

CS 7907473

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

## 166501



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

Přihlášeno 12. IX. 1973 (PV 6310-73)

Zveřejněno 10. VI. 1975

Vydáno 15. XII. 1976

Int. Cl.<sup>2</sup>  
C 07 D 239/54

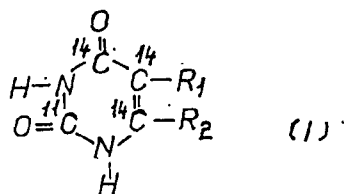
MDT  
547.853:539.163

Autor vynálezu LADISLAV PŘITASIL a JIŘÍ FILIP, PRAHA

### Způsob přípravy derivátů pyrimidinu, značených universálně radioisotopem <sup>14</sup>C

1

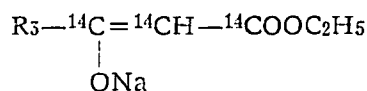
Předmětem vynálezu je způsob přípravy derivátů pyrimidinu, universálně značených radioisotopem <sup>14</sup>C obecného vzorce I:



ve kterém

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku nebo methyl-<sup>14</sup>C skupinu

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, methyl-<sup>14</sup>C skupinu, nebo karboxyl-<sup>14</sup>C skupinu, přičemž znamená-li R<sub>1</sub> methyl-<sup>14</sup>C skupinu, je R<sub>2</sub> vodík, kondensací sodných solí etylesterů beta-ketokyselin značených radioisotopem uhlíku <sup>14</sup>C o mol. aktivitě větší než 40 mCi/miliatom <sup>14</sup>C obecného vzorce II:



kde

(II)

166501

2

R<sub>3</sub> je atom vodíku nebo methyl-<sup>14</sup>C skupina -nebo karbethoxy-<sup>14</sup>C skupina v bezvodém ethanolu s thiomocovinou-<sup>14</sup>C o molové aktivitě větší než 40 mCi/mMol v ekvimolárním poměru, a následující desulfurací.

Dosud známé metody přípravy těchto látek používají jednak organickou syntézu, jednak kultivaci mikroorganismů za autotrofních podmínek v atmosféře <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, popřípadě kultivaci mikroorganismů na příslušných substrátech; extrakcí buněčného materiálu se pak získají nukleové kyseliny, značené nespécificky radioisotopem <sup>14</sup>C, ze kterých se za použití známých biochemických postupů izolují nespécificky <sup>14</sup>C značené deriváty pyrimidinu, na příklad uracil-<sup>14</sup>C(U) a thymín-<sup>14</sup>C(U). Vzhledem k nízkému obsahu těchto látek v mikroorganismech je biochemická příprava základních pyrimidinových bází nespécificky značených <sup>14</sup>C neekonomická.

Pro úspěšné řešení rostoucího počtu problémů biochemického a biologického výzkumu nukleových kyselin je nezbytné použití nukleotidů (resp. nukleosidů) pyrimidinových bází, na příklad uracilu a thymínu, značených radioisotopem <sup>14</sup>C s vysokou molovou aktivitou.

Protože jsou známy metody enzymové syntézy radioaktivních nukleosidů i nukleotidů, které vycházejí ze základních pyrimidinových

bázi a poskytují velmi uspokojivé výsledky (výtěžky nad 60 %), byla zaměřena pozornost na vypracování způsobů přímé syntézy výchozích pyrimidinových bází s vysokou molovou aktivitou.

Byla publikována syntéza uracilu- $^{14}\text{C}$ (U) s radiochemickým výtěžkem 10 % (EHREN-SVÄRT G., LILJEKVIST J.: Acta chem. scand. 13, 2070/1959/). Popsaný postup je zdlouhavý, má 9 reakčních stupňů a je obtížně reprodukovatelný.

BENNETT (BENNETT L. L. Jr.: J. Am Chem. Soc. 74, 2432 /1952/) připravil uracil- $^{14}\text{C}$  kondensací sodné soli formylacetanu ethylnatého s thiomocovinou- $^{14}\text{C}$  za přítomnosti ethylátu sodného a desulfurací vzniklého 2-thiouracilu- $^{14}\text{C}$ . Náhrada etylátu sodného jako kondenzačního činidla několikanásobným přebytkem sodné soli formylacetanu ethylnatého vedla k významnému zvýšení výtěžků 2-thiouracilu- $^{14}\text{C}$  (JEZDIČ V., ROZUMENIČ N., SKAKUN M., ALBAHARI S., ODAVIČ-JOSIČ J.: J. Labelled Comp., 6, 88 /1970/). Použití velkého přebytku sodné soli formylacetanu ethylnatého -1,2,3- $^{14}\text{C}$  při syntéze 2-thiouracilu- $^{14}\text{C}$ (U) by bylo neekonomické, protože jeho příprava je náročná a cena vysoká.

Přínosem předloženého vynálezu je nalezení takových reakčních podmínek, při kterých kondensace sodné soli ethylesterů beta-ketokyselin (vzorec II) o molové aktivitě větší než 40 mCi/miliatom  $^{14}\text{C}$  s thiomocovinou- $^{14}\text{C}$  o molové aktivitě větší než 40 mCi/miliatom  $^{14}\text{C}$  probíhá v prostředí bezvodého ethanolu v molárním poměru 1 : 1 ve výtěžku 40 až 50%. Sodné soli ethylesterů beta-ketokyselin  $^{14}\text{C}$  (vzorec II) se připraví Claisenovou kondensací z příslušných ethylesterů kyselin značených radiouhlíkem s molovou aktivitou větší než 40 mCi/miliatom  $^{14}\text{C}$  v prostředí bezvodého ethanolu za katalýzy hydridu sodného. Použití vakuového systému umožňuje bezpečnou práci v mikroměřítku. 2-thiouracil- $^{14}\text{C}$ (U) lze desulfurovat popsáním postupem v literatuře (WHEELER L. H., LIDDLE M. L.: Am. Chem. J. 40, 547 /1908/).

Vyššího účinku podle vynálezu ve srovnání se známými způsoby přípravy derivátů pyrimidinu- $^{14}\text{C}$ (U) je dosaženo nalezením optimálních reakčních podmínek. Zatímco biosyntetické postupy umožňují získat uracil- $^{14}\text{C}$ (U) (respektive jeho deriváty) o radiochemickém výtěžku kolem 1 %, je dosahováno při chemické syntéze výtěžků kolem 10 %. Při použití reakčních podmínek podle vynálezu jsou radiochemické výtěžky nad 20 %.

6-methyluracil- $^{14}\text{C}$ (U) lze známým postupem (KWANG-JUEN ZEE-CHENG, C. C. CHANG: J. Heterocycl. Chem 4, 163 /1967/, C. HEIDELBERGER, R. B. HURLBERT: J. Am. Chem. Soc. 72 4704 /1950/) převést na kyselinu orotovou- $^{14}\text{C}$ (U), jejíž příprava dosud nebyla popsána.

Využití postupu podle vynálezu umožňuje připravit deriváty pyrimidinu- $^{14}\text{C}$ (U) s vysokou molekulovou aktivitou. Těchto látek se

používá přímo nebo jako výchozích sloučenin pro enzymové syntézy. Tímto způsobem lze získat široký sortiment požadovaných derivátů značených nespecificky uhlíkem  $^{14}\text{C}$  v pyrimidinové bázi.

#### Příklad 1

##### Uracil- $^{14}\text{C}$ (U)

80 mCi (1 mMol) ethylesteru kyseliny octové-1,2- $^{14}\text{C}$  a 40 mCi (1 mMol) ethylesteru kyseliny mravenčí- $^{14}\text{C}$  se předestiluje za vakua do reakční baňky, obsahující 27 mg NaH ve 3 ml bezvodého etheru. Reakční směs se míchá 48 hodin za teploty místnosti. Sraženina sodné soli formylacetanu ethylnatého-1,2,3- $^{14}\text{C}$  se oddělí od etherického roztoku odstředěním, rozpustí ve 3 ml absolutního ethanolu, přidá 20,5 mCi (0,5 mMol) thiomocoviny- $^{14}\text{C}$  a zahřívá 3 1/2 hodiny za bezvodých podmínek k varu. Potom se ethanol oddestiluje, odparek rozpustí ve 3 ml vody a okyslí 2 ml HCl (1 : 2). Vypadlá sraženina 2-thiouracilu- $^{14}\text{C}$ (U) se odstředí, rozpustí ve 2 ml konc. amoniaku a přečistí preparativní papírovou chromatografií v rozpouštědlovém systému 1-butanol-kys. octová-voda (4 : 1 : 5). K odparce 2-thiouracilu- $^{14}\text{C}$ (U) se přidá roztok 25 mg kyseliny monochloroctové ve 4 ml vody a zahřívá pod zpětným chladičem 2 1/2 hodiny na lázni 130 – 140 °C teplé.

Uracil- $^{14}\text{C}$ (U) se z reakční směsi izoluje preparativní papírovou chromatografií v rozpouštědlovém systému 1-butanol-kyselina octová-voda (4 : 1 : 5).

Výtěžek: 36 mCi uracilu- $^{14}\text{C}$ (U), tj. 25,8 % (vztaheno na použité meziprodukty) o molové aktivitě 161 mCi/mMol.

#### Příklad 2

##### 6-methyluracil- $^{14}\text{C}$ (U)

160 mCi (2,0 mMol) ethylesteru kyseliny octové-1,2- $^{14}\text{C}$  se předestiluje do reakční baňky obsahující 2 mMoly trifenylmethylsodria v 16 ml bezvodého etheru. Reakční směs se míchá 48 hodin za teploty místnosti. Sraženina sodné soli acetoacetanu ethylnatého-1,2,3,4- $^{14}\text{C}$  se oddělí od etherického roztoku odstředěním, rozpustí v 5 ml absolutního ethanolu, přidá 30 mCi (0,75 mMol) thiomocoviny- $^{14}\text{C}$  a zahřívá 4 hodiny za bezvodých podmínek k varu. Potom se ethanol oddestiluje, odparek rozpustí v 5 ml vody a okyslí 2 ml kyseliny solné (1 : 2). Vypadlá sraženina 2-thio-6-methyluracilu- $^{14}\text{C}$ (U) se odstředí, rozpustí ve 2 ml konc. hydroxidu amonického a přečistí preparativní papírovou chromatografií v rozpouštědlovém systému 1-butanol-kyselina octová-voda (4 : 1 : 5). K odparce 2-thio-6-methyluracilu- $^{14}\text{C}$ (U) se přidá roztok 250 mg kys. monochloroctové ve 4 ml vody a reakční směs se zahřívá pod zpětným chladičem 2,5 hodiny na lázni 130 – 140 °C

teplé. 6-methyluracil- $^{14}\text{C}(\text{U})$  se z reakční směsi izoluje preparativní papírovou chromatografií v rozpouštědlovém systému 1-butanol-kys. octová-voda (4 : 1 : 5).

Výtěžek: 41 mCi 6-methyluracilu- $^{14}\text{C}(\text{U})$  o molové aktivitě 200 mCi/mMol tj. 21 % (vztaheno na použité meziprodukty).

Příklad 3

#### Orotová kyselina- $^{14}\text{C}(\text{U})$

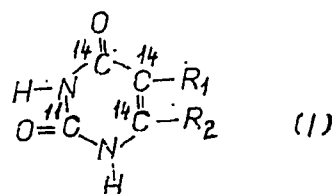
80 mCi (1 mMol) ethylesteru kyseliny šta-  
velové-1,2- $^{14}\text{C}$  a 80 mCi (1 mMol) ethylesteru  
kyseliny octové-1,2- $^{14}\text{C}$  se předestiluje za va-  
kua do reakční baňky obsahující 27 mg NaH  
v 5 ml bezvodého etheru. Reakční směs se za-  
hřívá na vodní lázni teplé 40 °C 2 hodiny.  
Sraženina sodné soli oxalocetové kyseliny-

-1,2,3,4- $^{14}\text{C}$  se oddělí od etherického roztoku  
odstředěním, rozpustí v 5 ml absolutního e-  
thanolu, přidá 20,5 mCi (0,5 mMol) thiom-  
čoviny  $^{14}\text{C}$  a zahřívá 3 $\frac{1}{2}$  hodiny za bezvo-  
dých podmínek k varu. Po vychladnutí se při-  
dá 0,4 g NaOH ve 4 ml 50% ethanolu a za-  
hřeje 45 minut k varu. Potom se ethanol od-  
destiluje, k odparku se přidá roztok 250 mg  
kyseliny monochlorocetové ve 4 ml vody a re-  
akční směs se zahřívá pod zpětným chladičem  
3 hodiny na lázni 130 — 140 °C teplé. Kyselina  
orotová- $^{14}\text{C}(\text{U})$  se z reakční směsi izoluje  
preparativní papírovou chromatografií v roz-  
pouštědlovém systému 2-propanol-amoniak-  
voda (7 : 1 : 2).

Výtěžek: 41 mCi kyseliny orotové- $^{14}\text{C}(\text{U})$ , tj.  
21,7 % (počítáno na celkovou aktivitu všech  
použitých složek) a mol. aktivitě 205 mCi/  
mMol.

#### P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy derivátů pyrimidinu, zna-  
čených universálně radioisotopem  $^{14}\text{C}$  obecné-  
ho vzorce I

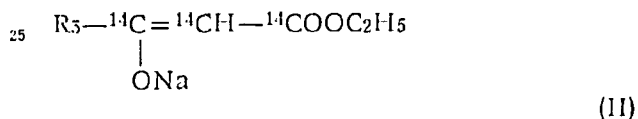


ve kterém

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku nebo methyl- $^{14}\text{C}$   
skupinu

R<sub>2</sub> znamená atom vodíku, methyl- $^{14}\text{C}$  skupi-

nu, nebo karbonyl- $^{14}\text{C}$  skupinu, přičemž zna-  
mená-li R<sub>1</sub> methyl- $^{14}\text{C}$  skupinu, je R<sub>2</sub> vodík,  
kondensací látky obecného vzorce II



kde

R<sub>3</sub> je atom vodíku nebo methyl- $^{14}\text{C}$  skupina  
nebo karbethoxy- $^{14}\text{C}$  skupina, s thiomčoví-  
nou- $^{14}\text{C}$  a následující desulfurací, vyznačený  
tím, že se kondensace provádí v bezvodém  
ethanolu a při ekvimolárním poměru konden-  
sujících látek.