

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ОФС.1.2.1.1.0009

РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Рамановская спектроскопия – метод колебательной спектроскопии, при котором образец облучают интенсивным монохроматическим источником света, обычно лазером. Допустимо использовать и другие методы облучения. Большая часть излучения, рассеиваемого образцом, имеет ту же длину волны, что и падающий свет; этот процесс известен как рэлеевское рассеяние или упругое рассеяние света. Только очень малая часть падающих фотонов (около 10^6 – 10^8) рассеивается от образца на длинах волн, смещённых от длины волны возбуждения; этот рассеянный свет известен как рамановское (комбинационное) рассеяние или неупругое рассеяние света. Различия между длиной волны возбуждения и длинами волн рамановского рассеяния называют рамановскими (комбинационными) сдвигами, связанными с молекулярными колебаниями образца. Рассеянный свет с более низкой и более высокой энергией называют стоксовым и антистоксовым рассеянием, соответственно. Как правило, при анализе рамановского рассеяния чаще анализируют стоксово рассеяние. Спектр рамановского рассеяния представляет собой график зависимости интенсивности рамановского рассеянного излучения, или числа фотонов, от комбинационного сдвига, обычно выражаемого в волновом числе (в см^{-1}).

Методы рамановской и инфракрасной (ИК) спектроскопии являются взаимодополняющими. Оба метода позволяют анализировать фундаментальные молекулярные колебания определяемого вещества. Но из-за различных условий возбуждения рамановская и ИК-спектроскопия имеют различную чувствительность к определённым функциональным группам в определяемом веществе. Рамановская спектроскопия в большей степени способна выявлять высокосимметричные поляризуемые связи

(например, одинарные или множественные связи C-C), функциональные группы и колебания; но в меньшей степени способна выявлять антисимметричные полярные связи (например, C=O) и колебания. Например, вода, для которой характерно сильное поглощение в ИК-области, имеет относительно слабое рамановское рассеяние, поэтому рамановскую спектроскопию можно использовать для испытаний водных растворов.

Вещества (или их примеси) при испытании могут проявлять флуоресценцию, маскирующую рамановский сигнал. Для ограничения влияния флуоресценции можно выбрать большее значение длины волны возбуждения, например, в ближней ИК-области, но за счёт снижения эффективности рамановского рассеяния и, следовательно, увеличения времени испытания. Использование специального оборудования или программного обеспечения также могут ограничить влияние флуоресценции.

Помимо различных геометрий сбора (рассеяние на 90° или обратное рассеяние на 180°), рамановская спектроскопия охватывает множество методик, включая просвечивающую рамановскую спектроскопию (TRS), резонансную рамановскую спектроскопию (RR), поверхностно-усиленную рамановскую спектроскопию (SERS), усиленную наконечником рамановскую спектроскопию Рамана (TERS), пространственно-смещённую рамановскую спектроскопию (SORS), рамановскую оптическую активность (ROA), когерентную антистоксовую рамановскую спектроскопию (CARS), стимулированную рамановскую спектроскопию (SRS) и конфокальную (CF) рамановскую спектроскопию. Она также подходит для методов химической визуализации, так как имеет высокое пространственное разрешение.

2. ПРИМЕНЕНИЕ

Рамановскую спектроскопию обычно используют для качественных и количественных определений и применяют при испытании твёрдых, жидких и газообразных образцов. Рамановская спектроскопия является быстрым и неинвазивным аналитическим методом и может выполняться off-line, at-line,

in-line, on-line, например, для аналитической технологии процесса (РАТ). Рамановские спектрометры для сбора сигнала от образца используют оптические волокна большой длины, которые могут быть расположены далеко от точки измерения.

Рамановская спектроскопия имеет широкий спектр применения, в том числе:

- идентификация веществ, например, действующих веществ или вспомогательных веществ;
- определение свойств твёрдого вещества, например, полиморфизма и его свойств в растворах;
- контроль качества, например, испытание на однородность дозированных единиц;
- анализ процессов, например, мониторинга биологических и химических реакций, синтеза, кристаллизации, грануляции, смешивания, сушки, лиофилизации, экструзии, инкапсуляции и покрытия;
- обнаружение фальсифицированных продуктов;
- картирование, визуализация и глубинное профилирование лекарственных форм, например, распределение химических соединений, обнаружение неизвестных веществ.

3. ОБОРУДОВАНИЕ

В зависимости от принципа детектирования можно выделить два типа рамановского спектрометра: дисперсионные и Фурье преобразующие (FT) приборы. Это могут быть настольные приборы (включая устройства, соединённые с микроскопом, портативные приборы) или ручные приборы.

Рамановские спектрометры обычно состоят из:

- источника монохроматического света, обычно лазера, с длиной волны в ультрафиолетовой, видимой или ближней ИК-области. Большинство приборов, работающих при длине волны ниже 1064 нм, являются дисперсионными, тогда как те, которые работают при длине волны равной или

выше 1064 нм, основаны на Фурье преобразовании. Длину волны и интенсивность лазерного излучения выбирают в зависимости от предполагаемого применения и определяемого вещества, включая потенциально флуоресцирующие второстепенные компоненты;

- подходящей оптики (линзы, зеркала или оптоволоконная сборка), которая направляет монохроматический свет на испытуемый образец и собирает от него рамановский рассеянный свет; если применимо, микроскоп, фокусирующий лазерный луч на испытуемом образце;

- оптического устройства (например, фильтры), которое пропускает смещённое по частоте комбинационное рассеяние, но препятствует упруго рассеянному рэлеевскому излучению достигать детектора; и

- диспергирующего устройства (дифракционная решётка и(или) призматический полихроматор) в сочетании с щелями, пропускающими определённые длины волн, и одно- или многоканальным детектором (например, прибором с зарядовой связью) или

- интерферометра с детектором, который регистрирует интенсивность рассеянного света с течением времени, и устройства обработки данных (например, компьютер и соответствующее программное обеспечение), которое преобразует эти данные в частотную или волновую область с помощью вычисления преобразования Фурье;

- приспособления для размещения образца на пути возбуждающего излучения для конкретных применений (например, держатель образца, подвижный лоток).

Рамановские спектрометры обычно связаны со специальным программным обеспечением для получения спектров. При необходимости аналитик должен иметь возможность проверять записанные спектры, чтобы подтвердить достоверность измерения (например, целостность образца, флуоресценцию, насыщенность сигнала, отношение сигнал/шум) и достоверность аналитического заключения (например, идентификацию с использованием спектрального сравнения).

4. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБОРУДОВАНИЯ

Калибровки и(или) испытания производительности системы проводят через регулярные интервалы времени в зависимости от режима использования прибора в соответствии с инструкциями производителя. Например, для калибровки часто используют спектры излучения лампы низкого давления, показывающие характерные максимумы при волновых числах по всему спектральному диапазону прибора, (например, неоновые лампы, а также ртутные, аргоновые, криптоновые или ксеноновые лампы).

4.1. ШКАЛА ВОЛНОВЫХ ЧИСЕЛ

Рамановские сдвиги по шкале волновых чисел проверяют, используя подходящий стандарт, имеющий характерные максимумы при испытываемых волновых числах.

Следует выбрать минимум три волновых числа, охватывающих рабочий диапазон прибора, предназначенного для измерений. Для дисперсионных рамановских спектрометров, которые используют несколько решёток для различных спектральных разрешений, шкала волновых чисел должна быть проверена при том же оптическом разрешении, что и при измерении образца. Все решётки, используемые для рамановских измерений, должны быть проверены на точность рамановского сдвига.

4.2. ШКАЛА ИНТЕНСИВНОСТИ ОТКЛИКА

Абсолютная и относительная интенсивность рамановских сигналов зависят от изменений нескольких факторов, включая:

- поляризацию излучающего света;
- поляризацию рамановского рассеянного света;
- интенсивность излучающего света;
- отклик прибора(детектора);
- фокус и геометрию на образце;
- плотность упаковки частиц в твёрдых образцах;

- показатель преломления n или изменение n (Δn) между определяемым веществом и окружающей средой;
- размер частиц и распределение размеров частиц;
- сечение рассеяния;
- сечение поглощения.

Проверка шкалы интенсивности отклика в основном выполняется для количественных методов.

Соответствующие критерии приемлемости зависят от применения метода. В большинстве случаев достижимо максимальное отклонение в интенсивности полос по сравнению с предыдущей квалификацией прибора, составляющее ± 10 процентов. Калибровка отклика может включать использование стандартов белого света или подходящего люминесцентного стекла.

4.3. СПЕКТРАЛЬНОЕ РАЗРЕШЕНИЕ

Спектральное разрешение – это способность спектроскопической системы разделять примыкающие полосы, что позволяет характеризовать сложные образцы (например, анализ группы, кристалличность, полиморфизм).

Соответствующие критерии приемлемости для контроля спектрального разрешения в соответствии со спецификациями каждого прибора и предполагаемым применением должны быть рассмотрены или указаны в фармакопейной статье. Для испытаний на подлинность, если иное не указано в фармакопейной статье, спектральное разрешение должно быть меньше или равно 15 см^{-1} (измерено в диапазоне волновых чисел между 1000 см^{-1} и 1100 см^{-1}).

Спектральное разрешение проверяют с использованием подходящего стандартного материала. Параметры прибора, используемые для испытания, такие как лазер, ширина щели и дисперсионная решётка и круглая апертура (остановка Жакино или J-остановка) для ФТ-приборов, должны быть такими же, как и у применяемых для испытаний образцов. Например, регистрируют

рамановский спектр фармакопейного стандартного образца *карбоната кальция* для квалификации оборудования и определяют полную ширину полосы на половине высоты (W_{1085}) полосы, расположенной при волновом числе 1085 см^{-1} . Затем рассчитывают спектральное разрешение (R) с использованием карбоната кальция, используя следующее уравнение:

$$R = \frac{W_{1085} - 0,684}{1,0209}$$

где: R – спектральное разрешение с использованием карбоната кальция;

W_{1085} – полная ширина на половине высоты полосы, расположенной при волновом числе 1085 см^{-1}

5. МЕТОД

5.1. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Рамановские спектры твёрдых тел, жидкостей и газов, как правило, можно получить без предварительной подготовки или разбавления образца. Измерения можно проводить напрямую или в подходящих стеклянных или пластиковых ёмкостях, или через плёнки, при условии, что влияние нежелательных сигналов контролируется.

При испытании методами рамановской спектроскопии площадь и объём измеряемого образца могут быть небольшими (например, для устройств, соединённых с микроскопом), и необходимо убедиться в том, что проводимые измерения будут репрезентативными. Для этого, например, образец вращают, выполняют измерения серии образцов испытуемого вещества, используют орбитальное растровое сканирование (ORS), увеличивают область освещения путём уменьшения фокусировки, дефокусировки лазерного луча или изменением фокусного расстояния между измерениями для сканирования на разной глубине. TRS и SORS также подходят для исследования относительно большого объёма благодаря разделению областей возбуждения и сбора.

Энергия, передаваемая лазером, зависит от длительности воздействия и длины волны. Избыток энергии может изменять физическое состояние или

приводить к разрушению образца, поэтому рамановскую спектроскопию не всегда можно считать неразрушающим методом.

Для анализа химических изображений, полученных при сканировании поверхности образца, подготовка образца должна быть совместима с оборудованием. Например, при испытании спектрометрами, оснащёнными микроскопом, образцы должны иметь плоскую поверхность.

5.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

Поскольку для идентификации используют положения частоты сдвига и относительные интенсивности, для стандартного материала и определяемого вещества может потребоваться разная интенсивность лазера. Испытуемый образец при испытании должен быть в том же физическом состоянии (например, жидком, твёрдом), что и образец сравнения или материал, спектр которого получен для библиотеки спектров. При проведении испытания методами рамановской спектроскопии допустимо не извлекать испытуемое вещество из упаковки. Некоторые упаковочные материалы могут приводить к дополнительным сигналам в рамановском спектре, в особенности непоглощающие на длине волны возбуждения лазера упаковочные материалы. Их рамановский сигнал может быть наложенным [на другой], иметь высокое сечение рассеяния или представлять другую спектроскопическую помеху.

Идентификацию проводят с использованием образца сравнения или библиотеки стандартных спектров.

5.2.1. Идентификация с использованием образца сравнения

Испытуемый образец и образец сравнения подготавливают, следуя одной и той же процедуре, регистрируют спектры с помощью того же (или эквивалентного) типа прибора в тех же условиях и сравнивают спектры в диапазоне волновых чисел между 400 см^{-1} и 2000 см^{-1} , если не указано иное. Если спектры, зарегистрированные для образцов в твёрдом состоянии, показывают различия в положениях максимумов сигнала, испытуемый образец и образец сравнения необходимо обработать одним и тем же способом, чтобы они кристаллизовались или были получены в одной и той же

твёрдой форме, или подготавливают, как указано в фармакопейной статье, затем регистрируют спектры. При наличии фармакопейной статьи для веществ, имеющих определённую полиморфную форму, эту процедуру подготовки не проводят.

5.2.2. Идентификация с использованием библиотеки стандартных спектров

Регистрируют спектры подходящего количества образцов веществ, отличающихся, например, производителями, сериями, размерами частиц, профилями примесей, и соответствуют требованиям фармакопейной статьи или установленным требованиям. Количество и выбор образцов в базе данных зависят от конкретного приложения. Для более качественного сравнения спектров используют подходящую предварительную математическую обработку рамановского спектра (например, коррекция базовой линии, нормализация, производные и др.).

Процедуры сравнения

Можно использовать несколько процедур сравнения, необходимо документировать и обосновать используемый метод и критерии приемлемости, которые позволяют сделать вывод об идентификации. Спектры сравнивают наложением спектров (во всём спектральном диапазоне или в интересующей области, указанной в фармакопейной статье), или с помощью математических расчётов программного обеспечения. Например, можно выполнить:

- визуальное сравнение на основе положения полос и относительной интенсивности, если не указано иное; максимумы в спектре, полученном с испытуемым образцом, соответствуют по положению и, если применимо, по относительной интенсивности максимумов в спектре, полученном с образцом сравнения;

- статистическое определение сходства между спектрами испытуемого образца и образца сравнения. Значение рассчитывают с использованием

программного обеспечения и устанавливают порог количественного определения;

– оценка хемометрическими методами (например, меры сходства и расстояния, оценка методами классификации); эти методы включают настройку библиотеки спектров и разработку, оценку и валидацию хемометрической модели.

5.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

Количественное определение образца сравнения и испытуемого образца проводят при одинаковой номинальной интенсивности возбуждения и частоте лазера. Испытуемый образец должен быть в том же физическом состоянии (например, жидком, твёрдом), и его концентрация должна находиться в том же диапазоне концентраций, что и концентрация стандартного образца, используемого для калибровки или в той же концентрации, что и вещество, спектр которого взят из библиотеки стандартных спектров. Несмотря на то, что закон Бера-Ламберта неприменим для рамановской спектроскопии, рамановская интенсивность прямо пропорциональна концентрации соответствующих определяемых веществ, и калибровка может быть основана как на одномерных, так и на многомерных хемометрических методах. Однако для твёрдых образцов и суспензий рамановская интенсивность может зависеть от матрицы (например, из-за флуоресценции и самопоглощения). На рамановский сигнал влияют показатель преломления образца, размер частиц и распределение частиц по размерам (маленькие частицы дают относительно более интенсивное рамановское рассеяние, чем крупные частицы), плотность упаковки, сечение рассеяния, сечение поглощения и т. д. (см. подраздел 4.2. *Шкала интенсивности отклика*).