

偶联剂汞代异烟酸-N-丁二酰亚胺酯的合成研究

周继萌 罗雯[#]

(四川大学原子核科学技术研究所 成都 610064 [#] 成都大学生物工程系 成都 610081)

摘 要 用亲电取代法通过异烟酸与氧化汞直接反应, 合成汞代吡啶羧酸再进行酯化, 制得一种适合于各种蛋白质碘标记的偶联剂: 氯化汞代异烟酸-N-丁二酰亚胺酯。该试剂结合固相分离技术来建立一简便的标记抗体途径。其蛋白质标记率可达 40%~60%。

关键词 偶联剂 标记蛋白质 合成 放射性免疫分析

Synthesis of *N*-Saccinimidyl-chlormercuriisonicotinizute

Zhou Jimeng, Luo Wen[#]

(Institute of Nuclear Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064)

([#]Department of Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610081)

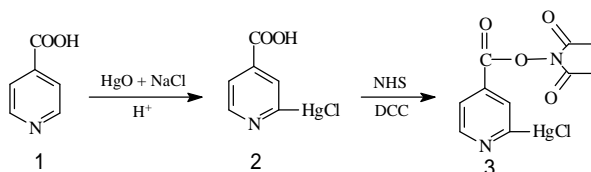
Abstract By virtue of isonicotinic acid as precursor compound, *N*-saccinimidyl lisonicotinizute has been synthesized through eletrophilic reaction and then being esterified, one kind of conjugate reagent adapted to all kinds of protein can be obtained. Moreover, a quick and convenient way of labell antibody has been established, combining this conjugate reagent with the technique of the fixed phrase separation. The rate of its protein labell thus can reach 40%~60% averagely.

Key words Conjugate reagent, Labell-protein, Synthesis, Redioimmunoassay

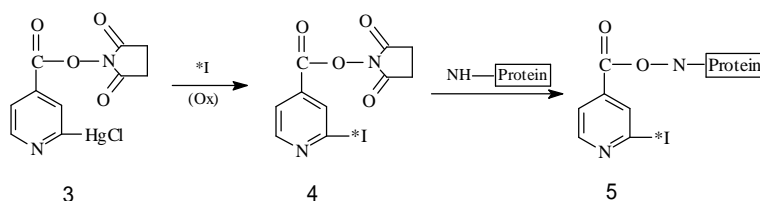
在肿瘤的体内诊断和治疗中, 氯胺-T-Iodogen^[1]直接标记法或 Bolton-Hunter^[2]试剂间接标记法都存在体内迅速脱碘并使射性碘被甲状腺所摄取的问题。脱碘的产生被认为是这些碘酚基与甲状腺素存在类似结构以及放射性碘在芳环的取代位置。Zalutsky 的研究指出: 用三丁基锡苯甲酸-N-丁二酰亚胺酯为偶联试剂^[3,4]可解决此类问题, 但该试剂合成较复杂, 因而探索合成类似化合物的简单途径十分有意义。采用异烟酸为原料合成的偶联剂氯化汞代异烟酸-N-丁二酰亚胺酯与亲酯性的芳环汞代苯甲酸^[5]相比较, 由于含吡啶环的偶联剂具有更强的亲水性, 与小分子蛋白质片段结合时, 具有能降低标记药物在体内的脱碘并被正常组织所吸收的现象。作为一种快速碘标记蛋白质及放射性药物偶联剂的合成方法, 该偶联剂的制备试剂易得, 操作程序更简便易行。

1 实验

合成路线:



蛋白质碘化:



1.1 化学试剂与仪器

FX-90QIT Φ 5 核磁共振仪, IR-408 红外光谱仪, GC-IMS4510 质谱仪, ML-902 定时恒温磁力搅拌器, XRC-1 熔点测定仪, 800 型离心机, FT-603#型闪烁[NaI \cdot TV], FH463A-自动定标器; 异烟酸(上海试剂厂), 氧化汞、氯化钠、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)均为 AR 级。薄层层析板(SIL \cdot G 产地 Gemny)。其它试剂为市售分析纯试剂。

1.2 氯化汞代异烟酸(2)的制备

取 2.2g (9.8mmol)黄色氧化汞溶解于 50mL 64%的高氯酸中的，在 500 mL 园底烧瓶内搅拌，溶解完全后加入 0.5g (4.6mmol)异烟酸匀速搅拌(异烟酸在溶解过程中汞化物逐渐结晶沉淀出来)。室温下继续搅拌 24h 后在混合物溶液中慢慢加入 150mL 10%的 NaCl 溶液进行转型反应，待溶液中沉淀物溶解后，继续滴加 NaCl 溶液使之再次沉淀完全，过滤。用去离子水洗涤沉淀，抽滤。将沉淀溶解于热丙酮中(用回流法)搅拌，趁热过滤去掉不溶残物，加水至沉淀完全析出后，冷却，过滤。用去离子水洗涤沉淀，真空干燥，得重结晶产物 2.05g，产率 76%，m.p.240°C。

MS, m/z :359[M]⁺, m/e :323[M⁺-Cl], 123[M⁺-HgCl], 78[123-COOH], 基峰(BP):201。

薄层层析(TLC)展开剂: $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1$ 。 R_f 尼古酸=0.22, R_f 毒代尼古酸=0.75。

1.3 氯化汞代异烟酸的酯化

0.3g (0.84mmol)氯化汞代异烟酸溶于 5.0mL 无水 CHCl_3 中,加入 0.5g (1.3mmol) NHS 和 0.19g (0.9mmol)DCC, 溶液呈悬浊液,在 -10°C 的冰浴中匀速搅拌 4h。保持低温放置过夜。用 3000r/min 的离心机离心除去沉淀物二环己基脲。取上清液于旋转蒸发仪上减压蒸馏使馏出液至尽, 容器中存留浅黄色油状物, 干燥, 得产物(3) 0.37g, 产率 57.8%。

1.4 氯化汞代异烟酸-*N*-丁二酰亚胺酯(3)的分离纯化

将上述酯化产物溶于乙酸乙酯中，在 $F1 \times 50\text{cm}$ 的色层柱上，用200目经预先处理的层析硅胶G为固定相进行分离。样品上柱后，以 0.5mL/min 的流速控制层析分配速度，分别用3:1、1:1、1:6的正己烷/乙酸乙酯为淋洗剂作梯度淋洗。根据薄层层析及柱层析分配色带分析结果，用刻度离心管收集主要产物，浓缩并蒸干有机相后，得汞代异烟酸-N-丁二酰亚胺酯白色油状物约 0.20g ，产率54%，低温保存。

薄层层析条件同前, $R_f=0.8$ 。

¹H NMR(CDCl₃), **d**: 0.8~1.56(m, 27H, 3×*n*-C₄H₉); 2.911(s, 4H, COCH₂CH₂CO); 8.34(s, 1H C-4H); 8.63(s, 1H, C-6H); 9.20(s, 1H, C-2H)。

MS, m/z : 454[M]⁺, m/e : 359[M⁺-C₄H₄O₂N], 323, 123, 77, 基峰(BP):104。

IR, ν/cm^{-1} : 3089(=C-H), 1716(C=C), 2979(C-H), 1071(C-O), 1510(NO_2), 1661(C=N).

元素分析 $C_{10}H_7O_4N_2HgCl$, 实测值(计算值)/%: C26.13(26.30), H1.60(1.54), N6.37(6.15)。

1.5 氯化汞代异烟酸-*N*-丁二酰亚胺酯的碘化

取含 2% 醋酸的氯仿溶液 0.1mL, 2-5mCi, $Na^{125}I$ 和 22.5 μ mol 的 *N*-氯代丁二酰亚胺酯(NCS)在 0.3mL $CHCl_3$ 中反应。搅拌混合后加入 0.25mL 酯化物溶液(将前面制备的酯化物溶解为 1mol $CHCl_3$ 溶液)。碘化反应在 60min 后通过加入 0.6mL 39.5mmol 的偏重亚硫酸钠溶液中终止反应。得混合物用 2×2 mL 二氯甲烷萃取, 除去上层水溶液, 有机相在氮气流中浓缩。

放射峰在 $R_f=0.5$ 与未标记的酯相比较, 用 THF 或 CH_2Cl_2 萃取纯化的标记产物。有机相被蒸干作偶联蛋白质用, 标记率为 60%。

1.6 人血清清蛋白(HAS)的放射性标记

将上述得到的干碘化试剂与 1mg HAS 溶解于 0.1mL 硼酸缓冲溶液(0.01mol, pH=8.5)。混合物在 4 $^{\circ}C$ 下搅拌过夜, 通过加 0.2mL 0.2mol/L 的甘氨酸(在同样的缓冲液中)终止反应, 碘化的 HAS 在 1×25 cm 柱上与其它反应产物分离, 用碳酸盐缓冲液(0.1mol, pH=9.6)作淋洗剂, 含有碘化蛋白质的收集物用 1mol/L HCl 中和至 pH=7。标记率为 40%~60%。

2 结果与讨论

为寻求合成方法简便、性能良好的标记物偶联剂, 从苯环和杂环类化合物中选择异烟酸为前体物; 以放射性碘在芳环取代位置选用汞化物为邻位取代基^[6]; 从不同汞盐中选择反应程序简便的氯化汞进行汞氢交换, 合成适宜于蛋白质标记的碘化试剂氯化汞代异烟酸-*N*-丁二酰亚胺酯, 经质谱及红外分析, 结果得到确认, 核磁共振分析 $HgCl$ 基团在苯环上能成功的进行交换。

氯化汞代异烟酸为一简便快速的制备过程, 以氯化汞转型反应能控制好汞化反应的程序并有望提高产率。酯合成在无水试剂操作下进行, 经分离纯化后获得含- $HgCl$ 和-*N* 双位功能基团的偶联剂, 先标记偶联剂, 然后用偶联蛋白质的间接标记法标记蛋白质以测定该偶联剂的性能。

用 ^{125}I 通过氯化汞代异烟酸-*N*-丁二酰亚胺酯标记人血清清蛋白(HAS)得到标记率平均达 40%~60%, 优于其它间接标记法, 说明产物是性能良好的偶联剂。

与其它碘化试剂合成方法比较, 氯化汞代异烟酸-*N*-丁二酰亚胺酯合成程序简便, 试剂易得, 操作方法简单易掌握。

参考文献

- [1] D Seyterth. J. Org. Chem., 1980,203:183.
- [2] C Warden. Org. Chem., 1980,9:19.
- [3] M R Zalutsky. Narula As Appl Radialisot, 1987,38:1051.
- [4] M R Zalutsky. Narula As Cancer Res., 1988, 48:1446.
- [5] A Frend, A Canfi, M Zafran. Nucl. Med. Bio., 1992,19(6):703.
- [6] 王积涛, 宋礼成. 金属有机汞化学. 北京:高教工业出版社, 1989: 266.