



**CONTRÔLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFARMACOS  
— CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA —**

*S. C. MELO, P. S. PODLECH, J. C. BARBÉRIO*

**PUBLICAÇÃO IEA N.º 204**  
Dezembro — 1969

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)  
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"  
SÃO PAULO — BRASIL

CONTRÔLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFÁRMACOS

-CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA-

S.C. Melo, P.S. Podlech, J.C. Barbério

Divisão de Radiobiologia  
Instituto de Energia Atômica  
São Paulo - Brasil

Publicação IEA Nº 204

Dezembro - 1969

Comissão Nacional de Energia Nuclear

Presidente: Prof.Dr. Hervásio Guimarães de Carvalho

Universidade de São Paulo

Reitor: Prof.Dr. Miguel Reale

Instituto de Energia Atômica

Diretor: Prof.Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Conselho Técnico-Científico do IEA

Prof.Dr. José Moura Gonçalves	}	pela USP
Prof.Dr. José Augusto Martins		
Prof.Dr. Rui Ribeiro Franco	}	pela CNEN
Prof.Dr. Theodoretto H.I. de Arruda Souto		

Divisões Didático-Científicas

Divisão de Física Nuclear -  
Chefe: Prof.Dr. José Goldenberg

Divisão de Radioquímica -  
Chefe: Prof.Dr. Fausto Walter de Lima

Divisão de Radiobiologia -  
Chefe: Prof.Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Divisão de Metalurgia Nuclear -  
Chefe: Prof.Dr. Tharcísio D.S. Santos

Divisão de Engenharia Química -  
Chefe: Lic. Alcídio Abrão

Divisão de Engenharia Nuclear -  
Chefe: Engº Pedro Bento de Camargo

Divisão de Operação e Manutenção de Reatores -  
Chefe: Engº Azor Camargo Penteado Filho

Divisão de Física de Reatores -  
Chefe: Prof.Dr. Paulo Saraiva de Toledo

Divisão de Ensino e Formação -  
Chefe: Prof.Dr. Rui Ribeiro Franco

## CONTRÔLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFÁRMACOS

### -CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA-

S.C.Melo<sup>\*</sup>, P.S.Podlech<sup>\*</sup>, J.C.Barbério<sup>\*\*</sup>

#### RESUMO

Os autores, através da técnica de cromatografia em camada delgada em lâminas para microscópio, estabeleceram controle radioquímico para diversos radiofármacos preparados rotineiramente no setor de Radiofarmácia do Instituto de Energia Atômica de S. Paulo.

Hippuran, Hipaque, Iôdotalamato de sódio, Telepaque, Biligrafina, Rosa Bengala e Lipiodol, marcados com Iôdo-131, foram analisados em relação à principal impureza radioquímica, o iôdo inorgânico.

A técnica mostrou-se rápida e sensível em todas as determinações; a análise autorradiográfica, por outro lado, mostrou-se valiosa auxiliar na identificação de frações radioativas não detectadas quimicamente.

#### 1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos marcados com Iôdo radioativo apresentam, como principal impureza radioativa, o Iôdo inorgânico. Este, de acordo com as Farmacopéias, não deve exceder de 5% em relação à atividade total. É, por isto, sumamente importante se dispor de método simples, rápido e preciso para sua identificação e avaliação quantitativa.

Para a maioria dos compostos radioativos, a cromatografia em camada delgada tem-se mostrado altamente satisfatória, não só pela sua simplicidade, como também, por ser mais rápida que a cromatografia em papel e a eletroforese, permitindo maior resolução. Desde 1963 temos usado esta técnica em nossos laboratórios, para o controle de diversos compostos radiofarmacêuticos<sup>(1)</sup>.

\* Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica.

\*\* Disciplina de Radioquímica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Os cromatogramas são desenvolvidos em lâminas para microscópio, recobertas por Silica Gel G e GF<sub>254</sub>, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A revelação ou visualização é feita por meio de reação química e autoradiografia, a fim de localizar as frações dotadas de radioatividade. Através da autoradiografia, é feita a curva de densidade óptica em Densitômetro óptico.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. MATERIAL

Estudamos a aplicação da técnica de controle nos seguintes compostos:

- 1 - HIPPURAN-<sup>131</sup>I (Orto iôdo Hipurato de sódio)<sup>(1,2)</sup>  
Utilizado no estudo da função renal.
- 2 - HIPAQUE-<sup>131</sup>I (3,5 - diacetilamino, 2, 4, 6 - triiôdo benzoato de sódio)<sup>(3)</sup>.  
Utilizado no estudo da função renal.
- 3 - IODOTALAMATO DE SÓDIO-<sup>131</sup>I (5-acetamido, 2, 4, 6 - triiôdo N-metilsoftalamato de sódio)<sup>(4)</sup>.  
Utilizado em medida de filtração glomerular.
- 4 - TEIEPAQUE-<sup>131</sup>I (Ácido 3-amino, 2, 4, 6, - triiodofenil, 2-etilpropanóico)<sup>(5)</sup>.  
Utilizado na visualização da vesícula biliar.
- 5 - BILIGRAFINA (Schering) <sup>131</sup>I (Ácido 3,3-adipoildiimino-bis 2, 4, 6-triidobenzóico).  
Utilizado em colangiografia e colecistografia.
- 6 - ROSA BENGALA-<sup>131</sup>I (Tetracloro-tetraiodo fluoresceína)<sup>(6)</sup>.  
Utilizado em prova de função hepática.
- 7 - LIPIODOL-<sup>131</sup>I (Ésteres etílicos iodados dos ácidos graxos do óleo de papoula).  
Utilizado em linfografias.

## 2.2. MÉTODOS

Várias amostras dos medicamentos radioativos foram analisadas por cromatografia em camada delgada.

A técnica permite a separação do composto radiofarmacêutico do Iôdo inorgânico, na forma de iodeto-131 e iodato-131 - suas principais impurezas - bem como verificar a existência de outras.

Quantidades de cerca de 0,1 - 0,5  $\mu$ l, correspondendo a 1 - 10mg e a 0,1  $\mu$ Ci - 0,5  $\mu$ Ci destes compostos, são aplicados por meio de capilares previamente calibrados, em lâminas de microscópio (2,5 cm por 7,5 cm) cobertas por Sílica Gel ou GF<sub>254</sub> de 250 micra de espessura, de acordo com o processo descrito por Stahl<sup>(7)</sup>.

Emprega-se o espalhador manual, de espessura fixa (250 micra).

As placas são ativadas em estufa a 115°C durante 15 minutos e, depois da aplicação, desenvolvidas em cubetas de 4cm de diâmetro por 9 cm de altura, contendo cerca de 2cm<sup>3</sup> de solvente, adequado a cada caso, após saturação prévia das mesmas durante 30 minutos. As cromatoplasmas secas são expostas por cerca de 2 horas a uma película Kodak-Blue Brand - X Ray Film, desenvolvidas por 3 minutos em Desenvolvedor metol-hidroquinona e fixadas em Fixador-Ácido Acético por 10 minutos.

## 3. RESULTADOS

1 - HIPPURAN-<sup>131</sup>I (Fig. 1)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: N-Butanol/Amônia 2N/Clorofórmio (376:60:70)

Tempo de desenvolvimento: 20 minutos

## VISUALIZAÇÃO

### a) Procedimento químico

Hippuran - p-dimetilamino benzaldeído (solução a 4% em anidrido acético)

Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

### b) Autoradiografia

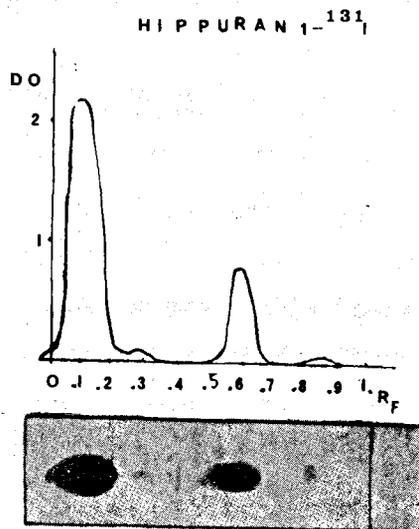
Observa-se o aparecimento de quatro frações radioativas com os seguintes Rf:

Hippuran - 0,10

fração - 0,28

Iodêto - 0,60

fração - 0,85



$1_1 - \text{HIPPURAN-}^{131}\text{I}$  (Fig.  $1_1$ )

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: N-Butanol/Etanol/Amônia (5:1:2)

Tempo de desenvolvimento: 20 minutos

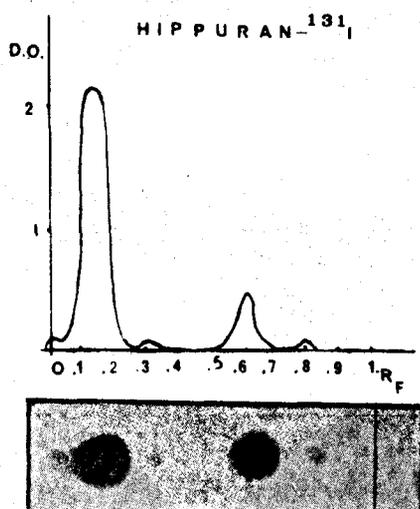
## VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico  
(Idêntico ao anterior)

b) Autoradiografia

Observam-se quatro frações com os seguintes Rf:

Hippuran	- 0,15
fração	- 0,32
Iodêto	- 0,60
fração	- 0,80



2 - HIPAQUE-<sup>131</sup>I (Fig. 2)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: Cloroformio/Metanol (10:4)

Tempo de desenvolvimento: 10 minutos

## VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico

Hipaque - p-dimetilamino benzaldeido em ácido acético (solução a 5%)

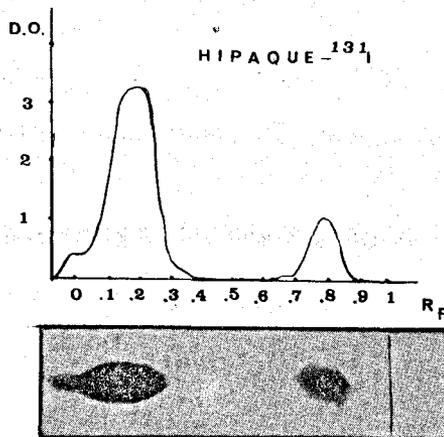
Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

b) Autoradiografia

Observam-se 2 frações radioativas correspondendo aos seguintes Rf:

Hipaque - 0,20

Iodêto - 0,80



3 - IODOTALAMATO DE SÓDIO-<sup>131</sup>I (Fig. 3)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: Cloroformio/Metanol (2:1)

Tempo de desenvolvimento: 10 minutos

VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico

Iodotalamato de Sódio - Ninhidrina (solução a 5% em

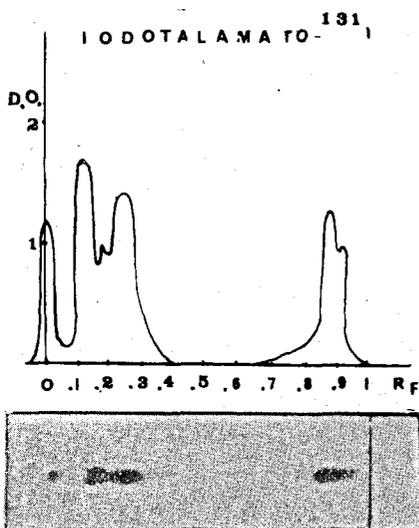
acetona)

Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

b) Autoradiografia

Observam-se frações radioativas sobrepostas correspondendo aos seguintes Rf:

Iodato	- 0,0
Iodotalamato	- 0,14
Iodêto	- 0,87



4 - TELEPAQUE-<sup>131</sup>I (Fig. 4)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: Fenol saturado com água (3:1)

Tempo de desenvolvimento: 20 minutos

VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico

Telepaque - p-dimetilamino benzaldeído (solução a

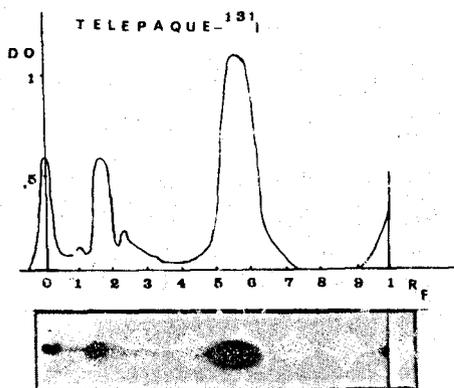
1% em ácido clorídrico normal)

Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

b) Autoradiografia

Observam-se 6 frações radioativas correspondendo aos seguintes Rf:

Iodato	- 0,0
fração	- 0,10
Iodêto	- 0,15
fração	- 0,23
Telepaque	- 0,55
fração	- 1



5 - BILIGRAFINA-<sup>131</sup>I (Fig. 5)

Adsorvente: Sílica Gel GF<sub>254</sub>

Solvente: Clorofórmio/Metanol (2:1)

Tempo de desenvolvimento: 10 minutos

## VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico

Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%

A Biligrafina é observada sob luz ultra-violeta.

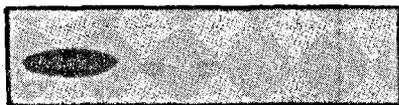
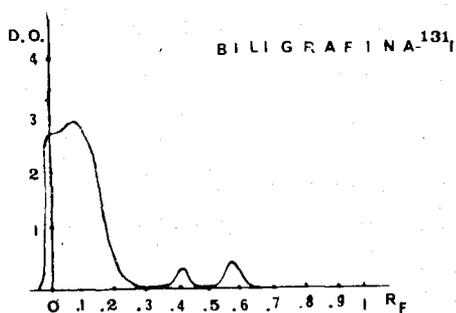
b) Autoradiografia

Observam-se 3 frações radioativas correspondendo aos seguintes R<sub>f</sub>:

Biligrafina - 0,10

fração - 0,40

Iodêto - 0,58



6 - ROSA BENGALA-<sup>131</sup>I (Fig. 6)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: Acetato de butila saturado com Ác. Acético 2 N

Tempo de desenvolvimento: 10 minutos

## VISUALIZAÇÃO

### a) Procedimento químico

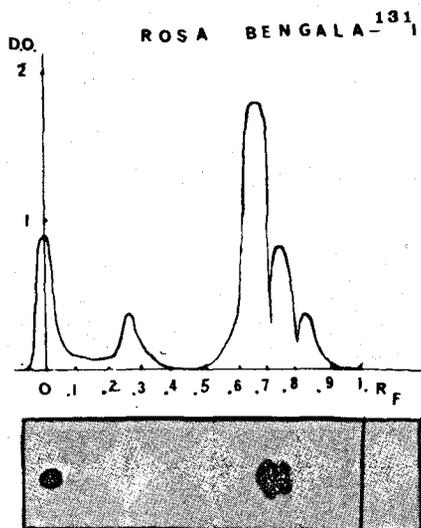
Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

Aparecem 3 componentes visíveis da Rosa Bengala-<sup>131</sup>I, um de côr violeta, outro vermelho e outro rosa pálido.

### b) Autoradiografia

Observam-se 5 frações radioativas, correspondendo aos seguintes R<sub>f</sub>:

1a. fração	- origem
Iodêto	- 0,25
2a. fração (côr violeta)	- 0,65
3a. fração (côr vermelha)	- 0,76
4a. fração (côr rosa-pálido)	- 0,85



7 - LIPIODOL-<sup>131</sup>I (Fig. 7)

Adsorvente: Sílica Gel G

Solvente: Metanol 75%

Tempo de desenvolvimento: 10 minutos

### VISUALIZAÇÃO

a) Procedimento químico

Iodêto - solução de acetato de chumbo a 10%.

côr amarela

Lipiodol - Iôdo/clorofôrmio (solução a 0,5%)

côr castanho

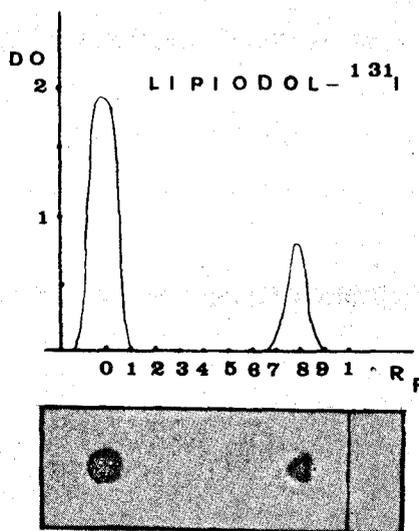
b) Autoradiografia

Observam-se 2 frações correspondendo aos seguintes

Rf:

Iodêto - 0,8

Lipiodol - 0,0



#### 4. COMENTÁRIOS

A finalidade do presente trabalho foi estabelecer um método de controle radioquímico rápido e sensível, por adsorção em

camada delgada.

A escolha do sistema solvente foi feita visando permitir, em primeiro lugar, a separação das impurezas radioquímicas principais, iodeto- $^{131}\text{I}$  e iodato- $^{131}\text{I}$ , bem como possíveis contaminantes de outra natureza. A rapidez da corrida cromatográfica apresenta uma média de 16 minutos e tem permitido a realização de controle radioquímico pouco antes da administração do composto radioativo, de grande importância para o usuário que, por motivos óbvios, utiliza os produtos alguns dias após o recebimento.

As atividades determinadas nas placas cromatográficas mostram-se, essencialmente devidas ao composto estudado e à impureza radioquímica tradicional, iodetos radioativos.

A autoradiografia das placas foi feita para se certificar de que, realmente, apenas as duas frações referidas se encontram presentes. Como se depreende das autoradiografias de Hippuran $^{131}\text{I}$ , Iodotalamato de Sódio $^{131}\text{I}$ , Telepaque $^{131}\text{I}$ , Biligrafina $^{131}\text{I}$  e Rosa Bengala $^{131}\text{I}$ , frequentemente pode-se notar a presença de outros contaminantes radioativos. Entretanto, representam pequena fração do produto principal. Para avaliar essa fração, procede-se a sobre-exposição da emulsão fotográfica, o que permite detectar contaminações em taxas inferiores a 1%.

As determinações quantitativas são realizadas por raspagem da placa e leitura das várias frações em contador de Cintilação, ou através de passagem da placa em mapeador.

Do ponto de vista químico, é difícil estabelecer que compostos, ou mesmo radicais, constituem as frações contaminantes reveladas.

Assim, por exemplo, pode-se pensar em iodo-benzoato no caso de Hippuran, pelo menos para um componente. Para o Telepaque poder-se-ia acreditar na decomposição do mesmo durante a preparação, devido à grande instabilidade dos radiocontrastes. Como já

foi dito em trabalho anterior<sup>(5)</sup> poderia ocorrer a desaminação do produto. No caso da Rosa Bengala é possível distinguir nitidamente quatro frações e, neste caso, o problema se prende à dificuldade de obtenção do produto comercial em grau de pureza elevado. Aliás, é fato conhecido que a estrutura original da Rosa Bengala, tetraiodo-tetracloro fluoresceína, está sempre acompanhada da fração diiodo e mesmo dicloro, o que explicaria, em parte, o aparecimento das frações encontradas.

Observou-se nas diversas partidas estudadas, uma constância na posição das diferentes manchas autoradiográficas, o que permitiu que se estabelecesse a determinação dos diversos  $R_f$  abrindo-se assim a possibilidade de um estudo mais detalhado de cada fração.

Todos os produtos radiofarmacêuticos estudados têm sido utilizados como agentes diagnósticos nas diversas unidades médicas e, os possíveis contaminantes, dada a proporção em que são encontrados, levam a admitir a não interferência nas provas diagnósticas.

## 5. CONCLUSÕES

1. Hippuran, Hipaque, Iodotalamato, Telepaque, Biligráfica, Rosa Bengala e Lipiodol marcadas com  $^{131}\text{I}$  foram analisadas com o objetivo de determinar a presença de iodo inorgânico radioativo, bem como de outras impurezas radioquímicas.
2. A técnica cromatográfica se mostrou rápida e sensível (média de 16 minutos).
3. Através da autoradiografia foi possível revelar frações não identificadas por reveladores químicos.

SUMMARY

The authors have established a technic of radiochemical quality control by means of thin-layer chromatography on microscopic slides, for radiopharmaceutical products prepared routinely in the Radiopharmaceutical Division of the Atomic Energy Institute- São Paulo.

Hippuraa, Hipaque, Iodotalamic acid, Telepaque, Biligrafin, Rosa Bengal and Lipiodol labelled with Iodine- $^{131}$ I have been analysed for their principal radiochemical impurity, that is, inorganic iodine.

The technic is rapid and sensitive. In every run, the autoradiographic analysis has helped to detect radioactive substances which could not be identified by chemical means.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) STRUFALDI, B.; ENGELSTEIN, E.; MITTA, A.E.A. & BARBÉRIO, J.C. - Determinação de impurezas radioativas em compostos marcados com iôdo- $^{131}$ I pelo emprêgo da cromatografia em camada delgada. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, 1965, 6p. (publicação I.E.A., nº 120).
- (2) BARBÉRIO, J.C. - Preparação do orto-iôdo-hipurato de sódio (Hippuran)  $^{131}$ I - Em publicação.
- (3) KERNIANOV, S.; CELIA, A & MITTA, A.E.A. - Preparação de ácido 3,5-diacetilamino 2, 4, 6 - triiodobenzóico  $^{131}$ I. Comisión Nacional de Energia Atômica. República Argentina, B. Aires, 1968 (Informe CNEA - 248).
- (4) ALVAREZ, J.C.; ARRIAGA, C. S. & MITTA, A.E.A - Obtenção do 5 acetamido 2, 4, 6 - triiodo-N-metilisóftalamato de sódio  $^{131}$ I. B. Aires, Comisión Nacional de Energia Atômica, 1968, 8p - (Informe CNEA - 229).
- (5) BARBÉRIO, J.C.; HIRATA, I.S.; NAKAZONE, A & MITTA, A.E.A. Preparação do ácido 3 (3-amino 2, 4, 6 - triiodo fenil) 2-etil propanóico com  $^{131}$ I (Telepaque). Rev. Fac. Farm.. Bioquím. S. Paulo 7(2): 361-70 jul/dez. 1969.

- (6) LIMA, W. e PIERONI, R.R. - Paper Chromatographic Separation of components of Rose Bengal labelled with Iodine-131. Publicação IEA nº 15, 1960.
  
- (7) STAHL, E.: DUNNSCHICHT - Chromatographic. II Standardisierung; Scht**h**armachung, Dokumentation und Anwendung, Chemiker Ztg. 82: 323, 1958.