



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

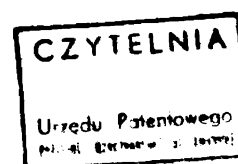
Zgłoszono: 87 04 24 (P. 265354)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 88 11 10

Opis patentowy opublikowano: 90 04 30

Int. Cl.⁴ C07B 59/00



Twórcy wynalazku: Marian Kuczek, Aleksander Franciszek Sikorski

Uprawniony z patentu: Akademia Medyczna,
Wrocław (Polska)

Sposób wytwarzania 4-J¹²⁵-jodofenyloizotiocyjanianu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 4-J¹²⁵-jodofenyloizotiocyjanianu znajdującego zastosowanie jako grupowo swoisty odczynnik do znakowania centrów hydrofobowych w białkach lub do analizy sekwencji aminokwasów w białkach.

Związek ten jest związkiem nowym, nigdzie w literaturze nie opisanym. Ze stosowania znany jest 4-jodofenyloizotiocyjanian jako grupowo swoisty odczynnik do znakowania centrów hydrofobowych w białkach.

Z grupy odczynników o wymienionym przeznaczeniu znany jest fenyloizotiocyjanian C¹⁴ firmy Jscommerz z NRD. Jako odczynnik hydrofobowy jest on znacznie mniej swoisty od 4-jodofenyloizotiocyjanianu.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania 4-J¹²⁵-jodofenyloizotiocyjanianu.

Istota wynalazku polega na tym, że 4-nitroanilinę diazuje się azotynem sodowym w obecności kwasu solnego, a otrzymany roztwór chlorku 4-nitrofenylodiazoniowego miesza się z jodkiem potasowym z dodatkiem jodku sodowego J¹²⁵, po czym zawiesinę alkalizuje się i otrzymany 4-J¹²⁵-jodonitrobenzen redukuje się podsiarczynem sodowym. Otrzymaną 4-J¹²⁵-jodoanilinę ekstrahuje się chloroformem i uzyskany ekstrakt chloroformowy poddaje się reakcji z tiofosgenem, otrzymując 4-J¹²⁵-jodofenyloizotiocyjanian, który oczyszcza się za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, eluując heksanem i zbierając frakcję o R_f 0,5.

Nie jest możliwa wymiana jodu niepromieniotwórczego, zimnego, na jod¹²⁵ jak i na inny izotop promieniotwórczy w jodofenyloizotiocyjanianie, nie jest też możliwa reakcja podstawienia wodoru w fenyloizotiocyjanianie. Wyprowadzenie jodu promieniotwórczego okazało się możliwe przez dodanie soli jodu¹²⁵ w mieszaninie z solą jodu zimnego, naturalnych izotopów, do roztworu chlorku 4-nitrofenylodiazoniowego. W ten sposób można uzyskać trwałe znakowanie związku jodem 125 i w dalszych reakcjach, po redukcji i reakcji z tiofosgenem, otrzymać 4-125-jodofenyloizotiocyjanian.

Otrzymany sposobem według wynalazku nowy związek 4-¹²⁵-jodofenyloizotiocyjanian znacznie podnosi czułość stosowanych metod analitycznych w porównaniu do analiz wykonanych z

użyciem tylko samego 4-jodofenyloizotiocyanianu. Znakowanie jodem-125 jest trwałe w warunkach degradacji białka, co umożliwia zastosowanie tego odczynnika także do analizy sekwencji aminokwasów. Natomiast zastosowanie odczynnika zawierającego promieniotwórczy izotop jodu zamiast izotopu węgla C^{14} , zawartego w fenyloizotiocyanianie C^{14} , zmniejsza zagrożenie wynikające z ewentualnego skażenia promieniotwórczego, ze względu na stosunkowo krótki czas półtrwania jodu 125 , wynoszący 60,2 dni, w porównaniu do 5730 lat dla węgla C^{14} . Koszt otrzymanego w ten sposób odczynnika jest znacznie niższy od fenyloizotiocyanianu C^{14} .

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładzie wykonania.

Przykład. 138 mg (1 mmol) 4-nitroaniliny, $0,5\text{ cm}^3$ stężonego kwasu solnego i 2 cm^3 wody miesza się i po rozpuszczeniu składników ochładza w łaźni lodowej, po czym dodaje $0,98\text{ cm}^3$ (0,98 mmola) roztworu azotynu sodowego i nadal miesza przez 20 minut w łaźni lodowej, a następnie dodaje 1 cm^3 (1 mmol) roztworu jodku potasowego z dodatkiem $0,01\text{ cm}^3$ roztworu jodku sodowego $J^{125}/37\text{ MBq}$ bez nośnika, produkcji Instytut Badań Jądrowych w Świerku. Składniki miesza się przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym zawiesinę alkaliczuje się przez dodanie $1,2\text{ cm}^3$ (6 mmoli) roztworu wodorotlenku sodowego. Następnie do zawiesiny dodaje się 5 cm^3 etanolu i ogrzewa na łaźni wodnej, dodając przy ciągłym mieszaniu 0,8 g podsiarczynu sodowego porcjami po około 0,1 g, a następnie chłodzi do temperatury pokojowej otrzymaną zawiesinę i poddaje trzykrotnej ekstrakcji za pomocą 3 cm^3 chloroformu. Otrzymany ekstrakt chloroformowy przemywa się wodą w ilości 5 cm^3 i następnie ponownie dodaje 5 cm^3 wody oraz $0,07\text{ cm}^3$ tiofosgeny. Po 5 minutach wstrząsania fazą chloroformową oddziela się i odparowuje na wyparce obrotowej. Pozostałość rozpuszcza się w 2 cm^3 heksanu i nanosi na kolumnę chromatograficzną z żel krzemionkowym o wymiarach $1,5 \times 12\text{ cm}$. Kolumnę eluuje się heksanem zbierając frakcję o Rf 0,5-żel krzemionkowy/heksan. Otrzymuje się 80 mg 4- J^{125} -jodofenyloizotiocyanianu o aktywności $7,5 \times 10^{12}\text{ dpm/mol}$, z wydajnością równą około 30% wydajności teoretycznej.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania 4- J^{125} -jodofenyloizotiocyanianu, **znamienny tym**, że 4-nitroanilinę diazuje się azotynem sodowym w obecności kwasu solnego, a otrzymany roztwór chlorku 4-nitrofenyldiazoniowego miesza się z jodkiem potasowym z dodatkiem jodku sodowego J^{125} , po czym zawiesinę alkaliczuje się i otrzymany 4- J^{125} -jodonitrobenzen redukuje się podsiarczynem sodowym, natomiast otrzymaną 4- J^{125} -jodoanilinę ekstrahuje się chloroformem i uzyskany ekstrakt chloroformowy poddaje reakcji z tiofosgenem, otrzymując 4- J^{125} -jodofenyloizotiocyanian, który oczyszcza się za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, eluuując heksanem i zbierając frakcję o Rf 0,5.