**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектрометрия в средней инфракрасной области** |  | **ОФС.1.2.1.1.0002** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0002.15** |

|  |
| --- |
|  |

Спектрометрия в средней инфракрасной области (ИК-спектрометрия) – метод, основанный на взаимодействии инфракрасного излучения с веществом, в результате которого возникают межмолекулярные и внутримолекулярные колебания со специфической частотой. Инфракрасные спектры (колебательные спектры) (ИК-спектры) возникают вследствие поглощения энергии электромагнитного излучения при колебаниях ядер атомов в молекулах или ионах, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны (λ) или частоты колебаний (ν).

Под инфракрасной областью (ИК-область) подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,8 до 1000 мкм. Область от 0,8 до 2,5 мкм относится к ближней ИК-области спектра, область от 2,5 до 25 мкм – к средней ИК-области, область от 25 до 1000 мкм – к дальней ИК-области.

Длину волны (λ) в ИК-спектрах обычно измеряют в микрометрах (микронах), мкм.

Поскольку частота колебаний в ИК-спектрах имеет большие числовые значения, обычно используют не частоты (ν), а волновые числа ($\overbar{ν}$), которые измеряются в см−1 и связаны с частотой (*ν*) уравнением:

$\overbar{ν}$= ν/*с*,

где *ν* – частота, Гц (с−1);

*с* – скорость света в вакууме, см∙с−1.

Волновое число ($\overbar{ν}$) связано с длиной волны (λ, мкм) соотношением:

$\overbar{ν}$= 104/λ.

Таким образом, область 12500–4000 см−1 относится к ближней ИК-области, область 4000–400 см−1 – к средней, а область 400–10 см−1 – к дальней ИК-области.

В данной ОФС рассматривается метод спектрометрии в средней области, то есть в области от 4000 до 400 см−1 (2,5–25 мкм). Это область, в которой основные колебания функциональных групп молекул проявляются на спектре в виде полос поглощения. Область ниже 1500 см−1, называемая также областью «отпечатков пальцев», является наиболее информативной частью спектра, которая характеризует исследуемые молекулы.

В ОФС также рассматриваются метод нарушенного полного внутреннего отражения и метод диффузного отражения. Измерение нарушенного полного внутреннего отражения основано на явлении общего внутреннего отражения. Образец с коэффициентом преломления *n*2 приводят в плотный контакт с кристаллом (из алмаза, германия, селенида цинка или другого подходящего вещества), имеющим коэффициент преломления *n*1, который больше, чем *n*2. Через кристалл подают ИК-излучение. Теоретически полное отражение всего излучения (полное внутреннее отражение) происходит, когда угол α между падающим лучом и границей раздела образец-кристалл превышает критическое значение α*с*. Однако на самом деле излучение слегка проникает в образец и при этом частично поглощается. Полное отражение нарушается, в результате чего становится возможной запись спектра поглощения. На практике для увеличения интенсивности поглощения часто используют многократное внутреннее отражение, хотя некоторые приспособления позволяют проводить измерения при однократном отражении.

В отличие от зеркального отражения на идеально гладких поверхностях, диффузное отражение возникает на «идеально» шероховатой поверхности. Принцип измерения диффузного отражения основан на фокусировке ИК-излучения эллипсоидным зеркалом на поверхности образца, находящегося в открытой чашечке. Затем диффузно-отраженное от образца излучение собирается вторым эллипсоидным зеркалом и с помощью отклоняющего плоского зеркала направляется к детектору спектрометра.

**Область применения**

Поскольку полосы поглощения в ИК-спектре характеризуют входящие в состав молекулы функциональные группы, спектрометрия в средней инфракрасной области широко используется для установления подлинности субстанций и получения информации об их структуре.

ИК-спектрометрия широко используется в химическом и физическом анализе, а также на различных стадиях производственного процесса лекарственных средств. Основными областями применения данного метода являются:

- установление подлинности действующих и вспомогательных веществ, промежуточных продуктов производственного процесса и упаковочных материалов;

- оценка качества действующих и вспомогательных веществ, промежуточных продуктов производственного процесса и упаковочных материалов, включая контроль «от серии к серии»;

- определение количества действующих веществ в образце;

- определение количества примесей, например, в газах, неорганических веществах;

- контроль за химическими реакциями, например при химическом синтезе;

- установление свойств твёрдых веществ, таких как полиморфизм (испытание по этому показателю проводятся аналогично испытанию по показателю «Подлинность», при этом используется СО определённой полиморфной модификации).

ИК-спектрометрия наиболее часто используется для идентификации веществ, но также может применяться и для количественного анализа. Определение количества действующего вещества основано на законе Бугера-Ламберта-Бера, который устанавливает отношение поглощения образца к его концентрации. Измерение выполняют с использованием приготовленного подходящим образом образца. Затем данные обрабатываются и анализируются для идентификации веществ или количественного определения (например, на основании интегрирования полос поглощения ИК-спектра). Качество спектра можно повысить с помощью предварительной математической обработки. На практике она заключается в спектральной нормализации и вычитании полос, соответствующих диоксиду углерода и парам воды. Для спектров образца и раствора сравнения выполняется одинаковая предварительная математическая обработка.

Однако применение данного метода имеет некоторые ограничения. Метод не подходит для анализа следовых количеств веществ при ограниченном объёме образца. Кроме того, установление подлинности методом ИК требует использования СО. При отсутствии СО необходимо применение дополнительных методов, так как метод ИК не дает однозначной информации о последовательности соединения функциональных групп в молекуле. Метод ИК-спектрометрии также не позволяет отличить энантиомеры вещества, поскольку они будут давать одинаковый спектр.

**Оборудование**

Наиболее часто используются ИК-спектрофотометры с Фурье-преобразованием, которые обычно состоят из подходящего источника полихроматического излучения (например, проводящего керамического стержня), интерферометра, держателя образца, детектора и специального программного обеспечения для контроля работы спектрофотометра, записи спектров и обработки данных. В спектрофотометрах с Фурье-преобразованием используется полихроматическое излучение и рассчитывается спектр в заданной области частот путём Фурье-преобразования исходных данных.

Также могут быть использованы инфракрасные спектрофотометры, снабжённые оптической системой (призмы или дифракционные решетки), выделяющей монохроматическое излучение в измеряемой области.

Для записи спектра по методу нарушенного полного внутреннего отражения оборудование должно быть оснащено специальной приставкой, которая позволяет проводить измерение при однократном или многократном отражении. Она состоит из отражающего элемента и подходящего крепления, позволяющего её установку в спектрофотометр для достижения максимального пропускания.

ИК-спектрофотометры также могут работать вместе с микроскопом для исследования мелких частиц в составе образца или для химической визуализации.

ИК-спектрометрия может применяться в комбинации с другими аналитическими методами, такими как термический анализ или хроматография.

**Подготовка образца**

Для записи спектра пропускания или поглощения готовят образец субстанции по одной из следующих методик.

***Жидкости.***Жидкости исследуют в форме плёнки между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения, или в кювете с малой (обычно 0,01–0,05 мм) толщиной слоя, также прозрачной для инфракрасного излучения.

***Жидкости или твёрдые вещества в растворе.***Готовят раствор испытуемой субстанции в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить удовлетворительный спектр.

Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 до 0,1 мм.

Поглощение растворителя компенсируют путём помещения в канал сравнения аналогичной кюветы, содержащей выбранный растворитель. Если кюветы, заполненные растворителем, обладают разным поглощением при выбранной длине волны, то вносят поправку на измеренное поглощение испытуемого раствора. При использовании спектрофотометров с Фурье-преобразованием коррекция кювет не требуется, поскольку одна и та же кювета может быть использована и для растворителя, и для испытуемого раствора. Кюветы для спектрометрии в инфракрасной области изготавливают из солевых материалов (NaCl, KBr, CaF2, LiF и др.). Область прозрачности кюветы в ИК-области зависит от использованного материала.

Не существует растворителей, которые при значительной толщине слоя были бы полностью прозрачными для ИК-спектров. Четырёххлористый углерод (при толщине слоя до 5 мм) практически прозрачен до области 6 мкм (1666 см−1). Углерода дисульфид (при толщине слоя 1 мм) подходит как растворитель до области 40 мкм (250 см−1) за исключением областей от 4,2 до 5,0 мкм (от 2381 до 2000 см−1) и от 5,5 до 7,5 мкм (от 1819 до 1333 см−1), где он имеет сильное поглощение. Другие растворители прозрачны в относительно узкой области.

Растворители, применяемые в спектрометрии в инфракрасной области, должны быть инертны к материалу, из которого сделана кювета.

***Твёрдые вещества.*** Твёрдые вещества исследуют в твёрдом состоянии (диски из галогенидов щелочных металлов), диспергированными в подходящей жидкости в виде суспензии или в виде плёнки из расплавленной массы между двумя пластинами, прозрачными для инфракрасного излучения. Способ подготовки образца должен быть указан в методике испытания.

*Диски.* Растирают 1–2 мг испытуемого вещества с 0,3–0,4 г (если не указано иначе в методике испытания) тщательно измельчённого и высушенного калия бромида или калия хлорида (если вещество является гидрохлоридом, рекомендуется использовать калия хлорид). Обычно такого количества достаточно для приготовления диска диаметром 13±2 мм и получения спектра подходящей интенсивности. Смесь тщательно растирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют диск при давлении около 800 МПа (8 т/см2). Диски из нестабильных при обычных атмосферных условиях или гигроскопичных веществ прессуют в вакууме.

Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влага или иные примеси в дисперсионной среде. Диск непригоден для испытания, если в области прохождения луча на диске имеются трещины, или при визуальном осмотре он неоднороден по прозрачности, или его пропускание при 2000 см-1 (5 мкм) составляет менее 60 % без компенсации при отсутствии специфической полосы поглощения.

*Суспензии.* Небольшое количество вещества, предназначенного для испытания, растирают с минимальным количеством вазелинового масла или другой подходящей жидкости (смешивают 5–20 мг твёрдого вещества с 1–2 каплями иммерсионной жидкости). Полученную суспензию сжимают между двумя пластинками (NaCl или KBr), прозрачными для инфракрасного излучения.

***Газы.*** Газы исследуют в кювете, прозрачной для инфракрасного излучения, с длиной оптического пути около 100 мм. Откачивают воздух из кюветы и заполняют её анализируемым газом через кран или при помощи игольчатого клапана.

Если необходимо, доводят давление в кювете до атмосферного, используя газ, прозрачный для инфракрасного излучения (например, азот или аргон). Для исключения помех, связанных с поглощением воды, углерода диоксида или других атмосферных газов, в канал сравнения помещают идентичную кювету, которая либо вакуумирована, либо заполнена газом, прозрачным для инфракрасного излучения.

Для записи спектра по ***методу нарушенного полного внутреннего отражения*** подготовку образца проводят одним из нижеприведённых способов.

***Растворы.***Вещество растворяют в соответствующем растворителе, соблюдая условия, приведённые в методике испытания. Раствор испаряют на поверхности внутреннего элемента отражения, который может быть изготовлен из алмаза, германия, цинка селенида, таллия бромида – таллия йодида (KRS-5) или другого подходящего минерала с большим показателем преломления.

***Твёрдые вещества.***Вещество помещают на поверхность внутреннего элемента отражения таким образом, чтобы достичь как можно более плотного и полного контакта со всей поверхностью кристалла (обычно подготовку таких образцов проводят под давлением).

Подготовка образцов для ***спектрометрии в инфракрасной области диффузного отражения****:* испытуемое вещество растирают с тщательно измельчённым и высушенным калия бромидом или калия хлоридом. Содержание испытуемого вещества в полученной смеси должно составлять около 5 %, если не указано иначе в методике испытания. Смесь тщательно растирают и регистрируют спектр.

**Идентификация с использованием стандартных образцов**

Образец испытуемого вещества и стандартный образец готовят по одной и той же методике и записывают спектры, если не указано иначе в методике испытания, в области от 4000 до 650 см−1, в некоторых случаях до 200 см−1, в одних и тех же условиях. Полосы поглощения (минимумы пропускания и максимумы поглощения) в спектре испытуемого образца должны соответствовать по положению полосам поглощения в спектре стандартного образца.

Несовпадение спектров испытуемого образца и СО может быть вызвано их различной степенью чистоты или различными полиморфными модификациями. В обоих случаях рекомендуется перекристаллизация испытуемого образца и СО в одинаковых условиях, если иное не указано в методике испытания.

**Идентификация с использованием эталонных спектров**

***Контроль разрешающей способности.***В случае приборов с монохроматором записывают спектр плёнки полистирола толщиной около 0,04 мм. Разность *х* (рис. 1) между процентом пропускания в максимуме пропускания А при 2870 см−1 (3,48 мкм) и минимуме пропускания В при 2849,5 см−1 (3,51 мкм) должна быть более 18. Разность *y* между процентом пропускания в максимуме пропускания С при 1589 см−1 (6,29 мкм) и минимуме пропускания D при 1583 см−1 (6,32 мкм) должна быть более 10.

Контроль разрешающей способности ИК-спектрометров с Фурье-преобразованием проводят в соответствии с рекомендациями производителя прибора.

***Проверка шкалы волновых чисел.***Шкала волновых чисел может быть проверена с помощью плёнки полистирола, которая имеет минимум пропускания (максимум поглощения) при волновых числах (в см−1), приведённых в таблице.

***Методика.***Субстанцию готовят к испытанию в соответствии с инструкцией, прилагаемой к эталонному спектру. Используя условия, при которых проводилась проверка разрешающей способности и получен эталонный спектр, записывают спектр испытуемого образца и на него накладывают полосы полистирола при 2849,5 см−1 (3,51 мкм), 1601,2 см−1 (6,25 мкм) и 1028,3 см−1 (9,72 мкм). Сравнивают два спектра (эталонный и спектр испытуемой субстанции) и полосы полистирола, указанные выше. При использовании положения полос полистирола в качестве стандартных величин положения значимых полос в спектре испытуемой субстанции и в эталонном спектре должны соответствовать друг другу в пределах 0,5 % от шкалы волновых чисел. Относительная величина полос обоих спектров должна согласовываться между собой.

Рисунок 1 – Типичный спектр полистирола, используемый для проверки разрешающей способности

Таблица 1 – Минимумы пропускания и допустимые отклонения для плёнки полистирола

| **Минимумы пропускания, см−1** | **Допустимые отклонения, см−1** |
| --- | --- |
| **ИК-спектрометр с монохроматором** | **ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием** |
| 3060,0 | ±1,5 | ±1,0 |
| 2849,59,5 | ±2,0 | ±1,0 |
| 1942,9 | ±1,5 | ±1,0 |
| 1601,2 | ±1,0 | ±1,0 |
| 1583,0 | ±1,0 | ±1,0 |
| 1154,5 | ±1,0 | ±1,0 |
| 1028,3 | ±1,0 | ±1,0 |

**Примеси в газах**

Для анализа примесей в газах используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую соответствующую длину оптического пути. Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для обнаружения и количественной оценки примесей используют методики, указанные в фармакопейных статьях.