



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Entwicklung geeigneter Ersatzmethoden für die
Qualitätskontrolle Technetium-markierter
Radiopharmaka“

Verfasserin

Claudia Rumpler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, September 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Diplomarbeit geholfen haben.

Bei O. Univ. -Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie zu realisieren.

An O. Univ. -Prof. Dr. Robert Dudczak und Univ. -Prof. DDr. Kurt Kletter geht mein Dank, dass ich in den Labors der Universitätsklinik für Nuklearmedizin am AKH Wien die für diese Arbeit notwendigen praktischen Qualitätskontrollen durchführen konnte.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Univ. -Doz. Mag. pharm. Dr. Markus Mitterhauser für die Auswahl des interessanten Themas sowie die fachliche und persönliche Betreuung während meiner Diplomarbeit.

Der Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin danke ich für ihre besondere Hilfsbereitschaft und das kollegiale Arbeitsklima.

Friedrich Girschele und Mag. pharm. Dr. Harald Eidherr danke ich ebenfalls ganz herzlich, da sie mir immer mit Rat und Tat und vielen praktischen Tipps zur Seite gestanden sind.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir immer eine große Stütze waren.

Zusammenfassung

Technetium ist ein künstliches Element und zählt zu den Übergangselementen der VII. Nebengruppe. Das unedle Metall kann in unterschiedlichen Oxidationszahlen (von -1 bis +7) vorliegen und wird durch den radioaktiven Zerfall des Molybdäns gebildet. Technetium-99m Radiopharmaka sind in der Diagnostik von Erkrankungen, auf Grund ihrer exzellenten chemischen und physikalischen Eigenschaften von großer Bedeutung und finden beinahe in jeder nuklearmedizinischen Abteilung routinemäßige Anwendung.

Radiopharmaka sind radioaktive Arzneimittel, die auf Grund ihres geringen Anteils an biologisch aktiver Substanzmenge praktisch keine pharmakologischen Effekte zeigen. Sie werden den Patienten zumeist parenteral verabreicht und müssen daher steril und pyrogenfrei sein und die vorgesehene Qualitätskontrolle durchlaufen.

Die Qualitätskontrolle ist Teil der Qualitätssicherung und dient der Sicherstellung der Qualität des Radiopharmakons. In der Nuklearmedizin ist die Dauer der Qualitätsprüfung durch die beschränkte Haltbarkeit von radioaktiven Arzneimitteln von großer Bedeutung. Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich besonders mit der radiochemischen Reinheit von Technetium-markierten Radiopharmaka. Diese bezieht sich nur auf radioaktive Verunreinigungen mit dem gleichen Isotop in einer anderen chemischen Form. Die radiochemische Reinheit wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der Sep-Pak Methode (miniaturisierte Säulenchromatographie-Systeme) überprüft.

Die Dünnschichtchromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem sich die zu trennenden Substanzen zwischen zwei nur begrenzt bzw. nicht mischbaren Phasen (mobile und stationäre Phase) verteilt.

Das Thema dieser Diplomarbeit, wurde ausgewählt nachdem bekannt wurde, dass die Firma Gelman Sciences die Herstellung der ITLC Materialien einstellt. Diese Platten sind auf Grund ihrer kurzen Chromatographiezeiten von 3 bis 5 Minuten die in der Nuklearmedizin am häufigsten verwendeten stationären Phasen und deswegen von großer Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Ersatzsorbenten für die ITLC Materialien zu evaluieren, die für die Qualitätskontrolle von Technetium Radiopharmaka gleich gut oder sogar besser geeignet sind. Darüber hinaus wurde versucht auch andere Standardadsorbenten, die in der Packungsbeilage von den Herstellerfirmen der Kits und im Europäischen Arzneibuch angegeben waren, zu ersetzen.

Abstract

Technetium is an artificial element and belongs to group VII of the periodic table. The base metal can exist in various oxidation states (from -1 – +7) and can be obtained by the radioactive decay of molybdenum. Technetium-99m radiopharmaceuticals are of great importance in the diagnostics and therapies of illnesses due to their excellent chemical and physical qualities and are applied routinely in almost every nuclear medical department.

Radiopharmaceuticals are radioactive drugs, which show due to their little proportion of biologically active substance amount practically no pharmacological effects. They are administered parenterally. Therefore, they must be sterile and pyrogen free and pass stringent quality controls.

The present diploma thesis deals particular with the radio-chemical purity of technetium-labelled radiopharmaceuticals. This only refers to radioactive contamination with the same isotope in a different chemical form. The radio-chemical purity was tested by means of the thin-layer chromatography technique and the Sep-Pak-Method (miniaturized column chromatography system).

Thin-Layer chromatography is a physical-chemical separation technique, in which the substances to be separated distribute between two limited miscibles or even immiscible phases (mobile and stationary phases).

The Topic of this diploma thesis was selected after it was made public that the company Gelman Science Inc. stopps producing ITLC materials. These plates are the most commonly used stationary phases in nuclear medicine, due to their short chromatography time from 3 to 5 minutes and therefore they are extremely important. The aim of this work was to find suitable stationary phases for the quality control of technetium radiopharmaceuticals which are close to or even better suitable. If another DC plate than ITLC was indicated at the test specification, it also was attempted to replace these.

Inhalt

1. Theoretische Grundlagen.....	1
1.1. Grundlagen der Radiopharmazie	1
1.1.1. Radioaktivität	1
1.1.2. Strahlungsarten	2
1.1.3. Zerfallsgesetz	4
1.1.4. Halbwertszeit	4
1.1.5. Einheit der Radioaktivität	5
1.2. Technetium	6
1.2.1. Historisch.....	6
1.2.2. Chemische Grundlagen des Technetiums	7
1.2.3. Herstellung von Technetium	7
1.2.3.1. Der [⁹⁹ Mo]/[^{99m} Tc]-Generator.....	7
1.3. Radiopharmaka	8
1.3.1. Anwendungen in der Nuklearmedizin.....	9
1.3.2. Nuklearmedizinische Untersuchungen	9
1.3.3. Applikationsformen von Radiopharmaka.....	10
1.4. Qualitätssicherung.....	11
1.4.1. Qualitätskontrolle	11
1.4.1.1. Rechtliche Hintergründe	12
1.4.1.2. Art der Qualitätskontrolle und Frequenz	12
1.5. Qualitätskriterien.....	13
1.5.1. Radioaktivitätsmenge.....	13
1.5.2. Radionuklididentität.....	14
1.5.3. Radionuklidreinheit	14
1.5.4. Radiochemische Reinheit	15
1.5.5. Chemische Reinheit.....	15
1.5.6. Sterilität.....	15
1.5.7. Pyrogenfreiheit.....	16
1.6. ^{99m}Tc-Radiopharmaka	17

1.6.1. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten ^{99m}Tc -Radiopharmaka.....	17
1.6.2. Anwendungen	18
1.7. Grundlagen der Dünnschichtchromatographie	21
1.7.1. Historisch	21
1.7.2. Grundlagen	21
1.8. Grundlagen der Sep-Pak-Methode.....	22
2. Methoden und Materialien	23
2.1. Herstellung von ^{99m}Tc-Radiopharmaka	23
2.1.1. Markierung mit vorgefertigten Kits.....	23
2.1.2. Durchführung der Markierung	24
2.2. Dünnschichtchromatographie	25
2.2.1. Stationäre Phasen.....	25
2.2.2. Mobile Phasen	29
2.2.3. Durchführung der Dünnschichtchromatographie	30
2.2.3.1 Vorbereitung der DC-Platten.....	30
2.2.3.2. Arten von Trennkammern	31
2.2.3.3. Auftragen der Probe und Entwicklung in der Trennkammer	32
2.2.4. Auswertung	32
2.2.4.1. Dauer der Laufzeit	33
2.2.4.2. R_f -Wert	33
2.2.4.3. Messung mit dem Gamma Dünnschichtscanner.....	33
2.2.4.4. Messung mit dem Bohrlochzähler.....	34
2.3. Sep-Pak-Methode.....	35
2.3.1. Durchführung der Sep-Pak-Methode.....	35
2.3.2. Auswertung	35
2.3.2.1. Messung im Aktivimeter.....	36
2.3.2.2. Berechnung der Markierungsausbeute	36
3. Experimenteller Teil	37
3.1. Allgemein.....	37
3.1.1. Radiochemische Reinheit.....	37

3.1.2. Grenzwerte	39
3.2. Materialien	40
3.2.1. Stationäre Phasen	40
3.2.2. Mobile Phasen	41
3.3. Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie.....	41
3.3.1. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Antigranulocyte	42
3.3.2. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Nanocoll	43
3.3.3. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DPD	44
3.3.4. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MAG ₃	45
3.3.5. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DMSA.....	46
3.3.6. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MIBI.....	47
3.3.7. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Tetrofosmin	48
3.3.8. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Phytacis	49
3.3.9. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -HMPAO	50
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	51
3.5. Ergebnisse der Sep-Pak-Methode.....	52
3.5.1. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DPD.....	53
3.5.2. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MAG ₃	53
3.5.3. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MIBI	53
3.5.4. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Tetrofosmin.....	53
3.5.5. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -HMPAO	53
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	55
Literaturverzeichnis.....	57
Abkürzungsverzeichnis.....	61
Abbildungsverzeichnis.....	63
Tabellenverzeichnis.....	65

1. Theoretische Grundlagen

1.1. Grundlagen der Radiopharmazie

Die Radiopharmazie beschäftigt sich mit der Herstellung, Anwendung, Verteilung und Qualitätskontrolle von radioaktiven Arzneimitteln, die zur Diagnose und Therapie am Patienten verwendet werden. Sie teilt sich in unterschiedliche Bereiche.

Die Radiopharmazeutische Chemie ist verantwortlich für die Herstellung von radioaktiv markierten Substanzen, die für die nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie verwendet werden.

Die sogenannte „echte Radiopharmazie“ beschäftigt sich mit der Qualitätssicherung und der Qualitätskontrolle. Außerdem ist sie verantwortlich für die Verteilung der Radiopharmaka im menschlichen Organismus und für die Überprüfung der Arzneibuchkonformität.

Die Radiopharmakologie prüft die biochemischen Aufnahmemechanismen.

Die Radiopharmazeutische Technologie befasst sich mit der Überführung der radioaktiv markierten Substanzen in geeignete verabreichbare Formulierungen. [1]

1.1.1. Radioaktivität

Unter Radioaktivität versteht man die Eigenschaft von Atomkernen, sich spontan, ohne äußere Einwirkung, in andere instabile oder stabile Kerne umzuwandeln, wobei Energie in Form von ionisierter Strahlung frei wird. Die Stabilität des Atomkerns eines bestimmten Nuklids wird von seinem Neutronen-Protonen-Verhältnis bestimmt und damit durch seine Ordnungszahl Z und seiner Massenzahl M . Nuklide mit einer instabilen Anordnung von Neutronen und Protonen wandeln sich spontan in eine andere Anordnung um. Die entstehenden Nuklide sind radioaktiv und werden Radionuklide genannt. Das instabile Ausgangsnuklid ist das Mutter-Radionuklid und das Zerfallsprodukt das Tochter-Radionuklid. [2,3]

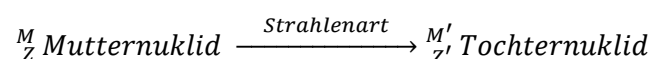


Abb. 1 Symbolische Darstellung des radioaktiven Zerfalls [2]

1.1.2. Strahlungsarten

Alpha-Strahlung

Alphastrahler finden sich bevorzugt bei schweren, neutronenarmen Kernen mit höheren Kernladungszahlen. In der Nuklearmedizin sind sie derzeit von geringer Bedeutung und werden nur im Bereich der experimentellen nuklearmedizinischen Therapie eingesetzt.

Beim Alpha-Zerfall wird aus dem Mutternuklid ein Heliumkern emittiert, der als Alphateilchen bezeichnet wird. Dieser Kern besteht aus 2 Protonen und 2 Neutronen. Daraus ergibt sich, dass das Tochternuklid um 4 Nukleonen leichter ist.

Alphateilchen sind monoenergetisch, ihre Strahlung ist eine Korpuskularstrahlung. [2]. Sie besitzen eine hohe Energie und eine starke Wechselwirkung mit der Materie. Dadurch verlieren sie ihre Energie rasch und besitzen nur eine geringe Reichweite, wodurch sie leicht mit Hilfe von Papier abgeschirmt werden können. Gelangen sie jedoch an eine Zelle, haben sie eine große Zerstörungskraft. Diese Eigenschaft wird in der Tumorthherapie genutzt. [1]



Abb. 2 Schematische Darstellung der Alpha-Strahlung [4]

Beta⁻-Strahlung

Bei der Beta-Minus-Strahlung wandelt sich im Kern ein Neutron in ein Proton und ein Elektron um. Auf Grund von Symmetrie-, Impuls- und Massenerhaltung wird auch ein Anti-Neutrino erzeugt. Das Elektron, auch Betateilchen genannt, und das Anti-Neutrino werden aus dem Kern emittiert. Die dabei entstehende Strahlung bezeichnet man als Beta-Minus-Strahlung. Da die Energie der Beta-Teilchen je nach Nuklid sehr unterschiedlich sein kann, erzielt sie eine Reichweite von wenigen μm bis zu cm und kann durch Plexiglas oder einige Millimeter Blei abgeschirmt werden.

Beta-Minus-Strahlung zählt zur Korpuskularstrahlung und tritt bei neutronenreichen Nukliden auf. Sie wird zur Therapie in der Nuklearmedizin eingesetzt. [1]

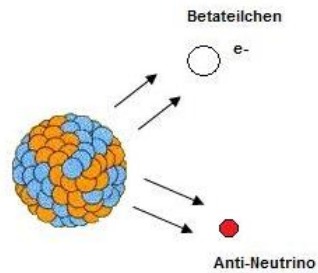


Abb. 3 Schematische Darstellung der Beta-Minus-Strahlung [4]

Beta⁺-Strahlung

Bei der Beta-Plus-Strahlung wandelt sich im Kern ein Proton in ein Neutron und ein Positron um, welches auch Anti-Elektron genannt wird. Auf Grund von Symmetrie-, Impuls- und Massenerhaltung wird auch ein Neutrino erzeugt; dieses besitzt keine weitere Bedeutung. Das Positron, auch Beta-Plus-Teilchen genannt, wird aus dem Kern geschleudert. Die dabei entstehende Strahlung bezeichnet man als Beta-Plus-Strahlung. Diese Strahlung gehört, im Gegensatz zu den oben genannten Strahlungsarten, zur Annihilationsstrahlung, die auch als Vernichtungsstrahlung bezeichnet wird. Dies erklärt sich durch den Umstand, dass Beta-Plus-Teilchen Anti-Materie sind und beim Zusammentreffen mit einem Elektron sofort vernichtet werden. Positronenstrahler treten bei neutronenarmen Nukliden auf und werden in der Nuklearmedizin für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Diagnostik verwendet. [1]

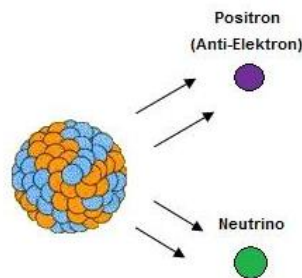


Abb. 4 Schematische Darstellung der Beta-Plus-Strahlung [4]

Gamma-Strahlung

Ein Kern, der sich in einem angeregten oder metastabilen Zustand befindet, kann durch Aussendung von Gamma-Strahlung wieder in seinen Grundzustand übergehen. Dabei gibt er die überschüssige Energie in Form von einem oder mehreren Gamma-Quanten ab. [1] Gamma-Strahlen sind energiereiche elektromagnetische Schwingungen und besitzen das größte Durchdringungsvermögen. Die Abschirmung ist mit Bleiplatten und

Betonwänden möglich. [5] In der Nuklearmedizin werden Gamma-Strahler in der SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) Diagnostik eingesetzt.

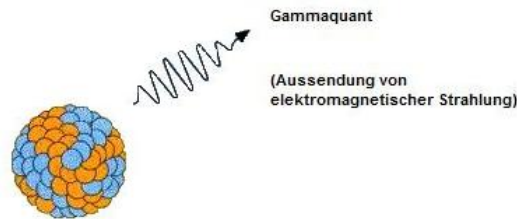


Abb. 5 Schematische Darstellung der Gamma-Strahlung [4]

1.1.3. Zerfallsgesetz

Der radioaktive Zerfall ist ein zufälliger Prozess und kann mit Hilfe von statistischen Methoden beschrieben werden. Den genauen Zeitpunkt der Umwandlung eines einzelnen Atomkerns kann man nicht vorhersagen, aber die Darstellung über Wahrscheinlichkeitsaussagen ist sehr zuverlässig. Die Zerfallswahrscheinlichkeit λ charakterisiert den Anteil der im Zeitintervall Δt zerfallenden Atome $\Delta N(t)$, wenn zu einem bestimmten Zeitpunkt t $N(t)$ Kerne vorhanden sind. Daraus ergibt sich, dass in einem bestimmten Zeitintervall jeweils ein konstanter Anteil der vorhandenen Kerne umgewandelt wird. Die dazugehörige Gleichung lautet:

$$\frac{\Delta N(t)}{\Delta t} = -\lambda \cdot N(t)$$

Löst man diese Differentialgleichung auf, ergibt sich daraus das Zerfallsgesetz für den radioaktiven Zerfall. Das Zerfallsgesetz zeigt, dass exponentiell mit der Zeit die Anzahl der noch vorhandenen Atome abnimmt. [2] Die dazugehörige Gleichung lautet:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

1.1.4. Halbwertszeit

Um die jeweils noch vorhandene Menge eines radioaktiven Stoffes einfacher berechnen zu können, ist es üblich, anstelle der Zerfallswahrscheinlichkeit λ die sogenannte Halbwertszeit zu verwenden, da sie vorteilhafter und anschaulicher ist. Die Halbwertszeit

beschreibt jene Zeit die vergeht, bis die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Atome zerfallen ist. Der Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit und der Zerfallskonstante wird deutlich, indem man, nach dem Einsetzen von $N(T_{1/2}) = N_0/2$ in die oben genannte Gleichung, logarithmiert. [2]

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

Die Halbwertszeit ist für jedes Radionuklid unterschiedlich und reicht von Millisekunden bis zu Milliarden Jahren. In der Nuklearmedizin sind Werte zwischen Minuten und Stunden für diagnostische Untersuchungen besonders geeignet, während für therapeutische Anwendungen Stunden bis Tage wünschenswert sind. [1]

Im menschlichen Organismus nimmt die Radioaktivität durch die biologische Ausscheidung und durch den Zerfall des Radionuklids ab. Dadurch wird die Elimination eines Radiopharmakons von zwei Halbwertszeiten, der biologischen und der physikalischen, bestimmt und durch die effektive Halbwertszeit ausgedrückt.

Die physikalische Halbwertszeit beschreibt den physikalischen Vorgang der Kernumwandlung und damit den radioaktiven Zerfall des Radionuklids. Dieser Wert ist für jedes radioaktive Element charakteristisch.

Die biologische Halbwertszeit gibt jenen Zeitraum an, in dem die Hälfte der sich ursprünglich im Organismus befundenen Menge eines Radiopharmakons auf natürliche Weise (Harn, Stuhl) eliminiert wurde.

Die effektive Halbwertszeit berücksichtigt sowohl die biologische als auch die physikalische Halbwertszeit und gibt dadurch die Zeit an, in der die ursprünglich im Körper befindliche Aktivitätsmenge auf die Hälfte reduziert wird. [6]

$$T_{eff} = \frac{T_{biol} \cdot T_{phys}}{T_{biol} + T_{phys}}$$

1.1.5. Einheit der Radioaktivität

Bei der Verwendung von Radiopharmaka ist ihre Aktivität von großer Bedeutung. Darunter versteht man die Anzahl der Kernzerfälle pro Zeiteinheit. Die Einheit der Aktivität wird im internationalen Maßsystem (SI) in Becquerel angegeben. [2]

$$1 \text{ Becquerel [Bq]} = 1 \text{ Kernumwandlung / Sekunde}$$

1.2. Technetium

1.2.1. Historisch

Der russische Chemiker Dmitri Mendeléeve sagte 1869 die Existenz eines Elementes mit dem Atomgewicht von 100 voraus, welches den freien Platz zwischen Molybdän und Ruthenium in seinem Periodensystem einnehmen wird. Er nannte es Eka-Mangan, auf Grund der Position unterhalb von Mangan. [7]

Die deutschen Chemiker Walter Noddack, Ida Tacke und Otto Berg nahmen an, dass sich das Element 43 im Columbit finden lässt. Sie beschossen das Mineral mit einem Elektronenstrahl und fanden ein Signal im Röntgenspektrum. Im Jahr 1925 gaben sie die Entdeckung des Elementes 43 bekannt und benannten es nach der masurischen Heimat von Walter Noddack als Masurium. Da das beobachtete Signal nahe der unteren Nachweisgrenze war und von keiner anderen Arbeitsgruppe zu dieser Zeit reproduziert werden konnte, wurde ihre Entdeckung nicht anerkannt. [8]

Der Physiker Josef Mattauch postulierte 1934 seine Isobarenregel, durch die klar wurde, dass das Element 43 mit keinem Isotop stabil sein könne, da alle infrage kommenden stabilen Plätze bereits von den beiden Nachbarelementen belegt werden. Demzufolge wurde die Entdeckung der deutschen Chemiker ebenfalls revidiert. [9]

Den ersten überzeugenden experimentellen Beweis für das Element 43 lieferten im Jahr 1937 die italienischen Atomphysiker Emilio Segrè und Carlo Perrier an der Universität von Palermo. Sie bombardierten Molybdänfolien, die Segrè von Ernest Lawrence von der University of California erhalten hatte, mit Deuteronen und isolierten daraufhin das erste künstlich dargestellte Element. Segrè und Perrier benannten es Technetium, nach dem griechischen Wort technetos, welches übersetzt künstlich heißt. [8]

Der amerikanische Wissenschaftler John T. Armstrong simulierte 1998 die Experimente von Noddack, Tacke und Berg mit Hilfe eines Computers und kam zu vergleichbaren Resultaten wie die deutschen Wissenschaftler. David Curtis vom Los Alamos National Laboratory wies mit den Methoden von Noddack, Tacke und Berg das sehr geringe natürliche Vorkommen von Technetium nach. Dadurch wurde die Zurückweisung ihrer Arbeit aus dem Jahr 1925 wieder in Frage gestellt. Die Debatte über die umstrittene Erstentdeckung ist immer noch nicht abgeschlossen. [8]

1.2.2. Chemische Grundlagen des Technetiums

Technetium ist ein künstliches Element, das durch den radioaktiven Zerfall von Molybdän entsteht. Das unedle Metall ist ein Übergangselement der VII Nebengruppe des Periodensystems und steht zwischen Mangan und Rhenium. Der atomare Radius des Technetiums ist dem des Rheniums ähnlich. Dies weist darauf hin, dass es viele Ähnlichkeiten in der Chemie zwischen den beiden Elementen gibt. Die elektronische Konfiguration des neutralen Atoms 43 wird als $[Kr]4d^65s^1$ beschrieben. Technetium kann in unterschiedlichen Oxidationszahlen (von -1 bis +7) vorliegen, wobei +7 die häufigste Oxidationszahl ist. [10]

1.2.3. Herstellung von Technetium

Radionuklide können auf Grund ihrer Halbwertszeit oft nicht verschickt werden. Deshalb benötigt man ein System, welches direkt vor Ort und ohne größeren Platzbedarf die mehrmalige Herstellung ermöglicht. [1] Diese Tatsache führte zu einer der wichtigsten Entwicklungen in der Nuklearmedizin: die Vor-Ort-Herstellung von Radioisotopen mit Hilfe von Radionuklidgeneratoren. [11]

1.2.3.1. Der $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ wird heute fast ausschließlich aus sogenannten Radionuklidgeneratoren gewonnen.

Diese Generatorsysteme beruhen auf dem Gleichgewichtszustand zwischen einem längerlebigen Mutternuklid, das auf Grund seines radioaktiven Zerfalls ständig neues Tochternuklid bildet und dem kurzlebigen Tochternuklid, dessen Aktivität bis zur Gleichgewichtseinstellung anwächst. Ist das Gleichgewicht erreicht, zerfallen beide Radionuklide scheinbar mit der Halbwertszeit des Mutternuklids. [1]

Die Generatoren bestehen aus einer kleinen, mit Aluminiumoxid als Ionenaustauscher gefüllten Glassäule, die sich in einer Bleiabschirmung befindet. An der Säule wird das Mutternuklid absorbiert und durch Aufsetzen eines evakuierten Injektionsfläschchens wird das Tochternuklid eluiert. [1]

Nach dem Beladen des Generators mit radioaktivem Molybdän zerfällt ^{99}Mo durch Beta-Übergänge zunächst in den metastabilen Zwischenkern $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von 87 %. 13 % des ^{99}Mo zerfallen direkt in das langlebige Radionuklid ^{99}Tc . Das zuvor mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden entstandene $^{99\text{m}}\text{Tc}$ geht unter Gamma-Emission ebenfalls in ^{99}Tc über, so lange, bis sich zwischen Bildung

und Zerfall ein sogenanntes transientes Equilibrium einstellt. Damit ist das Maximum des ^{99m}Tc mit einer Aktivität von 96.25 % der Molybdänaktivität erreicht. Im $[^{99}\text{Mo}]/[^{99m}\text{Tc}]$ -Generator wird dieser Zustand nach 23 Stunden erreicht. [12]

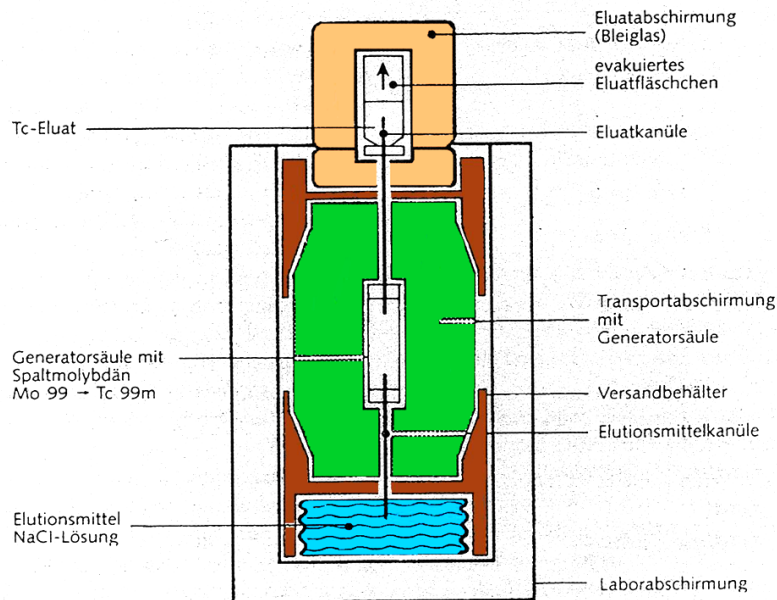


Abb. 6 ^{99m}Tc -Generator [11]

^{99m}Tc wird in Form von Pertechnetat TcO_4 mit physiologischer Kochsalzlösung mittels eines evakuierten Fläschchens vom Generator eluiert. Ist das Eluat durch relevante Mengen des Mutternuklids verunreinigt, spricht man von einem Generatordurchbruch. Die großen Vorteile dieses Generatorsystems sind die rasche und kostengünstige Verfügbarkeit und die Möglichkeit der täglichen Elution. [2]

Die Ausbeute an ^{99m}Tc ist von der Zeit, die seit der Elution vergangen ist, und der Menge an ^{99}Mo , mit der der Generator beladen wurde, abhängig. [12]

1.3. Radiopharmaka

Radiopharmaka sind radioaktive Arzneimittel, die in der Nuklearmedizin zu 95 % für die Diagnostik und zu 5 % für die Therapie von menschlichen Erkrankungen genutzt werden. [13] Auf Grund ihres geringen Anteils an biologisch aktiver Substanzmenge haben sie praktisch keine pharmakologischen Effekte. Da sie parenteral dem Patienten verabreicht werden, müssen sie steril und pyrogenfrei sein und eine Qualitätskontrolle durchlaufen. [14]

Laut dem Europäischen Arzneibuch zählen zu Radiopharmaka radioaktive Arzneimittel, Radionuklid-Generatoren, Kits für ein radioaktives Arzneimittel und radiopharmazeutische Vorläufersubstanzen. [3]

Eine wichtige Abgrenzung ist auch zwischen den Begriffen Radiochemikalien und Radiopharmaka zu treffen. Radiochemikalien sind auf Grund eines möglichen Mangels an Sterilität und Pyrogenfreiheit nicht für die Anwendung am Patienten geeignet. Radiopharmaka hingegen weisen diese Eigenschaften auf und können dadurch dem Patienten sicher verabreicht werden. [13]

Ein Radiopharmakon besteht aus zwei Komponenten: einem Radionuklid und einem Molekül (Ligand). Radionuklide werden auch direkt als Ionen eines radioaktiven Elements in Form einer sterilen Radionuklid-Lösung oder als Gas verwendet. Ein Beispiel dafür wäre das in dieser Arbeit besprochene ^{99m}Tc Technetium als Na-Pertechnetat. Charakterisiert werden Radiopharmaka durch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie durch die Strahlungseigenschaften des Radionuklids. Um eine Anwendung in der Nuklearmedizin zu ermöglichen, müssen sie bestimmten Anforderungen entsprechen. Es sollte keine oder nur eine geringe Absorption stattfinden, um die Zerfallsstrahlen außerhalb des Körpers messen zu können und dadurch eine Visualisierung realer Stoffwechselprozesse zu ermöglichen. Die Strahlenbelastung für den Patienten und das Personal muss gering sein. Dies erreicht man mit einer relativ kurzen Halbwertszeit. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die kostengünstige und ausreichende Herstellungsmöglichkeit. [15]

1.3.1. Anwendungen in der Nuklearmedizin

In der Nuklearmedizin werden Radiopharmaka zur Messung zahlreicher physiologischer Parameter verwendet. Das Radionuklid sendet Strahlung aus und ermöglicht dadurch, den Radioaktivitätsverlauf im biologischen System zu verfolgen. Außerdem kann man Rückschlüsse auf die Organfunktion, die regionale Durchblutung oder auf metabolische Umsätze ziehen, da sich das Radiopharmakon in einem Organ anreichert oder daraus ausgeschieden wird. Pathologische Abweichungen können auch dargestellt werden, was in der Tumordiagnostik zur Anwendung kommt. [6]

1.3.2. Nuklearmedizinische Untersuchungen

Im Gegensatz zu den „klassischen“ bildgebenden Verfahren wie zum Beispiel die Röntgen- oder die Ultraschalluntersuchung, die vorwiegend strukturelle Informationen

über Organe, Gewebe und Knochen liefert, steht bei der nuklearmedizinischen Untersuchung die Funktionsbeurteilung im Vordergrund. Dadurch ergänzen sich die unterschiedlichen Verfahren, wodurch bestimmte Erkrankungen effektiver behandelt bzw. deren Ursache besser definiert werden können. [1]

Die wichtigsten nuklearmedizinischen Untersuchungen mit radioaktivem ^{99m}Tc sind die Szintigraphie und die SPECT.

Szintigraphie

Szintigraphie bedeutet, aus dem Lateinischen und Griechischen übersetzt, so viel wie „Funken zeichnen“. Es ist ein bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin, das für die Diagnostik eingesetzt wird.

Bei der Untersuchung werden dem Patienten radioaktive Stoffe verabreicht, die sich in dem zu untersuchenden Gewebe besonders gut anreichern. Das Radiopharmakon sendet Gammastrahlen aus, die mit Hilfe einer Gammakamera detektiert und in ein farbvisualisiertes Bild transformiert werden. Es entsteht ein Szintigramm. Diese Methode kann sowohl zur Lokisationsdiagnostik, zum Beispiel um Entzündungsherde im Skelett (Skelettszintigraphie) festzustellen, als auch zur Funktionsdiagnostik von Organen, beispielsweise in der Nierenszintigraphie, angewendet werden. [16]

Die Bilder der Szintigraphie sind vorwiegend flächenhafte Darstellungen räumlicher Strukturen. [6]

SPECT

Die Single Photon Emission Computed Tomography, auch Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie genannt, basiert auf dem gleichen Prinzip wie die Szintigraphie. Der Vorteil der SPECT liegt in der dreidimensionalen Bildgebung. Diese kommt durch eine oder mehrere um den Körper rotierende Gammakameras zustande. Dadurch wird die emittierende Strahlung aus unterschiedlichen Raumrichtungen detektiert. [17]

1.3.3. Applikationsformen von Radiopharmaka

Die unterschiedlichen Applikationsformen von Radiopharmaka werden nach der gewünschten diagnostischen bzw. therapeutischen Verwendung und den Eigenschaften des verwendeten Arzneistoffes gewählt. Die angewendete Untersuchungsmethode hat ebenfalls eine große Bedeutung. Radiopharmaka werden intravenös als isotonische

Injektionslösungen appliziert oder peroral in Form von Kapseln oder als radioaktiver Trunk verabreicht. Radioaktive Aerosole bzw. Gase werden inhalativ eingesetzt. Am häufigsten werden Radiopharmaka parenteral (überwiegend intravenös) appliziert. Radioaktive Injectabilia werden auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften in vier Gruppen geteilt: radioaktive Gase (aufgelöst in wässrigen Lösungen), echte Lösungen, kolloiddisperse Lösungen und grobdisperse Systeme. [14]

1.4. Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung, im Englischen quality assurance genannt, befasst sich mit allen Maßnahmen, die zur Verbesserung, Beibehaltung und dadurch Sicherung der Qualität eines Arzneimittels gesetzt werden. Dazu ist die Schaffung geeigneter Arbeitsplätze, eine Schulung des Personals, die Qualitätskontrolle, die Kennzeichnung des Arzneimittels (um eine mögliche Verwechslung auszuschließen und die Identifikation zu ermöglichen) und eine genaue Dokumentation der Arbeitsschritte erforderlich. [18]

Die Qualitätssicherung hat vor allem bei der Herstellung von Radiopharmaka eine besondere Bedeutung auf Grund ihrer besonderen Merkmale, wie zum Beispiel die Verwendung kleiner Volumina und die oftmals auftretende Notwendigkeit, das Produkt dem Patienten zu injizieren, bevor die Qualitätskontrolle abgeschlossen ist. [19]

1.4.1. Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle, im Englischen quality control genannt, ist ein Teil der Qualitätssicherung. Sie dient der Sicherstellung der Qualität des Radiopharmakons. Die Aufgaben der Qualitätskontrolle liegen in der Überwachung, Bewertung und Dokumentation.

Im Mai 2000 wurde der Erlass „Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle auf dem Gebiet des Strahlenschutzes im Bereich der Humanmedizin“ eingeführt. Ab diesem Zeitpunkt sollte die Qualitätskontrolle ein fixer Bestandteil der klinischen Routine sein. Unklarheiten bestehen noch immer in der Umsetzung der Qualitätskontrolle in die klinische Praxis. [20]

1.4.1.1. Rechtliche Hintergründe

Da es sich bei Radiopharmaka, die am Menschen angewendet werden, nach dem Arzneimittelgesetz um Arzneimittel handelt, gelten für sie die gleichen Qualitätsrichtlinien wie für andere Arzneimittel. Ein signifikanter Unterschied, der die Qualitätskontrolle erschwert, liegt in der beschränkten Haltbarkeit von radioaktiven Arzneimitteln, die durch den physikalischen Zerfall mit zum Teil sehr kurzen Halbwertszeiten bedingt ist. Die Dauer der Qualitätsprüfung erhält große Bedeutung, da eine zeitaufwendige Kontrolle, wie bei nicht radioaktiven Arzneimitteln, nicht durchführbar ist. [21]

Radiopharmaka werden in der nuklearmedizinischen Anwendung unterteilt in Radiopharmaka, die fertig zur Anwendung sind, Radiopharmaka, die mit Hilfe von Kits hergestellt werden und sonstige Radiopharmaka, die vom Anwender selbst hergestellt werden.

Für gebrauchsfertige Radiopharmaka trägt, wie bei anderen Arzneimitteln, der Hersteller die Verantwortung für die Qualität des Präparates. Vom Anwender werden nur die Identität und die Menge geprüft.

Bei Radiopharmaka, die mit Hilfe von Kits hergestellt werden, muss der Anwender aus dem gelieferten, dem Arzneimittelgesetz unterliegenden, Ausgangsprodukt erst ein fertiges Radiopharmakon herstellen. Deshalb teilt sich der Hersteller von Kits und Generator (oder Radionuklid) die Verantwortung für die Qualität mit dem Anwender. Wichtig ist dabei zu beachten, dass sich der Anwender strikt an die Vorschriften des Herstellers hält, da sonst dieser aus seiner Mitverantwortung entbunden ist.

Bei Radiopharmaka, die vom Anwender selbst hergestellt werden, ist dieser selbst verantwortlich und haftet für alle Folgen, die aus der Verabreichung dieser Präparate entstehen.

Genauere Informationen über die Qualitätskontrolle findet man im Österreichischen Arzneimittelgesetz, im Europäischen Arzneibuch und in zahlreichen Richtlinien wie u.a. in den „Guidelines for good manufacturing practice“. [18]

1.4.1.2. Art der Qualitätskontrolle und Frequenz

Bei gebrauchsfertigen Radiopharmaka muss vor dem Gebrauch die Identität (durch Kontrolle der Angabe auf dem Etikett) und die Aktivität geprüft werden.

Bei der erstmaligen Elution des Generators muss sichergestellt werden, dass es keinen ⁹⁹Mo-Durchbruch gibt. Danach wird bei jeder anschließenden Elution die Elutionsausbeute geprüft. Diese darf nicht mehr als 10 % von der theoretisch berechneten Aktivität abweichen. Weiters werden die Klarheit und das Volumen der

Lösung kontrolliert. Die Prüfung der radiochemischen Reinheit des Eluats erfolgt durch monatliche Stichproben.

Bei Kit-Markierungen wird bei jeder Markierung die Klarheit der Lösung kontrolliert. Die radiochemische Reinheit wird bei jeder neuen Charge eines Kits vor der Applikation geprüft. Zusätzlich werden monatlich alle Markierungen eines Tages stichprobenartig getestet. Ist eine Markierung nicht in Ordnung, sollten fünf darauffolgende Markierungen getestet werden. Nur wenn diese entsprechen, kann wieder auf Chargentestung übergegangen werden.

Die Prüfung auf Sterilität dient zur Dokumentation einer aseptischen Arbeitsweise, da die Radiopharmaka-Zubereitungen nur von Personal mit entsprechender Schulung durchgeführt werden. Deshalb reicht es aus, die Markierungen eines Tages halbjährlich abklingen zu lassen und die Sterilität zu testen. Wird eine Markierung von einem neuen Mitarbeiter durchgeführt, muss diese einen Sterilitätstest durchlaufen. [20]

1.5. Qualitätskriterien

Qualitätskriterien für Radiopharmaka definieren sich einerseits durch die Radioaktivität des Arzneimittels, andererseits durch ihre häufigste Art der Anwendung, als Parenteralia. [12]

Im Europäischen Arzneibuch 2011 sind in der Monographie „Radioaktive Arzneimittel“ die wesentlichen Qualitätskriterien angeführt: Prüfung auf Identität (z.B. Radionuklididentität und Messung der Radioaktivität), Prüfung auf Reinheit (z.B. Radionuklidreinheit, radiochemische Reinheit und chemische Reinheit) sowie sonstige Prüfungen wie Sterilität und Pyrogenfreiheit. [21]

1.5.1. Radioaktivitätsmenge

Je nach Art der Untersuchung muss die Menge an Radioaktivität genauestens angepasst werden. Der Anwender muss gewährleisten, dass der Patient die richtige Aktivitätsmenge verabreicht bekommt. Eine zu hohe Aktivität kann zu einer erhöhten Strahlenbelastung und gegebenenfalls zu direkten Nebenwirkungen beim Patienten führen. Bei zu geringer Radioaktivität kann es zu einem unzureichenden Ergebnis der Untersuchung kommen oder die Therapie beeinflusst werden.

Zur Messung der Patientendosis werden im Allgemeinen Aktivimeter verwendet. Um die richtige Aktivitätsmenge festzustellen, muss der Anwender wesentliche Kontrollen der

Messgeräte vornehmen und ihre Funktionsfähigkeit überprüfen. Getestet werden dabei vor allem Genauigkeit, Linearität und Kontamination. [12]

1.5.2. Radionuklididentität

Die Radionuklididentität ist durch die Halbwertszeit sowie durch die Art und die Energie der Strahlung charakterisiert. [3] Dies ist besonders wichtig um sicherzustellen, dass der Patient das richtige Radionuklid bekommt.

Die Halbwertszeit gibt außerdem Auskunft über die radionukleare Reinheit, da eine Verunreinigung mit anderen Radionukliden zu einer Verschiebung der gemessenen Halbwertszeit führen würde. Die Messung wird mit einem geeigneten Radioaktivitätsdetektor wie z.B. einer Ionisationskammer, einem Szintillationszähler oder einem Geiger-Müller-Zählrohr durchgeführt.

Die Art und Energie der Strahlung lassen sich durch Aufnahme einer Schwächungskurve, die bei Elektronenstrahlung verwendet wird, und durch Spektroskopie (bei Gammastrahlung) bestimmen. [21]

1.5.3. Radionuklidreinheit

Die Radionuklidreinheit ist ein wesentlicher Parameter, der angibt, ob ein Radionuklid in reiner Form vorliegt, ob das Radiopharmakon noch fremde Nuklide enthält oder sich durch den radioaktiven Zerfall andere Radionuklide gebildet haben. [14]

Diese Verunreinigungen können zu einer unerwünschten Erhöhung der Strahlenbelastung für den Patienten sowie zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. [11]

Zur Bestimmung der Radionuklidreinheit wird die Gammaspektrometrie verwendet. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt darin, dass Verunreinigungen mit Alpha- oder Betastrahlern schwer nachzuweisen sind. Als zusätzliche Kontrolle wird die Halbwertszeit bestimmt. Ein weiteres Problem stellt die Änderung der Radionuklidreinheit mit der Zeit dar, die sich auf Grund der unterschiedlichen Halbwertszeiten des Radiopharmakons und der Verunreinigung ergibt. Deshalb müssen alle Anforderungen an die Radionuklidreinheit während der gesamten Dauer der Diagnostik oder Therapie erfüllt sein. [3]

Im Produktionsprozess des Radiopharmakons entstehen Verunreinigungen durch Kontamination des Ausgangsmaterials oder unvollständige Reinigungsschritte bei der Aufarbeitung. Für alle gängigen Radiopharmaka sind Grenzwerte für die auftretenden

Verunreinigungen während des Produktionsprozesses vorgegeben, die im Europäischen Arzneibuch und in den Herstellerangaben festgehalten sind. [18]

1.5.4. Radiochemische Reinheit

Die radiochemische Reinheit bezieht sich nur auf radioaktive Verunreinigungen mit dem gleichen Isotop in einer anderen chemischen Form. Zu diesen Verunreinigungen kann es bei der Lagerung kommen oder sie können bei der Markierung durch eine unzureichende Reaktionsausbeute entstehen. Chemisch unterschiedliche Verbindungen besitzen eine unterschiedliche Pharmakokinetik. Es kann zu einer Veränderung des Verteilungsmusters der Radioaktivität im Körper und dadurch bei der diagnostischen Untersuchung zu einer Fehlbeurteilung kommen. Die Beurteilung ist daher nicht oder nur eingeschränkt möglich. [12]

Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit kann mit analytischen Trennverfahren durchgeführt werden. In nuklearmedizinischen Abteilungen wird am häufigsten die Dünnschicht- oder die Papierchromatographie angewendet. [3]

1.5.5. Chemische Reinheit

Die chemische Reinheit gibt Verunreinigungen an, die von nicht radioaktiven, fremden Stoffen stammen und weder Hilfsstoffe noch Lösungsmittel sind. Sie können zu Problemen bei der Herstellung und zu toxischen Auswirkungen für den Patienten führen. [18]

Die Bestimmung der chemischen wie auch der radiochemischen Reinheit erfolgt über chromatographische Methoden.

1.5.6. Sterilität

Die Sterilität muss bei radioaktiven Arzneimitteln, die parenteral verabreicht werden, ebenso wie bei nicht-radioaktiven Parenteralia gewährleistet sein, um schwer kontrollierbare Infektionen zu verhindern. Die Radioaktivität kann bakterizid wirksam sein, allerdings reichen die in den nuklearmedizinischen Präparaten verwendeten Aktivitätsmengen nicht aus, um die Sterilität zu garantieren. [18]

Bei radioaktiven Arzneimitteln können auf Grund der Strahlenbelastung des Personals, der zum Teil sehr kurzen Halbwertszeiten einiger Radionuklide und eines geringen Umfangs der Chargen Schwierigkeiten bei der Sterilitätsprüfung auftreten. Deshalb

existiert für Radiopharmaka eine Regelung, die eine Abweichung von den allgemeinen Prüfvorschriften für die Sterilität erlaubt. In einigen Fällen ist es sogar möglich, auf die Durchführung eines Sterilitätstests zu verzichten, wenn das Herstellungsverfahren auf eine aseptische Zubereitung der Wirkstofflösung validiert ist. [21]

1.5.7. Pyrogenfreiheit

Die Pyrogenfreiheit garantiert, dass in dem parenteral verabreichten Radiopharmakon keine Pyrogene enthalten sind, die beim Patienten Fieber auslösen würden.

In der Nuklearmedizin spielt dieser Parameter eine geringe Rolle, da laut dem Europäischen Arzneibuch nur Einzeldosen, die größer als 15 ml sind, getestet werden müssen und im Normalfall nur ca. 1 ml des Radiopharmakons injiziert werden. [12]

1.6. ^{99m}Tc -Radiopharmaka

^{99m}Tc Technetium Radiopharmaka sind in der Diagnostik und der Therapie von Erkrankungen von großer Bedeutung. Durch die gute Verfügbarkeit dieses Radionuklids, das an Ort und Stelle aus einem Radionuklidgenerator gewonnen werden kann, wird es nahezu in jeder nuklearmedizinischen Abteilung routinemäßig eingesetzt. Es verfügt über ausgezeichnete chemische und physikalische Eigenschaften (z.B. günstige Zerfallseigenschaften und eine Halbwertszeit von 6 Stunden). Durch seine ideale Gammaenergie von 140 keV ist ^{99m}Tc heute das wichtigste Radionuklid für das bildgebende SPECT- Verfahren in der nuklearmedizinischen Diagnostik. [22]

1.6.1. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten ^{99m}Tc -Radiopharmaka

Radiopharmaka	Ligand	Präparationskit	Klinische Anwendung
^{99m}Tc -Antigranulozyte	Monoklonaler Antikörper (Maus IgG1)	Scintimun® Granulocyte	Szintigraphie des Knochenmarks und von Entzündungen
^{99m}Tc -Nanocoll	Denaturiertes menschliches Albumin	Nanocoll®	Szintigraphie des Knochenmarks und von Entzündungen; Lymphszintigraphie
^{99m}Tc -DPD	Diphosphonopropan-dicarbonsäure	Teceos®	Knochenszintigraphie
^{99m}Tc -DMSA	Dimercaptobernsteinsäure	Renocis®	Nierenszintigraphie
^{99m}Tc -MAG ₃	Mercaptoacetyltriglycin	TechneScan®	Nierenszintigraphie
^{99m}Tc -MIBI	Methoxyisobutylisonitril	Cadiolite®	Herzszintigraphie; Tumordiagnose
^{99m}Tc -Tetrofosmin	Tetrofosmin	Myoview®	Myokardialer Perfusionstracer; Tumorlokalisation
^{99m}Tc -Phytacis	Phytinsäure	Phytacis®	Leberszintigraphie
^{99m}Tc -HMPAO	Exametazim	Ceretec®	Hirnszintigraphie

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten ^{99m}Tc -Radiopharmaka

1.6.2. Anwendungen

^{99m}Tc-Antigranulozyte

^{99m}Tc-Antigranulozyte wird zur Knochenszintigraphie angewendet. Es dient der Erkennung und Lokalisierung von Entzündungen und Infektionen des peripheren Knochens.

^{99m}Tc-Antigranulozyte bindet spezifisch an Granulozyten und Granulozytenvorstufen. Nach 24 Stunden sind 14 % der verabreichten Dosis über die Niere ausgeschieden. [23]

^{99m}Tc-Nanocoll®

^{99m}Tc-Nanocoll® wird zur Szintigraphie des Knochenmarks, von Entzündungen und des Lymphsystems eingesetzt. Dadurch können der Lymphfluss und die Lymphknoten im Körper sichtbar gemacht werden. Bei der Knochenmarkszintigraphie, die auf der hohen Aufnahme der Substanz im Knochenmark durch Phagozytose beruht, können Knochenmarkdefekte, ungleiche Knochenmarkverteilungen und Ausdehnungen von aktivem Knochenmark in die langen Röhrenknochen diagnostiziert werden. [10]

^{99m}Tc-DPD

^{99m}Tc-DPD findet in der Knochenszintigraphie Anwendung. Es dient der Diagnose von Knochentumoren, Knochenmetastasen, Stoffwechselerkrankungen des Knochens wie zum Beispiel Osteomyelitis und der Lokalisation von Knochenfrakturen.

Es wird über glomeruläre Filtration eliminiert und nach 6 Stunden sind 60 % der verabreichten Dosis ausgeschieden.

^{99m}Tc-DMSA

^{99m}Tc-DMSA wird für die Nierenszintigraphie verwendet und ermöglicht Aussagen über die Funktion der Nierenrinde, Größe und Form der Niere sowie Funktionsstörungen. Außerdem können raumfordernde Veränderungen wie zum Beispiel Tumore diagnostiziert werden.

Nach der intravenösen Injektion wird der ^{99m}Tc-DMSA Komplex im Nierenparenchym aufgenommen und zeigt eine hohe Affinität zur Nierenrinde. Er wird ausschließlich als unverändertes Molekül über den Harn ausgeschieden und in 24 Stunden werden etwa 30% eliminiert. [10]

^{99m}Tc-MAG₃

^{99m}Tc-MAG₃ wird ebenfalls für die Nierenszintigraphie angewendet. Im Gegensatz zu ^{99m}Tc-DMSA kann mit dieser Substanz sowohl über die Anatomie und die Funktion der Niere als auch über die Nierenausscheidung, das Harnabflusssystem und die Nierenperfusion eine Diagnose erstellt werden.

Nach intravenöser Injektion wird die Substanz rasch über die Niere, überwiegend durch Sekretion in den proximalen Tubulus, aus dem Blut eliminiert. Nach etwa 30 Minuten sind 70 %, nach 3 Stunden ca. 99 % der verabreichten Dosis renal ausgeschieden. [24]

^{99m}Tc-MIBI

^{99m}Tc-MIBI wird zur Myokardperfusionsszintigraphie verwendet. Dies ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation von koronaren Herzkrankheiten und Myokardinfarkt. Außerdem kann eine Beurteilung der globalen ventrikulären Funktion (mittels First-Pass-Technik zur Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion), des Volumens und der regionalen Wandbewegung erfolgen.

Eine weitere Anwendung von ^{99m}Tc-MIBI ist bei Verdacht auf Brustkrebs durch die Mammaszintigraphie sowie bei der Dignitätsbeurteilung von Schilddrüsenknoten möglich.

Der positiv geladene lipophile Komplex reichert sich in den Mitochondrien an, da diese zu den am stärksten negativ geladenen Zellkompartimenten zählen.

Nach 24 Stunden werden etwa 27 % der verabreichten Dosis renal eliminiert und etwa 33 % werden innerhalb von 48 Stunden über die Fäzes ausgeschieden. [25]

^{99m}Tc-Tetrofosmin

^{99m}Tc-Tetrofosmin ist ein myokardialer Perfusionstracer, der zur Diagnose bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen angewendet wird. Er ermöglicht die Diagnose von ischämischen Herzkrankheiten, von reduzierter regionaler Durchblutung, von Durchblutungsstörungen im Myokard und die Lokalisierung eines Herzinfarkts. Das linksventrikuläre Volumen und die Ejektionsfraktion können ebenfalls getestet werden. Der lipophile ^{99m}Tc-Tetrofosmin Komplex wird rasch vom Herzmuskelgewebe aufgenommen und proportional zum Blutfluss akkumuliert. Die Elimination aus dem Blut erfolgt ebenfalls sehr rasch, da 10 Minuten nach der Injektion nur mehr weniger als 5 % der Radioaktivität im Blut gemessen werden können. [10]

^{99m}Tc -Phytacis

^{99m}Tc -Phytacis wird für die Leberszintigraphie verwendet und dient der Diagnose von anatomischen oder funktionellen Erkrankungen der Leber.

^{99m}Tc -HMPAO

^{99m}Tc -HMPAO findet in der Hirnszintigraphie Anwendung. Es dient der Diagnose von Durchblutungsstörungen, zerebrovaskulären Erkrankungen, Schlaganfällen und der Klassifizierung von Schäden, die durch einen Schlaganfall im Gehirn entstanden sind. Der lipophile ^{99m}Tc -HMPAO Komplex kann die Bluthirnschranke überwinden. Da die Elimination aus dem Gehirn sehr langsam verläuft, sind nach 48 Stunden noch über 70 % der verabreichten Dosis im Gehirn. [10]

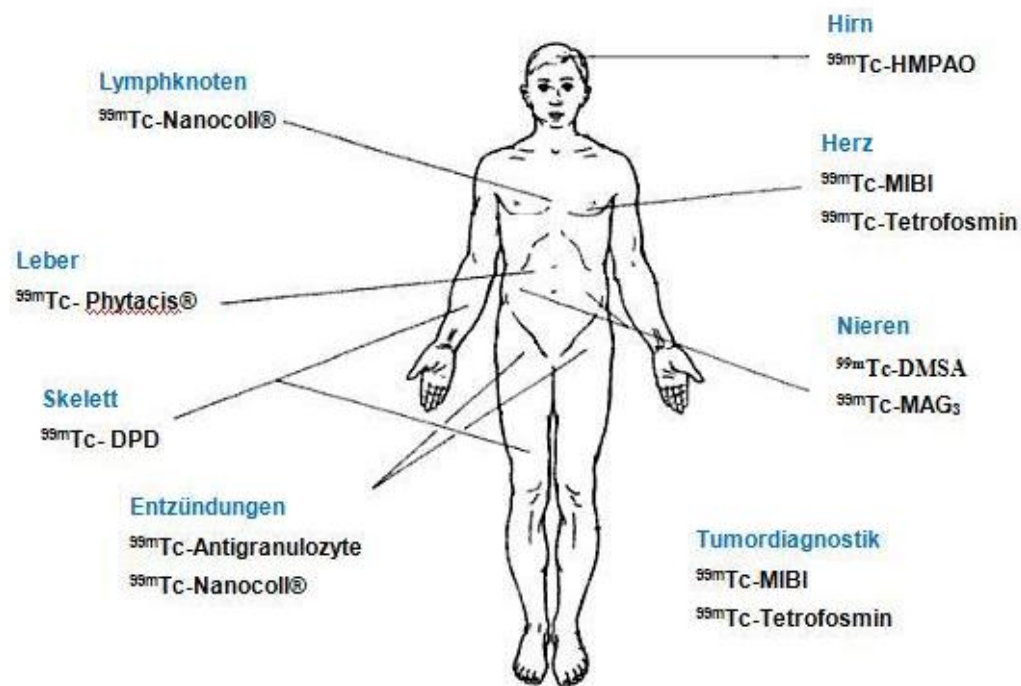


Abb. 7 Anwendung der ^{99m}Tc -Radiopharmaka [14]

1.7. Grundlagen der Dünnschichtchromatographie

1.7.1. Historisch

Der russische Botaniker Michael Tswett verwendete erstmals 1903 in der Literatur den Begriff „chromatographische Adsorptionsanalyse“. Es gelang ihm, Pflanzenfarbstoffe an unterschiedlichen Adsorbentien in Säulen zu trennen. [26] Dadurch, dass die getrennten Substanzen als farbige Banden auf der Säule erschienen, prägte Tswett den Begriff Chromatographie. Aus dem Griechischen übersetzt bedeutet es „Farbe schreiben“. [27] Die Geschichtsschreibung der Dünnschichtchromatographie beginnt mit den Arbeiten von N. A. Izmailov und M. S. Shraiber 1938, die galenische Zubereitungen an losen Aluminiumoxidschichten auf Glasplatten trennten. Dies geschah, indem sie bestimmte Lösungsmittel im Auftragepunkt der Probe ständig nachtropfen ließen. Mainhard und Hall verwendeten erstmals Schichten, die mit Stärke als Bindemittel stabilisiert wurden. Kirchner et al. führten Gips als Bindemittel ein und fanden heraus, dass sich Kieselgel hervorragend als Sorbens eignet. Egon Stahl führte 1956 den Begriff „Dünnschichtchromatographie“ ein. Er arbeitete mit den Firmen Merck und Desaga zusammen und brachte ein wesentlich feinkörnigeres und standardisiertes Kieselgel auf den Markt. Sie entwickelten auch eine leistungsfähige Ausrüstung zur Schichtpräparation und Trennung. [28] Diese Arbeit führte zu einer Standardisierung der Sorbentien und der Gerätschaften und dadurch wurde die Dünnschichtchromatographie als Verfahren der analytischen Chemie voll anerkannt und hat sich etabliert. [29]

1.7.2. Grundlagen

Unter Chromatographie versteht man ein physikalisch-chemisches Trennverfahren für analytische und präparative Zwecke. Die zu trennenden Substanzen werden zwischen zwei nur begrenzt bzw. nicht miteinander mischbaren Phasen verteilt, von denen die eine, die stationäre Phase, unbeweglich ist, während sich die andere, die mobile Phase, über die stationäre Phase bewegt.

Die verschiedenen chromatographischen Verfahren werden eingeteilt nach dem Phasenaufbau z.B. nach der verwendeten mobilen Phase (Fließmittel) oder der stationären Phase (Sorbens) und nach der Ausführungstechnik.

Eine weitere Klassifikation kann nach den Trennprinzipien erfolgen. Die wichtigsten sind Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch und Molekülausschluss.

2. Methoden und Materialien

2.1. Herstellung von ^{99m}Tc -Radiopharmaka

Auf Grund seiner exzellenten chemischen und physikalischen Eigenschaften (6 Stunden Halbwertszeit, reiner Gamma-Strahler mit einer günstigen Energie von 140 keV) wird Technetium-99m in der Nuklearmedizin sehr häufig verwendet. Über 80 % aller Radiopharmaka, die in der diagnostischen Nuklearmedizin verwendet werden, basieren auf diesem kurzlebigen Nuklid, das durch Elution eines Generators erhalten wird, der in jeder nuklearmedizinischen Abteilung vorhanden ist. [10]

Um eine Reaktion mit einem Liganden zu ermöglichen, muss Technetium reduziert werden, da es nach der Elution aus dem Generator als negativ geladenes Pertechnetat Anion vorliegt und in dieser Form relativ stabil ist. Das reduzierte Technetium kann dann an einen Liganden binden. Dadurch entsteht ein Technetium Komplex und damit das gewünschte Radiopharmakon. [10]

2.1.1. Markierung mit vorgefertigten Kits

Die Herstellung von ^{99m}Tc -Technetium-Radiopharmaka direkt am Ort der Anwendung wird durch Markierungsbestecke, sogenannte Kits, die sämtliche für die Markierung erforderlichen Bestandteile in lyophilisierter Form enthalten, ermöglicht. [1] Diese industriell vorgefertigten Reagenziensätze sind pyrogenfrei, steril und gefriergetrocknet. Durch Zugabe von ^{99m}Tc -Natriumpertechnetat, welches aus dem Generator eluiert wurde, wird das gewünschte, mit ^{99m}Tc -markierte Radiopharmakon in steriler, injizierbarer Form erhalten. Die Dauer der Markierung beträgt zwischen 10 und 15 Minuten und muss eine Markierungsausbeute von mehr als 95 % erreichen. Damit eine einwandfreie Markierung stattfindet, muss die Markierungsvorschrift des Herstellers eingehalten werden. [14]

Ein solcher Kit enthält im Allgemeinen den Ligand, ein Reduktionsmittel, Puffersubstanzen, Stabilisatoren und eventuell andere Hilfsstoffe.

Das Reduktionsmittel ist bei den derzeitigen verwendeten Kits fast ausschließlich Zinn(II)chlorid, welches $^{99m}\text{TcO}_4^-$ auch im schwach sauren pH-Bereich reduziert. Um die leichte Oxidierbarkeit der Zinn(II)-Verbindungen durch Luftsauerstoff zu verhindern, werden Kits unter Stickstoffzufuhr abgefüllt.

Die Puffersubstanzen dienen dazu, den gewünschten pH-Wert für die Reaktion einzustellen, da eine Änderung des Wertes die Art und das Ausmaß der Reaktion

wesentlich beeinflussen kann. Außerdem wird dadurch die physiologische Verträglichkeit gewährleistet.

Zu den Stabilisatoren gehören schwache Komplexbildner und Antioxidantien, die eine Oxidation des Zinns verhindern sollen.

Hilfsstoffe, wie zum Beispiel Kochsalz, werden verwendet, um die Verträglichkeit des Radiopharmakons zu gewährleisten und eine Blutisotonie einzustellen. [12]

2.1.2. Durchführung der Markierung

Nach Elution des Generators wird die gewünschte Aktivität von ^{99m}Tc -Pertechnetat in dem vom Hersteller des Kits angegebenen Volumen aufgezogen und unter Luftabschluss in die Reaktionsflasche injiziert. Diese wird danach mit Hilfe der verwendeten Spritze entlüftet, um eine Kontamination bei der Entnahme der einzelnen Proben zu verhindern, da bei großen Volumina die Reaktionsflasche unter Überdruck stünde. Danach wird das Lyophilisat durch Schütteln gelöst und in der vom Hersteller angegebenen Zeit inkubiert. Die benötigten Einzeldosen können nun entnommen werden. [11]

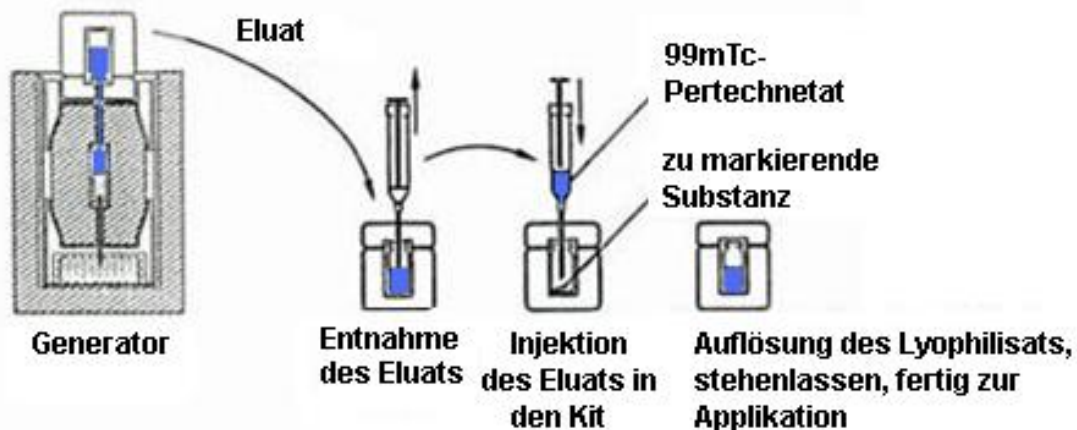


Abb. 9 Markierung mit Hilfe eines Kits [14]

Die wichtigsten Faktoren, die die Qualität bei der Markierung beeinflussen, sind ein niedriger Anteil an ^{99}Tc im Generatoreluat und die vollständige Reduktion des Pertechnetats. Bei Einhaltung der Markierungsvorschrift beträgt der Gehalt an freiem Pertechnetat in den meisten Kits unter 1 % der Gesamtaktivität. Außerdem sollte beachtet werden, dass der Zeitraum zwischen den Elutionen des ^{99m}Tc -Generators nicht zu lange ist. [11]

2.2. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (im Englischen thin layer chromatography, TLC genannt) gehört zur planaren Flüssigchromatographie. Diese Trennmethode bietet viele Vorteile gegenüber klassischen Methoden, die vor allem für die Pharmazie von großer Bedeutung sind. Bei einem geringen apparativen Aufwand erhält man Ergebnisse mit einer hohen Aussagekraft. Dadurch ist sie eine relativ kostengünstige Methode. Weitere wichtige Vorteile sind die hohe Selektivität des Nachweises, die niedrigen Nachweisgrenzen, die hohe Trennleistung und der geringe Zeitaufwand.

Mit der Dünnschichtchromatographie ist es möglich, eine Trennung von verschiedenen gelösten Stoffen durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen dem zu trennenden Stoffgemisch und der stationären sowie der mobilen Phase zu erreichen. Der Trennungsmechanismus beruht vorwiegend auf der Adsorption der Substanz durch hydrophile Wechselwirkungen an der Oberfläche einer festen stationären Phase und der Verteilung zwischen zwei miteinander nicht mischbaren flüssigen Phasen. Weitere in der Chromatographie wichtige Mechanismen der Trennung sind Molekularsiebwirkung (Ausschluss), Ionenaustausch und Bioaffinität. Selten treten diese Effekte alleine auf, daher ist manchmal keine hundertprozentige Abgrenzung möglich. Vielmehr können sie bei jedem chromatographischen Verfahren in unterschiedlichem Ausmaß gemeinsam wirksam sein.

2.2.1. Stationäre Phasen

Als Sorbentien sind Materialien geeignet, die bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllen. Dazu zählt, dass sie in dem verwendeten Fließmittel unlöslich sind und keine Bestandteile enthalten oder abgeben, welche die Trennung oder die Detektion stören oder beeinflussen. Darüber hinaus müssen sie eine genügende Abriebfestigkeit besitzen und sollten keine Eigenfarbe aufweisen. [28]

In der Adsorptionschromatographie wird eine stationäre Phase aus einer aktiven Sorbensschicht verwendet, während in der Verteilungschromatographie eine modifizierte Sorbensschicht bzw. ein Flüssigkeitsfilm, der auf ein inertes Trägermaterial, wie Kieselgur oder Cellulose aufgebracht ist, benutzt wird. [30] In der Dünnschichtchromatographie wird das Sorbens in Form einer gleichmäßigen dünnen Schicht (mit einer Schichtdicke von 200 – 250 µm) auf eine Trägerplatte aufgebracht. Diese besteht aus Glas, Kunststoff oder einer Aluminiumfolie. Zur besseren Haftung der stationären Phase auf der Trägerplatte werden oftmals Calciumsulfat, Stärke oder

Polymere als Bindemittel verwendet. [27] Die Adsorptionskraft des Sorbensmaterials ist abhängig von seiner Partikelgröße, seiner spezifischen Oberfläche, vom Porenvolumen und vom mittleren Porendurchmesser. [29]

Beschichtungsmaterial	Überwiegender Trennmechanismus	spezielle Anwendungsgebiete
Aluminiumoxid	Adsorptionschromatographie	Alkaloide, Steroide, Terpene, aliphatische und aromatische Verbindungen
Cellulose (unmodifiziert)	Verteilungschromatographie polarer Substanzen je nach Acetylierungsgrad Übergang Normal Phase → Reversed-phase-Chromatographie	Aminosäuren, Carbonsäuren, Kohlehydrate
Cellulose (acetyliert)		Anthracenderivate, Antioxidantien, mehrkernige Aromaten, Carbonsäuren, Nitrophenole, Süßstoffe
Cellulose-Ionenaustauscher	Anionenaustausch	Aminosäuren, Peptide, Enzyme, Nucleotide, Nucleoside,
Mischschicht CEL 300 DEAE/HR 2/15	Ionenaustausch	Mono- u. Oligonucleotide in Nucleinsäurehydrolysaten
IONEX Ionenaustauscher	Kationen- bzw. Anionenaustausch	Aminosäuren, Nucleinsäurehydrolysate, Aminosucker, Antibiotica, anorg. Phosphate, Kationen
Kieselgur	Verteilungschromatographie, meist imprägniert für Reversed-phase-Trennungen	Zucker
Kieselgel	Adsorptions- und Verteilungschromatographie	
Polyamid	Wasserstoffbrückenbindung	Phenolische u. polyphenolische Naturstoffe
modifizierte Kieselgele:		
RP	Reversed-phase-Chromatographie	

Abb. 10 Fertigschichten für die Dünnschichtchromatographie [29]

Kieselgel

Kieselgel ist das am häufigsten verwendete Sorbens in der Dünnschichtchromatographie. Es wird aus Wasserglas durch Fällung mit Schwefelsäure hergestellt und ist ein amorphes, hochporöses und oberflächenreiches Siliziumdioxid. Durch unterschiedliche Fällungsbedingungen und Nachbehandlungen des noch bildsamen Hydrogels ist es möglich, Porensystem und Oberfläche den speziellen Anforderungen an die Aktivität anzupassen. [28] Die interne Oberfläche des Kieselgels wird durch die Teiloberfläche kugelförmiger Partikel gebildet. Diese bestehen im Inneren

aus Siloxanketten ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) und an der Oberfläche aus Silanol- ($-\text{SiOH}$) und Silandiol-Gruppen ($-\text{Si}(\text{OH})_2$). Die Oberfläche des Partikels kann 3 – 12 Oberflächen der Nachbarpartikel berühren. Dadurch bildet sich ein Konglomerat von mit Kapillaren durchsetzten Räumen mit verflochtenen Membranen. Die spezifische Oberfläche und der Porendurchmesser der Schicht werden durch die Größe und Häufigkeit der Gruppierung der elementaren Partikel bestimmt. [29] Die hauptsächlich von den SiOH -Gruppen ausgehenden polaren Wechselwirkungen bewirken eine starke Wasserstoffbrückenfunktion und machen das Kieselgel hydrophil und polar. Die Adsorptionsaktivität des Kieselgels wird physikalisch über Wasserstoffbrücken gebundenes Wasser bestimmt. [28]

Kieselgel 60 wird heute am häufigsten eingesetzt. Die Zahl hinter dem Namen des Sorbens bezeichnet den mittleren Porendurchmesser des Sorptionsmittels in der früher gebräuchlichen Längeneinheit Å ($10 \text{ Å} = 1 \text{ nm}$). [31]

Modifizierte Kieselgele

Modifizierte Kieselgele werden auch RP-Phasen (reversed phase) oder Umkehrphasen genannt.

Sie entstehen durch Umsetzung von standardisiertem Kieselgel 60 mit Chloralkyl- bzw. Dichlordialkylsilanen unterschiedlicher Kettenlänge (z.B. C_2 , C_4 , C_8 und C_{18}), wobei mit zunehmender Kettenlänge die Polarität sinkt und die Hydrophobie ansteigt. Die Alkylsilane werden durch Silylierung kovalent an die Silanolgruppen des Kieselgels gebunden.

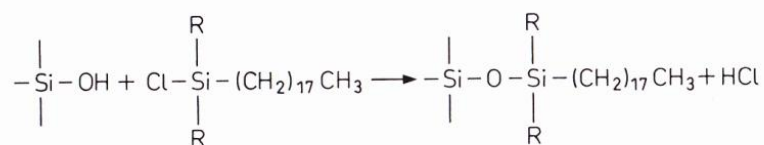


Abb. 11 Silylierung der Alkylsilane [29]

Durch die Umkehrphasen wird die Durchführung einer Verteilungschromatographie ermöglicht. Dieser Prozess überwiegt umso mehr, je vollständiger die Umsetzung erfolgt und je besser die Abschirmung der verbleibenden Silanol-Gruppen des Kieselgels ist.

Die Trennung der Substanz erfolgt durch Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen mit der stationären Phase, wobei das Verteilungsgleichgewicht von der Retention der Einzelsubstanzen an der mobilen bzw. stationären Phase abhängt. [29]

Ein Problem der Umkehrphase ergibt sich dadurch, dass bei der Alkylierung des Kieselgels nur ca. 50 % der Si-OH-Gruppen umgepolt werden können. Dadurch sind die übrigen sterisch abgeschirmt ("umbrella effect") und führen dazu, dass die stationäre Phase noch wasserbenetzbar ist. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird beim sogenannten "endcapping" das modifizierte Kieselgel nochmals mit dem wesentlich kleineren Trimethylchlorsilan umgesetzt und somit weitere Si-OH-Gruppen alkyliert. Dadurch werden die hydrophoben Eigenschaften der Umkehrphase verstärkt. [32]

ITLC

Sogenannte Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) – Materialien von Gelman Science Inc. sind die am meisten verwendeten stationären Phasen in der Nuklearmedizin.

Diese Methode bietet eine rasche und genaue Analyse der radiochemischen Reinheit von Radiopharmaka und ist dadurch auch als Prüfmethode im Europäischen Arzneibuch angeführt.

Die ITLC Platte besteht aus einer Glasfaserplatte, die mit Kieselgel imprägniert ist. Dadurch kommt es zu einer wesentlich stärkeren Kapillarwirkung und durch die Feinporigkeit des Materials zu deutlich verkürzten Entwicklungszeiten von meist unter 5 Minuten. [10]

Cellulose

Cellulose zählt zu den Papiermaterialien und wird als pulverförmiges Dünnschichtchromatographie-Sorbens aus hochreiner Baumwollcellulose gewonnen. Es wird zwischen einer nativen Cellulose mit weitgehend erhaltener Faserstruktur und einer chemisch stark abgebauten mikrokristallinen Cellulose mit großem Quellvermögen unterschieden. [28] Cellulose besteht vorwiegend aus β -1,4-glykosidisch verknüpften Cellobiose-Einheiten und ist in der Lage, Wasserstoffbrücken sowohl innerhalb des Cellulosegerüsts als auch mit Flüssigkeiten wie Wasser und Alkohol zu bilden.

Die Trennung erfolgt überwiegend durch verteilungschromatographische Methoden, jedoch können Adsorptionseffekte nicht ausgeschlossen werden. [29]

Aluminiumoxid

Das zur Dünnschichtchromatographie verwendete Aluminiumoxid wird aus Hydrargillit durch Entwässerung bei ca. 500° Celsius hergestellt. Der Trennmechanismus beruht wie

beim Kieselgel auf Adsorptionseffekten, allerdings weist es eine geringere Aktivität auf. Durch unterschiedliche Entwässerungstemperaturen lassen sich Porensystem und Oberfläche beeinflussen. Auf Grund seines polaren Kristallgitters ist die Modellierbarkeit jedoch eingeschränkt. Aluminiumoxid ist katalytisch aktiv und reagiert in wässriger Lösung schwach alkalisch. Durch den Hersteller kann Aluminiumoxid aber auch neutral, durch Verwendung von Gips als Bindemittel, oder sauer eingestellt werden. [28]

Tec-Control-Chromatography Strips

Tec-Control ist ein verkleinertes Chromatographiesystem, welches speziell für die Prüfung der radiochemischen Reinheit von bestimmten Radiopharmaka entwickelt wurde. Je nachdem welche Verunreinigung nachgewiesen werden soll, stehen unterschiedlich gefärbte Teststreifen zur Verfügung. Die roten und schwarzen Teststreifen sind durch 3 Trennlinien geteilt: einer Auftragelinie, einer Schnittlinie und der Lösungsmittelfrontlinie. [33]

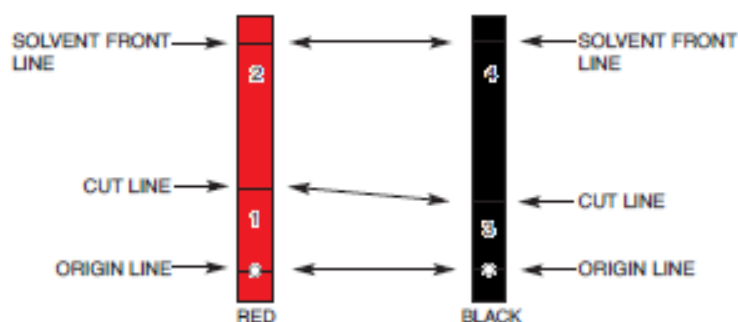


Abb. 12 Tec-Control-Chromatography Strips Rot und Schwarz [33]

2.2.2. Mobile Phasen

Die richtige Wahl des Fließmittels, welches auch als Lauf-, Elutions- oder Entwicklungsmittel bezeichnet wird, ist ein entscheidender Faktor für den Trennerfolg der Dünnschichtchromatographie. Das Fließmittel stellt die mobile Phase dar und dient zum Transport der zu trennenden Substanzen über die chromatographische Schicht. Diese Trennung beruht in der Adsorptionschromatographie auf Verdrängungsprozessen. [29]

Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie sollten gewisse Forderungen erfüllen. Die Bestandteile sollten nicht toxisch und leicht zu entsorgen sein. Es sollte eine genügende Reinheit aufweisen, um die Ausbildung von Schmutzfronten oder einer desaktivierenden Schicht zu vermeiden. Das Fließmittel braucht eine ausreichende

Eine weitere Orientierung für die Wahl des Fließmittels bildet das Dreieck nach Stahl. Mit einer Spitze des in der Mitte drehbaren Dreiecks wird die ungefähre Polarität des zu trennenden Substanzgemisches eingestellt. Dadurch kann man, mit Hilfe der zwei anderen Spitzen, die günstigen Eigenschaften der mobilen und stationären Phase ablesen. [26]

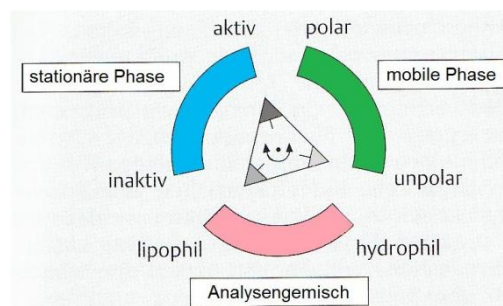


Abb. 13 Dreieck nach Stahl [30]

2.2.3. Durchführung der Dünnschichtchromatographie

2.2.3.1 Vorbereitung der DC-Platten

30

wird später die Probe aufgetragen. Sie soll verhindern, dass die Probe bei der anschließenden Entwicklung in der DC-Kammer in die mobile Phase eintaucht. Ca. 0.5 cm vom oberen Rand der DC-Platte wird ebenfalls mit einem Bleistift die Laufmittelfront eingezeichnet. Um bei der Entwicklung die Laufmittelfront besser sichtbar zu machen, kann, je nach verwendetem Laufmittel, ein kleiner Punkt mit einem wasserlöslichen oder wasserfesten Marker gemacht werden. Wenn das Laufmittel den markierten Punkt erreicht hat, wandert die Farbe mit dem Lösungsmittel mit und zeigt dadurch das Ende der Entwicklung an.

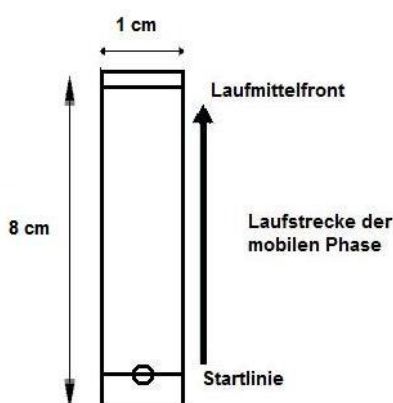


Abb. 14 Größe und Markierung einer DC-Platte

2.2.3.2. Arten von Trennkammern

Das Dünnschichtchromatogramm wird in der sogenannten Trennkammer oder Elutionskammer entwickelt.

Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Trennkammern, die dem jeweiligen Entwicklungstyp angepasst werden müssen, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Austauschreaktionen haben. Die am häufigsten verwendete Kammer ist die Normalkammer, die auch Flachbodenkammer oder Standardkammer genannt wird. Sie ist rechteckig geformt und besteht aus Glas. Die Normalkammer besitzt einen plangeschliffenen Deckel aus Glas oder einen Deckel aus Edelstahl. Dieser ist besonders wichtig, um einen dichten Verschluss der Kammer zu gewährleisten. [29]

Um Fließmittel einzusparen, können sogenannte Doppeltrogkammern verwendet werden. Sie sind charakterisiert durch eine Schwelle am Boden, die den Trog teilt. Dadurch ermöglichen sie eine Vorkonditionierung der DC-Platte. Das Fließmittel befindet sich zuerst in einer Trogkammer und sättigt den Gasraum. Nach etwa 10 Minuten Vorbeladung gelangt das Fließmittel durch Kippen der Kammer in die Trogkammer mit der Platte, wodurch die Entwicklung gestartet wird. [29]

2.2.3.3. Auftragen der Probe und Entwicklung in der Trennkammer

Das Auftragen der Probe ist einer der wichtigsten Schritte in der Dünnschichtchromatographie, da es durch unsachgemäßes Arbeiten zu mangelhaften Chromatogrammen und somit zu einer erschwerten Auswertung kommen kann. Die häufigsten Fehler sind das Aufbringen von zu großen Probenmengen und das Überladen der Platte. [27]

Die Probe kann punktförmig oder strichförmig aufgetragen werden, wobei bei Radiopharmaka die erste Variante bevorzugt wird.

Mittels steriler Einmalspritze und unter Verwendung einer dünnen Nadel wird die Probe aus dem Kit entnommen. Auf der Dünnschichtplatte wird ein kleiner Tropfen in der Mitte der Startlinie aufgebracht, der sich durch vorsichtiges Rückführen des Stempels auf der Spitze der Nadel vorher gebildet hat. Bei der Qualitätskontrolle von Radiopharmaka wird der Tropfen nicht getrocknet, um eine Handhabung der Probe unter denselben Bedingungen, die bei der Applikation am Patienten verwendet wird, zu garantieren. Die Dünnschichtplatte wird sofort nach dem Auftragen der Probe in der Trennkammer entwickelt. [12]

In der Trennkammer muss der Boden mit ausreichend Fließmittel bedeckt sein, jedoch nicht höher als ca. 0.5 cm, um ein Eintauchen der Probe in der mobilen Phase zu verhindern.

Die häufigste und einfachste Form, die Probe aufzutrennen, ist die aufsteigende Entwicklung. Dabei wird die DC-Platte senkrecht oder schräg in die Trennkammer gestellt und der Deckel sofort geschlossen. Durch das Eintauchen der Platte in das Fließmittel wird die Entwicklung gestartet. Die mobile Phase wird durch die Kapillarkwirkung an der Platte nach oben bewegt. Wenn die Laufmittelfront erreicht ist, wird die DC-Platte aus der Trennkammer herausgenommen und die Entwicklung ist abgeschlossen. [28]

Bevor die DC-Platte ausgewertet werden kann, muss zuerst das Laufmittel abgedampft werden. Dies geschieht, indem man die Platte kurze Zeit auf eine Heizplatte legt.

2.2.4. Auswertung

Bei der quantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen in der Radiopharmazie ist die hohe analytische Präzision weniger von Bedeutung. Für die klinische Anwendung zählt die Schnelligkeit, mit der ein Ergebnis erhalten wird. Dadurch wird beurteilt, ob ein Präparat dem Patienten verabreicht werden kann oder nicht. [12]

In dieser Arbeit wurden die Dünnschichtplatten bezüglich ihrer Laufzeit und die Chromatogramme entsprechend ihrer R_f -Werte mit Hilfe eines Gamma Dünnschichtscanners ausgewertet. Für die radiochemische Auswertung wurde ein Bohrlochzähler verwendet.

2.2.4.1. Dauer der Laufzeit

Die Laufzeit der DC-Platte wurde mit Hilfe einer Stoppuhr bestimmt. Gestartet wurde die Zeit beim Eintauchen der Platte in das Fließmittel, gestoppt wurde beim Erreichen der Fließmittelfront. Für die Qualitätskontrolle von Radiopharmaka sind Platten mit einer Laufzeit von unter 5 Minuten erwünscht.

2.2.4.2. R_f -Wert

In der Dünnschichtchromatographie werden Chromatogramme durch das Ausmaß der Retention der Probe auf der Platte ausgewertet. Die verschiedenen Bestandteile der Probe werden je nach ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften auf der Platte zurückgehalten und dadurch getrennt. Die Strecke, welche jede Komponente der Probe wandert, wird durch den R_f -Wert, auch Retentionsfaktor genannt, ausgedrückt.

$$R_f = \frac{\text{Wanderstrecke der Probe}}{\text{Wanderstrecke der mobilen Phase}}$$

Der R_f -Wert ist definiert als Quotient aus der Wanderstrecke der Probe und der mobilen Phase von der Startlinie aus. Der errechnete R_f -Wert liegt immer zwischen 0 und 1. Wandert eine Komponente mit der mobilen Phase mit und wird nicht auf der Platte zurückgehalten, ist der R_f -Wert 1. Bleibt eine Komponente auf der Startlinie, ist der R_f -Wert 0. Für ein System, das durch die mobile und stationäre Phase definiert ist, ist der R_f -Wert für eine reine Substanz spezifisch und reproduzierbar. [10]

2.2.4.3. Messung mit dem Gamma Dünnschichtscanner

Für diese Arbeit wurde der Gita Star Dünnschichtscanner der Firma Raytest verwendet. Gita Star (Gamma Isotope Thin layer Analyzer) ist ein Gerät zum Messen und Analysieren von Dünnschichtplatten, auf denen radioaktive Proben entwickelt wurden. Die Messfläche des Gerätes beträgt 200 x 400 mm Länge. Es können unterschiedliche stationäre Phasen wie z.B. Glasplatten, Aluminium- oder Papierstreifen gemessen

werden, da der Detektor manuell der Stärke der DC-Platte angepasst werden kann. Er sollte so nahe wie möglich an die Plattenoberfläche gebracht werden, ohne diese zu berühren. Der Radioaktivitätsdetektor ist mit einem schmalen Schlitz in einem Kollimator versehen, um damit die Position des Strahlenemitters zu definieren. Der Detektorkopf enthält den BGO-Szintillationskristall. In dem Kristall werden kurze Lichtblitze von der ionisierenden Strahlung erzeugt, welche von dem ebenfalls im Detektorkopf befindlichen Photomultiplier detektiert und in elektrische Pulse umgewandelt werden. Diese Pulse werden dann an die Zählelektronik weitergeleitet. Mit diesem Gerät ist eine Messung des Energiebereiches von 25 keV bis 1600 keV möglich. [34] Mit Hilfe der angeschlossenen Software werden die Chromatogramme automatisch gezeichnet und die Ergebnisse berechnet.

Chromatogramme sind graphische Darstellungen, bei denen das Detektorsignal gegen die Zeit aufgetragen wird. Je nach Art des Detektors erhält man entweder eine differentielle Form, bei der man für die Analyten Signale in Form einer Gaußkurve erhält, die man als Peaks bezeichnet, oder die integrale Form, bei der man stufenförmige Signale bekommt. Zur Quantifizierung der Chromatogramme können sowohl die Peakfläche als auch die Peakhöhe herangezogen werden, wobei beide Parameter proportional zur Konzentration der Analyten in der Probe sind. [27]

2.2.4.4. Messung mit dem Bohrlochzähler

Mit dem Bohrlochzähler, der auch Gamma counter genannt wird, können gammastrahlen-emittierende Proben quantifiziert werden. Der Bohrlochdetektor besteht aus einem NaI(Tl)-Szintillationskristall mit einer Bohrung, in welche die Probe eingeführt und somit in der Mitte des Kristalles positioniert wird. Die von der Probe abgegebenen Gammastrahlen interagieren mit dem Kristall und dieser sendet Lichtblitze aus, die mit Hilfe eines Photomultipliers von Lichtenergie in elektrische Energie umgewandelt werden. Das Prinzip gleicht dem Szintillationszähler. Der Gammazähler ist an einen Computer angeschlossen, der die Steuerung und die Auswertung der Messergebnisse übernimmt. Um eine gleichbleibende Zuverlässigkeit der Messergebnisse sicherzustellen und eine Kontamination rechtzeitig zu erkennen, ist eine tägliche Leerwertkontrolle notwendig. Dafür wird ein Probenröhrchen ohne Inhalt im Gamma counter gemessen. Eine gute Abschirmung des Detektors ist auf Grund der geringen Probenaktivität ebenfalls sehr wichtig. [2]

2.3. Sep-Pak-Methode

Sep-Pak Kartuschen sind miniaturisierte Säulenchromatographie-Systeme, die eine rasche und reproduzierbare Festphasenextraktion ermöglichen. Sie dienen zum einmaligen Gebrauch und verhelfen zu einer besonders einfachen Art der Reinigung und Analyse von Radiopharmaka.

2.3.1. Durchführung der Sep-Pak-Methode

Die Durchführung einer Qualitätskontrolle mit Hilfe einer Sep-Pak Kartusche kann in verschiedene Punkte unterteilt werden: das Vorbereiten der Probe, die Konditionierung, das Laden der Probe, das Waschen und die Eluierung. Da nicht jede Probe gleich ist, kann es sein, dass nicht alle Punkte durchlaufen werden.

Die Probe kann in flüssiger oder gasförmiger Form auf die Kartusche aufgebracht werden. Handelt es sich um eine feste Probe, muss sie vorher gelöst werden. Ein Konditionierungsschritt ist erforderlich, wenn sich in der Kartusche Umkehrphasen-Sorbentien befinden wie z.B. C18. Dafür wird ein starkes organisches Lösungsmittel wie z.B. Methanol, Acetonitril oder Isopropanol verwendet, um die stationäre Phase zu befeuchten. Anschließend folgt ein Ausgleichsschritt mit einem schwachen Lösungsmittel wie Wasser oder Puffer. Nach der Aktivierung der Säule wird die zu analysierende Probe aufgebracht.

Der anschließende Waschschrift ermöglicht die Entfernung der unerwünschten Matrix-Komponenten. Bei der Auswahl des Waschlösungsmittels ist darauf zu achten, dass nur die Matrix entfernt wird und die Probe an das Sorbens gebunden bleibt. Für komplexe Proben ist es möglich, die Waschschriffe durch Stärke und Polarität des Lösungsmittels zu optimieren.

Der letzte Schritt ist die Eluierung, die mit 2 unterschiedlichen Lösungsmitteln (meist NaCl 0,9 % und Ethanol) stattfindet. [35] Auf der Säule bleiben nicht eluierte Verunreinigungen (bei Tc^{99m}-Radiopharmaka handelt es sich dabei vor allem um Tc-Kolloide) zurück. [12]

2.3.2. Auswertung

Um die radiochemische Reinheit zu bestimmen, wird die Radioaktivität in den Eluaten und in der Säule mit einem Aktivimeter gemessen, um anschließend die Reinheit in Prozenten zu berechnen.

2.3.2.1. Messung im Aktivimeter

Aktivimeter sind unverzichtbare Bestandteile in der Nuklearmedizin und besonders in der Qualitätskontrolle von Radiopharmaka sind sie von großer Bedeutung. Sie messen die Aktivität, die in Proben oder in Volumina vorliegen, indem die durch Wechselwirkung mit der ionisierenden Strahlung im Detektorvolumen deponierte Energie nachgewiesen wird. Aktivimeter besitzen als Detektoren Ionisationskammern und eine zylinderförmige Messkammer mit einem bohrlochförmigen Hohlraum zur Aufnahme der Probe. Diese Bauweise der Kammer wird auch als „Schachtmesskammer“ bezeichnet. Um das Personal während der Messung vor der Strahlung zu schützen, ist die Messkammer oft unterhalb der Arbeitsfläche eingebaut oder mit einer Bleiabschirmung versehen. [2]

2.3.2.2. Berechnung der Markierungsausbeute

Nach der Messung der Aktivität mit dem Aktivimeter wird die radiochemische Reinheit nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Radiochemische Reinheit} = \frac{\text{gemessene Aktivität von Eluat 2}}{\text{gemessene Aktivitäten von Eluat 1 + Eluat 2 + Sep Pak Säule}} \times 100$$

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemein

Die ITLC Materialien von Gelman Sciences Inc. sind die in der Nuklearmedizin am häufigsten angegebenen Standardadsorbenten zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit. Sie werden sowohl in der Packungsbeilage von den Herstellerfirmen der Kits als auch im Europäischen Arzneibuch auf Grund ihrer kurzen Chromatographiezeiten von 3 bis 5 Minuten empfohlen. Die Firma Gelman Sciences hat die Herstellung dieser Platten seit Ende 2008 eingestellt. [36]

Ziel dieser Arbeit war es, für die in Kapitel 2.6.1. angeführten Technetium Radiopharmaka geeignete Ersatzsorbenten für die Qualitätskontrolle zu finden, da zu Beginn dieser Arbeit noch keine anderen Anbieter von ITLC Platten am Markt waren. Ist bei der Prüfvorschrift eine andere DC-Platte als ITLC angegeben gewesen, wurde ebenfalls versucht, einen Ersatz zu finden. Die verschiedenen DC-Platten sollten bezüglich Geschwindigkeit und Genauigkeit der Aussage über die radiochemische Reinheit vergleichbar mit den ITLC Platten sein.

3.1.1. Radiochemische Reinheit

Wie schon in Kapitel 2.5.4. erwähnt, bezieht sich die radiochemische Reinheit auf radioaktive Verunreinigungen mit dem gleichen Isotop in einer anderen chemischen Form.

Eine Ursache dafür kann zum Beispiel die Radiolyse sein. Darunter versteht man die durch radioaktive Strahlung verursachte Zersetzung von Molekülen. Es kommt zur Bildung von Radikalen (chemisch reaktive Substanzen), die dann z.B. unter Bildung von freiem Pertechnetat mit dem Radiopharmakon reagieren können.

Ein weiterer Grund kann die spezifische Aktivität sein, da sich das Verhältnis ^{99m}Tc zu ^{99}Tc mit der Zeit ändert. Unmittelbar nach der Elution beträgt es theoretisch 1:0, nach 24 Stunden etwa 1:4 und nach 72 Stunden 1:13.

Außerdem kann es zu Problemen mit dem Kit kommen. Diese können z.B. herstellungsbedingt durch schlechte Lösung des Lyophilisats oder durch eine falsche Lagerung auftreten.

Weitere Ursachen für Verunreinigungen können chemische Unreinheiten oder Wechselwirkungen mit den verwendeten Materialien sein. [18]

Bei ^{99m}Tc -Radiopharmaka sind die wesentlichen Verunreinigungen freies Pertechnetat, das entweder durch nicht umgesetztes Generatoreluat oder durch Reoxidation des Tc-Komplexes entstanden ist, und Tc-Kolloid, das ein nicht an den Liganden gebundenes Technetium in einer niederen Oxidationsstufe ist (hydrolisiertes reduziertes Technetium). [18]

Auf Grund der kurzen Zeit, die für die Analyse der radiochemischen Reinheit in der Nuklearmedizin zur Verfügung steht, können meist nur einfache Trennungen durchgeführt werden, bei denen die Verunreinigung und das Radiopharmakon mit der mobilen Phase mitwandern ($R_f = 1$) oder am Auftragepunkt bleiben ($R_f = 0$). Gibt es mehr als eine Verunreinigung zu detektieren, verwendet man die sogenannte 2-Streifenmethode, bei der durch Änderung der mobilen Phase die Wanderung des Radiopharmakons beeinflusst und 2 Analysen durchgeführt werden. [18]

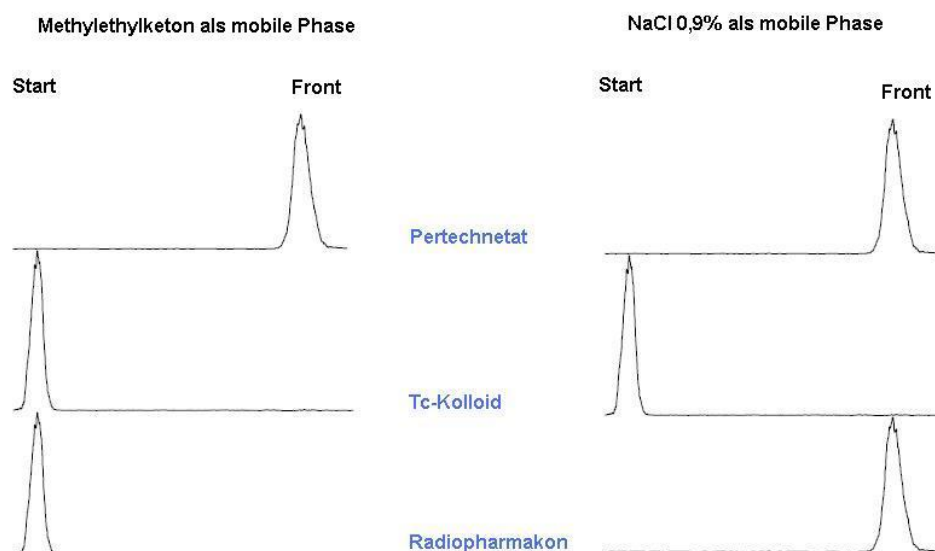


Abb. 15 Verhalten von Radiopharmakon und Verunreinigung in verschiedenen mobilen Phasen [18]

Verwendet man z.B. ein polares Fließmittel, zeigt freies Pertechnetat ein starkes Migrationsverhalten. Da Technetium Kolloid nur eine geringe Löslichkeit in den üblicherweise verwendeten Lösungsmitteln aufweist, verbleibt es am Auftragspunkt und zeigt keine Migrationstendenz. [12]

3.1.2. Grenzwerte

Für jedes in der Nuklearmedizin eingesetzte Radiopharmakon gibt es Grenzwerte für die Qualitätskontrolle der radiochemischen Reinheit, die nicht unterschritten werden dürfen. Informationen zu den genauen Werten findet man entweder im Beipackzettel des Kits oder, falls vorhanden, in der entsprechenden Monographie im Europäischen Arzneibuch. Die radiochemische Reinheit in Prozenten wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ } ^{99\text{m}}\text{Tc} - \text{Radiopharmaka} = \frac{\text{Aktivität pro Abschnitt}}{\text{Gesamtaktivität}} \times 100$$

In dieser Arbeit wurde die radiochemische Reinheit in Prozenten nur bei den Tec-Control Chromatography Strips mit Hilfe des in Kapitel 3.3.1.4. beschriebenen Bohrlochzählers berechnet, da das Hauptaugenmerk auf die R_f -Werte gelegt wurde.

Radiopharmaka	Grenzwert [%]	Referenz
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Antigranulozyte	min. 95 %	Beipackzettel
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocoll	min. 95 %	Beipackzettel
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DPD	min. 95 %	Beipackzettel
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG ₃	min. 94 %	Ph. Eur.
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA	min. 95 %	Ph. Eur.
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI	min. 94 %	Ph. Eur.
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmin	min. 90 %	Beipackzettel
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Phytacis	min. 95 %	Beipackzettel
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO	min. 80 %	Ph. Eur.

Tabelle 2 Grenzwerte der radiochemischen Reinheit

3.2. Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten mobilen und stationären Phasen sind in den nachstehenden Tabellen aufgelistet.

3.2.1. Stationäre Phasen

Bezeichnung	Abkürzung	Herstellerfirma	Größe
Chromatography paper Grade 3MM CHR	W3	Whatman	150 x 200 mm
Chromatography paper Grade 1 CHR	W1	Whatman	200 x 200 mm
Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel Impregnated Glass Fiber Sheets	ITLC	Gelman Sciences	200 x 200 mm
MN 866	MN 866	Macherey-Nagel	380 x 380 mm
Kieselgel 60: TLC Silica Gel	KG 60	Merck	200 x 200 mm
Reversed Phase 18: TLC Aluminium sheets	RP 18	Merck	200 x 200 mm
Baker Flex Aluminium Oxid	Alox	J.T. Baker	200 x 200 mm
Baker Flex Silica Gel	Silica	J.T. Baker	200 x 200 mm
Tec-Control Chromatography Strips Model# 150-005 (schwarz)	TCCS schwarz	Biodex	57 x 7 mm
Tec-Control Chromatography Strips Model# 150-001 (rot)	TCCS rot	Biodex	57 x 7 mm
Tec-Control Chromatography Strips Model# 150-025 (gelb)	TCCS gelb	Biodex	57 x 7 mm
Tec-Control Chromatography Strips Model# 150-771 (grün)	TCCS grün	Biodex	57 x 7 mm

Tabelle 3 Verwendete stationäre Phasen

3.2.2. Mobile Phasen

Bezeichnung	Herstellerfirma
Methylethylketon	Merck
Natriumchlorid 0,9 %	Braun
Aceton 100 %	Fa. SAV LP GmbH
Methanol : for HPLC > 99,9 %	Fa. SIGMA - ALDRICH
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol absolut	Merck
Isopropylether p.a. > 99,0 % (GC)	Fa. FLUKA

Tabelle 4 Verwendete mobile Phasen

3.3. Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

Es wurde bei jeder Substanz die radiochemische Reinheit von mindestens 3, bei den meisten sogar von 5 Chargen getestet. Dabei wurde immer dieselbe mobile Phase und alle in Kapitel 4.2.2. angeführten stationären Phasen verwendet. Ziel war es, die in der Packungsbeilage des Kits angegebene stationäre Phase zu ersetzen. Die unterschiedlichen DC-Platten wurden hinsichtlich ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit und ihrer Chromatogramme verglichen, wobei das größere Augenmerk auf die Zeit gerichtet war, da diese in der Nuklearmedizin eine große Rolle spielt.

Zur Auswertung wurde ein Ampelsystem verwendet. In den nachfolgenden Tabellen sind die grünen Platten am besten, die gelben noch akzeptabel und die roten nicht geeignet.

3.3.1. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Antigranulocyte

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Scintimun® Granulocyte	ITLC	Methylethylketon	$R_f = 0$	$R_f = 1$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
MN 866	0,016	< 5 min
W3	0,0188	< 10 min
W1	0,008	< 20 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	97,76 %
TCCS Rot	97,89 %
TCCS Gelb	97,27 %
TCCS Grün	96,88 %

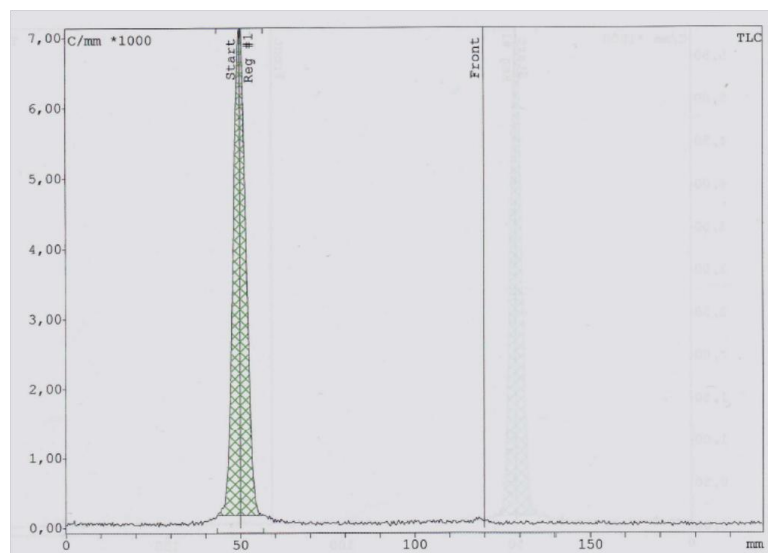


Abb. 16 Antigranulocyten Chromatogramm der ITLC Platte

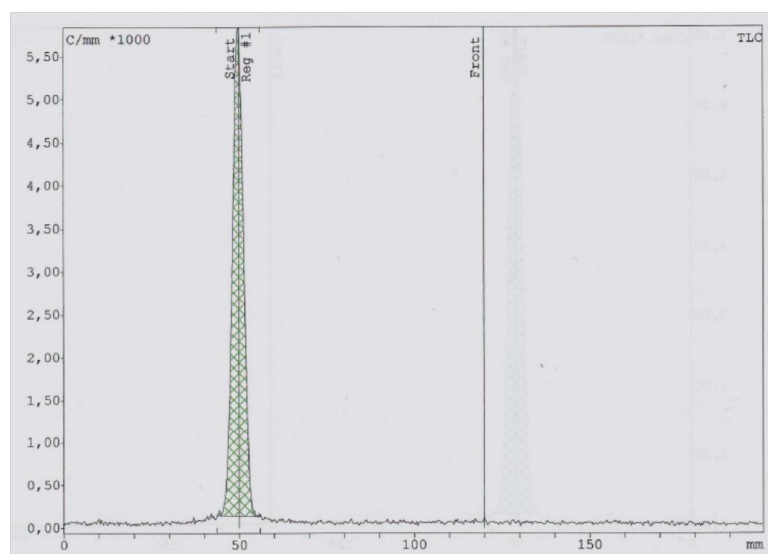


Abb. 17 Antigranulocyten Chromatogramm der MN 866 Platte

3.3.2. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc-Nanocoll

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Nanocoll®	ITLC	NaCl 0,9 %	R _f = 0	R _f = 1

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
TCCS Schwarz	0,02	< 5 min
W3	0,02	< 15 min
KG 60	0,03	< 15 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	94,10 %
TCCS Rot	99,24 %
TCCS Gelb	96,08 %
TCCS Grün	96,73 %

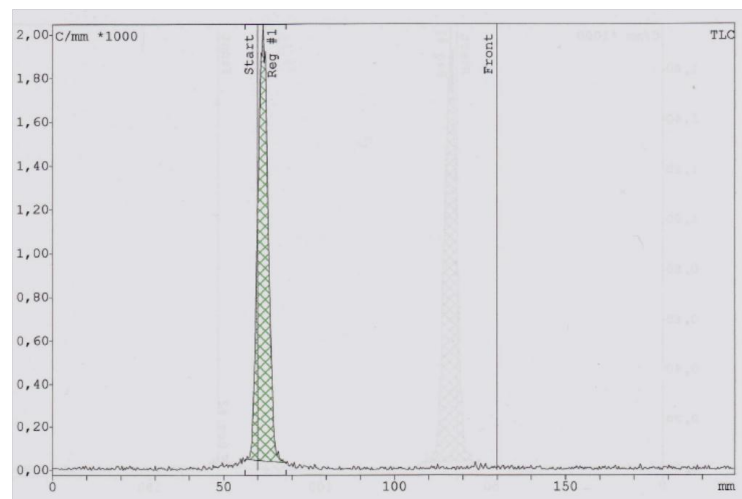


Abb. 18 Nanocoll Chromatogramm der ITLC Platte

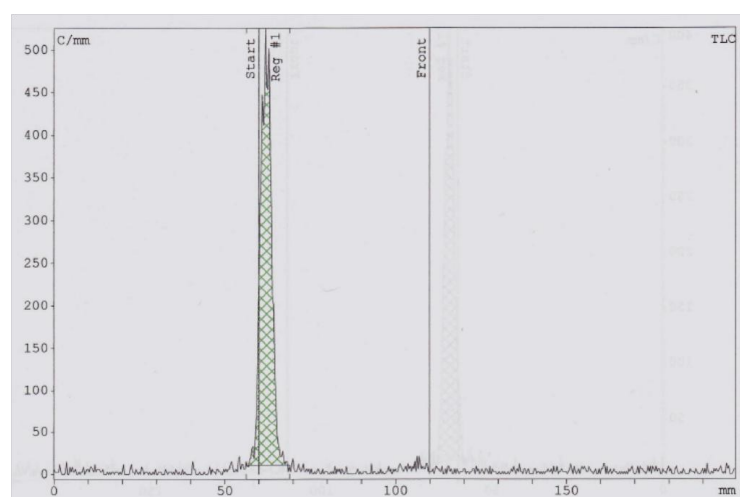


Abb. 19 Nanocoll Chromatogramm der TCCS Schwarz Platte

3.3.3. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DPD

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Teceos®	ITLC	Aceton	$R_f = 0$	$R_f = 1$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Radiochemische Reinheit in %

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
MN 866	0,07	< 5 min
TCCS Rot	0,107	< 5 min
W1	0,078	< 15 min

TCCS Schwarz	98,34 %
TCCS Rot	96,81 %
TCCS Gelb	98,27 %
TCCS Grün	96,90 %

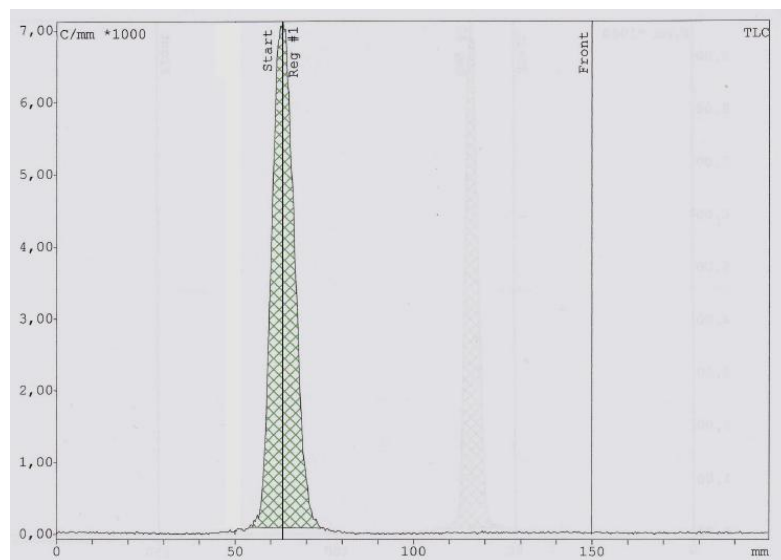


Abb. 20 DPD Chromatogramm der ITCL Platte

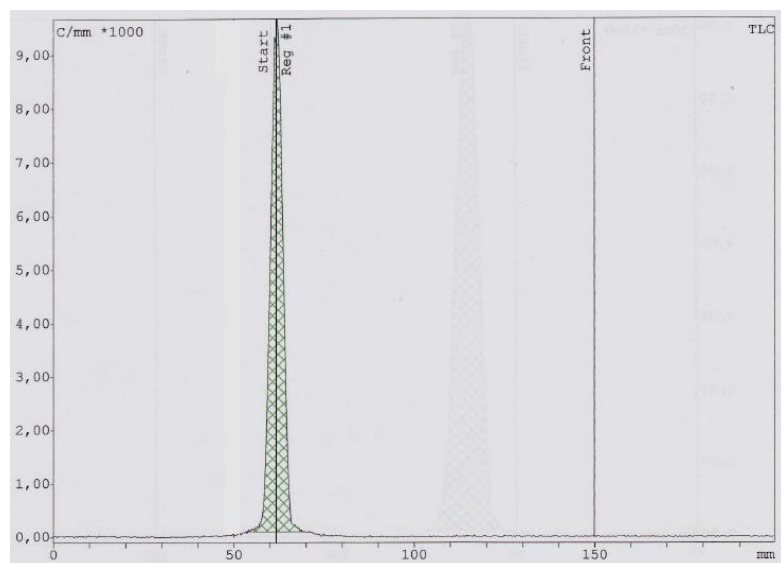


Abb. 21 DPD Chromatogramm der MN 866 Platte

3.3.4. Radiochemische Reinheit von $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
TechneScan®	RP 18	Methanol + NaCl (0,9 %) + Essigsäure (100 %) (i.V.:45 + 55 + 1)	$R_f = 0,5$	$R_f = 1$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
W3	0,64	< 30 min
W1	0,65	< 30 min
TCCS Schwarz	0,77	< 5 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	98,27 %
TCCS Rot	91,74 %
TCCS Gelb	97,98 %
TCCS Grün	98,04 %

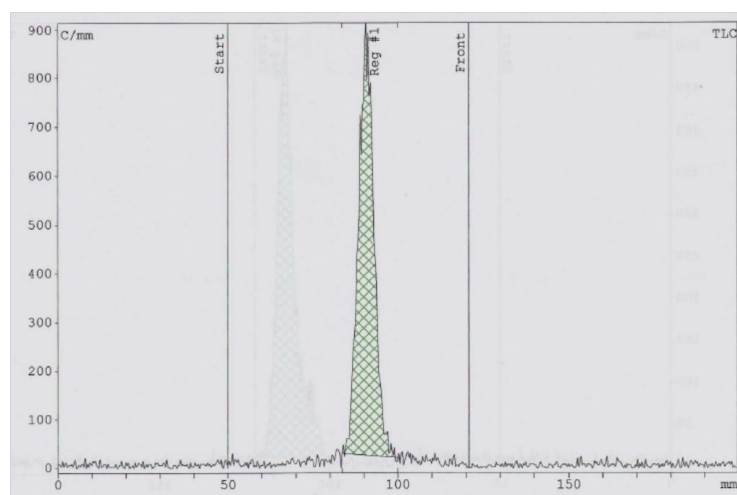


Abb. 22 MAG_3 Chromatogramm der RP18 Platte

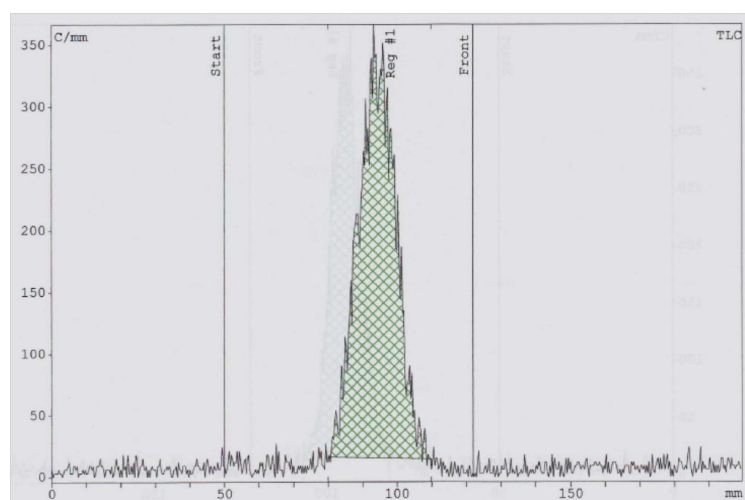


Abb. 23 MAG_3 Chromatogramm der W3 Platte

3.3.5. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DMSA

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Renocis®	Whatman 1	Methylethylketon	$R_f = 0$	$R_f = 1$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
MN 866	0,028	< 5 min
ITLC	0,038	< 5 min
TCCS Schwarz	0,024	< 5 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	99,15 %
TCCS Rot	98,21 %
TCCS Gelb	99,88 %
TCCS Grün	99,27 %

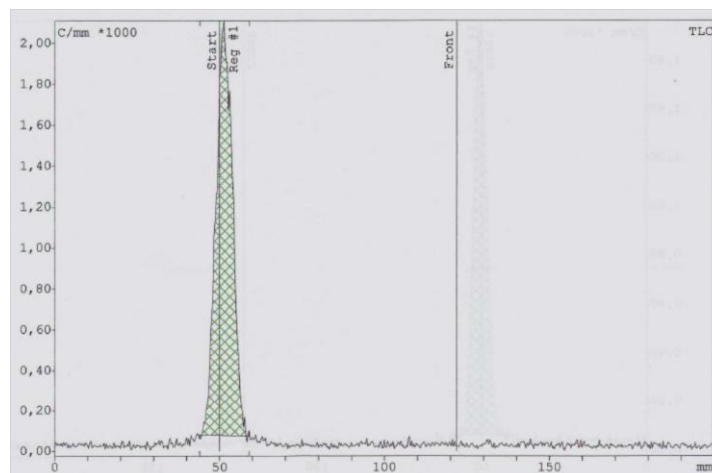


Abb. 24 DMSA Chromatogramm der W1 Platte

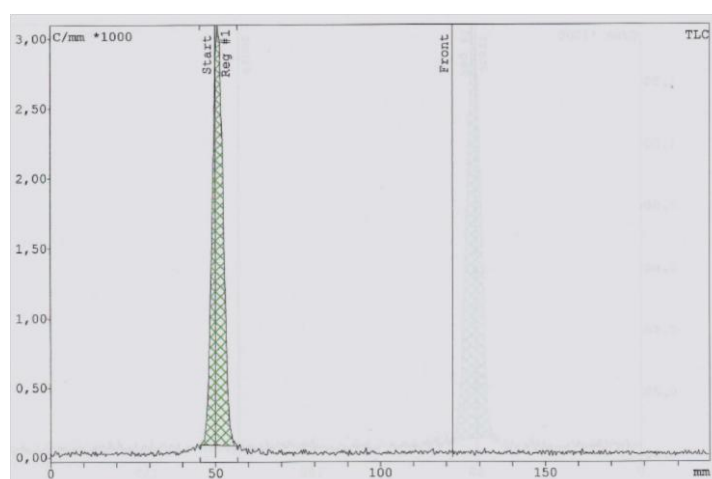


Abb. 25 DMSA Chromatogramm der MN866 Platte

3.3.6. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MIBI

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Cadiolite®	Baker Flex Aluminium Oxid	Ethanol absolut	$R_f = 1$	$R_f = 0$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Radiochemische Reinheit in %

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Rf Peak 2	Zeit
MN 866	0,025	0,9028	< 5 min
ITLC		0,9694	< 15 min
W1		0,9825	< 30 min

TCCS Schwarz	91,05 %
TCCS Rot	90,89 %
TCCS Gelb	72,83 %
TCCS Grün	93,80 %

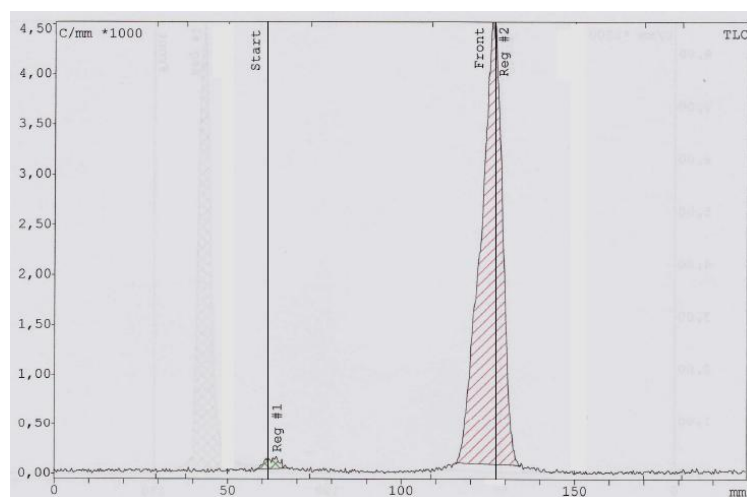


Abb. 26 MIBI Chromatogramm der Aluminium Oxid Platte

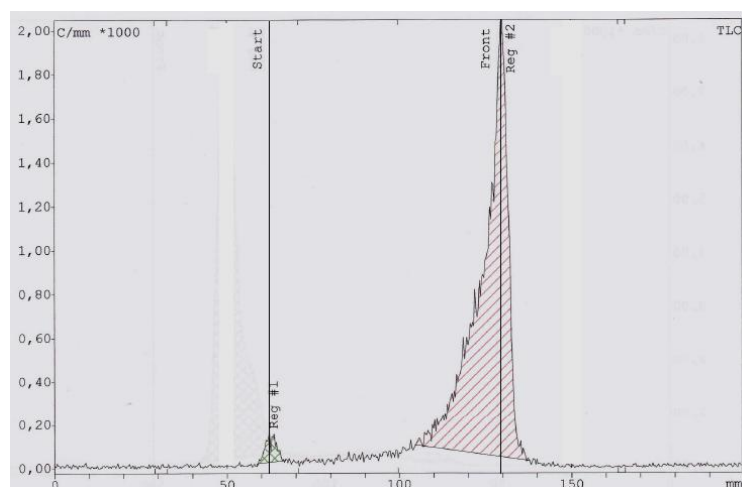


Abb. 27 MIBI Chromatogramm der MN866 Platte

3.3.7. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Tetrofosmin

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Myoview®	ITLC	Methylethylketon	$R_f = 0$	$R_f = 1$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
KG 60	0,13	< 5 min
Silica	0,156	< 10 min
RP 18	0,116	< 15 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	98,35 %
TCCS Rot	91,07 %
TCCS Gelb	99,41 %
TCCS Grün	95,12 %

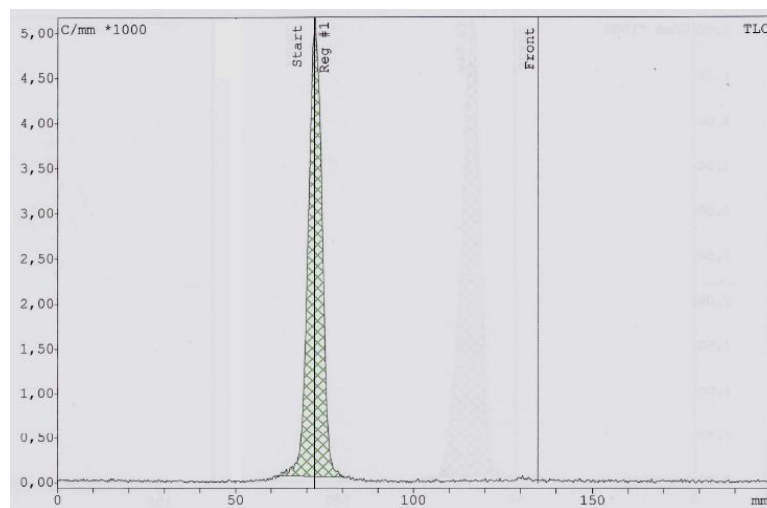


Abb. 28 Tetrofosmin Chromatogramm der KG 60 Platte

3.3.8. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc-Phytacis

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Phytacis®	Whatman 1	Methanol + Wasser (i.V.: 80 + 20)	R _f = 0	R _f = 0,6

Ergebnisse:

Chromatogramme

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Zeit
MN 866	0,05	< 5 min
TCCS Rot	0,07	< 5 min
Alox	0,05	< 20 min

Radiochemische Reinheit in %

TCCS Schwarz	91,71 %
TCCS Rot	97,47 %
TCCS Gelb	96,62 %
TCCS Grün	93,75 %

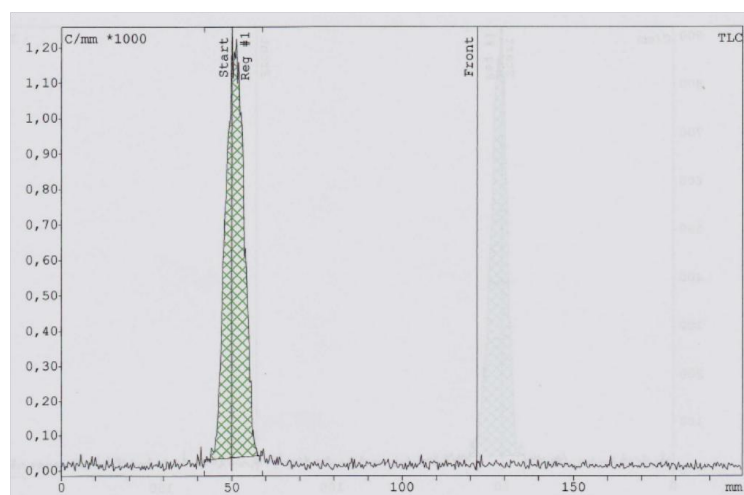


Abb. 29 Phytacis Chromatogramm der W1 Platte

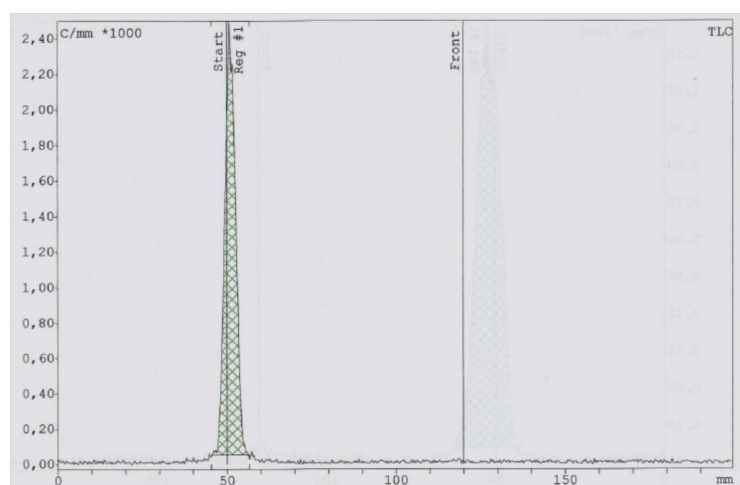


Abb. 30 Phytacis Chromatogramm der MN866 Platte

3.3.9. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -HMPAO

Präparationskit	Standard stat. Phase	Standard mob. Phase	Sollwert Produkt	Sollwert Pertechnetat
Ceretec®	MN 866	Isopropylether	$R_f = 1$	$R_f = 0$

Ergebnisse:

Chromatogramme

Radiochemische Reinheit in %

Stationäre Phase	Rf Peak 1	Rf Peak 2	Zeit
MN 866	0,05	0,94	< 5 min
W3	0,07	0,96	< 15 min
W1	0,05	0,97	< 30 min

TCCS Schwarz	73,86 %
TCCS Rot	60,99 %
TCCS Gelb	99,93 %
TCCS Grün	63,04 %

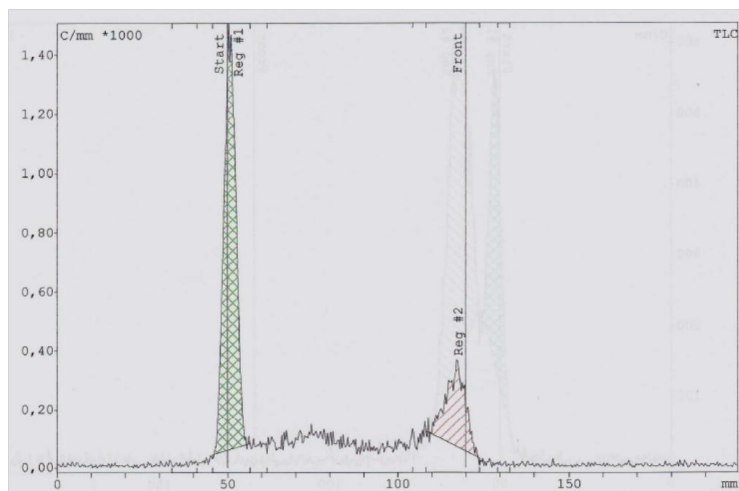


Abb. 31 HMPAO Chromatogramm der MN866 Platte

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Tabelle zeigt die am besten geeigneten stationären Phasen, die Rf-Werte der Produkte und den für die getesteten Technetium Radiopharmaka benötigten Zeitaufwand der Qualitätskontrolle.

Die angeführten Sorbentien können als gleichwertige Ersatzsorbenten für die ITLC Materialien oder für die in der Packungsbeilage der Kits und im Europäischen Arzneibuch angegebenen Standardsorbenten verwendet werden.

^{99m} Tc-Radiopharmaka	Stationäre Phase	Mobile Phase	Rf-Wert Produkt	Zeit
^{99m} Tc-Antigranulocyte	MN 866	Methylethylketon	0,02	< 5 min
^{99m} Tc-Nanocoll	TCCS Schwarz	NaCl 0,9 %	0,02	< 5 min
^{99m} Tc-DPD	MN 866	Aceton	0,07	< 5 min
^{99m} Tc-MAG3	W3	Methanol + NaCl + Essigsäure	0,64	< 30 min
^{99m} Tc-DMSA	MN 866	Methylethylketon	0,03	< 5 min
^{99m} Tc-MIBI	MN 866	Ethanol absolut	0,90	< 5 min
^{99m} Tc-Tetrofosmin	KG 60	Methylethylketon	0,13	< 5 min
^{99m} Tc-Phytacis	MN 866	Methanol + Wasser	0,05	< 5 min
^{99m} Tc-HMPAO	MN 866	Isopropylether	0,94	< 5 min

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.5. Ergebnisse der Sep-Pak-Methode

Wie in Kapitel 2.3. beschrieben, sind Sep-Pak Kartuschen miniaturisierte Säulenchromatographiesysteme zum einmaligen Gebrauch. Sie ermöglichen eine besonders einfache und rasche Qualitätskontrolle. Bei bestimmten Radiopharmaka wird die Sep-Pak-Methode oft statt der Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit verwendet.

Die Radioaktivität wird in den Eluat und in der Säule mit Hilfe eines Aktivimeters gemessen und die Ergebnisse werden in MBq angegeben. Anschließend wird die radiochemische Reinheit in Prozent nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Radiochemische Reinheit in Prozent} = \frac{\text{gemessene Aktivität von Eluat 2}}{\text{gemessene Aktivitäten von Eluat 1 + Eluat 2 + Sep Pak Säule}} \times 100$$

In dieser Arbeit wurde die SepPak light C18 Kartusche verwendet. Aktiviert wurde mit 2 x 5 ml Ethanol absolut, konditioniert mit einem Puffer oder Aqua bidest (MIBI und Tetrofosmin) oder bei MAG 3 mit 0,001N HCl.

Da es sich um eine SepPak light Kartusche handelt, beträgt das Volumen, mit der die Kartusche befüllt werden kann, 0,1 ml bis max. 0,3 ml.

Gewaschen wurde mit 2 x 5 ml mit einer Konditionierungsflüssigkeit, eluiert mit Ethanol absolut oder im Falle von MAG 3 mit einem Gemisch aus Ethanol absolut und 0,9 % NaCl im Verhältnis 1:1.

Wichtig zu beachten ist, dass Aktivierung, Konditionierung, Probenauftragung und Elution stets langsam und konstant erfolgen müssen. Um die Matrix nicht zu zerstören, sollte man die Schritte tröpfchenweise und nicht in einem Strahl durchführen, da sonst ein zu hoher manueller Druck entstehen würde.

Ein weiteres Problem kann durch die Bildung eines Matrixkanals entstehen. Dadurch verliert man C18 Oberfläche, was zur Folge hat, dass weniger Radiopharmakon auf der Kartusche bleibt (das Ergebnis ist falsch negativ) und dieses findet sich allerdings dann im Eluat (falsch positiv) und wird fälschlich als freies ^{99m}Tc identifiziert.

3.5.1. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -DPD

Eluat1	Eluat2	Sep-Pak	Ergebnis in %
50,7 MBq	0,2 MBq	0,7 MBq	98,26
178,7 MBq	0,4 MBq	2,6 MBq	98,35
85,7 MBq	0,2 MBq	1,2 MBq	98,39
60,8 MBq	1,2 MBq	0,9 MBq	96,66
41,1 MBq	0,1 MBq	0,1 MBq	99,52

3.5.2. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MAG₃

Eluat1	Eluat2	Sep-Pak	Ergebnis in %
0,6 MBq	20 MBq	0,1 MBq	96,62
0,1 MBq	11,6 MBq	0,1 MBq	98,31
0,1 MBq	25,7 MBq	0,1 MBq	99,23
0,1 MBq	2,87 MBq	0	96,63
0,3 MBq	45,7 MBq	0,1 MBq	99,13

3.5.3. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -MIBI

Eluat1	Eluat2	Sep-Pak	Ergebnis in %
0,6 MBq	77,6 MBq	0,3 MBq	98,85
0,5 MBq	83,3 MBq	0,4 MBq	98,93
0,1 MBq	61,3 MBq	0,1 MBq	99,67
0,1 MBq	58,7 MBq	0,1 MBq	99,66
0,2 MBq	91,1 MBq	0,6 MBq	99,13

3.5.4. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -Tetrofosmin

Eluat1	Eluat2	Sep-Pak	Ergebnis in %
0,5 MBq	137 MBq	3,7 MBq	97,03
0,1 MBq	35,3 MBq	1,1 MBq	96,71
0,1 MBq	99,1 MBq	0,9 MBq	99,00
0,1 MBq	57,5 MBq	0,5 MBq	98,97
0,1 MBq	54,7 MBq	0,3 MBq	99,27

3.5.5. Radiochemische Reinheit von ^{99m}Tc -HMPAO

Eluat1	Eluat2	Sep-Pak	Ergebnis in %
3,8 MBq	17,2 MBq	11,2 MBq	53,42
0,2 MBq	19 MBq	2,7 MBq	86,76
0,8 MBq	23 MBq	7 MBq	74,68
0,3 MBq	30,8 MBq	4,62 MBq	86,23
0,2 MBq	36,8 MBq	7,43 MBq	82,83

4. Zusammenfassung und Ausblick

Meine Diplomarbeit beschäftigt sich mit geeigneten Ersatzmethoden für die Qualitätskontrolle von Technetium-markierten Radiopharmaka. Dieses Thema wurde gewählt, da die ITLC Materialien von Gelman Sciences Inc. seit Ende 2008 nicht mehr produziert wurden und zu Beginn dieser Arbeit noch keine anderen Anbieter von ITLC Platten am Markt waren.

Darüber hinaus wurde versucht, auch andere Standardadsorbenten, die in der Packungsbeilage von den Herstellerfirmen der Kits und im Europäischen Arzneibuch angegeben waren, zu ersetzen. Die verschiedenen DC-Platten sollten bezüglich Geschwindigkeit und Genauigkeit der Aussage über die radiochemische Reinheit vergleichbar mit den ITLC Platten bzw. den angegebenen Standardplatten sein.

Es wurde bei jeder Substanz die radiochemische Reinheit von mindestens 3, bei den meisten sogar von 5 Chargen mittels Dünnschichtchromatographie getestet. Dabei wurde immer die in der jeweiligen Prüfungsvorschrift angegebene mobile Phase und unterschiedliche stationäre Phasen verwendet. Bei einigen Substanzen wurde auch die Sep-Pak-Methode angewandt.

Die Qualitätskontrolle der radiochemischen Reinheit hat in den meisten Fällen Werte erreicht, die weit über den vom Hersteller oder dem Europäischen Arzneibuch geforderten Grenzwerten liegen. Einige Ausreißer erklären sich dadurch, dass die verwendeten stationären Phasen für diese Prüfung nicht geeignet waren.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Qualitätskontrolle der radiochemischen Reinheit in der Nuklearmedizin innerhalb kürzester Zeit mit verschiedenen DC-Platten möglich ist. Es wurde gezeigt, dass es für jede angegebene stationäre Phase mindestens eine Ersatzplatte mit vergleichbaren Ergebnissen gibt. Zusätzlich bietet die Sep-Pak-Methode bei einigen Substanzen eine raschere und besonders einfache Art der Reinigung und Analyse.

Literaturverzeichnis

- [1] Wadsak W.: *Medizinische Radiochemie*, Wien 2009
- [2] Nicoletti R., Oberladstätter M., König F.: *Messtechnik und Instrumentierung in der Nuklearmedizin*, Wien: Facultas, Oktober 2006
- [3] Europäisches Arzneibuch 7. Ausgabe Grundwerk 2011, Verlag Österreich GmbH
- [4] 09.04.2012, 16:15
<http://www.lanuv.nrw.de/radioaktivitaet/grundlagen.htm>
- [5] Viernstein H.: *Pharmazeutische Technologie*, Wien
- [6] 10.04.2012, 16:44
http://zrw.web.psi.ch/lectures/files/Kapitel_01_02.pdf
- [7] Schwochau K.: *Technetium*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2000
- [8] 26.03.2012, 15:00
http://de.wikipedia.org/wiki/Technetium#cite_note-10
- [9] 26.03.2012, 15:14
<http://www.periodensystem-online.de/index.php?el=43&id=history>
- [10] Zolle I.: *Technetium-99m Pharmaceuticals*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2007
- [11] Hermann H.-J.: *Nuklearmedizin*, München: Elsevier Urban&FischerVerlag, 2004
- [12] Decristoforo C.: *Arzneimittelsicherheit neuer 99mTc-Radiopharmaka*, Innsbruck, 1997
- [13] Gopal S.: *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, New York: Springer Verlag, 1998
- [14] *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1991
- [15] Mitterhauser M.: *Vorlesungsskriptum zu Radiopharmazie*, Wien

- [16] 10.04.2012, 20:22
http://de.wikipedia.org/wiki/Szintigrafie#cite_note-1
- [17] 10.04.2012, 21:00
<http://de.wikipedia.org/wiki/Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie>
- [18] Decristoforo C.: *Radiopharmazeutische Qualitätskontrolle*, Innsbruck, 1995
- [19] 17.04.2012, 17:15
http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_09_annex3_en.pdf
- [20] 17.04.2012, 18:30
<http://www.ogn.at/downloads/empfehlungenfuerdiequalitaetskontrolle15092005.pdf>
- [21] Grillenberger K.: *Radioaktive Arzneimittel*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2003
- [22] 12.04.2012, 15:20
<http://www.ogn.at/downloads/artikelokz.pdf>
- [23] 14.04.2012, 16:50
http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2010/2010011170109/anx_70109_de.pdf
- [24] *TechneScan MAG3 Fachinformation*
- [25] *STAMICIS 1 mg Kit für ein radioaktives Arzneimittel*, iba Molecular 2009
- [26] Schwedt G.: *Analytische Chemie*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.KGAA, 2001
- [27] Cammann K.: *Instrumentelle Analytische Chemie*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2001
- [28] Frey H-P., Zieloff K.: *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1993
- [29] Kraus LJ., Koch A., Hoffstetter-Kuhn S.: *Dünnschichtchromatographie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1996

- [30] Naumer H., Heller W.: *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Weinheim: WILEY- VCH-Verlag GmbH, 2002
- [31] Hahn-Deinstrop E.: *Dünnschichtchromatographie*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 1998
- [32] 28.02.2012, 11:23
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/duennschichtchromatographie.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/dc/stat_phase/rp_phasen/rp_pha-sen1m70te0101.vscml.html
- [33] 28.02.2012, 17:00
http://www.biodex.com/sites/default/files/150001man_10-019reva.pdf
- [34] Raytest: *Gita Star Instrument Manual March 2009*, Straubenhardt: Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, 1994, 1995
- [35] 22.03.2012 15:15
<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720002966en.pdf>

Abkürzungsverzeichnis

BGO	$\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$
DC	Dünnschichtchromatographie
e^-	Elektron
HCl	Salzsäure
IgG1	Immunoglobulin G1
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
keV	Kilo-Elektronenvolt
M	Massenzahl
M'	Massenzahl des Tochternuklids
MBq	Megabecquerel
^{99}Mo	Molybdän-99
n	Neutron
NaCl	Natriumchlorid
Na-Pertechnetat	Natrium-Pertechnetat
P	Proton
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R_f	Retentionsfaktor
RP	reversed phase
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
T_{biol}	biologische Halbwertszeit
^{99}Tc	Technetium-99
^{99m}Tc	Technetium-99m
TcO_4	Pertechnetat
T_{eff}	effective Halbwertszeit
TLC	Thin Layer Chromatography
T_{phys}	physikalische Halbwertszeit
Z	Ordnungszahl
Z'	Ordnungszahl des Tochternuklids

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Symbolische Darstellung des radioaktiven Zerfalls [2].....	1
Abb. 2	Schematische Darstellung der Alpha-Strahlung [4]	2
Abb. 3	Schematische Darstellung der Beta-Minus-Strahlung [4].....	3
Abb. 4	Schematische Darstellung der Beta-Plus-Strahlung [4]	3
Abb. 5	Schematische Darstellung der Gamma-Strahlung [4].....	4
Abb. 6	^{99m} Tc-Generator [11]	8
Abb. 7	Anwendung der ^{99m} Tc-Radiopharmaka [14].....	20
Abb. 8	Klassifizierung der verschiedenen chromatographischen Verfahren [27].....	22
Abb. 9	Markierung mit Hilfe eines Kits [14]	24
Abb. 10	Fertigschichten für die Dünnschichtchromatographie [29]	26
Abb. 11	Silylierung der Alkylsilane [29].....	27
Abb. 12	Tec-Control-Chromatography Strips Rot und Schwarz [33]	29
Abb. 13	Dreieck nach Stahl [30]	30
Abb. 14	Größe und Markierung einer DC-Platte	31
Abb. 15	Verhalten von Radiopharmakon und Verunreinigung	38
Abb. 16	Antigranulocyten Chromatogramm der ITLC Platte	42
Abb. 17	Antigranulocyten Chromatogramm der MN 866 Platte	42
Abb. 18	Nanocoll Chromatogramm der ITLC Platte.....	43
Abb. 19	Nanocoll Chromatogramm der TCCS Schwarz Platte	43
Abb. 20	DPD Chromatogramm der ITCL Platte	44
Abb. 21	DPD Chromatogramm der MN 866 Platte	44
Abb. 22	MAG ₃ Chromatogramm der RP18 Platte	45
Abb. 23	MAG ₃ Chromatogramm der W3 Platte.....	45
Abb. 24	DMSA Chromatogramm der W1 Platte.....	46
Abb. 25	DMSA Chromatogramm der MN866 Platte.....	46
Abb. 26	MIBI Chromatogramm der Aluminium Oxid Platte	47

Abb. 27 MIBI Chromatogramm der MN866 Platte	47
Abb. 28 Tetrafosmin Chromatogramm der KG 60 Platte	48
Abb. 29 Phytacis Chromatogramm der W1 Platte	49
Abb. 30 Phytacis Chromatogramm der MN866 Platte	49
Abb. 31 HMPAO Chromatogramm der MN866 Platte.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten ^{99m}Tc -Radiopharmaka	17
Tabelle 2 Grenzwerte der radiochemischen Reinheit	39
Tabelle 3 Verwendete stationäre Phasen	40
Tabelle 4 Verwendete mobile Phasen	41
Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51

Lebenslauf

Claudia Rumpler
Tivoligasse 18/11
1120 Wien
Tel 0676 61 44 393
E-Mail: claudia.rumpler@gmail.com



geboren am: 10. Dezember 1984
in: Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig

Schule & Studium

Volksschule: 1991-1995 1150 Wien, Friesgasse
Bundesgymnasium: 1995-2003 1120 Wien, Rosasgasse
Studium: Pharmazie seit Oktober 2003, Universität Wien

Ferialpraxis

Sommer 2001 Teerag Asdag AG
Sommer 2003 Anwaltsbüro Spohn, Richter und Partner
Sommer 2006 Vindobona Apotheke
Sommer 2007,2008, 2009 Germania Apotheke

Nebenjob

Vindobona Apotheke Juni 2006 – Jänner 2010
Apotheke zur Austria Februar 2010 – Juli 2012

Weitere Kenntnisse und Fähigkeiten

Besondere Fortbildung: Maschinschreibkurs, Literaturkurs,
Tanzausbildung im Performing Center Austria
Fremdsprachen: Englisch, Französisch
Hobbys: Lesen, Tanzen, Tennis, Yoga

Wien, September 2012