
**Спектрометрия в ближней
инфракрасной области**

ОФС.1.2.1.1.0001.15
Вводится впервые

Спектрометрия в ближней инфракрасной (БИК) области – метод, основанный на способности веществ поглощать электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 780 до 2500 нм (от 12500 до 4000 см⁻¹).

Поглощение в БИК диапазоне связано, как правило, с обертонами основных колебательных частот связей С–Н, N–Н, О–Н и S–Н и их комбинациями. Наиболее информативным диапазоном является область от 1700 до 2500 нм (от 6000 до 4000 см⁻¹).

Для спектрометрии в БИК области характерны простота подготовки проб или отсутствие пробоподготовки, быстрота измерений, неразрушающий характер анализа (без вскрытия упаковки лекарственного препарата), одновременная оценка нескольких параметров (показателей), проведение дистанционного контроля, в том числе в технологических потоках в режиме реального времени.

БИК-спектрометрия позволяет прямо или косвенно проводить качественную и количественную оценку химических, физических и физико-химических характеристик анализируемого объекта, в том числе:

- содержание воды и органических растворителей;
- гидроксильное и йодное число, степень гидроксирования;
- кристаллическую форму и степень кристалличности;
- полиморфную форму или псевдополиморфную форму;
- дисперсность частиц и другие.

Анализ информации, извлекаемой из БИК-спектров, проводится с применением хеометрических алгоритмов.

Оборудование

БИК-спектрометры состоят из:

- источника излучения, например, кварцевой лампы (лампы накаливания) или ее аналога;
- монохроматора (дифракционная решетка, призма, оптико-акустический фильтр) или интерферометра (для Фурье-спектрометров);
- регистрирующего устройства – детектора (на основе кремния, сульфида свинца, арсенида индия, арсенида индия-галлия, теллурида ртути-кадмия, дейтерированного триглицина сульфата и др.);
- устройства размещения образца и/или дистанционного оптоволоконного зонда.

Спектрометры могут быть оснащены кюветным отделением, интегрирующей сферой (интегрирующая сфера представляет собой оптический компонент, состоящий из сферической полости с покрытием из хорошо отражающего материала, сфера предназначена для получения спектров отражения неоднородных образцов), внешними модулями для измерения пропускания сильно рассеивающих образцов, устройствами автоматической подачи образцов, оптоволоконными зондами и т.д. Выбор того или иного приспособления для анализа зависит от типа образца и выбранного способа измерения.

Для размещения образцов используют стеклянные или кварцевые кюветы, флаконы, стеклянные стаканы, держатели капсул или таблеток и другие приспособления.

Обработка данных и анализ полученных результатов проводится с использованием специального программного обеспечения.

Для каждого режима измерения (пропускание, диффузное отражение и их комбинация) должна быть предусмотрена своя методика проверки,

включающая проверку точности и воспроизводимости волновой шкалы, линейности, стабильности откликов и фотометрического шума.

Проверка точности волновой шкалы. Для проверки точности волновой шкалы регистрируют спектр стандарта, имеющего характеристические максимумы и минимумы поглощения, и сравнивают полученные значения длин волн с заявленными характеристиками. В качестве стандартов используют оксиды редкоземельных элементов, пары воды в атмосфере, метиленхлорид и другие.

В приборах с Фурье-преобразованием шкала волновых чисел линейна во всем рабочем диапазоне, и для проверки точности волновой шкалы достаточно использовать один стандарт с контролем заявленных характеристик по одной полосе поглощения. Приборы других типов могут иметь нелинейный характер шкалы волновых чисел и требуют проверки заявленных метрологических характеристик не менее чем по трем пикам (один или несколько стандартов) с охватом всего рабочего диапазона.

Погрешность при установке длин волн должна быть не более ± 1 нм (или эквивалентная ему величина волнового числа) в диапазоне длин волн до 1900 нм и не более $\pm 1,5$ нм для диапазона длин волн ≥ 1900 нм.

Воспроизводимость установки длины волны должна соответствовать требованиям завода-изготовителя или требованиям нормативных документов, действующих на территории Российской Федерации.

Проверка фотометрической линейности и стабильности откликов. Для проверки фотометрической линейности регистрируют БИК-спектры стандартов с известными значениями пропускания или отражения и строят графическую зависимость полученных значений пропускания или отражения от известных значений. Результатом построения такой зависимости должна являться прямая линия с отсечением $(0,00 \pm 0,05)$ и тангенсом угла наклона прямой $(1,00 \pm 0,05)$.

Для проверки фотометрической линейности в режиме отражения в качестве стандартов используются полимеры, допированные углеродом, или

аналоги. Если прибор используется для измерения образцов с поглощением 1,0 и менее, то достаточно использовать 4 стандарта в диапазоне значений отражения от 10 до 90 %, например, 10, 20, 40 и 80% с соответствующими значениями поглощения 1,0; 0,7; 0,4 и 0,1. При измерении образца с поглощением выше 1,0 к указанному набору стандартов добавляют стандарт отражения 2 и/или 5 %.

Для проверки фотометрической линейности в режиме пропускания в качестве стандартов используют 3 фильтра со значениями пропускания в области от 10 до 90 % и линию 100 % пропускания, т.е. регистрируют спектр пропускания пустого канала.

Для проверки стабильности отклика периодически проводят измерение стандарта с неизменными физическими и химическими свойствами. Измерение фона должно проводиться с помощью одного и того же внутреннего или внешнего стандарта. Отклонение фотометрического отклика не должно превышать ± 2 %.

Проверка фотометрического шума. Для оценки фотометрического шума при измерении пропускания записывают линию 100 % по воздуху; при измерении отражения регистрируют линию 100 % с применением подходящих стандартов с отражением не менее 99 %. При этом под линией 100 % подразумевается измерение, при котором стандарт является измеряемым образцом и фоном одновременно. При высоких значениях поглощения проводят оценку фотометрического шума с применением стандартов со значениями пропускания или отражения около 10 %.

Фотометрический шум должен соответствовать требованиям, указанным в спецификации производителя.

Способы измерения

БИК-спектр представляет собой зависимость соответствующей фотометрической величины [оптической плотности (A), коэффициента пропускания (T), коэффициента отражения (R) и производных величин] от длины волны или частоты излучения. При измерениях в БИК области

реализуются следующие способы:

- измерение пропускания (или поглощения) при прохождении излучения через образец;
- измерение излучения, отраженного или рассеянного от образца;
- комбинация вышеуказанных способов.

Измерения всегда проводят относительно фона.

Измерение пропускания. Пропускание является мерой снижения интенсивности излучения при прохождении через образец. Этот принцип реализован в большинстве используемых спектрометров, и результат может быть представлен непосредственно в единицах пропускания (T) и/или оптической плотности (A).

$$T = \frac{I}{I_0},$$

где I_0 – интенсивность падающего света;

I – интенсивность света, прошедшего через образец;

$$A = -\log_{10}(T) = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right).$$

В качестве фона используют спектр воздуха или среды сравнения.

Способ применим для твердых и жидких проб, в том числе для дисперсных систем.

Специальной подготовки проб при измерении пропускания, как правило, не требуется. Для измерения спектра жидких образцов используют флаконы или кюветы с подходящей длиной оптического пути (обычно 0,5 – 22 мм), а также оптоволоконные зонды со специальной насадкой.

Диффузное отражение. В методе диффузного отражения измеряют коэффициент отражения (R), представляющий отношение интенсивности света, отраженного от образца (I), к интенсивности света, отраженного от фона (I_r):

$$R = \frac{I}{I_r},$$

или обратную логарифмическую величину этого отношения (A_R):

$$A_R = \lg\left(\frac{1}{R}\right) = \lg \frac{I_r}{I}.$$

В качестве фона используют поверхность с высокой величиной R : пластины из золота, перфторированных насыщенных полимеров, керамические пластины и другие подходящие материалы.

Способ используется для анализа твердых образцов с применением интегрирующей сферы или оптоволоконных зондов, работающих в режиме отражения. В последнем случае для воспроизводимости получаемых результатов необходимо обеспечить стабильность условий проведения измерений, в частности относительную неподвижность зонда, степень соприкосновения датчика с образцом и другие условия.

Пропускание – отражение. Данный способ является комбинацией пропускания и отражения благодаря специальной конструкции кювет и датчиков, в которых излучение дважды проходит через образец, что позволяет анализировать образцы с низкой поглощающей и рассеивающей способностью.

В качестве фотометрической величины используют коэффициент двойного пропускания (T^*):

$$T^* = \frac{I}{I_T},$$

где I_T – интенсивность излучения после двойного пропускания, без образца;

I – интенсивность пропущенного и отраженного излучения, измеренная с образцом;

и величину, аналогичную оптической плотности (A^*):

$$A^* = \lg\left(\frac{1}{T^*}\right).$$

В качестве фона используют спектр воздуха или среды сравнения.

Способ применим для жидких, в том числе негетерогенных проб.

Для регистрации спектра исследуемый образец помещают в кювету с зеркалом или другим диффузным отражателем. Возможно использование оптоволоконного зонда со специальной насадкой, который погружают в образец.

Факторы, влияющие на результаты измерений

Температура образца. Температура образца может влиять как на его пропускание, так и на его отражение. Контроль температуры важен при анализе термически лабильных объектов, в случае которых разница в несколько градусов может приводить к существенным спектральным изменениям, в том числе твердых образцов, содержащих воду, дисперсных систем, аморфных объектов и прочее.

Влага и остаточные количества растворителей. Наличие воды и остаточных количеств растворителей может оказать влияние на характер спектра и результаты анализа. Необходимость и условия высушивания должны быть указаны в фармакопейных статьях.

Толщина образца определяет степень пропускания. С увеличением толщины слоя наблюдается увеличение поглощения. Поэтому при сравнительных измерениях пропускания толщина образца должна быть одинаковой или учитываться. При измерении отражения толщина слоя не имеет принципиального значения, но нужно учитывать, что толщина слоя должна быть сопоставимой с глубиной проникновения луча в образец. В случае недостаточной толщины за образцом ставится дополнительный рефлектирующий материал, например штамп с золотым покрытием.

Оптические свойства образца. При анализе твердых образцов необходимо обеспечивать максимально возможную однородность пробы, так как различия в плотности или размерах частиц сказываются на характере спектра. Спектры физически, химически или оптически гетерогенных образцов следует регистрировать либо с увеличенным размером пучка света, либо используя устройства, вращающие образцы во время измерений. При этом желательно проводить измерения каждого образца несколько раз с

последующим усреднением спектров.

Полиморфизм. Разница в кристаллической структуре (полиморфизм) оказывает влияние на спектр, что позволяет отличать друг от друга кристаллические или аморфные формы на основании их БИК-спектров. При проведении анализа необходимо учитывать кристаллическую структуру (модификацию) эталонного спектра, используемого в методе анализа.

Возраст образцов. Свойства образцов могут изменяться во времени, и эти изменения могут обуславливать спектральные различия для одних и тех же образцов. Данные изменения должны быть учтены при построении калибровочных моделей, как для целей идентификации, так и для целей количественного анализа.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Качественный анализ (квалификация и идентификация) в БИК-спектрометрии основан на схожести спектров одного и того же вещества.

Для проведения качественного анализа первоначально создают библиотеку стандартных спектров, подбирают оптимальную математическую модель для обработки спектров и реализации алгоритмов их сравнения. Далее проводят валидацию библиотеки в совокупности с выбранной математической моделью (см. раздел «Валидация качественных методов»). Качественный анализ проводят путем сравнения спектра испытуемого образца со спектрами в библиотеке (см. раздел «Анализ данных»).

Создание библиотеки спектров. Библиотека представляет совокупности спектров, содержащих характеристическую информацию о каждом объекте анализа. Для каждой совокупности спектров при помощи соответствующих методов и алгоритмов определяют оптимальные параметры идентификации. Заданные установки действительны для всей библиотеки. Для близких объектов, неразличимых при заданных установках, создаются подбиблиотеки, в которых могут быть использованы другие методы предварительной обработки спектров и алгоритмы анализа. Количество спектров в библиотеке не ограничивается.

В библиотеку включают спектры веществ, соответствующих предъявляемым требованиям, качество которых подтверждено фармакопейными или другими аттестованными методами.

Для учета возможных вариаций свойств каждого вида анализируемых объектов регистрируют спектры нескольких серий (партий). Регистрацию спектров проводят в схожих условиях измерений и выполняют одинаковую предварительную обработку. Выбранная предварительная обработка включенных в библиотеку спектров сохраняется неизменной при последующих измерениях.

Методы предварительной обработки спектров. Рекомендуется проводить предварительную обработку спектров с целью повышения информативности получаемых результатов и уменьшения влияния спектральных вариаций. Обработка первичных данных может включать вычисление первой или второй производной, нормализацию, мультипликативную коррекцию рассеивания и другие методы или их комбинации. При выборе методов предварительной обработки спектров следует учитывать, что они могут привести к потере информации или появлению ошибок-артефактов.

Анализ данных. Сравнение спектров испытуемых образцов при качественном анализе проводится с индивидуальными или усредненными спектрами в библиотеке, в том числе с помощью различных математических методов.

Библиотека может использоваться для построения алгоритмов классификации. Возможно использование разных алгоритмов, например, метода главных компонент (МГК), комбинированного с кластерным анализом, метода SIMCA (soft independent modeling of class analogy – независимого моделирования аналогий классов), а также других алгоритмов, как включенных в математическое обеспечение БИК-спектрометров, так и разработанных третьей стороной. Надежность используемого метода должна быть проверена. Например, коэффициент корреляции, сумма квадратов

отклонений, расстояния внутри модели и прочие показатели должны быть согласованы с уровнем принятия решений, представленным в процедуре валидации.

Метод анализа должен быть валидирован.

Валидация метода качественного анализа. Валидация метода призвана продемонстрировать его пригодность для целей анализа.

Валидация метода проводится на проверочном наборе объектов, не участвовавших в построении метода, и предполагает проверку специфичности, чувствительности и устойчивости (робастности).

Чувствительность показывает, какая часть объектов проверочного набора, схожих с объектами библиотеки, правильно распознается как «свой».

Специфичность показывает, какая часть объектов проверочного набора, отличных от библиотечных, правильно распознается как «чужие».

Особое внимание уделяется результатам классификации объектов, спектры которых визуально схожи со спектрами объектов библиотеки, но отличаются от них по композиции или химической структуре. Такие образцы должны правильно определяться как «чужие».

Устойчивость показывает, что незначительные изменения условий (например, температура, влажность воздуха, вибрации, температура образца, степень уплотнения материала, глубина погружения зонда, толщина слоя и т.д.) не влияют на результаты и надежность идентификации или квалификации.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Разработка калибровочной модели. При разработке модели устанавливается зависимость изменения интенсивности поглощения или отражения в спектре образцов от изменения свойств и/или состава веществ. При этом регистрируют спектры образцов с известными значениями их состава и/или их свойств, подтвержденных аттестованными методами. Так как хемометрические алгоритмы не допускают экстраполяций, необходимо, чтобы область калибровочных концентраций была не менее ожидаемого

диапазона анализируемых концентраций или других количественных характеристик. Калибровочные образцы должны быть по возможности равномерно распределены внутри диапазона рабочих концентраций.

Регистрацию спектров проводят при соблюдении параметров эксперимента, факторов, влияющих на результаты измерений и первичной обработки, которые предварительно оптимизированы для всех анализируемых объектов и сохраняются постоянными при последующих измерениях.

Калибровочную модель оптимизируют при помощи подходящего способа предварительной обработки спектров, выбора спектральной области и математического алгоритма.

Предварительная обработка спектров. Проводят так же, как описано в разделе «Качественный анализ».

Анализ данных. Для построения калибровочной модели может использоваться любой обоснованный математический алгоритм. Так как в области БИК диапазона наблюдается сильное перекрывание полос поглощения, количественный анализ проводят преимущественно хемометрическими алгоритмами, например такими, как метод проекций на латентные структуры (ПЛС, англ. PLS), метод регрессии на главные компоненты (РГК, англ. PCR) и другими.

Валидация калибровочной модели. Валидация модели калибровки предполагает демонстрацию ее пригодности для решения поставленной цели. При этом должны быть определены следующие валидационные характеристики: специфичность (селективность), линейность, рабочий диапазон концентраций (аналитическая область), правильность, прецизионность и устойчивость (робастность).

При построении калибровочных моделей с помощью хемометрических методов анализа качество калибровки оценивается по среднеквадратичному остатку калибровки (*RMSEC*) и среднеквадратичному остатку прогноза (*RMSEP*).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{1}{N_c} \sum_{i=1}^{N_c} (\hat{y}_i - y_i)^2},$$

где N_c – число образцов калибровочного набора;
 y_i – количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;
 \hat{y}_i – количественная характеристика, полученная по калибровочной модели.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{j=1}^{N_p} (\hat{y}_j - y_j)^2},$$

где N_p – число образцов проверочного набора, схожих с образцами калибровочного набора;
 y_j – количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;
 \hat{y}_j – предсказанная с помощью калибровочной модели количественная характеристика.

Для сравнения результатов калибровки, построенной по БИК-спектрам, с результатами, полученными по аттестованной методике, могут быть использованы альтернативные статистические методы (парный t -тест, оценка смещения и др.).

Выбросы

При анализе БИК методом следует учитывать, корректировать и обоснованно исключать резко выделяющиеся результаты.

Все выбросы подлежат анализу и, в случае их информативной важности или подтверждения правильности с помощью аттестованной методики, они могут быть включены в модель.

Ревалидация или повторная валидация

Прошедший валидацию и признанный пригодным для применения метод качественного или количественного анализа нуждается в периодической повторной валидации или ревалидации. При выявлении отклонений необходимо провести корректировку метода.

БИК метод повторно валидируют, если:

- в библиотеку добавлен новый объект (для качественного анализа);
- есть предпосылки к изменению характеристик объектов, спектры которых уже включены в библиотеку (изменение технологии производства (синтеза), состава, качества исходного сырья упаковки и т. д.);
- обнаружены иные изменения и/или несоответствия в свойствах анализируемых объектов или методике.

Перенос моделей

При переносе моделей качественного и количественного анализа с одного прибора на другой должны учитываться спектральные характеристики используемых спектрометров (разрешение, диапазон волновых чисел и др.). Под процедурами переноса моделей понимаются различные хемометрические алгоритмы (математические и статистические). После переноса на другой прибор для подтверждения работоспособности модели её необходимо ревалидировать.

Хранение данных

Хранение данных осуществляется в электронном виде в соответствии с требованиями программного обеспечения. При этом необходимо сохранять исходные спектры, не подвергшиеся математической обработке, с целью их возможного дальнейшего использования при оптимизации библиотек или методов.