

Titolo articolo / Article title:

**Analisi della purezza radiochimica del ^{99m}Tc -
mercaptoacetiltriglicina (MAG3) come garanzia di elevata
qualità: metodiche cromatografiche a confronto**

**Validation of solid phase extraction (SPE) coupled with
autoradiochromatography for ^{99m}Tc -MAG3 radiochemical
purity determination and comparison with traditional TLC**

Autori / Authors: S. Tamburri, M. Di Franco, V. Podio, A. Fileri

Pagine / Pages: 29-45, N.1, Vol.1 - 2017 (ISSN 2532-7925)

Submitted: 1 may 2017 – *Revised:* 3 may 2017 – *Accepted:* 21 may 2017 –

Published: 25 July 2017

Contatto autori / Corresponding author: **Simona TAMBURRI,**
simona.tamburri@libero.it

JBP – periodico per le professioni biomediche a carattere tecnico - scientifico - professionale

Open Access journal – www.ojs.unito.it/index.php/jbp



Opera distribuita con Licenza Creative Commons.

Attribuzione – Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale.

Questa Rivista utilizza il [Font EasyReading®](http://www.easyreading.com), carattere ad alta leggibilità, anche per i dislessici.

Direttore responsabile: Francesco Paolo SELLITTI

Direttore di redazione: Antonio ALEMANNI

Webmaster e ICT Admin: Simone URIETTI, Annamaria VERNONE

Comitato di redazione:

Editors: Antonio ALEMANNI, Mario CORIASCO,
Simone URIETTI, Sergio RABELLINO

Journal manager: Simone URIETTI, Annamaria VERNONE

Book manager: Francesco P. SELLITTI, Mario CORIASCO

Graphic Design Editor Francesco P. SELLITTI, Sergio RABELLINO,
Mario CORIASCO

Comitato scientifico:

Prof. Roberto ALBERA

Dott. Luciana GENNARI

Prof. Nello BALOSSINO

Prof. Caterina GUIOT

Dott. Alberto BALDO

Dott. Gianfranco GRIPPI

Prof. Paolo BENNA

Dott. Sergio MODONI

Prof. Mauro BERGUI

Dott. Grazia Anna NARDELLA

Prof. Gianni Boris BRADAC

Dott. Salvatore PIAZZA

Dott. Gianfranco BRUSADIN

Ing. Sergio RABELLINO

Prof. Alessandro CICOLIN

Dott. Irene VERNERO

Dott. Mario Gino CORIASCO

JBP – periodico per le professioni biomediche a carattere tecnico - scientifico - professionale

Open Access journal – www.ojs.unito.it/index.php/jbp



Opera distribuita con Licenza Creative Commons.

Attribuzione – Condividi allo stesso modo 4.0 Internazionale.

Questa Rivista utilizza il [Font EasyReading®](http://FontEasyReading.com), carattere ad alta leggibilità, anche per i dislessici.

Analisi della purezza radiochimica del ^{99m}Tc -MAG3 come garanzia di elevata qualità: metodiche cromatografiche a confronto

Validation of solid phase extraction (SPE) coupled with autoradiochromatography for ^{99m}Tc -MAG3 radiochemical purity determination and comparison with traditional TLC

Simona Tamburri, Marisa Di Franco, Valerio Podio, Andrea Filieri

Struttura Universitaria di Medicina Nucleare, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino)

Abstract

Scopo: Il ^{99m}Tc -MAG3 è il radiofarmaco più largamente impiegato per la diagnosi di alterazioni in campo nefro-urologico. Il nostro studio ha posto a confronto le due metodiche cromatografiche maggiormente utilizzate nel controllo di qualità della Purezza Radiochimica (P.R.) del ^{99m}Tc -MAG3: la cromatografia su strato sottile (TLC) e l'estrazione in fase solida (SPE), al fine di stabilire un'eventuale equivalenza tra le due o la definizione di un fattore di correzione che permetta il passaggio da una metodica all'altra senza perdita di accuratezza nell'analisi. Lo scopo secondario del lavoro è stato quello di analizzare la diversa sensibilità dei campioni SPE in relazione alla variazione della concentrazione radioattiva del radiofarmaco (0,11 GBq/ml, 0,6 GBq/ml, 0,1 GBq/ml, 0,25 GBq/ml), alla riduzione del volume di radiofarmaco dal valore standard di 100 μl a 75 μl e 50 μl ed alla modalità di acquisizione delle frazioni SPE usando uno schermo ed un lettore per autoradiocromatografia o lo strumento della gamma camera.

Materiali e Metodi: I diversi esperimenti condotti possono essere classificati in base alla modalità di marcatura proposta (concentrazione radioattiva del preparato), al metodo cromatografico impiegato per l'analisi della P.R., alla metodica di rivelazione utilizzata ed al volume dei campioni di ^{99m}Tc -MAG3. I test utilizzati per l'elaborazione statistica dei dati sono stati: test



U Mann-Whitney (non parametrico e ad una coda) ed il test dell'analisi della varianza (ANOVA single factor) (p value < 0,05).

Risultati: L'analisi della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3 con le TLC per le quattro diverse concentrazioni radioattive ha mostrato una differenza non statisticamente significativa (valore della P.R. molto maggiore del 95% minimo stabilito dalla Farmacopea) mentre, se comparata con l'analisi della P.R. con la SPE delle due concentrazioni radioattive maggiormente impiegate negli studi clinici (0,11 GBq/ml e 0,6 GBq/ml), quest'ultima evidenzia una differenza statisticamente significativa. Il confronto tra i due diversi sistemi di rivelazione impiegati nella tecnica SPE ha anch'esso mostrato una differenza non statisticamente significativa (entrambi i rivelatori possono essere quindi usati in maniera indifferente). Non è stato possibile calcolare il fattore correttivo che ci eravamo proposti nello scopo del lavoro. Inoltre i test statistici che hanno messo a confronto le colonnine portate a secco da quelle non portate a secco hanno evidenziato l'importanza della procedura a secco. Infine la riduzione del volume del campione di radiofarmaco dal valore di riferimento ha portato a risultati statistici non sovrapponibili.

Conclusioni: È stato possibile validare il metodo SPE per il controllo di qualità della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3, ponendo attenzione a non ridurre il volume analitico da quello di riferimento (100 μl), senza che vi siano differenze di rivelazione tra i sistemi dell'autoradiocromatografia e della gamma camera. La TLC è stata confermata come il metodo cromatografico di riferimento per tale controllo di qualità, data la sua più alta ripetibilità rispetto alla SPE. La metodica di controllo SPE, così messa a punto, verrà quindi riservata alle preparazioni di ^{99m}Tc -MAG3 che alla TLC risulteranno particolarmente ricche di impurezze lipofile ad alto peso molecolare separabili solo con le colonnine, affiancate alla metodica di riferimento TLC. In conclusione, l'orientamento futuro è quello predisporre ulteriori indagini per la valutazione delle variabili chimiche (O_2 ? Sn^{2+} ?) implicate nei processi redox che concorrono a dare un'influenza diversa sul risultato di purezza radiochimica nel saggio su colonnine rispetto alla TLC, migliorando così anche i risultati di ripetibilità inter-day.

Parole Chiave

^{99m}Tc -MAG3, radiofarmaco, radiofarmacia, medicina nucleare, purezza radiochimica (P.R.), cromatografia a strato sottile (TLC), estrazione in fase solida (SPE), cromatografia, gamma camera, autoradiocromatografia, kit freddi, marcatura a caldo.

English abstract

Aim: ^{99m}Tc -mertiatide (MAG3, mercaptoacetyltriglycine) is the most used radiopharmaceutical for nefro-urological studies. Concerning the importance to carry out a series of test in order to evaluate qualitative parameters, such as the Radiochemical Purity (R.P.), our study compared the two major chromatographic methods to perform R.P. quality control: thin layer chromatography (TLC) and solid phase extraction (SPE) (potential correction factor). Secondary aims were:

the study of SPE samples different sensibility compared with different radiopharmaceuticals activity/volume ratio (0.11 GBq/ml, 0.6 GBq/ml, 0.1 GBq/ml, 0.25 GBq/ml), by reducing the volume from the standard value of 100 μl to 75 μl and 50 μl and detecting the SPE fractions by means of autoradiochromatography and gamma camera.

Materials And Methods: According to the work planning, the experiments can be classified depending on the labelling procedures, the chromatographic methods, the detection systems and the samples volumes. Test U Mann-Whitney (non-parametric, one winged) and analysis of variance test (ANOVA single factor) with p value $< 0,05$ has been used for statistical data processing.

Results: The analysis of MAG3 R.P. with TLC for the four activity/volume ratio showed a difference statistically non significant (R.P. higher than 95% the minimum prescribed), while if compared with SPE method for the two major labelling procedures used for clinical studies (0.11 GBq/ml and 0.6 GBq/ml) a statistical difference can be noticed. The comparison between the two detecting systems adopted in the SPE technique was statistically non significant, so both detectors can be used indifferently. It was also impossible to calculate a correction factor in order to move from a chromatographic methods to the other without losing analysis accuracy. Furthermore, the statistic test between "dry column" and "moist column" has highlighted the importance of dry procedure for SPE methods. At the end by reducing the sample volume from the reference value, statistics tests underlined non overlappable results.

Conclusions: SPE method has been validated for MAG3 R.P. control, paying attention not to reduce the analytical volume (100 μl), and showing an equal value between detection performed by gammacamera and autoradiochromatography. TLC was confirmed as the reference method because of its higher repeatability compared with SPE technique. The latter should be destined to samples which portray an higher concentration of lipofilic impurities to TLC. In conclusion, our results open the possibility to validate plausible chemical factor responsible for different SPE method sensibility in respect to MAG3 radioactive concentration (O_2 ? Sn^{2+} ?) and to reassess SPE inter-day repeatability broadening the experimental sample.

Keywords

^{99m}Tc -MAG3, radiopharmaceutical, radiopharmacy, nuclear medicine, radiochemical purity (R.P.), thin layer chromatography (TLC), solid phase extraction (SPE), Chromatography, gammacamera, autoradiochromatography, cold kits, labeling procedure.

Introduzione e scopo del lavoro

Dalla fine degli anni '50 le indagini non invasive di medicina nucleare hanno garantito un approccio diagnostico ottimale delle principali sindromi nefro-urologiche fornendo informazioni fisiologiche (valutazione della funzione renale e del deflusso urinario). [1] [2]

Nella scintigrafia renale dinamica vengono utilizzati radiofarmaci aventi un'elevata clearance renale [3]: l'ortoioidoippurato (Hippuran) presenta una farmacocinetica ideale (estrazione quasi totale attraverso il rene ed eliminazione con le urine senza ritenzione a livello del parenchima), ma a partire dagli anni '80 si è iniziato a preferire l'uso del ^{99m}Tc -MAG3 (mercaptoacetiltriglicina) per superarne le caratteristiche sfavorevoli riguardanti le proprietà fisico-dosimetriche (quando marcato con ^{131}I) e la difficile disponibilità (marcatura con ^{123}I) [4]. Il ^{99m}Tc -MAG3 possiede dunque tutte le caratteristiche che lo rendono idoneo per l'acquisizione di immagini cliniche di elevata qualità. [5]

La metodica cromatografica di riferimento per l'analisi della Purezza Radiochimica (P.R.) è la High Performance Liquid Chromatography che consente la separazione di differenti componenti presenti nello stesso campione con selettività e sensibilità molto elevata (ordine del ng), ma è presente in un numero limitato di reparti di medicina nucleare [6] [7].

In un laboratorio di camera calda il controllo di qualità della P.R. Viene però più comunemente eseguito con l'ausilio della cromatografia su carta (PC) e della cromatografia a strato sottile (TLC). Queste tecniche cromatografiche presentano entrambe buoni vantaggi (esecuzione semplice e rapida, elevata riproducibilità, costi ridotti), ma trovano il proprio limite nella bassa selettività e sensibilità.

L'estrazione in fase solida (SPE) è un'altra tecnica cromatografica con buona abilità identificativa di molecole aventi comportamenti cromatografici simili e non richiede per il suo utilizzo una strumentazione particolarmente complessa e costosa. [8]

Lo scopo del nostro lavoro scientifico era la valutazione dell'SPE quale metodica di analisi della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3 preparato nel per uso clinico nel Servizio di Medicina Nucleare dell'Ospedale San Luigi Gonzaga di Orbassano (TO).

Ciò richiede anche la comparazione delle metodiche di rivelazione impiegate: non era disponibile all'interno del reparto un gamma counter avente parametri prestazionali adeguati al tipo di indagine, né è stato possibile l'utilizzo di un calibratore di attività in quanto notevolmente disturbato dall'elevata radioattività di fondo.

Sono stati usati due diversi strumenti per la rivelazione dei campioni SPE: l'autoradiocromatografo e la gammacamera. Entrambe le metodiche di imaging erano già state validate per la rivelazione delle analisi attraverso TLC.

Materiali e metodi

I kit freddi di MAG3 (TechneScan® MAG3, Tyco Healthcare, Italia) sono stati marcati con una soluzione di tecnezio- ^{99m}Tc (^{99m}Tc) ottenuto dall'eluizione di un generatore ^{99}Mo - ^{99m}Tc (Drytec®, GE Healthcare Limited, Amersham Buckinghamshire, UK).

Dopo l'aggiunta dell'eluato al kit, preparati sono stati posti all'interno di un contenitore schermato in un bagno di glicerina-acqua (1:1) e riscaldati per 10 minuti ad una temperatura di

100°C. Essi sono poi stati raffreddati sotto acqua corrente per un tempo di 2-3 minuti e successivamente conservati a temperatura ambiente [9].

I radiocomposti allestiti differiscono tra loro per l'attività con i quali sono stati marcati e per il volume di soluzione fisiologica utilizzata per la diluizione:

- $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 1,1 GBq in 10 ml di soluzione salina (0,11 GBq/ml), modalità di marcatura riportata sul foglietto illustrativo e conforme al summary of product characteristic (SPC) [10];
- $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 1,5 GBq in 2,5 ml di soluzione salina (0,60 GBq/ml), protocollo di marcatura interno validato nel 2004 in collaborazione con il servizio di Medicina Nucleare dell'Ospedale Santa Croce e Carle di Cuneo.

In aggiunta a queste due diverse proposte di marcatura per la pratica clinica, sono stati posti ad esperimento altri due metodi di marcatura non convenzionali:

- $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 1,5 GBq in 15 ml di soluzione fisiologica (0,10 GBq/ml);
- $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 1,5 GBq in 6 ml di soluzione fisiologica (0,25 GBq/ml).

Queste ultime due tipologie di marcatura, difformi dalle attività e dai volumi proposti dal foglietto illustrativo del ^{99m}Tc -MAG3, sono classificate come off-label e pertanto non è possibile impiegarle a scopo clinico.

L'attività di $^{99m}\text{TcO}_4^-$ necessaria prelevata dalla colonna è stata misurata all'interno di un calibratore di dose (Capintec CRC[®]-15R, Ramsay, NJ, USA).

L'analisi della purezza radiochimica del radiofarmaco ha previsto l'utilizzo di due differenti metodiche: la cromatografia su strato sottile (TLC), quale metodica di riferimento, e l'estrazione in fase solida (SPE) in fase di validazione. Sia le TLC che le mini-colonne SPE sono state acquisite mediante l'autoradiocromatografia in quanto metodica di imaging standard e successivamente si è ripetuta l'acquisizione delle frazioni SPE con lo strumento della gamma camera. Riassumendo, le variabili per cui le diverse prove sperimentali differiscono tra di loro sono:

- la concentrazione radioattiva dell'eluato (soluzione di ioni pertecnetato);
- l'attività con la quale marcare il kit;
- il volume di ^{99m}Tc -MAG3 analizzato, con riduzione del campione da 100 μl a 75 μl , fino a 50 μl , ciascuno analizzato con tre colonnine SPE e con 3 coppie di ITLC-SG;
- la modalità di acquisizione delle immagini.

È stato allestito un numero totale di 32 controlli di qualità. Ogni prova sperimentale SPE è stata condotta con un numero di 3 analisi per campione sperimentale, mentre ogni serie di TLC ha previsto l'allestimento di 9 esperimenti (Fig 1).

	1,1 GBq 10 ml	1,5 GBq 2,5 ml	1,5 GBq 15 ml	1,5 GBq 6 ml
TLC Cyclone	•••••	••••••	•	•
SPE 100 µl Cyclone	•••••	••••	•	•
SPE 100 µl γ-camera	•••	•••	•	•
SPE 75 µl Cyclone	•	•••		
SPE 75 µl γ-camera		••		
SPE 50 µl Cyclone	•	•••		
SPE 50 µl γ-camera		••		

Figura 1: Rappresentazione schematica del numero di prove sperimentali totali classificate in base alla tipologia di marcatura, alla metodica di controllo di qualità, alla modalità di acquisizione e al volume del campione di radiofarmaco prelevato.

Estrazione in fase solida (SPE)

La purezza radiochimica è stata altresì determinata attraverso il metodo SPE americano con colonne miniaturizzate Sep-Pak C-18 (C-18 Sep-Pak cartridge, Waters Chromatography, Milford, MA) costituenti la fase fissa.

Le colonnine sono state condizionate con 10 ml di etanolo assoluto seguiti da 10 ml di acido cloridrico 1 mM, portando a secco la colonnina al termine del processo. È stato successivamente deposto un campione di 100 µl di soluzione di $^{99m}\text{Tc-MAG3}$ attraverso l'estremità lunga della colonnina e questa è stata eluita goccia a goccia con 10 ml di HCl 1 mM, raccogliendo l'eluato contenente pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) ed impurezze idrofile ($^{99m}\text{Tc-tartrato}$) in una provetta di plastica tipo "Falcon" da 50 ml (frazione 1). La seconda eluizione, con 10 ml di una miscela etanolo:soluzione fisiologica (1:1), è stata in grado di isolare il $^{99m}\text{Tc-MAG3}$, che è stato raccolto in una seconda provetta "Falcon" (frazione 2). In ultimo, la colonnina stessa è stata posta all'interno di una terza provetta "Falcon" (frazione 3) rappresentante la frazione del tecnezio ridotto idrolizzato ($^{99m}\text{TcO}_2$) e delle impurezze idrofobe colloidali. Al fine di ottenere la medesima geometria di radioattività per tutti i campioni, le frazioni SPE sono state portate a volume di 10 ml con l'aggiunta di soluzione fisiologica [11] (Fig 1.2).

Con l'acquisizione di esperienza pratica, è stato sviluppato un ulteriore protocollo che prevede, dopo ogni singola fase, l'asciugatura della colonnina attraverso il passaggio di circa 10 ml di aria. Tale passaggio evita la presenza di residui dell'eluato precedente e consente l'eluizione di ciascuna frazione in modo quantitativo all'interno di una sola provetta [12] [13].

Fase mobile	Rf = 0	Rf = 1
Butanone: Etilacetato (40:60)	Radiofarmaco e tecnezio ridotto idrolizzato ($^{99m}\text{TcO}_2$)	Pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)
Acetonitrile: Acqua (60:40)	($^{99m}\text{TcO}_2$)	(^{99m}Tc -MAG3) e ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Figura 1.1: rappresentazione schematica della metodica TLC per la determinazione della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3

Condizionamento	10 ml di <u>EtOH</u> , 10 ml di <u>HCl</u> 1 mmol/l
Eluizione Fraz ¹ (<u>impurezze</u> idrofile)	10 ml di <u>HCl</u> 1 mmol/l
Eluizione Fraz ² (^{99m}Tc -MAG3)	10 ml di <u>EtOH</u> , 10 ml di <u>NaCl</u> 0,9% (1:1)
Raccolta Fraz ³ (<u>impurezze</u> lipofile + colloidali)	Residuo in colonna

Figura 1.2: rappresentazione schematica della metodica SPE per la determinazione della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3.

Cromatografia su strato sottile (TLC)

L'esecuzione di ogni controllo con tecnica cromatografica su strato sottile ha previsto l'utilizzo di lastre di fibra di vetro ricoperte di silice gel (ITLC-SG Varian, Lake Forest, 2,5 cm x 19 cm). Per il test sono state utilizzate due diverse fasi mobili: una miscela di butanone:etilacetato (40:60) ed una di acetonitrile:acqua (60:40). Con il sistema cromatografico butanone:etilacetato (40:60) è stato possibile identificare e dosare il pertecnetato libero ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) migrato fino al fronte del solvente (Fattore di Ritenzione Rf pari a 0,9-1) dal tecnezio complessato e dal tecnezio colloidale (Rf=0-0,2), mentre l'acetonitrile:acqua (60:40) è stata in grado di separare il tecnezio ridotto idrolizzato ($^{99m}\text{TcO}_2$) (Rf=0) dal ^{99m}Tc -MAG3 e dal pertecnetato migrati entrambi al fronte del solvente (Rf=1) (Fig 1.1) [10].

Autoradiocromatografia

L'acquisizione dei conteggi delle ITLC-SG è stata effettuata impiegando uno schermo per autoradiocromatografia, simile per struttura e composizione ad un plate ai fosfori ma sensibile alle radiazioni γ e β , per circa 10 secondi. Lo schermo, così impressionato, è stato agganciato ad un rotore in modo da permetterne la scansione ad opera del lettore per autoradiocromatografia (Cyclone). Questo strumento è caratterizzato da un sistema completamente automatizzato in grado di analizzare la distribuzione radioattiva di campioni di piccole dimensioni. Il cuore del sistema è costituito da un sistema detettore ad array multicanale per un'efficiente rivelazione ad alta risoluzione [11]. Mediante il software OptiQuant è stato possibile procedere all'elaborazione computerizzata dell'immagine risultante dal processo di scansione. Come primo passaggio, per ogni coppia di ITLC-SG, sono state disegnate le Region of Interest (ROI) in corrispondenza degli Rf delle specie chimiche coinvolte, intorno alla distribuzione di radioattività effettivamente visibile. Per ogni lastrina è stata inoltre disegnata una ROI su una zona apparentemente priva di conteggi significativi per permettere al sistema software la sottrazione del background (Fig 1.3).

Dall'elaborazione software di ogni striscia, si ottiene come risultato una tabella riportante, oltre al valore di sottrazione del fondo (DLU/mm²), i parametri della distanza dall'origine (Rf, mm), della densità di conteggio (Gross/Net DLU), ma soprattutto della percentuale di ^{99m}Tc-complessato e di impurezze. Si è quindi calcolata la purezza radiochimica mediante la formula:

$$P.R. = 100 - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2)$$

Il risultato ottenuto è stato confrontato con i valori riportati sul foglio illustrativo che, a sua volta, fa riferimento alla specifica monografia della Farmacopea Ufficiale riportante, quale purezza radiochimica minima richiesta, un valore \geq a 96% immediatamente dopo la procedura di marcatura e \geq a 95% fino a quattro ore [14].

Per quanto riguarda invece l'acquisizione delle tre diverse frazioni SPE, sono state alloggiare all'interno di uno schermo multiforato in Lega di Lipowitz (27 % di Pb, 13 % di Sn, 50 % di Bi e 10 % di Cd) avente la medesima funzione di un collimatore a fori paralleli per una corretta distribuzione della radioattività minimizzando così la radiazione diffusa allo schermo per autoradiocromatografia; quest'ultimo è stato posto in posizione sottostante a tale collimatore. L'acquisizione anche in questo caso è stata di 10 secondi.

Come per la TLC, lo schermo impressionato è stato agganciato al rotore dell'apparecchio "Cyclone" con successivo avvio della scansione. L'immagine derivante è stata elaborata attraverso ROI tracciate nelle regioni di interesse con le stesse dimensioni in zone ad intermedia densità di conteggio. Anche in questo caso è stata posizionata una ROI per il calcolo di background subtraction, il più distante possibile dalle regioni di intensità maggiore di conteggi (Fig 1.4). La tabella ottenuta dal calcolo software, del tutto simile a quella ottenuta dall'acquisizione delle lastre cromatografiche, risulta riportare i valori percentuali di ^{99m}TcO₄⁻, ^{99m}Tc-MAG3 e ^{99m}TcO₂.

Il range di tolleranza della purezza radiochimica del ^{99m}Tc -MAG3 con il metodo delle colonnine Sep-Pak C-18 è $\geq 90\%$ [15].

Gamma camera

I conteggi delle tre diverse frazioni SPE sono stati inoltre acquisiti con la gamma camera (γ -camera Axis, Philips Medical Systems, Ohio, USA) per una maggiore affidabilità e riproducibilità dei risultati.

Le mini-colonne, alloggiare in un apposito portaprovette costituito in materiale plastico radio-trasparente, sono state poste sulla testata della gamma camera (collimatore LEHR-Par). È stata inoltre utilizzata una sorgente puntiforme di ^{57}Co , con funzione di repere radioattivo. I parametri di acquisizione impostati all'apparecchio sono stati i seguenti:

- Matrice di acquisizione: 256x256;
- Zoom: 1,60;
- Orientamento: 7;
- Numero di viste: 1;
- Tempo di acquisizione: 180 secondi;
- Slice: 1,46 mm.

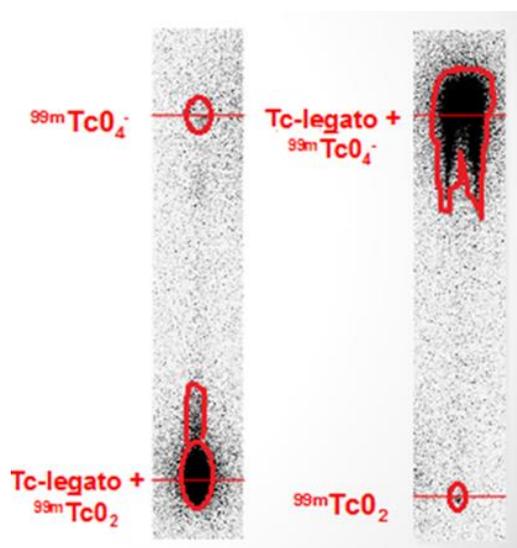


Figura 1.3: rappresentazione grafica dell'elaborazione software delle ITLC-SG al fine di calcolo della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3

L'immagine ottenuta è stata elaborata disegnando delle ROI intorno alle singole frazioni, più una per il calcolo di sottrazione del background. Per ciascuna regione di interesse i parametri calcolati sono stati: densità di conteggio (cts/pix), numero di pixel (region pixel), numero totale di conteggi (region total) ed i valori di massimo e minimo (region max e min).

La purezza radiochimica del ^{99m}Tc -MAG3 è stata calcolata attraverso la seguente formula matematica:

$$PR = \frac{\text{Frazione 2 (cts)}}{[\text{Frazione 1 (cts)} + \text{Frazione 2 (cts)} + \text{Frazione 3 (cts)}]} * 100$$

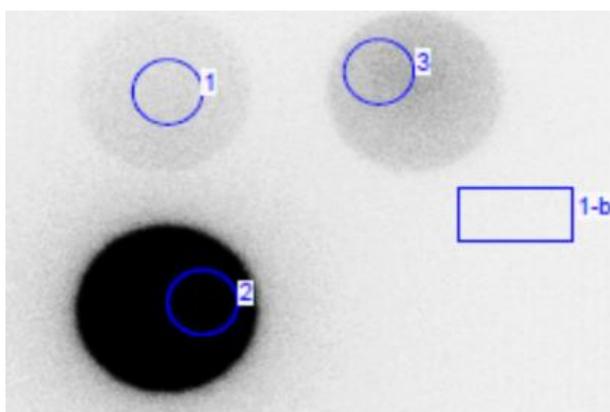


Figura 1.4: rappresentazione grafica dell'elaborazione software delle colonnine SPE al fine di calcolo della P.R. del ^{99m}Tc -MAG3 dove:

- 1= frazione 1 ($^{99m}\text{TcO}_4^-$);
- 2= frazione 2 (^{99m}Tc -MAG3);
- 3= frazione 3 ($^{99m}\text{TcO}_2$)

Elaborazione statistica dei dati

A causa della distribuzione non normale dei dati e, in alcuni casi, della ridotta numerosità campionaria, per l'analisi statistica a due campioni il test t di Student è stato sostituito dall'analogo test U di Mann-Whitney non parametrico ad una coda, in grado di fornire un'approssimazione gaussiana della distribuzione. Per quanto riguarda l'analisi di campioni superiori di numero a due, è stato usato il test statistico dell'analisi della varianza (test ANOVA non parametrico).

Risultati

Sono state eseguite 44 valutazioni nell'ambito di 18 prove di marcature del ^{99m}Tc -MAG3 prendendo in esame diversi parametri chimico-fisici dai quali può dipendere la resa di marcatura in un laboratorio di radiofarmacia ospedaliera. Alcuni sono risultati pressoché ininfluenti sulla qualità del preparato, in contrasto con quanto descritto da alcuni Autori, mentre altri si sono rivelati decisivi.

Mentre i risultati ottenuti con le TLC hanno rivelato sovrapposibilità dei risultati di P.R. ottenuti dalle due marcature caratterizzate da diversa concentrazione, l'analisi mediante SPE ha invece rivelato differenza significativa tra i risultati ottenuti dai kit marcati con rapporto A/V pari a 0,11 GBq/ml e 0,60 GBq/ml. Si è quindi voluto indagare se ciò che ha determinato questo

risultato sia legato all'attività di ^{99m}Tc impiegata od alla concentrazione radioattiva del radiofarmaco. Pertanto, sono state implementate altre due tipologie di marcatura: 1,5 GBq in 15 ml e 1,5 GBq in 6 ml (A/V pari a 0,10 GBq/ml e 0,25 GBq/ml).

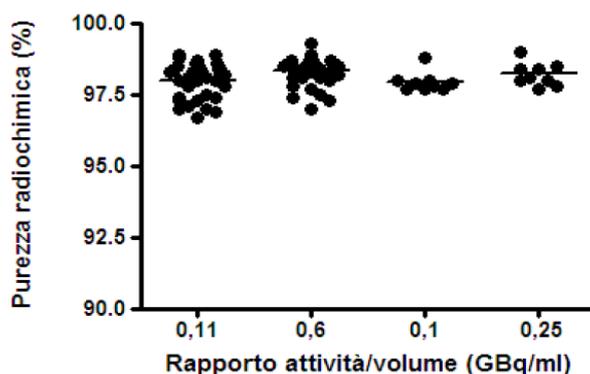


Figura 1.5: Purezza radiochimica (%) controllata con il metodo TLC per i quattro diversi rapporti attività/volume analizzati

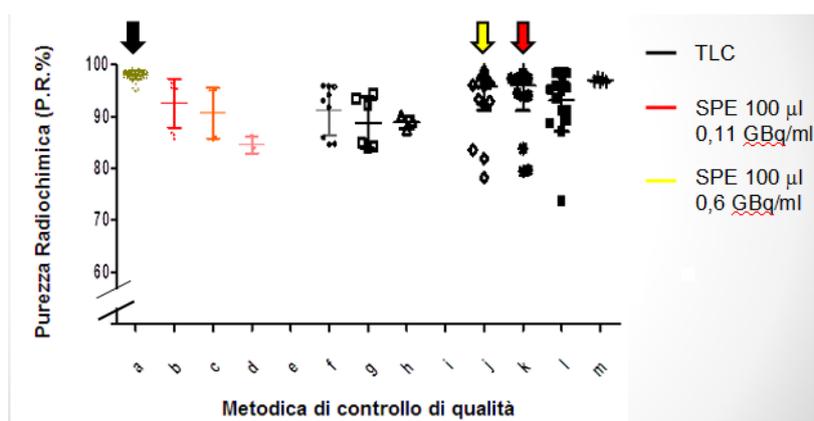


Figura 1.6: Purezza radiochimica (%) controllata mediante TLC confrontata con tutte le colonnine prese in analisi nello studio.

Un ulteriore parametro portato all'attenzione dello studio è stato l'influenza della riduzione del volume del campione analitico (dal valore standard di 100 µl a 75 µl e 50 µl) sul risultato di P.R. per il metodo SPE. La finalità pratica legata all'impiego di volumi ridotti di radiofarmaco è quella di minimizzare la radioesposizione dell'operatore ed il volume di radiofarmaco sottratto al preparato per uso clinico per l'effettuazione del controllo di qualità nonché per la possibilità di utilizzare siringhe da 1 ml.

Inoltre è stato ritenuto utile eseguire l'acquisizione delle colonnine, oltre che attraverso l'autoradiocromatografia, mediante la camera, poiché dotata di maggior sensibilità e potere risolutivo per determinare l'eventuale sovrapposibilità dei due rivelatori accoppiati alla tecnica analitica SPE.

Le figure Fig. 1.6, Fig. 1.7 e Fig. 2 fanno riferimento alla seguente legenda:

- a) TLC + autoradiocromatografia
- b) volume del campione pari a 50 μ l (portato a secco) + autoradiocromatografia
- c) volume del campione pari a 50 μ l (portato a secco) + gamma camera
- d) volume del campione pari a 50 μ l (ad umido) + autoradiocromatografia
- e) volume del campione pari a 50 μ l (ad umido) + gamma camera
- f) volume del campione pari a 75 μ l (portato a secco) + autoradiocromatografia
- g) volume del campione pari a 75 μ l (portato a secco) + gamma camera
- h) volume del campione pari a 75 μ l (ad umido) + autoradiocromatografia
- i) volume del campione pari a 75 μ l (ad umido) + gamma camera
- j) volume del campione pari a 100 μ l (portato a secco) + autoradiocromatografia
- k) volume del campione pari a 100 μ l (portato a secco) + gamma camera
- l) volume del campione pari a 100 μ l (ad umido) + autoradiocromatografia
- m) volume del campione pari a 100 μ l (ad umido) + gamma camera
- n) volume del campione pari a 100 μ l (portato a secco) + autoradiocromatografia (per le marcature 1,1 GBq in 10 ml e 1,5 GBq in 2,5 ml)
- o) volume del campione pari a 100 μ l (portato a secco) + gamma camera (per le marcature 1,1 GBq in 10 ml e 1,5 GBq in 2,5 ml)

Effettuando il confronto tra tutti i controlli di qualità effettuati con il metodo della cromatografia a strato sottile per i quattro diversi rapporti attività/volume tramite test ANOVA (Fig 1.5) si è riscontrata una differenza statisticamente non significativa ($P = 0,3671$ per $p < 0,05$).

La TLC genera ridotta esposizione dei campioni all'ossigeno atmosferico così che essa per preparati marcati con tecnezio-99m, notoriamente sensibili all'ossigeno (rischio di riossidazione del tecnezio ridotto a pertecnetato), risulta essere una tecnica soggetta a scarsa variabilità (σ , deviazione standard) ad opera di agenti esterni, mostrando dunque una variabilità minore rispetto alla tecnica SPE (TLC $\sigma = 0,80$ vs SPE $\sigma = 5,51$).

Successivamente è stata considerata la comparazione tra le due metodiche di controllo di qualità, appunto la TLC e la SPE, per ogni tipologia di marcatura (Fig 1.6 e 1.7). Il test U di Mann-Whitney ha evidenziato differenze statisticamente significative per tutte le modalità di marcatura considerate:

- $P = 0,0195$ per $p < 0,05$ confrontando TLC e colonnine per 1,1 GBq in 10 ml;
- $P < 0,0001$ per $p < 0,05$ comparando TLC e colonnine per 1,5 GBq in 2,5 ml;
- $P = 0,0062$ per $p < 0,05$ confrontando TLC e colonnine per 1,5 GBq in 15 ml;
- $P = 0,0005$ per $p < 0,05$ confrontando TLC e colonnine per 1,5 GBq in 6 ml.

Gli scarti tra i valori medi di P.R. Determinata mediante TLC e colonnine sono: 0,3% per la marcatura da foglietto illustrativo (media TLC = 97,8% e media SPE = 97,5%), 5,9% per la modalità di allestimento di 1,5 GBq in 2,5 ml (media TLC = 98,3% e media SPE = 92,4%), 0,2% per la marcatura 1,5 GBq in 15 ml (media TLC = 98,3% e media SPE = 98,1%) e 0,5% per la marcatura 1,5 GBq in 6 ml (media TLC = 98,3% e media SPE = 97,8%).

Effettuando, inoltre, il test dell'analisi della varianza fra le colonnine per la marcatura 1,1 GBq in 10 ml e le colonnine per la modalità di marcatura 1,5 GBq in 2,5 ml è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($P = 0,0001$ per $p < 0,05$) in termini di P.R. del radiofarmaco. Questo significa che è intervenuto un fattore chimico esterno che ha influito diversamente sui campioni impiegati per l'analisi SPE per le due marcature. In particolare, la marcatura 1,5 GBq in 2,5 ml ha rivelato sempre una percentuale di $^{99m}\text{TcO}_4^-$ superiore a quella registrata per l'altra marcatura. Si tratta quasi certamente della presenza di un agente ossidante che, in maniera differenziale, reagisce con il tecnezio ridotto rilasciato lentamente dal complesso di chelazione ^{99m}Tc -MAG3. Esso potrebbe identificarsi con l'ossigeno o con lo ione stagno $4+$ ottenuto dall'ossidazione dello stagno $2+$ ad opera dell'ossigeno atmosferico. Questo sistema chimico dinamico potrebbe influenzare maggiormente la marcatura con maggior concentrazione radioattiva (1,5 GBq in 2,5 ml), seguita dalla marcatura 1,5 GBq in 6 ml ed in coda dalle due marcature con rapporto A/V pari a 0,10 e 0,11 GBq/ml, influenzate in modo trascurabile [16] [17].

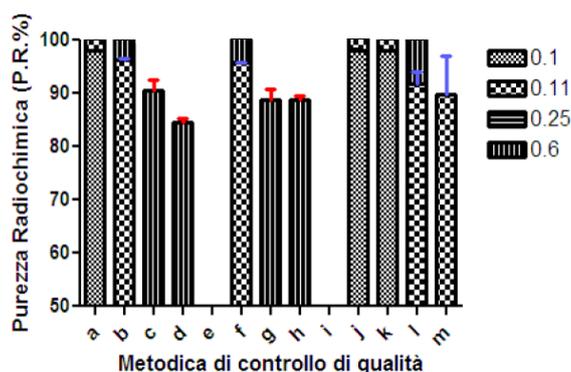


Figura 1.7: Purezza radiochimica (%) controllata mediante TLC confrontata con tutte le colonnine prese in analisi nello studio, entrambe diversificate unicamente per la tipologia di marcatura

Alla luce di questi risultati, si era pensato di calcolare un fattore di correzione per poter effettuare agevolmente il passaggio da una metodica all'altra; dal risultato del test ANOVA tra le colonnine per la marcatura 1,1 GBq in 10 ml e le mini-colonnine per la marcatura 1,5 GBq in 2,5 ml eseguite nelle varie giornate si è osservata differenza statisticamente significativa ($P < 0,0001$ per $p < 0,05$): ciò implica la scarsa ripetibilità dell'analisi SPE in giornate diverse.

Pertanto, non è stato possibile stabilire un fattore correttivo univoco tra le due metodiche (Fig 1.8). Al contrario, la riproducibilità tra le mini-colonnine all'interno della stessa giornata è elevata (il valore della varianza per tutti i controlli con metodica SPE è minore del 5%).

L'importanza della procedura di portare a secco la colonnina tra una frazione e l'altra in maniera tale da espellere la considerevole attività altrimenti residua nella fase stazionaria del sistema estrattivo ha portato ad effettuare un confronto, per le due modalità di marcatura più rilevanti, tra le colonnine portate a secco e quelle non portate a secco. Per il campione marcato con 1,1 GBq in 10 ml l'analisi statistica ha dimostrato un'elevata ripetibilità dei risultati delle

colonnine portate a secco (σ 0,78 contro 4,48 delle colonnine "umide") che sottolinea la necessità di questa procedura durante tutte le fasi operative del controllo di qualità SPE; per la marcatura 1,5 GBq in 2,5 ml la ridotta dimensione del campione non ha consentito l'esecuzione di analisi statistiche dedicate (Fig 1.9).

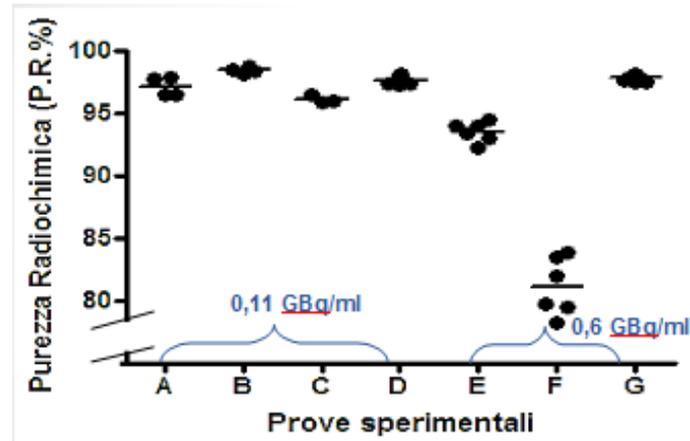


Figura 1.8: Purezza radiochimica (%) delle colonnine 100 μ l portate a secco diversificate per la tipologia di marcatura considerata (1,1 GBq in 10 ml o 1,5 GBq in 2,5 ml)

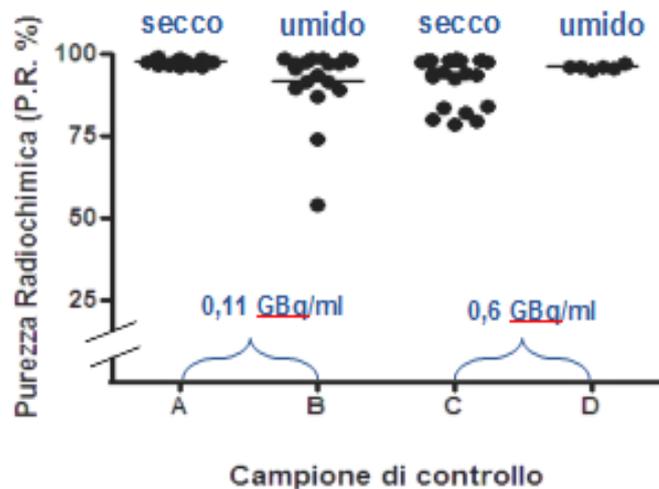


Figura 1.9: Purezza radiochimica (%) delle colonnine portate a secco vs le colonnine non portate a secco, diversificata per le modalità di marcatura (1,1 GBq in 10 ml e 1,5 GBq in 2,5 ml).

Inoltre è stato eseguito il test U di Mann-Whitney di confronto tra la metodica delle colonnine rivelata con i due diversi metodi di acquisizione delle immagini: autoradiocromatografia e lettura con gamma camera (Fig 2). Il test non produce differenze statisticamente significative ($P=0,4200$ per $p < 0,05$). Ciò significa che è possibile impiegare indifferentemente le due tecniche di rivelazione sia alla cromatografia su strato sottile che all'estrazione in fase solida.

Riguardo la riduzione del volume di campione analitico, è stato effettuato il test ANOVA tra i tre volumi presi in considerazione nello studio (100 μl , 75 μl e 50 μl) per le due diverse modalità di marcatura proposte (Fig 2.1). I risultati hanno mostrato, per la marcatura prevista dal produttore del kit di MAG3, una differenza statisticamente significativa ($P = 0,0005$ per $p < 0,05$), mentre per la marcatura 1,5 GBq in 2,5 ml una differenza statisticamente non significativa ($P = 0,0684$). In aggiunta a ciò è stato eseguito il test U di Mann-Whitney a due campioni considerando le coppie 100-75 μl e 100-50 μl , anch'esse diversificate per tipologia di marcatura che ha però portato a risultati non sovrapponibili.

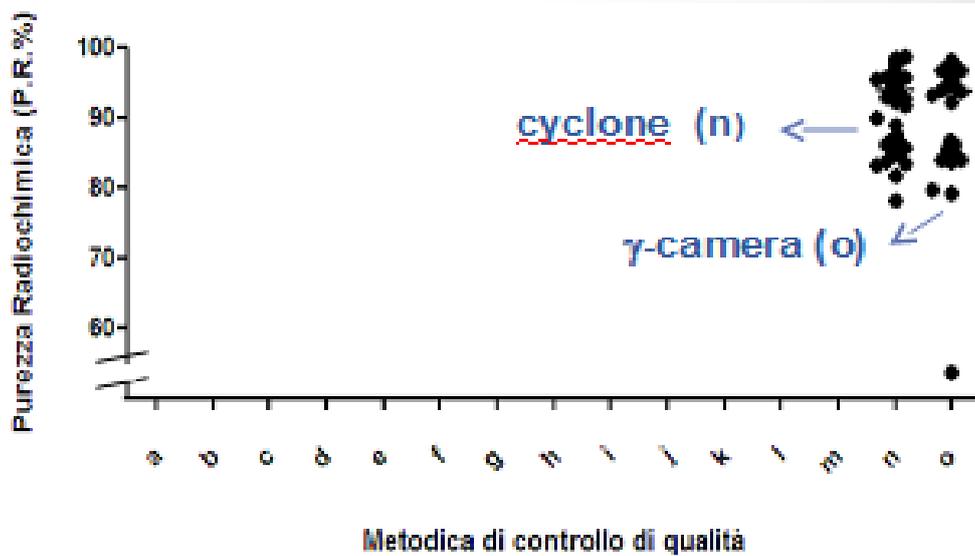


Figura 2: Purezza radiochimica (%) delle colonnine con riduzione del volume del campione (100 μl , 75 μl e 50 μl) diversificati per le modalità di marcatura (1,1 GBq in 10 ml e 1,5 GBq in 2,5 ml).

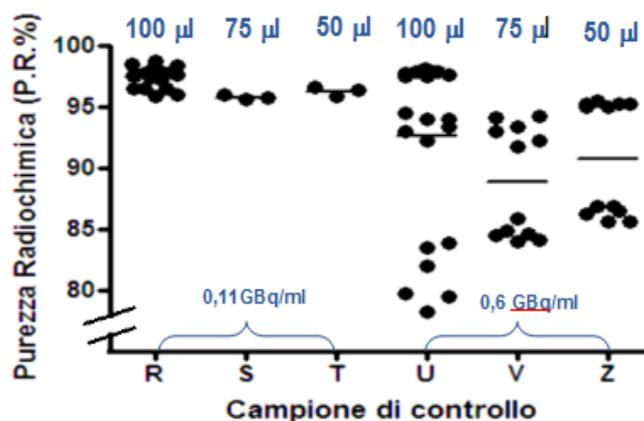


Figura 2.1: Purezza radiochimica (%) delle colonnine con riduzione del volume del campione (100 μl , 75 μl e 50 μl) diversificati per le modalità di marcatura (1,1 GBq in 10 ml e 1,5 GBq in 2,5 ml).

Conclusioni

In conclusione, la metodica di controllo della P.R. mediante estrazione in fase solida su colonnine SepPack C18 applicata al radiofarmaco ^{99m}Tc -MAG3 è stata validata con la condizione di non variare il volume del campione dallo standard di 100 μl e di portare a secco la mini-colonna durante l'analisi.

La metodica di riferimento rimane la cromatografia su strato sottile poiché più ripetibile (varianza 0,5%) rispetto alla tecnica SPE, fino al chiarimento del fattore chimico responsabile della elevata variabilità delle analisi SPE.

L'equivalenza tra i due sistemi di acquisizione dei conteggi provenienti dai campioni analizzati mediante SPE permette libertà di scelta, qualora fosse disponibile uno solo dei due rivelatori.

La metodica di controllo SPE, così messa a punto, verrà riservata alle preparazioni di ^{99m}Tc -MAG3 che alla TLC risulteranno particolarmente ricche di impurezze lipofile ad alto peso molecolare separabili solo con le colonnine SPE, affiancate alla metodica di riferimento TLC.

L'orientamento futuro è quello predisporre ulteriori indagini per la validazione delle variabili chimiche (ossigeno atmosferico e ioni stagno) implicate nei processi redox che concorrono a dare un'influenza diversa sul risultato di purezza radiochimica nel saggio su colonnine rispetto alla TLC e rispetto alla concentrazione radioattiva del radiofarmaco ^{99m}Tc -MAG3 ed, inoltre, rivalutare la ripetibilità inter-day della metodica SPE con un allargamento del campione sperimentale.

Riferimenti bibliografici

- [1] DONDI M., GIUBBINI R.: *La Medicina Nucleare nella pratica clinica*. 2004. Bologna: Pàtron Editore, pp. 339-350
- [2] MARTINI F.H., NATH J.L.: *Fondamenti di Anatomia e Fisiologia – III edizione*. 2010. Napoli: Edises s.r.l, pp. 967-972
- [3] Università di Padova-Scuola di Medicina Nucleare (11/10/2010) La scintigrafia renale sequenziale (Consultato il 22/11/14): <http://www.unipd.it/nucmed/TF/TF.kydseq.ita.html>
- [4] L.A. Shattuck, D. Eshima, A. T. Taylor, T. L. Anderson, D. L. Graham, F. A. Latino and S. E. Payne: *Evaluation of the hepatobiliary excretion of technetium-99m-MAG3 and reconstitution factors affecting radiochemical purity*". 1994. *Journal Nuclear of Medicine*, 35, pp. 349-355
- [5] Associazione Italiana di Medicina Nucleare (AIMN): *Linee Guida per la Preparazione ed il Controllo di Qualità dei Radiofarmaci*. 1996. Pisa, pp. 3, 6-10
- [6] AIMN-Associazione Italiana di Medicina Nucleare (03/06/2006) Le Norme di Buona Preparazione in Medicina Nucleare (Consultato il 12/12/14) http://www.aimn.it/pubblicazioni/notiziario/archivio/notiziario_023_066.pdf
- [7] ZOLLE I. EDITOR: *Technetium-99m pharmaceuticals – Preparation and quality control in Nuclear Medicine*. 2007. Berlino. Springer, pp. 131, 141
- [8] Shankar Seetharaman, James R. Ballinger, Michael H. Sosabowski: *Simplified Method for Determining the Radiochemical Purity of ^{99m}Tc -MAG3*. 2006. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 34, pp.179-183.
- [9] SAHA G.B.: *Fundamental of Nuclear Pharmacy*. 2010. New York: Springer pp. 102, 124, 271-276
- [10] European Medicines Agency (07/05) *Scheda Tecnica del MAG3* (Consultato il 01/12/14) <http://www.emea.eu>
- [11] T. Murray, K. McKellar, J. Owens, W.S. Watson, T.E. Hilditch and A.T. Elliott: *^{99m}Tc -MAG3: Problems with radiochemical purity testing*. 2000. *Nuclear Medicine Communications*, 21, pp. 71-75
- [12] JC. Hung: *Comparison of technetium-99m MAG3 kit formulations in Europe and USA*. 1992. *European Journal of Nuclear Medicine*, 19, pp. 990-992.
- [13] James A. Ponto, MS: *Effect of solvent flow rate in mini-column testing of ^{99m}Tc -mercatide*. 2005. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 33, pp. 232-233
- [14] D.J. Hnatowich, F. Chang, K. Lei, T. QU and M. Ruszkowski: *The influence of temperature and alkaline pH on the labeling of free and conjugated MAG3 with Technetium-99m*. 1997. *Applied radiation and isotopes; including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 48(5), pp. 587-594
- [15] Empireo (Consultato il 26/11/2014) <http://www.empireo.it/wp-content/uploads/2008/04radiofarmaci-2-menchi.pdf>
- [16] MARENGO M.: *La fisica in Medicina Nucleare*. 2001. Bologna: Pàtron Editore, pp. 89-97
- [17] ZUCCHINI, TARRONI, MARINELLI, MARGON: *Tecnezio-99m: proprietà fisico-chimiche, produzione ed impiego in Medicina Nucleare*. 1984. Saluggia: Sorin