

金丝桃素的碘 - 131 标记

孟 斌¹, 马 娅¹, 朱 伟¹, Yicheng Ni², 张 健³, 孙自平¹

中图分类号: R817.9⁺2 文献标识码: B 文章编号: 1004-714X(2013)05-0610-02

【摘要】 目的 建立金丝桃素的碘 - 131 标记方法。方法 以 Iodogen 为氧化剂, 对金丝桃素进行了碘 - 131 的亲电取代标记。结果 在中性反应条件下, 使用适当量金丝桃素和 Iodogen, 标记反应可快速而高效地完成, 标记率可高达 99%。结论 该标记流程操作简单, 标记率高, 标记物稳定。

【关键词】 金丝桃素; 碘; Iodogen

Labeling of Hypericin With Iodine - 131. MENG Bin, MA Ya, ZHU Wei, Yicheng Ni, ZHANG Jian, SUN Zi-ping.

1. Shandong Academy of Medical Sciences; 2. Katholieke Universiteit Leuven; 3. Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine.

【Abstract】 Objective The aim of this study is to establish the method for labeling hypericin with iodine - 131. **Methods** we used Iodogen as the oxidant and the hypericin were labelled with iodine - 131 by electrophilic substitution. **Results** In the neutral reaction conditions, using the proper amount of hypericin and Iodogen, the labeling reaction will complete quickly and efficiently and the labeling rate could be as high as 99%. **Conclusion** The labeling process was relatively simple and the labeling rate was high and the labeled compound was stable.

【Key words】 Hypericin; Iodine; Iodogen

金丝桃素是贯叶连翘提取物。前期的研究表明, 金丝桃素对坏死组织有特异性亲和, 是一种很好的靶向药物载体^[1]。对其进行放射性核素标记, 可获得以坏死组织为靶点的靶向放疗药物。金丝桃素为苯并二蒽酮类化合物, 其化学构架上含多个适合进行碘的亲电取代反应的点位(见结构式)。本文报告了以 Iodogen 为氧化剂, 对金丝桃素进行的碘 - 131 亲电取代标记的方法研究及结果。

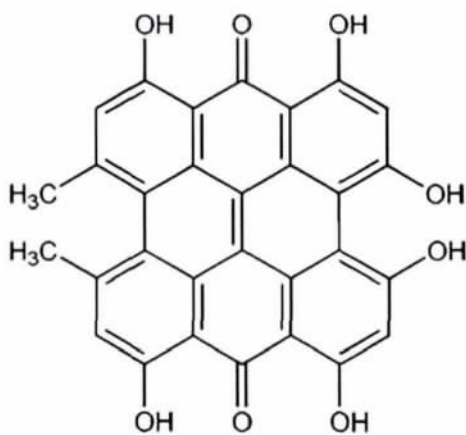


图 1 金丝桃素结构式

1 材料与方法

作者单位: 1 山东省医学科学院放射医学研究所, 山东 济南 250062; 2 比利时鲁汶大学; 3 江苏省中医药研究院
作者简介: 孟斌(1967-), 男, 山东平阴人, 副研究员, 从事核医学研究工作。
通讯作者: 孙自平, 研究员 E-mail: zpsun@163.com;
张健 E-mail: zjwonderful2008@hotmail.com

1.1 试剂及仪器 金丝桃素(纯度大于 98%)(由成都普瑞发科技开发有限公司提供), 碘 - 131 水溶液(由北京原子高科股份有限公司提供), Iodogen(1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycouril)(SIGMA 出品), 二氯甲烷(天津市科密欧化学试剂有限公司), DMSO(天津市巴斯夫化工有限公司), NaHCO₃(淄博化学试剂厂), Na₂CO₃(淄博化学试剂厂), HCl(淄博化学试剂厂), 新华 1 号滤纸(杭州新华造纸厂), 放免测定仪 SN-695B(上海日环仪器厂), 核素扫描仪 NSC-350(科大创新股份有限公司中佳分公司), 活度计 Rm905-a(中国计量院)。

1.2 实验方法

1.2.1 Iodogen 涂管制备 配制 5 mg/mL Iodogen 二氯甲烷溶液, 移取 10 μ L 该溶液置于 1 mL 具塞试管中, 用真空泵抽干二氯甲烷, 即得 50 μ g Iodogen 涂管。密闭冷藏保存。

1.2.2 标记率测定 以新华 1 号滤纸为固定相, 以 0.1N HCl 为展开剂, 对反应液进行纸层析分析。展开后, 标记物位于原点, 游离碘位于前沿。核素扫描仪扫描显示, 层析条中间部分无放射性拖尾存在。标记率测定时将层析条居中剪开, 分别测定计数。标记率 = 原点计数 / (原点计数 + 前沿计数)。

1.2.3 金丝桃素浓度及标记反应时间对标记率的影响 在 50 μ g Iodogen 涂管加入不同浓度的金丝桃素 - DMSO 溶液 100 μ L, 再加入 20 μ L 碘 - 131 水溶液

$7.4 \times 10^7 \text{ Bq/mL}$ (2 mCi/mL) ,反应 10 min 测定各管标记率 ,以确定金丝桃素溶液浓度对标记率的影响。

1.2.4 反应体系中水份比例对标记率的影响 取 5 只 $50 \mu\text{g}$ Iodogen 涂管 ,每只先加入 $100 \mu\text{L}$ 金丝桃素二甲基亚砷溶液 (1 mg/mL) ,再以蒸馏水和二甲基亚砷调整管内溶液的水份比例 ,总体积保持在 $150 \mu\text{L}$,最后加入 $3.7 \times 10^5 \text{ Bq}$ ($10 \mu\text{Ci}$) 碘 - 131 水溶液 ,反应 10 min 后测定标记率 ,以确定水份比例对标记率的影响。

1.2.5 pH 值对标记率的影响 以碘 - 131 水溶液及碳酸盐溶液配制 pH 值分别为 7、9 及 11 的碘 - 131 水溶液 $7.4 \times 10^7 \text{ Bq/mL}$ (2 mCi/mL) 。在 3 只 $50 \mu\text{g}$ Iodogen 涂管中加入 $100 \mu\text{L}$ 金丝桃素 - DMSO 溶液 (1 mg/mL) ,再分别加入不同 pH 值的碘 - 131 水溶液 $20 \mu\text{L}$,10 min 后测量标记率 ,以测定所用碘 - 131 溶液的 pH 值对标记率的影响。

1.2.6 Iodogen 量对标记率的影响 配制 1 mg/mL 的 Iodogen/DMSO 溶液 , 1 mg/mL 的金丝桃素/DMSO 溶液及 $7.4 \times 10^7 \text{ Bq/mL}$ (2 mCi/mL) 的碘 - 131 水溶液 ,以不同量的 Iodogen 进行金丝桃素的碘 - 131 标记 ,测定 Iodogen 用量对标记率的影响。

1.2.7 标记物的脱碘率测定 将 $100 \mu\text{L}$ 金丝桃素 - DMSO 溶液 (1 mg/mL) 移入 Iodogen 涂管 ($50 \mu\text{g}$ Iodogen) 中 ,再加入 $20 \mu\text{L}$ 碘 - 131 水溶液 $3.7 \times 10^9 \text{ Bq/mL}$ (100 mCi/mL) ,反应 10 min。标记完成后 ,标记物于标记管中避光室温保存。每天以纸层析法测定游离碘 - 131 的比例。检测至第 7 天。

1.2.8 Iodogen 在二甲基亚砷中的活性衰减 配制 5 mg/mL Iodogen 二甲基亚砷溶液 ,并在配制后的不同时间用其对金丝桃素进行碘 - 131 标记。标记管中依次加入 $100 \mu\text{L}$ 金丝桃素/DMSO 溶液、 $10 \mu\text{L}$ 碘 - 131 溶液 $1.85 \times 10^6 \text{ Bq}$ ($50 \mu\text{Ci}$) 及 $10 \mu\text{L}$ Iodogen 溶液 ,10 min 测量标记率。

2 结果

Iodogen 涂管通常作为固态氧化剂用于放射性碘的氧化标记^[2]。但本实验中制备涂管仅仅是为了方便使用 ,因为在标记过程中 Iodogen 是溶解在 DMSO 中的 ,并非以涂层形式参与标记反应。

TLC 法是测量标记率的常用方法。我们采用的新华 1 号滤纸 - 盐酸体系 ,简单而有效。我们也曾试用过硅胶 G - 乙醇 - 乙酸乙酯体系^[3] ,未重复出文献中的结果。

金丝桃素属于苯并二萜酮类化合物 ,其结构含多

个适合进行碘的亲电取代反应的点位。有人曾以过氧乙酸为氧化剂进行金丝桃素的放射性碘标记 ,结果并不理想^[4]。我们以 Iodogen 为氧化剂进行的标记 ,取得了良好的标记效果。

表 1 金丝桃素浓度对标记率的影响

| 标记管 | 浓度 (mg/mL) | 标记率 (%) |
|-----|-----------------------|---------|
| 1 | 0.05 | 10 |
| 2 | 0.10 | 21 |
| 3 | 0.20 | 49 |
| 4 | 0.50 | 81 |
| 5 | 1.00 | 98 |
| 6 | 2.00 | 99 |

表 1 的结果表明 ,使用适当的标记条件 (金丝桃素溶液浓度 $\approx 1 \text{ mg/mL}$,pH 值为 7 , $50 \mu\text{g}$ Iodogen) 进行碘 - 131 标记 ,标记反应在几分钟内即可完成 ,标记率可达 98% 以上。由于标记过程中金丝桃素和 Iodogen 都是过量的 (相对于碘 - 131) ,标记物的比活度可通过加入的碘 - 131 量来控制。

我们在标记过程中可通过加入碘 - 131 的量来获得所需比活度的标记物 ,但加入碘 - 131 水溶液时应控制体积 ,以免水的比例过大导致金丝桃素析出。

表 2 水份比例对标记率的影响

| 标记管 | 水/DMSO ($\text{V/V}\%$) | 标记率 (%) |
|-----|---------------------------|---------|
| 1 | 14 | 98 |
| 2 | 23 | 99 |
| 3 | 33 | 98 |
| 4 | 45 | 98 |
| 5 | 60 | 99 |

表 2 的结果显示 ,在均相条件下 ,标记率不受水份比例的影响 ,但我们在实验中发现 ,水份比例过高时 ,金丝桃素会随时间延长而析出。

由于市售碘 - 131 水溶液有些呈碱性 (国外提供的实验用碘 - 131 水溶液多为碱性) ,我们研究了碱性环境对标记率的影响。结果显示 ,与 pH 值 7、9、11 相对应的标记率为 98%、36% 及 20%。pH 值越高 ,标记率越低。若标记时发现碘 - 131 溶液为碱性 (反应液变蓝) ,则使用 pH 值为 7 的缓冲液将反应液 pH 值调回到 7 ,再加 Iodogen ,仍可获得满意的标记率。

Iodogen 用量与标记率呈正相关 (见表 3) ,用量不足则难以获得满意的标记率。在这种情况下可通过添加 Iodogen 来完成标记。

金丝桃素与碘 - 131 的结合比较稳定 ,室温下避光保存 ,一周内未发现碘的脱标现象。

使用 Iodogen 涂管进行标记时 Iodogen (下转第 613 页)

人距离仪器较近时对监测结果的影响较大,随着两者间距离的增大,影响逐渐减小,当距离大于 1 m,影响甚微且稳定。

因为人是电导体,所以当环境中电磁水平高时人的影响大,而当环境中电磁水平低时人的影响小。

同一场址不同仪器监测结果不同,分析原因有二点:一是基站不同时间的瞬时发射功率不同,因此环境中的电磁水平不同,这是主要原因;二是由于仪器本身的性能^[6],响应不同,但这个影响较小。

参考文献:

[1] 张彦文,张广斌,田伟,等.某市环境电磁辐射水平的分布

[J]. 环境与健康杂志 2005 2:93-96.

[2] 卑伟慧,曹毅.电磁辐射的生物学效应[J].辐射防护通讯,2007 3:27-31.

[3] 付婷婷,秦启忠,陈于,等.重庆市住宅楼环境电磁辐射的初步测量与分析[J].中国环境监测 2012 1:85-88.

[4] 赵福祥,张起虹,蔡新华,等.电磁辐射环境测量比对[J].中国计量 2008 3:85-86.

[5] 林兆丰,姚海云,朱玲,等.全国辐射环境监测网络射频综合场强测量比对[J].环境监测管理和技术 2012 4:62-66.

[6] 张斌,吴小平.江苏省 2011 年环境 γ 辐射剂量率测量比对[J].环境监测管理和技术 2012 4:67-70.

(收稿日期:2013-05-27)

(上接第 611 页)

是溶于 DMSO 的。Iodogen 溶于 DMSO 后,随着时间的增加,其氧化活性降低,影响标记效果(见表 4)。所以若标记过程中使用 Iodogen 溶液,则必须是新鲜配制的。

表 3 Iodogen 量对标记率的影响

| 标记管 | 金丝桃素 溶液(μ L) | DMSO (μ L) | Iodogen 溶液(μ L) | 碘-131 水溶液(μ L) | 标记率 (%) |
|-----|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|------------|
| 1 | 100 | 48 | 2 | 20 | 7 |
| 2 | 100 | 45 | 5 | 20 | 11 |
| 3 | 100 | 40 | 10 | 20 | 35 |
| 4 | 100 | 30 | 20 | 20 | 97 |
| 5 | 100 | 0 | 50 | 20 | 99 |

表 4 Iodogen 在二甲基亚砷中的活性衰减

| 时间(h) | 标记率(%) |
|-------|--------|
| 0 | 99 |
| 2 | 91 |
| 5 | 85 |
| 8 | 60 |
| 24 | 8 |

3 小结

以 Iodogen 为氧化剂的金丝桃素碘标记流程,操作简单,标记率高。制得的标记物稳定性好。高达 99% 的标记率使得标记物可直接使用而无需纯化,这对于放射性标记物制备来说尤为重要。

考虑到金丝桃素有三个标记点位,所以标记物其实是一碘、二碘和三碘金丝桃素的混合物。若想获得特定的标记物,还需使用 HPLC 分离。

在不经纯化而直接使用的情况下,标记液内会有 Iodogen 存在。先前动物实验结果提示残留的 Iodogen 和溶剂不会构成毒性隐患^[5]。

该标记流程已在几项研究中得到应用^[6,7]。

参考文献:

[1] Marie Van de Putte, Huaijun Wang, Feng Chen, et al. Hypericin as a Marker for Determination of Tissue Viability After Intratumoral Ethanol Injection in a Murine Liver Tumor Model [J]. Academic Radiology 2008 107-113.

[2] 中华人民共和国卫生部医政司.核医学诊断与治疗规范[M].北京:科学出版社,1997:62.

[3] 中华人民共和国卫生部医政司.核医学诊断与治疗规范[M].北京:科学出版社,1997:61.

[4] Sang Wook Kim, Jeong Hoon Park, et al. Synthesis and in vitro/vivo Evaluation of Iodine-123/124 Labelled Hypericin Derivatives [Z]. Bull Korean Chem Soc, 2008; 2 023-2 025.

[5] Marlein Mirandn Cona, Junjie Li, Feng Chen, et al. A safety study on single intravenous dose of tetrachloro-diphenyl glycoluril [Iodogen] dissolved in dimethyl sulfoxide [DMSO] [J]. Xenobiotica, 2013: 16.

[6] Kong M, Zhang J, et al. Necrosis affinity evaluation of 131 I-hypericin in a rat model of induced necrosis. J [J]. duag target, 2013: 29.

[7] Li J, Sun Z, Zhang J, et al. A dual-targeting anticancer approach: soil and seed principle [J]. Rdiology, 2011, 260 (3): 799-807.

(收稿日期:2013-08-17)