

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252230

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 H 5/06

(22) Přihlášeno 18 09 85

(21) PV 6629-85

(40) Zveřejněno 15 01 87

(45) Vydáno 15 09 88

(75)

Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., ČERNÝ MILOSLAV doc. RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem

Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že značená 1-amino-1-deoxy-D-fruktosa nebo 1-N-alkyl/nebo aryl/amino-1-deoxy-D-fruktosa se uvede v reakci s kapalným amoniakem nebo metanolickým amoniakem nebo etanolickým amoniakem, s výhodou při teplotě 18 až 25 °C po dobu 4 až 24 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti chloridu amonného v množství 0,5 až 3 moly na 1 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou, kyselinu gallovou, výhodně v množství 3 až 8 molů na 1 mol výchozí látky.

Vynález řeší způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem ^{14}C z 1-amino-1-deoxy-D-fruktosy nebo jejích N-substituovaných derivátů.

D-Glukosamin je mimořádně významný přírodní aminosacharid jehož výskyt charakteristický především pro různé typy polysacharidů, lipopolysacharidů a glykoproteinů. Výzkum látek obsahujících D-glukosamin patří z hlediska biochemie ke stěžejním. D-Glukosamin je sledován zejména jako součást skeletu muramové a neuraminové kyseliny, biologicky velmi významných, a ve formě značené isotopem uhlíku ^{14}C má v tomto směru neocenitelný význam

Způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem ^{14}C z D-fruktosy jako výchozí látky je předmětem AO 231 498. D-Fruktosa, značená isotopy uhlíku je však obtížněji dostupná než ekonomicky výhodnější značená D-glukosa, ze které se značená D-fruktosa také běžně získává /isomerizací katalysovanou enzymy aj./. Bylo by proto výhodné využití k přípravě značeného D-glukosaminu přímo D-glukosu.

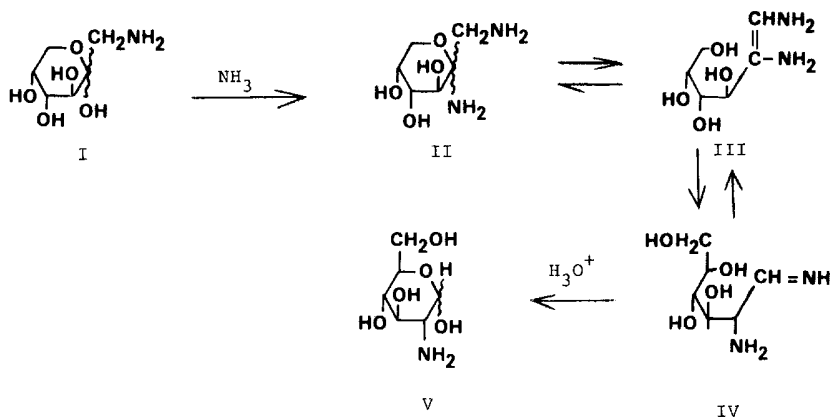
V oblasti neznačených sloučenin jsou běžným zdrojem D-glukosaminu přírodní látky, především chitin /Stacey M., Webber J.M.: Methods in Carbohydr. Chem. 1, 228 /1962//. V jediném dostupném literárním zdroji je uváděna příprava D-glukosaminu reakcí D-glukosy s amoniakem při $100\text{ }^\circ\text{C}$ /Patent US 2,884.441/.

Reakční podmínky jsou však příliš energické pro práci s D-glukosou značenou isotopy uhlíku a dochází k velkým ztrátám radioaktivity v rozkladných produktech, představujících kolem 80 %, přičemž výtěžky značeného D-glukosaminu jsou nízké.

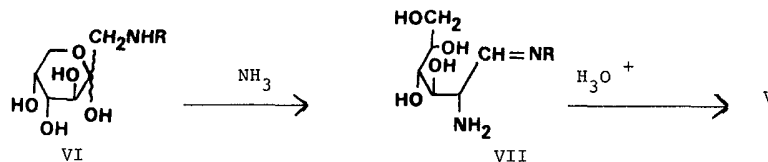
Využitím Amadoriho přesmyku lze z D-glukosy připravit 1-amino-1-deoxy-D-fruktosu /Kuhn R., Haas H.J.: Liebig's Ann. Chem, 600, 148 /1956/, Druey J., Huber G.: Helv. Chim. Acta 40, 342 /1957//, která reakcí s amoniakem poskytuje D-glukosamin /Patent US 2,918.462/.

Vznik D-glukosaminu při této reakci, která nebyla teoreticky studována, by patrně bylo možno vystělit mechanismem Heynsova přesmyku /Heyns K., Koch W.: Z. Naturforsch. 7b, 486 /1952/, Heyns K., Meinecke K.H.: Chem. Ber. 86, 1453 /1953/, The Carbohydrates /Pigman W., Horton D., Eds./, Academic Press, New York 1980, s 905/ a to za předpokladu, že aminoskupina 1-amino-1-deoxy-D-fruktosy I by se při reakci chovala analogicky, jako hydroxylová skupina v poloze C-1 D-fruktosy /která při reakci s amoniakem poskytuje D-glukosamin, viz např. Heyns K., Paulsen H., Eichstedt R., Rolle M.: Chem. Ber. 90, 2 039 /1957/ a v oblasti značených sloučenin AO 231 498/.

Reakcí derivátu I s amoniakem vzniká 1-amino-1-deoxy-D-fruktosylamin II, poskytující dále endiamin III, z něhož vzniká tautomerní aldimin IV, snadno hydrolyzovatelný na D-glukosamin V:



Na základě analogického schematu by bylo možno očekávat, že také N-substituované deriváty 1-amino-1-deoxy-D-fruktosy, tj. 1-N-alkyl /nebo aryl/amino-1-deoxy-D-fruktosa IV /pro R = primární alkyl nebo aryl/ by reakcí s amoniakem mohla cestou Heynsova přesmyku /viz uvedený přesmyk derivátu II na aldimin IV/ poskytovat N-substituovaný aldimin VII, opět hydrolysovatelný na D-glukosamin V:



Tento typ reakcí dosud nebyl v dostupné literatuře popsán.

Výchozí deriváty jsou dostupné z D-glukosy a vhodných typů aminů s využitím Amadoriho přesmyku přechodně vznikajících N-substituovaných D-glukosylaminů /Hodge J.E., Fisher B.E.: *Methods Carbohydr. Chem.* **2**, 99 /1963/, Weygand r.: *Chem. Ber.* **73**, 1 259 /1940/, Micheel F., Hagemann G.: *Chem. Ber.* **93**, 2 381 /1960// a to i ve formě značené radioisotopem ¹⁴C /Skála L.: Kandidátská disertace, PĚF University Karlovy, Praha 1984, s. 36/.

Vznik D-glukosaminu při reakcích derivátů IV s amoniakem a hydrolyse odpovídajících aldiminů VII byl prokázán a ověřen na látkách značených radioisotopem ¹⁴C i na látkách neznačených.

Na uvedeném reakčním principu je založen navrhovaný způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem ¹⁴C jehož podstata spočívá v tom, že 1-amino-1-deoxy-D-fruktosa nebo 1-N-alkyl/nebo aryl/amino-1-deoxy-D-fruktosa se uvede v reakci s kapalným amoniakem nebo metanolickým amoniakem nebo etanolickým amoniakem, s výhodou při teplotě 18 až 25 °C po dobu 4 až 24 dnů, v uzavřeném systému v přítomnosti chloridu amonného v množství 0,5 až 3 moly na 1 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou, kyselinou gallovou, výhodně v množství 3 až 8 mol výchozí látky.

Reakce může být prováděna s kapalným amoniakem po dobu 5 až 8 dnů v přítomnosti chloridu amonného v množství 1 až 3 moly na 1 mol výchozí látky nebo po dobu 4 až 10 dnů v přítomnosti chloridu amonného v množství 1 až 2 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou v množství 4 až 8 molů na 1 mol výchozí látky.

Reakci s kapalným amoniakem je možno též provádět po dobu 4 až 6 dnů v přítomnosti chloridu amonného v množství 0,5 až 2 moly na 1 mol výchozí látky, poté odstranit kapalný amoniak, přidat metanol nebo etanol nasycený při 0 °C plynným amoniakem a alespoň jeden katalysátor ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou v množství 4 až 6 molů na 1 mol výchozí látky a reakci nechat probíhat po dobu dalších 10 až 12 dnů.

Reakce může být prováděna také s metanolickým nebo etanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C plynným amoniakem, a to po dobu 20 až 24 dnů v přítomnosti chloridu amonného v množství 1 až 2 moly na 1 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou v množství 3 až 6 molů 1 mol výchozí látky. Katalysátor ze skupiny kyselin může být přidán do reakční směsi až po 8 až 12 dnech od počátku reakce.

Ve všech uvedených případech se po ukončení reakce odstraní amoniak z reakční směsi a provede se hydrolysa vzniklých aldiminů, výhodně zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, na D-glukosamin, který se izoluje ve formě soli, výhodně jako hydrochlorid.

Výhoda tohoto způsobu přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem ^{14}C spočívá v tom, že

- D-glukosamin se připravuje z dostupného a ekonomicky výhodného zdroje, tj. D-glukosy,
- D-glukosu lze převádět na výchozí látky reakcemi s aminy s využitím Amadoriho přesmyku ve výtěžcích až přes 80 %,
- lze regenerovat výchozí látky, takže je celkově využito až přes 70 % výchozí radioaktivity,
- reakce 1-N-alkyl/nebo aryl/amino-1-deoxy-D-fruktosy s amoniakem představují nový obecný typ reakcí, umožňující volbu 1-N-substituentu.

Způsob podle vynálezu je dále objasněn v následujících příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

1-Amino-1-deoxy-D-/U- ^{14}C /fruktosa /ve formě acetátu/ /40 MBq; měrná aktivita výchozí D-/U- ^{14}C /fruktosy $9,2 \text{ GBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$, což platí i dále pro příklady 2 až 6/, 1 ml kapalného amoniaku a 0,6 mg chloridu amonného se nechá reagovat po dobu 5 dnů při teplotě 20 až 22 °C v zatavené skleněné ampuli. Amoniak se odpaří, přidá se 0,5 ml 0,5 M kyseliny chlorovodíkové a roztok se zahřívá po dobu 5 až 10 min na 50 až 60 °C.

D-/U- ^{14}C /Glukosamin ve formě hydrochloridu lze izolovat např. preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol - etanol - voda 52:33:15. Totéž platí i dále pro příklady 2 až 6. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U- ^{14}C /glukosaminu je 44 %.

P ř í k l a d 2

1-N-Benzylamino-1-deoxy-D-/U- ^{14}C /fruktosa /ve formě hydrochloridu/ /61 MBq/, 1,5 ml kapalného amoniaku, 1 mg chloridu amonného a 3,5 mg kyseliny glutarové se nechá reagovat po dobu 8 dnů v autoklávu při teplotě 23 až 25 °C. Amoniak se odpaří, přidají se 2 ml 0,5M kyseliny chlorovodíkové a roztok se zahřívá po dobu 15 až 20 min na 60 °C. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U- ^{14}C /glukosaminu je 22 %.

P ř í k l a d 3

1-N-Cyklohexylamino-1-deoxy-D-/U- ^{14}C /fruktosa /ve formě hydrochloridu/ /83 MBq/, 1,5 ml kapalného amoniaku a 0,5 mg chloridu amonného se nechá reagovat v zatavené ampuli po dobu 6 dnů.

Amoniak se odpaří, přidá se 2,5 mg kyseliny jantarové, 2,7 mg kyseliny benzoové a 1,5 ml bezvodého etanolu, nasyceného při 0°C plynným amoniakem a nechá se reagovat v zatavené ampuli při teplotě stejné jako v první fázi reakce, tj. 20 až 25 °C. Roztok se vakuově odpaří, načež se provede hydrolysa kyselinou chlorovodíkovou jako v příkladu 2. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U- ^{14}C /glukosaminu je 19 %.

P ř í k l a d 4

1-N-Fenylamino-1-deoxy-D-/U- ^{14}C /fruktosa /ve formě hydrochloridu/ /48 MBq/, 4 ml bezvodého metanolu, nasyceného při 0°C plynným amoniakem, 0,5 mg chloridu amonného a 7,8 mg kyseliny gallové se nechá reagovat v dobře utěsněné baňce při teplotě 22 až 25 °C po dobu 22 dnů.

Roztok se vakuově odpaří, přidá se 2,5 ml 0,5M kyseliny chlorovodíkové a roztok se zahřívá po dobu 25 min na 65 °C. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U- ^{14}C /glukosaminu je 29 %.

P ř í k l a d 5

1-N-p-Tolylamino-1-deoxy-D-/U-¹⁴C/fruktosa /ve formě hydrochloridu /64 MBq/, 4 ml metanolu, nasyceného při 0 °C plynným amoniakem, a 0,6 mg chloridu amonného se nechá reagovat v dobře utěsněné baňce při teplotě 20 až 25 °C po dobu 10 dnů.

Poté se do reakční směsi přidá roztok 4,3 mg kyseliny jantarové v 0,3 ml metanolu a reakční směs se nechá stát při stejné teplotě po dobu dalších 11 dnů. Roztok se vakuově odpaří a provede se hydrolysa kyselinou chlorovodíkovou jako v příkladu 4. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U-¹⁴C/glukosaminu je 33 %.

P ř í k l a d 6

1-N-p-Tolylamino-1-deoxy-D-/U-¹⁴C/fruktosa /ve formě hydrochloridu/ /39 MBq/, 1,5 ml kapalného amoniaku, 2,8 mg kyseliny jantarové a 2,1 mg kyseliny glutarové se nechá reagovat v zastavené ampuli při teplotě 22 až 25 °C po dobu 8 dnů.

Amoniak se odpaří a provede se hydrolysa kyselinou chlorovodíkovou jako v příkladu 4. Radiochemický výtěžek hydrochloridu D-/U-¹⁴C/glukosaminu je 15,5 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy D-glukosaminu značeného radioisotopem ¹⁴C vyznačený tím, že značená 1-amino-1-deoxy-D-fruktosa nebo 1-N-alkyl/nebo aryl/amino-1-deoxy-D-fruktosa se uvede v reakci s kapalným amoniakem nebo/a metanolickým amoniakem nebo/a etanolickým amoniakem s výhodou při teplotě 18 až 25 °C po dobu 4 až 24 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti chloridu amonného v množství 0,5 až 3 moly na 1 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou, výhodně v množství 3 až 8 molů na 1 mol výchozí látky.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že reakce s kapalným amoniakem se provádí po dobu 4 až 6 dnů v přítomnosti chloridu amonného v množství 0,5 až 2 moly na 1 mol výchozí látky, poté se kapalným amoniakem odstraní a přidá metanol nebo etanol nasycený při 0 °C plynným amoniakem a alespoň jeden katalysátor ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou, v množství 4 až 6 molů na 1 mol výchozí látky a směs se nechá reagovat po dobu dalších 10 až 12 dnů.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že reakce se provádí s metanolickým nebo etanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C plynným amoniakem, po dobu 20 až 24 dnů, v přítomnosti chloridu amonného v množství 1 až 2 moly na 1 mol výchozí látky a/nebo alespoň jednoho katalysátoru ze skupiny zahrnující kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu benzoovou a kyselinu gallovou, v množství 3 až 6 molů na 1 mol výchozí látky.

4. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že katalysátor ze skupiny kyselin se přidá do reakční směsi až po 8 až 10 dnech od počátku reakce.

OPRAVA

popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 252 230

Int. Cl.⁴ C 07 H 5/06

V popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 252 230
na titulní straně není dotištěn název vynálezu.

Správně má být:

Způsob přípravy D-glukosaminu značeného
radioisotopem ¹⁴C

Úřad pro vynálezy a objevy
