

·论著·

国产模块 LOOP 环改良法合成 ^{11}C -蛋氨酸

李海峰 张晓军 李云钢 沈智辉 张锦明

330029, 江西省肿瘤医院核医学科(李海峰); 100853 北京, 中国人民解放军总医院核医学科(张晓军、李云钢、沈智辉、张锦明)

通信作者: 张锦明, Email: zhangjm301@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.02.004

【摘要】 目的 用国产 ^{11}C -多功能合成模块经 LOOP 环法合成放射性药物 ^{11}C -蛋氨酸 (^{11}C -MET), 与 C-18 柱固相法合成 ^{11}C -蛋氨酸进行比较。方法 对国产模块 LOOP 环法制备 ^{11}C -MET 的合成工艺进行探讨, 研究碱当量、溶剂效应及前体量等影响因素。结果 LOOP 环法制备 ^{11}C -MET 优化后的合成条件: 前体量 2~3 mg 溶于 NaOH 溶液(2 mol/L), 碱当量 5.6~11.5 eq, 加入乙醇 100 μL , 室温反应。此条件下 ^{11}C -MET 的合成效率为 $(65.31\pm 4.32)\%$ ($n=24$, ^{11}C - CH_3I 未校正效率), 产品的放化纯度 $>95\%$, 产量为 (6.61 ± 1.38) GBq。结论 LOOP 环法提高了 ^{11}C -MET 合成效率, LOOP 环可以多次重复利用, 降低了生产成本, 提高了合成产量, 实现了稳定、全自动化合成 ^{11}C -MET, 且产品能满足临床需求。

【关键词】 正电子发射断层显像术; 甲硫氨酸; 碳放射性同位素; LOOP 环法; 全自动化合成

基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高项目(14ZJZ2101)

Synthesis of ^{11}C -methionine on home-made module by the improved LOOP method Li Haifeng,

Zhang Xiaojun, Li Yungang, Shen Zhihui, Zhang Jinming

Department of Nuclear Medicine, Jiangxi Cancer Hospital, Jiangxi 330029, China (Li HF); Department of Nuclear Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China (Zhang XJ, Li YG, Shen ZH, Zhang JM)

Corresponding author: Zhang Jinming, Email: zhangjm301@163.com

【Abstract】 Objective The synthesis of radiopharmaceutical ^{11}C -methionine (^{11}C -MET) by LOOP and C-18 on-column method on home-made ^{11}C -multifunction synthesis module was compared. **Method** The synthesis conditions of ^{11}C -MET with home-made synthesis module by LOOP method was studied, which included the alkali equivalent, solvents and the amount of precursor. **Results** The optimum condition was 2~3 mg of precursor in NaOH solution(2 mol/L), alkali equivalent(5.6~11.5 eq) and ethanol(100 μL), and at room temperature for synthesis of ^{11}C -MET. It could be got with radiochemical yield of $(65.31\pm 4.32)\%$ ($n=24$, end of synthesis of ^{11}C - CH_3I). The radiochemical purity of ^{11}C -MET was higher than 95% and the production radioactivity was (6.61 ± 1.38) GBq ($n=24$). **Conclusions** By the method of LOOP, it showed that the production efficiency was increased, the output was increased and production cost of synthetic was reduced. The synthetic process was reliable and full automatic, and the product synthesized by this process was suitable for clinical use.

【Key words】 Positron-emission tomography; Methionine; Carbon radioisotope; LOOP method; Full automated synthesis

Fund program: The Enhancing Program of Military Hospital Prepared Medicine (14ZJZ2101)

^{11}C -蛋氨酸(^{11}C -methionine, ^{11}C -MET)是肿瘤氨基酸代谢显像剂, 在脑胶质瘤的良恶性、疗效评价、治疗后残留或复发的鉴别诊断中有着重要意

义^[1-2], 在临床诊断多发性骨髓瘤、多灶性白质脑病、肢端肥大症等方面也有着独特优势^[3-6]。目前, 临床研究所用的 ^{11}C -MET 的制备方法主要是 C-

18 柱固相合成法和液相合成法^[7-8]，固相合成法反应面积小，¹⁴C-CH₃I 不能与前体充分反应，合成效率受到影响；液相合成法的合成时间长，放化产率低。Gómez 等^[9]使用 LOOP 环法合成 ¹⁴C-MET，其操作过程复杂，合成效率低；张政伟等^[10]使用 LOOP 环法合成 ¹⁴C-MET，自制 LOOP 环管径较大，管壁产品残留多，产品产量较低，合成效率不高。本研究对国产 ¹⁴C-多功能合成模块进行了改进，寻求在国产模块上以 LOOP 环法合成合格的 ¹⁴C-MET，实验中使用的聚四氟乙烯 LOOP 环(1 mm×0.5 mm×2 m)，管径较小，表面积大，反应充分，管壁产品残留少，取得了较好的效果，并与 C-18 柱固相合成法进行了比较，固相合成法参见文献^[11]。

1 材料与方法

1.1 仪器

自动化 ¹⁴C 多功能合成模块(PET-CM-3H-IT-I)购自派特(北京)科技有限公司；HM-20 加速器购自日本住友重机械株式会社；Endosafe-PTS 细菌内毒素快速检测仪购自 USA Charles River 公司；AB104G 分析天平购自 Switzerland Mettler Toledo 公司；CRC-15R 型活度计购自 USA Capintec 公司；分析型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪、Sep-Pak C-18 柱购自美国 Waters 公司；无菌滤膜购自 Merck Millipore 公司。

1.2 试剂

L-高胱氨酸硫内酯购自北京百灵威科技有限公司；57%HI 和 LiAlH₄ 四氢呋喃溶液(1 mol/L)购自

美国 Sigma Aldrich 公司；AR 级磷酸二氢钠、氢氧化钠、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司；0.9%生理盐水购自青岛华仁药业公司；灭菌注射用水购自石家庄四药有限公司；HPLC 级乙腈、丙酮购自美国 TEDIA 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ¹⁴C-CH₃I 的合成

液相法制备 ¹⁴C-CH₃I：HM-20 加速器经 ¹⁴N(P, α)¹⁴C 核反应在加速器内产生 ¹⁴CO₂，氮气作为载气将 ¹⁴CO₂ 传送到 ¹⁴C-多功能合成模块，传送完毕，开启自动化程序，¹⁴CO₂ 被 N₂ 载至反应管与 0.2 ml LiAlH₄ 四氢呋喃溶液(1 mol/L)反应，加热并通入 N₂ 除去四氢呋喃，再加入 0.3 ml 57%HI，生成的 ¹⁴C-CH₃I 通入到 LOOP 环与前体反应^[12]。

1.3.2 产品的制备与纯化

将在线生成的 ¹⁴C-CH₃I 通入至含有 L-高胱氨酸硫内酯的 NaOH 乙醇溶液，废气排入尾气收集囊。反应结束后用 NaH₂PO₄ 溶液将 LOOP 环内反应液经 C-18 纯化柱和无菌滤膜淋洗至收集瓶，¹⁴C-MET 自动化合成系统图见图 1。

1.3.3 合成效率的影响因素

1.3.3.1 碱量对合成效率的影响

反应保持 ¹⁴C-MET 的前体量为 3 mg，溶解到不同碱当量的 NaOH 溶液中，溶解 1 min 后再加入 100 μl 乙醇，室温下通入至在线合成的 ¹⁴C-CH₃I 中反应，比较反应结果，寻求合适的碱当量。

1.3.3.2 溶剂对合成效率的影响

在 3 mg 的 ¹⁴C-MET 前体量和 100 μl 的 2 mol/L

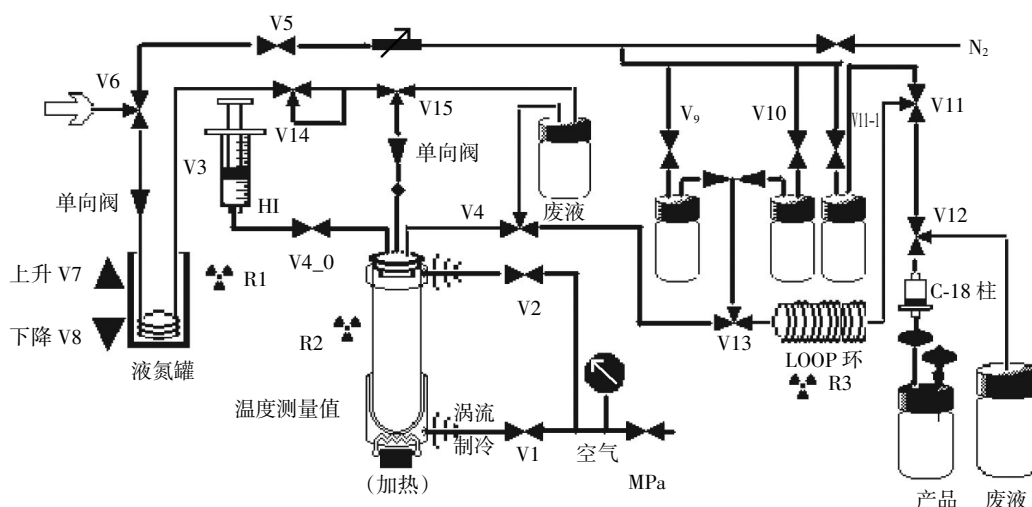


图 1 ¹⁴C-蛋氨酸自动化合成系统

Fig.1 Auto synthesis of ¹⁴C-methionine

NaOH 溶液中分别加入丙酮、乙腈、丙酮:乙腈(1:1)和乙醇各 100 μ l 作为反应溶剂, 室温反应, 比较不同溶剂的反应效率, 寻求较为理想的反应溶剂。

1.3.3.3 前体用量对合成效率的影响

取 14 C-MET 不同前体量(0.5~4 mg)溶于 10.0 eq (化学当量)新鲜配制的 NaOH 溶液(2 mol/L)中, 溶解静置 1 min 后再加入 100 μ l 乙醇混合均匀, 分别与 14 C-CH₃I 在室温下反应, 比较不同前体量对合成效率的影响。

1.3.4 产品的质量

检查产品外观, 精密 pH 试纸测试产品 pH 值, 使用 Endosafe-PTS 细菌内毒素快速检测仪检测产品的细菌内毒素, HPLC 仪检测产品有机溶剂残留, 通过 HPLC 测量产品放化纯度和比活度: 分析产品 14 C-MET 的分析柱为反相 Nova-Park C-18 柱(150 mm \times 3.9 mm), 流动相为 NaH₂PO₄ 溶液(pH=2.5, 10 mmol/L), 流速 1 ml/min; 用放射性活度计测定产品放射性活度, 化学量按天平称量的前体量换算成产物量进行计算, 估算产品放射性比活度。本研究对产品质量控制一般重复 3 次, 抽检的产品量为 3 批, 改变条件进行合成时需重新抽检 3 批产品。

2 结果

2.1 碱量对 14 C-MET 反应的影响

14 C-MET 在不同碱量下的合成效率见图 2(n=3, 未校正效率): NaOH 碱量相对于前体摩尔量 5.6~11.5 eq, 合成效率稳定, 为 55%~68%。碱当量 3.1 eq 的合成效率为 41.53%, 碱当量逐渐减小, 合成效率不断下降; 碱当量>11.5 eq, 随碱量增加, 合成效率迅速下降; 碱当量 20.7 eq 的合成效率为 44.57%, 产品放射化学纯度 78.36%, 见图 3 (峰 1 是产品; 峰 2 为副产物)。

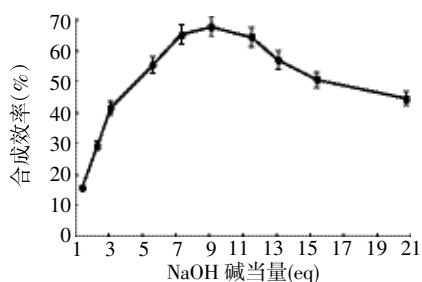


图 2 碱量对合成的影响

Fig.2 Effect of alkali equivalent on the synthesis

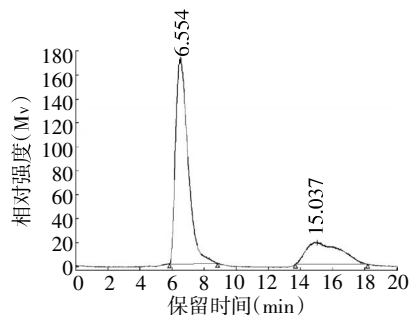


图 3 14 C-蛋氨酸的高效液相色谱图(20.7 eq)

Fig.3 High performance liquid chromatography of the 14 C-methionine(20.7 eq)

2.2 溶剂的影响

本研究分析了正电子药物常用反应溶剂, 合成效率结果见表 1。乙腈、丙酮等溶剂中的反应效率均低于乙醇, 可见 NaOH 的乙醇溶液更适合 LOOP 环法合成 14 C-MET。

表 1 不同溶剂对 14 C-蛋氨酸合成的影响

Table 1 Effect of solvent on the 14 C-methionine synthesis

溶剂	14 C-蛋氨酸合成效率(n=3, 未校正效率)
丙酮	(35.96 \pm 2.06)%
乙腈	(28.24 \pm 2.10)%
丙酮:乙腈(1:1)	(31.47 \pm 1.63)%
乙醇	(64.74 \pm 0.60)%

2.3 前体用量对合成 14 C-MET 的影响

不同量的 14 C-MET 前体药分别与在线合成的 14 C-CH₃I 反应, 其合成效率见图 4。 14 C-MET 前体量为 1~3 mg 的合成效率均超过 60%, 降低前体量至 0.5 mg 时合成效率为 45.20%; 如果前体量较大(>3 mg), 产品的合成效率并没有太大的提高。

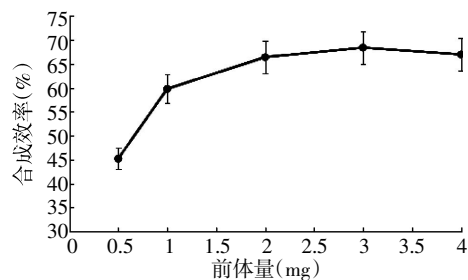


图 4 前体量对合成效率的影响

Fig.4 Effect of the precursor on the synthesis efficiency

2.4 自动化合成及质量控制

优化 14 C-MET 自动化合成条件为: 2~3 mg 14 C-MET 前体溶于 100 μ l 新鲜配制的 NaOH(2 mol/L)溶液中, 再加入 100 μ l 乙醇, 将混合液装于自动合成器的 LOOP 环内, 通入在线转化的 14 C-CH₃I, 待

LOOP 环处放射性不再升高停止通气，室温静置反应；打开 V9、V12，用 5 ml NaH₂PO₄ 溶液(0.3 mmol/L)经 C-18 纯化柱和无菌滤膜淋洗至收集瓶。¹¹C-CO₂ 传至 LOOP 环后，开启自动合成程序，从 ¹¹C-CO₂ 到取代反应、纯化至终产品，总计用时为 11 min。产品的外观、pH 值、HPLC 检测放化纯、细菌内毒素检测、气相色谱仪检测溶剂残留等质量控制结果均符合静脉注射要求，并与 C-18 柱固相法进行比较，结果见表 2。

表 2 ¹¹C-蛋氨酸的质控结果(n=4)

项目	C-18 柱固相合成法	LOOP 环法	欧洲药典 8.0
外观	无色澄明	无色澄明	无色澄明
pH 值	6.5~7.0	6.5~7.0	4.5~8.5
放化纯	>95%	>97%	>95%
乙腈残留	<0.3 mg/ml	<0.2 mg/ml	<0.41 mg/ml
丙酮残留	<1 mg/ml	<0.6 mg/ml	<5 mg/ml
乙醇含量	<4.3 mg/ml	<4.1mg/ml	<5 mg/ml
细菌内毒素	<4 Eu/ml	<4 Eu/ml	<175/V IU/ml

2.5 LOOP 环法与 C-18 柱固相合成法的比较

本研究优化了 ¹¹C-MET 的 LOOP 环法合成条件，并与常用的 C-18 柱固相合成法进行了比较，其合成效率明显提高，见图 5。国产 ¹¹C 多功能模块经 LOOP 环法合成 ¹¹C-MET 与 C-18 柱固相合成法相比较，合成效率、产量、最大产量、制备用时分别为：(65.31±4.32)%、54.3±3.41%(n1=24, n2=29, CH₃I 未校正效率)；(6.61±1.38) GBq、(3.83±0.77) GBq；9.03 GBq、5.38 GBq；11 min、12 min；比活度分别不低于(3.32±0.62) TBq/g 和(1.93±0.39)TBq/g。LOOP 环法与 C-18 柱固相法合成的 ¹¹C-MET 在临床应用中进行了比较，由图 6 可知两种合成 ¹¹C-MET 的图像质量并无太大差别，均可应用于临床研究。

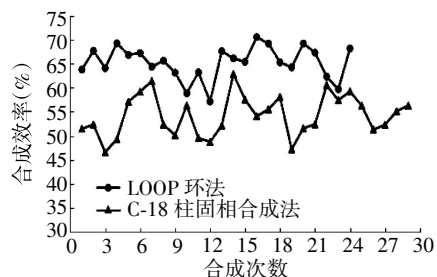


图 5 两种方法合成效率的比较

Fig.5 Compared two methods for the synthesis efficiency of ¹¹C-methionine

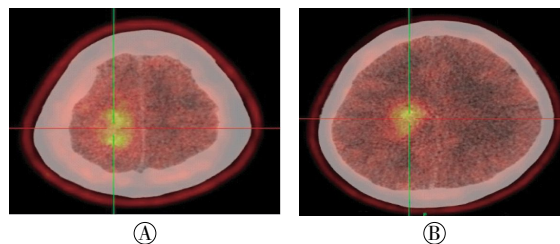


图 6 不同方法合成的 ¹¹C-蛋氨酸对患者 PET/CT 图像质量影响的对比图 图中: A: LOOP 环法; B: C-18 柱固相合成法。

Fig.6 The influence of ¹¹C-methionine which synthesised by two methods on the quality of PET/CT images

3 讨论

本研究中，NaOH 溶液与 L-高胱氨酸硫内酯发生开环反应，生成中间体 ¹¹C-4-巯基丁氨酸盐，再与 ¹¹C-CH₃I 发生取代反应，碱性环境中的中间体比较稳定，中性或弱酸环境中会发生逆化反应。NaOH 量较大，中间体可能与 ¹¹C-CH₃I 发生酯化反应生成副产品 ¹¹C-4-巯基丁氨酸甲酯；同时碱量过大，调节产品 pH 值需要更多缓冲溶液，增加产品无机盐的含量。实验表明，碱量增加导致 L-高胱氨酸硫内酯更容易发生开环反应，碱量在 5.6~11.5 eq，合成效率稳定在 55%~68%，产品放化纯度>95%，放射性比活度不低于(3.32±0.62) TBq/g，副产品含量较低；碱量<3.1 eq 时，合成效率较低，碱量>11.5 eq 时，副反应比例逐渐增加。前体 L-高胱氨酸硫内酯与 NaOH 的乙醇溶液发生开环反应，再与 ¹¹C-CH₃I 发生亲核取代，小极性溶剂可降低电荷集中的亲核试剂溶剂化，有利于亲核取代反应，提高反应效率。丙酮、乙腈是较为合适的反应溶剂，但由于其本身易挥发，在 LOOP 环法或 C-18 柱固相合成法中易造成较大的放射性损失，产品放化纯度较高，但合成效率大大降低。本研究认为丙酮、乙腈不适合 LOOP 环法或 C-18 柱固相合成法，合成 ¹¹C-MET 时应选用乙醇为反应溶剂。本研究的反应为亲核取代反应，合成效率与前体浓度呈正相关，提高前体浓度可提升合成效率；但前体量过大会造成化学纯度降低，同时浪费了前体。为了保证合成效率、控制产品中前体含量，同时降低合成成本，本研究认为使用 2~3 mg 的 ¹¹C-MET 前体为宜。

国内外关于 ¹¹C-MET 制备方面研究的问题，主要在质量控制、制备时间及合成效率等方面^[8-11]。本研究采用自动化模块经 LOOP 环法合成放射性药

物 ^{11}C -MET, 在制备过程中, LOOP 环可以重复、多次使用, 同时减少了 Sep-Pak C-18 柱的使用量, 降低生产药物合成成本; LOOP 环法制备 ^{11}C -MET 可以提高合成效率, 大大增加了产品的产量; LOOP 环法还可应用于制备 ^{11}C -乙酸盐、 ^{11}C -胆碱和 ^{11}C -carfentanil 等药物, 扩展了国产 ^{11}C 多功能模块的使用范围; 每次在使用 LOOP 环之前要求仔细清洗 LOOP 环, 以免造成合成效率的降低。近年来, 微流控法制备药物成为一个兴起的研究热点^[13-14], 此方法制备放射性药物具有放射损失较少、合成效率高、合成耗时少等优点, 为放射性药物的制备指引了一个新的研究方向。

本研究采用 LOOP 环法合成 ^{11}C -MET, 优化了 ^{11}C -MET 的合成条件, 并与 C-18 柱固相合成法进行了比较。制备放射性药物 ^{11}C -MET 的操作过程并不复杂, 提高合成效率, 增加产品产率, 降低合成成本成为制备简单药物所追求的目标, LOOP 环法制备 ^{11}C -MET 是一种值得推广的合成方法。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 李海峰负责现场实验、论文撰写; 张晓军、李云钢负责部分论文资料收集及现场实验; 沈智辉负责临床显像图片整理; 张锦明负责命题的提出、论文审阅。

参 考 文 献

- [1] D' Souza MM, Sharma R, Jaimini A, et al. ^{11}C -MET PET/CT and advanced MRI in the evaluation of tumor recurrence in high-grade gliomas[J]. Clin Nucl Med, 2014, 39(9): 791-798. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000532.
- [2] Navarria P, Reggiori G, Pessina FA, et al. Investigation on the role of integrated PET/MRI for target volume definition and radiotherapy planning in patients with high grade glioma[J]. Radiother Oncol, 2014, 112(3): 425-429. DOI: 10.1016/j.radonc.2014.09.004.
- [3] Kobayashi M, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Clinical value of ^{18}F -FDG-PET and ^{11}C -MET-PET in patients with plasma cell malignancy[J]. Nihon Rinsho, 2015, 73(1): 74-79.
- [4] Lütckerath K, Lapa C, Albert C, et al. ^{11}C -Methionine-PET: a novel and sensitive tool for monitoring of early response to treatment in multiple myeloma[J]. Oncotarget, 2015, 6(10): 8418-8429. DOI: 10.18632/oncotarget.3053.
- [5] Shirai S, Yabe I, Kano T, et al. Usefulness of ^{11}C -methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy[J]. J Neurol, 2014, 261(12): 2314-2318. DOI: 10.1007/s00415-014-7500-y.
- [6] Rodriguez-Barcelo S, Gutierrez-Cardo A, Dominguez-Paez M, et al. Clinical usefulness of coregistered ^{11}C -methionine positron emission tomography/3-T magnetic resonance imaging at the follow-up of acromegaly[J]. World Neurosurg, 2014, 82(3/4): 468-473. DOI: 10.1016/j.wneu.2013.11.011.
- [7] Cheung MK, Ho CL. A simple, versatile, low-cost and remotely operated apparatus for [^{11}C] acetate, [^{11}C] choline, [^{11}C] methionine and [^{11}C] PIB synthesis[J]. Appl Radiat Isot, 2009, 67(4): 581-589. DOI: 10.1016/j.apradiso.2008.08.018.
- [8] Pascali C, Boggi A, Iwata R, et al. High efficiency preparation of L-[S-methyl- ^{11}C] methionine by on-column [^{11}C] methylation on C18 Sep-Pak[J]. J Labelled Compd Radiopharm, 1999, 42: 715-724.
- [9] Gómez V, Gispert JD, Amador V, et al. New method for routine production of L-[methyl- ^{11}C] methionine: in loop synthesis[J]. J Label Compd Radiopharm, 2008, 51(1): 83-86. DOI: 10.1002/jlcr.1483.
- [10] 张政伟, 薛方平, 刘平, 等. 国产 ^{11}C 多功能模块在 ^{11}C 标记药物中的应用研究[J]. 中国医疗设备, 2009, 24(8): 5-7, 16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1633.2009.08.002.
Zhang ZW, Xue FP, Liu P, et al. The application of the homemade ^{11}C -module in the ^{11}C labeling radiopharmaceuticals[J]. J Press China Med Devices, 2009, 24(8): 5-7, 16.
- [11] 张晓军, 李云刚, 刘健, 等. L-[S- ^{11}C -甲基]-蛋氨酸的合成及 HPL 分析[J]. 同位素, 2014, 27(4): 236-240. DOI: 10.7538/tws.2014.27.04.0236.
Zhang XJ, Li YG, Liu J, et al. Preparation and HPLC analysis of L-[s-methyl- ^{11}C]methionine[J]. J Isotopes, 2014, 27(4): 236-240.
- [12] 张锦明, 田嘉禾, 王武尚, 等. 单管法自动化合成 ^{11}C -碘代甲烷[J]. 中华核医学杂志, 2004, 24(4): 243-244. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2004.04.019.
Zhang JM, Tian JH, Wang WS, et al. An automated synthesis of ^{11}C -methyl iodide with single vessel[J]. Chin J Nucl Med, 2004, 24(4): 243-244.
- [13] Kundu S, Bhargale AS, Wallace WE, et al. Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(15): 6006-6011. DOI: 10.1021/ja111346c.
- [14] 金杰, 董玲, 张克华, 等. 微流控合成研究进展[J]. 有机化学, 2012, 32(1): 201-209. DOI: 10.6023/cioc1105131.
Jin J, Dong L, Zhang KH, et al. Recent advances in microfluidic synthesis[J]. Chin J Org Chem, 2012, 32(1): 201-209.

(收稿日期: 2016-01-12)