

·论著·

# 高效液相色谱与放射性流动计数器联用确证<sup>13</sup>N-氨水及测定放射化学纯度的研究

何山震 王淑侠 李石磊 王朋

**【摘要】目的** 建立新的快速鉴别正电子显像剂<sup>13</sup>N-氨水及测定其放射化学纯度的有效方法。**方法** 采用高效液相色谱-紫外检测器联用放射性流动计数器(HPLC-UV-Flow-Count)的方法,以12.5%的氨水和0.1 mg/ml 硝酸钠(NaNO<sub>3</sub>)作为标准液, AQ-C18柱为分离柱,流动相为5 mmol/L的辛烷磺酸钠水溶液和乙腈(体积比为3:1),流速为0.5 ml/min,紫外吸收波长为210 nm。将氨水和硝酸钠标准液进样检测,得到它们的色谱图后对比保留时间进行鉴别。**结果** 在上述的洗脱条件下,氨水和硝酸钠的UV保留时间分别为2.3和1.4 min,<sup>13</sup>N-氨水和杂质<sup>13</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的放射性保留时间分别为5.8和3.1 min,两种物质分离良好。放射性显像剂<sup>13</sup>N-氨水的放射化学纯度大于95%,符合临床应用的要求。**结论** 该方法简单、快速,适合半衰期极短的<sup>13</sup>N-氨水正电子显像剂的鉴别和放射化学纯度的测定。

**【关键词】** 色谱法, 高压液相; <sup>13</sup>N-氨水; 放射化学纯度

**Identification of <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub> and analysis of its radiochemical purity using high performance liquid chromatography-ultraviolet-flow-count** He Shanzhen, Wang Shuxia, Li Shilei, Wang Peng. PET Center of Guangdong General Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China

Corresponding author: He Shanzhen, Email: candido.he@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a new, rapid, and effective method to identify <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub> and analyze its radiochemical purity. **Methods** The chromatographic method of high performance liquid chromatography-ultraviolet(HPLC-UV)-flow-count was performed using a C18 column with mobile phase of acetonitrile and 5 mmol/L sodium 1-octanesulfonate solution (V/V=1/3) at a flow rate of 0.5 ml/min and a wavelength of 210 nm. 15% <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub> and 0.1 mg/ml NaNO<sub>3</sub> were detected separately, and their retention times were compared and identified. **Results** The UV retention times of NH<sub>3</sub> and NaNO<sub>3</sub> were 2.3 and 1.4 min, respectively, and the retention times of <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub> and <sup>13</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> were 5.8 and 3.1 min, respectively. The established separation method using HPLC-UV-flow-count showed good efficiency. **Conclusion** HPLC-UV-flow-count is a simple, valid, and rapid method to identify <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub> and analyze its radiochemical purity.

**【Key words】** Chromatography, high pressure liquid; <sup>13</sup>N-NH<sub>3</sub>; Radiochemical purity

PET 探针<sup>13</sup>N-氨水在临床被广泛应用于心肌血流测定和局部脑血流显像,<sup>13</sup>N-氨水联合<sup>18</sup>F-FDG 心肌显像已成为评价心肌存活的影像学金标准<sup>[1]</sup>。而且,临床还发现,<sup>13</sup>N-氨水对脑胶质瘤<sup>[2]</sup>、无症状的纤维肉瘤<sup>[3]</sup>和星型细胞瘤<sup>[4]</sup>的检测比<sup>18</sup>F-FDG 更

有独特的优势,其在临床上的应用范围日益扩展。

作为被中国药典收录,可以进行临床应用的12种静脉注射的正电子显像剂之一的<sup>13</sup>N-氨水,与目前临床最常用的<sup>18</sup>F-FDG一样,在使用前必须进行药物的系列质量控制,其中,对药物进行鉴别和放射化学纯度的检测是最重要的常规质控之一。但是,由于<sup>13</sup>N-氨水的化学量是痕量的,而<sup>13</sup>N的半衰期极短,只有10 min,所以要求鉴别确认和放射化学纯度的检测过程必须快速、简单。目前,国内对<sup>13</sup>N-氨水还没有出台相关的质量标准和

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.03.004

基金项目: 广东省企业技术研发与升级改造专项资金(2013B021800191)

作者单位: 510080 广州,广东省人民医院 PET 中心(广东省医学科学院)

通信作者: 何山震(Email: candido.he@163.com)

检测方法,美国药典推荐了  $^{13}\text{N}$ -氨水的鉴别和放射化学纯度的检测方法——使用氯化铵( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )作为标准液,电导池检测器作为检测器进行  $^{13}\text{N}$ -氨水的鉴别确认和放射化学纯度的检测<sup>[5]</sup>。由于受检测器的限制,该方法难于普及。本研究使用最常用的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)紫外(ultraviolet, UV)检测器,对  $^{13}\text{N}$ -氨水进行了有效的鉴别确认和放射化学纯度的分析,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:RDS-111 加速器(美国 CTI 公司),HPLC 仪(美国 Waters 公司),UV 检测器(美国 Waters 2489),CRC-15R 型活度计(美国 Capintec 公司),精密电子天平(德国 Sartorius 公司),放射性流动计数器 Flow-count(美国 Bioscan 公司),AQ-C18 色谱柱(规格 250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )(美国 Ultimate 公司)。

试剂:无水乙醇(分析纯)、无水乙腈(HPLC 级)、硝酸钠(分析纯)、25%浓氨水(分析纯)均为广州试剂厂产品,去离子水由我院药理实验室提供。

### 1.2 合成原理及制备方法

在 500 ml 的无菌注射用水中加入 0.14 ml 的美国药典级别乙醇,混合均匀得到 5 mmol/L 的反应原料,装载在加速器上,开启加速器,将混合好的乙醇水溶液压入靶中,回旋加速器加速后的质子轰击预先装载在靶内的含有 5 mmol/L 乙醇的无菌水,在靶内发生  $^{16}\text{O}(\text{p}, \alpha)^{13}\text{N}$  核反应得到  $^{13}\text{NH}_3$ ,经 IC-OH 柱纯化后,无菌过滤得到临床使用的显像剂  $^{13}\text{N}$ -氨水,其反应的合成原理如图 1 所示。

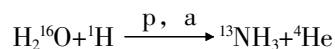


图 1  $^{13}\text{N}$ -氨水的放化合成反应式

Fig.1 The synthetic route of  $^{13}\text{N}$ -NH<sub>3</sub>

### 1.3 色谱条件

色谱柱为 AQ-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为 5 mmol/L 的辛烷磺酸钠水溶液和乙腈,紫外吸收波长为 210 nm。放射性流动计数器为 Flow-Count,计数档为 200 千次/min。

### 1.4 标准试剂的制备

用移液管取浓度为 25%的浓氨水 0.2 ml,加入 0.2 ml 去离子水,充分摇匀后得到浓度为 12.5%的

氨水标准液,溶液经精密 pH 试纸测得 pH=11。

用精密电子天平称取硝酸钠 200.0 mg,置于 50 ml 的容量瓶中,加水到刻度,摇匀,得到浓度为 4.0 mg/ml 的标准溶液,用移液器取上述标准溶液 0.5 ml 到 20 ml 的容量瓶中,加水到刻度,摇匀,得到浓度为 0.1 mg/ml 的硝酸钠标准液。

分别取 2  $\mu\text{l}$  氨水标准液和硝酸钠标准液进样检测,得到它们的 UV 色谱图,从图中可以得到对应的硝酸根离子和氨水的保留时间。

### 1.5 $^{13}\text{N}$ -氨水的确认

取回旋加速器生产的未经纯化的放射性显像剂  $^{13}\text{N}$ -氨水 0.1 ml(pH=7),取 5  $\mu\text{l}$  进样,按上述 HPLC 色谱的分析得到未纯化的  $^{13}\text{N}$ -氨水的放射性色谱图和 UV 吸收色谱图,对比 UV 的保留时间可以在放射性色谱图上确认出  $^{13}\text{N}$ -氨水的放射性色谱峰的位置。

### 1.6 样品的测量

取回旋加速器生产的经 IC-OH 柱纯化后的  $^{13}\text{N}$ -氨水 0.1 ml,取 5  $\mu\text{l}$  进样,按上述 HPLC 的分析条件进行 HPLC 的 UV-放射性色谱检测,测定  $^{13}\text{N}$ -氨水的放射化学纯度,每个样品重复测定 3 次。

## 2 结果

### 2.1 标准氨水溶液和副产物硝酸钠的 UV 检测结果

氨水的 UV 吸收很弱,高浓度下其 UV 吸收峰才能被检测器检测,而硝酸钠的硝酸根则具有强的 UV 吸收,低浓度的硝酸钠即可以被 UV 检测器检测,因此本实验使用了高浓度的氨水(通过 1:1 稀释)和低浓度的硝酸钠(0.1 mg/ml)作为标准液。通过优化流动相的比例后发现,在以辛烷磺酸钠水溶液和乙腈为流动相,体积比为 3:1,流速为 0.5 ml/min 时,杂质和样品可以有效被分离。从图 2 中的色谱图可以知道,杂质硝酸钠的保留时间为 1.4 min,样品氨水的保留时间为 2.3 min,两种物质分离良好,硝酸钠对 210 nm 的 UV 具有强的吸收,而氨水则表现为弱吸收。另外,在标准液氨水中明显存在硝基化合物类的杂质,其保留时间与硝酸钠的保留时间基本一致。

### 2.2 未纯化的 $^{13}\text{N}$ -氨水的 UV 和放射性检测结果

对比图 3 中的 UV 吸收色谱图和放射性色谱图可以看出,未经纯化的  $^{13}\text{N}$ -氨水的保留时间为 3.3 min,硝基类化合物的保留时间为 1.7 min,它

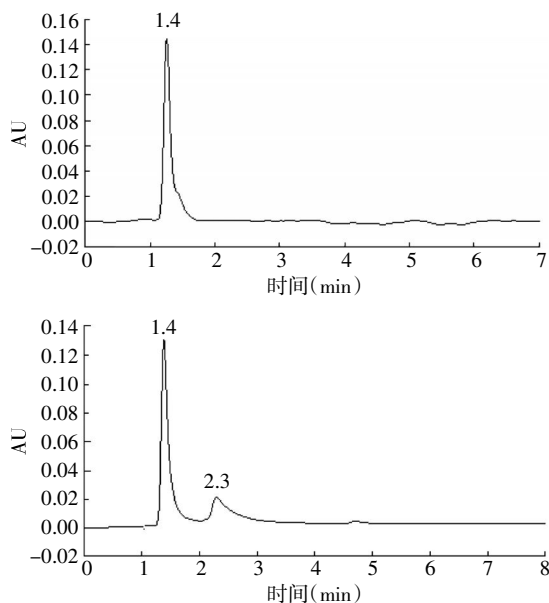


图2 标准物硝酸钠和标准溶液氨水的紫外吸收色谱图 图中, 上图为硝酸钠紫外吸收色谱图; 下图为氨水紫外吸收色谱图。

Fig.2 The high performance liquid chromatography of NaNO<sub>3</sub> and <sup>15</sup>N-NH<sub>3</sub>

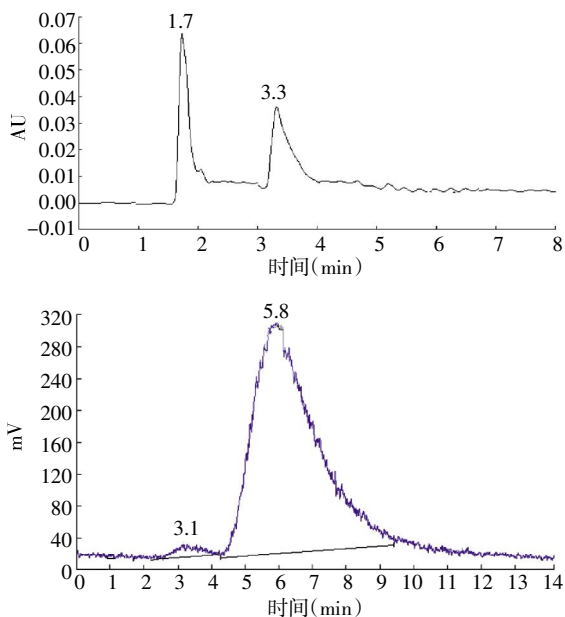


图3 未纯化的<sup>15</sup>N-氨水的紫外吸收色谱图和放射性检测色谱图 图中, 上图为紫外吸收色谱图; 下图为放射性检测色谱图

Fig.3 The high performance liquid chromatography and radioactivity detector chromatogram of unpurified <sup>15</sup>N-NH<sub>3</sub>

们各自的放射性检测的保留时间分别为 5.8 min 和 3.1 min, 两种物质分离良好。

### 2.3 样品的分析结果

连续生产 4 批次的 <sup>15</sup>N-氨水并经同样的方法处理后在同样的色谱条件下进行检测, 进样量均为

5 μl, 其放射化学纯度分别为(99.3±0.4)%、(99.9±0.1)%、(99.9±0.1)%和(99.4±0.5)%, 各批次 <sup>15</sup>N-氨水的放射化学纯度都大于 95%, 符合美国药典规定的要求。

### 3 讨论

<sup>15</sup>N-氨水的合成可通过戴氏合金还原法和在线还原法两种常用方法生产<sup>[6]</sup>。戴氏合金还原法通过核反应 <sup>12</sup>C(d, n)<sup>13</sup>N 或 <sup>13</sup>C(p, n)<sup>13</sup>N 得到 <sup>13</sup>NO<sub>3</sub> 和 <sup>13</sup>NO<sub>2</sub>, 再利用戴氏合金将 <sup>13</sup>NO<sub>3</sub> 和 <sup>13</sup>NO<sub>2</sub> 还原为 <sup>13</sup>NH<sub>3</sub><sup>[7-8]</sup>, <sup>13</sup>NH<sub>3</sub> 被蒸馏到生理盐水中得到 <sup>15</sup>N-氨水。在线还原法通过回旋加速器轰击含少量氧化自由基清除剂甲醇或乙醇的靶水, 发生核反应 <sup>16</sup>O(p, a)<sup>13</sup>N 并直接得到 <sup>15</sup>N-氨水, 经纯化、除菌、热源检测后用于临床<sup>[9-10]</sup>。本研究中所使用的 <sup>15</sup>N-氨水采用后者进行生产得到, 其整个反应过程简单, 没有其他物质的参与, <sup>15</sup>N-氨水中仅存在少量的副产物硝基类化合物(NO<sub>x</sub><sup>-</sup>)。

对于 <sup>15</sup>N-氨水注射液, 国内还没有对其制定统一的质量控制标准, 而美国药典规定的鉴别和放射化学纯度的检测方法在当前国内的 PET 中心难于实施。考虑到鉴别和放射化学纯度质控是药物质量控制的重要指标, 也是要求在临床使用前必须完成的项目, 有必要建立与国情相适应的新方法。

由于普通的氨水溶液中氨的挥发性和较低的 UV 吸收能力, 本研究没有对其进行定量方面的研究。美国药典使用的方法是以氯化铵作为标准物质, 其没有挥发性, 可以进行定量的分析, 这是其优势所在, 但该方法使用特殊的、不具普遍性的电导池检测器进行鉴别确认和测定, 受仪器条件的限制难于进行广泛应用。而本研究所使用的 UV 检测器是 HPLC 最常用的检测器, 在实际工作中更具有优势。

作为半衰期极短的正电子显像剂 <sup>15</sup>N-氨水, 其质量控制必须简单快速, 本研究通过建立新的 HPLC 的方法, 可以在 6 min 内完成 <sup>15</sup>N-氨水的鉴别和放射化学纯度检测, 适合目前国内 PET 中心的应用和推广, 并为 <sup>15</sup>N-氨水的质量控制方法提供了借鉴。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Ryzhkova DV, Krasil'nikova LA, Nifontov EM, et al. Evaluation of coronary bed function by positron emission tomography using <sup>15</sup>N-

- ammonium during cold stimulation[J]. Vestn Rentgenol Radiol, 2011, 3(1): 30-35.
- [ 2 ] Shi X, Liu Y, Zhang X, et al. The comparison of  $^{13}\text{N}$ -ammonia and  $^{18}\text{F}$ -FDG in the evaluation of untreated gliomas[J]. Clin Nucl Med, 2013, 38(7): 522-526.
- [ 3 ] Harisankar CN, Mittal BR, Watts A, et al. Utility of dynamic perfusion PET using  $^{13}\text{N}$ -ammonia in diagnosis of asymptomatic recurrence of fibrosarcoma[J]. Clin Nucl Med, 2011, 36(2): 150-151.
- [ 4 ] Xiangsong Z, Changhong L, Weian C, et al. PET imaging of cerebral astrocytoma with  $^{13}\text{N}$ -ammonia[J]. J Neurooncol, 2006, 78(2): 145-151.
- [ 5 ] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia(USP 35)[Z]. 2010.
- [ 6 ] Berridge MS, Landmeier BJ. In-target production of [ $^{13}\text{N}$ ] ammonia: target design, products, and operating parameters[J]. Appl Radiat Isot, 1993, 44(12): 1433-1441.
- [ 7 ] 鄢敏, 秦志星, 程鹏亮, 等. 住友 CLC 模块在线优化合成  $^{13}\text{N}$ - $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  的研究[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2014, 38(6): 360-362.
- [ 8 ] Firouzbakht ML, Schlyer DJ, Wolf AP, et al. Mechanism of nitrogen-13-labeled ammonia formation in a cryogenic water target[J]. Nucl Med Biol, 1999, 26(4): 437-441.
- [ 9 ] Krasikova RN, Fedorova OS, Korsakov MV, et al. Improved [ $^{13}\text{N}$ ] ammonia yield from the proton irradiation of water using methane gas[J]. Appl Radiat Isot, 1999, 51(4): 395-401.
- [ 10 ] Okada M, Nakao R, Hosoi R, et al. In vivo monitoring of extracellular  $^{13}\text{N}$ -glutamine derived from blood-borne  $^{13}\text{N}$ -ammonia in rat striatum using microdialysis with radio-LC method[J]. J Neurosci Methods, 2009, 184(1): 37-41.

(收稿日期: 2014-09-04)

## ·读者·作者·编者·

### 关于投稿的中英文摘要的书写要求

论文是用来进行科学研究和描述科研成果的载体。论文摘要是对论文的简短陈述, 具有不读原文就知全文的特点。摘要以供读者确定有无必要阅读论文全文, 或提供给文摘第二次文献采用, 可以独立使用, 也可以引用。摘要应着重反映研究中的创新内容和作者的独到观点, 不必列出本学科已成为常识的内容, 不要简单地重复题名中已有的信息。

1. 论著类文章摘要的内容应包括研究目的、研究方法、主要发现(包括关键性或主要的数据)和主要结论, 一般应写成四段式结构式摘要: 目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)。

(1)目的: 简明指出此项工作的目的, 研究的范围。

(2)方法: 简要说明研究课题的基本做法, 包括对象(分组及每组例数、对照例数或动物只数等)、材料和方法(包括所用药品剂量, 重复次数等)。统计方法特殊者需注明。

(3)结果: 简要列出主要结果(需注明单位)、数据、统计学意义等, 并说明其价值和局限性。

(4)结论: 简要说明从该项研究结果取得的正确观点、理论意义或实用价值、推广前景。

2. 综述类文章的摘要, 应包括综述的主要目的、资料来源、综述时所选择的文献量和依据、数据提炼的规则和应用方法、数据综合得出的结果和结论。可以结构式形式写出: 背景、数据来源、结果和结论。也可写成指示性或报道指示性摘要。

3. 中文摘要一般使用第三人称撰写, 建议采用“对……进行了研究”、“报告了……现状”、“进行了……调查”等记述方法标明, 不必使用“本文”、“我们”等作为主语。不列图、表, 不引用文献, 不加评论。除了公知公认者外, 摘要中首次出现的缩略语、代号等须注明全称或加以说明。

4. 中文摘要一般 250~400 字, 英文摘要与中文摘要内容原则上相对应, 但考虑到国外读者的需要, 可更详细。

本刊编辑部