

11.8 XÁC ĐỊNH GIỚI HẠN TIỂU PHÂN

Tiểu phân tạp nhiễm trong thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền là các phần tử nhỏ không hòa tan, linh động, không phải là bọt khí, có mặt ngoài ý muốn. Tiểu phân tạp nhiễm có thể đến từ nhiều nguồn khác nhau nhưng đều cần phải giảm thiểu bất kể là loại nào. Phải kiểm soát mức độ nhiễm tạp tiểu phân trong thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền. Tùy theo kích thước, có thể phân loại các tiểu phân tạp nhiễm thành hai loại là nhìn thấy và không nhìn thấy bằng mắt thường.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền, các tiểu phân nhìn thấy được coi như là nguy cơ mất an toàn cho người dùng và cần phải được giảm thiểu đến mức tối đa. Tiểu phân nhìn thấy thường là những phần tử không đồng nhất, phân bố không đều trong một lô, vì vậy cỡ mẫu kiểm tra phải đủ lớn. Mặc dù sự xuất hiện của các tiểu phân như vậy thường ngẫu nhiên nhưng đó cũng có thể là dấu hiệu của vấn đề mang tính hệ thống. Bởi vậy, sự xuất hiện của các tiểu phân nhìn thấy phải được xem xét đánh giá và phải có các biện pháp thích hợp để loại bỏ mọi nguồn gây nhiễm tiểu phân và/hoặc cải thiện công thức, đồ đựng cấp 1 hoặc quy trình sản xuất.

Nguồn nhiễm tiểu phân có thể từ bên ngoài (từ môi trường, thiết bị, đồ đựng cấp 1 hoặc con người) hoặc từ bên trong (liên quan đến công thức, bao gồm dược chất và tá dược, tạp nhiễm hoặc tồn dư trong quy trình sản xuất hoặc do sự tương tác giữa thuốc và đồ đựng). Ví dụ tiểu phân bị nhiễm từ bên ngoài bao gồm sợi bông, thủy tinh, mảnh sơn, tóc, mảnh côn trùng. Ví dụ tiểu phân tạo ra từ bên trong như các hạt protein, hạt silicon, tủa vô cơ như bari sulfat, nhôm sulfat, các tiểu phân acid béo là sản phẩm phân hủy của polysorbat, mảnh thủy tinh.

Đôi khi chỉ có thể phát hiện các tiểu phân tạp nhiễm trong quá trình bảo quản, tức là trong quá trình nghiên cứu độ ổn định của sản phẩm, do đó việc kiểm tra theo dõi mức độ nhiễm tạp tiểu phân bằng phương pháp phù hợp là rất quan trọng. Việc đánh giá tiểu phân phải dựa trên cơ sở cân nhắc về mức độ an toàn liên quan đến sản phẩm và đường dùng.

Cần lưu ý khuyến cáo người dùng phải quan sát, kiểm tra tiểu phân bằng mắt trước khi sử dụng.

A. Xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường

Để xác định giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường có thể áp dụng hai phương pháp mô tả dưới đây, Phương pháp 1 (dùng thiết bị đếm tiểu phân cản ánh sáng) và Phương pháp 2 (dùng kính hiển vi đếm tiểu phân). Khi kiểm tra tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường của thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền, thường áp dụng Phương pháp 1. Tuy nhiên, đối với một số chế phẩm, sau khi đã áp dụng Phương pháp 1, phải dùng đến Phương pháp 2 để khẳng định kết quả.

Không phải tất cả các thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền đều có thể kiểm tra được giới hạn tiểu phân không nhìn thấy bằng mắt thường bằng một trong hai phương pháp, hay cả hai phương pháp. Các chế phẩm không thật trong, hay có độ nhớt cao, không áp dụng Phương pháp 1 mà phải tiến hành thử theo Phương pháp 2, ví dụ nhũ tương, dịch keo, chế phẩm liposom. Tương tự, các chế phẩm tạo bọt khí khi đưa vào thiết bị

đếm cũng cần phải có lưu ý đặc biệt khi chuẩn bị mẫu hoặc dùng Phương pháp 2. Nếu độ nhớt của chế phẩm quá cao, không thể áp dụng phương pháp nào, thì phải pha loãng chế phẩm với dung môi không có tiểu phân thích hợp để làm giảm độ nhớt và có thể tiến hành được thử nghiệm.

Kết quả kiểm tra một đơn vị hay một nhóm các đơn vị riêng lẻ không có giá trị ngoại suy tin cậy đối với các đơn vị chưa được kiểm tra. Bởi vậy, cần xây dựng kế hoạch lấy mẫu có căn cứ về mặt thống kê để sao cho từ kết quả kiểm tra có thể đánh giá được mức độ nhiễm tiểu phân của cả nhóm lớn các đơn vị chế phẩm.

Phương pháp 1: Dùng thiết bị đếm tiểu phân cản ánh sáng

Sử dụng thiết bị thích hợp hoạt động theo nguyên tắc cản ánh sáng, cho phép tự động xác định kích thước tiểu phân và số lượng tiểu phân theo kích thước.

Hiệu chuẩn thiết bị bằng vật liệu chuẩn là các hạt hình cầu có kích thước đã biết trong khoảng 10 µm đến 25 µm. Phân tán hạt chuẩn trong *nước không có tiểu phân (TT)*. Tránh kết tụ tiểu phân trong quá trình phân tán.

Lưu ý chung về điều kiện thử

Tiến hành thử nghiệm trong các điều kiện hạn chế được nhiễm tiểu phân, tốt nhất là trong tủ lọc khí vô khuẩn.

Rửa thật cẩn thận dụng cụ thủy tinh và dụng cụ lọc (trừ màng lọc) bằng dung dịch tẩy rửa ấm, tráng lại bằng nước cho sạch hết chất tẩy. Ngay trước khi dùng, tráng lại các dụng cụ từ trên xuống dưới, bên ngoài, sau đó là bên trong với *nước không có tiểu phân (TT)*.

Tránh tạo bọt khí trong chế phẩm đem thử, đặc biệt là khi chuyển mẫu vào dụng cụ để tiến hành đếm tiểu phân.

Để kiểm tra môi trường có thích hợp cho thử nghiệm, dụng cụ thủy tinh có đủ sạch và nước sử dụng có đảm bảo không có tiểu phân hay không, tiến hành phép thử sau:

Kiểm tra giới hạn tiểu phân của 5 mẫu *nước không có tiểu phân (TT)*, mỗi mẫu 5 ml, theo phương pháp mô tả ở dưới. Nếu trong cả 25 ml nước thử có trên 25 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 10 µm, phải tiến hành lại các bước chuẩn bị cho đến khi môi trường, dụng cụ thủy tinh và nước thích hợp cho thử nghiệm.

Cách tiến hành

Trộn đều chế phẩm bằng cách lộn đi, lộn lại nhẹ nhàng đơn vị thử 20 lần liên tiếp. Nếu cần, tháo bỏ phần bảo vệ ngoài nắp đậy. Dùng tia *nước không có tiểu phân (TT)* rửa bề mặt nắp và cổ đồ đựng, mở nắp cẩn thận, tránh nhiễm tiểu phân từ bên ngoài. Loại bọt khí bằng cách để yên 2 min hoặc siêu âm.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền thể tích lớn (trên 100 ml, tiến hành thử với từng đơn vị đóng gói).

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền thể tích nhỏ (từ 100 ml trở xuống) có thể tích dưới 25 ml, gộp lượng thuốc của ít nhất 10 đơn vị đóng gói vào một đồ đựng sạch sao cho có được ít nhất 25 ml. Trong trường hợp đặc biệt, khi có thuyết minh phù hợp, dung dịch thử có thể được chuẩn bị bằng cách trộn thuốc từ một số đơn vị

đóng gói thích hợp, pha loãng thành 25 ml với *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc với dung môi thích hợp không có tiểu phân [khi không thể dùng *nước không có tiểu phân (TT)*].

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền thể tích nhỏ có thể tích từ 25 ml trở lên có thể thử với từng đơn vị đóng gói.

Thuốc bột để pha tiêm được hoàn nguyên trong *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc dung môi thích hợp không có tiểu phân [khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp].

Số đơn vị đem thử phải đủ để cho đánh giá đúng đắn về mặt thống kê. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, số đơn vị đem thử có thể nhỏ hơn 10, căn cứ vào một kế hoạch lấy mẫu phù hợp.

Lấy 4 mẫu thử, mỗi mẫu không dưới 5 ml, đưa vào thiết bị đếm, đếm số tiểu phân có kích thước bằng hay lớn hơn 10 μm và số tiểu phân bằng hay lớn hơn 25 μm .

Loại bỏ kết quả của mẫu đầu tiên. Tính số lượng trung bình các tiểu phân của chế phẩm đã thử.

Đánh giá kết quả

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích lớn hơn 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi mililít có không quá 25 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 10 μm và không quá 3 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 μm .

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi đơn vị đóng gói đã kiểm tra có không quá 6000 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 10 μm và không quá 600 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 μm .

Nếu số lượng tiểu phân trung bình vượt quá các giới hạn nêu trên, kiểm tra chế phẩm bằng Phương pháp 2.

Phương pháp 2: Dùng kính hiển vi đếm tiểu phân

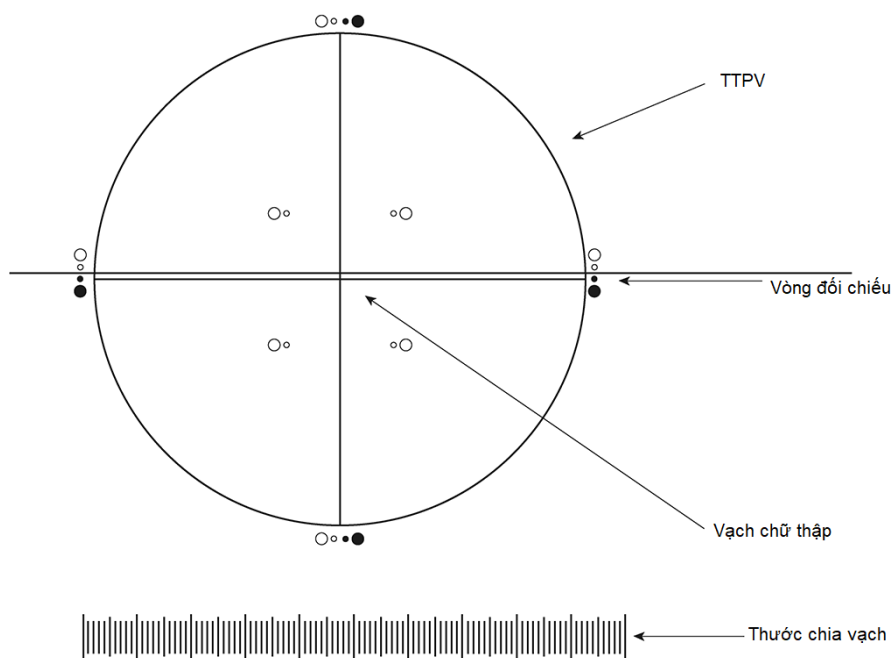
Sử dụng kính hiển vi hai thị kính thích hợp, bộ lọc để lưu giữ các tiểu phân và màng lọc để đếm tiểu phân.

Kính hiển vi có độ phóng đại 100 ± 10 -lần, được trang bị một trắc vi thị kính hiệu chỉnh bằng một trắc vi vật kính, một bàn soi có khả năng giữ và di chuyển toàn bộ diện tích của màng lọc, hai nguồn chiếu thích hợp cấp ánh sáng phản xạ và ánh sáng chéo.

Trắc vi thị kính (Hình 11.8.1) bao gồm một vòng tròn lớn có vạch chữ thập chia tư, các vòng đối chiếu trong suốt hay màu đen đường kính 10 μm và 25 μm ở độ phóng đại 100 lần, một thước chia vạch đến 10 μm . Trắc vi thị kính phải được hiệu chuẩn bằng một trắc vi kế được chứng nhận bởi cơ quan đo lường chuẩn quốc gia hoặc quốc tế. Sai số tương đối cho phép của thước chia vạch là $\pm 2\%$. Vòng tròn lớn được gọi là thị trường phân vạch (TTPV).

Trong hai nguồn chiếu sáng, một nguồn cấp trường sáng phản xạ từ trong kính hiển vi và nguồn bên ngoài hỗ trợ hội tụ, có khả năng điều chỉnh để rọi ánh sáng khúc xạ chéo ở góc 10° đến 20° .

Bộ lọc để lưu giữ các tiểu phân bao gồm màng lọc thích hợp và đế lọc bằng thủy tinh hoặc vật liệu khác thích hợp, nối với máy hút chân không. Màng lọc kích thước thích hợp màu đen hoặc xám sẫm, với kích thước lỗ lọc bằng 1,0 μm hoặc nhỏ hơn.



Hình 11.8.1 - Trắc vi thị kính

Lưu ý chung về điều kiện thử

Tiến hành thử nghiệm trong các điều kiện hạn chế được nhiễm tiểu phân, tốt nhất là trong tủ lọc khí vô khuẩn.

Rửa thật cẩn thận dụng cụ thủy tinh và dụng cụ lọc (trừ màng lọc) bằng dung dịch tẩy rửa ấm, tráng lại bằng nước cho sạch hết chất tẩy. Ngay trước khi dùng, tráng lại các dụng cụ từ trên xuống dưới, bên ngoài, sau đó là bên trong và tráng hai mặt của màng lọc với *nước không có tiểu phân (TT)*.

Để kiểm tra môi trường có thích hợp cho thử nghiệm, dụng cụ thủy tinh và màng lọc có đủ sạch, nước sử dụng có đảm bảo không có tiểu phân hay không, tiến hành phép thử sau: Kiểm tra giới hạn tiểu phân của 50 ml *nước không có tiểu phân (TT)* theo phương pháp mô tả ở dưới. Nếu có quá 20 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 10 μm hoặc có quá 5 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 μm trên màng lọc, phải tiến hành lại các bước chuẩn bị cho đến khi môi trường, dụng cụ thủy tinh, màng lọc và nước thích hợp cho thử nghiệm.

Cách tiến hành

Trộn đều chế phẩm bằng cách lộn đi, lộn lại nhẹ nhàng từng đơn vị thử 20 lần liên tiếp. Nếu cần, tháo bỏ phần bảo vệ ngoài nắp đậy. Dùng tia *nước không có tiểu phân*

(TT) rửa bề mặt nắp và cổ đồ đựng, mở nắp cẩn thận, tránh nhiễm tiểu phân từ bên ngoài.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích lớn (trên 100 ml), tiến hành thử với từng đơn vị đóng gói.

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ (từ 100 ml trở xuống) có thể tích dưới 25 ml, gộp lượng thuốc của ít nhất 10 đơn vị đóng gói vào một đồ đựng sạch. Trong trường hợp đặc biệt, khi có thuyết minh phù hợp, dung dịch thử có thể được chuẩn bị bằng cách trộn thuốc từ một số đơn vị đóng gói thích hợp, pha loãng thành 25 ml với *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc với dung môi thích hợp không có tiểu phân [khi không thể dùng *nước không có tiểu phân (TT)*].

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền thể tích nhỏ có thể tích từ 25 ml trở lên có thể thử với từng đơn vị đóng gói.

Thuốc bột để pha tiêm được hoàn nguyên trong *nước không có tiểu phân (TT)* hoặc dung môi thích hợp không có tiểu phân [khi *nước không có tiểu phân (TT)* không thích hợp].

Số đơn vị đóng gói đem thử phải đủ để cho kết quả đánh giá đúng đắn về mặt thống kê. Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích từ 25 ml trở lên, số mẫu thử có thể nhỏ hơn 10, căn cứ vào một kế hoạch lấy mẫu phù hợp.

Dùng vài mililit *nước không có tiểu phân (TT)* làm ẩm bên trong đế lọc đã gắn màng lọc. Chuyển toàn bộ thể tích mẫu gộp hoặc thể tích của một đơn vị đóng gói vào phễu lọc và hút chân không. Nếu cần, đổ từng lượng nhỏ mẫu thử vào phễu cho đến khi toàn bộ thể tích dung dịch thử được lọc.

Sau lần đổ cuối cùng, dùng tia *nước không có tiểu phân (TT)* rửa thành bên trong đế lọc. Hút chân không cho tới khi bề mặt màng lọc không còn chất lỏng. Đặt màng lọc vào đĩa Petri và để khô tự nhiên bằng cách mở hé nắp đĩa. Sau khi màng lọc khô, đặt đĩa Petri lên bàn soi của kính hiển vi và soi toàn bộ màng lọc dưới ánh sáng phản xạ từ nguồn chiếu. Đếm số tiểu phân bằng hay lớn hơn 10 µm và số tiểu phân bằng hay lớn hơn 25 µm. Hoặc, có thể đếm trên một phần của màng lọc, rồi tính số lượng trên cả màng lọc. Tính số lượng trung bình tiểu phân của chế phẩm đã thử.

Quá trình phân loại kích thước tiểu phân được tiến hành bằng cách so sánh hình ảnh của mỗi tiểu phân với các vòng đối chiếu 10 µm và 25 µm mà không di chuyển tiểu phân khỏi vị trí ban đầu trong thị trường phân vạch, tức là không đặt tiểu phân chồng lên vòng đối chiếu. Đường kính bên trong của các vòng đối chiếu trong suốt dùng để phân loại các tiểu phân màu trắng và trong suốt, còn các tiểu phân thẩm màu được phân loại bằng đường kính ngoài của các vòng đối chiếu màu đen.

Khi tiến hành kiểm tra theo Phương pháp 2, không phân loại hay liệt kê các chất vô định hình, nửa lỏng hoặc các chất không rõ ràng về hình thái khác xuất hiện như một vết màu hay đổi màu trên màng lọc. Những chất này gần như không nổi rõ trên màng lọc, có dạng keo hay lớp phim mỏng. Trong trường hợp này cần kiểm tra bổ sung bằng Phương pháp 1.

Đánh giá kết quả

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích lớn hơn 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình trong mỗi mililit có không quá 12 tiểu phân kích thước

bằng hay lớn hơn 10 μm và không quá 2 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 μm .

Đối với thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền có thể tích nhỏ hơn hoặc bằng 100 ml: Chế phẩm đạt yêu cầu phép thử, nếu trung bình mỗi đơn vị đóng gói đã kiểm tra có không quá 3000 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 10 μm và không quá 300 tiểu phân kích thước bằng hay lớn hơn 25 μm .

B. Xác định tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường

Phép thử này là qui trình đơn giản để kiểm tra tiểu phân nhìn thấy trong thuốc dạng lỏng, nếu có thể, áp dụng cả với thuốc sau khi hoàn nguyên.

Dụng cụ

Thiết bị (Hình 11.8.2) là một bộ dụng cụ để soi bao gồm:

- A. Bảng màu đen mờ, kích thước thích hợp, gắn thẳng đứng.
- B. Bảng màu trắng không lóa, kích thước thích hợp, gắn thẳng đứng bên cạnh bảng màu đen.
- C. Bảng màu trắng không lóa, kích thước thích hợp, gắn vuông góc với bảng A và B.
- D. Hộp đèn có gắn nguồn ánh sáng trắng được che chắn thích hợp và bộ khuếch tán ánh sáng thích hợp (ví dụ nguồn sáng bao gồm hai đèn huỳnh quang 13W, mỗi ống dài 525 mm hoặc nguồn sáng đèn LED phù hợp). Cường độ chiếu sáng tại vùng soi phải duy trì từ 2000 lux đến 3750 lux. Có thể phải sử dụng cường độ sáng cao hơn đối với đồ chứa là thủy tinh màu hoặc plastic và đối với chế phẩm có màu hoặc đục.

Cách tiến hành

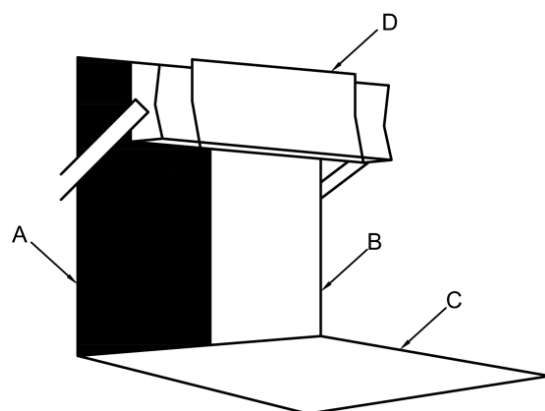
Loại bỏ mọi nhãn mác dán vào đồ chứa, rửa sạch và làm khô bên ngoài các đơn vị đóng gói đem thử. Lắc nhẹ hay lộn đi, lộn lại chậm từng đơn vị, tránh không tạo thành bọt khí và quan sát trong khoảng 5 s trước bảng màu trắng. Tiến hành lặp lại việc lắc trộn và quan sát như trên trước bảng màu đen. Khi không thể soi được qua đồ đựng trực tiếp, có thể chuyển mẫu vào một đồ đựng không có tiểu phân và rất thận trọng để không bị nhiễm tiểu phân từ môi trường. Ghi lại khi phát hiện thấy bất kỳ tiểu phân nào.

Đánh giá kết quả đối với thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền

Trong sản xuất, phải kiểm tra 100 % sản phẩm và loại bỏ bất kỳ sản phẩm nào có chứa tiểu phân nhìn thấy.

Đối với thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền đang lưu hành trên thị trường, có thể kiểm tra như sau.

Lấy 20 đơn vị đóng gói để thử. Chế phẩm được xem là cơ bản không có các tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường nếu không quan sát được bất cứ tiểu phân nào trong các đơn vị đóng gói đem thử. Nếu có thể, kiểm tra thêm một số đơn vị đóng gói nữa để có thêm thông tin về nguy cơ chế phẩm bị nhiễm các tạp tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường.



Hình 11.8.2 - Dụng cụ để soi độ trong

