ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252228

(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 07 C 69/02

(22) Přihlášeno 11 09 85
(21) PV 6484-85

(40) Zveřejněno 15 01 87
(45) Vydáno 15 09 88

(75)
Autor vynálezu ELBERT TOMÁŠ RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy symetrických triglyceridů

Navržené řešení se týká způsobu přípravy symetrických triglyceridů, obsluhujících mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, značených radioisotopy ^{14}C a ^{3}H o molových aktivitách 1 200 MBq.mmol^{-1} až 6.6 TBq.mmol^{-1}, vyznačeného tím, že se k roztoku značené mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, glycerinu a 4-dialkylaminopyridinu, například 4-dimetylaminopyridinu, v chlorovaném uhlovodíku, například 1,2-dichloretanu, dichlormetanu, chloroformu, postupně přidává roztok dicyklohexylkarbodiimidu v aromatickém uhlovodíku, například benzenu. Značené symetrické triglyceridy, například glyceryl-tri[U-^{14}C]palmitát, glyceryl-tri[U-^{14}C]oleát, glyceryl-tri[9,10-^{3}H]-stearát, je možné využít v klinické biochemii při diagnostice chorob zažívacího ústrojí a dále v základním medicínském výzkumu při studiu metabolismu srdečního svalu.

Vynález se týká způsobu přípravy symetrických triglyceridů značených radioisotopy ^{14}C a ^{3}H o molových aktivitách 1 200 MBq.mmol^{-1} až 6.6 TBq.mmol^{-1} reakcí značené mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku s gylcerinem a dicyklohexylkarbodiimidem (dále jen DCC) za katalýzy 4-dialkylaminopyridinem, například 4-dimetylaminopyridinem, v prostředí chlorovaných uhlovodíků, například 1,2-dichlorethanu.

V literatuře popsané přípravy značených triglyceridů (Dauben W.G.: J.Amer. Chem. Soc. 70, 1 976 (1948); Rakoff H., Emken E.A.: J. Labelled Compd. Radiopharm. 19, 19 (1982) spočívají v převedení mastné kyseliny na axylchlorid jenž pak reaguje s glycerinem v chloroformu za přítomnosti pyridinu. Molové aktivity jsou nízké (37 MBq.mmol^{-1}), celkově se zpracovávají gramová množství látek a výtěžky se pohybují v rozmezí 50 až 60 %, vztaženo na výchozí mastnou kyselinu. Při použití uvedeného postupu pro syntézu symetrických triglyceridů s molovou aktivitou o tři a více řádů vyšší v hmotnostním měřítku desítek miligramů a méně lze očekávat další rapidní pokles výtěžků, což je nepřijatelné vzhledem k ceně výchozích mastných kyselin. V neaktivních a stopovacích pokusech byla vyzkoušena aplikace Hassnerovy metody esterifikace alkoholů volnými karboxylovými kyselinami (Hassner A., Alexanian V.: Tetrahedron Lett. 46, 4 475 (1978) působením nadbytku DCC za katalýzy 4-dimetylaminopyridinem v dichlormetanu na přípravu symetrických triglyceridů. Výtěžky nepřesáhly 60 %, vztaženo na výchozí mastnou kyselinu.

Výsledkem podrobného studia mechanismu Hassnerovy esterifikace je předmětný vynález způsobu přípravy symetrických triglyceridů značených radioisotopy ^{14}C a ^{3}H jehož podstatou je, že se k roztoku značené mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, glycerinu a 4-dialkylaminopyridinu, například 4-dimetylaminopyridinu, v chlorovaném uhlovodíku, například 1,2-dichloretanu, dichlormetanu, chloroformu, postupně přidává roztok DCC v aromatickém uhlovodíku, například benzenu.

Přínosem vynálezu je vypracování metody esterifikace glycerinu mastnými kyselinami se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku značenými radioisotopy ^{14}C a ^{3}H v měřítku 0,001 až 0,1 mmol bez nutnosti předchozí derivatizace umožňující přípravu značených symetrických triglyceridů o molových aktivitách 1 200 MBq.mmol^{-1} až 6.6 TBq.mmol^{-1} ve výtěžku 80 až 90 %, vztaženo na výchozí mastnou kyselinu. Výhodou 1,2-dichloretanu je jeho dobrá stabilita při skladování nad molekulovým sítem za nepřístupu světla. Dichlormetanu či chloroform je nutno před reakcí vždy čerstvě předestilovat.

Vyšší účinek podle vynálezu, ve srovnání se známými postupy, spočívá v postupném přidávání roztoku DCC (zásobní roztok DCC v benzenu je za nepřístupu vzdušné vlhkosti stálý několik měsíců) k reakční směsi, takže vlastním acylačním činidlem je anhydrid mastné kyseliny na rozdíl od O-acylmočoviny (vzniklé jednorázovým přidáním nadbytku DCC), která částečně přesmykuje na nereaktivní N-acylmočovinu, čímž se snižují výtěžky.

Reakce se provádí v reakční baňce opatřené magnitickým míchadlem a nástavcem pro práci v inertní atmosféře opatřeným septem ze silikonového elastomeru. Obsah baňky se chrání před světlem obalením hliníkovou folií (Alobal). Ke směsi mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, glycerinu a 4-dialkylaminopyridinu, například 4-dimetylaminopyridinu, v chlorovaném uhlovodíku, například 1,2-dichloretanu, se za intenzivního míchání při teplotě místnosti přidává injekční stříkačkou roztok DCC v aromatickém uhlovodíku, například benzenu.

Průběh reakce se sleduje pomocí tenkovrstvé radiochromatografie. Po dosažení 90 až 95% konverze výchozí mastné kyseliny se připravený triglycerid izoluje bleskovou chromatografií (flash-chromatography) na silikagelu o nominálním zrnění 40 u v systému n-hexan - -etylacetátu. Molová aktivita připraveného triglyceridu se vypočte z celkové aktivity izolovaného produktu a z hmotnostního výtěžku, stanoveného vážením krystalického odparku. Radiochemická a chemická čistota produktu se stanový tenkovrstvou radiochromatografií.

Využití postupu podle vynálezu umožňuje přípravu glyceryl-tri[U-^{14}C]palmitátu a glyceryl-tri[U-^{14}C]oleátu o molové aktivitě vyšší než 1 200 MBq.mmol^{-1} používaných v klinické biochemii k diagnostice chorob zažívacího ústrojí a v základním medicínském výzkumu ke studiu metabolismu srdečního svalu. Metoda je obecně vhodná pro přípravu esterů značených radioisotopy ^{14}C a ^{3}H z volné kyseliny a alkoholu v submilimolovém měřítku.

P ř í k l a d 1

Příprava glyceryl-tri[U-^{14}C]palmitátu

Reakční baňka obsahující 324 MBq kyseliny [U-^{14}C]palmitové molové aktivitě 736 MBq.mmol^{-1}, 13,8 mg (0,15 mmol) glycerinu a 30 mg 4-dimetylaminopyridinu (0,27 mmol) opatřená magnetickým míchadlem a nástavcem pro práci v inertní atmosféře byla propláchnuta atgonem a do baňky bylo injekčním stříkačkou přidáno 5 cm^3 1,2-dichloretanu. Po rozpouštění všech reakčních složek bylo za intenzivního míchání po částech přidáno celkem 0,89 cm^3 0,5 M roztoku DCC v benzenu. Podle tenkovrstvé radiochromatografie bylo 92 % aktivity ve formě glyceryltripalmitátu. Reakční směs byla odpařena k suchu, odparek byl extrahován 5 cm^3 benzenu a 5 cm^3 toluenu a po zahuštění na objem 2 cm^3 byl extrakt nanesen na kolonu s 25 g silikagelu /fy J.T. Baker). Jako mobolní fáze bylo použito n-hexanu obsahujícího 4 % (obj.) ethalacetátu. Po kontrole jednotlivých frakcí tenkovrstvou radiochromatografií byly frakce obsahující čistý glyceryl-tri U-^{14}C palmitát spojeny a odpařeny k suchu - hmotnostní výtěžek 105 mg (86,7 %). Odparek byl rozpuštěn v 10 cm^3 toluenu a byla stanovena celková aktivita roztoku - 276 MBq (85,2 %). Molová aktivita připraveného glyceryl-tri U-^{14}C palmitátu byla 2 123 MBq.mmol^{-1}. Radiochemická a chemická čistota, stanovené tenkovrstvou radiochromatografií a detekcí kyselinou fosfomolybdenovou, byly lepší než 98 %.

P ř í k l a d 2

Příprava glyceryl-tri[U-^{14}C]oleátu

Esterifikace 9,2 mg (0,1 mmol) glycerinu 82 mg kyseliny [U-^{14}C]olejové o molové aktivitě 630 MBq.mmol^{-1} za katalýzy 18 mg (0,15 mmol) 4-dimetylaminopyridinu v 5 cm^3 dichlormetanu postupným přidáním celkem 0,61 cm^3 0,5 M roztoku DCC v benzenu byl provedena stejným postupem, jako je uvedeno v příkladu 1. Jako mobilní fáze při bleskvé chromatografii byl použit n-hexan s 2 % (obj.) etylacetátu. Hmotnostní výtěžek byl 78 mg (88 %). Odparek byl rozpuštěn v 5 cm^3 toluenu a byla stanovena celková aktivita roztoku - 165 MBq (87 %). Molová aktivita připraveného glyceryl-tri [U-^{14}C]oleátu byla 1 833 MBq.mmol^{-1}. Radiochemická a chemická čistota, stanovené tenkovrstvou radiochromatografií a detekcí kyselým roztokem $KMnO_4$, byly lepší než 98 %.

P ř í k l a d 3

Příprava glyceryl-tri [9,10-^{3}H]stearátu

K roztoku 336 MBq kyseliny [9,10-^{3}H]stearové o molové aktivitě 767 MBq.mmol^{-1}, 13,8 mg (0,15 mmol) glycerinu a 22 mg (0,2 mmol) 4-dimetylaminopyridinu v 5 cm^3 chloroformu bylo za míchání v ochranné argonové atmosféře a za nepřístupu světla přidáno po částech celkem 0,91 cm^3 0,5 M roztoku DCC v benzenu. Hmotnost čistého glyceryl-tri-[9,10.^{3}H]stearátu po izolaci bleskovou chromatografií byla 123 mg (92 %), celková aktivita byla 306 MBq (91 %). Molová aktivita připraveného glyceryl-[9,10-^{3}H]stearátu byla 2 186 MBq.mmol^{-1}. Radiochemická a chemická čistota, stanovené tenkovrstvou radiochromatografií a detekcí kyselinou fosfomolybdenovou, byly lepší než 98 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy symetrických triglyceridů, obsahujících mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, značených radioisotopy ^{14}C a ^{3}H o molových aktivitách 1 200 $MBq.mmol^{-1}$ až 6.6 $TBq.mmol^{-1}$ vyznačený tím, že se k roztoku značené mastné kyseliny se čtrnácti až dvaceti atomy uhlíku, glycerinu a 4-dialkylaminopyridinu, například 4-dimetylaminopyridinu, v chlorovaném uhlovodíku, například 1,2-dichloretanu, dichlormetanu, chloroformu, postupně přidává roztok dicyklohexylkarbodiimidu v aromatickém uhlovodíku, například benzenu.

Severografia, n. p., MOST

Cena 2,40 Kčs