



1949

**Pozitronbomló fémizotópokkal történő jelzések
reakciókörülményeinek optimalizálása és
folyadékkromatográfiás követése**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Botárné Forgács Viktória
témavezető neve: Dr. Szikra Dezső

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2023.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/4 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2023.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Botárné Forgács Viktória doktorjelölt 2017- 2021. között a fent megnevezett Doktori Iskola K/4 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2023.

a témavezető aláírása

**Pozitronbomló fémizotópokkal történő jelzések reakciókörülményeinek
optimalizálása és folyadékkromatográfiás követése**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Botárné Forgács Viktória okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok Doktori Iskolája
(K/4 programja) keretében

Témavezető: Dr. Szikra Dezső

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2023.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzés	4
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. PET képképzés és az alkalmazott izotópok	5
3.2. Pozitronbomló fémizotópokkal jelölt radiofarmakonok.....	12
3.3. Radiojelzési reakciók követésére szolgáló módszerek	18
3.4. Átmenetifémionok származékképző reagensekkel történő meghatározása.....	22
4. Alkalmazott módszerek és vizsgálati körülmények	27
4.1. Felhasznált anyagok, vegyszerek	27
4.2. [^{44}Sc] Sc^{3+} előállítása ciklotronnal	28
4.3. [^{68}Ga] Ga^{3+} előállítása ciklotronnal	28
4.4. [^{52}Mn] Mn^{2+} előállítása ciklotronnal	28
4.5. HPLC készülékek és vizsgálati körülmények	29
4.5.1. Kolonna utáni származékképzés.....	29
4.5.2. Kolonna előtti származékképzés	31
4.5.3. Kolorimetriás meghatározás	31
4.5.4. Módszerfejlesztéshez használt UPLC készülék és körülményei	33
4.5.5. HPLC készülék és körülményei	34
4.5.6. Mikrofluid rendszer	34
4.6. Egyéb készülékek és berendezések	37
4.7. Radioizotóppal jelölt minták előállítása	38
5. Eredmények és értelmezésük	39

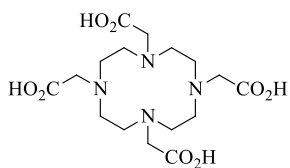
5.1. Radioaktív szennyező fémizotópok meghatározása	39
5.2. Nem radioaktív szennyező fémionok meghatározása	42
5.2.1. Kolonna utáni származékképzés	42
5.2.2. Kolonna előtti származékképzés	46
5.2.3. Kolorimetriás fémmeghatározás	48
5.3. Folyadékkromatográfiás módszerek kidolgozása.....	53
5.3.1. HPLC módszer fejlesztése [⁴⁴ Sc]Sc ³⁺ radiojelzési reakcióinak követésére	54
5.3.2. HPLC módszer fejlesztése [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ radiojelzési reakcióinak követésére	58
5.3.3. HPLC módszer fejlesztése [⁵² Mn]Mn ²⁺ radiojelzési reakcióinak követésére	62
5.4. Radiojelzési reakciók optimalizálása.....	63
5.4.1. Elektroforézis vizsgálatok	63
5.4.2. [⁴⁴ Sc]Sc ³⁺ izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata	66
5.4.3. [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata.....	72
5.4.3.1. Különböző pufferek hatása a radiokémiai hozamra	73
5.4.3.2. Mikrofluid rendszerben végzett reakciók	75
5.4.4. [⁵² Mn]Mn ²⁺ izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata	80
6. Összefoglalás	84
7. Summary	87
8. Irodalomjegyzék	90
9. Köszönetnyilvánítás	103

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

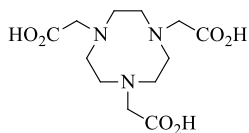
AAS	Atomabszorpciós Spektrométer
AAZTA	6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepin-tertaacetát
AmAc	Ammónium-acetát
CT	Komputertomográfia
DGA	<i>N,N,N',N'</i> -tetra- <i>n</i> -oktildiglikolamid
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraacetát
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz
GMP	Helyes Gyógyszergyártási Gyakorlat
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ICP-MS	Induktív csatolású plazma tömegspektrometria
ICP-OES	Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria
LOQ	Meghatározási határ
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)-etánszulfonsav
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)-propánszulfonsav
MRI	Mágeses Rezonanciás Képképzés
NaAc	Nátrium-acetát
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triacetát
PAR	4-(2-piridilazo)-rezorcin
PDA	Fotodióda soros detektor
PDCA	Piridin-2,6-dikarbonsav
PET	Pozitronemissziós Tomográfia
PEEK	Poli(éter-éter-ke-ton)
PIPES	Piperazin- <i>N,N'</i> -bisz(2-etánszulfonsav)
RA	Radioaktivitás detector
SPECT	Egyfoton-emissziós komputertomográfia

TLC	Vékonyréteg kromatográfia
UPLC	Ultrahatékony folyadékkromatográfia
UV	Ultraibolya detektor
XO	Xilenolnarancs; 3,3-bisz[bisz(karboxi-metil)aminoetil]-o-krezolszulfonftalin-tetranátrium-só

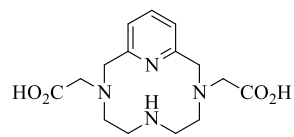
Az értekezésben szereplő ligandumok szerkezeti képletei



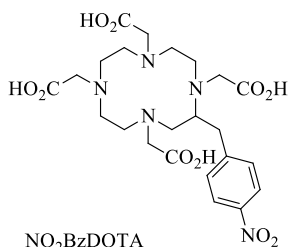
DOTA



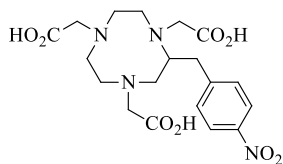
NOTA



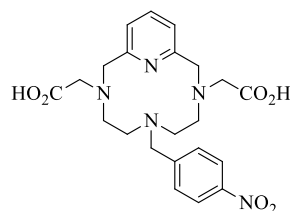
PC2A



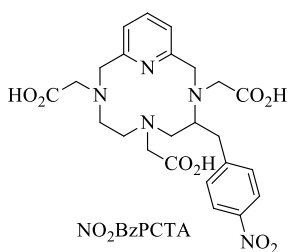
NO₂BzDOTA



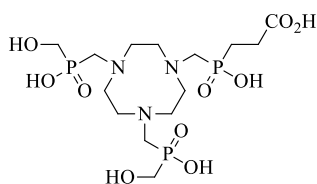
NO₂BzNOTA



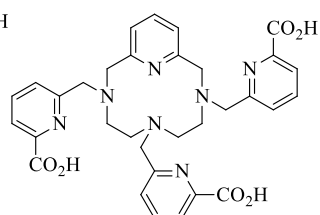
NO₂BzPC2A



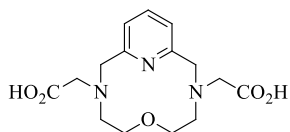
NO₂BzPCTA



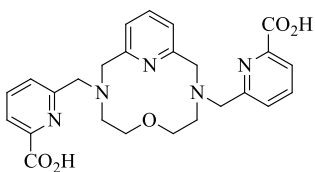
NOPO



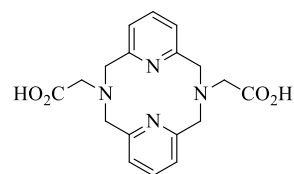
PC3PA



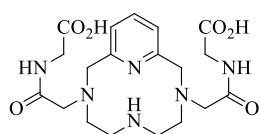
OPC2A



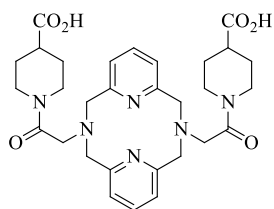
OPC2PA



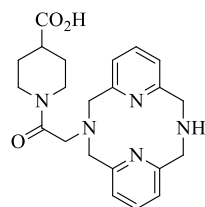
BP2A



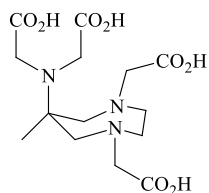
PC2AM^{gly}



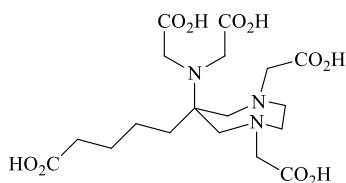
BP2AM^{pipcarb}



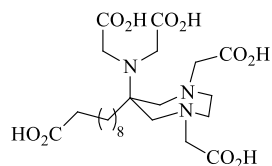
BP1AM^{pipcarb}



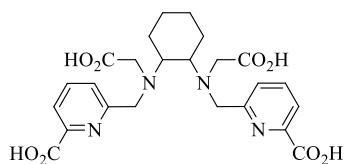
AAZTA



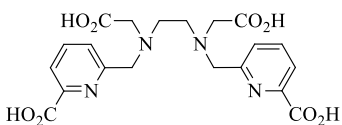
AAZTA-C4



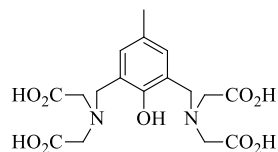
AAZTA-C9



CDDADPA



EDDADPA



HXTA

1. Bevezetés

A pozitronemissziós tomográfia (PET) egy funkcionális non-invazív orvosi diagnosztikai eljárás, melynek segítségével meghatározható a szervezetbe juttatott radioaktív pozitronbomló izotópok bomlásának pontos helye. Magyarországon először 1994-ben Debrecenben helyeztek üzembe PET kamerát humándagnosztikai felhasználásra¹, majd 2009-től CT-vel kombinált vizsgálatokra is lehetőség nyílt.

A PET alkalmazása során képet alkothatunk a pozitron-annihilációs események segítségével, vagyis egy pozitron és egy elektron kölcsönhatásából származó 511 keV energiájú gamma-fotonokkal.² Az élő szervezetben található elemek pozitront emittáló izotópjai, mint a ¹⁵O, ¹³N és ¹¹C rövid felezési idővel rendelkeznek (2,04; 9,97 és 20,36 perc), ami csak gyors, helyben történő felhasználást tesz lehetővé. Jelzett anyagok előállítása során kis molekuláknál leggyakrabban a hidroxil-csoporthoz hasonló polaritású ¹⁸F izotóp kovalens kötéssel történő bevitelét alkalmazzák, ami ciklotronnal nagy hozamban előállítható és hosszabb felezési ideje révén (109,7 perc) többlépcsős radiofarmakon szintézisekben is alkalmazható. A legszélesebb körben használt radiofarmakon a 2-[¹⁸F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz ([¹⁸F]FDG)³, ami az egyes szövetek cukorfelvételének intenzitását teszi értékelhetővé, viszont nem minden esetben teszi lehetővé egyértelmű diagnózis felállítását. Peptidek, fehérjék és antitestek esetén a fémizotópokkal való jelzés gyakran előnyösebbnek bizonyul.⁴ A radiofémek legnagyobb előnyei a hosszabb felezési idő, illetve a vizes közegben, szobahőmérsékleten is végrehajtható radiojelzés. A jelzett anyag *in vivo* viselkedését nagyban befolyásolják a fémizotóp megkötésére használt kelátor- és az esetlegesen a kelátor és a biomolekula összekapcsolására alkalmazott linker tulajdonságai. A molekula polaritásával befolyásolható például a szervezetből való kiürülés

útja és sebessége. A megfelelően megválasztott kelátor-fémion páros biztosíthatja a jelzési folyamat gyors lejátszódását és a hosszú idejű *in vivo* stabilitást.

A radiofémionok közül kedvező tulajdonságaival kiemelkedik a ciklotronnal is előállítható $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ ($t_{1/2}=3,97$ óra)⁵, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ ($t_{1/2}=67,71$ perc)⁶ és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ ($t_{1/2}=5,59$ nap).⁷ Felhasználásukat nehezítik az előállítás során mellékreakciókban keletkező radionuklidok, illetve a külső forrásból származó szennyező fémionok. Inaktív szennyező ionok származhatnak a felhasznált alapanyagokból, illetve a targetanyag előkészítési- és feldolgozási lépései során juthatnak a fémizotópot tartalmazó oldatba. Hasonló koordinációs tulajdonságaik révén csökkentik a jelzési reakció hatásfokát, valamint a különböző felezési idejű izotópok megnehezítik a későbbi képalkotás számszerűsített kiértékelését. Az alkalmazott reagensek az átmenetifém ionok nagy részével azonnal vízoldható komplexeket képeznek, intenzív színváltozás kíséretében.

A radiofémekkel végzett jelzések követésére általában olyan folyadékkromatográfiás módszereket alkalmaznak, melyek a kelátorral konjugált biomolekula retencióját használják ki a szabad fémionoktól való elválasztásra. Azonban a többnyire fordított fázisú oszlopokat alkalmazó módszerek nem megfelelőek a szabad kelátorok jelzésének követésére, vagyis fémionok és fémkomplexek elválasztására, mivel a legtöbb kelátor és a képződő komplexek polárosak, így nincs visszatartásuk az apoláros kolonnán. A módszerfejlesztéshez kevert módú kromatográfiás állófázisokat használtunk, amelyek egynél több kölcsönhatás alkalmazását teszik lehetővé a minta komponensek elválasztására. Az apoláros láncok mellett kation- és/vagy anioncserélő csoportokat is tartalmaznak, így egy elúció során többféle kromatográfiás elválasztási mód is használható. Kiváló olyan vegyületek

elválasztásában, amelyek visszatartása csekély fordított fázison, különösen a poláris és töltött molekulák esetében.

2. Célkitűzés

Jelen értekezés egyik célkitűzéseként a radioaktív- és a nem radioaktív fémszennyezők kvalitatív- és kvantitatív meghatározására szolgáló módszerek kidolgozását választottuk. A radioaktív nuklidokat gamma-spektroszkópiával detektáltuk, míg az inaktív fémionokat 4-(2-piridilazo)-rezorcin (PAR) és xilenolnarancs (XO) származékképző ágensekkel határoztuk meg folyadékkromatográfiás és kolorimetriás módszerek kidolgozásával.

Dolgozatom másik célja olyan új folyadékkromatográfiás módszerek kifejlesztése volt, melyek lehetővé teszik szabad- és biomolekulához konjugált kelátorok pozitronbomló fémizotópokkal történő jelzésének követését. A módszerek kidolgozása során az egyik cél a szabad fémizotóp retenciójának elérése volt reverzibilis megkötődés mellett, valamint az aktív komplex elúciója.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. PET képalkotás és az alkalmazott izotópok

A nukleáris medicina az orvostudomány, azon belül az orvosi képalkotás olyan szakterülete, amely radioaktív izotópokat (radionuklidokat) használva a radioaktív bomlási folyamatra támaszkodik a betegségek diagnosztizálása és kezelése során. A vizsgálat során a páciensnek általában intravénásan adnak be egy radioaktív vegyületet, az úgynevezett radiofarmakont.^{8,9} A nyomjelzőként szolgáló radioizotópot tartalmazó molekula a vizsgálandó szövet iránti affinitása alapján a szervezet megfelelő pontján halmozódik. Ezt a folyamatot kihasználva jelenleg a nukleáris medicina lehetővé teszi az emberi test legtöbb szervének vagy szövetének diagnosztikai vizsgálatát. A különféle betegségek diagnosztizálására többféle orvosi képalkotó technikát alkalmaznak, mint például a computer tomográfiát (CT), a mágneses rezonancia képalkotást (MRI), az egyfoton emissziós számítógépes tomográfiát (SPECT) és a pozitronemissziós tomográfiát (PET). Ezek a technikák kiegészítik egymást. A CT és az MRI képek morfológiai információkat tartalmaznak, míg a SPECT és a PET képeken a jelzett anyag detektálása segítségével az adott szövetek funkciójáról kapunk információt. A SPECT és a PET térbeli felbontása nagyobb, mint egy milliméter. Ez kisebb, mint a lumineszcens vagy fluoreszcens eljárásoké, azonban nagyobb, mint az MRI¹⁰ készülékeknek, amelyek a mikrométeres tartományban vannak.

A legkorszerűbb funkcionális képalkotási eljárás a pozitronemissziós tomográfia^{11,12}, mely egy non-invazív *in vivo* képalkotó technika. Lehetővé teszi például a véráramlás, az anyagcsere és a neurotranszmitterek fiziológiai funkcióinak monitorozását, mivel a betegség kialakulása először a szervek vagy szövetek funkcionalitásában okoz elváltozást, az anatómiai eltérések jellemzően csak ezt követően figyelhetőek meg. Az anatómiai lokalizáció

pontosságának növelése érdekében a PET képalkotást leggyakrabban CT készülékkel kombinálva alkalmazzák.

Az alkalmazott molekulák β^+ -bomló, vagyis γ -sugárzó radionuklidot tartalmaznak, melyeknél az emittált pozitron és a szövetek vegyértékelektronjának annihilációs kölcsönhatásából származó egymástól 180° -os szögben kibocsátott 511 keV energiájú gamma-foton párokat detektálva valósul meg a háromdimenziós képalkotás. Az így nyert milliónyi koincidenciát matematikai rekonstrukciós technikák alkalmazásával tomográfiás képekké alakítják. A PET korlátait főként a felhasznált radionuklidok élettartama (felezési ideje), illetve jellemzően a radiofarmakon előállítási költségei jelentik. Többnyire ugyanazon a napon történik az izotóp előállítása, a radiógyógyszer szintézise, a farmakon injektálása a páciensbe és a PET felvételek készítése. A radioizotópok rövid felezési ideje azonban előny is, hiszen, a radionuklid gyorsan lebomlik, így alacsonyabb sugárdózist okoz. Egyes radiofarmakonok esetében a radioaktív izotóp vektorként is működik, például a ^{131}I nátrium-jodid formájában a pajzsmirigyek szcintigráfiájához, míg a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nátrium-pertechnetátként a pajzsmirigy és a nyálmirigyek szcintigráfiájához alkalmazható.^{13–15} Azonban a radiotrészek többségénél a radioizotóp egy adott szervhez vagy biológiai funkcióhoz affinitással rendelkező molekulához van kapcsolva. Elsősorban az alkalmazott targetáló molekula határozza meg a radiofarmakon biológiai viselkedését. Ezt bizonyos mértékben módosíthatja a hozzá kapcsolt kelátor, és az ebből kialakuló fémkomplex. A radiofémionokkal történő jelzés során kialakított komplexszel szemben a legfontosabb elvárás a megfelelő *in vivo* stabilitás. A radioizotóp bomlási sebessége és a targetáló molekularész által meghatározott felhasználási időn belül ellen kell állnia a hidrolízisnek, a redoxi-, transzkelációs- és transzmetallációs átalakulásoknak, vagyis termodinamikailag nagy stabilitással és kinetikailag nagy inertséggel kell

rendelkeznie. Egy radiofarmakon farmakokinetikája több paramétertől függ, melyek az oldhatóság, töltés, lipofilitás, molekulatömeg és összetétel. A radionuklid fizikai tulajdonságaitól függően pedig a specifikus radiofarmakon diagnosztikára vagy terápiára is alkalmazható.¹⁶ A PET egyik előnye a többi diagnosztikai technikához képest, hogy a radioaktív izotópok, a velük megjelölhető molekulák és a biológiai vektorok széles skálája és variációja áll rendelkezésre és mindegyik más-más biológiai funkció vizsgálatát teszi lehetővé. Nyomjelzőként elérhetőek többek között a szerves vegyületek építő elemei, nevezetesen a szén, a nitrogén és az oxigén (1. táblázat).

1. táblázat: A leggyakoribb PET radionuklidok fizikai tulajdonságai, a velük jelölt radiotrészerek és alkalmazási területük.^{8,11,17,18}

Izotóp	Felezési idő (perc)	E _{β max.} (keV)	Leggyakoribb radiofarmakonok	Vizsgálati indikáció
¹¹ C	20,36	970	[¹¹ C]MET (L-([¹¹ C]-metil)-metionin)	agytumrok kiterjedésének és kiújulásának vizsgálata
			[¹¹ C]KOL ((N-[¹¹ C]-metil)-kolin)	prosztatarák vizsgálata
¹³ N	9,97	1190	[¹³ N]NH ₃ ([¹³ N]-ammónia)	szívizom perfúzió
¹⁵ O	2,04	1720	H ₂ O[¹⁵ O] ([¹⁵ O]-víz)	szívizom oxigénfelvétel
			Na[¹⁸ F]F ⁻ (nátrium-[¹⁸ F]-fluorid)	csontszcintigráfia, csontáttétek
¹⁸ F	109,7	635	[¹⁸ F]FDG (2-[¹⁸ F]-fluoro-2-dezoxi-D-glükóz)	sokféle tumor/áttét leképezése, stádiumok meghatározása
			[¹⁸ F]FET (O-(2-[¹⁸ F]-fluoretil)-L-tirozin)	agytumrok leképezése
			[¹⁸ F]F-DOPA (6-[¹⁸ F]-fluoro-3,4-dihidroxi-fenilalanin)	neuroendokrin tumorok leképezése,
			[¹⁸ F]FLT (3-dezoxi-3-[¹⁸ F]-fluorotimidin)	agytumrok leképezése
			[¹⁸ F]F-MISO ([¹⁸ F]-mizonidazol)	hipoxiás területek
			[¹⁸ F]FAZA ([¹⁸ F]-fluorazomicin-arabinozid)	feltérképezése terápia tervezéséhez

Így elvileg beépíthetőek a szervezetben mindenütt jelenlévő vegyületekbe, például glükózba vagy vízbe anélkül, hogy megváltoztatnák kémiai tulajdonságaikat vagy anyagcseréjüket. A ¹⁵O és ¹³N radiojelzésben

való felhasználhatósága nagyon korlátozott túl rövid élettartamuk miatt, szemben a ^{11}C és a ^{18}F izotópokkal, amelyek hosszabb felezési idejük révén a PET képalkotás legszélesebb körben használt elemei.^{17,19}

Felhasználási ideje révén közülük is a leggyakrabban használt izotóp a ^{18}F , amely [^{18}F]FDG formájában kerül humándagnosztikai alkalmazásra. A rákos szövetek felgyorsult anyagcseréjük miatt több glükózt használnak fel, mint az egészséges szövetek, ez a fokozott glükóz felvétel pedig FDG-vel követhető és leképezhető. Az automatizált szintézispanelen a radiojelzés során a molekula 2-es helyzetben lévő hidroxilcsoportja ^{18}F izotópra cserélődik le. A kovalens kötés kialakításához azonban elengedhetetlen a vízmentes közeg biztosítása, ami a gyártási folyamatot viszonylag komplikálttá teszi. Ennek a radionuklidnak a nagy előnye a 109,7 perces felezési idő, ami lehetővé teszi az előállítás helyétől, jellemzően közúton történő szállítását más városokban vagy országokban lévő kórházakba is.

A pozitron bomló izotópok előállítása elsősorban ciklotron segítségével történik, általában p,n reakcióban. A radionuklidok előállításának közelmúltbeli fejlődésével jelenleg a kutatások középpontjában a hosszabb felezési idejű izotópok felhasználásának feltárása áll. Amíg a ^{11}C izotóppal jelzett vegyületeknél a molekula teljesen azonos, a ^{18}F radionukliddal jelzetteknél pedig nagyrészt hasonló szerkezetű vegyületekről beszélhetünk, addig a radiofémek komplexálása egy ismert molekulába csak a megfelelő donoratomokat tartalmazó kelátor alkalmazásával lehetséges, melynek a molekulához kapcsolása jelentősen megváltoztatja annak szerkezetét. A tervezett fémkomplexnek olyan fiziko-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságokkal kell rendelkeznie, amely képessé teszi a megfelelő biokémiai- és fiziológiai folyamatokban való részvételre. Az olyan radioizotópok, mint a cirkónium (^{89}Zr), ittrium (^{86}Y), gallium (^{68}Ga), szkandium (^{44}Sc) és réz (^{64}Cu) megfelelő jelöltek a hasonló alkalmazásokhoz

(2. táblázat). A fémizotópok előállításához szükséges berendezések ugyanakkor nem állnak rendelkezésre minden ciklotronnál, ezért a radiofémek elterjedését nagyban segítette az izotópgenerátorok elérhetővé válása. A fémizotóppal jelzett diagnosztikumok egyre nagyobb arányú használata viszont előtérbe hozza a költséghatékonyabb és magasabb hozamú ciklotronos előállítást.

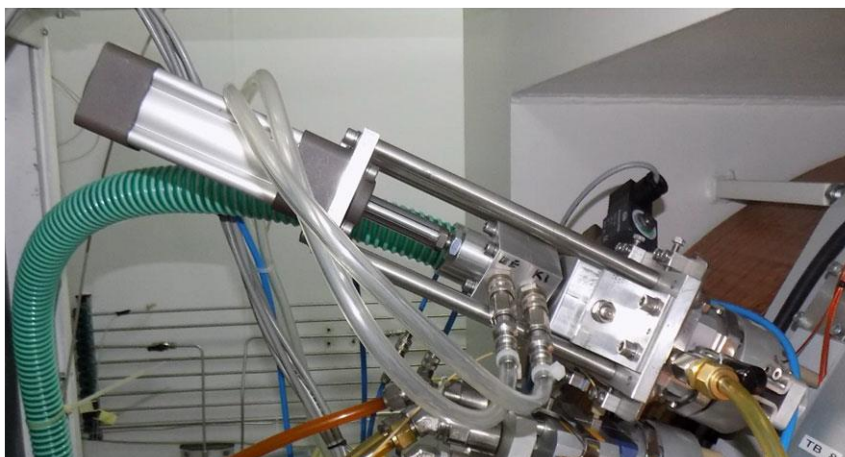
2. táblázat: PET-kompatibilis radiofémek fizikai tulajdonságai, előállítási lehetőségeik és ismertebb kelátoraik.^{20–24}

Izotóp	Felezési idő	$E_{\beta \text{ max.}}$ (keV)	Előállítás		Legismertebb farmakonjai*
			Ciklotron	Generátor	
⁴⁴ Sc	3,97 óra	1474	⁴⁴ Ca(p,n) ⁴⁴ Sc	⁴⁴ Ti/ ⁴⁴ Sc	DOTA-(ciklo-RGD) ₂ ,
⁶⁸ Ga	67,71 perc	1899	⁶⁸ Zn(p,n) ⁶⁸ Ga	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	DOTA-peptidek
⁵² Mn	5,59 nap	576	⁵² Cr(p,n) ⁵² Mn	-	DOTA-peptidek
⁶⁴ Cu	12,7 óra	653	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu ⁶⁴ Zn(d,2p) ⁶⁴ Cu	-	TETA, DOTA, ATSM
⁸⁶ Y	14,74 óra	1248	⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y	⁸⁶ Zr/ ⁸⁶ Y	DOTA-peptidek
⁸⁹ Zr	3,27 nap	902	⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr	-	DFO-antitestek

*TOC/TATE: oktreotid-származék peptid; TETA: 1,4,8,11-tetraaza-ciklotetradekán-1,4,8,11-tetraecetsav; ATSM: diacetil-2,3-bisz-(*N*-metil-3-tioszemikarbazon); BPAMD: 4-[bisz(foszfono-metil)-karbomil]-metil-1,4,7,10-tetraaza-ciklododekán-1,7,10-triecsav; DFO: deszferrioxamin-B, azaz *N*'-{5-[acetil-(hidroxil)-amino]-pentil}-*N*-[5-({4-[(5-amino-pentil)-(hidroxil)-amino]-4-oxobutanoil}-amino)-pentil]-*N*-hidroxil-szukcinimid

A 2. táblázatban szereplő ligandumok radiofémkomplexeit már sikeresen használták többek között angiogenezis, hipoxia, áttétképződés és szomatosztatinreceptort hordozó tumorok leképezésére. Jelentőségük az FDG-vel nem vizsgálható tumorok kimutatása és a célzott izotópterápia követése. Az izotópgenerátorok lehetővé teszik a nukleáris medicinai alkalmazás számára a radiofémek szélesebb körben történő felhasználását. A legtöbb helyen a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga érhető el. A ⁶⁸Ga izotóppal végzett PET-képalkotásnak

jelentős hátránya a meglehetősen rövid fizikai felezési idő. Ez amellet, hogy korlátozza az egyszerre előállított radiogyógyszer felhasználási idejét, kizárja a lassabb biológiai folyamatok (pl. nagy molekulák) követésére való felhasználását. Emiatt hosszabb fizikai felezési idejű radionuklidokat biztosító generátorokat is kifejlesztettek mint például a ^{72}As ($t_{1/2}=26,0$ óra) izotópot adó $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$ generátor²⁵, vagy a ^{44}Sc -ot adó ($t_{1/2}=3,97$ óra) $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor.^{26–28} A ciklotron által előállított radioaktív fémizotópok széles készletéből is a ^{68}Ga kapja a legnagyobb figyelmet. Napjainkban a pozitront kibocsátó ^{68}Ga izotópot főként a már említett $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorokból nyerik a radiofarmakonok szintéziséhez, de a generátorok árának és elérhetőségi problémáinak a közelmúltban bekövetkezett emelkedése motiválta a különböző folyadék-^{29–31} és szilárd targeteket (1. ábra) alkalmazó ciklotronnal történő előállítási módszerek kidolgozását.^{32–39}



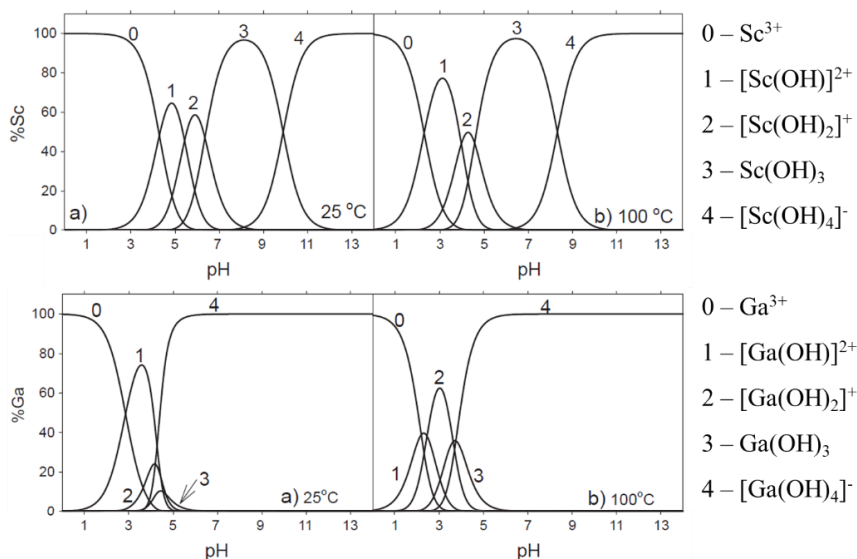
1. ábra: A Debreceni Egyetemen kifejlesztett, pneumatikus target szállítóval ellátott szilárd target rendszer.⁴⁰

A ciklotronban történő radiofém előállítás mellett megfigyelhető az a trend is, hogy a nagyobb számban használt radiofarmakonok esetén kifejlesztik a ^{18}F izotóppal jelzett analógot is (pl. PSMA). A ^{18}F izotóp előállításának

magas hozama és hosszabb felezési ideje miatt a betegvizsgálat költséghatékonyabbá tehető. A ^{18}F származékok izotópterápia követésére való felhasználhatóságát eddig nem igazolták. A ^{68}Ga egyszerű jelölési kémiája azonban elősegíti a receptor-ligandum kölcsönhatáson alapuló új, specifikus radiofarmakonok kifejlesztését különböző betegségekre, a célzott receptor radionuklid terápia szélesedő alkalmazása pedig szükségessé teszi a ^{68}Ga -mal jelölt vegyületek alkalmazását a terápia monitorozására és dozimetria meghatározására. Az ugyancsak pozitront emittáló ^{44}Sc izotópot a hosszabb felezési ideje és lutéciumhoz hasonló koordinációs kémiája a ^{68}Ga potenciális versenytársává teszi. Umbricht és munkatársai már bizonyították, hogy a ^{44}Sc jelzett anyagok biológiai megoszlása jobban hasonlít az izotópterápiában használt ^{177}Lu -mal jelölt vegyületekhez, mint a ^{68}Ga -mal jelzett radiofarmakonoké.⁴¹ Az MRI leképezéseknél paramágneses tulajdonsága miatt a már szélesebb körben tanulmányozott mangán tartalmú kontrasztanyagok⁴² révén a nukleáris medicina területén is növekvő figyelmet kezd kapni a mangán izotópok felhasználásának vizsgálata. Ez köszönhető többek között a pozitronsugárzó ^{52}Mn ($t_{1/2}=5,59$ nap) még hosszabb felezési idejének, a technika nyújtotta *in vivo* mennyiségi eloszlások vizsgálati lehetőségének^{43,44}, valamint annak, hogy bimodális PET/MRI képalkotás is végezhető a mangán radionuklidok és a megfelelő kontrasztanyagok kombinálásával.⁴⁵

3.2. Pozitronbomló fémizotópokkal jelölt radiofarmakonok

A szkandium koordinációs kémiáját csaknem teljesen az Sc^{3+} háromértékű ionos formája határozza meg, tulajdonságai miatt nagyobb a hasonlósága az Y^{3+} -ionnal, sem, mint az Al^{3+} -mal. Emiatt is sorolják a szkandiumot inkább a lantanoidaszerű ritkaföldfémek közé.⁴⁶ Vizes oldatban az Sc^{3+} akvakomplex formájában csak savas, pH 4 alatti körülmények között stabil, pH 4 felett $[\text{Sc}(\text{OH})]^{2+}$ -ra, pH 7 és pH 11 között pedig oldhatatlan $\text{Sc}(\text{OH})_3$ -ra hidrolizál (2. ábra). A $\text{Sc}(\text{OH})_3$ amfoter jellege pH 11 felett jelentkezik és kialakul az $[\text{Sc}(\text{OH})_4]^-$ vegyület.⁴⁷ A Ga^{3+} az alumínium ionhoz már nagyobb mértékben hasonlít, stabil vegyületeiben oxidációs száma +3. A 2. ábra a hidratált Ga^{3+} hidrolízisállandóiból számított koncentráció eloszlási görbét mutatja be a pH függvényében, két különböző hőmérsékleten. Ez alapján a $\text{Ga}(\text{OH})_2^+$ és a $\text{Ga}(\text{OH})_3$ egyik pH értéken sem domináns részecske és képződésük jelentősen átfed egymással. A Ga^{3+} akvakomplexe pH 3 alatti tartományban stabil, míg pH 5 fölött már szinte csak a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ forma van jelen. A hőmérséklet növelésével a Ga^{3+} és $\text{Ga}(\text{OH})_2^+$ mennyisége jelentősen csökken, míg a $[\text{Ga}(\text{OH})_2]^+$ és $\text{Ga}(\text{OH})_3$ részecskévé növekszik.



2. ábra: A hidratált Sc(III) és Ga(III) hidrolízise a pH függvényében.⁴⁷

A Sc^{3+} és Ga^{3+} kis atomsugara, nagy elektrontöltése és a háromértékű oxidációs állapotának savas jellege miatt, főként N- vagy O-donoratomokat tartalmazó ligandumokkal képez nagy stabilitású komplexeket.^{48,49} Többek között ilyenek a karboxilátok, a foszfonátok, az aminok vagy a hidroxamátok. A szkandium ezekkel a molekulákkal olyan komplexeket képez, amelyekben a fémion koordinációs száma általában 6 és 9 között változik⁵⁰, még akkor is, ha az oktaéderes szerkezetű komplexek előfordulása a leggyakoribb. A gallium esetében a 6-os koordinációs szám a meghatározó, komplexei ortorombos kristályszerkezetben a legstabilabbak.

A Mn^{2+} -ion biológiai szempontból is nagy jelentőségű, mivel az élőlények számára esszenciális ásványi anyag, számos enzim alkotórésze.⁵¹ A mangán a vegyületeiben megannyi oxidációs állapotban fordul elő (+2 és +7 között), amelyek jellemzően különböző színűek. Legstabilabbak a +2, +3 és +4-es oxidációs számú komplexei, a magasabb oxidációs számúak többnyire oxidok.⁵² Komplexei általában köbös tércentrált rácsban kristályosodnak, amelyben 12 vagy 14 a fémion koordinációs száma. Az O-donoratomot tartalmazó ligandumokkal jellemzően stabilabb komplexeket képez, mint a N-tartalmú ligandumokkal.⁵³

A szkandium izotópjai közül az ^{45}Sc az egyetlen stabil állapotú, mellette 13 radioaktív izotópja ismert. Közülük a hosszabb felezési idejű izotópjai a ^{46}Sc ($t_{1/2}=83,8$ nap), a ^{47}Sc ($t_{1/2}=3,35$ nap) és a ^{48}Sc ($t_{1/2}=43,7$ óra). Öt metastabil izotópja is van, a leghosszabb felezési idejű közülük a $^{44\text{m}}\text{Sc}$ ($t_{1/2}=58,6$ óra). Az összes fennmaradó radioaktív izotóp felezési ideje kevesebb, mint négy óra, ilyen például a ^{43}Sc ($t_{1/2}=3,89$ óra) és a legfontosabb pozitront emittáló ^{44}Sc ($t_{1/2}=3,97$ óra). A ^{47}Sc és a ^{44}Sc radionuklidok úgynevezett teranosztikus izotóp párt alkotnak.⁵⁴ A ^{47}Sc radiofém 600 keV maximális energiájú β^- sugárzás kibocsátásával bomlik el, miközben alacsony energiájú γ sugárzást (159 keV) is kibocsájt, amely alkalmassá teszi SPECT

képalkotásra, valamint szintén tanulmányozták már radioimmunterápia céljából is.⁵⁵ Koordinációs kémiai viselkedése révén a ^{47}Sc radionuklid megfelelő alternatívája lehet a ^{177}Lu izotópnak⁵⁶, míg a ^{44}Sc β^+ sugárzóként ideális jelölt a PET-diagnosztikához. A ^{44}Ca besugárzásával történő ^{44}Sc előállítás során $^{44\text{m}}\text{Sc}$ is keletkezik, amely hosszabb felezési idővel rendelkezik. Ez azonban megkönnyítheti a dozimetriai vizsgálatok elvégzését a ^{47}Sc radionuklid sugárterápiás felhasználása érdekében. A $^{44\text{m}}\text{Sc}$ és a ^{47}Sc fizikai felezési ideje azonos nagyságrendű, ami lehetőséget nyújt az anyagcsere folyamatok nyomon követésére, így a ciklotronban történő előállítás előnyt jelent a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátorhoz alkalmazásához képest.⁴⁰

A galliumnak több, mint 30 izotópja ismert, a természetes elem leggyakoribb előfordulású stabil izotópja a ^{69}Ga (60,11%) és a ^{71}Ga (39,89%). Leghosszabb fizikai élettartammal a ^{67}Ga ($t_{1/2}=3,26$ nap) rendelkezik, PET szempontból pedig a ^{68}Ga ($t_{1/2}=67,71$ perc) radionuklid a legfontosabb. A ^{44}Sc a ^{68}Ga alternatívájaként használható, mivel hosszabb felezési idővel rendelkezik, és hasonló szerkezetű, stabil radioaktívan jelölt komplexeket képez, mint a ^{90}Y és a ^{177}Lu . Emiatt fontossá válhat a sugárterápia tervezésében.⁵⁷ A mangánnak szintén csupán egy stabil nuklidja van, az ^{55}Mn , míg radioaktív izotópjaként több, mint 25 ismert a millió éves felezési idejűtől (^{53}Mn ; $t_{1/2}=3,7$ millió év) a milliszekundumos értékekig. Fontosabb β^+ -bomló radionuklidjai az ^{54}Mn ($t_{1/2}=312,3$ nap), az ^{52}Mn ($t_{1/2}=5,59$ nap) és az $^{52\text{m}}\text{Mn}$ ($t_{1/2}=21,1$ perc).^{58,59} A PET radionuklidokkal jelölt antitestek alkalmazásának (immunoPET) száma jelentősen megnövekedett az elmúlt évtizedben. Annak érdekében, hogy megfeleljenek az antitestek biológiai felezési idejének a hosszabb fizikai felezési radioizotópokkal (^{89}Zr , ^{64}Cu , ^{52}Mn) történő antitest és fehérje radiojelzéseket fejlesztettek ki. Az említett radiofémek előállíthatóak ciklotronnal.

A radiofarmakonként alkalmazható komplexek tervezésénél az első szempont a termodinamikai stabilitási állandó (K_{ML}). Természetesen ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a komplex pontosan ugyanolyan viselkedésű lesz *in vivo* körülmények között is, de gyakran használják a gyógyszerfejlesztés elsődleges kiválasztási kritériumaként. A különböző fémkomplexek stabilitásának ismerete azonban nem elegendő a ligandumok fémionokhoz való affinitásának összehasonlításához, mivel eltérő sav-bázis tulajdonságokat és denticitást mutathatnak. Emiatt célszerű meghatározni a nem komplexált szabad fémion koncentrációját (pM), mely által kvantitatív módon összehasonlítható a különböző kelátok fémmegkötő képessége. Azonban fontos megjegyezni, hogy a radiokémiai reakciókban a radionuklidok mennyisége (fM-pM) nagyságrendekkel kisebb, mint az azt komplexáló ligandumé (μ M-mM), így a radiojelzések jelentős részénél pseudo elsőrendű kinetikáról beszélhetünk. A kisebb stabilitási állandójú komplexek a szervezeten belül fémioncserét vagy transzkelációt szenvedhetnek, például ligandumcsere következhet be transferrinnel.⁶⁰ A komplexek kinetikai inertsége a második vizsgálandó paraméter, mivel nagyon fontos annak meghatározása, hogy a komplex hajlamos-e disszociációra *in vivo*. A makrociklusos ligandumok különféle fémionokat, különösen háromértékű lantanoidákat képesek jól megkötni, így vízben oldódó monomer komplexeket képeznek. A képződött komplexek jellemzően termodinamikailag stabilak és kinetikailag inerteek. Ezt a vegyületcsoportot orvosi alkalmazásokhoz széleskörűen vizsgálták, leginkább MRI kontrasztanyagként^{61–63} vagy bifunkcionális kelátképzőkként molekuláris képalkotásra és/vagy célzott sugárterápiára.^{64,65} A Gd^{3+} alapú MRI kontrasztanyagoknál⁶⁶ és a radiolantanoidáknál alkalmazott többfogú kelátképzőket (DOTA, DTPA) próbálták meg elsőként alkalmazni a szkandium és gallium orvosi célra történő komplexálására.^{54,67} Komplex vegyületeiknek stabilitása összemérhető a Lu^{3+}

és Fe^{3+} komplexekével.^{57,68} A ^{13}C NMR spektrszkópiás vizsgálatok alapján a Sc-DOTA a Lu-DOTA-hoz hasonlóan nyolcas koordinációs geometriájú komplex formájában képződik. Ez a fokú koordináció tökéletesen megfelel a szkandiumnak. A DOTA-t és származékait sikeresen konjugálták szomatosztatin analógokhoz, a kapott radiofarmakonok jó farmakológiai paraméterekkel rendelkeztek.^{69,70} A DOTA szintén alkalmas ^{67}Ga , ^{52}Mn , ^{64}Cu , ^{90}Y és ^{111}In kelátképzésére, amelyek nagyon jó *in vivo* farmakokinetikai tulajdonságokat mutattak.^{71,72} Azonban ezekben a radiofarmakonokban a kelátképző rész módosíthatja az eredeti peptid konformációját, és megváltoztathatja a molekula polaritását, ami hatással lehet a receptorhoz való kötődésre. A makrociklus azonban viszonylag nagy termodinamikai stabilitással köti meg a fémeket, továbbá a DOTA acetát karjának hidrofil karaktere elősegíti a jelöletlen DOTA-peptid kiürülését a radiofarmakonhoz képest, így csökkentve a versengést a receptor kötőhelyeiért a két forma között.⁷³ A DOTA-val végzett radioaktív jelölés kinetikája azonban általában lassú és viszonylag magas hőmérsékletű reakciót igényel, míg a DTPA komplex szobahőmérsékleten képződik.⁷⁴ A kisméretű peptidek viszonylag magas (100 °C alatti) hőmérsékletnek is ellenállnak, az antitestek viszont ezeken a hőmérsékleteken már elveszítik immunreaktivitásuk nagy részét. Az elmúlt években kifejlesztett AAZTA ligandum termodinamikai stabilitási állandója kisebbnek bizonyult, mint a DOTA komplexeké, azonban szignifikáns különbséget figyeltek meg a radiokémiai hozamban 25 °C-on, amely alapján az AAZTA gyorsabban képes volt koordinálni a ^{44}Sc , ^{68}Ga és ^{177}Lu izotópokat.^{75,76}

A radiofarmakonokat jellemzően automatizált szintézispaneleken vagy úgynevezett KIT készletek (puffert és a prekuzort tartalmazó liofilizált porampullák) alkalmazásával állítják elő. Az irodalomban korlátozott számban ugyan, de találhatóak mikrofluid rendszerekben végrehajtott nyomjelzési

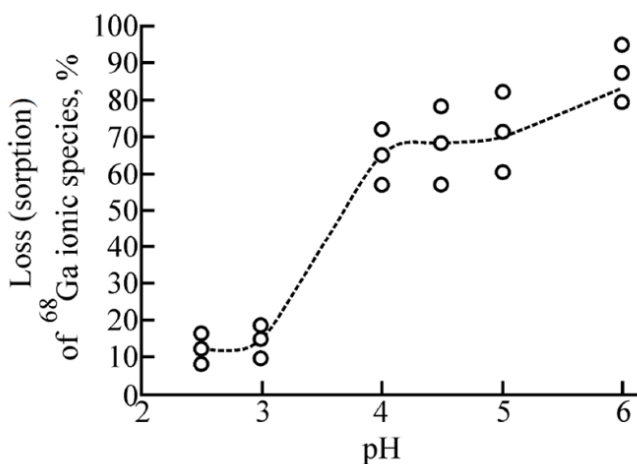
reakciók is.⁷⁷ A mikrofluidika kis mennyiségű reagensek kezelését teszi lehetővé, a csökkentett térfogatok révén pedig lehetővé teszi a reakcióparaméterek gyors és egyszerű optimalizálását. Radiokémiai szintéziseknél a kis mennyiségek és méretek további előnye a hatékonyabb árnyékolás és emiatt az alacsonyabb sugárterhelés. A rendszer geometriájából adódóan az önradiolízis is elhanyagolható.⁷⁸ A mikrofluidikai rendszerekben alkalmazott technológiák alapján lehetnek chip-alapú, kapilláris, folyamatos áramlású^{79–81} vagy térfogatcsökkentett hagyományos készülékek. Ezek a berendezések képesek automatizált szintézisek és tisztítási folyamatok végrehajtására is, illetve nem utolsósorban meg kell említeni, hogy a mikrofluid rendszerek jelentős költségmegtakarítást kínálnak azáltal, hogy lehetővé teszik a kisebb mennyiségek előállítását a felhasználói igények alapján. Számos kutatás középpontjában a chip-alapú radioszintézisek vizsgálata áll, amellyel például a [¹⁸F]FDG előállítási idejét 40 percről 25 percre sikerült csökkenteni.^{82–84} Radiofémekkel jelölt trészerek szintéziséről már kevesebb publikáció jelent meg, azon belül is csak ⁶⁸Ga és ⁶⁴Cu alkalmazásáról számoltak be DOTA és NOTA kelátorokkal konjugált peptidek előállítása során.^{85,86} Ovdichuk és munkatársai kereskedelmi forgalomban kapható makro- és mikrofluid szintézis modulokkal előállított [⁶⁸Ga]Ga-citrát *in vitro* és *in vivo* tulajdonságait hasonlították össze, így bizonyítva a szintézismodul megbízhatóságát.⁸⁷

A jelenlegi Európai Gyógyszerkönyvben ⁶⁷Ga és ⁶⁸Ga tartalmú radifarmakonok szerepelnek. Ezek a következők: [⁶⁷Ga]Ga-citrát, ciklotronnal és generátorral is előállítható [⁶⁸Ga]GaCl₃ oldat radiojelölési reakciókhoz, [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE, [⁶⁸Ga]Ga-DOTANOC, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 és [⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC. ⁴⁴Sc és ⁵²Mn izotópokat jelenleg csak preklinikai és néhány esetben klinikai kísérletek során alkalmaznak.⁸⁸

3.3. Radiojelzési reakciók követésére szolgáló módszerek

Egy radiofarmakon humándiagnosztikai vizsgálatokhoz történő felhasználása minden esetben annak radiokémiai- és radionuklidos tisztaság és a termék specifikációban szereplő paraméterek meghatározása, majd a gyógyszerészeti felszabadítást követően kezdődhet el. Ebből a célból a radiokémiai komponensek szétválasztását és az egymáshoz viszonyított radioaktivitás arányuk meghatározását általában kromatográfiás módszerekkel végzik. A PET izotóppal nyomjelzett vegyületeket a leggyakrabban vékonyréteg-kromatográfiás kifejlesztést követően egy Geiger-Müller kamrával felszerelt szkennerral azonosítják be. A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátorok elterjedése révén az irodalomban főként a ^{68}Ga radiofémre található kromatográfiás módszerfejlesztés. Az Európai Gyógyszerkönyv a ^{68}Ga -mal jelölt radiofarmakonok tisztaságára vonatkozóan két fő radiokémiai szennyező vizsgálatát írja elő a készítményekben, melyekre < 3%-os határértékeket is megad: a hidrolizált ^{68}Ga -ot („kolloid”) és az úgynevezett „szabad” ^{68}Ga izotópot. A szabad ^{68}Ga alatt a ^{68}Ga ionos formáinak teljes halmazát értjük, amelyek nem vettek részt a komplexképződésben vagy nem estek át hidrolízisen. A HPLC nem alkalmas kolloid részecskék kimutatására, mivel az ilyen részecskék a rendszerben való kitapadásuk miatt nem érhetik el a detektort. Így az egyetlen radiokémiai szennyeződés, amely HPLC-vel kimutatható ezeknél a radiofarmakonoknál⁸⁹ az ionos ^{68}Ga . Azonban például Larenkov és munkatársai kimutatták, hogy a HPLC eredmények nem mindig egyeznek meg a TLC-vel kapott eredményekkel.^{90,91} Különböző ^{68}Ga tartalmú radiofarmakonok radiokémiai összetételének vékonyréteg-kromatográfiás (iTLC) vizsgálatára irányuló módszerek kidolgozása során érdekes hatást figyeltek meg. Egyes esetekben a szabad ^{68}Ga meghatározása a mintákban HPLC-vel erősen alul becsült eredményeket adott a TLC-hez képest.

Munkájuk során különböző TLC és HPLC eljárásokkal kapott vizsgálati eredményeket hasonlítottak össze, amely során azt tapasztalták, hogy az ionos ^{68}Ga egy része irreverzibilisen szorbeálódott a C18-as fordított fázisú analitikai kromatográfiás oszlopokon, mértéke elérte a 10%-os kitapadás mennyiségét is. Az általuk alkalmazott kromatográfiás körülmények között (eluensek: (A) 0,1% TFA vizes- és (B) 0,1% TFA acetonitriles oldata, gradiens módszer: 0–10–15 perc, 80–70–80% A) az aktivitás vesztesége a pH értékének növelésével folyamatosan növekedett (3. ábra). A visszanyerés meghatározásához szabad ^{68}Ga mintát és az Európai Gyógyszerkönyv által a $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$ ⁹² minőségellenőrzéséhez referenciamintaként javasolt $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA}$ komplexet alkalmazták izokratikus elválasztás során. Kolonna alkalmazása nélkül a vizsgált minták esetén 1,5%-os hiba mellett az injektált aktivitás teljes mennyiségét visszanyerték, így igazolva a kitapadás elsősorban az alkalmazott kolonnán történik meg.



3. ábra: Az ionos ^{68}Ga kitapadás mértékének pH függése ACE C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm , 100 Å) oszlopon, 0,2 M nátrium-acetát oldatban vizsgálva.

A 3. ábrán látható, hogy az acetát puffer használatakor a fordított fázisú HPLC oszlopon az ionos formájú ^{68}Ga komponensek részleges szorpciója figyelhető meg még kis pH értékek (2,5–3) mellett is. Az oszlopon szorbeált

^{68}Ga százalékos aránya meredeken növekszik a pH növekedésével. A radiofarmakon szintézisében leggyakrabban használt pH 4-nél a kitapadás mennyisége átlagosan 65%, pH 6,0-nál pedig elérte a 87%-ot. Hacht mérési adatai arra utalnak⁹³, hogy alacsony galliumion koncentráció és viszonylag magas acetát koncentráció (0,07–0,2 M) mellett [^{68}Ga]Ga-acetát asszociátumok képződhetnek, amelyek visszatarthatóak az oszlopon. Ebben az esetben logikus azt feltételezni, hogy az ilyen asszociátumok visszatartása csökkenthető, ha acetonitrilt adunk az eluenshez, azonban az ellenkező eredményt kapták, vagyis a kromatográfiás kolonnán mért aktivitásveszteség akkor nőtt, ha acetonitrilt adtunk a HPLC eluenshez. Például az egyik kísérleti sorozatban a veszteség 58% volt acetonitril nélkül, 66% 10% acetonitrilt és 80% 30% acetonitrilt tartalmazó eluens használatával.

A radiofarmakon szintézisekben a másik gyakran alkalmazott puffer a HEPES⁹⁴, amelyet nátrium-acetáttal együtt is használnak. Az acetát pufferes oldatokkal ellentétben a nem koordinálódó HEPES (pH 3–7) tartalmú mintákat a kolloidos ^{68}Ga fokozatos képződése jellemzi, egészen az összes ionos ^{68}Ga teljes hidrolíziséig. Ez a tény megnehezíti a méréseket és az adatfeldolgozást, de ennek ellenére a kísérleti adatok azt mutatják, hogy az acetát puffer alkalmazásakor megfigyelt hatás a HEPES esetében is megfigyelhető.⁹⁰ A szakirodalomban fellelhető kevés forrás tehát azt mutatja, hogy fordított fázisú HPLC oszlopon a ^{68}Ga ionos részecskék jelentős mértékben képesek kitapadni, így az nem biztosítja a szükséges megbízhatóságot a radiofarmakonok analízisében. Ez különösen akkor fontos, ha olyan radiofarmakonokról van szó, amelyeket nem vetnek alá további tisztításnak (például szilárd fázisú extrakcióval). Azonban a TLC-s módszereknek is van számos hátránya (farmakon specifikus futtatószer megtalálása, nem automatizálható, nagyobb sugárterhelés stb.), amelyeket egy jól kidolgozott folyadékkromatográfiás módszer ki tudna küszöbölni.

A bemutatott néhány példától eltekintve általában a radiofémekkel történő jelzési reakciók követésére olyan kromatográfiás elválasztásokat alkalmaznak, amelyek csupán a komplexképzővel konjugált biomolekula visszatartását használják fel a radiokémiai tisztaság meghatározására.⁹⁵ Ezek az eljárások nem alkalmasak az el nem reagált fémionok és a biomolekulához nem konjugált kelátorból képződött komplexek elválasztására, mivel a legtöbb ligandum és képződött komplex poláris, így nincs visszatartásuk az apoláris oszlopon. Munkánk egyik célja ezért is volt olyan HPLC-s módszerek kidolgozása, amelyek lehetővé teszik a szabadon maradt radiofémionok elválasztását a nyomjelzett vegyülettől. A fordított fázisú oszlopok mellett új lehetőséget kínálnak a mixed-mode, vagyis kevert módú állófázisok, amelyek az elválasztandó komponensek számára egynél több kölcsönhatás egyidejű alkalmazását teszik lehetővé.^{96,97} Ezekkel a töltetekkel rendelkező kolonnákkal egy mérés során többféle elúciós módot is választhatunk, mivel anion- és/vagy kationcserélő csoportokat is tartalmaznak a szénláncok mellett, de alkalmazhatóak csak ioncserélő- vagy fordított fázisú módban is. A kevert módú állófázisok képesek a töltéssel rendelkező és poláris vegyületek visszatartását növelni, mellyel összetett minták, különböző tulajdonságú komponensek is elválaszthatóak egymástól. Ha a töltet szemcséi ezen túlmenően mag-héj típusúak, úgy még nagyobb kinetikai hatékonyság érhető el magasabb áramlási sebesség mellett is, miközben a nyomásesés értéke a hagyományos rendszerekkel összemérhető, vagyis az elválasztás jóval gyorsabbá válik.^{98–100}

3.4. Átmenetifémionok származékképző reagensekkel történő meghatározása

A ciklotronnal előállított radioaktív fémizotópok alkalmazásának terjedésével egyre fontosabbá válik a nem radioaktív szennyező fémionok meghatározása, mivel ezek jelentős mértékben csökkenthetik a radioaktív jelölés hatékonyságát. Számos publikáció kiemelte a nyomjelzési reakció előtti radiofém oldat magas kémiai tisztaságának fontosságát, mivel a jelenlévő más fémek kölcsönhatásba léphetnek például a már sokszor említett DOTA kelátorral (vagy bármely más kelátképzővel), ami befolyásolhatja a radiokémiai hozamot. Az Al^{3+} , a Cu^{2+} , a Pb^{2+} , a Zn^{2+} és a Fe^{3+} leggyakrabban előforduló szennyező fémionok. Közülük a legnagyobb nehézséget a Fe^{3+} okozza, amelynél a kialakuló Fe-DOTA komplex stabilitása nagyobb, mint a Sc-DOTA komplex esetében. Ezzel szemben a kétértékű fémionok hatása elhanyagolható a DOTA-kétértékű fémkomplexek alacsonyabb stabilitása miatt. A legtöbb ciklotronnal rendelkező intézetnél nem elérhető saját ICP vagy AAS készülék, a külső laboratóriumok pedig nincsenek felkészülve a radioaktív minták fogadására, így a mérések a radioaktív izotóp teljes lebomlása után történnek meg. Ez viszont egy folyamat optimalizálásához túl lassú, a radiofémoldatok rutin minőségellenőrzéséhez egyszerű és gyors vizsgálatok szükségesek. A szakirodalomban több módszert írtak le, amelyek mindegyike erősen a kiindulási target anyagtól való elválasztáshoz kapcsolódik, például a szkandium kalciumtól történő elválasztására többnyire oldószeres extrakciót javasoltak.⁴⁰ Az úgynevezett cartridge vagy kis méretű oszlopkromatográfiás extrakciós eljárások egyszerűen automatizálhatók és lehetővé teszik a reprodukálható tisztítást. Tekintettel a radiofém előállítások további kutatás-fejlesztésére, a besugárzással, a targetek kezelésével, a kioldásával és a feldolgozásával kapcsolatos technikai kérdések megoldásra

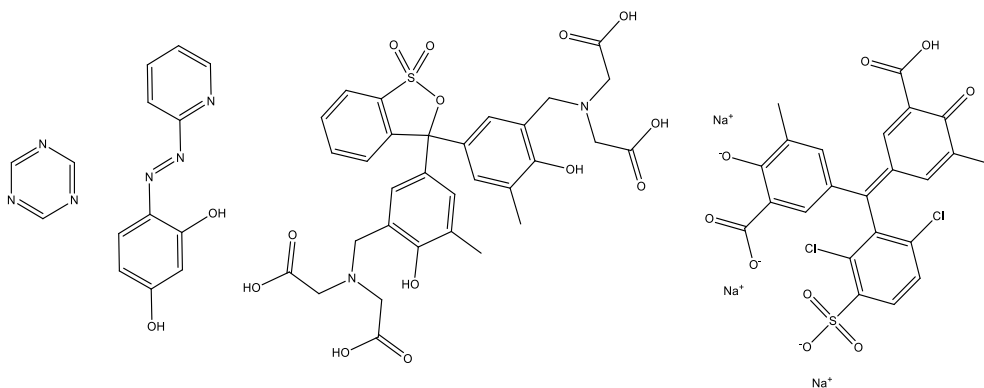
szorulnak. A klinikai vizsgálatokban és a jövőbeli diagnosztikai felhasználásban történő rutinszerű alkalmazáshoz ezeket a lépéseket automatizálni kell a gyártás megkönnyítése, a GMP és a sugárvédelem követelményeinek való megfelelés érdekében.¹⁰¹ A radiofarmakonokra vonatkozó követelmények teljesítése érdekében a kapott radionuklidot tartalmazó oldatnak nagy kémiai tisztaságúnak, kis térfogatban, mérsékelt savas oldatban koncentráltan kell lennie, annak érdekében, hogy elősegítse a hatékony radioaktív jelölést és az azt követő *in vivo* alkalmazást. Azonban a legtöbb esetben a publikációk nem tartalmazzák a kapott szarzsok kémiai tisztaságát.

Függetlenül tehát attól, hogy a radiofémek előállítása ciklotronnal vagy generátorral történik, szükséges meghatározni az átmeneti fémion szennyezőket, melyek később befolyásolhatják a radiojelzési reakciót. Jelenlétük a termelt izotópok kémiai tisztasága miatt is nagyon fontos. A ciklotronnal előállított ^{44}Sc , ^{68}Ga és ^{52}Mn mellett keletkező fémionok mennyiségének csökkentésére számos módszer található az irodalomban. A különböző ioncserélő gyanták anyagi minőségük révén nagy hatással vannak a tisztításra, leginkább a Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} és Zn^{2+} ionok esetében.^{102,103} A tisztított minták átmenetifém tartalmának ICP-OES vagy ICP-MS technikával való meghatározásának nagy előnye az összes fémion egyidejű detektálása alacsony koncentráció (ppm-ppb) tartományban, ugyanis a szennyező fémionoknak a radiojelölési hatékonyságra gyakorolt hatása összeadódik nem szelektív kelátképző esetén (pl. DOTA). Azonban a komplex képződési reakciókban a fémionok nem egyforma mértékben vesznek részt. Oehlke és munkatársai számos fémion hatását hasonlították össze a DOTA és a ^{68}Ga izotóp radioaktív jelölési reakciójában. A leginkább zavaró fémionnak a Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} és Zn^{2+} ionokat találták, hasonlóan a ^{44}Sc izotóppal végzett optimalizációs vizsgálatokhoz.¹⁰⁴ Az atomspektroszkópiai technikák

alkalmazásának fő korlátja, hogy a méréseket jelentős késéssel a külső laboratóriumban kell elvégezni. További jelentős hátrány a nagy mintatérfogat-fogyasztás, a mintainjektálás módjától függően akár több mL mintaoldat is szükséges lehet. A mintának inaktívnak kell lennie a mérés időpontjában, és nem tartalmazhat hosszú élettartamú izotópokat, amelyek felhalmozódhatnak a műszer különböző részein. A ciklotronnal termelt ^{68}Ga esetében az Európai Gyógyszerkönyv GFAAS módszert ír le a Zn^{2+} és Fe^{3+} ionok meghatározására, 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ határértékkel.¹⁰⁵ Mivel a legtöbb PET-központ nem rendelkezik ilyen berendezéssel, az egyik megközelítés az izotópgyártási és -tisztítási folyamat validálása során a radiofém minták jellemző hidegfém-tartalmának meghatározása. Ez elfogadható lehet akkor, ha az előállított radiofém azonnal radiojelzési reakciókra használják fel. De ha a ciklotronnal előállított radiofém nem a felhasználás helyén termelik, akkor az előállított oldat fémion tartalmát meg kell vizsgálni. Minden laboratóriumban számtalan fémforrás található, amelyek különböző pontokon könnyen bejuthatnak a radiofém gyártási folyamatába. A nem szűrt laboratóriumi levegő jelentős mennyiségű fém tartalmú porszemcsét tartalmaz, a púderes gumikesztyűk és a fecskendők gumidugattyúi pedig cinket, valamint nejlón alkatrészeket és erősen pigmentált műanyagokat tartalmaznak, amelyek a fémszennyezők forrásai.¹⁰⁶

A fémtartalom rendszeres ellenőrzése nélkül nehéz azonosítani és elkerülni ezeket a forrásokat. A fémion koncentráció meghatározásához a legtöbb radiokémiai kutatócsoport a házon belüli módszereket részesíti előnyben. A jól ismert atomspektroszkópiai technikák mellett az átmeneti fémek spektrofotometriás vagy kolorimetriás technikákkal, kromatográfiás elválasztással vagy anélkül színes komplexekké alakítással is meghatározhatóak. A komplexképződés a kolonna előtt és után is megtörténhet. Az egyik legszélesebb körben használt komplexképző a 4-(2-

piridilazo)rezorcin (PAR) (4. ábra).^{107,108} Ez a háromfogú ligandum szobahőmérsékleten azonnal színes, vízben oldódó kelátokat képez a legtöbb átmeneti fémionnal. A PAR vizes oldata maga is színes, pH 5,5 értéknél vörös, pH 6-12,5 között narancssárga, 13 felett pedig mélyvörös színű.



4. ábra: Gyakran alkalmazott származékképző reagensek: triazin, 4-(2-piridilazo)-rezorcin, xilenolnarancs, króm azurol S.

Környezeti mintákban a fémionok mennyiségi meghatározására gyakran használják a kolonna utáni származékképzést az ionkromatográfiás elválasztás után. Az átmeneti fémionok (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} és Pb^{2+}) piridin-2,6-dikarbonsavat (PDCA) tartalmazó eluenssel anionos komplexekként választhatók el.^{109–111} Leggyakrabban piridilazo-származékokat (például PAR-t és 5-Br-PADAP-t (2-(5-bróm-2-piridilazo)-5-dietil-amino-fenol)-t) alkalmaznak komplexképzőként. A kolonna utáni származékképző módszerek fő hátránya a kromatográfiás rendszer viszonylagos összetettsége. Két fémmentes HPLC pumpa és egy injektor (automatikus mintavevő) szükséges. A származékképző reagens lassan bomlik levegő hatására, elszennyezve a csatlakozásokat és az UV detektor celláját. A reagenteket emiatt frissen kell elkészíteni, a mérések végeztével pedig a rendszert alapos tisztításnak kell alávetni.^{112–116}

A radiofarmakon minőségellenőrzése során elengedhetetlen, hogy az alkalmazott módszerek és vizsgálatok megbízhatóak és gyorsak legyenek. Ilyen a [^{18}F]FDG rutin minőségellenőrzésében Kryptofix 2.2.2 fázistranszfer katalizátor kimutatására használt színfoltteszt¹¹⁷ is. A szennyező átmenetifémionok szintén meghatározhatóak kolorimetriás vizsgálatokkal, például a xilenol-narancs^{118,119}, a triazin^{120,121} vagy a króm azurol S^{122,123} reagensok alkalmazásával (4. ábra). Az átmeneti fémek kolorimetriás detektálása gyorsan és nagy érzékenységgel végezhető el a ppm-es koncentráció tartományban, mivel a komplexképződés intenzív színváltozással jár együtt.^{124,125}

4. Alkalmazott módszerek és vizsgálati körülmények

4.1. Felhasznált anyagok, vegyszerek

A kísérletek során használt vegyszereket a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország), a HPLC tisztaságú oldószereket a VWR (Debrecen, Magyarország) szállította. Az eluensek és oldatok készítéséhez a nagy tisztaságú (25 °C-on 18,2 MΩ*cm) vizet a Merck (Budapest, Magyarország) által forgalmazott Simplicity víztisztító rendszer által nyertük, míg az ultratiszta sósavat (35%) és az ultratiszta salétromsavat (69%) a Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Németország) cég biztosította. Az ionkromatográfiás vizsgálatoknál használt eluens inert körülményének biztosításához alkalmazott hélium gáz a Linde (Debrecen, Magyarország) cég terméke. A 4-(2-piridilazo)rezorcint (PAR) az Alfa Aesar-tól vásároltuk (Kandel, Németország).

A radiofémek előállításához a kalciumot (99,99%) a Merck Kft-től, az izotóp dúsított ⁶⁸Zn-et (98,60%) a NeonestAB-tól (Stockholm, Svédország), a krómot (99,99%) az Alfa Aesar-tól szereztük be, majd a TrisKem (Bruz, Franciaország) által forgalmazott DGA, Zr és TK200, valamint a Bio-Rad (Budapest, Magyarország) által beszerezhető AG[®] 1-X8 gyantákon tisztítottuk. Tisztaságuk gyors ellenőrzéséhez az Agilent Technologies (Santa Clara, Egyesült Államok) szilikagéllal impregnált üveg mikroszálás vékonyréteg kromatográfiás papírját (iTLC-SG) használtuk. A kromatográfiás módszerfejlesztésekhez alkalmazott DOTA és NOTA kelátorokat a ChemaTech (Dijon, Franciaország) gyártótól vásároltuk, míg a többi ligandumot a Fizikai Kémiai Tanszék Ritka(föld)fém Kutatócsoport munkatársai és hallgatói, valamint Baranyai Zsolt és hallgatói biztosították számunkra.

4.2. [^{44}Sc] Sc^{3+} előállítása ciklotronnal

A [^{44}Sc] Sc^{3+} izotópot GE PETtrace típusú ciklotronnal, saját készítésű target rendszerrel körülbelül 120 mg természetes fém kalcium besugárzásával állítottuk elő $^{44}\text{Ca}(\text{p},\text{n})^{44}\text{Sc}$ magreakció során. Az alumínium targetbe préselt fémet 10-30 μA proton nyalábbal sugároztuk be 10-60 percen át. Az átlagosan 100-500 MBq termelt aktivitású ^{44}Sc -ot tartalmazó targetanyagot 4 mL 3 M u.p. sósavval oldottuk ki, majd 70 mg aktivált DGA gyantán 3 mL 3 M sósavval és 3 mL 1 M salétromsavval tisztítottuk meg. A tisztítási lépések során a szkandium-44-et először a kiindulási kalciumtól, majd a szennyező vas-, cink- és nikkel ionoktól választottuk el. Ezután a gyantáról a tiszta izotópot 1 mL 0,1 M sósavval frakcionáltan eluálva kaptuk meg. A visszanyert aktivitás 75-85%, míg a targeten 1-3 MBq aktivitás maradt vissza.

4.3. [^{68}Ga] Ga^{3+} előállítása ciklotronnal

A [^{68}Ga] Ga^{3+} radiofémét a [^{44}Sc] Sc^{3+} izotóphoz hasonló módon állítottuk elő. 40 mg Zn-68 izotóp dúsított cinkből, 50 μA proton nyalábbal 180 perces besugárzással, $^{68}\text{Zn}(\text{p},\text{n})^{68}\text{Ga}$ reakcióban nyertük a gallium-68-at. 10 mL 5 M u.p. sósavval oldottuk ki a 2-60 GBq aktivitású target anyagot, amit Zr gyantán 10 mL 5 M sósavval mostunk, majd TK400-as gyantán tisztítottuk 5 mL 2 M sósavval. A második gyantáról végül 0,05 M sósavval frakcionáltan eluálva kaptuk a tiszta [^{68}Ga] Ga^{3+} -ot.

4.4. [^{52}Mn] Mn^{2+} előállítása ciklotronnal

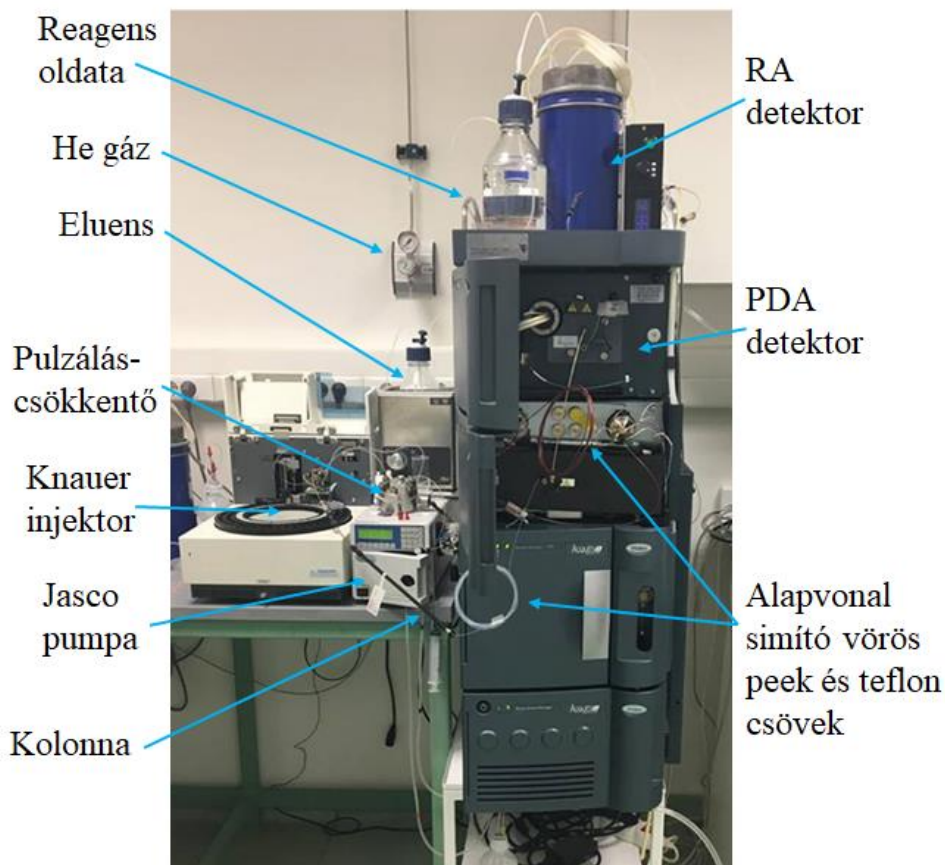
A [^{52}Mn] Mn^{2+} radiofémét 250 mg természetes fém króm, 20 μA proton nyalábbal 60 percen át történő besugárzásával, $^{52}\text{Cr}(\text{p},\text{n})^{52}\text{Mn}$ reakcióban nyertük. 24 óra elteltével 2 mL cc. u.p. sósavval oldottuk ki az átlagosan 150 MBq aktivitású target anyagot, majd az oldatot körülbelül 1,5 mL-re betöményítettük, ekkor szilárd CrCl_3 kiválását figyeltük meg. Az oldatot

elválasztottuk a csapadéktól, 50 mL térfogatra hígítottuk abs. etanollal, majd az 5 mL 3%-os tömény sósav/etanol oldattal előkondicionált AG® 1-X8 extrakciós oszlopra vittük fel (300 mg). Az oszlopot 20 mL 3%-os tömény sósav/etanol oldattal és 0,5 mL 0,1 M u.p. sósav oldattal mostuk le. A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ izotópot tartalmazó oldatot szárazra párlást követően 300 μL cc. HCl-val oldatba vittük és 10 mL-re hígítottuk abs. etanollal. Az eljárást még 2 alkalommal ismételtük meg, de a második alkalommal 200 mg, míg a harmadik alkalommal 100 mg töltetű tisztító oszlopot használtunk. Végül 0,1 M sósavval eluálva kaptuk a tiszta $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ -t.

4.5. HPLC készülékek és vizsgálati körülmények

4.5.1. Kolonna utáni származékképzés

A fémionok folyadékkromatográfiás méréséhez a következő részegységekből összeállított készüléket használtuk: fémmentes Jasco PU-2080i pumpa, Knauer 3800 automatikus mintavevő (műanyag szelep, tű, és 10 μL -es PEEK injektor loop), Hamamatsu Photonics H10493-001 radioaktív detektor és Waters 2487 dual λ abszorbancia detektor. Az általunk épített rendszer az 5. ábrán látható. Az adatok gyűjtését és a kromatogramok kiértékelését Empower 3 szoftverrel végeztük, 530 nm hullámhosszon¹²⁶. Az izokratikus elválasztás időtartama a kolonna utáni származékképző módszernél 15 perc volt. A külső kis nyomású pumpa 0,3 mL/perc áramlási sebességgel szállította az elválasztáshoz szükséges eluenst, ami a következő összetételű volt: 7,0 mM PDCA (piridin-2,6-dikarbonsav), 66 mM kálium-hidroxid, 74 mM hangyasav, 5,6 mM kálium-hidrogén-szulfát. A kolonna utáni származékképző reagenst az UPLC pumpája 0,15 mL/perc áramlási sebességgel szállította.



5. ábra: A csak műanyag egységekből álló ionkromatográfiás rendszer.

A komplexképző oldat, 0,5 mM PAR-t, 1,0 M 2-dimetil-etanol-amint, 0,50 M ammónium-hidroxidot és 0,30 M nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmazott. Az eluensek inert atmoszféra alatt készültek és voltak tárolva. A reagens oldat frissen készítve élénk narancssárga színű, hűtőszekrényben tartva körülbelül egy hétig használható fel. Ezt követően az oldat színe barnulni és sötétedni kezd, szilárd só kiválás mellett. A kromatográfiás elválasztás Dionex IonPac CS5A (2 x 250 mm) típusú ionkromatográfiás oszlopon történt. A módszer során a PDCA tartalmú eluens révén az átmeneti fémionok anionos komplexeik formájában váltak el egymástól. Az alacsony áramlási sebességek miatt a rendszer nyomását 0,1 mm belső átmérőjű PEEK

vezetékkel és egy szűrő kolonna utáni bekötésével növeltük egészen 1400 psi-ig, míg az alapvonali zaj mérséklésére 0,5 mm x 3 m teflon csövet építettünk be. A módszer nem igényelt mintaelőkészítést, a származékképző PAR reagens a kolonna után lett a mintához adva.

4.5.2. Kolonna előtti származékképzés

Kolonna előtti származékképzéshez a fent leírt kromatográfias rendszert használtuk a Jasco pumpa nélkül. A komplexképző reagens már a LiChrospher 100 RP-18 (75 x 4 mm, 5 μ m) kolonnára történő injektálás előtt a mintához lett adva, így csak a kisnyomású pumpára volt szükség, ami a 65% 0,1 M pH 6,5 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ puffer és 35% metanol tartalmú eluenst 0,8 mL/perc áramlási sebességgel áramoltatta. A reagens oldat készítése során 6 mg (2,8 mM) PAR-t 3,5 mL metanolban oldottunk fel, majd ehhez hozzáadtunk 6,5 mL $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ puffer (0,1 M pH 6,5) oldatot. A minta oldatot az injektálás előtt 1:1 arányban kevertük össze az elkészített PAR oldattal. A PAR-fém komplex kialakulását azonnali színváltozás kísérte szobahőmérsékleten.

4.5.3. Kolorimetriás meghatározás

A kolorimetriás reagenseket általában színskálával történő vizuális összehasonlítással értékelik ki. Azonban ehhez nagy térfogatú minta szükséges. A minta igény jelentős csökkentése érdekében a kolorimetriás reagensekkel összekevert minták részleteit kolonna nélkül HPLC-re injektáltuk és detektálásra a készülék UV detektorát használtuk. Eluensként vizet használtunk, a kiértékelés hullámhossza pedig az alkalmazott származékképző és a kialakuló komplex abszorpciós maximumától függően változott.

3. táblázat: Mintaelőkészítési módszerek összefoglalása kolorimetriás fémion meghatározásokhoz.

Reagens	Eredeti módszer*	Saját módszer
PAR	-	Reagens: 6 mg PAR 3,5 mL metanolban és 6,5 mL pufferben** oldva. Minta: 5 µL PAR oldathoz, 1465 µL puffert** és 30 µL meghatározandó mintát adtunk hozzá.
Xilenolnarancs	-	Reagens: 14,3 mg xilenolnarancs 10 mL pufferben** oldva. Minta: 10 µL XO oldathoz, 1460 µL puffert** és 30 µL meghatározandó mintát adtunk hozzá.
Cink teszt (MQuant 1.14412.0001)	5 mL mintát, 4 csepp 1-es reagenst, 1 adagoló-kanálnyi 2-es reagenst és 1 spatulányi 3-as reagenst. 5 perc reakcióidőre állni hagytuk, majd 4 csepp 4-es reagenst adtunk hozzá.	45 µL 1-es reagenst, 53 mg 2-es reagenst, 9 mg 3-as reagenst, 1380 µL puffert** adtunk hozzá 30 µL mintához, 5 perc reakcióidőre állni hagytuk, majd végül 45 µL 4-es reagenst adtunk még hozzá.
Vas teszt (MQuant 1.14403.0001)	20 mL mintához 5 csepp 1-es reagenst adtunk hozzá, majd 3 perc reakcióidőre állni hagytuk.	15 µL reagenst, 1455 µL puffert** és 30 µL mintát mértünk össze, majd 3 perc reakcióidőre állni hagytuk.
Alumínium teszt (MQuant 1.14413.0001)	5 mL mintához 1 spatulányi 1-es reagenst, 1,2 mL 2-es reagenst és 4 csepp 3-as reagenst adtunk hozzá. Végül 7 perc reakcióidőre állni hagytuk.	34,8 mg 1-es reagenshez, 282 µL 2-es reagenst, 1150 µL puffert**, 30 µL mintát és 38 µL 3-as reagenst adtunk hozzá. Végül 7 perc reakcióidőre állni hagytuk.

* Az eredeti módszereket és az alkalmazott 1,2 és 3-as reagenseket a Merck biztosította a kolorimetriás teszttel együtt. ** 1 M ammónium-acetát puffer, pH 6,5.

A kialakuló komplexek azonnali színváltozással jártak, a mintákat az 3. táblázatban szereplő receptek szerint készítettük elő.

4.5.4. Módszerfejlesztéshez használt UPLC készülék és körülményei

A radiofémek és komplexeik elválasztására Waters Acquity UPLC I-Class típusú kromatográfiás rendszert használtunk, amihez eluensszállító egység (BSM), automata mintaadagoló (átfolyó-tűvel és 100 µL-es loop-al), kolonnaváltó, diódasoros detektor és fotoelektron-sokszorozó csővel ellátott szcintillációs radioaktivitás detektor (Hamamatsu Photonics) volt kapcsolva. A kromatogramok kiértékelését Empower 3 szoftverrel végeztük el. A módszerfejlesztésekhez Adsorbosphere XL SCX (Grace, 4,6 x 150 mm, 5 µm), Obelisc N (Sielc, 4,6 x 150 mm, 100 Å, 5 µm), Obelisc R (Sielc, 4,6 x 150 mm, 100 Å, 5 µm), Coresep S (HELIX chromatography, NP-SCX 4.6 x 50 mm, 90 Å, 2,7 µm), Coresep 100 (HELIX chromatography, RP-SCX 4.6 x 50 mm, 90 Å, 2,7 µm) és Kinetex XB-C18 (Phenomenex, 50 x 4,6 mm, 100 Å, 2,6 µm) kevert töltetű oszlopokat alkalmaztunk.

[⁴⁴Sc]Sc³⁺ izotópot tartalmazó minták esetén a végső módszer gradiense során tiszta vízről 2 perc után 1 perc alatt 100% 1,32 M KNO₃ és 0,077 M pH 5,0 oxálsav tartalmú eluensre vált, majd 3 percig izokratikusan tartja azt. A módszer végén a kiinduló összetételre való mosás miatt az elválasztás teljes időtartama 10 perc. A mérések során az áramlási sebesség 1,0 mL/perc, az injektált minta térfogata a radioaktív koncentrációtól függően 5-20 µL volt.

[⁶⁸Ga]Ga³⁺ izotópot tartalmazó minták esetén a végső módszer gradiense során tiszta vízről 1,5 perc után 0,5 perc alatt 100% 1 M pH 4,0 AmAc és 0,01 M pH 3,0 oxálsav 1:1 arányú eluensre vált, majd 2 percig izokratikusan tartja azt. A módszer végén a kiinduló összetételre való mosás miatt az elválasztás teljes időtartama 6 perc. A mérések során 0,6 mL/perc az áramlási sebesség, az injektált minta térfogata a radioaktív koncentrációtól függően 5-10 µL volt. A mikrofluid rendszerrel végzett mérések során a kromatográfiás körülményekben csak az áramlási sebesség volt eltérő, 0,4 mL/perc. A csökkentésére a rendszernyomás megnövekedett értéke miatt volt szükség,

1150 psi volt az átlagos nyomás, ezt nem akartuk jobban megnövelni a műanyag csatlakozások miatt.

[⁵²Mn]Mn²⁺ izotópot tartalmazó minták esetén a végső módszer gradiense során 0,1% hangyasav vizes oldatáról 1 perc után 1 perc alatt 100% 90%-os ACN eluensre vált, majd 1 percig izokratikusan tartja azt. A módszer végén a kiinduló összetételre való mosás miatt az elválasztás teljes időtartama 5 perc. A mérések során 0,8 mL/perc az áramlási sebesség, az injektált minta térfogata a radioaktív koncentrációtól függően 5-10 µL volt.

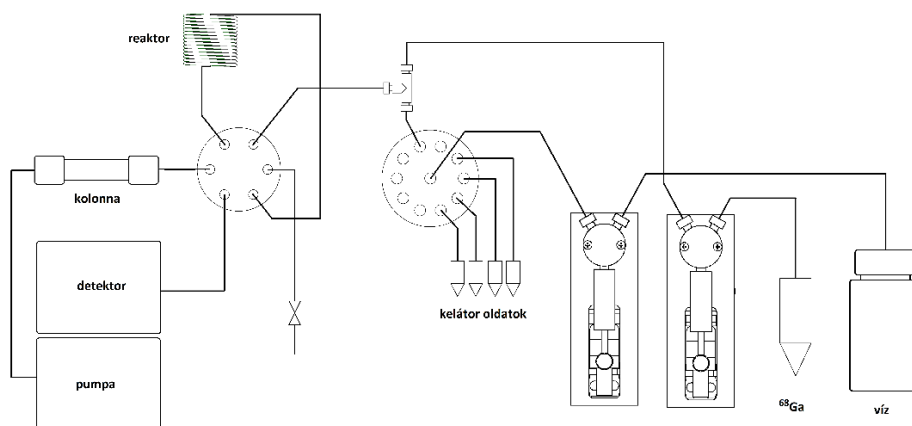
4.5.5. HPLC készülék és körülményei

Az UPLC készüléken kidolgozott módszereket hagyományos HPLC-re való átültetéséhez Waters 2695 Alliance HPLC rendszert használtunk, melyhez Waters 996 PDA- és Atomki gyártmányú RA detektorok voltak kapcsolva. A kromatogramok kiértékelését Empower 3 szoftverrel végeztük el. Az elválasztásokhoz a már bemutatott analitikai kolonnákat és eluens összetételeket alkalmaztuk lassabb gradiens módszerekkel.

4.5.6. Mikrofluid rendszer

A radiojelzési reakciók tanulmányozása során különböző reakciókörülmények (reagensek koncentrációja, pH, hőmérséklet, reakcióidő stb.) hatását vizsgáltuk. A kísérletek során problémát jelent, ha az előre meghatározott reakcióidő letelte után a termékelegy vizsgálatát nem azonnal végezzük el. Vékonyréteg kromatográfiás elválasztás esetén lehetőség van néhány minta (5-10 db) párhuzamos vizsgálatára, azonban a HPLC szekvenciális minta kezelése miatt az egy időben elkészített minták analízisének eredményét meghamisíthatja a reakcióidő és az elválasztás között eltelt időben a reakció esetleges továbbhaladása. Az általunk épített rendszer

(6. ábra) segítségével automatizáltan tudtuk a reagenseket injektálni és a reakcióelegyeket a reakcióidő letelte után azonnal kromatográfiásan vizsgálni.



6. ábra: A mikrofluid rendszer és összekapcsolása az UPLC készülékkel.

A rendszer vezérlésére szolgáló program a LabVIEW 16.0 (National Instrument Corporation) szoftverrel készült. Lehetővé teszi egyszerű szöveges parancsok segítségével a szelepek és a fecskendőpumpák időzített működtetését. A LabVIEW program által küldött parancsokat egy Arduino Uno kártya továbbította I2C buszon keresztül az egyes moduloknak, melyekben egy-egy Arduino Nano kártya vezérelte az adott szelepet vagy fecskendőpumpát. A moduláris felépítés lehetővé tette az alkatrészek eltérő összekapcsolását és egyszerű bővítését is. A kísérleti elrendezés kialakításánál az volt a célunk, hogy lehetővé tegyük a reagensek 1:1 térfogatarányú reprodukálható összeinjektálását egy fűthető kapillárisba, ahol enyhe túlnyomás alatt (max. 2 bar) akár 100 °C hőmérsékletre is fűthettük az elegyet a reakció időtartamára, majd azonnal injektálhattuk az elválasztást végző HPLC-s kolonnára. Ezzel az elrendezéssel egyszerűen vizsgálható volt egy adott reakció időfüggése állandó összetételű reakcióelegyeknél. Ezentúl célunk volt a reakcióelegyek összetételének változtatása is egy sorozaton belül,

ezért egy 10 utas váltószelep beépítésével lehetővé tettük különböző koncentrációjú- vagy pH-jú oldatok összeinjektálását is. A rendszerben a folyadékmozgatást két darab, 1 mL-es üveg fecskendővel felszerelt Cavro XP 3000 fecskendőpumpa végezte. Ezek egy-egy 3 utas váltószeleppel is el voltak látva, vagyis lehetőség volt a fecskendő egyik ágon történő feltöltésére és a másik ágon való ürítésére. Ezt a funkciót úgy használtuk ki, hogy a ^{68}Ga -ot mozgó fecskendőt tele töltöttük 0,1 M sósavas ^{68}Ga oldattal a szívó ágon keresztül, majd 100 μL -es részletekben adagoltuk a radioaktív oldatot a nyomó ágon keresztül. Így 10 reakcióból álló sorozatok végrehajtására volt lehetőség. A másik fecskendő szívó ágára vizet kötöttünk, amellyel a fecskendőt és a hozzá kapcsolódó kapillárisokat alaposan átmosva buborékmentesítettük. A puffertelt kelátor oldatok részleteit nem szívtuk be a fecskendőbe a keresztzennyezés elkerülésére, hanem csak az adott kelátor oldatot kiválasztó tízutas szelep (Valco) és a fecskendő közötti kapillárisba szívtuk fel. A felszívott kelátor oldat és a fecskendőben lévő víz keveredésének elkerülésére a két folyadékot 10 μL -es levegő buborékkal választottuk el. A kapillárisba felszívott kelátor oldat és a fecskendőpumpából érkező ^{68}Ga oldat összeinjektálását egy T-elágazáson keresztül végeztük, amely egy rövid kapillárisal egy HPLC-s injektor szelephez volt kötve. Az injektált folyadék a szelepen keresztül egy 100 μL térfogatú 0,15 mm átmérőjű fűtött loop-ba jutott, amelyet egy 24 V-os fűtőpatronnal ellátott alumínium henger segítségével fűtöttük. A fűtés szabályozását egy REX C200-as PID vezérlő végezte. A loop kivezetése egy hulladéktároló edény felé egy 2-utas Bürkert szelepen keresztül vezetett, amelyet a reakció idejére zárva tartottunk a felmelegedő folyadékban képződő buborékok okozta szivárgás elkerülésére.

A rendszer fölkészítése a reaktor fűtés bekapcsolásából, a fecskendőpumpák átmosásából és feltöltéséből, majd a kelátor oldatok betöltéséből állt. Ezt követően a rendszer automatikusan szívott föl egy

100 μL -es kelátor oldat részletet, majd injektálta össze egy 100 μL -es ^{68}Ga oldat részlettel a HPLC-s injektorszelephez kötött fűtött kapillárisba. A kétszeres térfogatú loop-töltést korábbi kromatográfias tapasztalatok alapján alkalmaztuk, mert ez biztosítja a kapilláris egységes összetételű folyadékkal való feltöltését. A betöltést követően a kapilláris kivezető ágán lévő 2 utas Bürkert szelep elzáródott, meggátolva a folyadék szivárgását. A reakcióidő letelte után a HPLC-s szelep váltott és injektálta a reakcióelegyet a kolonnára. Injektálást követően a következő oldatrészletek összeinjektálása történt, így egy reakcióelegy termékeinek elválasztása közben a következő minta már a fűtött kapillárisban tartózkodott.

A rendszer tehát az UPLC készülék mintaadagolóját, illetve a kézi minta keverést és fűtőblokkban való melegítést váltotta ki, az elválasztás, a detektálás és a kiértékelés már az előzőekben ismertetett módon történt.

4.6. Egyéb készülékek és berendezések

A folyadékkromatográfias módszerfejlesztéshez $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátorból (Eckert-Ziegler, GalliaPharm®, Berlin, Németország) nyertük a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ radionuklidot 0,1 M ultratiszta sósavas elúcióval. Gamma spektrometriás vizsgálatokhoz Canberra típusú HPGe detektort használtunk Genie 2000 (Mirion Technologies, New Jersey, Egyesült Államok) kiértékelő szoftverrel. Az egyes minták radioaktivitásának megmérésére Capintec CRC-15PET (Mirion Technologies, New Jersey, Egyesült Államok) típusú dóziskalibrátort és Packard Cobra gamma számlálót (Perkin Elmer, Llantrisant, Egyesült Királyság) alkalmaztunk. Oldatok és eluensek pH beállításához InLab 413/IP67 kombinált pH elektróddal ellátott Mettler Toledo MP220 (Budapest, Magyarország) típusú pH métert használtunk. A vékonyrétegekromatográfias vizsgálatok kiértékeléséhez Raytest miniGita Star

Radio-TLC szkennert (Beta Detector GMC) és GINA Star TLC (Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, Németország) szoftvert használtunk.

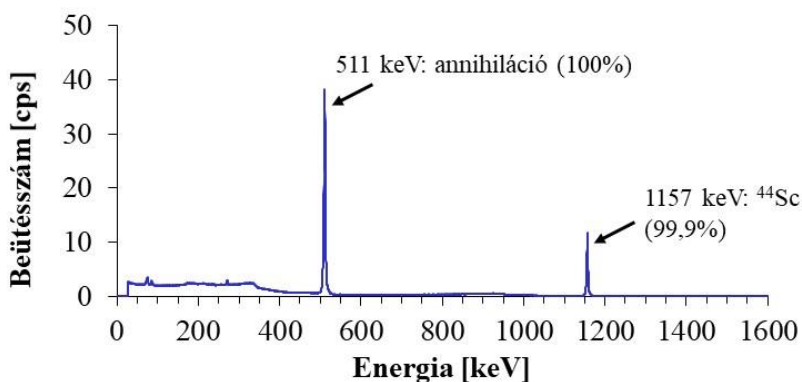
4.7. Radioizotóppal jelölt minták előállítása

Minden esetben 80 μL pufferoldathoz 10 μL -t adtunk a kelátor vizes oldatából, melyhez a 10 μL [^{44}Sc] Sc^{3+} , [^{68}Ga] Ga^{3+} vagy [^{52}Mn] Mn^{2+} izotóp sósavas oldatát adagoltuk ($\sim 0,15\text{-}0,40$ MBq). A radiojelzési reakciókat 1,5 mL térfogatú Eppendorf csövekben, 95 °C-ra termosztált fűtőblokkban, 5-30 perces reakcióidővel végeztük, majd 0,05 M Na_2CO_3 vagy tiszta vizes futtatószerben hívtuk elő a mintával megjelölt iTLC lapokat.

5. Eredmények és értelmezésük

5.1. Radioaktív szennyező fémizotópok meghatározása

A ciklotronnal előállított radionuklidok azonosítása és tisztaságának meghatározása gamma spektrometriás méréssel lehetséges. A radioaktív nuklid gerjesztett állapotából általában egy vagy több gamma-foton kibocsátásával tér vissza az alapállapotába. Az emittált gamma-fotonok energiája és intenzitása adott atommagra jellemző érték, mely lehetővé teszi a pontos azonosításukat (7. ábra) egy nuklid könyvtár⁵⁹ segítségével. A legerjesztődés több útvonalon is végbe mehet, de a folyamatokhoz más-más átmeneti valószínűség tartozik.



7. ábra: [⁴⁴Sc]Sc³⁺ eluátum gamma spektruma.

Munkám során ciklotronnal előállított [⁴⁴Sc]Sc³⁺, [⁶⁸Ga]Ga³⁺ és [⁵²Mn]Mn²⁺ izotópokat vizsgáltam, amelyeknél elengedhetetlen volt a későbbi felhasználás előtt az alapos tisztítás elvégzése. A besugárzás következtében a sugárnyaláb útjában álló fóliákból, illetve magából a target anyagokból a kívánt izotóp mellett szennyezőként radioaktív- és nem radioaktív fémionok keletkezhetnek, rontva annak tisztaságát. A ⁴⁴Sc-ot legegyszerűbben természetes izotópösszetételű (⁴⁰Ca 96,9%, ⁴²Ca 0,65%, ⁴³Ca 0,14%, ⁴⁴Ca 2,09%, ⁴⁶Ca 0,004%, ⁴⁸Ca 0,19%), jó hővezető fém kalcium besugárzásával állítottuk

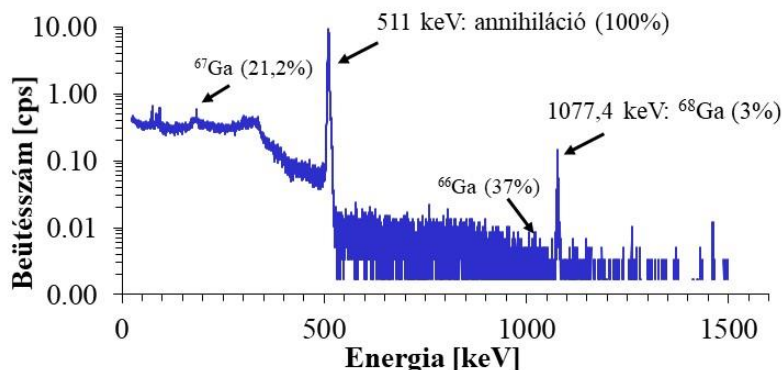
elő, azonban az így kapott ^{44}Sc radionuklidos tisztasága alacsony (^{44}Sc 94,94%, ^{47}Sc 0,52%, ^{48}Sc 1,21%, $^{44\text{m}}\text{Sc}$ 0,83%, ^{43}Sc 2,50%).¹²⁷ Magasabb radionuklidos tisztaságú szkandium előállításához izotópdúsított $^{44}\text{CaCO}_3$ besugárzását végeztük el, melyhez a hővezetőképesség javítására magnézium port kevertünk.

A 4. táblázatban látható, hogy a tisztítási folyamat előtt számos szennyező radionuklidot tartalmazott a minta, majd a $[\text{}^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ átlagos radionuklidos tisztaságát 90,43%-ról 98,94%-ra jelentősen növelte az extrakciós gyantán végzett sósavas és salétromsavas tisztítás. Az előállítani kívánt radionuklidot saját izotópjaitól nem lehet elválasztani, azok aránya kémiai elválasztási lépésekkel nem befolyásolható.

4. táblázat: $[\text{}^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ minta radiokémiai tisztasága tisztítás előtt és után.

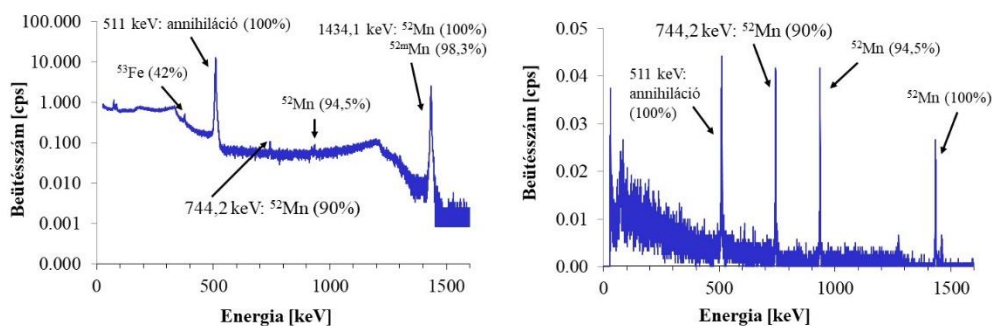
	Radionuklidos tisztaság (%) tisztítás előtt	Radionuklidos tisztaság (%) tisztítás után
^{44}Sc	90,43	98,94
^{47}Sc	5,90	0,08
	9,57	0,98
egyéb radionuklidok	^{43}Sc , ^{48}Sc , ^{22}Na , ^{24}Na , $^{44\text{m}}\text{Sc}$, ^{56}Co	^{43}Sc , ^{48}Sc , $^{44\text{m}}\text{Sc}$

A $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ pozitronbomló izotóppal is hasonlóan jártunk el minden előállítás során. A 8. ábra mutatja, hogy a tisztított mintában nagyon kis százalékbán a gallium saját izotópjai fordultak elő. A ^{68}Ga radiofémre jellemző 1077,4 keV energiájú csúcs ugyan csak 3% emittálási hatásfokkal rendelkezik, azonban nagy aktivitású minta esetén jól látható a spektrumban. Az átlagos mintaösszetétel a következőnek adódott: 99,97% ^{68}Ga , 0,018% ^{67}Ga és 0,012% ^{66}Ga , minden egyéb szennyező a tisztításnál használt aktivált gyantával töltött oszlopokon áttört oldatban jelent meg.



8. ábra: Ciklotronnal előállított $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ minta gamma spektruma, megadva az emittálási valószínűséget az egyes energia csúcsokhoz.

$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ esetén a felaktivált target korong gamma spektruma alapján a besugárzást követően a minta csak nagyon kis százalékban tartalmazta a kívánt izotópot. Az átlagos mintaösszetétel ekkor 4,09% ^{53}Fe , 1,02% ^{52}Mn és 94,89% $^{52\text{m}}\text{Mn}$ volt. Szerencsére a szennyező radionuklidok rövid felezési idejüknek köszönhetően (mely a ^{53}Fe esetén 8,5 perc, míg a $^{52\text{m}}\text{Mn}$ -nak 21,1 perc) másnapra elbomlanak és 100%-ban csak az előállítani szándékozott 5,59 nap felezési idejű $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ radiofémeket kaptuk. A 9. ábrán látható a besugárzást 1,17 órával követően mért gamma spektrum és a 20 órával később kapott radioaktív szennyezőktől mentes eredmény. Emiatt a felhasználás előtt minden esetben egy napot állni hagytuk a besugarazott target anyagot.



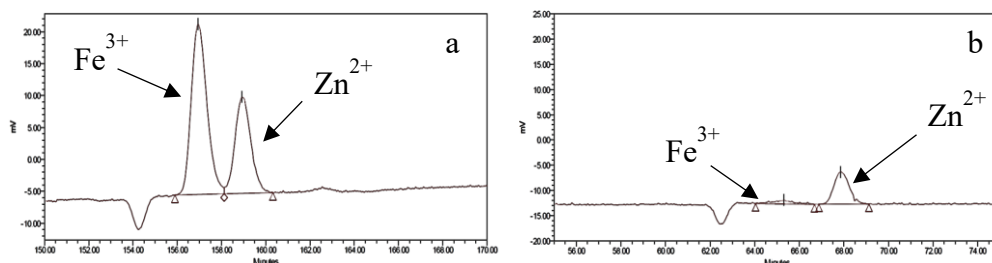
9. ábra: $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ minta gamma spektrumai a besugárzást követően 1 és 20 órával.

5.2. *Nem radioaktív szennyező fémionok meghatározása*

A nem kívánt radioaktív izotópok mellett nem radioaktív, többségében átmenetifémion szennyezők is előfordulnak. Jelenlétük miatt a későbbi felhasználás során csökkenhet a jelzés hatásfoka, hiszen ezek a fémionok kompetícióban vannak a komplexképző koordinációs helyeiért. A radiojelzéseket ppm-es koncentráció tartományban is zavarhatják, meghatározásukra az ICP-MS/ICP-OES technikák lennének a legalkalmasabbak, azonban az ilyen berendezésekkel rendelkező laboratóriumok általában nem tudnak radioaktív mintákat mérni. Az inaktív fémionok ICP készülék nélküli meghatározására több módszert is kidolgoztunk 4-(2-piridilazo)-rezorcin és xilenolnarancs származékképző reagensek alkalmazásával.

5.2.1. *Kolonna utáni származékképzés*

Az átmeneti fémionokat Dionex IonPac CS5A oszlopon választottuk el. A PAR reagens oldatát a kolonnán történő elválasztás után kevertük az eluenshez, ami UV-aktív komplexet képez a fémionokkal. A ciklotron által előállított [^{44}Sc] Sc^{3+} fő szennyezőjének tekintett két fémiont, a Fe^{3+} és Zn^{2+} ionokat alapvonalon választottuk el egymástól (10. ábra). A kiértékelés során 0,5 ppm Fe^{3+} és Zn^{2+} standard oldatok mérésével kapott csúcs alatti területekhez viszonyítva számoltam ki az ismeretlen minták fémion koncentrációit.



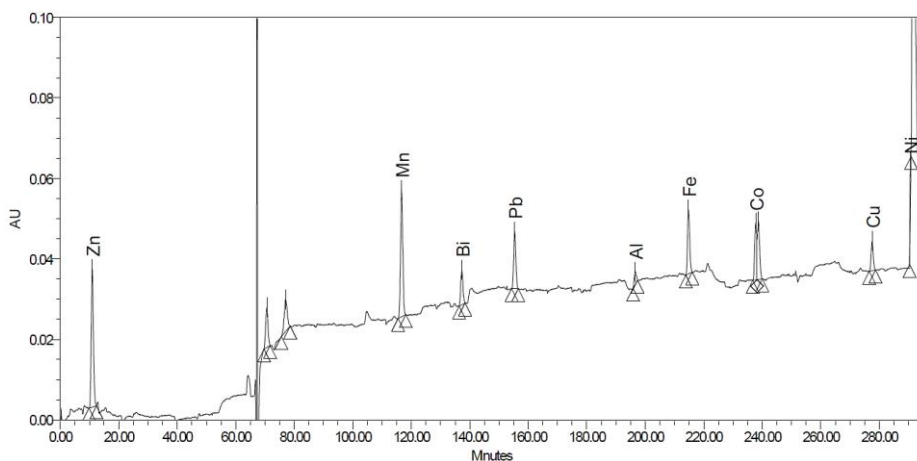
10. ábra: Dionex IonPac CS5A kolonnán történő elválasztás PDCA eluenssel.
a) Salétromsavas mosás előtti és b) megtisztított eluátum kromatogramja.

A jelenlévő Zn^{2+} -ionok 0,16 ppm-ig, míg a Fe^{3+} -ionok 0,26 ppm-ig határozhatók meg a módszerrel. A két említett átmenetifém mellett a Cu^{2+} ionok is erős versenytársak a DOTA kelátor jelölési reakciókban¹⁰⁴, azonban a módszerrel nem tudtuk elválasztani a Zn^{2+} ionoktól, de mindkét fémion jelenléte kizárható, ha 8-9 perc között nem detektálható csúcs. Számos átmenetifémion kimutatható alacsony LOQ értékekkel (5. táblázat).

5. táblázat: Meghatározási határértékek a vizsgált fémionokra.

Fémionok	LOQ (ppm)	t _R (perc)	c (ppm)	Rs
Bi ³⁺	8,85	5,32	1,0	-
Fe ³⁺	0,26	6,56	0,5	0,89
Zn ²⁺	0,16	8,52	0,5	1,43
Cu ²⁺	0,13	8,87	0,3	0,26
Ni ²⁺	1,39	9,48	1,0	0,80
Al ³⁺	1,17	9,69	1,0	0,25
Pb ²⁺	0,31	9,75	1,0	0,04
Co ²⁺	0,13	9,96	1,0	0,15
Cd ²⁺	0,33	10,41	0,3	0,33
Mn ²⁺	0,10	17,57	1,0	5,17

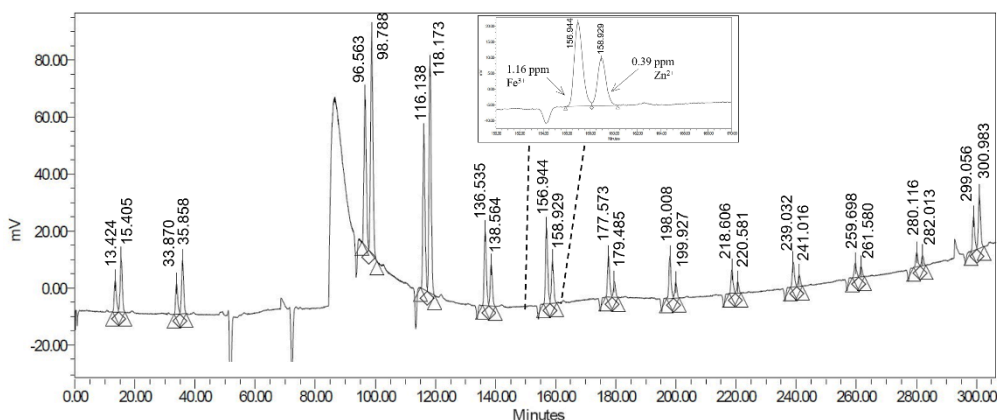
Az alapvonal hosszú távú megfigyelése (11. ábra) azonban jelentős zajt mutatott, amely a rendszer alapos ekvilibrálásával csökkenthető volt, de teljesen megszüntetni nem lehetett. Így a retenciós időkben mutatkozó kis különbségek az alapvonal instabilitásával együtt nem tették lehetővé minden esetben az egyes csúcsok egyértelmű azonosítását, azonban a csúcsok hiánya jól jelezte a minta tisztaságát.



11. ábra: Átmeneti fémionok elválasztása kolonna utáni származékképzéssel.

A módszerrel elfogadható, $R_s=1,43$ felbontás értéket kaptunk a Fe^{3+} és Zn^{2+} ionokra nézve (12. ábra), de más, potenciálisan zavaró fémionok

(pl. Cu^{2+} , Al^{3+}) esetében az elválasztás nem volt megfelelő. A besugárzást követően a $^{44}\text{Sc}\text{Sc}^{3+}$ minták átlagos Fe^{3+} tartalma 0,61 ppm, míg átlagos Zn^{2+} tartalma 1,40 ppm volt. Az alapos sósavas és salétromsavas tisztítást követően mennyiségük jelentősen lecsökkent, Fe^{3+} esetében átlagosan 0,05 ppm, míg Zn^{2+} ionokra nézve 0,09 ppm fémionkoncentrációt detektáltunk. Az eljárás képes volt igazolni a radiofém minták alacsony átmeneti fémion tartalmát, de nem tette lehetővé a pontos mennyiségi meghatározást nagyon alacsony koncentrációknál.



12. ábra: $^{44}\text{Sc}\text{Sc}^{3+}$ eluátumok vizsgálata.

A módszer jól alkalmazható előre összegyűjtött nagyobb számú minta mérésére, azonban a rendszer előkészítése hosszadalmas és a szokásosnál összetettebb. A folyadékkromatográfias rendszer a kis áramlási sebesség miatt kialakuló alacsony nyomása miatt érzékeny a nyomásingadozásokra, hosszan tartó egyensúly ellenére gyakran jelentős alapvonal eltolódás és stabilitási problémák tapasztalhatóak. Az eluens- és a reagens is oxigén érzékeny, így elkészítésük és tárolásuk is inert körülményt igényelt, ehhez hélium gázt alkalmaztunk. Eredményeink alapján ennek a módszernek az alkalmazása a rövid felezési idejű izotópok rutin minőségellenőrzésére nem javasolt, de jól használható a tisztítási eljárások fejlesztése során.

5.2.2. Kolonna előtti származékképzés

Az oszlop utáni származékképzés során tapasztalt nehézségek elkerülése érdekében a minták vizsgálatához kolonna előtti komplexképzőt alkalmazó módszert fejlesztettünk. A minta injektálása előtt ugyanazt a származékképzési reakciót alkalmaztuk, mint az előzőekben leírt módszer esetében. Célunk a legfőbb szennyező fémionok, mint Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} és Zn^{2+} meghatározása volt. A felsorolt átmenetifémionok közül az első három esetében a kialakult fémion-PAR komplexeket fordított fázisú oszlopon (LiChrospher 100 RP-18) foszfát puffer-metanol tartalmú eluenssel választottuk el egymástól (6. táblázat).

6. táblázat: Átmenetifémionok meghatározása kolonna előtti származékképzéssel.

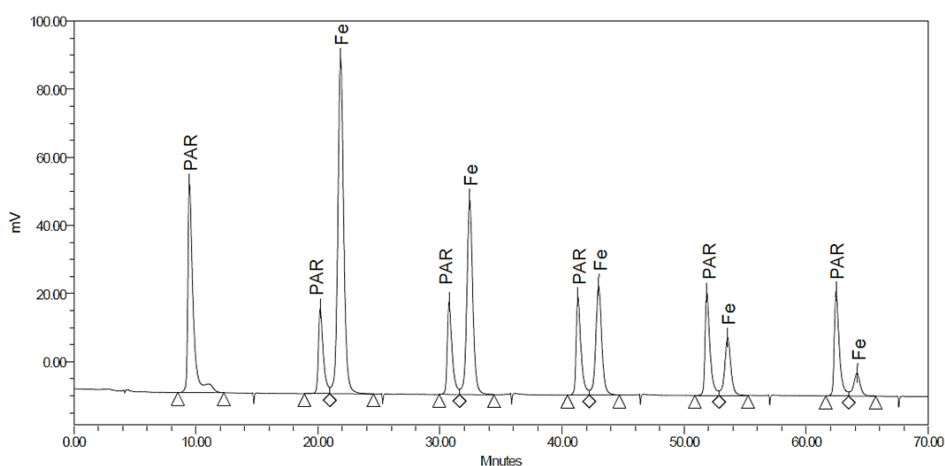
Komponens	LOQ (ppm)	t_R (perc)	c (ppm)	R_s
Co^{2+}	0,004	4,14	4,91	-
PAR	-	7,19	-	6,54
Fe^{3+}	0,1	8,12	3,3	1,33
Cu^{2+}	22,33	9,50	52,96	1,78

Mivel Fe^{3+} ion folyadékkromatográfias módszerrel való meghatározása jó egyezést mutatott az ICP készülékkel meghatározott eredményekhez képest (7. táblázat), így a nemzetközi irányelvek alapján történő validálását is elvégeztük csak PAR és Fe^{3+} -ionokat tartalmazó minta használatával.

7. táblázat: Radioaktív minták Fe^{3+} tartalmára kapott eredmények összehasonlítása ICP-vel és oszlop előtti származékképzéssel.

Minták	$c(\text{Fe}^{3+})$ ppm	
	ICP	HPLC
07.02	0,39	0,41
07.01/2	0,41	0,30
07.01/1	0,39	0,24

A feleslegben maradt PAR reagens 6,1 perc retenciós idővel eluálódott, míg az őt követő Fe^{2+} -PAR komplex 7,8 perces retenciós ideje révén a két csúcs alapvonalon történő elválasztásával a felbontás $R_s=3,09$ -nek adódott 530 nm hullámhosszon történő detektálással. A 13. ábrán látható linearitás vizsgálatra kapott $R^2=0,9981$ 0,5-10 ppm koncentrációtartományban. A módszer LOD és LOQ értékét a zaj ($32 \mu\text{V}$) 3,3 és 10-szeresének vett értékéből számoltuk a csúcsmagasság-koncentráció linearitás vizsgálatnál kapott egyenletet alkalmazva.



13. ábra: Linearitás vizsgálat kromatogramja.

A robusztusság meghatározása során a két csúcs közötti felbontás értékeket vizsgáltuk 0,6 – 0,8 – 1,0 mL/perc eluens áramlási sebesség mellett. A módszer validálási eredményeit a 8. táblázat foglalja össze, amelyben látható, hogy minden vizsgált paraméter megfelelt a követelményeknek.

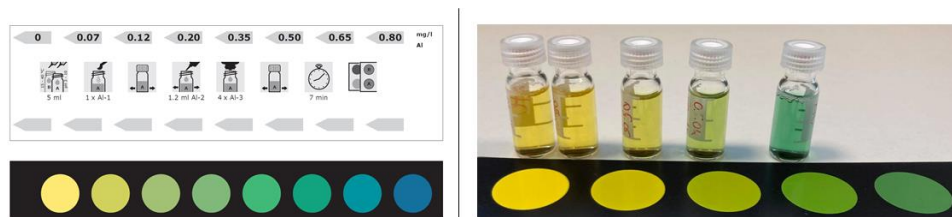
Azonban ezzel a módszerrel a ciklotronnal előállított ^{68}Ga másik fontos vizsgálandó nem radioaktív szennyező fémionját nem sikerült detektálni. A Zn^{2+} -ion azonnal szilárd csapadékot képez a PAR reagenssel, így folyadékkromatográfián nem vizsgálható.

8. táblázat: Validálási eredmények összefoglalása.

Validálási paraméterek	Eredmények	Követelmények
Specifikusság	3,09	>1,5
Szelektivitás	3,09	>1,5
Precizitás	0,25 - 0,47%	<5%
LOD	0,03	<10 ppm
LOQ	0,1	<10 ppm
Linearitás (csúcsterület)	0,9981	>0,99
Linearitás (csúcsmagasság)	0,9974	>0,99
Tartomány	0,5 - 10,0 ppm	<10 ppm
Robusztusság	2,42 - 3,09	>1,5

5.2.3. Kolorimetriás fémmeghatározás

A fémionok még könnyebb és gyorsabb kimutatása érdekében színreakción alapuló gyorsesztet fejlesztettünk ki, ezzel is rövidítve az előállított radiofémek minőségellenőrzésének idejét. A kis mennyiségű átmenetifém-ionok (Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+}) jelenlétét kereskedelmi forgalomban kapható kolorimetriás tesztekkel is vizsgáltuk. Ezek a vizsgálatok egy fém-festék komplex szelektív kialakulásán alapulnak. Az egyes fémreagensek zavaró fémionok jelenlétében való használatát az teszi lehetővé, hogy különböző maszkírozó reagenseket is tartalmaznak, melyek színtelen komplexeket képeznek a zavaró ionokkal, így növelik a szelektivitást. A kereskedelembe kapható kolorimetriás tesztek fő hátránya, hogy nagy térfogatú mintát igényelnek, amit radioaktív minták vizsgálatakor csökkenteni kell. Az eredeti színösszehasonlítási módszer nem teszi lehetővé a vizsgált oldat térfogatának csökkentését az érzékenység romlása nélkül. A 14. ábra bal oldalán példaként látható az eredeti mennyiségeket használó Al^{3+} -ion kimutatására szolgáló receptúra és hozzá a színkártya, míg a kép jobb oldalán a már általunk csökkentett térfogatú kalibráló minták, melyeket a színskála mellé helyezve a megfelelő koncentrációt jelölő színhez rendeltünk.



14. ábra: MQuant 1.14413.0001 alumínium teszt eredeti módszere és az általunk csökkentett térfogatú minták színegyezése a megadott skálával.

Ezt a kolorimetriás módszer vizuális kiértékeléséről műszeresre történő megváltoztatásával lehet kiküszöbölni, például UV-VIS detektálással. Így csökkentettük a minta- és reagenstérfogatot (3. táblázat), majd a mintákat a HPLC-UV detektorba injektáltuk kolonna jelenléte nélkül. A bemutatott Al^{3+} -ion jelenlétét kimutató teszt hátránya azonban a több maszkírozó reagens alkalmazása miatti időigény mellett, hogy az oldat kialakuló színe pár percig tartós csupán, utána elszíntelenedik, emiatt nem lehet több mintát egyszerre előkészíteni a méréshez. Az alumínium mellett a cink-teszt is hasonlóan összetett, ezért próbáltuk egyszerűsíteni a fémionok kimutatására szánt módszert. A radioaktív minták fémtartalmának meghatározására a kereskedelmi forgalomban elérhető kolorimetriás tesztek mellett PAR- és xilenolnarancs reagensek elválasztás nélküli használatát is vizsgáltuk. A PAR és a kialakuló fémkomplex oldatbeli színe erősen pH függő, így fontos volt a megfelelő töménységű puffer alkalmazása. Ebből a célból 1 M pH 6,5 AmAc puffert alkalmaztunk, ami a ciklotronnal előállított 2 M-os sósavban lévő ^{68}Ga mintákat is a megfelelő pH tartományban tartotta. Ezt Duotest típusú pH 1-12 tartományú, egész pH érték szerint skálázott indikátorpapírral ellenőriztük. A kromatográfiás módszereknél alkalmazott 2,8 mM kiindulási töménységű PAR erős narancssárga színű, melyhez ismert koncentrációjú fémiont adva nehezen látható a kialakuló komplex színe. A törzsoldat hígításával viszont már a szinte színtelen/ halvány sárga színű oldatban könnyen látható volt a megjelenő rózsaszín színváltozás. A megfelelő összetétel megtalálásához

(9. táblázat) a kiindulási 2,8 mM koncentrációjú PAR törzsoldatból 100 μL térfogatot hígítottam 1380 μL puffer oldattal, majd 10 μL 100 ppm koncentrációjú Fe^{3+} referenciaoldatot adtam hozzá. Vizsgáltuk a legkisebb kimutatható vas ion koncentrációt, a már meghatározott lehető legkevesebb oldatban jelenlévő PAR mellett. UV detektorral meghatároztuk, hogy a kelátképzőhöz képest 2 ekvivalens Fe^{3+} -ionnál már telítésbe hajlott a komplexképződés 490 nm-en, 10 ppm Fe^{3+} koncentrációig (15. ábra).

9. táblázat: A megfelelő koncentrációjú PAR oldat meghatározása.

PAR (μM)	186,67	18,67	9,33	7,47	5,60	3,73	1,87
Fe (ppm)	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67



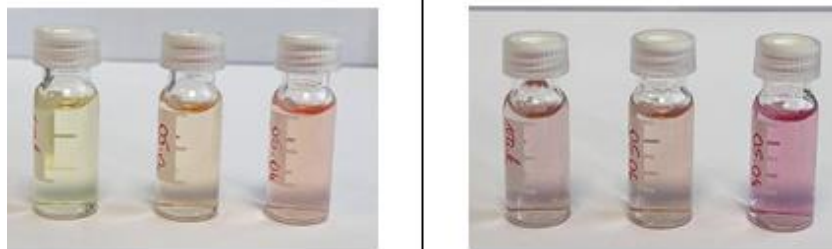
A kalibrációs görbe lineárisnak mondható ($R^2=0,9993$). Az LOQ Fe^{3+} -ion esetében fotometriás detektálással 0,21 ppm volt, illetve szabad szemmel is ez a koncentráció volt az, amelyet még jól lehetett látni.



15. ábra: A mintaoldatok a következők voltak: 1) 0,6 ppm Fe^{3+} oldat PAR nélkül – szintelen. 2) csak PAR oldat. Komplexek: 3-4) 0,001 – 0,01 ppm – halvány sárga. 5-8) 0,02 – 0,08 ppm – halvány narancs. 9-11) 0,2 – 0,6 ppm – rózsaszín.

Zn^{2+} ionok meghatározására xilenolnarancsot alkalmaztunk, ami 0,01 M HCl-oldatot tartalmazó mintákban (LOQ: 0,61 ppm, $R^2=0,9996$) sikeres volt

(16. ábra), azonban nagy sósavkoncentráció esetén (2–5 M HCl) nem kaptunk megfelelő eredményt. Annak ellenére, hogy a mintákat nagy feleslegben pufferrel semlegesítettük, a xilenolnarancs spektruma eltolódott, ami az abszorbancia csökkenését okozta a vizsgált hullámhosszon, ami valószínűleg a klorid-anionok jelenlétének köszönhető. Emiatt a módszer használata csak kis HCl koncentrációjú mintákra korlátozódott, így a tisztított $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ minták maradék Zn^{2+} -tartalmának vizsgálatára is használható, de a tisztítási folyamat közbeni mintáinak ellenőrzésére nem alkalmazható. Hasonló zavart tapasztaltunk a mintában lévő egyéb átmenetifém-ionok (Fe^{3+} , Cu^{2+}) jelenlétében 1 ppm-nél nagyobb koncentrációban. Ezt is figyelembe kellett venni, amikor xilenolnarancsot akartunk használni Zn^{2+} ionok meghatározásához. Ennek megfelelően a Fe^{3+} - és egyéb zavaró átmenetifém-ionok jelenlétének kizárására először a PAR tesztet (oszlop előtti származékképzés vagy kolorimetriás meghatározás) kellett alkalmazni, majd ezt követte a xilenolnarancs teszt a radioaktív minták Zn^{2+} -tartalmának meghatározására.



16. ábra: A baloldali képen a PAR oldat 0, 5 és 10 ppm Fe^{3+} okozta színváltozásai, míg a jobboldali képen a xilenolnarancs oldat színváltozása 0, 5 és 10 ppm Zn^{2+} hatására.

A vizsgált kolorimetriás reagensek (10. táblázat) kis ppm tartományban használhatóak fémionok meghatározására, de eredményeink alapján a tisztított $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ oldatok tipikus Fe^{3+} - és Zn^{2+} tartalma az LOQ érték alatt volt,

köszönhetően az ultratiszta vegyszerek alkalmazásának és az alapos tisztítási lépéseknek.

10. táblázat: A vizsgált módszerek összehasonlítása.

Reagensok	Módszerek	Vizsgált fémionok	Tartomány (ppm)	LOQ (ppm)	Zavaró fémionok
PAR	kolonna-utáni származékképzés	Fe ³⁺	0,5 – 1,0	0,08	-
	kolonna-előtti származékképzés	Fe ³⁺	1,95 – 10,0	0,10	-
Triazin származék (Merck)	kolorimetria	Fe ³⁺	1,50 – 11,0	0,21	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Ga ³⁺ , Bi ³⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺
	kolorimetria	Fe ³⁺	1,50 – 13,0	0,62	Co ²⁺ , Cr ³⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺
Xilenolarancs	kolorimetria	Zn ²⁺	1,50 – 20,0	0,61	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ³⁺ , Co ²⁺ , Al ³⁺
Tiocianát (Merck)	kolorimetria	Zn ²⁺	1,0 – 20,0	0,20	Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺ ,
Króm azurol S (Merck)	kolorimetria	Al ³⁺	–	0,04	Ag ⁺ , Co ²⁺ , Cr ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Zn ²⁺

5.3. Folyadékkromatográfiás módszerek kidolgozása

A ciklotronnal előállított, radioaktív- és inaktív fémionszennyezőktől megtisztított $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ radiojelzési reakcióinak követésére folyadékkromatográfiás módszer kidolgozása volt a munkánk következő célkitűzése, mivel az irodalomban alig található példa a szabad fémionok és a belőlük képződő komplexek elválasztására. Gyakoribb a vékonyréteg kromatográfia alkalmazása, amely gyorsasága és egyszerűsége miatt közkedvelt, azonban a megfelelő elválasztási körülmények megtalálása sokszor nehézkes a kereskedelemben elérhető kromatográfiás állófázisok (ITLC-SG, Kieselgel és kromatográfiás papírok) és eluensek (só- vagy puffer oldatok) korlátozott szelektivitása miatt. A vékonyréteg kromatográfiás eljárások hátránya, hogy nem automatizálhatóak és a mérések reprodukálhatósága alacsonyabb így összehasonlító méréssorozatok végrehajtására kevésbé alkalmas.

Általánosan alkalmazható folyadékkromatográfiás módszereket dolgoztunk ki különféle ioncserélő-, fordított fázisú- és kevert típusú állófázisra (Adsorbosphere XL SCX, Obelisc R és N, Coresep S és 100, Kinetex XB-C18) radioaktivitás detektorral kapcsolt Waters Acquity UPLC I-Class rendszeren, amelyek lehetővé teszik a fémizotópokkal jelölt szabad és biomolekuláris konjugált kelátképzők kimutatását. A módszerfejlesztések során minden esetben DOTA kelátképzőt használtuk modellvegyületként az előállított fémizotópok tisztaságának és reaktivitásának összehasonlítására, a reakcióelegyeket analitikai oszlopokra injektáltuk a radiokémiai hozam meghatározására.

5.3.1. HPLC módszer fejlesztése [^{44}Sc] Sc^{3+} radiojelzési reakcióinak követésére

A módszerfejlesztést a hosszabb felezési idejű [^{44}Sc] Sc^{3+} nukliddal ($t_{1/2}=3,97$ óra) Adsorbosphere oszlopon kezdtük el egy, a kutatócsoportban már használt gradiens módszer alkalmazásával (11. táblázat).

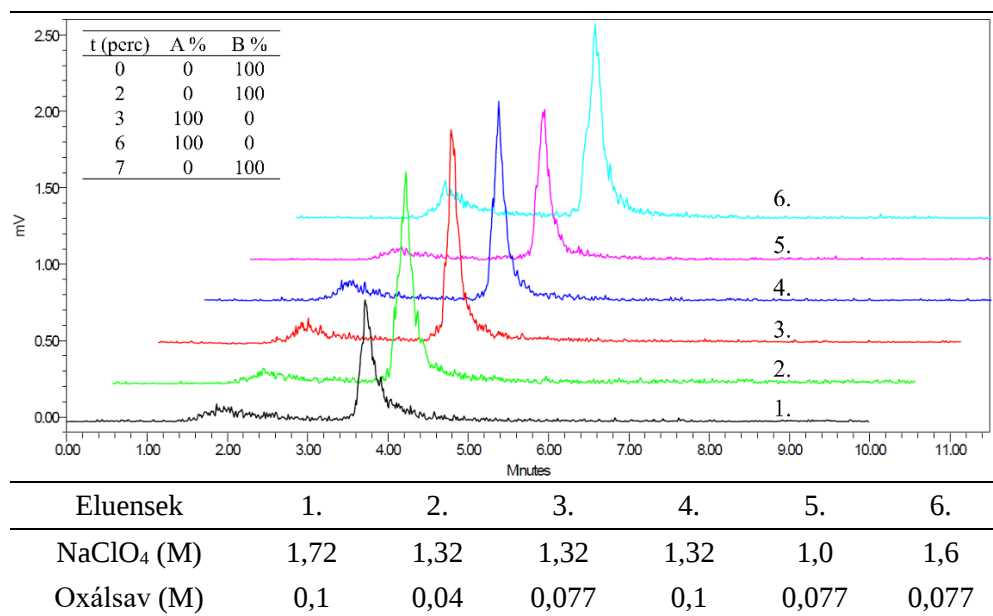
11. táblázat: Eredeti módszer gradiens programja.

t (perc)	A %	B %	A: 1,72 M NaClO_4 , 0,1 M Oxálsav
0	0	100	B: víz
4	0	100	$\lambda = 254 \text{ nm}$
6	1	99	áramlási sebesség: 1 mL/perc
7	100	0	
12	100	0	$t_0(\text{perc}, \text{KNO}_3): 1,243$
14	0	100	$t_R(\text{perc}): 7,714$

Az általunk használt szabad radiofémek hard jellegűek, így figyelembe kellett venni a felületi adszorpciójukat, ugyanis jelentős mennyiségű radiofémion és így vele együtt radioaktivitás képes kitapadni a kapillárisok falára, kolonnákra, ami meghamisíthatja a mérési eredményeket. Emiatt minden esetben külön kísérletben vizsgáltuk az adott fémion kitapadásának mértékét a kromatográfiás rendszeren. Bizonyos esetekben nem is eluálódott le a kolonnáról a fölinjektált aktivitás. Eluensként ezért mindig valamilyen sav- és sóoldat elegyét alkalmaztuk. Ez általában hangyasav vagy oxálsav, illetve nátrium-perklorát vagy ammónium-acetát volt. Az oxálsav jelenlétében keletkező oxalát komplexek kitapadása sokkal kisebb mértékű volt. Jelen módszerrel azonban a rendszer nyomásesése meghaladta a 10.000 psi értéket, valamint a túl tömény oldat használata miatt másnapra sókiválás jelentkezett. Így a mozgófázis összetételét szükséges volt hígítani, illetve a további mérések során nem alkalmaztuk a PDA detektort, óvva az esetleges kiválások okozta

meghibásodásoktól. Ezt azért is tehattuk meg, mert radioaktív minták vizsgálatakor jellemzően nem is detektálunk csúcsot az UV kromatogramon, így nem jelentett problémát csak az RA detektor használata.

12. táblázat: A mozgófázis összetétel hatásának vizsgálata a szabad $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ kolonnáról történő elúciójára.



A 12. táblázat tartalmazza a vizsgált eluens összetételeket. A kromatogramon látható, hogy a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ retenció ideje minden esetben átlagosan 3,677 percnek adódott, míg az első, kiszélesedett csúcs 1,843 percnél eluálódott az oszlopról. A kiindulási gradiens módszerhez képest az elért kisebb retenciókat az ábrán feltüntetett gyorsított eljárás révén kaptuk. A só- vagy savkoncentráció nem volt jelentős hatással a csúcshélesség értékekre sem, így a 3. eluens összetétellel, mint a vizsgált tartományok közbeső NaClO₄ és oxálsav koncentrációkat tartalmazó mozgófázissal haladtunk tovább. A kromatogramokon rendre jelentkező első csúcs a nyers $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ minta szennyezője, vagy kolloid formája, ugyanis a frakcionált tisztítást követően nem jelentkezett a mérések során. Vizsgáltuk a kolonnán és a

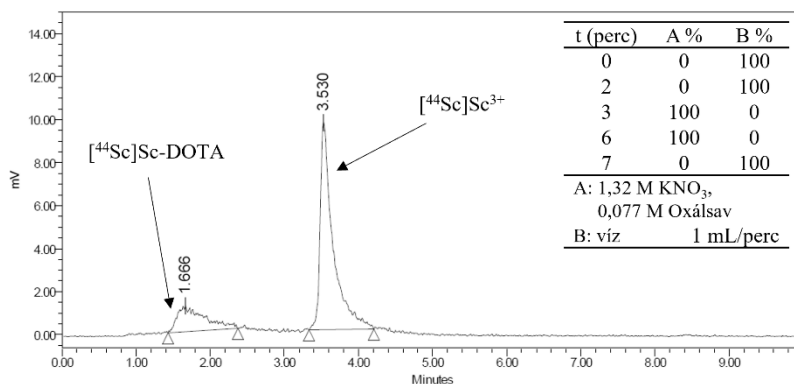
rendszeren kitapadt radioaktivitás mértékét is: az injektálások előtt és az elválasztás után összegyűjtött minták radioaktivitás értékét gamma számlálóval, a bomláskorrekciót figyelembe véve határoztuk meg. Nátrium-perklorát esetében ez a visszanyerés csupán 77,6% volt, ezért a 13. táblázatban szereplő sók alkalmazásával is meghatároztuk a visszakapott aktivitás százalékokat.

13. táblázat: Radioaktivitás visszanyerése a kolonnáról különböző sóoldatok használatával 0,077 M oxálsav mellett.

Eluensek	c (M)	Visszanyerés (%)
KNO ₃	1,32	99,4
NaNO ₃	1,10*	97,9
AmAc	1,32	89,7
NaAc	0,94*	83,8
NaClO ₄	1,32	77,6

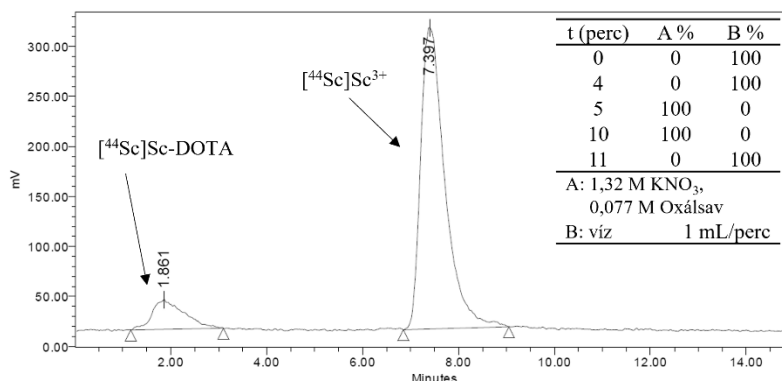
*Telített oldat koncentrációja

Azonos savkoncentráció mellett a legjobb 99,4%-os eredményt KNO₃ alkalmazásával érték el. A kialakult végleges módszert alkalmazva a 17. ábrán látható [⁴⁴Sc]Sc-DOTA és a szabad [⁴⁴Sc]Sc³⁺ sikeres elválasztása Adsorbosphere XL SCX oszlopon UPLC készüléket használva.



17. ábra: [⁴⁴Sc]Sc-DOTA és a szabad [⁴⁴Sc]Sc³⁺ elválasztása UPLC-vel.

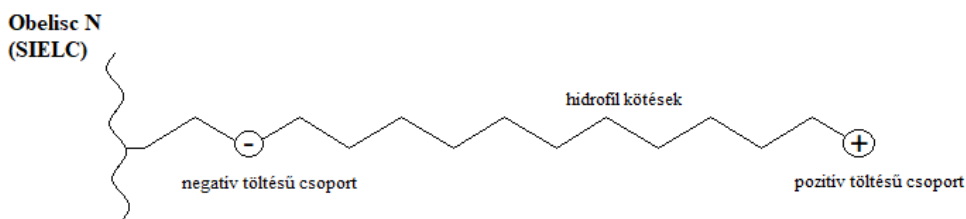
A módszert sikerült hagyományos HPLC készülékre is átültetni (18. ábra), amelynek célja a szélesebb körben történő felhasználás volt. A mérés ideje 10 percről 15 percre nőtt a rendszer nagyobb gradiens térfogata miatt. Vizsgáltuk a módosított módszer linearitását [^{44}Sc]Sc-DOTA-val, a meghatározott LOQ érték 0,89 kBq-nek adódott. A vizsgált reakcióelegyek átlagos aktivitás értéke 0,05-1 MBq tartományban voltak, melyből rendszerint 5-15 μL térfogatot injektáltam.



18. ábra: A kidolgozott módszer átültetése hagyományos HPLC készülékre.

5.3.2. HPLC módszer fejlesztése $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ radiojelzési reakcióinak követésére

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ ($t_{1/2}=67,71$ perc) fémizotóp és a vele megjelölt ligandumokat az Adsorbosphere kolonnán nem sikerült elválasztani, a szabad radionuklid nem eluálódott le az oszlopról, irreverzibilisen megkötődött rajta. Oxalát jelenlétében a ^{68}Ga széles, erősen tailing-es csúcsban eluálódott. A csúcsalakot töményebb eluens alkalmazásával sem sikerült javítani. A módszerfejlesztéshez így több ioncserélő kolonnát is teszteltünk: Obelisc R és Obelisc N, Coresep S és Coresep 100 elnevezésű állófázisokat. Tölteteiket tekintve mind ioncserélő oszlopok, azonban két csoportra bonthatóak az őket alkotó szemcsék típusától függően. Az Obelisc kolonnák kevert módú állófázisok, míg a Coresep oszlopok mag-héj szerkezetűek is egyben. A 19. ábrán látható példa a kevert módú állófázis sematikus felépítésére, miszerint mind tartalmaznak pozitív és negatív töltésű csoportokat, köztük pedig hidrofíli vagy hidrofób tulajdonságú szénláncok helyezkednek el lehetővé téve így a többszörös kölcsönhatások kialakulását.



19. ábra: Obelisc N kolonna kevert módú állófázisa.

Az említett analitikai oszlopok mindegyikén vizsgáltuk a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA és a szabad $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -ionok elválasztását UPLC rendszeren a 14. táblázatban feltüntetett 1-5. sorszámú módszerekkel.

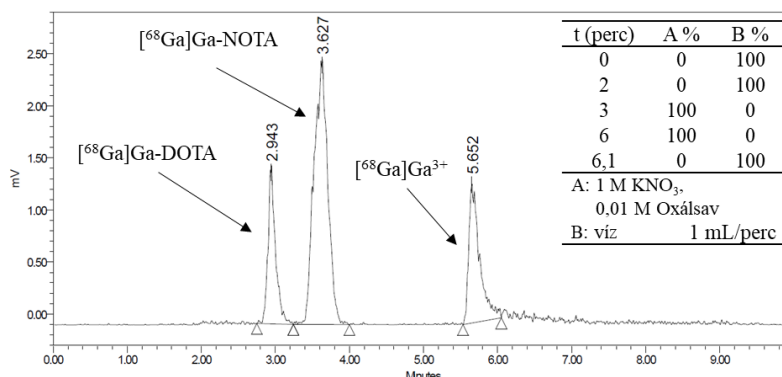
14. táblázat: Módszerek összefoglalása kevert módú kolonnákra.

Eluensek*		mL/ perc	Gradiens módszer	t _R (perc)		R _s
A	B			[⁶⁸ Ga]Ga ³⁺	[⁶⁸ Ga]Ga- DOTA	
1. Oxálsav	NaClO ₄	0,8	95-30%A 3 perc alatt, 30% 4 percig, 30-95% 0,1 percen belül	0,555	-	-
2. Oxálsav	NaClO ₄	0,6	95-30%A 3 perc alatt, 30% 2 percig, 30-95% 0,1 percen belül	0,735	-	-
3. Oxálsav	AmAc	0,6	98-30%A 3 perc alatt, 30% 2 percig, 30-98% 0,1 percen belül	1,156	4,000	4,64
4. Oxálsav	AmAc	0,6	100%A 2 percig, 100-30% 1 perc alatt, 30% 1 percen át, 30-100% 0,1 percen belül	0,819	0,905	-
5. Oxálsav : AmAc = 1:1	Víz	0,6	0%A 2 percig, 0-100% 1 perc alatt, 100% 2 percig, 100-0% 0,1 percen belül	3,717	1,055	3,20
6. Oxálsav : AmAc = 1:1	Víz	0,6	0%A 1,5 percig, 0-100% 0,5 perc alatt, 100% 2 percen át, 100-0% 0,1 percen belül	2,974	0,79	5,89

*Oxálsav (0,01 M, pH 3,0), NaClO₄ (1,72 M), AmAc (1 M, pH 4,0)

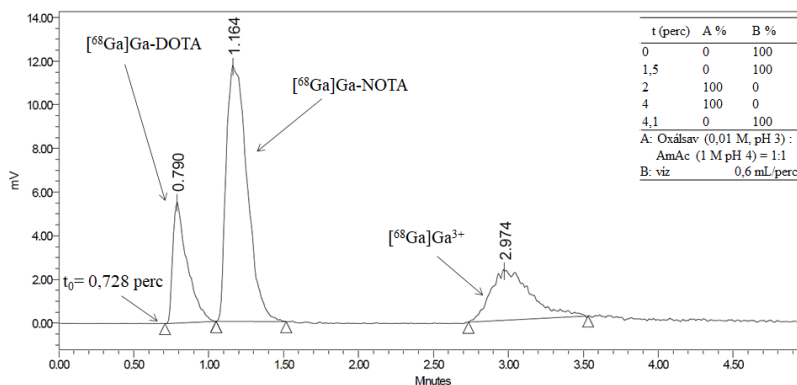
A módszer kidolgozása során kezdetben a szabad [⁶⁸Ga]Ga³⁺ alig rendelkezett visszatartással. A módszer a jelölő fémion és a jelzett komplex között nem adott megfelelő felbontást, a csúcsok átfedtek. Kelátorként itt is a széleskörben elterjedt DOTA-t alkalmaztuk, ami egy különösen jó komplexképző makrociklusos ligandum¹²⁸. A gradiens változtatásával (5. módszer) megfordult az elúciós sorrend, a szabad fémion már jóval nagyobb visszatartású, jól elkülönült a jelzett DOTA komplextől. Az előző gradienshez képest (4. módszer), itt kezdetben nem tartalmazott az eluens ammónium sót, csak a 2. perctől kezdődően, ami így később eluálta a radiofémét. Végül sikerült egy olyan módszert kifejleszteni, mellyel több [⁶⁸Ga]Ga³⁺ izotóppal jelölt vegyület is elválasztható volt egymástól (20. ábra), ezen fémkomplexek

felbontása 2,51-nek adódott az Obelisc N kolonnán. Mind a két vizsgált ligandum makrociklusos alapvázú.



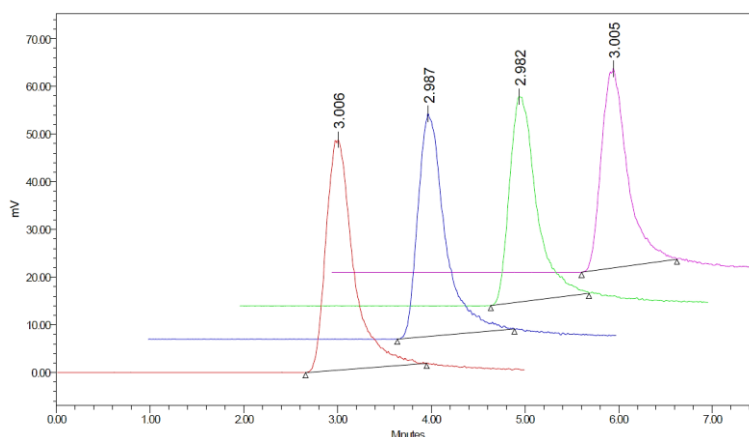
20. ábra: Az 5. eljárással elért elválasztás Obelisc N kolonnát alkalmazva.

Az elválasztást a Coresep 100 kolonnán is sikerült elérni (21. ábra), itt a mérés ideje rövidebb volt (kedvezve a radiokémiai vizsgálatoknak), hiszen maga a kolonna hossza 5 cm, ellentétben a 15 cm-es Obelisc N-nel, valamint a töltet szemcsemérete is fele akkora, mint a másik esetben. A két jelzett fémkomplex közötti felbontás 1,71-re csökkent, azonban még eleget tesz az általánosan elvárt 1,5-ös értéknek.



21. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -komplexek kromatográfiás elválasztása a 6-os módszerrel Coresep 100 kolonnán.

Minden radionuklid esetében figyelembe kell venni a felületi adszorpciót, mivel jelentős aktivitás tapadhat ki a kapillárisok falára és az oszlopra, ami téves eredményt ad. Ezen okból vizsgáltuk a szabad $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ injektálásának ismételhetségét (22. ábra) és a kolonnáról való visszanyerését (15. táblázat). A retenciós idők szórása 0,011-nek adódott, $\text{RSD}\%=0,36$.



22. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -ion retenciós idejének precizitás vizsgálata.

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -ot tartalmazó minták aktivitás értékeit injektálás előtt gamma számlálóval határoztuk meg, majd attól függetlenül, hogy a mérés kolonnával vagy anélkül történt meg az injektált térfogatokat a rendszeren áthaladva egyesével összegyűjtöttük és újra megmértük a gamma számlálóval. Az így kapott aktivitás értékeket a bomlaskorrigált kezdeti értékekkel összevetve határoztuk meg a visszanyerés mértékét vizsgálva az injektált térfogattól való függését is (15. táblázat).

15. táblázat: Radioaktivitás visszanyerésének vizsgálata.

Injektált térfogat (μL)	Mérés módja	Számolt aktivitás (MBq)	Mért aktivitás (MBq)	Visszanyerés%
5,0	kolonna nélkül	0,26	0,26	98,2
		0,26	0,24	92,5
	Coresep 100	0,25	0,24	97,3
		0,23	0,22	94,9
			átlag	94,9
			RSD%	2,53
1,0	kolonna nélkül	0,044	0,042	95,3
		0,043	0,042	97,2
	Coresep 100	0,041	0,040	97,5
		0,039	0,038	97,4
			átlag	97,4
			RSD%	0,16

5.3.3. HPLC módszer fejlesztése $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ radiojelzési reakcióinak követésére

A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ ($t_{1/2}=5,59$ nap) radionuklid reakcióinak folyadékkromatográfiás követését Kinetex XB-C18 analitikai kolonnán végeztük (16. táblázat). Ebben az esetben elég volt az oxálsav helyett hangyasavat használni eluensként, mivel kelátképző távollétében sem tapasztaltuk a radioaktivitás kitapadását sem a rendszeren, sem a kolonnán.

16. táblázat: $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$ radiojelzésének követésére kidolgozott módszer gradiens programja.

t (perc)	A %	B %	
0	0	100	A: 90% ACN
1	0	100	B: 0,1% Hangyasav
2	100	0	áramlási sebesség: 1 mL/perc
3	100	0	$t_R([^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+})$: 0,561 perc
3,1	0	100	$t_R([^{52}\text{Mn}]\text{Mn-ligandum}^*)$: 2,589 perc

*ligandumok: DOTA, $\text{NO}_2\text{BzPC}_2\text{A}$, BP_2A , NO_2BzPCTA , PC_2A , CDDADPA, NO_2BzNOTA , OPC_2A , NO_2BzDOTA , EDDADPA, HXTA.

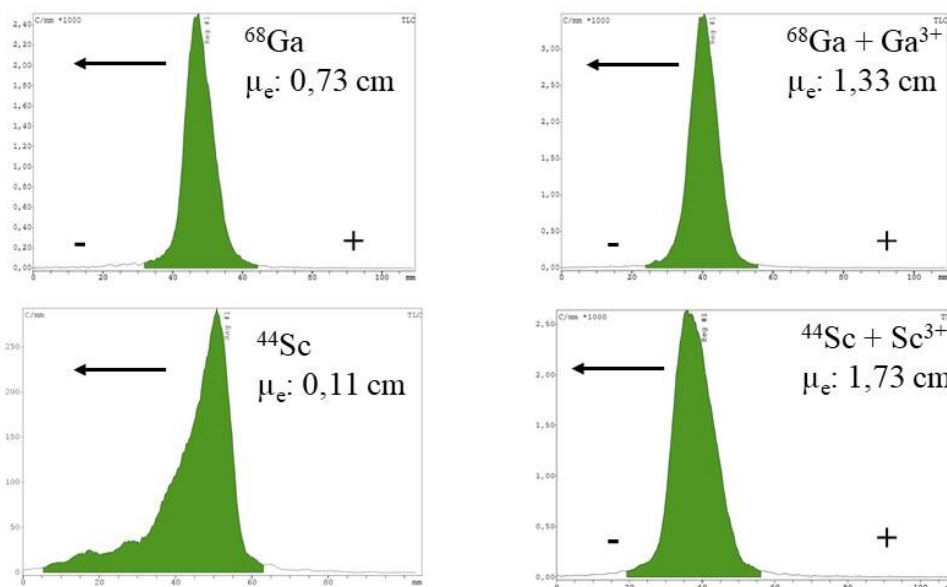
5.4. Radiojelzési reakciók optimalizálása

5.4.1. Elektroforézis vizsgálatok

Új kelátorok radiojelzésének vizsgálata során számos esetben problémát okoz a reakció követésére alkalmas kromatográfiás elválasztás kidolgozása. A TLC-s elválasztások során az alkalmazható állófázisok kis száma (iTLC, cellulóz, szilikagél, RP szilika) erősen korlátozza az alkalmazható kromatográfiás módokat. Gyakran nehéz eldönteni, hogy adott körülmények (pH, ionerősség, potenciális komplexképzők jelenléte) között a radiofém milyen formá(k)ban van jelen. Emiatt megvizsgáltuk az elektroforetikus elválasztás alkalmazhatóságát is radiofémekkel történő jelzés során. A kapilláris módszereket az alkalmazott nanoliteres nagyságrendű minta térfogattól adódó detektálási problémák miatt elvetettük, így megpróbáltuk a fémionok papírelektroforézissel való elválasztását.

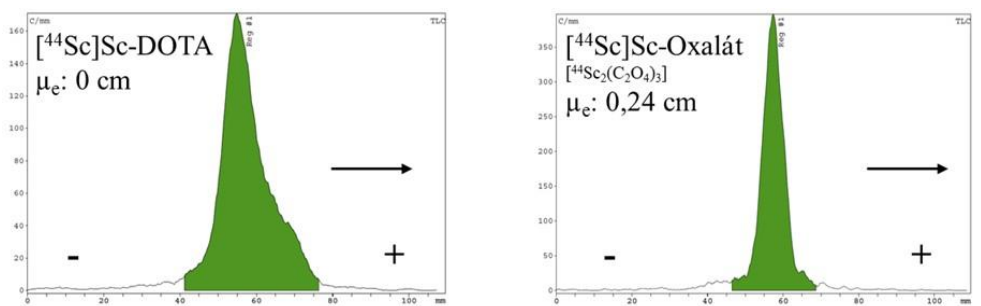
A radiojelzési reakciók során [^{44}Sc] Sc^{3+} izotóp alkalmazása esetén számos alkalommal a vártnál alacsonyabb radiokémiai hozamokat kaptunk, így kérdésként merült fel, hogy az előállított radionuklid milyen formában van jelen az oldatban. A szabad radiofémek, illetve a velük képződött komplexek töltésének gyors megállapítására saját elektroforézis készüléket állítottunk össze, amivel a megfelelő elektrolitoldatban feszültség hatására töltésüknek megfelelő irányba mozdultak el a részecskék. A módszer alkalmazható radioaktív fémionok és komplexeik töltésének, szilárd felületeken történő kitapadásának és kromatográfiás viselkedésének tanulmányozására is.^{57,129} A vizsgálatok kiértékelését Radio-TLC szkennelvel végeztük el, de az ionkromatográfiás elválasztás során használt PAR festékkel is láthatóvá volt tehető a fémion, mely teljesen megegyezett a műszeres eredményekkel. Az előkísérletekhez $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor sósavas elúciójával nyerhető [^{68}Ga] Ga^{3+} használtuk. A 23. ábrán látható, hogy 10 perc alatt 3 cm x 11 cm-es Whatman

típusú kromatográfiás papír közepére cseppentett ^{68}Ga 0,1 M u.p. HCl elektrolitban 100 V feszültség hatására kisebb, hideg hordozó hozzáadásával nagyobb elmozdulást eredményezett. A szkandium viszont már nehezebben mozdult el, jobban megkötődik a papíron, de minden esetben a negatív pólus irányába indult el, tehát kationos formában volt jelen.



23. ábra: Ga^{3+} és Sc^{3+} fémionok feszültség hatására történő elektroforetikus mozgékonyságának (μ_e) vizsgálata

Az ionok elmozdulását hosszabb mérési idő vagy töményebb elektrolit oldat alkalmazásával sem tudtuk jelentősen növelni. Vizsgáltuk a $[\text{}^{44}\text{Sc}]\text{Sc}$ -komplexekeket is, ahol az anód irányába történő elmozdulást tapasztaltuk (24. ábra).

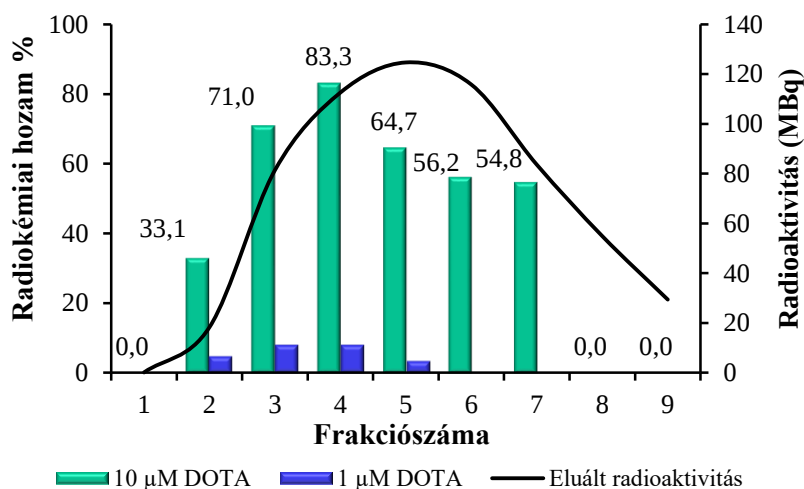


24. ábra: [^{44}Sc]Sc-komplexek töltésének meghatározása

A folyadékkromatográfias elválasztásoknál használt eluensben lévő szabad [^{44}Sc]Sc(C_2O_4) $_3^{3-}$ és a [^{44}Sc]Sc-DOTA $^-$ komplexek az anód felé vándoroltak, így a töltés még alacsonyabb 0,01 M u.p. HCl elektrolitkoncentráció használata esetén is negatív. A tisztított ^{44}Sc minták összehasonlító vizsgálata során nem találtunk eltérést az aktív komponens elektroforetikus viselkedésében eltérő jelzési hatások esetén sem, ez alapján arra következtettünk, hogy a jelzési hatások változásáért nem a $^{44}\text{Sc}^{3+}$ oldatbeli formájának változása lehet a felelős. A vizsgálatok során tapasztalt kismértékű elmozdulás és a TLC szkennerek alacsony térbeli felbontása miatt többféle töltött részecskét tartalmazó minták komponenseinek elválasztására nem tűnik alkalmasnak az eljárás.

5.4.2. [^{44}Sc] Sc^{3+} izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata

A kromatográfiás vizsgálatokkal párhuzamosan, vagy azok előkísérleteként a reakciók kimenetelét Radio-TLC-vel is követhetjük. Ennél a módszernél azonban problémás a futtatóelegy helyes megválasztása, illetve nem automatizálható. A HPLC-s módszer kidolgozásáig azonban számos reakciót vékonyrétegekromatográfiával követtünk. A 3.2. fejezetben leírt előállítás utolsó lépése a DGA gyantáról történő frakcionált elúció, melynek során 1,5 mL-es Eppendorf csövekbe általában 6 cseppet gyűjtöttünk, amiből a radiojelzésre a legnagyobb radioaktivitással rendelkező frakciókat használtuk fel. A 25. ábrán látható egy adott besugárzásból származó frakciók vizsgálata. A teljes aktivitás 752 MBq volt, melynek a tisztítást követően 82,56%-át nyertük vissza, ami megfelel az átlagos 75-85% aktivitás visszanyerési tartománynak.



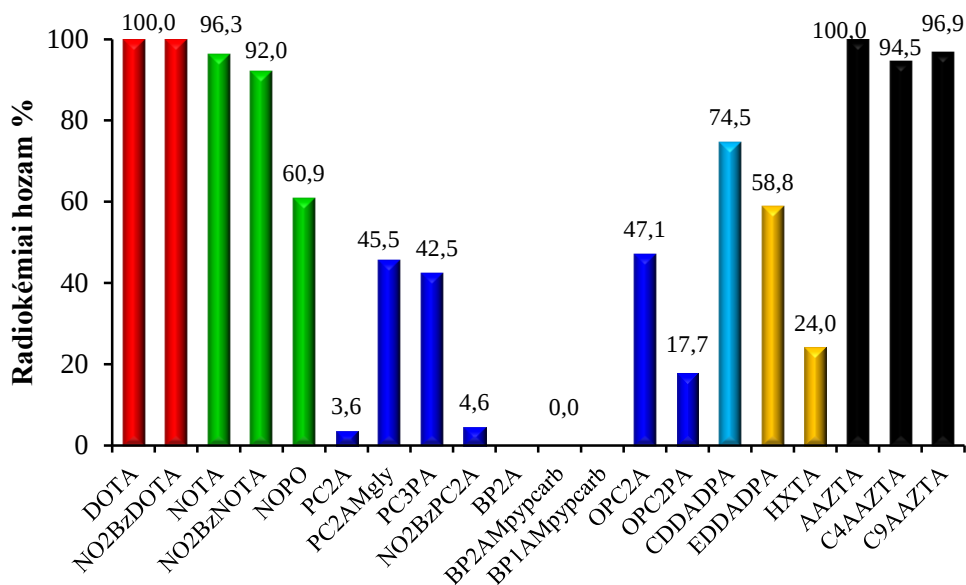
25. ábra: Nagyaktivitású [^{44}Sc] Sc^{3+} besugárzás frakcionáltan eluált mintáinak radiojelzési hatékonysága.

Reakciókörülmények: 10 μL DOTA ligandum, 10 μL [^{44}Sc] Sc^{3+} , 80 μL AmAc (pH 4,0; 0,1 M), 95 °C, 5 perc.

Reakció követése: Radio-TLC-vel, elválasztás iTLC lapokon, futtatóelegy: víz.

Legnagyobb aktivitású az 5.-6. frakció volt, a legmagasabb jelzési hatásfokot a 3.-4. frakciónál találtuk. Ez alapján azt feltételeztük, hogy a gyantáról ^{44}Sc -ot követően, attól csak részlegesen elválva kis mennyiségben szennyező átmeneti fémion(ok) eluálódnak, melyek az adott frakcióban a jelzés során a $^{44}\text{Sc}^{3+}$ -al versengve csökkentik a jelzési hatásfokot. A szennyező fémionokat ICP-OES technikával nem sikerült egy esetben sem azonosítani. A későbbiekben a target készítés és kioldás lépéseit lamináris fülkében végezve a fent tapasztalt eltérések a jelzés során megszűntek. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a jelzést zavaró fémszennyező a laboratórium levegőjéből került be és feltételezhetően vas volt.

Több kutatócsoporttal kialakított együttműködés keretében számos új kelátorhoz jutottunk hozzá, melyeket az elsődlegesen vizsgált radiofém mellett ^{44}Sc és ^{68}Ga jelzés során is vizsgáltunk. A 26. ábrán látható számos kelátor [^{44}Sc] Sc^{3+} -mal végzett radiojelzésének radiokémiai hozama (95 °C, 5 perc, 10 μM kelátor koncentráció). Jól látszik, hogy a piros és zöld színnel ábrázolt DOTA és NOTA származékok kedvezőek a szkandium számára, komplexei kiemelkedően nagy stabilitásúak és inertségűek^{50,130}. Azonban a szintén makrociklusos ligandumok közé tartozó, kék színnel jelölt piklén vázú származékok esetén már csak nagyon alacsony radiokémiai hozamot kaptunk. Ennek az az oka, hogy ezeket a kelátorokat mangán fémionok megkötésére tervezték, Sc^{3+} -komplexeik stabilitása kisebb a makrociklus üregének mérete, az alapváz, a koordinációs szám és a donoratomok minősége miatt. A sárga színnel jelzett, nyílt láncú kelátorok számos fémionnal képesek komplexet képezni, azonban stabilitásuk kisebb, mint a makrociklus alapvázú komplexeké.

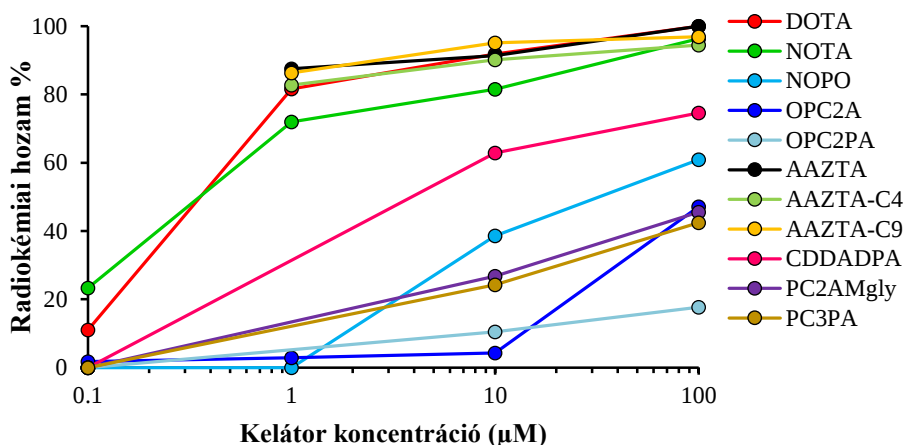


26. ábra: Különböző alapvázú ligandumok radiokémiai jelzése [⁴⁴Sc]Sc³⁺-mal.

Reakciókörülmények: 80 µL AmAc (pH 4,0; 0,5 M), 10 µL kelátor (100 µM), 10 µL [⁴⁴Sc]Sc³⁺, 95 °C, 5 perc zárt Eppendorf csőben

Reakció követése: iTLC lapokon RadioTLC-vel, futtatóelegy: víz

Végül a szemimakrociklusos AAZTA vegyületcsalád (fekete színnel) kiemelkedő eredményei megfelelnek az irodalomban közölteknek⁷⁵. A mérésorozatból az ígéretesebb ligandumok radiojelzésének koncentrációfüggését a 27. ábra szemlélteti. Az anyagmennyiség logaritmikus csökkentésével az 1 µM kelátor koncentrációnál már jól látható a különbség a ligandumok komplexképzésre való hajlama között, melyek közül a DOTA, NOTA és az AAZTA származékok adták a legnagyobb radiokémiai hozamokat.



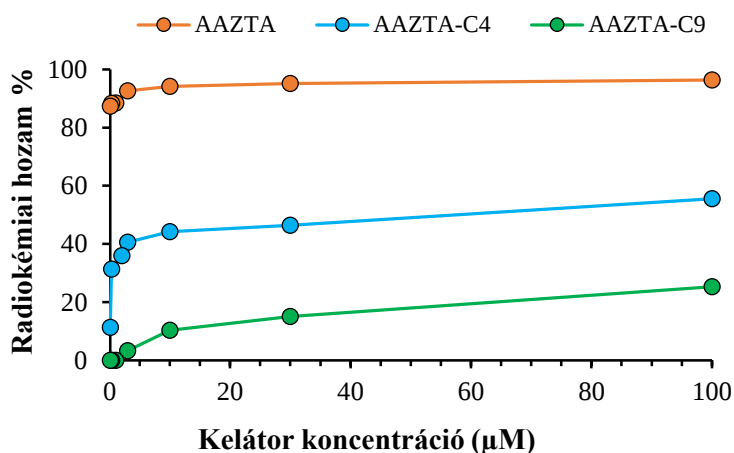
27. ábra: A komplexképződések koncentrációfüggésének vizsgálata.

Reakciókörülmények: 80 μL AmAc (pH 4,0; 0,5 M), 10 μL kelátor, 10 μL [^{44}Sc]Sc $^{3+}$, 95 °C, 5 perc

Reakció követése: iTLC lapokon RadioTLC-vel, futtatóelegy: víz

A 4.3.1-es fejezetben ismertetett 18. ábrán szereplő végleges, hagyományos HPLC-re átültetett kromatográfiás módszerrel több jelzett makrociklusos alapvázú komplex esetén vizsgáltuk az elválasztás megfelelőségét. A reakcióelegyek átlagos aktivitása 0,92 MBq volt 100 μL összterfogatban, melyből minden esetben 10 μL-t injektáltam. A radiofémkomplexek átlagos retenciós ideje 1,940 percnél, míg a szabad [^{44}Sc]Sc $^{3+}$ elúciós ideje 7,243 percnél adódott. A méréseket célszerű volt az 5 perces reakcióidő lejártá után mihamarabb injektálni a rendszerre, mivel a DOTA-, NOTA- és O-piklén származékok komplexképződési reakciója szobahőmérsékleten ugyan jóval lassabb ütemben, de tovább folytatódott. Így a később megmért minták magasabb radiokémiai hozamot mutattak az azonnali radio-TLC-s eredményhez képest. A reakciók befagyasztására számos kísérletet tettünk, de nem sikerült a tervezett időpillanatra megállítani azokat. Emiatt megvizsgáltuk a radiojelzési reakcióknak közvetlenül az injektálást megelőző automatizált végrehajtásának lehetőségét. Az Alliance

HPLC rendszer lehetővé teszi a minta felszívásának programozását, vagyis lehetséges két reagens (pufferelt kelátor és radiofém oldat) egymást követő felszívása az injektor loop-ba, majd a reakcióidő letelte után az elegy injektálása a kolonnára. Az AAZTA származékok szkandiummal történő komplexképződése szintén végbemegy már szobahőmérsékleten, így ezzel a vegyületcsaláddal teszteltük a rendszer ezen lehetőségét felhasználva a már kidolgozott kromatográfiás módszerünket (28. ábra).

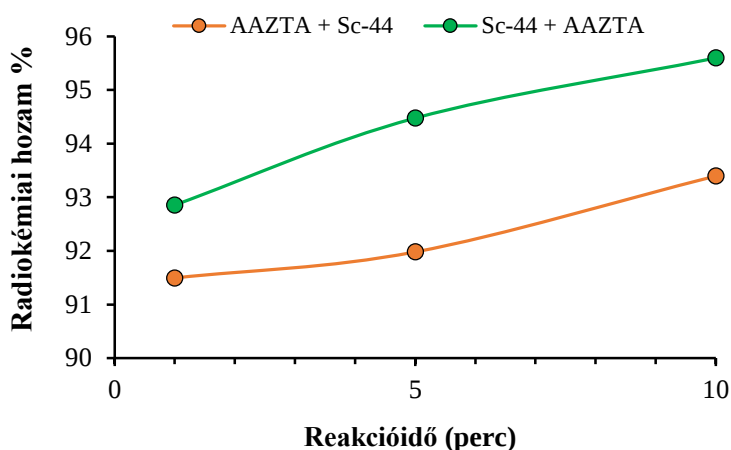


28. ábra: AAZTA származékok komplexképződési koncentrációfüggése szobahőmérsékleten automatizált körülmények között.

Reakciókörülmények: 5 μL [AmAc (pH 4,0; 1 M) - 10 μL kelátor=40:10], 5 μL [⁴⁴Sc]Sc³⁺. Reakció követése: HPLC, Adsorbosphere XL SCX kolonnán.

Az egyik mintatartó üveg a radiofémion savas oldatát, míg a második az AmAc puffer (pH 4,0, 1 M) és a megfelelő koncentrációjú ligandum vizes oldatának 40:10 arányú keverékét tartalmazta. A két komponensből 5-5 μL-t szívtunk fel a loop-ba, majd 5 perc várakozási idő után az eluens a kolonnára juttatta a reakcióelegyet. A [⁴⁴Sc]Sc-AAZTA már a legkisebb 0,1 μM ligandum koncentráció esetén is 87% fölötti radiokémiai hozammal képződött, míg a C4-es és C9-es származékok feltehetően nagymértékű kitapadás következtében szignifikánsan kisebb mennyiségű komplexképződést mutattak

még 100 μM kelátor koncentráció alkalmazásával is. Vizsgáltuk, hogy van-e szerepe a két injektálás sorrendjének, az előző mérések során ugyanis először a radiofémion oldata, majd a puffertelt ligandum került a loopba. A magasabb radiokémiai hozamot adó AAZTA kelátor radiojelzésének időfüggését a 29. ábra szemlélteti. Az 1, 5 és 10 perces reakcióidőket vizsgálva az elért hozamok közel azonos nagyságrendűek voltak, függetlenül az összeinjektálás sorrendjétől.

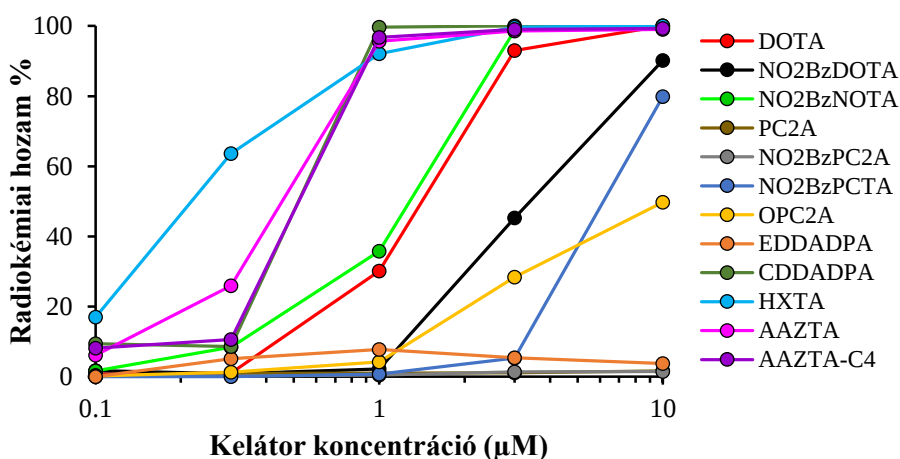


29. ábra: Az összeinjektálás sorrendjének vizsgálata és a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-AAZTA}$ képződésének időfüggése

Reakciókörülmények: 5 μL [AmAc (pH 4,0; 1 M) - 10 μL 100 μM AAZTA=40:10], 5 μL $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$. Reakció követése: HPLC, Adsorbosphere XL SCX kolonnán.

5.4.3. [^{68}Ga] Ga^{3+} izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata

Számos, az előző fejezetben bemutatott ligandum komplexképzési reakcióját a 67,71 perc felezési idejű [^{68}Ga] Ga^{3+} radionukliddal is vizsgáltuk. A kísérletekhez szükséges izotópot $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor sósavas elúciójával kaptuk. Hasonlóan a szkandiummal^{50,130} végzett reakciókhoz ebben az esetben is szükséges volt a megfelelő pH alkalmazása a fémionok hidrolízisének elkerülése és a komplexképződés lejátszódásának érdekében¹³¹. A 30. ábrán látható számos [^{68}Ga] Ga -komplex radiokémiai hozamának összehasonlítása különböző ligandum koncentrációk függvényében. Az előkísérletek során megnövelt térfogatú radiofémion oldatot tartalmazott a minta, amelynek oka az előregedő izotópgenerátorról nyerhető csökkent radioaktivitás volt. A legjobb hozamokat adó komplexképzőknak az AAZTA származékok és a nyíltláncú CDDADPA, valamint HXTA bizonyultak. A makrociklusos ligandumok közül a gallium esetén is kiemelhetők a DOTA és NOTA származékok, így a további optimalizációs vizsgálatokhoz ezeket a kelátorokat használtuk.



30. ábra: Különböző alapvázú ligandumok radiokémiai jelzése [^{68}Ga] Ga^{3+} -mal.

Reakciókörülmények: 40 μL AmAc (pH 4,0; 0,1 M), 10 μL kelátor, 50 μL [^{68}Ga] Ga^{3+} , 95 °C, 5 perc

Reakció követése: iTLC lapokon, RadioTLC-vel, futtatóelegy: víz

5.4.3.1. Különböző pufferek hatása a radiokémiai hozamra

A széleskörűen alkalmazott ammónium-acetát mellett úgynevezett nem koordináló pufferekkel is vizsgáltuk a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}$ komplexképződési reakcióját.¹³² A 17. táblázatban látható, hogy az összes alkalmazott puffert az előzőekben leírt kísérleti körülményeknek megfelelően azonos koncentrációra és pH értékre állítottuk be. NOTA kelátorral vizsgáltuk a komplexképződés koncentrációfüggését hét puffer esetében. Az aszorbátal- és citráttal pufferelt mintákat csak egy alkalommal vizsgáltuk, mivel nagyon alacsony lett a velük elért radiokémiai hozam. Irodalmi adatok alapján a komplexképződést segítheti citrát puffer jelenléte, azonban a saját kísérleteink során csak a komplexképződés gátlását figyeltük meg.¹³³ A kialakult komplexek Coresep 100 RP-SCX kolonnáról történő visszanyerését is vizsgáltuk 1,0 és 0,6 mL/perc áramlási sebességek mellett. Ehhez a kolonna nélküli méréseknél kapott radioaktivitás detektor által adott csúcs alatti területeket vetettük össze a kolonna használatával kapott, megfelelően bomláskorrigált csúcsterület értékekkel.

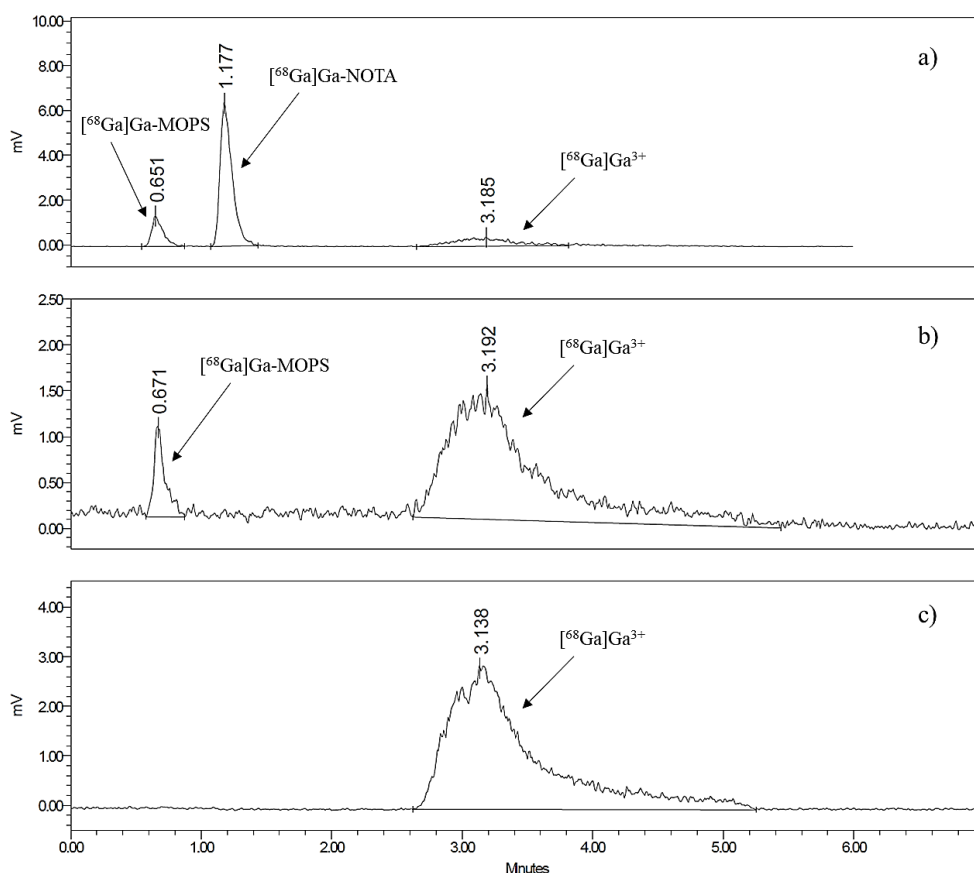
17. táblázat: NOTA radiojelzési reakciójának optimalizálása különböző pufferek használatával és a képződött komplex visszanyerése a folyadékkromatográfiás elválasztást követően.

	AmAc	MOPS	PIPES	MES	HEPES	Aszorbát	Citrát
pH	4,0	4,0	5,1	4,0	4,0	4,0	4,0
c (M)	1	1	0,0033*	1	1	1	1
NOTA (μM)	Radiokémiai hozam %						
3	97,01	98,48	93,19	95,78	98,92	11,72	73,50
1	3,17	93,92	91,94	93,36	96,91	0,00	74,60
0,3	0,00	85,17	80,28	59,21	81,02	0,00	71,89
	Visszanyerés %						
1,0 mL/min	91,7	92,2	93,2	88,8	96,5	-	-
0,6 mL/min	99,6	99,9	99,4	92,5	98,5	-	87,4

* PIPES telített oldat koncentrációja (1 g/L = 0,003307 M).

Reakciókörülmények: 80 μL puffer, 10 μL NOTA, 10 μL $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, 95 °C, 5 perc
Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

A táblázatból látható, hogy a legjobb jelzési hatásfokokat AmAc, MOPS és HEPES pufferekkel érték el. A HEPES és MES puffer esetén kaptuk a legalacsonyabb visszanyerést, kevesebb százalékban eluálódott le az oszlopról az aktivitás. A folyadékkromatográfiás elválasztások során azonban a nem koordinálódó pufferek közül a MOPS, HEPES és PIPES esetében is $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -al alkotott komplexeik megjelenését detektáltuk (31. ábra), ezért a további reakcióoptimalizálási kísérleteket AmAc-tal pufferelt közegben végeztük el.



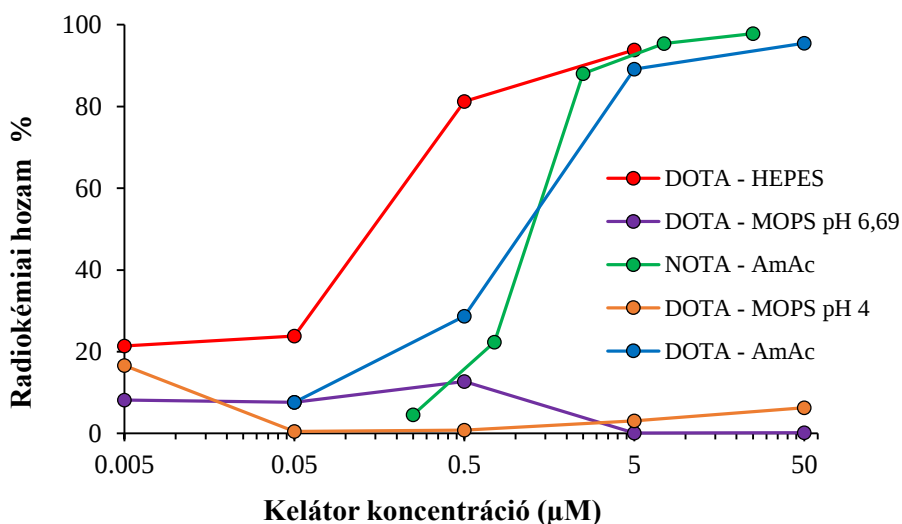
31. ábra: A MOPS puffer koordinációs viselkedésének vizsgálata.

Reakciókörülmények: a) 80 μL MOPS (pH 4,0; 1 M), 10 μL 0,3 μM NOTA, 10 μL $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 perc; b) 90 μL MOPS (pH 4,0; 1 M), 10 μL $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 perc; c) csak $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ injektálása

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

5.4.3.2. Mikrofluid rendszerben végzett reakciók

A DOTA ligandum esetén a MOPS puffer hatása kedvezőtlennek bizonyult automatizált mikrofluid rendszerben (32. ábra). A MOPS puffert pH 4,0 és pH 6,7-es értéken is kipróbáltuk, azonban mindkét esetben 10% alatti radiokémiai hozamokat értünk csak el, HEPES-sel (hasonlóan a manuális jelzésnél) már alacsony kelátképző koncentrációnál is jól mérhető volt a komplexképződés, de a nagy kitapadásra való hajlama miatt elvetettük a hosszabbtávú alkalmazását. Az AmAc puffer használata mind DOTA, mind NOTA esetén is jól bevált, így a további kísérletekben végig ezt használtuk a pH beállítására.

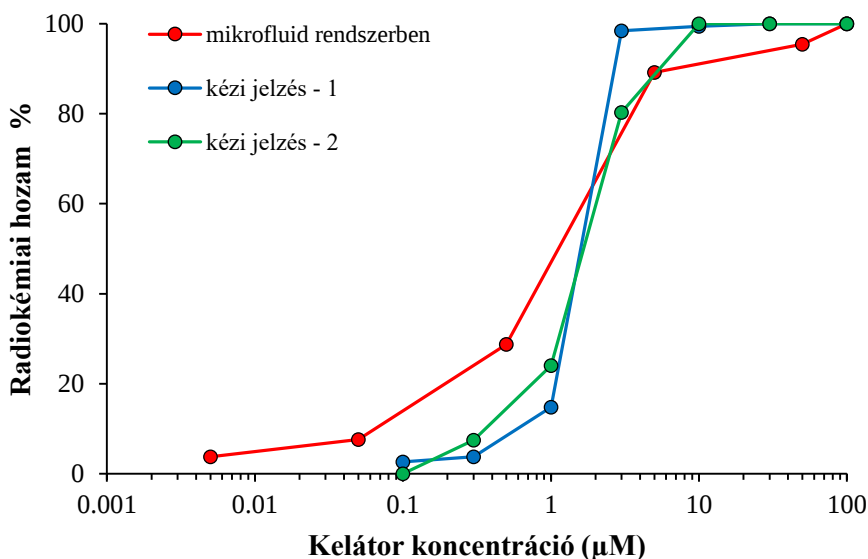


32. ábra: Különböző pufferek hatásának összehasonlítása automatizált mikrofluid rendszerben.

Reakciókörülmények: 25 μL puffer (pH 4,0; 2 M) és 25 μL ligandum elegye, 50 μL [⁶⁸Ga]Ga³⁺, 100 °C, 5 perc

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

Összehasonlítottuk az Eppendorf csőben kézzel végzett jelzési reakciókat (33. ábra) és az automatizált mikrofluid rendszerrel kapott eredményeket, mely által megbizonyosodtunk a rendszer megbízható működéséről.



33. ábra: Mikrofluid rendszer megbízhatóságának ellenőrzése [^{68}Ga]Ga-DOTA komplexképződési reakciójának követésével.

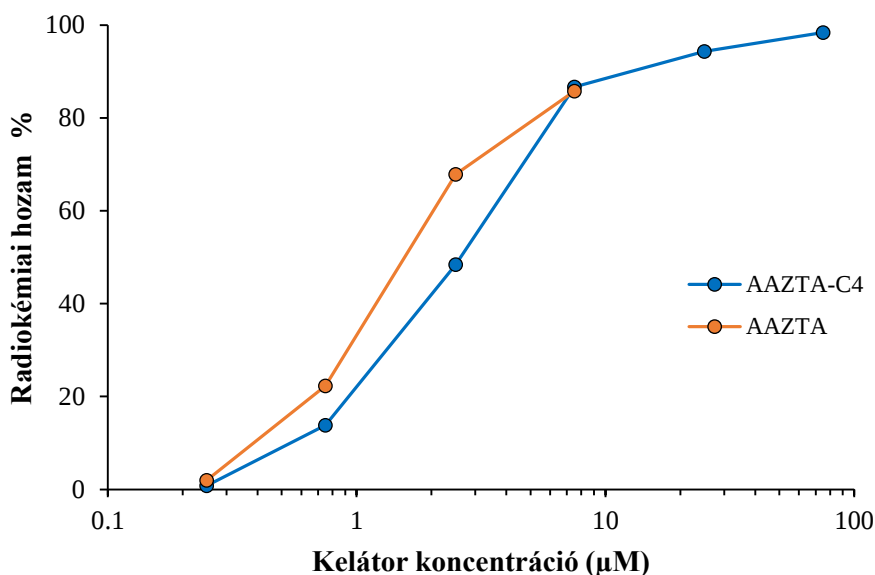
Reakciókörülmények mikrofluid rendszerben: 25 μL AmAc (pH 4,0; 2 M) és 25 μL DOTA elegye, 50 μL [^{68}Ga]Ga $^{3+}$, 100 °C, 5 perc

Reakciókörülmények kézi jelzésnél: 80 μL AmAc (pH 4,0; 1 M), 10 μL DOTA, 10 μL [^{68}Ga]Ga $^{3+}$, 95 °C, 5 perc

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

A DOTA és NOTA ligandumok mellett, a már kiváló komplexképzőnek talált AAZTA és AAZTA-C4 kelátorokkal is teszteltük a mikrofluid rendszert, hiszen további előnyös tulajdonságaik, hogy a komplexképződési reakcióban már szobahőmérsékleten is részt vesznek. A 34. ábrán a két [^{68}Ga]Ga-komplex kialakulásának a koncentrációfüggését mutatjuk be a ligandumok mennyiségének függvényében 5 perces reakcióidő alatt. Az AAZTA esetében már 0,75 μM koncentrációnál 22% fölötti volt a radiokémiai hozam, míg az

alkil láncsal rendelkező származéknál a 14%-ot sem érte el a komplexképződés mértéke, azonban ez a kis különbség kísérleti hibahatáron belüli, vagyis a két vizsgált ligandum között nem találtunk jelentős különbséget. 7,5 μM és annál nagyobb koncentrációban jelen lévő kelátképző esetén azonban már a két görbe fedésbe ment át, a radiokémiai hozamok szinte megegyeztek.

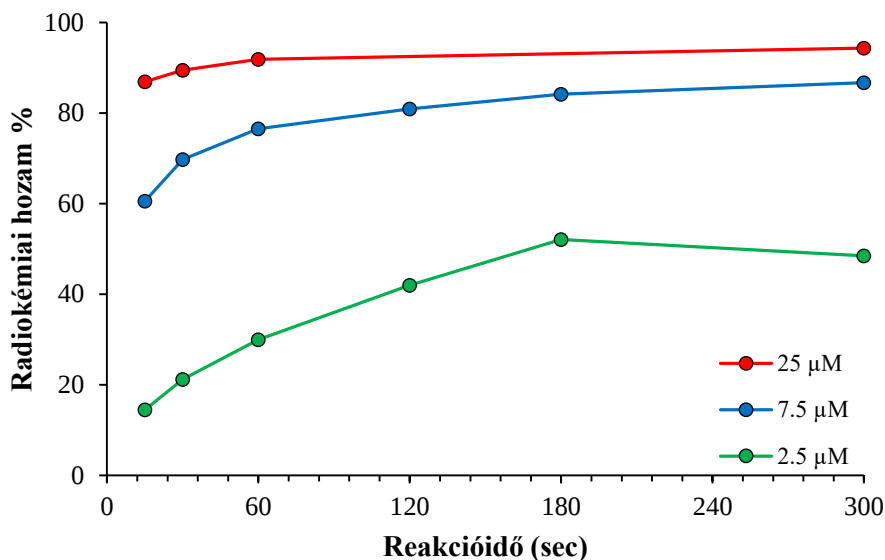


34. ábra: [^{68}Ga]Ga-AAZTA és [^{68}Ga]Ga-AAZTA-C4 komplexek kialakulásának ligandumkoncentrációtól való függése.

Reakciókörülmények: 25 μL AmAc (pH 4,0; 2 M) és 25 μL ligandum elegye, 50 μL [^{68}Ga]Ga $^{3+}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 perc

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

Az AAZTA-C4 [^{68}Ga]Ga $^{3+}$ -mal alkotott komplexének kialakulása az előzőekben bemutatott koncentrációfüggés alapján lassabbnak bizonyult, kis mértékben gátoltabbnak tűnt, ezért 25 μM , 7,5 μM és 2,5 μM kelátor koncentrációk mellett vizsgáltuk a komplexek képződésének időfüggését (35. ábra).



35. ábra: [^{68}Ga]Ga-AAZTA-C4 komplexképződésének időfüggése

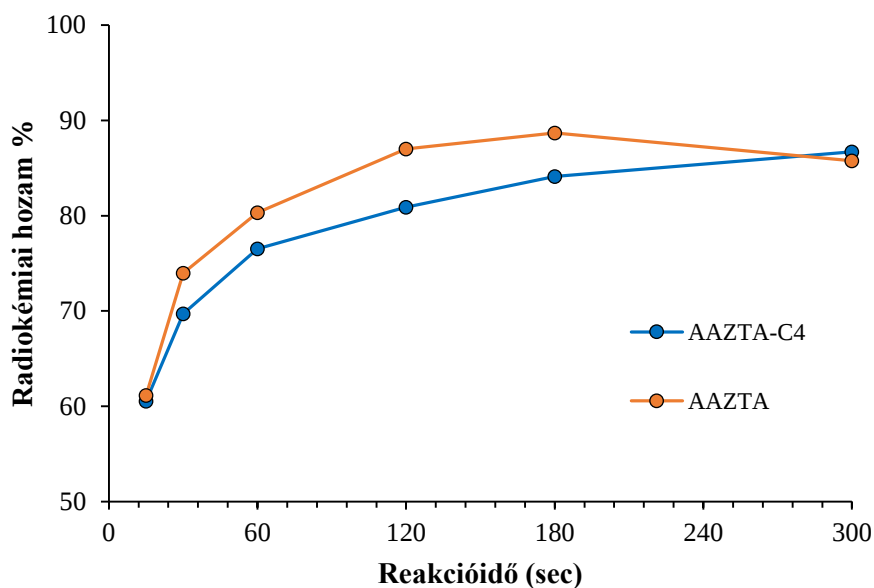
Reakciókörülmények: 25 μL AmAc (pH 4,0; 2 M) és 25 μL AAZTA-C4 elegye, 50 μL [^{68}Ga]Ga $^{3+}$, 25 $^{\circ}\text{C}$

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

25 μM és 7,5 μM AAZTA-C4 komplexképző jelenlétében már 60 másodperc elteltével telítődés figyelhető meg a diagramon, a radiokémiai hozam értékek jelentősen nem emelkedtek tovább. A vizsgált legkisebb koncentráció értéknél azonban látványosan lassult a komplexképződés sebessége, 180 másodpercig a görbe folyamatos emelkedése figyelhető meg.

Végül összehasonlítottuk a mikrofluid rendszer segítségével a két vizsgált ligandum komplexképződési sebességét 7,5 μM kelátor koncentráció mellett. A 34. ábrán bemutatott koncentráció függésnél a két AAZTA származék 7,5 μM koncentráció értéknél 5 perces reakcióidő után azonos radiokémiai hozamot eredményezett, ezért is gondoltuk ennek reakciónak a részletesebb vizsgálatát elvégezni. A 36. ábrán a várt eredményt kaptuk, miszerint ugyan a görbék a 300. másodpercben már egybefutnak, viszont addig

az AAZTA gyorsabban képes gallium komplexet kialakítani, mint az alkil lánccal ellátott származéka.



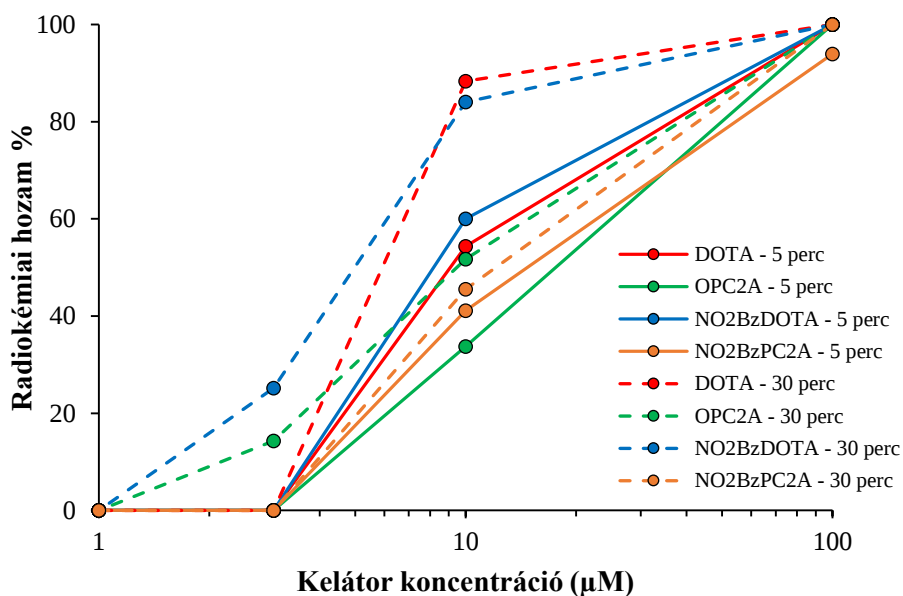
36. ábra: Komplexképződés időfüggése 7,5 μM ligandum koncentrációk esetében.

Reakciókörülmények: 25 μL AmAc (pH 4,0; 2 M) és 25 μL 7,5 μM ligandum elegye, 50 μL [^{68}Ga] Ga^{3+} , 25 $^{\circ}\text{C}$

Reakció követése: UPLC, Coresep 100 RP-SCX

5.4.4. [^{52}Mn] Mn^{2+} izotóp radiojelzési reakcióinak vizsgálata

A [^{52}Mn] Mn^{2+} izotóp 5,59 napos felezési ideje lehetővé teszi a hosszabb idejű vizsgálatokat is, így először 4 ligandum esetében összehasonlítottuk a 37. ábrán az 5 és 30 perc alatt elérhető radiokémiai hozamokat.



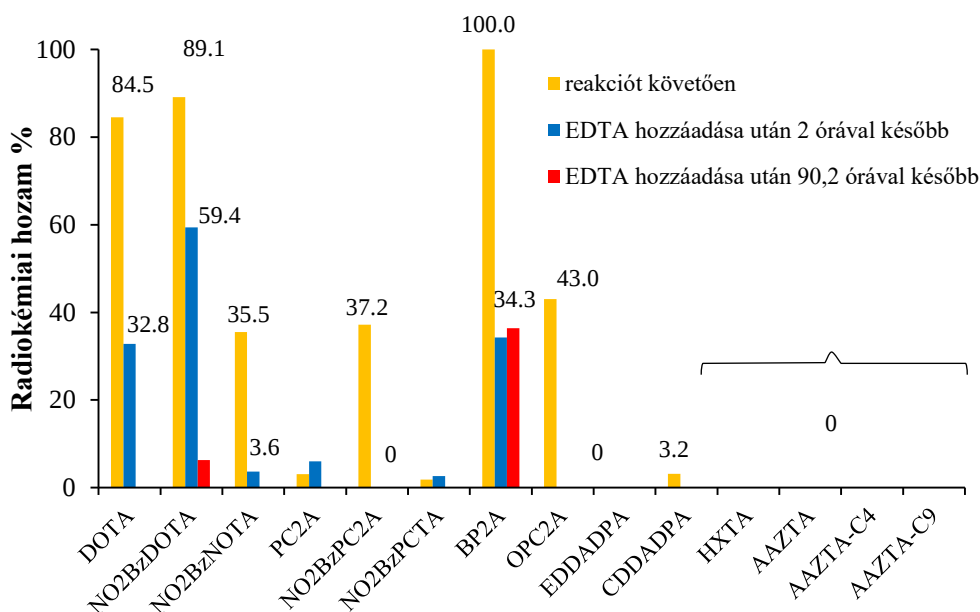
37. ábra: [^{52}Mn] Mn -ligandumok kialakulásának koncentráció- és időfüggése.

Reakciókörülmények: 40 μL AmAc (pH 4,0; 1 M), 10 μL kelátor, 50 μL [^{52}Mn] Mn^{2+} , 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 és 30 perc

Reakció követése: HPLC, Kinetex XB-C18

Hosszabb reakcióidő alkalmazása esetén sem tapasztaltunk komplexképződést egyik ligandum esetében sem 1 μM alatti koncentráció tartományban, azonban 3 és 10 μM ligandum koncentrációt alkalmazva már 30 perc alatt jól láthatóan nagyobb radiokémiai hozamokat kaptunk. A megnövelt reakcióidővel a [^{44}Sc] Sc^{3+} és [^{68}Ga] Ga^{3+} izotópokkal is tanulmányozott kelátorok komplexképződési hajlamát [^{52}Mn] Mn^{2+} radionukliddal is megvizsgáltuk (38. ábra). A galliumnál kisebb méretű

mangánnal, az előző fejezetben nem említett biszpiklén vázú (BP2A) kelátor kiemelkedő jelzési hatékonyságot mutatott.



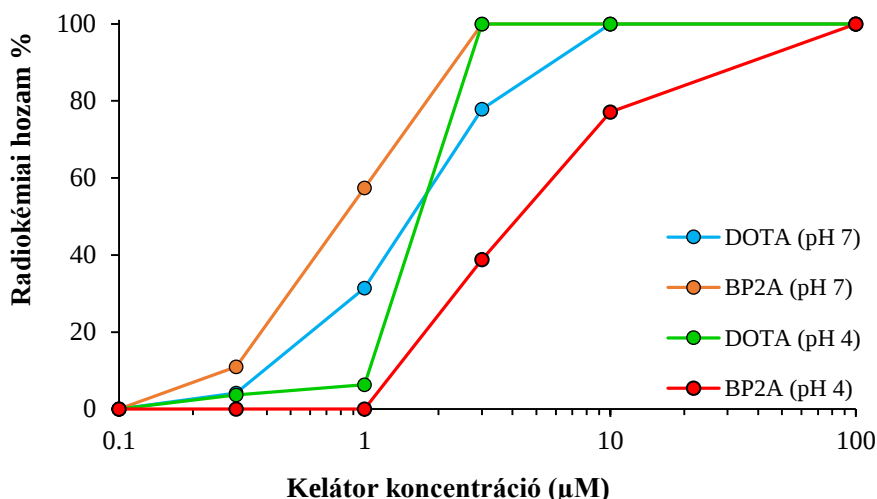
38. ábra: [^{52}Mn]Mn-komplexek radiokémiai hozama és stabilitásuk vizsgálata.

Reakciókörülmények: 40 μL AmAc (pH 4,0; 0,1 M), 10 μL kelátor (100 μM), 50 μL [^{52}Mn]Mn $^{2+}$, 95 °C, 30 perc

Reakció követése: HPLC; Kinetex XB-C18

A kialakult komplexeknél stabilitás vizsgálatot is végeztünk EDTA kelátor hozzáadásával, segítségével durva közelítést kapunk a szerkezetbeli folyamatokban való részvételükről. Így modellezhető^{134,135} a humáandiagnosztikai célokra szánt fémkomplexek egyensúlya a vérben található, EDTA-hoz hasonlóan jó komplexkémiaili tulajdonságokkal rendelkező kompetitor komplexképző ágensekkel (laktát, citrát, foszfát stb.). Látható a 38. ábrán, hogy a [^{52}Mn]Mn-BP2A komplex még 90 óra elteltével is stabil maradt, feltételezhetően a jó termodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik a komplex.

A jó hatásfokkal jelölt biszpiklén és a DOTA esetén vizsgáltuk a pH hatását a komplexképződésre (39. ábra), mely alapján a komplex képződéséhez a pH 7,0 jobbnak bizonyult, ellenben az eddig $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ radiofémionnál tapasztalt pH 4,0-val. Ez két fémion közötti különbségből is adódik, eltérő tulajdonságaik többek között a töltésük, hidrolitikus stabilitásuk, valamint a Mn^{2+} -ion nem hard jellegű, mint a Sc^{3+} -ion.

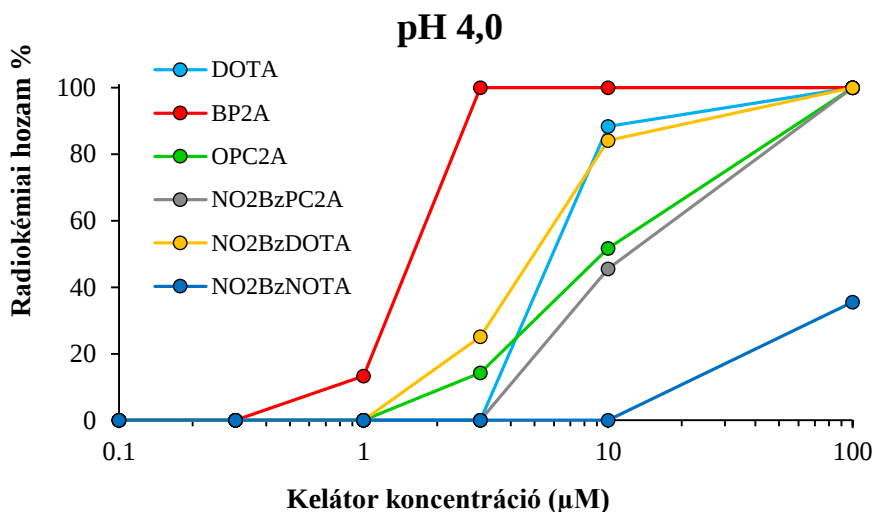


39. ábra: $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -BP2A és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -DOTA komplexképződésének koncentrációtól és pH-tól való függése.

Reakciókörülmények: 40 μL AmAc (pH 4,0; 1 M) vagy HEPES (pH 7,0; 1 M), 10 μL BP2A vagy DOTA, 50 μL $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$, 95 °C, 30 perc
 Reakció követése: HPLC, Kinetex XB-C18

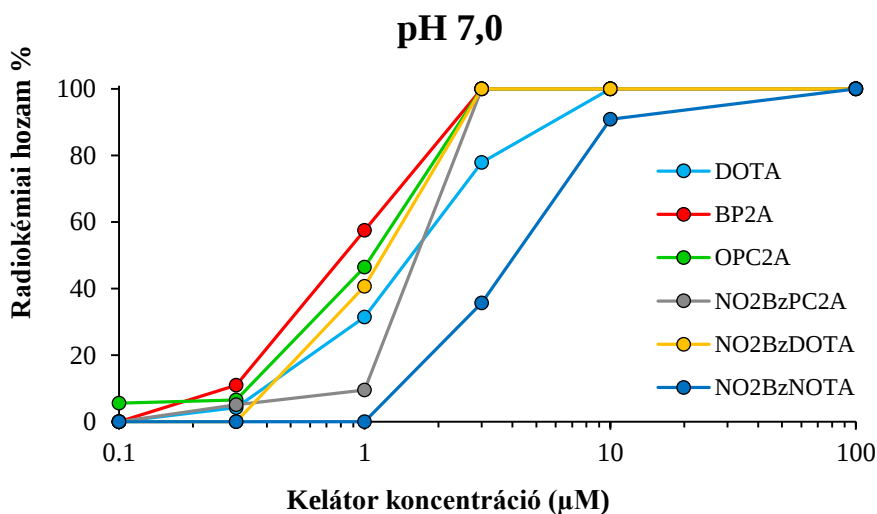
Végül az optimalizált reakciókörülmények között is megvizsgáltuk a ligandumok komplexképződési hajlamát a kelátorok koncentrációinak függésében (40-41. ábra). A diagramok jól mutatják, hogy a ligandum koncentráció csökkentésével egyre szignifikánsabb a különbség ugyanazon fémkomplex radiokémiai hozamát tekintve a pH értékének változtatásával. 1 μM komplexképző esetén a BP2A kelátort kivéve, csak pH 7,0-ás értéken alakult ki mangán-komplex. Így az elvégzett vizsgálatok alapján a piklén

alapvázú (BP2A és OPC2A) ligandumok komplexálják leginkább a mangán-ionokat.



40. ábra: Radiokémiai hozamok összehasonlítása pH 4,0 értéken.

Reakciókörülmények: 40 μL AmAc (pH 4,0; 1 M), 10 μL kelátor, 50 μL $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$, 95 °C, 30 perc
 Reakció követése: HPLC, Kinetex XB-C18



41. ábra: Radiokémiai hozamok összehasonlítása pH 7,0 értéken.

Reakciókörülmények: 40 μL HEPES (pH 7,0; 1 M), 10 μL kelátor, 50 μL $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}^{2+}$, 95 °C, 30 perc
 Reakció követése: HPLC, Kinetex XB-C18

6. Összefoglalás

Doktori munkám során pozitront emittáló radiofémionok és a különböző ligandumokkal alkotott komplexeik folyadékkromatográfiás elválasztására alkalmas módszerek kidolgozásával foglalkoztam, amelyek segítségével néhány optimalizációs kísérlet során követni tudtam a fémkomplexek képződését.

^{44}Sc , ^{68}Ga és ^{52}Mn fémizotópok ciklotronnal történő előállításának kifejlesztéséhez származékképző reagensek használatával eljárásokat dolgoztunk ki és hasonlítottunk össze a szennyező átmenetifémek mennyiségi- és minőségi meghatározásához. A targetanyagból származó fémionok (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+}) mellett mindig keletkeztek radioaktív és további nem radioaktív ionok, amelyek a későbbi komplexképzési reakciók során csökkentették az elérhető radiokémiai hozamokat. A radioaktív izotópokat gamma spektrometriával azonosítottuk a feloldott targetanyag mintákban. Minden esetben igazoltuk, hogy a szennyező radionuklidok az ioncserélő gyantákon megkötődtek és savas elúciót alkalmazva szelektíven elválaszthatóak voltak a kívánt fémizotóptól. A megtisztított frakciók átlagos radionuklidos összetételei a következőnek adódtak:

1. ^{44}Sc 98,94%, ^{47}Sc 0,08%; egyéb izotópok: ^{43}Sc , ^{48}Sc , $^{44\text{m}}\text{Sc}$ 0,98%;
2. ^{68}Ga 99,97%, ^{67}Ga 0,018%, ^{66}Ga 0,012%;
3. ^{52}Mn 100%.

Kolonna utáni- és előtti származékképző eljárásokat dolgoztunk ki folyadékkromatográfiás rendszerekre, amelyekkel az előállítást követően rövid időn belül vizsgálni tudtuk a mintákban lévő a nem radioaktív fémion szennyezőket. A kapott eredmények alapján a kolonna utáni származékképzéssel végzett kromatográfiás elválasztás szelektívebb és érzékenyebb módszernek bizonyult a fémionok kimutatására, de a műszer

összeállításának bonyolultsága és a tapasztalt alapvonalai instabilitások miatt nem alkalmazható rutinszerű minőségellenőrzésre. Vizsgáltuk a fémkomplexek kialakulását kísérő színváltozáson alapuló meghatározási módszereket is különböző reagensek alkalmazásával. A kereskedelembe kapható vagy saját fejlesztésű kolorimetriás tesztek hasznosak lehetnek nagyobb (néhány ppm-nél több) koncentrációjú szennyező fémionok kimutatására, de nem bizonyultak elég szelektívnek a ppb tartományban történő alkalmazáshoz, ami a radioaktív minták jellemző fémtartalma. Megállapítottuk, hogy a kolorimetriás vizsgálat megbízhatósága és dokumentáltsága javítható, ha a mintákat oszlop jelenléte nélkül HPLC-UV detektorra injektáljuk. Ezen túlmenően a HPLC-detektálás lehetővé teszi a sokkal kisebb mintamennyiségek alkalmazását (5-20 mL helyett 30 μ L), ami jelentősen csökkenti a rövid felezési idejű radioaktív fémek anyagvesztését a minőségellenőrzési vizsgálatok során. A részletesen tanulmányozott kolorimetriás vizsgálatok nem helyettesíthetik az atomspektroszkópiai technikákat a radioaktív mintákban található szennyező fémionok meghatározására, de megállják a helyüket az előállítási és tisztítási módszerek fejlesztésében, valamint az izotópos nyomjelzésre szolgáló radiofémoldatok rutin minőségellenőrzésében.

Általánosan alkalmazható folyadékkromatográfias módszereket dolgoztunk ki a három vizsgált radiofém esetén lehetővé téve a fémizotópokkal jelölt szabad és az akár biomolekulához konjugált kelátképzők egymástól való elválasztását. Modellvegyületként DOTA és NOTA ligandumok fémkomplexeit használtuk. Három fordított állófázisú analitikai kolonnán fejlesztettünk ki eljárásokat, amelyeken a vizsgálni kívánt komponensek visszatartással rendelkeztek. A módszerek közös jellemzője, hogy a fémkomplexek gyenge kölcsönhatásba léptek az állófázissal, feltételezhetően annak központi fémionja, azonban a kölcsönhatás olyan gyenge, hogy a

komplexek tiszta vízzel is eluálhatóak az oszlopról. Vizes oldatban viszont a szabad fémionok megkötődnek a kolonnán. Nagy koncentrációjú só, illetve kelátképző alkalmazásával a megkötött fémionok eluálhatóak voltak. Tanulmányoztuk a fémionok HPLC rendszeren való kitapadásának mértékét, amely nagyban függött az eluensben alkalmazott szervesen oldott só minőségétől. A kidolgozott folyadékkromatográfiás elválasztás alkalmas a radiokémia területén elterjedten alkalmazott vékonyréteg kromatográfiás módszerek kiváltására, gyorsítva és egyszerűsítve a sorozatméréseket, csökkentve a sugárterhelést, valamint növelve az eredmények reprodukálhatóságát. Az elválasztási módszerek további teszteléséhez és a komplexképzési reakciók automatizálási lehetőségének vizsgálatához egy általunk épített mikrofluidikai rendszert alkalmaztuk. A berendezés meggyorsította és leegyszerűsítette a reakciók optimalizálását. Segítségével több komplexképződési folyamat idő- és koncentrációfüggését határoztuk meg hosszadalmas mintaelőkészítés nélkül.

7. Summary

During my doctoral studies, I developed methods for the liquid chromatographic separation of positron-emitting radiometals and their complexes with various ligands. With the help of these methods I was able to follow the formation of metal complexes during labeling optimization experiments.

In order to support the cyclotron production of ^{44}Sc , ^{68}Ga and ^{52}Mn isotopes, procedures for the qualitative- and quantitative determination of contaminating transition metals using derivatizing reagents were developed and compared. In addition to the metal ions (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+}) from the respective target material, radioactive and non-radioactive ions were always formed, reducing the attainable radiochemical yields during the subsequent complexation reactions. Radioactive isotopes were identified by gamma spectrometry in the dissolved target material samples. In all cases, it has been proven that the contaminating radionuclides were adsorbed on the ion exchange resins and could be selectively separated from the desired metal isotopes using acid elution. The average radionuclidic composition of the purified final fractions were:

1. ^{44}Sc 98.94%, ^{47}Sc 0.08%; other isotopes: ^{43}Sc , ^{48}Sc , $^{44\text{m}}\text{Sc}$ 0.98%;
2. ^{68}Ga 99.97%, ^{67}Ga 0.018%, ^{66}Ga 0.012%;
3. ^{52}Mn 100%.

Post-column and pre-column derivatization methods for liquid chromatography systems were developed, with which it could be examined the non-radioactive metal ion contaminants in the samples within a short period of time after production. Based on the obtained results, the chromatographic separation with post-column derivatization proved to be a more selective and sensitive method for the detection of metal ions, but due to the complexity of

the instrument assembly and the experienced baseline instabilities, it can't be used for routine quality control. Determination methods based on the color change accompanying the formation of metal complexes using different reagents have also been investigated. Commercially available or self-developed colorimetric tests can be useful for the detection of contaminant metal ions in higher concentrations (more than a few ppm), but they have not proven to be selective enough for use in the ppb range, which is the typical metal content of radioactive samples. It has been founded that the reliability and documentation of the colorimetric tests can be improved if the samples are injected into the HPLC-UV detector without the presence of a column. In addition, HPLC detection allows the use of much smaller sample volumes (30 μ L instead of 5-20 mL), which significantly reduces sample consumption of short-lived radioactive metals during quality control tests. The colorimetric tests, studied in detail, cannot replace atomic spectroscopy techniques for the determination of contaminating metal ions in radioactive samples, but they can stand their ground in the development of production- and purification methods, as well as in the routine quality control of radiometal solutions for isotopic tracers.

Generally applicable liquid chromatography methods were developed for the three investigated radiometals, enabling the separation of free chelators labeled with metal isotopes and chelators - even if conjugated to biomolecules. Metal complexes of DOTA and NOTA ligands were used as model compounds. Procedures were developed on three reversed stationary phase analytical columns, retaining the test compounds. The common feature of the methods is that the metal complexes interacted weakly with the stationary phase, presumably through its central metal ion, but the interaction was so weak that the complexes could be eluted from the column with pure water. In an aqueous solution, on the other hand, the free metal ions were bound to the

column. The adsorbed metal ions could be eluted by using a high concentration of salt or a chelating agent. The extent of metal ion adsorption to the HPLC system was studied, which was highly dependent on the quality of the inorganic salt used in the eluent. The developed liquid chromatographic separation is suitable for replacing the thin-layer chromatographic methods widely used in the field of radiochemistry, speeding up and simplifying the serial measurements, reducing the radiation exposure and increasing the reproducibility of the results. A homemade microfluidic system was used to further test the separation methods and to examine the possibility of automating the complex formation reactions. The equipment accelerated and simplified the optimization of labeling reactions. With its help, the time and concentration dependence of several complex formation processes were determined without lengthy sample preparation.

8. Irodalomjegyzék

- (1) Trón, L. *Pozitron Emissziós Tomográfia (PET) - nagy érzékenységű képalkotó eljárás élő rendszerek funkcionális vizsgálatára*. Fizikai Szemle 1995. (5) 160.
- (2) Ter-Pogossian, M. M.; Phelps, M. E.; Hoffman, E. J.; Mullani, N. A. A Positron-Emission Transaxial Tomograph for Nuclear Imaging (PETT). *Radiology* **1975**, *114* (1), 89–98. <https://doi.org/10.1148/114.1.89>.
- (3) Ido, T.; Wan, C.-N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E. Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Analogs. 18F-Labeled 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose, 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Mannose and 14C-2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose. *J Label Compd Radiopharm* **1978**, *14* (2), 175–183. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580140204>.
- (4) van der Meulen, N. P.; Bunka, M.; Domnanich, K. A.; Müller, C.; Haller, S.; Vermeulen, C.; Türlér, A.; Schibli, R. Cyclotron Production of ⁴⁴Sc: From Bench to Bedside. *Nuclear Medicine and Biology* **2015**, *42* (9), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.05.005>.
- (5) Krajewski, S.; Cydzik, I.; Abbas, K.; Bulgheroni, A.; Simonelli, F.; Holzwarth, U.; Bilewicz, A. Cyclotron Production of ⁴⁴Sc for Clinical Application. *Radiochimica Acta* **2013**, *101* (5), 333–338. <https://doi.org/10.1524/ract.2013.2032>.
- (6) Pandey, M. K.; Byrne, J. F.; Jiang, H.; Packard, A. B.; DeGrado, T. R. Cyclotron Production of (68)Ga via the (68)Zn(p,n)(68)Ga Reaction in Aqueous Solution. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, *4* (4), 303–310.
- (7) Kakavand, T.; Mirzaei, M.; Eslami, M.; Valizadeh, S. Cyclotron Production of ⁵²Mn and Monte Carlo Benchmarking. *J Radioanal Nucl Chem* **2015**, *304* (2), 669–674. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3880-9>.
- (8) Környei, J.; Mikecz, P.; Tóth, Gy. PET-Radiofarmakonok: Újdonságok És Új Lehetőségek. *Magyar Onkológia* **2014**, No. 58, 245–250.
- (9) Mikecz, P.; Fekete, A.; Tóth, Gy.; Környei, J.; Bali, T.; Cserenyák, T.; Borbély, K. 2020 Onkológiai PET-Radiógyógyszerei a Klinikumban És a Kutatásban. *Magyar Onkológia* **2020**, No. 64, 104–111.
- (10) Reeth, E. Van; Tham, I. W. K.; Tan, C. H.; Poh, C. L. Super-Resolution in Magnetic Resonance Imaging: A Review. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2012**, *40A* (6), 306–325. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.21249>.
- (11) J. Wang, L. Maurer. Positron Emission Tomography: Applications In Drug Discovery and Drug Development. **2005**, 1053–1075. <https://doi.org/10.2174/156802605774297056>.

- (12) Blodgett, T. M.; Meltzer, C. C.; Townsend, D. W. PET/CT: Form and Function. *Radiology* **2007**, 242 (2), 360–385. <https://doi.org/10.1148/radiol.2422051113>.
- (13) Balon, H. R.; Silberstein, E. B.; Meier, D. A.; Charkes, N. D.; Royal, H. D.; Sarkar, S. D.; Donohoe, K. J.; Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for Thyroid Uptake Measurement. *Thyroid* **2013**, No. 3, 1–4.
- (14) Dittmann, M.; Gonzalez Carvalho, J. M.; Rahbar, K.; Schäfers, M.; Claesener, M.; Riemann, B.; Seifert, R. Incremental Diagnostic Value of [18F]Tetrafluoroborate PET-CT Compared to [131I]Iodine Scintigraphy in Recurrent Differentiated Thyroid Cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2020**, 47 (11), 2639–2646. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04727-9>.
- (15) Giovanella, L.; Avram, A. M.; Iakovou, I.; Kwak, J.; Lawson, S. A.; Lulaj, E.; Luster, M.; Piccardo, A.; Schmidt, M.; Tulchinsky, M.; Verburg, F. A.; Wolin, E. EANM Practice Guideline/SNMMI Procedure Standard for RAIU and Thyroid Scintigraphy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, 46 (12), 2514–2525. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04472-8>.
- (16) Zimmermann, R.; Couchot, P. *Nuclear Medicine: Radioactivity for Diagnosis and Therapy*, 2nd ed.; EDP sciences: Les Ulis, 2017.
- (17) Elsinga, P. H.; Present and Future of PET-Radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine Review* **2012**, No. 5, C13–C16. <https://doi.org/10.5603/NMR.2012.0003>.
- (18) Jødal, L.; Le Loirec, C.; Champion, C. Positron Range in PET Imaging: An Alternative Approach for Assessing and Correcting the Blurring. *Phys. Med. Biol.* **2012**, 57 (12), 3931–3943. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/12/3931>.
- (19) Cheung, M.; Ho, C. A Simple, Versatile, Low-Cost and Remotely Operated Apparatus for [11C]Acetate, [11C]Choline, [11C]Methionine and [11C]PIB Synthesis. *Applied Radiation and Isotopes* **2009**, 67 (4), 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2008.08.018>.
- (20) Jødal, L.; Le Loirec, C.; Champion, C. Positron Range in PET Imaging: Non-Conventional Isotopes. *Phys. Med. Biol.* **2014**, 59 (23), 7419–7434. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/23/7419>.
- (21) Le Fur, M.; Caravan, P. 86Y PET Imaging. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2021; Vol. 651, pp 313–342. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.013>.
- (22) Ma, Z.; Lan, H.; Liu, W.; Wu, S.; Xu, Y.; Zhu, Z.; Luo, W. Photonuclear Production of Medical Isotopes ^{62,64} Cu Using Intense Laser-Plasma Electron Source. *Matter and Radiation at Extremes* **2019**, 4 (6), 064401. <https://doi.org/10.1063/1.5100925>.
- (23) Baimukhanova, A.; Radchenko, V.; Kozempel, J.; Marinova, A.; Brown, V.; Karandashev, V.; Karaivanov, D.; Schaffer, P.; Filosofov, D.

- Utilization of (p, 4n) Reaction for ^{86}Zr Production with Medium Energy Protons and Development of a $^{86}\text{Zr} \rightarrow ^{86}\text{Y}$ Radionuclide Generator. *J Radioanal Nucl Chem* **2018**, 316 (1), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10967-018-5730-7>.
- (24) O'Hara, M. J.; Murray, N. J.; Carter, J. C.; Kellogg, C. M.; Link, J. M. Hydroxamate Column-Based Purification of Zirconium-89 (^{89}Zr) Using an Automated Fluidic Platform. *Applied Radiation and Isotopes* **2018**, 132, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.10.048>.
- (25) Ballard, B.; M. Nortier, F.; R. Birnbaum, E.; D. John, K.; R. Phillips, D.; E. Fassbender, M. Radioarsenic from a Portable $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$ Generator: A Current Perspective. *CRP* **2012**, 5 (3), 264–270. <https://doi.org/10.2174/1874471011205030264>.
- (26) Pruszyński, M.; Loktionova, N. S.; Filosofov, D. V.; Rösch, F. Post-Elution Processing of $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ Generator-Derived ^{44}Sc for Clinical Application. *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, 68 (9), 1636–1641. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2010.04.003>.
- (27) Filosofov, D. V.; Loktionova, N. S.; Rösch, F. A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ Radionuclide Generator for Potential Application of ^{44}Sc -Based PET-Radiopharmaceuticals. *Radiochimica Acta* **2010**, 98 (3). <https://doi.org/10.1524/ract.2010.1701>.
- (28) Roesch, F. Scandium-44: Benefits of a Long-Lived PET Radionuclide Available from the $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ Generator System. *Current Radiopharmaceuticals* **2012**, 5 (3), 187–201.
- (29) Pandey, M. K.; DeGrado, T. R. Cyclotron Production of PET Radiometals in Liquid Targets: Aspects and Prospects. *CRP* **2020**, 13. <https://doi.org/10.2174/1874471013999200820165734>.
- (30) Rodnick, M. E.; Sollert, C.; Stark, D.; Clark, M.; Katsifis, A.; Hockley, B. G.; Parr, D. C.; Frigell, J.; Henderson, B. D.; Abghari-Gerst, M.; Piert, M. R.; Fulham, M. J.; Eberl, S.; Gagnon, K.; Scott, P. J. H. Cyclotron-Based Production of ^{68}Ga , $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$, and $^{68}\text{Ga}[\text{Ga-PSMA-11}]$ from a Liquid Target. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2020**, 5 (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00106-9>.
- (31) Alves, V.; do Carmo, S.; Alves, F.; Abrunhosa, A. Automated Purification of Radiometals Produced by Liquid Targets. *Instruments* **2018**, 2 (3), 17. <https://doi.org/10.3390/instruments2030017>.
- (32) Siikanen, J.; Jussing, E.; Milton, S.; Steiger, C.; Ulin, J.; Jonsson, C.; Samén, E.; Tran, T. A. Cyclotron-Produced ^{68}Ga from Enriched ^{68}Zn Foils. *Applied Radiation and Isotopes* **2021**, 176, 109825. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2021.109825>.
- (33) Thisgaard, H.; Kumlin, J.; Langkjær, N.; Chua, J.; Hook, B.; Jensen, M.; Kassaian, A.; Zeisler, S.; Borjian, S.; Cross, M.; Schaffer, P.; Dam, J. H. Multi-Curie Production of Gallium-68 on a Biomedical Cyclotron and

- Automated Radiolabelling of PSMA-11 and DOTATATE. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2021**, 6 (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00114-9>.
- (34) Lin, M.; Paolillo, V.; Ta, R. T.; Damasco, J.; Rojo, R. D.; Carl, J. C.; Melancon, M. P.; Ravizzini, G. C.; Le, D. B.; Santos, E. B. Fully Automated Preparation of ^{68}Ga -PSMA-11 at Curie Level Quantity Using Cyclotron-Produced ^{68}Ga for Clinical Applications. *Applied Radiation and Isotopes* **2020**, 155, 108936. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.108936>.
- (35) Nelson, B. J. B.; Wilson, J.; Richter, S.; Duke, M. J. M.; Wuest, M.; Wuest, F. Taking Cyclotron ^{68}Ga Production to the next Level: Expeditious Solid Target Production of ^{68}Ga for Preparation of Radiotracers. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**, 80–81, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.01.005>.
- (36) Svedjehed, J.; Pärnaste, M.; Gagnon, K. Demystifying Solid Targets: Simple and Rapid Distribution-Scale Production of ^{68}Ga]GaCl₃ and ^{68}Ga]Ga-PSMA-11. *Nuclear Medicine and Biology* **2022**, 104–105, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2021.10.002>.
- (37) Becker, K. V.; Chernysheva, M.; Barnhart, T. E.; Gagnon, K.; Engle, J. W. A Review of Accelerator-Produced Ga-68 with Solid Targets. *CRP* **2021**, 14 (4), 315–324. <https://doi.org/10.2174/1874471013666201224113651>.
- (38) Lin, M.; Waligorski, G. J.; Lepera, C. G. Production of Curie Quantities of ^{68}Ga with a Medical Cyclotron via the $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ Reaction. *Applied Radiation and Isotopes* **2018**, 133, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.12.010>.
- (39) Talip, Z.; Favaretto, C.; Geistlich, S.; Meulen, N. P. van der. A Step-by-Step Guide for the Novel Radiometal Production for Medical Applications: Case Studies with ^{68}Ga , ^{44}Sc , ^{177}Lu and ^{161}Tb . *Molecules* **2020**, 25 (4), 966. <https://doi.org/10.3390/molecules25040966>.
- (40) Mikolajczak, R.; Huclier-Markai, S.; Alliot, C.; Haddad, F.; Szikra, D.; Forgacs, V.; Garnuszek, P. Production of Scandium Radionuclides for Theranostic Applications: Towards Standardization of Quality Requirements. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2021**, 6 (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s41181-021-00131-2>.
- (41) Umbricht, C. A.; Benešová, M.; Schmid, R. M.; Türlér, A.; Schibli, R.; van der Meulen, N. P.; Müller, C. ^{44}Sc -PSMA-617 for Radiotheragnostics in Tandem with ^{177}Lu -PSMA-617—Preclinical Investigations in Comparison with ^{68}Ga -PSMA-11 and ^{68}Ga -PSMA-617. *EJNMMI Res* **2017**, 7 (1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13550-017-0257-4>.

- (42) Botár, R.; Molnár, E.; Trencsényi, G.; Kiss, J.; Kálmán, F. K.; Tircsó, G. Stable and Inert Mn(II)-Based and PH-Responsive Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (4), 1662–1666. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09407>.
- (43) Lewis, C. M.; Graves, S. A.; Hernandez, R.; Valdovinos, H. F.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Meyerand, M. E.; Nickles, R. J.; Suzuki, M. ⁵² Mn Production for PET/MRI Tracking Of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Theranostics* **2015**, *5* (3), 227–239. <https://doi.org/10.7150/thno.10185>.
- (44) Graves, S. A.; Hernandez, R.; Fonslet, J.; England, C. G.; Valdovinos, H. F.; Ellison, P. A.; Barnhart, T. E.; Elema, D. R.; Theuer, C. P.; Cai, W.; Nickles, R. J.; Severin, G. W. Novel Preparation Methods of ⁵² Mn for ImmunoPET Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00414>.
- (45) Brandt, M.; Cardinale, J.; Rausch, I.; Mindt, T. L. Manganese in PET Imaging: Opportunities and Challenges. *J Label Compd Radiopharm* **2019**, *62* (8), 541–551. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3754>.
- (46) Gschneidner, K. A. The Theory of Phase Formation in Rare Earth Metal Systems. *Archives of Metallurgy and Materials* **2006**, Vol. 51, iss. 4, 519–524.
- (47) Wood, S. A.; Samson, I. M. The Aqueous Geochemistry of Gallium, Germanium, Indium and Scandium. *Ore Geology Reviews* **2006**, *28* (1), 57–102. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2003.06.002>.
- (48) Meehan, P. R.; Aris, D. R.; Willey, G. R. Structural Chemistry of Sc(III): An Overview. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *181* (1), 121–145. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00214-8).
- (49) Tsionou, M. I.; Knapp, C. E.; Foley, C. A.; Munteanu, C. R.; Cakebread, A.; Imberti, C.; Eykyn, T. R.; Young, J. D.; Paterson, B. M.; Blower, P. J.; Ma, M. T. Comparison of Macrocyclic and Acyclic Chelators for Gallium-68 Radiolabelling. *RSC Adv.* **2017**, *7* (78), 49586–49599. <https://doi.org/10.1039/C7RA09076E>.
- (50) Kerdjoudj, R.; Pniok, M.; Alliot, C.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Rösch, F.; Hermann, P.; Huclier-Markai, S. Scandium (Iii) Complexes of Monophosphorus Acid DOTA Analogues: A Thermodynamic and Radiolabelling Study with ⁴⁴ Sc from Cyclotron and from a ⁴⁴ Ti/ ⁴⁴ Sc Generator. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (4), 1398–1409. <https://doi.org/10.1039/C5DT04084A>.
- (51) Erikson, K. M.; Ascher, M. Chapter 10. Manganese: Its Role in Disease and Health. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*; De Gruyter: Berlin, Boston, 2019; pp 253–266. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-016>.

- (52) Lelis, D. F.; Leão, V. A.; Lima, R. M. F. Effect of EDTA on Quartz and Hematite Flotation with Starch/Amine in an Aqueous Solution Containing Mn²⁺ Ions. *REM, Int. Eng. J.* **2016**, 69 (4), 479–485. <https://doi.org/10.1590/0370-44672016690014>.
- (53) Wilkinson, G.; Gillard, R. D. *Comprehensive Coordination Chemistry The Synthesis, Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds V3 Main Group and Early Transition Elements*; Pergamon Press: United Kingdom, 1987.
- (54) Mausner, L. F.; Joshi, V.; Kolsky, K. L. Evaluation of Chelating Agents for Radioimmunotherapy with Scandium-47. *Journal of Nuclear Medicine* **1995**, 36.
- (55) Moghaddam-Banaem, L.; Jalilian, A. R.; Pourjavid, M.; Radfar, E.; Bahrami-Samani, A.; Yavari, K.; Mazidi, M.; Ghannadi-Maragheh, M. Development of a Radioscandium Immunoconjugate for Radioimmunotherapy. *Radiochimica Acta* **2012**, 100 (3), 215–221. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1902>.
- (56) Bartoś, B.; Majkowska, A.; Krajewski, S.; Bilewicz, A. New Separation Method of No-Carrier-Added ⁴⁷Sc from Titanium Targets. *Radiochimica Acta* **2012**, 100 (7), 457–462. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1938>.
- (57) Majkowska-Pilip, A.; Bilewicz, A. Macrocyclic Complexes of Scandium Radionuclides as Precursors for Diagnostic and Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, 105 (2), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.003>.
- (58) Audi, G.; Bersillon, O.; Blachot, J.; Wapstra, A. H. The Nubase Evaluation of Nuclear and Decay Properties. *Nuclear Physics A* **2003**, 729 (1), 3–128. <https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2003.11.001>.
- (59) [Http://Nucleardata.Nuclear.Lu.Se/Toi/](http://Nucleardata.Nuclear.Lu.Se/Toi/).
- (60) Farkas, E.; Nagel, J.; Waldron, B. P.; Parker, D.; Tóth, I.; Brücher, E.; Rösch, F.; Baranyai, Z. Equilibrium, Kinetic and Structural Properties of Gallium(III) and Some Divalent Metal Complexes Formed with the New DATA^m and DATA^{5m} Ligands. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23 (43), 10358–10371. <https://doi.org/10.1002/chem.201701508>.
- (61) Tircsó, Gy.; Molnár, E.; Csupász, T.; Garda, Z.; Botár, R.; Kálmán, F. K.; Kovács, Z.; Brücher, E.; Tóth, I.; Gadolinium(III)-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. A Re-Appraisal. In *Metal Ions in Bio-Imaging Techniques*; Metal ions in life sciences; De Gruyter: Boston, 2021.
- (62) Caravan, P. Strategies for Increasing the Sensitivity of Gadolinium Based MRI Contrast Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (6), 512. <https://doi.org/10.1039/b510982p>.
- (63) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the

- Complexes. *Dalton Trans.* **2008**, No. 23, 3027. <https://doi.org/10.1039/b719704g>.
- (64) Liu, S.; Edwards, D. S. Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12 (1), 7–34. <https://doi.org/10.1021/bc000070v>.
- (65) Ahmedova, A.; Todorov, B.; Burdzhiev, N.; Goze, C. Copper Radiopharmaceuticals for Theranostic Applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 157, 1406–1425. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.051>.
- (66) Oudkerk, M.; Sijens, P. E.; Van Beek, E. J. R.; Kuijpers, T. J. A. Safety and Efficacy of Dotarem (Gd-DOTA) versus Magnevist (Gd-DTPA) in Magnetic Resonance Imaging of the Central Nervous System: *Investigative Radiology* **1995**, 30 (2), 75–78. <https://doi.org/10.1097/00004424-199502000-00002>.
- (67) Kilian, K. 68Ga-DOTA and Analogs: Current Status and Future Perspectives. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **2014**, 19, S13–S21. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.04.016>.
- (68) Huclier-Markai, S.; Sabatie, A.; Ribet, S.; Kubíček, V.; Paris, M.; Vidaud, C.; Hermann, P.; Cutler, C. S. Chemical and Biological Evaluation of Scandium(III)-Polyaminopolycarboxylate Complexes as Potential PET Agents and Radiopharmaceuticals. *ract* **2011**, 99 (10), 653–662. <https://doi.org/10.1524/ract.2011.1869>.
- (69) Otte, A.; Jermann, E.; Behe, M.; Goetze, M.; Bucher, H. C.; Roser, H. W.; Heppeler, A.; Mueller-Brand, J.; Maecke, H. R. DOTATOC: A Powerful New Tool for Receptor-Mediated Radionuclide Therapy. *Eur J Nucl Med* **1997**, 24 (7), 792–795. <https://doi.org/10.1007/BF00879669>.
- (70) Keire, D. A.; Jang, Y. H.; Li, L.; Dasgupta, S.; Goddard, W. A.; Shively, J. E. Chelators for Radioimmunotherapy: I. NMR and Ab Initio Calculation Studies on 1,4,7,10-Tetra(Carboxyethyl)-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (DO4Pr) and 1,4,7-Tris(Carboxymethyl)-10-(Carboxyethyl)-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (DO3A1Pr). *Inorg. Chem.* **2001**, 40 (17), 4310–4318. <https://doi.org/10.1021/ic0010297>.
- (71) Virgolini, I.; Britton, K.; Buscombe, J.; Moncayo, R.; Paganelli, G.; Riva, P. 111In- and 90Y-DOTA-Lanreotide: Results and Implications of the MAURITIUS Trial. *Seminars in Nuclear Medicine* **2002**, 32 (2), 148–155. <https://doi.org/10.1053/snuc.2002.31565>.
- (72) Jensen, A. I.; Severin, G. W.; Hansen, A. E.; Fliedner, F. P.; Eliassen, R.; Parhamifar, L.; Kjær, A.; Andresen, T. L.; Henriksen, J. R. Remote-Loading of Liposomes with Manganese-52 and in Vivo Evaluation of the Stabilities of 52Mn-DOTA and 64Cu-DOTA Using Radiolabelled Liposomes and PET Imaging. *Journal of Controlled Release* **2018**, 269, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.006>.

- (73) Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-Specific Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33 (7), 445. <https://doi.org/10.1039/b309961j>.
- (74) Rinne, S. S.; Vorobyeva, A. Radiometals—Chemistry and Radiolabeling. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2021; p B9780128229606000000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822960-6.00044-2>.
- (75) Nagy, G.; Szikra, D.; Trencsényi, G.; Fekete, A.; Garai, I.; Giani, A. M.; Negri, R.; Masciocchi, N.; Maiocchi, A.; Uggeri, F.; Tóth, I.; Aime, S.; Giovenzana, G. B.; Baranyai, Z. AAZTA: An Ideal Chelating Agent for the Development of ^{44}Sc PET Imaging Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56 (8), 2118–2122. <https://doi.org/10.1002/anie.201611207>.
- (76) Sinnes, J.-P.; Nagel, J.; Rösch, F. AAZTA5/AAZTA5-TOC: Synthesis and Radiochemical Evaluation with ^{68}Ga , ^{44}Sc and ^{177}Lu . *EJNMMI radiopharm. chem.* **2019**, 4 (1), 18. <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0068-1>.
- (77) Bruton, L.; Scott, P. J. H. Automated Synthesis Modules for PET Radiochemistry. In *Handbook of Radiopharmaceuticals*; Scott, P., Kilbourn, M., Eds.; Wiley, 2020; pp 437–456. <https://doi.org/10.1002/9781119500575.ch13>.
- (78) Chao, P. H.-S. Novel Microfluidic Technologies for the Concentration of Radionuclides and Radiotracers for Positron Emission Tomography. In *ProQuest Dissertations and Theses*; University of California, Los Angeles: Ann Arbor, 2019.
- (79) Máté, G.; Szikra, D.; Šimeček, J.; Szilágyi, S.; Trencsényi, G.; Wester, H.-J.; Kertész, I.; Galuska, L. Multiparametric Labeling Optimization and Synthesis of ^{68}Ga -Labeled Compounds Applying a Continuous-Flow Microfluidic Methodology. *Journal of Flow Chemistry* **2016**, 6 (2), 86–93. <https://doi.org/10.1556/1846.2016.00004>.
- (80) Matesic, L.; Kallinen, A.; Greguric, I.; Pascali, G. Dose-on-Demand Production of Diverse ^{18}F -Radiotracers for Preclinical Applications Using a Continuous Flow Microfluidic System. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**, 52, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.05.004>.
- (81) Pfaff, S.; Philippe, C.; Pichler, V.; Hacker, M.; Mitterhauser, M.; Wadsak, W. Microfluidic ^{68}Ga -Labeling: A Proof of Principle Study. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (17), 5997–6004. <https://doi.org/10.1039/C8DT00158H>.
- (82) Lei, M.; Pan, J.; Xu, G.; Du, P.; Tian, M.; Zhang, H. Automated Microfluidic Chip System for Radiosynthesis of PET Imaging Probes. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2019**, 20 (11), 865–867. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900535>.

- (83) Knapp, K.-A.; Nickels, M. L.; Manning, H. C. The Current Role of Microfluidics in Radiofluorination Chemistry. *Mol Imaging Biol* **2020**, 22 (3), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s11307-019-01414-6>.
- (84) Pascali, G.; Watts, P.; Salvadori, P. A. Microfluidics in Radiopharmaceutical Chemistry. *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, 40 (6), 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.04.004>.
- (85) Zeng, D.; Desai, A. V.; Ranganathan, D.; Wheeler, T. D.; Kenis, P. J. A.; Reichert, D. E. Microfluidic Radiolabeling of Biomolecules with PET Radiometals. *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, 40 (1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.08.012>.
- (86) Zhang, X.; Liu, F.; Payne, A. C.; Nickels, M. L.; Bellan, L. M.; Manning, H. C. High-Yielding Radiosynthesis of [68Ga]Ga-PSMA-11 Using a Low-Cost Microfluidic Device. *Mol Imaging Biol* **2020**, 22 (5), 1370–1379. <https://doi.org/10.1007/s11307-020-01515-7>.
- (87) Ovdiiichuk, O.; Roeder, E.; Billotte, S.; Veran, N.; Collet, C. Fully Automated Macro- and Microfluidic Production of [68Ga]Ga-Citrate on MAIO® and IMiDEVTM Modules. *Molecules* **2022**, 27 (3), 994. <https://doi.org/10.3390/molecules27030994>.
- (88) Pharmeuropa 34.2, 2022. <https://www.edqm.eu/en/-/pharmeuropa-34.2-just-released>.
- (89) Roesch, F.; J. Riss, P. The Renaissance of the 68Ge/68Ga Radionuclide Generator Initiates New Developments in 68Ga Radiopharmaceutical Chemistry. *CTMC* **2010**, 10 (16), 1633–1668. <https://doi.org/10.2174/156802610793176738>.
- (90) Larenkov, A. A.; Maruk, A. Ya.; Kodina, G. E. Intricacies of the Determination of the Radiochemical Purity of 68Ga Preparations: Possibility of Sorption of Ionic 68Ga Species on Reversed-Phase Columns. *Radiochemistry* **2018**, 60 (6), 625–633. <https://doi.org/10.1134/S1066362218060103>.
- (91) Maruk, A. Ya.; Larenkov, A. A. Determination of Ionic 68Ga Impurity in Radiopharmaceuticals: Major Revision of Radio-HPLC Methods. *J Radioanal Nucl Chem* **2020**, 323 (1), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06964-1>.
- (92) EDQM (2018) In: Eur Pharmacopoeia 9.0. Gallium (68Ga) Edotreotide Injection (2482).
- (93) Hacht, B. Gallium (III)-Acetate Speciation Studies under Physiological Conditions. *OSJ* **2016**, 1 (1). <https://doi.org/10.23954/osj.v1i1.97>.
- (94) Martins, A. F.; Prata, M. I. M.; Rodrigues, S. P. J.; Geraldés, C. F. G. C.; Riss, P. J.; Amor-Coarasa, A.; Burchardt, C.; Kroll, C.; Roesch, F. Spectroscopic, Radiochemical, and Theoretical Studies of the Ga³⁺ - N - 2-Hydroxyethyl Piperazine- N '-2-Ethanesulfonic Acid (HEPES Buffer) System: Evidence for the Formation of Ga³⁺ - HEPES Complexes in ⁶⁸

- Ga Labeling Reactions: Ga^{3+} -HEPES COMPLEXES IN ^{68}Ga LABELLING. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, 8 (3), 265–273. <https://doi.org/10.1002/cmml.1517>.
- (95) Mueller, D.; Breeman, W. A. P.; Klette, I.; Gottschaldt, M.; Odparlik, A.; Baehre, M.; Tworowska, I.; Schultz, M. K. Radiolabeling of DOTA-like Conjugated Peptides with Generator-Produced ^{68}Ga and Using NaCl-Based Cationic Elution Method. *Nat Protoc* **2016**, 11 (6), 1057–1066. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.060>.
- (96) Kristl, A.; Podgornik, A.; Pompe, M. Simultaneous Separation of Insulin and Six Therapeutic Analogues on a Mixed Mode Column: HPLC-UV Method Development and Application. *Journal of Chromatography B* **2021**, 1171, 122557. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122557>.
- (97) Orlovsky, V.; Zelechonok, Y.; Evolution of Mixed-Mode Chromatography. *Chromatography Today* **2011**, 24–28.
- (98) González-Ruiz, V.; Olives, A. I.; Martín, M. A. Core-Shell Particles Lead the Way to Renewing High-Performance Liquid Chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 64, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.008>.
- (99) Liu, Y.; Sun, K.; Shao, C.; Shi, X.; Zeng, J.; Guo, R.; Zhang, B. Performance of Nanoflow Liquid Chromatography Using Core-Shell Particles: A Comparison Study. *Journal of Chromatography A* **2021**, 1648, 462218. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462218>.
- (100) Poole, C. F.; Atapattu, S. N. Selectivity Evaluation of Core-Shell Silica Columns for Reversed-Phase Liquid Chromatography Using the Solvation Parameter Model. *Journal of Chromatography A* **2020**, 1634, 461692. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461692>.
- (101) Pourmand, A.; Dauphas, N. Distribution Coefficients of 60 Elements on TODGA Resin: Application to Ca, Lu, Hf, U and Th Isotope Geochemistry. *Talanta* **2010**, 81 (3), 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.008>.
- (102) Kilian, K.; Cheda, Ł.; Sitarz, M.; Szkliniarz, K.; Choiński, J.; Stolarz, A. Separation of ^{44}Sc from Natural Calcium Carbonate Targets for Synthesis of ^{44}Sc -DOTATATE. *Molecules* **2018**, 23 (7), 1787. <https://doi.org/10.3390/molecules23071787>.
- (103) Pyrżyńska, K.; Kilian, K.; Pęgier, M. Separation and Purification of Scandium: From Industry to Medicine. *Separation & Purification Reviews* **2019**, 48 (1), 65–77. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1430589>.
- (104) Oehlke, E.; Le, V. S.; Lengkeek, N.; Pellegrini, P.; Jackson, T.; Greguric, I.; Weiner, R. Influence of Metal Ions on the ^{68}Ga -Labeling of DOTATATE. *Applied Radiation and Isotopes* **2013**, 82, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2013.08.010>.

- (105) Pharmeuropa 30.4: PA/PH/Exp. 14/T, 2018, 13 ANP.
- (106) U.S. Environmental Protection Agency's (EPA's) Office of Water (OW). METHOD 1640 DETERMINATION OF TRACE ELEMENTS IN WATER BY PRECONCENTRATION AND INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-MASS SPECTROMETRY, 1997. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1640_1997.pdf.
- (107) Geary, W. J.; Nickless, G.; Polland, F. H. The Metal Complexes of Some Azo and Azomethine Dyestuffs. *Analytica Chimica Acta* **1962**, 26, 575–582. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88433-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88433-0).
- (108) Sommer, L. Complexation of Aluminium, Yttrium, Lanthanum and Lanthanides with 4-(2-Pyridylazo)Resorcinol (Par). *Talanta* **1967**, 14 (4), 457–471. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(67\)80072-9](https://doi.org/10.1016/0039-9140(67)80072-9).
- (109) Ding, X.; Mou, S.; Liu, K.; Siriraks, A.; Riviello, J. Ion Chromatography of Heavy and Transition Metals by On- and Post-Column Derivatizations. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 407 (1–2), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00798-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00798-9).
- (110) Horstkotte, B.; Jarošová, P.; Chocholouš, P.; Sklenářová, H.; Solich, P. Sequential Injection Chromatography with Post-Column Reaction/Derivatization for the Determination of Transition Metal Cations in Natural Water Samples. *Talanta* **2015**, 136, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.001>.
- (111) Ahmed, S. H.; El Gammal, E. M. Chromatographic Separation and Determination of Some Heavy Metals and the Sum of the Rare Earth Elements in Some Geological Materials. *Chem. Pap.* **2020**, 74 (10), 3491–3501. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01182-6>.
- (112) Hu, Q.; Yang, G.; Yang, J.; Yin, J. Study on Determination of Iron, Cobalt, Nickel, Copper, Zinc and Manganese in Drinking Water by Solid-Phase Extraction and RP-HPLC with 2-(2-Quinolinyazo)-5-Diethylaminophenol as Precolumn Derivatizing Reagent. *J. Environ. Monitor.* **2002**, 4 (6), 956–959. <https://doi.org/10.1039/b204874b>.
- (113) Li, Z.; Yang, G.; Wang, B.; Jiang, C.; Yin, J. Determination of Transition Metal Ions in Tobacco as Their 2-(2-Quinolinyazo)-5-Dimethylaminophenol Derivatives Using Reversed-Phase Liquid Chromatography with UV–VIS Detection. *Journal of Chromatography A* **2002**, 971 (1–2), 243–248. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01040-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01040-3).
- (114) Zhang, C.; Miura, J.; Nagaosa, Y. Determination of Cadmium, Zinc, Nickel and Cobalt in Tobacco by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with 2-(8-Quinolylazo)-4,5-Diphenylimidazole as a Chelating Reagent. *Anal. Sci.* **2005**, 21 (9), 1105–1110. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1105>.

- (115) Burakham, R.; Srijaranai, S.; Grudpan, K. High-Performance Liquid Chromatography with Sequential Injection for Online Precolumn Derivatization of Some Heavy Metals. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30* (16), 2614–2619. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700215>.
- (116) Roston, D. A. Precolumn Chelation with 4-(2-Pyridylazo)Resorcinol for Simultaneous Determination of Metal Ions by Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (2), 241–244. <https://doi.org/10.1021/ac00266a027>.
- (117) Chaly, T.; Dahl, J. R. Thin Layer Chromatographic Detection of Kryptofix 2.2.2 in the Routine Synthesis of [18F]2-Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology* **1989**, *16* (4), 385–387. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(89\)90105-0](https://doi.org/10.1016/0883-2897(89)90105-0).
- (118) Martínez-Zepeda, D. L.; Meza-González, B.; Álvarez-Hernández, M. L.; Bazany-Rodríguez, I. J.; Vilchis Néstor, A. R.; Cortés-Guzmán, F.; Gómez-Espinosa, R. M.; Valdes-García, J.; Dorazco-González, A. Efficient Naked Eye Sensing of Tartrate/Malate Based on a Zn-Xylenol Orange Complex in Water and Membrane-Based Test Strips. *Dyes and Pigments* **2021**, *188*, 109239. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109239>.
- (119) Študlar, K.; Janoušek, I. The Photometric Determination of Zinc with Xylenol Orange. *Talanta* **1961**, *8* (4), 203–208. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(61\)80065-9](https://doi.org/10.1016/0039-9140(61)80065-9).
- (120) Smith, F. E.; Herbert, J.; Gaudin, J.; Hennessy, D. J.; Reid, G. R. Serum Iron Determination Using Ferene Triazine. *Clinical Biochemistry* **1984**, *17* (5), 306–310. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(84\)90613-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(84)90613-1).
- (121) Dahlén, J.; Karlsson, S. Determination of Iron(II) in Natural Waters by Capillary Zone Electrophoresis Using on-Capillary Complexation with 2,4,6-Tri(2'-Pyridyl)-1,3,5-Triazine. *Journal of Chromatography A* **1999**, *848* (1–2), 491–502. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00433-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00433-1).
- (122) Kennedy, J. A.; Powell, H. K. J. Colorimetric Determination of Aluminium(III) with Chrome Azurol S and the Reactivity of Hydrolysed Aluminium Species. *Analytica Chimica Acta* **1986**, *184*, 329–333. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86501-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86501-0).
- (123) Pakalns, P. Spectrophotometric Determination of Aluminium with Chrome Azurol s. *Analytica Chimica Acta* **1965**, *32*, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88892-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88892-3).
- (124) Kim, D.; Jo, A.; Seo, B.-K.; Lee, K.-W.; Park, W. H.; Lee, T. S. Colorimetric Detection of Transition Metal Ions with Azopyridine-Based Probing Molecule in Aqueous Solution and in PMMA Film. *Fibers Polym* **2013**, *14* (12), 1993–1998. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-1993-3>.

- (125) McCall, K. A.; Fierke, C. A. Colorimetric and Fluorimetric Assays to Quantitate Micromolar Concentrations of Transition Metals. *Analytical Biochemistry* **2000**, *284* (2), 307–315. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4706>.
- (126) Thermo Scientific Technical Note 10 Ic-Transition-Metals Tn72544.
- (127) Severin, G. W.; Engle, J. W.; Valdovinos, H. F.; Barnhart, T. E.; Nickles, R. J. Cyclotron Produced ⁴⁴gSc from Natural Calcium. *Applied Radiation and Isotopes* **2012**, *70* (8), 1526–1530. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.04.030>.
- (128) Baranyai, Z.; Tircsó, G.; Rösch, F. The Use of the Macrocyclic Chelator DOTA in Radiochemical Separations. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020* (1), 36–56. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900706>.
- (129) Tewari, B. B. Paper Electrophoretic Technique in the Study of Metal Complexes. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2009**, *54* (7), 1135–1138. <https://doi.org/10.1134/S0036023609070225>.
- (130) Pniok, M.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Sabatie-Gogová, A.; Plutnar, J.; Huclier-Markai, S.; Hermann, P. Thermodynamic and Kinetic Study of Scandium(III) Complexes of DTPA and DOTA: A Step Toward Scandium Radiopharmaceuticals. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (26), 7944–7955. <https://doi.org/10.1002/chem.201402041>.
- (131) Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I. Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA–Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (23), 10960–10969. <https://doi.org/10.1021/ic101378s>.
- (132) Kandegedara, A.; Rorabacher, D. B. Noncomplexing Tertiary Amines as “Better” Buffers Covering the Range of PH 3–11. Temperature Dependence of Their Acid Dissociation Constants. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (15), 3140–3144. <https://doi.org/10.1021/ac9902594>.
- (133) Morfin, J.-F.; Tóth, É. Kinetics of Ga(NOTA) Formation from Weak Ga-Citrate Complexes. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (20), 10371–10378. <https://doi.org/10.1021/ic201445e>.
- (134) Byrne, S. L.; Chasteen, N. D.; Steere, A. N.; Mason, A. B. The Unique Kinetics of Iron Release from Transferrin: The Role of Receptor, Lobe–Lobe Interactions, and Salt at Endosomal PH. *Journal of Molecular Biology* **2010**, *396* (1), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.023>.
- (135) Levina, A.; Lay, P. A. Transferrin Cycle and Clinical Roles of Citrate and Ascorbate in Improved Iron Metabolism. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (5), 893–900. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b01100>.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szikra Dezsőnek, hogy munkám során folyamatosan segített és támogatott. Köszönöm továbbá, hogy bármikor fordulhattam hozzá a felmerülő kérdéseimmel, problémáimmal és hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérte.

Köszönöm a Nukleáris Medicina tanszéken működő Radiokémiai kutatócsoport és az Intézet valamennyi munkatársának, hogy a gyógyszergyártásban betöltött minőségellenőrzési munkámban és a Ph.D. képzésemhez szükséges kutatói tevékenységemben is mindvégig segítettek.

Köszönöm a Fizikai Kémiai Tanszék Ritka(föld)fém Kutatócsoport munkatársai és hallgatói, illetve Baranyai Zsolt és hallgatói által biztosított ligandumokat, valamint Dr. Baranyai Edinának és Sajtos Zsófinak az ICP-OES mérésekhez nyújtott segítségüket.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani legfőképpen a Férjemnek a kitartó támogatásáért és szakmai segítségéért, valamint köszönöm a Családomnak és a Barátaimnak a folyamatos támogatásukat, biztatásukat, és hogy mindig mellettem álltak.

10. Publikációs lista

Az értekezés alapját képező közlemények

1. **V. Forgács**, I. Jószai, A. Fekete, D. Szikra
HPLC method development using a mixed-mode column for following ^{68}Ga -radiolabeling
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, **2023**; (IF: 1,6, Q3)
2. **V. Forgács**, A. Fekete, B. Gyuricza, D. Szücs, Gy. Trencsényi, D. Szikra
Methods for the determination of transition metal impurities in cyclotron produced radiometals
Pharmaceuticals, **2022**, 15 (1), 1-24.; (IF: 4,6, D1)

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények

3. D. Szücs, T. Csupász, J. P. Szabó, A. Kis, B. Gyuricza, V. Arató, **V. Forgács**, A. Vágner, G. Nagy, I. Garai, D. Szikra, I. Tóth, Gy. Trencsényi, Gy. Tircsó, A. Fekete
Synthesis, physicochemical, labeling and in vivo characterization of ^{44}Sc -labeled DO3AM-NI as a hypoxia sensitive PET probe
Pharmaceuticals, **2022**, 15 (6), 1-16.; (IF: 4,6, D1)
4. I. Jószai, C. A. Balogh, Cs. Hámori, D. Molnár, **V. Forgács**, B. Rubleczyk, Gy. Trencsényi
Determination of total radiochemical purity of $^{[18]\text{F}}\text{FDG}$ and $^{[18]\text{F}}\text{FET}$ by high-performance liquid chromatography avoiding TLC method
Chromatographia, **2022**, 85, 469-479.; (IF: 1,7, Q3)
5. T. Csupász, N. Lihi, Zs. Fekete, A. Nagy, R. Botár, **V. Forgács**, D. Szikra, N. V. May, Gy. Tircsó, F. K. Kálmán
Exceptionally fast formation of stable rigidified cross-bridged complexes formed with Cu(II) isotopes for molecular imaging
Inorganic Chemistry Frontiers; **2022**, 6, 1-26; (IF: 7,0, D1)
6. B. Gyuricza, J. P. Szabó, V. Arató, N. Dénes, Á. Szücs, K. Berta, A. Kis, D. Szücs, **V. Forgács**, D. Szikra, I. Kertész, Gy. Trencsényi, A. Fekete
Synthesis of ^{68}Ga -labeled cNGR-based glycopeptides and in vivo evaluation by PET imaging
Pharmaceutics, **2021**, 13 (12), 1-14.; (IF: 6,525, Q1)

7. R. Mikolajczak, S. Huclier-Markai, C. Alliot, F. Haddad, D. Szikra, **V. Forgács**, P. Garnuszek
Production of Scandium radionuclides for theranostic applications, Towards standardization of quality requirements
Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag. (EJNMMI) Radiopharmacy and Chemistry, **2021**, 6, 1-40.; (IF: -)
8. **V. Forgács**, E. Németh, B. Gyuricza, A. Kis, J. P. Szabó, P. Mikecz, P. Mátyus, Zs. Helyes, T. Kálai, Gy. Trencsényi, A. Fekete, D. Szikra
Radiosynthesis and preclinical investigation of ^{11}C labelled 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime ([^{11}C]SZV-1287)
ChemMedChem, **2020**, 15 (24), 2470-2476, (IF: 3,466, Q1)

Az értekezés témakörében tartott előadások

1. **Viktória Forgács**, Dezső Szikra
Methods for the determination of transition metal impurities in cyclotron produced radiometals
III. Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, **2021.** Június 04-05., Online
2. **Forgács Viktória**, Leskó Máté, Szikra Dezső
Ciklotronnal előállított ^{44}Sc radiojelzési hatékonyságának optimalizálása
XLII, Kémiai Előadói Napok (KEN), **2019.** Október 28-30., Szeged
3. **Forgács Viktória**, Szikra Dezső, *Ciklotronnal előállított ^{44}Sc radiojelzési hatékonyságának optimalizálása*, Őszi Radiokémiai Napok, **2019.** Október 9-11., Balatonszárszó
4. **Forgács Viktória**, Szikra Dezső
Pozitronbomló fémizotópokkal történő jelzések folyadékkromatográfiás követése
Őszi Radiokémiai Napok, **2018.** Október 10-12., Balatonszárszó
5. **Forgács Viktória**, Szikra Dezső
Pozitronbomló fémizotópokkal történő jelzések folyadékkromatográfiás követése
Analitikai Napok, **2018.** Április 23-24., Balatonszemes

Az értekezés témakörében bemutatott posztterek

1. **Forgács Viktória**, Szikra Dezső
Ciklotronnal előállított radiofémek minőségellenőrzésére szolgáló módszerek kidolgozása
II, Fiatal Kémikusok Fóruma (FKF) Szimpózium, **2021.** Június 16-18., Online
2. **V. Forgács**, M. Leskó, D. Szikra
Determination of transition metal ion impurities in cyclotron produced ^{44}Sc and ^{68}Ga by reversed-phase liquid chromatography
7th European Federation for Medicinal Chemistry - Young Medicinal Chemist Symposium (EFMC-YMCS), **2020.** Szeptember 09-11., Online
3. D. Szikra, **V. Forgács**, G. Nagy, A. Vágner, A. Fekete, Gy. Trencsényi
Development of a solid target system
European Association of Nuclear Medicine (EANM), **2019.** Október 12-16., Barcelona, Spanyolország
4. **Forgács Viktória**, Fekete Anikó, Baranyai György, Szikra Dezső
 ^{44}Sc ciklotronnal történő előállítása és radiojelzési reakcióinak követése
"Hevesy György" Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XXI, Kongresszusa, **2019.** Május 30 - Június 1., Hajdúszoboszló
5. **V. Forgács**, A. Fekete, Gy. Baranyai, D. Szikra
Radiolabeling optimization with cyclotron produced ^{44}Sc
26th Young Research Fellows Meeting (YRFM), **2019.** Február 20-22.; Párizs, Franciaország
6. R. Mikolajczak, D. Pawlak, W. Wojdowska, T. Janiak, T. Barcikowski, M. Zoltowska, I. Cieszykowska, J. L. Parus, I. Hajdu, Gy. Baranyai, **V. Forgács**, D. Szikra, G. Nagy; *Cyclotron production of Sc-44 from natural calcium*
Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting (SNMMI), **2018.** Június 23-26.; Philadelphia, USA
7. D. Szikra, G. Nagy, Gy. Trencsényi, N. Dénes, **V. Forgács**, E. Berényi, I. Garai
Radiolabeling with ^{68}Ga and ^{44}Sc in a capillary reactor
EANM, **2017.** Október 21-25., Bécs, Ausztria
8. I. Hajdu, **V. Forgács**, A. Fekete, E. Németh, D. Szikra
Development of solid target and purification for the production of scandium-44
EANM, **2017.** Október 21-25., Bécs, Ausztria
9. Hajdu István, **Forgács Viktória**, Fekete Anikó, Németh Enikő, Szikra Dezső
Szilárdtarget fejlesztés és tisztítás optimalizálás szkandium-44 előállítás céljából
"Hevesy György" MONT XX, Kongresszusa, **2017.** Május 25., Budapest