

文章编号 : 0253-9950(2002)03-0161-03

$^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 标记条件的研究

李宇国, 李晴暖, 张勇平, 黄 旋, 李文新

中国科学院 上海原子核研究所, 上海 201800

摘要: 用 ^{67}Ga 标记了水溶性富勒烯衍生物富勒醇($\text{C}_{60}(\text{OH})_x$)。研究了反应时间、温度、pH 值、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的质量浓度等对标记率的影响。研究表明, 反应时间在 3 ~ 60 min 时对标记率影响不大; 反应温度对标记率基本无影响; pH 值大于 12 后, 标记率较低; $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的质量浓度高于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 标记率均在 94 % 以上。稳定性研究结果表明, 标记后稀释与不稀释的溶液在放置 200 h 后, 其放化纯度都达 90 % 以上。

关键词: 富勒醇; ^{67}Ga 标记; 稳定性

中图分类号: R817 **文献标识码:** A

自 1985 年, Kroto 等^[1]发现了富勒烯(C_{60}) 以来, 在世界范围内迅速掀起了富勒烯的研究热潮。 C_{60} 具有 30 个双键, 可以发生许多有机反应, 是药物设计的理想载体。据文献^[2~5]报道, C_{60} 及其衍生物在抗爱滋病毒(HIV-1)、抑制酶活性、切割 DNA、光动力治疗等方面具有一定的应用价值。但 C_{60} 仅溶于一些非极性和弱极性的有机溶剂, 在水等极性溶剂中不溶。富勒烯要作为药物或药物载体, 首先要制成水溶性衍生物, 并必须了解它及其衍生物的基本药理性质。但目前对于 C_{60} 的水溶性衍生物的动物体内分布、代谢等的研究刚刚开始, 原因是缺少对富勒烯及其衍生物的分析检测方法。Yamago^[6]和 Cagle^[7]分别用 ^{14}C 标记的富勒烯羧酸衍生物和 $^{166}\text{Ho} @\text{C}_{82}(\text{OH})_x$ 研究了它们在动物体内分布代谢。但这两种方法由于受其核性质及合成方法的影响, 应用范围和研究结果均受限制。本文在应用 ^{125}I 和 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x\text{O}_y$ 的基础上^[8,9], 用 ^{67}Ga 标记 C_{60} 的另一种富勒烯水溶性衍生物 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$, 并研究影响标记率的各种因素, 为以后研究富勒烯 ^{67}Ga 标记物的体内分布、代谢以及在核医学中的应用提供

有用的数据。

1 实验部分

1.1 主要材料与仪器

1.1.1 材料 C_{60} , 武汉武大三维碳簇材料有限公司产品, 纯度大于 99.9 %; $^{67}\text{GaCl}_3$, 上海科兴药业有限公司提供; 四丁基氢氧化胺(10%), 上海试剂一厂产品; 其它试剂均为市售分析纯试剂。

1.1.2 仪器 ZD-I 型智能定标器, 上海原子核研究所科盛新技术公司产品; UV-240 型紫外分光光度计, 德国 Shimadzu 公司产品; pH S-3 型精密数显酸度计, 上海沪新电子仪器厂产品。

1.2 实验方法

1.2.1 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的制备 对文献^[10]中的方法稍作修改后合成 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 。实验步骤如下:

在 100 mL 含 C_{60} 饱和苯溶液中, 加入 2 mL 4 mol/L NaOH, 并用 1.5 mL 10 % 四丁基氢氧化铵作为相转移催化剂, 在加热下加入 10 mL 30 % H_2O_2 , 继续加热回流, 直至苯溶液由紫色变为无色, 同时水溶液由无色变为棕黄色, 离心分相后, 得到棕黄色的 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x\text{O}_y$ 溶液。加入甲醇使

收稿日期: 2001-07-24; 修订日期: 2001-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(19975066)

作者简介: 李宇国(1973—), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 纳米生物医药专业。

$C_{60}(OH)_xO_y$ 沉淀,加水使沉淀溶解,再加入甲醇沉淀,离心去掉甲醇,反复几次,直至甲醇溶液的 pH 8。将干燥后的固体加水溶解,水解 24 h 后,再用甲醇沉淀并干燥得到棕黑色固体 $C_{60}(OH)_x$ 。产物的红外谱图显示,存在 3400 cm^{-1} 的 OH 振动峰, 1600 cm^{-1} 附近的 C—C 的伸缩振动峰, 1080 cm^{-1} 附近的 C—O 伸缩振动峰和 1380 cm^{-1} 附近的 OH 面内弯曲振动峰,以及 900 cm^{-1} , 600 cm^{-1} 等峰。与文献[11]报道相一致。

1.2.2 $^{67}\text{Ga}-C_{60}(OH)_x$ 的标记率或放化纯度 选用聚酰胺薄膜为载体,以 $0.1\text{ mol/L NH}_4\text{AC}$ 为层析液测定标记率或放化纯度。在该体系中, $C_{60}(OH)_x$ 在 pH 为 1~13 内,其 R_f 值均在 0.7~1.0 之间; ^{67}Ga 在 pH 为 1~12 内,其 R_f 值均在 0~0.4 之间。

1.2.3 反应温度的影响 取 $2.0\text{ mL } 10\text{ mg/mL } C_{60}(OH)_x$, 并加入一定量的 ^{67}Ga , 调 pH 值为 6.5, 将反应液均分为 4 份, 分别在 12, 37, 60 及沸水浴下振荡反应 60 min 后终止, 用上述层析体系分别测定标记率, 观测温度对标记率的影响。

1.2.4 反应时间的影响 取 $0.5\text{ mL } 10\text{ mg/mL } C_{60}(OH)_x$, 并加入一定量的 ^{67}Ga , 调 pH 值为 6.5, 分别在 37 下反应 3, 10, 30, 60 min, 测定其标记率, 得反应时间对标记率的影响曲线。

1.2.5 pH 值的影响 取 $3.5\text{ mL } 10\text{ mg/mL } C_{60}(OH)_x$, 加入一定活度的 ^{67}Ga , 均分为 7 份, 调 pH 值分别为 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 13.0, 在相同的温度下反应 60 min, 测定标记率, 观测 pH 值对标记率的影响。

1.2.6 $C_{60}(OH)_x$ 质量浓度的影响 调节 $C_{60}(OH)_x$ 的质量浓度分别为 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/mL, 体积均为 0.5 mL。将 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的 $^{67}\text{GaCl}_3$ 与 $C_{60}(OH)_x$ 混合, 调 pH 值为 6.5 后, 反应体积基本不变, 在 45 下反应 60 min, 用上述层析体系测定标记率, 得 $C_{60}(OH)_x$ 质量浓度对标记率的影响曲线。

1.2.7 $^{67}\text{Ga}-C_{60}(OH)_x$ 的稳定性 将一定量的 ^{67}Ga 与 $C_{60}(OH)_x$ 混合 ($C_{60}(OH)_x$ 的质量浓度为 10 mg/mL), 调 pH 值为 7.0, 反应体积为 2.0 mL , 在 100 下反应 30 min。用上述层析体系测定标记率, 然后将标记液分为 3 份, 一份用蒸馏水稀释 5 倍, 一份不稀释, 都放在 37 恒温水浴中, 放置时间为 0.5, 4, 16, 40, 92, 210 h 时, 用上述层

析体系测定 $^{67}\text{Ga}-C_{60}(OH)_x$ 的放化纯度, 得到稳定性曲线。第三份用昆明种小鼠血清稀释 10 倍, 室温放置, 同样用上述层析体系测定不同时间点的放化纯度。

2 结果和讨论

2.1 温度对标记率的影响

保持其它条件不变, 温度在 12~100 (沸水) 之间变化时, 标记率均在 92% 以上。说明在该范围内, 温度变化对标记率的影响可以忽略。

2.2 反应时间对标记率的影响

当最短反应时间为 3 min 时, 标记率可达 93% 以上。延长反应时间至 1 h, 标记率仍保持在 92% 以上, 可见反应时间对标记率的影响也很小。本文选择最佳标记时间为 30 min。

2.3 pH 值对标记率的影响

pH 值对标记率的影响示于图 1。从图 1 看出, pH=0.5~11 时, 标记率均为 90% 左右; pH>12 时, 标记率下降至 70% 左右。说明在碱性条件下标记, 会使标记率下降。pH=1~12 时, ^{67}Ga 可能存在几种不同的化学形态, 并以不同的形态与 $C_{60}(OH)_x$ 结合。但不管是何种形态与 $C_{60}(OH)_x$ 结合, 其标记率都在 90% 以上。考虑到动物体内分布试验, 选择最佳 pH 在 6~8 之间。

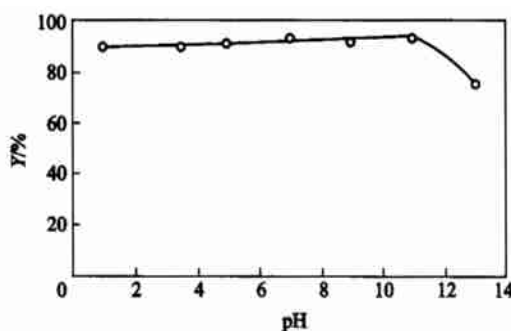


图 1 pH 值对标记率的影响

Fig. 1 Influence of pH on labeling yield

2.4 $C_{60}(OH)_x$ 质量浓度对标记率的影响

$C_{60}(OH)_x$ 质量浓度对标记率的影响示于图 2。从图 2 看出, $C_{60}(OH)_x$ 的质量浓度为 0.1 mg/mL 时, 其标记率只有 65%, 2.5 mg/mL 时, 其标记率也只达到 86%, 但达到 5 mg/mL 时, 其标记率可达 94%。 ^{67}Ga 的活度在实验中对标记率基本无影响, 其最大比活度可达 0.44 MBq/mg 。考虑到浓度太高, 可能会对以后的生物分布

产生不利影响,本文选择 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 最适宜的质量浓度为5~10 mg/mL。

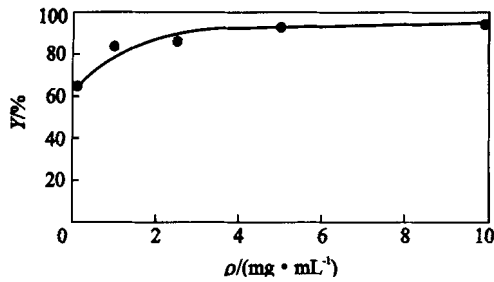


图2 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 质量浓度对标记率的影响

Fig. 2 Influence of concentration of $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ on labeling yield

2.5 $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的稳定性

未稀释的标记液在不同时间点测定的放化纯度变化示于图3。从图3可以看出,在放置200 h后,其放化纯度仍达90%以上。另外两份标记后分别用蒸馏水和小鼠血清稀释的 $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的稳定性与其基本一致。说明 $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 稳定性很好,即使稀释后并且放置在37 °C的水浴中,其稳定性也足以满足动物体内分布试验。

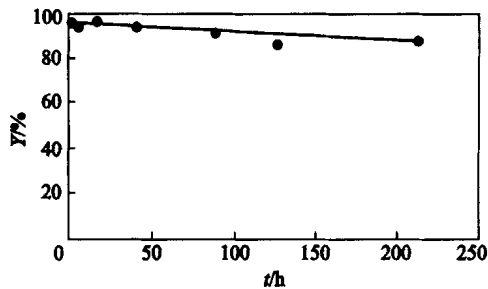


图3 $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的稳定性曲线

Fig. 3 Stability of $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$

3 结论

用 $^{67}\text{GaCl}_3$ 标记 C_{60} 的水溶性衍生物 $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$,研究结果表明,反应时间和反应温度对标记率基本无影响;pH值大于12时,标记率较低; $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ 的质量浓度在5 mg/mL之上时,其标记率均在94%以上。稳定性研究结果表明,标记后稀释与不稀释的溶液在放置200 h后,其放化纯度都达90%以上。

致谢:上海交通大学的张晓东博士和上海科兴药业公司对本职工作给予了大力支持和帮助,谨致深切谢意。

参考文献:

- [1] KROTO H W, HEATH J R, O'BRIEN S C, et al. Buckminsterfullerene [J]. Nature (London), 1985, 318: 162~163.
- [2] FRIEDMAN S H, DECAMP D L, SIBESMA R P, et al. Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification [J]. J Am Chem Soc, 1993, 115 (15): 6 506~6 509.
- [3] TOKUYAMA H, YAMAGO S, NAKAMURA E, et al. Photoinduced Biochemical Activity of Fullerene Carboxylic Acid [J]. J Am Chem Soc, 1993, 115 (17): 7 918~7 919.
- [4] BOUTORINE A S, TOKUYAMA H, TAKASUGI M, et al. Fullerene Oligonucleotide Conjugates: Photo-Induced Sequence-Specific DNA [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 1994, 33 (23/24): 2 462~2 463.
- [5] CHIANG Y L, LU F J, LIN J T. Free Radical Scavenging Activity of Water-Soluble Fullerenols [J]. J Chem Soc Chem Commun, 1995, 1 283~1 284.
- [6] YAMAGO S, TOKUYAMA H, NAKAMURA E, et al. *in vivo* Biological Behavior of A Water-Miscible Fullerene: ^{14}C Labeling, Absorption, Distribution, Excretion and Acute Toxicity [J]. Chem Biol, 1995, 2 (6): 385~389.
- [7] CAGLED W, KENEL S J, MIRZADEH S, et al. *in vivo* Studies of Fullerene-Based Materials Using Endohedral Metallofullerene Radiotracers [J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 5 182~5 187.
- [8] LI Yur-guo, ZHANG Xiao-dong, LI Qing-nuan, et al. Radioiodination of C_{60} Derivative $\text{C}_{60}(\text{OH})_x\text{O}_y$ [J]. J Radioanal Nucl Chem, 2001, 250(2): 363~364.
- [9] 李晴暖, 张晓东, 刘瑞丽, 等. $^{99}\text{Tc}^m-\text{C}_{60}(\text{OH})_x(\text{O})_y$ 标记条件研究 [J]. 同位素, 2001, 14 (1): 27~30.
- [10] 匡安仁, 王行肃. 发射俄歇电子核素靶向治疗应用研究 [J]. 中华核医学杂志, 1999, 19 (3): 191~192.
- [11] LI Tian-bao, HUANG Ke-xiong, LI Xin-hai, et al. Synthesis of $\text{C}_{60}(\text{OH})_x(\text{O})_y$ and its Hydrolyzation to $\text{C}_{60}(\text{OH})_n$ [J]. J Chem Soc, 1999, 4: 30~32.

(下转 186 页, Continued on page 186)

- [11] CHEN H C, LIN Z H, LIN W. A Facile Synthesis of Unsymmetrical Sulfides Under Phase Transfer Conditions[J]. Synth Commun, 1990, 20 (21) : 3 313 ~ 3 316.
- [12] 陆澄容, 赵 蓓, 王 璐. 一种简便的 α -亚磺酰基-N,N-二取代酰胺的合成方法[J]. 合成化学, 2001, 9 (6) : 557 ~ 560.

STUDY ON EXTRACTION OF U() WITH α -SULFINYL-N,N-DIBUTYLACETAMIDE

ZHAO Bei, LU Cheng-rong, HUANG Qing-hua, CAO Zheng-bai

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Suzhou University, Suzhou 215006, China

Abstract: New extractants, α -sulfinyl-N,N-dibutylacetamides, are synthesized. Study of extraction of U() with these compounds is performed by selecting diluents, changing the concentrations of the nitric acid and extractants and salting-out agent in the aqueous phase. The abilities of all compounds synthesized for extraction of U() are compared to TBP. The results show that all these compounds can efficiently extract UO_2^{2+} from nitric acid. With substituents 2-ethylhexyl and *n*-butyl, the abilities of extraction of U() are better than TBP.

Key words: α -sulfinyl-N,N-dibutylacetamide; TBP; extraction; UO_2^{2+}

(上接第 163 页, Continued from page 163)

STUDY ON THE PREPARATION OF $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$

LI Yu-guo, LI Qing-nuan, ZHANG Yong-ping, HUANG Xuan, LI Wen-xin

Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences,
P. O. Box 800-204, Shanghai 201800, China

Abstract: $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ has been prepared by the $^{67}\text{GaCl}_3$ and $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$. The influence of pH value, reaction time, temperature and mass concentration of the $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ on the labeling yield is studied. The stability of $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ is examined at 37 °C. The results show that labeling conditions have minor influence on the labeling yield in this work. The labeling yields are over 95 % at the conditions under study. The radiochemical purity of $^{67}\text{Ga}-\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ solution is kept at 90 % after 200 h.

Key words: fullerol; ^{67}Ga -labeling; stability