

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2018.4.2.80>

Assessment of chemical purity of [^{13}N]ammonia injection: Identification of aluminium ion concentration

Ho Young Kim^{1,2}, Jongbum Park², Ji Youn Lee¹, Yun-Sang Lee^{1,2*}, Jae Min Jeong^{1,2}

¹ Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea;

² Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Republic of Korea;

ABSTRACT

[^{13}N]Ammonia or [^{13}N]NH₃ is one of the most widely used PET tracer for the measurement of MBF. To produce [^{13}N]NH₃, Devarda's alloy which contains aluminum, copper and zinc is used for the purpose of reduction from ^{13}N -nitrate/nitrite to [^{13}N]NH₃. Since aluminum has neurotoxicity and renal toxicity, the amount of it should be carefully limited for the administration to the human body. Although USP and EP provide a way to identify the aluminum ion concentration, there are some difficulties to perform. Therefore, we tried to develop the modified method for verifying aluminum concentration of test solution. We compared color between test and standard solutions using chrome azurol S in pH 4.6 acetate buffer. We also tested color change of test and standard solutions according to pH, amounts and the order of reagent and time difference. These results demonstrated that the color change of the solution can reflect quantitatively measure aluminum ion concentration. We hope the method is to be used effectively and practically in many sites where [^{13}N]NH₃ is produced.

Key Word: [^{13}N]NH₃, Quality control, Aluminum test, Devarda's alloy, chrome azurol S

Introduction

[^{13}N]암모니아 주사는 positron emission tomography (PET) tracer로 관상 동맥 질환이 의심되는 환자에게서 심근 관류 (myocardial blood flow, MBF)를 평가하기 위해 사용되는데, 평가는 휴식 상태 (rest)와 약물을 이용한 부하 상태 (stress)를 만들어 서로 다른 조건에서 관상 동맥 혈류를 비교한다 (1-3). 심근 관류를 측정할 수 있는 다른 agent로는 [^{15}O]water (4), ^{82}Rb (5), ^{201}Tl (6), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (7) 등이 있으나 ^{82}Rb , ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI 등은 혈류 속도에 따른 혈액으로부터의 tracer 추출이 [^{13}N]NH₃보다 떨어진다는 단점이 있다 (8). [^{15}O]water의 경우 혈류 속도와 관계 없이 거의 100% 추출된다는 장점이 있으나, 반감기가 2 분밖에 되지 않아 생산과 사용에 제약을 가진다. 반면에 [^{13}N]NH₃는 [^{15}O]water

보다 상대적으로 긴 반감기 (10 분)와 추출이 비교적 잘 된다는 장점을 가지고 있어 PET으로 심근 관류를 정량적으로 측정하는데 가장 널리 사용되고 있다.

[^{13}N]암모니아 주사의 생산은 비교적 간단하다. 싸이클로 트론에서 [^{16}O]water로 채워진 target에 양성자를 조사하면 $^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$ 반응을 통해 산화된 형태인 ^{13}N -nitrate/nitrite가 녹아 있는 water를 얻을 수 있다. 이를 데바르다 합금 (Devarda's alloy)와 수산화나트륨으로 채워진 반응 용기에 넣긴 후 $^{13}\text{NO}_x$ 가 환원하여 생성된 기체 형태의 [^{13}N]NH₃를 얻을 수 있고 이를 다른 쪽 반응 용기에 포집하여 주사제 제법에 따라 만들면 원하는 [^{13}N]NH₃ 주사제를 만들 수 있다 (9). 생산 후에는 다른 방사성의약품과 마찬가지로 품질 시험을 해야 하는데, 순도 시험의 경우 반응에서 데바르다 합금을 사용하였기 때문에 이를 확인하는 시험을 해야 한다. 데바

Received: December 14, 2018 / Revised: December 21, 2018 / Accepted: December 23, 2018

Corresponding Author : Yun-Sang Lee, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Republic of Korea, Tel: +82-2-3668-8906, Fax: +82-745-7690, E-mail: wonza43@snu.ac.kr

Copyright©2018 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

르다 합금은 알루미늄, 구리, 아연의 합금으로 환원제로 사용되며, 정량했을 때 알루미늄 44–46%, 구리 49–51%, 아연 4–6%를 함유하고 있다. 특히 알루미늄의 경우 신경독성 (10) 이나 신장 독성 (11), 혹은 뼈 질환 (12) 등을 일으키기 때문에 주사제에 함유된 농도를 확인한 후 환자에게 사용해야 한다.

[¹³N]암모니아 주사의 품질시험에 대한 기준 및 시험방법은 주로 미국약전 (The United States of Pharmacopeia, USP)을 따른다. USP에 따르면 [¹³N]NH₃ Injection의 알루미늄의 농도는 10 ppm을 넘지 않도록 하고 있다. 하지만 시험방법의 경우 절차가 복잡할 뿐 아니라 535 nm에서 흡광도를 측정해야 하므로 spectrophotometer 장비를 갖추고 있어야 한다. 방사성의약품의 GMP가 도입되면서 새로운 장비에 대한 적격성 평가 (IQ, OQ 및 PQ) 및 지속적인 관리를 해야 하므로 생산에 대한 비용과 인력이 많이 필요로 한다. 또한, [¹³N]NH₃의 짧은 반감기를 고려할 때 인체에 적용하기 전에 USP의 시험법으로 알루미늄 이온 농도를 측정하는 것은 쉽지 않다.

USP와 함께 방사성 의약품 관련 공정서로 많이 인용되는 것이 유럽약전 (European Pharmacopeia)이다. EP의 경우 [¹³N]암모니아 주사의 알루미늄 농도 시험 방법은 비교적 간단하다. pH 4.6의 acetate solution과 1/20로 희석된 검액 또는 알루미늄 표준액 (2 ppm)을 섞은 후 발색 시약인 10 g/L 농도의 chrome azurol S를 넣고 변화된 용액의 색을 육안으로 비교하는 것이다. 하지만 검액과 표준액의 색의 변화를 관찰했을 때 색의 변화 차이가 적어 육안으로 차이를 구분하기 힘들 수 있다 (Figure 1). 그러므로 우리는 [¹³N]암모니아 주사의 알루미늄 이온 농도를 확인할 수 있는 빠르고 편리한 방법을 개발하고자 하였으며, 이를 통해 적절한 알루미늄 이온의 농도 기준을 설정하고자 하였다.

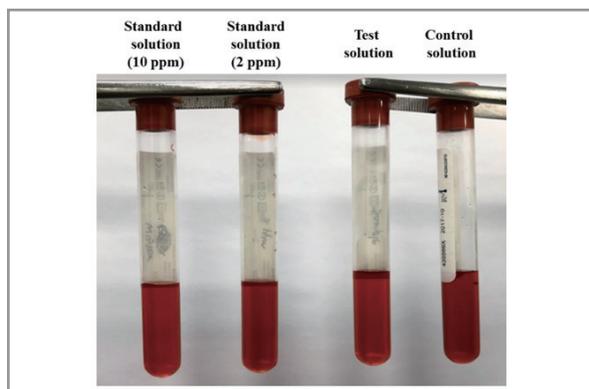


Figure 1. Results of aluminum ion concentration determination using EP method.

Materials and Methods

Materials

알루미늄 표준품 (1000 mg/L)은 Merck (미국)에서 구입하였으며 희석된 농도의 알루미늄 표준액은 1000 mg/L의 알루미늄 표준품을 KP 수준의 주사용수 (휴온스, 한국)로 희석하여 제조하였다. 검액은 서울대학교병원에서 생산되는 [¹³N]암모니아 주사액 방사능을 충분히 감쇠시킨 후 사용하였다. 발색 시약인 chrome azurol S (또는 Mordant Blue 29)는 TCI (일본)를 통해 구입하였다. pH 4.6의 acetate 완충용액은 Sigma-Aldrich (미국)에서 구입한 acetic acid와 sodium acetate를 이용하여 제조하였으며 다른 pH 완충용액 (pH 3 ~ 9)은 삼진 (한국)에서 구입하였다. 반응 용기는 지름 10 mm의 베큐테이너 튜브 (covidien, 아일랜드)를 사용하였으며 pH는 모두 pH 미터기 (Thermo Fisher Scientific, 미국)를 사용하여 측정하였다. 용액을 섞을 때에는 모두 vortex Genie-2 (Scientific Industries, 미국)를 이용하였다. Optical density (OD)는 spectrophotometer (BIO-TEK, 미국)를 이용해 측정하였다.

1. 표준액과의 색 비교를 통한 검액의 알루미늄 농도 확인 시험

1-1 검액 시험

0.9 mL의 pH 4.6 acetate 완충용액을 지름 10 mm인 tube에 넣은 후, 생산된 [¹³N]암모니아 주사액 0.1 mL을 넣고 섞어주었다. 10 g/L의 chrome azurol S 발색시약 10 µL를 넣은 후 잘 섞고 3 분 후에 색을 관찰하였다. 색을 확인한 후에는 pH 미터기를 이용하여 용액의 pH를 측정하였다.

1-2 표준액 시험

1000 mg/L의 알루미늄 표준품을 희석하여 각각 1, 2, 5, 10, 20, 50 ppm의 농도로 만든 후 이를 검액과 같은 방식으로 실험하였다.

1-3 대조액 시험

주사용수를 이용하여 검액과 같은 방식으로 실험하였다.

2. pH 변화에 따른 용액의 색 변화 시험

pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9의 완충용액 0.9 mL을 tube에 각각 넣은 후 ^{13}N 암모니아 주사액 0.1 mL을 넣고 잘 섞었다. 이후, 10 g/L의 chrome azurol S 발색시약 10 μL 를 넣은 후 잘 섞고 3 분 후에 색을 확인하였다. 색을 확인한 후에는 pH 미터기를 이용하여 용액의 최종 pH를 측정하였다.

3. 부피 변화에 따른 용액의 색 변화 시험

지름 10 mm인 tube에 0.9 mL의 pH 4.6 acetate 완충용액을 넣은 후 서로 다른 알루미늄 농도의 표준액 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mL을 각각 넣고 잘 섞었다. 10 g/L의 chrome azurol S 발색시약 10 μL 를 넣은 후 잘 섞고 3 분 후에 색을 확인하였다. 이후, 알루미늄의 농도를 정량적으로 확인하기 위해 각각의 용액을 0.2 mL씩 96 well plate에 넣고 570 nm에서 spectrophotometer를 이용해 OD 값을 측정하였다. OD 값을 측정한 후에는 pH 미터기를 이용하여 용액의 최종 pH를 측정하였다.

4. 시약을 넣는 순서와 시간의 차이에 따른 용액의 색 변화 시험

지름 10 mm인 tube에 0.9 mL의 pH 4.6 acetate 완충용액을 넣은 후, 10 g/L의 chrome azurol S 발색시약 10 μL 를 넣고 잘 섞어주었다. 4 시간 후 생산된 ^{13}N 암모니아 주사액 0.1 mL을 넣고 용액의 색 변화를 확인하였다. 색을 확인한 후에는 pH 미터기를 이용하여 용액의 pH를 측정하였다.

Results and Discussions

^{13}N 암모니아 주사의 함유되어 있는 알루미늄을 확인하기 위해 EP에 나와 있는 발색시약을 이용하여 시험해보았다. EP의 경우 검액 혹은 표준액으로 20 배 희석된 용액을 사용하는데, 작업자의 피폭을 감소시키는 것과 적은 양의 검체만을 사용할 수 있다는 장점이 있지만 직접 시험해 보았을 때 색 비교를 육안으로 확인하는 것이 힘들었다. 따라서 희석을 하지 않고 적당한 양의 검액을 바로 발색시약과 반응한 후 색 관찰을 확인하였으며 다양한 알루미늄 농도의 표준액을 만들어 비교하였다 (Figure 2). USP의 알루미늄 기준이 10 ppm

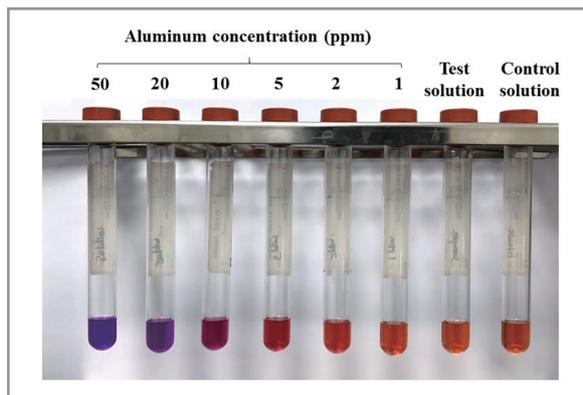


Figure 2. Aluminum test of test solution by color comparison with standard (1, 2, 5, 10, 20, 50 ppm) and control solutions.

미만이며 EP의 경우 2 ppm 미만이므로 2 가지 농도를 포함한 6 가지 농도의 표준액을 제조하여 색의 변화를 확인하였고, 알루미늄 이온 농도 의존적으로 색이 변함을 확인하였다. 육안으로 확인하였을 때 기존의 방법과는 달리 2 ppm까지 표준액과 검액의 색이 차이가 나는 것을 확인하였고 1 ppm에서는 구별하기가 힘들었다. 이 시험법의 알루미늄에 대한 특이성을 확인하기 위해 대조액으로 주사용수를 사용하였으며, 검액과 동일하게 대조액의 색 변화가 없음을 확인하였다.

또한 발색시약의 경우 pH에 따른 색 변화가 많이 나타나기 때문에 pH 변화에 따른 용액의 색이 어떻게 달라지는지를 확인하기 위해 검액을 이용하여 서로 다른 pH (3 ~ 8)에서 용액의 색 변화를 확인하였다. pH가 낮을수록 색이 진한 주황색에 가까웠으며 pH가 높을수록 점점 노란색으로 변하는 것을 확인하였다 (Figure 3). 특히, pH가 4~5 사이일 때 용액의 색이 밝은 주황색으로 다른 알루미늄 농도의 용액과 잘 구분되는 것을 확인하였다. 그러므로 ^{13}N 암모니아 주사의 알루미늄 시험법을 사용할 경우 pH 4.6의 buffer를 사용

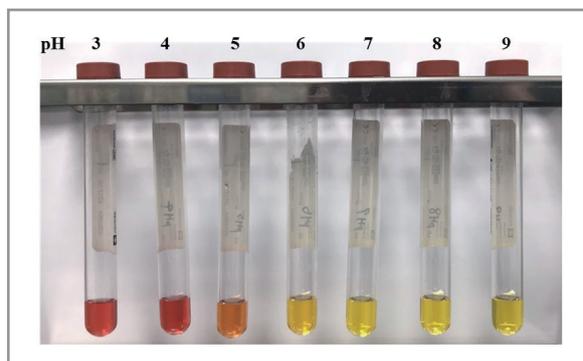


Figure 3. Results of color change of test solution according to pH (3 ~ 9).

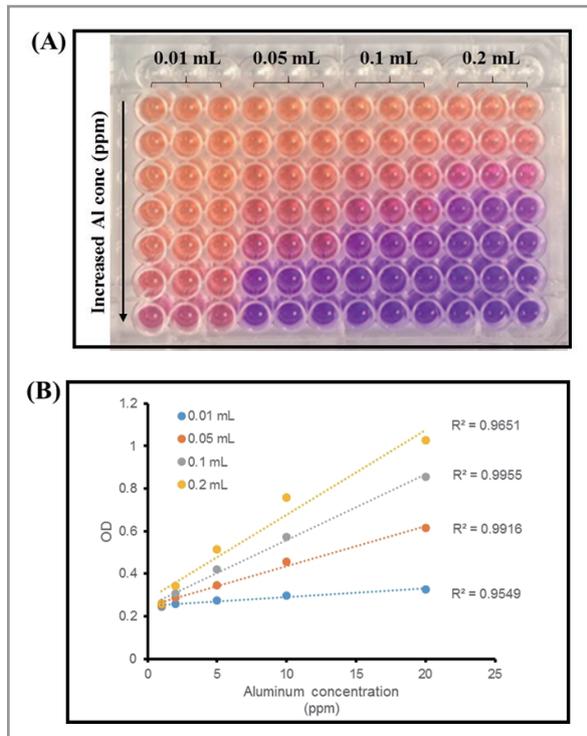


Figure 4. Change in solution color (A) and OD measurement (B) according to volume of test and standard solutions used in test

하여 pH 변화가 일어나지 않도록 하는 것이 중요하다는 것을 알 수 있었다.

이 후 작업자의 피폭을 막고 검액의 손실량을 줄이기 위해 시험하는 검액의 양을 줄일 수 있는지를 확인하였다. 적은 양의 용액으로도 알루미늄의 농도 차이가 색의 변화로 나타나는지를 확인하기 위해 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mL을 넣고 용액의 색을 비교하였다 (Figure 4A). 0.01 mL을 넣었을 경우, 전체적으로 주황색을 가지며 낮은 농도에서 색의 차이가 나지 않았고 0.2 mL을 넣었을 때에는 보라색을 띠며 낮은 농도에서도 색이 진하게 나타났다. 0.05와 0.1 mL

의 경우 색의 스펙트럼이 비교적 고르게 분포하였는데, 0.05 mL은 주로 높은 농도의 색 구분이 잘 되었고 0.1 mL을 넣었을 경우에는 낮은 농도에서 색의 구분이 잘 되었다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 각각의 용액의 OD 값을 측정하여 알루미늄의 농도를 정량적으로 확인할 수 있는지를 알아보았다 (Figure 4B). 낮은 농도 일수록 알루미늄의 농도에 대한 OD 값이 정량적으로 차이가 낮으며 추세선의 R2값도 1에 가까웠다. 하지만 OD 값의 차이가 적어 spectrophotometer를 사용하지 않고는 색의 구분이 잘 되지 않았다. 부피를 0.2 mL로 많이 사용할수록 오히려 알루미늄의 농도가 증가에 따른 OD 값의 증가가 비례하지는 않았다. 전체적으로 알루미늄의 농도가 20 ppm까지 알루미늄 농도 증가에 따른 OD 값이 정량적으로 증가하였으며, 알루미늄의 농도가 50 또는 100 ppm인 표준액을 사용하였을 때에는 OD 값이 saturation되어 정량성이 떨어지는 것을 확인하였다.

[¹³N]암모니아 주사의 경우 반감기가 10 분밖에 되지 않아 품질 시험을 확인하는 데 걸리는 시간을 줄이는 것이 중요하다. 우리는 실용적으로 [¹³N]암모니아 주사의 알루미늄 시험법이 사용되도록 하기 위해 pH 4.6 acetate 완충용액과 chrome azurol S 발색시약을 먼저 넣고 바로 검액 및 표준액을 넣은 것과 4 시간 후 검액과 표준액을 넣은 것에 대한 용액의 색을 비교해 보았다. 이는 생산 전 알루미늄 시험을 하기 위한 준비를 하고 생산 후 검액만 넣은 후 바로 용액의 색 변화를 비교한다면 훨씬 짧은 시간에 시험법을 마칠 수 있으므로 매우 실용적일 것이라 생각하였기 때문이다. 시험 결과 바로 넣은 것과 4 시간 후 검액 및 표준액을 넣은 용액들에서 색의 차이가 전혀 나지 않음을 확인하였다. 이러한 방법을 이용한다면 알루미늄 시험을 짧은 시간 이내에 끝마치면서 작업자의 피폭을 최소화할 수 있을 것이다.

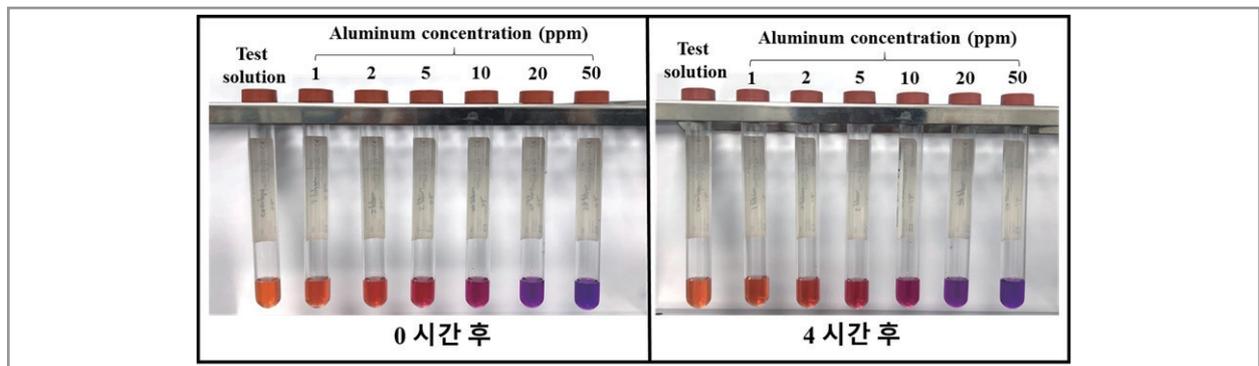


Figure 5. Comparison of color when test and standard solutions are added after 0 h or 4 h after mixing of the buffer solution and chrome azurol S.

Conclusion

우리는 EP의 방법을 변형하여 쉬우면서도 실용적으로 [¹³N]암모니아 주사액에 함유된 알루미늄의 양이 기준치 이하인 것을 확인하였다. 다만, EP의 기준인 2 ppm의 경우 색의 변화를 육안으로 분명히 확인할 수는 있었으나 사진이나 출력물을 통해 결과로 남길 경우 색 차이가 잘 나지 않을 수 있었다. USP의 기준인 10 ppm에서는 육안이나 사진에서 모두 용액의 색이 분명하게 구분되는 것을 확인하였다. 지금까지 많은 사람들이 주로 새로운 방사성의약품의 개발 및 평가를 다루었다. 그러나 최근에는 방사성의약품에도 GMP가 도입되면서 생산된 방사성의약품의 품질을 확인하고 관리하는 것에 대한 관심이 늘어나고 있다. 그러므로 이 논문이 [¹³N]암모니아 주사뿐만 아니라 다른 방사성 의약품들의 제조 및 품질 시험 등에 대한 내용을 활발히 교류할 수 있는 계기가 되기를 바란다.

Acknowledgements

이 연구는 2018년도 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 지원을 받은 국책연구사업(HI15C3093)을 통하여 수행된 연구이며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

References

1. Al-Mallah MH, Sitek A, Moore SC, Di Carli M, Dorbala S. Assessment of myocardial perfusion and function with PET and PET/CT. *J Nucl Cardiol*. 2010;17:498-513.
2. Hutchins GD, Schwaiger M, Rosenspire KC, Krivokapich J, Schelbert H, Kuhl DE. Noninvasive Quantification of regional blood flow in the human heart using N-13 ammonia and dynamic positron emission tomographic imaging. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1032-1042.
3. Rust TC, DiBella EV, McGann CJ, Christian PE, Hoffman JM, Kadmas DJ. Rapid dual-injection single-scan ¹³N-ammonia PET for quantification of rest and stress myocardial blood flows. *Phys Med Biol*. 2006;51:5347-5362.
4. Parker JA, Beller GA, Hoop B, Holman BL, Smith TW. Assessment of regional myocardial blood flow and regional fractional oxygen extraction in dogs, using ¹⁵O-water and ¹⁵O-hemoglobin. *Circ Res*. 1978;42:511-518.
5. Selwyn AP, Allan RM, L'Abbate A, Horlock P, Camici P, Clark J, O'Brien HA, Grant PM. Relation between regional myocardial uptake of rubidium-82 and perfusion Absolute reduction of cation uptake in ischemia. *Am J Cardiol*. 1982;50:112-121.
6. Bailey IK, Griffith LS, Rouleau J, Strauss W, Pitt B. Thallium-201 myocardial perfusion imaging at rest and during exercise. Comparative sensitivity to electrocardiography in coronary artery disease. *Circulation*. 1977;55:79-87.
7. Wackers FJ, Berman DS, Maddahi J, Watson DD, Beller GA, Strauss HW, Boucher CA, Picard M, Holman BL, Fridrich R, Inglese E, Delaloye B, Bischof-Delaloye A, Camin L, Mckusick K. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med*. 1989;30:301-311.
8. Knuuti J, Kajander S, Maki M, Ukkonen H. Quantification of myocardial blood flow will reform the detection of CAD. *J Nucl Cardiol*. 2009;16:497-506.
9. Vaalburg W, Kamphuis JAA, Beerling-van der molen HD, Reiffers S, Rijskamp A, Woldring MG. An improved method for the cyclotron production of ¹³N-labelled ammonia. *Int J Appl Radiat Isot*. 1975;26:316-318.
10. McLachlan DRC. Aluminium and the risk for alzheimer's disease. *Environmetrics*. 1995;6:233-275.
11. Monteagudo FS, Cassidy MJ, Folb PI. Recent developments in aluminum toxicology. *Med Toxicol Adverse Drug Exp*. 1989;4:1-16.
12. Jeffery EH, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger JL. Systemic aluminum toxicity: Effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. *J Toxicol Environ Health*. 1996;48:649-665.