

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA LESKOVAR

**RAZVOJ, OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA TEKOČINSKE
KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI ZA UGOTAVLJANJE
RADIOKEMIJSKE ČISTOTE RADIOOZNAČENIH ANALOGOV
SOMATOSTATINA**

**DEVELOPMENT, OPTIMISATION AND VALIDATION OF HIGH
PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY FOR ASSESSMENT
OF RADIOCHEMICAL PURITY OF RADIOLABELED
SOMATOSTATIN ANALOGUES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Oddelku za radiofarmacijo in klinično radiokemijo na Kliniki za nuklearno medicino v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Tanje Gmeiner Stopar, mag. farm., spec.

Zahvala

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm., somentorici doc. dr. Tanji Gmeiner Stopar, mag. farm., spec ter vsem zaposlenim na Oddelku za radiofarmacijo in klinično radiokemijo, še posebej delovni mentorici dr. Petri Kolenc-Peitel za strokovno pomoč v laboratoriju, pomoč pri nastajanju diplomskega dela in vrednotenju rezultatov. Rada bi se zahvalila tudi staršem, fantu Sašu, prijateljem in vsem, ki so mi stali ob strani in me ves čas vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Tanje Gmeiner Stopar, mag. farm., spec.

VSEBINA

1. POVZETEK	1
2. SEZNAM OKRAJŠAV	5
3. UVOD.....	7
3.1. RADIOFARMACIJA IN RADIOFARMAKI.....	7
3.2. VLOGA SOMATOSTATINA V ORGANIZMU	11
3.3. UPORABA SOMATOSTATINA IN ANALOGOV V MEDICINI	12
3.4. RADIOOZNAČENI ANALOGI SOMATOSTATINA	14
3.5. PRINCIP DELOVANJA TEKOČINSKE KROMATOGRFIJE	16
3.5.1. Mobilna in stacionarna faza.....	17
3.5.2. Izokratska in gradientna elucija.....	18
3.5.3. Injektor	18
3.5.4. Kolona in predkolona	19
3.5.5. Črpalka	19
3.5.6. Detektor	20
3.5.7. Detektor radioaktivnosti	20
3.5.8. Parametri za vrednotenje ustreznosti HPLC sistema.....	21
3.6. DEFINICIJA VALIDACIJE.....	24
3.6.1. Validacija priprave radiofarmaceutvskih izdelkov	25
4. NAMEN DELA	27
5. MATERIALI IN METODE	28
5.1. Materiali.....	28
5.1.1. Standardi.....	28
5.1.2. Vzorci	28
5.1.3. Mobilna faza.....	28
5.1.4. Oprema in ostali materiali	28
5.2. Metode dela.....	29
5.2.1. Razvoj ustrezne HPLC metode za optimalno ločbo analogov somatostatina.....	29
5.2.2. Priprava standardnih raztopin za validacijo HPLC metode.....	35
5.2.3. Stresni testi za določanje stabilnosti različnih koncentracij oktreetida.....	36
5.2.4. Meja zaznavnosti (angl. LD-limit of detection)	36

5.2.5.	Določanje linearnosti odziva detektorja radioaktivnosti	37
6.	REZULTATI	39
6.1.	Izbira in optimizacija HPLC metode za ločbo analogov somatostatina	39
6.1.1.	Kromatogrami mešanice oktreetida, DOTATOC-a, DOTATATE in HYNIC-TOC-a na koloni Phenomenex Gemini®	39
6.1.2.	Kromatogrami mešanic na koloni Kinetex®	42
6.2.	Validacija izbrane metode.....	46
6.2.1.	Določanje linearnosti odziva UV/VIS detektorja.....	47
6.2.2.	Stresni testi za določanje stabilnosti različnih koncentracij oktreetida.....	51
6.2.3.	Meja zaznavnosti (angl. DL- detection limit).....	52
6.2.4.	Meja določljivosti (angl. QL-quantification limit)	52
6.2.5.	Ponovljivost injiciranja.....	53
6.2.6.	Linearnost odziva detektorja radioaktivnosti	55
7.	RAZPRAVA.....	58
8.	SKLEP	64
9.	LITERATURA	65

SEZNAM SLIK IN TABEL

Seznam slik:

Slika 1: Pridobivanje ^{99m}Tc iz ^{99}Mo z radionuklidnim generatorjem.....	8
Slika 2: Poenostavljena struktura enega izmed različnih tipov radiofarmakov.....	9
Slika 3: Struktura nativnega somatostatina in sinteznih analogov oktreotida, lanreotida in RC-160 (vapreotid).....	13
Slika 4: Scintigrafija zdravega organizma po aplikaciji oktreotida označenega z ^{111}In	14
Slika 5: DOTATOC in DOTATATE.....	15
Slika 6: ^{99m}Tc -etilenediamin <i>N,N'</i> -diacetilna kislina/hidrazinonikotinamid-Tyr ³ -oktreotid (^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC).....	16
Slika 7: Shema HPLC aparature	17
Slika 8: Skica kromatograma.....	22
Slika 9: Skica izračuna faktorja simetrije	23
Slika 10: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 1a.....	39
Slika 11: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 2a.....	40
Slika 12: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 3a.....	41
Slika 13: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 4a.....	41
Slika 14: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 5a.....	42
Slika 15: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 1b	43
Slika 16: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 2b.....	44
Slika 17: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 3b.....	44
Slika 18: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 4b.....	45
Slika 19: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 5b.....	45
Slika 20: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 6b.....	46
Slika 21: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 7b.....	46
Slika 22: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za oktreotid.....	48
Slika 23: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za DOTATOC	49
Slika 24: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za DOTATATE	50
Slika 25: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za HYNIC-TOC	50
Slika 26: Umeritvena premica linearnega odziva detektorja radioaktivnosti	56

Seznam tabel:

Tabela I: Posamezni radioaktivni izotopi ter njihove značilnosti	10
Tabela II: Seznam uporabljenih metod za kromatografsko kolono Phenomenex Gemini®	31
Tabela III: Seznam uporabljenih metod za kolono Kinetex®	34
Tabela IV: Redčitve raztopin za določanje linearnosti detektorja radioaktivnosti	38
Tabela V: Retencijski časi pri posamezni metodi na koloni Phenomenex Gemini®.....	39
Tabela VI: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 1a	40
Tabela VII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 2a.....	40
Tabela VIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 3a.....	41
Tabela IX: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 4a	42
Tabela X: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 5a.....	42
Tabela XI: Retencijski časi analogov somatostatina pri posamezni metodi na koloni Kinetex®	43
Tabela XII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 1b	43
Tabela XIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 2b.....	44
Tabela XIV: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 3b.....	44
Tabela XV: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 4b.....	45
Tabela XVI: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 5b	45
Tabela XVII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 6b	46
Tabela XVIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 7b.....	46
Tabela XIX: Površine vrhov za posamezen analog somatostatina za določanje linearnosti. Podane so povprečne vrednosti za posamezno koncentracijo, izračunane vrednosti SD in RSD (v %)	48
Tabela XX: Površine vrhov pred in po trikratnem zamrzovanju in odtajanju oktreatida ..	51
Tabela XXI: Standardne deviacije odzivov mobilne faze (slepi vzorec), kjer pričakujemo odziv detektorja za posamezen peptid pri izbrani metodi	52
Tabela XXIII: Ponovljivost injiciranja za oktreatid	53
Tabela XXIIIIV: Ponovljivost injiciranja za HYNIC-TOC.....	54
Tabela XXIV: Ponovljivost injiciranja za DOTATATE.....	54
Tabela XXVI: Ponovljivost injiciranja za DOTATOC.....	55
Tabela XXVI: Izmerjene površine vrhov raztopin različnih aktivnosti ^{99m} Tc in preračunane vrednosti površin z upoštevanjem korekcije po enačbi 12	56
Tabela XXVII: Odstopanja izmerjenih površin od izračunanih, ki jih dobimo, če preračunavamo po enačbi, ki jo dajo meritve ($y = 103,95x - 92,10$).....	57

1. POVZETEK

Somatostatin je nevroendokrini peptidni hormon, katerega pglavitna funkcija v organizmu je inhibicija sekrecije ravnega hormona somatotropina. Sestavljen je iz 14 aminokislin. Na tržišču je danes tudi več različnih dolgodelujočih analogov somatostatina (oktreotid, lanreotid), ki se uporabljajo v terapiji akromegalije in pri simptomatskem zdravljenju karcinoidnega sindroma. V organizmu je znanih 5 različnih somatostatinskih receptorjev, ki pa so v povečanem obsegu izraženi tudi na površini celic nevroendokrinih tumorjev, kar v nuklearni medicini izkoriščajo v diagnostične in terapevtske namene. Na analoge somatostatina vežejo bifunkcionalne kelatorje, kamor nato kompleksirajo različne beta ali gama sevalce. Analog somatostatina v tem primeru služi kot transportni sistem, ki pripelje radionuklid na obolelo mesto, od tam seva, to sevanje pa zaznamo z ustreznim detektorskim sistemom (gama kamero).

Radiofarmaki se na kliniki pripravljajo *ex tempore* za vsakega pacienta. Imajo kratek razpolovni čas in rok uporabe, zato smo v diplomski nalogi razvili, optimizirali in validirali metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ki v čim krajšem možnem času zagotovi optimalno ločbo radiooznačenih analogov somatostatina. Uporabili smo dve različni reverzno-fazni koloni (Phenomenex Gemini® in Kinetex®) na sistemu Agilent 1100 Series. Mobilna faza A je bila sestavljena iz 0,1 % TFA (trifluoroocetna kislina) v vodi, mobilna faza B pa iz 0,1 % TFA v acetonitrilu. V splošnem smo ustrežnejše faktorje simetrije in ločljivost med kromatografskimi vrhovi dobili na Kinetex® koloni, ki je krajša, vsebuje manjše delce silikagela, molekule se v stacionarni fazi zadržujejo krajši čas in večkrat prehajajo iz SF (stacionarna faza) v MF (mobilna faza). Kinetex® kolona ima tako večje število teoretskih podov od kolone Phenomenex Gemini®, poleg tega je tudi čas ločbe krajši. Z gradientno elucijo, s spreminjanjem deleža mobilne faze B v odvisnosti od časa, smo dobili tudi ustrezno simetrijo in resolucijo vrhov (Tabela XVII).

Pri izbrani metodi 6b smo validirali linearnost odziva UV/VIS detektorja pri valovni dolžini 220 nm. Linearnost odziva UV/VIS detektorja za analoge somatostatina smo dokazali za območje koncentracij od 5 do 100 µg/ml, za detektor radioaktivnosti pa za aktivnosti tehnečija od 2,3 kBq do 500 kBq. Meja zaznavnosti UV/VIS detektorja je za vse analoge somatostatina v območju od $2,12 \times 10^{-3}$ µg do $4,33 \times 10^{-3}$ µg, meja določljivosti pa od $6,42 \times 10^{-3}$ µg do 0,013 µg. Ponovljivost, ki smo jo določali pri koncentracijah 5, 50 in

100 µg/ml (n=8 pri vsaki koncentraciji), je po literaturi 36 znotraj dovoljenih meja odstopanj (vrednosti niso presegale 8,5 %). Stresni testi stabilnosti kažejo dobro stabilnost kompleksa v širokem temperaturnem območju med -20 in +25°C, kar smo potrdili z izračuni v % ujemanja površine kromatografskih vrhov pred in po testu.

ABSTRACT

The major function of somatostatin is inhibition of secretion of growth hormone - somatotropin. Various long acting analogs, such as octreotid and lanreotid are used for treatment of acromegaly, and symptomatic treatment of carcinoid syndrome caused by neuroendocrine tumors. Five different known somatostatin receptors exist in human organism. The receptors are extensively expressed on the surface of many neuroendocrine tumor cells which enables imaging and molecular targeted radiotherapy in nuclear medicine. Bifunctional chelators are coupled to somatostatin analogues, afterwards the complex is radiolabelled with different beta or gamma emitters. Somatostatin analogue in this case serve as a transport system that delivers the radionuclide to the affected area(s). The radiation is detected by an appropriate detector system (gamma camera).

Radiopharmaceuticals are prepared *ex tempore* for each patient at the clinic. The radiopharmaceuticals have a short half-life and shelf-life, so we developed, optimized and validated a high resolution method based on Liquid Chromatography (HPLC), that assures an optimal separation of (radiolabelled) somatostatin analogues in shortest possible time. We experimented with various methods on two different reverse-phase columns (Phenomenex Gemini® and Kinetex®) on the Agilent 1100 Series system. Mobile phase A was composed of 0.1 % TFA (trifluoroacetic acid) in water, and mobile phase B with 0.1 % TFA in acetonitrile. In general, the experiments showed better symmetry factors and peak resolutions when methods with Kinetex® column were used. Kinetex® column is shorter and contains smaller silica gel particles than Phenomenex Gemini®, therefore the molecules remain shorter time in SF (stationary phase) of the silica gel surface and often move from SF in MF (mobile phase). Kinetex® chromatographic column has higher number of theoretical plates and possibly shorter time of elution. With gradient elution and changing the proportion of mobile phase B over time, we got a proper peak symmetry and resolution (Table XVII).

With selected method 6b we validated the linearity of UV/VIS detector response at wavelength of 220 nm. Linearity of detector response for somatostatin analogues was demonstrated in the concentration range from 5 to 100 µg/ml. Linearity of the radioactivity detector was measured for technetium activity range from 2,3 to 500 kBq. The detection limit of UV/VIS detector for all somatostatin analogues is in the range from $2,12 \times 10^{-3}$ µg to $4,33 \times 10^{-3}$ µg and the limit of quantification from $6,42 \times 10^{-3}$ µg to 0,013 µg.

Repeatability was determined at concentrations 5, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 8$ at each concentration), variation between the measurements was less than 8,5 %. Stress tests showed a good stability of the complex in a wide temperature range between -20 and $+25$ °C, which was confirmed by the calculations of % of accordance peak areas before and after the test.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

(h)SSTR – (humani) receptor za somatostatin

A – absorbanca

A_0 – aktivnost tehnečija v času 0

A_s – faktor simetrije

A_t – aktivnost tehnečija v času t

α – selektivnost

Bq – bekerel

c – koncentracija spojine

c_{mf} – koncentracija spojine v mobilni fazi

c_{sf} – koncentracija spojine v stacionarni fazi

d – dolžina pravokotnice (razdalja A-C na sliki 9)

DL – meja zaznavnosti (angl. detection limit)

DOTA - 1,4,7,10 - tetraazaciklododeka - 1,4,7,10 - tetraocetna kislina

DOTATATE - DOTA-Tyr³- oktreotat

DOTATOC – DOTA-Tyr³- oktreotid

ϵ – ekstinkcijski koeficient

GC – plinska kromatografija

GEP – gastroenteropankreatičen

GH – rastni hormon (angl. growth hormone)

H – višina teoretskega poda

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HYNIC-TOC – hidrazinonikotinamid-Tyr³-oktreotid

IEC – ionsko-izmenjevalna kromatografija (ion-exchange chromatography)

K – distribucijska konstanta

k – konstanta razpada tehnečija

k' – kapacitivnostni faktor

K_d – konstanta disociacije

L – dolžina kolone

l – dolžina kivete

IGF – inzulin rastni faktor-1

LC – tekočinska kromatografija

LLC – porazdelitvena kromatografija (liquid-liquid chromatography)

MF – mobilna faza

N – število teoretskih podov

PEEK – polieter eter keton

QL – meja določljivosti (angl. quantification limit)

R – alkil

R^2 – koeficient determinacije

RSD – relativna standardna deviacija

S – naklon krivulje

SD – standardna deviacija

SEC – izključitvena kromatografija (size-exclusion chromatography)

SFC – superkritična tekočinska kromatografija

SF – stacionarna faza

SLC – adsorpcijska kromatografija (solid- liquid chromatography)

SRIF – somatostatin (Somatotropin Release Inhibiting Factor)

TFA – trifluoroocetna kislina

t_0 – retencijski čas mobilne faze

t_r – retencijski čas

TSH – tirotropin

V_{sf} – volumen stacionarne faze

V_{mf} – volumen mobilne faze

W – širina vrha na bazni liniji

$w_{0,05\%}$ - širina vrha na 5% višine (razdalja A-B na sliki 9)

$w_{h/2}$ – širina vrha na $h/2$

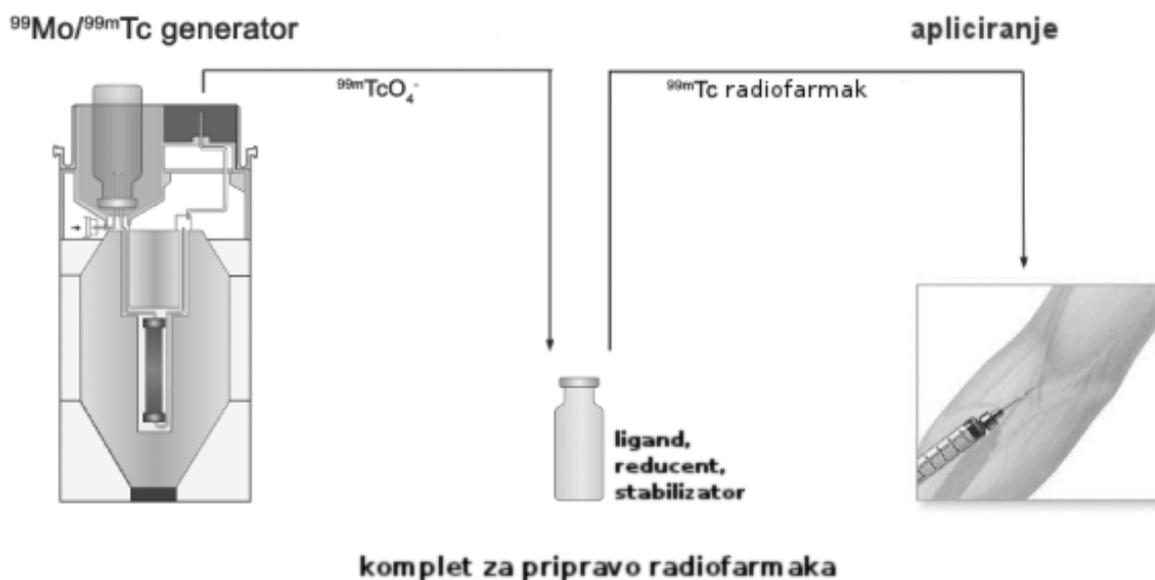
3. UVOD

3.1. RADIOFARMACIJA IN RADIOFARMAKI

Radiofarmacija je področje farmacevtske stroke, ki pokriva razvoj, pripravo in nadzor kakovosti radiofarmacevtskih izdelkov. S specialnimi področji fizike, kemije in medicine tvori nuklearno medicino. Med radiofarmacevtske izdelke spadajo:

- radiofarmaki,
- radiofarmacevtski predhodniki,
- kompleti za pripravo radiofarmakov,
- radionuklidni generatorji.

Radiofarmaki so radiofarmacevtski izdelki, ki jih vnašamo v človeški organizem in vsebujejo najmanj en radionuklid (radioaktivni izotop). Glede na namen uporabe jih delimo na radiodiagnostike in radioterapevtike. Pripravek, ki ga rekonstituiramo ali kombiniramo z radionuklidi (običajno preden apliciramo bolniku) v končni radiofarmak, pa imenujemo **komplet za pripravo radiofarmakov**. V večini primerov je liofilizat določene učinkovine in pomožnih snovi v sterilnih in apirogenih vialah, kateremu ob pripravi na nuklearno-medicinskem oddelku posamezne bolnišnice dodamo raztopino radioaktivnega izotopa, t.j. **radiofarmacevtskega predhodnika**. Med radiofarmacevtske izdelke štejemo tudi **radionuklidne generatorje**, kjer gre za sistem s stabilno vezanim starševskim izotopom, z relativno dolgo razpolovno dobo, iz katerega nastane hčerinski radionuklid, ki se pridobiva z eluiranjem ali katero drugo separacijsko metodo. Pogosto uporabljen je $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator za pridobivanje izotopa $^{99\text{m}}\text{Tc}$. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nastaja z razpadom starševskega izotopa ^{99}Mo , ki je v obliki $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ pritrjen na nosilec iz Al_2O_3 . Po razpadu ^{99}Mo nastane $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v obliki pertehnetata $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, ki ga od starševskega izotopa ločimo z eluiranjem s fiziološko raztopino, kjer pride do ionske izmenjave s Cl^- ioni (Slika 1) (1, 2, 3).



Slika 1: Pridobivanje ^{99m}Tc iz ^{99}Mo z radionuklidnim generatorjem. ^{99m}Tc eluiramo v obliki ^{99m}Tc -pertehnetata, ki ga dodamo kompletu za pripravo radiofarmaka preden apliciramo bolniku (4).

Izotopi posameznega elementa so nuklidi, ki vsebujejo enako vrstno število in različno masno število. Imajo enako število protonov in elektronov, vendar različno število nevtronov v jedru. Izotopi, ki so nestabilni, so posledično radioaktivni, pri čemer spontano prehajajo v stabilnejša stanja z oddajanjem delcev alfa in beta, včasih tudi nevtronov in protonov ter žarkov gama in rentgenskih žarkov. V nuklearni medicini se največ uporabljajo beta in gama sevalci. V primeru gama sevanja vzbujeno jedro z oddajo fotona γ preide v manj vzbujeno oziroma osnovno stanje. Pri gama sevanju se sestava jedra ne spremeni, zmanjša se samo njegova notranja energija. Običajno γ sevanje sledi razpadu β ali α . Ker imajo velik doseg v tkivu in zraku se več uporabljajo v diagnostiki. Število nastalih poškodb na njihovi poti je najmanjše.

Sevanje beta je za razliko od gama sevanja masno sevanje. Obstajata dve vrsti beta razpada, to sta β^+ razpad, kjer jedro izseva pozitron β^+ in nevtrino, ki je brez naboja ter β^- razpad, kjer jedro izseva β^- žarek (elektron) in delec brez naboja, antinevtrino. Delci beta imajo v primerjavi z gama sevanjem krajši doseg v tkivu (nekaj mm), povzročijo več poškodb na njihovi poti in jih uporabljamo v terapevtske namene (1, 2, 3, 5).

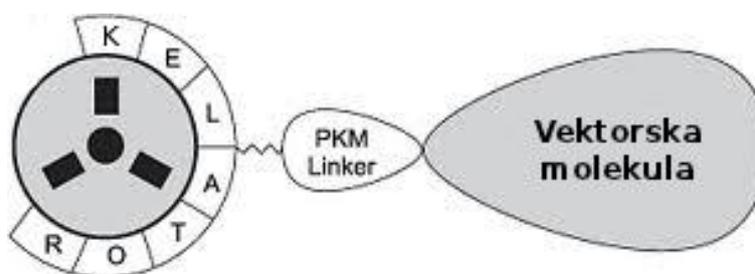
Enota za merjenje radioaktivnosti je **Bq** (becquerel) in je določena s količino razpada na sekundo. Pri prehodu sevanja skozi snov prihaja do prenosa energije preko mehanizma ionizacije in vzbujanja atomov ter molekul v snovi. Večina energije se na koncu pretvori v

toploto. Ker pa ima ionizacijski efekt ostale pomembne posledice, imenujemo sevanje, ki se sprošča pri radioaktivnem razpadu, ionizirajoče sevanje (1, 2).

V radiofarmaciji ionizirajoče sevanje izkoriščamo v terapevtske in diagnostične namene. Radiofarmak oddaja gama žarke, ki jih registriramo z gama kamero, in na ta način prikažemo njegovo razporeditev v organizmu. Radiofarmaki so kemijsko lahko atomi (^{133}Xe), anorganske soli (Na^{18}F , Na^{131}I) ali označeni proteini ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albumin, ^{131}I -albumin). Najpogosteje rabljeni radionuklidi v diagnostiki so tehneций ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), fluor (^{18}F) in indij (^{111}In). Najpogosteje se radiodiagnostiki uporabljajo za diagnosticiranje bolezni kardiovaskularnega sistema (srca in obtočil), skeleta, pljuč, ledvic, ščitnice, možganov, itd (2, 6).

V radioterapiji pa se največ uporabljajo radioaktivni jod (^{131}I), itrij (^{90}Y) in lutecij (^{177}Lu). Kopičenje radiofarmakov v telesu omogočajo različni mehanizmi. To so lahko kapilarno ujetje, ionska izmenjava, fagocitoza, aktivni in pasivni transport ter izkoriščanje avtogenih produktov (eritrociti in levkociti). Velika prednost radioterapije z uporabo radiofarmakov je v tem, da se pri enkratnem dajanju radiofarmak nakopiči v vseh prizadetih mestih, med tem ko je pri klasičnem obsevanju potrebno obsevati vsako obolelo mesto posebej.

Z gama kamero, povezano z računalniškim sistemom, zaznamo sevanje in s kompleksnim postopkom na računalniku dobimo sliko (scintigram), ki kot končni izdelek služi v diagnostične namene (2).



Slika 2: Poenostavljena struktura enega izmed različnih tipov radiofarmakov, kjer na peptid (ali protitelo) vežemo ustrezen kelator in izotop (7).

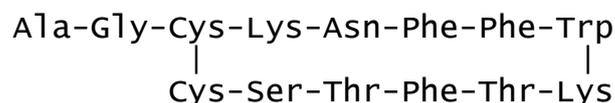
Tabela I: Posamezni radioaktivni izotopi ter njihove značilnosti (2, 3, 5, 8)

NAJPOGOSTEJŠI RADIOAKTIVNI IZOTOPI V RADIOFARMACIJI	
^{18}F (fluor)	<ul style="list-style-type: none"> • β^+-sevalec, • energija delcev: 633 keV; fotonov: 511 keV • razpolovni čas: 109,7 minut • uporaba v pozitron izsevni tomografiji (PET)
^{131}I (jod)	<ul style="list-style-type: none"> • beta sevalec • energija delcev: 606,3 keV; energija fotonov: 364,5 keV • razpolovni čas: 8,02 dni • uporablja se v diagnostične in terapevtske namene
^{111}In (indij)	<ul style="list-style-type: none"> • gama sevalec • energija fotonov: 245,4 keV in 171,28 keV • razpolovni čas: 2,8 dni • uporaba za diagnosticiranje
^{177}Lu (lutecij)	<ul style="list-style-type: none"> • nizkoenergijski β-sevalec • energija: 537 keV • razpolovni čas: 6,71 dni • uporaba v radionuklidni terapiji
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ (tehnecij)	<ul style="list-style-type: none"> • gama sevalec • energija fotona: 140 keV • razpolovni čas je 6 ur • zmožnost različnih oksidacijskih stanj • pridobivanje iz ^{99}Mo z $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generatorjem • uporablja se v diagnostične namene
^{90}Y (itrij)	<ul style="list-style-type: none"> • oddaja visokoenergijsko β-ionizirajoče sevanje • energija delcev: 2,3 MeV • razpolovni čas: 64 ur • uporaba v radionuklidni terapiji

3.2. VLOGA SOMATOSTATINA V ORGANIZMU

Somatostatin je peptidni hormon, ki regulira endokrini sistem, vpliva na nevrottransmisijo in celično proliferacijo preko z G-proteinom povezanim receptorjem za somatostatin (SSTR), in posledično prepreči nastajanje različnih sekundarnih prenašalcev. Nastaja v možganih in v prebavnem sistemu (želodec, tanko in debelo črevo, delta celice pankreasa). V možganih poleg neuropeptida Y vpliva na prenos živčnih prenašalcev v simpatičnih postganglionarnih vlaknih. Izločajo ga neuroendokrine celice paraventricularnega jedra hipotalamusa, od koder se sprošča preko hipotalamo-hipofizne osi v adenohipofizo, kjer somatostatin inhibira sekrecijo ravnega hormona (GH) iz somatotropnih celic in tirotopina (TSH) iz tirotropnih celic. Izločanje somatostatina regulirajo somatomedini, ki nastajajo v jetrih (somatomedin C, inzulin-rastni faktor, oz. IGF-1). V prebavnem sistemu zavira izločanje gastrointestinalnih hormonov kot so gastrin, holecistokinin, sekretin, GIP, motilin, VIP in tako upočasni praznjenje želodca, zavre krčenje žolčnika in zmanjša krčenje gladkih mišic. Somatostatin med drugim tudi inhibira sproščanje inzulina iz beta celic Langerhansovih otočkov, z zaviranjem proliferacije limfocitov pri vnetju modulira imunski odziv ter inhibira angiogenezo (9, 10).

Somatostatin (SRIF = *Somatotropin Release Inhibiting Factor*) je ciklični tetradekapeptid z naslednjim zaporedjem 14 aminokislin:



Nastane s cepitvijo z aminopeptidazami in endopeptidazami iz 28 aminokislin velikega preproteina. Somatostatin in njegov preprotein se vežeta na različne podtipe SSTR z nanomolarno afiniteto, K_d (konstanta disociacije) je 0,1 – 0,9 nM. Znanih je pet različnih podtipov SSTR, in sicer SSTR₁₋₅, ki se nahajajo v želodcu, dvanajstniku, možganih, ledvicah, trebušni slinavki in pljučih. Razpolovni čas somatostatina v organizmu je 1-3 minute (11, 12, 13).

Receptorje za somatostatin izraža na svoji membrani tudi večina neuroendokrinih in drugih tumorjev, kot so limfomi, tumorji v ČŽS, v pljučih in dojkah. Z vezavo analoga somatostatina na SSTR v celici aktiviramo antiproliferativni efekt vključno z apoptozo in tako zavremo nadaljnjo rast tumorja. Delovanje analogov somatostatina na rast

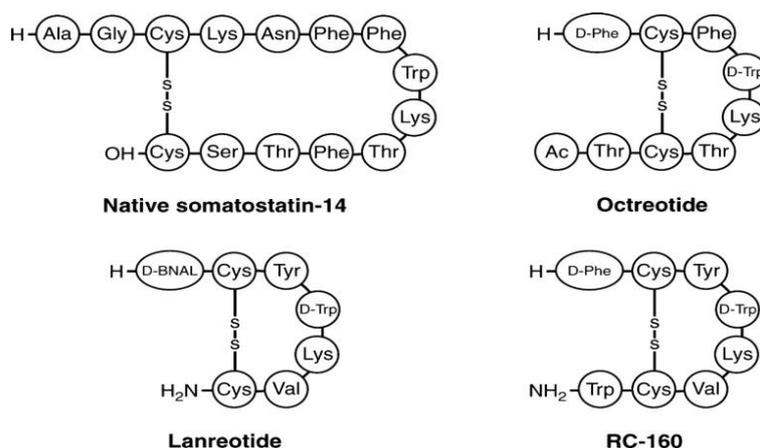
eksperimentalnih tumorjev verjetno poteka po enem ali več mehanizmov, katerih rezultat je inhibicija DNA sinteze in celične replikacije:

- Inhibicija sekrecije hormonov, ki so vključeni v regulacijo rasti tumorja, kot na primer rastni hormon (GH), insulin in/ali drugi hormoni v gastrointestinalnem traktu;
- Direktna ali indirektna (preko GH) inhibicija IGF-I in/ali ostalih rastijskih faktorjev, ki stimulirajo rast tumorjev;
- Inhibicija angiogeneze;
- Direktni inhibični učinki na tumorske celice (**12, 14, 15**).

3.3. UPORABA SOMATOSTATINA IN ANALOGO V MEDICINI

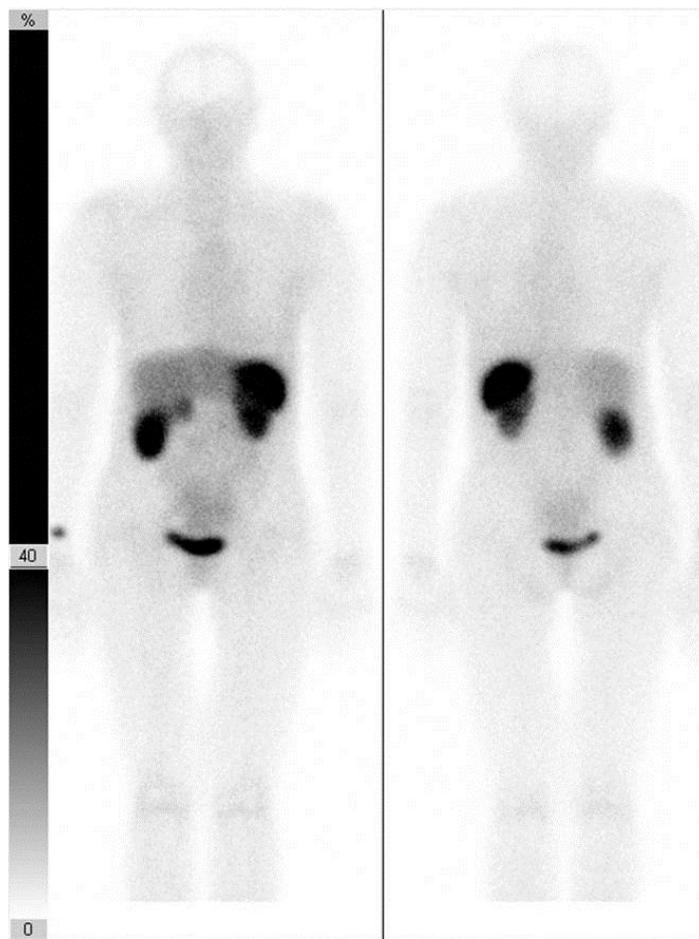
Somatostatin v obliki somatostatinijevega acetata hidrata, ki je danes na tržišču, je Somatostatin Eumedica[®], ki se uporablja pri terapijah hude akutne krvavitve ulkusov na želodcu ali dvanajstniku. V farmakoloških odmerkih zavre bazalno in stimulirano sproščanje gastrina in tako zmanjša prekrvavitev v splahnličnem območju.

Sintezni analogi, mimetiki somatostatina, kot sta na primer oktreatid (Sandostatin[®]) in lanreotid (Somatuline[®]), se uporabljajo pri simptomatskem zdravljenju karcinoidnega sindroma in v terapiji akromegalije, katere vzrok je povečano izločanje somatotropina iz somatotropnih celic hipofize. Najpogosteje gre za benigni tumor hipofize, posledično so prizadeti notranji organi, opazne so spremembe na obrazu, poveča se velikost rok, nog, stopal, pojavijo se motnje vida, koža postane aknasta in zadebeljena. Obstajajo trije načini zdravljenja akromegalije, in sicer operativna odstranitev adenoma, obsevanje in zdravljenje z analogi somatostatina (**16**). Oktreatid in lanreotid sta dolgo delujoča analoga, visoko rezistentna na encimsko razgradnjo, imata močnejše delovanje in daljši razpolovni čas, ki je okrog 90 – 113 minut (slika 3). Zaradi peptidne strukture in slabe absorpcije iz črevesja se aplicirata subkutano. Večina pacientov z akromegalijo oktreatid dobro prenaša, kljub temu pa se lahko zaradi inhibičnega delovanja analoga na sproščanje inzulina pri nekaterih pacientih pri dolgoročni terapiji zmanjša postprandialna glukozna toleranca (**13, 17**).



Slika 3: Struktura nativnega somatostatina in sinteznih analogov oktreotida, lanreotida in RC-160 (vapreotid) (18).

Glede na to, da je v organizmu identificiranih pet različnih podtipov hSSTR₁₋₅, se vsi ti podtipi pojavljajo tudi na površini celic endokrinih in drugih tumorjev, kar ima pomembno vlogo v diagnostiki in terapiji tumorjev. Največ teh vrst receptorjev je bilo najdenih v GH-sproščujočih hipofiznih tumorjih in na površini celic metastaz tumorjev trebušne slinavke (9, 14, 19).

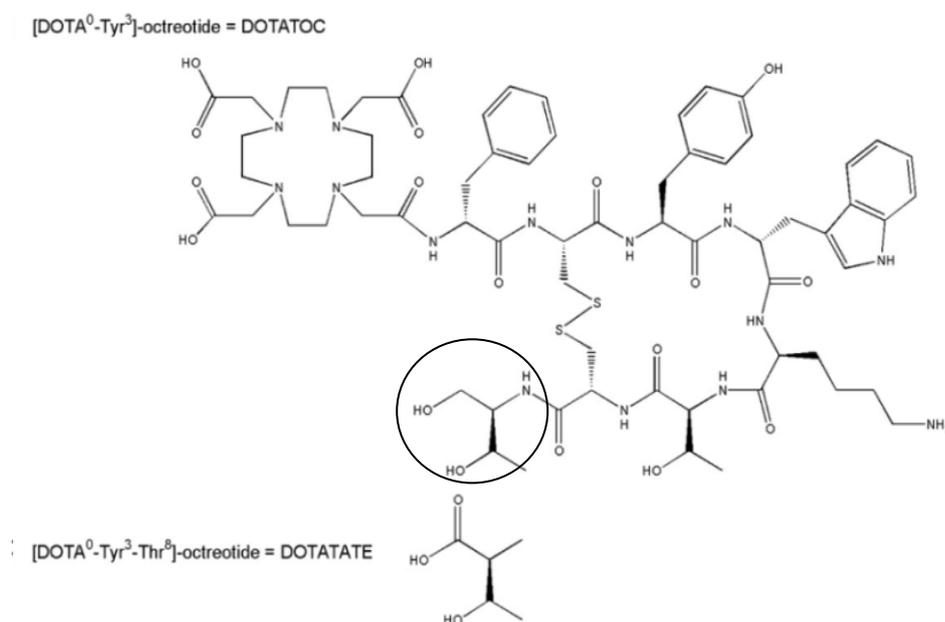


Slika 4: Scintigrafija zdravega organizma po aplikaciji oktreetida označenega z ^{111}In . Somatostatinski analog se veže na normalno prisotne receptorje v jetrih, vranici, ledvicah in mehurju (20).

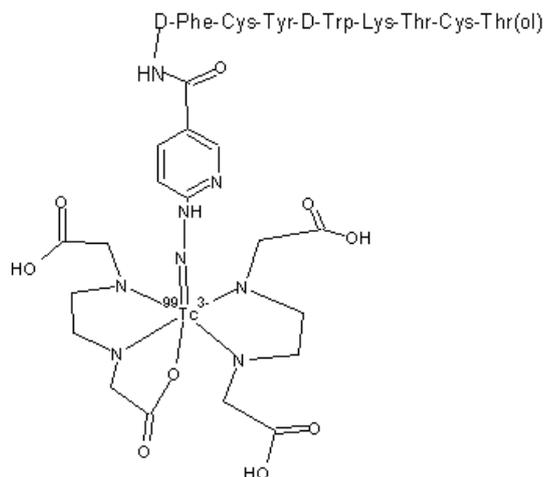
3.4. RADIOOZNAČENI ANALOGI SOMATOSTATINA

Uporaba radioaktivno označenih analogov somatostatina je relativno novejša metoda zdravljenja in diagnostike metastatskih gastroenteropankreatičnih (GEP) tumorjev, pri katerih ni možnosti operativnega zdravljenja (21). Radionuklid je na peptid kompleksiran z bifunkcionalnim kelatorjem, ki omogoča vezavo izotopa in peptida (slika 5, 6). Analog somatostatina, označen z gama sevalcem, apliciramo *in vivo* ter z metodo scintigrafije lokaliziramo primarni tumor in njegove metastaze, ki imajo na svoji površini receptorje za somatostatin. V terapiji GEP tumorjev označujemo analoge somatostatina z beta sevalcem. Iz mesta vezave na površini tumorskih celic oddajajo beta delce in poškodujejo tudi sosednje tumorske celice, saj je njihov maksimalni doseg v tkivu do nekaj mm. (22)

Vezava radioaktivno označenega analoga somatostatina na SSTR je odvisna od različnih fizikalno-kemijskih interakcij, kar določa peptidna sekvenca Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹, Thr¹⁰. Pomembnejši bifunkcionalni kelator za označevanje biomolekul s tehnecijem - ^{99m}Tc je hidrazinonikotinamid (HYNIC), ki pa lahko veže različne ko-ligande, kot na primer EDDA, tricin (N-(2-hidroksi-1,1-bis(hidroksimetil)etil)glicin) in EDTA. Za označevanje molekul z ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y in ¹¹¹In imamo na oktreetid vezano 12 - člensko tetraamino - makrociklično strukturo - bifunkcionalni kelator DOTA (1,4,7,10 - tetraazaciklododeka - 1,4,7,10 - tetraocetna kislina), katera omogoča stabilnost radionuklida v kompleksu in izboljša razpolovni čas le-tega v organizmu. Možnih je še več drugih različnih kelatorjev (DTPA, EDTA...) (10).



Slika 5: DOTATOC in DOTATATE (C-terminalni treoninol v DOTATOC-u zamenjan s treoninom) (23)



Slika 6: ^{99m}Tc -etilenediamin N,N' -diacetilna kislina/hidrazinonikotinamid-Tyr³-oktreotid (^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC) (**24**)

3.5. PRINCIP TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE

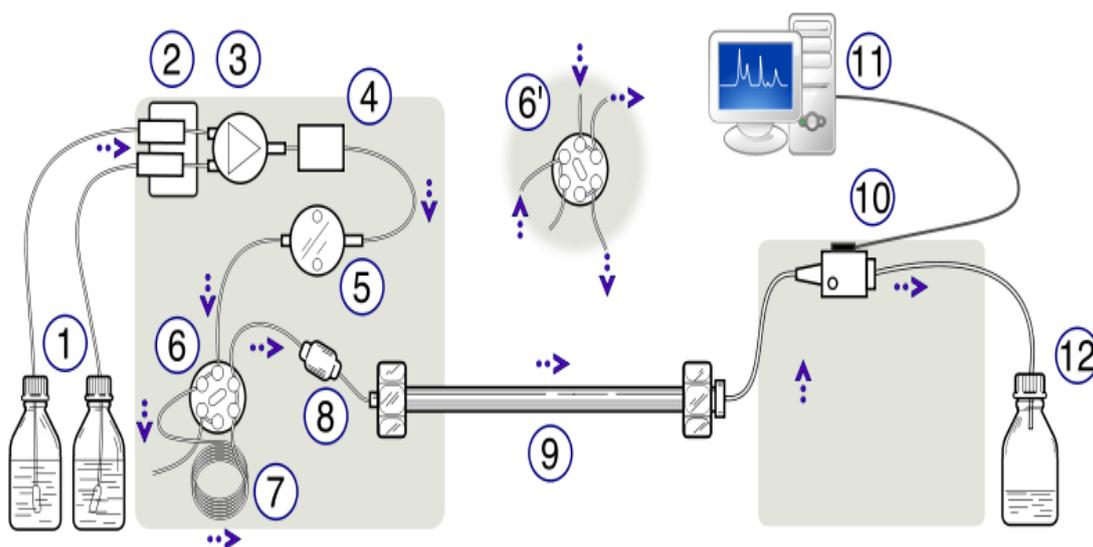
Pod pojmom kromatografija razumemo vrsto laboratorijskih tehnik za separacijo in določitev kemijskih spojin ter bioloških makromolekul. Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih potem zaznavamo z ustreznim detektorjem. Glede na način izvedbe ločimo kolonsko in planarno kromatografijo, glede na vrsto mobilne faze pa plinsko kromatografijo (GC), superkritično tekočinsko kromatografijo (SFC) in tekočinsko kromatografijo (LC). Poznamo tudi več različnih vrst tekočinske kromatografije glede na način ločbe molekul vzorca. Te so:

1. adsorpcijska (SLC-solid-liquid chromatography),
2. porazdelitvena (LLC-liquid-liquid chromatography + vezana SF),
 - normalno-fazna
 - reverzno-fazna
3. ionsko-izmenjevalna (IEC-ion-exchange chromatography),
4. izključitvena kromatografija (SEC-size-exclusion chromatography).

Ločitev z visokotlačno kromatografijo ali tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) poteka tako, da vzorec nanese (injiciramo) na začetek kromatografske kolone. V rezervoarjih za topila imamo pripravljeno ustrezno mobilno fazo. Raztopljeni vzorec in mobilno fazo pod visokim pritiskom potiskamo skozi kolono s posebnimi binarnimi ali kvarternimi črpalkami. Komponente zmesi se porazdeljujejo med mobilno fazo in

nosilec - stacionarno fazo, ki je nameščena v koloni. Porazdelitev komponent se ponavlja vzdolž kolone in končno se komponente zaradi različnih fizikalno – kemijskih interakcij ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznamo z detektorji. Signali so podani kot kromatografski vrhovi, celoten zapis pa kot kromatogram. Z izpisom kromatograma tako dobimo retencijski čas spojine in površino vrhov in s tem kvalitativno in kvantitativno ovrednoten rezultat.

HPLC se v današnjem času zelo veliko uporablja v kontrolno-analiznih laboratorijih za identifikacijo, kvantifikacijo in ločbo posameznih komponent v zmesi. Metodo v splošnem odlikuje natančnost, občutljivost in ponovljivost analize, problem pa je velika poraba topil in draga oprema (25).



Slika 7: Shema HPLC aparature: 1. rezervoarji topila, 2. odstranjevalec plina, 3. ventil, 4. mešalni sistem za pripravo ustrezne sestave mobilne faze, 5. črpalka, 6. injektor v t.i. "inject position", 6' injektor v t.i. "load position" 7. odmerna zanka s točno določenim volumnom injiciranja, 8. predkolona, 9. kolona, 10. detektor, 11. izpis, 12. odpadna topila (26).

3.5.1. Mobilna in stacionarna faza

V grobem delimo ločbo na HPLC kolonah na normalno-fazno in reverzno-fazno kromatografijo. Pri normalno-fazni kolonski kromatografiji eluiramo z nepolaro mobilno fazo, med tem ko imamo na koloni nameščeno polarno stacionarno fazo. Ta metoda se uporablja v manjšem obsegu, kot na primer pri ločbi spojin topnih v nepolarnih topilih. V

vsakdanji praksi večinoma uporabljamo kolonsko reverzno-fazno kromatografijo, ki ima na koloni nameščeno nepolarno stacionarno fazo, kjer so silanolne skupine zaetrene z organoklorosiloksanom (RMe_2SiCl ; R je alkilna veriga, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ali C_8H_{17}), polarna mobilna faza pa je sestavljena iz vode ali pufrov ustreznega pH in organskega modifikatorja, ki ga izberemo glede na lastnosti substanc, ki jih želimo ločiti. To so lahko metanol, acetonitril in tetrahidrofur (27).

Stacionarna faza pri reverzno-fazni HPLC vsebuje zelo majhne delce silikagela premera približno 5-10 μm , novejša celo do 2,6 μm . Delci stacionarne faze imajo neporozno sredico in na površini tanek porozen plašč. Spojine se tako zadržujejo precej krajši čas na površini delcev stacionarne faze, ne difundirajo v sredico in hitreje prepotujejo kolono. Posledično je tudi manjša poraba topil in krajši čas analize, rezultat pa so ožji vrhovi, boljša ločljivost in večje število teoretskih podov (N) (28).

3.5.2. Izokratska in gradientna elucija

Pojem izokratska elucija pripisujemo tehniki, pri kateri med analizo uporabljamo konstantno sestavo mobilne faze in je tako najenostavnejša. Pri nekaterih vzorcih pri katerikoli konstantni sestavi mobilne faze ne dobimo zadovoljive ločbe na kromatogramu. Bodisi so vrhovi preširoki ali retencijski časi zelo dolgi (29). V tem primeru uporabimo gradientno elucijo. Pri gradientni eluciji se sestava mobilne faze spreminja v odvisnosti od časa in glede na lastnosti substanc, ki jih želimo identificirati. Pri reverzno-fazni HPLC sestavo prilagajamo tako, da imamo v začetku ločbe bolj polarno mobilno fazo in nato manj polarno, saj povečamo delež nepolarne mobilne faze. Gradientno elucijo najpogosteje uporabljamo, kadar imamo v vzorcu več različnih (neznanih) komponent, saj s tem izboljšamo ločbo le-teh, skrajšamo čas analize in izboljšamo resolucijo (29, 30).

V praksi poskušamo z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema v čim krajšem možnem času doseči čim boljšo ločbo. Optimalnost metode je velikokrat odvisna in pogojena z zmogljivostjo opreme (25).

3.5.3. Injektor

Injektor mora omogočati dobro ponovljivost injiciranja med posameznimi injiciranjmi in čim manjšo kontaminacijo med zaporednimi vzorci. Omogočati mora tudi injiciranje različnih volumnov. Vzorec lahko injiciramo ročno z brizgo ali z avtomatskim injektorjem, ki

omogoča kontinuirano delovanje vsega sistema z istočasno kontrolo vseh operacij, potrebnih za nanos vzorca. Danes so v uporabi injektorji z dozirnimi zankami, ki omogočajo injiciranje določenega ali poljubnega volumna vzorca. Volumen zank za analitsko delo je 1 – 100 μl (**1, 27**).

3.5.4. Kolona in predkolona

Kromatografska kolona je nerjaveča jeklena cevka, dolžine od 3 cm do 25 cm in predstavlja bistveni del HPLC sistema, saj je od njenih lastnosti odvisna separacija komponent vzorca. Notranje stene kolone so prekrivane z inertnim materialom (steklo, polimer PEEK - polieter eter keton). Stacionarna faza se v koloni nahaja med dvema poroznima diskoma, ki sta nameščena vsak na svojem koncu kolone. Danes uporabljamo kolone z različnimi notranjimi premeri (2 – 4 mm, 1 – 2 mm), različnih proizvajalcev in z različno velikostjo delcev SF.

Nepolarno stacionarno fazo dobijo z reakcijo med enotnimi, poroznimi, mehansko odpornimi delci silikagela, premera 3, 5 ali 10 μm , ki ima proste silanolne skupine in organoklorosiloksanom ($\text{RSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$), pri katerem so R alkilne verige, najpogosteje z 8 ali 18 ogljikovimi atomi (**25**). Krajše alkilne verige, vezane na silanolne skupine, so primerne za ločevanje hidrofilnih vzorcev, daljše (C18), pa imajo odlično kemijsko stabilnost, prav tako hidrofobno površino in prenesejo visoke pritiske (**25, 28**).

Pri delu z analitsko kolono se lahko pojavita dve vrsti težav. Prva je nenehno raztapljanje stacionarne faze v mobilni fazi, še posebej pri visokih in nizkih pH vrednostih, kar vodi sčasoma do padca ločljivosti. Druga težava je nenehna kontaminacija analitske kolone, kar povzročijo nečisti vzorci. Posledica je prav tako padec učinkovitosti kolone. Temu se izognemo z uporabo predkolon, ki jih namestimo med injektorjem in analitsko kolono. Predkolone menjamo pogosteje, so krajše in polnjene z večjimi delci, ki pa so kemijsko podobni delcem v analitski koloni (**27**).

3.5.5. Črpalka

Poleg kolone so črpalke najpomembnejši del vsakega HPLC sistema. Črpalka poganja analit raztopljen v mobilni fazi iz injektorja skozi kolono na detektor, ki izpiše signal. Visokotlačna črpalka omogoča črpanje mobilne faze s tlakom 40 – 50 MPa. Potreben tlak je odvisen od kolone (velikost delcev, dolžina, premer...) skozi katero potiskamo mobilno

fazo, od mobilne faze in od pretoka mobilne faze. Črpalka mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je namreč zelo odvisna natančnost analize.

3.5.6. Detektor

Detektor je tisti del HPLC sistema, ki naredi substance, ločene na koloni, vidne. Izbira detektorja je odvisna od komponent, ki jih želimo določiti. Pri določevanju peptidov najpogosteje uporabljamo UV detektor, kjer lahko glede na absorpcijski maksimum iskanega analita izbiramo valovno dolžino v območju 180 - 350 nm. Je najbolj univerzalen in občutljiv, vir sevanja je devterijeva žarnica. Ustrezno valovno dolžino, ki potuje na celico, izberemo s pomočjo vgrajenega monokromatorja (uklonska mrežica, prizma). Količina prepuščene svetlobe je proporcionalna koncentraciji analita v vzorcu, zvezo med intenziteto absorbirane svetlobe in koncentracijo absorbirajoče snovi nam podaja Beer Lambertov zakon:

$$A = l c \varepsilon ; \text{ kjer je:}$$

Enačba 1

A...absorbanca

c...koncentracija (mol/L)

ε ...ekstinkcijski koeficient

Omejitev predstavljajo topila, ki v območju UV absorbirajo, saj zvišajo absorpcijska ozadja, to pa tudi zoži uporabno območje detektorja. V velikem obsegu se uporabljajo tudi UV detektorji z nizom fotodiod, ki omogočajo sočasno merjenje absorbance pri vseh valovnih dolžinah.

3.5.7. Detektor radioaktivnosti

Za merjenje radioaktivnosti na HPLC aparaturi imamo priključen scintilacijski detektor radioaktivnosti. Scintilator je anorganska ali organska snov, v kateri se energija vpadlega gama žarka pretvori v vidno svetlobo. V našem detektorju je scintilacijska snov kristal NaI, ki je najpogosteje uporabljen scintilator pri detektorjih radioaktivnosti v nuklearni medicini.

Pri meritvi radioaktivnosti raztopina radioaktivnega vzorca teče po cevki skozi merilno celico. Vzorec seva gama žarke in ko ti zadanejo scintilacijski kristal, se njihova energija pretvori v vidno svetlobo. To svetlobo zazna fotopomnoževalka, ki svetlobo ojača ter jo pretvori v izhodni električni signal, ki je sorazmeren številu gama žarkov, ki jih je izseval vzorec, torej (radio)aktivnosti vzorca. Ko radioaktivni vzorec teče skozi merilno celico, se meritev radioaktivnosti ponavlja ob pogostih časovnih intervalih in rezultat je kromatogram radioaktivnosti, ki se izrisuje po izhodnem električnem signalu in prikazuje aktivnost vzorca v odvisnosti od časa. (31)

3.5.8. Parametri za vrednotenje ustreznosti HPLC sistema

Čas zadrževanja spojine na koloni razdelimo na dva dela: na čas, ki ga spojina prebije v mobilni fazi in na čas, ko se nahaja v stacionarni fazi. Spojina prehaja iz ene faze v drugo in je v ravnotežju, ki ga opisuje **distribucijska konstanta K**:

$$K = \frac{c_{sf}}{c_{mf}}, \text{ kjer je:} \quad \text{Enačba 2}$$

c_{sf} ...koncentracija spojine v stacionarni fazi

c_{mf} ...koncentracija spojine v mobilni fazi

Pomemben parameter za opis prehoda spojin iz stacionarne v mobilno fazo in obratno, je **retencijski** ali **kapacitivnostni faktor k'** (32):

$$k' = \frac{K V_{sf}}{V_{mf}} \quad \text{Enačba 3}$$

V_{sf} ...volumen stacionarne faze

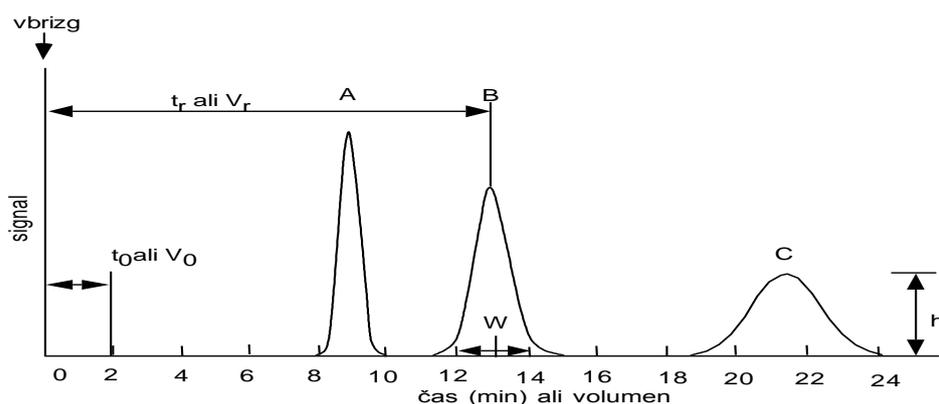
V_{mf} ...volumen mobilne faze

Kapacitivnostni faktor dobimo tudi, če upoštevamo retencijski čas spojine in čas prihoda mobilne faze na detektor, kateri podatki so razvidni iz kromatograma (Slika 8):

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}, \text{ kjer je:} \quad \text{Enačba 4}$$

t_r ...retencijski čas spojine

t_0 ...čas prihoda mobilne faze na detektor



Slika 8: Skica kromatograma

Retencijski čas, ki se izpiše na kromatogramu, in kapacitivnostni faktor pa nista odvisna samo od sestave stacionarne faze, temveč tudi od sestave mobilne faze, ki jo pripravimo v laboratoriju. Pri bolj polarni mobilni fazi se bolj polarne spojine prej eluirajo iz kolone. Če smo kolono pravilno izbrali bodo vrhovi na kromatogramu simetrični, ozki in dobro ločeni. Takšne lastnosti kolone opisujeta izraza »učinkovitost« in »ločljivost«. Učinkovitost kolone izražamo s **številom teoretskih podov (N)**:

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Enačba 5}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad \text{Enačba 6}$$

kjer je:

- t_r ... retencijski čas spojine
- W ... širina vrha na bazni liniji
- $W_{h/2}$... širina vrha na $h/2$
- L ... dolžina kolone
- H ... višina teoretskega poda

Ločljivost (R) je definirana kot razmerje razdalje med dvema sosednjima vrhovoma in aritmetično sredino njunih širin na bazni liniji (Slika 8):

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}, \text{ kjer je:} \quad \text{Enačba 7}$$

t_r ... retencijski čas posameznega vrha

W ... širina vrha na bazni liniji

Ločljivost kromatografskih vrhov je odvisna od učinkovitosti kolone (števila teoretskih podov, N), kapacitivnostnega faktorja (k_2') in selektivnosti oz. razmerja kapacitivnostnih faktorjev obeh spojin ($\alpha = k_2'/k_1'$):

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2'}{k_2' + 1} \quad \text{Enačba 8}$$

N ...število teoretskih podov

α ...selektivnostni faktor

k_2' ...kapacitivnostni faktor bolj retenirane spojine

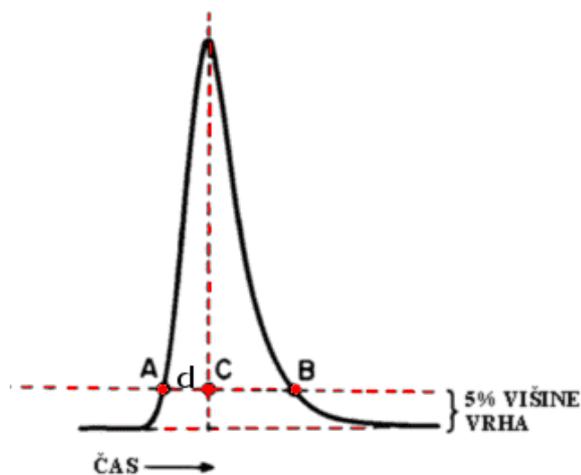
Kromatografski vrh ima v idealnih pogojih obliko Gaussove krivulje, kjer molekule z enakomerno hitrostjo potujejo na detektor in kakršnokoli večje odstopanje od idealnega porazdeljevanja pomeni tveganje predvsem pri integriranju in kvantitativnem določanju. Ta parameter predvidimo s *faktorjem simetrije* - A_s , in ga izračunamo po enačbi 9. Vrednost po predpisih v Evropski farmakopeji naj bi znašala med 0,8 in 1,5 (1, 30, 32).

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \quad \text{Enačba 9}$$

kjer je:

$w_{0,05}$... širina krom. vrha na 5% višine vrha (razdalja A-B na sliki 9)

d ...razdalja med prednjo krivuljo in sredino krom. vrha na 5 % višine kromatografskega vrha (razdalja A-C na sliki 9, str. 24)



Slika 9: Skica izračuna faktorja simetrije (enačba 9)

3.6. DEFINICIJA VALIDACIJE

Validacija je dokumentiran dokaz z visoko stopnjo zaupanja, da analizna metoda zagotavlja in bo konsistentno zagotavljala ponovljive, točne in natančne rezultate. Najnovejša zakonodaja v evropskem in severnoameriškem prostoru (EMEA in FDA) zahteva validacijo vseh kritičnih postopkov, procesov, sistemov, ljudi. Številne mednarodne smernice natančno definirajo parametre in metodologijo preizkusov, s katerimi ovrednotimo posamezne parametre. ICH (International Conference on Harmonisation) definira osem validacijskih parametrov za analizne metode (33):

- Specifičnost je zmožnost metode, da nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent, npr. nečistote. Izraz specifičnost se pogosto zamenjuje s pojmom *selektivnost*, ki pa se (po Vessmann-u) nanaša na metodo, ki daje odziv za več analitov, ki jih lahko ali ne moremo med seboj razlikovati (34).
- Linearnost je zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od vsebnosti iskanega analita v vzorcu.
- Delovno območje je koncentracijsko območje, znotraj katerega nam metoda zagotavlja linearne, točne in natančne podatke.
- Točnost pomeni ujemanje dobljene vrednosti s pravo vrednostjo.
- Natančnost izraža stopnjo razpršenosti rezultatov med serijo analiz istega vzorca.
- Robustnost pomeni sposobnost metode, da analizni postopek ostane neprizadet zaradi sprememb različnih parametrov analize. Pri HPLC je to pH, pretok in sestava mobilne faze, različni dobavitelji kolone, temperatura kolone, volumen injiciranja...
- Meja zaznavnosti (DL) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih eksperimentalnih pogojih še določimo.

Mejo zaznavnosti lahko določamo na več načinov:

1. Ocenimo iz kromatogramov analiz vzorcev pri mejni koncentraciji analita.
2. Na podlagi razmerja signal/šum, kjer primerjamo signal nizke koncentracije analita s signalom praznega vzorca. Za mejo detekcije zadostuje razmerje med signalom in šumom na bazni liniji 2-3:1.
3. Po enačbi 10 (str. 37) s pomočjo standardne deviacije odzivov detektorja in naklona umeritvene premice.

- Meja določljivosti (QL) (najmanjša koncentracija analita, ki zagotavlja dovolj visok signal (10-20-krat višje od šuma bazne linije), da ga lahko kvantificiramo z usrezno natančnostjo)

Načini določanja:

1. Ocenimo vizualno iz kromatogramov analiz vzorcev pri pričakovani meji kvantifikacije.
2. Ocenimo na podlagi razmerja signal/šum, razmerje mora biti vsaj 10:1.
3. Po enačbi 11 (str. 37) na podlagi SD odzivov in naklona umeritvene krivulje

Potrebno je tudi zagotoviti, da sistem vzdržujemo v validiranem stanju in da v primeru sprememb strokovno ovrednotimo ali sprememba vpliva na validacijo, in če je v tem primeru potrebno revalidirati postopek ali opremo (**33, 35, 36**).

3.6.1. Validacija priprave radiofarmaceutskih izdelkov

Radiofarmaceutski izdelki zaradi svoje radioaktivne narave spadajo med najstrožje nadzorovana zdravila. Izdelava, rokovanje in uporaba morajo biti v skladu s splošnimi načeli Dobrih praks, ki navajajo osnovne standarde za varovanje zdravja prebivalstva in delavcev pred nevarnostmi ionizirajočega sevanja.

Zakon o zdravilih radiofarmaceutske izdelke uvršča v posebno skupino rizičnih zdravil, za katero predvideva poostren nadzor. Ko radiodiagnostike po končani izdelavi sprostimo za promet, jih ne moremo zadržati za dokončanje vseh testov, ker bi v tem času radioaktivnost padla daleč pod mejo uporabnosti. Ko so dobljeni rezultati vseh testov, so radiodiagnostiki običajno že davno odslužili svojemu namenu. Glede na to se za nadzor kakovosti kritičnih parametrov uporablja set hitrih izključitvenih testov, ki se izvedejo po pripravi preden so radiodiagnostiki sproščeni za uporabo na nuklearno–medicinski kliniki. Evropska farmakopeja predpisuje vrednotenje radiokemijske in radionuklidne čistote radiofarmaka. **Radionuklidna čistota** pomeni delež radioaktivnosti radionuklida (v %) glede na celotno radioaktivnost radiofarmaka. **Radiokemijsko čistoto** dobimo z računanjem deleža radioaktivnosti radionuklida, ki je prisoten v radiofarmaceutskem pripravku v pravi kemijski obliki glede na celotno radioaktivnost radionuklida, prisotnega v vzorcu (**1, 3**). Radiokemijska čistota je pomemben parameter, saj je struktura radiofarmaka tista, ki bo usmerjala porazdelitev le-tega v organizmu. Potencialne nečistote lahko zakrijejo ogromno

informacij in tako onemogočijo pravilno interpretacijo rezultatov preiskav. Najpogosteje jo določamo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ali tenkoplastno kromatografijo **(1, 4, 8)**.

4. NAMEN DELA

Na Kliniki za nuklearno medicino uporabljajo radioaktivno označene analoge somatostatina za diagnostiko in zdravljenje metastatskih gastroenteropankreatičnih (GEP) tumorjev, ki imajo na zunanji površini celic izražene receptorje za somatostatin. Preden radiofarmak aplicirajo pacientu, morajo preveriti obseg vezave izotopa na peptid, oz. radiokemijsko čistoto. Radiofarmaki se na kliniki pripravljajo *ex tempore* za posameznega pacienta. Zaradi kratkega razpolovnega časa radioaktivnega izotopa in roka uporabnosti radiofarmaka je pomembno, da je čas analiznega postopka, s katerim določamo obseg vezave izotopa na peptid, čim krajši.

Za določanje radiokemijske čistote najpogosteje uporabljamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), pri čemer je potrebno postopek optimizirati in v celoti validirati, preden preide v rutinsko analitiko. V diplomski nalogi bomo na HPLC aparaturi razvili analizno metodo za določanje radiokemijske čistote, ki bo v čim krajšem možnem času omogočila ustrezno ločljivost (radiooznačenih) analogov somatostatina. Delo bo potekalo na Kliniki za nuklearno medicino v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

V postopku validacije izbrane HPLC metode bomo po ICH smernicah in smernicah FDA za validacijo bioanaliznih metod določali ponovljivost injiciranja, linearnost odziva UV/VIS detektorja in detektorja radioaktivnosti, mejo zaznavnosti in mejo določljivosti ter stabilnost analita po stresnem testu.

5. MATERIALI IN METODE

5.1. Materiali

5.1.1. Standardi

- Sandostatin® 0,1 mg/ml, proizvajalec: Novartis, Švica
- HYNIC-TOC (Hynic-Tyr³-oktreotid), proizvajalec: piCHEM, Avstrija
- DOTATOC (DOTA-Tyr³-oktreotid acetat), proizvajalec: Bachem, Švica
- DOTATATE (DOTA-Tyr³-oktreotat), proizvajalec: piCHEM, Avstrija

5.1.2. Vzorci

- ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC pripravljen *ex tempore* na Kliniki za nuklearno medicino, v laboratoriju Oddelka za radiofarmacijo, Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana
- ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-oktreotid pripravljen *ex tempore* na Kliniki za nuklearno medicino, v laboratoriju Oddelka za radiofarmacijo, UKC Ljubljana

5.1.3. Mobilna faza

- Mobilna faza A: 0,1 % trifluoroocetne kisline (TFA) v H₂O
- Mobilna faza B: 0,1 % TFA v acetonitrilu
- Acetonitril HPLC Gradient grade (Proizvajalec: Fisher Scientific UK Limited)
- Redestilirana voda (Proizvajalec: Galenski laboratorij UKC Ljubljana)
- Trifluoroocetna kislina (Proizvajalec: SIGMA-ALDRICH, Švica)

5.1.4. Oprema in ostali materiali

- Analitski HPLC: Agilent Technologies 1100 Series, ročni način injiciranja
- Detektor radioaktivnosti: Raytest Socket 8103 0111
- Kromatografski koloni:
 - 1.) Phenomenex® Gemini (proizvajalec: Phenomenex Inc.)
 - velikost delcev: 5 µm;

- stacionarna faza: oktadecilsilil (ODS) C18
- dimenzija: 150 mm x 4,6 mm
- 2.) Kinetex® (proizvajalec: Phenomenex Inc.)
 - velikost delcev: 2,6 μm
 - stacionarna faza: oktadecilsilil (ODS) C18
 - dimenzija: 50 mm x 4,6 mm
- valovna dolžina detekcije: 220 nm

5.2. Metode dela

5.2.1. *Razvoj ustrezne HPLC metode za optimalno ločbo analogov somatostatina*

V diplomski nalogi smo v prvem delu na različne načine poskušali razviti metodo, s katero bi na kromatogramu dobili optimalno resolucijo vrhov različnih analogov somatostatina. V ta namen smo spreminjali delež mobilne faze B v odvisnosti od časa in čas eluiranja na dveh različnih reverzno-faznih kromatografskih kolonah (Phenomenex Gemini® in Kinetex®). Pretok na posamezni koloni je bil vseskozi enak.

Razvoj metode na reverzno - fazni kromatografski koloni Phenomenex Gemini®

Pogoji meritev:

- pretok mobilne faze: 0,75 ml/min
- pritisk na koloni: 60 Bar
- volumen injiciranja na kolono: 20 μL
- temperatura kolone (enaka temperaturi okolja): $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

zaporedna številka metode	sestava metode		
1a	čas (min)	% A	% B
	0	90	10
	20	70	30
	21	5	95
	24-25	90	10
2a	čas (min)	% A	% B
	0	90	10
	20	65	35
	21	5	95
	24-25	90	10
3a	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	20	65	35
	21	5	95
	24-25	85	15
4a	čas (min)	% A	% B
	0	95	5
	20	50	50
	21	5	95
	24-25	95	5
5a	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	20	70	30
	21	5	95
	24-25	85	15

6a	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	10	65	35
	11	5	95
	13-15	85	15
7a	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	10	70	30
	11	5	95
	13-15	85	15
8a	čas (min)	% A	% B
	0	95	5
	10	50	50
	11	5	95
	13-15	95	5

Tabela II: Seznam uporabljenih metod za kromatografsko kolono Phenomenex Gemini® (A = 0,1 % trifluoroocetna kislina v vodi; B = 0,1 % trifluoroocetna kislina v acetonitrilu)

Na kromatografski koloni Phenomenex Gemini® smo za določanje retencijskih časov različno kompleksiranih in keliranih analogov somatostatina uporabili pet 25-minutnih in tri 15-minutne metode. (Tabela II) Pri vseh naštetih metodah smo najprej nanesli raztopine standardov ločeno na kolono. Pri metodi 1a smo delež mobilne faze B z 10 % po 20-ih minutah postopoma povečali na 30 %, pri metodi 2a pa na 35 %. Enak postopek smo izvajali tudi pri metodah 3a in 5a, kjer pa smo imeli v času 0 minut delež faze B 15 %, po 20-ih minutah pri metodi 5a 30 %, pri metodi 3a pa 35 % delež. Na koncu smo eluirali peptide še na standardnem gradientu pri metodi 4a (5 % B v 0 minutah smo povečali na 50 % po 20-ih minutah), ter pripravili še mešanice vseh peptidov in jih injicirali na kolono. Da bi preprečili zastajanje spojin na koloni, smo pri vseh metodah vpeljali dveminutno spiranje kolone s 95 % acetonitrila. Mobilna faza v zadnji minuti pa je bila enaka kot na začetku, tako da smo znova vzpostavili začetno sestavo mobilne faze za naslednje

injiciranje. Kasneje smo injicirali na kolono tudi mešanico oktreotida, DOTATOC-a in DOTATATE, vendar smo v tem primeru imeli 15-minutne metode (6a, 7a, 8a, tabela III).

Priprava mešanice oktreotida, DOTATOC-a, DOTATATE in HYNIC-TOC-a

Za ugotavljanje ločbe mešanice analogov somatostatina pri različnih metodah smo v manjšo epruveto dodali enake koncentracije analogov somatostatina, premešali na vorteks mešalu ter injicirali 20 µl na kromatografsko kolono Phenomenex Gemini®.

Razvoj metode na kromatografski koloni Ultra High Performance Kinetex®

Pogoji meritev:

- pretok mobilne faze: 1,5 ml/min
- pritisk na koloni: 160 Bar
- volumen injiciranja na kolono: 20 µL
- temperatura kolone (enaka temperaturi okolja): 25° ± 1°C

zaporedna številka metode	sestava metode																	
1b	<table border="1" data-bbox="868 264 1332 501"> <thead> <tr> <th>čas (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>8-10</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			čas (min)	% A	% B	0	90	10	5	50	50	6	5	95	8-10	90	10
čas (min)	% A	% B																
0	90	10																
5	50	50																
6	5	95																
8-10	90	10																
2b	<table border="1" data-bbox="868 586 1332 857"> <thead> <tr> <th>čas (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13-15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			čas (min)	% A	% B	0	90	10	10	50	50	11	5	95	13-15	90	10
čas (min)	% A	% B																
0	90	10																
10	50	50																
11	5	95																
13-15	90	10																
3b	<table border="1" data-bbox="874 925 1326 1196"> <thead> <tr> <th>čas (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13-15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			čas (min)	% A	% B	0	90	10	10	60	40	11	5	95	13-15	90	10
čas (min)	% A	% B																
0	90	10																
10	60	40																
11	5	95																
13-15	90	10																
4b	<table border="1" data-bbox="868 1245 1332 1482"> <thead> <tr> <th>čas (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13-15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			čas (min)	% A	% B	0	90	10	10	70	30	11	5	95	13-15	90	10
čas (min)	% A	% B																
0	90	10																
10	70	30																
11	5	95																
13-15	90	10																
5b	<table border="1" data-bbox="868 1565 1332 1803"> <thead> <tr> <th>čas (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>8-10</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			čas (min)	% A	% B	0	90	10	5	70	30	6	5	95	8-10	90	10
čas (min)	% A	% B																
0	90	10																
5	70	30																
6	5	95																
8-10	90	10																

6b	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	5	70	30
	6	5	95
	8-10	90	15
7b	čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	10	70	30
	11	5	95
	13-15	85	15

Tabela III: Seznam uporabljenih metod na koloni Kinetex® (A = 0,1 % trifluoroocetna kislina v vodi; B = 0,1 % trifluoroocetna kislina v acetonitrilu)

Na krajši, 5 cm dolgi koloni Kinetex®, smo uporabili 10 in 15-minutne metode, kjer smo delež mobilne faze B spreminjali v odvisnosti od časa, podobno kot pri prejšnji, 15 cm koloni Phenomenex Gemini®. (Tabela III) Pri 15-minutnih metodah (2b, 3b, 4b, 7b), smo delež faze B v času 0, ki je bil 10 % B, postopoma pri 2b metodi večali na 50 % v času 10 minut, pri 3b na 40 % in pri 4b na 30 % B. Pri metodi 7b smo za razliko od ostalih pričeli v času 0 s 15 % B in nato po 10-ih minutah nadaljevali s 30 % deležem mobilne faze B.

Krajša, 10-minutna metoda je bila pri 1b in 5b, kjer je v času 0 mobilna faza vsebovala 10 % B po 5-ih minutah pa pri prvem 50 % B in pri petem 30 % B. 6b metoda je vsebovala v začetku 15 % B in po 5-ih minutah 30 % B.

Priprava mešanice oktreotida, DOTATOC-a, DOTATATE in HYNIC-TOC-a

Pri vsaki metodi smo injicirali raztopino, ki je vsebovala vse analoge somatostatina (oktreotid, DOTATOC, DOTATATE in HYNIC-TOC). Pripravili smo raztopino enake koncentracije le-teh v manjših epruvetah, premešali na vorteks mešalu ter injicirali 20 µl na kromatografsko kolono Kinetex®. Na kromatogramu smo tako primerjali ločljivost, retencijske čase in ustreznost faktorjev simetrije.

5.2.2. Priprava standardnih raztopin za validacijo HPLC metode

V okviru procesa validacije metode smo določali linearnost odziva UV detektorja in detektorja radioaktivnosti, ponovljivost injiciranja, stabilnost analita ter mejo določljivosti in mejo zaznavnosti. Validacijo smo izvajali na podlagi smernic za validacijo bioanaliznih metod (FDA) (36) in ICH smernic za validacijo (33).

Linearnost odziva smo na našem HPLC sistemu preverili z merjenjem petih različnih koncentracij posameznega analoga somatostatina, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml in 100 µg/ml. Vsako koncentracijo smo pomerili trikrat (nanašali smo 20 µl vzorca) in pri vsaki izračunali povprečno vrednost, povprečno standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo odziva (v %). Za vsako premico smo z metodo najmanjših kvadratov izračunali enačbo, določili naklon (S) premice ter preverili linearno odvisnost obeh spremenljivk z determinacijskim koeficientom (R^2).

Ponovljivost injiciranja je eden izmed načinov preverjanja natančnosti metode pri ponovljivih pogojih (isti analitik, ista aparatura, isti pogoji in isti laboratorij). Za določitev ponovljivosti smo izvedli 8 meritev najmanjše (5 µg/ml), srednje (50 µg/ml) in največje koncentracije (100 µg/ml) vsakega standarda. Vzorce smo injicirali znotraj kratkega časovnega obdobja (8 ur), da smo zmanjšali verjetnost nastanka sprememb v pogojih merjenja (»intraday repeatability«). Dobljenim rezultatom smo izračunali povprečno vrednost, povprečen standardni odklon in relativno standardno deviacijo (36).

Priprava standardnih raztopin oktreatida

Uporabili smo standardno raztopino, zdravilo Sandostatin® 0,1 mg/ml, iz katerega smo pripravili 100 µl posamezne raztopine petih različnih koncentracij oktreatida (5, 10, 25, 50, 100 µg/ml). Preračunanim volumnom standardne raztopine (5 µl, 10 µl, 25 µl in 50 µl), smo dodali prečiščeno vodo do 100 µl. Za koncentracijo 100 µg/ml smo uporabili standard, ki ga nismo redčili. Tako pripravljene raztopine smo premešali na napravi za vorteksiranje in po 20 µl posamezne raztopine nanесли na kolono.

Za določanje ponovljivosti smo pripravili še 300 µl raztopine koncentracije 5 µg/ml in 50 µg/ml ter standardno raztopino. Preden smo injicirali na kolono, smo premešali na napravi za vorteksiranje.

Priprava standardnih raztopin spojine HYNIC-TOC

250 µg HYNIC-TOC-a smo raztopili v 0,5 ml vode in to raztopino koncentracije 500 µg/ml, uporabili za pripravo 300 µl raztopin vsebnosti 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml HYNIC-

TOC-a za določanje linearnosti in ponovljivosti. Potrebovali smo 2,5 μl , 5 μl , 12,5 μl 25 μl in 50 μl osnovne raztopine, dopolnili do 300 μl s prečiščeno vodo in vorteksirali pred injiciranjem na kolono.

Priprava standardnih raztopin spojine DOTATATE

Osnovno raztopino smo pripravili tako, da smo 250 μg DOTATATE raztopili v 1 ml prečiščene vode. Za 250 μl raztopine koncentracije 5, 10, 25, 50 in 100 $\mu\text{g/ml}$ smo potrebovali 5, 10, 25, 50 in 100 μl osnovne raztopine ter dopolnili s prečiščeno vodo do 250 μl in vorteksirali.

Priprava standardnih raztopin spojine DOTATOC

1 mg DOTATOC-a smo raztopili v 0,5 ml prečiščene vode in dobili osnovno raztopino s koncentracijo 2 mg/ml. Od te raztopine smo odpipetirali 25 μl in dodali 475 μl vode, da smo dobili 500 μl raztopine koncentracije 100 $\mu\text{g/ml}$, ki smo jo uporabili tudi za nadaljno redčenje. K 150 μl te raztopine smo dodali enako količino prečiščene vode, da smo dobili raztopino koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$, k 75 μl pa smo dodali 225 μl vode in dobili raztopino koncentracije 25 $\mu\text{g/ml}$. Za raztopino koncentracije 10 in 5 $\mu\text{g/ml}$ pa 30 μl in 15 μl katerima smo dodali prečiščeno vodo do 300 μl .

5.2.3. Stresni testi za določanje stabilnosti različnih koncentracij oktreotida

Da smo preverili, kakšna je stabilnost standardov pri stresnih pogojih, smo pripravili tri alikvote (volumna nekaj μL) raztopine oktreotida najnižje in najvišje koncentracije 5 μL in 100 μL (36), jih postavili v zamrzovalnik, naslednji dan segreli na sobno temperaturo, to ponovili še dvakrat in po tretjem odmrzovanju tretji dan staranja, vsakega posebej injicirali na kolono.

Za določitev intervala, v katerem smo želeli preveriti stabilnost oktreotida, smo znotraj treh dni preizkusili tudi stabilnost po vsakodnevem shranjevanju. Princip je bil enak, le da smo raztopino oktreotida, ki je bil segret na sobno temperaturo, postavili v hladilnik na temperaturo od +4 do +8°C, to ponovili še dvakrat in tretji dan nanesli na kolono.

5.2.4. Meja zaznavnosti (angl. LD-limit of detection)

Mejo zaznavnosti smo določili s pomočjo šestih zaporednih meritev odziva mobilne faze brez vzorca (slepi vzorec). Iz teh podatkov smo izračunali standardno deviacijo, naklon

premice smo dobili iz enačb grafov pri določanju linearnosti odziva detektorja za posamezen analog somatostatina, ter izračunali mejo zaznavnosti po enačbi 10 (33):

$$LD = \frac{3,3 SD}{S} \quad \text{Enačba 10}$$

SD ... standardna deviacija odziva UV detektorja

S ... naklon umeritvene premice (določanje linearnosti, str. 46)

5.2.5. Meja določljivosti (angl. *QL-quantification limit*)

Podobno kot mejo zaznavnosti smo tudi mejo določljivosti določili s pomočjo šestih zaporednih meritev odziva detektorja slepega vzorca (mobilne faze). Iz teh podatkov smo izračunali standardno deviacijo, naklon premice smo dobili iz enačb grafov pri določanju linearnosti odziva detektorja za posamezen analog somatostatina, ter izračunali mejo določljivosti po enačbi 11 (33):

$$QL = \frac{10 SD}{S} \quad \text{Enačba 11}$$

SD ... standardna deviacija odziva UV detektorja

S ... naklon umeritvene premice (določanje linearnosti, str. 46)

5.2.5. Določanje linearnosti odziva detektorja radioaktivnosti

Pripravili smo raztopino izotopa ^{99m}Tc z aktivnostjo 1 MBq. Redčitve so podane v tabeli IV. Vsako raztopino smo pomerili dvakrat in izračunali povprečno vrednost. Čas meritve posamezne raztopine smo zaradi korekcije zabeležili in izračunali časovno razliko (v urah) med prvo izmerjeno raztopino in ostalimi. Korekcijo, izračunano po enačbi 12, je potrebno upoštevati zaradi kratkega razpolovnega časa metastabilnega tehnečija, ki je 6,02 h.

$$A_t = A_0 e^{-kt} \quad \text{Enačba 12}$$

A_t ... aktivnost v času t

k ... konstanta razpada tehnečija

A_0 ... aktivnost v času 0

Tabela IV: Redčitve raztopin za določanje linearnosti detektorja radioaktivnosti

zaporedna št. raztopine	redčenja	aktivnost (kBq)
	osnovna raztopina	1000
1.	2x osn. razt.	500
2.	2x razt. 1	250
3.	2x razt. 2	125
4.	2x razt. 3	62,5
5.	3x razt. 4	20,8
6.	3x razt. 5	6,9
7.	3x razt. 6	2,3

6. REZULTATI

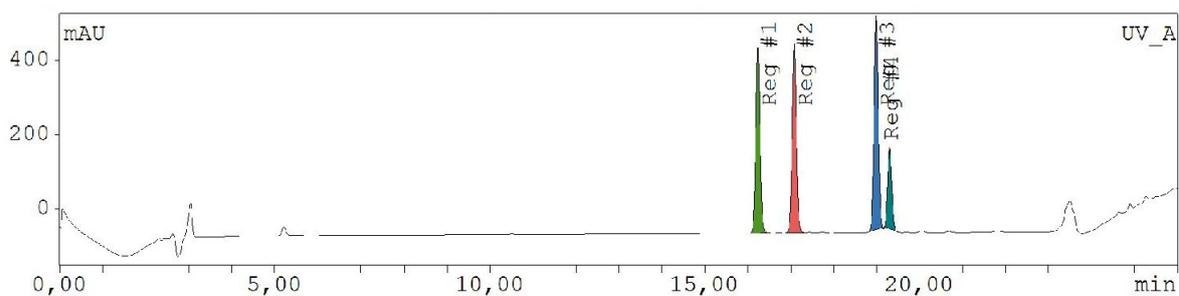
6.1. Izbira in optimizacija HPLC metode za ločbo analogov somatostatina

Tabela V: Retencijski časi pri posamezni metodi na koloni Phenomenex Gemini®

Številka metode	Oktreotid t_r (min)	HYNIC-TOC t_r (min)	DOTATATE t_r (min)	DOTATOC t_r (min)
1a	19,22	19,13	17,23	16,23
2a	16,55	16,50	14,97	14,12
3a	14,27	13,22	12,12	11,22
4a	15,03	14,77	13,62	12,38
5a	16,82	16,43	14,07	12,68
6a	10,70	10,30	9,30	8,90
7a	10,03	10,10	9,43	8,50
8a	9,87	9,77	8,78	8,43

6.1.1. Kromatogrami mešanice oktreotida, DOTATOC-a, DOTATATE in HYNIC-TOC-a na koloni Phenomenex Gemini®

- Metoda 1a



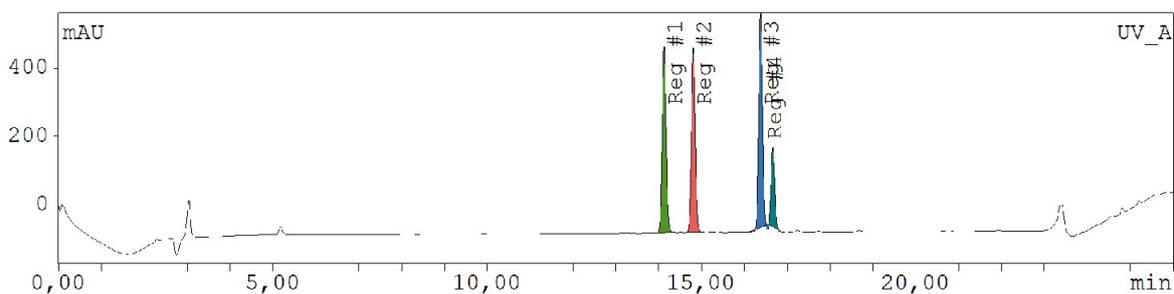
Slika 10: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 1a, čas ločbe je 25 minut (Opomba: zaradi slabe ločbe HYNIC-TOC-a in oktreotida program ne zmore popolnoma ločeno integrirati vrhov)

Tabela VI: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 1a

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	Št. teor. podov
16,23	DOTATOC	2,30	1,086	122000
17,08	DOTATATE	5,04	1,025	137000
18,98	HYNIC-TOC	0,85	1,228	156000
19,30	oktreotid	0,85	1,021	185000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 2a**



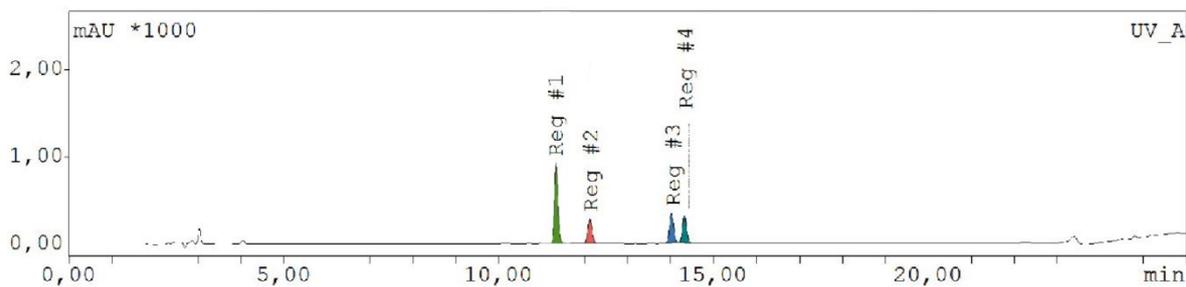
Slika 11: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 2a, čas ločbe je 25 minut (Opomba: zaradi slabe ločbe HYNIC-TOC-a in oktreotida program ne zmore popolnoma ločeno integrirati vrhov)

Tabela VII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 2a

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	Št.teor.podov
14,13	DOTATOC	2,01	0,979	110000
14,82	DOTATATE	4,55	0,915	122000
16,38	HYNIC-TOC	0,86	1,045	142000
16,67	oktreotid	0,86	0,899	186000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 3a**



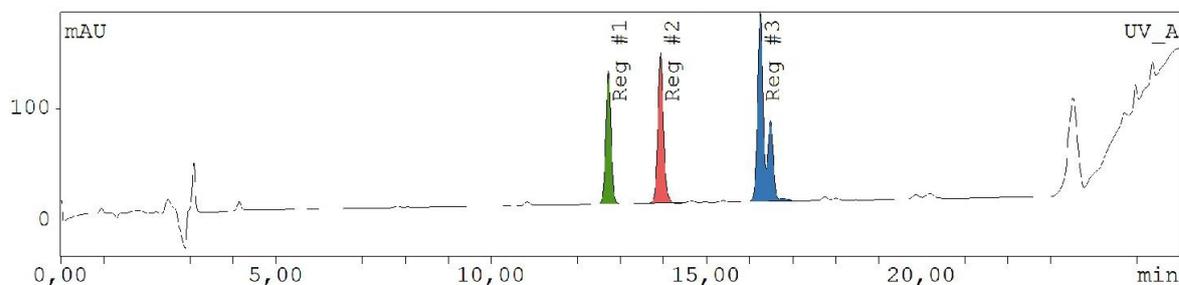
Slika 12: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 3a, čas ločbe je 25 minut

Tabela VIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 3a

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	Št.teor.podov
11,22	DOTATOC	2,27	1,392	44000
12,12	DOTATATE	5,13	1,211	69000
14,02	HYNIC-TOC	0,81	1,229	91000
14,32	oktreotid	0,81	1,156	99000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 4a**



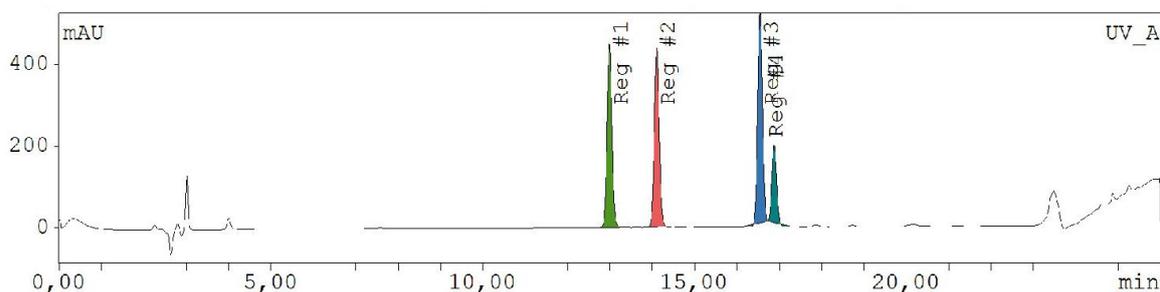
Slika 13: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 4a, čas ločbe je 25 minut (Opomba: zaradi slabe ločbe HYNIC-TOC-a in oktreotida program ne zmore popolnoma ločeno integrirati vrhov)

Tabela IX: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 4a

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	Št.teor.podov
12,72	DOTATOC	2,58	1,093	50000
13,93	DOTATATE	4,65	1,131	51000
16,25	HYNIC-TOC oktreotid	4,65	2,441	66000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni

- **Metoda 5a**



Slika 14: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 5a, čas ločbe je 25 minut (Opomba: zaradi slabe ločbe HYNIC-TOC-a in oktreotida program ne zmore popolnoma ločeno integrirati vrhov)

Tabela X: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 5a

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št.teor.podov
12,98	DOTATOC	2,54	1,280	54000
14,10	DOTATATE	5,56	1,215	68000
16,55	HYNIC-TOC	0,77	1,068	88000
16,88	oktreotid	0,77	0,908	106000

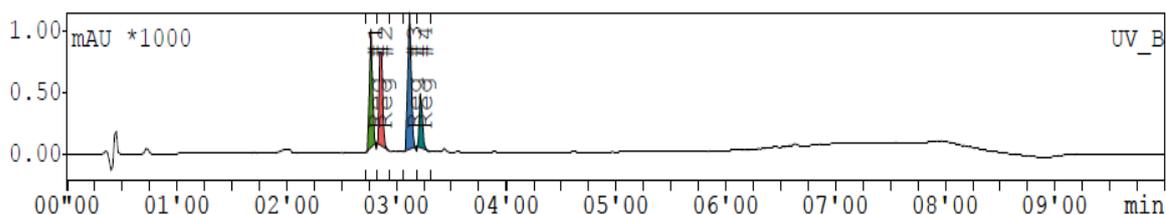
*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

6.1.2. Kromatogrami mešanic na koloni Kinetex®

Tabela XI: Retencijski časi analogov somatostatina pri posamezni metodi na koloni Kinetex®

Številka metode	Oktreotid tr (min)	HYNIC-TOC tr (min)	DOTATATE tr (min)	DOTATOC tr (min)
1b	3,07	3,10	2,50	2,44
2b	4,55	4,43	4,12	4,00
3b	5,58	5,47	5,10	4,54
4b	7,53	7,45	6,48	6,20
5b	4,55	4,47	4,16	4,04
6b	4,19	4,09	3,28	3,17
7b	6,25	6,10	5,00	4,28

- **Metoda 1b**



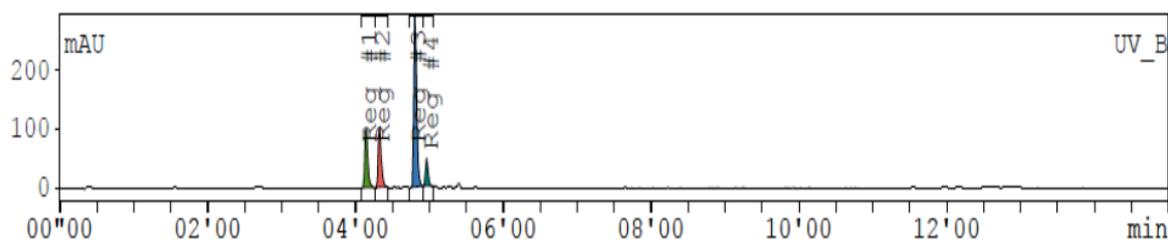
Slika 15: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 1b, čas ločbe je 10 minut (Opomba: zaradi slabe ločbe HYNIC-TOC-a in oktreotida program ne zmore popolnoma ločeno integrirati vrhov)

Tabela XII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 1b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	Št. teor.podov
2,47	DOTATOC	0,77	0,37	6500
2,52	DOTATATE	2,29	1,22	18000
3,08	HYNIC-TOC	0,80	0,43	8900
3,14	oktreotid	0,80	0,43	16000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 2b:**



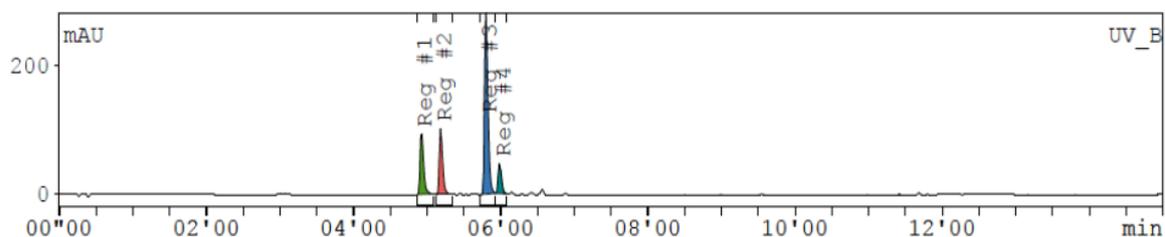
Slika 16: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 2b, čas ločbe je 15 minut

Tabela XIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 2b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št.teor.podov
4,09	DOTATOC	1,14	1,118	34000
4,20	DOTATATE	2,74	1,275	61000
4,49	HYNIC-TOC	0,69	0,964	33000
4,59	oktreotid	0,69	0,633	22000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 3b**



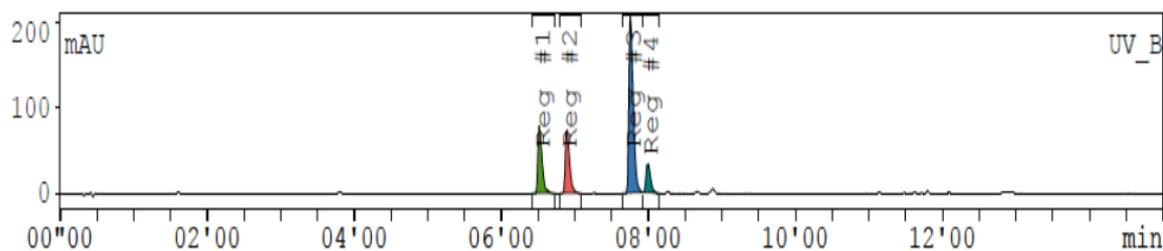
Slika 17: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 3b, čas ločbe je 15 minut

Tabela XIV: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 3b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št. teor.podov
4,56	DOTATOC	1,43	1,307	51000
5,12	DOTATATE	2,99	0,991	44000
5,49	HYNIC-TOC	0,77	0,900	47000
6,00	oktreotid	0,77	0,769	34000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 4b:**



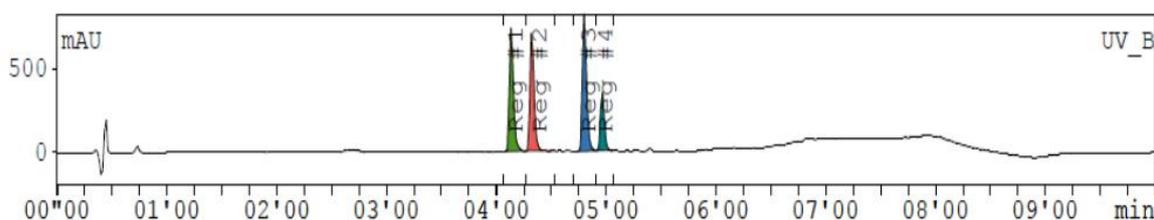
Slika 18: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 4b, čas ločbe je 15 minut

Tabela XV: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 4b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št.teor.podov
6,32	DOTATOC	1,66	1,404	50000
6,54	DOTATATE	3,90	1,607	70000
7,46	HYNIC-TOC	1,08	1,580	69000
8,00	oktreotid	1,08	1,312	106000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 5b:**



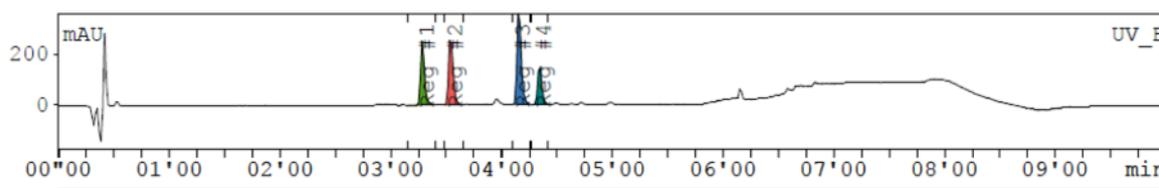
Slika 19: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 5b, čas ločbe je 10 minut

Tabela XVI: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 5b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št. teor.podov
4,09	DOTATOC	0,80	0,880	17000
4,20	DOTATATE	2,01	0,869	28000
4,49	HYNIC-TOC	0,70	0,852	20000
4,58	oktreotid	0,70	1,238	65000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreotidu

- **Metoda 6b:**



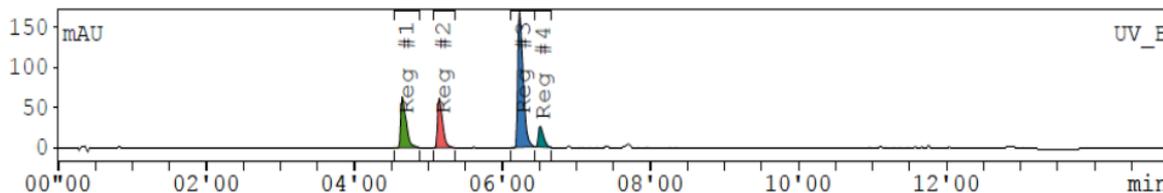
Slika 20: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 6b, čas ločbe je 10 minut

Tabela XVII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 6b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Resolucija glede na oktreatid	Faktor simetrije	št.teor.podov
3,18	DOTATOC	1,14	6,87	0,756	12000
3,33	DOTATATE	3,10	7,04	0,797	21000
4,10	HYNIC-TOC	0,96	0,96	0,906	27000
4,21	oktreatid	0,96	/	0,970	37000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreatidu

- **Metoda 7b:**



Slika 21: Kromatogram mešanice analogov somatostatina pri metodi 7b, čas ločbe je 15 minut

Tabela XVIII: Pomembnejši podatki ločbe analogov somatostatina pri metodi 7b

Retencijski čas	Predvidena spojina	Resolucija*	Faktor simetrije	št.teor.podov
4,40	DOTATOC	1,81	1,531	18000
5,10	DOTATATE	3,80	1,304	22000
6,15	HYNIC-TOC	1,00	1,570	29000
6,31	oktreatid	1,00	1,743	46000

*glede na naslednji vrh, oz. predhodni pri oktreatidu

6.2. Validacija izbrane metode

V sklopu validacije izbrane HPLC metode smo po ICH smernicah na metodi 6b določili ponovljivost injiciranja, linearnost odziva UV/VIS detektorja in detektorja radioaktivnosti, mejo zaznavnosti in mejo določljivosti ter stabilnost analita po stresnem testu in pri normalnih pogojih shranjevanja.

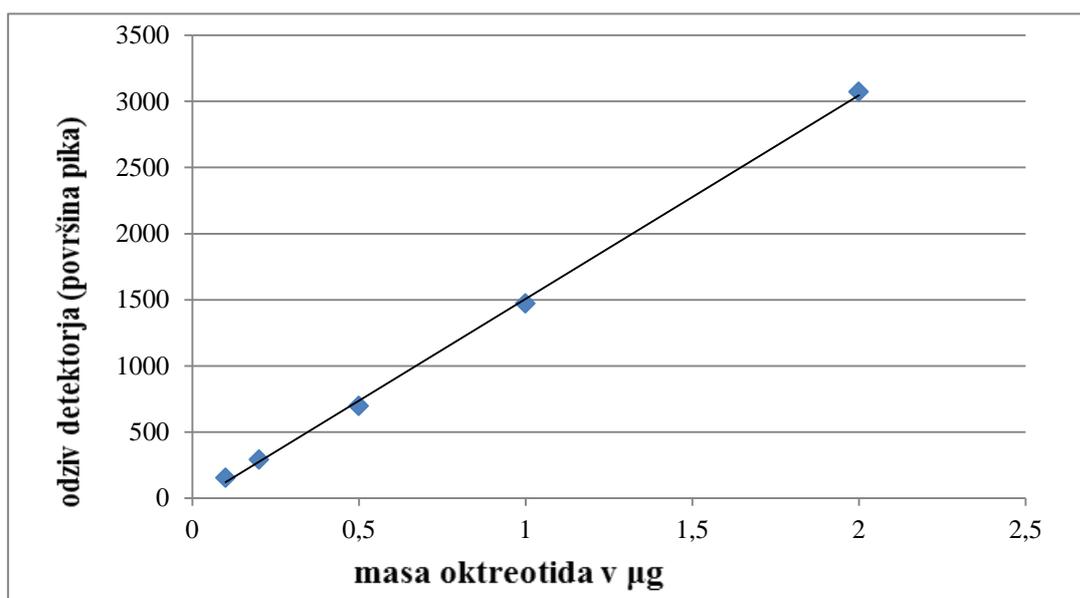
6.2.1. Določanje linearosti odziva UV/VIS detektorja

Linearnost metode smo določili tako, da smo izmerili 5 standardnih raztopin vzorcev oktreotida, DOTATOC-a, DOTATATE in HYNIC-TOC-a v območju od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$. Vsak vzorec smo pomerili trikrat (na kolono smo nanegli po 20 μl), izračunali povprečno vrednost, povprečen standardni odmik (SD) in relativni standardni odmik (RSD v %). Povprečne vrednosti odzivov različnih koncentracij za posamezen analog somatostatina smo vnesli v grafe in s pomočjo programa izračunali enačbe premice in determinacijski koeficient.

Tabela XIX: Površine vrhov za posamezen analog somatostatina za določanje linearnosti. Podane so povprečne vrednosti za posamezno koncentracijo, izračunane vrednosti SD in RSD (v %)

Konc. st. (masa v 20 μ l vz.)	površina vrha za OKTREETID	površina vrha za DOTATOC	površina vrha za DOTATATE	površina vrha za HYNIC-TOC
5 μ g/ml (m=0,1 μ g)	160 povp: 153,3	100 povp: 95,7	83 povp: 82,7	87 povp: 87
	151 SD: 5,9	91 SD: 4,5	82 SD: 0,6	95 SD: 8,0
	149 RSD: 1,0 %	96 RSD: 4,7 %	83 RSD: 0,7 %	79 RSD: 9,2 %
10 μ g/ml (m=0,2 μ g)	303 povp: 289,7	200 povp: 198	148 povp: 139,7	203 povp: 208,3
	292 SD: 14,6	205 SD: 8,2	133 SD: 7,6	214 SD: 5,5
	274 RSD: 5,1 %	189 RSD: 4,1 %	138 RSD: 5,5 %	208 RSD: 2,6 %
25 μ g/ml (m=0,5 μ g)	713 povp: 695,3	566 povp: 580,7	398 povp: 419,7	584 povp: 569,3
	730 SD: 46,1	602 SD: 18,9	424 SD: 19,9	552 SD: 16,2
	643 RSD: 6,6 %	574 RSD: 3,3 %	437 RSD: 4,7 %	572 RSD: 2,8 %
50 μ g/ml (m=1 μ g)	1452 povp: 1471	1326 povp: 1324	1012 povp: 1075	1243 povp: 1300
	1477 SD: 17,2	1313 SD: 10,2	1040 SD: 86,0	1330 SD: 48,6
	1485 RSD: 1,2 %	1333 RSD: 0,8 %	1173 RSD: 8,0 %	1324 RSD: 3,7 %
100 μ g/ml (m=2 μ g)	3095 povp: 3070	2958 povp: 2800	2126 povp: 2100	2641 povp: 2800
	3030 SD: 36,2	2803 SD: 121,7	2090 SD: 20,5	2866 SD: 135,1
	3090 RSD: 1,2 %	2718 RSD: 4,3 %	2125 RSD: 1,0 %	2883 RSD: 4,8 %

Oktreetid



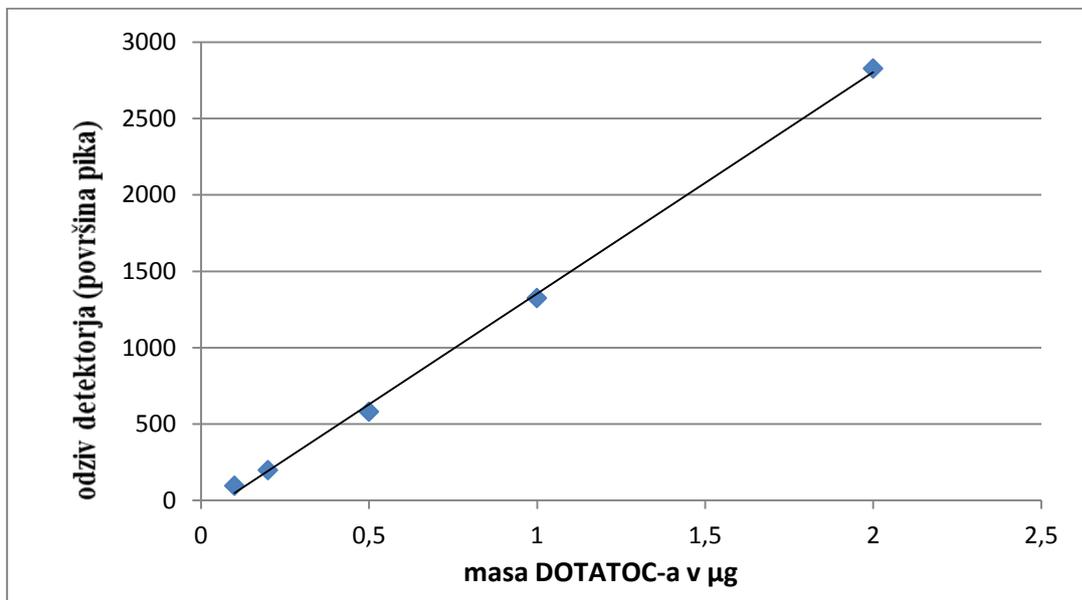
Slika 22: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za oktreetid

Enačba premice in determinacijski koeficient:

$$y = 1541,4x - 35,175$$

$$R^2 = 0,999$$

DOTATOC

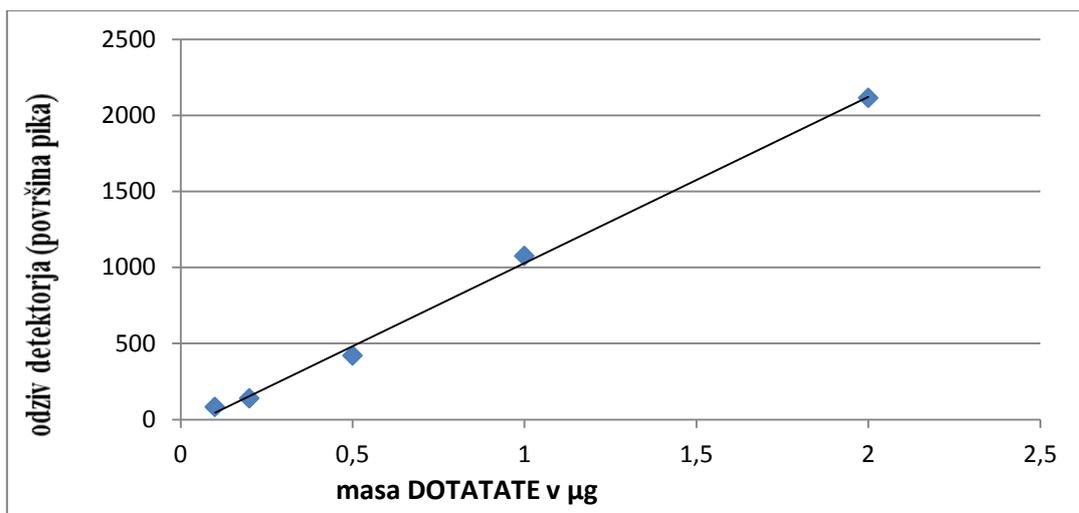


Slika 23: Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za DOTATOC

Enačba premice in determinacijski koeficient:

$$y = 1450x - 97,073$$

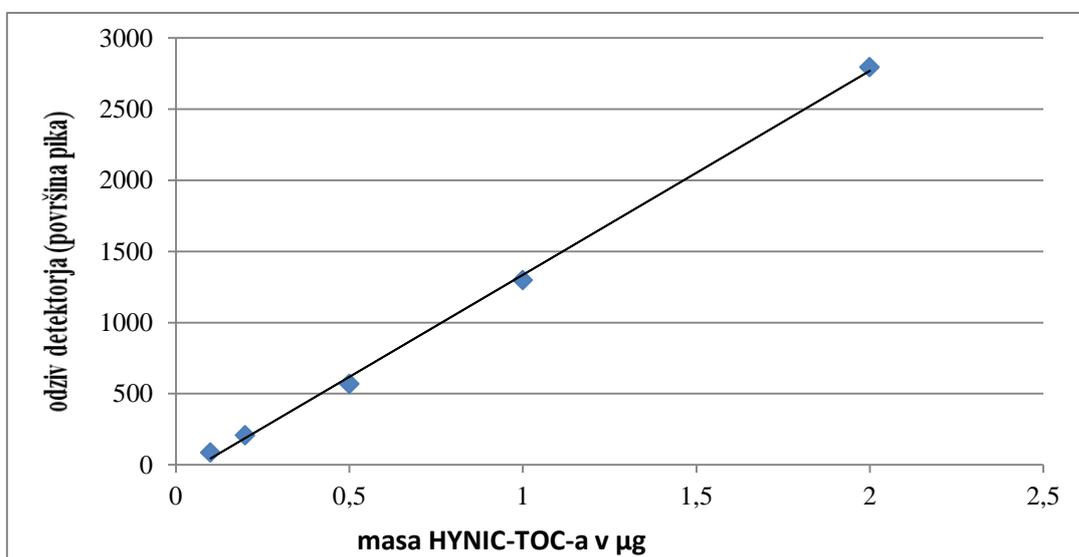
$$R^2 = 0,999$$

DOTATATE**Slika 24:** Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za DOTATATE

Enačba premice in determinacijski koeficient:

$$y = 1093,3x - 64,781$$

$$R^2 = 0,997$$

HYNIC-TOC**Slika 25:** Grafična ponazoritev linearnosti odziva UV detektorja za HYNIC-TOC

Enačba premice in determinacijski koeficient:

$$y = 1433,5 - 97,365$$

$$R^2 = 0,999$$

6.2.2. Stresni testi za določanje stabilnosti različnih koncentracij oktreotida

Rezultati tridnevnega testiranja oktreotida na temperaturne stresne pogoje treh alikvotov dveh različnih koncentracij po literaturi (36) so zbrani v tabeli XX in XXI, kot % ujemanja povprečnih površin vrhov. Na kromatogramu nismo opazili dodatnih vrhov, ki bi lahko pomenili možnost razpada oktreotida na posamezne aminokislino, retencijski čas vrha je ustrežal retencijskemu času oktreotida, ki smo ga analizirali z izbrano metodo 6b (kolona Kinetex®).

Tabela XX: Površine vrhov pred in po trikratnem zamrzovanju in odtajanju oktreotida

koncentracija analita	površina vrhov		% ujemanja
	1.dan	3.dan	
5 µg/ml	127	113	100,6 %
	113 povp: 121	137 povp: 121,7	
	123	115	
100 µg/ml	3013	3060	97,6 %
	2846 povp: 2906	2712 povp: 2836	
	2860	2736	

Tabela XXI: Površine vrhov pred in po trikratnem hlajenju na od +4 do +8°C in segrevanju oktreotida na sobno temperaturo

koncentracija analita	površina vrhov		% ujemanja
	1.dan	3.dan	
5 µg/ml	164	160	101,1 %
	152 povp: 156	151 povp: 157,7	
	152	162	
100 µg/ml	3200	3095	100,7 %
	2970 povp: 3051	3030 povp: 3072	
	2984	3090	

Izračunali smo % ujemanja povprečne površine vrhov pred in po zamrzovanju in ohlajanju. Površine vrhov raztopine najmanjše koncentracije se ujemajo v 100,6 %, pri koncentraciji 100 µg/ml pa 97,6 %, pri preverjanju stabilnosti pri manjših temperaturnih intervalih (do +4 oziroma +8°C) pa 101,1 % za manjšo in 100,7 % za večjo koncentracijo. Iz dobljenih vrednosti lahko sklepamo, da je oktreotid stabilen najmanj tri dni ne glede na stresne spremembe v širokem temperaturnem območju od najmanj -20°C do sobne temperature +25°C.

6.2.3. Meja zaznavnosti (angl. DL- detection limit)

Mejo zaznavnosti smo izračunali z enačbo 10, kjer je SD standardna deviacija odzivov slepega vzorca in S naklon premice. Standardne deviacije odzivov slepih vzorcev pri izbrani metodi so zbrane v tabeli XXI, koncentracija je preračunana za injiciran volumen 20 μl :

Tabela XXI: Standardne deviacije odzivov mobilne faze (slepi vzorec), kjer pričakujemo odziv detektorja za posamezen peptid pri izbrani metodi:

slepi vzorec (MF)	oktreotid; 4'20	DOTATOC; 3'15	DOTATATE; 3'30	HYNIC-TOC; 4'10
1.	1,5	3,3	0,8	2,3
2.	0,26	2,24	0,5	0,7
3.	0,36	1,45	1,5	0,45
4.	0,42	0,8	2,26	3,57
5.	3,75	2,57	4,24	0,81
6.	2,08	1,26	0,57	0,6
povprečna	1,4	1,94	1,65	1,41
SD	1,37	0,93	1,44	1,26

- za oktreotid:

$$DL = \frac{3,3 SD}{S} = \frac{3,3 \times 1,37}{1541,4} = 2,9 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,15 \mu\text{g/ml})$$

- za DOTATOC

$$DL = \frac{3,3 SD}{S} = \frac{3,3 \times 0,931}{1450} = 2,12 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,11 \mu\text{g/ml})$$

- za DOTATATE

$$DL = \frac{3,3 SD}{S} = \frac{3,3 \times 1,436}{1093,3} = 4,33 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,22 \mu\text{g/ml})$$

- za HYNIC-TOC

$$DL = \frac{3,3 SD}{S} = \frac{3,3 \times 1,257}{1433,5} = 2,9 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,14 \mu\text{g/ml})$$

6.2.4. Meja določljivosti (angl. QL-quantification limit)

Mejo določljivosti smo izračunali z enačbo 11, kjer je SD standardna deviacija odzivov slepega vzorca in S naklon premice (36). Standardne deviacije odzivov slepih vzorcev pri metodi 6b so zbrane v tabeli XXI, koncentracija je preračunana za injiciran volumen 20 μl .

- za oktreotid

$$QL = \frac{10 \cdot SD}{s} = \frac{10 \times 1,366}{1541,4} = 8,86 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,44 \mu\text{g/ml})$$

- za DOTATOC

$$QL = \frac{10 \cdot SD}{s} = \frac{10 \times 0,931}{1450} = 6,42 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,32 \mu\text{g/ml})$$

- za DOTATATE

$$QL = \frac{10 \cdot SD}{s} = \frac{10 \times 1,436}{1093,3} = 0,013 \mu\text{g}; (c = 0,66 \mu\text{g/ml})$$

- za HYNIC-TOC

$$QL = \frac{10 \cdot SD}{s} = \frac{10 \times 1,257}{1433,5} = 8,77 \times 10^{-3} \mu\text{g}; (c = 0,44 \mu\text{g/ml})$$

6.2.5. Ponovljivost injiciranja

Za določitev ponovljivosti smo izvedli 8 zaporednih injiciranj najmanjše (5 $\mu\text{g/ml}$), srednje (50 $\mu\text{g/ml}$) in največje koncentracije (100 $\mu\text{g/ml}$) vsakega standarda analogov somatostatina. Volumen zanke je bil 20 μl , valovna dolžina UV/VIS detektorja pa 220 nm. Dobljenim površinam kromatografskih vrhov smo izračunali povprečno vrednost, povprečen standardni odklon in relativno standardno deviacijo.

Tabela XXIII: Ponovljivost injiciranja za oktreotid

koncentracija standarda	5 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
odzivi	164	1225	3200
	152	1388	2970
	152	1357	2984
	150	1477	2883
	155	1389	3262
	154	1452	3207
	166	1255	3142
	150	1195	3223
povprečna	155,4	1342,3	3108,9
SD	6,2	105,4	142,1
RSD (%)	4,0	7,9	4,6

Tabela XXIIIIV: Ponovljivost injiciranja za HYNIC-TOC

koncentracija standarda	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
odzivi	153	1243	2641
	145	1169	2615
	150	1140	2889
	153	1324	2546
	137	1105	2504
	152	1135	2888
	133	1177	2686
	145	1221	2794
povprečna	146	1189,3	2695,4
SD	7,6	70,8	147,7
RSD (%)	5,2	5,9	5,5

Tabela XXIV: Ponovljivost injiciranja za DOTATATE

koncentracija standarda	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
odzivi	109	1012	2163
	102	1040	2319
	101	1173	2200
	104	897	2211
	103	1034	2070
	97	930	2132
	98	961	2215
	106	1030	2197
povprečna	102,5	1009,6	2188,4
SD	4,0	84,5	72,0
RSD (%)	3,9	8,4	3,3

Tabela XXVI: Ponovljivost injiciranja za DOTATOC

koncentracija standarda	5 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
odzivi	88	1326	2178
	90	1299	2803
	91	1313	2441
	87	1333	2652
	96	1282	2718
	88	1191	2488
	99	1168	2323
	98	1179	2368
povprečna	92,1	1261,4	2496,4
SD	4,8	70,0	213,2
RSD (%)	5,2	5,5	8,5

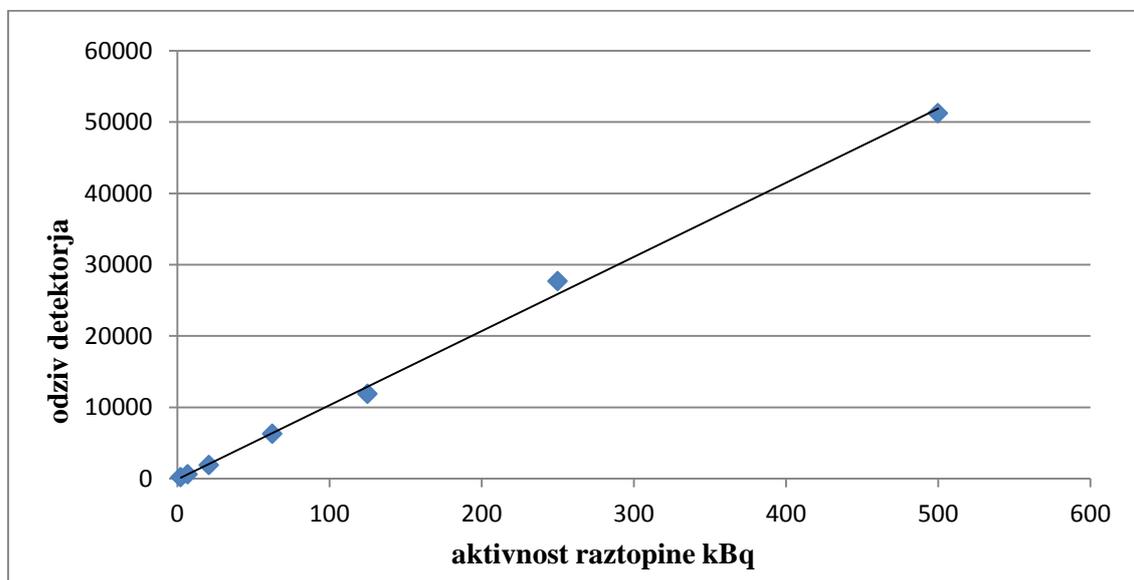
6.2.6. Linearnost odziva detektorja radioaktivnosti

Linearnost odziva detektorja radioaktivnosti smo preverjali z merjenjem radioaktivnosti pertehnetata ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), ki smo ga nanašali direktno na detektor radioaktivnosti. Zaradi kratkega razpolovnega časa tehnecija (6,02 ure) smo pri preračunavanju linearnosti upoštevali tudi enačbo, v kateri upoštevamo konstanto razpada (enačba 12, str. 37).

Tabela XXVI: Izmerjene površine vrhov raztopin različnih aktivnosti ^{99m}Tc (tabela IV) in preračunane vrednosti površin z upoštevanjem korekcije po enačbi 12 (str. 37).

zaporedna številka raztopine*	časovni interval Δt (h)	površina vrha (izmerjena)	površina vrha (korigirana)	povprečna korigirana površina vrha
1	0,83	50784	46142	51240
	0,37	58745	56336	
2	0,43	29263	27829	27710
	0,48	29170	27594	
3	0,57	13631	12772	11916
	0,77	12080	11059	
4	0,63	6778	6301	6314
	0,70	6858	6327	
5	1,25	2258	1978	1927
	1,22	2158	1876	
6	1,12	759	667	605
	1,20	624	543	
7	1,28	268	231	216
	1,33	233	200	

*Zaradi kratkega razpolovnega časa tehnečija smo pomerili raztopine samo 2x



Slika 26: Umeritvena premica linearnega odziva detektorja radioaktivnosti

Enačba premice in determinacijski koeficient:

$$y = 103,95x - 92,10;$$

$$R^2 = 0,999$$

Tabela XXVII: Odstopanja izmerjenih površin od izračunanih, ki jih dobimo, če preračunavamo po enačbi, ki jo dajo meritve ($y = 103,95x - 92,10$)

številka raztopine	aktivnost A_0 (kBq)	izračunana površina vrha (s pomočjo enačbe)	površina vrha (korigirana)	odstopanje (v %)
1	500	51884,5	51240	-1,25
2	250	25895,2	27710	6,55
3	125	12900,6	11916	-8,26
4	62,5	6403,3	6314	-1,41
5	20,8	2071,4	1927	-7,49
6	6,9	627,9	605	-3,72
7	2,3	240,6	216	-11,6

Odstopanja (v %) smo dobili z računanjem razmerja razlike korigirane površine od izračunane površine vrha (aktivnost A_0 smo vstavili v enačbo premice $y = 103,95x - 92,10$) s korigirano površino vrha. Kriteriji sprejemljivosti po literaturi 36 dovoljujejo odstopanja znotraj ± 15 %, najnižja vrednost sme biti večja od 15 %, vendar nobena vrednost ne sme presegati 20 % povprečne vrednosti.

7. RAZPRAVA

Oktreotid je sintezni analog hormona somatostatina, peptida s 14 aminokislinami. Uporablja se pri simptomatskem zdravljenju karcinoidnega sindroma in v terapiji akromegalije, pri kateri je povečano izražanje ravnega hormona, somatotropina. Receptorji za somatostatin pa so v večji meri izraženi tudi na površini celic gastroenteropankreatičnih tumorjev. V terapiji in diagnosticiranju raka se v nuklearni medicini uporabljajo radioaktivno označeni analogi somatostatina. V ta namen na oktreotid kovalentno vežemo različne bifunkcionalne kelatorje, kamor lahko nato kompleksiramo radioaktivne izotope, kot so itrij (^{90}Y), lutecij (^{177}Lu), indij (^{111}In) in tehnecij ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Peptid v tem primeru služi kot transportni sistem za dostavo radionuklida do željenega mesta.

Radiofarmake na kliniki pripravljajo *ex tempore* za posameznega pacienta. Rok uporabnosti radiofarmaka je kratek, zato je potrebno v čim krajšem možnem času preveriti radiokemijsko čistoto. V ta namen smo v diplomskem delu razvili metodo za ločbo analogov somatostatina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Uporabili smo dve različni reverzno-fazni koloni (Phenomenex® Gemini z velikostjo delcev 5 μm ; C18 110A; dimenzije 150 x 4,6 mm in Kinetex® z velikostjo delcev 2,6 μm ; C18; dimenzije 50 x 4,6 mm). Phenomenex Gemini® kolona je daljša, zato je tudi upor v pretoku tekočine večji, poleg tega pa smo imeli na tej koloni manjši pritisk (60 bar) in manjši pretok (0,75 ml/min) v primerjavi s kromatografsko kolono Kinetex®.

Mobilna faza je bila sestavljena iz različnega deleža faze A (voda + 0,1 % TFA) in faze B (organski modifikator, acetonitril + 0,1 % TFA). Organski modifikator pomembno vpliva na retencijo, večji delež le-tega pomeni krajšo retencijo analogov somatostatina v stacionarni fazi. TFA je močna organska kislina ($\text{pK}_a = 0,3$), dodatek le-te povzroči zmanjšanje pH vrednosti vodne faze, kar je pomembno za protonacijo stranskih verig proteina in kelatorja. Z dodatkom TFA je pH vodne faze blizu 3 in je tako nižji od pK_a analogov somatostatina, COOH skupine na proteinu in kelatorju so protonirane. Brez dodanega TFA bi imeli pH vodne faze v območju pK_a in v raztopini ravnotežje protoniranih in neprotiniranih oblik, kromatografske vrhove pa »razvlečene« v obliki dolgih repov.

Na obeh kolonah smo najprej na različnih metodah nanašali vsak analog somatostatina posebej, da bi ugotovili retencijski čas spojine. Nato smo pripravili mešanico standardov in na podlagi teh retencijskih časov poskušali ugotoviti, katera metoda bi bila za ločbo vseh

4-ih peptidov najustreznejša, torej pri kateri metodi dobimo optimalno razmerje med ločljivostjo in časom izvedbe. Na Phenomenex Gemini® koloni smo imeli najmanj težav z ločbo DOTATOC-a in DOTATATE, pri ločbi HYNIC-TOC-a in oktreotida pa ni bilo videti izboljšanja resolucije niti pri metodi 3a, kjer smo imeli v primerjavi z 1a metodo precej večji delež acetonitrila v mobilni fazi (od 15 % B v času 0 minut do 35 % B v 20. minuti). Pri standardni metodi 4a (0 minut 5 % B, 20 minut 50 % B) se vrhova niti ne ločita in ne moremo odčitati, oz. izračunati retencijskega časa. Resolucija med oktreotidom in HYNIC-TOC-om pri ločbi na Phenomenex Gemini® koloni ni presegla vrednosti 0,86. Na isti koloni smo poskušali dobiti ustreznejšo ločbo tudi pri treh 15-minutnih metodah. Gradienti za te tri metode so bili enaki gradientom 3a, 4a in 5a, le da smo enak delež % B pri 15-minutnih metodah dosegli v 10. minuti. Delež acetonitrila se hitreje povečuje do 30, 35 in 50 % B, zato je hitrejša elucija peptidov v primerjavi z elucijo pri 20-minutnih gradientih. Slabša je tudi ločba, predvsem pri HYNIC-TOC-u in oktreotidu. Prekrivali so se tudi vrhovi na kromatogramu radioaktivnosti.

Na Kinetex® koloni smo dobili precej boljše ločbe analogov somatostatina. Stacionarna faza ima manjše delce silikagela, ki imajo tanko porozno površino in neporozno sredico, zato se molekule krajši čas zadržujejo v SF ter večkrat prehajajo med stacionarno in mobilno fazo. Tako ima kromatografska kolona večje število teoretskih podov, doseže se boljša resolucija, večja je učinkovitost ter ožji in višji kromatografski vrhovi. Pretok je bil tukaj bistveno večji (1,5 ml/min). Delci silikagela v tej koloni v premeru merijo 2,6 μm , kar pomeni tudi večji upor kot pri Phenomenex Gemini® koloni, kjer so delci večji. Ta upor zaradi precej višjega pritiska na Kinetex® koloni ne vpliva na učinkovitost ločbe, saj je le-ta bil skoraj trikrat večji in je znašal 160 bar.

Pri metodi 1b retencijska časa oktreotida ($t_r = 3,07$) in HYNIC-TOC-a ($t_r = 3,10$) sovpadata, prav tako tudi DOTATATE ($t_r = 2,50$) in DOTATOC ($t_r = 2,45$). Po injiciranju mešanice smo to domnevo potrdili. Mobilna faza v tem primeru v zelo kratkem času, v 5-ih minutah, preide iz bolj polarne v manj polarno fazo, saj povečamo delež acetonitrila iz 10 na 50 %. Podobno smo poskušali tudi pri metodi 2b, kjer smo povečali delež B v mobilni fazi na 50 % v 10-ih minutah. Ločba ni bila boljša, kljub temu, da so se retencijski časi glede na čas ločbe (15 minut) premosorazmerno podaljšali. Pri metodi 3b in 4b dobimo približno enako sliko. Ločba med oktreotidom in HYNIC-TOC-om ostaja v glavnem nespremenjena že zaradi visokega tailinga. Z manjšanjem deleža faze B po 10-ih minutah (pri metodah 3b na 40 %, pri 4b pa na 30 % B) se izboljšuje ločba med

DOTATOC-om in DOTATATE. Glede na to, da imamo zaradi dodatka TFA pH vodne faze zelo nizek, so hidroksilne in karboksilne skupine na kelatorjih protonirane, prav tako tudi amino skupine, ki imajo v nižjih pH območjih tako pozitiven naboj. Več kot imamo polarnih skupin v strukturi kelatorja, boljša bo topnost v polarni mobilni fazi in s tem hitrejši čas prihoda na detektor. DOTATOC in DOTATATE imata na strukturo oktreetida vezano DOTA skupino, razlika je le v C-terminalnem delu peptida, kjer imamo treoninol v DOTATOC-u bioizosterno zamenjan s treoninom, torej so v polarnosti teh skupin manjše razlike, ki se bolje izražajo pri manjših spremembah polarnosti mobilne faze, kar smo morali upoštevati tudi pri izbiri ustrezne metode. Pri metodi 5b smo 30 % B uvedli že pri 5. minutah, saj je bil čas celotne metode tokrat 10 minut. S tem smo hoteli v krajšem času doseči približno enako ločbo, kot smo jo pri 15-minutni metodi 4b. Pri tej metodi so bili vrhovi veliko bolj simetrični, navidezno je ločba med HYNIC-TOC-om in oktreetidom veliko boljša, med tem ko je med DOTATOC-om in DOTATATE slabša (pri metodi 4b je bila resolucija 1,66, pri 5b pa 0,80 za DOTATOC). Poskusili smo še z večanjem deleža acetonitrila od časa 0 do 5 minut na 15 % B pri metodi 6b. Resolucija vrhov je bila veliko boljša, kar je razvidno iz kromatograma, poleg tega je bil čas ločbe 10 minut, kar je minimalno za ločbo peptidov na tej koloni. Ker separacija vrhov HYNIC-TOC-a in oktreetida ni bila najbolj optimalna ($R = 0,96$, enačba 7, 8), smo to zaporedje različnih deležev faz A in B uporabili tudi v 15 minutni ločbi na isti koloni pri metodi 7b. Pri slednji metodi smo iz 15 % B po 5. minutah nadaljevali s 30 % B. Tukaj pa je simetrija vrhov bolj odstopala od vrednosti idealne simetrije, ki je 1 (faktor simetrije je od 1,304 do 1,743; tabela XVIII), kar pomeni večji tailing in manjšo resolucijo zaradi večje širine vrha na bazni liniji.

V procesu validacije tekočinske kromatografije smo po ICH smernicah za izbrano metodo 6b analogom določali linearnost odziva UV/VIS detektorja in detektorja radioaktivnosti, mejo določljivosti in mejo zaznavnosti ter ponovljivost injiciranja. Linearnost detektorja je pomemben parameter, ki nam pove ali je odziv detektorja linearno odvisen od koncentracije. Pripravili smo pet različnih koncentracij raztopin vsakega analoga (5, 10, 25, 50 in 100 $\mu\text{g/ml}$) in vsako koncentracijo po 20 μl trikrat injicirali na kolono (tabela XIX). Iz preračunih povprečnih vrednosti smo izračunali še regresijsko premico in dobili vrednost determinacijskega koeficienta R^2 , ki nam predstavlja velikost linearne povezanosti obeh spremenljivk (37). Te vrednosti so bile pri vseh analogih od najmanjše vrednosti $R^2 = 0,997$ naprej, kar dokazuje linearno povezanost spremenljivk. Koeficienti

variacije pri posamezni koncentraciji niso presegali 9,2 % povprečne vrednosti, oz predpisanih 15 % po literaturi 36. Glede na te rezultate, lahko sklepamo, da je metoda linearna. Raztopine smo pomerjali pri valovni dolžini 220 nm. Količina prepuščene svetlobe je proporcionalna količini analita v vzorcu, svetloba, ki pa jo vzorec absorbira, pa je odvisna med drugim tudi od ekstinkcijskega koeficienta posamezne spojine, kar je tudi vzrok, da smo dobili različne naklone premic (Enačba 1). Največji naklon dobimo pri oktrotidu, ($S = 1541,4$) saj ta najbolj absorbira in ima največji ekstinkcijski koeficient, med tem ko ima najnižji naklon premica za DOTATATE ($S = 1093,3$).

Pri določanju linearnosti detektorja radioaktivnosti smo pripravili osnovno raztopino z aktivnostjo 1 MBq in jo naprej redčili, da smo dobili 7 raztopin, različnih aktivnosti, kot je navedeno v tabeli XXVII. Zaradi kratkega razpolovnega časa tehnecija smo zapisovali čas injiciranja na kolono in razlike (v urah) uporabili za računanje korekcije po enačbi 12, ter vrednosti v odvisnosti od aktivnosti prikazali grafično. Ker veliko prispeva tudi ozadje, smo izračunali tudi povprečje teh odzivov na območju, kjer dobimo vrh za tehnecij in vrednosti odšteli. Preračunali smo še razmerja izmerjenih površin vrhov na kromatogramu radioaktivnosti z vrednostmi, ki jih dobimo z izračunom, če vstavimo aktivnosti v dobljeno premico. Odstopanja med obema vrednostima smo podali v %. Linearnost odziva detektorja radioaktivnosti je bila ustrezna, saj odstopanja pri večjih vrednosti aktivnosti ne presegajo 10 %. Pri manjših aktivnostih pa dobimo večja odstopanja (tudi do 20 %), kjer ima visok vpliv že ozadje, saj se vedno bolj približujemo meji zaznavnosti. Kriteriji sprejemljivosti po literaturi 36 dovoljujejo odstopanja znotraj ± 15 %, največje odstopanje sme biti večje od 15 %, vendar nobena vrednost ne sme presegati 20 %. Linearno odvisnost obeh spremenljivk nam potrjuje tudi ustrezna vrednost determinacijskega koeficienta ($R^2 = 0,998$). Glede na dobljene podatke lahko določimo območje linearnosti od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$ za vse analoge somatostatina.

Natančnost HPLC instrumenta nam pove skladnost rezultatov serije večih injiciranj za UV/VIS detektor (podamo kot SD, oziroma RSD (v %)). Natančnost smo podajali po predpisih ICH smernic z merjenjem ponovljivosti znotraj kratkega časovnega obdobja, pri čemer glede na priporočila smernic izvaja poskuse znotraj laboratorija en sam analitik. Pripravili smo tri različne koncentracije vsakega analoga, najmanjšo (5 $\mu\text{g/ml}$), srednjo (50 $\mu\text{g/ml}$) in največjo (100 $\mu\text{g/ml}$). Vsako raztopino smo 8x nanesli na kolono in jo pred prvim injiciranjem homogenizirali na vorteks mešalu. Zato, da smo v celoti napolnili zanko, smo odmerjali malo večji volumen od volumna zanke, ki je bil 20 μl , izmerili

površino pod krivuljo za posamezen odziv in nato izračunali SD in RSD (v %). Dobljene RSD, katerih vrednost glede na smernice za validacijo bioanaliznih metod ne sme presegati 15 %, niso presegala 8,5 %, kar kaže na dobro ponovljivost metode in natančnost odmerjanja volumna raztopine. Največji odstopanja smo dobili pri DOTATATE koncentracije 50 µg/ml (RSD = 8,4 %) in pri DOTATOC-u, koncentracije 100 µg/ml (RSD = 8,5 %). Vzrok za takšno odstopanje bi lahko bil slabo homogeniziran vzorec, iz enakega razloga je tudi pri prvih injiciranjih ponekod izmerjena površina v začetku nad povprečjem in pri zadnjih injiciranjih pod povprečjem meritev. Temu bi se lahko izognili s homogeniziranjem na vorteks mešalu pred posameznim injiciranjem.

Mejo zaznavnosti smo izračunali za vsak analog somatostatina s pomočjo standardne deviacije in odklona (iz umeritvene krivulje in izračunov za linearnost) po enačbi 10. Slepri vzorec, ki je bila naša mobilna faza, smo pomerili šestkrat pri retencijskem času za posamezen analog, izračunali povprečje odzivov in standardno deviacijo. Najvišjo mejo zaznavnosti imamo za DOTATATE ($DL = 4,33 \times 10^{-3} \mu\text{g}$, oz. 0,22 µg/ml), saj ima premica za določanje linearnosti za DOTATATE ($y = 1093,3x - 64,781$) najmanjši naklon S , največje pa je povprečje odstopanja meritev ($SD = 1,44$). Podobno smo preračunavali tudi mejo določljivosti po enačbi 11. Vrednost meje določljivosti za DOTATATE smo dobili 0,013 µg (koncentracija 0,66 µg/ml) in je bila dvakrat višja, kot pri DOTATOC-u, kjer smo dobili najnižjo vrednost ($6,42 \times 10^{-3} \mu\text{g}$, koncentracija 0,32 µg/ml). Med drugim je zaradi manjšega molarne absorptivnega koeficienta pri DOTATATE manjša absorbanca, zato za enako koncentracijo dobimo manjši odziv in za detekcijo in kvantifikacijo na meji potrebujemo višje koncentracije.

V sklopu validacije smo po literaturi 36 ugotavljali še stabilnost oktreetida pri shranjevanju v zamrzovalniku (do -20°C) in v hladilniku (do +8°C). Pripravili smo tri alikvotne za dve različni koncentraciji, 5 µg/ml in 100 µg/ml (za obe testiranja). Vsako raztopino smo injicirali na kolono in jih nato postavili v zamrzovalnik, oz. hladilnik. Naslednja dva dneva smo vzorce odtalili in zopet zamrznili (oz. segreli in postavili nazaj v hladilnik) in tretji dan injicirali na kolono, integrirali površine vseh vrhov, izračunali povprečje in % ujemanja. Površine vrhov raztopin oktreetida, ki smo jih shranjevali v hladilniku, so se ujemale v 101,1 % (najmanjša koncentracija 5 µg/ml) in v 100,7 % (koncentracija 100 µg/ml). Raztopine, koncentracije 5 µg/ml, ki smo jih zamrzovali, se ujemajo v 100,6 %, pri koncentraciji 100 µg/ml pa 97,6 %. Iz dobljenih vrednosti lahko tako sklepamo, da je

oktreotid stabilen ne glede na stresne spremembe v širokem temperaturnem območju od najmanj -20°C do sobne temperature največ $+25^{\circ}\text{C}$.

8. SKLEP

V diplomski nalogi smo na HPLC sistemu Agilent 1100 series razvili in validirali analizno metodo za določanje radiokemijske čistote (radiooznačenih) analogov somatostatina.

Mobilna faza je bila sestavljena iz mobilne faze A (voda + 0,1 % TFA) in mobilne faze B (0,1 % TFA v acetonitrilu). Optimalno ločbo smo dobili na reverzno-fazni koloni Kinetex® s spreminjanjem deleža mobilne faze B v odvisnosti od časa, in sicer od 0 do 5 minut 15 % B in nato po 5-ih minutah 30 % B. Dobili smo ustrezne faktorje simetrije (med 0,756 in 0,970) in ločbo kromatografskih vrhov analogov somatostatina v 10-ih minutah, kar je v najkrajšem možnem času eluiranja.

V sklopu validacije smo na reverzno-fazni koloni Kinetex® z velikostjo delcev 2,6 μm in pretokom 1,5 ml/min preverjali linearnost odziva UV/VIS in detektorja radioaktivnosti, ponovljivost injiciranja, mejo zaznavnosti in določljivosti za vsakega od analiziranih analogov somatostatina. Pri tem smo dobili linearno povezanost odzivov v koncentracijskem območju od 5 do 100 $\mu\text{g/ml}$ za vse analoge somatostatina. Pri preverjanju ponovljivosti injiciranja smo ugotovili, da povprečje odstopanj meritev ni bilo večje od 8,5 %. Meja zaznavnosti UV/VIS detektorja je za vse analoge somatostatina v območju od $2,12 \times 10^{-3}$ μg do $4,33 \times 10^{-3}$ μg , meja določljivosti pa od $6,42 \times 10^{-3}$ μg do 0,013 μg .

Izbrana HPLC metoda, ki smo jo razvili in validirali, je glede na dobljene rezultate linearna, ponovljiva in primerna za rutinsko določanje radiokemijske čistote radiooznačenih analogov somatostatina.

9. LITERATURA

1. European Pharmacopoeia, 5th Edition online.
http://lib.njutc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/06_general_monographs/Radiopharmaceutical%20preparations.pdf.
2. Peitl PK, Stopar TG, Dolenc MS. Radiofarmaki. *Farmaceutski vestnik*. 2004;4:555-622.
3. Stopar TG. Radiofarmaceutski izdelki. *Študijsko gradivo FT I*. 2005.
4. *<http://nucleus.iaea.org>*. July 2011.
5. Short MD, Sampson CB. Textbook of Radiopharmacy. *Basic Principles of Radionuclide Physics, Chapter 1*. 2nd ed. Luxembourg; 1995:1 - 18.
6. Pečar S. Radiofarmaki, predavanja iz Farmaceutske kemije III. 2009.
7. Drugs of the Future. *Journals on the web*. Available at:
http://journals.prous.com/journals/dof/20032806/html/df280551/images/Liu_f1.gif.
Accessed July 20, 2011.
8. Short MD, Theobald AE. Textbook of radiopharmacy. *Quality Control of Radiopharmaceuticals*. 2nd ed. Luxembourg; 1995:145 - 161.
9. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Oei HY, et al. Somatostatin Receptor Scintigraphy in Gastroenteropancreatic Tumors. *Analysis New York Academy of Sciences*:416-424.
10. Liu S, Edwards S, Barrett JA. ^{99m}Tc Labeling of Highly Potent Small Peptides. *American Chemical Society*. 1997:621-636.
11. Wikipedia. *<http://en.wikipedia.org/wiki/Somatostatin>*. Accessed July 2011.
12. Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SWJ. Distribution of Somatostatin Receptors in Normal and Tumor Tissue. *Sandoz Research Institute, Berne*. 1990:78-81.
13. Despopoulos A. *Colored Atlas of Physiology*; 2000.
14. Lamberts SWJ, Bakker WH, Reubi JC, Krenning EP. Treatment With Sandostatin and In Vivo Localization of Tumors With Radiolabeled Somatostatin Analogs. *Departments of Medicine and Nuclear Medicine*. 1990:152-155.

15. Lamberts SWJ, Eric KP, Klijn JGM, Reubi JC. The clinical use of somatostatin analogues in the treatment of cancer. *Bailler's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1990:29-49.
16. INC. NPS. <http://www.akromegalija.si/>. september 2011.
17. www.zdravila.net. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-008477.pdf&dir=smpc>. Accessed July 2011.
18. <http://annonc.oxfordjournals.org/>. Available at: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/17/12/1733/F2.large.jpg>. Accessed July 2011.
19. Reubi JC, Maurer R, von Werder K, Torhorst J, Klijn JGM, Lamberts SWJ. Somatostatin Receptors in Human Endocrine Tumors. *Cancer Research*. 1987:551-558.
20. <http://de.wikipedia.org/wiki/Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie>. Available at: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Octreoscan2.jpg&filetimestamp=20080614174320>. Accessed July 2011.
21. Kwekkeboom DJ, Krenning E, Lebtahi R, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabeled Somatostatin Analogs. *Neuroendocrinology*. 2009:220-226.
22. Waldherr C, Pless M, Maecke HR, et al. Tumor Response and Clinical Benefit in Neuroendocrine Tumors After 7,4 GBq 90Y-DOTATOC. *The Journal Of Nuclear Medicine*. May 2002;43:610-617.
23. The Journal of Nuclear Medicine. <http://jnm.snmjournals.org/>. Available at: http://jnm.snmjournals.org/content/46/1_suppl/67S/F3.large.jpg. Accessed July 2011.
24. U.S. National Library of Medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23551/>. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23551/bin/HYNICTOC99mTc.jpg>. Accessed July 2011.
25. Skoog DA, West DM, Holler JF, Crouch SR. *Fundamentals of Analytical Chemistry*; 8th edition.
26. http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg.
27. Žorž M. *HPLC*. Ljubljana, samozaložba, 154 str.; 1991.

28. Kinetex™ Ultra-High Performance on any LC System. *www.phenomenex.com*. Accessed June 2011.
29. Snyder LW, Dolan JW. *High Performance Gradient Elution, The practical Application on the Linear Solvent Strength Model*; Willey, 2007.
30. Miller JM. *CHROMATOGRAPHY, Concepts and Contrasts, 2nd Edition*; WILLEY, 2005.
31. Cherry SR, Sorenson J, Phelps M. Physics in Nuclear Medicine. *Radiation Detectors*. 3rd ed; 2003:89 - 108.
32. Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. *Principles of instrumental analysis*. 5th ed: Saunders College ; 1998.
33. Guideline ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005.
34. <http://www.pharmainfo.net/reviews/introduction-validation-analytical-methods>.
35. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/home/Home_Page.jsp. *Emea Europa*.
36. U.S.Department of Health and Human Services FaDA. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*; 2001.
37. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Coefficient_of_determination. Accessed July 2011.