

^{99m}Tc -人血白蛋白聚合大颗粒肺显像剂的研制

许蓉珠 范广誉 刘英妹 白索珍

(中国原子能科学研究院, 北京)

夏振民 顾淑琴

(中国药品生物检定研究所, 北京)

· 本工作采用吐温-80作分散剂和稳定剂,提高了人血白蛋白聚合大颗粒的粒度均匀性和产物浓度。冻干品的稳定性达8个月,标记率在95%以上。采用离心分离法和微型纸层析法相结合,可得到 ^{99m}Tc -MAA及还原 ^{99m}Tc (IV)和游离 ^{99m}Tc (VII)的百分率。未冻干MAA样品的稳定性达51天。小鼠的器官分布试验达到美国药典同类产品的标准。其毒性试验结果达到中国药典的要求。兔子的 γ 照相结果表明肺的摄取率高达90%。注射 ^{99m}Tc -MAA的兔子2小时后,仍然保持高的肺摄取率,说明此药盒可用作肺显像诊断和研究。

关键词 人血白蛋白聚合大颗粒,肺显像剂,微型纸色层,动物器官,放射性分布,吐温-80, γ 照相。

一、前言

1974年Lyster等人^[1]用吸附亚锡离子的聚合大颗粒人血白蛋白(简称MAA)和 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 作用,使高价锝还原成四价锝并螯合生成 ^{99m}Tc -MAA,在 $10\sim 90\mu\text{m}$ 之间的 ^{99m}Tc -MAA粒子可作为理想的肺显像剂。1981年夏振民等人^[2]改进了Lyster方法,合成了MAA的冻干品药盒。1983年Janabi等人^[3]报道了一种制备大颗粒人血白蛋白的新技术。本工作在文献[2]基础上,用吐温-80作稳定剂和分散剂,改善粒度的均匀性和产物浓度,方法方便可靠,重复性好。

二、人血白蛋白聚合大颗粒肺显像剂的研制

1. 试剂与装置

人血清白蛋白(无菌无热原),北京市输血站供应;吐温-80,上海大众制药厂制品;氯化亚锡,乙酸钠,盐酸均为分析纯,北京化工厂生产;注射用水,北京市永康制药厂生产。

1988年2月10日收到,1990年2月28日收到修改稿。

电热恒温水浴锅HH, S11-1型, 北京长安科学仪器厂制; 电动搅拌器, 上海地理模型厂制。

2. 制备方法

将三颈反应瓶置于80±1℃的恒温水浴上, 搅拌速度约2000rpm, 加入0.5ml的吐温-80, 取1ml 50mg白蛋白/ml (乙酸钠) 于反应瓶中, 再加入4ml浓度为100mg/ml的乙酸钠溶液, 随后加19ml注射用水, 1.0ml 5mg SnCl₂/HCl(1mol/l), 25ml注射用水。搅拌10min, 白蛋白溶液变成粒子均匀的变性白蛋白悬浮液, 反应完毕用显微镜测粒度, 粒子大小均在10μm至<100μm之间。实验证明, 加料次序对MAA粒子大小无影响。

3. 实验条件的影响

在研制MAA药盒过程中, 研究了反应温度、搅拌速度和pH值对粒子大小的影响, 结果如下。

(1) **反应温度影响** 在制备MAA药盒时, 观察了78℃, 80℃, 84℃, 88℃, 90℃下粒子大小的变化, 发现在78—80℃之间, <50μm的粒子较多; 84—88℃之间, 50μm—<100μm的粒子多些, 个别粒子>100μm; 90℃以上的反应温度, 有较多的100μm—150μm的粒子, 并出现絮状物。为此反应温度以80℃为宜。

(2) **搅拌速度影响** 通过实验发现, 按文献[2], 因电磁加热器仅有三个控制档, 在反应过程中, 搅拌速度不易掌握, 造成反应温度起伏大, 往往出现白蛋白凝聚粒子偏大的现象。因此本工作采用控温精度为±1℃的恒温水浴和固定搅拌速度的操作方式。经试验, 搅拌速度为2000rpm时, 得到的粒子大小较理想, 重复性良好。

(3) **pH值影响** 实验中比较了pH值为4.0, 4.5, 5.0, 5.5时的粒子大小, 由显微镜观察未发现粒子大小有明显变化。为此制备MAA药盒时, 将pH值调节在5.0左右。

4. ^{99m}Tc-MAA的放射化学纯度测定

任取一瓶MAA冻干品加入^{99m}Tc淋洗液5ml左右(18ml洗脱液放射性活度约1.85×GBq), 放置片刻后, 待粒子分散均匀, 再进行放化纯度测定, 方法如下。

(1) **纸层析法** 用玻璃毛细管取^{99m}Tc-MAA样品点于Whatman No.1的层析纸原点处, 用XWY-1型便携式表面污染仪测量其计数到合适的数值(>500计数/s), 待吹干后置于层析缸内, 以醇试剂(含90%乙醇, 5%甲醇, 5%异丙醇):1mol/l盐酸=19:1为展开剂, 展开到10—15cm, 取出干燥后, 用EA-120A型γ层析扫描仪测量放射性分布。^{99m}Tc-MAA $R_f=0$, 游离TcO₄⁻ $R_f=0.9$, 然后计算标记率。结果示于图1和图2。

从图1可见, ^{99m}Tc-MAA在16℃和22℃时, 8h后标记率仍然高达95%以上, 图2表明冻干品MAA药盒稳定性达8个月。

(2) **离心法和微型纸层法联用** 将含吐温的MAA冻干品中加入0.1ml^{99m}Tc的淋洗液(每毫升约74MBq), 4.9ml生理盐水, 在63℃水温下加热5min, 在2000rpm的转速下离心5min, 在离心前先取0.1ml的溶液测总计数, 作为计算标记率的分母, 再取离心分离后的上清液0.1ml测计数, 作为分子, 测标记率=1-(分子计数/分母计数)×100%。

再将离心后的上清液进行微型纸层分析, 这样可将游离的^{99m}Tc(VII)和还原的^{99m}Tc(IV)

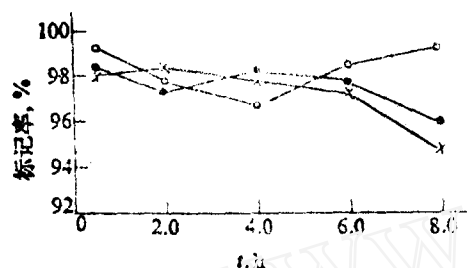


图1 ^{99m}Tc -MAA样品在不同温度
和不同时间后标记率的比较
○—16°C; ●—22°C; △—32°C。

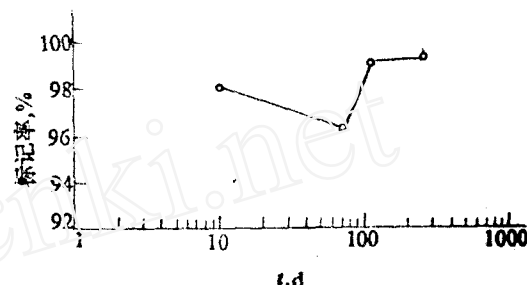


图2 MAA样品的标记率稳定性测定

得到分离,结果列入表1。表1说明在离心法中还原的 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 和游离的 $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$ 未能分离,但在微型纸层法中得到分离。

表1 离心法和微型纸层析法联合测定 ^{99m}Tc -MAA标记率**

样 品	离 心 法 分离百分率	微 型 纸 层 析 法			
		样 品	纸层分离百分率		占原样百分率
1号样	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -MAA	1号 上清液	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$	87.1	3.0
	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV}) + ^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$		$^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$	12.9	0.4
2号样	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -MAA	2号 上清液	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$	92.9	1.2
	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV}) + ^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$		$^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$	7.1	0.1
3号样	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -MAA	3号 上清液	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$	90.0	1.1
	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV}) + ^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$		$^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$	10.0	0.1
4号样	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -MAA	4号 上清液	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$	96.9	0.8
	$^{99m}\text{Tc}(\text{IV}) + ^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$		$^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$	3.1	0.0

** MAA是放置8个月的冻干品。

考虑到 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 和 SnCl_2 有产生胶体的趋向,在离心后也会产生沉淀。为了测定得锡胶体对 ^{99m}Tc -MAA沉淀的贡献,进行了 ^{99m}Tc 淋洗液和 SnCl_2/HCl 的离心空白试验。结果表明,上清液中 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 占85.1%,沉淀中仅占14.9%。由此可见, ^{99m}Tc 淋洗液在大量MAA粒子存在下,产生 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -MAA的络合反应是主要的。结合表1中所列的 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 的数据和空白试验数据可以推断,纸层析法和离心法用于标记率测定是可行的。

5. MAA颗粒总数和粒子大小分布的测定

将制备的数批MAA溶液摇匀,用1ml注射器吸入样品再滴入血球计数室,在显微镜下计算总数,并取一定数量的粒子进行粒度大小的分布计算,多次重复测定,得到平均值。其结果MAA总数为 $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 个/ml。其中95%以上的粒子在 $10\mu\text{m} - 80\mu\text{m}$ 之间, $10\mu\text{m} - 60\mu\text{m}$ 粒子占85%, $80\mu\text{m} - 100\mu\text{m}$ 的粒子<3%。此结果对临床使用很为理想,图3给出了MAA的粒子显微照相。

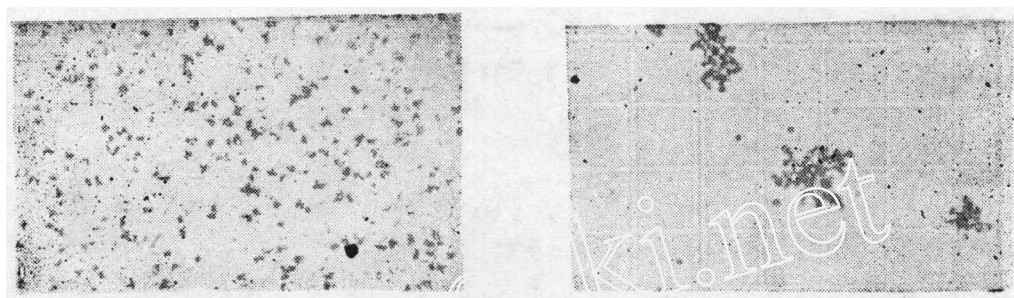


图3 MAA粒子的显微照相

b中 小方格边长为50 μm ;小黑点为水珠。

3 动物试验

1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA在小白鼠体内主要脏器的分布

取0.2ml(7.4—29.6) $\times 10^4\text{Bq}$ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA溶液自尾静脉注入体重为18—26g的—LACA种小白鼠体内,每批用三只小鼠进行试验,注射后立即处死,用通用单道 γ 谱仪(FH-1901型)测量各器官的放射性分布,结果列入表2。

由表2可见,肺的摄取率及肝的摄取率较为理想,此结果符合美国药典^[4]同类产品的指标。

表3为小白鼠在六个时间间隔中的肺和肝对 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA摄取率。由表3可见,肺摄取率从98.4%降到38.9%;肝摄取率由3.7%上升到8.7%。此结果表明经改进后制备的MAA作为肺显像剂是理想的。

表2 不同批号 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA在LACA种小白鼠中肺和肝的摄取率

批号	肺摄取率, %	肝摄取率, %
1	93.4, 88.1, 92.7	3.7, 2.9, 4.3
2	90.0, 91.7, 91.4	3.6, 3.4, 3.3
3	90.6, 89.9, 93.5	1.6, 2.2, 2.3
4	92.8, 83.2, 92.9	3.3, 2.2, 5.9
5	83.2, 84.4, 83.1	4.5, 4.6, 4.5
6	88.5, 98.3, /	2.6, 2.5, /

表3 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA在小鼠体内器官分布对不同时间间隔变化的关系

时间间隔	立即			15min			30min			60min			180min			360min			480min		
次 数	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
肺摄取率, %	98.4	88.1	92.7	91.9	91.9	35.9	79.2	76.3	84.4	68.9	70.9	76.4	67.5	62.5	68.6	43.4	45.9	49.5	42.4	33.5	33.9
肝摄取率, %	3.7	2.9	4.3	4.2	6.3	6.9	7.0	6.6	8.0	7.7	7.9	7.1	6.8	6.8	6.9	8.7	7.8	9.0	8.8	8.6	8.7

2. 小鼠毒性试验和无菌无热原试验

选用重量为20—30g的健康小鼠5只,事先并未用过试验。每只小鼠从尾静脉注入0.5ml MAA 试验溶液,并维持合适的饲料,两天后小鼠均活着,并没有对注射剂量有不正常的反应。此结果和无菌无热原结果均符合中国药典的指标^[5]。

3. 家兔 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA γ 照相

取 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA约111MBq自家兔耳静脉注入体内,注射后用日产Toshiba Digtai Camera GCA-501S进行 γ 照相,图4为不同时间间隔的 γ 照相,从图中可见 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA集中在肺区;肝和其它器官的放射性不明显,相比之下家兔的两肺显像很清晰。在试验过程中,将做过 γ

照相的家兔48h后,再重复做 γ 照相,结果重复,并和小鼠的试验结果相吻合。此结果表明,在注射后2h内,放射性集中在肺区,可供临床观察用。

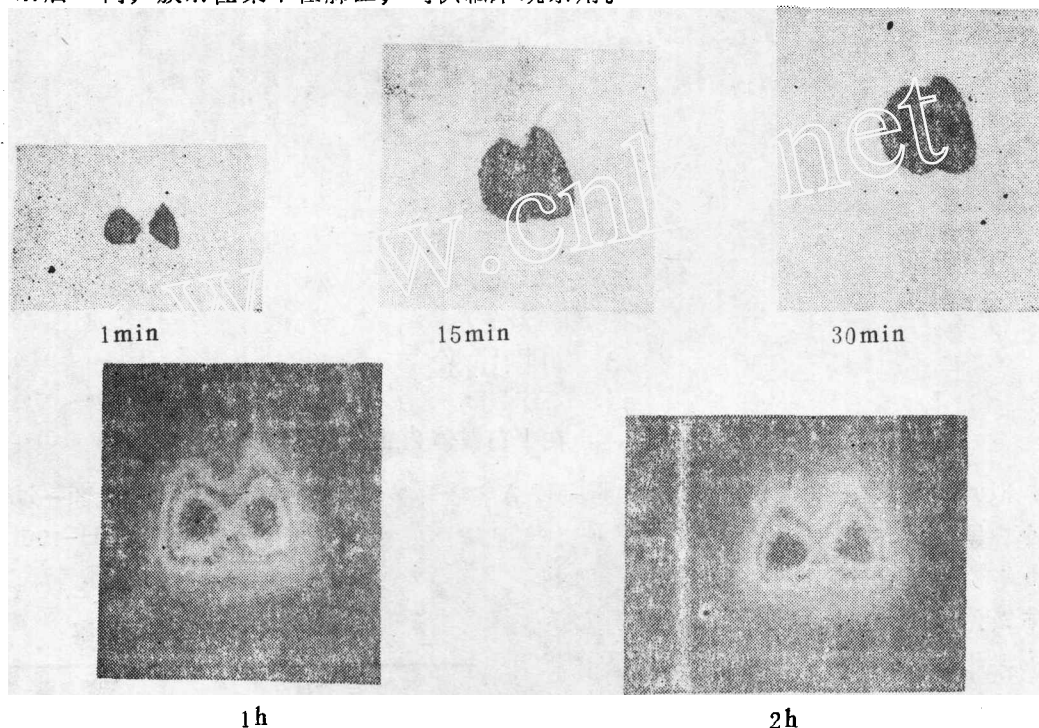


图4 家兔注射 ^{99m}Tc -MAA后在5个不同时间的 γ 照相

四、结果和讨论

1. 采用吐温-80作分散剂和稳定剂,提高了人血白蛋白大颗粒的粒度均匀性和产物浓度。经改进的MAA药盒制备方法可靠、简便,标记率高于95%,是较理想的肺灌注显像剂。

2. 在常规纸层析放射性分析技术中, ^{99m}Tc -MAA和不溶解的 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 不能分离。本工作采用离心法和微型纸层析技术相结合,得到 ^{99m}Tc -MAA和还原水解的 $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ 及游离的 $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$ 的百分率,并获得锝钡胶体在离心沉淀和上清液中的数据。

3. 冻干药盒稳定性长达8个月,非冻干药盒为51天。标记的 ^{99m}Tc -MAA样品在 16°C 和 22°C 时,8小时后标记率仍高于95%,这对用户使用是很方便的。

4. MAA的粒子大小在 $10\mu\text{m}$ — $<100\mu\text{m}$,80%以上的粒子在 $10\mu\text{m}$ — $60\mu\text{m}$,每毫升溶液含 5×10^5 — 2×10^6 个MAA粒子。

5. ^{99m}Tc -MAA在 小鼠体内器官的分布和家兔的肺扫描和 γ 照相试验表明,放射性集中在肺区并长达2h时,肺显像清晰,可供医生作详细的临床研究用。

景烈和 艾红同志协助微型纸层析工作;李九丹同志协助粒子显微照相;301医院田嘉和刘自来和傅成三同志协助 γ 照相工作,在此一并表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Lyster, D.M. et al., *J. Nucl. Med.*, 15, 198(1974).

- [2] Xia Zhermin et al., *J. Chinese Nucl. Med.*, 1 (2), 78(1981).
 [3] MAA Al-Janabi et al., *Appl. Radiat. Isot.*, 34 (10), 1473 (1983).
 [4] USA Pharmacopoeia XXI, NFX, VI, II, 1985, p.1013.
 [5] Chinese Pharmacopoeia II, Appendix 1985, p.86.

A STUDY ON ^{99m}Tc -MACROAGGREGATED ALBUMIN AS LUNG IMAGING AGENT

XU RONGZHU FAN GUANGYU LIU YINMEI BAI SUZHEN

(China Institute of Atomic Energy, P.O.Box 275, Beijing)

XIA ZHENMIN GU SHUQIN

(National Institute for the Control Pharmaceutical and Bio'ogical)

ABSTRACT

This paper describes a method for the preparation of macroaggregated albumin (MAA) kits which is labelled with ^{99m}Tc for lung scanning. The tween-80 is used as both dispersing agent and stable agent in order to raise uniformity and concentration of MAA particle size, which is between 10 to 100 μm . More than 80% particles are in the range of 10—60 μm . A millilitre MAA solution contains 5.3×10^6 particles. The lyophilized MAA kits are stable within eight months. The unlyophilized MAA kits are stable within 51 days. The radiochemical yield is >95% and the radiochemical purity is determined by paper chromatography. In addition, centrifuge method is used in combination with micro paper chromatography, in order to obtain the percentage of $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ bound to the MAA, the percentage of unreduced "free" $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$ and the percentage of reduced-hydrolyzed form of $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$. Blank centrifuge test of the $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ -Sn colloid shows that about 85% $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ is found in the supernatant solution. This method is simple and rapid. After eight hours the radiochemical purity of the labelled ^{99m}Tc -MAA sample placed at 16°C and 22°C remains >95%.

The organ distribution of LACA 18—26g mice meets the standard of the same product in the US pharmacopeia. The results of the study with rabbits by scanning with γ -camera indicate that the activity in the lung of the rabbit reaches a high level between 2—3 hours after injection. The toxic test and nonsterile and nonpyrogen test are very satisfactory and meet the standard of the Chinese pharmacopeia.

Key words Macroaggregated albumin, Lung imaging agent, Micro paper chromatography, Animal organ, Radioactive distribution, Tween-80, γ -camera.