

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2016.3.1.38>

## A study of $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi labeling condition using radio-chromatography

Sung-Hyun Moon,<sup>1,2,3</sup> Yun-Sang Lee,<sup>1,3\*</sup> Dong Soo Lee,<sup>1,3</sup> June-Key Chung,<sup>1,2,3</sup> and Jae Min Jeong<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Seoul National University College of Medicine, Korea

<sup>2</sup>Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Korea

<sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Korea<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Tc-99m labeled sestamibi ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI) is one of most widely used radiopharmaceuticals for myocardial SPECT imaging. Radiolabeling of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI is recommended by heating in 100°C water bath for 15 min. However, the water bath might be a source of contamination. Thus, if radiolabeling of  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi can be performed at room temperature, then it would be more convenient to use in clinical application. In this study, we performed the radiolabeling of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI in different temperature conditions or using different instruments to find out the efficient labeling condition. We studied the  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI labeling at room temperature or 100°C heating block, and checked the labelling yields every 1 min for 10 min using radio-TLC with 2 different eluents—saline and acetone. From the experiment, we confirmed that the  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI can be labeled over 90% yield but not completed at room temperature. However, the  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI labeling was completed when it was performed in the 100°C heating block. Finally, we proved that heating is essential for complete  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI labelling, furthermore using heating block is also possible instead of water bath.

*J Radiopharm Mol Probes* 3(1):38-43, 2017

**Key Word:**  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, Sestamibi, Radio TLC, Labelling condition

## Introduction

$^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI)는 단일광자방출전산화단층촬영 (Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT)에 의한 심근관류 영상용 방사성의약품으로서 이미 기존 임상분야에서 상업적으로 제품화되어 널리 사용되고 있다 (1-4).  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI는  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ 의 착물로서 리간드가 alkylisonitrile 구조이다. 본 착물은 심근에 장시간 잔류하는 반면 다른 장기에 대한 섭취분은 상대적으로 빠른 시간에 대

사, 배설되어 좋은 심근영상을 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다 (5). 또한  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI 섭취 정도의 정량적 분석을 통하여서는 높은 생존 심근 발견을 통하여 심근 생존능의 평가에도 그 이용이 활발히 이루어지고 있다 (6). 이 뿐만 아니라 최근에는 심근관련 영상뿐만 아니라 부갑상선, 유방암 등 다양한 분야에도 적용이 가능한지 많은 연구가 꾸준히 이루어지고 있다 (7-11). 이러한  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (Figure 1)는 6개의 methoxyisobutylisonitrile 리간드가  $^{99m}\text{Tc}$ 와 결합하여 비교적 안정한 형태의 착물 형태를 이루고 있다 (1).

Received: May 29, 2017 / Revised: June 21, 2017 / Accepted: June 24, 2017

**Corresponding Author :** Yun-Sang Lee, Ph.D

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 101 Daehak-ro Jongno-gu, Seoul 110-744 Korea, E-mail: wonza43@snu.ac.kr, Tel: +82-2-740-8906, Fax: +82-2-745-7690

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

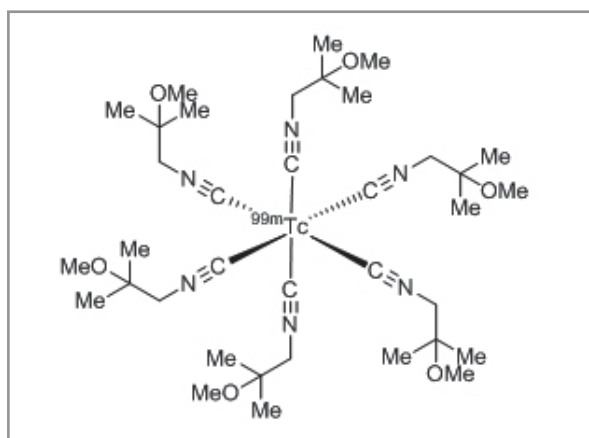


Figure 1. Synthesis of  $^{11}\text{C}$ -sertraline by the loop method with  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ .

시판되고 있는 키트의 설명서에 따르면  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI의 표지 조건은 중탕수조를 이용하여 95~99°C의 조건에서 표지하는 것으로 설명되어 있다. 하지만 중탕수조를 이용하여 고온에서 표지를 진행하고자 하면 물이 키트 바이알에 묻음으로써 오염의 우려가 있고, 번거로울 뿐만 아니라, 조작 중 고온의 물을 쏟음으로 발생하는 안전사고 등의 여지도 있으므로, 좀 더 간편하고 안전한 조건에서의 표지 조건이 확립될 수 있다면 더 편리하게 임상 연구 분야에서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

이에 본 연구진은 우선  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI가 실온에서 표지반응이 완료될 수 있는지를 확인하였다. 더 나아가서 같은 고온이라도 끓는 물을 이용하는 중탕수조 대신 물이 없이 깨끗하게 가열할 수 있는 가열 블록을 이용한 직접 가열 장치를 이용한 표지 조건 역시 함께 시험하였다.

## Materials and Methods

### 1. 장비 및 시약

본 연구에서 사용된  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 전구체는 동아제약 (Seoul, Korea)에서 판매하는 동아세스타미비주 (Sestamibi Injection Dong-A) 제품을 이용하였다. 동아세스타미비주의 조성은 주성분으로 테트라키스 (2-메톡시 이소부틸 이소니트릴) 구리(I) 테트라 플루오로보레이트 1.0 mg, 약한 킬레이트제로 구연산나트륨 2.6 mg, 환원제 염화제일주석 0.075

mg, 염산시스테인 1.0 mg, 부형제 만니톨 20.0 mg, 아스코르빈산 적량으로 구성되어 있다.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  방사성물질은 삼영유티텍 (Seoul, Korea)에서 판매하는  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  제너레이터에 생리식염수로 용출하여 표지 하였다. 반응에 사용한 가열 블록은 Lab-Line Instruments, Inc. (Illinois, IL, U.S.A.)에서 판매하는 Lab-Line H2025-5 모델을 사용하였다. 표지효율은 instant thin-layer chromatography-silica gel (ITLC-SG) plate (Pall Corp., USA) 와 Whatman No. 1 용지 (GE Healthcare Life Science, NY, U.S.A.)를 이용하여 측정하였으며, 이 때 방사성크로마토그램은 Bioscan AR 2000 (AR-2000, Poway, CA, U.S.A.)을 이용하여 판독하였다.

### 2. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI의 표지

세스타미비 키트에 제너레이터에서 용출한 Tc-99m (10 mCi, 2.0 mL)을 섞어준 후 각각 상온과 100°C에서 15분간 반응하여 표지하였다.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI의 방사화학적 표지효율은 10분까지는 매 분마다 시료를 채취하여 각 반응시간 별 표지효율을 확인하였고, 이후 15분에서의 결과 또한 TLC로 확인하였다. TLC 조건은 Whatman No.1 용지는 아세톤을 그리고 ITLC-SG는 생리식염수를 각각 이동상으로 하여 크로마토그래피를 실행하였다. 각각의 결과는 Radio TLC스캐너를 이용하여 판독하였다.

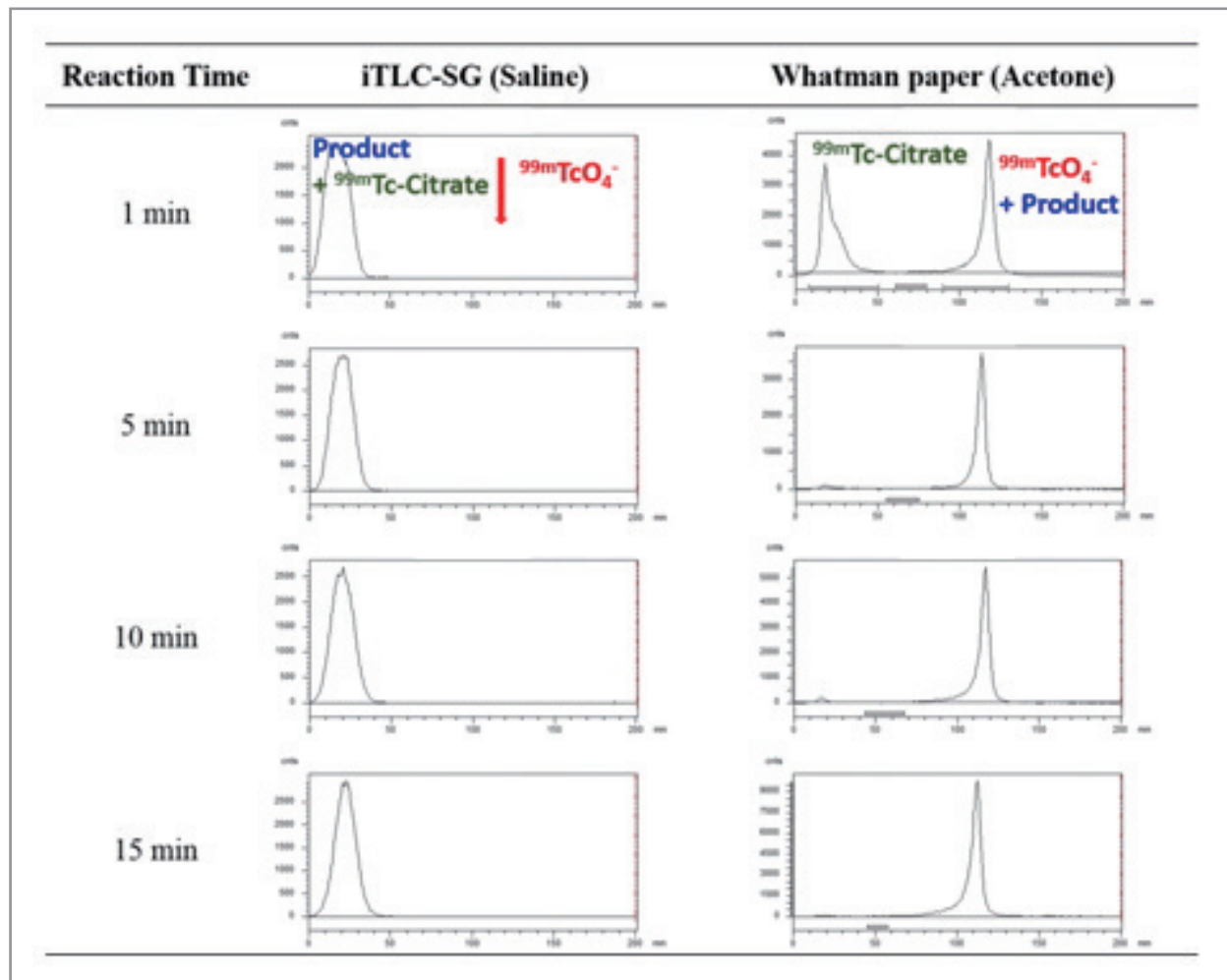
## Results and Discussion

MIBI에 Tc-99m 표지 결과는 radio TLC의 두 가지 상이한 조건 (ITLC-SG, 생리식염수/ Whatman No.1, 아세톤)에서 나온 결과를 이용하여 확인하였다. Tc-99m 표지 시 반응에 참여하지 않은 free Tc-99m은  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  형태로 두 가지 TLC 조건에서 모두  $R_f$  값이 1인 반면, 가수분해된 Tc-99m 콜로이드는 두 가지 조건 모두에서  $R_f$  값이 0으로 나타난다. 하지만 표지된  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI는 ITLC-SG, 생리식염수 조건에서는  $R_f$  값이 0인 반면, Whatman No.1, 아세톤 조건에서는  $R_f$  값이 1로 서로 다르므로 두 가지 크로마토그래피 조건을 비교함으로써 확인이 가능하다 (Table 1) (1).

**Table 1.** R<sub>f</sub> Values of Tc-99m-Labeled Components in Tc-99m-MIBI Preparation

Stationary Phase	Eluent	R <sub>f</sub>			
		Hydrolyzed <sup>99m</sup> Tc colloid	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	<sup>99m</sup> Tc-Citrate	<sup>99m</sup> Tc-MIBI
ITLC-SG	Saline	0 <sup>a)</sup>	1	0 <sup>a)</sup>	0
37°C		0 <sup>a)</sup>	1	0 <sup>a)</sup>	1

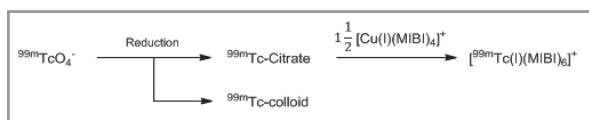
<sup>a)</sup> The R<sub>f</sub> values of <sup>99m</sup>Tc-colloid and <sup>99m</sup>Tc-Citrate are same. However, the peak of <sup>99m</sup>Tc-colloid on ITLC was not decreased after <sup>99m</sup>Tc-MIBI formation because it is irreversible reaction. On the contrary, the peak of <sup>99m</sup>Tc-Citrate on ITLC was decreased rapidly.



**Figure 2.** Radio TLC scan of iTLC-SG and Whatman paper chromatography of <sup>99m</sup>Tc-MIBI labeling at 1, 5, 10, and 15 min labeled in heating block at 95 ~ 99°C. (ITLC-SG; R<sub>f</sub> = 0 is product and <sup>99m</sup>Tc-Citrate, R<sub>f</sub> = 1 is <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> / Whatman paper; R<sub>f</sub> = 0 is <sup>99m</sup>Tc-Citrate, R<sub>f</sub> = 1 is product and <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>)

이에 우리는 본 연구에서 먼저 중탕수조가 아닌 일반 가열 블록을 이용해 권장되고 있는 조건은 95~99°C의 온도에서 가열하여 표지 효율을 확인하였다. ITLC-SG 조건에서는 가열한지 1분만에 모든 <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 이 사라지고 R<sub>f</sub> 값 0으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 Whatman No.1에서는 R<sub>f</sub>

값 0 위치에 52.64 %의 peak 을 확인할 수 있었다. 기존 연구에 따르면 이 위치에서는 Tc-99m 표지 시 첨가물인 주석에 의해 가수분해된 Tc-99m colloid 가 나오는 것으로 알려져 있으며 (12) 이는 비가역적으로 반응이 진행되어 일단 생성이 되면 재반응에 참여하지 않고 사라지지도 않는다 (Scheme



**Scheme 1.** Chemical structure of  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi

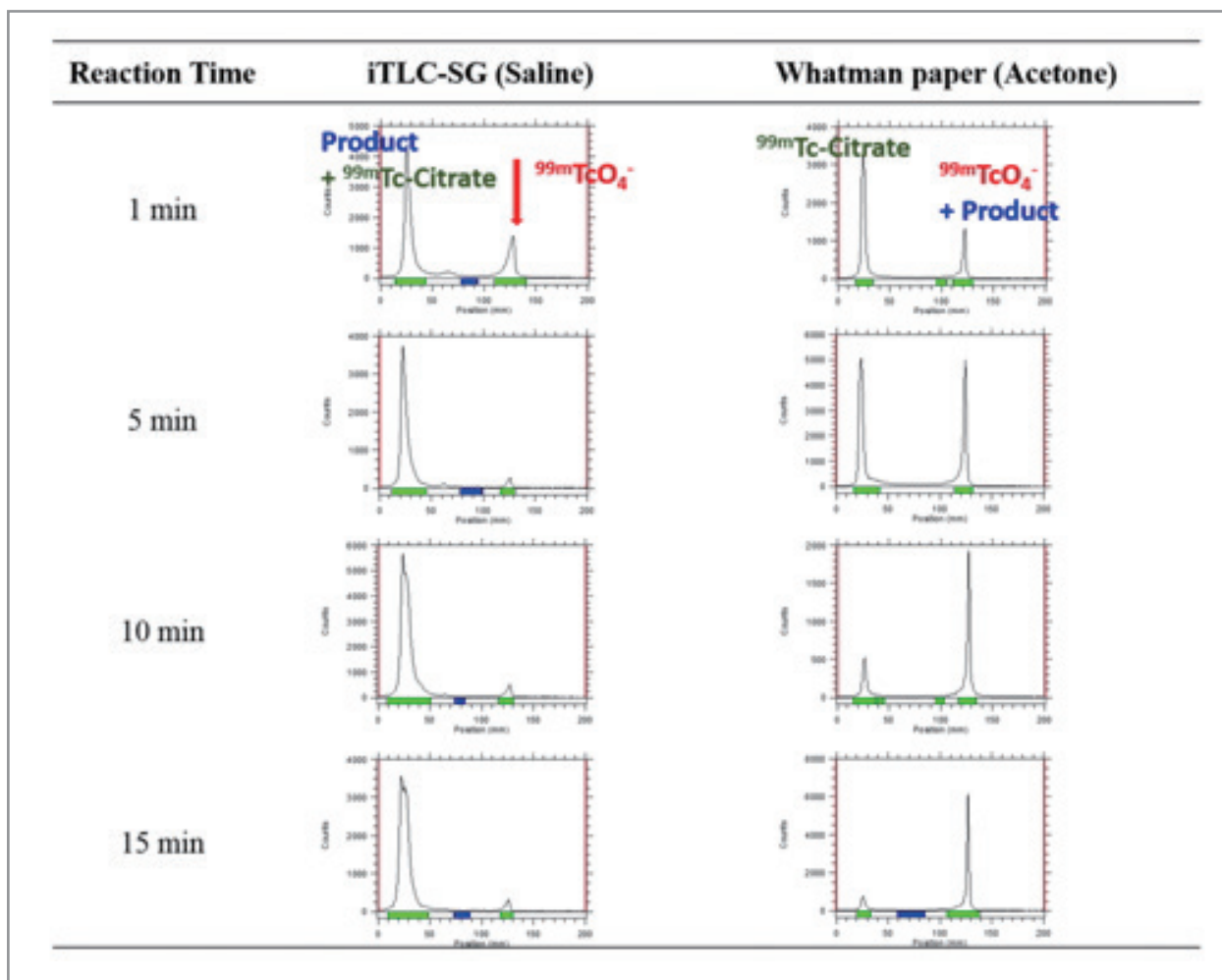
1). 하지만 2분 이후부터는 iTLC-SG 결과에서  $R_f = 0$  위치에 보이던 peak 이5% 미만으로 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2, 4A). 이에 본 연구진은  $R_f = 0$  위치에 보이던 peak 이  $^{99m}\text{Tc}$ -colloid 가 아닌 MIBI 표지 중간에 생성되는 중간체로 미루어 짐작할 수 있었다.

$^{99m}\text{Tc}$ -MIBI의 표지는 2 steps 에 걸쳐 반응이 진행되는 것으로 알려져 있다 (Scheme 1)(13).  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 가 키트 내 성분 중 하나인 citrate와 반응하여  $^{99m}\text{Tc}$ -citrate를 1차로 형성하고, 이 화합물이 구리와 착물 형태를 가지고 있는 MIBI와 다시

교차 결합하여 Tc- $^{99m}$  착물이 만들어 진다. 이와 같은 메커니즘을 기반으로 하여 우리는  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate가 두 가지 TLC 조건에서 모두  $R_f$  값 1을 가지고 있다고 판단하였다.

본 연구진은 중탕수조가 아닌 가열 블록으로도 기존의 표지 결과야 유사한 결과를 얻을 수 있으며, 반응이 단지 2분만에 95% 이상 진행되는 것으로 보아 상온에서도 좋은 표지효율을 얻을 수 있을 것으로 기대하였다. 이에 가열 조건에서 진행한 실험과 마찬가지로 상온에서 표지를 진행하며 매 1분마다 그 결과를 TLC로 확인하였다.

하지만 기대와는 다르게 상온에서는 그 반응이 더디게 진행되었다 (Figure 3, 4B). 가열하였을 경우에는 1분만에  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 가 모두 사라지고  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate로 반응하여 최종화합물은  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI가 형성되는 반면에, 상온에서는 1분에서  $^{99m}\text{Tc}$ -



**Figure 3.** Radio TLC scan of iTLC-SG and Whatman paper chromatography of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI labeling at 1, 5, 10, and 15 min labeled at room temperature. (iTLC-SG;  $R_f=0$  is product and  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate,  $R_f=1$  is  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  / Whatman paper;  $R_f=0$  is  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate,  $R_f=1$  is Product and  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ )

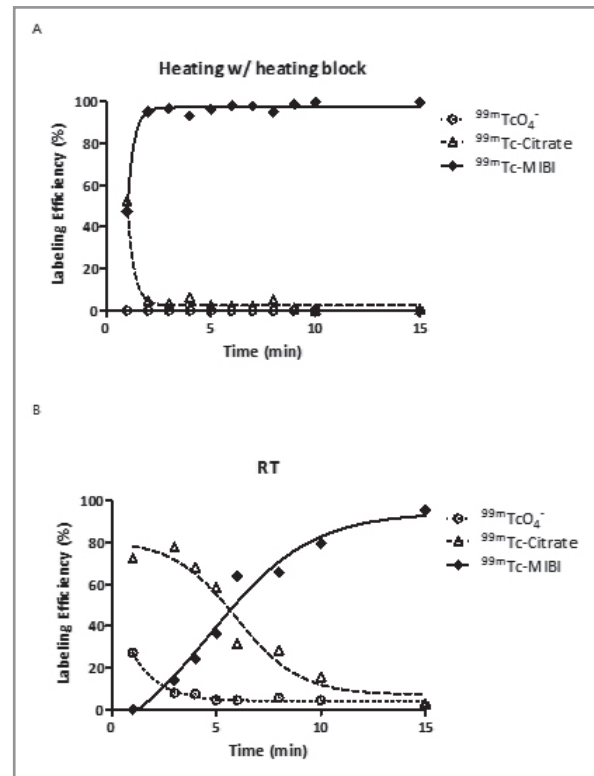
MIBI는 거의 생성되지 않고  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate가 주로 형성되었다.  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 는 5분 이내에 걸쳐 급격하게  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate가 되는데 반해  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI는 상대적으로 완만한 곡선을 그리며 표지가 진행되었다. 이후 5분에서 10분 사이에 약 80%의 표지 효율을 보이다가 이후 15분경에는 95% 이상의 표지 효율을 보인다. 상온에서도 표지가 진행은 되지만 가열했을 때에 비하여 확연히 더디게 반응이 진행되며, 또한 완전하게 반응이 모두 진행되지 않으므로 만약 실온반응 조건으로 임상에서 사용해야 할 경우에는 추가로 정제단계까지 필요로 하는 양상을 보였다.

이상의 결과들을 바탕으로  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI를 임상에서 사용하고자 할 경우 가열하여 고온에서 반응하는 것은 반드시 필요하며, 가열을 위하여 중탕수조를 반드시 사용할 필요 없이 간단한 가열 블록 등의 장치로도 사용이 가능함을 검증할 수 있었다.

## Conclusion

$^{99m}\text{Tc}$ -MIBI는 SPECT용 영상제제로서 심근 영상 등을 기본으로 하여 다양한 연구분야 및 임상분야에서 사용되고 있는 방사성의약품이다.  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI의 현재 시판되고 있는 약품은 환자를 대상으로 하는 약물의 경우 그 표지 방법을 95~99°C의 중탕수조를 이용한 표지를 안내하고 있다. 하지만 이러한 가열조건이 중탕수조를 이용한 경우 오염이나 안전사고 등의 위험을 동반할 수 있으므로 가열 블록과 같은 단순 가열 조건에서도 좋은 표지 효율을 보이는지에 대해 검증이 필요하였다. 이에 본 연구진은 가열 블록을 이용하여 간단하고도 상대적으로 안전한 표지 방법을 이용하여 그 표지 조건을 검토하였으며, 그 결과 가열 블록을 이용한 표지방법에서도 2분이라는 짧은 시간 만에 98% 이상의 높은 효율로 표지 되는 것을 확인할 수 있었다. 이와는 다르게 상온에서는 15분간의 반응시간에도 불구하고 95% 가량의 표지효율을 보임으로  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI의 표지에서 가열하는 것은 필요조건임을 확인할 수 있었다.

또한 ITLC-SG, 생리식염수 및 Whatman No.1, 아세톤의 두 가지 다른 조건을 이용한 TLC 분석을 통하여 반응 중간체인  $^{99m}\text{Tc}$ -Citrate를 확인할 수 있었고, 이를 통해 반응



**Figure 4.** Comparison of Tc-99m labeling efficiency by heating condition. (A) Tc-99m labeling efficiency curve in heating block at 95 ~ 99°C; (B) Tc-99m labeling efficiency curve at room temperature.

메커니즘에 대한 검증 역시 radio TLC를 통하여 할 수 있음을 확인하였다.

## Acknowledgements

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원 (과제고유번호: HI15C3093) 과, 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받은 국책연구사업을 통하여 수행된 연구 (No. 1711026888 and NRF-2016M2C2A1937981)이며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

## Reference

1. Son MW, Lim JI, Jung MY, Kim SH, Kim WB, Chang YS, et al. New synthesis of sestamibi and comparison of stability of its formulation. *Nucl Med Mol Imag.* 2001;35:334-341.



2. Taillefer R, Laflamme L, Dupras G, Picard M, Phaneuf D-C, Léveillé J. Myocardial perfusion imaging with  $^{99m}\text{Tc}$ -methoxy-isobutyl-isonitrile (MIBI): Comparison of short and long time intervals between rest and stress injections. *Eur Nucl Med.* 1988;13:515-522.
3. Abrams MJ, Davison A, Jones AG, Costello CE, Pang H. Synthesis and characterization of hexakis (alkyl isocyanide) and hexakis (aryl isocyanide) complexes of technetium (I). *Inorg Chem.* 1983;22:2798-2800.
4. Jeong HJ, Lee DS, Lee HY, Choi S, Han YH, Chung JK. Prognostic Value of Normal Perfusion but Impaired Left Ventricular Function in the Diabetic Heart on Quantitative Gated Myocardial Perfusion SPECT. *Nucl Med Mol Imaging.* 2013;47:151-157.
5. Chung BC, Ryu JK, Cho YK, Kwack DH, Bae HS, Bae YH, et al. Clinical Characterization of Reverse Redistribution Pattern in  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi Myocardial Perfusion Scan. *Korean Circulation J.* 1999;29:459-464.
6. Dilsizian V, Arrighi JA, Diodati JG, Quyyumi AA, Alavi K, Bacharach SL, et al. Myocardial viability in patients with chronic coronary artery disease. Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi with thallium reinjection and [ $^{18}\text{F}$ ] fluorodeoxyglucose. *Circulation.* 1994;89:578-587.
7. Im HJ, Lee IK, Paeng JC, Lee KE, Cheon GJ, Kang KW, et al. Functional evaluation of parathyroid adenoma using  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI parathyroid SPECT/CT: correlation with functional markers and disease severity. *Nucl Med Commun.* 2014;35:649-654.
8. Yoon HJ, Kim Y, Chang KT, Kim BS. Prognostic value of semi-quantitative tumor uptake on Tc-99m sestamibi breast-specific gamma imaging in invasive ductal breast cancer. *Ann Nucl Med.* 2015;29:553-560.
9. Suh YJ, Choi JY, Kim SJ, Chun IK, Yun TJ, Lee KE, et al. Comparison of 4D CT, ultrasonography, and  $^{99m}\text{Tc}$  sestamibi SPECT/CT in localizing single-gland primary hyperparathyroidism. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;152:438-443.
10. Koca G, Atilgan HI, Baskin A, Demirel K, Korkmaz M. Non-visualized Thyroid Gland by Tc-99m MIBI Scan with Normal Thyroid Scan. *Nucl Med Mol Imaging.* 2013;47:216-217.
11. Cheon M, Choi JY, Chung JH, Lee JY, Cho SK, Yoo J, et al. Differential findings of tc-99m sestamibi dual-phase parathyroid scintigraphy between benign and malignant parathyroid lesions in patients with primary hyperparathyroidism. *Nucl Med Mol Imaging.* 2011;45:276-284.
12. Khentigan A, Garrett M, Lum D, Winchell H, et al. Effect of proir administration of Sn(II) complexes used in nuclear medicine on in vivo distribution of subsequently administered Tc-99m pertechnetate and Tc-99m compounds. *J Nucl Med.* 1975; 16: 541
13. Kowalsky RJ, Pharm D. Technetium Radiopharmaceutical Chemistry. *New Mexico.* 2006:12:25.