

# PURIFICACIÓN DEL BENZOIL- MERCAPTOACETILTRIGLICINA, COMPLEMENTADO CON EVALUACIONES BIOLÓGICAS

Robles A. <sup>(1)</sup> [arobles@ipen.gob.pe](mailto:arobles@ipen.gob.pe); Ramos B. <sup>(1)</sup> [bramos@ipen.gob.pe](mailto:bramos@ipen.gob.pe);  
Herrera J. <sup>(1)</sup> [jherrera@ipen.gob.pe](mailto:jherrera@ipen.gob.pe); Caballero J. <sup>(1)</sup> [fcaballero@ipen.gob.pe](mailto:fcaballero@ipen.gob.pe);  
Otero M. <sup>(1)</sup> [motero@ipen.gob.pe](mailto:motero@ipen.gob.pe)

(1) Planta de Producción de Radioisótopos – IPEN / Lima, Perú

## RESUMEN

La purificación se realizó por cristalización fraccionada en metanol: agua (80:20), monitoreada por HPLC. Se obtienen varios precipitados, con los cuales se preparan minilotes de prueba que se marcan con Tc 99m y se realizan los controles radioquímicos y las evaluaciones biológicas. Los resultados obtenidos son los siguientes: la pureza química del Bz-MAG<sub>3</sub> se incrementa de 70 % a 98,12 % del compuesto activo, con un rendimiento del 25 % aproximadamente; la pureza radioquímica de los precipitados puros es mayor al 98 % y el porcentaje de dosis de inyección en riñones se incrementa de 8% a 20 % a los 5 minutos post-inyección en ratones sanos. El porcentaje de excreción renal promedio a los 60 minutos es mayor al 90%, porcentaje que garantizará una buena calidad de imágenes gammagráficas renales.

## 1. INTRODUCCIÓN

El mercaptoacetiltriglicina, es un ligando N<sub>3</sub>S o triamida monomercapto que al ser marcado con el Tc 99m, presenta una pureza radioquímica mayor al 90%; sin embargo, muestra una baja captación en riñones, entre el 6 al 8% de la dosis inyectada (D.I.) en sus primeros 5 minutos, debido a que el precursor tiene una pureza química baja (<90%). En la literatura se ha reportado la síntesis del benzoil-mercaptoacetiltriglicina (Bz-MAG<sub>3</sub>), pero no se describe la etapa de purificación; el producto final sintetizado presenta varias impurezas motivo por el cual es necesario purificarlo para lograr obtener una pureza química superior al 95%, este compuesto es un precursor del radiofármaco MAG<sub>3</sub>-<sup>99m</sup>Tc, utilizado en gammagrafías renales para estudios dinámicos (1).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Síntesis**  
Se realiza mediante la técnica de W. Brandau (2), quién presentó un método

alternativo al de Fritzberg para su preparación, el que comprende tres etapas: en la primera se obtiene el ácido S-benzoil-tioglicólico (intermediario I), por la reacción equimolar del ácido tioglicólico y el cloruro de benzoilo en medio alcalino; en la segunda se obtiene el succinimidil-S-benzoil-tioglicolato (intermediario II), por la reacción equimolar del intermediario I y la N-hidroxisuccinimida en presencia de dicitohexilcarbodiimida (DCC) y en la tercera la preparación del S-benzoil-mercaptoacetiltriglicina (MAG<sub>3</sub>), se lleva a cabo por la reacción del intermediario II con un exceso de glicilglicilglicina en medio alcalino (Esquema 1). Los intermediarios y el producto final han sido identificados por puntos de fusión y por espectrometría infrarroja.

- **Purificación**

Se realiza por cristalización fraccionada, se determinó la concentración óptima para solubilizar el Bz-MAG<sub>3</sub>, es de 33 mg por mL de metanol-agua (80:20). El proceso de purificación es monitoreado con un esquema que muestra la marcha sistemática de la purificación del Bz-MAG<sub>3</sub>. Se seleccionaron los siguientes precipitados: 4, 5, 6 y 7, cada uno de ellos fue analizados en un sistema HPLC para determinar la pureza química.

- **Formulación y marcación con <sup>99m</sup>Tc**

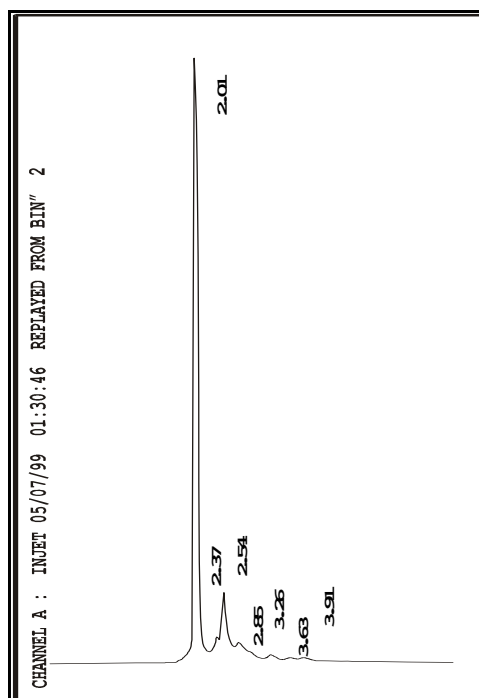
Con cada uno de los precipitados (ligandos) seleccionados, se formularon minilotes, disolviendo 25 mg del ligando con calentamiento en una solución de 0,5 g de lactosa y 1 g de tartrato de sodio, luego bajo nitrógeno se añade cloruro estañoso dihidratado; una vez disuelta se lleva a pH 5,5; luego se completa a 25 mL. Se dispensa 1 mL a cada vial y se liofiliza. El kit liofilizado es marcado con Tc 99m, con 1 a 3 mL de pertecnetato de sodio (37MBq a 3700 Bq), se lleva a baño de ebullición por 10 minutos, para acelerar la reacción de complejación (1).

- **Análisis cromatográficos del <sup>99m</sup>Tc-MAG3**

La pureza química se determina por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), con un detector ultravioleta ( $\lambda=230\text{nm}$ ), una columna  $\mu$ -bondapack C18, elución isocrática, fase móvil metanol:agua (80:20) a un flujo de 1mL/min. La pureza radioquímica se determina por cromatografía en papel ascendente (CP), en el siguiente sistema cromatográfico: papel filtro N°1/acetoniitrilo 60% y por HPLC asociado a un detector radiométrico y a una tarjeta de adquisición Canberra modelo S100.

- **Biodistribución del <sup>99m</sup>Tc-MAG3**

Los estudios de biodistribución, se realizaron en ratones sanos, los cuales fueron sacrificados a los 5 y 60 minutos post-inyección, se extrajo los órganos de interés y se midió la actividad en un detector de <sup>235</sup>Nal(Tl), tipo pozo. Los porcentajes de dosis de inyección fueron calculados con el método del estándar externo.



Cromatograma N°1: precipitado N° 4

### 3. RESULTADOS

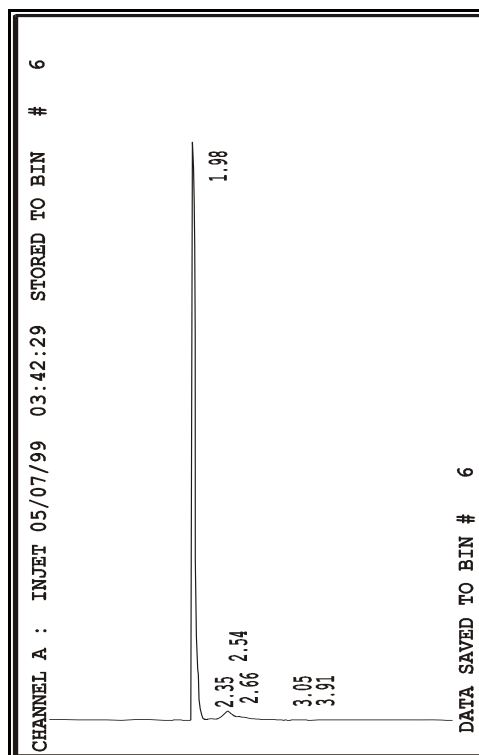
El espectro infrarrojo del Bz- MAG<sub>3</sub> purificado, muestra picos característicos de la molécula, a 3300 cm<sup>-1</sup> el grupo >NH, 3100 cm<sup>-1</sup> del grupo -OH y a 2850 cm<sup>-1</sup> del grupo -N-CH<sub>2</sub>. El punto de fusión de los precipitados seleccionados se encuentra entre 194 a 199 °C.

La Tabla 1 presentan los puntos de fusión y porcentajes de pureza química del Bz-MAG<sub>3</sub> en los diferentes precipitados obtenidos secuencialmente, como se aprecia el producto va siendo más puro, conforme precipitan las impurezas, los dos últimos precipitados tienen una pureza química mayor del 99%, determinada por HPLC.

Tabla 1.

N° Ppdo.	Masa (g)	P. Fusión (°C)	% Pureza Química
4	0,40	197,6 - 198,5	69,92
5	0,25	196,4 - 198,5	80,29
6	0,23	194,5 - 196,2	99,35
7	0,10	194,2 - 196,0	99,12

Los cromatogramas obtenidos por HPLC de los precipitados N° 4 y N° 7, son mostrados a continuación:



Cromatograma N°1: precipitado N° 7

La Tabla 2 muestra el porcentaje de pureza radioquímica (PRQ) determinada por HPLC que representa el porcentaje real de producto marcado, MAG<sub>3</sub>-<sup>99m</sup>Tc y determinada por

cromatografía en papel (CP), en donde no se la presencia de impurezas.

Tabla 2.

Nº Ppdo.	PH	PRQ-CP (%)	PRQ-HPLC (%)
4	5,5	93,12 ± 0,78	71,22 ± 2,14
5	5,5	96,29 ± 1,25	86,88 ± 2,78
6	5,5	99,79 ± 0,98	95,15 ± 1,72
7	5,5	98,02 ± 0,71	94,07 ± 1,88

La Tabla 3 muestra la biodistribución de los diferentes precipitados marcados con Tc 99m. El porcentaje de dosis de inyección está distribuido en los diferentes órganos, con baja captación en riñones en los precipitados 4 y 5, con presencia de tecnecio libre en estómago y una alta captación en hígado (>5%D.I.), debido al bajo porcentaje de pureza química (Bz-MAG3) y radioquímica (<sup>99m</sup>Tc-MAG3). La distribución biológica mejora en los precipitados 6 y 7, donde se logra una captación en riñones mayor al 20% de la dosis de inyección.

Tabla 3.

Nº Ppdo	Pureza Química (%)	PRQ (*)	% D.I / órgano (5 min. post-inyección)		
			Híg	Riñ	Est
4	69,92	71,22	12,93	2,83	11,99
5	80,29	86,88	8,24	8,83	2,10
6	99,35	95,15	4,24	23,62	0,29
7	99,12	95,07	4,14	31,20	0,12

(\*)pureza radioquímica por HPLC, detector radiométrico de <sup>3</sup>Nal (TI)

La Tabla 4 presenta los resultados de las distribuciones biológicas en ratones del <sup>99m</sup>Tc-MAG3, a los 5 y 60 minutos post-inyección, donde se aprecia que el precipitado 7, con alta pureza química, presenta una buena absorción en riñones a los 5 minutos y una excreción renal superior al 90% a los 60 minutos, además presenta una rápida limpieza plasmática y en hígado la captación es menor al 5% de la D.I, siendo la pureza radioquímica mayor al 98%. El precipitado 4, con baja pureza química no es eliminado tan fácilmente del organismo vivo y es visible la presencia de tecnecio libre en estómago, debido a la baja pureza radioquímica, ver tabla 3.

Tabla 4.

Órganos	Precipitado 4		Precipitado 7	
	5 min.	60 min.	5 min.	60 min.
San	20,45	12,78	2,07	0,04
Híg	12,93	15,55	4,14	0,71
Riñ	<b>2,83</b>	<b>2,50</b>	<b>31,20</b>	<b>1,17</b>
Est.	11,99	20,63	0,12	0,03
Intes.	7,50	11,98	1,85	1,78
E.R *	--	36,56	--	97,44

\*ER=excreción renal

#### 4. CONCLUSIONES

- El Bz-MAG3 purificado por recristalización fraccionada alcanzó una pureza química superior al 95%, en los últimos precipitados; lo cual demuestra que las impurezas son menos solubles en metanol:agua (80:20).
- Los rendimientos del Bz-MAG3 son inferiores al reportado en la literatura, sin embargo, se obtienen precursores de alta pureza química, radioquímica y tiene un comportamiento excelente en las distribuciones biológicas.
- Este precursor unido al agente reductor y al Tc 99m, forman un radiofármaco estable con una pureza radioquímica mayor al 98% y una excreción renal mayor al 90 % de la dosis de inyección a los 60 minutos, lo cual garantizará la obtención de buenas imágenes gammagráficas en estudios renales en pacientes de los servicios de medicina nuclear.

#### REFERENCIAS

- [1]. IAEA-TECDOC-805: Production of <sup>99m</sup>Tc radiopharmaceuticals for brain, heart and kidney imaging. Final report of a coordinated research programme 1991-1994. IAEA, July (1995).
- [2]. BRANDAU, W., BUBECK, B., et al. Technetium-99m labelled renal function and imaging agents: Synthesis of and <sup>99m</sup>Tc-MAG3 and biodistribucio of by products. Appl. Radiat. Isot. 39 (1988) 121-129.