

Otimização das Condições de Análise de CIDG em FDG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Acoplado a Detector Amperométrico Pulsado (DAP)

Thais O. M. de Castro¹, Jair Mengatti¹, Hylton Matsuda¹, Elaine B. de Araújo¹,
Neuza T. O Fukumori¹, Margareth M. N. Matsuda¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
thais.castrom@gmail.com; mmatsuda@ipen.br

RESUMO

A 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxi-D-glicose (FDG) é o principal radiofármaco utilizado para o mapeamento do metabolismo de glicose em vários órgãos por meio de imagens adquiridas por PET em centros de medicina nuclear. As farmacopeias americana e europeia apresentam metodologia para análise de 2-desoxi-2-cloro-D-glicose (CIDG), em caso de uso de HCl na obtenção de FDG. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros do método de análise de CIDG por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector amperométrico pulsado (CLAE-DAP), a saber: preparo de CIDG, temperatura de análise, volume de amostra, fluxo e potencial. Observou-se que a intensidade de pico em $\pm 9,5$ minutos atribuído a CIDG aumentou com a temperatura e o volume de amostra. O aumento do fluxo da fase móvel diminuiu o tempo de retenção. O método é adequado para determinação de carboidratos, como é o caso da impureza da síntese ácida de FDG.

1. INTRODUÇÃO

Fludesoxiglicose (¹⁸F), também conhecida como [18F]-FDG ou FDG, é o radiofármaco utilizado para o mapeamento do metabolismo de glicose no cérebro, doenças do coração, tumores, entre outros, por meio de imagens adquiridas por tomografia por emissão de pósitrons (PET) em centros de medicina nuclear. Quimicamente, trata-se de 2-desoxi-2-(¹⁸F) fluoro-D-glicose, um análogo da glicose que contém um isótopo radioativo emissor de pósitrons, flúor-18, em substituição ao grupo hidroxila na posição 2 da molécula de glicose. O processo de síntese de [18F] FDG tem sido aprimorado desde que foi inicialmente proposto em 1976. O módulo de síntese disponível comercialmente faz uso de método de substituição nucleofílica seguida da hidrólise alcalina ou ácida, extração em cartucho de fase sólida, resultando em síntese de cerca de 30 minutos. A demanda crescente por [18F] FDG requer que o rendimento da reação seja alto e o tempo de síntese seja relativamente curto, seguido por análises rápidas de controle de qualidade, que devem ser realizadas antes da liberação do radiofármaco para uso em humanos [1].

O controle de qualidade para cada lote de [18F] FDG deve contemplar ensaios de pureza radioquímica, pureza radionuclídica, ensaio de endotoxinas bacterianas e de esterilidade. As possíveis impurezas radioquímicas são [18F] fluoreto, [18F] FDM ([18F] fluorodesoximanose), e substâncias parcialmente ou totalmente acetiladas [18F] FDG ([18F] AC). Segundo Mosdzianowski *et al.*, 2002 [2], raramente [18F] FDM é produzido em quantidades consideráveis pois [18F] FDG é estável à epimerização sob condições normais de reação. As impurezas químicas “frias” rotineiramente avaliadas são Kryptofix 2.2.2, acetonitrila e etanol (os dois últimos considerados solventes residuais). Etanol é frequentemente utilizado como radioprotetor para minimizar a decomposição por radiólise de [18F] FDG e por isso é monitorado [3, 4, 5]. A determinação de algumas impurezas químicas como FDG, 2-desoxi-2-cloro-D-glicose (CIDG) e FDM é menos frequentemente realizada, provavelmente por causa da dificuldade em detectar quantidades traço dessas impurezas. Além disso, na hidrólise alcalina não é produzida CIDG, pois esta impureza é gerada exclusivamente em hidrólise ácida com HCl [6].

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica instrumental que pode ser utilizada para a separação de carboidratos em uma mistura complexa. Sabe-se que carboidratos exibem somente uma fraca absorvância na região do espectro eletromagnético, mesmo na região do ultravioleta e medições com detector de índice de refração só podem ser feitas para altas concentrações, porém sob condições fortemente básicas o grupo hidroxil pode ser ionizado e detectado com detector amperométrico triplamente pulsado (DAP) [7]. Nesta técnica, o potencial aplicado dá origem a uma corrente resultante da oxidação de espécies adsorvidas no eletrodo, e a seguir as espécies são desorvidas em um potencial mais anódico, em uma etapa de limpeza e reativação da superfície do eletrodo. Normalmente, o tempo de um ciclo é entre 0,5 e 1 s, que é suficientemente curto para permitir o monitoramento de sistemas de CLAE. Colunas de troca aniônica têm sido utilizadas, possibilitando boa resolução entre as misturas de carboidratos, com a vantagem de que a análise é realizada com fase aquosa. O aumento da temperatura aumenta a resolução por causa do aumento de difusão do analito entre a fase móvel e a estacionária. As farmacopeias americana (USP) e europeia (EP) descrevem a metodologia de análise de FDG, FDM e CIDM e o limite permitido de CIDG em uma produção de FDG na USP é de não mais que 1,0 mg de CIDG no volume total do lote de FDG produzido, e na EP, não mais que 0,5 mg de CIDG na dose máxima de FDG em mL [8, 9]. Entretanto, as monografias internacionais não trazem detalhes dos parâmetros que devem ser utilizados no detector eletroquímico [8, 9]. Alexoff *et al.* descreveram um método muito sensível para a análise de impurezas químicas, incluindo CIDG em FDG [10].

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros do método de análise de CIDG por CLAE-DAP, a saber: fluxo, volume, temperatura e potencial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se CIDG Substância Relacionada de FDG grau USP (padrão farmacopeia americana) no preparo da solução de CIDG 0,1 mg mL⁻¹. O reagente foi dissolvido em água purificada ou em NaOH 0,2 mol L⁻¹. A fase móvel NaOH 0,2 mol L⁻¹ foi preparada com reagente PA, da Merck Millipore e água purificada produzida por equipamento Elix 10, da Merck Millipore.

Para análise das amostras o equipamento utilizado foi o de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu modelo LC-20A, composto de bombas LC 20 AD SP, controlador CBM-20A, degaseificador DGU-20AS, injetor automático SIL20A, forno de colunas CTO-20A, acoplado a um detector eletroquímico Antec modelo Decade II com eletrodo de trabalho de ouro (Au), eletrodo de referência Hy-REF e um eletrodo auxiliar, e coluna de resina de troca iônica fortemente básica de dimensões 250 mm x 4,0 mm, 10 μm (Shimadzu ISA-07/S2504).

Foram avaliados os parâmetros do método de análise de CIDG por CLAE-DAP, a saber: solvente de preparo de CIDG 0,1 mg mL⁻¹, fluxo da fase móvel, volume de injeção de amostra, temperatura do forno de colunas e potencial de oxidação. As faixas de trabalho foram: fluxo de 0,5 a 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 a 100 μL , temperatura do forno de colunas de 25 a 50 °C e potencial de +100 a +1000 mV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os cromatogramas de CIDG 0,1 mg mL⁻¹ dissolvido em água ou em NaOH 0,2 mol L⁻¹, utilizada como fase móvel.

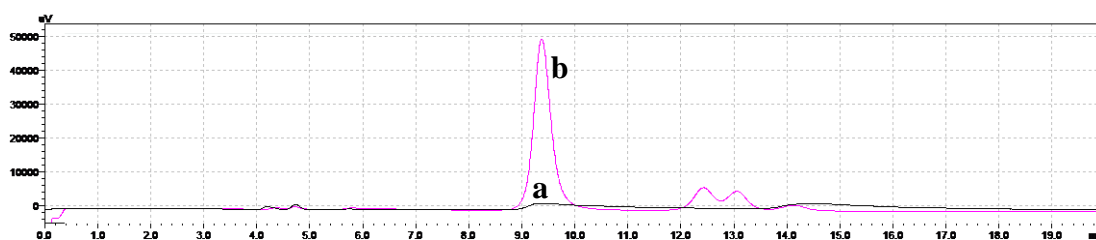


Figura 1: Cromatogramas de CIDG 0,1 mg mL⁻¹ preparado em a) água purificada e b) NaOH 0,2 mol L⁻¹. Condições experimentais: fluxo de 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μL , temperatura de forno de colunas a 40 °C e $E_1 = 0,2 \text{ V}$ ($t_1 = 300 \text{ ms}$), $E_2 = 0,75 \text{ V}$ ($t_2 = 120 \text{ ms}$) e $E_3 = -0,95 \text{ V}$ ($t_3 = 300 \text{ ms}$).

As farmacopeias americana e europeia preconizam o preparo do padrão em água, porém um pico com tempo de retenção em 9,3 minutos com intensidade significativa somente foi observado com o uso de NaOH. Outros picos com intensidade menor foram observados em 4,3; 4,7; 12,5; e 13,2 minutos.

O efeito da temperatura do forno de colunas na análise de CIDG 0,1 mg mL⁻¹ preparado em NaOH 0,2 mol L⁻¹ está representado nas Fig. 2A e 2B, em que estão relacionados os cromatogramas e as intensidades do pico de maior intensidade, respectivamente.

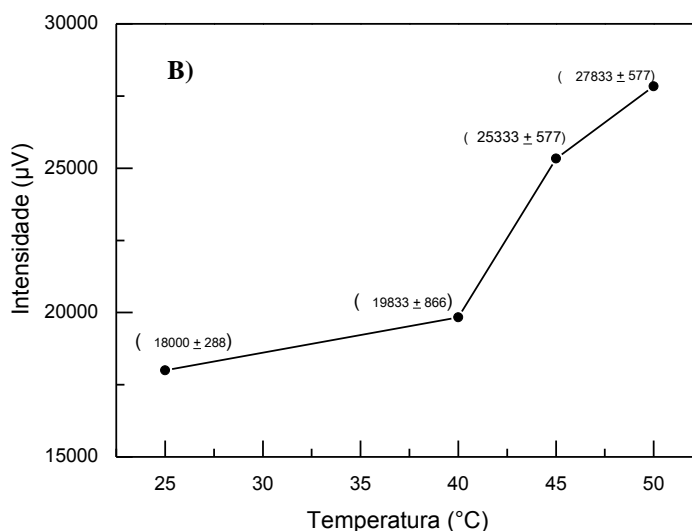
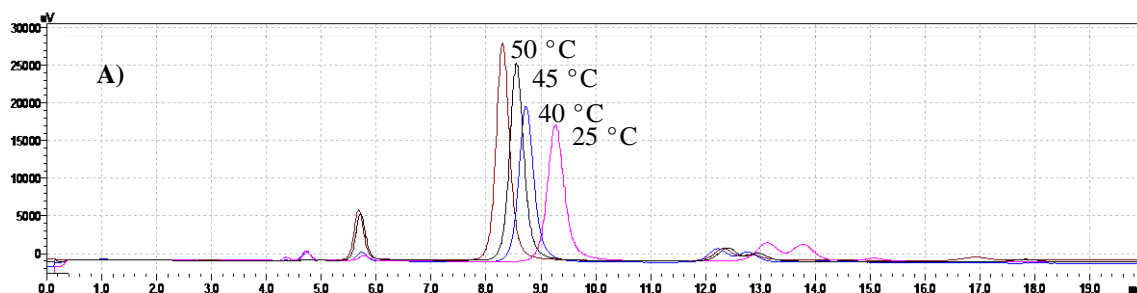


Figura 2: Efeito da temperatura do forno de colunas (25, 40, 45 e 50 °C) na análise de CIDG 0,1 mg mL⁻¹ preparado em NaOH 0,2 mol L⁻¹. A) Cromatogramas; B) Intensidade do pico com tempo de retenção de 9,7 para 25 °C; 8,7 para 40 °C; 8,6 para 45 °C e 8,3 para 50 °C minutos. Condições experimentais: fluxo de 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e E₁ = 0,2 V (t₁ = 300 ms), E₂ = 0,75 V (t₂ = 120 ms) e E₃ = -0,95 V (t₃ = 300 ms).

A variação de temperatura afeta a resposta de detectores eletroquímicos devido à sua influência sobre a taxa de difusão das moléculas na coluna e à velocidade da reação na superfície do eletrodo de trabalho resultando numa alteração na fração de moléculas que passam através da célula e que são oxidados ou reduzidos [11], fazendo com que ocorra variação na intensidade dos picos, como observado na Fig. 2. Os cromatogramas de CIDG em NaOH obtidos com o aumento de temperatura de 25 para 50 °C mostraram que o tempo de retenção do pico de maior intensidade diminuiu de 9,7 para 8,3 minutos e a intensidade aumentou 1,5 vezes. Os picos em 4,7; 5,7; 12,5 e 13,2 minutos também eluíram mais rapidamente e a resolução dos picos tornou-se menor. A estabilização da linha base em 25 °C foi mais demorada. A estabilização da linha base em 50 °C foi mais demorada, o que não foi observado em 25 °C. Não foram feitos experimentos em temperaturas superiores a 50 °C pois pode ocorrer decomposição do CIDG e perda de sensibilidade de detecção [12].

O volume de injeção de amostra de CIDG $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ preparado em NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliado. Os cromatogramas e as intensidades do pico estão representados nas Fig. 3A e 3B, respectivamente.

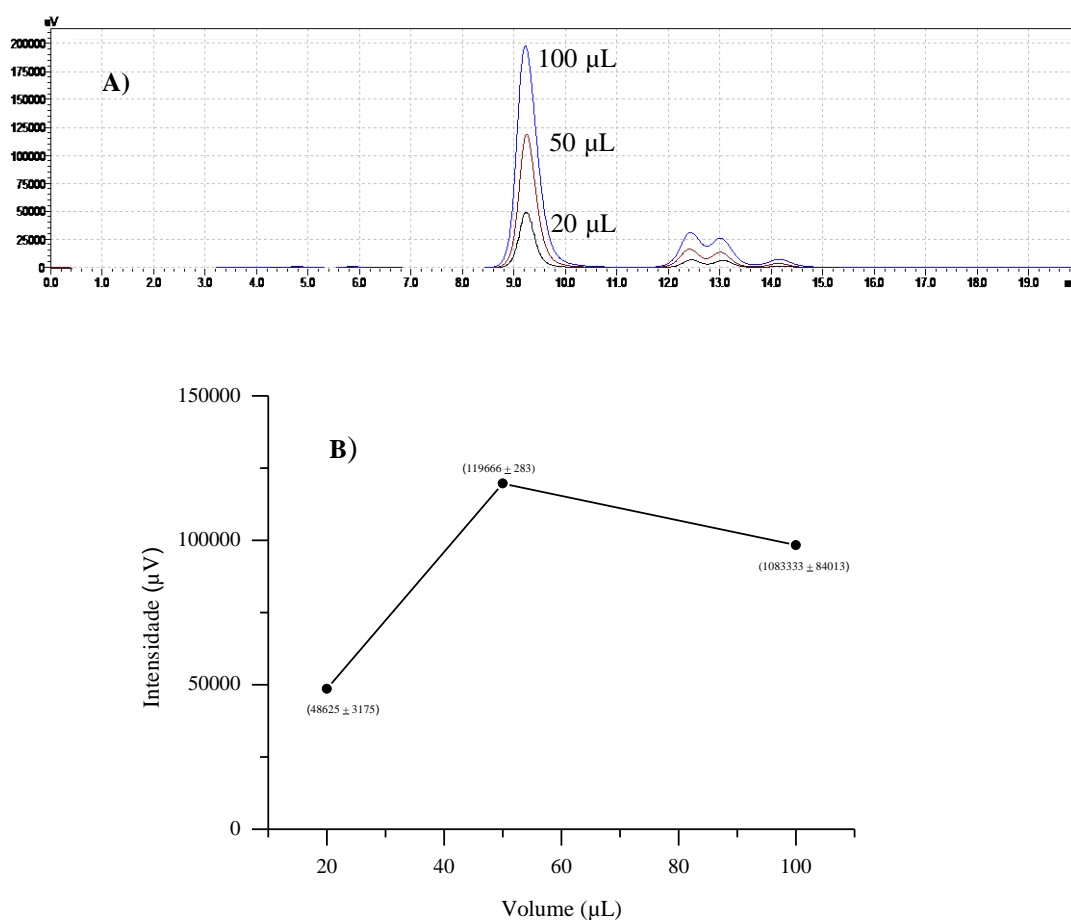


Figura 3: Efeito do volume de injeção (20, 50 e 100 µL) de CIDG $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ preparado em NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A) Cromatogramas; B) Intensidade do pico com tempo de retenção de 9,3 minutos. Condições experimentais: fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno de colunas a 40 °C e $E_1 = 0,2 \text{ V}$ ($t_1 = 300 \text{ ms}$), $E_2 = 0,75 \text{ V}$ ($t_2 = 120 \text{ ms}$) e $E_3 = -0,95 \text{ V}$ ($t_3 = 300 \text{ ms}$).

A intensidade do pico em 9,3 minutos aumentou em cerca de quatro vezes quando o volume de injeção da amostra foi de 20 para 100 µL, indicando que é um parâmetro importante na obtenção de maior sensibilidade. O tempo de retenção de todos os picos observados nas condições experimentais utilizadas não sofreu alteração.

Nas Fig. 4A e 4B estão relacionados os cromatogramas e as intensidades do pico de maior intensidade, respectivamente, com o aumento do fluxo de 0,5 a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

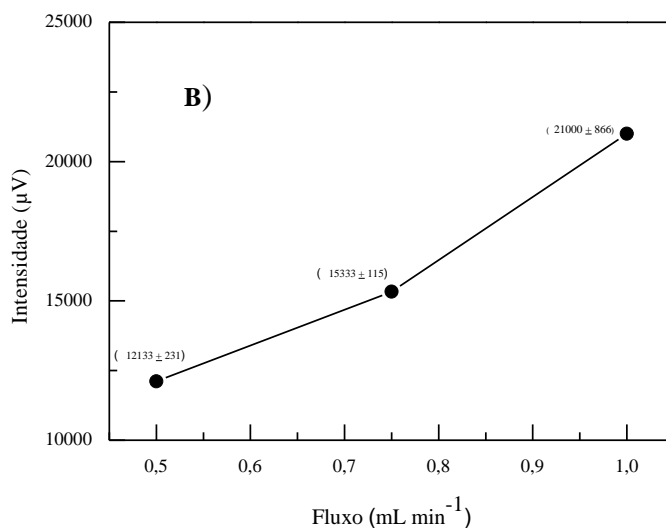
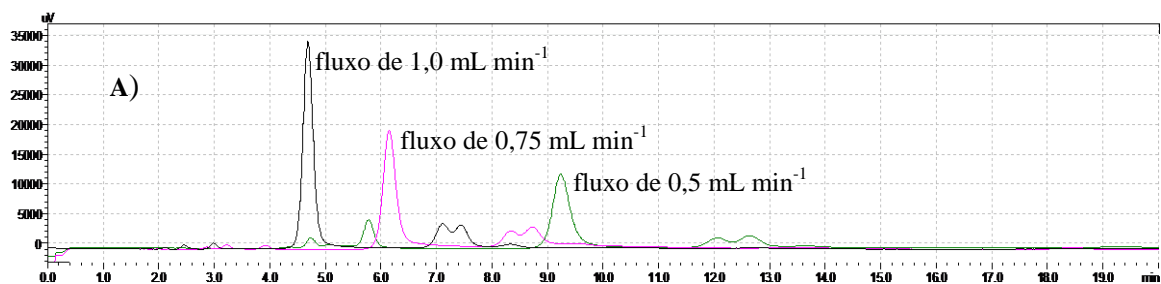


Figura 4: Efeito do fluxo da fase móvel (0,5; 0,75 e 1,0 mL min⁻¹) de CIDG 0,1 mg mL⁻¹ preparado em NaOH 0,2 mol L⁻¹. A) Cromatogramas; B) Intensidade do pico com tempo de retenção de 9,5; 6,3; 4,5 minutos respectivamente. Condições experimentais: volume de injeção de 20 μL, temperatura do forno de colunas a 40 °C e E₁ = 0,2 V (t₁ = 300 ms), E₂ = 0,75 V (t₂ = 120 ms) e E₃ = -0,95 V (t₃ = 300 ms).

O tempo em que a fase móvel permanece em contato com a fase estacionária depende da vazão da fase móvel, provocando um aumento ou não da eficiência da coluna utilizada na análise. Foi observado que o aumento do fluxo de 0,5 para 1,0 mL min⁻¹ tornou o pico com tempo de retenção em 8,8 minutos 1,7 vezes mais intenso e mais fino, provavelmente devido à menor dispersão da amostra. Desta forma, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ o tempo de análise pode ser reduzido de 20 para 10 minutos.

Na Fig. 5 estão relacionadas as intensidades do pico de maior intensidade com o aumento do potencial E₂ de +0,3 a 1,0 V.

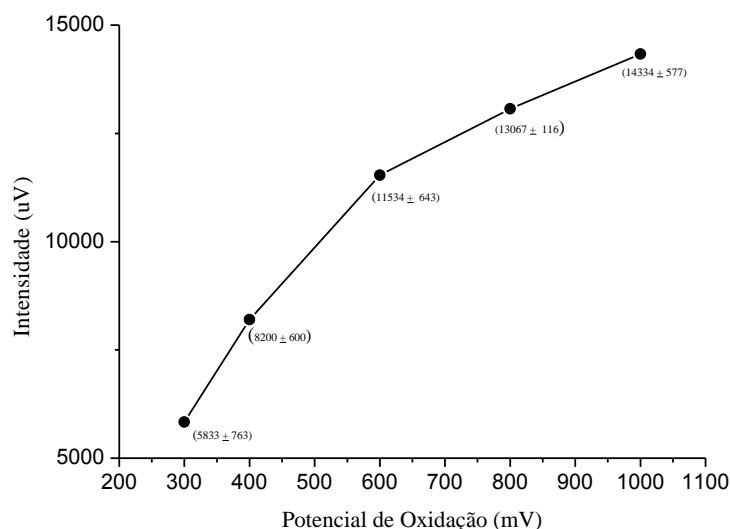


Figura 5: Efeito do potencial de oxidação ($E_2 = +300, 400, 600, 800$ e 1000 mV) de CIDG $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ preparado em NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Intensidade do pico com tempo de retenção de 8,7 minutos. Condições experimentais: volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$, temperatura do forno de colunas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $E_1 = 0,2 \text{ V}$ ($t_1 = 300 \text{ ms}$), ($t_2 = 120 \text{ ms}$) e $E_3 = -0,95 \text{ V}$ ($t_3 = 300 \text{ ms}$).

A utilização de um potencial inicial E_1 de $+0,20 \text{ V}$ contribui para a formação inicial de um óxido na superfície do eletrodo. O potencial E_2 , em um valor mais positivo (E_{oxd}) promove a oxidação do analito de interesse adsorvido na superfície do eletrodo. Potenciais maiores que $+0,80 \text{ V}$ podem resultar na formação de bolhas de O_2 na superfície do eletrodo e, desse modo, interferir no transporte do analito até o eletrodo. Finalmente, o terceiro potencial é aplicado em um valor negativo, para reduzir a camada de óxido formada, regenerando assim a atividade do eletrodo, de modo que o ciclo pode ser repetido [12]. Neste estudo foi utilizado $E_1 = +0,20 \text{ V}$, $t_1 = 300 \text{ ms}$ e o potencial E_2 foi variado entre $+0,3$ e $+1,0 \text{ V}$, $t_2 = 120 \text{ ms}$ e $E_3 = -0,95 \text{ V}$. Até $E_2 = +0,75 \text{ V}$, E_3 foi $-0,95 \text{ V}$, para valores maiores de E_2 , foi acrescido $-0,20 \text{ V}$ ao valor de E_3 . Foi observado que a intensidade do pico em 8,7 minutos aumentou cerca de 2 vezes com a variação do potencial de oxidação (E_2) e não ocorreu variação do tempo de retenção. Além disso, picos de menor intensidade aumentaram com potenciais de oxidação menores que $+0,7 \text{ V}$; quando E_2 foi maior que $+0,7 \text{ V}$, o tamanho e a intensidade desses picos diminuíram.

4. CONCLUSÃO

O método por CLAE-DAP proposto mostrou-se adequado para determinação de carboidratos, como é o caso de CIDG, impureza proveniente da síntese ácida de FDG, com algumas alterações. A preparação do padrão não pode ser realizada conforme o procedimento descrito na farmacopeia europeia. O controle das condições de análise é ponto fundamental para a confiabilidade do método, principalmente temperatura e fluxo da fase móvel que alteram o

tempo de retenção, e o volume de injeção de amostra que altera a área do pico e a sensibilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao financiamento concedido pelo IPEN e a todos do Centro de Radiofarmácia (IPEN-CNEN/SP).

REFERÊNCIAS

1. S. Farn, Y. Yeh, W. Lin, L. Shen, Development and validation of 2-deoxy-2-chloro-D-glucose impurity analysis in [^{18}F]FDG by three potential-time waveforms of high-performance liquid chromatography/pulsed amperometric detection, *Nucl. Med. Biol.*, **36**, pp. 225–231, 2009.
2. C. Lemaire, Ph. Damhaut, B. Lauricella, C. Mosdzianowski, J-L. Morelle, M. Monclus, J. Van Naemen, E. Mulleneers, J. Aerts, A. Plenevaux, C. Brihaye, A. Luxen. Fast [^{18}F]FDG synthesis by alkaline hydrolysis on a low polarity solid phase support, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **45**, pp. 435–447, 2002.
3. J. Koziorowski, A simple method for the quality control of [^{18}F] FDG, *Appl. Radiat. Isot.*, **68**, pp. 1740–1742, 2010.
4. M. S. Jacobson, H. R. Dankwarta, D. W. Mahoney, Radiolysis of 2- [^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) and the role of ethanol and radioactive concentration, *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, pp. 990–995, 2009.
5. M.Y. Kiselev, V. Tadino, Stabilization of radiopharmaceuticals labeled with 18-F, Eastern Isotopes, Inc., US Patent 7018614, 2006.
6. Y. Kuge, K. Nishijima, K. Nagatsu, K. Seki, K. Ohkura, A. Tanaka, M. Sasaki, E. Tsukamoto, N. Tamaki, Chemical impurities in [^{18}F]FDG preparations produced by solid-phase ^{18}F -fluorination, *Nucl. Med. Biol.*, **29**, pp 275-279, 2002.
7. Y. C. Lee, High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis, *Anal. Biochem*, **9**, pp. 151-162, 1990.
8. Fludeoxyglucose F18 injection. *The United States Pharmacopeia*, 37th Ed., and the National Formulary, 24th. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2015.
9. Fludeoxyglucose (18F) injection. *The European Pharmacopeia*. 6th Ed., Strasbourg, 2002.
10. D. L. Alexoff; R. Casati; J. S. Fowler, A. P. Wolf, C. Shea, D. J. Schlyer, C. Shiue. Ion Chromathographic Analysis of high specific activity ^{18}F FDG Preparations and detection of the chemical impurity 2-deoxy-2-chloro-D-glucose, *Appl. Radiat. Isot.* **43**, pp. 1313-1322, 1992.

11. D. J. Miner, Temperature dependence of electrochemical detection for liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **134**, pp. 101-109, 1982.
12. R. Nakao, I. Takehito, Y. Masatoshi, S. Kazutoshi, Simultaneous analysis of FDG, CIDG and Kryptofix 2.2.2 in [¹⁸F] preparation by high-performance liquid chromatography with UV detection, *Nucl. Med. Biol.*, **35**, pp. 239-244, 2008.