

CEA 1803 - COHEN Yves, INGRAM Jacques

ETUDES RECENTES SUR LE CONTROLE PHARMACEUTIQUE DES  
RADIOELEMENTS (1961).

Sommaire. - Le contrôle des préparations radioactives à usage médical est complexe par suite des difficultés dues à la radioactivité, à l'instabilité et aux modalités d'utilisation de ces solutions.

En effet, l'établissement justifié d'un protocole de contrôle nécessite la connaissance aussi bien du mode de préparation, que des propriétés du radioélément et des particularités parfois contradictoires de son emploi.

Ces contrôles sont de trois ordres physiques, chimiques, biologiques. Des études récentes ont porté sur des préparations de chrome 51, de fer 59, d'arsenic 76. Dans chaque cas, il est apparu nécessaire de pratiquer des contrôles particuliers qui seront exposés dans la communication. La pratique de ces derniers présente un double intérêt; d'une part, ils assurent à l'utilisateur un maximum de garantie, d'autre part, ils orientent le chimiste dans ses mises au point, immédiatement et de façon approfondie.

CEA 1803 - COHEN Yves, INGRAM Jacques

RECENT RESEARCH ON THE PHARMACEUTICAL CHECKING OF RADIO-  
ELEMENTS (1961).

Summary. - Checking on radioactive preparations for medical use is complicated by difficulties due to the radioactivity the instability and the methods of using these solutions.

In effect it is necessary, in order to draw up a practicable set of rules governing such checks, to know both the method of preparation and the properties of the radioelement, as well as special and often contradictory features of its use.

These tests fall into three categories: physical, chemical and biological. Preparations of chromium 51, iron 59 and arsenic 76 have been dealt with in recent studies. In each case special tests were necessary, and these will be described in this paper. The practice of these tests is of twofold interest: firstly they provide a maximum guarantee to the user, and secondly they guide the chemist in his manipulations, immediately and thoroughly.

PREMIER MINISTRE

COMMISSARIAT A  
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

**ETUDES RECENTES  
SUR LE CONTROLE PHARMACEUTIQUE  
DES RADIOELEMENTS**

par

**Yves COHEN et Jacques INGRAND**

**Rapport CEA N° 1803**

**1960**

**CENTRE D'ÉTUDES  
NUCLÉAIRES DE SACLAY  
SERVICE DE DOCUMENTATION  
Boite postale n° 2 - Gif-sur-Yvette (S.-et-O.)**

**- Rapport C.R.A. n° 1803 -**

**Service des Radioéléments Artificiels**

**ETUDES RECENTES SUR LE CONTROLE PHARMACEUTIQUE  
DES RADIOELEMENTS**

**par**

**Ives COHEN et Jacques INGRAND**

**- 1961 -**

## ETUDES RECENTES SUR LE CONTROLE PHARMACEUTIQUE DES RADIOELEMENTS

Parmi les radioéléments artificiels fabriqués au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, qui sont soumis à un contrôle pharmaceutique, nous retiendrons ici trois solutions qui ont fait l'objet d'études récentes :

- la solution de chromate de sodium  $^{51}\text{Cr}$
- la solution de chlorure ferrique  $^{59}\text{Fe}$
- et la solution d'arséniate d'ammonium  $^{76}\text{As}$

Auparavant nous rappelons la définition des préparations radioactives à usage médical : ce sont les préparations de radioéléments mises en forme pharmaceutique (par exemple solutés buvables et préparations injectables, ou topiques destinés à être mis en contact avec la peau) et ajustées à la dose thérapeutique ou diagnostique ; ces préparations deviennent des médicaments administrés sous la responsabilité d'un médecin qualifié.

Leur contrôle est conditionné par trois facteurs principaux, la production, le caractère radioactif des solutions et l'utilisation, comme l'a montré l'un de nous [1] à propos de solutions radioactives d'acide phosphorique, de phosphate de sodium, d'iodure de sodium et du colloïde d'or.

### 1°) La production

Le contrôle des radioéléments dépend de la nature du produit chimique ou cible, soumis à l'irradiation, du mode d'extraction et des limites de purification compatibles avec un bon rendement radioactif.

### 2°) Propriétés particulières à la radioactivité

Les solutions de substances radioactives ne sont pas stables. Indépendamment de la décroissance physique, elles présentent certaines particularités : ainsi la réaction nucléaire communique aux atomes des énergies qui les font participer à des réactions encore peu connues. La radioactivité des solutions peut entraîner la formation des radicaux libres qui modifient la composition du milieu et, par suite de la très faible concentration en atomes radioactifs, une perte importante de radioactivité peut se manifester par adsorption sur les parois des récipients.

### 3°) L'utilisation

L'usage de ces substances n'est pas limité à la seule thérapeutique ou au diagnostic chez l'homme, mais peut comprendre des études biologiques diverses.

Les critères de pureté sont sévères pour éviter aux utilisateurs toute déconvenue provenant d'une imperfection des préparations.

Avant d'exposer les analyses physiques, chimiques et biologiques auxquelles obligent ces diverses considérations, nous décrirons brièvement le mode de préparation des radioéléments étudiés, puisque ce dernier influe sur les essais.

I. - RAPPEL DE LA PREPARATION DES RADIOELEMENTS :

- Le chrome 51, de période 27,8 jours, est préparé à partir de chromate de potassium par l'effet Szilard-Chalmers, au cours duquel le bombardement neutronique arrache à la molécule des atomes radioactifs.

Le chrome radioactif sous forme trivalente est séparé par filtration et transformé en chromate de sodium à l'aide de bioxyde de sodium. La solution est alors amenée à un pH voisin de 6 par l'acide chlorhydrique ; le chlorure de sodium formé par cette neutralisation contribue à l'isotonie de la solution.

- Le fer 59, de période 45 jours, est obtenu par irradiation du fer 58 enrichi par séparation électromagnétique. On dissout l'oxyde de fer utilisé dans l'acide nitrique, qui porte le fer à son état de valence maximum. Après évaporation à sec et reprise par l'acide chlorhydrique, on obtient le fer 59 sous forme de chlorure ferrique qui est mis à la disposition des utilisateurs en solution aqueuse acide (pH 3) et isotonique.

- Quant à l'arsenic 76, de période 26 heures, on le prépare par effet Szilard-Chalmers sur l'acide cacodylique irradié ; une partie de l'arsenic radioactif est retrouvé sous forme d'arsenic trivalent qui est isolé par coprecipitation avec le fer en milieu ammoniacal. Après dissolution du précipité dans l'acide chlorhydrique, le mélange est passé sur une résine cationique qui retient le fer en laissant passer l'arsenic qui est oxydé par l'eau oxygénée à l'état d'arséniate. La solution neutralisée par l'ammoniaque renferme l'arsenic 76 sous forme d'arséniate d'ammonium.

## II. - CONTROLES PHYSIQUES DES RADIOELEMENTS :

Les contrôles physiques comprennent l'identification du radioisotope, l'évaluation de la pureté de son rayonnement et la détermination de la concentration radioactive.

### Identification du radioisotope et évaluation de la pureté de son rayonnement :

Nous réalisons un contrôle du rayonnement par l'étude du spectre d'énergie de l'émission  $\gamma$  ou l'établissement des courbes d'absorption ou de décroissance.

Les radioéléments étudiés doivent posséder la pureté radioactive suivante :

-  $^{51}\text{Cr}$  : moins de 1 p. 1000 d'impuretés radioactives.

Etant donné l'emploi du Chrome 51 en hématologie, nous recherchons en particulier le Rubidium 86, qui, traceur du potassium, pourrait pénétrer dans l'hématie. En effet, la présence de cet élément a été signalée dans certaines préparations de Chrome 51.

-  $^{59}\text{Fe}$  : moins de 10 p. 100 de fer 55. Ce radioélément provient de l'irradiation du fer 54 présent à côté du fer 58, Cette limitation a pour but d'éviter une irradiation interne prolongée par l'isotope du fer de masse 55 qui a une période de 2,6 ans. En effet, le fer des hématies détruites est réutilisé par les tissus hématopoïétiques et n'est éliminé que très lentement.

-  $^{76}\text{As}$  : moins de 1 p. 1000 d'impuretés radioactives contrôlées par spectrométrie  $\gamma$

### Concentration radioactive et activité spécifique :

La mesure de la radioactivité des solutions est effectuée au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay par des physiciens spécialisés qui utilisent les appareils les plus appropriés : compteur de Geiger-Müller, scintillateur, électroscope, chambre d'ionisation.

La détermination de l'activité par  $\text{cm}^3$ , effectuée parallèlement au dosage chimique de l'entraîneur, permet de calculer l'activité spécifique à laquelle nous avons fixé une limite inférieure. Cette limite est liée à l'utilisation qui restreint la quantité de chrome, de fer ou d'arsenic, élément à ajouter au substrat biologique.

- Dans le cas du chrome, il faut éviter l'altération des globules rouges.
- Le fer doit se lier entièrement à une  $\beta$  globuline plasmatique dont la capacité de fixation est limitée.
- Quant à l'arsenic, il doit pouvoir être ingéré à des doses non toxiques.

En conséquence, les activités spécifiques minimales adoptées sont les suivantes :

15 mc/mg pour le chrome 51 dont la concentration radioactive doit en outre être supérieure à  $0,5 \text{ mc/cm}^3$

1 mc/mg pour le fer 59.

20 mc/mg pour l'arsenic 76.

### III.- CONTROLES CHIMIQUES DES RADIOELEMENTS :

Ces contrôles visent à déterminer d'une part la pureté chimique, d'autre part, la teneur en isotope et la pureté radiochimique.

Teneur en isotope :

Le dosage de l'entraîneur, effectué parallèlement à celui de la radioactivité, permet de calculer l'activité spécifique, dont l'intérêt a été souligné plus haut.

Le dosage du chrome, du fer et de l'arsenic est basé sur la réaction colorée de ces éléments avec respectivement la diphénylcarbazine, l'orthophénanthroline et le réactif molybdique.

Pureté radiochimique :

La pureté radiochimique, qui est l'absence d'autre forme chimique du radioélément que celle attendue, est étudiée le plus souvent par chromatographie sur papier. La radioactivité des chromatogrammes est analysée soit au moyen d'un enregistreur automatique, soit par apposition sur un film radiographique.

L'analyse de l'enregistrement ou du cliché permet de détecter toute forme chimique du radioélément dont on connaît le Rf au moyen d'une chromatographie réalisée avec des substances inactives et mettant en oeuvre la révélation colorée des spots.

Le contrôle de la pureté radiochimique des trois radioéléments est réalisée par chromatographie ascendante sur papier Whatman 1, à la température du laboratoire.

Pour le chrome 51, nous utilisons le solvant eau : éthanol : ammoniacal, avec les proportions suivantes : 125 : 50 : 25 cm<sup>3</sup>.

La durée de migration est 2 heures 30.

Le Rf du chromate est égal à 0,9 ; celui du Cr<sup>3+</sup> à 0.

En effet, nous recherchons systématiquement le chrome trivalent dont nous avons récemment montré la présence dans les solutions de chromate de sodium radioactif et l'évolution possible d'une forme soluble en une forme insoluble qui peut

amener une cause d'erreur dans l'utilisation du chrome 51 en hématologie. (2)

Pour le fer 59, le solvant est constitué par un mélange de butanol : eau : ac. acétique : acétylacétate d'éthyle, aux concentrations respectives suivantes : 50 : 30 : 10 : 5 cm<sup>3</sup>  
La durée de migration est 6 heures.  
Le Rf du Fe<sup>3+</sup> est égal à 0,7, celui du Fe<sup>2+</sup> à 0,25.

Dans le cas du fer 59, nous vérifions que la radioactivité coïncide avec le seul spot du fer trivalent.

Pour l'Arsenic 76, le solvant est constitué du mélange Ethanol pyridine : eau : ammoniacque aux concentrations respectives 60 : 20 : 16 : 4.  
La durée de migration est 2 heures.  
Le Rf de l'arséniate est égal à 0,04, celui de l'arséniate à 0,18, celui de l'acide cacodylique à 0,35.

En effet, nous recherchons si l'arséniate radioactif n'est pas souillé d'acide cacodylique, témoin d'une mauvaise purification, ou d'arséniate, ce qui mettrait en évidence une oxydation incomplète.

A l'occasion du contrôle chimique de l'arsenic 76, nous avons utilisé l'analyse par activation à la pile des chromatogrammes.

Cette méthode a l'avantage de permettre le contrôle après leur décroissance physique, des radioéléments médicaux à période courte. Nous l'avons appliquée en outre au cuivre et à l'or.

Ainsi, par des méthodes appropriées, il est possible de vérifier la constance de la composition chimique des préparations qui, par ailleurs, sont soumises à un certain nombre de contrôles biologiques.

#### IV.- CONTROLE BIOLOGIQUE DES RADIOELEMENTS :

Les radioéléments destinés à l'usage médical subissent des contrôles biologiques qui complètent les contrôles physiques et chimiques.

Dans le cas des radioéléments étudiés, nous réalisons des contrôles de stérilité, d'innocuité et d'électivité de fixation.

##### 1°- Stérilité :

La stérilité des préparations injectables de fer 59 et de chrome 51, destinés le plus souvent à l'administration intraveineuse après une incubation in vitro, avec des constituants sanguins, est contrôlée par ensemencement sur les milieux suivants : gélose, bouillon au thioglycolate, milieu de Sabouraud, qui permettent de déceler les germes aérobies ou anaérobies et les champignons. Ces contrôles sont pratiqués sur les préparations stérilisées à l'autoclave à 100° pendant trente minutes.

##### 2°- Innocuité :

Nous entendons par innocuité, l'absence d'effets secondaires indésirables, qu'ils soient dus ou non à la radioactivité.

Chrome 51 - Le contrôle d'innocuité du chrome 51 consiste à rechercher toute substance cytotoxique pouvant léser les hématies à plus ou moins brève échéance. Dans ce but, après marquage des hématies dans les conditions opératoires classiques, nous vérifions d'une part l'absence d'hémolyse après le contact in vitro à 37°, d'autre part le caractère normal de la décroissance de la radioactivité sanguine après injection d'hématies marquées autotransfusées chez l'animal.

Arsenic 76 - Nous vérifions l'absence de toxicité des préparations d'arsenic 76 par injection intraveineuse de celles-ci à la Souris. Avec une dose de 0,2 cm<sup>3</sup> de solution par 10 grammes de poids, ce qui correspond en moyenne à 2 mg d'arsenic par kg, nous n'avons pas observé de mort chez les animaux d'expérience, ni à l'injection, ni les jours qui ont suivi.

3°- Electivité de fixation :

Lors de la mise au point d'une nouvelle substance radioactive, il est nécessaire de définir un test d'électivité.

- pour le chrome 51 - nous établissons le rendement de marquage in vitro des hématies de Lapin, c'est-à-dire la proportion de radioactivité fixée dans les hématies. Cette proportion ne doit pas être inférieure à 75% de la radioactivité introduite.

- pour le fer 59 - nous vérifions après électrophorèse la fixation élective in vitro sur les  $\beta$  globulines plasmatiques.

- pour le fer 59 et l'arsenic 76 -

Nous suivons par autoradiographie, la répartition in vivo de la radioactivité dans l'organisme de la Souris après administration intraveineuse ou orale de ces préparations.

Nous voyons ainsi le fer se concentrer dans le sang, la moëlle osseuse rouge, le foie et la rate ; l'arsenic se fixer au niveau du tube digestif, des os spongieux et de la peau, cette dernière n'étant radioactive qu'après une dizaine d'heures.

Ces derniers essais nous permettent de vérifier globalement les propriétés des préparations mises à la disposition des utilisateurs, ceci dans les conditions mêmes de leur emploi, de façon à éviter au biologiste et au médecin toute surprise.

CONCLUSION :

Nous avons essayé dans cet exposé, de mettre en évidence la complexité du contrôle pharmaceutique des préparations radioactives à usage médical, par suite des difficultés dues à la radioactivité, à l'instabilité et aux modalités d'utilisation de ces solutions.

Certains contrôles doivent être rapides, puisque la décroissance interdit toute possibilité de stockage ; cependant, nous pouvons maintenant mettre à profit les techniques d'analyse par activation.

En ce qui concerne les radioéléments étudiés dans ce travail, nous sommes arrivés à la conclusion qu'ils conviennent à l'usage biologique et médical lorsqu'ils remplissent les conditions suivantes :

(voir tableau p.11)

Manuscrit reçu le 7 décembre 1960.

CARACTERISTIQUES	CONDITIONS A REMPLIR PAR LA PREPARATION RADIOACTIVE		
	Chrome 51 ( <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> )	Fer 59 (Cl <sub>3</sub> <sup>59</sup> Fe)	Arsenic 76 <sup>76</sup> As O <sub>4</sub> H(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
<u>PHYSIQUES</u>			
Activité par cm <sup>3</sup>	> 0,5 mc/cm <sup>3</sup>		
Activité spécifique	> 15 mc/mg		
Pureté du rayonnement	impuretés < 1 p. 1000 radioactives	> 1 mc/mg Fer 55 < 10p.100	> 20 mc/mg impuretés < 1 p. 1000 radioactives
<u>CHIMIQUES</u>			
Pureté radiochimique	Cr <sup>3+</sup> < 5 p.100	Fe <sup>3+</sup> > 95 p.100	As <sup>5+</sup> > 95 p.100
Teneur en ClNa	8,5 p. 1000	9 p. 1000	-
pH	6	3	7
<u>BIOLOGIQUES</u>			
Stérilité	+	+	sans objet ( <sup>76</sup> As administré par voie orale)
Innocuité	- pas d'hémolyse au cours du marquage des hématies - courbe normale de la survie des hématies marquées auto-transfusées.		pas d'effets toxiques chez la Souris après injection de sol. à raison de 0,2cm par 10 g. de poids.
Electivité de fixation	rendement de marquage des hématies > 75 %.	Captation par β globuline	
		Vérification globale par la méthode autoradiographique	

BIBLIOGRAPHIE

- (1) COHEN Y. Ann. Pharm. F2 1959, 17, p.250
- (2) COHEN Y & INGRAND J. Rev. Hématol. 1960, 15, p. 217
-

**FIN**