

Разработка и валидация методики количественного определения медной (I) соли 2-метоксиизобутилизонитрила тетрафторбората в препарате «МИБИ, ^{99m}Tc».

Абдукаюмов А.М., Рихсиев А.З., Усаров З.О., Зикиров М.А.
Государственное предприятие «Радиофармацевт», Узбекистан

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время радионуклидные методы исследования сердечно-сосудистой системы находят все большее применение в клинической практике. Одним из радиофармацевтических препаратов (РФП) является МИБИ,^{99m}Tc. Данный РФП получают из комплексного соединения на основе лиганда медной соли 2-метоксиизобутилизонитрилтетрафторбората с оловом двухвалентным (МИБИ-Sn), мечением радионуклидом технеция-99m (МИБИ,^{99m}Tc), который используют в медицине для диагностических целей в качестве ядерного перфузионного агента для визуализации кровотока через сердце. Кроме того, МИБИ,^{99m}Tc позволяет одновременно оценивать фракцию выброса левого желудочка при физической нагрузке и в состоянии покоя. Визуализация перфузии миокарда с использованием МИБИ,^{99m}Tc менее инвазивна, чем коронарная ангиография, и демонстрирует убедительные доказательства для тестирования на неабортимую или обратимую ишемию. МИБИ,^{99m}Tc является предпочтительным средством из-за его медленного удаления из ткани миокарда после поглощения клетками с минимальным перераспределением, что обеспечивает более высокое качество визуализации. Благодаря длительному присутствию в тканях и зависящему от кровотока поглощению, МИБИ,^{99m}Tc также может использоваться при построении ОФЭКТ-томографии и для наблюдения за результатами тромболитической терапии [1]. Этот препарат также способен быстро отличать ишемическую ткань от пораженной инфарктом при использовании изображений с закрытым напряжением [2]. Другим показанием к применению МИБИ,^{99m}Tc является скинтимаммография, дополнительное средство второго ряда для визуализации молочной железы при раке молочной железы [3]. Один из этапов исследований по созданию лекарственного средства – разработка методик количественного определения содержания действующего вещества в готовом лекарственном препарате. При этом большое значение имеют методы анализа, позволяющие быстро и надежно выявить отклонения в качестве и свойствах препарата на самых ранних стадиях исследования. Простым и надежным методом контроля качества лекарственных средств признана спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра [4-9]. Применение этого метода отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью и позволяет значительно упростить методики количественного анализа.

Целью данного исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения медной (I) соли 2-метоксиизобутилизонитрила тетрафторбората (МИБИ) в препарате «МИБИ, ^{99m}Tc», методом спектрофотометрии. Валидацию разработанной методики проводили по следующим критериям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Методика количественного определения МИБИ

Субстанции МИБИ-Sn в виде лиофилизата соответствующей массе МИБИ 0,8 мг растворяли в 3,0 мл раствора пертехнетата натрия (Na^{99m}TcO₄) полученного из генератора технеция-99m. Оптическую плотность полученного раствора измеряли в максимуме поглощения при длине волны 435 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание МИБИ в таблетке (X, мг) рассчитывали по формуле: $G = \frac{D \cdot 5,0 \cdot 3,0 \cdot 602,9}{0,2 \cdot 13300}$

где: D- оптическая плотность испытуемого раствора; 5,0- объем испытуемого раствора, в миллилитрах; 3,0- объем раствора реагента, в миллилитрах; 602,9 - молекулярная масса медной соли 2-метоксиизобутилизонитрила тетрафторбората; 0,2- объем раствора реагента, взятый для анализа, в миллилитрах; 13300 - условный молярный показатель поглощения.

Приготовление модельных рабочих растворов: готовили семь модельных растворов согласно диапазону применения методики [5] в концентрациях: 70,00%, 80,00%, 90,00%, 100,00%, 110,00%, 120,00%, 130,00% от номинальной. Номинальный раствор приготовили растворением лиофилизата субстанции МИБИ-Sn соответствующей массе МИБИ 0,8 мг в 3,0 мл раствора пертехнетата натрия (Na^{99m}TcO₄).

Приготовление раствора плацебо: точная навеска 30,0 мг олова двуххлористый, 120,0 мг L-цистеин, 1,0 г маннит, 1,1 г натрий дигидроцитрат помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл, растворяют и доводят объем раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций до 100,00 мл, 1,00 мл полученного раствора помещают во флакон вместимостью 10,0 мл, добавляя 3,0 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций.

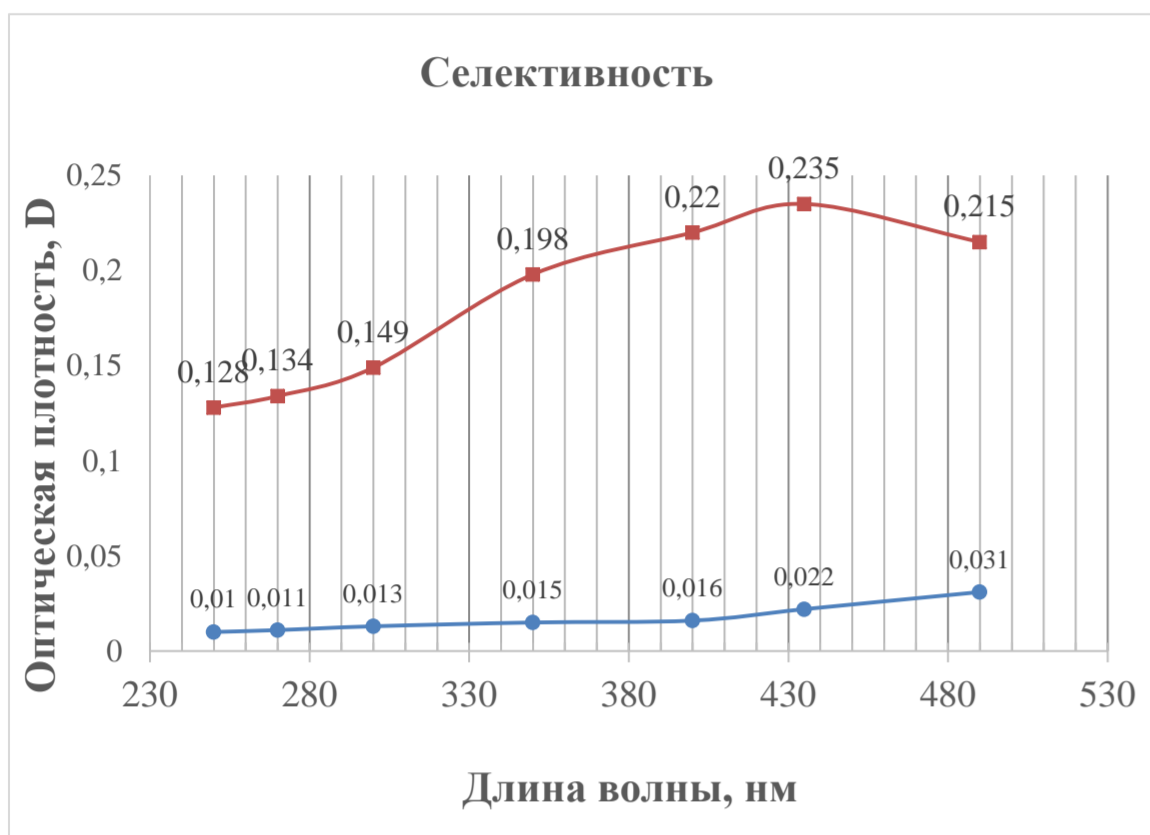


Рис. 1. Ультрафиолетовые спектры поглощения МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc (выделен красным цветом), раствора плацебо (выделен синим цветом).

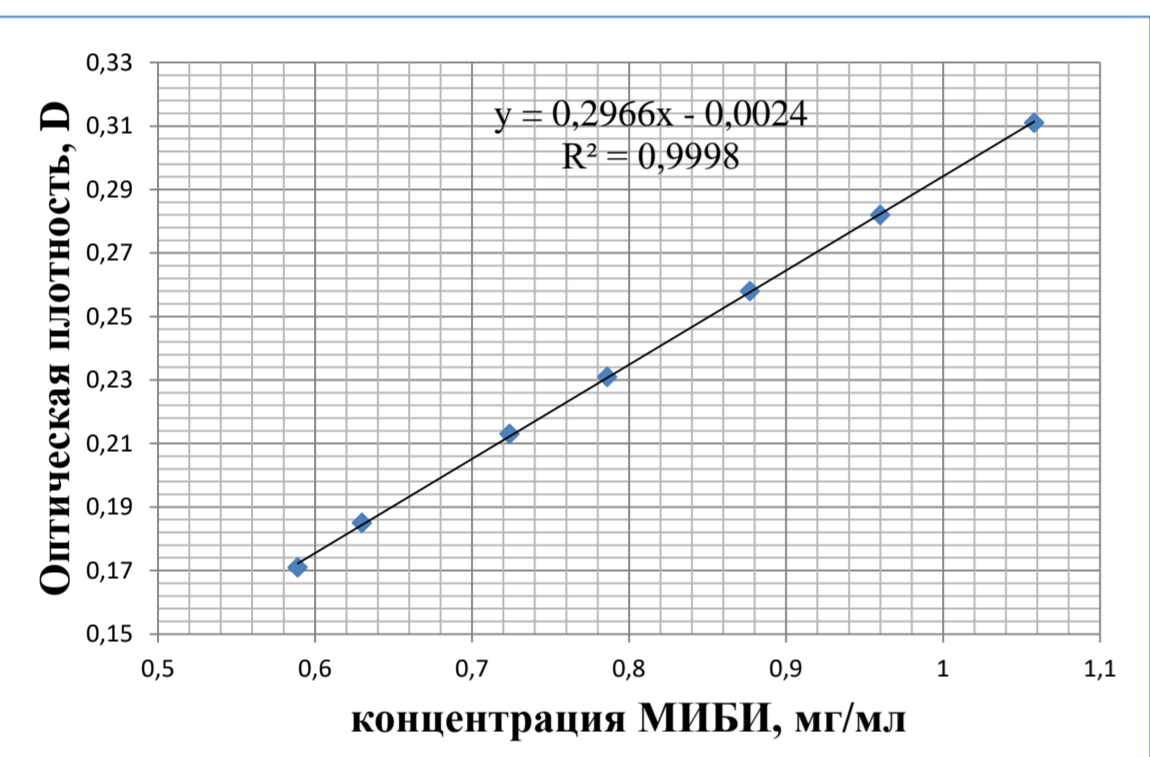


Рис. 2. Регрессионная прямая для количественного определения содержания МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc методом спектрофотометрии

Таблица 3. Результаты определения сходимости аналитической методики количественного спектрофотометрического определения содержания МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc

n	ОП, D	С, МИБИ, мг	ОП, D	С, МИБИ, мг	ОП, D	С, МИБИ, мг
1	0,166	0,5644	0,237	0,8058	0,303	1,0301
2	0,165	0,5610	0,235	0,7990	0,307	1,0437
3	0,166	0,5644	0,236	0,8024	0,308	1,0471
4	0,167	0,5678	0,233	0,7922	0,309	1,0505
5	0,168	0,5712	0,235	0,7990	0,306	1,0403
6	0,169	0,5746	0,231	0,7854	0,309	1,0505
7	0,159	0,5406	0,237	0,8058	0,311	1,0573
8	0,166	0,5644	0,235	0,7990	0,308	1,0471
9	0,164	0,5576	0,236	0,8024	0,307	1,0437
10	0,167	0,5678	0,231	0,7854	0,301	1,0233
Хср.		0,5633		0,7976		1,0434
СКО пов-мости, S _r , мг			0,0094	0,0076		0,0101
СКО пов-мости, S _r ² , мг			0,0001	0,0001		0,0001
Сумма СКО пов-мости, S _r ² , мг						0,0002
Макс СКО повторяемости, S _r ² , мг						0,0001
Критерий Кохрена, расчетное значение, G						0,4122
Критерий Кохрена, табличное значение (РМГ61), G						0,6170
СКО повторяемости методики, мг						0,0091
Общее среднее, Хср. С _r , мг						0,8014
отн. СКО повторяемости методики, %						1,1295
t (p, f) табл.						2,262
t (p, f) выч.						0,0264
(± Δx), мг		0,012				
ε, %				1,45		

Заключение

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения содержания основного действующего вещества в лекарственном препарате МИБИ, ^{99m}Tc. По результатам эксперимента установлено, что данная методика специфична в отношении МИБИ и обеспечена приемлемой правильностью, сходимостью, прецизионностью и линейностью как при нормальных рабочих концентрациях, так и в экстремальных точках диапазона концентраций.

Источники информации:

- Harvey A. Ziessman, Janis P. O'Malley, James H. Thrall. Nuclear Medicine. (2019) ISBN:
- Baldari S, Restifo Pecorella G, Cosentino S, Minutoli F. Investigation of brain tumours with (99m)Tc-MIBI SPET. (2002) The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR). 46 (4): 336-45.
- Minutoli F, Angileri FF, Cosentino S, Pecorella GR, Cardali S, De Divitiis O, Germanò A, Baldari S. 99mTc-MIBI SPECT in distinguishing neoplastic from nonneoplastic intracerebral hematoma. (2003) Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine. 44 (10): 1566-73.
- ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля лекарственных средств.
- МУ 64-004-001-2002. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения.
- ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.
- Пригодность аналитических методов для конкретного применения. Руководство для лабораторий по валидации методов и смежным вопросам. Б. Магнуссон, У. Эрнемарк. Киев 2016. Второе издание ООО «Юрка Любченко»
- ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
- Рекомендации по межгосударственной стандартизации РМГ 61— 2010

Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики количественного определения содержания МИБИ в препарате МИБИ, ^{99m}Tc, проводили в соответствии с установленными требованиями на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях. Исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность). Главное условие специфичности методики – способность безусловно определять анализируемое вещество при наличии других компонентов, которые могут присутствовать в образце, например вспомогательных веществ. Для количественного определения содержания действующего вещества в препарате МИБИ, ^{99m}Tc применен метод спектрофотометрии. В УФ-спектре поглощения раствор препарата МИБИ, ^{99m}Tc в области длина волны от 250 до 490 нм приведено на рисунке 1.

Из результатов измерений оптической плотности раствора препарата МИБИ, ^{99m}Tc и раствора плацебо рис.1. видно, что спектр раствора, приготовленный для количественного определения медной соли 2-метоксиизобутилизонитрилтетрафторбората, в области длина волны от 250 до 490 нм имеет максимум поглощения при длине волны 435 нм. В тоже время, раствор плацебо в этом диапазоне длине волны не имеет максимумов, то есть разработанная методика специфична в отношении МИБИ.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (ОП) для проб с различным содержанием МИБИ в пределах аналитической области методики – от 70 до 130 % номинального содержания МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc. Регрессионный анализ полученных данных проводили методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $y = bx + a$ (где x – количество определяемого вещества, y – величина отклика, b – угловой коэффициент, a – свободный член) и рассчитывали коэффициент корреляции r по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x. Полученные данные, представленные в табл. 1.

Таблица 1. Результаты оценки параметров линейной зависимости при количественном определении содержания МИБИ в модельных смесях

Процент от номинального содержания	Содержание МИБИ в пробе, мг	Оптическая плотность, D	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
70	0,589	0,171	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 0,2966$ Свободный член линейной зависимости $a = 0,0024$ Коэффициент корреляции $r = 0,9999$; $y = 0,2966x - 0,0024$
80	0,63	0,185	
90	0,724	0,213	
100	0,786	0,231	
110	0,877	0,258	
120	0,96	0,282	
130	1,058	0,311	

Правильность методики подтверждали анализом серии модельных смесей, соответствующей 70, 80, 90, 100, 110, 120 и 130 % номинального содержания МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc. На каждом уровне проводили 3 определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2,0 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. Результаты анализа оценивали, сравнивая полученные результаты с ожидаемым значением величины (содержанием МИБИ в модельной смеси, мг). Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики количественного спектрофотометрического определения содержания МИБИ в растворе препарата МИБИ, ^{99m}Tc.

Процент номинального содержания	от	п/п №	Содержание МИБИ анализируемой пробе, мг, X1	ОП, D	Найдено МИБИ, мг	Хср. значение	(X1-Хср) ²	Восстановление, %
70		1	0,56	0,165	0,5610	0,5678	0,000060	101,39
		2		0,167	0,5678			
		3		0,169	0,5746			
80		4	0,64	0,195	0,6630	0,6494	0,000088	101,46
		5		0,19	0,6460			
		6		0,188	0,6392			
90		7	0,72	0,21	0,7140	0,7140	0,000036	99,16
		8		0,211	0,7174			
		9		0,209	0,7106			
100		10	0,8	0,24	0,8160	0,8114	0,000130	101,43
		11		0,239	0,8126			
		12		0,237	0,8058			
110		13	0,88	0,257	0,8738	0,8681	0,000142	98,65
		14		0,255	0,8670			
		15		0,254	0,8636			
120		16	0,96	0,289	0,9825	0,9757	0,000248	101,64
		17		0,286	0,9723			
		18		0,286	0,9723			
130		19	1,04	0,313	1,0641	1,0562	0,000263	101,56
		20		0,309	1,0505			
		21		0,31	1,0539			
Хср.			0,8000			0,8061	0,0010	100,75
СКО, S			0,0127					
Смещение, мг						0,0061		
Относительное смещение, %						0,75		
Восстановление, %						100,75		
t (p, f) табл.						2,086		
t (p, f) выч.						0,2472		
Доверительный интервал среднего результата анализа (± Δx), мг						0,01		
Относительная ошибка среднего результата ε, %						1,2		

Таблица 4. Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного спектрофотометрического определения содержания МИБИ в препарате МИБИ, ^{99m}Tc

Номер серии (номер результата анализа), (1=1,10)	Содержание МИБИ в анализируемой пробе, мг	Номер результата единичного анализа, полученного в условиях параллельного определения		Средний результат анализа, мг	Сумма дисперсий
		аналитик 1	аналитик 2		
1	0,800	0,81	0,815	0,8125	0,000479
2		0,789	0,779	0,784	
3		0,793	0,781	0,787	
4		0,795	0,808	0,8015	
5		0,798	0,809	0,8035	
6		0,798	0,815	0,8065	
7		0,784	0,782	0,783	
8		0,805	0,814	0,8095	
9		0,796	0,795	0,7955	
10		0,803	0,808	0,8055	
СКО повторяемости, S _r , мг				0,0069	
Передель повторяемости, г, мг				0,019	
СКО промежуточной прецизионности, S _R , мг/мл				0,0103	
Передель промежуточной прецизионности, R ₁ , мг				0,028	
Критерий Кохрена, расчетное значение, G				0,301	
Критерий Кохрена, табличное значение (РМГ61), G				0,602	
t (p, f) табл.				2,262	
t (p, f) выч.				0,1322	
Доверительного интервала среднего результата анализа (± Δx), мг				0,0073	
Относительная ошибка среднего результата ε, %				0,92	