

CNEA 357

Preparación de Azul de Toluidina ¹³¹I

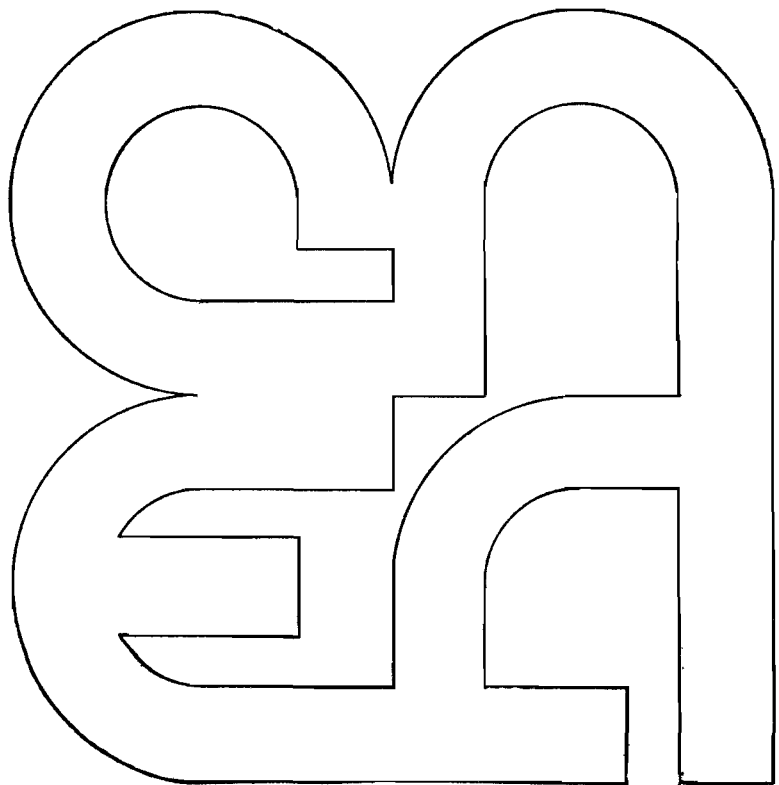
(3 amino-7 dimetilamino-2 metilfenazotio ¹³¹I)

Gladi N. B. de Salas
Aldo E. A. Mitta

Comisión
Nacional
de Energía
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1973



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

D13

LABELLED COMPOUNDS

IODINE 131

TOLUIDINE BLUE

CHEMICAL PREPARATION

CHLORAMINES

LABELLING

PREPARACION DE AZUL DE TOLUIDINA ¹³¹I
(3 amino-7 dimetilamino-2 metilfenazotionio ¹³¹I)

GLADI N. B. DE SALAS (*) y ALDO E. A. MITTA (*)

RESUMEN

Se estudió la preparación de azul de toluidina ¹³¹I. El método propuesto consiste en incorporar el radioyodo al colorante purificado o no, utilizando como agente oxidante cloramina T. El rendimiento radioquímico es de 98 %. El producto marcado se utilizó para ensayos en humanos en la cámara de Anger con resultados poco satisfactorios.

SUMMARY

The proposed method for the preparation of toluidine ¹³¹I was the incorporation of radioiodine to the purified or impurified colorant using chloramine T as oxidizing agent.

A radiochemical yield of 98 % was achieved.

The labelled product was used for measurements in human beings with the Anger camera.

(*) Gerencia de Investigaciones C.N.E.A.

INTRODUCCION

El hallazgo de un compuesto marcado para ser utilizado en scanning de paratiroides es aun un problema sin solución.

La seleniometonina 75 es utilizada para ese fin ⁽¹⁾. Brien y Kesveny ⁽²⁾ sugirieron el empleo de azul de toluidina ¹³¹I y la obtuvieron con un rendimiento radioquímico de 10-35 %.

Posteriormente, Czerniak y Boruchowsky ⁽³⁾ la preparan con un rendimiento radioquímico de 60-70 %.

En la literatura sobre el tema apareció un trabajo de Archer y col. ⁽⁴⁾ donde, previa marcación del colorante con radioyodo, se purifica utilizando distintos solventes. Luego de ensayos hechos en ratas se llega a la conclusión que no ha de resultar útil su uso en humanos.

A pedido de diversos profesionales argentinos decidimos estudiar la marcación azul de toluidina con radioyodo para su uso en humanos, habiéndose para ello seguido dos caminos, a saber: marcaciones sobre el azul de toluidina tal cual y con purificación previa. Los ensayos permitieron obtener rendimientos radioquímicos superiores al 98 % en ambos casos. Soluciones estériles del colorante radiactivo (en un caso realizando la purificación del azul de toluidina y luego marcándolo con radioyodo; en el otro, incorporando radioyodo directamente al colorante) fueron inyectadas en humanos. Se utilizó centellógrafo o cámara de Anger para su localización. Ambas muestras se comportaron y eliminaron igualmente, si bien, tal como concluyeron Archer y col. ⁽⁴⁾ no resultaron de utilidad a los fines propuestos.

Método de marcación

En un tubo de centrifuga provisto de tapón esmerilado se coloca 1 ml de una solución acuosa de azul de o-toluidina (3 mg/ml) se agregan 50 µg de cloramina T (1 mg/ml) y de 1-8 mCi de ¹³¹INa libre de portador y reductor. El pH de la mezcla se ajusta a 3.0 ± 0.1 , controlando con un microelectrodo combinado de vidrio. El tubo de reacción se tapa y se deja 60 minutos a temperatura ambiente. La acción del oxidante es detenida por el agregado de un ligero exceso de tiosulfato de sodio 0.1M. Rendimiento radioquímico (promedio de 30 determinaciones de rango 95-100) 98 ± 2 %. Se esteriliza pasando un filtro milliporo de 0,45 µ.

Controles

1. La radiactividad es medida en una cámara de ionización Mediac modelo 6362.
2. Los pirógenos y esterilidad se controlan de acuerdo a lo indicado por la farmacopea argentina ⁽⁵⁾.

3. Determinación de pureza radioquímica:

- a) Cromatografía en placa delgada de celulosa (Bakerflex, USA).
 Tiempo de desarrollo: 30 minutos
 Solvente: agua
 Rf azul de o-toluidina ^{131}I : 0.0
 Rf ^{131}INa : 1.0
- b) Cromatografía ascendente en papel Whatman N° 3
 Tiempo de desarrollo: 1 hora
 Solvente: agua
 Rf azul de o-toluidina ^{131}I : 0.0
 Rf ^{131}INa : 1.0
- c) Cromatografía ascendente en placa delgada. ITLC de Gelman SG ⁽⁴⁾.
 Tiempo de desarrollo: 15 minutos
 Solvente: cloroformo: acetona: propanol-2: 6,4 % de ácido sulfuroso (3:4:2:1)
 Rf azul de o-toluidina ^{131}I : 0.85
 Rf ^{131}INa : 0.0

Las placas y tiras se pasaron por un radioscaner Packard modelo 7200 y los porcentajes fueron calculados por planimetría y pesada.

Purificación del colorante

Siguiendo la técnica descrita por Archer y col. ⁽⁴⁾, y partiendo de azul de o-toluidina de Merck, cat. 1273, se purificó el colorante en la siguiente forma: 100 mg de compuesto disuelto en agua se lavaron 3 veces con éter de petróleo, 3 veces con acetato de etilo y 3 veces con cloroformo. Después de cada lavado se controla la pureza cromatográficamente según describimos en la parte (c) de controles. Luego se extrae el colorante con sucesivas porciones de n-butanol. La fase orgánica es ahora llevada a sequedad a presión reducida y suave calentamiento (no mayor a 50° C.) Se toma el residuo con agua ligeramente acidificada. El control cromatográfico evidencia una sola mancha, diferencia con el producto impuro que presenta varias. La recuperación es del 70-80 %. La concentración del producto puro fue de 3 mg/ml, para ello se usó un espectrofotómetro Cary 14, $\lambda = 630 \text{ nm}$.

Estudio de distintas variables

Se estudió la influencia de diversas variables tales como pH, oxidante, temperatura, luz, etcétera.

Influencia de pH

1 ml (3 mg/ml) de azul de o-toluidina, 50 μg (1 mg/ml) cloramina T, ^{131}INa de 1 a 3 mCi.

TABLA 1

pH	Tiempo de reacción (minutos)	Rendimiento % del producto marcado
3,6	30	72
	60	79
	120	83
3,2	30	77
	60	84
	120	84
3,0	30	92
	60	97
	120	98
2,8	30	89
	60	91
	100	93
2,0	30	78
	60	83
	120	85

Efectos de la cloramina T

En las condiciones indicadas en el método de marcación, se hicieron experiencias con y sin oxidante (cloramina T, en ausencia del mismo los resultados descienden de 98 % a 64 % en promedio).

Efectos de la temperatura

En las condiciones indicadas para la marcación, se efectuaron experiencias a temperatura ambiente y a ebullición. A temperatura ambiente (25° C) el promedio de los rendimientos es del 98 %, a 100° C es de 72 %. Se nota un evidente efecto desfavorable de la temperatura en cuanto a la incorporación de radioyodo a este compuesto.

Acción de la luz visible

En la técnica de marcación indicamos trabajar bajo iluminación natural del laboratorio, ensayos realizados con la presencia de una fuente de luz blanca (lámpara de 200 watts colocada a 30 cm del tubo de reacción) dieron rendimientos radioquímicos menores (91 %).

En trabajos anteriores ⁽⁶⁻⁷⁾ habíamos observado un efecto favorable de la luz blanca cuando empleábamos cloramina T.

Concentración de azul de o-toluidina

Ante la solicitud de profesionales de emplear el producto marcado en humanos, con diferente actividad específica, efectuamos experiencias con distinta masa de azul de o-toluidina, manteniendo los mismos volúmenes y condiciones que indicáramos en el método de marcación. La actividad específica de cada experiencia varió entre 1-5 mCi/mg.

Los resultados que se dan responden al promedio de 5 ensayos en cada caso.

TABLA 2

mg de azul de o-toluidina	R % promedio
5,0	98
3,0	98
2,5	98
1,2	94
1,0	96
0,5	93
0,2	94

Estabilidad

TABLA 3

Actividad Especifica (mCi/mg)	% ¹³¹ I libre a 25° C	% ¹³¹ I libre a 4° C
13,00	2,8	2,0
10,00	3,0	2,2
4,20	1,8	1,8
3,70	2,0	1,7
3,20	3,1	2,7
2,40	2,3	2,5
0,26	1,8	1,8
0,06	1,6	1,4
0,05	1,5	1,4
0,02	1,2	1,0

Los porcentajes de radioyodo libre que se indican en la tabla 3, corresponden al 7º día de marcado el compuesto. Los controles fueron efectuados diariamente tomando una alícuota del producto y haciendo una corrida cromatográfica como se indica en los métodos de control.

BIBLIOGRAFIA

1. E. J. POTCHEN, H. G. WATTS and H. K. AWWAD: *Radiol. Clinics N. Am.* 5 (1967), 267.
2. T. G. BRIEN and V. KEAVENY: *Int. J. of Appl. Rad. and Isotopes* 19 (1968), 821-822.
3. P. CZERNIAK y S. BORUCHOWSKI: *J. Labelled Compounds* 7 (1971), 541.
4. E. G. ARCHER, E. G. POTCHEN, R. STUDER and B. SIEGEL: *Journal of Nuclear Medicine* V 13, N° 1 (85-91).
5. R. J. CORREIA, A. E. A. MITTA, G. N. de NUÑEZ, J. NICOLINI, S. QUIROGA y R. RADICELLA: *Manual de Controles Radiofarmacéuticos - CNEA* (1970).
6. G. N. B. de SALAS, y A. E. A. MITTA: *Informe CNEA N° 289* (1971).
7. R. J. CORREIA y A. E. A. MITTA: *Informe CNEA N° 254* (1971).