

Un método alternativo para determinar la pureza radioquímica de las preparaciones de ^{99m}Tc -Tetrofosmina

J L GÓMEZ, F VEGA, A PEÑAFIEL, J DAUMAL, C PEÑA, L MONTSECH, F MATA

Sección de Medicina Nuclear. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

Resumen.—Este artículo describe un nuevo método de control de calidad para determinar la pureza radioquímica (PRQ) de las preparaciones de Tecnecio-99m-Tetrofosmina. Los resultados de este procedimiento fueron comparados con los resultados obtenidos mediante el método sugerido por el fabricante del kit (método clásico), que consiste en una cromatografía ascendente en capa fina en una tira de ITLC/SG como fase estacionaria y utiliza una mezcla de los disolventes acetona y diclorometano en una proporción 35:65 v/v (Ac:DCM) como fase móvil. El método que proponemos en este artículo (método alternativo) emplea la misma fase estacionaria pero es desarrollada en un único disolvente, la etilmetilcetona (EMC). Este método tiene como ventajas una mayor capacidad para la separación del complejo ^{99m}Tc -Tetrofosmina de las posibles impurezas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2$, un menor tiempo de desarrollo cromatográfico y el uso de una fase móvil más sencilla de preparar para realizar el control de calidad.

PALABRAS CLAVE: Tecnecio-99m-Tetrofosmina. Control de calidad. Pureza radioquímica.

AN ALTERNATIVE METHOD TO DETERMINE THE RADIOCHEMICAL PURITY OF THE ^{99m}Tc -TETROFOSMINE PREPARATIONS

Summary.—This paper describes a new quality control method to determine the radiochemical purity (RCP) value of Technetium-99m-Tetrofosmin preparations. The results of this procedure were compared with the results obtained with the method suggested by the manufacturer of the kit (classic method), consisting in thin-layer chromatography involving the use of a single strip of ITLC/SG as the stationary phase, and a acetone:dichlorometane 35:65 (Ac:DCM) solvent mixture as the mobile phase. The method that is proposed in this paper (alternative method) uses the same stationary phase but it is developed in a single solvent, methylethylketone (MEK). This method has the following advantages: a better capacity to se-

parate the ^{99m}Tc -Tetrofosmin complex from $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{99m}\text{TcO}_2$ impurities, a faster chromatographic developing time and the use of a single solvent in the quality control.

KEY WORDS: Technetium-99m-Tetrofosmin. Quality control. Radiochemical purity.

INTRODUCCIÓN

El complejo catiónico [$^{99m}\text{Tc}(\text{Tetrofosmina})_2\text{O}_2$] $^+$, donde la tetrofosmina es el ligando 1,2-bis[bis(2-etoxietil)fosfino]etano¹, es usado en medicina nuclear clínica principalmente para los estudios de perfusión miocárdica², además de para otras indicaciones como son las patologías tiroideas³, paratiroideas⁴, etc. Al igual que sucede con otros radiofármacos marcados con ^{99m}Tc , el pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) o el ^{99m}Tc reducido e hidrolizado ($^{99m}\text{TcO}_2$) pueden estar presentes en la preparación de ^{99m}Tc -Tetrofosmina^{5,6}. Para detectar la presencia de estas impurezas radioquímicas y cuantificarlas, el método de control de calidad clásico recomienda el uso de una cromatografía en capa fina mediante la utilización de una tira de ITLC/SG desarrollada en una mezcla de acetona y diclorometano en proporción de 35:65 v/v (Ac:DCM) como solvente de desarrollo, presentando este último el inconveniente de ser tóxico⁷. Otra desventaja del método clásico es que la proporción de esta mezcla de disolventes debe mantenerse constante para poder realizar el control de calidad siempre en las mismas condiciones, con la finalidad de que los resultados que se obtengan sean fiables y reproducibles, y puedan ser comparados entre sí. Sin embargo, el hecho de que el diclorometano tenga un punto de ebullición bastante bajo (40° C) permite su rápida evaporación, por lo que la mezcla tiene que ser preparada frecuentemente, prácticamente a diario; además, la fácil evaporación de este disolvente incrementa el riesgo de toxicidad por inhalación. Por otra parte, el método

Recibido: 2-6-98.

Aceptado: 1-8-98.

Correspondencia:

F VEGA
Sección de Medicina Nuclear
Hospital Son Dureta
Andrea Doria, 55
07014 Palma de Mallorca. España

clásico adolece de requerir un tiempo de desarrollo elevado para la realización de la cromatografía (alrededor de 15-17 minutos). Pero la principal desventaja de dicho método reside en su menor capacidad para la separación de los picos cromatográficos correspondientes a las especies ^{99m}Tc -Tetrofosmina y $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Por lo tanto, el propósito de este estudio es desarrollar un método cromatográfico de mayor resolución, y que a la vez sea más sencillo, rápido y seguro en la determinación de la pureza radioquímica de las preparaciones de ^{99m}Tc -Tetrofosmina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del ^{99m}Tc -Tetrofosmina

El complejo ^{99m}Tc -Tetrofosmina fue preparado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante⁸. Para ello, entre 4,4-8,8 GBq de ^{99m}Tc como pertecnetato sódico (obtenido no hace más de 2 horas de la elución del generador y cuya elución previa se produjo no hace más de 24 horas) contenidos en un volumen de 4-8 ml de solución salina fisiológica (concentración radiactiva = 1,1 GBq/ml), fueron añadidos al kit comercial (Myoview[®], Amersham Healthcare) que tiene la siguiente composición: 0,23 mg de Tetrofosmina, 30 μg de cloruro de estaño dihidrato, 0,32 mg de sulfosalicilato disódico, 1,0 mg de D-gluconato sódico y 1,8 mg de bicarbonato sódico. A continuación, la mezcla se agitó durante unos segundos para disolver el liofilizado y finalmente se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente para inmediatamente tomar las muestras del control de calidad.

Preparación de los blancos de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2$

El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ fue eluido directamente de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Amertec II[®], Amersham Healthcare) con una actividad nominal de 20 GBq de ^{99}Mo y con una concentración de ión Al^{+3} inferior a 10 ppm.

El $^{99m}\text{TcO}_2$ fue preparado reduciendo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ con ión estannoso a $\text{pH} > 5$ en ausencia de agentes complejantes o quelantes. Para este propósito, 10 μl de una disolución de estaño (II) (obtenida disolviendo 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 2 ml de HCl concentrado) fueron añadidos a 3 ml de solución salina fisiológica conteniendo 740 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$. A continuación, el pH fue neutralizado lentamente hasta un valor de 7 con NaOH 1N.

Métodos radiocromatográficos

El análisis radioquímico y la determinación de la PRQ de las preparaciones de ^{99m}Tc -Tetrofosmina fueron realizadas empleando dos métodos cromatográficos: el método clásico (ITLC-SG/Ac:DCM) y nuestro método alternativo (ITLC-SG/EMC).

Método A – ITLC-SG / Ac:DCM (Método Clásico)

Se sembraron con jeringa de 1 ml. y con aguja de 23G aproximadamente unos 10 μl de la especie a analizar (^{99m}Tc -Tetrofosmina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ó $^{99m}\text{TcO}_2$) a una distancia de 3 cm (punto de siembra) de la parte inferior del soporte cromatográfico consistente en tiras de fibra de vidrio impregnadas con silicagel (ITLC-SG de Gelman Sciences) con un tamaño de 20 x 2 cm. Evitando el secado de la mancha, las tiras fueron desarrolladas a lo largo de una distancia de 15 cm por encima del punto de siembra en Ac:DCM como solvente de desarrollo. Una vez que se alcanzó el frente de disolvente las tiras fueron secadas al aire con objeto de permitir su posterior manipulación.

Para determinar el perfil de actividad de cada especie a lo largo del cromatograma, las tiras fueron cortadas en fracciones de 0,5 cm y contadas en un contador automático de radiación gamma de tipo pozo (1480 Wizard de EG & G-Wallac).

Para la determinación rutinaria de la PRQ del ^{99m}Tc -Tetrofosmina, las tiras se cortaron en tres fracciones a 3 y 12 cm desde el punto de siembra de las mismas (Fig. 1). Cada fracción fue contada por separado en un calibrador de dosis (Atomlab-200), y el porcentaje de radiactividad de cada una de ellas fue calculado. La parte central de las tiras debe poseer una actividad superior al 90% para poder emplear la preparación.

Método B – ITLC-SG / EMC (Método Alternativo)

De manera similar al procedimiento operativo del método clásico, se sembraron unos 10 μl de ^{99m}Tc -Tetrofosmina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ó $^{99m}\text{TcO}_2$ a una distancia de 2 cm de la parte inferior de varias tiras de ITLC-SG (18 x 2 cm), y se permitió que el disolvente empleado (EMC) alcanzara una distancia de 12 cm desde el punto de siembra, dejando a continuación que las tiras se secaran al aire.

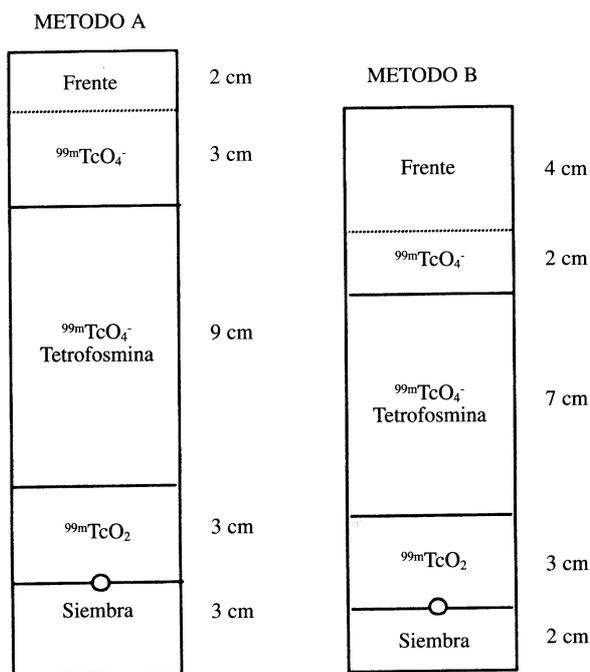


FIG 1.—Distribución de la actividad en los cromatogramas para las especies $^{99m}\text{TcO}_2$, ^{99m}Tc -Tetrofosmina y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ según ambos cromatográficos utilizados (la representación no está a escala).

Con fines de obtener los perfiles cromatográficos de las especies, las tiras fueron cortadas en fracciones de 0,5 cm y contadas en el mismo contador gamma de tipo pozo anteriormente citado.

Para la determinación rutinaria de la PRQ de las preparaciones del ^{99m}Tc -Tetrofosmina, las tiras fueron cortadas en tres piezas a 3 y 10 cm desde el punto de siembra de las mismas (Fig. 1). Cada una de las tres fracciones fue contada por separado en un calibrador de dosis (Atomlab-200), y se calculó el porcentaje de radiactividad de cada fracción, no debiendo aceptarse con fines diagnósticos aquellas preparaciones que no tengan un mínimo del 90% de actividad en la parte central.

RESULTADOS

Se representaron y analizaron 15 perfiles de cada especie ^{99m}Tc -Tetrofosmina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y $^{99m}\text{TcO}_2$ en cada uno de los dos sistemas cromatográficos empleados, determinando a continuación el intervalo de Rf de cada compuesto en base a los datos obtenidos, eligiendo para ello unos intervalos alrededor del pico central en los que hubiera un mínimo del 90% de la radiactividad total de la tira respectiva. Se analizaron

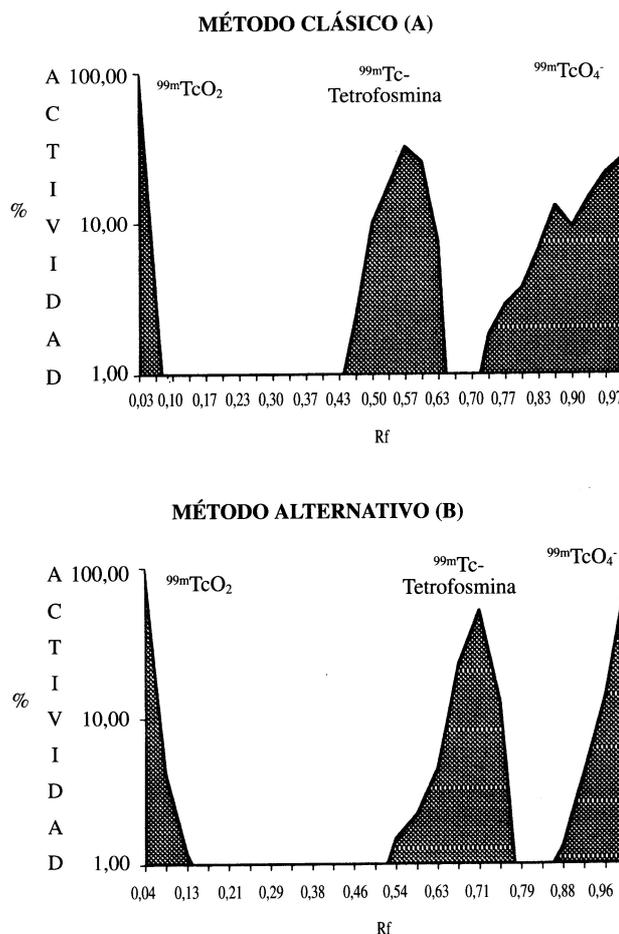


FIG 2.—Representación semilogarítmica de los perfiles cromatográficos obtenidos en una de las pruebas para las especies $^{99m}\text{TcO}_2$, ^{99m}Tc -Tetrofosmina y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ según ambos sistemas cromatográficos.

15 muestras de una misma preparación de cada una de las sustancias a analizar con el fin de eliminar las variaciones que resultarían de comparar muestras diferentes. La figura 2 muestra un perfil representativo de las tres sustancias para ambos sistemas y fue obtenida superponiendo los picos de cada una de las especies en cada sistema utilizado (nótese que los perfiles están representados en escala semilogarítmica).

Una vez determinados los valores de Rf para cada sustancia, se eligieron las líneas de corte de las tiras para poder estandarizar las técnicas cuando se tengan que realizar los controles de calidad rutinarios de las preparaciones del radiofármaco. En el caso del método clásico, estos valores de corte son los especificados por el fabricante en el prospecto del kit.

Las principales características de ambos métodos quedan reflejadas en la tabla I. Los resultados obtenidos indican que en el método A, el intervalo de

Tabla I
CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE AMBOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

| | Método clásico | Método alternativo |
|--|---------------------|--------------------|
| Fase estacionaria ¹ | ITLC-SG | ITLC-SG |
| Fase móvil | Ac:DCM ² | EMC ³ |
| Distancia de desarrollo | 15 cm | 12 cm |
| Tiempo de desarrollo | 15 min | 10 min |
| Intervalo de Rf de los perfiles cromatográficos: | | |
| • ^{99m} Tc-Tetrafosmina | 0,40-0,70 | 0,54-0,83 |
| • ^{99m} TcO ₄ ⁻ | 0,70-1,00 | 0,83-1,00 |
| • ^{99m} TcO ₂ | 0,00-0,10 | 0,00-0,13 |
| Intervalo de Rf de las piezas de corte de las tiras: | | |
| • ^{99m} Tc-Tetrofosmina | 0,20-0,80 | 0,25-0,83 |
| • ^{99m} TcO ₄ ⁻ | 0,80-1,00 | 0,83-1,00 |
| • ^{99m} TcO ₂ | 0,00-0,20 | 0,00-0,25 |

¹Tiras de fibra de vidrio impregnadas de silicagel (Gelman Sciences).
²Acetona: diclometano 35:65 v.v. ³Etilmetilcetona.

Rf del ^{99m}TcO₄⁻ según su perfil cromatográfico es mayor que el intervalo de Rf del ^{99m}TcO₄⁻ en la pieza correspondiente de la tira en el método B (0,70-1,00 frente a 0,83-1,00). El ^{99m}TcO₄⁻ es por lo tanto mejor separado con el método B que con el método clásico y además se eluye en un pico más estrecho, lo que confiere al método alternativo una mayor resolución en la separación de las especies. Además, puede comprobarse a la vista de los resultados de la tabla que los valores de corte de las tiras propuestos por el fabricante para su método de control de calidad no son coherentes con los perfiles de actividad obtenidos, ya que según éstos se observa que parte de la radiactividad del ^{99m}TcO₄⁻ aparece en la pieza de la tira correspondiente al ^{99m}Tc-Tetrofosmina, lo que conlleva a que a la hora de realizar el control de calidad rutinario de la preparación radiofarmacéutica se sobreestime la PRQ del ^{99m}Tc-Tetrofosmina a expensas del ^{99m}TcO₄⁻, subestimándose el porcentaje de esta impureza en la preparación. Aparte de esto, en nuestra experiencia diaria hemos encontrado que en un 10% de las pruebas el intervalo de Rf descrito para el complejo en el método A (0,40-0,70) se desplaza hacia el frente de disolvente (resultando un intervalo de Rf = 0,60-0,85), con lo cual la separación entre el complejo y el ^{99m}TcO₄⁻ es más difícil, llegando incluso a veces a estar tan desplazado que el pico correspondiente al ^{99m}Tc-Tetrofosmina se superpone al pico del ^{99m}TcO₄⁻. En este caso, puede darse la situación de que al ha-

cer el control de calidad rutinario de algunas preparaciones radiofarmacéuticas con una PRQ adecuada, estas tengan que ser desechadas por no obtenerse en la parte central de la tira la mínima riqueza recomendada.

Si bien los comentarios más notorios de la comparación entre ambos métodos se refieren a la separación entre el complejo y el pertecnetato, no hay prácticamente diferencias significativas que comentar en lo que respecta a la separación entre el ^{99m}Tc-Tetrofosmina y la otra impureza, el ^{99m}TcO₂, dado que los resultados de ambos métodos son similares. Si acaso, decir que el método alternativo ofrece ligeramente una mayor capacidad de separación de los respectivos picos cromatográficos.

Por otra parte, en lo que se refiere al tiempo de desarrollo cromatográfico, hay que señalar que en nuestro método alternativo el tiempo se reduce un 30% con respecto al método clásico (10 minutos frente a 15-17 minutos). El tiempo necesario para lograr los resultados del control de calidad es por tanto también reducido.

Para terminar, se estudiaron la precisión y la reproducibilidad de los resultados de la determinación rutinaria de la PRQ obtenidos con ambos métodos, chequeando para ello 15 muestras de la misma preparación radiofarmacéutica anteriormente utilizada para el estudio de los perfiles de actividad. En la tabla II queda reflejado que el método alternativo es más reproducible en base a que presenta una menor desviación estándar, debido principalmente a que no existe el desplazamiento del pico del complejo con el frente de disolvente encontrado para el método clásico.

CONCLUSIÓN

El principal problema del método clásico reside en el desplazamiento sufrido por el pico cromatográfico correspondiente al complejo, fenómeno observado aproximadamente en un 10% de los ensayos realiza-

Tabla II
DETERMINACIÓN DE LA PRQ PARA EL COMPLEJO ^{99m}-TC-TETROFOSMINA SEGÚN LOS DOS SISTEMAS EMPLEADOS

| Sistema cromatográfico | % Pureza radioquímica |
|------------------------|-----------------------|
| Método clásico | 94,3 ± 5,4 |
| Método alternativo | 95,7 ± 2,2 |

Datos expresados como media ± DE de 15 medidas.

dos con este método. Si intentamos dar una explicación científica a este hecho, lo que tenemos que hacer en primer lugar es recordar que en cromatografía, el factor de retardo (Rf) de una sustancia en un sistema determinado es una característica inherente a la misma que debe ser siempre único si los ensayos que se llevan a cabo son realizados siempre en las mismas condiciones para un mismo soporte cromatográfico y una misma fase móvil. En nuestra experiencia, todas las pruebas realizadas se hicieron en paralelo con lo cual, variables que pudieran influir en los resultados como son temperatura y humedad son descartadas a la hora de valorar los mismos. Además, todas las muestras de ^{99m}Tc -Tetrofosmina analizadas provenían de una misma preparación radiofarmacéutica. A la vista de estos antecedentes, no parece lógico que un 10% de las pruebas muestren el desplazamiento del pico del complejo que ya se conoce, siendo la única causa que pudiera justificarlo las posibles variaciones existentes en la proporción de la mezcla de disolventes empleada como fase móvil. Este problema se soluciona si la mezcla se prepara inmediatamente antes de realizar el control de calidad. Sin embargo, hay que reconocer que en la práctica, mucha gente no realiza esta operación bien por descuido o bien por comodidad. En consecuencia, muchas veces nos encontraremos con controles de calidad del ^{99m}Tc -Tetrofosmina que no alcanzan el mínimo de PRQ recomendado por el fabricante para su uso diagnóstico y no estaremos en condiciones de afirmar si esto ha sido motivado realmente por un problema en el marcaje del kit que originaría un mal estado del radiofármaco o si por el contrario ha sido debido a un control de calidad que no se ha efectuado en las condiciones óptimas. Esto conllevaría, en el mejor de los casos, a tener que repetir el control de calidad, desembocando en una demora en la administración de la dosis y en la consecuente exploración, o quizá en la necesidad de tener que marcar un nuevo vial frío, lo que aumentaría la dosis de radiación para el personal encargado de preparar el radiofármaco y el coste del estudio.

Así pues, el método clásico no nos permite determinar si la eficiencia de marcaje del kit no es la mínima recomendada, ya que nos hace dudar entre si realmente ha ocurrido un fallo en el marcaje o por el contrario ha existido un error en el método cromatográfico.

El sistema ITLC-SG/EMC proporciona por lo tanto un método de mayor resolución, más rápido, simple y seguro para determinar la PRQ de las preparaciones de ^{99m}Tc -Tetrofosmina en cualquier laboratorio. Además, los resultados de este método, aunque son

comparables a los obtenidos con el método clásico en muchas pruebas, presentan una mayor reproducibilidad y fiabilidad.

También es importante puntualizar que el método clásico no es recomendable en un área abierta, y requiere el uso de una campana de humos debido a los reconocidos efectos tóxicos del diclorometano. La EMC es un solvente menos tóxico⁷. Además, su superior punto de ebullición (79° C) reduce la toxicidad de este disolvente por inhalación.

En resumen, el método propuesto en este artículo ofrece las siguientes ventajas: una mejor separación de la impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$ que conlleva una mayor resolución, un menor tiempo de desarrollo que se traduce en una disminución del tiempo requerido para lograr los resultados del control de calidad y el uso de una fase móvil más sencilla de preparar (un único disolvente) y segura de manipular (disolvente con menor toxicidad).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a D. Daniel Juan Herrera, químico residente de la especialidad de Radiofarmacia en nuestra Sección, su inestimable colaboración en la revisión de este trabajo y su ayuda a enfocar diversos aspectos del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forster AM, Storey AE, Archer CM, Nagle KR, Booker B, Edwards B. Structural characterization of the new myocardial imaging agent technetium-99m tetrofosmin (^{99m}Tc -P53). *J Nucl Med* 1992;33:850.
2. Kelly JD, Forster AM, Higley B, Archer CM, Booker FS, Canning LR. Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med* 1993;34:222-7.
3. Klain M, Maurea S, Cuocolo A, Colao A, Marzano L, Lombardi G. Technetium-99m tetrofosmin imaging in thyroid diseases: comparison with Tc-99m pertechnetate, thallium-201 and Tc-99m-methoxyisobutylisonitrile scans. *Eur J Nucl Med* 1996;23:1568-74.
4. Aigner RM, Fueger GF, Nicoletti R. Parathyroid scintigraphy: comparison of technetium-99m-methoxyisobutylisonitrile and technetium-99m tetrofosmin studies. *Eur J Nucl Med* 1996; 23:693-6.
5. Eckelman WC. Radiochemical purity of new radiopharmaceuticals (editorial). *J Nucl Med* 1976;17:865.
6. Hung JC, Ponto JA, Hammes RJ. Radiopharmaceutical-related pitfalls and artifacts. *Semin Nucl Med* 1996;26:208-55.
7. The Merck Index. 12th edition 1996. Merck & Co, Inc. Whitehouse Station, NJ.
8. Package insert, May 1994. MYOVIEV®, kit for preparation of Technetium-99m-tetrofosmin. Amersham Healthcare. Amersham International plc. Bucks HP7 9NA. UK.