

• 实验研究 •

DMF的合成及其对糖基化血浆蛋白的含量测定*

浙江医科大学(杭州310006) 毛立峰 陈学平 周振群

杭州市第二人民医院 沈汶华

提要 本文介绍了DMF的合成方法。合成产品与标准品对照,用薄层层析法作了鉴定。并作了DMF与氮兰四唑呈色反应的标准曲线与吸收光谱曲线。同时以DMF为标准参照物,用初速度法测定了81例正常人及90例糖尿病患者糖基化血浆蛋白的含量,其结果 $\bar{x} \pm SD$ 分别为 $2.37 \pm 0.31 \text{ mmol/L}$ 及 $3.17 \pm 0.80 \text{ mmol/L}$,糖尿病患者明显高于正常人,经显著性检验,差别有非常显著意义($P < 0.001$)。

关键词 DMF; 1-脱氧-1-吗啉-果糖

体内除血红蛋白外,血浆蛋白与血中葡萄糖接触后,也可发生非酶性的糖基化作用,形成糖基化血浆蛋白(GPP)^[1],糖基化程度取决于蛋白质与糖的接触时间与糖浓度。糖尿病患者血糖持续地高于正常,GPP也明显增高^[2]。由于血浆蛋白的半寿期较短,因此测定GPP的含量,能回顾性地了解以往一个月,尤其是近两周内的平均血糖水平,可以作为糖尿病控制情况的一个短期指标。

GPP的果糖胺法测定^[3],基于糖基化血浆蛋白具有酮胺结构,在碱性环境中,在一定的温度下,与氮兰四唑(NBT)发生还原反应,生成紫红色的甲臈,其颜色深浅,可反应糖基化血浆蛋白的浓度,以DMF为标准参照物,用初速度法测定糖基化血浆蛋白的浓度。由于DMF国内无货供应,我们参照Hodge氏的方法^[4],作了适当修改,合成了DMF,并做了DMF与NBT试剂反应的有关试验。

方法与结果

一、DMF的合成

(一)材料

D-葡萄糖(化学纯,天津市化学试剂三厂出品)

吗啉(化学纯,上海曹杨第二中学化工厂出品)

(二)合成方法

取D-葡萄糖(无水)5.0g,吗啉(无水)3.6g,在75—80℃石蜡油浴上搅拌30分钟,开始为淡黄色糊状物,颜色逐渐加深,呈琥珀色。加醋酸酐4ml,不断搅拌。降温到50℃。在不断搅拌情况下,缓慢滴加丙二酸二乙酯:乙醇(1:1)50ml。100℃回流1.5小时。回流毕,置冰箱过夜,第二天见白色结晶析出。取结晶,用甲醇重结晶二次,得白色结晶,放50℃烘箱烘干,备用。

(三)合成产品的鉴定

熔点测定 146—147℃ (RDCSY-I型熔点测定仪)

薄层层析:

支持物:硅胶G

展开剂:正丁醇:丁酮:水 = 2:1:0.5 (V/V)

显色剂:0.50mmol/L NBT(pH10.8)

展开时间:2小时

结果合成产品除显示一个斑点外,没

* 国家自然科学基金资助项目

有显示其他斑点。合成产品与DMF标准品(Sigma公司出品)同时进行层析,两者所显示的斑点 R_f 值一致,均为0.56(图1)。

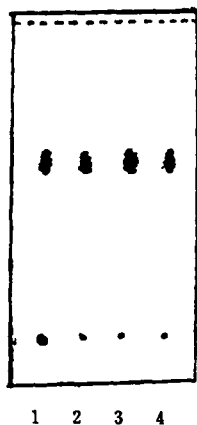


Fig 1. Thin-layer chromatogram of DMF standard product and synthetic product
1, 2: DMF synthetic product
3, 4: DMF standard product

二、DMF与NBT试剂反应的有关试验

(一) DMF与NBT试剂呈色反应的标准曲线

取合成产品DMF,用牛血清白蛋白(40 g/L)配制成1, 2, 3, 4 mmol/L标准液,并以牛血清白蛋白(40 g/L)为空白,与NBT试剂反应,反应在37℃条件下进行,15分钟后用10%冰醋酸终止反应,530 nm,比色,结果显示在4 mmol/L浓度范围内与吸光度呈线性关系(图2)。

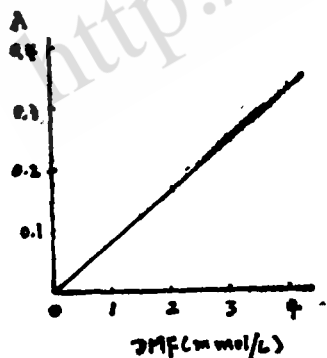


Fig 2. Standard curve of DMF reacting with NBT

(二) DMF与NBT试剂反应的吸收曲线

取合成产品DMF与NBT试剂反应,用Beckman分光光度计扫描,波长范围428 nm—700 nm,扫描速度500 nm/min,吸收曲线见图3,最高吸收在530—560 nm之间。

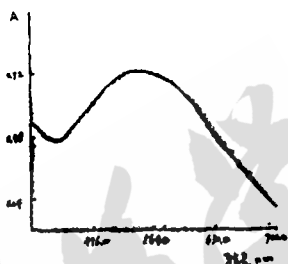


Fig 3. Absorbance spectrum of DMF reacting with NBT

三、样品的测定

以DMF为标准参照物,用初速度法测定了正常人81例,糖尿病患者90例血浆样本。正常人血浆样本取自浙医大附属第二医院血库献血员,均无糖尿病症状,空腹血糖正常。糖尿病患者血浆样本取自浙医大附属第一医院门诊及少数住院病人,均已确诊为糖尿病患者。其中男31例,女59例,17—76岁,平均年龄54.8岁。82例为非胰岛素依赖型糖尿病,8例为胰岛素依赖型糖尿病,病程均至少在一年以上。测定结果正常组糖基化血浆蛋白 $\bar{x} \pm SD$ 为 2.37 ± 0.31 mmol/L,糖尿病组糖基化血浆蛋白 $\bar{x} \pm SD$ 为 3.17 ± 0.80 mmol/L,两组比较,糖尿病组明显高于正常组,经显著性检验,差别有非常显著性意义($P < 0.001$)。

讨 论

一、DMF合成的整个过程需绝对无水,所用试剂要求绝对无水,否则合成产品呈粘稠状物质,不能结晶出来。

二、DMF合成过程中回流时,温度100℃为宜,时间需1.5小时。温度较低,时

间较短均不利于合成。

三、用甲醇重结晶效果较好。

参 考 文 献

[1] Kennedy AL, et al.: Diabetes 1982, 31

(1, suppl):52

[2] Mayer TK, et al.: Clin Chem Acta 1983,
127(2):147

[3] Roger NJ, et al.: Clinica Chimica Acta
1982, 127(1):87

[4] Hodge JE, Rist CE.: J Am Chem Soc
1953, 75(2):316

The Synthesis of DMF and it's Application on Estimation of Glycosylated plasma proteins

Mao Lifeng chen Xueping Zhou Zhenan

(Zhejiang Medical University, Hangzhou, 310006)

Shen wen Hua

(Second People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou, 310015)

Abstract

In this report, We describe the synthetic method of DMF. The synthetic product was compared by thin-layer chromatography with the standard product. The standard line and absorbance line was done also. The synthetic DMF was applied to measure 81 normal and 91 diabetic case. It allows clear discrimination of normal (2.37 ± 0.31 mmol/L) and diabetic populations (3.17 ± 0.80 mmol/L), $P < 0.001$. This synthetic method is simple, dependable and can be adopted by the laboratory in general.

Key words DMF, 1-Desoxy-1-morpholino-D-fructose