

氚标记胸腺嘧啶的制备

中国科学院上海生物化学研究所氚标记化合物合成小组
上海第二医学院同位素实验室

前 言

在生物科学和医学研究上^[1,2]广泛应用标记胸腺嘧啶及胸腺嘧啶核苷。

合成氚标记化合物比合成¹⁴C标记化合物操作简便,又能得到更高比活的产物,同时由于氚能量很弱,放射自显影的分辨率高,而且氚作为合成原料比¹⁴C作原料价格要便宜得多。特别是,近年来氚化物的测定技术有很大发展,为广泛应用氚标记化合物提供了有利条件。

随着国内科学事业的发展,氚标记化合物的使用也越来越多。脱氧核糖核酸的合成研究、电子显微镜鉴别高分辨的放射自显影等都需要高比活的氚标记胸腺嘧啶核苷。

本文报道了用5-氯甲基尿嘧啶作底物催化氚化制备^{[3}H]甲基-胸腺嘧啶,比较了几种反应溶剂,其中乙二醇二甲醚获得满意结果。

一、材 料

1. 试剂

尿嘧啶、多聚甲醛、盐酸、氯化钡、1,2-乙二醇二甲醚、醋酸酐等都是二级规格,其中乙二醇二甲醚及醋酸酐用金属钠浸泡重蒸。

2. 氚源

由贮有26居里氚氢混合气(容积比1:1)的铀粉瓶供给。

二、实 验 部 分

1. 5-氯甲基尿嘧啶的制备^[3]

12克尿嘧啶和4克多聚甲醛悬浮于350毫

升12N的盐酸中,边搅拌边通入氯化氢气体,加热至80℃,固体完全溶解,于80℃继续反应半小时,移去热源,让其自然降温。反应四小时结束,用沙芯漏斗过滤,滤饼于真空干燥器(放有五氧化二磷)中干燥,得白色粉状产物。

反应如图1:

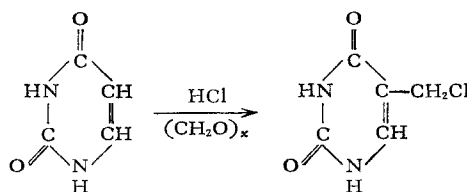
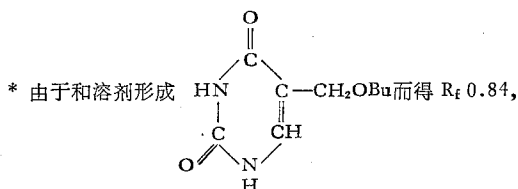


图 1

产物鉴定:产物溶于1,2-乙二醇二甲醚,于正丁醇-水(体积比172:28)系统中层析, R_f 值是0.20, 0.84*^[3]而尿嘧啶及胸腺嘧啶的 R_f 分别为0.28和0.42。

2. 钡黑制备

7毫升浓盐酸加到2.5克氯化钡中,于水浴蒸干。残渣溶于190毫升水,加热至80℃,在搅拌下依次加入1.1毫升(98%)甲酸,17毫升(20%)氢氧化钾,再加1毫升(98%)甲酸。在80℃继续搅拌10分钟后,冷至室温。滤出钡黑,用蒸馏水洗至氯离子-硝酸银,反应阴性。在放有五氧化二磷的真空干燥器中干燥备用。



Bu 表示丁基

3. 氟化胸腺嘧啶制备

16 毫克 5-氯甲基尿嘧啶(0.1 毫克分子)悬浮于 4.8 毫升溶剂中,加 8 毫升钨黑,加热钨粉瓶释放氟气供催化氟化反应^[4](图 2)。乙二醇二甲醚作溶剂时,底物氟化消耗氟气为 4 毫升;醋酸酐作溶剂时氟化所耗气体为 15.44 毫升。

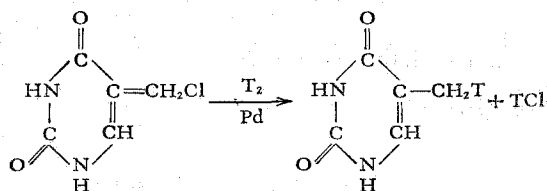


图 2

氟化操作与氟化雌二醇的制备工作^[5]相仿。氟化装置稍有改进,如图 3。

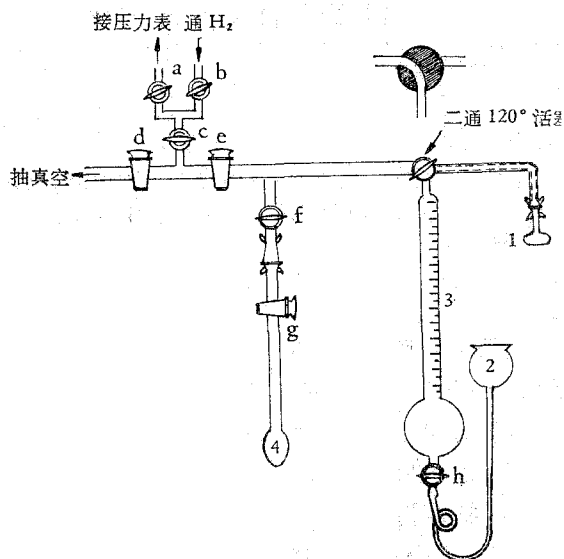


图 3 氟化装置

1——反应瓶; 2——水银盛器; 3——刻度柱;
4——钨粉瓶; a—h 活塞

在室温反应四小时后,反应液过滤,用热水洗涤滤渣,合并滤液及洗涤液,减压浓缩至 20 毫升左右,冰冻干燥,冻干物溶于水,如此溶解冻干处理,反复三次,以除去产物中不稳定位置的氟原子。

4. 纸层析分离

冻干物于正丁醇-水(体积比 172:28)系统层析鉴定。如醋酸酐作溶剂之氟化产物不纯,则将产物溶于双蒸水,样品在两张 19 × 45 平

方厘米的 Whatman 3 毫米滤纸上,于上述系统层析分离,将分得之第二条带(从原点算起)剪下,用热双蒸水洗涤下来。

三、分析鉴定

1. 产物的化学纯度用紫外吸收光谱分析(751 型,上海分析仪器厂出品)和纸层析鉴定。

紫外吸收光谱测定

	$\lambda_{\text{最大}}$ (毫微米)	250/260	280/260	290/260
产 品 A*	264.5	0.702	0.533	0.122
产 品 B*	264.5	0.714	0.537	0.123
标准胸腺嘧啶	264.5	0.726	0.548	0.114

A*——氟化溶剂为乙二醇二甲醚

B*——氟化溶剂为醋酸酐

纸层析鉴定

于正丁醇-水(172:28)、正丁醇-氨水-水(172:10:18)及叔丁醇-甲乙酮-甲酸-水(40:30:15:15)等系统,层析均得到 R_f 与标准胸腺嘧啶一致的紫外吸收点。

2. 产物的放化纯度用 DM 2100 (ACEC)液体闪烁计数器纸片法放射层析谱进行鉴定。

点样 1—2 微居里;层析系统为正丁醇-水;纸片分割:从点样线前一格至前沿等分为二十二份。液闪计数结果如图 4。乙二醇二甲醚为溶剂之产物放化纯度为 95%,醋酸酐所得之产物放化纯度为 99%。

3. 以乙二醇为溶剂氟化产物的化学产率为 75%,放化产率为 5%,比放射性为 3.7 居里/毫克分子。

以醋酸酐为溶剂氟化产物的化学产率为 65%,放化产率为 0.6%,比放射性为 1.9 居里/毫克分子。

讨 论

制备氟化嘧啶时,选取适当溶剂对氟化效率及耗氟量都有很大影响。我们比较了几种溶剂,常用的氟化溶剂二氧六环虽能很好的溶解底物,但氟化效率极差。而底物在醋酸酐及乙二醇二甲醚中,虽然形成混悬液,但底物的催化

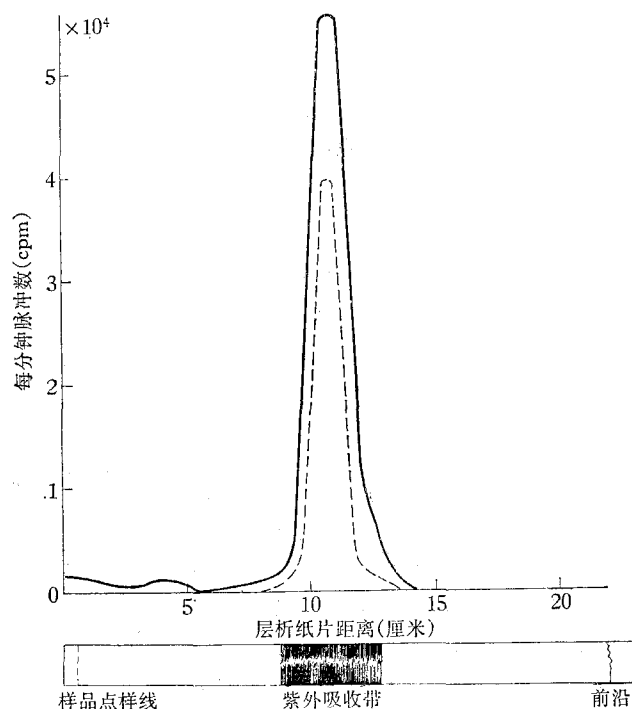


图4 $[^3\text{H}]$ 甲基胸腺嘧啶放射层析图谱

产品反应溶剂 A——乙二醇二甲醚 B——醋酸酐

氟化可获得满意的结果。但醋酸酐本身吸氟量大,这可能就是我们实验中醋酸酐作溶剂所得产物比放射性较低的原因。

资料[6]曾报道以含卤素底物进行催化去卤素时,所利用的氟的一半生成的卤化氟,使催化剂中毒,因而需在一个碱性介质中进行反应,而我们在氢化预实验中,于二氧六环或冰醋酸中加少量 H^+ ,显著地加速氢化反应。因而我们在氟化实验中,并未采用碱化系统,就使氟化反应顺利完成,但在真空系统中连接氢氧化钾管以吸收可能溢出的卤化氟。

制备氟化胸腺嘧啶,其底物有多种^[4]。氟标记在甲基上比标记在碳-6上容易,而且氟化产物前者比后者稳定,因此我们选用甲基上有活泼基团的底物。底物5-氯甲基尿嘧啶及5-羟甲基尿嘧啶氟化反应都很容易,但后者含有羟基,其不稳定氢可与氟交换,使所得底物比放

射性降低,所以我们选择5-氯甲基尿嘧啶作为氟化底物。这个底物不稳定极易水解,但交换反应易进行,且能得到比放射性达15居里/毫克分子水平。

参 考 资 料

- [1] Feinendegen, Ludwig, E.: Tritium-labeled Molecules in Biology and Medicine, 1967.
- [2] Cleaver, J. E.: Thymidine Metabolism and Cell Kinetics, 1967.
- [3] Skinner, W. A., et al.: *J. Org. Chem.*, **25**, 149, 1960.
- [4] Winand, M., et al.: Proceedings of the Conference on Methods of Preparing and Storing Marked Molecules, European Atomic Energy Community, 1147, 1963.
- [5] 待发表。
- [6] Pichat, L.: *Bull. Inform. Sci. Techn.*, (Paris), **178**, 73—77, 1973.

[本文于1975年9月9日收到]