^{99m}Tc-HMPAO의 광학이성체 *d*-, *l*-Form의 합성과 뇌섭취율 비교

성균관대학교 약학대학, 서울대학교 의과대학 핵의학교실[1]

강찬순 · 장영수[1] · 정재민[1] · 이동수[1] · 정준기[1] · 이강춘 · 이명철[1]

Synthesis of *d*- and *l*-Form of ^{99m}Tc-HMPAO, and Comparison of Brain Uptake

Chan Soon Kang, M.S., **Young Soo Chang,** M.S.,[1] **Jae Min Jeong,** Ph.D.,[1] **Dong Soo Lee,** M.D.,[1] **June-Key Chung,** M.D.,[1] **Kang Choon Lee,** Ph.D., and **Myung Chul Lee,** M.D.[1]

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University,

[1]Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Abstract

Purpose: ^{99m}Tc-HMPAO is a radiopharmaceutical for imaging cerebral blood flow. HMPAO (RR, SS)-4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethylundecan-2,10- dione bisoxime) has three stereoismers such as, *meso*-, *d*-, and *l*-HMPAO. Techentium complexes of *meso*-HMPAO and *d,l*-HMPAO are known to have different in vivo brain uptakes. In this study, enantiomers of HMPAO (*d*-HMPAO and *l*-HMPAO) were separated from *d,l*-HMPAO. These enantiomers were labeled with ^{99m}Tc and the biodistribution studies were performed in mice. **Materials and Methods:** An intermediate imine product was produced from 2,3-butanedione monooxime and 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine (54% yield) and was reduced into a mixture of three isomers (35% yield). The *meso*-isomer was separated from *d,l*-mixture by repeated fractional crystallization (11% yield). The d- and *l*-enantiomers were subsequently separated by co-crystallization with optical isomers of tartaric acid (25% and 5% yield, respectively). Each enantiomeric HMPAO was labeled with ^{99m}Tc by reacting with $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ and ^{99m}Tc-pertechnetate. Biodistribution study was performed 1 hr after tail vein injection to ICR mice. **Results:** Radiochemical purities of each compound were over 80%. In biodistribution study, the brain uptakes of *d,l*- d- and *l*-form were 1.34, 1.12 and 1.67% ID/g, respectively. In case of *l*-isomer the brain uptake was higher (1.5 fold) than d-isomer. **Conclusion:** We successfully purified each enantiomeric HMPAO. In biodistribution study of stereoismers of ^{99m}Tc-HMPAO in mice, *l*-HMPAO may show better brain image than *d,l*-HMPAO which was supplied in a commercial kit. **(Korean J Nucl Med 2001;35:69-74)**

Key Words : HMPAO, stereoisomers, brain uptake

서 론

^{99m}Tc-(RR,SS)-4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethylundecan-2,10-dione bisoxime (^{99m}Tc-HMPAO) (Fig. 1)은 뇌혈류영상에 널리 사용되는 방사성의약품이다. ^{99m}Tc-HMPAO의 뇌조직 섭취기전은 HMPAO가

Received Dec. 11, 2000; revision accepted Feb. 10, 2001
Corresponding Author: Jae Min Jeong, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 28 Yongun-dong Chongno-ku, Seoul 110-744 Korea
Tel: (02)760-3805, Fax: (02)745-7690
E-mail : jmjng@snu.ac.kr
※ 본 연구는 원자력중장기 연구비의 보조로 이루어졌음.

^{99m}Tc과 결합하여 중성 지용성 복합체(킬레이트)가 형성되어 쉽게 뇌조직으로 분포된 후 글루타치온 존재하에 친수성물질로 변화되어 뇌에 축적이 됨으로써 뇌혈류영상화를 가능하게 하는 것이다.[1,2]

HMPAO는 *d*-, *l*-, *meso*-형 3 가지의 입체이성체가 존재한다(Fig. 2). 일반적으로 두뇌 영상에는 *d*-형과 *l*-형의 라세미체인 *d,l*-형을 사용한다. HMPAO 입체이성체들은 각각 녹는점과 HPLC상 머무른 시간이 다르며, 생체내 분포에도 차이를 나타낸다. 특히, *d,l*-형이 *meso*-형보다 뇌섭취가 더 잘 되므로 일반적으로 *d,l*-형을 분리해 사용한다.[3-6]

광학이성질체인 *d*-HMPAO와 *l*-HMPAO도 생체내 분포가 다를 가능성이 있는 것으로 예측할 수 있다. 이 연구에서는 *d,l*-HMPAO 라세미 혼합물을 분리하고, *d*-형과 *l*-형 각각을 ^{99m}Tc으로 표지하여 생체내분포를 비교하고자 하였다.

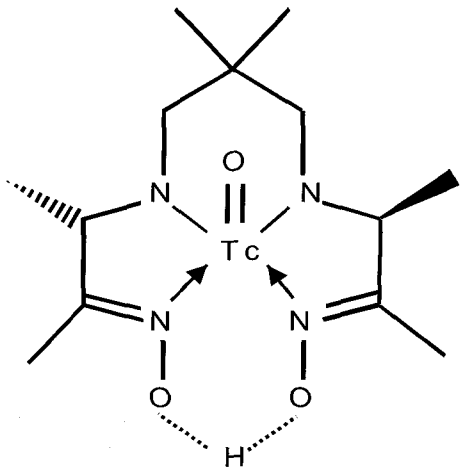

Fig. 1. This structure shows ^{99m}Tc-HMPAO.

대상 및 방법

1. HMPAO의 합성과 *meso*-HMPAO의 분리

HMPAO의 합성은 Neirinckx 등[7]의 방법을 변형하여 합성하였다. 분석에는 핵자기공명분광기(BRUKER AC 200 (200 MHz))와 선광도측정기(ZASCO DIP 1000 polarimeter)를 사용하였으며, 합성한 HMPAO의 대조용으로는 Ceretec® (Amersham Co.)을 사용하였다.[8]

2,3-Butanedione monooxime (12.005 g, 118.73 mmol)을 벤젠(100 ml)에 넣고 질소대기 하에서 30분간 환류, 교반한 후 아세트 산(77 μl)을 넣고, 벤젠(50 ml)에 녹인 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine (7.13 ml, 59.4 mmol)을 30분에 걸쳐 서서히 가하

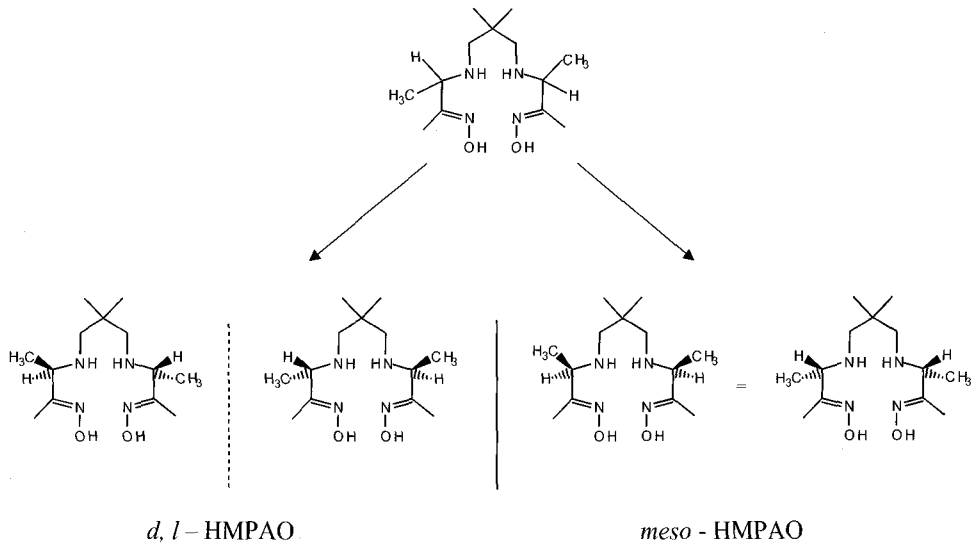

Fig. 2. These structures are stereoisomers of HMPAO.

였다. 16 시간 환류, 교반하며 Dean-Stark 장치를 사용하여 물을 제거하였다. 반응 용매를 감압증류하여 제거하고 아세토니트릴(40 ml)을 가한 후 생긴 침전을 여과하였다. 소량의 아세토니트릴을 사용하여 침전을 세척한 후 건조하여 4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethyl-3,8-undecadiene-2,10-dione bisoxime을 얻었다 (8.74 g, 수율 54%), M.P. : 132～135℃, ^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) :δ 3.3 (4H, brS), 2.1(6H, S), 2.0(6H, S), 1.1(6H, S).

이를 출발물질(42.8 g, 152.86 mmol)로 하여 95% 에탄올 수용액(389 ml)에 녹인 후 얼음수조를 사용하여 0～5℃로 냉각하였다. 이 용액에 $NaBH_4$ (5.78 g, 152 mmol)를 수회(3～4회)에 나누어 가하였다. 0～5℃에서 2 시간 교반 후, 증류수(131 ml)를 가하고 1 시간 더 교반하였다. 반응종결 후 반응용매를 감압증류하여 제거하였다. 잔유물을 감압 여과 후, 소량의 물로 세척하여 조결정의 *meso*-HMPAO와 *d,l*-HMPAO 혼합물(15.08 g, 수율 35%)을 얻었다. 이 혼합물을 ethyl acetate에서 재결정하여 *meso*-HMPAO (5 g, 재결정수율 33%)를 분리하였다. M.P. : 149.5～150℃, IR(KBr) : 3176.9, 2845.1, 1467.9, 1369.5, 1276.9, 1109.1, 1H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) : δ 3.20(4H, q), 2.27(6H, dd), 1.61(6H, S), 1.16(6H, d), 0.85(6H, d), ^{13}C-NMR (50 MHz, $CDCl_3$) : δ 158.51, 57.31, 55.75, 24.58, 24.38, 19.25, 8.26

meso-HMPAO를 분리하고 남은 여액을 3회 재결정하여 *d,l*-HMPAO (1.7 g, 재결정수율 11%)를 분리하였다. M.P. : 129～130℃, IR(KBr) : 288.3, 1452.4, 1361.8, 1099.4, 979.9, ^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) : δ 3.25(4H, q), 2.27(6H, dd), 1.80 (6H, S), 1.17(6H, d), 0.86(6H, S), ^{13}C-NMR (50 MHz, $CDCl_3$) : δ 158.49, 57.34, 56.23, 24.49, 19.25, 8.32.

2. 광학이성질체의 분리

d,l-HMPAO로부터 각각의 거울상인 *l*-HMPAO와 *d*-HMPAO를 분리하는 조작은 (+)-타르타르 산과 (-)-타르타르 산을 이용하였다. 먼저 (+)-타르타르 산을 사용하여 *l*-HMPAO · 타르타르 산 염을 만들어 여러번 재결정하였다. 재결정 후 타르타르 산을 제거하여 1차적으로 *l*-HMPAO를 분리하였다 (수율 5%, $[\alpha]_D^{20}$: -2.52 (c=4, CH_3OH), M.P. : 174～175℃).

여액에 (-)-타르타르 산을 가하여 *d*-형을 염 형태로 만들어 *l*-형과 같은 방법으로 재결정하여 분리하였다 (수율 25%, $[\alpha]_D^{20}$: +2.51 (c=4, CH_3OH), M.P : 167.5～168℃).

3. ^{99m}Tc 표지

d,l-HMPAO 또는 *d*-HMPAO, *l*-HMPAO 0.5 mg에 4.5 mg NaCl, 0.5～1 μg $SnCl_2 \cdot 2H_2O$을 바이알에 넣고 마개를 하였다. 여기에 ^{99m}Tc pertechnetate (8～15 mCi/1 ml)를 가하여 표지하고, 안정제로 0.01% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 ml을 가하였다.[9] ^{99m}Tc-HMPAO의 표지효율은 종이크로마토그래피(Whatman No.1 paper chromatography)와 즉석박층크로마토그래피(ITLC-SG chromatography)를 이용하여 측정하였다. Whatman No.1 paper를 50% 아세토니트릴 수용액에 전개시키고, ITLC-SG를 생리식염수와 butanone에 전개시켜 지용성인 ^{99m}Tc-HMPAO (L)의 방사화학적순도와 불순물인 pertechnetate (P), reduced hydrolyzed-^{99m}Tc (R), 친수성 ^{99m}Tc-HMPAO (H)의 양을 각각 구하였다.[10] Whatman No.1 paper를 50% 아세토니트릴 수용액에 전개시 R은 원점(Rf=0～0.3)에 남고 다른 성분은 선단 (Rf=0.9～1)까지 이동한다. ITLC-SG를 생리식염수에 전개시 L, H와 R은 원점에 남고 P는 선단까지 이동하며, butanone에 전개시에는 H와 R은 원점에 L과 P는 선단으로 이동한다.[11]

4. 마우스에서의 생체내분포

7～8 주령의 웅성 ICR 계 마우스(20～25 g)를 물과 먹이를 자유 섭취시키면서 1 주일간 순화사육한 후 사용하였다. 투여한 ^{99m}Tc 표지 HMPAO는 지용성 표지화합물의 방사화학적 순도가 유사한 것을 마우스에서의 생체내분포시험에 사용하였다. ^{99m}Tc-*d,l*-HMPAO, ^{99m}Tc-*d*-HMPAO, ^{99m}Tc-*l*-HMPAO 각각을 10 μCi/0.1 ml 씩 마우스(각 군별 6 마리)의 꼬리 정맥에 주사한 다음 1 시간 후에 장

기 (혈액, 근육, 지방, 심장, 폐, 간, 비장, 위, 장, 신장, 뇌, 뼈)를 적출하여 무게를 측정하였다. 각 장기에 남아있는 방사능을 감마카운터(Cobra II, Parkard)를 이용하여 측정하였다. 결과는 주사한 양에 대한 각 장기의 단위무게당 섭취백분율 (percent injected dose/gram, % ID/g)로 나타내었다.

5. 통계

각 군의 측정값은 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 군과의 차이는 통계 처리하여 비교하였으며, $p<0.05$인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. HMPAO의 합성과 *meso*-HMPAO의 분리

첫 번째 단계인 2,3-butanedione monooxime과 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine을 출발물질로 하여 imine형태의 4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethyl-3,8-undecadiene-2,10-dione bisoxime을 만드는 과정과 환원과정을 거쳐 *d,l*-과 *meso*-의 혼합물을 얻는 과정은 순조롭게 진행되었다. 이 혼합물에서 *meso*-HMPAO와 *d,l*-HMPAO를 ethyl acetate에서 분별결정시 첫 번째의 결정화에서는 *meso*-HMPAO를 주로 포함하는 고체가 얻어지며, 여액을 재결정하여 *d,l*-HMPAO가 주로 포함된 고체를 얻을 수 있었는데 이 과정은 시간이 오래 걸리고 수득률도 낮았다. *meso*-HMPAO의 용융점은 149.5~150℃로서 *d,l*-HMPAO의 용융점(129~130℃)보다 높았으며, 각각은 Banerjee 등[12]이 보고한 값과 유사하였다.

2. 입체이성질체의 분리

d,l-HMPAO로부터 *l*-HMPAO와 *d*-HMPAO를 분리하는 조작은 광학활성이 있는 타르타르 산을 이용하였다. 높은 순도의 광학활성 물질을 얻기 위하여 여러번의 재결정이 필요하였다. 재결정으로 분리한 *l*-HMPAO (174~175℃)와 *d*-HMPAO (167.5~168℃)의 용융점은 *d,l*-HMPAO (129~130℃)의 용융점보다 높은 것을 확인하였다.

3. ^{99m}Tc 표지

HMPAO 입체이성체의 ^{99m}Tc 표지 결과는 Table 1과 같다. *d,l*-HMPAO와 *d*-HMPAO, *l*-HMPAO의 ^{99m}Tc 표지시 지용성 표지화합물의 방사화학적 순도는 80% 이상이었다.

4. 마우스에서의 생체내분포

^{99m}Tc-HMPAO의 마우스에서의 생체내분포를 Table 2에 나타내었다. 마우스의 각 장기에 대한 ^{99m}Tc-HMPAO 입체이성체의 섭취분포는 유사하게 나타났다. 뇌섭취율은 ^{99m}Tc-*d,l*-HMPAO와 ^{99m}Tc-*d*-HMPAO, ^{99m}Tc-*l*-HMPAO 각각에서 1.34, 1.12, 1.67% ID/g 이었으며, ^{99m}Tc-*l*-HMPAO가 ^{99m}Tc-*d*-HMPAO보다 1.5 배정도 더 높게 나타났다.

고 찰

^{99m}Tc-HMPAO는 전하가 0인 중심부와 O-H-O 수소결합을 갖고 있는 지용성 환형 화합물(Fig. 1)로, 3번과 9번 탄소가 부제탄소이기 때문에 입체이성질체가 존재한다.[7] ^{99m}Tc-HMPAO의 입체 이

Table 1. Raiochemical Purities of ^{99m}Tc-HMPAO Optical Isomers

^{99m}Tc-HMPAO optical isomers	*d,l*-HMPAO	*d*-HMPAO	*l*-HMPAO
Lipophilic ^{99m}Tc-HMPAO	86±4	83±3	87±6
Hydrophilic ^{99m}Tc-HMPAO	11±5	12±4	7±5
Free ^{99m}Tc pertechnetate	3±1	5±2	6±3
Reduced hydrolyzed ^{99m}Tc	1±1	0	0

The values are mean±S.D. n=4

Table 2. Biodistribution of ^{99m}Tc-HMPAO Optical Isomers in Mice 1 hr Postinjection

%ID/g	*d,l*-HMPAO	*d*-HMPAO	*l*-HMPAO
Blood	4.83±0.35	4.56±0.64	5.09±0.69
Muscle	1.21±0.28	0.98±0.15	0.91±0.25
Fat	2.59±0.41	2.95±0.05	1.66±0.77
Heart	3.21±0.56	2.46±0.32	3.24±0.34
Lung	8.97±2.21	7.97±1.74	9.11±0.82
Liver	4.78±0.62	6.26±0.34	3.94±0.61
Spleen	2.13±0.43	2.08±0.21	2.16±0.46
Stomach	12.5±0.92	14.5±0.88	10.1±0.19
Intestine	2.57±0.39	3.01±0.13	2.67±0.23
Kidney	7.45±0.32	6.42±0.12	7.89±0.97
Brain	1.34±0.67	1.12±0.20	1.67±0.09
Bone	1.07±0.07	0.95±0.04	1.01±0.06

The values are percent injected dose/gram tissue, n=6

성질체는 광학적 불활성상태인 *meso*-형과 광학적 활성상태인 *d*-와 *l*-형이 존재한다(Fig. 2). *meso*-형은 부분입체이성질체 혼합물인 *d,l*-라세미 혼합물과는 다른 성질을 갖는다. 이들은 녹는점과 HPLC상 머무른 시간이 다르며, 뇌섭취 분포에 차이를 나타낸다. *d,l*-라세미 혼합물이 *meso*-형보다 2-3배 정도 더 우수하게 뇌에 섭취되므로 일반적으로 *d,l*-형을 분리하여 사용하고 있다.[5]

이 연구에서는 기존의 방법인 ethyl acetate액 중에서 분별결정법을 반복하여 *meso*-형을 분리하였으며, (+)-타르타르 산과 (-)-타르타르 산을 사용하여 *d*-형과 *l*-형을 분리하였다. *d,l*-라세미 혼합물에서 *d*-형과 *l*-형의 분리수율은 각각 25%와 5%로 낮게 나타났다. *d,l*-HMPAO의 융점은 *meso*-HMPAO보다 낮았지만 *d*-HMPAO와 *l*-HMPAO의 융점은 모두 *meso*-HMPAO보다 높았다. *l*-HMPAO의 융점이 *d*-HMPAO의 융점보다 약간 높게 측정되었는데 이는 *l*-HMPAO의 순도가 조금 높기 때문으로 추측된다.

Ding 등[13]은 ^{99m}Tc-L-HMPAO가 ^{99m}Tc-*d,l*-HMPAO나 ^{99m}Tc-D-HMPAO보다 뇌섭취율(%D in brain)이 높고 제거율도 느리다고 보고하였다. 이것은 뇌에 섭취된 ^{99m}Tc-L-HMPAO가 다른 이성체보다 빨리 수용성 HMPAO로 전환되기 때문이라고 하였다. 이 연구에서 마우스의 뇌섭취율은 *l*-형이 *d*-형보다 1.5 배 뛰어났으며, 이는 앞서 보고된 결과와 유사하였다.[5]

이상의 실험 결과에서 *d,l*-HMPAO에서 *d*-HMPAO와 *l*-HMPAO를 분리한 경우, *l*-HMPAO가 *d*-HMPAO 또는 *d,l*-HMPAO보다 높은 뇌섭취율을 나타내었다. 따라서 *l*-HMPAO의 합성방법의 개선을 통해 수율을 증가시킬 수 있다면, *l*-HMPAO를 뇌영상진단용 리간드로 사용하여 보다 좋은 영상을 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

목적: ^{99m}Tc-HMPAO는 뇌혈류영상에 사용되는 방사성의약품으로, HMPAO (RR,SS)-4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethylundecan-2,10-dione bisoxime)는 3개의 입체이성체(*meso*-, *d*-, *l*-HMPAO)가 존재한다. ^{99m}Tc표지 *meso*-HMAPO와 *d,l*-HMPAO는 체내에서 뇌섭취에 차이를 나타낸다. 이 연구에서는 *d,l*-HMPAO 입체이성체 혼합물을 *d*-형과 *l*-형으로 분리하여 각각을 ^{99m}Tc으로 표지하여 생체내분포를 비교하고자 하였다. **대상 및 방법**: 2,3-Butanedione monooxime과 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine을 반응시켜 imine 형태의 중간화합물(수율: 54%)을 얻었다. 이를 환원시켜 *d,l*-과 *meso*-HMAPO 혼합물을 얻었다(수율 : 35%). 이것을 4번 분별결정하여 *meso*-HMPAO를 분리하였다(수율: 11%). *d,l*-라세미 혼합물은 (+)-타르타르 산과 (-)-타르타르 산을 이용하여 *d*-형과 *l*-형을 분리하였다(수율 25%, 5%). 합성한 각 입체이성체 HMPAO를 환원제로 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$를 이용하여 ^{99m}Tc으로 표지한 후, 마우스에 투여하여 1 시간 후 생체내분포를 확인하였다. **결과**: 우리는 각 입체이성체 HMAPO를 합성하고 핵자기공명분광기와 선광도측정기를 이용하여 구조를 확인하였다. ^{99m}Tc 표지후 지용성 ^{99m}Tc-HMPAO의 방사화학적 순도는 80% 이상이었다. 각 입체이성체(*d,l*-, *d*-, *l*- HMPAO)의 뇌섭취율은 1.34, 1.12, 1.67% ID/g으로, *l*-형이 *d*-형보다 1.5 배 더 높았다. **결론**: 우리는 각 입체이성체 HMPAO를 성공적으로 합성하였다. *l*-HMPAO를 분리하여 사

용할 경우 보다 나은 영상을 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1) Neirinckx RD, Harrison RC. Method for localisation of glutathione involving propylene amine oxime complexes which are retained in cells after reaction mediated by glutathione. *Eur Pat Appl EP* 277,754
2) Holmes RA, Chaplin SB, Royston KG, Hoffman TJ and Volkert WA. Cerebral uptake and retention of ^{99m}Tc-hexamethylpropyleneamine oxime (^{99m}Tc-HM-PAO). *Nucl Med Commun* 1985;6:443-7,
3) Nowotnik DP, Canning LR, Cumming SA, Harrison RC, Higley B, Nechvatal G, et al. Development of a Tc-^{99m}-labelled radiopharmaceutical for cerebral blood flow imaging. *Nucl Med Commun* 1985;6:499-506
4) Sharp PF, Smith FW, Gemmell HG, Lyall D, Evans T, Gvozdanovic D, et al. Technetium-^{99m} HM-PAO stereoisomer as potential agents for imaging regional cerebral blood flow. *J Nucl Med* 1986;27:171-7
5) Canning LR, Nowotnik DP, Neirinckx RD, Piper IM. Complexes of technetium-99m with propylene amine oximes. 1985;EP0194843
6) Lee MC, Lee BW, Chung JK, Cho BY. Koh CS and Jeong JM. A study on synthesis of ^{99m}Tc-HMPAO as a brain perfusion agent and its distribution. Kor J Nucl Med 1990;24(2):216-21
7) Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickette RD, Holmes RA, et al. Techentium-^{99m} *d,l*-HMPAO : A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. J Nucl Med 1987;28: 191-202
8) Feinstein-Jaffe I, Boazi M and Tor Y. Assessment of the purity of *d,l*-HMPAO from diastereomeric mixtures using NMR techniques. *J Nucl Med* 1989;30:106-9
9) Hung JC, Chowdhury S and Mullan BP. Use of stabilized technetium-99m exametazime for radiolabelling leukocytes. *J Nucl Med* 1998;39 (5): 912-7
10) Zhang J, Tian J, Lin Q, Jin X, Wang S. Kinetic analysis of 99Tcm-HM-PAO decomposition and the method of stabilization. *J Radioanal Nucl Chem Art* 1996;206(1):85-9
11) Andersen AR, Friberg A, Lassen NA, Kristensen K, Neirinckx RD. Assessment of the arterial input curve for [^{99m}Tc]-*d,l*-HMPAO by rapid octanol extraction. *J Cerb Blood Flow Metab* 1998;8:S23-30
12) Banerjee S, Smuel G, Kothari K, Sarma HD, Pillai MRA. On the synthesis, isolation, and radiochemical studies for the preparation of in-house kits for ^{99m}Tc-*meso*- and *d,l*-HMPAO : a few additional observations. *Nucl Med Biol* 1999;26:327-38
13) Ding H-J, Huang Y-F, Tzeng C-C. Synthesis of Tc-D,*d*-HMPAO and Tc-L,*l*-HMPAO and their comparison of chemical and biological properties. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9:3199-202