



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208439

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 10 01 80

(21) (PV 224-80)

(40) Zveřejněno 31 12 80

(45) Vydáno 01 02 84

(51) Int. Cl.³
C 07 D 493/12

(75)

Autor vynálezu

VEREŠ KAREL doc. RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy radioligandu (2,3-³H)afatoxinu-B₂

Vynález se týká způsobu přípravy radioligandu (2,3-³H/afatoxinu-B₂).

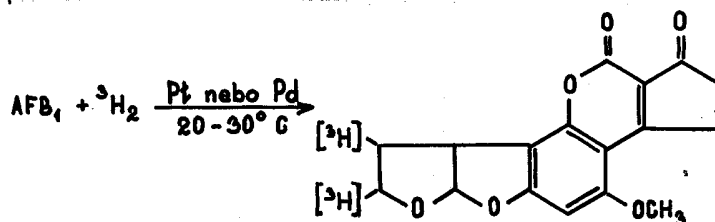
Aflatoxiny produkované plísněmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* patří mezi nejnebezpečnější mykotoxiny. Působí na živočišný organismus nejen jako teratogeny a mutageny, ale již v nepatrných dávkách také jako kancerogeny. Z těchto důvodů je detekce přítomnosti a stanovení i velmi malých množství aflatoxinů v krmivu, mléce a dalších článcích potravinového řetězce, závažný problém veterinární, hygienický a lékařský.

Jednou z nejcitlivějších a nejspecifičtějších metod pro kvantitativní stanovení malých množství organických látek v biologickém materiálu je radioimunologická analýza (RIA). K provedení této analýzy je zapotřebí t. zv. radioligandu, což je radioaktivní forma molekuly hledané látky nebo jejího nepatrně obměněného derivátu.

Aflatoxin-B₂ v malém množství doprovází v přírodě aflatoxin-B₁ (AFB₁), který je nejtoxičtější aflatoxin. Strukturu aflatoxin-B₂ popsali Asao a spolupracovníci (J. Am. Chem. Soc. **98** (1965) 882), chemicky tato sloučenina připravena dosud nebyla. Tato látka se liší od aflatoxinu-B₁ pouze nepřítomností dvojné vazby v poloze 2,3 a proto také nepřekvapuje, že má velmi shodné imunologické vlastnosti s aflatoxinem-B₁ a může být tudíž použitelná jako radioligand při radioimunologické analýze (RIA).

Podstatou způsobu přípravy radioligandu (2,3-³H/afatoxinu-B₂ je, že se na neradioaktivní aflatoxin-B₁ působí tritiovým plynem za přítomnosti katalyzátorů ze skupiny platinových kovů v organickém rozpouštědle při neutrálním pH a při teplotě místnosti, načež se surový produkt čistí chromatograficky.

Uvedená syntéza probíhá podle schematu:



(I)

208439

Výhodou tohoto postupu je, že při použití již 50 % plynného tritia lze získat preparát o vysoké specifické aktivitě alespoň $103,6 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol}$, který je dobře použitelný při radioimunologickém stanovení aflatoxinů. Dále je uveden příklad přípravy ($2,3\text{-}^3\text{H}$ /aflatoxinu- B_2).

Příklad

V malé hydrogenační baňce o objemu cca 3 ml se předredukuje cca 3 mg kyslíčnicku paladnatého v 0,5 ml absolutního suchého dioxanu vodíkem do konstantní spotřeby (asi 1 h). Poté se dioxan odlyofilisuje a ke zbylému katalyzátoru se přidá 2,8 mg aflatoxinu- B_1 v 1 ml abs. suchého dioxanu při neutrálním pH.

Tritiace se provádí plynným tritiem v tritiační aparatuře při tlaku 66,6 až 93,3 kPa po dobu 1 h (podle čs. autorského osvědčení č. 133 272). Poté je dioxan odstraněn lyofilisací a produkt i katalyzátor zbaven labilní aktivity třikrát opakovaným

oddestikováním 1 ml tere-butanolu za sníženého tlaku.

Produkt se čistí tím, že po rozpuštění v 0,5 ml chloroformu se naneše na malý sloupeček silikagelu pro kolonovou chromatografii (připraven z 0,3 až 0,5 g látky). Produkt se vymyje z kolony celkem 10 ml chloroformu. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v metanolu.

Čistota se stanoví tenkovrstvou chromatografií [na desce Silufol (Kavalier-ČSSR)] v soustavě $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 88 : 12 : 1,5$; $R_F = 0,6$. Hmotnost produktu se stanoví vážením odparku nebo přesněji z extinkce UV při 360 nm.

Radioaktivita se stanoví kapalně scintilační technikou.

V daném případě bylo získáno při použití 50% tritiového plynu 0,8 mg produktu o celkové aktivitě $196 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Výsledná specifická radioaktivita $118,4 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol}$ je v dobré shodě s teorií.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy radioligandu ($2,3\text{-}^3\text{H}$ /aflatoxinu- B_2), vyznačený tím, že se na neradioaktivní aflatoxin- B_1 působí tritiovým plynem za přítomnosti katalyzátorů ze skupiny platinových kovů

v organickém rozpouštědle při neutrálním pH a při teplotě místnosti, načež se surový produkt čistí chromatograficky.