

SINTESIS Y MARCACION DE $^{99m}\text{Tc} - \text{Sn}-1-$ HIDROXIETILIDEN 1, 1-DISODIO FOSFONATO

Elizabeth Chacón, Carlos Cruz,
José Caballero, Juan Quezada

Instituto Peruano de Energía Nuclear, Apt. 1687, Lima - Perú

Recibido 10 Octubre de 1988

Resumen

Se ha realizado la síntesis del producto 1-hidroxi-etiliden 1, 1-disodio fosfonato y luego su marcación con ^{99m}Tc . La síntesis del difosfonato se realizó según la patente de Albright y Wilson (1966) en dos etapas; una primera de preparación del ácido difosfónico y en la segunda por titulación se obtuvo la sal disódica. La identificación del hidroxietiliden disodio fosfonato se realizó por espectroscopía RMN, obtenido el difosfonato se procedió a su marcación vía una reducción del pertechnetato de sodio ^{99m}Tc con cloruro estañoso estableciéndose la formulación para el producto $^{99m}\text{Tc} - \text{Sn} - \text{hidroxietiliden disodio fosfonato}$ ($^{99m}\text{TC}-\text{HEDSP}$). Se ha preparado el juego de reactivos $^{99m}\text{Tc}-\text{HEDSP}$ que se ajusta a las especificaciones requeridas para su uso en gammagrafía ósea en humanos obteniéndose un producto marcado con buena estabilidad química y de una pureza radioquímica mayor a 95 o/o.

1. INTRODUCCION

El Tecnecio-99 metaestable (^{99m}Tc) es uno de los radionuclidos más útiles por su capacidad química para formar un gran número de compuestos de coordinación en medio neutro, uno de éstos es el $^{99m}\text{Tc}-\text{Sn}-\text{hidroxietiliden disodio fosfonato}$, importante por su afinidad con los cristales hidroxapatita del tejido óseo.

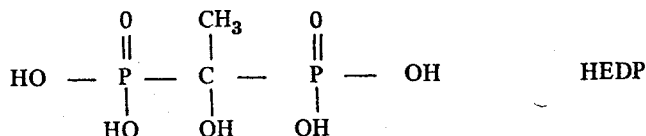
La obtención de este compuesto requiere un trabajo de síntesis convencional y posteriormente desarrollar la metodología de marcación que dé lugar a un producto con determinadas características. El trabajo de Albright y Wilson [1] sobre la preparación de ácido organo-fosfónicos y sus sales será una de las principales referencias para realizar

la etapa de síntesis luego de cuyo correspondiente control de calidad se procederá a la marcación con ^{99m}Tc . Será necesario que el producto final cumpla las especificaciones del juego de reactivos ^{99m}Tc -HEDSP en los aspectos físico-químico, biológico y nuclear.

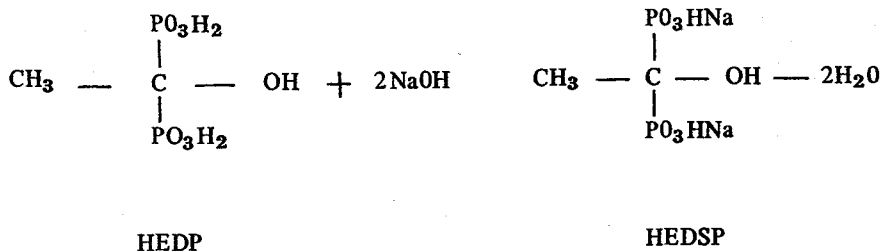
2. SINTESIS DE 1-HIDROXIETILIDEN 1, 1-DISODIO FOSFONATO

2.1 Fundamento Químico

La síntesis de 1-hidroxi-etiliden 1, 1-disodio fosfonato (HEDSP) parte de la reacción del ácido acético y el tricloruro de fósforo a temperaturas controladas en las cuales la formación de enlace P - C - P da lugar al ácido 1-hidroxi-etiliden 1, 1 difosfónico (HEDP) de fórmula :



Este ácido poliprótico por titulación con hidróxido de sodio da lugar a la sal disódica según la siguiente reacción :



2.2. Material y método

Mediante experiencias de síntesis preliminares se determinaron los detalles del modo operativo para ajustarlo a nuestras condiciones de trabajo, pero el procedimiento en general es como sigue :

Se armó el equipo de síntesis bajo campana colocando el ácido acético en un frasco trihoradado y el tricloruro de fósforo desde un embudo gradual se agregó lentamente hasta llegar a una relación 6 a 1 respectivamente, luego de unos 10 minutos de suave homogenización se colocó el frasco de reacción en un baño de hielo durante 30 minu-

tos al término de los cuales se colocó el frasco de reacción en un baño de aceite y conectado a un equipo de destilación se elevó lentamente la temperatura a 60°C durante 2 horas, posteriormente se llevó a 130°C durante unos 30 minutos hasta obtener un destilado de pH 5. Se obtuvo un producto que al enfriarse tomó consistencia semisólida. Tomando una alícuota del ácido obtenido se procedió a la titulación potenciométrica con una solución de hidróxido de sodio 1N para establecer los tres puntos de equivalencia del ácido HEDP obteniéndose la curva presentada en la Fig.1. Con los datos analíticos de la titulación se procedió a una adecuada titulación del resto del ácido para la obtención de la sal disódica (HEDSP). Finalmente se llevó todo el producto a sequedad en un rotavapor y se procedió a la cristalización.

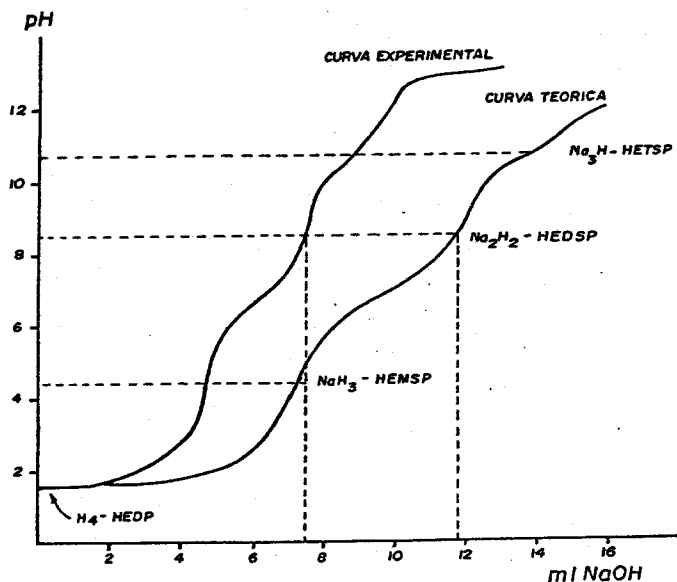


Fig. 1 . Curvas de Titulación Tribásica de HEDP vs. Na OH.

Titulación del ácido hidroxietilendifosfónico (HEDP)

En la primera etapa de la síntesis se controló la calidad del ácido HEDP mediante la titulación potenciométrica con NaOH 1N verificándose la curva característica de la titulación de ácidos polibásicos con base fuerte obteniéndose los 3 puntos de equivalencia esperados, a pH 4.4, 8.5, 10.7 como se observa en la Fig. 1. Los puntos de equivalencia se determinaron empleando el método de Gran [2] . En la Tabla 1 se presentan los datos empleados para estas determinaciones.

TABLA I. — Datos para el método de Gran

ml NaOH gastados	pH leído	pH por 0.2 ml	$\frac{1}{\Delta \text{pH}}$	ml NaOH a graficar
7.00	7.55	0.30	3.33	7.10
7.20	7.85	0.50	2.00	7.30
7.40	8.35	0.95	1.05	7.50
7.60	9.30	0.45	2.22	7.70
7.80	9.75	0.25	4.00	7.90
8.00	10.00	0.20	5.00	8.10
8.20	10.20			

Identificación de hidroxietilidedisodiofosfonato (HEDSP)

El producto final fue identificado mediante su espectro RMN ^1H a una frecuencia de 80 MHz y empleando como solvente D_2O , en la Fig. 2 se presenta el espectro del producto en el cual se observa el triplete característico del acoplamiento del fósforo al hidrógeno del metilo. Este resultado concuerda con el espectro reportado por Castro-novo y col. [3].

Rendimiento

Considerando la relación estequiométrica de la formación de la sal disódica se ha calculado el rendimiento total de la síntesis de HEDSP.

3. PREPARACION DE $^{99\text{m}}\text{Tc-Sn-HEDSP}$

3.1 Fundamento Químico

La preparación de moléculas marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se basa en la reducción del tecnecio a sus estados de valencia más reactivos: Tc (III), Tc (IV), Tc (V) y la formación de un gran número de compuestos de coordinación.

Respecto al compuesto $^{99\text{m}}\text{Tc-Sn-HEDSP}$, debe su nombre a la terminología empleada en compuestos análogos del Tecnecio, y no a su estructura porque ésta no es aún conocida con exactitud, pero existen investigaciones tendientes a su elucidación estructural que nos dan alguna información sobre su estructura, Deustsh y colaboradores [4] han establecido que es un compuesto químicamente estable con cantidades estequiométricas de estaño y que no es una sola especie química sino, mas probablemente una mezcla de entidades poliméricas que se inter convierten en un equilibrio hidrolítico.

Van Den Brand y colaboradores [5] mediante un estudio cromatográfico con gel de filtración encontraron por lo menos cinco complejos con tecnecio tetravalente. Si

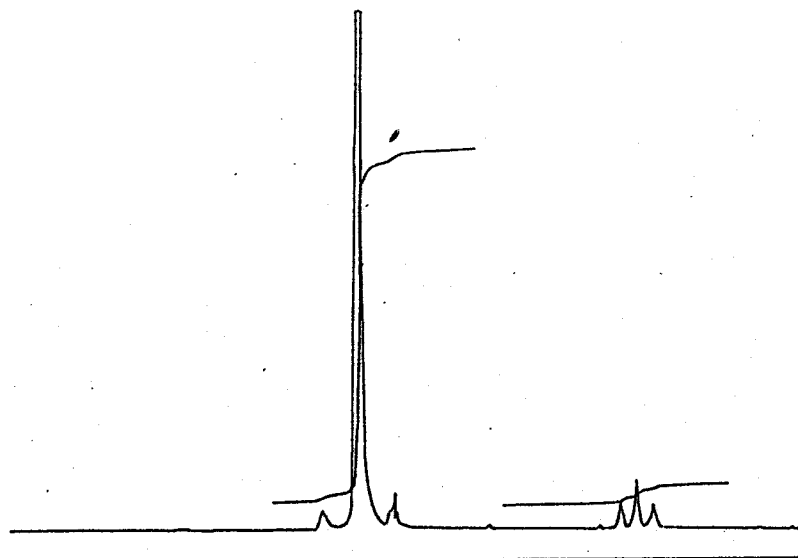


Fig. 2A: Espectro RMN de 1-Hidroxietiliden 1, 1 Disodio Fosfanato sintetizado en el Instituto Peruano de Energía Nuclear.

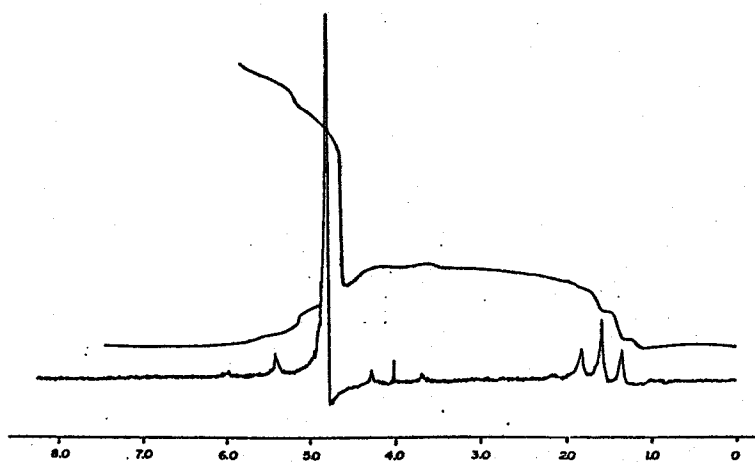
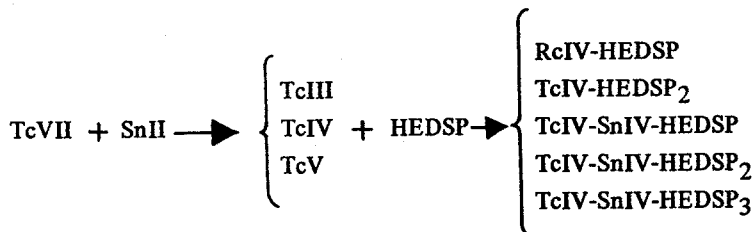


Fig. 2B: Espectro RMN de 1-Hidroxietiliden 1, 1 Disodio Fosfanato reportado por Castonovo y colaboradores [3].

consideramos que la formación del complejo $^{99m}\text{Tc-Sn-HEDSP}$, se inicia con la reducción del tecnecio que como pertecnetato de sodio se obtiene proveniente de un generador de Tecnecio- 99m y la posterior formación de una variedad de complejos de tecnecio, la preparación del complejo $^{99m}\text{Tc-Sn-HEDSP}$ se podría esquematizar de la siguiente manera:

RcIV-HEDSP



3.2 Material y Método

- Trabajando en medio ácido y ambiente de nitrógeno gaseoso se disolvió HEDSP y cloruro estañoso bihidratado en una relación de 3 a 1, se añadió 200 mg de cloruro de sodio y llevando a un volumen de unos 80 ml se ajustó el PH a 4 con hidróxido de sodio 2N.
- Luego se llevó todo el preparado a un volumen final de 100 ml y en condiciones estériles se fraccionó volúmenes de 1 ml en viales que posteriormente fueron liofilizados.
- El producto liofilizado fue reconstituido y simultáneamente marcado con ^{99m}Tc al adicionarle NaTcO_4 - ^{99m}Tc en 3 ml y con unos 2.5 mCi. Toda la operación de marcación se realizó siguiendo las normas de protección radiológica.

3.3 Control de Calidad

El producto final $^{99m}\text{Tc-Sn-HEDSP}$ que tiene como finalidad ser empleado para obtener gammagrafía ósea en humanos, fue sometido a un control de calidad físico-químico y biológico.

3.3.1 Control de Calidad físico-químico

- a. Inspección Óptica.
- b. Determinación de pH potenciométrica.
- c. Determinación de humedad del producto liofilizado por el método de pérdida de peso por secado.
- d. Determinación de estaño (II) por el método de titulación yodimétrica.
- e. Pureza radioquímica por cromatografía ascendente según los siguientes sistemas:

Soporte	Solvente	Rf = 0	Rf = 1
Whatman No. 1	Acetona p.a.	^{99m}Tc -HEDSP TcO_2	$^{99n}\text{TcO}_4$
Whatman No. 1	NaCl 0.9o/o	$^{99m}\text{TcO}_2$	^{99m}Tc -HEDSP $^{99m}\text{TcO}_4$

TABLA II.— *Resumen de resultados de control físico-químico.*

LOTE	pH	HUMEDAD (o/o) $\bar{x} \pm \sigma_n$ (n=2)	Sn II (µg/dosis) $\bar{x} \pm \sigma_n$ (n = 3)	PUREZA RADIOQUÍMICA (o/o) $\bar{x} \pm \sigma_n - 1$ (n = 12)
01	6.0	5.6 ± 0.9	103 ± 34	98.89 ± 0.65
02	6.0	2.5 ± 0.8	117 ± 23	99.32 ± 0.45
03	6.5	10.0 ± 0.7	135 ± 43	99.18 ± 0.27
04	6.0	3.1 ± 0.2	80 ± 31	99.00 ± 0.50
05	6.5	5.2 ± 1.2	135 ± 16	99.21 ± 0.41
06	6.5	1.9 ± 1.2	125 ± 16	99.21 ± 0.52

TABLA III.— *Control de estabilidad química del ^{99m}Tc -Sn-HEDSP*

No DE LOTE	02			03			04			05			06		
Solvente	ACET. S.F. PR o/o			ACET. S.F. PR. o/o			ACET. S.F. PR o/o			ACET. S.F. PR o/o			ACET. S.F. PR o/o		
Tiempo (h)															
0	99.93	0.12	99.81	99.98	0.12	99.86	99.69	0.37	99.32	99.77	0.27	99.50	99.98	0.17	99.81
2	99.86	0.42	99.44	99.60	0.24	99.36	99.71	0.31	99.40	99.67	0.17	99.50	99.95	0.38	99.57
4	99.92	0.33	99.59	99.86	0.17	99.69	99.75	0.19	99.56	99.60	0.27	99.33	99.84	0.39	99.45
6	99.70	0.22	99.48	99.81	0.35	99.46	99.56	0.31	99.25	99.39	0.18	99.21	99.97	0.96	99.01
8	99.89	1.49	98.40	99.44	0.71	98.73	99.52	0.64	98.88	99.10	0.93	98.17	99.61	0.75	98.86
24	99.56	3.47	96.09	94.04	3.33	90.71	95.46	4.42	91.04	93.15	4.03	89.12	95.43	4.45	90.98

La pureza radioquímica se determinó por diferencia de los porcentajes de actividad localizados en los Rf = 0 ó en los Rf = 1 de ambos sistemas.

- f. Estabilidad radioquímica del producto marcado realizando controles cromatográficos del producto marcado hasta las 24 horas como se indica en la Tabla III.

- g. Estabilidad química del producto liofilizado, el control de pureza radioquímica periódicamente y hasta los 6 meses después de preparado el producto, determinó la estabilidad del producto liofilizado.

En la Tabla II se presentan los resultados de los controles físico-químicos de 6 lotes preparados.

3.3.2. Control de Calidad Biológico.

- a. Toxicidad: se inyectó en 5 ratones Cepa CPW de 26 a 28 g, de 200 a 500 veces la dosis empleada en humanos la observación de completa normalidad en los 5 ratones hasta 30 días después de la inyección estableció la no toxicidad del producto.
- b. Esterilidad en medios de cultivos: agar nutritivo, agar saborand, tioglicolato dió resultado negativo hasta las 72 horas.
- c. Afinidad biológica: inyectando 50 μ l del producto marcado en ratas wistar, se efectuó la gammagrafía a las 3 horas de inyección observándose la imagen ósea del animal. Así mismo se realizaron 21 pruebas de disección y contaje de órganos críticos obteniéndose resultados positivos de contaje que siempre se ajustaron a las siguientes relaciones con respecto al contaje obtenido en hueso :
- Sangre < 5 ; Hígado < 1 ; Riñón < 5 ; Intestino < 0.3 ; Estómago < 0.1 .

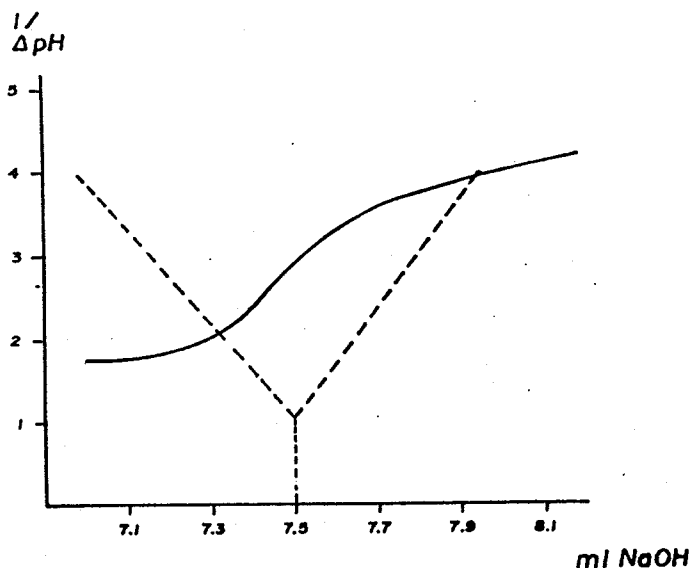


Fig. 3 Determinación del punto de equivalencia por el método de Gran $1/\Delta pH$ vs. $m/NaOH$.

4. ANALISIS Y DISCUSION

El trabajo experimental de síntesis de HEDP debe hacerse bajo campana y con cuidado en la manipulación de los reactivos especialmente del PCl_3 que es irritante, durante el proceso hay desprendimiento de ácido clorhídrico y acético pero si se trabaja en adecuadas condiciones y el equipo de síntesis necesario, el procedimiento por lo demás resulta sencillo y puede demorar una 10 horas hasta la obtención de HEDP.

La titulación de HEDP con hidróxido de sodio nos da buena información: establecer la curva característica es un control de calidad e identificación del ácido permite cuantificarlo y si la titulación se hace gota a gota es factible establecer con gran exactitud los puntos de equivalencia aplicando el método de Gran.

Con el espectro RMN se confirmó la identificación del HEDSP en el cual se observa el triplete característico del acoplamiento del fósforo al hidrógeno del metilo.

El trabajo de marcación de HEDSP con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ implica la consideración de las normas de seguridad y protección radiológica y otra como pureza radionucleídica, concentración de actividad dosis, etc., que para efectos del control de calidad del producto marcado es necesario establecer y controlar.

El control de pureza radioquímica también fue ensayado empleando como soporte placas de silicagel impregnado de fibra de vidrio (I.T.L.C.) y solvente metanol 850/o para determinar el porcentaje de tecnecio libre en Rf-1 pero para el control de rutina de los lotes experimentales se escogieron los sistemas Whatman No. 1 acetona y whatman No. 1 Na Cl 0.90/o. El conteo de las tiras cromatográficas se realizó en un contador gamma con detector de NaI (TI) tipo pozo.

Para las pruebas de afinidad biológica en ratas se ensayaron varias dosis de actividad y portador en función del peso obteniendose buenos resultados con 23 μg de portador en 33 μCi y un volumen de 0.05 ml para la inyección.

Al término de todas las pruebas de control de calidad se realizaron estudios de gammagrafía ósea en humanos obteniendose a opinión del médico especializado, imágenes de buena calidad.

5. CONCLUSIONES

El producto 1-hidroxietiliden 1,1-disodio fosfonato (HEDSP) ha sido sintetizado para fines de marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Partiendo de una relación 6 a 1 para los reactantes de síntesis de HEDSP, se obtuvo luego de varias experiencias previas y con el método operativo optimizado, un rendimiento de síntesis de 60.80/o.

El producto HEDSP ha sido marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ manteniendo una relación 3 a 1 para los componentes HEDSP: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ del preformado liofilizado.

Los resultados del control de calidad indican que el producto $^{99\text{m}}\text{Tc} - \text{Sn} - \text{HEDSP}$

tiene las siguientes principales características:

- Pureza Radioquímica 98 o/o.
- Afinidad biológica que da lugar a una imagen gammagráfica del sistema óseo de buena calidad.

REFERENCIAS:

- [1] ALBRIGHT Y WILSON, *Belgian Pat. No. 672.168, 1 March 1966.*
- [2] R. W. RAMETTE "Equilibrio y Análisis Químico", *Ed. Fondo Educativo Interamericano. Mexico 1983.*
- [3] CASTRONOVO Y COL, *IAEA-SM-171/31, 79-92, 1973.*
- [4] DEUTSCH Y COL, *J. Nucl. Med. 21: 859-866. 1980.*
- [5] VAN DEN BRAND J. A. Y COL. *Int. J. Appl. Radiat. Isot. Vol. 33: 39-45, 1982.*

Síntesis y marcación de ^{99m}Tc -Sn-1-hidroxieliden 1, 1-disodio fosfonato por Elizabeth Chacón, Carlos Cruz, José Caballero, Juan Quezada se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.