

氚标记环化腺一磷的制备

中国科学院上海生物化学研究所

上海第二医学院

上海第一医学院

环化腺一磷(cAMP),是一种重要的生理物质,存在于机体的各种组织中,在细胞内起着调节生理功能和物质代谢的作用,许多激素是通过它来行使生理功能的。氚标记环化腺一磷的合成,为生物学、医学方面的有关研究与临床诊断提供了有利的条件。

关于制备氚标记环化腺一磷(^3H -cAMP)的具体方法,尚未见有报道。通常在制备比度较高的氚标记化合物时,催化氚化均在不含有可交换氢的有机溶剂中进行,被氚化物中某些含可交换氢的基团亦需进行保护,或使用大量的氚气以满足交换平衡的需要。但是

cAMP 不易溶于有机溶剂,基团保护也较烦琐。遵照伟大领袖毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,我们实行社会主义大协作,利用国产原料及设备,自行设计合成方案及高真空反应系统,制备 ^3H -cAMP。将 cAMP 经溴化得 Br-cAMP^[1];在 pH 偏碱的水溶液中^[2],以 Pd/BaSO₄ 为催化剂,使 Br-cAMP 氚化脱卤,即得到 ^3H -cAMP。制备流程见图 1。标记产物用活性碳分离纯化,方法简便,产品回收率高,比度为 11.6 居里/毫克分子,放化纯度达 98% 以上。

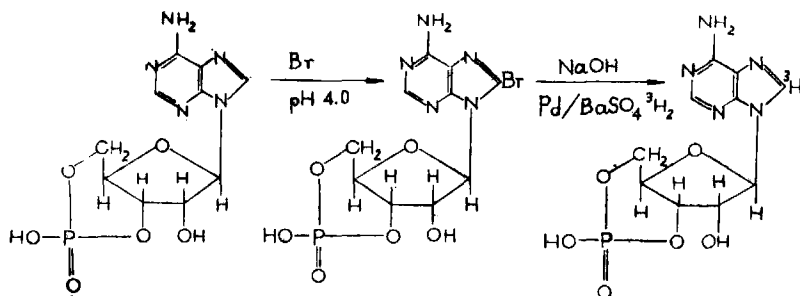


图 1 ^3H -cAMP 的制备流程

一、材料

氚源,其丰度 98% 以上,5 居里/2 毫升安瓿,由中国科学院原子能研究所供给。cAMP,纯度为 98%,毫克分子消光系数按 14.6×10^3 计算,中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品。“717”阴离子交换树脂、活性碳(769 型)及其它试剂均为国产。

二、 ^3H -cAMP 的制备

1. Br-cAMP 的制备^[1,3]

4 毫克分子 cAMP(1.32 克)溶于 20 毫升 2N NaOH,加入 25 毫升 1M NaAc 缓冲液(pH 4)及 30 毫升溴水溶液(0.28 毫升溴溶于 30 毫升 1M NaAc 缓冲液),搅拌过夜;加入乙醇,旋转蒸发至干;反复加入乙醇蒸干数次,以移去残余溴;残渣溶于少量水中,用“717”强碱性阴离子交换树脂(Cl⁻型)柱层析分离,经水洗,

0.02M LiCl + 0.001N HCl 洗后,再以 0.06M LiCl + 0.001N HCl 洗脱 Br-cAMP。合并 Br-cAMP 部分,将它吸附于活性碳柱,用水洗至中性;最后以含 2% NH₄OH 的 50% 乙醇溶液从活性碳柱洗脱 Br-cAMP,浓缩至小体积;加甲醇-丙酮使之沉淀,置冰箱过夜使沉淀完全;离心,顺次以丙酮、乙醚洗沉淀,真空干燥,即得白色粉状物。

2. Br-cAMP 的鉴定

在溶剂系统为正丁醇:醋酸:水 = 5:2:3(V/V)的

表 1 cAMP 与 Br-cAMP 紫外吸收光谱比较

	$\lambda_{\text{最大}}^{\text{H}^+}$ (毫微米)	$\lambda_{\text{最大}}^{\text{OH}^-}$ (毫微米)	250/260	280/260
cAMP	257	260	0.88(H ⁺) 0.81(OH ⁻)	0.27(H ⁺) 0.26(OH ⁻)
Br-cAMP	263	265	0.77(H ⁺) 0.70(OH ⁻)	0.50(H ⁺) 0.55(OH ⁻)

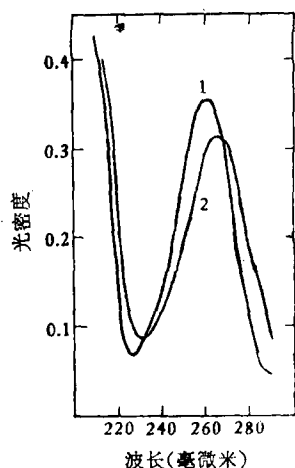


图2 cAMP 与 Br-cAMP 的紫外吸收光谱

1—cAMP; 2—Br-cAMP

纸层析谱上,仅有一紫外吸收点,比移值为 0.37;在同一溶剂系统中标准 cAMP 层析的比移值为 0.47。紫外吸收光谱测定结果见图 2 与表 1。

3. 钷钷的制备^[4]

51 克醋酸钷溶于 50 毫升水中,加热至 80℃,加入 50 毫升 Na_2SO_4 溶液(2.85 克无水 Na_2SO_4 溶于 50 毫升水),得 BaSO_4 悬浮液;在搅拌的情况下顺次加入温热的 PdCl_2 溶液(0.42 克 PdCl_2 溶于 5 毫升 1 N HCl 及 10 毫升水)、2.5 毫升 1 N NaOH 溶液和 7 毫升 10% 甲酸钠溶液,然后加热至 80—85℃,1—2 分钟后即产生大量黑泡,再慢慢转为灰色沉淀,并在 80—85℃ 继续搅拌 30 分钟;静置后倾去上清液,以 50 毫升水洗灰黑色沉淀多次,抽干,并用 20 毫升水洗二次,100℃ 真空干燥 2 小时,以玛瑙研钵研细,密封保存于真空干燥器中备用。

4. 氟化装置

氟化装置与氟化雌二醇的相仿^[5]。为了便于小量制备及节省氟的用量,我们采用体积小约 1.5 毫升的小反应瓶,并尽量缩短从氟气瓶至反应瓶之间的距离,使贮气刻度管上端活塞右侧的毛细管与反应瓶的总体积减少至约 2.5 毫升,见图 3。抽真空时先降低水银盛器,使贮气管内水银面降低,通入氟后,借水银盛器的升降调节系统内的压力。采用此装置,既可维持恒压,又可转移气体,并随时可在一大气压力下读出气体体

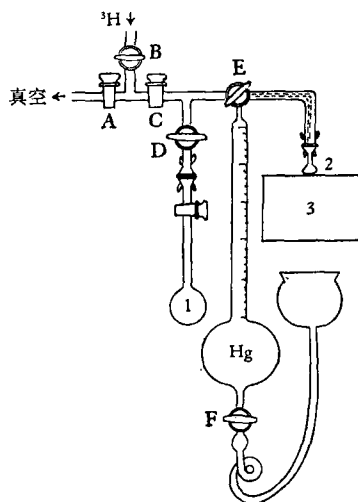


图3 氟化装置

1—铀粉瓶; 2—反应瓶;
3—电磁搅拌器; A—F—活塞

积的变化。

5. Br-cAMP 的氟化

在约 1.5 毫升反应瓶内放入 10 毫克 Br-cAMP, 加 0.7 毫升 0.3 N NaOH 溶液和 20 毫克 Pd/BaSO_4 , 电磁搅拌,将反应瓶连至氟化装置,外用干冰丙酮冷却即使反应混合物冰冻后,将该反应系统压力减至 $2-3 \times 10^{-3}$ 毫米汞柱;关闭活塞 A,用磁铁吸引铁珠打破封装氟气的安瓶,使氟气流入刻度贮气管;关闭活塞 E,逐渐升高汞柱,待平衡后读体积。降低水银盛器,转动活塞 E,使反应瓶与刻度贮气管连通,逐渐升高汞柱使刻度管内氟气转入反应瓶;关活塞 E,解冻反应物,室温搅拌一定时间。反应停止后,再借水银柱的升降将剩余氟气转入刻度管,读氟气体积的变化。转动活塞 E 及 D,使刻度贮气管与铀粉瓶连通,将剩余氟气转入铀粉瓶。过滤反应液以除去催化剂,用稀 HCl 调 pH 至 2;反应产物经活性炭柱(1×1 厘米)吸附,水洗至中性,再以 40 毫升含 2% NH_4OH 的 50% 乙醇溶液从活性炭柱洗出 ^3H -cAMP,减压浓缩至小体积(约 5 毫升),冷冻干燥;冻干物加入 1 毫升水溶解再冻干,反复加水冻干数次,以除去产物中不稳定位置的氟原子。经活性炭纯化后,标记物回收率达 85%,放化产率 10—16%。结果见表 2。

表 2 Br-cAMP 的氟化

Br-cAMP (毫克)	Pd/BaSO_4 (毫克)	反应时间 (分钟)	耗氟量 (毫升)	化学产率 (%)	放化产率 (%)	放化纯度 (%)	比放射性 (居里/毫克分子)
10	20	30	0.5	85	16	98	11.6
20	40	60	1.2	85	10	98	11.2

三、 ^3H -cAMP 的分析鉴定

纸层析鉴定 ^3H -cAMP 只有一紫外吸收点(溶剂系统前),比移值与标准 cAMP 相同。

^3H -cAMP 的紫外吸收光谱性质与标准 cAMP 一致。放化纯度是将放射层谱用液体闪烁计数器纸片法鉴定,从点样线前 1 厘米至前沿,分成 25 等分,测定结果见图 4。两次氟化实验所得 ^3H -cAMP 的放化纯度均在 98% 以上。

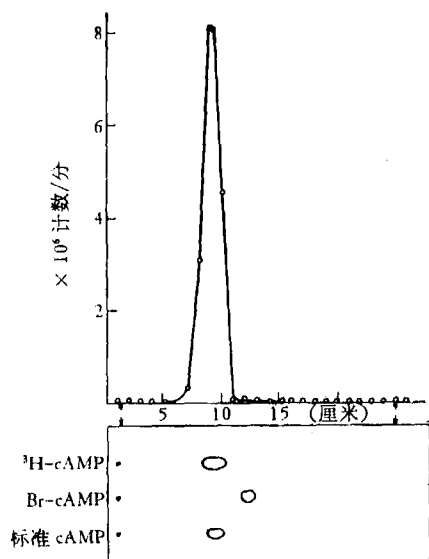


图 4 ^3H -cAMP 放射层析谱
(箭头所示处分别为点样线和溶剂前沿线)

比放射性的测定是用液体闪烁计数器和紫外吸收光谱,分别测定 ^3H -cAMP 的放射性及浓度。两次氟化产物的比放射性分别为 11.6 居里/毫克分子及 11.2 居里/毫克分子。

四、 ^3H -cAMP 的稳定性

浓度为 1 毫居里/毫升及 0.5 毫居里/毫升的

(上接第 21 页)

合液时,我们发现离子强度的下限为 0.02 M,低于 0.02 M 时获得胞二磷胆碱的量较差,这与有机合成反应液时不同。考虑到反应液中主要含有机离子,而外界加入的是无机离子,因此是否因离子性质不同而分离效果不同? 我们认为,当使溶液中离子的强度足以影响胞二磷胆碱吸附时,离子性质的差异不显现;当离子强度低时,有机的与无机的离子作用的差异才显示出来,因而分离效果不同。我们曾用对-甲苯磺酰氯等来代替氯化铵加入 CMP-胞二磷胆碱混合液中,调到低的离子强度 0.01 M 来分离,结果获得胞二磷胆碱的量确较同浓度氯化铵的高。

^3H -cAMP, 在 50% 乙醇溶液中贮存于低温冰箱 (-20°C) 六个月后,经层析鉴定,放化纯度仍可达 97%;但在水溶液中贮存时,三个月后放化纯度已降至 65% 左右。

五、讨论

制备氟标记化合物时,选择适当的溶剂对氟化效率有很大的影响。当需要比度较高的氟标记化合物时,多选用不含有可交换氢的有机溶剂,如二氧六环、乙酸乙酯等。但核苷酸之类的生化试剂不溶或极少溶于有机溶剂,给制备此类氟标记化合物带来了很大困难。Filip 等人^[1]研究了在不同浓度 H^+ 及 OH^- 溶液中氢与氟的交换,指出在碱性 pH 时,氢与氟的交换较还原脱卤的速度低。我们在制备 ^3H -cAMP 时,在碱性水溶液中以 Pd/BaSO₄ 为催化剂氟化(或氢化)脱卤,在 20—30 分钟内即顺利完成,得到比度较高的 ^3H -cAMP。增加氟化时间并不提高比度。

在工作中,我们采用了体积较小的反应瓶,每次反应只需 2 毫升氟气,既可节省氟源,又便于小量制备。

核苷酸等类化合物在酸性 pH 吸附于活性碳,又容易被碱性的乙醇溶液洗脱,因此如果被氟化的此类化合物较纯,经氟化后用活性碳柱分离纯化远较纸层析分离简便,回收量也高。

参 考 资 料

- [1] Ikahara, M. et al: *Chem. Pharm. Bull.*, 17, (2), 348, 1969.
- [2] Filip, J. et al: *Czech.*, 137984, 15 Aug, 1970.
- [3] Muneyama, K. et al: *Biochem.*, 10, (12), 2390, 1971.
- [4] Kuhn, R. et al: *Liebigs Ann. Chem*, 713, 50, 1968.
- [5] 中国科学院上海生物化学研究所, 上海第二医学院: 未发表。

[本文于 1975 年 5 月 5 日收到]

用“滤过法”将很容易地将胞二磷胆碱与 CMP 等分开,大大简化了分离步骤,但是在流出液中含有多量的盐,因而需采用活性碳柱来去盐。为了使产品色泽好、纯度高和便于应用在微生物合成法上除去含有的胞苷,因此增加一个 711 × 4 浓缩柱(使用 711 × 4 柱作浓缩柱,是因为它的交换容量大)。从所获结果来看,产品回收率较好,但有少部分损失,步骤尚可改进简化。如果分离的树脂采用 OH^- 型取代 Cl^- 型,以避免上柱流出液中存在大量的盐,使流出液可直接上浓缩柱,省去活性碳柱,则可进一步提高分离效率。

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]