

## 3'-脱氧-3'-[<sup>18</sup>F]氟代胸腺苷自动化合成效率的影响因素

张锦明<sup>1</sup>, 田嘉禾<sup>1</sup>, 刘长滨<sup>1</sup>, 刘 健<sup>1</sup>, 罗志刚<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军总医院 核医学科, 北京 100853;

2. 南京江原安迪科正电子研究发展有限公司, 江苏 南京 210016)

**摘要:** 为提高<sup>18</sup>F-FLT 合成效率及其纯度, 研究了以 N-BOC 为前体, 利用国产多功能合成器自动化合成<sup>18</sup>F-FLT 时各种因素对合成效率及化学纯度和放化纯度的影响。结果显示, 前体的化学量和合成体系中水的残留明显影响<sup>18</sup>F-FLT 的合成效率。增加 N-BOC 前体量, 可明显提高合成效率; 体系中残留水的存在明显降低合成效率; 催化剂中碱的含量也会影响合成效率, 最佳碱用量为前体与碱的摩尔比为 1 : 1; 半制备柱的平衡与否会影响产品的分离效率, 从而影响产品的放化纯度, 8% 乙醇流动相则降低了产品的化学纯度。以上结果提示, 使用国产多功能模块, 通过优化合成参数, 可明显提高<sup>18</sup>F-FLT 的合成效率, 提高放化纯度和化学纯度。

**关键词:** <sup>18</sup>F-FLT; 肿瘤显像剂; 影响因素; 合成效率

中图分类号: TQ463.7 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)03-0160-05

## Influence Factor on Automated Synthesis Yield of 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F] fluorothymidine

ZHANG Jin-ming<sup>1</sup>, TIAN Jia-he<sup>1</sup>, LIU Chang-bin<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>1</sup>, LUO Zhi-gang<sup>2</sup>

(1. Department Nuclear Medicine, The PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. JYAMS Ltd., Nanjing 210016, China)

**Abstract:** 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F] fluorothymidine (<sup>18</sup>F-FLT) was prepared from N-BOC precursor to improve the synthesis yield, chemical purity and radiochemical purity of <sup>18</sup>F-FLT by home-made automated synthesis module. The results showed that residual water in synthesis system and the amount of precursor could affect the synthesis yield dramatically. The more the amount of precursor, the higher the synthesis yield of N-BOC. The residual water can decrease the synthesis yield. In the presence of excess base, the precursor was consumed by elimination before substitution was completed. The precursor to base was optimal in 1 to 1. The balance of semi-preparative HPLC Column can affect purified the final <sup>18</sup>F-FLT product. The chemical purity of <sup>18</sup>F-FLT could be decreased with 8% EtOH as mobile phase in semi-preparative HPLC. The high chemical purity, radiochemical purity and syn-

thesis yield could be obtained by optimized the parameter of synthesis with home-made automated synthesis module.

**Key words:** <sup>18</sup>F-FLT; tumor imaging agent; influence factor; synthesis yield

<sup>18</sup>F-FDG 是目前应用最广泛的正电子肿瘤显像剂,但由于它本身为非特异性显像剂,在临床诊断中受到一定的限制。3'-脱氧-3'-[<sup>18</sup>F]氟代胸苷(<sup>18</sup>F-FLT)在体内无降解,在胸腺嘧啶核苷激酶的作用下发生磷酸化后滞留在细胞内,参与 DNA 补救合成,从而反映细胞 DNA 的合成和细胞的增殖状态,是一种有应用前景的特异性肿瘤显像剂<sup>[1]</sup>。

文献报道了多种合成<sup>18</sup>F-FLT 的方法,但大部分合成过程复杂、合成效率低。Yun M 等<sup>[2]</sup>报道了用 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基)-β-D-苏型-呋喃戊糖基]胸苷(N-BOC 前体)作前体合成<sup>18</sup>F-FLT,虽然该前体的合成过程较复杂,但亲核反应温度低,在乙腈溶剂中反应时间较短,亲核效率高达 80%。Oh 等<sup>[3]</sup>使用该前体,在开放式亲核模块中实现了<sup>18</sup>F-FLT 的自动化合成,并利用半制备 HPLC 纯化<sup>18</sup>F-FLT,最终合成效率为 50.5%。N-BOC 前体的优点为合成效率高,但前体量较大,一般为 30~40 mg,影响反应的因素较多,合成的成功率偏低。本研究尝试采用较少量的前体,采用国产氟多功能合成模块自动合成<sup>18</sup>F-FLT,并系统地研究可能影响合成效率的因素。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

H<sub>2</sub><sup>18</sup>O: 丰度 95%, 美国 Isotec 公司产品; 无水乙腈、氨基聚醚 K<sub>2.2.2</sub> 以及 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 美国 Aldrich 公司产品; Sep-Pak QMA 及 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 柱: 美国 Waters 公司产品; N-BOC 前体: 德国 ABX 公司和江苏华益化工有限公司产品; NaOH 和 HCl: 均为北京化工厂产品。

Sumitomo HM-20S 加速器: 日本驻友集团产品; MF-2V 氟多功能合成模块: 派特(北京)科技有限公司产品,配放射性检测器和半制备 HPLC, 626 双泵, UVIS200 紫外分光光度计(Alltech 公司), 半制备 Grace Alltima C-18(10 mm × 250 mm) HPLC 柱; 液相色谱串联质谱(LS/MS/MS): API2000, 美国应用生物系统公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 <sup>18</sup>F-FLT 的自动化合成

采用国产氟多功能合成模块合成<sup>18</sup>F-FLT。合成流程示于图 1, 合成线路示于图 2。

合成<sup>18</sup>F-FLT 步骤如下: Sumitomo HM-20S 加速器生产的<sup>18</sup>F<sup>-</sup>被 QMA 捕获后, 经 K<sub>2.2.2</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 乙腈水溶液洗脱入反应管, 共沸除

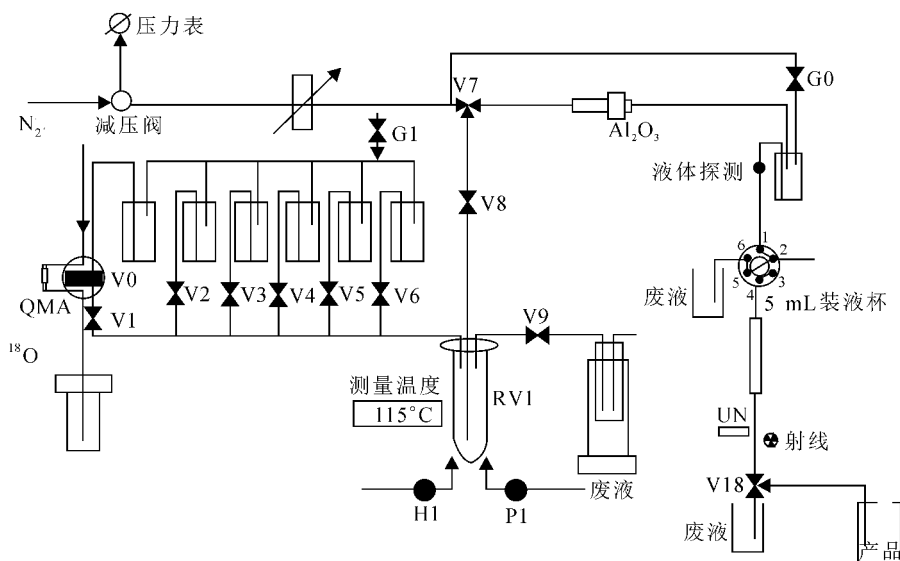
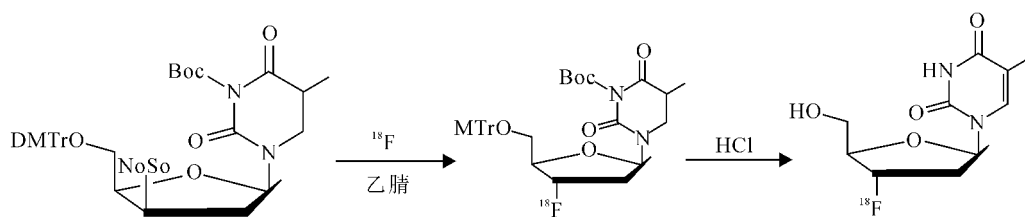


图 1 自动化模块合成<sup>18</sup>F-FLT 流程示意图

图 2  $^{18}\text{F}$ -FLT 合成线路图

水至干,再加入 2 mL 乙腈共沸除水至干。反应管内加入 0.5 mL 无水乙腈溶解的 10~30 mg N-BOC 前体,溶液马上变成淡黄色,100 °C 加热 5 min,除乙腈后加入 1 mL 1 mol/L HCl,在 70~120 °C 下水解 5 min,溶液变成透明橙红色。加入氢氧化钠中和,溶液又变成乳白色。将所得产物过中性铝柱,再用制备型 HPLC 分离,流动相为 8%~10% 乙醇,流速为 6 mL/min,收集有效组分,过无菌滤膜即可。整个合成过程约 45 min,计算校正合成效率(EOB)。

## 2.2 $^{18}\text{F}$ -FLT 纯度分析

采用 Waters 分析型 HPLC 分析其化学纯度和放化纯度。HPLC 内配 515 泵,2487 紫外检测器,Alltech Appollo 柱(150 mm × 4.65 mm),Bioscan 公司分析型 Flow-Count。流动相为 10% 的乙醇水溶液,流速为 1 mL/min。

水解的腺苷  $t_{\text{R}}=2.8$  min,游离  $^{18}\text{F}^-$  的  $t_{\text{R}}=2.1$  min, $^{18}\text{F}$ -FLT 的  $t_{\text{R}}=5.3$  min,未水解中间体的  $t_{\text{R}}=13$  min。

## 3 结果与讨论

### 3.1 N-BOC 前体量对合成效率的影响

选择不同化学量的 N-BOC 前体,固定  $\text{K}_{2.2.2}$  与  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的摩尔比为 10 : 1.4,水解温度为 70 °C,10% 的乙醇水溶液为流动相,观察前体 N-BOC 用量对合成效率的影响。结果显示,N-BOC 前体用量分别为 10、20 和 30 mg 时,合成效率分别为 20.2% ( $n=3$ )、26.3% ( $n=20$ ) 和 45.3% ( $n=3$ )。

$^{18}\text{F}^-$  在无水条件下经  $\text{K}_{2.2.2}$  催化,与 N-BOC 前体发生  $\text{S}_{\text{N}}2$  亲核反应, $^{18}\text{F}^-$  从背后进攻五元环 3' 位上的碳,取代对硝基苯磺酰酯,同时构型发生变化。这是典型的  $\text{S}_{\text{N}}2$  亲核反应,反应速率与反应物浓度呈正比。从本实验结果可以看

出,固定反应体积后,随前体量增加,产率也在不断升高;当前体量达到 30 mg 时,产率可达 45.3%,该结果与 Yun M 等<sup>[2]</sup> 采用相同量前体时产率为 40%~42% 一致。考虑 N-BOC 前体合成过程较复杂,且价格较昂贵,因此推荐前体 N-BOC 的用量为 20 mg,在该化学量下也可获得较理想的合成效率。

此外,ABX 和江苏华益公司的 N-BOC 前体在外观上有一定的区别,ABX 的前体为淡黄色粉末,江苏华益公司的前体为淡黄色晶体;经乙腈溶解后后者颜色略深于前者,但最终合成效率无明显区别( $P<0.01$ ),合成产品放化纯度也无明显区别。

### 3.2 催化剂中 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 量对合成效率的影响

固定 N-BOC 前体用量为 20 mg,改变相转移催化剂中  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的用量,观察  $\text{K}_2\text{CO}_3$  用量对  $^{18}\text{F}$ -FLT 合成效率的影响。结果显示,采用常规合成  $^{18}\text{F}$ -FDG 时所用催化剂的量,即  $\text{K}_{2.2.2}$  混合液中  $\text{K}_{2.2.2}$  与  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的摩尔比为 0.75,其余条件同 3.1 节,合成效率为 13.7% ( $n=3$ );升高  $\text{K}_{2.2.2}$  与  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的摩尔比为 2.4,其合成效率可提高到 26.3% ( $n=20$ )。

与合成  $^{18}\text{F}$ -FDG 时容易产生消除反应一样<sup>[4]</sup>,合成  $^{18}\text{F}$ -FLT 时, $^{18}\text{F}^-$  取代对硝基苯磺酰酯的同时,在碱性条件下很容易发生消除反应<sup>[5]</sup>。本实验中 HPLC 分析表明:N-BOC 前体与碱的摩尔比为 0.1 时,在加热条件下,N-BOC 前体很快转变成 2 位消除的副产物,5 min 内 97%~99% 的 N-BOC 前体分解;N-BOC 前体与碱的摩尔比为 1 时,5 min 时仍有 50% 的 N-BOC 保持原形。

### 3.3 系统中残留水对合成效率的影响

固定  $\text{K}_{2.2.2}$  与  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的摩尔比为 10 : 1.4,水解温度为 70 °C,10% 的乙醇为流动相,N-BOC 前体 20 mg。除水时,在可视化氟多功能

模块系统<sup>[6]</sup>中观察到反应瓶内有少量残留溶液,此时合成效率明显下降到 7.2%,甚至合成失败。另外,通过颜色的变化也能判断水对反应的影响,加入前体后如果溶液颜色立即变成紫红色,再变为淡黄色,最后变成棕黑色,此时标记率不高,只有 10%~20% (11.5%,  $n=4$ ),测纯化柱  $Al_2O_3$  柱上放射性均大于 50%;如果加入前体溶液颜色直接为淡黄色,再变为棕黑色,此时合成效率明显升高,达到 20%~30% (平均 26.3%,  $n=20$ ),纯化柱  $Al_2O_3$  柱上放射性约为 40%~50%。与合成 <sup>18</sup>F-FDG 相比<sup>[7]</sup>,<sup>18</sup>F-FLT 合成受系统中残留水影响更大。主要原因为残留的水环绕在 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 周围,使 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 的亲核性大大下降,同时在碱性条件下,水电离产生的  $OH^-$  与 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 竞争发生亲核反应,消耗了大量前体。因此,合成 <sup>18</sup>F-FLT 时,必须保证除水彻底。

### 3.4 水解温度对合成效率的影响

固定  $K_{2.2.2}$  与  $K_2CO_3$  的摩尔比为 2.4, N-BOC 前体用量为 20 mg,水解温度为 70 或 110 °C。结果显示,两种不同水解温度下合成效率无明显区别,均为约 26.3%。合成完毕,改用 98% 的乙醇水溶液为半制备 HPLC 流动相,4 min 后出现一放射性峰,收集测量其放射性活度,发现水解温度为 70 °C 时收集的淋洗液放射性占总放射性的 1.0%,而水解温度为 110 °C 时淋洗液放射性占总放射性的 2.8%。

经分析型 HPLC 证实,采用 98% 乙醇淋洗的放射性峰的保留时间为 13 min,为未水解的中间体。由此可见,两种温度对水解的影响不大,常规合成时可在 70 °C 下水解,但水解温度不能低于该值。文献<sup>[5]</sup>在 45~50 °C 下水解,5 min 内仅有 40% 的水解。

### 3.5 HPLC 流动相对分离效果的影响

采用 8% 和 10% 两种浓度的乙醇作流动相,流速均为 6 mL/min,其半制备 HPLC 分离的紫外谱图示于图 3。由图 3 可知,<sup>18</sup>F-FLT 产品在 HPLC 柱上的  $t_R$  有所改变。当采用 8% 的乙醇时,产品放射性峰的  $t_R$  为 12 min;当乙醇的浓度提高到 10% 时,产品放射性峰的  $t_R$  为 8.5 min。从放射性峰的  $t_R$  看,降低流动相中乙醇的浓度,有利于将产品与 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 分开。降低乙醇浓度,副产物或胸腺嘧啶核苷的保留时间也后移(图 3a),12 min 收集产品时,仍有副产物或胸腺嘧啶核苷的峰;而采用 10% 的乙醇作为流动相,7 min 后几乎没有副产物或胸腺嘧啶核苷的峰(图 3b)。虽然目前没有研究结果证实副产物或胸腺嘧啶核苷是否会影响肿瘤对 <sup>18</sup>F-FLT 摄取,但作为化学杂质,其含量应尽量减少,因此在常规合成时建议采用 10% 乙醇作流动相。

### 3.6 HPLC 柱平衡时间对分离效果的影响

半制备 HPLC 分离柱的平衡与否会影响产品的纯化分离效果,一般 HPLC 柱采用长时间、低流速平衡。图 4 为 <sup>18</sup>F-FLT 合成时不同平衡时间分离的放射性 HPLC 图谱。由图 4a 可以看出,<sup>18</sup>F-FLT 的  $t_R$  为 348 s,与 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 很近;收集的产品经 HPLC 分析,放化纯度仅为 89.2%。10% 乙醇的产品淋洗液再经  $Al_2O_3$  柱纯化后,放化纯度仍无改变,其原因为半制备 HPLC 分离柱没有充分平衡。由图 4b 可以看出,半制备 HPLC 分离柱充分平衡后,产品的  $t_R$  为 516 s,放化纯度大于 99%。

研究<sup>[2]</sup>发现,样品的 pH 也影响产品的  $t_R$ ,因此,合成 <sup>18</sup>F-FLT 时,保证所进样品的 pH 呈中性。

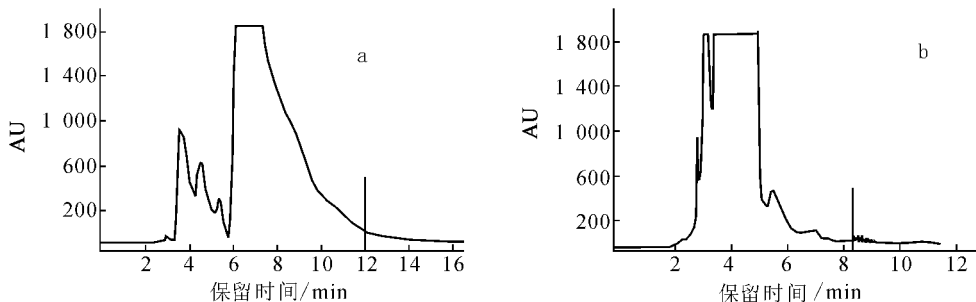


图 3 不同流动相时前体水解物 HPLC 分离紫外图

a——8%乙醇;b——10%乙醇

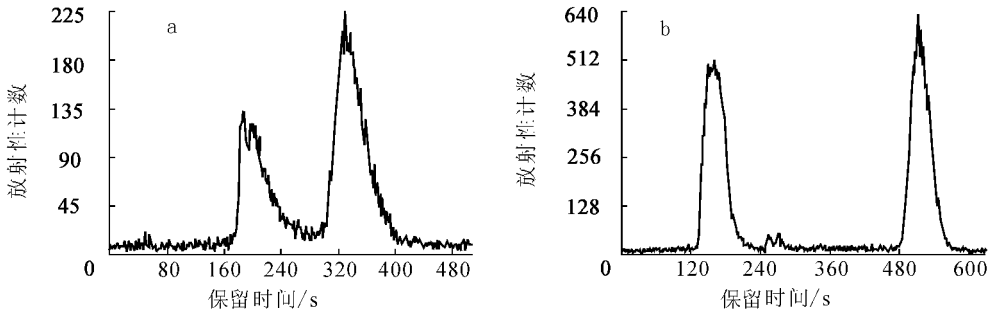


图 4 平衡时间对 HPLC 柱分离效果的影响

a——未平衡;b——平衡充分

## 4 小 结

(1) 由于 N-BOC 前体量对合成效率有明显影响,综合考虑价格和合成效率因素,较佳的 N-BOC 前体量为 20 mg,合成率可达 26.3%。

(2) 亲核反应前残留的水会明显降低<sup>18</sup>F-FLT 的合成效率,因此应确保亲核反应前反应瓶内无水残留。

(3) 催化剂中碱的用量明显导致 N-BOC 前体的消除反应,从而降低合成效率。前体与碱的摩尔比应大于 1.0,可获得较高的合成效率。

(4) 70 与 110 °C 的酸水解温度对合成效率无明显影响。

(5) 半制备 HPLC 纯化分离<sup>18</sup>F-FLT 时,应充分平衡 HPLC 分离柱;为提高产品的化学纯度,应用 10%乙醇作流动相。

## 参考文献:

[1] Been LB, Suurmeijer A, Connem D, et al. <sup>18</sup>F-FLT-PET in oncology: current status and opportunities[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31: 1 659-1 672.

[2] Yun M, Jun Oh SJ, Ha HJ, et al. High radiochemical yield synthesis of 3'-deoxy-3' -[<sup>18</sup>F]-

fluorothymidine using (5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxy-3'-O-nosyl-β-D-threo pentofuranosyl) thymine and its 3-N-BOC-protected analogue as a labeling precursor[J]. *Nucl Med Biol*, 2003, 30: 151-157.

[3] Oh SJ, Mosdzianowsk C, Chi DY, et al. Fully automated synthesis system of 3'-deoxy-3' -[<sup>18</sup>F]fluorothymidine [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31: 803-809.

[4] Chirakal R, McCarry B, Lonergan M, et al. Base-mediated decomposition of amannose triflate during the synthesis of 2-deoxy-2-<sup>18</sup>F-fluoro-D-glucose [J]. *Appl Radiat Isot*, 1995, 46 (3): 149-155.

[5] Suehiro M, Vallabhajosula S, Stanley J, et al. Investigation of the role of the base in the synthesis of [<sup>18</sup>F]FLT [J]. *Appl Radiat Isot*, 2007, 65: 1 350-1 358.

[6] 张锦明,田嘉禾,于生民,等. 可视化、双反应管氟-18 多功能自动化合成模块:中国, 200910119295. 3[P]. [2008-12-10]

[7] 张锦明,张文书,田嘉禾,等. 影响 2-<sup>18</sup>F-2-脱氧-β-D-葡萄糖合成效率因素初探[J], *同位素*, 2003, 16 (1): 30-34.