



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231 398

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 07 83
(21) PV 5095-83

(51) Int. Cl.³
C 07 C 59/105

(40) Zveřejněno 15 03 84
(45) Vydáno 01 03 87

(75)
Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy kyseliny D-glukuronové značené radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C

Vynález se týká způsobu přípravy kyseliny D-glukuronové, značené radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C .

Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že příslušným isotopem značený α -D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů nebo/a methyl- α -D-glukopyranosid se oxidují na odpovídající 6-karboxyderiváty, které se hydrolysuji kyselinou trifluoroctovou, s výhodou o 25 až 45 % koncentraci.

Vynález řeší způsob přípravy kyseliny D-glukuronové, značené radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C .

Kyselina D-glukuronová je po biochemické i fyziologické stránce velmi důležitá přírodní látka. Ve formě značené isotopy uhlíku ^{14}C nebo ^{13}C je efektivně využitelná při studiu metabolismů, zejména při sledování vylučování pro organismus nežádoucích látek a při lékařské diagnostice metabolických poruch, nebo při sledování metabolismu polysacharidů, zejména pocházejících z buněčných stěn mikroorganismů.

Přírodním zdrojem kyseliny D-glukuronové jsou polysacharidy a proteiny, ze kterých ji lze získat, poměrně s obtížemi, hydrolysou /Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J.: Monosacharidy, NČSAV, Praha 1960, s. 409/. K syntetické přípravě kyseliny D-glukuronové se využívá oxidace primární hydroxylové skupiny v molekule D-glukosy, přičemž je současně třeba chránit jiná, oxidace schopná místa v molekule, především anomerní hydroxylovou skupinu, případně i sekundární hydroxylové skupiny, zejména v polohách C-2 a C-4. Vhodnými výchozími deriváty D-glukosy jsou D-glukosidy, především methyl- α -D-glukopyranosid /Patentové spisy USA 2 592 249 a 2 592 266, Britský patentový spis 670 929/ a různé acetaly /Japonské patentové spisy 376/52 a 6282/53 /. Podmínku současného chránění hydroxylových skupin v polohách C-1 a C-4 splňují polysacharidy obsahující D-glukosu, které jsou rovněž využívány k přípravě kyseliny D-glukuronové, jako škrob /Japonské patentové spisy 6321/58 a 179 069, Patentový spis USA 2 472 590/ a celulóza /McGee P.A., Fowler W.F., Unruh C.C., Kenyon W.O.: J. Amer. Chem. Soc. 70, 2700 /1948/ /.

Jako oxidační činidla se používají /viz též shora citované patentové spisy/ kyslík nebo vzduch /Heyns K., Heinemann R.: Ann. 558, 187 /1947/ /, manganistan draselný /Stacey M.: J. Chem. Soc. 1939, 1529/, plynný nebo kapalný oxid dusičitý /Kerr R.W.: J. Amer. Chem. Soc. 72, 816 /1950/ /, kyselina dusičná /Heyns K., Graefe G.: Chem. Ber. 86, 646 /1953/ /, halogeny /Farley F.F., Hixon R.M.: Ind. Eng. Chem. 34, 677 /1942/ /, případně i jiná, méně významná.

Kyselina D-glukuronová se po oxidaci z příslušných 6-karboxylových derivátů uvolňuje hydrolytickou cestou použitím minerálních kyselin /sírové, chlorovodíkové/, organických kyselin /mravenčí, octové/ nebo enzymově /vždy viz už výše uvedené citace/. Právě tento stupeň přípravy kyseliny D-glukuronové je zdrojem největších problémů, především při použití polysacharidů jako výchozích látek. Výtěžky kyseliny D-glukuronové se v důsledku obtížné hydrolysy snižují do té míry, že obvykle nedosahují ani 10 % /viz např. shora citované patentové spisy/.

Za podmínek, kdy teprve dochází k hydrolyse, nastává již i značný rozklad kyseliny D-glukuronové a to zejména při použití minerálních kyselin /Heyns K., Graefe G.: Chem. Ber. 86, 646 /1953/, Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J.: Monosacharidy, NČSAV, Praha 1960, s. 413/. Použití mírnějších činidel je zase málo účinné a probíhá s nízkými výtěžky /Hardegger E., Spitz D.: Helv. Chim. Acta 32, 2165 /1949/, jako je tomu u kyseliny mravenčí nebo enzymové hydrolysy amylázovými nebo diastázovými preparáty /Kerr L.M.H., Graham A.F., Levvy G.A.: Biochem. J. 42, 191/1948/ /. S podobnými obtížemi se setkává i způsob přípravy kyseliny D-/U-¹⁴C/-glukuronové /Bílik V., Zemek J., Tihlárík K., Sandtnerová R.: PV 6160-79/, používající zmíněnou hydrolysu kyselinou mravenčí.

Při přípravě značené kyseliny D-glukuronové, kdy se jedná navíc o práci s množstvím výchozí látky cca 10³krát nižším, než je obvyklé při práci s neradioaktivním materiálem v laboratorních podmínkách, vedou obvyklé způsoby hydrolysy jak kyselin polyglukuronových, tak i uronosidů k dalšímu snížení výtěžků.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy kyseliny D-glukuronové, značené radioisotopem ¹⁴C nebo stabilním isotopem ¹³C jehož podstata spočívá v tom, že příslušným isotopem značený α-D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů nebo/a methyl-α-D-glukopyranosid se oxidují na odpovídající 6-karboxyderiváty, které se hydrolysuji kyselinou trifluoroctovou, s výhodou o 25 až 45% koncentraci.

Hydrolysa se provádí za normálního tlaku, výhodně při teplotách 80 až 100 °C po dobu 12 až 22 hodin.

Hydrolysu je též možno provádět v uzavřeném systému /tj. při zvýšeném tlaku/, s výhodou při teplotách 90 až 120 °C po dobu 8 až 14 hodin.

Výhoda tohoto způsobu přípravy kyseliny D-glukuronové, značené radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C spočívá v použití kyseliny trifluoroctové k hydrolyse meziproductů, vznikajících oxidací značeného α -D-glukanu nebo methyl- α -D-glukopyranosidu výhodně kapalným oxidem dusičitým. Takto prováděná hydrolysa

- probíhá snadněji, za mírnějších podmínek a dochází k menším ztrátám rozkladem produktu než při použití minerálních kyselin,
- probíhá snadněji, úplněji a bez nutnosti dodatečné hydrolysy esterů, vznikajících jako vedlejší produkty než při použití jiných organických kyselin,
- probíhá úplněji a rychleji, než při enzymové hydrolyse,
- umožňuje odstranění hydrolysujiícího činidla pouhým vakuovým odpařením,
- vede k vyšším výtěžkům produktu.

Způsob podle vynálezu je blíže objasněn v následujících příkladech provedení.

Příklad 1

α -D-/U- ^{14}C -Glukan /370 MBq/, izolovaný z řasy *Chlorella vulgaris* Beijerinck, se vysuší vymrazením in vacuo a při teplotě 0 °C se převrství 5 ml kapalného oxidu dusičitého. Reakční směs se nechá stát při teplotě 0 až 5 °C po dobu 120 hodin. Oxid dusičitý se vakuově odstraní a oxidovaný produkt se hydrolysuje 40% kyselinou trifluoroctovou /8 ml/ za varu pod zpětným chladičem po dobu 16 hodin. Vzniklý roztok se vakuově odpaří k suchu, odparek rozpustí ve vhodném objemu vody a kyselina D-/U- ^{14}C -glukuronová jednak volná, jednak ve formě laktonu, se kterým vytváří rovnovážné směsi, se isoluje preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě n-butanol - ethanol - voda /4:1:1/.

Radiochemický výtěžek kyseliny D-/U- ^{14}C -glukuronové /včetně laktonu/ 95 MBq, tj. 26 %.

Příklad 2

231 398

α -D-/U-¹⁴C/-Glukan /88 MBq/, izolovaný z řasy *Chlorella vulgaris* Beijerinck, se vysuší vymrazením in vacuo a při teplotě 0 °C se převrství 2 ml kapalného oxidu dusičitého. Reakční směs se nechá stát při teplotě 0 až 5 °C po dobu 80 hodin. Oxid dusičitý se vakuově odstraní a oxidovaný produkt se hydrolysuje 25% kyselinou trifluoroctovou /4 ml/ v autoklávu při teplotě 115 až 120 °C po dobu 9 hodin. Reakční směs se dále zpracuje a produkt izoluje jak je uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek kyseliny D-/U-¹⁴C/-glukuronové /včetně laktonu/ 15,8 MBq, tj. 18 %.

Příklad 3

Methyl- α -D-glukopyranosid /10 mg/ se přidá ke 2 ml vodného roztoku methyl- α -D-/U-¹⁴C/-glukopyranosidu /60 MBq/, roztok se vakuově odpaří k suchu a vysuší vymrazením. Odparek se převrství 4 ml kapalného oxidu dusičitého při teplotě 0 až 5 °C a nechá při téže teplotě stát po dobu 100 hodin. Oxid dusičitý se vakuově odstraní a oxidovaný produkt se hydrolysuje 45% kyselinou trifluoroctovou /4,5 ml/ v zatavené skleněné ampuli při 95 až 100 °C po dobu 8 hodin. Reakční směs se dále zpracuje a produkt izoluje jak je uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek kyseliny D-/U-¹⁴C/-glukuronové /včetně laktonu/ 27 MBq, tj. 45 %.

Příklad 4

Methyl- α -D-/U-¹⁴C/-glukopyranosid /203 MBq/ se vysuší vymrazením in vacuo a při teplotě 0 °C se převrství 3 ml kapalného oxidu dusičitého. Reakční směs se nechá při teplotě 0 až 5 °C stát po dobu 124 hodin. Oxid dusičitý se vakuově odstraní a oxidovaný produkt se hydrolysuje 35% kyselinou trifluoroctovou /5 ml/ za varu pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin a poté po přidavku dalších 3 ml 35% kyseliny trifluoroctové ještě 8 hodin. Reakční směs se dále zpracuje a produkt izoluje jak je uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek kyseliny D-/U-¹⁴C/-glukuronové /včetně laktonu/ 71 MBq, tj. 35 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

231 398

1. Způsob přípravy kyseliny D-glukuronové, značené radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C vyznačený tím, že příslušným isotopem značený α -D-glukan, izolovaný s výhodou z fotoautotrofních organismů nebo/a methyl- α -D-glukopyranosid se oxidují na odpovídající 6-karboxyderiváty, které se hydrolysují kyselinou trifluoroctovou, s výhodou o 25 až 45% koncentraci.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že hydrolysa se provádí za normálního tlaku, výhodně při teplotách 80 až 100 °C po dobu 12 až 22 hodin.
3. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že hydrolysa se provádí v uzavřeném systému, s výhodou při teplotách 90 až 120 °C po dobu 8 až 14 hodin.