) Int. Cl. C 12 P 19/02

(40) Zverejnené 17 07 84
(45) Vydané 01 01 87

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘI ing. CSc., LEHNICE,
KOČÁR ŠTEFAN RNDr. CSc., BRATISLAVA,
KOLINA JOSEF ing. CSc., PRAHA

(54) Spôsob prípravy /U-¹⁴C/ D-fruktózy o vysokej mólovej aktivite

Vynález sa týka oboru biochémie, chémie sacharidov, ako aj lekárskej a potravinárskej chémie.

Vynález rieši prípravu /U-¹⁴C/ D-fruktózy o vysokej mólovej aktivite, pre štúdium metabolizmu sacharidov, ako aj pre teoretické štúdiá v oblasti chémie a biochémie sacharidov.

Uvedeného účelu sa dosiahne tým, že /U-¹⁴C/ D-glukóza sa transformuje pôsobením enzýmu xylóza izomerázy v rozpustnom alebo imobilizovanom stave alebo ako súčasti imobilizovaných buniek a reakčná zmes sa chromatograficky rozdelí.

Vynález má použitie predovšetkým pri príprave /U-¹⁴C/ fruktózy ako čistej chemikálie, vhodnej pre štúdiá metabolizmu sacharidov, ako aj pre teoretické štúdium v oblasti chémie a biochémie sacharidov a tiež v lekárskom výskume a farmaceutickom priemysle.

Oprava ve vytištěných popisech vynálezů

V popise vynálezu k autorskému osvědčení č. 233 134 ~~XXXXXX~~ (PV 5254-83),
je chybně vytištěno jméno druhého autora vynálezu.

Správně: KUČÁR ŠTEFAN RNDr., CSc., BRATISLAVA

Tisk
C/1

Vynález sa týka spôsobu prípravy $/U-^{14}C/$ D-fruktózy o vysokej mólovej aktivite.

Obvyklou metódou prípravy $/U-^{14}C/$ D-fruktózy je inverzia rádioaktívnej sacharózy v slabo kyslom prostredí (Čs. patent 121 808), prípadne transformácia $/U-^{14}C/$ D-glukózy s nasýteným roztokom hydroxidu vápenatého (Čs. AO 181 475) alebo transformácia $/U-^{14}C/$ D-glukózy pôsobením roztoku hlinitanu sodného (Čs. AO 187 109). Príprava $/U-^{14}C/$ D-fruktózy z $/U-^{14}C/$ sacharózy je neekonomické pre nízky obsah sacharózy v riasach, ako východiskom biologickom materiáli pre prípravu značených sacharidov. Pri chemických transformáciách aldóz a ketóz je pomerne značný záchyt značených sacharidov rádionuklidom ^{14}C v precipitátoch, čím sa znižuje výťažok $/U-^{14}C/$ D-fruktózy. Technicky obťažným stupňom je ďalej aj vymývanie vzniknutých zrazenín vodou dovtedy, dokiaľ do filtrátu prechádza rádioaktivita. Z hľadiska výťažku, ďalšie straty sacharidov značených rádionuklidom ^{14}C vznikajú pri odsolovaní reakčnej zmesi na iontomeničoch.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy $/U-^{14}C/$ D-fruktózy o vysokej mólovej aktivite podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že $/U-^{14}C/$ D-glukóza sa transformuje pôsobením xylóza izomerázy v rozpustnom alebo imobilizovanom stave, alebo vo forme súčasti imobilizovaných buniek a reakčná zmes sa chromatograficky rozdelí.

Po ukončení reakcie katalyzovanej xylóza izomerázou (EC 5.3.1.5) reakčná zmes obsahuje $/U-^{14}C/$ D-glukózu a $/U-^{14}C/$ D-fruktózu v molárnom pomere cca 1 : 1. Výhodou navrhovaného postupu je jeho jednoduchosť, možnosť prípravy rádioaktívneho preparátu o vysokej špecifickej aktivite a možnosť spätnej kvantitatívnej izolácie nezreagovanej $/U-^{14}C/$ D-glukózy.

Príklad 1

10 mg $/U-^{14}C/$ D-glukózy o aktivite 248 MBq (6,7 mCi), mólová aktivita 4440 MBq (120 mCi) nmól sa rozpustí v 0,2 ml tlmivého roztoku Tris-(hydroxymetyl)-aminometan-hydrochlorid 20 mmol/l o pH 8,0, obsahujúcom 0,1 mol heptahydrát síranu horečnatého a 1 mmol hexahydrát chloridu kobaltnatého a enzým xylóza izomérázu (ex *Wingea robertsii*) 60 nkat. Inkubácia prebiehala po dobu 12 h pri teplote 70°C. Reakčná zmes sa potom naniesla na chromatografický papier (Whatman 3MM) a eluovala sa v zostupnom usporiadaní v systéme 2-butanon nasýtený vodou, resp. octan etylnatý-2-propanol-voda (6 : 2 : 1). Po rozdelení reakčnej zmesi sa jednotlivé zóny prislúchajúce čistej $/U-^{14}C/$ D-glukóze a $/U-^{14}C/$ D-fruktóze eluovali destilovanou vodou. Získalo sa 4,8 mg D-fruktózy o celkovej aktivite 120 MBq a 5,2 mg $/U-^{14}C/$ D-fruktózy o celkovej aktivite 128 MBq. Rádiochemická čistota preparátov bola vyššia ako 98 %, kontrolované pomocou papierovej chromatografie v systémoch 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5) a 1-butanol - 1-propanol - amoniak - voda (7 : 5 : 7 : 2).

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto vodorozpuštného enzýmu (ex *Wingea robertsii*) sa použije imobilizovaná xylóza izoméráza (ex *Streptomyces violaceus*), imobilizované v sieťovanom polyetylénimíne o celkovej aktivite 63 nkal (per 85 mg). Výťažok $/U-^{14}C/$ D-fruktózy bol 50 % pri reakčnej dobe 6 hodín.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že k transformácii $/U-^{14}C/$ sa použijú celé bunky *Wingea robertsii*, permeabilizované po dobu 5 min toluenom pri teplote 70 °C. Xylóza izomérázová aktivita buniek imobilizovaných v sieťovanej celulóze a impregnovanej sieťovaným polyetylénimínom bola 0,71 nkat/mg. Celkový objem reakčnej zmesi bol 0,7 ml, pričom imobilizovaných buniek *Wingea robertsii* sa použilo 100 mg. Reakčná zmes obsahovala 46 % $/U-^{14}C/$ D-fruktózy a 54 % $/U-^{14}C/$ D-glukózy a imobilizované bunky *Wingea robertsii* boli použiteľné ku katalýze izomérázovej reakcie 45 násobne.

Vynález môže nájsť široké uplatnenie pri výrobe $/U-^{14}C/$ D-fruktózy a pri štúdiu metabolizmu sacharidov, ako aj pre teoretické štúdie chémie a biochémie sacharidov a tiež v lekárskom výskume a farmaceutickom priemysle.

Spôsob prípravy $/U-^{14}C/$ D-fruktózy o vysokej mólovej aktivity vyznačujúci sa tým, že $/U-^{14}C/$ D-glukóza sa transformuje pôsobením enzýmu xylózo izamerázy v rozpustnom alebo imobilizovanom stave alebo ako súčasti imobilizovaných buniek a reakčná zmes sa chromatograficky rozdelí.