

SOUČASNÉ METODY MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC FARMACEUTICKÝCH LÁTEK A JEJICH OMEZENÍ

MICHAL ŠIMEK^a, VERONIKA GRÜNVALDOVÁ^b
a BOHUMIL KRATOCHVÍL^a

^a Ústav chemie pevných látek, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Zentiva, k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10

Michal.Simek@vscht.cz, Veronika.Grunwaldova@zentiva.cz, Bohumil.Kratochvil@vscht.cz

Došlo 23.9.13, přijato 2.11.13.

Klíčová slova: distribuce velikosti částic, tvar částic, laserová difrakce, obrazová analýza, objemová distribuce, početní distribuce, porovnání metod

Obsah

1. Úvod
2. Nejčastější metody měření distribuce velikosti částic ve farmacii
 - 2.1. Mikroskopie a obrazová analýza
 - 2.2. Metoda laserové difrakce
 - 2.3. Porovnání metod
3. Závěr

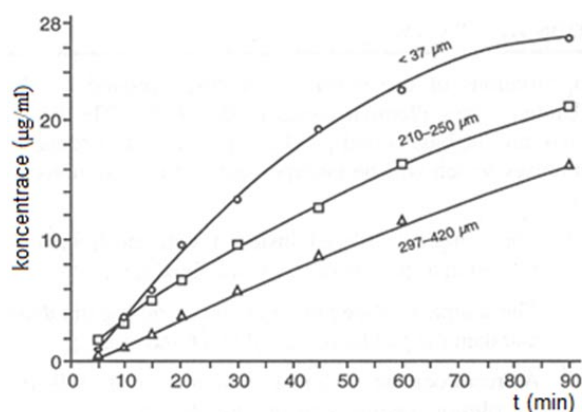
1. Úvod

Velikost částic je rozměrová vlastnost částice v prostoru charakterizovaná jednotkou délky. Ideální práškový materiál obsahuje pouze částice stejné velikosti. Naproti tomu reálný materiál se skládá z částic o určitém velikostním rozpětí – velikostním intervalu. V praxi se proto při popisu velikosti používá pojem distribuce velikosti částic¹. Početní distribuce velikosti částic (DVČ) vyjadřuje procentuální rozložení částic vzhledem k velikosti. Rozložení objemu částic je charakterizováno objemovou distribucí. Dalším, neméně důležitým parametrem popisu částic je jejich tvar. Velikost a tvar jsou neoddelitelné parametry, které ovlivňují chování pevných látek a jejich zpracování^{2,3}. Pro správné stanovení obou parametrů je zapotřebí reprezentativní vzorek studovaného materiálu, který musí být připraven a analyzován s dostatečnou reprodukovatelností měření v závislosti na použité analytické metodě^{4,5}.

Velikost a tvar částic ovlivňují nejen tokové vlastnosti prášku, ale také procesy mletí, homogenizace, granulace a tabletování. Mlít je nutné léčivé a pomocné látky tehdy,

pokud při vstupu do výroby nemají DVČ, kterou vyžadují jednotlivé výrobní operace. Při homogenizaci léčivé látky s pomocnými látkami (excipienty) je vhodné, aby distribuce jejich velikostí nebyly příliš rozdílné. S narůstajícím rozdílem v DVČ jednotlivých komponent se zvyšuje riziko protichůdného procesu homogenizace – segregace práškové směsi². Závislost míry segregace složek tabletoviny na velikosti částic vstupních surovin byla studována spektrálními metodami, mimo jiné, v práci Vajny a spol.⁶. Kontrolou a úpravou velikosti částic léčivé látky a excipientů je možné segregací proces minimalizovat.

Při inhalačním podání pevné léčivé látky, např. při léčbě bronchiálního astmatu, lidské dýchací ústrojí velmi úspěšně odfiltruje částice nad určitou velikostí, aby se zajistila integrita přívodu vzduchu a předešlo se podráždění plic. Vdechnutí musí být pro člověka snadné a lék se musí v plicích dobře deponovat⁷. Velikost částic léčivé látky v práškových inhalátorech je proto nutné kontrolovat. Při podávání tablet *per os* závisí rychlost dezintegrace tablety a disoluce (rozpuštění) léčivé látky v zažívacím traktu na velikosti částic a jejich porozitě². Zvýšení specifického povrchu způsobí snížení fyzikálních překážek rozpouštění, a urychlení celého procesu absorpce. Toho je využíváno pro úpravu chování generika *in vivo*⁸, protože generický léčivý přípravek musí být s originálním přípravkem bioekvivalentní. Během bioekvivalenční studie (BES) se prokáže shodný koncentrační průběh léčivé látky v krvi na čas. Mezní limity potvrzené shody jsou $\pm 20\%$ na hladině významnosti $P = 0,05$ (cit.⁹). Z praktických a ekonomických důvodů se BES provádí na závěr vývoje generického přípravku. Průběžná shoda se kontroluje pomocí disolučních testů, resp. shodou disolučních profilů originálu a generika¹⁰. Takové hodnocení není příliš ná-



Obr. 1. Disoluční profily tablet s léčivou látkou (API) o různé velikosti částic (převzato z cit.³²)

kladné a je možné ho provádět opakovaně. Změnou distribuce velikostí částic generika je možné upravit disoluční profil tablety do požadovaného průběhu. Na obr. 1 jsou ukázány disoluční profily tablet obsahující stejnou léčivou látku s rozdílnou distribucí velikostí částic.

2. Nejpoužívanější metody měření distribuce velikostí částic ve farmacii

Současným standardem měření distribuce velikostí částic ve farmacii jsou obrazová analýza snímků ze světelného nebo elektronového mikroskopu (SEM)¹¹ a laserová difrakce. Přehled měřitelného rozsahu, navážek vzorku a možných aplikací je uveden v tab. I.

Výsledná distribuce velikostí částic je uváděna jako početní nebo objemová. V závislosti na zvolené technice jsou distribuce prezentovány formou histogramu nebo

distribuční křivky a také percentilními d-hodnotami dolního decilu, horního decilu a mediánu – $d(0,1)$, $d(0,9)$, $d(0,5)$, odečtených z kumulativní křivky¹². Ta popisuje procentuální nárůst výskytu částic s jejich narůstající velikostí. Má vždy tvar rostoucí funkce s oborem hodnot od 0 do 100 % (cit.¹).

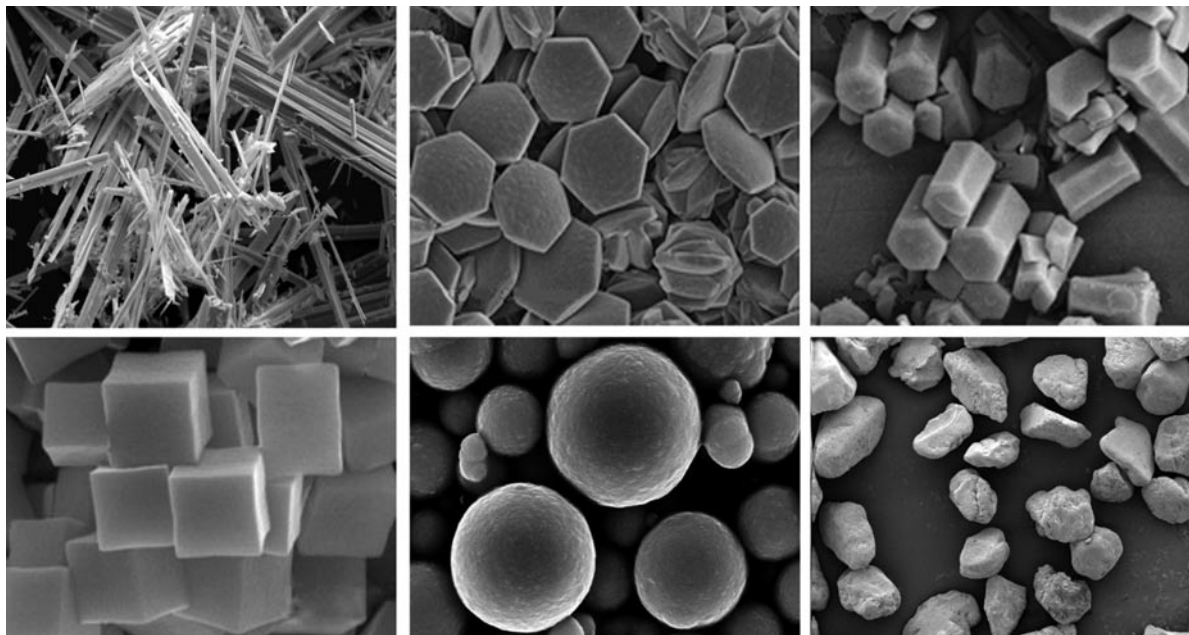
2.1. Mikroskopie a obrazová analýza

Světelná mikroskopie představuje tradiční metodu charakterizace částic. Při navážce řádově miligramů vzorku je možné rychle získat informace o tvaru a velikosti částic. Srovnatelné výsledky poskytuje i metoda elektronové mikroskopie. Oproti světelné mikroskopii však nabízí několikanásobně větší zvětšení a velkou hloubku ostrosti, čímž je možné pozorovat částice až na hranici 1 nm a pozorovat jejich povrch v prostorovém zobrazení¹³.

Distribuce velikostí částic se z mikroskopických snímků získává softwarem obrazové analýzy (např. NIS

Tabulka I
Přehled vybraných metod měření velikostí částic¹⁷

Metoda	Min [μm]	Max [μm]	Určení distribuce	Určení tvaru	Určení povrchu	Navážka [g]
Obrazová analýza z mikroskopie:						
optické	1	1000	ano	ano	ano	<0,1
SEM	0,02	1000	ano	ano	ano	<0,1
Laserová difrakce	0,02	2000	ano	ne	ne	>0,5



Obr. 2. Příklady reálných tvarů částic látek ve farmaceutickém průmyslu

Elements v.4.1.). Obrazová analýza NIS Elements je založena na principu označení dostatečně velkého souboru částic (1000 a více) a odečtení řady parametrů pro každou z nich. Mezi nejpoužívanější parametry patří minimální a maximální průměr, projekční plocha a vypočítaný objem ekvivalentní koule a kruhovitost. Na základě uživatelem zvolených parametrů a znalosti měřítka snímku program vygeneruje histogram DVČ. Zpracovávat je možné „živý“ i archivovaný obraz. Výsledkem je nejčastěji objemová nebo početní distribuce velikosti částic. Oba typy jsou blíže diskutovány v kapitole porovnání metod.

Výhodou obrazové analýzy je možnost korelovat výsledek distribuce se skutečným snímkem částic. Podrobnější informace o metodě a jejím použití ve farmacii je možné nalézt v literatuře^{1,10,14,15}.

2.2. Metoda laserové difrakce

Laserová difrakce je stále více preferovaná metodika měření velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu. Jedná se o techniku hromadného měření částic, která generuje výsledek pro celý vzorek. Princip spočívá v kontinuálním průtoku částic měřicí celou, na kterých difraktuje laserový svazek¹⁶. Informace o velikosti a tvaru částic jsou obsaženy v difrakčním obraze a odtud pomocí Fourierovy transformace převedeny na distribuční křivku¹⁷. Před měřením je nutné nejdříve vyvinout a validovat metodu pro konkrétní vzorek. To znamená stanovit fixní a hledané parametry měření, které souvisí s vlastnostmi měřené látky. Laserová difrakce je rychlá, reprodukovatelná a robustní metoda¹⁸.

Postup měření je možné rozdělit do tří kroků:

1. Interakce částic s laserovým paprskem a získání difrakčního obrazce.
2. Převod difrakčního obrazce do digitálního formátu.
3. Převod digitálního formátu difrakčního obrazce na distribuční a kumulativní křivku¹⁹.

V publikacích jsou výsledky běžně uváděny jako percentilní d-hodnoty^{20,21}. Protože metoda laserové difrakce poskytuje difrakční obraz a nikoliv přímý obraz částice, je vhodné výsledek doplnit mikroskopickými snímky. Podrobnější informace je možné nalézt v literatuře^{1,10,14,15,22}.

2.3. Porovnání metod

Z popsaných principů obou metod vyplývají důležité závěry. Již v roce 1940 Heywood uvedl, že výsledky distribucí získané určitou analytickou technikou závisí na fyzi-



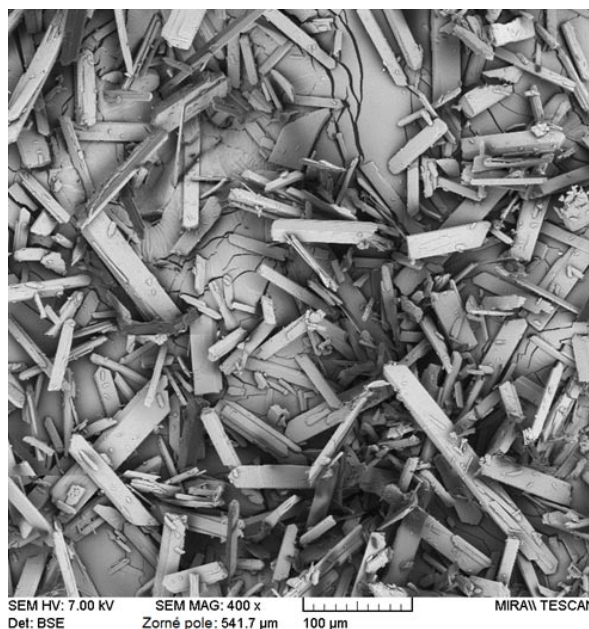
Obr. 3. Postup aproximace tvaru částice na objem ekvivalentní koule

kálních principech a omezeních použité metody²³. Chattopadhyay a spol.²⁴ konstatují, že i za předpokladu pravidelnosti částic se mohou výsledky jednotlivých metod mezi sebou lišit až o 10 %. Znamená to, že i při měření ideálních sférických částic není dosaženo stejného výsledku. Z tohoto důvodu je porovnávání výsledků získaných různými metodami měření nevhodné^{25,26}.

Podle Evropského lékopisu patří mezi základní tvary částic: jehličky, destičky, sloupečky, kvádry, krychle, koule a nepravidelné částice¹⁴. Ilustrativní příklady zmíněných tvarů jsou uvedeny na obr. 2. Nejjednodušší popis velikosti je v případě kouli, které je možné popsat jedním číslem – průměrem. Ve snaze popsat velikosti ostatních tvarů také jedním číslem, byla do praxe zavedena aproximace na ekvivalentní kouli. Tzn. kouli o stejném objemu, povrchu, rychlosti sedimentace apod., jako má reálná částice^{3,11,27}.

Metoda laserové difrakce umožňuje použít aproximace uživatelsky ovlivnit jen minimálně. Na základě znalosti tvaru částic v měřeném vzorku je možné zvolit pouze ze tří přednastavených variant přepočtu detegovaného signálu do distribuční křivky. Tím by se měl snížit vliv orientace částice při průletu měřicí celou. Nemělo by tedy docházet např. k bimodálnímu rozložení distribuce velikosti jehličkovitých částic z důvodu orientace nejdelší nebo naopak nejkratší délky na laserový paprsek. Pro zvolení správné varianty je nutné předem mikroskopicky zjistit tvar částic. Laserová difrakce používá pro výpočet distribuce velikosti částic pouze objemy ekvivalentních koulí¹⁷.

V případě obrazové analýzy se objemová distribuce získá nejčastěji aproximací na objem ekvivalentních koulí. Výpočet je založen na odečtení skutečné plochy částice, převodem na kruh se stejnou plochou a odečtení jeho prů-



Obr. 4. Jehličkovité částice měřené léčivé látky

Tabulka II

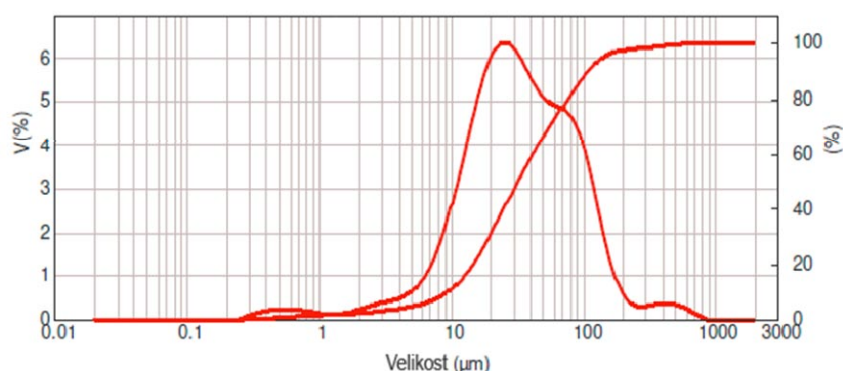
d-hodnoty objemových distribucí získaných metodou obrazové analýzy a laserovou difrakcí (d(0,1) – dolní decil; d(0,5) – medián; d(0,9) – horní decil distribuce)

Metoda	d(0,1) [μm]	d(0,5) [μm]	d(0,9) [μm]
Obrazová analýza	62	116	221
Laserová difrakce	10	32	111

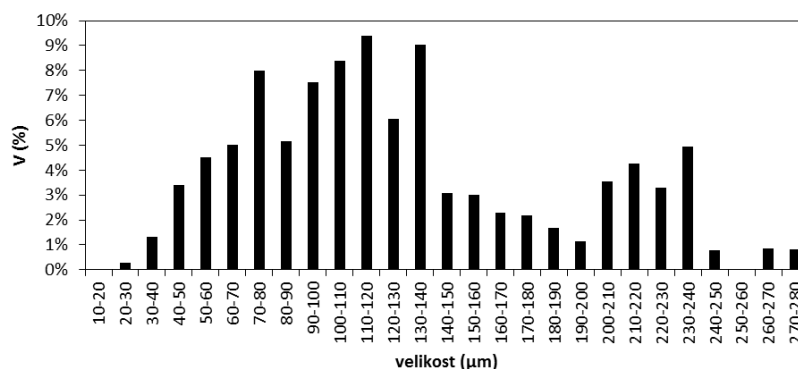
měru. Tento průměr je také označován jako ekvivalentní objemový průměr a je použit při výpočtu objemu ekvivalentní koule (obr. 3). Početní distribuce představuje procentuální rozdělení částic do histogramu na základě délky, např. maximálního průmětu¹⁷. Kombinací několika početních distribucí (např. minimálního a maximálního průmětu) je možné tvar částic lépe prezentovat²⁸. Kromě výše zmíněných postupů je možné naměřená data z obrazové analýzy exportovat do tabulkového editoru a zahrnout do výpočtu objemové distribuce podmínky tvarových faktorů²⁹. Tvarový faktor je vypočítaná veličina, která udává míru shody se zvoleným geometrickým tělesem – např. kruhovitost³. Kruhovitost nabývá hodnot <0;1> a udává

míru shody skutečného dvourozměrného tvaru částice s kruhem (hodnota rovna 1)³⁰.

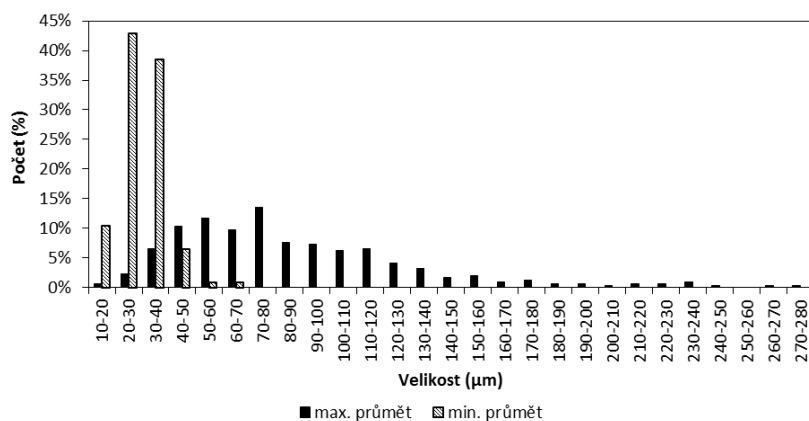
Pro ilustraci rozdílných výsledků objemových distribucí velikosti byla provedena měření těžce šarže léčivé látky pomocí obou metod – laserové difrakce a obrazové analýzy. Její částice měly tvar pravidelných jehliček (obr. 4). Výsledky objemových distribucí jsou uvedeny na obr. 5 a 6. Diskuse výsledků vychází z porovnání d-hodnot těchto distribucí uvedených v tab. II. Obrazová analýza proměřuje kolem 1000 částic. Ve srovnání s laserovou difrakcí je to o několik řádů méně. Další rozdíly pramení z výše diskutovaných rozdílů v principech obou metod a také jejich odlišných rozsazích měření. Světelná mikro-



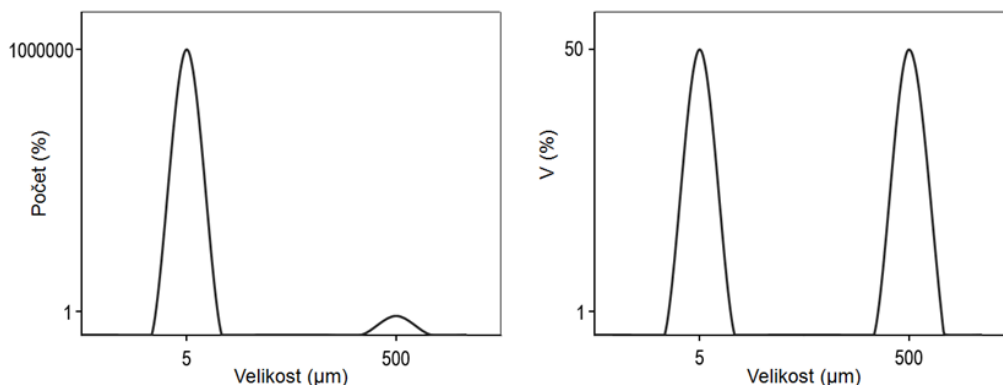
Obr. 5. Objemová distribuce velikosti částic získaná z laserové difrakce. Distribuční a kumulativní křivka



Obr. 6. Objemová distribuce velikosti částic získaná obrazovou analýzou



Obr. 7. Početní distribuce velikosti částic léčivé látky (API) v závislosti na min. a max. průmětu (obrazová analýza)

Obr. 8. Vliv výskytu velkých částic na distribuci velikosti částic početní (vlevo) a objemovou (vpravo)¹⁶

skopie je omezena rozlišením řádově několika jednotek mikronu. Z důvodu velkého počtu podmikronových a mikronových částic, které byly v případě obrazové analýzy označeny jen v malém zastoupení, jsou d-hodnoty rozdílné. Největší procento hmoty bylo zastoupeno v intervalu velikosti 3 až 200 μm (laserová difrakce) a 30–250 μm (obrazová analýza).

Na obr. 7 jsou uvedeny početní distribuce téhož vzorku, které lze získat jen obrazovou analýzou. Uvedené histogramy udávají procentuální rozdělení částic podle minimálního a maximálního průměru. Porovnáním výrazně rozdílných rozsahů obou histogramů je možné určit, že se jedná o jehličkovité částice. Tento způsob interpretace výsledků byl uveden např. v práci Garekaniho a spol.²⁸ Je vhodný nejen v případě, kdy není možné přiložit snímek částic, ale i pro lepší přiblížení jejich skutečných rozměrů. Příklad uvedený na obr. 8 napomáhá pochopení rozdílu citlivosti početní a objemové DVČ z obrazové analýzy. Objemové techniky jsou velmi citlivé na výskyt malého počtu velkých částic, které v celkovém objemu zaujímají velké procento^{16,20,31}. Při porovnání je důležité pamatovat

na prostorový vztah mezi délkou a objemem částice. Obr. 8 prezentuje systém obsahující milion částic o velikosti 5 μm a jedné částici velké 500 μm . V záznamu početní DVČ je zachován poměr výskytu, tedy 1000000:1. V případě objemové DVČ je objem částice velké 500 μm milionkrát větší než 5 μm částice. Objemové rozdělení pro milion 5 μm částic a jednu 500 μm částici bude v poměru 1:1. Vyplyvá to z použité třetí mocniny při výpočtu objemu z délky³.

3. Závěr

Metody mikroskopické obrazové analýzy a laserové difrakce pracují na odlišných principech a v jiném rozsahu měření. Z tohoto důvodu je nutné porovnávat pouze výsledky, které byly získány za stejných podmínek použitím jedné techniky.

Při výběru metody rozhoduje především rychlost a cena analýzy. Laserová difrakce je výrazně rychlejší metodou za předpokladu, že je k dispozici vyvinutá valido-

vaná metoda a zpracovává se výrazně větší množství vzorků. Obrazová analýza představuje velice levný způsob, jak zjistit distribuci velikosti částic bez zdlouhavého vývoje metody. Její výhodou je rovněž informace o tvaru a obecně vzhledu částic. Z tohoto důvodu je to optimální technika pro farmaceutický vývoj, kdežto laserová difrakce je vhodnou metodou rutinních analýz kontroly kvality.

Laserová difrakce poskytuje objemovou distribuci velikosti částic charakterizovanou distribuční křivkou, kumulativní křivkou a percentilními d-hodnotami. Naproti tomu software obrazové analýzy umožňuje vyjádřit výsledek ve formě početního i objemového histogramu. V obou případech je rovněž možné vyjádřit kumulativní závislost a dopočítat d-hodnoty. Obrazová analýza umožňuje exportovat data analyzovaných částic do tabulkového editoru. Export celé řady údajů (např. projekční plocha, kruhovitost, délkové rozměry a další) o každé částici otevírá možnosti vývoje vlastního výpočtu DVC dle požadovaných kritérií pro konkrétní aplikace.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR č. 6046137302.

LITERATURA

- Šimek M.: *Bakalářská práce*. VŠCHT, Praha 2010.
- Komárek P., Rabišková M.: *Technologie léků*. 3. vydání. Galen, Praha 2006.
- Crowder T. M., Hickey A. J., Louey M. D., Orr N.: *A Guide to Pharmaceutical Particulate Science*. Interpharm/CRC, New York 2003.
- Brittain H. G.: *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Academic Press, New York 1994.
- Taylor J. K., Cihon C.: *Statistical techniques for data analysis*. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Vajna B., Farkas A., Pataki H., Zsigmond Z., Igricz T., Marosi G.: *Anal. Chim. Acta* 712, 45 (2012).
- Malvern Instruments Ltd. (překlad: Hrdlička J.): *CHE-Magazin* 22, 8 (2012).
- Okáčová L., Vetchý D., Franc A., Rabišková M., Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 104, 21 (2010).
- Doležal T., Hausner T.: *Vnitř. Lék.* 51, 115 (2005).
- Ministerstvo zdravotnictví ČR: *Český lékopis*. 1. vydání. Grada, Praha 2009.
- Allen T.: *Particle Size Measurement*. 5. vydání. Chapman and Hall, New York 1997.
- Närvalen T.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 12 (2008).
- Newman A. W., Brittain H. G.: *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker, New York 2002.
- Council of Europe: *European pharmacopoeia*. European Pharmacopoeia Secretariat, Strasbourg 2008.
- ISO standards 9276-1: 1998 Representation of results of particle size analysis.
- http://www.malvern.com/LabEng/technology/laser_diffraction/laser_diffraction.htm, staženo 12. února 2010.
- Dohnal J.: *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2009.
- Amidon G. E., Secreast P. J., Mudie D.: *Developing Solid Oral Dosage Forms*. Academic Press, San Diego 2009.
- Zakrzewski A., Zakrzewski M.: *Solid State Characterisation of Pharmaceuticals*. Analytics Inc., Danbury 2006.
- Tinke A. P., Vanhoutte K., Vanhoutte F., De Smet M., De Winter H.: *Int. J. Pharm.* 1-2, 80 (2005).
- Ma Z., Mercus H. G., de Smet J. G. A. E., Heffels C., Scarlett B.: *Powder Technol.* 111, 66 (2000).
- ISO standards 13320: 2009 Particle size analysis - Laser diffraction methods.
- Heywood H.: *Particle Size Analysis*. Macmillan Magazines Ltd., Porters South 1947.
- Chattopadhyay P., Shekunov B.Y., Yim D., Cipolla D., Boyd B., Farr S.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 59, 6 (2007).
- Shewhart W.: *Statistical method from the viewpoint of quality control*. Dover, New York 1986.
- Deming W.: *Statistical adjustment of data*. Dover, New York 1964.
- Martin A.: *Physical pharmacy*. Lea and Febiger, Philadelphia 1993.
- Garekani H. A., Ford J. L., Rubinstein M. H., Rajabi-Siahboomi A. R.: *Int. J. Pharm.* 187, 77 (1999).
- Hesketh H. E.: *Fine particles in gaseous media*. Lewis publisher, Chelsea 1986.
- Dallavalle J. M.: *Micromeritics*. Pitman, New York 1948.
- Dunbar C. A., Hickey A. J.: *J. Aerosol Sci.* 31, 813 (2000).
- Byrn S. R., Pfeiffer R. R., Stowell J. G.: *Solid State Chemistry of Drugs*. 2. vydání. SSCI Inc., West Lafayette 1999.

M. Šimek^a, V. Grünwaldová^b, and B. Kratochvíl^a
^{(^aDepartment of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology Prague, Zentiva Co., Prague):} **Current Methods of Measurement of Pharmaceutical Particles Size and Their Restrictions**

The particle size and shape of raw materials influence the manufacture and behavior of solid dosage forms. The most widely used methods of particle size measurement are laser diffraction and image analysis. These methods are based on different principles and measurement ranges. Only the results obtained by the same method under the same conditions can be compared. Laser diffraction is significantly faster if a validated method is known. The method is defined for every raw material to guarantee reproducibility of measurement. Image analysis is inexpensive and does not require the validated method. Shape information is easily provided by image analysis. Laser diffraction is a suitable method for routine quality control. Image analysis is an optimal technique for development of pharmaceuticals.