บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมลิแกนด์เฮกซะเมทิลโพรไพลีนเอมีนออกซีม (HMPAO)

สารเคมีที่ใช้

- 2,3-บิวเทนไดโอนโมนอกซีม (2,3-butanedione monoxime), Sigma
- 2,2-ไดเมทิล-1,3-โพรเพนไดเอมีน (2,2-dimethyl-1,3-propane diamine), Aldrich
- โซเดียมโบโรไฮไดร์ด (Sodium Borohydride), Fluka
- แอนไฮดรัสเอธานอล (anhydrous Ethanol), Carlo erba
- อะซิโตไนไตร์ล (Acetonitrile), J.T.Baker Inc.
- เอธิลอะซิเตท (Ethylacetate), Carlo erba
- น้ำกลั่น (Distrilled water)
- ไนโตรเจนที่ปราศจากออกซิเจน (99.98 % Oxygen free nitrogen)
- 6 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริก (6 N. HCl)
- เบนซีน (Benzene), Carlo erba

เครื่องมือที่ใช้

- ขวดก้นกลม 3 ตอขนาด 500 มิลลิลิตรและ 2 ลิตร
- เตาร้อนพร้อมเครื่องกวนด้วยแม่เหล็กและแท่งกวนแม่เหล็กขนาด 1 1/2 นิ้ว IKAMAG PCT,Ika-laboratory
- กรวยหยด(Dropping funnel)ขนาด 250 มล.พร้อมจุกแก้ว
- ชุดรีฟลักซ์
- ชุดกลั่นความดันต่ำ
- เครื่องชั่ง
- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ

- ชุดกรองสาร ประกอบด้วย Buchner funnel,suction flask ปั๊มสุญญากาศและกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 4 ขนาดต่าง ๆ

เครื่องมือวิเคราะห์

- NMR สเปคโตรโฟโตมิเตอร์, Varian 360 L,Bruker AC 200 F
- เครื่องวิเคราะห์ธาตุ C,H,N
- IR สเปคโตรโฟโตมิเตอร์, Jusco A 100
- เครื่องหาจุดหลอมเหลว ของบริษัท Thomas scientific, USA

วิธีทดลอง

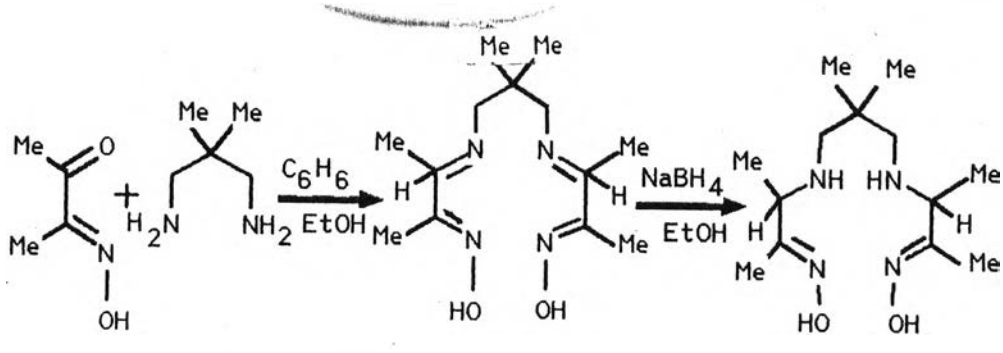
โดยทั่วไป การสังเคราะห์ลิแกนด์ HMPAO มี 2 ขั้นตอนดังนี้

1. Condensation เป็นปฏิกิริยาการรวมโมเลกุลของ 2,3-butanedione monoxime กับ 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine ในอัตราส่วนจำนวนโมลาร์เท่ากับ 2:1 ในตัวทำละลายเบนซีนหรือเอธานอล

2. Reduction เป็นปฏิกิริยาการรีดิวซ์ Bisimine ที่ได้ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดร์ด($NaBH_4$) ในสารละลายเอธานอลที่ปราศจากน้ำที่อุณหภูมิต่ำ

จะได้สารผสมของ d,l และ meso HMPAO ทำการแยกสารทั้งสองออกจากกันโดยการตกผลึกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายต่างกัน หรือใช้ HPLC หรือใช้เทคนิคการแยกสารไอโซเมอร์ที่มีลักษณะของผลึกต่างกันโดยคัดเลือกด้วยมือ

ปฏิกิริยาการเตรียม HMPAO โดยทั่วไป



3.1.1 การสังเคราะห์ 4,8-ไดเอซา-3,6,6,9-เตททราเมทิลอันเดคเคน-3,8-ไดอีน-2,10-ไดโอนไดออกซีม(4,8,-diaza-3,6,6,9-tetra-methylundecane-3,8-diene-2,10-dione bisoxime,Bisimine)

การสังเคราะห์ Bisimine มี 3 วิธีดังนี้

1. วิธีของ Neirinckx และคณะ

ละลาย 2,3-บิวเทนไดโอนโมนอกซีม (11.66 กรัม 115.4 มิลลิโมลในเบนซีน (50 มิลลิลิตร) กรดอะซีติก (75 ไมโครลิตร) รีฟลักซ์สารละลายภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ค่อย ๆเติมสารละลายของ 2,2-ไดเมทิล-1,3-โพรเพนไดเอมีน (5.0 กรัม 5.88 มิลลิลิตร 49 มิลลิโมล) ในเบนซีน (100 มิลลิลิตร) โดยใช้เวลามากกว่า 5 ชม. จะได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง รีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนต่ออีก 16 ชม.ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองแยกของแข็งที่ตกตะกอนออกมาด้วยวิธี Suction filtration ล้างตะกอนด้วยอะซิโตไนไตร์ลที่เย็น (- 40 °C) จำนวนน้อย ๆ จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นผงสีขาว ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 2 ชม.แล้วตกผลึกใหม่ในเบนซีนจะได้ผลึกที่ต้องการ(24)

2. วิธีของ Subramanian และคณะ

ละลาย 2,3-บิวเทนไดโอนโมนอกซีม (72.0 กรัม 0.71 โมล) พาราโทลูอีนซัลโฟนิคแอซิคโมโนไฮเดรท(p-toluene sulfonic acid monohydrate 0.15 กรัม) ในเบนซีน 725 มิลลิลิตร รีฟลักซ์สารละลายนี้ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนประมาณ 1 ชม.ค่อย ๆเติมสารละลายของ 2,2-ไดเมทิล-1,3-โพรเพนไดเอมีน (31.7 กรัม 0.31 โมล) ในเบนซีน (75 มิลลิลิตร) รีฟลักซ์สารละลายภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนทั้งหมด 21 ชม.แล้วนำมาคนต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 12 ชม.หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นที่ 4 °C 16 ชม.รวมผลึกที่ได้ ล้างด้วยเบนซีนเย็นแล้วตกผลึกใหม่ในอะซิโตไนไตร์ล ดูดสีสารละลายให้ใสด้วยผงถ่าน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกจะได้สารที่ต้องการ (37)

3. วิธีของ Huang Jin-Jie

ละลาย 2,3-บิวเทนไดโอนโมนอกซีม (9.1 กรัม 90.1 มิลลิโมล)ในแอบโซลูทเอธานอล (absolute Ethanol 10 มิลลิลิตร) คนและให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึงประมาณ 40 °C ค่อย ๆเติม 2,2-ไดเมทิล-1,3-โพรเพนไดเอมีน (5.88 มิลลิลิตร 49 มิลลิโมล) ในแอบโซลูทเอธานอล (5 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นคนที่อุณหภูมิ 52-55 °C ต่ออีก 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน กรองแยกตะกอนที่ได้ ล้างด้วยอีเทอร์ (diethyl ether) ทำให้แห้งที่สุญญากาศ 2 ชม.นำไปตกผลึกใหม่ในเบนซีน

นำ bisimine ที่ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีและพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการหาจุดหลอมเหลว(m.p.) วัดค่าการดูดกลืนในช่วงIR และหาปริมาณ C , H, N โดยวิธี Elementary analysis(38)

3.1.2 <u>การสังเคราะห์ ดี,แอล - 4,8-ไดเอซา -3,6,6,9 -เตททราเมทิล อันเดคเคน-2,10- ไดโอนไดออกซีม (d,l -4,8 -diaza-3,6,6,9-tetra-methyl undecane-2,10-dione dioxime,d,l-HMPAO)</u>

เมื่อได้ Bisimine ที่บริสุทธิ์แล้ว นำมารีดิวซ์ด้วย $NaBH_4$ ดังนี้

นำ bisimine (75 กรัม 287 มิลลิโมล) มา slurried ในเอธานอลที่ปราศจากน้ำ (anhydrous ethanol 690 มิลลิลิตร) ที่ 0 °C ค่อย ๆเติม $NaBH_4$ (10.9 กรัม 287 มิลลิโมล) โดยใช้เวลามากกว่า 1 ชั่วโมง คนสารละลายผสมที่ 0 °C นาน 2 ชม. เติมน้ำ (230 มิลลิลิตร) คนต่อที่อุณหภูมินี้อีก 2 ชม. แยกเอาเอธานอลออก แล้วเติมน้ำอีก (140 มิลลิลิตร) ปรับ pH เป็น 11 กรองตะกอนที่ได้ ล้างด้วยน้ำเล็กน้อย ทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศนำไปตกผลึกใหม่ในอะซิโตไนไตร์ล โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัม/ 50 มิลลิลิตรของอะซิโตไนไตร์ลกรองส่วนที่ไม่ละลายทิ้งไป ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรอง ทำให้แห้ง หาจุดหลอมเหลว (m.p.)

ชั้นของน้ำนำมาลดปริมาตรเพื่อให้เข้มข้น กรองตะกอนที่ได้ ทำให้แห้งและหาจุดหลอมเหลวซึ่งควรจะอยู่ในช่วง 120-140 °C ถ้าตะกอนที่ได้ยังคงมีจุดหลอมเหลวสูงกว่านี้ให้ระเหยชั้นของน้ำต่อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนใหม่ ส่วนของตะกอนที่มีจุดหลอมเหลวในช่วง 105-125 °C ให้นำไปรวมกับส่วนที่มีจุดหลอมเหลว 120 -140 °C เพื่อนำไปตกผลึกใหม่ในอะซิโตไนไตร์ลหรือเอธิลอะซิเตท โดยใช้อัตราส่วนดังกล่าว กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาหาจุดหลอมเหลว(m.p.) วัดค่าการดูดกลืนในช่วง IR และหาปริมาณ C,H,N โดยวิธี Elementary analysis(24,39)

3.2 <u>การเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปเฮกซะเมทิลโพรไพลีนเอมีนออกซีมเพื่อนำมาติดฉลากกับ Tc-99m</u>

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

- d,l HMPAO
- น้ำกลั่นยาฉีดที่ปราศจากเชื้อโรค

- โซเดียมคลอไรด์ , A.R. grade, Merck
- สแตนนัสคลอไรด์ไดไฮเดรตและดีบุกผง(metallic Sn), A.R. grade 98.9 %, Merck
- สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนีเตท
- 2 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอริก และ 2 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์
- ไนโตรเจนที่ปราศจากออกซิเจน

<u>เครื่องมือที่ใช้</u>

- เตาร้อนพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็กและแท่งกวนแม่เหล็กขนาด 1 นิ้ว
- ขวดก้นกลมขนาด 125 มล.
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, Suntex SX 600
- ขวดฉีดยาขนาด 10 มล.พร้อมจุกยางและฝาปิดอะลูมิเนียม
- กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดต่าง ๆ
- ตัวกรองเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมครอน ของ Millex หรือ Acrodisc
- ชุดให้ไนโตรเจน(ประกอบด้วยถังก๊าซไนโตรเจน ชุดควบคุมการไหลของก๊าซไนโตรเจน)

การติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูปของลิแกนด์ HMPAO ด้วย Tc-99m จะมีสารมลทินที่สำคัญ 3 ชนิดคือ

1. $^{99m}TcO_4^-$ อิสระ

สารมลทินตัวนี้จะพบเสมอ ในสารเภสัชรังสีของรีดิวซ์เทคนีเชียม เกิดจากปริมาณตัวรีดิวซ์ที่มีอยู่ในระบบไม่สามารถรีดิวซ์ Tc(VII)ที่อยู่ในรูปของ $^{99m}TcO_4^-$ ให้มีออกซิเดชันตามที่ต้องการได้ทั้งหมด

2. HR-^{99m}Tc

เป็นสารมลทินที่เป็นคอลลอยด์ของ Sn กับ OH^- ที่แข่งกับลิแกนด์แย่งจับกับรีดิวซ์เทคนีเชียม รวมทั้ง Tc รีดิวซ์สเตทอื่น ๆ ที่เกิดไฮโดรไลซิสต่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ต้องการ

3. 2^{nd} complex

เป็นสารมลทินที่เกิดจากความไม่เสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนไลโพฟิลิคในสารละลายน้ำ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนชนิดใหม่ที่ไม่ต้องการ

ในการติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO กับ Tc-99m จำเป็นต้องจำกัดปริมาณสารมลทินต่าง ๆเหล่านี้ให้มีน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารมลทินเหล่านี้คือ ปริมาณตัวรีดิวซ์ที่ใช้และ pH ของสารประกอบสำเร็จรูป

ดังนั้นในขั้นแรกจึงทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณตัวรีดิวซ์และ pH ที่เหมาะสมที่จะนำมาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO ที่มีคุณภาพดี มีความบริสุทธิ์ทางเคมีมากกว่า 85 %

การเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO

วิธีเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO ที่นำมาใช้ในการศึกษามีดังนี้

1. นำ d,l HMPAO (0.5 mg./kit) มาละลายในน้ำกลั่นยาฉีดปราศจากเชื้อ (ต้มเดือด 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น)ปรับ pH เป็น 1.0-1.5 ด้วย 2 N.HCl คนจนละลายหมด(เป่าก๊าซไนโตรเจนตลอดขณะเตรียม)

2. เติม NaCl ที่ชั่งไว้(4.5 mg./kit)คนจนละลายหมด ปรับ pH เป็น 5.0-5.5 ด้วย 2 N. NaOH

3.เติมสารละลาย $SnCl_2$ ที่เตรียมไว้ลงไปตามปริมาตรที่ต้องการ($SnCl_2.2H_2O$ 50 mg.ใน 1.0 ml.1 N. HCl หรือ metallic Sn 100 mg./ 1 ml.37 %HCl เติมน้ำกลั่นยาฉีดที่เป่าไนโตรเจนนาน 30 นาทีจนปริมาตรเป็น 20 ml.ผสมให้เข้ากันดี กรองด้วย millipore filter 0.22μ)

4. ปรับ pH สุดท้ายเป็น pH ที่ต้องการด้วย 2 N.NaOH แล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตรที่ต้องการ

5. แบ่งใส่ขวดไนโตรเจนที่ปราศจากเชื้อขนาด 10 ml. ขวดละ 1 ml.

6. นำไปแช่แข็งที่ -4 ถึง 0 °C

3.3 การติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ด้วยเทคนีเชียม-99 เอ็มและการหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc-d,l-HMPAO

3.3.1 การติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ด้วยเทคนีเชียม-99 เอ็ม

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนีเตท ($Na^{99m}TcO_4$)
- 0.9 % โซเดียมคลอไรด์, General Hospital

อุปกรณ์ที่ใช้

- กระบอกฉีดยาขนาด 20 มล.,5 มล.,1 มล.และเข็มขนาด 22G x 1 1/2 นิ้ว และ 26G x 1 1/2 นิ้ว
- กระปุกตะกั่วหนา 1 ซม.พร้อมฝาปิดเจาะรูตรงกลาง
- เครื่องปรับเทียบปริมาณรังสี (Dose calibrator), Deluxe Isotope Calibrator (II) model 34-056, Victoreen, USA

วิธีติดฉลาก

นำสารที่เตรียมไว้มาอย่างละ 3 ขวด ใส่ลงในกระปุกตะกั่วที่มีฝาปิด(มีรูตรงกลาง) เสียบกระบอกฉีดยาขนาด 20 มล.พร้อมเข็มขนาดเล็กไว้ ฉีดสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็ม เปอร์เทคนีเตทที่ได้จากgenerator หรือสกัดได้ใหม่ ๆไม่เกิน 2 ซม.ประมาณ 20-25 มิลลิคูรี/ 5 มิลลิลิตรเข่าและผสมให้เข้ากันดี หลังการติดฉลาก 5 นาที นำมาหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยวิธี paper chromatography

3.3.2 การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc-d,l-HMPAO (Radiochemical purity,RCP)

สารเคมีที่ใช้

- เมทิลเอธิลคีโตนที่กลั่นใหม่ ๆ, A.R. grade,Merck
- 0.9 % โซเดียมคลอไรด์, General Hospital
- สารละลายอะซิโตไนไตร์ลในน้ำ 50 % โดยปริมาตร
- 0.02 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
- เตตราไฮโดรฟิวแรน (THF), Fluka 98 %

อุปกรณ์ที่ใช้

- กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล.พร้อมเข็มขนาด 26G x 1/2 นิ้ว
- โครมาโตกราฟฟีแทงค์
- แผ่นโครมาโตกราฟฟีวอทแมน เบอร์ 1 และ ITLC-SG ขนาด 1.5 x 18 ซม.
- เครื่องปรับเทียบปริมาณรังสี (Dose Calibrator), Deluxe Isotope Calibrator (II) model 34-056, Victoreen, USA
- เครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้หัววัด NaI(Tl)(Multichannel Analyser), Ortec
- เครื่องวัดรังสีแบบสแกนที่ใช้หัววัด NaI(Tl) (Scanner)
- HPLC, Water

การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-d,l-HMPAO

การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-d,l-HMPAO ทำได้หลายวิธีดังนี้

1. Thin layer Chromatography (TLC)

1.1 Three systems method

เป็นการรวมระบบโครมาโตรกราฟี 3 ระบบเข้าด้วยกันคือ

ระบบที่ 1 ITLC-SG ใน MEK

ระบบที่ 2 ITLC-SG ใน 0.9% NaCl

ระบบที่ 3 Whatman no.1 ใน 50 % โดยปริมาตรของอะซิโตไนไตร์ลกับน้ำ

ระบบทั้งสามให้ผลการแยกองค์ประกอบต่างกันดังนี้

ระบบที่ 1 จะแยก HR-^{99m}Tcและ 2nd complex ออกจาก $^{99m}TcO_4^-$ และ 1st complex โดย HR-^{99m}Tcและ 2nd complex จะอยู่ที่ origin (Rf = 0) ส่วน $^{99m}TcO_4^-$ และ 1st complex จะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับตัวทำละลายด้วย capillary force ไปยัง solvent front (Rf = 0.9-1.0)

ระบบที่ 2 จะแยก $^{99m}TcO_4^-$ ออกจาก HR-^{99m}Tc, 2nd complex และ 1st complex โดย HR-^{99m}Tc, 2nd complex และ 1st complex จะอยู่ที่ origin (Rf = 0) ส่วน $^{99m}TcO_4^-$ จะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับตัวทำละลายไปยัง solvent front (Rf = 0.9-1.0)

ระบบที่ 3 จะแยก HR-^{99m}Tc ออกจาก 2nd complex, $^{99m}TcO_4^-$ และ 1st complex โดย HR-^{99m}Tc จะอยู่ที่ origin (Rf = 0) องค์ประกอบอื่น ๆจะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับตัวทำละลายไปยัง solvent front (Rf = 0.9-1.0)

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Rf การแยกขององค์ประกอบต่าง ๆของผลผลิตโดยวิธี TLC

องค์ประกอบ	ระบบ		
	1	2	3
[^{99m}Tc]d,l-HM-PAO primary(L)	0.9-1.0	0	0.9-1.0
[^{99m}Tc]d,l-HM-PAOsecondary(A)	0*	0	0.9-1.0
^{99m}Tc hydrolyzed,reduced(B)	0*	0	0*
[^{99m}Tc]pertechnetate(C)	0.9-1.0	0.9-1.0*	0.9-1.0

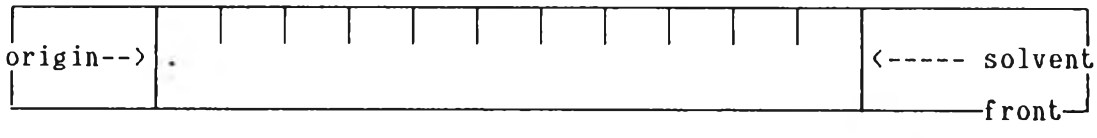
* Rfขององค์ประกอบนั้น ๆในระบบที่ใช้ตรวจสอบ

คำนวณหาร้อยละของสารประกอบเชิงซ้อนไลโพฟิลิค ^{99m}Tc-d,l-HMPAO ดังนี้

% ของไลโพฟิลิค (L) = 100-A%-B%-C%

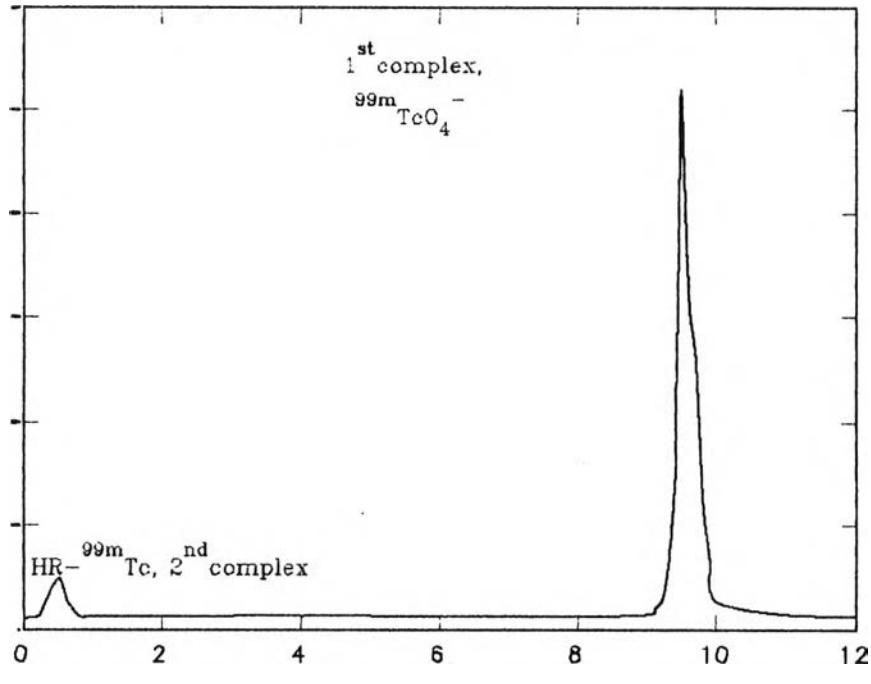
วิธีนี้เป็นวิธีที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี ทำได้โดยหยดตัวอย่างที่ต้องการหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีลงบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีชนิด ITLC-SG และวอทแมนเบอร์ 1 ที่จุดเริ่มต้น (ห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 2 ซม.)ให้มีขนาดเล็กที่สุด

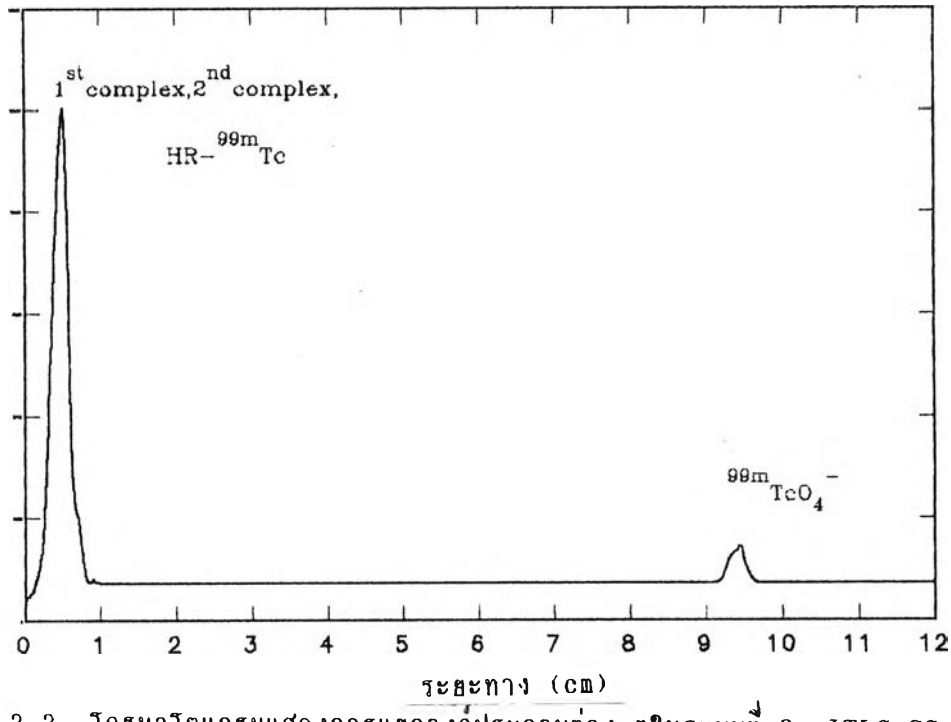


รูปที่ 3.1 ลักษณะของแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่ใช้แยกหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี

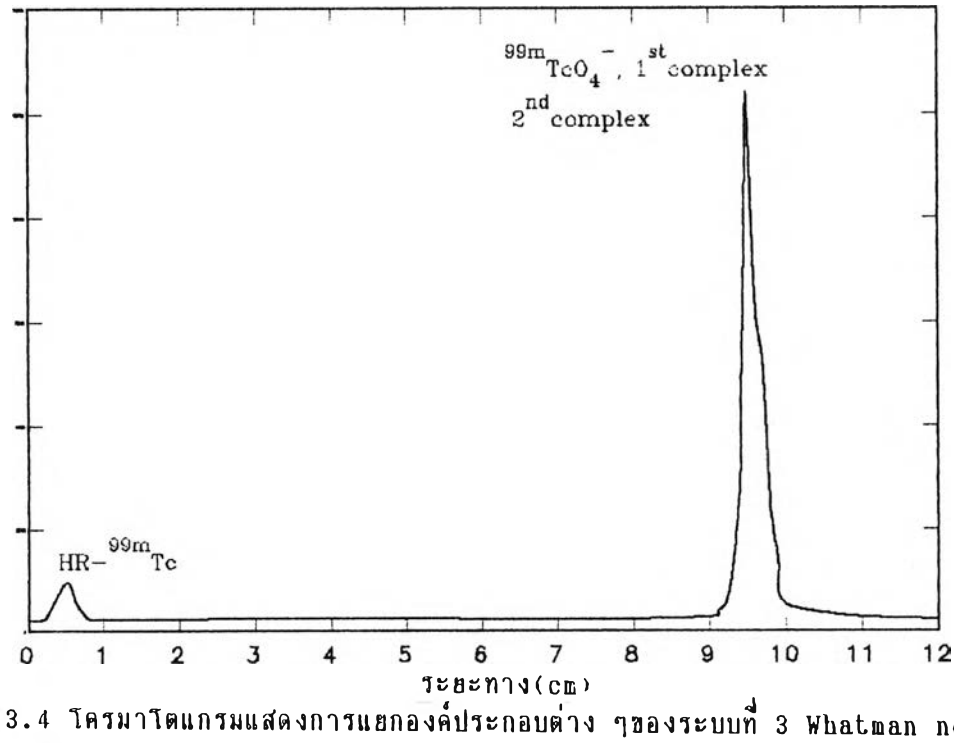
แล้วนำไปจุ่มในตัวทำละลายดังข้างต้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงsolvent front ที่กำหนดไว้(ห่างจากปลายอีกด้านหนึ่งประมาณ 4 ซม.)ยกแผ่นโครมาโตกราฟขึ้น นำไปตากให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปสแกนหาการกระจายของรังสีบนแผ่นโครมาโตกราฟระบบต่าง ๆด้วย Scanner หรือตัดแผ่นโครมาโตกราฟที่ได้เป็นแผ่นสั้น ๆขนาด 1 ซม.แล้ววัดการกระจายของรังสีบนแผ่นด้วย GM counter หรือเครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้หัววัด NaI(Tl)(MCA) คำนวณหาร้อยละของสารประกอบเชิงซ้อนไลโพฟิลิค ^{99m}Tc-d,l-HMPAO ที่เกิดขึ้นในระบบ



รูปที่ 3.2 โครมาโตแกรมแสดงการแยกองค์ประกอบต่าง ๆในระบบที่ 1 ITLC-SG ใน MEK



รูปที่ 3.3 โครมาโตแกรมแสดงการแยกองค์ประกอบต่าง ๆในระบบที่ 2 ITLC-SG ใน 0.9 % NaCl



รูปที่ 3.4 โครมาโตแกรมแสดงการแยกองค์ประกอบต่าง ๆของระบบที่ 3 Whatman no.1 ใน 50 % aq.acetonitrile

ตัวอย่างการกระจายรังสีของผลผลิตติดฉลากบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีทั้งสาม

ระยะทาง(ซม.)	อัตราการนับ/30 วินาที		
	ระบบที่ 1	ระบบที่ 2	ระบบที่ 3
origin	341 (A+B)	3628	97 (B)
1	80	43	33
2	107	30	38
3	154	35	28
4	150	35	28
5	230	29	19
6	268	21	14
7	471	28	18
8	711	25	142
9	3765	56	418
10	11984	89 (C)	5546
BACKGROUND	24	22	13

ตัวอย่างการคำนวณหา % ของสารไลโพฟิลิค(1^{st} complex)

$$\% (A+B) = \frac{\text{Counts at origin - background}}{\text{Total counts of system - Total background}} \times 100$$

$$= \frac{(341-24)}{(18261-264)} \times 100$$

$$= 1.76$$

$$\% C = \frac{\text{Counts at solvent front - background}}{\text{Total counts of system - Total background}} \times 100$$

$$= \frac{(56+89)-(22X2)}{(4014-242)} \times 100$$

$$= 2.68$$

$$\% B = \frac{\text{Counts at origin - background}}{\text{Total counts of system - Total background}} \times 100$$

$$= \frac{97-13}{6381-143} \times 100$$

$$= 1.35$$

$$\% A = \% (A+B) - \% B$$

$$= 1.76-1.35$$

$$= 0.41$$

$$\% \text{ Lipophilic} = 100-0.41-1.35-2.68$$

$$= 95.56$$

1.2 Ether paper chromatography

โดยหยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นโครมาโตรกราฟฟีชนิดวอทแมนเบอร์ 1 แล้วนำไปจุ่มใน diethyl ether ระบบนี้ Lipophilic [^{99m}Tc] d,l-HMPAO จะเคลื่อนไปยัง solvent front (Rf = 1) ในขณะที่ องค์ประกอบอื่น ๆ จะยังคงอยู่ที่ origin (Rf = 0)

การคำนวณความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (% Lipophilic)

$$\% \text{ Lipophilic} = 100 - \frac{\text{ความแรงรังสีที่จุดเริ่มต้น}}{\text{ความแรงรังสีรวม}} \times 100$$

2. Electrophoresis

หยดตัวอย่างบนแผ่นโครมาโตรกราฟฟีชนิด Whatman 541 ขนาด 20 cm. ที่ชุบด้วย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 นำไปจุ่มลงใน electrophoresis bath ที่มีความต่างศักย์ 300 V. นาน 1 ชม. ยกขึ้น ตากให้แห้ง นำไปวัดการกระจายของรังสีบนแผ่นโครมาโตกราฟฟี (24)

3. High pressure liquid chromatography (HPLC)

เป็นการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อน โดยหลักการทางเคมีที่ว่า " like dissolve like" ด้วยคอลัมน์ชนิด reverse phase แบบ Bondapak C-18 ที่ต่อกับ water pump แบบ dual pump gradient system

ตรวจวัดสารรังสีที่ชะออกมาด้วยหัววัด NaI ที่ต่อกับ ratemeter และ UV detecter มีชุดคอมพิวเตอร์เพื่อประเมินผลการตรวจวัด วัดการดูดกลืน UV ที่ 240 nm.อัตราการไหลของตัวทำละลาย 2.0 ml/min การวิเคราะห์ทำได้ดังนี้ ปั๊ม 0.02 M phosphate buffer pH 7.4 ผ่าน column ฉีดสารตัวอย่างขนาด 20 μl เข้าไป ค่อย ๆเพิ่มส่วนประกอบของ THF จาก 0 เป็น 30 % ที่เวลา 6 นาที

ระบบส่วนประกอบที่ใช้สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันได้อย่างชัดเจน retention time ขององค์ประกอบต่าง ๆเป็นดังนี้

$^{99m}TcO_4^-$ retention time ประมาณ 2.07 นาที

2nd complex retention time ประมาณ 5.84 นาที

1st complex retention time ประมาณ 12.37 นาที

ส่วน HR-^{99m}Tc ไม่สามารถหาได้โดยวิธีนี้ เนื่องจากเป็นคอลลอยด์ของแข็ง จึงติดอยู่ที่ตัวกรองหน้าคอลัมน์ ต้องใช้วิธี TLC ดังข้างต้นประกอบกันจึงจะตรวจหาปริมาณได้

3.4 <u>ปริมาณตัวรีดิวซ์และ pH ที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO</u>

3.4.1 <u>ปริมาณตัวรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO</u>

เตรียมสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ดัง(3.2) แต่ใช้ตัวรีดิวซ์ 2 ระบบคือ

<u>ระบบที่ 1</u> metallic Sn เป็นตัวรีดิวซ์ปริมาณที่ใช้แตกต่างกันดังนี้ 3.8,5.7,7.6, 11.4,19.0 และ 28.5ไมโครกรัมต่อขวดตามลำดับ

<u>ระบบที่ 2</u> $SnCl_2.2H_2O$ เป็นตัวรีดิวซ์ ปริมาณที่ใช้แตกต่างกันดังนี้ 3.0,5.0, 7.5,10.0,20.0 และ 30.0 ไมโครกรัมต่อขวดตามลำดับ

ปรับ pH เป็น 9.5 แบ่งใส่ขวดในรูปของสารละลายภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน นำสารที่เตรียมไว้มาอย่างละ 3 ขวด นำมาติดฉลากกับเทคนีเชียม-99 เอ็ม และหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีดัง (3.3.1) และ (3.3.2) ตามลำดับ

นำค่าต่าง ๆที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตัวรีดิวซ์กับความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (RCP) ของ ^{99m}Tc-d,l-HMPAO

3.4.2. <u>pH ที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป HMPAO</u>

จาก (3.4.1) เลือกปริมาณตัวรีดิวซ์ที่เหมาะสมที่ให้ค่า RCP ที่ดี(มากกว่า 85 %)มาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ใหม่ โดยปรับ pH ของสารละลายสุดท้ายเป็น 3.0,6.0,8.0,9.0,9.5,10.0 และ11.0 ตามลำดับ นำมาอย่างละ 3 ขวด

ติดฉลากกับสารละลายเปอร์เทคนีเตท และหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยวิธีดังกล่าว แสดงผลที่ได้ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ % ขององค์ประกอบต่าง ๆใน ระบบ

3.5 ศึกษาเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-d,l-HMPAO

จาก (3.4.1) และ (3.4.2) เลือกค่า pH และปริมาณตัวรีดิวซ์ที่เหมาะสม มาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO โดยวิธีดังข้างต้น 4 ระบบดังนี้

1. $SnCl_2.2H_2O$ 5.0 μg/kit
2. $SnCl_2.2H_2O$ 10.0 μg/kit
3. metallic Sn 4.0 μg/kit
4. metallic Sn 19.0 μg/kit

แล้วปิด (sealed) ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-5 °C นำมาติดฉลากกับสารละลายเปอร์เทคนีเตทความแรงรังสี 25 มิลลิคูรี/5 มิลลิลิตร หาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีที่เวลาต่าง ๆดังนี้คือ 5,30,และ 60 นาทีหลังการติดฉลาก แสดงผลที่ได้ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % ขององค์ประกอบต่าง ๆกับเวลา

จากผลการศึกษา(3.4)และ(3.5)เลือกระบบที่เหมาะสมที่ให้ความบริสุทธิ์ทางเคมี รังสีสูง และให้ ^{99m}Tc-d,l-HMPAO ที่มีเสถียรภาพดีที่สุดมาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผง (Lyophilized kit)ดังวิธีข้างต้นแล้ว ทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ (Freeze dry)ด้วยเครื่อง Lyophilizer เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-5 °Cเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.6 ศึกษาหาปริมาณรังสีของสารละลายเปอร์เทคนีเตทที่เหมาะสมในการนำมาติดฉลากกับสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผงที่เตรียมได้

เพื่อตรวจสอบว่าสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผงที่เตรียมได้สามารถใช้ติดฉลากกับ Tc-99m ได้ในขนาดความแรงรังสีเท่าใด จึงจะยังคงให้ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่า 85 % โดยทำการศึกษาดังนี้

นำสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผงที่เตรียมไว้ มาติดฉลากกับสารละลายเปอร์เทคนีเตท ความแรงรังสีต่าง ๆกันดังนี้ 20,25,35 และ 45 มิลลิคูรีตามลำดับ หาค่า RCP แสดงผลที่ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแรงรังสีที่ใช้ กับ RCP

สิ่งที่จะทำต่อไปคือ ทำการศึกษาการกระจายตัวของสารติดฉลากในหนู แต่ก่อนที่จะทำการทดสอบดังกล่าวจำเป็นจะต้องตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางชีวภาพของสาร เพื่อยืนยันวิธีการเตรียมว่าปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ไม่ว่ากับคนหรือสัตว์ทดลอง

การหาความบริสุทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผง

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผงดังนี้

1. Pyrogen testing โดยใช้ Fluid Thioglycolate Media
2. Sterility testing โดยวิธี LAL

การทดสอบทำโดยฝ่ายควบคุมคุณภาพ กองผลิตไอโซโทป เมื่อผลการทดสอบทั้งสองผ่านแล้ว จึงนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.7 ศึกษาการกระจายตัวของ ^{99m}Tc-d,l-HMPAO ในสัตว์ทดลอง

สารเคมีที่ใช้

- สารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ชนิดผง
- สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนีเตท (ความแรงรังสีประมาณ 25-30 มิลลิคูรีต่อ 5 มิลลิลิตร), Australian Isotope,Australia
- เมทิลเอธิลคีโตน , A.R. grade, Merck
- 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ , A.R. grade, Merck
- สารละลายอะซิโตไนไตร์ล 50 % ในน้ำ โดยปริมาตร
- สารประกอบสำเร็จรูปมาตรฐาน d,l-HMPAO (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Amersham International)

อุปกรณ์ที่ใช้

- เหมือนใน (3.3.1) และ (3.3.2)
- หนูใหญ่ (Sprague-dawley rats) น้ำหนัก 140-180 กรัม
- เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด
- กระบอกพลาสติกพร้อมฝาปิด
- เครื่องชั่ง

วิธีทดลอง

ฉีดสารประกอบติดฉลาก ^{99m}Tc-d,l-HMPAO 0.1 มิลลิลิตร (ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่า 85 % ความแรงรังสี 0.5-1.0 มิลลิคูรี) เข้าทางหางแล้วทำการผ่าหนูที่เวลา 20 และ 60 นาทีหลังการฉีดตามลำดับ โดยดูดเลือดทั้งหมดออกมาด้วยเข็มฉีดยาใส่ในขวดพลาสติกที่ชั่งเตรียมไว้ แยกอวัยวะต่าง ๆ ออกจากกันให้สะอาดที่สุด ใส่ในขวดพลาสติก นำไปชั่งหาน้ำหนักของอวัยวะแต่ละส่วนวัดปริมาณรังสีที่สะสมในแต่ละอวัยวะ ด้วยเครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้หัววัดรังสีแบบ NaI(Tl)(Multichannel analyser, MCA) คำนวณปริมาณรังสีที่สะสมเป็นร้อยละของปริมาณรังสีที่ฉีดเข้าไปทั้งหมด ร้อยละของความแรงรังสีในเลือดคำนวณจากความแรงรังสี น้ำหนักของตัวอย่างและองค์ประกอบอื่น ๆ ของร่างกาย โดยคิดจากค่าเฉลี่ยมาตรฐานในหนู 1 ตัวมีเลือดประมาณ 5.8 % กระดูก 5.0 % ผิวหนัง 18.0 % กล้ามเนื้อ 43 % และไขมันมี 7.0 %โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอกสารอ้างอิง (24) และสารที่ผลิตจากต่างประเทศ(Amersham International)

3.8 ศึกษาเสถียรภาพของสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO kit ชนิดผง

เพื่อตรวจสอบว่าสารที่เตรียมขึ้นสามารถเก็บไว้ใช้งานได้นานเท่าใด ประสิทธิภาพจะยังคงสูงเท่าที่ต้องการ โดยทำการทดลองดังนี้

นำสารประกอบสำเร็จรูป d,l-HMPAO ที่เก็บไว้ มาติดฉลากกับสารละลายเปอร์เทคนีเตทความแรงรังสีที่เหมาะสมดังข้างต้น หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี แสดงผลที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีกับระยะเวลาการเก็บ