

Canada



Health and Welfare  
Canada

Santé et Bien-être social  
Canada

81-EHD-70

CA5205990

# analytical techniques for the determination of radiochemical purity of radiopharmaceuticals prepared from kits part II



EHD -- 81-70

**ANALYTICAL TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION  
OF RADIOCHEMICAL PURITY OF  
RADIOPHARMACEUTICALS PREPARED FROM KITS**

PART II - Technetium 99m Labelled Bone Imaging Kits

Environmental Health Directorate  
Health Protection Branch

Published by Authority of the  
Minister of National Health  
and Welfare

81-EHD-70

**COPIES OF THIS PUBLICATION MAY BE OBTAINED FROM:**

*Information Directorate,*  
*Department of National Health and Welfare,*  
*5th Floor,*  
*Brooke Claxton Building*  
*Ottawa, K1A 0K9*

## ABSTRACT

The evaluation of efficacy of commercially available kits used for the preparation of radiopharmaceuticals is one aspect of the Radiation Protection Bureau's radiopharmaceutical quality control program. This report describes some of the analytical methodology employed in the program. The techniques may be of interest to hospital radiopharmacy personnel since many of the tests can be performed rapidly and with a minimum of special equipment, thus enabling the confirmation of radiopharmaceutical purity prior to patient administration. Manufacturers of kits may also be interested in learning of the analytical methods used in the assessment of their products.

The following persons were involved in the preparation of this report: J.R. McLean, L.J. Rockwell, and W.J. Welsh of the Radiation Protection Bureau, Environmental Health Directorate, Ottawa, Ontario.

## TABLE OF CONTENTS

	<u>Page</u>
Introduction .....	1
Analytical Techniques for Assessing the Radiochemical Purity of Technetium 99m Labelled Bone Imaging Agents .....	1
Discussion .....	3
References .....	4
Appendix .....	5
Paper Chromatography and 85% Methanol as the Solvent System.....	7
"Michrom" Method with Acetone as the Solvent System .....	8
Paper Chromatography (With Albumin Loaded Paper) and Nitrogen Purged Saline as the Solvent System .....	9
"Michrom" Method with Saline as the Solvent System .....	10
Methodology for Assessing the Biodistribution of Tc 99m Labelled Bone Imaging Agents in Mice .....	11

## INTRODUCTION

The development of the analytical methods presented in this series of reports is part of the radiopharmaceutical quality control program of the Radiation Protection Bureau. These methods are designed to assess the radiochemical purity, and hence indirectly monitor the efficacy of Tc 99m labelled radiopharmaceuticals prepared from kits. The procedures make use of both in vitro and animal (mouse) in vivo analytical techniques. It is important that radiopharmaceuticals be of an acceptable radiochemical purity. Radiochemical impurities accompanying a radiopharmaceutical, when administered to a patient, do not contribute to the generation of useful nuclear medicine information. Instead, unnecessary radiation dose and possibly degraded scintigraphic images may result.

This report is concerned with Tc 99m labelled bone imaging agents (medronate sodium, etidronate sodium, pyrophosphate, and pyro-plus trimeta-phosphates). Part I of this series (1) dealt with Tc 99m labelled macroaggregated albumin and normal albumin preparations. Future reports will be concerned with colloids (phytates, sulphur colloids, albumin colloids, etc.,) and miscellaneous kit preparations (DTPA, gluceptate, and the numerous derivatives of iminodiacetic acid). The techniques to be described in this report will be of interest to hospital radiopharmacy personnel since some of the tests can be performed rapidly and with a minimum of special equipment, thus enabling the confirmation of radiochemical purity prior to patient administration. Manufacturers of kits may also be interested in learning of the analytical methodology employed in the assessment of their products by the Bureau's radiopharmaceutical quality control section. Results of the analytical program are presented in separate reports (2, 3).

Persons not familiar with the chemistry of technetium may wish to refer to Part I of this series (1) which included a discussion on this subject.

### ANALYTICAL TECHNIQUES FOR ASSESSING THE RADIOCHEMICAL PURITY OF TECHNETIUM 99m LABELLED BONE IMAGING AGENTS

The recognized radiochemical impurities in Tc 99m labelled bone imaging agents are generally assumed to be unreacted free pertechnetate Tc 99m ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) and a reduced and hydrolyzed Tc 99m colloid ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ). Two separate analytical procedures are required to quantitate these impurities. A summary of the various techniques which we have evaluated, along with the problems which were encountered, is presented here. Detailed step-by-step procedures which we routinely use may be found in the accompanying Appendix.

Unreacted free pertechnetate Tc 99m may be quantitated using either paper chromatography or Colombetti's (4) "Michrom" method. Whatman No. 1 paper is used for the former with 85% methanol as the mobile phase. The latter method employs cellulose coated with silica gel as the stationary phase and acetone as the mobile phase. In both systems  $^{99m}\text{TcO}_2$  and the Tc 99m labelled bone imaging agent remain at the origin while  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  migrates with the solvent. The  $R_f$  with the "Michrom" method is 0.9-1.0 and 0.5-0.7 using paper chromatography. The paper chromatography system requires 1-1.5 hours to run; developing time for the "Michrom" method is less than two minutes.

Several methods were investigated for assessing the  $^{99m}\text{TcO}_2$  content in Tc 99m labelled bone imaging agents. Paper chromatography with nitrogen purged saline as the solvent system (5) yielded ill-defined peaks with smearing of activity between the peaks and its use was abandoned. An alternative paper chromatography procedure using Whatman No. 1 paper loaded with albumin and nitrogen purged saline gives much better separation of peaks. This is the same procedure that is used with Tc 99m labelled albumin products (1). The "Michrom" method of Colombetti (4) employing cellulose coated with silica gel and saline as the mobile phase yielded somewhat higher, but comparable, results than the paper chromatography system. In both systems  $^{99m}\text{TcO}_2$  remains at the origin while  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and the Tc 99m labelled bone imaging agent migrate with the solvent yielding unresolved peaks with an  $R_f$  of 0.8-1.0. While the paper chromatography procedure requires more time (2-2.5 hours as opposed to less than two minutes for the "Michrom" procedure) it is the one routinely used in our laboratory because of its applicability to other Tc 99m labelled products. We found that the "Michrom" method demonstrated less sensitivity and reproducibility, and was not applicable to some pyrophosphate preparations. With these reservations in mind, it is a useful, rapid quality control technique.

Biodistribution studies are conducted in a Health Protection Branch outbred strain of male, Swiss Webster mice. These studies are designed to monitor clearance from blood and determine the uptake in selected organs where the labelled radiopharmaceutical and most likely radiochemical impurities will concentrate. Tissues of interest are blood, liver, kidneys, skeleton, and bladder (as well as excreted urine). The bone (femur)/muscle ratio is also monitored since this provides a good indication of clinical efficacy (i.e., target/background ratio). Initially skeleton results were calculated by assaying a bone specimen and assuming skeletal mass to be 10-11% of body weight. However, this yielded results which appeared to be erroneously high as compared to residual carcass activity. Hence it was decided to assume skeletal content to be residual carcass activity after removal of all relevant organs and correction for blood content if blood activity was appreciable. In a limited study of 3 mice weighing 26-30 grams the weight of the skeleton was determined to be approximately 6% of body weight. Use of this value would yield skeletal uptake values more comparable with residual carcass activity.

## DISCUSSION

Experience with the Bureau's quality control program has demonstrated the necessity of monitoring for  $^{99m}\text{TcO}_2$  as well as the universally accepted  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . In fact the  $^{99m}\text{TcO}_2$  impurity content is often higher than  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in many kit prepared Tc 99m labelled radiopharmaceuticals. The USP (6) has published monographs for three Tc 99m labelled bone imaging agents; etidronate sodium, pyrophosphate, and pyro-plus trimeta-phosphates. These monographs specify that the sum of the  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and  $^{99m}\text{TcO}_2$  impurities should not exceed 10%; we have adopted these limits for our program.

The specifications which we are planning to adopt for the biodistribution studies are also based on, but are not identical to, USP requirements. The biological distribution test described in the USP for all Tc 99m labelled bone imaging agents (5) does not consider urinary excretion, results being based on total activity counted in the liver, kidneys, removed femur and carcass. Since urinary excretion of these particular preparations is significant (approximately 50% within 1-2 hours), it is difficult to obtain reproducible results if the USP protocol is followed. Hence our results are based on retained activity, i.e., the sum of the activities in liver, kidneys, excised femur and residual carcass (including tail but excluding bladder and contents). The limits which we are presently evaluating in our program at one hour post injection are as follows:

- not more than 10% in liver
- not more than 10% in kidneys
- not less than 2% in a single femur
- not less than 80% in skeleton

The skeleton value is based on residual carcass activity exclusive of bladder and contents, but including the excised femur and tail.



## REFERENCES

1. McLean, J.R., Rockwell, L.J., Welsh, W.J.: Analytical Techniques for the Determination of Radiochemical Purity of Radiopharmaceuticals Prepared from Kits Part I, Environmental Health Directorate, 77-EHD-16 (1977).
2. McLean, J.R., Rockwell, L.J., Welsh, W.J.: Results of Quality Control Studies of Technetium  $^{99m}\text{Tc}$  Labelled Radiopharmaceuticals Prepared from Kits, Environmental Health Directorate, 78-EHD-24 (1978).
3. McLean, J.R., Rockwell, L.J., Welsh, W.J.: Results of Quality Control Studies of Technetium  $^{99m}\text{Tc}$  Labelled Radiopharmaceuticals Prepared from Kits (1978-79) to be published.
4. Colombetti, L.G., Moerlien, S. et al: Rapid Determination of Oxidation State of Unbound  $^{99m}\text{Tc}$  and Labelling Yield in  $^{99m}\text{Tc}$ - Labelled Radiopharmaceuticals, J. Nucl. Med. 17: 805-809 (1976).
5. United States Pharmacopeia, Twentieth Revision (1980), page 766.
6. United States Pharmacopeia, Twentieth Revision (1980), pages 763, 765, 766.

**APPENDIX**

PAPER CHROMATOGRAPHY AND 85% METHANOL  
AS THE SOLVENT SYSTEM

APPLICABILITY For the measurement of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in  $^{99m}\text{Tc}$  labelled bone imaging agents.

- MATERIALS
1. Whatman No. 1 chromatography paper 4 cm wide.
  2. 85% methanol.
  3. Appropriate chromatographic chamber for ascending or descending development.

- PROCEDURE
1. Place an appropriate quantity of undiluted preparation representing at least 20 000 cpm per strip on each of two chromatographic strips and dry under a stream of nitrogen. The sample size should be in the range of 1-25  $\mu\text{L}$ .
  2. Develop each chromatogram by either ascending or descending technique in a saturated atmosphere until the solvent front has migrated about 15 cm from the origin (1-1.5 hours).
  3. Remove the chromatograms, mark the solvent fronts and air dry.
  4. Determine the distribution of radioactivity on the chromatograms using suitable instrumentation, such as a strip scanner or gamma camera, or by dividing the paper strips into 0.5 cm segments and assaying each segment using a suitable gamma counter.

CALCULATION The percent  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  content in the preparation is determined as follows:

(a) 
$$\frac{\text{cpm between } R_f \text{ 0.5-0.7}}{\text{total cpm on strip}} \times 100, \text{ or}$$

(b) 
$$100 - \frac{\text{cpm at the origin}}{\text{total cpm on strip}} \times 100$$

**"MICHROM" METHOD WITH ACETONE  
AS THE SOLVENT SYSTEM**

**APPLICABILITY** For the measurement of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in  $^{99m}\text{Tc}$  labelled bone imaging agents.

- MATERIALS**
1. Pure cellulose sheets, 1 mm thick, chromatographic quality, 7 mm wide by 57 mm long (e.g., Gelman Instrument Company, Ann Arbor, MI.) are immersed in a 6% suspension of silica gel, 60-200 mesh, grade 62 (Matheson, Coleman, and Bell), and air dried. The strips may be prepared in advance and stored in air-tight vials until used.
  2. Acetone.
  3. Appropriate flat-bottomed vials for ascending chromatographic development.

- PROCEDURE**
1. Place an appropriate quantity (dependent on the counting instrumentation to be used) of undiluted preparation 10 mm from the end of two previously prepared strips. The sample size should be 5-10  $\mu\text{L}$ , and the spot should be as small as practicable.
  2. Without drying, place the strips in flat-bottomed vials containing 2 mL of acetone.
  3. Remove the strips just before the solvent reaches the top (40-45 sec), mark the solvent front and air dry.
  4. Cut the strips 30 mm from the origin and assay each segment using a suitable gamma counter.

**CALCULATION** The percent  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  content in the preparation is determined as follows:

$$\frac{\text{cpm on solvent front segment}}{\text{cpm on both segments}} \times 100$$

**PAPER CHROMATOGRAPHY (WITH ALBUMIN LOADED PAPER)  
AND NITROGEN PURGED SALINE AS THE SOLVENT SYSTEM**

- APPLICABILITY** For the measurement of  $^{99m}\text{TcO}_2$  in  $^{99m}\text{Tc}$  labelled bone imaging agents.
- MATERIALS**
1. Albumin loaded paper is prepared by soaking 4 cm x 30 cm strips of Whatman No. 1 chromatography paper in a 1% aqueous solution of normal human serum albumin for 1 hour. The strips are thoroughly air dried, wrapped in paper towels and stored in a freezer until required.
  2. Normal saline, vigorously purged with nitrogen gas for 20 minutes immediately before use.
  3. Appropriate chromatographic chamber for descending development.
- PROCEDURE**
1. Place an appropriate quantity of undiluted preparation representing at least 50 000 cpm on each of two previously prepared chromatographic strips and dry under a stream of nitrogen. The sample size should be 1-25  $\mu\text{L}$ , and the spot should be as small as practicable (but not larger than 3 mm in diameter).
  2. Develop the chromatograms by descending technique until the solvent front has migrated about 15 cm from the origin (2-2.5 hours) in a chamber that has been vigorously purged with nitrogen for at least 5 minutes. Purge the chamber with nitrogen throughout the development procedure either by slow continuous flow or vigorous 1-2 minute bursts at 20-30 minute intervals.
  3. Remove the chromatograms, mark the solvent fronts and air dry.
  4. Determine the distribution of radioactivity using suitable instrumentation, such as a strip scanner or gamma camera, or by dividing the paper strips into 0.5 cm segments and assaying each segment using a suitable gamma counter.
- CALCULATION** The percent  $^{99m}\text{TcO}_2$  content in the preparation is determined as follows:
- $$\frac{\text{cpm between } R_f \text{ 0.0-0.08}}{\text{total cpm on strip}} \times 100$$

**"MICHROM" METHOD WITH SALINE  
AS THE SOLVENT SYSTEM**

**APPLICABILITY** For the measurement of  $^{99m}\text{TcO}_2$  in  $^{99m}\text{Tc}$  labelled bone imaging agents.

- MATERIALS**
1. Pure cellulose sheets, 1 mm thick, chromatographic quality, 7 mm wide by 57 mm long (e.g., Gelman Instrument Company, Ann Arbor, MI.) are immersed in a 6% suspension of silica gel, 60-200 mesh, grade 62 (Matheson, Coleman, and Bell), and air dried. The strips may be prepared in advance and stored in air-tight vials until used.
  2. Normal saline.
  3. Appropriate flat-bottomed vials for ascending chromatographic development.

- PROCEDURE**
1. Place an appropriate quantity (dependent on the counting instrumentation to be used) of undiluted preparation 10 mm from the end of two previously prepared strips. The sample size should be 5-10  $\mu\text{L}$ , and the spot should be as small as practicable.
  2. Without drying, place the strips in flat-bottomed vials containing 2 mL of normal saline.
  3. Remove the strips just before the solvent reaches the top (40-45 sec), mark the solvent front and air dry.
  4. Cut the strips 10 mm from the origin and assay each segment using a suitable gamma counter.

**CALCULATION** The percent  $^{99m}\text{TcO}_2$  content in the preparation is determined as follows:

$$\frac{\text{cpm on origin segment}}{\text{cpm on both segments}} \times 100$$

**METHODOLOGY FOR ASSESSING THE BIODISTRIBUTION OF  
Tc 99m LABELLED BONE IMAGING AGENTS IN MICE**

**MATERIALS**

1. Mice, male white, Swiss Webster strain; body weights should be in the range 20-35 g with the individual weights being  $\pm 2$  g of the mean weight.
2. Surgical instruments.
3. Stopwatch or other suitable timing device.
4. 1 cc syringes with 27 G x 1/2 inch needles.
5. Suitable radioactivity counting instrumentation.

**PROCEDURE**

1. Weigh 4 mice then warm under an infrared lamp for 2-3 minutes to ensure dilation of tail veins.
2. Withdraw 0.05-0.1 mL doses containing activity appropriate for the counting instrumentation to be used, into 1 cc syringes. Not more than 1% of the vial contents should be injected into a single mouse.
3. Assay each syringe for radioactivity content.
4. Inject doses slowly into the ventral or dorsal tail veins of properly restrained mice. Note times of injection.
5. Assay empty syringes and calculate injected doses.
6. Place each mouse in a suitable cage assembly so that urine contamination of the body is minimized. A 500 mL Erlenmeyer flask with 30-60 g of animal bedding makes an adequate holding cage for short-term experiments.
7. Sacrifice each mouse at 1 hour post injection by decapitation and collect the blood in a suitable container.

**NOTE:** Should time studies be of interest, repetitive blood samples may be taken from the live mouse by puncturing the tail vein with a sterile puncture blade and collecting 0.025 mL aliquots of blood.

8. In order to minimize contamination, collect any urine excreted during sacrifice on a square of bench coat or other suitable absorbent material.
9. Open abdominal cavity, clamp off ureter, and cut out bladder thus preventing urine contamination of the carcass and other organs.
10. In order, remove stomach, small and large intestines, liver, kidneys, and spleen.
11. Monitor residual activity at the injection site (not the entire tail). If this activity is  $> 5\%$  of the decay corrected injected dose, abort procedure and start again with additional mice.

12. Isolate thigh muscle, being careful not to touch the bone or contaminate with bone fibres.
13. Isolate femur and remove muscle tags by soaking for 0.5-1.0 hour in 1% trypsin (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ, 193 U/mg).
14. Weight muscle and femur specimens.
15. Assay liver, kidneys, femur, muscle specimen, aliquot of blood, residual carcass (including tail and injection site), and any other organs of interest, for radioactivity content.

CALCULATIONS

1. Calculate the retained dose as the sum of the activities in liver, kidneys, excised femur and residual carcass (including tail and injection site but excluding bladder and contents).
2. Calculate total blood volume as 6.5% of body weight.
3. Determine radioactivity content in total blood as follows:

$$\text{activity in sample aliquot} \times \frac{\text{total blood volume}}{\text{sample aliquot volume}}$$

4. Calculate bone/muscle ratio as follows:

$$\frac{\text{activity in femur}}{\text{weight of femur}} \times \frac{\text{weight of muscle specimen}}{\text{activity in muscle specimen}}$$

5. If blood activity is minimal, the activity in the residual carcass plus excised femur may be considered as representing skeletal content. Otherwise skeletal content may be calculated as follows:

$$(0.062) (\text{weight of mouse}) \frac{(\text{activity in femur})}{(\text{weight of femur})}$$

6. Express all results as a percentage of the retained dose (calculation 1), making decay corrections as required.



Canada



Santé et Bien-être social  
Canada

Health and Welfare  
Canada

EHD-81-70

81-DHM-70

# techniques analytiques relatives à la détermination de la pureté radiochimique des produits radiopharmaceutiques 2<sup>e</sup> partie



**TECHNIQUES ANALYTIQUES RELATIVES À LA DÉTERMINATION  
DE LA PURETÉ RADIOCHIMIQUE DES  
PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES**

**PARTIE II - Agents de visualisation  
des os marqués au technétium  $^{99m}$**

**Direction de l'hygiène du milieu  
Direction générale de la protection de la santé**

**Publication autorisée par  
le Ministre de la Santé nationale  
et du Bien-être social**

**81-DHM-70**

**DES EXEMPLAIRES DE CE RAPPORT PEUVENT  
ÊTRE OBTENUS DE LA**

**Direction de l'information  
Ministère de la Santé nationale  
et du Bien-être social  
5<sup>e</sup> étage  
Immeuble Brooke Claxton  
Ottawa K1A 0K9**

## RÉSUMÉ

L'évaluation de l'efficacité des troussees vendues pour la préparation des produits radiopharmaceutiques est une des activités du programme de contrôle de la qualité des produits radiopharmaceutiques du Bureau de la radioprotection. Le présent rapport décrit une partie de la méthodologie analytique utilisée dans le cadre de ce programme. Ces techniques sont susceptibles d'intéresser le personnel hospitalier chargé de la préparation de ces produits car de nombreux tests peuvent être effectués rapidement et avec un minimum de matériel, ce qui permet de confirmer la pureté radiopharmaceutique des produits avant de les administrer au malade. Sans doute, les méthodes analytiques utilisées pour évaluer leurs produits intéressent-elles également les fabricants.

Messieurs J.R. McLean, L.J. Rockwell et W.J. Welsh du Bureau de la radioprotection, Direction de l'hygiène du milieu, Ottawa (Ontario) ont contribué à la préparation de ce rapport.

## TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
Introduction .....	1
Techniques analytiques pour l'évaluation de la pureté radiochimique des agents de visualisation des os marqués au technétium $^{99m}$ .....	2
Discussion .....	4
Bibliographie .....	5
Annexe .....	7
Chromatographie sur papier utilisant du méthanol à 85% comme solvant .....	9
Méthode "Michrom" utilisant l'acétone comme solvant .....	10
Chromatographie sur papier (papier saturé d'albumine) utilisant comme solvant une solution saline dans laquelle on a fait barboter de l'azote .....	11
Méthode "Michrom" utilisant un soluté physiologique comme solvant .....	12
Méthode d'évaluation de la biodistribution chez la souris, des agents de visualisation des os marqués au $^{99m}$ Tc .....	13

## INTRODUCTION

La mise au point des méthodes analytiques présentées dans cette série de rapports fait partie du programme de contrôle de la qualité des produits radiopharmaceutiques du Bureau de la radioprotection. Ces méthodes doivent servir à évaluer la pureté radiochimique et donc, indirectement, l'efficacité des produits radiopharmaceutiques marqués au technétium  $^{99m}\text{Tc}$  préparés à partir de trousse. Les méthodes font appel à des techniques analytiques tant *in vitro* que *in vivo* (chez la souris). Il est important que les produits radiopharmaceutiques soient suffisamment purs du point de vue radiochimique. Lorsqu'elles sont administrées à un malade, les impuretés radiochimiques qui accompagnent un produit radiopharmaceutique nuisent à l'obtention de renseignements utiles dans le domaine de la médecine nucléaire. On risque au contraire d'obtenir une irradiation inutile et des images scintigraphiques de mauvaise qualité.

Le présent rapport porte sur les agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  (medronate sodium, etidronate sodium, pyrophosphate et pyro-plus trimétaphosphates). Le premier fascicule de la présente série (1) traite de l'albumine macroagglutinée marquée au  $^{99m}\text{Tc}$  et de l'albumine normale marquée au  $^{99m}\text{Tc}$ . D'autres rapports porteront sur des colloïdes (phytates, colloïdes du soufre, colloïdes de l'albumine, etc.) et diverses préparations sous forme de trousse (DTPA, gluceptate et les nombreux dérivés de l'acide iminodiacétique). Les techniques décrites dans le présent rapport intéresseront le personnel des services de radiopharmacie des hôpitaux étant donné que certains de ces tests peuvent être effectués rapidement et avec un minimum de matériel, de sorte que l'on peut confirmer la pureté radiochimique de ces produits avant de les administrer au malade. Sans doute, la méthodologie analytique utilisée par la section du Bureau chargée du contrôle de la qualité des produits radiopharmaceutiques pour évaluer leurs produits intéressera-t-elle également les fabricants. Les résultats du programme d'analyse sont présentés dans des rapports distincts (2,3).

Les lecteurs qui ne connaissent pas la chimie du technétium peuvent consulter le premier fascicule de cette série (1) dans laquelle on traite de ce sujet.

## TECHNIQUES ANALYTIQUES POUR L'ÉVALUATION DE LA PURETÉ RADIOCHIMIQUE DES AGENTS DE VISUALISATION DES OS MARQUÉS AU TECHNÉTIUM $^{99m}\text{Tc}$

Les impuretés radiochimiques reconnues dans des agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  sont généralement, suppose-t-on, du pertechnétate libre n'ayant pas réagi ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) et un colloïde du  $^{99m}\text{Tc}$  réduit et hydrolysé ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ). Il faut appliquer deux méthodes d'analyse distinctes pour doser ces impuretés. Nous présentons ci-après un résumé des différentes techniques que nous avons évaluées ainsi que des problèmes qui se sont posés. On trouvera en annexe la description détaillée, étape par étape, des techniques que nous appliquons habituellement.

La quantité de pertechnétate de  $^{99m}\text{Tc}$  libre, qui n'a pas réagi, peut être mesurée soit par chromatographie sur papier ou par la méthode "Michrom" de Colombetti (4). Pour la chromatographie sur papier, on utilise du papier Whatman N° 1 et du méthanol à 85% comme phase mobile. Dans le cas de l'autre méthode, on se sert de cellulose recouverte d'un gel de silice comme phase fixe et d'acétone comme phase mobile. Dans le cas des deux méthodes le  $^{99m}\text{TcO}_2$  et l'agent de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  restent sur la ligne de dépôt du chromatogramme alors que le  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  migre avec le solvant. Avec la méthode "Michrom", la valeur de  $R_f$  se situe entre 0,9 et 1,0, et entre 0,5 et 0,7, dans le cas de la chromatographie sur papier. Pour effectuer une chromatographie sur papier, il faut de 1 heure à 1,5 heure, quant à la méthode "Michrom" son développement exige moins de deux minutes.

Plusieurs méthodes ont été examinées pour déterminer le contenu en  $^{99m}\text{TcO}_2$  des agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ . La technique de la chromatographie sur papier utilisant comme solvant une solution physiologique dans laquelle on a fait barboter de l'azote (5) a produit des pics imprécis avec étalement de l'activité d'un pic à l'autre; son usage a donc été abandonné. Une autre méthode de chromatographie sur papier permet d'obtenir une bien meilleure séparation des pics; elle utilise du papier Whatman N° 1 saturé d'albumine et une solution saline dans laquelle on a fait barboter de l'azote. C'est la même méthode qui est appliquée avec les produits qui contiennent de l'albumine marquée au  $^{99m}\text{Tc}$  (1). La méthode "Michrom" de Colombetti (4), qui utilise de la cellulose recouverte d'un gel de silice et une solution saline comme phase mobile, a donné des résultats un peu plus élevés que la chromatographie sur papier, mais tout de même comparables. Avec les deux techniques, le  $^{99m}\text{TcO}_2$  demeure sur la ligne de dépôt alors que le  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  et l'agent de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  migrent avec le solvant, ce qui produit des pics mal définis ayant une valeur  $R_f$  entre 0,8 et 1,0. Même s'il faut plus de temps pour effectuer une chromatographie sur papier (de 2h à 2,5h alors que la méthode "Michrom" ne prend que moins de 2 minutes),

c'est cette méthode qui est utilisée systématiquement dans notre laboratoire parce qu'elle peut être appliquée à d'autres produits marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ . Nous avons constaté que la méthode "Michrom" était moins sensible et plus difficile à reproduire et qu'elle ne pouvait pas être appliquée à certaines préparations de pyrophosphate. Compte tenu de ces réserves, il s'agit d'une méthode utile et rapide de contrôle de la qualité.

Des études de biodistribution sont effectuées à l'aide de souris mâles de la souche suisse Webster, à la Direction générale de la protection de la santé. Ces études ont pour but de mesurer la clairance sanguine et la fixation dans certains organes où les produits radio-pharmaceutiques marqués et des impuretés radiochimiques vont le plus probablement se concentrer. À cet effet, on examine le sang, le foie, les reins, le squelette et la vessie (de même que l'urine éliminée). Le rapport os (fémur)/muscle est également considéré puisqu'il fournit une bonne indication de l'efficacité clinique (c'est-à-dire du rapport cible/fond de rayonnement). Au début, on a calculé les valeurs pour le squelette en effectuant des épreuves avec un échantillon d'os et en supposant que la masse squelettique représentait de 10 à 11% du poids corporel. Cependant, les résultats obtenus ont semblé trop élevés par rapport à l'activité dans le reste de la carcasse. On a donc décidé de présumer que la teneur dans le squelette correspondait à l'activité dans le reste de la carcasse après ablation de tous les organes utiles et correction faite pour la teneur dans le sang si l'activité dans le sang était mesurable. Dans le cadre d'une étude limitée à 3 souris de 26 à 30 grammes, on a calculé que le poids du squelette représentait environ 6% du poids corporel. L'utilisation de cette valeur donnerait au niveau du squelette, des valeurs de fixation plus comparables à l'activité dans le reste de la carcasse.



## DISCUSSION

L'expérience acquise avec le programme de contrôle de la qualité du Bureau a révélé qu'il était nécessaire de rechercher la présence du  $^{99m}\text{TcO}_2$  en même temps que celle du  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  universellement admise. En fait, dans de nombreuses préparations, on trouve souvent plus de  $^{99m}\text{TcO}_2$  à l'état d'impureté que de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ . La pharmacopée américaine (USP) (6) comprend des monographies relatives à trois agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ , à savoir: l'etidronate sodium, le pyrophosphate et les pyro-plus trimétaphosphates. On précise dans ces monographies que la somme des impuretés ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$  et  $^{99m}\text{TcO}_2$ ) ne doit pas dépasser 10%; nous avons adopté ces limites pour notre programme.

Les spécifications que nous avons l'intention d'adopter pour les études de biodistribution s'appuient également sur des exigences de la pharmacopée américaine (USP) sans toutefois être identiques. Le test de biodistribution décrit dans la pharmacopée américaine au sujet de tous les agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$  (5) ne tient pas compte de l'excrétion urinaire; en effet les résultats sont fondés sur l'activité totale calculée dans le foie, les reins, le fémur prélevé et la carcasse. Puisque l'excrétion urinaire des préparations de ce genre est importante (environ 50% en moins de 1 heure ou 2) il est difficile d'obtenir des résultats reproductibles si l'on observe le protocole de la pharmacopée américaine. Nos résultats sont donc fondés sur l'activité retenue c'est-à-dire la somme des activités mesurées dans le foie, les reins, le fémur excisé et dans le reste de la carcasse (comprenant la queue mais excluant la vessie et son contenu). Voici les limites que nous étudions à l'heure actuelle, dans le cadre de notre programme, une heure après l'injection:

- pas plus de 10% dans le foie
- pas plus de 10% dans les reins
- pas moins de 2% dans un seul fémur
- pas moins de 80% dans le squelette

La valeur pour le squelette est tirée de l'activité dans le reste de la carcasse à l'exception de la vessie et de son contenu, mais comprenant l'activité dans le fémur prélevé et dans la queue.

## BIBLIOGRAPHIE

1. McLean, J.R., Rockwell, L.J. et Welsh, W.J.: Techniques analytiques relatives à la détermination de la pureté radiochimique des produits radiopharmaceutiques, 1<sup>re</sup> partie, Direction de l'hygiène du milieu, 77-EHD-16 (1977).
2. McLean, J.R., Rockwell, L.J. et Welsh, W.J.: Résultats d'études de contrôle de la qualité sur les médicaments radioactifs marqués au technétium 99m préparés à partir de nécessaires, Direction de l'hygiène du milieu, 78-EHD-24, (1978).
3. McLean, J.R., Rockwell, L.J. et Welsh, W.J.: Results of Quality Control Studies of Technetium 99m Labelled Radiopharmaceuticals Prepared from Kits (1978-1979) - en instance de publication.
4. Colombetti, L.G., Moerlien, S. et coll.: Rapid Determination of Oxidation State of Unbound <sup>99m</sup>Tc and Labeling Yield in <sup>99m</sup>Tc- Labeled Radiopharmaceuticals, J. Nucl. Med. 17: 805-809 (1976).
5. United States Pharmacopeia, vingtième révision (1980), page 766.
6. United States Pharmacopeia, vingtième révision (1980), pages 763, 765, 766.

**ANNEXE**

## CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER UTILISANT DU MÉTHANOL À 85% COMME SOLVANT

APPLICATION	Dosage du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dans des agents de visualisation des os marqués au $^{99m}\text{Tc}$ .
MATÉRIEL	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Papier à chromatographie Whatman N° 1 (4 cm de largeur).</li><li>2. Méthanol à 85%.</li><li>3. Cuve pour chromatographie ascendante ou descendante.</li></ol>
MÉTHODE	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Déposer une quantité suffisante de préparation non diluée représentant au moins 20 000 cpm par bande sur deux bandes chromatographiques distinctes et sécher à l'aide d'un courant d'azote. La taille de l'échantillon devrait se situer entre 1 et 25 <math>\mu\text{L}</math>.</li><li>2. Développer chaque chromatogramme à l'aide de la méthode ascendante ou de la méthode descendante dans une atmosphère saturée, jusqu'à ce que le front du solvant se trouve à 15 cm environ de la ligne de dépôt (1h-1,5h).</li><li>3. Retirer les chromatogrammes de la cuve, marquer les fronts de solvant et laisser sécher à l'air.</li><li>4. Déterminer la répartition de la radioactivité sur les chromatogrammes à l'aide des instruments appropriés, tels qu'un scannographe de bande ou une caméra à rayons gamma, ou en divisant les bandes de papier en segments de 0,5 cm et en mesurant la radioactivité de chaque segment à l'aide d'un compteur de rayons gamma.</li></ol>
CALCULS	<p>La teneur en pour cent du <math>^{99m}\text{TcO}_4^-</math> dans la préparation est calculée de la façon suivante:</p> <p>a) <math display="block">\frac{\text{cpm entre } R_f \text{ 0,5-0,7}}{\text{Nombre total de cpm sur la bande}} \times 100</math> ou</p> <p>b) <math display="block">100 - \frac{\text{cpm à l'origine}}{\text{Nombre total de cpm sur la bande}} \times 100</math></p>

MÉTHODE "MICHROM" UTILISANT  
L'ACÉTONE COMME SOLVANT

APPLICATION	Dosage du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dans des agents de visualisation des os marqués au $^{99m}\text{Tc}$ .
MATÉRIEL	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Feuilles de cellulose pure d'une épaisseur de 1 mm, qualité pour chromatographie, mesurant 7 mm sur 57 mm (ex.: Gelman Instrument Company, Ann Arbor, MI) immergées dans une suspension à 6% de gel de silice, (mailles de 60 à 200), qualité 62 (Matheson, Coleman et Bell) séchées à l'air. Les bandes peuvent être préparées à l'avance et conservées dans des flacons hermétiques jusqu'au moment de leur utilisation.</li><li>2. Acétone.</li><li>3. Flacons à fond plat pour le développement par chromatographie ascendante.</li></ol>
MÉTHODE	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Déposer une quantité suffisante (selon le type de compteur utilisé) de préparation non diluée à 10 mm de l'extrémité des deux bandes déjà préparées. La taille de l'échantillon devrait se situer entre 5 et 10 <math>\mu\text{L}</math>, et la tache devrait être aussi petite que possible.</li><li>2. Sans faire sécher, placer les bandes dans des flacons à fond plat contenant 2 mL d'acétone.</li><li>3. Retirer les chromatogrammes juste avant que le solvant ait atteint l'extrémité supérieure de la bande (40-45 s), marquer le front du solvant et laisser sécher à l'air.</li><li>4. Couper les bandes à 30 mm de la ligne de dépôt et mesurer la radioactivité de chaque segment à l'aide d'un compteur de rayons gamma.</li></ol>
CALCULS	La teneur en pour cent du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dans la préparation est calculée comme suit: $\frac{\text{cpm sur le segment du front du solvant} \times 100}{\text{cpm sur les deux segments}}$

**CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER (PAPIER SATURÉ  
D'ALBUMINE) UTILISANT COMME SOLVANT UNE SOLUTION  
SALINE DANS LAQUELLE ON A FAIT BARBOTER DE L'AZOTE**

APPLICATION Dosage du  $^{99m}\text{TcO}_2$  dans des agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ .

- MATÉRIEL
1. Le papier saturé d'albumine est préparé en faisant tremper des bandes de papier Whatman N° 1 de 4 cm x 30 cm dans une solution aqueuse à 1% de sérum albumine humaine normale, pendant 1 heure. Les bandes sont bien séchées à l'air, enveloppées dans des serviettes de papier et conservées au congélateur jusqu'à ce qu'on les utilise.
  2. Solution physiologique normale dans laquelle on a fait barboter un fort courant d'azote pendant 20 minutes, immédiatement avant de l'utiliser.
  3. Cuve à chromatographie pour chromatographie descendante.

- MÉTHODE
1. Déposer une quantité suffisante de préparation non diluée représentant au moins 50 000 cpm sur chacune des deux bandes chromatographiques déjà préparées et sécher sous un courant d'azote. La taille de l'échantillon devrait se situer entre 1 et 25  $\mu\text{L}$ , et la tache devrait être aussi petite que possible et ne pas dépasser 3 mm de diamètre.
  2. Développer les chromatogrammes à l'aide de la technique descendante jusqu'à ce que le front du solvant se trouve à 15 cm environ de la ligne de dépôt (2-2,5) dans une cuve dans laquelle on a fait barboter un fort courant d'azote pendant au moins 5 minutes. Faire circuler l'azote dans la cuve pendant toute la durée du développement soit en instituant un flot lent mais continu ou par barbotage fort de 1 à 2 minutes, toutes les 20 à 30 minutes.
  3. Retirer les chromatogrammes, marquer les fronts du solvant et laisser sécher à l'air.
  4. Déterminer la répartition de la radioactivité à l'aide des instruments appropriés, soit un scannographe de bande ou une caméra à rayons gamma ou en divisant les bandes de papier en segments de 0,5 cm et en mesurant la radioactivité de chaque segment à l'aide d'un compteur de rayons gamma.

CALCULS La teneur en pour cent du  $^{99m}\text{TcO}_2$  dans la préparation est calculée comme suit:

$$\frac{\text{cpm entre } R_f \text{ 0,0-0,08}}{\text{Nombre total de cpm de la bande}} \times 100$$

## MÉTHODE "MICHROM" UTILISANT UN SOLUTÉ PHYSIOLOGIQUE COMME SOLVANT

- APPLICATION Dosage du  $^{99m}\text{TcO}_2$  dans des agents de visualisation des os marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ .
- MATÉRIEL
1. Feuilles de cellulose pure d'une épaisseur de 1 mm, qualité pour chromatographie, mesurant 7 mm sur 57 mm (par ex.: Gelman Instrument Company, Ann Arbor, MI.) immergées dans une suspension de gel de silice à 6%, mailles de 60 à 200, qualité 62 (Matheson, Coleman et Bell), séchées à l'air. Les bandes peuvent être préparées à l'avance et conservées dans des flacons hermétiques jusqu'au moment de leur utilisation.
  2. Soluté physiologique.
  3. Flacons à fond plat appropriés pour le développement par chromatographie ascendante.
- MÉTHODE
1. Déposer une quantité suffisante (suivant le type de compteur utilisé) de préparation non diluée à 10 mm de l'extrémité de chacune des deux bandes déjà préparées. La taille de l'échantillon devrait se situer entre 5 et 10  $\mu\text{L}$ , et la tache devrait être aussi petite que possible.
  2. Sans les faire sécher, placer les bandes dans des flacons à fond plat contenant 2 mL de soluté physiologique.
  3. Retirer les chromatogrammes juste avant que le solvant ait atteint l'extrémité supérieure de la bande (40-45), marquer le front du solvant et laisser sécher à l'air.
  4. Couper les bandes à 10 mm de la ligne de dépôt et mesurer la radioactivité de chaque segment à l'aide d'un compteur de rayons gamma.
- CALCULS
- La teneur en pour cent du  $^{99m}\text{TcO}_2$  dans la préparation est calculée comme suit:
- $$\frac{\text{cpm sur le segment portant la ligne de dépôt}}{\text{cpm sur les deux segments}} \times 100$$

**MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA BIODISTRIBUTION  
CHEZ LA SOURIS, DES AGENTS DE VISUALISATION  
DES OS MARQUÉS AU  $^{99m}\text{Tc}$**

**MATÉRIEL**

1. Souris blanches mâles de la souche suisse Webster; leur poids corporel doit se situer entre 20 et 35 g, le poids de chacune devant se trouver à  $\pm 2$  g du poids moyen.
2. Instruments chirurgicaux.
3. Chronomètre ou autre instrument pour mesurer le temps.
4. Seringues de 1 cc avec aiguilles 27G x 1/2 pouce.
5. Compteur de radioactivité.

**MÉTHODE**

1. Peser 4 souris puis les réchauffer sous une lampe à infrarouge pendant 2 à 3 minutes afin d'assurer la dilatation des veines de la queue.
2. À l'aide de seringues de 1 cc, prélever des doses de 0,05 à 0,1 mL contenant suffisamment de radioactivité pour que le compteur puisse fonctionner.
3. Mesurer la radioactivité de chaque seringue.
4. La contention des souris étant bien assurée, injecter lentement les doses de préparation dans la veine ventrale ou la veine dorsale de la queue. Noter le temps d'injection.
5. Mesurer la radioactivité des seringues vides et calculer les doses injectées.
6. Placer chaque souris dans une cage montée de façon à éviter autant que possible la contamination du corps par l'urine. Un Erlenmeyer de 500 mL contenant de 30 à 60 g de litière constitue une cage temporaire appropriée pour des expériences de courte durée.
7. Tuer chaque souris par décapitation, 1 heure après l'injection et recueillir le sang dans un contenant approprié.

REMARQUE: Si on est intéressé à faire des séries chronologiques, on peut prélever plusieurs échantillons de sang consécutifs sur la souris vivante; on pratique alors une ponction de la veine caudale au moyen d'un stylet stérile et on recueille des aliquotes de sang de 0,025 mL.

8. Pour réduire au minimum la contamination, recueillir sur un morceau de papier absorbant (bench coat) ou tout autre matériel absorbant approprié, l'urine éliminée pendant qu'on décapite l'animal.
9. Ouvrir la cavité abdominale, pincer les uretères et enlever la vessie ce qui empêche la contamination de la carcasse et d'autres organes par l'urine.
10. Enlever, dans l'ordre, l'estomac, le petit et le gros intestins, le foie, les reins et la rate.



11. Mesurer l'activité résiduelle au point d'injection (pas au niveau de toute la queue). Si celle-ci est supérieure à 5% de la dose injectée corrigée pour tenir compte de la désintégration, arrêter l'opération et recommencer avec une autre souris.
12. Isoler le muscle de la cuisse en prenant soin de ne pas toucher l'os ou de ne pas le contaminer avec des fibres d'os.
13. Isoler le fémur et enlever les morceaux de muscle en le faisant tremper dans de la trypsine à 1% (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ, 193 U/mg) pendant 0,5 à 1,0 h.
14. Peser les échantillons de muscle et de fémur.
15. Mesurer la radioactivité dans le foie, les reins, le fémur, l'échantillon de muscle, l'échantillon de sang, le reste de la carcasse (y compris la queue et le point d'injection) et dans tout autre organe qui peut présenter un intérêt.

#### CALCULS

1. Calculer la dose conservée comme étant la somme de l'activité mesurée dans le foie, les reins, le fémur excisé et le reste de la carcasse (y compris la queue et le point d'injection mais excluant la vessie et son contenu).
2. Considérer le volume sanguin total comme étant 6,5% du poids corporel de la souris.
3. Mesurer la radioactivité dans le sang total comme suit:

$$\text{activité dans l'aliquote} \quad \times \quad \frac{\text{volume de sang total}}{\text{volume de l'aliquote}}$$

d'échantillon

4. Calculer le rapport os/muscle comme suit:

$$\frac{\text{Activité dans le fémur}}{\text{poids du fémur}} \times \frac{\text{poids de l'échantillon de muscle}}{\text{activité dans l'échantillon de muscle}}$$

5. Si l'activité dans le sang est minimale, l'activité dans le reste de la carcasse, plus celle du fémur excisé, peuvent être considérées comme représentant la teneur dans le squelette. Autrement, l'activité dans le squelette peut être calculée comme suit:

$$(0,062) (\text{poids de la souris}) \frac{(\text{activité dans le fémur})}{(\text{poids du fémur})}$$

6. Exprimer tous les résultats comme un pourcentage de la dose retenue (calcul I), en apportant les corrections pour la désintégration au besoin.

