

文章编号:0253-9950(2008)01-0029-05

自动化合成 *N*-琥珀酰亚胺-4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸酯

刘晓飞,张锦明*,田嘉禾,陈英茂

解放军总医院 核医学科,北京 100853

摘要:通过自动化多功能化学合成模块,在线合成 *N*-琥珀酰亚胺-4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸酯($[^{18}\text{F}]$ SFB)。标记前体 4-三甲基胺苯甲酸乙酯三氟甲基磺酸盐与干燥的 $^{18}\text{F}^-$ 发生亲核反应,生成 4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸乙酯,碱水解得到 4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸($[^{18}\text{F}]$ FBA),经 Sep-Pak C18 固相柱分离,加 *O*-(*N*-琥珀酰亚胺)*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸盐(TSTU)乙腈溶液反应,生成 $[^{18}\text{F}]$ SFB, Sep-Pak C18 固相柱分离得纯 $[^{18}\text{F}]$ SFB。在 115 °C,密封条件间隔通氮气加热 10 min 亲核反应,用 NaOH 水解保护基团,得到 $[^{18}\text{F}]$ SFB 的不校正合成效率为(28.2±1.9)% ($n=5$),放射化学纯度大于 90%,总的合成时间为 45 min。

关键词: $[^{18}\text{F}]$ SFB; 自动化; 多功能化学合成模块

中图分类号:O628.51 文献标志码:A

Automatic Synthesis of *N*-Succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]$ Fluorobenzoate

LIU Xiao-fei, ZHANG Jin-ming*, TIAN Jia-he, CHEN Ying-mao

Department of Nuclear Medicine, The PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract: *N*-succinimidyl-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoate($[^{18}\text{F}]$ SFB) was prepared using a multifunction chemistry process control unit module. The dried $\text{K}_{222}/^{18}\text{F}^-$ was resolubilized with a solution of 4-trimethylammoniumbenzoate trifluoromethane-sulfonate and reacted to produce ethyl-4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoate. The ethylester was subsequently hydrolyzed using alkali to obtain the 4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoic acid($[^{18}\text{F}]$ FBA). After purifying through Sep-Pak C18 cartridge, $[^{18}\text{F}]$ FBA was dissolved with TSTU in CH_3CN and reacted to produce $[^{18}\text{F}]$ SFB. The nucleophilic reaction reated for 10 min at 115 °C in the covered vial, mixturing solvents with nitrogen for several seconds and the ethylester was subsequently hydrolyzed using alkali. The decay-corrected yields of $[^{18}\text{F}]$ SFB were much higher. The radiochemical yield of $[^{18}\text{F}]$ SFB is (28.2±1.9)% ($n=5$), and radiochemical purity of $[^{18}\text{F}]$ SFB is more than 90%. The whole reaction time is only 45 min from $^{18}\text{F}-\text{F}^-$ to $[^{18}\text{F}]$ SFB. The whole reaction time can be shorten and the yield of product is high by using the multifunction chemistry process control unit module. It is a quick and highly efficient method for labeling bioactive compound.

Key words: $[^{18}\text{F}]$ SFB; automatic; multifunction chemistry process control unit module

N-琥珀酰亚胺-4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸酯($[^{18}\text{F}]$ SFB)是适用于标记肽、蛋白质和抗体等生物活性分子的酰化基团^[1-2]。目前合成 $[^{18}\text{F}]$ SFB的常用方法是以 4-三甲基胺苯甲酸乙酯三氟甲基磺

酸盐为起始原料,亲核反应得到 4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸乙酯,碱性条件下水解得到 $[^{18}\text{F}]$ FBA,然后在 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)催化下与 *O*-(*N*-琥珀酰亚胺)*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸盐

收稿日期:2007-05-21;修订日期:2007-10-10

作者简介:刘晓飞(1982—),男,河南许昌人,硕士研究生,核医学及其药物研究专业

* 通讯联系人:张锦明,江苏南通人,研究员,放射性药物专业,zhangjm301@yahoo.com.cn

(TSTU)连接得到 $[^{18}\text{F}]$ SFB。

商品化 ^{18}F 的多功能合成均为单个反应管,不能用于像 $[^{18}\text{F}]$ SFB这样复杂标记物的合成。全自动合成有一定的难度,为了高效、快速合成短寿命的正电子核素药物,得到较稳定的合成效率,自动化合成是首选。Mading等^[3]首先采用GE公司双系统TRACERlab Fx FDG模块,对FDG模块进行了改造,合成效率为34%~38%,合成时间为68 min。Marik等^[4]同样采用Siemens/CTI双系统FDG合成模块(CPCU),合成效率为46%。本工作拟采用自行研制的1个双反应管的多功能化学合成模块,通过固相分离提取的方法纯化中间体和最终产物,并优化反应条件,在此模块上实现 $[^{18}\text{F}]$ SFB的自动化合成。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

H_2^{18}O , 丰度95%, 美国Isotec公司产品; 4, 7, 13, 16, 21, 24-六氧杂-1, 10二氮双环[8, 8, 8]二十六烷(K_{222})为分析纯, 德国ABX公司; NaOH, HCl为分析纯, 乙醚、三氟乙酸(TFA)为HPLC级, 均为北京化工厂产品; 三氟甲基磺酸甲酯($\text{CH}_3\text{CF}_3\text{SO}_3$)、对氟苯甲酸(FBA)、*O*-(*N*-琥珀酰亚胺)*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸盐(TSTU)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、*N,N'*-二环己基碳酰亚胺(DCC)、二甲基亚砷(DMSO)、*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)均为分析纯, 美国Alfa Aesar公司产品; 4-*N,N*-二甲基苯甲酸乙酯、无水乙腈为HPLC级, 美国Sigma-Aldrich公司产品; 硅胶板, 英国Whatman公司产品; Sep-Pak QMA柱, C18 Sep-Pak柱, 美国Waters公司产品。

RDS111加速器, 美国CTI公司; 双反应管 ^{18}F 多功能化学合成单元(chemistry process control unit), 自行研制; 活度计和放射性薄层扫描仪(Radio-TLC), 美国Bioscan公司; 高效液相色谱系统, 美国Waters公司, 配有Waters 515泵; 2487检测器, Bioscan flow-count放射性检测系统, 美国Bioscan公司; UNITY INOVA 600超导核磁共振谱仪, 美国Varian公司; WRS-IA数字熔点仪, 上海物理光学仪器厂; RE-52B旋转蒸发器, 上海青浦沪西仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 4-三甲基胺苯甲酸乙酯三氟甲基磺酸盐的制备 合成路线^[5]示于图1。将1.9 g (7.4 mmol)反应物1溶于20 mL乙醚, 然后向其中加入0.8 mL反应物2 (7.0 mmol), 用氩气饱和后密封, 室

温下反应6 h。反应结束后, 用布什漏斗抽滤, 经乙醚重结晶2次, 乙醚挥发后得到化合物3。

1.2.2 SFB的化学合成 SFB的合成路线^[5]示于图2。将1.05 g对氟苯甲酸(7.5 mmol), 0.86 g NHS (7.5 mmol), 20 mL THF加入用氩气饱和的三颈瓶中, 搅拌, 使之完全溶解, 然后慢慢加入DCC (1.55 g, 7.5 mmol溶于10 mL THF), 0℃冰浴下反应2 h。用15 mL冷冻THF洗涤3次, 抽滤除去生成的脲沉淀, 旋转蒸发器蒸干THF, 得到白色粉末, 蒸干滤液, 再经无水乙醇重结晶, 得到白色片状固体产物, 抽滤固体产物, 并用9 mL无水乙醇洗涤3次, 真空干燥, 得到目标产物*N*-琥珀酰亚胺-4- $[^{18}\text{F}]$ 氟苯甲酸酯。

1.2.3 $^{18}\text{F-F}^-$ 的生产 多功能化学合成模块示意图示于图3。采用RDS111医用回旋加速器通过 $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ 核反应, 应用小体积 $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ 靶, 用11 MeV, 25 μA 的质子束流连续轰击靶10 min。用气动方式将 $^{18}\text{F-F}^-$ 传输到多功能自动化化学合成模块中, $^{18}\text{F-F}^-$ 被吸附到Sep-Pak Light QMA柱上, 等待被淋入反应管中。

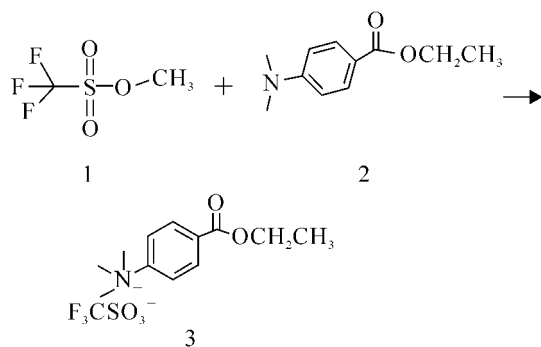


图1 4-三甲基胺苯甲酸乙酯三氟甲基磺酸盐的合成路线

Fig. 1 Route for synthesis of 4-trimethylammoniumbenzoate trifluoromethane-sulfonate

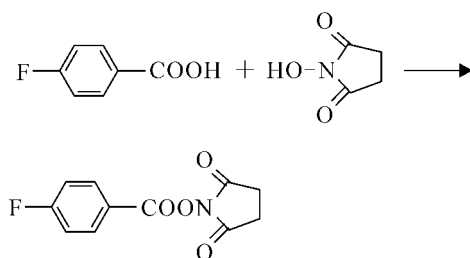


图2 SFB的合成路线

Fig. 2 Route for synthesis of SFB

1.2.4 [¹⁸F]SFB 的制备 [¹⁸F]SFB 的合成路线示于图 4。按照图 3, 将 B1 中的 K₂₂₂/K₂CO₃ (17.7 mg K₂₂₂, 4.2 mg K₂CO₃ 溶于 95% 乙腈溶液) 通过 QMA 柱, 将吸附在 QMA 柱上的 ¹⁸F-F⁻ 淋入 1 号反应管 (RV1), 通入氮气并加热, 将 RV1 内溶液蒸干; 将 B2 中 2 mL 无水乙腈加入 RV1, 重复以上步骤, 通气和加热, 将 RV1 内溶液蒸干; 冷却 RV1 至 40 °C 左右, 将 B3 中化合物 3 的溶液 (15.6 μmol 溶于 0.5 mL 无水 DMSO) 加入 RV1, 115 °C 反应 600 s, 每 200 s 用氮气流将溶液混合 1 次, 每次 5 s; 向 RV1 中加入 B4 中的 0.5 mL 0.5 mol/L NaOH, 115 °C 反应水解 300 s, 每 100 s 用氮气流将溶液混合 1 次, 每次 5 s。将 B5 中的 HCl (0.1 mol/L, 15 mL) 加入反应管

RV1, 中和碱。将反应管内液体转移出, 过第一个 C18 柱, [¹⁸F]FBA 吸附在 C18 柱上, 废液进废液瓶; 用 90 °C 氮气流干燥 C18 柱; 用 B6 中 2 mL 无水乙腈将 C18 柱上的 [¹⁸F]FBA 洗脱到 2 号反应管 (RV2) 中; 向 RV2 中通入氮气并加热, 共沸除去水分至干; 再将 B7 中的 DIPEA (15 μL 溶于 0.5 mL 无水乙腈) 加入 RV2, 通氮气并加热, 将 RV2 内液体蒸干, 冷却 RV2; 将 B8 内 TSTU (12~15 mg, 溶于 0.5 mL 无水乙腈) 加入 RV2 中, 100 °C 下密封反应 300 s; 将 B9 中 3 mL 5% 的乙酸与 10 mL H₂O 的混合溶液酸化, 反应液过第 2 个 C18 柱; 再用 90 °C 氮气流吹干 C18 柱; 最后, 用 2 mL 乙腈洗脱 C18 柱得到 [¹⁸F]SFB。

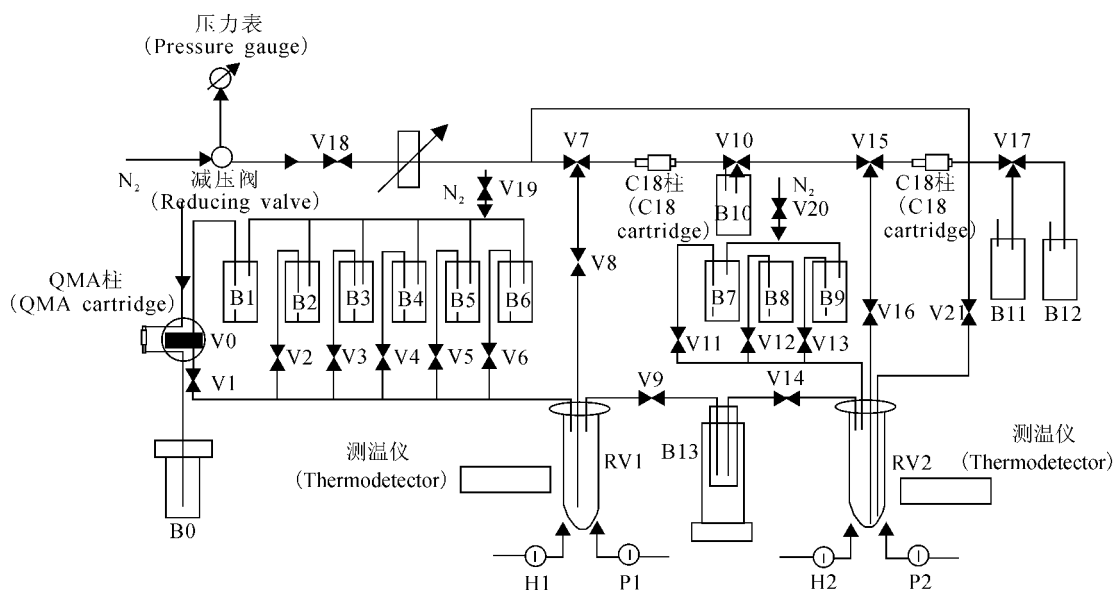


图 3 多功能化学合成模块示意图

Fig. 3 Scheme of the module for the synthesis of [¹⁸F]SFB

B1~B9——试剂瓶 (Reagent bottle); B0, B10, B11——废液瓶 (Waste bottle); B12——产品瓶 (Product bottle); B13——废气瓶 (Waste gas bottle); V0——二位六通液体阀 (Six-way joint liquid valve); V1~V6, V8, V9, V11~V14, V16——二通液阀 (Two-way joint liquid valve); V7, V10, V15, V17——三通阀 (Three-way joint valve); V18~V21——气体阀 (Gas valve); H1, H2——加热开关 (Heating button); P1, P2——冷却开关 (Cooling button); RV1, RV2——反应管 (Reaction vessel)

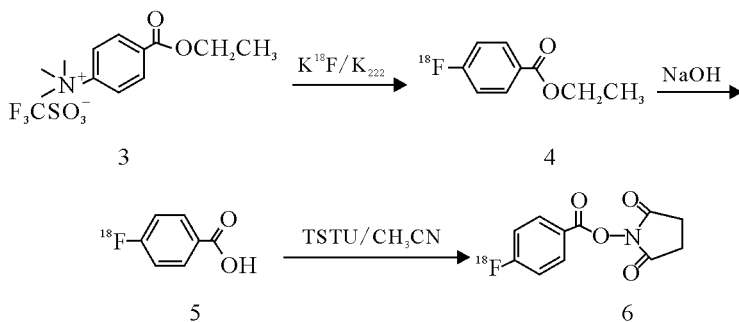


图 4 [¹⁸F]SFB 的合成路线

Fig. 4 Scheme for synthesis of [¹⁸F]SFB

1.2.5 产物的分析 毛细管吸取少量乙腈洗脱液点硅胶板,用 $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 4 : 1$ 的混合溶液作流动相放入层析缸展开,待流动相展开到硅胶板 $3/4$ 处,晾干,进行薄层扫描,测定产物的放射化学纯度并计算 R_f 值。

HPLC 分析的实验条件:分析柱 Vydac 218TP510 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) 218 nm ,梯度淋洗流速为 1 mL/min 。95% 溶剂 A (0.1% TFA 溶于水)和 5% 溶剂 B (0.1% TFA 溶于乙腈)保持 2 min, 30 min 内过渡到 35% 溶剂 A 和 65% 溶剂 B。用紫外检测器和放射性检测器分析鉴别产物。

2 结果和讨论

2.1 化合物的鉴定

标记前体化合物 4-三甲基胺苯甲酸乙酯三氟甲基磺酸盐的质量为 1.9 g ,产率为 76%,经 HPLC 检测,化学纯度大于 95%,熔点为 $117.5 \sim 119.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O})$: $8.253 \sim 8.278(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H})$, $7.978 \sim 8.003(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H})$, $4.432 \sim 4.468(\text{q}, 2\text{H}, \text{CH}_2)$, $3.07(\text{s}, 9\text{H}, \text{CH}_3)$, $1.409 \sim 1.443(\text{t}, 3\text{H}, \text{CH}_3)$ 。

产物 *N*-琥珀酰亚胺-4- ^{18}F 氟苯甲酸酯 (SFB) 质量为 0.37 g ,用 $V(\text{二氯甲烷}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 4 : 1$ 的混合溶液作展开剂,点板, R_f 值为 0.71。经 HPLC 检测,化学纯度大于 98%。熔点为 $116.0 \sim 118.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: $8.183 \sim 8.211(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H})$, $7.207 \sim 7.287(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H})$, $2.89(\text{s}, 4\text{H}, -\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$ 。

2.2 放射性 TLC 检测

经计算, ^{18}F SFB 的 $R_f = 0.73$,与冷合成参比物 SFB 的 $R_f = 0.71$ 一致。Radio-TLC 结果显示没有 4- ^{18}F 氟苯甲酸乙酯(4), ^{18}F FBA(5) 有很小的放射性峰。经分析 ^{18}F SFB 的放射化学纯度大于 90%。

2.3 HPLC 检测

^{18}F FBA 放射性 HPLC 图谱示于图 5,由图 5 可知,约 16.5 min 出现了 ^{18}F FBA 的放射性峰,与冷合成得到的 FBA 紫外吸收的保留时间 16.5 min 基本一致,没有发现 $^{18}\text{F}^-$ 放射性峰(约 3.7 min)和 4- ^{18}F 氟苯甲酸乙酯的放射性峰(约 25 min)。 ^{18}F SFB 放射性 HPLC 图谱示于图 6,由图 6 可知,约 19.7 min 出现了 ^{18}F SFB 放

射性峰,与冷合成得到的 SFB 紫外吸收的保留时间 19.5 min 一致(先进紫外检测器后放放射性检测器),有少量的 ^{18}F FBA(16.5 min)和被还原的 ^{18}F SFB(15.5 min)。经 Bio-Chrom Lite 程序分析, ^{18}F FBA 的放射化学纯度大于 95%, ^{18}F SFB 放射化学纯度大于 90%。

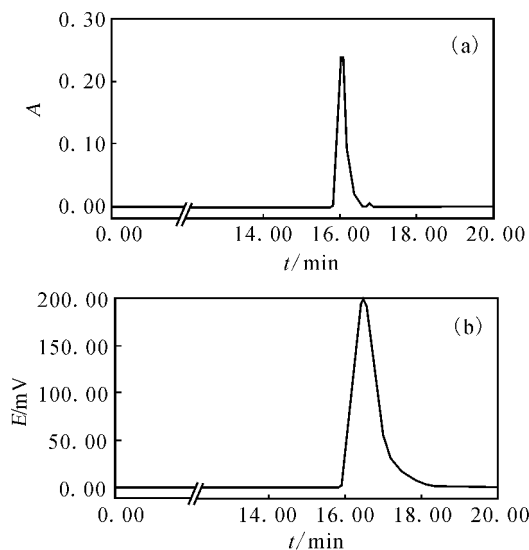


图 5 FBA 紫外 HPLC 图(a)和 ^{18}F FBA 放射性 HPLC 图(b)

Fig. 5 UV HPLC profile of FBA(a) and radio-HPLC profile of ^{18}F FBA(b)

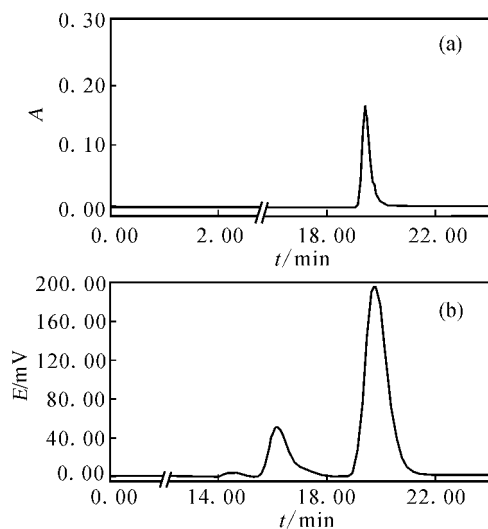


图 6 SFB 紫外 HPLC 图(a)及 ^{18}F SFB 放射性 HPLC 图(b)

Fig. 6 UV HPLC profile of SFB(a) and radio-HPLC profile of ^{18}F SFB(b)

2.4 合成条件的优化

制备 [¹⁸F]SFB 分 4 步反应:¹⁸F-F⁻ 的生产、亲核反应、保护基团的水解反应和最后 [¹⁸F]FBA 与 TSTU 的连接反应。在亲核反应时,溶解前体的溶剂有许多,如 DMSO, MeCN, DMF 等,不同溶剂反应的温度和时间也不同^[3, 6]。当采用 MeCN 作前体的溶剂时,如果反应管密封不好,溶剂极易蒸干,乙腈蒸干使反应管内部温度超过 K₂₂₂ 的分解温度,使 K₂₂₂ 分解变黑,反应易失败。当密封较好时,乙腈和 DMSO 作前体的溶剂的合成效率相近, [¹⁸F]SFB 的不校正合成效率分别为 (28.2 ± 1.9)% (n=5), (27.6 ± 1.2)% (n=5)。同样温度下,在完全密闭和密闭并吹氮气混合 2 种条件下,后者的 [¹⁸F]SFB 合成效率更高。因为采用密闭体系过程中用氮气将溶液混合 3 次,能够将粘在通气管道和反应管管壁的反应物吹下,使亲核反应更加完全。

亲核反应时间 (*t*) 是影响亲核反应的重要因素,设定温度为 115 °C,分别反应 5, 10, 20 min, 结果如下: *t* = 5 min 时, [¹⁸F]SFB 的不校正合成效率只有 (11.2 ± 1.3)% (n=5), 反应不完全,有更多的 ¹⁸F-F⁻ 未参与反应; *t* = 10 min 时, [¹⁸F]SFB 的不校正合成效率为 (28.2 ± 1.9)% (n=5), 可使亲核反应完全; *t* = 20 min 时, [¹⁸F]SFB 的不校正合成效率为 (25.2 ± 1.7)% (n=5), 亲核反应最完全,但延长时间 ¹⁸F-F⁻ 的衰减量也增加,放射性损失很多。因此 10 min 是更合适的亲核反应时间,从 ¹⁸F-F⁻ 到 [¹⁸F]SFB 的反应时间为 45 min。

在保护基团的水解反应过程中,如果反应物是丁基-4-[¹⁸F]氟苯甲酸酯, 1 mol/L HCl 能使水解反应很完全。本亲核反应的产物是 4-[¹⁸F]氟苯甲酸乙酯,因此采用水解能力更强的 NaOH 参与反应,加入 0.5 mL 0.5 mol/L NaOH, 结果 98% 的 4-[¹⁸F]氟苯甲酸乙酯水解,随后要过 C18 柱,因此还必须用盐酸中和碱,增加了反应步骤。

本工作研制的多功能化学合成模块,以热风浴作为热源,固定反应管,通过打开或关闭加热电热丝达到快速加热或冷却的目的,避免了油浴加热、需长时间平衡、设备复杂等缺点,大大缩短

了合成时间,减少了放射性在合成系统中的损失,提高了合成效率。模块采用自主研制开发的操作系统,通过电脑实现对模块的自动化控制。另外,有手动、半自动、全自动化控制 3 种操作模式,借助这一软件整个实验只需点击鼠标即可得到最终产品 [¹⁸F]SFB。

3 结 论

采用多功能化学合成模块制备 [¹⁸F]SFB,在 115 °C,密封条件间隔通氮气加热 10 min 亲核反应,用 NaOH 水解保护基团,得到 [¹⁸F]SFB 的不校正合成效率为 (28.2 ± 1.9)% (n=5),放射化学纯度大于 90%,总合成时间为 45 min,实现了完全自动化的操作,为随后快速、高效标记肽、蛋白质和抗体等生物活性分子创造了条件。

参考文献:

- [1] Zijlstra S, Gunawan J, Burchert W. Synthesis and Evaluation of a ¹⁸F-labelled Recombinant Annexin-V Derivative, for Identification and Quantification of Apoptotic Cells With PET [J]. *Appl Radiat Isot*, 2003, 58(2): 201-207.
- [2] Wester H J, Hamacher K, Stocklin G. A Comparative Study of n. c. a. Fluorine-18 Labeling of Proteins via Acylation and Photochemical Conjugation [J]. *Nucl Med Biol*, 1996, 23(3): 365-372.
- [3] Mading P, Fuchtnner F, Wust F. Module-Assisted Synthesis of the Bifunctional Labelling Agent *N*-Succinimidyl 4-[¹⁸F] Fluorobenzoate ([¹⁸F] SFB) [J]. *Appl Radiat Isop*, 2005, 63(3): 329-332.
- [4] Marik J, Sutcliffe J L. Fully Automated Preparation of n. c. a. 4-[¹⁸F] Fluorobenzoic Acid and *N*-Succinimidyl 4-[¹⁸F] Fluorobenzoate Using a Siemens/CTI Chemistry Process Control Unit (CPCU) [J]. *Appl Radiat Isop*, 2007, 65(2): 199-203.
- [5] 程登峰,尹端祉,王明伟,等. *N*-琥珀酰亚胺 4-[¹⁸F]氟苯甲酸酯的合成 [J]. *核技术*, 2006, 29(12): 917-920.
- [6] Chen X Y, Park R, Shahinian A H. ¹⁸F-Labeled RGD Peptide: Initial Evaluation for Imaging Brain Tumor Angiogenesis [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31(2): 179-189.