



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(22) Prihlásené 29 11 76

(21) (PV 7687-76)

(40) Zverejnené 31 07 79

(45) Vydané 15 07 81

196655

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 07 H 19/20

(75)

Autor vynálezu

FARKAŠ VLADIMÍR ing., CSc., BIELY PETER RNDr. CSc., BRATISLAVA
a KÖLBL JAN, ing., PRAHA

(54) Spôsob prípravy uridín-difosfo-¹⁴C-D-glukurónovej kyseliny vysokej mólovej aktivity a rádiochemickej čistoty

Predmetom vynálezu je spôsob prípravy uridín-difosfo-¹⁴C-D-glukurónovej kyseliny (UDPGK-¹⁴C) značenej rádioaktívnym uhlíkom ¹⁴C vysokej mólovej aktivity enzymatickou syntézou a spôsob jej izolácie z reakčnej zmesi. Vynález rieši novým spôsobom prípravu uvedenej látky vysokej rádiochemickej čistoty, pričom mólová aktivita takto pripravenej látky presahuje 150 mCi/mmól.

Uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónová kyselina sa používa ako glukuronozylový donor pri štúdiu mechanizmu rôznych enzymatických transglykozylačných reakcií vedúcich k biosyntéze pektínu, kyslých polysacharidov, a tvorbe rôznych fenolických, steroidných a iných glykozidov. Uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónová kyselina sa v poslednom čase stále viac využíva ako substrát pri sledovaní aktivít rôznych hepatálnych transglykozyláz, ktoré sa zúčastňujú pri eliminácii rozmanitých cudzorodých látok z organizmov vyšších živočíchov.

Z uvedeného je zrejmé, že uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónová kyselina nachádza široké možnosti uplatnenia hlavne v základnom biologickom výskume, ale aj v klinickej diagnostike a pri výskume kontroly znečisťovania životného prostredia.

Uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónová kyselina sa najčastejšie pripravuje selektívnou oxidáciou uridín difosfo-¹⁴C-D-glukózy (UDPG-¹⁴C) s nikotínamid adenín difosfátom v prítomnosti enzýmu uridín

difosfo-glukózo-dyhydrogenázy (J. L. Strominger, H. M. Kalckar, J. Axelrod a E. S. Maxwell, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 6411 (1954)).

Spoločným problémom všetkých doteraz používaných spôsobov prípravy uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónovej kyseliny je izolácia produktu z reakčnej zmesi. Doteraz používané metódy iónoménicové alebo preparatívna papierová elektroforéza sú pomerne náročné na materiál i na prístrojové vybavenie. Metóda preparatívnej papierovej chromatografie sa doteraz nedala použiť vzhľadom k nedokonalnej separácii produktu od doprevádzajúcich cukorných fosfátov a nukleozid-fosfátov prítomných v reakčnej zmesi.

Predmetom vynálezu je spôsob prípravy uridín-difosfo-¹⁴C-D-glukurónovej kyseliny o vysokej mólovej aktivite a rádiochemickej čistote enzymatickou syntézou vyznačený tým, že sa ako východiskovej látky používa D-glukózy-¹⁴C, ktorá sa enzymaticky prevedie na uridín difosfo-¹⁴C-D-glukózu, ktorá sa naväznou enzymatickou reakciou oxiduje na uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónovú kyselinu, ktorá sa z reakčnej zmesi izoluje preparatívnou papierovou chromatografiou, čím sa z reakčnej zmesi pôsobením alkalického fosfatázy v prítomnosti fenolftaleínu ako iniciátora odstráni doprevádzajúce cukorné fosfáty a nukleozid-5'-fosfáty.

Predmetný vynález uvádza nový spôsob enzymatickej syntézy uridín difosfo-¹⁴C-D-glukurónovej

kyseliny vysokej rádioaktívnej čistoty a mólovej aktivity prevyšujúcej 150 mCi/mmól a izoláciu tejto látky z reakčnej zmesi. Tvorba uridín difosfo- ^{14}C -D-glukurónovej kyseliny z východiskovej D-glukózy ^{14}C je katalyzovaná enzýmovým systémom pripraveným z pekárenského droždia, obohateným enzýmom uridín-difosfo-D-glukózo-dehydrogenázou. Izolácia produktu z reakčnej zmesi sa prevádza jednoduchou a málo nákladnou metódou papierovej chromatografie. Aplikácia tejto metódy je umožnená elimináciou doprevádzajúcich fosfátov glukózy a nukleozid-5'-fosfátov ich selektívnou enzymatickou hydrolýzou. Výťažky takto pripravenej uridín difosfo- ^{14}C -D-glukurónovej kyseliny sa pohybujú v rozmedzí 95 až 85 % vzhľadom k východiskovej D-glukóze- ^{14}C . Tento spôsob prípravy uridín-difosfo- ^{14}C -D-glukurónovej kyseliny prináša tieto výhody:

1. vysoké výťažky
2. ľahká izolácia produktu z reakčnej zmesi
3. úspora času
4. úspora materiálu
5. možnosť použitia domácich surovín.

Príklad prevedenia

Reakčná zmes obsahuje nasledovné pomery východiskových látok alebo ich násobky: 0,4 ml 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,8); 1 mg D-glukózy- ^{14}C špecifickej mólovej aktivity 150 mCi/mmól a vyššej; 12 mg trojsódnej soli uridín trifosfátu; 20 mg fosfoglycerátu sodného; 10 mg chloridu horečnatého hexahydrátu; 0,05 mg glukózo-1,6-difosfátu, 0,2 mg hexokinázy; 0,2 mg anorganickej pyrofosfatázy, 15 mg proteínu enzýmového preparátu pripravené-

ho z pekárenského droždia postupom podľa A. Wright a P. W. Robbins, Biochim. Biophys. Acta 104, 594 (1965). Celkový objem reakčnej zmesi sa upraví na 2,4 ml prídavkom redistilovanej vody a zmes sa inkubuje pri 30 °C. Po ukončení konverzie D-glukózy- ^{14}C na uridín-difosfo- ^{14}C -D-glukózu (PV 7687-76) sa pH inkubačnej zmesi upraví na 8,7 a pridá sa 15 $\mu\text{mólov}$ NAD, 10 $\mu\text{mólov}$ EDTA a 0,25 mg uridín-difosfo-D-glukózo-dehydrogenázy. Zmes sa inkubuje pri laboratórnej teplote pokiaľ sa nedosiahne kvantitatívnej oxidácie uridín-difosfo- ^{14}C -D-glukózy na uridín difosfo- ^{14}C -D-glukurónovú kyselinu. Zmes sa potom krátko ohreje na 100 °C, denaturované proteíny sa odstránia centrifugáciou. K roztoku sa pridá kvapka 1 % fenoltaleínu a 0,02 mg alkalické fosfatázy. Konštantná hodnota pH sa udržiava prídávaním roztoku uhlíčitanu sodného. Po ukončení hydrolýzy fosfátov, čo je indikované stálosťou ružového zafarbenia roztoku, sa zmes naniesie na chromatografický papier a chromatografuje v systéme kyselina izomáselná - 1M hydroxid amónny (5:3) v 20 hodín. Chromatogram sa potom dôkladne premyje v acetóne a uridín difosfo- ^{14}C -D-glukurónová kyselina sa eluuje vodou. Ďalšie čistenie produktu sa prevádza rechromatografiou na papieri v systéme etanol-1M octan amónny, pH 7 (2,5:1).

Výnález má rozsiahly význam pre lacnú a efektívnu prípravu uridín-difosfo- ^{14}C -D-glukurónovej kyseliny vo forme komerčného preparátu použiteľného na výskumné účely, pričom sa využívajú v prevažnej miere domáce suroviny. Vytvára všetky predpoklady pre zahájenie výroby preparátu, ktorý sa doteraz musel nakupovať zo štátov dolárovej oblasti.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy uridín-difosfo- ^{14}C -D-glukurónovej kyseliny vysokej mólovej aktivity a rádiochemickej čistoty enzymatickou syntézou, vyznačujúci sa tým, že ako východisková látka sa používa D-glukóza- ^{14}C , ktorá sa enzymaticky prevedie na uridín difosfo- ^{14}C -D-glukózu, ktorá sa náväznou enzymatickou reakciou oxiduje na uridín difosfo-

^{14}C -D-glukurónovú kyselinu, ktorá sa z reakčnej zmesi izoluje preparatívnou papierovou chromatografiou, pričom sa z reakčnej zmesi pôsobením alkalické fosfatázy v prítomnosti fenoltaleínu ako indikátora odstránia doprevádzajúce cukrové fosfáty a nukleozid-5'-fosfáty.