

سنتز HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن

طیبه هادیزاد، غلامعلی شعبانی، دکتر رضا نجفی

بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

از میان همه رادیوداروهایی که در سال‌های اخیر برای تشخیص جریان خون منطقه‌ای مغز (rCBF) مورد استفاده قرار گرفته‌اند، ^{99m}Tc -d,1-HMPAO کاربرد بیشتری پیدا کرده است. این ترکیب، پایدار، خنثی و چربی دوست بوده، و توانایی توقف در مغز به مدت زمان مناسب را دارد. HMPAO با دو اتم کربن نامتقارن (در موقعیت‌های ۳ و ۹) دو ایزومر فضایی d,1 و Meso را به وجود می‌آورد که هر یک به تنهایی می‌توانند با ^{99m}Tc کمپلکس چربی دوست تشکیل دهند. کمپلکس d,1-HMPAO با ^{99m}Tc پس از تزریق وریدی از BBB عبور کرده، خیلی سریع به کمپلکس آبدوست تبدیل می‌شود و در مغز متوقف می‌گردد. این عمل در مورد کمپلکس Meso بسیار آهسته صورت می‌گیرد. بدین مناسبت نوع d,1 بر Meso ترجیح داده می‌شود. در این مقاله ما ترکیب HMPAO را سنتز کرده، دو ایزومر فضایی آن را از هم جدا نمودیم. از ایزومر d,1 کیت تهیه شد و تمامی مراحل کنترل شیمیایی، رادیوشیمیایی و بیولوژیکی برای کیت انجام و در این مقاله مورد بحث قرار گرفته است.

مقدمه

دارند که منجر به کیفیت پایین در تشخیص می‌شود و ¹²³I نیز به دلیل گران بودن قیمت تولید به عنوان رادیوداروی مناسب مورد استفاده قرار نمی‌گیرد^(۱).

^{99m}Tc با دارا بودن خواص مناسب که از آن جمله می‌توان درجات اکسیداسیون متعدد آن را نام برد، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرد. این عنصر می‌تواند با دسته ترکیبات مختلف، کمپلکس‌های گوناگون با ساختمان‌های فضایی متفاوت تشکیل دهد که از این میان می‌توان گروه N_2S_2 (دی‌آمینوتیول‌ها) و N_4 (PAO)ها را نام برد.

به دنبال کشف کمپلکس ^{99m}Tc -PnAO توسط Troutner و همکارانش در سال ۱۹۸۴ و بررسی

در دهه گذشته رادیوداروهای متعددی که زمان نسبتاً طولانی و مناسب در مغز باقی می‌مانند تا فرصت کافی برای تشخیص جریان خون منطقه‌ای مغز (rCBF) با استفاده از SPECT وجود داشته باشد، به کار گرفته شده‌اند. از آن جمله می‌توان داروهایی چون PIPSE و MOSE نشاندار شده با ^{75}Se ، IMP و HIPOM نشاندار شده با ^{123}I و DDC نشاندار شده با ^{201}Tl را نام برد. در این میان، ترکیب [IMP] ^{123}I به عنوان یک ترکیب بسیار مناسب جهت مطالعات SPECT مغزی توجهات زیادی را به خود جلب کرد، ولی هیچ یک از این رادیوداروها برای مطالعات روزمره rCBF مناسب نیستند، زیرا ^{75}Se و ^{201}Tl خاصیت فیزیکی ویژه‌ای

سنتز HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن

چربی دوستی کمتر (Secondary) و پرتکتات آزاد ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) تبدیل می‌شود. مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی و بررسی‌های مقدماتی بالینی نشان داده‌اند که کمپلکس اولیه دارای برداشت زیاد (high-uptake) و زمان توقف طولانی (Long residence time) در مغز می‌باشد^(۲).

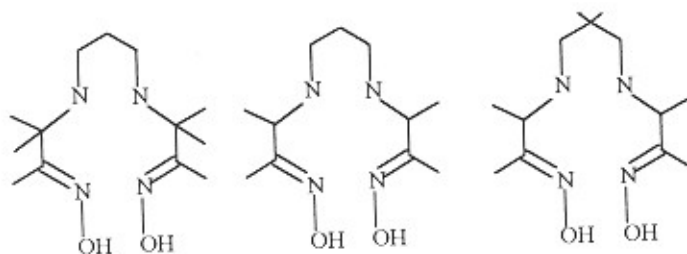
مکانیسم بقای ^{99m}Tc -HMPAO در مغز و سایر بافت‌ها شامل عبور سریع از این اجزای غیر قابل نفوذ و تعامل آن با گلوکوتائون است^(۳)، زیرا این کمپلکس با اندازه نسبتاً کوچک خود (کمتر از ۵۰۰ دالتون) این خاصیت مهم را از خود نشان می‌دهد.

HMPAO با دو اتم کربن نامتقارن (در موقعیت‌های ۳ و ۹) دو ایزومر فضایی d,1 و Meso را به وجود می‌آورد. Meso-HMPAO می‌تواند با ^{99m}TcO دو نوع کمپلکس متفاوت ایجاد کند که در یکی از آنها دو گروه متیل مستقر بر روی هر یک از کربن‌های ۳ و ۹ با گروه ^{99m}TcO هم‌جهت‌اند (در یک طرف صفحه مولکول واقع می‌شوند) و در ترکیب دوم در خلاف جهت قرار دارند (^{99m}TcO روی صفحه و متیل‌ها پشت صفحه واقع می‌شوند). تا به امروز تنها ترکیبی که در آن دو متیل با ^{99m}TcO حالت Syn دارند، جداسازی و شناسایی شده است. در مقابل، ترکیب HMPAO - d,1 به صورت مخلوط راسمیک دو انانتیومر d و l وجود

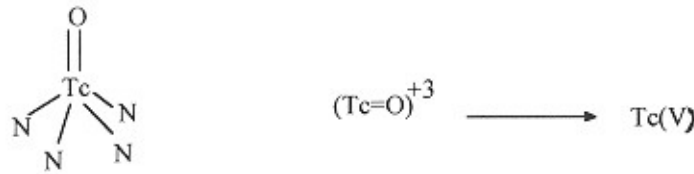
خواص این ترکیب، مشتقات گوناگونی از آن ساخته شد. این بررسی‌ها نشان داد تمام مشتقاتی که در آنها دو گروه متیل از دو موقعیت ۳ و ۹ PnAO کم شده‌اند و گروه ترکیبات TMPAO (۴) و ۸ دی‌آزا ۳ و ۹ - دی‌متیل آن دکان ۲ و ۱۰ - دی‌ان بیس اکسیم - شکل ۱) را به وجود آورده‌اند، زمان توقف‌های متفاوت ولی به مراتب طولانی‌تر از PnAO در مغز نشان می‌دهند^(۲).

کمپلکس ^{99m}Tc -PnAO ترکیبی پایدار و خنثی و چربی دوست است که پس از تزریق وریدی به راحتی از BBB (Blood Brain Barrier) عبور می‌کند، ولی مدت زمان مناسبی در مغز توقف نمی‌نماید تا فرصت کافی برای SPECT وجود داشته باشد. این زمان برای یک دوربین حساس به گاما (rotating gamma Camera) ۲۰ تا ۳۰ دقیقه است. از بین همه مشتقات PnAO، ترکیب ^{99m}Tc -HMPAO علاوه بر دارا بودن سه خاصیت مفید مذکور، توانایی توقف در مغز به مدت زمان مناسب را دارد. این کمپلکس در سال ۱۹۸۵ توسط Eil و همکارانش و همچنین Nowothilk و همکارانش به طور همزمان ساخته شد.

کمپلکس ^{99m}Tc -HMPAO در محلول‌های آبی پایدار نبوده، محلول تازه تهیه شده آن محتوی بیش از ۹۰ درصد کمپلکس چربی دوست و خنثی است (Primary) که خیلی آهسته به کمپلکس با خاصیت



شکل ۱ - انواع لیگاندها



شکل ۲ - ترکیب کمپلکس پنج‌دندانه TcO^{+3} در حالت هرم مربع‌القاعده

مکانیسم دیگر پیشنهاد شده مبنی بر این است که ترکیب HMPAO تنها نقش حامل ^{99m}Tc را به درون سلول دارد یعنی پس از ورود کمپلکس به درون سلول، ^{99m}Tc از HMPAO جدا می‌شود و با ترکیبات درون سلول کمپلکس‌هایی به مراتب پایدارتر از کمپلکس ^{99m}Tc -HMPAO تشکیل می‌دهد. اثبات این امر با محاسبه ثابت‌های پایداری کمپلکس واردشونده و کمپلکس تشکیل‌شونده درون سلول میسر است^(۴).

تعیین ساختمان کمپلکس ^{99m}Tc -PnAO توسط X-ray نشان می‌دهد که ترکیب فوق به صورت یک کمپلکس پنج‌دندانه از نوع $TcO(PnAO)_2$ یا Technetium(V)(oxo) PnAO است که قاعده یک هرم مربع‌القاعده را اشغال می‌کند (شکل ۲) و چون لیگاند PnAO سه پروتون از دست می‌دهد و دارای بار ۳- می‌باشد، لذا کمپلکس تکنسیم (V) آن بدون بار و خنثی است^(۵ و ۶).

در این مقاله، چگونگی سنتز HMPAO، جداسازی و ایزومر Meso و d,1 و روش تشخیص آنها توسط HPLC و تهیه کیت از d,1-HMPAO و تمامی کنترل‌های لازمه بیان شده است.

داشته که در آنها یکی از متیل‌ها با ^{99m}TcO در یک جهت و دیگری در خلاف جهت قرار دارد. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که نیمه‌عمر ^{99m}Tc -I-HMPAO در پلاسما به مراتب کوتاه‌تر از ^{99m}Tc -d-HMPAO است (به ترتیب ۱/۷ دقیقه و ۷/۴ دقیقه) هرچند که از تأثیر این اختلاف در جذب مغزی گزارشی داده نشده است^(۲). هر دو ترکیب ^{99m}Tc -d,1-HMPAO و ^{99m}Tc -Meso-HMPAO پس از تزریق وریدی از BBB عبور کرده، هر دو به ترکیب آبدوست تبدیل می‌شوند، ولی این واکنش در مورد ^{99m}Tc -d,1-HMPAO خیلی سریع اتفاق می‌افتد و ترکیب آبدوست حاصل به راحتی از سلول‌ها خارج نمی‌شود، بنابراین زمان مناسب برای SPECT وجود خواهد داشت. ترکیب ^{99m}Tc -dMeso-HMPAO خیلی آهسته به کمپلکس آبدوست تبدیل می‌شود؛ پس به همان راحتی که وارد سلول گشته، از آن خارج می‌شود. تاکنون مکانیسم دقیق واکنش شیمیایی فوق و تأثیر ساختمان فضایی ترکیبات در این تبدیلات گزارش نشده است، ولی گفته می‌شود که گلوکوتایون می‌تواند نقش مهمی در این روند تبدیل درون سلولی داشته باشد.

سنتر HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن

۴ گرم محصول یک را در اتانول حل کرده، فلاسک محتوی محلول را تا دمای ۵- درجه سانتیگراد سرد نمودیم. در همین دما به نمونه ۸/۴۷ گرم سدیم بوروهیدرید طی مدت یک ساعت اضافه شد و به مدت دو ساعت دیگر در همان دما هم زده شد. در این مرحله برای اطمینان از تشکیل محصول، کروماتوگرافی کاغذی با کاغذ ITLC-SG و حلال متانول انجام شد که در $R_f = 0/6$ محصول دو بسیار واضح مشاهده شد و در $R_f = 0/1$ که مربوط به محصول یک بود، چیزی دیده نشد. در پایان برای تکمیل واکنش، ۱۲۳ میلی لیتر آب به آن اضافه کرده، به مدت یک ساعت دیگر در دمای ۵- درجه سانتیگراد به هم زدن آن ادامه دادیم. پس از رساندن دمای واکنش به حدود دمای اتاق، مقدار زیادی از متانول را تحت خلأ تقطیر کرده، با تنظیم PH آن در حدود ۱۱، نمونه به مدت یک شب در یخچال قرار گرفت تا رسوبگیری کامل شود. رسوب حاصل صاف شده، با کمی آب مقطر سرد شسته و خشک گردید. محصول ۲۹/۱۶ گرم (۷۲/۴ درصد) وزن داشت و طیف FT-IR آن جذب در ناحیه $cm^{-1} 3300 (-NH)$ را نشان داد.

۳- جداسازی ایزومر d,1 از Meso:

جداسازی دو ایزومر فوق که مشکل ترین مرحله سنتر HMPAO می باشد، با بلوری کردن های مکرر توسط استونیتریل و اتیل استات انجام شد. نحوه عمل به طور خلاصه در شکل ۳ آورده شده است. محصولات بدست آمده در هر مرحله با HPLC کنترل شدند. ستون مورد استفاده در دستگاه از نوع فاز طبیعی و فاز متحرک آن متانول: NH_4OH ، ۴/۵ به نسبت ۵:۹۵ بوده، سرعت جریان حلال در دستگاه یک میلی لیتر در دقیقه و طول موج آن ۲۱۰ نانومتر بود.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده همگی از شرکت های Fluka، Merck، Sigma خریداری شدند. برای کنترل کیفی، از دستگاه های HPLC مدل Jasco و FT-IR مدل Bomem استفاده گردید. تکنسیوم $m-99$ مورد نیاز از ژنراتورهای تهیه شده در بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران تأمین شد.

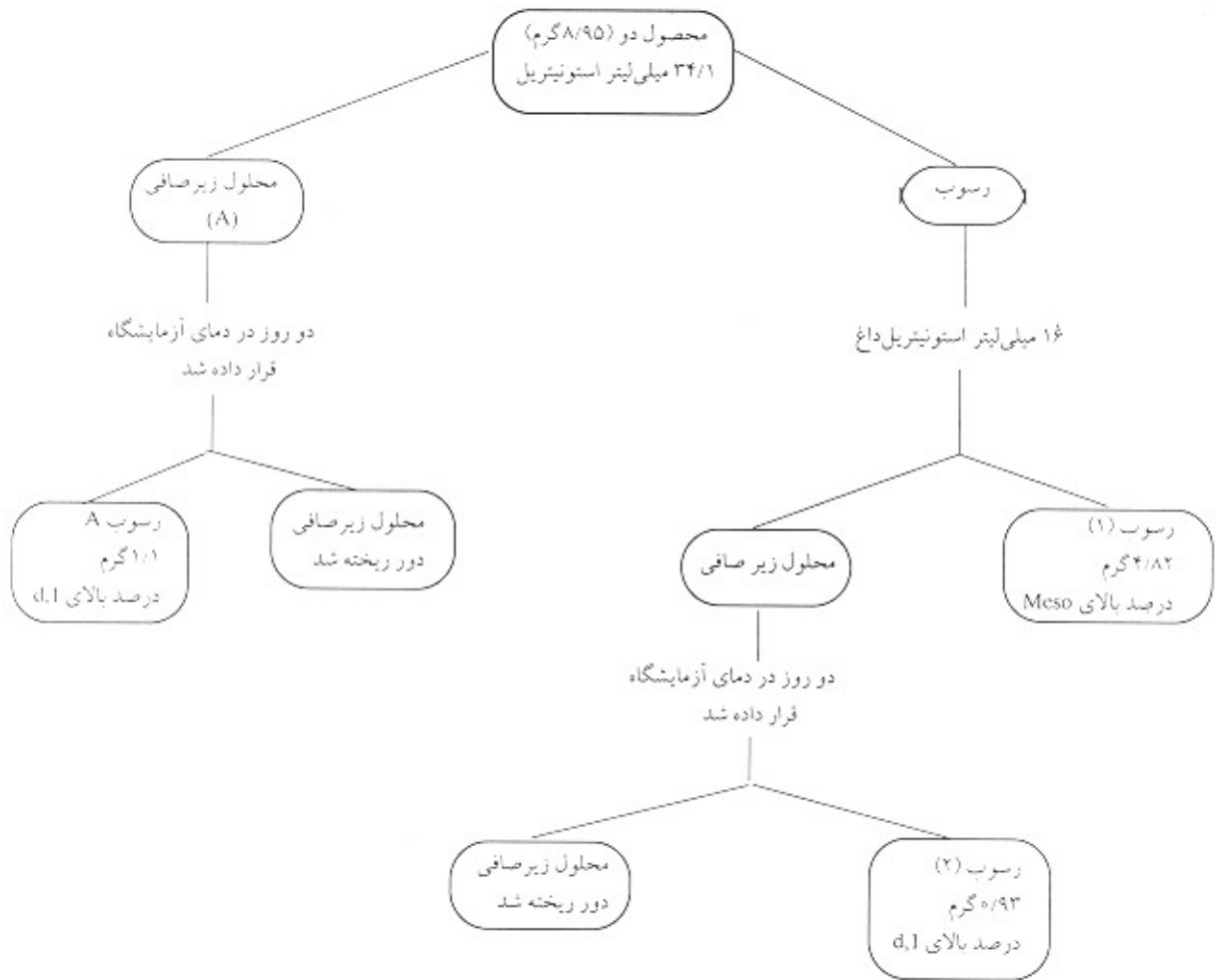
سنتر HMPAO - d,1

سنتر d,1-HMPAO که در مقالات مختلف به روش های گوناگون گزارش شده است طی سه مرحله انجام می پذیرد.

۱- سنتر ۴ و ۸- دی آزا ۳ و ۶ و ۶ و ۹- تترامیل آن دکان ۳ و ۶- دی ان ۲ و ۱۰- دی اون دی اکسیم (محصول یک):

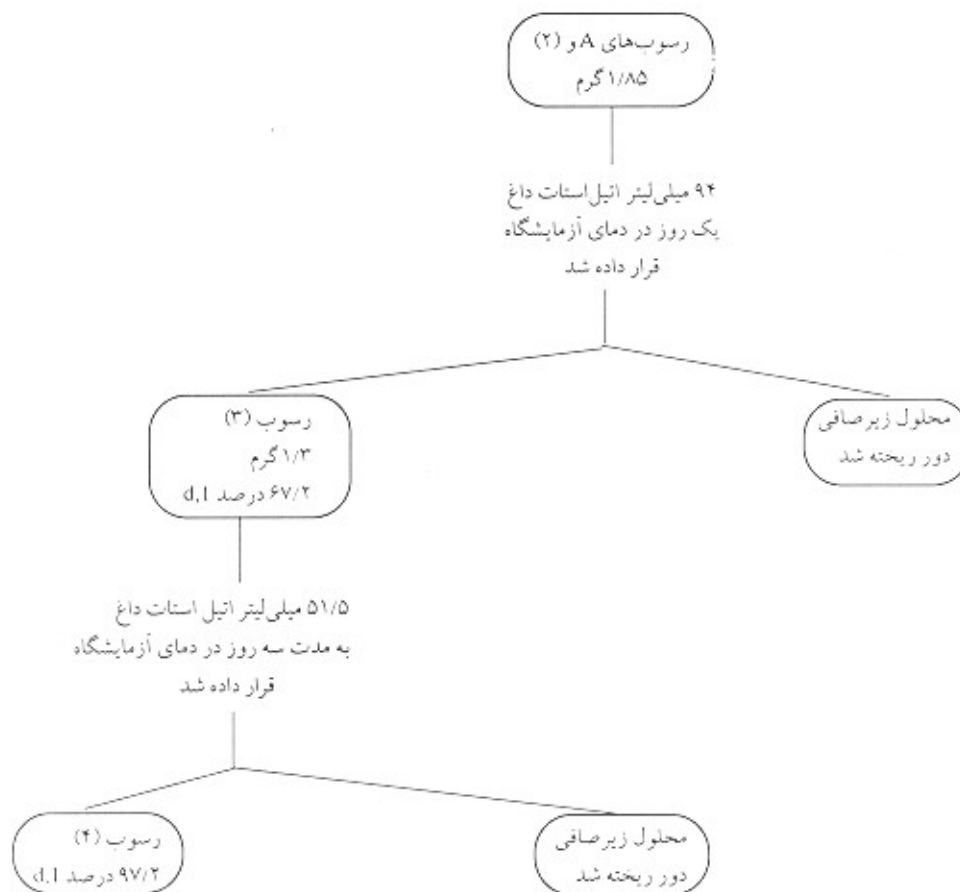
۵ گرم دی استیل مونوکسیم در کمتر از ۵۰ میلی لیتر استونیتریل حل شد و به محلول حاصل ۲۵/۵ گرم دی آمینوپروپان اضافه گردید. به این مجموعه مقداری Molecular Sieve که جاذب رطوبت است، اضافه و به مدت یک ساعت رفلاکس شد. محلول رفلکس شده را که محتوی محصول اصلی و به رنگ قهوه ی تیره بود، از دانه های Sieve جدا کرده، به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه قرار دادیم. روز بعد، رسوب را با استفاه از خلأ جدا کرده، شستشو دادیم. محصول بدست آمده ۴۱/۸ گرم (۶۲/۴ درصد) با نقطه ذوب $117^{\circ}C$ بود و طیف FT-IR آن جذب در نواحی $cm^{-1} 1626$ و $cm^{-1} 1626 (-N=C, -C=N-OH)$ را نشان می داد.

۲- سنتر Meso, d,1 - ۴ و ۸- دی آزا ۳ و ۶ و ۶ و ۹- تترامیل آن دکان ۲ و ۱۰- دی اون دی اکسیم (محصول دو):



رسوب های A و (2) که مشابه هم بوده، هر دو دارای درصد بالایی از ترکیب d,1 بودند، با هم مخلوط و مجدداً بلوری شدند و رسوب (1) کنار گذاشته شد.

سنتز HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن



شکل ۳ - مراحل خالص‌سازی ترکیب HMPAO

کلرید قلع (با غلظت ۱۶ میلی‌گرم در ۲۰ میلی‌لیتر) اضافه کرده، pH نمونه را به ۷/۹ می‌رسانیم. پس از رساندن حجم نهایی محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر و با عبور دادن از کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرونی، آن را به ویال‌های شیشه‌ای ۱۰ میلی‌لیتری (هر ویال یک میلی‌لیتر) تقسیم کرده، بلافاصله به فریزدرار منتقل و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد لیوفیلیزه می‌نماییم. هر کیت حاوی ۵/۰ میلی‌گرم HMPAO و ۸/۰۰۰ میلی‌گرم کلرید قلع دو ظرفیتی و ۴/۵ میلی‌گرم کلرید سدیم است. کیت تهیه‌شده را می‌توان حداکثر در ۵ میلی‌لیتر محلول تازه دوشیده‌شده پرتکتات سدیم محتوی ۳۰ - ۱۰

نمونه خالص (۴) پس از کنترل‌های لازم جهت تهیه کیت، مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه کیت HMPAO

۱ - فرمولاسیون کیت و نشاندار کردن آن

تهیه HMPAO بسیار حساس است، لذا دقت و سرعت عمل زیادی مورد نیاز است. برای این کار، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم HMPAO را در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول با کمی حرارت حل کرده، و به آن ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی‌لیتر سالین اضافه می‌نماییم. در حالی که محلول تحت اتمسفر ازت قرار دارد، به آن یک میلی‌لیتر محلول

میلی کوری اکتیویته حل کرد و حداکثر تا نیم ساعت پس از تهیه تزریق نمود.

۲- کنترل کیفی کیت

۲-۱: کنترل رادیوشیمیایی

درصد تشکیل کمپلکس اصلی و میزان کمپلکس‌های ثانویه، پرتکتات آزاد و $^{99m}\text{TcO}_2$ توسط کروماتوگرافی کاغذی معین می‌شود. برای این منظور به طور همزمان سه نوع کاغذ کروماتوگرافی به همراه سه نوع مختلف حلال شامل استونیتریل ۵۰ درصد و کاغذ واتمن شماره یک، متیل اتیل کتون و کاغذ واتمن شماره ۳ و سالین نرمال و کاغذ ITLC-SG پلاستیکی مورد استفاده قرار گرفت.

چون روش فوق کمی طولانی بوده و همیشه لازم است که کیت نشاندار شده قبل از تزریق به انسان، کنترل شود و میزان درصد کمپلکس اصلی آن بررسی گردد، روش دیگری برای کنترل رادیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت که سریع‌تر جوابگو باشد. این روش، استخراج با استفاده از دو حلال کلروفرم و سالین است و با محاسبه مقدار اکتیویته موجود در کلروفرم که بیانگر محصول اصلی چربی‌دوست است، مقدار درصد تشکیل کمپلکس بدست آمد.

تأثیر میزان اکتیویته برای نشاندار شدن، اثر گذشت زمان بر کیت و اثر گذشت زمان پس از نشاندار شدن نیز از جمله عواملی بودند که مورد بررسی قرار گرفتند، زیرا هر یک به تنهایی عامل مؤثر بر مقدار درصد کمپلکس می‌باشند.

۲-۲: کنترل شیمیایی:

۲-۲-۱: تعیین میزان قلع

از آنجا که میزان قلع موجود در هر کیت بسیار جزئی است، با روش‌های معمول آزمایشگاهی قابل

اندازه‌گیری نیست و تنها می‌توان مقدار قلع حل شده در محلول اولیه را کنترل نمود. این عمل با استفاده از روش یدومتری و یا اسپکتروفتومتر UV قابل انجام است.

۲-۲-۲: تعیین میزان آب

محتویات کیت HMPAO بر خلاف سایر کیت‌ها بسیار جزئی است، بنابراین اندازه‌گیری میزان آب آن توسط دستگاه کارل فیشر عملی نیست.

نحوه توزیع در بدن

برای کنترل بیولوژی و تعیین میزان جذب در اعضای مختلف به‌خصوص مغز، از موش‌های آزمایشگاهی استفاده شد. مقدار 0.1 میلی لیتر محتوی حدود $130 - 100$ میکروکوری اکتیویته به هر موش آزمایشگاهی از طریق رگ دم تزریق شد و موش‌ها در زمان‌های مختلف تشریح شده، مقدار اکتیویته اعضای آنها با استفاده از شمارنده گاما به دست آمد.

نتایج

سنتز HMPAO طی سه مرحله انجام گرفت. محصول بدست آمده در هر مرحله به روش‌های مختلف تحت کنترل قرار گرفته، پس از اطمینان از خلوص، مرحله بعدی آغاز شد. طیف FTIR محصول اصلی مرحله اول سنتز، نمایانگر جذب در نواحی 1626cm^{-1} و 1636cm^{-1} مربوط به گروه‌های $\text{C}=\text{N}-\text{OH}$ و $\text{N}=\text{C}$ می‌باشد. چون گروه $\text{C}=\text{N}-\text{OH}$ در یکی از مواد اولیه و محصول تکرار می‌شود، برای اطمینان از انجام کامل واکنش و تشکیل محصول، از کروماتوگرافی کاغذی طبق جدول ۱ استفاده گردید.

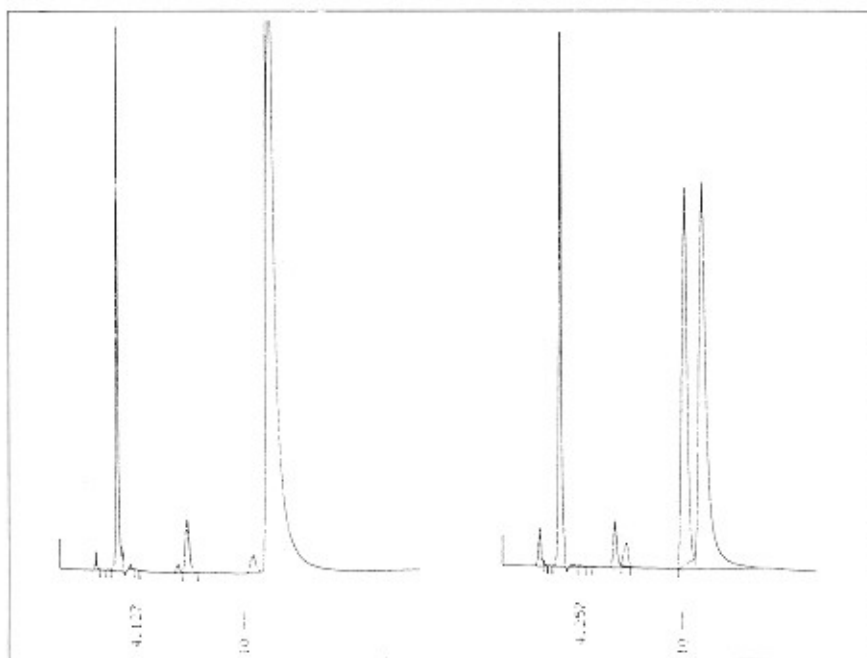
محصول بدست آمده از مرحله دوم سنتز نیز با FTIR کنترل شد و طیف حاصل جذب در ناحیه 3300cm^{-1}

سنتر HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن

پرتکتتات سدیم با استفاده از کروماتوگرافی کاغذی (TLC) به طور همزمان با سه دسته حلال متفاوت صورت گرفت. پس از نشاندار کردن کیت احتمال وجود سه ترکیب جانبی نیز علاوه بر محصول اصلی وجود دارد. در حلال متیل اتیل کتون، محصول اصلی پرتکتتات آزاد به $R_f=1$ رفته در حالی که محصول ثانویه و $^{99m}\text{TcO}_2$ در میداء باقی می ماند. حلال سالیین تنها پرتکتتات آزاد را به $R_f=1$ برده و سه ترکیب دیگر را در میداء باقی می گذارد و برعکس در حلال استونیتریل $^{99m}\text{TcO}_2$ در میداء باقی مانده و سه ترکیب دیگر به $R_f=1$ می رسند (جدول ۲). با محاسبه میزان اکتیویته در هر مورد، درصد تشکیل کمپلکس اصلی بدست آمد. نتایج حاصل در بهترین شرایط معادل ۸۴/۳۸ درصد کمپلکس $^{99m}\text{Tc-d,1-HMPAO}$ بود که ۱۰ دقیقه پس از نشاندار کردن کیت محاسبه شد.

مربوط به گروه NH را نشان داد، چون این گروه عاملی در ماده اولیه وجود ندارد، لذا طیف حاصل نمایانگر انجام واکنش احیا می باشد. این محصول نیز با کروماتوگرافی کاغذی با حلال متانول کنترل شده و در $R_f=0.6$ محصول اصلی به طور وضوح دیده شد در حالی که در $R_f=0.1$ (مربوط به ماده اولیه) چیزی مشاهده نشد. در سومین مرحله از سنتر، دو ایزومر فضایی Meso و d,1 را که به نسبت مساوی تشکیل می شدند، با بلوری کردن های متناوب از هم جدا کرده، با HPLC مورد شناسایی و کنترل قرار دادیم. چنانچه در شکل (۴) مشاهده می شود، دو ترکیب بسیار به هم نزدیک است به طوری که ایزومر Meso در $R_f=9/4$ و ایزومر d,1 در $R_f=10/2$ از ستون خارج می شوند. محصول بدست آمده در این مرحله ۹۷/۲ درصد ایزومر d,1 داشت.

کنترل رادیوشیمیایی کیت نشاندار شده با محلول



شکل ۴ - HPLC مخلوط دو ایزومر Meso, d,1 و d,1 خالص.

جدول ۱ - R_f ترکیبات مرحله اول سنتز

| فاز متحرک | A | B | C |
|-------------------------------|------|------|------|
| متانول | ۰ | ۰/۱۵ | ۰/۶۵ |
| متانول / اتیل استات (۷:۳) | ۰/۷۰ | ۰ | ۰/۲۰ |
| استونیتریل / اتیل استات (۹:۱) | ۰/۷۰ | ۰ | ۰ |

A: ۲ و ۳- بوتادی‌ان مونوکسیم به نسبت ۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر متانول

B: ۱ و ۳- دی‌آمینودی‌متیل پروپان ۹۹ درصد به نسبت ۰/۰۵ میلی‌لیتر در سه میلی‌لیتر متانول

C: محصول یک به نسبت ۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر متانول

کاغذ کروماتوگرافی: ITLC-SG

جدول ۲ - R_f ترکیبات مختلف پس از نشاندار کردن کیت HMPAO

| ترکیب | سیستم | | |
|----------------------|-------|-----|-----|
| | ۱ | ۲ | ۳ |
| کمپلکس اصلی | ۱/۰ | ۰/۰ | ۱/۰ |
| کمپلکس ثانویه | ۰/۰ | ۰/۰ | ۱/۰ |
| $^{99m}\text{TcO}_2$ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۰ |
| پرتکتات آزاد | ۱/۰ | ۱/۰ | ۱/۰ |

۱ متیل‌اتیل‌کتون - TLC/SG: سیستم ۱
 ۲ سالین - TLC/SG: سیستم ۲
 ۳ استونیتریل ۵۰ درصد - واتمن شماره ۱: سیستم ۳

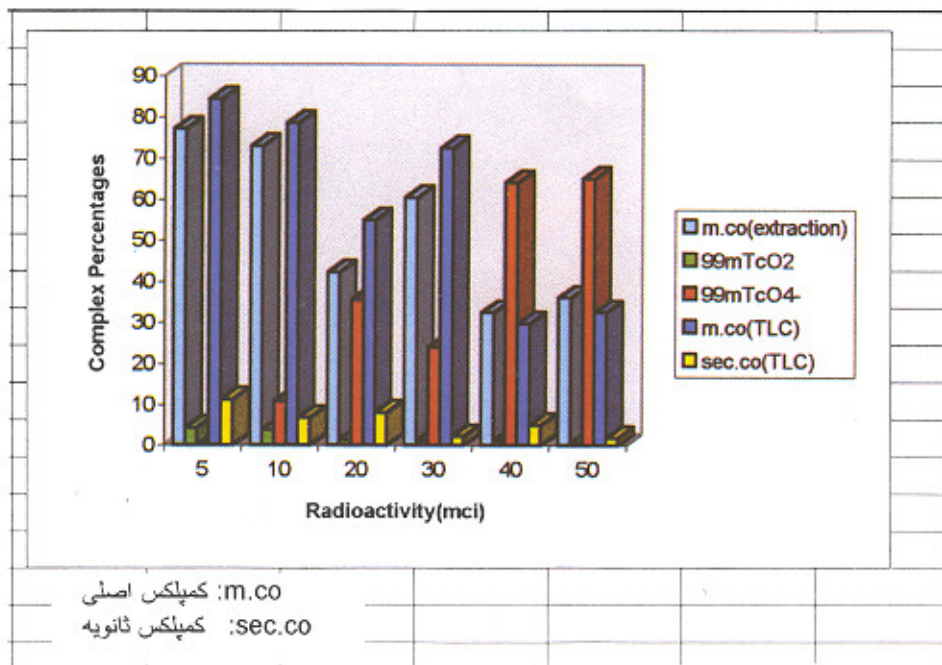
دلیل عدم جداسازی کامل دو فاز است.

از عوامل بسیار مؤثر در نشاندار کردن کیت HMPAO مقدار اکتیویته اضافه‌شده به کیت است. شکل (۵)، تأثیر میزان اکتیویته بر درصد تشکیل کمپلکس را نشان می‌دهد. طبق نتایج بدست‌آمده، حداکثر ۳۰ میلی‌کوری پرتکتات برای نشاندار کردن کیت مناسب است.

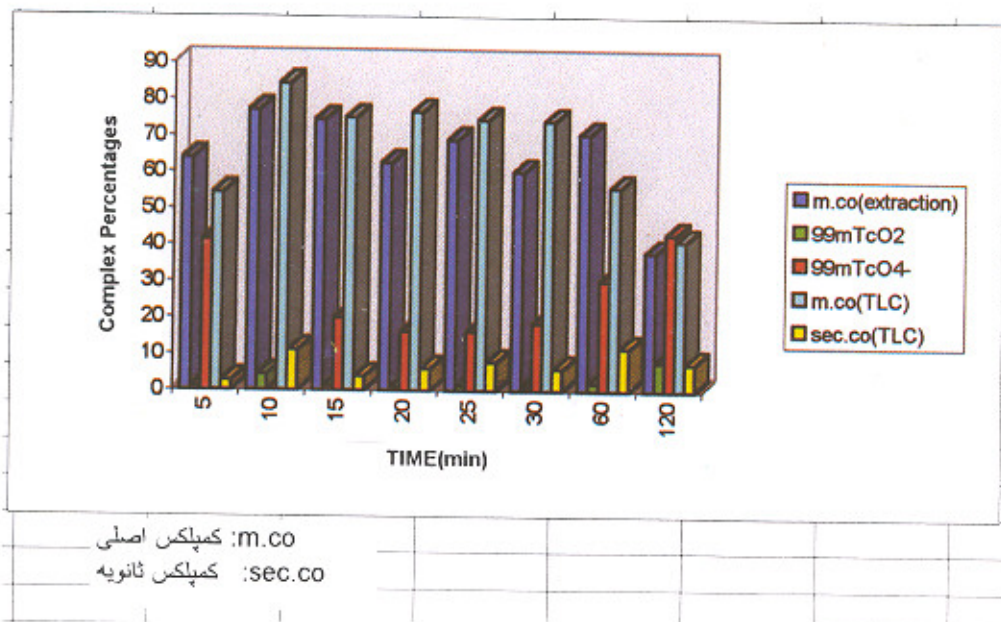
روش دیگر کنترل رادیوشیمیایی کیت نشاندارشده،

استفاده از استخراج با دو حلال سالین و کلروفرم است که خیلی سریع می‌توان درصد تشکیل کمپلکس را به دست آورد. از آنجا که کیت HMPAO بسیار حساس بوده حداکثر نیم ساعت پس از نشاندار کردن قابل استفاده است، در مواقع ضروری روش استخراج ترجیح داده می‌شود. عموماً نتایج حاصل از این روش با نتایج حاصل از TLC مقدار جزئی اختلاف دارد که این مورد به

سنتر HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن



شکل ۵ - تأثیر میزان اکتیویته اضافه شده به کیت بر درصد تشکیل کمپلکس



شکل ۶ - تأثیر گذشت زمان پس از نشاندار شدن کیت بر درصد تشکیل کمپلکس

جذب مورد انتظار در مغز ۲ درصد می‌باشد). این ترکیب به تدریج از طریق روده از بدن دفع می‌گردد.

بحث

HMPAO طی دو مرحله با مکانیسم نوشته شده سنتز می‌گردد:

در مرحله اول، اگر نسبت مواد اولیه استفاده شده مناسب انتخاب نشود، ترکیب a به عنوان یکی از محصولات جانبی و مزاحم تولید خواهد شد. خارج کردن آب تولیدشده در سنتز از اهمیت خاصی برخوردار است (شکل ۷). اگر از روش بیان شده در این مقاله برای سنتز استفاده شود، Molecular Sieve بیشتر می‌تواند در میزان جذب آب تولیدشده مفید باشد و در صورت استفاده از روش بیان شده در مقالات، آب تولیدشده از واکنش جدا می‌شود و با اندازه‌گیری مقدار آن می‌توان بازده واکنش را نیز محاسبه کرد. آن که میزان آب مورد انتظار تولیدشده بیانگر زمان خاتمه واکنش نیز می‌باشد.

در مرحله دوم (شکل ۸)، باید پیوند دوگانه $C=N$ احیا شود در حالی که پیوند دوگانه دوم ($C=N-OH$) محفوظ بماند. در این مرحله، انتخاب احیاکننده مناسب از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا ممکن است واکنش‌های تخریبی صورت گیرند و در واقع کل پیوندهای دوگانه احیا شوند. مناسب‌ترین ترکیب برای این عمل، سدیم بوروهیدرید تشخیص داده شد که مکانیسم احیای ترکیب ا با آن در شکل ۸ آورده شده است.

کمپلکس اصلی $^{99m}Tc-d,1-HMPAO$ پس از نشان‌دار کردن کیت در اثر گذشت زمان به تدریج به کمپلکس ثانویه که کمتر چربی دوست است، تبدیل می‌شود. بنابراین گذشت زمان پس از نشان‌دار کردن کیت از اهمیت خاصی برخوردار است به طوری که در شکل (۶) ملاحظه می‌شود، حداکثر ۳۰ دقیقه پس از نشان‌دار کردن کیت می‌توان آن را تزریق نمود.

کیت HMPAO پس از تهیه، برای مدت زمان محدودی قابل استفاده است و پس از گذشت زمان لازم به تدریج درصد نشان‌دار شدن آن کاهش می‌یابد، به طوری که پس از مدتی عملاً برای بررسی‌های بیولوژیکی قابل استفاده نیست. جدول (۳)، عمر مفید کیت تهیه شده را نشان می‌دهد و بیانگر آن است که پس از ۹۰ روز نیز کیت همچنان قابل استفاده است.

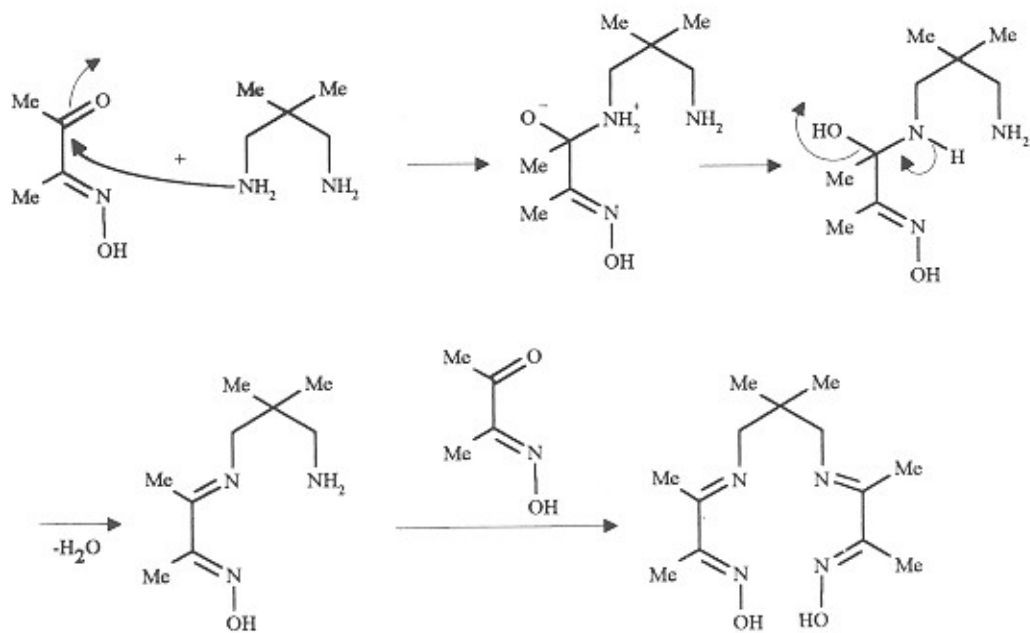
کیت نشان‌دار شده، حداکثر تا ۳۰ دقیقه بعد قابل تزریق می‌باشد. نتایج حاصل از تزریق کیت به موش‌های آزمایشگاهی و تشریح حیوانات در زمان‌های مختلف و میزان جذب اعضای گوناگون در جدول (۴) آورده شده است. چنان که ملاحظه می‌شود، در ابتدا میزان اکتیویته خون بالاست، ولی به تدریج اکتیویته از خون پاک می‌شود به طوری که پس از چهار ساعت، اکتیویته خون به حداقل مقدار خود می‌رسد.

جذب ترکیب چربی دوست در مغز بلافاصله پس از تزریق صورت می‌گیرد، به طوری که پس از چهار ساعت نیز همچنان میزان جذب در حدی است که بتوان از آن SPECT تهیه کرد (در بهترین شرایط، حداکثر

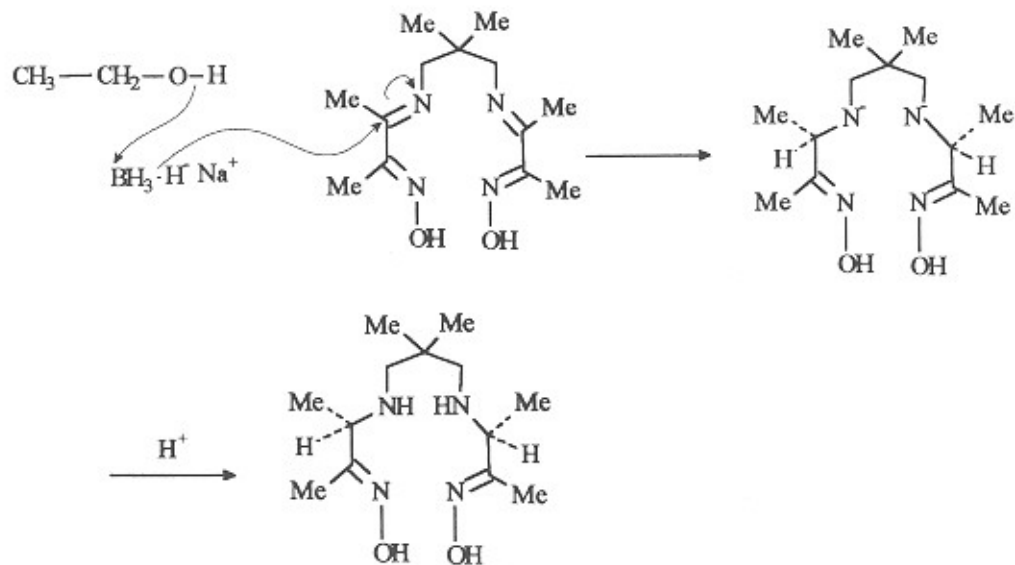
جدول شماره ۳ - تأثیر گذشت زمان بر کیت و درصد نشان‌دار شدن آن

| زمان (روز) | ۷ | ۱۵ | ۳۰ | ۶۰ | ۸۰ | ۹۰ | |
|-------------------|------|------|----|------|-------|------|-------|
| درصد تشکیل کمپلکس | ۷۰/۷ | ۷۳/۲ | ۶۹ | ۷۳/۵ | ۷۵/۱۵ | ۶۲/۷ | ۷۷/۱۳ |

سنتز HMPAO، تهیه کیت و نشاندار کردن آن



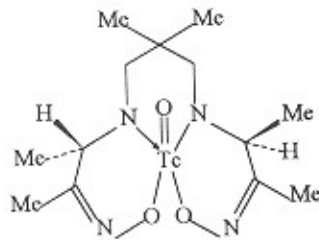
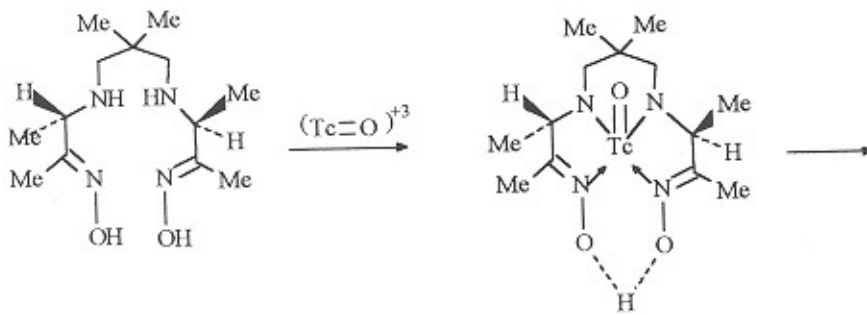
شکل ۷ - مکانیزم سنتز محصول اول



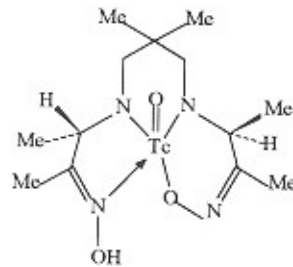
شکل ۸ - مکانیزم احیای ترکیب ۱

قدرت جذب مغزی را نخواهد داشت. لذا با توجه به نتایج حاصل، حداکثر ۳۰ دقیقه پس از نشاندار کردن کیت می‌توان از آن استفاده کرد. البته احتمال وجود ترکیب دیگری نیز تحت عنوان کمپلکس ثانویه وجود دارد ولی این ترکیب بیشتر به صورت حد واسط تبدیل کمپلکس اصلی به ثانویه عمل می‌کند (شکل ۱۰).

دو ایزومر ساخته شده با اختلاف کمی در R_f از ستون HPLC خارج می‌شوند و قابل شناسایی هستند. لیگاند ^{99m}Tc با d,1-HMPAO ترکیب شده، کمپلکس خنثی، چربی دوست و نسبتاً پایداری را تشکیل می‌دهد (شکل ۹). کمپلکس حاصل، پس از تزریق قابلیت جذب در مغز را دارد، ولی پس از گذشت زمان به تدریج به کمپلکس ثانویه آبدوست (شکل ۹) تبدیل می‌شود و



شکل ۹ - تشکیل کمپلکس‌های اولیه و ثانویه HMPAO - ^{99m}Tc



شکل ۱۰ - نوع دیگر کمپلکس ثانویه

جدول ۴- بررسی نحوه توزیع در بدن در زمان‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار سه موش و در صد جذب شده در عضو)

| | | | | | | | | |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---|--------------|
| ۳/۲ \pm ۰۳ | ۸۶/۳ \pm ۶۷/۵۳ | ۸/۲ \pm ۱،۸ | ۹۸/۳ \pm ۷/۶۸ | ۷۳/۱ \pm ۳۸/۲۸ | ۹۸/۱ \pm ۳۰/۶۱ | ۵۵/۲ \pm ۲/۲۱ | ۲ | زمان (دقیقه) |
| ۹۸/۰ \pm ۱/۱ | ۸۱/۰ \pm ۱/۱ | ۳۸/۰ \pm ۳/۱ | ۸۱/۰ \pm ۲/۱ | ۹۸/۰ \pm ۳۳/۱ | ۸۶/۱ \pm ۶۵/۲ | ۸۳/۰ \pm ۳۳/۱ | | روده |
| ۳۳/۰ \pm ۷/۸ | ۹۵/۰ \pm ۸/۳ | ۸۷/۰ \pm ۸/۳ | ۸۶/۰ \pm ۶۷/۳ | ۹۳/۰ \pm ۳۳/۵ | ۶۱/۱ \pm ۶۳/۶ | ۷۱/۲ \pm ۳۶/۸ | | معدده |
| ۳۳/۲ \pm ۶/۳۱ | ۳۰/۲ \pm ۶۸/۳۱ | ۱۸/۱ \pm ۶/۳۱ | ۳۸/۰ \pm ۶۳/۰۲ | ۶۰/۱ \pm ۶۳/۳۲ | ۳۸/۰ \pm ۳۰/۱۲ | ۶۷/۲ \pm ۳۷/۱۸ | | کبد |
| ۶۸/۰ \pm ۲/۱ | ۹۳/۰ \pm ۳۱/۱ | ۸/۰ \pm ۳۱/۱ | ۸۱/۰ \pm ۱/۱ | ۳۲/۰ \pm ۳۱/۱ | ۱۱/۰ \pm ۸۰/۱ | ۲/۰ \pm ۱ | | مغز |
| ۳۶/۱ \pm ۲/۵ | ۹۷/۱ \pm ۳۵/۵ | ۶/۳ \pm ۸/۰۱ | ۶۶/۱ \pm ۶۵/۱۱ | ۵۵/۱ \pm ۱/۰۱ | ۱۶/۱ \pm ۶۶/۱۱ | ۳۸/۲ \pm ۲/۳۳ | | خون |
| ۲۶۰ | ۱۲۰ | ۶۰ | ۳۰ | ۵۱ | ۵ | | | عضو |

مغز به سلول‌های مغزی معادل ۵/۴ درصد است که این مقدار تداخلی در تصویر SPECT نخواهد داشت.

در طی سال‌های اخیر، مطالعات جامع و وسیع بالینی در مراکز گوناگون در سطح جهان بر روی $^{99m}\text{Tc-d,1-HMPAO}$ صورت گرفته است و کیفیت بالای SPECT بدست آمده، تأییدی بر استفاده روزافزون از این ترکیب به عنوان یک رادیوداروی مناسب مغزی می‌باشد. لازم به ذکر است که ترکیب فوق به عنوان یک ترکیب بسیار مناسب برای نشاندار کردن گویچه‌های سفید و پلاکت‌های خونی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه همکاران بخش رادیوایزوتوپ به ویژه آقایان علی‌اصغر یراقچی، مجتبی عبدالله‌پور، حسین حمزه‌ای، مهدی صابری و خانم فاطمه محمودخان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

واکنش تبدیل کمپلکس اصلی به ثانویه هم به صورت *in vitro* و هم *in vivo* انجام پذیر است. چنانچه این واکنش قبل از تزریق صورت گیرد، از کیفیت رادیودارو کاسته شده، قابلیت جذب مغزی آن راکاهش می‌دهد و در صورتی که تبدیل فوق درون سلول‌های مغزی انجام گیرد، مانع دفع سریع رادیودارو از مغز می‌شود و فرصت کافی برای SPECT وجود خواهد داشت.

اکتیویته بالای خون پس از تزریق به دلیل به دام افتادن کمپلکس بین گویچه‌های قرمز خون است و مکانیسم این به دام افتادن می‌تواند مشابه عمل کمپلکس درون سلول‌های مغزی باشد^(۱). این مقدار اکتیویته تأثیری بر کیفیت SPECT نخواهد داشت، زیرا در انسان حجم خون موجود در مغز ۶/۰ درصد حجم کل خون است و یک ساعت پس از تزریق $^{99m}\text{Tc-d,1-HMPAO}$ حدود ۲/۱۰ درصد از کل اکتیویته تزریقی در کل خون جذب می‌شود و در عین حال میزان جذب در سلول‌های مغزی معادل ۱۳/۱ درصد می‌باشد، لذا نسبت اکتیویته جذب شده در خون

منابع

- 1 - Neirinckx Rudi D. Canning Lewis R. et al. Technetium-99m d,1 - HMPAO: A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. J. Nucl. Med. 1987; 28: 191-202.
- 2 - Volkert WA. Stereoreactivity of ^{99m}Tc - Chelates at chemical and physiological levels. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine. 1989; 343-352.
- 3 - Ballinger James R. Gulenchyn Karen Y. et al. Radiopharmaceutical factors in the variable quality of [^{99m}Tc] HMPAO images of the brain. J. Nucl. Med. 1990; 31(1): 118-122.
- 4 - Srivastava SC. Straub RF. Blood cell labeling with ^{99m}Tc : progress and perspectives. Seminars in Nuclear Medicine. 1990; 20(1): 41-51.
- 5 - Mazzi U. Nicolini M. et al. Technetium coordination chemistry: Development of new backbones for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine. 1989; 39-50.
- 6 - Jurisson S. Schlemper EO,... et al. Synthesis, characterization, and x-ray structural determinations of Technetium (V)-oxo- tetradentate amine oxime complexes. Inorg Chem. 1986; 25: 543-549.