

RADIOHEMIJSKA ČISTOĆA I STABILNOST Tc-99m RADIOFARMACEUTIKA

Jurij Vučina,

Institut za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za radioizotope, 11001 Beograd, p.f.522

Sadržaj – Ispitan je uticaj dugoživećeg ^{99}Tc , bakra i kiseonika na radiohemijsku čistoću $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiofarmaceutika namenjenih za ispitivanje bubrega, jetre i kostiju. U prisustvu kiseonika, radioliza vode je jako izražena i manifestuje se porastom sadržaja $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetata iznad dozvoljene granice. Sličan efekat može imati i povećana koncentracija bakra u preparatima. In vitro stabilnost, ispitana na $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfatu, je poboljšana ako se preparatu doda askorbinska kiselina. Koncentracija od 5×10^7 mol/dm³ ovog hemijskog stabilizatora je dovoljna da se preparat može koristiti šest časova nakon obeležavanja. Sadržaj $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetata je niži od 1% čak i u preparatima sa visokim početnim koncentracijama radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Pri usavršavanju postojećih i razvoju novih preparata, uključivanje hemijskih stabilizatora (askorbinska ili 2,5-dihidroksi benzoeva kiselina) omogućava jednostavniji i ekonomičniji rad.

1. UVOD

Radiohemijska čistoća radiofarmaceutika obeleženih sa $^{99\text{m}}\text{Tc}$ je vrlo bitan parametar kvaliteta jer ona definiše udeo radionuklida u željenom hemijskom obliku. Za najveći broj $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiofarmaceutika radionuklidna čistoća mora da bude veća od 95 % tokom celog vremena korišćenja. Dve glavne radiohemijske nečistoće su redukovani, hidrolizovani $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i slobodni $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetat. Za određivanje radiohemijske čistoće razvijene su hromatografske metode u kojima su stacionarna i mobilna faza specifične za svaki radiofarmaceutik.

U svakodnevnoj praksi u nuklearno-medicinskim ustanovama, pripremanje radiofarmaceutika vrši se korišćenjem takozvanih "kitova" ili "pribora". U penicilinskoj bočici, pod vakuumom ili u atmosferi azota, nalaze se sve neaktivne komponente (jedinjenje, reduktans, aditivi) u liofiliziranom obliku. Za dobijanje radiofarmaceutika tj. obeležavanje, korisnik treba samo da doda $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetat dobijen eluiranjem $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generatora. Međutim, ovaj postupak nije samo prosto dodavanje aktivnosti već ustvari predstavlja brzu hemijsku konverziju sedmovalentnog tehnecijuma. Nakon redukcije sa Sn(II) u niža valentna stanja, tehnecijum stupa u reakciju sa datim jedinjenjem. Uslovi rada i karakteristike svih aktivnih i neaktivnih komponenta se moraju podesiti tako da obeležavanje bude brzo i sa visokim prinosom. Pošto se radi u oblastima mikromotarnih koncentracija, moguće su razne sporedne, paralelne i kompetitivne reakcije. Kao posledica može doći do smanjenja radiohemijske čistoće i stabilnosti radiofarmaceutika.

Do snižavanja kvaliteta radiofarmaceutika usled smanjenja radiohemijske čistoće može doći iz više razloga. Pored karakteristika neaktivnih komponenta, glavni uticaj imaju kvalitet eluata $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i uslovi pod kojima se vrši obeležavanje.

U ovom radu ispitivani su efekti prisustva primesa u eluatu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i njihov uticaj na prinos obeležavanja. Očredjena je in vitro stabilnost nekih radiofarmaceutika sa i bez dodatka askorbinske ili 2,5-dihidroksi benzoeva kiseline kao hemijskih stabilizatora.

Dobijeni rezultati mogu biti od koristi pri daljem usavršavanju postojećih i razvoju novih radiofarmaceutika. Mnogi od njih u neaktivnom priboru, pored ostalih komponenta, sada

sadrže i stabilizator. Time je rad uprošćen i povećana stabilnost preparata što ima i komercijalni efekat jer omogućava efikasno iskorišćenje radiofarmaceutika..

2. EKSPERIMENTALNI DEO

U radu su korišćeni univerzalni $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator i osam radiofarmaceutika koji se rutinski proizvode u Laboratoriji za radioizotope Instituta za nuklearne nauke "Vinča". Liofilizirani preparati obeležavani su sa $^{99\text{m}}\text{Tc}$ prema uputstvu proizvođača, dodavanjem eluata aktivnosti oko 37 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Razblaživanja do propisane zapremine vršena su sa 0,9% NaCl sa sniženim sadržajem rastvorenog kiseonika (komercijalni proizvod).

Uticaj bakra ispitivan je dodavanjem potrebne količine rastvora CuCl₂ poznate koncentracije u rastvor za razblaživanje. Kod ispitivanja uticaja ^{99}Tc , za razblaživanje je korišćen eluat zaostao nakon radioaktivnog raspada poznate aktivnosti $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i u kome je sadržaj dugoživećeg tehnecijuma određivan računskom metodom [1]. Uticaj kiseonika ispitivan je barbotiranjem vazduha kroz preparat i izražavan preko koncentracije vodonik peroksida [2].

Stabilnost $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Sn)-pirofosfata in vitro ispitivana je na vodenim rastvorima ovog preparata. Koncentracija liganda bila je 4×10^2 (mol/dm³) a reduktansa SnCl₂ 9×10^4 (mol/dm³). Kao metode zaštite korišćeni su sledeći postupci: barbotiranje azotom rastvora preparata ili dodavanje vodenih rastvora askorbinske ili 2,5-dihidroksi benzoeva kiseline poznatih koncentracija, pre obeležavanja.

Radiohemijska čistoća preparata određivana je instant tankoslojnom hromatografijom (ITLC- Instant Thin Layer Chromatography) na SiO₂, debljine sloja 0,2 mm (Merck). Kao mobilna faza korišćeni su aceton ili smeša metanol/aceton (1:1, v/v). Kod ispitivanja stabilnosti $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Sn)-pirofosfata korišćena je uzlazna hromatografija na papiru Whatman No.1 sa acetonom kao mobilnom fazom

Nakon razvijanja trake su sečene u segmente od po 1 cm i merene u scintilacionom gama-brojaču sa jamom (Gamma Counter 5 55 ICN).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

U nuklearno medicinskim centrima $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiofarmaceutici se rutinski, jednostavno, brzo i efikasno dobijaju korišćenjem kitova i $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generatora. Karakteristike eluata $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dobijenog eluiranjem komercijalnih generatora se menjaju u zavisnosti od vremena proteklog od prethodnog eluiranja (vreme rasta aktivnosti $^{99\text{m}}\text{Tc}$) i od eluiranja do upotrebe eluata. Pod dejstvom zračenja nastaju razni proizvodi radiolize vode čije koncentracije, kao i sadržaj dugoživećeg ^{99}Tc , rastu sa vremenom. Osim toga mogu biti prisutne i razne hemijske primese i nečistoće koje potiču bilo iz eluensa fiziološkog rastvora 0,9% NaCl ili od materijala kolone generatora.

U praksi, glavni uzrok nižeg prinosa obeležavanja je smanjenje koncentracije jona Sn(II) do koga dolazi u neaktivnom preparatu zbog neadekvatnog čuvanja ili tokom ili nakon

obeležavanja (reakcije sa dugoživećim tehnecijumom ili proizvodima radiolize).

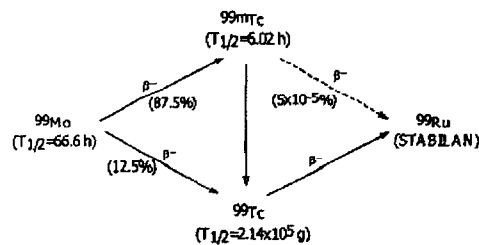
Šema raspada ^{99}Mo , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i ^{99}Tc prikazana je na Slici 1. Za određivanje sadržaja dugoživećeg tehnecijuma razvijeno je više eksperimentalnih metoda [3]. Za približan proračun u ovom radu korišćen je računski metod zasnovan na relaciji:

$$m(\mu\text{g } ^{99}\text{Tc}) = ^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{MBq}) \times 5,16 \times 10^6 / F$$

gde je F dato odnosom broja atoma $^{99\text{m}}\text{Tc}$ prema ukupnom broju atoma tehnecijuma ($^{99\text{m}}\text{Tc} + ^{99}\text{Tc}$). Ovaj odnos se nalazi u tablicama. Na primer, dva časa nakon prethodnog eluiranja $F = 0,765$, posle 6 časova $F = 0,619$, itd. Za preciznije određivanje sadržaja ^{99}Tc moraju se poznavati: vreme rasta $^{99\text{m}}\text{Tc}$, prinos eluiranja i vreme stajanja eluata pre upotrebe.

Sl.1. Šema radioaktivnog raspada ^{99}Mo , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i ^{99}Tc

Proces radiolize je izrazit u prisustvu rastvorenog kiseonika i visokim koncentracijama radionuklida. Pri



eksperimentima je ovaj proces simuliran barbotiranjem vazduha u rastvor preparata i izražen preko sadržaja vodonik peroksida koji je molekularni proizvod radiolize.

Od hemijskih primesa analiziran je uticaj jona $\text{Cu}(\text{II})$ koji potiče iz modifikovanog adsorbensa u koloni generatora. Naime, proizvodjači generatora, da bi obezbedili visoke prinose eluiranja $^{99\text{m}}\text{Tc}$, obično koriste razna sredstva, dodata u eluens ili vezana za adsorbens Al_2O_3 u koloni generatora. To su najčešće takozvani "hvatači elektrona" (eng. electron scavengers) jer se predpostavlja da su hidratizani elektroni odgovorni za redukciju sedmovalentnog tehnecijuma u niža valentna stanja koja se ne mogu eluirati već ostaju vezana na koloni. U generatoru koji se proizvodi u Vinči koristi se $\text{Cu}(\text{II})$ adsorbovan na Al_2O_3 . Pri eluiranju bakar se delimično desorbuje i pojavljuje u eluatu kao hemijska nečistoća.

U Tabeli 1. date su koncentracije ^{99}Tc , Cu^{2+} i H_2O_2 koje se normalno nalaze u eluatima (komercijalni eluati). Pri eksperimentima njihov sadržaj je povećan (eksperimentalni eluati). Za obeležavanja uvek su korišćeni su sveži eluati dobijeni eluiranjem generatora 24 časa od prethodnog eluiranja.

Tabela 1. Koncentracije ^{99}Tc , Cu^{2+} i H_2O_2 (mol/dm^3) u komercijalnim i eksperimentalnim eluatima $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Eluat	^{99}Tc (mol/dm^3)	Cu^{2+} (mol/dm^3)	H_2O_2 (mol/dm^3)
Komercijalni	5×10^{-9}	5×10^{-8}	3×10^{-8}
Eksperimentalni	2×10^{-8}	$2,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-7}$
Faktor povećanja	4	50	5

Zavisnost radiohemijske čistoće eksperimentalnih preparata (tj.onih sa povećanim sadržajem ^{99}Tc , $\text{Cu}(\text{II})$ i H_2O_2) od kvaliteta eluata $^{99\text{m}}\text{Tc}$ prikazana je u Tabeli 2. Ispitivani su radiofarmaceutici za ispitivanje: bubrega ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetraciklin glukonat, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimerkapto sukcinat (DMS) i $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA), kostiju ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfat (PiP), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dikarboksi propan difosfonat (DPD) i $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -metilen difosfonat (MDP) i jetre ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dielil ida (EHIDA) i $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -fitat).

Tabela 2. Zavisnost radiohemijske čistoće eksperimentalnih $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiofarmaceutika od karakteristika eluata (faktor povećanja sadržaja: $^{99}\text{Tc} = 4$; $\text{Cu}(\text{II}) = 50$; $\text{H}_2\text{O}_2 = 5$)
Koncentracije liganda: $5 \times 10^{-3} - 7 \times 10^{-4}$ (mol/dm^3)
Koncentracije reduktansa SnCl_2 : $7 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-3}$ (mol/dm^3)

Preparat	Radiohemijska čistoća, %		
	^{99}Tc	Cu^{2+}	H_2O_2
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -tetraciklin glukonat	≥ 95	≥ 95	≥ 95
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -DMS	≥ 95	≥ 95	≥ 95
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -dielil ida	≥ 95	≥ 95	≥ 95
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -PiP	≥ 95	≥ 95	85 ± 5
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -DTPA	≥ 95	≥ 95	80 ± 5
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -DPD	≥ 95	≥ 95	80 ± 5
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -fitat	≥ 95	≥ 95	55 ± 5
$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -MDP	≥ 95	85 ± 5	45 ± 5

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 2, može se zaključiti da efekat dugoživećeg ^{99}Tc nije primećen. To se može objasniti, pre svega, njegovim koncentracijama koje su i u eksperimentalnim uslovima niže od koncentracija drugih reaktanata. On učestvuje u reakcijama ali preparati sadrže dovoljno liganda i reduktansa tako da njegov uticaj ni u povećanim koncentracijama nije zapažen.

Najveće smanjenje radiohemijske čistoće primećeno je kod barbotiranja rastvora preparata vazduhom. Kiseonik utiče na radiohemijsku čistoću pet preparata. Njegov efekat se ogleda u sprečavanju redukcije sedmovalentnog tehnecijuma odnosno u redukciji redukovano Tc . Sadržaj slobodnog $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetata u prepatima raste, na primer kod $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -MDP za preko 50%.

U slučaju povećanih koncentracija bakra, sličan efekat porasta sadržaja pertehnetata primećen je samo kod $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{Sn})$ -MDP. Kod ostalih ispitivanih preparata bakar, pod datim eksperimentalnim uslovima, ne utiče na radiohemijsku čistoću.

Stabilnost preparata *in vitro* ispitivana je na vodenim rastvorima $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfata. Pripremljeni su rastvori preparata direktno od rastvora reaktanata ("nezaštićeni" uzorci). Pošto je na osnovu prethodnih ispitivanja pokazano da kiseonik ima najveći uticaj na radiohemijsku čistoću, prva mera zaštite bila je barbotiranje rastvora reaktanata i preparata azotom čime se smanjuje sadržaj rastvorenog kiseonika. Pored ove zaštite, ispitivan je i efekat dodavanja askorbinske ili 2,5-dihidroksi benzoove kiseline kao hemijskih stabilizatora. Pod ovim eksperimentalnim uslovima ispitivana je radiohemijska čistoća pirofosfata u zavisnosti od vremena proteklog od obeležavanja i početne koncentracije $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Rezultati eksperimenata prikazani su u Tabeli 3.

U svim ispitivanim uzorcima, bez obzira na različite eksperimentalne uslove, zapažen je praktično, isti tip zavisnosti porasta sadržaja slobodnog $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertehnetata. Kao mera zaštite arbitrarno je uzeto da se "zaštićenim" smatra uzorak u kome se

nakon 6 časova nakon obeležavanja ne nalazi više od 5 % ^{99m}Tc -pertechnetata. Najbolja stabilnost pirofosfata se postiže kada se u rastvor dodaje askorbinska kiselina. Sa porastom njenog sadržaja može se koncentracija vodonik peroksida držati daleko ispod 5 % čak i u slučaju vrlo velikih koncentracija ^{99m}Tc , kao što je to prikazano u Tabeli 3.

Slična zavisnost dobijena je i sa 2,5-dihidroksi benzoevom kiselinom. Međutim, da bi se dobio isti efekat, potrebne su oko deset puta veće koncentracije ovog stabilizatora nego u slučaju askorbinske kiseline.

Tabela 3. Zavisnost brzine stvaranja ^{99m}Tc -pertechnetata od početne koncentracije ^{99m}Tc u ^{99m}Tc -pirofosfatu u prisustvu askorbinske kiseline

Koncentracija liganda: $4 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$

Koncentracija reduktansa: $9 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$

Konc. ^{99m}Tc (GBq/dm ³)	Sadržaj ask.kis. (mol/dm ³)	Vreme nakon obeležavanja, h		
		0,25	3	6
18,5-37	$0,4 \times 10^{-7}$	$0,4 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
170-444	$0,8 \times 10^{-7}$	$0,1 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
555-630	$2,5 \times 10^{-7}$	$0,7 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
740-814	5×10^{-7}	$0,1 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

4. ZAKLJUČAK

Ispitivanje stabilnosti ^{99m}Tc -radiofarmaceutika, pod datim eksperimentalnim uslovima, pokazalo je da dugoživeći tehnecijum ne utiče na njihovu radiohemijsku čistoću. ^{99m}Tc učestvuje u reakcijama obeležavanja ali je njegova koncentracija suviše niska. Eksperimenti su pokazali da najveći uticaj ima uvođenje kiseonika u preparate pri čemu njegov efekat varira. Može se pretpostaviti da osetljivost preparata zavisi i od drugih parametara, pre svega od prirode kompleksa i njegovih karakteristika (konstante stabilnosti, odnosa koncentracija liganda i reduktansa). Pokazalo se takođe da i bakar, kao hemijska nečistoća u eluatu, može negativno uticati na kvalitet nekih radiofarmaceutika.

Kod ispitivanja *in vitro* stabilnosti $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})\text{-PiP}$, u zavisnosti od vremena nakon obeležavanja i početne koncentracije radionuklida ^{99m}Tc , pokazalo se da se najbolji efekat postiže dodavanjem askorbinske kiseline u preparat pre obeležavanja. Sadržaj askorbinske kiseline od $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ je dovoljan je da udeo ^{99m}Tc -pertechnetata u preparatu ostane ispod 1 % tokom 6 časova nakon obeležavanja čak i u slučaju visokih početnih radioaktivnih koncentracija ^{99m}Tc (740-814 GBq/dm³). Da bi se postigao isti efekat, koncentracija 2,5-dihidroksi benzoeve kiseline mora biti oko deset puta veća.

Dobijeni rezultati upućuju na mere predostrožnosti pri dobijanju radiofarmaceutika. Neophodno je da se korisnik pridržava uputstava proizvođača, koristi svež eluat ^{99m}Tc i upotrebi radiofarmaceutik što pre nakon obeležavanja. Bitno je da se spreči svaki ulaz kiseonika u preparat. Prisustvo hemijskih stabilizatora je poželjno. Dobijeni rezultati doprineli su usavršavanju postojećih i razvoju novih radiofarmaceutika. Mnogi od njih u neaktivnom priboru, pored ostalih komponentena, sada sadrže i stabilizator. Time je rad uprošćen i povećana stabilnost preparata što ima i komercijalni efekat jer omogućava efikasno iskorišćenje radiofarmaceutika. Izbor stabilizatora zavisi i od njegove hemijske strukture. Tako je, na primer, kod modifikovanog $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})$ -pirofosfata za primenu u kardiologiji

[4], kao hemijski stabilizator uključena 2,5-dihidroksi benzoeva kiselina.

LITERATURA

- [1] J.Vižek and V.Husak, "Long lived ^{99m}Tc in generator produced ^{99m}Tc , its determination and significance", *Int.J.Appl.Radiat.Isotopes*, vol.30, pp.165-167 (1979)
- [2] V.J.Molinski, "A review on ^{99m}Tc generator technology", *Int.J.Appl.Radiat.Isotopes*, vol.33, pp.811-819 (1982)
- [3] M.E.Holland, E.Deutsch, W.R.Heineman, "Studies on commercially available $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ radionuclide generators - II. Operating characteristics and behaviour of $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generators, *Int.J.Appl.Radiat.Isotopes*, vol.37, pp.173-180 (1986)
- [4] D.Djokić, T.Maksin, J.Vučina, D.Janković, "Modified pyrophosphate- ^{99m}Tc kit for application in nuclear cardiology", *J.Radiochem.Nucl.Chem.*, vol.238, pp.155-157 (1998)

Abstract- The increased contents of long lived ^{99}Tc , oxygen and cupric ions could affect the labeling yield of eight radiopharmaceuticals. Oxygen and in lesser extend copper were found to affect the radiochemical purity of the preparations. *In vitro* stability of radiopharmaceuticals, examined on $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})$ -pyrophosphate solutions, was extended when ascorbic acid was added as the chemical stabilizer. The quantity of $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ of ascorbic acid was found to be sufficient to keep the content of ^{99m}Tc -pertechnetate below 1 % six hours after labeling even in the cases when ^{99m}Tc was present in high radioactive concentrations (740-814 GBq/dm³). The results led to the development of the kits in which ascorbic or gentisic acid are the standard component in the kit composition.

RADIOCHEMICAL PURITY AND *IN VITRO* STABILITY OF Tc-99m RADIOPHARMACEUTICALS

Jurij Vučina