

การเตรียมเภสัชภัณฑ์รังสีสำเร็จรูปสำหรับติดฉลากด้วย ^{99m}Tc

เพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ

*อังคนันท์ อังกูรรัตน์ ทิพย์นันท์ งามประหยัด โมฬีพัฒน์ แดงประเสริฐ

สุคนธ์ พุ่มเข็ม และบุญอุมา เขาวนัฏฐ์

ศูนย์ไอโซโทปรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

โทรศัพท์ 0-2579-5230 ต่อ 5611 โทรสาร 0-2579-9560 E-mail: angkanan@tint.or.th

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยพบว่าเภสัชภัณฑ์รังสีไอโซโปรฟลอกซาซินซึ่งติดฉลากด้วยเทคนิคเชิม-99 เอ็ม ที่ศูนย์ไอโซโทปรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ เตรียมขึ้นสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อได้ โดยมีความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีไม่น้อยกว่า 95 % มีความคงตัว 6 ชั่วโมง และมีการกระจายตัวไปบริเวณที่ติดเชื้อได้ 0.25 – 0.56 % หลังจากการฉีด 1 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ มีความเป็นกรด-เบส (pH) เท่ากับ 4.0 – 5.0 มีความปลอดเชื้อ ปราศจากไพโรเจน และปลอดพิษ

คำสำคัญ : ไอโซโปรฟลอกซาซิน การติดเชื้อแบคทีเรีย การวินิจฉัยการติดเชื้อ

Preparation of ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals for Diagnosis of Bacterial Infection

*Angkanan Aungurarat, Tippanan Ngamprayad, Moleephan Dangprasert, Sudkanung Phumkem
and Boon-uma Jowanaridhi

Radioisotope Center, Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization)

Phone: 0-2579-5230 ext. 5611, Fax: 0-2579-9560, E-mail: angkanan@tint.or.th

Abstract

Preparation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin by Radioisotope Center, Thailand Institute of Nuclear Technology, for diagnosis of bacterial infection proceeded by varying the factors which affected this compound. The resulted ^{99m}Tc -ciprofloxacin had a pH of 4.0 - 5.0, 0.25 – 0.56 % injected dose per gram of infected area (1 and 3 hours after injection) and at least 95% radiochemical purity with 6-hour stability. ^{99m}Tc -ciprofloxacin was found sterile, pyrogen-free and non-toxic.

Keywords: infection, bacterial infection, ciprofloxacin, radioimaging

1. บทนำ

ปัจจุบันโรคติดเชื้อเป็นสาเหตุอัตราการตายและอัตราการเกิดโรคในประเทศกำลังพัฒนาและแพร่หลายไปทั่วโลก วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมีหลายวิธี อาทิเช่น การใช้ยาด้านแบคทีเรีย สำหรับการตรวจวินิจฉัยและรักษา หรือการใช้เทคนิคทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ในการวินิจฉัยเชื้อในกรณีผู้ป่วยที่มีไข้โดยไม่ทราบสาเหตุและในผู้ป่วยติดเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้โดยวิธีอื่น^{1,2,3} ซึ่งวิธีเหล่านี้มีข้อเสียคือ ไม่สามารถระบุตำแหน่งที่ติดเชื้อได้แน่นอนถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ เช่น เม็ดเลือดขาวที่ติดฉลากด้วย In-111 หรือ Tc-99m (labeled WBC) ให้ผลการวินิจฉัยที่ดี แต่ข้อเสียคือ มีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก โดยต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญพิเศษ และต้องทั้งระยะการถ่ายภาพหลังการฉีด labeled WBC เข้าสู่ผู้ป่วยเป็นเวลานานเพื่อให้ได้ผลที่ดี นอกจากนั้นยังนิยมใช้ Ga-67 citrate และ human immunoglobulin (HIG) ที่ติดฉลากด้วย In-111 หรือ Tc-99m ซึ่งมีข้อดีคือสามารถเตรียมได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ blood clearance ช้า ซึ่งทำให้ต้องรอนานหลายชั่วโมงเพื่อให้ได้ภาพถ่ายที่ดี ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทางศูนย์ไอโซโทปรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ จึงมีความสนใจศึกษาวิจัยการเตรียมเภสัชรังสีสำหรับติดฉลากด้วย ^{99m}Tc เพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อบริเวณที่มีการติดเชื้อ และมี blood clearance เร็ว ซึ่งเภสัชรังสีที่สนใจพัฒนาวิจัยในครั้งนี้ คือ เภสัชรังสี ^{99m}Tc-ciprofloxacin (Infecton) โดยจะศึกษาวิจัยเป็นเวลา 3 ปี เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ถึง 2553

2. วิธีการ

1. การเตรียม ^{99m}Tc-ciprofloxacin^{1,4}

เตรียมสารละลาย SnCl₂·2H₂O ความเข้มข้น 0.01 g/ml (10 µg/µl) แล้วนำมาทำการทดลองดังนี้

1.1 เติมน้ำ 4 µl ของสารละลาย SnCl₂·2H₂O ลงใน ciprofloxacin 2 mg ผสมให้เข้ากัน นำมาปรับ pH ด้วย 0.1 / 1 N NaOH หรือ 0.1 / 1 N HCl จนกระทั่งได้ pH 4 แล้วเติม ^{99m}Tc 10 mCi เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดค่าความแรงรังสี (activity = A) บันทึกค่าไว้ แบ่งสารละลายบางส่วนมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดฉลาก (% labeling) และนำสารละลายที่เหลือมากรองผ่าน 0.22 µm cellulose acetate วัดความแรงรังสี (= B) ของสารละลายที่ได้จากการกรอง (filtrate) แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (% radiochemical purity)

1.2 การคำนวณ % labeling

นำสารละลายที่แบ่งมาบางส่วน (ก่อนการกรอง) มา spot เพื่อหา % labeling ดังต่อไปนี้

1.2.1 ITLC-SG หรือ Whatman#31ET, acetone ($R_f = 0.9 - 1.0 = \text{TcO}_4^-$)

1.2.2 ITLC-SG, EtOH : H₂O : NH₄OH (2 : 5 : 1) ($R_f = 0 - 0.1 = \text{H.R.} + \text{tin colloid}$)

$$\% \text{ labeling} = 100 - \% \text{ TcO}_4^- - (\% \text{ H.R.} + \text{tin colloid})$$

1.3 การคำนวณ % radiochemical purity (% RCP)

ทำการทดลองเหมือนข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนสารละลายที่นำมา spot เป็นสารละลายที่ผ่านการกรอง
แทน (filtrate)

$$\text{limit} : \% \text{ radiochemical purity} \geq 95.00\%$$

1.4 การคำนวณหา % yield

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{ความแรงรังสีหลังการกรอง (B)} \times 100}{\text{ความแรงรังสีก่อนการกรอง (A)}}$$

หมายเหตุ : ค่าความแรงรังสีก่อนและหลังการกรอง ต้องเป็นค่า ณ เวลาเดียวกัน

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การติดฉลากของสารเภสัชรังสี ^{99m}Tc-ciprofloxacin

ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ SnCl₂.2H₂O และ ciprofloxacin pH^{6,8} ปริมาตร^{6,8} ความแรงรังสี
filter อุณหภูมิ อัตราส่วนโมลที่เหมาะสมของ SnCl₂.2H₂O ต่อ Na-tartrate.2H₂O ที่อยู่ในรูป

lyophilized kit¹⁹ ซึ่งมีค่า pH = 4.0 สำหรับการเตรียม ^{99m}Tc-ciprofloxacin

หลังจากนั้นนำ ^{99m}Tc-ciprofloxacin มาทำการศึกษาความคงตัว การกระจายตัว
(biodistribution in mice)^{1,3,7,14} sterility pyrogen test toxicity และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารด้วย
วิธี HPLC²⁰

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสารดังกล่าวแล้ว ได้มีการศึกษา clinical trial โดย
เตรียม ^{99m}Tc-ciprofloxacin (10 mCi/dose) สำหรับแผนกเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลศิริราช เพื่อ
นำไปทดลองใช้ (Fig 14 - 15) ซึ่งปัจจุบันได้ส่งตัวอย่างให้ไปทดลองใช้ประมาณ 14 dose (นับถึงเดือน
กุมภาพันธ์ 2554) โดยต้องรอผลทางคลินิกจากโรงพยาบาลตลอดอายุของการรักษา (ระยะของการ
รักษาและติดตามผลหลังการฉีดอยู่ในช่วง 8 ± 2 สัปดาห์ และ 6 เดือน)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

Table 1 Sterility, pyrogen test and toxicity of ^{99m}Tc-ciprofloxacin

Check	Result
Sterility	negative
Pyrogen	negative
Toxicity	negative

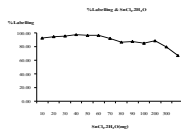


Fig. 1 Effect of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ quantity on % labeling

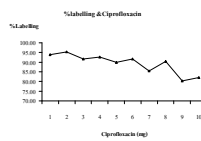


Fig. 2 Effect of ciprofloxacin quantity on % labeling

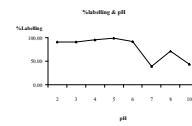


Fig 3. Effect of pH on % labeling

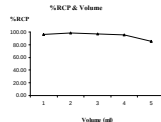


Fig. 4 Effect of volume on % RCP

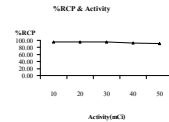


Fig. 5 Effect of activity on % RCP

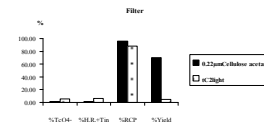


Fig. 6 Effect of filter on % RCP

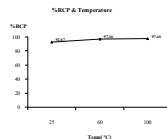


Fig. 7 Effect of temperature on % RCP

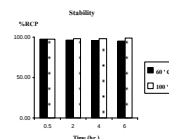


Fig. 8 Stability of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin

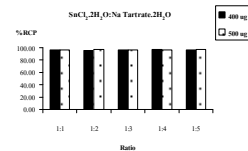


Fig. 9 Effect of mole ratio on % RCP

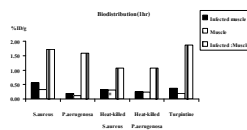


Fig. 10 Biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin in mice after injection 1 and 3 hr

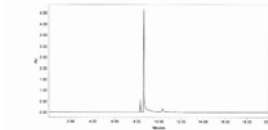


Fig. 11 HPLC of ciprofloxacin

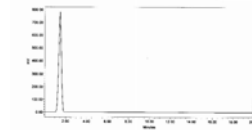


Fig. 12 HPLC of $^{99\text{m}}\text{Tc}$

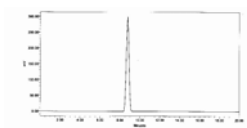


Fig. 13 HPLC of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin

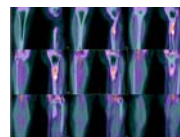


Fig. 14 Image of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin in chronic osteomyelitis at left tibia.

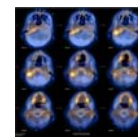


Fig. 15 Image of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin in left ear

การเตรียม $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์การติดฉลาก (% labeling) มากกว่า 90 % จะต้องใช้ ciprofloxacin ในช่วง 1-6 mg ใช้ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ในช่วง 30-60 μg และค่า pH อยู่ในช่วง 4 – 5 (Fig. 2 Fig. 1 และ Fig. 3 ตามลำดับ) ค่าความแรงรังสีและปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin มีค่าในช่วง 10 – 30 mCi และ 1 – 4 ml (Fig. 5 และ Fig. 4) ตามลำดับ อุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เหมาะสำหรับการเตรียม $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin เพราะให้ความคงตัวตลอดช่วงเวลา 6

ชั่วโมง (Fig. 8) filter ที่ใช้ในการกรอง ^{99m}Tc -ciprofloxacin ที่ให้ % RCP ≥ 95 % และให้ % yield ประมาณ 70 % คือ 0.22 μm cellulose acetate (Fig. 6) และ lyophilized kit of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (400,500 μg) : Na-tartrate ที่อัตราส่วนโมล 1 : 5 ให้ % RCP ≥ 95 % และสามารถนำมาใช้เตรียม ^{99m}Tc -ciprofloxacin ได้ง่ายและสะดวกกว่าการใช้ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution ที่ต้องเตรียมใหม่เสมอระหว่างการเตรียมสารดังกล่าว ทำให้ลดระยะเวลาการเตรียมและผลการได้รับรังสีที่น้อยลง

ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ciprofloxacin, TcO_4^- และ ^{99m}Tc -ciprofloxacin มีค่า retention time = 8.8, 1.3 – 1.6 และ 8.3 – 8.8 min ตามลำดับ (Fig. 11-13) และการกระจายตัวของ ^{99m}Tc -ciprofloxacin พบว่า อัตราส่วนของ infected muscle มีค่า 1.5 – 2.5 เท่าของ normal muscle สำหรับการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อเป็นของแบคทีเรีย ในขณะที่เชื้อตายของแบคทีเรีย พบว่า อัตราส่วนของ infected muscle มีค่าเท่ากับ normal muscle ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ^{99m}Tc -ciprofloxacin สามารถนำมาใช้วินิจฉัยการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อเป็นของแบคทีเรียเท่านั้น

ในขณะที่การอักเสบเนื่องมาจากน้ำมันสน ซึ่งใช้เป็นตัวแทนสิ่งที่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อ ให้ผลเช่นเดียวกับเชื้อเป็นแบคทีเรีย กล่าวคือ ผลการกระจายตัวของ ^{99m}Tc -ciprofloxacin ที่ infected muscle มีค่า 1.5 – 2.5 เท่าของ normal muscle ซึ่งหมายความว่า ^{99m}Tc -ciprofloxacin สามารถนำมาใช้วินิจฉัยการอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อได้เช่นเดียวกัน (Fig. 10)

4. สรุป

^{99m}Tc -ciprofloxacin ที่เตรียมได้ มีลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่มีสี เป็นยาฉีดปลอดเชื้อ ปราศจากไพโรเจนและปลอดพิษ มีความเป็นกรด-เบส (pH) = 4 – 5 ความแรงรังสี = 10 mCi/dose ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี ≥ 95 % ที่อุณหภูมิห้อง ความคงตัว = 6 ชั่วโมง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณสุชาดา พงษ์พัฒน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิทยาศาสตร์นิวเคลียร์ กลุ่มวิจัยพัฒนาสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ ที่เอื้อเพื่อเชื้อแบคทีเรียสำหรับงานวิจัย และ รศ. พญ.ภาวณา ภูสุวรรณ แผนกเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลศิริราชที่เอื้อเพื่อภาพการวินิจฉัย

5. เอกสารอ้างอิง

1. Siaens, R.H., et al., 2004. Synthesis and comparison of ^{99m}Tc -enrofloxacin and ^{99m}Tc -ciprofloxacin. J. Nucl. Med. 45, 2088-2094.
2. Vinjamuri, S., Hall, A.V., Solanki, K.K., et al., 1996. Comparison of ^{99m}Tc Infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. Lancet 347, 233–235.
3. Britton, K.E., Vinjurami, S., 1997. Clinical evaluation of technetium-99m Infecton for the localisation of bacterial infection. Eur. J. Nucl. Med. 24, 553–556.
4. Larikka, M.J., Ahonen, A.K., Britton, K.E., 2002. ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. Nucl. Med. Commun. 23, 167–170.
5. Britton, K.E., Wareham, D.W., Das, S., et al., 2002. Imaging bacterial infection with ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton). J. Clin. Pathol. 55, 817–823.
6. Kleisner, I., Komarek, P., Komarkova, I., Konopkova, M., 2002. A new technique of ^{99m}Tc -ciprofloxacin kit preparation. Nuklearmedizin 41, 224–229.
7. Sarda, L., Saleh-Mghir, A., Peker, C., Meulemans, A., Crémieux, A.C., Le Guludec, D., 2002. Evaluation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. J. Nucl. Med. 43, 239–245.
8. Kit for preparation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin. Preparation of kits for ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. International Atomic Energy Agency, 2007, pp.129-131.
9. USP 30, USP/NF 2007. vol.2. pp.1755-1756.