

Výběr dostupné metody stanovení radiochemické čistoty radiofarmaka ^{99m}Tc -etifenin, její ověření a optimalizace

Jiří Štěpán

KNM FN Brno a LF MU

51. Dny nukleární medicíny, 12. - 14. 11. 2014 - Seč - Ústupky

Úvod

- ^{99m}Tc -etifenin (^{99m}Tc -EHIDA, ^{99m}Tc -diethyl-HIDA) je oficiální v Evropském lékopise a kit pro jeho přípravu je vyráběný německou firmou ROTOP Pharmaka AG pod názvem ROTOP - EHIDA, 20,0 mg Kit für ein radioaktives Arzneimittel Etifenin
- Hepatobiliární exkrece komplexů ^{99m}Tc -IDA je řízena velikostí molekuly (optimální $M_r = 700 - 900$) a strukturní konfigurací
- Dvě molekuly ligandu jsou koordinovány k jednomu atomu technecia v oxidačním stavu 3+
- Komplexy ^{99m}Tc -IDA mají negativní náboj, vysokou polaritu a vykazují vysokou vazbu na plazmatické proteiny

Úvod

- Jaterní extrakční frakce je asi 82 % injikované dávky ^{99m}Tc -etifeninu
- ^{99m}Tc -etifenin je podobným způsobem jako bilirubin aktivně transportován do hepatocytů, maximální aktivity v játrech dosahuje po 12 minutách
- Sekrece do žluči přes membránu žlučových kanálků je nosičem zprostředkovaný proces s jaterním exkretčním poločasem 37,3 min
- Na rozdíl od ostatních derivátů ^{99m}Tc -IDA vykazuje ^{99m}Tc -etifenin vysokou kumulativní močovou exkreci (17 % za 5 h) při normální koncentraci bilirubinu

Úvod

- ^{99m}Tc -etifenin se používá k hepatobiliární scintigrafii
 - ke zhodnocení funkce hepatocytů
 - k prokázání průchodnosti nebo obstrukce žlučových kanálků
 - k vyloučení akutní cholecystitidy
 - k prokázání běžné obstrukce žlučovodu
 - ke kontrole po chirurgickém zákroku
 - k ověření atrézie jaterního žlučovodu u dětí

Kit pro přípravu radiofarmaka ROTOP - EHIDA, 20,0 mg

Složení kitu

26,76 mg prášku obsahujícího léčivou a pomocné látky.

Léčivá látka

- etifenin 20,0 mg

Pomocné látky

- chlorid cínatý dihydrát 0,2 mg
- askorbová kyselina 0,1 mg
- hydroxid sodný 4,94 mg
- kyselina chlorovodíková 36% 3,6 μ l
- dusík q.s.

Kit pro přípravu radiofarmaka ROTOP - EHIDA, 20,0 mg

Vzhled

- bílý lyofilizát
- po označení čirý bezbarvý roztok

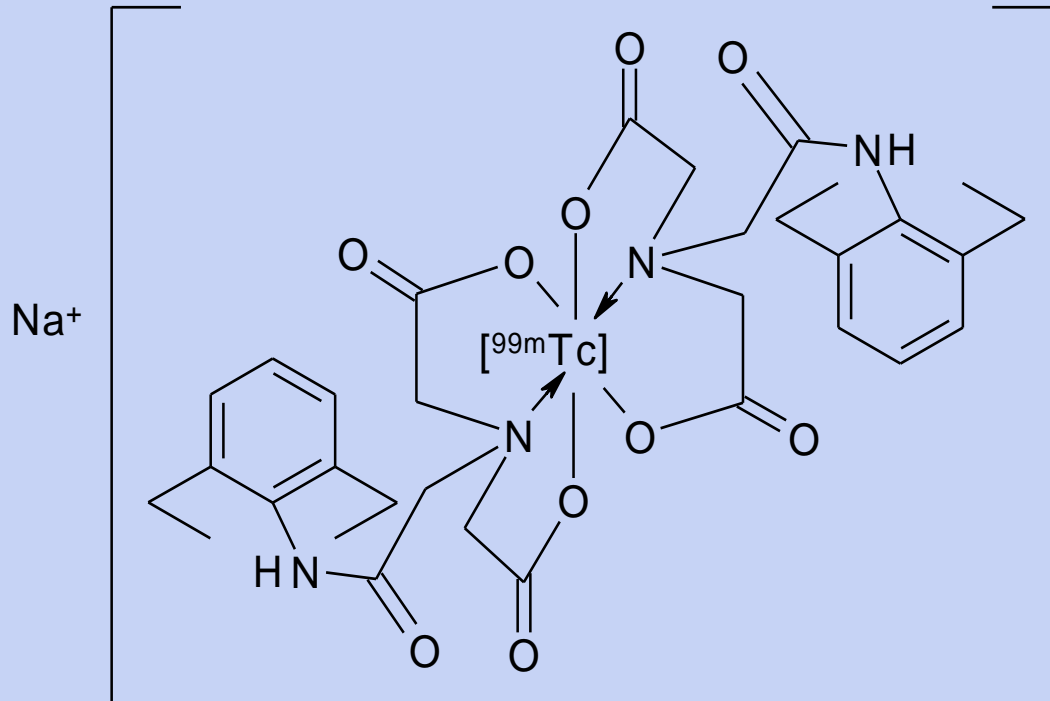
Uchovávání

- v chladničce při 2 - 8 °C
- po označení při teplotě místnosti 15 - 25 °C

Doba použitelnosti

- po označení 3 hodiny

Chemie ^{99m}Tc -etifenin



- $[^{99m}\text{Tc}]$ technecium-natrium-diethyl-HIDA
- bis{*N*-[(2,6-diethylfenyl)karbamoylmethyl]-*N*-(karboxymethyl)glycinato-*N,O,O^N*} $[^{99m}\text{Tc}]$ technecitan(1-) sodný
- bis(etifeninato-*N,O,O^N*) $[^{99m}\text{Tc}]$ technecitan(1-) sodný
- $[^{99m}\text{Tc}]$ technecium(III)-natrium-bis{*N*-[(2,6-diethylfenyl)karbamoylmethyl]iminodiacetát}

Chemie ^{99m}Tc -etifenin

- Vznik chelátu $[^{99m}\text{Tc}]$ -etifenin vyžaduje
 1. redukci $^{99m}\text{Tc(VII)}$ ve formě $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ ionty Sn^{2+} na $^{99m}\text{Tc(III)}$ ve formě $[^{99m}\text{Tc}]^{3+}$
 2. vytvoření komplexu $[^{99m}\text{Tc}]^{3+}$ s přítomným etifeninem (30minutová inkubace při teplotě místnosti)
- Reakce vzniku $[^{99m}\text{Tc}]$ technecia(III) v roztoku
- $\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4 + 2\text{SnCl}_2 \longrightarrow [^{99m}\text{Tc}]^{3+} + 2\text{SnO}_2 + 4\text{Cl}^- + \text{Na}^+$

Příprava ^{99m}Tc -etifenin

1. do lahvičky kitu pro přípravu ^{99m}Tc -etifenin přidej maximálně 3 ml roztoku $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ o maximální aktivitě 8 GBq
(roztok technecistanu-99m je možno ředit sterilním fyziologickým roztokem NaCl)
2. nechej probíhat reakci při teplotě místnosti 30 min za občasného promíchání
3. po označení je možno roztok doředit až do celkového objemu 6 ml sterilním fyziologickým roztokem NaCl

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta 1 dle PIL)

Určení RHTc (redukované hydrolyzované Tc)

- Radiochromatografie ITLC-SG/0,9% NaCl
- RHTc zůstává na startu
- ^{99m}Tc -etifenin je mezi středem a čelem chromatogramu

Určení $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$

- Elektroforéza na papíře v 0,05M K/Na-fosfátovém pufru o pH = 6,8 (KH_2PO_4 6,8 g/l a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,8 g/l nebo $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17,9 g/l v poměru 1:1)
- Potenciálový gradient 15 V/cm

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta 1 dle PIL)

- Nanášení vzorku na střed papíru
- Na elektroferogramu je $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ v čele rozpouštědla (putuje k anodě)
- ^{99m}Tc -etifenin je na startu
- Současně se vyvíjí i referenční roztok $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$

Nevýhoda

- Elektroforéza není předepsána pro jiná běžně používaná RF, tudíž na pracovištích radiofarmacie běžně není dostupná
- Pořizovací cena elektroforetické vany a zdroje pro elektroforézu se v nejlevnějším provedení pohybuje okolo 12000,- Kč

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta 2 dle PIL)

Určení RHTc (redukované hydrolyzované Tc)

- Radiochromatografie ITLC-SA/voda
- RHTc zůstává na startu
- $^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ a ^{99m}Tc -etifenin jsou v čele chromatogramu

Určení $^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$

- Radiochromatografie papír nasycený $\text{NaHCO}_3/\text{MEK}$ (papír se navlhčí NaHCO_3 25 g/l a vysuší při 80 °C)
- RHTc a ^{99m}Tc -etifenin zůstávají na startu
- $^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ je v čele chromatogramu

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta 2 dle PIL)

Nevýhoda

- Zdlouhavá příprava stacionární fáze – chromatografického papíru nasyceného NaHCO_3 . Takový nosič není předepsán pro jiná běžně používaná RF

Požadované limity dle výrobce (u obou variant)

- $\text{RHTc} \leq 5 \%$
- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^- \leq 5 \%$
- $\text{RHTc} + [\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^- \leq 5 \%$

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta dle Ph. Eur. / ČL)

Určení radiochemické čistoty

- Radiochromatografie ITLC-SA/0,9% NaCl
(chromatografická deska se před použitím zahřívá 10 min při 110 °C)
- RHTc zůstává na startu
- ^{99m}Tc -etifenin je téměř ve středu chromatogramu
- $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ je v čele chromatogramu

Požadovaný limit

- ^{99m}Tc -etifenin $\geq 95 \%$

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta dle Ph. Eur. / ČL)

Výhoda

- Jednoprůžková radiochromatografická metoda s běžně dostupným materiálem
- Z důvodu dostupnosti byla zvolena tato metoda, jejíž použití bylo dále ověřeno a optimalizováno

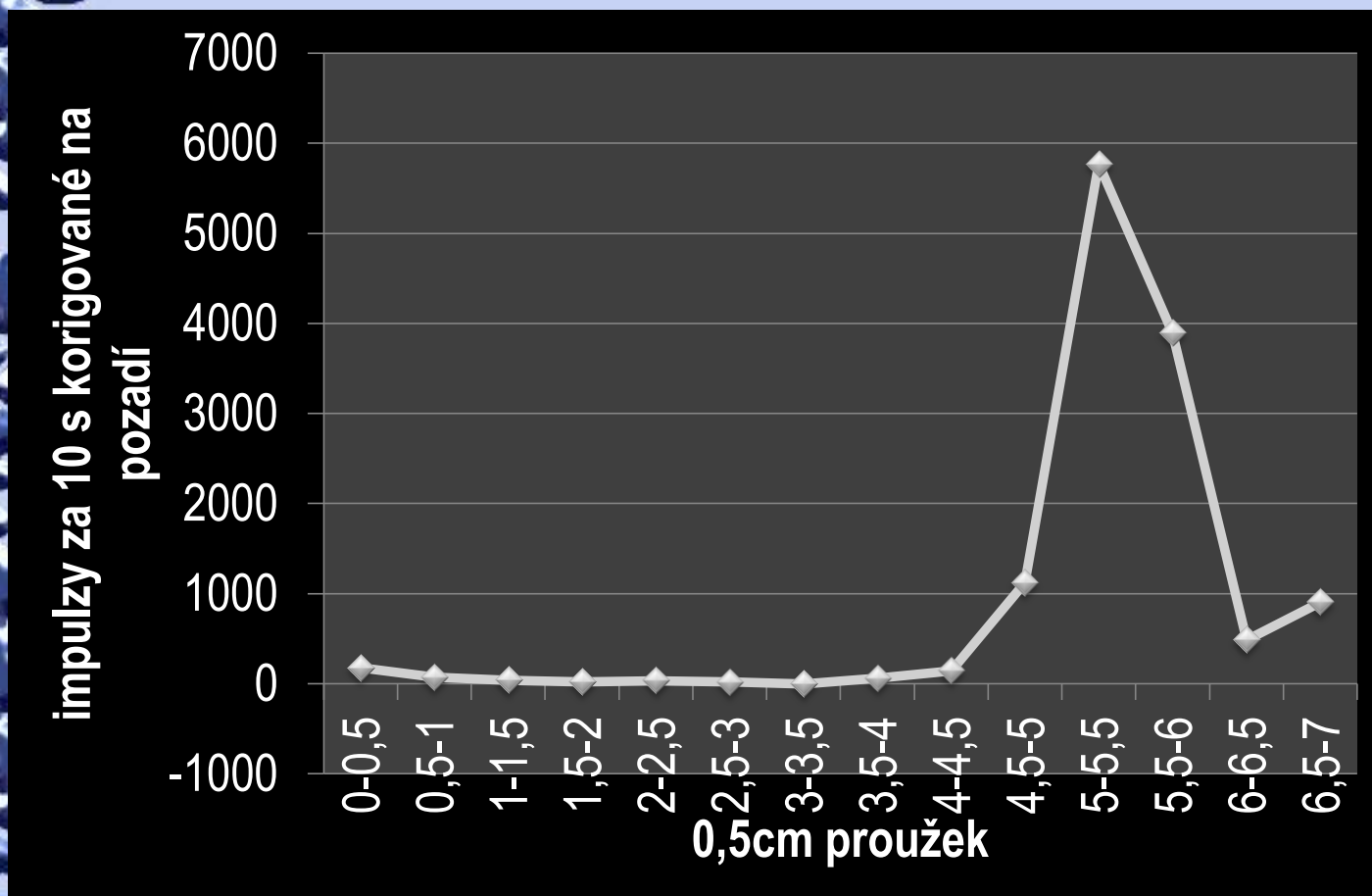
Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta dle Ph. Eur. / ČL)

Ověření distribuce analytů na chromatogramu

- Popsaná radiochromatografie byla provedena na 7cm dráze
- Pro zjištění distribuce radioaktivity proužek rozstříhán na 0,5cm proužky, jejichž aktivita byla měřena
- Detekce pomocí scintilačního detektoru NaI(Tl) připojeného na mnohokanálový analyzátor MCA-1000G

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta dle Ph. Eur. / ČL)

Ověření distribuce analytů na chromatogramu



R_F (retardační faktor)

RHTc

0 – 0,1

^{99m}Tc -EHIDA

0,75

$[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$

0,9 – 1

Kontrola ^{99m}Tc -etifenin (varianta dle Ph. Eur. / ČL)

Ověření distribuce analytů na chromatogramu

- V souladu s lékopisem RHTc zůstává na startu, $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ je v čele chromatogramu, nicméně ^{99m}Tc -etifenin není téměř ve středu chromatogramu (jak uvádí lékopis), což by znamenalo $R_F = 0,5$, bylo však stanoveno $R_F = 0,75$
- Z uvedeného vyplývá, že pro stanovení radiochemické čistoty je vyvinutý proužek nutno rozstříhat na 3 části nejlépe v místech odpovídajících $R_F = 0,1$ a $R_F = 0,9$ (spodní část obsahuje RHTc, prostřední ^{99m}Tc -etifenin, horní $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$)

Datum	Pracovník	RCP	RHTc	TcO ₄ ⁻
22.10.2013	Jiří Štěpán	97,50	1,29	1,21
29.10.2013	Petra Musilová	98,45	1,42	0,13
5.11.2013	Jiřina Luskačová	95,53	1,90	2,57
7.11.2013	Jiřina Luskačová	97,65	1,84	0,51
12.11.2013	Jiří Štěpán	97,95	1,07	0,98
14.11.2013	Jiří Štěpán	95,42	2,38	2,20
19.11.2013	Petra Musilová	96,41	1,55	2,03
28.11.2013	Jiřina Luskačová	98,45	1,51	0,04
3.12.2013	Jiří Štěpán	95,31	2,45	2,23
10.12.2013	Petra Musilová	95,43	1,55	3,02
12.12.2013	Petra Musilová	96,33	1,58	2,09
17.12.2013	Jiřina Luskačová	96,57	1,36	2,07
2.1.2014	Petra Musilová	97,74	1,37	0,89
9.1.2014	Jiří Štěpán	96,08	1,65	2,27
14.1.2014	Jiřina Luskačová	97,11	1,41	1,48
	průměry:	96,80	1,62	1,58
	směrodatné odchyly:	1,12	0,38	0,91

Stanovení radiochemické čistoty ^{99m}Tc-etifenin

- do výpočtu zahrnuto 15 příprav
- hodnoty v tabulce v jsou %

Průměrná radiochemická čistota (RCP): $(96,8 \pm 1,1) \%$

Průměrné RHTc: $(1,6 \pm 0,4) \%$

Průměrný [^{99m}Tc]O₄⁻: $(1,6 \pm 0,9) \%$

Závěr

- Nejjednodušší a nejdostupnější metoda stanovení RCP ^{99m}Tc -etifeninu je dle ČL
- Tuto metodu je možno použít za provedení modifikace ve způsobu vyhodnocování chromatografického proužku
- Vyvinutý proužek je nutno rozstříhat na 3 části v místech odpovídajících $R_F = 0,1$ a $R_F = 0,9$, aby bylo možno stanovit všechny tři požadované analyty
- Metoda je pak spolehlivá a dosahované hodnoty RCP vždy vyhovovaly (min. 95 %)

Děkuji za pozornost