

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0044-04

# 17 $\beta$ -雌二醇-黄素腺嘌呤二核苷酸结合物的合成

周 乐<sup>1</sup>, 史远刚<sup>2</sup>, 李 键<sup>2</sup>, 王建辰<sup>2</sup>

(1. 西北农业大学基础科学系; 2. 动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

[摘 要] 根据 ARIS 的需要, 设计出标题物的分子结构模型。以黄素-5-单磷酸、6-酮-17 $\beta$ -雌二醇羧甲基肟和 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸为原料, 经过 3 步反应合成出标题物。采用酶激活试验和免疫抑制试验确证了标题物的结构。

[关键词] 17 $\beta$ -雌二醇; 黄素腺嘌呤二核苷酸; ARIS; PGLIA

[中图分类号] O629.23 [文献标识码] A

脱辅基酶再激活免疫测定技术 (Apoenzyme reactivation immunoassay system, ARIS), 又称辅基标记免疫测定 (Prosthetic group-labeled immunoassay, PGLIA)<sup>[1]</sup>, 是 80 年代由国外发展起来的一种先进的均相酶免疫测定方法, 其优点是快速、灵敏、准确和操作简单。因此, ARIS 在现场测定方面具有重要的应用价值。目前, 国外已研究出茶碱<sup>[1]</sup>、苯妥因<sup>[2]</sup>、苯巴比妥<sup>[3]</sup>和孕酮<sup>[4]</sup>的超微量 ARIS, 而国内关于 ARIS 的研究则尚属空白。17 $\beta$ -雌二醇-黄素腺嘌呤二核苷酸结合物是构建 17 $\beta$ -雌二醇-ARIS 的辅基标记物, 标记物分子结构的设计及其合成品的质量是决定 ARIS 测定质量的关键因素之一。

## 1 标记物分子结构的设计

根据 ARIS 的原理, 理想的标记物应该具备以下生物学特性: ① 具有类似于辅基的功能, 即当其 与脱辅基的酶蛋白相遇时, 能够再生或重构出活性全酶, 而且这种能力应尽可能的接近天然辅基; ② 具有待测物即半抗原的免疫学特性, 也就是当其 与待测物的抗体相遇时, 能够形成稳定的抗原抗体复合物, 而且这种免疫反应应尽可能具有高的特异性和结合力; ③ 上述 2 种功能应该是相互抑制的, 即标记物不可能同时既与酶蛋白结合, 又与抗体结合, 换句话说, 就是标记物的免疫结合反应和其 与酶蛋白的结合反应是一对竞争抑制反应。

ARIS 对标记物的上述要求决定了标记物的分子结构应具备以下特征: ① 分子中需具有辅基黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, FAD) 的结构单元, 而且 FAD 上用于结合脱辅基葡萄糖氧化酶 (AGOD) 的功能基团, 以及 FAD 行使催化作用的功能基团尽量不受分子中其他结构因素的干扰, 这就要求辅基上的连接位点必须合适。根

[收稿日期] 1998-08-11

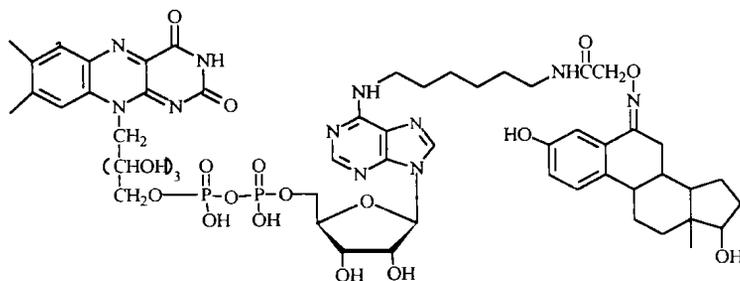
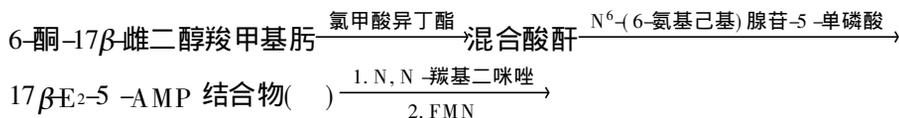
[基金项目] 高等学校博士点基金资助项目 (4397); 杨陵农业科技开发基金资助项目 (06B5)

[作者简介] 周 乐 (1965—), 男, 副教授, 博士

据有限的关于辅基 FAD 构效关系研究的报道<sup>[1]</sup>, N<sup>6</sup> 位作为连接位点是较好的。④分子中需具有 17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>)的结构单元,这是免疫反应所必须的。为了提高免疫反应的特异性,17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 与 FAD 的连接位点应该和制备 17 $\beta$ -雌二醇-人血清白蛋白结合物(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>-HSA, 抗原)时的要求一样,以选择 6 位为好<sup>[6]</sup>。(四)为了使标记物具有上述第 3 种生物学特性, FAD 和 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 应该是通过长度适当的“桥”链连接起来的,链太长或太短均不利于标记物功能的发挥。其次,靠近 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 的部分“桥”链应与制备 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>-HSA 结合物的“桥”链保持一致,这样可以减少免疫反应中的“桥”效应,提高标记物免疫反应的特异性和亲和力。此外,“桥”链应尽可能是惰性的,即不含极性基团,这样才能最大限度地降低“桥”链对 FAD 和 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 发挥各自生物学效应的影响。根据 Morris 等<sup>[1]</sup>的研究结果及人们在亲合层析方面的研究经验,笔者确定“桥”链为 12 个原子长度。基于以上分析,标记物的分子结构设计见图 1( )。

## 2 合成路线

以 6-酮-17 $\beta$ -雌二醇羧甲基肟为起始原料,采用混合酸酐法活化羧基,然后与 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸反应,制得 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>-5-AMP 结合物( )。最后利用 N,N-羰基二咪唑活化磷酸基,再与黄素单核苷酸(FMN)反应制得标记物( ),合成路线如图 1 所示。



( I )

图 1 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>-FAD 结合物合成路线

## 3 材料与方方法

### 3.1 试验材料

黄素单核苷酸(FMN)、N,N-羰基二咪唑、三正辛胺为美国西格玛(Sigma)化学公司产品,DEAE-23 购自沃特曼(Whatman)公司。氯甲酸异丁酯、732 阳离子交换树脂和分子筛为上海化学试剂厂产品。6-酮-17 $\beta$ -雌二醇羧甲基肟和 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸分别按文献[6]和[7]的方法制备。薄层层析硅胶 GF<sub>254</sub>系青岛海洋化工厂产品,硅胶薄层层析板为自制品,厚度约 1.0 mm, 7 g · L 聚乙烯醇为粘合剂,110 活化 40 min. 薄层展

开溶剂系统为无水乙醇/1.0 mol·L<sup>-1</sup>碳酸三乙铵=7/3(V/V)。二氧六环经金属钠干燥重蒸,吡啶经 NaOH 干燥重蒸,DMF 经分子筛干燥重蒸。UV 采用 PE LAM-BDA 17 UV/VIS 分光光度计测定。

### 3.2 制备方法

3.2.1 I 的制备 0.265 g(0.74 mmol) 6-酮-17β雌二醇羧甲基肟(17β-E<sub>2</sub>-CMO)溶于 10 mL 干燥二氧六环中,加入 175 μL 三正丁胺,温度降至 10 ℃以下,再加入 95 μL 氯甲酸异丁酯,搅拌 1 h, TLC 显示原料全部转变成混合酸酐。

0.270 g(0.6 mmol) N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸溶于 10 mL H<sub>2</sub>O 中,滴加 4 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 至 pH 9.5,搅拌至固体全溶。在 0 ℃冷却下,将混合酸酐溶液快速加到反应液中,pH 迅速降至 6.0 左右。随之用 4.0 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调整 pH 至 8.0~9.2,10 min 后,pH 基本恒定。在冰水浴冷却下,搅拌反应 4~5 h,用 4 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调整 pH 值至 2.0~3.0,用 3×20 mL 乙酸乙酯萃取未反应的原料 17β-E<sub>2</sub>-CMO。水相过 H<sup>+</sup>型 732 柱(1×15 cm),经 TLC 检测,未反应的原料 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸被交换到柱子上。用无离子水洗柱至无产物流出。用 N-甲基吗啡啉调整流出液的 pH 值至 7.5,40~50 ℃减压除去溶剂,得白色晶体。用 100 mL 0.43 g·L<sup>-1</sup> 热甲醇溶解后,滤去不溶物,减压蒸除溶剂。用 4×30 mL 干燥 DMF 反复溶解蒸干得淡棕色结晶 530 mg,产率为 99.6%,TLC 单点,Rf=0.465。

3.2.2 II 的制备 向上述产物中加入干燥的 DMF 25~30 mL, N,N-羰基二咪唑 560 mg(3.50 mmol),有气泡产生,摇匀,置于干燥器中反应 5~6 h,得反应液 A, TLC 显示反应完全。

282 mg(0.6 mmol) 黄素单核苷酸溶于 60 mL 水中,然后在搅拌下,滴加至含 258 μL 三正辛胺的 100 mL 丙酮中。期间溶液逐渐变浑浊,最后产生沉淀,并伴有轻微放热。用旋转蒸发器蒸去丙酮至溶液清亮。再加入 30 mL 丙酮和 50 mL 干燥 DMF,蒸去溶剂至干,用 3×30 mL 干燥 DMF 反复溶解蒸干,最后残渣溶于 40~50 mL 干燥 DMF 中,得备用液 B。

向反应液 A 中加入 57 μL(1.4 mmol) 甲醇水解未反应的 N,N-羰基二咪唑,摇匀,静置 30 min。减压蒸去溶剂,残渣溶于 40~50 mL DMF 中,得备用液 C。

将备用液 B 和 C 合并,密闭剧烈摇动数分钟后,室温避光静置 2 h, TLC 显示有产物出现,继续静置反应 30 h。取 3 mL 反应液溶于 100 mL 水中,溶液以 3 mL·min<sup>-1</sup> 的流速通过用 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 碳酸三乙铵充分平衡过的 DEAE-23 柱(2×50 cm),在柱子顶端形成约 3 cm 高的黄色色带。用 700 mL 水和 700 mL 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 碳酸三乙铵梯度洗脱,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,每管接收 10 mL,共收集 58 管。对各管分别进行酶激活和免疫抑制试验后,确定第 30~50 管呈双阳性,合并后用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(PBS)调 pH 至 7.0。根据 ε<sub>350</sub><sup>pH7.0</sup> 11 300 进行紫外光谱法浓度测定,计算产率为 34%,TLC 单点,Rf=0.580,UV (λ<sub>max, nm</sub>): 205, 265, 370, 445。

## 4 讨论

在设计 17β-E<sub>2</sub>-FAD 结合物的合成路线时,3 个中间体的连接次序是很重要的。Mor-

ris 等人的方法<sup>[1]</sup>是先将 FMN 和 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸连接,最后再与相应的半抗原连接。本文报道的方法与 Morris 等人的方法相比,免去了 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)腺苷-5-单磷酸的氨基保护和脱保护两个反应,省去了繁琐复杂的中间产物 N<sup>6</sup>-(6-氨基己基)FAD 的提纯分离工作,终产率提高了3倍多。因此,本方法具有合成路线短、操作简单、产率高等优点。

标题物是一个分子质量较大,结构复杂的化合物,一般的 IR, MS 和 NMR 难以完成对其结构的测定。加之本试验所合成的标题物量小且难以获得纯品,所以,标题物的结构确证是一个比较令人棘手的问题。本试验同时采用了酶激活试验和免疫抑制试验,不仅可证明分子中是否有 FAD 和 17 $\beta$ E<sub>2</sub> 结构单元的存在,而且还可证明产物的酶学和免疫学活性高低。试验表明该方法对于确证标题物结构的正确与否简单有效。

#### [参考文献]

- [1] Morris D L, Eills P B, Carrico R J, et al. Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassay[J]. Anal Chem, 1981, 53(4): 658 ~ 665.
- [2] Tyhach R J, Rupchock P A, Pendergrass J H, et al. Adaptation of prosthetic-group-label homogeneous immunoassay to reagent strip format[J]. Clin Chem, 1981, 27(9): 1499.
- [3] Sommet R, Clayborn J, Thompson S, et al. Dry reagent immunoassay for measuring phenobarbital in serum and plasma[J]. Therap Drug Monit, 1988, 10: 197 ~ 201.
- [4] Van der lende T, Schasfoort R B M, Van der Meer R F. Monitoring reproduction using immunological techniques[J]. Anim Reprod Sci, 1992, 28: 179 ~ 184.
- [5] Dean P D G, Exley D, Johnson M W. Preparation of 17 $\beta$ -oestradiol-6-(O-carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin conjugate[J]. Steroids, 1971, 18(5): 593 ~ 603.
- [6] 李 键, 刘智喜, 周 乐. 17 $\beta$ -雌二醇-6-(O-羧甲基)肟—人血清白蛋白结合物的合成[J]. 西南民族学院学报(自然科学版), 1993, 19(3): 253 ~ 258.
- [7] 周 乐, 史远刚, 李 键, 等. Synthesis of N<sup>6</sup>-(6-aminohexyl) adenosine-5-monophosphoric acid[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(2): 17 ~ 20.

## Synthesis of 17 $\beta$ -Oestradiol-Flavin Adenine Dinucleotide Conjugate

ZHOU Le<sup>1</sup>, SHI Yuan-gang<sup>2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, WANG Jian-chen<sup>2</sup>

(1. Department of Basic Science, 2. Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Based on the request of ARIS, the molecule structure model of 17 $\beta$ E<sub>2</sub>-FAD and its synthetic route were designed. 17 $\beta$ E<sub>2</sub>-FAD was synthesized from riboflavin 5-monophosphoric acid, 17 $\beta$ -oestradiol-6-(carboxymethyl) oxime and N<sup>6</sup>-(6-aminohexyl) adenosine 5-monophosphoric acid via three steps. The structure of 17 $\beta$ E<sub>2</sub>-FAD was identified by means of apoenzyme reactivation and immune inhibition test.

**Key words:** 17 $\beta$ -oestradiol, Flavin adenine dinucleotide, ARIS, PGLIA rights reserved. <http://www.cqvip.com>