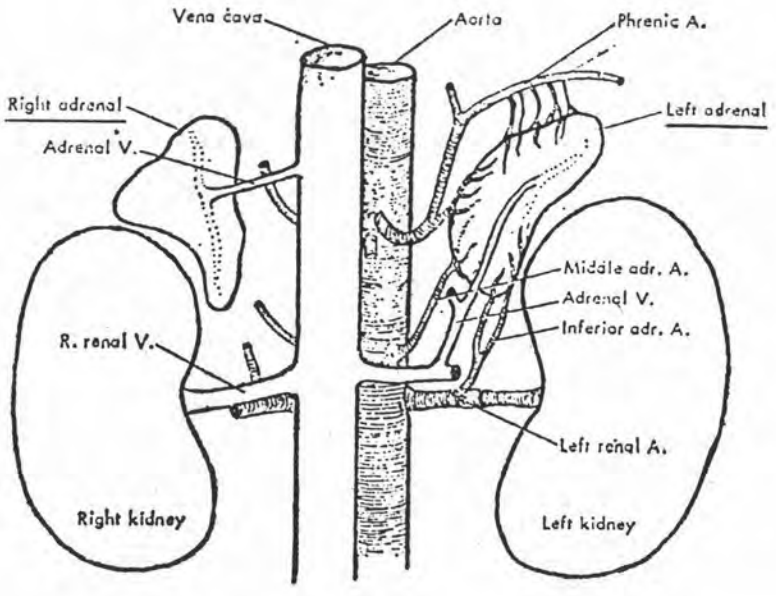
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 ต่อมหมวกไต

ต่อมหมวกไต (adrenal gland) เป็นต่อมไร้ท่อ ลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมวางตัวอยู่เหนือไตทั้งสองข้าง มีขนาดแตกต่างกันตามอายุและภาวะการทำงาน น้ำหนักประมาณ 5-15 กรัม ต่อมหมวกไตประกอบด้วย 2 ส่วนซึ่งแตกต่างกันทั้งลักษณะโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน ได้แก่ ต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) และต่อมหมวกไตชั้นใน (adrenal medulla)(24)



รูปที่ 8 ตำแหน่งของต่อมหมวกไต

2.1.1 หน้าที่ของต่อมหมวกไต

ต่อมหมวกไตชั้นในจะสร้างสาร catecholamine 2 ชนิดคือ epinephrine หรือ adrenalin กับ norepinephrine หรือ noradrenalin ซึ่งจะเหมือนกับสารเคมีที่ปล่อยออกมาจากปลายของ post ganglionic fibre ของประสาทซิมพาเทติค(sympathetic nerve) หน้าที่ของฮอร์โมนนี้จะเหมือนกับการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติค(24) คือ

1. ทำให้เส้นเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจ (coronary artery) ขยายตัว เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจมากขึ้น

2. ทำให้หลอดลมขยายตัว ช่วยให้อากาศเข้าสู่ปอดมากขึ้น

3. เส้นเลือดทั่วไปขยายตัว ทำให้เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อของร่างกายสูงขึ้น

4. ทำให้เส้นเลือดที่ไปเลี้ยงผิวหนังหดตัว เป็นผลทำให้ความดันเลือดสูงขึ้น

5. เพิ่มอัตราการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสของไกลโคเจน (glycogen) เพื่อทำให้มีกลูโคสเพียงพอต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ

6. ทำให้การหดตัวของลำไส้ (peristalsis) ลดลง รวมทั้งการขับน้ำลายลดลงด้วย

7. ทำให้รูม่านตา (pupil) ขยายตัว

2.1.2 ความผิดปกติของต่อมหมวกไตชั้นใน(25)

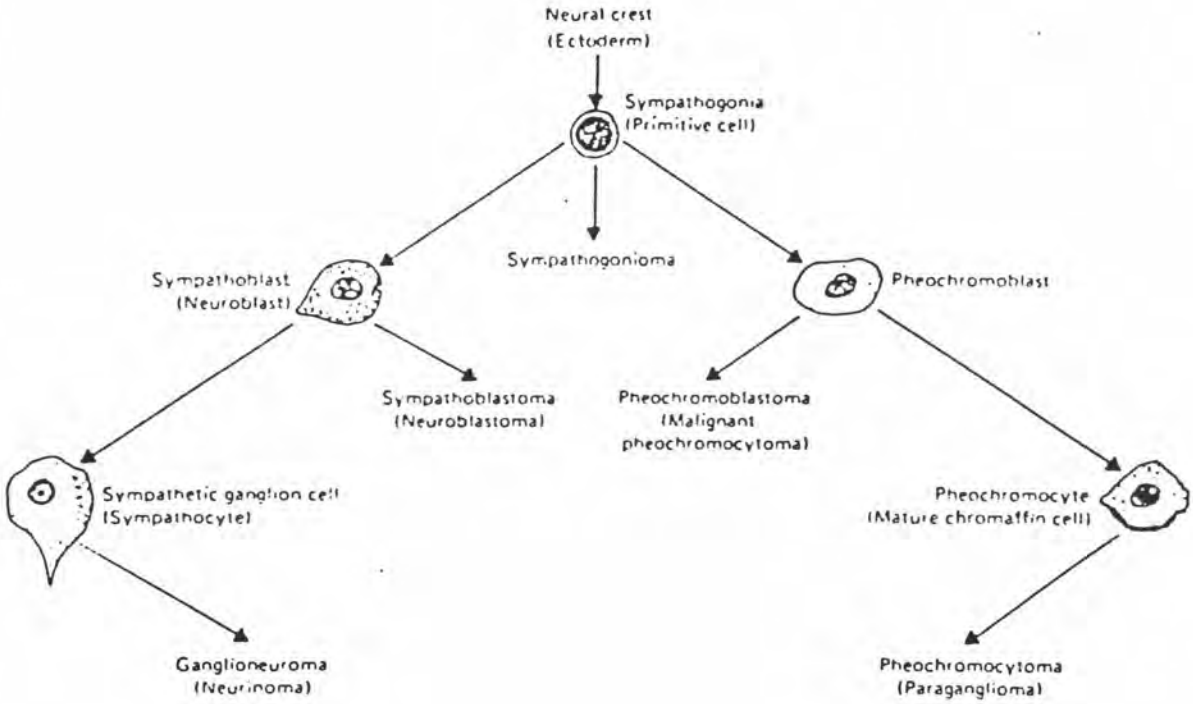
ที่พบมักเป็นภาวะที่มีการหลั่งฮอร์โมน adrenalin และ noradrenalin มากกว่าปกติ (hyperfunction) ภาวะการหลั่งน้อย (hypofunction) มักไม่ค่อยพบ โดยภาวะที่มีการหลั่งมากเกินพอนี้มักเกิดจากการมีเนื้องอกของ chromaffin cell ที่เรียกว่า pheochromocytoma ทำให้เกิดการหลั่ง adrenalin และ noradrenalin เพิ่มมากขึ้น อาการจะพบความดันโลหิตสูงเป็นอาการสำคัญ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการหลั่งของฮอร์โมนทั้งสองว่าจะหลั่งออกมามากตลอดเวลาหรือมากเป็นคราว ๆ ไป ซึ่งแบ่งเป็น

1. Paroxysmal hypertension ความดันโลหิตสูงที่เกิดเป็นครั้งคราว อาจเกิดวันละหลาย ๆ ครั้ง นานเป็นนาทีหรืออาจนานเป็นสัปดาห์ก็ได้ ผู้ป่วยจะมีอาการปวดศีรษะ ใจสั่น หัวใจเต้นแรง เหงื่อออก เหนื่อยอ่อนเพลีย เวียนศีรษะ เจ็บแน่นหน้าอก ปวดท้อง ซึ่งอาจเกิดจากภาวะทางจิตใจ (emotional upset) ก็ได้

2. Substained hypertension มีความดันโลหิตสูง เหมือนโรคความดันสูงทั่วๆ ไป แต่มีอาการ และอาการแสดงของการที่มี noradrenalin มาก ผู้ป่วยจะมีอาการกระวนกระวาย ใจสั่น และมีตามองไม่ชัด ม่านตาขยาย

2.1.3 เนื้องอกในต่อมหมวกไต (pheochromocytoma)

pheochromocytoma เป็นเนื้องอกของ chromaffin cells ของระบบประสาท sympathoadrenal ซึ่ง 90% ของเนื้องอกนี้พบได้ที่ต่อมหมวกไตชั้นใน และอีก 10% พบได้จาก sympathetic ganglion ในทรวงอก ช่องอก และ Organ of Zuckerkandl ซึ่งอยู่ที่บริเวณ bifurcation ของ aorta และผนังของกระเพาะปัสสาวะ(12)



รูปที่ 9 การเจริญเปลี่ยนแปลงภายในเอมบริโอของ adrenergic cell และเนื้องอกของมัน

2.1.4 การวินิจฉัยเนื้องอกในต่อมหมวกไตโดยวิธีการทางคลินิค

การวินิจฉัยอาศัยจากการประมาณระดับฮอร์โมน adrenalin และ noradrenalin ที่หลั่งมากเกินพอ เนื่องจากฮอร์โมนทั้งสองจะถูกออกซิไดส์ประมาณหนึ่งในสามให้เป็น 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid หรือเรียกว่า Vanillyl mandelic acid (VMA)(25,26) ดังรูปที่ 10 ซึ่งร่างกายจะขับออกทางปัสสาวะ ถ้ามีฮอร์โมนทั้งสองในระดับปกติจะพบ VMA ในปริมาณ 1-7 mg/24 hr.urine ดังนั้นการวินิจฉัยที่สำคัญคือ การวัดระดับ VMA ในปัสสาวะ24 ชั่วโมง เพราะเป็น metabolite ของ cathecholamine ที่ง่ายและสะดวกในการตรวจหามากที่สุด นอกจากนี้อาจวินิจฉัยได้โดยการวัดอัตราการเผาผลาญของร่างกาย (basal metabolic rate, BMR) ซึ่งจะได้ค่าสูง

2.1.5 การใช้ I-131 MIBG ในการวินิจฉัยเนื้องอกในต่อมหมวกไต

การนำ I-131 MIBG มาใช้วินิจฉัยเนื้องอกในต่อมหมวกไต เริ่มต้นตั้งแต่ปี 1981 เมื่อมีการค้นพบว่าสารประเภท radiolabeled aralkylguanidine สามารถนำมาใช้ถ่ายภาพต่อมหมวกไตได้ เนื่องจากสารดังกล่าวมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ catecholamine ที่ผลิตได้จากต่อมหมวกไต เมื่อเข้าสู่ร่างกายจึงมีการสะสมบริเวณต่อมหมวกไตได้ดี

Wieland และคณะ (1984)ได้สรุปกลไกการเคลื่อนที่ของ I-131 MIBG ไปสะสมยังบริเวณเนื้อเยื่อต่อมหมวกไตไว้ 3 ขั้นตอน คือ(7)

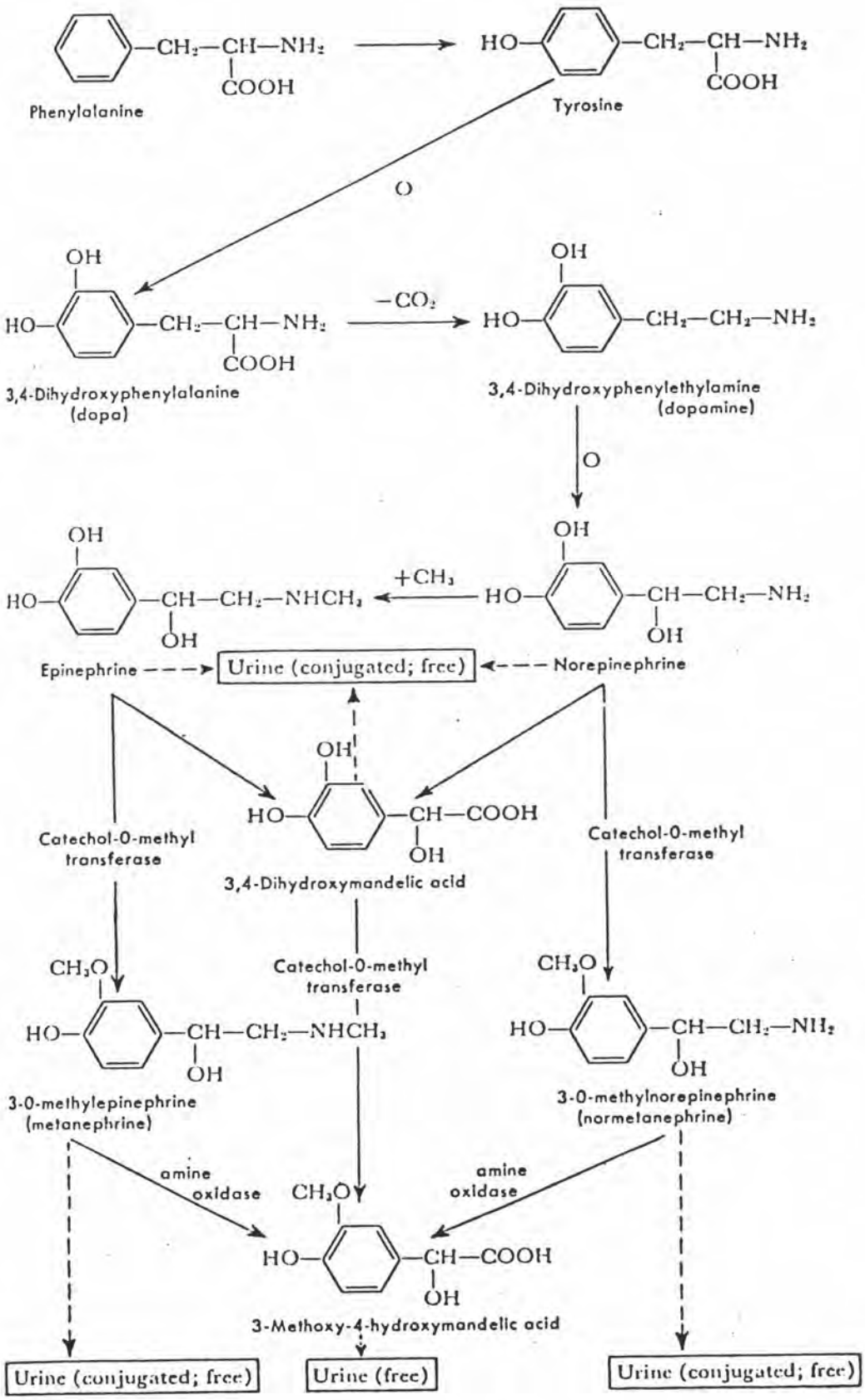
1. เกิดขบวนการ active transport ผ่าน plasma membrane ของเซลล์ต่อมหมวกไตชั้นใน (adrenomedullary cell)

2. เกิดการ transport ไปยัง 'chromaffin storage granule ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของต่อมหมวกไตชั้นใน

3. เกิดการ retention ใน granule เหล่านั้น โดยกลไกที่เรียกว่า pH-trapping mechanism

ถ้า chromaffin granule มี pH ต่ำ(5.5) guanidine ที่อยู่ในรูปของ free-base จะสามารถผ่าน membrane เข้าไปได้อย่างง่ายดาย และถูกเก็บไว้ใน granule ในรูปของ protonated cation แม้ว่า aralkylguanidine จะเป็นเบสแก่ (pK_a > 13) แต่ที่ pH ของร่างกายจะอยู่ในรูปของ protonated form (99.9999%) ซึ่งสังเกตได้จากการพบความเข้มข้นของ radiolabeled aralkylguanidineในต่อมหมวกไตชั้นในของสุนัขในปริมาณสูงภายหลังการฉีดเพียง 5 นาที สรุปได้ว่า ในการ transport ไปยังเซลล์ต่อมหมวกไตจะต้องเกี่ยวข้องกับ guanidinium cation อย่างแน่นอน

017930



รูปที่ 10 Biosynthesis และ metabolism ของ catecholamine(27)

2.2 สารเภสัชรังสี (Radiopharmaceutical)

สารเภสัชรังสี หมายถึง สารประกอบของสารไอโซโทปรังสี หรือยาที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทปรังสี(28) นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านเวชศาสตร์นิวเคลียร์ในการวินิจฉัยและรักษาโรค เพื่อให้มองเห็นโครงสร้างทางกายภาพของอวัยวะภายใน วิธีการวินิจฉัยจะเริ่มต้นจากการนำสารเภสัชรังสีที่ต้องการวินิจฉัยอวัยวะส่วนใด มาฉีดให้กับคนไข้ แล้วทิ้งระยะให้ยาเดินทางไปยังอวัยวะเป้าหมายนั้น จนมีปริมาณของยาที่อวัยวะเป้าหมายมากกว่าอวัยวะข้างเคียงมาก ๆ อาจช้าหรือเร็วแล้วแต่ชนิดของตัวยา จากนั้นจึงใช้หัววัดรังสีซึ่งต่อเข้ากับระบบนับรังสีมากวาดวัดรังสีที่อวัยวะเป้าหมายและบริเวณใกล้เคียงจนทั่ว แล้วบันทึกความเข้มของรังสีลงบนกระดาษ แผ่นฟิล์มหรือเก็บข้อมูลเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์แล้วแต่ความทันสมัยของเครื่องวัด ข้อมูลที่เป็นภาพเปรียบเทียบ ความเข้มของรังสีที่อวัยวะต่าง ๆ ซึ่งส่วนใดปกติหรือผิดปกติอย่างไรแพทย์จะสามารถวินิจฉัยได้ สารไอโซโทปรังสีที่ใช้ในการเตรียมสารเภสัชรังสีมีมากมายหลายชนิด โดยมีหลักเกณฑ์ในการเลือก เช่น จะต้องมีครึ่งชีวิตไม่ยาวนานมาก ให้รังสีแกมมาพลังงานไม่สูงหรือต่ำเกินไป อยู่ในระดับที่เครื่องวัดพอจะตรวจได้ และไม่ควรให้อนุภาคที่ไม่จำเป็นต่อการวินิจฉัย เช่น อนุภาคเบตา แอลฟา เป็นต้น

การสะสมของสารรังสีในบริเวณอวัยวะเป้าหมาย จะเกิดใน 2 ลักษณะ คือ

ก. การสะสมของสารรังสีในอวัยวะเป้าหมายส่วนที่ผิดปกติ (Direct localization) ในกรณีนี้ เนื่องจากยาที่ใช้ติดฉลากนั้นมีการสะสมในบริเวณเซลล์ที่มีอาการผิดปกติ การวินิจฉัยจึงสังเกตจากจุดที่มีการสะสมของรังสีมาก (hot area) ว่าเป็นบริเวณที่เป็นโรค เช่น การใช้ Tc-99m Glucoheptonate หรือ Tc-99m DTPA ในการวินิจฉัยโรคสมอง

ข. การสะสมของสารรังสีในอวัยวะเป้าหมายส่วนที่ไม่ผิดปกติ (Indirect localization) กรณีนี้เกิดขึ้นตรงข้ามกับกรณีแรกคือ จะมีการสะสมของยาในส่วนของเซลล์ที่เป็นปกติเท่านั้น จึงทำให้เห็นว่าส่วนที่เป็นปกติมีการสะสมของสารรังสี บริเวณที่ไม่มีการสะสมของรังสี (cold area) จึงเป็นส่วนที่เป็นโรค เช่น การใช้ Tc-99m Sulfur colloid ในการวินิจฉัยโรคตับ ซึ่งปกติแล้วสารตัวนี้จะเข้าไปสู่เนื้อเยื่อของตับ แต่เมื่อเกิดการผิดปกติที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของตับ จะทำให้เห็นส่วนนั้นเป็นจุดขาวบนแผ่นฟิล์ม

2.2.1 กลไกของการเคลื่อนที่ของสารเภสัชรังสีไปยังอวัยวะเป้าหมาย(29) มีหลายวิธีดังนี้

2.2.1.1 Active transport คือการเคลื่อนที่ของสารจากบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารต่ำกว่าไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารที่สูงกว่า เช่นการเคลื่อนที่ของไอโอไดด์ไปยังต่อมไทรอยด์

2.2.1.2 Exchange diffusion สารเภสัชรังสีจะถูกแลกเปลี่ยนกับสารที่มีลักษณะคล้ายกันหรือชนิดเดียวกันที่ไม่มีกัมมันตรังสีจากในเซลล์ของอวัยวะนั้น เช่น การตรวจสมอง (brain scan) และการตรวจกระดูก (bone scan) เป็นต้น

2.2.1.3 กลไกการจับ (Phagocytosis) อนุภาคที่มีขนาด 0.1-1 ไมครอน จะถูกจับโดย Reticuloendothelial system (RES) ซึ่งมีมากในตับและม้าม ดังนั้นเมื่อคนไข้ได้รับยาที่มีอนุภาคขนาดดังกล่าว RES ในตับและม้ามจะจับอนุภาคนั้น จึงสามารถถ่ายภาพของตับเพื่อการวินิจฉัยได้

2.2.1.4 กลไกการแยกเซลล์ (Cell sequestration) ม้ามมีหน้าที่จับแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตายแล้วหรือเสื่อมคุณสมบัติการทำงาน ดังนั้นถ้านำเม็ดเลือดแดงมาทำลายด้วยความร้อนหรือสารเคมี แล้วติดฉลากด้วยสารรังสี และนำมาฉีดกลับเข้าสู่ร่างกายม้ามจะทำการจับเซลล์ที่เสื่อมคุณสมบัติเหล่านี้ จึงสามารถวินิจฉัยการทำงานของม้ามได้

2.2.1.5 Compartmental localization ได้แก่ การสะสมของยาในเนื้อเยื่อบริเวณที่ให้ยาเข้าไป หรือใน body fluid ที่เวลาต่าง ๆ กัน เช่น สารรังสีที่มีการสะสมในช่องปาก, ระบบหมุนเวียนโลหิตเป็นต้น

2.2.1.6 กลไกการอุดตันที่เส้นเลือดฝอย (Capillary blocking) สารเภสัชรังสีที่มีขนาดโตกว่าขนาดของเส้นเลือดฝอย เมื่ออยู่ในกระแสเลือดจะไปอุดตันที่เส้นเลือดฝอยบริเวณปอด เนื่องจากปอดเป็นอวัยวะที่มีเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่อย่างหนาแน่น จึงสามารถใช้ในการตรวจปอด (lung scan) ได้

2.2.1.7 Specific action สารเภสัชรังสีที่มีความสามารถเฉพาะตัวที่จะไปอยู่ในตำแหน่งที่มีพยาธิสภาพนั้นโดยการช่วยเหลือของเอนไซม์ หรือขบวนการต่าง ๆ ในร่างกายผู้ป่วย เช่น ^{67}Ga-Scan, Monoclonal antibody เป็นต้น

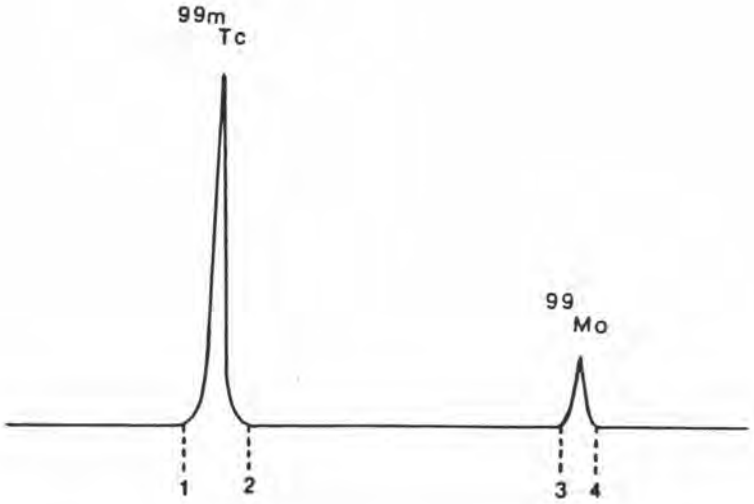
2.2.2 <u>การควบคุมคุณภาพของสารเภสัชรังสี</u>

ประกอบด้วยการควบคุมคุณภาพทางเคมี ได้แก่ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเรดิโอนิวไคลด์ ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี และการควบคุมคุณภาพทางชีววิทยา ได้แก่ การตรวจสอบความปราศจากเชื้อและไพโรเจน

2.2.2.1 <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเรดิโอนิวไคลด์ (Radionuclidic purity)</u>

ความบริสุทธิ์ทางเรดิโอนิวไคลด์ หมายถึง สัดส่วนของกัมมันตภาพรังสีทั้งหมดที่อยู่ในรูปของเรดิโอนิวไคลด์กับเรดิโอนิวไคลด์ที่ต้องการ(30) เช่น การผลิต ^{131}I จากปฏิกิริยา ^{130}Te(n,γ)^{131}Te $\xrightarrow{\beta^-}$ ^{131}I อาจมี ^{131}Te เป็นเรดิโอนิวไคลด์ที่เจือปนอยู่ใน ^{131}I หรือการผลิต ^{99m}Tc จาก ^{99}Mo อาจมี ^{99}Mo เป็นเรดิโอนิวไคลด์ที่เจือปนอยู่ใน ^{99m}Tc

การตรวจสอบทำได้โดย ตรวจหาแกมมาสเปคตรัม โดยใช้หัววัดซินทิลเลเตอร์หรือเซมิคอนดัคเตอร์ ซึ่งต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่อง (MCA) ตัวอย่างเช่น แกมมาสเปคตรัมของ ^{99m}Tc ดังรูปค่า count ทั้งหมดของ ^{99m}Tc ระหว่างช่องที่ 1 และ 2 = 99,500 cps และค่า count ของ ^{99}Mo ระหว่างช่องที่ 3 และ 4 = 500 cps ดังนั้นเปอร์เซนต์ของ ^{99}Mo ที่เจือปนอยู่มีค่าเท่ากับ 500/99,500+500 = 0.005%



2.2.2.2 <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (Radiochemical purity)</u>

ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี หมายถึง สัดส่วนของกัมมันตภาพรังสีทั้งหมดกับสารกัมมันตภาพรังสีที่ปรากฏอยู่ใน radiochemical form ที่ต้องการ(30) เช่นการเตรียมสารประกอบติดฉลาก I-131 sodium orthoiodohippurate หรือ I-131 hippuran ประกอบด้วย 1 % free radioiodide ion และ 1% o-iodobenzoic acid ดังนั้นความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ I-131 hippuran มีค่าเท่ากับ 98 % การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ได้แก่วิธีการทาง chromatography (paper chromatography และ thin-layer chromatography) และวิธี electrophoresis ซึ่งทั้งสองวิธีจะแยก radiochemical impurity ออก ทำให้สามารถคำนวณหาความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีได้

2.2.2.3 <u>การตรวจสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility test)</u>

กระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization process) คือ กระบวนการที่ใช้ทำลาย หรือขจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ให้หมดไปจากสารหรือสิ่งของ(31) ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ (sterile products) ก็คือ ผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ การทำให้ปราศจากเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี

วิธีทางกายภาพสามารถแบ่งออกเป็นวิธีย่อย ๆ ดังนี้

1. การใช้ความร้อน ได้แก่ dry heat และ moist heat

dry heat ใช้อากาศร้อนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อุณหภูมิและเวลา ที่มีความสัมพันธ์กันดังนี้ 140°C 180 นาที , 150°C 150 นาที , 160°C 120 นาที และ 170°C 60 นาที

moist heat ใช้ไอน้ำร้อน (steam) ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยกระทำใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15-30 นาที

2. การใช้รังสี แบ่งเป็น non-ionizing radiation ได้แก่ ultra-violet light และ ionizing radiation ได้แก่ accelerated electrons และ gamma rays

3. การกรองด้วยเยื่อกรอง (membrane filter) ตามปกติแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กที่สุดจะมีขนาดประมาณ 0.5 ไมครอน หรืออาจเล็กกว่านั้นเล็กน้อย ดังนั้นจึงจัด membrane filter ที่มีขนาดช่องตั้งแต่ 0.45 ไมครอนลงมาเป็น sterilizing filter โดยทั่วไปจะใช้ขนาด 0.22 ไมครอน

การทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีทางเคมี นิยมใช้แกสทำลายเชื้อ เช่น ethylene oxide, propylene oxide, formaldehyde, β-propiolactone, ethylene และ propylene glycols เป็นต้น

การเลือกวิธีการในการทำลาย หรือยจัดเชื้อต้องดูคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ โดยวิธีการที่เลือกใช้ต้องไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพ

การตรวจสอบความปราศจากเชื้อสำหรับยาฉีด จึงเป็นการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์, fungi และยีสต์ที่ปะปนอยู่ในยาฉีดนั้น โดยวิธีการตรวจสอบนิยมใช้วิธีของ United States Pharmacopeia (USP xx)

2.2.2.4 การตรวจสอบไพโรเจน (pyrogen test)

ไพโรเจน หมายถึง สารพิษที่ปะปนอยู่ในยาฉีด ซึ่งเมื่อเข้าไปในร่างกายคนเราจะทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า "Pyrogenic reaction" เช่น มีอาการไข้สูง หนาวสั่น หน้ามืด เป็นลม เป็นต้น ซึ่งคนไข้จะมีอาการมากหรือน้อย ขึ้นกับสภาพของคนไข้แต่ละคน และปริมาณของไพโรเจนที่ได้รับ(31)

เชื้อโรคต่าง ๆ เช่น bacteria, fungi และ virus เป็นแหล่งกำเนิดของไพโรเจน ซึ่งจะรวมทั้งที่ยังมีชีวิตอยู่หรือตายแล้วก็ได้ เชื้อโรคเหล่านี้จะปล่อยสารที่เรียกว่า endotoxin ออกมาปะปนอยู่ในยาฉีดหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นอกจากนี้ particulate contamination และ chemical contamination ก็เป็นแหล่งเพิ่มไพโรเจนด้วย แต่สาเหตุ 2 อย่างหลังนี้สามารถ กำจัดหรือควบคุมได้ถ้ามีการควบคุม GMP ที่ดี

จากการศึกษาของหลาย ๆ คนพบว่า ไพโรเจนที่พบส่วนใหญ่จะเป็น endotoxin ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวก Lipopolysaccharide(LPS) และอาจจะมีหรือไม่มีโปรตีนปะปนด้วยก็ได้ สาร LPS นี้มาจาก cell wall ชั้นนอกของ gram negative bacteria การที่ยาฉีดผ่านการทดสอบความปราศจากเชื้อแล้วนั้นไม่ได้หมายความว่าจะผ่านการทดสอบไพโรเจนด้วย ทั้งนี้เพราะเมื่อเชื้อโรคตายหรือถูกทำลาย endotoxin ก็อาจจะยังคงอยู่ได้ เนื่องจากมันสามารถคงทนต่อความร้อน และยังสามารถละลายในน้ำได้บ้างนั่นเอง ดังนั้นการกรองด้วยวิธีธรรมดาจึงกำจัดไพโรเจนไม่หมด

การกำจัดไพโรเจน มีหลายวิธี เช่น ใช้สารเคมี (พวกกรด, ด่าง) ความร้อน การกรอง ซึ่งการจะเลือกวิธีใดก็จะต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์นั้น ๆ สำหรับวิธีที่แนะนำไว้ในเภสัชตำรับมักใช้ dry heat เช่น 180°C 2 ชม., 200°C 1 ชม., 250°C 30 นาที เป็นต้น ซึ่งความร้อนขนาดนี้ตัวเชื้อโรคจะตายแต่ spore อาจจะยังอยู่ ต้องใช้วิธีการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน แต่ถ้าหากไพโรเจนอยู่ในรูปของ LPS ก็จะไม่สามารถกรองได้หมด นอกจากจะใช้กรองด้วย molecular filter จึงจะกรองได้หมด ส่วน moist heat เช่น autoclave ก็กำจัดได้ไม่หมด ดังนั้นการกำจัดไพโรเจนในเครื่องมือต่าง ๆ ต้องพยายามล้างด้วยน้ำกลั่นสำหรับยาฉีดหลาย ๆ ครั้ง เพื่อไล่ไพโรเจนที่ละลายน้ำได้ออกให้หมด แล้วจึงนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย dry heat หรือ moist heat ตามความเหมาะสมต่อไป

การทดสอบไพโรเจน มี 2 แบบ คือ

1. In vivo เป็นการทดสอบในสัตว์ทดลอง ซึ่งสัตว์ที่ใช้ทดสอบแล้วให้ปฏิกิริยาคล้ายกับคนก็คือกระต่าย และสามารถให้ผลกับไพโรเจนทุกชนิด ดังนั้นจึงยังคงใช้อยู่ในเภสัชตำรับ(BP 1980 และ USP xx) แต่วิธีนี้ยุ่งยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงมากและใช้เวลาทดสอบนาน

2. In vitro เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง โดยดูปฏิกิริยา gelation ระหว่าง Limulus กับ endotoxin เรียกว่า วิธี LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) ซึ่งวิธีนี้ใช้ตัวอย่างน้อย เวลาทดสอบรวดเร็ว ไม่ยุ่งยากในการเตรียมการทดสอบ sensitive ดี และประหยัดกว่าการทดสอบโดยใช้กระต่าย ปัจจุบันสามารถใช้ LAL test เป็นวิธีทดสอบไพโรเจนมาตรฐานได้ และ FDA แห่งสหรัฐได้จัดพิมพ์เป็นร่างข้อแนะนำวิธีทดสอบผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายโดยวิธี LAL ซึ่งสามารถใช้ทดสอบได้ทั้งยาสำหรับคน, ยาสำหรับสัตว์, ชีววัตถุ และเครื่องมือแพทย์

2.3 การเตรียมสารประกอบติดฉลาก

วิธีเตรียมสารประกอบติดฉลาก โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 4 วิธีใหญ่ ๆ ดังนี้(32)

1. การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis)
2. การสังเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical synthesis)
3. Recoil labelling
4. ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทป (Isotopic exchange reaction)

2.3.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

วิธีนี้โดยทั่วไปจะเป็นการสร้างโมเลกุลเชิงซ้อนจากสารตั้งต้นโดยติดฉลากด้วยไอโซโทปรังสีที่ตำแหน่งไอโซโทปเสถียร วิธีการสังเคราะห์มีหลายรูปแบบตั้งแต่ปฏิกิริยาขั้นเดียวไปจนถึงการสังเคราะห์ที่ต้องอาศัยปฏิกิริยาถึง 6 ขั้นหรือมากกว่า ผลิตผลที่ได้อาจสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับแต่ละปฏิกิริยา สามารถแสดงได้ในรูปของเปอร์เซนต์ผลิตผลทางเคมีรังสี (percentage radiochemical yield) หรือผลิตผลทางเคมี (chemical yield) สำหรับสารประกอบที่ติดฉลากด้วยไอโซโทปที่เสถียร

$$\text{เปอร์เซนต์ผลิตผลทางเคมีรังสี} = \frac{\text{กัมมันตภาพรังสีทั้งหมดในผลิตผล (มิลลิคูรี)}}{\text{กัมมันตภาพรังสีทั้งหมดในสารตั้งต้น (มิลลิคูรี)}} \times 100$$

ข้อดีของการใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีในการเตรียมสารประกอบติดฉลาก คือ สามารถควบคุมหรือเลือกตำแหน่งใด ๆ ในโมเลกุลที่ต้องการให้มีการติดฉลากได้ ในขณะที่การสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอโซโทปบางครั้งไม่สามารถเลือกตำแหน่งที่ต้องการติดฉลากได้อย่างแน่นอน

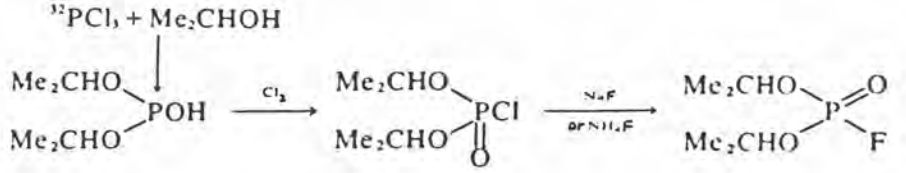
ตัวอย่างสารประกอบติดฉลากที่เตรียมโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น Acetic anhydride-^{14}C เตรียมจากปฏิกิริยาระหว่าง anhydrous sodium acetate-1-^{14}C กับ acetylchloride

$$CH_3{}^{14}COONa + CH_3COCl \longrightarrow CH_3{}^{14}COOCOCH_3 + NaCl \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

Methyl oleate-9, 10-T เตรียมจากปฏิกิริยารีดิวซ์ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic reduction) ของสารประกอบไม่อิ่มตัว methyl stearolate

$$CH_3(CH_2)_7C{\equiv}C(CH_2)_7COOMe \xrightarrow[Pd/C]{T_2} CH_3(CH_2)_7CT{=}CT(CH_2)_7COOMe \quad \text{.....(2)}$$

Diisopropylphosphorofluoridate-^{32}P หรือ DEP-^{32}P เตรียมจาก



..... (3)

2.3.2 <u>การสังเคราะห์ทางชีวเคมี</u> แบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่

2.3.2.1 การสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (Enzymic synthesis) โดยการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นสารรังสี ไปเป็นผลิตผลติดฉลากตามต้องการ วิธีนี้คล้ายคลึงกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งโดยปกติผลิตผลที่ได้จะมีกัมมันตภาพจำเพาะโมลาร์ (molar specific activity) เท่ากับของสารตั้งต้น

ตัวอย่างเช่น ใช้ amino acid oxidase จากไตเปลี่ยน DL-amino acid-T ให้เป็น D-amino acid-T หรือใช้ thymidine phosphorylase จากตับวัวเปลี่ยน thymine-T ให้เป็น deoxyribonucleoside thymidine-T

2.3.2.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis) โดยการให้สัตว์, พืช หรือ จุลินทรีย์ ทำการเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นสารรังสีให้เป็นผลิตผลตามที่ต้องการ โดยผ่านกระบวนการเมตาโบลิซึมตามปกติ แล้วแยกผลิตผลนั้นออกมา ข้อจำกัดของวิธีนี้มีหลายประการ ประการแรก คือ สารตั้งต้นนั้นต้องปรากฏอยู่ในสิ่งมีชีวิตนั้นตามธรรมชาติอยู่แล้ว ประการที่สองกัมมันตภาพจำเพาะที่ได้จะไม่สูงมากนัก เนื่องจากมีข้อจำกัดในการให้สารรังสีแก่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และประการสุดท้าย อาจมีการสูญเสียเนื่องจากเกิดผลิตผลข้างเคียง ซึ่งยากแก่การแยกและทำให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างของการใช้วิธีนี้เตรียมสารประกอบติดฉลากที่รู้จักกันดี เช่น การเตรียมวิตามินบี-12 ซึ่งติดฉลากด้วย ^{58}Co หรือ ^{58}Co-cyanocobalamin ซึ่ง ^{58}Co (carrier free) ที่ใช้จะต้องกำจัดสิ่งเจือปน เช่น นิเกิลหรือโลหะหนักอื่น ๆ ออกให้หมด แล้วจึงผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ <u>Streptomyces olevaceus</u> ในตัวกลางที่ใช้สังเคราะห์ที่ปราศจากโคบอลต์ แล้วแยก ^{58}Co-cyanocobalamin ออกโดยกระบวนการสกัดและโครมาโตกราฟี

2.3.3 Recoil labelling

วิธีนี้อาศัยปฏิกิริยานิวเคลียร์ในการทำให้เกิด recoil atom และความสามารถของ recoil atom ในการเกิดพันธะเคมีกับสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ เนื่องจาก recoil atom ที่ได้มีพลังงานจลน์สูงมากพอที่จะเกิดพันธะกับโมเลกุลที่ชน บางครั้งจึงเรียกปฏิกิริยาเช่นนี้ว่า Hot-atom reaction ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้มักจะได้ผลิตผลต่ำ มีกัมมันตภาพจำเพาะโมลาร์ต่ำ และเกิดผลิตผลข้างเคียง ซึ่งยากแก่การทำให้บริสุทธิ์ จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมในการนำมาใช้เตรียมสารประกอบติดฉลากสำหรับงานประจำ

ตัวอย่าง เช่น การเตรียมสารประกอบติดฉลากของตริเตียม (tritium) โดยใช้ recoil tritium atom (triton) ที่ได้จากปฏิกิริยา $^{6}Li(n,\alpha)^{3}H$, $^{3}He(n,p)^{3}H$

2.3.4 ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทป

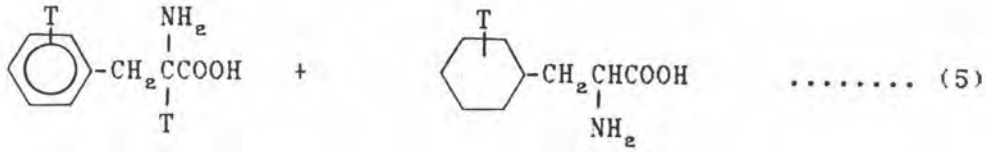
ในปฏิกิริยาจะเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างอะตอมในโมเลกุลหนึ่งกับอะตอมของธาตุเดียวกัน แต่มีมวลต่างกันในอีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งก็คือการแลกเปลี่ยนไอโซโทปของธาตุเดียวกัน อะตอมเหล่านี้อาจเป็นไอโซโทปรังสีหรือไอโซโทปที่เสถียรก็ได้ โดยทั่วไปปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไอโซโทปแสดงได้ดังสมการ (4)

$$AX + BX^{*} \rightleftharpoons AX^{*} + BX \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (4)$$

จากสมการ (4) สารประกอบ AX จะแลกเปลี่ยนอะตอม X กับอะตอม X^{*} ในสารประกอบ BX^{*} เมื่ออะตอม X^{*} คือ ไอโซโทปรังสีของธาตุ X

ข้อดีของการเตรียมสารประกอบติดฉลากโดยวิธีนี้ คือ สามารถใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยมาก ๆ ได้ เช่น น้อยกว่า 0.1 มิลลิโมล และวิธีนี้ทำได้ง่ายกว่าวิธีอื่น ๆ โดยเฉพาะพวกโมเลกุลเชิงซ้อน (complex molecules) ซึ่งใช้วิธีเคมีธรรมดาเตรียมได้ยาก ข้อสำคัญคือ สารเคมีที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง เพราะอาจเกิดการแลกเปลี่ยนไอโซโทปจากสารเจือปนได้เร็วกว่าสารที่ต้องการให้แลกเปลี่ยน และทำให้ขั้นตอนการทำสารประกอบติดฉลากให้บริสุทธิ์ทำได้ยากมากขึ้นเช่น การติดฉลาก L-phenylalanine ด้วยตริเตียม(T) โดยการอบสารดังกล่าวกับก๊าซตริเตียมความแรง 7 คูรี เป็นเวลา 10 วัน เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟี (paper chromatography) พบว่า สารที่ได้มีความบริสุทธิ์ แต่จากการทำ reverse isotope dilution analysis ด้วย L- และ D-phenylalanine carrier พบว่ามี D-isomer ซึ่งถูกติดฉลากด้วย T แม้ว่าน้ำหนักของ D-phenylalanine-T จะมีปริมาณน้อยมาก แต่มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะโมลาร์สูงมาก(มากกว่า 29 คูรี/มิลลิโมล) นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้สารที่พันธะคู่หายไปกลายเป็น 2-amino-3-cyclo-hexyl propionic acid ที่มีกัมมันตภาพจำเพาะสูงมาก (มากกว่า 150 คูรี/มิลลิโมล) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในสมการ (5)

(L-isomer)



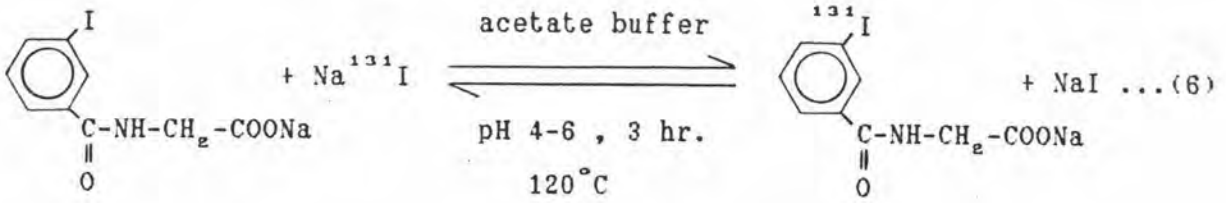
(D-isomer)

(L(D)-2-amino-3-*cyclo*-hexylpropionic acid-T(G))

..... (5)

ซึ่งจากตัวอย่างดังกล่าวอาจแยก phenylalanine-T(G) ที่มีกัมมันตภาพจำเพาะโมลาร์ต่ำ (มิลลิคูรี/มิลลิโมล) ออกจากสารเจือปนที่มีกัมมันตภาพจำเพาะโมลาร์สูงมาก(คูรี/มิลลิโมล) ได้ แต่สำหรับสารประกอบอื่น ๆ อาจพบว่าไม่สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์ได้ตามต้องการ

ตัวอย่างอื่นของการเตรียมสารประกอบติดฉลากโดยอาศัยปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทปเช่น การแลกเปลี่ยนไอโอดีนในการเตรียม I-131 Hippuran

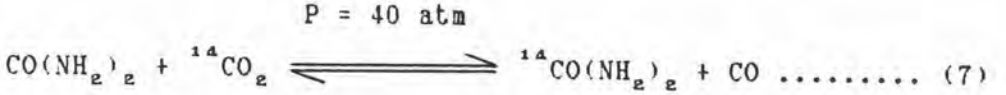


sodium orthoiodohippurate

I-131 Hippuran

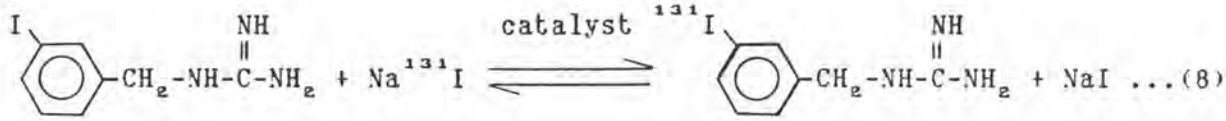
...(6)

การแลกเปลี่ยนคาร์บอนในการเตรียม urea-^{14}C



..... (7)

จากวิธีการเตรียมสารประกอบติดฉลากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด จะเห็นว่าวิธีการแลกเปลี่ยนไอโซโทป เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ได้ผลดี และเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย งานวิจัยนี้จึงใช้วิธีแลกเปลี่ยนไอโอดีน ในการศึกษาและทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบติดฉลาก I-131 MIBG ซึ่งจะเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างไอโอดีนที่เสถียรใน MIBG กับไอโอดีน-131 ได้เป็น I-131 MIBG โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และสภาวะที่เหมาะสมดังสมการ (8)



2.4 <u>จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทป</u>

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะกรณีของของผสมเอกพันธ์ (homogeneous) ที่ไม่ซับซ้อนและที่สภาวะสมดุล(33)

จากสมการทั่วไป $AX + BX^* \rightleftharpoons AX^* + BX$

ให้ R คือ อัตราการแลกเปลี่ยนไอโซโทป จากสมการก็คืออัตราการแลกเปลี่ยนของธาตุ X ระหว่าง A และ B (ในหน่วยของความเข้มข้นที่ใช้ในงานนั้น)

S_A และ S_B คือเศษส่วน (fraction) $a_{AX}/[AX]$ และ $a_{BX}/[BX]$ ตามลำดับ

เมื่อ a_{AX} และ a_{BX} เป็นความเข้มข้นของกัมมันตรังสี X ใน AX และ BX ตามลำดับ

[AX] และ [BX] เป็นความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ของ AX และ BX ทั้งหมด ทั้งที่เป็นกัมมันตรังสี และเสถียรที่เวลา t

อัตราการเพิ่มของกัมมันตภาพรังสีใน AX มีค่าเท่ากับผลต่างระหว่างอัตราการเกิดเป็น AX^* จากปฏิกิริยาไปข้างหน้ากับอัตราการลดลงของ AX^* จากปฏิกิริยาย้อนกลับ อัตราการเกิด AX^* ได้จากผลคูณระหว่างอัตราการปรากฏของ X ในรูปของ AX ทั้งหมดกับสัดส่วนของสารรังสีในปฏิกิริยาซึ่งเกิดเป็น AX เนื่องจากการแลกเปลี่ยนจะมีการสูญเสีย X^* จากโมเลกุล BX^* (มีค่าเท่ากับ S_B) และมีการเพิ่ม AX^* โดยโมเลกุล AX (เท่ากับ $1-S_A$) ดังนั้นอัตราการเกิดเป็น AX^* จึงมีค่าเท่ากับ $RS_B(1-S_A)$ ในทำนองเดียวกันปฏิกิริยาย้อนกลับซึ่งทำให้มีการสูญเสียกัมมันตภาพรังสีจาก AX มีค่าเท่ากับ $RS_A(1-S_B)$

ดังนั้น

$$\frac{da_{Ax}}{dt} = RS_B(1-S_A)-RS_A(1-S_B)$$

$$= R(S_B-S_A) \quad \ldots\ldots (9)$$

เมื่ออินทิเกรตสมการ (9) โดยกำหนดขอบเขตตั้งแต่ $a = (a)_o$ เมื่อ $t = 0$ ไปจนถึง $a = (a)_\infty$ ที่สภาวะสมดุล จะได้

$$R_t = -\frac{[AX][BX]}{[AX]+[BX]} \ln(1-F) \quad \ldots\ldots (10)$$

เมื่อ F เป็นเศษส่วนของการแลกเปลี่ยนไอโซโทปที่สภาวะสมดุลที่เวลา t

$$F = \frac{(a_{Ax})_t-(a_{Ax})_o}{(a_{Ax})_\infty-(a_{Ax})_o} = \frac{(a_{Bx})_t-(a_{Bx})_o}{(a_{Bx})_\infty-(a_{Bx})_o} \quad \ldots\ldots (11)$$

2.5 <u>กลไกของปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทป</u>(34)

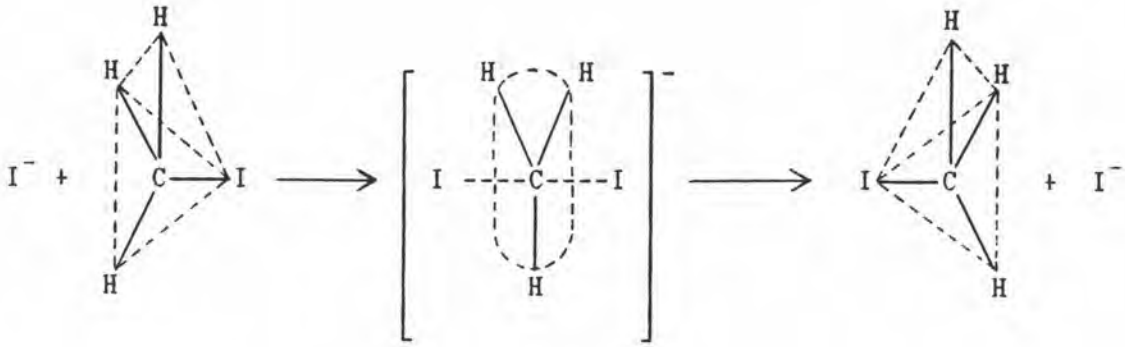
อาจเกิดได้ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการรวมตัว (associative) และกระบวนการแตกตัว (dissociative)

2.5.1 <u>กระบวนการรวมตัว</u>

$$AX + X^* \longrightarrow [AXX]^* \longrightarrow AX^* + X \quad \ldots\ldots (12)$$

จะมีขั้นอินเทอร์มิเดียตเกิดขึ้น และจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสอง (SN 2 Kinetic)

ตัวอย่างปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาระหว่างไอโอไดด์ไอออนกับอัลคิลเฮไลด์ ซึ่งแสดงกลไกได้ดังรูปที่ 11



ระนาบ CH_3 ในขั้นทรานสิชัน

รูปที่ 11 แผนภาพแสดงกลไกแบบรวมตัวของปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนระหว่างเมทิลไอโอไดด์กับไอโอไดด์อิออน

2.5.2 กระบวนการแตกตัว

$$AX \longrightarrow [A] + [X] \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (13)$$

เกิดสมการ (13) แล้วตามด้วยสมการ (14)

$$\left.\begin{aligned} [A] + [X] &\longrightarrow AX \\ [A] + X^{*} &\longrightarrow AX^{*} \end{aligned}\right] \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (14)$$

กระบวนการนี้ ค่าคงที่อัตรา (rate constant) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น AX เพียงตัวเดียว (SN 1 Kinetic)

ตัวอย่างของปฏิกิริยา เช่น การแลกเปลี่ยน $^{36}Cl^{-}$ ระหว่างคลอไรด์อิออนกับสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ (metal complex) MCl^{+} แสดงดังสมการ (15)

$$MCl^{+} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{ขั้นทรานสิชัน}}{H_2OMCl^{+}} \longrightarrow H_2OM^{2+} + Cl^{-}$$

$$\downarrow + {}^{36}Cl^{-}$$

$$H_2O + M^{36}Cl^{+} \longleftarrow \underset{\text{ขั้นทรานสิชัน}}{H_2OM^{36}Cl^{+}} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (15)$$

กลไกของปฏิกิริยาจะเกิดแบบใดนั้นอาจขึ้นกับตัวทำละลายด้วย เช่น การแลกเปลี่ยนอะตอมของไอโอดีนระหว่างไอโอไดด์อิออน กับ tertiary butyl iodide $(CH_3)_3CI$ ในอัลกอฮอล์มีกลไกแบบรวมตัว แต่ในซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จะมีกลไกแบบแตกตัว ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของไอโอไดด์ โดยในขั้นแรกจะเกิด tertiary butyl carbonium ion

$$(CH_3)_3CI \rightleftharpoons (CH_3)_3C^+ + I^- \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (16)$$

ทั้งนี้เนื่องจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการแตกตัวได้ดี (ionizing solvent)และ tertiary butyl carbonium ion ที่เกิดขึ้นในซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ก็มีเสถียรภาพมากกว่าในเอธานอล

กระบวนการแลกเปลี่ยนไอโซโทปจะเกิดขึ้นดีหรือไม่นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของอัตราการเกิดปฏิกิริยาแล้วยังขึ้นกับปฏิกิริยาทางเคมีในบางปฏิกิริยาด้วย และในการทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนนั้นอาจต้องมีการให้พลังงานแก่ระบบ ซึ่งอาจเป็นพลังงานจากรังสี ความร้อน หรือพลังงานทางชีวเคมี (เอนไซม์)

Elias และ Riess(35) ได้อธิบายถึงกลไกและจลนศาสตร์ของการแลกเปลี่ยนไอโซโทปซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยรังสี จากปฏิกิริยาระหว่างไอโอไดเบนซีนกับไอโอดีน ตามสมการ (17)

$$Ph\text{-}I + (1/2)\,{}^*I_2 \xrightarrow{\sim\sim} Ph\text{-}{}^*I + (1/2)\,I_2 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (17)$$

โดยศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (17) ในตัวทำละลายเบนซีนที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (อาบรังสีด้วย ${}^{60}Co$) พบว่าอัตราการแลกเปลี่ยน (R) เป็นไปตามความสัมพันธ์ดังสมการ (18)

$$R = \frac{a[I_2]^{1/2}}{1+b[I_2]/[Ph\text{-}I]} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (18)$$

จาก literature ได้อธิบายกลไกของปฏิกิริยา (17) ไว้ดังนี้

$$Ph - I \xrightarrow{\sim\sim} Ph^{\cdot} + I^{\cdot} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (19)$$

$$Ph^{\cdot} + {}^*I_2 \longrightarrow Ph - {}^*I + {}^*I \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (20)$$

จากสมการ (18) R ที่ได้ไม่เป็นไปตามกลไกของปฏิกิริยา (19) และ (20) ซึ่ง Elias และ Riess ได้อธิบายกลไกใหม่ดังนี้

$$^{*}I_2 \xrightarrow{h\nu} 2\,{}^{*}I^{\cdot} \quad \text{..... (21)}$$

$$^{*}I^{\cdot} + Ph\text{-}I \longrightarrow Ph - {}^{*}I + I^{\cdot} \quad \text{..... (22)}$$

$$^{*}I^{\cdot} + I_2 \longrightarrow I - {}^{*}I + I^{\cdot} \quad \text{..... (23)}$$