



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

225198

(11)

(B1)

(22) Prihlásené 05 05 82
(21) (PV 3221-82)

(40) Zverejnené 27 05 83

(45) Vydané 15 04 86

(51) Int. Cl.³
C 07 C 59/105
(C 07 C 59/105,
59/147)
C 07 B 23/00
//C 07 H 1/00

(75)
Autor vynálezu

BÍLIK VOJTECH RNDr. DrSc., TIHLÁRIK KAROL ing. CSc., KRÁTKY
ZDENEK ing. CSc., BRATISLAVA, KOLINA JOZEF ing. CSc., PRAHA

(54) Spôsob prípravy ¹⁴C-značkových D-aldohexuronových kyselín

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy ¹⁴C-značkových D-aldohexuronových kyselín.

V chémii sacharidov sa v mnohých prípadoch na selektívnu oxidáciu primárnych hydroxylových skupín osvedčil oxid dusičitý. Sekundárne hydroxylové skupiny sú oproti oxidácii pomerne rezistentné, avšak poloacetátová hydroxylová skupina sacharidu musí byť vo všetkých prípadoch chránená vo forme O-glykozidu. Z týchto dôvodov bola oxidácia aplikovaná viac na polysacharidoch vrátane škrobu [R. W. Kerr; J. Amer. Chem. Soc. 72, 816 (1950)], (U-¹⁴C) značkovanom škrobe [V. Bílik, R. Sandtnerová, Z. Krátky, L. Petruš; Chem. zvesti 34, 518 (1980)], celulóze [C. Mercer, H. I. Bolker; Carbohydr. Res. 14, 109 (1970), G. M. Laisha, V. I. Sharkov; Ž. prikl. Chim. 49, 453 (1976), I. Lužák, V. Lužáková; Papír a celulóza 35, V73, V860 (1980)] a v prípade monosacharidov tiež len vo forme ich O-alkylglykozidov [K. Maurer, G. Drehfahl; Ber. 75, 1489 (1942), ibidi 80, 94 (1947)]. Voľné urónové kyseliny sa potom získajú kyslou hydrolýzou ich O-glykozidov, alebo kyslých polysacharidov. O-glykozidy urónových kyselín, resp. kyslé polysacharidy sa podstatne ťažšie hydrolyzujú ako im odpovedajúce O-

2

-glykozídy aldóz, resp. neutrálne polysacharidy, pričom stabilita urónových kyselín za podmienok hydrolýzy nie je veľká. V navrhovanom spôsobe prípravy hexuronových kyselín je poloacetátová skupina aldózy chránená proti oxidácii oxidom dusičitým, a to prevedením na príslušný N-fenylglykozid, ktorý sa i po oxidácii primárnej hydroxylovej skupiny veľmi ľahko hydrolyzuje.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v suchom stave sa N-(4-nitrofenyl)glykozidy ¹⁴C-značkových D-aldohexóz oxidujú plyným oxidom dusičným pri teplote 20 až 25° Celsia po dobu 3 až 4 hodín. Oxidovaný produkt sa hydrolyzuje zriedenou organickou kyselinou (10 % mravčou, alebo 10 % octovou) pri teplote 80 až 90 °C po dobu 4 až 6 hodín a ¹⁴C-značované D-aldohexuronové kyseliny sa potom z reakčnej zmesi izolujú papierovou chromatografiou v 10 až 15 % výťažkoch. Príprava hexurónových kyselín sa môže zjednodušiť tým, že N-fenylglykozidy sa pripravujú predradenou reakciou aldohexózy a napríklad 4-nitroanilínu v metanole v roztoku (65 °C, 4 hod.) a vzniknuté N-(4-nitrofenyl)glykozidy (65 až 80 % konverzia) sa bez osobitnej izolácie ďalej oxidujú a spracovávajú ako je už uvedené.

TABUĽKA 1

Papierová chromatografia uronových kyselín, resp. ich laktónov získaných oxidáciou N-fenylglykozidov aldohexóz oxidom dusičitým

Sacharid	Relatívna pohyblivosť	
	S ₁ *)	S ₂ **)
kyselina D-glukuronová	0,50 3,17	1,06 3,18
kyselina D-manuronová	0,54 2,01	2,41
kyselina D-galakturonová	0,54	1,09 2,38
kyselina D-taluronová	0,51 2,00	1,23
kyselina D-iduronová	0,64 3,30	1,17 4,50
kyselina D-guluronová	0,44 1,30 3,25	0,92 1,69 3,10
kyselina D-altruronová	0,57	1,32
kyselina D-alluronová	0,36	1,13
D-glukóza	1,00	1,00
D-manóza	1,48	1,17
D-galaktóza	0,96	0,90
D-talóza	1,92	1,64
D-idóza	1,95	1,56
D-gulóza	1,45	1,15
D-altróza	1,26	1,35
D-allóza	1,31	1,28

*) elučný systém 1-butanol : etanol : voda v objemovom pomere, 5 : 1 : 4, prietok 18 až 20 hod.

**) elučný systém octan etylový : kyselina octová : voda v objemovom pomere 3 : 1 : 1, prietok 7 až 8 hod.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy hexuronových kyselín je, že technika prípravy malých množstiev je pomerne jednoduchá (celý postup prípravy sa uskutočňuje v jednej skúmavke postupným pridávaním jednotlivých reagentov v priebehu reakčného procesu) a potrebné chemikálie sú bežne dostupné.

Príklad 1

Do skúmavky opatrenej zábrusom sa dá 100 až 120 mg jednotlivéj ¹⁴C-značkovanej D-aldohexózy, 0,5 ml vody a 2,5 ml metanolového roztoku 4-nitroanilínu (3 g nitroanilínu, 3 ml kyseliny octovej a 95 ml metanolu) a zmes sa zahrieva 2 hod. pri 65 °C, potom sa pridajú 4 ml metanolového roztoku 4-nitroanilínu a zmes sa zahrieva ďalšie 2 hod. Roztok sa za zníženého tlaku zahustí a suchý zvyšok v uzavretej sklenenej nádobe oxiduje plynným oxidom dusičitým 3,5 hod. pri teplote miestnosti. Oxidovaný produkt po pridaní 4 ml 10% vodného roztoku kyseliny mravčej sa hydrolyzuje pri 90 °C 6 hod. Reakčná zmes sa prefiltruje a chromatografuje na preparačnom chromatogra-

fickom papieri (Whatman No 1, jeden hárok) elučným systémom 1-butanol — etanol — voda. Izolované úrónové kyseliny sa potom rechromatografujú (½ hárok) v elučnom systéme octan etylový — kyselina octová — voda. Relatívne pohyblivosti jednotlivých aldohexóz a aldohexuronových kyselín sú uvedené v tabuľke 1.

Príklad 2

Do skúmavky sa dá 10 až 15 mg D-manózy, alebo D-glukózy, prípadne D-galaktózy a 130 kBq odpovedajúcej (U-¹⁴C) značkovanej aldohexózy, potom sa pridá 0,1 ml vody a 1 ml metanolového roztoku 4-nitroanilínu (viď príklad 1) a zmes sa zahrieva pri 65 °C 2 hod., potom sa pridajú 2 ml 4-nitroanilínového roztoku a zahrieva sa ďalšie 2 hod. Ďalej sa postupuje (oxidácia, hydrolýza, izolácia) ako je uvedené v príklade 1.

Vynález má význam pre prípravu komerčne zaujímavých ¹⁴C-značkovaných D-aldohexuronových kyselín, ktoré sa môžu uplatniť ako štandardné zlúčeniny pri chemických a biochemických štúdiách premien sacharidov.

P R E D M E T V Y N Ā L E Z U

Spôsob prípravy ^{14}C -značkových D-aldo-hexuronových kyselín, vyznačený tým, že v suchom stave sa N-(4-nitrofenyl)glykozidy ^{14}C -značkových D-aldohexóz oxidujú plyným oxidom dusičitým pri teplote 20 až 25°

Celsia po dobu 3 až 4 hodín a z oxidovaného produktu po hydrolýze 10 %-nou kyselinou mravčou alebo 10 %-nou kyselinou octovou sa uvedené D-aldohexuronové kyseliny izolujú papierovou chromatografiou.