

Contrôle de qualité des produits radiopharmaceutiques par chromatographie liquide HPLC

C. Wastiel et M. Kosinski

Institut de Radiophysique Appliquée, EPFL, 1015 Lausanne, Suisse

Les médicaments radiopharmaceutiques constituent l'un des outils essentiels des services de Médecine Nucléaire. Ces médicaments sont principalement réservés au diagnostic (95 % des applications) mais également à la thérapie (< 5 %). De par leur spécificité (administration unique lors d'une exploration fonctionnelle ; durée de vie du médicament courte, du fait du principe même de la radioactivité), les radiopharmaceutiques posent des problèmes quant à la réalisation des tests requis garantissant leur conformité aux exigences de la Pharmacopée Européenne. Dans cet exposé, nous montrons l'importance de la chromatographie HPLC comme méthode d'analyse radiochimique permettant d'effectuer les contrôles de qualité de manière optimale (rapidité, spécificité).

Les radiopharmaceutiques (RP) se présentent sous forme de solutions stériles, apyrogènes et sont administrés aux patients dans un but diagnostique ou thérapeutique. Dans ce sens, ils ne diffèrent pas des médicaments injectables conventionnels quant aux exigences de pureté et d'efficacité. La différence principale entre les RP et les médicaments conventionnels réside dans la durée de vie limitée du produit radioactif (en jours ou en heures) comparée à celle des pharmaceutiques conventionnels (en mois ou années). Contrairement à ces derniers, les RP ne peuvent subir tous les tests requis (avec obtention des résultats) avant leur distribution au médecin. Ainsi, dans la plupart des cas, les RP doivent être fabriqués, testés et administrés au patient dans un laps de temps très court, en

général le même jour. Le contrôle de qualité du produit fini est donc souvent du ressort du médecin.

Les critères de qualité des RP sont décrits en détail dans des monographies officielles (pharmacopées : Ph.Eu, USP) ou dans des protocoles stricts remis par le producteur (industrie pharmaceutique) et acceptés par les autorités nationales lors de l'enregistrement.

Le paramètre le plus important, touchant l'efficacité du diagnostic, est la pureté radiochimique, c'est-à-dire le taux de radioactivité du radionucléide concerné sous la forme chimique recherchée, à la radioactivité totale du radionucléide présent dans la préparation. Les impuretés radiochimiques ont une biodistribution différente, ce qui perturbe l'image scintigraphique et engendre le risque d'erreur de diagnostic et d'irradiation inutile. Ainsi, la détermination de la pureté radiochimique (appelée aussi rendement de marquage) est effectuée pour chaque produit (ou lot de production) pour vérifier la qualité de la formulation du pharmaceutique.

Méthodes analytiques

Les méthodes de séparation chromatographique sont couramment utilisées : chromatographie plane (PC) et chromatographie liquide (HPLC). Dans la plupart des cas, les deux méthodes sont proposées dans la monographie : la chromatographie plane, rapide et simple d'emploi, est la méthode de routine retenue par l'utilisateur (médecin), mais elle n'offre pas les qualités de spécificité et de qualité de détection que présente la HPLC, méthode obligée des producteurs et des laboratoires spécialisés (hôpitaux universitaires). C'est la raison pour laquelle chaque méthode de chromatographie plane est validée par une méthode analytique reconnue (en général, chromatographie HPLC).

La Chromatographie Liquide HPLC

En ce qui concerne les problèmes de qualité, les RP sont divisés en trois catégories :

- RP prêts à l'emploi : du ressort du producteur ;
- RP à préparer avant injection : du ressort du médecin (ici, l'utilisateur) ;
- RP produits par cyclotron : du ressort du médecin (ici, producteur et utilisateur).

Dans le premier cas, une méthode HPLC fera partie du dossier d'enregistrement ; dans le second cas, une méthode par PC sera proposée au médecin, elle-même validée par une méthode HPLC ; dans le troisième cas, une méthode HPLC sera seule à même de répondre aux critères de détermination qualitative et quantitative en un laps de temps très court (quelques minutes) lié à la particularité de courte durée de vie des radiopharmaceutiques utilisés en tomographie par émission de positons.

Équipement analytique

Chromatographie planaire

La chromatographie sur couche mince (CCM) est la plus couramment utilisée. La phase stationnaire est un absorbant tel que le silicagel ou un support imprégné de cellulose. Les supports conventionnels sont des papiers Whatman (cellulose) ou des supports CCM (silice) commerciaux. La technique de ce type de chromatographie est simple et des résultats acceptables sont facilement obtenus. La figure 1 montre une installation de chromatographie planaire classique.

Après développement, les chromatogrammes peuvent être coupés en segments adéquats (après connaissance des Rf) et comptés dans un compteur de radioactivité gamma.

Néanmoins, la lecture des chromatogrammes au moyen d'un passeur de chromatogramme est sans conteste le meilleur moyen d'analyse de radiochromatogrammes. La figure 2 montre le schéma de principe d'un scanner PC. D'autres équipements commerciaux, appelés analyseurs linéaires, comptent simultanément l'activité détectée dans un nombre fixe de canaux le long du chromatogramme et donnent le résultat sous forme d'histogramme. Il faut mentionner que les centres de médecine nucléaire utilisent parfois

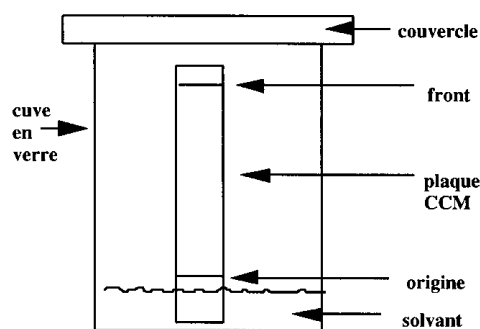


Figure 1. Exemple d'installation de chromatographie planaire.

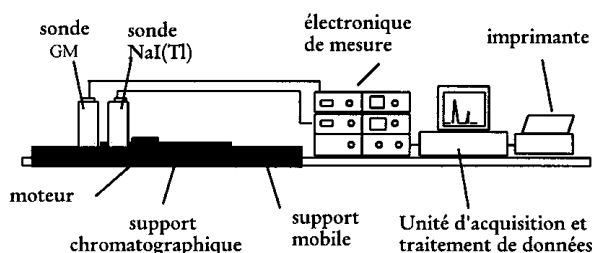


Figure 2. Scanner de chromatogrammes.

les caméras gamma comme scanner de chromatogrammes et visualisent le profil de l'activité sous forme d'image.

Chromatographie liquide HPLC

Les laboratoires spécialisés (hôpitaux et centres universitaires) disposent de moyens analytiques plus performants. Dans le cadre des RP, la chromatographie liquide donne des résultats performants et surtout permet de séparer tous les composants du radiopharmaceutique sauf les formes insolubles.

La détermination de la pureté radiochimique par HPLC fait appel à un équipement standard complété d'une détection radioactive. La figure 3 montre le schéma classique d'un équipement analytique de Radio-HPLC [1] comprenant deux détecteurs (UV, radioactivité). Le grand avantage de

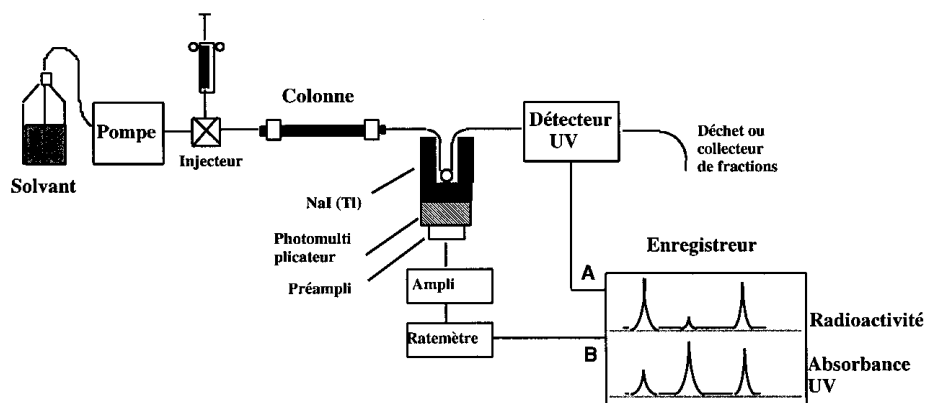


Figure 3. Système de base Radio-HPLC.

cette double détection réside dans le fait que la double information qualitative (Rf) est complétée par la détermination de l'activité spécifique (estimation du nombre de molécules marquées), paramètre important pour interpréter la biodistribution chez le patient.

La chromatographie liquide utilise des colonnes en acier de petite dimension (10 – 50 cm de longueur sur quelques mm de diamètre). Ces colonnes sont remplies sous haute pression (600 bars) avec une phase stationnaire constituée d'un absorbant greffé sur des petites particules de silice (5 – 10 µm). L'équipement de base consiste en un réservoir de phase mobile qui est pompée et envoyée sous pression dans la colonne chromatographique. L'échantillon à analyser est injecté en amont de la colonne au moyen d'un injecteur on-line. Le volume d'échantillon est de l'ordre de 1 à 20 µL. La sortie de la colonne est directement branchée au(x) détecteur(s). Selon le type d'analyse, on utilisera un détecteur UV, un détecteur de radioactivité, ou les deux en série.

le résultat de l'analyse d'un produit radiomarqué à l'iode-131 utilisé dans la scintigraphie rénale, l'Iodohippuran [¹³¹I]. Le chromatogramme obtenu par détection UV confirme la nature chimique du pic [B], celui obtenu par détection radioactive informe quant à la pureté radiochimique du pic [B], ici 100 %.

Durant les différentes étapes de production, la purification des produits intermédiaires et du produit fini est souvent effectuée par chromatographie préparative HPLC. A titre d'exemple, l'albumine humaine est purifiée par chromatographie d'exclusion. La séparation de protéines par filtration sur gel permet d'obtenir l'albumine pure. Cette protéine sera ensuite marquée au technétium-99m. La figure 5 montre le chromatogramme obtenu après passage de l'albumine humaine (SAH) sur une colonne HPLC TSK Gel 3000SW avec détection UV à 280 nm.

Applications

Industrie pharmaceutique

Le producteur contrôle toute la chaîne de production afin d'assurer un produit final de qualité (assurance qualité).

Les procédures utilisées sont décrites dans la monographie correspondante de la Pharmacopée. La figure 4 montre

Utilisateur (Service de Médecine Nucléaire)

Plus de 90 % des RP sont à préparer dans le laboratoire de Médecine Nucléaire avant l'injection au patient. Dans ce cas, le médecin dispose d'un radionucléide pur (technétium-99 m, iode-123, indium-111, ...) et d'un composé chimique non-radioactif conditionné par l'industrie pharmaceutique en vue du marquage par le radionucléide. Le paramètre important pour le médecin, le rendement de marquage, sera contrôlé par lui-même juste avant injection au patient. Par le fait de la complexité de la chromatographie liquide HPLC, ce dernier utilisera donc la procédure allégée (PC). Cette procédure sera auparavant validée par un laboratoire spécialisé (industrie, université). A titre d'exemple [2], la figure 6

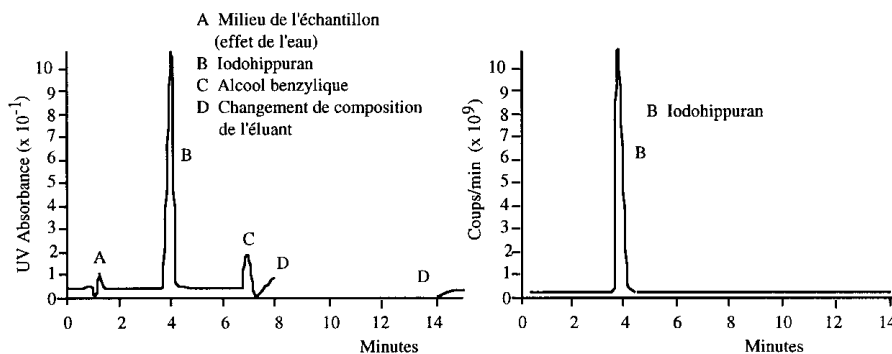


Figure 4. Analyse de l'Iodohippuran [¹³¹I] par HPLC sur colonne Partisphere. Eluant : méthanol/acétate de sodium 0,1M pH 3,9.

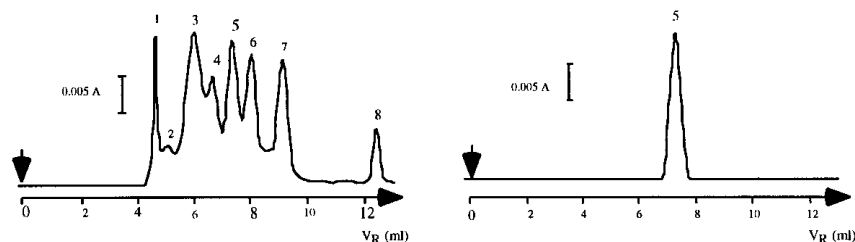


Figure 5. Séparation de protéines par filtration sur gel. Colonne : longueur : 50 cm ; diamètre intérieur : 7,8 mm. Phase stationnaire : TSK Gel 3000SW. Phase mobile : solution aqueuse de KH₂PO₄ 0,067 M, pH 6,8 + KCl 0,1 M. Débit : 1 mL/min. Détection : UV 280 nm. Nature des solutés : (1) = γ-globuline [I] ; (2) = γ-globuline [II] ; (3) = γ-globuline [III] ; (4) = LDH ; (5) = albumine ; (6) = pepsine ; (7) = cytochrome C ; (8) = adénosine (d'après un document Varian).

montre la validation effectuée entre PC (Col. 1) et HPLC (Col. 2) d'un composé iodé, la métaiodobenzylguanidine [¹³¹I], dans différents milieux. On voit l'influence du milieu sur la résolution en chromatographie planaire comparée à celle de la chromatographie HPLC.

Centre TEP (Radiopharmaceutique émetteur de positon)

Les centres de Médecine Nucléaire équipés de caméras TEP (tomographie à émission de positons) disposent la plupart du temps d'un cyclotron médical qui produit les radionucléides émetteurs de positons. Les principaux radioéléments utilisés (fluor-18, carbone-11, azote-13, oxygène-15) ont des durées de vie courtes, de 2 minutes à 2 heures). Pour cette raison, le centre TEP, en même temps producteur et utilisateur, se doit de disposer de l'infrastructure et de la compétence nécessaire au contrôle de qualité du radiopharmaceutique final.

On comprend immédiatement l'intérêt de la chromatographie HPLC comme outil rapide et performant dans l'analyse en ligne de ces médicaments.

L'utilisation de détecteurs à barette de diode (DAD) apporte dans ce cas une aide précieuse par la densité d'informations obtenues en un temps très court et en une seule analyse. La figure 7 montre l'exemple [3] d'un composé marqué au carbone-11 (période : 20,4 minutes) dont les

résultats doivent être connus avant injection. Le chromatogramme DAD (Fig. 7.1) obtenu permet d'identifier (temps de rétention), de quantifier (intégration des pics) et de déterminer la pureté des composés séparés (analyse des spectres UV aux longueurs d'onde d'intérêt).

La détection radioactive simultanée (Fig. 7.2) fournira l'information quant à la concentration radioactive des composés d'intérêt, après corrélation des temps de rétention obtenus par le chromatogramme DAD.

Conclusion

Les radiopharmaceutiques sont une catégorie particulière de médicaments ; ils présentent cependant des exigences de pureté identiques à celles des médicaments conventionnels.

Par le fait qu'ils sont préparés individuellement pour chaque patient, le contrôle de qualité par batch est impossible. Des techniques rapides et éprouvées étaient indispensables pour satisfaire les contrôles de qualité requis. La chromatographie liquide HPLC a apporté la solution à ces exigences. Actuellement, l'industrie pharmaceutique ne propose plus de nouveau radiopharmaceutique sans une méthode analytique validée, utilisant la chromatographie HPLC.

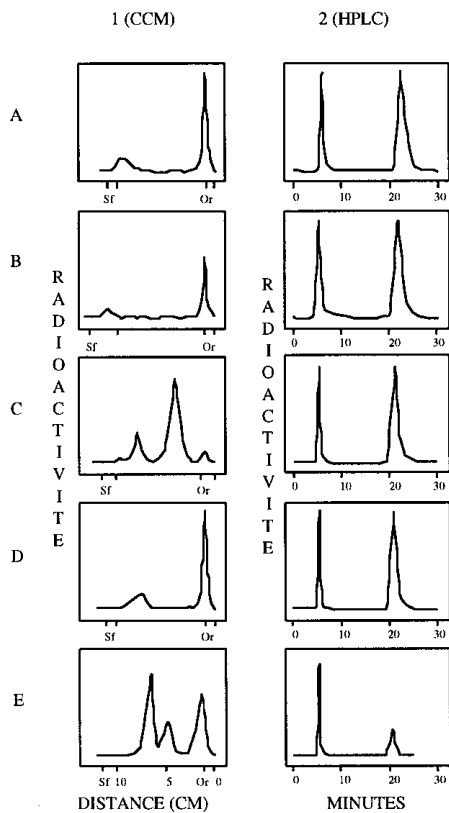


Figure 6. Radio-CP (Col. 1) et radio-HPLC (Col. 2). Validation analytique d'un mélange d'iodure [¹³¹I] et de MIBG [¹³¹I] contenus dans (A) l'eau ; (B) 13 mM acétate de sodium tampon pH 4,5 ; (C) solution saline 0,9 % NaCl ; (D) solution 10 mM d'iodure de sodium ; (E) solution 100 mM d'iodure de sodium.

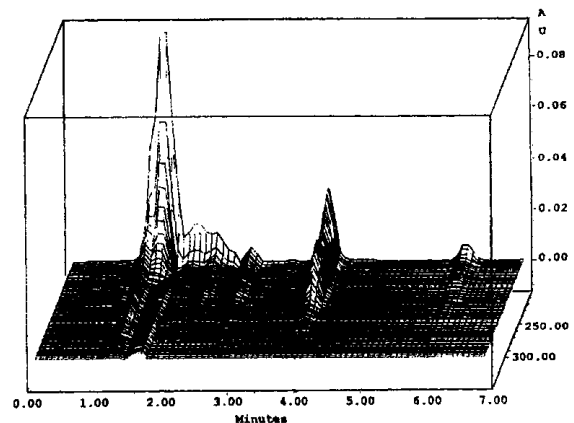


Figure 7.1. Analyse par HPLC d'un composé marqué au C-11. Détection DAD.

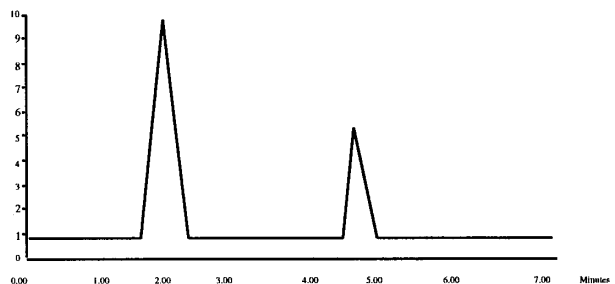


Figure 7.2. Analyse par HPLC d'un composé marqué au C-11. Détection radioactive.

Références

1. Wieland, D. M. Analytical and chromatographic techniques in radiopharmaceutical chemistry. Editions Springer, New York, 1986; pp 128-129.
 2. Wieland, D. M. Analytical and chromatographic techniques in radiopharmaceutical chemistry. Editions Springer, New York, 1986; pp 264-265.
 3. Chromatogramme obtenu sur un produit de recherche au cyclotron de l'Université de Liège, Belgique.
-