

出國報告（出國類別：實習）

**赴美國紐約 Brookhaven National
Laboratory 研習 PET 核醫藥物之研
製與品管分析技術之心得報告**

服務機關：行政院原子能委員會核能研究所

姓名職稱：樊修秀 助理研究員

派赴國家：美國 紐約

出國期間：94.08.31-94.10.30

報告日期：94.10.30

摘要

輻應中心之核醫製藥中心例行供應 ^{18}F -FDG核醫正子藥物於各大醫院，進行臨床診斷與研究，由於其正子照影影像清晰之優點，極具開發價值。因應新正子核醫藥物開發需求以及正子核醫藥物品管分析之嚴謹性、立即性與需求性，本次赴美國紐約Brookhaven National Laboratory (BNL) 之PET實驗室研習不同之PET核醫藥物研製與品管分析技術。美國BNL首創 ^{18}F -FDG核醫正子藥物診斷方法；設計開發Tc-99m發生器以及在多種核醫藥物追蹤研究與開發成果上成就斐然，可謂領導全球PET研究之先驅者，並獲得評選為國際PET優良實驗室之殊榮。化學系Dr. Ding教授領導之Radiotracer Development實驗室研究開發新正子核醫藥物與建立品管分析技術。

目 次

摘 要

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	1
三、心 得	23
四、建 議 事 項	23
五、附 錄	24

一、目的

Dr.Ding 實驗室主要針對 PET 研究開發不同的追蹤方法、研究腦部功能改變與精神病間關聯性之研究、並追蹤在各年齡層、神經退化症、藥物成癮與藥物治療患者之變化。本次實習目的主要希望能隨 Dr. Ding 研習不同之 PET 核醫藥物研製與品管分析技術，並了解該實驗室目前之研發動向，以提升本所核醫藥物研發能量，並希望與 Dr. Ding 建立未來良好之合作關係。

二、過程

職於 2005 年 8 月 31 日搭乘中華航空 (CI008 航班) 22:50 離開台灣中正國際機場 (TPE)，當日飛抵美國洛杉磯 (LAX) 並轉機搭乘達美航空 (DL2081 航班) 22:40 離開洛杉磯機場 (LAX)，於美東時間 2005 年 9 月 01 日 AM 07:01 抵達紐約甘迺迪機場 (JFK)。搭乘 Limousine 交通工具前往 Brookhaven National Laboratory (BNL)，並由 Dr.Ding Yu-Shin (以下簡稱 Dr.Ding) 親自接待與辦理進入 BNL 所有簽署文件與程序，取得識別證後，前往化學系辦公室與化學系研發計畫總負責人 Dr. Fowler 見面及認識化學系及迴旋加速器之相關研發工作夥伴。並了解與安排參加訓練課程，並與 Dr. Ding 討論本次有關新正子核醫藥物之研習主題，包括：了解(1) Radio HPLC of semi-preparation for production。(2) PPB (Plasma Protein Binding) for new tracers。(3) Pyrogen test, analytical HPLC and RadioTLC for QC。(4) Log P (Lipophilicity) for new tracers。(5) Sterile HPLC solvent preparation for production。(6) Metabolite analysis。

僅將本次實習之 PET 研發相關內容分成以下十二項次進行報告。

(一) Brookhaven National Laboratory 之簡介

Brookhaven National Laboratory (BNL) 隸屬美國原子能總署 (Department of Energy; DOE)，化學系館共有 4 棟，包括館舍 901/901W：具有三座迴旋加速器 (Cyclotrons)，分別為(1) JSW Cyclotron：17MeV *p*，10Mev *D*；(2) 60 inch Cyclotron：35MeV *p*，23Mev *D*與 57MeV³He，40Mev α ；(3) EBCO Cyclotron：19MeV *p*，10Mev *D*。60 inch Cyclotron 為可變能量式迴旋加速器，可放出 *p*, *d*, 4He 與 3He 共四種粒子，另兩座 (JSW 與 EBCO) 為固定能量式迴旋加速器，僅可放出 *p* 與 *d* 共兩種粒子。另外包括鉛室實驗室 (Hot Laboratories)，內含有 ¹¹C-MeI 合成儀器 (¹¹C-MeI GE BOX) 與 ¹¹C-Cocaine、¹¹C-Raclopride 及 ¹¹C-MRB 製備之 Red Hood，另有 ¹⁸F₂ 自動合成系統。

1. 館舍 906：Positron Emission Tomography (PET) 照影實驗室。
2. 館舍 560：High Field MRI, Magnetic Resonance Imaging。

3. 館舍 555：化學系辦公室與研究室，各類研發主題，包括 PET 藥物快速合成開發與影像處理、奈米科技、核化學與表面化學等。

本次赴美研習主題為不同 PET 核醫藥物之研製與品管分析技術建立，並了解該機構於神經科學之研究動向，職見習參與生產與品管研究工作，主要位置在館舍 901 之 Hot lab 實驗室。迴旋加速器與 Hot lab 實驗室主要成員包括：(1) Production 與 QC 人員：Youwen Xu, Lisa Wueun, Colleen Shea, Riche；(2) Cyclotron：David Schlyer, Mike；(3)metabolite: David Alexoff。

(二) ESR & RWP & CMS 實驗室管理與職前訓練

職於進入 BNL 化學系與迴旋加速器正式參與實驗前，需接受職務相關之訓練課程，包括：

- Laboratory Standard。
- Blood born pathogen。
- Haz. Waste Generator。
- Radiological Worker part-I。
- Radiological Worker part-II。
- Benchtop Dispersible。

等有關輻射之基本原理、放射性物質之操作、劑量限值、安全與防護知識課程，並於課程後，參加測驗，測驗合格標準 80 分。測驗合格後，需對化學系 PET 相關計畫進行實驗安全預習（Experiment Safety Review；ESR）與了解。

- PET Radiotracer Assays in Plasma；CO-11-06；
- Synthesis of Radiotracers Derived from [11C] Methyl Iodide；CO-11-07；
- Synthesis of Organic Compounds Related to PET Research；CO-11-21；
- F18-Labeled Radiopharmaceuticals for PET studies；CO-11-26。

並由專人帶領參觀了解相關實驗室應注意事項與該館舍之安全設施後，由館舍負責人給予輻射劑量配章，並於管制區出入口簽署 RWP（Radiological Work Permit），表示職已可進入管制區內參與力與研發工作。

(三) 應用於 PET 研究之放射性追蹤物（radiotracers）

一般來說，以迴旋加速器產製放射性同位素，可分為 $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ 、 $^{14}\text{O}(d,n)^{15}\text{O}$ 、 $^{16}\text{N}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}(p,n)^{13}\text{N}$ 與 $^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$ 等。迴旋加速器之原理為利用磁場使運動中之帶電粒子迴轉，並利用電極間交錯變換之正負電場，使粒子於迴轉中不斷地獲得能量。圖一顯示迴旋加速器之基本構造，包含有加速電極(Dees)、射頻系統(Radio Frequency)、氣源(Gas supply)、離子源(Ion source)、磁極(Magnet pole)、真空腔(Vacuum chamber)、及導引電極(Deflector Electrode)等。

加速之粒子始於氣體源之氣體，經離子源以高電壓將其離子化，產生加速

用之帶電粒子，再經一偏壓電壓吸引進入加速器內部之真空腔。運動中之帶電粒子受到磁場之磁力作用，開始旋轉。同時，輸入此加速腔之射頻波形成電磁駐波，使加速電極(Dees)間產生強電場，帶電粒子受電場加速而獲取能量。假如射頻波系統之振盪頻率與帶電粒子於磁場中迴轉之頻率相同，則當帶電粒子迴轉半圈後，二個加速電極間的電性正巧互換，使電場方向相反，因此帶電粒子又再次被加速。經反覆地變換加速電極極性，帶電粒子每迴轉一圈被加速兩次，故其能量愈來愈高導出而形成一高能粒子束。粒子束經導引撞擊靶內物質，可以產生新的核種。

近年來，正子電腦斷層掃描逐漸受到重視，其常用的正子同位素如 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、及 ^{18}F 等，半衰期都很短(分別為 20、10、2 及 110 分鐘)，因此，必需on-line生產。其特性如下表。(參見紙本)

(四) 應用於腦神經功能造影所用之 PET 放射性追蹤物

(radiotracers) 之最佳設計概念

對於腦部神經功能造影研究來說，一般考量偏重以放射性追蹤物追蹤腦部 receptor 結合位與神經功能等。包括下列各類：

- Endogenous transmitters
- Endogenous substrate for neurotransmitters
- Selective receptor binding ligands
- Selective molecules visualizing other processes of the neuron such as the uptake system, reuptake system, and enzymatic metabolic systems either for neurotransmitter synthesis or for the degradation of neurotransmitters

職與 Dr. Ding 討論有關腦部研究之 PET 放射性追蹤物應具備何特性，如下：

1. 親和性、專一性與選擇性 (Affinity, specificity and selectivity)：
放射性追蹤物分子對腦部標的 (target) 須具有專一性、選擇性與適當之 Kd 值 (於 nanomolar or subnanomolar 範圍)。另外，需考量 target 分布密度多寡。針對低密度 target，通常需要高親和性放射性追蹤物分子。因為低親和性易有不好的 S/N ratio (signal to noise ratio) 出現，但是，高親和性易造成不可逆結合，反而不易對 target 位置進行定量。
2. 適當之親脂性 (Appropriate lipophilicity)：
我們利用 LogP 來分析放射性追蹤物分子之親脂性，數值介於 1-4 間。相當低或高的 log P 數值表示不易穿過血腦屏障 (blood-brain barrier ; BBB)；也就是說，當 log P < 1，分子的親脂性不足以穿過 BBB，而當 log P > 4，除不易穿過 BBB 外，會有非特異性結合發生。另外，分子大小也會影響穿過 BBB 情形，一般來說，分子量需小於 500。
3. 高度分子穩定性、與血漿蛋白之間的低親和性：

放射性追蹤物分子在血漿或組織中快速的代謝及與與血漿蛋白之間的高度不可逆結合，均會影響腦部吸收率降低。

4. 腦部中不會出現具放射性之代謝產物。
5. 適當之動力學分析 (Appropriate kinetics for quantification)。
6. 高比活度 (specific activity) 以避免質量效應 (mass effects)。
7. 安全考量 (Safety profile)：

放射性追蹤物分子應為安全無毒性的。

由下圖，我們可得知，腦神經衝動傳導路徑。(參見紙本)

目前就腦神經功能造影所用之 PET 放射性追蹤物之化合物，整理如下表。(參見紙本)。各 PET 放射性追蹤物結構如下。(參見紙本)

(五) 碳-11 標幟藥物半製備系統 (^{11}C - Labeled Compound Production System)

1. ^{11}C -Methyl Iodide (^{11}C - MeI)合成法：

有兩種方法：

- (1) 化學合成法：將 $^{11}\text{C}\text{O}_2$ 捕捉於LAH溶液還原成 ^{11}C -methanol後，加入HI (hydroiodic acid)進行碘化反應形成 ^{11}C - MeI，但產率不高，目前該實驗室已不用這種方法。
- (2) GE box合成方法：先將 $^{11}\text{C}\text{O}_2$ 捕捉於nickel/molecular sieve中並轉換成 $^{11}\text{CH}_4$ 後，利用控制閥，將 $^{11}\text{CH}_4$ 隔離在具有pyrolysis tube的密閉循環系統中，pyrolysis tube內 I_2 蒸氣與 $^{11}\text{CH}_4$ 作用，使 $^{11}\text{CH}_4$ 變成 $^{11}\text{CH}_3$ 自由基，爾後 $^{11}\text{CH}_3$ 自由基再從 I_2 捕捉iodine轉變成 ^{11}C -methyl iodide(^{11}C - MeI)。**GE**

MeI Box 之參數設定：

在每次生產之前，必須確認 GE MeI Box 之各類參數數值，包括氣體流速，合成步驟時間、儀器預備時間與烘箱溫度等參數確認。

■ 氣體流速

Rotameter	Pressurize (MPa)	Flow	Flow (ml/min)
RMA (recirculate)	0.1	50	550±50
RMB (Argon)	0.1	50	45±5
RMC (H2)	0.15	5	130±10

■ 合成步驟時間

	Step	Time
1	Trap $^{11}\text{C}\text{O}_2$	100

2	Fill H ₂	50
3	CH ₄ Conversion.	160
4	CH ₄ Transfer	40
5	Pressurize	40
6	Recirculate	360
7	CH ₄ waste	60
8	MeI release	480
9	Recondition	240
10	Cool down	180
11	Cooldown new run?	400

■ 儀器預備時間

Action	Time
Purge	90
Recirculation	30
Purge	90
Cond. Trap	180
Cooldown	300

■ 烘箱溫度

Oven	Temperature (°C)
OMA	360
OMB	90
OMC	720
OMD	190

3. ¹¹C- MeI合成步驟

■ General Setup Procedures. :

- (1) **Setup Procedures for MeI using the GE MeI Box** : 打開GE box之cylinder head valves，並確認H₂與Argon氣體壓力各為 32 psi及 15 psi，空氣壓力為 90 psi。確認H₂、Argon與空氣之流速。將I₂ tube插入安裝在燃燒爐中及將兩端旋緊。作Leak #3 檢查動作，可見到Argon氣體流速測定掉到 zero。
- (2) **Setting Up HPLC** : 在 BioRad Column Selector 選擇適當的管柱，並確認流速、溶劑設定與所有管線已接緻密合，將 injector valve V15 開至 load position 及 V16 為 on position。開啓 pump 以溶劑流洗 column 5 分鐘後，打開 V18 與關閉 V16 來清洗 product collector line。2 分鐘後，重新開啓

V16 與關閉 V18 使溶劑流出到廢液槽中，連接 product collector line 與 product collector tube，同時，連結 rotovap transfer line 到 product collector tube。將 tube 放在 放射活度量測 chamber 中(此為 collector)，同時也放入 forecut collection tube 在放射活度量測 chamber 中，確認放射活度量測儀上設定為 multi-injection vial (MIV)，確認 UV detector 之讀值為 zero。

- (3) **V15 Injection Valve Setup**：當 V15 在 load position 位置時，先拔除 RV2 中 HPLC transfer line，以 5 mL acetonitrile 沖洗管線二次及無菌水清洗一次後，重新接上 HPLC transfer line。
- (4) **Rotovap Setup**：將 rotovap valve 旋至 product collector tube，並加入 4 mL acetonitrile 到 azeotrope solvent reservoir 中，把 rotovap bath 充滿水分。將 rotovap condenser 充滿乾冰及 acetone。

■ General [^{11}C] Methyl Iodide Processing Procedures

(1) Setup of GE Box

(2) Trapping $^{11}\text{CO}_2$

(3) Configuring Red Hot Cell

- (4) **Transfer $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ to RV2 and Reaction**：當 GE box 完成步驟 8，會釋放 methyl iodide 以流速 25 mL/min 傳送到實驗室中。注意所顯示之 carbon-11 radioactivity 數值，旋轉 GE process valve 成爲 RV2，打開 RV2 inlet 與 outlet valves 並確認液體通過 RV2，注意 Bioscan RV2 monitor 之活度數值，切換 valve 到 vent 位置並關閉 RV2 valves，以 Argon 氣體清潔管線並流至 balloon 中。

[^{11}C] Methyl Iodide 反應原理，如下圖。(參見紙本)

■ Purification After Reaction of [^{11}C]Methyl Iodide

- (1) **^{11}C -Product Injection into HPLC**：開啓 HPLC pump 約 1 分鐘並確認其壓力穩定，使 RV2 冷卻 10 秒。將 valve V14 全開並打開 V13 卸除 RV2 過多的壓力，將 V12 旋至 HPLC 位置，先丟棄剛從 HPLC sample syringe 流出到 RV2 的 1ml 液體。打開 V15 與 V17 與關閉 V16，此時，HPLC effluent 進入 forecut collector，打開活度量測儀顯示在 Collector mode。同時打開 rotovap water bath 其溫度應爲 100 °C。

- (2) **^{11}C -Product Collection**：打開 V18，關閉 V17。HPLC effluent 進入 product collector tube，依實驗所需收集 HPLC 分離峰，結束時，再次打開 V17 與關閉 V18。

- (3) **Evaporation of HPLC solvent**：打開 rotovap 電源，並開啓 rotovap vacuum valve，product collection tube 中成品被抽到 rotovap flask 中，關閉 rotovap transfer valve 並持續進行蒸發 evaporation，把 round-bottom flask 降到 hot water bath 中，azeotrope solvent 從 flask 溢出，當 flask 已經呈現抽乾狀態，將 rotovap vent，並移除 round-bottom flask，再次放入

hot water bath 中，並以氮氣趕走殘留的有機揮發物。

(4) **¹¹C-Product Filtration**：加入 5 mL無菌生理食鹽水，利用真空將成品抽取並通過millipore過濾後，打入無菌之multi-injection vial中。取微量進行品管分析作業。

(六) ¹¹C-Racloprine半製備型生產系統 (Semi-Preparation)

1. 試劑

品名	廠牌	儲存條件
Dimethylformamide, DMF, HPLC grade	Aldrich	Store at RT
Acetonitrile, CH ₃ CN, HPLC grade	Fisher	Store at RT
Ethyl Alcohol (95%), EtOH	U.S. Industrial Chemicals	Store at RT
Sodium Hydroxide, NaOH	Fisher	Store at RT
Hydrochloric Acid, HCl	Fisher	Store at RT
Water (USP), H ₂ O	Baxter	Store at RT
Saline (0.9%) USP	Baxter	Store at RT
Ammonium Formate, AF, HCO ₂ NH ₄ (analytical reagent)	Mallinckrodt	Store at RT
Nor-raclopride	In-house synthesis	Keep refrigerated and protected from light.
dimethylsulfoxide (DMSO)	Aldrich	Store at RT

* As specified or equivalent, RT: room temperature.

2. 合成¹¹C-raclopride之前處理

- (1) 前趨物：nor-raclopride(NCQ-259)。
- (2) 反應物：先後加入 nor-raclopride、4 uL 5.0N NaOH 與 0.2 mL of DMSO 到 RV2 三相管震盪混合約 2 分鐘，可見溶液顏色轉變成深綠色，再以 Argon 氣體打入溶液中混合。
- (3) **TLC Solvent**: 90:9:1 CH₃CN:H₂O:NH₄OH

3. 半製備型 HPLC 之條件與處理

- (1) Semi-preparatory column：Waters Novapak C18, 300mm x 7.8mm, 5 μm。
- (2) Analytical column：Waters Novapak C18, 300mm x 3.9mm, 5 μm。
- (3) HPLC solvent：

CH ₃ CN	373 mL
USP Sterile H ₂ O	561 mL

1.0M AF	63 mL
Acetic Acid	3.1 mL

(4) Flow Rate = 5.5 mL/min。

(5) 利用 Semi-preparatory column 分離，在 Retention time 約 12 minutes 收集 final product，參考第五點之過程。

(七) ^{18}F -FDG 自動化生產系統 (^{18}F -FDG Automated Synthesis System)

1. FDG 研發歷程：

早於 1976 年，Brookhaven National Laboratory、National Institutes of Health 與 University of Pennsylvania 共同開發研製 2-Deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (^{18}F FDG)，主要為了探討人體局部腦部中葡萄糖代謝追蹤。同時期亦有利用 ^{18}F FDG 作為心肌代謝與腫瘤代謝追蹤之相關研究報告。最初進行 $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ 反應，產生 ^{18}F 氣體後，經由親電性氟化反應 (electrophilic fluorination) 合成出 ^{18}F FDG。後來改以小體積 $^{18}\text{H}_2\text{O}$ 進行 $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ 反應產生大量 ^{18}F fluoride ion，經由親核性氟化反應 (nucleophilic fluorination) 得到高產率之 ^{18}F FDG。當然，高產製之 ^{18}F FDG 克服了 ^{18}F 之半衰期 110 分鐘之缺點。對於遠距離之研究單位或醫院而言，不需要建立 on-site cyclotron 與品管實驗室，研究機構僅須具備有 positron emission tomography (PET) scanner，即可進行臨床診斷應用與研究。目前， ^{18}F FDG 於心臟疾病、seizure disorders 與癌症等之臨床診斷應用上蓬勃發展，而且，也是神經科學與藥物研究之有力工具。

2. 現況：

BNL 迴旋加速器產製之 ^{18}F -FDG 已為自動化生產系統，並由電腦程式控制。經了解從 1986 年使用該自動化生產設備，已使用長達 19 年，其自動生產儀器與設備之配置圖，如圖。據了解 ^{18}F -FDG 反應原理採 HCl hydrolysis，與本所相同。但該機構目前已編列預算，採購新自動化生產設備，為 BIOSCAN Ltd 出品， ^{18}F -FDG 反應原理為 alkaline hydrolysis。

3. 氧-18 水靶 (oxygen-18 enriched water)：

靶材為一個 1mm 凹陷之銀質實體，凹陷處覆蓋 0.051mm 厚度 titanium foil 薄膜，透過口徑 1/16 英吋之不鏽鋼管線傳輸 oxygen-18 water 進入實體中，利

用高壓閥來控制傳輸管線的開啓與關閉，照射時間則依據所需fluorine-18 多寡而定。照射完畢後，以氦氣推送水進入樹脂進行分離，以 0.01M potassium carbonate或cesium carbonate 將fluorine-18 與oxygen-18 water洗濯出來。以氦氣(壓力 20-30psi)傳送富含fluorine-18 fluoride到¹⁸FDG鉛室中之Capintec Ionization Chamber 內量測放射活度。

4. Preparing FDG reagents, columns and Resins :

(1) FDG 生產用試劑 (Reagents)

Reagent	Source*	Storage
1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethane sulfonyl-D-mannopyranose, 99% (Triflate)	Aldrich, RBI, Sigma or Fluka	Store in freezer
4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]-hexacosane, 98% (Kryptofix)	Aldrich	Store in freezer
acetonitrile, anhydrous 99.8%	Aldrich	Store at RT
Hydrochloric acid, 0.1 N	Fisher	Store at RT
Hydrochloric acid, 1 N	Aldrich	Store at RT
Water (USP), H ₂ O	Baxter	Store at RT
Ethyl Ether (anhydrous)	Mallinckrodt	Store at RT
AG50W-X8 100-200 mesh hydrogen form	Bio-Rad	Store at RT
AG1-X8 200-400 mesh carbonate form	BNL (from Bio-Rad Cl- or OH)	Store at RT
Potassium carbonate, anhydrous	Mallinckrodt	Store at RT
Aluminum oxide, activated,neutral, Brockmann 1 150 mesh	Aldrich	Store at RT

RT : Room temperature

(2) FDG 生產用樹脂與純化管柱 (Columns and Resins)

	品名	規格
1	BioRad empty low pressure column	0.7 cm ID; 20 cm length
2	Alltech reservoir	4 mL
3	Alltech frits for 4.0 mL Alltech reservoir	4 mL
4	Alltech syringe adaptor for Alltech reservoir	4 mL
5	BioRad Analytical grade Anion Exchange Resin	AG 1-X8 resin (200-400 mesh, Chloride form)
6	BioRad biotechnology grade Anion Exchange Resin	AG 1-X8 resin. 200-400 mesh, Hydroxy form

7	BioRad Analytical grade Cation Exchange Resin	AG 50W-X8 resin, 100-200 mesh, Hydrogen form
8	Aluminum Oxide Activated neutral Brockmann 1	Standard grade, 150 mesh

5. ^{18}F -FDG合成：

以電腦程式控制，合成步驟如下：

- (1) Dry ^{18}F Fluoride：fluorine-18 fluoride(0.6ml/0.01M K_2CO_3)傳送至one-pot自動合成系統內Reaction vassals (Pyrex)，加入 1 ml Kryptofix 2.2.2™溶液與 K_2CO_3 ，並於 600mbar真空度、 N_2 Gas、 115°C 溫度下反應 14 分鐘後，真空度降低至 200mbar以下，不加熱 1 分鐘，使溶液乾燥。
- (2) Triflate & Displacement：在Pyrex內，1ml anhydrous acetonitrile溶液中，Kryptofix 2.2.2™為催化劑，使 ^{18}F Fluoride與mannose triflate (1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethane sulfonyl- β -D-mannopyranose) 進行親核性取代反應，約 5-6 分鐘。
- (3) Concentration：冷卻至 40°C 以下，濃縮成 0.4ml。
- (4) Dilute：再以 4.0ml H_2O 稀釋。
- (5) Sep-pak：利用流速 2-4ml/min之 N_2 Gas，將Pyrex內稀釋液推送通過C-18 Sep-pak分離管柱，再以 5ml 0.1N HCl溶液清洗管柱。
- (6) Dry ether：以 3ml ether重新洗濯C-18 Sep-pak分離管柱，洗濯液返回Pyrex中，並於 600mbar真空度、 N_2 Gas、 30°C 溫度下蒸發。
- (7) 1N HCl：加入 2ml 1N HCl 於 Pyrex。
- (8) Hydrolysis：於大氣壓力下，煮沸 15 分鐘，進行水解反應，形成終產物 2-deoxy-2- ^{18}F]fluoro-D-glucose。
- (9) Cool與Purify：以 N_2 Gas推送 ^{18}F -FDG溶液通過C-18 Sep-pak與Cation exchange column (AG50WX)分離管柱進行分離。
- (10) Rinse：以 4 ml H_2O 清洗Pyrex。
- (11) Recover：再純化。
- (12) 4 ml H_2O ：加入 4 ml H_2O 清洗mixed bed column.
- (13) Filter：藉由 N_2 氣體推送，通過 0.22 um millipore以進行filtration。

(八) PET 藥物之品質管制 (Quality Control) 與作業流程

無論Red Hood中產製的成品是 ^{11}C -Raclopride、 ^{11}C -Cocaine或 ^{11}C -MRB，其品管項目，包括：

1. 放射化學純度(Radiochemical Purity)
2. 無菌熱原試驗(Pyrogen test)與無菌試驗(Sterile test)
3. 濾膜完整性測試(Millipore Integrity)

4. 酸鹼值量測(pH Measurement)
5. 放射比活度(Specific Activity Determination)
6. 半衰期(Half life determination)

分別敘述如下：

1. **放射化學純度(Radiochemical Purity)**：放射化學純度一般合格標準需> 97%，該實驗室標準訂為> 92%。先準備 7 cm TLC片。自Red-hood取出微量終產物與UV標準品均勻混合，利用毛細管吸取微量之混合溶液，在TLC片 (Macherey-Nagel Silica plate)(2 cm x 10 cm) 點出spot，同時，也以UV標準品在TLC片另端點出spot。並以適當展開溶劑於TLC chamber展片(Table 1)，以展開溶劑跑到 7cm處後，陰乾或吹乾。以Bioscan Radio TLC Scanner與UV測定。由TLC可得到終產物之radio Rf value與放射化學純度結果，UV可得到的混合溶液(終產物與UV標準品)之UV Rf value，可來評估化學純度。進一步，計算UV Rf與radio Rf兩者之差異值。

FDG-TLC visualizing system：自Red-hood取出微量¹⁸F-FDG與 10mg/mL FDG carrier均勻混合，利用毛細管吸取微量之混合溶液，在Bakerflex Silica plate TLC片(2cm x 10cm)點出spot，同時，也以carrier FDG在TLC片另端點出spot。並以適當展開溶劑於TLC chamber展片。以Bioscan Radio TLC Scanner與P-Anisidine噴霧試劑(spray reagent)呈色測定，P-Anisidine噴霧試劑直接噴灑在TLC上方，再以熱風吹乾，約 1-3 分鐘可見到紅棕色的spot，由TLC可得到終產物之radio Rf value與放射化學純度結果，呈色法可得到的混合溶液之Rf value，可來評估化學純度。

2. **無菌熱原試驗(Pyrogen test)與無菌試驗(Sterile test)**：以 1 cc syringe取 0.6 cc 終產物分裝 0.3cc到 2 個無菌瓶中，1 瓶外送進行無菌試驗(Sterile test)，另 1 瓶則於該實驗室中進行無菌熱原試驗(Pyrogen test)，pyrogenicity試驗結果須 <175EU。

任何應用於人體研究的新 tracer 必須進行 sterility 與 pyrogenicity 試驗，必須做三次。per injection and a negative sterility test。

3. **濾膜完整性測試(Millipore Integrity)**：將millipore連接在Argon氣體鋼瓶出口 (40-45 psi)與flow meter之間。正常情況millipore無破損，flow meter不會有氣體流速讀值。若見到讀值，則表示須重新過濾終產物，且必須再做一次濾膜完整性測試。
4. **酸鹼值量測(pH Measurement)**
5. **放射比活度(Specific Activity Determination)**
6. **半衰期(Half life determination)**

(九) 血漿蛋白結合度評估 (Evaluation of Plasma Protein Binding Ability of radiotracers)

在 preclinical 藥物開發階段，評估一個新放射性追蹤物 (radioligand) 是否適合繼續進行動物或人體試驗，必須以兩方面進行考量：

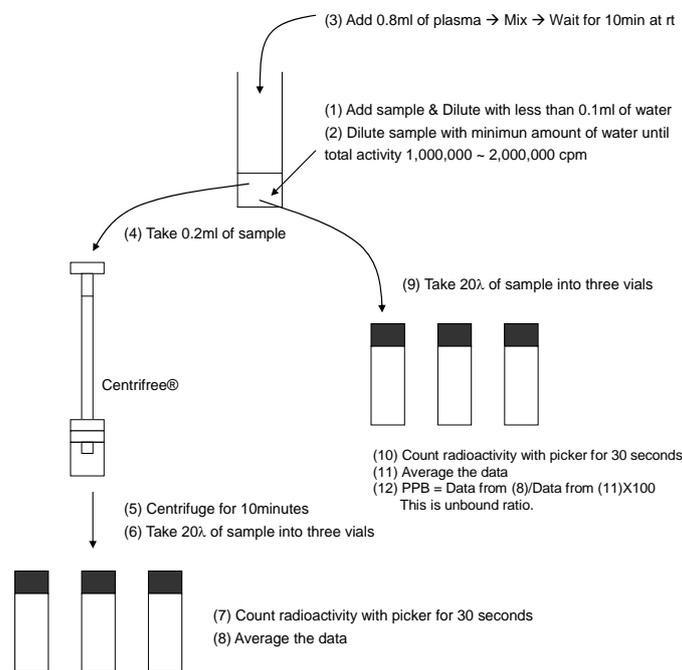
- (一) Radioligand 分子特性為何？
- (二) 是否可與血漿蛋白質結合？結合程度如何？

Radioligand 分子的特性可影響進入 BBB 程度；包括帶電性 (charge)、脂溶性 (lipid solubility)、與血漿蛋白結合力 (extent of protein binding) 與分子大小 (molecular size) 等特性。另外，如果分子具有 local dipole moments；即分子外部有氫鍵鍵結存在（例如分子氫鍵與血漿水分子結合），會降低分子穿過 BBB 的能力。

$$E=1-e^{-PS/F}$$

(E: Extraction; P: Permeability of the compound;
S: Surface area of capillary; F: blood flow)

藥物在血液中與血漿蛋白質結合程度，無論是可逆或是不可逆的結合，均會影響藥物通過腦部 BBB (blood brain barrier.) 的效率。而藥物與血漿蛋白質結合度好壞，取決於藥物之親脂性 (lipophilicity) 特性。Plasma protein binding (PPB) 檢測法，主要檢測出藥物不會與血漿蛋白質結合的比例。測定方法如下圖。



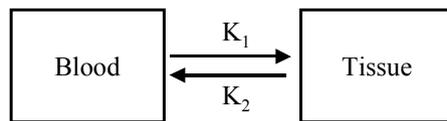
$$PPB \text{ (Unbound \%)} = \frac{A \text{ unbound}}{A \text{ unbound} + A \text{ bound}} \times 100$$

A unbound : Average value of Data from (8)

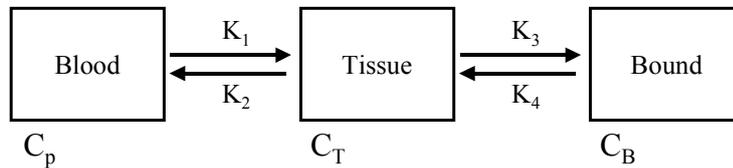
A unbound + A bound : Average value of Data from (10)

用在評估新合成 radioligand 與體內 receptor 或 binding site 結合能力的優劣。一般來說，人體生理狀況是相當複雜的，當放射性標幟物進入人體後，會受到數個因素；包括血管毛細管之運送、擴散到結合位置 (binding site)、與內生性神經傳導物質 (endogenous neurotransmitter) 競爭、與血漿蛋白 (plasma protein) 之結合度及與 specific binding site 之分離與結合狀況等因素，均影響放射性標幟物的分佈情形。放射性標幟物進入人體後，可用簡易的 two-compartment model 或 three-compartment model 概念來表示，並以數學模式推導後得到相關數據，進而藉以了解複雜的生理狀況。職向 David Schyler 請教 two-compartment model 與 three-compartment model 概念，如圖：

Two-compartment Model



Three-compartment Model



(圖一)

(C_p = concentration of plasma ; C_T = concentration of tissue ;
 C_B = concentration of bound)

不管two-compartment model或three-compartment model，基本概念為放射性標幟物 (radio-ligand) 的運送和與receptor結合，會受到四個參數控制 (包括 K_1 , K_2 , K_3 , K_4 等)。血液 (Blood) 與組織 (Tissue) 間radio-ligand的運送，受 K_1 與 K_2 控制， K_1 表示Blood-Tissue之注入常數 (influx constant)， K_2 表示Tissue-Blood之流出常數 (efflux constant)； K_3 與 K_4 常數與receptor有關， K_3 常數與free receptor或binding site的濃度成一比例關係， K_4 表示ligand-receptor解離常數。 C_p 、 C_T 或 C_B 之間屬於動態平衡，無論 C_p 、 C_T 或 C_B ，其瞬間動力變化可以下列公式表示。

$$-dC_p/dt = K_1 C_p - K_2 C_T \quad (1)$$

$$-dC_T/dt = K_1C_P - K_2C_T - K_3C_T + K_4C_B \quad (2)$$

$$-dC_B/dt = K_3C_T - K_4C_B \quad (3)$$

radio-ligand最終與 C_B 反應可分為可逆 (reversible reaction) 或不可逆反應 (irreversible reaction) 兩種。若radio-ligand與 C_B 結合為不可逆反應時 (如： $^{18}\text{F-FDG}$)，則式子(2)

$$K_4 \doteq 0$$

$$\begin{aligned} -dC_T/dt &= K_1C_P - K_2C_T - K_3C_T \\ &= K_1C_P - C_T (K_2 + K_3) \end{aligned}$$

又因動態平衡之故

$$-dC_T/dt \doteq 0$$

$$K_1C_P = C_T (K_2 + K_3)$$

$$C_T = K_1C_P / (K_2 + K_3) \quad (4)$$

將式子(4)代入式子(3)

$$-dC_B/dt = K_3C_T - K_4C_B$$

可得($\because K_4C_B \doteq 0$)

$$dC_B/dt = K_3K_1C_P / (K_2 + K_3) \quad (5)$$

所得式子(5)之結果，表示在不可逆反應下，radio-ligand 與 plasma protein 結合的狀態。

若radio-ligand與 C_B 結合為可逆反應時；

同樣， $K_4C_B \neq 0$ ， $-dC_T/dt \doteq 0$

$$-dC_T/dt = K_1C_P - K_2C_T - K_3C_T + K_4C_B$$

$$0 = K_1C_P - K_2C_T - K_3C_T + K_4C_B$$

$$C_T = K_1C_P + K_4C_B / (K_2 + K_3) \quad (6)$$

將式子(6)代入式子(3)

$$\begin{aligned} -dC_B/dt &= K_3 C_T - K_4 C_B \\ &= K_3 [K_1 C_P + K_4 C_B / (K_2 + K_3)] - K_4 C_B \\ &= K_3 K_1 C_P + K_3 K_4 C_B / (K_2 + K_3) - K_4 C_B \end{aligned} \quad (7)$$

所得式子(7)之結果，表示在可逆反應下，radio-ligand 與 plasma protein 結合的狀態。藉由測定 plasma radioligand 之 radioactivity 以及 PET 影像測量所得到的 total radioactivity 數據，代入上述公式中，則可得到參數數值。

(十) 放射性追蹤物之親脂性質評估 (Evaluation of Radioligand's Lipophilicity)

測定放射性追蹤物在有機相(organic solvent；如 octanol)與緩衝液水相(aqueous buffer solvent, pH = 7.34)之分配係數(Partition coefficient)，藉由評估放射性追蹤物通過 blood brain barrier (BBB)之能力。

Procedure of Log P

Prepare six test tubes, six vials for samples from organic layer, and six vials for samples from aqueous buffer solution.

- (1) Add 2.5ml of phosphate buffer solution to each test tube.
- (2) Add 0.5ml of octanol to No. 2 ~ 6 test tubes.
- (3) Add 50ul of product solution and 2.5ml of octanol to No.1 test tube.
- (4) Vortex test tube 1 for 2min.
- (5) Centrifuge test tube 1 for 2min.
- (6) Take out 0.1ml of octanol from test tube 1 and add to a vial.
- (7) Take out 2ml of octanol and transfer to next test tube
- (8) Discard rest of organic solution
- (9) Take out 1ml of phosphate buffer solution from test tube 1 and add to a vial
- (10) Repeat (5) ~ (10) for test tube 2 ~ 5.
- (11) Repeat (5) ~ (10), but skip (8) for test tube 6.
- (12) Check activities of each sample vial with Picker or Packard counter
- (13) Calculate the log P for each test tube with following formula

$$\text{Log P} = \text{Log} \left[\frac{(\text{Decay corrected activity})_o \times 10}{(\text{Decay corrected activity})_w} \right]$$

(十一) Troubleshooting 實例探討

在自動化 ^{18}F -FDG 生產過程中，發現以 Capintec 測得由 cyclotron 傳送的 ^{18}F -Fluorine 之 radioactivity 相當低，約為 38.9 uCi，探討原因？

1. Collen shea 以 ^{18}F -FDG QC 樣品放置隔夜，進行樣品半衰期測試，理論上， ^{18}F -Fluorine 每 110 分鐘活度衰退一半，以所測之活度與時間推論，應成一比例關係，但發現有其他長半衰期之物質存在，不知是何種物質？
2. Collen Shea 與 David Alexoff 討論原因，懷疑水靶 $^{18}\text{H}_2\text{O}$ 中可能含有其他雜質污染（例如：chloride）存在，使得水靶 $^{18}\text{H}_2\text{O}$ 經過 Bombardment 後， ^{18}F -Fluorine 濃度過低。David Alexoff 取樣進行 chloride 分析，發現並無太大變化。
3. David Alexoff 懷疑自動化生產過程中反應有問題，自各 waste 取出廢液，進行活度量測，並無太大變化。
4. David J. Schlyer 懷疑 $^{18}\text{H}_2\text{O}$ recovery 回收不佳，他以 ^{18}F -FDG QC 樣品以 r-Camera 進行測試，發現在 511、983 與 1312 有吸收強度值，經查核種之 r-ray 吸收表，證實存在樣品中之污染物質為 ^{48}V 物質，職向 David J. Schlyer 請教有關 ^{48}V 來源與水靶相關細節，了解該 $^{18}\text{H}_2\text{O}$ 水靶靶窗外有 Ti foil，當 ^{48}Ti 經過 bombardment 之後會產生 ^{48}V （如下圖，黑色方塊表示為穩定同位素）。

Half-life of nuclide →	^{48}V	^{49}V	^{50}V
	15.9735d		
	^{47}Ti	^{48}Ti	^{49}Ti
	^{46}Sc	^{47}Sc	^{48}Sc
	83.79d	3.3492d	43.67d

但是 ^{48}V 物質會被 Cation exchange Column (AG50W) 樹脂所吸收，不應該出現在成品中。修正策略方法：(a) 以 HAVAR foil 取代 Ti foil：再以 ^{18}F -FDG 樣品以 r-camera 進行測試，經查表，證實為 ^{56}Co 物質，HAVAR foil 成份中含有 ^{56}Fe 存在（如下圖，黑色方塊表示為穩定同位素），發現經過 bombardment 之後會產生 ^{56}Co 。

Half-life of nuclide →	^{56}Co 77.27d	^{57}Co 271.79d	^{58}Co 70.82d
	^{55}Fe 2.73y	^{56}Fe	^{57}Fe
	^{54}Mn 312.3d	^{55}Mn	^{56}Mn 2.5785h

(十二) Current studies of BNL Neurosciences department

目前Dr. Ding實驗室目前以研製碳-11 標幟化合物之新正子核醫藥物為主，包括 ^{11}C -Cocaine、 ^{11}C -Raproline、與 ^{11}C -Toluene等及 ^{18}F -FDG例行自動化供應生產與品管分析。該實驗室例行產製之正子核醫藥物主供應進行人體試驗、動物試驗（包括baboon及Rat）等研究，Radiotracer Development實驗室每週四例行召開研發會議，並根據該會議之結論，訂出隔週之生產時程表。 ^{11}C -MRB為放射性追蹤物（new tracer），目前已完成Robot階段（包括PPB與Log P分析），另一new tracer為 ^{11}C -DASB，尚未進入Robot階段。

應用F-18 trace之標幟化合物之研究有 ^{18}F Ro41-0960 及 ^{18}F -6F-A85380 等。

三、心得

1. 本次赴美 BNL 實習為期二個月，受益匪淺。獲得化學系與迴旋加速器之全體夥伴協助與鼓勵，讓職能跨足 PET 研究領域，習得 PET 與迴旋加速器相關知識，開闊國際視與提升外語溝通能力，時光縱逝，希望能習得完整概念攜回所內，期能有助 PET 相關研究發展。
2. 目前Radiotracer Development實驗室研究開發之新正子核醫藥物，包括 ^{11}C -Cocaine、 ^{11}C -Raproline、與 ^{11}C -Toluene與 ^{18}F -FDG例行自動化生產與品管分析。該實驗室例行產製之正子核醫藥物主供應進行人體試驗、動物試驗（包括baboon及Rat）等研究，Radiotracer Development實驗室每週四例行召開研發會議，並根據該會議之結論，訂出隔週之生產時程表。 ^{11}C -MRB為放射性追蹤物（new tracer），目前已完成Robot階段（包括PPB與Log P分析），另一new tracer為 ^{11}C -DASB，尚未進入Robot階段。
3. 目前得知 Dr. Ding 已接受 Yale University 聘任前往任職，主持神經科學研究部門。經與 Dr. Ding 討論而實際了解，未來化學系仍希望與 Dr. Ding 繼續合作關係。Dr. Ding 專長於開發設計 new tracers，Dr. Ding 允諾可與持續保有聯繫。

四、建議事項

1. **建立PET與MicroPET影像中心**：目前各大醫學中心包括三總、長庚等醫院，具有正子照影中心（PET center），就職所了解的狀況，有些醫院預定採購 18F-FDG 自動化生產設備，其目的除可例行供應病患人體腫瘤照影外，並可繼續進行FDG多項研究。造成本所一大威脅。建議於迴旋加速器與同位素應用組旁，建立PET與MicroPET中心，並與各醫院或研究單位合作進行Cyclotron-based之核醫藥物等動物或人體PET照影等多項研究。
2. **密切與Dr.Ding聯繫與保持互動關係**：由於目前台灣逐漸呈現人口年齡老化之現象，以PET作為腦功能造影診斷技術與放射性追蹤物開發之迫切性與需求性漸增，未來本所欲提升核醫藥物於腦功能與神經訊息傳遞及老化之造影研究層次與深度，建議密切與Dr. Ding聯繫與保持互動關係，Dr. Ding已接受Yale University聘任前往任職，主持神經科學研究部門。據職所了解，Yale University其研究經費充裕且研發動能相當大。

五、附錄

1. PET Radiotracer Assays in Plasma ; CO-11-06。
2. Synthesis of Radiotracers Derived from [11C] Methyl Iodide
3. For Positron Emission Tomography (PET) Studies ; CO-11-07，
4. Synthesis of Organic Compounds Related to PET Research ; CO-11-21
5. F18-Labeled Radiopharmaceuticals for PET studies ; CO-11-26。