

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208440

(11)

(B1)



(51) Int. Cl.³

C 07 D 493/12

G 01 N 33/16

op. 601 N 33/56

C 07 D 493/12

(22) Přihlášeno 10 01 80

(21) (PV 227-80)

(40) Zveřejněno 31 12 80

(45) Vydáno 01 12 83

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(75)

Autor vynálezu

VEREŠ KAREL doc. RNDr. CSc., PRAHA
DOLEŽALOVÁ VLADIMÍRA RNDr. CSc., BRNO a
PÍCHOVÁ DRAHOMÍRA MVDr. CSc., PRAHA

(54) Amidické deriváty (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁ značené izotopem ¹²⁵I a způsob jejich přípravy

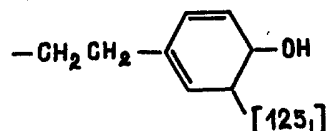
Vynález se týká amidických derivátů (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁ značených izotopem ¹²⁵I a způsobu jejich přípravy.

Uvedené látky našly použití v radioimunologické analýze (RIA) jako radioligandy při stanovení aflatoxinů v biologických materiálech.

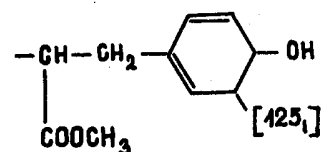
Chemické sloučeniny podle vynálezu jsou nové a nebyly dosud připraveny. Látky podobného amidického typu jsou známy z chemie steroidních hormonů jako je na příklad ¹²⁵I-tyramid 6-(0-karboxymethyl)oximu 17β-estradiolu (Lindberg P., Edquist L. E., Clin. Chim. Acta **53**, 169 (1974) nebo ¹²⁵I-tyramid 3-(0-karboxymethyl)oximu progesteronu (Allen R. M., Redshaw M. R., Steroids **32** (4) 467, (1978)) a sloužily jako radioligandy při stanovení těchto látek radioimunoanalýsou.

Podstatou vynálezu jsou nové látky, amidické deriváty (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁ značené izotopem ¹²⁵I obecného vzorce I.

kde R je

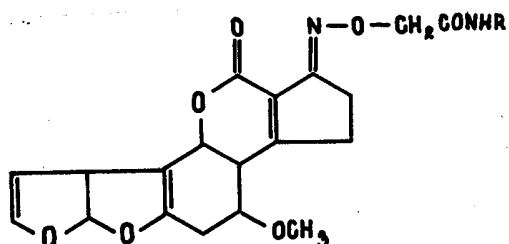


nebo



a způsob jejich přípravy vyznačený tím, že (0-karboxymethyl)oxim aflatoxinu-B₁ se kondensuje s aromatickým aminem při teplotě -5 až +5 °C, načež se získaný amid při pH 7 až 8 joduje jodidem sodným ¹²⁵I za přítomnosti chloraminu T nebo chloraminu B. Jedná se o dvě nové látky se strukturou vyznačenou v obecném vzorci (I).

Přípravu výchozí látky, (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁, popsali J. J. Langone a H. Van Vunakisová [J. Nat. Cancer Inst. **56** (3), 591, (1976)]. Kondensaci tohoto oximu s aromatickým aminem, jako je tyramin nebo methylester tyrosinu lze provést metodou aktivních esterů, nebo směsí anhydridů nebo použitím karbodiimidů.



(I)

Takto získaný amidický derivát se podrobí jodaci jodidem sodným- ^{125}I při pH 7 až 8 za teploty místnosti a použití chloraminu-T nebo chloraminu-B. Za těchto podmínek nedochází k jodaci vlastní molekuly aflatoxinu- B_1 a při použití beznosičového jodidu sodného- ^{125}I se dá získat preparát o specifické aktivitě 7400 až $8880 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$, který má shodné imunologické vlastnosti jako aflatoxin- B_1 a proto se dá výhodně použít jako radioligand při stanovení aflatoxinů radioimunologickou analýsou.

Dále jsou uvedeny příklady přípravy amidických derivátů podle vynálezu.

Příklad 1

Příprava 3- ^{125}I /(α -methoxykarbonyl)L-tyramidu (O-karboxymethyl)oximu aflatoxinu- B_1 .

Kondensace:

Do roztoku 1,5 ml absolutního tetrahydrofuranu, obsahujícího 11 mg (30 μmol) (O-karboxymethyl)oximu aflatoxinu- B_1 se přidá roztok 7 mg (40 μmol) tributylaminu rozpuštěného v 0,1 ml absolutního tetrahydrofuranu a po ochlazení v ledové lázni se přidá 4 mg (33 μmol) chloromravenčanu sek.-butylnatého rozpuštěného v 0,1 ml absolutního tetrahydrofuranu. Reakční směs se udržuje v ledové lázni 20 minut za občasného protřepání a poté se přikape roztok 7,6 mg (33 μmol) L-tyrosin methylesterhydrochloridu ve 2 ml směsi tetrahydrofuran : voda = 1 : 1. Hodnota pH roztoku se nastaví na 8 až 9 asi 10 mg tributylaminu a reakční směs se nechá stát 16 hodin v lednici při $+4^\circ\text{C}$. Tetrahydrofuran se poté odpaří do sucha za sníženého tlaku, zbytek rozpuští asi 5 ml chloroformu a vytřepá nejdříve 5 ml 3% kyseliny chlorovodíkové, potom 5 ml 5% roztoku hydrogenuhlíčitanu sodného a nakonec stejným objemem vody. Oddělená chloroformová vrstva se vysuší malým množstvím síranu hořečnatého. Po odpaření chloroformu do sucha za sníženého tlaku se zbytek podrobí chromatografii na sloupci z 1 g silikagelu.

Produkt ze sloupce se vymývá chloroformem, jímány jsou frakce o objemu 2 ml. Spojené frakce č. 6 až 14 poskytnou po odpaření rozpouštědla 12 mg produktu, který je nažloutlá látka, netající do 320°C , nerozpustná ve vodě, rozpustná ve většině organických rozpouštědlech.

Kontrola čistoty se provádí chromatografií na tenké vrstvě v soustavě $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 88 : 14 : 1,5$. Hodnoty R_f na desce Silufol (Kavalír, ČSSR) : produkt 0,5; výchozí látka 0,3; aflatoxin- B_1 0,6.

Důkaz složení derivátu:

1 mg produktu byl hydrolyzován zahříváním v zatavené trubici s 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové na 100°C 6 h a v hydrolyzátu dokázán tyrosin chromatograficky. Látka vykazuje výrazné maximum absorpce při 268 a 360 nm (pH 7; CH_3OH).

Jodace:

Do 5 ml zkumavky se postupně přidá roztok 3 μg produktu připraveného shora popsaným způsobem, rozpuštěným v 10 μl dioxanu, 10 μl fosfátového pufru, (0,05 M; pH 7,4), 20 μl roztoku $\text{Na } ^{125}\text{I}$ o radioaktivitě cca $37 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ a 20 μl 0,5% chloraminu-T v uvedeném pufru. Obsah baňky se jednu minutu intenzivně míchá pomocí vibrační třepačky a poté se přidá 20 μl 0,5 % hydrosiřičitanu sodného ve stejném pufru. Produkt se z vodného roztoku extrahuje dvakrát 100 μl ethylacetátu a poté se podrobí preparativní chromatografii na tenké vrstvě (Silufol, ČSSR) v soustavě $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 9 : 1 : 0,1$.

Radioaktivní jodderivát má o něco vyšší R_f než výchozí látka a jeho poloha se zjišťuje jednak v UV světle jednak autoradiografií. (Doba expozice při popsané radioaktivitě a při použití běžného rentgenového filmu 3 až 5 minut). Preparát se nyní vymyje z takto zjištěného pruhu tenkovrstevné folie 2-3 ml methanolu.

Získá se aktivita $(1110 \text{ až } 1480) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ preparátu značeného radioizotopem ^{125}I .

Příklad 2

Příprava 3- ^{125}I /tyramidu (O-karboxymethyl)oximu aflatoxinu- B_1 .

Kondenzace:

Způsobem uvedený v příkladu 1 se nechá reagovat 60 mg (O-karboxymethyl)oximu aflatoxinu- B_1 s 25 mg chloromravenčanu sek.-butylnatého za přítomnosti 30 mg tributylaminu ve 4 ml tetrahydrofuranu a tento roztok se vnese do roztoku 30 mg hydrochloridu tyraminu, 60 až 100 mg tributylaminu ve 4 ml směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 1 : 1.

Jodace a čištění se provádí opět stejným způsobem, produkt je vymýván ze sloupce silikagelem směsí $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$.

Získá se 52 mg světležluté pevné látky, která má obdobné fyzikálněchemické vlastnosti jako předchozí derivát (z příkladu 1).

Kontrola čistoty se provádí stejným způsobem, hodnota $R_f = 0,4$.

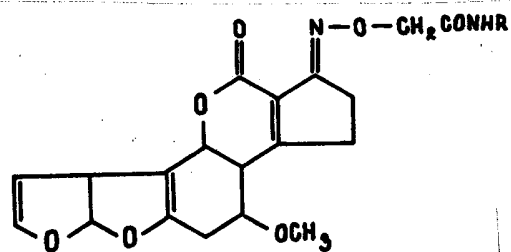
Důkaz složení derivátu:

Po hydrolyse vzorku, provedené způsobem podle příkladu 1 se tyramin dokazuje chromatograficky. Látka poskytuje hnědooranžové zabarvení s roztokem chloridu železitého a vykazuje rovněž výrazné maximum UV absorpce při 268 a 360 nm (pH 7; CH_3OH).

Jodace:

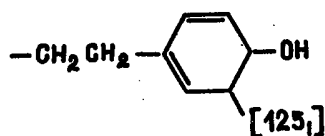
Jodace se provádí použitím 3 μg tyramidu v 10 μl dioxanu a 10 až 20 μl (asi $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) roztoku beznosičového jodidu sodného způsobem popsaným v příkladu 1. aktivita $(1110 \text{ až } 1480) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ^{125}I -tyramidu (O-karboxymethyl)-oximu aflatoxinu- B_1 .

1. Amidické deriváty (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁ značené izotopem ¹²⁵I obecného vzorce



2. Způsob přípravy amidických derivátů obecného vzorce I podle bodu 1 vyznačený tím, že (0-karboxymethyl)oximu aflatoxinu-B₁ se kondenzuje s aromatickým aminem při teplotě -5 až +5°C, načež se získaný amid při pH 7 až 8 joduje jodidem sodným-¹²⁵I za přítomnosti chloraminu-T nebo chloraminu-B.

kde R je



nebo

