

L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸的研制

郭子丽 唐国忠

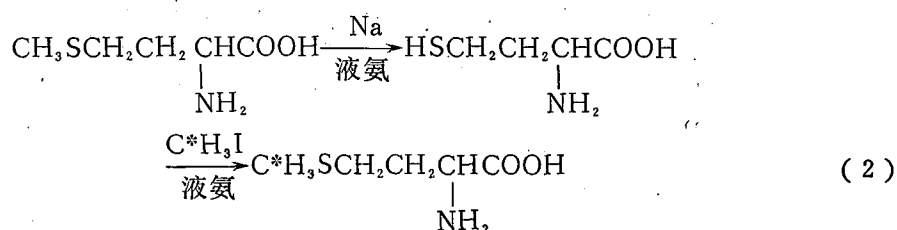
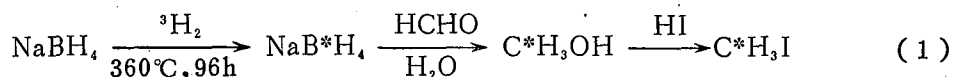
(中国科学院上海原子核研究所)

关键词 氚标记, 标记化合物, ^3H -碘甲烷, L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸。

L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸是重要的标记氨基酸之一, 用于生命的起源、氨基酸在体内的合成与代谢等学科研究中, 不少文章报道了用它来研究烷基取代的生化过程。

特定在甲基上标记的蛋氨酸一般都采用标记的碘甲烷与相应的去甲基化合物——高半胱氨酸在液氨溶液中反应而得^[1]。氚标记的碘甲烷是制备氚标记化合物的关键化合物, 关于它的制备方法, 文献上已有较多的报道^[2-4], 但我们根据实验室现有的条件, 设计了一条合成 ^3H -碘甲烷的路线, 较简便地制得了比度较高的 ^3H -碘甲烷。首先用同位素交换法制备氚化的硼氢化钠, 在交换过程中增加氚气的用量并分散被交换的样品以提高硼氚化钠的比度, 然后以水为溶剂, 用 ^3H -硼氚化钠来还原聚甲醛制得 ^3H -甲醇, 并碘化得 ^3H -碘甲烷, 化学产率为80% (以甲醛计算)。冷试验中用气相色谱分析证明, 用此法合成的碘甲烷的色谱图与A.R.级的碘甲烷一致。再取L-蛋氨酸在液氨溶液中用金属钠去甲基后, 通入 ^3H -碘甲烷便生成L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸, 经重结晶及制备性硅胶纸层析分离纯化后产品的化学产率为27%, 比度为12.5Ci/mM, 纯化纯度为95%。我们还用氚标记的碘甲烷按同样方法制得了L-(甲基-D)-蛋氨酸, 再进行质谱与核磁共振图谱的分析, 证明同位素完全定位标记在蛋氨酸的甲基上, 而且甲基上氚的丰度与碘甲烷的氚丰度相同。

L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸的合成路线如下:



实 验 部 分

1. ^3H -硼氚化钠的制备

在密闭的干燥箱里, 将硼氢化钠研细, 称取11mg, 与少许玻璃毛混和后放入镍坩埚(高30mm, 直径12mm)内, 再把镍坩埚放入交换反应管(70ml)里。将反应管接到氚化系统上, 抽

1982年5月7日收到。

真空达 2×10^{-3} Torr, 通入氟气 285 mmHg, 然后将反应管放入管状电炉内, 控制温度为 345—360°C, 交换反应 96 小时后停止加热, 冷却, 并将反应管内的氟气回收入铀粉瓶中。

2. ^3H -碘甲烷的制备

取出镍坩埚, 用 1.5 ml 蒸馏水溶解其中的碘化钠并转移入碘甲烷反应瓶内, 加入聚合甲醛 28 mg 于冰水浴中用电磁搅拌反应 2 小时。逐滴加入新蒸的氢碘酸 2 ml, 渐渐加热反应瓶 (油浴温度不超过 110°C), 同时缓缓通入氩气流, 使生成的 ^3H -碘甲烷随氩气流通过水冷凝管及氯化钙干燥管收集在用液氮冷却的接受管内。一个半小时后, 停止加热, 接受管内收集得 ^3H -碘甲烷 48 μl , 化学产率为 80% (以甲醛计算)。

冷试验中用气相色谱分析证明, 用此法合成的碘甲烷的层析图谱与 A.R. 级碘甲烷的一致。

3. L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸的制备

称取 L-蛋氨酸 46.5 mg 放入双颈反应瓶内, 置于 -50°C 的干冰丙酮浴中, 通入氨气, 使液氨体积达 6—7 ml, 加入金属钠 40 mg, 并通入氩气搅拌。此时溶液呈深兰色, 反应 20 min 后, 加入氯化铵 23 mg, 溶液褪色 (在冷试验中曾多次用纸层析鉴定证明, 此时蛋氨酸去甲基是完全的), 接上盛有 ^3H -碘甲烷的管子, 使 ^3H -碘甲烷随氩气流缓缓通入反应液。通完后, 继续通氩气反应 20 min, 然后让液氨自然挥发至干。

加 1 ml 蒸馏水使反应物溶解, 并用浓 HCl 调 pH 至 8, 再加无水乙醇 7 ml, 使有结晶析出, 待结晶完全后过滤得产物 75 mg (其中混有少许盐, 因此超过理论值)。将结晶产物用少量水溶解后滴于制备性的含硅胶层析滤纸上, 展开剂为叔丁醇: 丁酮: 氨水: 水 = 40:30:10:20 (体积比)。展开后用放射自显影定位, 并取很少部分用茚三酮显色, 发现显色的部位与自显影显示的位置完全重合, 并与标准样品的 R_f 值一致。从层析纸上剪下含有 L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸产品的那部分用灭菌蒸馏水浸取。

4. L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸的分析鉴定

(1) 比度与放化纯度的测定 取部分浸取液经稀释后用 TNBS 比色分析法测定其化学含

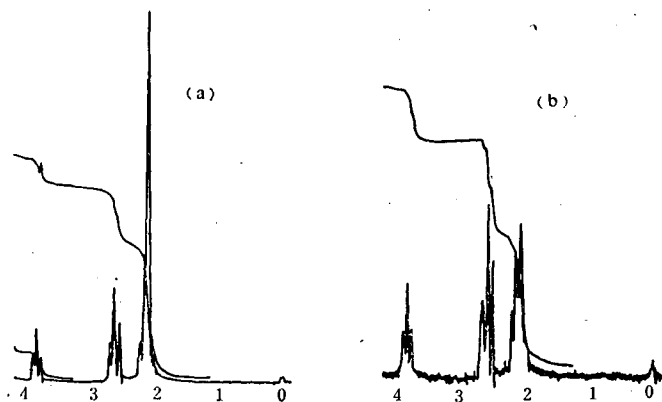


图1 L-蛋氨酸的NMR图谱
(a)——L-蛋氨酸; (b)——L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸。

量, 算出纯化后 L-(甲基- ^3H)-蛋氨酸的化学产率为 27%。再用 NE8312 液体闪烁谱仪测其绝对强度, 算出产品的比度为 12.5 Ci/mM。分别用两种溶剂系统的纸层析来鉴定产品的放化纯度, 以叔丁醇: 丁酮: 氨水: 水 = 40:30:10:20 (体积比) 为展开剂, 放化纯度为 95%。以正丁醇: 醋酸: 水 = 8:2:10 (体积比) 为展开剂, 放化

纯度为96%。

(2) 标记位置的确定 采用氙标记的碘甲烷, 进行质谱分析(70eV), 结果表明 m/e (相对强度): 145(143), 144(60), 143(33), 142(5), 可算出碘甲烷中氙的丰度为81%。按上述相同的方法制得L-(甲基-D)-蛋氨酸, 质谱分析(70eV)显示, m/e (相对强度): 152(125), 151(50), 150(9), 149(11), 则产品中氙的丰度约为80%。其核磁共振图谱与标准L-蛋氨酸的图谱完全相同, 唯有 δ 值为2.1处的峰缩小了。这证明氙标记在甲基上, 并可算出甲基上氙的丰度为81% (见图1)。同时也证实了在该反应过程中在甲基上没有发生同位素交换。

殷林祥, 郑冬珠, 吴逸平三同志协助进行气相色谱、核磁共振谱及质谱分析工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] D. Dolphin et al., *Anal. Biochem.*, **36**, 338 (1970).
- [2] N. H. Smith et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1033 (1955).
- [3] F. A. Cotton et al., *J. Chem. Soc.*, Dec., 4138 (1959).
- [4] R. Schwob et al., *J. Labelled Compd. and Radiopharm.*, **14** (3), 335 (1978).

THE PREPARATION OF L-(METHYL-³H)-METHIONINE

GUO ZILI TANG GUOZHONG

(Shanghai Institute of Nuclear Research, Academia Sinica)

ABSTRACT

A procedure for preparing L-(methyl-³H)-methionine is described. The method involves the tritiated sodium borohydride reduction of formaldehyde. This will be followed by iodination to give a 80% yield of tritiated methyl iodide. Direct alkylation of the L-homocysteine anion, generated by the sodium-liquid ammonia reduction of L-methionine, by methyl-T iodide gives L-(methyl-³H)-methionine with 27% yield after purification. The specific activity of labelled methionine is 12.5 Ci/mM. The radiochemical purity is over 95%.

Mass spectrum and NMR spectroscopy of deuterated methionine, prepared from deuterated methyl iodide by the same method, show that the deuterium content of the S-methyl group is the same as that of the methyl iodide, and methionine specifically labelled in the methyl group is obtained.

Key words Tritium labelling, Labelled compound, ³H-methyl iodide, L-(methyl-³H)-methionine.