

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Рамановская спектрометрия

ОФС.1.2.1.1.0009.15

Вводится впервые

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

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

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

Метод. 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). Под действием излучения 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 возбужденном колебательном состоянии, является упругим, то энергетическое состояние молекулы не меняется, и частота рассеянного

излучения будет такая же, как падающего (релеевская полоса Рамановского спектра). В случае неупругого взаимодействия происходит обмен энергией между квантом излучения и молекулой, за счет чего возникает рассеянное излучение, которое может быть большей или меньшей частоты (антистоксова и стоксова полоса соответственно). Таким образом, формируется Рамановский спектр.

Спектры комбинационного рассеяния очень чувствительны к природе химических связей – как в органических молекулах и полимерных материалах, так и в кристаллических решетках 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 C–C, C=C и C≡C, а также гидроксильной –ОН, аминогруппы –NH₂ и т.д. Эти линии проявляются в диапазоне от 600 см⁻¹ (валентные колебания одинарных C–C связей) до 3600 см⁻¹ (колебания –ОН 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.

Пробоподготовка при проведении исследования методом Рамановской спектроскопии не требуется, что позволяет значительно ускорить идентификацию и контроль качества лекарственных средств.

Прибор. Рамановские спектрометры основаны на одном из двух способов получения спектров: дисперсионная Рамановская спектроскопия

или Рамановская спектрометрия с Фурье преобразованием. Каждый из способов имеет свои преимущества для выполнения определенных задач.

Дисперсионный Рамановский спектрометр. В дисперсионном Рамановском спектрометре обычно используют лазеры в видимой области. Типичные длины волн лазеров 780, 633, 532 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 решетке, которая выделяет различные длины волн, фиксируемые на детекторе ПЗС (прибор с зарядовой связью), 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.

Фурье-Рамановские спектрометры 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 – InGaAs или охлаждаемый жидким азотом Ge-детектор, которые посредством Фурье-трансформаций превращают сигналы в набор частот или волновых чисел.

Идентификация и количественное определение с использованием стандартного образца

Идентификация соединения по спектру комбинационного рассеяния осуществляется 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 интенсивности (I) линий спектра числа молекул (N) в единице объема:

$$I = i \cdot k \cdot N ,$$

где i – интенсивность рассеиваемого света на одну молекулу;

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

При количественном анализе смеси проводится последовательная регистрация спектров в одинаковых условиях и сравнение интенсивностей линий образцов, с учетом предварительной идентификации всех компонентов смеси и наличия соответствующих стандартов. Сравнение может быть осуществлено также по методу внутреннего стандарта при добавлении в анализируемую смесь определенного количества стандартного вещества.

Идентификация и количественное определение с использованием библиотек спектров

Количественное определение образца проводят также с использованием библиотек спектров сравнения и с учетом всех необходимых поправок и калибровок прибора.

Интенсивность в максимуме спектральной линии (I_0) выражают или в произвольной относительной шкале либо в условной, принимая в качестве эталона интенсивность линии образцов сравнения. Шкалу волновых чисел

проверяют по характерным максимумам стандартов: циклогексана ($801,3 \text{ см}^{-1}$), индена ($533,9 \text{ см}^{-1}$) или нафталина ($513,8 \text{ см}^{-1}$).

Факторы, влияющие на абсолютную и относительную интенсивность спектральных полос:

- поляризация падающего света;
- поляризация собирающей оптической системы;
- интенсивность падающего света;
- различия в отклике прибора;
- различия в фокусе и геометрии образца.

При эксплуатации прибора допустимы колебания в относительных интенсивностях спектральных полос $\pm 10 \%$.

При анализе примесей в лекарственных средствах важно иметь программное обеспечение, включающее библиотеки спектров. Набор спектров, полученных на данном спектрометре и образующих спектральную библиотеку, содержит информацию, определяющую границы подобию или количественные пределы, которые могут быть применены при идентификации вещества и установлении его количественного состава. Использование библиотек позволяет провести качественный анализ состава лекарственного средства с определением пропорций содержания отдельных компонентов. Селективность базы данных, которая позволяет уверенно идентифицировать конкретное вещество или отличить его от других материалов базы данных, устанавливается при валидации.

Полученная таким образом спектральная библиотека пригодна только для использования данного прибора либо аналогичного при условии подтверждения достоверности работы библиотеки после переноса.