

HPLC-MS/MS检测 ^{18}F FDG中 Kryptofix 2.2.2 的残留量

何山震¹ 王淑侠¹ 王朋¹ 翟创彦¹ 周志凌²

1 (广东省人民医院 PET 中心, 广东省医学科学院 广州 510080)

2 (广东省人民医院医学研究中心 广州 510080)

摘要 应用高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-MS/MS)测定 ^{18}F FDG 示踪剂中残留的 Kryptofix 2.2.2 浓度, 并进行方法学确证。以乙腈 40 mmol/L NH_4Ac 水溶液(50:50, V/V)为流动相, 采用 ultimate XB-C₁₈ (4.6×150 mm, 3 μm)色谱柱进行分离, 流速为 0.85 mL·min⁻¹, 通过电喷雾离子化串联质谱, 以多反应监测(MRM)方式对 ^{18}F FDG 中的 K-222 残留量进行检测。结果表明, 用 HPLC-MS/MS 法可以在 4 min 内完成 K-222 的检测, 其线性范围为 0.5–120 ng·mL⁻¹, 平均回收率在 101.3%–106.6%, 批内和批间变异均小于 9.4%。HPLC-MS/MS 方法简单、快速、灵敏, 适合于短半衰期 ^{18}F FDG 中 K-222 残留浓度的检测。

关键词 氨基聚醚(K-222), 高效液相色谱质谱串联法, 电喷雾

中图分类号 R817

氨基聚醚(Kryptofix 2.2.2, K-222)的化学名为 4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂双环[8,8,8]二十六烷, 是典型的相转移催化剂^[1], 广泛应用于 ^{18}F 标记放射性药物的制备, 能增强 ^{18}F 的亲核性^[2], 提高标记产率。

目前, ^{18}F 2-氟代脱氧-D-葡萄糖(^{18}F FDG)是使用最多的 PET(正电子断层扫描)氟标记的示踪剂, 其他 ^{18}F 标记药物也已大量应用于临床研究^[3]。鉴于 K-222 是高毒性物质, 美国药典(USP-34)明确要求, 使用 ^{18}F FDG 前须对 K-222 的残留量进行薄层色谱(TLC)检测^[4], 其残留量须低于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

^{18}F 的半衰期为 110 min, 为提高示踪剂的利用效率, K-222 的检测方法要求快速、灵敏、稳定、可靠。本研究用液相色谱质谱联用方法来检测 ^{18}F FDG 中的 K-222 残留浓度。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

K-222 对照品(Sigma-aldrich, 含量 98%); 阿奇霉素对照品(内标, 中国药品生物制品检定所, 946 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$); 乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 乙酸铵,

质谱纯, 美国 Sigma 公司; 水为重蒸去离子水。

Shimadzu 20A 高效液相色谱仪系统(日本岛津公司); API 4000 QTrap 串联质谱仪(美国 ABSCIEX 公司); Analyst 1.4.2 数据处理工作站。数字脉冲旋涡混合仪(美国 Glas-Col 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱和质谱条件

色谱柱: ultimate XB C₁₈ (Φ 4.6 mm × 150 mm, 填料颗粒直径 3 μm); 流动相: 乙腈和 40 mmol/L NH_4Ac (50:50), 流速 0.85 mL/min, 通过调节 PEEK 管的长度使其中 1/3 进入离子源, 其余的流入废液瓶; 柱温: 室温; 进样体积: 10 μL 。

离子源为电喷雾离子源(ESI 源), 正离子方式检测, 用于定量分析的离子对 K-222 为 m/z 377.3–114.2 (裂解能量(CE)为 45 V)。内标为 m/z 749.9–158.4 (CE 为 55 V), 解簇电压(DP)值为 100 V, 扫描时间为 200 ms, 入口电压(EP)为 9 V, 出口电压(CXP)为 7 V, 气帘气(CUR)为 137.9 kPa (高纯氮), 碰撞气(CAD)为中度, 源电压(IS)为 5500 V, 源温度(TEM)为 500°C, 雾化气(GS1)为 413.7 kPa (高纯氮), 加热辅助气(GS2)为 482.65 kPa (高纯氮)。

广东省医学科研基金(A2011035)、广东省自然科学基金(9151064101000063)项目资助

第一作者: 何山震, 男, 1976 年出生, 2008 年中山大学药学院硕士毕业, 现为在读博士, 影像医学与核医学专业

通讯作者: 周志凌, chowzli@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-06, 修回日期: 2011-01-05

1.2.2 储备液及工作溶液配制

精确称取 K-222 10 mg, 配成浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 K-222 储备液; 取 $10 \mu\text{L}$ 储备液, 配成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的工作液 I。

精确称取阿奇霉素(内标)10 mg, 配成浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿奇霉素储备液; 将储备液用 50%乙腈水溶液稀释成浓度为 $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。

1.2.3 示踪剂 [^{18}F]FDG 的制备及样品的处理

从德国西门子 RDS-111 回旋加速器出质子轰击富氧水, 由 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ 反应得 [^{18}F]负离子, 被经预活化的负离子交换树脂(QMA)捕获, 再经含 K_2CO_3 和 Kryptofix 2.2.2 的乙腈溶液洗脱后进入反应管, 蒸发除水后与前体 1,3,4,6-四-O-乙酰基-2-O-三氟甲磺酸基- β -D-甘露糖进行亲核取代反应, 加入盐酸水解后得到粗产品 [^{18}F]FDG, 粗产品经纯化、无菌过滤后得到临床用药。

直接取制备得到的 [^{18}F]FDG 水溶液 $10 \mu\text{L}$ 或按一定比例稀释后进样 $10 \mu\text{L}$ 。稀释液(空白液)为制备 [^{18}F]FDG 过程中不加入 K-222 得到的水溶液。

1.2.4 方法的专一性试验和标准曲线的制备

空白溶液进样 $10 \mu\text{L}$, 获得空白液样品色谱图。以 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 K-222 工作液 I 用空白液配成浓度为 $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 K-222 样品, 各加入内标工作液, 以空白液逐步稀释成浓度分别为 120、60、20、5、1、0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而内标浓度为 $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 各进样 $10 \mu\text{L}$ 。以 K-222 峰面积与内标峰面积之比(y)为纵坐标, 以 K-222 浓度(x)为横坐标得到标准曲线。

1.2.5 方法回收率及精密度

分别配制低(LQC, $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(MQC, $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高(HQC, $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)浓度的 K-222 溶液质控样品各 15 份, 分 3 批, 每批 5 份, 各取 $10 \mu\text{L}$ 进样, 计算质控样品的检测浓度, 求得回收率和精密度, 以及 K-222 低、中、高浓度的质控样品批内 RSD 和批间 RSD。

1.2.6 稳定性和稀释因子考察

考察 K-222 低、中、高浓度的质控溶液样品, 以及室温和 4°C 下放置 24 h 后的稳定性。每个浓度 5 份样品, 稳定性=(测定值/加入值) $\times 100\%$ 。

配制浓度为 1、10、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 K-222 质控溶液各 5 份, 将 1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的用空白液稀释 100 倍, 将 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的用空白液稀释 2000 倍, 考察稀释后质控的准确性。

1.2.7 基质效应考察

用 2 种条件下信号峰面积的平均值考察基质效应。Set1: 对照品用流动相配成低、中、高浓度样品, Set2: 将空白液用样品处理方法得到的上清液来配成低、中、高浓度样品, 则基质效应 (ME)=Set2/Set1, K-222 采用低($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)浓度点, 内标采用一个浓度点($15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 各条件下重复测定 5 个样品。

2 结果

2.1 方法专属性

分别进样空白液样品的色谱图见图 1。

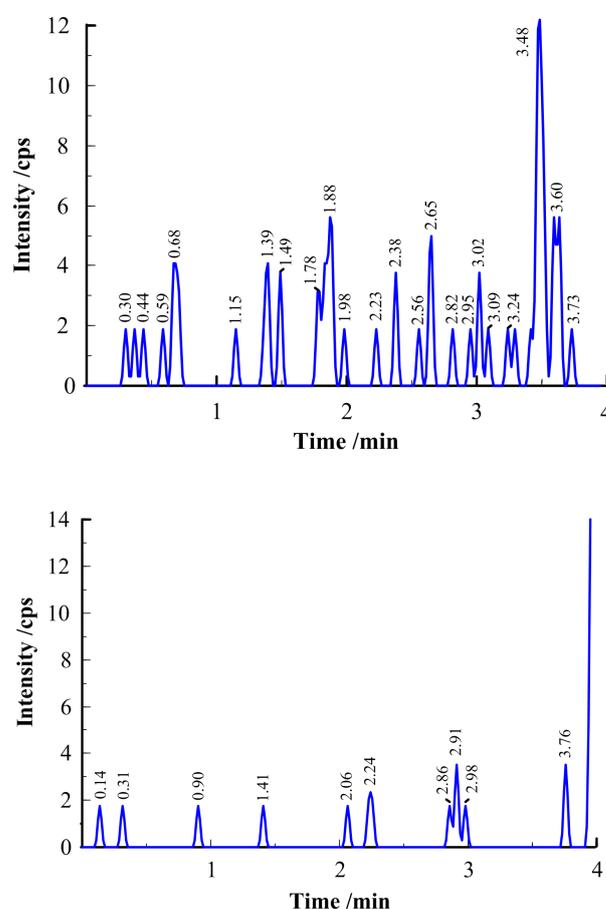


图 1 空白液色谱图

Fig.1 Chromatograms of the blank solution.

空白液加入含一定浓度内标的标准溶液, 获得的色谱见图 2; 由图 1 图 2, K-222、内标的出峰时间分别为 3.48 min 和 2.53 min。

取 [^{18}F]FDG 溶液样品, 依同法操作, 得色谱见图 3。结果表明, 空白液中内源性物质并不干扰 K-222 及内标的测定。

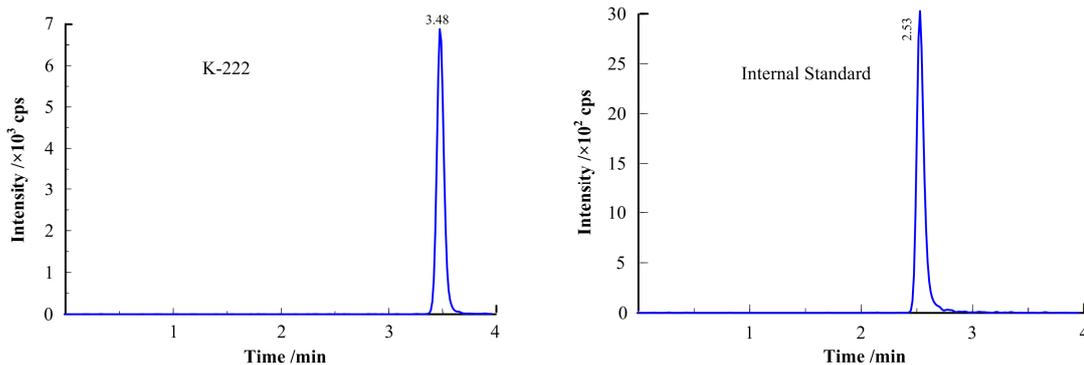


图 2 空白液中加入 K-222 标准品(50 ng·mL⁻¹)和内标(15 ng·mL⁻¹)的色谱

Fig.2 Chromatograms of the blank solutions spiked with K-222 (50 ng·mL⁻¹) and internal standard (15 ng·mL⁻¹)

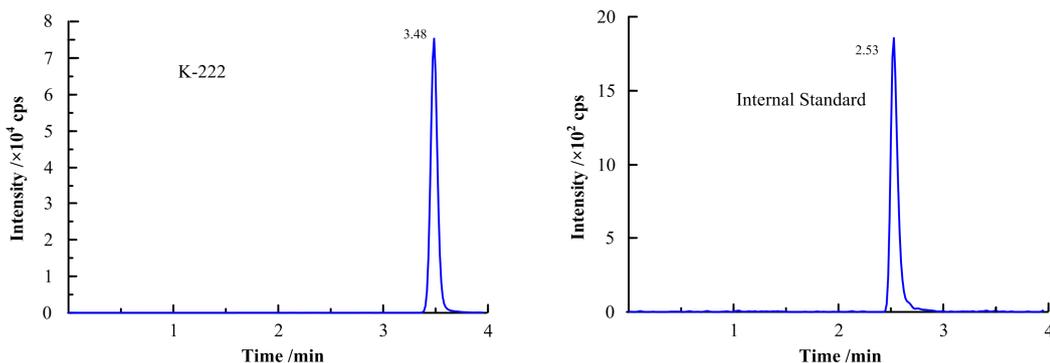


图 3 ¹⁸F]FDG 样品溶液的色谱

图 3 Chromatograms of a sample taken from reaction solutions.

2.2 标准曲线及线性范围

K-222 浓度在 0.5–120 ng·mL⁻¹ 呈良好线性关系, 所有标准曲线的线性(*r*)均好于 0.99。浓度为 120、60、20、5、1、0.5 ng·mL⁻¹ 的标准溶液各进样 10 μL, 获得代表性标准方程: $y=0.508x+0.00244$ ($r=0.9959$, 权重系数为 $1/x^2$)。最低检测

限为 0.5 ng·mL⁻¹ (信噪比 $S/N \geq 9$)。

2.3 方法回收率及精密度

由表 1, K-222 低、中、高浓度的质控样品批内 RSD 在 5.2%–7.8%, 批间 RSD 介于 5.4%–8.4%, 方法回收率介于 101.3%–106.6%。

表 1 LC-MS/MS 检测 K-222 的稳定性、基质效应、精密性和准确性

Table 1 The stability, matrix effect, precision and accuracy of K-222 using LC-MS/MS method.

	重复性 RSD/Reproducibility /%		回收率 Recovery /%	稳定性 Stability/%		基质效应 Matrix effect/%
	批内 Intrabatch	批间 Interbatch		24 h at RT	24 h at 4°C	
LQC	5.2	8.4	101.3±5.0	98.7±7.6	99.7±4.8	100.9±4.4
MQC	7.8	5.4	102.4±6.9	101.6±8.7	102.0±7.8	103.3±2.5
HQC	6.9	6.5	106.6±6.2	106.0±5.5	107.0±6.2	104.0±3.2

2.4 稳定性和稀释因子考察

由表 1, K-222 低、中、高浓度的质控样品置于室温 24 h 后的稳定性分别为 98.7%、101.6%、106%, 样品于 4°C 放置 24 h 后的稳定性分别为 99.7%、102%、107%。说明 K-222 在常温和较低温度下是稳定的。稀释后的准确性分别为(108.2±

7.6)%、(94.4±5.7)%、(105.2±8.5)%。

2.5 基质效应考察

由表 1, 低、中、高浓度的 K-222 和内标的基质效应分别为 100.9%、103.3%、104.0%和 97.1%, 可见空白液基质对低、中、高浓度药物的测定影响程度基本一致。

2.6 常规 5 批次¹⁸F]FDG检测结果

随机取 5 批次的¹⁸F]FDG 用空白液稀释 100 倍后取 10 μL 进样, 结果列于表 2。日常生产的¹⁸F]FDG 中 K-222 的残留量均符合 USP 的要求, 其值均低于 50 μg·mL⁻¹。

表 2 常规¹⁸F]FDG 中 K-222 的检测结果($n=3$)
Table 2 The level in routine ¹⁸F]FDG.

样品批次 Batch	K-222 的残留量 Level in [¹⁸ F]FDG /ng·mL ⁻¹
20110506	5.23±0.36
20110521	14.6±0.06
20110602	11.2±0.12
20110616	17.7±0.07
20110701	11.9±0.21

3 讨论

目前, K-222 的检测方法很多, 如薄层色谱法^[5](TLC, 最低检测限为 2 μg·mL⁻¹)、气相色谱法^[6](GC, 最低检测限为 0.25 μg·mL⁻¹)、液相质谱联用法^[7](HPLC-MS, 最低检测限为 1 ng·mL⁻¹)等, 但都具有检测限低、低灵敏度、重现性不好、操作繁琐、样品使用量大、有专用的检测器、分析时间长、误差大等缺点。对于短半衰期的放射性药物而言, 浪费了药物的使用效率, 直接造成经济损失, 且使操作人员接受的辐射量大大增加。

与文献[7]报道检测 K-222 的方法相比, 本研究的标准曲线线性范围宽、灵敏度高、检测限低(0.5 ng·mL⁻¹)、分析时间短, 可在 4 min 内完成 K-222 的定量检测, 特别适合短半衰期示踪剂药物中 K-222 残留量的检测。

K-222 母离子经二级质谱打碎后会形成较多碎片, 经比较, 选取稳定性最好的 m/z 114.2 的碎片离子与母离子(m/z 377.3)组成离子对进行定量分析。

实验所用 LC-MS/MS 方法主要应用于¹⁸F]标记的示踪剂中 K-222 残留量的测定, 每次进样前在相同条件下进标准品作标准曲线。测定的结果值如果在规定范围之内(即低于 50 μg·mL⁻¹), 该批次的药物可用于 PET 显像。

实验中每批需随行做两支空白管, 标准曲线, 6 支质控(低、中、高浓度各 2 支), 如所测样品浓度

超出标准曲线的线性范围, 则用空白将该样品按一定比例稀释, 得到结果再乘以稀释倍数即可。

4 结语

研究表明, HPLC-MS/MS 方法具有快速、简便、灵敏、稳定性好、线性范围宽等优点, 适合测定短半衰期¹⁸F]标记的示踪剂中 K-222 残留量的检测。

参考文献

- 唐刚华. 短半衰期正电子发射放射性药物合成方法学及进展[J]. 核技术, 2003, 26(7): 551-555
TANG Ganghua. Synthetic methodology of short half-life radiopharmaceuticals for PET. Nucl Tech, 2003, 26(7): 551-555
- 何山震, 王淑侠, 王朋, 等. 单管法酸水解合成¹⁸F]FDG 中反应条件的探讨[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(3S): 61-63
HE Shanzhen, WANG Shuxia, WANG Peng, *et al.* Study of influence factors on preparing [¹⁸F]FDG by hydrolyzing with HCl in single vessel [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30(3S): 61-63
- Peter J H, Scott, Michael R, Kilbourn. Determination of residual Kryptofix 222 level in [¹⁸F]-labeled radiopharmaceuticals for human use. Applied Radiation and Isotopes, 2007, 65: 1359-1362
- USP 32-NF 27, 《823》Radiopharmaceuticals for positron emission tomography—compounding, Official Monographs, 2010: 933-934
- Nakao R, Ito T, Yamauchi M, *et al.* Simultaneous analysis of FDG, CIDG and Kryptofix 2.2.2 in [¹⁸F]FDG preparation by high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. Nucl Med Biol, 2008, 35(2): 239-244
- Ferrieri R A, Schlyer D J, Alexoff D L, *et al.* Detect analysis of Kryptofix 2.2.2 in [¹⁸F]FDG by GC using a nitrogen-selective detector. Appl Radiat Isot, 1993, 57: 697-703
- Ying Ma, Bill X. Huang, Michael A, *et al.* Quantification of Kryptofix 2.2.2 in 2-[¹⁸F]FDG and other radiopharmaceuticals by LC/MS/MS [J]. Nuclear Medicine and Biology, 2002, 29(01): 125-129

HPLC-MS/MS determination of residue level of Kryptofix 2.2.2 in ^{18}F -FDG

HE Shanzhen¹ WANG Shuxia¹ WANG Peng¹ ZHAI Chuanyan¹ ZHOU Zhiling²

¹ (Nuclear Department, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

² (Research Center of Medical Sciences, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract In this work, we focused at establishing an efficient and rapid method of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) for quantitative analysis of Kryptofix 2.2.2 as ^{18}F -FDG tracer. K-222 and internal standard were chromatographically separated on an ultimate XB-C₁₈ column (Φ 4.6 mm \times 150 mm, 3 μm) with a mobile phase containing 40 mmol/L ammonium acetate buffer and acetonitrile (50:50) at a flow rate of 0.85 mL \cdot min⁻¹. The electronic spray ion tandem mass spectrum with the positive mode and multitude reaction monitor (MRM) were used to detect K-222 in [^{18}F]FDG. The linear range of calibration curves was 0.5–120 ng \cdot min⁻¹ for K-222, with the intrabatch and innerbatch variations of <9.4%. The recovery rate ranged from 101.3% to 106.6%. The study indicated that the present method was rapid (less than 4 min), sensitive, efficient, and reliable, being suitable for detecting K-222 in ^{18}F -FDG.

Key words K-222, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), Electronic spray ion (ESI), Kryptofix 2.2.2

CLC R817