

CONTROLLI DI QUALITA' DEI RADIOFARMACI PER TERAPIA

Tesi della Dott.ssa Sandra Antonella Giuffrida

Relatore Dott.ssa Nicoletta Urbano

CAPITOLO 1

Introduzione

Il termine radiofarmaco è di diffusione molto recente, infatti, nel trattato di Monasterio e Donato⁽¹⁾ “livre de chevet”, nel quale sono raccolte le esperienze di una generazione di medici nucleari, non compare mai la parola radiofarmaco, ma al suo posto vi sono termini quali “composti radiattivi” o “prodotti radiattivi” distinti in “traccianti” ed “indicatori”.

Solo 35 anni dopo la pubblicazione di questo trattato del 1960, compare per la prima volta il termine radiofarmaco, infatti, B. J. Baker inizia il suo capitolo, nel trattato di Murray ed Ell⁽²⁾, evidenziando la crescente tendenza in medicina nucleare ad utilizzare il termine radiofarmaco al posto di agente radio-diagnostico. Baker, inoltre, elenca le differenze, secondo la sua opinione, tra farmaci e radiofarmaci e quindi i motivi per i quali è difficile considerare come farmaco un “Radiofarmaco”. In particolare, egli afferma che questi ultimi sono radiattivi e, in quanto tali, devono essere sottoposti alla legge sulla radioprotezione, oltre a quella dei medicinali, quindi richiedono una normativa peculiare a se stante.

Della stessa opinione sembrarono essere i Legislatori Europei, i quali emanarono una specifica direttiva sui radiofarmaci la 89/343/CEE⁽³⁾, che tiene conto della normativa 84/466/Euratom che stabilisce le misure radioprotezionistiche fondamentali. In Italia, tale direttiva, che impostava una

normativa specifica per i radiofarmaci , non è stata recitata singolarmente ma contestualmente al Il D.Lgs. n° 178 del 29/5/1991⁽⁴⁾, che racchiude in blocco varie direttive sui medicinali.

Tale decreto, successivamente integrato dal D. Lgs n°. 44 del 18/2/1997⁽⁵⁾, inserisce i radiofarmaci nella categoria generale di “prodotti medicinali”. In particolare, nell’Art 1, comma 1 vi è una chiara definizione di medicinale, quale : “ogni sostanza o composizione presentata avente come proprietà curative o profilattiche delle malattie umane o animali, nonché ogni sostanza o composizione da somministrare all’uomo o all’animale allo scopo di stabilire una diagnosi medica o di ripristinare, correggere o modificare funzioni organiche dell’uomo o dell’animale”. Come si deduce chiaramente da tale definizione il radiofarmaco è indubbiamente da considerarsi un medicinale, inoltre, l’art 21 precisa che per radiofarmaco si intende “qualsiasi medicinale che, quando è pronto all’uso, include uno o più radionuclidi incorporati a scopo sanitario” e definisce: generatori, kit e precursori decretando la necessità che essi, così come i radiofarmaci prodotti industrialmente, siano dotati di autorizzazione all’immissione in commercio (AIC).

Ai radiofarmaci, pertanto, sono stati estesi gli adempimenti generali dei prodotti farmaceutici che, come tali, devono possedere una ben precisa composizione e devono rispondere ai requisiti di qualità, efficacia e sicurezza. A tal proposito, il I supplemento della farmacopea ufficiale XI ed⁽⁶⁾. contiene le *Norme di Buona preparazione dei Radiofarmaci per Medicina Nucleare*.

Tali norme diventano un presupposto imprescindibile per la realizzazione di un Sistema di Assicurazione di Qualità, che prevede la protezione dei pazienti da esposizione indebite e la realizzazione di composti costantemente conformi a delle specifiche, al fine di ottenere “la massima efficacia diagnostica e terapeutica possibile”.

Le monografie di interesse per i radiofarmaci sono: “Sostanze per uso farmaceutico (2034)” e “Preparazioni radiofarmaceutiche (0125)”. Quest’ultima è la più importante, in quanto contiene le caratteristiche generali, la sezione produzione del radionuclide, e i saggi previsti per svariate preparazioni radiofarmaceutiche.

1. Controlli di qualità dei radiofarmaci, per garantirne la somministrazione nell'uomo

Il Sistema di Assicurazione di Qualità prevede che le preparazioni farmaceutiche dovrebbero essere sottoposte a controllo di qualità, secondo le modalità previste dalla Farmacopea Ufficiale F.U⁽⁷⁾ e secondo le istruzioni del fabbricante.

Le proprietà che dovrebbero essere valutate, in modo particolare, sono: la purezza radionuclidica, la purezza chimica, la purezza radiochimica, l'attività specifica, il pH, la sterilità e l'apirogenicità.

La purezza radionuclidica è la percentuale di attività dovuta al radionuclide desiderato rispetto all'attività totale.

Le impurezze radionuclidiche possono essere caratterizzate da un tempo di dimezzamento diverso, più lungo o più breve, rispetto a quello di interesse. Bisogna considerare, pertanto, il tempo che intercorre tra la produzione del radionuclide e la sua somministrazione, durante il quale la percentuale di tali impurezze possono sia aumentare che diminuire, al fine di evitare la cosomministrazione di radionuclidi indesiderati, che comporterebbero una dose inutile al paziente. In realtà, la purezza non deve essere assoluta, ma la preparazione deve essere sufficientemente pura per l'uso a cui è destinata.

Un'altra proprietà è la purezza chimica che è la percentuale di sostanza nel campione, presente nella forma chimica richiesta, senza tener conto di qualsiasi sostituzione isotopica.

Tale parametro è molto importante in quanto, le impurezze chimiche se presenti possono competere con i meccanismi di trasporto e con il legame dei radiofarmaci a enzimi o recettori, e possono anche provocare reazioni avverse e effetti tossici al paziente. Il controllo consiste nell'identificazione, mediante "tests" colorimetrici o spettroscopici, della natura e della quantità di contaminanti non radioattivi eventualmente presenti nel composto finale.

L'attività specifica, invece, è la quantità di radiazione per unità massa di farmaco. Tale parametro può essere valutato mediante l'utilizzo dei rivelatori a flusso.

Nella Farmacopea vigente sono inoltre riportati i criteri, i saggi e i controlli che devono essere effettuati al fine di assicurare la sterilità e l'apirogenicità di tutte le preparazioni iniettabili.

Tali riferimenti li ritroviamo in diverse sezioni della Farmacopea Ufficiale, ma in particolare nella sezione "Preparazioni Radiofarmaceutiche", dove chiaramente si afferma che "le preparazioni radiofarmaceutiche destinate alla somministrazione parenterale devono essere preparate in condizioni tali da escludere ogni contaminazione batterica e da garantire la sterilità". In aggiunta viene espresso un secondo criterio: "la sterilità di un prodotto non può essere garantita solo dai saggi; essa deve essere assicurata dall'applicazione di un processo di produzione opportunamente convalidato". I processi di produzione dei radiofarmaci possono essere classificati in diversi gruppi, i cui estremi sono:

- ad alto rischio, dove si richiede la manipolazione e la ripartizione dei preparati in condizioni asettiche, cioè effettuate sotto cappa a flusso laminare.
- a basso rischio, nei casi in cui è possibile effettuare la sterilizzazione finale.

In quest'ultimo caso, la sterilizzazione finale può essere effettuata per composti temorestistenti in autoclave dedicata e convalidata; per composti termolabili, invece, si effettua una filtrazione sterilizzante, mediante l'utilizzo di filtri a membrana monouso, con diametro nominale inferiore o uguale a 0,22 micron.

Per quanto riguarda l'apirogenicità, ossia l'assenza di materiale che può causare febbre, tipicamente le endotossine batteriche, può essere verificata tramite i saggi previsti nelle monografie specifiche. I pirogeni, infatti, non possono essere rimossi né per semplice ebollizione né per filtrazione, e, sul prodotto finale, il saggio va effettuato comunque, anche se si utilizzano soluzioni acquose, reagenti e vetreria apirogena.

Un'altra proprietà che deve essere valutata per ogni sintesi è il pH che deve essere compreso nel range di accettabilità fisiologica cioè 4-8,5.

Il parametro più importante da controllare, prima di ogni somministrazione, è la purezza radiochimica definita come la percentuale di attività totale dovuta al radionuclide considerato, presente nella forma chimica specificata. Impurezze radiochimiche dannose possono generarsi in tutte le fasi della radiomarcatura di un composto, come pure da processi radiolitici originatisi dopo la marcatura dello stesso composto. Esse non contribuiscono all'informazione diagnostica o al beneficio terapeutico del radiofarmaco, piuttosto aumentano indebitamente la radioattività somministrata allo stesso paziente. Un esempio è dato dall'Ittrio-90, un radioisotopo terapeutico, che libero, cioè non chelato, si accumula nella matrice ossea causando mielotossicità e peggiorando le già precarie condizioni del paziente neoplastico.

La purezza radiochimica di un radiofarmaco è un parametro essenziale per la somministrazione dello stesso, specie se trattasi di un radiofarmaco terapeutico, dove il valore della purezza radiochimica deve essere rigorosamente maggiore del 95% a causa della pericolosità dei radioisotopi terapeutici impiegati che, liberi, potrebbero determinare danni irreparabili ad altri tessuti diversi da quelli bersaglio.

I fattori da tenere presenti prima di una somministrazione sono la clearance ematica e renale, sia del radiofarmaco che della sua impurezza, se quest'ultima viene eliminata più lentamente del radiofarmaco la purezza radiochimica diminuirà nel tempo, viceversa se la clearance è più rapida.

Esistono diversi metodi analitici per poter valutare tale proprietà e verranno analizzati più in dettaglio nei successivi capitoli.

CAPITOLO 2

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

2. Tecniche cromatografiche per il controllo della purezza radiochimica

Attualmente, la valutazione quantitativa della purezza radiochimica viene effettuata mediante l'ausilio delle tecniche cromatografiche, che sono diventate essenziali per ottenere degli accurati controlli di qualità.

La cromatografia, in generale, è una metodica analitica che permette la separazione delle differenti sostanze, presenti nello stesso campione.

Il campione, quindi, viene risolto nei suoi componenti, tramite una migrazione differenziale indotta da due sistemi di forze: la ritenzione su una fase stazionaria e il trascinamento di una fase mobile.

La fase stazionaria può essere costituita da un solido o da un liquido, depositati o introdotti in un colonna. La fase mobile, invece, può essere un gas o un liquido a bassa viscosità che viene o introdotto in colonna, oppure può salire o scendere per capillarità lungo uno strato di fase stazionaria.

I legami, che si possono instaurare, tra la sostanza da separare e le due fasi sono per lo più di tipo debole, come legami a idrogeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo indotto e legami di Van der Waals. In alcuni casi è possibile la formazione di composti di coordinazione, oppure si può verificare l'instaurarsi di meccanismi di scambio ionico, di interazioni steriche, e così via. In tutte queste interazioni, la polarità delle due fasi svolge di solito un ruolo determinante.

I principali fenomeni di interazione, con tale tecnica analitica, sono:

1) l'adsorbimento, che si verifica quando la fase stazionaria è un solido in polvere, che mostra sulla superficie dei suoi granuli dei siti attivi che possono stabilire dei legami deboli con le molecole della miscela da separare. Si parla, pertanto, di cromatografia di adsorbimento, più precisamente, se la fase mobile

è un gas, si ha la cromatografia gas-solido (GSC), se è un liquido, si ha la cromatografia liquido-solido (LSC).

2) la ripartizione, che prevede una fase stazionaria liquida che impregna un solido granulare inerte, in cui le sostanze da separare si solubilizzano. Durante l'eluizione, le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi, che devono essere fra loro immiscibili, secondo la diversa solubilità di ciascuna di esse. Questo meccanismo di ripartizione viene sfruttato sia nella cromatografia gas-liquido (GLC) sia in quella liquido-liquido (LLC).

3) lo scambio ionico, che si verifica quando la fase stazionaria è costituita da macromolecole con siti attivi ionizzati, i cui controioni possono essere scambiati con altri aventi carica dello stesso segno, quando eluiti con la fase mobile. Si parlerà di cromatografia a scambio ionico (IEC).

4) ad esclusione, che si ha se la fase stazionaria è un solido poroso o, più comunemente, un gel con pori. Le molecole dell'analita, presenti nella fase mobile, penetrano nei pori del gel e sono trattenute per un certo tempo, invece, le molecole troppo grandi vengono escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi molto brevi. Questo è il meccanismo su cui si basa la cromatografia ad esclusione (SEC).

Qualunque sia la tecnica adottata spesso uno o più meccanismi sono implicati nella separazione delle sostanze.

2.2 Cromatografia su strato sottile

Generalmente, in medicina nucleare per controllare la purezza radiochimica, viene utilizzata la cromatografia su strato sottile (TLC, Thin Layer Chromatography) o la ITLC (Instant Thin Layer Chromatography).

Nella TLC, la fase stazionaria è stratificata, come un film sottilissimo, su supporti di natura diversa come: la plastica, il vetro, i fogli di alluminio o la fibra di vetro, che possono essere tagliati dall'operatore a varie lunghezze. Nella ITLC, le lastre sono miniaturizzate in modo da ridurre i tempi di analisi. Questo concetto è molto importante in radioterapia, in quanto il

controllo della purezza radiochimica, prima della somministrazione, deve essere effettuato in modo triplicato, cioè l'analisi deve essere ripetuta per tre volte. Il supporto utilizzato nella ITLC, è in fibra di vetro, mentre la fase stazionaria può essere o gel di silice (ITLC-SG) o acido silicico (ITLC-SA).

Per effettuare una analisi ITLC e TLC, la fase mobile, deve essere immessa in un contenitore, munito di coperchio (fig.1) fino a circa un centimetro di livello, in tal modo si otterrà, dopo circa 5-10 min, la saturazione della camera. Dopo aver effettuato tale lavoro, l'operatore segnerà sulla lastrina, a circa 1.5 cm dal margine inferiore del supporto (fig.2), l'origine che è il luogo di semina, cioè il punto in cui viene depositato il campione, mediante l'utilizzo di una pipetta Pasteur. La lastrina viene prima lasciata asciugare e poi posta all'interno della camera cromatografica. La fase mobile salirà lungo la lastrina per adsorbimento e capillarità fino alla distanza desiderata.

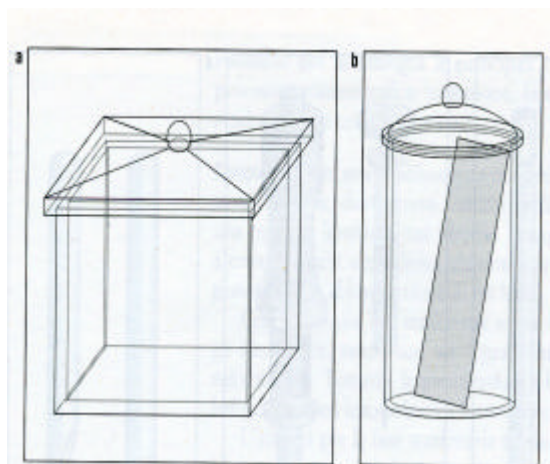


Fig.1. Camere cromatografiche munite di coperchio.

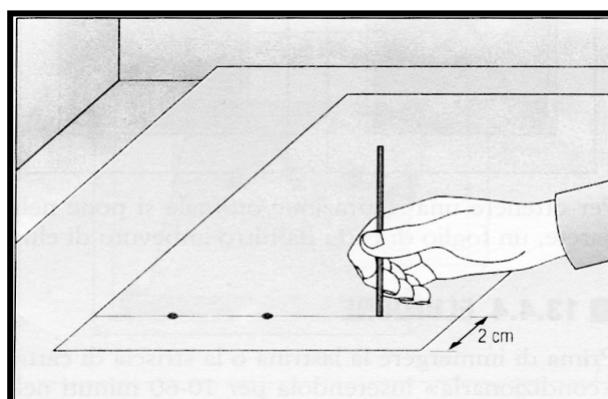
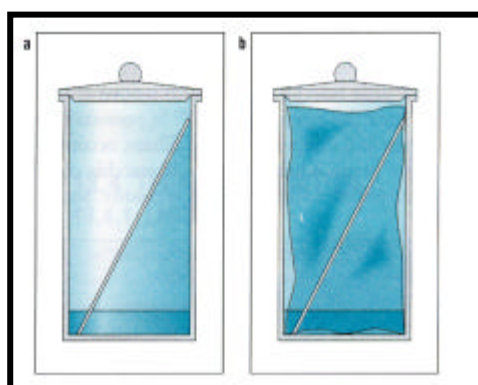


Fig.2. Impostazione dell'origine in un lastrina



**Fig.3. Sviluppo di una lastra ITLC
o TLC**

La distanza relativa che un composto percorre rispetto alla distanza del fronte del solvente viene definita come R_f (Relative Front)⁽⁸⁾, e questo valore è tipico di un determinato composto. Questo parametro si ricava dalla formula seguente:

$$R_f = F_c / F_s$$

dove:

F_c = distanza dall'origine al centro della macchia;

F_s = distanza dall'origine al fronte del solvente.

Se gli R_f delle sostanze sono molto simili è necessario che le macchie siano compatte per distinguerle l'una dall'altra.

La misura dell'attività dei composti separati sulla lastrina può essere effettuata mediante radiocromatografo, autoradiocromatografo o tramite il calibratore di dose. In quest'ultimo caso la lastrina viene frazionata in strisce di uguale lunghezza dove viene contata l'attività di ciascuna striscia. In ogni caso, la purezza radiochimica sarà data dal rapporto percentuale tra l'attività del composto desiderato, contraddistinto dal suo specifico R_f , e la somma delle attività dovute alle impurezze, anch'esse caratterizzate dai rispettivi R_f . Questa tecnica di separazione è sfruttata per il controllo della purezza radiochimica dei radiofarmaci terapeutici, in particolare la ITLC per l' ^{111}In e l' $^{90}\text{Y-Zevalin}^{\text{®}}$, mentre la TLC per l' $^{90}\text{Y-DOTA-TOC}$ e l' $^{90}\text{Y-DOTA-TATE}$.

2.3 Cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC)

L'HPLC è l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna, con tale tecnica è possibile effettuare la separazione di sostanze in matrici complesse, inoltre, se accoppiata a determinati rivelatori è possibile ottenere il riconoscimento delle sostanze analizzate.

Nell'HPLC, la forza che determina lo scorrimento dell'eluente nella colonna è la pressione, che è esercitata da una pompa in testa alla colonna, che forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase stazionaria. Il processo, pertanto, è più veloce e permette anche di ottenere una migliore risoluzione, infatti, il cromatogramma che si ottiene, con questo tipo di tecnica, mostra dei picchi relativi alle singole sostanze in miscela, nettamente separati.

Per ottenere tali risultati è determinante la scelta della fase stazionaria, in quanto questa deve ritenere selettivamente le diverse sostanze che si trovano nel campione, trattenendole in colonna in modo differenziato. Di norma, per conseguire una buona risoluzione cromatografica, la colonna deve possedere un'adeguata selettività verso le sostanze da separare, di modo che ogni

composto eluisca a un determinato tempo di ritenzione. E' pur vero che la separazione dipende dalla fase stazionaria, ma le prestazioni dipendono fortemente dalla fase mobile, pertanto, è importante decidere la coppia fase mobile- fase stazionaria, necessaria al successo di una separazione.

La ritenzione selettiva è una condizione necessaria ma da sola insufficiente, al fine di ottenere una buona risoluzione, infatti, è indispensabile che i picchi siano abbastanza stretti, per non sovrapporsi neanche in parte. La capacità di mantenere i picchi stretti in un determinato sistema fase stazionaria-fase mobile viene definita efficienza. In generale, la selettività e l'efficienza determinano il grado di risoluzione di un determinato sistema cromatografico.

Le fasi stazionarie utilizzate in HPLC , di norma, possono essere di due tipi:

- 1) rivestimenti con particelle di tipo pellicolare, con un diametro di 40/50 μm ; in particolare si possono riconoscere: una porzione interna "nucleo" di tipo non poroso e una strato di rivestimento esterno, di spessore di 1-3 μm , di materiale microporoso.
- 2) Rivestimenti con microparticelle porose con diametri medi che vanno da 3 a 10 μm .

Nella moderna HPLC⁽⁹⁾, le pressioni di pompaggio devono essere di diverse centinaia di atmosfere, per raggiungere velocità di flusso necessari a una buona separazione. L'equipaggiamento, pertanto, dell'attuale apparecchiatura per HPLC è notevolmente più costoso rispetto a quello della cromatografia classica. I più importanti componenti di uno strumento per HPLC sono mostrati in figura 4.

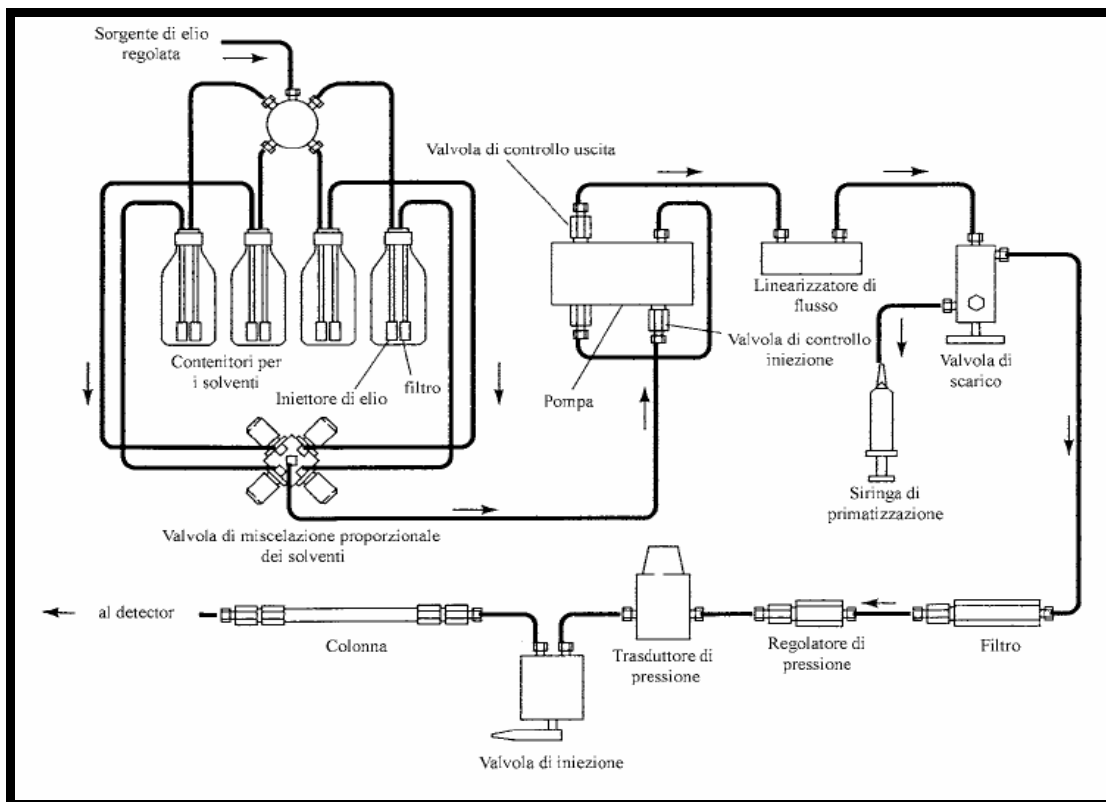


Fig.4. Schematizzazione di un tipico strumento per HPLC.

Dalla figura si evince che i solventi, che costituiscono la fase mobile, sono immessi in uno o più contenitori in vetro o acciaio, generalmente bottiglie da 500 ml.

In genere, nell'HPLC sono presenti dei meccanismi per degasare i solventi e le soluzioni eluenti⁽¹⁰⁾. La preparazione della soluzione e la sostituzione del contenitore di un solvente, infatti, producono bolle e scorie, che se entrassero in colonna potrebbero causare uno slargamento delle bande con una diminuzione dell'efficienza del sistema di pompaggio. La macchina è quindi provvista di un sistema di degasaggio, cioè una pompa da vuoto, un sistema di distillazione o un sistema per il riscaldamento e l'agitazione della soluzione.

Per quanto riguarda le pompe da vuoto possono essere impiegate, generalmente, due modelli di pompe meccaniche: del tipo a siringa guidata a vite, oppure una pompa alternativa (o a pistone), che devono possedere alcune proprietà molto restrittive, queste includono:

- 1) la generazione di pressioni maggiori di 6000 psi , senza produrre una pressione pulsatile in uscita;
- 2) la capacità di produrre una velocità di flusso variabile, in un range di 0.1-10 ml/min;
- 3) la riproducibilità del flusso, che non deve variare più dello 0.5%;
- 4) la Resistenza alla corrosione verso una grande varietà di solventi.

Le colonne per HPLC sono di solito costruite in acciaio, ma esistono anche in vetro ricoperto di metallo, impiegate soprattutto quando si lavora a pressioni inferiori a 600 psi.

La lunghezza delle colonne varia da 10 a 30 cm e il diametro interno da 4 a 10 mm.

Recentemente sono state introdotte sul mercato microcolonne lunghe dai 3 ai 6.5 cm e aventi un diametro interno variabile da 1 a 4.6 mm.

Spesso, per aumentare la vita di una colonna analitica, in testa ad essa è immessa una precolonna, che rimuove dai solventi particelle indissolte e contaminanti. La composizione di questa precolonna deve essere simile a quella della colonna analitica, la grandezza delle particelle, invece, deve essere maggiore per minimizzare la caduta di pressione agli estremi.

I migliori cromatogrammi si ottengono mantenendo la temperatura della colonna costante e vicina alla temperatura ambiente. I moderni strumenti sono equipaggiati con riscaldatori di colonne che possono mantenere una temperatura in un "range" variabile da qualche decina di gradi a 150 °C.

Per quanto riguarda i rivelatori, questi hanno il compito di fornire indicazioni sul composto in uscita dalla colonna. In campo radiologico sono utilizzati spettrometri UV e radioisotopici. L'HPLC è una tecnica di separazione di largo impiego in radiofarmacia, in quanto applicabile sia a radiofarmaci diagnostici che terapeutici.

CAPITOLO 3

ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA

3. UTILIZZO DELLA SPE PER LA PUREZZA RADIOCHIMICA

La purezza radiochimica di alcuni radiofarmaci, in particolare quelli peptidici utilizzati in terapia, viene valutata con l'utilizzo dell'estrazione in fase solida SPE.

La SPE è un processo di tipo fisico che avviene tra una fase solida e una fase liquida. La fase solida deve presentare una affinità maggiore per il composto da isolare rispetto al solvente in cui esso è disciolto. La fase solida che funge da adsorbente viene impaccata in una cartuccia. Un campione di radiofarmaco viene fatto passare attraverso questa cartuccia in maniera tale che i diversi analiti, in esso presenti, possano più o meno interagire con la superficie adsorbente, venendo o no trattenuti nel suo interno, in relazione alla loro capacità di stabilire interazioni.

La ritenzione non è altro che il processo che avviene quando la fase solida riesce ad intrappolare alcuni dei composti presenti nel campione. Tale processo varia in funzione del tipo di adsorbente o del solvente adoperato.

L'effetto finale è la purificazione e la concentrazione delle sostanze isolate dal materiale adsorbente, grazie ad interazioni specifiche tra i gruppi funzionali dei composti e il substrato della fase solida.

Gli adsorbenti silicici sono tra gli adsorbenti più utilizzati, questi sono prodotti mediante reazione tra organosilani e silicati attivi (legame silil-etero). Tali composti sono stabili in un "range" di pH tra 2 e 7.5, infatti, ad un valore di pH superiore a 7.5, questi tendono a dissolversi in soluzione acquosa; mentre al di sotto di un pH = 2, il legame silil-etero diventa instabile e i gruppi funzionali modificano le loro caratteristiche di specificità. Di norma sono materiali rigidi, che non rigonfiano a contatto con i solventi, come avviene invece per le resine di polistirene.

La fase adsorbente è costituita da particelle di dimensioni variabili tra i 15 e i 100 μm , di forma irregolare o sferica, necessarie per ottenere un flusso rapido del solvente in condizioni di vuoto minimo. La porosità degli adsorbenti è di circa 60 Angstroms, adeguata a composti con peso molecolare attorno a 15.000 Da.

Le molecole che presentano dimensioni maggiori non vengono trattenute, in quanto escluse dai pori. Le proprietà di ritenzione degli adsorbenti silicei dipendono: dai gruppi funzionali legati al substrato di silice, dalla polarità del substrato e dai silanoli rimasti liberi sulla sua superficie. Il substrato e l'analita possono dare interazioni secondarie in funzione della loro polarità, ciò può determinare o meno la formazione di legami ad idrogeno tra i silanoli e i gruppi amminici o i gruppi -OH degli analiti, in presenza di un solvente non-polare.

Le interazioni non polari più importanti che possono intercorrere tra fase adsorbente e analita, sono le forze di Van der Waals (interazioni tra i gruppi C-H dell'analita e dell'adsorbente).

L'adsorbente più usato per le interazioni non-polari è il **C18** (Octadecil-silano). Quest'ultimo non è selettivo e di conseguenza permette di bloccare molti analiti non polari. Le interazioni non-polari e la ritenzione sono facilitate in presenza di solventi molto polari (come l'acqua). In presenza di questo tipo di solventi, anche molecole che presentano gruppi funzionali polari, ma che hanno una struttura non polare, possono interagire con l'adsorbente non-polare. I Solventi non-polari pertanto non vengono utilizzati inizialmente, in quanto interferiscono con i meccanismi di ritenzione. L'eluizione degli analiti isolati deve avvenire tramite un solvente non-polare, in grado di rompere le interazioni non-polari tra analita ed adsorbente.

L'Eluizione, in SPE, quindi non è altro che il processo di rimozione delle sostanze isolate dall'adsorbente, tramite il passaggio nella cartuccia di un opportuno solvente⁽¹¹⁾. Maggiore è l'interazione tra adsorbente e analita, minore è il rischio che questo venga eliminato dalla cartuccia durante le fasi di lavaggio, utilizzate per eliminare molecole interferenti coadsorbite.

L'unità di misura per quantificare sia la ritenzione che l'eluizione è la quantità di solvente, essenziale per colmare gli interstizi tra particelle di

adsorbente e tutti i pori presenti nella fase stazionaria della cartuccia di estrazione, definito “bed volume”.

La ritenzione è valutata “sufficientemente forte” quando possono transitare 20 “bed volumes” di solvente di lavaggio, senza determinare l’eluizione degli analiti isolati. Una eluizione ottimale richiede non più di 5 “bed volumes” di solvente di estrazione.

Un parametro che si deve valutare quando si effettua una SPE è la capacità dell’adsorbente, vale a dire la quantità di analita trattenuta da una specifica quantità di adsorbente in condizioni ottimali.

Questa proprietà è diversa quando si passa da un adsorbente ad un altro. Tranne che per gli adsorbenti a scambio ionico, che hanno capacità di 0,5-1,5 meq/g, gli altri adsorbenti mostrano una capacità variabile tra l’1 e il 5% della massa.

Un’altra caratteristica della fase solida è la selettività, intesa come la capacità dell’adsorbente di riconoscere le sostanze da isolare e gli interferenti da allontanare. Questa caratteristica dipende da molti fattori come la struttura chimica dell’analita da isolare, le proprietà dell’adsorbente e la composizione della matrice del campione. La selettività è massima, quando l’adsorbente interagisce solo con i gruppi funzionali di un determinato analita, e non con gli altri componenti della matrice del campione.

La solvatazione dell’adsorbente, fig 5, è un’operazione necessaria prima che questo interagisca con le sostanze da isolare, presenti nel campione di radiofarmaco, infatti, l’adsorbente viene bagnato mediante il passaggio di diversi volumi di un solvente, ad esempio il metanolo, questa è detta **fase di condizionamento**. Il solvente inizialmente utilizzato viene a sua volta allontanato (anche se non completamente), mediante passaggio di un secondo solvente, che prepara l’adsorbente al passaggio del campione, questa fase è invece denominata **fase di lavaggio della cartuccia**. Una volta avvenuta la solvatazione, l’adsorbente non deve essere lasciato essiccare, pertanto il campione viene introdotto rapidamente nella cartuccia ed inseguito eluito, “**fase di eluizione**”, generalmente con metanolo e tampone acetato a pH 5,5⁽¹¹⁾ (tutte le fasi citate sono schematizzate in fig.6).

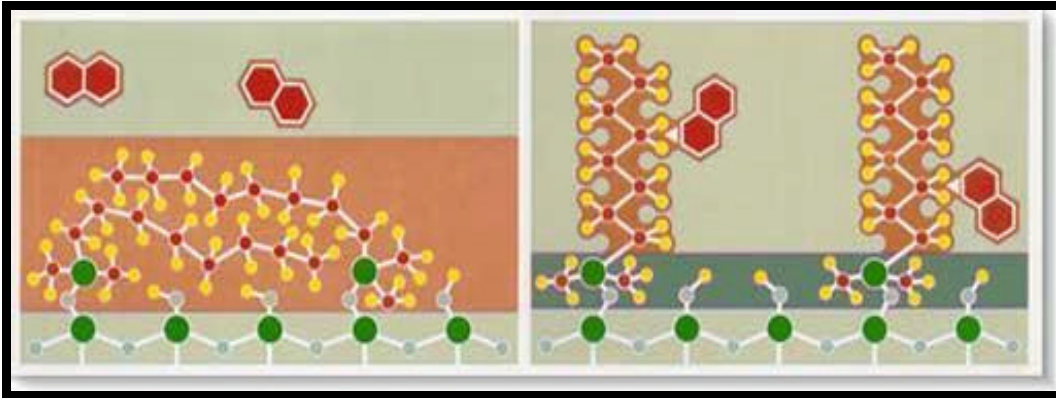


Fig. 5. La solvatazione dell'adsorbente rende possibile il riconoscimento degli analiti

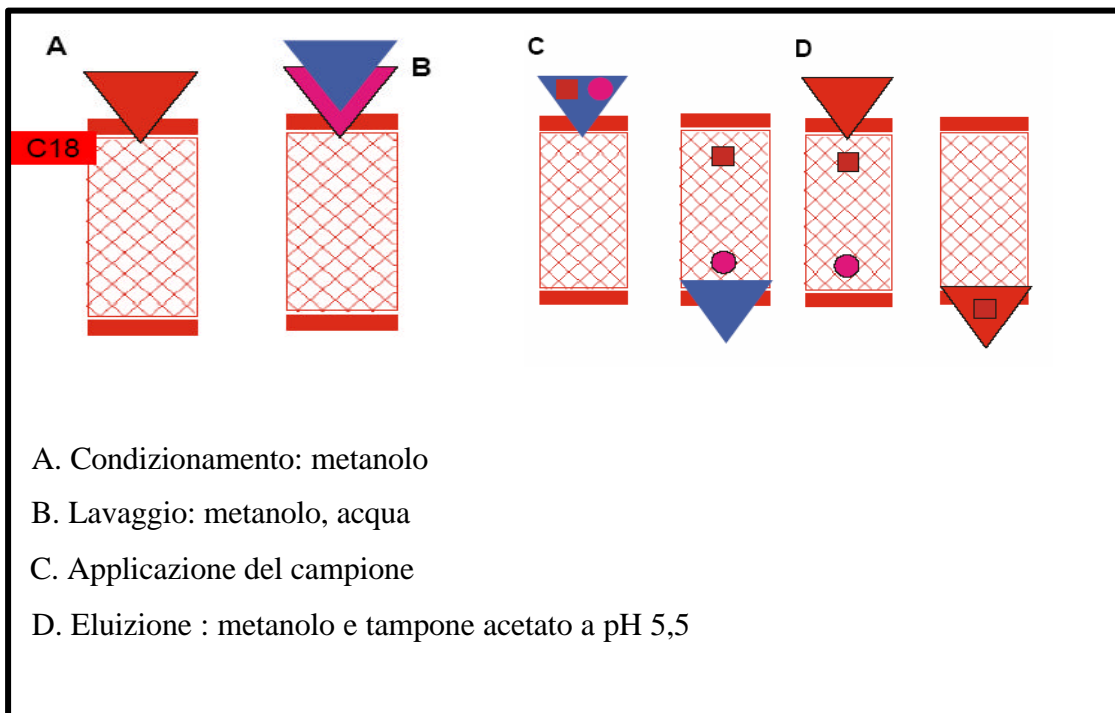


Fig. 6. Schema di tutte le fasi SPE

CAPITOLO 4

RIVELATORI DI RADIOATTIVITA'

4. INTRODUZIONE

I rivelatori di radioattività, denominati con il termine inglese “detector”, sono capaci di registrare un segnale dovuto alle modificazioni, che un mezzo subisce quando è attraversato sia da particelle nucleari sia dalle radiazioni elettromagnetiche ad alta energia, cioè raggi X e fotoni γ . Il segnale, pertanto, è determinato da una eccitazione e conseguente ionizzazione del materiale di cui è costituito il detector, che può essere diretta, dovuta alle particelle nucleari, o indiretta, indotta dai raggi X e dai fotoni γ ⁽¹²⁾.

La misura della radioattività non è altro che il numero di segnali o conteggi registrati nell'unità di tempo cioè Conte per Minuto (CMP), in quanto il tempo di conteggio (T_c) è espresso in minuti. Il calcolo, invece, della disintegrazione per minuto DMP è effettuato dividendo il CMP per l'efficienza. Quest'ultimo parametro per un detector è riportato in forma percentuale ed esprime la capacità dello stesso di produrre un segnale in uscita per ogni quanto o particella che interagisce con il suo volume attivo. Più precisamente si parla di efficienza intrinseca ed assoluta. Nel primo caso si riferisce al numero di segnali registrati rispetto al numero di particelle o quanti incidenti sul detector; mentre nel secondo caso si parlerà di segnali registrati rispetto al numero di quanti o particelle emessi dalla sorgente, pertanto questo parametro dipende non solo dalle proprietà del detector, ma anche dalla geometria della conta.

Un altro importante aspetto da valutare in un detector è la sensibilità, cioè la capacità di rilevare un segnale molto basso nonostante l'attività di fondo. Questo concetto è legato anche alla attività minima rivelabile, cioè il limite di attività misurabile, infatti tra sensibilità e limite di rilevabilità vi è un'inversa proporzionalità, cioè all'aumentare della sensibilità diminuisce l'attività minima rivelabile. Tutti i sistemi di rivelazione dell'attività sono caratterizzati da un peculiare tempo morto, cioè il tempo che separa due eventi. Questo

tempo è necessario per raccogliere due eventi successivi come due segnali separati.

In spettroscopia, in genere, il radiodetector riporta la distribuzione degli eventi come energia della radiazione incidente, pertanto la risoluzione di tali detector è la loro capacità di distinguere due picchi di energia simili.

4.1 Rivelatori a flusso per HPLC

I rivelatori a flusso, “Flows scintillation analyzer”, misurano l’attività in movimento lungo un tubo, in particolare rilevano i picchi radioattivi dopo separazione cromatografica tramite HPLC e GC (radiocromatografia a flusso).

Solitamente le misure sono effettuate arrotolando una porzione del tubo, dove vi passa l’attività, che viene poggiato su un detector, schermato ai lati per ridurre il background. Nel caso del Radiomatic 150TR (PerkinElmer), vi è un sistema tecnologico denominato “Time-Resolved Liquid Scintillation Counting (TR-LSC)”, che riduce il rumore di fondo molto più del 65% con un incremento significativo della sensibilità, inoltre, questo sistema permette di migliorare la rivelazione dell’attività minima misurabile offrendo una buona risoluzione e degli accurati risultati. Oltre a questo sistema vi è un rivelatore a Luminescenza che permette di correggere il segnale eliminando le interferenze dovute alla chemiluminescenza.

In altri sistemi come nel “Flow-Count radio- HPLC (BIOSCAN)”, la riduzione del rumore di fondo viene effettuata modificando la finestra dell’energia variabile, invece la sensibilità è ottimizzata adottando celle a flusso con volumi differenti. Molti di questi detector sono dotati di sistemi di integrazioni che permettono di correggere i dati ottenuti per il tempo di decadimento.

L’accuratezza dei cromatogrammi con il conteggio a flusso, che acquisisce i conteggi ad intervalli regolari di tempo, è notevole, infatti, si può osservare il profilo in uscita dalla colonna. Il conteggio a flusso, inoltre, consente una più rapida velocità d’analisi con la possibilità di verificare i risultati ottenuti in tempo reale. Per quanto riguarda le celle di rivelazione a flusso sono

generalmente in Teflon, disponibili in vari volumi e utili per molti tipi di applicazioni. Bisogna tenere a mente, che le celle sono situate tra due finestre di materiale scintillante e possono essere connesse o a un fotomoltiplicatore o a un fotodiode a seconda il tipo di radioisotopo considerato.

Quando si effettua una radiocromatografia bisogna innanzitutto stabilire il tempo di permanenza del campione all'interno della cella, questo è definito come tempo di residenza T_r che dipende da due parametri, il flusso e il volume della cella, secondo la formula seguente:

$$T_r = \text{volume della cella} / \text{flusso}$$

$$CMP = \text{conte osservate} / T_r$$

Dall'ultima equazione pare evidente che diminuendo il flusso si incrementa la sensibilità, ma ciò determina un allungamento del tempo di analisi, d'altro canto intervenire aumentando il volume della cella comporterebbe una perdita della risoluzione cromatografia ⁽¹²⁾.

In conclusione si preferisce adottare un compromesso tra ottima sensibilità e risoluzione. Un rivelatore a flusso connesso a un sistema HPLC deve fornire un accurato valore dell'attività specifica del radiofarmaco. Quest'ultima viene calcolata andando a misurare l'area del picco corrispondente al composto desiderato, secondo la seguente formula:

$$CPM/mCi = \text{Area del picco corretta per il tempo di decadimento} \times V(\text{volume soluzione}) / A(\text{attività della soluzione corretta per il tempo di iniezione}) \times V(\text{iniettato}) \times \text{purezza} (\%)$$

L'attività così calcolata viene divisa per le nmoli misurate in modo da ottenere l'attività specifica del radiofarmaco considerato.

4.2 Rivelatori per TLC, ITLC

La misura dell'attività, dopo la separazione cromatografica TLC, ITLC, può essere effettuata con tre strumentazioni diverse:

- 1) Radiocromatografo
- 2) Autoradiocromatografo
- 3) Calibratore di dose.

Tutti e tre i sistemi sono molto efficienti, ma i tempi di analisi e l'esposizione alle radiazioni durante tutta la procedura sono ben diverse, infatti, l'autoradiocromatografo offre due vantaggi importanti rispetto agli altri due sistemi, il primo è la rapidità di esecuzione dell'analisi, in quanto è possibile effettuare con un'unica lastrina l'analisi triplicata, l'altra caratteristica è la diminuita esposizione dell'operatore alla radioattività.

Al fine di comprendere le differenze tra i diversi strumenti di rivelazione verranno qui di seguito descritte le principali caratteristiche tecniche dei singoli rivelatori.

4.2 a RADIOCROMATOGRFO

Il radiocromatografo è un rivelatore che effettua una scansione della lastra cromatografica, la sua risoluzione dipende comunque sia dalla lunghezza della TLC o ITLC, sia dalla vicinanza dei picchi da analizzare che dalla velocità di scansione. In commercio possiamo ritrovare una serie di radiocromatografi, come il Bioscan AR 2000 (fig 7) e il MINI-SCAN TLC, sempre della Bioscan (fig.8).

Il primo strumento è dotato di una plancia dove vengono depositate le lastre TLC, quest'ultime vengono attraversate per tutta la loro lunghezza da un detector a braccio, all'interno del quale abbiamo un contatore proporzionale, cioè una camera contenente gas inerte, connesso a più anodi a forma di filo. Il gas a contatto con le particelle nucleari o quanti viene ionizzato e gli ioni vengono raccolti dall'anodo e trasformati in segnale elettrico.

I contatori proporzionali sono utili per conoscere l'attività di numerosi radioisotopi, inoltre, in pochi minuti è possibile calcolare la purezza radiochimica, soprattutto per gli isotopi a breve tempo di decadimento. Il sistema di rivelazione è connesso a un sistema PC dedicato, dove è possibile visualizzare sia le immagini della lastra in 2D che il cromatogramma. Il software dedicato è in grado di identificare i picchi e automaticamente fornisce l' R_f e l'attività corretta di ciascun picco, cioè viene sottratto il rumore di fondo, grazie alla presenza di innovativi sistemi di integrazione.

La plancia ed il braccio di rivelazione dopo l'analisi non risultano contaminati, inoltre è possibile archiviare le informazioni ottenute come file ASCII per poterle analizzare anche con un altro PC.



Fig.7: Bioscan AR 2000

Il rivelatore della Bioscan MINI-SCAN TLC, invece, utilizza dei detector a scintillazione intercambiabili che vengono utilizzati per misurare l'attività di diversi radioisotopi. Gli scintillatori a NaI collegati a un tubo fotomoltiplicatore (PMT) sono impiegati, per esempio, per la conta di tutti i gamma emettitori; mentre gli scintillatori in plastica con PMT sono utilizzati per la conta del ^{14}C e di tutte le particelle beta e alfa ad alta energia. In taluni casi è possibile inserire un contatore proporzionale, elaborato appositamente per questo strumento, per aumentare la sensibilità al conteggio del trizio.

Il rivelatore anche in questo caso è connesso a un sistema PC dedicato e permette una elaborazione dei dati ottenuti simili al precedente.



Fig.8: MINI-SCAN TLC della Bioscan

4.2 b Autoradiocromatografo

L'autoradiogrammatografo più innovativo in commercio è il Cyclone Plus (PerkinElmer), che permette l'analisi in triplicato del campione, per la determinazione della purezza radiochimica. Questo strumento misura l'attività di diversi radioisotopi in maniera indiretta. Un particolare schermo al fosforo, infatti, viene esposto alla lastrina ITLC, o TLC, o a molti altri tipi di supporti dove è avvenuta la separazione degli analiti presenti nel campione, in seguito questo schermo viene scansionato dallo strumento, con un laser focalizzato a meno di 50 μm .

Gli schermi al fosforo sono quattro, per migliorare la "performance" dello strumento ad ogni tipo di applicazione, inoltre, sono disponibili a tre diverse dimensioni: small (12,5cm X 19,5cm), medium (12,5cm X 25,5cm) e long (2,5cm X 43cm) per le diverse applicazioni. Lo schermo al fosforo, utilizzato per radiofarmaci, è costituito in particolare da un cristallo BaFBr:Eu^{2+} , che quando viene esposto al campione radioattivo intrappola la sua energia, passando ad uno stato energetico intermedio. Dopo esposizione al campione, lo schermo viene agganciato ad un carosello e successivamente riposto all'interno dell'apparecchiatura. Il Cyclone effettua una scansione dello schermo in maniera elicoidale, punto per punto, tramite un raggio laser che

rilascia la sua energia allo schermo, pertanto, si ha l'eccitazione del cristallo BaFBr:Eu²⁺*. Lo stato eccitato è uno stato instabile, infatti, il cristallo ritorna al suo stato fondamentale (fig.9) emettendo energia sotto forma di luce blu.

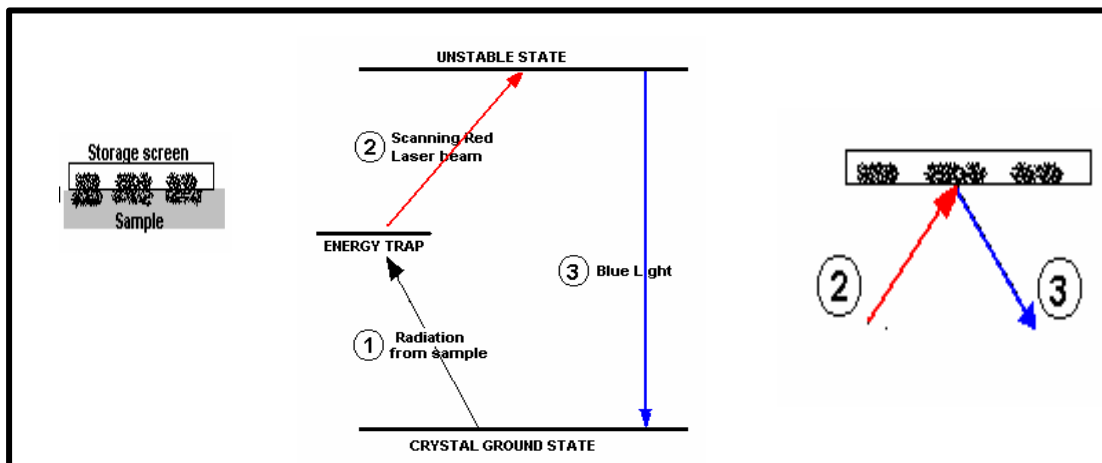


Fig.9. Schema di funzionamento dello schermo al fosforo.

La luce emessa dallo schermo (fig.10) è raccolta da un focalizzatore ottico conico, dotato di un'elevata sensibilità verso questo tipo di schermo. Il segnale viene trasmesso a un tubo fotomoltiplicatore, che risulta molto preciso nel misurare anche le basse attività catturate. Il segnale viene convertito in DLU (digital light units) e ci fornisce, tramite convertitore analogico-digitale- 16 bit, una precisa quantizzazione dell'immagine.

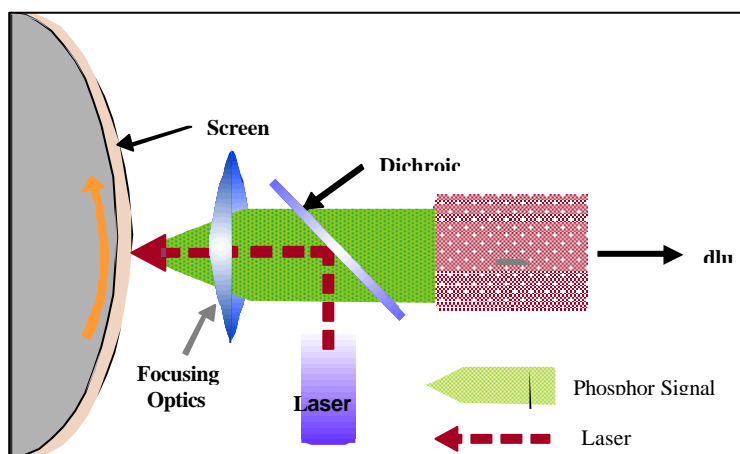


Fig.10: Sistema di rivelazione del Ciclone

Il miglioramento del rapporto segnale rumore è dovuto all'equipaggiamento dello strumento, infatti, vi è un processore del segnale digitale ultrarapido, che determina un miglioramento della risoluzione rispetto al 16 bit del convertitore.

Lo strumento è collegato a un sistema PC ed è dotato del software OptiQuant, fondamentale per l'acquisizione dell'immagine, per l'analisi e per l'archiviazione della stessa. Tutte le scansioni sono completate in un tempo tra i 3 e i 10 min, in relazione a due parametri: la risoluzione impostata e l'area da scansionare.

L'immagine ottenuta viene analizzata realizzando, generalmente, una griglia dove è possibile isolare la regione a maggiore densità ottica da quelle a minore densità, mediante dei sistemi chiamati "Lanes analysis Templates", che ci forniscono la quantizzazione in corsie, delle bande o dei punti di interesse, dalla sola analisi delle regioni a 2-D o dall'integrazione dell'area dei picchi del rispettivo cromatogramma.

Questo strumento è dotato, inoltre, di un sistema per la sottrazione specifica del rumore di fondo, che varia da analisi ad analisi. Quest'ultime vengono archiviate come file immagine e quindi è possibile renderle disponibili per ulteriori controlli, pubblicazioni e presentazioni.

4.3 Calibratore di dosi

Il calibratore di dose è lo strumento base in medicina nucleare, indispensabile per misurare la radioattività di radioisotopi e di dosi di radiofarmaci. E' facile e veloce da usare. Poco sicuro nella determinazione della purezza radiochimica di un radiofarmaco a causa della sua scarsa sensibilità nel registrare fedelmente le piccole radioattività coinvolte nel controllo di qualità di un radiofarmaco. Tuttavia, calibratori di dosi più recenti risultano più sensibili.

In generale, i calibratori di attività presentano una camera a ionizzazione a "pozzetto", all'interno della quale vi è un gas inerte, solitamente argon, la cui funzione è quella di ottimizzare l'efficienza di rivelazione dello strumento. Quest'ultimo è equipaggiato di un display, che mostra il valore di attività, ed è

connesso ad un sistema di elaborazione, che consente di convertire i conteggi, registrati all'interno della camera di ionizzazione, in valori di attività in funzione del radionuclide utilizzato.

I sistemi odierni, a differenza dei più tradizionali, offrono la possibilità di selezionare dal menù principale il fattore di calibrazione, in relazione al tipo di radioisotopo da sottoporre a misura.

Gli strumenti moderni, come ad esempio il VD-404 (Veenstra), sono dotati, inoltre, di funzioni avanzate che permettono sia la sottrazione del fondo, sia la possibilità di aggiustare lo zero.

Il calibratore di attività è sottoposto a controlli di qualità obbligatori, regolati dal D.Lgs 230/95, al fine di garantire sia il suo corretto funzionamento sia la sua affidabilità.

Uno di questi controlli di qualità è la taratura dello strumento, che si effettua per determinare di quanto la lettura, registrata dal calibratore di attività, si discosta dal valore di attività della sorgente di taratura.

Una volta calcolato il valore di correzione questo viene applicato a tutte le misure.

Altri controlli effettuati sono la ripetibilità della misura a lungo e a breve termine e il controllo sulla linearità della risposta. Il primo consiste nel misurare l'attività di una sorgente, ad attività nota e a lungo tempo di dimezzamento, e verificare che non differisca dal valore atteso di oltre il 5%.

La linearità della risposta, invece, non è altro che "la costanza del rapporto tra la risposta fornita dal calibratore di dose ed il valore dell'attività sottoposta a misura"⁽¹³⁾.

Il calcolo della purezza radiochimica delle lastre TLC o ITLC, dopo aver effettuato gli opportuni controlli strumentali, viene effettuato eseguendo le seguenti operazioni:

- 1) si fraziona la lastrina in striscette di uguale dimensione,
- 2) si misura l'attività di ciascuna di esse, tenendo in considerazione i fattori di correzione visti precedentemente;
- 3) si determina l'attività del radiofarmaco desiderato, conosciuto il suo Rf

4) si determina l'attività totale, cioè la somma delle attività delle singole striscette.

Il rapporto percentuale tra i valori calcolati nel punto 3 e nel punto 4 mi dà la purezza radiochimica.

Conclusioni

Con l'incalzante esigenza di nuovi radiofarmaci, sia in diagnostica che in terapia, nasce la necessità di effettuare dei controlli di qualità specifici, al fine di garantire la somministrazione nell'uomo, minimizzandone i rischi. D'altro canto, la tecnologia strumentale fa notevoli progressi, offrendo sul mercato una strumentazione sempre più avanzata, tale da permettere dei controlli sempre più precisi. Bisogna sempre tenere a mente che i radiofarmaci devono rispettare non solo tutti i requisiti di un farmaco tradizionale, ma devono anche sottostare alle leggi di radioprotezione vigenti.

Attualmente, infatti, con lo sviluppo dei radiofarmaci sta nascendo, e prende sempre più consistenza, la figura del radiofarmacista, cioè un laureato in Farmacia o in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, che in possesso di uno specifico master rappresenti il personale qualificato per effettuare sia la sintesi che il controllo dei radiofarmaci.

Bibliografia

¹ Monasterio G, Donato L. I radioisotopi nell'indagine medica. Minerva Medica, 1960

² Murray IPC, Ell PJ. Nuclear Medicine in clinical diagnosis and treatment. Churchill Livingstone, 1994

³ Direttiva 89/343/CEE del Consiglio del 3 maggio 1989 che estende il campo di applicazione delle direttive 65/65/CEE e 75/319/CEE e che prevede norme aggiuntive per i radiofarmaci. G.U. delle Comun. Eur. n. L. 142 del 25/5/1989

⁴ D.Lgs n. 178 del 29/5/1991. Recepimento delle direttive della Comunità economica europea in materia di specialità medicinali. G.U. n. 139 del 15/6/1991

⁵ D.Lgs n. 44 del 18/2/1997. Attuazione direttiva 93/39 CEE che modifica le direttive 65/65 CEE, 75/318 CEE e 75/319 CEE relative ai medicinali. G.U. n. 54 del 6/3/1997, Suppl. Ord. n. 49

⁶ I Supplemento alla Farmacopea Ufficiale XI ed. Ministero della Salute, Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della Farmacopea Ufficiale, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 2005

⁷ Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XI ed, Ministero della Salute, Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della Farmacopea Ufficiale, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 2002

⁸ *Analisi strumentale, Metodi Cromatografici vol.II* Cap 13 “Cromatografia su strato sottile”; Cozzi-Protti.

⁹ *Fundamentals of Analytical Chemistry*; 7th Ed., Skoog A., West D.M., Holler F.J., Saunders College Publishing, 1996.

¹⁰ *Chromatographic separations*; Sewell P., Clarke B., New York: Wiley, 1988.

¹¹ *Sorbent Extraction Technology* di D.D.Blevins, M.F.Burke, e altri; edited by N.Simpson e K.C.Van Horne – Varian.

¹² *Concetti Generali sulla Produzione di Radiofarmaci Emettitori di Positroni*; Claudio Pascali, Anna Bogni, Flavio Crippa ed Emilio Bombardieri, pag: 9-10.

¹³ Progetto e Realizzazione di un Protocollo Sperimentale per I Controlli di Qualità sul ^{99m}Tc utilizzato come Traccante in Radiofarmacia presso il Servizio di Medicina Nucleare di Villa Sofia di Palermo; tesi sperimentale di laurea in Chimica e Tecnologia farmaceutiche, Facoltà di Farmacia-Università degli Studi di Palermo, del Dott. L.Tranchina; Relatori: Ch.mo Prof. A. Bartolotta e il Dott. R. Di Liberto; anno accademico 1998/1999.

