

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SILVA PAVLOVIČ

**MAGISTRSKA NALOGA**

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SILVA PAVLOVIČ

VPLIV PARAMETROV OBLIKE DELCEV NA PRIMERLJIVOST  
REZULTATOV VREDNOTENJA VELIKOSTI DELCEV Z  
LASERSKO DIFRAKCIJO IN SLIKOVNO ANALIZO

THE INFLUENCE OF PARTICLE SHAPE PARAMETERS ON  
THE COMPARABILITY OF THE RESULTS EVALUATION  
PARTICLE SIZE BY LASER DIFFRACTION AND IMAGE  
ANALYSIS

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratorijih tovarne zdravil Krka, d.d., v Službi za razvoj analitike, na Oddelku za strukturne analize pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja.

### **Zahvala**

Za strokovno vodstvo, pomoč in razumevanje pri izdelavi magistrske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Francu Vrečerju ter vodji Oddelka za strukturne analize Poloni Bukovec, mag. farm.

Zahvala gre tudi vsem ostalim sodelavcem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku tega dela. Za vso spodbudo in podporo pa se zahvaljujem tudi svojemu partnerju Boštjanu.

### **Izjava o avtorstvu**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja.

---

# Kazalo

<b>POVZETEK.....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. VELIKOST DELCEV .....	1
1.1.1. Določitev velikosti delcev.....	1
1.1.2. Podajanje rezultatov .....	3
1.1.3. Številčna in volumska porazdelitev velikosti delcev.....	5
1.1.4. Določitev velikosti delcev z metodo laserske difrakcije .....	6
1.2. OBLIKA DELCEV .....	8
1.2.1. Določitev oblike delcev z optičnim mikroskopom .....	8
1.2.2. Določitev oblike delcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	8
1.2.3. Določitev oblike delcev s slikovno analizo.....	9
1.2.4. Podajanje rezultatov .....	13
1.3. VPLIV OBLIKE DELCEV IN DRUGIH DEJAVNIKOV NA REZULTATE LASERSKE DIFRAKCIJE .....	13
1.3.1. Vpliv parametrov oblike.....	14
1.3.2. Vpliv orientacije delcev pri analizi z lasersko difrakcijo .....	14
1.3.3. Vpliv načina vrednotenja rezultatov in drugih pogojev analize.....	15
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>17</b>
3.1. MATERIALI.....	17
3.2. UPORABLJENE NAPRAVE .....	17
3.3. METODE VREDNOTENJA DELCEV .....	18
3.3.1. Priprava raztopin površinsko aktivne snovi.....	18
3.3.2. Določitev morfologije delcev z optičnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	18
3.3.3. Določitev velikosti delcev z lasersko difrakcijo .....	19
3.3.4. Določitev oblike in velikosti delcev s slikovno analizo .....	24
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1. MORFOLOGIJA UPORABLJENIH VZORCEV .....	30
4.2. KARAKTERIZACIJA DELCEV Z LASERSKO DIFRAKCIJO IN SLIKOVNO ANALIZO .....	34
4.2.1. Rezultati delcev paličastih oblik.....	34

---

4.2.2.	<i>Rezultati delcev v obliki piramid, ploščic/palčk, nepravilnih ploščic in nepravilnih aglomeratov</i>	38
4.2.3.	<i>Rezultati delcev kroglastih oblik</i> .....	45
<b>5.</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>53</b>

---

## Slike

Slika 1: Shematični prikaz nekaterih parametrov velikosti delcev (slika prirrejena po 6) .....	2
Slika 2: Prikazani koncepti ekvivalentnih krogel z različnimi tehnikami (slika prirrejena po 2) .....	2
Slika 3: Prikaz cilindra in krogle z enakim volumnom za paličasti delec (slika povzeta po 4) .....	3
Slika 4: Ponazoritev številčne vs. volumske PSD (slika povzeta po 1) .....	5
Slika 5: Shema inštrumenta LD (slika prirrejena 11) .....	6
Slika 6: Prikaz sestavnih delov avtomatskega mikroskopa IA (slika prirrejena po 22) .....	10
Slika 7: Prikazane različne vrednosti podolgovatosti (slika prirrejena po 18) .....	11
Slika 8: Shema določitve konveksnosti (slika prirrejena po 18) .....	11
Slika 9: Prikazane različne vrednosti konveksnosti (slika prirrejena po 18) .....	12
Slika 10: Prikazane različne vrednosti okroglosti (slika prirrejena po 17) .....	12
Slika 11: Prikazan izračun CED parametra (slika povzeta po 31) .....	13
Slika 12: Shematični prikaz modelnih ploščatih delcev – diskov v petih orientacijah v smeri opazovanja (najbolj ploščat delec pri 0°, pri 90° v čelni legi-se ne razlikuje od krogle) (slika povzeta po 42) .....	15
Slika 13: Shematični prikaz področja snemanja (»scan area«), ki ga predstavlja zeleni kvadrat približno na sredini objektnega stekla, katerega dimenzije x, y ter širina in višina so definirani na desni strani, posledično tudi skupen čas analize .....	25
Slika 14: Merilne žličke z različnimi volumni (1-19 mm <sup>3</sup> ) .....	26
Slika 15: Prikaz postopka polnjenja vzorca za meritev na suh način z SDU enoto: 1-zaprte aluminijastega nosilca SDU enote s spodnje strani z aluminijasto folijo, 2-fiksiranje folije z obročem iz umetne mase, 3 in 4-napolnitev vzorca v sredinsko odprtino nosilca, 5 in 6-zapiranje nosilca s folijo in zaščitno zaporko iz umetne mase, 7-namestitev nosilca na vrh disperzne celice .....	28
Slika 16: Prikazane slike za vzorce A, B, C, D posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno) .....	31
Slika 17: Prikazane slike za vzorca E in F posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno) .....	32
Slika 18: Prikazani slike za vzorec G posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno) .....	32
Slika 19: Prikazane slike za vzorce H, I, J in K posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno) .....	34
Slika 20: Volumska distribucija dobljena z LD vzorcev paličastih oblik (A-F) .....	36
Slika 21: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorcev paličastih oblik (A-F) .....	36
Slika 22: Volumska distribucija dobljena z LD vzorcev G, H, I, K .....	41
Slika 23: Volumska distribucija LD vzorca zmesi C in G in posameznih vzorcev .....	41
Slika 24: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorcev G, H, I, K .....	42
Slika 25: Diagram sipanja (»scattergram«) prikazuje klasifikacijo vzorca H po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih večjih delcev-piramid s CED od ~80-100µm, ki so zastopani v oranžno označenem področju .....	43
Slika 26: Diagram sipanja (»scattergram«) prikazuje klasifikacijo vzorca I po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih večjih v obliki ploščic (CED od ~80-100µm) in palčk (CED od ~70-100µm), ki so zastopani v oranžno označenem področju .....	44
Slika 27: Porazdelitvene krivulje parametra intenzitete svetlobe vzorcev G, H, I, K .....	44
Slika 28: »Scattergram« prikazuje klasifikacijo vzorca J po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih, največjih kroglastih aglomeratov (CED <sub>maks</sub> je 246 µm) .....	47
Slika 29: Volumska distribucija LD vzorca J z modelom »General purpose« in »Single mode« .....	47
Slika 30: Ujemanje izmerjene in izračunane meritve z izbranim »General purpose« modelom za vzorec J .....	47
Slika 31: Ujemanje izmerjene in izračunane meritve s preračunananim »Single mode« modelom za vzorec J .....	48
Slika 32: Volumska distribucija dobljena z LD vzorca J .....	48
Slika 33: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorca J .....	49

---

## Tabele

<i>Tabela 1: Disperzni mediji za suspenzije vzorcev pri analizi z optično mikroskopijo.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2: Pogoji za analizo z SEM .....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 3: Pogoji za analizo vzorcev A, B, C in D z LD.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 4: Pogoji za analizo vzorca G z LD.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 5: Pogoji za analizo vzorcev H, I, J in K z LD .....</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 6: Pogoji za analizo vzorca zmesi C in G z LD .....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 7: Pogoji za analizo standarda QAS z LD.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 8: Pogoji meritev za vzorce A, B, C, D.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 9: Pogoji meritev za vzorca E in F.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 10: Pogoji meritve SDU za vzorec E.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 11: Pogoji meritve SDU za vzorec G.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 12: Pogoji meritev za vzorce H, I, J in K .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 13: Pogoji meritve SDU za standard QAS 3002 .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 14: Povprečne vrednosti premerov (D[4,3] ,CED) in parametrov D10, D50, D90 volumske porazdelitve LD in IA za vzorce paličastih oblik (A-F).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 15: Širina volumske distribucije pri LD in IA za vzorce paličastih oblik (A-F).....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 16: Povprečne, min., maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovitost, konveksnost) parametrov IA za vzorce paličastih oblik (A-F).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 17: Povprečne vrednosti premerov (D[4,3] ,CED) in parametrov D10, D50, D90 volumske porazdelitve LD in IA za vzorce G, H, I, K in zmes vzorca C in G.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 18: Širina volumske distribucije pri LD in IA za vzorce G, H, I, K.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 19: Povprečne/maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovitost, konveksnost, intenziteta) parametrov IA za vzorce G, H, I, K .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 20: Povprečne vrednosti premerov (D[4,3] ,CED) in parametrov D10, D50, D90 volumske porazdelitve LD in IA za vzorec J.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 21: Vrednosti D10, D50, D90 volumske porazdelitve LD in IA za standard QAS 3002 in specifikacija za standard merjen z LD in IA.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 22: Širina volumske distribucije pri LD in IA vzorca J.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 23: Povprečne/maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovitost, konveksnost, intenziteta) parametrov IA za vzorec J .....</i>	<i>50</i>

---

## Povzetek

Velikost in porazdelitev velikosti delcev zdravilne učinkovine in pomožnih snovi je ena od ključnih fizikalnih lastnosti v številnih fazah razvoja zdravila, zato je izredno pomembno, da je izmerjena velikost delcev pravilna že od samega začetka razvoja zdravila, posebej v primeru razvoja trdnih farmacevtskih oblik.

Vrednotenje velikosti delcev je močno odvisno od oblike delcev, zato smo v okviru magistrske naloge ovrednotili vpliv poglavitnih parametrov oblike na rezultate velikosti in porazdelitve velikosti delcev pridobljenih na osnovi laserske difrakcije (LD). Metoda LD namreč temelji na predpostavki, da so merjeni delci kroglasti in nam poda premer hipotetične krogle, ki ima enak volumen kot izmerjeni delec. Ker pa imamo v farmacevtski industriji praviloma opravka z delci nekroglastih oblik, smo se v nalogi osredotočili na raziskovanje vpliva različnih oblik delcev (palčke, piramide, nepravilne ploščice, palčke/ploščice, krogle) na rezultate LD. Vsakemu posameznemu vzorcu smo določili velikost z LD ter parametre oblike (tudi velikost) s pomočjo slikovne analize (IA).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da so pričakovano največje razlike med rezultati LD in IA kažejo v primeru paličastih delcev (večmodalnost pri LD zaradi preferenčne orientacije palčk), ki so po obliki najbolj različni od idealne krogle. Torej bolj kot se oblika približuje obliki krogle, manjše so razlike med rezultati LD in IA, z izjemo primera delcev v obliki piramid, kjer smo pričakovali boljše ujemanje rezultatov LD in IA. Rezultate pridobljene z različnima tehnikama, smo razložili na osnovi razlik v načinu merjenja, saj gre pri LD za 3D analizo v pretočni celici in so posledično izmerjene vse dimenzije piramid, kar doprinese k višjim rezultatom LD. Pri IA pa gre za statično 2D analizo, pri kateri se delci preferenčno orientirajo pri nanosu vzorca na objektno steklo. Najmanjšo stopnjo napake pri obeh tehnikah smo pričakovano dosegli pri delcih kroglastih oblik. Rezultati večine parametrov LD so višji od rezultatov IA, kar pripisujemo dejstvu, da gre pri LD za volumsko podajanje rezultatov, kjer imajo veliki delci večji vpliv na končni rezultat.

Pridobljene ugotovitve rezultatov magistrskega dela so že znane in opisane v številni literaturi, vendar večina temelji na modelih ali standardih s točno določeno velikostjo in definirano obliko, zato so naše ugotovitve na realnih vzorcih nepravilnih oblik toliko bolj pomembne in uporabne pri vsakdanjem delu v laboratoriju, saj nam bodo v pomoč pri interpretaciji rezultatov pri vsakodnevnih analizah velikosti delcev tako v razvoju kot kontroli kakovosti.



---

**Ključne besede:** velikost delcev, porazdelitev velikosti delcev, laserska difrakcija, oblika delcev, slikovna analiza

**Key words:** particle size, particle size distribution, laser diffraction, particle shape, image analysis

## **Abstract**

Particle size and particle size distribution of the active substance and excipients is one of the key physical properties in a number of stages of drug development and it is extremely important that the particle size is correctly measured already in the early stages of product development, especially when we are developing solid pharmaceutical forms.

Evaluation of the particle size is strongly dependent on the shape of the particles, so in the context of this master's thesis we have evaluated the influence of the main particle shape parameters on the results of particle size and particle size distribution obtained by laser diffraction (LD).

LD method is based on the assumption that all measured particles are spherical and provides us with the diameter of a hypothetical sphere having the same volume as the measured particle. In the pharmaceutical industry we are usually dealing with non-spherical particles, however we have focused on the research of different particle shapes (rods, pyramids, irregular plates, rods/plates, spheres) and their influence on the results of LD. We have determined particle size by LD and shape parameters (and size) by image analysis (IA) for each individual sample.

Based on the results we have come to the conclusion that the expected maximum difference between the results of the LD and IA is expressed in the case of the rod-like particles (multimodality in the LD because of the preferential orientation of rod-like particles), which differ the most from the shape of an ideal sphere. Therefore, more the shape of a sample is similar to the sphere, smaller the difference between the results of LD and IA, with the exception of pyramids, where we expect better comparability between LD and IA results. The results obtained by different techniques are explained on the basis of differences in the method of measurement. Since LD is a 3D analysis and the instrument measures all directions of the particles in the flow cell whereas IA is a static 2D analysis, where the particles orient themselves in one preferred direction when applied on a glass slide, the results even by LD are higher and show broader distribution. The minimum rate of error in both techniques

---

achieved in the case of the spherical particles as expected. The results of the majority of LD parameters were found to be higher than the results provided by IA, which we have attributed to the fact that result of LD are based on volume, where large particles have greater influence on the final result.

Similar conclusions are already known and described in many literatures, but most are based on models or standards with the precisely defined size and shape. Our research on the real particle samples of with irregular shapes will be useful in everyday work in the laboratory, because they will help interpreting the results of particle size on a daily basis in both pharmaceutical development and also the quality control laboratories.

---

## Seznam okrajšav

<b><i>PSD</i></b>	Porazdelitev velikosti delcev (»Particle size distribution«)
<b><i>LD</i></b>	Laserska difrakcija (»Laser diffraction«)
<b><i>IA</i></b>	Slikovna analiza (»Image analysis«)
<b><i>2D</i></b>	Dvodimenzionalna slika delcev
<b><i>3D</i></b>	Tridimenzionalna slika delcev
<b><i>TH</i></b>	Meja detekcije (»Treshold limit«)
<b><i>SDU</i></b>	Disperzna enota za suh način merjenja (»Sample dispersion unit«)
<b><i>SEM</i></b>	Vrstični elektronski mikroskop (»Scanning electron microscopy«)
<b><i>UZ</i></b>	Ultrazvočna obdelava
<b><i>AR</i></b>	Razmerje stranic: širina/dolžina (»Aspect ratio«)
<b><i>CED</i></b>	Ekvivalentni premer kroga (»Circle Equivalent Diameter«)
<b><i>BG</i></b>	Ozadje (»Background«)
<b><i>RI</i></b>	Refrakcijski indeks ali lomni količnik
<b><i>A</i></b>	Absorbcija ali navidezni refrakcijski indeks snovi iz katere so delci vzorca
<b><i>rpm</i></b>	Obratov na minuto (»Rounds per minute«)
<b><i>QAS</i></b>	»Quality Audit Standard«

## 1. UVOD

### *1.1. VELIKOST DELCEV*

Velikost delcev je v farmacevtski industriji ena izmed najpomembnejših fizikalnih lastnosti prahov in je pogosto kritičen parameter v številnih fazah razvoja in proizvodnje farmacevtskih izdelkov, saj ima lahko odločilen vpliv na tehnologijo izdelave (npr. pretočne lastnosti), stabilnost zdravilnih učinkovin in izdelkov, enakomernost vsebnosti ter hitrost raztapljanja in posledično biološko učinkovitost predvsem trdnih farmacevtskih oblik.

Merjenje velikosti in porazdelitve velikosti delcev ter razumevanje njihovega vpliva na lastnosti končnih izdelkov je lahko ključnega pomena tudi na številnih drugih področjih in ni povezana samo z izzivi v farmacevtski industriji. Od velikosti delcev je namreč lahko odvisen npr. videz in sijaj barve, aroma kakava v prahu, odbojnost avtocestnih barv, stopnja hidratacije in trdnost cementa, itd (1).

#### 1.1.1. Določitev velikosti delcev

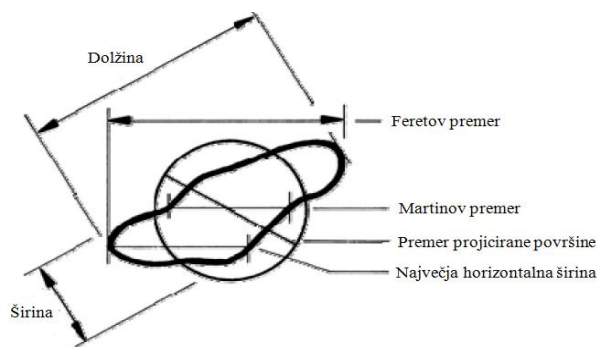
Ker so delci tridimenzionalnih oblik, je njihovo velikost zelo težko opisati z enim podatkom oz. parametrom. V primeru kroglastih oblik delcev, kjer so vse dimenzije v vseh prostorskih smereh identične pa lahko velikost opišemo samo z navedbo enega podatka, t.j. premera. V realnosti imamo opravka predvsem z nepravilnimi oblikami delcev, za katere obstaja več načinov podajanja njihove velikosti, zato je potrebno vedno navesti tudi kateri parameter smo merili in s katero analizo tehniko. Za zagotovitev popolnega opisa realnih delcev je potrebno podati vsaj tri parametre (dolžina, debelina/širina in višina). Kljub opaznemu velikemu razvoju na področju analiznih tehnik za vrednotenje velikosti delcev, žal še vedno nimamo na razpolago univerzalne analizne tehnike, ki bi lahko podala tako natančen opis velikosti delca, t.j. vse tri parametre z realnimi vrednostmi (1, 2, 3, 4).

Klasične analizne tehnike za določevanje porazdelitve velikosti delcev se med seboj razlikujejo tako v merjenih parametrih (dolžina, volumen, masa,..), kot tudi načinu prikaza rezultatov (številčna, volumska oz. masna porazdelitev,..) (3, 5).

V primeru dvodimenzionalne projekcije (mikroskopska analiza) lahko izmerimo (Slika 1):

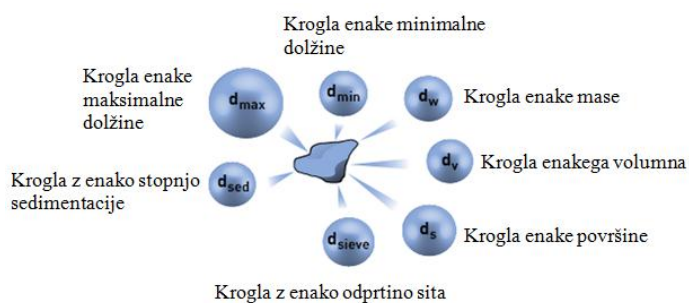
- Feretov premer – razdalja med imaginarnima paralelnima tangentama na naključno orientiran delec in pravokotno na okularno skalo,

- Martinov premer – premer delca na mestu, ki deli naključno orientiran delce na dve enaki projicirani površini,
- Premer projicirane površine («Projected area diameter») – premer kroga, ki ima enako projicirano površino kot izmerjen delec,
- Dolžino – najdaljša razdalja med dvema koncema delca, orientiranega paralelno z okularno skalo,
- Širino – najdaljša razdalja delca, merjenega pravokotno na dolžino (6, 7).



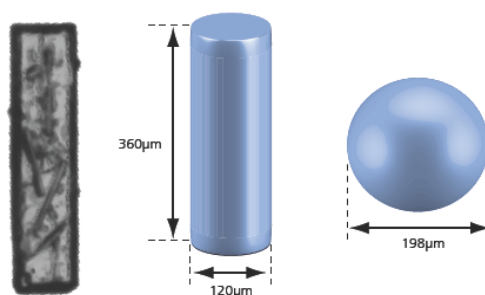
Slika 1: Shematični prikaz nekaterih parametrov velikosti delcev (slika prirejena po 6)

Večina analiznih metod za določevanje velikosti delcev temelji na poenostavljenem modelu, ki predvideva, da so merjeni delci kroglasti. Velikost delca je v tem primeru določena s premerom ekvivalentne krogle, ki ima enako lastnost (volumen, maso, površino,...) kot dejanski merjeni delec. Zavedati se moramo, da različne tehnike merjenja uporabljajo različne modele ekvivalentnih krogel, zato se tudi rezultati med tehnikami razlikujejo. Slika 2 prikazuje način kako aproksimacija oz. približek ekvivalentne krogle deluje za delec nepravilne oblike, kjer je premer odvisen od izmerjenega parametra z izbrano tehniko. Aproksimacija ekvivalentnih krogel prikazanih z različnimi tehnikami potrjuje, da standardna velikost ne obstaja, temveč je rezultat vedno relativen, odvisen od izbrane analizne metode (2, 8).



Slika 2: Prikazani koncepti ekvivalentnih krogel z različnimi tehnikami (slika prirejena po 2)

Omenjeni koncept ekvivalentne krogle za analizo paličastih delcev sicer ni najbolj primeren, primernejša bi bila primerna aproksimacija na cilindrične delce, kar prikazuje slika 3. V primeru paličastega delca ima po volumnu enaka krogla volumski premer  $198\mu\text{m}$ , kar seveda ni ravno natančen opis prave dimenzije. Lahko pa delec opišemo tudi kot cilindar z enakim volumnom, ki ima dolžino  $360\mu\text{m}$  in širino  $120\mu\text{m}$ . Slednji pristop bolj natančno opiše velikost delca in zagotavlja bistveno boljše razumevanje obnašanja takšnih delcev npr. med postopki kristalizacije in izolacije, tehnološkimi procesi izdelave trdnih farmacevtskih oblik (FO) oz. rokovanjem (3).



Slika 3: Prikaz cilindra in krogle z enakim volumnom za paličasti delec (slika povzeta po 4)

### 1.1.2. Podajanje rezultatov

Delci so v nekem materialu običajno prisotni v večjih populacijah, zato je smotrno podati povprečno velikost (premer) in opisati porazdelitev velikosti okoli tega povprečja, torej ostale parametre porazdelitve velikosti delcev ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ , širina distribucije).

Porazdelitev velikosti delcev (PSD) je lahko predstavljena na različne načine in je odvisna od principa merjenja (tehnike), ki se uporablja. Izračuna se lahko na osnovi številnih modelov, najbolj pogosti sta številčna in volumska/masna porazdelitev.

Porazdelitev je statistično ovrednotena z naslednjimi parametri:

- Povprečje (»mean«) – povprečna velikost populacije
- Sredina (»mediana«) – velikost, kjer je 50% populacije nad/pod to vrednostjo
- Najpogostejša vrednost ali najvišja točka frekvenčne porazdelitve (»mode«) (3, 8).

Predvsem pri volumski porazdelitvi velikosti delcev, ki je značilna za lasersko difrakcijo, pogosto izražamo porazdelitev velikosti delcev v deležih od celotnega volumna vzorca:

- $D_{10}$  ali  $D_{v0,1}$  - 10% delcev manjših od določene vrednosti
- $D_{50}$  ali  $D_{v0,5}$  (»mediana«) - 50% populacije nad/pod določeno vrednostjo
- $D_{90}$  ali  $D_{v0,9}$  - 90% delcev manjših od določene vrednosti

Znanih je več različnih načinov podajanja povprečnih velikosti delcev (»mean«), ki so odvisne od uporabljenega načina merjenja delcev oz. analizne tehnike. Najpogosteje so v literaturi uporabljeni naslednji načini podajanja povprečne velikosti delcev, če si predstavljamo sistem s 3 delci (kroglicami) katerih premeri znašajo 1, 2 in 3 enote (9):

- **D[1,0] – številčni povprečni premer** (»number length mean«): imenovan tudi aritmetična sredina, ki je pomemben pri aplikacijah štetja delcev (npr. slikovna analiza). Izračunamo ga iz vsote vseh izmerjenih premerov, ki jo delimo s celotnim številom vrednotenih delcev v preiskovanem vzorcu - enačba 1:

$$\frac{1+2+3}{3} = 2.00 = \frac{\sum d}{n} \quad /1/$$

n...število delcev

d...premer

- **D[3,2] – površinski povprečni premer** (»surface area moment mean«): najbolj relevanten npr. pri vrednotenju raztapljanja zdravilnih učinkovin iz trdnih FO, ki je odvisno od specifične površine delcev in najbolj občutljiv na prisotnost finih delcev v vzorcu. Izračuna se tako, da vsoto premerov na tretjo potenco delimo z vsoto premerov na drugo potenco - enačba 2:

$$D[3,2] = \frac{1^3+2^3+3^3}{1^2+2^2+3^2} = 2.57 = \frac{\sum d^3}{\sum d^2} \quad /2/$$

d...premer

- **D[4,3] – volumski povprečni premer delcev** (»volume moment mean«): najbolj občutljiv na prisotnost velikih delcev. Izračuna se tako, da vsoto premerov na četrto potenco delimo z vsoto premerov na tretjo in drugo potenco – enačba 3:

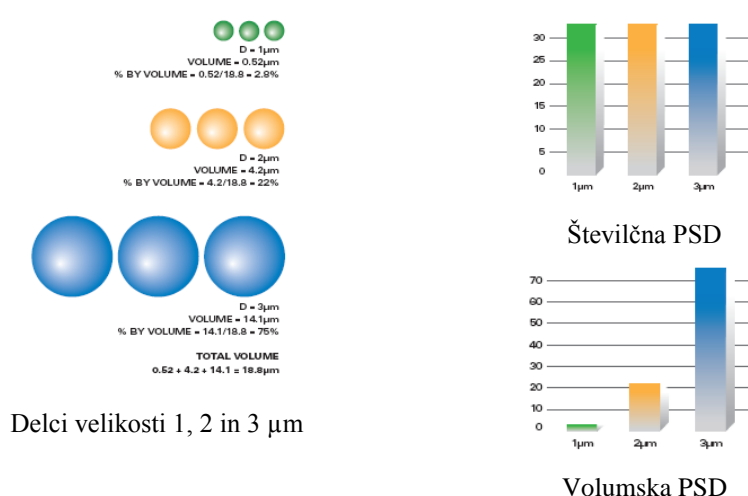
$$D[4,3] = \frac{1^4+2^4+3^4}{1^3+2^2+3^3} = 2.72 = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad /3/$$

d... premer

Na vrednost površinskega in volumskega povprečnega premera ne vpliva dejansko število analiziranih delcev. Gre le za center gostote porazdelitve posameznih distribucij, ki nakazuje okrog katere centralne točke neke frekvence (t.j. površine ali volumna) se bodo vrednosti gibale. Podrobna razlaga povprečij (enačb) je opisana v literaturi, navedeni pod 8 in 9.

### 1.1.3. Številčna in volumska porazdelitev velikosti delcev

Številčna porazdelitev velikosti delcev je značilna za metode pri katerih določimo velikost na osnovi štetja, kot je npr. slikovna analiza, pri čemer ima vsak delec enak prispevek k porazdelitvi ne glede na njegovo velikost, pri tehnikah, ki podajajo volumsko porazdelitev pa temu ni tako. Na sliki 4 je za ponazoritev razlik med številčno in volumsko PSD prikazanih devet kroglastih delcev, od katerih so po trije velikosti 1 $\mu\text{m}$ , 2 $\mu\text{m}$  in 3 $\mu\text{m}$ . Pri številčni PSD je razvidno, da vsaka velikost prispeva tretjino celotne PSD. Če pa te iste rezultate pretvorimo v volumsko distribucijo (LD) bodo 75% celotnega volumna predstavljali 3 $\mu\text{m}$  delci in manj kot 3% 1 $\mu\text{m}$  delci. Torej pri volumski porazdelitvi glavnino porazdelitve predstavljajo največji delci (1).



Slika 4: Ponazoritev številčne vs. volumske PSD (slika povzeta po 1)

- **Pretvorba rezultatov med številčno in volumsko porazdelitvijo**

Rezultati iz sistema, ki temelji na številčnem modelu, kot je slikovna analiza, konstruirajo številčno PSD, rezultati LD pa preko optično matematičnega modela volumsko PSD. Na osnovi matematičnih modelov je mogoča pretvorba rezultatov iz številčne v volumsko porazdelitev in obratno. Vendar pri tem prihaja do napak, in sicer so te največje pri pretvorbi iz številčne v volumsko porazdelitev, saj se premer delcev spremeni na tretjo potenco.

Na primer, če merimo z LD fizikalno-kemijsko stabilen vzorec, ki se ne raztaplja, nabreka ali aglomerira, v disperznem mediju pretočne celice, je ponovljivost povprečnega premera  $\pm 0,5\%$ . Če ta premer pretvorimo v številčni premer je napaka tega premera kubični koren vrednosti 0,5%. V praksi to pomeni, da ima npr. kadar uporabljamo mikroskopsko analizo za

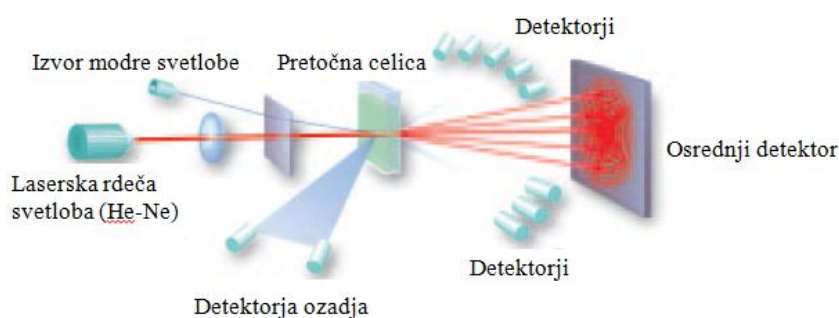


določitev volumske PSD, neupoštevanje enega  $10\mu\text{m}$  delca enak učinek kot neupoštevanje tisoč  $1\mu\text{m}$  delcev (10).

#### 1.1.4. Določitev velikosti delcev z metodo laserske difrakcije

Laserska difrakcija (LD) je danes široko uporabljena metoda za določevanje velikosti delcev in omogoča merjenje velikosti delcev v različnih fizikalnih stanjih (praški, pršila, suspenzije, emulzije) odvisno od uporabljene opreme. Primerna je za merjenje širokega razpona velikosti delcev ( $0,02\text{-}3500\mu\text{m}$ ) in majhnih količin vzorca (nekaj mg do g). Analize so hitre in dajejo ponovljive rezultate. Inštrumenti omogočajo merjenje samih praškastih substanc v toku zraka («dry» metoda) ali substanc dispergiranih v vodnih in nevodnih medijih oz. topilih («wet» metoda). Sistem klasičnega inštrumenta sestavlja (Slika 5):

- laser kot izvor monokromatske svetlobe (rdeča He-Ne svetloba z  $\lambda = 638\text{ nm}$  za delce  $> 1\mu\text{m}$  in modra svetloba z  $\lambda = 466\text{ nm}$  za delce manjše od  $1\mu\text{m}$ )
- pretočna celica (enota za pripravo vzorca), kjer skozi vzorec potuje laserski žarek
- sistem optike ter detektor - ploščica iz svetlobno občutljivega silicija na kateri je več manjših detektorjev (optimalno od 16 do 32), ki pretvori svetlobni signal v električnega. Z večjim številom detektorjev, se natančnost ne poveča.
- osrednji (centralni) detektor, ki na podlagi razlike med izmerjeno največjo intenziteto laserskega žarka in intenziteto svetlobe, ki so jo sipali delci, izračuna optično koncentracijo delcev («obscuration») (11).



Slika 5: Shema inštrumenta LD (slika prirejena 11)

- **Osnove delovanja instrumentov laserske difrakcije**

Osnovni princip merjenja velikosti delcev z LD temelji na predpostavki, da so delci kroglasti. Pri LD se vpadni žarek valovne dolžine  $638\text{nm}$  (rdeča svetloba) oz.  $466\text{nm}$  (modra svetloba) na površini delca razprši pod različnimi koti. Pri večjih delcih je kot sipanja manjši, medtem ko je pri manjših laserska svetloba bolj razpršena (večji koti, manjša intenziteta svetlobe) (12). Sipanje svetlobe pri nižji valovni dolžini je bolj intenzivno kot pri višji, saj je intenziteta sipane svetlobe premo sorazmerna s šesto potenco velikosti delca in obratno sorazmerna s

četrto potenco valovne dolžine (13). Razpršeni vzorci svetlobe, ki jih zaznajo detektorji se nato preko optično-matematičnega modela pretvorijo v volumsko porazdelitev (12).

Novejši inštrumenti so zasnovani na Mie teoriji, ki v primerjavi s starejšo Fraunhoferjevo teorijo bolj natančno opisuje interakcijo med elektromagnetnim valovanjem in snovjo. Ta predpostavlja, da so delci kroglasti, homogeni in imajo premer približno enak valovni dolžini rdeče in modre svetlobe, lahko so transparentni ali neprozorni. Pri tej metodi je potrebno poznati optične lastnosti medija in merjene substance, saj je od njih odvisna intenziteta razpršene laserske svetlobe. Mie teorija opisuje tudi kako absorpcijska lastnost delca vpliva na količino svetlobe, ki prehaja skozi delec, se bodisi absorbira ali odbija od njega. Inštrumenti, ki delujejo na osnovi algoritma temelječega na Mie teoriji, so primerni za karakterizacijo vseh delcev znotraj merilnega območja. Starejša Fraunhoferjeva teorija, ki je primerna za merjenje delcev s premerom nad 50 $\mu\text{m}$  pa predpostavlja, da so delci večji od valovne dolžine svetlobe ter da so neprozorni diski, kjer ni potrebno poznati lomnih količnikov. Danes sta sicer oba modela v uporabi, vendar ISO standard (ISO13320) priznava le metode, ki delujejo na osnovi algoritmov temelječih na Mie teoriji (14).

Kot vsaka druga analizna tehnika pa ima tudi LD svoje omejitve. Pri analizi velikosti in porazdelitve velikosti delcev je za zagotovitev kakovostnih rezultatov zelo pomembno, da je vzorčenje vzorca za analizo reprezentativno, kar je opazno predvsem pri vzorcih, ki vsebujejo delce večje od 70 mikronov. Večji delci namreč zavzamejo večji volumen v primerjavi z manjšimi (en 100 $\mu\text{m}$  delec zavzame enak volumen kot milijon 1 $\mu\text{m}$  delcev in tako poda enak odziv na detektorju), kar ima lahko za posledico velika odstopanja v rezultatih. (15).

Na končni, točen rezultat pa odločilno vpliva tudi ustrezna izbira disperznega medija in koncentracije vzorca oz. merjenih trdnih delcev v disperznem mediju. Pri t.i. »mokrih« metodah je ključna izbira optimalnega medija/topila, v katerem delci dispergirane substance ne smejo med analizo spreminjati svoje primarne oblike (prekristalizacija, raztapljanje, obarjanje, idr.). Pomembna je tudi koncentracija vzorca, ki ne sme biti previsoka, da med meritvijo ne pride do mnogoternega razprševanja svetlobe (»multiple scattering«), kar ima za posledico lažen pomik rezultatov k nižjim vrednostim (16).

Merilni instrumenti temelječi na LD različnih proizvajalcev in tudi inštrumenti istega proizvajalca različnih generacij se med seboj razlikujejo predvsem v samih pretvorbenih algoritmih ter konfiguracijah detektorjev. Prav te razlike pa lahko bistveno vplivajo na končni rezultat. Razlike pa se kažejo tudi v primerjavi glede na rezultate metod, ki temeljijo na drugih principih npr. Coulterjev števec, sejalna analiza, idr. (17).

## **1.2. OBLIKA DELCEV**

Kot kritičen parameter je pri razvoju in proizvodnji farmacevtskih izdelkov širše priznana predvsem velikost delcev, vendar je v zadnjih letih, s prihodom hitrih analiznih tehnik z zanesljivejšo tehnologijo vrednotenja, tudi oblika delcev prevzela enakovreden pomen.

V določenih situacijah nam zgolj analiza velikosti delcev sicer zadostuje, vendar nam pogosto poznavanje samo tega parametra ni dovolj in je potrebna še natančnejša analiza definicija oblike delcev. Zaradi različne oblike se material lahko povsem drugače obnaša med tehnološkim procesom (npr. različna pretočnost, stisljivost, abrazivne karakteristike, itd.) ali raztapljanjem zaradi različne pogostnosti izkazovanja bolj ali manj polarnih kristalnih ploskev (18).

Pravilno nekroglasto obliko delcev lahko podamo po USP definiciji z izrazi kot so: stebri, kosmiči, ploščice, letve. Posamezne pravilne oblike so kot take redko prisotne v realnih vzorcih, pogosteje se pojavljajo npr. v kompleksnih strukturah (v obliki agregatov, aglomeratov, konglomeratov, sferulitov), zato je pri opisu realnih vzorcev potrebno navesti čim več parametrov oblike. Lahko jih opišemo tudi po videzu robov (oglati, zaokroženi, gladki, ostri) in površine (razpokana, gladka, porozna, groba) (4), saj so vse točke na delcih odgovorne za njihovo obnašanje predvsem tekom tehnoloških faz razvoja zdravila.

Videz oz. obliko in tudi velikost delcev lahko določimo z različnimi tehnikami mikroskopije (optični mikroskop, vrstični elektronski mikroskop, avtomatski mikroskop – slikovna analiza).

### **1.2.1. Določitev oblike delcev z optičnim mikroskopom**

Optična mikroskopija je zelo uporabna, hitra ter relativno cenena metoda in je primerna za karakterizacijo delcev večjih od 1  $\mu\text{m}$ . Spodnjo mejo določa valovna dolžina svetlobe, zgornja meja pa je manj definirana (6). Praktično se uporablja vedno vzporedno z metodo laserske difrakcije, saj nam omogoča razlikovanje med različnimi oblikami delcev ter med primarnimi delci in morebitno prisotnimi aglomerati v analiziranem vzorcu. Metoda laserske difrakcije namreč teh razlik ne zazna.

### **1.2.2. Določitev oblike delcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom**

Vse vrste elektronskih mikroskopov za opazovanje strukture in sestave vzorca uporabljajo fokusiran elektronski snop. Delovanje elektronskega mikroskopa lahko poenostavljeno opišemo na naslednji način:

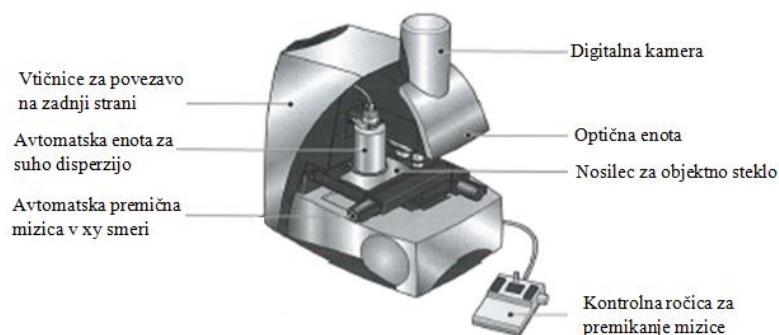
- iz vira elektronov (katode) se elektroni zaradi velike razlike električnega potenciala med katodo in anodo pospešijo proti vzorcu
- za opazovanje vzorca potrebujemo koherenten elektronski snop majhnega preseka, ki ga oblikujemo z uporabo magnetnih leč
- med vpadnim elektronskim snopom in atomi vzorca pride do številnih fizikalnih pojavov, ki jih s pomočjo detektorjev prevedemo v sliko, pri čemer dobimo informacije o topografiji, morfologiji, kvalitativni in kvantitativni elementni sestavi (prisotni atomi in njihov delež v vzorcu) (19).

Vzorci za SEM analizo ne moremo analizirati direktno, ampak jih je potrebno pripraviti. Priprava običajno poteka tako, da na aluminijasti nosilec nalepimo dvostransko prevodno karbonsko folijo, ki ima tako kot nosilec lastnost elektrostatične nevtralnosti. Skupaj z nosilcem vzorca predstavljata prevodnik v komori, kar onemogoča ustvarjanje električnega naboja na površini vzorca. Pomembno je, da je vzorec nanešen v tanki plasti, saj s tem preprečimo generiranje električnega naboja, ki preprečuje izdelavo ustrezno kakovostnih mikroskopskih slik. Električnemu naboju na površini delcev vzorca se sicer lahko izognemo z napraševanjem vzorcev s prevodnimi snovmi (npr. ogljik, zlato, platina). V primeru analiz z emitirano rentgensko svetlobo, kjer moramo uporabiti višje napetosti (pri tem se v krajšem času procesira več signala o elementni sestavi površine vzorca), pa je še vedno potrebno predhodno napajanje vzorcev (20).

### 1.2.3. Določitev oblike delcev s slikovno analizo

Obliko delcev lahko določamo tudi z uporabo slikovne analize (IA), pri čemer iz dvodimenzionalne projekcije delca, lahko pridobimo več različnih parametrov njegove oblike. Novejša, avtomatizirana slikovna analiza omogoča hitre, visoko kakovostne informacije o obliki in tudi velikosti vsakega posameznega delca v preiskovanem vzorcu z minimalnim poseganjem uporabnika ter zagotavlja zanesljive, ponovljive in statistično obdelane rezultate že v nekaj minutah (21).

Nekateri inštrumenti omogočajo popolnoma avtomatizirano disperzijo vzorca na suh način, s pomočjo stisnjenega zraka, kar izboljša ponovljivost rezultatov v primerjavi s klasično pripravo vzorca (vzorec suspendiran v primernem tekočem mediju in v tankem sloju nanešen na objektno steklo) in omogoča tudi varnejše ravnanje s toksičnimi substancami, saj je dispergiranje delcev v zraku izvedeno v zaprti komori. Same meritve se izvajajo avtomatsko z video pogledom (tudi na večjem dodatnem zaslonu), pri čemer lahko spremljamo meritev »v živo«. Primer sestavnih delov avtomatskega mikroskopa oz. slikovnega analizatorja (IA) je prikazan na sliki 6 (22).



Slika 6: Prikaz sestavnih delov avtomatskega mikroskopa IA (slika prirejena po 22)

Pridobljene podatke lahko obdelamo in prikažemo na več različnih načinov. Za vsak posneti delec imamo na razpolago več različnih parametrov za obliko in velikost. Na podlagi tega lahko hitro in enostavno ocenimo npr. razliko ali podobnosti med dobrimi in slabimi serijami neke surovine (23, 24, 25) v času različnih tehnoloških faz izdelave (npr. med kristalizacijo, sušenjem, mletjem,...) (22).

Tako kot pri LD, je tudi pri IA bistvenega pomena reprezentativno vzorčenje in optimalna disperzija vzorca pred analizo, s čimer zagotovimo ponovljivost rezultatov. Izbiramo lahko med suho disperzijo z uporabo avtomatske disperzne enote ali bolj klasično metodo, kjer vzorec dispergiramo v različnih tekočih medijih (26). Pomembno je tudi, da za merjeno območje velikosti delcev izberemo primerno povečavo, kjer so delci ustrezno fokusirani in da je določena optimalna meja detekcije (»threshold limit« - TH) (26, 27).

Najbolj pogosto uporabljeni parametri za vrednotenje oblike so podolgovatost, konveksnost, in okroglost, ki imajo vrednosti v območju od 0-1 (27, 28). Ostali parametri, ki so tudi lahko pokazatelji razlik med delci, so intenziteta oz. transparentnost delcev, trdnost (»solidity«) delcev, ki izraža razmerje med površino delca in površino delca z izobčeno (navidezno) površino oz. videz površine, razmerje med širino in dolžino delca (»aspect ratio« - AR). Določevanje AR so strokovnjaki navajali že pred razvojem sofisticirane programske opreme za slikovno analizo (22), med drugim je AR mogoče določiti tudi na podlagi rezultatov velikosti delcev in njihove specifične površine (npr. z BET metodo) (29).

- **Parametri slikovne analize**

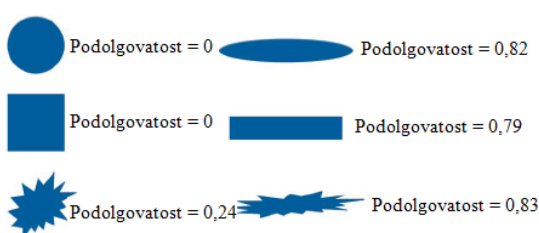
#### Podolgovatost delca

Podolgovatost (»elongation«) delca je merilo razmerja med dolžino in širino delca in zajema vrednosti od 0-1. In sicer simetrične oblike, kot sta krog ali kvadrat, imajo vrednost 0 (vse stranice enake), npr. iglice pa imajo vrednosti bližje 1. Dejansko se izračuna podolgovatost iz

težišče delca, ki opredeli natančno lokacijo daljše in krajše osi. Glavna oz. daljša os je opredeljena kot os z minimalno rotacijske energijo, krajša os pa je tista, ki tvori pravi kot glede na glavno os (18). Definicija podolgovatosti je analogna razmerju med širino in dolžino delca in se izračuna po enačbi 4 (31):

$$\text{Podolgovatost} = 1 - AR \text{ ali } 1 - \frac{\text{širina}}{\text{dolžina delca}} \quad /4/$$

Iz slike 7 je razvidno, da je podolgovatost bolj odvisna od oblike kot od hrapavosti površine, saj imata bodeča elipsa in elipsa z gladko površino enako vrednost parametra podolgovatosti (18).



Slika 7: Prikazane različne vrednosti podolgovatosti (slika prirejena po 18)

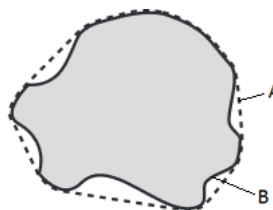
### Konveksnost delca

Konveksnost («convexity») delca je merilo za hrapavost robov delca, ki ga določimo tako, da orisan obseg delca delimo z dejanskim obsegom, kar je razvidno iz slike 8 in enačbe 5 (18):

$$\text{Konveksnost} = A / B \quad /5/$$

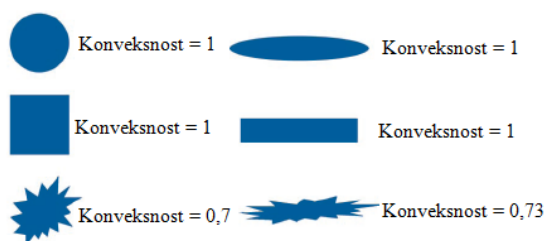
A...orisan obseg delca

B...dejanski obseg delca



Slika 8: Shema določitve konveksnosti (slika prirejena po 18)

Vrednosti se gibljejo od 0-1, vrednost pod 1 imajo nazobčane ali nepravilne oblike, oblike z ravnimi robovi kot npr. krog, kvadrat, elipsa pa 1. Za razliko od podolgovatosti, ki je odvisna od oblike oz. simetrije delca, je konveksnost ali fraktalna dimenzija (32, 33) pogojena s hrapavostjo površine delca, torej s fraktalnimi lastnostmi površine delcev, saj ima gladka palčka enako vrednost kot gladek krog, kvadrat ali elipsa (Slika 9) (18).



Slika 9: Prikazane različne vrednosti konveksnosti (slika prirejena po 18)

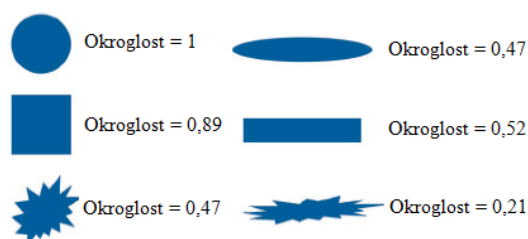
### Okroglost delca

Okroglost («circularity») delca je dobro merilo za odstopanje od oblike popolnega kroga, je razmerje med obsegom kroga z enako površino kot jo ima merjen delec in obsegom dejanske slike delca. Popolni krog ima vrednost 1, nazobčan oz. nepravilen delec oz. njegova slika pa vrednost proti 0. Parameter je občutljiv na celotno obliko in hrapavost površine delca, kar je prikazano na sliki 10 (18). Okroglost se izračuna po naslednji enačbi 6 (22):

$$\text{Okroglost} = 4\pi A/P^2 \quad /6/$$

A...površina delca

P...obseg delca

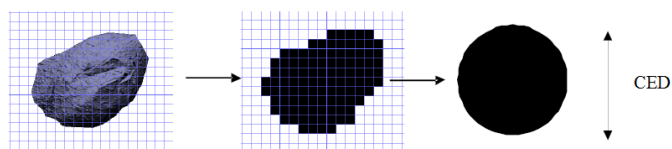


Slika 10: Prikazane različne vrednosti okroglosti (slika prirejena po 17)

Na podlagi parametra okroglosti so npr. pri proizvodnji sintetičnega vlakna olefina (polimer, znan tudi kot polipropilen ali polietilen) v končni kontroli kakovosti spremljali ustreznost samega procesa, ki je pogojena z določeno obliko in tudi velikostjo katalizatorja (30).

### Ekvivalentni premer kroga

Ekvivalentni premer kroga (CED) je premer kroga z enako površino kot jo ima dvodimenzionalna (2D) slika delca, kar je ponazorjeno prikazano na sliki 11, kjer je tridimenzionalni delec (3D) posnet kot 2D slika in pretvorjen v krog z enako površino kot 2D slika originalnega delca in iz tega je potem določen CED (31).



Slika 11: Prikazan izračun CED parametra (slika povzeta po 31)

Le na podlagi parametra CED so v podjetju Malvern ločili ustrezen vzorec, sestavljen iz kroglic z ozko distribucijo velikosti v območju  $1\mu\text{m}$ , ki se uporablja v senzorskih napravah, od neustreznih vzorcev z širšo porazdelitvijo velikosti, ki vsebujejo poleg večjih kroglastih delcev še delce nepravilnih oblik (34).

#### 1.2.4. Podajanje rezultatov

Tako kot pri določitvi velikosti, so tudi pri določitvi oblike delcev, rezultati prikazani kot porazdelitvene krivulje, ki podajo številčno (s transformacijo tudi volumsko) porazdelitev skozi celotno območje merjenja. Običajno so rezultati podani statistično kot povprečne vrednosti,  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  vseh zgoraj naštetih parametrov oblike.

Pri IA komercialno dosegljivi programski opremi, sam program omogoča tudi prikaz diagrama sipanja (»scattergram«), kjer je prikazana povezava podatkov med dvema izbranimi parametroma (npr. med parametrom velikosti in parametrom oblike delcev), pri čemer dobimo obsežnejšo informacijo, ki je samo iz rezultatov enega parametra (npr. samo PSD) ne moremo pridobiti (23, 35, 36).

### ***1.3. VPLIV OBLIKE DELCEV IN DRUGIH DEJAVNIKOV NA REZULTATE LASERSKE DIFRAKCIJE***

V nadaljevanju bomo predstavili vpliv parametrov oblike delcev in drugih dejavnikov, ki vplivajo na rezultat velikosti in porazdelitve velikosti delcev določene z metodo laserske difrakcije. Že sam termin 'velikost delcev' v ožjem smislu ni točno definiran. Posplošeno gre za velikost nekega delca izraženo kot premer krogle z enakim volumnom kot analizirani delec. Kroglasti delec opišemo z njegovim premerom, za nekroglaste delce pa ni standardizirano katera dimenzija opiše njegovo obliko, zato tudi ni možno iz rezultatov velikosti nedvoumno sklepati na pravo obliko analiziranih delcev (1, 2, 3, 4, 8).



### 1.3.1. Vpliv parametrov oblike

Podolgovatost oz. AR, konveksnost (hrapavost površine) ter okroglost so poglavitni parametri oblike, ki opisujejo dimenzije preiskovanih delcev. Parameter okroglosti je občutljiv tako na obliko kot površino delca, podolgovatost zgolj na obliko, medtem ko je konveksnost odvisna od hrapavosti površine. Vpliv le-teh parametrov na rezultate LD so raziskovali različni avtorji (37, 38). Ugotovili so, da LD ni občutljiva na hrapavost površine merjenih delcev, medtem ko ima podolgovatost pomemben vpliv na PSD in jo je zato potrebno upoštevati pri vrednotenju rezultatov.

### 1.3.2. Vpliv orientacije delcev pri analizi z lasersko difrakcijo

Pri analizi z LD se delci v pretočni celici med homogenizacijo v ustreznem disperznem mediju različno orientirajo oz. se gibljejo v smeri laminarnega toka in tako prečkajo laserski žarek v različnih orientacijah – laserskemu žarku so zato izpostavljene različne dimenzije (min., maks. in vmesne), kar se na rezultatih odraža na porazdelitvenih krivuljah, bolj pri asimetričnih oblikah delcev kot simetričnih.

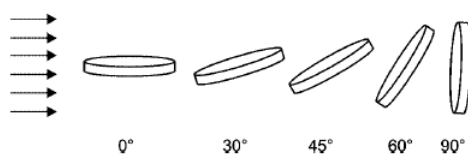
Kateri del PSD je odraz katere dimenzije delcev je mogoče določiti le s pomočjo mikroskopske analize (IA), saj nam ta poda več parametrov oblike, s katerimi lahko okarakteriziramo praškasti material.

Pri delcih paličastih oblik je zaradi preferenčne orientacije delcev (LD) značilna široka PSD (večmodalnost), kjer vrhovi ponazarjajo izmerjeno širino, dolžino in vmesne dimenzije, medtem ko pri mikroskopski (številčna PSD) analizi tega efekta ni opaziti (39).

Leta 2003 sta Kelly in Kazanjian (40) preučevala vpliv oblike na številčno in volumsko porazdelitev velikosti delcev analiziranih pod enakimi pogoji z LD. Uporabila sta tri referenčne standarde v obliki palčk, ki so se razlikovali po dolžini, medtem ko so bili po širini in globini enaki. Avtorja (40) sta ugotovila, da se distribucija z odmikanjem od oblike realne krogle širi. Tudi pri letvastih delcih so razlike v širini PSD med LD in IA, ki so se odrazile v območju finih in večjih delcev, pripisali naključni orientaciji delcev v merilni celici instrumenta LD (41).

Orientiranost delcev v pretočni celici si je najlažje predstavljati s simulacijo orientiranih delcev pravih oblik, ki imajo znano razmerje stranic. Pabst s sodelavci (42) je na tak način iz povsem statističnega vidika predstavil grobo oceno kako na meritve PSD bolj ali manj vpliva ekstremna orientacija delcev. Za modelne delce so izbrali ploščate diske z razmerjem stranic 10 in široko distribucijo (od 1-100 $\mu$ m). Zaradi lažje predstave/izvedbe je model

simetričen in predpostavlja, da so vsi delci-diski orientirani glede na svojo ravnino vzporedno v smeri opazovanja (Slika 12).



*Slika 12: Shematični prikaz modelnih ploščatih delcev – diskov v petih orientacijah v smeri opazovanja (najbolj ploščat delec pri 0°, pri 90° v čelni legi-se ne razlikuje od krogle) (slika povzeta po 42)*

Kvantitativna primerjava parametrov PSD vseh petih primerov pokaže, da so odstopi med orientacijami delcev (glede na 90°) relativno majhni (manj kot 17% pri vseh primerih, najvišji odstop pri 30°). Torej orientacija ploščatih delcev ne vpliva na rezultate PSD (42, 43).

### 1.3.3. Vpliv načina vrednotenja rezultatov in drugih pogojev analize

Ocena velikosti in oblike praškastih materialov je kompleksna, saj na osnovi teh parametrov pridobimo ogromno različnih rezultatov, ki pa jih moramo ustrezno interpretirati in v prvi vrsti izbrati glede na namen študije, saj v nasprotnem primeru lahko dobimo povsem napačne rezultate. V podjetju Partec, ki razvija inštrumente za LD in IA, so leta 2004 razvili metodo, ki omogoča pretvorbo rezultatov med različnimi generacijami LD in IA instrumenti. Izkazalo se je, da je pri nekroglastem materialu potrebna dodatna transformacija IA rezultatov preko določenega laserskega modela (algoritma) za doseganje boljše korelacije z LD meritvijo. Pri kroglastem materialu pa po pričakovanjih ta ni bila potrebna (44), kar so potrdili tudi Califice in sodelavci (45). Tak pristop je sicer rešil temeljni problem kako obravnavati vpliv delcev nepravilnih oblik na rezultate LD, vendar pa je primerjava še vedno močno odvisna od izbranega načina vrednotenja rezultatov.

Tudi z izbiro matematičnega modela lahko vplivamo na končni rezultat. Pri napačni izbiri lahko namesto unimodalne dobimo bimodalno distribucijo, saj je pri instrumentih LD možna izbira med različnimi modeli (npr. model za vzorce s široko populacijo delcev, model za vzorce z eno ali več ozkih populacij, model za vzorce - standarde zelo ozke populacije).

Poleg analiznega modela lahko na samo porazdelitev pri LD vplivajo tudi izbrane optične lastnosti, hitrost mešanje disperzije v merilni celici in slaba disperzija, kar je potrebno upoštevati pri samem razvoju metode. Napake, ki jih naredimo zaradi neoptimalne metode še dodatno poslabšajo korelacijo med rezultati IA in LD.

## 2. NAMEN DELA

V sklopu magistrske naloge želimo primerjalno ovrednotiti vpliv parametrov oblike delcev na zanesljivost rezultatov porazdelitve velikosti delcev pridobljenih na osnovi laserske difrakcije. Večina substanc za farmacevtsko uporabo ima delce, ki imajo bolj ali manj neokroglo obliko, metoda laserske difrakcije pa deluje na predpostavki, da so delci približno kroglastih oblik in nam zato poda informacijo o premeru krogle, ki ima enak volumen kot izmerjen delec, torej bolj kot se oddaljujemo od oblike krogle, večja je eksperimentalna napaka.

Vzorcem realnih trdnih delcev zdravilnih učinkovin z različnimi oblikami (palčke, piramide, nepravilne ploščice, krogle) delcev bomo v našem eksperimentalnem delu določili velikost in porazdelitev velikosti delcev z LD ter parametre oblike (okroglost, podolgovatost, konveksnost, itd.) in tudi velikosti (CED) delcev s pomočjo IA.

Po opravljenih meritvah bomo za vsak posamezen vzorec primerjali volumsko PSD med LD in IA (transformacija številne v volumsko PSD) ter ovrednotili na kakšen način vplivajo kritični parametri oblike na PSD določene z LD.

Rezultati in ugotovitve, ki jih bomo pri tem delu pridobili bodo koristili pri našem vsakodnevnem vrednotenju vzorcev v razvoju in kontroli kakovosti, saj je velikost delcev v farmacevtski industriji ena izmed najbolj pomembnih fizikalnih lastnosti prahov. Pogosto je to kritičen parameter v številnih fazah razvoja zdravila, ki ga vrednotimo na različne načine. Pravilno izmerjena velikost delcev in njihova porazdelitev velikosti je ključna predvsem pri slabo topnih zdravilnih učinkovinah, kjer nam že manjše razlike lahko bistveno spremenijo hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine in s tem vplivajo na biološko učinkovitost končnega izdelka.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### *3.1. MATERIALI*

Uporabili smo kristalizirane vzorce zdravilnih učinkovin (šifrirane oznake: K00001, K00002, K00003, K00004), doniranih s strani Krke d.d., v izbranih oblikah delcev:

- zdravilna učinkovina K00001 s kristali paličastih oblik (vzorci A, B, C, D)
- zdravilna učinkovina K00002 s kristali paličastih oblik (vzorca E, F)
- zdravilna učinkovina K00003 s kristali v obliki nepravilnih ploščic (vzorec G)
- zdravilna učinkovina K00004 s kristali v obliki piramid (vzorec H) in palčk/ploščic (vzorec I) ter z aglomerati v obliki kroglic (vzorec J) in aglomerati nepravilnih oblik (vzorec K)

Uporabljeni standard QAS 3002, sestavljen iz steklenih kroglic točno določene velikosti, je namenjen za preveritev delovanja instrumentov za določevanje porazdelitve velikosti delcev:

- Malvern Quality Audit Standards (QAS) 3002, Whitehouse Scientific Ltd., Velika Britanija

Disperzni mediji:

- prečiščena voda
- rastlinsko olje, Gea, Slovenija
- tekoči silikon F10, Wacker Chemie, Nemčija

Površinsko aktivna snov za pripravo vzorcev:

- polisorbat 20 (Tween<sup>®</sup> 20), Merck, Nemčija

#### *3.2. UPORABLJENE NAPRAVE*

- Optični mikroskop BX50, Olympus Optical, Japonska
- Vrstični elektronski mikroskop Ultra plus, Carl Zeiss, Nemčija
- Aparatura za merjenje velikosti delcev z lasersko difrakcijo Mastersizer 2000, Malvern Instrumens Ltd., Velika Britanija

- Avtomatski mikroskop Morphologi G3, Malvern Instrumens Ltd., Velika Britanija
- Orbitalni stresalnik Vortex Genius 3, IKA, Nemčija

### 3.3. METODE VREDNOTENJA DELCEV

#### 3.3.1. Priprava raztopin površinsko aktivne snovi

- **Priprava 0,1% raztopine polisorbata 20 v prečiščeni vodi**

V 100 ml merilno bučko smo natančno natehtali 0,1g polisorbata 20 ter počasi dodajali prečiščeno vodo do oznake volumna.

- **Priprava 1% raztopine polisorbata 20 v prečiščeni vodi**

V 100 ml bučko smo natančno natehtali 1g polisorbata 20 ter počasi dodajali prečiščeno vodo do oznake volumna.

#### 3.3.2. Določitev morfologije delcev z optičnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom

- **Izvedba analize z optično mikroskopijo**

Vzorci smo suspendirali v primernih disperznih medijih (Tabela 1). Izbrali smo enake medije kot pri LD, saj se v teh delci optimalno dispergirajo (delci se ne raztapljajo, ne tvorijo kosmičev, aglomeratov). Točnih koncentracij suspenzij nismo določali, primerno koncentracijo smo izbrali na podlagi vizualne ocene. Po 10  $\mu$ l pripravljene suspenzije vzorca smo prenesli na klasično objektno steklo (75x25 mm), ki smo ga nato pokrili s krovnim steklom in analizirali oz. posneli karakteristične slike pod 40x povečavo.

*Tabela 1: Disperzni mediji za suspenzije vzorcev pri analizi z optično mikroskopijo*

<b>vzorec</b>	<b>disperzni medij</b>
A, B, C, D, G	tekoči silikon F10
E, F	0,1% raztopina polisorbata 20 v prečiščeni vodi
H, I, J, K	rastlinsko olje

- **Izvedba analize z vrstično elektronsko mikroskopijo**

Vzorci trdnih delcev posameznih substanc smo nanесли na aluminijasti nosilec predhodno prekrit s karbonsko folijo, v enakomerni tanki plasti po površini karbonske folije. Tako pripravljene vzorce smo vstavili v komoro elektronskega mikroskopa in počakali, da se je vzpostavil podtlak (min.  $1 \times 10^{-4}$  mbar). Analize SEM se namreč izvajajo pod visokim podtlakom, ker molekule plina lahko z motnjami vplivajo na elektronski snop. Reprezentativne slike vzorcev smo posneli s 500x povečavo pod pogoji (vsi pomembni pogoji snemanja so prikazani tudi v nogi posamezne slike), ki so navedeni v tabeli 2.

*Tabela 2: Pogoji za analizo z SEM*

<b>parameter</b>	<b>vrednost/območje/oznaka</b>
napetost (EHT)	1,00kV
zaslonka	30 $\mu\text{m}$
delovna razdalja (WD)	3,5-4,6 mm
detektor sekundarnih elektronov	SE2

### 3.3.3. Določitev velikosti delcev z lasersko difrakcijo

Vzorci delcev različnih morfologij iste zdravilne učinkovine smo analizirali po enaki metodi v primernem disperznem mediju v katerem se posamezna zdravilna učinkovina ni raztapljala (rastlinsko olje in tekoči silikon, prečiščena voda) in se je optimalno dispergirala, kar pomeni, da posamezni primarni delci niso npr. nabrekli, se povezovali v kosmiče ali večje aglomerate. Pri vseh vzorcih, razen za analizo standarda, smo uporabili enak matematični model, in sicer »General purpose«, ki se uporablja za realne vzorce s široko porazdelitvijo. Za standard QAS pa smo uporabili matematični model (»Single mode«) za kroglaste delce, saj le-ta vsebuje steklene kroglice z ozko porazdelitvijo.

- **Analiza paličastih delcev**

Vzorci A, B, C in D, kjer gre za isto zdravilno učinkovino (K00001) smo analizirali v tekočem silikonu F10 v disperzni celici Hydro 2000S. Vzorca A in C sta ne sejana, B in D pa njihova presejana vzorca.

Tabela 3: Pogoji za analizo vzorcev A, B, C in D z LD

parameter	vrednost/območje
RI medija	1,39
RI vzorca	1,6
A	0,1
hitrost mešanja	1750 rpm (50%)
optična koncentracija vzorca	5-15%
čas meritve	5s
št. zaporednih meritev/cikel	3

**Izvedba analize:**

V epruveto smo na manjšo količino (nekaj 100mg) posameznega vzorca kanili nekaj kapljic tekočega silikona ter homogenizirali na stresalniku, tako da je nastala gosta suspenzija, nato smo jo razredčili s pribl. 5-10ml medija ter ponovno homogenizirali. V merilno celico smo ob vklopljeni črpalki in mešalom po predhodni meritvi ozadja in nastavitvi ostalih merilnih pogojev (optične lastnosti, čas meritve,...) dodali (reprezentativno s pomočjo kapalke) toliko pripravljene suspenzije vzorca, da smo dobili ustrezno optično koncentracijo. Po pribl. 20sek homogenizacije smo izvedli meritev, pri čemer smo pridobili informacijo dejanskega stanja. Nato smo suspenzijo podvrgli ultrazvočni obdelavi (1min, 75% moči UZ), ker ga ima metoda sicer predpisanega (za primere, ki vsebujejo aglomerate), vendar v vseh naših primerih (A-D) je pri tem prišlo do loma primarnih delcev (palčk), kar smo preverili pod mikroskopom pred in po delovanju ultrazvoka, zato smo upoštevali meritev brez obdelave z ultrazvokom (Tabela 3).

Vzorca druge zdravilne učinkovine K00002 paličastih oblik E in F smo analizirali na podoben način kot predhodne, le v drugem disperznem mediju (prečiščena voda), ker se vzorca v nepolarnem mediju oziroma v tekočem silikonu raztapljata.

Zaradi slabe močljivosti delcev vzorcev zdravilne učinkovine K00002, smo suspenzijo pripravili v 1% raztopini polisorbata 20 v prečiščeni vodi. Uporabili smo tudi drugo disperzno celico (Hydro 2000G), ki je namenjena vrednotenju delcev suspendiranih v vodnih medijih.

- **Analiza ploščatih delcev nepravilnih oblik**

Vzorec zdravilne učinkovine K00003 (G) nepravilnih ploščatih oblik smo analizirali v tekočem silikonu F10 v disperzni celici Hydro 2000S, vendar brez obdelave z ultrazvokom, saj analiziran vzorec ne vsebuje aglomeratov.

*Tabela 4: Pogoji za analizo vzorca G z LD*

<b>parameter</b>	<b>vrednost/območje</b>
RI medija	1,39
RI vzorca	1,7
A	0,01
hitrost mešanja	1750 rpm (50%)
optična koncentracija vzorca	10-25%
čas meritve	10s
št. zaporednih meritev/cikel	3

**Izvedba analize:**

V epruveto smo na manjšo količino vzorca (nekaj 100mg) kanili nekaj kapljic tekočega silikona ter homogenizirali na stresalniku, tako, da je nastala gosta suspenzija, nato smo jo razredčili s pribl. 5-10ml medija ter ponovno homogenizirali. V merilno celico smo ob vklopljeni črpalki in mešalom po predhodni meritvi ozadja in nastavitvi ostalih merilnih pogojev (optične lastnosti, čas meritve,...) dodali (reprezentativno s pomočjo kapalke) toliko pripravljene suspenzije vzorca, da smo dobili ustrezno optično koncentracijo. Po pribl. 20sek homogenizacije smo izvedli meritve (Tabela 4).

- **Analiza kristalov (piramide, palčke/ploščice) in aglomeratov (kroglice, nepravilne oblike)**

Po identični metodi, ker gre za isto zdravilno učinkovino (K00004), smo analizirali dva vzorca (H in I), ki se razlikujeta po obliki primarnih delcev (piramide, palčke/ploščice) in dva vzorca (J in K), ki vsebujeta primarne delce povezane v kompaktne aglomerate (kroglasti oz. nepravilnih oblik), na katere dodatna obremenitev (UZ) nima vpliva.



Tabela 5: Pogoji za analizo vzorcev H, I, J in K z LD

parameter	vrednost/območje
RI medija	1,469
RI vzorca	1,52
A	1
hitrost mešanja	2200 rpm (pribl. 60%)
optična koncentracija vzorca	10-25%
čas meritve	10s
št. zaporednih meritev/cikel	3

**Izvedba analize:**

V epruveto smo na manjšo količino vzorca (nekaj 100mg) kanili nekaj kapljic rastlinskega olja ter homogenizirali na stresalniku, tako da je nastala gosta suspenzija, nato smo jo razredčili s pribl. 5-10ml medija ter ponovno homogenizirali. V merilno celico Hydro 2000S smo ob vklopljeni črpalki in mešalom po predhodni meritvi ozadja in nastavitvi ostalih merilnih pogojev (optične lastnosti, čas meritve,...) dodali (reprezentativno s pomočjo kapalke) toliko pripravljene suspenzije vzorca, da smo dobili ustrezno optično koncentracijo. Po pribl. 20sek homogenizacije smo izvedli meritev (Tabela 5).

- **Analiza vzorca zmesi paličastih in ploščatih delcev**

Vzorcema zmesi (C in G) dveh zdravilnih učinkovin K00001 in K00003 smo določili velikost z lasersko difrakcijo v tekočem silikonu v razmerju 1:1 in razmerju 0,5:1, saj se obe zdravilni učinkovini v njem optimalno dispergirata. Ostale pogoje pa smo določili tako, da smo upoštevali metodo vsakega posameznega vzorca. Pri optičnih pogojih smo za RI vzorca zmesi upoštevali povprečno vrednost vsakega posameznega vzorca, za A pa od vzorca C, saj se pri tem izračunana meritev nekoliko bolj ujema s teoretično kot če bi upoštevali A vzorca G. Meritvi smo izvedli pri hitrosti mešanja in upoštevali število zaporednih meritev kot jo ima metoda za posamezen vzorec (Tabela 6).

Tabela 6: Pogoji za analizo vzorca zmesi C in G z LD

parameter	vrednost/območje
RI medija	1,39
RI vzorca	1,65
A	0,1
hitrost mešanja	1750 rpm (50%)
optična koncentracija vzorca	10-25%
čas meritve	10s
št. zaporednih meritev/cikel	3

**Izvedba analize:**

V epruveto smo na manjšo količino vzorca zmesi (nekaj 100mg) kanili nekaj kapljic silikonskega olja ter homogenizirali na stresalniku, tako da je nastala gosta suspenzija, nato smo jo razredčili s pribl. 5-10ml medija ter ponovno homogenizirali. V merilno celico Hydro 2000S smo ob vklopljeni črpalki in mešalu po predhodni meritvi ozadja in nastavitvi ostalih merilnih pogojev (optične lastnosti, čas meritve,...) dodali (reprezentativno s pomočjo kapalke) toliko pripravljene suspenzije vzorca, da smo dosegli ustrezno optično koncentracijo. Po pribl. 20sek homogenizacije smo izvedli meritev (Tabela 6).

- **Analiza standarda QAS**

Analizo standarda QAS 3002 z LD smo izvedli na suh način po predpisanem protokolu, tako, da smo standard natresli na pladenj enote za dispergiranje Scirocco 2000 ter vklopili meritev s predhodno nastavljenimi parametri meritve (Tabela 7).

Tabela 7: Pogoji za analizo standarda QAS z LD

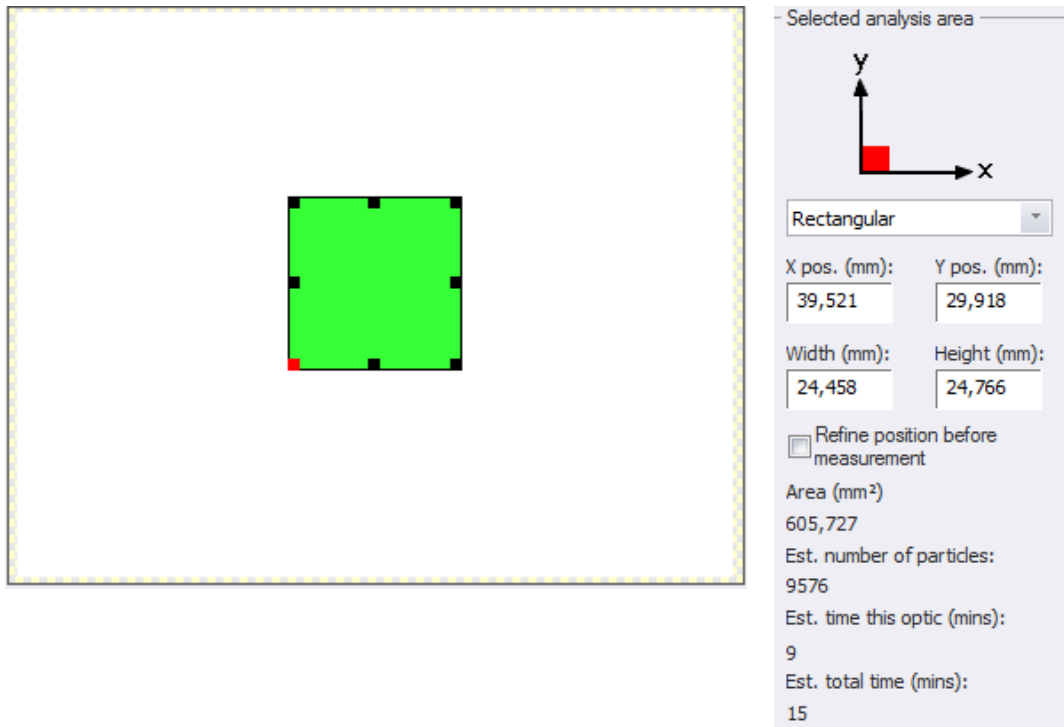
parameter	vrednost/območje
RI vzorca	1,52
A	0
tlak	1 bar
hitrost stresanja	50%
odprtina reže	10 mm
optična koncentracija vzorca	0,5-6%
čas meritve	12s
št. zaporednih meritev/cikel	1

### 3.3.4. Določitev oblike in velikosti delcev s slikovno analizo

Pri slikovni analizi (IA) je bilo potrebno razviti metodo za vsako posamezno zdravilno učinkovino posebej. Pri večini primerov smo uporabili enak disperzni medij kot pri laserski analizi, saj smo te identificirali kot najprimernejše, ostale pogoje pa smo določili v skladu z internim SOP-om za delo z avtomatskim mikroskopom Morphologi G3. Razvoj posamezne metode vrednotenja je potekal na naslednji način:

- ustrezen način merjenja smo najprej izbrali glede na splošni protokol, ki ga uporabljamo za posamezen predpisan medij pri analizi delcev z LD, v primeru, da se ta ni izkazal za optimalnega, smo določili drugi disperzni medij ali pa samo izbrali drugo objektno steklo, nižjo koncentracijo površinsko aktivne snovi itd.
- določitev primerne koncentracije vzorca v mediju, ki zagotavlja optimalno disperzijo delcev na objektnem steklu, kar pomeni, da smo izbrali takšno koncentracijo, pri kateri so bili delci vzorca dispergirani čim bolj posamezno oz. da so se čim manj dotikali med sabo, saj smo na tak način dosegli boljšo ponovljivost meritev
- definiranje pogojev meritve, kjer smo izbrali ustrezno objektno steklo, določili primerno povečavo (objektiv), optimalno mejo detekcije (TH) in čas/področje snemanja (»scan area«, slika 13)
- izvedba meritve po predhodno definiranimi pogoji
- obdelava podatkov in
- morebitna optimizacija.

Optimalno izbrane pogoje smo potrdili s preveritvijo ponovljivosti na vsaj treh paralelakah.



Slika 13: Shematski prikaz področja snemanja (»scan area«), ki ga predstavlja zeleni kvadrat približno na sredini objektnega stekla, katerega dimenzije  $x$ ,  $y$  ter širina in višina so definirani na desni strani, posledično tudi skupen čas analize

- **Analiza paličastih delcev**

Vzorci iste zdravilne učinkovine K00001 (A, B, C in D) smo analizirali v tekočem silikonu F10 na enakem objektnem steklu in pri enaki meji detekcije ter pri različnih koncentracijah vzorca, saj imajo preiskovani vzorci različno velikost (Tabela 8).

Tabela 8: Pogoji meritev za vzorce A, B, C, D

vzorec	A	B	C	D
koncentracija ( $V_{\text{merilne žličke}}/V_{\text{susp}}$ )	4 mm <sup>3</sup> /ml	1,4 mm <sup>3</sup> /ml	4 mm <sup>3</sup> /ml	1 mm <sup>3</sup> /ml
$V_{\text{suspensije}}$	5ml			
$V_{\text{merilne žličke}}$	20mm <sup>3</sup>	7mm <sup>3</sup>	20mm <sup>3</sup>	5mm <sup>3</sup>
objektiv	5x			
TH	150			
čas/področje snemanja	15min/x: 40 mm, y: 30 mm, širina: 24 mm, višina: 25 mm			

**Izvedba analize:**

Za vsak posamezen vzorec smo pripravili pribl. 5ml suspenzije v koncentracijskem območju delcev od 1-4 mm<sup>3</sup>/ml v silikonskem olju F10 ter jih enakomerno prenesli oz. vbrizgali med dve objektni stekelci za ta namen posebno oblikovane celice (Wet Cell Plate, 100x800mm). Vzorce smo zajeli iz embalažne enote z merilno žličko definiranega volumna (Slika 14). Pripravljeno objektno steklo z vzorcem smo nato namestili na premično mizico ter vklopili meritev s predhodno nastavljenimi parametri (Tabela 8).



Slika 14: Merilne žličke z različnimi volumni (1-19 mm<sup>3</sup>)

Vzorca zdravilne učinkovine K00002 (E in F) smo prav tako pripravili v različnih koncentracijah in sicer je pri vzorcu F, ki vsebuje večje delce, dvakrat višja kot pri vzorcu E (Tabela 9). Za disperzni medij smo pa uporabili 0,1% raztopino polisorbata 20 v prečiščeni vodi.

**Izvedba analize:**

Za vsak posamezen vzorec smo pripravili pribl. 3ml suspenzije s koncentracijo delcev predstavljeno v tabeli 9 v 0,1% raztopini polisorbata 20 v prečiščeni vodi ter jo enakomerno prenesli oz. vbrizgali med dve objektni stekelci za ta namen posebno oblikovane celice (Wet Cell Plate, 100x800mm). Za optimalno disperzijo delcev smo uporabili površinsko aktivno snov polisorbata 20. Vzorce smo zajeli iz embalažne enote z merilno žličko z definiranim volumnom. Pripravljeno objektno steklo z vzorcem smo nato namestili v premično mizico ter vklopili meritev s predhodno nastavljenimi parametri navedenimi v tabeli 9.

Tabela 9: Pogoji meritev za vzorca E in F

<b>vzorec</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
koncentracija ( $V_{\text{merilne žličke}}/V_{\text{susp}}$ )	6,3 mm <sup>3</sup> /ml	12,7 mm <sup>3</sup> /ml
$V_{\text{suspencije}}$	3ml	
$V_{\text{merilne žličke}}$	19mm <sup>3</sup>	38mm <sup>3</sup>
objektiv	5x	
TH	150	
čas/področje snemanja	25 min/x: 34mm, y: 32 mm, širina: 43 mm, višina: 29 mm	

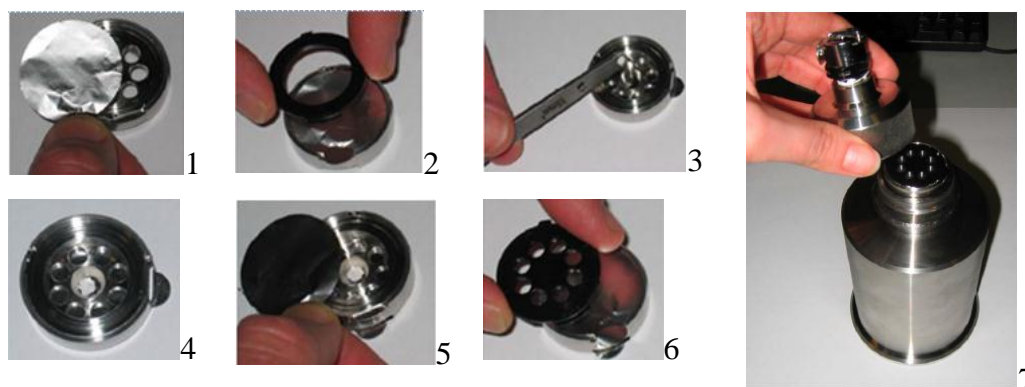
Pri vzorcu z manjšimi delci (E) smo primerjalno izvedli meritev tudi na suh način z SDU enoto pod pogoji, ki so navedeni v tabeli 10.

Tabela 10: Pogoji meritve SDU za vzorec E

<b>vzorec</b>	<b>E</b>
$V_{\text{merilne žličke}}$	1 mm <sup>3</sup>
tlak SDU	0,8 bar
objektiv	5x
TH	100
čas/področje snemanja	25min/x: 44mm, y: 49mm, radij: 20mm

### Izvedba analize:

Z merilno žličko smo zajeli 1 mm<sup>3</sup> vzorca in ga natresli v sredinsko odprtino kovinskega nosilca SDU enote, ki smo ga predhodno s spodnje strani zaprli najprej z aluminijasto folijo in nato še fiksirali z obročem iz umetne mase. Z vzorcem napolnjen nosilec smo nato zaprli še z aluminijasto folijo, ki je prav tako zaščitena z zaporko iz umetne mase. Tako pripravljen nosilec (brez obračanja) smo namestili na vrh disperzne celice in vse skupaj previdno priključili na nosilec mikroskopa, ki je povezan z dovodno cevjo za zrak (Slika 15). Disperzija vzorca je bila izvedena na objektno steklo Glass Plate (180x110mm) na suh način s pomočjo stisnjenega zraka, ki je vzorec enakomerno razpršil po objektnem steklu.



Slika 15: Prikaz postopka polnjenja vzorca za meritev na suh način z SDU enoto: 1-zaprteje aluminijastega nosilca SDU enote s spodnje strani z aluminijasto folijo, 2-fiksiranje folije z obročem iz umetne mase, 3 in 4-napolnitev vzorca v sredinsko odprtino nosilca, 5 in 6-zapiranje nosilca s folijo in zaščitno zaporko iz umetne mase, 7-namestitev nosilca na vrh disperzne celice

- **Analiza ploščatih delcev nepravilnih oblik**

Vzorec G zdravilne učinkovine K00003 smo za razliko od prejšnjih primerov analizirali na klasičnem (manjšem) objektnem steklu (75x25mm), saj smo že na tak način (z manjšo količino vzorca) dobili ponovljive rezultate med paralelkami.

**Izvedba analize:**

Pripravljeno suspenzijo vzorca G v silikonskem olju F10 koncentracije  $2 \text{ mm}^3/\text{ml}$  smo s kapalko reprezentativno nanесли na klasično objektno steklo (4 Slide Plate, 75x25mm), ga namestili v premično mizico ter zagnali meritev po predhodno nastavljenimi pogoji navedenimi v tabeli 11.

Tabela 11: Pogoji meritve SDU za vzorec G

<b>vzorec</b>	<b>G</b>
V <sub>merilne žličke</sub>	$2 \text{ mm}^3$
objektiv	10x
TH	140
čas/področje snemanja	20min/x: 5 mm, y: 26 mm, širina: 15 mm, višina: 16 mm

- **Analiza kristalov (piramide, palčke/ploščice) in aglomeratov (kroglice in nepravilne oblike)**

Vzorci H, I, J in K zdravilne učinkovine K00004 smo analizirali v drugem disperznem mediju kot pri laserski analizi zaradi slabše disperzije vzorcev v rastlinskem olju.

#### **Izvedba analize:**

Ustrezno količino vzorca, ki zagotavlja optimalno disperzijo smo zajeli z merilno žličko definiranega volumna in natresli v sredinsko odprtino kovinskega nosilca SDU enote (potek polnjenja vzorca že opisan in razviden iz slike 23). Disperzijo vzorca smo izvedli na objektno steklo Glass Plate (180x110mm) po predhodno nastavljenimi pogoji (Tabela 12).

*Tabela 12: Pogoji meritev za vzorce H, I, J in K*

vzorec	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>
V <sub>merilne žličke</sub>	7mm <sup>3</sup>			
tlak SDU	1,5bar	0,8	1,5bar	1,5bar
objektiv	5x			
TH	100		90	100
čas/področje snemanja	20min/ x: 46 mm, y: 51mm, radij: 16 mm			

- **Analiza standarda QAS**

Analizo standarda QAS 3002 smo izvedli na suh način po predpisanem protokolu, tako da smo ustrezno količino standarda natresli v nosilec SDU enote, katerega smo priključili na nosilec mikroskopa ter zagnali meritev pod definiranimi pogoji iz tabele 13.

*Tabela 13: Pogoji meritve SDU za standard QAS 3002*

<b>vzorec</b>	<b>standard QAS 3002</b>
tlak SDU	1 bar
objektiv	5x
TH	101
čas/področje snemanja	28min/x: 45 mm, y: 26 mm, radij: 26,5 mm



## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

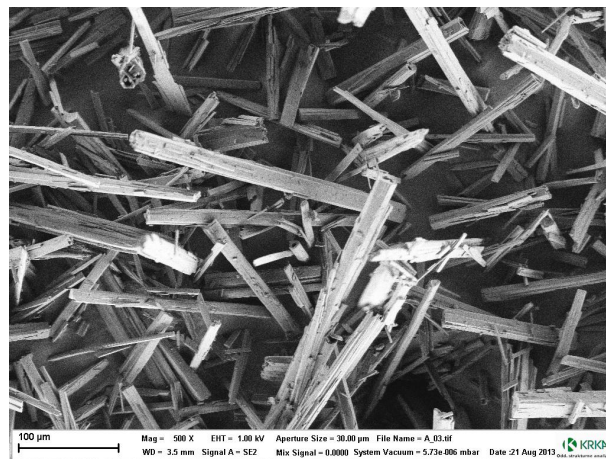
### 4.1. MORFOLOGIJA UPORABLJENIH VZORCEV

Kot je razvidno iz slik 16-19 se uporabljeni vzorci razlikujejo predvsem po obliki (morfologiji) delcev, opazne so pa tudi razlike v velikosti ter porazdelitvi velikosti delcev.

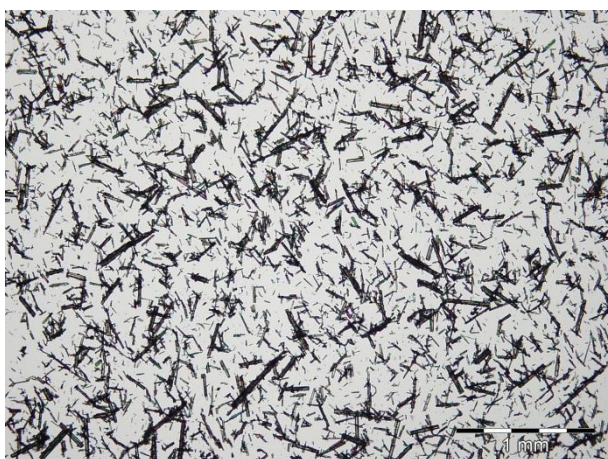
Vzorci A, B, C, D, E in F zdravilne učinkovine K00001 in K00002 vsebujejo delce paličastih oblik. Morfološko so si med sabo najbolj podobni vzorci zdravilne učinkovine K00001, ki vsebujejo tanjše oz. daljše palčke kot vzorca zdravilne učinkovine K00002.



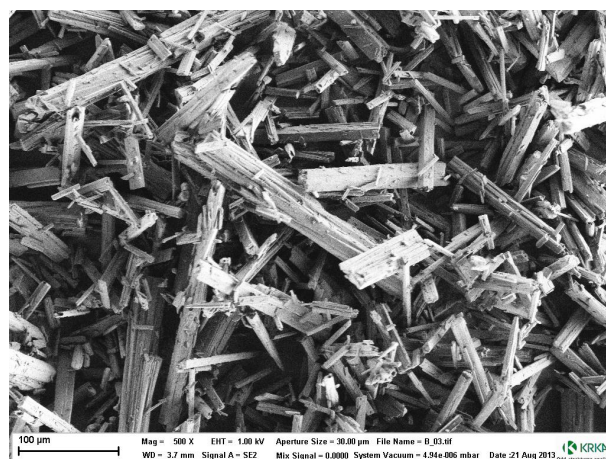
A



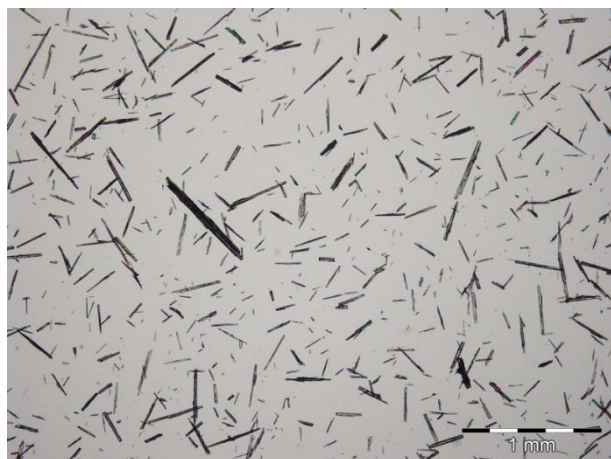
A



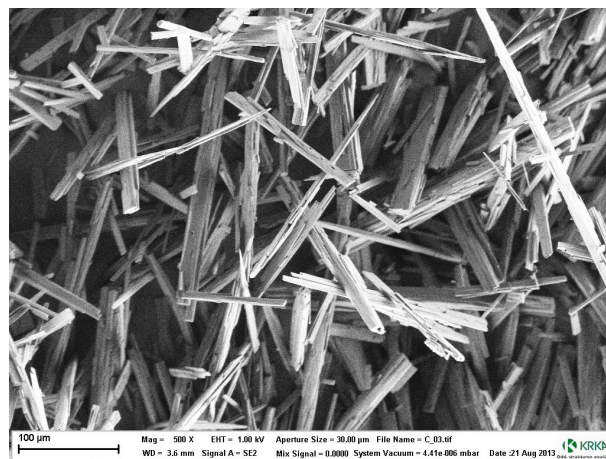
B



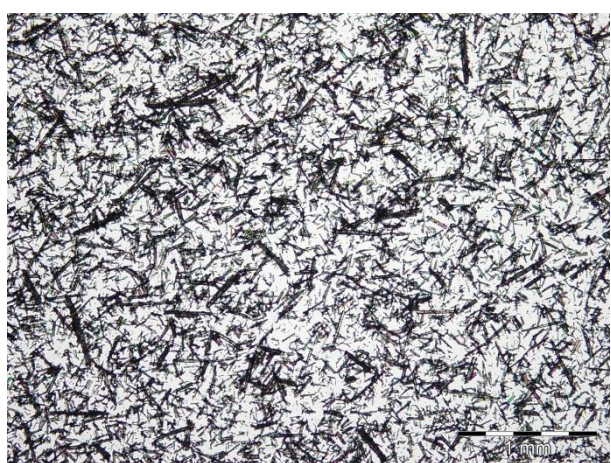
B



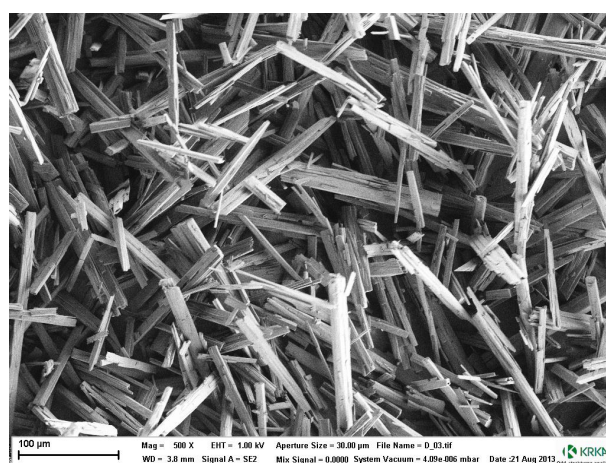
C



C

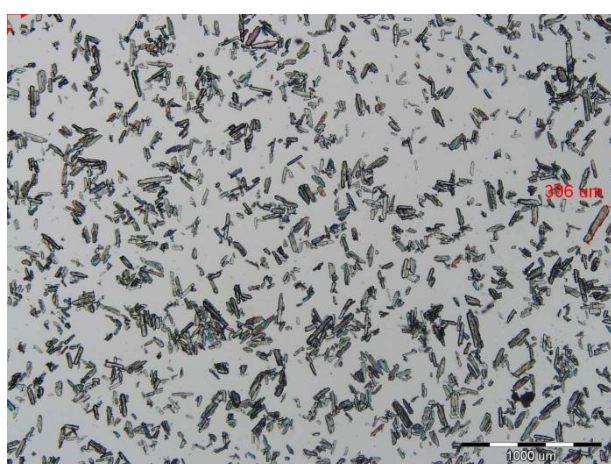


D

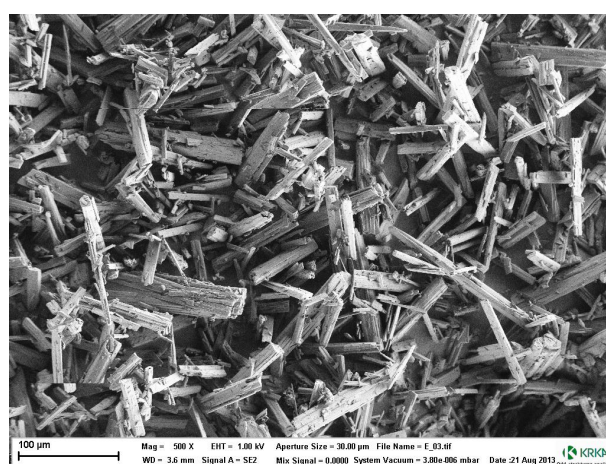


D

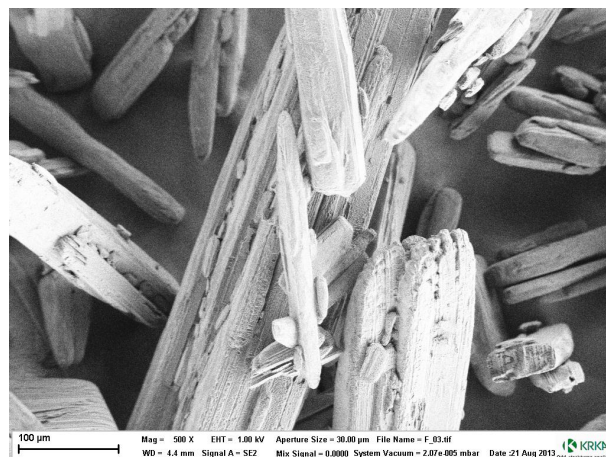
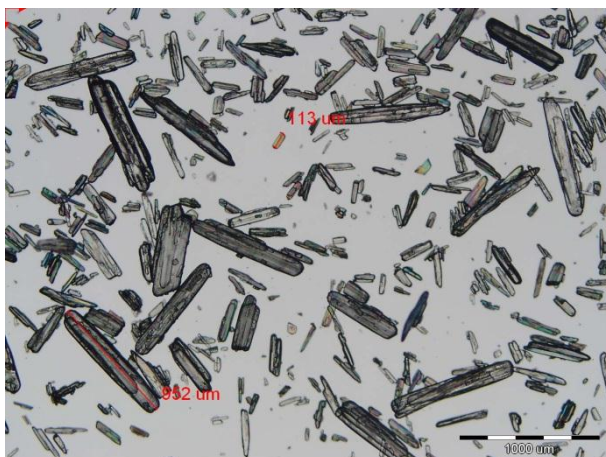
Slika 16: Prikazane slike za vzorce A, B, C, D posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno)



E



E

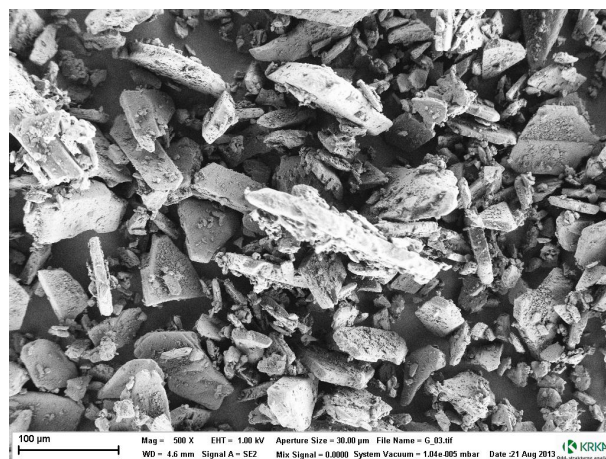
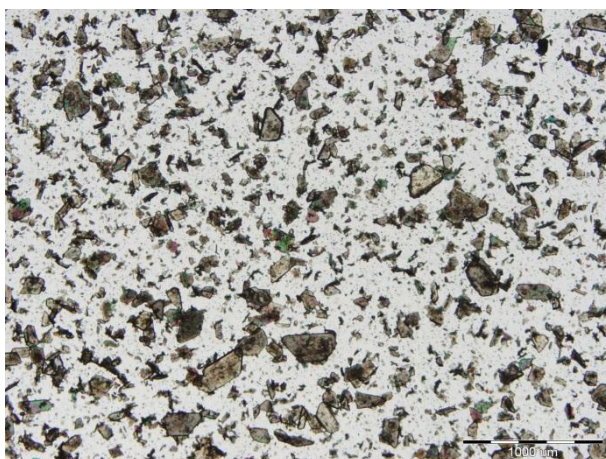


F

F

Slika 17: Prikazane slike za vzorca E in F posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno)

Vzorec G zdravilne učinkovine K00003 se po obliki delcev bistveno razlikuje od vzorcev paličastih oblik, vsebuje ploščate delce nepravilnih oblik.

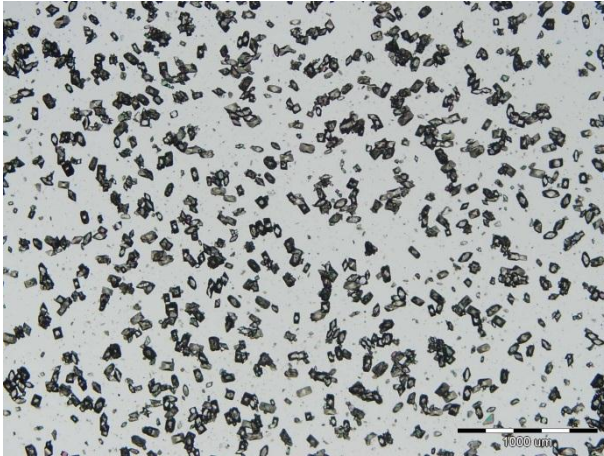


Slika 18: Prikazani slike za vzorec G posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno)

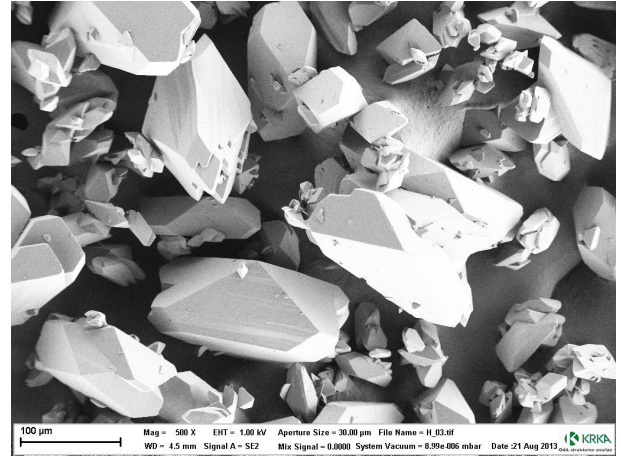
Vzorci H, I, J in K, ki predstavljajo zdravilno učinkovino K00004 se med sabo bistveno razlikujejo po obliki delcev.

V vzorcu H so prisotni delci v obliki piramid, v vzorcu I so zastopani delci širše populacije – drobni delci in delci paličastih ter ploščatih oblik.

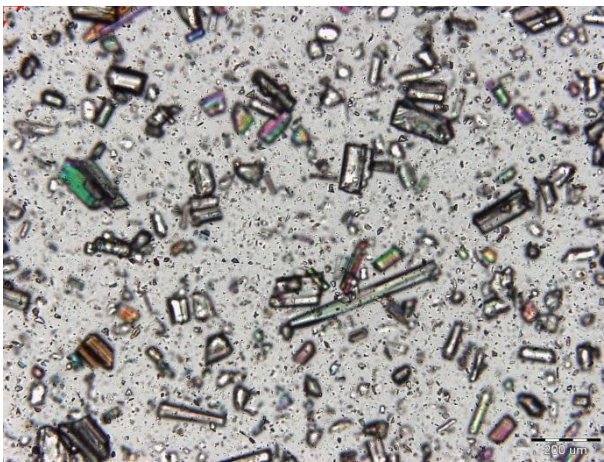
Vzorca J in K pa za razliko od vseh ostalih praktično ne vsebujeta posameznih kristalov oz. primarnih delcev, saj so le ti že med kristalizacijo povezali v aglomerate pravilnih kroglastih oblik (vzorec J), v vzorcu K pa v aglomerate nepravilnih oblik dokaj uniformnih velikosti, ki so sestavljeni iz manjših piramid kot jih vsebuje vzorec H.



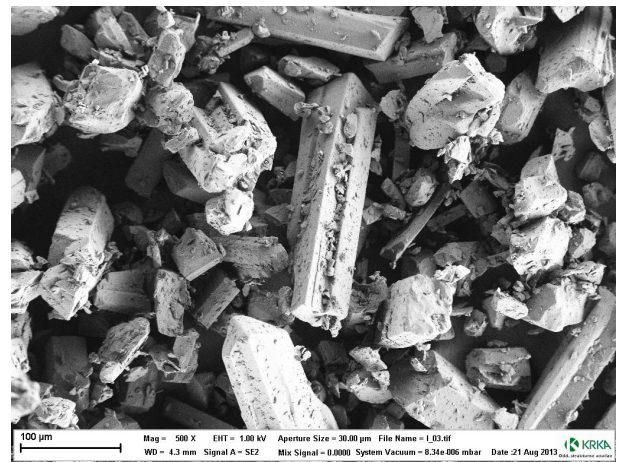
H



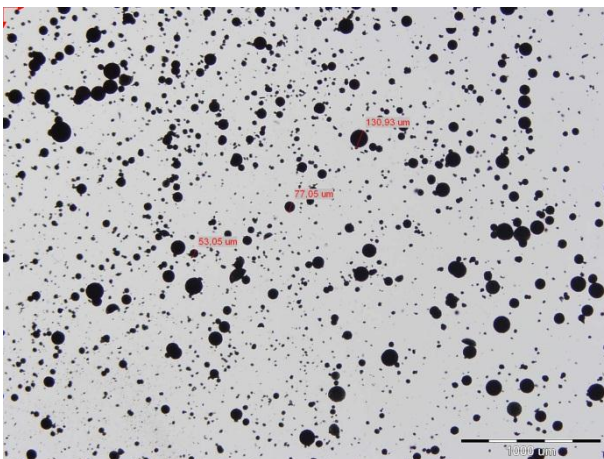
H



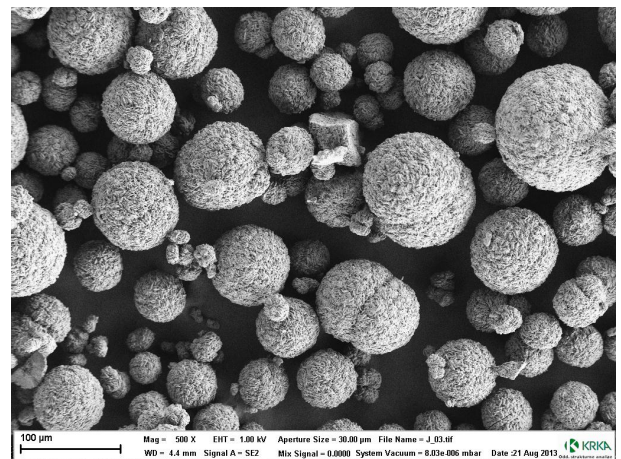
I



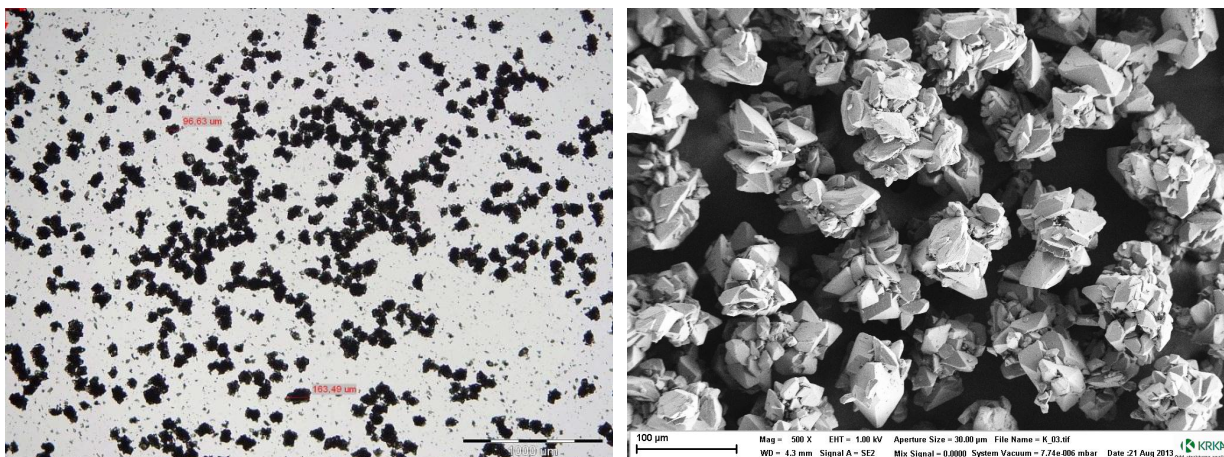
I



J



J



K

K

Slika 19: Prikazane slike za vzorce H, I, J in K posnete na optičnem mikroskopu pri 40x povečavi (levo) in SEM pri 500x povečavi (desno)

## 4.2. KARAKTERIZACIJA DELCEV Z LASERSKO DIFRAKCIJO IN SLIKOVNO ANALIZO

Pri LD smo kot rezultate meritev podali povprečje večjih zaporednih meritev parametrov  $D[4,3]$ ,  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  ter porazdelitveno krivuljo. Število zaporednih meritev je v večini primerov (vzorci A-G) tri, pri vzorcih H, I, J in K, kjer je slabša ponovljivost, pa pet zaporednih meritev.

Kot rezultate meritev pri IA smo podali povprečne vrednosti parametrov velikosti (CED (vol),  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ , širina, dolžina) in porazdelitvene krivulje ter vrednosti parametrov oblike (okroglost, podolgovatost, konveksnost, AR).

Pri obeh analiznih tehnikah smo podali tudi širino porazdelitvene krivulje.

### 4.2.1. Rezultati delcev paličastih oblik

Pri vzorcih **paličastih oblik** rezultati LD sicer razvrstijo vzorce po velikosti po enakem vrstnem redu kot pri IA, vendar se med tehnikama pričakovano pojavijo precejšnje razlike med posameznimi vrednostmi parametrov velikosti.

Pri vzorcih A-D so najbolj primerljivi rezultati za parameter  $D_{50}$  in tudi za  $D_{10}$ , s tem da so rezultati laserske difrakcije nižji, medtem ko se v primeru vzorcev F in E, katerih delci imajo

večji AR, zelo dobro ujameta vrednosti povprečnih premerov, in sicer sta pri slednjem vzorcu celo identična.

Večje razlike med tehnikama pa se pojavijo predvsem pri večjih primarnih delcih (A, C, F), ki se najbolj odražajo na parametru  $D_{90}$  in posledično tudi na povprečnem premeru. Pri LD so rezultati višji, kar lahko pripišemo dejstvu, da gre za rezultat na podlagi volumnske distribucije, pri katerih imajo veliki delci v populaciji večji vpliv na končni rezultat, možno pa je tudi, da zaradi nepopolnega dispergiranja oz. deaglomeracije sekundarnih delcev v rezultat zajamemo tudi delež aglomeratov, česar sicer na osnovi mikroskopskega pregleda suspenzije po meritvi nismo dokazali.

Pri vzorcih z manjšimi paličastimi delci (B, D, E) je korelacija med povprečnima premeroma zelo dobra, torej se z manjšanjem velikosti palčk rezultati LD približajo rezultatom IA (Tabela 14).

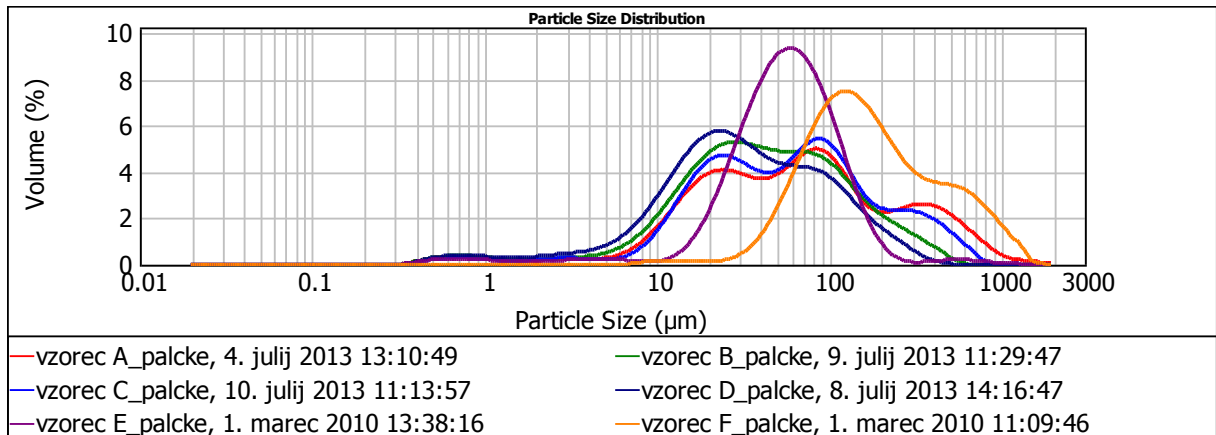
Pri vzorcu E smo primerjalno izvedli meritev tudi na suh način z SDU enoto, kjer smo dobili primerljive rezultate kot pri metodi z disperznim medijem, vendar smo za optimalnega izbrali slednjega, saj je disperzija boljša, rezultat največjega izmerjenega delca pa je v tem primeru višji, kar kaže na to, da je pri SDU uporabljen previsok tlak in je prišlo do loma delcev. Pri vzorcu F meritve z SDU enoto nismo izvedli, saj bi imel uporabljen tlak (tudi nižji) zaradi večje velikosti delcev v vzorcu, še izrazitejši destruktivni vpliv na večje delce.

*Tabela 14: Povprečne vrednosti premerov ( $D[4,3]$ , CED) in parametrov  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  volumnske porazdelitve LD in IA za vzorce paličastih oblik (A-F)*

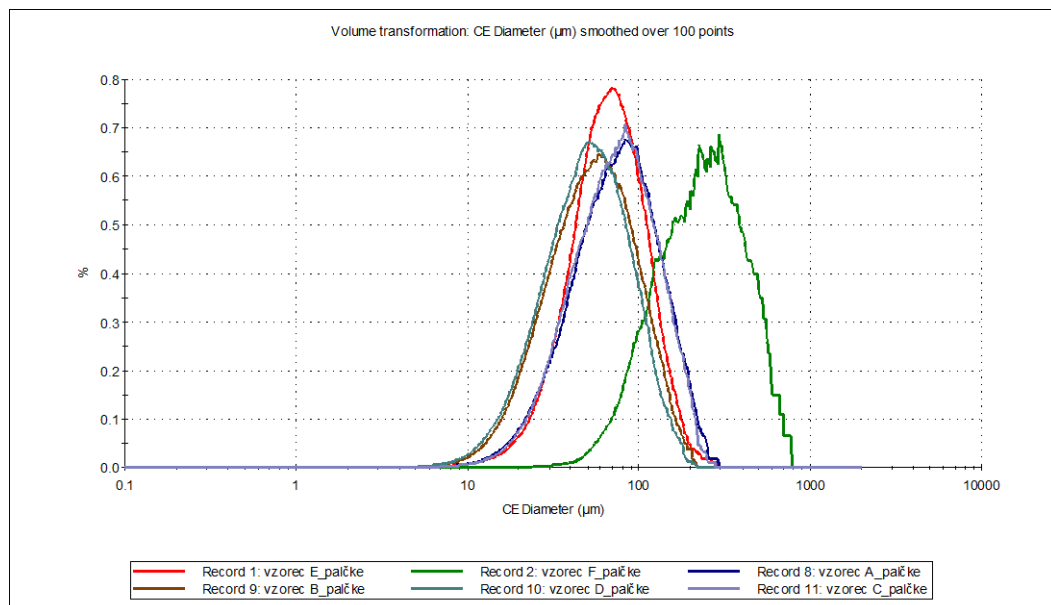
	LD				IA			
	$D[4,3]$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]	CED [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]
<b>A</b>	141	13	64	399	81	35	74	133
<b>B</b>	72	11	42	171	60	26	54	100
<b>C</b>	106	14	59	282	79	36	74	130
<b>D</b>	54	8	31	131	55	24	51	94
<b>E</b>	71	23	57	124	71	37	68	108
<b>F</b>	264	63	161	639	255	112	235	423

Razlike med LD in IA pri delcih paličastih oblik se odražajo tudi na obliki porazdelitvenih krivulj, kar pripisujemo dejstvu, da gre pri IA za statično analizo, pri LD pa uporabimo

pretočno celico, kjer se delci različno orientirajo v mediju in lahko zato prečkajo laserski žarek obrnjeni pod različnimi koti (izmerjene različne dimenzije), kar posledično vpliva na porazdelitveno krivuljo – večmodalnost oz. širši vrhovi, kar smo že opisali v uvodu (39, 40, 41). Daljše palčke imajo trimodalno, krajše pa bimodalno porazdelitev (Slika 20), medtem ko pri IA takega efekta ni zaradi preferenčne orientacije, ki jo dosežemo pri nanosu vzorca na objektno steklo, pri IA je torej porazdelitev vseh vzorcev unimodalna (Slika 21).



Slika 20: Volumska distribucija dobljena z LD vzorcev paličastih oblik (A-F)



Slika 21: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorcev paličastih oblik (A-F)

Tudi med širinami porazdelitvenih krivulj med LD in IA so vidne razlike (Tabela 15), in sicer so pri LD le-te širše kot pri IA, kar je posledica različnega načina merjenja (statična/dinamična, številčna/volumska).

Tabela 15: Širina volumske distribucije pri LD in IA za vzorce paličastih oblik (A-F)

vzorec	A	B	C	D	E	F
<b>širina distribucije LD</b>	6,0	3,9	4,6	4,0	1,8	3,6
<b>širina distribucije IA</b>	1,3	1,4	1,3	1,4	1,0	1,3

Porazdelitvene krivulje LD (Slika 20) za delce paličastih oblik imajo dva ali tri vrhove (bimodalnost, trimodalnost). In sicer je pri vzorcih A-D prvi vrh pri pribl. 20-25 $\mu\text{m}$ , drugi pri pribl. 80 $\mu\text{m}$ , tretji pri pribl. 300-400 $\mu\text{m}$ . Pri vzorcu E, ki je po velikosti podoben vzorcem A-D, s tem da nima tako izražene bimodalnosti, prevladuje osnovni vrh pri pribl. 60 $\mu\text{m}$  ter minimalni vrh oz. rep pri pribl. 500 $\mu\text{m}$ . Pri vzorcu F, ki vsebuje glede na ostale vzorce paličastih oblik največje palčke ima porazdelitev bimodalno (prvi vrh pri pribl. 150 $\mu\text{m}$ , drugi vrh pri pribl. 550 $\mu\text{m}$ ).

Glede na rezultate širine in dolžine delcev analiziranih vzorcev, pridobljenih na osnovi IA lahko sklepamo, da je prvi vrh predvsem odraz širine delcev, ostale vrhove pa ponazarja dolžina oz. vmesne orientacije delcev. Večja kot je razlika med širino in dolžino oz. ožje (nižji je AR in višji je parameter podolgovatosti) kot so palčke bolj je izražena bimodalnost (bolj pri vzorcu D kot pri B) pri LD. Vzrok za to je preferenčna orientacija paličastih delcev tudi med analizo z LD. Zaradi laminarnega toka medija pride pri paličasti obliki kristalov prav tako do preferenčne orientacije delcev, torej se delci obrnejo v smer toka, zato so vmesne orientacije delcev manjkrat izmerjene.

Vzorec E je najbolj podoben po širini/dolžini vzorcu B, le da ima kristale v obliki širših palčk, ki so bolj uniformnih velikosti in se po obliki bolj približajo obliki krogle (faktor AR znaša 0,526 pri vzorcu E in 0,324 pri vzorcu B). Posledično se rezultati LD in IA zelo dobro ujemajo – najboljša korelacija glede na ostale vzorce z delci v obliki palčk.

Vzorec F, ki napram ostalim odstopa po velikosti palčk (vsebuje največje) ima porazdelitev LD bimodalno, povprečna premera izmerjena z LD in IA sta dokaj primerljiva, pri ostalih parametrih pa so razlike večje pri LD je osnovni vrh pri pribl. 150 $\mu\text{m}$ , drugi pri pribl. 550 $\mu\text{m}$ , pri IA dobimo samo en vrh pri pribl. 300 $\mu\text{m}$ . Razlika v obliki krivulje je odraz tako preferenčne orientacije (prvi pik LD ponazarja širino, saj se pri maks. pribl. 230 $\mu\text{m}$  zaključuje



omenjen pik), kot tudi vpliva velikih delcev na rezultat volumske distribucije in algoritma pretvorbe izmerjene vrednosti (volumen/površina) na obliko krogle. Zaradi visoke vrednosti parametra AR (0,518), ki nakazuje velik odklik od oblike krogle se rezultati zelo razlikujejo (maks. izmerjeni delec pri IA znaša pribl. 1000 $\mu$ m, pri LD pa pribl. 1500 $\mu$ m) (Tabela 16).

Tabela 16: Povprečne, min., maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovatost, konveksnost) parametrov IA za vzorce paličastih oblik (A-F)

	širina [ $\mu$ m]			dolžina [ $\mu$ m]			AR	okroglost	podolgovatost	konveksnost
	min	maks	mean	min	maks	mean				
<b>A</b>	2,4	166	13,2	7,2	575	72	0,266	0,442	0,734	0,985
<b>B</b>	2,5	114	11,8	7,0	418	47	0,324	0,532	0,680	0,989
<b>C</b>	2,3	59	12,8	7,1	809	84	0,224	0,326	0,793	0,957
<b>D</b>	2,3	54	11,6	6,9	408	44	0,334	0,550	0,663	0,985
<b>E</b>	1,1	124	12,9	2,2	347	31	0,526	0,602	0,474	0,953
<b>F</b>	1,1	228	17,7	2,2	1005	55	0,518	0,595	0,482	0,981

Po konveksnosti se vzorci ne razlikujejo, kar kaže na to, da imajo vzorci podobno hrapavost površine, katere vpliv lahko torej pri interpretaciji zanemarimo. Parameter okroglosti pa še dodatno potrди zgornje, saj sovpada z AR ( $E > F > D > B > A > C$ ) - tanjšje kot so palčke bolj se odklikajo od popolnega kroga, večje so razlike med IA in LD (Tabela 16).

#### 4.2.2. Rezultati delcev v obliki piramid, ploščic/palčk, nepravilnih ploščic in nepravilnih aglomeratov

Korelacija je med LD in IA pri **ploščatih** delcih nepravilnih oblik (vzorec G) sicer zelo dobra pri povprečnem premeru bistveno slabša pa pri ostalih parametrih, kar je razvidno tudi iz oblike krivulj, pri LD je tako kot v primeru paličastih delcev izmerjena večja maksimalna velikost, višji je tudi parameter  $D_{90}$  kot pri IA. Večjo primerljivost pripišemo dejstvu, da je oblika delcev bolj podobna obliki krogle, višje rezultate LD pa prav tako razložimo z večjim vplivom večjih delcev na dobljen rezultat volumske distribucije.

Vzorec G smo za razliko od primerov vzorcev A-F analizirali (IA) na klasičnem (manjšem) objektumem steklu (75x25mm), saj smo že na tak način (z manjšo količino vzorca) dobili

ponovljive rezultate med paralelkami. Za primera E in F, ki sta analizirana v 0,1% raztopini polisorbata 20 v prečiščeni vodi namreč tak način ni primeren, ker bi medij lahko povsem izhlapel med analizo. Na klasičnem objektnejem steklu je namreč težko doseči, da je suspenzija vzorca brezračno pokrita s krovnim steklom, kar pa omogoča posebno oblikovana celica (Wet Cell Plate 100x800mm). Uporaba klasičnega objektnege stekla je zato primernejša kadar uporabljamo bolj viskozne, nehlapne disperzne medije.

Pri vzorcih z delci paličastih oblik analiziranih v silikonskem olju pa tega načina nismo preizkusili, ker bi prenesli na objektno steklo zaradi prisotnih večjih oz. daljših palčk premajhno količino suspenzije vzorca kot v posebno oblikovano celico in bi tako lahko zajeli manj reprezentativen vzorec.

Vzorci H, I in K zdravilne učinkovine K00004 smo analizirali v drugem disperznem mediju kot pri laserski analizi zaradi slabše disperzije vzorcev v rastlinskem olju (pri analizi z lasersko difrakcijo smo slabo dispergirano izboljšali s homogenizacijo vzorca v merilni celici) - preveč sprijetih delcev vidnih na objektnejem steklu je podaljšalo čas obdelave podatkov in zmanjšalo št. delcev na osnovi katerih je bil podan končni rezultat. Zato smo poskusili dispergirati vzorce še na suh način z disperzno enoto SDU, kar se je izkazalo za primernejši način, saj je bila disperzija vzorcev na objektnejem steklu bistveno boljša kot v rastlinskem olju.

Pri vzorcu I, ki vsebuje **palčke in ploščice** je med tehnikama primerljiv le parameter  $D_{50}$ , medtem ko je  $D_{90}$  in posledično povprečje pri LD višje (širša porazdelitev). Torej se ponovno odraza izrazitejši vpliv večjih delcev na volumsko distribucijo ter tudi dejstvo, da se pri LD izmerijo vse orientacije delcev, kar distribucijo širi .

Iz tabele 17 je razvidno, da so pri vzorcu H, ki vsebuje delce v obliki **piramid**, odstopanja med LD in IA največja. Razlike so med vsemi parametri, rezultati LD so pričakovano višji, saj so delci voluminozni. Torej je prispevek tretje dimenzije (debeline) na rezultate LD precejšen, saj večji delci predstavljajo glavnino distribucije in tako posledično vplivajo na višje rezultate.

Za razliko od vzorca H, se pri vzorcu K, v katerem so prisotni **nepravilni skupki** rezultati med LD in IA bolj ujemajo. Podobno kot v primeru G, gre za rahlo odstopanje od oblike krogle in pri LD imajo večji delci večji prispevek. Vrednosti vseh parametrov so tako kot pri vzorcu H višji, s tem da je ta razlika precej manjša – manjši vpliv tretje dimenzije.

Tabela 17: Povprečne vrednosti premerov ( $D[4,3]$ , CED) in parametrov  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  volumske porazdelitve LD in IA za vzorce G, H, I, K in zmes vzorca C in G

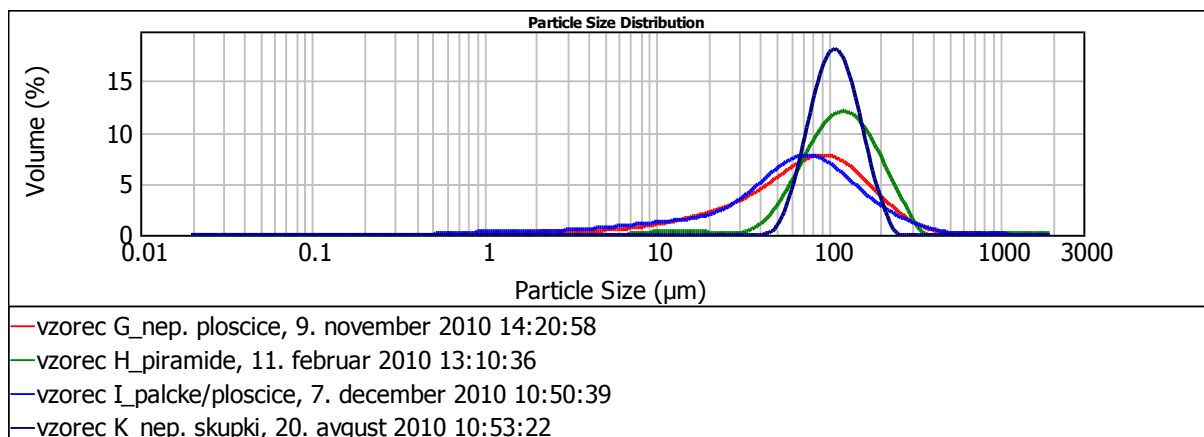
	LD				IA			
	$D[4,3]$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]	CED [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{10}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{50}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$D_{90}$ [ $\mu\text{m}$ ]
<b>G</b> nepravilne ploščice	94	18	76	190	95	29	100	153
<b>H</b> piramide	133	61	119	218	86	37	77	139
<b>I</b> palčke/ploščice	86	13	67	178	73	33	66	121
<b>K</b> nepravilni skupki	115	72	110	166	96	64	99	120
zmes C (palčke) in G (ploščice) (1:1)	101	14	65	235	/	/	/	/
zmes C (palčke) in G(ploščice)(0,5:1)	99	16	73	220	/	/	/	/

Distribucije so v vseh primerih tako pri LD kot pri IA unimodalne (Slika 22 in 24). Pri vzorcu I, ki vsebuje poleg ploščic tudi palčke z drugačnim volumnom, bi lahko pričakovali npr. večmodalnost na račun prisotnih palčk, vendar očitno niso prisotne v tolikšni meri, da bi se njihova širina/dolžina odrazila na profilu PSD kot je to razvidno iz že opisanih primerov paličastih delcev.

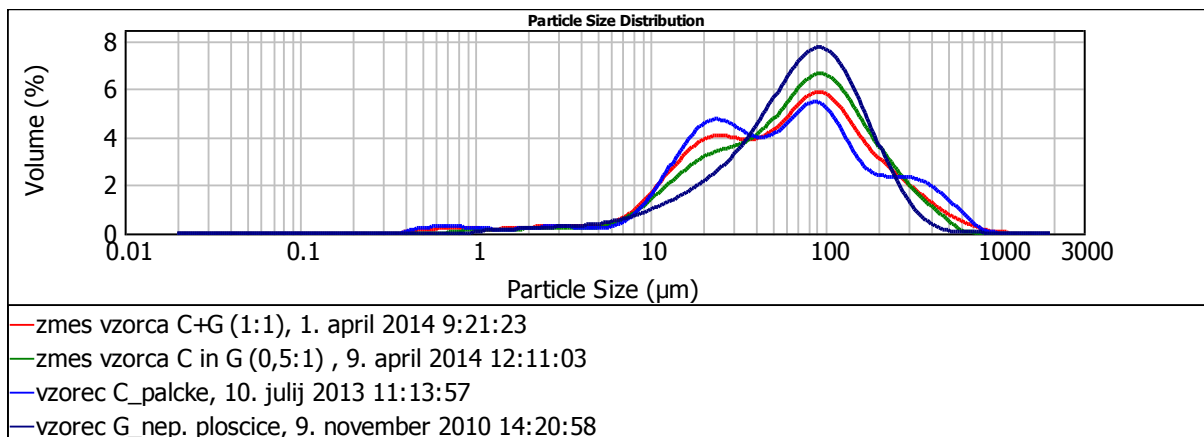
Slednjo ugotovitev smo preverili z analizo zmesi vzorca paličastih (C) in ploščatih (G) oblik v razmerju 1:1 in 0,5:1. Kot je razvidno iz primerjave PSD zmesi in PSD vsakega posameznega vzorca (Slika 23) lahko potrdimo zgornjo ugotovitev, saj ima zmes palčk in ploščic v razmerju 1:1 in 0,5:1 bimodalno porazdelitev. Drugi vrh PSD obeh zmesi je bolj izražen kot pri vzorcu C, saj vsebuje na račun ploščic večji delež delcev povprečne velikosti pribl. 100  $\mu\text{m}$ , kar je tudi razlog, da vzorec zmesi nima trimodalne PSD, večje dimenzije palčk pa se odražajo samo še v podaljšanem repu krivulje. Torej z manjšim deležem palčk, se bimodalnost krivulj izgublja.

Skladno s porazdelitvenimi krivuljami se tudi vrednosti povprečnega premera in parametrov  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  spreminjajo – manjši kot je delež palčk bolj so rezultati zmesi primerljivi vzorcu G (Tabela 14, 17).

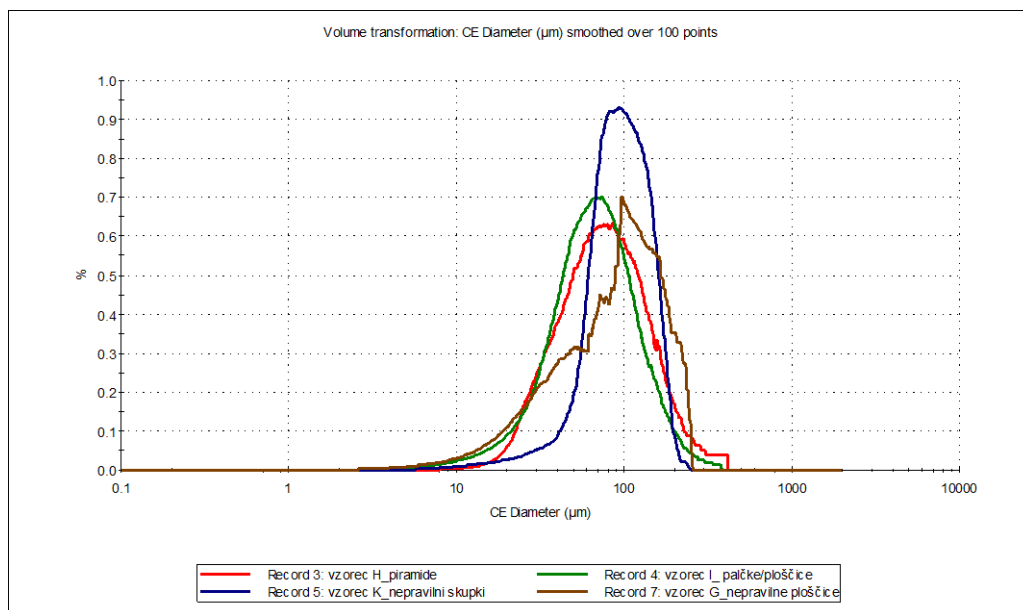
Sami položaji vrhov PSD so med LD in IA v večini primerov med sabo primerljivi (vzorca G in K pri pribl.  $100\mu\text{m}$ , I pri pribl.  $80\mu\text{m}$ ), razen pri vzorcu piramid (vzorec H), kjer je očitna razlika (vrh LD pri pribl.  $150\mu\text{m}$ , vrh IA pri pribl.  $80\mu\text{m}$ ).



Slika 22: Volumska distribucija dobljena z LD vzorcev G, H, I, K



Slika 23: Volumska distribucija LD vzorca zmesi C in G in posameznih vzorcev



Slika 24: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorcev G, H, I, K

Tudi v širini porazdelitvenih krivulj so vidne razlike med LD in IA (Tabela 18), in sicer je pri LD širša za vzorca G in I, medtem ko sta pri vzorcih H in K širini LD in IA primerljivi med sabo (pri H celo identični). Dobro ujemanje v širini PSD je poleg oblike delcev (manjši AR) posledica tudi prisotnosti bolj uniformnih velikosti delcev v primerjavi z večino primerov paličastih delcev, kar je razvidno tudi iz SEM analize, saj vzorca H in K vsebujeta v primerjavi z vzorcema G in I ožjo distribucijo delcev.

Tabela 18: Širina volumske distribucije pri LD in IA za vzorce G, H, I, K

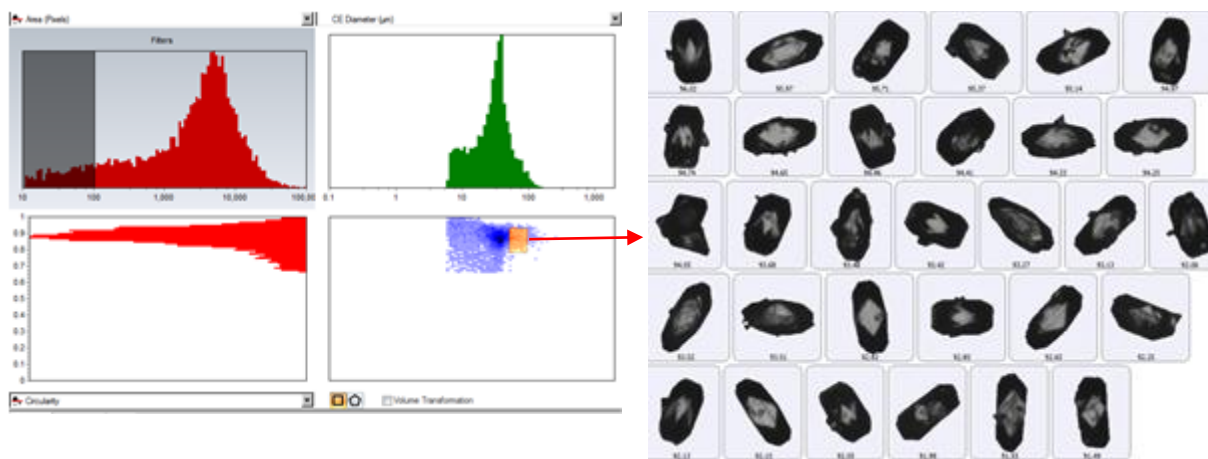
vzorec	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>K</b>
<b>širina distribucije LD</b>	2,3	1,3	2,5	0,9
<b>širina distribucije IA</b>	1,2	1,3	1,3	0,7

Iz tabele 19 je razvidno, da višji kot je AR in okroglost delca ( $G > K > H > I$ ) ter nižji kot je parameter podolgovatost ( $G < K < H < I$ ) bolj so oblike delcev približajo obliki krogle. Torej se vzorec z nepravilnimi ploščicami najbolj približa. Zanimivo pa je, da je v primeru piramid (vzorec H) podolgovatost delcev (najmanj okrogli) najbolj primerljiva vzorcju palčk/ploščic (vzorec I), kar pa ni ravno skladno z morfologijo delcev, saj so bolj kubični (bistveno manj odmakjeni od oblike krogle kot palčke/ploščice). Glede na to, da je analiza IA statična 2D analiza, pri čemer so delci analizirani izključno v najbolj ugodnem (stabilnem) položaju, je

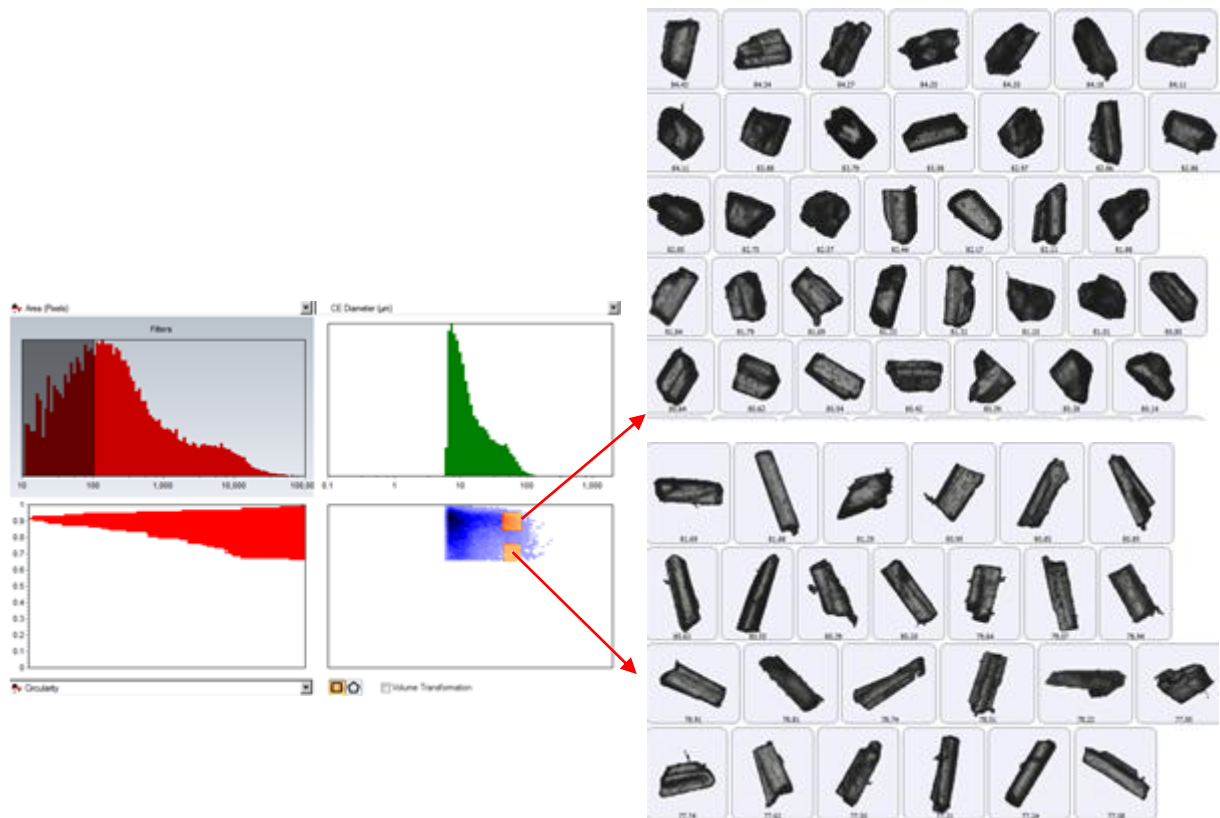
pričakovano, da so videti kot ploščice (Slika 25) in tako pri IA podobni ploščicam vzorca I (Slika 26). Pri LD pa dejansko izvedemo 3D meritev piramid, ki v različnih položajih prečkajo laserski žarek, zato so tudi rezultati LD precej višji kot pri IA, tudi v primerjavi z rezultati LD ostalih vzorcev (pri LD je isti delec večkrat pomejen pod različnimi koti, posledično je njegova velikost v distribuciji zastopana večkrat-kot bi dejansko izmerili več enako velikih delcev).

Tabela 19: Povprečne/maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovatost, konveksnost, intenziteta) parametrov IA za vzorce G, H, I, K

	širina (maks)	dolžina (maks)	AR	okroglost	podolgovatost	konveksnost	intenziteta (D50)
<b>G</b>	153 $\mu\text{m}$	222 $\mu\text{m}$	0,711	0,778	0,289	0,973	123
<b>H</b>	237 $\mu\text{m}$	289 $\mu\text{m}$	0,631	0,756	0,369	0,974	62
<b>I</b>	171 $\mu\text{m}$	355 $\mu\text{m}$	0,620	0,733	0,380	0,982	69
<b>K</b>	247 $\mu\text{m}$	254 $\mu\text{m}$	0,665	0,739	0,335	0,970	68

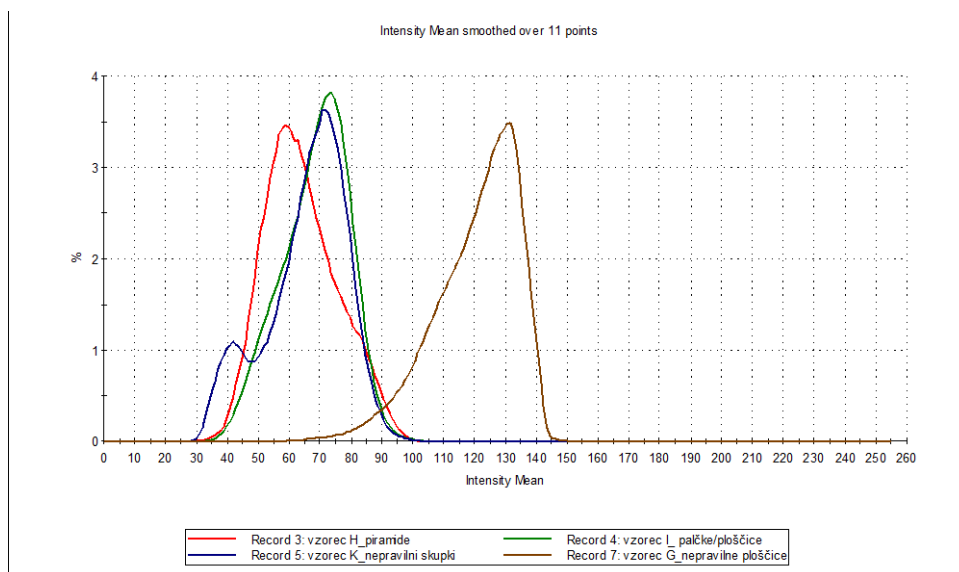


Slika 25: Diagram sipanja (»scattergram«) prikazuje klasifikacijo vzorca H po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih večjih delcev-piramid s CED od  $\sim 80\text{-}100\mu\text{m}$ , ki so zastopani v oranžno označenem področju



Slika 26: Diagram sipanja (»scattergram«) prikazuje klasifikacijo vzorca I po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih večjih v obliki ploščic (CED od ~80-100µm) in palčk (CED od ~70-100µm), ki so zastopani v oranžno označenem področju

Tudi na osnovi rezultatov intenzitete svetlobe lahko zaključimo, da so delci v obliki piramid najdebelejši, saj je intenziteta prepuščene svetlobe najnižja – vrednosti proti 0 kažejo na temnejše delce (Slika 27).



Slika 27: Porazdelitvene krivulje parametra intenzitete svetlobe vzorcev G, H, I, K

Vrednosti (maks.) širine in dolžine pridobljene z IA lahko ponovno povežemo s širinami porazdelitvenih krivulj pri LD. In sicer večja kot je razlika med širino in dolžino delcev ( $I > G > H > K$ ), širša je PSD pri LD ( $I > G > H > K$ ). Torej ima vzorec I, ki vsebuje delež palčk, najširšo PSD, kar kaže na vpliv preferenčne orientacije paličastih delcev v pretočni celici LD. Kljub različnim oblikam delcev se vzorci bistveno ne razlikuje po konveksnosti, kar kaže na to, da imajo podobno hrapavost površine delcev. Pričakovano najbolj nazobčeno površino ima vzorec z nepravilnimi skupki, najbolj gladko pa vzorec, ki vsebuje palčke/ploščice (Tabela 19).

#### 4.2.3. Rezultati delcev kroglastih oblik

Pri vzorcu J, ki vsebuje **kroglaste aglomerate** je korelacija med LD in IA vseh parametrov zelo dobra razen pri  $D_{90}$  (Tabela 20), ki je za razliko od prejšnjih primerov višji pri IA (širša porazdelitev). To bi lahko bila posledica razpustitve aglomeratov pri meritvi z LD, kjer v disperznem mediju med mešanjem pride do močnejših mehanskih obremenitev, medtem ko je bila meritev z IA izvedena na nedestruktiven suh način (SDU enota). Na sliki 28 je prikazano, da so dejansko prisotni večji skupki (maks. pribl.  $250\mu\text{m}$ ) kot so izmerjeni z LD (maks. pribl.  $220\mu\text{m}$ ), torej je v tem primeru meritev z IA pravilnejša. Večja verjetnost pa je, da ni prišlo do razpustitve aglomeratov in so rezultati pogojeni z izborom matematičnega modela.

Za preveritev slednje predpostavke smo prvotne rezultate vzorca J preračunali, tako da smo namesto »General purpose« modela upoštevali model za kroglaste delce (»Single mode«). Dobljeni preračunani rezultati kažejo na to, da ni prišlo do deaglomeracije, saj je iz slike 29 razvidno, da uporabljen model vpliva na obliko PSD – v tem primeru smo dobili večjo maksimalno velikost (pribl.  $350\mu\text{m}$ ) kot pri IA. Ostale vrednosti parametrov pa se ne zvišajo, vrednosti  $D_{10}$  in  $D_{90}$  sta celo malenkost nižji, vendar v območju eksperimentalne napake. Glede na to, da vzorec vsebuje kroglice (večji delci večji prispevek) in je ujemanje izmerjene z izračunano meritvijo nekoliko boljše pri kroglastem modelu (Slika 30, 31), kar potrjujejo tudi nižje vrednosti parametrov »residual« (0,3%) kot pri modelu »General purpose« (0,5%), lahko zaključimo, da so dobljeni rezultati pravilnejši s kroglastim modelom (bližje kot je vrednost »residual« 1, slabše je ujemanje izračunane meritve z izmerjeno). Trditev smo preverili še z analizo standarda, ki je sestavljen iz steklenih kroglic točno določene velikosti in je namenjen za preveritev delovanja instrumentov za določevanje porazdelitve velikosti delcev. Za preveritev avtomatskega mikroskopa je namenjen QAS 3006, za preveritev inštrumentov na osnovi LD pa QAS 3002, vendar oba standarda spadata v isto skupino QAS



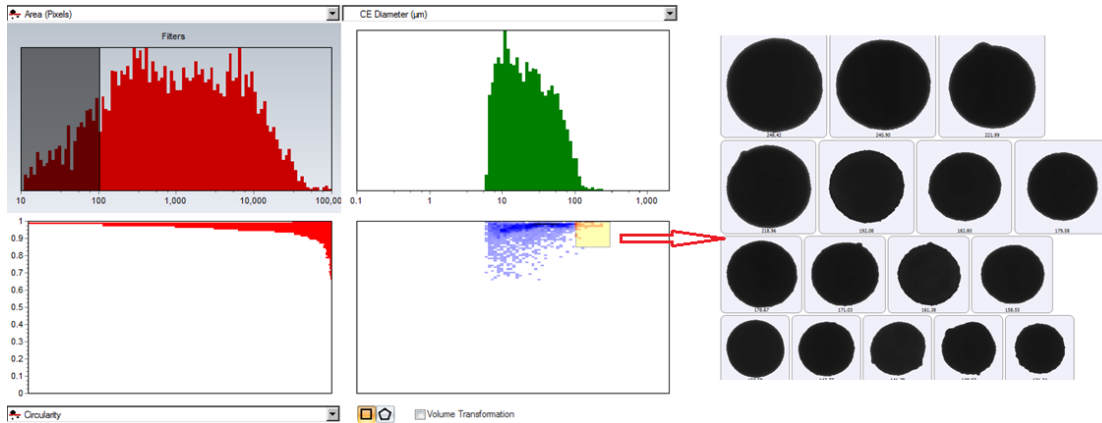
standardov zaradi istega velikostnega razreda (15-150 $\mu$ m) in se razlikujeta samo v količini kroglic (QAS 3002 je 2,5g, QAS 3006 pa 25mg), zato smo na obeh inštrumentih lahko preverili le QAS 3002. Rezultati dobljeni z LD so ustrezni glede na specifikacijo standarda QAS 3002 in nekoliko višji od rezultatov IA istega standarda, vendar so tudi ti ustrezni. Odstopanje med vrednostmi parametrov  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  in  $D_{90}$  (Tabela 21) kaže na to, da imajo pri LD večji delci večji prispevek. Torej je v primeru standarda, ki vsebuje odporne kroglaste delce tako meritev z LD kot tudi meritev na osnovi IA pravilna, manjše razlike so le posledica drugega načina meritve oz. podajanja rezultatov.

Tako z analizo standarda kot tudi vzorca smo potrdili, da z LD dobimo pričakovano višje rezultate, s tem, da je izbran ustrezen model pri LD.

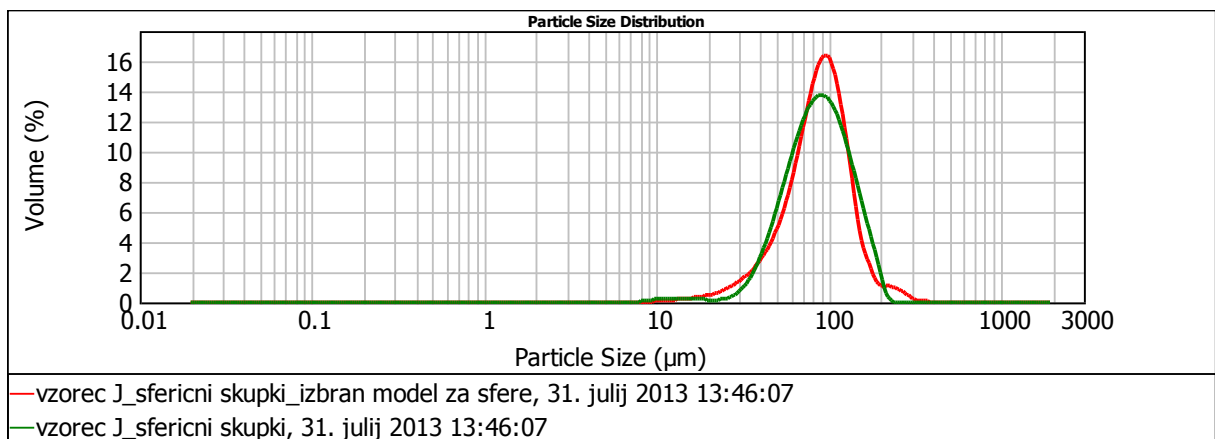
Razlog za tako dobro korelacijo je dejstvo, da smo se približali obliki pravilne krogle in smo pri obeh tehnikah dosegli najmanjšo možno stopnjo napake.

*Tabela 20: Povprečne vrednosti premerov ( $D[4,3]$ , CED) in parametrov  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  volumske porazdelitve LD in IA za vzorec J*

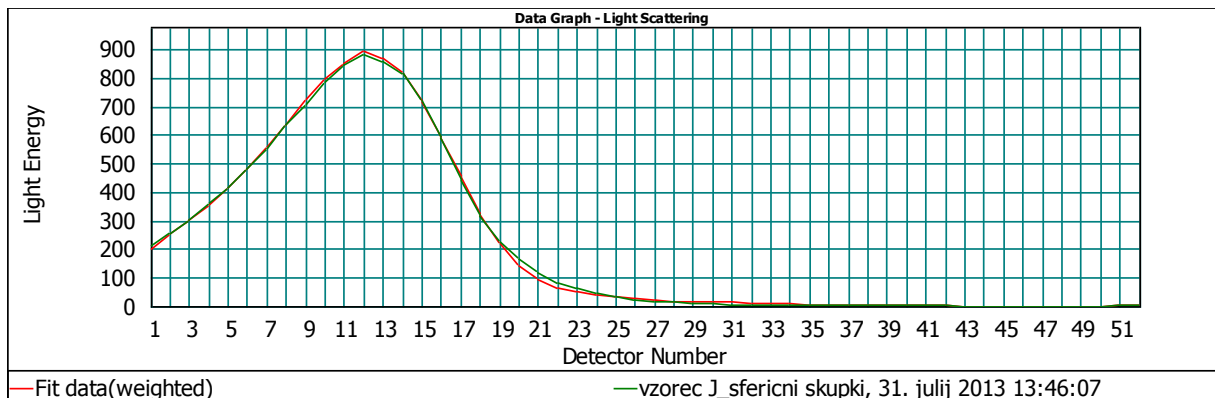
	LD				IA			
	$D[4,3]$ [ $\mu$ m]	$D_{10}$ [ $\mu$ m]	$D_{50}$ [ $\mu$ m]	$D_{90}$ [ $\mu$ m]	CED [ $\mu$ m]	$D_{10}$ [ $\mu$ m]	$D_{50}$ [ $\mu$ m]	$D_{90}$ [ $\mu$ m]
<b>J</b> »General purpose«	94	49	88	149	106	47	90	216
<b>J</b> »Single mode«	94	47	89	140	/	/	/	/



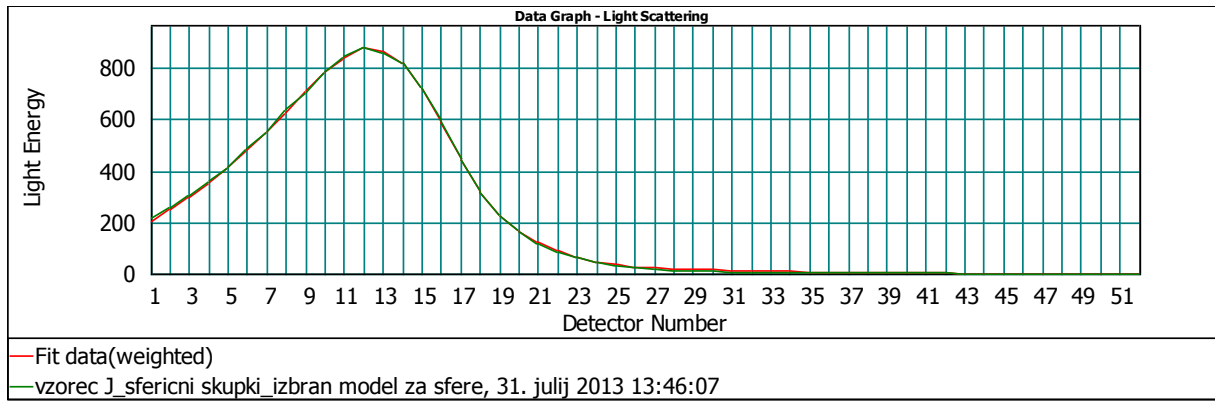
Slika 28: »Scattergram« prikazuje klasifikacijo vzorca J po velikosti (CED-zelena PSD) in obliki (okroglost-rdeča PSD) in karakterističnih, največjih kroglastih aglomeratov ( $CE_{maks}$  je  $246 \mu m$ )



Slika 29: Volumska distribucija LD vzorca J z modelom »General purpose« in »Single mode«



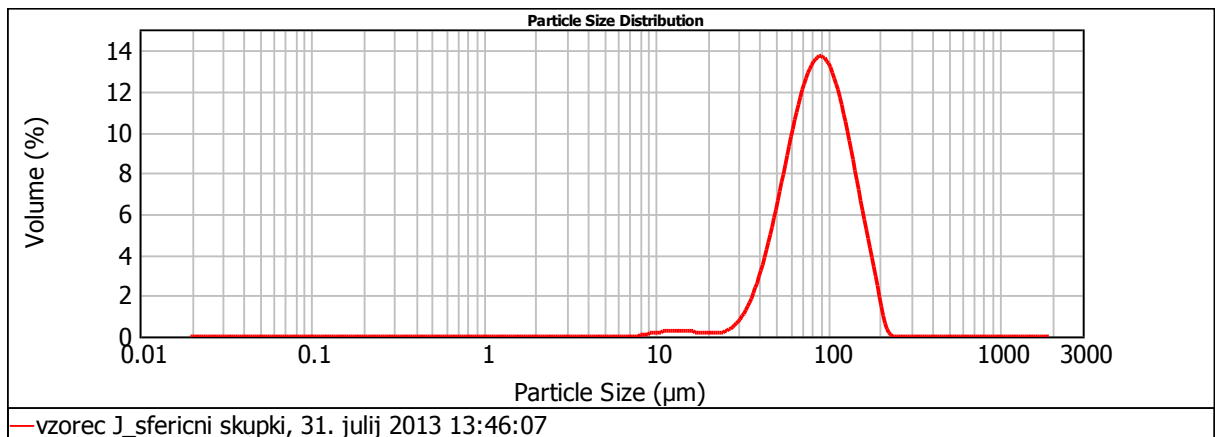
Slika 30: Ujemanje izmerjene in izračunane meritve z izbranim »General purpose« modelom za vzorec J



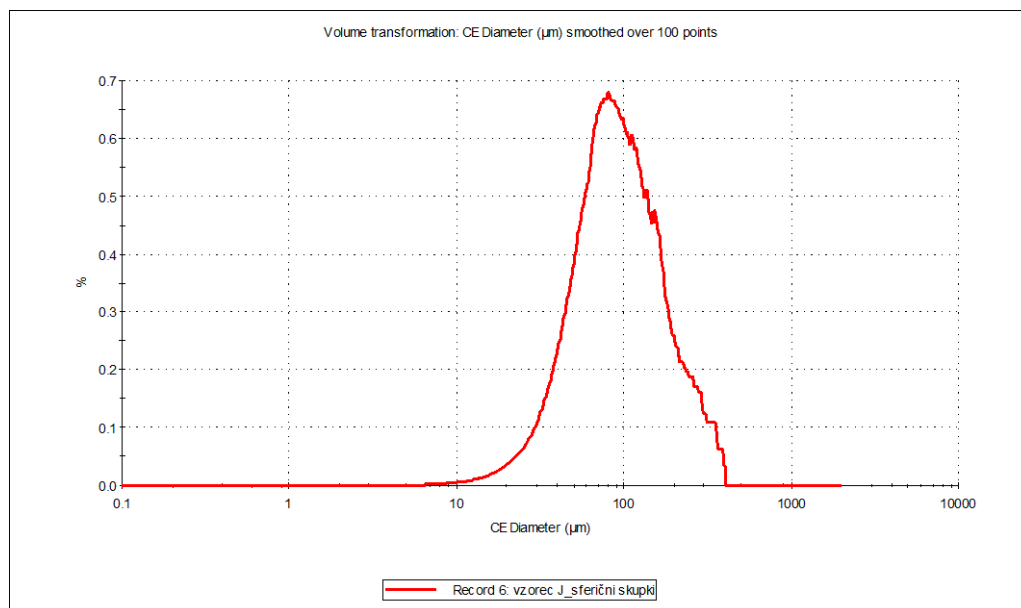
Slika 31: Ujemanje izmerjene in izračunane meritve s preračunanim »Single mode« modelom za vzorec J

Tabela 21: Vrednosti  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  volumske porazdelitve LD in IA za standard QAS 3002 in specifikacija za standard merjen z LD in IA

QAS 3002	LD [ $\mu\text{m}$ ]	specifikacija LD [ $\mu\text{m}$ ]		IA [ $\mu\text{m}$ ]	specifikacija IA [ $\mu\text{m}$ ]	
		spodnja meja	zgornja meja		spodnja meja	zgornja meja
$D_{10}$	38	37	40	37	33	40
$D_{50}$	62	61	65	59	49	66
$D_{90}$	88	86	95	80	74	86



Slika 32: Volumska distribucija dobljena z LD vzorca J



Slika 33: Volumska distribucija IA (transformacija iz številčne) vzorca J

Tudi iz primerjave porazdelitvenih krivulj, predvsem po položajih vrhov PSD (Slika 32 in 33), je razvidna dobra korelacija med tehnikama. Edino v širini PSD je manjša razlika (Tabela 22), ki je odvisna od izbranega matematičnega modela pri LD.

Tabela 22: Širina volumske distribucije pri LD in IA vzorca J

vzorec	J
širina distribucije LD	1,1
širina distribucije IA	1,9

Ostali parametri pridobljeni na osnovi IA tudi potrjujejo, da so v vzorcu J prisotni kroglasti aglomerati. Parameter okroglost je namreč najvišji (skoraj 1), parameter podolgovatost pa najnižji v primerjavi z ostalimi vzorci. Glede na vrednost intenzitete svetlobe so aglomerati najmanj transparentni in imajo najbolj gladko površino (konveksnost blizu 1), kar je pričakovano (Tabela 23).

*Tabela 23: Povprečne/maks. vrednosti ostalih (širina, dolžina, AR, okroglost, podolgovatost, konveksnost, intenziteta) parametrov IA za vzorec J*

	<b>širina (maks.)</b>	<b>dolžina (maks.)</b>	<b>AR</b>	<b>okroglost</b>	<b>podolgovatost</b>	<b>konveksnost</b>	<b>intenziteta (D50)</b>
<b>J</b>	140 $\mu\text{m}$	211 $\mu\text{m}$	0,792	0,909	0,208	0,994	53

## 5. SKLEP

Velikosti delcev zdravilne učinkovine in pomožnih snovi je ena od ključnih karakteristik, ki jih je potrebno vzeti v obzir že na samem začetku razvoja zdravila. In ker je vrednotenje velikosti delcev močno odvisno od oblike merjenih delcev, smo v magistrski nalogi raziskovali in vrednotili vpliv parametrov oblike na rezultate velikosti delcev pridobljene z metodo LD.

Največje razlike med rezultati LD in IA analize, predvsem v obliki porazdelitvenih krivulj, smo pričakovano dobili v primeru paličastih delcev, kot je znano že iz literature.

Rezultati LD so v vseh primerih paličastih delcev dejansko višji, kar pripisujemo dejstvu, da gre pri LD za prikaz in izračun rezultatov na osnovi volumske porazdelitve, kjer imajo veliki delci večji vpliv na končni rezultat. Med tehnikama se pojavijo večje razlike pri daljših palčkah. Z manjšanjem dolžine palčk pa se zmanjšujejo tudi razlike - rezultati LD se približajo rezultatom IA, ker se oblika delcev približuje obliki krogle.

Pri LD so krivulje večmodalne, kar je posledica preferenčne 3D orientacije v pretočni celici in so posledično izmerjeni isti delci pod različnimi koti, kar širi porazdelitev. Pri IA pa so vse krivulje unimodalne zaradi popolne preferenčne orientacije pri nanosu vzorca na objektno steklo, v tem primeru gre namreč za statično analizo.

Da se s krajšanjem dolžine palčk približujemo obliki krogle smo dokazali tudi s spremljanjem parametra okroglosti in podolgovatosti.

V drugem sklopu smo preučevali vpliv različnih oblik, ki se po obliki manj oddaljujejo od oblike krogle, na porazdelitev LD. Pri vseh vzorcih različnih oblik so prav tako kot pri vzorcih paličastih oblik vrednosti parametrov delcev z LD višje, ker se znova izrazi izrazitejši vpliv večjih delcev na volumsko distribucijo.

Pri nepravilnih ploščicah in nepravilnih skupkih je primerljivost med rezultati LD in IA večja kot v primeru vzorca, ki vsebuje palčke in ploščice, kar pripisujemo dejstvu, da prva dva vzorca vsebujeta delce, ki so po obliki bolj primerljivi obliki krogle.

Pri vzorcu, ki vsebuje delce v obliki piramid, so odstopanja med rezultati posameznih parametrov LD in IA največja, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji. Rezultate lahko razložimo na podlagi razlik v volumnu – piramidni delci so bolj voluminozni. Torej je prispevek tretje dimenzije (debeline), na rezultate LD, precejšnji, kar ima za posledico precej

---

višje rezultate vseh parametrov pri LD. Zanimivo pri takem vzorcu je tudi to, da se po parametrih oblike (vrednosti AR, okroglosti in podolgovatosti) najbolj približa vzorcu, ki vsebuje delce v obliki palčk in ploščic in so ti dejansko najbolj oddaljeni od oblike krogle, za delce piramid pa smo pričakovali obratno. Vendar je dobljena primerljivost med vzorcema posledica načina merjenja, saj gre pri IA za 2D analizo in so delci videti kot ploščice in so zato bolj primerljivi vzorcu s palčkami in ploščicami, pri LD pa gre kot že omenjeno za 3D analizo.

V zadnjem sklopu meritev smo analizirali delce (aglomerate) kroglastih oblik (vzorec J), pri katerih smo dobili pričakovano najboljšo korelacijo med LD in IA, s tem da smo pri LD upoštevali ustrezen matematični model, s katerim smo dobili pravilnejše rezultate, katere smo nato še preverili in potrdili z analizo standarda (steklene kroglice točno določene velikosti), ki je namenjen preveritvi delovanja instrumentov za določevanje porazdelitve velikosti delcev. V obeh primerih (vzorca in standarda) smo dobili pri LD višje rezultate, kar ponovno pripisujemo dejstvu, da imajo večji delci večji prispevek na volumsko PSD.

Najmanjšo stopnjo napake smo pri obeh tehnikah pričakovano dosegli pri delcih bolj kroglastih oblik, saj so ti po obliki najbližje obliki krogle in največjo napako pri delcih paličastih oblik, ki so najbolj oddaljeni od oblike krogle.

Da bi lahko kvantitativno ovrednotili stopnjo napake med korelacijo LD in IA različnih oblik delcev, bi bilo potrebno analizirati po več vzorcev enakih oblik (več vzorcev z delci v obliki piramid, v obliki nepravilnih ploščic, itd.), ki bi omogočila ustrezno statistično obdelavo.

Iz rezultatov našega dela je razvidno, da pri primerjavi rezultatov različnih tehnik največjo napako naredimo, kadar analiziramo voluminozne delce nepravilnih oblik (piramid). Taki delci so pri farmacevtskih substancah redki, najpogosteje se srečujemo z delci v obliki ploščic in palčk. Glede na naše rezultate, so razlike pri takih vzorcih manjše, vendar kljub vsemu večje kot če analiziramo bolj kroglaste delce (npr. granule, pelete).

## 6. LITERATURA

1. Horiba Scientific: A guidebook to particle size analysis
2. A. Rawle, Malvern Instruments: Basic principles of particle size analysis
3. A basic Guide to Particle Characterization, Malvern Instruments Limited 2012, Inform white paper
4. Harry G. Brittain: Particle-Size Distribution, Part I, Representations of Particle Shape, Size, and Distribution
5. [http://www.tcd.ie/CMA/misc/particle\\_size.pdf](http://www.tcd.ie/CMA/misc/particle_size.pdf) (dostop 8.2.2014)
6. Optical Microscopy. USP <776>, Ph.Eur. 2.9.37
7. Solid State Characterization of Pharmaceuticals. Edited by Angeline and Marek Zakrzewski. 2006 by assa Inc., All rights reserved
8. <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/application-notes/AN020710BasicPrinciplesPSA.aspx> (dostop 8.2.2014)
9. [http://www.sonozap.com/Particle\\_Sizing-An\\_Introduction.htm](http://www.sonozap.com/Particle_Sizing-An_Introduction.htm) (dostop 8.2.2014)
10. A. Rawle, Malvern Instruments: The importance of particle sizing to the coatings industry, Part 1: Particle size measurement
11. Malvern Instruments Ltd, Mastersizer 2000, user manual, MRK0864-01, 2007
12. [http://www.malvern.com/labeng/technology/laser\\_diffraction/laser\\_diffraction.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/laser_diffraction/laser_diffraction.htm) (dostop 22.6.2013)
13. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Rayleighovo\\_sipanje#Aproksimacija\\_velikosti\\_delca\\_in\\_intezitete\\_sipanja](http://sl.wikipedia.org/wiki/Rayleighovo_sipanje#Aproksimacija_velikosti_delca_in_intezitete_sipanja) (dostop 9.2.2014)
14. Mie theory, The first 100 years, Malvern application note
15. ISO13320 (1999). Particle Size Analysis – Laser Diffraction Methods. Part 1: General Principles.
16. Mastersizer 2000 application note MRK561-01: Wet method development for laser diffraction measurements
17. Tatsushi Matsuyama, Hideo Yamamoto: Particle Shape and Laser Diffraction: A Discussion of the Particle
18. Carl Crompton: Particle Shape An Important Parameter in Pharmaceutical Manufacturing, Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer Spring 05 issue. Samedan Ltd. 2005
19. Vaje iz materialov, Elektronska mikroskopija, Marijan Marinšek, Univerza v Ljubljani 2008-2009
20. <https://www.youtube.com/watch?v=ArPxfPjOJQc> (dostop 9.2.2014)
21. Morphologi G3, Automated Particle Characterization System, MRK978-01
22. Morphologi G3 User Manual, MAN0410 issue 2.0 November 2009
23. Automation of Manual QC analysis of Nasal Spray on the Morphologi G3. Application note MRK1064-01



24. Paul Kippax, Deborah Huck, Carl Levoguer, Anne Virden, Julie Suman: Characterizing A Nasal Spray Formulation From Droplet To API Particle Size (2011)
25. Characterization of pollen samples with the Morphologi G3S – A case study, Morphologi G3 application note, MRK1186-01
26. Morphologi G3S-Method development example: Assessing sample volume and dispersion homogeneity, Technical note, MRK1283-01
27. Deborah Huck: Particle shape – an important parameter, Malvern Instruments Ltd
28. ISO9276-6:2008(E): Representation of results of particle size analysis. Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology
29. Daniel Gantenbein, Joachim Schoelkopf, G. Peter Matthews, Patrick A.C. Gane: Determining the size distribution defined aspect ratio of platy particles. Applied Clay Science 53 (2011) 544-552
30. Characterization of air-sensitive catalyst particles using the Morphologi G3S particle characterization system in a glove box. Application note MRK1187-01
31. Particle size and shape measurement using image analysis, Image analysis application note MRK664-01
32. [http://ocw.metu.edu.tr/pluginfile.php/788/mod\\_resource/content/0/lecture-08.pdf](http://ocw.metu.edu.tr/pluginfile.php/788/mod_resource/content/0/lecture-08.pdf) (dostop 9.2.2014)
33. R. G. Billiones, M. L. Tackx and M. H. Daro: The Geometric Features, Shape Factors and Fractal Dimensions of Suspended Particulate Matter in the Scheldt Estuary (Belgium). Estuarine, Coastal and Shelf Science (1999) 48, 293–305
34. Characterizing the Monodispersity of Beads Using the Morphologi G3. Application note MRK1370-01
35. Set up classifications using the Morphologi G3's Scattergram tool. Morphologi application note MRK1028-01
36. Case study-Analyzing gypsum slurry on the Morphologi G3 with the wet cell accessory. Application note MRK1250-01
37. Heike Muhlenweg, E. Dan Hirleman: Laser Diffraction Spectroscopy: Influence of Particle Shape and a Shape Adaptation Technique. Part. Syst. Charact. 15 (1998) 163-169
38. Nadine Gabas, Noel Hiquily, Claude Laguerie: Response of Laser Diffraction Particle Sizer to Anisometric Particles. Part. Syst. Charact. 11 (1994) 21-126
39. M. Bumiller, J. Carson, J. Prescott: A preliminary investigation concerning the effect of particle shape on a powder's flow properties
40. Richard N. Kelly<sup>1</sup>, Jacqueline Kazanjian: Commercial Reference Shape Standards Use in the Study of Particle Shape Effect on Laser Diffraction Particle Size Analysis, AAPS PharmSciTech 2006; 7(2) Article 49
41. A.P. Tinke, A. Carnicer, R. Govoreanu, G. Scheltjens, L. Lauwerysen, N. Mertens, K. Vanhoutte, M.E. Brewster: Particle shape and orientation in laser diffraction and static image analysis size distribution analysis of micrometer sized rectangular particles, Powder Technology 186 (2008) 154-167
42. Willi Pabst, Jan Mikač, Eva Gregorova, Jiri Havrda: An estimate of orientation effects on the results of size distribution measurements for oblate particles (2002)

43. Ed Brewer, Arnold Ramsland: Particle Size Determination by Automated Microscopical Imaging Analysis with Comparison to Laser Diffraction
44. Ulrich Kohler, Thomas Stubinger, Wolfgang Witt: Laser-diffraction results from dynamic image analysis data. WCPT62010
45. Arnaud Califice, Frederic Michel, Godefroid Dislaire, Eric Pirard: Influence of particle shape on size distribution measurements by 3D and 2D image analyses and laser diffraction. Powder Technology 237 (2013) 67-75