บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีมเพื่อนำมาติดฉลากกับเทคนีเซียม-99เอ็ม

ปัจจัยสำคัญสำหรับการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime เพื่อนำมาติดฉลากกับ ^{99m}Tc เพื่อให้ได้ค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีสูงคือ ปริมาณตัวรีดิวซ์ และ pH ดังนั้นในลำดับแรกจึงทำการศึกษาหาปริมาณตัวรีดิวซ์ และ pH ที่เหมาะสมดังนี้คือ

1. ศึกษาหาปริมาณตัวรีดิวซ์ที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีม

สารเคมีที่ใช้

1,2 ไซโคลเฮกเซนไดโอน ไดออกซีม (1,2 Cyclohexanedione dioxime) ; Aldrich

แกมมา-ไซโคเดกตริน (γ-Cyclodextrin) ; Fluka

กรดซีตริก แอนไฮดรัส (Citric acid anhydrous) ; Fluka

กรดเพนทีติค (Pentetic acid) ; Fluka

กรดเมทธิล โบโรนิก (Methyl boronic acid) ; Sigma

โซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride) ; Fluka

แสตนนัสคลอไรด์ ไดไฮเดรท ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) ; Merk

สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนิเตท ($Na^{99m}TcO_4$)

2 โมลลาร์กรดไฮโดรคลอริก

2 โมลลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์

น้ำกลั่นยาฉีดปราศจากเชื้อโรค

ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์

เครื่องมือที่ใช้

เครื่องกวนแม่เหล็กและแท่งกวนแม่เหล็กขนาด 1 นิ้ว

ขวดเตรียมสารขนาด 250 มล.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) , Orion model 920A

ขวดยาฉีดขนาด 10 มล. พร้อมจุกยางและฝาปิดอะลูมิเนียม

กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดต่างๆ

ตัวกรองเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน ของ Acrodisc

ชุดให้ไนโตรเจน (ประกอบด้วยถังก๊าซไนโตรเจน ชุดควบคุมการไหลของก๊าซไนโตรเจน)

1.1 วิธีการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime

ละลาย Gamma cyclodextrin (50 มิลลิกรัม/ขวด) และ 1,2 Cyclohexaneddione dioxime (2.0 มิลลิกรัม/ขวด) ในน้ำกลั่นยาฉีดปราศจากเชื้อ ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน เติมสารละลาย $SnCl_2.2H_2O$ ปริมาณต่างๆ ดังนี้ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 และ 160 ไมโครกรัมต่อขวดตามลำดับ แล้วเติม Pentetic acid (2.0 มิลลิกรัม/ขวด) ปรับ pH เป็น 9.5-10.0 ด้วย 2 M . NaOH คนจนละลายหมด เติม Methylboronic acid (2.0 มิลลิกรัม/ขวด) Sodium chloride (100 มิลลิกรัม/ขวด) และ Citric acid anhydrous (9.0 มิลลิกรัม/ขวด) ตามลำดับ ปรับ pH สุดท้ายเป็น 3.0 ด้วย 2 M. HCl แล้วเติมน้ำกลั่นยาฉีดปราศจากเชื้อจนได้ปริมาตรที่ต้องการ แบ่งตวงใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อ (2 มิลลิลิตร/ขวด) ปิดจุกยางพร้อมฝาอลูมิเนียม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -4 °C ถึง 0 °C

1.2 การติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีม ด้วยเทคนีเชียม-99เอ็ม

สารเคมีที่ใช้

สารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime

สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนีเตท ($Na^{99m}TcO_4$)

0.9% โซเดียมคลอไรด์

อุปกรณ์ที่ใช้

กระบอกยาฉีดขนาด 20 มล.,5 มล.และ 1 มล.

เข็มขนาด 22G x11/2 นิ้ว และ 26G x11/2 นิ้ว

กระปุกตะกั่วหนา 1 ซม. พร้อมฝาปิดเจาะรูตรงกลาง

ชุดอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องปรับเทียบปริมาณรังสี (Dose calibrator) , Deluxe Isotope Calibrator (II) model 34-056, Victoreen, USA

วิธีติดฉลาก

นำสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีมที่เตรียมไว้ใส่ลงในกระปุกตะกั่วที่มีฝาปิด (มีรูตรงกลาง) เสียบกระบอกยาฉีดขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมเข็มขนาดเล็กไว้เพื่อปรับความดันภายในขวด เติมสารละลายเทคนีเซียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทความแรงรังสี 25-30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณภูมิห้องในอ่างน้ำไหล หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยวิธี Thin layer chromatography

1.3 การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc-Teboroxime (Radiochemical purity: RCP)

การหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroximme โดยวิธี Thin layer chromatography และ High performance liquid chromotography ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

1:1 โดยปริมาตรของ Acetone : 0.9% NaCl

0.9% NaCl

9:1 โดยปริมาตรของ Acetonitrile : 0.1 M Ammonium acetate buffer pH4.6

อุปกรณ์ที่ใช้

กระบอกยาฉีดขนาด 1 มล.พร้อมเข็มขนาด 26G x1/2นิ้ว

โครมาโตกราฟฟีแทงค์

แผ่นโครมาโตกราฟฟีวอทแมม 31อีที ขนาด 1.5 x16 ซม.

Thin Layer Chromatography Analyzer raytest Scanner Model Gita 92

High Performance Liquid Chromotography (HPLC) , Water

Thin Layer Chromatography (TLC)

ระบบที่ 1

เฟสที่เคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ 0.9% NaCl

เฟสที่อยู่กับที่(Stationary phase) คือ Whatman 31ET chromatography paper

ระบบนี้ จะทำการแยก $^{99m}TcO_4^-$ (Free pertechnetate) ออกจาก HR-^{99m}Tc (Hydrolyzed,reduced-^{99m}Tc) และ ^{99m}Tc-Teboroxime โดย H.R-^{99m}Tc และ ^{99m}Tc-Teboroxime จะอยู่ที่ origin (Rf = 0.0-0.1) ส่วน $^{99m}TcO_4^-$ เคลื่อนที่ไปพร้อมกับตัวทำละลายไปยัง solvent front (Rf = 0.9-1.0)

ระบบที่ 2

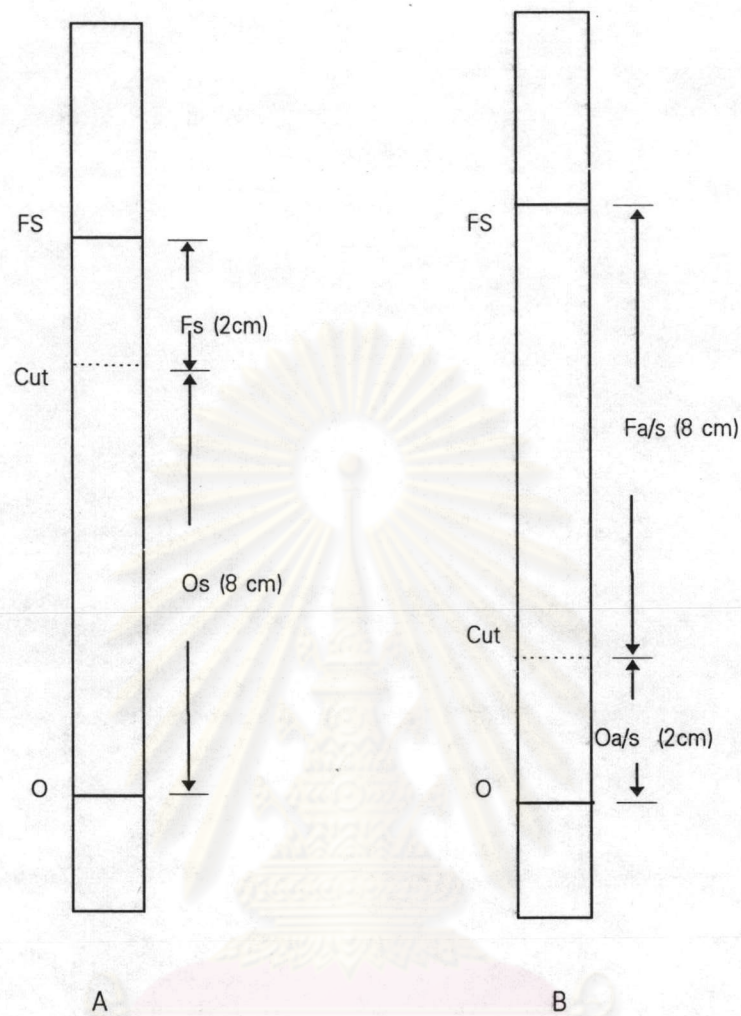
เฟสที่เคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ1:1โดยปริมาตรของ Acetone : 0.9%NaCl

เฟสที่อยู่กับที่ (Stationary phase) คือ Whatman 31ET chromatography paper

ระบบนี้ HR-^{99m}Tc จะแยกออกจาก ^{99m}Tc-Teboroxime และ $^{99m}TcO_4^-$ โดย HR-^{99m}Tc จะอยู่ที่ origing (Rf = 0.0-0.1) ส่วน ^{99m}Tc-Teboroxime และ $^{99m}TcO_4^-$ เคลื่อนที่ไปกับตัวทำละลายไปยัง solvent front (Rf = 0.9-1.0)

วิธีทดลอง

หยดตัวอย่างที่ต้องการหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีลงบนแผ่นโครมาโตกราฟฟี Whatman 31ET ขนาด 1 .5 ซม. x 16.0 ซม. ที่จุดเริ่มต้นซึ่งห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 2 ซม. จำนวน 2 แผ่น โดยหยดให้มีขนาดเล็กที่สุด แผ่นแรกนำไปจุ่มลงในตัวทำละลาย 0.9% NaCl แผ่นที่สองจุ่มลงในตัวทำละลาย 1:1 โดยปริมาตรของ Acetone : 0.9%NaCl เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซ็นติเมตร ยกแผ่นโครมาโตกราฟฟีขึ้นนำไปตากให้แห้ง แล้ววัดการกระจายตัวของรังสีบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีด้วยเครื่อง scanner หรือ ตัดแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่ได้เป็นแผ่นสั้นๆ ขนาด 1 ซม. แล้ววัดความแรงรังสีด้วย GM counter หรือ MCA คำนวนหาร้อยละของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime



รูปที่ 21 ลักษณะของ paper chromatograph โดยใช้ Whatman 31Et เป็น stationary phase โดยที่ (A) ใช้ 0.9% NaCl เป็น solvent (B) ใช้ 1:1 โดยปริมาตรของ Acetone : 0.9% Nacl เป็น solvent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณ

$$\% \ {}^{99m}TcO_4^- = \frac{Fs}{(Fs + Os)} \times 100$$

เมื่อ Fs คือ radioactivities ที่ front ของแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่จุ่มในตัวทำละลาย 0.9% NaCl

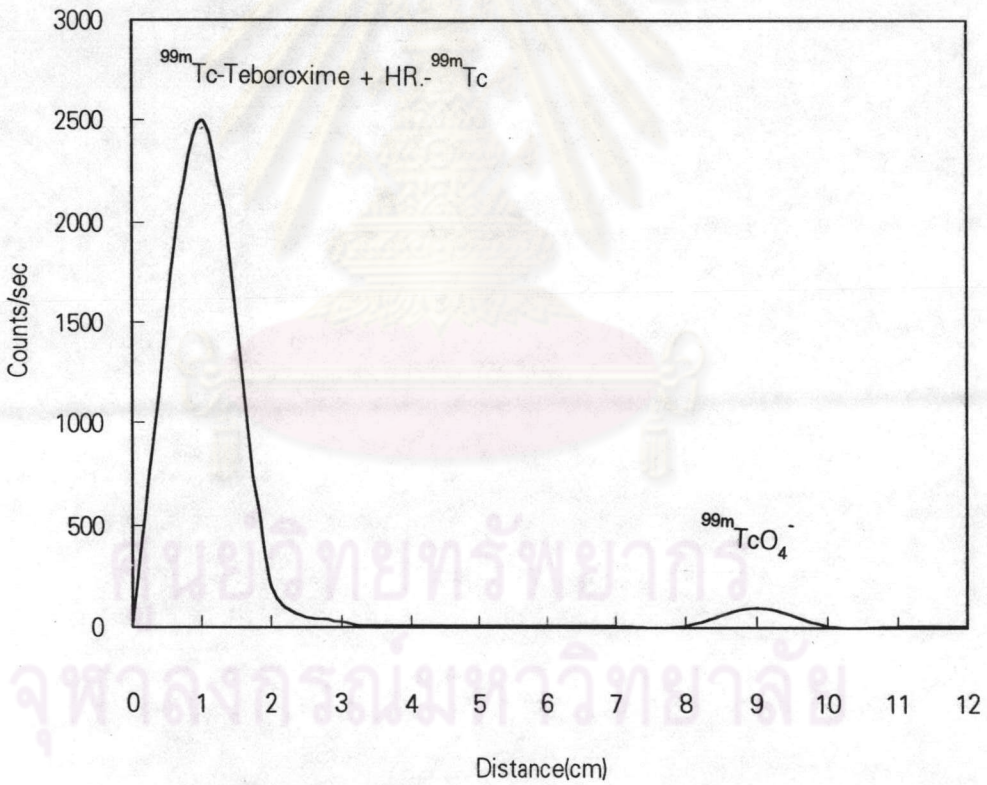
Os คือ radioactivities ที่ origin ของแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่จุ่มในตัวทำละลาย 0.9% NaCl

$$\%\ HR\text{-}^{99m}Tc = \frac{Oa/s}{(Fa/s + Oa/s)} \times 100$$

เมื่อ Fa/s คือ radioactivities ที่ front ของแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่จุ่มในตัวทำละลาย 1:1 โดยปริมาตร ของ Acetone : 0.9% NaCl

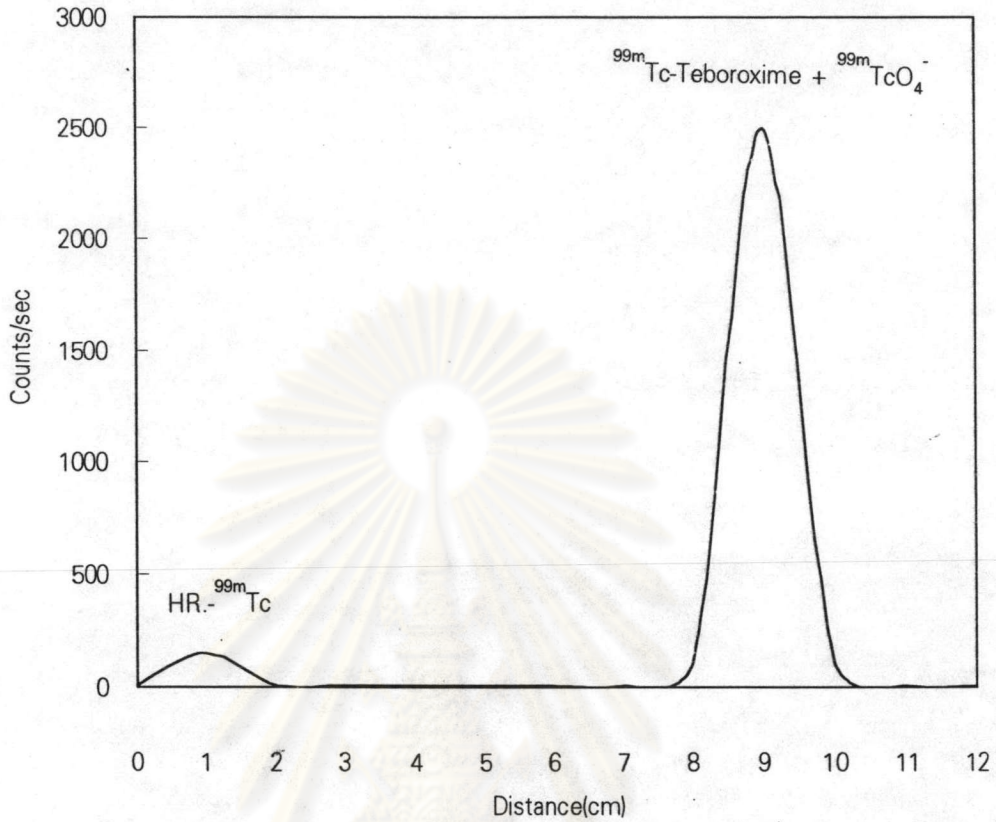
Oa/s คือ radioactivities ที่ origin ของแผ่นโครมาโตกราฟฟีที่จุ่มในตัวทำละลาย 1:1 โดยปริมาตร ของ Acetone:0.9% NaCl

$$\%\ RCP = [\ 100 - (\ \%\ {}^{99m}TcO_4^- + \%\ HR\text{-}^{99m}Tc\ )\ ]$$



รูปที่ 22 โครมาโตรแกรมแสดงการแยกองค์ประกอบต่างๆ ของระบบที่1 ใช้ 0.9% NaCl เป็น mobile phase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 โครมาโตแกรมแสดงการแยกองค์ประกอบต่างๆ ของระบบที่2 ใช้ 1:1โดยปริมาตรของ Acetone : 0.9% NaCl เป็น mobile phase

2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography เตรียมสภาวะของการวิเคราะห์โดยใช้ตัวชะคือ 90% Acetonitile : 10% 0.1 M. Ammonium acetate buffer pH 4.6 ผ่านคอลัมน์ Hamilton PRP-1 column ขนาด 250 x 4.1 มิลลิเมตร ซึ่งต่อกับ pump ให้มีอัตราการไหลของตัวชะ 2.0 มิลลิลิตร / นาที เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ สารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime โดยฉีดสารตัวอย่างของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจจับรังสีที่ถูกชะออกมาด้วยหัววัด NaI(Tl) ที่ต่อกับ Rate meter เก็บสัญญาณจากหัววัดด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ประมวลผล

Retention time ขององค์ประกอบต่างๆ ที่ทำการตรวจวัดได้ดังนี้คือ

$^{99m}TcO_4^-$ Retention time ประมาณ 1.43 นาที

^{99m}Tc-Teboroxime Retention time ประมาณ 4.68 นาที

H.R.-^{99m}Tc ไม่สามารถตรวจวัดโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography ทั้งนี้เนื่องจาก H.R.-^{99m}Tc เป็นคอลลอยด์ จึงติดอยู่ที่ Guard column ดังนั้นในการหาปริมาณของ H.R.-^{99m}Tc จึงต้องใช้วิธี TLC ดังกล่าวข้างต้น

2. <u>ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีม</u>

จากผลการศึกษาหาปริมาณตัวรีดิวซ์ที่เหมาะสม เลือกปริมาณตัวรีดิวซ์ที่ให้ค่า RCP ที่ดี (>90%) มาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีมตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 โดยปรับ pH ของสารละลายสุดท้ายเป็น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ นำมาอย่างละ 3 ขวด ติดฉลากกับสารละลายเทคนีเซียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทและหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 และ 1.3 นำค่าต่างๆ ที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับร้อยละขององค์ประกอบต่างๆของเทคนีเซียม-99เอ็ม

จากการศึกษาหาปริมาณตัวรีดิวซ์ และ pH ที่เหมาะสม เลือกระบบที่ให้ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีสูง(RCP>90%)ที่ได้จากการทดลองข้างต้นมาเตรียมสารประกอบสำเร็จรูปทีโบรอกซีมชนิดผง (Lyophilized kit) ตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 แล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ ด้วยเครื่อง Lyophilizer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-5 °C เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ด้วย ^{99m}Tc นั้นจะต้องทำในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime ที่ให้ค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีสูงมากกว่า 95% ในการศึกษาลำดับต่อไปจึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดฉลากดังนี้คือ

<u>การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดฉลากสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ด้วย ^{99m}Tc</u>

1. <u>ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime</u>

นำสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ชนิดผงที่เตรียมไว้มาติดฉลากกับสารละลายเทคนีเซียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทความแรงรังสี 25-30 มิลลิคูรี/มิลลิลิตร นำมาต้มในอ่างน้ำที่

อุณหภูมิ 100 °C, 70 °C, 37 °C, และ25 °C(อุณหภูมิห้อง) แล้วดูดสารละลายที่ต้มในอุณหภูมิต่างๆ ออกมาหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีที่เวลา 10, 15, 20 และ 60 นาที นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (RCP) ที่อุณหภูมิต่างๆ

2. <u>ศึกษาปริมาณรังสีของเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทที่เหมาะสมในการติดฉลาก</u>

นำสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ชนิดผงที่เตรียมไว้มาติดฉลากกับสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตท ดังกล่าวมาแล้วในข้อ 1.2 โดยใช้ความแรงรังสีต่างๆ กันดังนี้คือ 30, 70 , 100, 130 และ 160 มิลลิคูรีในปริมาตรคงที่ 3 มิลลิลิตร หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีดังวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1.3 นำค่าต่างๆ ที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีกับร้อยละขององค์ประกอบต่างๆของเทคนีเชียม-99เอ็ม

3. <u>ศึกษาปริมาตรของเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทที่เหมาะสมในการติดฉลาก</u>

นำสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ชนิดผงที่เตรียมไว้มาติดฉลากกับสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตท ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 โดยใช้ปริมาณความแรงรังสี 70 มิลลิคูรีต่อปริมาตร 1, 2, 3 , 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีตามวิธีที่ 1.3 นำค่าต่างๆที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรของสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตทกับร้อยละขององค์ประกอบต่างๆของเทคนีเชียม-99เอ็ม

<u>ศึกษาเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime</u>

นำสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ชนิดผงที่เตรียมไว้มาติดฉลากกับสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็ม เปอร์เทคนีเตท ตามวิธีการทดลองข้อ1.2 โดยใช้ความแรงรังสี 25-30 มิลลิคูรี/มิลลิตร หาค่าความบริสุทธ์ทางเคมีรังสีที่เวลาต่างๆ ดังนี้คือ 5, 15, 30, นาที 1, 2, 4, 6, และ 8 ชม. หลังการติดฉลาก แสดงผลที่ได้ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละขององค์ประกอบต่างๆของเทคนีเชียม-99เอ็ม กับเวลา

การหาความบริสุทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime

ส่งตัวอย่างของสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ที่เตรียมให้ฝ่ายควบคุมคุณภาพ กองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพดังนี้ คือ

1. Pyrogen test โดยใช้ Limulus Amebocyte (LAL)
2. Sterility test โดยใช้ Fluid Thioglycolate Media (FTM)

เมื่อผ่านการตรวจสอบทางด้านชีวภาพ จึงดำเนินการศึกษาการกระจายตัวของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime ในสัตว์ทดลองต่อไป

ศึกษาการกระจายตัวของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime ในสัตว์ทดลอง

สารเคมีที่ใช้

สารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime

0.9% NaCl

สารละลายโซเดียมเปอร์เทคนีเตท ($Na^{99m}TcO_4$)

อุปกรณ์ที่ใช้

หนู (male Spragwe-Dawley rats) น้ำหนัก 100-120 กรัม

กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็ม

กระบอกพลาสติก

เครื่องชั่ง

ชุดเครื่องมือผ่าตัด

เครื่องปรับเทียบปริมาณรังสี (Dose calibrator) , Deluxe Isotope Calibrator (II) model 34-056, Victoreen, USA

เครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ หัววัด NaI(Tl) (Multichannel Analyser), Ortec

วิธีทดลอง

ฉีดสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime ที่มีความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีสูงกว่า 95 % ความแรงรังสี 30-70 ไมโครมิลลิคูรี ในปริมาตรไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางหางของหนูเพศผู้ (Spragwe-Dawley rats) แล้วทำการฆ่าหนูที่เวลา 1, 5 และ 15 นาทีหลังการฉีด ตามลำดับ แยกอวัยวะต่างๆ ออกจากกันใส่กระบอกพลาสติกที่ชั่งเตรียมไว้ นำไปชั่งหาน้ำหนักของอวัยวะแต่ละส่วน แล้วนำไปวัดปริมาณรังสีที่สะสมในแต่ละอวัยวะ โดยเครื่องแกมมาสเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้หัววัดแบบ NaI(Tl) (Multichannel analyzer, MCA) คำนวณหาปริมาณรังสีที่สะสมเป็นร้อยละของปริมาณรังสีที่ฉีดเข้าไปทั้งหมด- เปรียบเทียบค่าที่ได้กับเอกสารอ้างอิง

ศึกษาเสถียรภาพของสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime

เพื่อตรวจสอบว่าสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ที่เตรียมสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานเท่าใด โดยที่เมื่อนำมาติดฉลากกับ ^{99m}Tc แล้วยังคงให้ค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีทางรังสีของสารประกอบเชิงซ้อน ^{99m}Tc-Teboroxime สูงกว่า 95 % ทำได้ดังต่อไปนี้

นำสารประกอบสำเร็จรูป Teboroxime ชนิดผงที่เตรียมเก็บไว้มาติดฉลากกับสารละลายเทคนีเชียม-99เอ็มเปอร์เทคนีเตท ความแรงรังสี 40 มิลลิคูรี/ มิลลิลิตร หาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี นำค่าที่ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีกับระยะเ วลาในการเก็บ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย