

М. В. Нездольева, Р. Р. Сулейманов, О. А. Попова, С. Г. Ларионова,
О. А. Победин, Л. А. Трухачева*

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ВЛИЯНИЯ СКОРОСТИ ПОТОКА НА АЭРОДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДОЗИРОВАННОГО АЭРОЗОЛЬНОГО ИНГАЛЯТОРА “КРОМОСПИР”

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2;
* e-mail: truhacheva@expmed.ru

Изучено влияние изменения скорости потока на аэродинамическое распределение частиц до-
зированной аэрозольной ингаляционной системы (ДАИ) “Кромоспир” с использованием каскадного им-
пактора Андерсена (КИА) в стандартной конфигурации, предназначенной для анализа при
скорости потока 28,3 л/мин, и в модифицированной конфигурации, предназначенной для ана-
лиза при скорости потока 60 л/мин. Показано, что изменение скорости потока воздуха, прохо-
дящего через импактор, приводит к изменению профиля аэродинамического распределения
частиц и значений респираторной фракции аэрозоля. Рекомендовано при разработке методик
оценки качества аэрозолей, а также *in vitro* сравнении эффективности ДАИ, проведение ис-
следований аэродинамических свойств аэрозолей с моделированием вдоха пациента при раз-
личных скоростях потока воздуха.

Ключевые слова: Кромогликат; дозированные аэрозольные ингаляторы; аэродинамиче-
ское распределение мелкодисперсных частиц; каскадный импактор Андерсена; респира-
бельная фракция.

Дозированные аэрозольные ингаляционные препа-
раты (ДАИ) относятся к лекарственным средствам, ис-
пользуемым для лечения острых и хронических
форм заболеваний дыхательных путей. До недавнего
времени в состав большинства ДАИ в качестве про-
пеллента входили хлорфторуглероды (фреоны), кото-
рые после подписания Монреальского протокола о
“субстанциях, вызывающих истощение озонового
слоя” оказались под запретом. Возникшие затрудне-
ния с поиском нового пропеллента, обеспечивающего
адекватную замену фреонам и в то же время не являю-
щегося источником экологических проблем, оказались
настолько серьезными для дальнейшего производства
ДАИ, что медицинская общественность прогнозиро-
вала необходимость полного перехода на использова-
ние ингаляторов порошкового типа. В конце 20-столетия
альтернатива фреонам была найдена в виде гидро-
фторалканов и, после существенных конструкцион-
ных изменений, ДАИ продолжили применяться для
ингаляционной терапии [1].

Эффективность ингаляционного препарата обеспе-
чивается респираторной фракцией частиц (РП) дей-
ствующего вещества, которую получает при вдохе па-
циент, то есть содержанием в выдохе из ДАИ
дозе частиц диаметром от 1 до 5 мкм, способных де-
понироваться в нижних отделах легких. Частицы с
большим или меньшим размером не имеют вклад в те-
рапевтическую концентрацию препарата, поскольку
либо осаждаются в ротоглотке и проглатываются (при
диаметре более 5 мкм), либо выводятся с выдохом па-
циента (при диаметре менее 1 мкм) [2].

Учитывая перечисленные ранее недостатки уст-
ройств ДАИ, оценка эффективности “*in vitro*” должна
проводиться при моделировании дыхательной систе-

мы пациента. Для этого в настоящее время наиболее
часто используются каскадные импакторы, среди ко-
торых импактором выбора считается каскадный им-
пактор Андерсена (КИА), представляющий собой сис-
тему из каскадов ступеней, характеризующихся эф-
фективным предельным диаметром (ЭПД), на которых
происходит разделение образца на фракции частиц оп-
ределенного размера на основе их инерции [3].

В данной работе исследовали влияние скорости по-
тока воздуха, проходящего через импактор, а также
различия в подходах к оценке респираторной фрак-
ции в дозированном аэрозольном ингаляторе, содер-
жащем кромоглициевую кислоту.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследований был выбран Кро-
моспир, аэрозоль дозированный, 5 мг/доза, коммерче-
ски доступный на момент проведения испытаний и со-
держащий в качестве действующего вещества кислоту
кромоглициевую. Для приготовления референсных
растворов использовали стандартный образец натрия
кромоллин (USP RS). В работе применяли реактивы со-
ответствующей градации чистоты, отвечающие требо-
ваниям ГФ РФ XIII [4].

Количественную оценку содержания кромогликата
проводили с использованием системы ВЭЖХ серии
Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), оснащенной
модулями автосамплера образцов, термостата колонок
и диодноматричного детектора.

Для анализа применяли колонку Zorbax
150 × 4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США) при
температуре 40 °С. Детектирование проводили при
254 нм. Скорость потока составляла 1,5 мл/мин, объем

ввода — 25 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смесь фосфатного буфера (раствор 0,015 М ди-натрия гидрофосфата и 0,015 М калия дигидрофосфата) и метанола в соотношении 80:20.

Концентрация кромогликата натрия в стандартном растворе составляла 4 мкг/мл. В качестве растворителя для приготовления стандартного и испытуемого растворов использовали подвижную фазу.

Аэродинамическое распределение частиц оценивали с использованием КИА (Copley Scientific Ltd), подключенного к вакуумному насосу НСР5 (Copley Scientific Ltd). Скорость потока воздуха контролировали с помощью измерителя потока DFM2000 (Copley Scientific Ltd) и контроллера критического потока Critical Flow Controller Model ТРК (Copley Scientific Ltd). Импактор использовали в стандартной конфигурации в соответствии с требованиями [4–6], предназначенной для анализа при потоке 28,3 л/мин и в модифицированной конфигурации, предназначенной для анализа при потоке 60 л/мин (табл. 1). Обработку импакционных данных проводили с помощью программного обеспечения (ПО) Copley CITDAS version 2.00 (Copley scientific Limited, Англия).

Теоретические значения эффективных предельных диаметров ступеней импактора в стандартной конфигурации, но использующегося при 60 л/мин, рассчитывали в ПО CITDAS с помощью уравнения:

$$\text{ЭПД}_{60} = \text{ЭПД}_{28,3} \cdot (28,3/60)^{0,5},$$

где ЭПД₆₀ — ЭПД соответствующей ступени для отбора проб при 60 л/мин; ЭПД_{28,3} — ЭПД соответствующей ступени для отбора проб при 28,3 л/мин.

Импактор необходимой конфигурации собирали в соответствии с указаниями производителя и [4–6] подключали в линию с вакуумным насосом и устанавливали соответствующую скорость потока (28,3 или 60 л/мин) с помощью измерителя потока. Предварительно перед проведением испытаний ингалятор разрабатывали, выпуская первые 10 доз вхолостую. Затем

выпускали последующую 1 дозу в импактор. Между каждой активацией ингалятор встряхивали в течение 5 с. Испытуемые растворы готовили смыванием осевших частиц аэрозоля со всех ступеней и тарелок импактора, а также с мундштука, адаптера мундштука, индукционного порта, пресепаратора (при его использовании) и фильтра (Pall Type A/E glass filter 76 mm) в отдельные мерные колбы в соответствии с табл. 2. Объем в мерной колбе доводили до метки растворителем. Полученные растворы фильтровали через мембранный фильтр Chromafil АО-45/25 0,46 мкм (MACHEREY-NAGEL).

Результаты и их обсуждение

Валидация используемых методик. Хроматографическая методика, использованная для проведения испытаний, была валидирована по показателям специфичность, линейность, прецизионность, относящимся к количественному определению действующего вещества [4]. Дополнительно, учитывая ожидаемо низкую концентрацию кромогликата в растворах, полученных с фильтра и последних тарелок импактора, оценивали чувствительность хроматографической методики. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Типичные хроматограммы стандартного раствора, раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, а также испытуемых растворов с минимальной и максимальной концентрацией кромогликата, полученных в процессе исследования аэродинамического распределения частиц, приведены на рис. 1.

Методика пробоподготовки, использованная для оценки респираторной фракции, оценивалась по показателям “Правильность” и “Прецизионность”. Правильность определяли по общей извлекаемости частиц кромогликата (общей извлеченной с импактора массы) с поверхностей импактора и отсутствию потерь между ступенями импактора, прецизионность — по сходимости результатов (% RSD) для извлеченной массы кромогликата и респираторной фракции при выполнении методики в одних и тех же условиях одним и тем же аналитиком в течение небольшого промежутка времени. Согласно результатам, приведенным в табл. 4, извлекаемость составила более

Таблица 1
Эффективные предельные диаметры ступеней КИА и его модификаций, мкм

№ тарелки импактора	ЭПД ступеней модифицированной конфигурации КИА при 60 л/мин	Теоретические ЭПД ступеней стандартной конфигурации КИА при	
		60 л/мин	28,3 л/мин
– 2	н/п	н/п	н/п
– 1	9,0	н/п	н/п
– 0	5,8	н/п	н/п
0	н/п	6,2	9,0
1	4,7	4,0	5,8
2	3,3	3,2	4,7
3	2,1	2,3	3,3
4	1,1	1,4	2,1
5	0,7	0,8	1,1
6	0,4	0,5	0,7
7	–	0,3	0,43
Фильтр	0	0	0

Таблица 2
Объем разведения при приготовлении испытуемых растворов

Компонент системы ингалятор-импактор	Объем мерной колбы, мл
Мундштук, адаптер мундштука	100
Индукционный порт, пресепаратор (при его использовании)	500
Ступени – 1, – 0 (в конфигурации для 60 мл/мин) и 1	50
Объединенный смыв со ступеней 2, 3, 4, 5, 6	50
Тарелки – 1, – 0 (в конфигурации для 60 мл/мин), 1, 2, 3	200
Тарелки 4, 5, 6, 7 (в конфигурации для 28,3 мл/мин), фильтр	50

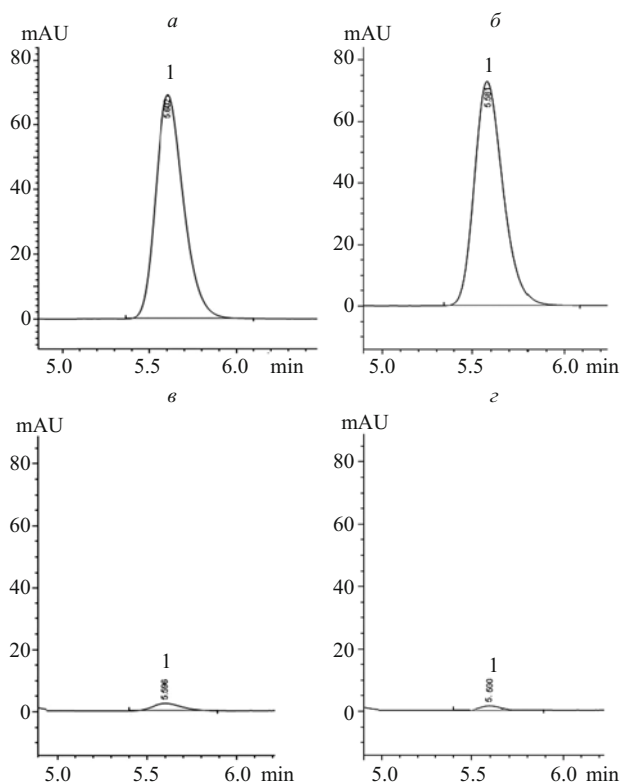


Рис. 1. Типичные хроматограммы: а) стандартного раствора; б) испытуемого раствора, соответствующего смыву с горловины при использовании КИА в стандартной комплектации при 28,3 л/мин; в) испытуемого раствора, соответствующего смыву с фильтра при использовании КИА в стандартной комплектации при 28,3 л/мин; г) раствора, для проверки чувствительности хроматографической системы.

4000 мкг кромогликата, что соответствует более 80 % относительно номинального количества в дозе и согласуется с допустимым пределом 75 – 125 % [4 – 6], % RSD — менее 7.

Влияние изменения скорости потока и конфигурации импактора на аэродинамические характеристики. В соответствии с указаниями, приведенными в Европейской, Американской фармакопеех, а также в ГФ РФ XIII, основной процедурой для оценки респираторной фракции является использование импактора Андерсена в стандартной комплектации при скорости потока 28,3 мл/мин с заданными ЭПД ступеней. И, если в рекомендациях Европейской фармакопее допускаются возможность использования иной скорости

потока после проведения калибровки и установления в этих условиях соответствующих значений ЭПД ступеней КИА, то в общей статье Американской фармакопее подобные модификации не рассматриваются [5, 6]. Вероятно, в связи с этим производители ингаляционных препаратов достаточно редко проводят дополнительные исследования и предоставляют данные об аэродинамических характеристиках своих продуктов при изменении скорости потока.

Нами было изучено аэродинамическое распределение частиц аэрозоля “Кромоспир” с использованием КИА при потоках 28,3 и 60 л/мин в стандартной комплектации и при потоке 60 л/мин в модифицированной комплектации, в которой, по сравнению со “стандартным” вариантом, удалена ступень 7 и добавлены ступени “– 0” и “– 1”. Также в процессе испытаний было обнаружено, что значительное количество содержимого ингалятора осаждается не только на импакционных улавливающих тарелках, расположенных между ступенями импактора, но и на самих ступенях, в связи с чем отдельно рассчитывалось количество кромогликата, как на тарелках, так и на соответствующих ступенях. Кроме того, дополнительно при потоках 28,3 и 60 л/мин были проведены испытания на КИА доукомплектованным пресепаратором. Полученные результаты приведены на рис. 2 и в табл. 4.

Анализируемый препарат “Кромоспир” относится к суспензионным ингаляционным лекарственным формам, в которых действующее вещество вместе со вспомогательными веществами диспергированы в пропелленте. В состав Кромоспира, помимо кромогликата натрия и газа-пропеллента, входят “Повидон” и “Макрогол 6000”. Указанные компоненты могут оказывать влияние на распределение частиц кромогликата в импакторе. В большинстве случаев при исследовании осаждения частиц в импакторе испытуемые растворы готовятся смыванием осевших частиц только с импакционных тарелок, однако, в случае “Кромоспира”, из-за значительного осаждения порошка препарата на самих ступенях, были дополнительно проанализированы смывы со ступеней над каждой тарелкой и проведены испытания с использованием пресепаратора. Полученные результаты общей извлеченной массы кромогликата находились в диапазоне $\pm 8\%$ от номинального значения в дозе, при этом наименьшая масса наблюдалась в опытах, где не учитыва-

Таблица 3

Валидационные характеристики используемой хроматографической методики

Валидационные характеристики	Критерий приемлемости	Полученный результат
Чистота пика кромогликата на хроматограмме испытуемых и стандартных растворов	Более 90 %	Более 98,0 %
Время удерживания кромогликата на хроматограммах стандартного раствора должно соответствовать времени удерживания кромогликата на хроматограммах испытуемых растворов	$\pm 2\%$	Соответствует
Диапазон применения методики	0,001 – 0,1 мг/мл	
Коэффициент корреляции	0,995	0,9994
Соотношение сигнал/шум по раствору для проверки чувствительности хроматографической системы с концентрацией 0,001 мг/мл	Не менее 10	Более 20

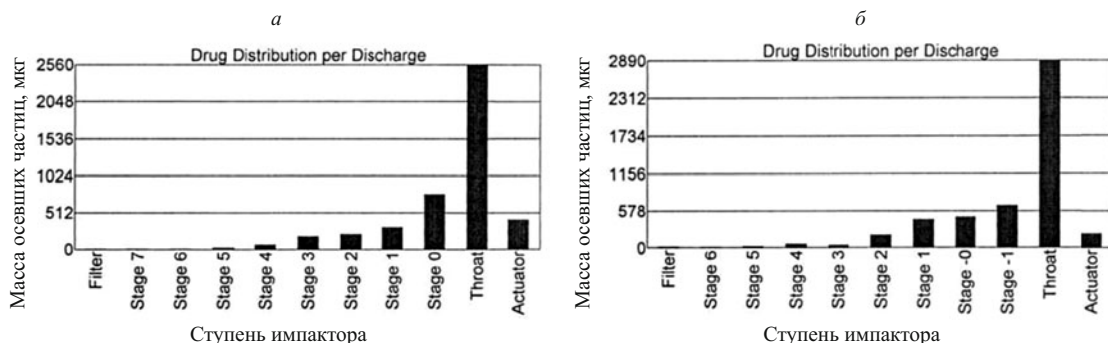


Рис. 2. Аэродинамическое распределение частиц по размерам на ступенях импактора — фильтре, ступенях 7–0 (а), или 6–– 1 (б), горловине, переходнике ингалятора (названия соответствуют приведенным английским названиям ступеней импактора слева направо): а) с использованием КИА в стандартной комплектации при 28,3 л/мин; б) с использованием КИА в модифицированной комплектации при 60 л/мин.

ли частицы, осевшие на ступенях, и не использовали пресепаратор.

Масс-медианный диаметр — критерий, показывающий, что 1/2 массы частиц аэрозоля имеют диаметр меньше, а оставшаяся половина больше указанного значения, — характеризует размер частиц аэрозоля в целом [7]. Полученные согласно табл. 4 значения ММАД изменялись незначительно и находились в пределах ± 1 мкм от среднего (около 6 мкм).

Неожиданно значимыми (около 5 %) оказались различия величин респиральной фракции частиц, полученных при потоке 60 л/мин между КИА в стандартной комплектации (с ЭПД ступеней, предназначенных для 28,3 л/мин) и модифицированного КИА (с ЭПД ступеней, предназначенных для 60 л/мин). Согласно документации производителя оборудования (Copley), использование указанного оборудования со скоростью 60 л/мин возможно в случае пересчета ЭПД ступеней стандартной комплектации КИА по уравнению (1) и должно приводить к одинаковым результатам. Однако, несмотря на применение калиброванных при указанных скоростях импакторов в стандартной и модифицированной комплектациях и расчетных ЭПД ступеней, разница в результатах составила более чем 4 %, в

связи с чем значения респиральной фракции, полученные в результате пересчета ЭПД ступеней, были признаны спорными и не учитывались.

По результатам испытаний показано, что только около 8–10 % частиц действующего вещества от его номинального содержания в дозе ДАИ “Кромоспира” относятся к респиральной фракции и теоретически могут депонироваться в нижних отделах легких. При этом в наибольшей степени от изменения скорости потока зависела респиральная фракция частиц. Различия в значениях РП полученных при использовании стандартной и модифицированной конфигураций КИА при потоках 28,3 и 60 мл/мин составили более 2 % (абс.). Также при изменении скорости потока существенно различались профили распределения частиц в импакторе (рис. 2).

Несмотря на безвариантные условия проведения оценки аэродинамических свойств аэрозолей, заявленные в [4–6], очевидно, что скорость потока, проходящего через импактор, моделирующий дыхательную систему при вдохе пациента, объем пропущенного воздуха, соответствующий объему вдоха, а также скорость перемещения ингалируемых веществ могут являться критичными для обеспечения доставки респир-

Таблица 4

Характеристики аэродинамического распределения ДАИ “Кромоспир”

Скорость потока, л/мин	Наличие пресепаратора	Учет смыслов со ступеней	ММАД*, мкм	Общая извлеченная с импактора масса кромогликата, мкг	Доза мелкодисперсных частиц, мкг	Респиральная фракция в дозе, %**
28,3	нет	нет	6,05	4135,41	359,26	7,68
	нет	да	6,85	4323,60	362,08	7,74
	да	нет	5,60	4386,51	394,71	8,43
	да	да	5,25	4391,70	393,38	8,41
60 модиф.	нет	нет	5,65	4133,35	429,31	9,18
	нет	да	6,25	4810,58	468,30	10,01
	да	нет	6,55	4449,66	477,63	10,21
	да	да	5,20	4673,88	421,99	9,02
60 расчет.	нет	нет	5,65	4127,48	684,93	14,64
	нет	да	6,25	4781,91	712,05	15,22

* ММАД — масс-медианный аэродинамический диаметр частиц;

** рассчитывали относительно фактически определенного в тесте “Однородность выпускаемой дозы” среднего содержания кромогликата в дозе 4678,1 мкг.

рабельной фракции до цели. Для порошковых ингаляторов, в которых попадание действующих веществ в нижние дыхательные пути напрямую зависит от вдоха пациента, это подтверждается результатами многих исследований и связано с их специфической резистентностью к потоку воздуха [8].

Для дозированных аэрозолей, в которых доставка дозы препарата осуществляется в основном за счет пропеллента-носителя, принято считать, что скорость потока не влияет на распределение частиц в дыхательных путях, в связи с чем для них данных по проведению подобных исследований значительно меньше [9, 10].

Сравнительные испытания оригинальных аэрозольных препаратов и генериков и оценку эффективности ДАИ *in vitro* рекомендуется проводить только при стандартной скорости потока 28,3 л/мин [USP], что вполне оправдано в случае допущения отсутствия влияния изменения скорости потока на аэродинамическое поведение частиц аэрозолей [11]. Однако на примере полученных в работе данных для ДАИ “Кромоспир” показано, что изменение скорости потока может приводить к значимым изменениям аэродинамического распределения частиц. Учитывая различия в скорости потока вдыхаемого воздуха у взрослого пациента и у ребенка, или у пожилого человека, либо у человека с ослабленными функциями дыхательной системы, для характеристики эффективности аэрозолей, а также для подтверждения взаимозаменяемости аэрозольных лекарственных средств целесообразно проводить оценку аэродинамических свойств аэрозолей при различных скоростях потока. Также на основании полученных данных по влиянию наличия/отсутствия пре-

сепаратора с учетом осевших на ступенях частиц аэрозоля и способа расчета необходимо обращать внимание на обоснованный, индивидуальный в каждом случае подход к методикам проведения испытаний.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “НЦЭСМП” Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

ЛИТЕРАТУРА

1. P. B. Myrdal, P. Sheth, S. W. Stein, *Formulation Development, AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **15**(2), 434 – 455 (2014).
2. B. Scarlett, *Am. Pharm. Rev.*, **5**, 93 – 101 (2003).
3. A. Kamiya, M. Sakagami, M. Hindle, P. Byron, *J. Pharm. Sci.*, **93**(7), 1828 – 1837 (2004).
4. *Государственная фармакопея РФ*, XIII изд., том 1 – 3, Москва (2015); <http://femb.ru>.
5. European Pharmacopoeia; [Электронный ресурс]: EDQM. 9th ed. <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
6. United States Pharmacopoeia. 39th ed.; [Электронный ресурс]: United States Pharmacopoeial Convention. URL: <http://www.uspnf.com/uspnf/>.
7. О. А. Победин, Л. А. Трухачева, Е. Б. Нечаева, *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*, **2**, 20 – 26 (2014).
8. Shic, Y. Songc, A. Katsifisb, S. Eberlrb, et al., *Int. J. Pharm.*, **513**(1 – 2), 294 – 301 (2016).
9. D. L. Ross, R. K. Schultz, *J. Aerosol Med.*, **9**(2), 215 – 226 (1996).
10. D. A. Lewisa, H. O’Sheaa, T. K. Churcha, G. Brambillaa, et al., *Int. J. Pharm.*, **514**(2), 420 – 427 (2016).
11. M. Weda, E. Geuns, R. Vermeer, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **49**, 295 – 302 (2000).

Поступила 12.07.18

STUDYING THE *IN VITRO* EFFECT OF FLOW VELOCITY ON THE AERODYNAMIC PARAMETERS OF CROMOSPIR AEROSOL INHALER

M. V. Nezdol’eva, R. R. Suleimanov, O. A. Popova, S. G. Larionova, O. A. Pobedin, L. A. Trukhacheva*

Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia;

* e-mail: truhacheva@expmed.ru

We have studied the effect of flow rate on the aerodynamic characteristics of metered dose inhaler (MDI) Cromospir using Andersen cascade impactor in two configurations - commonly accepted configuration for sampling at 28.3 L/min and a modified configuration for sampling at 60 L/min. The results showed that the aerodynamic particle size distribution profile and respirable fine particle fraction in MDI change depending on the flow rate value. This points to the significance of studying the influence of the sampling flow rate on the particle size distribution during the evaluation of quality control procedures or during the *in vitro* comparative effectiveness testing of various aerosols.

Keywords: cromoglycate; metered dose inhaler; aerodynamic particle size distribution; Andersen cascade impactor; respirable fine particle fraction.