

# Sep-Pak –menetelmä radiolääkkeiden laadunvalvonnassa


Radiofarmasian koulutuspäivä 17.11.2006

Eeva-Liisa Paattiniemi

# Sep-Pak -pylväät

- n Pylväitä, joihin on pakattu nestekromatografiassa tarvittava kiinteä faasi
  - .. Ensimmäinen: SEP-Pak Cartridge, Waters
- n Kiinteäfaasiuuttoa (Solid Phase Extraction, SPE) käytetään laajasti näytteiden esikäsittelyyn ennen muita kromatografisia erottelutekniikoita
- n Kiinteitä faaseja on lukuisia erilaisia - yhdisteiden erottelu pylväissä perustuu ioninvaihtoon, adsorptioon (eri yhdisteillä erilainen adsorptioaffiniteetti kiinteään aineeseen), partitioon (eri yhdisteillä on erilainen liukoisuus liikkuvaan ja kiinteään faasiin) tai näiden yhdistelmään





# Sep-Pak –menetelmät radiolääkkeiden laadunvalvonnassa

- n Käytetään pääasiassa käänteisfaasi-materiaalilla täytettyjä Sep-Pak –pylväitä
- n **Käänteisfaasikromatografia:**
  - .. Yhdisteiden erottuminen perustuu näytekomponenttien liukoisuuseroihin liikkuvassa ja kiinteässä faasissa (partitioon)
  - .. Retentiojärjestys on käänteinen perinteisellä silikageelillä saatavaan



# Sep-Pak –menetelmät radiolääkkeiden laadunvalvonnassa

## n Käänteisfaasimateriaali:

- Kemiallisesti sidottu faasi, jossa silikan hydroksyyliiryhmistä suuri osa on korvattu suoraketjuisilla hiilivedyillä (**C18**, C8, C2 ) tai hiilivetyketjuilla, joissa on poolisia substituutioryhmiä (fenyyli)
- Enemmän tai vähemmän hydrofobinen: yhdisteet pidättyvät pylväässä sitä paremmin, mitä vähemmän vesiliuokoisia ne ovat

## n Liikkuva faasi

- Vesi on heikoin liuotin
- Yleisesti käytetään metanoli, etanoli, asetonitriili /vesi-seoksia



# C18-pylväsmateriaali


n -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**C18**H<sub>37</sub>

n Erittäin hydrofobinen

· Adsorboi jopa heikosti hydrofobisia yhdisteitä vesipohjaisista liuoksista

n Eluoinnissa käytetään polaarisia liuottimia, esim. etanolia

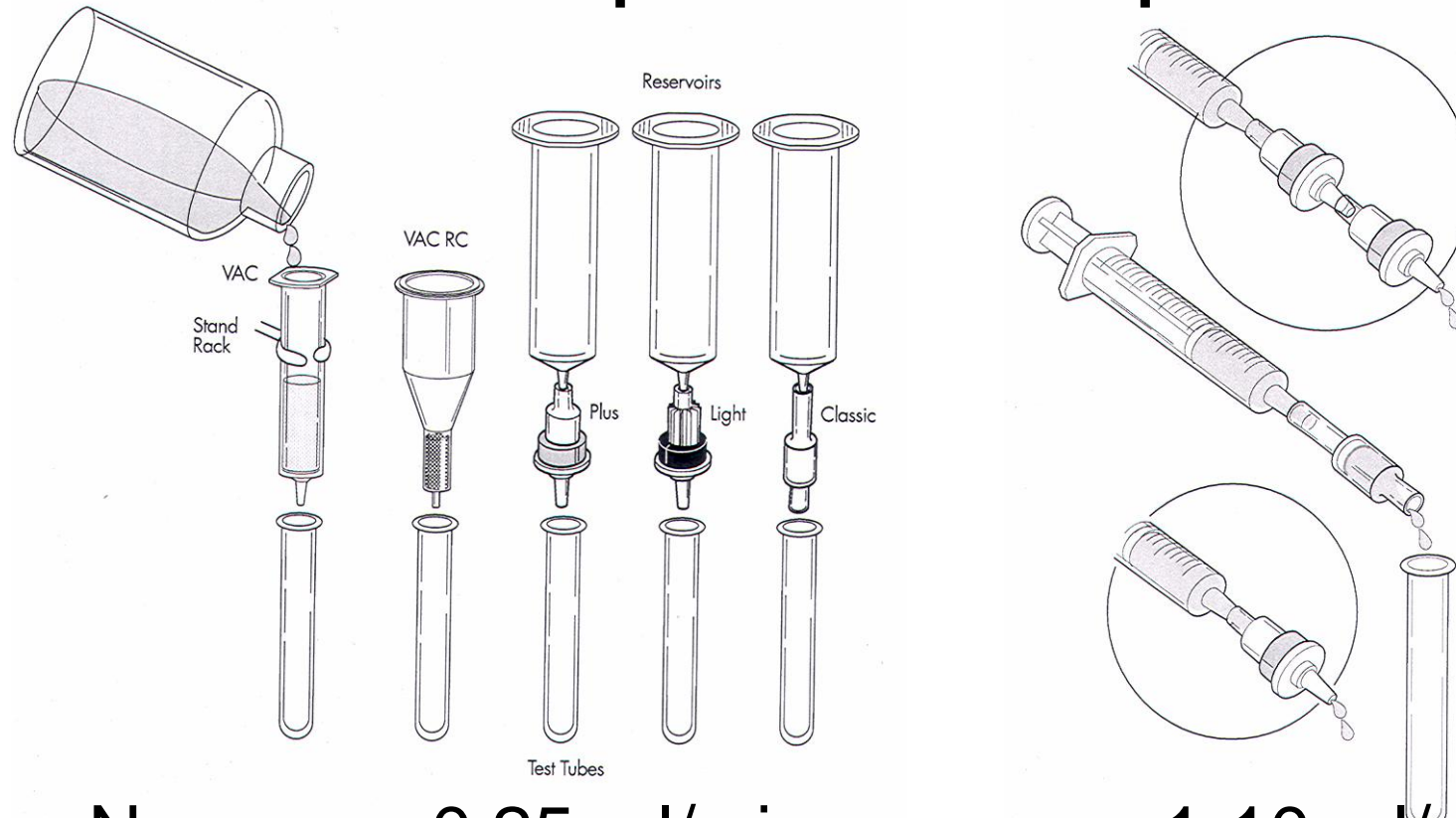
n Käytetään mm. lääkkeiden ja niiden metaboliittien erottamiseen seerumi/plasma/virtsanäytteistä



# Sep-Pak –menetelmän käyttö radiolääkkeiden laadunvalvontaan – Huomioitavia asioita

- n Menetelmä validoitava omassa laboratoriossa
  - .. Rinnanajo valmisteyhteenvedossa kuvatus  
menetelmän kanssa
  - .. Validointi pylväskohtainen eli tehtävä uudelleen,  
jos pylvästyyppi muuttuu
  - .. Validoinnissa huomioitava myös  
**eluointinopeus!**
- n Eluointitapa?
  - .. Vetovoima, ”positive displacement” vai vakuumi?

# Vetovoima / "positive displacement"



n Nopeus: <0.25 ml/min

1-10 ml/min

n Eluointinopeudella suuri vaikutus menetelmän toimivuuteen!

# Yksi pylväs isotooppilabraan:

- n Sep-Pak® Classic C18 cartridge (WAT051910)
  - .. 50 kpl/laatikko
  - .. Pylvään tilavuus 0.85 ml
- n Sep-Pak® Plus Short C18 cartridge (WAT020515)
  - .. Pylvään tilavuus 0.7 ml
- n Waters, 09-5659 6288 (HUOM! Numero on muuttunut!)





# Työvaiheet: tasapainotus

- n Kastellaan kiinteän faasin huokokset orgaanisella liuottimella ja tämän jälkeen tasapainotetaan vedellä/puskurilla (samalla missä näyte)
  - 6-10 pylvään tilavuutta (5-8.5 ml)
- n Nesteylimäärä poistetaan injisoimalla pylvääseen muutama ml ilmaa
  - Pylväs ei saa tämän jälkeen kuivua
- n Ilman tasapainotusta vain muutama % pylvään sitomiskapasiteetista on käytössä!
  - 99% kromatografisesta pinnasta on huokosten sisällä, jonne vesi ei pääse, jos ei tasapainotettu



# Työvaiheet: Näytteen analysointi

## n Näytteen lataus pylvääseen

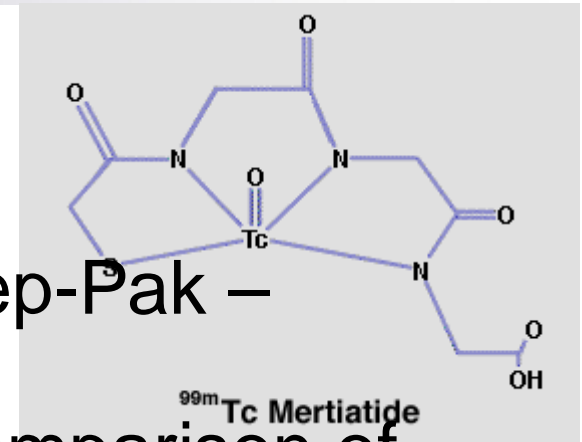
- Radiolääkkeillä tilavuus on niin pieni ( $<100 \mu\text{l}$ ), ettei nopeudella merkitystä
- Polaarissa liuottimessa (vedessä, niukkasuolaisessa puskurissa)

## n Eluointivaihe

- Nopeus 1-10 ml/min Sep-Pak Classic –pylväille, nopeus pyrittävä vakioimaan
- Polaarilla liuottimella tulevat ulos heikosti sitoutuneet yhdisteet, polaarisuutta vähentämällä tiukemmin sitoutuneet

# MAG3:

- n Valmisteyhteenvedossa kuvattu Sep-Pak – menetelmä
  - .. Millar AM, Hesslewood SR: A comparison of SepPak and high-performance liquid chromatography as techniques for measuring the radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG3. Nucl Med Commun. 2004 Oct;25(10):1049-51.
  - .. Menetelmässä käytetään eluointiin fosfaattipuskuria – säilyvyys?
- n Voidaan käyttää myös 1:1 etanoli: 0.9%NaCl
  - .. Useita ”reseptejä” internetissä
  - .. Jos eluoidaan 100% etanolilla, lipofiilisiä epäpuhtauksia tulee mukaan



# MAG3:

## n Pylvään tasapainotus:

- 5 ml 100% etanolia, 5 ml 1 mM HCl, ilmaa

## n 100 µl MAG3

## n **Hitaasti** 5-10 ml 1 mM HCl, eluaatti putkeen 1

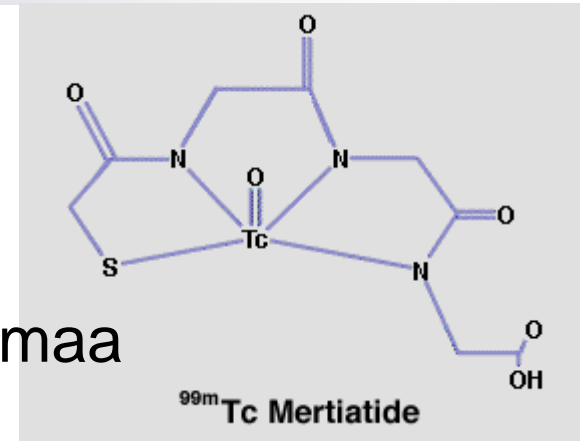
- Sisältää hydrofiiliset epäpuhtaudet (vapaan perteknetaatin,  $^{99m}\text{Tc}$ -tartraatin, osan pelkistyneestä-hydrolysoituneesta  $^{99m}\text{Tc}$ :stä)

## n **Hitaasti** 5-10 ml 1:1 EtOH:0.9%NaCl, putkeen 2

- Sisältää puhtaan radiolääkkeen

## n Pylvääseen jää loput pelkistyneestä-hydrolysoituneesta $^{99m}\text{Tc}$ :stä ja muut lipofiiliset epäpuhtaudet (?)

## n $\text{RP}\% = \text{putki 2} / (\text{putki 1} + \text{putki 2} + \text{pylväs}) * 100$



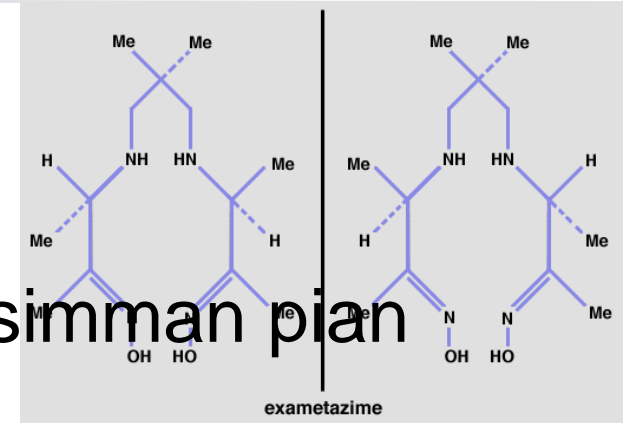
# HM-PAO (Ceretec):

- n Laadunvalvonta tehtävä mahdollisimman pian valmistamisen jälkeen

- .. Sekundaarisen (vähemmän lipofiilisen) kompleksin nopea muodostuminen: 7% 30 minuutissa

- n Pandos G, Penglis S, Tsopelas C: Validation of a column method for technetium-99m exametazime quality control. J Nucl Med Technol. 1999 Dec;27(4):306-8.

- .. Tulokset verrattavissa TLC –menetelmään
- .. Kolonniin jäävällä pelkistyneen-hydrolysoituneen  $^{99m}\text{Tc}$ :n määrällä ei merkitystä potilasannokseen



# HM-PAO:

## n Pylvään tasapainotus:

- 5 ml 100% etanolia, 5 ml 0.9% NaCl, ilmaa

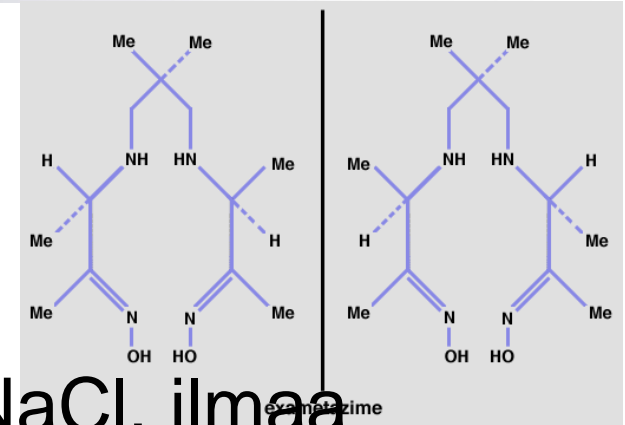
## n 100 µl HM-PAO

## n 5-10 ml 0.9% NaCl, ilmaa, eluaatti putkeen 1

- Sisältää hydrofiiliset epäpuhtaudet (vapaa perteknetaatti, osan pelkistyneestä-hydrolysoituneesta  $^{99m}\text{Tc}$ :stä ja sekundaarisesta kompleksista)

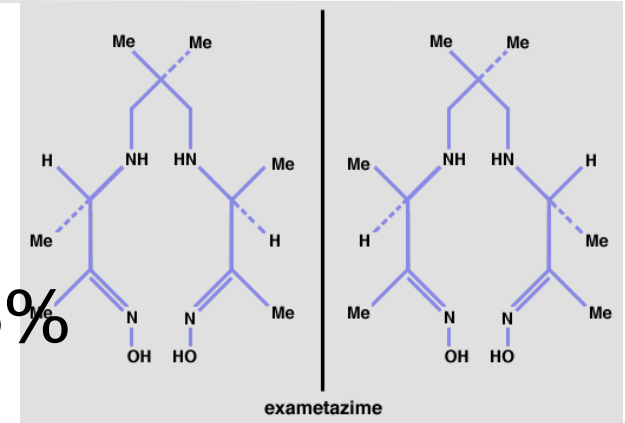
## n Pylvääseen jää puhdas radiolääke (ja loput pelkistyneestä-hydrolysoituneesta $^{99m}\text{Tc}$ :stä )

## n $\text{RP}\% = \text{pylväs} / (\text{putki 1} + \text{pylväs}) * 100$



# HM-PAO:

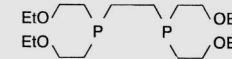
n **PHKS:n validoinnissa:** RP% > 85%



n **Vaihtoehtoisesti:** radiolääkkeen voi eluoida 5-10 ml:lla 100% EtOH, putkeen 2

- Sisältää puhtaan radiolääkkeen
- $RP\% = \text{putki 2} / (\text{putki 1} + \text{putki 2} + \text{pylväs}) * 100$

# Tetrofosmiini (Myoview):



- n Useampia Sep-Pak –menetelmiä kuvattu
- n Hammes R et al: A better method of quality control for  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin. J Nucl Med Technol 2004 32:72-78
  - .. Huom! Silica-pylväs, ei käänteiskromatografia!
  - .. Metanoli:vesi 70:30 ja 80:20 eluointiin





# Yhteenveto

- n Sep-Pak –menetelmä soveltuu useiden radiolääkkeiden laadunvalvontaan
  - .. Menetelmä voi alii/yliarvioida radiokemiallista puhtautta, mutta on riittävän hyvä rutiiniin
- n Myös julkaistut menetelmät on validoitava huolella
- n ”Käsiala” vaikuttaa (ohjeistus!)