

การศึกษาปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของไอออนเชิงซ้อนบิส-(เอ็น-(2,6-ไดเมทิล
เฟนิลคาร์บาโมอิลเมทิล) อิมมิโนไดอะซิโต) เทคนีเทต(III) กับยาต้านมะเร็งบริโอไมซิน

Study of Ligand Exchange Reaction of Bis-(N-(2,6-Dimethylphenyl
Carbamoylmethyl)Iminodiaceto) Technetate (III) Complex Ion
with Anticancer Drug Bleomycin

ขจัดภัย ทิพยพงษ์ และ ณัฐวิศิษฐ์ ยะสารวรรณ

Khajadpai Thipyapong and Nuttawisit Yasarawan

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 20 February 2017

Accepted : 18 April 2017

Published online : 11 May 2017

บทคัดย่อ

โมเลกุลของบริโอไมซิน (BIm) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็ง สามารถแทนที่ลิแกนด์เอ็น-2, 6 ไดเมทิลเฟนิลคาร์บาโมอิลเมทิลอิมมิโนอะซิติกแอซิด (HIDA) ที่จับอยู่กับเทคนีเทียม-99m (III) ไอออน เกิดเป็นไอออนเชิงซ้อนเทคนีเทียม-99 เอ็ม-บริโอไมซิน ($^{99m}\text{Tc-BIm}$) จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ระหว่างไอออนเชิงซ้อนบิส-(เอ็น-(2,6-ไดเมทิลเฟนิลคาร์บาโมอิลเมทิล) อิมมิโนไดอะซิโต) เทคนีเทต(III) กับ BIm ในสภาวะที่เป็นกรด ($\text{pH} < 3.0$) ที่อุณหภูมิ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ อัตราส่วนโมลของ HIDA : BIm เท่ากับ 1 : 1 เมื่อปรับ pH เป็น 7.4 ได้ $^{99m}\text{Tc-BIm}$ ที่มีความเสถียร โดยความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ $^{99m}\text{Tc-BIm}$ อยู่ในระดับที่สูงเกินกว่า 95% ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง ไอออนเชิงซ้อน $^{99m}\text{Tc-BIm}$ จึงอาจมีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารสร้างภาพเซลล์มะเร็งได้

คำสำคัญ : เทคนีเทียม-99เอ็ม บริโอไมซิน การแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ไอออนเชิงซ้อน สารสร้างภาพรังสี

*Corresponding author. E-mail : khajadpa@buu.ac.th

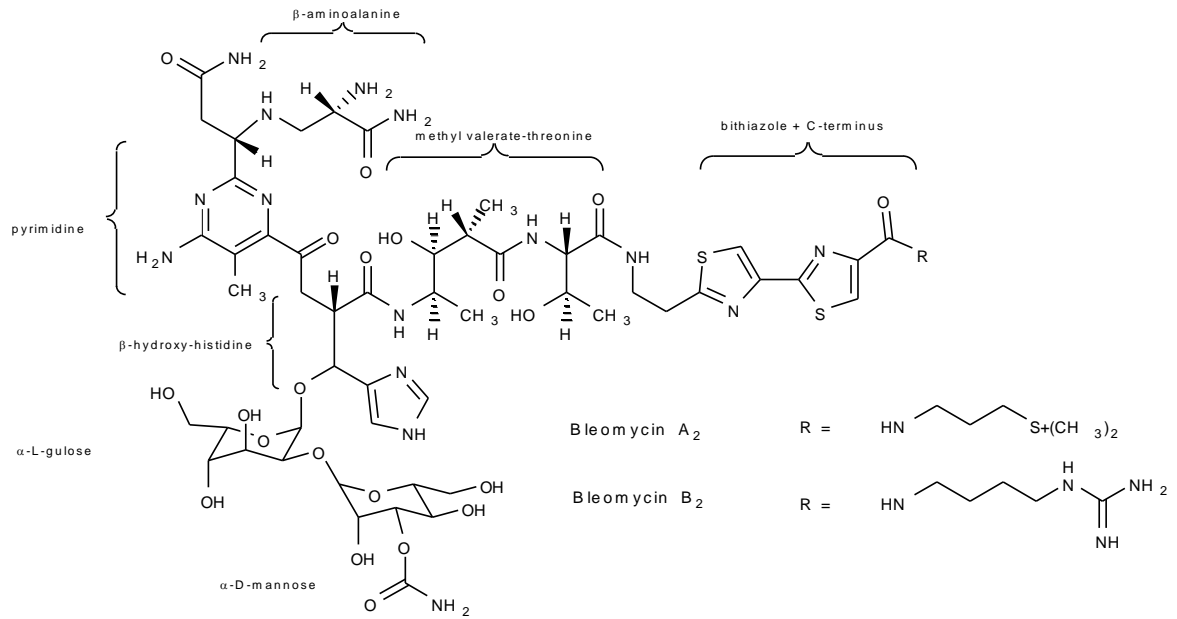
Abstract

A molecule of an anticancer drug such as bleomycin (Blm) could replace N-(2,6-dimethylphenylcarbamoyl methyl) iminodiacetic acid (HIDA) bound to technetium (III), yielding technetium-99m-bleomycin ($^{99m}\text{Tc-Blm}$) complex ion. The experimental results showed that a stable $^{99m}\text{Tc-Blm}$ could be prepared by the ligand exchange reaction between bis-(N-(2,6-dimethylphenylcarbamoylmethyl) iminodiaceto) technetate (III) ion and Blm under acidic condition ($\text{pH} < 3$) at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the HIDA : Blm mole ratio of 1 : 1. The radiochemical purity of $^{99m}\text{Tc-Blm}$ at $\text{pH} 7.4$ was found to remain higher than 95% within 3 hours, allowing this complex ion to be a potential candidate for use as a cancer imaging agent.

Keywords : Technetium-99m, Bleomycin, ligand Exchange, complex Ion, radio-imaging agent

บทนำ

บรีโอไมซิน (Bleomycin หรือ Blm) ถูกสกัดจากแบคทีเรีย *Streptomyces verticillus* เป็นครั้งแรกโดย Umezawa และคณะในปี ค.ศ. 1962 (Umezawa *et al.*, 1962) และมีการนำ Blm มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งอัมพา และมะเร็งคาร์ซิโนมาชนิดสความัส (Squamous cell carcinoma) ที่ศีรษะและลำคอ กันอย่างกว้างขวาง Blm มีฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งได้ (Chen *et al.*, 2016) สารประกอบ Blm มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างย่อยในโมเลกุล โดยโครงสร้างย่อยเกิดจากความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชัน ที่สำคัญคือตำแหน่งของกลุ่มไกลโคไซด์ ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ Blm 2 ชนิด ได้แก่ Blm ชนิด A2 และ B2 ที่เป็นส่วนผสมหลักของยาปฏิชีวนะบรีโอไมซินที่ใช้ในทางคลินิกเพื่อต้านมะเร็ง Blm มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้เมื่อรวมตัวกับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) แล้วเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อน อะตอมกลางที่เป็นไอออนของเหล็กนอกจากเชื่อมต่อกับ Blm แล้วยังเชื่อมต่อกับโมเลกุลของออกซิเจนด้วย ลักษณะคล้ายกับการขนส่งออกซิเจนในโมเลกุลของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Dabrowiak, 1980) ไอออนเชิงซ้อนของ Blm กับ Fe^{2+} ทำให้อะตอมไฮโดรเจนหลุดออกจาก C-4' ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสในดีเอ็นเอ แล้วทำให้เกิดการแตกของดีเอ็นเอสายคู่หรือสายเดี่ยวที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในโครโมโซมของเซลล์มะเร็ง และทำให้เซลล์มะเร็งตาย



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารผสมของ Blm A2 และ B2 ที่มีอยู่ในยาปฏิชีวนะบริโอไมซินที่ใช้เพื่อต้านมะเร็ง

นอกจากนี้พบว่า Blm เกิดเป็นไอออนเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะทรานสิชันที่มีเลขออกซิเดชันต่ำได้อีกหลายชนิด เช่น Fe(II), Fe(III), Co(II) และ Cu(II) (Stubbe *et al.*, 1987 และ Kosjek *et al.*, 2016) ก่อนหน้านี้ได้มีการนำเสน่วิธีการเตรียมไอออนเชิงซ้อนของ Blm จากไอโซโทปรังสีของโคบอลต์-57 (Raban *et al.*, 1979) เพื่อใช้เป็นสารสร้างภาพถ่ายรังสีของเซลล์มะเร็งที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งไปในตัว แต่เนื่องจากโคบอลต์-57 (⁵⁷Co) ให้พลังงานจากรังสีแกมมาหลายค่าเกินไป และมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวถึง 271.8 วัน ทำให้ผู้ป่วยได้รับรังสีนานจนอาจได้รับอันตรายจากรังสีได้

ไอโซโทปรังสีของเทคนิคเนียม-99เอ็ม (^{99m}Tc) เหมาะต่อการใช้สร้างภาพถ่ายรังสีมากกว่าโคบอลต์-57 เพราะสลายตัวให้รังสีแกมมาที่มีพลังงาน 141 keV เพียงค่าเดียว ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่ตรวจวัดได้ง่าย ไม่สูงหรือต่ำจนเกินไป นอกจากนี้เทคนิคเนียม-99เอ็มยังมีค่าครึ่งชีวิตเพียง 6 ชั่วโมง ซึ่งนานพอต่อการตรวจวัดรังสีแกมมาเพื่อสร้างภาพถ่ายรังสี แต่ก็ไม่นานจนกระทั่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย สารประกอบหลักของเทคนิคเนียมที่ใช้ในโรงพยาบาลอยู่ในรูปของเปอร์เทคนิคเตไอออน (TcO₄⁻) ที่มีเลขออกซิเดชันของเทคนิคเนียมเท่ากับ +7 ซึ่งไม่เหมาะต่อการเตรียมเป็นไอออนเชิงซ้อน การเตรียมไอออนเชิงซ้อนของเทคนิคเนียมในสมัยก่อนทำได้โดยวิธีดิซเปอร์เทคนิคเตไอออนด้วยสแตนนัสไอออน (Sn²⁺) โดยตรงในสารละลายที่มีลิแกนด์จำนวนมากเกินพอ เลขออกซิเดชันของเทคนิคเนียมในไอออนเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะมีค่าต่ำกว่า +7 และความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของไอออนเชิงซ้อนของเทคนิคเนียมที่ได้สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ก่อนหน้านี้ Mori และคณะได้ใช้วิธีเดียวกันนี้สังเคราะห์ไอออนเชิงซ้อนของเทคนิคเนียมกับ Blm (Mori *et al.*, 1975) แต่พบว่าภาพถ่ายรังสีที่ได้มีความไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้การเตรียมไอออนเชิงซ้อนของเทคนิคเนียมด้วยปฏิกิริยารีดักชันยังมีข้อเสียคือไม่อาจระบุเลขออกซิเดชันที่แน่นอนของไอออนเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นได้ ต่อมาจึงมีการเตรียมไอออนเชิงซ้อนของเทคนิคเนียมด้วยปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ซึ่งผลผลิตไอออนเชิงซ้อนที่เตรียมได้จะมีเลขออกซิเดชันเท่ากับไอออนเชิงซ้อนที่ใช้เป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ยังใช้ลิแกนด์ในปริมาณที่น้อยกว่าปฏิกิริยารีดักชัน จึงเป็นผลดีต่อการสร้างภาพถ่ายรังสี

และความปลอดภัยของผู้ป่วย หลังจากนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมไอออนเชิงซ้อนของเทคโนโลยีนี้เชื่อมกับ Blm ด้วยปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ระหว่าง Blm กับไอออนเชิงซ้อนเทคโนโลยีนี้เชื่อมกับกลูโคสโพรตีนที่มีเลขออกซิเดชันเท่ากับ +5 อย่างไรก็ตามภาพถ่ายรังสีที่ได้ยังมีคุณภาพไม่ดีขึ้น แม้ว่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของไอออนเชิงซ้อนที่ได้จะสูงมากก็ตาม (Yokoyama *et al.*, 1978., Horiuchi *et al.*, 1981) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอะตอมกลางของ Tc(V) ที่มีเลขออกซิเดชันสูงเมื่อเทียบกับไอออนของ Fe(II), Fe(III), Co(II) และ Cu(II) ที่มีเลขออกซิเดชันต่ำกว่า ทำให้มีประจุสุทธิบนขอบเขตโคออร์ดิเนชันมีค่าต่างกัน จึงเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ผ่านผนังเซลล์และสะสมในเซลล์มะเร็งได้น้อยลงทำให้ภาพถ่ายรังสีที่ไม่ชัดเจน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการเตรียมไอออนเชิงซ้อนเทคโนโลยีนี้เชื่อม-99เอ็ม-Blm เพื่อใช้เป็นสารสร้างภาพถ่ายรังสีในการติดตามเซลล์มะเร็ง โดยใช้ไอออนเชิงซ้อนเทคโนโลยีนี้เชื่อมที่มีเลขออกซิเดชัน +3 นั่นคือ บิส-(เอ็น-(2, 6-ไดเมทิลฟีนิล)คาร์บาโมอิลเมทิล) อิมมิโนไดอะซิโต) เทคโนโลยีเทต(III) หรือ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ (Wistow, 1977., Costello *et al.*, 1983., Loberg *et al.*, 1977, 1978) เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ HIDA กับ Blm นอกจากนี้ยังทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราส่วนโมลของลิแกนด์ และความเข้มข้น พร้อมทั้งประเมินความเสถียรของไอออนเชิงซ้อนที่เตรียมได้

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

การทดลองครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะบริโอไมซินที่เป็นของผสม Blm A2 และ B2 ชนิดผงสำหรับละลายน้ำเพื่อใช้เป็นยาฉีด ของบริษัท Nihon Kaya Ku Co, Ltd., เทคโนโลยีเคมีเปอร์เทคโนโลยีเทต ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) จากชุดกำเนิดเทคโนโลยีเคมีของบริษัท daiichi Co, LTD. และสารเคมีอื่นๆ ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 95% (เกรดสำหรับการวิเคราะห์) เครื่อง HPLC ใช้ปั๊มและตัวตรวจวัดแบบ UV/Vis ของบริษัท Jasco รุ่น 880pu และ UV 100-III ตามลำดับ ตรวจวัดความแรงของรังสีโดยการต่อฟองหลังคอลัมน์ของ HPLC ด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา ของบริษัท Kobe Industries Co. รุ่น RM 900 สภาวะการแยกใช้คอลัมน์ ODS รุ่น C18-MT ของบริษัท Nacali Co., LTD และชะด้วย 0.025 M สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตทในเมทานอล (55:45) สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) ใช้ TLC silica gel aluminum plate 254 F ของบริษัท Merck และชะด้วยสารละลาย 10% แอมโมเนียมอะซิเตทในเมทานอล (1:1)

1. การเตรียม $^{99m}\text{Tc-HIDA}$

เตรียม $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ และทดสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ตามวิธีของ Wistow และคณะ (Wistow *et al.*, 1977) โดยการเตรียมแยกเป็นสองส่วนคือ สารประกอบของลิแกนด์ HIDA กับสแตนนัสคลอไรด์ไดไฮเดรต (Sn-HIDA) ในรูปยาฉีดผง โดยปรับลดความเข้มข้นของลิแกนด์ HIDA ลง 10 เท่า หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ในหนึ่งขวดมีลิแกนด์ HIDA 1 มิลลิกรัม และ สแตนนัสคลอไรด์ไดไฮเดรต 250 ไมโครกรัม pH เท่ากับ 6 เมื่อนำมาเติมส่วนที่สองคือโซเดียมเปอร์เทคโนโลยีเทตที่มีความแรงรังสี 7 mCi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าขวดทิ้งไว้เวลานาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วย TLC โดยการแยกบน silica gel aluminum plate 254 F ด้วย 10% แอมโมเนียมอะซิเตทในเมทานอล (1:1) แล้วนำแผ่น TLC ที่ได้มาวัดความแรงรังสีด้วยเครื่อง TLC scanner คำนวณความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีจาก

พื้นที่ใต้พีคของโครมาโทแกรมกัมมัตภาพรังสี ของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ที่ค่า R_f 0.8 เทียบกับ ความแรงรังสีทั้งหมดของโครมาโทแกรม ต้องได้สารละลายของไอออนเชิงซ้อน $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ที่มีความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีมากกว่า 99% จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียม $^{99m}\text{Tc-Blm}$ โดยปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ กับ Blm

เติมสารละลาย $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ความแรงรังสี 1-1.5 mCi ลงใน 1.4 มิลลิกรัม (0.001 mmole) pH 5.5 ของสารละลายลิแกนด์ Blm ผสมให้เข้ากันได้ pH เท่ากับ 5.6

2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยา โดยนำสารละลายผสมของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ กับ Blm มาแบ่งเป็นส่วนต่างๆ กัน นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25, 37, 70 และ 100 °C แล้วติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการหาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสี ด้วยเทคนิค TLC หลังจากให้ความร้อน 0, 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ การหาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีทำโดยคำนวณร้อยละของพื้นที่ใต้พีคที่ R_f 0.4 และ 0.6 ที่เกิดขึ้นใหม่แทน $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ และใช้การคำนวณนี้ตลอดการทดลอง ผลการแยกยืนยันด้วยด้วยเทคนิค HPLC ของตัวอย่างหลังจากให้ความร้อนที่ 100 °C นาน 0, 30 และ 60 นาทีตามลำดับ

2.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อปฏิกิริยา โดยแบ่งสารละลายผสมของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ กับ Blm เป็นสามส่วนต่างๆ กัน ปรับค่า pH เป็น 2, 4 และ 5.6 นำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 100 °C แล้วติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการหาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยเทคนิค TLC ที่เวลา 0, 20, 40, และ 60 นาที

2.3 ศึกษาผลของอัตราส่วนโมลของลิแกนด์ที่มีต่อปฏิกิริยาดังนี้ แบ่งสารละลาย $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลาย Blm 0.1000 0.2150 และ 0.4300 กรัม ใน 0.25 มิลลิลิตร ได้อัตราส่วนโมลของ HIDA : Blm เป็น 2 : 1 1 : 1 และ 1 : 2 แล้วปรับ pH เท่ากับ 2 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C หาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยเทคนิค TLC ที่เวลา 0, 10, 30, 45 และ 60 นาที

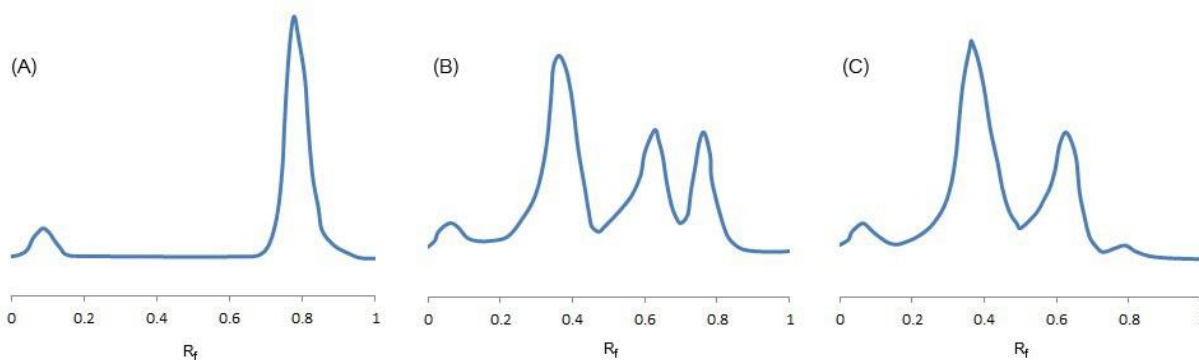
2.4 ศึกษาความเข้มข้นของ Blm โดยเตรียม $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่มีอัตราส่วนโมล 1:1 ตามข้อ 2.3 แต่ลดปริมาตรสุดท้ายของสารละลายให้อยู่ในช่วง 300 - 1000 μL ได้รับความเข้มข้นของ Blm 1.07 1.5 2.1 และ 3.57 mM และควบคุมอุณหภูมิที่ 100 °C และ pH เท่ากับ 2

2.5 ศึกษาความเสถียรของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ โดยนำสารละลาย $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่เตรียมจากปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์อัตราส่วนโมลของ HIDA : Blm เท่ากับ 1:1 มาปรับ pH ให้เท่ากับ pH 7.4 (เท่ากับ pH ของเลือด) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ปรับ pH แล้วไปหาค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยเทคนิค TLC ที่เวลา 15, 60, 90 และ 180 นาที

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

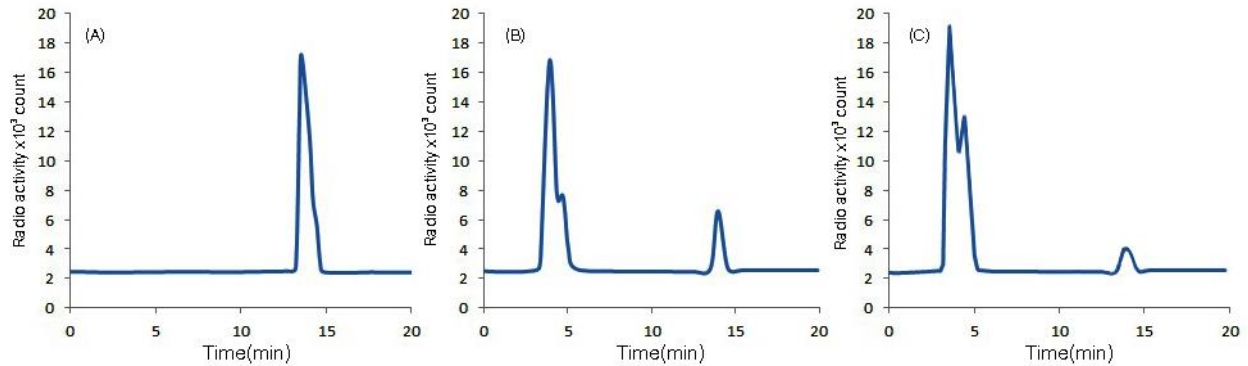
การเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ระหว่าง Blm กับ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ จำเป็นต้องมีปริมาณไอออนเชิงซ้อน $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ เริ่มต้นที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของไอออนเชิงซ้อน และปริมาณเริ่มต้นของลิแกนด์ Blm ที่มากเกินไป วิธีการเตรียม $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ของ Wistow และคณะ (Wistow *et al.*, 1977) เพื่อใช้เป็นสารสร้างภาพรังสีของท่อน้ำดีในตับนั้น ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของลิแกนด์ HIDA ที่มากเกินไป ซึ่งอาจทำให้การแทนที่ลิแกนด์ HIDA ด้วย Blm เกิดขึ้นได้ยาก ในงานวิจัยนี้จึงทดลองลดความเข้มข้นเริ่มต้นของลิแกนด์ HIDA ลง 10 เท่าจากวิธีของ Wistow และคณะ โดยยังพบว่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ยังคงมีค่ามากกว่า 99% ซึ่งสูงพอสำหรับการนำไปทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์กับ Blm

จากการทดลองนำ ^{99m}Tc -HIDA ที่เตรียมได้มาเติมลิแกนด์ Blm ที่ pH 5.6 มาให้ความร้อนที่ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สภาวะเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัย ก่อนหน้าของ Mori และคณะ (Mori *et al.*, 1975) ได้โครมาโทแกรมรังสีแกมมาดังภาพที่ 2B - 2C ส่วนภาพที่ 2A คือโครมาโทแกรม ของ ^{99m}Tc -HIDA ที่ไม่ได้เติม Blm เพื่อทำการเปรียบเทียบ พบว่า R_f ของ ^{99m}Tc -HIDA (สารตั้งต้น) มีค่าเท่ากับ 0.8 และเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 30 นาที (ภาพที่ 2B) และ 60 นาที (ภาพที่ 2C) ความเข้มของพีคที่ตำแหน่งนี้ลดลงจนเกือบหายไป แสดงว่า ^{99m}Tc -HIDA ได้ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา ส่วนพีคใหม่ที่ปรากฏขึ้นที่ตำแหน่ง R_f เท่ากับ 0.38 และ 0.66 เป็นของ ^{99m}Tc -Blm-A2 และ ^{99m}Tc -Blm-B2 (Mori *et al.*, 1975)

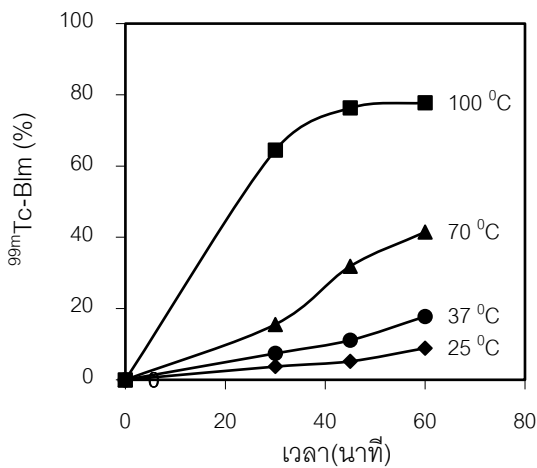


ภาพที่ 2 TLC โครมาโทแกรมของ (A) ^{99m}Tc -HIDA, (B) ^{99m}Tc -HIDA + Blm เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 30 นาที และ (C) ^{99m}Tc -HIDA + Blm เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 60 นาที

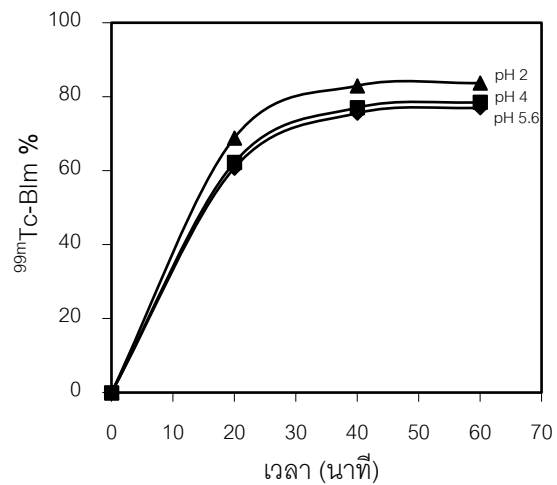
เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการแยกด้วย HPLC ที่แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายผสม ^{99m}Tc -HIDA กับ Blm ดังภาพที่ 3B และ 3C ซึ่งทำการวัดเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ ภาพที่ 3A คือ HPLC โครมาโทแกรมของ ^{99m}Tc -HIDA ที่ไม่ได้เติม Blm ซึ่งพบพีคที่ตำแหน่งรีเทนชันไทม์ (Retention time, RT) เท่ากับ 14.7 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับภาพที่ 3B และ 3C พบว่าพีคที่ตำแหน่งดังกล่าวมีความแรงรังสีลดลงเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 30 นาที และเกือบหายไปเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 60 นาที ในขณะที่เดียวกันก็มีพีคใหม่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง RT เท่ากับ 5 นาที ซึ่งเป็นของ ^{99m}Tc -Blm มีลักษณะเป็นพีคซ้อนกันอยู่ของ ^{99m}Tc -Blm-A2 และ ^{99m}Tc -Blm-B2 ผลที่ได้จาก HPLC นี้สอดคล้องกับผลที่ได้จาก TLC ที่กล่าวมาแล้วเป็นอย่างดี ดังนั้นนอกจาก TLC เป็นเทคนิคที่ง่ายแล้ว ยังสามารถติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพอีกด้วย



ภาพที่ 3 HPLC โครมาโทแกรมของ (A) ^{99m}Tc-HIDA, (B) ^{99m}Tc-HIDA + Blm หลังจากให้ความร้อนที่ 100 °C นาน 30 นาที และ (C) ^{99m}Tc-HIDA + Blm เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 60 นาที



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเกิด ^{99m}Tc-Blm ที่ อุณหภูมิ 25, 37, 70 และ 100 °C ที่เวลา 0, 30, 45 และ 60 นาที pH 5.6 ที่ อัตราส่วน HIDA :Blm เท่ากับ 3:1

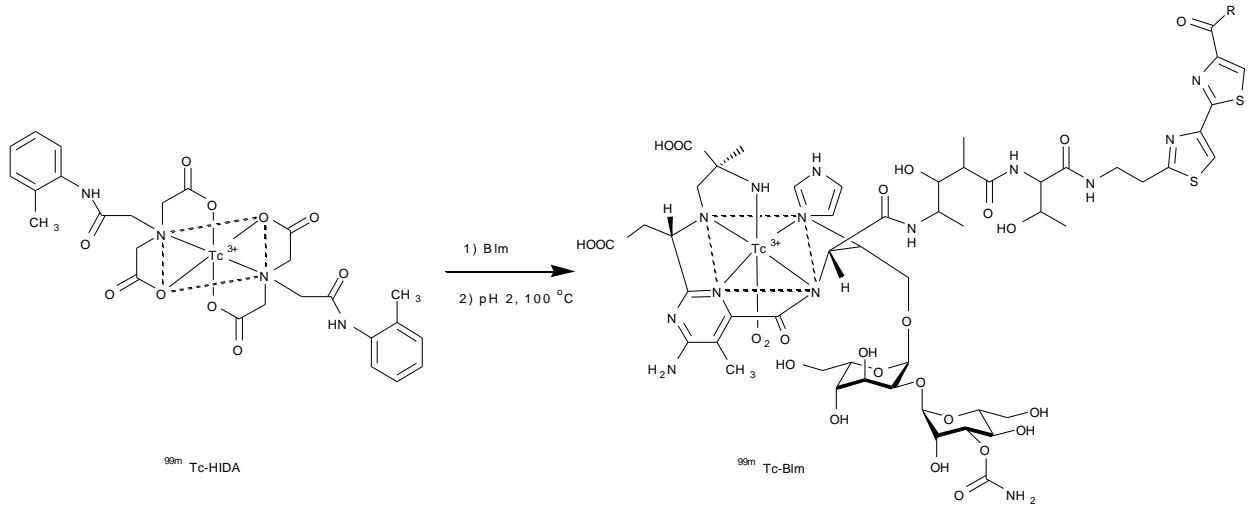


ภาพที่ 5 ผลของ pH ต่อการเกิด ^{99m}Tc-Blm ที่ pH 2 4 และ 5.6 อุณหภูมิ 100 °C ที่เวลา 0, 20, 40 และ 60 นาที อัตราส่วน HIDA :Blm เท่ากับ 3:1

ภาพที่ 4 แสดงค่าร้อยละความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีที่คำนวณจากโครมาโทแกรมกัมมันตภาพรังสีของ ^{99m}Tc-Blm จากปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25 - 100 °C ที่เวลาของการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่ 0 - 60 นาที โดยในช่วง 30 นาทีแรก ที่อุณหภูมิ 100 °C มีอัตราการเพิ่มขึ้นของ ^{99m}Tc-Blm สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 2% ต่อนาที ในขณะที่ภายในช่วงเวลาเดียวกัน ปริมาณของ ^{99m}Tc-Blm จะเพิ่มขึ้นเพียง 0.5% 0.2% และ 0.1% ที่อุณหภูมิ 70 °C 37 °C และ 25 °C ตามลำดับ แสดงว่าอัตราการเกิด ^{99m}Tc-Blm สูงขึ้นตามอุณหภูมิ นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่ 100 °C ใช้เวลาในการเข้าสู่สมดุลเพียง 45 นาที (ปริมาณ ^{99m}Tc-Blm เริ่มคงที่) แต่ที่อุณหภูมิต่ำกว่าปฏิกิริยายังไม่เข้าสู่สมดุลแม้เวลาผ่านไปถึง 60 นาที ในแง่ของปริมาณผลผลิตพบว่า ปริมาณของ ^{99m}Tc-Blm เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ โดยพิจารณาที่เวลา 60 นาที ปริมาณของ ^{99m}Tc-Blm มีค่าเท่ากับ 9% ที่ 25 °C และเพิ่มเป็น 78% ที่ 100 °C ดังนั้นปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์จึงเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อน และอาจตีความ

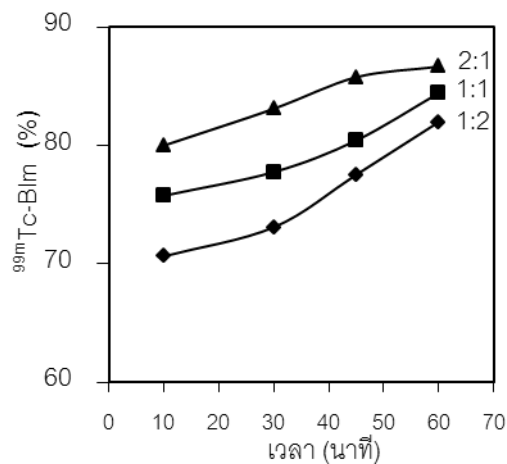
ในเชิงอุณหพลศาสตร์ได้ว่า พลังงานที่ถูกดูดเข้าไปเพื่อสลายพันธะระหว่าง ^{99m}Tc กับ HIDA สูงกว่าพลังงานที่คายออกมา ในขณะที่มีการสร้าง พันธะโคออร์ดิเนชันระหว่าง ^{99m}Tc กับ Blm

ภาพที่ 5 แสดงผลของ pH ต่อค่าร้อยละความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ ^{99m}Tc -Blm จากการปรับ pH สารละลายของ ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ให้มีค่าตั้งแต่ 2 - 5.6 ที่อุณหภูมิคงที่ 100 °C และใช้เวลาของการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่ 0 - 60 นาที พบว่าปฏิกิริยาสามารถเข้าสู่สมดุลภายใน 45 นาที ที่ทุกค่า pH ที่ทดลอง โดยที่ pH เท่ากับ 2 ให้ปริมาณของ ^{99m}Tc -Blm สูงสุด ที่ 80% ที่ pH ในช่วง 4 - 5.6 พบว่าปริมาณ ^{99m}Tc -Blm ต่ำกว่า 80% เล็กน้อย และในสภาวะที่เป็นต่าง พบปริมาณ ต่ำกว่า 70% (ข้อมูลไม่ได้แสดงในภาพที่ 5) เมื่อพิจารณาจากค่า pK_{a1} ของหมู่ คาร์บอกซิลิกในโมเลกุลของ HIDA มีค่า 2.7 ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของโปรตอนที่อยู่กับออกซิเจนของหมู่คาร์บอกซิลิกเนื่องจากออกซิเจนที่ตำแหน่งนี้ทำหน้าที่เป็นอะตอมให้อิเลคตรอน (donor atom) ในการเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ ^{99m}Tc ตามโครงสร้าง Tc-HIDA ในภาพที่ 6 (Loberg *et al.*, 1977) และเกิดพันธะได้อย่างแข็งแรงเมื่อเกิดการแตกตัวให้โปรตอนหลุดออกไปแล้วเกิดเป็นหมู่คาร์บอกซิเลต ในทางกลับกัน ในสภาวะที่ pH เท่ากับ 2 (น้อยกว่า 2.7) อะตอมออกซิเจนของ HIDA ที่เชื่อมต่อกับ ^{99m}Tc รับโปรตอนอิสระที่มีอยู่ในสารละลาย ได้ทำให้หมู่คาร์บอกซิเลตเปลี่ยนกลับเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกพันธะโคออร์ดิเนชันระหว่างอะตอมของออกซิเจนกับเทคโนโลยีเนียม ดังนั้นการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของ ^{99m}Tc -HIDA จึงเกิดได้ง่ายที่ pH ต่ำ ในขณะที่ค่า pK_{a1} ของหมู่ เอมีนทุติยภูมิใน Blm มีค่าเท่ากับ 2.91 (sugiura *et al.*, 1979) ใกล้เคียงกับ HIDA แต่ที่ pH 2 ลิแกนด์ Blm ยังสามารถเข้าแทนที่ HIDA และเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ ^{99m}Tc ได้ เนื่องจากโมเลกุลของ Blm เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่มีอะตอมให้อิเลคตรอนจำนวนมาก และที่บริเวณ ไฮโปตาอะมิโนอลานีน ที่ต่ออยู่กับวงไพริมิดีน และไฮโปตาไฮดรอกซีฮีสตีดีน (ภาพที่ 1) มีไนโตรเจนที่เป็นอะตอมให้อิเลคตรอนจำนวนมากทำอะตอม จึงเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ ^{99m}Tc ได้หาพันธะขณะที่ HIDA เป็น ไตรเดนเทตลิแกนด์ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันได้เพียงสามพันธะแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนี้ลิแกนด์ Blm ยังเกิดเป็นวงคีเลตแบบวง 5 อะตอมซึ่งเป็นขนาดวงคีเลตที่ให้ความเสถียรสูงที่สุดได้ถึง 4 วง จึงทำให้เกิดการแทนที่ของลิแกนด์ Blm ในปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ของเทคโนโลยีเนียม 3+ ที่อยู่ในโคออร์ดิเนชันสเฟียร์ของลิแกนด์ HIDA ได้ โครงสร้างในภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างของ ^{99m}Tc -Blm ที่นำเสนอเป็นแบบออกตะฮีดรอลที่มีโมเลกุลของออกซิเจนต่ออยู่กับเทคโนโลยีเนียมด้วยพันธะโคออร์ดิเนชันเป็นพันธะที่ 6 โดยเทียบเคียงกับโครงสร้างของ Fe^{2+} -Blm ที่ได้มีการศึกษาโครงสร้างไว้ก่อนแล้วด้วยวิธี NMR โดย Norman และคณะ (Norman J. O. 1979) และโครงสร้างเอกซ์เรย์ของ Cu^{2+} -P3A โดยที่ P3A เป็นแบบจำลองของไฮโปตาอะมิโนอลานีน วงไพริมิดีน และไฮโปตาไฮดรอกซีฮีสตีดีนที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันของลิแกนด์ Blm ที่รายงานไว้โดย litaka และคณะ (litaka *et al.*, 1978)

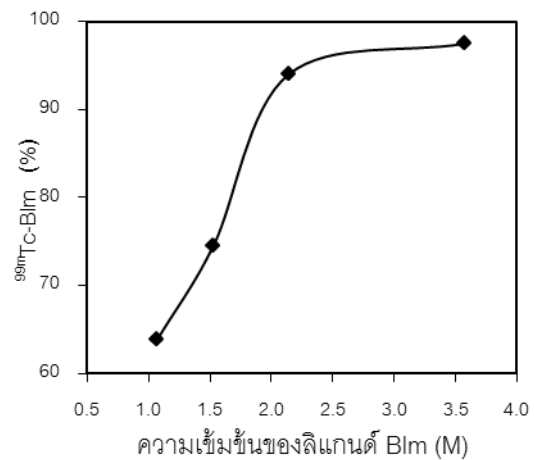


ภาพที่ 6 การแลกเปลี่ยนลิแกนด์และของโครงสร้างของ $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ และ $^{99m}\text{Tc-Blm}$

ผลของอัตราส่วนโมลของลิแกนด์ HIDA : Blm ต่อปริมาณ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่เกิดขึ้นที่เวลาตั้งแต่ 0 - 60 นาที ที่อุณหภูมิ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ และ pH เท่ากับ 2 แสดงดังภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า อัตราการเกิด $^{99m}\text{Tc-Blm}$ (อัตราการแลกเปลี่ยนลิแกนด์) มีค่าสูงสุดเมื่อจำนวนโมลของ Blm เป็น 2 เท่าของจำนวนโมลของ HIDA อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที พบว่าปริมาณของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันคือมากกว่า 90% งานวิจัยก่อนหน้าระบุว่า การเตรียมสารสร้างภาพถ่ายรังสีควรเลือกใช้ อัตราส่วนโมลของลิแกนด์ที่ให้ความแรงของรังสีต่อน้ำหนักรวมของลิแกนด์ในสารละลายมีค่าสูงสุด เพื่อให้ได้ภาพถ่ายรังสีที่มีคุณภาพ (Mori *et al.*, 1975) เพื่อให้ได้ค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีที่สูงในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ อัตราส่วนโมลของ HIDA : Blm เท่ากับ 1 : 1



ภาพที่ 7 ผลของอัตราส่วนโมลของลิแกนด์ HIDA : Blm ต่อการเกิด $^{99m}\text{Tc-Blm}$



ภาพที่ 8 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของลิแกนด์ Blm ต่อการเกิด $^{99m}\text{Tc-Blm}$ อัตราส่วน HIDA : Blm เท่ากับ 1 : 1

เนื่องจากค่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่เตรียมได้ยังมีค่าร้อยละต่ำกว่า 95 ซึ่งยังไม่เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นสารสร้างภาพถ่ายรังสี ดังนั้นจึงทำการแปรผันความเข้มข้นของ Blm ในช่วง 1.07 - 3.57 mM โดยลดปริมาตรสุดท้ายของสารละลายให้อยู่ในช่วง 300 - 1000 μL และควบคุมอุณหภูมิที่ 100 °C และ pH เท่ากับ 2 ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละผลผลิตของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ กับความเข้มข้นของ Blm พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Blm สูงขึ้นในช่วง 1.07 - 2.14 mM ทำให้ปริมาณของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ เพิ่มขึ้นอย่างมาก (จาก 64% เป็น 94%) และเมื่อความเข้มข้นของ Blm เพิ่มขึ้นเป็น 3.57 mM (ที่ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเท่ากับ 300 μL) ปริมาณของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ เข้าสู่ค่าสูงสุดที่ 98% ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้งานเป็นสารสร้างภาพถ่ายรังสี แต่สารละลายยังมีความเป็นกรดสูง (pH \approx 2) ไม่เหมาะแก่การใช้เป็นยาฉีดเข้าทางเส้นเลือด จึงทำการทดลองปรับ pH ของสารละลาย $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ให้เท่ากับ 7.5 (pH ของเลือด) ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีอยู่ในช่วง 95% - 97% หลังจากปรับ pH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แสดงว่า $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่สังเคราะห์ได้ในสภาวะกรดมีความเสถียรดีในสภาวะ pH ของเลือด

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยพบว่าไอออนเชิงซ้อน $^{99m}\text{Tc-Blm}$ เตรียมได้จากปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนลิแกนด์ระหว่าง $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ กับ Blm โดย $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่ได้จากปฏิกิริยานี้ควรมีเลขออกซิเดชันของ ^{99m}Tc ต่ำ (+3) เช่นเดียวกับในสารตั้งต้น $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ อัตราการเกิด $^{99m}\text{Tc-Blm}$ และปริมาณของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิในช่วง 25 - 100 °C สภาวะของปฏิกิริยาที่ทำให้ได้ความบริสุทธิ์ทางเคมีรังสีของ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ สูงกว่า 95% ได้แก่ pH ของสารละลายที่เป็นกรด (pH < 3) อุณหภูมิ 100 °C และความเข้มข้นเริ่มต้นของ Blm เท่ากับ 3.57 mM โดยอัตราส่วนโมลของ HIDA : Blm ที่เหมาะสมคือ 1 : 1 นอกจากนี้ยังพบว่า $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ที่เตรียมในสภาวะกรด มีความเสถียรดีหลังจากปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 7.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงเหมาะที่จะพัฒนาเป็นสารถ่ายภาพรังสีสำหรับฉีดเข้าทางหลอดเลือด ไอออนเชิงซ้อนของ Blm กับ ^{99m}Tc ที่มีเลขออกซิเดชันต่ำอาจมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกับไอออนเชิงซ้อนของ Blm กับ Fe(II) หรือ Co(II) ซึ่งเหมาะกับผู้ป่วยมะเร็งที่จะได้รับการรักษาด้วยยาบิสไอนินอินอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาความเสถียรและการกระจายตัวทางชีวภาพ รวมถึงความเป็นพิษและผลข้างเคียงต่างๆ อย่างละเอียด ก่อนที่จะนำ $^{99m}\text{Tc-Blm}$ ไปใช้งานจริง

เอกสารอ้างอิง

- Chen J. K., Yang D., Shen B., Neilan B. A., Murray V. (2016). Zorbamycin has a different DNA sequence selectivity compared with bleomycin and analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(22), 6094-6101
- Costello CE, Brodack JW, Jones AG, Davison A, Johnson DL, Kasina S, Fritzberg AR. (1983) The investigation of radiopharmaceutical components by fast atom bombardment mass spectrometry : The identification of Tc-HIDA and the epimers of Tc-CO₂DADS. *J. Nucl. Med.* ,24(4), 353-355.
- Dabrowiak J.C. (1980) The coordination chemistry of bleomycin : A review. *J. Inor. Biochem.* ,13, 317-337.

- Horiuchi K., Yokoyama A., Fujibayashi Y., Tanaka H., Odori T., Saji H., Morita R., Torizuka K. (1981) Tin-adsorbed resin for the preparation of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals: Stable complex of ^{99m}Tc -bleomycin. *Int. J. App. Radiat. Iso.* , 32(1), 47-52.
- litaka Y, Nakamura H, Nakatani T, Muraoka Y, Fujii A, Takita T, Umezawa H. (1978). Chemistry of bleomycin. XX. The X-ray structure determination of P-3A Cu(II)-complex a biosynthetic intermediate of bleomycin. *J Antibiot (Tokyo)*. , 31(10),1070-1072.
- Kosjek T., Krajnc A., Gornik T., Zigon D., Groselj A., Sersa G., Cemazar M. (2016). Identification and quantification of bleomycin in serum and tumor tissue by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, *Talanta*, 160, 164-171,
- Loberg MD., Fields AT. (1977) Stability of ^{99m}Tc -labeled N-substituted iminodiacetic acids: Ligand exchange reaction between ^{99m}Tc -HIDA and EDTA. *Int. J. App. Radiat. Iso.*, 28(8), 687-692.
- Loberg MD., Fields AT. (1978) Chemical structure of technetium- 99m -labeled N-(2,6-dimethylphenyl carbamoylmethyl)-iminodiacetic acid (Tc-HIDA) *Int. J. App. Radiat. Iso.*, 29(3), 167-173.
- Mori T, Hamamoto K, Onoyama Y, Torizuka K. (1975) Tumor imaging after administration of ^{99m}Tc -labeled bleomycin. *J. Nucl. Med.*, 16, 414-422.
- Oppenheimer, N. J., Rodriguez, L. O., & Hecht, S. M. (1979). Structural studies of "active complex" of bleomycin: assignment of ligands to the ferrous ion in a ferrous-bleomycin-carbon monoxide complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), 5616–5620.
- Raban P, Brousil J, Svihovcová P. (1979) Chemical and biological properties of bleomycin labelled with ^{57}Co . *Eur. J. Nucl. Med.* ,4, 191-197.
- Stubbe J., and Kozarich JW. (1987) Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.* 87(5), 1107-1136.
- Sugiura Y., Ishizu K., Miyoshi K. (1976) Studies of metalbleomycins by electronic spectroscopy, electron spin resonance spectroscopy, and potentiometric titration. *J. Antibiotics (Tokyo)*., 29, 1102-1108
- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. (1962) New antibiotics bleomycin A and B. *J. Antibiot (Tokyo)*., 19, 200-209.
- Wistow BW, Subramanian G, Heertum RL, Henderson RW, Gagne GM, Hall RC, McAfee JG. (1977) An evaluation of ^{99m}Tc -labeled hepatobiliary agents. *J. Nucl. Med.*, 18(5),455-461.
- Yokoyama A., Terauchi Y.i, Horiuchi K., Okumura S., Saito Y., Tanaka H., Odori T., Morita R., Mori T., Torizuka K. (1978) The importance of the chemical state of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals : an effective tumor imaging form of ^{99m}Tc bleomycin. *Int. J. App. Radiat. Iso.* ,29, 549-555.