



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254 823

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 12 85
(21) PV 9675-85

(51) Int. Cl.^A

G 01 N 30/00

(40) Zveřejněno 11 06 87
(45) Vydáno 01 05 89

(75)
Autor vynálezu

KÖLBL JAN ing., ONDŘEJOV

(54)

Způsob preparativní izolace /methyl-³H/ thyminu eluční
vysokoučinnou kapalinovou chromatografií

/methyl-³H/ thymin je používán jako stopovací látka v biologickém, biochemickém a lékařském výzkumu, dále jako výchozí látka pro syntézu složitějších biologicky aktivních látek, tj. /methyl-³H/ thyadinu, resp. 5 -fosfátu /methyl-³H/ thymidinu. Cílem řešení je zajistit vyšší výtěžky /methyl-³H/ thyminu, zlepšit kvalitu výsledného produktu a snížit časovou náročnost jeho preparativní izolace, při využití eluční vysokoučinné kapalinové chromatografie. Uvedeným postupem bylo dosaženo radioaktivního výtěžku 85 až 90 % /methyl-³H/ thyminu, vztaženo na radioaktivitu výchozí reakční směsi. Radiochemická a chemická čistota je 98 %.

Vynález se týká způsobu preparativní izolace /methyl-³H/ thyminu metodou eluční vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dosud známá metoda izolace uvedené sloučeniny z reakční směsi po její syntéze je metoda preparativní papírové chromatografie (Hais I.M., Macek K. a kol. : Papírová chromatografie, NČSAV Praha 1959, str. 532 - 535). Zejména při přípravě /methyl-³H/ thyminu o vysoké molové aktivitě má tento způsob izolace řadu nedostatků. Především dochází k izolačním ztrátám (30 % hmotnostních) a izolovaná sloučenina není chemicky čistá. Příprava /methyl-³H/ thyminu a dosud používaná metoda jeho izolace je popsána v AO 192 238. Nízký stupeň chemické čistoty preparátů izolovaných preparativní papírovou chromatografií je zapříčiněn přítomností výluhů z chromatografického papíru, případně nečistoty z rozpouštědel. Při případné aplikaci /methyl-³H/ thyminu, obsahující chemické nečistoty, na př. pro enzymatickou syntézu /methyl-³H/ thymidinu, /methyl-³H/ thymidin monofosfátu a /methyl-³H/ thymidin trifosfátu nelze vyloučit úplnou ztrátu katalytické účinnosti enzymových preparátů (Výzkumná zpráva ÚVVVR, Ing.J.Filip, Ing.L.Boháček, 1979). Další nedostatek papírové chromatografie spadá do oblasti bezpečnosti práce s radioaktivními látkami. Manipulace s radioaktivními sloučeninami při nanášení na chromatografické papíry vlastní chromatografie, autoradiografie a eluce zvyšují možnost kontaminace prostředí i osob.

Dosud používaný technologický způsob izolace /methyl-³H/ thyminu z reakční směsi se provede metodou papírové chromatografie na chromatografickém papíru Whatmann-3 v soustavě butanol - propanol - amoniak - voda (7:5:7:2), rozdělovací koeficient R_f thyminu v této soustavě je 0,45. Identifikace radioaktivních sloučenin na chromatogramech se provede jejich porovnáním s neaktivními standardy. Pruh odpovídající radioaktivnímu thyminu se vystříhne a eluuje redestilovanou vodou. Protože se nedosáhne požadované radiochemické čistoty, je třeba papírovou chromatografií zopakovat v jiné vyvíjející soustavě, čímž se dále zvyšují ztráty izolovaného preparátu.

Výše uvedené nedostatky nemá způsob preparativní izolace /methyl-³H/ thyminu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, jehož podstata spočívá v tom, že se směs sloučenin, vznikajících při přípravě radioaktivního /methyl-³H/ thyminu dělí na sloupci hydrofobního sférického sorbentu za použití vodného roztoku čistého etanolu o objemové koncentraci 1,5% jako eluentu.

Povrch silikagelu (kyselina tetrahydrokřemičitá H_4SiO_4) je pokryt oktadecylovými skupinami a zbytkové silanoly jsou blokovány methylovými skupinami. Eluovaný radioaktivní /methyl- ^3H / thymin se po dozimetrii a stanovení radiochemické čistoty naředí na expediční koncentraci a přímo expeduje, respektive se použije pro další chemické syntézy.

Výhody nového postupu spočívají v tom, že výtěžek radioaktivního produktu je v dlouhodobém průměru o 20% vyšší než při izolaci výše uváděným způsobem preparativní papírové chromatografie.

Přínosem vynálezu je nalezení takového postupu, který umožňuje získat produkt o vysoké radiochemické čistotě (minimálně 97%) a bez přítomnosti chemických nečistot. K přínosu vynálezu patří i to, že výchozí substráty při přípravě /methyl- ^3H / thyminu chemickou syntézou (na př. formyluracil) se získávají zpět bez chemické kontaminace. Dělení kapalinovou chromatografií probíhá v kapalném prostředí v uzavřeném poloautomatizovaném systému. Odpadá autoradiografie a sušení chromatografických papírů, při nichž snadno může dojít ke kontaminaci radioaktivitou, tím se podstatně zvyšuje bezpečnost práce při přípravě /methyl- ^3H / thyminu.

Kde není v textu uvedena bližší specifikace u výrazu %, jedná se o radiochemickou čistotu. Radiochemická čistota je vyjádřena poměrným vztahem mezi skutečným a teoretickým obsahem stanovované látky.

Příklad :

Jedná se o izolaci /methyl- ^3H / thyminu z reakční směsi po hydrogenaci neaktivního 5 mg formyluracilu v prostředí 0,4 ml 0,1 M HCl, plynným tritiem. Jako katalyzátoru se používá 10% Pd na aktivním uhlí (AO 192 238). Kromě uvedených látek obsahuje reakční směs ještě vzniklý hydroxymethyluracil. Po chemické syntéze se z reakční směsi odstředí katalyzátor s aktivním uhlím. K reakční směsi se přidá 0,1 M NaOH pro úpravu pH na hodnotu 6 - 7. Takto upravená reakční směs v objemu 5 ml se vnášecím zařízením vnese na kolonu 15 x 450 mm. Kolona je plněna tuzemským sorbentem SEPARON SIX-C-18. Po vnesení vzorku se kolona promývá vodným roztokem čistého etanolu v objemové koncentraci 1,5% a průtoku 100 ml/hod. Při takto nastaveném průtoku se po 50 - 52 minutách

od začátku promývání začíná eluovat neaktivní formyluracil. Tato látka se eluuje 7 minut v objemu 14 ml. Po 60 minutách od začátku promývání se eluuje neaktivní hydroxymethyluracil, který se uluuje též 7 minut v objemu 14 ml. Po 102 minutách se začíná eluovat /methyl-³H/ thymin. Jeho doba eluce činí 14 minut. Radioaktivní /methyl-³H/ thymin se eluuje v objemu 28 ml. Radiochemická čistota takto získaného /methyl-³H/ thyminu je 98%. Na kolonu byla nanesena reakční směs o radioaktivitě 15 760 MBq. Z kolony bylo získáno 14 170 MBq /methyl-³H/ thyminu, což představuje výtěžek 89,9%.

PŘEDMĚT VÝNÁJEMU

Způsob preparativní izolace /methyl-³H/ thyminu eluční vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s etanolem jako rozpouštědlem, vyznačený tím, že se směs sloučenin vznikajících při přípravě radioaktivního /methyl-³H/ thyminu dělí na sloupci porézního hydrofóbního iontoměniče na bázi silikagelu, jehož povrch je pokryt oktadecylovými skupinami, při čemž se eluce provádí za použití vodného roztoku čistého etanolu v objemové koncentraci 1,5%.