

Validación de un método analítico por TLC-scanner para la determinación de pureza radioquímica del pertecnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable

Miguel Vásquez*, Bertha Ramos

Planta de Producción de Radioisótopos, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. José Saco km 12.5, Lima 6, Perú.

Resumen

Se realizó la validación de un método analítico para la determinación de la pureza radioquímica del radiofármaco Pertecnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable, mediante cromatografía en capa delgada (TLC) con un sistema de Escáner radio-TLC, el mismo que permite evaluar la calidad del producto. Se evaluaron los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, rango y estabilidad de la solución muestra. En las condiciones experimentales se demostró estadísticamente que el método por TLC-scanner es selectivo para la banda de pertecnetato TcO_4^- Rf de 0,9 y para la impureza radioquímica TcO_2 Rf de 0,1, la linealidad desde 0,25 a 3,0 mCi/mL, la precisión intermedia con RSD global de 0,237%, la robustez con RSD global 0,012%, el límite de detección de 0,03% mCi/mL, límite de cuantificación de 0,24 mCi/mL, rango conforme y la estabilidad de la solución muestra evaluado en los tiempos 0, 2 y 3 horas con un RSD global de 0,196% obteniéndose resultados conformes. En todas las operaciones se verificaron la conformidad de las pruebas a los criterios de aceptación en cada una de las etapas de validación. Se concluye la validez de nuestro método en las condiciones establecidas y es apta para su uso en el proceso de elaboración del pertecnetato de sodio ^{99m}Tc .

Palabras clave: Validación; Pureza radioquímica; Pertecnetato de sodio; Radiofármacos

Validation of an analytical method by TLC-scanner for the determination of radiochemical purity of sodium pertechnetate ^{99m}Tc injectable solution

Abstract

The validation of an analytical method was carried out for the determination of the radiochemical purity of the radiopharmaceutical Pertechnetate sodium ^{99m}Tc solution for injection, by means of thin layer chromatography (TLC) with a Radio-TLC scanner system, which allows to evaluate the quality of the product. The parameters of selectivity, linearity, precision, robustness, limit of detection, limit of quantification, range and stability were evaluated in the sample solution. Under the experimental conditions, the TLC-scanner method was statistically demonstrated to be selective for the pertechnetate band TcO_4^- Rf of 0.9 and for the radiochemical impurity TcO_2 Rf of 0.1, the linearity from 0.25 to 3.0 mCi / mL, intermediate precision with overall RSD of 0.227 %, robustness with overall RSD 0.012 %, detection limit of 0.03 % mCi / mL, limit of quantification of 0.24 mCi/mL, conformal range and stability of the sample solution evaluated at times 0, 2 and 3 hours with a global RSD of 0.196 % obtaining compliant results. In all the operations, the conformity of the tests to the acceptance criteria was verified in each of the validation stages. Under the established conditions, the validity of our method is concluded to be suitable for use in the process of making ^{99m}Tc sodium pertechnetate.

Keywords: Validation; Radiochemical purity; Sodium pertechnetate; Radiopharmaceuticals

1. Introducción

El ^{99m}Tc es el radioisótopo más utilizado en medicina nuclear debido a su período de

semidesintegración física de solo 6 horas, que posibilita administrar actividades del orden de los mCi sin que signifique una alta dosis para un paciente. La naturaleza química de los radiofármacos de ^{99m}Tc es amplia e incluye

* Correspondencia autor: mvasquez@ipen.gob.pe
 <https://orcid.org/0000-0001-8725-7156>

radionucleídos primarios, como el caso del ^{99m}Tc -pertechnetato y compuestos marcados [1]. El control de calidad para radiofármacos abarca categorías como: controles físico-químicos, controles biológicos y controles nucleares. Dentro de los controles físico-químicos encontramos la pureza radioquímica, definida como la fracción de radioactividad total en la forma química deseada presente en el radiofármaco. Estas impurezas pueden ser causadas por descomposición del radiofármaco debido a la acción del solvente usado, temperatura, luz, radiólisis o marcación de una impureza con el mismo radionucleído; por ejemplo, la presencia de ^{99m}Tc reducido hidrolizado en complejos marcados con ^{99m}Tc . Los métodos analíticos más usados para detectar y determinar las impurezas radioquímicas de un radiofármaco son la precipitación, cromatografía en papel, capa fina y en gel, electroforesis en papel y en gel, cromatografía líquida de alta eficiencia, extracción por solvente, extracción fase sólida y destilación [2].

El método más utilizado, sencillo y rápido es el cromatográfico que esencialmente es un método físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de ellas es un lecho estacionario, mientras que la otra se mueve por percolación a través de este lecho, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra. Los tipos de cromatografía más utilizados, debido a su fácil realización y el tiempo corto que requieren son las cromatografías en papel (TLC) y en capa delgada instantánea (ITLC) [3]. El método farmacopéico oficial descrito por la USP 40 para Pertechnetato de sodio ^{99m}Tc inyección indica que se debe colocar un volumen de inyección de 20000 cuentas por minuto aproximadamente en una tira de 25 mm x 300 mm, desarrollándose la cromatografía usando una mezcla de acetona y ácido clorhídrico 2 N (80:20). Luego, se determina la distribución de radioactividad mediante barrido del cromatograma con un detector de radiación colimada [4].

Para el control de la pureza radioquímica, donde se utilizan papel y tiras cromatográficas de tamaño reducido, hay técnicas simples que permiten realizar la cromatografía en un tiempo breve [3]. Por eso, se pueden usar

métodos o procedimientos alternativos que proporcionen alguna ventaja en cuanto a exactitud, sensibilidad, precisión, selectividad o adaptabilidad a la automatización, reducción de datos computarizados. Sin embargo, los métodos y procedimientos alternativos deben validarse de acuerdo con las pautas del capítulo general Validación de Procedimientos Farmacopéicos <1225> y debe demostrarse que proporcionan resultados equivalentes o mejores; por esa razón, el método propuesto requiere de una validación analítica.

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que se establece mediante estudios en laboratorio, para evaluar si las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos previstos [5]. El objetivo del procedimiento analítico debe entenderse claramente porque registrará las características típicas de validación a evaluarse, tales como exactitud, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango. Cabe señalar que la robustez no se incluye en la tabla, pero debe considerarse en una etapa apropiada durante el desarrollo del procedimiento analítico [6].

Este estudio se enfoca en la validación del método analítico para la determinación de la pureza radioquímica del radiofármaco Pertechnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable en un sistema de Escáner radio-TLC, que es un escáner versátil para la detección confiable de radioisótopos en tiras y placas estrechas (Figura 1). El sistema es ideal para el control de calidad de rutina de ^{99m}Tc , que consiste en una etapa móvil y un PMT basado en detector.

2. Experimental

El proceso de validación de la metodología analítica de pureza radioquímica por TLC-scanner para el radiofármaco Pertechnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable, por tratarse de una metodología no farmacopéica se ha tomado como base los parámetros de validación indicados en la USP y en el Informe 40 de la Organización Mundial de Salud. Se utilizó como muestra de análisis el lote: 1030728, a la que se aplicó la validación de tipo concurrente al método analítico de pureza radioquímica en el producto Pertechnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable para los parámetros selectividad, linealidad, estabilidad

de la muestra, robustez, límite de detección y cuantificación, precisión y rango. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para cada parámetro de la validación.

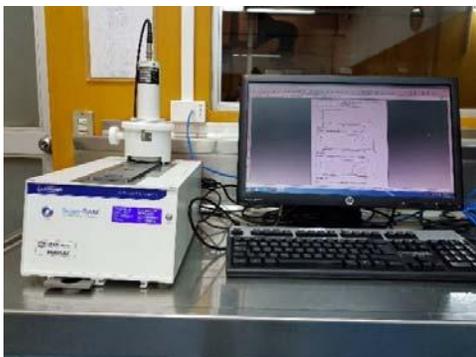


Figura 1. TLC-scanner Scan-RAM.

2.1 Descripción del proceso

El proceso de validación se desarrolló en el Departamento de Control de Calidad, Laboratorio de Radioquímica I de la Planta de Producción de Radioisótopos del IPEN. Los equipos usados en el proceso de validación de la metodología para determinación de la pureza fueron un escáner radio-TLC con código PM05AC, marca Scan-RAM, modelo SR1A, Serie SR1A/0117/380 (Figura 1) y una cadena de espectrometría gamma monocanal con código PM03AC, marca Canberra (Figura 2).

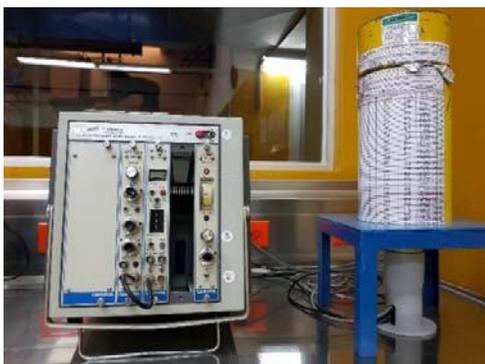


Figura 2. Cadena de espectrometría gamma monocanal.

2.2 Método analítico

El método analítico utilizado es el ensayo: Pureza radioquímica de Pertecnetato de sodio ^{99m}Tc Solución Inyectable.

2.2.1 Equipos, materiales y reactivos

Materiales:

- Papel cromatográfico N° 1 de 10 x 100 mm

- Tiras de ITLC-SG de 10 x 110 mm
- Cámaras o cubas cromatográficas.
- Micropipeta de 2 a 20 μL código TH80AC y micropipeta de 20 a 200 μL código TH82AC.

Equipos:

- Escáner radio-TLC, código PM05AC, marca Scan-RAM.
- Cadena de espectrometría gamma monocanal, código PM03AC, marca Canberra.
- Calibrador de dosis, código CA05AC, marca Capintec.
- Monitor de radiaciones, código DP28JP, marca Technical Associates.

Reactivos:

- Metiletilcetona ACS, marca J.T. Baker Lote: 57168.
- Cloruro de estaño, marca Sigma, Lote MKBZ7691V.
- Peróxido de hidrógeno, marca Merck, Lote K447934310.

2.2.2 Sistema cromatográfico cromatografía en capa fina (TLC)

- o Detector : NaI (Ioduro de sodio).
- o Fase móvil : Metiletilcetona ACS
- o Fase estacionaria : Tira ITLC-SG
- o Volumen : 5 μL .
- o Tiempo : 5 minutos aprox.
- o Valores de Rf : Rf Tc VII (TcO₄⁻) : 0,9
- o Rf Tc IV (reducido-hidrolizado): 0,1

2.3 Desarrollo de la validación

El control de calidad para la determinación de pureza radioquímica fue validado mediante el método de cromatografía en capa delgada (TLC) con un sistema de Escáner radio-TLC.

2.4 Parámetros considerados

- Selectividad: Se prepararon 2 soluciones muestras, 2 soluciones muestras con impureza radioquímica ^{99m}Tc IV reducido, 2 soluciones muestra de placebo y 1 muestra de diluyente o muestra de fase móvil.
- Linealidad/Función respuesta: Se consideraron 5 niveles de concentración y análisis por triplicado para cada concentración radioactiva de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 mCi/mL. Se realizó una curva de regresión en mCi/mL de la lectura de las áreas (counts) a diferentes concentraciones radioactivas.

- Precisión: Se preparó 1 solución muestra de pertechnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable. También soluciones a concentraciones de 0,25; 1,0; 3,0 mCi/mL; luego, se hicieron 6 ensayos con diferentes equipos y especialistas de control de calidad.
- Robustez: Se evaluó el factor de variabilidad aportado por el cambio de tipo de soporte: papel cromatográfico y tiras de ITLC-SG.
- Límite de detección y cuantificación: Se realizó análisis, por triplicado, para cada concentración radiactiva entre 0,25 hasta 3,0 mCi/mL.
- Rango: Se evaluó los parámetros de precisión, linealidad, LOD y LOQ.
- Estabilidad de la solución muestra: Se evaluó la estabilidad a las 0 horas hasta las 3 horas de su preparación.

2.5 Soluciones de trabajo

- Solución muestra: Concentración radioactiva aproximada: 1,0 mCi/mL. Se diluye la solución de ^{99m}Tc con solución de cloruro de sodio 0,9 % para obtener una concentración de 1,0 mCi/mL.
- Solución placebo: Se usó placebo entregado por el área de producción.
- Solución blanco: Se usó la fase móvil.

2.6 Procedimiento

Se utiliza guantes de látex o polietileno, pinza metálica, visor plomado, blindaje de plomado e iluminación adecuada.

Se coloca las tiras cromatográficas sobre un papel toalla con la ayuda de una pinza y se activa en una estufa a 110 °C por 30 minutos; una vez activado se retira y utiliza inmediatamente, también puede almacenarse por 24 horas en un desecador sobre silicagel activada.

Luego, se coloca la tira activada sobre una toalla y se pone en la zona de sembrado del laboratorio. Marcar una línea suave a 1,5 cm del inicio, sembrar con una micropipeta 5 μL de la solución muestra de ^{99m}Tc en un extremo de la tira; enseguida, secarla a temperatura ambiente por 1 minuto aproximadamente.

Posteriormente, la tira se coloca en la cuba cromatográfica previamente equilibrada en la fase móvil, teniendo en cuenta que la altura, en la cuba, no debe superar los 0,7 cm aproximadamente y 7 mL de fase móvil. A continuación, se desarrolla el cromatograma

hasta que el frente de fase móvil se sitúe a 0,5 cm del borde superior, luego retirarla y dejar que seque.

Adecuación del sistema: Se inyecta la solución muestra por duplicado. La desviación estándar relativa para ambas corridas de pureza radioquímica PRQ1 y PRQ2 no debe ser mayor a un 2,0 %.

Especificación: Pureza radioquímica: $\geq 95\%$. El valor de Rf correspondiente al producto es 0,9.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de la selectividad

En el análisis de selectividad se comparó la respuesta de los blancos y/o placebos y las muestras degradadas con respecto a la muestra a temperatura ambiente. El método permite distinguir entre todas las posibles especies químicas que pueden generarse (Figura 3). El método por TLC-scanner los valores de Rf en los cromatogramas para la banda de pertechnetato TcO_4^- es 0,9 y la impureza radioquímica TcO_2 de 0,1 y sin ningún pico cromatográfico del blanco y/o placebo, lo cual nos indica que no producen interferencia y los valores de Rf para la banda de pertechnetato TcO_4^- y la impureza radioquímica son diferentes.

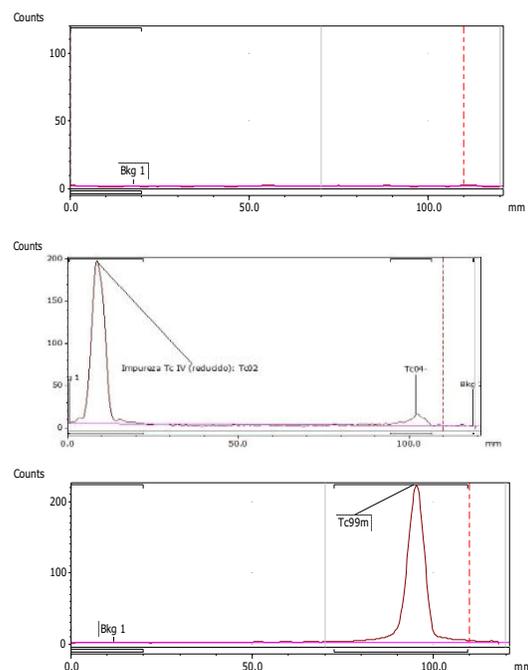


Figura 3. Cromatogramas TLC-scanner: Blanco, impureza radioquímica (reducido): TcO_2 , muestra de ^{99m}Tc .

3.2 Determinación de la linealidad

Los valores obtenidos en la medición para las soluciones de ^{99m}Tc se muestran en la Tabla 1. En ella podemos observar que hay una clara tendencia a la linealidad, debido a que cuando se aumenta la concentración radioactiva del ^{99m}Tc se incrementa en forma proporcional las cuentas. Con estos datos elaboramos la curva de regresión para la concentración de ^{99m}Tc (Figura 4).

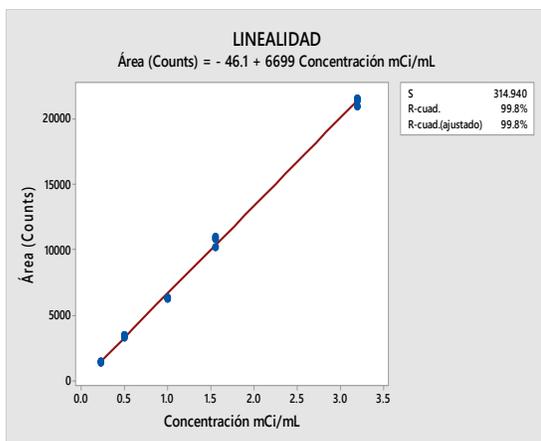


Figura 4. Linealidad del ^{99m}Tc .

Tabla 1. Total áreas (counts) del ^{99m}Tc .

Replicas	Total áreas (Counts)	Retention (RF)
1	6374	0,855
2	6242	0,856
3	6288	0,887
4	5952	0,855
5	6114	0,862
6	6143	0,867

RSD = 2,405 %

Los resultados fueron analizados estadísticamente evaluándose las concentraciones radioactivas (mCi/mL) versus área (Counts) encontrada. En la Figura 3 se observa la ecuación de la recta, donde se obtiene:

$$y = 6698.744 x \pm 46.108$$

Los valores alcanzados mediante la estadística de regresión fueron un coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0,999 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,998. El coeficiente de determinación nos indica que existe una buena linealidad y aporta mayor significación estadística.

Mediante la prueba *t-student* y ANOVA se halló el estadístico “t” junto con un test de

varianza. El valor de $t_{\text{regresión}} = 763,13$ demuestra que la correlación es lineal y significativa. El valor $p = 0,000$ nos indica que el análisis de varianza posee una alta correlación por lo que se puede inferir que el método es lineal.

3.3 Determinación de la precisión

En el análisis para el parámetro precisión se evaluó la repetibilidad instrumental, repetibilidad de método y precisión intermedia. Se observa que el RSD de las áreas de la repetibilidad instrumental es de 2,4 % como se muestra en la Tabla 2. El RSD de la repetibilidad de método es 0,859 % con un intervalo de confianza individual de 97,71 % a 101,66 % conforme y un intervalo de confianza promedio de $99,681 \pm 0,658$ % conforme. Para la precisión intermedia se evaluó diferentes equipos y analistas, equipo 1: TLC-scanner marca Scan-Ram modelo SR1A código PM05AC (Figura 1). Equipo 2: Cadena de espectrometría monocanal marca Camberra (Figura 2). Se obtuvieron resultados conformes, el RSD global fue 0,237 % como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Precisión: Repetibilidad del ^{99m}Tc .

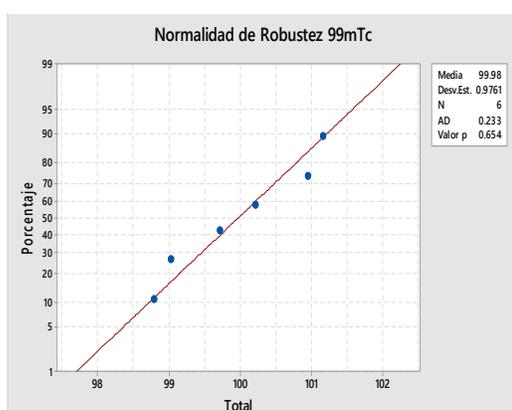
Concentraciones (mCi/mL)	Área (Counts) Promedio
0,22	1413,333 \pm 2,2199
0,50	3412,333 \pm 3,2424
1,00	6301,667 \pm 1,0719
1,55	10652,67 \pm 3,8897
3,20	21330,67 \pm 1,4621

3.4 Determinación de la robustez

En este parámetro se evaluó la condición de variabilidad. Para este caso, Condición 1: Fase estacionaria: soporte de tira ITLC-SG y para la Condición 2: Soporte de papel cromatográfico N° 1. El RSD global con todos los resultados es 0,012%, la normalidad total es 0,654 (Figura 5), la normalidad 1° condición es 0,470, la normalidad 2° condición es 0,494 y la prueba estadística t es 0,986, obteniéndose resultados conformes.

Tabla 3. Precisión Intermedia del ^{99m}Tc .

Analista Equipo	Área (Counts)	PRQ (%)	RSD (%)	RSD (%) Global
Analista 1 Equipo 1	6491	98,948	0,5780	0,237
	6418	99,458		
	7094	97,883		
	6870	98,466		
	6454	99,415		
6563	98,647			
Analista 2 Equipo 2	286413	99,689	0,6008	0,237
	291329	99,634		
	307873	99,727		
	289549	98,478		
	279799	98,541		
285416	98,843			

**Figura 5.** Normalidad robustez de ^{99m}Tc .

3.5 Determinación del límite de detección y cuantificación

El límite de detección es la concentración derivada de la respuesta más pequeña que se puede detectar con una certeza razonable para un procedimiento analítico dado [7]. Se determinó mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas. El límite de detección se calculó mediante la fórmula [8]:

$$\text{LOD} = (s \times 3) / \text{Slope}$$

Donde s es la desviación estándar de la respuesta.

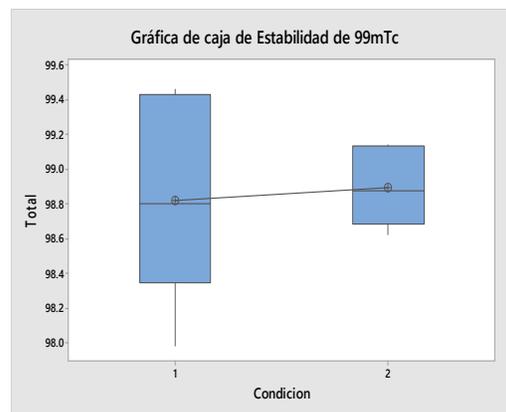
El límite de cuantificación (LOQ) se calculó mediante la fórmula [8]:

$$\text{LOQ} = (s \times 10) / \text{Slope}$$

Mediante la interpolación de la ecuación de regresión se calculó el valor límite de detección donde obtuvo una concentración radioactiva de 0,03 mCi/mL y el valor límite de cuantificación una concentración radioactiva de 0,24 mCi/mL, obteniéndose resultados conformes.

3.6 Determinación del rango

El rango de trabajo para los parámetros de validación quedó establecido desde el 0,25 mCi/mL hasta el 3,0 mCi/mL al demostrarse precisión y linealidad en ese intervalo para el método analítico validado.

**Figura 6.** Gráfica de cajas estabilidad del ^{99m}Tc .

3.7 Determinación de estabilidad de la solución muestra

Los parámetros de estabilidad para la solución de las muestras fueron evaluadas a los tiempos de 0 horas, 2 horas y 3 horas, obteniéndose resultados conformes, también se evaluó la distribución de los datos. El RSD global con todos los resultados de las muestras a 0, 2 y 3 horas es 0,196 %. La normalidad de las muestras a las 0 horas es 0,725; a las 3 horas es 0,264 y la prueba estadística t es 0,786, obteniéndose resultados conformes y se determina que las muestras preparadas pueden ser procesadas hasta 3 horas después (Figura 6).

4. Conclusiones

Después de la evaluación detallada de la validación del Pertecnetato de sodio ^{99m}Tc solución inyectable se demostró estadísticamente que el método por TLC-scanner es selectivo debido a que permite distinguir especies químicas que se generan sin interferencias tanto para la banda de pertecnetato TcO_4^- con un R_f de 0,9 y para la impureza radioquímica TcO_2 con un R_f de 0,1 con una respuesta lineal en los cinco niveles de concentración desde 0,25 a 3,0 mCi/mL con coeficiente de Correlación de Pearson (r) de 0,999 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,998, demostrando la precisión del método con un RSD global de 0,237%, la robustez de

diferentes fases estacionarias con RSD global 0,012 %, capaz de detectar pequeñas cantidades de concentraciones radioactivas, obteniéndose un límite de detección de 0,03 % mCi/mL, un límite de cuantificación de 0,24 mCi/mL, el rango de los parámetros conforme y una estabilidad para procesar las muestras evaluado en los tiempos 0, 2 y 3 horas con un RSD global de 0,196 %.

Los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, rango y estabilidad de la solución muestra tuvieron un resultado conforme, lo cual nos indica que el método queda validado para las condiciones analíticas establecidas.

En todas las operaciones se verificaron la conformidad de las pruebas a los criterios de aceptación en cada una de las etapas de validación. Se concluye la validez de nuestro método en las condiciones establecidas y es apta para su uso rutinario en control de calidad en el proceso de elaboración del pertecnetato de sodio ^{99m}Tc .

5. Agradecimientos

A la Lic. Flor Martínez por el apoyo brindado en el proceso de validación.

6. Bibliografía

[1]. Chain Y, Illanes L. Radiofármacos en medicina nuclear. Fundamentos y aplicación clínica. 1. Edición. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires. Argentina, 2015.

[2]. Organismo Internacional de Energía Atómica. Manual de protocolos de calidad de radiofármacos. ARCAL XV Producción y control de radiofármacos. Viena, 1999.

[3]. Montero de Espinosa Costa G. Control de calidad de generadores de Molibdeno-99-Tecnecio-99m [Tesis para optar al grado de Doctor]. Universidad Complutense de Madrid Madrid, Facultad de Farmacia; 2002.

[4]. USP 40 NF 35 (2017) – Farmacopea de los Estados Unidos de América. Monografía Oficial del Pertecnetato de Sodio Tc99m, Inyección. pág. 6835-6836.

[5]. USP 40 NF 35 (2017) – Farmacopea de los Estados Unidos de América. Capítulo General Validación de Procedimientos Farmacopéicos <1225>.

[6]. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1).

[7]. Leonardi N, Casale G, Nicolini J, Zubata P, Salgueiro M, *et al.* Validation of a paper chromatographic methodology as an alternative for determination of the radiochemical purity of Na^{18}F . Journal of Nuclear Medicine Technology. 2012; 40(4): 271-274.

[8]. Mihon M, Tuta CS, Manea C, Ion AC, Lavric V. Validation of the HPLC method for determination of identity and radiochemical purity of $[\text{18F}]\text{NaF}$. U.P.B. Sci. Bull, Series B. 2016; 78(1):71-78.