

HPLC 法在 PET 显像剂分析中的应用

1、简介

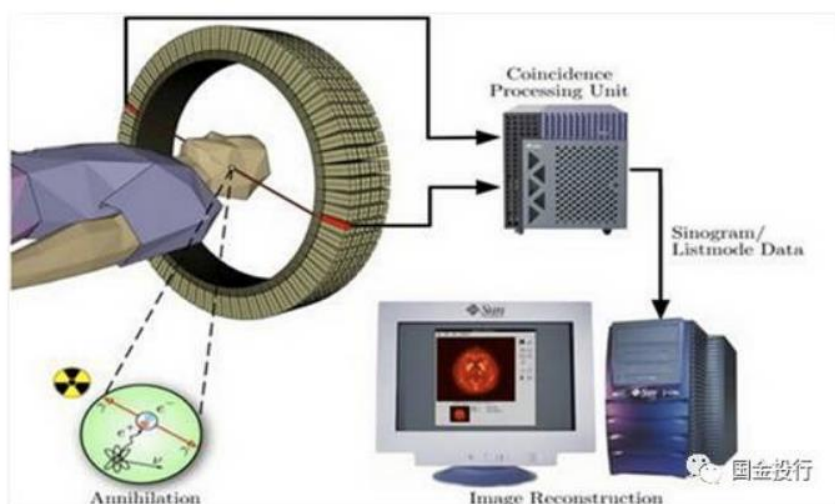
PET (Positron Emission computed Tomography) “正电子发射型计算机断层扫描”，是反映病变的基因、分子、代谢及功能状态的显像设备。其利用带正电子的放射性核素标记人体化合物或代谢物，如葡萄糖、蛋白质、核酸、脂肪酸、受体的配体及水等人体代谢物作为显像剂，其中临床应用最广泛的是 ^{18}F -FDG，经注射到受检者体内后，正电子核素伴随被标记物参与人体组织器官在生理病理过程中的细胞代谢活动，而重新聚集分布，然后用 PET 这种体外探“神器”进行采集，从而得到人体代谢活动分子水平的信息，为临床提供疾病的生物代谢信息。

2- ^{18}F -2-脱氧-D-葡萄糖(^{18}F -FDG)是最常用的代谢显像剂，其代谢途径与天然葡萄糖相似。通过载体-传递转运系统运输到组织细胞内，在己糖激酶作用下催化磷酸化，变成 6-磷酸- ^{18}F -脱氧葡萄糖(^{18}F -FDG-PO₄)，但它不象 6-磷酸-葡萄糖能继续代谢，而较长时间滞留在组织细胞内，在葡萄糖代谢平衡时，滞留量大体上与组织葡萄糖消耗量一致，因此， ^{18}F -FDG 能反映体内葡萄糖代谢状态， ^{18}F -FDG 的分布情况就会很好地反映体内细胞对葡萄糖的摄取和磷酸化的分布情况。

^{18}F -FDG 此类的正电子显像剂有两个特点，一是因所用放射性核素的半衰期短，生产时必须涉及高水平的放射性，以便最后能得到临床研究需要的有用数量，生产工序必须遥控。二是所研究的化合物极其微量，生产的绝大多数正电子显像剂不加载体，通常相当于近纳摩尔量级。这在测定生理机能时具有不产生药效效应的优点。因此，使用于质量控制的分析方法必须具有更低的探测下限。

采用放射性高效液相色谱 (HPLC) 和放射性气相色谱 (GC) 等方法，可以保证产品质量。在 ^{18}F -FDG 生产中，比较重要的原材料包括靶材料的纯度和丰度、三氟甘露糖的纯度、乙腈的纯度与含水量的高低以及其它化学试剂的质量，同时也包括靶室的清洁程度、反应器皿的清洁程度以及分离纯化材料的质量等，只有这些材料均合乎要求，才能生产出符合要求的 ^{18}F -FDG。

2、PET 系统组成部分



PET 装备硬件部分由 PET 扫描架、探测器环、电子线路和计算机系统、图像工作站组成。软件部分包括图像重建和图像处理系统。

3、PET-CT 设备

PET-CT 设备是 PET 和 CT 的强强联合，PET 因 CT 的加入提高了对病灶准确定位；CT 因与 PET 结合，病灶定性诊断能力大幅提高；还因 CT 所起的衰减校正作用，PET 检查时间大幅度缩短，对指导肿瘤和心脏、脑部疾病的诊治极具优势。

2011-15 年的年均 PET-CT 增量达到近 30 台，高于 08-11 年的年均 13 台。公立医院配置的限制进一步提升，比如床位、科室、流量等指标均有明确要求。而社会资本办医机构的要求正在放宽，卫计委 11-15 年规划明确提出支持非公立医疗机构合理配备大型医用设备；地方层面，过去上海、浙江、江西、河南已经有支持独立影像中心的政策出台。预计未来仍会多省市陆续出台。

浙江省医学影像中心-区域性医学影像中心设置基本标准（试行）》概要

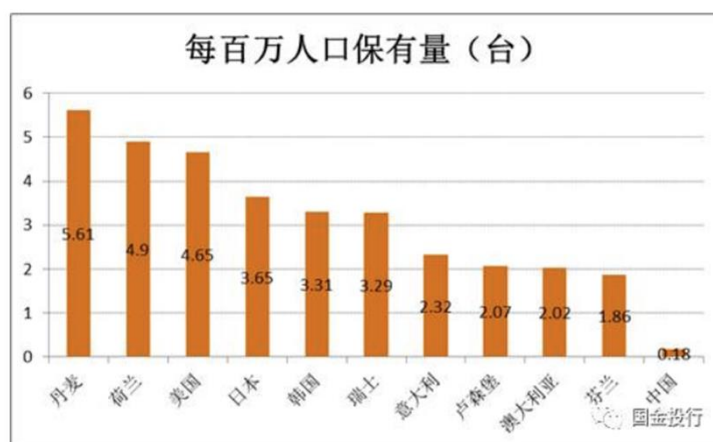
	必须	可选
专业设置	X 线、CT、MRI、超声	核医学
设备配置	USG5 台、DR1 台、CT（16 排）1 台、CT（64 排）1 台、MRI（1.5T）1 台	SPECT、PET-CT、PET-MRI
人员配置	CT、MRI：医师和技师各 2 名；DR：医师和技师各 1 名；USG：医师 1 名	SPECT、PET-CT、PET-MRI：医师和技师各 2 名
人员资质	放射医学：主任医师 2 名，副主任医师 2 名，主治医师 4 名，副主任技师 1 名，主管技师 4 名 超声医学：主任医师 1 名，副主任医师 2 名，主治医师 2 名	核医学：副主任医师 2 名，主管技师 2 名
场地建设	面积 1500 平方米	SPECT：一台 200 平方米；PET-CT 或 PET-MRI：一台 300 平方米
注册资金	8000 万元	

正是 PET-CT 在部分领域的独特效用，国内装机数量不断增长。根据相关普查情况，自本世纪初西安万杰长信医院(现已更名“长安医院”)购买了中国大陆第一台 PET-CT 设备，中国 PET-CT 的数量已经增长到 2014 年的 257 台，年均复合增长率超过 30%。



截至 2015 年 6 月，全国三甲医院总数量为 705 家，根据最新的《2014 年全国核医学现状普查简报》显示数据，全国约 190 家医疗机构拥有 PET 设备，仅约 27% 的三甲医院拥有 PET 设备，即使是在三甲医院方面，PET 设备的配置比例也较低。

从保有量看，丹麦每百万人口 PET-CT 保有量最高，达到 5.61 台/每百万人，相比之下中国只有 0.18 台/每百万人，排名最靠前的 10 个国家中，最少的芬兰也有 1.86 台/每百万人，设备数量方面有 10 倍多的提升空间。



各国 PET-CT 百万人口保有量

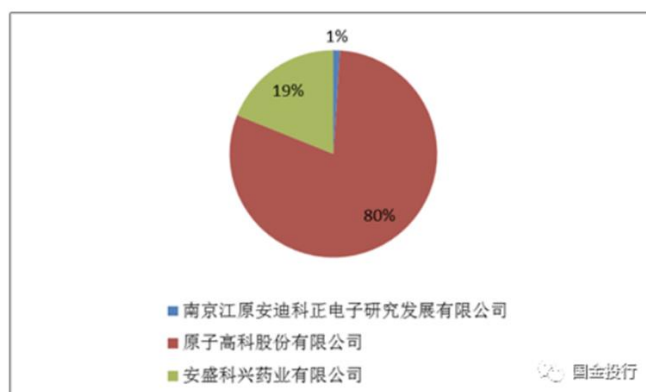
近年来随着技术突破，国内部分公司也研发成功 PET-CT，主要有东软集团、上海联影、锐视康、中惠医疗、大基医疗等公司。但国产 PET-CT 在影像清晰度、性能稳定性、操控性等方面对比进口产品还有较大差距，需要进一步改进。未来国产设备大规模上市，有望降低检查费用，加速下游服务市场增速。

4、我们的机会

因行业的进入门槛高，产业链相对简单，即上游 PET-CT 设备和配套试剂，其中配套试

剂按照自备和外购分为两种方式，如果自备的需要回旋加速器。下游是影像服务市场：三级医院和独立影像中心。

对我们来讲，配套试剂 FDG 注射液的制备纯化和纯度分析需要用到液相色谱，而 FDG 注射液目前主要是国内公司占据主要市场份额，PDB 数据库显示南京江原、原子高科、安盛科兴基本占据全部市场。其中原子高科的市场占有率最高，达到近 80%，主要归功于其市场布局较为完善，价格低于安盛科兴。



试剂竞争格局

按照 PDB 数据库显示，FGD 规模从 08 年的 7.13 万元增长到 15 年的 2867.74 万元，复合增长率高达 117%。因为还有三分之一的医院是自制，加之服务市场需求还有很大空间，FGD 注射液后期值得看好。

5、 ^{18}F -FDG 的制备纯化

制备方法有亲电加成反应和亲核取代反应，包括固相亲核氟化反应和液相亲核氟化反应。水解分为盐酸水解和氢氧化钠水解。

1) 亲核取代法的合成流程（Kry2.2.2 催化法）

氨基聚醚 2.2.2（Kry2.2.2）催化法是目前首选并广泛使用的方法，其流程如下：

- He 加压将含有 ^{18}F -F-的靶水从靶室内传出，使其通过预先活化的 Sep-pak QMA 柱而捕获 ^{18}F -F-；
- 用含 3.0mg K_2CO_3 和 10.0mg Kry2.2.2 的洗脱液 1.0ml 洗脱 ^{18}F -F-到反应瓶中；
- 将反应瓶在 115°C 的油浴中加热蒸干，然后，加入乙腈再蒸干；
- 将 20~30mg 三氟甘露糖（Mannose triflate）溶解于 1ml 乙腈，并加入到反应瓶中；
- 将反应瓶置于 110°C 的油浴中 5min，使其进行亲核氟代反应，生成四乙酰基-2- ^{18}F -2-脱氧葡萄糖（1.3.4.6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose）；
- 吹入 N_2 ，吹干反应瓶中的乙腈；

- g) 在反应瓶中加入 1mol/L HCl 溶液 2ml, 在 115°C 的油浴中加热, 水解去掉乙酰保护基 (AcO-);
- h) 向反应瓶中加入碱性磷酸盐缓冲液终止水解反应, 并使溶液 pH 为中性;
- i) 加压将反应瓶中所有溶液通过 C18 反相柱, Al₂O₃ 柱及 0.2μm 微孔滤膜而收集产品瓶中, 得到可供注射的 ¹⁸F-FDG 溶液。

2) 亲电取代法的合成流程

亲电氟化试剂较多, 现以 ¹⁸F-CH₃COOF 为亲电氟化试剂合成 ¹⁸F-FDG 的方法为例。

- a) 将含有 ¹⁸F-F₂ 的靶气体从靶室内传出, 进入装有 0.010ml 液氨和 12~15ml 冰乙酸的玻璃起泡器中, 得到 ¹⁸F-CH₃COOF, 并用 KI-Na₂S₂O₃ 滴定法测定 ¹⁸F-CH₃COOF 的化学产量;
- b) 在 ¹⁸F-CH₃COOF 溶液中加入含 25~30mg 3,4,6-三乙酰-D-葡萄糖醛(TAG)的冰乙酸溶液 1ml, 然后加热蒸干;
- c) 加入 2mol/L HCl 3ml, 120°C 加热 10~15min;
- d) 加入 10 mg 活性炭, 并加热蒸干;
- e) 加入 3ml 乙腈水溶液(0.3% H₂O), 混合后, 使该混合物通过硅胶柱(0.75×10cm), 然后用相同的乙腈水溶液淋洗, 弃去前面收集的 6.5ml 洗提液, 收集以后的洗提液 15ml;
- f) 将 15ml 洗提产物溶液蒸干, 加入 1 ml 无热源 H₂O, 再次蒸干;
- g) 加入无菌无热源生理盐水, 溶解后, 用 0.2μm 微孔滤膜过滤除菌并收集于产品瓶中, 得到可供注射的 ¹⁸F-FDG 溶液。

制备纯化过程中: C18 柱是为了出去残余的 ¹⁸F-, 而中性 Al₂O₃ 柱主要功能是除去部分未水解的 ¹⁸F-FDG-OAc。

6、纯度分析

¹⁸F-FDG 是载于美国药典的第一个 PET 放射性药物, 需要对放射性核纯度、化学纯度、放射化学纯度、比活度等质量指标进行控制, 同时需要对合成反应的副产物含量进行控制, 而液相色谱法是进行 ¹⁸F-FDG 化学纯度分析的最好方法。

1) ¹⁸F-FDG 化学纯度检测

色谱条件:

流动相: 乙腈/水=85/15

色谱柱：氨基柱

流速：1.0mL/min

检测波长：示差检测器

2) ^{18}F -FDG 放射化学纯度检测方法

色谱条件：

流动相：乙腈/水=85/15

色谱柱：氨基柱

流速：1.0mL/min

检测波长：放射性检测器

注意：在乙腈水溶液洗脱的反相氨基柱法中，为了起排代作用，在洗脱液中加入一定量的 NaF，才能有效地将 ^{18}F 氟化物分离并从该柱上洗脱下来。

3) ^{18}F -FDG 溶液注射液中氨基聚醚的含量检测

色谱条件：

流动相：50mmol/L 乙酸铵：乙腈=50/50

色谱柱：C18 5 μm 3.9 $\times$ 150mm

流速：0.5mL/min

检测波长：210nm

参考文献：赵岩，王晓静等.高效液相色谱法测定 ^{18}F -FDG 注射液中氨基聚醚的含量【J】

同位素, 2012,25(3):171-174.

4) 脑血流显像剂原料盐酸双半胱乙酯的含量分析

色谱条件：

流动相：乙腈/水（磷酸调 pH=6.5）=5/95

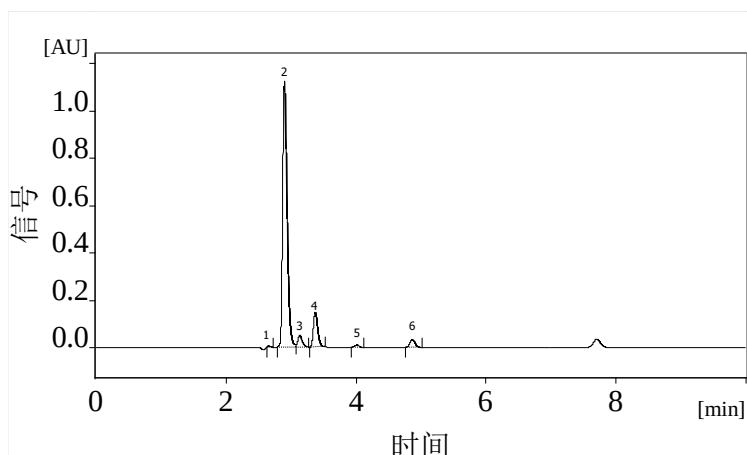
色谱柱：SinoChrom ODS-BP 5 μm 4.6 $\times$ 250mm

流速：1.0 mL/min

检测波长：200nm

进样量：10 μL

色谱图：



对显像剂的纯度检测方法，汇总见下表。

序号	显像剂名称	分析项目	色谱柱	检测器	色谱条件	纯度要求
1	$2\text{-}^{18}\text{F}\text{-FDG}$	化学纯度	氨基柱	示差检测器	85%乙腈水，1ml/min	>95%
		放射化学纯度	氨基柱	放射性检测器	85%乙腈水，加入一定量的 NaF，1ml/min，	
2	$^{13}\text{N}\text{-NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$	化学纯度	C18	电化学检测器	85%甲醇水，1ml/min	>99%
		放射化学纯度	C18	放射性检测器	85%甲醇水，1ml/min	>95%
3	$^{18}\text{F}\text{-NaF}$	放化纯度	氨基柱	----	含 KF 的 60%乙腈水溶液	----
4	$^{18}\text{F}\text{-FMISO}$	纯化	^{18}F 阴离子分离柱 (QMA)、 Al_2O_3 分离柱	放射性检测器	水/乙醇=95/5，流速 8 ml/min	----
		放化纯度	C18	紫外检测器	20%乙腈/水，254nm	----
5	$^{18}\text{F}\text{-FLT}$	纯化	^{18}F 阴离子分离柱 (QMA)、 Al_2O_3 分离柱 (Alumina N)	放射性检测器	10 mM Na_2HPO_4 /乙醇=92/8，流速 8 ml/min	----
6	$^{18}\text{F}\text{-FES}$	纯化	^{18}F 阴离子分离柱 (QMA)、 Al_2O_3 分离柱 (Alumina N)	放射性检测器	水/乙醇=50/50，流速 7 ml/min	----
		放化纯度	C18	---	乙醇/水(42/58, v/v)	----
7	$^{18}\text{F}\text{-Dopa}$	放化纯度	C18	紫外检测器	0.07 M 的 KH_2PO_4 溶液，280nm	----

序号	显像剂名称	分析项目	色谱柱	检测器	色谱条件	纯度要求
		对映纯度	C18		手性流动相法	----
8	¹¹ C-Raclopride	放化纯度	C18	紫外检测器	乙腈/0.01 M 的磷酸 (30/70,v/v), 230nm	----
9	¹¹ C-MSPC-MSP	放化纯度	C18	----	甲醇/0.1 M 甲酸铵 (78/22,v/v)	----
10	¹⁸ F-FESP	放化纯度	C18	----	甲醇/100 mM 乙酸铵与乙酸缓冲液(pH 4.8, 75/25)	----
11	¹¹ C-Flumazenil	放化纯度	C18	紫外检测器	乙腈/0.01 M 的磷酸 (20/80,v/v), 254nm	----
12	¹¹ C-胆碱	放化纯度	NH2-柱	紫外检测器	乙腈/0.01 M NaH ₂ PO ₄ 溶液(80/20, v/v), 205 nm	----
13	¹⁸ F-胆碱	放化纯度	C18	----	1 mM 2-萘磺酸+0.05 M H ₃ PO ₄ 溶液	----
14	¹¹ C-β-CIT	放化纯度	C18	紫外检测器	乙腈/0.01 M 的磷酸 (25/75,v/v), 254 nM	----
15	¹⁸ F-β-FP-CIT	放化纯度	C18	紫外检测器	乙腈/0.01 M 的磷酸 (25/75,v/v), 254 nM	----
16	¹¹ C-乙酸盐	放化纯度	Aminex HPX – 87H (BioRad)	紫外检测器	1 mM 硫酸溶液, 229 nm	>99%

7、放射性检测器

高效液相放射性检测器也称为 HPLC 高效液相在线 γ 计数仪，能为放射药物研发、单克隆抗体标记、环境分析及 PET 化学提供时代领先的、可靠的 HPLC 检测。在代谢产物研究、放药纯度测量以及 HPLC 检测中，HPLC 在线放射性检测器-Flow-Count™ 的探测池能够提供不同活度范围的检测。

仪器类型: 计量/剂量率仪

仪器型号: Flow-Count

品牌: 美国 BIOSCAN 公司