**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Размер частиц (капель) и их распределение по размерам в эмульсиях для парентерального применения** |  | **ОФС.1.4.2.0028** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения размера частиц (капель) и их распределения по размерам в эмульсиях для парентерального применения. Данное испытание относится к эмульсиям для парентерального применения типа «масло в воде», предназначенным для инъекционного или инфузионного введения.

При получении эмульсий типа «масло в воде» для парентерального применения (называемых жировыми или липидными эмульсиями), в качестве действующих и вспомогательных веществ используют масла жирные природного происхождения (соевое, пальмовое, оливковое, рыбий жир и др.), которые диспергируют с помощью эмульгатора в воде для инъекций. Образовавшаяся эмульсия представляет собой гетерогенную дисперсную систему с жидкой дисперсной фазой в виде частиц масла шаровидной формы (капель масла, капель жира, жировых шариков) различного размера (диаметра) и жидкой дисперсионной, не прозрачной средой.

Размер частиц (капель масла) в эмульсиях, предназначенных для внутрисосудистого введения, имеет решающее значение, так как из-за механической фильтрации в лёгких могут задерживаться частицы, имеющие размер более 5 мкм. Если количество частиц большого размера по отношению к общему содержанию частиц в эмульсии велико, то это также влияет на безопасность использования лекарственной формы.

Поэтому для эмульсий для парентерального применения должны быть учтены такие показатели, как «Размер частиц (капель)», «Распределение частиц (капель) по размерам» и определены критерии их приемлемости. При испытании, определяют средний размер (диаметр) частиц (капель) эмульсии и диапазон частиц (капель) других размеров, выраженный в виде стандартных отклонений, обращая особое внимание при этом на наличие и допустимое содержание частиц (капель) большого размера, известное как «хвост» частиц большого размера (диаметра).

Нормативные требования к размеру частиц (капель) и их распределению по размерам, а также методы определения этих показателей, должны быть указаны в фармакопейной статье на лекарственный препарат, выпускаемый в виде эмульсии, предназначенной для внутрисосудистого введения (для инфузий, для инъекций, для внутривенного введения и др.).

При отсутствии других указаний в фармакопейной статье размер (диаметр) частиц (капель) масла, полученных при диспергировании в эмульсиях должен быть не более 5 мкм.

Для анализа распределения частиц (капель) по размеру (от 0,2 мкм и более) в эмульсиях используют, как правило, методы, основанные на принципах светорассеяния: метод динамического рассеяния света, метод лазерной дифракции света. Определение размера и количества частиц (капель) в эмульсиях проводят методами, основанными на принципах светоблокировки и электрочувствительных зон, например, счётно-фотометрическим, методом Култера.

Методики, используемые для определения размера частиц (капель) и их распределения в эмульсиях для парентерального применения указанными методами, должны быть валидированы. Испытания по определению размера и количества частиц (капель) и анализ распределения частиц (капель) в эмульсиях для парентерального применения проводят одним из указанных методов.

**Метод динамического рассеяния света**

***Область применения***. Метод эффективен для определения наличия частиц (капель) в эмульсии в диапазоне их номинальных размеров от 0,001 до 1,0 мкм, особенно эффективен для определения частиц (капель) размером менее 0,5 мкм; метод дает относительную информацию о распределении частиц (капель) по размерам, но не подсчитывает их.

***Принцип***

Метод динамического рассеяния света или метод фотонной корреляционной спектроскопии основан на анализе быстро меняющихся временных флуктуаций (колебаний) интенсивности рассеянного света, которые происходят из-за случайного броуновского движения или диффузии любых частиц, включая капли масла, находящиеся в жидкости во взвешенном состоянии. Быстро меняющуюся интенсивность рассеянного света, создаваемую взвешенными, рассеивающимися частицами (каплями), измеряют под заданным углом, обычно под углом 90°, с помощью подходящего детектора, например, фотоумножительной трубки. Полученные данные о рассеянной интенсивности используют для вычисления автокорреляционной функции интенсивности, которая представляет собой простую экспоненциальную функцию затухания во времени для частиц (капель) одного размера. При суммировании экспоненциальных функций затухания во времени представителей каждого из установленных размеров частиц (капель) и применении необходимых формул и расчётов, можно получить данные о распределении частиц (капель), малого размера (диаметра).

Функция автокорреляции, генерируемая данными об интенсивности рассеяния, полученными из испытуемой эмульсии, может быть «инвертирована» (трансформирована) с помощью соответствующего алгоритма деконволюции (обратного интегрального преобразования) чтобы получить приблизительное распределение коэффициентов диффузии по отношению к интенсивности.

Исходя из последнего распределение частиц (капель) малого диаметра вычисляют с использованием уравнения Стокса-Эйнштейна и правил классического (Ми) рассеяния света.

***Оборудование***. Определение методом динамического рассеяния света или методом фотонно-корреляционной спектроскопии проводят с помощью анализаторов, спектрометров и других подходящих приборов, имеющих возможность автоматического разбавления образца или же разбавление проводят вручную, выполнение испытаний контролируется валидированным программным обеспечением, угол рассеяния обычно устанавливают на уровне 90 °. Надлежащие результаты измерения (средний размер (диаметр) частиц и стандартное отклонение от среднего размера) могут быть получены при использовании приборов, условий и наличия других необходимых данных, соответствующих заданным параметрам определения.

***Вода***. Воду, используемую в качестве растворителя, фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Для удаления пузырьков воздуха воду обрабатывают ультразвуком в течение 30 с. Допускается использовать стерильную воду для инъекций, хранящуюся в упаковке из стекла.

***Подготовка стандартных образцов***

К заранее установленному объёму воды добавляют соответствующее количество концентрированной дисперсии, содержащей стандартный образец. В качестве стандартного образца используют сертифицированный стандартный материал, представляющий собой дисперсию сферических частиц (например, полистирольных латексных или других подходящих наночастиц), имеющих известный размер. Аккуратно перемешивают жидкость до получения однородной слегка мутной дисперсии (исходный стандартный образец).

Если используемый прибор оснащён автоматической системой введения, то после ввода в прибор через шприц исходного стандартного образца, дальнейшее разбавление образца для проведения испытания и оптимизации концентрации частиц, происходит автоматически, гарантируя, что она не настолько высока, чтобы вызвать погрешности измерения из-за многократного рассеяния или взаимодействия между каплями. В случае отсутствия автоматической системы введения, исходный стандартный образец разбавляют водой, как правило, не менее чем в 10 раз по сравнению с первым разбавлением, а затем помещают в «измерительную» кювету.

Оптимальная схема разбавления, обеспечивающая надлежащую интенсивность рассеяния для анализа в случае ручного разбавления и использования кюветы, определяется техническими характеристиками прибора. Таким образом, для используемого прибора устанавливают концентрацию частиц в конечном стандартном образце.

Определение следует выполнять отдельно для трёх различных стандартных образцов с размерами частиц 100, 250 и 400 мкм (трёхкратно для каждого размера).

Полученные результаты среднего размера (диаметра) частиц и стандартного отклонения от среднего размера стандартных образцов, определенные по интенсивности, должны совпадать с ожидаемыми значениями в пределах допустимых отклонений.

***Пробоподготовка***.

К заранее установленному объёму воды добавляют соответствующий объём образца испытуемой эмульсии. Аккуратно перемешивают жидкости до получения однородной слегка мутной дисперсии, представляющей собой исходный испытуемый образец.

Пробоподготовку проводят аналогично методике подготовки стандартных образцов.

Для используемого прибора, основанного на принципе светорассеяния, должна быть установлена концентрация конечного испытуемого образца эмульсии. Результаты должны быть установлены на основании трёх измерений, или, в зависимости от ситуации, на основе валидационных данных метода.

***Пригодность системы***. Используя стандартный образец, указанный в подразделе «Подготовка стандартных образцов», определяют значение среднего размера (диаметра) частиц и соответствующее стандартное отклонение. Система пригодна для использования после того, как температура образца достигла равновесия, результаты стабилизировались, получены данные трёх определений среднего размера (диаметра) частиц. Коэффициент вариации не должен превышать 15 % среднего размера частиц (капель) от соответствующего сертифицированного стандартного образца. Более высокое значение коэффициента вариации указывает на то, что используемые стандартные дисперсии сферических частиц не подходят в качестве стандартного образца, так как они либо изначально не обладают однородностью, либо стали агломерированными в неприемлемой степени. В этом случае необходимо выбрать и протестировать другую стандартную дисперсию сферических частиц.

Примечание – Рекомендуемый коэффициент вариации в 15 % увеличен по сравнению с методом классического рассеяния света из-за различий в способе определения среднего размера частиц (капель).

***Методика определения и анализ данных***. В прибор для измерения методом светового рассеяния или методом фотонно-корреляционной спектрометрии, оснащённый автоматической системой разбавления, используя одноразовый шприц, вносят испытуемый или стандартный образец. Если автоматическая система разбавления не используется, переносят соответствующим образом разбавленный испытуемый или стандартный образец в кювету, кювету помещают в держатель образца с регулируемой температурой прибора. Позволяют образцу уравновеситься до заданной контролируемой температуры, близкой к температуре окружающей среды, устанавливают угол рассеивания прибора на 90° и выполняют измерения. До тех пор, пока параметр распределения (χ2) остается приемлемо низким согласно спецификациям прибора, результаты определения являются приемлемыми (нормальными). Чрезмерные значения параметра распределения (χ2) свидетельствуют о том, что распределение частиц (капель) не является нормальным, что может указывать на нестабильность эмульсии. Определяемый размер частиц (капель) эмульсий должен быть менее 0,5 мкм, независимо от концентрации дисперсной (масляной, липидной, жировой) фазы.

**Метод лазерной дифракции света**

Метод лазерной дифракции света, использующий классическое рассеяние света, основанное на теории Ми, анализирует пространственное (угловое) изменение интенсивности света, путём измерения последнего в зависимости от угла рассеяния, как правило, в большом диапазоне обнаруженных углов. Временные флуктуации (колебания) интенсивности рассеяния, обусловленные броуновским движением, усредняются во времени для каждого углового измерения. Это угловое изменение происходит вследствие взаимной интерференции отдельных рассеянных волн, поступающих на детектор с разными фазами из разных точек в пределах каждой из частиц (капель) эмульсии, суммированных по всем различным частицам. Степень углового изменения значительна всякий раз, когда размер частицы (капли) не мал по сравнению с длиной волны лазерного излучения (обычно 633-635 нм). Частицы заданного размера и показателя преломления дают уникальную кривую зависимости интенсивности рассеяния от угла наклона. Распределение размеров частиц (капель) приводит к конечной угловой зависимости, которая представляет собой суммирование всех индивидуальных кривых интенсивности и угла наклона. Измеренная угловая зависимость интенсивности рассеяния, полученная из испытуемого образца эмульсии, может быть инвертирована (трансформирована) с помощью соответствующего алгоритма деконволюции (обратного интегрального преобразования) в сочетании с теорией рассеяния Ми для получения приблизительного распределения частиц (капель) по размерам. Область применения, оборудование, пробоподготовка, методика определения и другие данные, касающиеся метода классического рассеяния света, представлены в ОФС «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции света».

**Метод светоблокировки**

***Область применения***. Метод эффективен для определения частиц (капель) эмульсии размером от 1,3 до 400 мкм, при испытании эмульсий обеспечивает подсчет частиц размером до 5 мкм и частиц (капель) большого диаметра (более 5 мкм).

***Принцип***

Метод светоблокировки (светового затемнения, световой экстинкции) основан на оптическом определении размера отдельных частиц (капель). При применении метода прохождение частицы (капли) через тонкую оптическую «чувствительную» зону приводит к эффективной блокировке части падающего светового пучка, вызывая мгновенное снижение интенсивности света, достигающее отдалённого детектора экстинкции уменьшением обнаруженной интенсивности света.

Величина этого уменьшения сигнала связана с площадью поперечного сечения частицы (капли), предположительно меньшей, чем толщина «чувствительной» зоны (зоны зондирования), т.е. для сферических частиц (капель) связана с квадратом их диаметра. Чем больше диаметр сферической частицы (капли), тем больше высота (напряжение) импульса сигнала, вызванного кратковременным уменьшением обнаруженной интенсивности света.

При оптимизации прибора для оптического измерения отдельных частиц методом светоблокировки, для определенного образца эмульсии необходимо протестировать серию разведений для достижения согласованности между образцами.

Цель состоит в том, чтобы определить стандартный диапазон разведений, которые дают последовательные данные и наиболее применимы к тестируемому составу лекарственного препарата. Необходимо, чтобы при сравнении различных эмульсий каждый раз измерялось одно и то же приблизительное количество капель, и как только стандартный диапазон разведений будет достигнут, его можно использовать для определения.

До тех пор, пока концентрация частиц (капель) находится ниже «предела измерения» датчика (определённого проточной ячейкой и оптической конструкцией и проверенного экспериментально), только одна частица (капля) в большинстве случаев пройдёт через «чувствительную» зону (зону зондирования) в определённый момент времени, что позволит определить размер и подсчитать менее чем 1 % частиц (капель). Для используемого в испытании датчика должен быть известен как «предел измерения» (концентрация), так и оптимальный расход.

Целесообразно выполнять измерения большого диаметра частиц (капель) при уменьшенной концентрации эмульсии таким образом, чтобы измеряемая концентрация частиц (капель) от порога обнаружения (например, более 1,8 мкм) до соответствующего верхнего размера (например, 50 мкм) составляла приблизительно одну треть от номинального «предела измерения» для используемого датчика. Полученные значения высоты одиночных импульсов преобразуются в диаметры капель с применением стандартной калибровочной кривой, построенной предварительно с использованием стандартного образца, в качестве которого применяют сертифицированный стандартный материал, представляющий собой дисперсию сферических моноразмерных частиц.

***Оборудование***

Для измерения используют подходящее для метода, светоблокировки оборудование с возможностью автоматического разбавления образца или без него, оснащённое подходящим программным обеспечением.

Надлежащие результаты измерения (количество частиц, распределение частиц по размерам) могут быть получены при использовании приборов, условий и наличия других необходимых данных, соответствующих заданным параметрам определения.

***Вода***. Воду, используемую в качестве растворителя, фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Для удаления пузырьков воздуха воду обрабатывают ультразвуком в течение 30 с. Допускается использовать стерильную воду для инъекций, хранящуюся в упаковке из стекла.

***Подготовка стандартных образцов***

К заранее установленному объёму воды добавляют соответствующее количество концентрированной дисперсии, содержащей стандартный образец. В качестве стандартного образца используют сертифицированный стандартный материал, представляющий собой дисперсию сферических частиц. Аккуратно перемешивают жидкость до получения однородной слегка мутной дисперсии (исходный стандартный образец). Если используемый прибор оснащён автоматической системой введения и разбавления, то после ввода в прибор через шприц или тефлоновую пробоотборную линию исходного стандартного образца, дальнейшее разбавление образца для проведения испытания и оптимизации концентрации частиц, происходит автоматически.

В случае отсутствия автоматической системы разбавления, исходный стандартный образец разбавляют водой, как правило, не менее чем в 10 раз по сравнению с первым разбавлением, а затем помещают в ёмкость из нейтрального стекла типа I, перед тем как пропустить его через датчик.

Поверка прибора и калибровка должны быть проведены с использованием двух различных стандартных образцов дисперсий с размером частиц приблизительно 5 и 10 мкм и на основании трёх измерений для каждого размера частиц. После калибровки прибора устанавливают порог обнаружения частиц на уровне 1,8 мкм, верхний предел на уровне 50 мкм.

***Пробоподготовка***

К заранее установленному объёму воды добавляют соответствующий объём образца испытуемой эмульсии для проведения не менее трёх измерений. Аккуратно перемешивают жидкости до получения однородной слегка мутной дисперсии, представляющей собой исходный испытуемый образец.

Пробоподготовку проводят аналогично методике подготовки стандартных образцов.

***Пригодность системы***. Используя стандартный образец, указанный в подразделе «Подготовка стандартных образцов», определяют среднее значение размера (диаметра) частиц и количество частиц в миллилитре каждого из стандартных образцов, содержащих частицы размером 5 и 10 мкм. Система пригодна для использования после того, как полученные данные трёх измерений размера (диаметра) частиц будут находиться в пределах 10 % от целевого значения, как с точки зрения повторяемости, так и с точки зрения близости к значению соответствующего сертифицированного стандартного образца.

***Методика определения и анализ данных***

В прибор для измерения методом светоблокировки, оснащённый автоматической системой разбавления, используя одноразовый шприц или тефлоновую пробоотборную линию, вносят испытуемый или стандартный образец. Если автоматическая система разбавления не используется, переносят соответствующим образом разбавленный испытуемый или стандартный образец в свободную от частиц ёмкость из нейтрального стекла типа I, содержащую соответствующий объём воды.

Образец тщательно перемешивают с водой до получения однородной дисперсии.

Устанавливают на приборе диапазон измерения частиц от 1,8 мкм до 50 мкм и варьируют концентрацию и/или время сбора данных таким образом, чтобы разница между двумя измерениями количества частиц превышающих 5 мкм была как минимум двукратной.

Количество частиц размером более 5 мкм в исходной эмульсии должно быть достаточным, для достоверного определения «хвоста» частиц большого диаметра.

Средний диаметр капель жировых эмульсий для парентерального применения должен быть менее 500 мкм независимо от концентрации дисперсной липидной фазы.

Необходимые данные проведённого испытания, как правило, определяют с помощью программного обеспечения прибора.

Примечание – При проведении испытания не допускается использование материала на основе поливинилхлорида с диэтилгексилфталатом, так как такой материал инициирует распад липидных эмульсий для парентерального применения.

**Метод электрочувствительных зон (метод Култера)**

***Область применения***. Метод предназначен для измерения размера и количества частиц в диапазоне от 0,2 мкм до 1600 мкм. Может использоваться для определения количества частиц (жировых капель) размером от 0,5 мкм до 5 мкм и более.

***Принцип***. Метод Култера основан на регистрации электрических импульсов, возникающих при прохождении через апертуру находящихся в электролите частиц. Во время испытания измеряется сопротивление между электродами. В апертуре создается так называемая «чувствительная зона» и частицы, находящиеся в электролите во взвешенном состоянии, могут быть подсчитаны при прохождении через неё. При этом эквивалентный объём 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 объёму частицы. Используя автоматическую систему для анализа числа и уровня импульсов, можно подсчитать число частиц и измерить объём каждой частицы, проходящей через «чувствительную зону».

***Оборудование***

Метод Култера используется в приборах – анализаторах, которые представляют собой одну установку, содержащую апертурную трубку, систему анализа жидкостей (включающую насос и измерительный прибор) и электронику для управления апертурным током. Анализатор осуществляет управление током таким образом, что его значение остается постоянным. Регуляторы скорости потока и фокусировки апертуры находятся на передней панели анализатора. Все остальные регулирующие устройства управляются с помощью соответствующего программного обеспечения, которое обеспечивает получение распределения по размерам с высоким разрешением частиц. Каждая апертурная трубка покрывает диапазон размера частиц от 2 до 60 % диаметра апертуры (апертура – отверстие определенного диаметра от 20 до 2000 мкм). Используются апертуры диаметром 20, 50 мкм в зависимости от предполагаемого размера жировых капель. Верхний предел измерений диктуется вязкостью раствора и плотностью частиц, а нижний предел – размером апертуры, электрической проводимостью анализируемого образца и условиями окружающей среды. Заданные сила тока и усиление используются во время анализа и определяют величину электрического импульса (сила тока) и коэффициент его усиления, создаваемые в анализаторе автоматически при прохождении частиц через апертуру (так например, для апертуры 20 мкм рекомендуется установить усиление 4 и силу тока 600 µА).

Результаты, полученные на приборе, представляются в виде числа частиц, а также в виде распределения частиц по объёму или площади поверхности, на них не влияют цвет частиц, показатель преломления частиц или жидкости, а также форма частиц.

Все данные сохраняются в памяти прибора в виде значений зарегистрированных импульсов, причём значение каждого импульса преобразовано прибором в значение размера частиц, выраженное в мкм.

Автоматически создается файл с полной информацией о параметрах проведения анализа и полученных результатах.

***Растворитель.*** Для электропроводности и в качестве растворителя используют натрия хлорида раствор 4 %. Перед использованием (за 2–3 ч) раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Для промывки системы после работы используют спирт 70 % и оставляют её заполненной этим раствором.

***Пригодность системы***

Перед началом работы, при каждой смене растворителя и замене апертуры прибор калибруют в соответствии с инструкцией по эксплуатации, используя для этого калибровочную суспензию латексных стандартных образцов (в зависимости от определяемого размера).

При выполнении калибровки анализируют известный размер латексных стандартных образцов. Калибровать апертуру следует стандартными частицами, размер которых составляет от 10 до 20 % размера апертуры. Разброс измерений стандартных образцов определяет константу калибровки *Kd*, необходимую анализатору для того, чтобы измерять действительные размеры частиц. После калибровки, необходимо тщательно отмыть апертуру и внешний электрод.

***Пробоподготовка.*** К определенному объёму растворителя добавляют объём образца испытуемой эмульсии. Делают дальнейшие разведения до необходимой концентрации для прохождения испытуемого образца через апертуру.

***Методика определения и анализ данных***

Проверяют, что в систему введено значение *Kd*, полученное при калибровке. Согласно инструкции по эксплуатации опорожняют систему, продувая ее воздухом, заполняют растворителем. Кювету с образцом помещают в держатель для проб. Проверяют проходимость апертуры, анализируют пробу и снимают показания прибора. Количество испытаний и объём анализируемой пробы зависит от определяемого размера и требований. Измерения и расчёт проводят с учетом объёма анализируемой пробы, а также по времени анализа без учёта объёма образца.

С помощью программного обеспечения прибора рассчитывают долю частиц необходимого размера.