

高效液相色谱法定量 分析 *d,l*-HMPAO 及其冻干药盒

陈素珍

(中国原子能科学研究院, 北京, 102413)

采用反相高效液相色谱法,在国内外首次建立了鉴定 HMPAO(六甲基丙二胺肟)非对映异构体和 *d,l*-HMPAO(外消旋-六甲基丙二胺肟)冻干药盒的定量分析方法。研究出一种最佳的流动相分离分析 HMPAO 非对映异构体的纯度和冻干药盒中 *d,l*-HMPAO 的含量。色谱参数:理论塔板高小于 0.06 mm,总分离时间为 5.5 min,分离度大于 5。测得 *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 的紫外最小检出量各为 1×10^{-8} g 和 5×10^{-7} g,精密密度为 5%,重加回收率在 94%~107%。实验表明,本方法具有准确、快速、稳定和简便等优点,适于常规质量控制,并已成功用于本院合成的 HMPAO 非对映异构体及其所生产的 *d,l*-HMPAO 冻干药盒和对照品英国 Amersham 公司同类制品的定量分析。

关键词 *d,l*-HMPAO 冻干药盒 高效液相色谱法

近年来英国推出一种新的放射性药物—— $^{99}\text{Tc}^m$ -*d,l*-HMPAO 注射液,它能够透过完整无损的血脑屏障,在脑内滞留时间较长,并能保持固定分布,是一种新的 SPECT 脑灌注显像剂,已广泛用于临床诊断脑部疾病和研究脑生理功能。 $^{99}\text{Tc}^m$ -*d,l*-HMPAO 注射液是由 *d,l*-HMPAO 冻干药盒^[1]和 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^m$ 发生器的洗脱液一步法配制成的。该冻干药盒是 *d,l*-HMPAO、氯化亚锡和氯化钠经冷冻干燥而成的无菌无热原粉末。文献[2]报道 HMPAO 可以 *d,l*-HMPAO 和 *meso*-HMPAO(内消旋-六甲基丙二胺肟)非对映异构体存在,该两种化合物分子中只有一个碳原子的构型不同(图1),而且 *d,l*-HMPAO 在一定条件下极易转变成 *meso*-HMPAO。由此可见,在 *d,l*-HMPAO 冻干药盒中存在着杂质 *meso*-HMPAO,它直接关系到 $^{99}\text{Tc}^m$ -*d,l*-HMPAO 注射液在脑内的摄取和显像质量,是该药质量控制的关键。为此必须研究建立定量分析此杂质的可靠方法。

文献上未见采用反相高效液相色谱法定量分析 HMPAO 非对映异构体的纯度和 *d,l*-HMPAO 冻干药盒中的 *d,l*-HMPAO 含量。文献[2,3]报道采用正相高效液相色谱法定性分析 HMPAO 非对映异构体,但该法的基本色谱参数不好,分离度小于 1.5,并使用昂贵的仪器。

收稿日期:1993-03-04 收到修改稿日期:1993-05-27

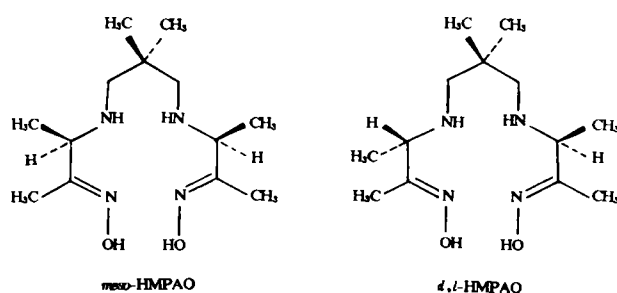


图1 HMPAO 的非对映异构体

我们在现有的条件下,进行正相色谱工作,发现 *d,l*-HMPAO 的样品很不稳定。文献[4]虽然报道反相高效液相色谱法初步定性分析英国同类制品“Ceretec”,但分离结果不好,分离度小于1.5。经我们实验证明,结果不能重复,且样品很难溶解。我们研究比较了 HMPAO 非对映异构体分离的色谱条件,最后确定本工作采用反相高效液相色谱法。

本文比较 HMPAO 非对映异构体在不同的流动相体系中的分离结果,得到了最佳的流动相在普通的紫外检测器(254nm)等仪器条件下,分析出 HMPAO 非对映异构体的纯度和 *d,l*-HMPAO 冻干药盒中的 *d,l*-HMPAO 含量。我们获得的高效液相色谱图好于迄今唯一发表分离谱图的文献[2]中的报道,而且我们的工作无论在系统性方面或在质量方面都优于专利文献[3]的报道,并符合中国药典1990年版^[5]“高效液相色谱法”项的规定。本工作的有关技术已申请专利(专利公开号:CN10725064)。

1 实验部分

1.1 试剂、样品和仪器

1.1.1 试剂 甲醇、乙醇、二氯甲烷和正己烷等均为分析纯,水经二次蒸馏。

1.1.2 样品 HMPAO 非对映异构体, *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 由中国原子能科学研究院(CIAE)提供。*d,l*-HMPAO 冻干药盒由 CIAE 和英国 Amersham 公司提供。样品溶于流动相中,浓度为0.1—0.3 mg/ml。

1.1.3 仪器 美国 Waters ALC/GPC-244型高效液相色谱仪,包括 M6000A 泵,U6K 进样器,M440紫外检测器(254nm)和 M 730数据处理机。电子天平,Mettler,AT 250,瑞士产品。

1.2 实验方法

1.2.1 流程 高效液相色谱法流程示意图如图2所示。新鲜配制的流动相经抽气过滤、负压脱气后进入色谱系统。取新鲜配制的样品溶液10 μ l,由进样器注入。样品随着流动相经色谱柱被分离,再通过紫外检测器后收集。来自检测器的输出信号直接送数据处理机,同时在该机上得到 *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 各组份的分离谱图、保留时间和色谱峰积分的结果等。*d,l*-HMPAO

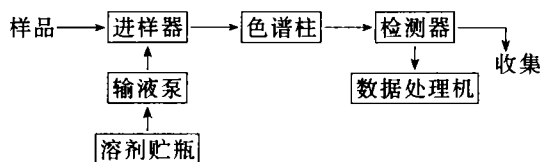


图2 高效液相色谱法流程示意图

的含量可由数据处理机的外标准定量法或由 *meso*-HMPAO 标准曲线法获得。

1.2.2 定量方法 (1)外标准定量法:使用含 *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 的标准混和液,按数据处理机的外标准定量法程序操作,得到 *d,l*-HMPAO 的含量。(2)标准曲线法:取适量的纯 *meso*-HMPAO 结晶体配成的标准液,按其进样量由小至大的顺序依次注入系统,进样两次,取色谱峰积分结果(或测峰高结果)的平均值与进样量制得标准曲线。由被测样品溶液的 *meso*-HMPAO 色谱峰积分结果(或峰高结果),查标准曲线得到 *meso*-HMPAO 的含量,最后计算出被测样品的 *d,l*-HMPAO 的含量。

1.2.3 色谱条件 检测波长254nm,灵敏度为0.1AUFS,数据处理机的纸速为1cm/min。正相色谱:硅胶柱, μ Porasil,10 μ m, ϕ 3.9mm $\times$ 300mm,流动相为正己烷-二氯甲烷体系,流速为2ml/min;反相色谱:色谱柱为 μ Bondapak C18,10 μ m, ϕ 3.9mm $\times$ 300mm,流速为1ml/min。

2 结果和分析

2.1 正相色谱

实验比较了 HMPAO 在正己烷-二氯甲烷等体系13种流动相中的色谱行为。实验表明,流动相为正己烷:二氯甲烷=1:1(V/V)时分离较好,当流速为2 ml/min 时, *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 的进样量各为 1.3×10^{-6} g 和 1.8×10^{-6} g 时,其保留时间各为2.7min 和21min,峰高各为2cm 和2.5cm。

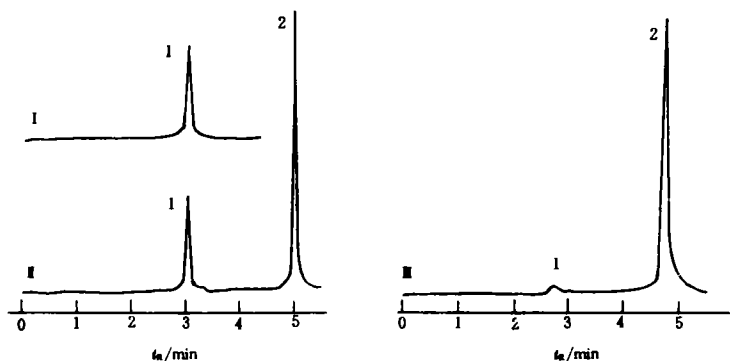
2.2 反相色谱

2.2.1 流动相的选择 实验比较了 *d,l*-HMPAO 和 *meso*-HMPAO 在13种流动相中的分离结果。当流速为1ml/min 时, *d,l*-HMPAO 和 *meso*-HMPAO 的进样量各为 15×10^{-6} g 和(15或1.5) $\times 10^{-6}$ g,几种流动相中的色谱行为列入表1。由表1可见,HMPAO 非对映异构体在流动相 D 中的分离结果最佳。该流动相能使杂质 *meso*-HMPAO 先洗脱出柱,分离时间最短,且最灵敏,因此它被选为本法的流动相。

表1 *d,l*-HMPAO 和 *meso*-HMPAO 的分离结果

流动相	保留时间/min		峰高/cm		<i>meso</i> -HMPAO
	<i>d,l</i> -	<i>meso</i> -	<i>d,l</i> -	<i>meso</i> -	进样量/ $\times 10^{-6}$ g
A	6.8	7.3	2	2.2	15
B	4.4	4.8	1.8	1.2	15
C	3.8	2.9	0.2	3.3	1.5
D	4.7	2.9	0.9	3.3	1.5
E	4.5	4.2	0.2	0.5	1.5

2.2.2 液相色谱主要参数 在选定的色谱条件下,获得97% *d,l*-HMPAO 含量的冻干药盒分离谱图示于图3。表2列出4个药盒的分离结果,由表2可见, *d,l*-HMPAO 和杂质 *meso*-HMPAO 的保留时间分别为4.8—5.3 min 和2.9—3.2 min,总分离时间小于6 min,理论塔板高在0.01—0.06 mm 间,分离度大于5,拖尾峰因子在0.95—1间,其分离结果好于中国药典的规定^[5],本法快速、准确。

图3 *d,l*-HMPAO 冻干药盒溶液的色谱图对照品: 1 为 *meso*-HMPAO 溶液; II 为英国“Cerotec”溶液。

样品: II 为冻干药盒溶液。

组分: 1——*meso*-HMPAO; 2——*d,l*-HMPAO。

表2 色谱主要参数

样品号	保留时间 t_R/min		分离度 ¹⁾ R_S	理论塔板高 $H/\text{mm}^{2)}$		峰的拖尾因子 $T^{3)}$	
	<i>meso</i> -	<i>d,l</i> -		<i>meso</i> -	<i>d,l</i> -	<i>meso</i> -	<i>d,l</i> -
1	3.14	4.83	5.3	0.06	0.02	1	1
2	3.09	5.02	5.9	0.06	0.01	1	1
3	2.95	4.95	5.3	0.06	0.02	0.95	1
4	3.05	5.27	5.4	0.06	0.02	1	1

注: 1) $R_S = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$; 2) $H = L/n$, $n = 5.54(t_R/W_{0.5h})^2$; 3) $T = W_{0.05h} / 2d_1$ 。

2.2.3 标准曲线 取适量的纯 *meso*-HMPAO 结晶体配成标准液, 实验测得 *meso*-HMPAO 的进样量在 $1 \times 10^{-8} \text{g} - 3 \times 10^{-6} \text{g}$ 范围内与其峰高成线性关系。图4示出进样量 $\leq 8 \times 10^{-8} \text{g}$ 时, 进样量与其峰高的标准曲线。

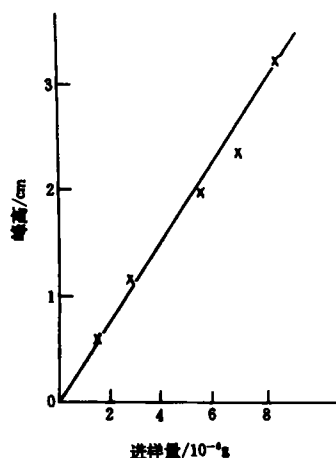
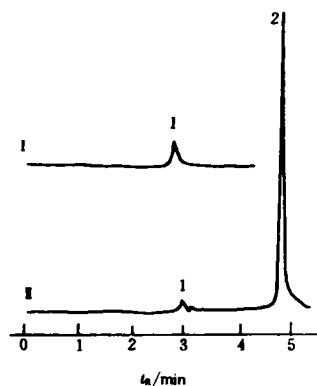
图4 *meso*-HMPAO 标准曲线

图5 HMPAO 非对映异构体的色谱图

样品: 1 为 *meso*-HMPAO 溶液; II 为 *d,l*-HMPAO 溶液。组分: 1——*meso*-HMPAO; 2——*d,l*-HMPAO。

2.2.4 HMPAO 非对映异构体的纯度分析 在同样的色谱条件下,进样量各为 $1.4 \times 10^{-8} \text{g}$ *meso*-HMPAO 和 $2.1 \times 10^{-6} \text{g}$ *d,l*-HMPAO 的分离结果示于图5,由图5可见,本院合成的 *d,l*-HMPAO 纯度达99%,此值与 NMR 法所测结果一致。适当控制 *d,l*-HMPAO 纯度就能确保 *d,l*-HMPAO 冻干药盒的质量。

2.2.5 方法的精密度和重加回收率 每个药盒样品连续进样分析5次,测得5个冻干药盒的精密密度,结果列入表3,精密密度为5%。

表3 方法精密密度测得结果

样品号	单次测得 <i>meso</i> -HMPAO 值/ μg	平均值/ μg	精密密度/%
1	36.7 36 35.3 38.9 38.9	37.2	5
2	38 38.1 38 38 37.2	37.8	1.2
3	45.4 46.4 45.4 46.4 47.7	46.3	2.5
4	67.8 68.6 68.6 71.5 75.2	70.3	4.3
5	267 288 279 285 288	281.4	3.8

注: $(t \cdot \delta_{n-1}) / (\sqrt{n} \cdot \bar{x}) \times 100\%$, $n=5, t=2.78$ 。

向3个药盒溶液中各加入不同量的 *meso*-HMPAO,进行5个平行样品的分析测定,结果列入表4。*meso*-HMPAO 的重加回收率为94%—107%。

表4 样品重加回收结果

样品号	重加 <i>meso</i> -量/ μg	回收 <i>meso</i> -量/ μg	回收率/%
1	10	9.4	94
2	20	21.4	107
3	33.7	33.4	99

2.2.6 方法的最小检出量 配制0.1mg/ml *meso*-HMPAO 溶液和0.2mg/ml *d,l*-HMPAO 溶液,连续进样3次,测得 *meso*-HMPAO 和 *d,l*-HMPAO 的紫外最小检出量分别为 $1 \times 10^{-8} \text{g}$ 和 $5 \times 10^{-7} \text{g}$ 。结果表明本法的灵敏度好。

2.2.7 *d,l*-HMPAO 冻干药盒溶液的稳定性 CIAE 的90-11-9批号冻干药盒溶液在常温下,于6小时内的不同时间进样,分析结果如表5和图6所示。图7示出英国 Amersham 公司的 Ceretec Lot A163冻干药盒溶液在 -20°C 下、3天时间内的分离谱图。结果说明药盒溶液在本法的工作条件下具有很好的稳定性。

表5 药盒溶液的稳定性

进样号	1	2	3	4	5	6	7	8
贮存时间/min	7	15	24	31	37	190	200	360
<i>d,l</i> -HMPAO 含量/%	98	98	98	98	98	97	97	96

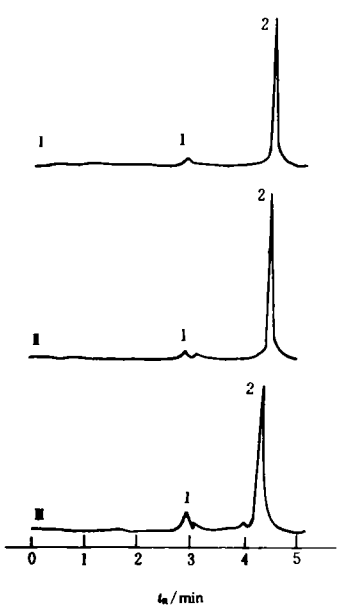


图6 CIAE药盒溶液的稳定性谱图
贮存时间/h: I——0.1; II——0.5; III——6。
贮存温度: 20℃。
组分: 1——*meso*-HMPAO; 2——*d,l*-HMPAO。

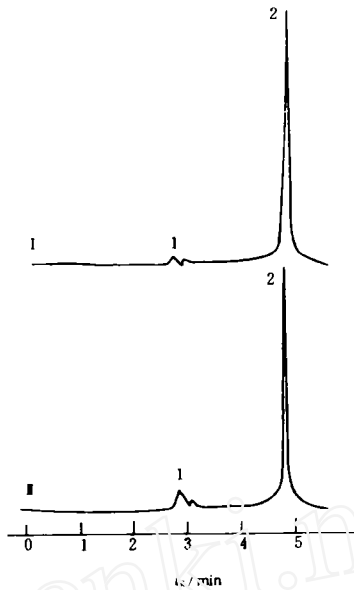


图7 英国药盒溶液的稳定性谱图
贮存时间/h: I——0.1; II——68。
贮存温度: -20℃。
组分: 1——*meso*-HMPAO; 2——*d,l*-HMPAO。

2.2.8 *d,l*-HMPAO 冻干药盒贮存的稳定性 本院和英国的不同批号冻干药盒在-20℃贮存3-6个月的*d,l*-HMPAO含量变化列入表6。结果表明冻干药盒的稳定性在该贮存温度下是好的。在使用有效期内,冻干药盒仍能确保放射性药物⁹⁹Tc^m-*d,l*-HMPAO注射液的质量。

表6 冻干药盒的贮存稳定性

生产厂家	贮存时间/d	批号	瓶号	<i>d,l</i> -HMPAO 含量/%
CIAE	180	91-09-12	126	97
	9		2	97
	15	90-11-15	64	98
	30	90-11-09	16	98
	60	90-07-23	28	96
	90	90-09-07	51	95
Amersham	90	Lot A 115		98
	180	Lot A 163		99

3 结 论

(1)本工作在国内外首次建立了用反相高效液相色谱法定量分析一种新的放射性药物⁹⁹Tc^m-*d,l*-HMPAO注射液的配体原料——HMPAO非对映异构体的纯度和放射性药物的配体——*d,l*-HMPAO冻干药盒中的*d,l*-HMPAO的含量,它们是该药物质量控制的关键

指标。

(2)我们研究出一种最佳的流动相使本工作获得满意的结果,已成功地用于本院合成的 HMPAO 非对映异构体纯度和 *d,l*-HMPAO 冻干药盒以及英国 Amersham 同类制品的质量控制。

(3)本法准确、快速、稳定和简便,理论塔板高小于0.06mm,总分离时间为5.5min,分离度大于5,测得 *d,l*-HMPAO 和杂质 *meso*-HMPAO 的最小检出量分别为 5×10^{-7} g 和 1×10^{-8} g,精密度为5%,重加回收率在94%—107%。

(4)CIAE 和英国 Amersham 公司的 *d,l*-HMPAO 冻干药盒溶液在本法的工作条件下,稳定性都很好。

本院同位素所药盒组黄晋杰等同志提供了 *d,l*-HMPAO 冻干药盒等样品,工作初期与北京医科大学第一医院贾少微同志进行了有益的讨论,在此一并谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 白兰芹,黄晋杰,范 礼,等. 新型脑局部血流量灌注显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*d,l*-HMPAO 的研制. 中国核科技报告, CNIC-00547, 1992.
- 2 Rudi DN, Lewis RC, Lan MP, et al. Technetium-99m *d,l*-HMPAO: A New Radiopharmaceutical for SPECT Imaging of Regional Cerebral Blood Perfusion. J Nucl Med, 1987, 28(2): 191.
- 3 Lewis RC, David PN, Rudi DN, et al. Complexes of Technetium-99m With Propylene Amine Oximes. U. K. Patent, EP-0194843, 1986-10-03.
- 4 贾少微,潘中允,朱绍莉,等. 用 $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ -HMPAO SPECT 断层影像定量测定 CBF 和 γCBF . 北京医科大学学报(增刊), 1989, 21(2): 11.
- 5 中华人民共和国卫生部药典委员会, 中华人民共和国药典, 1990年版, 二部, 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990年11月, 附录34.

THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF *d,l*-HMPAO AND ITS FREEZE-DRIED KIT BY HPLC

CHEN SUZHEN

(China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275, Beijing, 102413)

ABSTRACT

A quantitative analysis method of reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) is first established to study the stereoisomeric purity of HMPAO and *d,l*-HMPAO content of *d,l*-HMPAO freeze-dried kit. An optimized mobile phase has been selected to obtain chromatographic parameters which are better than those in all of references up to now. The theoretical plate height is less than 0.06mm. The total time of separation is only 5.5min when the flow rate is 1ml/min. The separation factor is larger than 5. The minimum detecting weights of *meso*-HMPAO and *d,l*-HMPAO are 1×10^{-8} g and 5×10^{-7} g, re-

spectively. The precision and the additional recovery of this method are 5% and 94%—107%, respectively. The method has the advantages of accuracy, rapidity, simplicity and suitability for the routine work and has been successfully applied to analyze *d,l*-HMPAO in stereoisomer and kit, which are made in China Institute of Atomic Energy and Amersham International plc UK.

Key words *d,l*-HMPAO Freeze-dried kit High performance liquid chromatography (HPLC)

学术会议消息

第四届全国核化学与放射化学 学术讨论会在西安举行

第四届全国核化学与放射化学学术讨论会于1993年11月2日至6日在西安西北核技术研究所举行。来自全国各高等院校、科研院所及核工业总公司所属厂矿的160余名代表出席了会议。

会议由学会理事长刘元方教授致开幕词。放射化学界老前辈、82岁高龄的杨承宗教授到会发表了热情洋溢的讲话。闭幕式上副理事长林漳基研究员做了总结。

大会共收到60多个单位的科学论文179篇,大会特邀报告10篇。内容涉及核燃料循环、核化学、铀系和钍系元素化学、放射分析化学、分离方法、示踪原子应用、核药物化学、标记化合物及环境放射化学等方面,较全面地覆盖了现代核化学与放射化学的整个领域。这是对近几年来我国核化学与放射化学研究成果的一次大检阅,也表明了我国核化学与放射化学在核能和核技术领域作出了重要贡献。

会议期间,与会代表通过各种形式进行了广泛的学术交流,这必将促进和推动我国核化学与放射化学的发展。

会议期间,中国核化学与放射化学学会理事会召开了第一次全体会议,《核化学与放射化学》召开了第四届编委会议。

与会代表参观了西北核技术研究所所史展览和实验设施,并收看了有关所史的录相。代表们对西北核技术研究所为我国核试验作出的卓越贡献表示由衷的钦佩。

中国原子能科学研究院
李大明供稿