

约 50 微升 (500 微克/毫升) 点于纸上 (新华 1 号滤纸), 再取约 4 微升的 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 点于同一位置上, 另在边侧点上标准的 cGMP 及 $[8\text{-Br}]\text{-cGMP}$ 做对照。上行展开。温度 20°C , 层析六小时。

结果: 产品有单一的放射峰与标准品所在的位置一致, 其放射性层析谱示于图 2 中, 经计算放化纯度为 99%。

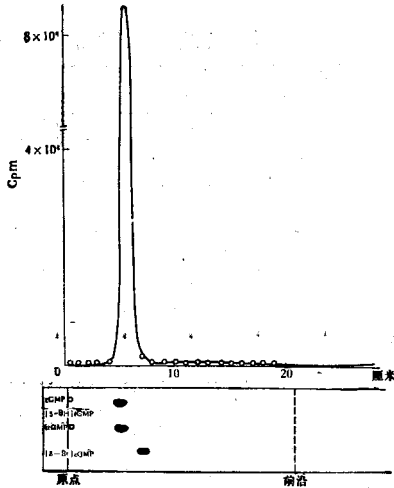


图 2 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 的放射层析图谱

5. 贮存条件

将 $[8-^3\text{H}]\text{-cGMP}$ 用 50% 乙醇-蒸馏水稀释到 1 毫居里/毫升, 在 $1-2^\circ\text{C}$ 冰箱中贮存, 以防止细菌的污染。

六、小 结

$[8\text{-Br}]\text{-cGMP}$ 的纯度是提高氟化产物比度

的先决条件, 经过几种溴化方法的比较, 我们选用 J. P. Müller 法^[6]。制得的溴化物的克分子消光系数较高 (16,000), 且游离溴含量较低, 有利于催化氟化反应, 并防止卤素对催化剂的毒化。

氟化过程, 预先将催化剂用氟饱和, 借以增加氟与样品的接触机会。维持样品量与催化剂的比例为 1:2, 以保证催化剂有足够高的浓度, 同时采取减少溶剂体积, 降低反应瓶液面的办法来扩大氟气与反应液的接触机会, 使氟卤置换完全。

制得的氟标记化合物的生化性能已取得初步满意的实验结果, 本工作曾得到 307 医院蒋滋慧、原子能研究所夏祖平及北京医学院张礼和同志的热心帮助, 在此深表致谢。

参 考 文 献

- [1] Ryan, W. L. et al.: *Science*, **162**, 1484, 1968.
- [2] Sheppard, J. R.: *Nature New Biology*, **336**, 1972.
- [3] Kolata, G. B.: *Science*, **182**, 149, 1973.
- [4] 张礼和: 《北医学报》, **3**, 191, 1975.
- [5] Elliott, M.: *The Pediatric clinics of North America* **22**(1), 111, 1975.
- [6] Müller, J. P.: *Biochem.*, **12**, 26, 5310, 1973.
- [7] Mian, A. M.: *J. Medichem.*, **173**, 259, 1973.
- [8] Chin Hsi Chu: *J. Medichem.*, **18**, 6, 559, 1975.
- [9] Bellamy, L. J.: *The Infrared Spectra of Complex molecules*, 257, 1958.
- [10] Filip, J.: *Czech*, 137984, 15 Aug. 1970.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所等: 《生物化学与生物物理进展》, 1975 年, 第 4 期, 第 22 页。
- [12] 朱青: 《原子能科学技术》, 1978 年, 第 1 期, 第 84 页。

【本文于 1978 年 9 月 28 日收到】

金 硫 代 葡 萄 糖 的 合 成

张 友 尚 崔 大 敷

(中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组)

一、引 言

近年来关于糖尿病病因的研究已深入到胰岛素与其受体相互作用的分子水平。对胰岛素

具有抗性的成年型糖尿病可能是由于胰岛素的受体减少而产生。肥胖的小白鼠糖耐量不正常, 血液中的胰岛素增加, 对胰岛素的敏感性下降, 这些都和上述类型的糖尿病人很相似。因此肥

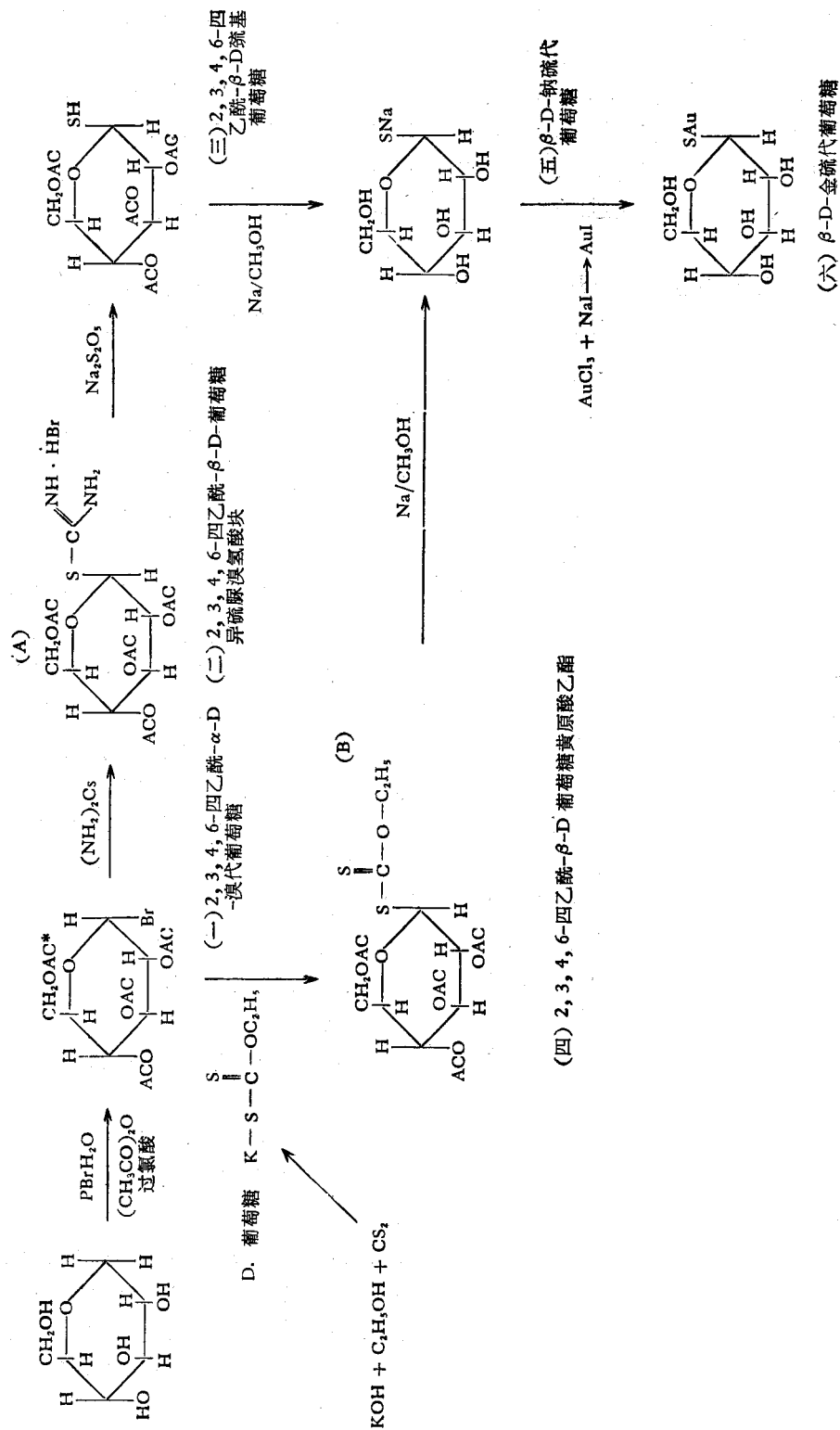


图1 金硫代葡萄糖合成途径

*Ac = CH₃CO

胖型小白鼠是研究糖尿病的一种较好的实验动物模型^[1]。形成这种动物模型可以应用金硫代葡萄糖(Gold thioglucose, 简称 GTG), 它能使下丘脑的饱中枢产生坏死性病变, 结果动物无控制地摄食而肥胖^[2]。引起病变的是金与硫代葡萄糖相结合, 是为了使金易于通过血脑屏障而发挥其作用^[3]。

由于金硫代葡萄糖在国内外市场上均不易获得, 我们在实验室中通过两条途径(图 1)进行了合成。现将合成方法及合成过程中应注意的事项介绍如下。

二、实 验

(一) 2, 3, 4, 6-四乙酰- α -D-溴代葡萄糖

400 毫升醋酸酐与 2.4 毫升过氯酸混合搅拌, 将 100 克 D-葡萄糖·H₂O 逐步加入, 温度控制在 30—40℃。然后加入 30 克红磷, 容器用冰块浴冷却, 再渐渐加入 62 毫升溴, 维持温度在 20℃ 以下, 然后立即滴加入 36 毫升水(避免局部温度升高, 保持 20℃ 以下)。滴加完毕继续在室温搅拌 2 小时, 加入 300 毫升氯仿和 800 毫升冰水, 滤去未反应的磷。分出的氯仿层用 KHCO₃ 洗至 pH7; 以无水 CaCl₂ 干燥, 同时加少量 KHCO₃ 维持 pH7; 以 5 克活性炭脱色, 轻微摇动, 1 小时后过滤。在 35℃ 水浴中真空浓缩, 得油状物, 加 300 毫升乙醚使其溶解, 再加 300 毫升石油醚得白色结晶, 过滤, 真空干燥得 146 克, 熔点 84—85℃。以乙醚重结晶得 132 克, 熔点 88—89℃*(63%)(文献熔点 87℃^[7])。此产物需在真空干燥器中避光放置, 以免分解。

(二) 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-葡萄糖异硫脲溴氢酸块

2, 3, 4, 6-四乙酰溴代葡萄糖 103 克, 溶解于 105 毫升丙酮, 加入 20.6 克硫脲, 将此悬浮液用水浴加热回流。硫脲逐渐溶解, 并有白色晶体在器壁析出。共回流 15 分钟, 大量晶体析出; 冷却, 过滤, 得 69 克, 熔点 206—208℃(文献值为 189℃^[8], 205℃^[14], 192℃^[4])。

(三) 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-巯基葡萄糖(GSH)

5.07 克 Na₂S₂O₅(焦亚硫酸钠)溶于 25.2 毫升水, 加入 14.4 克 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-葡萄糖异硫脲溴氢酸块和 28.8 毫升四氯化碳, 使其全部溶解, 在 85℃ 水浴中加热回流搅拌 14 分钟。冷至 30℃, 分出有机相; 水相用四氯化碳抽提 2 次。合并抽提液, 放置于 -20℃ 低温冰箱, 次日得花状晶体^[6]。过滤后, 母液浓缩至四分之一, -20℃ 冰箱放置, 得晶体。所有晶体再以热甲醇重结晶得 8.5 克, 熔点 74—76℃。(文献值 74—76℃^[9,10], 113—114℃^[6]; Richtmyer 等指出熔点 113—114℃ 者为同质异晶体)。

(四) 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-葡萄糖黄原酸乙酯

18 克乙基黄原酸钾(上海试剂一厂出品, 化学纯级。或按文献方法^[11, 12]制备)加热溶于 157 毫升无水乙醇中, 再加入 46 克 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-溴代葡萄糖, 用水浴加热回流 6 分钟, 立即有 KBr 沉淀产生。加入水使 KBr 溶解, 然后析出油状物。加入 220 毫升水使油固化, 冷却(0℃)研洗, 干燥得 47 克, 熔点 75—80℃以石油醚重结晶, 得 27 克, 熔点 82—84℃(文献值 88—89℃^[4])。

元素分析 C₁₇H₂₄S₂O₁₀

实验值(%): S 14.28

理论值: S 14.1

(五) β -D-钠硫代葡萄糖(GTNa)(含两分子结晶水)

10 克四乙酰- β -D-葡萄糖黄原酸乙酯悬浮于 50 毫升无水甲醇, 冷却至 -15℃。另取 0.9 克新鲜钠小块加入到 20 毫升无水甲醇中, 激烈反应成溶液。待冷却后滴加入上述悬浮液中, 搅拌, 控制温度在 -15℃—-8℃, 并保持反应系统无水。随着反应进行, 悬浮的反应物逐渐溶解。将少量混浊物过滤去, 滴加入几滴酚酞指示剂, 溶液呈粉红色。在冷却条件下加入 50% HAc 2.8 毫升, 至粉红色褪去。加入 30 毫升甲

* 未校正, 下同。

醇,并用玻棒研磨器壁,有白色晶体析出。加入 20 毫升甲醇使结晶完全,冷却(0℃)过滤,空气干燥得 3 克(53%),熔点 174—176℃(分解)。再以 9 毫升水(50℃)溶解,加入 27 毫升甲醇,重结晶得 2.4 克(41%),熔点 176—178℃分解, $[\alpha]_D^{25} + 14.3^\circ$ (C1.5 水)[文献值为 $[\alpha]_D^{25} + 16^\circ$ (C1.5 水)^[5]。

元素分析 $C_6H_{15}SO_7Na(GTNa \cdot 2H_2O)$

实验值(%): C28.21 H5.98 S12.89

理论值(%): C28.3 H5.91 S12.6

如果采用四乙酰- β -D-硫基葡萄糖作反应物,按同样方法,也得到 $GTNa \cdot 2H_2O$, 熔点 176—178℃

元素分析 $C_6H_{15}SO_7Na$

实验值(%): C28.34 H6.03 S12.90

理论值(%): C28.3 H5.91 S12.6

降低钠与酰化物的反应分子比为 1:12:1 (文献为 1:8:1)时,也能得到 $GTNa \cdot 2H_2O$ 晶体,熔点 172—174℃,收率 50%。

元素分析 $C_6H_{15}O_7SNa$

实验值(%): C27.89 H5.99

理论值(%): C28.3 H5.91

(六) β -D-金硫代葡萄糖(GTG)

1. 制备 AuI

3 克 $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ 溶于 10 毫升水,用 5 N NaOH 调 pH 至 6.5,滴加入 3.18 克 NaI 的 24 毫升水溶液,搅拌;避免阳光直接照射,得暗

绿色沉淀。为了除净残余的碘,依次用水、乙醇、乙醚、彻底研洗至固体粉末呈柠檬黄色。真空干燥 15 分钟。

2. 金硫代葡萄糖^[6]

用上面所得 AuI 1.94 克(6 毫克分子)悬浮于 2.5 毫升水中,然后将 $GTNa \cdot 2H_2O$ 1.54 克(6 毫克分子)溶于 12.5 毫升水中,并倾入上述 AuI 溶液中,搅拌,悬浮的柠檬黄 AuI 很快溶解,在乳状液中析出白色沉淀。继续搅拌 5 分钟,过滤,依次用水、乙醇、乙醚洗涤,真空干燥得 2.3 克(97%)。

元素分析 $C_6H_{11}SO_3Au$

实验值(%): C18.40 H3.21 S8.20

理论值(%): C18.37 H2.81 S8.16

X 光荧光分析(40 仟伏、10 毫安、钨靶)见图 2,证明有金。

GTG 是一不稳定的金与硫葡萄糖化合物,在水中不稳定,易解离,具吸湿性^[3]。

三、讨 论

1. A, B 两条合成途径比较: B 法的步骤简单,中间体稳定;A 法的硫基葡萄糖易氧化,不便于保存。

2. 四乙酰- β -D-葡萄糖黄原酸乙酯或四乙酰- β -D-硫基葡萄糖用甲醇钠处理,生成钠硫代葡萄糖的反应是一种转酯反应,在此反应中,等克分子钠和一 SH 形成钠块,其余钠起催化作用。保证反应的无水 and 用适量的新制备的甲醇钠可能是重要的。因为一旦水掺入将产生皂化反应,形成 CH_3COONa 和 GSH,并使硷性增强,从而硫基本身很易氧化成二硫键熔点 143—144℃^[5]。GS-SG 是此反应中应防止的主要副产物。高于 -8℃ 的温度有利于这个副产品的生成。

在降低钠量方面作了新的试验,结果表明,适当降低钠量能防止形成二硫键的副反应,从而提高产率。

关于反应的最适温度问题,我们按照 M. CERN' Y 的方法^[6]在 20℃ 用甲醇

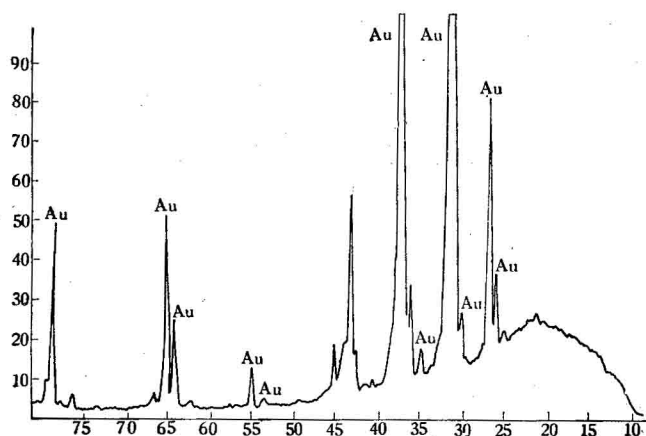
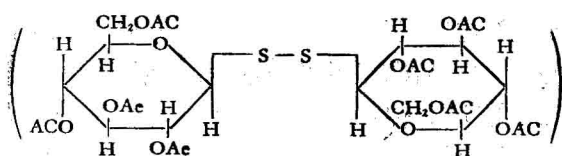


图 2 金硫代葡萄糖的 X 荧光分析图谱



GS-SG

钠反应却得到熔点 143—144℃ 的 GS-SG, 低于 -15° 时又常常成冻状物, 使反应不完全。我们的实验结果表明 -15℃—-8℃ 是合适的。

关于脱除乙酰基反应的溶剂问题, 我们重复不出 Schneideru^[4] 用氯仿作溶剂的结果。这可能是因为氯仿同醇钠能发生反应, 生成原甲酸酯^[13]由于难于掌握。而改用甲醇为溶剂, 则得到比较理想的结果。由于产物在甲醇中溶解度比在乙醇中大, 因此选择甲醇比乙醇好。

本工作得到本室主任组经义同志的热情指导, 工作中元素分析由绪宝珍、厉惠萍两位同志承担; GTG 的 X 荧光分析由有机化学研究所分析室测定, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Andrew, H. et al.: *J. Clin. Investigation*, **56**, 769, 1975.
- [2] Schwarty, I. L. et al.: *Tr. Associ. Am. Physicians*, **774**, 300, 1961.
- [3] 秦正誉等: 《四军医大科技资料》, 1978 年。
- [4] Schneideru, W. et al.: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **61**, 1244, 1928.
- [5] Horton, D.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **VII**, 435, 1963.
- [6] Cern, Y. M. et al.: *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **26**, 2084, 1961.
- [7] Acczal-Martos, M. B. et al.: *Nature* **165**, 369, 1950.
- [8] Cerny, M. et al.: *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **24**, 64, 1959.
- [9] Wredef, Z.: *Physiol. Chem.*, **119**, 46, 54, 1922.
- [10] Richtmyer, N. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1477, 1943.
- [11] Kirk-othmer: *Encyclopedia of Chemical Technology*, **22**, 420, 1970. Second Edition.
- [12] *Chem. Abstr.* **33**, 8573, 1939.
- [13] 韩广甸等: 《有机制备化学手册》(上册), 1975.
- [14] Bonner, W. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2241, 1951.

【本文于 1978 年 10 月 20 日收到】

荧光胺的合成和应用

顾本贤 徐 珉 方继康

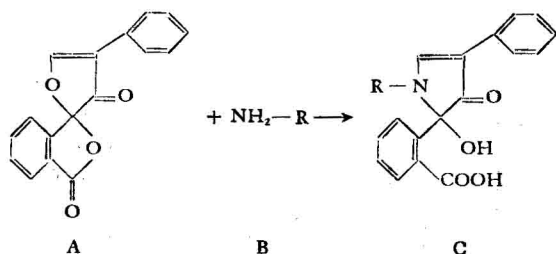
(中国科学院上海生物化学研究所)

近几年来, 在蛋白质化学研究中, 分析微量化的重要方面之一是使用荧光方法。在氨基酸、多肽、蛋白质测定中, 荧光胺 (Fluorescamine) 可与游离的氨基反应, 产生荧光的物质, 借此测定的灵敏度可提高达 10^{-12} 克分子。荧光胺在柱层析、薄层层析中都可用来测定氨基酸和多肽; 也有用作抗体荧光标记的荧光试剂。此试剂已有 Hoffman-La Roche 公司生产出售, 由于此试剂价格昂贵, 因而很多实验室都不能普遍使用。本实验室使用国内的现有试剂, 参照了有关的方法尝试合成该试剂, 现已初步合成。合成的试剂与进口的 Hoffman-La Roche 公司的产品作了比较, 基本符合。并且就此试剂在溶液

中和薄层中的测定作了一些比较。在此作一介绍。

一、基本原理

荧光胺与伯胺类反应的机制:



荧光胺 (A) + 伯胺 (B) 反应生成具有荧光