

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE PARTICULAS MEDIANTE UN MICRÓSCOPIO DE LUZ ÓPTICA ASISTIDO POR UN COMPUTADOR PERSONAL

VALIDATION OF THE TECHNIQUE OF ANALYSIS OF THE SIZE OF PARTICLES
BY MEANS OF AN IMPROVED OPTIC LIGHT MICROSCOPE ASSISTED BY A
PERSONAL COMPUTER

Oscar Albeiro Florez A.^{1*}, Gloria Elena Tobón Z.¹, Jairo Baena R.¹

RESUMEN

En este artículo se presenta la validación de la técnica de medición del tamaño de partículas micropulverizadas usando el microscopio de luz óptica facilitando y mejorando el método cuando se adapta a un computador personal. Los parámetros críticos evaluados para esta técnica (Precisión intermedia y robustez) son recomendados por la FDA en una guía de validación para la industria.

Palabras clave: *Tamaño de partícula, validación, partículas microcristalinas, precisión intermedia.*

ABSTRACT

This paper reports the validation of a technique for size measurement of micropulverized particles through a method that improves and facilitates the use of the optic light microscope when it is adapted to a personal computer. The critical parameters evaluated for this technique are recommended by the FDA in a validation guide for the industry.

Key words: *Particle size, validation, microcrystalline particles, intermediate precision.*

1 Departamento de Farmacia, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia, Correo electrónico: oflorez@muisca.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han venido incrementando las exigencias de verificación de la aptitud del uso de métodos y equipos de análisis, como componentes de los sistemas de aseguramiento de calidad en lo que tiene que ver con la obtención de datos confiables y se ha planteado la necesidad de que estas técnicas puedan ser aplicadas, independientemente del laboratorio donde se realice la prueba.

La validación de un método o una técnica analítica permite confirmar con un alto grado de confiabilidad, que el procedimiento empleado para una prueba específica es adecuado para el uso propuesto. En este sentido, es necesario determinar para cada validación en particular, cuáles son las pruebas críticas que puedan evaluar si un determinado factor del método de análisis, posee los atributos requeridos para obtener las especificaciones esperadas.

De manera particular dentro de los principales objetivos de la implementación del método de microscopía óptica en un análisis de cristalinidad, está el conseguir mediciones confiables de las características físicas de las partículas, como son el tamaño, la forma y otros atributos relacionados, propiedades estas que pueden afectar grandemente los procesos de formulación y de manufactura de las formas de dosificación farmacéuticas.

Entre las muchas maneras de medir y caracterizar las partículas finas, la utilización de la microscopía de luz óptica sigue siendo una técnica básica y de amplio uso gracias a su bajo costo y fácil implementación. Entre las ventajas que esta técnica tiene están las de poder medir partículas individuales, observarlas directamente en dos dimensiones reales, evaluar la capacidad de birrefringencia, determinar la presencia de aglomerados y agregados, y otras características más.

Para medir el tamaño de partícula por el método del microscopio simple se utilizan prin-

cipalmente 2 técnicas (1). La primera es la British Standard 3406 parte 4 (1963), en la que de dos series de círculos de tamaño creciente y de contraste claro y oscuro, deben compararse en tamaño con las partículas medidas.

La segunda técnica es la determinación por medio de una escala lineal, en donde la medición de tamaño de la partícula debe incluir también la información sobre el tipo de diámetro medido -unidades de área (d^2), de volumen (d^3) equivalentes, o de peso (d_w)- así como la información sobre la forma de la partícula, ya que en la mayoría de los casos las partículas no son uniformes en sus 3 dimensiones (2).

En la guía borrador propuesta por la FDA para procedimientos analíticos y métodos de validación, se sugiere evaluar como puntos críticos en la medición del tamaño de partículas por medio de la microscopía óptica, la precisión intermedia y la robustez, asegurando la reproducibilidad de los datos (3). En este caso la exactitud se evalúa como parámetro de control del método y de calibración del equipo.

Finalmente, en el presente trabajo se evalúa el potencial que representa un microscopio de luz óptica acoplado a un computador y las muchas ventajas que los diferentes software pueden ofrecer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y software. Las pruebas se realizan utilizando un microscopio de luz óptica acoplado a un computador compatible y una cámara de video. La adquisición de fotografías de las muestras a medir se realiza por medio del software Opticam (4).

Muestras. En el análisis se utilizaron diferentes materias primas sólidas farmacéuticas: ranitidina (Orchev Pharma PVT. Ltd, lote: R-005(00)) M1, ibuprofeno (Mallinckrodt, lote: B04675 (00)) M2, captopril (T. C. Chemical Development Ltd., lote:000305 (00)) M3.

Preparación de las muestras. Todas las mediciones se realizan preparando una suspensión de las partículas en aceite mineral o silicona.

Calibración. En las mediciones del tamaño de partícula obtenidas por el método mejorado por medio del computador, se toman microfotografías que se calibran contra las medidas realizadas en una escala horizontal micrométrica (Nikon, MBM12100), utilizando diferentes objetivos del microscopio. Cada una de las unidades de lectura en una microfotografía equivale a 0,0036 milímetros de la escala. Esta es una calibración de tipo rutinaria y que en este caso, sirve como control de la exactitud del método.

DISEÑO DE LAS PRUEBAS

Ensayos para la exactitud. Aún cuando la exactitud, en este caso, no es considerada un parámetro crítico de control, se realiza para comparar si existe diferencia entre los resultados obtenidos sobre varios objetos microscópicos medidos por medio de la escala ocular micrométrica colocada en un microscopio simple, y luego con los mismos objetos medidos en las microfotografías del computador.

En estas pruebas se utilizan objetivos de 4X, 6.3X, y 10X, para ambos métodos.

Como base de cálculo inicialmente se evalúa si los datos obtenidos por el método de la escala y el de microfotografía provienen de una distribución normal. Este análisis se realiza por las pruebas de kurtosis y de asimetría estandarizadas. A continuación se verifica si existe diferencia significativa en la desviación estándar entre los 2 métodos por medio de la prueba F de Snedecor. Posteriormente se debe efectuar la comparación de los promedios de ambos métodos por medio de la prueba de t-Student.

Ensayos para la precisión intermedia. Se realizan mediciones de tamaño de partícula para determinar la reproducibilidad debida al cambio de analistas y de días diferentes.

- Se toman microfotografías de una partícula cada vez.
- Se hacen mediciones independientes de las muestras seleccionadas.
- Un analista un día, otro día otro analista, para la misma microfotografía.

Como base de cálculo se efectúa un análisis de varianza (ANOVA), de acuerdo con lo presentado en la tabla 1, producto del cambio de analista y/o día de las mediciones:

Tabla 1. Modelo del análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de precisión intermedia.

F. de V.	G. de L.	SC	CM	F. cal.	F. tab.
Analista (a)	a-1	SC _a	$CM_a = \frac{SC_a}{GL_a}$	$F_a = \frac{CM_a}{CM_d}$	$\frac{GL_a}{GL_d}$
Día (d)	(d-1)a	SC _d	$CM_d = \frac{SC_d}{GL_d}$	$F_d = \frac{CM_d}{CM_e}$	$\frac{GL_d}{GL_e}$
Error (e)	(r-1)ad	SC _e	$CM_e = \frac{SC_e}{GL_e}$		

En donde, F. de V., son las fuentes de variación; G. de L., son los grados de libertad; SC, es la suma de cuadrados respectivos; CM, son los cuadrados medios; F. Cal. (F_a y F_d), son la razón de varianzas calculadas para analistas o días, F.Tab., es la razón de varianzas obtenida de la tabla de F.

Esta tabla ANOVA se interpreta de la siguiente manera: Si F_a es menor que el valor obtenido en la tabla de F para GL_a/G_d, el método se puede considerar reproducible por los analistas; y si F_d es menor que el valor obtenido en la tabla de F para GL_d/GL_e, el método se pue-

de considerar reproducible en días diferentes por un mismo analista.

Ensayos para la robustez.

Se utilizó el método de Plackett y Burman (5). Este plan presenta un diseño experimental fraccional especialmente simple, en donde 7 variables combinadas pueden ser evaluadas con solo 8 pruebas. Cada una de las variables se lleva a cabo a 2 niveles. Los niveles son aquellas pequeñas variaciones que presenta la técnica, que a veces podrían no ser controlables.

La mitad de los 8 ensayos necesarios utiliza un nivel (ABCDEFG), y la otra mitad el otro nivel (abcdefg). Los resultados de estas pruebas aparecen expresadas con las letras: s, t, u, v, w, y, z. Este plan experimental se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas y resultados de la prueba de robustez

Ensayo N°	Prueba	Resultado
1	A B C D E F G =	s
2	A B c D e f g =	t
3	A b C d E f g =	u
4	A b c d e F G =	v
5	a B C d e F g =	w
6	a B c d E f G =	x
7	a b C D e f G =	y
8	a b c D E F g =	z

Las variables analizadas con sus respectivos niveles serán:

1. Medio líquido en donde se suspenden las partículas: En aceite mineral (A), o en silicona (S).
2. Forma de iluminación: Vertical (V), o la combinación de luz vertical y horizontal (VH).
3. Tiempo de medición después de suspendidas las partículas: Inmediatamente (0), o luego de 5 minutos (5).

4. Objetivo utilizado para la misma partícula: Con 10X (10), o con 40X (40).
5. Métodos de medición utilizada para medir el diámetro de las partículas: Diámetro de Martín (M), o diámetro de Feret (F). (Ver figura 1 y 2).
6. Tamaño de ampliación de las microfotografías en las cuales se hacen las mediciones: Aumento de 150 veces (150), o aumento de 250 veces (250).

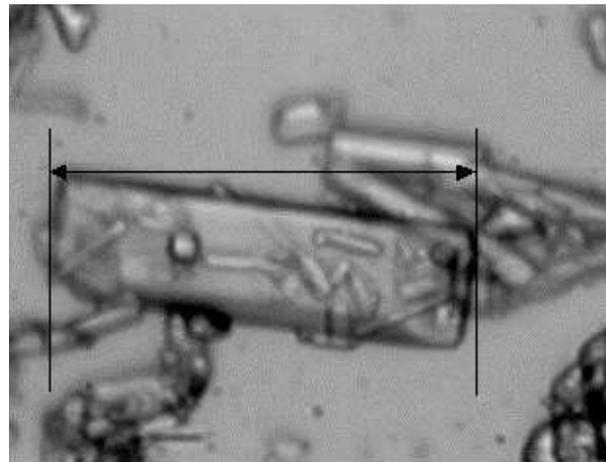


Figura 1. Medición por el diámetro de Feret. de cristales de ibuprofeno.

Como base de cálculo de cada uno de los resultados obtenidos en las 8 pruebas se obtiene el efecto E_i (producto de la diferencia) de cada factor, representado en la tabla 3.

Tabla 3. Representación de la obtención de los efectos para la prueba de robustez

Factor	Diferencia	Efecto
A - B	... (s+t+u+v) ... (w+x+y+z)	E_A
B - b	... (s+t+w+x) ... (u+v+y+z)	E_B
C - c	... (s+u+w+y) ... (t+v+x+z)	E_C
D - d	... (s+t+y+z) ... (u+v+w+x)	E_D
E - e	... (s+u+x+z) ... (t+v+w+y)	E_E
F - f	... (s+v+w+z) ... (t+u+x+y)	E_F
G - g	... (s+v+x+y) ... (t+u+w+z)	E_G

Para decidir si un factor tiene un efecto importante, se utiliza la prueba t de Student (6).

La varianza (S^2) debida al error puede obtenerse por:

$$S^2 = \sum E_i^2 / (n), \text{ con } E_i \text{ cada uno de los efectos}$$

Y se debe comparar la significancia para cada uno de estos efectos sustituyendo los datos experimentales en la ecuación:

$$t_i = \frac{E_i (n-1)^{1/2}}{S},$$

donde n es igual al número de variables

contra el valor de t crítico. Si algún valor $|t_i|$ excede el valor de t crítico, entonces se asume que el efecto es significativo.

EXACTITUD

Se basa en la comparación de los promedios de las mediciones obtenidos por medio de la técnicas de la escala y de la microfotografía (véase la tabla 4).

Tabla 4. Datos obtenido y análisis estadísticos para la prueba de exactitud, donde se comparan los valores obtenidos por el método de la escala y el de las microfotografías, también se muestran los objetivos utilizados.

Objetivo	Escala	Microfotografía
10X	0,008	0,0063108
10X	0,005	0,0049680
6,3X	0,004	0,0039960
6,3X	0,004	0,0039960
6,3X	0,010	0,0097164
6,3X	0,004	0,0041472
6,3X	0,003	0,0030348
4X	0,002	0,0024768
4X	0,002	0,0024840
4X	0,005	0,0059832
4X	0,002	0,0024300
4X	0,002	0,0019548
Total de muestras	12	12
Promedio	$4,25 \times 10^{-3}$	$4,29 \times 10^{-3}$
Desviación estándar	$2,53 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-3}$
Varianza	$6,39 \times 10^{-6}$	$4,92 \times 10^{-6}$
Grados de libertad	11	11

Comparación de las Desviaciones Estándar- El intervalo de confianza para la razón de varianzas va desde 0,374 hasta 4,512. Como este intervalo contiene el valor 1, No hay una diferencia estadística entre las desviaciones estándar de las 2 muestras a un nivel de confianza del 95,0%.

En la prueba F, tomando como $H_0: \sigma_1 = \sigma_2$, y $H_a: \sigma_1 \neq \sigma_2$, presenta:

$$F = 1,29884, \text{ valor-P} = 0,672092$$

y puesto que el valor-P no es menor que 0,05, no se puede rechazar H_0 , o sea que no se puede asumir una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar de los dos métodos.

Los resultados de las pruebas de asimetría estandarizada (1.8748, 1.97968) y de Kurtosis estandarizada (0.963079, 1.55837), necesarias para demostrar que los datos obtenidos deben venir de una distribución de frecuencia normal muestran valores dentro del rango de -2 a +2, ratifican que la prueba anterior de comparación de varianzas puede ser utilizada.

Comparación de medias- En la prueba de t-Student para comparar medias, tomando como H_0 : media1 = media1, y H_a : media1 \neq media2, da como resultado:

$$t = -0,0427597, \text{ y un valor-P} = 0,483139$$

Como el valor-P no es menor que 0.05, no se puede rechazar H_0 .

PRECISIÓN INTERMEDIA

Los datos que aparecen en la tabla N° 5 se obtuvieron de la siguiente manera: Cada una de las microfotografías es medida por un analista y otro día, esta misma microfotografía es medida por otro analista.

Tabla 5. Datos obtenidos por cada analista y cada día.

DÍA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	16,05	17,29
	15,85	14,64
	16,11	15,90
2	16,22	15,35
	16,56	15,66
	16,72	15,46

Luego se efectúa una ANOVA para evaluar la reproducibilidad debida a los factores analista y día, los cuales, para este caso, constituyen la precisión intermedia, y los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. ANOVA para el análisis de la precisión intermedia.

F. de V.	G. de L.	S. de C.	C.M.	F. Cal.	F. Tab.
Analista (a)	1,00	0,86	0,86	2,53	38,51
Día (d)	2,00	0,68	0,34	0,73	6,06
Error (e)	8,00	3,73	0,47		

ROBUSTEZ

Como se indicó anteriormente, este parámetro se debe evaluar por medio de 8 ensayos (véase la tabla 7), además, en este caso se hicieron 8 réplicas y con diferentes partículas (ver la tabla 8), de la siguiente forma:

- 2 analistas diferentes: A1 y A2
- 3 muestras diferentes: M1, M2, M3
- Se repitió cada una de las mediciones por cada uno de los analistas: $(A_1-M_1)_1, (A_1-M_1)_2$.

Tabla 7. Ensayos para evaluar la robustez.

N°	Prueba							Resultado	
1	A	V	0	10	M	150	G	=	s
2	A	V	5	10	F	250	g	=	t
3	A	VH	0	40	M	250	g	=	u
4	A	VH	5	40	F	150	G	=	v
5	S	V	0	40	F	150	g	=	w
6	S	V	5	40	M	250	G	=	x
7	S	VH	0	10	F	250	G	=	y
8	S	VH	5	10	M	150	g	=	z

Para esta prueba, las letras G y g se utilizaron como variables falsas que no afectan las respuestas y que complementan el diseño experimental.

Tabla 8. Resultados de las pruebas y repeticiones para el análisis de robustez. Analistas diferentes: A1 y A2; muestras diferentes: M1, M2, M3; repeticiones por cada una de las pruebas (A_i-M_j)1, (A_i-M_j)2.

Prueba	(A1-M1)1	(A1-M1)2	(A2-M1)1	(A2-M1)2	(A1-M2)1	(A1-M2)2	(A2-M3)1	(A2-M3)2
s	2,82	3,00	11,82	13,23	16,05	16,05	8,46	8,64
t	6,95	6,25	8,40	8,68	16,80	14,05	9,38	8,57
u	12,76	12,17	45,75	48,37	66,40	60,70	30,27	27,62
v	25,04	25,57	33,51	34,05	52,38	52,3	31,75	31,23
w	61,38	60,68	31,05	30,69	70,93	69,15	10,3	10,23
x	38,15	38,85	25,61	25,19	63,85	64,98	32,83	32,60
y	15,76	15,45	8,12	7,73	18,02	18,09	15,50	15,03
z	9,05	11,47	6,33	5,65	16,72	15,34	8,60	8,80

La estimación de los efectos (E_i) para cada una de las pruebas por diferente analista y muestra de las 7 variables (E_A, E_B, \dots, E_G) y por cada una de las repeticiones. (véase la tabla 9).

Tabla 9. Efectos estimados (E_i) para cada una de las repeticiones.

Efecto	(A1-M1)1	(A1-M1)2	(A2-M1)1	(A2-M1)2	(A1-M2)1	(A1-M2)2	(A2-M3)1	(A2-M3)2
Ea	-19,193	-19,865	7,0925	8,7675	-4,4725	-6,115	3,1575	2,35
Eb	11,673	11,030	-4,2075	-4,5025	3,5275	4,450	-6,2875	-5,66
Ec	3,3825	2,290	5,7225	6,6125	5,4125	4,330	-4,5075	-4,92
Ed	-25,688	-25,275	25,313	-25,753	-46,493	-45,90	-15,803	-15,16
Ee	-11,588	-10,615	2,1075	2,8225	1,2225	0,870	3,3075	3,15
Ef	6,1675	7,000	1,2925	-1,5875	-2,2475	-1,245	-7,2175	-6,23
Eg	-2,0925	-1,925	-3,1175	-3,2975	-5,1375	-1,955	7,4975	8,07

El efecto global de las pruebas (E_i^2), se obtiene elevando al cuadrado el promedio de los valores de cada uno de los efectos anteriores y el valor comparativo para cada efecto E_i , se puede estimar por medio de los valores t_i (experimentales). El valor crítico obtenido t de Student con $n-1$ grados de libertad y a un nivel de confianza del 95%. Los datos anteriores se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de E_i , $|t_i|$ (experimental), desviación estándar calculada S y el valor crítico, en donde $t_{(0.95;7)}$.

Efecto	E_i^2	$ t_i $
Ea	12,49400	1,1852
Eb	1,569539	0,4201
Ec	5,245531	0,7680
Ed	477,19040	7,3252
Ee	1,188781	0,3650
Ef	0,258509	0,1704
Eg	0,059872	0,0820
Desv. Estd.		8,43
Valor crítico de t		1,9432

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la validez de la técnica de medición del tamaño de partículas finamente pulverizadas por medio de un microscopio de luz óptica adaptado a un computador, por medio del cual las mediciones se realizan en microfotografías ampliadas de las muestras a medir. Como la mayoría de las partículas se presentan con forma externa irregular la caracterización del tamaño y las definiciones de las medidas pueden ser muy variadas.

Para llevar a cabo la validación se consideraron como parámetros críticos:

Para la precisión intermedia, se evaluó el efecto de cambio de analista y de día. Como en la prueba de ANOVA se encontró que F_a obtenido experimentalmente fue menor que el valor obtenido en la tabla de F (con $G.L_a/G.L_d = 1/2$), el método se puede considerar reproducible por los analistas; a su vez, como F_d es menor que el valor obtenido en la tabla de F ($G.L_d/G.L_c = 2/8$), el

método se considera reproducible en días diferentes por un mismo analista.

En la evaluación de la robustez del método, se puede observar que uno de los valores experimentales sobrepasa el valor crítico de la tabla de t-Student (E_d), lo cual significa que el método es robusto y que las pequeñas variaciones de: líquido de suspensión, dirección de la luz, tiempo de preparación de estas suspensiones, técnica de medición del diámetro, o la ampliación de las microfotografías, no afectarán la respuesta cuando se aplique este método; sin embargo, las mediciones de una misma partícula hechas por diferente objetivo (10X o 40X), si pueden presentar una variación significativa.

La calibración de las mediciones se verificó mediante la prueba de exactitud, en la cual se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la medición con una escala tradicional de referencia y las mediciones hechas sobre una microfotografía ampliada por computador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wells, J. I. Pharmaceutical Preformulation. Londres. Ellis Horwood. 1993; pág. 199.
2. United States Pharmacopeia 24. NF 19. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. Washington, D.C. 1999; pag. 1965 – 1967.
3. Federal Drug Administration. Guidance For Industry. Analytical Procedures And Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, And Controls Documentation. Anexo B., Rockville, Maryland. 2000; pág. 26.
4. Plustek Opticam. Model 300U. User's guide. USB. Versión 1.0. March, 1999.
5. Plackett, R. L., Burman, J. P. Biometrika. Vol. 33, 305-308, 1946.
6. Connors, K., A., Amidon, G., L., Stella, V., J. Chemical Stability of Pharmaceuticals. A Handbook for Pharmacists. 2° Ed. New York. John Wiley & Sons. 1985; pág. 148-149.

*Recibido: Abril 9 de 2002
Aceptado: Mayo 21 de 2002*