



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231499

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 07 H 15/00

/22/ Přihlášeno 05 07 83
/21/ /PV 5098-83/

(40) Zveřejněno 15 03 84

(45) Vydáno 15 06 86

(75)

Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., PRAHA

- (54) Způsob přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C s využitím značeného alfa-D-glukanu

Vynález se týká způsobu přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C s využitím značeného alfa-D-glukanu.

Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že značený alfa-D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů se uvede v reakci s methanolicou kyselinou trifluoroctovou, výhodně o 5 až 25% koncentraci, v přítomnosti 2 až 4 % vody vztaženo na hmotnost methanolu, při teplotě 85 až 100 °C a reakční době 4 až 24 hodin v uzavřeném systému.

Vynález řeší způsob přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C s využitím značeného alfa-D-glukanu.

Methyl-alfa-D-glukopyranosid značený izotopy uhlíku ^{14}C nebo ^{13}C v D-glukopyranosové jednotce, případně i na uhlíku methylové skupiny tvořící aglykon, má velmi mnohostranné využití v chemii sacharidů zejména jako modelová látka pro syntézy a studie v důsledku vhodně chráněné anomerní hydroxylové skupiny, v biochemii ke sledování substrátové specifity enzymů a v biologii při sledování transportních jevů v buňkách.

Methyl-alfa-D-glukopyranosid je dostupný především Fischerovou metodou přípravy glykosidů z D-glukosy /Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J.: Monosacharidy, NČSAV, Praha 1960, s. 173/ a průmyslově metanolýzou škrobu /Langlois D. P.: Methods Carbohydr. Chem. 4, 272 /1964//.

Jiné možné cesty přípravy podle analogií s více či méně obecnými metodami syntézy glykosidů mají význam jen ve zvláštních případech vesměs u derivátů D-glukosy.

Fischerova metoda, spočívající v reakci D-glukosy s methanolem v přítomnosti kyselého katalyzátoru /minerální kyseliny/, je dnes rozšířená především v provedení, využívajícím katalýzu katexem /Cadotte J. E., Smith F., Spriestersbach D.: J. Amer. Chem. Soc. 74, 1 501 /1952// a tato metoda byla též aplikována na přípravu methyl-alfa-D-/U- ^{14}C /-glukopyranosidu /Barlett G. M., Sheppard G.: J. Labelled Comp. 5, 275 /1969//.

Metanolýza škrobu, prováděná methanolem v přítomnosti minerální kyseliny /chlorovodíkové nebo sírové/, je používána k přípravě methyl-alfa-D-glukopyranosidu ve velkém /franc. patentový spis 1 114 382, patentový spis USA 2 276 621/.

Pro přípravu methyl-alfa-D-glukopyranosidu, značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C by bylo možno využít kysele katalyzovanou metanolýzu značeného alfa-D-glukanu, zejména vzhledem k jeho dostupnosti z fotoautotrofních organismů /čs. patentový spis č. 121 808/.

Obvyklý typ katalýzy minerální kyselinou je však spojen s obtížemi, které se dále výrazně zvyšují při práci s malými kvanty při přípravě značeného methyl-alfa-D-glukopyranosidu. Minerální kyselina v reakčním prostředí má za následek nebezpečí rozkladu D-glukosy v průběhu takto katalyzované metanolýzy /Chambers R. E., Clamp J. R.: Biochem. J. 125, 1 009 /1971//, navíc její odstraňování ze směsi po reakci je pracné a opět spojené s nebezpečím rozkladu produktu.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C s využitím značeného alfa-D-glukanu, jehož podstata spočívá v tom, že značený alfa-D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů, se uvede v reakci s methanolickou kyselinou trifluoroctovou, výhodně o 5 až 25% koncentraci, v přítomnosti 2 až 4 % vody vztaženo na hmotnost methanolu, při teplotě 85 až 100 °C a reakční době 4 až 24 hodin v uzavřeném systému.

Při reakci je možno použít též methanolu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C .

Výhodou tohoto způsobu přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ^{14}C nebo stabilním izotopem ^{13}C je, že použití kyseliny trifluoroctové při kyselé metanolýze alfa-D-glukanu je šetrnější, než obvyklé použití minerálních kyselin, přičemž zpracování směsi po reakci je jednodušší, neboť kyselinu trifluoroctovou lze odstranit vakuovou destilací. Omezují se ztráty spojené s rozkladem D-glukosy i produktu, stejně jako ztráty spojené se zpracováním reakční směsi.

Způsob podle vynálezu je dále objasněn příklady provedení.

P ř í k l a d 1

alfa-D-/U-¹⁴C/-Glukan /318 MBq/, izolovaný z řasy *Chlorella vulgaris* Beijerinck a 1,5 ml 8% methanolicke kyseliny trifluoroctové, obsahující 3,5 % vody vztaženo na hmotnost methanolu se zahřívá v zatavené trubici při teplotě 85 °C po dobu 24 hodin. K roztoku po reakci se přidá 0,5 ml vody a vakuově se odpaří. Odparek se rozpustí v přiměřeném objemu vody a methyl-alfa-D-/U-¹⁴C/-glukopyranosid se izoluje preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě n-butanol-kyselina octová-voda /4:1:5/.

V produktu byl zjištěn obsah 3 % beta-anomeru metodou plynové chromatografie per-O-acetylderivátu.

Radiochemický výtěžek methyl-alfa-D-/U-¹⁴C/-glukopyranosidu 235 MBq, tj. 74 %.

P ř í k l a d 2

alfa-D-/U-¹⁴C/-Glukan /82 MBq/ a alfa-D-glukan /20 mg/, v obou případech izolovaný z řasy *Chlorella vulgaris* Beijerinck a 4,5 ml 10% methanolicke kyseliny trifluoroctové, obsahující 2,5 % vody vztaženo na hmotnost methanolu se zahřívá v zatavené trubici při teplotě 90 °C po dobu 16 hodin. K roztoku po reakci se přidá 1 ml vody a vakuově se odpaří.

Reakční směs se dále zpracuje a produkt izoluje jak je popsáno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek methyl-alfa-D-/U-¹⁴C/-glukopyranosidu 66 MBq, tj. 82 %.

P ř í k l a d 3

alfa-D-/U-¹³C/-Glukan /65 mg/, izolovaný z řasy *Chlorella vulgaris* Beijerinck a 7,5 ml 25% methanolicke kyseliny trifluoroctové, obsahující 3 % vody vztaženo na hmotnost methanolu se zahřívá v autoklávu při teplotě 100 °C po dobu 6 hodin. K roztoku po reakci se přidají 3 ml vody a vakuově se odpaří. Krystalizací z bezvodého methanolu se izoluje methyl-alfa-D-/U-¹³C/-glukopyranosid, obsahující 4 % beta-anomeru /viz příklad 1/.

Výtěžek methyl-alfa-D-/U-¹³C/-glukopyranosidu 57,8 mg, tj. 89 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy methyl-alfa-D-glukopyranosidu značeného radioizotopem ¹⁴C nebo stabilním izotopem ¹³C s využitím značeného alfa-D-glukanu vyznačený tím, že značený alfa-D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů, se uvede v reakci s methanolicke kyselinou trifluoroctovou, výhodně o 5 až 25% koncentraci, v přítomnosti 2 až 4 % vody vztaženo na hmotnost methanolu, při teplotě 85 až 100 °C a reakční době 4 až 24 hodin v uzavřeném systému.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že se použije methanolu značeného radioizotopem ¹⁴C nebo stabilním izotopem ¹³C.