

Оценка возможности применения метода Култера (электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства

А. А. ВОРОПАЕВ, О. В. ФАДЕЙКИНА, Т. Н. ЕРМОЛАЕВА, Д. С. ДАВЫДОВ, Э. Ю. КУДАШЕВА

Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

The Assessment of the Possibility to Use the Coulter's Method (Electrosensitive Zones) for Identification of Invisible Particulate Matter in Human Blood-Derived Products Produced in Russia

A. A. VOROPAEV, O. V. FADEIKINA, T. N. ERMOLAEVA, D. S. DAVYDOV, E. YU. KUDASHEVA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

В статье представлены результаты изучения возможности применения метода электрочувствительных зон (метода Култера) для оценки показателя «Механические включения (невидимые)» в отечественных лекарственных препаратах крови человека. Исследования проводили на суспензиях латексных частиц, размер и количество которых соответствовало нормируемому для парентеральных препаратов. Суспензии имитировали препараты крови человека, которые предположительно могут содержать некоторое количество невидимых частиц. Определены факторы, которые могут влиять на достоверность результатов испытаний методом электрочувствительных зон: электропроводность испытуемого образца, объём аналитической пробы, степень разведения образца.

Ключевые слова: препараты крови человека, невидимые механические включения, метод Култера (метод электрочувствительных зон).

The article presents the results of the study of the possibility of using the method of electrosensitive zones (Coulter's method) to evaluate the indicator «Particulate matter (invisible)» in domestic medicinal human blood-derived products. The studies were carried out on suspensions of latex particles, the size and quantity of which corresponded to those normalized for parenteral preparations. Suspensions simulated human blood-derived products, which can presumably contain some invisible particles. Factors that can influence the reliability of test results conducted using the method of electrosensitive zones are determined: the electrical conductivity of the test sample, the volume of the analytical sample, the degree of dilution of the sample.

Keywords: human blood-derived products, invisible particulate matter, Coulter's method (method of electrosensitive zones).

Введение

Номенклатура лекарственных препаратов крови человека, выпускаемая отечественными производителями, представлена препаратами альбумина человека, иммуноглобулинов человека нормальных, специфических и специального назначения.

Значительную их часть составляют стерильные лекарственные формы белков плазмы крови человека, предназначенные для введения в организм путём инъекций и/или инфузий, что обусловлено необходимостью создания наиболее оптимальных условий для реализации фармакологического действия их основных действующих веществ с целью достижения требуемого терапевтического эффекта.

Оценка качества лекарственных препаратов для парентерального введения по показателю «Механические включения» — обязательное требование, предъявляемое к данным лекарственным формам.

Отсутствие посторонних подвижных нерасстворимых частиц, за исключением пузырьков газа, случайно присутствующих в растворах препаратов крови человека (видимых механических включений), отечественные производители оценивают поэтапно в определённых выборках продукции визуальным методом в процессе производства и в готовом продукте [1].

Для оценки содержания невидимых механических включений (размером менее 100 мкм) в лекарственных препаратах для парентерального применения, отечественные производители препаратов крови человека должны руководство-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 127051 Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2. НЦЭСМП

ваться требованиями ОФС.1.4.2.0006.15 «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Для определения частиц, невидимых невооруженным глазом, рекомендовано использовать три метода: счётно-фотометрический, метод электрочувствительных зон (метод Култера) и метод микроскопии. Счётно-фотометрический и микроскопический методы не пригодны для исследования коллоидных растворов и эмульсий, препаратов с высокой вязкостью [2]. При исследовании мутных лекарственных форм, например, эмульсий, рекомендовано применение метода электрочувствительных зон (метод Култера) после проведения количественного разбавления растворителем, свободным от механических включений. В РФ способ определения невидимых механических включений в окрашенных лекарственных препаратах парентерального применения методом Култера разработан сотрудниками ФГБУ «НЦЭСМП» [3].

Для метода электрочувствительных зон существует ограничение: измерение необходимо выполнять в растворе электролита [4]. Преобладающая часть растворов для парентерального введения являются растворами активных веществ в очищенной воде или воде для инъекций. Вследствие этого, метод Култера для определения невидимых механических включений не является общепризнанным и указан только в отечественной фармакопее последнего издания [2, 5, 6]. Тем не менее, по мнению ряда исследователей, метод электрочувствительных зон является одним из самых перспективных для определения содержания частиц в белковых препаратах [7, 8].

Лекарственные препараты крови человека являются коллоидными белковыми растворами и представляют собой прозрачные или слегка опалесцирующие бесцветные жидкости с концентрацией белка от 4,5 до 20%. Изучение сведений о составе отечественных препаратов крови человека (более 30 наименований) показало, что часть препаратов содержит физиологический раствор (следовательно, метод Култера применим). Для большинства препаратов нет сведений, являются они электролитами или нет, часть препаратов комплектуется водой для инъекций, которая не является электролитом (следовательно, метод Култера не применим). Альбумин человека является препаратом высокой вязкости, поэтому определение невидимых механических включений возможно только при обязательном предварительном разбавлении. Нами было сделано предположение, что достоверного результата испытаний можно добиться путём разбавления образцов отечественных препаратов крови человека изотоническим раствором хлорида натрия, свободным от механических невидимых включений.

Пробные испытания препаратов иммуноглобулина человека нормального и альбумина человека (производство НПО «Микроген») показали противоречивые результаты. Литературные сведения о значениях показателя «невидимые механические включения» в отечественных препаратах крови человека отсутствуют. Поэтому, с целью исключения возможности получения недостоверных результатов при проведении испытаний препаратов крови, обусловленных существующими ограничениями метода и особенностями прибора (счётчика частиц), эксперименты проводили на суспензиях латексных частиц, имитирующих препараты крови человека, которые предположительно могут содержать некоторое количество невидимых частиц.

Цель исследования — экспериментальная оценка возможности применения метода Култера (метода электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства.

В процессе выполнения исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ отечественных документов, регламентирующих требования к содержанию невидимых механических включений.
2. Определить факторы, которые могут влиять на достоверность результатов испытаний отечественных препаратов крови человека по определению количества и размера невидимых механических частиц методом Култера.

Материал и методы

Для исследования использовали:

- иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения (производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России);
- альбумин человека, раствор для инфузий 20% (производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России);
- коммерческий изотонический раствор Изотон 2 (производство фирмы Beckman CoulterTM, США);
- суспензии стандартных латексных частиц, размером 10 мкм (lot 9747356, срок годности 22.08.17 г), 20 мкм (lot 9694047, срок годности 19.09.17 г) и 43 мкм (lot 9141040, срок годности 10.07.17 г), производства Beckman Coulter R CC Size Standarts, N.I.S.T. (National Institute of Standards and Technology), США.

На данном этапе эксперименты проводили на суспензии латексных частиц, размер и количество которых приблизительно соответствовали нормируемому в парентеральных препаратах.

Подготовка проб для определения влияния электропроводности на результаты испытания. Растворы с различной концентрацией хлорида натрия готовили путём смешивания деионизованной воды с коммерческим изотоническим раствором Изотон 2. Концентрация хлорида натрия составляла от 0,9 до 0,1%, с шагом 0,1%; 0,09, 0,05 и 0 % (деионизованная вода).

Суспензию латексных частиц готовили путём добавления нескольких капель частиц каждого размера к 10 мл деионизованной воды.

К каждому образцу различной концентрации хлорида натрия добавляли по 0,2 мл приготовленной суспензии частиц. Тщательно перемешивали содержимое образца, медленно пе-

Таблица 1. Требования отечественных документов по содержанию невидимых механических включений

Для лекарственных препаратов, объемом 100 мл и менее	
Счётно-фотометрический метод	
ГФ XIII	РД 42-501-98
Не более 6000 частиц ≥ 10 мкм	Не более 6000 частиц ≥ 5 мкм
Не более 600 частиц ≥ 25 мкм	Не более 600 частиц ≥ 25 мкм
Метод микроскопии	
Не более 3000 частиц ≥ 10 мкм	Не более 5000 частиц $\geq 5-25$ мкм
Не более 300 частиц ≥ 25 мкм	Не более 500 частиц ≥ 25 мкм
Метод электрочувствительных зон	
Не более 6000 частиц ≥ 10 мкм	Нет сведений
Не более 600 частиц ≥ 25 мкм	
Для лекарственных препаратов, объёмом более 100 мл	
Счётно-фотометрический метод	
Не более 25 частиц ≥ 10 мкм	Не более 100 частиц ≥ 5 мкм
Не более 3 частиц ≥ 25 мкм	Не более 4 частиц ≥ 25 мкм
Метод микроскопии	
Не более 12 частиц ≥ 10 мкм	Не более 50 частиц $\geq 5-25$ мкм
Не более 2 частиц ≥ 25 мкм	Не более 3 частиц ≥ 25 мкм
Метод электрочувствительных зон	
Не более 25 частиц ≥ 10 мкм	Нет сведений
Не более 3 частиц ≥ 25 мкм	

Примечание. ГФ XIII Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания; РД 42-501-98 РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств».

реворачивая его 20 раз. Для удаления пузырьков воздуха образец оставляли стоять в течение 2 мин.

Подготовка проб для определения объёма аналитической пробы. В изотоническом растворе хлорида натрия готовили суспензии частиц размерами 10, 20 и 43 мкм. Определение количества невидимых механических частиц проводили методом электрочувствительных зон с применением счётчика частиц MultisizerTM 4E (производство Beckman Coulter, США). Использовали апертуру 100 мкм.

Статистическую обработку результатов измерений проводили, рассчитывая среднее арифметическое значение, стандартное (среднеквадратическое) отклонение с использованием программы Microsoft Excel. Промежуточную прецизионность метода электрочувствительных зон при различных факторах прецизионности (объём аналитической пробы, электропроводность, количество частиц) оценивали по значению относительного стандартного отклонения (коэффициент вариации) результатов измерений.

Результаты и обсуждение

Анализ отечественных документов, регламентирующих требования к содержанию невидимых механических включений в парентеральных препаратах. Изучены отечественные принципы нормирования содержания невидимых механических включений в парентеральных препаратах. Результаты приведены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, ГФ XIII нормирует содержание частиц размером более 10 и 25 мкм. Для метода Култера приняты те же нормы, что и для счётно-фотометрического метода.

Требования отечественного документа РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств» отличаются от фармакопейных требований, поскольку с 1998 г. в нашей стране исследования в этой области прекратились, и инструкция не пересматривалась [9].

Изучение требований ГФ XIII позволило сделать вывод о том, какого размера и количества стандартные латексные частицы должны содержаться в суспензиях, которые будут служить моделью препаратов крови человека.

Изучение влияния электропроводности на результаты испытаний. Для изучения влияния электропроводности образца на результаты испытания проводили измерения на образцах с различной концентрацией электролита, приготовленных по описанной выше методике. Одно измерение состояло из 3 аналитических проб с вычислением среднего количества частиц. Проводили четыре измерения, рассчитывали среднее значение количества частиц каждого размера, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты приведены на рис. 1, 2.

Как следует из данных, приведённых на рис. 1, при снижении концентрации ионов хлорида натрия (NaCl) в растворе до 0,1% не происходит изменений в количестве и размере частиц. При очень низкой электропроводности раствора (0% NaCl) счётчик частиц не выдает результата, на дисплее высвечивается ошибка с просьбой заменить электролит.

При незначительной концентрации электролита (0,05% NaCl) можно получить результат, который отличается от результата анализа проведённого в изотоническом растворе (стандартные условия): изменился размер частиц в меньшую сторону и их количество (синяя линия на рис. 2). Например, для суспензии частиц размером 20 мкм при недостаточной концентрации электролита прибор детектирует эти частицы, как имеющие размер 18 мкм и определяет их количество в 2 ра-

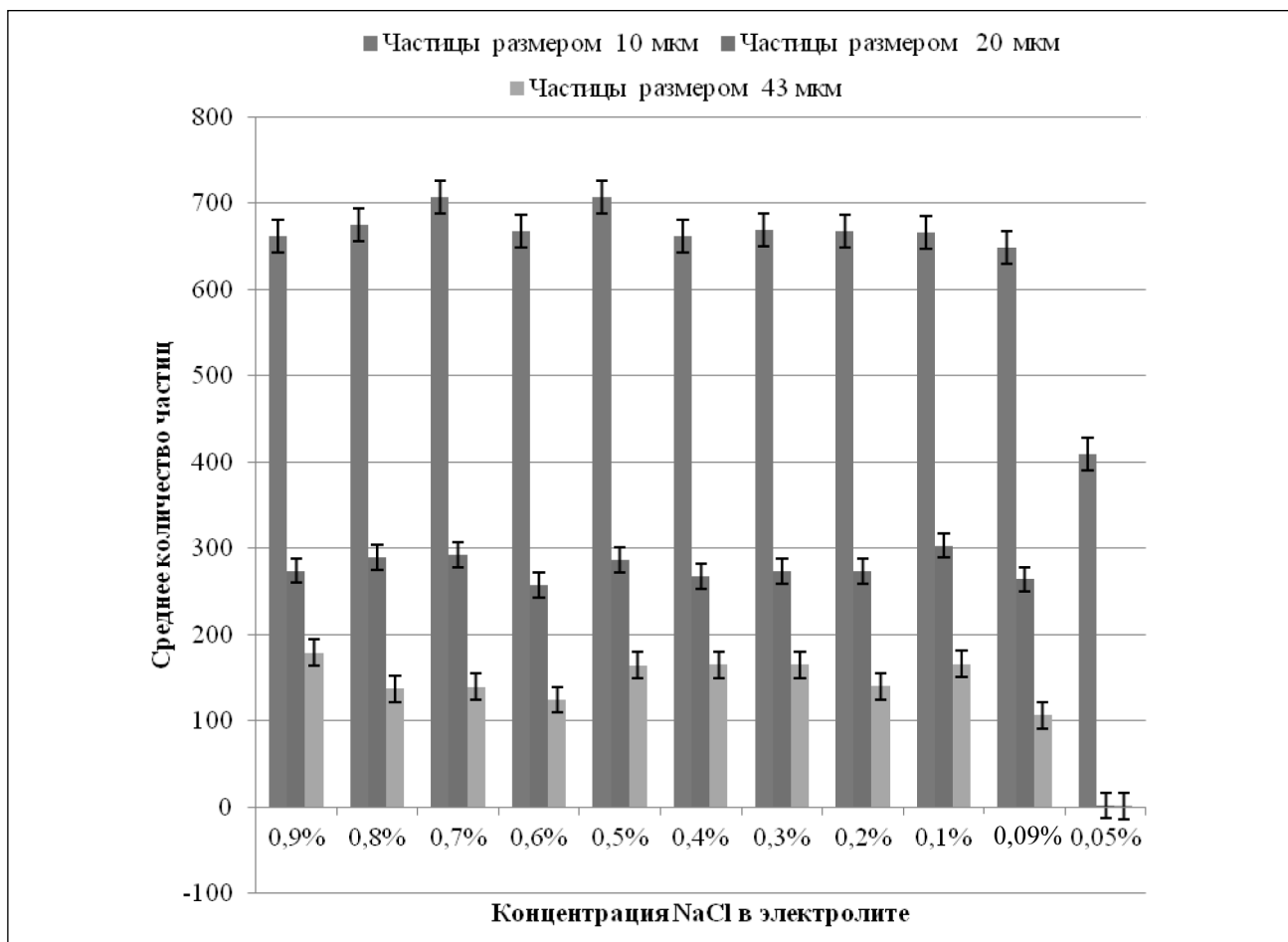


Рис. 1. Влияние концентрации хлорида натрия (NaCl) в исследуемом образце на результат определения среднего количества частиц

за меньше (около 150 шт), чем в стандартных условиях испытаний (около 300 шт).

Из вышеприведённых данных (см. рис. 1, 2) следует, что при анализе образцов с недостаточной или неизвестной электропроводностью можно получить недостоверный результат.

Изучение влияния степени разведения образца. Изучение влияния разведения исследуемого образца изотоническим раствором хлорида натрия провели на суспензии латексных частиц. Результаты приведены в табл. 2.

Как следует из данных, приведённых в табл. 2, при уменьшении количества частиц в суспензии в 2—6 раз, значение коэффициента вариации не

увеличивается ($CV < 3\%$). Следовательно, добавление электролита в недостаточно электропроводные образцы или в образцы с неизвестной электропроводностью не влияет на результат определения количества выявляемых частиц нормируемых размеров. При этом можно рекомендовать разведение образца не более, чем в 6 раз, так как дальнейшее разведение приводит к увеличению ошибки при определении количества частиц с 3,6% (для разведения в 15 раз) до 18,2% (для разведения в 200 раз).

Выбор объёма аналитической пробы. В связи с тем, что в настройках прибора режим дозирования может варьировать от 0,05 мл до 2 мл, необхо-

Таблица 2. Результаты оценки промежуточной прецизионности метода электрочувствительных зон при различном количестве латексных частиц в исследуемом образце ($n=10$)

Среднее количество частиц, шт	Стандартное отклонение, шт	Коэффициент вариации (CV), %
6584	113	1,7
3008	68	2,3
910	17	1,9
449	16	3,6
169	11	6,6
70	10	14,0
31	6	18,2

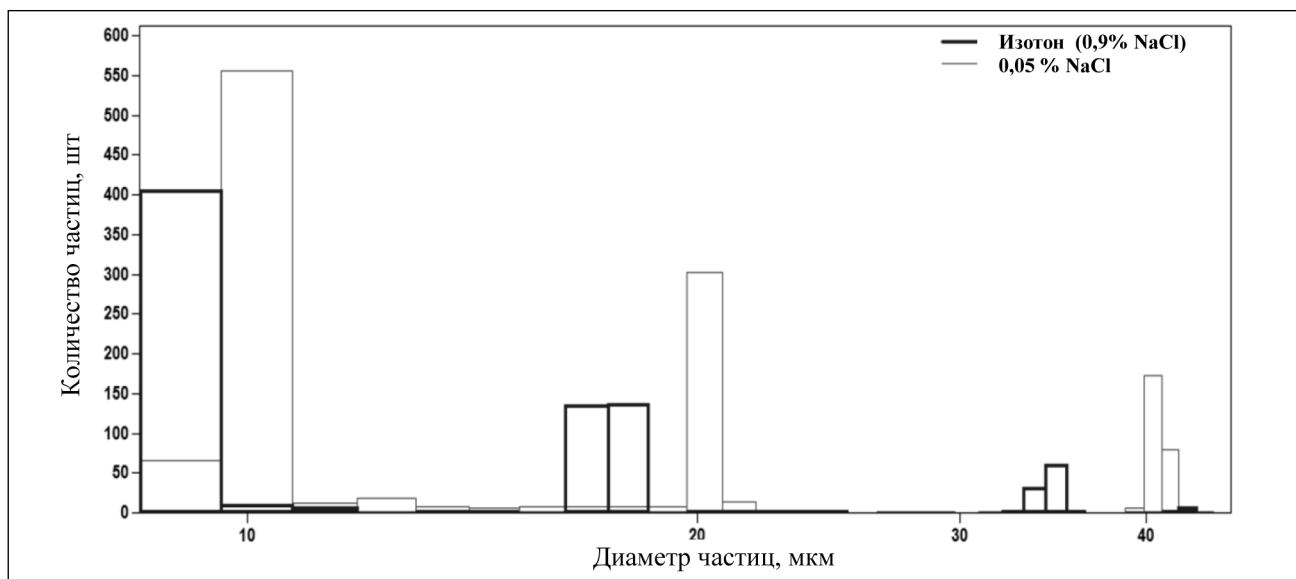


Рис. 2. Сравнение результатов измерения одинакового количества частиц в электролите (линия красного цвета) и в воде для инъекций с добавлением 1 мл изотонического раствора хлорида натрия (концентрация 0,05 % NaCl) (линия синего цвета)

Таблица 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности метода электрочувствительных зон при различном объёме аналитической пробы

Объём аналитической пробы, мл	Размер частиц, мкм	Коэффициент вариации (CV), %
0,1	10	7,8
	20	9,2
	40	13,6
1	10	1,8
	20	4,5
	40	5,3
2	10	1,8
	20	1,9
	40	5,0

димо было провести исследования по выбору объёма аналитической пробы.

Для выбора объёма аналитической пробы мы использовали режимы 0,1 мл, 1 мл и 2 мл. Для каждого режима проводили 10 измерений. Каждое измерение состояло из трёх аналитических проб с расчётом среднего значения. Далее по десяти измерениям рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. Результаты определения объёма аналитической пробы приведены в табл. 3.

Сравнение значений коэффициентов вариации, приведённых в табл. 3, показало, что наилучший результат имеет место при объёме аналитической пробы 2 мл (коэффициент вариации не более 5 %). Режим дозирования менее 1 мл не может быть рекомендован для проведения испытаний, т.к. существенно возрастает ошибка, которая достигает 13,6%.

Некоторые препараты крови, такие как сывороточный альбумин человека, являются коллоидными растворами, имеют мутность и обладают вязкостью. Для таких препаратов не применимы счётно-фотометрический метод и метод микро-

скопии. ГФ РФ XIII рекомендует в этих случаях использование метода электрочувствительных зон после проведения количественного разбавления препарата соответствующим растворителем.

Для отечественных препаратов крови человека ограничение метода по электропроводности при испытании можно избежать путём их разбавления изотоническим раствором хлорида натрия. На следующих этапах научно-исследовательской работы необходимо провести исследования на отечественных препаратах крови человека по оценке влияния разведения испытуемого образца и выбору аналитической дозы.

Выводы

1. Установлено, что в РФ определение содержания невидимых механических включений в лекарственных препаратах для парентерального применения регламентировано счётно-фотометрическим методом, методом Култера (электрочувствительных зон) и микроскопии.

2. Экспериментально показано, что на результат испытания лекарственных препаратов крови человека по показателю «Механические

включения (невидимые)» методом электрочувствительных зон оказывают влияние такие факторы, как электропроводность испытуемого образца, объём аналитической пробы и степень разведения образца.

Таким образом, использование метода Култера (электрочувствительных зон) для определения

невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства целесообразно и перспективно. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение и оптимизацию основных параметров методики и проведение валидационных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. ОФС.1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» 2: 179—192. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. OFS.1.4.2.0005.15 «Vidimye mekhanicheskie vkljucheniya v lekarstvennykh formakh dlja parenteral'nogo primeneniya» 2: 179—192. [in Russian]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. ОФС.1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Т.2: 192—199. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. OFS.1.4.2.0006.15 Nevidimye mekhanicheskie vkljucheniya v lekarstvennykh formakh dlja parenteral'nogo primeneniya. T.2: 192—199. [in Russian]
3. Гунар О.В., Новик Е.С., Доренская А.В. Способ определения невидимых механических включений в окрашенных лекарственных средствах. Патент RU2593019, 2015 май 29. / Gunar O.V., Novik E.S., Dorenskaja A.V. Sposob opredeleniya nevidimyx mekhanicheskikh vkljucheniij v okrashennykh lekarstvennykh sredstvakh. Patent RU2593019, 2015 maj 29. [in Russian]
4. Новик Е.С., Гунар О.В. Метод электрочувствительных зон для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах для парентерального применения. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; 1: 58—61. / Novik E.S., Gunar O.V. Metod jelektrochuvstvitel'nykh zon dlja opredeleniya nevidimyx mekhanicheskikh vkljucheniij v lekarstvennykh preparatakh dlja parenteral'nogo primeneniya. Vedomosti Nauchnogo centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya 2012; 1: 58—61. [in Russian]
5. European Pharmacopeia. 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). 2.9.19 Particulate contamination: sub-visible particle. 2011.
6. United States Pharmacopeia, General Chapters: <788> Particulate matter in injections USP 40-NF35:665-9 Available from: URL: <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=40&nf=35&s=0&officialOn=May 1, 2017>
7. Barhrad J.G., Rhyner M.N., Carpenter J.F. Critical evaluation and guidance for using the coulter method for counting subvisible particles in protein solutions. J Pharm Sci 2012, 101 (1): 140—153.
8. Subvisible (2—100 µm) Particle Analysis During Biotherapeutic Drug Product Development: Part 1, Considerations and Strategy [editorial]. J Pharm Sci 2015, 104 (6): 1899—1908.
9. Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств (РД-42-501-98); 1998. / Instrukcija po kontroľu na mekhanicheskie vkljucheniya in#ekcionnykh lekarstvennykh sredstv (RD-42-501-98); 1998. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Воропаев Андрей Андреевич — эксперт 2 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Фадеекина Ольга Васильевна — к.б.н., главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Ермолаева Татьяна Николаевна — эксперт 1 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Давыдов Дмитрий Сергеевич — к.м.н., начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Кудашева Эльвира Юрьевна — к.м.н., начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП