

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CET PARA DETERMINAÇÃO DE SAH EM RADIOFÁRMACO DE $^{99m}\text{Tc}$

*Érika Vieira de Almeida, Neuza Taeko O. Fukumori, Elisiane Godoy de Monteiro, Jair Mengatti, Marycel Rosa F. F. Barboza, Constancia Pagano G. da Silva, e Margareth Mie N. Matsuda.*

Diretoria de Radiofarmácia - IPEN – CNEN/SP, São Paulo, Brasil  
erikavieira@usp.br, ntfukumo@ipen.br, elisianegodoy@terra.com.br, mengatti@ipen.br, mbarboza@ipen.br, cpgsilva@ipen.br, mmatsuda@ipen.br

**Resumo:** SAH- $^{99m}\text{Tc}$  é um radiofármaco utilizado como agente traçador para determinação de alterações na circulação linfática. Cromatografia por exclusão de tamanho (CET) é uma técnica analítica que permite identificar monômero, dímero e oligômeros. Este trabalho desenvolveu e validou um método cromatográfico para quantificar SAH em RL e SAH- $^{99m}\text{Tc}$ . Foram determinados os principais parâmetros de validação do método de análise de SAH- $^{99m}\text{Tc}$  e SAH por CET. Foram utilizados sistema LC 20AT Prominence (Shimadzu) e coluna Protein-Pack 300SW. O RL foi reconstituído pela adição de 1 mL de eluído contendo 55 MBq de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ . 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram injetados. A fase móvel utilizada foi constituída de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  e  $\text{NaN}_3$  (4:1:1:0,1), (m/m). O cromatograma apresentou picos em 4,35 min, 6,51 min, 7,58 min e 12,45 min atribuídos ao dímero de SAH, SAH de peso molecular intermediário, monômero de SAH e agentes estabilizantes, respectivamente. A curva de calibração encontrado foi  $\text{Área} = 2,931 [\text{SAH}] + 0,128$ ,  $R = 0,9997$ . O LD encontrado foi  $65 \mu\text{g mL}^{-1}$  e LQ  $216 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O valor encontrado para SAH nos kits foi de  $6,20 \text{ mg L}^{-1}$ . Concluiu-se que o método é indicado para a quantificação de SAH em RL usados em medicina nuclear.

**Palavras chave:** Validação, CET, SAH e radiofármaco.

### 1. INTRODUÇÃO

Soro Albumina Humano (SAH) é a proteína que se encontra em maior quantidade dentro do plasma humano (concentração aproximada de  $42 \text{ g L}^{-1}$ ). É sintetizada e secretada pelo fígado, apresenta massa molecular entre 66- 69 kDa e é usada terapeuticamente em solução aquosa (15-20% proteína) [1].

SAH marcado com tecnécio-99m (SAH- $^{99m}\text{Tc}$ ) é um radiofármaco comumente utilizado como agente para determinação de alterações na circulação linfática, diagnóstico de linfedemas primários e secundários, além de aplicação clínica para estudos cardíacos e de placenta. É comercialmente disponível na forma de reagente liofilizado e

sua preparação é feita pela adição de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) a conjuntos de reagentes liofilizados (RL) em que  $^{99m}\text{Tc}$  heptavalente é reduzido e posteriormente ligado à proteína [2- 3].

SAH- $^{99m}\text{Tc}$  é administrado intravenosamente e sua preparação exige alta pureza radioquímica. Quantidades significantes de impurezas podem comprometer a qualidade da imagem e conseqüentemente o diagnóstico [3].

Vários métodos têm sido usados no controle de qualidade da SAH e SAH- $^{99m}\text{Tc}$ . Owunwanne, Patel e Sadek [4] indicaram a cromatografia em papel (CP) para determinar a eficiência de marcação; Farmacopéia Americana (USP) [5] tem sugerido a cromatografia em camada delgada (CCD).

Cromatografia por exclusão de tamanho (CET) é um método físico-químico de separação utilizado para verificar a massa molecular e permite identificar monômero, dímero e oligômeros [3]. Na CET as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho. As moléculas pequenas penetram nos poros pequenos da fase estacionária e ficam por mais tempo retidas enquanto que moléculas grandes permeiam mais rapidamente pela coluna e são eluídas com tempo de retenção menor [6].

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar método cromatográfico para quantificar SAH em reagentes liofilizados (RL) e SAH- $^{99m}\text{Tc}$ . Foram determinados os principais parâmetros de validação do método de análise de SAH- $^{99m}\text{Tc}$  e SAH por CET.

### 2. MATERIAIS

#### 2.1. Reagentes

Utilizou-se padrão SAH (pureza superior a 95%) obtido da Baxter (Canadá), RL de SAH e eluído do gerador foram obtidos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-

IPEN (Brasil). Os reagentes monoidrogeno fosfato de disódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), diidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) foram obtidos da Merck (Alemanha).

## 2.2. Equipamentos

A pesagem do reagente para preparação da solução padrão de SAH foi feita em balança analítica Shimadzu, modelo AW-220. As diluições foram realizadas utilizando-se micropipetas calibradas da marca Eppendorf. Membranas filtrantes de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) foram utilizadas. Sistema Milli-RX 45 da Millipore (França) foi utilizado para obtenção de água purificada.

A análise foi executada em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu, modelo LC-20AT Prominence, composto por duas bombas, degaseificador modelo DGU-20A<sub>5</sub>, injetor automático de amostras modelo SIL-20A, coluna cromatográfica por exclusão de tamanho protein-Pack 300SW (300 mm x 7,5 mm d.i., 10  $\mu\text{m}$ ), forno de coluna (CTO 20A), detector UV-visível modelo SPD-M20A e detector de radioatividade Bioscan modelo B-FC-3300.

## 3. MÉTODO

### 3.1. Cromatografia por exclusão de tamanho (CET)

O RL foi reconstituído pela adição de 1 mL de eluído contendo 55,0 MBq  $\text{mL}^{-1}$  de  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  e o tempo de reação foi de 30 minutos. 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram injetados e a fase móvel utilizada foi constituída de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,30 mol  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,08 mol  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  (0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e  $\text{NaN}_3$  (0,30 mol  $\text{L}^{-1}$ ) nas proporções de 4:1:1:0,1, (m/m). As amostras foram eluídas isocraticamente em fluxo de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e o tempo de cada corrida foi de 20 minutos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e as curvas analíticas foram obtidas no intervalo 0- 20  $\text{mg mL}^{-1}$ . As análises do padrão e do RL de SAH foram monitoradas pelo detector UV em comprimento de onda de 280 nm.

#### 3.1.1. Validação do método

A validação do método analítico desenvolvido para quantificação de SAH em RL e em radiofármaco SAH- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi realizada por meio da determinação dos parâmetros: robustez, especificidade, precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme a resolução nº 899, de 23 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [7].

##### 3.1.1.1. Robustez

A robustez foi avaliada pela alteração dos parâmetros: variação de fluxo da fase móvel (0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2  $\text{mL}$

$\text{min}^{-1}$ ), volume de injeção (10, 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ ), pH da fase móvel (2,00; 3,50; 6,50; 7,50 e 8,00) e temperatura da coluna (25, 30, 40, 60 e 80  $^\circ\text{C}$ ).

##### 3.1.1.2. Especificidade

A capacidade do método em quantificar SAH e SAH- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi investigada na presença de possíveis impurezas.

##### 3.1.1.3. Precisão

Este parâmetro foi determinado pela análise de amostras de SAH em seis diferentes concentrações (zero, 2, 5, 10, 15 e 20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e três repetições (precisão intra-dia = análises realizadas no mesmo dia; precisão inter-dia = análises realizadas em dias diferentes). Calculou-se a precisão utilizando-se a equação 1.

$$\text{Precisão} = (\text{DP} \times 100) / \text{CMD} \quad (1)$$

onde

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

##### 3.1.1.4. Exatidão

Para o cálculo da exatidão aplicou-se a equação 2.

$$\text{Exatidão} = (\text{CMD} \times 100) / \text{CT} \quad (2)$$

onde

CMC = concentração média determinada;

CT = concentração teórica.

##### 3.1.1.5. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Analisando-se seis concentrações de padrão de SAH em triplicata, estabeleceu-se a faixa linear, a equação da reta e a correlação linear entre concentração (x) e absorbância (y) da altura de pico referente a SAH.

##### 3.1.1.6. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi definido como a menor concentração de SAH que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD foi determinado pela equação 3.

$$\text{LD} = (\text{DP} \times 3) / \text{IC} \quad (3)$$

onde

DP = desvio padrão do branco;

IC = inclinação da curva analítica.

##### 3.1.1.7. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão

aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro foi determinado pela equação 4.

$$LQ = (DP \times 10) / IC \quad (4)$$

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização quanto às condições operacionais do equipamento é essencial para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica. Utilizando-se solução padrão de SAH foi feita a análise de alguns parâmetros de robustez do método analítico: fluxo, volume de injeção, pH da fase móvel e temperatura. O efeito da variação do fluxo da fase móvel permitiu otimizar o tempo de análise (Fig. 1).

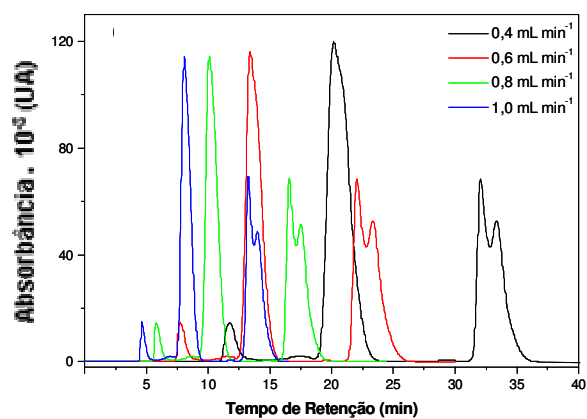


Fig. 1. Variação de fluxo da fase móvel. Absorbância em  $\lambda=280$  nm. Cromatogramas da SAH padrão 10mg mL<sup>-1</sup> em função do tempo de retenção.

A Fig. 2 apresenta o efeito da variação do fluxo da fase móvel na absorbância máxima do pico referente a SAH.

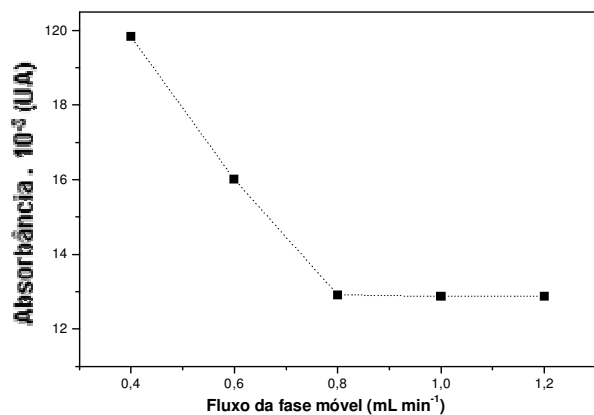


Fig.2. Efeito da variação do fluxo da fase móvel (0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>) na absorbância máxima do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Com fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, o tempo total de análise foi de 40 minutos. Ao aumentar o fluxo até 1,2 mL min<sup>-1</sup>, o tempo de análise reduziu à metade (20 minutos) e a largura do pico à meia altura também foi reduzida (Fig. 1). Foi observado que em fluxo igual ou superior a 0,8 mL min<sup>-1</sup> o pico ficou 55% mais estreito e a absorbância reduziu em cerca de 6% (Fig. 2). Para fluxo baixo tem-se uma largura a meia altura maior, o que não é conveniente, pois o alargamento de pico pode encobrir outros picos que eluem próximos a SAH. Para fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> observou-se um pico de SAH estreito e simétrico.

A influência do volume de amostra injetada no cromatograma do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup> (Fig. 3) mostrou-se linear.

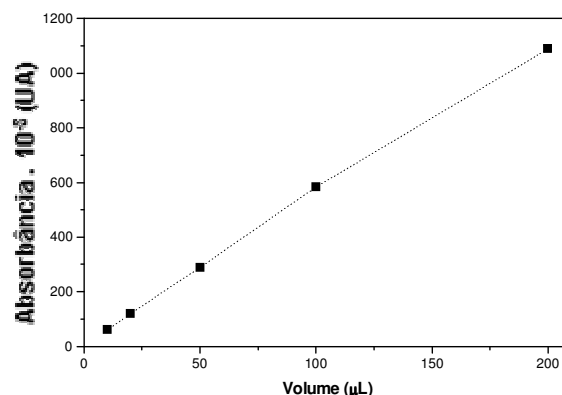


Fig.3. Efeito da variação do volume de injeção (10, 20, 50, 100 e 200 µL) no cromatograma do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Observou-se que para volumes maiores que 100 µL ocorre perda de resolução do pico em 12,46 minutos e o alargamento do pico referente ao monômero de SAH no RL em 7,58 minutos (Fig. 1, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>).

Estudou-se a influência do pH da fase móvel na análise de RL SAH (Fig. 4).

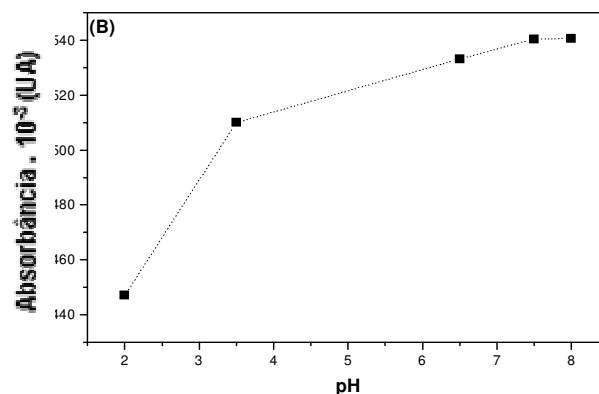


Fig. 4. Efeito da variação do pH da fase móvel: pH = 2,0; 3,5; 6,5; 7,5 e 8,0 no cromatograma de SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>.

A variação do pH da fase móvel demonstrou que em meio ácido (pH = 2,0 e 3,5) e básico (pH = 8,00) o perfil do cromatograma alterou consideravelmente. Enquanto a análise em meio ácido diminui consideravelmente a intensidade do sinal de absorvância (dado não representado) aumentando a instabilidade da linha base, em pH 8,00 ocorre perda de resolução de picos que eluem no tempo de retenção de 12,46 minutos (Fig. 1), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>). Análise com fase móvel entre o pH 6,5– 7,5 demonstrou ser a melhor condição para análise de RL SAH por CET.

A Fig. 5 apresenta os perfis cromatográficos da SAH padrão 10 mg mL<sup>-1</sup> ao variar a temperatura da coluna.

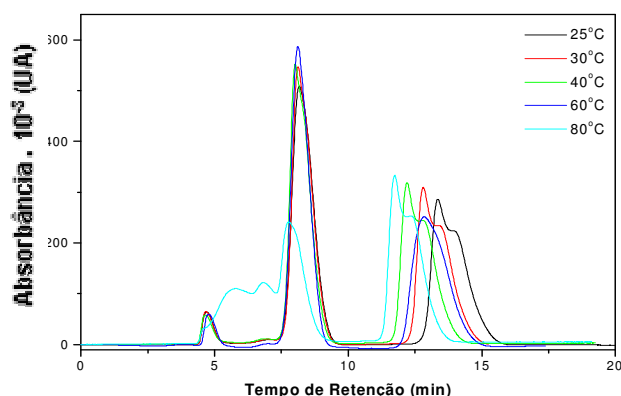


Fig. 5. Cromatogramas do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>. Variação da temperatura do forno de coluna. Absorbância em  $\lambda= 280$  nm.

A influência da variação da temperatura do forno de coluna no cromatograma do RL SAH é apresentada na Fig. 6.

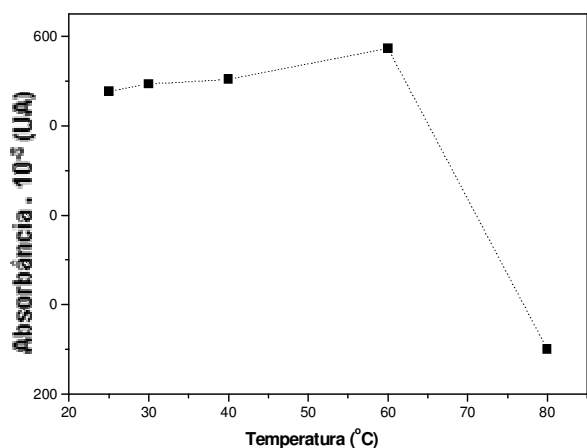


Fig. 6. Efeito da variação da temperatura do forno de coluna (25, 30, 40, 60 e 80 °C) no cromatograma do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Observou-se o alargamento de banda e o aparecimento de picos secundários com baixa resolução para a temperatura de

80 °C; em 60 °C ocorreu perda de resolução no pico com tempo de retenção de 12,46 minutos. A intensidade do sinal de absorvância não apresentou mudanças significativas nas análises nas temperaturas de 25, 30, 40 °C (Fig. 6).

O SAH é uma proteína. As proteínas são macromoléculas contendo um número elevado de aminoácidos. Estes estão ligados linearmente formando a estrutura primária e por estabelecerem outras ligações mais fracas entre as cadeias laterais originam estruturas secundárias e terciárias. Essas estruturas são mantidas por interações fracas e por isso são facilmente quebradas quando expostas ao calor ou ácidos ocasionando a perda da estrutura tridimensional, processo chamado desnaturação. Portanto a mudança do perfil cromatográfico para temperaturas elevadas pode estar relacionada ao processo de desnaturação, com formação de agregados de massa molecular maior que a forma monomérica da SAH [8].

As análises para validação do método foram desenvolvidas em fluxo da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 100  $\mu$ L, temperatura 25 °C, pH da fase móvel igual a 7,0 e tempo de análise de 20 minutos. A Fig. 7 apresenta o cromatograma do RL de SAH.

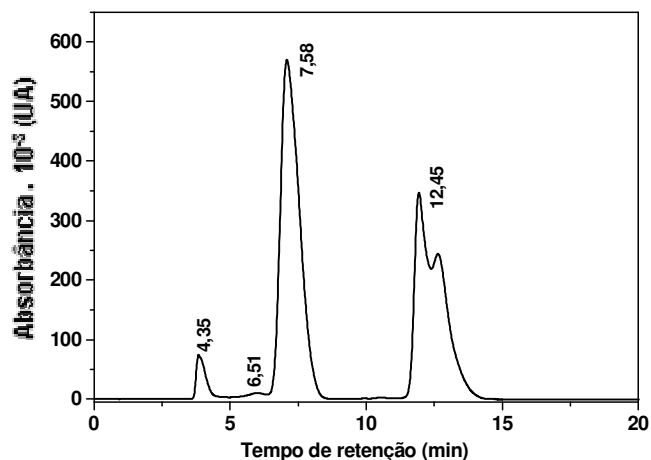


Fig. 7. Cromatograma do RL SAH 10 mg mL<sup>-1</sup>. Temperatura do forno de coluna: 25°C; volume de amostra: 100  $\mu$ L. pH da fase móvel: 7,0

O método desenvolvido demonstrou-se específico para SAH e com separação entre o monômero e demais formas poliméricas. A Tabela 1 apresenta os tempos de retenção correspondentes aos analitos. Foi utilizada solução padrão de SAB (soro albumina bovino) para determinação do tempo de retenção referente à massa molecular 69 kDa (monômero) e do dímero (138 kDa).

Tabela 1. Tempos de retenção dos analitos observados nos cromatogramas de SAH.

Amostra	Tempo de Retenção (minutos)		
	Monômero	Dímero	Agregados
SAH 10 mg mL <sup>-1</sup>	7,58	4,35	6,51
RL SAH 10 mg mL <sup>-1</sup>	7,53	4,25	6,38

O agente estabilizante (triptofana) de baixa massa molecular elue em tempo de retenção acima de 12,45 minutos. A distribuição molecular encontrada para o SAH padrão foi de 91,86% de monômeros, 5,93% de dímero e 2,21% de agregados. Em um lote analisado de RL SAH, foram encontrados 86,52% de monômeros, 9,09% de dímero e 4,38% de agregados, ou seja, a quantidade de monômero diminuiu com aumento na quantidade de dímero. Tanaka, Sawatani, Shigueoka, Dias e Arashiro [9] também constataram aumento na porcentagem de dímeros nas soluções de SAH 20% (0,7% para 1,8%) e uma queda na concentração de monômero (99,0% para 98,2%).

A Fig. 8 apresenta o cromatograma do radiofármaco SAH-<sup>99m</sup>Tc.

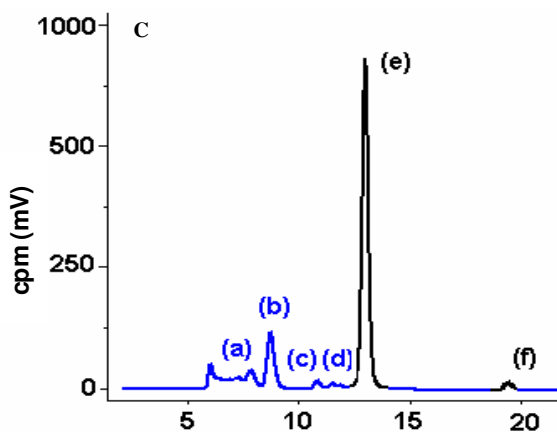


Fig. 8. Cromatograma de SAH-<sup>99m</sup>Tc 55,0 MBq mL<sup>-1</sup>. Temperatura do forno de coluna: 24,7 °C; volume de amostra: 100 µL. pH da fase móvel: 7,00. (a) compostos de massa molecular alta, (b) SAH poli-III, (c) SAH poli-II, (d) SAH poli-I, (e) SAH-<sup>99m</sup>Tc e (f) <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>.

As análises por CET mostraram eficiência de marcação média da SAH-<sup>99m</sup>Tc de (97,28 ± 0,09)% e picos (Fig. 8) com tempos de retenção 8,71, 9,25, 11,44, 12,58, 14,48, 18,91 atribuídos a: (a) compostos de massa molecular alta (massa molecular acima do dímero), (b) SAH poli-III, (c) SAH poli-II (dímero), (d) SAH poli-I (correspondente aos analitos de massa molecular intermediária entre o dímero e o monômero), (e) SAH-<sup>99m</sup>Tc (monômero marcado) e (f) <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>, respectivamente.

Verbeke e Verbruggen [3] estudaram um método alternativo para análise de SAH-<sup>99m</sup>Tc. Substituindo o método CET pelo método FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), os autores observaram que a impureza <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> não foi eluída no método CET o tempo de retenção foi de 25 minutos.

O método mostrou-se linear no intervalo de concentração de 0–20 mg mL<sup>-1</sup>. A curva analítica pode ser representada pela equação: Área = 2,931 [SAH] + 0,128 (n = 6), coeficiente de correlação (r<sup>2</sup>) igual a 0,9997, maior que o valor mínimo estabelecido pela ANVISA [7], que é r<sup>2</sup> = 0,99.

Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão intra-dia e precisão e exatidão inter-dia do método estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Precisão e exatidão intra-dia de SAH padrão.

Valor nominal (mg mL <sup>-1</sup> )	Média ± DP	Precisão (%)	Exatidão (%)
2	1,98 ± 0,09	4,54	99,00
5	4,96 ± 0,24	4,84	99,20
10	9,60 ± 0,42	4,37	99,00
15	14,91 ± 0,62	3,17	99,40
20	19,51 ± 0,24	1,23	97,55

Tabela 3. Precisão e exatidão inter -dia de SAH padrão.

Valor nominal (mg mL <sup>-1</sup> )	Média ± DP	Precisão (%)	Exatidão (%)
2	1,95 ± 0,22	4,28	97,50
5	4,92 ± 0,80	0,79	98,40
10	10,05 ± 2,33	2,34	100,50
15	15,12 ± 2,24	2,26	100,80
20	19,63 ± 1,33	1,30	98,15

A repetibilidade (intra-dia) variou entre 1,23 e 4,84% e a precisão intermediária (inter-dia) variou entre 0,79 e 4,28%. Os valores de precisão (Tabelas 2 e 3) estão abaixo dos critérios aceitáveis (≤ 5%) segundo a ANVISA [7]. Os valores de exatidão obtidos estão dentro da faixa de especificação de 98 -103% [7].

A sensibilidade do método foi expressa em limite de detecção (LD) de 65 µg mL<sup>-1</sup> e limite de quantificação (LQ) de 216 µg mL<sup>-1</sup>. O valor encontrado para SAH nos kits foi de 6,20 mg, referente apenas ao monômero. O valor de bula é de 10,00 mg. A diferença entre o valor obtido e o valor de bula pode ser explicada devido à formação de dímero.

## 5. CONCLUSÕES

O método mostrou-se robusto e aplicável ao controle de qualidade por sua rapidez e capacidade em determinar as formas poliméricas presentes na determinação da pureza radioquímica. Concluiu-se que o método é indicado para a quantificação de SAH em reagentes liofilizados usados em medicina nuclear.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo suporte financeiro e à Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) pela infra-estrutura.

## REFERÊNCIAS

[1] G. Walsh, "Biopharmaceuticals", *John Wiley & sons*, Chichester, England, 2006.

[2] Y. Wang, M. Chuang, J. Chiu, T. Cham, "On-site preparation of technetium-99m labeled human serum albumin for clinical application", *J. Exp. Med.*, vol. 211, pp. 379- 385, 2007.

[3] K. Verbeke, A. Verbruggen, "Usefulness of fast protein liquid chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography of 99mTc-labelled human serum albumin

preparations", *J. Pharm. and Biom.l Anal.*, vol. 14, pp. 1209-1213, 1996.

[4] A. Owunwanne, M. Patel, S. Sadek, "The handbook of Radiopharmaceuticals", *Chapman & Hall medical*, London, UK, 1995.

[5] United States Pharmacopeia, 30 ed., Rockville, USA, United States Pharmacopeia Convention, v.1, 2007.

[6] C.H. Collins, G.L Braga, P.S. Bonato, "Introdução a métodos cromatográficos", *Unicamp*, Campinas, 1995.

[7] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resol. N 899, de 23 de maio de 2003. D. O. U. 02 jun. 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>.

Acesso em: 10/03/2009.

[8] L. Stryer, "Biochemistry", *W. H. Freeman*, New York, 2007.

[9] K. Tanaka, E. Sawatani, E. M Shigueoka, G. A., "Quality evaluation of Albumin 20% and Immunoglobulin G 5% by means of liquid chromatography method: data from five years period-study", *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, vol. 63(1), pp. 104-110, 2004.