

А. В. Капустян*, А. А. Буряк, В. М. Бойко

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК АНАЛИЗА МЕТА-ЙОДБЕНЗИЛГУАНИДИНА СУЛЬФАТА С ИЗОТОПАМИ ЙОДА ¹²⁷I И ¹³¹I

АО "Научно-исследовательский физико-химический институт имени Л. Я. Карпова",
Россия, 249033, Обнинск.

* e-mail: commander-scaramouche@hotmail.com

Разработаны методики определения количественного содержания *мета*-йодбензилгуанидина (*м*-ИБГ), йодид-ионов, химической чистоты *м*-ИБГ и радиохимической чистоты *м*-[¹³¹I]ИБГ методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим и радиоспектрометрическим детектированием. Пределы определения: *м*-ИБГ — 50 – 250 мкг/мл, натрия йодид — 0,78 – 58,5 мкг/мл, *м*-[¹³¹I]ИБГ — 300 – 2250 кБк. Валидация методик подтвердила соответствие их характеристик установленным требованиям.

Ключевые слова: *мета*-йодбензилгуанидин; радиофармацевтический препарат; ВЭЖХ; РФП; *м*-ИБГ.

мета-Йодбензилгуанидина сульфат с йодом-131 (*м*-[¹³¹I]ИБГ) широко применяется в медицинской практике как терапевтическое и диагностическое средство для терапии злокачественных новообразований [1, 2].

м-[¹³¹I]ИБГ является структурным аналогом норадреналина и при внутривенном введении избирательно накапливается в тканях с высокой адренергетической иннервацией (стимулируемых адреналином и норадреналином), особенно в опухолях нейроэктодермального происхождения.

Препарат обладает ярко выраженной тропностью по отношению к целевому органу и поврежденным тканям и накапливается в основном в органах выделительной системы, слюнных железах, надпочечниках, легких и селезенке [2].

Основными технологическими примесями, подлежащими контролю, являются предшественник *м*-ИБГ — *мета*-йодбензиламина хлорид (*м*-ИБА) и участвующий в синтезе лекарственного вещества изотоп йода-131. Международные фармакопеи устанавливают следующие пределы содержания примесей: *м*-ИБА — не более 1 %, ¹³¹I — не более 5 % для диагностических и не более 7 % для терапевтических целей. Разработка методов их контроля и посвящена данная статья.

Химическая чистота и содержание *м*-ИБГ. Для определения количественного содержания основного компонента возможно использовать неводное титрование, ВЭЖХ. У каждого из методов есть свои плюсы и минусы: ВЭЖХ — метод относительный и для калибровки прибора необходим стандартный образец субстанции, что в случае титрования необязательно, так как титр уточняется по достаточно распространенным веществам, а абсолютность метода позволяет сразу определять концентрации вещества без использования калибровочных графиков и математических моделей. Однако неводное титрование весьма требовательно к постановке эксперимента и качеству используемых реагентов, также необходимо маскировать, учитывать содержащуюся примесь, которая будет влиять на ре-

зультаты анализа. Титрование смесей ароматических аминов рассмотрены в работах [3 – 5]. В то же время ВЭЖХ позволяет за 1 анализ определить и содержание, и химическую чистоту.

Известны методики определения содержания основного компонента и химической чистоты методом ВЭЖХ, описанные в Европейской (EuPha) [6], Американской (USP) [7] и Международной фармакопеях [8], а также в научной литературе [9 – 11], однако на практике нами выявлены различные их недостатки и решили разработать свою.

Радиохимическая чистота. Определять радиохимическую чистоту можно методами планарной хроматографии и электрофореза с последующим детектированием бета- или гамма-спектрометром, ВЭЖХ с использованием детектора бета- и гамма-излучения. Точность методов планарной хроматографии сильно зависит от величины и геометрии щели в коллиматоре при использовании гамма- или бета-сканеров и расстояния от пластины до коллиматора, либо от размера полоски пластины, бумаги, активность которых измеряют с помощью спектрометра. В случае ВЭЖХ таких проблем не наблюдается, однако в используемом нами детекторе "Raytest Ramona Star" наблюдаются размытие и уширение пика аналита при регистрации гамма-квантов, связанные с геометрией измерительной ячейки и оказывающие негативное влияние при проведении быстрых анализов. При выборе метода анализа и вида детектирования учли меньшую (по сравнению с гамма-излучением) величину фона бета-частиц. Исходя из вышеизложенного и имевшейся отработанной методики определения химической чистоты и содержания *м*-ИБГ, решили использовать метод ВЭЖХ с бета-спектрометрическим детектированием.

Экспериментальная часть

Объектами исследования выступили образцы субстанции *м*-ИБГ и готового препарата *м*-[¹³¹I]ИБГ, тех-

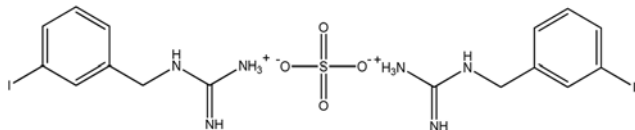


Рис. 1. *мета*-Йодбензилгуанидина сульфат.

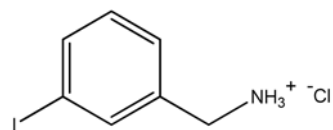


Рис. 2. *мета*-Йодбензиламина хлорид.

нологических примесей *мета*-йодбензиламина хлорида (*м*-ИБА), NaI и Na¹³¹I.

В качестве эталона при разработке методики определения содержания *м*-ИБГ использовали фармакопейный стандарт (EuPha: Iobenguane sulfate, cat. code I0328000); при разработке методики определения содержания йодид-ионов в роли стандарта выступал рабочий стандартный образец NaI (ч.д.а., Реахим); при разработке методики определения радиохимической чистоты *м*-[¹³¹I]ИБГ в качестве эталона — аттестованный раствор Na¹³¹I (АО “НИФХИ имени Л. Я. Карпова”).

Растворы реальных проб готовились из *м*-ИБГ и *м*-ИБА производства АО “НИФХИ имени Л. Я. Карпова”.

Работы проводились на ВЭЖХ хроматографах “Shimadzu LC-20AD” (Shimadzu Corporation, Japan) с УФ-детектором “Shimadzu SPD-20A” (Shimadzu Corporation, Japan) и “Shimadzu LC-20AT” (Shimadzu Corporation, Japan) с радиоспектрометрическим детектором “Raytest Ramona Star” (Elysia-Raytest GmbH, Germany) с использованием ячейки для регистрации β-излучения.

Диапазоны исследуемых концентраций и активностей: “холодный” *м*-ИБГ — 50 – 250 мкг/мл; йодид натрия — 0,78 – 58,5 мкг/мл; *м*-[¹³¹I]ИБГ + Na¹³¹I — 300 – 2250 кБк.

Планирование, постановку и проведение всех валидационных испытаний выполняли в соответствии с Государственной фармакопеей XIV (ГФ XIV) [12], РМГ 61-2010 “Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа” (РМГ 61-2010) [13]. Расчеты проводили в соответствии с ГФ XIV, РМГ 61-2010, МИ 2083-90 “Измерения косвенные. Определение результатов измерений и оценивание их погрешностей” (МИ 2083-90) [14], ГОСТ Р 8.736-2011 “Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений” (ГОСТ Р 8.736-2011) [15]. Проверка на выбросы проводилась по критериям Диксона и Граббса, адекватность модели — по критерию Фишера, корреляционные зависимости — по критерию Пирсона. Значимость коэффициентов в уравнении регрессии проверялась по критерию Стьюдента и *p*-критерию. Критические значения статистических распределений Стьюдента и Фишера, значения критерия Граббса брали из “Таблиц математической статистики” [16] и ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 “Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений” [17].

Результаты и их обсуждение

Рассмотрение существующих методик анализа. В фармакопейной статье EuPha 9.0 предлагается для

детектирования использовать длину волны 254 нм, исследования показали, что максимум поглощения находится в области 230 нм (рис. 3); вызывает вопросы состав подвижной фазы, имеющий pH 8, хотя критичным для используемого в методике силикагеля без привитой фазы считается pH не выше 7,5. В USP не обоснован выбор сорбента довольно крупного зерна (10 мкм) и полупрепаративного масштаба колонки; наличие в составе подвижной фазы фосфорной кислоты ограничивает возможности использования методики с испарительными и аэрозольными детекторами. В процессе подбора условий разделения наблюдалась плохая воспроизводимость результатов анализа: по методике из EuPha получается сильно размытый, асимметричный пик аналита, который выходит гораздо позже регламентируемого времени: время выхода — 13 мин при использовании Merck Purospher STAR Si 5μ 125 × 4 мм против 7 мин при использовании колонки с силикагелем 5μ 250 × 4 мм; по методике из USP не удается отделить *м*-ИБА от *м*-ИБГ в тестовой смеси.

Процесс разделения. В ходе разработки методик анализа уточнили роли модификаторов подвижной фазы: уксусная кислота ускоряет десорбцию вещества с колонки, диэтиламин усиливает сорбцию и снижает асимметрию пика (рис. 4).

Ввиду отсутствия остатка гуанидина в составе катиона можно было ожидать проявления сильноосновных свойств, однако исследования растворимости *м*-ИБГ говорят о гораздо большем вкладе бензольного кольца в химические свойства по сравнению с гуанидиновым остатком. Положительное влияние (снижение асимметричности, уменьшение ширины и времени выхода пика) наблюдается при внесении небольших (не более 0,5 мл/100 мл элюента) добавок кислоты и амина, при внесении добавок 1 мл/100 мл элюента и более происходит некоторое снижение параметров разделения, возможно вызванное увеличением ионной силы раствора и усилением конкуренции

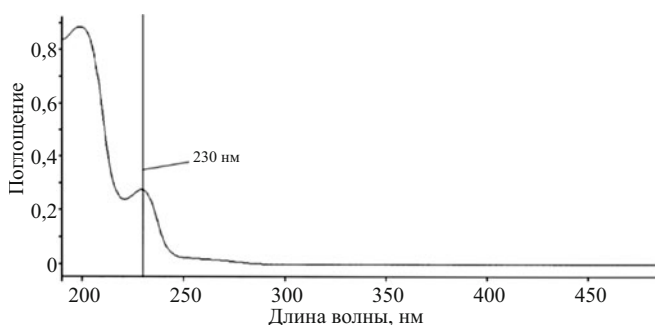


Рис. 3. УФ-спектр *м*-ИБГ.

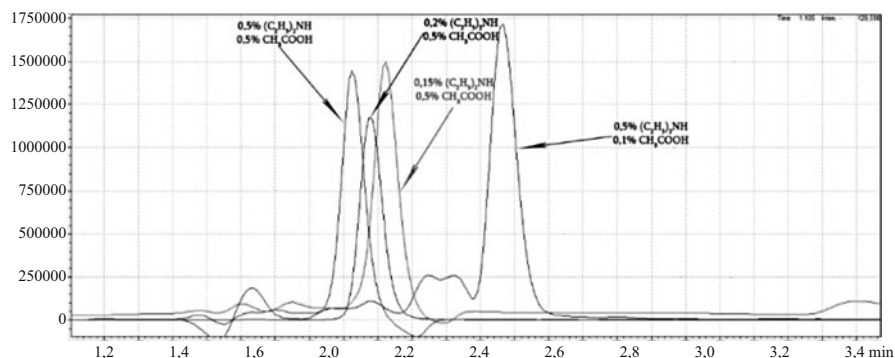


Рис. 4. Влияние модификаторов на разделение *m*-ИБГ и *m*-ИБА.

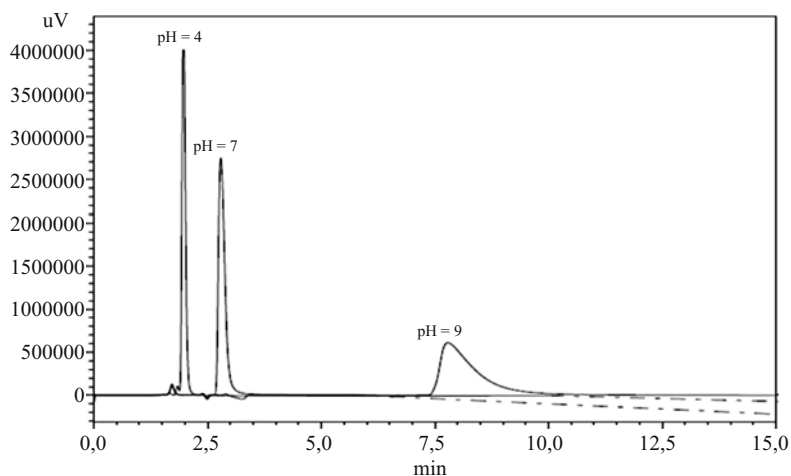


Рис. 5. Влияние pH на размывание и время выхода пика.

аналита с растворителем в слое элюента на поверхности частичек сорбента [18].

Исследовали влияние pH на перераспределение *m*-ИБГ в подвижной и неподвижной фазах — в кислой среде время удерживания соли меньше, в щелочной — больше. Зависимость между pH, концентрациями модификаторов и параметрами разделения имеет нелинейный вид (рис. 5).

Подбор и оптимизация условий анализа *m*-ИБГ. Валидация и изучение границ применимости методики. В результате проведенных исследований и отработки условий разделения на нескольких сериях образцов для определения содержания *m*-ИБГ нашли оптимальные условия:

Колонка	Merck ChromoLith High Resolution RP-18 100 × 4,6 мм
Подвижная фаза	25 % _{v/v} CH ₃ CN: 75 % _{v/v} H ₂ O : 0,2 % _{v/v} CH ₃ COOH : 0,1 % _{v/v} (C ₂ H ₅) ₂ NH
Скорость потока	2,0 мл/мин
Температура	45 °С
Детектор	спектрофотометрический, 230 нм
Объем пробы	20 мкл
Длительность анализа	2 мин

В процессе валидации методики установили, что наиболее точно описывает концентрации *m*-ИБГ в диапазоне 50 – 250 мкг/мл модель: $C = 7,17 \times 10^{-5} \times x$, где C — концентрация *m*-ИБГ в мкг/мл, x — площадь пика. Прямая зависимость концентрации от площади пика имеет высокую степень корреляции ($r = 0,9999$).

Таблица 1

Статистические и валидационные параметры методик

Анализируемое вещество	Диапазон концентраций, мкг/мл	Уравнение регрессии	Статистические параметры	Валидационные критерии
<i>m</i> -ИБГ сульфат	50 – 250	$C = 7,17 \times 10^{-5} \times x$	$r = 0,9999$ $r^2 = 0,9999$ $F(1,3) = 25878$	Прецизионность = 95 % ДИ [– 2,41, 2,41 %] Правильность = 2,66 % Точность = 4,76 %
Натрия йодид	0,78 – 58,5	$C = 1,51 \times 10^{-5} \times x$	$r = 0,9997$ $r^2 = 0,9994$ $F(1,6) = 9239$	Прецизионность = 95 % ДИ [– 3,19, 3,19 %] Правильность = 1,6 % Точность = 3,92 %

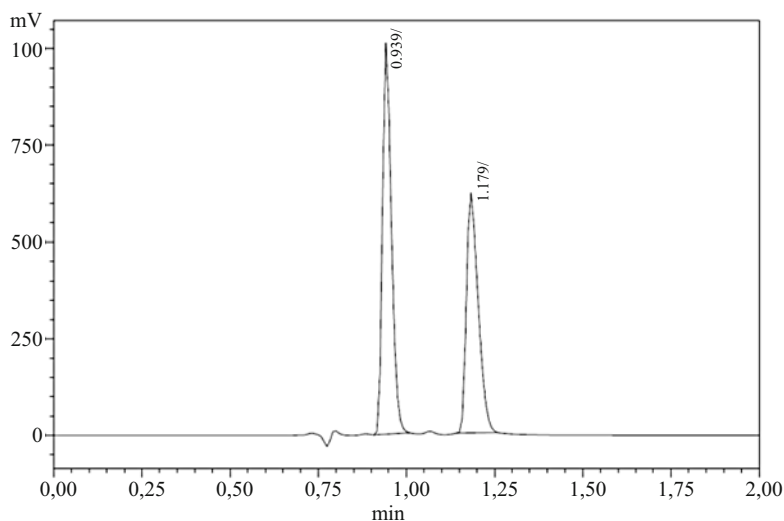


Рис. 6. Хроматограмма разделения смеси *m*-ИБА (0,939 мин) и *m*-ИБГ (1,179 мин).

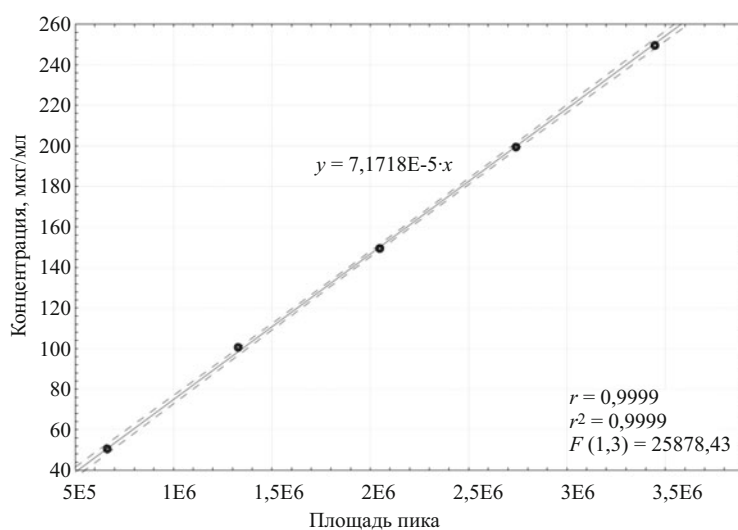


Рис. 7. График зависимости концентрации *m*-ИБГ сульфата от площади пика.

Регрессионная модель описывает получаемые результаты с коэффициентом детерминации, равным 0,9999. Прецизионность в виде границ доверительного интервала, правильность в виде среднеквадратического отклонения неисключенной систематической погрешности методики анализа и точность в виде среднеквадратического отклонения погрешности результатов анализа (совокупность систематической и случайной погрешностей) представлены в табл. 1.

Зависимость концентрации йодида натрия в диапазоне 0,78 – 58,5 мкг/мл от площади пика описывается уравнением: $C = 1,51 \times 10^{-5} \times x$, где C — концентрация натрия йодида в мкг/мл, x — площадь пика. Прямая зависимость концентрации от площади пика имеет высокую степень корреляции ($r = 0,9997$). Регрессионная модель описывает получаемые результаты с коэффициентом детерминации, равным 0,9994. Прецизионность, правильность и точность представлены в табл. 1.

В рамках исследования радиационной стойкости *мета*-йодбензилгуанидина сульфата была изучена

возможность использования предлагаемой методики при совместном присутствии *m*-ИБГ и различных антирадов. Благодаря высокой селективности методики возможно ее использование для разделения смесей *m*-ИБГ, йодидов, ацетона, метилэтилкетона, этанола, пара-гидроксibenзойной кислоты.

Оптимизация и валидация методики определения радиохимической чистоты m -[^{131}I]ИБГ. Из-за особенностей устройства и работы радиоспектрометрического детектора условия анализа пришлось немного изменить под задачи определения радиохимической чистоты m -[^{131}I]ИБГ:

Колонка	Merck ChromoLith High Resolution RP-18 100 × 4,6 мм
Подвижная фаза	33 % _{v/v} CH ₃ CN : 66 % _{v/v} H ₂ O : 0,2 % _{v/v} CH ₃ COOH
Скорость потока	1,5 мл/мин
Температура	40 °C
Детектор	β-спектрометрический, каналы 0 – 1023
Объем пробы	20 мкл
Длительность анализа	3 мин

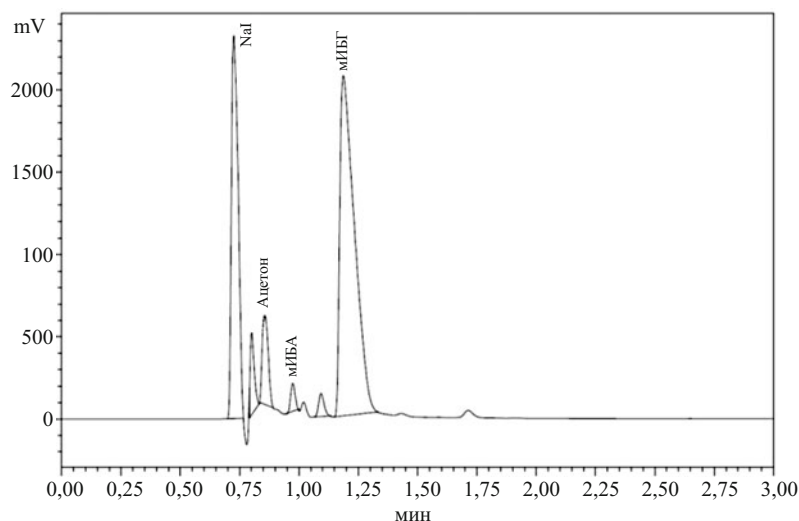


Рис. 8. Хроматограмма смеси йодида натрия, ацетона, *m*-ИБА, *m*-ИБГ и неизвестных примесей после облучения образца ($\lambda = 230$ нм).

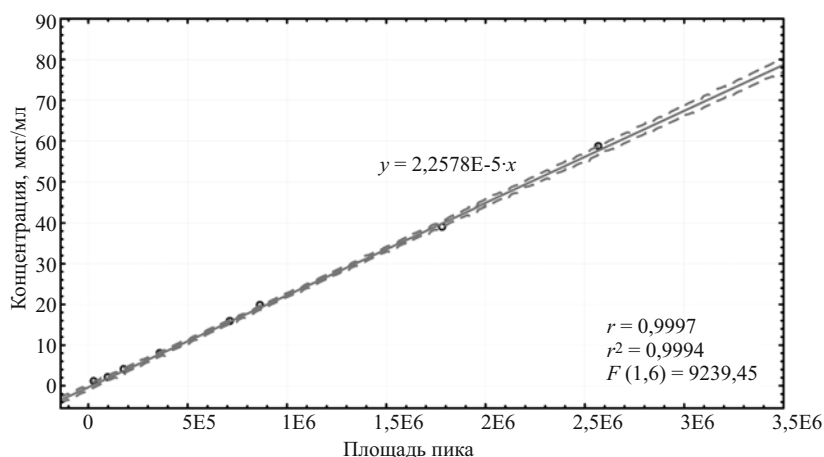


Рис. 9. График зависимости концентрации натрия йодида от площади пика.

Из-за отсутствия и невозможности получения стандартного образца *m*-[^{131}I]ИБГ в качестве РСО использовали образец примеси (Na^{131}I), оцененный методом гамма-спектрометрии. Для оценки показателей качества применили описанный в РМГ 61-2010 метод добавок с использованием стандарта примеси. Использовали пробу с удельной активностью = 768 кБк/мл и добавку $\text{Na}^{131}\text{I} = 127,6$ кБк/мл. Расчеты погрешностей производили в соответствии с МИ 2083-90 и ГОСТ Р 8.736-2011. Значения показателей в процентах от вели-

чины радиохимической чистоты: прецизионность = 2,2 %, правильность = 2,93 %, точность = 6,14 %.

Эксперимент по демонстрации линейности проводили на пробах с одинаковой радиохимической чистотой, но разной объе-

мною активностью в диапазоне 300 – 2250 кБк/мл. Первый этап статистической обработки заключался в восстановлении уравнения регрессии, расчете статистических критериев для зависимостей площадей пиков компонентов от активности пробы и в подтвержде-

Таблица 2

Статистические критерии и адекватность регрессионных моделей линейности

Зависимость	Уравнение регрессии	Статистические критерии	Статистическая значимость модели
Активность пробы — площадь пика <i>m</i> -[^{131}I]ИБГ	$A = 0,0245x$	$r = 0,9962, r^2 = 0,9924$ $F(1,3) = 391,51$	Значима
Активность пробы — площадь пика Na^{131}I	$A = 0,1045x$	$r = 0,9896, r^2 = 0,9793$ $F(1,3) = 142,12$	Значима
Радиохимическая чистота — активность пробы	$\text{РХЧ} = 0,7275 + 3,51 \times 10^{-5} \times x$	$r = 0,8456, r^2 = 0,7150$ $F(1,3) = 7,53$	Не значима

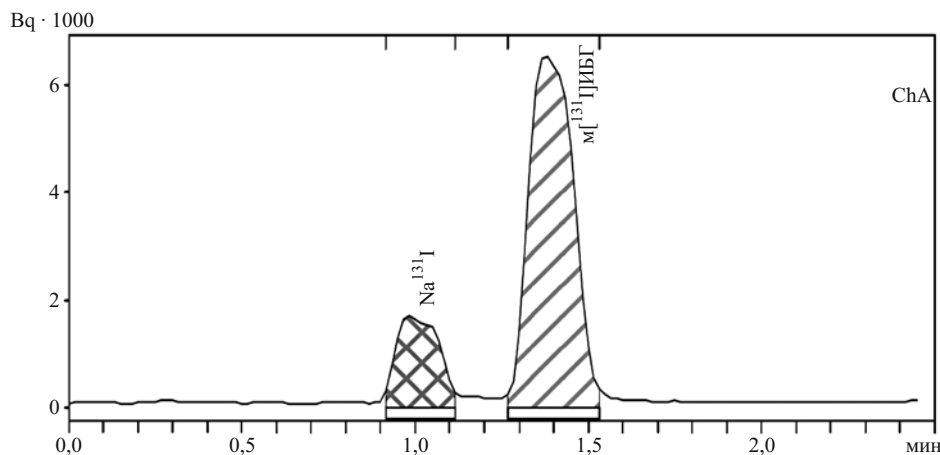


Рис. 10. Хроматограмма смеси Na^{131}I и $m\text{-}[^{131}\text{I}]\text{IBG}$.

нии адекватности построенной модели. Второй этап включал в себя восстановление уравнения линейной регрессии, описывающей зависимость радиохимической чистоты от активности вводимой пробы. Значения статистических критериев, регрессионные модели приведены в табл. 2.

Данная работа выполнена с использованием оборудования “Уником ВВР-ц” АО “НИФХИ имени Л. Я. Карпова”

ЛИТЕРАТУРА

1. EANM procedure guidelines for ^{131}I -meta-iodobenzylguanidine (^{131}I -mIBG) therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, **35**, 1039 – 1047 (2008).
2. ^{131}I / ^{123}I -Metaiodobenzylguanidine (mIBG) scintigraphy: procedure guidelines for tumor imaging, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **37**, 2436 – 2446 (2010).
3. Von R. Pohloudek-Fabini, K. Konig, *Pharmazie*, Heft 12, 752 – 756 (1958).
4. И. Денеш, *Титрование в неводных средах*, Мир, Москва (1971).
5. С. Сиггиа, Дж. Г. Ханна, *Количественный органический анализ по функциональным группам*, Химия, Москва (1983).
6. Iobenguane sulfate for radiopharmaceutical preparations (2351), *European Pharmacopoeia 9.0*, Strasbourg (2018).
7. Iobenguane I-123 Injection, *The United States Pharmacopoeia 42 The National Formulary 37*, United Book Press, Inc., Baltimore, MD (2018).
8. Iobenguane (^{131}I) injection, *The International Pharmacopoeia*, Eighth Ed. (2018).
9. T. J. Mangner, *Potential Artifacts in the Chromatography of Radiopharmaceuticals. Analytical and Chromatographic Techniques in Radiopharmaceutical Chemistry*, Springer, New York (1986).
10. J. J. R. Mertens, W. Vanryckeghem, L. Carlsen, *Progress in Radiopharmacy. Proceedings of the Second European Symposium of Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals*, (Cox P. Ed.) (1986), p. 101.
11. D. M. Wieland, J. Wu, L. E. Brown, et al., *J. Nucl. Med.*, **21**, 349 (1980).
12. *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XIII изд., т. 1 – 3 Москва (2015).
13. РМГ 61-2010 “Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа”, Стандартинформ, Москва (2013).
14. *МИ 2083-90 “Измерения косвенные. Определение результатов измерений и оценивание их погрешностей”*, Комитет стандартизации и метрологии СССР, Москва (1991).
15. *ГОСТ Р 8.736-2011 “Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений”*, Стандартинформ, Москва (2013).
16. Л. Н. Большев, Н. В. Смирнов, *Таблицы математической статистики*, Наука, Москва (1983).
17. *ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 “Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений”*, Стандартинформ, Москва (2009).
18. О. Б. Рудаков, *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*, Водолей, Воронеж (2004).

Поступила 30.05.17

DETERMINATION AND VALIDATION OF METHODS FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF META-IODOBENZYLGUANIDINE WITH IODINE ISOTOPES ^{127}I AND ^{131}I

A. V. Kapustyan, A. A. Buryak, and V. M. Boiko

L. Ya. Karpov Physicochemical Research Institute, Obninsk, Kaluga oblast, 249033 Russia

* e-mail: commander-scaramouche@hotmail.com

Methods for determining quantitative content of meta-iodobenzylguanidine (*m*-IBG), iodide ions, chemical purity of *m*-IBG and radiochemical purity of $m\text{-}[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ using HPLC with UV and radiospectrometric detection have been developed. The limits of determination are as follows: *m*-IBG, 50 – 250 $\mu\text{g/mL}$; sodium iodide, 0.78 – 58.5 $\mu\text{g/mL}$; $m\text{-}[^{131}\text{I}]\text{IBG}$, 300 – 2250 kBq. Validation of the proposed methods confirmed correspondence of their characteristics to specified requirements.

Keywords: meta-iodobenzylguanidine; *m*-IBG; radiopharmaceutical preparation; HPLC.