Особенности анализа лекарственных препаратов для парентерального применения методом электрочувствительных зон

* Е. С. Новик, А. В. Доренская, Н. А. Борисова, О. В. Гунар

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

Резюме. В статье описаны стандартные методические подходы к определению невидимых механических включений методом электрочувствительных зон (метод Култера). Стандартная методика пробоподготовки лиофилизатов и порошков состоит в растворении их в Isoton® II Diluent (далее Изотон), растворе натрия хлорида 0,9 % с добавлением консерванта, производства «Бекмен Култер», США, в условиях, свободных от механических включений. Дана характеристика метода Култера, впервые включенного в общую фармакопейную статью «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания. Показано, что для большей части растворов для инъекций и инфузий не требуется специальной пробоподготовки при проведении испытаний, тогда как для оценки невидимых механических включений в 13 % таких лекарственных форм необходимо добавление растворителя Изотон для повышения их электропроводности. Представлены результаты экспериментальных исследований по разработке модификаций стандартной методики пробоподготовки различных лекарственных препаратов для оценки их качества по показателю «Невидимые механические включения». Для пробоподготовки ряда лиофилизатов, порошков, суспензий, масляных растворов, образующих осадки с раствором Изотона, разработаны рекомендации по выбору альтернативных растворителей для получения электропроводных растворов (вода, 4 % раствор натрия хлорида, раствор тиоцианата аммония в изопропанол, ацетон и др.). В других случаях предлагается изменить режим растворения (увеличить время растворения и/или количество растворителя). Таким образом, обоснована возможность определения невидимых механических включений в различных лекарственных формах методом Култера.

Ключевые слова: метод электрочувствительных зон; лекарственные препараты для парентерального применения; невидимые механические включения; пробоподготовка; электролиты

Для цитирования: Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Особенности анализа лекарственных препаратов для парентерального применения методом электрочувствительных зон. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2018;8(2):123–127. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-123-127>

* **Контактное лицо:** Новик Елена Самарьевна; Novik@expmed.ru

Aspects of Medicines Quality Evaluation by Electrical Sensing Zone Method

* E. S. Novik, A. V. Dorenskaya, N. A. Borisova, O. V. Gunar

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article describes standard methodological approaches to the determination of subvisible particles by electrical sensing zone method (the Coulter principle). The standard procedure of lyophilisate and powder preparation includes their dilution with Isoton® II Diluent (Beckman Coulter, USA) — 0.9 % sodium chloride solution containing a preservative agent (hereinafter — Isoton) under conditions free from particulate matter. The article provides a brief description of the Coulter principle which was included into the General monograph «Subvisible particulate matter in parenteral preparations» of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition. It was demonstrated that most solutions for injection and infusion do not need special preparation before testing, whereas 13 % of such preparations need the addition of the diluent Isoton to increase their electrical conductivity for determination of subvisible particulate matter. The article presents the results of experimental studies that were aimed at modification of the standard sample preparation procedure for different medicinal products for the purpose of their evaluation in terms of Subvisible particulate matter. A number of lyophilisates, powders, suspensions, and oily solutions can not be diluted with Isoton because of precipitate formation, so recommendations are offered for these types of products regarding the choice of alternative diluents (water, 4 % sodium chloride solution, ammonium thiocyanate solution in isopropanol, acetone, etc.) for obtaining electrically conductive solutions. Alternatively, it may be recommended to change the dilution mode (increase the time of dilution and/or diluent volume). Thus, the article provides rationale for using the Coulter principle for determination of subvisible particulate matter in various pharmaceutical forms.

Key words: electrical sensing zone method; parenteral preparations; subvisible particulate matter; sample preparation; electrolytes

For citation: Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Aspects of Medicines Quality Evaluation by Electrical Sensing Zone Method. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2018;8(2):123–127. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-123-127>

* **Contact person:** Elena S. Novik; Novik@expmed.ru

Одним из обязательных показателей качества лекарственных средств (ЛС) для парентерального применения является количество механических включений (МВ), которое нормируется в соответствии с требованиями ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» и «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» [1].

К ЛС для парентерального применения, в которых необходимо определять невидимые механические включения (НМВ), относятся:

- растворы для инъекций;
- эмульсии для инъекций;
- суспензии для инъекций;
- растворы для инфузий;
- концентраты для приготовления инъекционных или инфузионных лекарственных форм (ЛФ);
- порошки и лиофилизаты (в том числе «лиофилизированные порошки»), предназначенные для приготовления инъекционных и инфузионных лекарственных форм;
- имплантаты (если указано в соответствующем НД) [1].

В ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» [2] описаны три метода определения частиц, невидимых невооруженным глазом. Наряду с принятым в ведущих мировых фармакопеях методом светоблокировки [3, 4], в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) был впервые включен метод электрочувствительных зон (метод Култера) после предварительно проведенной валидации [5, 6].

Метод электрочувствительных зон (метод Култера) основан на регистрации электрических импульсов, возникающих при прохождении через аперттуру находящихся в растворе частиц. Величина импульса пропорциональна размеру частицы [7].

Рассматриваемый метод лежит в основе работы счетчика, который может быть использован для измерения частиц любого дисперсного материала, находящегося во взвешенном состоянии в растворе электролита.

Прибор, на котором проводятся испытания, проходит квалификацию и поверку один раз в год.

Сотрудники лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств в течение последних 12 лет успешно проводили определение НМВ методом электрочувствительных зон на приборе Мультисайзер-3 («Бекмен Культер», США). За этот период было проанализировано более трех тысяч серий отечественных и импортных препаратов. Однако, так как метод Култера относительно новый в сфере фармацевтического анализа, при определении НМВ в некоторых лекарственных препаратах (ЛП) встречались трудности методического характера.

Цель работы — разработка методических подходов для определения НМВ в различных ЛФ методом электрочувствительных зон.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подсчет НМВ проводили на счетчике частиц Мультисайзер-3 («Бекмен Культер», США), работа которого основана на методе электрочувствительных зон.

В счетчике Култера трубка с аперттурой погружена в стакан, содержащий частицы, взвешенные в электролите низкой концентрации. Два электрода (один внутри трубки, а другой — снаружи, но внутри стакана) используются для обеспечения тока в электролите при прикладывании электрического поля. Во время испытания измеряется сопротивление между электродами. Аперттура создает так называемую «чувствительную зону». Частицы, взвешенные в электролите, могут быть посчитаны при прохождении через нее. При этом эквивалентный объем электролита удаляется из чувствительной зоны, что вызывает короткое изменение сопротивления в апертуре. Это изменение можно измерить как импульс тока или напряжения. Высота этого импульса пропорциональна объему частицы. Используя электрическую схему для анализа числа и уровня импульсов, можно подсчитать число частиц и измерить объем каждой частицы, проходящей через «чувствительную зону».

Для стандартной процедуры растворения ЛФ в виде лиофилизатов и порошков, а также для повышения электропроводности жидких ЛП, не проводящих электрический ток, использовали Изотон II (Isoton® II Diluent, — коммерческий раствор натрия хлорида 0,9 % с добавлением консерванта, производства «Бекмен Культер», США, далее — Изотон).

К стандартному процессу оценки качества ЛП по показателю «Невидимые механические включения» относится испытание электропроводных растворов для инъекций (инфузий) или лиофилизатов и порошков, растворимых в Изотоне.

В работе рассматривались ЛФ, анализ которых требовал модификации стандартной методики определения НМВ:

- растворы: Амитриптилин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 10 мг/мл; Ондансетрон, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 2 мг/мл;
- масляные растворы: Ревмонн, раствор для внутримышечного введения 500 мг/мл; Сенорм, раствор для внутримышечного введения 50 мг/мл; Фазлодекс, раствор для внутримышечного введения 50 мг/мл;
- концентраты: Таксол, концентрат для приготовления раствора для инфузий; Абитаксел, концентрат для приготовления раствора для инфузий 6 мг/мл; Винпоцетин, концентрат для приготовления раствора для инфузий 5 мг/мл; Джебтана, концентрат для приготовления раствора для инфузий 10 мг/мл;
- лиофилизаты: Доксорубин-ЛЭНС, лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутривенного введения 50 мг; Рифампицин лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 150 мг, 300 мг; Эпирубин, лиофилизат

для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения 50 мг;

- порошки: Пиперацillin натрия + тазобактам натрия (8:1), полуфабрикат порошок; Амписид, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения 1000 мг + 500 мг;
- имплантаты: Озурдекс, имплантат для интравитреального введения 0,7 мг;
- суспензии: Хумалог Микс 50, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл; Хумалог Микс 25, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл; Инсуран НПХ, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл.

Пробоподготовку проводили в аттестованном шкафу с ламинарным потоком воздуха («Жуан», Франция).

Все использованные растворители соответствовали условиям, изложенным в разделе «Проверка пригодности условий испытания» (метод 2) ОФС.1.4.2.0006.15 «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» ГФ XIII.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2016 году было проанализировано около 370 серий различных ЛФ по показателю «Невидимые механические включения», из них 300 серий (81 %) растворов для инъекций (инфузий), 70 серий (19 %) лиофилизатов и порошков, стандартная пробоподготовка которых сопряжена с растворением в Изотоне.

Растворы для инъекций (инфузий) 260 серий (87 %) анализировали без специальной пробоподготовки, тогда как для подсчета частиц в растворах 140 серий (47 %) требовалось добавление Изотона для повышения их электропроводности, что является стандартным процессом пробоподготовки.

Задача пробоподготовки — получить электропроводный раствор (суспензию) в условиях, свободных от МВ. Для этого использовали растворитель Изотон.

При подготовке ОФС «Механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» для ГФ XIII были проведены эксперименты, позволившие предложить ряд модификаций стандартной методики пробоподготовки, что позволило в дальнейшем анализировать с помощью метода Култера различные ЛП для парентерального применения.

В таблице 1 приведены некоторые модификации пробоподготовки, применяемые при невозможности использовать Изотон в качестве растворителя. Во избежание образования осадков при анализе ряда лиофилизатов и порошков в качестве растворителя использовали воду, свободную от частиц. Так, Амписид, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения и Доксорубин-ЛЭНС, лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения, 50 мг полностью растворялись только в воде.

Таблица 1

МОДИФИКАЦИИ СТАНДАРТНОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕВИДИМЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ ВКЛЮЧЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ КУЛТЕРА

Растворитель / Условия растворения	Лекарственный препарат
В воде	Амписид, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения 1000 мг + 500 мг; Доксорубин-ЛЭНС, лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения 50 мг
В 4 % растворе натрия хлорида	Ондансетрон, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 2 мг/мл; Винпоцетин, концентрат для приготовления раствора для инфузий 5 мг/мл
В воде с добавлением 4 % раствора натрия хлорида	Рифампицин лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 150 мг, 300 мг; Эпирубин, лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого и внутрипузырного введения 50 мг
В растворе тиоцианата аммония в изопропанолe	Масляные растворы: Ревмонн, раствор для внутримышечного введения 500 мг/мл; Сенорм раствор для внутримышечного введения 50 мг/мл; Фазлодекс раствор для внутримышечного введения 50 мг/мл
В растворе ацетона	Озурдекс — имплантат для интравитреального введения 0,7 мг
В Изотоне с добавлением 0,2 % раствора аскорбиновой кислоты или 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты	Инсуран НПХ, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл; Хумалог Микс 50, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл; Хумалог Микс 25, суспензия для подкожного введения 100 МЕ/мл
Увеличение времени растворения	Пиперацillin натрия + тазобактам натрия (8:1), полуфабрикат порошок; Джевтана, концентрат для приготовления раствора для инфузий 10 мг/мл
Увеличение количества растворителя (разбавителя) в некоторых случаях до 100 мл и более	Таксол, концентрат для приготовления раствора для инфузий; Абитаксел, концентрат для приготовления раствора для инфузий 6 мг/мл; Амитриптилин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 10 мг/мл

В случае когда ЛП образовывали осадки при растворении в Изотоне (Ондансетрон, Винпоцетин), а их водные растворы обладали низкой электропроводностью, Изотон заменяли раствором натрия хлорида с повышенной концентрацией, как правило, 4 %, или добавляли известное количество этого растворителя в образец для повышения его электропроводности. Этот же раствор применяли и для предварительного промывания апертуры вместо раствора натрия хлорида 0,9 %.

Особое внимание в нашей работе было уделено препаратам инсулинов в виде растворов и суспензий. Методические трудности вызывало определение частиц в суспензиях для подкожного введения (Инсуран НПХ, Хумалог Микс 25, Хумалог Микс 50). Препараты инсулинов, как правило, образуют осадки с раствором Изотона, что делает невозможным определение НМВ методом электрочувствительных зон в стандартных условиях. Нами было предложено перед проведением испытания смешивать содержимое емкостей с 0,2 % раствором аскорбиновой кислоты в соотношении не менее 1:2. В полученном растворе измеряли содержание частиц стандартным способом. При анализе препаратов с номинальным объемом менее 100 мл среднее число частиц рассчитывали на единицу первичной упаковки, с учетом разведения. При валидации метода Култера [5, 6] была показана робастность (устойчивость) методики к добавлению дополнительных реактивов.

Для перевода суспензий инсулинов в раствор также использовали 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты. 10 мл препарата смешивали с 30 мкл кислоты, затем переносили 5 мл полученного раствора в колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же раствором, после чего проводили определение НМВ методом Култера.

Нестандартных методических подходов с точки зрения пробоподготовки при определении НМВ требовали образцы препаратов в виде масляных растворов. Для них был подобран разбавитель-электролит — 2 % раствор аммония тиоцианата в изопропанол, в котором растворяли исследуемый образец в соотношении не менее 1:80 (0,5 мл масла в 40 мл раствора). Перед измерением промывали апертуру тем же электролитом. Указанный разбавитель был выбран из списка электролитов, пригодных для растворения масляных препаратов, имеющегося в инструкции на прибор Мультисайзер-3, апро-

бирова и затем использован для подсчета частиц в подобных ЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод электрочувствительных зон позволяет определять НМВ практически во всех ЛФ для парентерального применения. Большую часть ЛП (растворов) анализировали без специальной пробоподготовки, лиофилизаты и порошки предварительно растворяли в Изотоне. Для ЛП, неразстворимых в Изотоне, разработаны модификации стандартной методики, подобраны соответствующие растворители, изменены условия пробоподготовки, что позволило проводить анализ методом Култера растворов (включая масляные), лиофилизатов, порошков, суспензий и имплантатов.

Авторы не заявили о конфликте интересов

The authors did not declare a conflict of interest

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Общая фармакопейная статья 1.4.1.0007.15 Лекарственные формы для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. [General Monograph 1.4.1.0007.15. Pharmaceutical Forms for Parenteral Application. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://femb.ru/feml>
2. Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.4.2.0006.15. Sub-visible Particles in Medicines for Parenteral Application. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]. Available from: <http://femb.ru/feml>
3. European Pharmacopoeia Online. European Directorate for the Quality of Medicines. 2017. Available from: <http://online.edqm.eu>
4. United States Pharmacopeia. 40th ed. 2017. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>
5. Новик ЕС, Гунар ОВ. 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 ES, Gunar OV. Electrical Sensing Zone Method for Determination of Invisible Particulate Matters in Parenteral Medicines. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2012;(1):58–61 (In Russ.)]
6. Доренская АВ. Применение метода электрочувствительных зон в фармацевтическом анализе: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2015. [Dorenskaya AV. Electrical Sensing Zone Method Applications in Pharmaceutical Analysis. Cand. Pharm. Sci. [thesis]. Moscow; 2015 (In Russ.)]
7. How are Particles Sized and Counted Using the Coulter Principle? Available from: <https://www.beckman.com/support/faq/scientific/behind-the-coulter-principle>

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Новик Елена Самарьевна. Ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук

Доренская Анна Викторовна. Эксперт 1-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук

Борисова Наталья Александровна. Эксперт 2-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Гунар Ольга Викторовна. Начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р фарм. наук

Статья поступила 18.12.2017

Принята к печати 14.05.2018

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky Boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Elena S. Novik. Leading Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Anna V. Dorenskaya. 1st Professional Category Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences

Natalia A. Borisova. 2nd Professional Category Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Olga V. Gunar. Head of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Doctor of Pharmaceutical Sciences

Article was received 18 December 2017

Accepted for publication 14 May 2018