



UDK: 543.544.58.74:543.48

Lazizbek HAJIEV,

Falsafa doktori, O‘zR FA Yadro fizikasi instituti “Radiopreparat” davlat muassasasi yetakchi muhandisi,

E-mail: hajiyev.lazizbek@mail.ru

Ilxom SADIKOV,

Texnika fanlari doktori, professor, akademik, O‘zR FA Yadro fizikasi instituti direktori

Ayubxon ABDUKAYUMOV,

Texnika fanlari doktori, O‘zR FA Yadro fizikasi instituti “Radiopreparat” davlat muassasasi direktori

Abror RIHSIEV,

Texnika fanlari doktori, O‘zR FA Yadro fizikasi instituti “Radiopreparat” davlat muassasasi bosh texnologi

O‘zbekiston Milliy universiteti professori A.Xaitbaev taqrizi asosida

FOSFOR-32 RADIONUKLIDI ASOSIDAGI RADIOFARMATSEVTIK DORI VOSITASINING MOLYAR FAOLLIGINI SPEKTROFOTOMETRIK ANIQLASH

Annotatsiya

Ushbu tadqiqotda tashuvchisiz fosfor-32 (^{32}P) bilan nishonlangan ortofosfat kislotasi ($\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$) ishlab chiqarish jarayonida preparatning molyar faolligini (Ci/mmol) tezkor baholash uchun vanadiy–molibden reaktivi asosidagi sezgir spektrofotometrik usul ishlab chiqildi. Fosfat ionining vanadat va molibdat ionlari bilan nitrat kislotasi muhitida hosil qiladigan sariq fosfor–vanadiy–molibden (P–V–Mo) kompleksi 410 nm to‘lqin uzunligida maksimal yutilish beradi. Kalibrovka tenglamasi $d = 0,07812 \cdot n + 0,00783$ ($n \times 10^{-8}$ mol), $R^2 = 0,9993$ bo‘lib, usulning chiziqliligini tasdiqlaydi. Aniqlash chegarasi (LOD) 0,17 mkg, miqdoriy aniqlash chegarasi (LOQ) 0,56 mkg, ishchi (chiziqli) diapazon 0,31–4,96 mkg fosforni tashkil etdi. Amaliy namuna uchun molyar faollik 8410 Ci/mmol bo‘lib, nazariy qiymatdan chetlanish 1,06% ekanligi aniqlandi.

Kalit so‘zlar: fosfor-32, vanadiy–molibden reaktivi, spektrofotometriya, ammoniy vanadat, ammoniy molibdat, kaliy digidrofosfat, molyar faollik.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОЙ АКТИВНОСТИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РАДИОНУКЛИДА ФОСФОРА-32

Аннотация

В работе предложен простой и чувствительный спектрофотометрический метод определения молярной активности (Ci/ммоль) радиофармацевтического препарата в виде ортофосфатной кислоты, меченной фосфором-32 без носителя ($\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$). Метод основан на образовании окрашенного фосфорно-ванадий-молибденового комплекса в среде азотной кислоты с максимумом поглощения при 410 нм. Калибровочная зависимость: $d = 0,07812 \cdot n + 0,00783$ ($n \times 10^{-8}$ моль), $R^2 = 0,9993$. Предел обнаружения (LOD) составил 0,17 мкг, предел количественного определения (LOQ) — 0,56 мкг, линейный диапазон — 0,31–4,96 мкг фосфора. Для исследуемого образца молярная активность составила 8410 Ci/ммоль, отклонение от теоретического значения — 1,06%.

Ключевые слова: фосфор-32, ванадий-молибденовый реагент, спектрофотометрия, ванадат аммония, молибдат аммония, дигидрофосфат калия, молярная активность.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF THE MOLAR ACTIVITY OF A RADIOPHARMACEUTICAL BASED ON PHOSPHORUS-32 RADIONUCLIDE

Annotation

In this study, a simple and sensitive spectrophotometric method was developed to determine the molar activity (Ci/mmol) of a carrier-free phosphorus-32 labeled orthophosphoric acid radiopharmaceutical ($\text{H}_3[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$). The method relies on the formation of a yellow phospho–vanadium–molybdenum complex in nitric acid medium, showing a maximum absorbance at 410 nm. The calibration equation was $d = 0.07812 \cdot n + 0.00783$ ($n \times 10^{-8}$ mol), with $R^2 = 0.9993$. The limit of detection (LOD) was 0.17 μg and the limit of quantification (LOQ) was 0.56 μg , with a linear working range of 0.31–4.96 μg of phosphorus. For the tested sample, the molar activity was 8410 Ci/mmol and the deviation from the theoretical value was 1.06%.

Key words: phosphorus-32, vanadium–molybdenum reagent, spectrophotometry, ammonium vanadate, ammonium molybdate, potassium dihydrogen phosphate, molar activity.

Kirish. Yadro tibbiyotida terapevtik va diagnostik maqsadlarda qo‘llaniladigan radiofarmatsevtik preparatlarning sifat ko‘rsatkichlari ichida molyar faollik (molyar aktivlik) alohida o‘rin tutadi. Molyar faollik – radioaktiv izotopning kimyoviy modda miqdoriga nisbati bo‘lib, u preparatning “tashuvchisizlik” darajasi, biologik ta‘sir mexanizmi va dozalash aniqligi bilan bevosita bog‘liq. Xususan, fosfor-32 (^{32}P) radionuklidi beta-nurlanish manbai sifatida ayrim proliferativ kasalliklar va mahalliy terapiya yo‘nalishlarida qo‘llaniladi; shu bois ^{32}P asosidagi preparatlarda fosfatning iz miqdorlari ham nazorat qilinishi zarur. Amaliy laboratoriya sharoitida molyar faollikni aniqlashning asosiy murakkabligi shundan iboratki, radioaktiv faollik (mCi yoki Ci) ni o‘lchash nisbatan sodda bo‘lsa-da, kimyoviy tashuvchi (barqaror fosfor) miqdorini aniqlash uchun ko‘pincha qimmat va murakkab asbob-uskunalar talab qilinadi. Shuning uchun spektrofotometrik tahlil kabi arzon, tezkor va yetarlicha sezgir usullarni ishlab chiqish ham ishlab chiqarish jarayonida, ham sifat nazorati (QC) bosqichida dolzarb hisoblanadi.

Tadqiqotning maqsadi va vazifalari. Tadqiqotning maqsadi – ^{32}P asosidagi radiofarmatsevtik preparatlarda molyar faollikni aniqlash uchun vanadiy–molibden reaktivi yordamida fosfat ionini spektrofotometrik aniqlashga asoslangan ekspress, sezgir va ishonchli usulni ishlab chiqish hamda uni amaliy namunalarda sinab ko'rishdan iborat.

Ushbu maqsadga erishish uchun quyidagi vazifalar belgilandi: (I) P–V–Mo kompleksining maksimal yutilish sohasini aniqlash; (II) kaliy digidrofosfat standartidan foydalangan holda kalibrovka grafisini tuzish; (III) usulning chiziqiligi, sezgirligi va aniqlik ko'rsatkichlarini (LOD/LOQ, nisbiy xato va h.k.) baholash; (IV) ^{32}P preparat namunasida fosfor miqdorini aniqlab, molyar faollikni hisoblash.

Materiallar va metodlar. Tahlilda quyidagi reaktivlar qo'llanildi: ammoniy vanadat (NH_4VO_3), ammoniy molibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitrat kislotasi (HNO_3) hamda standart sifatida kaliy digidrofosfat (KH_2PO_4).

Optik zichlik Shimadzu UV-1900i (Yaponiya, aniqlash diapazoni 190 dan 1100 nm gacha; xatolik $\pm 2\text{nm}$; P-95,0% $U \pm 0,0024$) spektrofotometrda 1 sm optik yo'lga ega kuvetalarda 410 nm da o'lchandi.

Hajim faollik bir kanalli beta spektrometr MKГБ-01 «РАДЭК» (Rossiya, beta zarrachalarini aniqlash diapazoni 50 dan 3000 keV gacha; xatolik-5%; P-95,0% $U \pm 1,75$) da o'lchandi.

Vanadiy–molibden reaktivini tayyorlash

Vanadiy–molibden reaktivi uch bosqichda tayyorlandi. A eritma: 25% li nitrat kislotasi eritmasi distillangan suv bilan 280 ml hajmgacha suyultirildi (yakuniy zichlik $\rho \approx 1,147 \text{ g/cm}^3$). B eritma: ammoniy vanadatning 0,06% li eritmasi (50 ml) issiqqa chidamli kolbada tayyorlandi; to'liq erish uchun yengil qizdirish qo'llanildi. C eritma: ammoniy molibdatning 2,5% li eritmasi (170 ml) 60–70 °C haroratdagi suvda tayyorlandi. So'ng A, B va C eritmaları ketma-ket aralashtirilib, qorong'i shisha idishda xona haroratida saqlandi.

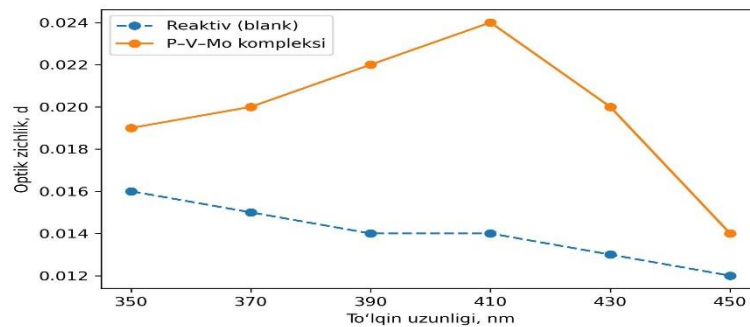
Standart eritmalar va kalibrovka

Kalibrovka uchun KH_2PO_4 ning $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ konsentratsiyali standart eritmasidan turli hajmlarda olinib, har bir kolbaga 5 ml vanadiy–molibden reaktivi qo'shildi va belgilangan hajmgacha distillangan suv bilan to'ldirildi. Hosil bo'lgan rangli kompleksning optik zichligi 410 nm da o'lchandi. Kalibrovka grafigi 1-jadval ma'lumotlari asosida tuzildi.

1-jadval.

KH_2PO_4 standart eritmasidan tayyorlangan kalibrovka eritmaları

Kolbaning tartib raqami	1	2	3	4	5
KH_2PO_4 eritmasining hajmi ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$), ml	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Fosfor miqdori, $n (\times 10^{-8} \text{ mol})$	1,0	2,0	4,0	8,0	16



Rasm 1. Vanadiy–molibden reaktivi (blank) va P–V–Mo kompleksi uchun yutilish spektri; maksimum yutilish 410 nm da kuzatildi.

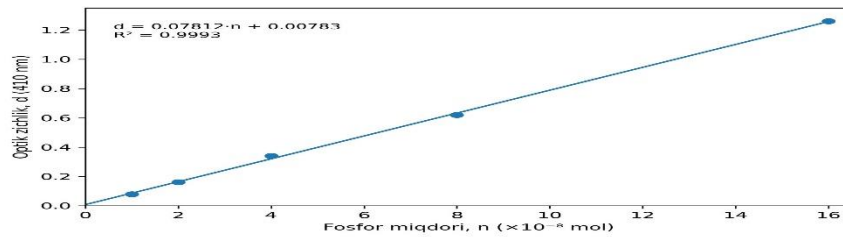
- Natijalar va muhokama. Spektral tekshiruv natijalariga ko'ra, fosfat ionining vanadiy–molibden reaktivi bilan hosil qilgan rangli kompleksi 410 nm atrofida maksimal yutilishga ega bo'ldi. Shu sababli keyingi barcha o'lchovlar 410 nm to'lqin uzunligida olib borildi. Reaktivning blank eritmasi ushbu sohada past fon yutilish ko'rsatdi, bu esa usulning sezgirligi va selektivligini oshiradi.

2-jadval.

Kalibrovka tajribalari natijalari va usulning analitik ko'rsatkichlari ($n=6$, $P=0,95$).

Kolbaning tartib raqami	1	2	3	4	5
KH_2PO_4 eritmasining hajmi $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$, ml	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Fosfor miqdori, $x 10^{-8} \text{ mol}$	1,0	2,0	4,0	8,0	16
Optik zichlik, d	$0,079 \pm 0,0029$	$0,162 \pm 0,00351$	$0,34 \pm 0,00648$	$0,62 \pm 0,00707$	$1,26 \pm 0,02366$
	$8,41 \times 10^{-6}$	$1,232 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$4,998 \times 10^{-5}$	$5,6 \times 10^{-4}$
s	0,0029	0,00351	0,00648	0,00707	0,02366
SKO	0,0143	0,0143	0,0143	0,0143	0,0143
r	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993
ACh, mkg	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
ATD, mkg	0,31-4,96	0,31-4,96	0,31-4,96	0,31-4,96	0,31-4,96
NX	1,5 %	8,6 %	7,8 %	4,66 %	0,767 %

Eslatma: d – optik zichlik; s^2 – dispersiya; s – standart og'ish; σ (SKO) – o'rtacha kvadratik og'ish; r – korrelyatsiya koeffitsiyenti; LOD – aniqlash chegarasi; LOQ – miqdoriy aniqlash chegarasi; ATD – aniqlash (chiziqli) diapazoni; NX – nisbiy xato; $t(P,f)$ – Student koeffitsiyenti ($P=0,95$ uchun $t=2,57$).



Rasm 2. 410 nm da optik zichlikning fosfor miqdoriga bog'liqligi (kalibrovka chizig'i): $d = 0,07812 \cdot n + 0,00783$; $R^2 = 0,9993$ ($n \times 10^{-8}$ mol).

2-jadval va 2-rasm ma'lumotlariga ko'ra, fosfor miqdori ortishi bilan optik zichlik chiziqli ravishda oshadi. Bu holat Bouguer–Lambert–Beer qonuniga mos keladi va usulning chiziqiligi tasdiqlaydi. Kalibrovka tenglamasi asosida noma'lum namunalarda fosfor miqdori quyidagicha topildi: $n = (d - b)/k$, bu yerda k – kalibrovka chizig'i qiyligi, b – erkin had.

LOD/LOQ va validatsiya izohlari

Usulning aniqlash chegarasi (LOD) va miqdoriy aniqlash chegarasi (LOQ) statistik yondashuv asosida hisoblandi. Hisoblashda kalibrovka chizig'ining qiyligi (S) hamda blank/kalibrovka o'lchovlaridan olingan standart og'ish (σ) qiymati qo'llanildi. Hisoblash formulalari: $LOD = 3,3 \cdot \sigma/S$ va $LOQ = 10 \cdot \sigma/S$. Kalibrovka qatorida 1×10^{-8} – 16×10^{-8} mol diapazoni massaga o'tkazilganda 0,31– 4,96 mkg (P) ga mos keladi. Aniqlik (precision) ko'rsatkichlari takroriy o'lchovlar bo'yicha baholanadi; mazkur ishda amaliy namuna uchun optik zichlikning RSD qiymati 0,32% bo'ldi ($n=6$), bu yuqori qaytaruvchanlikni bildiradi. Qayta tiklanish (recovery)ni baholashda "standart qo'shish" (spike) yondashuvi qo'llanishi mumkin: namuna matritsasiga ma'lum miqdorda KH_2PO_4 standartini qo'shib, topilgan qiymat bilan kiritilgan qiymat taqqoslanadi. Selektivlik/interferensiya nuqtayi nazaridan reaktiv asosan fosfatni komplekslaydi; blank eritma bilan parallel o'lchovlar fon yutilishni kompensatsiya qiladi. Robustlik (barqarorlik) bo'yicha esa reaktiv hajmi (5 ml), rang hosil bo'lish vaqti hamda o'lchov harorati bir xil sharoitda ushlab turilishi metod natijalarining barqarorligini ta'minlaydi.

^{32}P preparat namunasini tahlil qilish va molyar faollikni hisoblash

"Fosfor-32 bilan nishonlangan, ortofosfat kislotasi" preparati namunasi tahlil qilinib, namuna tayyorlash jarayonida radionuklidning faolligini yo'qotmasdan fosfatni komplekslashga qulay muhit yaratildi. Namuna bilan bir vaqtda blank eritma tayyorlanib, optik zichlik o'lchovlari parallel bajarildi.

Analiz qilish tartibi

25 ml issiqqa chidamli kolbaga hajim faolligi 4000 mCi/ml bo'lgan preparat eritmasidan 100–150 mCi olinadi, unga 2,5 ml 25% li nitrat kislotasi qo'shib aralastiriladi. Oqartiruvchi bug' chiqquncha qizdiruvchi plitada 15 daqiqa davomida muntazam aralastirib turiladi. Sovutilgach, belgilangan tartib bo'yicha reaktiv qo'shiladi va 410 nm da optik zichlik o'lchanadi.

3-jadval.

Fosfor-32 preparat namunasida molyar faollikni aniqlash natijalari ($n=6$, $P=0,95$).

№	1	2	3	4	5	6	O'rtacha
<i>Av, mCi/ml</i>	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
<i>V, ml</i>	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
<i>Optik zichlik, d</i>	0,093	0,092	0,096	0,097	0,095	0,091	0,094± 0,001
<i>n, 10⁻⁸ mol</i>	1,195	1,189	1,187	1,192	1,185	1,186	1,189± 0,0157

Bu yerda A_v – hajm faolligi (mCi/ml); V – tahlil uchun olingan namuna hajmi (ml); d – optik zichlik; n – fosfor miqdori (mol). Fosfor miqdori 2-rasmdagi kalibrovka tenglamasi orqali aniqlanadi.

Molyar faollik (MF) hisoblash:

- $A_{total} (Ci) = (A_v \cdot V) / 1000$;
- $n (mmol) = n (mol) \cdot 1000$;
- $MF (Ci/mmol) = A_{total} / n = (A_v \cdot V) / (n \cdot 10^6)$.

Nazariy molyar faollikdan chetlanish quyidagicha hisoblanadi: $b, \% = |MF_{o'rtacha} - MF_{nazariy}| / MF_{nazariy} \cdot 100$.

Eslatma: hisob-kitoblarda ^{32}P uchun nazariy molyar faollik sifatida $MF_{nazariy} = 8075$ Ci/mmol qiymat qabul qilinadi (FM 42 Uz-4828-2025: Ortofosfat kislotasi, tashuvchisiz fosfor-32 bilan nishonlangan).

3-jadval ma'lumotlariga asosan hisoblangan molyar faollikning o'rtacha qiymati 8410 Ci/mmol ni tashkil etdi. Takroriy o'lchovlar bo'yicha nisbiy standart og'ish (RSD) 0,32% atrofida bo'lib, usulning yuqori qaytaruvchanligini ko'rsatadi. Nazariy qiymatdan chetlanish 1,06% bo'lib, ushbu ko'rsatkich amaliy sifat nazorati uchun qoniqarli hisoblanadi.

Xulosa. Vanadiy–molibden reaktivi asosida fosfat ionining P–V–Mo kompleksini hosil qilishiga tayangan spektrofotometrik yondashuv ^{32}P asosidagi radiofarmatsevtik preparatlarning molyar faolligini tezkor va sezgir aniqlash imkonini beradi. Kompleksning maksimal yutilishi 410 nm da kuzatildi, kalibrovka chizig'i yuqori chiziqlikka ega ($R^2=0,9993$). Usulning LOD va LOQ ko'rsatkichlari mikrogramm diapazonida bo'lib, ishlab chiqarish jarayonida tashuvchi fosfor izlarini nazorat qilish uchun yetarli sezgirlikni ta'minlaydi. Metodning afzalligi – murakkab asboblarni talab qilmasligi, tahlilning qisqa muddatda bajarilishi hamda QC laboratoriyalariga joriy etish qulayligidir.

Xavfsizlik bo'yicha eslatma. Radioaktiv materiallar (^{32}P) va konsentrlangan kislotalar bilan ishlashda ishlar amaldagi laboratoriya hamda radiatsion xavfsizlik reglamentlariga qat'iy rioya qilgan holda bajarildi.

ADABIYOTLAR

1. Tennvall J, Brans B. EANM procedure guideline for ^{32}P phosphate treatment of myeloproliferative diseases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34: 1324.
2. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev* 1999;99:2269.
3. Hosain F, Spencer RP. Radiopharmaceuticals for palliation of metastatic osseous lesions: Biologic and physical background. *Semin Nucl Med* 1992;22:11.
4. Lewington VJ. Bone-seeking radionuclides for therapy. *J Nucl Med* 2005;46:38S.
5. Das T, Pillai MRA. Options to meet the future global demand of radioisotopes for radionuclide therapy. *Nucl Med Biol* 2013;40:23.
6. Banerjee S, Das T, Chakraborty S, Venkatesh M. Emergence and present status of Lu-177 in targeted radiotherapy: The Indian scenario. *Radiochim Acta* 2012;100:115.
7. Cheng Y., Kiess A.P., Herman J.M., Pomper M.G., Meltzer S.J., Abraham J.M. Phosphorus-32, a Clinically Available Drug, Inhibits Cancer Growth by Inducing DNA Double-Strand Breakage. *PLOS ONE* // 2015; 1-11.
8. G.V.S. Ashok Kumar, J. Vithya, R. Kumar, C. R. Venkata Subramani. Development of a flowsheet for the radiochemical processing of irradiated sulphate targets for the production of carrier-free ^{32}P . *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2014; 302:939-945.
9. Silva M, Luck JV, Siegel ME (2001) ^{32}P chromic phosphate radiosynovectomy for chronic haemophilic synovitis. *Haemophilia* 7(2):40–49
10. Prabhakar G, Sachdev SS, Umamaheswari S, Sivaprasad N, Bhatia MH, Chaudhari PR, Solav SV (2007) Development of samarium [^{32}P] phosphate colloid for radiosynoviorthesis applications: preparation, biological and preliminary clinical studies experience. *Appl Radiat Isot* 65(12):1309– 1313
11. Pandey U, Saxena SK, Sarma HD, Tandon P, Ram R, Samuel G, Dash A, Venkatesh M (2008) Bioevaluation studies of ^{32}P incorporated mould brachytherapy sources for potential application in treatment of superficial tumors. *Nucl Med Commun* 29:717–723
12. Vivante H, Salgueiro M.J, Ughetti R, Nicolini J, Zubillaga M (2007) ^{32}P -patch contact brachyradiotherapy in the management of recalcitrant keloids and hypertrophic scars. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73:336–339