

文章编号:0253-9950(2012)02-0093-09

新型骨显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的制备与初步生物学性质

王立勤^{1,2}, 邱玲^{2,*}, 林建国², 南蓓蓓^{1,2}, 罗世能²,
马海霞¹, 黄洁¹

1. 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069;

2. 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

摘要:在 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 存在下, 用 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 标记 1-羟基-2-(1-丁基-1H-咪唑-2-基)亚乙基-1, 1-双膦酸 (HBIDP)。研究了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的最优标记条件、理化性质及其在正常小鼠体内分布。结果表明, 当 $\text{pH}=6$ 、 $m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=100 \mu\text{g}$ 、 $m(\text{HBIDP})=5 \text{ mg}$ 、 $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-)=55.5 \text{ MBq}$ 、室温反应 15 min 时, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的标记率大于 95%。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 在 pH 为 7.0 和 7.4 时, 脂水分配系数 $\lg P$ 分别为 -2.17 和 -2.28。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的血浆蛋白结合率为 $(31.41 \pm 1.25)\%$ 。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 具有良好的体外稳定性。动物分布实验显示: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 在骨组织中有较高摄取, 并能保持较长时间; 其在软组织中的摄取相对较低, 并能较快的清除。此外, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 较 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -ZL 在心、肝、脾等器官组织中的摄取低。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 有望成为新型骨显像剂。

关键词: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP; 标记; 理化性质; 动物分布; 骨显像剂

中图分类号:R817 **文献标志码:**A

Preparation and Biological Study on a Novel Bone Imaging Agent $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP

WANG Li-qin^{1,2}, QIU Ling^{2,*}, LIN Jian-guo², NAN Bei-bei^{1,2}, LUO Shi-neng²,
MA Hai-xia¹, HUANG Jie¹

1. School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine; Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health;
Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine; Wuxi 214063, China

Abstract: To obtain a maximum radiolabeling yield, the labeling parameters for $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP were optimized. Chemical and physical properties and biodistribution studies in mice for $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP were performed. The optimal labeling parameters are found as follows: $\text{pH}=6$, $m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=100 \mu\text{g}$, $m(\text{HBIDP})=5 \text{ mg}$, $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-)=55.5 \text{ MBq}$ at room

收稿日期:2011-09-14; **修订日期:**2011-12-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20801024); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2009077); 江苏省卫生厅科研项目(H200963)

作者简介:王立勤(1986—), 男, 陕西宁强人, 硕士研究生, 化学工程专业

* **通信联系人:**邱玲, 女, 江苏扬州人, 博士, 副研究员, 研究室主任, 主要从事肿瘤诊治药物的研究

temperature for 15 min and the radiochemical purity is more than 95% and it is stable within 6 h *in vitro* at room temperature. The octanol-water partition coefficients of $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP (lg *P*) are -2.17 and -2.28 at the pH value of 7.0 and 7.4, respectively. The plasma protein binding ratio of $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP is $(31.41 \pm 1.25)\%$. In the biodistribution studies, $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP exhibits a relatively high uptake in bone and much lower uptake in soft tissues and shows rapid clearance from soft tissues. Besides, the uptake of $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP in heart, liver and spleen is much lower than that of $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL. These preliminary studies indicate that $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP has significant potential as a novel bone imaging agent.

Key words: $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP; radiolabeling; chemical and physical property; biodistribution; bone imaging agent

放射性核素骨显像已成为临床诊断和研究骨质病变最为普遍的技术手段之一^[1]。20世纪70年代中期,骨扫描代替了X射线用以研究骨质病变,它能够比X射线提早几个月探测到某些骨质病变的发生。Subramanian等^[2]对 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP和其它 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的骨显像剂进行了详细的对比,认为 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP用于骨显像效果最佳。然而 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP作为骨显像剂也存在不足之处,比如给药后2~6 h,骨扫描效果才比较好^[3]。缩短给药后扫描等待时间可以减轻病人的负担,这就要求放射药物对骨质有更高的亲和力。在其后30多年里,科研工作者不断将双膦酸结构优化后进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,以发展性能优异的新型骨显像剂^[1,3-4]。

双膦酸以含P—C—P键为特征,侧链由R₁和R₂构成。改变两个侧链R₁和R₂的结构,极大地丰富了双膦酸的结构,为寻求更优秀的双膦酸提供了可能。侧链R₁和R₂决定了双膦酸的药理特性^[5-7]。R₁为羟基,提高了双膦酸对骨质的亲和力。R₂的性质对于提高双膦酸抑制骨再吸收能力至关重要。R₂为含氮烷基或含氮杂环,R₁为羟基的双膦酸的治疗效果更好。帕米膦酸(pamidronate)的烷基链上有1个伯胺氮原子,其效能是不含氮原子的依替膦酸(etidronate)效能的10到100倍^[6]。大多数的第三代双膦酸R₂为含有1个或2个氮原子的杂环。唑来膦酸(1-羟基-2-(1H-咪唑-1-基)乙烷-1,1-双膦酸,Zoledronic acid)是目前综合治疗效果最佳的双膦酸,它的效能至少是帕米膦酸的100倍或者是依替膦酸的1000倍^[8]。

为了寻找新型品优双膦酸骨显像剂,本课题组进行了大量尝试,陆续制备了 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的双膦酸,包括 $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL^[9]、 $^{99}\text{Tc}^m$ -MIDP^[10]、 $^{99}\text{Tc}^m$ -

EIDP^[11]、 $^{99}\text{Tc}^m$ -PIDP^[12]和 $^{99}\text{Tc}^m$ -EMIDP^[13],探索了它们作为骨显像剂的可能性。结果表明,这些标记物有良好的生物学性质,注射药物后1~2 h可以给出清晰的全身兔骨显像,是潜在的骨显像剂。为了寻找新型性能更加优异的骨显像剂,本工作拟合成一种新型双膦酸,即1-羟基-2-(1-丁基-1H-咪唑-2-基)亚乙基-1,1-双膦酸(HBIDP),并用 $^{99}\text{Tc}^m$ 进行标记,测定 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP的脂水分配系数和血浆蛋白结合率,比较 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP与 $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL小鼠体内分布的差异。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

1-丁基咪唑(纯度为99%),上海邦成化工有限公司;其他试剂均为分析纯,无需提纯,可直接使用,国药集团上海化学试剂有限公司。

Yanaco MP-500熔点仪,日本岛津公司;Elementar Varil EL III型元素分析仪,德国Elementar公司;TENSOR27型傅里叶变换红外光谱仪,德国Bruker光谱仪器公司;Waters Platform ZMD4000型质谱仪,美国Waters公司;Bruker DRX-500型核磁共振仪,德国Bruker光谱仪器公司;Waters 600型高效液相色谱仪,美国Waters公司;HPLC柱,SinoChrom ODS-BP,PN: E2117215-080108,4.6 mm × 250 mm × 10 μm,大连依利特分析仪器有限公司;Cd(Te)检测器,美国Perkin Elmer公司;PackardCobra型自动γ计数器,美国Victoreen公司。

ICR小鼠,18~20 g,上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 1-羟基-2-(1-丁基-1H-咪唑-2-基)亚乙基-1,1-双膦酸(6)(HBIDP)的合成

按图1所示,原料1-丁基咪唑(1)经五步反应,合成了目标化合物1-羟基-2-(1-丁基-1H-咪

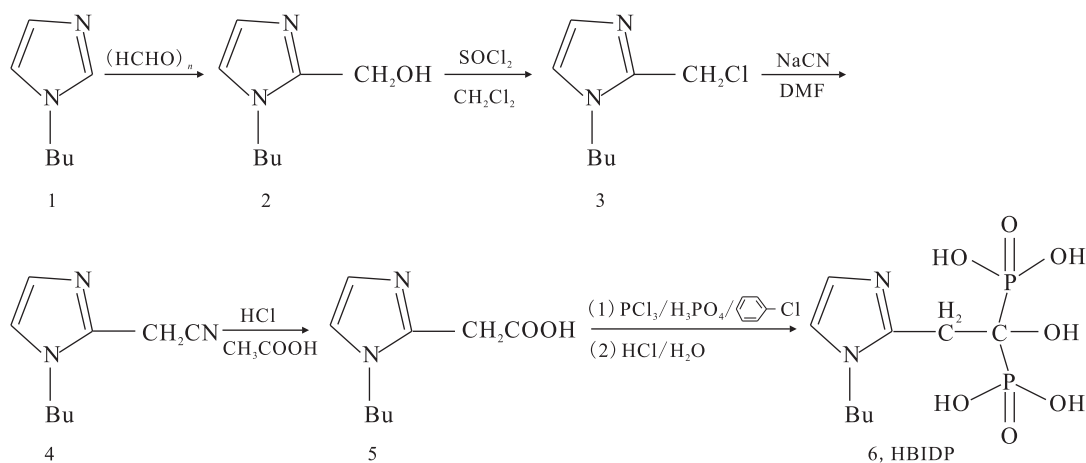


图 1 HBIDP 的合成路线

Fig. 1 Scheme for synthesis of HBIDP

啉-2-基)亚乙基-1,1-双磷酸(6)。详细合成方法参见文献[14-15]。

1.3 ⁹⁹Tc^m-HBIDP 的制备

配体溶液的配制:将 250 mg HBIDP 加入到 5 mL 0.02 mol/L NaOH 溶液中使之溶解,其质量浓度为 50 g/L, pH≈6。

SnCl₂·2H₂O 溶液的配制:准确称量 10 mg SnCl₂·2H₂O 置于干净的西林瓶中,加入 0.5 mol/L HCl 10 mL,将其溶解完全,其质量浓度为 1 g/L。此溶液需现配现用。

向 10 mL 西林瓶中依次加入一定体积的 50 g/L 双磷酸钠盐溶液、一定体积的 1 g/L SnCl₂·2H₂O 盐酸溶液,一定量的 Na⁹⁹Tc^mO₄ 溶液,再加入 pH=6 的磷酸盐缓冲溶液(PBS),控制总体积为 2 mL,涡旋振荡器充分振荡混匀,室温(25±1)℃下反应一定时间即标记完毕。

1.4 标记率和放化纯的测定方法

本实验所获得的标记物因未进行分离纯化,所以标记率(Y)即为放化纯(RCP)。标记物的放化纯用薄层纸层析法(TLC)和高效液相色谱法(HPLC)测定。TLC:采用新华一号试纸为支持物,将反应液用毛细管分别在两条层析条一端点样(3 μL),然后分别在丙酮和水展开剂中竖直向上展开,待溶剂到达终点后,取出晾干,然后剪成 1 cm 小碎片,用 γ 计数器测定其放射性计数,进而计算标记率,得到放化纯。对于丙酮相,⁹⁹Tc^mO₂ 随溶剂一起向上移动,⁹⁹Tc^mO₂ 胶体和 ⁹⁹Tc^m-HBIDP 仍留在点样点附近。对于水相,⁹⁹Tc^mO₂ 胶体留在点样点附近,⁹⁹Tc^mO₄⁻ 和 ⁹⁹Tc^m-HBIDP 随溶剂一起向上移动。HPLC:将已过滤(滤膜孔

径 0.22 μm)的标记液(10 μL)注入 HPLC 柱, Cd(Te) 检测器检测标记物放射性。流速 0.9 mL/min,流动相为 70% 乙酸溶液(w=1%) 和 30% 乙腈。

1.5 最佳标记条件的选择

1.5.1 pH 值对放化纯的影响 向 12 个西林瓶中各加入 100 μL 50 g/L HBIDP 的钠盐溶液、100 μL 1 g/L SnCl₂·2H₂O 的盐酸溶液、55.5 MBq 新鲜淋洗的 Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液,分别用 pH 为 1 至 12 的磷酸盐缓冲液将其定容至 2 mL,涡旋混合器充分混匀后开始计时,室温(25±1)℃下反应 20 min 用 TLC 法测定各个体系的放化纯。

1.5.2 SnCl₂·2H₂O 用量对放化纯的影响 向 10 个西林瓶中均加入 100 μL 50 g/L HBIDP 钠盐溶液,再分别加入含 5、10、30、50、80、100、120、150、200 和 250 μg SnCl₂·2H₂O 的盐酸溶液,新鲜淋洗的 Na⁹⁹Tc^mO₄⁻ 洗脱液(55.5 MBq)后,用 pH=6 的磷酸盐缓冲液将其定容至 2 mL,涡旋混合器充分混匀后开始计时,在室温(25±1)℃下反应 20 min 后用 TLC 法测定各个体系的放化纯。

1.5.3 ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 活度对放化纯的影响 向 8 个西林瓶中均依次加入 100 μL HBIDP 钠盐溶液和 100 μL 1 g/L SnCl₂·2H₂O 盐酸溶液,再分别加入 18.5、37、55.5、74、111、148、185、222 MBq 的 Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液,用 pH=6 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL,涡旋混合器将其充分混匀后开始计时,室温(25±1)℃下反应 20 min 用 TLC 法测定各个体系的放化纯。

1.5.4 配体用量对放化纯的影响 向 10 个西林瓶中分别加入含有 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、

5.0、6.0、8.0、10.0 mg HBIDP 的钠盐溶液,再逐个加入 100 μL 1 g/L $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的盐酸溶液,新鲜淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 洗脱液 55.5 MBq,用 $\text{pH}=6$ 的磷酸盐缓冲液将其定容至 2 mL,涡旋混合器充分混匀后开始计时,室温(25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下反应 20 min 后用 TLC 法测定各个体系的放化纯。

1.5.5 反应时间对放化纯的影响 向西林瓶中加入 100 μL 50 g/L HBIDP 的钠盐溶液,100 μL 1 g/L $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的盐酸溶液,新鲜淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 溶液(55.5 MBq),用 $\text{pH}=6$ 的磷酸盐缓冲液将其定容至 2 mL,涡旋混合器充分混匀后开始计时,室温(25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下反应,在 30 min 之内,每 5 min 取样 1 次测定不同时间下的放化纯。

1.6 脂水分配系数

将磷酸盐缓冲液与正辛醇超声振荡混合,使两相互相饱和后分离贮存备用。

取 2 支放敏管,编为 1 号与 2 号,向二者均加入饱和的 1.0 mL 正辛醇和 1.0 mL 磷酸盐缓冲液,其中向 1 号管所加磷酸盐缓冲液 $\text{pH}=7.0$,向 2 号管所加磷酸盐缓冲液 $\text{pH}=7.4$,然后向两支管中均加入 100 μL $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 溶液(约 1.85 MBq),室温下涡旋混合器混合振荡 2 min,然后离心 5 min(4 000 r/min),以保证两相完全分离,两相各取 100 μL 测其放射性计数。计算脂水分配系数 $\lg P = \lg(\text{有机相放射性计数}/\text{水相放射性计数})$ 。

1.7 血浆蛋白结合率

分别配制质量浓度为 100 g/L 和 250 g/L 的三氯乙酸;取新鲜肝素抗凝血浆 2 mL(江苏省原子医学研究所附属江原医院提供),于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

取 3 支放敏管,各加入 100 μL 血浆和 100 μL $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 溶液(约 55.5 kBq),37 $^\circ\text{C}$ 水浴孵育 2 h。给每管加入 250 g/L 三氯醋酸 1 mL,以使血浆蛋白沉淀。上层清液和沉淀离心分离 5 min(2 000 r/min),收集上清液。向沉淀中加入 100 g/L 的三氯醋酸 1 mL,涡旋混合器混匀,离心 5 min(2 000 r/min),收集上清液。此步骤重复操作 3 次。分别测定沉淀的放射性计数和上清液的放射性计数,计算血浆蛋白结合率 = 沉淀物放射性计数 / (沉淀物放射性计数 + 上清液放射性计数) $\times 100\%$ 。

1.8 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 在鼠体内分布实验

ICR 小鼠 35 只,随机分为 7 组,每组 5 只,每

只小鼠尾静脉注射 200 μL 新配制的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP(约 7.4 MBq),分别于注射后 5、10、15、30、60、120、240 min 时断颈处死,先用一次性定量采血管取 200 μL 颈动脉血液,后解剖取心、肝、脾、肺、肾、大腿骨、关节、肌肉、脑等组织,称重,用 γ 计数器测定放射性计数,同时测定标准液的放射性计数,分别计算各脏器每克组织的摄取量($\% \text{ID/g}$)。

2 结果与讨论

2.1 HBIDP 的合成

HBIDP 的合成反应前半步属于磷酰化反应,三氯化磷对于反应的顺利进行十分必要,没有三氯化磷反应不能进行^[16]。该反应是一个强烈的放热反应,同时放出大量氯化氢气体。当三氯化磷加入速度过快时,体系内温度快速升高,反应异常剧烈,瞬间产生大量气体,容易造成危险,同时造成产物产率低下。通过控制三氯化磷的滴加速度和加料时油浴温度(70~80 $^\circ\text{C}$),既可以使反应较快进行,又不致因反应剧烈放热和放出气体使体积迅猛膨胀而发生危险,从而保证了反应平稳顺利进行。由于该反应是非均相反应,产率一般在 40%~60%^[17]。据文献[17]报道,若用甲磺酸做溶剂,整个反应过程保持均相反应,收率可达到 90%,但后处理不如用氯苯简单方便,且后者更廉价。

本实验所得目标物 HBIDP,收率:50.0%;熔点:140~145 $^\circ\text{C}$;元素分析:实测值(理论值)C 32.89% (32.94%), H 5.61% (5.53%), N 8.49% (8.54%);IR(KBr, cm^{-1}): 3 155(s), 2 962(s), 2 875(s), 2 318(br, w), 1 598(m), 1 520(m), 1 467(w), 1 164(s), 985(s);ESI-MS, $m/z(\%)$: 329(100) = M+1; ^1H NMR(400 MHz, D_2O , δ): 7.31(d, 1H, ring-H), 7.26(d, 1H, ring-H), 4.21(t, 2H, N- CH_2), 3.58(t, 2H, $J_{\text{HP}} = 12$ Hz, $\text{CH}_2\text{C-P}$), 1.81(m, 2H, N- CH_2CH_2), 1.32(m, 2H, - CH_2CH_3), 0.91(t, 3H, - CH_3)。

2.2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的放射化学纯度

对于丙酮展开相, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$ 胶体和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的 $R_f = 0.0 \sim 0.1$, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的 $R_f = 0.9 \sim 1.0$ 。对于水展开相, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$ 胶体的 $R_f = 0.0 \sim 0.1$, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的 $R_f = 0.8 \sim 1.0$, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的 $R_f = 0.9 \sim 1.0$ 。两个展开剂相结合,能准确计算出 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的放射化学纯度。在选择的最佳

标记条件下($\text{pH}=6$, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用量为 $100 \mu\text{g}$, 配体用量为 5 mg , $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 活度为 55.5 MBq , 室温反应 15 min), $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的放射化学纯度大于 95% 。

图 2 为 HPLC 方法对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -

HBIDP 的分析结果。从图 2 可以看出, 游离 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的保留时间为 10.00 min , $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的保留时间为 2.80 min 。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$ 胶体没有出峰的原因可能是被吸附在色谱柱内。 TLC 和 HPLC 法测得的结果一致。

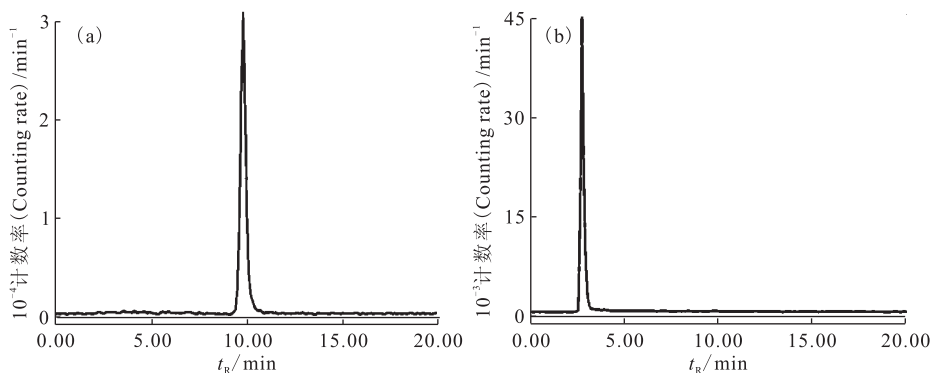


图 2 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ (a) 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP (b) 的 HPLC 谱图分析

Fig. 2 HPLC chromatograms of $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ (a) and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP (b)

2.3 最佳标记条件

通过逐步改变体系 pH 值、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的用量、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 活度、配体用量和反应时间等, 确定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 的最佳标记条件。

2.3.1 pH 值对放化纯的影响结果 pH 对放化纯的影响示于图 3。从图 3 可以看出, 放化纯对体系 pH 值变化很敏感。 $\text{pH} \approx 6$ 时, 放化纯最高, 达到 95% 以上; pH 大于 7 或小于 2 时, 放化纯急剧下降, 并小于 90% 。氯化亚锡在中性水溶液易分解生成沉淀, 与碱作用生成水和氧化物沉淀, 但碱量过剩时, 生成能溶解的亚锡酸盐, 均会使还原性大大降低甚至消失。但酸性太强时, 放化纯也会明显下降。这可能是因为强酸性条件下, 大量质子存在抑制了配位反应的发生。据此, 选择

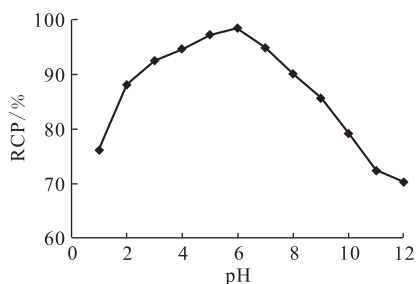


图 3 pH 对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 放化纯的影响

Fig. 3 Influence of the pH value on RCP of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP

$\text{pH}=6$ 作为标记反应条件。

2.3.2 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的用量对放化纯的影响结果 氯化亚锡用量 ($m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$) 对放化纯的影响示于图 4。从图 4 可看出, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用量过少时, 不足以使全部 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 被还原, 因而放化纯较低, 不能达到使用要求。当 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用量为 $100 \mu\text{g}$ 时, 放化纯最高。当 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用量大于 $100 \mu\text{g}$ 时, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 被还原成 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_2$ 胶体的量也随之增加, 标记率低于 95% , 随着还原剂用量的增多, 放化纯缓慢降低。故选择 $100 \mu\text{g}$ 为 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 最优用量。

2.3.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 活度对放化纯的影响结果 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 活度 ($A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-)$) 对放化纯的影响示于图 5。从图 5 可以看出, 当 $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-) = 18.5 \text{ MBq}$ 时,

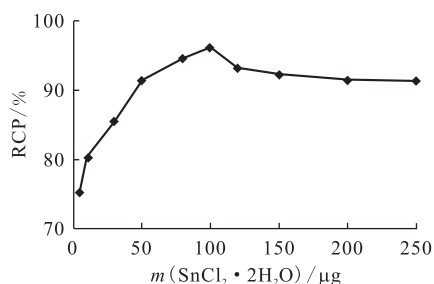


图 4 氯化亚锡用量对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP 放化纯的影响

Fig. 4 Influence of the amount of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ on RCP of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HBIDP

放化纯已达 90% 以上; 当 $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-) = 55.5 \text{ MBq}$ 时, 放化纯已基本稳定 ($> 96\%$), 且再增加 $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-)$, 放化纯变化不大, 为了节约同位素和减少辐射, 本标记实验选取 $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-) = 55.5 \text{ MBq}$ 为最优用量。

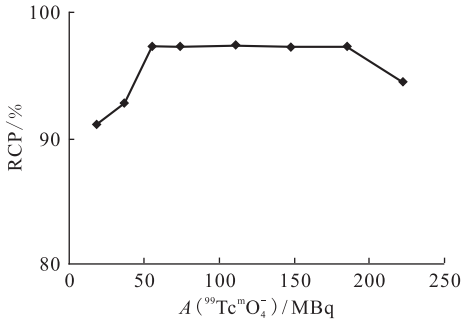


图 5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 活度对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 放化纯的影响
Fig. 5 Influence of $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-)$ on RCP of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$

2.3.4 配体用量对放化纯的影响 配体用量 ($m(\text{HBIDP})$) 对放化纯的影响示于图 6。从图 6 可以看出, 配体用量为 5 mg 时, 放化纯大于 95%; 配体用量大于 5 mg 时, 放化纯几乎保持不变; 当配体用量减少时, 放化纯有明显的下降, 可能是因为游离的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 和胶体的放射性计数占总放射性计数的比例升高。因此, 配体用量 5 mg 为最佳选择。

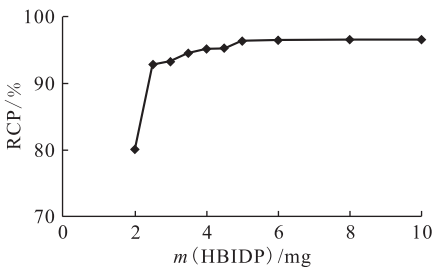


图 6 配体用量对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 放化纯的影响
Fig. 6 Influence of the amount of HBIDP on RCP of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$

2.3.5 反应时间对放化纯的影响 反应时间 (t_{reac}) 对放化纯的影响示于图 7。从图 7 可以看出, 时间对放化纯的影响较小。1 min 内放化纯已达 90%, 说明此反应十分迅速。15 min 时 RCP 已达 95%, 时间再延长, 标记率略有上升。为了缩短制备放射药物的时间, 15 min 已经可以满足

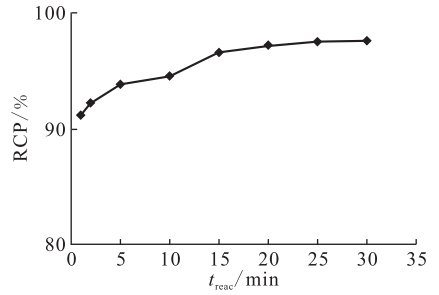


图 7 反应时间对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 放化纯的影响
Fig. 7 Influence of the reaction time on RCP of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$

使用要求。

2.3.6 小结 依据上面的实验结果, 确定最佳标记条件是 $\text{pH} = 6$, $m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 100 \mu\text{g}$, $m(\text{HBIDP}) = 5 \text{ mg}$, $A(^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-) = 55.5 \text{ MBq}$, 室温反应 15 min。在最佳标记条件下, 放化纯大于 95%。

2.4 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的体外稳定性

标记物良好的体外稳定性是放射性药物能被应用的前提。将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 置于室温 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下, 分别于标记后 1、2、3、4、5、6 h 时取样测定放化纯。其结果示于图 8。由图 8 可知, 6 h 时放化纯大于 90%, 这说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的体外稳定性较好, 满足使用要求。

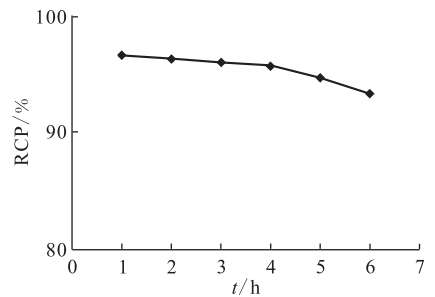


图 8 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的体外稳定性
Fig. 8 *In vitro* stability of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$

2.5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的脂水分配系数

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 在 pH 为 7.0 和 7.4 时, 脂水分配系数 $\lg P$ 分别为 -2.17 和 -2.28 , 表现出很强的亲水性。对骨显像药物而言, 亲水性越好, 单位质量的药物在软组织中的吸收将会相对下降, 靶向组织 (骨骼) 中的摄取相对增加, 有利于发挥药物的显像作用。

2.6 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的血浆蛋白结合率

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-HBIDP}$ 的血浆蛋白结合率为 $(31.41 \pm$

1.25)%。⁹⁹Tc^m-ZL 血浆蛋白结合率为 17.40%^[9]。前者血浆蛋白结合率高于后者,可能是分子中含有亲脂性丁基,增加了其与蛋白的结合能力,从而使其血浆蛋白结合率增大。

2.7 ⁹⁹Tc^m-HBIDP 在小鼠体内分布实验

⁹⁹Tc^m-HBIDP 小鼠体内分布实验结果列于表 1。从表 1 可以看出,⁹⁹Tc^m-HBIDP 主要集中在骨、关节和肾中,并且在骨中有高度选择性的摄取。⁹⁹Tc^m-HBIDP 在注射 5 min 后,在骨和关节中的摄取分别达到了(4.76±0.37)% ID/g 和(11.55±0.85)% ID/g,并且逐渐增加,在 30 min

时达到最高,分别为(9.07±0.97)% ID/g 和(30.12±2.36)% ID/g。随着时间的延长,其在骨和关节中的吸收有所下降,但是在 240 min 时仍分别高达(6.83±0.14)% ID/g 和(18.96±1.87)% ID/g,而药物在心、肝、脾、肺等器官组织中已经基本清除完毕。⁹⁹Tc^m-HBIDP 在肾脏和血液中的摄取随时间延长而快速下降,表明此药物主要经过肾脏代谢,经由泌尿系统排出体外。随着时间的延长,骨摄取与心、肝、脾、肺、血液中摄取的比值快速升高,有利于降低显像本底,提高骨显像质量。图 9 给出了⁹⁹Tc^m-HBIDP 和⁹⁹Tc^m-

表 1 ⁹⁹Tc^m-HBIDP 小鼠体内分布
Table 1 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-HBIDP in normal mice

组织(Tissues)	每克组织百分注射剂量率(Percentage of the injected dose per gram of tissue mass)/(%ID · g ⁻¹)						
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
心(Heart)	1.97±0.08	1.36±0.06	0.95±0.01	0.60±0.03	0.42±0.01	0.21±0.02	0.12±0.01
肝(Liver)	1.37±0.03	1.01±0.09	1.00±0.05	0.62±0.04	0.57±0.03	0.51±0.02	0.31±0.01
脾(Spleen)	0.99±0.13	0.71±0.08	0.67±0.05	0.41±0.04	0.35±0.01	0.24±0.01	0.08±0.02
肺(Lung)	2.54±0.24	2.10±0.55	1.98±0.25	1.12±0.05	0.63±0.03	0.33±0.02	0.11±0.02
肾(Kidney)	9.00±0.68	7.22±1.37	6.61±0.65	5.39±0.22	3.70±0.13	3.11±0.33	2.36±0.01
骨(Bone)	4.76±0.37	6.30±0.24	7.76±1.26	9.07±0.97	7.75±0.64	8.83±0.27	6.83±0.14
关节(Joint)	11.55±0.85	13.10±0.96	20.06±1.23	30.12±2.36	22.28±2.45	25.19±2.33	18.96±1.87
肌肉(Muscle)	1.29±0.05	0.79±0.15	0.74±0.02	0.32±0.01	0.19±0.01	0.14±0.03	0.06±0.01
脑(Brain)	0.14±0.02	0.10±0.01	0.09±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01	0.01±0.00
血(Blood)	6.67±0.38	4.11±0.69	3.39±0.40	1.55±0.10	1.07±0.08	0.36±0.05	0.21±0.04
骨/心(Bone/Heart) ¹⁾	2.41	4.63	8.09	14.90	18.23	41.40	52.91
骨/肝(Bone/Liver) ¹⁾	3.45	6.24	7.75	14.54	5.64	17.00	22.25
骨/脾(Bone/Spleen) ¹⁾	4.77	8.82	11.47	22.25	17.21	36.18	59.98
骨/肺(Bone/Lung) ¹⁾	1.13	2.10	2.85	4.79	5.60	11.55	22.77
骨/肾(Bone/Kidney) ¹⁾	0.53	0.87	1.17	1.68	2.09	2.84	2.88
骨/肌肉(Bone/Muscle) ¹⁾	3.67	7.95	10.51	27.74	40.30	62.97	105.01
骨/脑(Bone/Brain) ¹⁾	32.26	58.94	81.67	228.96	215.60	387.00	579.55
骨/血(Bone/Blood) ¹⁾	0.71	1.53	2.29	5.84	7.19	24.50	31.82

注(Notes):1) 量纲为 1(Unit is 1)

2) n=5

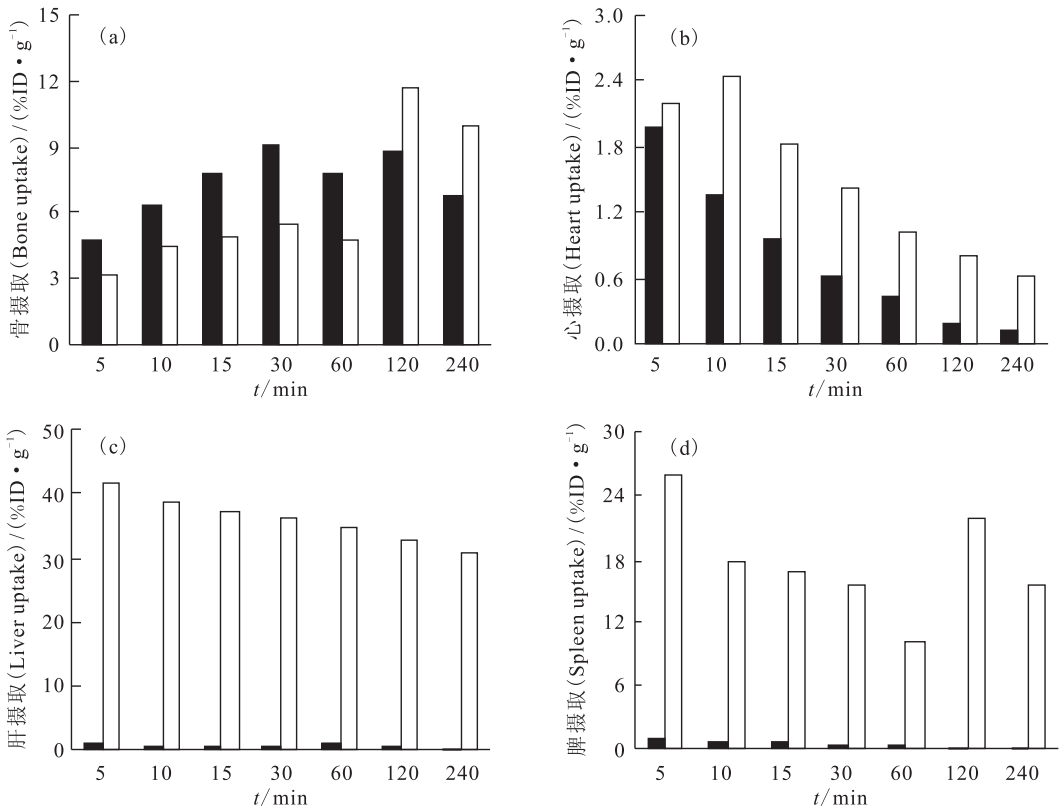


图 9 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 和 $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL 不同时刻的小鼠体内分布

Fig. 9 Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP and $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL in mice at different post-injection time

■ — $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP, □ — $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL

(a) — 骨摄取 (Bone uptake), (b) — 心摄取 (Heart uptake),

(c) — 肝摄取 (Liver uptake), (d) — 脾摄取 (Spleen uptake)

ZL(其小鼠分布数据可参考文献[9])不同时刻骨、心、肝和脾器官组织中的摄取值的对比。前者在骨中摄取 60 min 内高于后者。在 240 min 内 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 在心、肝和脾器官组织中的摄取远低于 $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL, 表明 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 对这些重要脏器的伤害较小。总之, $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 有望成为新型骨显像剂。

3 结论

在合成双磷酸 HBIDP 的基础上, 对其进行标记, 最优标记条件为 $\text{pH}=6$ 、 $m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=100 \mu\text{g}$ 、配体用量为 5 mg、 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 活度为 55.5 MBq, 室温下反应 15 min, 标记率大于 95%, 得到的 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 体外稳定性较好。 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 在 pH 为 7.0 和 7.4 时, $\lg P$ 分别为 -2.17 和 -2.28。 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 的血浆蛋白结合率为 $(31.41 \pm 1.25)\%$ 。 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 在骨组织中有较高的选择性摄取。 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 较 $^{99}\text{Tc}^m$ -ZL 在心、肝、脾等器官组织中

的摄取低, 对器官伤害小。 $^{99}\text{Tc}^m$ -HBIDP 有望成为一种新型骨显像剂。

参考文献:

- [1] Vbrbeke K, Rozenski J, Cleyhens B, et al. Development of a Conjugate of $^{99}\text{Tc}^m$ -EC With Aminomethylenediphosphonate in the Search for a Bone Tracer With Fast Clearance From Soft Tissue[J]. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13 (1): 6-22.
- [2] Subramanian G, McAfee J G, Blair R J, et al. Technetium-99m-Methylene Diphosphonate-A Superior Agent for Skeletal Imaging: Comparison With Other Technetium Complexes [J]. *J Nucl Med*, 1975, 16 (8): 744-755.
- [3] Ogawa K, Mukai T, Inoue Y, et al. Development of a Novel $^{99}\text{Tc}^m$ -Chelate-Conjugated Bisphosphonate With High Affinity for Bone as a Bone Scintigraphic Agent[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47 (12): 2 042-2 047.

- [4] Fogelman I, Pearson D W, Bessent R G, et al. A Comparison of Skeletal Uptakes of Three Diphosphonates by Whole-Body[J]. *J Nucl Med*, 1981, 22: 880-883.
- [5] Russell R G G, Croucher P I, Rogers M J. Bisphosphonates; Pharmacology, Mechanisms of Action and Clinical Uses[J]. *Osteoporosis Int Suppl*, 1999, 2: S66-80.
- [6] Russell R G G, Rogers M J. Bisphosphonates; From the Laboratory to the Clinic and Back Again[J]. *Bone*, 1999, 25 (1): 97-106.
- [7] Widler L, Jaeggi K A, Glatt M. Highly Potent Geminal Bisphosphonates. From Pamidronate Disodium (Aredia) to Zoledronic Acid (Zometa)[J]. *J Med Chem*, 2002, 45 (17): 3 721-3 738.
- [8] Smith M R. Osteoclast Targeted Therapy for Prostate Cancer; Bisphosphonates and Beyond[J]. *Urol Oncol-Semin Ori*, 2008, 26: 420-425.
- [9] Lin Jianguo, Qiu Ling, Cheng Wen, et al. Preparation and *in Vivo* Biological Investigations on a Novel Radioligand for Bone Scanning: Technetium-99m-Labeled Zoledronic Acid Derivative[J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(5): 619-629.
- [10] 罗世能,王洪勇,谢敏浩,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIDP 的制备及其生物学分布[J]. *中华核医学杂志*, 2005, 25(6): 341-343.
- [11] 牛国塞,罗世能,严孝红,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EIDP 的制备及生物学分布[J]. *核技术*, 2008, 31(9): 698-701.
- [12] Chen Chuanqing, Luo Shineng, Lin Jianguo, et al. Preparation and Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -PIDP as Bone Imaging Agent[J]. *Nucl Sci Technol*, 2009, 20 (5): 302-306.
- [13] Lin Jianguo, Luo Shineng, Chen Chuanqing, et al. Preparation and Preclinical Pharmacological Study on a Novel Bone Imaging Agent $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EMIDP[J]. *Appl Radiat Isot*, 2010, 68: 1 616-1 622.
- [14] 南蓓蓓,邱玲,林建国,等.两种新型 1-烷基咪唑类双膦酸的合成和表征[J]. *化学试剂*, 33(11): 971-974.
- [15] Guo Xuehua, Luo Shineng, Wang Hongyong, et al. Study on the Preparation and Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HMIBP[J]. *Nucl Sci Tech*, 2006, 17 (5): 285-288.
- [16] Prentice J B, Quimby O T, Grabenstetter R J, et al. Interaction of Acylating Agents and Phosphorus (III) Sources. I. Intermediacy of Condensed Species in the Formation of Ethane-1-Hydroxy-1, 1-Diphosphonic Acid[J]. *J Am Chem Soc*, 94 (17): 6 119-6 124.
- [17] Kieczkowski G R, Jobson R B, Melillo D G. Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidene)Bisphosphonic Acid Sodium Salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An Improved Procedure for the Preparation of 1-Hydroxy-1, 1-Bisphosphonic Acids[J]. *J Org Chem*, 1995, 60 (25): 8 310-8 312.