

VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STUDIUM MECHANISMŮ MÍSENÍ PRÁŠKOVÝCH SMĚSÍ

PETR DOLEŽEL a JAN MUSELÍK

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
muselikj@vfu.cz

Došlo 11.4.12, přepracováno 28.2.13, přijato 15.3.13.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, mechanismy mísení, práškové směsi, vícerozměrná analýza dat, procesní analytická technologie

Úvod

Mísení práškových směsí je jeden z klíčových stupňů při výrobě lékové formy, jemuž je ve farmaceutické technologii věnována velká pozornost^{1–5}. V současné době je směřováno značné úsilí na vývoj vhodných analytických postupů a technik, které by umožnily přímou, rychlou a nedestruktivní analýzu mísícího procesu. Mezi analytické metody vhodné pro studium práškových směsí patří Ramanova spektroskopie. Jedná se o metodu procesní analytické technologie (process analytical technology, PAT), umožňující bezkontaktně monitorovat průběh celého mísícího procesu a studovat souvislosti mezi fyzikálně-chemickými a výrobními proměnnými⁶.

Při vyhodnocení spekter více-komponentních směsí je nutné využít metody vícerozměrné analýzy dat. Nejčastěji používaná je metoda částečných nejmenších čtverců (partial least squares), která umožňuje vyjádřit závislosti mezi maticí spektrálních dat a maticí hodnot koncentrací pomocí redukovaného počtu latentních proměnných. Kalibrací získaný model lze zpětně využít k predikci hodnot koncentrace látek v příslušné práškové směsi⁷.

Kvalita vyvinutého modelu je značně odvislá od použité kalibrační procedury. V literatuře je popsána řada ka-

libračních technik pro tvorbu modelů na zjištění obsahu práškových směsí. Některé techniky využívají jednorázově připravených kalibračních řad^{1,2}, jiné zohledňují proměnlivost homogenity vzorků v čase^{3–5}, v přístupech však chybí zohlednění vlivu fáze mísení na průběh kalibrace^{8,9}.

Na homogenitu vzorku mají vliv tři fáze mísení. Rozlišují se na konvekci, difuzi a stříh. Konvektivně-difuzní mísení je specifické pro bubnové mísiče, kdy v první fázi dochází ke střetu toků prášků a jejich rychlému smísení, později se uplatňuje zejména difuze charakteristická náhodným přeskupováním jednotlivých částic prášků. Stříhová fáze nastává jako důsledek tečné síly, která je způsobena pohybující se plochou částí mísiče, např. lopatky. Tato fáze mísení je značně účinná při mísení kohezivních materiálů a prášků se špatnými tokovými vlastnostmi^{8,9}.

Cílem práce je popsat možnosti bezkontaktní Ramanovy spektroskopie při studiu mísení práškových směsí. V práci jsou použity dvě modelové práškové směsi identického chemického složení, ale lišící se velikostí částic prášků. První část práce popisuje vývoj kalibračních modelů pro zjišťování koncentrace léčiva v modelových směsích, se zaměřením na zjištění vlivu použitého mechanismu mísení. Další část práce se věnuje studiu vlivu mísení a vlivu vibrací na homogenitu modelových směsí. Vibrace jsou běžné u některých technologických zařízení, jako násypky rotačních tabletovacích přístrojů a mohou vyústit až v segregaci směsi¹⁰.

Experimentální část

Materiál a složení směsí

Askorbová kyselina – AK (Ascorbic acid – fine granular, Takeda); Laktosa 80 (Pharmatose 80M, Fonterra Excipients); Laktosa 200 (Pharmatose 200M, Fonterra Excipients). Fyzikální vlastnosti prášků shrnuje tab. I.

Ke studiu mísení byly zvoleny dvě modelové směsi stejného chemického složení, hmotnostního poměru 60 % kyseliny askorbové a 40 % laktosy, lišící se v použitých síťových frakcích laktosy. Směs A obsahuje hrubozrnnou síťovou frakci Laktosa 80, o velikosti částic 250–350 μm . Směs B obsahuje jemnozrnnou frakci Laktosa 200, o velikosti částic <90 μm .

Tabulka I
Fyzikální vlastnosti prášků

Vzorek	Sítová frakce [μm]	Hustota částice [g cm^{-3}]	Setřesná hustota [g cm^{-3}]	Hausnerův poměr	Charakteristika toku
Laktosa 80	250–350	1,532±0,003	0,829±0,000	1,09±0,00	výborný
Laktosa 200	<90	1,544±0,003	0,630±0,002	1,17±0,01	dobrý
AK	250-350	1,688±0,001	0,970±0,000	1,11±0,00	výborný

Vývoj modelů

Vícerozměrná kalibrační metoda částečných nejmenších čtverců, PLS, se použila pro konstrukci modelů vystihujících závislost mezi spektrálními daty (matice X) a hmotnostními koncentracemi AK (matice Y). Cílem bylo vyvinout model pro každou modelovou směs, A resp. B.

K měření sloužil Ramanův spektroskop – RXN (Raman RXN, Kaiser Optical Systems) se sondou (PhAT system probehead, Kaiser Optical Systems) s laserem o vlnové délce 785 nm a šířce paprsku 6 mm. Detegovalo se emitované záření Ramanova posunu v oblasti vlnových délek 0–1920 nm.

Vzorky kalibrační řady se navážily do 20ml vialek, kde zabíraly přibližně třetinu objemu (5,0 g). Pro každou modelovou směs, A resp. B, se připravila jedna kalibrační řada, každá po 9 vzorcích, obsahující AK v rozsahu hmotnostních koncentrací 60 ± 15 %. K přípravě kalibračních vzorků se použil homogenizér Turbula – T2C (T2C, WAB AG Maschinenfabrik) a dále hřídelové míchadlo – RZR (RZR 2020, Heidolph). Nejprve se vialky vložily do nádoby T2C vystlané látkou, kde se mísilo 60 s při 48 ot./min. Poté se vialky vyjmuly, provedlo se skenování sondou RXN jedenkrát ze středu každé vialky a pak se obsah každé vialky mísil 15 s rotující lopatkou RZR při 400 ot./min, poté se znovu mísilo v T2C a následně provedlo skenování sondou RXN. Proces se několikrát opakoval, tak jak uvádí schéma z obr. 1a).

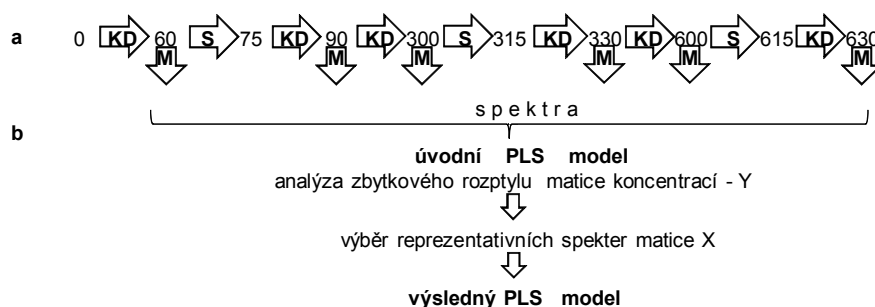
Vyhodnocení naměřených spekter proběhlo v programu Unscrambler 10.2. (Camo Inc.). Schéma vývoje výsledného modelu znázorňuje obr. 1b). Pro každou směs zvlášť, A resp. B, se sestrojil úvodní model ze spekter naměřených ve všech časech kalibrační procedury. Spektra se předem upravila standardizací optické dráhy (standard normal variate), redukující posuny základní linie způsobené nestejným rozptylem odraženého záření^{5,7}. Matice X úvodního modelu obsahovala spektra z 9 koncentračních hladin a 6 časů, celkově 54 spekter. Z těchto spekter se vybrala ta, jejichž zbytkový rozptyl (residual variance) příslušných koncentrací v matici Y se nelišil od průměrného zbytkového rozptylu o více než dvojnásobek hodnoty

směrodatné odchylky. Tímto postupem lze ve vícerozměrné analýze odstranit odlehle hodnoty⁷. Vybraná spektra se v každé koncentrační hladině zprůměrovala do jediného a použila se pro konstrukci výsledného modelu. Takto se postupovalo pro každou modelovou směs zvlášť.

Úvodní model směsi A resp. B se použil k hodnocení vlivu mechanismu mísení na homogenitu příslušné kalibrační řady. Párovým t-testem (QC Expert 3.2, TriloByte) se hodnotila významnost rozdílu středních hodnot zbytkového rozptylu koncentrací od nuly ($\alpha=0,05$; $n=28$), a to mezi časy s vlivem konvektivně-difuzního mísení (60, 300 a 600 s) a časy ovlivněnými stříhovým mísením (90, 330 a 630 s).

Validace modelů

Jako metoda pro externí validaci výsledných kalibračních modelů se použila UV-Vis spektrofotometrie (UV-1600 PC Spectrophotometer, VWR). Pro každou modelovou směs, A. resp. B, se připravila validační řada obsahující 10 vzorků, jejíž složení pokrývalo celý rozsah hmotnostních koncentrací AK, tedy 60 ± 15 %. Vzorky o hmotnosti 50 g se navážily do 100ml lékovek a poté umístily do T2C, kde se mísily 300 s bez přerušení. Poté se provedla tři měření sondou RXN okolo středu lékovky v odstupu 120° po pomyslné kružnici odpovídající přibližně polovině poloměru lékovky. Takto se proměřilo přibližně 25 % povrchu práškové směsi. Každá tři spektra se zprůměrovala do jediného. Z povrchu celé proměřené oblasti se dále odebralo špachtlí přibližně přesně 500 mg prášku, které se poté rozpustilo ve vodném roztoku 0,01 M kyseliny fosforečné prostém oxidu uhličitého. Měřila se absorbance kyseliny askorbové při 244 nm. Kvantifikace se provedla na základě kalibrační přímky, která byla lineární v rozsahu 0 až $18 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($r=0,999$). Při validaci metody se použil test regresní rovnici a dále analýza výtěžnosti (QC Expert 3.2, TriloByte)^{11,12}.



Obr. 1. (a) Schematické znázornění průběhu kalibrační procedury s uvedenými časy (v sekundách) mísení homogenizérem Turbula (KD) a hřídelovým míchadlem (S) a časy měření sondou Ramanova spektrometru (M). (b) Znárodnění vývoje výsledného PLS modelu z naměřených spekter

Studium vlivu mísení a vibrací na homogenitu práškové směsi

Vyvinuté a validované modely se následně aplikovaly při studiu vlivu mísení a vlivu vibrací na homogenitu práškových směsí. Každá modelová směs, A resp. B, se homogenizovala v T2S ve dvou nezávislých bězích. Homogenizace probíhala ve 100ml širokoúhlé lékovce s 50 g práškové směsi. Lékovky se vložily do T2S a v časech 5, 30, 60, 180, 300, 420, 600, 900, 1200, 1500 a 1800 s se mísení přerušilo, lékovka se vyjmula a obsah proměřil sondou RXN ze třech míst, způsobem popsáným v kapitole Validace modelů. Spektra po úpravě standardizací optické dráhy se následně hodnotila vyvinutým a validovaným modelem. Pro každý čas se získaly tři hodnoty hmotnostních koncentrací AK, které se vynesly do grafu v závislosti na čase.

Po skončení homogenizace se lékovky přemístily na svrchní plochu síťovacího přístroje (Fritch Analysette, Fritch) za účelem aplikace vibrací. Intenzita byla nastavena na čtvrtinu výkonu při frekvenci 50 Hz, což odpovídá amplitudě 0,7 mm. Lékovky podložené 1 cm tlustou neoprenovou destičkou se nechaly stát volně na ploše síťovacího přístroje. V časových intervalech 30, 120, 300, 600, 900, 1200, 1500 a 1800 s se lékovky opatrně ve vodorovné poloze přemístily pod sondu RXN. Měření a vyhodnocení se provedlo stejným způsobem jako v případě studia vlivu mísení.

Výsledky a diskuse

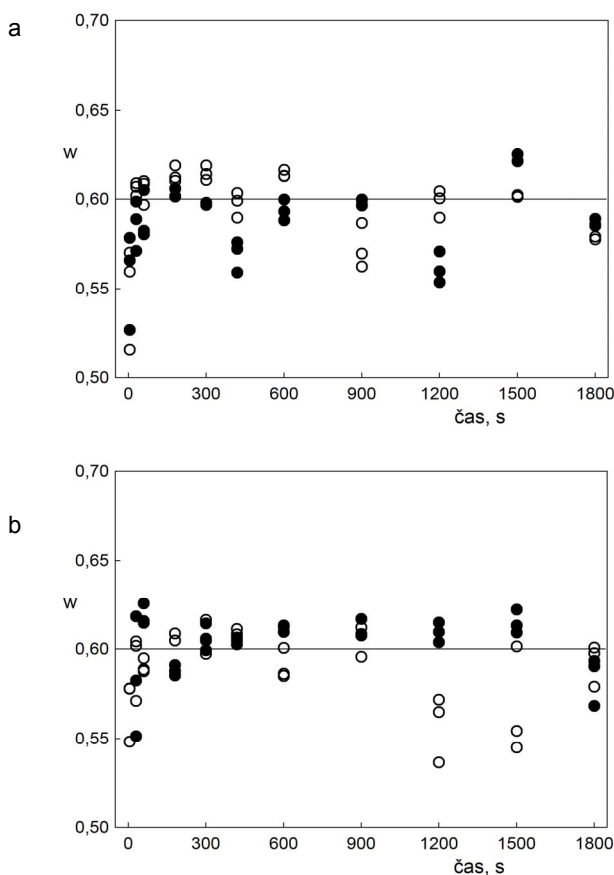
Vývoj modelů

Ze vzorků kalibračních sad se naměřila spektra, ze kterých se nejprve sestrojily úvodní modely pro směs A resp. B. Z těchto modelů se na základě maximálních hodnot zbytkového rozptylu koncentrací vybrala spektra vhodná pro konstrukci výsledných modelů. Vyřadila se 4 spektra z celkového počtu 54 spekter kalibrační řady směsi A, resp. 3 spektra z 54 spekter směsi B.

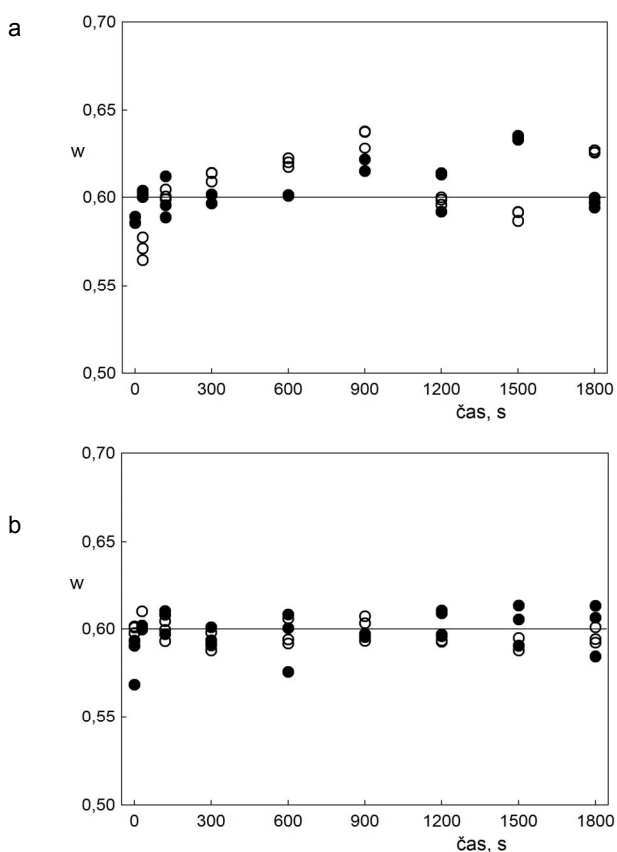
Dále se statisticky hodnotil vliv mechanismu mísení na homogenitu kalibračních řad. Zjistilo se, že rozdíl středních hodnot zbytkového rozptylu koncentrací v porovnávaných časech mísení se velmi významně liší od nuly u směsi B ($P < 0,01$), u směsi A je nevýznamný ($P = 0,37$). Zařazením stříhového mísení se tedy významně zlepšila homogenita směsi B obsahující podíl jemnozrné frakce pod 90 μm . To lze vysvětlit tím, že jemné částice jsou vázány silnějšími kohezními silami, mají menší volnost pohybu (viz tab. I), a tudíž stříhový efekt má vliv na jejich rozmíslení. Z výsledků plyne, že pro práškové směsi s obsahem jemnozrných frakcí je vhodné při přípravě kalibračních vzorků zařazovat mísení stříhem, což je aktuální u většiny práškových směsí ve farmaceutické technologii.

Validace modelů

Ověření kvality výsledných modelů proběhlo externí validací porovnávací hodnoty koncentrací AK predikovaných modelem a zjištěných UV-Vis spektrofotometrií. Testem regresní rovnice ($n=10$, $\alpha=0,05$) se podařilo vyloučit konstantní i soustavnou chybu měření u obou modelů (intervaly spolehlivosti pro směrnici a absolutní člen zahrnují hodnotu 1 resp. 0; $r \geq 0,998$). Průměrná výtěžnost a její pravděpodobná chyba aritmetického průměru pro model směsi A resp. B je $100,16 \pm 0,15\%$ a $99,80 \pm 0,22\%$. Následně se provedl párový t-test srovnávající predikované koncentrace s referenčními ($n=10$, $\alpha=0,05$). Výsledky potvrzují, že u obou modelů jsou rozdíly mezi koncentracemi AK predikovanými a zjištěnými referenční metodou statisticky nevýznamné.



Obr. 2. (a) Hmotnostní zlomek (w) AK v závislosti na čase mísení směsi A; (b) Hmotnostní zlomek AK v závislosti na čase mísení směsi B; v každém čase provedena tři měření; nominální koncentrace (—), první šarže (●), druhá šarže (○)



Obr. 3. (a) Hmotnostní zlomek (w) AK v průběhu působení vibrací na směs A; (b) Hmotnostní zlomek AK v průběhu působení vibrací na směs B; v každém čase provedena tři měření; nominální koncentrace (—), první šarže (●), druhá šarže (○)

Studium vlivu mísení a vibrací na homogenitu práškové směsi

Průběh mísení dvou šarží od každé modelové směsi A resp. B zobrazuje obr. 2. U obou směsí je v první minutě patrná prudká změna homogenity, která je charakteristická pro konvektivní fázi mísení. U směsi A obsahující hrubozrné prášky pozorujeme později průběh s kolísáním koncentrace kolem nominální hodnoty, což by se dalo vysvětlit opakovanou změnou homogenity směsi. U směsi B obsahující hrubé i jemné prášky se obě šarže zdají nejvíce homogenní v čase 420 s, kdy jsou obsahy AK nejbližší nominální hodnotě a mají minimální rozptyl. Následné mísení vede u obou šarží k odchylování od nominální hodnoty až do 1500 s, což lze vysvětlit postupnou segregací směsi. Ke konci mísení lze pozorovat opětovné zlepšení homogenity.

Působení vibrací na modelové směsi znázorňuje obr. 3. Je patrné, že hodnoty hmotnostní koncentrace AK obou šarží směsi A se mění výrazněji, než směsi B, kde

jsou téměř konstantní po celou dobu působení vibrací. Průběh se dále hodnotil metodou jedno-faktorové analýzy rozptylu. Potvrdilo se, že významný rozdíl ve středních hodnotách ($\alpha=0,05$) hmotnostních koncentrací AK se našel u obou šarží směsi A, nikoliv u směsi B. Z výsledků lze vyvodit, že obsah jemné sítové frakce (pod $90\ \mu\text{m}$) snižuje volnost pohybu částic (tab. I), což výsledně omezuje schopnost přeskupování částic a tím změnu homogenity. Jemnozrné prášky jsou tedy vhodnější pro procesy, kde působí vibrace, jako např. plnění některých typů tabletovacích strojů ve farmacii.

Závěr

První částí příspěvku popisují vývoj, optimalizaci a validaci kalibrační procedury pro získání modelů predikujících obsah kyseliny askorbové v práškových směsích. Použití inovativního postupu, využívajícího stříhové mísení, vedlo k významnému zlepšení kvality kalibračních řad práškových směsí s obsahem jemnozrných částic pod $90\ \mu\text{m}$. Toho lze prakticky využít při vývoji metod procesní analytické technologie ve farmaceutickém průmyslu, kde se při výrobě pevných lékových forem hojně využívá jemnozrných prášků. Zmíněný postup kalibrace, využívající malých objemů kalibračních vzorků, může nalézt uplatnění při tvorbě modelů i pro více-komponentní směsi, nebo kalibraci vzorků s problematickými tokovými vlastnostmi.

V další části příspěvku se výsledné modely aplikovaly na studium vlivu mísení a vibrací na homogenitu práškových směsí. Zjistilo se, že působením vibrací dochází k statisticky významné změně koncentrace kyseliny askorbové u směsi složené z hrubozrných částic nad $250\ \mu\text{m}$. Tyto částice mají větší volnost pohybu a jsou náchylnější k rozvrstvení, na rozdíl od směsi s obsahem jemnozrných částic, kde působení vibrací nemělo vliv na změnu koncentrace. Dosažené výsledky dokládají možnosti Ramanovy spektroskopie jako metody procesní analytické technologie.

Seznam zkratek

AK	askorbová kyselina
T2S	homogenizér Turbula
RZR	stříhové míchadlo
RXN	Ramanův spektroskop

Nášemu velkému poděkování se těší Dr. Jaakko Aaltonen a celý Ústav technologie léků University Helsinky za poskytnutí zázemí při měření experimentálních dat.

LITERATURA

- Berntsson O., Danielsson L. G., Lagerholm B., Folestad S.: Powder Technol. 123, 185 (2002).
- Li W., Worosila G. D.: Int. J. Pharm. 295, 213 (2005).
- Popo M., Romero-Torres S., Conde C., Romañach R.

- J.: AAPS Pharm. Sci. Tech. 3, 24 (2002).
4. Karande A. D., Liew C. V., Heng P. W. S.: Int. J. Pharm. 395, 91 (2010).
 5. Liew C. V., Karande A. D., Heng P. W. S.: Int. J. Pharm. 386, 138 (2010).
 6. DeBeer T., Burggraeve A., Fonteyne M., Saerens L., Remon J. P., Vervaet C.: Int. J. Pharm. 417, 32 (2011).
 7. Esbensen K. H.: *Multivariate Data Analysis – In Practice*, CAMO Process AS, 5. vydání, 2004.
 8. Gyenis J.: Chem. Eng. Process. 38, 665 (1999).
 9. Lu L. S., Hsiau S. S.: Powder Technol. 184, 31 (2008).
 10. Staniforth J. N.: Int. J. Pharm. 12, 199 (1982).
 11. Muselík J., Krejčová K., Rabišková M., Bartošíková A., Dračková M., Vorlová L.: Chem. Listy 104, 41 (2010).
 12. Ševčík J. G. K.: *Metodologie měření v analytické chemii*, Karolinum, Praha 1996.

P. Doležel and J. Muselík (*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **The Use of Raman Spectroscopy in the Study of Mixing Mechanisms for Powder Blends**

The article describes the development of calibration procedures for quantitative evaluation of powder blends utilizing non-contact probe of Raman spectrometer. Two model blends containing ascorbic acid and lactose were chosen. They differed in the used sieve fractions. A new procedure combining convective-diffusive and shear mixing was used for the development of PLS (partial least squares regression) calibration methods. This procedure significantly improves the homogeneity of the mixtures containing fine particles of the size below 100 μm . The newly developed methods were further utilized to study blending and the impact of vibrations on the powder blend. The results imply that the particles size has a statistically significant impact on the change of homogeneity in the course of vibration action. The results demonstrated the potential of Raman spectroscopy to be used as a PAT (process analytical technology) method in pharmaceutical analysis.