



Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом

А.А. Воропаев , О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов, А.А. Мовсесянц

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

 Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Резюме

Счетно-фотометрический метод определения невидимых механических включений, описанный в Государственной фармакопее Российской Федерации, предусматривает формирование из образцов лекарственных препаратов пробы объемом не менее 25 мл, необходимой для проведения четырех измерений, каждое объемом 5 мл. Для препаратов, выпускаемых, например, в готовых к использованию преднаполненных шприцах объемом 0,2–0,3 мл, метод требует объединения большого количества первичных упаковок, что экономически затратно. Для дорогостоящих препаратов актуальным является использование малых объемов аналитических проб при проведении испытаний счетно-фотометрическим методом. Применяющиеся на практике счетчики частиц позволяют проводить анализ лекарственных препаратов в объемах от 0,1 мл, но это требует оценки точности методики. **Цель работы:** оценить точность определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб. **Материалы и методы:** в работе использовали счетчик частиц HIAC 9703+; стандартные образцы счетной концентрации, содержащие $0,998 \times 10^6$ частиц/мл и 3800 частиц/мл; суспензии стандартных латексных частиц с заданным размером (20 мкм). **Результаты:** оценена точность методики определения количества невидимых частиц счетно-фотометрическим методом при использовании малых аналитических проб объемом от 0,1 до 5,0 мл: правильность составила 96–100%; повторяемость – 0,8–1,8%; коэффициенты корреляции линейной зависимости расчетного количества частиц от теоретического значения – более 0,999. Проведение измерений с аналитической пробой объемом 0,1 мл нецелесообразно из-за недостаточной точности результатов. Относительное стандартное отклонение результатов измерений количества невидимых частиц, получаемых при использовании аналитических проб объемом от 0,2 до 5,0 мл, не превышает относительной погрешности результатов измерений счетчика частиц. При проведении испытания с использованием малых аналитических проб (0,2–1,0 мл) рекомендуется использовать шприц-пробоотборник объемом 1 мл. Показана необходимость предварительной установки объема преаналитической пробы (не менее 0,1 мл). Сравнительные испытания биологических лекарственных препаратов белковой природы (7 наименований) при использовании стандартной (5,0 мл) и малой (0,5 мл) аналитических проб продемонстрировали сопоставимые результаты. **Выводы:** анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о возможности использования счетно-фотометрического метода с малыми объемами аналитических проб.

Ключевые слова: счетно-фотометрический метод; невидимые механические включения; биологические лекарственные препараты

Для цитирования: Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Давыдов Д.С., Мовсесянц А.А. Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):94–104. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-94-104>

The use of small volumes of test samples in subvisible particle testing by the light obscuration method

A.A. Voropaev ✉, O.V. Fadeikina, D.S. Davydov, A.A. Movsesyants

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

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Abstract

The light obscuration method described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation for subvisible particle testing, provides for preparation of a pooled sample with a minimum volume of 25 mL to be used in four measurements, each with 5.0 mL of the test sample. In the case of, for example, ready-to-use 0.2–0.3 mL pre-filled syringes, the method requires pooling the contents of a large number of products, which is economically costly. The use of small volumes of test samples in measurements by the light obscuration method is especially relevant for expensive medicines. Current particle counters allow for testing of 0.1 mL samples, but this requires assessment of the procedure's accuracy. **The aim of the study** was to assess the accuracy of subvisible particle testing by the light obscuration method for small volumes of test samples. **Materials and methods:** we used an HIAC 9703+ liquid particle counter; particle count reference standards containing 0.998×10^6 particles/mL and 3800 particles/mL; suspensions of standard latex particles with a known size (20 μm). **Results:** the study assessed the accuracy of subvisible particle determination by the light obscuration method for small test samples of 0.1–0.5 mL: trueness was 96–100%; repeatability was 0.8–1.8%; linear correlation coefficients for the calculated versus theoretical number of particles were more than 0.999. The use of 0.1 mL test samples is impractical because of insufficient accuracy of the test results. The relative standard deviation of subvisible particle measurements obtained with 0.2–5.0 mL test samples did not exceed the measurement error of the instrument. The use of small test samples (0.2–1.0 mL) requires the use of a 1 mL sampling syringe. The study demonstrated the need for determination of the pre-run volume (not less than 0.1 mL). Comparative testing of standard (5.0 mL) and small (0.5 mL) samples of protein-based biological products showed comparable results. **Conclusions:** the study demonstrated that the light obscuration method could be used for small volumes of test samples.

Key words: light obscuration method; subvisible particulate matter; biological products

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Davydov D.S., Movsesyants A.A. The use of small volumes of test samples in subvisible particle testing by the light obscuration method. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):94–104. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-94-104>

Введение

Определение невидимых невооруженным глазом механических включений является одним из критических показателей качества для парентеральных лекарственных препара-

тов. Согласно базе данных FDA Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts 23 из 59 (39%) отзывов и изъятий лекарственных препаратов с рынка США и предупреждений об их безопасности в период с 2018 по 2020 г. были

связаны с загрязнением данных препаратов посторонними частицами¹. Такие частицы могут иметь внешнее происхождение, не связанное с самим препаратом (пыль, волосы, пыльца и др.); внутреннее происхождение, связанное с производством препарата (частицы первичной упаковки, металлические частицы конвейера и др.); или могут быть собственными частицами препарата, что характерно для белковых препаратов, способных к образованию агрегатов, например моноклональных антител [1, 2].

Методика определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом предусматривает проведение четырех измерений, каждое объемом по 5,0 мл, с общим объемом пробы не менее 25 мл. Для препаратов, выпускаемых в дозированных формах малого объема, например в готовых к использованию преднаполненных шприцах объемом 0,2 или 0,3 мл, методика требует объединения большого количества упаковок (например, 125 упаковок для дозировки 0,2 мл и 84 упаковки для препаратов дозировкой по 0,3 мл), что является чрезвычайно экономически затратным для дорогостоящих препаратов. В 2012 г. Фармакопейная Конвенция США (USP) опубликовала монографию <787> «Невидимые механические включения в инъекционных лекарственных препаратах белковой природы»², в которой описывалось измерение невидимых частиц счетно-фотометрическим методом, но в существенно меньших объемах. В данной монографии предлагается проводить подсчет частиц в четырех аналитических пробах объемом от 0,2 до 5,0 мл на выбор пользователя в зависимости от объема первичной упаковки. 1 августа 2014 г. монография <787> USP вступила в силу на территории США. Российская³ и Европейская фармакопеи⁴ пока не допускают использование уменьшенных объемов аналитической пробы, тем не менее европейские исследователи поддерживают использование малых объемов аналитических проб [3].

Цель работы – оценить точность определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб.

Материалы и методы

Материалы

- вода очищенная, полученная на установке Milli-Q Integral 10 (Millipore Corp., Франция);
- стандартные образцы счетной концентрации: суспензия латексных частиц для проверки концентрации (серия 7497044F; Beckman Coulter Life Sciences, США, концентрация $0,998 \times 10^6$ частиц/мл $\pm 10\%$); PHARM-TROL™ Particle Count Control (серия 227847, Thermo Scientific™, США, концентрация 3800 частиц/мл $\pm 15\%$);
- суспензия стандартных латексных частиц NIST (National Institute of Standards and Technology) Coulter® CC Size Standard с заданным размером 20 мкм (серия 477062K; Beckman Coulter Life Sciences, США).
Биологические лекарственные препараты:
- Иммуновенин, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (серия У111, АО «НПО «Микроген», Россия);
- Плазбумин-20, раствор для инфузий 20% (серия P1EC6AY001, «Грифолз Терапьютикс Инк», США);
- Коэйт-ДВИ, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (серия В2NAB00053, «Грифолз Терапьютикс Инк», США);
- Интерферон бета-1b, раствор для подкожного введения (серия V740421S, ЗАО «БИОКАД», Россия);
- Хайгарда, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения (серии P100255524, P100255084, «СиЭсЭл Беринг ГмбХ», Германия);
- Тебериф, раствор для подкожного введения (серия V200220S, ЗАО «БИОКАД», Россия).

Методы

Метод счетно-фотометрический. Испытания проводили на счетчике частиц в жидкости HIAC 9703+ (Beckman Coulter Life Sciences, США), с программным обеспечением PharmSpec. Объем аналитической пробы 0,2–5,0 мл. Количество измерений 4, при этом не принимали в расчет результаты определения для первой пробы и рассчитывали среднее число частиц в испытуемом образце⁵. Критерий приемлемости результатов:

¹ <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>

² USP 41–NF 36 <787> Subvisible particulate matter in therapeutic protein injections.

³ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ 2.9.19. Particulate contamination: sub-visible particles. European Pharmacopoeia 10th ed.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

относительная погрешность не должна превышать $\pm 30\%$ ⁶, коэффициент корреляции линейной зависимости должен быть не менее 0,99⁷.

Весовой метод определения точности дозирования пробы. Воду очищенную наливали в стакан и взвешивали с точностью до 0,0001 г на весах аналитических ВР-2215 (ООО «Сартогосм», Россия). После этого отбирали одну аналитическую пробу счетчиком частиц HIAC 9703+ и проводили повторное взвешивание. Повторяли данную процедуру пять раз. По разности масс определяли массу одной дозы и рассчитывали точность дозирования счетчика частиц.

Подготовка суспензии стандартного образца счетной концентрации. Тщательно перемешивали суспензию стандартных латексных частиц (Beckman Coulter Life Sciences, США) в течение 15 с на вортексе. Ожидали 10 минут для оседания пены. После этого переносили 200 мкл суспензии в лабораторный стакан, добавляли 20 мл воды очищенной и перемешивали на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+ при 350 об/мин. Концентрация частиц в подготовленной суспензии согласно паспорту составляет $0,998 \times 10^3$ частиц/мл с погрешностью 10%.

Подготовка суспензии стандартных латексных частиц NIST. В лабораторный стакан с 800 мл воды очищенной добавляли суспензию стандартных латексных частиц по каплям при постоянном перемешивании на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+ при 350 об/мин. При этом измеряли количество частиц в 1 мл, доводя концентрацию частиц до верхнего предела измерения счетчика. После этого суспензию перемешивали в течение 10 минут и переносили 400 мл в другой стакан, содержащий 400 мл воды очищенной, для получения двукратного разведения. Снова перемешивали в течение 10 мин и проводили следующее двукратное разведение. Таким способом готовили пять разведений исходной суспензии (суспензии 1–5) и использовали их для оценки линейности методики и влияния преаналитического объема на точность измерений.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD), коэффициент корреляции (r) с помощью программы Excel [4]. Статистическую значимость различий групп данных оценивали

с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку характеристик точности (правильность, повторяемость, линейность) методики с малыми пробами проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик⁸.

Результаты и обсуждение

Факторы, влияющие на результаты определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

Влияние шприца-пробоотборника. Возможные комплектации счетчика частиц в жидкости HIAC 9703+ включают шприцы-пробоотборники объемом 1, 10 и 25 мл. В данной работе использовали шприц-пробоотборник объемом 10 мл, являющийся стандартным для проведения испытаний по фармакопейным методикам, и шприц-пробоотборник объемом 1 мл для испытания образцов с малым объемом. Программное обеспечение счетчика частиц позволяет провести испытания любым объемом вне зависимости от установленного шприца-пробоотборника. Для оценки точности измерений в зависимости от шприца-пробоотборника проводили подсчет количества частиц с разными аналитическими пробами в подготовленной модельной смеси стандартного образца счетной концентрации частиц. Использовался шприц-пробоотборник объемом 10 мл. Итоговый результат рассчитывали на 1,0 мл образца. Результаты представлены на рисунке 1.

При объеме аналитической пробы от 1,0 до 5,0 мл правильность измерений находится в интервале 99,5–100,0%. Наилучший результат зафиксирован для аналитической пробы 5,0 мл. Повторяемость результатов (RSD) составила 0,4–1,0%. При измерении аналитической пробой менее 1,0 мл точность результата заметно уменьшилась: отличие среднего значения измеренного количества частиц от паспортного значения достигало 10% и находилось в интервале 90,9–93,8% при высокой повторяемости 1,1–2,7%.

При замене шприца-пробоотборника объемом 10 мл на шприц объемом 1 мл правильность измерений аналитических проб малых объемов (от 0,2 до 0,9 мл) существенно возрастала: до 97–100%.

⁶ Методика поверки МП 242-2221-2018 Государственная система обеспечения единства измерений. Счетчики частиц в жидкости HIAC 9703.

⁷ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁸ Там же.

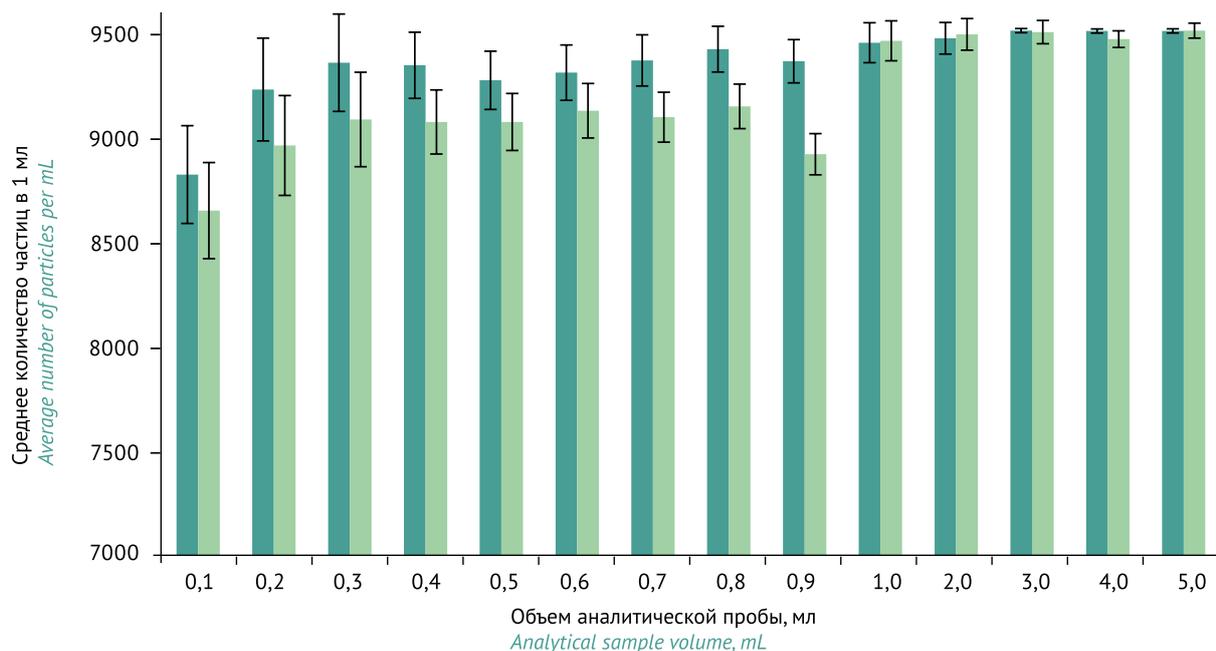


Рис. 1. Влияние объема шприца-пробоотборника на точность измерения количества частиц. Светло-зеленым цветом обозначены результаты, полученные при использовании шприца-пробоотборника объемом 10 мл. Темно-зеленым цветом обозначены результаты, полученные при использовании шприца-пробоотборника объемом 10 мл (аналитических пробы объемом 1,0–5,0 мл) и шприца-пробоотборника объемом 1 мл (аналитических пробы объемом 0,1–0,9 мл).

Fig. 1. Effect of the sampling syringe volume on the accuracy of the particle count measurement. The light green colour shows the results obtained with a 10 mL syringe. The dark green colour shows the results obtained with a 10 mL syringe (for 1.0–5.0 mL test samples) and a 1 mL syringe (for 0.1–0.9 mL test samples).

Правильность при использовании аналитической пробы объемом 0,1 мл составила 93%.

Различия результатов измерений при использовании разных шприцов-пробоотборников можно объяснить недостаточной точностью дозирования пробы. Точность дозирования определяли весовым методом, проводя взвешивание пробы до и после отбора дозы. По разности масс определяли массу одной дозы и рассчитывали точность дозирования счетчика частиц. В расчетах массы пробы использовали значение плотности воды при 20 °С, равное 998,2067 кг/м³ [5]. Используя полученные значения, рассчитывали правильность дозирования пробы счетчиком частиц разными шприцами-пробоотборниками. Результаты оценки средней массы дозы в зависимости от объема используемого шприца-пробоотборника приведены в таблице 1.

Как следует из данных, представленных в таблице 1, точность дозирования шприца-пробоотборника объемом 1 мл составляет не менее 99,7%. В то время как точность дозирования тех же аналитических проб шприцом-пробоотборником объемом 10 мл значительно меньше: от 86,2 до 97,8%.

Таким образом, при проведении испытаний с малыми аналитическими пробами (менее 1,0 мл) следует использовать шприц-пробоот-

борник объемом 1 мл, а для аналитических проб от 1,0 до 5,0 мл – стандартный шприц-пробоотборник объемом 10 мл. Аналитическую пробу, равную 0,1 мл, использовать нецелесообразно из-за недостаточной точности.

Влияние объема преаналитической пробы.

Преаналитическая проба отбирается счетчиком частиц между отдельными аналитическими пробами прибором для стабилизации скорости потока жидкости до подсчета частиц. Слишком большой объем преаналитической пробы увеличивает общий объем пробы, поэтому необходимо определить минимальный объем преаналитической пробы, при котором сохраняется необходимая точность измерений. Для определения минимального объема преаналитической пробы использовали суспензии стандартных латексных частиц NIST размером 20 мкм в концентрации около 500 частиц в 1 мл. Результаты оценки влияния объема преаналитической пробы представлены на рисунке 2.

Дисперсионный анализ (ANOVA) результатов показал, что различия между группами с объемом преаналитической пробы от 0,1 до 0,4 мл статистически не значимы:

$$F_{\text{экс}} = 1,009 < F_{\text{крит}} (df=3;0,05) = 2,683.$$

При анализе групп данных, включающих результаты измерений без установки объема преа-

Таблица 1. Результаты оценки правильности дозирования пробы шприцами-пробоотборниками разного объема
Table 1. Evaluation of the sampling accuracy of syringes with different volumes

Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>	Объем шприца-пробоотборника 1 мл <i>1 mL sampling syringe</i>		Объем шприца-пробоотборника 10 мл <i>10 mL sampling syringe</i>	
	средняя масса пробы, г <i>average sample mass, g</i>	правильность, процент от рассчитанной массы пробы, % <i>accuracy, percentage of the calculated mass of the sample, %</i>	средняя масса пробы, г <i>average sample mass, g</i>	правильность, процент от рассчитанной массы пробы, % <i>accuracy, percentage of the calculated mass of the sample, %</i>
0,200	0,200	100,1	0,172	86,2
0,300	0,299	99,9	0,264	88,3
0,400	0,399	100,0	0,371	93,0
0,600	0,598	99,9	0,576	96,2
0,800	0,797	99,8	0,781	97,8
1,000	0,995	99,7	0,977	97,9

налитической пробы (0,0 мл), появляются статистически значимые отличия:

$$F_{\text{эксп}} = 3,498 > F_{\text{крит}}(df=4;0,05) = 2,434.$$

Следовательно, проведение испытания без предварительной установки преаналитической пробы может привести к получению некорректного результата.

Таким образом, при проведении испытания по показателю «Механические включения (невидимые)» счетно-фотометрическим методом при использовании малых объемов аналитических проб в настройках прибора необходимо предусматривать обязательную установку преаналитической пробы объемом от 0,1 до 0,4 мл.

Оценка характеристик точности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

Показатели правильности и повторяемости методики оценивали с использованием стандартного образца счетной концентрации PHARM-TROL™ Particle Count Control. Правильность определения концентрации частиц оценивали двумя способами. В первом случае рассчитывали процент от номинального (согласно паспорту) количества частиц в стандартном образце счетной концентрации. Во втором случае рассчитывали процент от количества частиц, определенного при анализе с аналитической пробой объемом 5,0 мл, так как данный объем является стандартным при реализации действующей фармакопейной методики. Повторяемость оценивали как относительное стандартное отклонение (*RSD*) результатов определения коли-

чества частиц. Результаты приведены в таблицах 2 и 3.

Из приведенных в таблице 2 данных следует, что для пробы объемом 0,2 мл значение показателей правильности является наименьшим (97 и 96%) среди исследуемых аналитических проб. А величина *RSD*, равная 1,8%, характеризующая меру разброса результатов измерения количества частиц, является максимальной.

Оценку линейности проводили с использованием стандартных латексных частиц NIST. Результаты приведены в таблице 3.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что максимальное отклонение результатов определения количества частиц при использовании малых объемов аналитических проб (2,0; 1,0; 0,5; 0,2 мл) не превышает 8% (для суспензии 4). Минимальное значение показателя правильности составило 92,1% (для суспензии 4), т.е. относительное отклонение от среднего количества частиц, измеренного с использованием аналитической пробы объемом 0,2 мл, не превышает 7,9%. Результаты регрессионного анализа, проведенного по методу наименьших квадратов с линейной моделью $y = bx + a$, и коэффициент корреляции r представлены в таблице 4. Для каждой аналитической пробы коэффициент корреляции $r > 0,999$, а угловые коэффициенты линейной зависимости b сопоставимы между собой.

Оценка характеристик точности методики с использованием малых объемов аналитической пробы показала, что возможно проведение испытаний с использованием любого из объемов от 0,2 до 5,0 мл, так как все результаты с использованием малых объемов аналитических проб

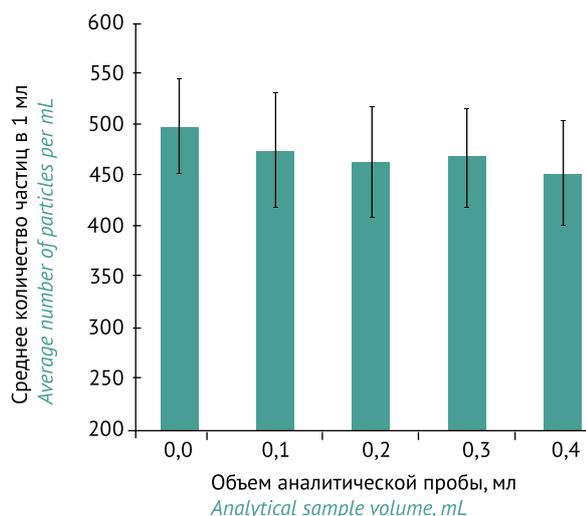


Рис. 2. Влияние объема преаналитической пробы на точность измерений количества частиц.

Fig. 2. Effect of the pre-run volume on the measurement accuracy.

удовлетворяют предъявляемому критерию приемлемости измерения количества частиц.

Описание методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб.

Содержимое не менее 10 первичных упаковок лекарственных средств объединяют в одну пробу. В настройках прибора устанавливают объем преаналитической пробы, равный

0,1 мл. При использовании аналитической пробы объемом менее 1,0 мл необходимо заменить шприц-пробоотборник объемом 10 мл на шприц-пробоотборник для малого объема. Определяют число частиц размером, равным или превышающим 10 и 25 мкм. Проводят четыре измерения с объемом аналитической пробы от 0,2 до 5,0 мл (в зависимости от объема первичной упаковки). Результаты первого измерения не учитывают и рассчитывают среднее количество частиц в одной емкости.

Таблица 2. Результаты оценки правильности и повторяемости методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

Table 2. Assessment of the trueness and repeatability of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Среднее количество частиц в 1 мл ± стандартное отклонение <i>Average number of particles per mL ± standard deviation</i>	3836±16	3788±32	3762±32	3741±54	3691±65
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	0,4	0,8	1,2	1,4	1,8
Правильность, процент от номинального количества частиц в стандартном образце счетной концентрации, % <i>Trueness, percentage of the nominal number of particles in the particle count reference standard, %</i>	101	100	99	98	97
Правильность, процент от количества частиц, определенных с объемом аналитической пробы 5,0 мл, % <i>Trueness, percentage of the calculated number of particles in the 5.0 mL test sample, %</i>	100	99	98	98	96

Примечание. RSD, % – относительное стандартное отклонение.
Note. RSD, % – relative standard deviation.

Таблица 3. Результаты оценки линейности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб**Table 3.** Assessment of the linearity of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Суспензия 1 <i>Suspension 1</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	8596	8694	8663	8563	8385
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	109	35	47	170	177
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,3	0,4	0,5	2,0	2,1
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	101	101	97	98
Суспензия 2 <i>Suspension 2</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	4447	4422	4388	4305	4257
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	45	430	16	36	63
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,0	1,0	0,4	0,8	1,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	99,4	98,7	96,8	95,7
Суспензия 3 <i>Suspension 3</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	2143	2111	2099	2082	2081
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	29	23	27	36	8
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,4	1,1	1,3	1,8	0,4
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	98,5	98,0	97,2	97,1
Суспензия 4 <i>Suspension 4</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	1048	1049	1022	1017	965
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	10	10	27	20	43
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	0,9	0,9	2,6	1,9	4,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100,0	100,1	97,5	97,0	92,1

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Суспензия 5 <i>Suspension 5</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	518	510	529	516	543
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	6	10	10	22	33
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,2	2,0	1,8	4,2	6,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100,0	98,5	100,6	100,3	97,1

Примечание. RSD, % – относительное стандартное отклонение. Правильность рассчитана как процент от количества частиц, определенного с объемом аналитической пробы 5,0 мл.

Note. RSD, % – relative standard deviation. Trueness was determined as a percentage of the calculated number of particles in the 5.0 mL test sample.

Таблица 4. Результаты регрессионного анализа оценки линейности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

Table 4. Regression analysis of the linearity of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Параметры линейной зависимости <i>Linear dependence parameters</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Множественный коэффициент корреляции <i>r</i> <i>Multiple correlation coefficient r</i>	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Угловой коэффициент линейной зависимости <i>b</i> <i>Slope of the linear function b</i>	1,017	1,030	1,033	1,007	1,015
Свободный член линейной зависимости <i>a</i> <i>Y-intercept of the linear function a</i>	-0,041	-35,58	-54,04	-29,83	-71,44

Испытания биологических лекарственных препаратов с использованием малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом

Методика определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб была применена для испытания по показателю «Механические включения (невидимые)» биологических лекарственных препаратов белковой природы (7 наименований). Для проведения испытаний в сравнении со стандартным объемом аналитической пробы (5,0 мл) был выбран один малый объем аналитической пробы, равный 0,5 мл. Результаты приведены в таблице 5.

Сравнительные испытания по определению невидимых механических включений счетно-

фотометрическим методом стандартной методикой с объемом пробы 5,0 мл и методикой с использованием малого объема пробы 0,5 мл показали сопоставимые результаты для всех препаратов.

Выводы

1. Показана принципиальная возможность использования малых объемов аналитических проб при проведении испытаний счетно-фотометрическим методом по показателю «Невидимые механические включения» биологических парентеральных препаратов.
2. Оценено влияние объема шприца-пробоотборника на точность измерений количества частиц. Рекомендуется при проведении испытания по определению невидимых механических включений с использованием аналитических проб малых объемов (0,2–1,0 мл) применять шприц-пробоотборник объемом 1 мл.

Таблица 5. Результаты определения количества частиц в биологических лекарственных препаратах с использованием стандартного объема аналитической пробы (5,0 мл) и малого объема (0,5 мл)

Table 5. Number of particles in standard (5.0 mL) and small (0.5 mL) samples of biological products

Название <i>Name</i>	Объем пробы 5,0 мл <i>5.0 mL sample</i>		Объем пробы 0,5 мл <i>0.5 mL sample</i>	
	среднее количество частиц более <i>average number of particles larger than</i>		среднее количество частиц более <i>average number of particles larger than</i>	
	10 мкм <i>10 μm</i>	25 мкм <i>25 μm</i>	10 мкм <i>10 μm</i>	25 мкм <i>25 μm</i>
Иммуновенин <i>Immunovenin</i>	2198	124	2136	113
Плазбумин-20 <i>Plasbumin-20</i>	86	3	87	3
Козйт-ДВИ <i>Koate-DVI</i>	132	5	118	4
Интерферон бета-1b <i>Interferon beta-1b</i>	23	0,3	16	0,3
Хайгарда, 2000 МЕ <i>Haegarda, 2000 ME</i>	1255	65	1075	42
Хайгарда, 3000 МЕ <i>Haegarda, 2000 ME</i>	373	13	324	17
Тебериф <i>Teberif</i>	408	3	367	1

3. Оценено влияние объема преаналитической пробы на точность измерений. Данный объем должен составлять 0,1–0,4 мл.
4. Относительное стандартное отклонение результатов определения количества невидимых частиц, получаемых при использовании аналитических проб объемом от 0,2 до 5,0 мл, не превышает относительной погрешности результатов измерений счетчика частиц. Проведение измерений аналитической пробой объемом 0,1 мл нецелесообразно из-за невысокой точности результатов. Характеристики точности методики определения невидимых

механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб: правильность в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 96–100%. Относительное стандартное отклонение повторяемости – 0,8–1,8%. Коэффициенты корреляции линейной зависимости расчетного количества частиц от теоретического значения – более 0,999, вне зависимости от объема аналитической пробы. Установленные характеристики удовлетворяют принятым критериям приемлемости.

Литература/References

1. Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Невидимые механические включения в инъекционных лекарственных препаратах белковой природы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(4):50–7. [Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Subvible particulate matter in therapeutic analysis in therapeutic protein injections. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):50–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-4-50-57>
2. Guo S, Yu C, Guo X, Jia Z, Yu X, Yang Y, et al. Subvisible particle analysis of 17 monoclonal antibodies approved in China using flow imaging and light obscuration. *J Pharm Sci*. 2021;S0022-3549(21)00491-3. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.09.021>
3. Hawe A, Schaubhut F, Geidobler R, Wiggenghorn M, Friess W, Rast M, et al. Pharmaceutical feasibility of sub-visible particle analysis in parenterals with reduced volume light obscuration methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt B):1084–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.004>
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998 [Glantz S. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
5. Tanaka M, Girard G, Davis R, Peuto A, Bignell N. Recommended table for the density of water between 0 °C and 40 °C based on recent experimental reports. *Metrologia*. 2001;38(4):301. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/38/4/3>

Вклад авторов. **А.А. Воропаев** — идея, дизайн исследования, экспериментальная работа с набором суспензий стандартных латексных частиц, обобщение экспериментальных данных, написание текста; **О.В. Фадейкина** — концепция, уточнение дизайна исследований, экспериментальная работа со стандартным образцом счетной концентрации, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, редактирование текста рукописи; **Д.С. Давыдов** — разработка дизайна исследования, консультативная помощь в анализе результатов, редактирование текста рукописи; анализ и интерпретация результатов; **А.А. Мовсесянц** — консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. А.А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. **A.A. Voropaev**—elaboration of the study idea, concept, and design, experimental work with suspensions of standard latex particles, preparation of the summary of the experimental data; writing of the text; **O.V. Fadeikina**—elaboration of the study idea, refinement of the study design, experimental work with the particle count reference standard, analysis, interpretation, and statistical processing of the results, writing of the text; **D.S. Davydov**—elaboration of the study design, providing consultations on the analysis of the study results, editing of the text, analysis and interpretation of the results; **A.A. Movsesyants**—providing consultations on the analysis of the study results, approval of the final version of the paper for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davidov@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Поступила 03.11.2021

После доработки 11.01.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Andrey A. Voropaev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davidov@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Received 3 November 2021

Revised 11 January 2022

Accepted 11 March 2022