



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231498

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 5/06

/22/ Přihlášeno 05 07 83
/21/ /PV 5097-83/

(41) Zveřejněno 15 03 84

(45) Vydáno 15 06 86

(75)

Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioizotopem ^{14}C
nebo stabilním izotopem ^{13}C

Vynález se týká způsobu přípravy D-glukosaminu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C .

Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že značená D-fruktóza se uvede v reakci s methanolickým nebo ethanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C, s výhodou při teplotě 18 až 24 °C po dobu 15 až 18 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti jednoho nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu salicylovou, kyselinu gallovou, kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, výhodně v celkovém množství 0,03 až 0,09 mmol na 1 mg výchozí D-fruktózy.

Vynález řeší způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C .

D-glukosamin patří k významným přírodním látkám. Je součástí polysacharidů charakteristických pro koryšce, hmyz a některé houby, vyskytuje se v glykoproteinech, lipopolysacharidech a antibiotikách. Tvoří základ skeletu kyseliny muramové, obsažené v polysacharidech bakteriálních stěn, je součástí kyseliny neuraminové v mucinech, kyseliny hyaluronové a jiných látek. D-glukosamin značený isotopy uhlíku je mimořádně důležitý zejména při biochemických a imunochemických studiích.

Zdrojem D-glukosaminu jsou přírodní látky /např. chitin/, z nichž se izoluje po hydrolyze, zejména ve formě funkčních derivátů (Stacey M., Webber J. M.: *Methods Carbohydr. Chem.* 1, 228 /1962/). Tyto cesty přípravy praktickým významem výrazně převyšují syntetické postupy.

I když je známa řada metod přípravy aminocukrů, použitelných i pro přípravu D-glukosaminu /Pigman W., Horton D., Wander J. D.: *The Carbohydrates*, Academic Press, New York 1980/, jako jsou kyanhydrinová syntéza, redukce nitroderivátů po nitrometanové syntéze, štěpení oxiranových kruhů, substituce sulfoesterů, oxyaminace dvojné vazby nebo redukce dusíkatých kondenzačních produktů glykosulos (uplatnitelná i u polysacharidů jako tzv. aminace amylosy, viz Wolfrom M. L., Wang P. Y.: *Carbohydr. Res.* 18, 23 /1971/) jsou to postupy pro přípravu tak základního aminocukru, jako je D-glukosamin, příliš komplikované a ekonomicky nevýhodné, neboť výchozí látky těchto syntéz jsou téměř vesměs nedostupnější, než samotný D-glukosamin.

Tyto postupy by byly o to nevýhodnější s ohledem na práci s malými kvanty při přípravě značeného D-glukosaminu.

V praxi je pochopitelná tendence používat co nejdostupnější suroviny v jednodušších procesech. Z tohoto hlediska v podstatě jedinou využitelnou cestou přípravy D-glukosaminu jsou přesmyky glykosylaminů a aminoketos /Amadoriho a Heynsův/ /Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J.: *Monosacharidy*, NČSAV, Praha 1960/.

Tak byla popsána příprava D-glukosaminu reakcí D-fruktosy s kapalným amoniakem v autoklávu při teplotě 100°C v přítomnosti nebo bez přítomnosti katalyzátoru /chloridu nebo octanu amonného/ /patentový spis USA 2 884 411/. Součástí téhož patentového spisu jsou příklady přípravy D-glukosaminu z D-fruktosy nebo D-glukosy a vodného amoniaku při teplotě varu za normálního tlaku.

V dalším případě je výchozí látkou pro přípravu D-glukosaminu 1-amino-1-deoxy-D-fruktosa, která se uvede v reakci s kapalným amoniakem v autoklávu buď při 95 až 105°C nebo při teplotě místnosti /patentový spis USA 2 918 462/.

Výtěžky D-glukosaminu při přípravě z D-fruktosy a kapalného amoniaku jsou v citovaných patentových spisech udávány v rozmezí 19 až 24 %, přičemž ve vodném prostředí a zejména v případě přípravy z D-glukosy klesají. Výhodnější je v tomto ohledu využití 1-amino-1-deoxy-D-fruktosy, komplikujícím faktorem je ale příprava této výchozí látky.

Mimo uvedenou patentovou literaturu je o syntetickou přípravu D-glukosaminu minimální zájem. Z dostupných zdrojů lze uvést práci popisující dvoustupňovou přípravu D-glukosaminu z D-fruktosy reakcí s metanolickým amoniakem při teplotě místnosti v přítomnosti chloridu amonného (Heyns K., Paulsen H., Eichstedt R., Rolle M.: *Chem. Ber.* 90, 2 039 /1957/), přičemž D-glukosamin má vznikat během druhého, odděleného stupně reakce po odstranění amoniaku a přidavku kyseliny jantarové při teplotě 4°C . D-glukosamin, ve výtěžku 12 %, vzniká zřejmě cestou Heynsova přesmyku (Heyns K., Koch W.: *Z. Naturforsch.* 70, 486 /1952/, Heyns K., Eichstedt R., Meinecke K.-H.: *Chem. Ber.* 90, 2 039 /1955/, Carson J. F.: *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 3 728 /1956/).

Výtěžek je ovšem pro preparativní využití málo uspokojivý.

Postupy, které jsou uváděny v dostupných literárních pramenech, splňují vždy jen některý z požadavků, významných pro přípravu značeného D-glukosaminu. Společným nedostatkem postupů, které by vyhovovaly jednoduchosti včetně dostupnosti výchozí látky je nižší výtěžnost. Při práci ve vodném prostředí nebo při vyšších teplotách a tlacích je průběh reakcí složitější, přibývá vedlejších produktů /hnědnutí reakčních směsí/ a omezuje se možnost regenerace výchozí látky a tím zvyšuje ztrátovost, což je obzvláště nežádoucí při přípravě izotopy značených sloučenin.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C , jehož podstata spočívá v tom, že D-fruktosa se uvede v reakci s methanolickým nebo ethanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0°C , s výhodou při teplotě 18 až 24°C po dobu 15 až 18 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti jednoho nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu benzoovou, kyselinu salicylovou, kyselinu gallovou, kyselinu jantarovou a kyselinu glutarovou, výhodně v celkovém množství $0,03$ až $0,09$ mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

Do reakční směsi se může přidat chlorid amonný, s výhodou v množství $0,008$ až $0,025$ mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

Provádí-li se reakce v přítomnosti chloridu amonného, může se katalyzátor, vybraný ze skupiny kyselin, přidat až v jejím průběhu, s výhodou po 8 až 10 dnech.

Výhodou tohoto způsobu přípravy D-glukosaminu, značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C spočívá v tom, že:

- výtěžnost D-glukosaminu je významně vyšší, než u dosavadních postupů, vycházejících z D-fruktosy nebo D-glukosy,
- umožňuje regenerovat kolem 50% výchozí D-fruktosy, kterou je možno vrátit do reakce a tím výtěžnost dále zvýšit,
- reakce probíhá za mírných podmínek a provedení je jednoduché.

Způsob podle vynálezu je dále objasněn v následujících příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

D-/U- ^{14}C -Fructosa / 84 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 5 ml bezvodého methanolu, 2 mg pevného chloridu amonného a nasytí plyným amoniakem při 0°C . Reakční směs se nechá stát v dobře uzavřené baňce při teplotě 20 až 22°C a po 3 a 6 reakčních dnech vždy nasytí plyným amoniakem při 0°C . Po 9 dnech reakce se přidá $0,5$ ml roztoku $5,9$ mg kyseliny jantarové v bezvodém methanolu a opět nasytí amoniakem. Sycení se dále opakuje po 12 a 15 dnech reakce. Po 17 dnech reakce se směs ochladí na 0 až 5°C , roztok se oddekantuje od vyloučeného jantaru amonného, vakuově odpaří při co nejnižší teplotě ne zcela k suchu a přidá se $0,003$ mmol kyseliny chlorovodíkové v $0,2$ ml vody. D-/U- ^{14}C -Glukosamin ve formě hydrochloridu se izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavě n-butanol-ethanol-voda / $55:33:12$ / na papíře Whatman 3 současně s druhým podílem, získaným po promytí jantaranu amonného studeným methanolem do odstranění radioaktivity, zahuštění a okyselení a současně s D-/U- ^{14}C -Fruktosou.

Celkový radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U- ^{14}C -glukosaminu $32,7$ MBq, tj. 39% a D-/U- ^{14}C -fruktosy $43,7$ MBq, tj. 52% .

P ř í k l a d 2

D-/U- ^{14}C -Fructosa / 115 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 8 ml bezvodého

ethanolu, nasytí se plynným amoniakem při 0 °C a přidá 0,5 ml roztoku směsi 5,5 mg kyseliny glutarové a 2,5 mg kyseliny salicylové v bezvodém ethanolu. Reakční směs se nechá stát v dobře uzavřené baňce po dobu 15 dnů, přičemž každý druhý až třetí den se opakovaně nasytí amoniakem při 0 °C. Poté se zpracuje jak uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U-¹⁴C/-glukosaminu 42 MBq, tj. 36,6 % a D-/U-¹⁴C/-fruktosy 60,9 MBq, tj. 53 %.

P ř í k l a d 3

D-/U-¹⁴C/-Fruktosa /63 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 10 ml bezvodého methanolu, 3 mg pevného chloridu amonného, 0,5 ml roztoku 6,8 mg kyseliny benzoové v bezvodém methanolu a nasytí se plynným amoniakem při 0 °C. Reakční směs se nechá stát při teplotě 24 °C v dobře uzavřené baňce, přičemž se průběžně sytí amoniakem při 0 °C každý druhý až třetí den. Po 18 dnech reakce se směs zpracuje jak uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U-¹⁴C/-glukosaminu 20,4 MBq, tj. 32,4 % a D-/U-¹⁴C/-fruktosy 30,7 MBq, tj. 48,8 %.

P Ř E D M Ě T V Ý N Á L E Z U

1. Způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioizotopem ¹⁴C nebo stabilním izotopem ¹³C vyznačený tím, že značená D-fruktosa se uvede v reakci s methanolickým nebo ethanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C, s výhodou při teplotě 18 až 24 °C po dobu 15 až 18 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti jednoho nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu benzoovou, kyselinu salicylovou, kyselinu gallovou, kyselinu jantarovou a kyselinu glutarovou, výhodně v celkovém množství 0,03 až 0,09 mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že do reakční směsi se přidá chlorid amonný, s výhodou v množství 0,008 až 0,025 mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

3. Způsob podle bodu 2 vyznačený tím, že katalyzátor, vybraný ze skupiny kyselin se přidá až v průběhu reakce, s výhodou po 8 až 10 dnech.