

HPLC法测定A β 斑块显像剂标记前体AV45的含量及有关物质^Δ

毛师师*, 张建康, 张荣军, 周杏琴*(江苏省原子医学研究所/卫生部核医学重点实验室/江苏省分子核医学重点实验室, 江苏无锡 214063)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2535-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.29

摘要 目的:建立测定 β -淀粉样蛋白(A β)斑块显像剂标记前体AV45的含量及有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil C₁₈,流动相为50 mmol/L磷酸氢二钠溶液-乙腈(含0.01%三乙胺)(15:85, V/V),检测波长为325 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μ l。结果:AV45与其反应中间体及其他杂质分离度较好;AV45及其反应中间体的检测质量浓度线性范围分别为200~1 000、20~100 μ g/ml($r=0.999\ 2$ 、 $0.999\ 6$);AV45反应中间体的检测限、定量限分别为0.1、0.5 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<0.5%;AV45的回收率为98.93%~101.58%,RSD=0.69%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、专属性高、重复性好,适用于A β 斑块显像剂标记前体AV45的含量及有关物质测定。

关键词 标记前体;AV45;高效液相色谱法;含量;有关物质

Content Determination of AV45, a Labeled Precursor of PET Agent for A β Plaques, and Its Related Substances by HPLC

MAO Shishi, ZHANG Jiankang, ZHANG Rongjun, ZHOU Xingqin (Key Laboratory of Nuclear Medicine/Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Ministry of Health/Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Jiangsu Wuxi 214063, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of AV45 (the labeled precursor of PET agent for A β plaques) and its related substances. METHODS: HPLC method was performed on the column of Inertsil C₁₈ with mobile phase of 50 mmol/L Disodium hydrogen phosphate solution - acetonitrile (containing 0.01% triethylamine) (15:85, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 325 nm, and column temperature was 30 ℃, and volume injection was 20 μ l. RESULTS: The AV45 and reaction intermediate as well as individual impurity peaks were well separated; the linear range was 200-1 000 μ g/ml for AV45 ($r=0.999\ 2$) and 20-100 μ g/ml for intermediate ($r=0.999\ 6$); the detection limit and quantification limit of reaction intermediate AV45 were 0.1 ng and 0.5 ng, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.5%; recovery of AV45 was 98.93%-101.58% (RSD=0.69%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with high specificity and good reproducibility, and suitable for content determination of AV45(the labeled precursor of PET agent for A β plaques) and its related substances.

KEYWORDS Labeled precursor; AV45; HPLC; Determination; Related substances

β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)聚集是阿尔茨海默病(AD)的主要病理特征^[1]。随着社会进入老龄化,我国老年人口越来越多,AD的发病率逐年上升,严重影响老年人的生活质量^[2]。因此,研制A β 斑块显像剂对于AD的早期诊断及治疗进程评价具有重要意义^[3-4]。¹⁸F-AV45由美国Avid公司研制,是具有良好临床应用价值的正电子发射断层扫描(PET)显像剂,目前正进行Ⅲ期临床研究。¹⁸F-AV45具有较好的亲和力,能够特异性结合A β 斑块,通过PET显像可以显著区别AD患者与认知正常的健康志愿者^[5]。据报道,¹⁸F-AV45目前正用于人体内A β 沉积过程的可视化及定量研究^[6]。一系列临床前及临床研究表明,¹⁸F-AV45能够在体内鉴别AD患者脑中A β 斑块病理状态,即将应用于临床^[7]。¹⁸F-AV45是由标记前体AV45经¹⁸F标记制备而成^[8]。

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81371590);江苏省科技项目(No.BK2011167)

* 助理研究员。研究方向:药物分析。E-mail: 510701180@qq.com

通信作者:研究员。研究方向:脑受体靶向药物。E-mail: zhouxingqin@jsinm.org

要获得放化纯较高的PET显像剂¹⁸F-AV45,除了控制标记条件外,另一个关键之处是在合成标记前体过程中严格控制前体杂质的含量,包括AV45反应中间体的含量,以获得高纯度的标记前体AV45。本试验参考相关文献^[3-8],建立了高效液相色谱(HPLC)法测定标记前体AV45的含量及有关物质,以为该制剂的质量控制提供有效的分析手段。

1 材料

1.1 仪器

600型HPLC仪,配有2487紫外检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);BSA224S-CW电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

AV45对照品(批号:201115,纯度:99.3%)、AV45反应中间体对照品(批号:201108,纯度:99.7%)、AV45样品(批号:201202、201203、201204)均由江苏省原子医学研究所合成室提供;磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、三乙胺、醋酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,北京百灵威科技有限公司);试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil C₁₈ (250 nm×4.6 nm, 5 μm); 流动相: 50 mmol/L 磷酸氢二钠溶液-乙腈 (含 0.01% 三乙胺) (15:85, V/V); 检测波长: 325 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取 AV45 对照品适量, 用乙腈溶解并定量制成质量浓度为 0.6 mg/ml 的溶液, 得含量测定用对照品溶液; 精密称取 AV45 对照品适量, 用乙腈溶解并定量制成质量浓度为 5.0 mg/ml 的溶液, 得有关物质测定用对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取 AV45 样品适量, 用乙腈溶解并定量制成质量浓度为 0.6 mg/ml 的溶液, 得含量测定用供试品溶液; 精密称取 AV45 样品适量, 用乙腈溶解并定量制成质量浓度为 5.0 mg/ml 的溶液, 得有关物质测定用供试品溶液。

2.2.3 对照溶液 精密量取 1 ml 有关物质测定用供试品溶液, 置于 100 ml 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取 AV45 反应中间体对照品 10 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 摇匀, 得系统适用性贮备液; 精密称取 AV45 对照品 100 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 精密移取上述系统适用性贮备液 1.0 ml 置于此量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 摇匀, 得系统适用性溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 精密量取“2.2”项下含量测定用对照品溶液、含量测定用供试品溶液、有关物质测定用供试品溶液、对照溶液、系统适用性溶液和空白溶剂(乙腈)适量, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, AV45 与其反应中间体在该色谱条件下能有效分离, 分离度 > 1.5, 理论板数以 AV45 峰计 > 15 000。

2.3.2 专属性试验 取样品(批号: 201203)约 25 mg, 精密称定, 共 5 份, 分别置于 25 ml 量瓶中并作如下处理: (1) 加入 6 mol/L 盐酸溶液 5 ml, 放置 1 h, 再加入氢氧化钠溶液调 pH 至中性; (2) 加入 6 mol/L 氢氧化钠溶液 5 ml, 放置 1 h, 再加入盐酸溶液调 pH 至中性; (3) 加入 30% 过氧化氢溶液 5 ml, 放置 1 h; (4) 加入 5 ml 乙腈溶解, 在强光 4 500 lx 下照射 4 h; (5) 加入 5 ml 乙腈溶解, 在 100 °C 水浴中加热 2 h。将上述 5 份溶液减压蒸干, 用乙腈溶解, 稀释成质量浓度为 0.6 mg/ml 的溶液, 各取 20 μl, 分别注入 HPLC 仪, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 2。由图 2 可知, 样品在酸、碱、氧化、高温和光照破坏条件下均保持相对稳定, 各破坏条件下产生的降解产物峰与主峰均能达到基线分离, 分离度良好。

2.4 线性关系考察

精确称取 AV45 对照品适量, 加乙腈溶解并稀释制成每 1.0 ml 中含 1 000 μg 的线性工作贮备液, 分别精密量取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml, 用乙腈稀释制成质量浓度分别为 200、400、600、800、1 000 μg/ml 的 AV45 系列线性工作溶液; 精确称取 AV45 反应中间体对照品适量, 加乙腈溶解并稀释制成每 1.0 ml 中含 100 μg 的线性工作贮备液, 分别精密量取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml, 用乙腈稀释制成质量浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/ml 的 AV45 反应中间体系列线性工作溶液。分别精密量取上述溶液 20 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得 AV45 及其反应中间体的回归方程分别为 $y=3.2 \times 10^{-8}x-0.0087$ 和 $y=6.9 \times 10^{-8}x+0.0156$ ($r=0.9992$ 、 0.9996)。结果表明, AV45 及其反应中间体的检测质量浓度线性范围分别为 200~1 000、20~100 μg/ml。

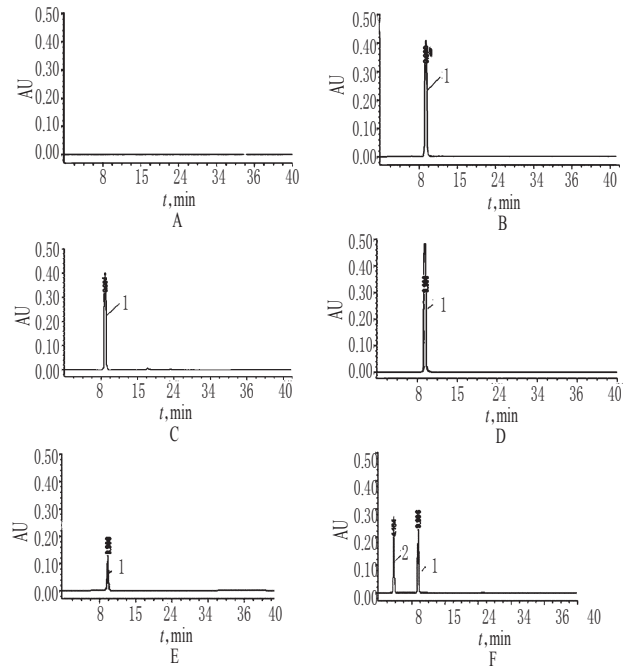


图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

A. 空白溶剂(乙腈); B. 含量测定用对照品溶液; C. 含量测定用供试品溶液; D. 有关物质测定用供试品溶液; E. 对照溶液; F. 系统适用性溶液; 1. AV45; 2. AV45 反应中间体

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A. blank solvent (acetonitrile); B. reference solution for content determination; C. test sample for content determination; D. test sample for related substances determination; E. reference solution; F. solution for system suitability; 1. AV45; 2. reaction intermediate AV45

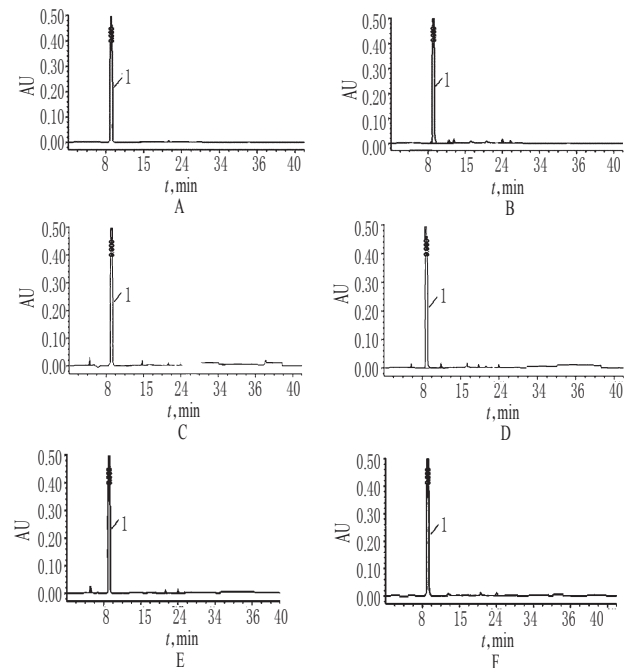


图 2 专属性试验高效液相色谱图

A. 未破坏样品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 高温破坏样品; F. 光照破坏样品; 1. AV45

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. undestroyed sample; B. sample destroyed by acid; C. sample destroyed by alkali; D. sample destroyed by oxidation; E. sample destroyed by high temperature; F. sample destroyed by illumination; 1. AV45

2.5 检测限与定量限考察

精确称取 AV45 反应中间体对照品适量,按“2.2.4”项下方法制备系统适用性贮备液,采用逐步稀释法稀释至 0.05 $\mu\text{g/ml}$,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比 3:1 计算得 AV45 反应中间体的检测限为 0.1 ng;以信噪比 10:1 计算得 AV45 反应中间体的定量限为 0.5 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下 AV45 含量测定用对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,AV45 峰面积的 RSD=0.29% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取样品(批号:201203)适量,按“2.2.2”项下方法制备含量测定用供试品溶液,分别于在室温下放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,AV45 峰面积的 RSD=0.36% ($n=7$),表明含量测定用供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:201203)适量,共 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备含量测定用供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果,AV45 平均含量为 99.5%, RSD=0.49% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取 AV45 对照品 12、15、18 mg,各 3 份,精密称定,分别置于 25 ml 量瓶中,加乙腈使其溶解,定容,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=9$)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
12.05	12.04	99.92		
12.11	11.98	98.93		
12.08	12.08	100.00		
15.06	15.11	100.33		
15.22	15.46	101.58	100.11	0.69
15.15	15.14	99.93		
18.25	18.21	99.78		
18.16	18.19	100.17		
18.09	18.15	100.33		

2.10 样品含量及有关物质测定

2.10.1 样品含量测定 取 AV45 及其反应中间体对照品和 3 批样品各适量,分别按“2.2”项下方法制备含量测定用对照品溶液和供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,每批样品重复进样 3 次,记录色谱,根据主峰的峰面积计算样品的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量及有关物质测定结果 ($n=3, \%$)

Tab 2 Results of content and related substances determination ($n=3, \%$)

批号	AV45	AV45 反应中间体	杂质总量
201202	99.5	未检出	0.10
201203	99.6	未检出	0.12
201204	99.5	未检出	0.09

2.10.2 样品有关物质测定 取 AV45 及其反应中间体对照品和 3 批样品各适量,分别按“2.2”项下方法制备有关物质测定用对照品溶液、供试品溶液和对照溶液,取对照溶液 20 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样,调节仪器灵敏度,使主成分峰高约为记录仪满量程的 20%~25%;再量取有关物质测定用对照品溶液和供试品溶液各 20 μl ,按“2.1”项下色谱条件重复进样 3

次,记录色谱,根据主峰和有关物质峰的峰面积,按自身对照法计算含 AV45 反应中间体的量和杂质总量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 测定波长的选择

取一定量的 AV45 对照品及其反应中间体对照品,用乙腈溶解,以乙腈作空白,在 200~500 nm 波长范围扫描,记录光谱。结果,在 325 nm 波长附近两者的紫外吸收较大且峰形平缓。文献报道的 HPLC 法^[6]采用 350 nm 进行检测,而本试验发现 350 nm 波长处 AV45 反应中间体吸收值较低,因此本试验改用 325 nm 波长检测,更有利于杂质测定。

3.2 流动相体系的选择

本试验在选择流动相过程中,设计了多组不同组成的流动相体系[乙腈-醋酸铵、磷酸氢二钾-乙腈、磷酸氢二钠-乙腈、磷酸氢二钾-乙腈(含三乙胺)、磷酸氢二钠-乙腈(含三乙胺)等],通过考察,发现文献采用的乙腈-醋酸铵体系^[6]峰形较宽,而且有拖尾现象,理论板数较低;考虑到 AV45 结构中含叔丁氧羰基(BOC 保护基团),以及末端对甲苯磺酰氧基(OTS)具有一定的疏水性,笔者发现采用 50 mmol/L 磷酸氢二钠溶液-乙腈(含 0.01% 三乙胺)(15:85, V/V)作为流动相时,峰拖尾现象得到了改善,理论板数增加,各峰能够达到基线分离。

3.3 溶剂的选择

取一定量的 AV45 样品,分别用甲醇、乙醇、乙腈等不同的溶剂溶解并进行稳定性试验。结果发现,AV45 在甲醇、乙醇中稳定性较差,室温放置 3 d 后发生降解,杂质峰增加,主峰含量降低;在乙腈溶液中相对稳定,室温放置 3 d 后 AV45 含量仍 > 95%。因此,选择乙腈作溶剂,分析在当日完成。

参考文献

- [1] Prvulovic D, Hampel H. Amyloid β ($A\beta$) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(3):367.
- [2] 何跃.老年性痴呆患病率及神经生化标志物的研究现状[J]. *中国临床康复*, 2006, 9(4):143.
- [3] Cairns NJ, Ikonovic MD, Benzinger T, et al. Absence of Pittsburgh compound B detection of cerebral amyloid beta in a patient with clinical, cognitive, and cerebrospinal fluid markers of Alzheimer disease: a case report[J]. *Arch Neurol*, 2009, 66(12):1557.
- [4] Berti V, Osorio RS, Mosconi L, et al. Early detection of Alzheimer's disease with PET imaging[J]. *Neurodegener Dis*, 2010, 7(1/2/3):131.
- [5] Wong DF, Rosenberg PB, Zhou Y, et al. In vivo imaging of amyloid deposition in Alzheimer disease using the radioligand ^{18}F -AV-45 (florbetapir [corrected] F18) [J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(6):913.
- [6] Choi SR, Golding G, Zhuang Z, et al. Preclinical properties of ^{18}F -AV-45: a PET agent for A β plaques in the brain[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(11):1887.
- [7] Ledford H. Alzheimer's-disease probe nears approval[J]. *Nature*, 2011, 469(7331):458.
- [8] Liu Y, Zhu L, Plössl K, et al. Optimization of automated radiosynthesis of ^{18}F AV-45: a new PET imaging agent for Alzheimer's disease[J]. *Nucl Med Biol*, 2010, 37(8):917.

(收稿日期:2015-07-05 修回日期:2016-05-15)

(编辑:周 箐)