**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Рамановская спектрометрия** |  | **ОФС.1.2.1.1.0009** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0009.15** |

|  |
| --- |
|  |

Рамановский спектр (он же спектр комбинационного рассеяния) возникает при облучении вещества монохроматическим лазерным излучением ультрафиолетового или видимого диапазона (диапазон длин волн от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области).

**Область применения**

Рамановская спектрометрия используют для анализа таких физических свойств, как кристалличность, фазовые переходы и полиморфные состояния.

Данный метод является экспрессным (1–2 с) и неразрушающим аналитическим методом идентификации и контроля качества лекарственных средств, поскольку даёт возможность получить индивидуальный спектр молекулы вещества.

К преимуществам Рамановской спектрометрии следует отнести: возможность бесконтактного анализа твёрдых, жидких и газообразных веществ; метод не требует большого количества вещества (около 50 мг); анализ проводится без разрушения образца; метод позволяет анализировать вещества в стеклянной и пластиковой упаковке.

Спектры комбинационного рассеяния очень чувствительны к природе химических связей – как в органических молекулах и полимерных материалах, так и в кристаллических решётках и кластерах, что обуславливает индивидуальность спектра конкретного вещества. Спектры комбинационного рассеяния органических материалов в основном состоят из линий, отвечающих деформационным и валентным колебаниям химических связей углерода с водородом, кислородом и азотом, а также характеристическим колебаниям различных малополярных функциональных групп: связей С – С, С = С и С ≡ С, а также гидроксильной – OH, аминогруппы –NH2 и т.д. Эти линии проявляются в диапазоне от 600 см−1 (валентные колебания одинарных С–С связей) до 3600 см−1 (колебания – OH группы). Кроме того, в спектрах ряда органических соединений в диапазоне 250−400 см−1 проявляются деформационные колебания алифатических цепочек.

В результате анализа можно идентифицировать молекулярные фрагменты − определять строение вещества или изучать внутримолекулярные взаимодействия, наблюдая положение и интенсивность полос в Рамановском спектре. При этом достаточно просто идентифицировать фрагменты, используя поиск по библиотекам спектров.

**Метод**

Под действием монохроматического лазерного излучения ультрафиолетового или видимого диапазона молекулы вещества поляризуются и рассеивают свет в интервале от 2 до 4000 см−1. Если взаимодействие кванта падающего излучения с молекулой, находящейся в основном или возбуждённом колебательном состоянии является упругим, то энергетическое состояние молекулы не меняется, и частота рассеянного излучения будет такая же, как падающего (рэлеевская полоса Рамановского спектра). В случае неупругого взаимодействия происходит обмен энергией между квантом излучения и молекулой, за счёт чего возникает рассеянное излучение, которое может быть большей или меньшей частоты (антистоксова и стоксова полоса соответственно). Таким образом, формируется Рамановский спектр. Основными характеристиками Рамановского спектра являются Рамановский сдвиг и волновое число.

Рамановский сдвиг описывают уравнением:

$$Δω=\left(\frac{1}{λ\_{0}}―\frac{1}{λ\_{1}}\right),$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$Δω$$ | – | разность энергий между начальным и конечным колебательными уровнями, ($см^{-1}$); |
|  | $$λ\_{0}$$ | – | длина волны падающего фотона, (см); |
|  | $$λ\_{1}$$ | – | длина волны Рамановского рассеянного фотона,(см).Волновое число ($\overbar{ν}$) связано с длиной волны соотношением:$\overbar{ν}$= 104/λ. |

Рамановские спектры могут быть получены для твёрдых веществ, жидкостей, суспензий, эмульсий, гелей, плёнок и газов, причём как напрямую, так и помещённых в стеклянные контейнеры или трубки, как правило, без предварительной подготовки образца или растворения. Испытуемый образец и стандартный образец подвергают одинаковой обработке и затем при одинаковых условиях получают их спектры.

Вследствие небольшого пространственного разрешения метода обращают внимание на качество испытуемых образцов и стандартных образцов, например, необходимо быть уверенным в том, что они находятся в одном и том же физическом состоянии либо использовать внутренний стандарт для жидких образцов.

Если спектры, полученные для твёрдых веществ, имеют различия в положениях максимумов, испытуемый образец и стандартный образец подвергают одинаковой обработке для того, чтобы они выкристаллизовались или образовались в одинаковой форме, либо поступают так, как описано в фармакопейной статье, и затем снимают спектры.

Основным ограничением Рамановской спектрометрии является флуоресценция примесей, которая мешает детектору улавливать значительно более слабый Рамановский сигнал. Флуоресценции можно избежать при использовании в качестве возбуждающего света лазерного излучения с большой длиной волны, например, находящейся в ближней инфракрасной области. Интенсивность некоторых Рамановских линий может быть усилена несколькими способами, например, путём использования резонансной Рамановской спектрометрии или усиленной поверхностью Рамановской спектрометрии.

Из-за узости светового потока падающего лазерного излучения для получения спектра необходимо всего лишь несколько микролитров образца. Учитывают неоднородность образца, если только его объём не увеличен, например, путём вращения.

Рамановский метод не всегда можно считать неразрушающим. Энергия, передаваемая лазером, зависит от продолжительности воздействия и длины волны. Избыток энергии может изменить физическое состояние или изменить образец.

Подготовка образца должна быть адаптирована к оборудованию. Например, для спектрометров, оснащённых микроскопом, могут потребоваться образцы с плоской поверхностью.

**Оборудование**

Спектрометры для получения Рамановских спектров обычно состоят из следующих компонентов:

- источник монохроматического света, чаще всего лазер с длиной волны в ультрафиолетовой, видимой или ближней инфракрасной области;

- подходящая оптика (линзы, зеркала, оптико-волоконные устройства), которые направляют возбуждающее излучение на образец и собирают свет, рассеиваемый образцом;

- оптическое устройство (монохроматор или фильтр), которое пропускает сдвинутое по частоте Рамановское рассеяние и препятствует попаданию на детектор интенсивного света, частота которого равна частоте возбуждающего света (рэлеевское рассеяние);

- диспергирующее устройство (дифракционная решётка или призма), соединённое со щелью, регулирующей длину волны, и детектором (обычно фотоумножитель);

или:

- диспергирующее устройство (дифракционная решётка или призма), соединённое с многоканальным детектором (обычно прибор с зарядовой связью (ПЗС);

или:

- интерферометр с детектором, регистрирующий интенсивность рассеянного света во времени (например, компьютер и соответствующее программное обеспечение), и устройство обработки данных, которое с помощью Фурье-преобразования переводит данные в диапазон частот или волновых чисел.

Рамановские спектрометры подразделяются на: спектрометры дисперсионного рассеяния и спектрометры дисперсионного рассеяния с преобразованием Фурье.

***Дисперсионный Рамановский спектрометр***

В дисперсионном Рамановском спектрометре используют лазеры в видимой области. Типичные длины волн лазеров 780 нм, 633 нм, 532 нм и 483 нм. Одним из преимуществ использования более коротковолновых лазеров является увеличение Рамановского сигнала, которое происходит при более коротких длинах волн. Рассеянное Рамановское излучение фокусируется на дифракционной решётке, которая выделяет различные длины волн, фиксируемые на детекторе ПЗС, представляющем собой двумерную кремниевую матрицу светочувствительных элементов (пикселей). Ограничением использования лазера с более короткой длиной волны для получения усиленного Рамановского сигнала от образца является флуоресцентное излучение, превышающее Рамановский сигнал при облучении образца коротковолновым лазером.

***Фурье - Рамановский спектрометр***

Рамановская спектрометрия с Фурье преобразованием позволяет устранить проблемы с флуоресценцией образцов, которая характерна для дисперсионной Рамановской спектрометрии. В Фурье-Рамановском спектрометре используют возбуждающий лазер 1 мкм, интерферометр и высокочувствительный детектор в ближнем инфракрасном диапазоне. При использовании возбуждающего лазера с большей длиной волны снижается энергия облучения, поэтому уменьшается вероятность наложения высоких электронных уровней, что значительно снижает вероятность возникновения флуоресценции. В Рамановской спектрометрии с Фурье преобразованием используют чувствительные детекторы на основе галлия индия арсенида, или охлаждаемый жидким азотом германиевый детектор, которые посредством Фурье-трансформаций превращают сигналы в набор частот или волновых чисел.

**Идентификация и количественное определение с использованием стандартного образца**

Идентификацию испытуемого образца по спектру комбинационного рассеяния осуществляют сравнением его спектра со спектром стандартного образца, зарегистрированных на одном и том же приборе в одних и тех же условиях. Количественное определение проводят с использованием известных количеств или концентраций стандартного образца.

Количественный анализ основан на прямо пропорциональной зависимости между интенсивностью (I) линий спектра и числом молекул (N) в единице объёма:

$$I=i ⋅k⋅N ,$$

где i – интенсивность рассеиваемого света на одну молекулу;

k – коэффициент, зависящий от условий эксперимента, постоянная величина для данного прибора.

При количественном анализе смеси проводят последовательную регистрацию спектров в одинаковых условиях и сравнение интенсивностей линий образцов, с учётом предварительной идентификации всех компонентов смеси и наличия соответствующих стандартов. Сравнение может быть осуществлено также по методу внутреннего стандарта при добавлении в анализируемую смесь определённого количества стандартного вещества. Максимумы в спектре испытуемого образца должны совпадать по расположению и интенсивности с соответствующими максимумами в спектре фармакопейного стандартного образца (ФСО).

**Идентификация и количественное определение
с использованием библиотек спектров, статистических методов классификации и калибровки**

***Контроль за работой прибора***

При использовании прибора следуют инструкциям производителя; регулярно, в зависимости от применения прибора и испытуемых образцов, проводят предписанные калибровки и испытания работы системы. При использовании Рамановской спектрометрии для количественных определений либо при создании спектральных библиотек сравнения для (хемометрической) классификации или калибровки обращают внимание на то, чтобы были сделаны все поправки к измерениям либо предприняты меры для контроля за изменяемостью величин волновых чисел и интенсивностью сигнала прибора.

***Проверка шкалы волновых чисел***

Шкалу волновых чисел Рамановских сдвигов (обычно выражаемую в обратных сантиметрах) проверяют с помощью подходящих стандартов, которые имеют характерные максимумы при исследуемых величинах волновых чисел (например, органическое вещество).

***Калибровка прибора***

Должна соответствовать типу образца, т.е. для твёрдых испытуемых образцов следует использовать твёрдые стандартные образцы, а для жидких – жидкие. Интенсивность в максимуме спектральной линии (*I*0) выражают либо в произвольной относительной шкале, либо в условной, принимая в качестве эталона интенсивность линии образцов сравнения. Шкалу волновых чисел проверяют по характерным максимумам стандартов. Выбирают подходящее вещество (например, полистирол, парацетамол, циклогексан), для которого установлены точные значения сдвигов волновых чисел. Рекомендуют выбирать стандарт с полосами, присутствующими во всем спектральном диапазоне Рамана, чтобы можно было оценить точность длины волны прибора в нескольких точках спектра.

Таблица 1 – Сдвиги волновых чисел (и допустимые отклонения) для полистирола, парацетамола и циклогексана.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Сдвиги волновых чисел, см−1 | Допустимые отклонения |
| Настольный прибор, см−1 | Портативный прибор, см−1 |
| Полистирол1 | 620,9 | ±1,5 | ±2,5 |
| 1001,4 | ±1,5 | ±2,0 |
|  |  |  |
| 1031,8 | ±1,5 | ±2,0 |
| 1602,3 | ±1,5 | ±3,0 |
| 3054,3 | ±3,0 | Не применимо 4 |
| Парацетамол 2 | 797,2 | ±1,5 | ±2,5 |
| 857,9 | ±1,5 | ±2,0 |
| 1168,5 | ±1,5 | ±2,0 |
| 1236,8 | ±1,5 | ±2,0 |
| 1323,9 | ±1,5 | ±2,5 |
| 1648,4 | ±1,5 | ±3,0 |
| 2931,1 | ±2,0 | Не применимо 4 |
| Циклогексан 3 | 801,3 | ±1,5 | ±2,5 |
| 1028,3 | ±1,0 | ±2,0 |
| 1266,4 | ±1,0 | ±2,0 |
| 1444,4 | ±1,0 | ±2,5 |
| 2852,9 | ±2,0 | ±3,0 |
| 1 Используют полистирольную плёнку (например, толщиной 76 мкм), гранулы или стержень.2 Фармакопейный стандартный образец парацетамола для квалификации оборудования, представляющий собой моноклинальную форму I.3 Циклогексан Р.4 Не применимо в связи с выходом за пределы диапазона детектора. |

***Проверка шкалы интенсивностей*.** На абсолютную и относительную интенсивность Рамановских полос оказывают влияние следующие факторы:

- поляризация падающего света;

- поляризация собирающей оптической системы;

- интенсивность падающего света;

- различия в отклике прибора;

- различия в фокусе и геометрии образца;

- различия в насыпной плотности для твёрдых образцов;

- показатель преломления n или изменение n (Δn) между образцом и окружающей средой;

- размер частиц и распределение частиц по размерам;

- сечение рассеяния;

- сечение поглощения.

Подходящие критерии приемлемости могут изменяться в зависимости от применения, но в большинстве случаев допустимы колебания (изо дня в день) в относительных интенсивностях полос ±10 %.

***Создание спектральных библиотек сравнения*.** Снимают спектры подходящего числа полностью исследованных (например, так, как описано в фармакопейной статье) веществ, имеющих отличия в производителе, серии, кристаллической модификации, размерах частиц и т.д., типичные для анализируемого материала. Набор спектров, полученных на данном спектрометре, и образующих спектральную библиотеку, содержит информацию, определяющую границы подобия или количественные пределы, которые могут быть применены при идентификации вещества, установлении его количественного состава, при анализе примесей в лекарственных средствах.

Количество веществ в базе данных зависит от особенностей её применения. Использование библиотек позволяет провести качественный анализ испытуемых образцов с определением пропорций содержания отдельных компонентов. Селективность базы данных, которая позволяет уверенно идентифицировать конкретное вещество или отличить его от других материалов базы данных, устанавливают при валидации. Для уверенности в пригодности базы данных эта селективность должна регулярно проверяться; в особенности это необходимо делать после любых значительных изменений, произошедших с веществом (например, изменения поставщика или производственного процесса), либо при настройке прибора для Рамановской спектрометрии (например, при проверке шкалы волновых чисел или повторяемости отклика спектрометра).

Полученная таким образом спектральная библиотека пригодна только для использования с данным прибором, либо с аналогичным, при условии подтверждения достоверности работы библиотеки после переноса.