



**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL**

**2017**

**SISTEMAS EN FLUJO AUTOMATIZADOS PARA  
EXTRAER, PRECONCENTRAR Y DETERMINAR  
TECNECIO-99 EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y EN  
RESIDUOS DE MEDICINA NUCLEAR**

**Marina Villar Pulido**





**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL**

**2017**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología  
Química**

**SISTEMAS EN FLUJO AUTOMATIZADOS PARA  
EXTRAER, PRECONCENTRAR Y DETERMINAR  
TECNECIO-99 EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y EN  
RESIDUOS DE MEDICINA NUCLEAR**

**Marina Villar Pulido**

**Directora: Laura Ferrer Trovato**

**Director: Víctor Cerdà Martín**

**Tutor: José Manuel Estela Ripoll**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**





**Universitat**  
de les Illes Balears

Laboratorio  
de Radiactividad  
Ambiental

Esta Tesis, titulada “*Sistemas en flujo automatizados para extraer, preconcentrar y determinar tecnecio-99 en muestras biológicas y en residuos de medicina nuclear*”, fue realizada por la doctoranda *Marina Villar Pulido*, quien llevó a cabo los trabajos de investigación en el Laboratorio de Radioactividad Ambiental (LaboRA) de la UIB, y en el Laboratorio del Servicio de Radiofarmacia del Hospital Universitario Son Espases, bajo la dirección de la Dra. Laura Ferrer y el Dr. Víctor Cerdà, quienes firman este documento en Palma de Mallorca, a los 4 días del mes de mayo de 2017.

Fdo: Laura Ferrer

Fdo: Víctor Cerdà



## **Agradecimientos**

Ha sido un largo camino desde que hace ya más de 10 años me decidí por la carrera de química. No fue nada vocacional pero conforme avanzaba más me gustaba y eso fue gracias a muchas de las personas a las que he tenido la suerte de conocer, desde entonces y hasta ahora.

Empezando por los compañeros del laboratorio de Química Analítica de la Universidad de Jaén, con Antonio Molina y Nati Ramos, y mis amigas de la carrera con las que tantos momentos memorables pasé.

Siguiendo por la Universidad de les Illes Balears, agradecer a Víctor Cerdà por abrirme las puertas de su laboratorio, a todos los compañeros que lo integraban y, en especial, a Laura y a Jessica que han estado ahí siempre, cuando el método se nos atascaba pero también cuando tocaba celebrar algún logro, por pequeño que fuera. Respondían a todas mis llamadas, siempre con la mejor disposición, y muchos fueron los paseos desde la universidad al hospital para echarme una mano. Muchas gracias por todo, habéis sido clave. También deseo agradecer el soporte financiero para llevar a cabo esta Tesis, a través de un proyecto de investigación financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI), cofinanciado con Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), ref. CTM2013-42401-R, AEI/FEDER, UE.

Todo este esfuerzo habría sido en vano sin las facilidades que he tenido en el servicio y los compañeros que me ayudaron tanto, gracias a Fernando por permitirme 'invadir' el laboratorio al instalar todo el equipo allí y por prestarme su ayuda siempre que se lo pedía.

Por último, la guinda a todo lo pone mi familia, imprescindible en todo este proceso. Gracias por el apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado, por vuestros ánimos cuando a mí me flaqueaban y por sentirlos tan cercanos durante todos estos años.

A mis padres, mis hermanas y Mateu, esta tesis os la dedico a vosotros.





## ABREVIACIONES

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análisis de la Varianza)
AMD	Actividad Mínima Detectable
BC	Bucle de carga
BR	Bucle de reacción
BI	<i>Bead Injection</i> (inyección de perlas de resina para la extracción en fase sólida)
CC	Conducto central o puerto central
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i> (Dispositivo de carga acoplada)
CCD-FC	<i>Central Composite Design Face Centered</i> (Diseño central compuesto centrado en las caras)
DLL	<i>Dinamic Link Library</i> (Librería de Enlace Dinámico)
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido)
DM	<i>Matriz Doehlert</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
EOP	<i>End of Processing</i> (Final del procesado)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análisis por Inyección en Flujo)
GM	<i>Geiger Müller</i>
HEU	<i>High Enriched Uranium</i> (Uranio altamente enriquecido)
HLG-MR	<i>High-level Group on the Security of Supply of Medical Radioisotopes</i> (Grupo de alto nivel para la seguridad en el abastecimiento de radioisótopos médicos)
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
LEU	<i>Low Enriched Uranium</i> (Uranio pobremente enriquecido)
LIS	<i>Lab-In-Syringe</i> (Laboratorio en Jeringa)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción Líquido-Líquido)

LLME	<i>Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextracción Líquido-Líquido)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de Detección)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de Cuantificación)
LOV	<i>Lab-on-valve</i> (Laboratorio en Válvula)
LSC	<i>Liquid Scintillation Counter</i> (Contador de Centelleo Líquido)
LWCC	<i>Liquid Waveguide Capillary Cell</i> (Celda Capilar de Largo Paso Óptico)
NEA	<i>Nuclear Energy Agency</i> (Agencia de Energía Nuclear)
MCFIA	<i>Multicommutated Flow Injection Analysis</i> (Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado)
MPS	<i>Multipumping System</i> (Sistema Multibomba)
MSFIA	<i>Multisyringe Flow Injection Analysis</i> (Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa)
PMMA	Poli-metil-metacrilato
PMT	<i>Photo-Multiplier Tube</i> (Fotomultiplicador)
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflón)
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desviación estándar relativa)
SIA	<i>Sequential Injection Analysis</i> (Análisis por Inyección Secuencial)
SFA	<i>Segmented Flow Analysis</i> (Análisis en Flujo Segmentado)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en Fase Sólida)
TBP	Fosfato de tributilo
TEVA-resin <sup>®</sup>	<i>Tetravalent resin</i> (Resina para la extracción de actínidos tetravalentes y tecnecio)
TiOA	Triisooctilamina
WBEC-resin <sup>®</sup>	<i>Weak base extraction chromatographic resin</i> (Resina para la extracción de tecnecio y plutonio(IV))

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<i>Página</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	1
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	2
<i>RESUMEN</i>	5
<i>RESUM</i>	7
<i>ABSTRACT</i>	9
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b>	<b>11</b>
1.1 Origen del tecnecio	13
1.2 El tecnecio	14
1.3 Fuentes de tecnecio	16
1.4 Aplicaciones en medicina nuclear	19
1.5 Residuos con tecnecio	20
<b>CAPÍTULO 2. Técnicas empleadas</b>	<b>23</b>
2.1 Técnicas de extracción	25
2.1.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva	25
2.1.2 Extracción mediante resinas selectivas	26
2.1.2.1 Resina TEVA <sup>®</sup>	28
2.1.2.2 Resina WBEC <sup>®</sup>	28
2.2 Técnicas de análisis por inyección en flujo	29
2.3 Técnicas de detección	31
2.3.1 Contador de centelleo líquido	31
2.3.2 Espectrofotómetro	33
<b>CAPÍTULO 3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>35</b>
3.1 Hipótesis	37
3.2 Objetivo general	37
3.3 Objetivos específicos	37
<b>CAPÍTULO 4. Materiales y Métodos</b>	<b>39</b>
4.1 Configuración de los sistemas	41
4.1.1 Bureta automática multijeringa	41
4.1.2 Módulos de válvulas de selección y LOV	42

4.1.3	Válvulas solenoides	44
4.1.4	Tuberías y conectores	44
4.2	Software	45
4.3	Optimización multivariante	47
4.3.1	Análisis de cribado de datos o <i>screening</i>	49
4.3.2	Superficie de respuesta	50
4.3.2.1	Función deseabilidad	51
4.4	Patrón de <sup>99</sup> Tc	51
4.5	Cálculo de actividad mínima detectable (AMD)	52
<b>CAPÍTULO 5. Sistema totalmente automatizado para monitorizar <sup>99</sup>Tc en residuos hospitalarios y urbanos mediante resina selectiva con detección UV-Vis</b>		<b>53</b>
5.1	Introducción	55
5.2	Reactivos y materiales	56
5.3	Procedimiento analítico	56
5.4	Resultados y discusión	58
5.4.1	Propiedades de la resina	58
5.4.2	Optimización de las variables del sistema	59
5.4.3	Parámetros analíticos	61
5.4.4	Comparativa con trabajos previos	63
5.4.5	Aplicación en muestras reales	65
5.5	Conclusiones	67
<b>CAPÍTULO 6. Microextracción líquido-líquido dispersiva automatizada de <sup>99</sup>Tc en muestras biológicas y de residuos hospitalarios con determinación mediante contador de centelleo líquido</b>		<b>69</b>
6.1	Introducción	71
6.2	Reactivos y materiales	72
6.3	Procedimiento analítico	72
6.4	Resultados y discusión	74
6.4.1	Selección de disolventes	74
6.4.2	Optimización de las variables del sistema	77
6.4.3	Influencia de la salinidad	80

6.4.4	Parámetros analíticos	81
6.4.5	Aplicación en muestras reales	83
6.5	Conclusiones	85
<b>CAPÍTULO 7. Método simple y automatizado para la determinación de <sup>99</sup>Tc mediante resina selectiva y detección por centelleo líquido en muestras de orina</b>		<b>87</b>
7.1	Introducción	89
7.2	Reactivos y materiales	89
7.3	Procedimiento analítico	90
7.4	Resultados y discusión	92
7.4.1	Configuración del sistema	92
7.4.2	Optimización de las variables del sistema	93
7.4.3	Propiedades de la columna	95
7.4.4	Monitorización de <sup>99</sup> Tc por sistemas automatizados	98
7.4.5	Aplicación en muestras reales	99
7.5	Conclusiones	101
<b>CAPÍTULO 8. Comparativa de los sistemas propuestos</b>		<b>103</b>
<b>CAPÍTULO 9. Conclusiones finales</b>		<b>107</b>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>		<i>111</i>
<i>ANEXOS: Comunicaciones derivadas de esta Tesis</i>		<i>119</i>



## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<b>Tabla 2.1.</b> Composición de la resina WBEC® (Alamine® 336).	29
<b>Tabla 2.2.</b> Condiciones operacionales del LSC.	32
<b>Tabla 5.1.</b> Procedimiento analítico para la automatización completa para la determinación de <sup>99</sup> Tc mediante un sistema LOV-MSFIA con detección LWCC-UV-VIS.	58
<b>Tabla 5.2.</b> Valores optimizados del método totalmente automatizado LOV-MSFIA para la determinación de <sup>99</sup> Tc.	61
<b>Tabla 5.3.</b> Parámetros analíticos del método totalmente automatizado LOV-MSFIA para la determinación de <sup>99</sup> Tc.	63
<b>Tabla 5.4.</b> Pretratamiento aplicado a las muestras de residuos analizadas por el sistema LOV-MSFIA propuesto.	66
<b>Tabla 5.5.</b> Determinación de <sup>99</sup> Tc mediante un sistema automatizado LOV-MSFIA aplicado a muestras de residuos hospitalarios y urbanos (n=3).	67
<b>Tabla 6.1.</b> Procedimiento automatizado para la microextracción líquido-líquido dispersiva de <sup>99</sup> Tc en muestras biológicas y residuos hospitalarios.	74
<b>Tabla 6.2.</b> Dominio experimental de las variables estudiadas en los ensayos de <i>screening</i> y de superficie de respuesta.	79
<b>Tabla 6.3.</b> Influencia de la adición de EDTA sobre las muestras de orina y saliva	81
<b>Tabla 6.4.</b> Parámetros analíticos del sistema desarrollado.	82
<b>Tabla 6.5.</b> Comparación con métodos previos de LLE de <sup>99</sup> Tc.	83
<b>Tabla 6.6.</b> Aplicación del método DLLME-LSC de <sup>99</sup> Tc a muestras biológicas y de residuos.	84
<b>Tabla 7.1.</b> Procedimiento automático para la extracción y preconcentración de tecnecio mediante SPE.	92
<b>Tabla 7.2.</b> Dominio experimental y valores críticos obtenidos a partir de la optimización multivariante para la determinación de <sup>99</sup> Tc mediante el sistema SPE-LSC propuesto.	95
<b>Tabla 7.3.</b> Parámetros analíticos del sistema SPE-LSC propuesto.	97
<b>Tabla 7.4.</b> Aplicación del método SPE-LSC a muestras de orina.	100
<b>Tabla 8.1.</b> Tabla comparativa de las principales características de los sistemas propuestos.	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1.1.</b> Esquema de desintegración radioactiva de <sup>99</sup> Mo.	16
<b>Figura 1.2.</b> Cadena de suministro del mercado global Radiofarmacéutico.	18
<b>Figura 1.3.</b> Red mundial de abastecimiento de radioisótopos de interés médico.	19
<b>Figura 2.1.</b> Representación de las etapas de preconcentración y extracción en el proceso de SPE.	27
<b>Figura 2.2.</b> Sal de amonio cuaternaria de la resina TEVA® y equilibrio de extracción.	28
<b>Figura 2.3.</b> Equilibrio de intercambio catiónico de la resina WBEC®.	29
<b>Figura 2.4.</b> Proceso de producción de luz mediante la interacción de la partícula radioactiva con el líquido de centelleo.	31
<b>Figura 2.5.</b> Representación gráfica del circuito de coincidencia producido en el interior del contador de centelleo líquido.	32
<b>Figura 2.6.</b> Componentes del sistema de detección espectrofotométrico: (izq.) celda capilar de largo paso óptico y (der) espectrofotómetro miniaturizado Ocean Optics USB2000.	33
<b>Figura 4.1.</b> (I) Bureta multijeringa 4S (Crison Instruments, España), equipada con jeringas de diferentes volúmenes. (II) Esquema del funcionamiento de la válvula solenoide ubicada en la cabeza de cada jeringa.	42
<b>Figura 4.2.</b> Módulo de válvulas de selección/inyección Pump 2060 (Crison Instruments, España).	43
<b>Figura 4.3.</b> Rotor con canal de conexión entre el puerto central y los puertos laterales de una válvula de selección (izq.) y una pieza LOV de PMMA (der.).	43
<b>Figura 4.4.</b> Válvula solenoide externa (Takasago Electric Inc, Japón).	44
<b>Figura 4.5.</b> Conectores de PMMA de 4 y 5 vías.	45
<b>Figura 4.6.</b> Menú del hardware, configuración de los instrumentos.	46
<b>Figura 4.7.</b> Ventana de AutoAnalysis: ejemplo de un método empleado con todas las instrucciones que lo componen.	47
<b>Figura 4.8.</b> Diseño Doehlert para dos variables.	50
<b>Figura 4.9.</b> Diseño central compuesto centrado en las caras (CCD-FC) para tres variables.	51
<b>Figura 5.1.</b> Diagrama del sistema LOV-MSFIA para la determinación espectrofotométrica en línea de <sup>99</sup> Tc.	57
<b>Figura 5.2.</b> Superficie de respuesta para las variables que interfieren en la reacción de derivatización de <sup>99</sup> Tc y DPC: [H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] y [DPC].	60
<b>Figura 6.1.</b> Representación gráfica del sistema de LOV empleado para llevar a cabo la DLLME-LSC de <sup>99</sup> Tc en muestras biológicas y residuos hospitalarios.	73



<b>Figura 6.2.</b> Diferentes proporciones de TBP y TiOA como extractantes, y de xileno y dodecano como disolventes orgánicos.	75
<b>Figura 6.3.</b> Influencia de la salinidad en la eficiencia de extracción de $^{99}\text{Tc}$ con 2-propanol/TBP.	76
<b>Figura 6.4.</b> Porcentajes de extracción obtenidos por Aliquat® 336 y TBP, como extractantes frente a varios dispersantes.	77
<b>Figura 6.5.</b> Gráfico de Pareto para un <i>screening</i> con diseño factorial completo $2^k$ .	78
<b>Figura 6.6.</b> Función deseabilidad para dos respuestas: la máxima señal de $^{99}\text{Tc}$ y la mínima desviación estándar relativa (RSD) con un Diseño Central Compuesto centrado en las caras para obtener los valores óptimos en el rango estudiado.	79
<b>Figura 6.7.</b> Influencia de la concentración de NaCl sobre la eficiencia de extracción de $^{99}\text{Tc}$ con Aliquat® 336.	80
<b>Figura 6.8.</b> Espectro obtenido en LSC de una muestra de orina analizada mediante el sistema DLLME-LSC.	84
<b>Figura 7.1.</b> Representación esquemática del sistema LOV para la determinación de $^{99}\text{Tc}$ .	91
<b>Figura 7.2.</b> Diagrama de Pareto obtenido en el análisis de <i>screening</i> .	94
<b>Figura 7.3.</b> Gráfico de deseabilidad usado para obtener los valores óptimos codificados para el volumen y la concentración del eluyente.	95
<b>Figura 7.4.</b> Espectros obtenidos en LSC de muestras de orina sin actividad, de orina con adición de un estándar de 1,25 Bq $^{99}\text{Tc}$ y de un estándar de 1,25 Bq $^{99}\text{Tc}$ , analizadas mediante un sistema LOV.	101



**RESUMEN**

En los últimos años, el uso de  $^{99m}\text{Tc}$  como herramienta con fines diagnósticos ha aumentado considerablemente y por consiguiente también lo ha hecho la generación de residuos de  $^{99}\text{Tc}$ , considerándose este isótopo como un importante contribuidor a la dosis ambiental debido a su largo periodo de semidesintegración ( $2,111 \cdot 10^5$  años), su elevada abundancia y su alta movilidad. En los centros sanitarios con servicio de Medicina Nuclear, en los cuales se emplea  $^{99m}\text{Tc}$ , existen sistemas de gestión que incluyen el almacenamiento y la posterior supervisión de las actividades de los residuos de  $^{99}\text{Tc}$  liberado al medio ambiente. Estos residuos comprenden la orina y las heces de pacientes tratados, ya que son las vías de excreción fisiológicas más frecuentes, además de restos de los eluatos de  $^{99m}\text{Tc}$ , decaídos a  $^{99}\text{Tc}$ . De acuerdo con estos precedentes, es de gran utilidad el desarrollo de diferentes metodologías capaces de monitorear  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas y residuos hospitalarios.

En esta tesis se presentan sistemas parcial y completamente automatizados basados en técnicas de análisis por inyección en flujo que conducen a métodos analíticos de mayor simplicidad, precisión, con un tiempo de análisis menor, con reducción del consumo de muestras y de reactivos, además de una mínima manipulación de muestras y patrones, mejorando así la seguridad del analista. Por otra parte, el uso de resinas selectivas o sistemas de extracción líquido-líquido para extraer y preconcentrar  $^{99}\text{Tc}$  permite eliminar la matriz de la muestra (*clean-up*), evitar las interferencias debido a su elevada selectividad y aumentar el factor de preconcentración, contribuyendo a mejorar la sensibilidad de los métodos.

En un primer trabajo, se presenta un sistema completamente automatizado que incluye todos los pasos del protocolo analítico: desde la extracción y preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$  desde la matriz de la muestra, su derivatización para formar un complejo coloreado hasta su detección espectrofotométrica en línea. La combinación de dos técnicas de análisis por inyección en flujo, i.e. lab-on-valve y análisis por inyección multijeringa (LOV-MSFIA), junto con una celda de largo paso óptico (LWCC) y un espectrofotómetro miniaturizado han permitido alcanzar un alto grado de automatización. El sistema propuesto ha sido aplicado con éxito al análisis de residuos hospitalarios.

En el segundo trabajo se presenta un sistema automatizado para la extracción y preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$ , con posterior detección mediante un contador de centelleo líquido, en muestras biológicas de orina y saliva de pacientes tratados, así como en residuos líquidos. El método se basa en la técnica lab-in-syringe (LIS) y plantea un

nuevo enfoque en el cual se emplea la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), alcanzando parámetros analíticos altamente satisfactorios.

Por último, se presenta una metodología automatizada basada en la técnica de análisis por inyección en flujo (LOV), para la extracción y preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$  utilizando una resina selectiva, con posterior detección mediante un contador de centelleo líquido. Esta combinación resulta en un método muy sencillo pero con unos resultados sumamente satisfactorios en su aplicación a muestras de orina de pacientes tratados.

**RESUM**

En els darrers anys, l'ús de  $^{99m}\text{Tc}$  com a eina amb finalitat diagnòstica ha augmentat considerablement i per tant també ho ha fet la generació de residus de  $^{99}\text{Tc}$ , considerant aquest isòtop com a un important contribuïdor a la dosi ambiental a causa del seu llarg temps de vida mitjana ( $2,111 \cdot 10^5$  anys), a la seva elevada abundància i a la seva alta mobilitat. En els centres sanitaris amb servei de Medicina Nuclear, en els quals s'empra  $^{99m}\text{Tc}$ , hi han sistemes de gestió que inclouen l'emmagatzematge i la posterior supervisió de les activitats dels residus de  $^{99}\text{Tc}$  alliberats al medi ambient. Aquests residus comprenen l'orina i la femta de pacients tractats, ja que són les vies d'excreció fisiològiques més freqüents, a més de restes dels eluats de  $^{99m}\text{Tc}$ , decaiguts a  $^{99}\text{Tc}$ . D'acord amb això, és de gran utilitat el desenvolupament de diferents metodologies amb la capacitat de supervisar  $^{99}\text{Tc}$  en mostres biològiques i residus hospitalaris.

En aquesta tesi es presenten sistemes parcial i completament automatitzats basats en tècniques d'anàlisi per injecció en flux que condueixen a mètodes analítics amb més simplicitat i precisió, amb un temps d'anàlisi menor, una reducció del consum de mostres i de reactius, a més d'una mínima manipulació de mostres i patrons, millorant així la seguretat de l'analista. D'altra banda, l'ús de resines selectives o sistemes d'extracció líquid-líquid per extreure i preconcentrar  $^{99}\text{Tc}$  permet eliminar la matriu de la mostra (*clean-up*), evitar les interferències a causa de la seva elevada selectivitat i augmentar el factor de preconcentració, contribuint així a millorar la sensibilitat dels mètodes.

En un primer treball, es presenta un sistema completament automatitzat que inclou tots els passos del protocol analític: des de l'extracció i preconcentració de  $^{99}\text{Tc}$  des de la matriu de la mostra, la seva derivatització per formar un complex acolorit/ fins a la seva detecció espectrofotomètrica en línia. La combinació de dues tècniques d'anàlisi per injecció en flux, i.e. lab-on-valve i anàlisi per injecció multixeringa (LOV-MSFIA), juntament amb una cel·la de llarg pas òptic (LWCC) i un espectrofotòmetre miniaturitzat han permès assolir un alt grau d'automatització. El sistema proposat ha estat aplicat amb èxit a l'anàlisi de residus hospitalaris.

En el segon treball es presenta un sistema automatitzat per a l'extracció i preconcentració de  $^{99}\text{Tc}$  en mostres biològiques d'orina i saliva de pacients tractats, així com en residus líquids, amb posterior detecció mitjançant un comptador de centelleig líquid. El mètode es basa en la tècnica lab-in-Syringe (LIS) i planteja un nou enfoc en el qual s'empra la microextracció líquid-líquid dispersiva (DLLME), assolint

així paràmetres analítics altament satisfactoris.

Finalment, es presenta una metodologia automatitzada basada en la tècnica d'anàlisi per injecció en flux (LOV), per a l'extracció i preconcentració de  $^{99}\text{Tc}$  utilitzant una resina selectiva, amb posterior detecció mitjançant un comptador de centelleig líquid. Aquesta combinació dona lloc a un mètode molt senzill però amb uns resultats summament satisfactoris en la seva aplicació a les mostres d'orina de pacients tractats.

**ABSTRACT**

In recent years, the use of  $^{99m}\text{Tc}$  as a tool for diagnostic purposes has increased significantly and therefore the generation of  $^{99}\text{Tc}$  waste. This isotope is considered as a major dose contributor to the environment due to its long half-life ( $2,111 \cdot 10^5$  years), its high abundance and high mobility. In hospitals with Nuclear Medicine service, where  $^{99m}\text{Tc}$  is used, there are management systems that include the storage and subsequent monitoring of the activities of  $^{99}\text{Tc}$  released into the environment. These residues comprise the urine and feces of treated patients, since they are the most frequent physiological excretion pathways, in addition to  $^{99m}\text{Tc}$  eluates residues, decayed to  $^{99}\text{Tc}$ . Accordingly, the development of different methodologies capable of monitoring  $^{99}\text{Tc}$  in biological samples and hospital waste is very useful.

In this thesis, partial and fully automated systems based on flow injection analysis techniques are presented, achieving greater simplicity, precision, shorter analysis time, reduction on samples and reagents consumption, besides a minimal sample and standard manipulations, thus improving the analyst's safety. On the other hand, the use of selective resins or liquid-liquid extraction systems to extract and pre-concentrate  $^{99}\text{Tc}$  allows the clean-up of the sample matrix, in order to avoid interferences and to increase the preconcentration, contributing to improve the sensitivity and selectivity of the methods.

In a first contribution, a fully automated system that includes all the steps of the analytical protocol is presented, i.e.  $^{99}\text{Tc}$  extraction and pre-concentration from the sample matrix, its derivatization to form a colored complex until its on-line spectrophotometric detection. The combination of two flow injection analysis techniques, i.e. lab-on-valve and multisyringe flow injection analysis (LOV-MSFIA), together with a long wave capillary cell (LWCC) and a miniaturized spectrophotometer have enabled a high degree of automation. The proposed system has been successfully applied to hospital waste analysis.

The second work presents an automated system for the extraction and pre-concentration of  $^{99}\text{Tc}$  in biological samples of urine and saliva of treated patients, as well as in liquid residues, with subsequent detection by a liquid scintillation counter. The method is based on the lab-in-syringe technique (LIS) and presents a new approach in which dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is used, reaching highly satisfactory analytical parameters.

Finally, an automated methodology is presented, based on the LOV flow injection technique, for the extraction and pre-concentration of  $^{99}\text{Tc}$  using a selective

resin, with subsequent detection by a liquid scintillation counter. This combination results in a very simple method but with extremely satisfactory results on its application to urine samples from treated patients.



# **CAPÍTULO 1**

# **Introducción**



## 1.1 Origen del tecnecio

Históricamente, desde el desarrollo de la tabla periódica por Dimitri Mendeleev, el tecnecio ha sido conocido como el ‘elemento perdido’ de la vacante del elemento 43. Desde 1828, han sido múltiples los estudios fallidos en los que se investigaban elementos químicos que cumplieran características químicas similares al manganeso, llamado *eka-manganeso* [1].

En 1925, Otto Berg, Walter Noddack e Ida Tacke, basándose en el análisis del espectro de rayos X, afirmaron el descubrimiento del elemento 43 y del elemento 75, el renio. El elemento 43 fue nombrado como ‘masurio’ en honor a la región de Masuria situada al este de Prusia, actualmente territorio polaco, de la cual era originario el científico Noddack [2]. El descubrimiento no fue totalmente considerado, ya que posteriores estudios no pudieron ratificar la presencia de masurio de manera natural, mediante el estudio de difracción por rayos X. En aquella época, Emilio Segrè junto con Carlos Perrier investigaban acerca de los elementos perdidos de la tabla periódica y en su visita al laboratorio de Noddack en 1937, afirmaron que era poco probable que sus resultados fueran ciertos ya que estos científicos no pudieron mostrarles las placas de rayos X argumentando que se habían roto.

Una visita de Segrè al laboratorio de Ernest Lawrence en Berkeley en 1936, le permitió llevarse de vuelta a Palermo una pieza de ‘chatarra’ radioactiva del ciclotrón de Lawrence. En esa primera muestra encontró altas cantidades de  $^{32}\text{P}$  y otras especies radioactivas de cobalto, zinc y plata. Segrè solicitó a Lawrence más restos de material radioactivo, y recibió por correo postal una tira de molibdeno. Esta tira, proveniente del material del ciclotrón de Lawrence y no empleado como blanco, fue disuelta en agua regia, y su análisis posterior determinó que la actividad generada podía separarse de zirconio, niobio y molibdeno, arrojando argumentos en contra de la presencia del elemento 43. Al no disponer de una cantidad suficiente del elemento 43 como isótopo estable que pudiera ser pesada no se pudo confirmar su presencia mediante precipitación. Sin embargo, la radioactividad era fácilmente aislable químicamente del manganeso y se comportaba similar al renio, lo cual concordaba con lo establecido en la tabla periódica para el elemento 43. Así quedó probada la existencia del elemento 43, que se conocería como ‘tecnecio’. Más concretamente el primer isótopo fue el  $^{97\text{m}}\text{Tc}$ , de 90 días de semivida, y además la tira original de molibdeno también contenía  $^{95\text{m}}\text{Tc}$  de 60 días de semivida. Aún faltaban por obtener los isótopos de semivida corta y para ello, Segrè se trasladó un tiempo a Berkeley y en colaboración con Seaborg comenzaron los estudios. Mediante el bombardeo de una

tira de molibdeno con deuterones de 8 MeV en el ciclotrón, obtuvieron especies radioactivas de molibdeno (65 h de semivida) que decaían por emisión beta a un isótopo de semivida corta (6 h semivida) con nuevas propiedades: la capacidad de emitir partículas con una energía cercana a los 110 keV. Químicamente confirmaron que, en efecto, se trataba de un isótopo del elemento 43 [3,4].

En 1937, Perrier y Segrè propusieron como nombre para el nuevo elemento, '*technetium*' con el símbolo 'Tc', proveniente del griego '*artificial*' ya que había sido el primer elemento en descubrirse mediante producción artificial.

No fue hasta 1952, cuando apareció la primera evidencia de su presencia en la naturaleza. En 1961, Kenna y Kuroda publicaron el primer estudio capaz de aislar  $^{99}\text{Tc}$  de una muestra de mineral de pechblenda del Congo belga. El proceso analítico sobre este mineral consistía en múltiples filtraciones y extracciones con el fin de aislar y purificar el tecnecio de posibles trazas de renio, también presentes en el propio mineral [5]. En la tierra, la fisión espontánea de  $^{238}\text{U}$  se propone como una fuente de formación permanente de isótopos de tecnecio.

## 1.2 El tecnecio

El tecnecio pertenece al grupo de los metales de transición. Debido a su configuración electrónica  $4d^5 5s^2$ , el tecnecio proporciona múltiples configuraciones para la formación de complejos con un gran número de ligandos, variando su estado de oxidación (EO) de 1 a 7. La estructura de los complejos de tecnecio se caracteriza por el número de coordinación (N), que puede variar de 4 a 7, lo que permite conformaciones geométricas tetraédricas (N= 4), pirámides tetragonales (N= 5), octaédricas (N= 6), octaédricas encapsuladas (N= 7) o bipirámides pentagonales (N= 7). Otro parámetro característico de los complejos de tecnecio es la carga eléctrica de la molécula completa, lo que puede conferirle un carácter aniónico, neutro o catiónico. La alta variabilidad de los núcleos o 'cores' de los complejos resultan en diferentes estabilidades para cada uno de ellos. El pertecneciato (N= 4, EO= +7) es la forma más estable de tecnecio en medio acuoso. La presencia de pertecneciato libre en la disolución de un compuesto de tecnecio es posible, especialmente tras largos periodos de almacenamiento. En los estados de oxidación más bajos, los enlaces químicos del Tc-S, Tc-P(III) y Tc-C(II) son bastante estables en la geometría apropiada [6].

Los radioisótopos de larga semivida del tecnecio, como el  $^{97}\text{Tc}$ ,  $^{98}\text{Tc}$  y  $^{99}\text{Tc}$  están ampliamente presentes en la naturaleza debido al continuo proceso de fisión y activación que tiene lugar en los minerales de uranio y torio. De entre estos isótopos de tecnecio, el  $^{99}\text{Tc}$  es el principal de ellos en estos minerales, debido a que algunos de los productos de fisión de los minerales generan isótopos de Mo estables y que por tanto no se desintegrarán en los otros isótopos de tecnecio. Por tanto, los rendimientos de fisión para los isótopos  $^{97}\text{Tc}$  y  $^{98}\text{Tc}$  son independientes de otras cadenas de desintegración y sus valores oscilan entre  $10^{-6}$ – $10^{-10}$  % en  $^{235}\text{U}$  puro y de  $10^{-8}$ – $10^{-12}$  % en U con composición isotópica natural [7]. Sin embargo, estos rendimientos son muy bajos si se comparan con otros procesos de fisión con neutrones térmicos e inducidos de núclidos fisionables como  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{233}\text{Th}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{236}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{239}\text{Pu}$  y  $^{240}\text{Pu}$ , así como la fisión espontánea de  $^{238}\text{U}$ . Este último proceso es la principal fuente de  $^{99}\text{Tc}$  en la naturaleza gracias a las grandes cantidades de uranio presentes. Por ejemplo, considerando que el contenido medio de uranio es de aproximadamente 1 g de U por tonelada de corteza terrestre, suponiendo un espesor medio de unos 17 km, con una densidad media de  $2,8 \text{ kg m}^{-3}$  y un porcentaje de 0,5 % de la masa de la tierra, implicaría una cantidad de U del orden de  $10^{17}$  mol (alrededor de  $2,4 \cdot 10^{16}$  kg U). Esto permitiría estimar la presencia de tecnecio de manera natural en la corteza terrestre, en una cantidad en equilibrio de alrededor de  $1,5 \cdot 10^6$  kg  $^{99}\text{Tc}$ , provenientes de la fisión espontánea del  $^{238}\text{U}$  [8, 9].

Por su parte, el  $^{99}\text{Mo}$  se desintegra mediante dos vías  $\beta^-$ , siendo la principal la que genera  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  que a su vez, mediante transición isomérica, da lugar al  $^{99}\text{Tc}$  con una energía de 140 keV (Figura 1.1). Con un 100% de probabilidad, el  $^{99}\text{Tc}$  decae al isótopo estable  $^{99}\text{Ru}$ , transcurrido un periodo de semidesintegración tan largo que algunos autores, coloquialmente, se refieren al  $^{99}\text{Tc}$  como “estable”.

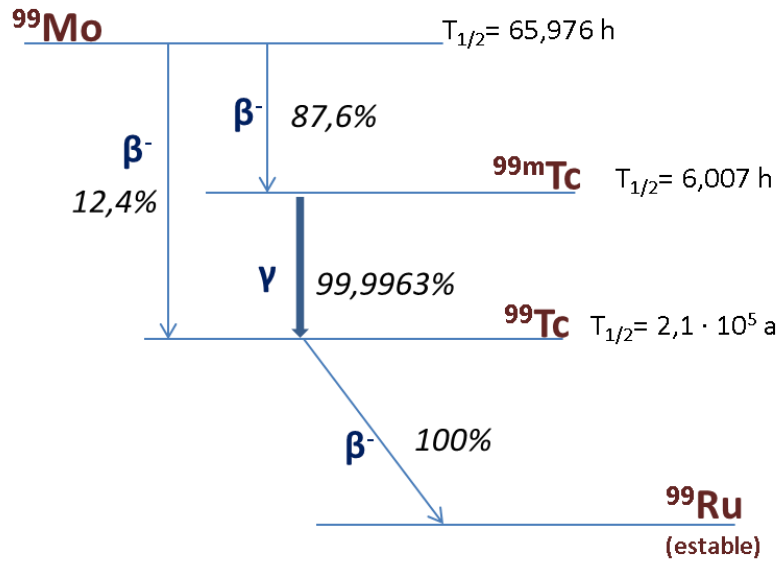


Figura 1.1. Esquema de desintegración radioactivo de  $^{99}\text{Mo}$ .

### 1.3 Fuentes de tecnecio

Hoy en día, la principal fuente de  $^{99}\text{Tc}$  de manera artificial es la fisión de uranio en los reactores nucleares. En esta fisión se producen como resultados muchos radionúclidos y entre ellos se encuentra el  $^{99}\text{Mo}$ . Además, se producen también cantidades del orden de los kilogramos de  $^{99}\text{Tc}$  que se recuperan como residuos de fisión y que llegan incluso a superar la cantidad de renio en la tierra [10].

Las emisiones de  $^{99}\text{Tc}$  al medio ambiente son causadas por el ciclo del combustible nuclear (en particular, en el reprocesamiento del combustible), por los primeros ensayos de la bomba atómica y por el uso generalizado del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  desintegrándose en  $^{99}\text{Tc}$ , en pruebas de radiodiagnóstico. Esta última fuente de  $^{99}\text{Tc}$  es una de las principales, y la que resulta de interés para el objeto de esta tesis.

Para la producción del radionúclido padre  $^{99}\text{Mo}$ , existen actualmente varios procesos [11]. De entre ellos, la ruta dominante es la fisión con neutrones de  $^{235}\text{U}$  natural o enriquecido isotópicamente (LEU, *low enriched uranium* o HEU, *high enriched uranium*), mientras que la ruta secundaria de producción es la activación de  $^{98}\text{Mo}$  natural o enriquecido isotópicamente. Los blancos de  $^{235}\text{U}$  son irradiados durante aproximadamente una semana, tras la cual, se retiran del reactor y se disuelven en una disolución ácida o básica para extraer el  $^{99}\text{Mo}$ . Este proceso ofrece unos rendimientos elevados gracias al alto flujo de neutrones que se genera en la fisión, a la

masa de  $^{235}\text{U}$  disponible y a la alta probabilidad de fisión cuando un neutrón impacta con el blanco [9].

De manera globalmente extendida, el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se obtiene a partir de generadores  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ , donde el  $^{99}\text{Mo}$  está adsorbido sobre una columna de óxido de alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y, mediante la elución con una disolución de cloruro sódico al 0,9 %, se separa el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  generado por la desintegración radioactiva del padre. Esta columna se comporta como una columna de intercambio aniónico común, donde el tecnecio se eluye en forma de pertechnetato de sodio, con EO +7. Este proceso se puede repetir hasta la desintegración completa del radionúclido padre, lo que permite múltiples eluciones con las que disponer al momento el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con el que trabajar. Esta alta disponibilidad ha sido el principal factor que ha permitido el avance de las pruebas diagnósticas con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en Medicina Nuclear.

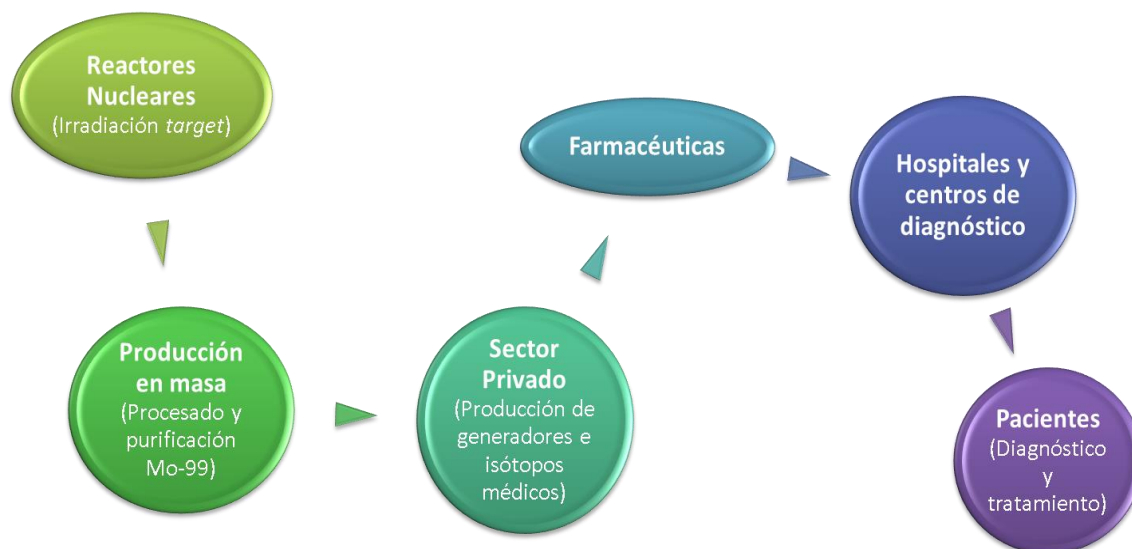
Sin embargo actualmente, pese al ratificado éxito de estos generadores, son múltiples los estudios que pretenden obtener  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  prescindiendo de la fuente de  $^{99}\text{Mo}$  obtenida en los reactores nucleares. En su lugar se están ensayando ciclotrones donde blancos de  $^{100}\text{Mo}$  son bombardeados con protones ( $^{100}\text{Mo} (p, 2n) ^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) [12-15]. Este creciente aumento de estudios acerca de la producción de  $^{99}\text{Mo}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se puede explicar por los intermitentes cortes y restricciones en el suministro de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  que han tenido lugar en años anteriores. Estas situaciones se han debido al aumento de la demanda de este isótopo en Medicina Nuclear y a la falta de previsión del suministro [16].

El uso del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en Medicina Nuclear supone cerca del 80 % de las pruebas diagnósticas que se llevan a cabo en este campo y esto supone alrededor de 35 millones de exploraciones en todo el mundo cada año. Un informe de la NEA (*Nuclear Energy Agency*) de 2016, estimó una demanda de este isótopo de 9000/ 6-day curies  $^{99}\text{Mo}$  EOP (*End of Processing*) a la semana, a las centrales encargadas de su procesado [17]. El término “6-day curies”, es la medida de la radioactividad remanente de  $^{99}\text{Mo}$  seis días después de su expedición desde el centro de procesado.

La cadena de producción, procesado y distribución de  $^{99}\text{Mo}$  está organizada a nivel global desde aquellas centrales donde se irradia el blanco, pasando por las encargadas de la extracción y purificación del  $^{99}\text{Mo}$ , hasta las responsables de la manufacturación de los generadores de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . En la Figura 1.2 se esquematiza todo el proceso.

Se prevé que esta situación de creciente demanda se estabilice y, que el abastecimiento en la cadena de producción sea suficiente y pueda mantenerse en el tiempo. La NEA creó en 2009 un grupo denominado ‘Grupo de alto nivel para la

seguridad en el abastecimiento de radioisótopos médicos (HLG-MR)', el cual es responsable de supervisar el estado global del suministro de estos isótopos, teniendo en cuenta posibles paradas técnicas de los reactores en funcionamiento y de los futuros cierres de los hoy en día existentes.



**Figura 1.2.** Cadena de suministro del mercado global Radiofarmacéutico.

En la Figura 1.3 se recoge un organigrama a nivel mundial del abastecimiento de radioisótopos en el ámbito médico, desde los suministradores de uranio hasta los distribuidores de material radioactivo en centros hospitalarios. Como puede observarse, el mercado europeo representa un 25 % del mercado global, lo que atestigua el extenso uso que se hace del  $^{99m}\text{Tc}$  en nuestra región.



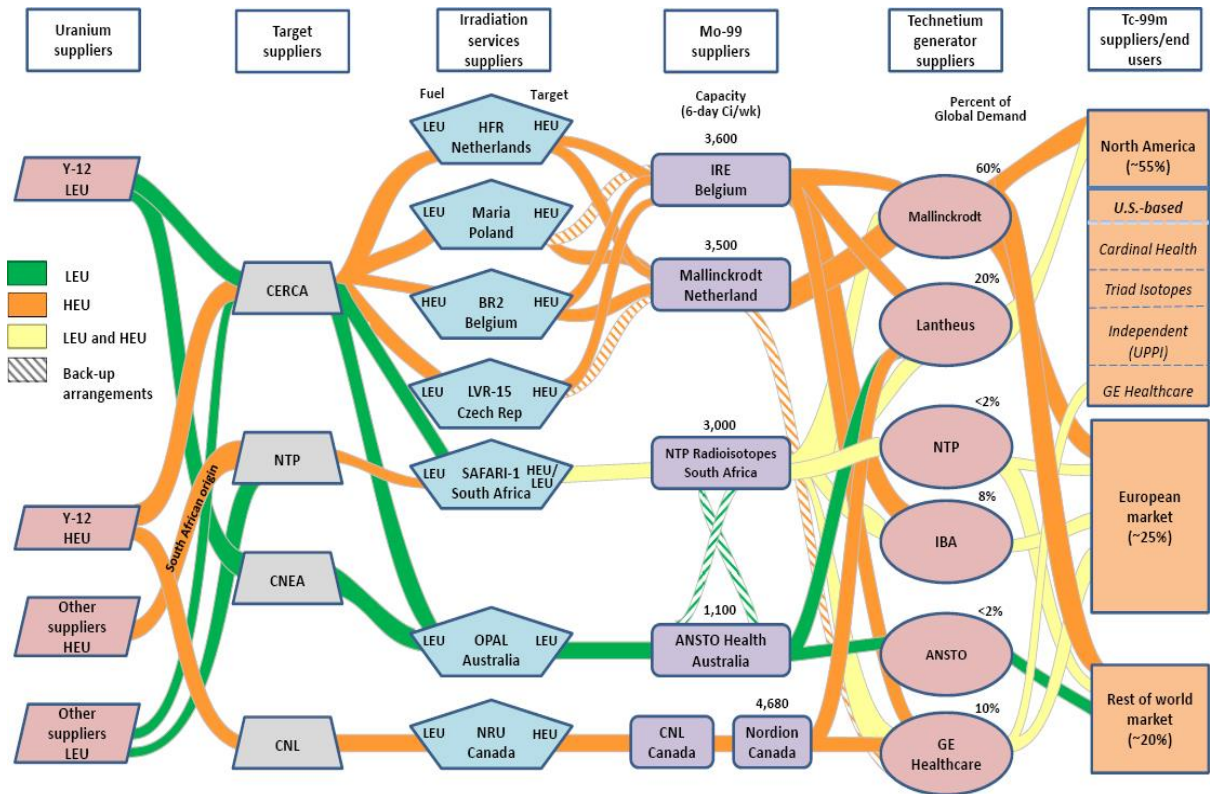


Figura 1.3. Red mundial de abastecimiento de radioisótopos de interés médico [18].

### 1.4 Aplicaciones del tecnecio en Medicina Nuclear

La Medicina Nuclear es una especialidad médica basada en el uso de radioisótopos con fines principalmente diagnósticos, con los que proporcionar una información esencialmente funcional, pero también con fines terapéuticos y de investigación médica. Se basa en la administración de radiofármacos por diferentes vías (oral, intravenosa, inhalatoria, intracavitaria, etc.) para posteriormente estudiar su biodistribución en el organismo.

Se puede definir *radiofármaco* como aquella sustancia que contiene un átomo radioactivo dentro de su estructura y que, por su formulación farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrado con fines diagnósticos o terapéuticos. Existen diversas clasificaciones de los radiofármacos, pero siguiendo el criterio de cómo han sido diseñados podemos hablar de primera, segunda y tercera generación de radiofármacos. En la primera, se radiomarcaban compuestos químicos que fueran capaces de dirigirse a un órgano determinado pero sin receptores específicos o bien se administraban radiopartículas que siguieran procesos fisiológicos. Ya en la década de los 80's, los radiofármacos de segunda generación emergieron gracias al desarrollo

de compuestos que contenían un radiometal unido a ligandos o a agentes quelantes bifuncionales, que por un extremo se unían al metal y por otro a receptores biológicos. Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación se utilizan en Medicina Nuclear para obtener imágenes de regiones moleculares específicas, y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados, tales como receptores y enzimas. Los agentes bifuncionales suelen ser moléculas bioactivas específicas de los receptores, tales como fracciones de anticuerpos, péptidos, péptidos miméticos, análogos de ADN y ligantes no peptídicos.

En Medicina Nuclear, el  $^{99m}\text{Tc}$  siempre ha ocupado una posición destacada gracias a su alta disponibilidad y su bajo costo a pesar del importante crecimiento de las pruebas diagnósticas mediante isótopos emisores de positrones, más concretamente con radiofármacos que contienen  $^{18}\text{F}$ . Es por tanto necesario mantener la investigación y el desarrollo de nuevos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  de tercera generación. Gracias a los diferentes EO y las configuraciones que puede adoptar el tecnecio, las posibilidades en el diseño de estos radiofármacos superan las limitaciones que supone la presencia de un metal no fisiológico como el tecnecio en la marcación de biomoléculas.

En todos los casos, el primer paso para la formación del quelato con tecnecio, es la reducción de este desde el estado de oxidación +7, en su forma de ión pertecneciato, tal cual se obtiene tras su elución del generador, hasta un EO que permita la coordinación. Este proceso va a estar influido por la naturaleza del ligando y del reductor, que generalmente es  $\text{SnCl}_2$ , por el pH y por la temperatura.

## 1.5 Residuos con tecnecio

Cuando un paciente acude al servicio de Medicina Nuclear para someterse a una prueba diagnóstica con algún radiofármaco de  $^{99m}\text{Tc}$ , se le administra una inyección del mismo vía intravenosa o, en ciertos casos, la administración es por vía inhalatoria o subcutánea. Independientemente de la vía de administración, el radiofármaco se biodistribuye alcanzando los órganos objeto de la prueba diagnóstica. La biodistribución, eliminación y excreción del tecnecio vendrán determinadas por la farmacocinética del radiofármaco [19].

El ión pertecneciato tiene una biodistribución similar a la de los iones yoduro y perclorato, concentrándose temporalmente en las glándulas salivares, plexos coroideos, estómago (mucosa gástrica) y la glándula tiroidea, de donde es liberado de

forma intacta. Además, tiende a concentrarse en áreas con mayor vascularización o con una permeabilidad vascular anormal, en particular cuando se ha realizado un tratamiento previo con agentes bloqueantes que inhibe la captación en las estructuras glandulares.

La eliminación del pertecneio se realiza por tres mecanismos principales: eliminación rápida (depende del equilibrio de la difusión con respecto al fluido intersticial); tasa intermedia de eliminación (depende de la concentración de pertecneio en los tejidos glandulares, principalmente en el tiroideo y salivar, así como en las glándulas del fundus gástrico que tienen un mecanismo de bombeo iónico); y eliminación lenta (mediante filtración glomerular por los riñones, que depende de la tasa de excreción urinaria).

Las principales vías de excreción son la urinaria y la fecal, aunque existen otras vías como la salival. Durante las primeras 24 h tras la administración, la excreción del pertecneio es fundamentalmente urinaria (aproximadamente el 25%) y la excreción fecal tiene lugar en las 48 h siguientes. Aproximadamente el 50% de la actividad administrada es excretada en las primeras 50 h. Al mismo tiempo, se produce el decaimiento radioactivo del  $^{99m}\text{Tc}$  al isótopo hijo  $^{99}\text{Tc}$ . Otros radiofármacos cuyo átomo de tecnecio no esté en su forma completamente oxidada, sufrirán estas mismas vías de excreción pero las fracciones excretadas y los tiempos diferirán.

Por lo tanto, en el área de Medicina Nuclear el proceso de decaimiento puede ser cuantificado a partir de la cantidad de  $^{99}\text{Tc}$  en los residuos de saliva, orina y heces, excretados por los pacientes tratados, así como del exceso de  $^{99m}\text{Tc}$  no utilizado, que es recogido y almacenado hasta que decae a  $^{99}\text{Tc}$ .

En el hospital Son Espases, estos residuos, líquidos y sólidos, se almacenan en tres tanques o depósitos blindados de 35 hectolitros de capacidad cada uno. El sistema de llenado de estos depósitos es consecutivo, es decir, comienza a llenarse el depósito 1, este se completa y empieza el llenado del depósito 2, y de igual manera se llena el depósito 3. Cuando ya están los tres depósitos llenos, al depósito 1 se le realiza una estimación de la dosis de manera conservadora, para ello se tiene en cuenta que toda la actividad que ha sido inyectada a todos los pacientes tratados durante el tiempo de llenado del depósito, será recogida en el mismo. Según lo anterior y de acuerdo con la carga asistencial del servicio, cada depósito permanece cerrado hasta su evacuación al menos 3 meses, consiguiendo que la actividad teórica en ese momento sea aproximadamente de  $2 \cdot 10^3$  Bq. Este valor es inferior al Límite Derivado de Concentración de Agua más restrictivo que es de  $1,60 \cdot 10^4$  Bq/m<sup>3</sup>. Este se calcula a partir del isótopo de mayor energía y semivida empleado en el servicio, el  $^{131}\text{I}$ . Para calcular este valor se considera como límite de dosis para público 1 mSv/a,

grupo de edad < 17 años y tasa de ingestión promedio de 600 L/a [20]. Cuando se comprueba que la actividad no supera ningún límite se procede a su vertido en el sistema público de alcantarillado. Además cada uno de los depósitos contiene un detector Geiger-Müller para monitorear la actividad del caudal de salida al desagüe. Gracias a lo cual todo el circuito de los residuos radioactivos del servicio queda completamente monitoreado.

Considerando el elevado número de exploraciones con radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  y, en consecuencia el gran volumen de residuos con  $^{99}\text{Tc}$  generados, resulta de interés científico conocer la fracción de este isótopo en el global de los residuos vertidos para así desarrollar metodologías que permitan su rápida cuantificación y conseguir una vigilancia más completa [21-23].

# **CAPÍTULO 2**

# **Técnicas empleadas**



## 2.1 Técnicas de extracción

### 2.1.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva

En 2006, el grupo de M. Rezaee desarrolló una nueva técnica de extracción conocida como microextracción líquido-líquido en fase dispersa, abreviada como DLLME (*Dispersive liquid-liquid microextraction*) [24]. De una manera sencilla y rápida, esta técnica permite la extracción y la preconcentración de compuestos desde matrices acuosas. Consiste en obtener un sistema disolvente–extractante–dispersante óptimo, sobre el cual inyectar rápidamente la muestra y, a continuación separar las dos fases que se generan, ya sea por simple decantación o bien por centrifugación. La inyección rápida de la muestra sobre la mezcla dispersante–extractante es crítica, ya que con una buena mezcla se consigue aumentar la eficiencia de extracción gracias a que se favorece una mayor superficie de contacto y transferencia de masa [25].

De esta técnica cabe destacar ventajas como son la simplicidad de la operación, la rapidez, el bajo costo, la alta recuperación y un elevado factor de enriquecimiento. De esta manera se eliminan los inconvenientes que la técnica inicial de extracción líquido-líquido clásica tiene respecto al alto consumo de tiempo y disolventes. Existen diversos factores que influyen sobre el proceso de extracción como son los disolventes dispersantes y los extractantes, sus volúmenes y el tiempo de extracción, lo cual exige una experimentación previa y un proceso de optimización. Otras características importantes a valorar son la baja viscosidad y la tensión superficial del extractante, ya que van a facilitar la formación espontánea de microgotas [26]. Por una parte, en lo referente al disolvente de extracción o extractante, éste debe ser de una densidad superior a la del agua y además no debe interferir en el método de detección posterior, pudiendo ser disolventes apolares orgánicos clorados. Por otra parte, el dispersante tiene que ser miscible tanto en la fase acuosa de la muestra como en la fase orgánica del extractante, como por ejemplo lo son el acetonitrilo, la acetona o el metanol.

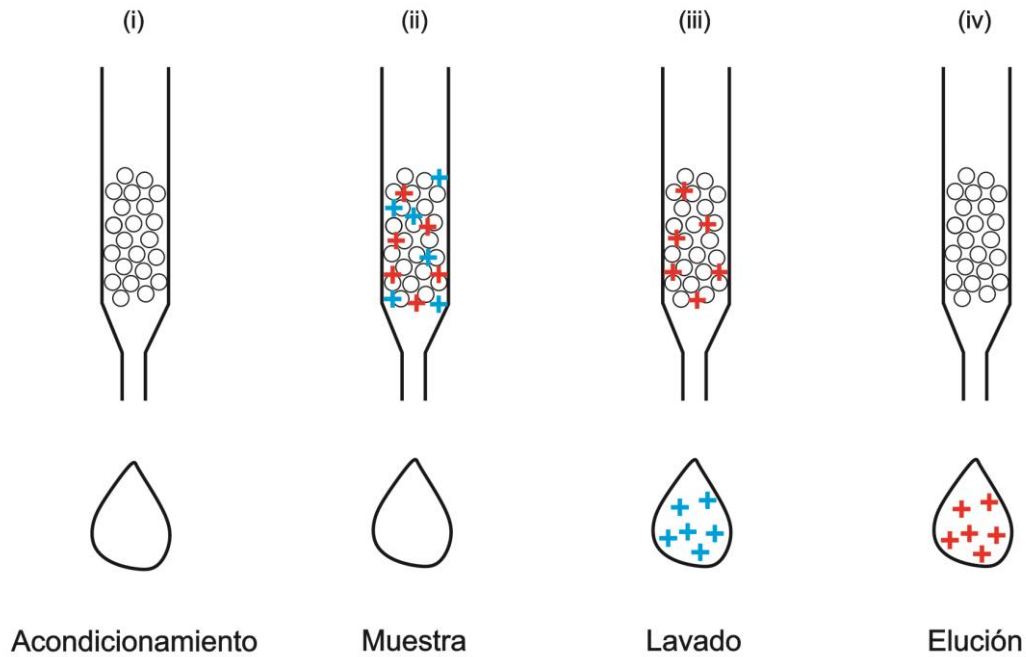
Otro factor importante es el volumen de ambos disolventes, extractante y dispersante, que interfieren en la recuperación y en el factor de enriquecimiento. Por último, el tiempo de extracción es uno de los factores más influyentes en todos los procedimientos de extracción. El tiempo de extracción en la técnica DLLME es muy pequeño, de apenas segundos, gracias a que el sistema extractante–dispersante facilita alcanzar el equilibrio entre las fases acuosas y orgánicas.

### **2.1.2 Extracción mediante resinas selectivas**

Resulta indiscutible que la extracción en fase sólida (SPE) sigue siendo hoy en día una técnica ampliamente extendida dentro de los métodos de preparación de muestras [27]. Hasta no hace mucho tiempo, aún competía con la extracción líquido-líquido (LLE), principalmente en el campo de las muestras ambientales. El desarrollo de la SPE ha crecido gracias a la optimización de los formatos del adsorbente, de la automatización y de la introducción de nuevas fases sólidas en el mercado que han incrementado la selectividad de la extracción. Una de las ventajas con respecto a la LLE, que ha impulsado su crecimiento, es la reducción del consumo de disolventes en los laboratorios. Otra característica es la versatilidad en cuanto al tipo de muestras a analizar, ya que no sólo se limita a muestras polares, sino que combinando diferentes fases móviles y fases sólidas se alcanzan recuperaciones muy satisfactorias de analitos apolares. Este hecho se acompaña con el aumento de disolventes más respetuosos con el medio ambiente, lo cual ha propiciado que incluso ciertas agencias reguladoras implanten como métodos de rutina aquellos que emplean SPE. Otra ventaja de esta técnica, es que además de aislar y preconcentrar analitos de manera rápida, sencilla y reproducible, evita la formación de emulsiones que comúnmente se producen en la LLE y dificultan la posterior separación de las fases.

Las principales etapas de la técnica separativa SPE se representan en la figura 2.1 y son las siguientes: (i) acondicionamiento de la fase sólida, activando los grupos funcionales para asegurar la retención de los analitos; (ii) paso de la muestra a través del adsorbente; (iii) etapa de lavado para eliminar interferencias o (iv) directamente elución del analito de interés. Se desprende de ello que la selección del adsorbente y del eluyente son dos puntos críticos de esta técnica ya que cuanto mayor sea la selectividad del adsorbente, mayor será la sensibilidad del método. Actualmente hay disponibles una amplia variedad de formatos de fase sólida, como son los cartuchos tipo jeringa, los discos o perlas de diferentes diámetros, con adsorbentes muy versátiles.



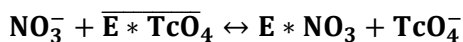
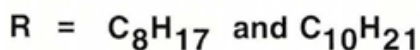
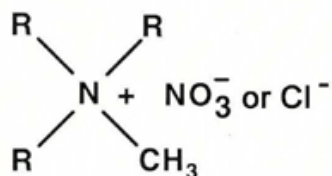


**Figura 2.1.** Representación de las etapas de preconcentración y extracción en el proceso de SPE.

En esta tesis se han empleado resinas selectivas de extracción cromatográfica comerciales (TrisKem International, Bruz, Francia) [28]. Las resinas de extracción cromatográfica combinan la selectividad de la extracción líquido-líquido con la rapidez de los métodos cromatográficos. Si bien estas resinas permiten la separación cromatográfica de dos o más radionúclidos, en esta tesis se han utilizado para la separación y preconcentración sólo de  $^{99}\text{Tc}$ , y de ahí su tratamiento como SPE. La separación del tecnecio se basa en la distribución de los cationes de interés entre una fase orgánica y una acuosa. El extractante es adsorbido por un soporte inerte que contiene la fase orgánica estacionaria. Dicho soporte además de ser inerte con respecto a las reacciones químicas entre la fase orgánica y los cationes retenidos, también debe ser estable ante las influencias mecánicas; comprender una gran superficie específica y además ser esférico para permitir un mejor empaquetamiento. Mientras que el extractante, al ser el que determina la capacidad de la resina, tiene que tener una alta selectividad y necesita ser química y físicamente estable.

### 2.1.2.1 Resina TEVA®

La resina TEVA® (*TEtraVAlent actinides*) se emplea principalmente en la separación de actínidos(IV) y del tecnecio(VII). El grupo funcional que le confiere la capacidad extractante es el Aliquat® 336, que es una sal de amonio cuaternario (trialquilmetilamonio), con grupos nitrato o cloruro, tal como se observa en la Figura 2.2. Esta amina tiene propiedades similares a una resina de intercambio aniónico de base fuerte [29]. Además, el hecho de que los grupos funcionales estén en disolución en lugar de estar fijados en un polímero, le confiere una mayor flexibilidad para coordinarse alrededor del anión de interés. Esto significa que la captación de estos iones es generalmente más alta y ocurre a concentraciones más bajas de ácido [30,31]. La alta retención de Tc(VII) en la resina a baja acidez es debido a la alta selectividad de las sales de amonio cuaternario por el ión pertecneciato frente al anión del ácido.



**Figura 2.2.** Sal de amonio cuaternaria de la resina TEVA® y equilibrio de extracción [28] (E: extractante).

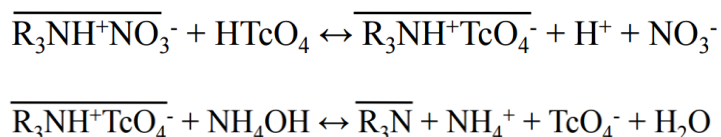
### 2.1.2.2 Resina WBEC®

La resina WBEC® (*Weak Base Extraction Chromatographic*) es una resina compuesta por una mezcla de decilaminas y octilaminas terciarias, conocidas como Alamine® 336 (Tabla 2.1). Estos grupos amino le confieren capacidad para fijar tecnecio cuando este se encuentra en estado de oxidación +7, pero también puede usarse para la extracción de Pu(IV) y ciertos actínidos tetravalentes.

**Tabla 2.1.** Composición de la resina WBEC® (Alamine® 336).

<i>Amina</i>	<i>Contenido (%)</i>
(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) <sub>3</sub> N	27
(C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> )(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) <sub>2</sub> N	47
(C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )N	27
(C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> )N	2,4

Su selectividad es similar a la de la resina TEVA®, con una elución más favorecida, con un equilibrio de intercambio entre el grupo nitrato y el ión pertecneciato tal y como se muestra en la Figura 2.3 [32].



**Figura 2.3.** Equilibrio de intercambio catiónico de la resina WBEC®.

## 2.2 Técnicas de análisis por inyección en flujo

En la actualidad, la automatización de las técnicas analíticas es de gran utilidad para reducir el tiempo de análisis, aumentar la reproducibilidad y garantizar la seguridad del analista. Desde sus inicios, las técnicas de análisis por inyección en flujo han evolucionado considerablemente: desde el análisis en flujo segmentado (SFA) propuesto por Skeggs en 1957 [33], seguido por el análisis por inyección en flujo (FIA) desarrollado por Ruzicka y Hansen en 1975 [34], pasando por el sistema de análisis secuencial (SIA) de Ruzicka y Marshall presentado en 1990 [35], el análisis en flujo multiconmutado (MCFIA) propuesto por Reis y col. en 1994 [36], el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) desarrollado por Cerdà y col. en 1999 [37], hasta las técnicas más recientes como el sistema Lab-on-valve (LOV) propuesto por Ruzicka en el año 2000 [38], el sistema multibomba (MPS) presentado por Lapa y col. en 2002 [39] y el Lab-in-syringe (LIS) propuesto por Maya y col. en 2012 [25].

Con el empleo de estas técnicas de análisis por inyección en flujo se consigue la automatización total o parcial de los protocolos analíticos. Entre las ventajas

alcanzadas, cabe destacar la reducción del consumo de disolventes y reactivos, la disminución del tiempo de análisis, la minimización de la manipulación de la muestra y con ello, la disminución del riesgo para el operador, además de que estos métodos son robustos y altamente reproducibles. La implantación de estas técnicas junto con el acoplamiento, en muchos casos, de los sistemas de detección, ha permitido el análisis de muestras con un método analítico totalmente automatizado.

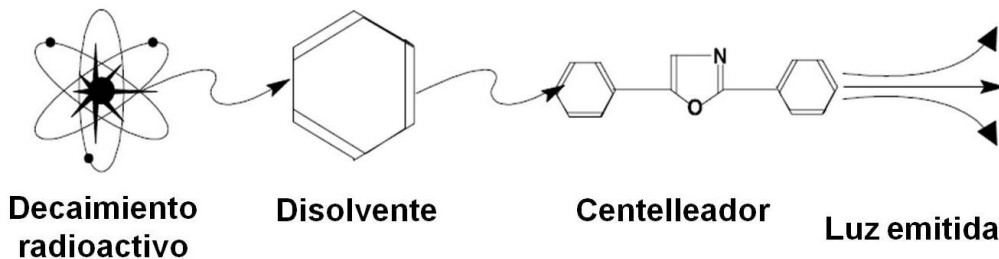
La técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa, conocida como MSFIA, fue introducida en 1999 por el grupo de V. Cerdà. Con esta técnica se subsanaban inconvenientes de las técnicas de inyección en flujo ya existentes y se optimizaban las ventajas que ya tenían. El sistema es sencillo, consiste en un módulo de hasta cuatro jeringas, cuyos pistones son impulsados simultáneamente por un motor paso-a-paso. Se trabaja por tanto en modo multicanal, con la posibilidad de ajustar el caudal variando el volumen de cada una de las jeringas y la velocidad de movimiento del pistón. Este módulo puede conectarse en serie a otros módulos formando una cadena, por ejemplo a una válvula de selección rotatoria para direccionar los líquidos. La técnica MSFIA se controla mediante el software específico AutoAnalysis, que permite el control instrumental, y la obtención y el procesamiento de los datos.

La técnica LOV, que fue desarrollada por J. Ruzicka, ha sido ampliamente utilizada en múltiples estudios que la han aplicado a procesos rutinarios en el laboratorio, facilitando el trabajo del operador. El LOV es una pieza monolítica fabricada con polímeros (usualmente metacrilato), que posee un sistema de canales en miniatura que permite reducir la escala del procedimiento analítico hasta el orden de los microlitros. El LOV se monta sobre una válvula multiposición convencional sustituyendo su tapadera. Trabajando en modo secuencial ofrece la posibilidad de inyectar los reactivos y las muestras invirtiendo el flujo o deteniéndolo, consiguiendo así un sistema extremadamente versátil. Esta versatilidad permite desarrollar trabajos completamente automatizados, programando desde el software todas las instrucciones necesarias del método analítico. Como ventajas cabe destacar, no sólo la compacidad del sistema y la automatización de todas las etapas del método analítico, sino también la integración de todos los componentes múltiples en una estructura rígida lo que mejora la repetitividad del método.

## 2.3 Técnicas de detección

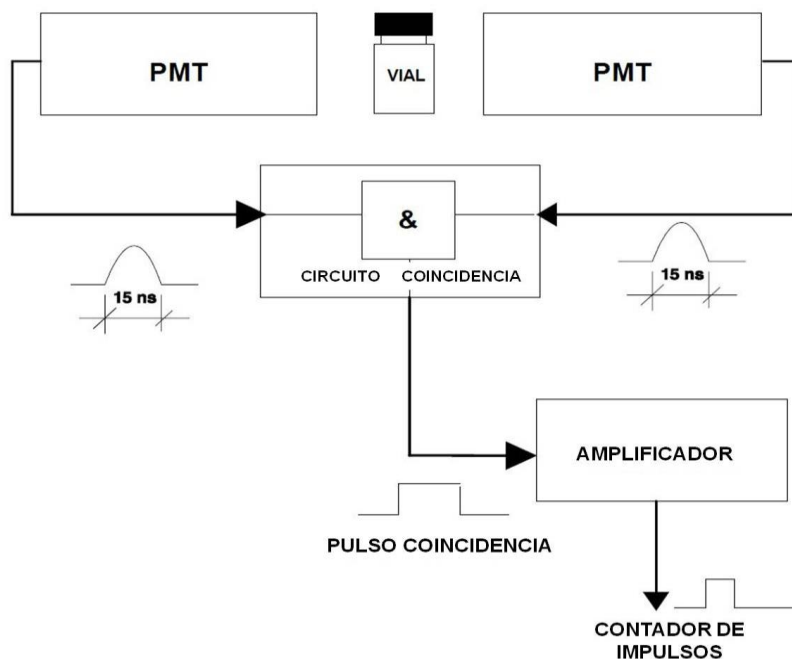
### 2.3.1 Contador de centelleo líquido

Un contador de centelleo líquido está basado en la interacción entre un radionúclido (emisor alfa o beta) y un centelleador, que estará contenido en el líquido de centelleo. El centelleador convertirá la radiación ionizante de los radionucleidos en fotones de luz, cuya intensidad será proporcional a la energía inicial de la partícula emitida. Un dispositivo fotosensible amplifica la luz emitida desde el vial que contiene la mezcla de radionúclido y líquido de centelleo, la señal amplificada se convierte en pulsos de energía eléctrica y es registrada como cuentas (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Proceso de producción de luz mediante la interacción de la partícula radioactiva con el líquido de centelleo.

Las cuentas acumuladas durante este proceso se clasifican en canales separados, de acuerdo con la energía de cada una, y a partir de estos canales se extrae la información para generar el espectro de la muestra. Dos tubos fotomultiplicadores (PMTs) de alto rendimiento y diametralmente opuestos están acoplados a una cámara óptica hermética a la luz, como se muestra en la Figura 2.5. El vial de la muestra se coloca entre ambos PMTs los cuales detectan simultáneamente los centelleos del vial. Esta detección simultánea de una emisión fluorescente dada genera pulsos eléctricos simultáneos (habitualmente 20 ns) y separados, y sólo serán contabilizados aquellos que sean detectados al mismo tiempo en ambos PMTs. Este sistema se conoce como circuito de coincidencia, gracias al cual se evitan interferencias debidas al ruido intrínseco del equipo, reduciendo además el fondo al mínimo [40,41].



**Figura 2.5.** Representación gráfica del circuito de coincidencia producido en el interior del contador de centelleo líquido.

El contador de centelleo líquido empleado en esta tesis ha sido un Tricarb 2810 TR de Perkin Elmer, cuyas condiciones de recuento fueron 1-600 canales, tiempo de recuento de 1800 s y contaje en modo normal, alcanzando una eficiencia de recuento del 97,5 % (Tabla 2.2). La eficiencia del contador de centelleo se determinó a partir de una actividad conocida de un patrón de  $^{99}\text{Tc}$  en  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  y la misma cantidad de disolución de  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pero sin actividad de  $^{99}\text{Tc}$ . No fue necesario estudiar el fenómeno de *quenching* ya en que en todas las muestras la composición fue constante ( $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) al igual que la proporción de mezcla con el líquido de centelleo.

**Tabla 2.2.** Condiciones operacionales del LSC.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Indicador <i>Quenching</i>	tSIE/AEC*
Estandar externo (s)	0,5**
Tiempo contaje (s)	1800
Modo contaje	Normal
Región de contaje (canales)	1-600

\*tSIE/AEC: Índice espectral transformado de los estándares externos acoplados a una corrección automática de eficiencia.

\*\*2s%. Incertidumbre de contaje en un límite de confianza del 95%.

### 2.3.2 Espectrofotómetro

La detección espectrofotométrica se trata de una técnica asequible para cualquier laboratorio, sencilla y rápida pero que presenta baja selectividad y sensibilidad. Para solventar ambos inconvenientes, se ha utilizado como técnica de detección en un sistema que previamente realiza una extracción selectiva y además, utiliza una celda de largo paso óptico.

En cualquier caso, al emplear la espectrofotometría es importante conocer cómo pueden afectar las posibles interferencias de la muestra en la medida de la absorbancia a una determinada longitud de onda, siendo ésta siempre característica de cada molécula o complejo en concreto. La optimización de las condiciones de lectura como pueden ser el disolvente empleado, el pH o la concentración de la muestra es un requisito para asegurar un resultado fiable. Una vez que las condiciones se han optimizado, en todos los casos se requiere la elaboración de una curva de calibrado que relacione la concentración de la muestra con la medida de absorbancia [42].

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad, se ha empleado una celda de largo paso óptico (LWCC) que mejora considerablemente la sensibilidad en el sistema de detección. El principio de funcionamiento de la LWCC se basa en que la luz introducida a través del capilar, fabricado de Teflón AF2400 de largo alcance, es totalmente reflejada hacia el detector, debido a que el índice de refracción de este tubo de teflón es menor que el índice de refracción del líquido que circula por su interior.

En esta tesis, el sistema de detección estaba compuesto por una fuente de luz de deuterio-halógeno (Mikropack, Alemania), dos fibras ópticas de 600  $\mu\text{m}$  d.i. (Ocean Optics, USA), una de ellas conectada a la LWCC de 550  $\mu\text{m}$  d.i., con un paso óptico de  $100,0 \pm 0,5$  cm y volumen interno 240  $\mu\text{L}$  (World Precision Instruments, Florida, USA). La otra fibra óptica conectaba la salida de la celda con un espectrofotómetro Ocean Optics USB2000 miniaturizado (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Componentes del sistema de detección espectrofotométrico: (izq.) celda capilar de largo paso óptico y (der) espectrofotómetro miniaturizado Ocean Optics USB2000.





# **CAPÍTULO 3**

# **Hipótesis y Objetivos**



### 3.1 Hipótesis

El establecimiento de metodologías analíticas automatizadas que incluyan la extracción, preconcentración y, si es posible, la detección en línea de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras radioactivas de origen biológico, o en residuos provenientes del Servicio de Medicina Nuclear, deberá permitir la mejora de los parámetros analíticos (límite de detección, reproducibilidad o frecuencia de análisis) de los métodos radioquímicos clásicos. Además deberá proporcionar algunas ventajas añadidas, tales como aumentar la seguridad del analista, disminuir el consumo de reactivos y minimizar la generación de residuos.

El presente trabajo plantea abordar el desarrollo de sistemas parcial o totalmente automatizados basados en técnicas de análisis por inyección en flujo, que presenten una alta selectividad y sensibilidad, que contribuyan a reducir los tiempos de análisis y el riesgo del analista al manipular muestras radioactivas. Estas características los convertirán en una buena alternativa para la monitorización de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas provenientes de pacientes tratados y de los residuos generados en los servicios de Medicina Nuclear de los hospitales.

### 3.2 Objetivo general

Desarrollar sistemas automatizados basados en técnicas de análisis por inyección en flujo multiconmutadas que permitan tanto la extracción como la preconcentración, y la posterior detección del radionúclido tecnecio-99 en residuos derivados de Medicina Nuclear y en muestras biológicas de pacientes sometidos a pruebas diagnósticas con radiofármacos tecneciados.

### 3.3 Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son los siguientes:

- 1) Desarrollar un sistema completamente automatizado para extraer y determinar espectrofotométricamente  $^{99}\text{Tc}$  en residuos hospitalarios.

2) Desarrollar un sistema automatizado de microextracción líquido-líquido en fase dispersa y posterior detección mediante centelleo líquido de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas y residuos hospitalarios.

3) Desarrollar un sistema automatizado para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras de orina mediante extracción con resina selectiva y posterior detección por centelleo líquido.

La metodología de trabajo básica para conseguir cada uno de los objetivos específicos planteados, es la siguiente:

- Construcción e implementación de los sistemas automáticos mediante el uso de técnicas de análisis por inyección en flujo multiconmutadas.
- Optimización de los sistemas en términos de sensibilidad y reproducibilidad a través de ensayos analíticos de cada una de las variables que influyen en el mismo.
- Determinación de los parámetros analíticos de cada método desarrollado mediante ensayos, utilizando las condiciones óptimas obtenidas en la etapa previa.
- Validación de cada método propuesto.
- Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras reales.

# **CAPÍTULO 4**

# **Materiales y Métodos**



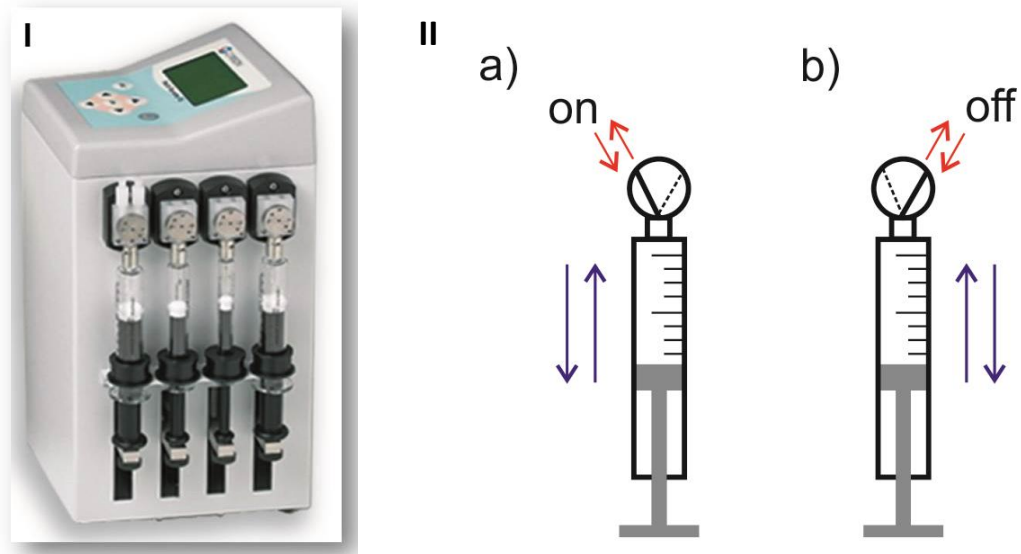
## 4.1 Configuración de los sistemas

### 4.1.1 Bureta automática multijeringa

La bureta multijeringa (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España), Figura 4.1 (I), es un módulo al que se le pueden conectar hasta 4 jeringas de vidrio de diferentes volúmenes (Hamilton, Suiza, 0,5, 1, 2,5 y 10 mL), que se mueven simultáneamente a un caudal programable, ejerciendo la función de una bomba tipo pistón para la propulsión de los líquidos en el sistema. Cada jeringa tiene conectada en su cabeza una válvula solenoide de tres vías (N-Research, USA), lo que facilita la aplicación en esquemas de multiconmutación. Generalmente se conecta “on”: flujo en línea hacia el la red de flujo o *manifold*; “off”: hacia el reservorio de los reactivos, permitiendo cuatro tipo de desplazamientos del flujo: on-dispensar, off-dispensar, on-cargar y off-cargar (Fig.4.1, II). Los émbolos de las jeringas están colocados sobre una barra, cuyo desplazamiento viene regido mediante un motor paso-a-paso.

Cada módulo, dispone además de 4 salidas de voltaje en la parte trasera, que sirven como fuente de alimentación externa (hasta 13 V) para conectar agitadores, microbombas, relés y válvulas solenoides externas, que se controlan también desde el software. Esto aumenta las posibilidades de construcción de sistemas automatizados más complejos y con mayores aplicaciones.

La bureta se conecta al puerto serie de un ordenador para el control remoto de sus operaciones a través de una interfaz RS232 utilizando el software AutoAnalysis. Además, posee otra salida que permite la conexión en cadena con otro dispositivo que comparta la misma configuración de comunicación, por ejemplo una válvula de selección de la misma marca comercial.



**Figura 4.1.** (I) Bureta multijeringa 4S (Crison Instruments, España), equipada con jeringas de diferentes volúmenes. (II) Esquema del funcionamiento de la válvula solenoide ubicada en la cabeza de cada jeringa. a) Activando la válvula solenoide: posición on y b) desactivando la válvula: posición off.

#### 4.1.2 Módulos de válvulas de selección y LOV

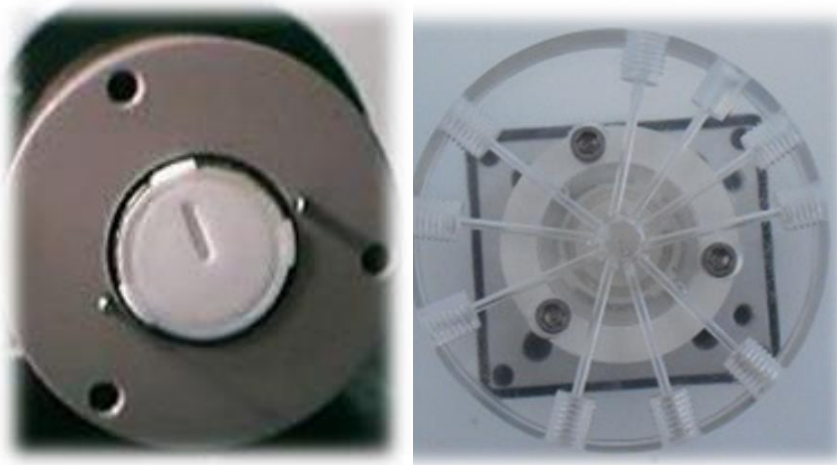
Se trata de un módulo mixto que contiene una válvula de selección de hasta 10 canales (parte superior) y un válvula de inyección de 6 puertos y dos posiciones (parte inferior) (Figura 4.2). Una bomba de pistón (jeringa) es la encargada de impulsar los líquidos, a través de un bucle de carga que se conecta a la posición “on” de la jeringa y al canal central de la válvula de selección. La rotación de la válvula de selección permite direccionar los fluidos hacia o desde los diferentes puertos laterales, permitiendo aspirar y dispensar de forma secuencial los diferentes fluidos desde los distintos puertos periféricos de la válvula de selección.





**Figura 4.2.** Módulo de válvulas de selección/inyección Pump 2060 (Crison Instruments, España).

El sistema LOV de microconductos (Sciware Systems, Bunyola, España), está fabricado a partir de PMMA y comprende hasta diez microcanales integrados (1,5 mm d.i. / 16,0 mm longitud, excepto la microcolumna de 3,2 mm d.i.). La pieza monolítica del LOV se coloca sobre una válvula de selección a la que se le quita la tapa externa que sirve para la conexión de la tubería (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Rotor con canal de conexión entre el puerto central y los puertos laterales de una válvula de selección (izq.) y una pieza LOV de PMMA (der.).

Uno de los microcanales del LOV hace la función de microcolumna, conteniendo las perlas de resina para la extracción selectiva del tecnecio. Esta columna se rellena con una cantidad adecuada de resina evitando su compactación y posibles sobrepresiones. Para contener la resina en la microcolumna del LOV, se coloca un prefiltro de fibra de vidrio (Millipore) o lana de vidrio a la salida de la columna, reteniendo la resina y dejando que las disoluciones fluyan libremente.

#### 4.1.3 Válvulas solenoides

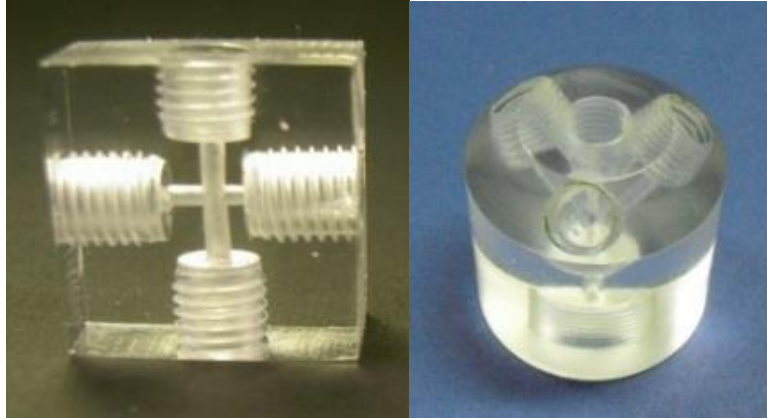
Estas válvulas solenoides externas (Takasago Electric Inc, Japón), Figura 4.4, se ubican en el sistema fuera del módulo multijeringa, si bien funcionan de la misma manera que las que van incorporadas en la bureta multijeringa. Las válvulas solenoides conmutan entre las posiciones “on” y “off”, según el solenoide se encuentre activado o desactivado, dirigiendo el flujo en el sistema.



Figura 4.4. Válvula solenoide externa (Takasago Electric Inc, Japón).

#### 4.1.4 Tubería y conectores

El *manifold* se construyó con tuberías de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de d.i., con excepción de los bucles de carga conectados al LOV que se construyeron con tubería de 1,5 mm de d.i. Todas las conexiones se realizaron por medio de conectores fabricados con PMMA (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Conectores de PMMA de 4 y 5 vías.

## 4.2 Software

El control instrumental, la adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el paquete de software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). La característica principal de este software basado en bibliotecas de enlaces dinámicos (DLL) a 32 bits, es la capacidad de utilizar una aplicación única, versátil, que no conlleva modificaciones adicionales, y que además es compatible con cualquier instrumentación y sistema de detección requeridos. Se trata de un protocolo básico, que permite la implementación de DLL específicas e individuales que se ajusten a la configuración del analizador de flujo montado.

El programa AutoAnalysis está diseñado para ofrecer una gran versatilidad ya que permite la aplicación automática o semiautomática de un gran número de técnicas de flujo así como otros procedimientos de laboratorio. Por tanto, con un único programa se controlan la gran mayoría de los procedimientos analíticos. Para trabajar con el programa, en primer lugar se realiza la conexión de los distintos aparatos e instrumentos necesarios a través de la ventana de *Hardware* (Figura 4.6) para, a continuación, definir el método analítico a seguir con la secuencia de instrucciones, donde cada instrucción puede ser ejecutada por uno de los instrumentos o bien pueden ser comandos usuales en informática, tales como control del tiempo, condicionales, marcas, bucles de repetición, tiempos de espera, etc. AutoAnalysis permite también la definición de procedimientos, que al igual que los métodos, consisten en una secuencia de instrucciones que se agrupan bajo un nombre y pueden ser reutilizados en diferentes métodos (Figura 4.7).

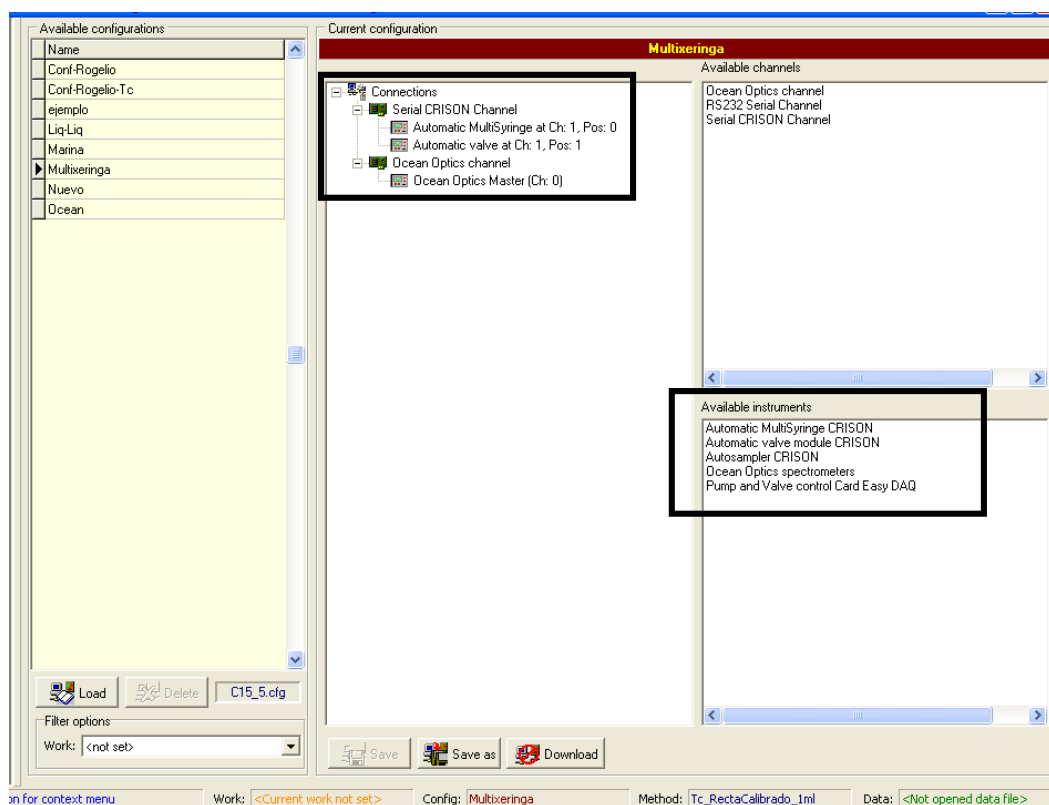


Figura 4.6. Menú del hardware, configuración de los instrumentos.

Una vez ejecutado el método, si el detector está conectado para realizar la detección en línea, se recogen los datos y se procesan, mediante la detección de picos, el cálculo de sus áreas y alturas, tratamientos matemáticos, etc. Finalizado esta etapa es posible exportarlos a hojas de datos tipo Excel [43].

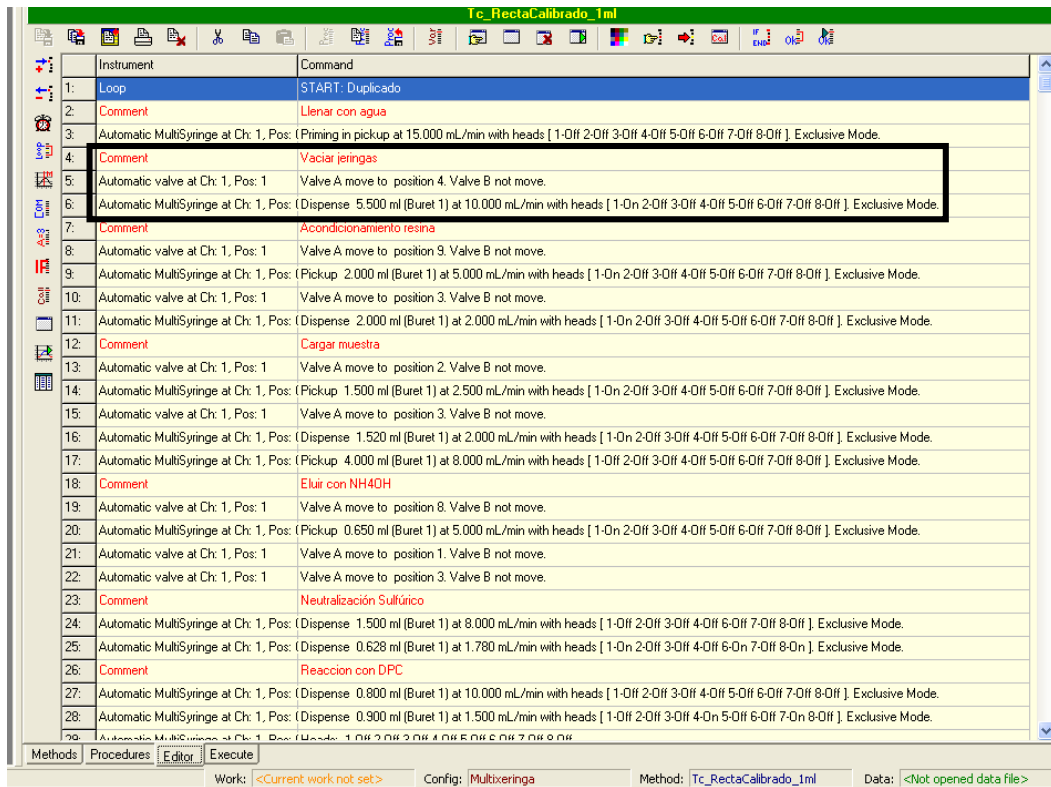


Figura 4.7. Ventana de AutoAnalysis: ejemplo de un método empleado con todas las instrucciones que lo componen.

### 4.3 Optimización multivariante

Cuando se desea establecer un método analítico, una etapa primordial es su optimización, es decir, obtener las mejores condiciones de trabajo en términos de selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. Para ello, hay que describir en primer lugar los posibles factores que puedan influir en los resultados finales y gracias a la optimización multivariante conoceremos también como pueden afectar las interacciones entre ellos. De esta manera, al contrario de lo que sucedía con la optimización univariante, no hay riesgo de interpretaciones erróneas por falta de datos además de que los resultados serán verdaderos valores óptimos [44]. Por lo tanto, la optimización multivariante proporciona conocimientos del efecto de las variables estudiadas dentro de todo el dominio experimental seleccionado, y de la varianza de las estimaciones de las respuestas en cada punto del rango estudiado, ofreciendo por tanto mejores resultados que los métodos univariantes [45,46]. Además el número de experimentos es notablemente más reducido en la optimización multivariante mediante el diseño de experimentos. Pero ante todo, la calidad de los resultados siempre

dependerá de la correcta distribución de los experimentos en el rango de trabajo [47,48].

Es interesante especificar ciertos conceptos para comprender mejor el lenguaje estadístico utilizado:

- El dominio experimental, es el área experimental que está siendo investigada y está delimitada por los niveles de las variables experimentales.
- El diseño experimental, es un grupo de experimentos concretos definidos por una matriz conformada por las variables y sus diferentes niveles.
- Los factores o variables independientes, son variables experimentales que pueden ser modificadas independientemente una de otra.
- Los niveles de un factor o variable, son los grados específicos del factor que se tendrán en cuenta en la realización del experimento. En el diseño central compuesto centrado en las caras (CCD-FC), cada variable tiene tres niveles codificados, +1, 0 y -1. Esta codificación consiste en transformar cada valor real estudiado en coordenadas dentro de una escala con valores adimensionales, las cuales deben de ser proporcionales y correspondientes a las cifras experimentales.
- Las respuestas o variables dependientes, son los valores de los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados.
- Los datos residuales, se obtienen de la diferencia entre los resultados calculados y los experimentales.

De manera general, una vez que ya han sido definidas las variables experimentales y las respuestas, se pueden plantear y llevar a cabo los experimentos de tal manera que se obtenga el máximo de información con el mínimo número de experimentos. Para ello lo primero es realizar un análisis de cribado de datos o *screening*, determinar así las variables significativas y, a continuación, obtener las condiciones óptimas de trabajo empleando diseños experimentales más complejos que incluyan términos cuadráticos, tipo la matriz de Doehlert (DM), CCD-FC o el diseño factorial a tres niveles ( $3^k$ ).

Para el diseño de la matriz de experimentos y el estudio estadístico de la optimización a través de un enfoque multivariante el software empleado en esta tesis ha sido el paquete Statistica 7.0.

### 4.3.1 Análisis de cribado de datos o *screening*

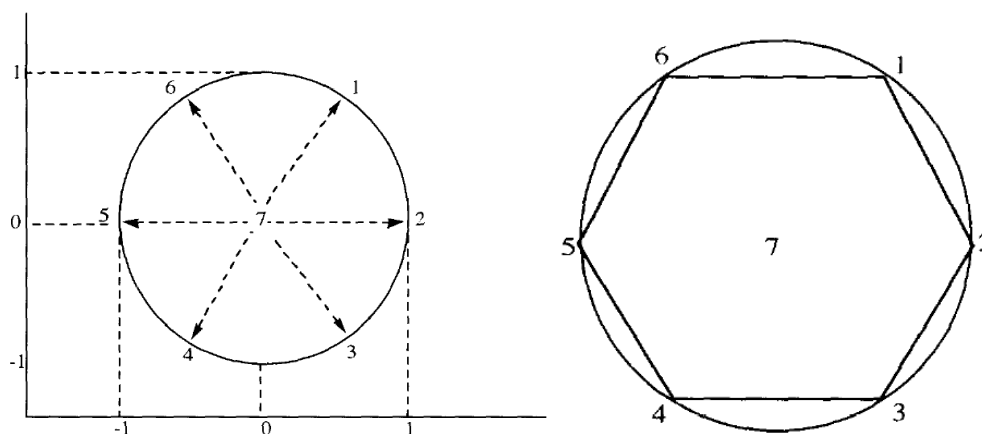
En cualquier procedimiento experimental, varias variables o factores experimentales pueden influir en el resultado. Un *screening* experimental se realiza con el objetivo de conocer las variables experimentales y las interacciones que puedan tener influencia en el resultado [49]. Una vez definidas las variables a investigar, se elige un diseño experimental pudiendo ser un diseño factorial completo ( $2^k$ ) o fraccionado ( $2^{k-n}$ ).

El diseño factorial completo resulta más útil cuando el número de factores es relativamente limitado, siendo necesario determinar cuántos serán los factores de interés y que niveles tendrá cada uno de los factores, es decir para un factor 'n', un nivel 'k' implicará  $k_n$  experimentos. Una vez definidas las variables y el dominio experimental, se selecciona el diseño de experimentos para el *screening* que este tesis fue  $2^k$ . Los datos obtenidos al llevar a cabo este tipo de diseño se pueden ajustar a un modelo lineal con interacciones de acuerdo con el número de variables. Se recomienda adicionar réplicas de un mismo experimento realizado en el punto central de los niveles de todas las variables, que permitan estudiar tanto la curvatura del modelo, como el error del diseño que define el intervalo de confianza. La significación de la curvatura indica que dentro del dominio experimental estudiado puede haber variables con valores capaces de ofrecer una respuesta crítica. El estudio de la significación estadística se lleva a cabo con un análisis de la varianza o ANOVA, donde la variación de las respuestas es resultado de la suma de un componente de regresión y otro residual. Si la desviación estándar de las respuestas en el modelo de regresión es mayor que la de los residuos se dice entonces que el modelo es significativo al nivel de probabilidad seleccionado, y será necesario realizar de nuevo el estudio ANOVA a un nivel de confianza menor.

A partir de estos resultados se obtiene información sobre la significación de la influencia de todos los factores experimentales estudiados y de sus interacciones, si existen. Sin embargo, para conocer un valor crítico para cada una de las variables es necesario determinar el polinomio que contenga los términos cuadráticos (superficie de respuesta) que mejor describan nuestro proceso químico.

### 4.3.2 Superficie de respuesta

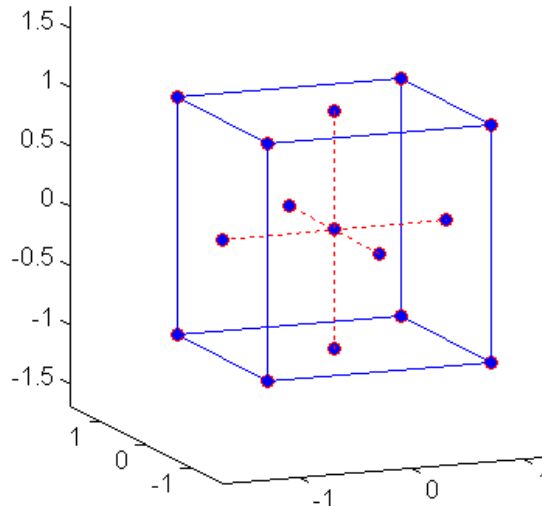
La superficie de respuesta diseña un nuevo set de experimentos que permiten ajustar los datos a una función tridimensional conocida como superficie de respuesta, la cual es un polinomio que describe el modelo e incluye términos cuadráticos [50,51]. Para ello en los trabajos de esta tesis se han empleado tanto el CCD-FC como el diseño DM. Cuando se realiza una optimización con dos factores se genera un hexágono, al cual se le conoce como matriz de Doehlert y permite el cálculo de una superficie de respuesta mediante un mínimo de experimentos (Figura 4.8). Únicamente añadiendo algunos experimentos más es posible estudiar regiones aledañas de la matriz.



**Figura 4.8.** Diseño Doehlert para dos variables. Los números corresponden al número de experimentos a realizar.

Por su parte el diseño CCD-FC, es un diseño compacto que consta de un diseño factorial completo con experimentos centrales y otros situados en los puntos axiales, tal cual se muestra en la Figura 4.9.





**Figura 4.9.** Diseño central compuesto centrado en las caras (CCD-FC) para tres variables.

#### 4.3.2.1. Función deseabilidad

La función de deseabilidad se trata de una forma ampliamente extendida de tratamiento de respuestas múltiples [52]. La deseabilidad individual ( $d$ ) evalúa la manera en que la configuración de valores de factores optimiza una sola respuesta, mientras que la deseabilidad global ( $D$ ) evalúa la manera en que la configuración optimiza un conjunto de respuestas en general. Para el caso del análisis de un sistema con múltiples respuestas, la  $D$  es una combinación de respuestas individuales en una sola respuesta. La escala de la función de deseabilidad está comprendida entre  $d=0$  (para la respuesta no deseada) y  $d=1$  (para la respuesta completamente deseada).  $D$  se calcula combinando los valores individuales de deseabilidad aplicando la media geométrica,  $D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n}$ .

La aplicación de estas funciones de deseabilidad proporciona ventajas como aumento de la eficiencia, economización y focalización en la optimización de los múltiples procedimientos.

En resumen, el diseño experimental es una herramienta básica a la hora de abordar un problema analítico.

## 4.4 Patrón de $^{99m}\text{Tc}$

El Servicio de Radiofarmacia del Hospital Universitario Son Espases (Mallorca, Islas Baleares, España) obtiene  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de generadores que recibe semanalmente. Uno de ellos, en concreto el generador Ultra-Technekow™ DTE-Technetium  $^{99m}\text{Tc}$  de

Mallinckrodt, proporciona cada día suficiente actividad para las exploraciones médicas programadas. Semanalmente, cuando el generador  $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$  llega, se realiza una elución en un vial de unos 5 mL con una actividad promedio de 77,7 GBq. Este vial se deja decaer durante un mes para asegurarse de que todos los átomos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se han desintegrado a  $^{99}\text{Tc}$ . Previo al proceso de desintegración, se mide una alícuota de este vial mediante un espectrómetro gamma, un detector de germanio Canberra - GR5023 - 7500 SL protegido con hierro, y adicionalmente con un calibrador de dosis, Capintec CRC® - 25R, para asegurar la actividad contenida. Esta alícuota se tomó como disolución patrón de trabajo.

Para calcular la actividad de  $^{99}\text{Tc}$  es necesario conocer la actividad exacta de  $^{99}\text{Mo}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a un tiempo concreto. El  $^{99}\text{Mo}$ , con una semivida de 66,48 h, durante su desintegración ramificada genera un 12,5 % de  $^{99}\text{Tc}$  y un 87,5 % de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Todos los átomos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  decaen a  $^{99}\text{Tc}$ . Así, teniendo en cuenta las actividades  $^{99}\text{Mo}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , la hora y fecha de la actividad certificada de  $^{99}\text{Mo}$  y de la elución de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , se puede calcular exactamente la actividad  $^{99}\text{Tc}$  [53].

Todas las disoluciones patrón de trabajo se prepararon por dilución en  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ .

#### 4.5 Cálculo de actividad mínima detectable (AMD)

La actividad mínima detectable (AMD) fue calculada siguiendo la norma ISO 11929-1 [54] con un nivel de confianza del 95% (Ecuación 1). Esta norma resulta algo más conservadora que el método propuesto por Currie [55] para muestras de bajo número de cuentas.

$$AMD = \frac{5.41 + 4.66\sqrt{C_b * t}}{60 * E * Y * V * t} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Por lo tanto, la AMD depende del tiempo de adquisición de señal (t) en minutos, de la cuentas del blanco ( $C_b$ ) en cpm (cuentas por minuto), de la eficiencia de medición (E) como una fracción decimal, del rendimiento químico (Y) como fracción decimal y del volumen de muestra (V) en litros (si se desea expresar la AMD en concentración de actividad).

**CAPÍTULO 5**

**Sistema totalmente  
automatizado para monitorizar  
<sup>99</sup>Tc en residuos hospitalarios y  
urbanos mediante resina  
selectiva con detección UV-Vis**



## 5.1. Introducción

En los centros sanitarios con servicio de Medicina Nuclear, en los cuales se emplea  $^{99m}\text{Tc}$ , existen sistemas de gestión que incluyen el almacenamiento de sus residuos radioactivos hasta su desintegración a  $^{99}\text{Tc}$ . Estos sistemas de gestión también permiten supervisar las actividades de  $^{99}\text{Tc}$  liberado al medio ambiente. El monitoreo de  $^{99}\text{Tc}$  que se realiza en hospitales, ya sea estimando su actividad mediante cálculos o realizando tediosos protocolos analíticos manuales, que generalmente emplean detección de centelleo líquido, da información de los residuos que se generan derivados de este radioisótopo. Pero ambas técnicas consumen mucho tiempo y los resultados no se obtienen lo suficientemente rápido como para realizar un manejo ágil de estos residuos.

Las técnicas de análisis de flujo han permitido la automatización de un gran número de protocolos analíticos [43]. Particularmente, en el campo de la radioquímica se han automatizado varias metodologías dedicadas a determinar radionúclidos específicos o pruebas de detección de elementos radioactivos [56].

El uso de una resina selectiva para extraer y preconcentrar  $^{99}\text{Tc}$  permite eliminar la matriz de la muestra (*sample clean-up*), evita las interferencias debido a su selectividad y aumenta el factor de preconcentración, contribuyendo a la sensibilidad del método. En este trabajo se ha seleccionado la resina WBEC<sup>®</sup>, que se utiliza principalmente para tecnecio, plutonio(IV) y para ciertos actínidos tetravalentes [32]. Una vez eluido, el  $^{99}\text{Tc}$  se derivatiza con 1,5-difenilcarbohidrazida (DPC) para formar un complejo coloreado que puede ser detectado por espectrofotometría a 520 nm [57]. El mecanismo de la reacción Tc-DPC está basado en la reducción del Tc(VII) hasta Tc(IV) mediante DPC y la consecuente formación del complejo.

Así, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar un sistema totalmente automatizado para el monitoreo de  $^{99}\text{Tc}$  de manera sencilla y rápida que pueda convertirse en una herramienta sensible y económica para el manejo de residuos radioactivos. El sistema propuesto incorpora la extracción y preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$  de la matriz de la muestra, la derivatización para formar un complejo coloreado y la detección UV-Vis en línea. El desarrollo de esta metodología es posible gracias a la combinación de las técnicas de análisis en flujo, con una resina selectiva y con un espectrofotómetro CCD miniaturizado.

## 5.2 Reactivos y materiales

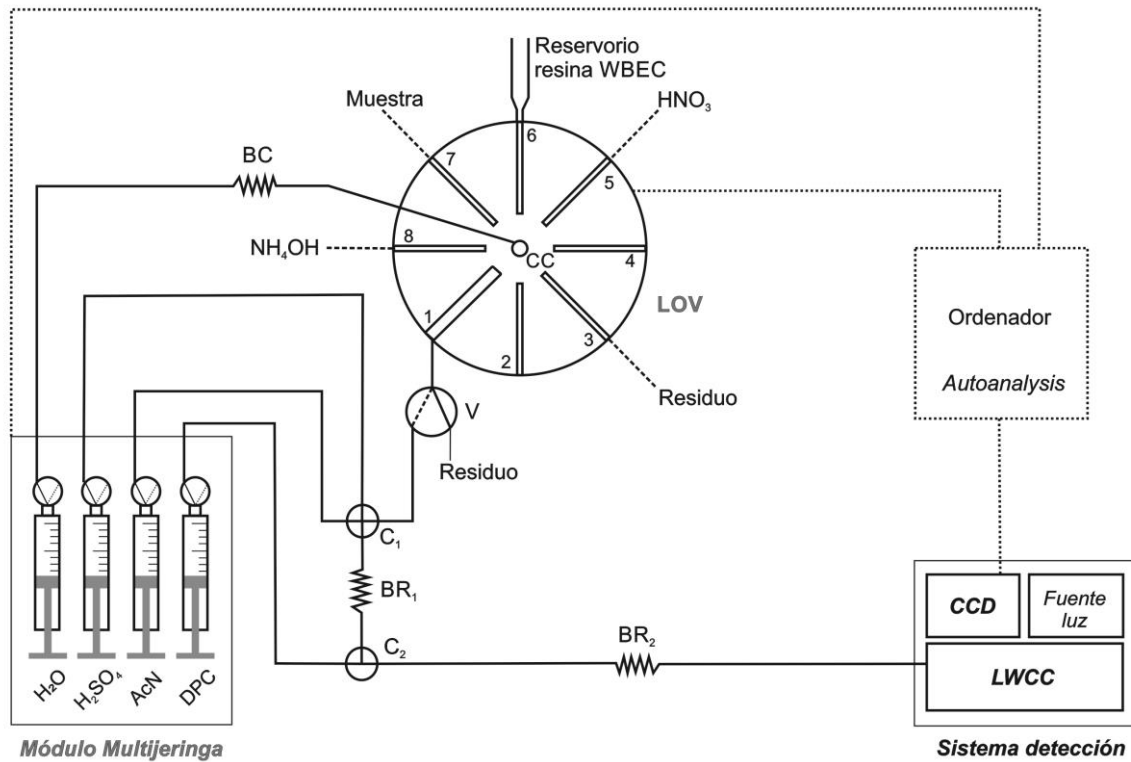
Todas las disoluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y con agua de calidad Milli-Q (Direct 8, Millipore). Los reactivos usados fueron HNO<sub>3</sub> 60%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% adquiridos en Scharlau (Barcelona, España), acetonitrilo (AcN) y disolución de amonio 25% de Merck (Darmstadt, Alemania), 1,5-difenilcarbohidrazida (DPC) de Sigma Aldrich, resina WBEC<sup>®</sup> 50–100 μm (Triskem International, Francia) y prefiltros de fibra de vidrio de Millipore (Madrid, España). El líquido de centelleo Ultima Gold<sup>™</sup> se adquirió en Perkin Elmer.\*

## 5.3 Procedimiento analítico

Una representación gráfica del sistema LOV-MSFIA se muestra en la Figura 5.1. Uno de los canales del LOV sirvió como microcolumna para la resina WBEC<sup>®</sup>. Se colocó un prefiltro de fibra de vidrio en la salida de la columna con el fin de retener las perlas de resina dentro de la microcolumna del LOV y al mismo tiempo permitir que los líquidos fluyeran libremente. Como reservorio de la resina se utilizó una jeringa de plástico de 5 mL, que contenía una suspensión de resina WBEC<sup>®</sup>. La configuración de los puertos periféricos fue la siguiente: (1) microcolumna para la resina, (3) residuos, (5) disolución acondicionadora (0,1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>), (6) reservorio de resina, (7) entrada de muestra, (8) eluyente (3 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH). Se acopló una bureta equipada con cuatro jeringas de vidrio, que contenían agua (portador), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,4 mol L<sup>-1</sup> para ajustar el pH, AcN 0,15% (v/v) para impulsar al detector y DPC 0,27% en AcN 50% (v/v). Se utilizó una válvula solenoide adicional (V) para impulsar el flujo que sale del LOV (puerto 1) hacia el sistema o bien para ser desechado hacia los residuos.

---

\* La instrumentación utilizada se encuentra detallada en los capítulos 2 y 4.



**Figura 5.1.** Diagrama del sistema LOV-MSFIA para la determinación espectrofotométrica en línea de <sup>99</sup>Tc. BC: bucle de carga; BR: bucle de reacción; C: conector; CC: conducto o puerto central; CCD: Espectrofotómetro; LWCC: Celda de largo paso óptico; V: válvula solenoide.

Con el software de AutoAnalysis se creó la secuencia operativa, con todas las instrucciones necesarias para llevar a cabo la extracción, la preconcentración, la derivatización y la detección de <sup>99</sup>Tc, tal cual se recoge en la Tabla 5.1. Brevemente, en una primera etapa, la resina se cargó en el canal 1 del LOV y se acondicionó antes de pasar la muestra. Posteriormente, se pasó a través de la columna una disolución de muestra con una concentración final de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A continuación, el <sup>99</sup>Tc se eluyó en un medio básico, que debe ser posteriormente acidificado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para formar el complejo <sup>99</sup>Tc-DPC. Dado que la cinética de la reacción es lenta, y con el fin de aumentar la sensibilidad, fue necesario un tiempo de incubación de 5 minutos. En esta etapa, el complejo <sup>99</sup>Tc-DPC se almacenó en BR<sub>2</sub> deteniendo el flujo. Finalmente, el complejo se envió al detector UV-Vis propulsado por AcN. La microcolumna se enjuagó con agua después de cada elución con el fin de asegurar la retención de <sup>99</sup>Tc en la siguiente muestra evitando así cualquier residuo de eluyente sobre ella. Del mismo modo, la LWCC se limpió con AcN 15% (v/v) entre muestras.

**Tabla 5.1.** Procedimiento analítico para la automatización completa para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  mediante un sistema LOV-MSFIA con detección LWCC-UV-VIS.

<i>Instrucción analítica</i>	<i>Caudal</i> ( <i>mL min<sup>-1</sup></i> )	<i>LOV</i>	<i>MSFIA</i>				<i>V</i>
			<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	
<b>1. Acondicionamiento de la resina WBEC<sup>®</sup></b>							
Cargar 2 mL HNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup>	5	5	On	Off	Off	Off	Off
Dispensar en la columna	2	1	On	Off	Off	Off	Off
<b>2. Cargar muestra.</b>							
Cargar X mL de muestra en BC	2	7	On	Off	Off	Off	Off
Dispensar en la columna	2	1	On	Off	Off	Off	Off
<b>3. Elución y neutralización de <math>^{99}\text{Tc}</math></b>							
Cargar 0,65 mL 3mol L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> OH	5	8	On	Off	Off	Off	Off
Elución y neutralización con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5,4 mol L <sup>-1</sup>	1,78	1	On	On	Off	Off	On
<b>4. Derivatización con DPC</b>							
Dispensar 0,9 mL DPC y mezcla con el $^{99}\text{Tc}$ acidificado	1,5	1	Off	Off	On	On	Off
Esperar 300s para la reacción	0	1	Off	Off	Off	Off	Off
<b>5. Transferir al detector</b>	2	1	Off	Off	Off	On	Off
<b>6. Limpieza resina WBEC<sup>®</sup></b>	2	1	On	Off	Off	Off	Off
<b>7. Limpieza LWCC</b>	2	1	Off	Off	Off	On	Off

## 5.4 Resultados y discusión

### 5.4.1 Propiedades de la resina

La resina WBEC<sup>®</sup> se seleccionó para extraer y preconcentrar  $^{99}\text{Tc}$  porque ofrece una selectividad alta para tecnecio, con una elución facilitada. La resina WBEC<sup>®</sup> es capaz de separar tecnecio, plutonio y ciertos actínidos tetravalentes, siendo su selectividad similar a la resina TEVA<sup>®</sup>. Aunque el plutonio y los actínidos tetravalentes son eluidos



en condiciones ácidas, el tecnecio, según la recomendación del fabricante, es eluido con  $\text{NH}_4\text{OH}$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  lo cual le confiere un alto grado de selectividad [32].

Los ensayos de retención y elución se realizaron previos a la optimización de la derivatización y de la detección en línea, por lo cual los eluatos fueron leídos en un contador de centelleo líquido. Después de cada ensayo, la dilución final se ajustó para que fuera la misma, evitando así el efecto *quenching*, y se trabajó siempre con concentraciones que no afectaran al cóctel de centelleo.

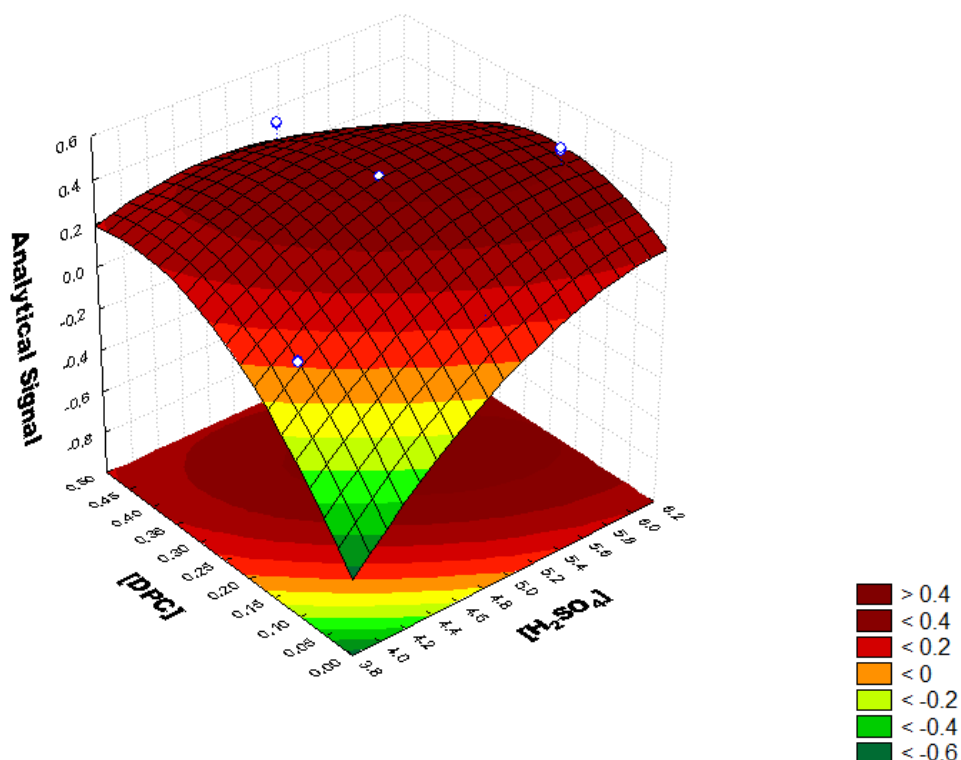
Mediante el acondicionamiento de la resina con ácido nítrico, el nitrato de la amina cuaternaria, actúa como contraión para el intercambio aniónico con el ion pertecneciato ( $\text{TcO}_4^-$ ). La alta retención de Tc(VII) por la resina WBEC® a baja acidez se debe a la alta selectividad de la composición de Alamine® 336 para el anión pertecneciato sobre el anión del ácido. Así, para encontrar el valor óptimo de la concentración de retención, se realizaron pruebas preliminares variando la concentración de ácido nítrico entre  $0,001$  y  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . El valor de  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fue seleccionado como medio de retención ya que proporcionó los mejores resultados. Una vez establecido este parámetro, se estudió el procedimiento de elución a partir de la resina WBEC®. En primer lugar, se realizó una prueba para seleccionar el volumen (rango:  $0,5 - 1 \text{ mL}$ ) y la concentración (rango:  $1 - 4 \text{ mol L}^{-1}$ ) de  $\text{NH}_4\text{OH}$  como eluyente, considerando que ambas variables eran significativas así como su interacción. A pesar de que los resultados (la tabla de ANOVA, el gráfico de Pareto y los valores predichos vs observados) sugirieron que aumentar el valor de las variables sería positivo, se mantuvo el dominio experimental del volumen, con el fin de no aumentar la proporción muestra/reactivo enviado al detector. Un aumento de esta proporción dificultaría la mezcla y originaría una mayor anchura de pico de la señal. Por lo tanto, se realizó un CCD-FC variando la concentración de amonio entre  $3 - 6 \text{ mol L}^{-1}$  y se mantuvo el volumen entre  $0,5 - 1 \text{ mL}$ . De ahí se obtuvieron unos valores óptimos de  $0,65 \text{ mL}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a  $3 \text{ mol L}^{-1}$  los cuales se emplearon en el sistema propuesto.

#### 5.4.2 Optimización de las variables del sistema

En primer lugar, se realizó un diseño factorial completo de dos niveles con el fin de averiguar qué variables tenían un efecto significativo sobre la señal analítica. A continuación, se realizó un diseño de superficie de respuesta para obtener los valores críticos de cada variable significativa.

La optimización de las variables del sistema incluye las condiciones de la derivatización, la detección en línea, y los pasos de limpieza del sistema y de la celda de flujo. A partir de aquí, se seleccionaron los volúmenes de las jeringas de la bureta para alcanzar las proporciones de reactivos necesarios con las que producir la reacción, manteniendo siempre el volumen mínimo de la proporción muestra/reactivo. Por lo tanto, únicamente fue necesario optimizar las concentraciones.

Las condiciones de la derivatización fueron optimizadas mediante análisis multivariante. En primer lugar, se realizó un ensayo para seleccionar la concentración de  $H_2SO_4$  (rango: 3 – 5 mol  $L^{-1}$ ) y la concentración de DPC (rango: 0,1 – 0,5 %) para llevar a cabo la reacción entre el  $^{99}Tc$  y la DPC. Los resultados obtenidos, es decir, la tabla de ANOVA, el gráfico de Pareto y los valores predichos vs los observados, indicaron que ambas variables afectan significativamente a la reacción de derivatización. Por lo tanto, se llevó a cabo un diseño Doehlert teniendo en cuenta estos resultados. Puesto que la concentración de DPC tuvo un efecto mayor que la concentración de  $H_2SO_4$ , se construyó una matriz experimental con 5 y 3 niveles, respectivamente. Así, los dominios experimentales se establecieron entre 4 – 6 mol  $L^{-1}$  para  $H_2SO_4$  y 0,05 – 0,45% para la concentración de DPC. Como valores críticos se obtuvieron 5,4 mol  $L^{-1}$  de  $H_2SO_4$  y 0,27 % de DPC. El gráfico superficie-respuesta se muestra en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Superficie de respuesta para las variables que interfieren en la reacción de derivatización de  $^{99}Tc$  y DPC:  $[H_2SO_4]$  y  $[DPC]$ .

Debido a que la cinética de reacción no es muy rápida, se tomó una decisión de compromiso entre la sensibilidad requerida, para aplicar el sistema a las muestras de residuos, y la frecuencia del análisis. Así, después de realizar ensayos entre 3 y 7 min, se estableció un tiempo de reacción de 5 min.

Finalmente, se realizaron varios ensayos para limpiar el sistema. La microcolumna se enjuagó con agua después de cada elución para asegurar la retención de  $^{99}\text{Tc}$  en la muestra siguiente evitando así cualquier traza de amonio (eluyente) sobre ella. La celda LWCC se limpió con AcN 15% (v/v) entre muestras. Todos los valores óptimos se enumeran en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Valores optimizados del método totalmente automatizado LOV-MSFIA para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ .

<i>Variable</i>	<i>Valores optimizados</i>
Concentración eluyente, $\text{NH}_4\text{OH}$	3 mol L <sup>-1</sup>
Volumen eluyente, $\text{NH}_4\text{OH}$	0,65 mL
Concentración DPC	0,27 %
Concentración $\text{H}_2\text{SO}_4$	5,4 mol L <sup>-1</sup>
Tiempo de reacción	5 min

### 5.4.3 Parámetros analíticos

**Rango de trabajo.** Se obtuvieron curvas de calibración másica (absorbancia neta frente a masa, en ng de Tc(VII)), con un ajuste estadístico satisfactorio ( $y = (0,0015 \pm 0,0001)x - (0,011 \pm 0,003)$ ,  $R^2 = 0,9962$ ,  $n = 5$ ). En las condiciones óptimas descritas anteriormente, las curvas de calibración son lineales en el intervalo de concentración 4 – 500 ng Tc(VII). Dado que el método propuesto permite variar el volumen de muestra a preconcentrar, se realizaron curvas de calibración másicas ya que el volumen deberá ser elegido por el analista dependiendo de las características de la muestra.

**Volumen de la muestra.** Se ensayaron diferentes volúmenes de muestra. Para el caso de muestras con alto contenido de tecnecio, se analizó de manera satisfactoria una muestra de 100  $\mu\text{L}$  y se comparó con otra de 3 mL e igual masa de Tc(VII). Por otra parte, se estudiaron con éxito muestras de hasta 100 mL (con 96% de recuperación en comparación con una muestra de 3 mL e igual masa de Tc(VII)). Por lo tanto, puesto que el volumen de eluato se ajustó a 0,65 mL, el sistema propuesto es capaz de diluir

la muestra, si su volumen está comprendido entre 0,1 – 0,65 mL, o de preconcentrarla, si su volumen está entre 0,65 – 100 mL.

Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Siguiendo la recomendación de la IUPAC, el LOD y LOQ se calcularon, respectivamente, como tres veces y diez veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración. De acuerdo con ello, se obtuvo un LOD de 4 ng (2,5 Bq) y un LOQ de 13 ng (8 Bq)  $^{99}\text{Tc}$ .

Concentración de la muestra. Teniendo en cuenta que la masa de  $^{99}\text{Tc}$  que se puede determinar sin perder eficiencia de extracción está comprendida entre 0,1 y 100 mL de volumen de muestra, la concentración de  $^{99}\text{Tc}$  a analizar puede variar entre 40,6 ng L<sup>-1</sup> y 40,6 µg L<sup>-1</sup>.

Durabilidad y repetitividad. Ambos parámetros están relacionados entre sí ya que informan del número factible de análisis consecutivos que pueden realizarse sin cambiar el relleno de la columna. Así, se calculó una repetitividad del 6,0 % expresada como RSD (n= 10) a partir de las primeras diez extracciones, mientras que se realizaron hasta 78 extracciones consecutivas en las que se obtuvieron recuperaciones del 98 %, cargando 3 mL de muestra en cada extracción.

Reproducibilidad. Se calculó una precisión del 6,1 % expresada como RSD (n= 5) a partir de 5 extracciones llevadas a cabo durante cinco días laborables diferentes, cambiando el relleno de la columna y utilizando la misma disolución estándar de trabajo de  $^{99}\text{Tc}$ .

Frecuencia de extracción. Dependiendo del volumen de muestra a preconcentrar, se observaron frecuencias de extracción comprendidas entre 4 – 9 h<sup>-1</sup>. Esto supone que si se realizan tres réplicas por muestra, la frecuencia del análisis es de 1– 3 muestras por hora.

Los parámetros analíticos resultantes se muestran en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Parámetros analíticos del método totalmente automatizado LOV-MSFIA para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ .

<b>Parámetros analíticos</b>	<b>Valor</b>
Límite de detección (ng)	4,1
Límite de cuantificación (ng)	13,5
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,9914
Repetitividad (%) (n= 10)	6,0
Reproducibilidad (%) (n= 5)	6,1
Cantidad de resina en la microcolumna (mg)	32
Durabilidad resina (inyecciones)	78
Volumen preconcentración de muestra (mL)*	hasta 100
Frecuencia extracción ( $\text{h}^{-1}$ )**	4 – 9
Rango lineal (ng)	4 – 500

\*según el contenido de tecnecio en la muestra.

\*\*según el volumen de muestra a preconcentrar.

#### 5.4.4 Comparativa con trabajos previos

Las principales técnicas utilizadas para cuantificar  $^{99}\text{Tc}$  son el contador Geiger-Müller y los contadores de centelleo líquido. Ambos requieren la separación del  $^{99}\text{Tc}$  de su matriz y de otros radionucleidos, especialmente los emisores  $\beta$ , previo a la lectura. La razón principal es la interferencia de los componentes de la matriz y las interferencias espectrométricas [21]. La utilización de un contador centelleo líquido implica el uso de un cóctel de centelleo y por tanto, la generación de un volumen de residuos considerable. La técnica de ICP-MS es el método de espectrometría que se emplea con mayor frecuencia en la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ , con especial énfasis en muestras ambientales, debido a sus extremadamente bajos LODs [58]. Sin embargo, deben aplicarse obligatoriamente antes de la lectura, métodos altamente eficientes para separar el  $^{99}\text{Tc}$  de isómeros e iones moleculares. En cualquier caso, el proceso de separación es tedioso y requiere mucho tiempo ya que normalmente se realiza de modo manual.

Recientemente, una nueva metodología para realizar el análisis de los residuos radiofarmacéuticos, sin purificación de los componentes de la matriz se ha aplicado con éxito. El sistema propuesto ofrece mejores resultados analíticos que los métodos

LSC existentes para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  con ahorros significativos en costos y tiempo de análisis [59].

Los sensores de radionúclidos basados en sistemas de flujo apuntan a ser una metodología de alta relevancia ya que alcanzan el grado máximo de automatización, al combinar el material de extracción con la detección en línea de radioactividad. El sensor capta el radionúclido de la matriz, aumentando la selectividad, y por tanto alcanzando límites de detección muy bajos [60]. Un sensor para la cuantificación de  $^{99}\text{Tc}$  en forma de pertechnetato en muestras de agua subterránea puede detectar niveles 10 veces por debajo del nivel de referencia de agua potable de  $0,033 \text{ Bq mL}^{-1}$  [61].

Otro ejemplo de automatización total es un sistema para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  en residuos nucleares, que incorpora la preparación de muestra asistida por microondas con una separación automática en columna de intercambio aniónico y una detección por centelleo sólido en flujo continuo. Este sensor alcanza un límite de detección de  $23,5 \text{ Bq mL}^{-1}$ , y una frecuencia de análisis de  $5 \text{ h}^{-1}$  [62]. Por otra parte se ha presentado un nuevo sensor espectroelectroquímico que combina tres modos de selectividad (electroquímica, espectroscopia y partición selectiva) en un solo sensor para mejorar sustancialmente la selectividad en la detección de  $^{99}\text{Tc}$ . Su LOD está en el orden de los nanomoles [63].

Existen varias metodologías parcialmente automatizadas, en las que el pretratamiento se automatiza aunque la detección se realiza posteriormente de manera *off-line*, utilizando ICP-MS [64] o LSC [65,66] como detectores. Hasta ahora sólo un sistema, basado en la técnica SIA, está totalmente automatizado para determinar  $^{99}\text{Tc}$  en residuos nucleares [67]. Este método logra un LOD de  $2 \text{ ng } ^{99}\text{Tc}$ , empleando resina TEVA<sup>®</sup> y un flujo detenido de 15 minutos para la posterior detección en línea en un contador de centelleo líquido. En comparación, el método totalmente automatizado propuesto en este trabajo, alcanza LOD similar usando la detección espectrofotométrica, que es una técnica de detección más rápida y simple.

### 5.4.5 Aplicación en muestras reales

Residuos líquidos de Medicina Nuclear. Los residuos líquidos del servicio de Medicina Nuclear del Hospital Son Espases (Palma de Mallorca, España) se recogen en tres depósitos plomados, hasta que sus actividades disminuyen por debajo de los límites establecidos [20], pudiendo ser tratados como residuos no radioactivos y vertidos al sistema público de alcantarillado. Estos residuos están compuestos por la orina y heces de pacientes tratados y por el agua de los lavabos del área de Radiofarmacia, que no siempre contiene radioactividad.

Residuos laboratorio de Radiofarmacia. El laboratorio de Radiofarmacia del Hospital Son Espases dispone de un contenedor de plástico para residuos de disolventes empleados en el laboratorio, así como disoluciones de radioisótopos ya decaídos.

Lixiviado del filtro de Technegas. El Generador *Technegas* es un equipo capaz de alcanzar una temperatura hasta 2550°C bajo una corriente de argón ultrapuro que, en presencia de  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ , produce un aerosol de micropartículas de carbono marcadas con  $^{99m}\text{Tc}$  denominadas *Technegas*. Este aerosol es inhalado por el paciente con el fin de estudiar la calidad de su ventilación pulmonar. El filtro de algodón del equipo captura el *Technegas* exhalado por lo que, después de que decaiga, contendrá una concentración elevada de  $^{99}\text{Tc}$  ya que cada filtro se reutiliza aproximadamente cincuenta veces antes de ser reemplazado. Para extraer el  $^{99}\text{Tc}$  del filtro, se sumerge en  $\text{HNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 21 horas.

Aguas residuales urbanas. Fuera del hospital, en la planta de tratamiento de aguas residuales EDAR-1 de Palma de Mallorca, se tomaron muestras de las corrientes de entrada y salida y se analizaron inmediatamente después de su recogida.

Todas las disoluciones tuvieron una concentración final de  $\text{HNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> para garantizar la retención del pertecneciato. Dada la importancia de asegurar el estado oxidado de Tc en las muestras, se ensayaron cantidades crecientes de peróxido añadido a la muestra, y se seleccionó la más baja que permite la señal analítica más alta. Por lo tanto, se añadió 6% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% en aquellas muestras en las que el Tc podía no estar como Tc(VII), e.g. los residuos líquidos del Servicio de Medicina Nuclear en los que la presencia de radiofármacos con  $\text{SnCl}_2$  como agente reductor puede reducir el Tc, o el agua residual urbana con condiciones reductoras. Los pretratamientos de las muestras se resumen en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Pretratamiento aplicado a las muestras de residuos analizadas por el sistema LOV-MSFIA propuesto.

<i>Muestra*</i>	<i>pH original de la muestra</i>	<i>Tipo de filtro</i>	<i>Oxidación a Tc(VII)**</i>
Residuos líquidos de Medicina Nuclear	8,1	Filtro de 0,45 µm de tamaño de poro	Sí
Residuos Laboratorio de Radiofarmacia	2,0	---	No
Lixiviado del filtro de Technegas	2,2	Filtro de fibra de vidrio	No
Aguas residuales urbanas - Entrada	7,5	Filtro de 0,45 µm de tamaño de poro	Sí
Aguas residuales urbanas - Salida	6,5	Filtro de 0,45 µm de tamaño de poro	Sí

\* Todas las disoluciones tenían una concentración final de 0,1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>.

\*\* Para oxidar, se adicionó 6% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

Con la intención de validar el método propuesto, éste se utilizó para analizar diferentes muestras de residuos. Con la excepción del filtro de *Technegas*, el resto de las muestras están compuestas por matrices muy complejas que no sólo contienen tecnecio. Por lo tanto, el empleo de la resina selectiva fue necesario para separar el <sup>99</sup>Tc antes de la detección evitando así interferencias y al mismo tiempo, preconcentrando. Se llevaron a cabo ensayos de adición/recuperación en todas las muestras analizadas. Los resultados obtenidos mostraron recuperaciones satisfactorias, entre el 90 y 110 % (Tabla 5.5).



**Tabla 5.5.** Determinación de  $^{99}\text{Tc}$  mediante un sistema automatizado LOV-MSFIA aplicado a muestras de residuos hospitalarios y urbanos (n=3).

<i>Muestra</i>	<i>Volumen muestra (mL)</i>	<i>Añadido (ng)</i>	<i>Encontrado (ng)</i>	<i>Recuperación (%)</i>	<i>Concentración radioactiva de la muestra (Bq mL<sup>-1</sup>)</i>
Residuos líquidos de Medicina Nuclear	4	0	281 ± 1	--	44,2
		328	575 ± 17	90	--
Residuos Laboratorio de Radiofarmacia	5	0	76 ± 1	--	9,6
		183	255 ± 3	98	--
Lixiviado del filtro de Technegas	1	0	15 ± 2	--	9,4
		142	145 ± 9	91	--
Aguas residuales urbanas - Entrada	100	0	< LOQ	--	<0,1*
		28	27 ± 1	95	--
Aguas residuales urbanas - Salida	100	0	< LOQ	--	<0,1*
		71	78 ± 3	110	--

\* LOQ 0,1 Bq mL<sup>-1</sup>.

## 5.5 Conclusiones

El uso combinado de dos técnicas de análisis por inyección en flujo multiconmutadas, es decir, el LOV y MSFIA, ha permitido el desarrollo de un sistema analítico para el monitoreo de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras de residuos con matrices complejas con un alto grado de automatización. Este sistema totalmente automatizado es capaz de llevar a cabo todas las etapas del protocolo analítico, incluyendo la extracción, preconcentración, elución, ajuste de acidez, detección, renovación de la microcolumna, limpieza del sistema y adquisición y procesamiento de datos. El sistema propuesto tiene varias ventajas, en comparación con otros sistemas utilizados para determinar  $^{99}\text{Tc}$ . Entre ellas está un tiempo de respuesta corto, que permite una gestión rápida de los residuos, una buena selectividad debido al uso de una resina selectiva, que asegura los resultados obtenidos corresponden al analito pese a que el detector no sea selectivo. Además, garantiza una buena sensibilidad gracias a la preconcentración y al

empleo de una LWCC, que permite detectar por encima de los 4 ng de  $^{99}\text{Tc}$  (2,5 Bq) lo suficiente como para realizar un manejo responsable de los residuos.

Por otra parte, también se asegura una buena reproducibilidad debido al relleno automático de la microcolumna y la precisión de las técnicas de flujo utilizadas. Cabe destacar el bajo costo en la implementación y uso del sistema gracias a la disminución de los volúmenes de reactivos y al uso de un espectrofotómetro CCD como detector. Además, debido a la reutilización hasta 78 veces de cantidades mínimas de resina, el coste por análisis disminuye significativamente. Otra de las ventajas es la compactación y miniaturización del sistema lo que permite su montaje en un pequeño lugar, cerca de los depósitos de residuos. Por último, la automatización completa asegura la minimización del manejo por parte de los analistas aumentando así su seguridad. Todas estas características hacen que el sistema propuesto sea una muy buena herramienta para monitorear  $^{99}\text{Tc}$  en los residuos hospitalarios y urbanos.

## **CAPÍTULO 6**

# **Microextracción líquido-líquido dispersiva automatizada de $^{99}\text{Tc}$ en muestras biológicas y en residuos hospitalarios, con determinación mediante contador de centelleo líquido**



## 6.1 Introducción

En este trabajo se plantea un nuevo enfoque en el cual la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es empleada en la extracción y preconcentración automáticas de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas de orina y saliva de pacientes tratados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  así como en residuos líquidos. Para establecer el método, se llevó a cabo en primer lugar, un estudio comparativo entre diversos disolventes actuando como extractantes en disolventes apolares, y de los dispersantes. A continuación, a través de un diseño experimental, el sistema fue optimizado y aplicado a muestras reales.

En lo que respecta al tratamiento previo de la muestra, los métodos clásicos resultan a menudo tediosos, aumentan el riesgo de contaminación de la muestra y exponen al analista a agentes tóxicos o radioactivos en nuestro caso. Por ello, la automatización total o parcial de los métodos analíticos convencionales en el campo de la radioquímica es de gran interés y puede lograrse mediante técnicas de análisis por inyección en flujo [43,68]. Además, la automatización del protocolo de análisis permite un control preciso de los volúmenes empleados tanto de muestra como de reactivos y de las velocidades de flujo, lo que conduce al aumento de la reproducibilidad [69]. De este modo, se plantea el desarrollo de un método alternativo para la automatización de la DLLME basada en la realización de la extracción dentro de una jeringa. Una de las ventajas de la DLLME en jeringa es que permite el uso de disolventes más ligeros que el agua consiguiendo formar pequeñas gotas de extractante que se separan del resto de disolventes y quedan en la cabeza de la jeringa, para después ser separadas fácilmente.

A partir de la bibliografía consultada, los extractantes ensayados fueron fosfato de tributilo (TBP) y triisooctilamina (TiOA) [70-73] en diferentes proporciones de xileno y dodecano. Posteriormente se incluyó en el estudio la sal de amonio cuaternario Aliquat® 336 y se comparó con el TBP, que había ofrecido mejores resultados frente a TiOA. La detección se llevó a cabo con un contador de centelleo líquido. Los resultados de la aplicación a muestras reales fueron satisfactorios, pudiendo concluir que es un método rápido, fácil de implementar y gracias al cual es posible monitorizar la entrada de  $^{99}\text{Tc}$  en el medio ambiente.

## 6.2 Reactivos y materiales

Todas las disoluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y en agua de calidad Milli-Q (Direct 8, Millipore). Los reactivos: ácido nítrico 60% (v/v), ácido sulfúrico 96% (v/v), ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y peróxido de hidrógeno fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España). El Aliquat® 336, fosfato de tributilo (TBP), triisooctilamina (TiOA), xileno, dodecano, acetona, acetonitrilo, 2-propanol, 1-propanol, metanol y etanol provenían de Sigma Aldrich. El líquido de centelleo Ultima Gold™ se adquirió en Perkin Elmer.<sup>†</sup>

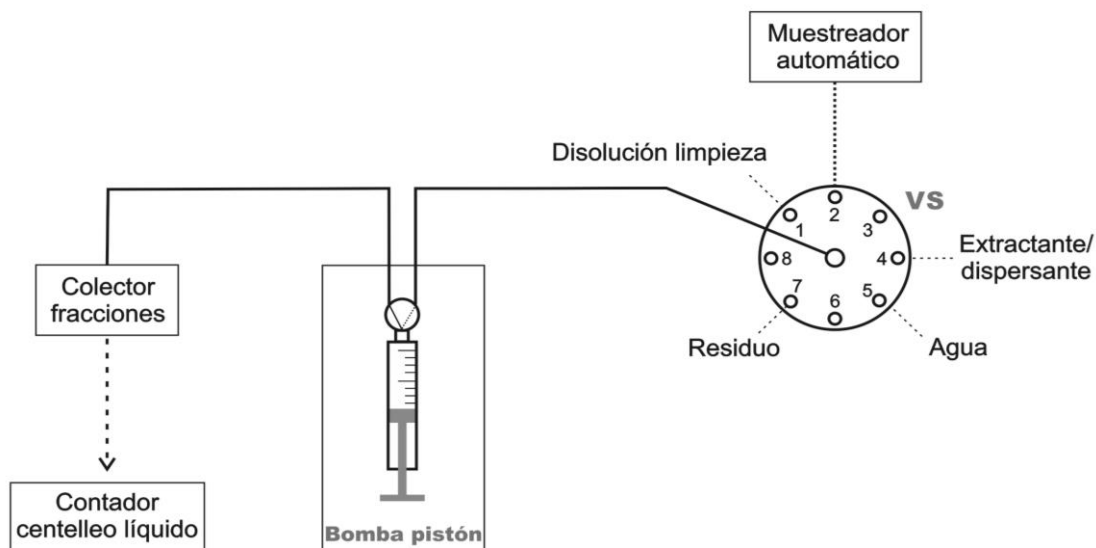
## 6.3 Procedimiento analítico

El procedimiento analítico se llevó a cabo sobre un sistema de LOV como aparece esquematizado en la Figura 6.1. Brevemente consiste en cargar la jeringa con la mezcla extractante/dispersante (1,5 mL) y a continuación la muestra (3,5 mL) a un caudal muy elevado para favorecer la mezcla. Tras reposar 90 s, se recoge la fase orgánica (0,7 mL) en el vial de centelleo. El resto de disolventes se desechan y se procede a la limpieza de la jeringa con un lavado de acetona al 10 % y otro lavado con agua. La limpieza entre muestras es crucial para evitar la contaminación cruzada puesto que todos los pasos del método se llevan a cabo dentro de la jeringa.

El eluato obtenido (fase orgánica) se diluye hasta un volumen de 2 mL con 22,5 % Aliquat® 336 en acetona, se mezcla con 8 mL de líquido de centelleo líquido y se mantiene en la oscuridad durante una noche [74]. La medida en el contador se realizó al día siguiente para evitar las interferencias debidas a fluorescencia y/o fosforescencia [75].

---

<sup>†</sup> La instrumentación utilizada se encuentra detallada en los capítulos 2 y 4.



**Figura 6.1.** Representación gráfica del sistema de LOV empleado para llevar a cabo la DLLME-LSC de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas y residuos hospitalarios (VS: Válvula de selección).

El método desarrollado en AutoAnalysis permitió el control de todas las etapas excepto la detección, la cual se llevó a cabo en modo *off-line*, debido al tiempo de incubación y lectura que requerían los eluatos. En la Tabla 6.1 se detallan las etapas del procedimiento automatizado.

**Tabla 6.1.** Procedimiento automatizado para la microextracción líquido-líquido dispersiva de <sup>99</sup>Tc en muestras biológicas y residuos hospitalarios.

<i>Etapa analítica</i>	<i>Caudal (mL min<sup>-1</sup>)</i>	<i>Posición válvulas</i>	
		<b>S</b>	<b>VS</b>
<b>1. Cargar la jeringa</b>			
Dispensación completa	15	Off	-
Cargar 1,5 mL extractante/dispersante	2,5	Off	4
Cargar 3,5 mL de muestra	10	Off	2
<b>2. Separación de fases</b>			
Esperar 90 s separación fases	-	Off	-
<b>3. Extracción fase orgánica</b>			
Dispensar 0,7 mL fase orgánica	2	On	-
Vaciar jeringa	15	Off	7
Cargar aire	15	Off	8
Impulsar fase orgánica al vial	15	On	-
<b>4. Limpieza jeringa</b>			
Cargar 5 mL acetona 10%	15	Off	1
Desechar en residuos	15	Off	7
Cargar 5 mL agua	15	On	5
Desechar en residuos	15	Off	7

## 6.4 Resultados y discusión

### 6.4.1 Selección de disolventes

Un punto crítico en el desarrollo de este método es la selección de un disolvente apropiado de extracción, o de una mezcla de disolventes orgánicos que mejoren el proceso de extracción, así como de un dispersante adecuado para llevar a cabo la DLLME. Para ello, se evaluaron una serie de disolventes orgánicos con menor densidad que el agua. Inicialmente, se ensayó el TBP y TiOA puros o mezclados con xileno y dodecano como extractantes [70,76]. Los resultados indicaron que ni el xileno ni el dodecano mejoraban la eficiencia de extracción de los extractantes, y de entre ellos dos, el TBP proporcionó eficiencias de extracción mayores, cuando su concentración era del 100%, mientras que la mezcla TiOA/xileno en una proporción 5:95 dio los mejores resultados de extracción para TiOA, pero inferiores a los del TBP (Figura 6.2). Debido a esto la TiOA fue descartada como agente extractante.

Con el objetivo de aumentar la eficiencia de la extracción, se estudiaron mezclas con los siguientes dispersantes: acetona, acetonitrilo, metanol, etanol, 1-



propanol, y 2-propanol. La miscibilidad del dispersante en la fase orgánica (extractante) y en la fase acuosa es crítica en la selección del mismo. De acuerdo con esto, la mezcla de 2-propanol/TBP ofreció mejores resultados. Sin embargo, la eficiencia de extracción seguía siendo baja, incluso después de haber aumentado la salinidad con NaCl y Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, según se observa en la Figura 6.3. Siguiendo con el mismo objetivo, se realizó una agitación extra en la propia jeringa, pero no reportó ningún aumento en el porcentaje de analito extraído que seguía siendo inferior al 43%. En los ensayos con TBP y 2-propanol, las muestras fueron preparadas en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol L<sup>-1</sup> [77].

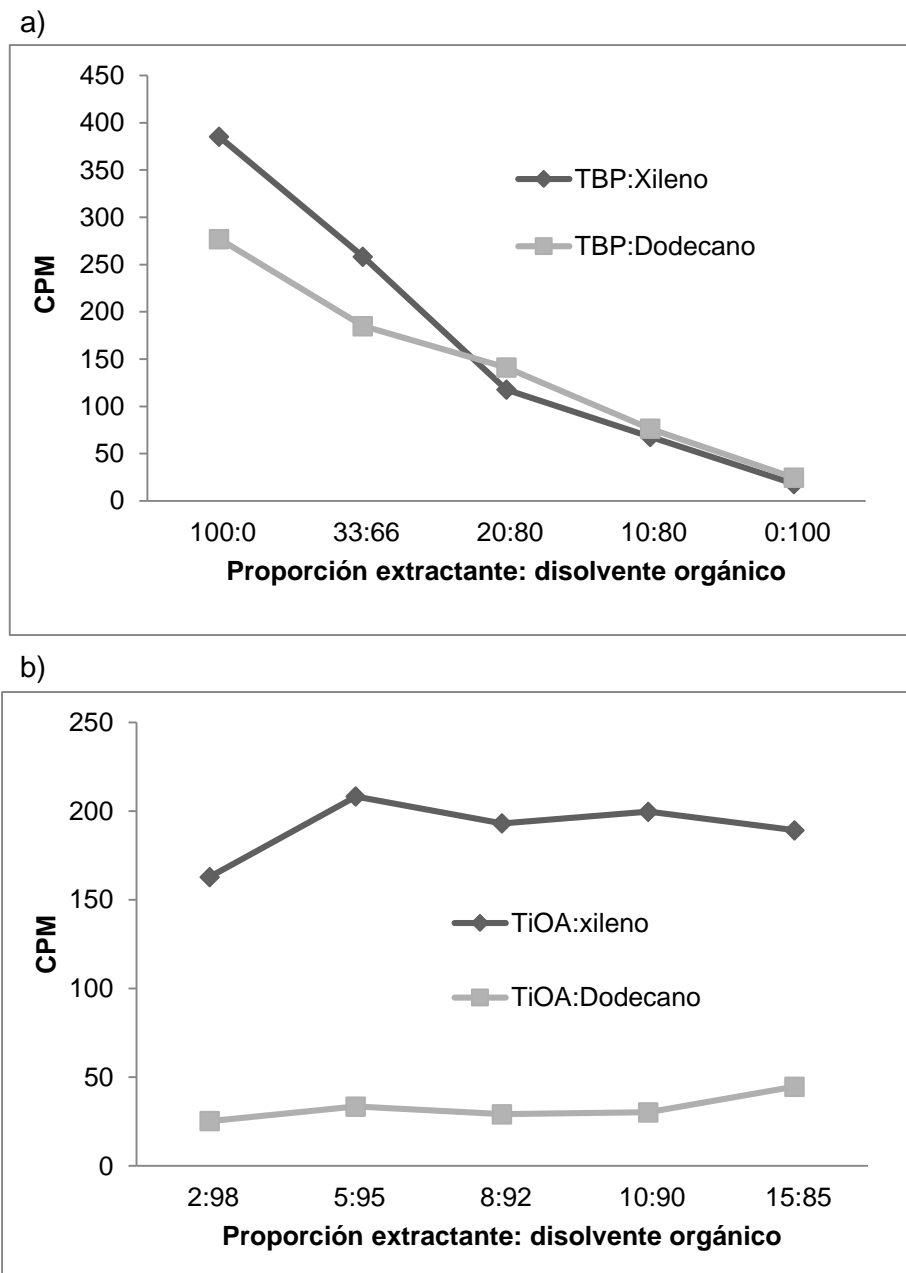
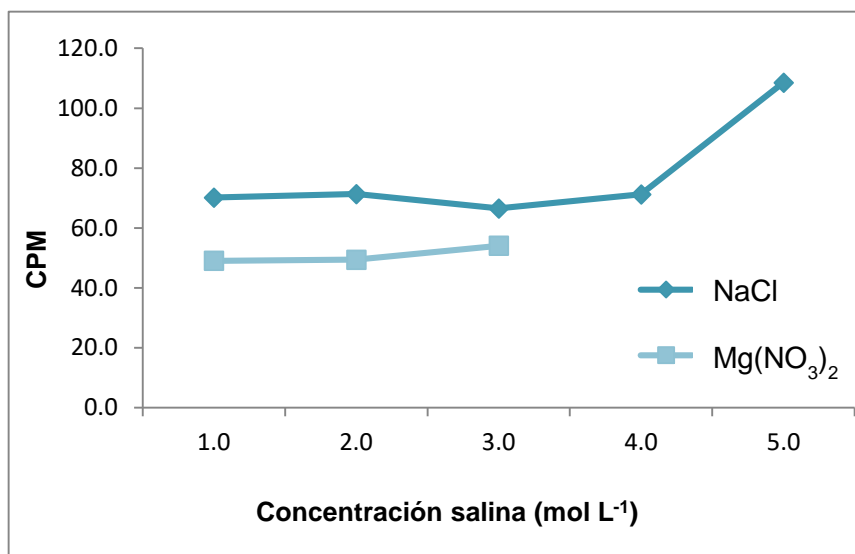
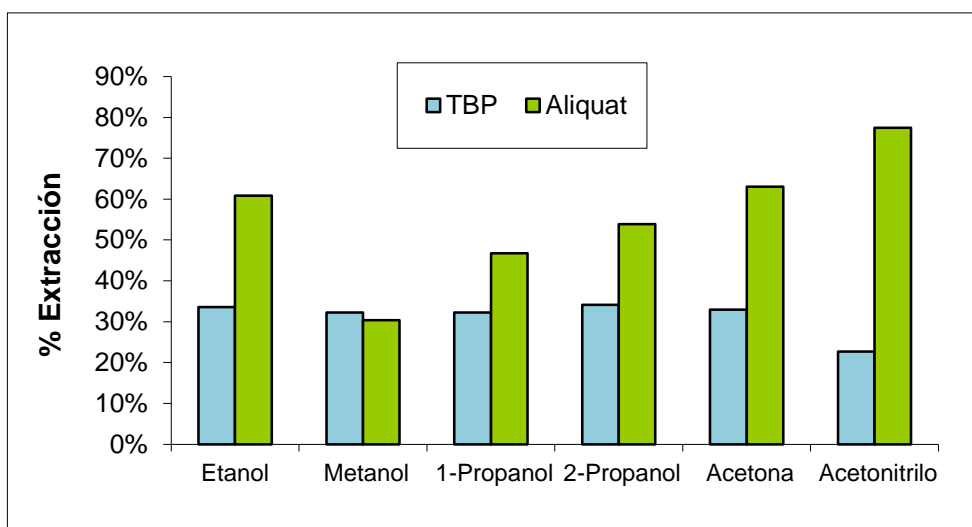


Figura 6.2. Diferentes proporciones de (a) TBP y (b) TiOA como extractantes y, xileno y dodecano como disolventes orgánicos.



**Figura 6.3.** Influencia de la salinidad en la eficiencia de extracción de <sup>99</sup>Tc con 2-propanol/TBP (n=3).

En la búsqueda de un agente extractante más eficiente, se decidió estudiar la extracción con Aliquat® 336 ya que se trata de un quelante del tecnecio. Una vez más, se estudiaron mezclas con los dispersantes anteriores (acetona, acetonitrilo, etanol, metanol, 1-propanol y 2-propanol) y se compararon los resultados obtenidos entre TBP y Aliquat® 336, quedando representados en la Figura 6.4. En general, el Aliquat® 336 proporcionó mayores eficiencias de extracción en las mezclas con acetonitrilo, acetona y etanol. Aunque el acetonitrilo proporcionó recuperaciones ligeramente más altas que el resto, la acetona fue seleccionada como dispersante por ser más económica y ofrecer una mayor reproducibilidad.

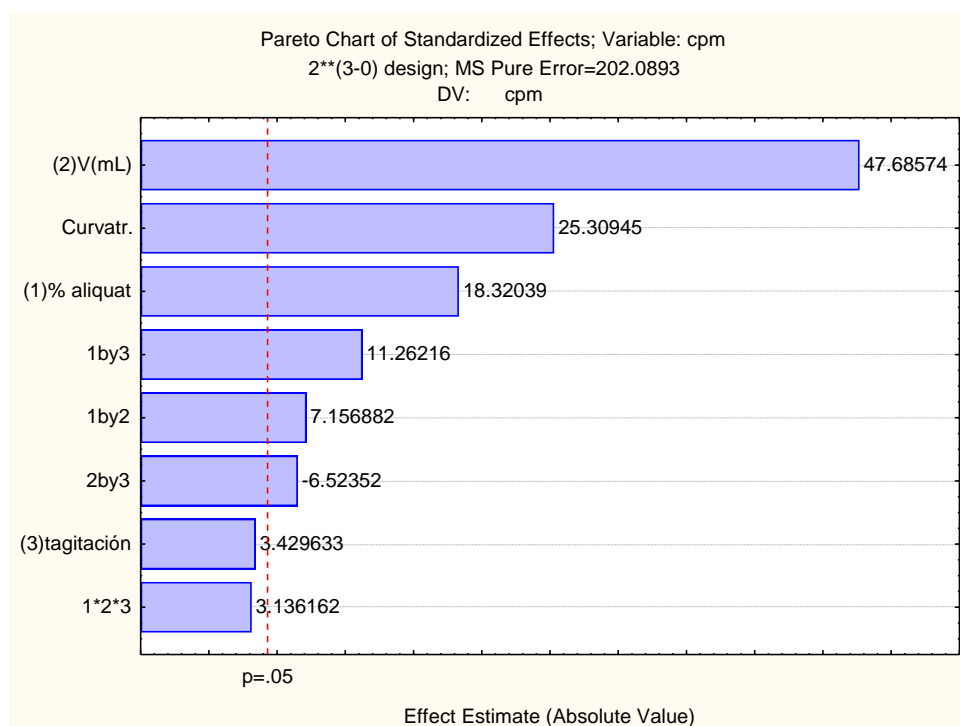


**Figura 6.4.** Porcentajes de extracción obtenidos por Aliquat® 336 y TBP, como extractantes frente a varios dispersantes.

#### 6.4.2 Optimización de las variables del sistema

Para obtener las condiciones más favorables de trabajo para la DLLME de  $^{99}\text{Tc}$ , se optimizó el sistema en modo multivariante. En primer lugar, con el fin de conocer aquellas variables que tienen una influencia sobre la respuesta y cómo interaccionan entre ellas, se realizó un diseño factorial completo  $2^k$ . A través de un análisis de tres puntos centrales se evaluó la curvatura del modelo y se estimó su precisión. Las variables estudiadas fueron: la concentración de extractante (Aliquat® 336), el volumen de disolución orgánica (extractante + dispersante), y el tiempo de agitación. Los resultados obtenidos de la tabla de ANOVA, en el gráfico de Pareto y en la distribución de residuales, mostraron que dos de las variables y la curvatura fueron significativas en el dominio experimental estudiado, siendo estas variables la concentración de extractante y el volumen de disolución orgánica (Figura 6.5). El volumen de disolución orgánica fue la variable más significativa seguida de la concentración del extractante, ambas con un efecto positivo. Por lo tanto, el rango de concentración del extractante se modificó, hacia valores más elevados, mientras que el intervalo de volumen de la disolución orgánica se acortó y quedó como límite superior 1,5 mL, ya que se alcanzaron buenas recuperaciones, y el aumento de este volumen habría repercutido en la reducción del volumen de muestra y por tanto en el factor de preconcentración debido a la limitación de volumen de la jeringa. El tiempo de agitación no fue significativo en el rango estudiado.

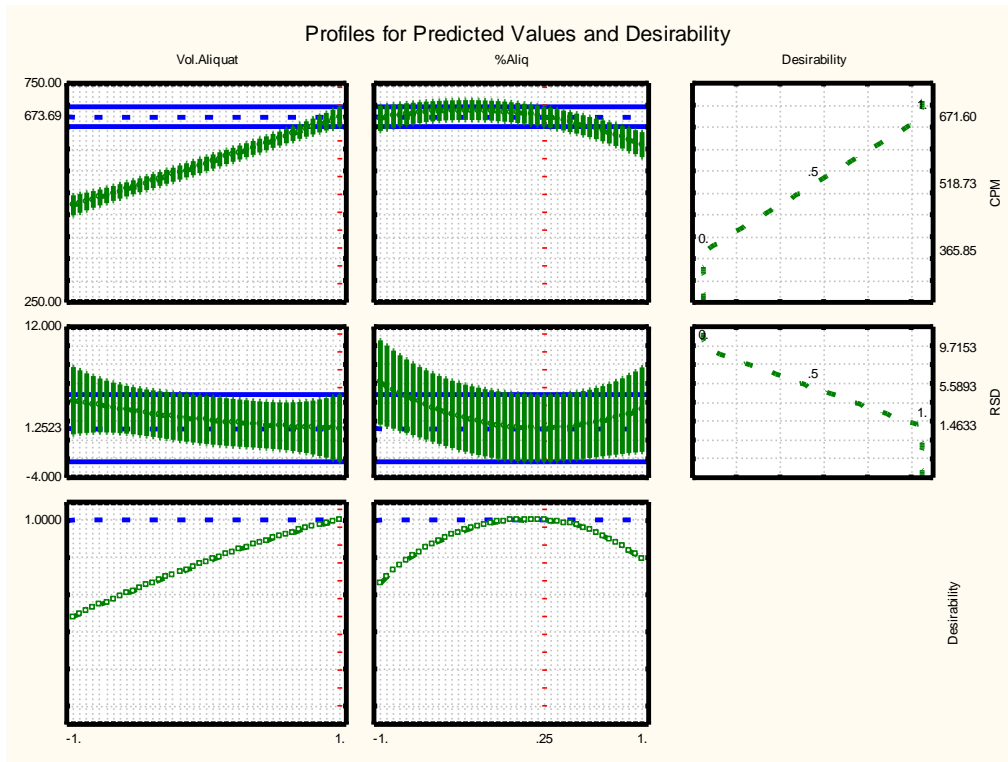
De acuerdo con estos resultados y con el fin de evaluar la necesidad de un sistema de agitación adicional, se repitieron los puntos centrales pero sin agitación y no se observaron diferencias significativas, por lo tanto se decidió continuar sin agitación en los ensayos posteriores. Estos resultados manifiestan que el uso de un dispersante es suficiente para conseguir una buena mezcla, sin necesidad de incluir agitación magnética externa que haría más complejo el sistema propuesto. De hecho, la mezcla ternaria que se formaba era claramente visible, lográndose una buena separación entre las fases cuando el tiempo de reposo fue de 90 s.



**Figura 6.5.** Gráfico de Pareto para un *screening* con diseño de factorial completo  $2^k$ .

Por lo tanto, el rango estudiado de las dos variables significativas se modificó ligeramente siguiendo la tendencia de los resultados del *screening* y se aplicó un modelo de superficie de respuesta centrado en las caras (CCD-FC) para conseguir los valores críticos tanto de la concentración de Aliquat® 336 como del volumen de extractante/dispersante. Todos los resultados experimentales se analizaron estadísticamente y sus respuestas fueron satisfactorias, es decir, se obtuvieron un buen coeficiente de ajuste al modelo de interacción de tres vías, una distribución normal del histograma de residuales y un buen ajuste entre los valores observados y predichos. La función de deseabilidad se empleó para seleccionar el valor crítico de las variables mediante la evaluación de dos respuestas: la máxima señal de  $^{99}\text{Tc}$  y la

mínima desviación estándar relativa (RSD) (Figura 6.6). Así, resultó como concentración de extractante/dispersante un valor óptimo de 22,5 % de Aliquat® 336 en acetona y como volumen de extracción 1,5 mL, ya que se alcanzaron eficiencias de extracción del 84% (Tabla 6.2).



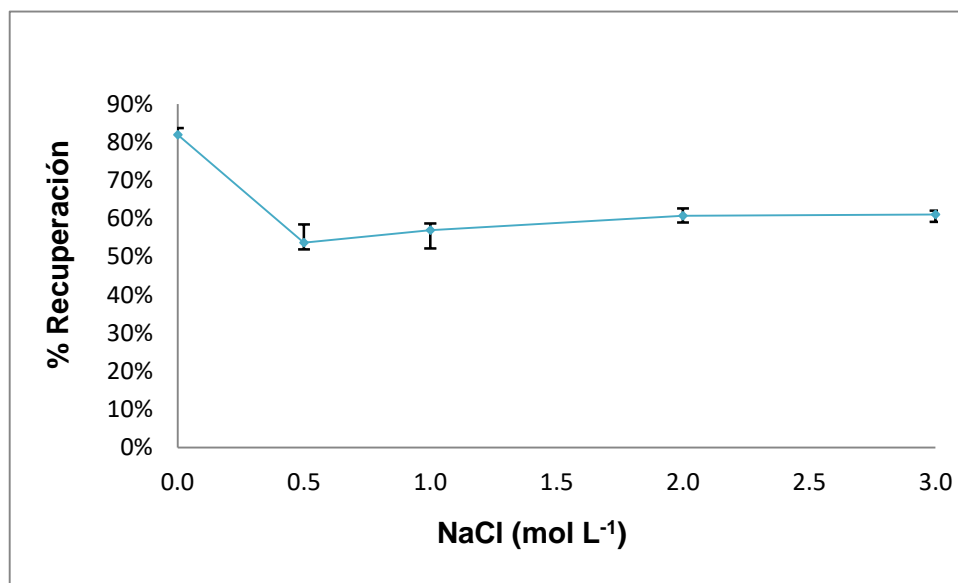
**Figura 6.6.** Función deseabilidad para dos respuestas: la máxima señal de  $^{99}\text{Tc}$  y la mínima desviación estándar relativa (RSD) con un Diseño Central Compuesto centrado en las caras para obtener los valores óptimos en el rango estudiado.

**Tabla 6.2.** Dominio experimental de las variables estudiadas en los ensayos de *screening* y de superficie de respuesta.

<i>Variable</i>	<i>Screening</i>	<i>Superficie de respuesta</i>	<i>Valor óptimo</i>
Concentración Aliquat® 336 (%)	5 – 20	10 – 30	22,5
Volumen Aliquat® 336 (mL)	0,5 – 1,5	0,75 – 1,5	1,5
Tiempo de agitación (s)	20 – 60	--	--

### 6.4.3 Influencia de la salinidad

El efecto de la sal se estudió mediante la adición de cantidades crecientes de cloruro de sodio (0 – 3 mol L<sup>-1</sup>) a la muestra. La relación entre la concentración salina y las recuperaciones fueron inversamente proporcionales, conllevando una disminución de la recuperación a medida que aumentaba la concentración de la sal (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Influencia de la concentración de NaCl sobre la eficiencia de extracción de <sup>99</sup>Tc con Aliquat® 336 (n=4).

Este efecto negativo se podría explicar debido a que la sal hace que la separación entre fases sea más rápida y en consecuencia, se produce un menor tiempo de contacto entre la fase acuosa y la fase orgánica cuando se añade la sal. Además, se observaron restos de fase orgánica en la fase acuosa tras la extracción. Se probó la implementación de una etapa de agitación adicional en las muestras con mayor contenido salino, en concreto, en las muestras de orina y saliva, pero no se observaron diferencias significativas en las eficiencias de extracción. De hecho, a este tipo de muestras se añadieron cantidades crecientes de EDTA 0,1 mg mL<sup>-1</sup> y se evidenció que los resultados mejoraban por lo que se acordó una relación de 0,2 mg de EDTA por cada 20 mL de muestra (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3.** Influencia de la adición de EDTA sobre las muestras de orina y saliva.

<i>Muestra</i>	<i>mg EDTA</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Orina (n=4)	0,01	61
Orina (n=4)	0,05	73
Orina (n=4)	0,1	77
Saliva (n=4)	0,1	70
Saliva (n=4)	0,2	84

#### 6.4.4 Parámetros analíticos

Una vez que se estudiaron y se seleccionaron las variables críticas, se determinaron los principales parámetros analíticos (Tabla 6.4). La AMD se calculó de acuerdo a la norma ISO 11929-1 con 95 % de nivel de confianza y resultó de 0,075 Bq. Se calculó también la precisión intra-día como RSD %, teniendo en cuenta diez extracciones llevadas a cabo en el mismo día y la precisión entre-días como el RSD % de cinco extracciones realizadas en cinco días diferentes. El factor de preconcentración del presente método se obtuvo como la relación del volumen de la muestra cargado en la jeringa y el volumen de la fase orgánica recogida. Además, se ensayó la posibilidad de un aumento en el factor de preconcentración usando una jeringa de 10 mL, pero la precisión se deterioró respecto a una jeringa de 5 mL. Por lo tanto, la principal limitación de la metodología propuesta recae en el factor de preconcentración, ya que por lo general el  $^{99}\text{Tc}$  se encuentra en niveles bajos tanto en muestras biológicas como ambientales. Pese a lo anterior, el método propuesto es rápido y práctico, es decir, cada procedimiento de extracción conlleva únicamente 8 minutos de duración y posteriormente el eluato obtenido se mezcla con 8 mL de líquido de centelleo antes de ser contado durante 30 min en un contador de centelleo líquido.

**Tabla 6.4.** Parámetros analíticos del sistema desarrollado.

<b>Parámetros analíticos</b>	<b>Valor</b>
Actividad mínima detectable (Bq)	0,075
Precisión Intra-día (%) (n= 10)	4,1
Precisión Inter-día (%) (n= 5)	6,9
Frecuencia extracción (h <sup>-1</sup> )	8
Factor de enriquecimiento	5
Eficiencia detección (%)	95,2
Eficiencia extracción (%)	84

La Tabla 6.5 resume algunas características analíticas de trabajos previos en los que se lleva a cabo LLE de <sup>99</sup>Tc en diferentes matrices. Por ejemplo, el <sup>99</sup>Tc se extrae mediante LLE seguido de detección por ICP-MS en dos trabajos diferentes [72,78], donde obtienen AMDs de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  Bq y  $1,5 \cdot 10^{-3}$  Bq de <sup>99</sup>Tc, respectivamente. Sin embargo, estos trabajos se realizaron manualmente utilizando volúmenes de muestra y reactivos elevados, lo cual implica un procedimiento más tedioso y largo que el aquí propuesto. Por otra parte el equipo de ICP-MS no suele estar disponible en centros médicos para usos tan concretos, además de que presenta mayor número de interferencias como puedan ser <sup>99</sup>Mo o <sup>99</sup>Ru. A través de un contador de gas tipo Geiger Müller se obtuvo un valor similar de AMD, de 0,082 Bq de <sup>99</sup>Tc, después de un pretratamiento de al menos 1 día de duración, además de consumir grandes volúmenes de reactivos y muestra, con el que se lograron recuperaciones entre el 70 y el 75 % [70]. Otro estudio en muestras sólidas basado en extracciones manuales, implicando numerosas etapas y una LLE final en tri-n-octilamina al 5% en xileno y determinación posterior del <sup>99</sup>Tc mediante detector de centelleo líquido, alcanzó un AMD de 0,017 Bq con 2 h de contaje y recuperaciones del 70 al 95% [71].

Por lo tanto, tras la revisión de anteriores trabajos, el método propuesto es el primero que desarrolla un sistema DLLME para la extracción y preconcentración de <sup>99</sup>Tc, proporcionando buenos resultados en términos de sus parámetros analíticos, con elevada frecuencia de muestreo. El tratamiento previo de la muestra ha sido completamente automatizado, logrando buena sensibilidad, precisión y elevada eficacia de extracción. Por otra parte, los volúmenes de disolventes orgánicos y de muestra se reducen hasta dos órdenes de magnitud en comparación con trabajos anteriores, reduciendo al mismo tiempo el impacto ambiental del análisis.



**Tabla 6.5.** Comparación con métodos previos de LLE de  $^{99}\text{Tc}$ .

<i>Pretratamiento</i>	<i>Técnica Detección</i>	<i>AMD (Bq)</i>	<i>Eficiencia Extracción</i>	<i>Referencia</i>
SPE-LLE	GM	0,082	70-75	[70]
LLE	LSC	0,017	70-95	[71]
LLE-SPE	ICP-MS	0,0025	--	[72]
LLE	ICP-MS	0,0015	86-92	[78]
DLLME	LSC	0,075	84	Este trabajo

#### 6.4.5 Aplicaciones a muestras reales

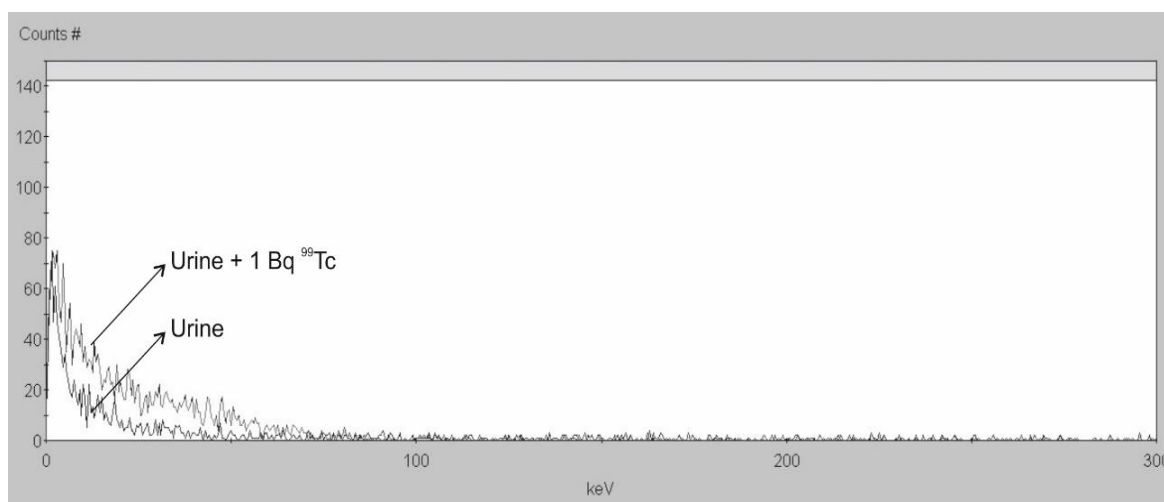
Las muestras de orina y saliva fueron tomadas del personal del laboratorio, mientras que las muestras de residuo se recogieron de los depósitos plomados de residuos líquidos radioactivos del hospital. Todas las muestras se acidificaron con ácido nítrico hasta una concentración final de  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ . En el caso de las muestras de residuos, existe la posibilidad de que el  $^{99}\text{Tc}$  se encuentre reducido ya que en las preparaciones de los radiofármacos se usa Sn(II) liofilizado que reduce al tecnecio para que se formen los quelatos correspondientes con las moléculas del fármaco. Para asegurar la extracción, el tecnecio tiene que estar en estado de oxidación +7, para lo cual se le añadió peróxido de hidrógeno a las muestras. Se estudiaron diferentes volúmenes de oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 0,2, 0,5, 0,7 y 1 mL, resultando el volumen de 0,7 mL el que mejor recuperaciones ofreció. Por otra parte, para eliminar las posibles interferencias debidas al alto contenido salino de las muestras de orina y saliva, a estas se les añadió EDTA (0,2 mg de EDTA por cada 20 mL de muestra).

Para validar el método se adicionaron actividades conocidas de  $^{99}\text{Tc}$  a las muestras reales de orina, saliva y residuos hospitalarios, con el objetivo de calcular el porcentaje de recuperación. En todos los casos las recuperaciones que se obtuvieron fueron superiores al 82%, como se recogen en la Tabla 6.6.

**Tabla 6.6.** Aplicación del método DLLME-LSC de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas y de residuos.

Muestras	$^{99}\text{Tc}$ Añadido		$^{99}\text{Tc}$ Encontrado		Recuperación (%)
	Act (Bq)	Incer (Bq)	Act (Bq)	Incer (Bq)	
Orina 1	0		< AMD		
	0,36	0,05	0,30	0,05	82
	1,55	0,07	1,44	0,07	93
Orina 2	0		< AMD		
	0,66	0,06	0,73	0,06	110
	1,55	0,07	1,44	0,07	93
Orina 3	0				
	0,36	0,05	0,31	0,05	85
Saliva 1	0		< AMD		
	1,55	0,07	1,35	0,07	87
	0		< AMD		
Saliva 2	1,14	0,06	0,99	0,06	87
	1,55	0,07	1,30	0,07	84
	0		< AMD		
Residuos hospitalarios	0,47	0,05	0,56	0,05	119
	1,14	0,07	0,99	0,06	87
	2,62	0,09	2,57	0,08	98

A modo de ejemplo en la Figura 6.8 se muestra un espectro de muestras de orina con y sin adición de patrón de 1 Bq de  $^{99}\text{Tc}$ , eliminando la matriz de la muestra mediante el método propuesto, previo a la medida por contador de centelleo líquido.



**Figura 6.8.** Espectro obtenido en LSC de una muestra de orina analizada mediante el sistema DLLME-LSC.

## 6.5 Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema basado en la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) que automatiza la separación y la preconcentración de las muestras de  $^{99}\text{Tc}$ , garantizando la seguridad del analista y la mejora de la precisión del método.

La presente metodología ha sido aplicada a matrices complejas como orina, saliva, y muestras de residuos hospitalarios con resultados satisfactorios. Por otra parte, los volúmenes de los disolventes orgánicos y de las muestras se reducen hasta dos órdenes de magnitud en comparación con trabajos anteriores, y esto se traduce en un menor impacto ambiental. Además, este método rápido automatizado tiene varias ventajas como son la simplicidad, el bajo coste por análisis, la alta recuperación, la precisión, y el factor de enriquecimiento. Por lo tanto, este sistema se propone como una herramienta útil para el seguimiento del  $^{99}\text{Tc}$  generado en hospitales a partir de muestras biológicas y de residuos.



**CAPÍTULO 7**

**Método simple y automatizado  
para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$   
mediante resina selectiva y  
detección por centelleo líquido  
en muestras de orina**



## 7.1. Introducción

En los últimos años, el uso de  $^{99m}\text{Tc}$  como herramienta con fines diagnósticos ha aumentado considerablemente y por consiguiente también lo ha hecho la generación de residuos de  $^{99}\text{Tc}$ . Los residuos que contienen  $^{99}\text{Tc}$  comprenden la orina y las heces de pacientes tratados, ya que son las vías de excreción fisiológicas más frecuentes, además de restos de los eluatos de  $^{99m}\text{Tc}$ , decaídos a  $^{99}\text{Tc}$ . De acuerdo con esto, desarrollar un método capaz de monitorear  $^{99}\text{Tc}$  en ciertas muestras biológicas y residuos es de gran utilidad.

Con el fin de automatizar la extracción y preconcentración de este radionúclido, que es el paso más laborioso en los análisis radioquímicos, se trabajó con técnicas de análisis por inyección en flujo y una resina selectiva [67,79,80]. La técnica LOV, la cual proporciona un manejo total de las muestras desde su modo de inyección secuencial, integra varios pasos del protocolo de análisis en un mismo dispositivo [38,81-83].

Los contadores de centelleo líquido son los más ampliamente utilizados en la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ , y son los equipos que se encuentran habitualmente en los hospitales. Sin embargo, la determinación directa de tecnecio en muestras de orina, no está completamente desarrollada por la complejidad de la matriz y por la falta de sensibilidad. Para resolver esto, se planteó el empleo de la resina TEVA<sup>®</sup>, altamente selectiva para extraer tecnecio.

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un método sencillo, versátil, selectivo, sensible, y de bajo costo para la determinación de bajas actividades de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras de orina acidificadas, que fuera fácil de implantar en la mayoría de hospitales, resultando así una herramienta asequible para monitorizar la entrada de  $^{99}\text{Tc}$  al medio ambiente.

## 7.2 Reactivos y muestras

Todas las disoluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y con agua de calidad Milli-Q (Direct 8, Millipore). El ácido nítrico 60% (v/v) se adquirió en Scharlab. La resina TEVA<sup>®</sup>, 50–100  $\mu\text{m}$ , se adquirió en Triskem Industries, (Triskem International, Francia) y los prefiltros de fibra de vidrio en Millipore. El cóctel de centelleo OptiPhase Hisafe, se compró a Perkin-Elmer.<sup>‡</sup>

---

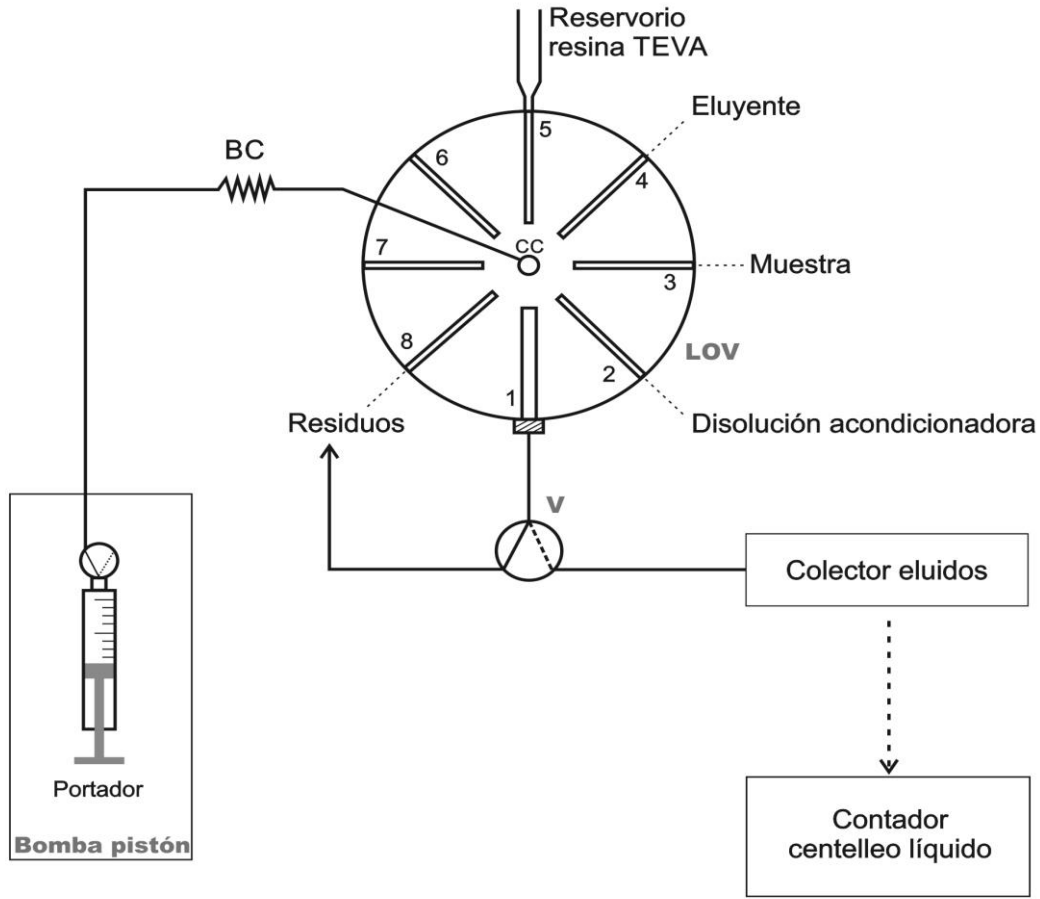
<sup>‡</sup> La instrumentación utilizada se encuentra detallada en los capítulos 2 y 4.

### 7.3 Procedimiento analítico

El sistema empleado se detalla en la Figura 7.1. En ella se distingue un sistema LOV al cual se conecta un bucle de carga que permite la aspiración secuencial de la muestra y los reactivos desde o hacia los diferentes puertos de la válvula de selección. Uno de los canales LOV (puerto 1) sirve como microcolumna para contener la resina de extracción. Esta columna se rellena con 32 mg de resina TEVA® y para contener esta resina dentro del canal y evitar que se pierda, se colocó un prefiltro de fibra de vidrio que retiene las partículas de la resina pero que a su vez permite el flujo de disolventes libremente. Este filtro fue reemplazado manualmente cada tres meses aproximadamente. La disolución de la resina de extracción estaba contenida en una jeringa de plástico de 5 mL, montada verticalmente en el puerto 5 de la válvula de selección. Los puertos periféricos tenían la siguiente configuración: (1) microcolumna, (2) disolución acondicionadora ( $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ ), (3) muestreador automático, (4) eluyente ( $6,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ ), (5) reservorio de resina y (8) contenedor de residuos. Este módulo se conectó a una bureta equipada con una jeringa de vidrio de 10 mL como conductor de líquidos. Se utilizó además otra válvula solenoide externa para conducir el flujo desde la microcolumna bien hacia el contenedor de residuos o bien para dirigir la muestras hacia un vial de centelleo.

La secuencia completa del método analítico esta descrita en la Tabla 7.1 y consiste, en primer lugar, en cargar la microcolumna con 32 mg de resina de la disolución saturada del reservorio, a continuación, acondicionar la misma con  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$  y posteriormente cargar la muestra. El  $^{99}\text{Tc}$  que ha quedado retenido en la columna se eluye con  $6,7 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$  y se envía al vial de centelleo situado en el colector de eluidos. Los eluatos obtenidos se diluyen hasta 6 mL con agua para que la concentración final no supere los  $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ , que es el máximo de acidez permitido por el líquido de centelleo con el que posteriormente se mezclan [74].





**Figura 7.1.** Representación esquemática del sistema LOV para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ . CC: conducto o puerto central; BC: bucle de carga; V: válvula solenoide externa.

Los viales de vidrio ya preparados con líquido de centelleo se mantuvieron lejos de la luz en la bandeja del detector durante la noche para evitar interferencias debido a fenómenos de fluorescencia y/o fosforescencia [75] y al día siguiente fueron leídos en el contador de centelleo líquido con las condiciones operacionales especificadas en el Capítulo 2, Tabla 2.1. Tras cada elución la columna se lavó con agua con el fin de asegurar la retención de tecnecio en la siguiente ejecución, evitando cualquier rastro de ácido concentrado en ella. El relleno de la columna se sustituyó de forma automática cada cierto número de ensayos.

**Tabla 7.1.** Procedimiento automático para la extracción y preconcentración de tecnecio mediante SPE.

<i>Instrucción analítica</i>	<i>Caudal (mL min<sup>-1</sup>)</i>	<i>Posición válvula</i>		
		<b>S</b>	<b>LOV</b>	<b>V</b>
<b>1. Empaquetado de la columna</b>				
Cargar 32 mg resina TEVA® en BC	5	On	5	Off
Dispensar en la columna	2	On	1	Off
<b>2. Acondicionamiento resina TEVA®</b>				
Cargar 2 mL HNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup>	5	On	2	Off
Dispensar en la columna	2	On	1	Off
<b>3. Cargar muestra</b>				
Cargar X mL de muestra en BC	5	On	3	Off
Dispensar en la columna	2	On	1	Off
<b>4. Elución <sup>99</sup>Tc</b>				
Cargar 1,7 mL 6,7 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	5	On	4	Off
Dispensar en la columna	2	On	1	On
<b>5. Lavado del ácido de la resina TEVA®</b>				
Cargar 3 mL H <sub>2</sub> O	5	On	-	Off
Dispensar en la columna	2	On	1	Off

## 7.4 Resultados y discusión

### 7.4.1 Configuración del sistema

El sistema de LOV se fabrica como una estructura monolítica que se monta sobre una válvula de selección multiposición convencional. Además de la compactibilidad, la ventaja de este sistema es la posición fija permanente de los canales, lo cual asegura la repetitividad en la manipulación de los fluidos. En contraposición a los métodos manuales cuyas operaciones pueden durar hasta días, este sistema permite una drástica reducción del consumo de reactivos y de la generación de residuos, también reduce el consumo de resina y permite ahorro de tiempo, con una frecuencia de extracción de hasta 12 muestras h<sup>-1</sup>. Además la técnica LOV permite la sustitución de la columna de manera totalmente automatizada.

Dado que los viales tuvieron que mantenerse en oscuridad durante una noche para evitar los fenómenos de emisión, y los contajes eran de 1800 s, fue inevitable la detección *off-line*. Además este tipo de detección es el método más comúnmente

utilizado en los laboratorios para reducir costos cuando se trata de grandes instrumentos como ICP-MS o detectores radiométricos con tiempos largos de recuento asociados a muestras con bajo contenido de actividad.

#### 7.4.2 Optimización de las variables del sistema

En primer lugar se realizó un test de cribado o *screening*  $2^k$  con el objetivo de conocer que variables tienen un efecto significativo sobre la señal de la respuesta y la posibilidad de readaptar los límites experimentales estudiados. Las cuatro variables que pueden afectar significativamente al método propuesto fueron: la concentración y el volumen del eluyente, el caudal de retención y el caudal de elución [47,84]. De esta manera, se realizaron 19 experimentos para el test de cribado. Los resultados del *screening*, (diagrama de Pareto, tabla de ANOVA) mostraron que las cuatro variables fueron significativas en el rango experimental estudiado. La Figura 7.2 muestra el diagrama de Pareto que resume gráficamente la información más importante del *screening*.

Teniendo en cuenta estos resultados, los rangos de trabajo de la concentración y el volumen del eluyente se modificaron, aunque los caudales de retención y de elución se fijaron para lograr una frecuencia de extracción más alta ( $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) siempre evitando problemas de sobrepresión. Con las dos variables seleccionadas se llevó a cabo un diseño central compuesto centrado en las caras (CCD-FC) con 11 experimentos (incluidos tres puntos centrales). Los valores máximos para el volumen y la concentración de eluyente se establecieron considerando que el líquido de centelleo tiene una tolerancia limitada tanto al volumen como a la concentración de ácidos. Siendo el volumen de elución la variable más significativa del *screening*, su rango se modificó hasta un volumen máximo de 1,75 mL y en consecuencia, la concentración del eluyente también fue modificada dentro del rango permitido por las especificaciones del líquido de centelleo.

La disolución empleada para la optimización fue de 2,5 Bq de  $^{99}\text{Tc}$ .

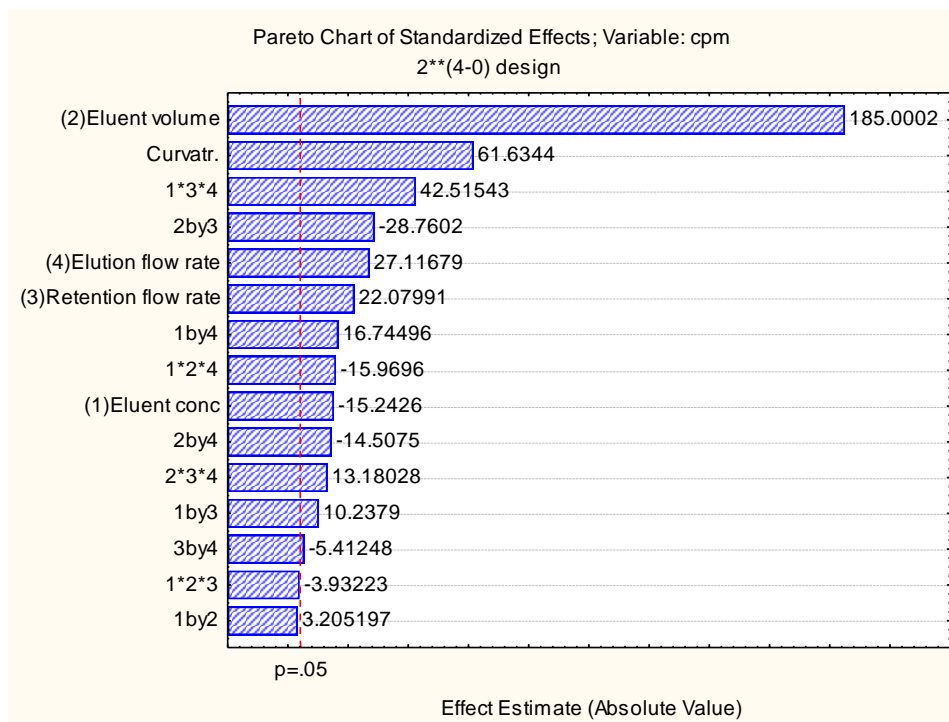
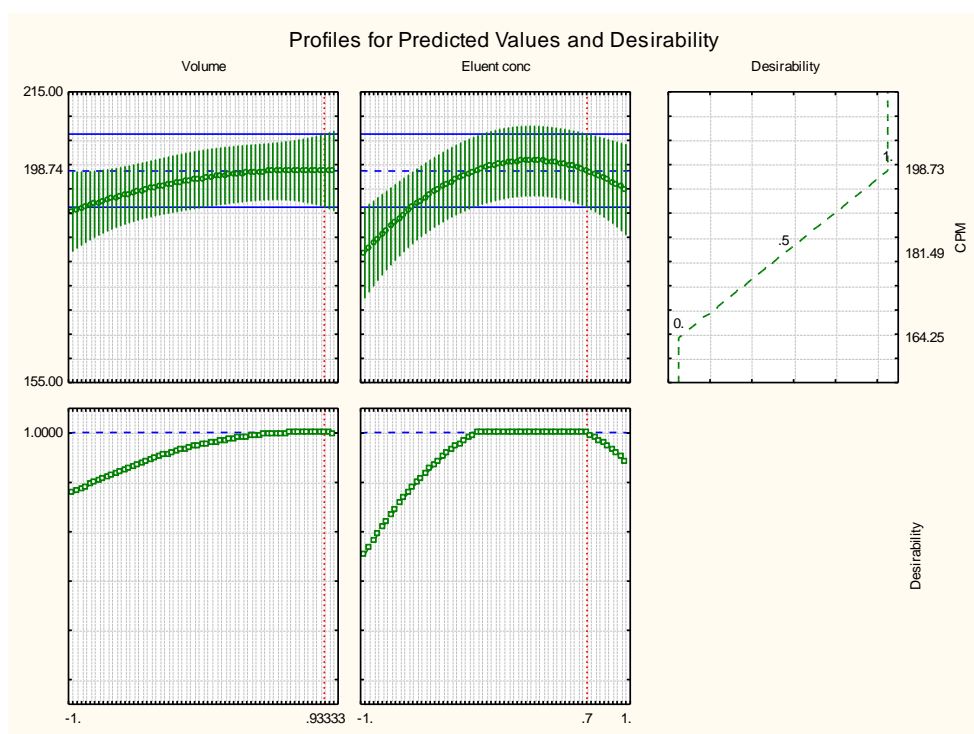


Figura 7.2. Diagrama de Pareto obtenido en el screening.

Los valores óptimos se obtuvieron a partir de la función de deseabilidad, considerando la máxima respuesta del patrón y la mínima respuesta para el blanco de reactivos (Figura 7.3). Los resultados se ajustaron a un modelo con términos cuadráticos con un  $r^2= 0,9487$ , siendo ambas variables significativas (tabla ANOVA). El histograma de residuales y la gráfica de los valores observados y predichos mostraron distribuciones satisfactorias. De acuerdo con estos resultados se fijaron los valores óptimos que fueron empleados a lo largo de todo el trabajo experimental. Estos valores aparecen resumidos en la Tabla 7.2.



**Figura 7.3.** Gráfico de deseabilidad usado para obtener los valores óptimos codificados para el volumen y la concentración del eluyente.

**Tabla 7.2.** Dominio experimental y valores críticos obtenidos a partir de la optimización multivariante para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  mediante el sistema SPE-LSC propuesto.

<i>Variable</i>	<i>Rango Screening</i>	<i>Rango Optimización</i>	<i>Valor óptimo</i>
Caudal elución ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,6 - 2	2	2
Caudal retención ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,6 - 2	2	2
Concentración eluyente $\text{HNO}_3$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	6 - 9	5 - 7	6,7
Volumen eluyente $\text{HNO}_3$ (mL)	0,5 – 1,3	1 – 1,75	1,7

### 7.4.3 Propiedades de la columna

La resina TEVA<sup>®</sup> fue seleccionada por su capacidad de extraer tecnecio gracias al grupo funcional que contiene, una amina cuaternaria alifática con propiedades similares a una resina de intercambio aniónico de base fuerte [29]. Además, el hecho de que los grupos funcionales estén en disolución en lugar de estar fijados en un polímero, le confiere una mayor flexibilidad para coordinarse alrededor del anión de interés. Esto significa que la captación de estos iones es generalmente más alta y

ocurre a concentraciones más bajas de ácido [30,31]. Al acondicionar la resina con ácido nítrico, el nitrato se une a la amina cuaternaria y actúa como contraión para el intercambio aniónico con el pertecneciato.

Esta resina fija tecnecio cuando se encuentra como ión pertecneciato lo cual ocurre en condiciones oxidantes en disolución acuosa [85], o como  $Tc_2O_7$  volátil en ausencia de agua, por ejemplo, tras una calcinación o secado [71]. El Tc(VII) se retiene en la resina con un rango de acidez de entre  $0,1 - 1 \text{ mol L}^{-1} H^+$  como  $HNO_3$ . En este medio, los actínidos tetravalentes no se retienen, eliminando de esta manera las posibles interferencias. Por ejemplo, en el citado rango de pH la retención de tecnecio es de 2 órdenes de magnitud más alta que la siguiente especie fuertemente retenida, es decir, el Pu(IV) [86].

Por lo tanto, la concentración de ácido nítrico optimizada en los ensayos previos que mejores resultados proporcionó fue de  $0,1 \text{ mol L}^{-1} HNO_3$ . El uso de la resina TEVA<sup>®</sup> aporta no sólo la eliminación de la matriz de la muestra (*sample clean-up*), sino también la preconcentración de  $^{99}Tc$  al mismo tiempo. La capacidad de la resina para retener tecnecio se estudió realizando un ensayo de saturación de los 32 mg de resina empacados en la microcolumna. La resina fue capaz de retener hasta 85 kBq de tecnecio por gramo de resina ( $135 \text{ mg Tc g}^{-1} \text{ resina}$ ).

La duración de la columna de extracción, es decir, la durabilidad de la resina, está íntimamente ligada a la repetitividad del método y es indicativo del número de análisis consecutivos factibles sin cambiar entre ellos el relleno de la columna. Ambos parámetros, repetitividad y durabilidad, se estudiaron al mismo tiempo. Por un lado, las diez primeras eluciones dieron una repetitividad de 1,6 %, expresado en RSD ( $n= 10$ ) y por otro, para el ensayo de durabilidad de la resina se realizaron hasta 110 extracciones consecutivas con recuperaciones superiores al 95% cargando en cada una de ellas 1 mL de muestra. Esta larga durabilidad para una cantidad de resina tan pequeña reduce los costes del método en comparación con otros sistemas automatizados o manuales previos.

La reproducibilidad del método, expresada como RSD, fue de 2,0 %. Esta se determinó a partir de los resultados obtenidos durante cinco días de trabajo diferentes, cambiando el relleno de la columna cada día y empleando en todo momento la misma disolución patrón de  $^{99}Tc$ . Todos los parámetros analíticos estudiados están recogidos en la Tabla 7.3.

No se realizaron estudios de interferencias ya que con el empleo de este tipo de resinas selectivas, el detector específico para el analito y la ausencia de interferencias en las muestras de orina, no se consideraron necesarios.

**Tabla 7.3.** Parámetros analíticos del sistema SPE-LSC propuesto.

<b>Parámetros analíticos</b>	<b>Valor</b>
Actividad Mínima Detectable (Bq)	0,1
Actividad Mínima Detectable (Bq L <sup>-1</sup> )	1
Repetitividad (%) (n=10)	1,6
Reproducibilidad (%) (n=5)	2,0
Cantidad de resina en la microcolumna (mg)	32
Durabilidad resina (inyecciones)	110
Volumen preconcentración de muestra (mL)	hasta 100*
Frecuencia extracción (h <sup>-1</sup> )	1-12**

\*según el contenido de tecnecio en la muestra.

\*\*según el volumen de muestra a preconcentrar.

Es importante enfatizar ciertas características del método desarrollado como son la simplicidad, la compactibilidad y que requiere muy poco mantenimiento. Experimentalmente se ha obtenido una eficiencia de contaje del 97,5 % para <sup>99</sup>Tc, lo cual está en consonancia con la bibliografía existente al respecto de estos contadores de centelleo líquido para emisores beta. La actividad mínima detectada fue de 0,1 Bq y se calculó siguiendo la norma ISO 11929-1 con un nivel de confianza del 95%. Teniendo en cuenta que el sistema es capaz de preconcentrar hasta 100 mL de muestra, la AMD para este método también podría expresarse como concentración de actividad, de 1 Bq L<sup>-1</sup>.

La actividad de una dosis inyectada en Medicina Nuclear suele ser aproximadamente de 740 MBq de <sup>99m</sup>Tc. Una vez que ha sido inyectada al paciente, habrá ya alrededor 5,7 Bq de <sup>99</sup>Tc procedente de la desintegración del <sup>99m</sup>Tc porque habrán transcurrido casi cuatro T<sub>1/2</sub>. Esta actividad se incrementará hasta aproximadamente 8 Bq cuando todo el <sup>99m</sup>Tc haya decaído. De acuerdo con los modelos de excreción, durante la primera hora el principal mecanismo de excreción es la vía urinaria, en un 30 % [87]. Por lo tanto, si analizamos una muestra de orina transcurrida 1h desde la inyección, la cantidad de <sup>99</sup>Tc debe estar entre 1,7 y 2,5 Bq. Por tanto, el método propuesto es capaz de detectarlo, pudiéndose emplear como herramienta de control de la cantidad de <sup>99</sup>Tc excretada por los pacientes que han sido tratados con cualquier radiofármaco de <sup>99m</sup>Tc y extrapolarlo como actividad que se acumulará en el medio ambiente. A pesar de ser actividades muy bajas, hay que

considerar que el número de pacientes tratados con este radioisótopo en todo el mundo es elevado.

El volumen de preconcentración se calculó ensayando diez volúmenes diferentes de muestra, entre 1 y 100 mL. Los resultados mostraron que es factible llegar a preconcentrar en la resina hasta 100 mL de muestra con una RSD de 1,7 % (n= 4).

#### 7.4.4 Monitorización de $^{99}\text{Tc}$ por sistemas automatizados

En la bibliografía existen diversos trabajos previos relacionados con la automatización de la determinación de  $^{99}\text{Tc}$  en diferentes muestras. Hay algunos métodos automatizados que emplean el ICP-MS como detector y técnicas FIA para automatizar la extracción y preconcentración de tecnecio desde la matriz de la muestra. Eroglu y col. aplican su sistema a muestras de agua de mar con una resina de intercambio aniónico, alcanzando un LOD de  $0,02 \text{ Bq L}^{-1}$  [88]. Otros ejemplos en los que se emplean resinas de extracción selectivas, como la resina TEVA<sup>®</sup>, son los trabajos de Kim y col. [58] y Hollenbach y col. [89] que obtienen LODs de  $0,05 \text{ Bq L}^{-1}$  y  $11 \text{ Bq kg}^{-1}$ , respectivamente. Aunque, las detecciones mediante ICP-MS proporcionan LODs más bajos, este equipo no se encuentra comúnmente en los laboratorios de rutina de los hospitales debido al alto coste del propio equipo, de sus fungibles y su mantenimiento. Por otra parte, las técnicas FIA suponen un alto consumo de muestra y de reactivos dada su manera de trabajo en modo continuo, además de requerir una calibración más frecuente debido al envejecimiento de sus tuberías.

Tal como se ha apuntado anteriormente, el contaje mediante LSC es la técnica más comúnmente utilizada para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ . Un ejemplo de un sistema completamente automatizado que combina LSC con SIA es el desarrollado por Egorov y col. [67] que determina  $^{99}\text{Tc}$  en modo *stop flow* con un LOD de  $1,1 \text{ Bq}$ . Este sistema se aplicó a muestras con niveles de actividad más altos que provenían de vertederos de residuos nucleares. A pesar de tener una frecuencia de análisis de  $3 \text{ muestras h}^{-1}$ , la detección con LSC permite analizar muestras que contengan una actividad baja. Los mismos autores han desarrollado más recientemente sistemas con sensores de radionucleidos para la determinación de  $^{99}\text{Tc}$ , siendo éstos de gran relevancia para la monitorización *in situ*. En estos sensores la detección se lleva a cabo sobre un material de centelleo en el cual también se realiza la extracción y la preconcentración. Egorov y col. [80] desarrollaron un sistema SIA también con sensores basado en microesferas centelleadoras selectivas químicamente, que son reemplazadas en cada



lectura, alcanzando un LOD de 6,2 Bq L<sup>-1</sup>. Grate y col. [90] optimizaron sensores de centelleo extractivo con diferentes combinaciones de material extractante y centelleador, logrando un AMD de 6 Bq L<sup>-1</sup>, trabajando en modo *stop flow* y con adiciones de 330 Bq L<sup>-1</sup> de <sup>99</sup>Tc a las muestras. Más recientemente O'Hara y col. [61] desarrollaron un sistema para la cuantificación de <sup>99</sup>Tc en matrices complejas de aguas subterráneas mediante un sensor radiométrico minicolumna para su preconcentración. Estos sistemas han sido aplicados a muestras agua de *Hanford site* (complejo de producción nuclear en su mayoría fuera de servicio) con un alto contenido de <sup>99</sup>Tc.

En la bibliografía existen pocos trabajos en los que se lleve a cabo la determinación de <sup>99</sup>Tc en orina, y todos ellos son métodos manuales. Con la información conocida hasta entonces, el método propuesto es el primero automatizado que determina bajas actividades de <sup>99</sup>Tc en muestras de orina, siendo muy interesante para el control de la entrada de este radionúclido en el medio ambiente a partir de una de sus principales fuentes antropogénicas, como son los hospitales.

#### 7.4.5 Aplicación en muestras reales

El método propuesto fue validado mediante el análisis de muestras reales de orina. La orina humana es una matriz muy compleja, que se compone principalmente de agua, pero también de moléculas orgánicas como urea, creatinina, ácido úrico, de cantidades traza de enzimas, carbohidratos, hormonas, ácidos grasos, pigmentos, y de iones inorgánicos, tales como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Por lo tanto, mediante el uso de SPE se separa el analito de su matriz y de sus posibles interferentes previa detección y se consigue al mismo tiempo preconcentrarlo.

Las muestras de orina fueron tomadas de los miembros del laboratorio que no habían sido sometidos a ninguna prueba de Medicina Nuclear con radiofármacos de <sup>99m</sup>Tc.

El único tratamiento previo de las muestras fue acidificarlas para obtener una disolución final de 0,1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Se añadieron varias actividades conocidas de <sup>99</sup>Tc a las muestras de orina con el fin de validar la aplicabilidad del sistema propuesto tanto en pacientes tratados con radiofármacos de <sup>99m</sup>Tc como en muestras con actividades más altas de <sup>99</sup>Tc. En todos los casos se preconcentraron 100 mL de muestra. El *t*-test de comparación de medias reveló que no existían diferencias significativas para un nivel de confianza del 95% entre las actividades añadidas y las

encontradas. En todos los casos las recuperaciones se encontraban entre el 91% y 111 % (Tabla 7.4).

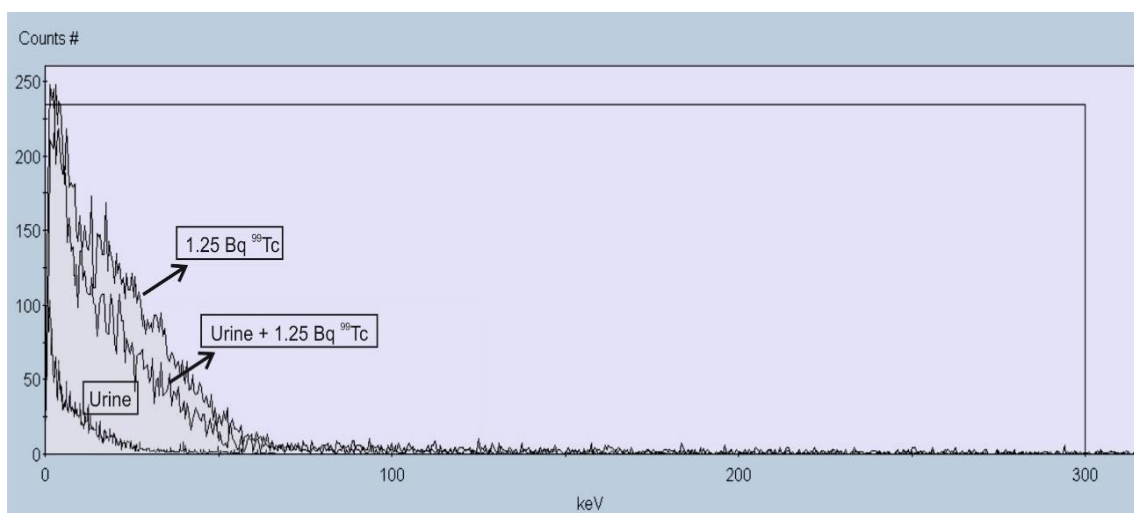
**Tabla 7.4.** Aplicación del método SPE-LSC a muestras de orina.

<b>Muestras*</b>	<b><sup>99</sup>Tc Añadido</b>		<b><sup>99</sup>Tc Encontrado</b>		<b>Recuperación (%)</b>
	<b>Act (Bq)</b>	<b>DE (Bq)</b>	<b>Act (Bq)**</b>	<b>DE (Bq)</b>	
Orina 1a	0		< AMD		100
	0,589	0,007	0,59	0,02	
Orina 1b	0		< AMD		108
	1,32	0,07	1,43	0,07	
Orina 1c	0		< AMD		100
	2,1	0,2	2,1	0,1	
Orina 2a	0		< AMD		111
	0,62	0,08	0,69	0,06	
Orina 2b	0		< AMD		110
	1,34	0,09	1,48	0,12	
Orina 2c	0		< AMD		99
	2,1	0,2	2,07	0,02	
Orina 3	0		< AMD		91
	4,3	0,2	3,9	0,3	
Orina 4	0		< AMD		93
	4,3	0,2	4,0	0,1	
Orina 5	0		< AMD		94
	7,2	0,8	6,8	0,5	

\*100 mL volumen de muestra

\*\*No existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%. Las desviaciones estándar (DE) fueron calculadas a partir de tres réplicas del análisis (n=3).

En la Figura 7.4 se observa el espectro de un muestra de orina sin actividad, de otra con adición de un estándar de <sup>99</sup>Tc y de una disolución estándar de <sup>99</sup>Tc, todas analizadas con el sistema LOV propuesto. Como se puede observar, el <sup>99</sup>Tc puede ser cuantificado de manera satisfactoria en este tipo de muestras con rangos de actividades típicos de pacientes tratados con <sup>99m</sup>Tc.



**Figura 7.4.** Espectros obtenidos en LSC de muestras de orina sin actividad, de orina con adición de un estándar de 1,25 Bq  $^{99}\text{Tc}$  y de un estándar de 1,25 Bq  $^{99}\text{Tc}$ , analizadas mediante un sistema LOV.

## 7.5 Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema automatizado LOV cuya validación con muestras reales de orina ha dado resultados satisfactorios. La combinación de un sistema basado en técnicas de análisis por inyección en flujo con un material de extracción selectivo (resina TEVA<sup>®</sup>) permite la completa automatización de las etapas de extracción y preconcentración del analito de interés, aumentando además la seguridad del analista. El procedimiento propuesto se aplicó a muestras de orina, que llevan como único pretratamiento la acidificación con ácido nítrico, proporcionando así simplicidad y reducción del tiempo del análisis. Además, este método tiene varias ventajas tales como sencillez, compactibilidad, sensibilidad, selectividad, versatilidad, repetitividad, y la reducción al mínimo la manipulación de la muestra. Por lo tanto, el presente sistema se presenta como una potencial herramienta para el control de la entrada al medio ambiente de  $^{99}\text{Tc}$  través de la orina de los pacientes tratados.



## **CAPÍTULO 8**

# **Comparativa de los sistemas propuestos**



Los sistemas propuestos a lo largo de los tres capítulos anteriores comparten un objetivo común, desarrollar sistemas automatizados basados en técnicas de análisis por inyección en flujo multiconmutadas que permitan el análisis de muestras biológicas o residuos hospitalarios, de manera que el  $^{99}\text{Tc}$  pueda ser extraído y preconcentrado, para posteriormente ser cuantificarlo. La combinación de técnicas separativas junto con técnicas de detección radiométricas y clásicas como la espectrofotométrica, han permitido alcanzar el objetivo propuesto, con ciertos matices que son comparados a continuación.

De este modo, quedan reflejadas en la Tabla 8.1 las principales características de cada sistema desarrollado. El grado de automatización alcanzado por cada uno, varió en función del acoplamiento en línea de la técnica de detección empleada. La detección radiométrica mediante LSC exige ciertas horas de oscuridad previas al conteo, más el tiempo de conteo de modo secuencial de cada vial, con lo cual los métodos que utilizan LSC son parcialmente automatizados, i.e. se automatiza el tratamiento de la muestra. Por otra parte, se han empleado dos técnicas de extracción, una basada en resinas selectivas, que es una técnica muy recurrente para este tipo de matrices, y la DLLME, que es una alternativa más novedosa que podría ser fácilmente adaptada a los laboratorios de centros hospitalarios. En todos los casos, al no existir legislación específica que regule los límites de actividad de  $^{99}\text{Tc}$  permitidos en estas muestras, no podemos realizar una valoración más concreta a cerca de la idoneidad de los límites de detección alcanzados. También resulta interesante valorar el volumen de residuos generado en cada extracción, que considerando un volumen de muestra igual para los tres métodos (3,5 mL), en ningún caso supera los 30 mL de residuo por extracción. Comparado con las técnicas manuales, este volumen de residuo se ve reducido de manera muy considerable, al menos en un orden de magnitud, aun teniendo que emplear líquido de centelleo. Por tanto, la gestión de los residuos generados durante el análisis se facilita en gran medida. Por último, cabe mencionar que el resto de parámetros analíticos son similares, garantizando la aplicación satisfactoria de todos los sistemas propuestos, aunque el sistema SPE-LSC presenta las características más ventajosas en término de precisión, durabilidad de la resina y frecuencia de extracción.

**Tabla 8.1.** Tabla comparativa de las principales características de los sistemas propuestos.

<b>Característica</b>	<b>SPE-LWCC-UV-Vis</b>	<b>DLLME-LSC</b>	<b>SPE-LSC</b>
Automatización	Completa	Parcial	Parcial
Técnica separativa	SPE	DLLME	SPE
Modo Detección	On-line	Off-line	Off-line
Límite de Detección (Bq)	2,5*	0,075**	0,1**
Límite de Cuantificación (Bq)	8	--	--
Cantidad de resina (mg)	32	--	32
Durabilidad resina (inyecciones consecutivas)	78	--	110
Repetitividad (%) (n=10)	6,0	4,1	1,6
Reproducibilidad (%) (n=5)	6,5	6,9	2,0
Volumen de muestra preconcentrado (mL)	Hasta 100 <sup>+</sup>	3,5	Hasta 100 <sup>+</sup>
Frecuencia de extracción (h <sup>-1</sup> )	4 – 9 <sup>++</sup>	8	1 – 12 <sup>++</sup>
Residuos generados por extracción (mL/extracción) <sup>o</sup>	21,5	25,0 <sup>oo</sup>	28,5 <sup>oo</sup>
Tipo de muestras	Residuos hospitalarios y aguas residuales	Orina, saliva y residuos hospitalarios	Orina
Recuperación muestras reales (%)	90 – 110	82 – 119	91 – 111

\* Calculado como LOD según IUPAC.

\*\* Calculado como AMD según ISO 11929-1.

<sup>+</sup> Según el contenido de tecnecio en la muestra.

<sup>++</sup> Según el volumen de muestra a preconcentrar.

<sup>o</sup> Calculado para 3,5 mL de muestra.

<sup>oo</sup> Incluido el volumen añadido de líquido de centelleo.



## **CAPÍTULO 9**

# **Conclusiones finales**



En esta tesis se ha desarrollado un sistema completamente automatizado para extraer y determinar espectrofotométricamente  $^{99}\text{Tc}$  en residuos hospitalarios gracias a la implementación de dos técnicas de análisis por inyección en flujo multiconmutadas, el LOV y el MSFIA. Este sistema totalmente automatizado es capaz de llevar a cabo todas las etapas del proceso analítico, i.e. la extracción, la preconcentración, la elución, el ajuste de acidez, la detección en línea, la renovación de la microcolumna, la limpieza del sistema y la adquisición y procesamiento de datos. El sistema propuesto tiene varias ventajas, en comparación con otros sistemas utilizados para determinar  $^{99}\text{Tc}$ . Entre ellas caben resaltar, un tiempo de respuesta corto, que permite una gestión rápida de los residuos, una buena selectividad debido al uso de una resina selectiva, que asegura los resultados obtenidos corresponden al analito pese a que el detector no sea selectivo. Además, garantiza una buena sensibilidad gracias a la preconcentración y al empleo de una celda de largo paso óptico.

Se ha desarrollado un sistema automatizado de microextracción líquido-líquido en fase dispersa con detección mediante centelleo líquido de  $^{99}\text{Tc}$ . Este sistema automatiza la separación y la preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$  de las muestras, garantizando la seguridad del analista y la mejora de la precisión del método. Además, este método rápido automatizado tiene varias ventajas como la simplicidad, el bajo coste por análisis, la alta recuperación, la precisión, y el factor de enriquecimiento. La presente metodología ha sido aplicada a matrices complejas tal como orina, saliva, y muestras de residuos hospitalarios con resultados satisfactorios, proponiéndose por tanto como una herramienta útil para la cuantificación del  $^{99}\text{Tc}$  generado en los hospitales y así conocer la cantidad vertida al medio ambiente.

Se ha desarrollado un sistema LOV automatizado para la extracción y preconcentración de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras de orina mediante extracción con resina selectiva y posterior detección por contador de centelleo líquido, el cual ha mostrado resultados satisfactorios. La combinación de un sistema basado en técnicas de análisis por inyección en flujo con un material de extracción selectivo (resina TEVA<sup>®</sup>) permite la completa automatización de las etapas de extracción y preconcentración del analito de interés, aumentando además la seguridad del analista. El procedimiento propuesto se aplicó a muestras de orina, que llevan como único pretratamiento la acidificación con ácido nítrico, proporcionando así simplicidad y reducción del tiempo del análisis.

La compactación y miniaturización de los sistemas que permite su montaje en pequeños lugares, ayuda a su implementación en prácticamente cualquier laboratorio.

La automatización total o parcial asegura la minimización de la manipulación por parte del analista, aumentando así su seguridad lo cual es de mayor interés cuando se trabaja con muestras y patrones radioactivos.

Los métodos propuestos, además de ofrecer una alta precisión en términos de repetitividad y reproducibilidad, y una elevada frecuencia de análisis en relación a los trabajos publicados anteriormente, ofrecen como ventajas adicionales una reducción considerable del uso de reactivos y de muestra, y por tanto de la generación de residuos.

Se considera que los métodos desarrollados en esta Tesis ofrecen una alternativa viable para la monitorización de  $^{99}\text{Tc}$  en muestras biológicas y de residuos hospitalarios derivados de Medicina Nuclear.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- 
- [1] FA. de Jonge, K. Pauwels. Technetium, the missing element. ***European Journal of Nuclear Medicine* (1996) 23, 336-344.**
- [2] HJ. Biersack, F. Stelzner, FF. Knapp. Discovery of rhenium and masurium (technetium) by Ida Noddack-Tacke and Walter Noddack. ***Nuklearmedizin* (2015) 54, 48-52.**
- [3] FA. Paneth. The making of the missing chemical elements. ***Nature* (1947) 159, 8-10.**
- [4] C. Perrier, E. Segrè. Some chemical properties of elements 43. ***J Chemical Physics* (1937) 5, 712-716.**
- [5] A. Pozdnyakov. The present state of the analytical chemistry of technetium. ***Russian Chemical Reviews* (1965) 34, 129-140.**
- [6] Technical Reports series no. 466. Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits, (2008) ***International Atomic Energy Agency.***
- [7] M. Bonardi, C. Birattari, F. Groppi, E. Sabbioni. Thin target excitation functions, cross-sections and optimised thick-target yields for  $^{nat}\text{Mo}(p,xn)^{94g,95m,95g,96(m+g)}\text{Tc}$  nuclear reactions induced by protons from threshold up to 44 MeV. No Carrier Added radiochemical separation and quality control. ***Appl. Radiat. Isot.* (2002) 57, 617–635.**
- [8] PA. Cox. The Elements-Their Origin, Abundance and Distribution. ***Ed. Oxford University Press, Oxford, UK* (1994) 11–186pp.**
- [9] Z. Alfassi, F. Groppi, M. Bonardi, J. Goeij. On the artificial nature of Tc and the carrier-free nature of  $^{99m}\text{Tc}$  from  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  generators. ***App. Radiation and Isotopes* (2005) 63, 37-40.**
- [10] EA. Cotton, GG. Wilkinson. Basic Inorganic Chemistry. ***Third edition, Wiley, New York, USA* (1995) 596pp.**
- [11] JJM. de Goeij. Routes for supply of technetium-99m for diagnostic nuclear medicine. ***Trans. American Nuclear Society* (1997) 77, Conference 971125.**
- [12] JE. Beaver, HB. Hupf. Production of  $^{99m}\text{Tc}$  on a medical cyclotron: a feasibility study. ***J Nucl. Med.* (1971) 12, 739-741.**
- [13] MC. Lagunas-Solar. Accelerator Production of Tc-99m with Proton Beams and Enriched Mo-100 Targets. International Atomic Energy Agency technical document 1065. Vienna, Austria (1999) ***International Atomic Energy Agency.***
- [14] S. Takacs, Z. Szucs, F. Tarkanyi, A. Hermanne, M. Sonck. Evaluation of proton induced reactions on Mo-100: new cross sections for production of Tc-99m and Mo-99. ***J. Radioanal. Nucl. Chem.* (2003) 257, 195-201.**

- 
- [15] K. Gagnon, F. Benard, M. Kovacs, T.J. Ruth, P. Schaffer, JS. Wilson, SA. McQuarrie. Cyclotron production of  $^{99m}\text{Tc}$ : experimental measurement of the  $^{100}\text{Mo}(p,x)^{99m}\text{Mo}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{99}\text{Tc}$  excitation functions from 8 to 18 MeV. ***Nucl. Med. Biol.* (2011) 38, 907-916.**
- [16] MRA. Pillai, A. Dash, FF. Knapp. Diversification of  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  separation: Non-fission reactor production of  $^{99}\text{Mo}$  as a strategy for enhancing  $^{99m}\text{Tc}$  availability. ***J. Nucl. Med.* (2015) 56, 159-161.**
- [17] NEA/SEN/HLGMR. The supply of medical radioisotopes. Medical isotope supply review:  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  Market demand and production capacity projection 2016-2021 **(2016).**
- [18] Molybdenum-99 for medical imaging. Chapter 3: Global production of molybdenum-99 and future prospects. ***National Academies Press* (2016) doi: 10.17226/23563.**
- [19] MIRDO/Dose Estimate Report No. 8. Summary of current radiation dose estimates to normal humans from  $^{99m}\text{Tc}$  as sodium pertechnetate. ***J. Nucl. Med.* (1976) 17, 74-77.**
- [20] Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes, modificado por el RD 35/2009.
- [21] K. Shi, X. Hou, P. Roos, W. Wu. Determination of technetium-99 in environmental samples: A review. ***Anal. Chim. Acta* (2012) 709, 1-20.**
- [22] Q. Hu. Technetium. Radionuclides in the Environment. DA. Atwood (Ed.), ***Wiley & Sons: Chichester, U.K.* (2010) 217-224pp.**
- [23] JE. Till, HA. Grogan. Radiological risk assessment and environmental analysis. ***Oxford University Press, Oxford* (2008).**
- [24] M. Rezaee, Y. Assadi, MM. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. ***J. Chromatography A* (2006) 1116, 1-9.**
- [25] F. Maya, B. Horstkotte, JM. Estela, V. Cerdà. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. ***Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 404, 909-917.**
- [26] F. Maya, JM. Estela, V. Cerdà. Completely automated insyringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water. ***Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 402, 1383-1388.**
- [27] MC. Hennion. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. ***J. Chromatography A* (1999) 856, 3-54.**
- [28] TrisKem International. Extraction Chromatography: Technical Documentation. V\_6\_HT. (Último acceso enero 2017).

<http://www.triskem->

[international.com/iso\\_album/technical\\_doc\\_general\\_v6\\_en\\_ht\\_web.pdf](http://www.triskem.com/iso_album/technical_doc_general_v6_en_ht_web.pdf)

- [29] M. Fern, A. Thakkar, L. Jassin. Recent developments in the analysis of technetium-99. ***J. Nucl. Radiochem. Sciences (2005) 6, 223-225.***
- [30] DP. DiPrete, CC. DiPrete, RA. Sigg. Measurement of <sup>99</sup>Tc in Savannah River site high activity waste. ***J. Radioanal. Nucl. Chem. (2005) 263, 593–598.***
- [31] O. Egorov, M. O'Hara, JW. Grate, J. Ruzicka. Sequential injection renewable separation column instrument for automated sorbent extraction separations of radionuclides. ***Anal. Chem. (1999) 71, 345–352.***
- [32] Triskem International. WBEC resin product sheet (Último acceso enero 2017).  
[http://www.triskem.com/iso\\_album/ft\\_resine\\_wbec\\_en\\_151210.pdf](http://www.triskem.com/iso_album/ft_resine_wbec_en_151210.pdf)
- [33] L. Skeggs. An automatic method for colorimetric analysis. ***Am. J. Clinical Pathology (1957) 28, 311-322.***
- [34] J. Ruzicka, EH. Hansen. Flow injection analyses. Part I. New concept of fast continuous flow analysis. ***Anal. Chim. Acta (1975) 78, 145-157.***
- [35] J. Ruzicka, GD. Marshall. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. ***Anal. Chim. Acta (1990) 237, 329-343.***
- [36] BF. Reis, MF. Gine, EAG. Zagatto, JLFC. Lima, RA. Lapa. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. ***Anal. Chim. Acta (1994) 293, 129-138.***
- [37] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar. Flow technique in water analysis. ***Talanta (1999) 50, 695-705.***
- [38] J. Ruzicka. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. ***Analyst (2000) 125, 1053-1060.***
- [39] R. Lapa, J. Lima, B. Reis, J. Santos, E. Zagatto. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. ***Anal. Chim. Acta (2002) 466, 125-132.***
- [40] Reference Manual, QuantaSmart™ for the Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyzer ***(2009) Perkin Elmer.***
- [41] P. Mäkinen. Handbook of Liquid Scintillation Counting ***(2001) Perkin Elmer.***
- [42] J. Ermer, J. McB. Miller. Method validation in pharmaceutical analysis. A Guide to best practice ***(2005) Wiley.***
- [43] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà. Flow analysis: a practical guide. ***First Edition. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (2014) 278 pp.***



- 
- [44] DC. Montgomery. Design and analysis of experiments. International Student Version. **Seventh edition, Ed. John Wiley & Sons, Asia (2009).**
- [45] M. Almeida, R. Santelli, EP. Oliveira, LS. Villar, LA. Escaleira. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta (2008) 76, 965–977.**
- [46] PW. Araujo, RG. Brereton. Experimental Design 3. Quantitation. **Trends Anal. Chem. (1996) 15, 156-163.**
- [47] R. Leardi. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Anal. Chim. Acta (2009) 652, 161-172.**
- [48] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman. Experimental design and optimization. **Chemometr. Intell. Lab. (1998) 42, 3-40.**
- [49] PW. Araujo, RG. Brereton. Experimental Design 1. Screening. **Trends Anal. Chem. (1996) 15, 26-31.**
- [50] PW. Araujo, RG. Brereton. Experimental Design 2. Optimization. **Trends Anal. Chem. (1996) 15, 63-70.**
- [51] J. Ferré, FX. Rius. Introducción al diseño estadístico de experimentos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Universitat Rovira i Virgili. (Último acceso enero 2017). <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/dis.pdf>
- [52] G. Derringer, R. Suich. Simultaneous-optimization of several response variables. **J. Qual. Technol. (1980) 12, 214-219.**
- [53] BA. Rhodes, BY. Croft. Basics of radiopharmacy. **Mosby, Saint Louis (1978).**
- [54] International Organization for Standardization, ISO 11929: 2010. Determination of the characteristics limits (decision threshold, detection limit and limits of the confidence interval) for measurements of ionizing radiation – fundamentals and application. **ISO, Geneva (2010).**
- [55] LA. Currie. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. **Anal. Chem. (1968) 40, 586–593.**
- [56] Y. Fajardo, J. Avivar, L. Ferrer, E. Gómez, M. Casas, V. Cerdà. Automation of radiochemical analysis by applying flow techniques to environmental samples. **Trends Anal. Chem. (2010) 29, 1399–1408.**
- [57] FJ. Miller, HE. Zittel. Spectrophotometric determination of technetium with 1,5-diphenylcarbohydrazide. **Anal. Chem. (1963) 35, 299–301.**

- [58] CK. Kim, CS. Kim, B. Rho, JI. Lee. Rapid determination of  $^{99}\text{Tc}$  in environmental samples by high resolution ICP-MS coupled with on-line flow injection system. **J. Radioanal. Nucl. Chem. (2002) 252, 421–427.**
- [59] M. Khan, W. Um. Liquid scintillation counting methodology for  $^{99}\text{Tc}$  analysis: a remedy for radiopharmaceutical waste. **Anal. Chem. (2015) 87, 9054–9060.**
- [60] JW. Grate, OB. Egorov, MJ. O'Hara, TA. DeVol. Radionuclide sensors for environmental monitoring: from flow injection solid phase absorptiometry to equilibration-based preconcentrating minicolumn sensors with radiometric detection. **Chem. Rev. (2008) 108, 543–562.**
- [61] MJ. O'Hara, SR. Burge, JW. Grate. Quantification of Technetium-99 in complex groundwater matrixes using a radiometric preconcentrating minicolumn sensor in an equilibration-based sensing approach. **Anal. Chem. (2009) 81, 1068–1078.**
- [62] OB. Egorov, MJ. O'Hara, JW. Grate. Automated radioanalytical system incorporating microwave-assisted sample preparation, chemical separation, and online radiometric detection for the monitoring of total  $^{99}\text{Tc}$  in nuclear waste processing streams. **Anal. Chem. (2012) 84, 3090–3098.**
- [63] S. Chatterjee, SA. Bryan, CJ. Seliskar, WR. Heineman. Three-component spectroelectrochemical sensor module for the detection of pertechnetate ( $\text{TcO}_4^-$ ). **Rev. Anal. Chem. (2013) 32, 209–224.**
- [64] R. Rodríguez, L. Leal, S. Miranda, L. Ferrer, J. Avivar, A. García, V. Cerdà. Automation of  $^{99}\text{Tc}$  extraction by LOV prior ICP-MS detection: application to environmental samples. **Talanta (2015) 133, 88–93.**
- [65] M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, M. Galmés, F. Vega, V. Cerdà. Automatic and simple method for  $^{99}\text{Tc}$  determination using a selective resin and liquid scintillation detection applied to urine samples. **Anal. Chem. (2013) 85, 5491-5498.**
- [66] M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, A. Borràs, F. Vega, V. Cerdà. Automatic in-syringe dispersive liquid-liquid micro-extraction of  $^{99}\text{Tc}$  from biological samples and hospital residues prior liquid scintillation counting. **Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407, 5571–5578.**
- [67] OB. Egorov, MJ. O'Hara, J. Ruzicka, JW. Grate. Sequential injection separation system with stopped-flow radiometric detection for automated analysis of  $^{99}\text{Tc}$  in nuclear waste. **Anal. Chem. (1998) 70, 977–984.**
- [68] K. Kołacińska, M. Trojanowicz. Application of flow analysis in determination of selected radionuclides. **Talanta (2014) 125, 131-145.**

- 
- [69] V. Cerdà, J. Avivar, A. Cerdà. Laboratory automation based on flow techniques. ***Pure Appl. Chem.* (2012) 84, 1983–1998.**
- [70] Q. Chen, H. Dahlgard, HJM. Hansen, A. Aarkrog. Determination of  $^{99}\text{Tc}$  in environmental samples by anion exchange and liquid-liquid extraction at controlled valency. ***Anal. Chim. Acta* (1990) 228, 163–167.**
- [71] F. Wigley, PE. Warwick, IW. Croudace, J. Caborn, AL. Sánchez. Optimised method for the routine determination of technetium-99 in environmental samples by liquid scintillation counting. ***Anal. Chim. Acta* (1999) 380, 73–82.**
- [72] JL. Mas, M. García-León, JP. Bolívar. Overcoming ICP-QMS instrumental limitations for  $^{99}\text{Tc}$  determination in environmental solid samples using radiochemistry. ***Appl. Radiat. Isot.* (2006) 64, 502–507.**
- [73] AB. Melent'ev, AN. Mashkin, OV. Tugarina, DN. Kolupaev, BY. Zilberman, IG. Tananaev. Effect of some reducing and complexing agents on the extraction behavior of technetium in the TBP- $\text{HNO}_3$  system. ***Radiochemistry* (2011) 53, 256–263.**
- [74] Scintillation cocktails and consumables. (2007) ***Perkin Elmer***. [www.perkinelmer.com/](http://www.perkinelmer.com/) (Último acceso enero 2017).
- [75] LD. Hughes, TA. DeVol. Evaluation of flow cell detector configurations combining simultaneous preconcentration and scintillation detection for monitoring of pertechnetate in aqueous media. ***Anal. Chem.* (2006) 78, 2254-226.**
- [76] BW. East, Ihsanullah. Method for the determination of technetium-99 in environmental samples using inductively coupled plasma-mass spectrometry. ***Radioact. Radiochem.* (1994) 5, 20-26.**
- [77] Ihsanulla. Losses of technetium during various steps in the development of a procedure for environmental samples. ***J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.* (1993) 176, 303–313.**
- [78] JL. Mas, M. García-León, JP. Bolívar.  $^{99}\text{Tc}$  detection in water samples by ICP-MS. ***Radiochim. Acta* (2004) 92, 39–46.**
- [79] R. Rodríguez, J. Avivar, L. Ferrer, L. Leal, V. Cerdà. Automated total and radioactive strontium separation and preconcentration in samples of environmental interest exploiting a lab-on-valve system. ***Talanta* (2012) 96, 96–101.**
- [80] OB. Egorov, SK. Fiskum, MJ. O'Hara, JW. Grate. Radionuclide sensors based on chemically selective scintillating microspheres: renewable column sensor for analysis of  $^{99}\text{Tc}$  in water. ***Anal. Chem.* (1999) 71, 5420-5429.**

- [81] J. Wang, EH. Hansen. Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. ***Trends Anal. Chem.* (2003) 22, 225–231.**
- [82] MD. Luque de Castro, J. Ruiz-Jiménez, JA. Pérez-Serradilla. Lab-on-valve: a useful tool in biochemical analysis. ***Trends Anal. Chem.* (2008) 27, 118–126.**
- [83] SSMP. Vidigal, IV. Tóth, AOSS. Rangel. Sequential injection lab-on-valve platform as a miniaturisation tool for solid phase extraction. ***Anal. Methods* (2013) 5, 585-597.**
- [84] K. Tagami, SJ. Uchida. Comparison of the TEVA-Spec resin and liquid-liquid extraction methods for the separation of technetium in soil samples. ***J. Radioanal. Nucl. Chem.* (1999) 239, 643–648.**
- [85] WJ. Kieviet. Technetium Radiopharmaceuticals: Chemical characterization and tissue distribution of Tc-glucoheptonate using Tc-99m and carrier Tc-99. ***J. Nucl. Med.* (1981) 22, 703–709.**
- [86] EP. Horwitz, ML. Dietz, R. Chiarizia, H. Diamond, SL. Maxwell, MR. Nelson. Separation and preconcentration of actinides by extraction chromatography using a supported liquid anion exchanger: application to the characterization of high-level nuclear waste solutions. ***Anal. Chim. Acta* (1995) 310, 63–78.**
- [87] Technical leaflet of OSTEOCIS. (2010) ***IBA Molecular***. (Último acceso enero 2017).  
<http://www.ibamolecular.com/sites/default/files/OSTEOCIS%20SPC.pdf>.
- [88] AE. Eroglu, CW. McLeod, KS. Leonard, D. McCubbin. Determination of technetium in sea-water using ion exchange and inductively coupled plasma mass spectrometry with ultrasonic nebulization. ***J. Anal. At. Spectrom.* (1998) 13, 875-878.**
- [89] M. Hollenbach, J. Grohs, S. Mamich, M. Kroft, E. Denoyer. Determination of technetium-99, thorium-230 and uranium-234 in soils by inductively coupled plasma mass spectrometry using flow injection preconcentration. ***J. Anal. At. Spectrom.* (1994) 9, 927-933.**
- [90] JW. Grate. Extractive scintillating resin for <sup>99</sup>Tc quantification in aqueous solutions. ***J. Radioanal. Nucl. Chem.* (2001) 249, 181–189.**

# **ANEXOS**



En este anexo se presentan las comunicaciones derivadas de esta Tesis:

Artículos en revistas indexadas:

- Automatic and simple method for  $^{99}\text{Tc}$  determination using a selective resin and liquid scintillation detection applied to urine samples. M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, M. Galmés, F. Vega, V. Cerdà. ***Analytical Chemistry (2013) 85, 5491–5498.***
- Automatic in-syringe dispersive liquid-liquid micro-extraction of  $^{99}\text{Tc}$  from biological samples and hospital residues prior liquid scintillation counting. M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, A. Borràs, F. Vega, V. Cerdà. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry (2015) 407, 5571–5578.***
- Fully automated system for monitoring  $^{99}\text{Tc}$  in hospital and urban residues using a selective resin and spectrophotometric on-line detection. M. Villar, A. Borràs, J. Avivar, F. Vega, V. Cerdà, L. Ferrer (En evaluación en *Analytical Chemistry*).
- Screening analysis previous radionuclide identification and quantification applied to environmental samples and residues. M. Villar, A. Borràs, V. Cerdà, L. Ferrer (En redacción).

Comunicaciones en Congresos

- Automated system for technetium-99 determination in urine from patients treated with technetium-99m. M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, M. Galmés, F. Vega, V. Cerdà. Póster. ***12<sup>th</sup> International Conference on Flow Analysis. Thessaloniki, septiembre 2012.***
- In-syringe dispersive liquid-liquid micro-extraction of  $^{99}\text{Tc}$  applied to biological samples from treated patients. M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, F. Vega, V. Cerdà. Póster. ***18<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA18), Oporto, septiembre 2013.***
- $^{99}\text{Tc}$  determination exploiting in-syringe dispersive liquid-liquid micro-extraction previous liquid scintillation counting. M. Villar, J. Avivar, L. Ferrer, F. Vega, V. Cerdà. Póster. ***Flow Analysis XIII, Praga, julio 2015.***
- Lab-on-valve system coupled to on line UV-VIS detection for monitoring  $^{99}\text{Tc}$  in hospital and urban residues. M. Villar, A. Borràs, F. Vega, V. Cerdà, L. Ferrer. Póster.

**20<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques' (ICFIAXX), Palma de Mallorca, octubre 2016.**

- Fully automated system for monitoring <sup>99</sup>Tc using a selective resin and UV-VIS on-line detection. M. Villar, A. Borràs, F. Vega, V. Cerdà, L. Ferrer. Póster. **Second International Conference on Radioecological Concentration Processes, Sevilla, noviembre 2016.**

- Automated dispersive liquid–liquid microextraction of <sup>99</sup>Tc from biological samples and hospital residues previous liquid scintillation counting. M. Villar, A. Borràs, F. Vega, V. Cerdà, L. Ferrer. Póster. **LSC2017 conference, Copenhagen, mayo 2017.**



# Automatic and Simple Method for $^{99}\text{Tc}$ Determination Using a Selective Resin and Liquid Scintillation Detection Applied to Urine Samples

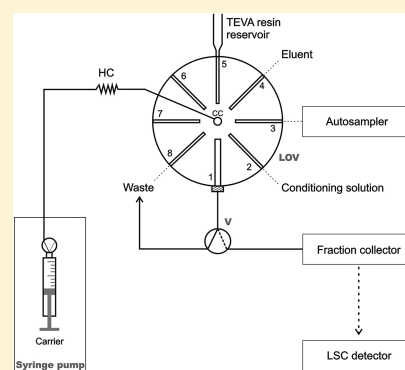
Marina Villar,<sup>†</sup> Jessica Avivar,<sup>‡</sup> Laura Ferrer,<sup>‡</sup> Margalida Galmés,<sup>†</sup> Fernando Vega,<sup>†</sup> and Víctor Cerda\*<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Radiopharmacy Service, Son Espases Hospital, Cra. Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca, Spain

<sup>‡</sup>Laboratory of Environmental Radioactivity—LaboRA, University of Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

<sup>§</sup>Laboratory of Environmental Analytical Chemistry—LQA<sup>2</sup>, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

**ABSTRACT:**  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (6.0067 h half-life) is an artificial radionuclide largely used in diagnostic medicine. Its daughter  $^{99}\text{Tc}$  is a beta emitter of great concern because of its long half-life ( $2.111 \times 10^5$  years) and presumed mobile behavior in the environment. To monitor the  $^{99}\text{Tc}$  in urine from treated patients, an automatic Lab-on-valve (LOV) system for separation and preconcentration of  $^{99}\text{Tc}$  was developed. TEVA resin was selected since it retains pertechnetate ion selectively from diluted nitric acid solutions. After elution,  $^{99}\text{Tc}$  is detected using a liquid scintillation counting (LSC) detector. The present method has been successfully applied to urine samples with low  $^{99}\text{Tc}$  content (recoveries between 94–111%). The minimum detectable activity (MDA) of the developed method is 0.1 Bq or 1 Bq L<sup>-1</sup> (expressed as activity concentration), when preconcentrating 100 mL of sample. The high durability of the resin, together with the low amount of resin required (32 mg), the good reproducibility (RSD 2%,  $n = 5$ ) and the high extraction frequency (up to 12 h<sup>-1</sup>) makes of the present method an inexpensive, precise and fast useful tool for monitoring  $^{99}\text{Tc}$  in urine samples.



Technetium is an artificial radioactive element, in fact the first element to be produced artificially.<sup>1</sup>  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  is used in nuclear medicine for a wide variety of diagnostic tests (e.g., renal, thyroid, cardiac gammagraphy, detection of internal infectious process, etc.) because of its short half-life, the low  $\gamma$ -ray energy it emits, and its stability to chemically bind to many active biomolecules.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  decays to  $^{99}\text{Tc}$  which is a pure  $\beta$ -emitter ( $\beta_{\text{max}} = 294$  keV). The low energy of the  $\beta$ -particle, the lack of significant  $\gamma$ - or X-rays, and the rapid excretion of  $^{99}\text{Tc}$  from the body limit the potential for health effects. However,  $^{99}\text{Tc}$  is considered a very important dose contributor in environmental risk assessment because of its long half-life of  $2.111 \times 10^5$  years, high abundance and high mobility.<sup>1,2</sup>

In recent years,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  use for medicinal purposes as a diagnostic tool has considerably increased and so has the consequently waste generation of  $^{99}\text{Tc}$ .<sup>1</sup> These residues comprise urine and feces, which are the excretion mode of  $^{99}\text{Tc}$  from the human body, and the remains of the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  eluates, decayed to  $^{99}\text{Tc}$  which hadn't been used. Latter are quantified by hospitals themselves, that is, hospitals have systems for radioactive waste management and control the final destination of this radionuclide. Nevertheless, the input of  $^{99}\text{Tc}$  activities into the environment from human excretions of treated patients should be also monitored. So, as a first step, we developed a method for monitoring  $^{99}\text{Tc}$  in urine samples in an automatic approach that allows results in a simple and fast way.

In order to automate the extraction and preconcentration of this radionuclide, which is the most laborious step in radiochemical analyses, flow analysis techniques, and a selective resin were employed.

Flow analysis techniques have been applied to automate and improve the determination of many analytes, including radioactive elements.<sup>3–7</sup> Modern instrumentation makes possible the total or partial automation of many conventional analytical methods in the radiochemical field that, in practice, leads to simplicity, reliability, significant decrease in time of analysis, reduction of sample and reagent consumption, and minimal handling of samples and standards, improving the safety of the analyst. Moreover, automation of the analytical method allows precise control of sample and reagent volumes and flow rates, what leads to improvement in reproducibility. Lab-on-valve (LOV)<sup>8,9</sup> can integrate various analytical units in the valve and provides great potential for miniaturization of the entire instrumentation. LOV provides sample handling in the sequential injection mode, allowing forward, reversed, and stopped flow, and it can be programmed to perform a wide variety of assays within the same device. Precise liquid

Received: February 27, 2013

Accepted: May 3, 2013

Published: May 3, 2013

manipulation by the LOV system and the channel configuration also make it a powerful platform for bead injection (BI).<sup>10,11</sup>

Radiometric methods using  $\beta$ -counting by liquid scintillation (LSC) are the most widely used for the determination of  $^{99}\text{Tc}$ , being liquid scintillation counters commonly found in hospitals. Nevertheless, direct determination of technetium in urine samples by LSC is still difficult because of presence of complex matrix and sometimes insufficient sensitivity. To solve these problems, separation and preconcentration techniques have been used for  $^{99}\text{Tc}$  determination. Extraction chromatographic resins combine the selectivity of solvent extraction with the high separation efficiency of chromatography. In these resins, the extractant is immobilized on the surface of inert resin beads, corresponding to the organic phase and stationary phase in solvent extraction and chromatography, respectively. TEVA resin is mainly used to fix tetravalent actinides and technetium.<sup>12</sup> The extractant that provides its specificity to the TEVA resin is a quaternary ammonium salt, also called Aliquat 336. TEVA resin fixes technetium under its pertechnetate ion. Under oxidizing conditions, technetium (VII) will exist as the pertechnetate ion<sup>13</sup> ( $\text{TcO}_4^-$ ) in aqueous solution or as volatile  $\text{Tc}_2\text{O}_7$  in the absence of water, for example, in ashing or drying conditions.<sup>2,14</sup>  $\text{Tc(VII)}$  is retained on the resin for an acidity range between 0.1 and 1 mol L<sup>-1</sup> H<sup>+</sup> as  $\text{HNO}_3$ . In this medium, tetravalent actinides are not well retained on the resin, these being the only possible retained radionuclides but Tc. For example, at 0.1 mol L<sup>-1</sup>  $\text{HNO}_3$  Tc retention is 2 orders of magnitude higher than the next most strongly retained species, that is, Pu (IV).<sup>15</sup>

The main aim of this work was the development of a simple, versatile, selective, sensitive, and inexpensive method for the determination of low activities of  $^{99}\text{Tc}$  in acidified urine samples, easily implemented in most hospitals. Thus, resulting in an affordable tool to quantify the  $^{99}\text{Tc}$  input into the environment. Therefore, LOV technique has been combined with selective extraction resin to isolate and preconcentrate  $^{99}\text{Tc}$  from urine samples. Afterward the  $^{99}\text{Tc}$  was eluted, directly transferred into liquid scintillation vials and mixed with liquid scintillation cocktail for counting.

## MATERIALS AND METHODS

**$^{99}\text{Tc}$  Standard.** A homemade  $^{99}\text{Tc}$  standard was used. The Radiopharmacy Service of the hospital generates  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  from Ultra-Technekow DTE-Technetium  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  Generator of Covidien, which provides each day enough activity for the programmed explorations. Weekly, when the  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator arrived, a vial of 5 mL with an average activity of 77.7 GBq, was kept aside during a month to be sure that all  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  had decayed into its daughter  $^{99}\text{Tc}$ . Previously to the decay process, an aliquot of this vial was measured both by a gamma spectrometer, germanium detector Canberra-GR5023-7500 SL iron shielded and by a dose calibrator, Capintec CRC-25R, to ensure the activity content. This aliquot was taken as working standard solution.

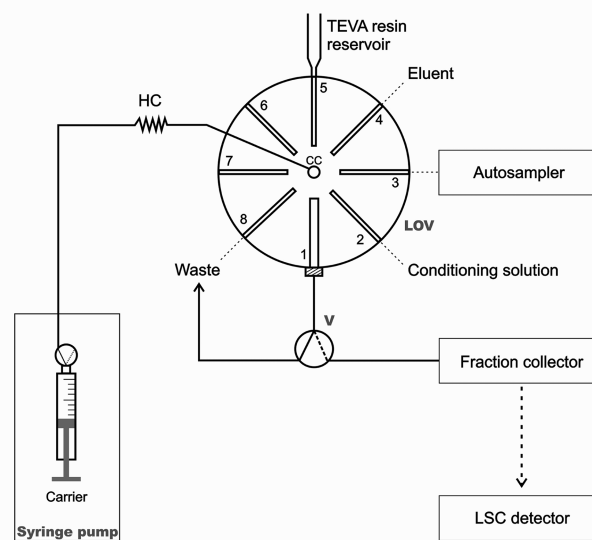
To calculate the  $^{99}\text{Tc}$  activity it is necessary to know the exact activity of  $^{99}\text{Mo}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  in a point of time.  $^{99}\text{Mo}$ , with a half-life of 66.48 h, during its branching decay generates 12.5% of  $^{99}\text{Tc}$  and 87.5% of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . All  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  decays to  $^{99}\text{Tc}$ . Thus, taking into account the  $^{99}\text{Mo}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  activities, the hour and date of the certified  $^{99}\text{Mo}$  activity and of the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  elution, the  $^{99}\text{Tc}$  activity can be exactly calculated.<sup>16</sup>

All working standard solutions were prepared by dilution in 0.1 mol L<sup>-1</sup>  $\text{HNO}_3$ .

**Reagents.** All solutions were prepared from analytical grade reagents with Millipore quality water. The nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 60% v/v) used was of analytical reagent grade and purchased from Scharlab S.L. (Spain). TEVA resin 50–100  $\mu\text{m}$  was supplied by Triskem Industries, (Triskem International, France) and glass fiber prefilters by Millipore (Madrid, Spain). Scintillation cocktail, OptiPhase Hisafe, was purchased from Perkin-Elmer.

**Samples.** Urine samples were taken from members of the laboratory. The only pretreatment made to these samples was acidifying to a final solution of 0.1 mol L<sup>-1</sup>  $\text{HNO}_3$ .

**Manifold and Software.** The LOV system used is shown in Figure 1. The LOV microconduit (Sciware Systems, Palma



**Figure 1.** Schematic depiction of the LOV system for  $^{99}\text{Tc}$  determination: CC, communication channel; HC, holding coil; V, external solenoid valve; LSC, liquid scintillation counter.

de Mallorca, Spain), fabricated from methacrylate encompassing eight integrated microchannels (1.5 mm i.d./16.0 mm length, excepting the bead column channel made of 3.2 mm i.d.), was mounted atop of an eight-port multiposition selection valve (SV) (Multiburet 4S; Crison Instruments, Spain).

The central port of the integrated LOV sample processing unit, connected to the syringe pump, via a holding coil, was made to address the peripheral ports of the unit (1–8), for sequential aspiration of the various constituents for the BI process, via the central communication channel (CC) in the selection valve. One of the LOV channels (port 1) served as microcolumn position for the renewable beads. This column was filled in with 32 mg of TEVA resin. To contain the sorbent within the channel of the LOV microbore module and prevent it from escaping, the outlet of the column was furnished with a glass fiber prefilter which retained the beads while allowed the solution to flow freely.<sup>17,18</sup> This filter was manually replaced every three months approximately. The suspension of extraction chromatographic resin was contained in a 5.0 mL plastic syringe, which was mounted vertically on port 5 of the integrated microsystem. Peripheral ports configuration was as follows: (1) preconcentration column, (2) conditioning

solution (0.1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>), (3) sample aspiration (Autosampler), (4) eluent (6.7 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>), (5) resin reservoir, and (8) waste. A buret (BU4S; Crison Instruments, Spain) with programmable flow rates equipped with a 10 mL glass syringe was used as liquid driver. The syringe had a three-way solenoid valve (N-Research, U.S.A.) at the head, which facilitates the application of multicommutation schemes (on, in-line flow; off, to reservoir). An external solenoid valve was used to drive the flow coming out the LOV (port 1) in the desired way, that is, to the scintillation vials located at the fraction collector or to waste. The flow network was constructed with 0.8 mm internal diameter polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing, except for the holding coil connected to the LOV (HC), which was constructed with 1.5 mm internal diameter PTFE tubing, corresponding to a volume of 15 mL. All connections were made by means of polyvinylidene fluoride (PVDF) connectors, except cross-junctions, which were made of methacrylate.

Instrumental control was performed using the software package AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). The distinguished feature of this software based on dynamic link libraries (DLLs) at 32 bits is the viability to use a single and versatile application without further modification for whatever instrumentation and detection system needed. It involves a basic protocol, which allows the implementation of specific and individual DLLs attending the configuration of the assembled flow analyzer.

**Analytical Procedure.** The complete operational sequence for <sup>99</sup>Tc isolation and preconcentration is listed in Table 1.

**Table 1. Automatic Procedure for Technetium Determination**

step	flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	valve position		
		S	LOV	V
1. fill the column				
loading 32 mg TEVA resin into HC	5	on	5	off
delivering on the column	2	on	1	off
2. conditioning of TEVA resin				
loading 2 mL HNO <sub>3</sub> 0.1 mol L <sup>-1</sup>	5	on	2	off
delivering on the column	2	on	1	off
3. sample loading				
loading X mL sample into HC	5	on	3	off
delivering on the column	2	on	1	off
4. elution of <sup>99</sup> Tc				
loading 1.7 mL 6.7 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	5	on	4	off
delivering on the column	2	on	1	on
5. washing out acid from TEVA resin				
loading 3 mL H <sub>2</sub> O	5	on	6	off
delivering on the column	2	on	1	off

Briefly, first the resin is loaded into channel 1 of the LOV which serves as microcolumn, that is, the CC connects to port S, loads 1 mL of saturated TEVA solution into the HC and afterward connects to port 1 and dispenses 1 mL filling channel 1. Then the column is conditioned prior the sample loading. Afterward the <sup>99</sup>Tc is eluted and sent to the scintillation vials located at the fraction collector. The obtained eluates were diluted up to 6 mL with water not to surpass a final

concentration of 2 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, and then were mixed with 14 mL of scintillation cocktail for Tc determination, following the LSC manufacturer recommendations.<sup>19</sup> Borosilicate glass LSC vials were kept away from light in the detector tray overnight and measured the next day to avoid interferences due to fluorescence and/or phosphorescence phenomena.<sup>20</sup> The column was washed with water after elution in order to ensure Tc retention in the next run by avoiding any trace of concentrated acid on it. The column was automatically replaced when necessary by loading the old beads into the HC and discarding these through port 8 which served as waste.

<sup>99</sup>Tc was analyzed with a Liquid Scintillation Counter, Tricarb 2810 TR (Perkin-Elmer). A 1–600 channels window was used for counting, measuring during 1800 s in normal mode, achieving a counting efficiency of 97.5%. Counting conditions are summarized in Table 2. Since the proposed

**Table 2. LSC Operational Conditions**

parameter	value
quench indicator	tSIE/AEC <sup>a</sup>
external standard terminator (s)	0.5 <sup>b</sup>
precount delay	overnight
count time (s)	1800
count mode	normal
region of counting (channels)	1–600

<sup>a</sup>tSIE/AEC: Transformed spectral index of external standards coupled to automatic efficiency correction. <sup>b</sup>2s%: Gross uncertainty in a count value with 95% confidence limits.

sample preparation method predicts constant quenched samples, quenched curves were not necessary. The LSC counting efficiency was determined from a known <sup>99</sup>Tc standard. Blanks were prepared similarly that samples but without <sup>99</sup>Tc.

**Optimization of Experimental Conditions.** Multivariate designs provide relevant knowledge on the effect of variables within the entire experimental domain selected, and the variance of the estimate of the response in every point of the domain is better than that obtained by univariate methods.<sup>21–24</sup> Therefore, first of all a two-level full factorial screening test was carried out to find out which variables had a significant effect on the response signal and their tendency to readapt the experimental domain of the study. Four variables that could significantly affect the proposed method were studied, that is, concentration and volume of the eluent, flow rate of retention, and elution.<sup>25,26</sup> Then a response surface design was carried out to optimize the proposed method exploiting the computer statistics package Statistica 6.0 taking into account the screening results. Screening and optimization experimental domains are listed in Table 3.

**Table 3. Experimental Domains and Critical Values Obtained by Multivariate Optimization for the <sup>99</sup>Tc Determination Using the Proposed LOV-LSC System**

variable	screening range	optimization range	critical value
elution flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.6–2	2	2
retention flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.6–2	2	2
HNO <sub>3</sub> (eluent) concentration (mol L <sup>-1</sup> )	6–9	5–7	6.7
HNO <sub>3</sub> (eluent) volume (mL)	0.5–1.3	1–1.75	1.7

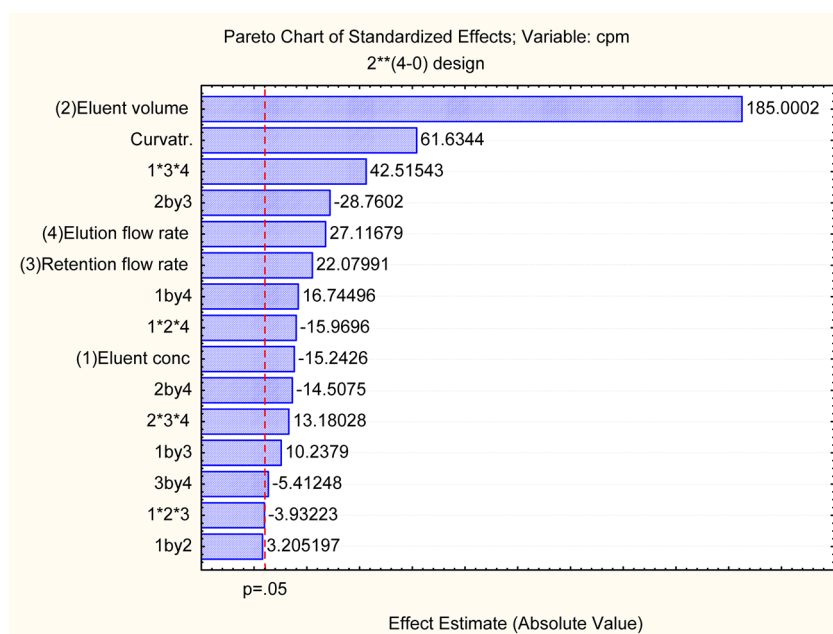


Figure 2. Pareto chart obtained from the screening.

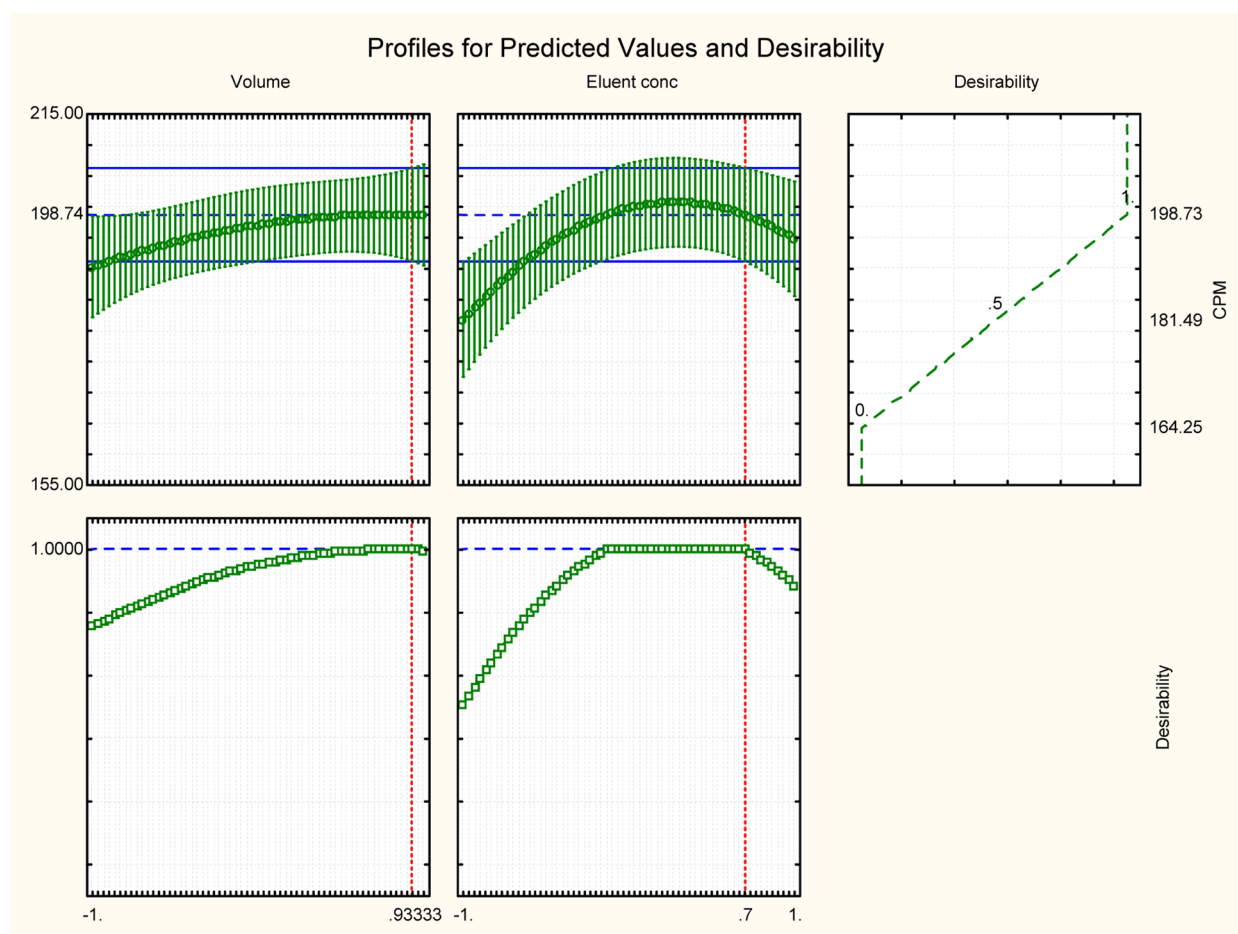


Figure 3. Desirability charts used to obtain the coded critical values of the eluent volume and concentration.

The experimental design was built in a dimensionless coordinate system using factor coding, wherein the highest and lowest levels are given as +1 and -1, respectively. Two randomized complete blocks amounting to a total number of

19 and 11 experiments for the screening and the response surface, respectively, were performed aimed at ensuring that the variability found in the response is on the account of the variables rather than the random error. Three center points



were included, to identify any irregularities, such as the loss of linearity in the center of the interval.

## RESULTS AND DISCUSSION

**System Setup.** The LOV channel system is fabricated as a monolithic structure mounted atop a conventional multi-

**Table 4. Analytical Parameters**

analytical parameter	value
minimum detectable activity (Bq)	0.1
minimum detectable activity (Bq L <sup>-1</sup> )	1
repeatability (%) ( <i>n</i> = 10)	1.6
reproducibility (%) ( <i>n</i> = 5)	2.0
resin durability (injections)	110
preconcentration volume (mL)	up to 100
extraction frequency (h <sup>-1</sup> )	1–12 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Depending on the sample volume loaded (100–1 mL).

**Table 5. Application of the Proposed Method to Urine Samples**

samples <sup>a</sup>	<sup>99</sup> Tc added		<sup>99</sup> Tc found		% recovery
	act (Bq)	<i>s</i> (Bq)	act (Bq) <sup>b</sup>	<i>s</i> (Bq)	
urine 1a	0		<MDA		
	0.589	0.007	0.59	0.02	100
urine 1b	0		<MDA		
	1.32	0.07	1.43	0.07	108
urine 1c	0		<MDA		
	2.1	0.2	2.1	0.1	100
urine 2a	0		<MDA		
	0.62	0.08	0.69	0.06	111
urine 2b	0		<MDA		
	1.34	0.09	1.48	0.12	110
urine 2c	0		<MDA		
	2.1	0.2	2.07	0.02	99
urine 3	0		<MDA		
	4.3	0.2	3.9	0.3	91
urine 4	0		<MDA		
	4.3	0.2	4.0	0.1	93
urine 5	0		<MDA		
	7.2	0.8	6.8	0.5	94

<sup>a</sup>Sample volume 100 mL. <sup>b</sup>There are not significant differences at the 95% confidence level. Standard deviations were calculated from three replicates of analysis (*n* = 3).

position selection valve. In addition to compactness, the advantage of this “lab-on-valve” system is the permanent rigid position of the sample processing channels that ensures repeatability of microfluidic manipulations, controlled by conventional sized peripherals. This system allows drastic reduction of reagents consumption and waste generation, reduction of resin consumption and time saving in relation to manual methodologies, whose operations can last days against an extraction frequency of up to 12 samples h<sup>-1</sup>. Furthermore LOV technique allows the fully automated column replacement.<sup>8,17,18</sup>

Since the vials had to be kept in darkness overnight to avoid light emission phenomena, and the counting time was of 1800 s, off-line detection was mandatory. Moreover off-line detection is the most common approach used in laboratories to reduce costs when dealing with big instruments such as ICP-MS or

radiometric detectors with long counting times associated to samples with low activity content.

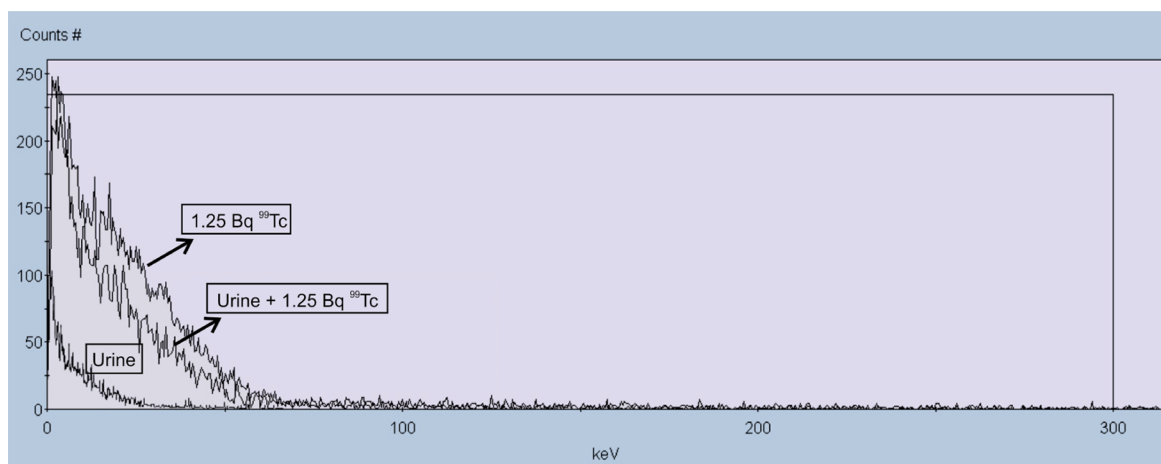
**Optimization Results.** To find the best operational conditions for separation, preconcentration and detection of very low levels of technetium with the proposed LOV system a series of investigations were conducted. All optimization assays were carried out with 2.5 Bq of <sup>99</sup>Tc. Screening results (e.g., Pareto chart, ANOVA table) showed that the four variables and the curvature were significant in the studied experimental domain. Figure 2 shows the Pareto chart that graphically summarizes most relevant information from the screening. Taking into account these results, ranges were modified and the retention and elution flow rates were fixed to achieve the highest extraction frequency (2 mL min<sup>-1</sup>) without back pressure problems. Critical values of the concentration and volume of eluent were obtained by a response surface model including quadratic terms.

Eluent volume and concentration were correlated, since the scintillation cocktail has a limited tolerance to the amount and concentration of acid, which is maximum 6 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> nitric acid.<sup>19</sup> Increasing nitric acid concentration is known to quench liquid scintillation, which results in a lower detection efficiency. So taking into account that the volume of eluate was the most significant variable upon the screening (Figure 2), its range was modified, enlarging it up to 1.75 mL and consequently the nitric acid concentration studied range was also modified considering the limitations of the liquid scintillation cocktail.

Thus, a face centered central composite design with a total number of 11 experiments was resorted to find the critical values of the variables for the technetium determination. Results were fitted to a linear-quadratic model with an *r*<sup>2</sup> = 0.9487, being both variables significant (ANOVA table). The histogram of residuals and predicted vs observed values graphics showed satisfactorily distributions, therefore critical values were obtained using the desirability function (Figure 3). Optimum conditions are summarized in Table 3. These were used in all experiments throughout this work.

**Column Properties.** TEVA resin was chosen because it is able to extract technetium as pertechnetate from diluted HNO<sub>3</sub> solutions selectively.<sup>12</sup> The active component of the TEVA resin is an aliphatic quaternary amine, which has similar properties to those of a typical strong base anion exchange resin.<sup>27</sup> Furthermore, since functional groups are in a liquid form, rather than fixed to a polymer backbone these groups have greater flexibility to coordinate around target anions. This means that the uptake of these ions is generally higher and often at lower acid concentrations.<sup>28,29</sup> By conditioning the resin with nitric acid, the nitrate is linked to the quaternary amine and acts as counterion for the anionic interchange with the pertechnetate. The high retention of Tc(VII) by the TEVA resin at low acidity is due to the high selectivity of the quaternary ammonium salts for the pertechnetate anion over the anion of the acid.<sup>15</sup>

Thus, the concentration of nitric acid was optimized in previous assays and best results were obtained with a concentration of 0.1 mol L<sup>-1</sup> nitric acid. Using TEVA resin provided not only the cleanup of the sample but also <sup>99</sup>Tc preconcentration at the same time. The resin capability for Tc was studied carrying out a saturation assay of the 32 mg of resin employed in this method. The resin was able to retain up to 85000 Bq of technetium per gram of resin (135 μg Tc g<sup>-1</sup> resin).



**Figure 4.** Spectra of a urine sample, 1.25 Bq  $^{99m}\text{Tc}$  spiked urine and 1.25 Bq  $^{99m}\text{Tc}$  standard, obtained using the LOV system and an LSC with linear amplification.

The extraction column lifetime, that is, the durability, is intimately linked to the repeatability of the methodology and is indicative of the number of consecutive analyses feasible without changing the column packing. Both parameters, repeatability and durability, were studied at the same time. On the one hand, first ten extractions gave a repeatability of 1.6% expressed as RSD ( $n = 10$ ). On the other hand, the durability of the column was tested up to 110 consecutive extractions and recoveries higher than 95% were obtained loading 1 mL of sample each run. This long durability of such small amount of resin (32 mg) allows the reduction of the method costs even comparing with previous automated systems for  $^{99m}\text{Tc}$  determination.<sup>7</sup>

The method reproducibility, expressed as RSD, is of 2.0%. It was determined from results obtained on five different working days, changing the column packing, and using the same working standard solution of technetium.

No interference study was carried out because of TEVA resin selectivity, the detector used for our analyte of interest and the lack of interferences observed when analyzing urine samples.

Analytical parameters are summarized in Table 4.

**Minimum Detectable Activity (MDA).** It should be emphasized that the proposed method is simple, compact almost straightforward and requires low maintenance. A typical LSC beta counting efficiency of 97.5% was obtained experimentally and was in agreement with other reports counting efficiency for  $^{99m}\text{Tc}$ .<sup>30</sup> The minimum detectable activity was 0.1 Bq calculated following the norm ISO 11929-1<sup>31</sup> with 95% confidence level (eq 1). This is slightly more conservative than the Currie method<sup>32</sup> for low number of counts.

$$\text{MDA} = \frac{5.41 + 4.66\sqrt{C_b \times t}}{60 \times E \times Y \times V \times t} \quad (1)$$

Hence, the MDA depends on signal acquisition time ( $t$ ) in minutes, background count ( $C_b$ ) in cpm, the measurement efficiency ( $E$ ) as a fraction of unity, chemical yield ( $Y$ ) as a fraction of unity, and the sample volume ( $V$ ) in liters. Considering that the system is able to preconcentrate up to 100 mL of sample, the MDA for the method expressed as concentration activity would be 1 Bq L<sup>-1</sup>.

A common injected activity in Nuclear Medicine consists of 740 MBq approximately of  $^{99m}\text{Tc}$ . Just when the patient is injected, there will be already approximately 5.7 Bq of  $^{99m}\text{Tc}$

coming from the  $^{99m}\text{Tc}$  decay because almost three  $T_{1/2}$  will have elapsed. This activity will increase up to approximately 8 Bq when all the  $^{99m}\text{Tc}$  had decayed. According to excretion models, during the first hour, the principal mechanism of excretion is by urine, in a 30%.<sup>33</sup> Therefore, analyzing a urine sample collected 1 h postinjection, there will be between 1.71 and 2.5 Bq of  $^{99m}\text{Tc}$ . Thus, the proposed method is able to measure it, being a potential tool for monitoring the  $^{99m}\text{Tc}$  present in urine from treated patients and to calculate the input of this radionuclide to the environment. Although being a low activity, it has to be taken into account that thousands of patients are treated with  $^{99m}\text{Tc}$  everyday.

Preconcentration volume was obtained studying ten different volume samples, from 1 to 100 mL. Results showed that 100 mL of sample can be preconcentrated in the TEVA resin with an RSD of 1.7% ( $n = 4$ ).

**$^{99m}\text{Tc}$  Monitoring by Automated Systems.** There are previous works in bibliography which deal with  $^{99m}\text{Tc}$  automated determination applied to different sample matrixes. In this section, a brief state of the art of automation strategies to monitor this radionuclide is presented.

There are some automated approaches which determine  $^{99m}\text{Tc}$  in environmental samples exploiting ICP-MS as a detector and flow injection analysis (FIA) technique to automate the Tc enrichment and sample clean up. For example, Eroglu et al.<sup>34</sup> applied their system to seawater samples using an anion exchange resin and reaching a LOD of 0.02 Bq L<sup>-1</sup>. Other examples exploiting TEVA resin applied to soil samples are the works of Kim et al.<sup>7</sup> and Hollenbach et al.<sup>35</sup> that reach LODs of 0.05 Bq L<sup>-1</sup> and 11 Bq kg<sup>-1</sup>, respectively. Although, the ICP-MS provides lower LODs, it is not so commonly found in routine laboratories due to the high cost of the instrument itself and of the involved consumables. In addition, FIA results in a high sample and reagents consumption given its continuous operation mode, requiring also a more frequent recalibration because of the aging of Tygon tubing.

As stated previously, LSC is the most commonly used technique for  $^{99m}\text{Tc}$  determination. An example of the use of LSC technique is a fully automated Sequential Injection Analysis (SIA) system developed by Egorov et al.<sup>5</sup> for  $^{99m}\text{Tc}$  determination in stopped flow approach, with a LOD of 1.1 Bq. This system was applied to samples with higher activity levels from nuclear waste disposals. Although having an analysis

frequency of 3 samples  $\text{h}^{-1}$ , the online LSC detection system allows the minimization of high activity samples handling. Same authors have more recently developed systems exploiting radionuclide sensors for  $^{99}\text{Tc}$  determination, these being of great relevance for in situ monitoring. In these sensors detection is carried out on the scintillation material in which retention and preconcentration are also performed. Egorov et al.<sup>6</sup> developed a SIA system exploiting a radionuclide sensor based on chemically selective scintillating microspheres, which were replaced every run, and reported a LOD of  $6.2 \text{ Bq L}^{-1}$ . This system was applied to a working range between 1700 and  $23000 \text{ Bq L}^{-1}$   $^{99}\text{Tc}$  standards. DeVol et al.<sup>36</sup> optimized some extractive scintillating sensors exploiting different combinations of extraction sorbent material and scintillator, achieving a MDA of  $6 \text{ Bq L}^{-1}$  with stopped flow operation and spikes of  $330 \text{ Bq L}^{-1}$  of  $^{99}\text{Tc}$  to the samples. More recently O'Hara et al.<sup>37</sup> developed a system for  $^{99}\text{Tc}$  quantification in complex groundwater matrixes exploiting a radiometric preconcentrating minicolumn sensor. These systems have been applied to water samples from Hanford site (a mostly decommissioned nuclear production complex) containing high  $^{99}\text{Tc}$  content.

There are scarce reported works in bibliography determining  $^{99}\text{Tc}$  in urine and all of them are manual approaches. To the best of our knowledge the proposed methodology is the first automated system applied to raw urine samples with low  $^{99}\text{Tc}$  content, being an affordable tool for monitoring the input of this radionuclide to the environment from one of its main anthropogenic sources, that is, hospitals.

**Application to Real Samples.** This method was evaluated by analyzing five different urine samples. Human urine is a very complex matrix since consists primarily of water, with organic solutes, including urea, creatinine, uric acid, and trace amounts of enzymes, carbohydrates, hormones, fatty acids, pigments, and inorganic ions, such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$ . Therefore, by using SPE the analyte of interest is isolated prior detection avoiding interferences and at the same time preconcentrated.

Urine samples were spiked with known  $^{99}\text{Tc}$  activities. Various levels of spiking were studied in order to validate the applicability of the proposed system to urine from patients treated with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  and even to samples with higher activities of  $^{99}\text{Tc}$ . 100 mL of sample were analyzed in all cases. The *t* test for comparison of means revealed that there were no significant differences at the 95% confidence level between the added and found values. Results have shown good recoveries, between 91% and 111% in all cases (Table 5). Figure 4 shows spectra of a urine sample, spiked urine and  $^{99}\text{Tc}$  standard analyzed with the proposed LOV system. Thus, as can be seen  $^{99}\text{Tc}$  can be satisfactorily quantified in this kind of samples at the typical levels found in urine from patients treated with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

## CONCLUSIONS

An automatic LOV system has been developed and tested for different preconcentration volumes of urine samples containing technetium with highly satisfactory results. Combination of a flow-based system with a selective extraction material (TEVA resin) enabled the fully automation of the extraction and preconcentration of the target analyte, improving the analyst safety. The proposed procedure was successfully applied to raw urine samples, previously acidified, which provided simplicity and time reduction of the analysis. Moreover, this method has several advantages such as simplicity, compactness, sensitivity,

selectivity, versatility, repeatability, and minimization of sample handling. Therefore, the present system is presented as a potential tool for monitoring the  $^{99}\text{Tc}$  environmental input through urine of treated patients.

As future prospects, we plan to apply the proposed method to assess  $^{99}\text{Tc}$  environmental impact from feces, hospital residues, and environmental samples.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: victor.cerda@uib.es.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTQ2010-15541) and Balearic Government (43/2011 cofinanced by FEDER funds) is gratefully acknowledged. Authors would like to thank to A. Borràs for his valuable collaboration.

## REFERENCES

- (1) Hu, Q. Technetium. *Radionuclides in the Environment*; Atwood, D. A., Ed. Wiley & Sons: Chichester, U.K., 2010; pp 217–224.
- (2) Shi, K.; Hou, X.; Roos, P.; Wu, W. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *709*, 1–20.
- (3) Fajardo, Y.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Gómez, E.; Casas, M.; Cerda, V. *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1399–1408.
- (4) Rodríguez, R.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Leal, L. O.; Cerda, V. *Talanta* **2012**, *96*, 96–101.
- (5) Egorov, O. B.; O'Hara, M. J.; Ruzicka, J.; Grate, J. W. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 977–984.
- (6) Egorov, O. B.; Fiskum, S. K.; O'Hara, M. J.; Grate, J. W. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5420–5429.
- (7) Kim, C. K.; Kim, C. S.; Rho, B. H.; Lee, J. I. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, *252*, 421–427.
- (8) Ruzicka, J. *Analyst* **2000**, *125*, 1053–1060.
- (9) Wang, J.; Hansen, E. H. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 225–231.
- (10) Luque de Castro, M. D.; Ruiz-Jiménez, J.; Pérez-Serradilla, J. A. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 118–126.
- (11) Vidigal, S. S. M. P.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 585–597.
- (12) Triskem. TEVA resin specifications, 2008. <http://www.triskem-international.com/>.
- (13) Kieviet, W. J. *Nucl. Med.* **1981**, *22*, 703–709.
- (14) Wigley, F.; Warwick, P. E.; Croudace, I. W.; Caborn, J.; Sanchez, A. L. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *380*, 73–82.
- (15) Horwitz, E. P.; Dietz, M. L.; Chiarizia, R.; Diamond, H.; Maxwell, S. L., III; Nelson, M. R. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *310*, 63–78.
- (16) Rhodes, B. A.; Croft, B. Y. *Basics of Radiopharmacy*; CV Mosby Company: St. Louis, MO, 1978; pp 163–168.
- (17) Avivar, J.; Ferrer, L.; Casas, M.; Cerda, V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3585–3594.
- (18) Avivar, J.; Ferrer, L.; Casas, M.; Cerda, V. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 327–334.
- (19) Perkin Elmer. Perkin Elmer Scintillation cocktails and consumables, 2007, [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com).
- (20) Hughes, L. D.; DeVol, T. A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2254–2261.
- (21) Brereton, R. G. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 156–163.
- (22) Almeida, M.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escalera, L. A. *Talanta* **2008**, *76*, 965–977.
- (23) Araujo, P.; Brereton, R. G. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 26–31.
- (24) Araujo, P.; Brereton, R. G. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 63–70.
- (25) Tagami, K.; Uchida, S. J. *Radioanal. Nucl. Chem.* **1999**, *239*, 643–648.
- (26) Leardi, R. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *652*, 161–172.

- (27) Fern, M.; Thakkar, A.; Jassin, L. *J. Nucl. Radiochem. Sci.* **2005**, *6*, 223–225.
- (28) DiPrete, D. P.; DiPrete, C. C.; Sigg, R. A. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2005**, *263*, 593–598.
- (29) Egorov, O.; O'Hara, M.; Grate, J. W. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 345–352.
- (30) Barnett, J. M.; Jones, R. A.; Barney, G. S.; Kurtz, J. E.; Colbert, E. M.; Catlow, S. A.; Hetzer, D. C. *Radiocarbon* **1993**, 467–472.
- (31) International Organization for Standardization. *Determination of the Detection Limits and Decision Threshold for Ionizing Radiation Measurements. Part 1*, ISO 11929; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2000.
- (32) Currie, L. A. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 586–593.
- (33) IBA Molecular. Technical leaflet of OSTEOCIS, 2010. <http://www.ibamolecular.com/sites/default/files/OSTEOCIS%20SPC.pdf>.
- (34) Eroglu, A. E.; McLeod, C. W.; Leonard, K. S.; McCubbin, D. J. *Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13*, 875–878.
- (35) Hollebach, M.; Grohs, J.; Mamich, S.; Kroft, M.; Denoyer, E. J. *Anal. At. Spectrom.* **1994**, *9*, 927–933.
- (36) DeVol, T. A.; Egorov, O. B.; Roane, J. E.; Paulenova, A.; Grate, J. W. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2001**, *249*, 181–189.
- (37) O'Hara, M. J.; Burge, S. R.; Grate, J. W. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1068–1078.



# Automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction of $^{99}\text{Tc}$ from biological samples and hospital residues prior to liquid scintillation counting

Marina Villar<sup>1</sup> · Jessica Avivar<sup>2,3</sup> · Laura Ferrer<sup>3</sup> · Antoni Borràs<sup>3</sup> · Fernando Vega<sup>1</sup> · Víctor Cerdà<sup>4</sup>

Received: 5 January 2015 / Revised: 13 April 2015 / Accepted: 5 May 2015 / Published online: 26 May 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** A new approach exploiting in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) for  $^{99}\text{Tc}$  extraction and preconcentration from biological samples, i.e., urine and saliva, and liquid residues from treated patients is presented.  $^{99}\text{Tc}$  is a beta emitter with a long half-life ( $2.111 \times 10^5$  years) and mobility in the different environmental compartments. One of the sources of this radionuclide is through the use of its father  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  in medical diagnosis. For the first time a critical comparison between extractants and disperser solvents for  $^{99}\text{Tc}$  DLLME is presented, e.g., tributyl phosphate (TBP), trioctylmethylammonium chloride (Aliquat<sup>®</sup>336), triisooctylamine (TiOA), as extractants in apolar solvents such as xylene and dodecane, and disperser solvents such as acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, 1-propanol, and 2-propanol. The system was optimized by experimental design, and 22.5 % of Aliquat<sup>®</sup>336 in acetone was selected as extractant and disperser, respectively. Off-line detection was performed using a liquid scintillation counter. The present method has a  $^{99}\text{Tc}$  minimum detectable activity (MDA) of 0.075 Bq with a high extraction/preconcentration frequency ( $8 \text{ h}^{-1}$ ). Urine, saliva, and hospital residues were satisfactorily

analyzed with recoveries of 82–119 %. Thus, the proposed system is an automatic powerful tool to monitor the entry of  $^{99}\text{Tc}$  into the environment.

**Keywords** Dispersive liquid–liquid microextraction · Technetium-99 · In-syringe · Liquid scintillation analysis · Biological matrices · Hospital residues

## Introduction

$^{99}\text{Tc}$  is a low beta emitter with a maximum of emission of 293.6 keV and a long half-life ( $2.111 \times 10^5$  years). Despite this, it is possible to find it in the environment as a secondary residue of the nuclear industry, and also as the product of decay of its father  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  which is widely used in nuclear medicine for diagnosis. Hence, taking into account its long half-life and its increasing use, it can be considered an emerging and potential contributor to the radiation dose, especially for surface water pathways [1].

Once the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  is injected into the body, it is distributed and reaches the target organs, including salivary glands. The radioactive decay process then takes place, together with the excretion processes, mainly via urine and feces [2]. Thus, in the area of nuclear medicine in hospitals, the decay process can be quantified as  $^{99}\text{Tc}$  residues contained in saliva, urine, and feces, which are excreted from the human body of treated patients, and the excess of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  not used, which decays to  $^{99}\text{Tc}$ . The remaining  $^{99}\text{Tc}$  is quantified by hospitals, i.e., hospitals have radioactive waste management systems to control the final destination of this radionuclide. Hospitals also have special receptacles for the rooms occupied by patients treated with radioactive substances in order to ensure the decay of some radioactive species into their less dangerous daughters, prior to discharge to the urban waste. However, the activity of

✉ Laura Ferrer  
laura.ferrer@uib.es

<sup>1</sup> Radiopharmacy Service, Son Espases Hospital, Cra. Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca, Spain

<sup>2</sup> Sciware Systems, S.L., C/ Pi 37-07193, Bunyola, Spain

<sup>3</sup> Laboratory of Environmental Radioactivity-LaboRA, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

individual radionuclides is not usually controlled, and the knowledge of the composition of these residues would improve their management.

Liquid scintillation counters (LSC) are found in most nuclear medicine services to measure beta emitters, and they are the preferred technique to determine  $^{99}\text{Tc}$ . However, the complex matrix of clinical samples and the low sensitivity of LSC make the direct determination of technetium in these kinds of samples difficult. This can be overcome by the implementation of separation and preconcentration techniques prior to detection.

Dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) allows both extraction and preconcentration processes, and it is based on the use of a low volume of an immiscible extractant solvent and a disperser solvent as ternary component [3]. The disperser solvent must be miscible in both the aqueous and the organic phases, thereby improving the mixing efficiency. Another important characteristic to be taken into account is the low viscosity and surface tension of the extraction solvent which allow spontaneous formation of droplets that stick to hydrophobic surfaces, such as the syringe piston head [4]. In order to increase the extraction efficiency the extractant and the disperser are commonly mixed and injected rapidly into the sample, favoring the interaction surface area [5]. Advantages of DLLME are simplicity, low cost, and the achievement of high recovery and enrichment factors and fast pretreatment protocols [6]. In this work, different extractants and disperser solvents were studied. Previously reported extractants for Tc, such as tributyl phosphate (TBP) and triisooctylamine (TiOA) [7–10], were tested in different percentages in xylene and dodecane. The quaternary ammonium salt Aliquat<sup>®</sup>336, which is used as a Tc extractant in commercial resins, was also studied. Thus, a critical comparison between TBP and Aliquat<sup>®</sup>336 as Tc extractants is also presented in this work.

However, classical sample pretreatment can be tedious and time-consuming, leading to sample contamination and exposing the analyst to toxic substances. Total or partial automation of conventional analytical methods in the radiochemical field can be accomplished by the use of flow analysis techniques [11–13]. Benefits of automation are simplicity, reliability, significant decrease in time of analysis, reduction of sample and reagent consumption and thus waste generation, and minimal handling of samples and standards by the analyst, which is of great relevance when dealing with radioactive substances [14, 15]. In addition, automation of the analytical protocol allows precise control of sample and reagent volumes and flow rates, which leads to reproducibility improvement [16]. In this way, an alternative approach for the automation of DLLME based on the accomplishment of the extraction inside a syringe was developed [4]. One of the advantages of in-syringe DLLME is that it allows the use of solvents lighter than water since the separated extractant droplets can be collected at the head of the syringe.

Therefore, an automatic in-syringe system based on DLLME with liquid scintillation counting detection has been developed to determine  $^{99}\text{Tc}$  in complex matrix samples, i.e., biological and residue samples from hospitals, providing a new, rapid, and easily implemented radiochemical method.

## Experimental

### Reagents and solutions

Working standard solutions of  $^{99}\text{Tc}$  were obtained from the decayed  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  generated at the Radiopharmacy Service of the hospital by an Ultra-Technekow<sup>™</sup> DTE  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator from Mallinckrodt. Every week, the contents of a 5-mL vial with an average activity of 77.7 GBq of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  was eluted from the  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator, and kept aside for 1 month to ensure that all  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  had decayed into its daughter  $^{99}\text{Tc}$ . An aliquot of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  was measured both by a gamma spectrometer, germanium detector Canberra–GR5023–7500 SL iron shielded, and by a dose calibrator, Capintec CRC<sup>®</sup>–25R, to ensure the activity content.  $^{99}\text{Tc}$  activity was calculated taking into account (a) that  $^{99}\text{Mo}$ , with a half-life of 66.48 h, generates 12.5 % of  $^{99}\text{Tc}$  and 87.5 % of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  during its branching decay, (b) that all  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  decays to  $^{99}\text{Tc}$ , (c) and the hour and date of the certified  $^{99}\text{Mo}$  activity and of the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  elution [17].

All working standard solutions were prepared by dilution in  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ .

All solutions were prepared from analytical grade reagents with Millipore quality water. The nitric acid ( $\text{HNO}_3$  60 % v/v), sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  96 % v/v), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and hydrogen peroxide used were of analytical reagent grade and purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Aliquat<sup>®</sup>336, TBP, TiOA, xylene, dodecane, acetone, acetonitrile, 2-propanol, 1-propanol, methanol, and ethanol were purchased from Sigma Aldrich. The liquid scintillation cocktail Ultima Gold was purchased from Perkin Elmer.

### Samples

Urine and saliva samples were taken from staff of the laboratory. Residue samples were taken from a big leaded container which is connected to the patient's room of the Nuclear Medicine Service. Samples were just acidified with nitric acid up to a final concentration of  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ . When the combination of TBP and 2-propanol was tested as extractant and disperser, respectively, samples were prepared in  $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  [18]. Hydrogen peroxide had to be added to residue samples as a result of the reducing nature of the original medium which precluded Tc determination, since Tc has to be present as Tc(VII) to achieve good extraction efficiencies. EDTA also had to be added to samples with high salt content such as urine and saliva samples.

## Instrumentation and software

A schematic of the system is shown in Fig. 1. The system comprised an eight-port multiposition selection valve (SV) (Crison Instruments, Spain) connected to a multisyringe burette (Multiburette 4S, Crison Instruments) with programmable flow rates equipped with a 5-mL glass syringe (Hamilton, Switzerland) which was used as mixing chamber and liquid driver. The central port of the SV was connected to the syringe pump for sequential aspiration of the various solutions for the DLLME process and cleaning of the syringe. Peripheral ports were configured as follows: (1) cleaning solution (10 % acetone in water), (2) autosampler, (4) extractant/disperser (22.5 % Aliquat<sup>®</sup>336/acetone), (5) Milli-Q water, and (8) waste. The syringe is equipped with a three-way solenoid valve (N-Research, USA) at the head, which permits multicommutation performance (on, to the fraction collector; off, to the SV). Polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing of 0.8 mm internal diameter was used to build the flow network. All connectors were made of poly(vinylidene fluoride) (PVDF).

A magnetic stirring system (Sciware Systems, Bunyola, Spain) allowing homogeneous and rapid mixing of sample and reagents without the requirement of additional mixing chambers was tested to study its effect on extraction efficiency. It consisted of four principal parts: a small magnetic stirring bar placed inside the syringe, a nylon ring with two neodymium magnets placed around the glass barrel of the syringe, a motor that forces the magnetic stirring bar driver to rotate, and a regulation circuit board connected to the syringe pump for revolution control.

The software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems) was exploited for instrumental control. This software based on dynamic link libraries (DLLs) at 32 bits permits the use of a single and versatile application for whatever instrumentation is needed without further modification. It involves a basic protocol allowing the implementation of specific and individual DLLs attending the configuration of the flow analyzer.

<sup>99</sup>Tc was analyzed exploiting a liquid scintillation counter, Tricarb 2810 TR (Perkin Elmer). A window comprising 1–600

channels was used for counting. The counting time was 1800 s in normal mode, achieving a counting efficiency of 95.2 % determined from a known <sup>99</sup>Tc activity. Given that the proposed method provides constant quenched samples, quenched curves were not required.

The statistical software Statistica 7.0 was used for the optimization of the method via a multivariate approach.

## Analytical procedure

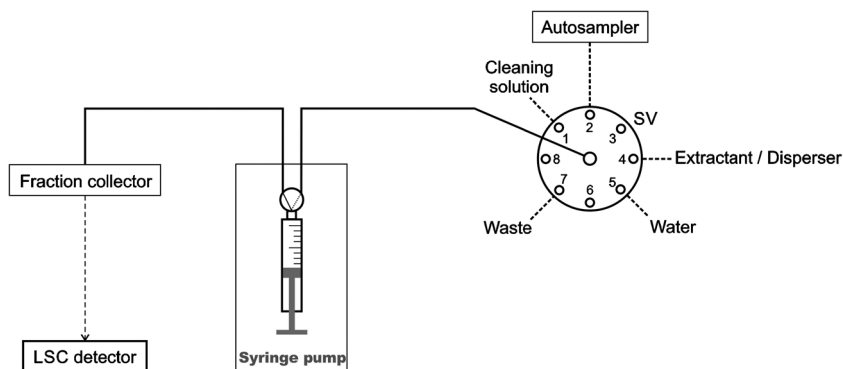
The presumed operational sequence is presented in Table 1. Briefly, first the extractant/disperser solution (1.5 mL) is loaded into the syringe. Then the sample (3.5 mL) is rapidly aspirated to achieve a turbulent mixture. Afterwards the phases are allowed to separate for 90 s. Then the syringe in the on position delivers the organic phase left (0.7 mL) into a scintillation vial. To empty the tube connecting the syringe and the vial avoiding carry-over, first the syringe is emptied and then air is aspirated to push the organic solution to the vial. The cleaning between runs is very important to avoid sample cross contamination, since all the steps are carried out inside the syringe. Thus, the syringe is cleaned once with 10 % acetone solution and twice with water after each run. The obtained eluates are diluted up to a volume of 2 mL with 22.5 % Aliquat<sup>®</sup>336 in acetone and mixed with 8 mL of liquid scintillation cocktail, according to the LSC manufacturer's recommendations [19]. Borosilicate glass LSC vials were kept in the dark overnight and measured the following day to avoid interferences due to fluorescence and/or phosphorescence [20].

## Results and discussion

### Selection of extractant and disperser solvents

A critical point of this method is the selection of an optimum extraction solvent, or a mixture of organic solvents to improve the extraction process, and also a disperser solvent to perform DLLME. So a series of organic solvents with lower density than water were evaluated. Initially, TBP and TiOA pure or

**Fig. 1** Schematic depiction of the in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction system for <sup>99</sup>Tc determination. LSC liquid scintillation counter, SV selection valve



**Table 1** Automatic lab-in-syringe  $^{99}\text{Tc}$  DLLME procedure

Step	Flow rate ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Valve position	
		Syringe valve	Selection valve
1. Loading into the syringe			
a. Priming in dispense	15	Off	8
b. Loading 1.5 mL of extractant/ dispersant	2.5	Off	4
c. Loading 3.5 mL of sample	10	Off	3
2. Phase separation			
a. Wait 90 s for phases breakup	–	Off	–
3. Organic phase collection			
a. Dispensing 0.7 mL of organic phase	2	On	–
b. Emptying the syringe	15	Off	8
c. Taking air	15	Off	7
d. Pushing organic phase to the vial	15	On	–
4. Syringe cleaning			
a. Loading 5 mL acetone 10 %	15	Off	2
b. Delivering to waste	15	Off	8
c. Loading 5 mL of water	15	On	5
d. Delivering to waste	15	Off	8

mixed with xylene and dodecane were tested as extraction solvents according to previously reported works [7, 18, 21]. The results indicated that neither xylene nor dodecane helped to enhance the extraction efficiency of TiOA or TBP (Fig. 2).

TBP gives higher extraction efficiencies than TiOA, specifically 100 % of TBP gave the best results as can be seen in Fig. 2a. TiOA/xylene in a proportion 5:95 gives the best results for TiOA (Fig. 2b) but lower than TBP. Thus, TiOA was discarded for further assays given its low extraction efficiency in comparison with TBP.

Aiming to increase the efficiency of extraction, DLLME was implemented and several disperser solvents were assayed, e.g., acetone, acetonitrile, methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol. The miscibility of the disperser solvent in the organic extraction solvent and the aqueous phase is the main

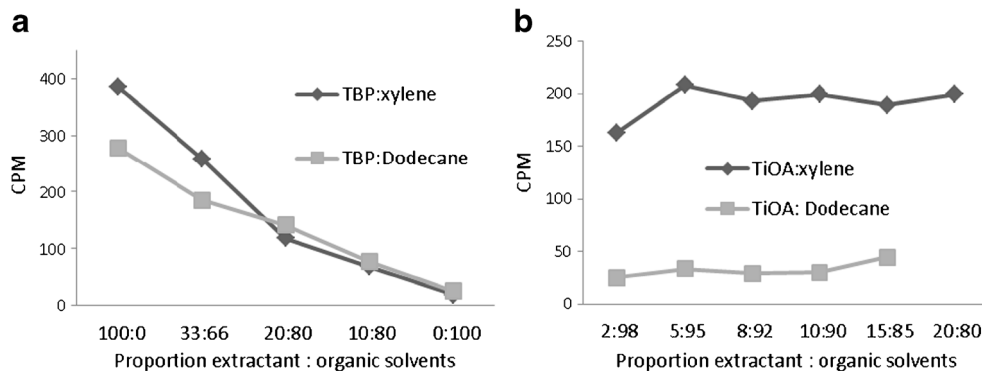
feature determining its selection. Thus, 2-propanol was selected as dispersant for TBP. However, low extraction efficiencies were achieved even with addition of different salts ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ). Moreover, with the aim of increasing the extraction efficiency, additional in-syringe agitation was implemented but poor extraction efficiency (43 %) was accomplished.

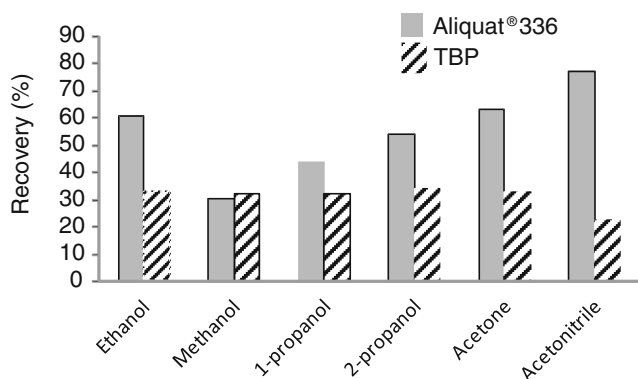
In the search for a more efficient extractant, Aliquat<sup>®</sup>336 was tested because of its capability of chelating technetium. Again, a study of dispersants was also carried out; i.e., acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, 1-propanol, and 2-propanol were tested in order to perform DLLME. A comparison between TBP and Aliquat<sup>®</sup>336 with different dispersants is shown in Fig. 3. In the case of TBP, 2-propanol gave higher extraction efficiencies than with other disperser solvents. However, Aliquat<sup>®</sup>336 provided higher extraction efficiencies in general. The best results were obtained with acetonitrile, acetone, and ethanol. Although acetonitrile gave slightly higher recoveries, acetone was selected as dispersant since it is cheaper than acetonitrile and higher reproducibility was observed. Thus, Aliquat<sup>®</sup>336 in acetone was selected as extractant and dispersant, respectively, for further assays.

### Multivariate optimization

Several assays were carried out to find the best operational conditions for the DLLME of  $^{99}\text{Tc}$ . First, in order to study the variables having a significant effect upon the response signal and/or had a significant interaction, a full factorial screening design ( $2^k$ ) was performed. Three center points were included to evaluate the curvature of the model and to estimate the precision. Three variables were evaluated, i.e., concentration of Aliquat<sup>®</sup>336, volume of organic solution (extractant+dispersant), and agitation time, in the range detailed in Table 2. The results (ANOVA table, Pareto chart, and residuals distribution) showed that two of the variables and the curvature were significant in the studied experimental domain, namely the extractant concentration and the volume of organic solution. The volume of organic solution was the most significant

**Fig. 2** Study of two extractants TBP (a) and TiOA (b) with different percentages of organic solvents (xylene and dodecane). CPM counts per minute





**Fig. 3** Comparison of TBP and Aliquat®336 as extractants with different dispersants

variable with a positive effect and secondly the concentration of extractant also with a positive effect. Thus, the range of concentration of extractant was modified, increasing the upper level. However, the range of volume of organic solution was shortened; however, maintaining the upper level at 1.5 mL, since good recoveries were achieved, and increasing this volume would have reduced the sample volume and thus the enrichment factor given the limited volume of the syringe. The agitation time was not significant across the studied range. According to these results, in order to evaluate the need for an additional agitation system, the center points were repeated without agitation and no significant differences were observed; therefore, we decided to continue without agitation in further assays. Given that a dispersant is used, there is no need to make the system more complicated by adding an agitation system, since the effect of the dispersant was enough to reach a good mixing efficiency. In fact, the ternary mixture formed was clearly visible. Good phase separation was ensured by fixing the separation time or phase breakup time at 90 s.

Thus, the studied range for the two significant variables was slightly modified following the tendency of the screening results described above (Table 2) and a face-centered central composite response surface model including quadratic terms was applied to attain the critical values of the concentration of Aliquat®336 and volume of extractant/dispersant. All experimental responses were statistically analyzed and showed satisfactory results (i.e., good adjust coefficient for the three-way interaction model, normal distribution of the residuals

**Table 2** Experimental domains of the studied variables in the screening and the response surface assays

Variable	Screening	Response surface	Critical value
Aliquat®336 concentration (%)	5–20	10–30	22.5
Aliquat®336 volume (mL)	0.5–1.5	0.75–1.5	1.5
Agitation time (s)	20–60	–	–

**Table 3** Most relevant figures of merit of the developed system

Figures of merit	Value
Minimum detectable activity (Bq)	0.075
Intra-day precision (%) ( $n=10$ )	4.1
Inter-day precision (%) ( $n=5$ )	6.9
Extraction frequency ( $h^{-1}$ )	8
Enrichment factor	5
Detection efficiency (%)	95.2
Extraction efficiency (%)	84

histogram, and good fit between observed vs. predicted values). The desirability function was used to select the critical values of the variables evaluating two responses: the maximum signal and the minimum relative standard deviations (RSD). Hence, 22.5 % of Aliquat®336 in acetone and a volume of 1.5 mL of extractant/disperser solvent solution were selected as critical values, attaining an extraction efficiency of 84 %.

### Influence of salinity

The effect of salt was tested by adding increasing amounts of sodium chloride ( $0\text{--}3\text{ mol L}^{-1}$ ) to the sample. Decreasing recoveries were observed by increasing salt concentration. This negative effect is related to the faster separation of phases when salt is added. Also it was observed that a higher volume of organic droplet was left after extraction. Thus, a lower contact time between the aqueous and the organic phase can be assumed when salt is added. We also tested the implementation of the additional agitation step in samples with higher salt content, e.g., urine samples, and no significant differences in the extraction efficiencies were observed. Therefore, no salt was added. In fact, EDTA had to be added to samples with higher salt content such as urine and saliva. Increasing amounts of a  $0.1\text{ g L}^{-1}$  EDTA solution were tested, and better results were observed by adding 0.2 mg of EDTA to 20 mL of sample.

**Table 4** Comparison of methods involving Tc-LLE

Pretreatment	Detection technique	MDA (Bq)	Extraction efficiency (%)	Reference
SPE-LLE	GM-gas flow counter	0.082	70–75	[7]
LLE	LSC	0.017	70–95	[8]
LLE-SPE	ICP-MS	0.0025	–	[9]
LLE	ICP-MS	0.0015	86–92	[23]
DLLME	LSC	0.075	84	This work



**Table 5** Analysis of biological and residue samples by the in-syringe DLLME-LSC method

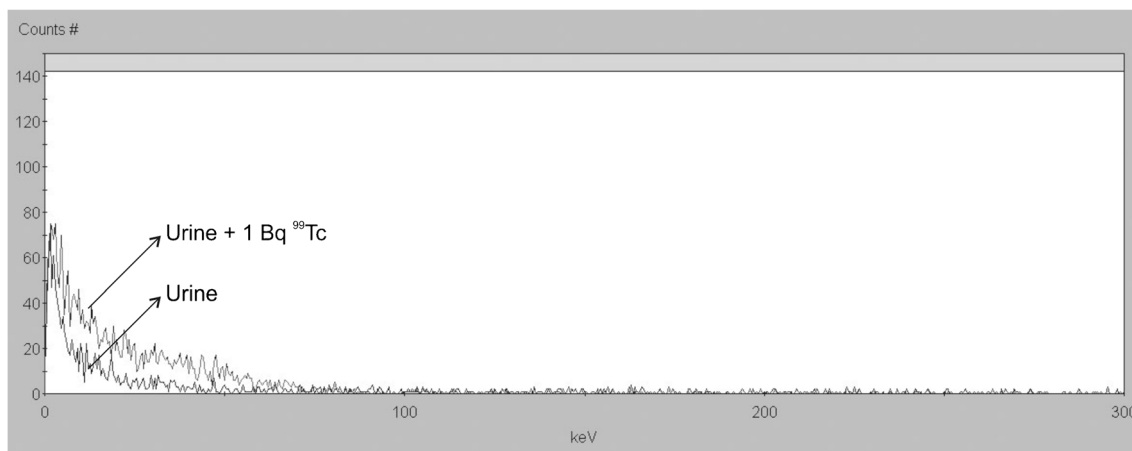
Samples	<sup>99</sup> Tc added		<sup>99</sup> Tc found		% recovery
	Act (Bq)	Uncer (Bq)	Act (Bq)	Uncer (Bq)	
Urine 1	0		<MDA		
	0.36	0.05	0.30	0.05	82
	1.55	0.07	1.44	0.07	93
Urine 2	0		<MDA		
	0.66	0.06	0.73	0.06	110
	1.55	0.07	1.44	0.07	93
Urine 3	0				
	0.36	0.05	0.31	0.05	85
Saliva 1	0		<MDA		
	1.55	0.07	1.35	0.07	87
Saliva 2	0		<MDA		
	1.14	0.06	0.99	0.06	87
	1.55	0.07	1.30	0.07	84
Hospital residues	0		<MDA		
	0.47	0.05	0.56	0.05	119
	1.14	0.07	0.99	0.06	87
	2.62	0.09	2.57	0.08	98

### Analytical parameters

Once the critical variables were studied and selected, the analytical figures of merit were determined. These are summarized in Table 3. Minimum detectable activity (MDA) calculated according to ISO 11929-1 [22] with 95 % of confidence level resulted in 0.075 Bq. Intra-day precision was calculated as the % RSD of ten extractions performed on the same day and inter-day precision as the % RSD of five extractions performed on five different days. The enrichment factor of the present method was obtained as the relation of sample volume loaded in-syringe and the volume of organic phase collected.

Furthermore, the improvement of enrichment factor was tested using a syringe of 10 mL but the intra-day precision was lower than that obtained with a syringe of 5 mL. The reproducibility of the formed organic phase was affected by the different dimensions of the syringe. Thus, this is the main limitation of the proposed methodology since <sup>99</sup>Tc is usually found at low levels in biological and environmental samples and a higher sample volume would provide a higher preconcentration factor. However, the proposed method is fast and practical, i.e., each extraction procedure takes only 8 min to complete and then the organic phase is collected in an LSC vial and mixed with 8 mL of liquid scintillation cocktail before counting in an LSC for 30 min.

Table 4 summarizes some figures of merit of previous works which deal with <sup>99</sup>Tc liquid–liquid extraction applied to different sample matrixes. For example, <sup>99</sup>Tc is extracted by liquid–liquid extraction followed by ICP-MS detection in two different works [9, 23] reaching the lowest MDAs,  $2.5 \times 10^{-3}$  Bq and  $1.5 \times 10^{-3}$  Bq of <sup>99</sup>Tc, respectively. However, these works used large amounts of sample and reagents and involved a long procedure with more chemical manipulations than the proposed method. Furthermore, ICP-MS is very expensive, a less common technique in hospitals, and presents more interferences, e.g., Mo, <sup>99</sup>Ru. A similar MDA was obtained, i.e., 0.082 Bq of <sup>99</sup>Tc, exploiting a Geiger Müller (GM) gas flow counter as a detector, a pretreatment method lasting at least 1 day, and large volumes of reagents and sample, achieving recoveries of 70–75 % [7]. Other studies of solid samples based on extraction by hand, involving numerous steps with a final liquid–liquid extraction in 5 % tri-*n*-octylamine in xylene, determined <sup>99</sup>Tc by liquid scintillation counting obtaining MDAs of 0.017 Bq with 2 h of counting and recoveries of 70–95 % [8]. Thus, comparing with previous works, the proposed method is the first one exploiting DLLME for <sup>99</sup>Tc extraction and preconcentration, affording good performance in terms of its analytical parameters without being time-consuming either for extraction or counting.

**Fig. 4** Spectra of urine sample analyzed with the proposed system. Raw and 1 Bq <sup>99</sup>Tc spiked urine sample

The pretreatment has been completely automated, achieving good sensitivity, a high extraction efficiency, and precision. Moreover, volumes of organic solvents and sample are reduced by one up to two orders of magnitude in comparison with previous works, and so too is the environmental impact of the analysis.

### Application to biological and hospital waste samples

Some biological and residue samples were analyzed for evaluation of the applicability of the proposed method. All samples were acidified with up to 0.1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> and spiked with different levels of <sup>99</sup>Tc. EDTA was added to urine and saliva samples to reduce the salt effect. Since Tc pharmaceutical preparations commonly include Sn<sup>2+</sup>, which reduces Tc(VII) to Tc(IV) precluding its efficient extraction, 0.7 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to hospital residues to ensure that all Tc was totally oxidized to Tc(VII). Different volumes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were tested, namely 0.2, 0.5, 0.7, and 1 mL, and 0.7 mL of oxidant was sufficient to obtain satisfactory recoveries.

Various levels of spiking with known <sup>99</sup>Tc activities were evaluated to validate the application of the proposed method to urine, saliva, and hospital residue samples. Table 5 summarizes the results of the studied samples. In all cases recoveries higher than 82 % were obtained. As an example, Fig. 4 shows spectra of a urine sample with and without a spike of 1 Bq of <sup>99</sup>Tc standard following elimination of the sample matrix prior to measurement with LSC using the proposed system.

### Conclusions

An automatic in-syringe system exploiting DLLME for <sup>99</sup>Tc extraction and preconcentration has been developed. Applying DLLME the fully automation of the sample clean-up and enrichment of <sup>99</sup>Tc was achieved, assuring the analyst safety and enhancing the method precision.

The present methodology has been applied to complex matrices such as urine, saliva, and hospital waste samples with highly satisfactory results. Moreover, volumes of organic solvents and sample are reduced by one up to two orders of magnitude in comparison with previous works, and so too is the environmental impact of the analysis. Additionally, this fast automatic method has several benefits such as simplicity, low cost per analysis, high recovery, precision, and enrichment factor. Therefore, this system is proposed as a useful tool for monitoring the <sup>99</sup>Tc generated in hospitals from biological and residue samples.

**Acknowledgments** Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (CTM2013-42401-R) co-financed by European Regional Development's funds (FEDER) is gratefully acknowledged. J. Avivar acknowledges the Torres Quevedo Program of the MINECO co-financed with European funds for financial support through the PTQ-2012-05755.

### References

1. Till JE, Grogan HA (2008) Radiological risk assessment and environmental analysis. Oxford University Press, Oxford
2. Summary of current radiation dose estimates to normal humans from <sup>99m</sup>Tc as sodium pertechnetate (1976) *J Nucl Med* 17:74–77
3. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J Chromatogr A* 1116:1–9
4. Maya F, Estela JM, Cerdà V (2012) Completely automated in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction using solvents lighter than water. *Anal Bioanal Chem* 402:1383–1388
5. Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V (2012) Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid–liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Anal Bioanal Chem* 404:909–917
6. Anthemidis AN, Ioannou KI (2009) Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta* 80:413–421
7. Chen Q, Dahlgaard H, Hansen HJM, Aarkrog A (1990) Determination of <sup>99</sup>Tc in environmental samples by anion exchange and liquid-liquid extraction at controlled valency. *Anal Chim Acta* 228:163–167
8. Wigley F, Warwick PE, Croudace IW, Caborn J, Sánchez AL (1999) Optimised method for the routine determination of Technetium-99 in environmental samples by liquid scintillation counting. *Anal Chim Acta* 380:73–82
9. Mas JL, García-León M, Bolívar JP (2006) Overcoming ICP-QMS instrumental limitations for <sup>99</sup>Tc determination in environmental solid samples using radiochemistry. *Appl Radiat Isot* 64:502–507
10. Melent'ev AB, Mashkin AN, Tugarina OV, Kolupaev DN, Zilberman BY, Tananaev IG (2011) Effect of some reducing and complexing agents on the extraction behavior of technetium in the TBP-HNO<sub>3</sub> system. *Radiochemistry* 53:256–263
11. Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A (2014) Flow analysis: a practical guide. Elsevier, Amsterdam
12. Kołacińska K, Trojanowicz M (2014) Application of flow analysis in determination of selected radionuclides. *Talanta* 125:131–145
13. Grate JW, Egorov OB, O'Hara MJ, DeVol TA (2008) Radionuclide sensors for environmental monitoring: from flow injection solid-phase absorptometry to equilibration-based preconcentrating minicolumn sensors with radiometric detection. *Chem Rev* 108:543–562
14. Fajardo Y, Avivar J, Ferrer L, Gómez E, Casas M, Cerdà V (2010) Automation of radiochemical analysis by applying flow techniques to environmental samples. *Trends Anal Chem* 29:1399–1408
15. Villar M, Avivar J, Ferrer L, Galmés M, Vega F, Cerdà V (2013) Automatic and simple method for <sup>99</sup>Tc determination using a selective resin and liquid scintillation detection applied to urine samples. *Anal Chem* 85:5491–5498
16. Cerdà V, Avivar J, Cerdà A (2012) Laboratory automation. *Pure Appl Chem* 84:1983–1998
17. Rhodes BA, Croft BY (1978) Basics of radiopharmacy. Mosby, Saint Louis
18. Ihsanulla (1993) Losses of technetium during various steps in the development of a procedure for environmental samples. *J Radioanal Nucl Chem Lett* 176:303–313
19. Perkin Elmer (2007) Scintillation cocktails and consumables. [www.perkinelmer.com/](http://www.perkinelmer.com/)
20. Hughes LD, DeVol TA (2006) Evaluation of flow cell detector configurations combining simultaneous preconcentration and scintillation detection for monitoring of pertechnetate in aqueous media. *Anal Chem* 78:2254–2261
21. East BW, Ihsanullah (1994) Method for the determination of technetium-99 in environmental samples using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Radioact Radiochem* 5:21–26

22. International Organization for Standardization (2010) ISO 11929: 2010. Determination of the characteristics limits (decision threshold, detection limit and limits of the confidence interval) for measurements of ionizing radiation – fundamentals and application. ISO, Geneva
23. Mas JL, García-León M, Bolívar JP (2004)  $^{99}\text{Tc}$  detection in water samples by ICP-MS. *Radiochim Acta* 92:39–46



**Marina Villar Pulido** has a degree in chemistry and a master in advances in food safety from the University of Jaen (Spain). She is a chemistry specialist in radiopharmacy, who trained at Son Espases University Hospital (U. H.), Balearic Islands (Spain). Nowadays, she is working as a specialist in radiopharmacy at the Nuclear Medicine Service of Son Espases U. H. and is doing her Ph.D. at the University of the Balearic Islands.



**Jessica Avivar Cerezo** is a Researcher at the spin-off Sciware Systems, S.L., and Secretary of the Laboratory of Environmental Radioactivity (LaboRA) at the University of the Balearic Islands. She is coauthor of a book, book chapters, and research articles related to automation of analytical protocols including hyphenation with modern analytical instrumentation.



**Laura Ferrer** is the Head of the Laboratory of Environmental Radioactivity (LaboRA) at the University of the Balearic Islands, co-author of several books, book chapters, and research articles, and she is responsible for supervising a number of Ph.D. and masters students in the field of automation and environmental monitoring. Her research is focused on the development of automated approaches for radionuclide environmental monitoring.



**Antoni Borràs** holds a Ph.D. in quantum mechanics from the University of the Balearic Islands (Spain). He worked as a Postdoctoral Researcher at the Delft University of Technology (the Netherlands). He is currently an Assistant Professor and Deputy Director of the Laboratory of Environmental Radioactivity (LaboRA) at the University of the Balearic Islands. His research interests focus on theoretical quantum mechanics and environmental radioactivity.



**Fernando Vega Martínez** has a degree in chemistry from Valladolid University (Spain) and he is a radiopharmacy specialist, who trained at Son Dureta Hospital on the Balearic Islands (Spain). At present, he is responsible for the radiopharmacy service at Son Espases University Hospital, Balearic Islands (Spain).



**Víctor Cerdà Martín** leads the group of analytical chemistry, automation, and environment of the University of the Balearic Islands. He is also the head and founder of the spin-off Sciware Systems, S.L. His main line of research is focused methodologies of analysis based on flow techniques and their application to the determination of environmental parameters. He is also editor, author, and coauthor of numerous books, book chapters, and research articles.



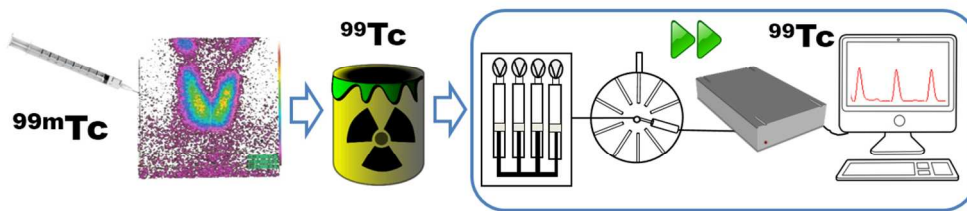
This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

**Fully automated system for  $^{99}\text{Tc}$  monitoring in hospital and urban residues: a simple approach to waste management**

Journal:	<i>Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID	ac-2017-00184c.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Villar, Marina; Hospital Universitari Son Espases Borràs, Antoni; University of the Balearic Islands, Physical Department Avivar, Jessica; University of the Balearic Islands, Chemistry Vega, Fernando ; Hospital Universitari Son Espases Cerdà, Víctor; Universitat de les Illes Balears, Química Ferrer, Laura; University of the Balearic Islands, Chemistry

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



211x55mm (150 x 150 DPI)

1  
2  
3 Fully automated system for  $^{99}\text{Tc}$  monitoring in hospital and urban residues:  
4  
5  
6 a simple approach to waste management  
7  
8

9 *Marina Villar*<sup>1</sup>, *Antoni Borràs*<sup>2</sup>, *Jessica Avivar*<sup>2</sup>, *Fernando Vega*<sup>1</sup>, *Víctor Cerdà*<sup>3</sup>, *Laura*  
10 *Ferrer*<sup>2\*</sup>  
11

12 <sup>1</sup>*Radiopharmacy Service, Son Espases Hospital, Cra. Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca,*  
13 *Spain.*  
14

15 <sup>2</sup>*Laboratory of Environmental Radioactivity - LaboRA, University of Balearic Islands Cra.*  
16 *Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain.*  
17

18 <sup>3</sup>*Laboratory of Environmental Analytical Chemistry – LQA<sup>2</sup>, University of the Balearic Islands,*  
19 *Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain.*  
20

21 *\*corresponding author: laura.ferrer@uib.es*  
22  
23  
24  
25

26 **ABSTRACT**  
27

28  $^{99}\text{Tc}$  is an artificial beta emitter widely used in nuclear medicine for diagnostic tests. A  
29 fully automated and rapid system for  $^{99}\text{Tc}$  monitoring is introduced with the aim to  
30 improve hospital residues management. This system can also be helpful to control urban  
31 wastewater. Figures of merit similar to those obtained with liquid scintillation counting  
32 were achieved exploiting a simple, economic and portable system with  
33 spectrophotometric detection. Combination of flow analysis techniques, i.e. Lab-on-valve  
34 (LOV) and multisyringe flow injection analysis (MSFIA), with a selective resin (WBEC-  
35 resin) enables the analysis to be performed in a short time, achieving high selectivity and  
36 sensitivity levels. After elution with  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $3 \text{ mol.L}^{-1}$ ),  $^{99}\text{Tc}$  is derivatized with 1,5-  
37 diphenylcarbohydrazide (DPC) and finally detected by a miniaturized fiber optic CCD  
38 spectrophotometer at 520 nm, exploiting a long path-length liquid waveguide capillary  
39 cell (LWCC) of 100 cm path length. The proposed method was optimized by  
40 experimental design, achieving a LOD of 4 ng of  $^{99}\text{Tc}$  (2.5 Bq), a reproducibility of 6%,  
41 and a resin durability of 78 injections. The microcolumn allows to preconcentrate up to  
42 100 mL of sample without deterioration of the analytical signal. The automated system  
43 was successfully applied to hospital residues and urban wastewater, and the attained  
44 recoveries were between 90-110%.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

59 **Keywords:**  $^{99}\text{Tc}$ ; hospital residues; urban residues; flow techniques; spectrophotometric  
60 detection.

## 1. INTRODUCTION

Technetium was the first radioactive element to be produced artificially [1].  $^{99m}\text{Tc}$  is used in nuclear medicine for a wide variety of diagnostic tests because of its short half-life, low emitted  $\gamma$ -ray energy, and its stability to chemically bind to many active biomolecules.  $^{99m}\text{Tc}$  decays to  $^{99}\text{Tc}$  which is a pure  $\beta$ -emitter ( $\beta_{\text{max}} = 294 \text{ keV}$ ).  $^{99}\text{Tc}$  is considered a very important dose contributor in environmental risk assessment because of its long half-life, high abundance, and high mobility [1,2]. In recent years, the use of  $^{99m}\text{Tc}$  for medical purposes as a diagnostic tool has considerably augmented and consequently the waste generation of  $^{99}\text{Tc}$  has also been increased. These residues comprise urine and feces, which are the excretion mode of  $^{99}\text{Tc}$  from the human body, and the remains of the  $^{99m}\text{Tc}$  eluates decayed to  $^{99}\text{Tc}$ , which had not been used. In those hospitals where  $^{99m}\text{Tc}$  is employed, there are management systems that include the storage of its radioactive residues until its decay in  $^{99}\text{Tc}$  [3]. These management systems are also used to monitor the activities of  $^{99}\text{Tc}$  released into the environment.

The main common radiometric techniques used to quantify  $^{99}\text{Tc}$  are Geiger–Müller and liquid scintillation counters (LSC). Both need chemical separation of  $^{99}\text{Tc}$  from the matrix and other radionuclides, especially  $\beta$ -emitters, before measurement. The main reason is the interference of matrix components and spectrometric interferences [2]. The selection of LSC implies the use of scintillation cocktail and the generation of a considerable waste volume. ICP-MS is the most widely and frequently used mass spectrometric method for measurement of  $^{99}\text{Tc}$ , with a special focus on environmental samples, due to its extremely low LODs [4]. Highly efficient methods for  $^{99}\text{Tc}$  isolation from interferences of isobars and molecular ions before measurement are mandatory. In any case, the separation process is tedious and time-consuming and it is usually manually carried out. Recently, a novel methodology to perform the analysis without purification of matrix components was successfully applied to radiopharmaceutical waste. The proposed system offers better analytical results than existing LSC methods for  $^{99}\text{Tc}$  determination with significant savings in analysis cost and time [5].

Flow analysis techniques have allowed the automation of a huge number of analytical protocols, providing the partial or complete automation of the analytical methods. This automation allows a significant decrease in time of analysis, the reduction of sample and reagent consumption, and a minimal handling of samples and standards, improving the safety of the analyst [6]. Particularly, in the radiochemical field various

1  
2  
3 methodologies dedicated to determine specific radionuclides were automated by flow  
4 techniques [7-9]. There already exist several partially automated methodologies, in which  
5 the pretreatment is automated although the detection is performed off-line, using ICP-MS  
6 [10] or LSC [11,12] as detectors.  
7  
8  
9

10 Flow-based radionuclide sensors achieve the maximum degree of automation, since  
11 comprising the extraction material in combination with the radioactivity on-line  
12 detection. Sensor captures the radionuclide from the matrix, given selectivity, and can  
13 reach very low detection limits [13]. A sequential flow system has been fully automated  
14 to determine  $^{99}\text{Tc}$  in nuclear waste. This method achieves a detection limit of 2 ng  $^{99}\text{Tc}$ ,  
15 exploiting TEVA resin and using 15 min stopped-flow for detection with a LSC [14]. A  
16 sensor developed for  $^{99}\text{Tc}$  quantification in groundwater samples can detect pertechnetate  
17 to levels 10-times below the drinking water reference level of 0.033 Bq.mL $^{-1}$  [15]. Other  
18 example of total automation is a system for  $^{99}\text{Tc}$  determination in nuclear waste, which  
19 incorporates microwave-assisted sample preparation with an automated anion exchange  
20 column separation and detection using a flow-through solid scintillator detector. This  
21 sensor reaches a detection limit of 23.5 Bq.mL $^{-1}$ , and an analysis frequency of 5 h $^{-1}$  [16].  
22 A novel spectroelectrochemical sensor has been designed, that combines three modes of  
23 selectivity (electrochemistry, spectroscopy, and selective partitioning) into a single sensor  
24 to substantially improve the selectivity for  $^{99}\text{Tc}$  detection. Its LOD range is in the  
25 nanomolar order [17].  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 Among the flow techniques, multisyringe flow injection analysis (MSFIA) [18] is  
40 a powerful tool combining the multichannel operation and high injection throughput of  
41 Flow Injection Analysis (FIA) [19] with the robustness and versatility of Sequential  
42 Injection Analysis (SIA) [20]. The MSFIA device consists of an automatic burette, which  
43 can be equipped with up to four syringes, which are used as liquid drivers. Each syringe  
44 has a three-way solenoid valve at the head, which facilitates the application of  
45 multicommutation schemes. The Lab-on-valve (LOV) [21], consists in a monolithic piece  
46 commonly fabricated in poly(methyl-methacrylate) (PMMA) which is mounted atop a  
47 multi-position selection valve used in SIA systems. LOV provides sample handling in a  
48 sequential injection mode, allowing a precise liquid manipulation. One of the LOV  
49 channels can serve as microcolumn to carry out the bead injection (BI) process. The  
50 combination MSFIA-LOV provides the full automation of all the steps including the  
51 replacement of the packing of the column.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The use of a selective resin to extract and pre-concentrate  $^{99}\text{Tc}$  enables the sample  
4 clean-up, avoids interferences given selectivity and increases the concentration factor,  
5 contributing sensitivity to the method. In these resins, the extractant is immobilized on  
6 the surface of inert resin beads, corresponding to the organic phase and stationary phase  
7 in solvent extraction and chromatography, respectively. Weak Base Extraction  
8 Chromatographic (WBEC) resin is mainly used for plutonium(IV), technetium and to a  
9 certain extent for tetravalent actinides. Its selectivity is similar to that of TEVA resin but  
10 the elution is facilitated [22]. This resin is based on a mix of tertiary octyl and  
11 decylamines, known as Alamine®336. WBEC resin fixes technetium that is found as  
12 pertechnetate ion. Under oxidizing conditions, technetium(VII) will exist as the  
13 pertechnetate ion ( $\text{TcO}_4^-$ ) in aqueous solution or as volatile  $\text{Tc}_2\text{O}_7$  in the absence of water,  
14 for example, in ashing or drying conditions [23]. Once eluted, pertechnetate ion is  
15 derivatized with 1,5-diphenylcarbohydrazide (DPC) to form a colored complex which can  
16 be detected by spectrophotometry at 520 nm. The mechanism of the Tc-DPC reaction is  
17 based on the reduction from Tc(VII) to Tc(IV) by DPC and subsequent complex  
18 formation [24].  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 Thus, the main objective of this work is to develop a fully automated system for  
33  $^{99}\text{Tc}$  monitoring in a simple and fast way to become a sensitive and inexpensive tool for  
34 hospital and urban residues management. The proposed system incorporates the  
35 extraction and pre-concentration of  $^{99}\text{Tc}$  from matrix sample, the derivatization to form a  
36 colored complex, until the on-line UV-Vis detection. All these steps are possible thanks  
37 to the hyphenation of flow analysis techniques, a selective resin and a long path-length  
38 liquid waveguide capillary cell (LWCC) of 100 cm connected with a miniaturized CCD  
39 spectrophotometer.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

## 49 **2. EXPERIMENTAL**

### 50 **2.1. Reagents and equipment**

51 All solutions were prepared from analytical grade reagents with Millipore quality water.  
52 Reagents and materials include  $\text{HNO}_3$  60%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96% from Scharlau  
53 (Barcelona, Spain), acetonitrile (AcN) and ammonia solution 25% from Merck  
54 (Darmstadt, Germany), 1,5-diphenylcarbohydrazide (DPC) from Sigma Aldrich, WBEC  
55 resin 50–100  $\mu\text{m}$  (Triskem International, France) and glass fiber prefilters from Millipore  
56 (Madrid, Spain).  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The Son Espases Hospital Radiopharmacy Service weekly receives a  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$   
4 generator (Ultra-Technekow<sup>TM</sup> DTE- Technetium  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  Generator of Mallinckrodt), to  
5 perform the programmed explorations. On the arrival day, a 5 mL vial with an average  
6 activity of 77.7 GBq obtained from generator elution, was kept aside during a month to  
7 ensure that all  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  had decayed into its daughter  $^{99}\text{Tc}$ . Previously to the decay process,  
8 the eluates from generator were measured by a dose calibrator, Capintec CRC-25R, to  
9 ensure the activity content, and they were taken as working standard solutions. These  
10 solutions were prepared by dilution in  $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ .  
11  
12

13  
14 According to  $^{99}\text{Mo}$  branching decay, 12.5% decays to  $^{99}\text{Tc}$  and 87.5% to  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .  
15 Taking into account the  $^{99}\text{Mo}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  activities, the hour and date of the certified  $^{99}\text{Mo}$   
16 activity and of the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  elution, the  $^{99}\text{Tc}$  activity can be exactly calculated [12].  
17  
18

19 To make the previous assays of retention and elution of the WBEC resin,  $^{99}\text{Tc}$  was  
20 determined using a liquid scintillation counter Tricarb 2810-TR (Perkin Elmer), with a  
21 window comprising 1–600 channels for counting. The counting time was set to 1800 s in  
22 normal mode, attaining an average efficiency of 95% calculated from a known  $^{99}\text{Tc}$   
23 activity. Maintaining the same conditions in terms of concentration and volume sample,  
24 as well as the proportion sample: scintillation cocktail, it was possible to work with  
25 constant quenched samples, so quench curve was not necessary [11]. The liquid  
26 scintillation cocktail Ultima Gold<sup>TM</sup> was purchased from Perkin Elmer.  
27  
28

## 29 2.2. Samples

30  
31 *Nuclear Medicine residues.* Liquid residues from Nuclear Medicine Service of Son  
32 Espases Hospital (Palma de Mallorca, Spain) are collected into three-leaded container of  
33 35 hectolitres. These residues are composed by urine of the treated patients and cleaning  
34 water from the Radiopharmacy area, which does not always contain radioactivity. Before  
35 emptying a deposit, its activity is estimated assuming that all the activity injected to the  
36 patients treated during the period of deposit filling is contained on it. Once a deposit is  
37 closed, it remains stored until its evacuation for at least 3 months. Taking into account  
38 that among the radionuclides used in the service,  $^{131}\text{I}$  has the higher energy and half-life,  
39 its activity is estimated and used as reference before discharging the residues to the public  
40 sewage system. This activity should be lower than a limit calculated for each hospital  
41 following local legislation [25].  
42  
43

44  
45 *Laboratory waste.* Radiopharmacy laboratory of Son Espases Hospital has a waste drum  
46 to discard all non-radioactive solvents and solutions with decayed radioisotopes.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*Technegas filter.* Technegas Generator is able to heat up to 2550°C under ultrapure argon in the presence of  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$  producing an aerosol of carbon microparticles labeled to  $^{99m}\text{Tc}$  called Technegas [26]. Then, the patient inhales these particles to carry out a study that provides information about the pulmonary ventilation quality of the patient. The cotton filter captures the exhaled Technegas so, after it decays,  $^{99}\text{Tc}$  is supposed to be present in a high concentration because each filter is used approximately fifty times before its replacement. To extract  $^{99}\text{Tc}$  from the filters, they were submerged in 0.1 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for 21 hours.

*Urban wastewater.* Outside of the hospital, in the wastewater treatment plant (EDAR-1, Palma Mallorca), samples were collected from the inlet and outlet streams, and analyzed immediately after collection.

All final solutions have a HNO<sub>3</sub> concentration of 0.1 mol.L<sup>-1</sup> in order to guarantee the retention. Given the importance to ensure the oxidized state of Tc in the samples, increasing amounts of peroxide added to the sample were tested, and the lowest, which allows the highest analytical signal, was selected. Thus, 6% (v/v) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% was added to samples where Tc could not be in an oxidized state as Tc(VII), e.g. liquid residues of Nuclear Medicine Service in which the presence of radiopharmaceuticals with SnCl<sub>2</sub> as reducing agent can reduce the Tc, or urban residual water with reducing conditions. Samples pre-treatments are summarized in Table 1.

### 2.3. Manifold and software

The LOV-MSFIA system is shown in Figure 1. The LOV microconduit (Sciware Systems, Bunyola, Spain), fabricated from methacrylate encompassing eight integrated microchannels (1.5 mm i.d./16.0 mm length, excepting the microcolumn made of 3.2 mm i.d.), was mounted atop of an eight-port multiposition selection valve (Multiburette 4S; Crison Instruments, Spain). The central conduit (CC) of the LOV unit connects to the syringe pump, via a holding coil (HC), in order to address the liquids toward the peripheral ports of the unit (1–8), through the sequential aspiration mode.

One of the LOV channels (port 1) served as microcolumn for the renewable beads of WBEC resin. A glass fibre prefilter was placed in the outlet of the column with the purpose of retain the sorbent within the channel of the LOV while allows the solution to flow freely. A suspension of WBEC resin was contained in a 5.0 mL plastic syringe, which was mounted vertically (port 6) of the LOV. Peripheral ports configuration was as



1  
2  
3 follows: (1) microcolumn, (3) waste, (5) conditioning solution ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ ), (6)  
4 resin reservoir, (7) sample input, (8) eluent ( $3 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NH}_4\text{OH}$ ).  
5  
6

7 A burette module (BU4S; Crison Instruments) with programmable flow rates  
8 equipped with four glass syringes: S1 of 10 mL containing water (carrier); S2 of 5 mL  
9 with  $5.4 \text{ mol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; S3 of 10 mL containing AcN 0.15% (v/v) and S4 of 2.5 mL with  
10 DPC 0.27% in AcN 50% (v/v). The syringes have a three-way solenoid valve (N-  
11 Research, USA) at the head, which facilitates the application of multicommutation  
12 schemes (on: in-line flow; off: to reservoir). An additional solenoid valve (V) was used  
13 to drive the flow coming out the LOV (port 1) in the desired way, i.e. to neutralize, form  
14 the complex and go to the detector or to waste (see Fig. 1). The flow network, including  
15 the reaction coils (RC), was constructed with 0.8 mm i.d. polytetrafluoroethylene (PTFE)  
16 tubing, except for the holding coil connected to the LOV, which was constructed with 1.5  
17 mm i.d. PTFE tubing, corresponding to a volume of 15 mL. All connections were made  
18 by means of polyvinylidene fluoride (PVDF) connectors, except cross-junctions (C),  
19 which were made of methacrylate.  
20  
21

22 The detection system is composed of a deuterium–halogen light source (Mikropack,  
23 Germany), two optical fibers of 600  $\mu\text{m}$  i.d. (Ocean Optics, Dunedin, USA), a flow cell  
24 made from type II Teflon AF long path-length liquid core waveguide capillary cell (World  
25 Precision Instruments, FL, USA) (internal diameter 550  $\mu\text{m}$ , effective path length  
26  $100.0 \pm 0.5 \text{ cm}$ , internal volume 240  $\mu\text{L}$ ), and a USB2000 miniaturized optical fiber  
27 spectrometer (Ocean Optics), connected to a computer via an USB interface. The  
28 absorbance was measured at 520 nm.  
29

30 Instrumental control, data acquisition and processing were performed using the  
31 software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). This software, based on dynamic link  
32 libraries (DLLs) at 32 bits, allows using a single and versatile application with the  
33 implementation of specific DLLs attending the configuration of the assembled flow  
34 analyser.  
35  
36

## 37 2.4. Analytical procedure

38 The complete operational sequence for  $^{99}\text{Tc}$  isolation, pre-concentration, derivatization  
39 and detection is listed in Table 2.  
40  
41

42 Briefly, on a first step, the resin is loaded into channel 1 of the LOV that serves as  
43 microcolumn and then it is conditioned prior the sample loading. Afterwards, sample  
44 solution in a final  $\text{HNO}_3$  concentration of  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  is passed through the column. Then,  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

<sup>99</sup>Tc is eluted in a basic medium, which must be subsequently acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in order to form the <sup>99</sup>Tc–DPC complex. Since the kinetic reaction is slow, and to achieve a good sensitivity, a 5 min wait is necessary. In this step, the <sup>99</sup>Tc–DPC complex is stored in RC2 by stopping flow. Finally, the complex is sent to the UV-Vis detector propelled by AcN. The microcolumn is rinsed with water after each elution in order to ensure the <sup>99</sup>Tc retention in the next run by avoiding any trace of eluent on it. Likewise, the LWCC was cleaned with AcN 15% (v/v) between samples.

## 2.5. Optimization of experimental conditions

Multivariate design provides relevant knowledge on the effect of variables within the entire selected experimental domain. The response estimate variance in every point of the domain is better than that obtained by univariate methods [27]. Firstly, a two-level full factorial screening test was carried out in order to find out which variables had a significant effect on the response signal. After that, a response-surface design was performed in order to obtain the critical values of each significant variable.

The software package Statistica 6.0 was used to design the matrix assays and analyse the results.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The LOV-MSFIA system consists of two modules, a multisyringe burette composed of four glass syringes to drive fluids into the system and a multiposition switching valve module where LOV is mounted. This hyphenation accomplishes the compactness of the system, while ensuring repeatability of microfluidic manipulations, which provides robustness to the process. Additionally, it also guarantees a drastic saving of reagents and resin, and therefore reduction of waste generation. The use of spectrophotometric detection exploiting a LWCC, provides high sensitivity in an economic way. These characteristics provide a high degree of automation. The full automation of the system is achieved including the analytical steps of extraction, pre-concentration, elution, adjust the acidity, detection, data processing, and renewal of the microcolumn, which are reflected in the following sections.

### 3.1. WBEC resin features

WBEC resin was selected to extract and preconcentrate <sup>99</sup>Tc because it offers an interesting selectivity for Tc, with an easygoing elution. WBEC resin is able to separate

1  
2  
3 Tc, Pu and to a certain extent, tetravalent actinides, being its selectivity similar to TEVA  
4 resin. Although Pu and the tetravalent actinides are eluted in acidic conditions, Tc is,  
5 according to the manufacturer recommendation, eluted with 1 mol.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH allowing  
6 a high degree of Tc selectivity [22].  
7  
8  
9

10 A liquid scintillation counter was used to ensure the results of the retention and  
11 elution assays, since the conditions for derivatization and on-line detection were not yet  
12 optimized. After each assay, the final dilution was adjusted to be the same, to avoid  
13 quenching, and always working with concentrations which do not affect the scintillation  
14 cocktail.  
15  
16  
17  
18

19 By conditioning the resin with nitric acid, the nitrate is linked to the quaternary  
20 amine and acts as counter ion for the anionic interchange with the pertechnetate ion  
21 (TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>). The high retention of Tc(VII) by the WBEC resin at low acidity is due to the  
22 high selectivity of the Alamine®336 composition for the pertechnetate anion over the  
23 anion of the acid. With the aim to study the medium of retention, preliminary tests with  
24 concentration of nitric acid varying between 0.001 and 1 mol.L<sup>-1</sup> were performed. The  
25 best results were obtained using 0.1 mol.L<sup>-1</sup> nitric acid as retention medium, which is in  
26 concordance with the values proposed by the manufacturer [22].  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 Once the retention medium was established, the elution process from WBEC resin  
34 was studied in a multivariate approach, since the manufacturer recommend at least 12 mL  
35 of 1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH solution for the elution [22], and this volume is too high for  
36 developing an automated system exploiting on-line detection. First, a screening test of  
37 volume (range: 0.5 – 1 mL) and concentration (range: 1 – 4 mol.L<sup>-1</sup>) of NH<sub>4</sub>OH as eluent  
38 was made indicating that both variables are significant as well its interaction. Although  
39 an increase of value in both variables was suggested by the results, the experimental  
40 domain of volume was kept, in order not to increase the sample/reagent plug to be sent to  
41 the detector. Thus, a Central Composite Design was carried out varying the ammonia  
42 concentration between 3 – 6 mol.L<sup>-1</sup>, and volume of ammonia between 0.5 – 1 mL.  
43 Optimal values of 0.65 mL of 3 mol.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH was used in the proposed system. Matrix  
44 of experimental design, ANOVA table and response-surface graphic are available as  
45 supplementary material.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

56 The use of a selectivity resin provides then the matrix sample clean-up as well as  
57 the pre-concentration of technetium.  
58  
59  
60

### 3.2. Optimization of system variables

1  
2  
3 The optimization of the system variables includes the derivatization conditions, the on-  
4 line detection, and the manifold and flow cell cleaning steps. From here, the volumes of  
5 the syringes to be used in the burette were selected in order to reach the proportions of  
6 reagents necessary for the reaction to occur, always maintaining the minimum volume of  
7 the sample/reagent plug to be sent to the detector. Therefore, only concentrations have  
8 been optimized.  
9

10  
11  
12  
13  
14 The derivatization conditions were optimized in a multivariate approach. First, a  
15 screening test of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (range: 3 – 5 mol.L<sup>-1</sup>) required to develop the  
16 reaction between Tc and DPC, and concentration of DPC (range: 0.1 – 0.5 %) was made.  
17 The obtained results indicate that both variables significantly affect the reaction of  
18 derivatization. Hence, a Doehlert Design was carried out taking into account the screening  
19 results, i.e. since the DPC concentration had an effect higher than the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 concentration, an experimental matrix was constructed with 5 and 3 levels, respectively.  
21 Thus, experimental domains were set between 4 – 6 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration and  
22 0.05 – 0.45 % DPC concentration. Matrix of experimental design, ANOVA table and  
23 response-surface graphic are available as supplementary material. Critical values as  
24 maximum response were found for both variables: 5.4 mol.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.27 % DPC  
25 concentrations were used for further assays.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 Because the reaction kinetics is not very fast, a compromise decision was made  
36 between the sensitivity required to apply the system to waste samples and the frequency  
37 of analysis. Thus, after performing tests between 3 and 7 min, a reaction time of 5 min  
38 was set.  
39  
40  
41

42 Finally, several assays were performed in order to clean the system. The  
43 microcolumn was rinsed with water after each elution to ensure the <sup>99</sup>Tc retention in the  
44 next sample by avoiding any trace of ammonia (eluent) on it. The LWCC was cleaned  
45 with AcN 15% (v/v) between samples.  
46  
47  
48

49 All optimal values are listed in Table 3.  
50  
51

### 52 3.3. Analytical parameters 53

54 *Working range.* Mass calibration curves (net absorbance versus mass in ng of Tc(VII)),  
55 with a statistically satisfactory fit were obtained ( $y = (0.0015 \pm 0.0001)x - (0.011 \pm 0.003)$ ,  
56  $R^2 = 0.9962$ ,  $n = 5$ ). Under the optimal conditions described above, calibration curves are  
57 linear over the concentration range 4 – 500 ng Tc(VII). Since the proposed method allows  
58 varying the pre-concentration sample volume, mass calibration curves were performed  
59  
60

1  
2  
3 because the volume to be concentrated can be chosen by the analyst depending on the  
4 characteristics of the sample.  
5

6 *Sample volume.* Different sample volumes were tested. For the case of samples with high  
7  $^{99}\text{Tc}$  content, 100  $\mu\text{L}$  of sample were satisfactorily analyzed, comparing with a sample of  
8 3 mL and an equal mass of Tc(VII). On the other hand, up to a 100 mL volume was tested  
9 successfully (96% recovery comparing with a sample of 3 mL and an equal mass of  
10 Tc(VII)). Therefore, since the eluate volume was set to 0.65 mL, the proposed system is  
11 able to dilute the sample, if the sample volume is comprised between 0.1 – 0.65 mL, or  
12 to pre-concentrate the sample, if its volume is between 0.65 – 100 mL.  
13

14 *Detection and quantification limits.* Following the IUPAC recommendation, LOD and  
15 LOQ were calculated, respectively, as three-times and ten-times the standard deviation of  
16 ten replicates of the reagent blank divided by the slope of the calibration curve. Thus,  
17 LOD of 4 ng (2.5 Bq) and LOQ of 13 ng (8 Bq)  $^{99}\text{Tc}$  were achieved.  
18

19 *Sample concentration.* Taking into account the mass of  $^{99}\text{Tc}$  that can be determined  
20 between 0.1 and 100 mL sample volume without losing extraction efficiency, the sample  
21 concentration to be analyzed can vary widely between 40.6 ng  $\text{L}^{-1}$  and 40.6  $\mu\text{g L}^{-1}$ .  
22

23 *Durability and repeatability.* Both parameters are related since they report the feasible  
24 number of consecutive analyses without changing the column packing. Thus, a  
25 repeatability of 6.0% expressed as RSD (n=10) was calculated from the first ten  
26 extractions, while up to 78 consecutives extractions gave recoveries of 98%, loading 3  
27 mL of sample in each extraction, allowing a notable cost reduction.  
28

29 *Reproducibility.* A precision of 6.1% expressed as RSD (n=5) was calculated from 5  
30 extractions during five different working days, changing the column packing and using  
31 the same working standard solution of  $^{99}\text{Tc}$ .  
32

33 *Analysis frequency.* Depending on the sample volume to pre-concentrate, an extraction  
34 frequency between 4 – 9  $\text{h}^{-1}$  is achieved. This means that by making three replicates per  
35 sample, the sample analysis frequency is 1 – 3 samples per hour.  
36

37 Analytical parameters are summarized in Table 4.  
38

### 39 3.4. Application to real samples

40 This method was evaluated by analysing different waste samples. With the exception of  
41 the Technegas filters, the rest of the samples have very complex matrices and contained  
42 not only  $^{99}\text{Tc}$ . They were taken in hospital waste-containers or in a wastewater treatment  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 plant. Therefore, by using a selective resin, pertechnetate ion is isolated prior detection  
4 avoiding interferences and at the same time, it can be pre-concentrated.  
5

6 All samples were spiked with known  $^{99}\text{Tc}$  activities. The added activities were  
7 selected in order to work over the whole working range. Results have shown good  
8 recoveries, between 90 and 110 % (Table 5).  
9  
10  
11

#### 12 13 14 15 **4. CONCLUSIONS**

16  
17 The hyphenation of two multicommutated flow analysis techniques, i.e. Lab-on-valve  
18 (LOV) and multisyringe flow injection analysis (MSFIA), has allowed the development  
19 of an analytical system for  $^{99}\text{Tc}$  monitoring in complex matrix samples with a high degree  
20 of automation. This fully automated system is capable to carry out all analytical steps of  
21 extraction, pre-concentration, elution, acidity adjustment, detection, renewal of the  
22 microcolumn, system cleaning and data acquisition and processing. Several advantages  
23 can be highlighted: a short response time, which allows a fast management of the residues;  
24 a good selectivity due to the use of selective resin, that ensures the results obtained with  
25 a non-selective detector; a good sensitivity thanks to the pre-concentration step and the  
26 employ of a long path-length liquid waveguide capillary cell (LWCC), which allows to  
27 determine above 4 ng of  $^{99}\text{Tc}$  (2.5 Bq) enough to make a responsible waste management;  
28 and a good reproducibility due to the automatic packing of the microcolumn and the  
29 precision of the flow techniques used. Moreover, the low cost of implementation and use  
30 of the system thanks to the decrease in reagents volumes and the use of a CCD  
31 spectrophotometer as detector should be pointed out. In addition, due to the use of  
32 minimum amounts of resin, which can be reused up to 78 times, the cost per analysis  
33 decreases. The compactness and miniaturization of the system that allows its assembly in  
34 a little place, near the waste warehouses. Finally, the full automation ensures the  
35 minimization of handling by the analysts and increases their safety. All these  
36 characteristics make the proposed system a very good tool to monitor  $^{99}\text{Tc}$  in hospital and  
37 urban residues.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Acknowledgements

Financial support from Spanish State Agency for Research (AEI) cofinanced by European Regional Development's funds (FEDER), are gratefully acknowledged (CTM2013-42401-R, AEI/FEDER, UE).

## Figure Captions

**Fig. 1.** Diagram of LOV-MSFIA system for  $^{99}\text{Tc}$  on-line spectrophotometric determination. AcN: acetonitrile; C: connector; CC: central conduit; CCD: charge coupled device spectrophotometer; DPC: 1,5-diphenylcarbohydrazide; HC: holding coil; LOV: lab-on-valve; LWCC: long wave capillary cell; RC: reaction coil; V: solenoid valve.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

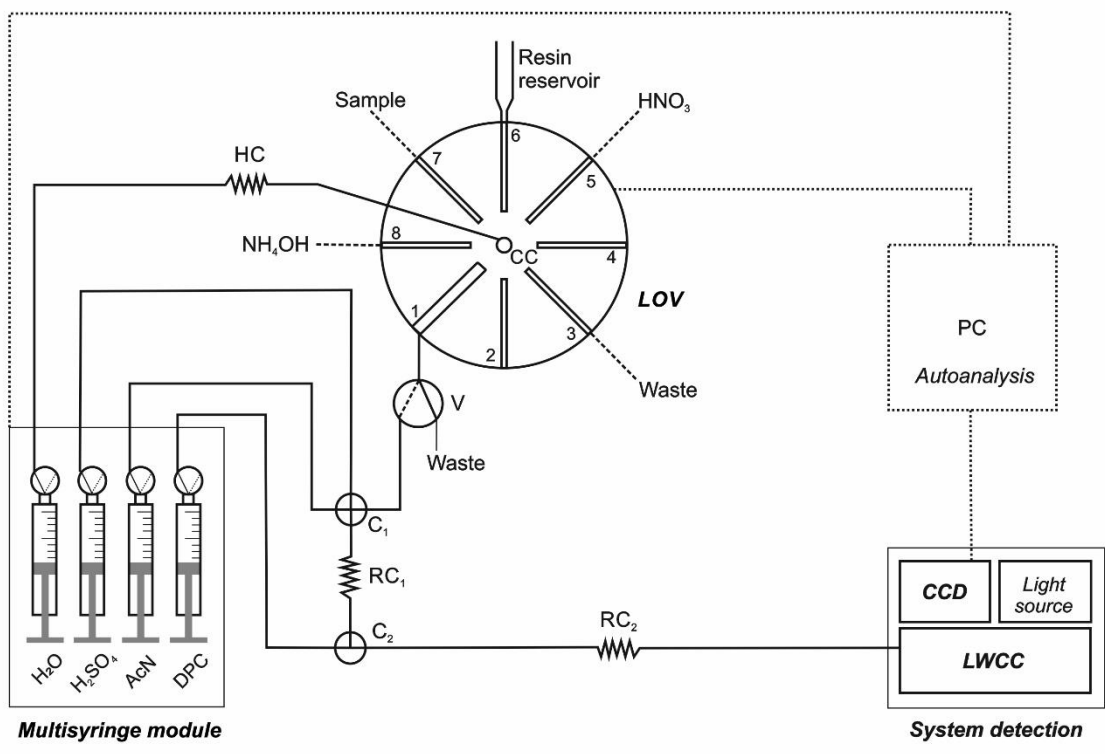


Fig. 1.



Table 1. Residual sample pretreatments.

Sample*	Original sample pH	Filter type	Oxidation to Tc(VII)**
Laboratory waste of Radiopharmacy Service	2.0	---	No
Lixiviated of Technegas filter	2.2	Glass filter	No
Liquid residues of Nuclear Medicine Service	8.1	0.45 $\mu\text{m}$ pore size filter	Yes
Urban residual water - Inlet stream	7.5	0.45 $\mu\text{m}$ pore size filter	Yes
Urban residual water - Outlet stream	6.5	0.45 $\mu\text{m}$ pore size filter	Yes

\* All final solutions have a  $\text{HNO}_3$  concentration of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .

\*\* To make oxidation, 6% (v/v) of  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% was added.

**Table 2.** Analytical procedure for the fully automated  $^{99}\text{Tc}$  determination exploiting a LOV-MSFIA system coupled to LWCC-UV-VIS spectrophotometer.

Analytical step	Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	LOV port	MSFIA				V
			S1	S2	S3	S4	
1. Conditioning of WBEC resin							
a. Loading 2 mL HNO <sub>3</sub> 0.1 mol.L <sup>-1</sup>	5	5	On	Off	Off	Off	Off
b. Delivering on the column	2	1	On	Off	Off	Off	Off
2. Sample loading							
a. Loading X mL sample into HC	2	7	On	Off	Off	Off	Off
b. Delivering on the column	2	1	On	Off	Off	Off	Off
3. Elution of $^{99}\text{Tc}$ and neutralization							
a. Loading 0.65 mL 3 mol L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> OH	5	8	On	Off	Off	Off	Off
b. Elution and neutralization with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5.4 mol.L <sup>-1</sup>	1.8	1	On	On	Off	Off	On
4. Derivatization with DPC							
a. Delivering 0.9 mL DPC and mixing with acidified $^{99}\text{Tc}$	1.5	--	Off	Off	Off	On	Off
b. Waiting 300 sec for reaction	--	--	Off	Off	Off	Off	Off
5. Transfer to the detector	2	--	Off	Off	On	Off	Off
6. Rinsing WBEC resin	2	1	On	Off	Off	Off	Off
7. Cleaning LWCC	2	--	Off	Off	On	Off	Off

Table 3. Optimized values of variables that affect the proposed system.

<b>Variable</b>	<b>Optimized values</b>
Eluent concentration, NH <sub>4</sub> OH	3 mol L <sup>-1</sup>
Eluent volume, NH <sub>4</sub> OH	0.65 mL
DPC concentration	0.27 %
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentration	5.4 mol.L <sup>-1</sup>
Reaction time	5 min

Table 4. Analytical parameters.

Analytical parameter	Value
Detection limit (ng)	4
Quantification limit (ng)	13
Determination coefficient ( $r^2$ )	0.9914
Repeatability (%) (n=10)	6.0
Reproducibility (%) (n=5)	6.1
Resin durability (injections)	78
Pre-concentration volume (mL)*	Up to 100
Extraction frequency ( $h^{-1}$ )**	4 – 9
Linear working range (ng)	4 – 500

\*depending on the Tc content of the sample

\*\*depending on the sample volume to pre-concentrate.

Table 5.  $^{99}\text{Tc}$  determination by a fully automated system applied to hospital and urban residues samples (n=3).

Sample	Sample volume (mL)	Add (ng)	Found (ng)	Recovery (%)	Sample activity concentration (Bq.mL <sup>-1</sup> )
Nuclear Medicine liquid residues	4	0	281 ± 1	--	44.2
		328	575 ± 17	90	--
Laboratory waste	5	0	76 ± 1	--	9.6
		183	255 ± 3	98	--
Technegas filter	1	0	15 ± 2	--	9.4
		142	145 ± 9	91	--
Urban wastewater - Inlet Stream	100	0	< LOQ	--	<0.1*
		28	27 ± 1	95	--
Urban wastewater - Outlet Stream	100	0	< LOQ	--	<0.1*
		71	78 ± 3	110	--

\*LOQ 0.1 Bq.mL<sup>-1</sup>

## References

- [1] Hu, Q. Technetium. In: Radionuclides in the Environment. Atwood, D.A. (ed.), Wiley & Sons, Chichester, UK, **2010**, pp 217-224.
- [2] Shi, K.; Hou, X.; Roos, P.; Wu W. Determination of technetium-99 in environmental samples: a review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 709, 1–20.
- [3] Real Decreto 1836/1999, por el que se aprueba el Reglamento sobre instalaciones nucleares y radiactivas. BOE nº 313, de 31 de diciembre de 1999.
- [4] Kim, C.K.; Kim, C.S.; Rho, B.H.; Lee, J. I. Rapid determination of  $^{99}\text{Tc}$  in environmental samples by high resolution ICP-MS coupled with on-line flow injection system. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, 250, 421–427.
- [5] Khan, M.; Um, W. Liquid scintillation counting methodology for  $^{99}\text{Tc}$  analysis: a remedy for radiopharmaceutical waste. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 9054–9060.
- [6] Cerdà, V.; Ferrer, L.; Avivar, J.; Cerdà, A. *Flow Analysis: A practical guide*, 1st Ed., Elsevier Science Ltd., Amsterdam, The Netherlands, 2014.
- [7] Grate, J.W.; Egorov, O.B. Automating analytical separations in radiochemistry. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 779A–788A.
- [8] Fajardo, Y.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Gómez, E.; Cerdà, V.; Casas, M. Automation of radiochemical analysis by applying flow techniques to environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 1399–1408.
- [9] Kołacińska K.; Trojanowicz, M. Application of flow analysis in determination of selected radionuclides. *Talanta* **2014**, 125, 131–145.
- [10] Rodríguez, R.; Leal, L.; Miranda, S.; Ferrer, L.; Avivar, J.; García, A.; Cerdà, V. Automation of  $^{99}\text{Tc}$  extraction by LOV prior ICP-MS detection: application to environmental samples. *Talanta* **2015**, 133, 88–93.
- [11] Villar, M.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Borràs, A.; Vega, F.; Cerdà, V. Automatic in-syringe dispersive liquid-liquid micro-extraction of  $^{99}\text{Tc}$  from biological samples and hospital residues prior liquid scintillation counting. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 5571–5578.
- [12] Villar, M.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Galmés, M.; Vega, F.; Cerdà, V. Automatic and simple method for  $^{99}\text{Tc}$  determination using a selective resin and liquid scintillation detection applied to urine samples. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 5491–5498.
- [13] Grate, J.W.; Egorov, O.B.; O'Hara, M.J.; DeVol, T.A. Radionuclide sensors for environmental monitoring: from flow injection solid-phase absorptiometry to

1  
2  
3  
4 equilibration-based preconcentrating minicolumn sensors with radiometric detection.  
5  
6 Chem. Rev. **2008**, 108, 543-562.

7  
8 [14] Egorov, O.B.; O'Hara, M.J.; Ruzicka, J.; Grate, J.W. Sequential injection separation  
9 system with stopped-flow radiometric detection for automated analysis of  $^{99}\text{Tc}$  in nuclear  
10 waste. Anal. Chem. **1998**, 70, 977-984.

11  
12 [15] O'Hara, M.J.; Burge, S.R.; Grate, J.W. Quantification of technetium-99 in complex  
13 groundwater matrixes using a radiometric preconcentrating minicolumn sensor in an  
14 equilibration-based sensing approach. Anal. Chem. **2009**, 81, 1068–1078.

15  
16 [16] Egorov, O.B.; O'Hara, M.J.; Grate, J.W. Automated radioanalytical system  
17 incorporating microwave-assisted sample preparation, chemical separation, and online  
18 radiometric detection for the monitoring of total  $^{99}\text{Tc}$  in nuclear waste processing streams.  
19 Anal. Chem. **2012**, 84, 3090–3098.

20  
21 [17] Chatterjee, S.; Bryan, S.A.; Seliskar, C.J.; Heineman, W.R. Three-component  
22 spectroelectrochemical sensor module for the detection of pertechnetate ( $\text{TcO}_4^-$ ). Rev.  
23 Anal. Chem. **2013**, 32, 209–224.

24  
25 [18] Cerdà, V.; Estela, J.M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Becerra, E.; Altimira, P.; Sitjar, P.  
26 Flow techniques in water analysis, Talanta **1999**, 50, 695–705.

27  
28 [19] Ruzicka, J.; Hansen, E.H. Flow injection analyses. I. New concept of fast continuous  
29 flow analysis, Anal. Chim. Acta **1975**, 78, 145–157.

30  
31 [20] Ruzicka, J.; Marshall, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors,  
32 process analysis and laboratory assays, Anal. Chim. Acta **1990**, 237, 329–343.

33  
34 [21] Ruzicka, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and  
35 bead injection, Analyst **2000**, 125, 1053–1060.

36  
37 [22] Triskem International. WBEC resin product sheet (Last access April 2017).

38  
39 [http://www.triskem.com/iso\\_album/ft\\_resine\\_wbec\\_en\\_151210.pdf](http://www.triskem.com/iso_album/ft_resine_wbec_en_151210.pdf)

40  
41 [23] Kieviet, W.J. Technetium radiopharmaceuticals: chemical characterization and  
42 tissue distribution of Tc-glucoheptonate using Tc-99m and carrier Tc-99. Nucl. Med.  
43 **1981**, 22, 703–709.

44  
45 [24] Miller, F.J.; Zittel, H.E. Spectrophotometric determination of technetium with 1,5-  
46 diphenylcarbohydrazide. Anal. Chem. **1963**, 35, 299–301.

47  
48 [25] Real Decreto 783/2001, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre  
49 protección sanitaria contra radiaciones ionizantes, modificado por el RD 35/2009.

50  
51 [26] Data sheet of PULMOTEC™. Spanish Drugs Agency.

1  
2  
3  
4  
5 [27] Araujo, P.W.; Brereton, R.G. Experimental design II. Optimization. Trends Anal.  
6 Chem. **1996**, 15, 63–70.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60