

2.1.9.13. ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦, ♦».

Оптическая микроскопия, как правило, используется для определения параметров частиц размером от 1 мкм и более. Нижний предел определяется разрешающей способностью микроскопа. Верхний предел менее точно определен и обусловлен возрастающей сложностью, связанной с определением параметров более крупных частиц. Существуют различные альтернативные методы для определения параметров частиц, находящихся вне пределов рабочего диапазона оптической микроскопии. Оптическая микроскопия лучше всего подходит для характеристики несферических частиц. Данный метод также может служить основой для калибровки более быстрых и рутинных методов, которые могут быть разработаны.

Прибор. Микроскоп должен быть установлен в устойчивом и защищенном от вибрации месте. Увеличительная способность микроскопа (произведение увеличений объектива, окуляра и дополнительных увеличительных компонентов) должно быть достаточным для точного определения характеристик наименьших частиц в испытуемом образце. Для каждого предела увеличения выбирают максимальную числовую апертуру объектива. Могут быть использованы поляризационные (поляризующие) фильтры с подходящими анализаторами и «замедляющими» пластинами. Светофильтры с относительно узкополосной спектральной пропусканием используются с ахроматическими или, что более предпочтительно, с апохроматическими объективами; они необходимы для соответствующей цветопередачи при микрофотографии. Конденсоры с коррекцией, как минимум сферической аберрации, находятся под предметным столиком со встроенным осветителем. В условиях эксплуатации числовая апертура конденсора микроскопа соответствует числовой апертуре объектива; на это может влиять фактическая апертура диафрагмы конденсора и присутствие иммерсионных масел.

Регулировка. Необходимы точная настройка всех элементов оптической системы и надлежащая фокусировка. Фокусировка элементов осуществляется в соответствии с рекомендациями производителя микроскопа. Рекомендуются критическая настройка осей.

Освещение. Необходимым условием надлежащего освещения прибора является однородная и регулируемая интенсивность света во всем поле зрения; предпочтительным является использование настройки освещения по Келеру. Для окрашенных частиц выбирают цвет фильтров так, чтобы контролировать контрастность и детализацию изображения.

Визуальное определение параметров. Увеличение объектива и числовая апертура должны быть достаточно высокими для обеспечения необходимого разрешения изображений частиц испытуемого образца. Фактическое увеличение устанавливают, используя калиброванный объект-микрометр для калибровки окулярного микрометра. Для уменьшения погрешности выбирают такое увеличение, чтобы изображение частицы занимало не менее 10 делений окуляра. Каждый объектив должен быть откалиброван отдельно. Чтобы откалибровать шкалу окуляра, необходимо совместить шкалу микрометра и шкалу окуляра. Таким способом можно точно определить расстояние между делениями окуляра. Для определения параметров материалов с широким распределением размеров частиц может потребоваться использование нескольких различных увеличений.

Определение параметров фотографическими методами. Если размер частиц определяют фотографическими методами, то следует принять меры для того, чтобы объект был четко сфокусирован на плоскости фотоэмульсии. Фактическое увеличение определяют

путем фотографирования калиброванного объект-микрометра с использованием фотопленки с достаточной светочувствительностью, разрешающей способностью и контрастностью. Экспозиция и обработка фотографии испытуемого образца и фотографии, полученной для определения увеличения, должны быть одинаковыми. Видимый размер фотографического изображения зависит от экспозиции, проявления и печати фотографии, а также от разрешающей способности микроскопа.

Подготовка испытуемого образца. Среду, используемую для подготовки испытуемого образца, выбирают в зависимости от его физических свойств. Для обеспечения достаточно четкого изображения края образца требуется наличие достаточного, но не избыточного контраста между образцом и иммерсионной жидкостью. Частицы должны располагаться в одной плоскости и быть достаточно распределены надлежащим образом, чтобы различать отдельные анализируемые частицы. Кроме того, частицы должны быть репрезентативны относительно распределения их по размеру в испытуемом образце и не должны претерпевать изменений при подготовке образца для микроскопии. Должны быть предприняты меры, чтобы это важное требование было выполнено. При выборе среды для подготовки испытуемого образца необходимо учитывать его растворимость.

Характеристика кристалличности. Кристалличность испытуемого образца может быть определена для подтверждения соответствия требованию к кристалличности, указанному в частной фармакопейной статье на субстанцию. Если в частной фармакопейной статье не указано иное, несколько частиц образца помещают в минеральное масло на чистом предметном стекле и исследуют смесь с использованием поляризационного микроскопа: при вращении столика микроскопа наблюдают двойное лучепреломление (интерференционную окраску), а также зоны затухания.

Определение предельного размера частиц микроскопическим методом. Взвешивают подходящее количество испытуемого порошка (например, 10-100 мг) и суспендируют его в 10 мл подходящей среды, в которой порошок не растворяется, при необходимости прибавляя смачивающий агент. Гомогенность суспензии частиц может быть обеспечена путем суспендирования частиц в среде с аналогичной или сходной плотностью и соответствующим перемешиванием. Помещают часть полученной гомогенной суспензии в соответствующую счетную камеру и исследуют под микроскопом площадь, соответствующую не менее 10 мкг испытуемого порошка. Подсчитывают все частицы с максимальным размером, которые превышают установленный предел. Предельный размер и допустимое количество частиц, превышающих этот предел, определяют для каждого действующего (активного) вещества.

Характеристика размера частиц. Измерение размеров частиц отличается разной степенью сложности в зависимости от формы частиц, при этом количество исследуемых частиц должно быть достаточным для обеспечения приемлемого уровня неопределенности измеренных параметров. Дополнительная информация об измерении размера частиц, объеме (размере) образца и анализе данных приведена, например, в стандартах, эквивалентных международному стандарту ISO 9276. Для сферических частиц размер определяется диаметром. Для частиц неправильной формы существуют различные способы определения размера. Как правило, характеристика размеров частиц неправильной формы должна включать не только информацию о форме частицы, но и о типе измеренного диаметра. Некоторые наиболее распространенные измерения размеров частиц приведены на рисунке 2.1.9.13.-1.

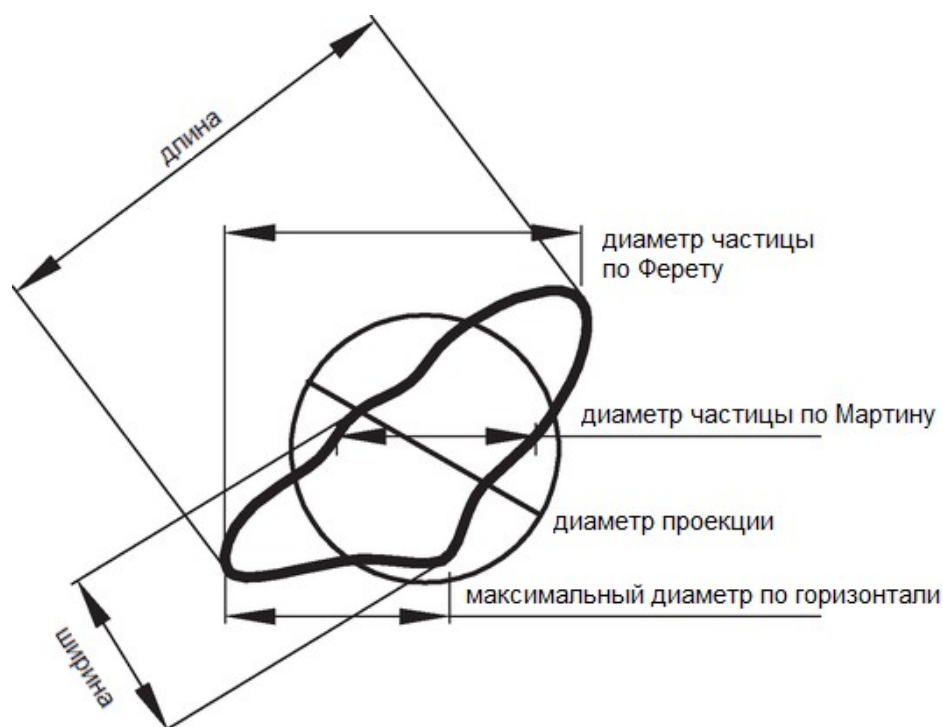


Рисунок 2.1.9.13.-1. – Наиболее часто используемые способы измерения размеров частиц

– *диаметр частицы по Ферету*: расстояние между воображаемыми параллельными линиями, касательными к частице, расположенной случайным образом, и перпендикулярными шкале окуляра;

– *диаметр частицы по Мартину*: диаметр частицы в точке, которая делит частицу, расположенную случайным образом, на две равные проекционные поверхности;

– *диаметр проекции*: диаметр окружности частицы, которая имеет такую же площадь проекции, что и частица;

– *длина частицы*: максимальный размер частицы, ориентированной параллельно шкале окуляра, от одного ее конца до другого;

– *ширина частицы*: максимальный размер частицы, измеренный под прямым углом к длине.

Форма частиц. Описание характеристики размеров частиц неправильной формы должно включать информацию и об их форме. Однородность порошка должна быть проверена при подходящем увеличении микроскопа. Ниже приведены некоторые наиболее распространенные характеристики, используемые для определения формы частиц (рисунок 2.1.9.13.-2).

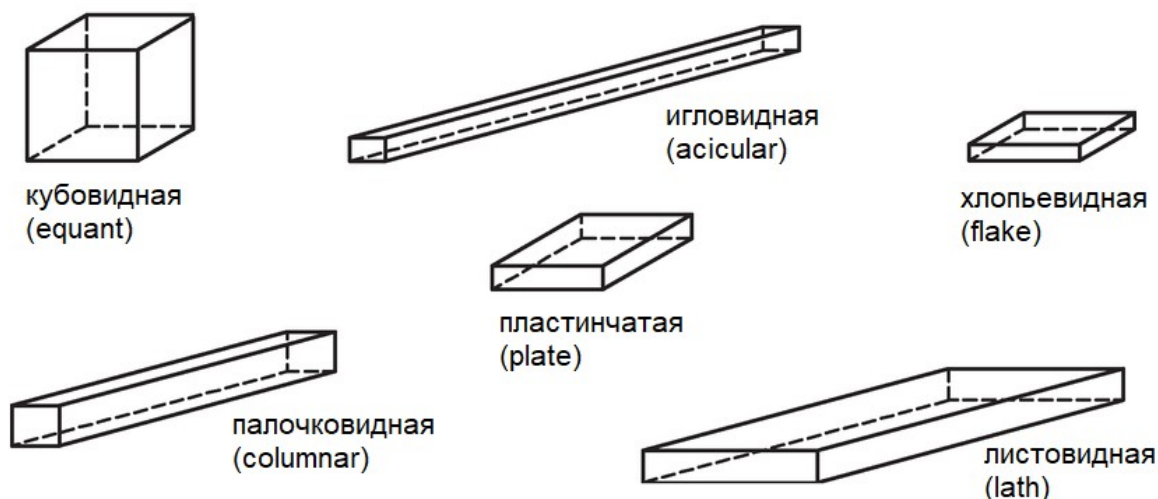


Рисунок 2.9.13.-2. – Наиболее используемые описания форм частиц

- *кубовидная (equant)*: частица со схожей длиной, шириной и толщиной, включая кубические и сферические частицы;
- *игловидная (acicular)*: тонкая игольчатая частица со схожей шириной и толщиной;
- *палочковидная (columnar)*: длинная тонкая частица, ширина и толщина которой превышают размеры игловидной частицы;
- *хлопьевидная (flake)*: тонкая плоская частица со схожей длиной и шириной;
- *пластинчатая (plate)*: плоская частица со схожей длиной и шириной, но с большей толщиной, чем хлопьевидная частица;
- *листовидная (lath)*: длинная, тонкая, с формой, похожей на лист, частица.

Общие положения. Частица, как правило, считается наименьшей дискретной единицей. Частица может быть жидкой или «полутвердой» каплями; отдельным кристаллом или поликристаллом; в аморфном виде или в виде кластера. Частицы могут быть объединенными (ассоциированными).

Степень их ассоциации может быть описана с помощью следующих терминов:

- *многослойная (lamellar)* – расположенные друг над другом пластинки;
- *агрегат (aggregate)* – масса слипшихся частиц;
- *агломерат (agglomerate)* – сплавленные или прочно сцепленные частицы;
- *конгломерат (conglomerate)* – смесь двух или более типов частиц;
- *сферолит (spherulite)* – радиальное скопление;
- *друзовая (drusy)* – частица, покрытая другими мелкими частицами.

Состояние частиц может быть описано следующими терминами:

- *по форме края (edges)*: угловатые, округлые, гладкие, острые, ломаные;
- *по оптическим свойствам (optical)*: окрашенные (используют соответствующие компенсирующие фильтры балансировки цвета), прозрачные, полупрозрачные, непрозрачные;

- *дефекты (defects)*: без включений, с включениями.

Характеристика поверхности может быть описана следующим образом:

- *растрескавшаяся (cracked)*: с частичными расколами, разломами или трещинами;
- *гладкая (smooth)*: свободная от неровностей, шероховатостей или выступов;
- *пористая (porous)*: наличие отверстий или ходов;
- *шероховатая (rough)*: бугристая, неоднородная, неровная;
- *изрытая (pitted)*: с маленькими выемками.