

Zastosowanie automatycznej mikroskopowej analizy w analizie farmaceutycznej

Wioleta Maruszak, Magdalena Bodziachowska

Instytut Farmaceutyczny, Zakład Analityki Badawczej, Warszawa

Adres do korespondencji: Wioleta Maruszak, Instytut Farmaceutyczny, Zakład Analityki Badawczej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, tel.: 022 456 38 93, faks: 022 456 38 38, e-mail: w.maruszak@ifarm.waw.pl

Wstęp

Wielkość cząstek jest jednym z parametrów charakteryzujących wytwarzany produkt, często determinującym jego stabilność, wytrzymałość, czy nawet aktywność chemiczną. Stabilność tego parametru w kolejnych szarżach wytwarzanego produktu świadczy o powtarzalności procesu produkcyjnego, stąd określanie wielkości cząstek jest jednym z parametrów analizy kontroli jakości. W przypadku substancji farmaceutycznych istotne jest określenie na wczesnym etapie prac rozwojowych technologii substancji i postaci leku nie tylko wielkości, ale również kształtu cząstek, jako parametru mającego wpływ na dalsze etapy procesu produkcyjnego. Farmakopea Europejska (Ph. Eur.) [1] i Amerykańska (USP) [2] proponują analizę sitową (rozdział 2.9.38 [1] i rozdział 786 [2]) oraz dyfrakcję laserową (rozdział 2.9.31 [1] i rozdział 429 [2]), jako techniki wykorzystywane do badania rozkładu wielkości cząstek. Jednocześnie Farmakopee wskazują na konieczność oglądu morfologicznego cząstek i charakteryzowania kształtu cząstek nieregularnych (rozdział 2.9.37 [1] i rozdział 776 [2]). Parametr ten może warunkować postęp procesu technologicznego mając bezpośredni wpływ np. na sypkłość mieszaniny tabletkowej, a w konsekwencji na uzyskanie stałego, określonego składu formy leku. Określenie kształtu cząstek dostarcza cennych informacji nie tylko z punktu widzenia rozwoju technologii, lecz również warunków związanych z procesem uwalniania substancji aktywnej z leku, a co za tym idzie jej biodostępności. Niejednokrotnie obserwowanie różnego kształtu cząstek w badanych szarżach substancji farmaceutycznej sygnalizuje prawdopodobieństwo występowania różnych form polimorficznych substancji, krystalizujących w określonych układach krystalograficznych, mogących wykazywać drastycznie inne

The application of automatic optical microscopy in pharmaceutical analysis

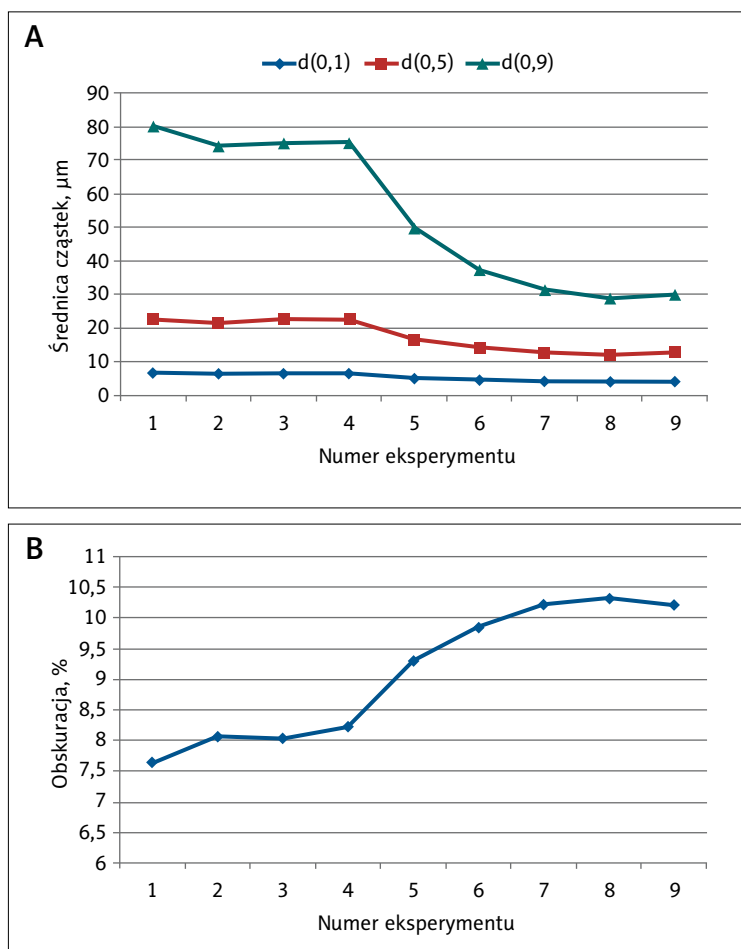
Particle size is one of the parameters which has determined the stability, resistance or even chemical activity of manufactured product. This parameter could determine a progress of pharmaceutical technology by influencing, for instance, on flowability and as a consequence on the constitution of drug product. Nowadays, the most common technique used for the determination of particle-size distribution is laser light diffraction. However, this method has very important limit – is unable to recognize a particle shape. The determination of particle shape provides information important not only from technological point of view but also for dissolution and bioavailability processes. Automatic optical microscopy allows to generate information about each, individual particle of tested sample and gives the opportunity for creation of distribution graph of any morphological parameter. The application of automatic optical microscopy for the optimization of particle-size distribution determination using laser light diffraction has been presented.

Keywords: automatic optical microscopy, particle characterization, particle-size distribution, laser light diffraction.

© Farm Pol, 2010, 66(3): 157-161

charakterystyki fizykochemiczne wpływające na ich stabilność i biodostępność.

Obecnie, dzięki możliwości pomiaru szerokiego spektrum wielkości cząstek, automatyzacji czyniącej analizę szybką i przyjazną dla operatora oraz ze względu na dużą ilość przyrządów pomiarowych, do określania rozkładu wielkości cząstek powszechnie stosowana staje się metoda dyfrakcji laserowej. W 1999 r. został zdefiniowany międzynarodowy wzór pomiarów wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej zawarty w normie ISO 13320-1 [3]. Istnieje wiele teorii i modeli, które można współcześnie stosować do tego typu analiz. Jedną z najprostszych



Rycina 1. Wykresy trendu: **a)** wpływ mocy mieszania i ultradźwięków na średnicę cząstek, **b)** wpływ mocy mieszania i ultradźwięków na obskurację. Warunki eksperymentów: 1. 0% us; 1015 rpm, 2. 0% us; 1400 rpm, 3. 0% us; 1750 rpm, 4. 0% us; 2100 rpm, 5. 1400 rpm; 25% us, 6. 1400 rpm; 50% us, 7. 1400 rpm; 75% us, 8. 1400 rpm; 100% us, 9. 1400 rpm; 100% us

teorii wykorzystuje model Fraunhofera, który pozwala przewidzieć jak rozpraszane będzie światło wiązki laserowej skierowanej na stałą nieprzeźroczystą tarczkę o znanym rozmiarze. Teoria Mie, wykorzystywana w najnowocześniejszych urządzeniach, pozwala przewidzieć jak rozpraszane jest światło przez cząstki kuliste wraz z określeniem sposobu, w jaki światło przechodzi przez cząstkę lub jest przez nią absorbowane. Teorie te bazują na tym, że jeśli wiadomo jaka jest wielkość cząstki i znane są jej współczynniki załamania światła i absorpcji, to można przewidzieć jak będzie ona rozpraszala światło. Każda wielkość cząstek charakteryzuje się innym wzorem rozpraszania światła. Metoda dyfrakcji laserowej ma jednak ograniczenia niezwykle istotne z punktu widzenia analizy farmaceutycznej – nie rozróżnia kształtu cząstek, dlatego coraz popularniejszą metodą stosowaną w badaniu substancji farmaceutycznych jest automatyczna analiza mikroskopowa, dająca możliwość określania nie tylko kształtu cząstek, ale również rozkładów wielkości cząstek w ujęciu ilościowym

i objętościowym. Automatyczna analiza mikroskopowa jest narzędziem pozwalającym na charakterystykę kształtu każdej pojedynczej cząstki badanej próbki. Charakterystyka kształtu uwzględni m.in. takie parametry, jak: długość, szerokość, średnica, pole powierzchni, kolistość, wydłużenie, zwartość, wypukłość, objętość. Automatyczny sposób pomiaru pozwala na zgromadzenie informacji dotyczących morfologii cząstek badanej populacji, której liczebność jest reprezentatywna i statystycznie znacząca, co pozwala na określanie rozkładów definiowanych parametrów. Uzyskanie rozkładów wielkości cząstek w oparciu o ich liczbę, czyli przy założeniu, że udział każdej cząstki w rozkładzie będzie taki sam, pozwala na wykrywanie niewielkich ilości relatywnie małych lub obcych cząstek. Natomiast uzyskiwanie rozkładów wielkości cząstek bazujących na objętości, co oznacza że udział każdej cząstki w rozkładzie jest proporcjonalny do jej objętości, podobnie jak w metodzie dyfrakcji laserowej, umożliwia porównywanie rezultatów uzyskanych obiema metodami.

W pracy przedstawiono zastosowanie automatycznej analizy mikroskopowej, jako narzędzia optymalizacji oznaczania rozkładu wielkości cząstek substancji farmaceutycznej metodą dyfrakcji laserowej.

Materiał i metody

| Materiał | Producent | Nazwa/seria |
|------------------------------|--------------|-----------------|
| Substancja farmaceutyczna | Manus Akteva | MA-BO-79/7EZ003 |
| Folia aluminiowa, 6 μm | Malvern | MOR 4433 |
| Woda destylowana | IF | – |
| Środek powierzchniowo czynny | INCO-Veritas | Ludwik / Z-43-B |

Metody

Dyfrakcja laserowa

| | |
|---|---|
| Aparat/przystawka dyspersyjna | Mastersizer 2000 / Hydro 2000S f. Malvern |
| Ultradźwięki (us) | 0–100% |
| Prędkość mieszania | 1015–2500 rpm |
| Dyspergant | Woda destylowana + środek powierzchniowo czynny |
| Czas pojedynczego pomiaru | 5 s |
| Czas pomiaru tła | 10 s |
| Współczynnik refrakcji substancji farmaceutycznej | 1,5 |
| Współczynnik refrakcji dysperganta | 1,33 |
| Współczynnik absorpcji | 0,01 |
| Obskuracja | 5–10% |

Analiza mikroskopowa

| | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Aparat/przystawka dyspersyjna | Morphology G3S / SDU, f. Malvern |
| Ciśnienie | 1 bar |
| Czas dyspersji | 20 ms |

Wyniki i omówienie

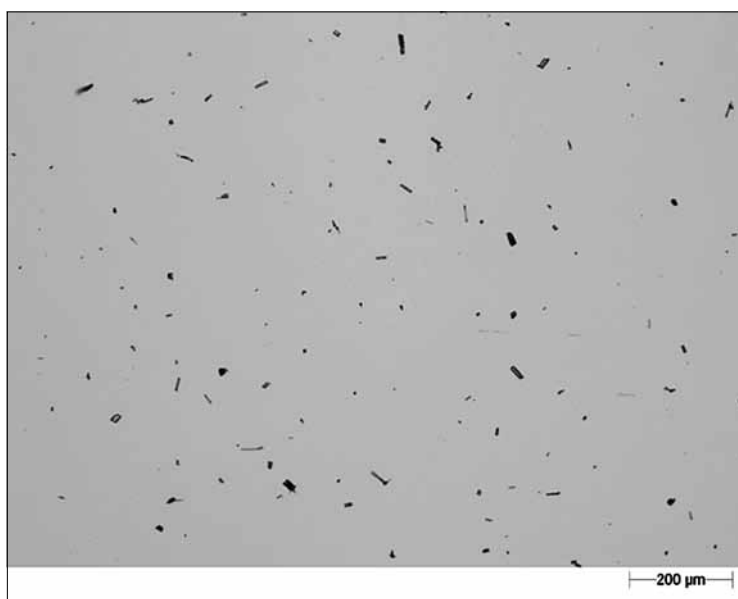
Jednym z kluczowych etapów opracowywania metody pomiaru rozkładu wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej w dyspersji cieczowej jest uzyskanie stabilnej dyspersji zapewniającej utrzymanie pojedynczych rozdzielonych cząstek, nie rozpuszczających ani nie aglomerujących w dyspergancie. Na **rycynie 1a,b** przedstawione są wykresy trendów zmian średnic cząstek i obskuracji podczas opracowywania metody. Kolejne serie pomiarowe uzyskano przy różnych prędkościach mieszania oraz różnej mocy ultradźwięków.

Przedstawione na **rycynie 1** wykresy trendów zarówno średnic cząstek, jak i obskuracji wskazują na generowanie stabilnej dyspersji próbki w dwóch przedziałach: przy mieszaniu próbki z prędkością od 1400 do 2100 obrotów bez zastosowania ultradźwięków oraz podczas stosowania ultradźwięków (100%), przy optymalnym mieszaniu (1400 rpm). Jednocześnie linie trendu obserwowanych parametrów zmieniają się w trakcie optymalizacji metody, szczególnie po zastosowaniu ultradźwięków. Obserwowany jest wówczas gwałtowny spadek wielkości średnic cząstek, przy jednoczesnym wzroście obskuracji. Szczególnie duże różnice obserwowane są dla wartości $d(0,9)$. Obserwacje te mogą świadczyć zarówno o skutecznej deaglomeracji cząstek, jak i ich kruszeniu. Prawidłowa interpretacja obserwowanych zmian, warunkująca opracowanie odpowiedniej metody pomiarowej, wymaga wizualnego oglądu badanej próbki. W tym celu wykorzystano automatyczny analizator mikroskopowy. Dokonano oglądu substancji przed dyspersją (**rycina 2**), po dyspersji powietrznej (**rycina 3**), w przygotowanej dyspersji cieczowej bez i po zastosowaniu ultradźwięków (**rycina 4 a,b**).

Obserwacje mikroskopowe próbki wskazują na igłowy kształt cząstek (**rycina 2**). Ze względu na znaczne wydłużenie cząstki są niezwykle kruche i ulegają zniszczeniu zarówno podczas dyspersji powietrznej (**rycina 3**), przy zastosowaniu minimalnej mocy dyspersyjnej, jak i podczas stosowania ultradźwięków (**rycina 4 b**). Wyniki uzyskane na podstawie automatycznej analizy obrazu potwierdzają numerycznie obserwacje mikroskopowe i pozwalają na porównanie rozkładów wybranych parametrów morfologicznych cząstek badanej próbki. Na **rycynie 5** przedstawiono porównanie rozkładów najbardziej charakterystycznego dla cząstek igłowych parametru wydłużenia dla próbki analizowanej przed i po zastosowaniu ultradźwięków oraz dyspergowanej powietrznie. Obserwowane przesunięcie wykresów w kierunku niższych wartości (zakres 0–1, gdzie 1 odpowiada igle) wskazuje na zmianę igłowego kształtu cząstek na skutek ich kruszenia. Kruszenie cząstek jest obserwowane zarówno



Rycina 2. Morfologiczny ogląd substancji przed dyspersją



Rycina 3. Morfologiczny ogląd substancji po dyspersji powietrznej (1bar/20 ms)

podczas stosowania ultradźwięków o różnej mocy, jak i, choć w mniejszym stopniu, podczas dyspersji powietrznej.

W **tabeli 1** zamieszczono charakterystyczne dane rozkładu wielkości cząstek otrzymane metodą dyfrakcji laserowej i automatycznej analizy mikroskopowej.

Wyniki uzyskane na podstawie analizy obrazu przedstawione w postaci rozkładów stanowią punkt odniesienia podczas opracowania metody dyfrakcji laserowej. Obserwowana jest dobra korelacja uzyskanych wyników dla cząstek próbki zdyspergowanej w aparacie Mastersizer z użyciem ultradźwięków, a następnie badanej obiema metodami. Obserwowana korelacja wynika zarówno z braku

Tabela 1. Zestawienie parametrów objętościowych rozkładów wielkości cząstek

| Średnice cząstek (µm) | Analiza mikroskopowa | | | | Dyfrakcja laserowa | |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|--|--|--------------------|--|
| | Dyspersja powietrzna | Dyspersja cieczowa bez us | Dyspersja cieczowa po us ¹⁾ | Dyspersja cieczowa po us ²⁾ | Bez us | Dyspersja cieczowa po us ²⁾ |
| d [0,1] | 9 | 19 | 14 | 5 | 6 | 4 |
| d [0,5] | 18 | 34 | 23 | 10 | 19 | 10 |
| d [0,9] | 34 | 63 | 38 | 16 | 60 | 23 |

Ultradźwięki – us;

¹⁾ Płuczka ultradźwiękowa;

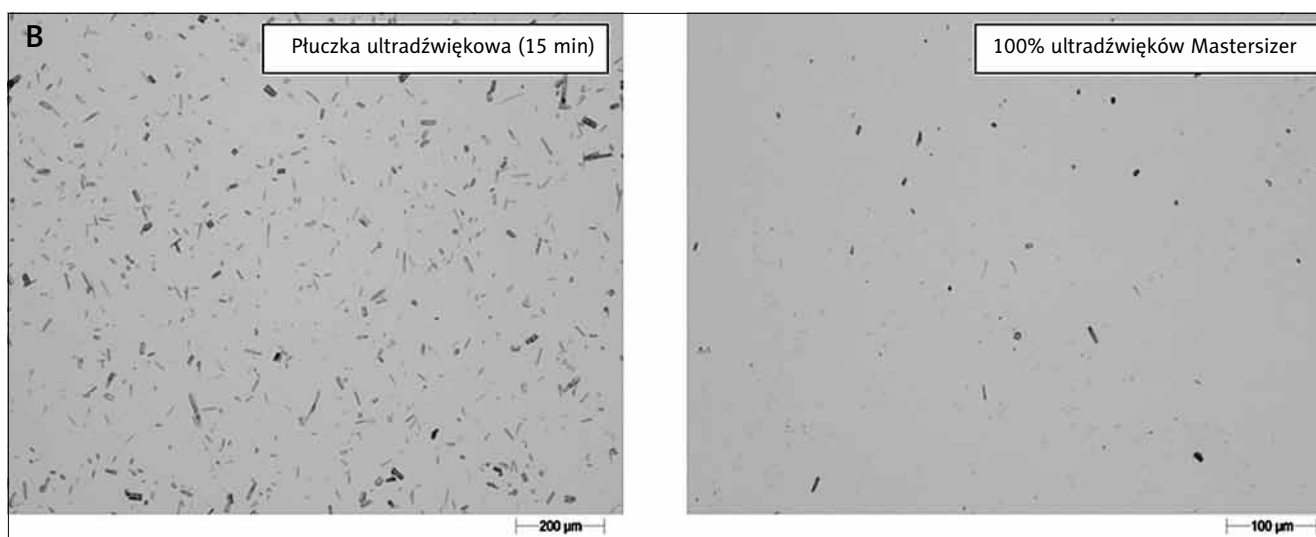
²⁾ 100% ultradźwięków w aparacie Mastersizer

różnic podczas przygotowania próbki do badań, jak i z faktu, iż próbka jest maksymalnie pokruszona, jednorodna i kształtem bliska modelowi stanowiącemu podstawę pomiarów metodą dyfrakcji

laserowej. Dla cząstek otrzymanych w dyspersji cieczowej bez zastosowania ultradźwięków obserwowane są rozbieżności wartości średnic rozkładów objętościowych w zakresie cząstek małych, w stosunku do których rozkłady objętościowe są mało czułe. Na obserwowane rozbieżności wpływa również sposób przygotowania dyspersji: manualne – bardzo delikatne rozmieszanie próbki analizowanej mikroskopowo, mechaniczna – ciągła cyrkulacja próbki podczas pomiaru metodą dyfrakcji laserowej oraz niewrażliwość metody dyfrakcji laserowej na polidispersyjność próbki pod względem kształtu cząstek.

Podsumowanie

Zarówno właściwe używanie przyrządów pomiarowych, jak i właściwa interpretacja uzyskiwanych wyników wymaga odpowiednio zdefiniowanej metodologii badań. W przypadku oznaczeń rozkładów wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej niezbędne jest weryfikowanie otrzymanych rezultatów lub wstępne bazowanie na wynikach uzyskiwanych metodami analizy mikroskopowej. W pracy



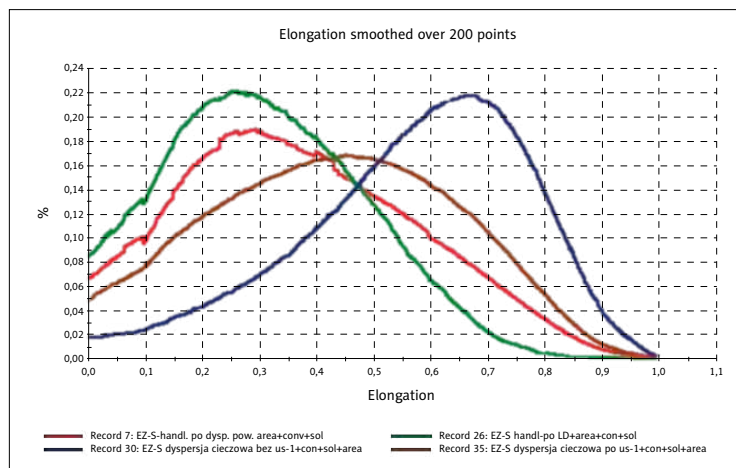
Rycina 4. a) morfologiczny ogląd substancji w dyspersji cieczowej przygotowanej bez zastosowania ultradźwięków
b) morfologiczny ogląd substancji w dyspersji cieczowej przygotowanej przy zastosowaniu ultradźwięków

wykazano jak znaczący wpływ na uzyskiwane wyniki rozkładów wielkości cząstek, niezwykle istotnej z punktu widzenia technologii farmaceutycznej, ma prawidłowa optymalizacja metody dyfrakcji laserowej z użyciem automatycznej analizy obrazu. Interpretacja danych optymalizacyjnych bez analizy mikroskopowej może prowadzić do błędnego zdefiniowania metody, a tym samym generowania nieprawdziwych wyników.

Otrzymano: 2009.11.16 · Zaakceptowano: 2009.12.20

Piśmiennictwo

1. Farmakopea Europejska 6.
2. Farmakopea Amerykańska 32.
3. Międzynarodowa norma ISO 13320-1: 1999 – Particle size analysis – Laser diffraction methods.



Rycina 5. Wpływ warunków dyspersji próbki na rozkład morfologicznego parametru wydłużenia cząstek. **Linia czerwona:** dyspersja powietrzna (1 bar/20 ms). **Linia zielona:** dyspersja cieczowa 100% ultradźwięków Mastersizer. **Linia brązowa:** dyspersja cieczowa – płuczka ultradźwiękowa (15 min). **Linia niebieska:** dyspersja cieczowa bez ultradźwięków