J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 41, pp. 9-14, 2007

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۴۱، صفحات ۱۴-۹، ۱۳۸٦

سنتز بی‌فسفونات HEDP بعنوان رادیوداروی تشخیصی استخوانی-^{99m}Tc

غلامعلی شعبانی*، مجتبی عبداله‌پور، رضا نجفی

بخش رادیوایزوتوپ، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران- ایران

چکیده: رادیوداروهای تشخیصی ^{99m}Tc-MDP و ^{99m}Tc-HEDP بیش از سه دهه است که برای سنتیگرافی استخوان بکار می‌روند. هدف از اجرای این کار پژوهشی سنتز بی‌فسفونات HEDP در بخش تهیه و تولید رادیوایزوتوپ است که بعنوان ماده اولیه برای تولید کیت لیوفیلیزه HEDP بصورت استریل و بدون مواد تب‌زا می‌باشد. نتایج حاصل نشان می‌دهند که ماده سنتز شده HEDP بیش از ۹۵ درصد قابلیت نشاندارشدن با رادیوداروی پرتکنتات $^{99m}TcO_4^-$ را داشته و کلیه آزمایشهای رادیوداروئی آن مطابق با فارماکوپه USP می‌باشد. ضمناً پایداری کیت کافتی خواه شده (لیوفیلیزه) HEDP بیش از یک سال در دمای یخچال (۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد) است.

واژه‌های کلیدی: سنتز بی‌فسفونات، HEDP، FTIR، NMR، اسکن استخوان، تکنسیوم-99m

Synthesis of a Biphosphonate (HEDP) as a Bone Imaging Agent with ^{99m}Tc

G. Shabani*, M. Abdollahpoor, R. Najafi
Radioisotope Dep, Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 11365-3486, Tehran – Iran

Abstract: In the last three decades, ^{99m}Tc-MDP and ^{99m}Tc-HEDP have been used as diagnostic radiopharmaceuticals for bone imaging agents. The radioisotope Department after many investigations decided to develop the synthesis of a biphosphonate derivative, named 1-hydroxy-ethylidene-1, 1-disodium phosphonate (HEDP). In this article, we discuss the method of synthesis, formulation, and labeling of lyophilised kit with ^{99m}Tc. The results show that our kit has a high radiochemical purity (>95%), according to the US pharmacopeia. In addition, the stability of lyophilised HEDP kit is more than one year at 4-8^{o}C.

Keywords: ***Synthesis of Biphosphonate, HEDP, FTIR, NMR, Bone scan, ^{99m}Tc***

*email: gashabani@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۱/۲۶

۱- مقدمه

بی‌فسفوناتها ترکیباتی هستند که در تشخیص اختلالات کلسیوم و متابولیسم استخوانی بیش از سه دهه بکار رفته‌اند. بی‌فسفوناتها آنالوگ پیروفسفات (P-O-P) هستند و با دو پیوند کربن فسفات (P-C-P) مشخص می‌شوند. بر خلاف پیروفسفات که به وسیلهٔ هیدرولیز آنزیمی شکسته می‌شود، پیوند P-C-P بی‌فسفوناتها در مقابل هیدرولیز مقاوم است. جایگزین کردن عواملی بجای هیدروژن متصل به اتم کربن منجر به سنتز ترکیبات مختلفی از بی‌فسفوناتها می‌شود که هر کدام خواص فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی، درمانی و سمیت مشخصی دارد.

از مهمترین بی‌فسفوناتهایی که تاکنون بعنوان رادیوداروهای ^{99m}Tc برای تصویربرداری از استخوان بکار رفته‌اند عبارتند از متیلن‌دی‌فسفونات MDP (که در آن اتم کربن به دو اتم هیدروژن متصل است)، هیدروکسی‌متیلن‌دی‌فسفونات HMDP (که اتم کربن به یک اتم هیدروژن و یک OH متصل است) و هیدروکسی اتیلیدن دی‌فسفونات HEDP (اتم کربن به یک رادیکال متیل و یک عامل OH متصل است) [۱، ۲ و ۳].

هدف از اجرای سنتز بی‌فوسفونات HEDP به عنوان ماده اولیه برای تهیه کیت رادیوداروی تشخیصی استخوانی است که پس از نشاندارشدن با پرتکنتات سدیوم ($^{99m}TcO_4^-$) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روشها

۲-۱ روش تهیه اسید بی‌فسفونات HEDP

در یک بالون ۲۵۰ میلی‌لیتری ته گرد سه دهانه‌دار (یک دهانه برای قرار دادن دماسنج، دهانهٔ دیگر برای انجام عمل تقطیر با بخار آب و دهانه اصلی برای قرار گرفتن کندانسور) که دارای یک همزن مغناطیسی است مقدار ۹۰ گرم اسید استیک (۱/۵ مول) ریخته و به آرامی ۳۴/۴ گرم کلرید فسفر (۰/۲۵ مول) به آن اضافه کرده و به آرامی در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد [۳]. سپس بالون واکنش در ظرف محتوی آب یخ قرار داده شد و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به ملایمت مخلوط گردید؛ بالون را از آب یخ خارج کرده و به یک مبرد متصل و دهانه دوم بالون با چوب پنبه لاستیکی که دماسنجی از آن عبور کرده بود بسته شد و دهانه سوم با یک در شیشه‌ای مسدود گردید، سپس دستگاه را درون حمام پارافین قرار داده و دمای مخلوط واکنش به آرامی حداقل به مدت دو ساعت تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد.آنگاه مخلوط را طی مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به دمای ۱۲۰-۱۱۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و بعد دما ثابت نگاه داشته شد تا مخلوط به دو فاز تقسیم شود. فاز آبی (بالایی) که حاوی اسید استیک بود به وسیلهٔ عمل تقطیر با بخار آب بطور کامل از محیط عمل خارج گردید. ماده نیمه جامد شفاف باقیمانده در ته بالن، همان محصول مورد نظر یعنی هیدروکسی اتیلیدن دی فسفونیک اسید بود که درجه حرارت آن را به آرامی به دمای اطاق رسانده سپس برای نگهداری در یخچال گذاشته شد.

۲-۲ تهیه نمک دی سدیوم HEDP

مواد لازم: هیدروکسید سدیوم، آب مقطر

اسید سنتز شده HEDP را در مقداری آب مقطر حل کرده، سپس pH آن با محلول سود نرمال به ۹ رسانده شد و نمک دی‌سدیوم حاصل به وسیلهٔ تبخیرکننده گردان تحت خلاء جدا گردید. ماده جامد حاصل در حداقل آب مقطر گرم حل شد تا یک محلول فوق اشباع بدست آید؛ آنگاه چند قطره اتانول داغ را به آن افزوده و پس از همزدن، بی‌درنگ در آب سرد فرو برده شد تا متبلور شود. بلورها پس از جدا کردن به وسیلهٔ قیف بوخنر در خلاء خشک شدند. برای بررسی درجه خلوص نمک به دست آمده، از طیف نگار IR استفاده شد و پس از اطمینان کامل از خلوص آن، به صورت کیت‌های لیوفیلیزه تهیه و با تعیین درصد جذب استخوانی ^{99m}Tc-HEDP در حیوانات آزمایشگاهی و بازده نشاندار شدن کمپلکس مذکور (بیش از ۹۰ درصد) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳ تهیه طیف IR و NMR و نمودار تیتراسیون

برای تهیه نمودار تیتراسیون اسید سنتز شده HEDP از محلول هیدروکسید سدیوم نرمال و با استفاده از وسایل تیتراسیون متداول انجام گرفت که نتایج آن در قسمت "بحث و نتایج" بیان شده است.

طیف فروسرخ (IR) و حصول درستی سنتز از نمک دی‌سدیوم HEDP سنتز شده به همراه KBr به صورت قرص

درآورده شد، سپس با استفاده از دستگاه FITR با مارک BOMEM، MB-Series پیکهای جذبی آن مشخص گردید. لازم به توضیح است، پس از تهیه هر بار HEDP، طیفهای IR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج پیکهای جذبی به تفصیل در قسمت "بحث و نتایج" آمده است.

باید به خاطر داشت که علاوه بر این آزمایشهای کنترلی، هر بار سنتز شده HEDP پس از تهیه کیت خشک (لیوفیلیزه) برحسب درجه خلوص رادیوشیمیایی و رادیوبیولوژیکی بر طبق منوگراف رادیو داروهای ^{99m}Tc فارماکوپه‌های معتبر انجام گرفت. نتایج طیف NMR نیز در بخش بحث و نتایج آمده است.

۲-۴ فرموله کردن کیت HEDP و نشاندارکردن آن با ^{99m}Tc

ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم نمک دی‌سدیوم HEDP را در ۱۸ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده حل کرده و به آن یک میلی‌لیتر از محلول کلرید قلع (II) دی‌هیدراته می‌افزاییم (مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم کلریدقلع‌دی‌هیدراته را در ۰/۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک حل کرده و به آن ۹/۸ میلی‌لیتر آب مقطر می‌افزاییم). و pH محلول نهایی را در محدوده ۷-۶ تنظیم می‌کنیم [۴]. محلول تهیه شده را از صافی ۰/۲۲ میکرون عبور داده و در ویالهای استریل ۱۰ میلی‌لیتری به حجم ۱ میلی‌لیتر تقسیم می‌کنیم. برای عمل لیوفیلیزاسیون، آنها را در دستگاه فریزدرایر بمدت ۴۸ ساعت قرار داده و در پایان، کیت‌ها را تحت خلاء می‌بندیم و برای کنترل خواص رادیوشیمیایی و بیولوژیکی با ماده رادیوآکتیو ^{99m}Tc نشاندار می‌کنیم.

برای نشاندار کردن کیت HEDP، مقدار آکتیویته لازم (۵-۱۰۰mCi) با حجم ۵-۱ میلی‌لیتر را به ویال لیوفیلیزه HEDP افزوده (ویال درون کانتینر سربی قرار داده می‌شود) و پس از گذشت حدود ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۰°C) کنترلهای رادیوشیمیایی و بیولوژیکی روی آن انجام می‌گیرد.

۲-۵ کنترل کیفی رادیوداروی ^{99m}Tc-HEDP

کنترل کیفی رادیواروها معمولاً به دو صورت رادیوشیمیایی و کنترل بیولوژیکی انجام می‌گیرد:

۲-۵-۱ کنترل رادیوشیمیائی

خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس تشکیل شده HEDP با ^{99m}Tc، به روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) معین شد. در این روش از دو حلال مختلف برای جداسازی ناخالصیهای رادیوشیمیایی پرتکنتات آزاد ($^{99m}TcO_4^-$) و تکنسیوم هیدرولیز شده ($^{99m}TcO_2$) استفاده شد [۵].

۲-۵-۲ کنترل بیولوژیک

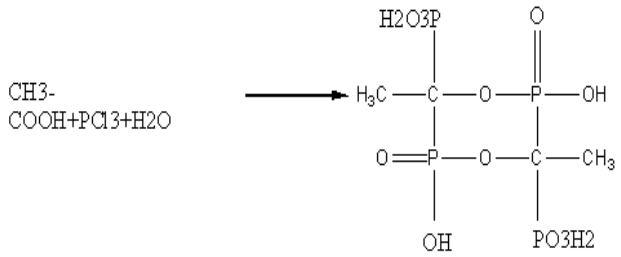
برای بررسی آزمایش توزیع در بدن از حیوانات آزمایشگاهی مانند موش صحرایی استفاده شد، که در این روش پس از تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر ^{99m}Tc-HEDP با آکتیویته ۲۰۰-۱۰۰ میکروکوری به سیاهرگ دمی و با گذشت یک ساعت، حیوان را تشریح و اعضایی مانند خون، استخوان ران، کبد، کلیه، معده و روده‌ها را جدا کرده و تعیین مقدار جذب رادیودارو در هر اندام به وسیلهٔ دستگاه دتکتور سدیوم یدید (Ortec) انجام گرفت.

۳- بحث و نتایج

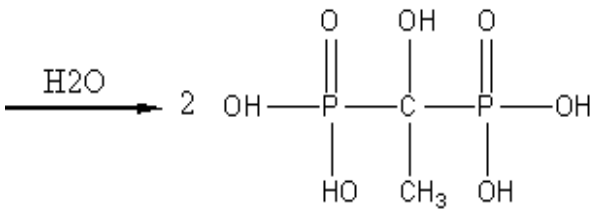
ساخت کیت HEDP از سه جهت مورد بررسی قرار گرفت:

۳-۱ سنتز لیگاند HEDP

یکی از آسانترین روشهای تهیه هیدروکسی اتیلیدن دی‌فسفونیک‌اسید، واکنش متراکم کردن اسیداستیک و کلریدفسفر به نسبت مولی ۶ به ۱ است:



محصول کندانساسیون حلقوی مطابق واکنش زیر به هیدروکسی دی فسفونیک اسید دو تایی[1] هیدرولیز می‌شود:

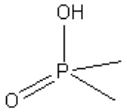
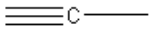


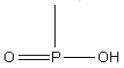
اسید HEDP بدست آمده به وسیلهٔ محلول سود نرمال، به نمک دی‌سدیوم در pH=8.5 تهیه شد. برای کنترل کیفی اسید HEDP، از محلول سود نرمال برای تهیه نمودار تیتراسیون آن استفاده شد که نشان‌دهنده یک اسید تری بازیک است که سه نقطه هم ارز در pHهای ۵/۴، ۸/۴ و ۱۰/۷ دارد [۶]. همچنین برای بررسی درجه خلوص آن از پیک NMR و FTIR نمک دی‌سدیوم آن استفاده شدکه پیکهای جذبی زیر در آن شناسایی شدند.

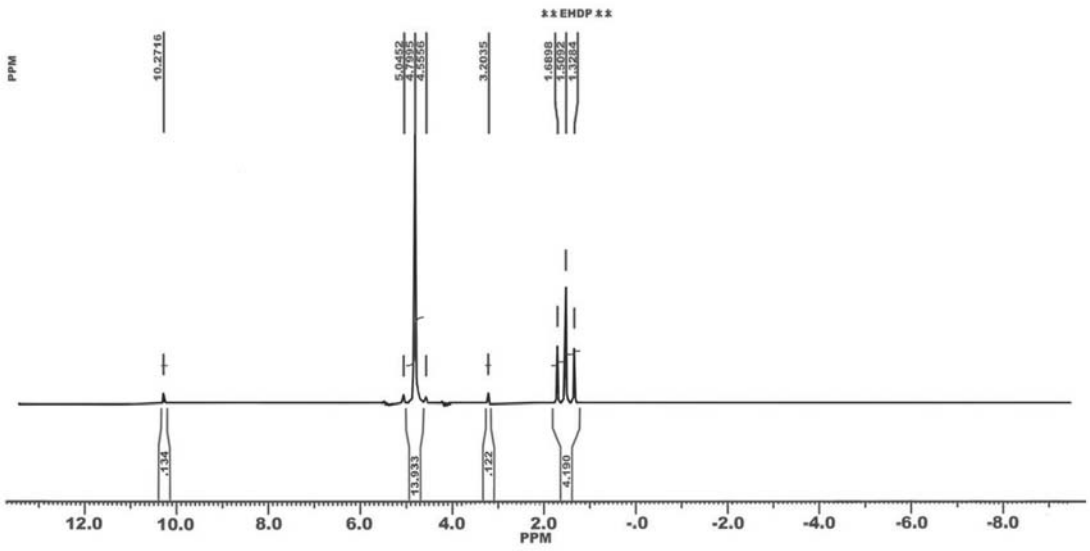
در طیف NMR نمک دی‌سدیوم پیک مربوط به پروتونهای متیل در ۱/۵ppm مشاهده شد که به وسیلهٔ دو گروه فسفر به صورت سه شاخه درآمده است (j=۱۴/۸Hz). پیک مربوط به H-O-D در ۴/۷۹ppm و پیکهای ضعیف مربوط به OH که با دوتریوم پوشیده شده است در ۳/۲ppm (OH متصل به کربن) و در ۱۰/۲۷ppm (OH متصل به گروههای فسفات) دیده می‌شود (شکل ۱).

1H NMR δ:1.50(t,J=14.8 Hz,3H)

در طیف FTIR نمک دی‌سدیوم، این پیکها شناسایی شدند:

- $۲۳۰۰Cm^{-1}$ (پهن با شدت متوسط): مربوط به ارتعاش خمشی OH- متصل به گروه  که فقط دارای یک OH باشد.
- $۱۶۷۰Cm^{-1}$ (پهن با شدت متوسط): مربوط به گروه O=P-OH که فقط دارای یک OH باشد.
- $۱۴۵۰Cm^{-1}$ (تیز با شدت ضعیف): ارتعاشی خمشی نامتقارن گروه 
- $۱۳۵۰Cm^{-1}$ (تیز با شدت متوسط): ارتعاشی خمشی OH
- $۱۱۴۰ Cm^{-1}$ (تیز با شدت زیاد): P=O آلیفاتیک
- $۱۱۰۰Cm^{-1}$ (تیز با شدت زیاد): ارتعاشی خمشی OH–
- سه پیک (تیز با شدت زیاد) در $۱۰۶۰Cm^{-1}$، ۹۷۰، ۹۱۰:

ترکیبات آلی فسفردار حدود $۹۸۰Cm^{-1}$ شروع به جذب شدن می‌کنند بنابراین پیک $۹۷۰Cm^{-1}$ احتمالاً مربوط به این جذب است. پیک $۱۰۶۰Cm^{-1}$ نیز احتمالاً مربوط به جذب فسفاتهای یونی است. علاوه بر آن گروه  که دارای یک OH باشد و گروه P-OH نیز در حدود $۹۰۰-۱۱۰۰Cm^{-1}$ از خود جذب قوی نشان می‌دهند که پیک $۹۱۰Cm^{-1}$ ممکن است مربوط به آن باشد، بنابراین پیکهای جذبی مذکور صحت سنتز HEDP را تأیید می‌کنند. هر چند جذب استخوانی ترکیب مذکور در حیوانات آزمایشگاهی و بازدهی بالای بعد از نشاندار شدن با ^{99m}Tc دال بر صحت سنتز می‌باشد.



شکل ۱- طیف NMR نمک دی‌سدیوم HEDP.

۳-۲ فرموله کردن کیت HEDP

کیت ایده‌آل تکنسیوم-۹۹m، کیتی است که با حداقل کار آماده‌سازی، حداکثر بازده نشاندار شدن را داشته باشد. بنابراین باید بصورتی تهیه شود که با افزودن محلول رادیوآکتیو پرتکنتات سدیوم ($Na^{99m}TcO_4$) در محل مصرف (بیمارستانها) در حداقل زمان ممکن کمپلکس رادیوداروی ^{99m}Tc-HEDP تشکیل گردد. در فرموله کردن کیت HEDP علاوه بر مقدار لیگاند، میزان کلرایدقلع (II) نیز بسیار مهم است، زیرا بعنوان عامل احیاکننده پرتکنتات ($^{99m}TcO_4^-$) عمل می‌کند. این ماده سبب می‌شود که ابتدا ^{99m}Tc از ظرفیت ۷ به ظرفیت‌های کمتر احیاء شود سپس با لیگاند، کمپلکس ^{99m}Tc-HEDP را بدهد. با توجه به موارد فوق موارد زیر در نظر گرفته شده و بازده نشاندارشدن کیت بیش از ۹۵ درصد است.

- اتیلن هیدروکسی دی‌فسفونات سدیوم ۱۰ میلی‌گرم
- کلرید قلع (II) دی‌هیدراته ۱میلی‌گرم
- سدیوم کلراید ۴/۵ میلی‌گرم
- حداکثر می‌توان تا ۱۵۰ میلی‌کوری پرتکنتات سدیوم به هر ویال اضافه کرد.
- هر ویال را می‌توان با ۲ تا ۵ میلی‌لیتر محلول رادیوآکتیو یا نرمال سالین رقیق کرد.
- کیت نشاندار شده را می‌توان تا ۴ ساعت بعد از نشاندارکردن مورد استفاده قرار داد.

۳-۳ روش کنترل کیفی رادیوداروی استخوانی ^{99m}Tc-HEDP

برای تعیین میزان خلوص رادیوداروهای-^{99m}Tc، معمولاً از دو روش کروماتوگرافی روی کاغذ و توزیع در بدن حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود [۷].

- برای تعیین میزان خلوص رادیوشیمیایی ^{99m}Tc-HEDP به روش کروماتوگرفی از کاغذ واتمن شماره ۱ به ابعاد ۱۰×۱ سانتی‌متر و برای تعیین هر یک از ناخالصیهای رادیوشیمیایی $^{99m}TcO_2$ و $^{99m}TcO_4^-$ از حلالهای زیر استفاده شد.

در حلال متانول-استون (۱:۱) پرتکنتات آزاد ($^{99m}TcO_4^-$) در جلو حلال حرکت کرده (Rf=1) کمپلکس و تکنسیوم هیدرولیز شده در مبدأ باقی می‌ماند.

در حلال اسیدفسفریک ۱۵ درصد، تکنسیوم احیاء شده ($^{99m}TcO_2$) در مبدأ باقی می‌ماند (Rf=0.0)، کمپلکس و پرتکنتات آزاد در جلو حرکت می‌کنند.

مجموع درصد ناخالصی رادیوشیمیایی پرتکنتات آزاد و تکنسیوم هیدرولیز شده نباید بیش از ۱۰ درصد باشد بعبارت دیگر درجه خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس ^{99m}Tc-HEDP حداقل ۹۰ درصد باید باشد [۷].

- در روش توزیع در بدن حیوانات آزمایشگاهی (کنترل بیولوژیک) با تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر کمپلکس ^{99m}Tc-HEDP با آکتیویته ۲۰۰-۱۰۰ میکروکوری به هر یک از سه موش بزرگ آزمایشگاهی و گذشت یک ساعت از تزریق، نتایج درصد جذب در اندام و مقدار انحراف معیار هر یک از اندامهای خون، معده، روده‌ها، کبد، کلیه‌ها و استخوان ران در جدول ۱ مندرج است.

لازم به ذکر است که در کیت فرموله شده در بخش رادیوایزوتوپ پژوهشکده علوم هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران پس از گذشت یکسال تغییری در میزان بازدهی تشکیل کمپلکس بوجود نیامده است، بعبارت دیگر مقدار درصد کمپلکس تشکیل شده ^{99m}Tc-HEDP بعنوان رادیوداروی تشخیصی بیش از ۹۵ درصد می‌باشد. کیت HEDP بصورت لیوفیلیزه، استریل و عاری از مواد تب‌زا در اختیار مراکز پزشکی هسته‌ای کشور قرار می‌گیرد.

جدول ۱- توزیع بیولوژیکی رادیوداروی ^{99m}Tc-HEDP در بدن Rat.

اندام	خون	استخوان ران	کبد	کلیه‌ها	معده	روده‌ها
درصد جذب بر ارگان	۳/۴۶±۰/۸۷	۱/۸±۰/۲۳	۰/۹±۰/۰۵	۱/۲±۰/۱۷	۰/۱۶±۰/۰۵	۱/۳۶±۰/۴۷

پی‌نوشت:

۱- Geminate

References:

1. C.D. Russell, and A.G Cash, "Complexes of technetium with pyrophosphate, etidronate and medronate," J. Nucl. Med. **20**.532-37(1979).

2. J.A. Bevan, J.A Tofe, J.J Bendict, et al. ^{99m}Tc-HMDP (hydroxymethylene diphosphonate) "A radiopharmaceutical for skeletal and acute myocardial infarct imaging. I. Synthesis and distribution in animals," J. Nucl. Med. **21**,961-66 (1980).

3. F.P. Castronovo, "Method for the synthesis of 1-hydroxyethylidene-1, 1-disodium phosphonate (HEDSPA), a skeletal seeking radiopharmaceutical after labeling with ^{99m}Tc," J. Nucl. Med. **15**, 1237-30 (1974).

4. IAEA-TECDOC-649, "Preparation of kits for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals," IAEA,Vienna (1992).

5. C.B. Sampson, quality control of radiopharmaceuticals; text book of radiopharmacy, 3rd edition, Gordon and Breach Science Publishers (1999).

6. F.P Castronovo, Jr. and Ronald J. Callaham, "New bone scanning agent; ^{99m}Tc-labeled 1-Hydroxy-ethylidene-1, 1-disodium phosphonate," J. Nucl. Med. **13**,823-827 (1972).

7. The United States Pharmacopeia, "Official monographs/technetium," (2005).