**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Оптическая микроскопия** |  | **ОФС.1.2.1.0009** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.0009.15** |

|  |
| --- |
|  |

Оптической микроскопией называют совокупность методов исследования частиц фармацевтических образцов лекарственных средств, невидимых невооруженным глазом, с помощью оптического микроскопа.

Размер частиц, которые могут быть исследованы данным методом, определяется разрешающей способностью микроскопа и обычно составляет 1 мкм и более. Используют также микроскопы с общим увеличением более 1500 крат, что позволяет характеризовать объекты размером от 0,5 мкм с разрешением отдельных структур объекта до 0,1 мкм.

**Область применения**

Оптическую микроскопию применяют:

- в фармакопейном анализе для определения размера частиц при контроле качества мягких лекарственных форм, суспензий, эмульсий, аэрозолей;

- в технологии лекарственных форм для определения степени измельчения фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ;

- для исследования кристаллической структуры фармацевтических субстанций;

- для определения характеристик (формы и размера) частиц фармацевтических субстанций, которые не являются сферическими (не имеют сферическую форму).

**Оборудование**

Оптический микроскоп имеет двухступенчатую систему увеличения, образованную объективом и окуляром. Все узлы микроскопа монтируются на массивном основании. На основании микроскопа установлен трубодержатель, в котором укреплён тубус с объективом и окуляром. Под объективом находится предметный столик, под которым расположена осветительная система (зеркало, коллектор, конденсор).

Для освещения объекта наблюдения может быть использован как естественный свет, так и специальные источники света (встроенные или внешние осветители).

Микроскоп может быть снабжён дополнительными приспособлениями (фазово-контрастными устройствами, конденсорами тёмного поля, поляризаторами, анализаторами и др.) и, в зависимости от выбранного метода исследования, может быть светлопольным, тёмнопольным, фазово-контрастным, поляризационным и др.

Испытуемый образец помещают на предметный столик. Свет от источника света, проходя через осветительную систему, испытуемый образец (далее – образец) и объектив, попадает в окуляр или установленную вместо него систему регистрации, фото- или видеокамеру. Через окуляр осуществляют визуальное исследование образца, а соединённая с компьютером цифровая фото- или видеокамера позволяет регистрировать изображения образца, после чего их можно обрабатывать по специальным программам в полу- или полностью автоматическом режиме.

**Условия калибровки и измерения**

Увеличение микроскопа (произведение увеличений объектива, окуляра и дополнительных приставок) должно быть достаточным для адекватного описания и определения размеров самых мелких частиц испытуемого образца.

Для каждого диапазона увеличения следует выбирать максимальную числовую апертуру объектива. Для контроля контрастности и детализации изображения окрашенных образцов необходимо использовать цветные фильтры с относительно узким спектром пропускания. Цветные фильтры могут применяться и для ахроматических (бесцветных) образцов.

Настройку всех элементов оптической системы и фокусировку проводят в соответствии с прилагаемой к микроскопу инструкцией. Калибровку проводит сертифицированная специализированная организация.

**Методика**

Испытуемые образцы исследуют с использованием или без использования иммерсионной жидкости. Природа применяемой иммерсионной жидкости в значительной степени определяется физическими свойствами испытуемого образца, который не должен в ней растворяться. В качестве иммерсионной жидкости при исследовании фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, если нет других указаний в фармакопейной статье, используют минеральные масла: вазелиновое масло, иммерсионное масло для микроскопии классическое или профессиональное, водный раствор глицерина и др.

Частицы порошка должны находиться в одной плоскости и должны быть диспергированы так, чтобы были видны отдельные частицы (недопустимо слипание частиц).

При приготовлении образца для микроскопии (в том числе, при диспергировании в иммерсионной жидкости) должны быть сохранены первоначальный размер частиц и их распределение по размерам, свойственные испытуемому образцу.

Лекарственные формы анализируют без разведения или разводят, как указано в фармакопейной статье.

При исследовании порошков от 5 мг до 100 мг порошка суспендируют в подходящем объёме, например, 10 мл иммерсионной жидкости, добавляя при необходимости смачивающий агент (поверхностно-активные вещества).

На предметное стекло в счётное поле микроскопа помещают 1–2 капли полученной гомогенной суспензии, содержащей не менее 10 мкг вещества.

Предел размера частиц и допустимое количество частиц, превышающее этот предел, для каждой фармацевтической субстанции указан в фармакопейной статье или определяется в зависимости от задач проводимых испытаний.

Анализ лекарственных форм (по показателю «Размер частиц») проводят, как указано в соответствующей фармакопейной статье.

***Определение кристаллического состояния вещества***. Если не указано иное, испытуемый образец в минеральном масле помещают на предметное стекло и исследуют при помощи поляризационного микроскопа: при вращении предметного столика частицы проявляют двойное лучепреломление (демонстрируют интерференционную окраску) и положение экстинкции (поглощение и рассеяние света).

***Фотографирование объекта***. При необходимости фотографирования объекта используют цифровую фото- или видеокамеру, соединённую с компьютером с установленным программным обеспечением.

Испытуемый образец нужно чётко сфокусировать на плоскости фотоэмульсии; затем определить фактическое увеличение с помощью калиброванного объект – микрометра, используя фотопленку с достаточной светосилой, разрешающей способностью и контрастностью; экспозиция и обработка должны быть одинаковы как для фотографий испытуемого образца, так и для определения увеличения.

На видимый размер фотографии влияют процессы экспонирования, проявления и печати, разрешающая способность микроскопа.

**Характеристика формы частиц**

На рис. 1 представлены наиболее часто встречающиеся формы частиц.



Рисунок 1 – Формы частиц

1 – равносторонние: частицы с одинаковой длиной, шириной и толщиной,

включая кубические и сферические частицы;

2 – игольчатые: тонкие, похожие на иглу частицы, или сходные с ней

по соотношению длины и толщины;

3 – колоннообразные: длинные, тонкие частицы с шириной и толщиной

больше, чем игольчатые;

4 – чешуйчатые: тонкие, плоские с одинаковой шириной и длиной;

5 – пластинчатые: плоские, одинаковые по длине и ширине,

но с большей толщиной, чем чешуйчатые;

6 – планкообразные: крупные, тонкие, пластинчатые частицы.

Частицы могут быть иной, неопределённой формы.

**Характеристика размера частиц**

Способ определения размера частицы зависит от её формы. Для сферических частиц размер определяется диаметром. Размер частиц, представленных на рис. 1, обычно определяют по значению максимальной длины. На рис. 2 представлены размеры, обычно используемые для характеристики частиц неправильной формы.



Рисунок 2 – Способы определения размеров частиц неправильной формы

1 – Диаметр Фере – расстояние между параллельными линиями, касательными к случайно ориентированной частице и перпендикулярными к шкале окуляра;

2 –Диаметр Мартина – длина хорды, которая делит площадь проекции случайно ориентированной частицы на две равные части;

3 – Эквивалентный диаметр – диаметр окружности, площадь которой равна

площади проекции частицы;

4 –Максимальный размер по горизонтали;

5 – Длина – максимальный размер частицы, ориентированной параллельно шкале окуляра, от одного её конца до другого;

6 – Ширина – максимальный размер частицы, измеренный под прямым углом к длине.

Под единичной частицей, как правило, подразумевают мельчайшее образование. Частица может быть жидкой или вязкой каплей, моно- или поликристаллической, аморфной или агломератом; частицы могут быть ассоциированными.

По степени ассоциациичастицы могут быть описаны следующими терминами:

- *ламеллары* – скученные пластинки;

- *агрегаты* – масса слипшихся частиц;

- *агломераты* – сплавленные или сцементированные частицы;

- *конгломераты* – смесь двух или более типов частиц;

- *сферолиты* – сферический кластер тонких игольчатых кристаллов;

- *друзы* – частицы, покрытые очень мелкими частицами.

Поверхность частиц может быть описана следующим образом:

*- гладкая* – свободная от неровностей, шероховатости или налипаний;

- *шероховатая* – неровная, негладкая;

- *ломкая* – частично расщеплённая, разрушенная, с трещинами;

- *пористая* – имеющая отверстия или ходы;

- *изрытая* – с маленькими выемками.

Частицы могут быть описаны также:

- *по форме краёв* – угловатые, зазубренные, гладкие, острые, ломкие;

- *по оптическим свойствам* – окрашенные, прозрачные, полупрозрачные, непрозрачные;

- *по наличию дефектов* – без включений, с включениями.