



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

206 942

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 12 09 79

(21) PV 6160-79

(51) Int. Cl.³ C 07 H 3/02

(40) Zverejnené 15 09 80

(45) Vydané 01 11 83

(75) Autor vynálezu BÍLIK VOJTECH RNDr. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEDNICA,
TIHLÁRIK KAROL ing. CSc. a SANDTNEROVÁ ROZÁLIA RNDr., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy kyseliny D-(U-¹⁴C) glukurónovej z (U-¹⁴C) α-glukánov oxidovaných
kysličníkom dusičitým

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny D-(U-¹⁴C) glukurónovej z (U-¹⁴C) α-glukánov oxidovaných kysličníkom dusičitým.

Efektívne prípravy kyseliny D-glukurónovej sú vo väčšine prípadov založené na oxidácii primárnej hydroxylovej skupiny D-glukózy za súčasného chránenia vhodnými substituentami poloacetálovej prípadne i sekundárnych hydroxylových skupín oxidovanej aldózy. Ako oxidačné činidlá sa používajú manganistan draselný, kysličník dusičnatý, avšak najčastejšie kysličník za katalytického účinku vzácnych kovov (C. L. Mehlretter; adv. Carbohydr. Chem. 8, 231 (1953); K. Heyns, H. Paulsen; Adv. Carbohydr. Chem. 17, 169 (1962). Metóda prípravy kyseliny D-glukurónovej oxidáciou - kyslíkom za prítomnosti platínového katalyzátora - 1,2-O-izopropylidén-α-D-glukofuranózy (C. L. Mehlretter; Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 2, p. 29, Academic Press Inc., New York - London 1963) sa uplatňuje tiež na prípravu kyseliny D-(U-¹⁴C) glukurónovej. Navrhovaný spôsob prípravy je v prevedení podstatne jednoduchší a využíva relatívne najdostupnejší zdroj D(U-¹⁴C)glukózy - (U-¹⁴C)α-glukány (Z. Nejedlý, J. Filip, J. Kolina, J. Ekl, D. Gruenberger; čs. patent 121808, CA. 68, 11728 (1968)).

Podstata vynálezu spočíva v tom, že (U-¹⁴C)α-glukán oxidovaný kysličníkom dusičitým sa hydrolyzuje 80 až 90 % kyselinou mravčou pri teplote 80 až 90 °C po dobu 10 až 15 hodín, alebo pôsobením α-amylázy a glukosylázy po dobu 24 až 48 hodín pri teplote 20 až 35 °C. Z reakčnej zmesi sa kyselina D-(U-¹⁴C)glukurónová izoluje vo forme jej 3,6-laktónu chromatografiou na papieri za použitia elučného systému 1-butanol-etanol-voda 5 : 1 : 4

208 942

od D-(U- ^{14}C)glukózy a nezhydrolyzovaného zvyšku polysacharidov. Výťažky kyseliny D-(U- ^{14}C)glukurónovej sa pri postupe kyslej hydrolyzy pohybujú v rozmedzí 38 až 43 % a enzymatickej hydrolyzy 10 až 13 % počítané na východiskový (U- ^{14}C) α -glukán.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy kyseliny D-(U- ^{14}C)glukurónovej je, že

- využíva relatívne dostupný (U- ^{14}C) α -glukán a súčasne tým sa zároveň ušetrí ďalšie stupne syntézy vhodných derivátov D-(U- ^{14}C)glukózy pre jej oxidáciu,
- technické prevedenie oxidácie a hydrolyzy je veľmi jednoduché a chromatografická izolácia umožňuje získať kyselinu D-(U- ^{14}C)glukurónovú o vysokej čistote.

Príklad 1

Do skúmavky opatrenej zábrusom sa dá vodorozpustný (U- ^{14}C) α -glukán (10 μCi - glukán izolovaný z rias *Chlorella* sp. - produkt Ústavu pre výskum, výrobu a využitie rádioizotópov, Praha), prípadne sa riedi neznačeným glukánom (50 mg - glykogén z ustríc - produkt JT Baker Chemical Co). Glukán sa vysuší v exikátore nad kyslíčnikom fosforečným (24 h) a potom vloží do ďalšieho exikátora, v ktorom je atmosféra kyslíčnikov dusíka a nechá stáť pri teplote miestnosti 4 až 5 dní. Atmosféra kyslíčnikov dusíka sa vytvorí buď vložením 2 až 3 ml kvapalného kyslíčnika dusičitého (produkt Syntézia n.p. Pardubice) alebo reakciou dusitanu sodného s kyselinou sírovou. Po odparení zvyškov kyslíčnikov dusíka (na vákuovej rotačnej odparke) sa do skúmavky pridá 85 % vodný roztok kyseliny mravčej (1 ml) a reakčná zmes sa zahrieva 12 hodín na 90 °C. Roztok sa na rotačnej odparke odparí do sucha, potom sa pridá voda (1 ml) zahreje na 90 °C 1 hodinu a opäť odparí do sucha. Nakoniec sa k destiláčnemu zvyšku pridá voda (1 ml) zahrieva 2 hodiny na 90 °C a po vychladnutí roztok sa nanesie na chromatografický papier (Whatman No 1) a chromatografuje v elučnom systéme 1-butanol-etanol-voda (5 : 1 : 4 V/V) 17 - 19 hodín pri teplote miestnosti. Po detekcii reprezentatívneho pásu chromatografického papiera (0,5 cm) radiometricky, resp. číničkom kyslého ftalátu anilínu sa jednotlivé zóny chromatogramu izolujú (formylderivát kyseliny D-glukurónovej, kyselina D-glukurónová, D-glukóza a polysacharidy). Výťažek kyseliny D-glukurónovej sa pohybuje v rozmedzí 38 až 43 % počítané na východiskový glukán.

Príklad 2

Oxidácia (U- ^{14}C) α -glukánu sa uskutočňuje ako je uvedené v príklade 1 a po odstránení zvyškov kyslíčnikov dusíka (na vákuovej rotačnej odparke) získaný oxidovaný glukán sa rozpustí (1 ml) v fosfátarovom pufre (0,05 M, pH 5,6), ktorý obsahuje α -amylázu (0,2 U, zo slín) a glucoamylázu (0,5 U, z *Endomycopsis bispore*). Po enzymatickej hydrolyze (24 h, 30 °C) sa kyselina D-(U- ^{14}C)glukurónová izoluje z reakčnej zmesi chromatografiou na papieri, ako je uvedené v príklade 1. Výťažek kyseliny D-(U- ^{14}C)glukurónovej sa pohybuje v rozmedzí 10-13 % počítané na východiskový glukán.

Kyselina D-(U- ^{14}C)glukurónová je zlúčenina veľmi užitočná pri štúdiu metabolizmu kyslých polysacharidov živočíšneho pôvodu, predovšetkým v medicíne pri diagnostike metabolických porúch a pri štúdiu fyziologických procesov prebiehajúcich v rastlinách a k sledovaniu metabolizmu polysacharidov bunečnej steny mikroorganizmov.

Spôsob prípravy kyseliny D-(U-¹⁴C)glukurónovej z (U-¹⁴C) α-glukánov oxidovaných kyslíč-
níkom dusičitým, vyznačujúci sa tým, že oxidovaný (U-¹⁴C) α-glukán sa hydrolyzuje 80 až
90 % kyselinou mravčou pri teplote 80 až 90 °C po dobu 10 až 15 hodín, alebo pôsobením
α-amylázy a glukoamylázy po dobu 24 až 48 hodín pri teplote 20 až 35 °C a z reakčnej zme-
si sa kyselina (U-¹⁴C) D-glukurónová izoluje od vedľajších produktov hydrolyzy chromatogra-
fiou na papieri elučným systémom 1-butanol-etanol-voda.