



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231 698

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 07 83
(21) PV 5096-83

(51) Int. Cl.³
C 07 H 15/00

(40) Zveřejněno 16 04 84
(45) Vydáno 01 05 86

(75)

Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., PRAHA

(54)

Způsob přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C s využitím značeného methyl- α -D-glukopyranosidu

Vynález se týká způsobu přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C s využitím značeného methyl- α -D-glukopyranosidu. Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že methyl- α -D-glukopyranosid se oxiduje bromovou vodou, s výhodou o 0,25 až 0,45 % koncentraci, při teplotě 24 až 26 °C po dobu 32 až 38 hodin v přítomnosti uhličitanu vápenatého nebo barnatého a vzniklá směs se redukuje výhodně hybridem borito-sodným za vzniku methy- α -D-galaktopyranosidu.

231 698

Vynález řeší způsob přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C s využitím značeného methyl- α -D-glukopyranosidu.

D-Galaktosa je biologicky i fyziologicky významný monosacharid, v přírodě hojně zastoupený především jako součást oligo- a polysacharidů /laktosa, galaktany/. Ve formě značené isotopy uhlíku ^{14}C nebo ^{13}C , specificky nebo nespecificky, je užitečná zejména při studiu metabolismů. Její glykosid, methyl- α -D-galaktopyranosid má význam v chemii sacharidů jako modelová látka a v biochemii ke sledování enzymové specifity.

Otázka synthetické přípravy D-galaktosy není v dostupných literárních pramenech řešena. Důvod spočívá zřejmě v existenci dostačujících přírodních zdrojů D-galaktosy.

Synthetická cesta přípravy D-galaktosy naopak přichází v úvahu v případě isotopy uhlíku značených sacharidů, neboť možnosti biosynthes jsou omezeny a často nedostačující. Nejdostupnější výchozí látkou pro přípravu značené D-galaktosy je D-glukosa. Přeměna D-glukosy /ve formě vhodného derivátu/ na D-galaktosu je ovšem obtížný problém.

Teoreticky lze tuto přeměnu uskutečnit inverzí konfigurace hydroxylové skupiny v poloze C-4 molekuly D-glukosy. K tomu lze v principu použít dvě cesty: buď inverzi vynutit za podmínek nukleofilní substituce typu S_N2 , nebo po oxidaci na 4-ulosu připravit její redukci produkt z větší či menší míry invertovaný. Uvažovat o jiných cestách má z praktického hlediska jen spekulativní význam.

První cesta je pro oblast značených sacharidů prakticky neschůdná. Vyžaduje vhodný substituent v poloze C-4, chránění ostatních hydroxylových skupin a energické reakční podmínky. Přitom substituce probíhá neochotně s nízkými výtěžky, jak bylo popsáno při reakci methyl 2,3-di-O-benzoyl-4,6-di-O-mesyl- α -D-glukopyranosidu s benzoátem sodným v N,N-dimethylformamidu při teplotě 140 °C po dobu 20 hodin /Hill J., Hough L., Richardson A.C.: Proc. Chem. Soc. 1963, 314 a 346/.

Schůdnější se jeví druhá cesta, i když opět není nijak snadná. Oxidace hydroxylové skupiny v poloze C-4 u D-glukosy s chráněnými ostatními hydroxylovými skupinami je poprvé uváděna u methyl 2,3-di-O-benzoyl-6-O-trityl- α -D-glukopyranosidu, který byl v nízkém výtěžku oxidován oxidem chromovým v pyridinu /Overend W.G.: Chem. and Ind. 1963, 342/.

Efektivnější je použití oxidu rutheničelého, jak bylo popsáno v případě methyl 2,3,6-tri-O-benzoyl- α -D-glukopyranosidu /Collins P.M., Doganges R.T., Kolarikol A., Overend W.G.: Carbohydr. Res. 11, 199 /1969/ /. Bez ohledu na možnosti využití i jiných oxidačních činidel obvyklých v chemii sacharidů /Butterworth R.F., Hanessian S.: Syntheses 1971, 70 / spočívá hlavní problém v přílišné komplikovanosti a řadě reakčních stupňů.

Výrazné zjednodušení oxidace, přijatelnější pro práci s malými kvanty, by bylo umožněno za podmínek, kdy by postačovalo chránění jen anomerní hydroxylové skupiny, nejlépe přípravou methyl- α -D-glukopyranosidu, dostupného z D-glukosy /Barlett G.M., Sheppard G.: J. Labelled Comp. 5, 275 /1969/ / nebo z glukánů /Langlois D.P.: Methods Carbohydr. Chem. 4, 272 /1964/ /.

Za těchto okolností jsou ovšem nepoužitelná účinnější oxidační činidla. Např. při oxidaci methyl- α -D-glukopyranosidu dimethylsulfoxidem v přítomnosti acetanhydridu vzniká nejméně 17 produktů /Wirén E., Ahrgren L., De Belder A.N.: Carbohydr. Res. 49, 201 /1976/ /.

Méně účinná oxidační činidla vedou zase pouze k nižším výtěžkům, jako oxidace methyl- α - nebo - β -D-glukopyranosidu oxidem chromovým v acetonu /Assarsson A., Theander O.: Acta Chem. Scand. 12, 1507 /1958/, chlorovou vodou /Theander O.: Svensk Papperstid. 18, 581 /1958/, peroxidem vodíku /De Belder A.N., Lindberg B., Theander O.: Acta Chem. Scand. 17, 1012 /1963/, bromovou vodou při kontrole pH přídavky hydroxidu sodného /Larm O., Schollander E., Theander O.: Carbohydr. Res. 49, 69 /1976/, oxidem dusičitým /Assarsson A., Theander O.: Acta Chem. Scand. 18, 553 /1964/, případně jinými činidly /Theander O.: Advances Carbohydr. Chem. 17, 223 /1962/ /.

Postup, který by umožňoval přípravu methyl- α -D-galaktopyranosidu a tedy i D-galaktosy z methyl- α -D-glukopyranosidu není v dostupných literárních pramenech popsán.

Výše uvedený problém řeší způsob přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C s využitím značeného methyl- α -D-glukopyranosidu jehož podstata spočívá v tom, že methyl- α -D-glukopyranosid se oxidaže bromovou vodou, s výhodou o 0,25 až 0,45% koncentrací, při teplotě 24 až 26 °C po dobu 32 až 38 hodin v přítomnosti uhličitanu vápenatého nebo barnatého a vzniklá směs se redukuje, výhodně hydridem borito-sodným za vzniku methyl- α -D-galaktopyranosidu.

Methyl- α -D-galaktopyranosid se převede na D-galaktosu hydrolyzou, s výhodou kyselinou trifluoroctovou o 10 až 20% koncentrací při teplotě 80 až 90 °C.

Výhoda tohoto způsobu přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C spočívá jednak ve využití dostupných surovin k přípravě synteticky obtížně získatelných látek, jednak umožňuje regeneraci významného množství výchozího methyl- α -D-glukopyranosidu a získání methyl- α -D-mannopyranosidu a kyseliny methyl- α -D-glukopyranosiduronové, které vznikají jako další produkty v důsledku vedlejších reakcí.

Způsob podle vynálezu je dále objasněn příklady provedení.

Příklad 1

K roztoku methyl- α -D-/U- 14 C/-glukopyranosidu /200 MBq/ ve 2 ml vody se přidají 4 ml 0,35% bromové vody a 80 mg uhličitanu vápenatého. Reakční směs se nechá stát při 25 °C po dobu 35 hodin za míchání. Potom se nezreagovaný brom odstraní vakuově, směs se zředí 4 ml vody a přidá se 0,6 ml 0,08% vodného roztoku hydridu boritosodného. Nechá se stát při teplotě 18 až 20 °C po dobu 16 hodin a poté zneutralizuje katexem Amberlite IR-120 /H⁺/. Pevné látky se odcentrifugují, promyjí vodou do vymizení radioaktivity a spojené supernatanty se vakuově zahustí na přiměřený objem.

Kyselé podíly se zachytí na sloupci anexu Amberlite IRA 400 /OH⁻/ který se promývá vodou do vymizení radioaktivity. Eluát se vakuově zahustí na vhodný objem a preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě t-amylnalkohol - n-propylalkohol - voda /8:2:3/ se izolují methyl- α -D-/U- 14 C/-galaktopyranosid /42 MBq, tj. 21 %/, methyl- α -D-/U- 14 C/-glukopyranosid /66 MBq, tj. 33 %/, methyl- α -D-/U- 14 C/-mannopyranosid /9 MBq, tj. 4,5 %/.

Sloupec anexu se zachyceným kyselým podílem se eluuje 1% kyselinou trifluoroctovou do vymizení radioaktivity, eluát se vakuově odpaří, odparek rozpustí ve vhodném objemu vody a preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě ethylacetát - pyridin - kyselina octová - voda /5:5:1:3/ se izoluje kyselina methyl- α -D-/U- 14 C/-glukopyranosiduronová /51 MBq, tj. 25,5 %/.

Příklad 2

Methyl- α -D-/U- 14 C/-galaktopyranosid /20 MBq/ a 1 ml 20% kyseliny trifluoroctové se zahřívá v zábrusové zkumavce při teplotě 80 °C po dobu 8 hodin. Roztok se vakuově odpaří, odparek rozpustí ve vhodném objemu vody a preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě n-butylalkohol - kyselina octová - voda /4:1:5/ se izoluje D-/U- 14 C/-galaktosa /17,4 MBq, tj. 87 %/.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

231 698

1. Způsob přípravy methyl- α -D-galaktopyranosidu a D-galaktosy značených radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C s využitím značeného methyl- α -D-glukopyranosidu vyznačený tím, že methyl- α -D-glukopyranosid se oxiduje bromovou vodou, s výhodou o 0,25 až 0,45% koncentraci, při teplotě 24 až 26 °C po dobu 32 až 38 hodin v přítomnosti uhličitanu vápenatého nebo barnatého a vzniklá směs se redukuje, výhodně hydridem borito-sodným za vzniku methyl- α -D-galaktopyranosidu.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že vzniklý methyl- α -D-galaktopyranosid se převede na D-galaktosu hydrolysou, s výhodou kyselinou trifluorooctovou o 10 až 20% koncentraci při teplotě 80 až 90 °C.