

## 稳定同位素标记的 *L*-色氨酸

刘占峰

(上海化工研究院, 上海 200062, China)

**摘要:** 稳定同位素标记的 *L*-色氨酸是核技术在氨基酸方面的应用。在合成方面, 除有机合成和同位素交换法外, 微生物法由于在全标记以及构型方面的优势, 近年来也得到广泛应用; 在应用方面, 稳定同位素标记的色氨酸作为示踪剂, 已被广泛用于医学、生物、化工等行业。随着蛋白质工程、分子生物学以及多肽等药物的发展, 它将迎来更加美好的应用前景。

**关键词:** 稳定同位素; 标记; *L*-色氨酸

中图分类号: O628; O629.7.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7512(2007)04-0240-04

## Stable Isotope Labeled *L*-tryptophan

LIU Zhan-feng

(Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** Stable isotope labeled *L*-tryptophan is an application of nucleus technology in amino acids. Progresses in stable isotope labeled *L*-tryptophan in recent years are reviewed. In the respect of synthesis, in addition to the methods of organic synthesis and isotope exchange, the microbial technology which has the advantage of U-label and construct has been used widely. In the respect of applications, stable isotope labeled *L*-tryptophan as trace has been used widely in yields of medicine, biology and chemistry et al. Along with the development of protein engineering, molecular biology and peptide drugs, they will have a fine future.

**Key words:** stable isotope; label; *L*-tryptophan

色氨酸(Tryptophan), 又称  $\beta$ -吲哚- $\alpha$ -氨基丙酸, 是人类及动物所必需的八种氨基酸之一。自 1901 年 Hopkins 和 Cole 发现并将它分离出来, 至今已被广泛应用于食品、饲料、医药等领域。

自 1927 年以来, 稳定同位素  $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{33}\text{S}$  和  $^{34}\text{S}$  相继被发现<sup>[1]</sup>。相关研究表

明, 同位素标记的化合物与其相应的未标记的化合物的理化性质非常相似, 而化合物中被标记的原子, 通过质谱、核磁共振等分析仪器很容易被跟踪、检测。基于以上原理, 科研人员将稳定同位素引入到 *L*-色氨酸中, 合成稳定同位素标记的 *L*-色氨酸。由于稳定性同位素和放射性同位素相比, 具有无毒、无放射性、生产简便等优点,

因此,稳定性同位素标记的色氨酸用途更广泛,在研究物质的反应机理、药理、动植物的生理以及在农业、化工等方面有着极其重要的作用。

## 1 稳定同位素标记的 L-色氨酸的合成

稳定同位素标记 L-色氨酸的合成过程,和 L-色氨酸基本相似。考虑到同位素在 L-色氨酸中引入的位置以及同位素的转化率,同位素标记 L-色氨酸的合成方法与 L-色氨酸的合成方法又有很大不同。目前常见的<sup>15</sup>N、<sup>13</sup>C 以及氘标色氨酸中,利用氘与活泼氢易于交换的特点,可合成氘标色氨酸。<sup>15</sup>N、<sup>13</sup>C 标记的色氨酸过去常采用化学合成法,可根据不同的合成路线确定不同的标记位置。近年来,由于微生物技术的发展,相关学者也开始探索利用微生物技术合成稳定同位素色氨酸的方法。目前,利用酶法以及前体物发酵法,除获得不同标记位置的色氨酸以外,还可一次性获得 L 型色氨酸,而有机合成法要获得 L 型,必须采用拆分方法,但该方法收率较低。

### 1.1 <sup>15</sup>N-L-色氨酸的合成

R. F Borch 等<sup>[2]</sup>利用化学合成方法,将 3-吲哚基丙酮酸和<sup>15</sup>N-硝酸铵溶于甲醇,再加入氰基硼氢化钠,调节溶液 pH = 7, 25 °C 下搅拌 36 h, 蒸除溶剂,使残余物溶于水,转入离子交换柱 [Dowex-50(H<sup>+</sup>), 100 mL], 依次用水和氢氧化铵淋洗,产物为无定形粉末,收率 23%。

本研究小组<sup>[3]</sup>曾以<sup>15</sup>N 标记的邻氨基苯甲酸作为前体物,通过微生物发酵,获得了高同位素转化率的<sup>15</sup>N-L-色氨酸产品。该合成过程中,先以<sup>15</sup>N-尿素合成了<sup>15</sup>N-邻氨基苯甲酸,其合成路线示于图 1。

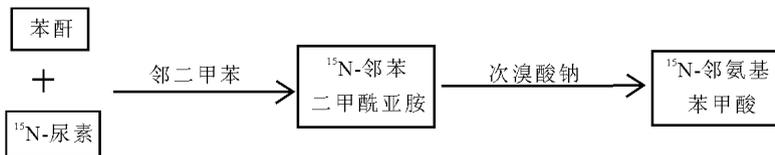


图 1 <sup>15</sup>N-邻氨基苯甲酸的合成路线

以经过诱变和 5-甲基色氨酸处理的假丝酵母突变株作为出发菌株,葡萄糖为碳源,硫酸铵为氮源,<sup>15</sup>N-邻氨基苯甲酸作为前体物进行发酵,经 732 树脂分离、大孔树脂脱色、结晶,获得了 L-[1-<sup>15</sup>N]色氨酸产品。若以<sup>15</sup>N 标记的硫酸铵作为氮源,所获得的色氨酸产品经 Micromass Quattro II 型质谱仪、MAT-271 型气体同位素质谱仪以及核磁共振检测分析,<sup>15</sup>N 被同时标记在 α 以及 1 位上,转化率在 50% 以上。

### 1.2 <sup>13</sup>C 和<sup>15</sup>N-L-色氨酸的合成

Van den Berg 等<sup>[4]</sup>将有机合成法与发酵法相结合,分别合成了<sup>15</sup>N 和<sup>13</sup>C 双同位素标记的色氨酸。其合成路线示于图 2。

首先,以标记的 H<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>、K<sup>13</sup>CN 和 <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>CN 为初始原料,合成了<sup>15</sup>N 和<sup>13</sup>C 双标记的丰度为 99% 的 1-<sup>15</sup>N, 2-<sup>13</sup>C-吲哚以及丰度为 90% 的 1-<sup>15</sup>N, 3-<sup>13</sup>C-吲哚。收率约 22%。此后,以 E. coli 的基因工程菌为出发菌株,1% 葡萄糖为碳源,在 37 °C 下培养。将获得的菌体细胞加入到含有 L-丝氨酸、1-<sup>15</sup>N, 3-<sup>13</sup>C-吲哚、磷酸吡哆醛和硫酸铵的合成培养基中,37 °C 下培养 24 h, 1-<sup>15</sup>N-2-<sup>13</sup>C-吲哚和 1-<sup>15</sup>N-3-<sup>13</sup>C-吲哚几乎全部转化成<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-L-色氨酸。

Unkefer 等<sup>[5]</sup>以邻甲苯酰氯、<sup>15</sup>N-氨水以及<sup>13</sup>C-甲酸为初始原料,合成了单核素标记的吲哚:[1-<sup>15</sup>N]-吲哚和[2-<sup>13</sup>C]-吲哚。以大肠杆菌的基因工程菌作为出发菌株,L-[3-<sup>13</sup>C]丝氨酸或[1-<sup>15</sup>N]-和[2-<sup>13</sup>N]-吲哚为前体物,在色氨酸酶作用下,分别合成 L-[β-<sup>13</sup>C]-色氨酸、L-[1-<sup>15</sup>N]-色氨酸和 L-[2-<sup>13</sup>C]色氨酸。L-[1-<sup>15</sup>N]-色氨酸的合成路线示于图 3。

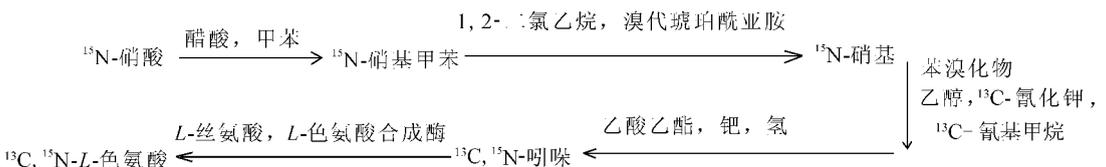
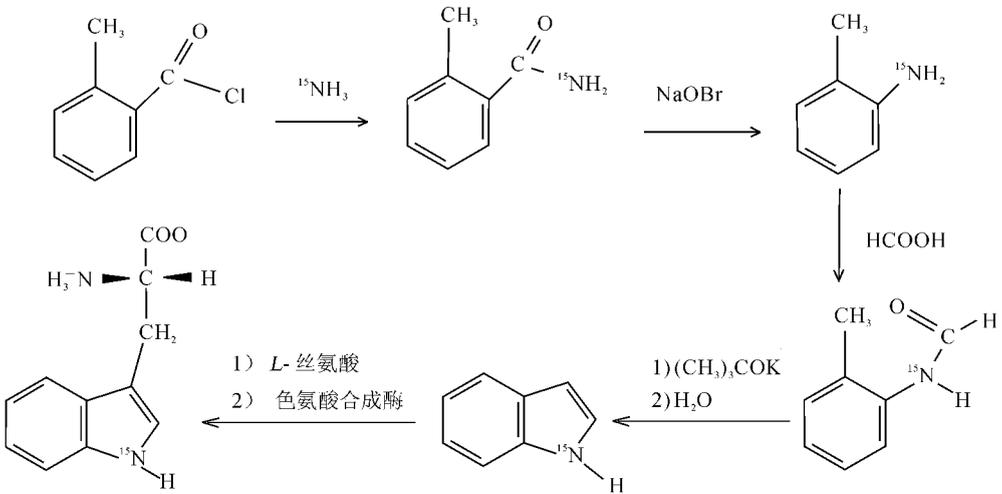


图 2 <sup>15</sup>N 和<sup>13</sup>C 双核素标记色氨酸的合成路线

图 3  $L$ -[1- $^{15}\text{N}$ ]-色氨酸的合成路线

### 1.3 氘标 $L$ -色氨酸的合成

氘标记的色氨酸主要采用同位素交换法合成。唐刚华等<sup>[6]</sup>将  $L$ -色氨酸溶于三氟乙酸酐和丰度为 99.8% 的氘水中, 经过交换, 用稀氢氧化钠溶液和乙醇处理, 获得氘标记色氨酸产品, 产率约 95%, 丰度 96.2%。他们又改进了工艺流程, 将  $L$ -色氨酸溶于氘水中, 抽出溶剂, 加入 DC1 (由氯化亚砷和高丰度氘水配制而成) 溶解, 回流, 用稀的氢氧化钠和乙醇处理, 获得产率约 92% 的氘标色氨酸产品, 丰度提高到 98.5%。

## 2 稳定同位素标记的色氨酸用途

色氨酸是人体必需的氨基酸之一, 在人体和生物体内主要代谢途径为合成蛋白质, 转化为具有重要生物活性的酶、激素等; 经转运、脱氨、脱羧, 变成二氧化碳、尿素等, 被其它组织利用或排出体外。采用同位素标记的色氨酸作为示踪剂, 利用氨基酸的代谢特性, 对揭开生物体内和细胞内的理化过程, 了解生物体的新陈代谢有很重要的作用。根据所研究和分析的物质结构不同, 可分别采用  $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$  以及氘标色氨酸, 在生物学、临床研究等方面  $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$  以及氘标色氨酸使用的几率是相等的, 而农业科学中  $^{15}\text{N}$  标记的色氨酸应用较多。

### 2.1 在医学临床诊断上的应用

$\text{CO}_2$  呼气法是同位素标记色氨酸用于临床诊断的方法。首先, 给患者口服或静脉注射一定量的  $^{13}\text{C}$  标记的色氨酸, 在一定时间内, 间隔一

定的时间, 用  $\text{NaOH}$  吸收经过代谢呼出体外的  $^{13}\text{CO}_2$ , 将生成的  $\text{Na}^{13}\text{CO}_3$  用酸处理获得  $^{13}\text{CO}_2$  气体, 经纯化后, 用质谱测其  $^{13}\text{C}$  含量, 绘出  $^{13}\text{CO}_2$  排出特征曲线。患有与色氨酸有关疾病的病人, 色氨酸的氧化能力与正常人不同, 因此, 所获得曲线也存在明显的差异, 据此可诊断人体类固醇激素过剩症、维生素 B6 缺乏症及癞皮症等疾病<sup>[7-8]</sup>。

### 2.2 在药学上的应用

在药理研究过程中, 稳定同位素标记的色氨酸本身既是药物, 同时又可用作示踪剂, 可以据此研究其在体内的转变、吸收、分布、排泄等。如 Schayer<sup>[9]</sup>将 1.5~2.0 mg/kg 和 0.5~0.8 mg/kg 剂量的  $^{15}\text{N}$ - $L$ -色氨酸分别注射进大鼠和兔子体内。2~6 周后, 同位素检测结果表明, 色氨酸能够在大鼠和兔子体内被转变成犬尿氨酸、犬尿喹啉以及黄尿酸, 而且同位素的丰度只有少量降低; 在这个转变过程中, 大鼠可以利用  $D$ -色氨酸, 而兔子却不能。他们还分析了注射  $^{15}\text{N}$ - $DL$ -色氨酸的大鼠脏器中  $^{15}\text{N}$  的分布。

### 2.3 在生物学上的应用

利用同位素标记的色氨酸与天然色氨酸的结构关系, 以同位素标记的色氨酸作为起始原料, 通过分析产物的标记物丰度, 研究生物体内天然色氨酸在植物、动物以及微生物体内的生物合成路线。

Ruhul 等<sup>[10]</sup>在紫色杆菌素的生物合成中, 利用  $[2-^{13}\text{C}]$  和  $[\alpha-^{15}\text{N}]$  色氨酸, 验证了中心环氮

原子来源于色氨酸的右侧,从而解决了合成过程中,由于氨基转移酶的存在,无法确定合成中间体是来源于丙酮酸还是来源于吡咯烷酮上的氮原子的问题。紫色杆菌素合成机理示于图 4、图 5。

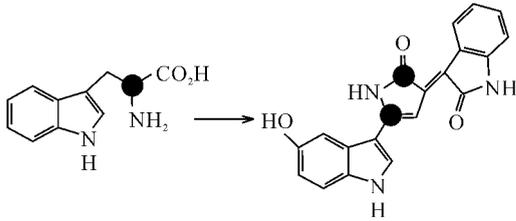


图 4 以 $[2-^{13}\text{C}]$ 色氨酸合成紫色杆菌素的标记模式



图 5 以 $[\alpha-^{15}\text{N}]$ 色氨酸合成紫色杆菌素的标记模式

Diem 等<sup>[11]</sup>利用氙标记的色氨酸研究了梨中  $\text{N}^1$ -( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖- $^4\text{C}_1$ )L-色氨酸的合成。将氙标记的 L-色氨酸注射到梨以及人工梨汁(含 2.2% 的葡萄糖、6% 的果糖及 1.1% 的蔗糖, pH3.8)中,在一定条件下,经  $^1\text{H}$ , HHCOSY 和  $^{13}\text{C}$  NMR 检测,在梨中检测出氙标记的  $\text{N}^1$ -( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖- $^4\text{C}_1$ )L-色氨酸,而梨汁中却未检测到。以上结果提示,L-色氨酸是  $\text{N}^1$ -( $\beta$ -D-吡喃葡萄糖- $^4\text{C}_1$ )L-色氨酸的前体物。

Rapparini 等<sup>[12]</sup>利用  $^{15}\text{N}$ -邻氨基苯甲酸和  $^2\text{H}_5$ -色氨酸,研究了胖青萍草(Lemna Gibba)中的吲哚三乙酸的生物合成动力学。将胖青萍草 3F7-11 分别在含有 400  $\mu\text{mol}$   $^{15}\text{N}$ -邻氨基苯甲酸和  $^2\text{H}_5$ -色氨酸的 E 培养基中培养 24 h,然后将 3F7-11 捣碎处理,经 GC-MS 检测分析,90% 的  $^{15}\text{N}$ -邻氨基苯甲酸和 20% 的  $^2\text{H}_5$ -色氨酸被植物吸收并转变成吲哚三乙酸。此结果表明,在胖青萍草中,吲哚三乙酸至少来源于邻氨基苯甲酸和色氨酸两个物质。此外,胖青萍草对邻氨基苯甲酸的利用优于色氨酸,外加色氨酸的利用优于植物自身合成的色氨酸。

### 3 小结

稳定同位素标记的色氨酸有着放射性同位素标记的色氨酸无可比拟的优越性:最常用的碳、氮及氧等稳定同位素无毒、价廉、无放射性,氙仅在高浓度时才有微弱的毒性(60 kg 体重的人体可以忍受 30 g 的氙,大鼠体内的  $^{13}\text{C}$  丰度达到 90% 无异常现象)。同时,色氨酸是蛋白质合成的最基本物质,许多疾病的诊断、治疗以及药物的研究都离不开蛋白质的代谢、更新。这些都是其它同位素标记物所无法替代的。因此,对它的合成以及应用方面的研究越来越引起国内外学者的重视。国外如荷兰、澳大利亚、德国等发达国家都在研究,并有相关的文献报道。由于国内色氨酸研究起步较晚,稳定同位素标记的色氨酸合成鲜见报道。近几年,由于技术保密的缘故,合成方面文献报道不多。由于微生物法可获得不同标记位置甚至全标记色氨酸,步骤简单,一次性得到 L 型产品而不用拆分,因此微生物法以及微生物法与有机合成法相结合的方法将会得到广泛应用。应用方面,由于色氨酸并非广谱试剂,加上价格因素,使用范围相对还比较狭窄。目前,生物、医药、临床、基因工程等研究领域在不断发展,由稳定同位素色氨酸合成的标记多肽、药物以及衍生物的需求将逐步加大。加快稳定同位素标记色氨酸合成的研究,降低稳定同位素标记色氨酸的价格,对促进稳定同位素标记的色氨酸在生物学、化学、医学、药物学等各研究领域的运用,扩大和发展新的应用范围,具有十分重要的意义。

### 参考文献:

- [1] 埃尔维奇 JA, 琼斯 JR. 同位素的基本化学和应用[M]. 北京:原子能出版社,1987:42-67.
- [2] 范如霖. 稳定同位素标记有机合成法[M]. 北京:化学工业出版社,1986:47-232.
- [3] ZHANFENG L, QIPENG Y, WENCHUAN W. Biosynthesis of  $[1-^{15}\text{N}]$  L-tryptophan From  $^{15}\text{N}$  Labeled Anthranilic Acid by Fermentation of *Candida Utilis* Mutant[J]. Amino Acids, in press.
- [4] Van DEN BERG EMM, BALDEW AU, DE GOEDE ATJW, et al. Synthesis of Three Isotopomers of L-tryptophan via a Combination of Organic Synthesis and Biotechnology[J]. Recl Trav Chim Pays-Bas, 1988, 107: 73-81.

- [5] UNKEFER CJ, LODWIG SN, SILKS LA, et al. Stereoselective Synthesis of Stable Isotope-Labeled *L*- $\alpha$ -Amino Acids; Chemomicrobiological Synthesis of *L*-[ $\beta$ - $^{13}\text{C}$ ]-, *L*-[2'- $^{13}\text{C}$ ]-, and *L*-[1'- $^{15}\text{N}$ ]Tryptophan[J]. J Labelled Compd Radiopharm, 1991, XXIX(11): 1 247-1 256.
- [6] 唐刚华, 王世真, 姜国辉. 氘标记色氨酸和氘标苜蓿的合成研究[J]. 核技术, 1999, 22(9): 573-575.
- [7] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991: 240-282.
- [8] 张炜明. 稳定核素的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 67-203.
- [9] SCHAYER RW. Studies of the Metabolism of Tryptophan Labeled With  $^{15}\text{N}$  in the Indole Ring [J]. J Biol Chem, 1950, 187(2): 777-786.
- [10] RUHUL MOMEN AZM, Tsutomu Hoshino. Biosynthesis of Violacein; Intact Incorporation of the Tryptophan Molecule on the Oxindole Side, With Intramolecular Rearrangement of the Indole Ring on the 5-Hydroxyindole Side[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(3): 539-549.
- [11] DIEM S, BERGMANN J, HERDERICH M. Tryptophan-N-glucoside in Fruits and Fruit Juices [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 4 913-4 917.
- [12] RAPPARINI F, COHEN JD, SLOVIN JP. Indole-3-acetic Acid Biosynthesis in Lemna Gibba Studied Using Stable Isotope Labeled Anthranilate and Tryptophan[J]. Plant Growth Regulation, 1999, 27: 139-144.