

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Título:

Validación de técnica analítica para la determinación de la identidad y pureza radioquímica de ^{68}Ga -DOTA-TATE

Alcance:

La validación del método alcanza a todos los lotes del radiofármaco ^{68}Ga -DOTA-TATE producido y controlado en la Fundación Centro Diagnostico Nuclear.

Descripción resumida de la tarea a desarrollar:

La Fundación Centro de Diagnóstico Nuclear (FCDN) se dedica al diagnóstico y la asistencia profesional en la investigación de diferentes enfermedades. Para cumplir con dicha labor, tiene como uno de sus sectores fundamentales el área de radiofarmacia, donde fabrica de manera aséptica inyectables estériles que se utilizan en el diagnóstico de enfermedades crónicas a través de la tomografía por emisión de positrones.

La producción de estos fármacos se realiza en un entorno conforme y calificado para las diferentes etapas del proceso, en cumplimiento con las normas GMP dadas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) así como a los diversos requerimientos de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN). Actualmente la FCDN produce ^{68}Ga -DOTA-TATE solo para uso interno. Dado que se busca poder distribuir a otras localidades del país, se debe presentar un expediente al ANMAT y a la ARN en el cual se incluya la validación de las técnicas analíticas utilizadas en el control de calidad del radiofármaco en cuestión. Por lo cual la validación de la identidad y pureza radioquímica es uno de los puntos de partida en el proyecto de la futura comercialización del producto.

Para elaborar la validación se desarrolla un protocolo en el cual se describen todos los pasos que se ejecutaran para obtener los datos que acrediten el correcto desempeño del método, este protocolo está basado en las guías y farmacopeas de reconocimiento internacional. Se evaluará la especificidad del método, la linealidad, la precisión, los límites de detección tanto para el producto principal como para sus posibles impurezas, todo esto con el propósito de identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse cuando se aplique al tipo específico de muestras, en este caso, radiactivas.

La validación de este método agrupa los diferentes aspectos relacionados con el concepto PDCA o MNPQ (medir-normalizar-ensayar-asegurar la calidad) y las áreas tecnológicas de la especialización en Calidad Industrial. Dado que las mediciones a realizar deben satisfacer un requerimiento establecido, deben ser realizadas usando métodos (cromatográficos) y equipos (HPLC, Radioescaner, etc) que hayan sido probados para garantizar que cumplan su propósito y el personal involucrado debe estar calificado y ser competente para efectuar su labor, brindando así una garantía para el aseguramiento de la calidad.

Alumno: Gabriel Casanova Luisi

DNI: 95793655

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

INDICE

1	Descripción de la organización.....	1
1.1	Sector de radiofarmacia.	1
2	Contexto	3
3	Gestión de la calidad.	4
4	Método a validar.	7
4.1	Equipos utilizados.....	8
4.2	Sistema cromatográfico HPLC	8
4.3	Sistema cromatográfico TLC.....	8
4.4	Preparación de estándares y muestras.....	8
5	Procedimiento.....	9
5.1	Especificidad.....	9
5.2	Linealidad	10
5.3	Repetibilidad (Precisión del sistema)	12
5.4	Precisión intermedia pureza radioquímica y química (HPLC)	12
5.5	Precisión intermedia pureza radioquímica (TLC)	13
5.6	Límite de cuantificación (Detector radiométrico HPLC).....	13
5.7	Límite de cuantificación (Detector radiométrico TLC)	14
5.8	Límite de detección (Detector UV HPLC)	14
6	Resultados	15
6.1	Especificidad.....	15
6.2	Linealidad	20
6.3	Repetibilidad (Precisión del sistema)	24
6.4	Precisión intermedia pureza radioquímica y química (HPLC)	25
6.5	Precisión intermedia pureza radioquímica (TLC)	26
6.6	Límite de cuantificación (Detector radiométrico HPLC).....	27
6.7	Límite de cuantificación (Detector radiométrico TLC).	28
6.8	Límite de detección (Detector UV del HPLC).....	30
7	Conclusiones generales.	30
8	Bibliografía	32

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

1 DESCRIPCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN.

La Fundación Centro de Diagnóstico Nuclear (FCDN) es una prestigiosa institución que cuenta con un equipo multidisciplinario de excelencia dedicado al diagnóstico y asistencia profesional en la investigación de diversas enfermedades.

La FCDN se distingue por ser una entidad de bien público, sin fines de lucro, comprometida con ofrecer atención de calidad a pacientes de obras sociales, medicina prepaga y aquellos con recursos económicos limitados. Su enfoque incluye brindar atención con sensibilidad social y calidez humana genuina, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de cada paciente.

La FCDN realiza actividades como el diagnóstico de enfermedades crónicas cardíacas, neurológicas, oncológicas, traumatológicas, urológicas, ginecológicas y oftalmológicas, también se dedica a la producción industrial de radiofármacos para uso interno y venta. Además, la institución propicia la capacitación continua de científicos y técnicos, la investigación, el desarrollo y la innovación, cumpliendo con estrictas normas de calidad y seguridad internacionales. Entre sus prioridades esta brindar un servicio de información interdisciplinario a profesionales médicos, educar a la comunidad en el conocimiento, prevención y tratamiento de diversas enfermedades, así como contribuir al desarrollo de la calidad de las prestaciones de salud en Argentina. Asimismo, establece vínculos de intercambio de conocimientos científicos con universidades, centros de investigación, profesionales de prestigio y estudiantes avanzados en el campo de la salud.

La FCDN se posiciona como un referente en el avance y la difusión del conocimiento en el ámbito de la salud en Argentina.

1.1 SECTOR DE RADIOFARMACIA.

El laboratorio de Radiofarmacia produce de manera aséptica productos inyectables estériles, contando con una zona de fabricación diseñada y calificada para las operaciones correspondientes. Dispone de la infraestructura necesaria para cumplir con rigurosas normativas de fabricación establecidas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y requisitos de seguridad según la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN).

Cuenta con dos depósitos para materia prima, uno destinado a la cuarentena y otro para productos aprobados. Además, cuenta con un área de almacenamiento general que incluye una cámara fría con temperatura controlada de 2-8 °C y un congelador a -20 °C. La entrada a la zona de fabricación se realiza a través de un cambiador/esclusa de aire dedicado, facilitando el flujo de materiales mediante el uso de sistemas de acceso estéril (SAS) entre cada área con diferentes niveles de exigencia.

Adicionalmente, el laboratorio dispone de un laboratorio de control de calidad fisicoquímico y una sección dedicada al despacho de radiofármacos, asegurando así la calidad y la eficiencia en todo el proceso de producción y control.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

El laboratorio de Radiofarmacia, con una extensión total de 292,6 m², está equipado con componentes esenciales para la fabricación del producto, entre los cuales se incluyen:

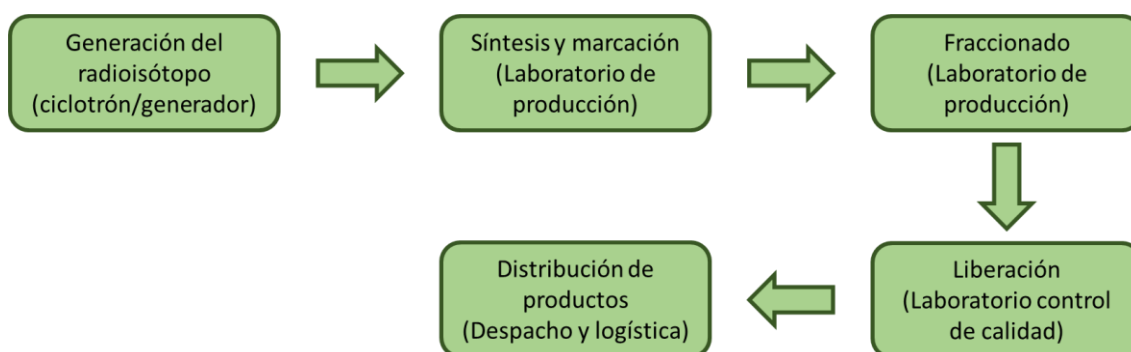
- Gabinetes de flujo laminar destinados a manipulaciones asépticas.
- Módulos de producción especializados.
- Módulo de dispensado semiautomático.

Para garantizar el funcionamiento normal del laboratorio, se han implementado sistemas de apoyo críticos, tales como:

- Sistema HVAC (Calefacción, Ventilación y Aire Acondicionado).
- Sistema de aire comprimido.
- Sistema de suministro de nitrógeno.

Estos elementos contribuyen a mantener un entorno propicio para las operaciones requeridas, asegurando así la calidad y esterilidad de los productos inyectables estériles preparados asépticamente en el laboratorio de Radiofarmacia.

Los procesos de Radiofarmacia se pueden describir con el siguiente flujo:



Este proceso de producción de los radiofármacos, incluyendo la síntesis y la dispensación, se realiza bajo el control exclusivo de un operador autorizado, utilizando un software especializado. Para la elaboración de estos radiofármacos, se emplean casetes de un solo uso y kits de reactivos específicamente diseñados y estandarizados a nivel global para cada tipo de molécula y módulo. Esta metodología de uso único reduce significativamente el riesgo de contaminación cruzada.

Los radiofármacos producidos tienen un corto período de semidesintegración; por ejemplo, aquellos marcados con ⁶⁸Ga tienen una vida útil de solo 4 horas. Por lo tanto, se consideran productos de uso inmediato, y el almacenamiento no se ve como un aspecto crítico en términos de la estabilidad del producto. En cambio, los tiempos de producción y control de calidad son elementos críticos en estos procesos.

Sin embargo, no hay que dejar de lado que se trabaja con productos radiactivos, por lo tanto, las medidas de radioprotección deben ser una parte integral de los planes de validación. En este sentido, el almacenamiento sí es un aspecto crítico; el material radiactivo debe mantenerse en blindajes adecuados para evitar la exposición de los trabajadores.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Las preparaciones radiofarmacéuticas, que contienen uno o más radionucleidos con fines médicos, deben ser controladas en cuanto a calidad antes de ser administradas a los pacientes. Esto asegura que sus características, como la identidad, concentración y pureza, sean las adecuadas para su uso previsto. No obstante, en el control de calidad de los radiofármacos, se deben considerar dos aspectos específicos que los diferencian de los productos farmacéuticos convencionales: primero, la potencia de un radiofármaco se define por su contenido de radiactividad (Bq) o en concentración (MBq/ml), que disminuye con el tiempo siguiendo la ley de decaimiento $A=A_0 \cdot e^{-\lambda t}$. Segundo, aunque las técnicas analíticas para determinar componentes no radiactivos son similares a las utilizadas en farmacéuticos convencionales, la determinación de la radiactividad requiere técnicas y equipos especializados para detectar y cuantificar la radiactividad en las muestras.

2 CONTEXTO

Los tumores neuroendocrinos (TNE) constituyen un conjunto diverso de neoplasias que se originan tanto en las células de la cresta neural como en aquellas del endodermo, presentando características neuroendocrinas. Su comportamiento y evolución varían según la naturaleza de su diferenciación histológica y su tasa de crecimiento. Independientemente de su ubicación, estos tumores se comportan de manera similar a las células endocrinas que les dieron origen. Últimamente, hemos notado un incremento en la presencia de los TNE en conferencias de endocrinología. A pesar de ser un conjunto diverso y no muy común de tumores, su incidencia ha ido en ascenso, llegando recientemente a 7.41 casos por cada 100.000 personas. Esto podría deberse a un mejor entendimiento de su biología y al avance en las técnicas de imagen.

A pesar de su diversidad, la mayoría de estos tumores (alrededor del 80%) se distinguen por una marcada presencia de receptores de somatostatina, en particular del subtipo 2. La existencia de estos receptores tiene consecuencias clínicas significativas. Por un lado, afectan directamente la regulación del tumor, influenciando la secreción de hormonas, el crecimiento del tumor y la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que tiene implicaciones en el tratamiento. Por otro lado, son fundamentales para la detección y clasificación de estos tumores. Esta alta presencia de receptores de somatostatina es crucial para el diagnóstico de estos tumores mediante técnicas de medicina nuclear como la gammagrafía y el PET.

El [^{68}Ga]-DOTATATE, que muestra una gran afinidad por el receptor de somatostatina subtipo 2 y se elimina rápidamente de zonas no objetivo, es un agente ideal para la obtención de imágenes de tumores neuroendocrinos. Utiliza su capacidad de detectar la gammagrafía del receptor de somatostatina, y esta habilidad varía según el grado del tumor, proporcionando así un elevado valor diagnóstico al [^{68}Ga]-DOTATATE.

La administración intravenosa de [^{68}Ga]-DOTATATE se distribuye a órganos que poseen el receptor de somatostatina subtipo 2, incluyendo la pituitaria, tiroides, bazo, glándulas suprarrenales, riñones, páncreas, próstata, hígado y glándulas salivales. No se observa acumulación de esta sustancia en la corteza cerebral ni en el corazón, y las captaciones en el timo y el pulmón son mínimas.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

En la actualidad, la fundación centro diagnóstico nuclear únicamente produce $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTATATE para su uso interno, debido a que aún no posee la autorización de la ANMAT para su comercialización. Considerando su tiempo de semidesintegración de 68 minutos y un lapso de validez de 4 horas, sería factible su traslado a diversos centros de diagnóstico en la provincia de Buenos Aires. Esto representa una oportunidad significativa para comercializar este radiofármaco, ampliando la oferta existente que se limita a $[^{18}\text{F}]$ -NaF, $[^{18}\text{F}]$ -FDG y $[^{18}\text{F}]$ -FCH.

Para llevar a cabo la comercialización de un radiofármaco, uno de los requisitos esenciales de las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP), y que la ANMAT exige para la aprobación de un expediente comercial, es la validación de las técnicas analíticas empleadas en el control de calidad. Por lo tanto, la comprobación de la identidad y la pureza radioquímica constituyen los pasos iniciales en el proyecto de comercialización futura de $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTATATE.

3 GESTIÓN DE LA CALIDAD.

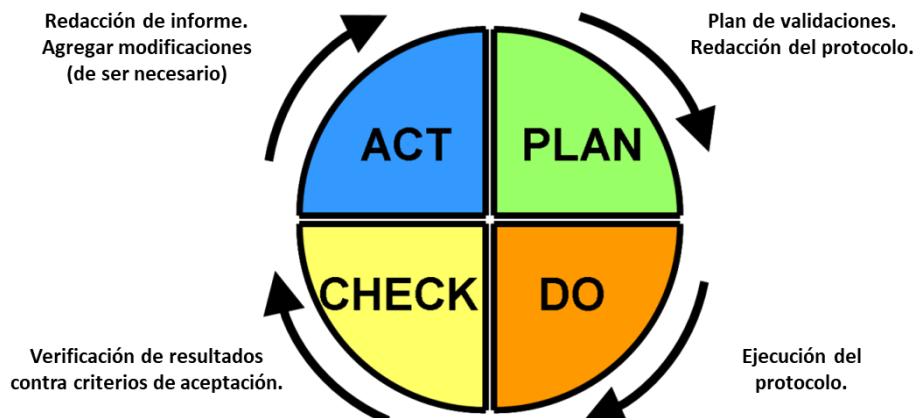
La validación de métodos de medición es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto. La industria farmacéutica suele regirse por distintas guías o lineamientos de reconocimiento internacional. Entre ellos están las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) que son un conjunto de reglas y/o recomendaciones basadas en la aplicación de principios técnicos bajo las que el laboratorio de análisis asegura la calidad, la validez y la integridad de los datos producidos.

Para que las mediciones analíticas sean fiables, deben cumplir con un estándar acordado y realizarse con métodos y equipos comprobados para asegurar su adecuación al propósito. Además, el personal encargado de estas mediciones debe estar cualificado y ser competente, y su capacidad técnica debe ser garantizada de forma independiente para asegurar la calidad.

En la Fundación Centro Diagnóstico Nuclear, el sector de control de calidad y el departamento de aseguramiento de la calidad colaboran estrechamente en la ejecución de validaciones. Los responsables supervisan continuamente la correcta aplicación de las normas BPL, controlando registros diarios y verificando resultados a través de gráficos de control y análisis de tendencias. Cualquier desviación detectada se investiga para determinar su causa raíz y proponer las acciones correctivas y preventivas necesarias. Todas las determinaciones analíticas se describen en procedimientos controlados y aprobados por el sistema de calidad interno, y se revisan cada dos años o antes si se requieren cambios.

Para llevar a cabo la validación de una técnica, se sigue el ciclo PDCA (Planificar, Hacer, Verificar, Actuar). Primero, se definen los encargados de realizar las distintas etapas del proceso de validación, dichos responsables empiezan elaborando un protocolo que describe todos los pasos necesarios para obtener datos que avalen el desempeño adecuado del método. Este protocolo se basa en las guías "ICH: Q2 (R1) Validation of analytical procedures", que detallan cómo realizar la validación de la técnica analítica. El objetivo es identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del método al aplicarse a tipos específicos de muestras, como en este caso, las radiactivas. Todo el proceso de validación debe estar supervisado tanto por personal de aseguramiento como por los encargados del análisis de los resultados obtenidos.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial



En el protocolo se define que es responsabilidad del analista de control de calidad la redacción y ejecución del protocolo. Es responsabilidad del jefe de control de calidad supervisión del protocolo. Es responsabilidad del director técnico y aseguramiento de calidad, el control y revisión del protocolo propuesto. Los prerrequisitos establecidos para poder empezar con la validación del método son los siguientes:

- 1) Verificación del estado de calificación de equipos e instrumentos analíticos.

Descripción - ID	Modelo/Marca	Control Aplicado
Distintas pipetas automaticas	Eppendorf	Calibración anual
Microjeringa	Hamilton	Limpieza mensual con Ácido Nítrico 10%
Cromatógrafo Líquido de alta eficacia	SHIMADZU Serie LC-20	IQ/OQ/Calificación de performance anual + 2 Mantenimientos preventivos con proveedor calificado.
Radio-Scanner	Radio-Scanner Elysia Raytest MiniGita con un detector de positrones beta.	IQ/OQ/PQ + verificación mensual con fuente de patrón Cs137
Balanza	Mettler Toledo XS204 DeltaRange	IQ/OQ/PQ + verificación previa a uso con pesas patrón calibradas anualmente

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

2) Verificación de la capacitación del personal.

Procedimientos y Capacitaciones del Personal involucrado				
Procedimientos asociados		Vigente:	Capacitaciones	
			Analista 1:	Analista 2:
PON422: Scanner RTLC02	Rev.:	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐
PON 423 Uso y mantenimiento de Balanza analítica	Rev.:	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐
PON425: Manipulación de microjeringas	Rev.:	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐
PON431: HPLC SHIMATZU	Rev.:	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐	SI ☐ NO ☐

3) Estándares vigentes y con certificado de calidad.

- Estándar de referencia [68Ga]-DOTA-TATE Marca ABX Prod. N° 9773.0000.5 (Cod Int. ST008)
- Estándar de referencia DOTA-TATE acetate. Marca ABX Prod. N° 9772.0001.000 (Cod. Int. ST007)

4) Procedimiento analítico escrito, controlado y aprobado.

La validación del método se divide en 2 secciones principales. La pureza química cuya finalidad es detectar impurezas químicas asociadas al precursor (DOTATATE Acetate) la molécula fría, la categoría del método según la guía ICH es la II (Límite) “determinación de impurezas o trazas en ingredientes activos o productos medicinales, sustancias relacionadas; análisis cuantitativos y pruebas límites para impurezas”. Pero por su naturaleza también debemos evaluar la Identidad y Pureza radioquímica, es decir debemos evaluar a la molécula caliente, para ello, se utilizará la tabla 2 de ICH adaptada a radiofármacos. (“EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceutical”). Resumiendo, esta información nos da las directrices de los ensayos a realizar teniendo como resultado lo indicado en la siguiente tabla:

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

	Identidad Radioquímica	Pureza Radioquímica HPLC	Pureza Radioquímica TLC	Pureza Química
Especificidad	+	+	+	+
Linealidad	-	+	+	+
Repetibilidad	+	+	+	+
Precisión Intermedia	-	+	+	+
Límite de detección	-	-	-	+
Límite de cuantificación	-	+	+	-

4 MÉTODO A VALIDAR.

El método analítico por validar es la determinación de identidad, pureza química y radioquímica de [68Ga]-DOTA-TATE por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC), descrito en el PON379. El mismo se basa en la monografía “Gallium (68Ga) oxodotreotide injection” de la Farmacopea Europea 11.3.

El método determina:

- Identidad del radiofármaco por HPLC, comparando el tiempo de retención del estándar Ga-DOTATATE (muestra fría) por detección por UV con el tiempo de retención obtenido para la muestra (muestra caliente) con el detector radiométrico

- Pureza radioquímica:

Por HPLC: se determinan las impurezas radioquímicas (distintas de especies de [68Ga], como porcentaje de la radiactividad total, a través del análisis de la muestra con el detector radiométrico.

Por TLC: se determinan las especies de [68Ga] ([68Ga]coloidal y [68Ga]3+) por detección con radio-scanner

- Pureza química:

Por HPLC: se determinan las impurezas químicas mediante el análisis de la muestra con el detector UV, comparando el área de las impurezas químicas asociadas al precursor y el área de otras impurezas químicas con el área del estándar de referencia de DOTATATE.

El método se utiliza con una variación en algunos detalles descritos en esta sección de la EP 11.3, tales como la re-suspensión del estándar que se realiza en HCl 10,3 g/ml (en vez de Agua + 0,1 % TFA) y la temperatura del método cromatográfico es de 35° (en vez de 25°) por lo que se considera un método interno y se valida como tal.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

4.1 EQUIPOS UTILIZADOS

- HPLC03: Es un HPLC Shimadzu que consta de 6 módulos principales: Auto sampler SIL-20A HT, horno columna CTO-10AS VP, desgasificador DGU-20 A5R, sistema de bombeo LC-20AT, detector de arreglo de yodos SPD-M20 A, detector radiométrico Eckert & Ziegler Modelo: B-FC-1000 y el módulo de combinación CBM-20A. Cuyo software es "LabSolutions".
- RTLC02: Radio-Scanner Elysia Raytest MiniGita con un detector de positrones beta.
- BAL01: Balanza Mettler Toledo XS204 DeltaRange.
- MP-01: Micropipeta automática Eppendorf Research 10-100 µl.
- MP-02: Micropipeta automática Eppendorf Reference 100-1000.
- MP-06: Micropipeta automática 0,1 – 2,5 µl.

4.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC

- Columna: ACE 3 C18 (150 X 3,0 mm - 3µm).
- Flujo: 0,6 ml/min.
- Temperatura: 35°C.
- Detectores: Espectrofotométrico a 220 nm y radiométrico, conectados en serie.
- Fase móvil A: Agua + 0.1% TFA (Validez fase móvil 15 días).
- Fase móvil B: ACN + 0.1% TFA (Validez fase móvil 15 días).
- Tipo de corrida: Isocrática 78% A y 22% B.
- Tiempo de estabilización: mínimo 15 minutos de la señal de base sin variaciones.
- Tiempo de Corrida: 15min.
- Volumen de inyección manual: 60µl.
- Volumen de inyección automático: 20µl.

4.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO TLC

- Placa: Hecha de microfibras de vidrio impregnada en sílica gel (TLC-SG) de 2 x 10 cm.
- Fase móvil: Solución de 77 g/L de acetato de amonio en agua, metanol (50:50 V/V).
- Aplicación: 2 µL.
- Secado: al aire.
- Detección: Elysia raytest beta positron detector Ser. -Nr: 19PS1198.

4.4 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES Y MUESTRAS.

- Mezcla de solventes: Solución de Ácido clorhídrico 10,3 g/ml en agua ultrapura.
- Solución de referencia STD1: Ga-DOTA-TATE. Solución de concentración 5 µg/ml, preparada en mezcla de solventes. Esta solución se conserva a -20°C según PON411. (Concentración distinta a la recomendada por la EP, para no saturar la columna y lo suficiente como para ser detectado por el equipo).
- Solución de referencia STD2: DOTA-TATE acetate. Solución de concentración 50 µg/ml, preparada en mezcla de solventes. Esta solución se conserva a -20°C según PON411.
- Solución de referencia 3: Diluir 1 ml de solución de referencia STD2 a V con la mezcla de solventes, siendo V la dosis máxima recomendada en mililitros (20).

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

- Solución de referencia 4: Mezcla de Solución de referencia STD1 y solución de referencia 3, 50:50.
- Muestra: Se inyecta una alícuota de la muestra enviada por producción.

5 PROCEDIMIENTO.

5.1 ESPECIFICIDAD

5.1.1 Objetivo

Demostrar la capacidad del método analítico para distinguir entre dos picos potencialmente adyacentes, sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra.

5.1.2 Criterio de aceptación

El valor de resolución entre picos adyacentes debe ser $\geq 1,5$.

5.1.3 Especificidad Identidad y Pureza Radioquímica (Detector Radiométrico HPLC)

Para la prueba de identificación se realiza la comparación cromatográfica del pico del producto radiactivo con su homólogo no radiactivo. Antes de comenzar con el procedimiento se debe inyectar el estándar de Ga-DOTA-TATE preparado según punto 4.3 e identificar el tiempo de retención del pico con el detector UV. Este tiempo de retención será el mismo que el del tiempo de retención del [^{68}Ga]-DOTA-TATE producto final con el detector radiométrico.

Para evaluar la especificidad se preparan e inyectan las siguientes soluciones:

- A) Matriz del producto final: Mezclar 0,5 ml de Etanol/Agua 50% V/V y 4,5 ml de solución fisiológica.
- B) Especies de ^{68}Ga : Se hace una elución del generador para obtener distintas especies de ^{68}Ga mayoritariamente ^{68}Ga 3+ libre.
- C) Muestra de producto final: Muestra radiomarcada.
- D) Mezcla radiomarcada: 80 μl de B + 80 μl de C.

Se identifican todos los picos y se calcula el factor de resolución entre ellos.

5.1.4 Especificidad Pureza Radioquímica (Detector Radiométrico TLC)

Otra de las impurezas esperadas son las distintas especies de ^{68}Ga , tales como el ^{68}Ga Coloidal, ^{68}Ga +3 entre otros, que se detectan mediante el ensayo de cromatografía de capa delgada.

Se siembra 2 μl de la solución D del apartado previo en una placa de 2 cm x 10cm de papel para cromatografía, de microfibras de vidrio impregnada en sílica gel (TLC-SG) cuya zona de siembra a

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

1cm del límite inferior y la línea a la cual se desea hacer llegar el frente del solvente, a 5 cm aproximadamente de la línea de siembra.

Verter en la cámara cromatográfica una cantidad de fase móvil suficiente para llenar aproximadamente 3 mm de la cuba y dejar 20min que la cámara sature. Depositar la placa sembrada en la cuba cromatográfica y esperar el tiempo necesario para que lleguen a la distancia de corrida y se retira la placa. Se deja secar durante 2 minutos y se lee en el Radio-Scanner. Se realiza este mismo procedimiento con la solución C mencionada en el punto 5.1.3

En el cromatograma las distintas especies de ^{68}Ga deben verse en el punto de siembra y el ^{68}Ga -DOTA-TATE al final donde llega el frente de solvente.

5.1.5 Especificidad Pureza Química (Detector UV)

Se inyecta estándar de precursor DOTA-TATE acetate para identificar el tiempo de retención. Se utilizan los cromatogramas de matriz y estándar Ga-DOTA-TATE inyectados en el ensayo de especificidad del detector radiométrico para identificar los demás picos. Se enriquece la muestra radiomarcada con estándar de precursor DOTA-TATE en la concentración de trabajo y se inyecta esta solución.

Se realizan las siguientes inyecciones:

- E) Blanco: Solución de Ácido clorhídrico 10,3 g/l
- F) Muestra enriquecida: 60 μl Muestra radiomarcada + 60 μl Solución de referencia 3

Se identifican todos los picos y se calcula el factor de resolución entre ellos.

5.2 LINEALIDAD

5.2.1 Objetivo

Demostrar que el método es capaz de obtener resultados que sean directamente proporcionales o lo sean mediante una transformación matemática durante su decaimiento. Establecer un rango de trabajo en el cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión y linealidad.

5.2.2 Criterio de aceptación

El coeficiente de regresión lineal debe ser mayor o igual a 0,99.

5.2.3 Linealidad pureza radioquímica (detector radiométrico HPLC).

Se determina mediante el análisis secuencial de 4 muestras del radiofármaco en la concentración de trabajo.

Se inyecta de forma manual y ejecuta la corrida del método en el HPLC cada 20 minutos. Se integran las áreas de ^{68}Ga -DOTA-TATE en los cromatogramas obtenidos y se grafica área en

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

base a la concentración de actividad, se calcula la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal. En base a los resultados se establece el rango.

5.2.4 Linealidad pureza radioquímica (detector radiométrico TLC)

Al igual que en HPLC, se determina mediante el análisis secuencial de 4 muestras del radiofármaco en la concentración de trabajo.

Se siembra en la placa, se deja secar y ejecuta la corrida dentro de la cuba cromatográfica cada 20 minutos. Se aconseja usar dos cubas para que no se agote la fase móvil. Se integran las áreas de [^{68}Ga]-DOTA-TATE obtenidos en los cromatogramas y se grafica área en base a la concentración de actividad, se calcula la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal.

5.2.5 Linealidad pureza química (detector UV HPLC).

Se evalúa la linealidad del método para la impureza DOTA-TATE acetate mediante la inyección automática de 9 diluciones del estándar en un rango de concentración comprendido entre 0,5% al 200% de la concentración de trabajo al 100% que equivale a una solución de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Solución al 200%: Tomar 200 μl de la Solución de referencia STD2 y llevar a volumen de 2 ml con mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 100%: Tomar 100 μl de la Solución de 200% y agregar 100 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 50%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 150 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 25%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 350 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 10%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 950 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 5%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 1950 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 2,5%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 4950 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 1%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 9950 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Solución al 0,5%: Tomar 50 μl de la Solución de 200% y agregar 19950 μl de mezcla de solventes. Homogeneizar.

Registrar la preparación cada solución en el cuaderno de analista, incluyendo lote y vencimiento de los reactivos y estándares utilizados.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

5.3 REPETIBILIDAD (PRECISIÓN DEL SISTEMA)

5.3.1 Objetivo

Determinar la aptitud del sistema cromatográfico independientemente de la muestra cuando se realizan 4 inyecciones secuenciales de la misma.

5.3.2 Criterio de aceptación

Se acepta un 2% de CV entre inyecciones tanto para el área como para el tiempo de retención del pico.

5.3.3 Procedimiento pureza e identidad radioquímica (detector radiométrico HPLC)

Se determina mediante el análisis secuencial de 4 muestras del radiofármaco en la concentración de trabajo. Se utilizan los cromatogramas del ensayo de linealidad 5.2.3, las áreas deben recalcularse a t_0 usando la ecuación de decaimiento:

$$A_0 = A/e^{-\lambda t}$$

Donde:

A_0 = Área corregida

A = Área medida.

t = Intervalo de tiempo en minutos entre la inyección considerada y la primera inyección.

λ = Constante de desintegración (0,010193341 para ^{68}Ga).

5.3.4 Procedimiento pureza química (detector radiométrico TLC)

Se determina mediante el análisis secuencial de 4 muestras del radiofármaco en la concentración de trabajo. Se utilizan los cromatogramas del ensayo de linealidad 5.2.4, las áreas deben recalcularse a t_0 usando la ecuación de decaimiento mencionada en el punto previo.

5.3.5 Procedimiento pureza química (detector UV HPLC)

Se determina mediante el análisis secuencial de 4 muestras del radiofármaco en la concentración de trabajo.

5.4 PRECISIÓN INTERMEDIA PUREZA RADIOQUÍMICA Y QUÍMICA (HPLC)

5.4.1 Objetivo

Dado que el sistema HPLC está automatizado, los resultados son independientes del analista y, por lo tanto, la precisión intermedia se estudia haciendo que diferentes analistas evalúen los cromatogramas obtenidos teniendo en cuenta que la integración de los picos es la parte más subjetiva del ensayo. El objetivo es demostrar que la integración manual no afecta la precisión del método.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

5.4.2 Criterio de aceptación

Se acepta un 5% de CV% (coeficiente de variación porcentual) entre analistas.

5.4.3 Procedimiento

Se determina mediante la evaluación de los cromatogramas de la repetibilidad de los puntos 5.3.3 y 5.3.5. Diferentes analistas integran los cromatogramas obtenidos y se comparan entre sí.

5.5 PRECISIÓN INTERMEDIA PUREZA RADIOQUÍMICA (TLC)

5.5.1 Objetivo

Dado que la forma en la que corre la placa usando una misma fase móvil es independiente del analista, se considera como punto crítico de comparación la siembra de la muestra. Por tal motivo la precisión intermedia se evaluará comparando las siembras entre analistas.

5.5.2 Criterio de aceptación

El área del pico de [^{68}Ga]-DOTA-TATE, obtenido por dos analistas diferentes del laboratorio deberán compararse y dar lugar a un análisis estadístico consistente. Promedio, desviación estándar y CV% deberán calcularse, verificándose que este último $\text{CV\%} < 10\%$

5.5.3 Procedimiento

Cada analista realizará 5 siembras en una misma placa. Las realizará una cada 3 centímetros a partir de la línea de siembra. No hay necesidad de correr la placa en la fase móvil dado que lo único que se busca es comparar las siembras realizadas, por ello una vez que cada analista haya sembrado los 6 puntos se lee cada placa en el Radio-Scanner y se realiza el análisis estadístico correspondiente.

5.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (DETECTOR RADIOMÉTRICO HPLC)

5.6.1 Objetivo

Calcular el límite de cuantificación del detector radiométrico del HPLC, definido como la concentración de actividad más baja de otras impurezas radioquímicas confiablemente cuantificable.

5.6.2 Criterio de aceptación

Es una prueba de aptitud del sistema. Se espera confirmar que el método es capaz de cuantificar la muestra aun a concentraciones inferiores a la de trabajo, con un valor de señal / ruido ≥ 10 .

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

5.6.3 Procedimiento

Se realizará una serie de diluciones a partir de la actividad inicial de las impurezas radioquímicas hasta alcanzar un valor de la señal / ruido del cromatograma de 10:1.

5.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (DETECTOR RADIOMÉTRICO TLC)

5.7.1 Objetivo

Calcular el límite de cuantificación del detector radiométrico del TLC, definido como la concentración de actividad más baja de otras especies de [^{68}Ga] confiablemente cuantificable.

5.7.2 Criterio de aceptación

Es una prueba de aptitud del sistema. A diferencia del HPLC que el dato que nos informa el equipo es la señal/ruido el Radio-Scanner arroja un valor de Límite de detección (LOD 3σ counts) cuyo calculo se basa en la recomendación de la ICH en su sección “Basado en la desviación estándar del blanco”. El dato representa el límite de detección con 3σ de la desviación del blanco, se espera confirmar que el método es capaz de cuantificar la muestra aun a concentraciones inferiores a la de trabajo, con un valor de 10σ .

5.7.3 Procedimiento

Se realizarán 3 diluciones de la elución del generador, 10%, 5%, y 1%. En cada placa se realizan dos siembras, una será 2 μl de la dilución a evaluar en el inicio de la placa y otra de 2 μl de la elución del generador sin diluir en la línea de fondo donde termina el frente de solvente, esto con la finalidad de comparar de manera porcentual la dilución contra la actividad total, ya que el criterio de aceptación del producto según EP es que las impurezas asociadas a otras especies de [^{68}Ga] es que no debe ser mayor al 3% de la actividad total.

5.8 LÍMITE DE DETECCIÓN (DETECTOR UV HPLC)

5.8.1 Objetivo

Calcular el límite de detección definido como la concentración más baja del analito detectable en la muestra y confiablemente distinguida del blanco, pero no necesariamente cuantificable en las condiciones experimentales.

5.8.2 Criterio de aceptación

Es una prueba de aptitud del sistema. Se espera confirmar que el método es capaz de detectar la muestra de la impureza DOTA-TATE aun a concentraciones inferiores a las esperadas, con un valor de señal / ruido ≥ 3 .

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

5.8.3 Procedimiento

Se utilizan los cromatogramas de linealidad del punto 5.2.5 y caso de ser requerido preparar diluciones aún más bajas hasta llegar a la S/N menor a 3.

6 RESULTADOS

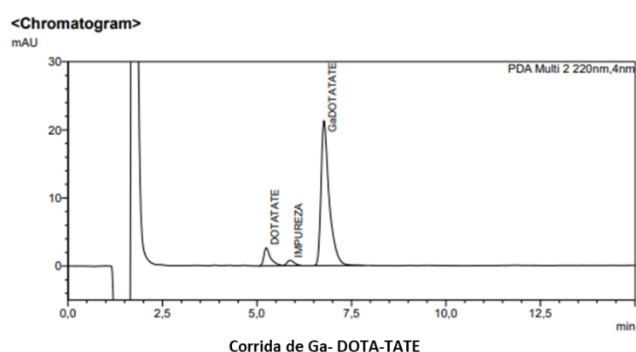
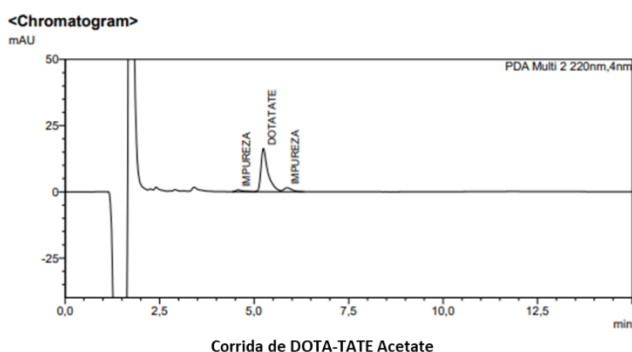
6.1 ESPECIFICIDAD

La identidad estructural de la molécula de $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-TATE se verifica mediante métodos cromatográficos. Este proceso implica comparar el tiempo de retención del pico radiactivo obtenido del análisis del producto marcado con $[^{68}\text{Ga}]$ con el tiempo de retención de un patrón de referencia conocido como Ga-DOTA-TATE "frío" (no radiactivo). El objetivo de esta comparación es asegurar que la molécula marcada y el patrón de referencia tengan estructuras idénticas o muy similares, lo que se refleja en tiempos de retención comparables durante la cromatografía.

Las directrices de la ICH recomiendan, si está disponible, incluir en la solución a analizar otra sustancia que se espera encontrar en la preparación que se está examinando. Por ejemplo, en el caso de $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-TATE, esto podría incluir otras especies de $[^{68}\text{Ga}]$, como $[^{68}\text{Ga}]+3$ en forma libre. En el caso de la molécula no radiactiva, podría ser DOTA-TATE Acetate. La presencia de estas sustancias adicionales ayuda a evaluar la especificidad del método, asegurando que identifica y diferencia correctamente el compuesto de interés de otros posibles componentes en la muestra.

6.1.1 Identidad y Pureza Radioquímica (Detector Radiométrico HPLC)

Primeramente, se corrieron los estándares fríos de Ga-DOTA-TATE y DOTA-TATE Acetate:

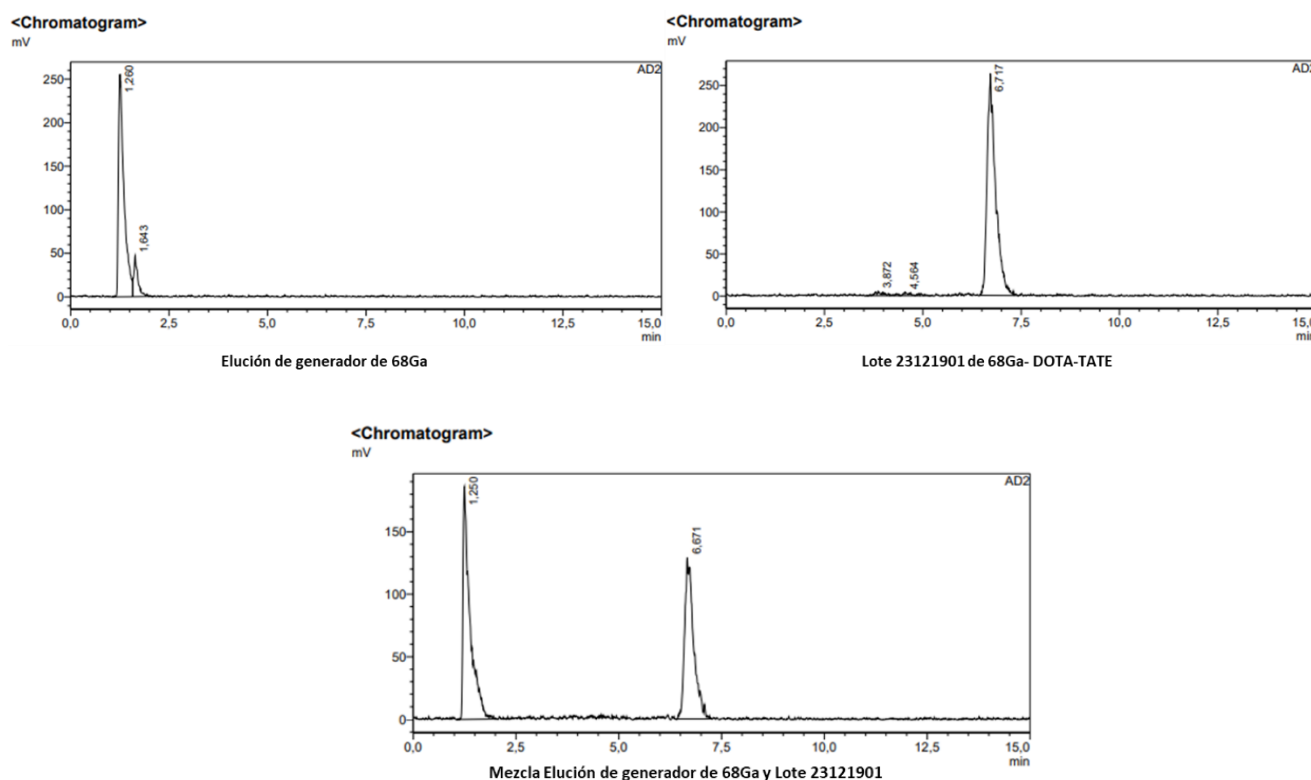


 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Los estándares utilizados ya tenían cierto tiempo de estar resuspendidos y por ello presentan algunas impurezas por decaimiento que no son relevantes a lo que necesitamos que son los tiempos de retención de los picos principales, indicados en la tabla:

Analito/s	Tiempo de retención (min)
DOTA-TATE Acetate	5,871
Ga-DOTA-TATE	6,774

Como se indicó previamente se realizaron las corridas, de la muestra, la elución del generador de galio y una solución mezcla de ambos, obteniéndose:



 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Especificidad HPLC (detector radiométrico)					
Solución	Analito/s	Tiempo de retención (min)	Resolución pico precedente	Criterio de aceptación RS $\geq 1,5$	Área de pico
Solución C Elución generador de Ga	Especie de [^{68}Ga]	1,26	-	N/A	2503198
	Especie de [^{68}Ga]	1643	1,742	CUMPLE	337186
Muestra Lote 23121901	[^{68}Ga]-DOTATATE	6,717	-	N/A	2105136
Solución D: Mezcla de elución + Lote muestra	Especie de [^{68}Ga]	1,25	-	N/A	2184019
	Especie de [^{68}Ga]	6,671	15,751	CUMPLE	1949770

Se puede observar en el cromatograma de la elución del generador un pico doble, lo que nos indica que cuando se inyecta solo dicha solución se puede constatar que hay más de una especie de [^{68}Ga], sin embargo, al realizar la mezcla se altera la elución original (la solución cambia el pH, la concentración entre otros) el método me muestra solo un pico es decir que no es capaz de diferenciar o resolver cada especie de [^{68}Ga] en particular. Asimismo, podemos observar que el pico de impurezas de especies de [^{68}Ga] está claramente diferenciado del pico del producto principal [^{68}Ga]-DOTA-TATE.

Conclusión:

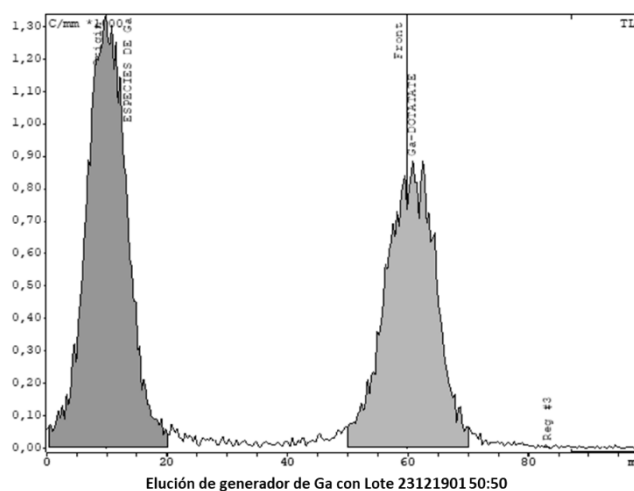
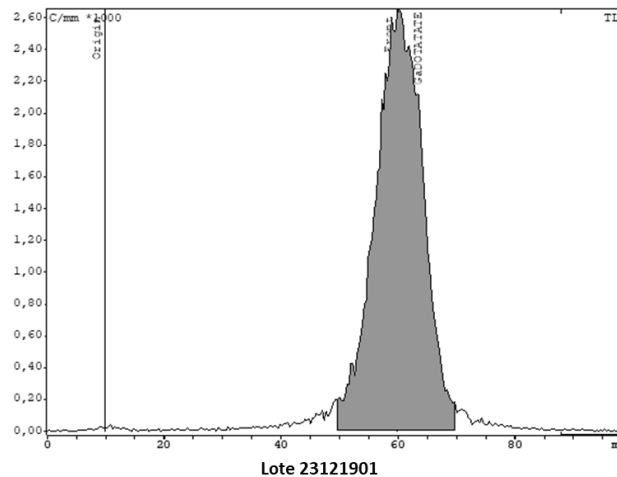
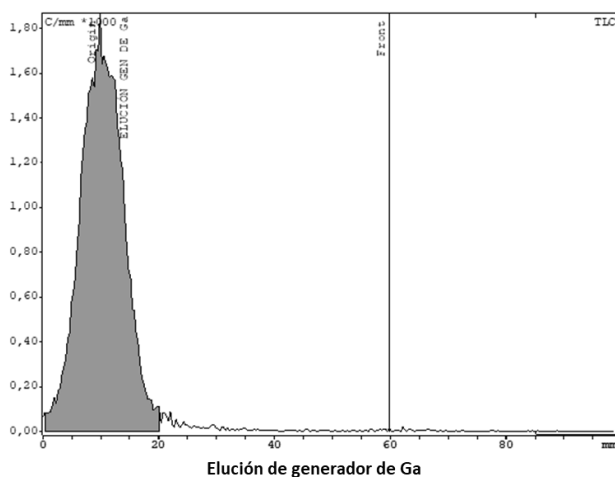
Todas las resoluciones calculadas son superiores al 1,5, cumpliendo ampliamente con los criterios propuestos. No se hallaron picos interferentes en la solución mezcla (Solución D). Los resultados han demostrado que el método propuesto para la identidad y pureza radioquímica de la muestra de [^{68}Ga]-DOTA-TATE es específico, pudiendo identificar con certeza los analitos.

Los tiempos de retención difieren en menos del 2% por lo que también cumple con los requerimientos de identidad.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

6.1.2 Pureza radioquímica (Detector radiométrico TLC)

En este caso no hubo necesidad de correr estándares dado que farmacopea me dice que la impureza de las diferentes especies de $[^{68}\text{Ga}]$ tienen un RF cercano a cero, es decir quedan en la línea de siembra mientras que el $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-TATE llega al frente de solvente teniendo un RF cercano a 1.



 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

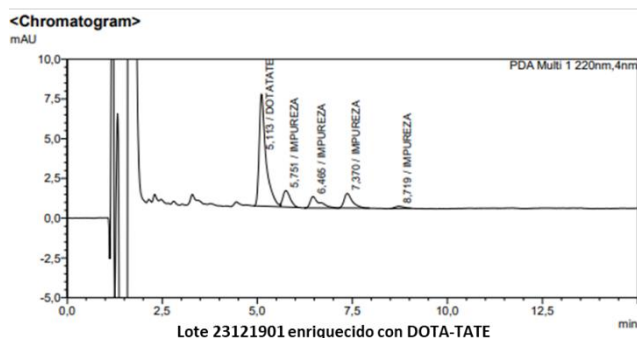
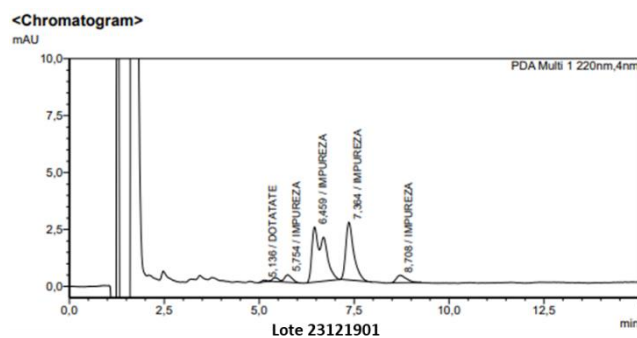
Especificidad TLC (detector radiométrico)				
Solución	Analito/s	R/F	Resolución pico precedente	Criterio de aceptación RS $\geq 1,5$
Solución C Elución generador de Ga	Especie de 68Ga	0	-	N/A
Muestra Lote 23121901	68Ga-DOTATATE	1,007	-	N/A
Solución D: Mezcla de elución + Lote muestra	Especie de 68Ga	0,007	-	N/A
	Especie de 68Ga	1,02	3,45	CUMPLE

Conclusión:

Los analitos tienen un R/F aproximado de 0 y 1 tal y como informaba la farmacopea europea 11.3 y al igual que en el caso previo la resolución calculada entre el pico de impurezas y el pico principal del producto es superior a 1,5. Lo que indica que con el detector radiométrico del radio-scanner el método es específico, pudiendo identificar con certeza los analitos.

6.1.3 Pureza química (Detector UV HPLC).

Cuando de impurezas químicas se trata, la EP 11.3 tiene como parámetro que no debe superarse el área asociada al DOTA-TATE en la solución de referencia 3. Por tal motivo para evaluar la especificidad del método, tal y como se mencionó en el protocolo lo que se hace es enriquecer con DOTA-TATE la muestra del lote de producto terminado y así distinguir de los



 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

otros posibles picos que pudiesen aparecer. También se inyecta la matriz para evaluar posibles picos asociados a la misma.

Especificidad HPLC (detector UV)					
Solución	Analito/s	Tiempo de retención (min)	Resolución pico precedente	Criterio de aceptación RS $\geq 1,5$	S/N
Lote 23121901	DOTATATE	5,136	-	N/A	4,23
	IMPUREZA	5,754	1,982	CUMPLE	17,92
	IMPUREZA	6,459	1,873	CUMPLE	134,03
	IMPUREZA	7,364	2,419	CUMPLE	141,25
	IMPUREZA	8,708	3,084	CUMPLE	18,08
Lote 23121901 enriquecido con DOTA-TATE	DOTATATE	5,113	-	N/A	453,52
	IMPUREZA	5,751	1,892	CUMPLE	66,22
	IMPUREZA	6,465	1,962	CUMPLE	46,35
	IMPUREZA	7,37	2,467	CUMPLE	58,92
	IMPUREZA	8,719	3,194	CUMPLE	8,81

Conclusión:

Las resoluciones calculadas entre todas las impurezas detectadas son superiores al 1,5, cumpliendo ampliamente con los criterios propuestos. Podemos notar que en la muestra tenía una cantidad de DOTA-TATE no cuantificable porque su S/N es menor a 10. Sin embargo, al enriquecerla con la impureza principal pudimos obtener una S/N claramente cuantificable y además con resolución mayor a 1,5 cumpliendo así el criterio deseado.

6.2 LINEALIDAD

6.2.1 Linealidad pureza radioquímica (detector radiométrico HPLC).

Para el caso particular de detectores radiométricos (que pueden ser una sonda Geiger-Müller, un detector de centelleo o un diodo PIN) no se cuenta con proveedores nacionales que realicen estos ensayos por lo cual son realizados internamente. Por tal motivo, este ensayo no solo sirve cumplir con las exigencias de la validación, sino que sirve para calificar la performance de estos detectores.

Los datos de partidas son obtenidos en el sector de producción quienes miden la actividad del lote directamente en la celda de fraccionamiento indicando actividad y hora de medición.

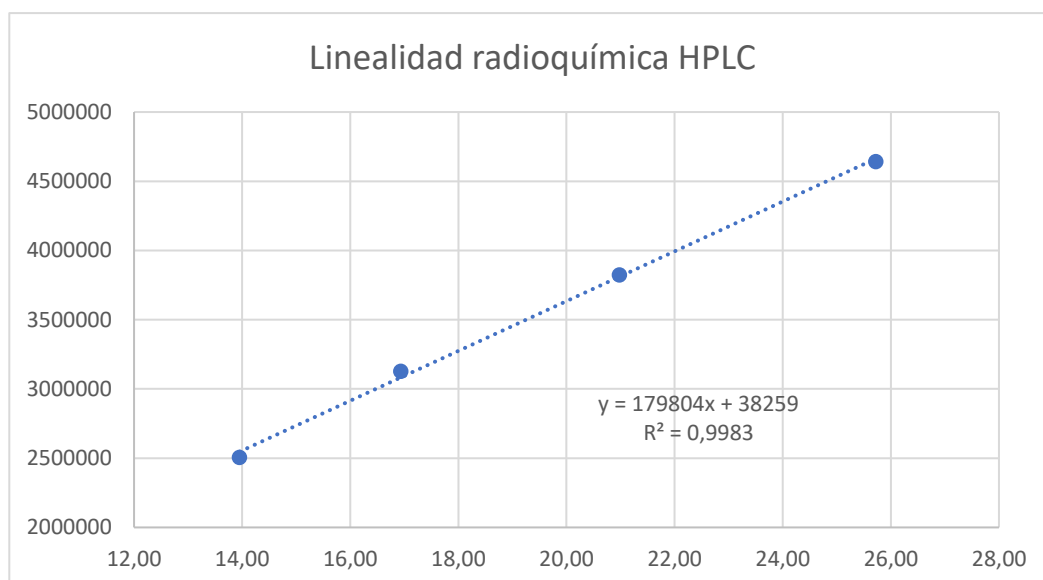
[⁶⁸ Ga]-DOTA-TATE Lote: 23120701	
Ec. Decaimiento	$A=A_0 \cdot e^{-\lambda t}$
λ de ⁶⁸ Ga=	0,010193341
A ₀ =	39,87
Hora	07:13

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

A continuación, el área se presenta una tabla resumen en los que se indica el área del del pico principal y la actividad asociada que se calcula teóricamente mediante la ecuación de decaimiento y el tiempo transcurrido desde la medición inicial.

Linealidad HPLC (detector radiométrico)			
Hora de corrida	T (min)	Actividad (mCi)	Área HPLC
07:56	43	25,72	4642501
08:16	63	20,98	3824960
08:37	84	16,94	3129034
08:56	103	13,95	2506897

Se gráfica la curva que relaciona actividad con área obteniendo:



Conclusión:

Se determinó que el detector radiométrico del HPLC muestra un comportamiento lineal en el rango de 13,95 a 25,72 mCi (rango habitual de trabajo), ya que su coeficiente de regresión lineal es mayor a 0,99, el método cumple con el criterio establecido.

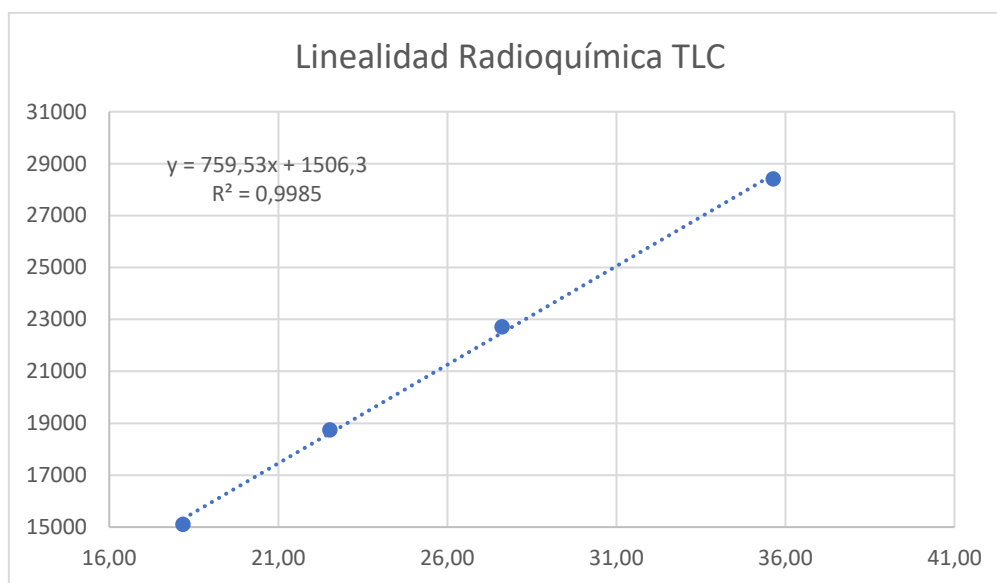
6.2.2 Linealidad pureza radioquímica (detector radiométrico TLC).

Las condiciones iniciales para el ensayo usando el radio-scanner son las mismas del apartado anterior ya que se utilizó el mismo lote [⁶⁸Ga]-DOTA-TATE, y de igual forma presentamos la tabla resumen:

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Linealidad HPLC (detector radiométrico)			
Hora de corrida	t (min)	Actividad (mCi)	Área TLC
07:24	11	35,64	28417
07:49	36	27,62	22721
08:09	56	22,53	18752
08:30	77	18,19	15112

Se gráfica la curva que relaciona actividad con área obteniendo:



Conclusión:

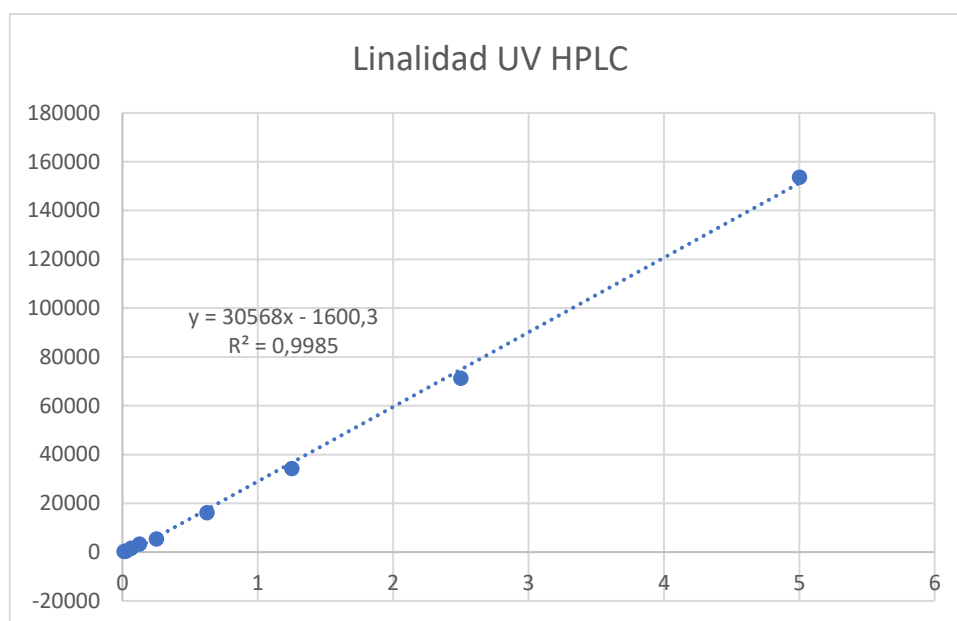
El coeficiente de regresión lineal calculado fue de 0,9985, cumpliendo con el requerimiento establecido y verificando que el detector radiométrico del Radio-Scanner del TLC muestra un comportamiento lineal en el rango de 18,19 a 35,64 mCi (rango habitual de trabajo).

6.2.3 Linealidad química (detector UV del HPLC).

Se evaluó la linealidad del método para la impureza DOTA-TATE acetate inyectando las 9 diluciones del estándar en un rango de concentración comprendido entre 0,5% al 200% de la concentración de trabajo de 2,5 µg/ml. Obteniendo:

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Área DOTATATE
5	200	153701
2,5	100	71311
1,25	50	34336
0,625	25	16180
0,25	10	5490
0,125	5	3270
0,0625	2,5	1641
0,025	1	412
0,0125	0,5	349



Conclusión:

El detector UV del HPLC presenta un comportamiento lineal en el rango de concentración de la impureza DOTA-TATE desde 0,0125 µg/ml hasta 5 µg/ml con un coeficiente de regresión lineal de 0,9985.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

6.3 REPETIBILIDAD (PRECISIÓN DEL SISTEMA)

6.3.1 Detectores radiométricos (HPLC y TLC)

Como se menciona en el protocolo la repetibilidad de ambos detectores radiométricos tanto el de HPLC y el de TLC no se hace un ensayo adicional, sino que se utilizan los datos obtenidos en los cromatogramas de linealidad y se recalcula la actividad al tiempo inicial utilizando la ya mencionada ecuación de decaimiento. Obteniendo:

Detector radiométrico HPLC			Detector radiométrico TLC		
Área	t (min)	Área corregida	Área	t	Área corregida
4642501	0	4642501,00	28417	0	28417
3824960	20	4689916,73	22721	25	29315,70
3129034	41	4752407,38	18752	45	29665,97
2506897	60	4621161,99	15112	66	29614,07
Promedio=		4676496,78	Promedio=		29253,19
Desviación STD=		58195,55	Desviación STD=		578,43
CV%=		1,24	CV%=		1,98

Conclusión:

En los cálculos mostrados se evidencia que tanto el detector radiométrico del HPLC como el del Radio-Scanner TLC son repetibles obteniendo un CV% de 1,24 y 1,98 respectivamente. Ambos menores a 2 por lo que cumple el criterio de aceptación.

6.3.2 Detector UV del HPLC

Dado que lo que se busca detectar con el UV es la impureza de DOTA-TATE, se inyectaron 4 veces la misma muestra del estándar cuya concentración es de 2,5 µg/ml. En la que no solo se evalúa repetibilidad del área obtenida sino también del tiempo de retención ya que es un parámetro crítico en la caracterización del producto. Obteniendo:

Detector UV del HPLC		
DOTATATE	T.RET	Área
Iny #1	5,231	71311
Iny #2	5,236	70471
Iny #3	5,234	70309
Iny #4	5,252	69668
Promedio=	5,24	70439,75
Desviación STD=	0,01	676,45
CV%=	0,18	0,96

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Conclusión:

Para el detector UV del HPLC los resultados son aún mejores dado que arrojan un CV% para T. Ret 0,18 y para el área de 0,96, menos de la mitad del requerimiento, cumple.

6.4 PRECISIÓN INTERMEDIA PUREZA RADIOQUÍMICA Y QUÍMICA (HPLC)

Para el detector radiométrico se realiza la evaluación de los cromatogramas de linealidad se hace la corrección a t0 para la repetibilidad y a partir de este dato se hace el estudio estadístico. Los dos analistas integran los cromatogramas de manera independiente y se comparan entre sí. Obteniendo:

	t(min)	Área integrada	Área Corregida
Analista #1	0	4642501	4642501,00
	20	3824960	4689916,73
	41	3129034	4752407,38
	60	2506897	4621161,99
Analista #2	0	4531795	4531795,00
	20	3688315	4522371,53
	41	3091172	4694902,21
	60	2351554	4334805,92
	Promedio=		4598732,72
	Desviación STD=		132862,32
	CV%=		2,89

Para el caso del detector UV se realiza la evaluación de los cromatogramas de repetibilidad del detector UV. AL igual que con el radiométrico los dos analistas integran los cromatogramas de manera independiente y se comparan entre sí, obteniendo:

	DOTATATE UV	T.RET	Área
Analista #1	Iny #1	5,231	71311,00
	Iny #2	5,236	70471,00
	Iny #3	5,234	70309,00
	Iny #4	5,252	69668,00
Analista #2	Iny #1	5,231	68406,00
	Iny #2	5,236	62891,00
	Iny #3	5,234	67639,00
	Iny #4	5,252	65579,00
	Promedio=	5,24	68284,25
	Desviación STD=	0,01	2848,41
	CV%=	0,17	4,17

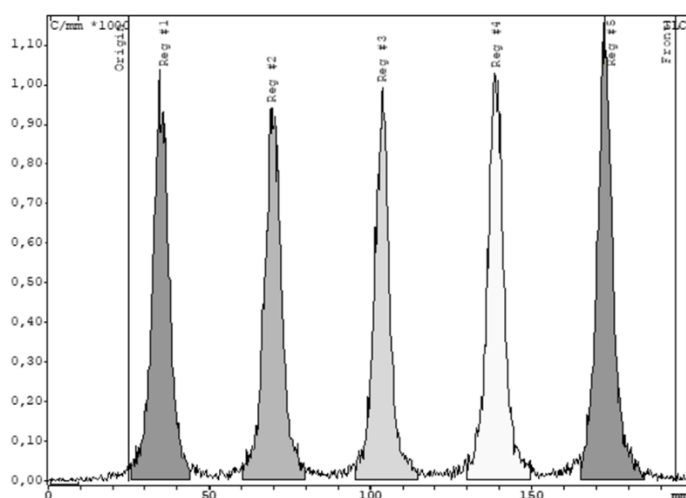
 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Conclusión:

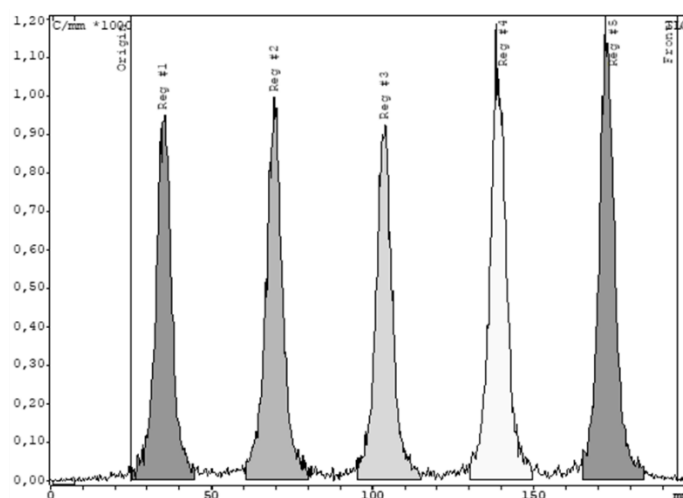
Cumple con el criterio de aceptación dado que en ninguno de los detectores ni en las variables estudiadas se supero el CV% de 5.

6.5 PRECISIÓN INTERMEDIA PUREZA RADIOQUÍMICA (TLC)

El punto crítico de este ensayo es la siembra de la muestra en la placa por ello cada analista realizó 5 siembras en una misma placa de 20 cm de manera independiente. Las realizará una cada 3 centímetros a partir de la línea de siembra, obteniendo:



Precisión intermedia. Analista #1



Precisión intermedia. Analista #2

	t(min)	Área integrada
Analista #1	Iny #1	6123
	Iny #2	6029
	Iny #3	5512
	Iny #4	6318
	Iny #5	6657
Analista #2	Iny #1	5697
	Iny #2	6072
	Iny #3	5655
	Iny #4	6787
	Iny #5	6954
	Promedio=	6180,40
	Desviación STD=	495,19
	CV%=	8,01

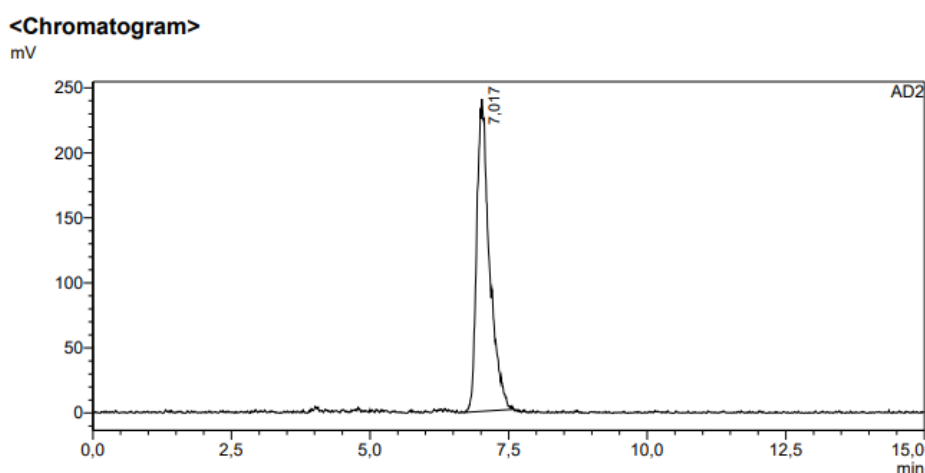
 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Conclusión:

A diferencia del HPLC donde la inyección es automática o semi automática, el ensayo del radio-scanner es mucho más manual, involucrando más variables de error en la técnica por ello su criterio de CV% es más flexible (10). En este caso el método cumple teniendo un CV% de 8,01

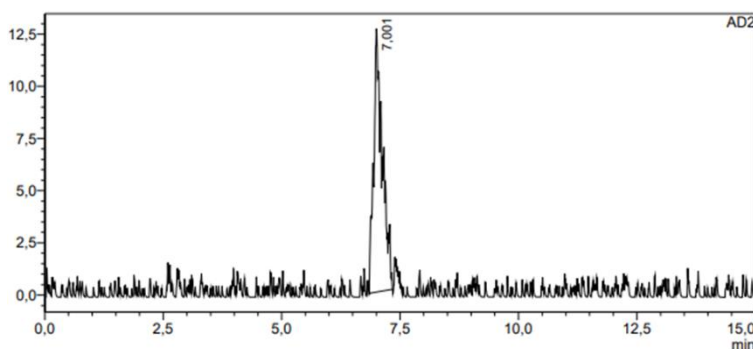
6.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (DETECTOR RADIOMÉTRICO HPLC)

Se realiza una corrida inicial del lote de [^{68}Ga]-DOTA-TATE 23121201 obteniendo la siguiente información del cromatograma:



DATA INICIAL	Hora	Área	S/N	% del pico principal
T0	08:14	3864561	117,53	100

Lo que se busca cuantificar es el porcentaje de otras impurezas radioquímicas en función de la actividad del pico principal. Por ello se realizó la dilución de la muestra 1:15 y se comparo el área obtenida con respecto al pico principal. Esto hasta alcanzar una señal ruido de 10:1. Obteniéndose:



Cromatograma correspondiente a T2

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial

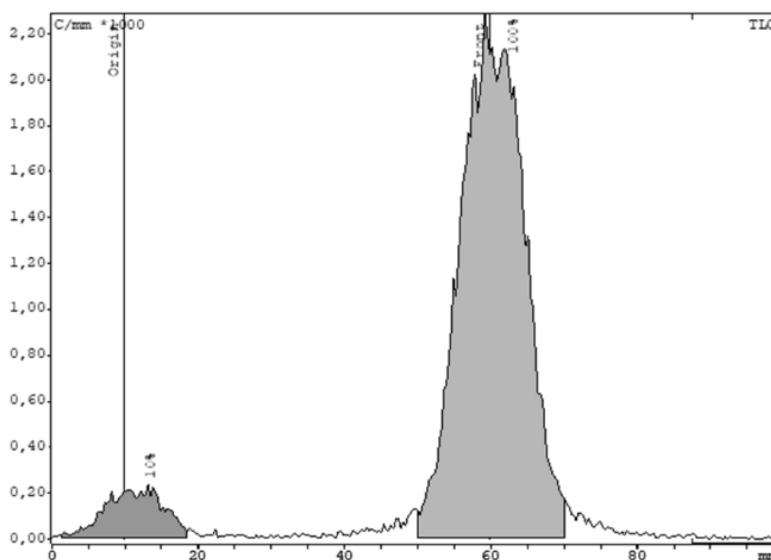
Dil 1:15	Hora	Área	S/N	% del pico principal
T1	08:34	384243	18,32	9,94
T2	09:02	162352	10,6	4,20
T3	09:30	112118	7,67	2,90

Conclusión:

En la 2da corrida de la dilución realizada se alcanzó una S/N de 10,6. Dicho pico posee un área de 162352 que corresponde al 4,2% del área inicial. Por tal motivo se define el límite de cuantificación del detector radiométrico a partir del 4% del pico principal. Se considera que es un porcentaje alto debido a lo ruidosa que es la línea de base, se propondrá buscar formas de disminuir ese ruido para bajar el porcentaje en revisiones futuras.

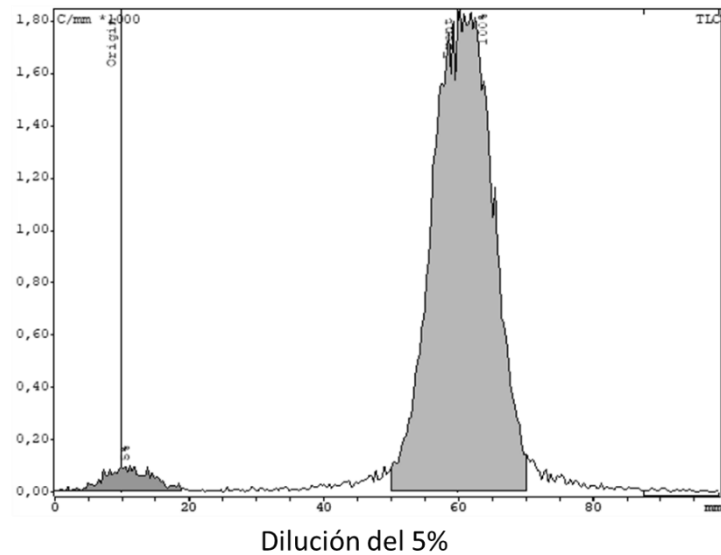
6.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (DETECTOR RADIOMÉTRICO TLC).

En cada placa se realizaron dos siembras, una de la dilución a evaluar en el inicio de la placa (R/F aproximadamente 0) y otra de la elución del generador sin diluir en la línea de fondo donde termina el frente de solvente (R/F aproximadamente 1), La región verde de las tablas mostradas a continuación son los datos arrojados por el equipo, mientras que el amarillo son cálculos realizados a parte solamente para evaluar en función de porcentaje de pico principal. Se obtuvo:

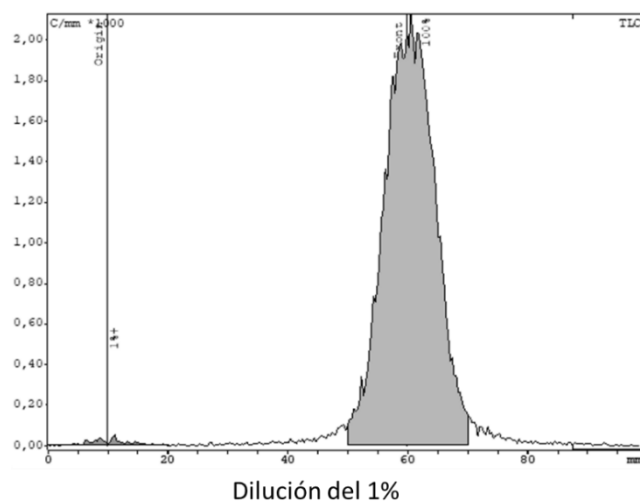


Solución	R/F	Area Counts	%Area	LOD 3 σ Counts	%LOD Pico Principal	LOQ
10%	0,072	2038,03	8,07	31,03	0,13	0,45
100%	0,993	23201,51	91,93	33,61	-	-

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI



Solución	R/F	Area Counts	%Area	LOD 3 σ Counts	%LOD Pico Principal	LOQ
5%	0,013	729,85	3,59	30,76	0,16	0,52
100%	1,033	19593,38	96,41	32,4	-	-



Solución	R/F	Area Counts	%Area	LOD 3 σ Counts	%LOD Pico Principal	LOQ
1%+	0,026	170,42	0,8	29,48	0,14	0,47
100%	1,026	21042,42	99,2	29,48		

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

Conclusión:

Podemos observar que para concentraciones más bajas el dato de LOD 3σ que me muestra el equipo se mantiene aproximadamente en 30 cuentas, lo que nos indica que incluso al 1% el límite sigue siendo el mismo. Con esto no solo determinamos que el LOD es alrededor de 0,15% del pico principal, sino que haciendo un límite cuantificación igual a 10σ estaría en 0,5%.

6.8 LÍMITE DE DETECCIÓN (DETECTOR UV DEL HPLC).

Se utiliza la data de los cromatogramas de linealidad para el detector UV, obteniéndose:

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje	Señal/Ruido
5	200	874,75
2,5	100	402,39
1,25	50	215,09
0,625	25	79,34
0,25	10	24,16
0,125	5	17,19
0,0625	2,5	11,33
0,025	1	2,4

Conclusión:

Se determina que se alcanza una S/N menor a 3 a partir de concentraciones cercanas al 1% de la concentración del STD a comparar. Por lo que se define el límite de detección en una concentración de 0,025 $\mu\text{g/ml}$.

7 CONCLUSIONES GENERALES.

Los radiofármacos tienen algunas particularidades relevantes tales como los volúmenes pequeños de producción y/o la necesidad de administrar el producto antes de completar los análisis por ser de vida útil de apenas unas horas y en algunos casos solo minutos. En este contexto, es fundamental lograr una alta actividad específica y una pureza radionucleídica elevada para minimizar la dosis no deseada al paciente por posibles impurezas. Asimismo, es esencial garantizar una alta pureza química y radioquímica para asegurar la marcación efectiva de diversas moléculas durante la preparación de los radiofármacos.

Por lo tanto, el aseguramiento y control de calidad de estos productos se vuelve un factor crucial. Es entonces cuando la validación de la técnica analítica para la determinación de identidad y pureza química y radioquímica, como se desarrolla en este trabajo, adquiere una gran importancia. Esta técnica, que ha demostrado ser rápida y confiable, es esencial para la liberación segura del radiofármaco.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

El proceso de validación de métodos siguió el ciclo de Deming (PDCA), ya que, durante la preparación del protocolo, se realizan pruebas para normalizar el método, basándose en métodos establecidos en farmacopeas o guías reconocidas internacionalmente. Posteriormente, se procede con los distintos ensayos mediante la ejecución de la validación del método. Finalmente, la calidad se asegura mediante el monitoreo continuo de los resultados a través de gráficos de control y una gestión adecuada de cambios.

Para que el sistema sea considerado validado, es imprescindible cumplir de manera oportuna con los programas de calibración, calificación y mantenimiento preventivo, además de los controles diarios de verificación con estándares adecuados. Esto garantiza que el proceso de producción de radiofármacos se realice bajo las más estrictas normas de calidad, asegurando la seguridad y eficacia del producto final para los pacientes.

Gracias al trabajo realizado se comprobó que el método es específico, capaz de diferenciar el $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-TATE y sus principales impurezas esperadas con una resolución mayor a 1,5 con respecto al pico previo. Asimismo el método demostró ser lineal en el detector radiométrico del HPLC en el rango de 13,95 a 25,72 mCi y en su detector UV en concentraciones de DOTA-TATE entre 0,0125 $\mu\text{g/ml}$ hasta 5 $\mu\text{g/ml}$ y para del radio-scanner en la lectura de actividad de las distintas especies de $[^{68}\text{Ga}]$ entre 18,19 a 35,64 mCi. De igual manera podemos decir que el método es repetible ya que sus 3 detectores presentaron CV% menores a 2. Los analistas están capacitados para realizar la metodología ya que su precisión intermedia no supera CV%=5 para el HPLC ni el CV%=10 del Radio-Scanner TLC y para finalizar se definieron los límites de cuantificación en 4% del pico principal para el detector radiométrico del HPLC y 0,5% del total de cuentas del pico principal para el detector radiométrico del TLC igualmente se definió el límite de detección del UV del HPLC en 1% de la concentración de trabajo.

La validación realizada nos pone un paso mas adelante en conseguir la meta de obtener la habilitación para comercialización de $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-TATE y poder distribuirlo en diversos puntos de la provincia, promoviendo el acceso a la salud de calidad a un mayor número de pacientes.

El trabajo realizado ha tenido un impacto significativo a nivel personal, facilitando la integración de los conocimientos teóricos adquiridos durante la especialización en Calidad Industrial con la práctica aplicada en la FCDN. Esta experiencia ha representado un valioso aporte en el proceso de implementación de las validaciones, proporcionando una perspectiva más clara y concreta del papel que desempeña el especialista en calidad. La oportunidad de aplicar de manera práctica los conceptos y habilidades aprendidos en el ámbito académico ha enriquecido la comprensión del campo, permitiendo una mejor apreciación de la importancia y el impacto del trabajo en calidad en un contexto real y operativo.

 Universidad Nacional de San Martín	Especialización en Calidad Industrial	 Diagnóstico Nuclear
 Instituto de Calidad Industrial INCALIN_UNSAM-INTI	Trabajo final integrador	 Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI

8 BIBLIOGRAFÍA

- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (s.f.). Q2 (R1) Validation of analytical procedures. Text and Methodology.
- Bureau International des Poids et Mesures. (2012). International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM) (3rd ed.). https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf
- European Pharmacopoeia. (2023). Gallium (68Ga) Oxodotreotide Injection, Volumen 11.3.
- Protocolos e Informes de validación de técnicas analíticas (documentación de la FCDN).
- Plan Maestro de Validación (documentación de la FCDN).