

# 超高压液相色谱-质谱联用法研究 *L,L*-双半胱氨酸的氧化反应动力学

乔晋萍, 孙啸涛, 乔洪文, 朱霖

(北京师范大学化学学院, 放射性药物教育部重点实验室, 北京 100875)

## Study the Oxidation Reaction of *L,L*-Ethylene Dicysteine by Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

QIAO Jin-ping, SUN Xiao-tao, QIAO Hong-wen, ZHU Lin

(Key Laboratory of Radiopharmaceuticals, Ministry of Education, College of Chemistry,  
Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**Abstract:** *L,L*-ethylene dicysteine(*L,L*-EC) is a diaminedithiol( $N_2S_2$ ) ligand used in nuclear medicine for the preparation of  $^{99m}Tc$ -*L,L*-EC, a tracer agent for renal function studies. The dithiol groups of *L,L*-EC are easily oxidized and form the corresponding disulfide. In this paper, the dynamic oxidation process of *L,L*-EC was studied by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(UPLC/MS/MS) in multiple reaction monitoring(MRM) mode. The kinetic experiments were conducted at three different temperatures. The reaction order and the rate constants for the transformation of *L,L*-EC were calculated using kinetic data under pseudo-first-order reaction conditions. The activation energy of the oxidation of *L,L*-EC was calculated by an Arrhenius graph.

**Key words:** *L,L*-ethylene dicysteine;  $N_2S_2$  ligand; UPLC/MS/MS; oxidation kinetics

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0040-02

锝[ $^{99m}Tc$ ]双半胱氨酸( $^{99m}Tc$ -*L,L*-ethylene dicysteine,  $^{99m}Tc$ -*L,L*-EC)是临床上常用的一种肾小管分泌型肾功能显像剂,具有选择性高、低血浆蛋白结合率及血中清除迅速等优点。 $^{99m}Tc$ -*L,L*-EC的制备过程为将钼-锝发生器淋洗得到的高锝酸钠注射液加入含有配体 *L,L*-EC 的药盒中,溶解后静置数分钟即可。但在这个简单的制备过程中,却发生了复杂的氧化还原反应、络合反应和配体交换反应等化学变化。由于配体 *L,L*-EC 中含有  $N_2S_2$  基团,2 个巯基很容易通过自由基反应氧化生成二硫键,配位能力降低。因此研究 *L,L*-EC 的氧化动力学过程,确定影响反应速率的因素,可以为药盒以及  $^{99m}Tc$ -*L,L*-EC 的制备条件的选择和优化,提高标记率提供理论依据<sup>[1-2]</sup>。目前,关于 *L,L*-EC 氧化动力学的研究尚未见报道。

本研究采用 UPLC/MS/MS 法研究了 *L,L*-EC 在 3 个不同温度下的氧化反应动力学,对实验数据进行分析,运用 Arrhenius 公式,计算活化能。结果表明, *L,L*-EC 的氧化过程符合拟一级反应动力学规律,温度是影响反应速率的重要因素。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Acquity Ultra Performance LC 超高压液相色谱仪: 美国 Waters 公司产品, 配二元高压梯度泵、自动进样器。Quattro Micro 串联四极杆质谱仪: 美国 Waters 公司产品。

*L,L*-双半胱氨酸 (*L,L*-EC) (纯度>99.5%): 由北京欣科斯达科技有限公司提供; 乙腈、甲酸为色谱纯; 水为超纯水。

### 1.2 样品处理

精密称取2.0 mg *L,L*-EC溶于100 mL *V* (乙腈) :*V* (水) =50:50溶液中, 取500 μL该溶液, 用 *V* (乙腈) :*V* (水) =50:50稀释20倍, 作为待测溶液, 浓度为1 000 μg·L<sup>-1</sup>。样品配好后, 立即进行UPLC-MS/MS分析, 自动进样器连续进样, 时间间隔为6 min。

分别在4、20、40 °C温度下, 检测*L,L*-EC及其氧化产物浓度随时间的变化, 进行氧化动力学研究。

### 1.3 分析条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱 (50 mm×2.1 mm×1.7 μm), 进样量为2 μL, 流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相为乙腈-水 (含1%甲酸) 体系, 梯度洗脱。

**1.3.2 质谱条件** 电喷雾离子源, 正离子模式检测, 毛细管电压2.8 kV, 离子源温度110 °C, 脱溶剂温度350 °C, 脱溶剂气流量400 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流量40 L·h<sup>-1</sup>, 氩气为碰撞气, 扫描方式为MRM, 用于监测的离子对为 *m/z* 269→148 (*L,L*-EC), *m/z* 267→146 (*L,L*-EC的氧化产物), 锥孔电压分别为30 V和20 V。

## 2 结果与讨论

*L,L*-EC在溶液中的浓度随反应时间的延长而下降, 其氧化产物的浓度则增加。对实验数据进行分析, 分别以浓度和浓度的自然对数ln[A]对时间*t*进行相关性检验, *L,L*-EC的氧化反应符合拟一级反应动力学规律。计算反应速率常数, 发现温度对反应速率常数影响明显, 温度越高, 反应速率常数越大, *L,L*-EC的含量下降越快。根据Arrhenius公式, 绝对温度*T*与反应速率常数*k*有函数关系:

$$\ln k = -\frac{E}{RT} + B$$

*R* 为普适气体常数 (8.31 J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup>), *E* 为活化能, 用反应速率常数的自然对

数ln*k*对绝对温度*T*的倒数进行回归分析, 计算出*L,L*-EC的氧化反应活化能为44.5 kJ·mol<sup>-1</sup>。

实验发现, 虽然*L,L*-EC含有2个羧基, 但在ESI正离子模式下离子化效果更好。考察了流速对于待测物色谱和质谱行为的影响, 发现流速加大, 灵敏度降低, 鉴于待测物成分比较简单, 确定流速为0.3 mL·min<sup>-1</sup>。

## 3 小结

本研究采用UPLC-MS/MS法研究了*L,L*-EC的氧化反应动力学, 得到了相关的动力学参数和速率方程, 可以用来确定影响反应速率的因素, 优化<sup>99m</sup>Tc-*L,L*-EC的标记条件, 提高标记率, 为标记过程的优化提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] 刘蕴忠, 张正, 郭风, 等. 一种新的肾功能显像剂<sup>99m</sup>Tc-EC的研制及初步临床应用[J]. 中华核医学杂志, 1993, 13(1): 8-10.
- [2] QIAO J P, SUN X T, ZHU L. Study of the oxidation dynamics of ethyl cysteinylglycine dimer in solution by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23: 1 264-1 268.