



ORIGINAL ARTICLE

Optimization of Automated Solid Phase
Extraction-based Synthesis of [¹⁸F]FluorocholineJun Young PARK¹, Jeongmin SON¹, Won Jun KANG²¹Nuclear Medicine Laboratory, Yonsei University Severance Hospital, Seoul, Korea²Department of Nuclear Medicine, Yonsei University Severance Hospital, Seoul, Korea고체상 추출법을 기반으로 한 [¹⁸F]Fluorocholine 합성법의
최적화 연구박준영¹, 손정민¹, 강원준²¹연세대학교 세브란스병원 핵의학검사실, ²연세대학교 세브란스병원 핵의학과

ARTICLE INFO

Received October 30, 2023
Revised November 13, 2023
Accepted November 14, 2023

Key words

Fluorine-18
[¹⁸F]fluorocholine
Radiopharmaceuticals
Solid phase extraction

ABSTRACT

[¹⁸F]Fluorocholine is a radiopharmaceutical used non-invasively in positron emission tomography to diagnose parathyroid adenoma, prostate cancer, and hepatocellular carcinoma by evaluating the choline metabolism. In this study, a radiolabeling method for [¹⁸F]fluorocholine was optimized using a solid phase extraction (SPE) cartridge. [¹⁸F]Fluorocholine was labeled in two steps using an automated synthesizer. In the first step, dibromomethane was reacted with [¹⁸F]KF/K₂.2.2/K₂CO₃ to obtain the intermediate [¹⁸F]fluorobromomethane. In the second step, [¹⁸F]fluorobromomethane was passed through a Sep-Pak[®] Silica SPE cartridge to remove the impurities and then reacted with *N,N*-dimethylaminoethanol (DMAE) in a Sep-Pak[®] C18 SPE cartridge to label [¹⁸F]fluorocholine. The reaction conditions of [¹⁸F]fluorocholine were optimized. The synthesis yield was confirmed according to the number of silica cartridges and DMAE concentration. No statistically significant difference in the synthesis yield of [¹⁸F]fluorocholine was observed when using four or three silica cartridges (*P*>0.05). The labeling yield was 11.5±0.5% (N=4) when DMAE was used as its original solution. On the other hand, when diluted to 10% with dimethyl sulfoxide, the radiochemical yield increased significantly to 30.1±5.2% (N=20). In conclusion, [¹⁸F]Fluorocholine for clinical use can be synthesized stably in high yield by applying an optimized synthesis method.

Copyright © 2023 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

콜린(choline)은 생체내에서 세포막의 구성성분인 인지질의 합성, 지질-콜레스테롤 수송 및 대사, 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성과 세포막 신호전달(transmembrane signaling)에 필수적으로 사용된다[1, 2]. 생체 내 콜린이 결핍될 경우 세포의

증식, 분화, 세포자멸사(apoptosis) 등에 관여하는 유전자의 발현에 영향을 주어 간기능 저하 및 종양 발생을 촉진시킬 수 있고 [3, 4], 콜린 수송체와 콜린 대사에 문제가 생길 경우 알츠하이머 병(Alzheimer's disease)이나 파킨슨병(Parkinson's disease) 등과 같은 신경퇴행성질환을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다[5]. 콜린 수송체(choline transporter)를 통해 세포내로 들어온 콜린은 콜린 인산화효소(choline kinase)에 의해 인산화된 후 세포막의 주요 성분인 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)으로 변환된다[6]. 특히, 세포분열과 증식이 활발한 종양세포는 표유류의 세포막에서 가장 풍부한 인지질인 포스파티

Corresponding author: Won Jun KANG

Department of Nuclear Medicine, Yonsei University Severance Hospital, 50-1

Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

E-mail: mdkwj@yuhs.ac

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2107-8160>

덜콜린의 형성을 위해 콜린의 섭취를 증가시킬 뿐만 아니라 콜린 인산화효소 유전자를 과발현시킨다[7]. 이와 같이 콜린은 종양세포의 세포막 합성에 직접적으로 연관되어 있기 때문에 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET)으로 콜린 대사를 측정하여 비 침습적으로 종양을 진단하기 위해 다양한 콜린 방사성의약품의 개발되어 왔다.

현재까지 개발되어 임상에서 사용되고 있는 PET용 콜린 방사성의약품은 ¹¹C-choline, [¹⁸F]fluoromethylcholine ([¹⁸F]fluorocholine), [¹⁸F]fluoroethylcholine 등이 있다. 그중 ¹¹C-choline은 처음 개발된 콜린 방사성의약품으로 뇌종양을 비롯하여 전립선암, 폐암, 식도암 등과 같이 [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxyglucose ([¹⁸F]FDG) PET검사에서의 민감도(sensitivity)나 특이도(specificity)가 낮은 종양의 진단에 주로 사용되었다 [8, 9]. 하지만 ¹¹C-choline은 ¹¹C의 짧은 물리적 반감기($t_{1/2}$ = 약 20분) 때문에 의료용가속기(cyclotron)가 설치되어 있는 곳에서만 사용할 수 있는 단점이 있다[10]. 이를 극복하기 위해 ¹¹C보다 비교적 긴 반감기를 가지는 ¹⁸F ($t_{1/2}$ = 110분)이 표지된 [¹⁸F]fluorocholine, [¹⁸F]fluoroethylcholine 등이 개발되어 현재 다양한 종류의 종양 진단에 사용되고 있다. 특히, [¹⁸F]fluorocholine은 in vitro에서 ¹⁴C-choline과 동일한 비율로 콜린 인산화효소에 의해 인산화되며, 전립선암과 간세포암종에서 [¹⁸F]FDG보다 진단적 유용성이 더 높은 것으로 보고되고 있다[11-13]. 국내에서는 2018년 「신의료기술의 안전성·유효성 평가결과 고시」를 통해 [¹⁸F]fluorocholine 양전자 방출단층촬영이 부갑상선 선종의 병변 위치확인 및 전립선암과 전이를 진단하기 위한 검사로서 신의료기술로 인정되었고, 2021년에는 간세포암종 의심환자 및 환자에서 진단 및 병기설정, 치료방침 결정을 위한 검사로서 신의료기술로 인정되어 현재 임상에서 사용되고 있다.

처음 보고된 [¹⁸F]fluorocholine의 합성법은 [¹⁸F]fluorobromomethane ([¹⁸F]FCH₂Br)을 합성한 후 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 분리정제 한 후 *N,N*-dimethylaminoethanol (DMAE)과 반응시켜 [¹⁸F]fluorocholine를 표지하는 방법이 다[14]. 하지만 이후 고체상 추출(solid phase extraction) 카트리지를 사용하여 [¹⁸F]FCH₂Br을 분리정제 후 [¹⁸F]fluoromethyl triflate로 변환하여 반응성을 높인 후 DMAE와 반응시켜 [¹⁸F]fluorocholine을 합성하는 방법이 개발되었고, [¹⁸F]FCH₂Br을 [¹⁸F]fluoroiodomethane 혹은 [¹⁸F]fluoromethyl tosylate로 변환 후 DMAE와 반응시키는 방법도 개발되었다[15-17]. 이러한 방법들은 [¹⁸F]fluorocholine의 효율적

이고 균질한 품질의약품 생산을 위해 자동화합성장치에 도입하는 방법들도 다양하게 제시되었다[18-20]. 본 연구에서는 PET용 콜린 방사성의약품 중 [¹⁸F]fluorocholine의 임상적용을 위해 고체상 추출 카트리지를 사용하여 방사성의약품 자동화합성장치에 적용하여 수행할 수 있는 제조방법을 최적화하여 소개하고자 한다.

재료 및 방법

1. 장비 및 시약

본 연구에서 사용한 dibromomethane (part No. D41686), DMAE (part no. 471453 or 38990), dimethyl sulfoxide (DMSO; part no. 276855), acetonitrile (part no. 271004), potassium carbonate (K₂CO₃; part no. 60109), Kryptofix 2.2.2 (K2.2.2; part no. 291110), 에탄올(part no. 1.00986)은 Sigma-Aldrich에서 구매하여 별도의 정제과정 없이 사용하였다. Sep-Pak[®] Accell Plus QMA Carbonate Plus Light (part no. 186004540) 카트리지, Sep-Pak[®] Accell Plus CM Plus Short (part no. WAT020550) 카트리지, Sep-Pak[®] C18 Plus Short (part no. WAT020515) 카트리지 및 Sep-Pak[®] Silica Plus Long Cartridge (part no. WAT020520) 카트리지는 Waters Corp.의 제품을 사용하였다. C18 카트리지는 사용 전 5 mL의 에탄올로 흘려 준 후 10 mL의 주사용수로 전처리한 후 사용하였고, QMA carbonate 카트리지는 사용 전 10 mL의 주사용수로 전처리를 하였으며, CM 카트리지는 사용 전 0.5 M 염산용액 5 mL로 흘려 준 후 10 mL의 주사용수를 흘려 활성화 한 후 사용하였다. 멸균필터는 Supor[®] AEF 0.2 μm Intravenous filter (part no. AEF1NTE; Pall Corp.)를 사용하였고, filtered venting needle (part no. 16596HMK)은 International Medical Industries, Inc.에서 구매하여 사용하였다.

2. [¹⁸F]Fluorocholine의 표지

[¹⁸F]Fluorocholine 표지반응은 한 개의 반응용기가 장착된 자동화합성장치 TRACERlab[™] FXFN (GE Healthcare)을 사용하여 두 단계 표지(two-step)반응으로 합성하였다 (Figure 1). 고체상 추출 카트리지를 적용시키기 위하여 먼저 V12에 연결된 V14를 분리한 후 bulb vessel에 연결된 V17과 결합하였고, Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 결합한 후 V14와 V17사이에 장착하였다. DMAE (0.1 mL)는 DMSO (0.4 mL)에 희석한 후 Sep-Pak[®] C18 카트리지에 통과시켜 흡착하였으며, Sep-Pak[®] C18 카트리지를 아래쪽에 Sep-Pak[®] CM 카트리지를 결합 후 V17과 V15사이에 장착하였다 (Figure 2).

1) [¹⁸F]Fluoride의 생산

의료용가속기(PETtrace™ 16.5-MeV cyclotron; GE Healthcare)를 이용하여 ¹⁸O-H₂O에 양성자를 50 μA로 약 20~30분간 조사하여 44.4±7.4 GBq (1,200±200 mCi)의 [¹⁸F]fluoride를 획득하였다.

2) [¹⁸F]FCH₂Br의 합성

의료용가속기에서 생성된 수화 된 [¹⁸F]fluoride는 TRACERlab™ FXFN으로 전송 후 Sep-Pak® QMA carbonate 카트리지에 통과시켰다. QMA 카트리지에 흡착된 [¹⁸F]fluoride ion은 K2.2.2 (30 mg, 0.079 mmol)와 K₂CO₃ (5.5 mg, 0.040 mmol)가 각각 acetonitrile (0.95 mL) 및 물(0.05 mL)

에 녹여져 있는 혼합액(1 mL, vessel 1)으로 흘려주어 반응용기 (reactor)로 용출하였다. 혼합액은 60℃에서 1분간 예열 후 110℃로 온도를 올린 다음 진공상태에서 헬륨가스를 9분간 흘려주어 용매를 제거하였다. 반응용기의 온도를 120℃로 올린 후 acetonitrile (2.7 mL)에 희석된 dibromomethane (0.3 mL, vessel 3)을 건조된 [¹⁸F]KF/K2.2.2/K₂CO₃에 첨가하여 10분간 반응시켰다.

3) [¹⁸F]FCH₂Br의 정제

표지반응이 끝난 후, [¹⁸F]FCH₂Br 혼합물들은 헬륨가스를 이용하여 반응용기로부터 Sep-Pak® Silica 카트리지에 10분간 통과시켰다.

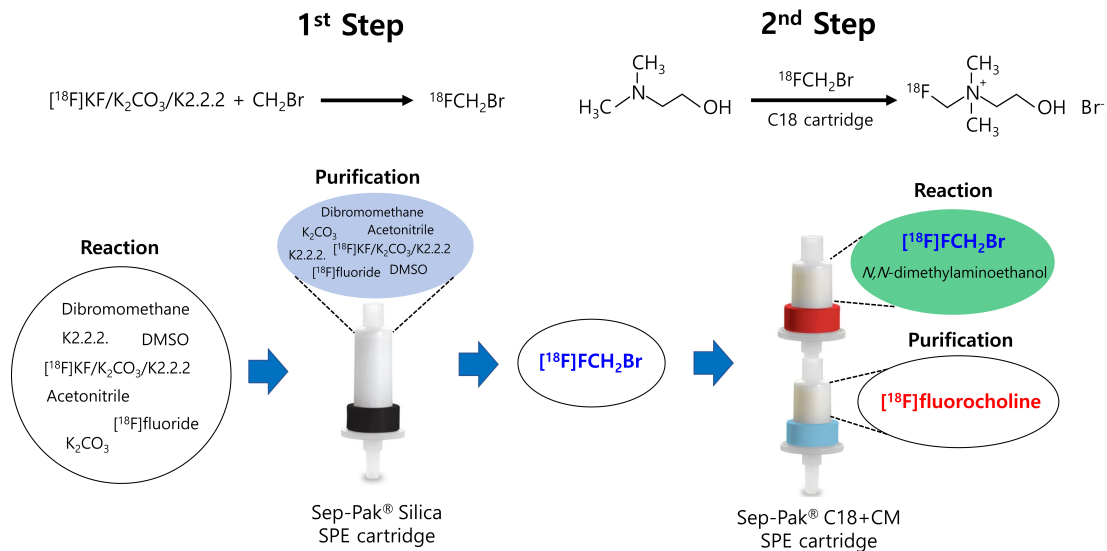


Figure 1. Synthesis scheme of [¹⁸F]fluorocholeline. Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; K2.2.2, Kryptofix2.2.2; SPE, solid-phase extraction.

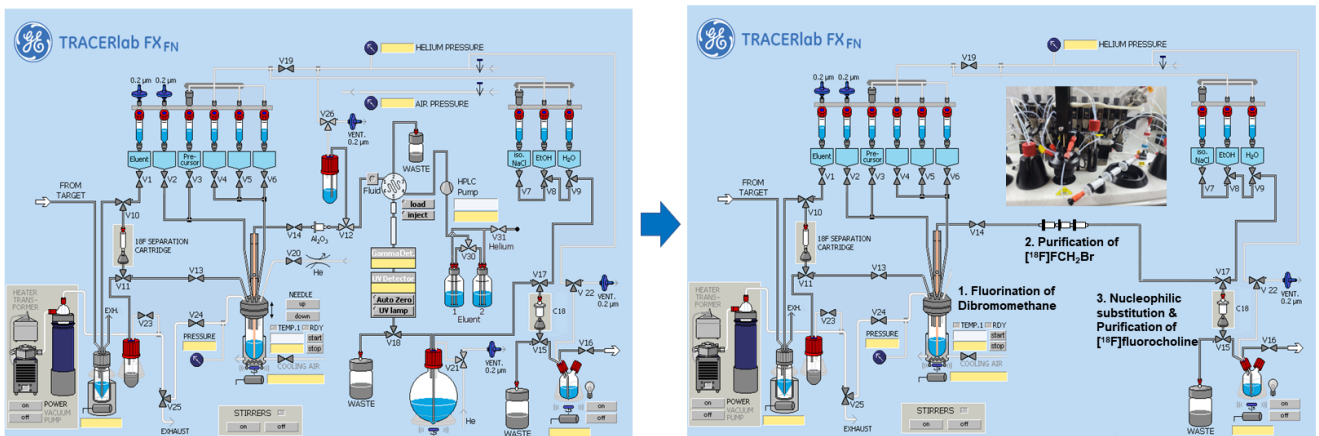


Figure 2. Schematic overview of the [¹⁸F]fluorocholeline production on the modified TRACERlab™ FXFN synthesizer.

4) [¹⁸F]Fluorocholine의 친핵성치환반응

Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 통과하여 분리정제된 [¹⁸F]FCH₂Br은 Sep-Pak[®] C18 카트리지에 미리 흡착되어 있는 DMAE와 친핵성 치환반응을 통해 [¹⁸F]fluorocholine을 합성하였다.

5) [¹⁸F]Fluorocholine의 정제

Sep-Pak[®] C18 카트리지 및 Sep-Pak[®] CM 카트리지에 에탄올(15 mL, vessel 9)을 흘려주어 DMSO와 DMAE 등 잔여 유기용매 및 전구물질을 제거하였고, 주사용수(15 mL, vessel 7)를 추가로 흘려주어 카트리지에 잔류하고 있는 에탄올을 제거하였다.

6) [¹⁸F]Fluorocholine의 멸균 및 포장

Sep-Pak[®] CM 카트리지에 흡착된 [¹⁸F]fluorocholine은 0.9% 생리식염수(10 mL, vessel 8)를 통과시켜 product collection vessel에 용출하였다. [¹⁸F]fluorocholine 혼합용액은 헬륨가스를 이용하여 0.22- μ m 멸균필터에 통과시킨 후 멸균 바이알에 충전하였다.

3. 정도관리

제조 완료된 [¹⁸F]fluorocholine 주사액의 품질관리를 위하여 멸균 바이알로부터 1 mL의 검체를 채취하였다. 정상확인을 위하여 검체의 색깔 및 탁도를 육안으로 관찰하였고, 방사화학적 순도는 이온 크로마토그래피(ion chromatography)와 방사능-박층크로마토그래피(radio-thin layer chromatography)로 평가하였다. 이온 크로마토그래피는 ThermoFisher Scientific Inc.의 Dionex[™] Aquion[™] 모델에 Eckert & Ziegler사의 Flow-Count system (FC-2000)을 장착하여 분석하였다. 컬럼은 IonPac CS14 (4×250 mm; Dionex Corp.)를 사용하였고, 이동상 용매로 20 mM methanesulfonic acid를 사용하여 0.8 mL/min의 유속으로 분석하였다. 방사능-박층크로마토그래피는 TLC Silica gel 60 F254 (part no. 10554; Merck Millipore) 박층판에 검체를 점적한 후 프로피온산(propionic acid)·아세톤·물 혼합액(1:3:2, v/v) 혹은 acetonitrile·0.9% 생리식염수 혼합액(1:1, v/v)을 전개용매로 전개한 후 Eckert & Ziegler사의 AR-2000으로 분석하였다. 이핵종 분석을 위해 다중채널 분석기(ORTEC[®] DigiBASE; AMETEK ORTEC)를 사용하였고, 반감기는 방사능측정기(dose calibrator) CRC[®]-25PET (Capintec Inc.)를 사용하여 10분간 방사능을 측정 후 반감기를 산출하였다. 화학적 이물은 요오드 점적 시험(spot test)으로 K2.2.2의 잔존농도를 확인하였다. 잔류 유기용매는 불꽃이온화

검출기가 장착된 Agilent Technologies사의 7890A 기체크로마토그래피를 사용하였고, 분석용 컬럼은 DB-5 컬럼(0.53 mm inner diameter×30 m length, 1 μ m; J&W scientific/Agilent Technologies)을 사용하였다. 수소이온농도지수(pH)는 pH 시험지(pH range 0~14; Sigma-Aldrich)와 pH 측정기(S220; Mettler-Toledo)를 사용하여 측정하였다. 엔도톡신 시험은 Charles River Laboratories International, Inc.의 Endosafe[®] nexgen-PTS[™]를 사용하여 실시하였고, 무균시험은 액상티오글리콜산배지 및 대두카제인소화배지(Becton, Dickinson and Company)에 직접 주사액을 접종하여 14일간 호기성균, 혐기성균 및 진균의 증식 여부를 확인하였다.

결 과

1. Sep-Pak[®] Silica 카트리지 개수에 따른 [¹⁸F]fluorocholine의 합성수율 변화

고체상 추출 카트리지법을 적용한 선행연구에서는 [¹⁸F]FCH₂Br의 분리정제를 위하여 4개의 silica 카트리지를 연속적으로 조립 후 사용하였다[20]. 하지만 본 연구에서 약 18.5~22.2 GBq (500~600 mCi)의 [¹⁸F]fluoride으로 Sep-Pak[®] Silica 카트리지 4개를 사용하여 합성할 경우 [¹⁸F]fluorocholine의 방사화학적 수율은 11.3±1.0% (decay-corrected, N=4)이었으며, 3개의 Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 사용할 경우 11.6±0.2% (decay-corrected, N=4)로 Silica 카트리지 3개와 4개간의 방사화학적 수율은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 이에 본 연구에서는 [¹⁸F]fluorocholine의 표지수율 최적화 작업 시 Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 3개를 사용하여 합성반응을 진행하였다(Figure 3A).

2. DMAE 농도에 따른 [¹⁸F]fluorocholine의 합성수율 변화

중간물질 [¹⁸F]FCH₂Br과 반응하는 DMAE의 농도에 따른 표지수율을 확인하기 위해 희석하지 않은 원액의 DMAE와 DMSO를 사용하여 10%로 희석된 DMAE를 사용하여 합성수율을 비교하였다. 희석하지 않은 DMAE를 사용할 경우 [¹⁸F]fluorocholine의 방사화학적 수율은 11.5±0.5% (decay-corrected, N=4)이었으며, 10%로 희석된 DMAE를 사용할 경우 31.2±1.6% (decay-corrected, N=4)로 DMAE를 희석하여 반응할 경우 방사화학적 수율이 유의하게 증가하였다($P<0.001$). 이에 DMAE의 농도는 10%로 고정한 후 추가적인 표지수율 최적화 실험을 진행하였다(Figure 3B).

3. [¹⁸F]Fluoride 방사능 양 따른 [¹⁸F]fluorocholine의 합성수율 변화

[¹⁸F]Fluoride의 방사능 양에 따른 수율 변화를 확인하기 위하여 의료용가속기를 50 μA로 고정한 후 10분, 15분, 30분간 양성자를 ¹⁸O-H₂O에 조사하였다. 10분간 조사하여 획득한 26.8±2.3 GBq (724.8±62.4 mCi)의 [¹⁸F]fluoride를 사용하여 합성할 경우 [¹⁸F]fluorocholine의 방사화학적 수율은 27.5±3.7% (decay-corrected, N=20)이었고, 15분간 조사하여 획득한 26.8±2.3 GBq (943±50.2 mCi)을 사용할 경우 방사화학적 수율은 27.7±3.5% (decay-corrected, N=10)로 두 실험군 간의 표지 수율은 크게 차이가 나지 않았다(*P*>0.05). 하지만, 30분간 양성자를 조사하여 획득한 46.5±6.5 GBq (1,257.7±177.0 mCi)의 [¹⁸F]fluoride를 사용하여 [¹⁸F]fluorocholine을 합성할 경우 방사화학적 수율은 36.3±7.5% (N=60)로 통계적으로 유의하게 방사화학적 수율

이 증가하였다(*P*<0.05) (Figure 3C). [¹⁸F]Fluorocholine을 제조하는데 소요되는 시간은 총 38.9±3.6분이 소요되었다 (N=100).

4. [¹⁸F]Fluorocholine의 정도관리

최종 생산된 [¹⁸F]fluorocholine의 품질관리는 유럽 약전 (European pharmacopoeia, monograph number 2793)의 지침에 의거하여 평가하였다(Table 1). 정상 평가를 위해 육안으로 관찰 시 [¹⁸F]fluorocholine 주사액은 맑고 투명하였으며 부유입자는 관찰되지 않았다. 방사화학적 순도는 이온 크로마토그래피로 측정 시 95% 이상으로 확인되었다. 방사능-박층 크로마토그래피로 방사화학적 순도를 측정 시 문헌에 보고되는 대표적인 2가지 방법인 프로피온산·아세톤·물 혼합액(1:3:2, v/v)과 acetonitrile·0.9% 생리식염수 혼합액(1:1, v/v)을 용매로 사용하여 비교한 결과 두 용매의 머무름 인자(retention factor) 값은 약 0.5로 유사하였으며, 방사화학적순도는 99%이

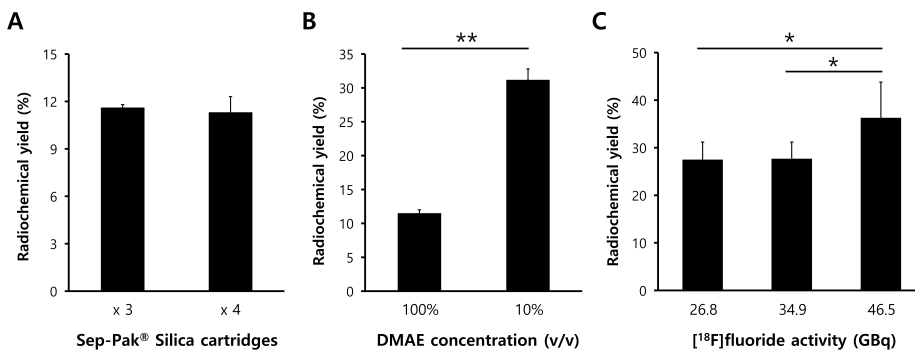


Figure 3. Effect of (A) number of Sep-Pak® Silica cartridges, (B) concentration of DMAE, (C) radioactivity of [¹⁸F]fluoride on radiochemical yield of [¹⁸F]fluorocholine. Data were presented as the mean±standard deviation. Statistical analysis is performed by Student's t test. **P*<0.05, ***P*<0.001. Abbreviation: DMAE, *N,N*-dimethylaminoethanol.

Table 1. Data summary of the QC for [¹⁸F]fluorocholine

QC test	Method	Acceptance criteria	Result	Guideline
Appearance	Visual inspection	Clear, colorless solution	Pass	KP, EP
pH	pH meter	4.5~8.5	6~7	EP
Radionuclidic identity	Half-life	F-18: 105~115 min	110±3 min	EP
	Gamma spectroscopy	511, 1,022 KeV	511 KeV	
Radiochemical purity	Radio-TLC	>90%	>99%	EP
Radionuclidic purity	Gamma spectroscopy	511 keV>99.9%	>99.9%	KP, EP
Chemical purity	Spot test	Kryptofix2.2.2<50 μg/mL	Pass	EP
Residual solvents	Gas chromatography	DMAE<100 ppm	<1 ppm	KP, EP
		Acetonitrile<400 ppm	<1 ppm	
		Ethanol<5,000 ppm	<150 ppm	
		Dimethyl sulfoxide<5,000 ppm	<1 ppm	
		Supor AEF® (Pall Corp.): 46 psi	Pass	EP
Membrane filter integrity	Bubble point test		Pass	EP
Foreign insoluble matter	Visual inspection	No particles	Pass	KP, EP
Bacterial endotoxin	Limulus amoebocyte lysate test	17.5 EU/V _{max}	<17.5 EU/mL	KP, EP
Sterility	Tryptic soy broth at 20~25	No growth observed after 14 days	Sterile	KP, EP
	Fluid thioglycolate medium at 30~35			

Abbreviations: QC, quality control; KP, Korean Pharmacopoeia; EP, European Pharmacopoeia; F-18, fluorine-18; TLC, thin-layer chromatography; DMAE, *N,N*-dimethylaminoethanol; EU, entotoxin units; ppm, parts per million; V_{max}, maximum recommended volume in millilitres.

상으로 확인되었다. 요오드 점적 시험으로 K2.2.2의 잔존농도를 확인한 결과 기준값인 50 µg/mL 미만으로 측정되었다. 확인 시험에서 방사성핵종 순도시험 시 511 KeV 및 1,022 KeV 이외의 피크는 검출되지 않았고, 방사능측정기로 측정된 [¹⁸F]fluorocholine의 방사능으로 반감기를 산출하였을 때 fluorine-18의 반감기 기준인 105~115분을 만족하였다. 잔류유기용매 측정 시 DMAE 농도는 100 ppm미만으로 검출되었고 acetonitrile은 410 ppm미만으로 검출되었으며, 에탄올과 DMSO는 5,000 ppm 미만으로 검출되었다. pH의 평가를 위해 pH 시험지와 pH 측정기를 사용하여 측정 시 pH 7로 기준범위 (pH 4.5~8.5)를 만족하였다. 엔도톡신시험에서 [¹⁸F]fluorocholine 주사액의 엔도톡신은 175 EU/V 미만으로 검출되었으며, 무균시험에서 어떠한 미생물의 발육도 관찰되지 않았다.

고 찰

암 진단에 있어 가장 많이 사용되는 방사성의약품은 [¹⁸F]FDG이다. [¹⁸F]FDG는 인체의 주요 에너지원인 포도당의 구조 중 2번 탄소의 하이드록시기(hydroxy group)를 방사성동위원소인 ¹⁸F으로 치환한 구조를 가지고 있어 체내에서 포도당과 유사한 대사를 하기 때문에 양전자 단층 촬영을 통해 포도당 소비가 높은 암의 존재 여부를 영상으로 진단할 수 있다[21]. 하지만 포도당 소비가 높은 염증이나 뇌, 심근에도 정상적으로 섭취되기 때문에 [¹⁸F]FDG의 단점을 보완 할 수 있는 다양한 방사성의약품의 개발이 이루어지고 있다. 특히, [¹⁸F]fluorocholine은 세포막 필수 성분인 콜린의 대사를 이용하여 암을 진단할 수 있는 방사성의약품으로 분화도가 높은 부갑상선선종 및 전립선암의 진단에 주로 이용된다. [¹⁸F]fluorocholine은 다양한 방법으로 합성할 수 있으나, 크로마토그래피 충전제가 카트리지 형태의 장치에 포함되어 있는 고체상 추출 카트리지를 활용한 합성 방법이 주로 사용되고 있다. 고체상 추출법은 HPLC와 유사한 원리로 시료를 추출, 분리, 농축 및 정제할 수 있지만, HPLC에 비해 크기가 작아 공간 활용도가 높고 가격이 저렴하며 사용방법이 간편하므로 방사성의약품의 합성에 많이 활용된다. HPLC는 다량의 용매를 사용하여 시료를 분석 및 분리정제 하는데, 방사성물질이 포함된 용매는 방사성폐기물로 간주되기 때문에 HPLC를 합성에 사용 시 방사능 액체폐기물이 많이 발생될 수 있는 단점이 있다. 하지만 고체상 추출 카트리지는 HPLC에 비해 비교적 소량의 용매를 사용하므로 방사능폐기물을 줄일 수 있다. 이에 본 연구에서는 고체상 추출 카트리지를 상용화된

방사성의약품 자동합성장치에 적용하여 [¹⁸F]fluorocholine 주사액을 합성하는 방법을 최적화하고자 하였다.

본 연구에서는 [¹⁸F]fluorocholine을 한 개의 반응용기가 장착된 자동합성장치를 사용하여 두 단계 표지반응으로 합성하였다. 두 단계 표지반응 시 두 개의 반응용기를 사용하는 것이 가장 이상적인 합성방법이지만 상용화된 대부분의 자동합성장치는 한 개의 반응용기를 장착하고 있다. 하지만 고체상 추출 카트리지를 사용할 경우 한 개의 반응용기만 사용하여도 두 단계 표지반응이 가능하다. [¹⁸F]fluorocholine 합성의 첫 번째 단계에서 [¹⁸F]fluoride anion을 친핵성 치환반응(nucleophilic substitution)으로 dibromomethane에 표지하여 중간물질인 [¹⁸F]FCH₂Br을 합성하였다. 처음 개발된 [¹⁸F]fluorocholine의 합성법은 [¹⁸F]FCH₂Br의 합성과정에서 생성되는 불순물들과 반응하지 않은 dibromomethane을 HPLC를 사용하여 분리정제 하였지만, 본 연구에서는 합성시간의 단축과 더 간편한 방법으로 [¹⁸F]fluorocholine을 합성하기 위하여 고체상 추출 카트리지인 Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 사용하였다. 기존 문헌 보고에서는 Sep-Pak[®] Silica 카트리지는 4개를 사용할 때 가장 좋은 합성수율을 획득할 수 있다고 기술하였지만[20], 본 연구를 통해 Sep-Pak[®] Silica 카트리지는 3개를 사용하여도 4개의 카트리지를 사용할 때와 통계적으로 유의적 차이가 없는 방사화학적 수율을 얻을 수 있었다.

두 번째 단계에서는 Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 통과한 [¹⁸F]FCH₂Br을 Sep-Pak[®] C18 카트리지 상에서 3차 아민(tertiary amine)인 DMAE와 알킬화 반응(alkylation)을 통해 [¹⁸F]fluorocholine을 표지하였다. 특히, [¹⁸F]fluorocholine 주사액의 정도관리에 있어서 잔류되는 DMAE의 농도는 매우 중요하다. 왜냐하면 표지반응에 전구물질로 사용되는 DMAE는 중앙세포에서 [¹⁸F]fluorocholine의 섭취를 방해하는 것으로 알려져 있기 때문이다[22]. 선행연구를 통해 DMAE는 콜린의 혈액 뇌장벽(blood-brain barrier)의 통과를 막고[23], 폐포 2형 세포(alveolar type II epithelial cells)와 전립샘암세포(prostate cancer cells)의 [¹⁸F]fluorocholine 섭취를 방해하는 것으로 보고된 바 있다[24, 25]. 유럽약전에는 DMAE의 기준값을 1.0 mg/V 미만(V: 유효시간 내 mL당 최대투여량)으로 규정하고 있고, 최근 보고되는 문헌에서는 100 ppm 미만을 기준농도로 설정하였다[20, 26]. 본 연구에서는 최종 [¹⁸F]fluorocholine 주사액에 잔류할 수 있는 DMAE의 농도를 최소화하기 위해 DMAE 원액을 사용하지 않고 10%로 희석을 하여 합성을 하였으며, 원액의 DMAE를 사용할 때보다 10%로 희석할 경우 오히려 방사화학적 수율이 약 3배 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 10%로 희석된 DMAE를 $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$ 과 표지반응 후 합성된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 을 Sep-Pak[®] CM 카트리지에 포획한 다음 에탄올과 주사용수를 차례로 흘려주어 카트리지를 세척하였을 때, 최종적으로 생산된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 주사액내 잔류 DMAE 농도는 100 ppm 미만으로 측정되어 유럽약전 기준을 만족하였다.

방사성의약품 자동합성장치는 제조사에서 제공되는 장치구조를 변경하지 않고 합성할 경우 가장 안정정인 합성수율을 획득할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 고체상 추출 카트리지를 적용하기 위하여 방사성의약품 자동합성장치 TRACERlab[™] FXFN의 구조를 최소한으로 변경하여 사용하였다. 세브란스병원에서는 2021년부터 약 200회 이상의 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 을 생산하였는데, 생산기간 중 몇 차례의 급격한 합성 수율 저하가 발생되었다. 합성 수율 저하의 원인은 고체상 추출 카트리지를 적용을 위한 자동합성장치의 구조 변경과 무관하게 첫 번째 단계의 $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$ 생산과정에서 주로 발생되었다. $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$ 은 매우 기화성이 높은 물질로써 증류상태로 Sep-Pak[®] Silica 카트리지를 통과한 후 Sep-Pak[®] C18 카트리지에 흡착되어 있는 DMAE와 반응한다. 하지만, $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$ 을 합성하는 반응용기에 시약 이송의 목적으로 연결된 튜빙이 높은 에너지의 방사능에 의해 손상이 되거나, 튜빙을 반응용기에 고정하는 피팅이 느슨해지거나, Sep-Pak[®] Silica 카트리지가 연결이 완전하지 못할 경우 기화성이 높은 $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{Br}$ 이 새어나와 합성수율을 저하시키는 원인이 되었다. 이에 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 의 합성 전 반드시 자동합성장치를 점검하여 반응용기의 차압유지 및 튜빙 손상유무를 확인한 후 합성하는 것을 권장한다.

본 연구를 통해 PET용 콜린 방사성의약품 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 의 표지방법을 고체상추출 카트리지를 사용하여 상용화된 자동합성장치에 성공적으로 도입할 수 있었다. 또한, 최적화 과정을 통해 높은 표지수율의 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 을 획득할 수 있었으며, 최종 생산된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 주사액은 모든 품질관리 기준을 만족하였다. 이에 본 연구에서 최적화된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 표지방법은 동일한 품질을 안정적인 수율로 생산하여 임상현장에 공급하는데 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

요약

$[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 은 임상에서 부갑상선 선종, 전립선암 및 간세포암 진단 등에 사용되는 PET용 콜린 방사성의약품이다. 본 연구에서는 고체상 추출 카트리지를 방사성의약품 자동합성장치에 적용하여 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 을 제조하는 방법을 최적화하

였다. $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 은 하나의 반응용기를 사용하여 두 단계 표지반응으로 합성하였으며, $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 합성 과정 중 생성되는 불순물을 제거하기 위해 사용하는 Sep-Pak[®] Silica 카트리지의 개수를 3개로 최적화하였고, 전구 물질인 DMAE를 10%로 희석하였을 때 가장 높은 방사화학적 수율을 획득 할 수 있었다. 또한 최종 생산된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 주사액은 유럽약전에 명시된 품질관리기준을 모두 만족하였다. 본 연구를 통해 쉽고 간편하게 사용할 수 있는 고체상 추출 카트리지를 사용하여 방사성의약품 자동합성장치에 최적화된 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 의 합성법은 임상 현장에 안정적으로 $[^{18}\text{F}]\text{fluorocholine}$ 을 공급하는데 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

Funding: None

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Park JY¹, Clinical laboratory technologist; Son J¹, Clinical laboratory technologist; Kang WJ², Professor.

Author Contributions

- Conceptualization: Kang WJ.
- Data curation: Son J.
- Formal analysis: Park JY.
- Methodology: Park JY.
- Software: Park JY.
- Validation: Son J.
- Investigation: Park JY.
- Writing - original draft: Park JY.
- Writing - review & editing: Park JY, Kang WJ.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Jun Young PARK <https://orcid.org/0000-0003-3403-2767>
Jeongmin SON <https://orcid.org/0009-0007-4762-7942>
WonJun KANG <https://orcid.org/0000-0002-2107-8160>

REFERENCES

1. Zeisel SH, Blusztajn JK. Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:269-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.14.070194.001413>

2. Shim E, Park JH, Lee Y, Park E. Literature review and future tasks necessary to establish of Korean Dietary Reference Intake for choline. *J Nutr Health*. 2022;55:211-226. <https://doi.org/10.4163/jnh.2022.55.2.211>
3. Zeisel SH. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J*. 1993;7:551-557. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.6.8472893>
4. Mehedint MG, Zeisel SH. Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16:339-345. <https://doi.org/10.1097/mco.0b013e3283600c46>
5. Michel V, Yuan Z, Ramsubir S, Bakovic M. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:490-504. <https://doi.org/10.1177/153537020623100503>
6. Blusztajn JK, Liscovitch M, Mauron C, Richardson UI, Wurtman RJ. Phosphatidylcholine as a precursor of choline for acetylcholine synthesis. *J Neural Transm Suppl*. 1987;24:247-259.
7. Plathow C, Weber WA. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med*. 2008;49 Suppl 2:43S-63S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.045930>
8. Tian M, Zhang H, Oriuchi N, Higuchi T, Endo K. Comparison of 11C-choline PET and FDG PET for the differential diagnosis of malignant tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:1064-1072. <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1496-y>
9. Hara T. 18F-fluorocholine: a new oncologic PET tracer. *J Nucl Med*. 2001;42:1815-1817.
10. Roivainen A, Forsback S, Grönroos T, Lehtiköinen P, Kähkönen M, Sutinen E, et al. Blood metabolism of [methyl-11C]choline: implications for in vivo imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med*. 2000;27:25-32. <https://doi.org/10.1007/pl00006658>
11. DeGrado TR, Baldwin SW, Wang S, Orr MD, Liao RP, Friedman HS, et al. Synthesis and evaluation of (18)F-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. *J Nucl Med*. 2001;42:1805-1814.
12. Schmid DT, John H, Zweifel R, Cserenyak T, Westera G, Goerres GW, et al. Fluorocholine PET/CT in patients with prostate cancer: initial experience. *Radiology*. 2005;235:623-628. <https://doi.org/10.1148/radiol.2352040494>
13. Talbot JN, Fartoux L, Balogova S, Nataf V, Kerrou K, Gutman F, et al. Detection of hepatocellular carcinoma with PET/CT: a prospective comparison of 18F-fluorocholine and 18F-FDG in patients with cirrhosis or chronic liver disease. *J Nucl Med*. 2010;51:1699-1706. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075507>
14. DeGrado TR, Coleman RE, Wang S, Baldwin SW, Orr MD, Robertson CN, et al. Synthesis and evaluation of 18F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: initial findings in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61:110-117.
15. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Furumoto S, Terasaki K, Yanai K. [18F]fluoromethyl triflate, a novel and reactive [18F]fluoromethylating agent: preparation and application to the on-column preparation of [18F]fluorocholine. *Appl Radiat Isot*. 2002;57:347-352. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(02\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(02)00123-9)
16. Zhang MR, Ogawa M, Furutsuka K, Yoshida Y, Suzuki K. [18F]fluoromethyl iodide ([18F]FCH₂I): preparation and reactions with phenol, thiophenol, amide and amine functional groups. *J Fluor Chem*. 2004;125:1879-1886. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2004.06.017>
17. Neal TR, Apana S, Berridge MS. Improved synthesis of [18F]fluoromethyl tosylate, a convenient reagent for radiofluoromethylations. *J Label Compd Radiopharm*. 2005;48:557-568. <https://doi.org/10.1002/jlcr.949>
18. Kryza D, Tadino V, Filannino MA, Villeret G, Lemoucheux L. Fully automated [18F]fluorocholine synthesis in the TracerLab MX FDG Coincidence synthesizer. *Nucl Med Biol*. 2008;35:255-260. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.11.008>
19. Rodnick ME, Brooks AF, Hockley BG, Henderson BD, Scott PJ. A fully-automated one-pot synthesis of [18F]fluoromethylcholine with reduced dimethylaminoethanol contamination via [18F]fluoromethyl tosylate. *Appl Radiat Isot*. 2013;78:26-32. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2013.04.017>
20. Huang YY, Tsai CL, Wen HP, Tzen KY, Yen RF, Shiue CY. High yield one-pot production of [18F]FCH via a modified TRACERlab FxFN module. *Appl Radiat Isot*. 2017;128:190-198. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.07.029>
21. Kobayashi K, Bhargava P, Raja S, Nasser F, Al-Balas HA, Smith DD, et al. Image-guided biopsy: what the interventional radiologist needs to know about PET/CT. *Radiographics*. 2012;32:1483-1501. <https://doi.org/10.1148/rg.325115159>
22. Slaets D, De Bruyne S, Dumolyn C, Moerman L, Mertens K, De Vos F. Reduced dimethylaminoethanol in [(18)F]fluoromethylcholine: an important step towards enhanced tumour visualization. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:2136-2145. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1508-z>
23. Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH. Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. *J Neurochem*. 1978;30:299-308. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb06530.x>
24. Dodia C, Fisher AB, Chander A, Kleinzeller A. Inhibitors of choline transport in alveolar type II epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:426-429. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.4.426>
25. Kwee S, Turner H, Lim J, Wakano C, Coel M. Dimethylaminoethanol reduces 18F-fluoroethylcholine uptake in prostate cancer cells. *J Nucl Med*. 2006;47(Suppl 1):425P.
26. Costa CLS, Santos LM, Castro ACF, Nascimento LTC, Silva JB, Silveira MB. Chromatographic method development using multivariate approaches for organic solvents optimized analysis in [18F]fluorocholine. *Appl Radiat Isot*. 2023;195:110736. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2023.110736>