

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.0.0.0000

СПЕКТРОМЕТРИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

Спектрометрия в инфракрасной области (также известная как ИК-спектрометрия) основана на взаимодействии инфракрасного (ИК) излучения с веществом. В результате взаимодействия молекулы с ИК-излучением может происходить поглощение частот электромагнитного излучения, специфичных для данной молекулы, и некоторые межмолекулярные и внутримолекулярные колебания могут возбуждаться до более высоких колебательных уровней. Это приводит к формированию инфракрасного спектра поглощения с характерными полосами, соответствующими функциональным группам молекулы.

Инфракрасный диапазон длин волн можно разделить на 3 области: ближняя ИК-область, средняя ИК-область и дальняя ИК-область. Обычно диапазоны длин волн данных областей по соглашению принимаются как 0,8–2,5 мкм, 2,5–25 мкм и 25–1000 мкм соответственно. Однако в ИК-спектрометрии волновое число используется чаще, чем длина волны; оно может быть рассчитано с помощью следующего уравнения:

$$\bar{\nu} = \frac{10^4}{\lambda}, \quad (1)$$

где $\bar{\nu}$ — волновое число, см^{-1} ;

λ — длина волны, мкм.

Таким образом, область 12 500–4000 см^{-1} относится к ближней ИК-области, область 4000–400 см^{-1} — к средней ИК-области, 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 см^{-1} 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.

Средняя ИК-область граничит с ближней ИК-областью, где обнаруживаются обертоны и комбинации основных колебательных частот связей СН, NH и OH (*ОФС «Спектрометрия в ближней инфракрасной области»*), и дальней ИК-областью, где наблюдаются полосы поглощения, связанные с модами кристаллической решётки, водородными связями, угловыми деформационными колебаниями тяжёлых атомов и молекулярными вращениями.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Поскольку полосы поглощения в ИК-спектрах характеризуют функциональные группы, входящие в состав соединения, ИК-спектрометрия широко применяется для идентификации веществ и получения информации об их строении. Она также может быть использована в количественном анализе, где требуется установление математической зависимости между интенсивностью поглощённого образцом излучения и концентрацией исследуемого компонента в образце.

ИК-спектрометрия широко используется в фармацевтической области для химического и физического анализа в лабораторных условиях и имеет широкий спектр применений в процессе производства, как описано ниже. Таким образом, ИК-спектрометрия позволяет применять мониторинг технологического процесса (Process Analytical Technology, PAT) как часть стратегии контроля.

Применение в химическом анализе:

- идентификация фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ, лекарственных форм, промежуточных продуктов производственного процесса, реактивов и упаковочных материалов;

- оценка качества фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ, лекарственных форм, промежуточных продуктов производственного процесса и упаковочных материалов, включая сравнение

спектров серий/партий и оценку при смене поставщиков;

- количественное определение фармацевтических субстанций в матрице образца, содержания воды и растворителей;

- количественное определение примесей, например, в газах, неорганических материалах;

- мониторинг химических реакций, например, при химическом синтезе;

Применение в физическом анализе:

- установление свойств твёрдых веществ, таких как полиморфизм.

ОГРАНИЧЕНИЯ

К существенным ограничениям использования ИК-спектromетрии относятся следующие:

- может потребоваться использование дополнительных методов для однозначной идентификации вещества;

- невозможность отличить чистые энантиомеры вещества;

- метод может не подойти для анализа следовых количеств вещества;

- условия подготовки образца (например, давление, растворитель) могут изменить кристаллическую форму вещества, проявляющего полиморфизм;

- для неоднородных образцов ограниченный объём выборки может вызывать проблемы при анализе.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ

Измерения в ИК-спектromетрии основаны на прохождении излучения сквозь образец или внутрь образца и измерении затухания выходящего луча на различных длинах волн. Это соответствует 2 основным методам измерения: методу пропускания и методу нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, ATR). Однако существуют и другие методы для конкретных задач (например, спектromетрия диффузного отражения и

спектрометрия зеркального отражения).

МЕТОД ПРОПУСКАНИЯ

Этот режим основан на определении пропускания (T), то есть способности образца пропускать ИК-излучение на заданной длине волны (при заданном волновом числе). Оно определяется следующим соотношением:

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (2)$$

где T – пропускание;

I_0 – интенсивность падающего монохроматического излучения;

I – интенсивность прошедшего монохроматического излучения.

Результирующий спектр представлен графиком зависимости пропускания (T) на оси Y от длины волны или волнового числа на оси X . Он также может быть представлен графиком зависимости поглощения (A) на оси Y , которое связано с пропусканием (T) следующим уравнением:

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = a \times b \times c, \quad (3)$$

где A – поглощение;

a – молярный коэффициент поглощения образца, $\text{см}^2/\text{моль}$;

b – толщина образца, см ;

c – концентрация образца, $\text{моль}/\text{см}^3$.

МЕТОД НАРУШЕННОГО ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ

Метод НПВО основан на явлении полного 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_c . Однако на самом деле возникает затухающая волна,

которая 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.

Глубина проникновения d_p обычно составляет около нескольких микрон и определяется для длины волны λ следующим уравнением:

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi\sqrt{\sin^2 \alpha - (n_1 - n_2)^2}}, \quad (2)$$

где d_p – глубина проникновения, мкм;

λ – длина волны, мкм;

α – угол падения луча;

n_1 – коэффициент преломления отражательного элемента;

n_2 – коэффициент преломления образца.

Из-за взаимосвязи между этими параметрами интенсивность поглощения в НПВО больше при больших длинах волн (т.е. меньших волновых числах), и происходят небольшие сдвиги полос по сравнению с соответствующим спектром пропускания. Поэтому не рекомендуется сравнивать спектры НПВО со спектрами пропускания при идентификации соединений.

ОБОРУДОВАНИЕ

Наиболее часто используются ИК-спектрофотометры с Фурье-преобразованием, которые обычно состоят из следующих элементов:

- подходящий источник полихроматического излучения, например, проводящий керамический стержень;
- интерферометр;
- приспособление для представления образцов, например, держатель образцов;

- детектор;
- подходящее программное обеспечение для управления спектрометром, а также для оценки спектра и обработки данных.

Другие спектрометры, основанные на альтернативных принципах, также могут использоваться, если выполнены требования, описанные в разделе «Контроль производительности оборудования».

ИК-спектрометры также можно использовать совместно с микроскопом для изучения небольшой части образца или для химической визуализации.

ИК-спектрометрию можно сочетать с другими аналитическими методами, такими как термический анализ или хроматография.

ПРОВЕРКА РАБОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ

Точность шкалы волновых чисел и разрешающая способность являются критически важными параметрами и должны быть проверены. Испытания, описанные ниже, могут быть использованы для контроля работы прибора и для его квалификации. Их также можно использовать в качестве испытаний на пригодность системы.

Данные параметры проверяются с использованием соответствующих эталонных материалов, которые выбираются в зависимости от режима измерения (например, пропускание или НПВО).

Для количественного анализа необходимо также определить подходящие критерии оценки для контроля интенсивности поглощения.

ШКАЛА ВОЛНОВЫХ ЧИСЕЛ

Шкалу волновых чисел обычно проверяют с помощью плёнки из полистирола, которая демонстрирует полосы поглощения ИК-излучения при волновых числах, указанных в таблице 1.

Таблица 1. – Положения полос и соответствующие допустимые отклонения плёнки из полистирола, используемой для проверки точности волновых чисел

Положение полосы (см ⁻¹)		Допустимые отклонения, см ⁻¹
Режим пропускания	Режим НПВО	
906,6	906,1	±1,0
1028,3	1027,7	±1,0
1601,2	1601,1	±1,0
3060,0	3059,7	±1,0

Для режимов измерения, отличных от режима пропускания или режима НПВО, эталонные материалы должны быть определены пользователем.

РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

Спектры, полученные в режиме пропускания. Спектральное разрешение обычно проверяется с помощью плёнки из полистирола толщиной приблизительно 35 мкм.

Критерии приемлемости (см. рисунок 1): разница между поглощением в минимуме поглощения при 2870 см⁻¹ (А) и максимуме поглощения при 2849,5 см⁻¹ (В) должна быть больше 0,33; разница между поглощением в минимуме поглощения при 1589 см⁻¹ (С) и максимуме поглощения при 1583 см⁻¹ (D) должна быть больше 0,08.

Спектры, полученные в режиме НПВО. Устанавливают подходящие критерии приемлемости для контроля разрешающей способности в соответствии со спецификациями конкретного прибора.

Для режимов измерения, отличных от режима пропускания или режима НПВО, эталонные материалы должны быть определены пользователем.

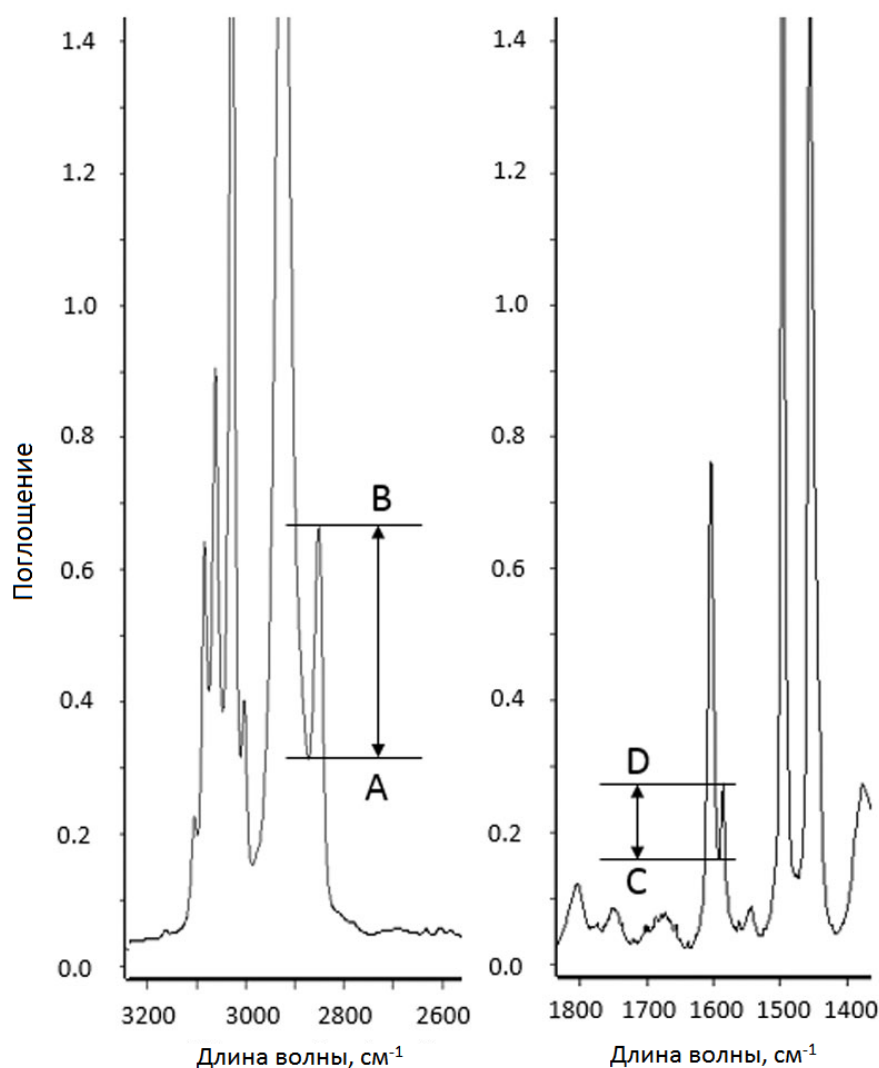


Рисунок 1. – Типичный ИК-спектр поглощения полистирола, используемый для проверки разрешающей способности

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Подготовка образцов различаются в зависимости от физического состояния образца и режима измерения.

Режим пропускания применяют к прозрачным образцам, таким как чистые жидкости, растворы, газы или подходящим образом подготовленные дисперсные системы и диски из галогенидов щелочных металлов. Для жидкостей и газов могут использоваться кюветы с фиксированной или переменной длиной пути и прозрачными к ИК-излучению окнами. Для дисков из галогенидов щелочных металлов используют специальные

держатели образцов. Режимы отражения, например, режим НПВО подходят для измерения широкого спектра образцов в твёрдом и жидком состоянии.

Некоторые методы подготовки (например, для дисков и дисперсионных смесей в режиме пропускания или для твёрдых веществ в режиме НПВО) включают измельчение и/или применение давления, что может вызывать непредвиденные изменения кристаллической структуры.

РЕЖИМ ПРОПУСКАНИЯ

Подготавливают вещество одним из следующих способов в зависимости от агрегатного состояния образца (твёрдое, жидкое или газообразное). Полосы образца в спектре должны иметь минимальный коэффициент пропускания не ниже 5 %, если не обосновано иное.

Жидкости. Жидкости исследуют в форме плёнки между двумя пластинками, прозрачными для ИК-излучения, либо в кювете с подходящей толщиной слоя с окнами, прозрачными для ИК-излучения.

Жидкости или твёрдые вещества в растворе. Готовят раствор испытуемого образца в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить спектр удовлетворительного качества. Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 г/л до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 мм до 0,1 мм. Поглощение, обусловленное растворителем, обычно компенсируют путём последовательной регистрации спектров растворителя и раствора образца и вычитания полос поглощения растворителя из спектра раствора образца.

Твёрдые вещества, диспергированные в твёрдом веществе (диски). Измельчают испытуемый образец, принимая во внимание все возможные изменения (например, кристаллическую форму), и смешивают с подходящим количеством мелко измельчённого и высушенного *калия бромида* или *калия хлорида*, если не указано иное. Смесь 1–2 мг испытуемого образца и 0,3–0,4 г галогенида обычно является достаточной для получения диска диаметром 10–15 мм и снятия спектра подходящей интенсивности. Если испытуемое вещество представляет собой гидрохлорид, рекомендуется использовать

калия хлорид. Смесь тщательно растирают, равномерно распределяют в подходящей пресс-форме и прикладывают подходящее давление. Силы давления около 800 Мпа обычно достаточно для приготовления диска. Диски из веществ, нестабильных при обычных атмосферных условиях или являющихся гигроскопичными, можно прессовать в вакууме.

Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влага или иные примеси в дисперсионной среде. Например, наличие воды в образце или калия бромиде вызовет помутнение диска и вызовет низкое пропускание в спектре. Диск непригоден, если в области прохождения луча на диске имеются трещины, или при визуальном осмотре он неоднороден по прозрачности, или при 2000 см^{-1} (5 мкм) без компенсации его пропускание составляет менее 60 % или поглощение составляет более 0,22, если не указано иное.

Твёрдые вещества, диспергированные в жидкости. Растирают небольшое количество исследуемого вещества с минимальным количеством *парафина жидкого* или другой подходящей жидкости. Для подготовки образца обычно достаточно нескольких миллиграммов (например, 5–10 мг) исследуемого вещества в 1 капле *парафина жидкого*. Дисперсионную смесь сжимают между двумя пластинами, прозрачными для ИК-излучения. Дисперсионная смесь непригодна для испытания, если при визуальном осмотре наблюдается недостаточно однородная прозрачность, а также если на спектре наблюдается:

- низкое пропускание при 4000 см^{-1} ;
- сильный наклон базовой линии между 4000 см^{-1} и около 2500 см^{-1} ;
- отношение значений относительной интенсивности некоторых полос поглощения ниже ожидаемого.

Расплавленные твёрдые вещества. Если указано в фармакопейной статье, формируют плёнку из расплавленной массы и фиксируют её в подходящем держателе.

Выпаренные растворы. Если указано в фармакопейной статье, испытуемый образец растворяют в подходящем растворителе. Получают плёнку, выпаривая растворитель на подходящем носителе, и фиксируют её в подходящем держателе.

Газы. Газы исследуют в кювете, прозрачной для ИК-излучения. Откачивают воздух из кюветы и заполняют её анализируемым газом через кран или при помощи игольчатого клапана, используя подходящую систему передачи газа между кюветой и контейнером. При необходимости регулируют давление в кювете, используя газ, прозрачный для ИК-излучения (например, *азот* или *аргон*) или продувают воздухом, не содержащим углекислого газа. Необходимо следовать соответствующему протоколу измерений для компенсации спектральных полос воды, углекислого газа или других атмосферных газов.

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ НПВО

Метод НПВО подходит для жидких и твёрдых образцов и не требует пробоподготовки, за исключением простой обработки, например, измельчения крупных кристаллов и крупнозернистых материалов. Подготовку проводят, как описано ниже, в зависимости от состояния вещества (жидкость или твёрдое вещество).

Жидкости. Испытуемый образец помещают на контактную поверхность кристалла.

Твёрдые вещества. Обеспечивают плотный и равномерный контакт между испытуемым образцом и всей поверхностью кристалла; для этого либо используют давление, либо образец растворяют в подходящем растворителе, покрывают кристалл полученным раствором и выпаривают досуха.

МЕТОДЫ

Спектрометрия в инфракрасной области в основном используется для идентификации веществ, но её также можно применять для количественного анализа. Количественный анализ (основанный на законе Бера-Ламберта,

который связывает поглощение образца с его концентрацией) не будет описан в данной фармакопейной статье.

Измерение проводится на соответствующим образом подготовленном образце. Затем обрабатывают и оценивают полученные данные либо для идентификации веществ, либо для их количественного определения (например, на основе интеграции полос ИК-поглощения).

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.

Идентификация

Проводят пробоподготовку испытуемого образца подходящим образом и записывают спектры в диапазоне от 4000 до 650 см^{-1} , если не указано иное.

Идентификационные испытания проводятся путём сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца Государственной фармакопеи или спектром сравнения Государственной фармакопеи.

Спектр стандартного образца действующей серии ФСО может быть получен с целью немедленного использования в условиях испытания или сохранён, например, в библиотеке спектров. Сохранённый спектр может быть использован в испытаниях без необходимости снимать спектр ФСО заново при условии обеспечения прослеживаемости к действующей серии ФСО.

В случае субстанций, не охваченных отдельными фармакопейными статьями, допустимо использовать другие подходящие стандартные образцы.

Во всех случаях спектры должны быть получены с использованием одних и тех же рабочих условий и методик, и особенно одного и того же режима измерения.

Если сравнение спектров, полученных с образцов в твёрдом состоянии, показывает различия (см. ниже), то испытуемый образец и образец сравнения

обрабатывают одинаковым образом, добиваясь перекристаллизации или получения одной и той же кристаллической формы, или действуют, как предписано в фармакопейной статье, затем снова записывают спектры. Однако эту процедуру необходимо выполнять только для субстанций, фармакопейная статья для которых не распространяется на конкретную форму вещества, обладающего полиморфизмом.

Для сравнения спектров может быть использовано несколько методик сравнения, и аналитик должен задокументировать и обосновать используемый режим и определённые критерии пригодности, позволяющие сделать заключение по идентификации. Спектры можно сравнивать посредством их наложения (во всём спектральном диапазоне или в интересующем диапазоне, указанном в фармакопейной статье) или с помощью математических расчётов, выполненных программным обеспечением. Например, можно выполнить:

- визуальное сравнение, основанное на положении полос и относительных интенсивностях (если не указано иное): минимумы пропускания (или максимумы поглощения) в спектре испытуемого образца и в спектре образца сравнения должны соответствовать по положению и относительной величине;

- расчёт коэффициента корреляции между двумя спектрами – данное значение рассчитывается с помощью программного обеспечения, а предельное значение для идентификации определяется пользователем;

- анализ с помощью хеометрических методов (например, евклидово расстояние, расстояние Махаланобиса, методы классификации); эти методы включают в себя разработку, анализ и валидацию хеометрической модели аналитиком.

ПРИМЕСИ В ГАЗАХ

Для анализа примесей в газах используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую подходящую длину оптического пути

(например, 1–20 м). Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для обнаружения и количественной оценки примесей в газе используют методики, указанные в соответствующей фармакопейной статье.

ПРОЕКТ