

2'-取代苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸的合成及反应

北京医科大学药学院 程天荣 张勇民 张礼和

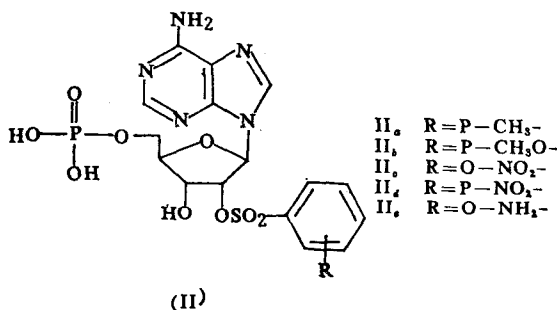
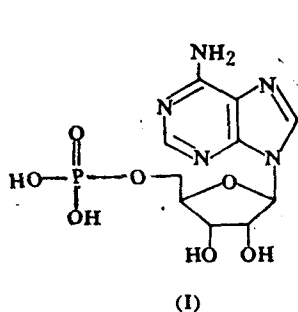
[摘要] 取代苯磺酰氯在碱作用下选择性的使 5'-腺嘌呤核苷酸的 2'-羟基酰化。2'-取代苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸与亲核性试剂反应, 极易产生脱嘌呤反应。

关键词 2'-取代苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸 亲核性置换反应 脱嘌呤反应

近年来已经报道了多种抗肿瘤药和抗病毒药具有阿拉伯糖苷的结构, 如阿糖胞苷, 阿糖腺苷等。这些化合物可以通过相应的核糖核苷 2'-位羟基构型转化而得到⁽¹⁾。在多核苷酸的合成中寻找选择性高的 2'-羟基保护基也是当前核酸化学领域中的重要工作之一⁽²⁾。为此我们研究了一系列不同取代的苯磺酰氯与 5'-腺嘌呤核苷酸的反应, 观察其选择性保护糖上羟基的情况以及作为离去基团与亲核性试剂的

反应能力。

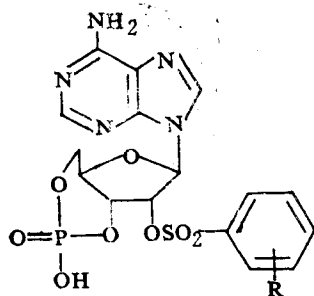
5'-腺嘌呤核苷酸(I)在含氢氧化钠的丙酮溶液中 0℃与带有不同取代基的苯磺酰氯反应, 得到 2'-O-取代苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II_{a-d})。反应选择性极高, 几乎没有 3'-位异构体的生成。除 2'-O-对硝基苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II_c)收率为 64.5% 外, 其他收率都在 90% 左右。II_a在室温下用 Pd 催化氢化, 得到 2'-O-邻氨基苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II_b)。



核苷酸(II_a)。

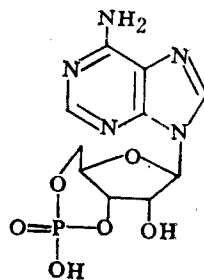
(II_a)和(II_b)在无水吡啶中与 DCC 回流生成 2'-O-取代苯磺酰基-3', 5'-腺嘌呤环核苷酸(III_a)和(III_b)。(III_a)和(III_b)在室温与钠汞齐搅拌或在 -78℃与萘化钠反应, 可以定量

的脱去 2'-O-取代苯磺酰基, 得到已知化合物, 腺嘌呤 3', 5'-环核苷酸(IV)。以上反应证明了取代苯磺酰基选择性的进入了(I)的 2'-位。



(III)

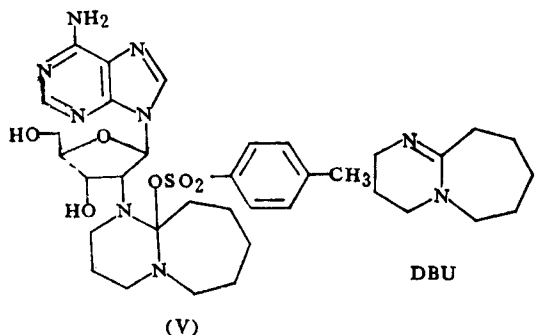
III, R = P-CH₃,
III, R = P-CH₃O



(IV)

(II_a-)与不同胺反应, 企图得到 2'-胺基-腺嘌呤阿拉伯糖苷 5'-磷酸没有成功。(II_c) (II_d) 在碱性溶液中迅速消除得到腺嘌呤的对硝基(或邻硝基)苯磺酸盐, 而(II_a)和(II_b)在室温与 NH₃、甲胺或二乙胺不起反应, 当加热时也产生消除反应。

(II_a)与 DBU 在吡啶中反应时, 得到(II_a)与 DBU 1:1 的复盐, 当此复盐在吡啶中含氢氧化钠的甲醇中再与 DBU 反应时, 除产生脱嘌呤反应外还得到化合物(V)。(V)分子中不含磷, 质谱和核磁共振数据显示分子中含有嘌呤环(δ 8.25, δ 8.15), 对甲苯磺酰基(δ 2.5, δ 7.0-7.8)以及 DBU 的多个次甲基(δ 3.2~3.6, δ 2.4~2.7), 初步推测(V)是(II_a)经过 2'-位上二次置换反应的产物。进一步的结构证明仍在进行中。同样的产物也可从 2'-O-对甲苯磺酰基-腺嘌呤核苷与 DBU 在吡啶中反应得到。



(V)

因此, 取代苯磺酰基能作为保护基选择性的进入 5'-腺嘌呤核苷酸的 2'-位。但作为离去基团, 进行亲核性取代反应, 在本实验条件

下, 并不成功。

实验部分

纸上电泳用新华 1 号滤纸, 0.1 mol/L 三乙胺碳酸氢盐溶液(pH 7.8), 电压 380 V, 一小时, 柱层析用硅胶(200~300目)为青岛海洋化工厂出品。紫外光谱用 Du-7 B 紫外分光光度计, 核磁共振谱用 FX-90 Q 仪器, 质谱用 ZAB-HS 质谱仪, 所有浓缩都在 40 °C 以下进行。

一、2'-O-取代苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II):

6.3 克(0.018 mol)的 5'-腺嘌呤核苷酸(I)溶于 60 ml 1 mol/L 氢氧化钠溶液中, 在冰浴温度下, 慢慢加入 27 ml 含 0.0198 mol 取代苯磺酰氯的丙酮溶液。反应物室温搅拌过夜, 析出的固体过滤, 用水和丙酮洗至中性即得相应的(II)的二钠盐。将其溶于少量含吡啶的水中, 用盐酸中和到 pH 2, 加入等量乙醇即得游离的(II_{a-d})。

(II_a)⁽³⁾收率 90 %。

(II_b)收率 88.9 %, 熔点 158 °(分解), UV λ_{max}^{H₂O} 246.5, 260 nm, ¹HNMR (D₂O, δ): 8.05(S, 1 H, C₂H), 8.0(S, 1 H, C₈H), 6.62-7.52(dd, 4 H, 对位取代苯), 6.0(d, 1 H, C₁H), 3.74(S, 3 H, CH₃O-) 元素分析 C₁₇H₂₀O₁₀N₆SP · 2 H₂O, 理论值 %C 36.89, H 3.62; N 12.65 分析值 %C 36.54, H 3.55, N 11.98。

(II_c)收率 87.9 %, 熔点 172 ~ 174 °(分解), UV λ_{max}^{H₂O} 259.5 nm, ¹HNMR (D₂O, δ),

8.25 (S, 2 H, C₂H, C₈H), 7.40-8.20 (m, 4 H, 邻取代苯), 6.4 (d, 1 H, C₁H)。元素分析 C₁₆H₁₇O₁₁N₆SP·2 H₂O 理论值 %C 33.80; H 2.99; N 14.79, 分析值 (33.61; H 3.07; N 14.25)。

(II_a) 收率 64.5%, 熔点 156° (分解)。UV λ_{max}²⁵: 254.5 nm, ¹H NMR (D₂O, δ), 8.32 (S, 2 H, C₂H, C₈H), 7.32-8.20 (m, 4 H, 对取代苯), 6.2 (d, 1 H, C₁H), MS (FAB), 533 (M+H⁺), 136 (B+H⁺)。

二、2'-O-取代苯磺酰基-腺嘌呤 3', 5'-环核苷酸(III):

0.5 g (II_a) 或 (II_b) 与 0.3 g N,N'-二环己基吗啉胍溶于 20 ml 吡啶及 5 ml 水中, 溶液真空蒸干后, 加入无水吡啶多次蒸干, 固体再用 P₂O₅ 真空干燥。

0.14 g 二环己基碳二亚胺(DCC)溶于 10 ml 无水吡啶, 在回流温度下滴加 0.16 g 以上制备的复盐在无水吡啶中的溶液, 回流半小时后溶液蒸干。残渣用水提取, 提取液用乙醚洗及浓缩到较小体积, 酸化后加等量乙醇得白色结晶 III_a 或 III_b。(III_a)⁽⁴⁾ 收率 80%。(III_b) 收率 65%, 电泳比移值 0.5 (II_b 为 1.0), 元素分析 C₁₇H₁₈O₉N₅SP·H₂O, 理论值 %C 39.46; H 3.89 分析值 %C 39.19; H 4.28。MS (FAB) 500 (M+H⁺), 136 (B+H⁺)。

三、(III_a) 和 (III_b) 的脱取代苯磺酰基反应:

1. 钠汞齐法: 1 mol (III_a) 或 (III_b) 于 10 ml 甲醇中, 加入 1.2% 的钠汞齐 7 g, 室温搅拌 12 小时, 过滤后滤液蒸干, 残渣用水提取, 水提液浓缩到较小体积, 酸化后加等量乙醇即得几乎定量收率的腺嘌呤 3', 5'-环核苷酸 (IV)。

2. 苯化钠法: 见文献(5)。

四、2'-O-邻氨基苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II):

100 mg (II_a) 溶于 20 ml 水中, 加入 5 mg

钯黑与氢气振荡过夜, 过滤后滤液用硅胶柱层析分离, (展开剂甲醇:水=2:1) 得到 20 mg (II_c)。UV λ_{max}²⁵: 255 nm, ¹H NMR (D₂O, δ), 8.24 (S, 1 H, C₂H), 8.12 (S, 1 H, C₈H), 6.97-7.4 (m, 4 H, 邻取代苯), 6.2 (d, 1 H, C₁H), MS (FAB) 501 (M+H⁺)。

五、2'-O-对甲苯磺酰基-5'-腺嘌呤核苷酸(II_c)与 DBU 的反应:

500 mg (II_c) 溶于 20 ml 无水吡啶及 2 ml DBU, 反应物 75°C 搅拌一小时, 得 II_c 与 DBU 1:1 的复盐沉淀。用甲醇重结晶后元素分析 C₂₀H₃₆O₉N₇SP 理论值 %C 47.77; H 5.51。分析值 %C 47.75; H 5.80。

200 mg 以上复盐加入 10 ml 无水吡啶及 1 ml DBU, 120°C 搅拌 1 小时, 混合物蒸干, 残渣用硅胶柱层析, 用氯仿甲醇洗脱得 30 mg (V)。MS (FAB) 573 (M⁺), ¹H NMR (CDCl₃, δ): 8.25 (S, 1 H, C₂H), 8.15 (S, 1 H, C₈H), 7.0-7.8 (dd, 4 H, 对取代苯), 5.9 (m, 1 H, C₁H), 3.2-3.6 (m, 6 H, N-CH₂), 2.5 (s, 3 H, CH₃-), 2.4-2.7 (m, -CH₂-), 1.5-1.9 (m, -CH₂-)。

参 考 文 献

1. Ranganathan R and Larwood D. Facile Conversion of Adenosine into new 2'-Substituted-2'-deoxy-arabinofuranosyladenine derivatives: Stereospecific Syntheses of 2'-azido-2'-deoxy-, 2'-Amino-2'-deoxy, and 2'-mercapto-2'-deoxy-β-D-arabinofuranosyladenine. Tetrahedron Lett 1978; 45:4341.
2. Mizuno Y, et al. Protecting Group in Nucleosides and Nucleotides Synthesis. VIII. Synthesis of (4-Substituted 2-Picolyl-oxide) Halides and 2'-and 3'-O-(4-Substituted-2-Picolyl-oxide) Nucleosides. Chem Pharm Bull 1980; 28(10):3041.
3. Ikehara M, et al. Synthesis of 9-(β-D-Arabinofuranosyl) adenine 5'-phosphate starting from Adenosine 5'-phosphate. Chem Pharm Bull 1977; 25(8):1892.
4. 张礼和等. 核苷 3, 5-环亚磷酸的合成. 化学通报 1980; 12:14.
5. 张礼和等. 环状核苷酸衍生物的合成. 高等学校化学学报 1985; 6(10):903.

高效液相色谱电化学检测法分离 测定狒狒血浆中的儿茶酚胺

北京医科大学药学院 夏 桂 珠

美国匹兹堡大学医学院 L.T.Chan S.K.Wolfson

【提要】 HPLC-ED 法测定血浆中的儿茶酚胺类是一种灵敏、专属的方法。我们发现用 EDTA 抗凝后的全血样品在 3°C 存放 5 小时, 与立即离心分离所得血浆中测得的儿茶酚胺类的浓度无显著差别。若在血浆中加入谷胱甘肽作抗氧化剂并冷却至 -13°C, 样品可稳定保存两天。当用高氯酸溶液由三氧化二铝上解吸儿茶酚胺时, 时间应控制在 1~2 分钟之内, 否则所得结果不准确。

关键词 肾上腺素 去甲肾上腺素 多巴胺 血浆 高效液相色谱电化学检测 稳定性 儿茶酚胺类

已有文献报道血浆中儿茶酚胺类的浓度与嗜血细胞瘤、神经母细胞瘤和高血压等疾病有关⁽¹⁾。建立准确、简便的测定儿茶酚胺的方法是进一步研究这类问题的关键。目前应用较多的方法有放射免疫法(REA)⁽²⁾和高效液相色谱电化学检测法(HPLC-ED)^(3~6)。前者需要有特殊的实验设备。而后者在一般的实验室易于实现。遗憾的是在有关 HPLC-ED 测定方法的报道中, 所强调控制的实验条件彼此各不相同, 有些结论甚至是完全相反的。有些作者⁽⁵⁾主张在采血以后需立刻离心分离测定, 否则儿茶酚胺浓度会降低。也有认为⁽⁶⁾全血样品即使在室温下存放 3 小时, 儿茶酚胺的浓度无明显变化。有的文献提出⁽³⁾在血浆中加入抗氧化剂并在 -20°C 下存放可保存更长的时间。有人⁽²⁾则认为只需保存在 -20°C 下, 不必加入抗氧化剂仍可长时间保存。为此, 我们对 HPLC-ED 法进行了研究, 得到一些有价值的结果。

实 验 部 分

一、样品制备及仪器与试剂:

1. 样品处理: 由动物的股静脉取血, 将血注入置于冰浴中并含有 0.10 ml 15% EDTA 的试管内, 在 0°C 下离心分离 10 分钟(转速 1500r/min), 取出血浆, 每 0.50 ml 血浆加谷

胱甘肽溶液(60 mg/ml, pH 5~6) 20 μ l, 混匀置 -13°C 贮存, 使用前在冰浴中解冻。

2. 试剂: 酒石酸氢去甲肾上腺素(NE), 酒石酸氢肾上腺素(EP), 盐酸多巴胺(DA), 氢溴酸二羟苯胺(DHBA)和谷胱甘肽均为美国 Sigma 公司分析试剂。庚烷磺酸钠、乙二胺四乙酸二钠、乙腈均为 ALDRICH 试剂。酸性氧化铝、炭糊粉(CP-O)为 BAS 产品。醋酸钠 BAKER 试剂。

3. 仪器: 液相色谱和电化学检测器包括 U6k 进样器, 45 型溶剂输送泵, 不锈钢 μ BondapakC-18 3.9 mm $\times$ 30 cm 色谱柱, 均为 waters 公司产品。Lc-3 电流检测器、薄层转换流过池为 BAS 公司产品。

二、实验方法:

1. 色谱条件: 在工作电极与参比电极间加 0.65 伏特电压, 电流检测器的灵敏度放在 2 nA 档, 记录仪满刻度为 0.50 伏特, 流动相流速为 1.0 ml/min, 柱前压为 10 Mpa。

2. 流动相溶液: 于 1 L 水中含有 6.8 g 醋酸钠, 100 mg 乙二胺四乙酸二钠, 1 g 庚烷磺酸钠, 用 2 mol/L 盐酸调节溶液到 pH 为 4.8, 玻璃砂漏斗过滤, 弃去 10 ml 此溶液, 加入 10 ml 乙腈, 混匀, 脱气备用。

3. 分析方法: 精密量取 0.52 ml 血浆(内