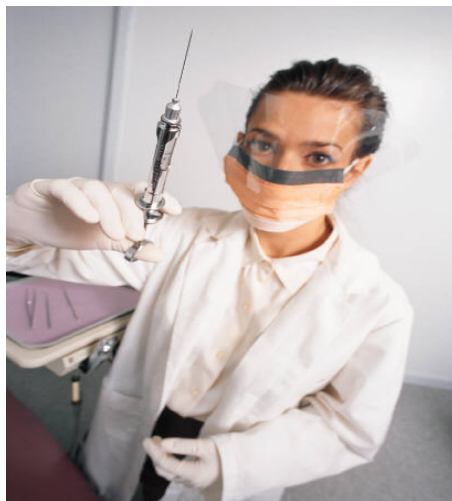


Partikelräkning i injicerbara lösningar enligt EP 2.9.19



Inledning

Pharmaceutiska företag som tillverkar lösningar för injektion måste verifiera att deras produkter inte innehåller mikrokontaminering i form utav ej upplösta partiklar.

Enligt den Europeiska Pharmacope´n 5.1 kapitel 2.9.19 är det partiklar lika med och större än 10 och 25 mikron som är av intresse när det gäller produktionen av injicerbara lösningar.

Anledningen till att man vill kontrollera dessa storlekar är att dom kan utgöra en direkt fara för patienten om dom förekommer i för stora kvantiteter. Olika saker kan ske i kroppen om man utsätta för en för stor koncentration av dess partiklar:

1. Partiklarna är inkompatibla med kroppens artärer och kan starta en kemisk reaktion som förgiftar patienten.
2. Partiklarna är tillräckligt stora för att blockera artärerna och i värsta fall leda till hjärtstillestånd.
3. Kroppen stöter bort partiklarna och immunsystemet går på högvarv vilket kan leda till andra bieffekter.

Dessa partiklar kan introduceras i lösningen utav själva tillverkningsprocessen och av personalen och består normalt sett utav olika typer av gummi, plast, metall och glas. Partiklar får förekomma i lösningen, men då består dom utav den aktiva substansen i medicinen.

Det finns 2 typer av tester som utförs för partiklar ej synliga för det mänskliga ögat:

Metod 1: Partikelräknare med ljublockeringsteknik som automatiskt detekterar och kvantifierar antalet partiklar i en lösning. Detta är den metod som är att föredra om det är möjligt att använda tekniken.

Metod 2: Inspektion med hjälp av mikroskop. Denna teknik används då vätskan som ska analyseras har för låg viskositet, är för grumlig eller har lätt för att generera bubblor när den dras in i partikelräknaren. Exempel på sådana lösningar är emulsioner, kolloider och liposomer.

Denna artikel beskriver endast metod 1.

EP 2.9.19 anger att det finns 3 typer av produkter som ska analyseras:

SVI Small Volume Injectable (förpackningar med en volym på 100 ml eller mindre, vialer, ampuller och förfyllda sprutor)

LVI Large Volume Injectable (förpackningar med större volym än 100 ml, påsar och flaskor)

Dry Powder Powder for parenteral use (pulver som löses i vatten) till SVI eller LVI.

LVI förpackas normalt som påsar eller flaskor och innehåller en stor volym av intravenös lösning och används oftast för korregering av störningar i elektrolyt och vätskebalansen, näringslösningar eller lösningar för att bistå andra aktiva substanser.

SVI är normalt sätt förpackade i ampuller, vialer, små påsar eller förfyllda sprutor.

Detektionsteknik

Tekniken som är accepterad för att detektera partiklar i vätskor enligt EP 2.9.19 kallas för ljusblockerad och bygger på att partiklar passerar en laserstråle och mängden ljus som blockeras av partikeln är relaterad till dess storlek. Tekniken möjliggör att man analyserar 100% av den provmängd som man tillför instrumentet.

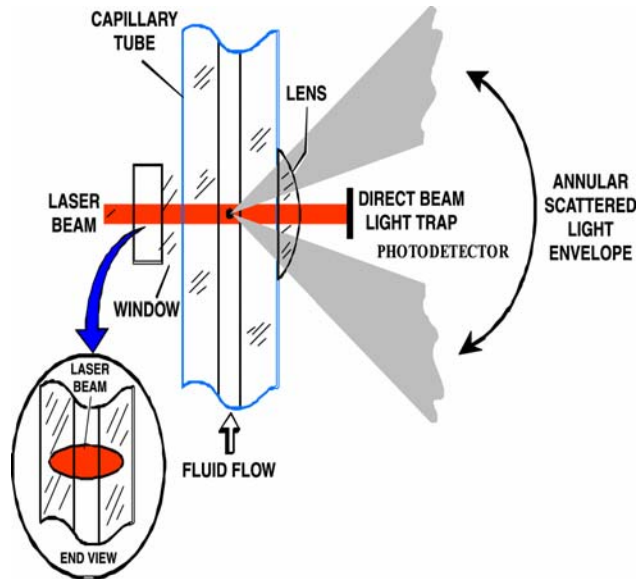
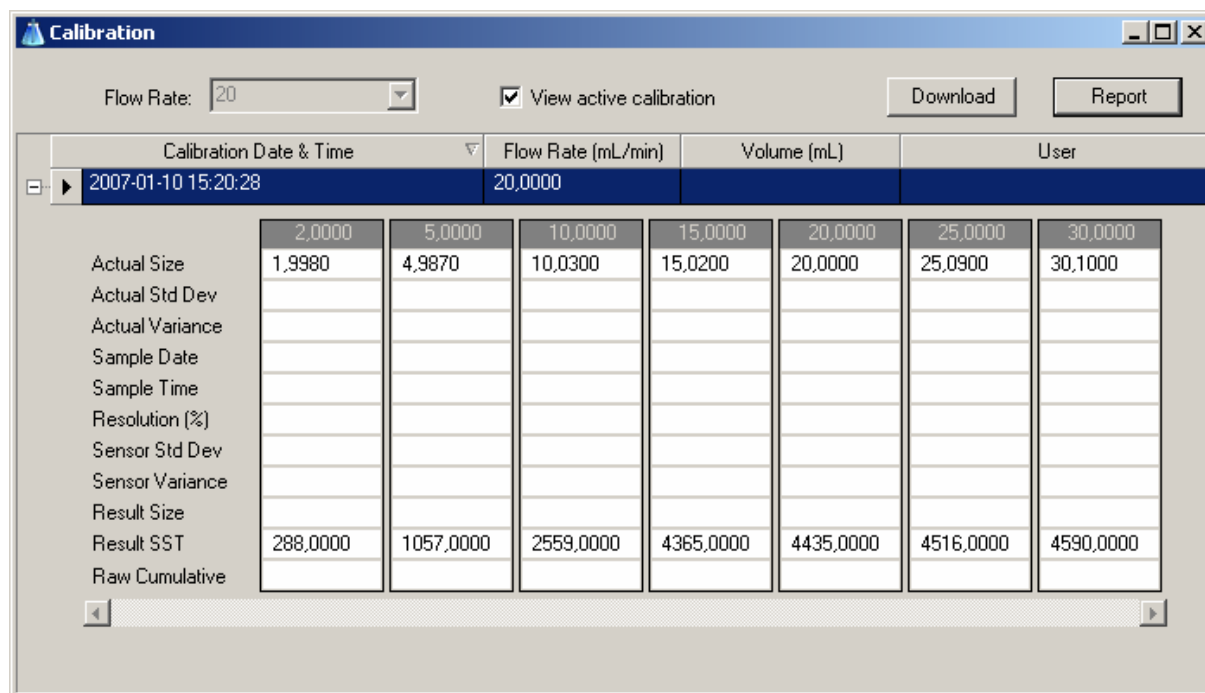


Bild 1 *Detektionsteknik*

Krav på partikelräknaren enligt EP 2.9.19

Enligt EP 2.9.19 så ska analyserna utföras på ett kalibrerat instrument. I dom flesta mjukvarorna till vätskepartikelräknare finns det en kalibreringsguide som hjälper användaren att utföra en kalibrering. Kalibrering utförs på storlekarna 2, 5, 10, 15, 20, 25 och 30 mikrometer (EP kräver 10 och 25 mikrometer). Kalibreringen utförs med hjälp av NIST certifierade latex partiklar som droppas ned i en bägare med rent vatten. En bägare för varje partikelstorlek förbereds och analyseras. Varje partikelstorlek analyseras och kanalen justeras automatiskt för att hamna innanför acceptans kriteriet.



The screenshot shows the 'Calibration' window in the software. At the top, there is a 'Flow Rate' dropdown set to '20', a checked 'View active calibration' box, and 'Download' and 'Report' buttons. Below this is a table with columns for 'Calibration Date & Time', 'Flow Rate (mL/min)', 'Volume (mL)', and 'User'. The first row shows a date of '2007-01-10 15:20:28' and a flow rate of '20,0000'. Below this is a detailed calibration table with columns for flow rates of 2,0000, 5,0000, 10,0000, 15,0000, 20,0000, 25,0000, and 30,0000 mL/min. The rows include 'Actual Size', 'Actual Std Dev', 'Actual Variance', 'Sample Date', 'Sample Time', 'Resolution (%)', 'Sensor Std Dev', 'Sensor Variance', 'Result Size', 'Result SST', and 'Raw Cumulative'.

| | 2,0000 | 5,0000 | 10,0000 | 15,0000 | 20,0000 | 25,0000 | 30,0000 |
|-----------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Actual Size | 1,9980 | 4,9870 | 10,0300 | 15,0200 | 20,0000 | 25,0900 | 30,1000 |
| Actual Std Dev | | | | | | | |
| Actual Variance | | | | | | | |
| Sample Date | | | | | | | |
| Sample Time | | | | | | | |
| Resolution (%) | | | | | | | |
| Sensor Std Dev | | | | | | | |
| Sensor Variance | | | | | | | |
| Result Size | | | | | | | |
| Result SST | 288,0000 | 1057,0000 | 2559,0000 | 4365,0000 | 4435,0000 | 4516,0000 | 4590,0000 |
| Raw Cumulative | | | | | | | |

Bild 2 *Kalibreringsguide i mjukvara för vätskepartikelräknare.*

Kalibrering av instrumentet är normalt sätt något som utförs utav leverantörens certifierade servicepersonal som har kännedom om vilka parametrar som ska uppfyllas vid en kalibrering.

Latex standarderna är också relativt dyra och det lönar sig för kunden att köpa in tjänsten för kalibrering istället för att köpa alla standarder som behövs.

Dock så kan kunden utföra egna tester med vissa intervall för att förvissa sig om att instrumentet fortfarande är i god form. Dessa tester kan läggas upp som färdiga program i mjukvaran för snabb åtkomst. Nedan följer ett exempel på tester som kan utföras och med vilka intervall.

| Test | Förklaring | Rekommenderat Intervall |
|----------------------------|---|-------------------------|
| Nollräkningstest | Verifierar att instrumentet inte falskräknar partiklar | Före varje analys |
| Partikelräkningstest | Verifierar att instrumentet kan detektera rätt antal partiklar av en viss storlek av en känd koncentration partiklar/ml | 1 gång/månad |
| Noggrannhetstest | Verifierar att instrumentet kan detektera en viss känd partikelstorlek med en viss noggrannhet | 1 gång/månad |
| Verifiering av Kalibrering | Verifierar om konstanterna från kalibreringskurvan har ändrats och om instrumentet behöver kalibreras på nytt | 1 gång/månad |
| Flödestest | Verifierar att instrumentet drar en viss volym vätska/sek | 1 gång/halvår |
| Volymtest | Verifierar att instrumentet drar in den mängd vätska som den har ställts in för att göra | 1 gång/halvår |

Tabell 1 *Testintervall för vätskepartikelräknare*

Faktorer som påverkar mätresultatet

Partikelkoncentration

För att en partikelräknare ska kunna detektera och kvantifiera partiklar på ett korrekt sätt så kräver det att partiklarna passerar lasern en i taget. Normalt så anger man koncentrationsgränsen i något som kallas för ”% coincidence error”. Vätskepartikelräknare som använder sig av ljusblokeringstekniken har oftast en gräns på ca 10 000 partiklar/ml vid 10% coincidence error, vilket innebär att det är 10% chans att 2 små partiklar räknas som en stor.

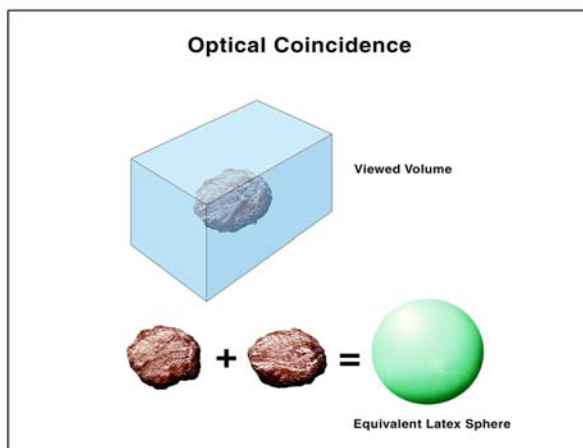


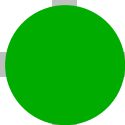
Bild 3 *Coincidence error*

Luftbubblor

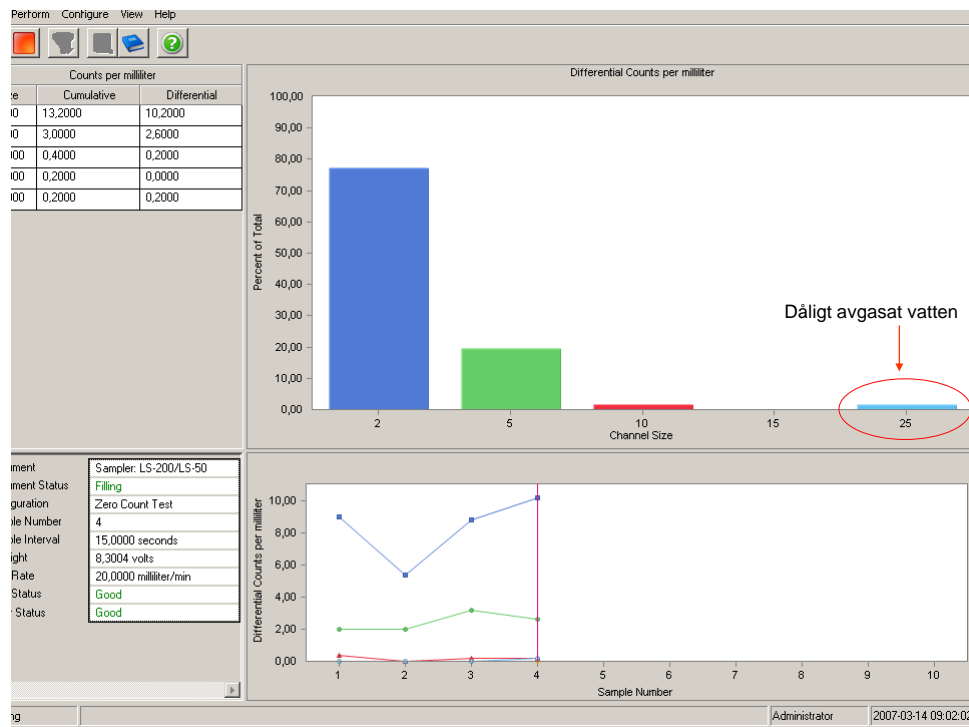
För att kunna detektera partiklar i en vätska måste den vara fri från bubblor, då dessa räknas som partiklar i instrumentet. Om bubblor uppstår så kan man försiktigt rör om i provet för att upplösa bubblorna och låta provet stå någon minut eller så kan man genom ultraljud upplösa bubblorna i provet.



Bild 4 *Luftbubblor i vatten*



Även vatten som ser ut att vara bubblfritt kan innehålla bubblor och behöver avgasas, detta är vanligt förekommande när avjoniserat vatten används. I graf 1 nedan kan man se effekten av bubblor på ett vatten som inte är avgasat, men är filtrerat ned till 0,22 mikrometer. Instrumentet registrerar många 2 mikron partiklar och även en del 25 mikron partiklar.



Graf 1 Stora partiklar pga. luftbubblor

Sedimentering av partiklarna

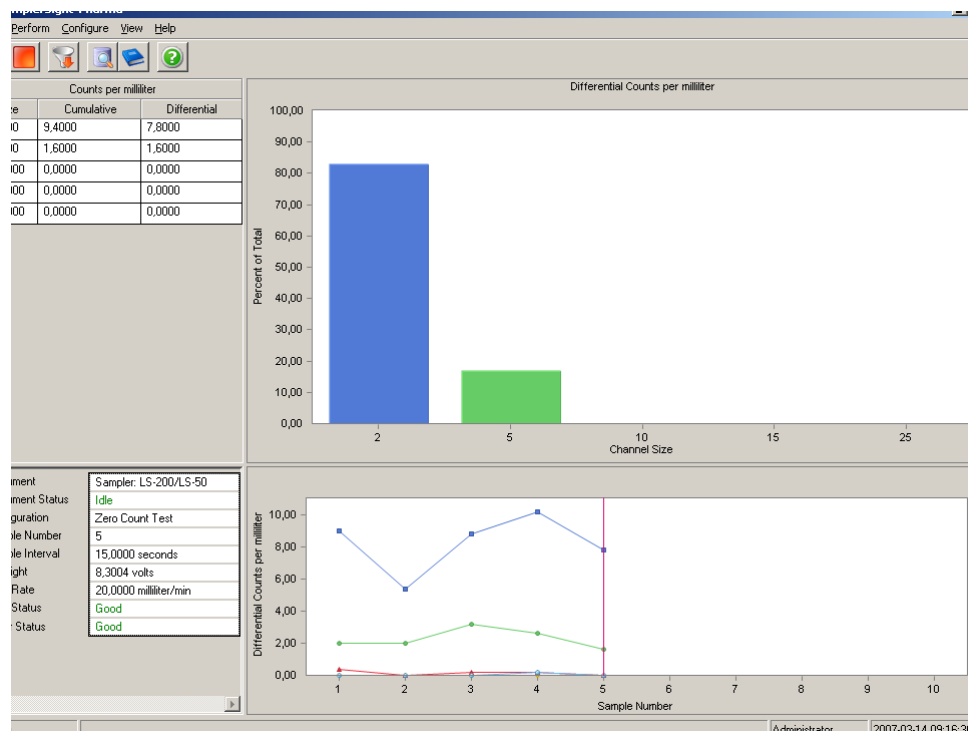
För att provet som tillförs instrumentet ska vara så representativt som möjligt bör man se till att provet är under konstant omrörning för att förhindra att dom större partiklarna inte sedimenterar till botten av flaskan eller vialen. I dom flesta instrument finns det en inbyggd funktion för detta.

Kontaminering av provet

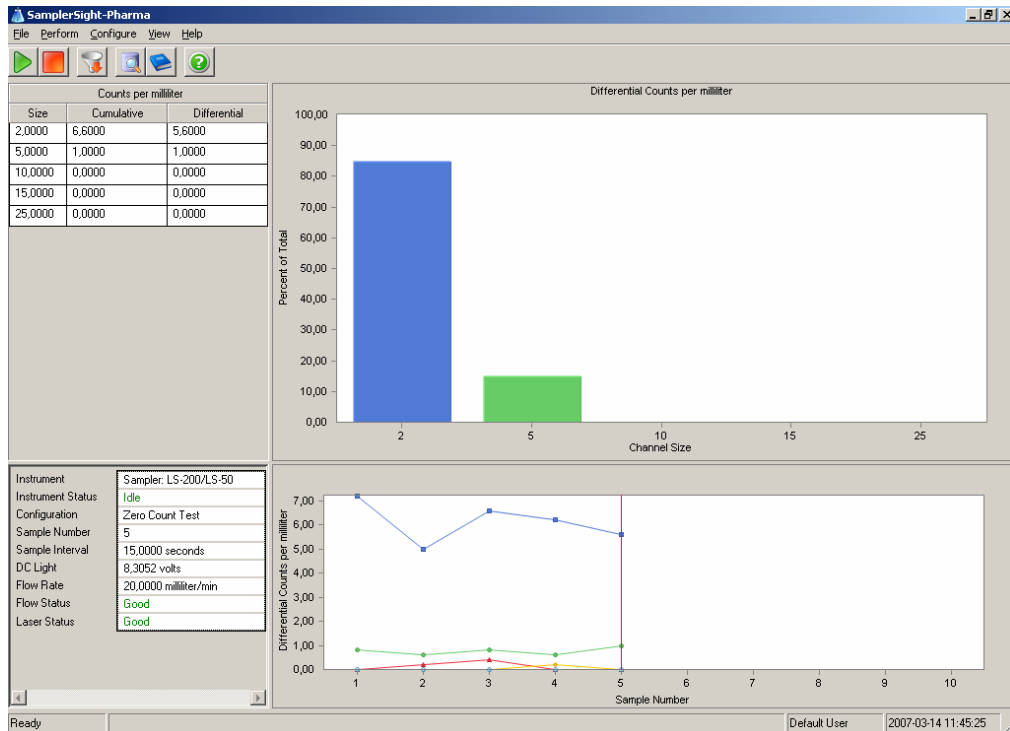
Då själva testet går ut på att verifiera att provet inte har mer partiklar av en viss storlek/ml eller flaska så bör man vidta åtgärder som förhindrar att man kan misstänka att partiklarna i provet har introducerats under själva provtagningsförfarandet. Den enklaste åtgärden är att placera instrumentet i en LAF bänk där man även bryter sina förpackningar som ska provtas. Dock så visar resultaten i graferna nedan att man kan utföra testerna framgångsrikt även utan en LAF bänk.

I Graf 2 så ser man partikelkoncentrationen från ett vatten som har analyserats direkt efter att det har fyllts i en ren bägere.

I graf 3 så ser vi resultatet av samma vatten efter att det har stått i ca 2 timmar i ett vanligt kontor med heltäckningsmatta och en person närvarande utan renrumskläder med en koncentration av 1.062.441,00 partiklar/kubikmeter 0,5 mikron och större. Koncentrationen för 5 mikron och större var 77.054,00 partiklar/kubikmeter.



Graf 2 Partikelkoncentration direkt efter att vattnet är upphällt.



Graf 3 Partikelkoncentration efter ca 2 timmar.

Vidare bör man också se till så att bägaren eller flaskan som man använder sig av när man håller upp provet från flera små flaskor är ordentligt ren genom att tvätta med partikelfritt vatten (vanligt MilliQ vatten är filtrerat ned till 0,22 mikrometer).

Man kan sedan verifiera renheten i flaskan genom att fylla flaskan med samma typ av rent vatten och verifiera genom att köra ett program som tar 5 repetitioner med 5 ml och om mängden partiklar av storleken 10 mikrometer och större överstiger 25 st/25 ml har man inte vidtagit ordentliga åtgärder för att förhindra kontaminering av provet och man bör då repetera analysen tills man uppnår önskat resultat.

Brytningsindex

För att kunna detektera partiklarna i vätskan måste dom ha ett brytningsindex som skiljer sig från bakgrundsvätskan, variationen i kontrasten mellan dom två medierna måste vara tillräckligt stor. I tabellen nedan finns angivet några exempel på olika brytningsindex:

| Media | Brytningsindex |
|---------|----------------|
| Vakuum | 1.0 |
| Luft | 1.00029 |
| Is | 1.309 |
| Vatten | 1.33 |
| Glas | 1.5 |
| Diamant | 2.417 |

Tabell 2 Olika mediers brytningsindex

Av tabellen framgår att tex. en ispartikel i vatten är i princip omöjlig för en vätskepartikelräknare att detektera. I nedan bild illustreras fenomenet tydligare, där man kan se att glasstaven i flaskan i mitten inte syns när den är nedsänkt i vätskan.



Bild 5 Vätskor med olika brytningsindex

Analysmetod

Innan man bryter förseglingen på flaskan eller vialen bör man vända på flaskan upp och ner ca 20 gånger för att blanda vätskan ordentligt och sedan rengöra öppningen med partikelfritt vatten för att förhindra kontaminering av provet.

För LVI testas man en flaska/påse i taget och provet kan med fördel tas direkt ur flaskan för att förhindra kontaminering.

För SVI mindre än 25 ml tar man prov från minst 10 st. flaskor eller vialer och blandar dessa i en rengjord partikelfri glasbägare för att uppnå en volym av minst 25 ml. För SVI som är 25 ml eller större men inte mer än 100ml så kan varje flaska/vial testas individuellt.

Om det krävs (om volymen är liten) kan man späda provet med partikelfritt vatten eller annan lösning där vatten inte är brukbart, för att uppnå den 25 ml som krävs.

För Dry powder så löser man det i partikelfritt vatten eller annan passande lösning i en glasbägare till en volym av minst 25 ml.

Antalet prover som ska utföras måste vara tillräckligt många för att kunna påvisa ett statistiskt pålitligt resultat. För LVI och SVI 25 ml och mer kan antalet prover vara mindre än 10 om man har en sund testplan som påvisar att man utför testerna med tillräcklig frekvens.

Analysen utförs genom att sätta instrumentet till att ta 4st 5ml prover från den totala volymen (25 ml eller mer). Instrumentet räknar sedan antalet partiklar lika med eller större än 10 och 25 mikrometer. Det första provet av den 4 tas inte med i beräkningen då det finns risk för att det kan vara kontaminerat från föregående provtagning. Medelvärdet från de 3 sista proverna beräknas och anges sedan i en rapport genererad av mjukvaran i instrumentet.

Acceptanskriterier för analysen

För lösningar levererade i flaskor med en volym på mer än 100ml (LVI) så gäller att antalet partiklar lika med eller större 10 mikrometer inte får överstiga 25 st./ml och partiklar lika med eller större än 25 mikrometer inte får överstiga 3st/ml.

För lösningar som levereras i flaskor med en volym på 100 ml eller mindre (SVI) gäller att antalet partiklar lika med eller större än 10 mikrometer inte får överstiga 6000 st./flaska och partiklar lika med eller större än 25 mikrometer inte får överstiga 600 st./flaska.

Ordlista:

| | |
|-----------------------|--|
| Mikrometer | En miljondel av en meter |
| Injicering | När en lösning tillförs en människa via en spruta (generellt mindre volymer) |
| Infusion | När en lösning tillförs en människa Tex. via dropp (näringslösningar) |
| Brytningsindex | En egenskap hos ett material som anger hur mycket långsammare ljuset går i materialet jämfört med i vakuum |
| Emulsion | Två vätskor som blandas med varandra (t.ex Olja & vatten) |
| Liposomer | Ihåliga små ”transportbubblor”, gjorda av lipider (fettceller) |
| Viskositet | En beteckning på hur lätt- eller trögflytande en vätska är |

Tabell 3 *Ordlista*

För mer information om hur man använder en vätskepartikelräknare för att uppfylla kraven enligt EP 2.9.19 kontakta:

Thomas Lööf
Malvern Instruments Nordic AB
Vallongatan 1
752 28 Uppsala

018-55 24 55
thomas@malvern.se
www.malvern.se