

用于肝癌检测的酶底物

——5'-(5-碘吲哚酚-[3])胸腺嘧啶核苷酸的制备

山四妹 戎积圻

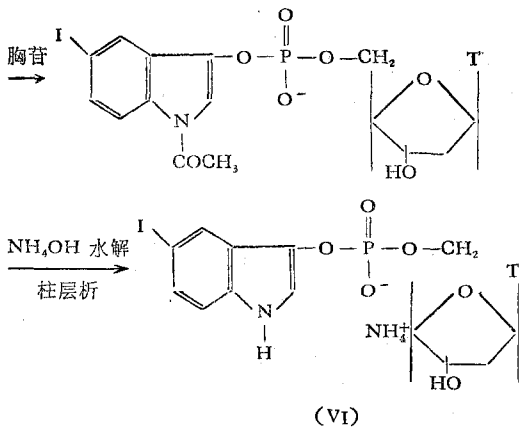
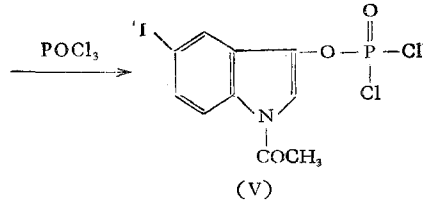
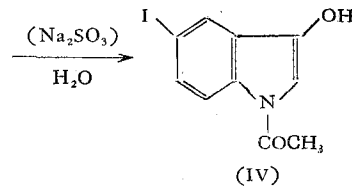
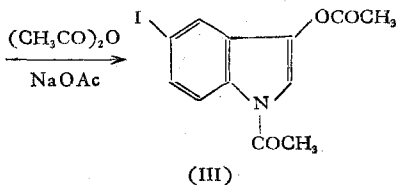
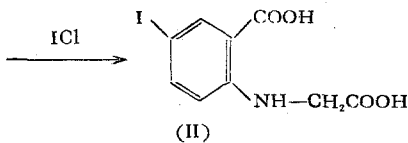
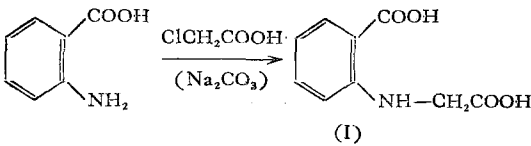
(中国科学院上海生化所东风生化试剂厂)

检测人血清中5'-核苷酸磷酸二酯酶同工酶谱的变化,是诊断人类原发性肝癌的一个有效的血清酶学方法。和甲胎蛋白诊断法协同,可使肝癌的诊断符合率自80%提高到约94%^[1-4]。减少了甲胎蛋白诊断肝癌存在的假阴性问题,具有重要的临床诊断意义。

检测5'-核苷酸磷酸二酯酶(5'-NPDase)同工酶的底物,5'-(5-碘吲哚酚-[3])胸腺嘧啶核苷酸,我所潘禄兴等^[5]已有直接合成法报道。本文在潘禄兴等工作基础上对工艺作了改进,使产率有了明显提高。

一、合成方法

合成路线如下:



5-碘-1-乙酰吲哚酚-[3] (IV) 的制备

邻-氨基苯甲酸在 Na_2CO_3 存在下与一氯醋酸反应,得2-羧基苯甘氨酸(I)^[5]。(I)与一氯化碘作用,得N-(4-碘-2-羧基苯)甘氨酸(II)^[6]。(II)和乙酸

迟胆甾醇的沉淀,或将其结晶转变成为“溶液”。如果这种推测正确,那么胆结石的形成,也可以用化学的方法处理掉。

参 考 文 献

[1] Olszewski M. F.: *Nature*, (Condon) 1973, **242**, 336.
[2] G. H. 布朗著,吴熙载译:《液晶与生物结构》科学出

版社, 1983, 176—177.

[3] Steven, H.: *The journal of Clinical investigation*, 1978, **51**, 1893—1894.
[4] Stewart, G. T.: *Ordered fluids and liquid crystals*, 1966, **11**, 148—153.
[5] Magda, A. E.: *Journal of Colloid and interface science*, 1981, **84**, 230—231.

[本文于1987年12月7日收到]

酞、无水乙酸钠反应后,得5-碘-1-乙酰-3-吡啶酚乙酸酯(III)^[6]。(III)在Na₂SO₃存在下水解,生成5-碘-1-乙酰吡啶酚-[3](IV)^[7];再经无水乙醇和丙酮混合溶剂重结晶后,得淡黄色针状结晶。熔点:191—193℃,产率:46—50%。(文献:熔点:189—191℃,产率:54.7%)。

N-乙酰-5-碘吡啶酚磷酸氯(V)的制备

1g(3.32mmol)(IV)溶于30ml无水吡啶,加入0.42ml(4.35mmol)重蒸POCl₃,室温反应20小时。反应液通过冷阱用油泵抽干,得(V)。立即进行下一步反应。

5'-(5-碘吡啶酚-[3])胸腺嘧啶核苷酸铵盐(VI)的制备

在上述(V)中加入1g(4.13mmol)胸苷溶于30ml无水吡啶的溶液。室温反应48小时。加入80ml 7mol/L氨水,室温水解2—2.5小时,旋转蒸发到干。残留物溶于200ml无离子水,用1mol/L氨水调节到pH7。上DEAE-Sephadex A-25柱(3.5×42cm, HCO₃⁻型)进行分离提纯。经水洗柱后,用0.25mol/L NH₄HCO₃和0.65mol/L NH₄HCO₃,各3000ml进行梯度洗脱,流速:2—2.5ml/分,产物在大约0.45mol/L NH₄HCO₃浓度时开始被洗脱下来。如图1所示。合并洗脱液中紫外吸收比值为:230nm/268nm = 2.9(±0.1)和268nm/250nm = 1.35(±0.05)部分。旋转蒸发到干,并反复用甲醇溶解后再蒸发到干,以除尽所含之NH₄HCO₃。用少量水溶解,1mol/L氨水调节到pH7.0。过滤使清,冷冻干燥。得淡黄色5'-(5-碘吡啶酚-[3])胸腺嘧啶核苷酸铵盐700—780mg。产率:36—40%。

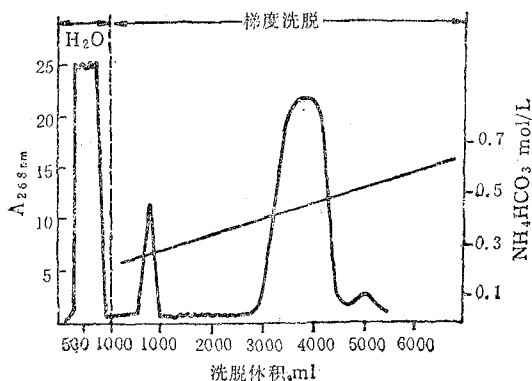


图 1

二、产品鉴定

1. 光谱吸收

称取3mg产品,配制成0.03mg/ml水溶液。其全光谱波形和潘禄兴等^[3]报道接近。

$$A_{230}/A_{268} = 2.92, A_{268}/A_{250} = 1.32$$

2. 纸层析(表1)

新华1号滤纸。上行。分别用溶剂系统(A):正丁醇:乙酸:水(5:3:2)和(B)正丁醇:水(86:14)进行层析。在紫外灯下观察,只有一个斑点。

表1 纸层析鉴定的R_f值

样品	产品(VI)	胸苷	中间体(IV)
A系统	0.58	0.67	0.89
B系统	0.20	0.44	0.78

3. 酶学定性鉴定

按潘禄兴等方法^[3]。结果表明:我们的产品可与5'-NPDase反应,产生靛蓝色。但与3'-NPDase无反应,同实验对照管完全一样。说明本品中没有3'-核苷酸衍生物存在。此外,产品经广西医学院和上海新华医院等单位用于临床检测,结果均表满意。

三、讨 论

5'-(5-碘吡啶酚-[3])核苷酸类的产率,文献报道均很低。我所潘禄兴等^[3]简化了磷酸化反应后,收率可达到30%左右。我们自邻-氨基苯甲酸开始,通过四步合成,可以方便地大量制得5-碘-1-乙酰吡啶酚-[3]。其纯度也是影响磷酸化的重要因素之一。用吡啶作溶剂重结晶,可以有效地提高其纯度。我们在磷酸化时采取了严格的无水操作,不仅使扩大投料得以实现,并进一步使产率提高到36—40%。个别批数甚至超过40%。由于副产物的相对减少,也为下一步的柱分离提纯提供了较为方便的条件。本法批量收率达到近克水平,不仅降低了成本,并使5'-核苷酸磷酸二酯酶法在我国的推广应用于临床检验肝癌提供了必要的物质基础。

参加部分工作的有秦正蕊、吴美英和黄铮同志;酶学的定性鉴定由本厂金承德同志完成,谨以致谢。

参 考 文 献

- [1] Lu, H. M. et al.: Int. J. Cancer, 1980, 26, 31.
- [2] 林克敏等:《广西医药》, 1984, 6(4), 191.
- [3] 潘禄兴等:《生物化学与生物物理学报》, 1985, 17(4), 544.
- [4] Lin, Ke-min et al. Int. J. Cancer, 1986, 37, 849.
- [5] Vogel's: Textbook of Practical Organic Chemistry, 1978, 4th ed., 887.
- [6] Holt, S. G. et al.: Proc. Roy. Soc. (London), 1958, 148B, 481—494.
- [7] Robiger, D. J. et al.: J. Heterocyclic chem., 1970, 7, 307.

[本文于1988年2月11日收到]