

การเตรียมเภสัชรังสี ^{99m}Tc -Hynic TOC สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก

นิภาวรรณ ปรมัติกุล^{1*} จตุพล แสงสุริยัน² วิราณี ศรีเวียง¹ นภารัตน์ มินสาคร² ทิพนันท์ งามประหยัด²
สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ³ และ เฉลิมสิน เพ็ญเต็มสิน³

¹กลุ่มงานวิจัยและพัฒนา สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ

²ศูนย์ไอโซโทปรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ ³สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

โทร. 5795230 ต่อ 5813 e-mail: pomnipa@yahoo.com

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาวิธีการเตรียมเภสัชรังสี ^{99m}Tc -Hynic TOC ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกของระบบประสาทต่อมไร้ท่อ ทำการติดฉลาก ^{99m}Tc เข้ากับ Hynic-TOC โดยมี EDDA/Tricine เป็นลิแกนด์ตัวร่วม บ่มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที สารที่ติดฉลากได้มีร้อยละของการติดฉลากมากกว่า 90 และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จะมีร้อยละของความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่า 95 มีความคงตัวมากกว่า 24 ชั่วโมง สารที่เตรียมได้ปลอดเชื้อ และปราศจากสารก่อไข่ การกระจายตัวของเภสัชรังสีในสัตว์ทดลองที่ได้รับปลูกเซลล์เนื้องอกชนิดที่เกิดในตับอ่อนหนู (AR42J) พบการกระจายตัวในเนื้องอกสูงที่ 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้เภสัชรังสี อัตราส่วนการจับตัวของ ^{99m}Tc -Hynic TOC ที่ก้อนเนื้องอกสูงสุดประมาณ 400 เท่าของที่บริเวณกล้ามเนื้อปกติ

คำสำคัญ: เภสัชรังสี เทคนิคเขม-99เอ็ม เนื้องอก เพพไทด์

Preparation of ^{99m}Tc -Hynic TOC for Clinical Diagnosis

Nipavan Poramatikul^{1*}, Jatupol Sangsuriyan², Wiranee Sriweing¹, Napharat Minsakorn²,
Tippanan Ngamprayad², Surasak Laloknam³ and Chalerm sin Permtersin³

¹Research and Development Group, Thailand Institute of Nuclear Technology

² Radioisotope Center, Thailand Institute of Nuclear Technology, ³Office of Atoms for Peace

Tel. 5795230 ext 5813 e-mail: pomnipa@yahoo.com

Abstract

Labeling of ^{99m}Tc -Hynic TOC for diagnosis of neuroendocrine tumor was studied. It was found that labeling yield of the prepared product was more than 90%. The purified product is sterile, free from pyrogen and has more than 95% radiochemical purity. More over it was stable up to 24 hours. Biodistribution study of AR42J induced mice showed high uptake in tumor at 2 and 4 hours post injection. Maximum uptake of tumor was about 400 to normal tissue.

Key word: radiopharmaceuticals, ^{99m}Tc -Hynic TOC, peptide, tumor

1. บทนำ

โซมาโตสแตติน เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว เรียงต่อตัวในลักษณะเป็นวง เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในร่างกายมีคุณสมบัติในการควบคุมการหลั่งโซมาโตโทรปินซึ่งเป็น growth hormone ได้มีการพิสูจน์แล้วว่าในเซลล์เนื้องอกของระบบประสาทและต่อมไร้ท่อมีตัวรับของโซมาโตสแตตินอยู่เป็นจำนวนมาก^{1,2,3} จึงมีความพยายามที่จะนำโซมาโตสแตตินมาเตรียมเป็นเภสัชภัณฑ์สำหรับการวินิจฉัยเนื้องอกของระบบประสาทและต่อมไร้ท่อ แต่ข้อจำกัดอยู่ที่มันเป็นสารที่มีในร่างกายนั่นเองเมื่อเข้าสู่ร่างกายจึงถูกเมตาโบไลต์ได้โดยเอ็นไซม์ ทำให้มีรูปแบบผิดไปจนไม่สามารถจับกับตัวรับที่อวัยวะเป้าหมาย จึงมีความพยายามที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของมันขึ้นมาใช้แทน โดยให้ยังคงมีหมู่กรดอะมิโนที่สำคัญที่จะทำให้คุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนเดิมแต่มีความคงตัวในร่างกายดีขึ้น ในบรรดาสารที่ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นออกทรีโอไทด์ (Octreotide) เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ตัวเรียงกันเป็นวงในลักษณะคล้ายกับโซมาโตสแตตินได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการนำมาเตรียมเป็นเภสัชภัณฑ์ เพื่อการวินิจฉัยเนื้องอกทดแทนโซมาโตสแตติน

มีการนำสารกัมมันตรังสีหลายชนิดเช่น I-125, I-131 และ In-111 มาติดฉลากกับออกทรีโอไทด์ เพื่อเป็นสารติดตามการเคลื่อนตัวของออกทรีโอไทด์ในร่างกาย ในบรรดาสารติดตามทั้งหลายที่ใช้กันในงานเวชศาสตร์นิวเคลียร์ เทคนิเทียม-99เอ็ม (Tc-99m) เป็นเภสัชรังสีที่มีคุณสมบัติดีที่สุด⁴ สำหรับการตรวจติดตามการทำงานของร่างกาย ด้วยรังสีแกมมาพลังงาน 140 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์ ครึ่งชีวิต 6 ชั่วโมง จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการติดฉลากเทคนิเทียมเข้ากับออกทรีโอไทด์ซึ่งพบว่าจะต้องมีตัวช่วย คือ จะต้องติดฉลากผ่านลิแกนด์ โดยให้แขนด้านหนึ่งของลิแกนด์จับกับเพปไทด์และแขนอีกด้านที่เหลือจับกับเทคนิเทียม จึงจะได้เภสัชรังสีของเทคนิเทียมออกทรีโอไทด์ที่มีร้อยละของการติดฉลากสูง และมีความคงตัวดี ลิแกนด์ที่สามารถจับกับทั้งออกทรีโอไทด์และเทคนิเทียม-99 เอ็มได้ดี คือ Hynic (Hydrazino-pyridine-3-carboxylic acid)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมเภสัชรังสี ^{99m}Tc-Hynic-Tyr³-Octreotide (^{99m}Tc - Hynic-TOC) ที่สามารถเตรียมได้สะดวก ให้ผลในการติดฉลากดีที่สุด มีความคงตัวดี มีอายุการเก็บนาน มีความปลอดภัยและปราศจากสารก่อมะเร็ง เหมาะสมที่จะใช้งานทางคลินิก เพื่อให้คณะแพทย์ผู้ร่วมโครงการทำการทดสอบผลการใช้ทางคลินิก หากเป็นผลสำเร็จจะทำการผลิตเพื่อให้บริการต่อไป

2. วิธีการ

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ ได้รับการอบ/นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางคลินิก

2.1. การเตรียมเภสัชรังสี ^{99m}Tc -HYNIC-TOC

2.1.1 แบบที่หนึ่ง เป็นเภสัชรังสีสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วย

ขวดที่ 1 มีส่วนผสมดังนี้ Hynic-TOC (25 ไมโครกรัม) Ethylene diamine diacetic acid (EDDA, 10 มิลลิกรัม) Tricine (20 มิลลิกรัม) Mannitol (50 มิลลิกรัม) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 ไมโครกรัม) อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilization)

ขวดที่ 2 สารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 35.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การติดฉลากกับเทคนิคเข็ม

- ละลายสารในขวดที่สอง (0.5 มิลลิลิตร) ด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.5 มิลลิลิตร) แล้วนำสารละลายไปเติมลงในสารขวดที่หนึ่ง เขย่าให้เข้ากัน

- เติมสารละลายโซเดียมเปอร์เทคนิคิเตรต ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) ความแรงรังสี 25 มิลลิวูรี/1 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน

- นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.1.2 แบบที่สอง มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับแบบที่หนึ่ง เว้นแต่ในขวดที่หนึ่งไม่ได้ใส่ Hynic-TOC

การติดฉลากกับเทคนิคเข็ม

- ละลายสารในขวดที่สอง (0.5 มิลลิลิตร) ด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.5 มิลลิลิตร) แล้วนำสารละลายไปเติมลงในสารขวดที่หนึ่ง เขย่าให้เข้ากัน

- เติมสารละลาย Hynic-TOC (25 ไมโครกรัม/ 25 ไมโครลิตรของสารละลายเอทานอลในน้ำความเข้มข้นร้อยละ 10)

- เติมสารละลายโซเดียมเปอร์เทคนิคิเตรต ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) ความแรงรังสี 25 มิลลิวูรี/1 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน

- นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.1.3 แบบที่สาม เป็นเภสัชรังสีสำเร็จรูป ที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับแบบที่หนึ่ง เว้นแต่ในสารขวดที่หนึ่งไม่ได้ใส่ Hynic-TOC และ สารละลาย $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

การติดฉลากกับเทคนิคเข็ม

- ใช้กระบอกฉีดยา (ขนาด 1 มิลลิลิตร) ดูดละลายสารในขวดที่สอง (0.5 มิลลิลิตร) และสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.5 มิลลิลิตร) เขย่าให้ผสมเข้ากัน แล้วนำสารละลายไปเติมลงในสารขวดที่หนึ่ง

- เติมสารละลายโซเดียมเปอร์เทคนิคิเตรต ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) ความแรงรังสี 25 มิลลิวูรี/1 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน

- เติม Hynic-TOC (25 ไมโครกรัม) แล้วตามด้วยสารละลาย $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 ไมโครกรัมใน 12.5 ไมโครลิตรของสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) ที่เตรียมใหม่ๆ

- นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.1.4 แบบที่สี่ เป็นสารละลายที่ถูกทำให้อยู่ในรูปผงแห้งดังนี้

ขวดที่ 1 สารละลายซึ่งประกอบด้วย tricine (15 มิลลิกรัม) Hynic-TOC (20 มิลลิกรัม) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 ไมโครกรัมใน 10 ไมโครลิตรของสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์)

ขวดที่ 2 สารละลาย Ethylene diamine diacetic acid (EDDA, 50 มิลลิกรัม) ในน้ำ (0.5 มิลลิตร) ซึ่งได้รับการปรับค่า pH เป็น 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การติดฉลากกับเทคนิคเข็ม

- ละลายสารในขวดที่สองด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (0.5 มิลลิตร) แล้วนำสารละลายทั้งหมดไปเติมลงในสารขวดที่หนึ่ง ปั่นให้ทำปฏิกิริยา 15 นาที

- เติมสารละลายโซเดียมเปอร์เทคนิคเรต ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) ความแรงรังสี 25 มิลลิคูรี 0.5 มิลลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน

- นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

ทำการแยกสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออกด้วย SepPak Light C-18 cartridge ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.2.1 การปรับสภาพของ cartridge โดยการใช้หลอดฉีดยาอัลเทรูลอัลกอซอลต์ (ความเข้มข้นร้อยละ 95) ประมาณ 10 มิลลิตร แล้วตามด้วย 0.09% NaCl 10 มิลลิตร

2.2.2 ผ่านสารตัวอย่างลงใน SepPak cartridge พร้อมทั้งเก็บของเหลวที่ผ่านออกมาไว้ในขวดขนาด 10 มิลลิตร (ขวด ก)

2.2.3 จะสิ่งปนเปื้อนที่ติดค้างบน cartridge ด้วยน้ำเกลือ ปริมาตร 5 มิลลิตร เก็บของเหลวที่ผ่านออกมา รวมไว้ใน ขวด ก

2.2.4 จะ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hynic-TOC ออกจาก cartridge ด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 0.5 มิลลิตร เก็บลงในขวดขนาด 10 มิลลิตร (ขวด ข)

2.2.5 ล้างสารที่ยังติดค้างใน cartridge ออก ด้วยน้ำเกลือประมาณ 5 มิลลิตร เก็บสารที่ผ่านออกมา รวมไว้ในขวด ข

2.2.6 เก็บ SepPak cartridge ไว้ในภาชนะที่เหมาะสม (ขวด ค) สำหรับนำไปใช้คำนวณร้อยละของการติดฉลาก

2.3 การตรวจสอบคุณภาพ

นำเภสัชภัณฑ์ที่เตรียมมาทำการตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.3.1 การตรวจสอบร้อยละของการติดฉลาก และความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี

นำเภสัชภัณฑ์ที่เตรียมได้ตามข้อ 2.1 มาทำการตรวจสอบร้อยละของการติดฉลากซึ่งรวมถึงค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วย และสารที่เตรียมได้ในข้อ 2.2 มาตรวจสอบค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี ดังนี้

2.3.1.1 Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) โดยใช้แผ่น ITLC ชนิด Silica gel ขนาด 1 ซม. x 10 ซม. เป็นตัวยึดจับสาร (stationary phase) และตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เอทิลเมทิลคีโตน (ethyl-methyl ketone, MEK) สารละลายโซเดียมซิติเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลายผสมระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 โมลาร์ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวแยกสาร (mobile phase)

การคำนวณ

I. ร้อยละของโซเดียมเปอร์เทคนิเตรตและ โคลิแกนค์

= คำนับวัดที่ Rf 1 ของแผ่น TLC ที่ชะด้วย สารละลายโซเดียมซิติเรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

II. ร้อยละของเทคนิคิเทียมคอลลอยด์

= คำนับวัดที่ Rf 0 ของแผ่น TLC ที่ชะด้วย สารละลายผสมระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 โมลาร์ในอัตราส่วน 1:1

III. ร้อยละของความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี = $100 - I - II$

2.3.1.2 High performance liquid chromatography (HPLC) ด้วย คอลัมน์ชนิด Reverse phase C-18, 0.5 ไมโครเมตร, ขนาดคอลัมน์ 4.5 mm x 25 mm ทำการชะแบบเกรเดียนต์โดยแปรเปลี่ยนส่วนผสมระหว่าง สารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติกในน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (A) กับอะซิโตนไตริล (B) ดังนี้ 0-3 นาที 0%B ที่ 5-18 นาที 30% (B) ที่ 22-24 นาที 50% (B) และที่ 25-30 นาที 0%B ตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งตรวจวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา เทคนิคิเทียมโคลิแกนค์จะถูกชะออกที่เวลา 3.8 นาที เทคนิคิเทียมเปอร์เทคนิเตรตจะถูกชะออกที่เวลา 4.1 นาที และ เทคนิคิเทียมเพฟไทด์จะถูกชะออกที่เวลา 10.5 นาที

2.3.1.3 SepPak cartridge

ทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับที่ทำในข้อ 2.2 จากนั้นนำขวดบรรจุสารปนเปื้อน ขวดบรรจุ ^{99m}Tc -Hynic-TOC และขวดบรรจุ SepPak ที่ใช้ มานับวัดความแรงรังสี แล้วคำนวณค่าร้อยละการติดฉลากของสารที่เตรียมได้ (เฉพาะสารตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์) /หรือร้อยละความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี (ของทั้งสารที่เตรียมได้และสารที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว) ตามสูตรข้างล่าง

$$\text{ร้อยละของการติดเชื้อ} = \frac{\text{ความแรงรังสีของสารในขวด ข} \times 100}{\text{ความแรงรังสีของสารในขวด ก ข และ รวมกัน}}$$

2.3.2 การตรวจสอบความคงตัวของ ^{99m}Tc -Hynic-TOC หลังการติดเชื้อ

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc -Hynic-TOC ด้วยวิธี ITLC และ/หรือ HPLC ที่ช่วงเวลาต่างๆ หลังการติดเชื้อ

2.3.3 การกระจายตัวของเกสรังสีในร่างกายสัตว์ทดลอง

ฉีด ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยให้มีความแรงรังสีประมาณ 100 ไมโครคูรี เข้าเส้นเลือดดำที่บริเวณหางของสัตว์ทดลอง ปล่อยให้เกสรังสีกระจายตัวในร่างกายเป็นเวลา 1 2 4 และ 24 ชั่วโมง จึงทำให้ตายโดยการรมด้วยไดเอทิลอีเธอร์ ผ่าตัดเก็บแยกอวัยวะต่างๆ แล้ว นับวัดปริมาณรังสีที่มีอยู่ในแต่ละอวัยวะด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา คำนวณหาร้อยละของเกสรังสีที่มีในอวัยวะนั้นๆ ชนิดของสัตว์ทดลองที่นำมาทดสอบ ได้แก่

- หนูไร้ขน (nude mice) ที่ได้รับการปลูกเซลล์เนื้องอกจำนวน 5×10^6 เซลล์ เข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาขวา แล้วเลี้ยงจนก้อนเนื้องอกมีขนาด 5-10 มิลลิเมตร เซลล์ที่ศึกษาได้แก่ เซลล์เนื้องอกตับอ่อน (AR42J) และ เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW20)

- หนูไร้ขนปกติ (normal nude mice)

- หนู (Swiss Albino mice) ปกติ

2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติในการใช้งานทางคลินิก

2.4.1 การตรวจสอบความปลอดภัยและปลอดจากสารก่อไข่

นำ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ทั้งชนิดที่เตรียมในห้องปฏิบัติการทั่วไป เตรียมภายใต้ laminar flow cabinet และเตรียมในห้องปลอดเชื้อภายใต้ laminar flow cabinet พร้อมทั้ง เครื่องแก้ว อุปกรณ์ สารละลาย และ เกสรังสีที่เตรียม ไปทำการตรวจสอบความปลอดภัยโดยวิธี Direct Inoculation⁶ และการปลอดจากสารก่อไข่ใช้วิธี Bacterial endotoxin test⁷

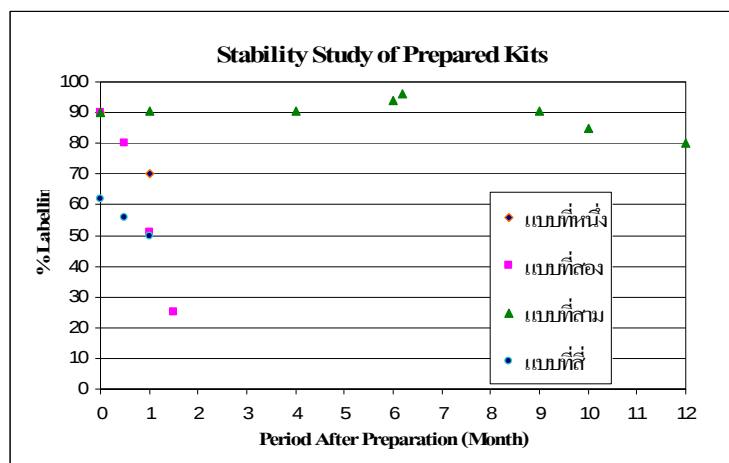
สำหรับความปลอดภัยนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด ได้แก่ ฟลูอิดไทโอไกลิโคเลต (Fluid Thioglycolate) และ ทริปติกชอยบรอต (Tryptic Soy Broth) นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 และ 20-25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่วนการตรวจสอบสารก่อไข่ เดิม ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ลงในชุดทดสอบ Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) หากตัวอย่างกลายเป็นเจล หลังการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแสดงว่ามีสารก่อไข่ปนเปื้อน

2.4.2 ความเป็นพิษของ HYNIC-TOC

ฉีดสารละลาย HYNIC-TOC 0.9 มิลลิกรัมเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง Albino Mice
น้ำหนักตัวประมาณ 25 กรัม สังเกตอาการของสัตว์ทดลองหลังการฉีด และเลี้ยงสัตว์ทดลองต่อ
พร้อมทั้งสังเกตอาการ ว่ายังคงปกติหรือไม่

3. ผลการทดลอง (Results)

3.1 ความคงตัวของเภสัชรกัณฑ์



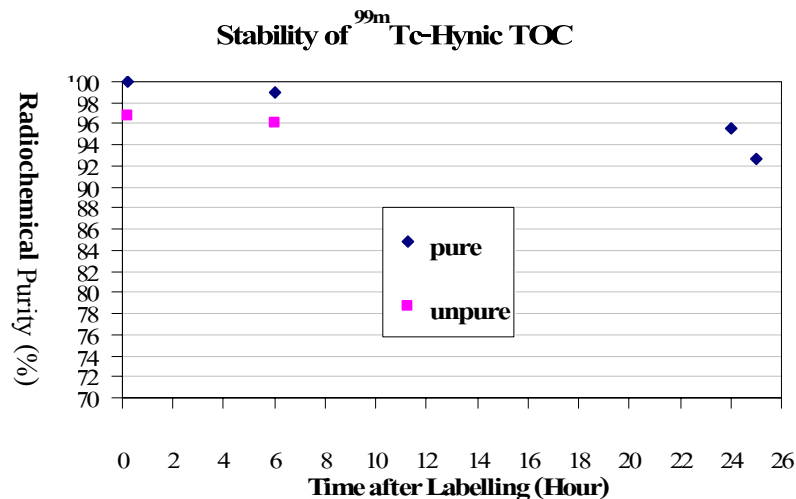
ภาพที่ 1 แสดงความสัมพัทธ์ของร้อยละการติดฉลากต่อเวลาหลังการผลิตของเภสัชรกัณฑ์ทั้งสี่แบบ

จากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่า ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ที่เตรียมตามแบบที่หนึ่ง สอง และ สี่ มีความคงตัวต่ำร้อยละของการติดฉลากลดลงแม้เมื่อเก็บไว้เพียงไม่ถึงหนึ่งเดือนหลังการผลิตเภสัชรกัณฑ์ ขณะที่สารที่เตรียมตามแบบที่สามให้ค่าร้อยละของการติดฉลากมากกว่าหรือเท่ากับ 90 ตลอดอายุช่วงการเก็บ 9 เดือน ทั้งนี้เนื่องจาก SnCl_2 เป็นตัวรีดิวซ์ให้ Tc มีเลขออกซิเดชันที่เหมาะสมกับการเกาะติดกับสาร เมื่อเก็บไว้คุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์จะลดลงตามเวลาและสภาพแวดล้อม จากการทดลองนำเภสัชรกัณฑ์ที่เตรียมแบบที่หนึ่งและสอง (ที่เสื่อมประสิทธิภาพแล้ว) มาเติม SnCl_2 ก่อนการติดฉลาก พบว่าร้อยละของการติดฉลากสูงขึ้น แต่หากเพิ่มปริมาณ SnCl_2 ในสูตรการเตรียมดังเช่นในสูตรที่สี่ จะทำให้อัตราการติดฉลากลดลงเช่นกัน เนื่องจากเกิดสารปนเปื้อนชนิด TcO_2 เพิ่มขึ้น

3.2 ความคงตัวของ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC

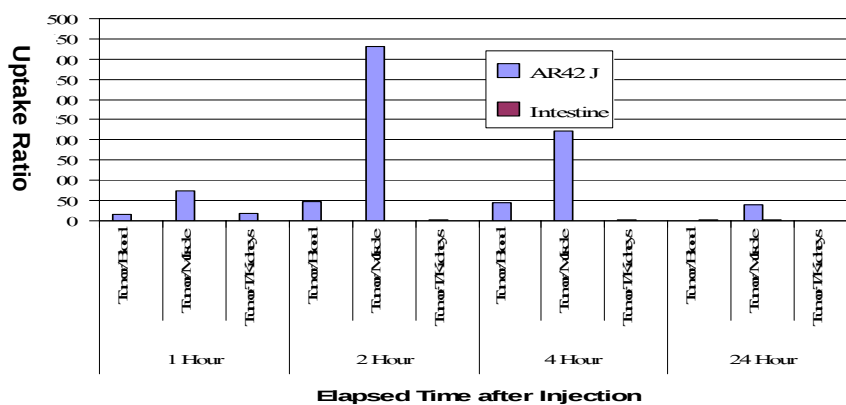
ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ที่เตรียมตามสูตรแบบที่สาม ทั้งชนิดที่ไม่ได้รับการแยกสารปนเปื้อนและชนิดที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย SepPak ปรากฏว่ามีความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่าร้อยละ 90 เป็นเวลานานกว่า 6 ชั่วโมง ตรงตามรายละเอียดของข้อกำหนดการนำไปใช้ในผู้ป่วย สำหรับสารที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า

มีความคงตัวดีแม้จะเก็บไว้เป็นเวลานานกว่า 24 ชั่วโมง ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี ยังคงมากกว่าร้อยละเก้าสิบ



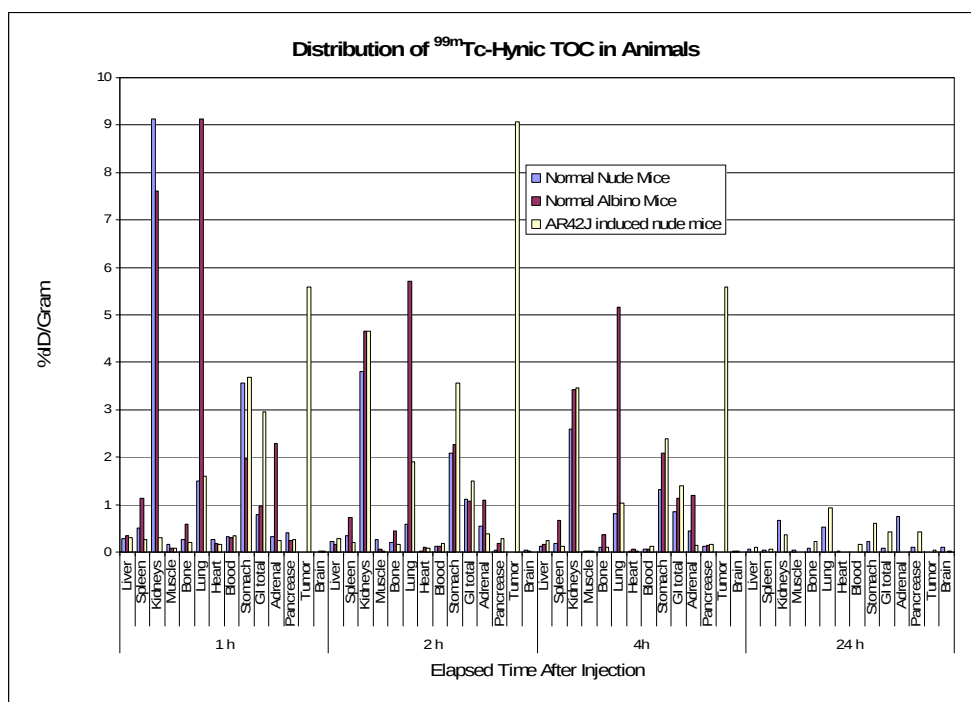
ภาพที่ 2 ร้อยละของความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ที่เตรียมโดยเภสัชภัณฑ์แบบที่สาม ที่เวลาต่างๆ หลังการติดฉลาก ทั้งชนิดที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (pure) และชนิดที่ไม่ได้ผ่านการแยกสารปนเปื้อน (unpure)

3.3 การกระจายตัวของ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ในสัตว์ทดลอง



ภาพที่3 อัตราส่วนของ ^{99m}Tc -Hynic TOC ที่บริเวณเนื้อเป้าหมายต่อเลือด ต่อกล้ามเนื้อ และต่อไต ที่เวลาต่างๆ หลังการฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ

ผลการศึกษาการกระจายตัวในหนูไขนที่ได้รับการปลูกเซลล์ AR42J พบว่าปริมาณ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ในก้อนเนื้องอก มีอัตราส่วนของปริมาณรังสีที่เซลล์เนื้องอก/กล้ามเนื้อสูงมาก ที่เวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่3 ขณะที่ในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายมะเร็งลำไส้มีการกระจายตัวของสารสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายต่ำมาก และอัตราส่วนของปริมาณรังสีที่เซลล์เนื้องอก ต่อเลือด ต่อกล้ามเนื้อ และต่อไต ต่ำกว่า ในหนูที่ได้รับการปลูกเซลล์ AR42J ที่ทุกเวลาที่เลือกทำการทดลอง



ภาพที่ 4 ร้อยละของเภสัชรังสีต่อกรัมของอวัยวะต่างๆ ที่ 1 2 4 และ 24 ชั่วโมงหลังการฉีดเข้าสู่ร่างกาย

จากผลที่แสดงในภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่าสัตว์ทดลองปกติจะมีปริมาณรังสีที่ได้สูงที่เวลา 1 ชั่วโมง และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป จนถึง 24 ชั่วโมงจะเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกเซลล์เนื้องอกจะมีปริมาณรังสีในก้อนเนื้องอกสูงกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยมีปริมาณสูงสุดที่ 2 ชั่วโมง และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 4 ถึง 24 ชั่วโมง

3.4 ความปลอดภัยและปราศจากสารก่อไข่

จากการทดสอบความปลอดภัยของ อุปกรณ์ สารละลาย เภสัชภัณฑ์ ที่ใช้เตรียม และ ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ทุกตัวอย่างที่ทดสอบไม่พบเชื้อในอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด และ ไม่มีการเกิดเป็นเจลในตัวอย่าง ^{99m}Tc -HYNIC-TOC ที่นำมาทดสอบด้วย LAL แสดงว่าวิธีการเตรียมที่ใช้ในการทดลองนี้ จะทำให้ได้เภสัชรังสีที่ปราศจากแบคทีเรีย ทั้งชนิด aerobic และ anaerobic รวมทั้ง เชื้อรา และ สารก่อไข่

4. สรุป (Conclusion)

เภสัชภัณฑ์ที่เตรียมตามแบบที่สามมีอายุการเก็บดีที่สุดคือประมาณ 9 เดือน เภสัชรังสีที่เตรียมได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องมากกว่า 6 ชั่วโมง ในการทดสอบการกระจายตัวในสัตว์ทดลองพบปริมาณรังสีที่กล้ามเนื้อของสัตว์ทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกเนื้องอกมีค่าต่ำมากและใกล้เคียงกับกล้ามเนื้อปกติของสัตว์ที่ได้รับการปลูกเนื้องอก แสดงว่า ^{99m}Tc -Hynic TOC ไม่จับตัว

กับเนื้อเยื่อปกติ และไม่จับกับเซลล์มะเร็งลำไส้ นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้องอกยังมีอัตราการจับตัวที่เซลล์เนื้องอกต่อเลือด และ ต่อม้ามเนื้อ สูง ดังนั้นหากนำไปทำภาพถ่ายรังสีในผู้ป่วย จะสามารถบ่งบอกบริเวณที่เป็นเนื้องอกได้อย่างชัดเจน

ในส่วนของการตรวจคุณสมบัติในการนำไปใช้ทางคลินิกของ ^{99m}Tc -Hynic TOC พบว่าสารที่เตรียมได้มีความปลอดภัย ปราศจากสารก่อไข่ แม้จะทำการเตรียมโดยอาศัยหลักป้องกันเชื้อในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่ได้มีการควบคุมเป็นพิเศษ หรือ การเตรียมภายใต้ laminar flow cabinet หรือแม้การเตรียมในห้องปลอดเชื้อภายใต้ laminar flow cabinet แสดงว่าวิธีการที่ใช้มีความเหมาะสมสำหรับการเตรียมยาเพื่อใช้ในผู้ป่วย แต่ควรเตรียมในห้องปลอดเชื้อภายใต้ laminar flow cabinet เพื่อความมั่นใจในการผลิตตามหลักเกณฑ์ที่ดี (GMP) ของการเตรียมยาปราศจากเชื้อ เมื่อทดลองหาความเป็นพิษของ Hynic-TOC โดยการฉีดเข้าสารเข้าร่างกายสัตว์ทดลองประมาณ 100 เท่าของปริมาณที่จะใช้กับผู้ป่วย (เทียบอัตราส่วนตามน้ำหนักตัว) แล้วเลี้ยงสัตว์ทดลองต่อตามปกติ ไม่พบอาการผิดปกติในสัตว์ทดลอง แสดงว่าความเป็นพิษของเภสัชรังสีมีน้อยมาก

เภสัชรังสี ^{99m}Tc -Hynic TOC ที่เตรียมได้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้กับผู้ป่วย ในการวินิจฉัยเนื้องอกของต่อมไร้ท่อ

5. เอกสารอ้างอิง

1. E Kouroumalis, P Skordilis, K Thermo, et.al, 1998. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomized controlled study, Gut 42, 442-447.
2. W H.Bakker, E P.Kenning, W A.Breeman, et.al. , 1990. Receptor scintigraphy with radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals, J.Nucl.Med. 31, 1501-1509.
3. J Fitchna and A Janecka, 2003. Synthesis of target specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. Bioconjugate Chem. 14, 3-17.
4. S Pervez, A Mustaq and M Arif, 2001. Technetium-99m direct radiolabeling of lanreotide: a somatostatin analog, Applied Radiation and Isotopes .55, 647-651
5. S Liu and D. Scott Edwards, 1999. ^{99m}Tc -Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals, Chem. Rev., 99, 2237
6. The United State Pharmacopeia, 2007, Sterility test, USP 30, I, 97.
7. The United State Pharmacopeia, 2007, Bacterial endotoxin test, USP 30, I, 109.