

Способ получения субстанции к Генератору Технеция-99м на основе лиганда метилендифосфоновой кислоты (MDP) с оловом двухвалентным, для приготовления диагностического средства

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

ВВЕДЕНИЕ

В ядерной медицине, одной из наиболее востребованной диагностикой является диагностика заболеваний скелета. Следует отметить, что метастатическое поражение скелета выявляется в более чем у 60% больных раком молочной железы, легких, предстательной железы, толстой кишки. Для диагностирования этих заболеваний, наиболее чувствительным и специфичным методом является скинтиграфия остеотропными радиофармацевтическими препаратами (РФП). Метод основан на введении в организм пациента тропного, к костной ткани, РФП, и последующей регистрацией его при распределении и накоплении в скелете. Среди таких соединений особое место занимает бифосфонаты, применяемые при выявлении и терапии любой патологии скелета.

После открытия полифосфата меченным Tc-99m для визуализации костей в 1971 г. Субраманианом был введен ряд соединений, меченных Tc-99m пирофосфатом и бифосфонатом для визуализации костей [1-5]. Агенты, получившие самое широкое клиническое применение, включают комплексы полифосфата, гидроксэтилиден дифосфоната (HEDP) и метилендифосфоната с Tc-99m. Гидроксэтилиден дифосфонат (HEDP) применялся наиболее широко в мире, вплоть до конца восьмидесятых годов и применяется до настоящего времени в России и в Узбекистане под коммерческим названием «Фосфотех, ^{99m}Tc».

Данная работа посвящается исследованию образования комплекса (MDP^{99m}Tc) метилендифосфоновой кислоты (MDP) с радионуклидом технеций-99m, подбирая оптимальные соотношения основного вещества метилендифосфоновой кислоты (лиганд) и восстанавливающего агента двухвалентного олова в растворе с разным pH. Также изучению кинетики образования комплекса (MDP^{99m}Tc) метилендифосфоновой кислоты (MDP) с радионуклидом технеций-99m и срок хранения субстанции MDP(Sn).

МЕТОДЫ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЯ

При приготовлении субстанции комплекса метилендифосфоновой кислоты (MDP) с (II) оловом использовали следующие химические реактивы:

- метилендифосфоновая кислота, Alfa Aesar 99%;

-олова двухлористый, Sigma Aldrich 99%;

В экспериментальных исследованиях использовали метод радиоиндикаторов с использованием радиоактивного нуклида ^{99m}TcO₄⁻ полученного из Генератора технеций-99m производства ГП «Радиопрепарат».

Радиометрические измерения образцов проводились на гамма-спектрометре с полупроводниковым Ge(Li), детектором и программным обеспечением «Аспект» с помощью спектрометрического устройства СУ-03П № 0037-06.

Приготовление экспериментальных партий субстанции метилендифосфоновой кислоты с двухвалентным оловом (MDP(Sn)) проводили в реакционной установке.

Расфасованные растворы субстанции во флаконы вместимостью 10 см³ лиофилизовали в сублиматоре Epsilon2-16D.

Качественные и количественные характеристики основного вещества метилендифосфоновой кислоты и вспомогательных веществ определялись спектрофотометрическим методом на спектрофотометре LKB Biochrom Ultrespec II (Швеция). Для определения процентное соотношение образовавшегося комплекса MDP^{99m}Tc, свободного пертехнетат ионов ^{99m}TcO₄⁻ и гидролизованного восстановленного технеция (ГВТ) ^{99m}TcO₂ использовали хроматографическую бумагу марки ЗММ (Whatman) и хроматографическую пластину с тонким слоем силикагеля (Art. 5553, Merck).

Методика получения субстанции на основе лиганда MDP и восстанавливающего агента Sn²⁺.

Экспериментальные партии субстанции (MDP(Sn)) приготовили в реакционной установке путем растворения в воде для инъекций химических ингредиентов с пропусканием через раствор очищенного инертного газа, аргона со скоростью 5•10⁻⁶ м³/с., после чего, не прекращая подачу аргона, в смесь добавили олово двухлористое в солянокислом растворе. После завершения синтеза, полученный раствор пропустили через мембранный фильтр с размерами пор 0,22 мкм, в установку для разлива по 1 мл во флаконы, вместимостью 10 см³ и лиофилизовали в сублиматоре. После завершения лиофильной сушки, камеру сублиматора заполнили очищенным инертным газом аргона, выгрузили из камеры флаконы с субстанцией и незамедлительно укупили резиновыми крышками и алюминиевыми колпачками. Этим методом были приготовлены образцы субстанции MDP-Sn с разным содержанием метилендифосфоновой кислоты 7,0-12,0 мг/мл и Sn²⁺ (0,8-1,15 мг/мл), а также pH раствора комплекса изменялся в пределах 4,0-7,0.

Методика получения комплекса MDP^{99m}Tc.

Для получения комплекса MDP^{99m}Tc далее препарат в субстанции MDP(Sn) добавили раствор пертехнетата натрия с радионуклидом ^{99m}Tc в количестве 5 мл. Радионуклид ^{99m}Tc получили в виде раствора Na^{99m}TcO₄ из генератора технеция-99m. После полного растворения лиофилизат настояли в течение 5 минут и проверяли количество образовавшегося комплекса MDP^{99m}Tc, несвязанного в комплекс ^{99m}TcO₄⁻ и гидролизованного ^{99m}TcO₂ бумажной и тонкослойной хроматографическими методами.

Методика хроматографических исследований.

а) На хроматографической бумаге ЗММ (Whatman), размером 15 x 200 мм, отмечая линию старта на расстоянии 15 мм от одного из краев и линию фронта, находящуюся на расстоянии 100 мм от линии старта. На линию старта полоски нанесли 0,001 - 0,005 мл раствора препарата.

После высушивания пятна на воздухе провели хроматографирование восходящим методом до достижения растворителем, отмеченной линии фронта (ориентировочно 40 мин), используя в качестве растворителя раствор натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций. В указанном режиме хроматографирования значения Rf гидролизованного ^{99m}TcO₂ составляет 0,0 ± 0,05, а для комплекса ^{99m}Tc-MDP и пертехнетат ионов ^{99m}TcO₄⁻ составляет 1,0. С полученной хроматограммы измеряли скорость счёта от участка, содержащего ГВТ и от всей хроматограммы радиометрическим методом.

б) На полоске хроматографической пластины с тонким слоем силикагеля (Art. 5553, Merck) размером 15x100 мм отметили линию старта на расстоянии 15 мм от одного из краев, и линию фронта, находящуюся на расстоянии 80 мм от линии старта. На линию старта полоски нанесли 0,001 -0,005 мл раствора препарата.

После высушивания пятна на воздухе провели хроматографирование восходящим методом до достижения растворителем ацетоном отмеченной линии фронта (ориентировочно 20 мин). В указанном режиме хроматографирования значения Rf ^{99m}TcO₄⁻, составляет 0,95 ± 0,05 и 0,0 для ^{99m}TcO₂ и ^{99m}Tc-MDP. С полученной хроматограммы измерили скорость счёта от участка, содержащего свободные пертехнетат-ионы, и от всей хроматограммы радиометрическим методом.

Радиохимические примеси в растворе препарата, вычислили по формуле:

$$РХП = (\sum ГВТ + \sum ^{99m}TcO_4^- / \sum A_x) \times 100\%$$

где, РХП - Радиохимические примеси в растворе препарата; $\sum ГВТ$ – сумма скорость счёта активности гидролизованного восстановленного технеция и $\sum ^{99m}TcO_4^-$ скорость счёта активности свободных пертехнетат-ионов;

$\sum A_x$ – сумма скорости счёта активности для всей хроматограммы

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При изучении влияния концентрации лиганда, Sn²⁺ и pH на эффективность образования комплекса MDP^{99m}Tc в растворах, изменялась в пределах 7,0-12,0 мг/мл, Sn²⁺ 0,8-1,15 мг/мл и 4,0-7,0 соответственно. При минимальном количестве Sn²⁺ (0,8 мг/мл), участвующей в реакции восстановления TcO₄⁻, комплексообразования ^{99m}Tc с метилендифосфоновой кислотой содержанием 7,0 мг/мл и pH раствором 6,0 максимальный уровень связанного ^{99m}Tc составил ≤ 83,7%. Высокий уровень связывания ^{99m}Tc с метилендифосфоновой кислотой ≤ 99,3% наблюдался в субстанциях с количественным содержанием: Sn²⁺ 0,95 мг/мл, метилендифосфоновой кислотой 10,0 мг/мл и pH раствора 6,0. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Эффективность образования комплекса MDP^{99m}Tc в зависимости от концентрации лиганда, Sn²⁺ и pH раствора комплекса (в процентах), через 20 минут после добавления ^{99m}TcO₄⁻ в субстанцию.

MDP мг/мл	Содержание Sn ²⁺ , мг/мл								pH,раствор комплекса
	0,8	0,85	0,9	0,95	1,0	1,05	1,1	1,15	
7,0	82,3	82,7	85,1	86,2	85,9	83,2	81,6	79,4	4,0
	82,6	83,1	85,6	86,9	86,1	84,2	82,1	81,7	5,0
	83,7	85,7	87,1	88,2	87,6	84,9	83,7	81,9	6,0
	82,9	82,6	85,2	86,3	85,7	83,3	81,9	80,5	7,0
8,0	84,2	84,8	87,9	88,2	87,3	86,2	85,8	83,4	4,0
	84,6	85,1	88,6	90,9	88,7	87,2	86,1	84,7	5,0
	85,7	87,7	89,1	92,2	91,6	90,5	86,7	84,9	6,0
	84,5	84,9	88,2	90,8	88,3	87,1	85,9	84,2	7,0
9,0	87,2	88,8	93,9	94,2	92,3	91,2	85,8	83,4	4,0
	88,1	89,4	95,4	96,1	93,7	92,2	89,0	86,7	5,0
	89,7	92,7	96,1	96,9	94,3	93,5	89,3	86,9	6,0
	88,0	89,2	95,2	95,8	88,3	87,1	85,9	84,2	7,0
10,0	92,2	95,8	96,9	97,2	96,3	93,2	89,8	86,4	4,0
	93,1	96,4	97,9	98,6	97,7	95,2	91,5	90,7	5,0
	95,7	97,7	99,1	99,5	99,1	98,5	92,3	90,9	6,0
	92,8	96,5	97,2	98,5	97,1	95,1	90,9	89,2	7,0
11,0	92,0	95,1	95,9	97,1	96,3	93,1	89,1	85,4	4,0
	92,9	95,9	97,6	98,1	96,9	95,0	91,3	90,5	5,0
	95,1	97,2	98,9	99,1	98,6	97,0	92,1	90,5	6,0
	92,8	95,5	97,2	98,0	96,2	93,1	90,9	90,2	7,0
12,0	91,8	94,9	95,8	97,0	96,1	93,0	89,0	85,2	4,0
	92,7	95,6	97,4	98,0	96,7	95,0	91,1	90,2	5,0
	95,1	97,1	97,5	99,0	97,0	95,0	91,9	90,3	6,0
	92,6	95,5	97,2	98,0	96,1	92,9	90,8	90,0	7,0
Эффективность образования комплекса MDP ^{99m} Tc, %									

Из приведенных данных таблицы 3. следует, что качество субстанции в течение хранения 12 месяцев не значительно отличается от качества данных на день выработки. Видимо это объясняется присутствием инертного газа аргона внутри флакона с субстанцией, который предотвращает разложение субстанции и окисление Sn²⁺, тем самым обеспечивает качество в течение 12 месяцев и можно присвоит срок годности субстанции 12 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения работ определены оптимальные соотношения основного вещества метилендифосфоновой кислоты и восстанавливающего агента (двухвалентного олова), в реакции комплексообразования MDP^{99m}Tc и оптимальные условия мечения метилендифосфоновой кислоты с радионуклидом технеций-99m. Определена устойчивость комплекса метилендифосфоновой кислоты с радионуклидом технеций-99m и установлена предварительный срок хранения субстанции MDP-Sn, которая составляет 12 месяцев.

Из приведенных результатов таблицы 1. видно, что партия субстанции с количественным содержанием метилендифосфоновой кислотой в пределах 10,0-11,0 мг/мл, Sn²⁺ 0,95 мг/мл, и pH раствора 6,0, образует довольно устойчивый комплекс с ^{99m}Tc с эффективностью ≤ 99,1%.

Увеличение концентрации Sn²⁺ до 1,05 мг/мл в реакционных смесях не оказывали существенного влияния на характер образования комплексов ^{99m}Tc с метилендифосфоновой кислотой. Но дальнейшее увеличение концентрации Sn²⁺ в реакционных смесях до 1,15 мг/мл образование комплекса ^{99m}Tc с бифосфонатом начинается снижаться и это по-видимому, обусловлено тем, что избыточное количество Sn²⁺ приводит к восстановлению ионов ^{99m}Tc⁷⁺ в пертехнетате до более низкой степени окисления технеция.

Чтобы избежать дальнейшего снижения степени окисления ионов пертехнетата до более низкой степени окисления содержание хлорида олова по отношению к добавленной активности не должно быть в избытке.

При изучении скорости процесса образования комплекса MDP^{99m}Tc, в реакционной смеси концентрация Sn²⁺ составляла 0,95 мг/мл, лиганда 10,0 мг/мл и pH раствора было равно 6,0. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Кинетика образования комплекса MDP^{99m}Tc в разные промежутки времени

MDP, мг/мл	Sn ²⁺ , мг/мл	Эффективность мечения РФП ^{99m} Tc-МДР, %						
		5мин	10мин	15мин	20мин	1 ч	2,5 ч	5 ч
10,0	0,95	96,7±0,4	97,9±0,5	99,0±0,4	99,3±0,4	99,2±0,4	98,6±0,4	98,1±0,5

Как видно из результатов таблицы 2. при соотношении концентрации метилендифосфоновой кислоты, к олову 10:0,95 в реакционных смесях комплекс MDP^{99m}Tc образовывался практически мгновенно и их количество оставалось на высоком уровне в течение 5 ч. Высокий уровень ^{99m}Tc связанного с метилендифосфоновой кислотой (99,3±0,4%) наблюдался через 20 мин и сохранялся на этом уровне почти до 1 ч. По истечению 1 ч комплекс начинает гидролизываться и к 5 ч кондиционного состояния остается 98,1%.

Для изучения стабильности субстанции MDP(Sn) брали ранее приготовленные субстанции со сроком хранения 3, 6, 9 и 12 месяцев с содержанием MDP и Sn²⁺ 10:0,95 мг/мл соответственно приготовили комплекс MDP^{99m}Tc, затем проверяли количественные и качественные характеристики комплекса. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Изучения стабильности субстанции MDP(Sn)

Наименование показателей	Данные на день выработки	Срок после изготовления 3 месяца	Срок после изготовлени я 6 месяцев	Срок после изготовления 9 месяцев	Срок после изготовления 12 мес
Описание	Лиофилизат белого цвета	Лиофилизат белого цвета	Лиофилизат белого цвета	Лиофилизат белого цвета	Лиофилизат белого цвета
Содержание Sn ²⁺ , мг/мл	0,953 мг.	0,959 мг.	0,956 мг.	0,954 мг.	0,951 мг
Содержание MDP, мг/мл	10,1 мг.	10,0 мг.	10,05 мг.	10,1 мг.	10,04
Эффективность образования комплекса MDP ^{99m} Tc, в %	99,5±0,4	99,3±0,4	99,4±0,4	99,2±0,4	99,3±0,4

Источники информации:

- Subramanian G, McAfee JG (1971) A new complex of ⁹⁹mTc for skeletal imaging. Radiology 99:192-196
- Subramanian G, McAfee JG, Blair RJ, Kallfelz FA, Thomas FD (1975) Technetium-99m-methylene diphosphonate - a superior agent for skeletal imaging: comparison with other technetium complexes. J Nucl Med 16:744-755
- Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits. — Vienna: International Atomic Energy Agency, 2008SU 1471959.
- EP 0960623A2;
- Brazilian archives of biology and technology, Vol.48, Special: pp. 1-8, October 2005