

Método Alternativo para a Determinação de Pureza Radioquímica de MIBI-^{99m}Tc

Elisiane G. Monteiro, Érika V. Almeida, Stella Benedetti, Edson V. Alves, Neuza T. O. Fukumori, Margareth M. N. Matsuda

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, Brasil
Diretoria de Radiofarmácia - DIRF*

Resumo. MIBI-^{99m}Tc (2-Metoxi Isobutil Isonitrila-^{99m}Tc) é indicado para imagens cintilográficas de perfusão miocárdica e acompanhamento de pacientes com risco de infarto. A determinação da pureza radioquímica (PRq) do MIBI-^{99m}Tc nas farmacopéias internacionais envolve a utilização de método cromatográfico em camada delgada em fase reversa (CCD-FR) para determinar % ^{99m}TcO₄⁻, % ^{99m}TcO₂ e % produto e também a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O objetivo deste estudo foi determinar a PRq no MIBI-^{99m}Tc por método alternativo ao descrito nas farmacopéias internacionais. Foram utilizadas cromatografia em papel (CP) e sílica gel impregnada em fibra de vidro (ITLC-SG) com fase móvel acetato de etila:metanol (8:2) e cromatografia em camada delgada (CCD-SG) com solução salina 0,9%. Os resultados de % produto, %^{99m}TcO₄⁻ e %^{99m}TcO₂ obtidos por CCD-FR foram (97,98 ± 0,07)%, (1,49 ± 0,07)% e (0,53 ± 0,06)%, respectivamente. Na CP, ^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂ possuem R_f = 0,0 e a porcentagem de impurezas foi (2,70 ± 0,33)%, com pureza radioquímica de (97,31 ± 0,33)%. Em ITLC-SG, somente ^{99m}TcO₂ permanece na origem (R_f = 0,0), obtendo-se (0,69 ± 0,08)%. Entretanto, devido à interrupção na fabricação do suporte cromatográfico ITLC-SG, não será mais possível a sua utilização. Neste trabalho foi possível demonstrar que o controle de qualidade do MIBI-^{99m}Tc pode ser realizado por CP (% Impurezas) e CCD-SG (%^{99m}TcO₄⁻) como método alternativo ao descrito nas farmacopéias.

Palavras-chave: medicina nuclear, MIBI-^{99m}Tc, radiofármaco, pureza radioquímica.

Alternative method for determination of radiochemical purity of ^{99m}Tc-MIBI

Abstract. ^{99m}Tc-MIBI (^{99m}Tc-2-Metoxisobutylisonitrile) is prescribed for scintigraphy images of myocardial perfusion and assessment of patients with myocardium infarct at risk. The determination of the radiochemical purity (RCP) of ^{99m}Tc-MIBI in international pharmacopeias involves the use of a chromatographic method in thin layer with reverse phase (TLC-RP) for determination of % ^{99m}TcO₄⁻, % ^{99m}TcO₂ e % product and also the analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). The aim of this work was to determine radiochemical purity (RCP) in ^{99m}Tc-MIBI by an alternative method to that described in international pharmacopeias. Paper chromatography (PC) and instant thin layer chromatography (ITLC-SG) with ethyl acetate: methanol (8:2) as mobile phase and thin layer chromatography (TLC-SG) with 0.9% saline were used. The results of % product, %^{99m}TcO₄⁻ and %^{99m}TcO₂ obtained by TLC-RP were (97.98 ± 0.07)%, (1.49 ± 0.07)% and (0.53 ± 0.06)%, respectively. In PC, ^{99m}TcO₄⁻ and ^{99m}TcO₂ have R_f = 0.0 and the percentage of impurities was (2.70 ± 0.33)%, while the radiochemical purity was (97.31 ± 0.33)%. In ITLC-SG, only ^{99m}TcO₂ remains at the origin (R_f = 0,0) with (0.69 ± 0.08)%. However, since there was the interruption in the manufacture of ITLC-SG, it was necessary to look for other stationary phases. In this work it was demonstrated that the quality control of ^{99m}Tc-MIBI can be performed by PC (% Impurities) and TLC-SG (%^{99m}TcO₄⁻) as an alternative method for the determination of radiochemical purity.

Keywords: nuclear medicine, ^{99m}Tc-MIBI, radiopharmaceutical, radiochemical purity.

1. Introdução

Os radiofármacos de Tecnécio- ^{99m}Tc são amplamente utilizados para fins de diagnóstico pelas propriedades físicas favoráveis do radioisótopo (emissor gama puro com meia vida física de aproximadamente 6 horas). O MIBI- ^{99m}Tc (2-Metoxi Isobutil Isonitrila- ^{99m}Tc) é indicado para obtenção de imagens de perfusão miocárdica e acompanhamento de pacientes com risco de infarto [1-4].

A determinação de pureza radioquímica (PRq) é um importante parâmetro de qualidade para assegurar a eficácia e segurança de seu uso *in vivo*, uma vez que as impurezas radioquímicas podem alterar a biodistribuição dos radiofármacos e fornecer imagens com baixa resolução causando diagnóstico incorreto [5]. Em geral, a PRq exigida deve ser superior a 90%. As impurezas radioquímicas decorrentes de marcação inadequada do ^{99m}Tc com o reagente liofilizado MIBI são o pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o óxido de tecnécio ($^{99m}\text{TcO}_2$) [2-4]. A determinação de PRq do MIBI- ^{99m}Tc nas farmacopéias internacionais (americana e européia) envolve a utilização de método cromatográfico em camada delgada em fase reversa (CCD-FR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG), em que se inclui a ITLC-SG (sílica gel impregnada em fibra de vidro) e cromatografia em papel (CP), são largamente utilizadas na determinação de PRq. ITLC-SG apresenta maior facilidade em seu manuseio, porém teve recentemente a sua produção descontinuada [4-6].

O objetivo deste estudo foi determinar a PRq no MIBI- ^{99m}Tc por método alternativo (CCD-SG e CP) ao descrito nas farmacopéias.

2. Materiais e Métodos

O reagente liofilizado MIBI foi obtido do IPEN-CNEN/SP. Acetonitrila, metanol, solução de acetato de amônio, tetraidrofurano, acetato de etila foram obtidos da Merck (Alemanha) e solução salina 0,9% do IPEN. A água foi purificada em sistema Elix 10 da Millipore (França). O pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) foi obtido pela eluição de gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ do IPEN-CNEN/SP. Todas as análises foram realizadas em duplicata 30 e 60 minutos após a marcação com atividade de 55,5 MBq, medida no calibrador de dose Capintec CRC-35R.

A amostra foi aplicada com capilar no suporte cromatográfico. Após secagem, as fitas foram

cortadas em segmentos de 1 cm (CCD-FR foi cortada em segmentos de 0,5 cm). Os segmentos foram colocados sequencialmente em tubos para contagem em contador Gamma Cobra II, PerkinElmer. As porcentagens de pureza radioquímica e impurezas foram obtidas a partir das Equações 1 e 2:

(1)

$$\% \text{ PRq} = 100 - (\sum \% \text{ Impurezas}) \quad (2)$$

em que R_f = fator de retardamento

2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A determinação de pureza radioquímica do MIBI- ^{99m}Tc foi realizada utilizando-se os suportes cromatográficos CCD-FR, CCD-SG e ITLC-SG. Na CCD-FR foram determinados $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 0,8$ a $1,0$), $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0,0$ a $0,1$) e produto ($R_f = 0,3$ a $0,6$) utilizando-se mistura de acetonitrila, metanol, acetato de amônio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tetraidrofurano (4:3:2:1). Na CCD-SG ($17,5 \times 1,5 \text{ cm}$) foi determinada a porcentagem de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 1,0$) em NaCl 0,9% enquanto em ITLC-SG ($17,5 \times 1,5 \text{ cm}$) foram determinadas as impurezas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0,0$) em mistura de acetato de etila e metanol (8:2).

2.2 Cromatografia em papel (CP)

A determinação de PRq do MIBI- ^{99m}Tc por CP foi desenvolvida utilizando-se papel Whatman 1MM (W1MM $17,5 \times 1,5 \text{ cm}$) para determinação das impurezas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$) em mistura de acetato de etila e metanol (8:2).

2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise foi realizada em triplicata no cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20AT Prominence (Japão), composto por duas bombas, degaseificador modelo DGU-20A₅, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, coluna cromatográfica de fase reversa Shim-Pack VP-ODS ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), detector UV-visível modelo SPD-M20A e detector de radioatividade Bioscan modelo B-FC-3300. Utilizou-se coluna Shim-Pack VP-ODS ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). $25 \mu\text{L}$ da amostra foram injetados na fase móvel constituída por acetonitrila, sulfato de amônio e metanol (20:35:45) em fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e

gradiente linear de 15 minutos. A porcentagem de PRq foi calculada utilizando-se o programa LCSolutions da Shimadzu.

3. Resultados

Os valores de % PRq, ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ obtidos da análise realizada conforme método descrito nas farmacopéias por CCD-FR 30 e 60 minutos após a marcação estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados de % PRq para MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtida por CCD-FR (valores expressos em média e desvio-padrão).

Suporte	Tempo (min)	% PRq	${}^{99m}\text{TcO}_4^-$	${}^{99m}\text{TcO}_2$
CCD-FR	30	97,83 ± 0,12	1,62 ± 0,05	0,55 ± 0,19
	60	97,98 ± 0,07	1,49 ± 0,07	0,53 ± 0,06

O cromatograma do MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtido por CLAE está mostrado na Figura 1, onde (B) é a ampliação da região compreendida entre 1 e 4 minutos do cromatograma (A).

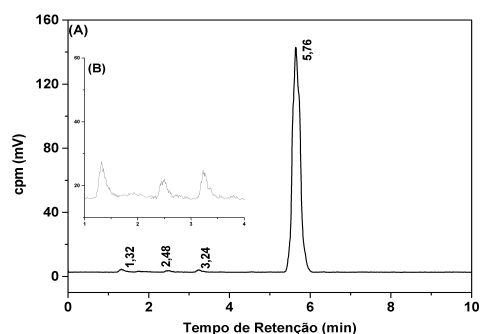


Figura 1. Cromatograma do MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtido por CLAE
Tabela 2. Resultados de tempo de retenção na análise de MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtidos por CLAE

Análitos	Tempo de Retenção (min)
${}^{99m}\text{TcO}_4^-$	1,32
${}^{99m}\text{TcO}_2$	2,48
Pentamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$	3,24
MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$	5,76

Os valores de % PRq e % impurezas obtidos por CCD-SG (Tabela 3) e ITLC-SG e CP (Tabela 4), 30 e 60 minutos após a marcação estão descritos a seguir:

Tabela 3. Resultados de % PRq para MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtida por CCD-SG (valores expressos em média e desvio-padrão).

Suporte	Tempo (min)	% PRq	${}^{99m}\text{TcO}_4^-$
CCD-SG	30	99,57 ± 0,03	0,43 ± 0,03
	60	99,57 ± 0,02	0,43 ± 0,02

Tabela 4. Resultados de % PRq para MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ obtida por CP e ITLC-SG (valores expressos em média e desvio-padrão).

4. Discussão e Conclusão

Os métodos descritos nas farmacopéias internacionais para controle radioquímico do MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ são CCD-FR e CLAE. Os resultados de % produto, ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ obtidos por CCD-FR foram (97,98 ± 0,07)%, (1,49 ± 0,07)% e (0,53 ± 0,06)%, respectivamente. Os resultados obtidos atenderam ao estabelecido nas farmacopéias americana e europeia (> 95% de PRq).

O método por CLAE tem o objetivo de complementar a análise por CCD-FR. A estrutura molecular do radiofármaco MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ consiste de um átomo de ${}^{99m}\text{Tc}$ e seis moléculas de MIBI sendo denominado por alguns fabricantes de Sestamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$ [1]. CLAE realiza a separação entre o produto MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ e as impurezas por diferenças de interação dos analitos com a coluna cromatográfica (tempo de retenção). As principais impurezas formadas na marcação do MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ são ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$, ${}^{99m}\text{TcO}_2$ e Pentamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$ com tempos de retenção 1,32; 2,48 e 3,24, respectivamente (Figura 1 e Tabela 2), sendo que o Pentamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$ é resultante da reação de complexação com apenas cinco moléculas de MIBI. A Farmacopéia estabelece que quando a relação do tempo de retenção do produto (MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$) e da impureza é cerca de 1,2, o pico refere-se ao Pentamibi- ${}^{99m}\text{Tc}$. Os tempos de retenção das impurezas ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ foram confirmados realizando-se a adição de padrão na análise cromatográfica do produto.

Na CP, ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ e ${}^{99m}\text{TcO}_2$ possuem $R_f = 0,0$ e a porcentagem de impurezas foi (2,70 ± 0,33)%. A pureza radioquímica foi de (97,31 ± 0,33)%.

A % ${}^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi determinada por CCD-SG e o resultado máximo foi de (0,43 ± 0,03)% com boa eficiência na separação das espécies radioativas.

Em CCD com suporte ITLC-SG, somente ${}^{99m}\text{TcO}_2$ permanece na origem ($R_f = 0,0$), obtendo-se (0,69 ± 0,08). Entretanto a produção deste suporte foi descontinuada, não sendo possível a utilização deste método para determinar a % ${}^{99m}\text{TcO}_2$.

Neste trabalho foi possível demonstrar que o controle de qualidade do MIBI- ${}^{99m}\text{Tc}$ pode ser realizado por CP (% Impurezas) e CCD-SG (${}^{99m}\text{TcO}_4^-$) como método alternativo ao descrito nas farmacopéias.

Agradecimentos

Ao IPEN e à DIRF pela infraestrutura, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido à Elisiane G. Monteiro e à Érika V. Almeida.

Suporte	Tempo (min)	% PRq	% Impurezas
ITLC-SG	30	99,32 ± 0,08	0,69 ± 0,08
	60	99,29 ± 0,04	0,71 ± 0,04
W1MM	30	97,31 ± 0,33	2,70 ± 0,33
	60	98,99 ± 0,04	1,01 ± 0,04

Referências

- Owunwanne A, Patel M, Sadek S. The handbook of radiopharmaceuticals. Chapman & Hall Medical, 1995.
- Oliveira R, Santos D, Ferreira D, Coelho PMB, Veiga F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. Braz J Pharm Scien 2006;42:151-65.
- Norenberg JP, Vaidya MP, Hladik WB, Pathak DR, Born JL, et al. The effect of selected preparation variables on the radiochemical purity of ^{99m}Tc-Sestamibi. J Nucl Med Technol 2005;33(1):34-41.
- Hung JC, Wilson ME, Brown ML, Gibbons RJ. Rapid preparation and quality control method for Technetium-99m-2-Metoxo isobutyl isonitrile (Technetium-99m-Sestamibi) J Nucl Med 1991; 32 (11): 2162-68.
- Vallabhajosula S, Killeen RP, Osborne JR. Altered Biodistribution of Radiopharmaceuticals: Role of Radiochemical/Pharmaceutical Purity, Physiological, and Pharmacologic Factors. Semin Nucl Med 2010; 40:220-41
- Bozkur MF, Kiratli PO, Konyali D, Metin F. Quality control of instant kit ^{99m}Tc-mercapto acetyl triglycine with inter and intra-operator measurements. Hell J Nucl Med 2009;12 (1):59-62.

Contato:

Elisiane de Godoy Monteiro

E-mail: elisianegmonteiro.farmacia@usp.br