



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

197 118

(11) (B1)

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 29 06 78
(21) PV 4278-78

(51) Int. Cl. C 07 D 239/54

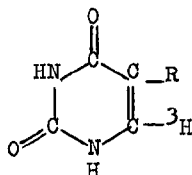
(40) Zveřejněno 31 07 79
(45) Vydáno 30 04 82

(75)
Autor vynálezu FILIP JIŘÍ ing. CSc., PRAHA a BOHÁČEK LUBOŠ ing., LIBČICE NAD VLTAVOU

(54) Způsob přípravy derivátů pyrimidinu značených tritiem v poloze 6 o vysoké molové aktivitě

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy derivátů pyrimidinu značených tritiem v poloze 6 o vysoké molové aktivitě obecného vzorce I



(I),

kde R je CH₃ nebo H, katalytickou redukční dehalogenací plynným tritiem bez nosiče.

Dosud známé metody umožňují připravit [6-³H]uracil (resp. [6-³H]tymin) dekarboxylací kyseliny orotové (resp. 5-metylorotové) nespecificky značené tritiem. (EVANS E. A.: Tritium and its Compounds, Butterworths, London 1974). Radiochemický i chemický výtěžek je však nízký. Významný přínos pro přípravu derivátů pyrimidinu o vysoké molové aktivitě bylo proto použití 6-brom-2,4-dimetoxy-5-metylpyrimidinu jako výchozí látky pro katalytickou redukční dehalogenaci plynným tritiem bez nosiče (FILIP J., HANKER I., VYŠATA F.: Čs. patent č. 137984). Nalezení optimálních reakčních podmínek a odstranění snadno vyměnitelných vodíků z reakční směsi umožnilo dosažení více než 80 % teoretické molové aktivity. Analogicky bylo možno připravit i [6-³H]uracil (FILIP J., VYŠATA F.: Čs. patent č. 133141). Katalytickou redukční dehalogenací byl však podle uvedeného postupu

připraven 2,4-dimetoxy-[6-³H]pyrimidin, ze kterého bylo nutno požadované deriváty pyrimidinu značené tritiem v poloze 6 získat varem v silně kyselém prostředí. Tyto operace v mikroměřítku, s velkou celkovou radioaktivitou reakční směsi, jsou experimentálně velmi náročné a významně zvyšují pracovní riziko celého postupu.

Uvedené nevýhody odstraňuje předmětný vynález způsobu přípravy derivátů pyrimidinu značených tritiem v poloze 6 o vysoké molové aktivitě obecného vzorce I, jehož podstatou je katalytická redukční tritace 6-halogenderivátu pyrimidinu obecného vzorce II



kde R je CH₃ nebo H a X je halogen, plynným tritiem bez nosiče v prostředí vodného hydroxidu sodného nebo draselného za přítomnosti paládia na nosiči, s výhodou 10 % paládia na uhlí a po odpaření rozpouštědla a odstranění labilní aktivity se produkt izoluje preparativní papírovou chromatografií.

Přínosem předloženého vynálezu je nalezení takového postupu, který umožňuje v jediném reakčním stupni připravit s vysokým chemickým i radiochemickým výtěžkem [6-³H]tymin a [6-³H]uracil. Vysoké molové aktivity jsou nutnou podmínkou pro úspěšnou aplikaci těchto látek v základním biologickém a biochemickém výzkumu. Mohou být dosaženy jen v reakčních podmínkách, které umožňují přímou inkorporaci tritia do molekuly a zároveň významně omezí izotopovou výměnu vodíku s reakčním prostředím. Pro dosažení vysokých molových aktivit je dále nezbytné, aby se při použitých reakčních podmínkách neuplatňoval významně izotopový efekt. Ve stopovacích pokusech byl námi nalezen postup, který umožňuje připravit [6-³H]tymin a [6-³H]uracil o molové aktivitě vyšší než 740 GBq/mmol a radiochemické čistotě lepší než 97 %.

Vyšší účinek podle vynálezu ve srovnání se známými postupy přípravy derivátů pyrimidinu značených tritiem je dosažen nalezením postupu umožňujícím zavedení tritia v jediném reakčním stupni. Postup podle vynálezu umožňuje (při dodržení podmínek pro bezpečnou práci) připravit velká množství základních tritiem značených pyrimidinových bází. Katalytická redukční dehalogenace za použitých reakčních podmínek probíhá velmi rychle (polovina teoretického množství tritia je spotřebována za 17 minut), což má příznivý vliv na dosažení vysokých molových aktivit.

Využití postupu podle vynálezu umožňuje připravit [6-³H]tymin a [6-³H]uracil o molové aktivitě 0,7 až 1,0 TBq/mmol a radiochemické čistotě lepší než 97 %. Úspěšné řešení řady problémů základního biologického a biochemického výzkumu nukleových kyselin je spojeno s použitím prekursorů značených tritiem. K nejdůležitějším tritiem značeným organickým sloučeninám nesporně patří [6-³H]tymidin, který je používán jako specifický prekursor pro značení deoxyribonukleové kyseliny. Enzymové syntézy nukleosidů a nu-

kleotidů z výchozích radioaktivních bází jsou vypracovány. (FILIP J., BOHÁČEK L.: Radioizotopy 12, 343 /1971/, VESELÝ J., ČIHÁK A.: J. Labelled Compounds 10, 489 /1974/). Tímto způsobem lze získat široký sortiment tritiem značených derivátů pyrimidinu.

Příklad 1:

Do reakční baňky objemu 1,0 ml se umístí 30 mg (0,146 mmol) 6-bromtyminu, 50 mg 5 % paládia na síranu barnatém a 0,6 ml 0,1 N hydroxidu draselného. Po připojení baňky k tritiační aparatuře (FILIP J., ŠTASTNÝ J., VEŘMIŘOVSKÝ J.: Jaderná energie 13, 432 /1967/) se reakční směs odplyní a do baňky se ze zásobníku převede 185 GBq tritia bez nosiče. Po 120 minutách míchání při teplotě místnosti se reakce přeruší a nezreagované tritium se převede zpět do zásobníku. Rozpouštědlo se odpaří v uzavřeném systému za vakua. Odparek se rozpustí v 1,0 až 2,0 ml vody a voda se odstraní mrazovou sublimací. Tento postup se opakuje celkem 3 krát.

[6-³H]Tymin se izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol-1-propanol - amoniak - voda (7 : 5 : 7 : 2).

Výtěžek: 8,15 mg [6-³H]tyminu o celkové aktivitě 55,5 GBq (tj. 30 % na použité tritium). Molová aktivita [6-³H]tyminu byla 860 GBq/mmol, radiochemická čistota lepší než 96 %.

Příklad 2:

Do reakční baňky objemu 1,0 ml se umístí 24 mg (0,149 mmol) 6-chlortyminu, 8,0 mg 10 % paládia na uhlí a 0,5 ml 0,1 N hydroxidu draselného. Baňka se připojí k tritiační aparatuře. Reakční směs se odplyní a ze zásobníku se do reakční baňky přivede 185 GBq tritia bez nosiče. Reakční směs se míchá elektromagneticky při teplotě místnosti 180 minut. Nezreagované tritium se převede zpět do zásobníku. Rozpouštědlo se odstraní v uzavřeném systému a odparek se znovu rozpustí ve 2,0 ml vody. Voda se odstraní mrazovou sublimací. Tento postup se opakuje třikrát.

[6-³H]Tymin se z reakční směsi izoluje preparativní papírovou chromatografií v soustavě 1-propanol - 1-butanol - amoniak - voda (7 : 5 : 7 : 2).

Výtěžek: 7,8 mg [6-³H]tyminu o celkové aktivitě 52,1 GBq (tj. 28,2 % na použité tritium). Molová aktivita [6-³H]tyminu byla 840 GBq/mmol a radiochemická čistota lepší než 96 %.

Příklad 3:

Do reakční baňky objemu 1,1 ml se umístí 20,0 mg (0,104 mmol) 6-bromuracilu, 30,0 mg 5 % paládia na síranu barnatém a 0,5 ml 1,0 N hydroxidu draselného. Reakční baňka se připojí k tritiační aparatuře, reakční směs se odplyní a ze zásobníku se do baňky převede 185 GBq tritia bez nosiče. Po 150 minutách se reakce přeruší a nezreagované tritium se převede zpět do zásobníku tritia. Rozpouštědlo se odstraní z reakční směsi za vakua v uzavřeném systému, odparek se rozpustí ve 2,0 ml vody a voda se odstraní mrazovou sublimací. Postup se opakuje celkem třikrát.

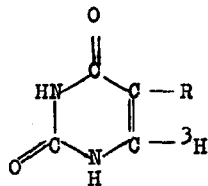
[6-³H]Uracil se izoluje z reakční směsi preparativní papírovou chromatografií

v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5).

Výtěžek: 5,4 mg $[6-^3\text{H}]$ uracilu o celkové aktivitě 44,4 GBq (tj. 23,9 % na použité tritium). Molová aktivita $[6-^3\text{H}]$ uracilu byla 925 GBq/mmol a radiochemická čistota lepší než 96 %.

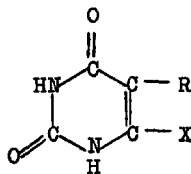
Předmět vynálezu

Způsob přípravy derivátů pyrimidinu značených tritiem v poloze 6 o vysoké molové aktivitě obecného vzorce I



(I),

kde R je CH_3 nebo H vyznačený tím, že se na halogenderivát pyrimidinu obecného vzorce II



(II),

kde R je CH_3 nebo H a X je halogen, působí v prostředí vodného hydroxidu sodného nebo draselného za přítomnosti paládia na nosiči, s výhodou 10 % paládia na uhlí, plynným tritiem bez nosiče za míchání při teplotě místnosti.