

Optimización del control de calidad de la ^{99m}Tc -tetrofosmina: Comparación de tres métodos

J. Vadillo Delgado, J.A. Pérez Iruela, P. Pastor, J. Castillo, M. Melgarejo, R. Blasco Ferrándiz

Resumen

Objetivo: Comparar tres métodos de control de calidad de la ^{99m}Tc -tetrofosmina y alternativos al propuesto por el fabricante y determinar cuál de ellos es el recomendado para emplear de rutina en centros de producción de radiofármacos. **Material y métodos:** Se marcaron 40 viales de ^{99m}Tc -tetrofosmina siguiendo las indicaciones del fabricante. Se estudiaron tres métodos diferentes para realizar el control de calidad de esta fosfina: ITLC-SG/Etil Metil Cetona (método 1), papel Whatman-17/Acetato de Etilo (método 2) papel Whatman-3MM/acetato de etilo (método 3). **Resultados:** Los valores medios de la pureza radioquímica (PRQ(%)) cuando se midió por los tres métodos reseñados fueron de $95,79 \pm 2,32$, $96,56 \pm 1,14$ y $93,38 \pm 1,36$ respectivamente no observándose diferencias en los valores obtenidos, teniendo un tiempo de desarrollo cada uno de los métodos, $617 \pm 0,95$, $301,8 \pm 1,54$ y $632,35 \pm 3,23$ segundos. **Conclusiones:** De todos los métodos comparados, el recomendado para su empleo es el método 2, al ser el método más rápido, a la vez de emplear una fase estacionaria más cómoda de trabajar.

Palabras clave: Radioquímica; Control de calidad.

Abstract: Optimization of the quality control of ^{99m}Tc -tetrofosmin: Three methods compared.

Objective: To compare 3 methods for quality control of ^{99m}Tc -tetrofosmin and alternative to that proposed by the manufacturer, and to determine which of them is recommended to be used in a Radiopharmacy unit. **Material and Methods:** 40 vials of ^{99m}Tc -tetrofosmin were marked following the manufacturer's instructions. Three different methods were studied to perform the quality control for tetrofosmin: ITLC-SG/Ethyl Methyl Ketone (Method 1), Whatman-17 paper /Ethyl Acetate (Method 2) and Whatman-3MM paper / Ethyl Acetate (Method 3). **Results:** Average values of radiochemical purity (PRQ (%)) when it was measured by the three methods were 95.79 ± 2.32 , 96.56 ± 1.14 and 93.38 ± 1.36 respectively, with no significant differences in the values obtained. **Development time of each method was,** 617 ± 0.95 , 301.8 ± 1.54 and 632.35 ± 3.23 seconds. **Conclusions:** From the methods compared, the recommended one for being used is method 2, which is the fastest one, and uses a more convenient stationary phase to work.

Key Words: Radiochemistry; Quality control.

INTRODUCCIÓN

Las fosfinas presentan un carácter nucleofílico, así como una gran reactividad, siendo esta mayor en las fosfinas terciarias que en las secundarias y la de éstas mayor que las primarias. Los compuestos de alquil y arilfosfinas se comportan como moléculas donadoras de electrones y por tanto resultan adecuadas para la formación de complejos con metales, con los que establecen enlaces covalentes coordinados como los formados con el ^{99m}Tc .

El complejo fosfínico ^{99m}Tc -tetrofosmina, es desarrollado como agente para la imagen mediante SPECT ("Single Photon Emission Computed Tomography" o "tomografía computadorizada por emisión de fotón único") de la perfusión miocárdica en estudios de Medicina Nuclear (1), al ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica por su carácter lipofílico. Del mismo modo,

también se encuentra indicado para la obtención de imágenes de tumores de mama para obtener una valoración inicial en la caracterización de malignidad de lesiones de mama sospechosas (2).

La fórmula molecular es $(^{99m}\text{Tc}(\text{tetrofosmina})_2 \text{O}_2)^+$, siendo la tetrofosmina el 1,2-bis[bis(2-etoxietil)fosfito]etano), el cual da lugar, cuando se reconstituye ^{99m}Tc , a un complejo catiónico y lipofílico. Su conservación después del proceso de marcaje con pertecnetato sódico ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), recogido a partir de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, debe ser a una temperatura de 2-8°C, pudiéndose usar durante las 12 horas siguientes a su preparación.

La ^{99m}Tc -tetrofosmina es un radiofármaco que se emplea con bastante asiduidad en los Centros de Producción de Radiofármacos tanto descentralizados como centralizados (3). Debido a esto, interesa que el tiempo requerido para su preparación y control de la calidad sea el más corto posible, de forma que se pueda adelantar su dispensación.

Para la detección de la pureza radioquímica (PRQ), el fabricante recomienda el empleo de la cromatografía en capa fina, utilizando ITLC-SG ("instant thin-layer chromatography - Gel Silica" o

“cromatografía instantánea en capa fina -Silica Gel”) con un tamaño de 2 x 20 cm como fase estacionaria, así como fase móvil acetona/diclorometano (35:65). Debido a las condiciones de la tira cromatográfica, el tiempo de desarrollo de este método es bastante elevado.

El objetivo de este estudio es emplear alternativas al método propuesto por el fabricante para la realización del control de la calidad del radiofármaco, compararlas y observar cual de ellas es la más apropiada para su uso rutinario en los Centros de Producción de Radiofármacos.

Para determinar la PRQ del compuesto se han empleado tres métodos cromatográficos distintos: ITLC-SG/Etil metilcetona (EMC)(4), papel Whatman-17/acetato de etilo (5) y papel Whatman-3MM/acetato de etilo (6). Se han comparado estos tres métodos, observando los tiempos de desarrollo de los mismos para determinar cuál es el más conveniente para utilizar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instrumentación

Para el recuento de las tiras cromatográficas se empleó un cromatógrafo minigita, Raytest con una sonda de INa (TI) (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Benzstraße 4, D-75334 Straubenhardt, Germany), con un tiempo de medida, mediante el barrido de la tira cromatográfica, de 15 segundos para los métodos 1 y 2, y de 30 segundos para el método 3.

Reactivos

Para la realización de los controles de calidad, necesitaremos los disolventes orgánicos acetato de etilo y metilacetona para emplearlo como fases móviles.

Como fase estacionarias emplearemos papel Whatman 17 y Whatman 3MM, así como tiras cromatográficas de ITLC-SG, las cuales las tendremos almacenadas en un estanco con bolsitas de deshidratante para minimizar al máximo la presencia de humedad en él.

Procedimientos

Para el presente estudio de comparación de controles de calidad del ^{99m}Tc -tetrofosmina, se realizaron controles del radiofármaco mediante cromatografía sólido/líquido para la detección de la PRQ de la ^{99m}Tc -tetrofosmina frente a sus impurezas (^{99m}Tc -RH y $^{99m}\text{TcO}_4^-$). Se emplearon 3 métodos cromatográficos diferentes:

• *Método 1:* Fase móvil: acetato de etilo; fase estacionaria: papel Whatman 3MM de un tamaño de 1 X 10 cm. Sus coeficientes de reparto son:

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-RH} + ^{99m}\text{TcO}_4^-) : 0,0$$

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-tetrofosmina}) : 0,4-0,7$$

• *Método 2:* Fase móvil: Acetato de etilo; fase estacionaria: papel Whatman 17 de un tamaño de 1 X 10 cm. Sus coeficientes de reparto son:

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-RH} + ^{99m}\text{TcO}_4^-) : 0,0$$

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-tetrofosmina}) : 0,4-0,7$$

• *Método 3:* Fase móvil: Metilacetona; fase estacionaria: tiras de ITLC-Silica Gel de un tamaño de 1 X 15 cm. Sus coeficientes de reparto son:

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-RH}) : 0-0,13$$

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-tetrofosmina}) : 0,54-0,8$$

$$Rf (^{99m}\text{TcO}_4^-) : 0,85-1$$

• *Método recomendado por el fabricante:* Fase móvil: acetona: diclorometano (35:65); fase estacionaria: tiras de ITLC-Silica Gel de un tamaño de 2 X 20 cm. Sus coeficientes de reparto son:

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-RH}) : 0-0,13$$

$$Rf (^{99m}\text{Tc}\text{-tetrofosmina}) : 0,54-0,8$$

$$Rf (^{99m}\text{TcO}_4^-) : 0,85-1$$

Población estudiada

Se marcaron 40 viales de ^{99m}Tc -tetrofosmina siguiendo las indicaciones del fabricante (3). Para ello, se prepararon entre 4,4 y 8,8 GBq (gigabequerelios) de ^{99m}Tc como pertecnetato sódico (obtenido a partir de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, Drytec, Amersham Health), al que en todas sus eluciones se comprobó, mediante la realización del control de la calidad, su pH (dentro del intervalo 6-7), la cantidad de Al^{3+} (<10 ppm) y de ^{99}Mo ($\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc mCi} < 0,1$) que eran los correctos para la preparación del radiofármaco, y contenidos en un volumen de 4-8 mL de solución de NaCl 0,9%.

Después de la colocación de una aguja estéril (aguja de ventilación, de tamaño de 19 G), se añadió la cantidad fijada ^{99m}Tc al vial del equipo reactivo con la siguiente composición: 0,23 mg de tetrofosmina, 30 μg de cloruro de estaño dihidrato, 0,32 mg de sulfosalicilato disódico, 1 mg de D-gluconato sódico y 1,8 mg de bicarbonato sódico.

A continuación, antes de retirar la jeringa del vial, se retiraron 5 mL de gas por encima de la solución, para mantener la presión dentro del vial, tras lo cual se retiró la aguja de ventilación. La mezcla se agitó durante unos segundos para disolver el liofilizado y finalmente, según la metodología del presente estudio, se dejó reposar durante 20 minutos en el vial original.

Tratamiento estadístico

Se hizo uso de ANOVA para comprobar si existe diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de desarrollo de los tres métodos propuestos

RESULTADOS

Como hemos indicado, el método recomendado por el fabricante requiere el uso de una tira cromatográfica demasiado larga (20 cm), por lo que su tiempo de desarrollo es bastante elevado. Por ello no hemos visto adecuado incluir datos de este método, al no ser los tiempos equiparables a los otros métodos a estudio.

En las figuras 1, 2 y 3 observamos los perfiles cromatográficos que se obtuvieron al realizar el cálculo de la PRQ por los 3 métodos anteriormente reseñados. Se observa como con el método 3 obtenemos no sólo la cantidad, sino que podemos identificar el tipo de impurezas que existen en el vial.

Para comprobar si las distribuciones de los diferentes datos obtenidos en este estudio se ajustaban o no a una distribución normal, se les realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, dando positivo en todas ellas.

Se compararon las medias de las PRQ obtenida en cada uno de los tres métodos cromatográficos, una vez transcurridos los 20 minutos de incubación del radiofármaco dentro del vial, mediante la prueba de análisis de la varianza ANOVA, observándose que existían diferencias significativas cuando la PRQ se determinaba mediante el método 3 con respecto a los otros dos métodos, pero no había diferencias entre los métodos 1 y 2 ($P < 0,05$), siendo en todos los casos superior al 90% de pureza (tabla I).

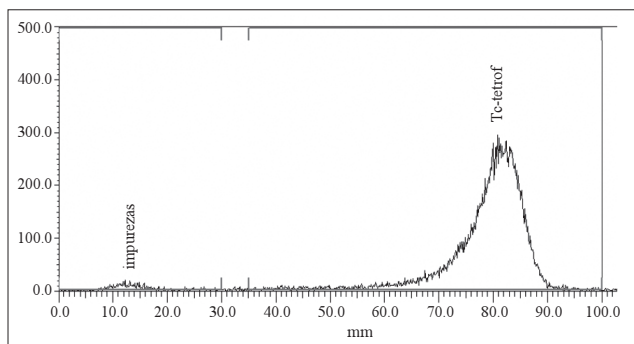


Figura 1. Cromatograma correspondiente al método 1. El eje Y corresponde al número de cuentas o número de desintegraciones radiactiva detectado por el radiocromatógrafo de la tira cromatográfica. El eje X nos indica los milímetros desde la base de la tira cromatográfica desarrollada.

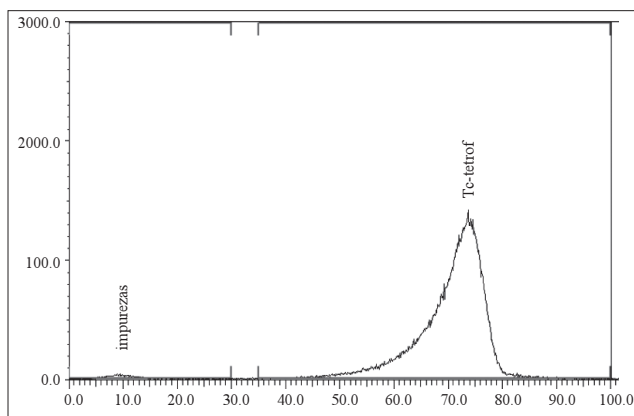


Figura 2. Cromatograma correspondiente al método 2. El eje Y corresponde al número de cuentas o número de desintegraciones radiactivas detectado por el radiocromatógrafo de la tira cromatográfica. El eje X nos indica los milímetros desde la base de la tira cromatográfica desarrollada.

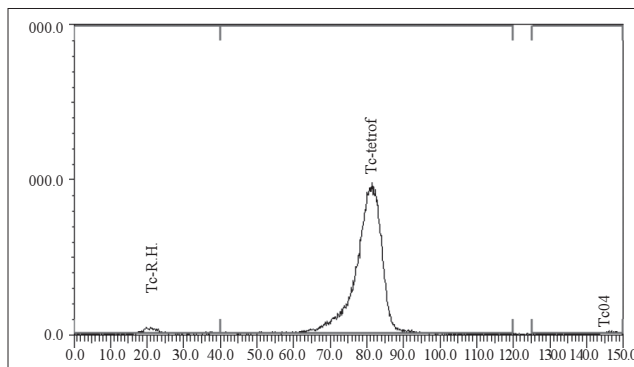


Figura 3. Cromatograma correspondiente al método 3. El eje Y corresponde al número de cuentas o número de desintegraciones radiactivas detectado por el radiocromatógrafo de la tira cromatográfica. El eje X nos indica los milímetros desde la base de la tira cromatográfica desarrollada.

Tabla I. PRQ de la ^{99m}Tc -tetrofosmina con una incubación de 20 minutos en el vial y tiempo de desarrollo de los métodos cromatográficos, para un número de pruebas $n = 40$

| F Movil / F Estacionaria | Tamaño | PRQ | Segundos |
|--------------------------|-----------|------------|---------------|
| AcEt / W3MM (Método 1) | 1 X 10 cm | 95,79±2,32 | 617,05 ± 0,95 |
| AcEt / W17 (Método 2) | 1 X 10 cm | 96,56±1,14 | 301,8 ± 1,54 |
| ITLC-SG / MEC (Método 3) | 1 X 15 cm | 93,38±1,36 | 632,35 ± 3,23 |

Mediante el empleo de la ANOVA se pudo comprobar que en los tiempos de desarrollo de los diferentes métodos no había diferencias significativas entre todos ellos, siendo el método 2 el que menor tiempo requería (tabla I).

DISCUSIÓN

Lo que se busca conseguir mediante la realización del Control de Calidad para el cálculo de la PRQ, es aislar al complejo tecnecio formado y conocer en qué proporción se encuentra en relación a las impurezas aparecidas. Éstas en general suelen ser el pertecnecato libre ($^{99m}\text{TcO}_4$ libre que no ha sido reducido por el estaño en el momento de su marcaje), y la formación de formas reducidas hidrolizadas (el ^{99m}Tc una vez reducido se puede hidrolizar en soluciones acuosas. El pH del medio, el tiempo y la presencia de otros agentes determinarán la cantidad y variedad de dichas especies, siendo las más frecuentes el $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_2^+$ y $^{99m}\text{TcOOH}^+$. También pueden existir especies hidrolizadas derivadas del estaño como $\text{Sn}(\text{OH})$)

A la vista de los resultados obtenidos, hemos observado que en todos los casos se obtiene una PRQ superior al 90% recomendada por el fabricante (3) mediante los métodos cromatográficos empleados, aunque se observa que mediante el método 1 y 2 la PRQ es ligeramente superior al método 3, como hemos indicado anteriormente, no llegando a obtenerse resultados estadísticamente diferentes entre ellos. Esto puede ser debido a que bajo este método se pueden detectar las impurezas procedentes del marcaje ($^{99m}\text{TcO}_4$ libre y el ^{99m}Tc reducido e hidrolizado) (5) (7), integrando así, tres partes en el radiocromatógrafo (disminuyéndose la región que corresponde al fármaco, y por tanto las cuentas totales detectadas en dicha zona), lo que produce una ligera disminución del rendimiento de marcaje con respecto a los otros dos métodos. Aún así su PRQ siempre fue superior a la mínima requerida (90%) para su administración.

Comparando los tres métodos cromatográficos expuestos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos al determinar la PRQ del complejo ^{99m}Tc -tetrofosmina, aunque el método 3 nos da una información más detallada de las posibles impurezas presentes en la preparación, como indican los estudios realizados por Gómez et al (5) o Métaýé et al (8). En el estudio de Gómez et al (5), se usaron tiras cromatográficas ITLC-SG de 18 x 2 cm, y permitiendo que el disolvente alcanzara una distancia de 12 cm, mientras que el estudio de Métaýé et al (8), usaron tiras cromatográficas ITLC-SG de 10 x 2,5 cm de longitud, obteniendo en ambos casos resultados superiores al 90% permitido. Nosotros hemos empleado tiras cromatográficas ITLC-SG de 15 x 1 cm obteniendo resultados similares.

Cuando comparamos los tiempos de desarrollo de los tres métodos empleados, observamos que el método Whatman 17/acetato de etilo se puede desarrollar en un tiempo de $301,8 \pm 1,54$ segundos, mientras que los métodos Whatman 3MM/acetato de etilo y ITLC-SG/EMC se desarrollaron en un tiempo de $617,05 \pm 0,95$ y $632,35 \pm 3,23$ segundos respectivamente, bastante superior al primero. Aunque la resolución no es tan buena como la obtenida con el método 3, en los Centros de Producción de Radiofármacos en general y en las centralizadas en particular, se requiere que los métodos cromatográficos sean rápidos y seguros para determinar las PRQ de los compuestos (8). El método 3 facilita un rápido control de calidad del radiofármaco y asegura la pureza del mismo, agilizando el trabajo en los centros de producción.

Recomendamos, a vista del estudio, el empleo del método 2 para la realización de los controles de calidad de rutina en los Centros de Producción de Radiofármacos. En general, es importante conocer varios métodos diferentes en el momento de la realización de los controles de calidad de un determinado radiofármaco, pues al desarrollarlo y observar que no se cumple la PRQ mínima recomendada, recomendamos repetir el control con otro método antes de descartar el vial por si el error viniera por algún factor externo (problemas en el almacenamiento de las tiras cromatográficas, del disolvente empleado, contaminación de la fase móvil, etc.).

Por tanto podemos concluir que:

- En los tres métodos propuestos, evitamos tener que realizar una mezcla de disolvente para configurar la fase móvil en el momento de realizar el control de calidad, como ocurre en el caso del método propuesto por el fabricante (acetona y clorometano).

- El método cromatográfico 2, es rápido y seguro para la determinación de la PRQ del complejo ^{99m}Tc -tetrofosmina, pues a pesar de no darnos de forma detallada el porcentaje que vamos a disponer de cada tipo de impureza, nos da la información rápida del porcentaje de radiofármaco que disponemos, siendo este el dato necesario para determinar la dispensación o no de la dosis.

- La manipulación y almacenamiento de las tiras de papel Whatman son más sencillas que las empleadas para las tiras de ITLC-SG, debido a que éstas se hidratan con facilidad por la humedad del aire. Esto provoca que existan riesgos para que el

control de la calidad no salga correctamente, debido a esta desactivación de la tira, teniendo que reactivarlas calentándola en la estufa. Esto último produciría un retraso en la dispensación de la dosis.

Agradecimientos

A Manuel M. Cerro Luna, Antonia Laut Martínez, Estefanía Torres Mañosa, José Luis Martínez Soler, Carolina Durán García, Verónica Palma García, Noelia Torres del Río, Antonia María López Rodríguez, TEMN por su inestimable ayuda a la hora de realizar este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blasco R, Rodríguez Zarauz J, Marcos MP, Gely P, Villares L, La Banda P. Complejo de fosfinas. *Rev Esp Med Nucl* 1995; 14: 59-65.
2. Nelly JD, Forster AM, Higley B, Archer CM, Broker FS, Canning LR, et al. Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med* 1993; 34: 222-7.
3. Ramírez de Arellano I, Píera C, Pavia J, Setoain J. Experiences in setting up the first centralized radiopharmacy in Spain. *Nucl Med Commun* 1999; 20: 270-85.
4. Gómez JL, Vega F, Peñafiel J, Daumal J, Peña C, Montsech L, et al. Un método alternativo para determinar la pureza radioquímica de las preparaciones de ^{99m}Tc -tetrofosmina. *Rev Esp Med Nucl* 1999; 18: 94-8.
5. McKay Zimmer AM, Spies SM. Rapid miniaturized chromatography for technetium-99m-tetrofosmin. *J Nucl Med Technol* 1997; 25: 52-4.
6. Patel M, Owunwanne A, Tuli M, Al-Za'abi, Al-Mohannadi S, Sa'ad M, et al. Modified preparation and rapid quality control test for technetium-99m-tetrofosmin. *J Nucl Med Technol* 1998; 26: 269-73.
7. Méteyé T, Desmarquet M, Rosenberg T, Guilhot J, Bouin-Pineau MH. Rapid quality control for testing the radiochemical purity of ^{99m}Tc -tetrofosmin. *Nucl Med Commun* 2001; 22: 1139-44.
8. Saha Gopal B. Nuclear pharmacy. In: *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2003, pp. 175-89.

Correspondencia

Rafael Blasco Ferrándiz
c/ Pablo Neruda, 32
41940 Tomares (Sevilla)
rafael.blasco@ge.com