

LOOP 环改良法全自动化制备¹¹C-胆碱

李海峰¹, 徐仁根¹, 何玉林², 陈志军¹, 张晓军², 李云钢², 张锦明²

(1. 江西省肿瘤医院 核医学科, 南昌 330029; 2. 中国人民解放军总医院 核医学科, 北京 100853)

摘要:为研究国产¹¹C-多功能合成模块经 LOOP 环法合成放射性药物[N-甲基-¹¹C]胆碱(¹¹C-Choline, ¹¹C-CH)的合成方法,对碱当量、溶剂效应及前体量等影响因素进行研究,优化 LOOP 环法合成¹¹C-CH的合成工艺。¹¹C-CH的优化条件:前体量为 60~150 μL,无碱无溶剂,室温与¹¹C-CH₃I 反应。此条件下¹¹C-CH的合成效率为(72.16±2.96)%(*n*=19, ¹¹C-CH₃I 未校正效率),产品的放化纯度均大于 95%,产量为(7.59±1.54) GBq(*n*=19)。国产¹¹C-多功能合成模块 LOOP 环法合成¹¹C-CH 与 C18 柱固相法进行比较表明,LOOP 环可以多次重复利用,降低生产成本,提高合成效率,实现稳定、全自动化合成¹¹C-CH,产品满足临床需求。

关键词: LOOP 环法;全自动化合成;PET/CT;胆碱

中图分类号: TL92+2;R817.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7512(2021)05-0462-06

doi: 10.7538/tws.2020.youxian.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Full Automated Synthesis of ¹¹C-CH by LOOP Method

LI Haifeng¹, XU Rengen¹, HE Yulin², CHEN Zhijun¹,
ZHANG Xiaojun², LI Yungang², ZHANG Jinming²

(1. Department of Nuclear Medicine, Jiang Xi Cancer Hospital, Nanchang 330029, China;

2. Department of Nuclear Medicine, the PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: The synthesis conditions of radiopharmaceutical [N-methyl-¹¹C] Choline (¹¹C-Choline, ¹¹C-CH) with home-made ¹¹C-multifunction synthesis module by LOOP method were studied, which included the alkali equivalent, solvents and the amount of precursor. The optimum condition was 60-150 μL of precursor in LOOP without alkali equivalent and solvent, and at room temperature for synthesis of ¹¹C-CH. It could be got with radiochemical yield of (72.16±2.96)% (*n*=19, EOS of ¹¹C-CH₃I). The radiochemical purity of ¹¹C-CH was higher than 95% and the production radioactivity was (7.59±1.54) GBq(*n*=19). The synthesis of ¹¹C-CH by LOOP and on-column method on home-made ¹¹C-multifunction synthesis module was compared: 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 fully automatic, and the product synthesized by this process was suitable for clinical use.

Key words: LOOP method; full automated synthesis ; PET/CT; choline

¹¹C-胆碱(¹¹C-Choline, ¹¹C-CH)在临床诊断膀胱癌、尿路上皮癌和前列腺癌等方面有着良好应用前景^[1-6]。目前,临床研究¹¹C-CH的制备方法主要是C18柱固相合成法和液相合成法等^[7-9],液相合成法的合成时间较长,步骤较繁琐,合成效率较低^[10],不能满足临床需求;C18柱固相合成法操作简单,制备时间较短,已在临床上推广使用,取得较好的效果,但合成效率不理想^[11]。文献[12]使用LOOP环法合成¹¹C-CH,LOOP环管径较大,反应不充分,管壁产品残留多,合成效率有待提高。本研究对国产¹¹C-多功能合成模块进行改进,使用管径较小、比表面积大的聚四氟乙烯 LOOP 环(1 mm×0.5 mm×2 m),寻求在国产模块上全自动化 LOOP 环法合成¹¹C-CH,与C-18柱固相法比较,实现合成方法简单可靠,合成效率高的目的。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

自动化¹¹C多功能合成模块(PET-CM-3H-IT-I);派特(北京)科技有限公司;Endosafe-PTS细菌内毒素快速检测仪;USA Charles River公司;分析天平:AB104G型号,Switzerland Mettler Toledo公司;活度计:CRC-15R型,USA Capintec公司;分析型HPLC仪、Sep-PakC-18柱、CM柱:美国Waters公司;无菌滤膜:Merck Millipore公司。

1.2 试剂

N,N-二甲基乙醇胺、57% HI、LiAlH₄ 四氢呋喃溶液(1 mol/L):USA Sigma Aldrich公司;浓硫酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、无水乙醇:AR级,国药集团化学试剂有限公司;0.9%生理盐水:青岛华仁药业公司;灭菌注射用水:石家庄四药有限公司;乙腈、丙酮:HPLC级,USA TEDIA公司。

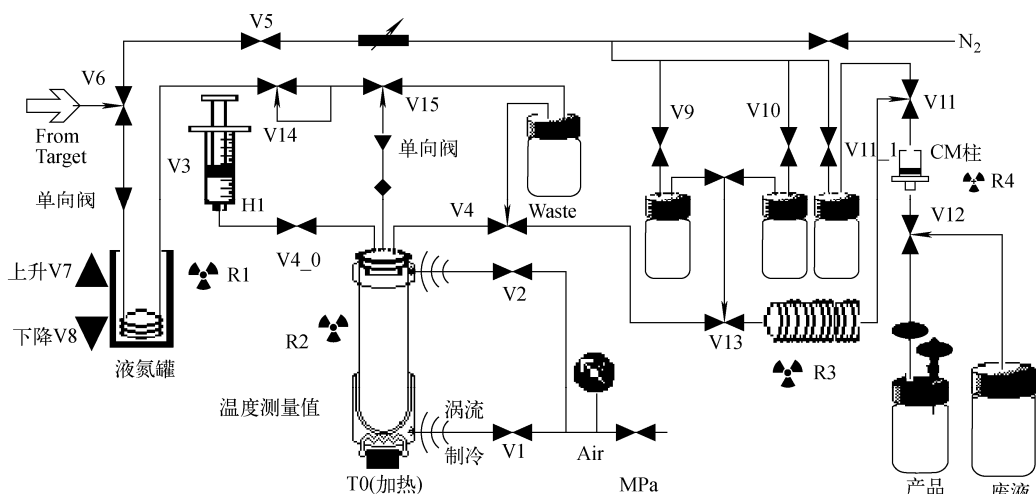
2 实验方法

2.1 ¹¹C-CH₃I的合成

参考文献[10],液相法制备¹¹C-CH₃I:HM-20加速器经¹⁴N(P, α)¹¹C核反应在回旋加速器内产生¹¹CO₂,氮气作为载气将¹¹CO₂传送到¹¹C-多功能合成模块,传送完毕,开启自动化程序,¹¹CO₂被N₂载带至反应管与0.2 mL四氢锂铝的四氢呋喃溶液(1 mol/L)反应,加热并通入N₂,除去THF,再加入0.3 mL 57%的氢碘酸,生成的¹¹C-CH₃I通入到LOOP环与前体反应。

2.2 产品的制备与纯化

前体*N,N*-二甲基乙醇胺装于LOOP环中,¹¹C-CH₃I通入到LOOP环中与前体进行反应,室温反应1 min,用乙醇溶液将LOOP环内反应液带至CM柱,经灭菌注射用水清洗,再用生理盐水将产品淋洗至无菌瓶中,自动化合成系统图示于图1。



V6, V7, V8, V3, V14, V15, V4, V4_0, V2, V1, V9, V10, V13, V11, V11_1, V12—开关阀;R1, R2, R3, R4—核素活度计;T0—加热;H1—注射

图1 ¹¹C-CH自动化合成系统

Fig. 1 Auto synthesis of ¹¹C-CH

2.3 合成效率的影响因素

2.3.1 溶剂 使用 $^{11}\text{C-CH}$ 前体量 100 μL , 选择丙酮、乙腈、乙醇各 100 μL 及无溶剂等不同的溶剂条件, 比较其合成效率。

2.3.2 前体用量 取 $^{11}\text{C-CH}$ 不同前体量(5~300 μL)装于 LOOP 环中, 通入在线生成的 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$, 室温反应, 寻求合适的前体量。

2.4 产品的实验室质量控制

检查产品外观, 精密 pH 试纸测试产品 pH, 使用 Endosafe-PTS 细菌内毒素快速检测仪检测产品的细菌内毒素, 高效气相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 $^{11}\text{C-CH}$ 的分析柱为离子交换柱(150 mm \times 7.8 mm, pH=1~3), 流动相硫酸溶液(pH=3.0, 0.01 mmol/L), 流速 1 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 碱量对 $^{11}\text{C-CH}$ 反应的影响

前体 *N,N*-二甲基乙醇胺本身提供碱催化, 与 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$ 反应生成 $^{11}\text{C-CH}$ 盐, 可以被富集在 CM 柱上, 再用乙醇、水清洗有机杂质和无机杂质。整个合成过程没有用到无机碱, 无机碱的存在会破坏 $^{11}\text{C-CH}$ 盐的生成而不易富集, 因此, 采用缓冲溶液调节产品 pH。

3.2 溶剂

反应溶剂对合成效率影响的结果列于表 1。由表 1 结果可知, 乙腈、丙酮、乙醇溶剂中的反应效率均低于无溶剂, 无溶剂反应更适合 LOOP 环法合成 $^{11}\text{C-CH}$, 本研究认为丙酮、乙腈、乙醇不适合 LOOP 环法, 合成 $^{11}\text{C-CH}$ 时选用无溶剂较好。

表 1 溶剂对合成的影响

Table 1 Effect of solvent on the synthesis

溶剂	$^{11}\text{C-CH}$ 合成效率(EOS)
丙酮	(44.01 \pm 1.19)%
乙腈	(34.02 \pm 3.40)%
乙醇	(50.77 \pm 2.42)%
无溶剂	(74.09 \pm 2.06)%

$^{11}\text{C-CH}$ 的前体 *N,N*-二甲基乙醇胺与 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$ 发生的是类似季铵盐反应, *N,N*-二甲基

乙醇胺本身为液体且极性较强, 既可以做碱催化, 也可以做溶剂, 反应前体的浓度较高, 更有利于取代反应的进行; 加入不同的溶剂时, 底物的反应浓度减小, 不利于反应的进行。本研究采用 $^{11}\text{C-CH}$ 的前体本身为溶剂的 LOOP 环法来制备 $^{11}\text{C-CH}$ 。

季铵盐具有盐的性质, 易溶于水而不易溶于非极性有机溶剂, 而在加热时易分解为叔胺和卤代烷, 熔点为 270~272 $^{\circ}\text{C}$ 。季铵盐与强碱如 KOH、NaOH 等作用得到含有季铵碱的平衡混合物。如果有醇类溶液, 由于碱金属的卤化物难溶于醇, 能将反应进行到底。季铵碱的碱性较强, 不宜直接用于临床研究。合成反应中, $^{11}\text{C-CH}$ 前体与 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$ 发生的是 $\text{S}_{\text{N}}2$ 反应, 受溶剂影响较大, 溶剂极性越大, 越有利于 $\text{S}_{\text{N}}1$ 反应, 而对 $\text{S}_{\text{N}}2$ 反应不利。 $\text{S}_{\text{N}}2$ 反应过程中, 由原来电荷比较集中的亲核试剂变成电荷比较分散的过渡态, 溶剂极性的增加使电荷集中的亲核试剂溶剂化, 降低反应效率。同时反应物浓度越高越有利于反应进行, 在这几类反应溶剂中, 无溶剂反应合成效率最高, 因而, 本研究选用无溶剂进行反应。

3.3 前体用量

前体用量对 $^{11}\text{C-CH}$ 效率的影响示于图 2。 $^{11}\text{C-CH}$ 的前体本身既可以做碱催化, 也可以做溶剂, $^{11}\text{C-CH}$ 的前体量过小, *N,N*-二甲基乙醇胺不能有效的捕获 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$, 不利于反应进行; 本研究使用的 LOOP 环可容纳的体积为 1.2 mL 左右, $^{11}\text{C-CH}$ 的前体量过大, 并不会提升合成效率, 而且有可能部分前体随着氮气流进入废液, 造成前体浪费。本研究的反应为类似季铵盐的反应, 其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, 同时浪费前体。为了保证合成效率、控制产品中前体含量, 同时降低成本, 选择 $^{11}\text{C-CH}$ 前体用量 60~150 μL 为宜。

3.4 自动化合成及质量控制

优化 $^{11}\text{C-CH}$ 自动化合成条件为: 自动合成器 LOOP 环中装有 60~150 μL 的 $^{11}\text{C-CH}$ 前体 *N,N*-二甲基乙醇胺, 通入 $^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$, LOOP 环处放射性计数稳定后, 室温静置反应; 打开

V9、V13,用8 mL乙醇溶液将 LOOP 环内的反应液带至 CM 柱,打开 V10、V13,用10 mL水清洗产品,最后打开 V11、V12,用8 mL生理盐水将产品从 CM 柱上洗脱,经无菌滤膜进入收集瓶中。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 10 min。对产品抽检进行质量控制,终产品的外观、pH、HPLC 检测放化纯度、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 C18 柱固相法进行比较,结果列于表 2。

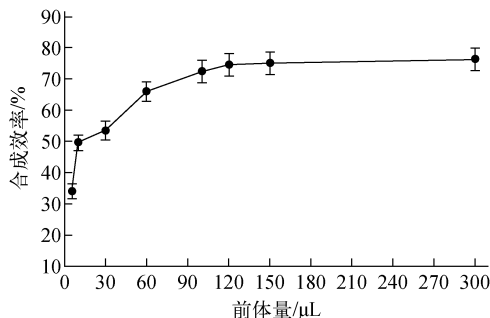


图 2 前体量对¹¹C-CH 合成效率的影响
Fig. 2 Effect of the precursor on the synthesis efficiency of ¹¹C-CH

表 2 ¹¹C-CH 的质控结果 ($n=4$)

Table 2 Results of quality control of ¹¹C-CH ($n=4$)

项目	C18 柱固相法	LOOP 环法	欧洲药典 8.0
外观	无色澄明	无色澄明	无色澄明
pH	6.5~7.0	6.5~7.0	4.5~8.5
放化纯度	>95%	>97%	>95%
乙腈残留/(mg·mL ⁻¹)	<0.2	<0.1	<0.41
丙酮残留/(mg·mL ⁻¹)	<0.7	<0.4	<5
乙醇含量/(mg·mL ⁻¹)	<4.4	<4.2	<5
细菌内毒素	<5 Eu/mL	<3.5 Eu/mL	<175/V IU/mL

3.5 LOOP 环法与 C18 柱固相法的比较

目前,临床上制备¹¹C-CH 的方法主要是 C18 柱固相合成法和液相合成法。1984 年 Diksic 等^[13]报道了¹¹C-胆碱的合成,利用 *N,N*-二甲基乙醇胺在 100 °C 加热条件下与¹¹C-CH₃I 反应 5 min,再用阳离子交换树脂纯化,经高压液相色谱(HPLC)纯化后得到¹¹C-胆碱。产品需经加热反应、HPLC 纯化后使用,此合成方法操作繁杂,不便于临床推广使用。Hara 等^[9]对 Diksic 制备方法进行了改进,合成过程仍需要加热反应、HPLC 纯化得到¹¹C-胆碱,不能满足临床需求。

Pascali 等^[8]采用 C18 柱固相合成法制备¹¹C-胆碱,前体药 *N,N*-二甲基乙醇胺与¹¹C-CH₃I 在 C18 柱上反应,再将粗产品吸附在离子交换柱 CM 柱上,进行简单纯化得到¹¹C-胆碱。此 C18 柱固相合成法简化了繁琐的合成过程,减少加热反应、HPLC 纯化等步骤,有利于临床推广使用,但其自动化程度不高,增加了

合成时间。张锦明等^[10,14]在 Pascali C18 柱固相合成法的基础上进行了改进,将前体 *N,N*-二甲基乙醇胺预装于 C18 柱上,省去再装载步骤,同时将注射器加淋洗液方法改成以氮气流为动力,实现了自动化合成¹¹C-胆碱,更有利于临床应用,但合成效率一般。何山震等^[11]通过优化标记的反应条件,以提高标记产率和生产的稳定性,但合成产率有待提高。龙婷婷等^[15]经过工艺优化,使用自制的 Light C18 柱,使¹¹C-胆碱的标记产率得到较大提升,具有一定的临床意义,在临床推广使用过程中,应保证自制的 Light C18 柱安全性。高志麒等^[16]将 PET-CS-I 合成模块小型化,使其体积缩小 80%,合成模块运行稳定,合成效率和质量同原模块无差,且缩短传输管道后,管道内残留减少,而改造后模块比较专一化,不利于开发更多放射性药物合成的用途。张政伟等^[8]尝试 LOOP 环法合成¹¹C-CH,其自制 LOOP 环管径较大,反应不充分,管壁产品残留多,合成效率受到影响。

本研究使用 LOOP 环法合成 ^{11}C -CH, 寻求一种简单可靠、合成效率高、全自动合成 ^{11}C -胆碱的方法。先对国产 ^{11}C -多功能合成模块进行改进, 使用的 LOOP 环材料为聚四氟乙烯。本研究优化了 ^{11}C -CH 的 LOOP 环法合成条件, 并与常用的 C18 柱固相合成法进行比较, 其合成效率明显提高, 结果示于图 3; 两种方法合成结果具体比较列于表 3。

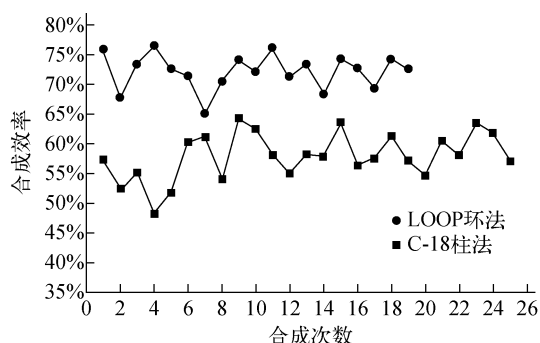


图 3 两种方法合成 ^{11}C -CH 效率的比较

Fig. 3 Comparison of two methods for the synthesis efficiency of ^{11}C -CH

表 3 ^{11}C -CH 的合成结果

Table 3 Results of synthesis of ^{11}C -CH

参数	C18 柱相法	LOOP 环法
合成效率(EOS)/%	57.36±4.04	72.16±2.96
产量/GBq	4.47±0.96	7.59±1.54
合成次数/次	25	19
最大产量/GBq	6.76	11.74
合成时间/min	13	10

改进后的 LOOP 环法制备 ^{11}C -CH, 可有效提高合成效率, 保证产品质量: 1) LOOP 环法制备 ^{11}C -CH 过程中, LOOP 环可以重复、多次使用, 同时减少了 Sep-PakC-18 柱的使用量, 降低生产药物合成成本; 2) LOOP 环, 管径较小, 比表面积大, 有利于 ^{11}C -CH₃I 与前体充分反应, 同时管壁产品残留较少, 合成效率提高, 产品的产量大大提高; 3) LOOP 环法还应用于制备 ^{11}C -乙酸盐、 ^{11}C -蛋氨酸、 ^{11}C -carfentanil 等药物的研究, 扩展了制备方法使用范围。

LOOP 环法制备 ^{11}C -CH 也有一定的局限性, 产品制备后需要对 LOOP 环进行及时清

洗, 管壁残留反应液可能会影响下次产品合成效率; LOOP 环最佳重复使用次数也有待研究。

4 结论

本研究采用 LOOP 环法合成 ^{11}C -CH, 并优化了 ^{11}C -CH 的合成条件。采用前体 *N,N*-二甲基乙醇胺本身做反应溶剂, 同时提供碱催化, 反应前体的浓度较高, 更有利于取代反应的进行; 确定 ^{11}C -CH 前体的使用量为 60~150 uL; 与文献报道的 LOOP 环法及 C18 柱固相合成法相比, 本研究的 LOOP 环法合成产量有较大提高; 缩短了制备终产品所需的时间; 减少了 C-18 柱的使用量, LOOP 环可以重复、多次利用, 降低了生产成本; LOOP 环法还应用于 ^{11}C -乙酸盐、 ^{11}C -蛋氨酸等药物研究, 扩展了制备方法使用范围; LOOP 环法制备 ^{11}C -CH 的合成效率提高至 $(72.16 \pm 2.96)\%$ ($n=19$, ^{11}C -CH₃I 未校正效率); 优化条件后合成的 ^{11}C -CH 质量控制结果符合静脉注射要求。

参考文献:

- [1] Ceci F, Castellucci P, Graziani T, et al. ^{11}C -choline PET/CT identifies osteoblastic and osteolytic lesions in patients with metastatic prostate cancer [J]. Clin Nucl Med, 2015, 40(5): e265-270.
- [2] Sánchez-Izquierdo N, Calderoni L, Farolfi A, et al. ^{11}C -Choline PET/CT detects multiple small peritoneal metastasis in a prostate cancer patient [J]. Revista Española de Med Nucl Imagen Mol, 2020, 39(2): 104-105.
- [3] Ceci F, Bianchi L, Graziani T, et al. ^{11}C -choline PET/CT and bladder cancer: lymph node metastasis assessment with pathological specimens as reference standard[J]. Clin Nucl Med, 2015, 40(2): e124-128.
- [4] Sassa N, Kato K, Abe S, et al. Evaluation of ^{11}C -choline PET/CT for primary diagnosis and staging of urothelial carcinoma of the upper urinary tract: a pilot study[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 41(12): 2232-2241.
- [5] Nozaki K, Kawai T, Fujimura T, et al. Carbon 11-choline positron emission tomography/computed tomography and palliative local therapy for castration-resistant prostate cancer[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(10): 1763-1769.

- [6] Giovacchini G, Guglielmo P, Mapelli P, et al. ¹¹C-choline PET/CT predicts survival in prostate cancer patients with PSA < 1 NG/ml[J]. Eur J Nucl Med, 2019, 46(4): 921-929.
- [7] Cheung M K, Ho C L. A simple, versatile, low-cost and remotely operated apparatus for [¹¹C] acetate, [¹¹C] choline, [¹¹C] methionine and [¹¹C] PIB synthesis[J]. Appl Radiat Isot, 2009, 67(4): 581-589.
- [8] Pascali C, Bogni A, Iwata R, et al. [¹¹C]Methylation on a C18 Sep-Pak cartridge: a convenient way to produce [N-methyl-¹¹C]choline[J]. J Labeled Compd Radiopharm, 2000, 43: 195-203.
- [9] Hara T, Yuasa M. Automated synthesis of [¹¹C] choline, a positron-emitting tracer for tumor imaging[J]. Appl Radiat Isot, 1999, 50(3): 531-533.
- [10] 张锦明, 田嘉禾, 王武尚, 等. 单管法自动化合成¹¹C-碘代甲烷[J]. 中华核医学杂志, 2004, 24(4): 51-52.
Zhang Jinming, Tian Jiahe, Wang Wushang, et al. Automated production and preliminary clinical application of ¹¹C-choline[J]. Chin J Nucl Med, 2004, 24(4): 51-52(in Chinese).
- [11] 何山震, 王淑侠, 徐卫平, 等. 单管法¹¹C-CH₃I的合成条件优化及胆碱生产与临床应用[J]. 同位素, 2010, 23(3): 166-169.
He Shanzhen, Wang Shuxia, Xu Weiping, et al. Optimizing conditions of ¹¹C-CH₃I production in single vessel, synthesis and clinical application of ¹¹C-choline[J]. Journal of Isotopes, 2010, 23(3): 166-169(in Chinese).
- [12] 张政伟, 薛方平, 刘平, 等. 国产¹¹C多功能模块在¹¹C标记药物中的应用研究[J]. 中国医疗设备, 2009, 24(8): 5-7.
Zhang Zhengwei, Xue Fangping, Liu Ping, et al. The application of the homemade ¹¹C-module in the ¹¹C labeling radiopharmaceuticals[J]. China Medical Devices, 2009, 24(8): 5-7(in Chinese).
- [13] Diksic Y, Yamamoto L, Feindel W. Synthesis of ¹¹C-labeled choline[J]. J Labelled Comp Radiopharm, 1984, 14: 9-15.
- [14] 陈立光, 唐安戊, 王淑侠, 等. ¹¹C-胆碱在线自动合成和生物体内分布[J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2005, 11(3): 181-183.
Chen Liguang, Tang Anwu, Wang Shuxia, et al. The on-line automatic synthesis and biodistribution of ¹¹C-choline[J]. J Modern Clin Med Bioengineering, 2005, 11(3): 181-183(in Chinese).
- [15] 龙婷婷, 周明, 杨能安, 等. 肿瘤显像药物¹¹C-胆碱的合成工艺优化研究[J]. 肿瘤药学, 2018, 8(3): 324-328.
Long Tingting, Zhou Ming, Yang Nengan, et al. Process development for the synthesis of ¹¹C-choline as tumor imaging agents[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2018, 8(3): 324-328(in Chinese).
- [16] 高志麒, 张勇平, 徐俊彦, 等. ¹¹C-胆碱合成模块小型化及其应用[J]. 上海医学影像, 2012, 21(4): 252-256.
Gao Zhiqi, Zhang Yongping, Xu Junyan, et al. Miniaturization of the ¹¹C-choline synthesis module and its application[J]. Shanghai Medical Imaging, 2012, 21(4): 252-256(in Chinese).