

NIR

a jeho využití ve farmacii

Josef Jampílek

Osnova

- **Charakterizace a principy metody**
- **Techniky měření**
- **Doporučení a předpisy**
- **Aplikace**
- **Výhody a nevýhody techniky NIR**

NIR – charakterizace

- **Rychlá nedestruktivní, neinvasivní analytická metoda, která nabízí široké spektrum využití.**
- **Nahrazuje pracnější, náročnější postupy analytické chemie.**
- **Rychlá kontrola vstupních surovin, meziproduktů a produktů.**
- **Lze aplikovat on-line analýzy a PAT (v procesní kontrole QC/AC).**

Historie a trendy vývoje

- **60. léta – kvantitativní stanovení vlhkosti v semenech olejnin.**
- **70. léta – analyzátory krmiv a potravin (fy Dickey-John, Neotec, Technicon).**
- **Koncem 80. let a začátkem 90. let vývoj přístrojů FT-NIR ⇒ širší využití techniky NIR.**
- **Rozvoj počítačové techniky a zlepšení kvality měřeného spektra akceleroval vývoj statistického softwaru.**
- **Vzrůstá počet publikovaných aplikací.**

NIR – předpisy, doporučení

USP 26NF21, kapitola 1119 a její aktualizace.

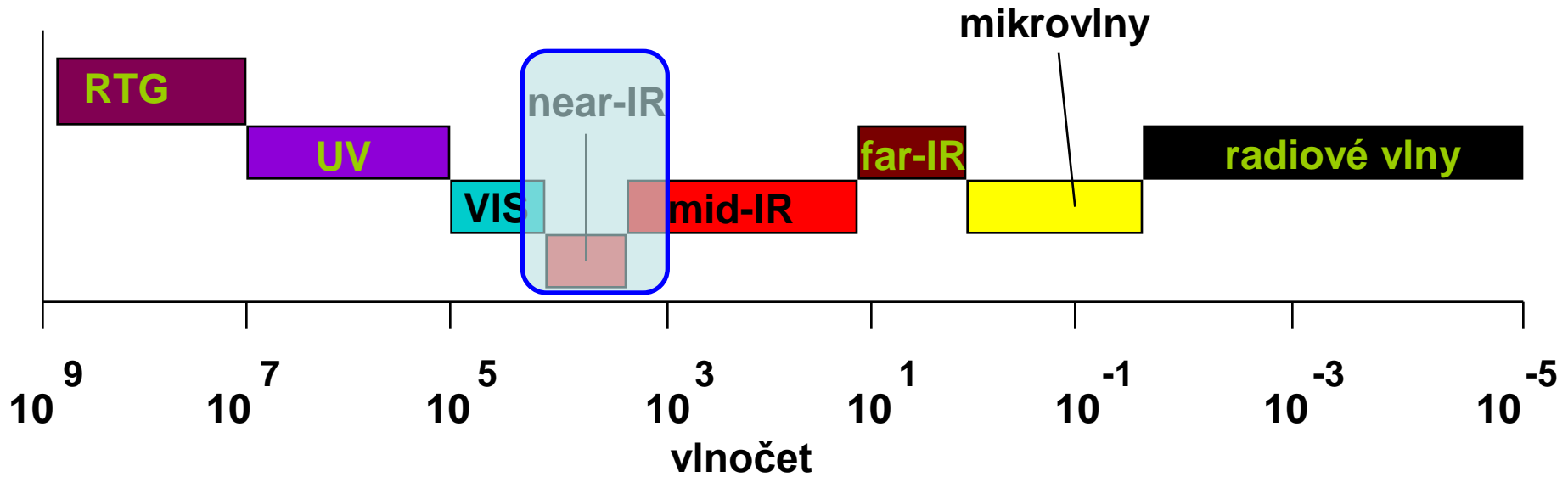
Moffat A.C. et al. *Analyst*, 2000, 125, 1341–1351.

PASG NIR SubGroup (An Association of Analytical Chemists within the research based Pharmaceutical Industry): **Guidelines for the Development and Validation of Near Infrared (NIR) Spectroscopic Methods, 2001.**

Guidelines for the Development and Validation of Near-infrared Spectroscopic Methods in the Pharmaceutical Industry, 2002.

US FDA Guidance for Industry: PAT – a framework for innovative pharmaceutical manufacturing and quality assurance, 2004.

Elektromagnetické spektrum



Regiony IR spektroskopie

- ***NIR***

- 13000 (12800) – 4000 cm^{-1} (vlnočet)
- 800 – 2500 nm (vlnová délka)

- ***MIR***

- 4000 – 400 cm^{-1} (vlnočet)
- 2500 – 25000 nm (vlnová délka)

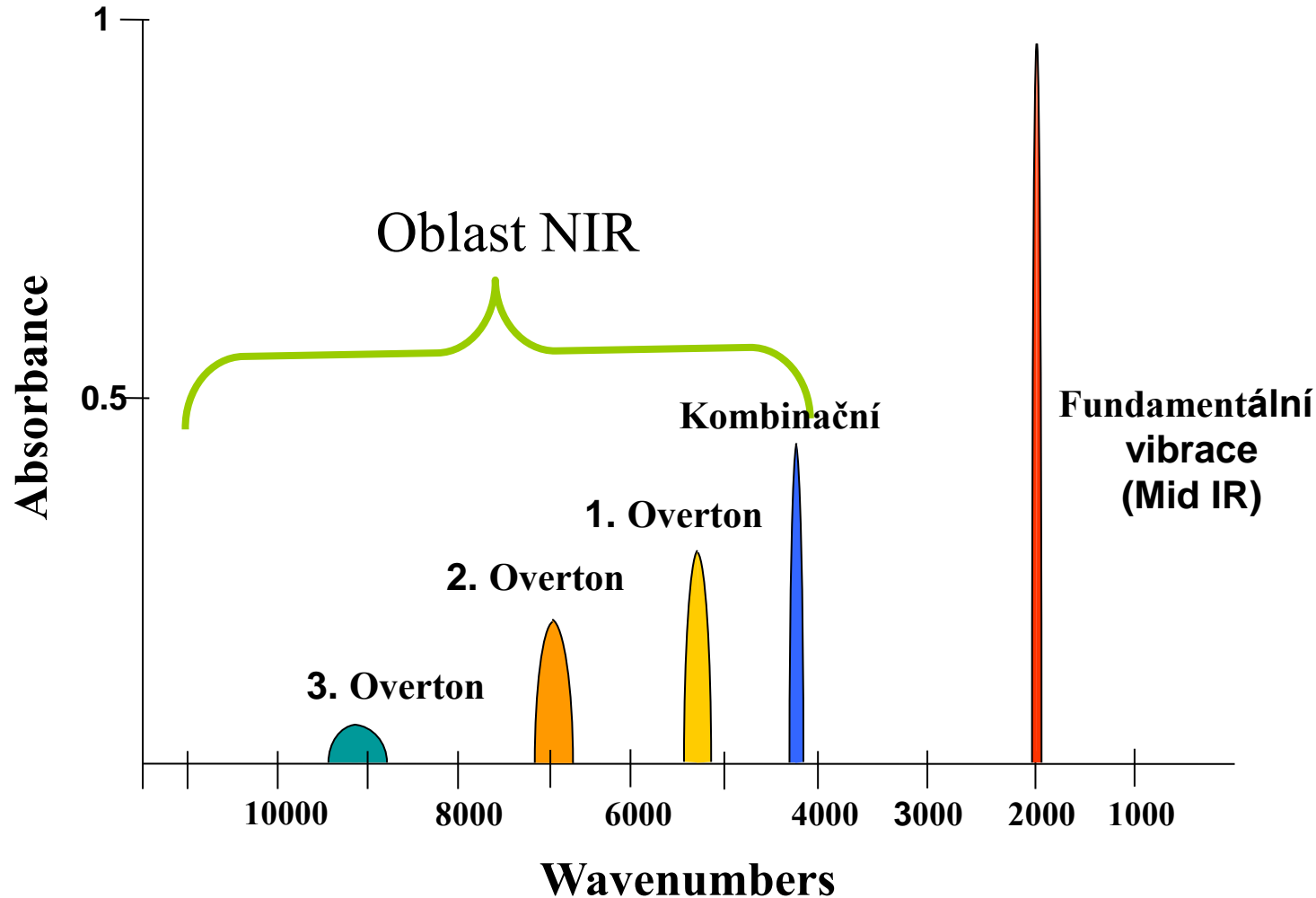
Fyzikální princip vzniku spekter MIR / NIR

Stejný základní fyzikální princip v obou oblastech.
Absorbce fotonů o stejných frekvencích jako jsou
frekvence vibrací příslušných vazeb.

MIR: fundamentální absorpční módy $0 \rightarrow 1$
overtony – svrchní tóny ($0 \rightarrow 2$, $0 \rightarrow 3$)
a kombinační absorpční módy funkčních skupin,
jejichž základní vibrace je $<2000 \text{ cm}^{-1}$.

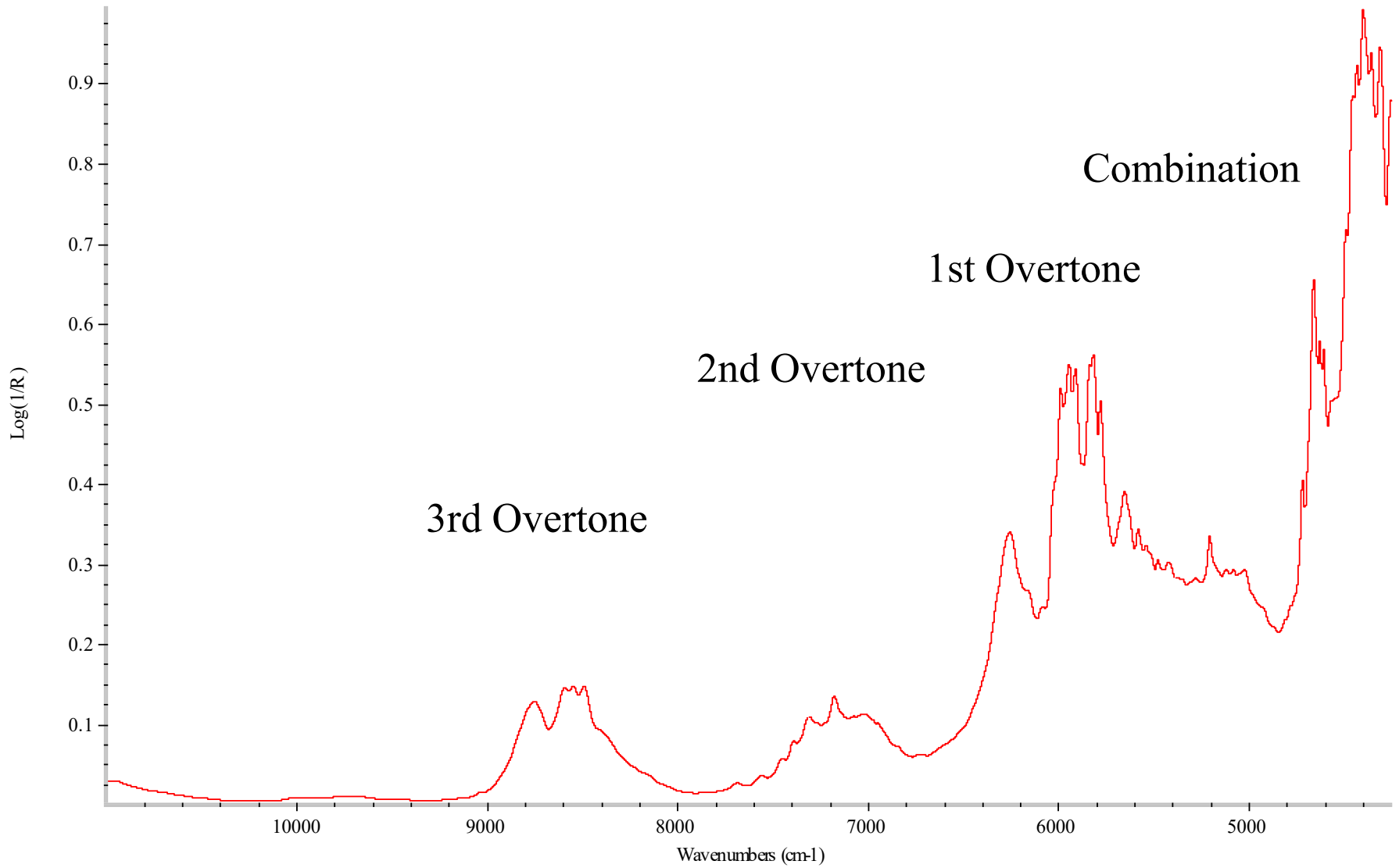
NIR: overtóny ($0 \rightarrow 2$, $0 \rightarrow 3$) a kombinační
absorpční módy funkčních skupin, jejichž
základní vibrace je $>2000 \text{ cm}^{-1}$.

Absorpční pásy NIR



NIR spektra složena z kombinačních pásů a pásů vyšších harmonických vibrací.
(projevují se při vyšších frekvencích)

NIR spektrum



Konstrukce spektrometru

Vzhledem k odlišným frekvencím záření, které se v NIR uplatňuje, nejsou NIR spektrometry tolik náročné na použité materiály jako přístroje pracující ve střední oblasti IČ záření.

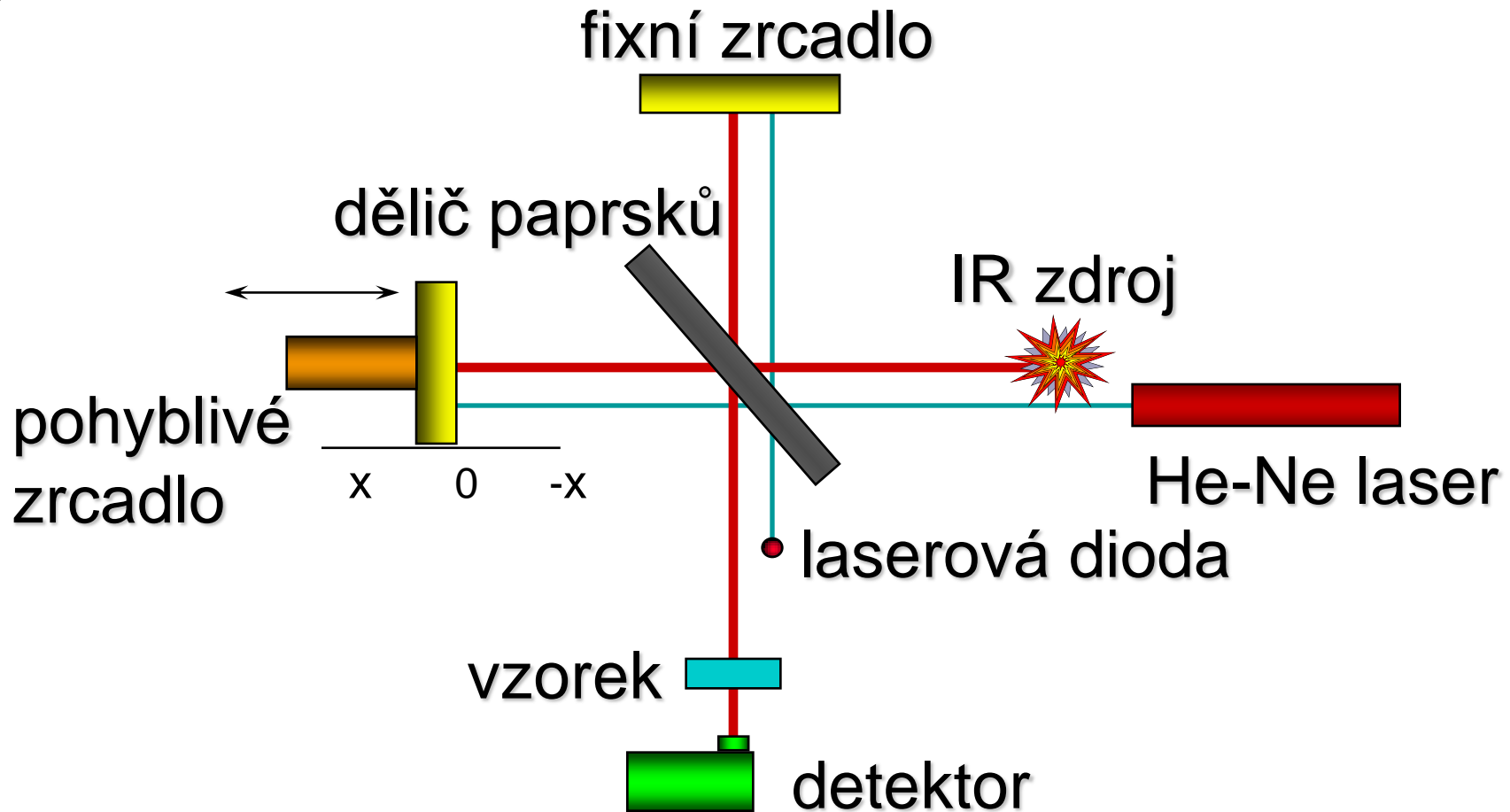
Blízké IČ záření prochází křemenným sklem, a proto může být veškerá optika z křemenných vláken, např. kyvety mohou být ze stejného skla, jaké se užívá v UV-VIS spektrometrii.

Konstrukce FT-NIR spektrometrů je zcela totožná jako pro střední oblast. Všechny NIR spektrometry se skládají ze tří základních součástí:

- zdroje záření
- detektoru
- interferometru

Konstrukce spektrometru

Základní konstrukční schéma spektrometru s Fourierovou transformací pro oblasti MIR a NIR je obdobné.



Rozdíly v konstrukci FT-MIR a FT-NIR spektrometru

Zdroje záření

MIR: odporový NiCr drát, žhavená keramická tyčinka

NIR: halogenová žárovka

Děliče paprsků

MIR: KBr, CsI

NIR: křemen, CaF_2

Rozdíly v konstrukci FT-MIR a FT-NIR spektrometru

Detektory

MIR: DTGS/KBr, MCT, fotoakustický

NIR: InGaAs, PbSe, PbS, Si

Vláknová optika

MIR: KBr

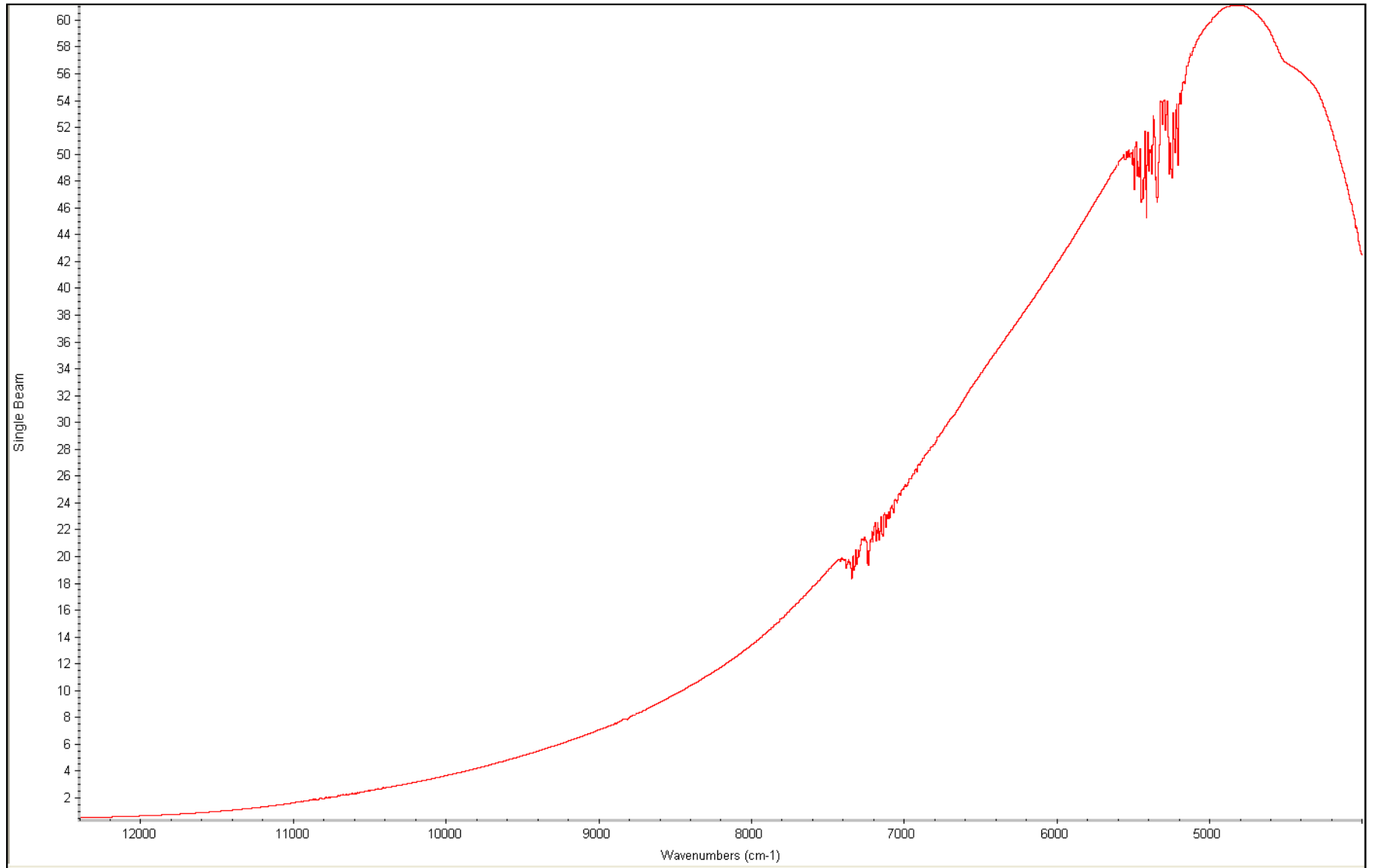
NIR: křemen

Materiál příslušenství

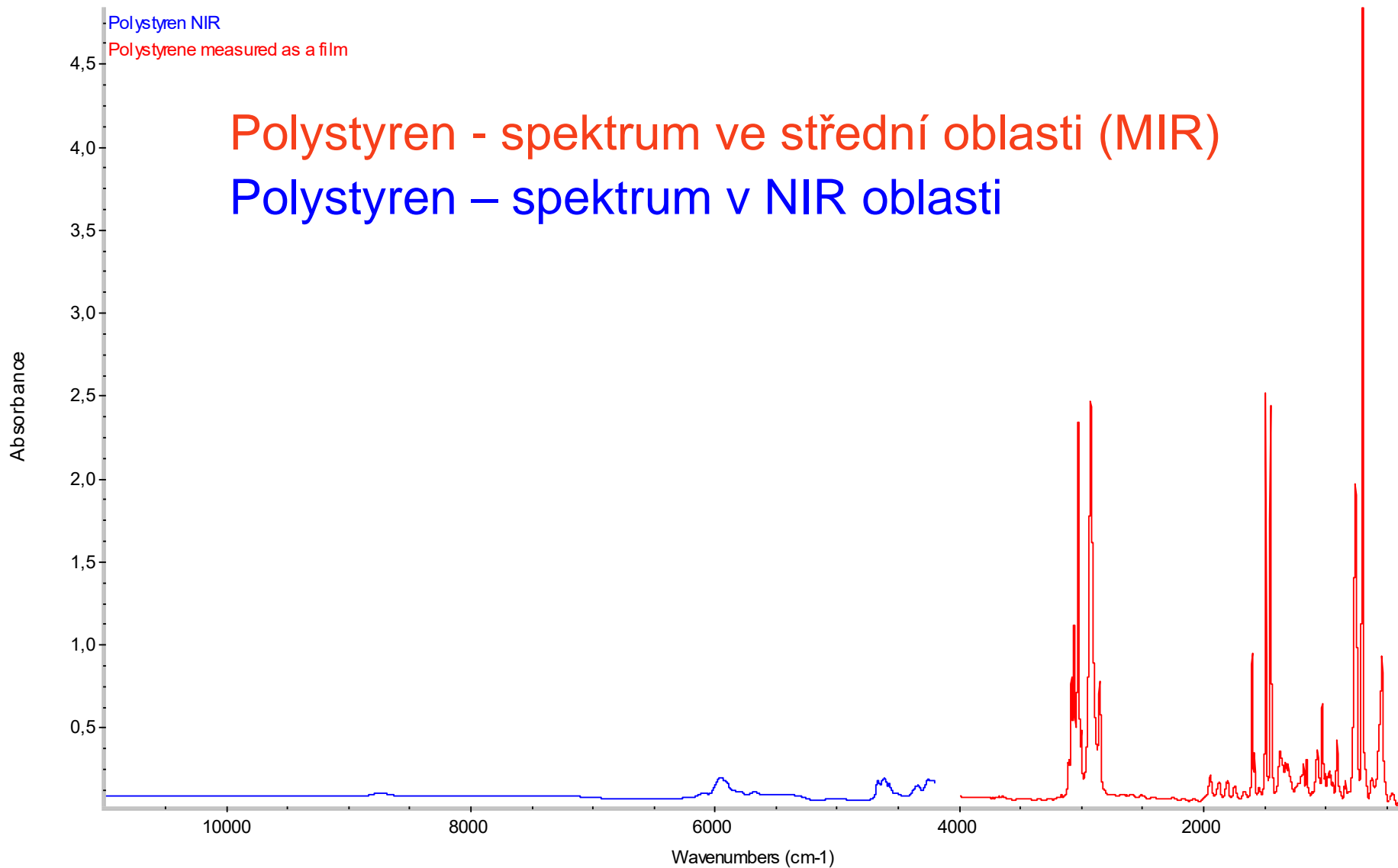
MIR: KBr, NaCl, CsI, ZnSe, diamant, Si

NIR: sklo, křemen

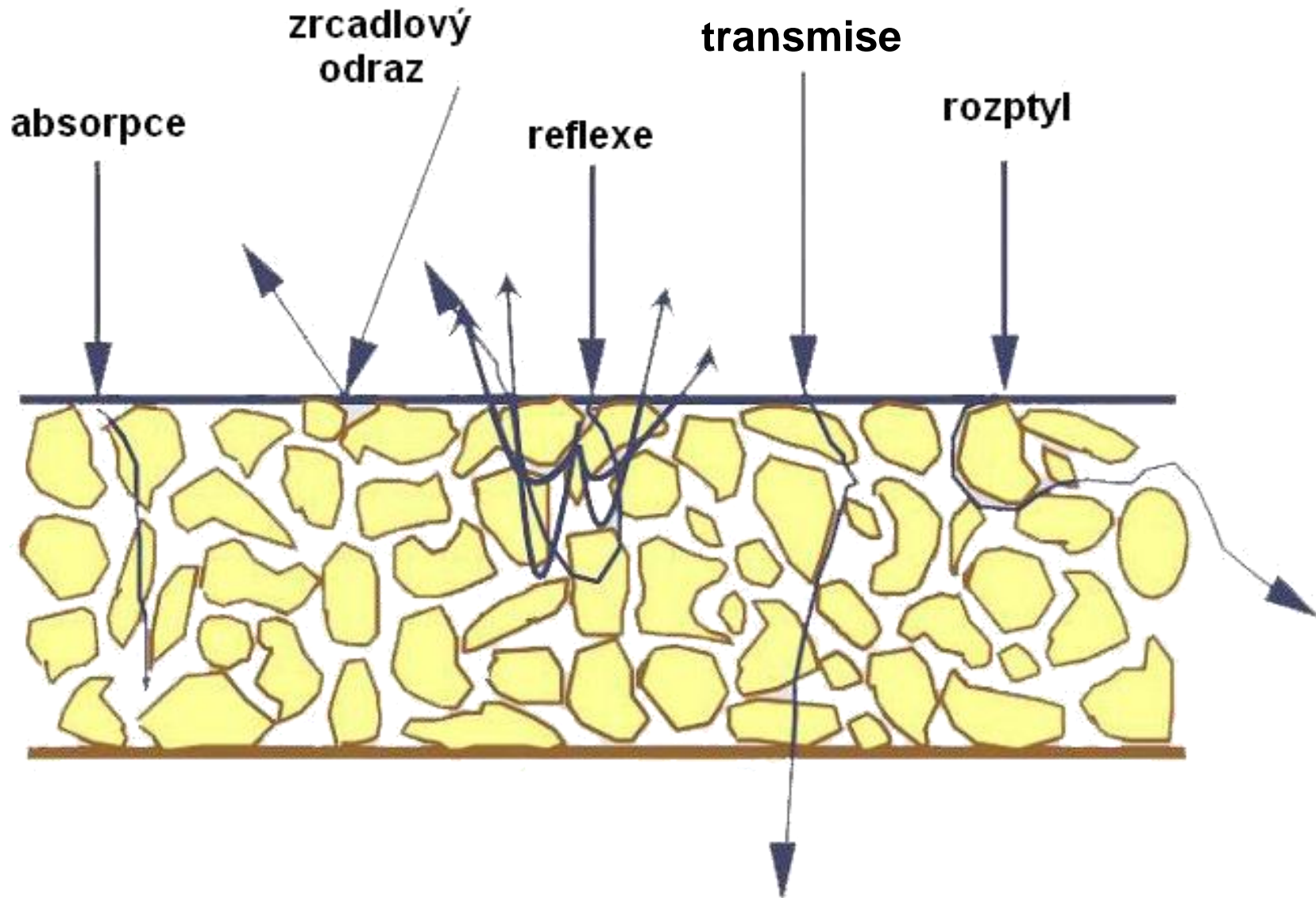
NIR spektrum vzdušného pozadí



Spektrum polystyrenu v MIR a NIR oblasti

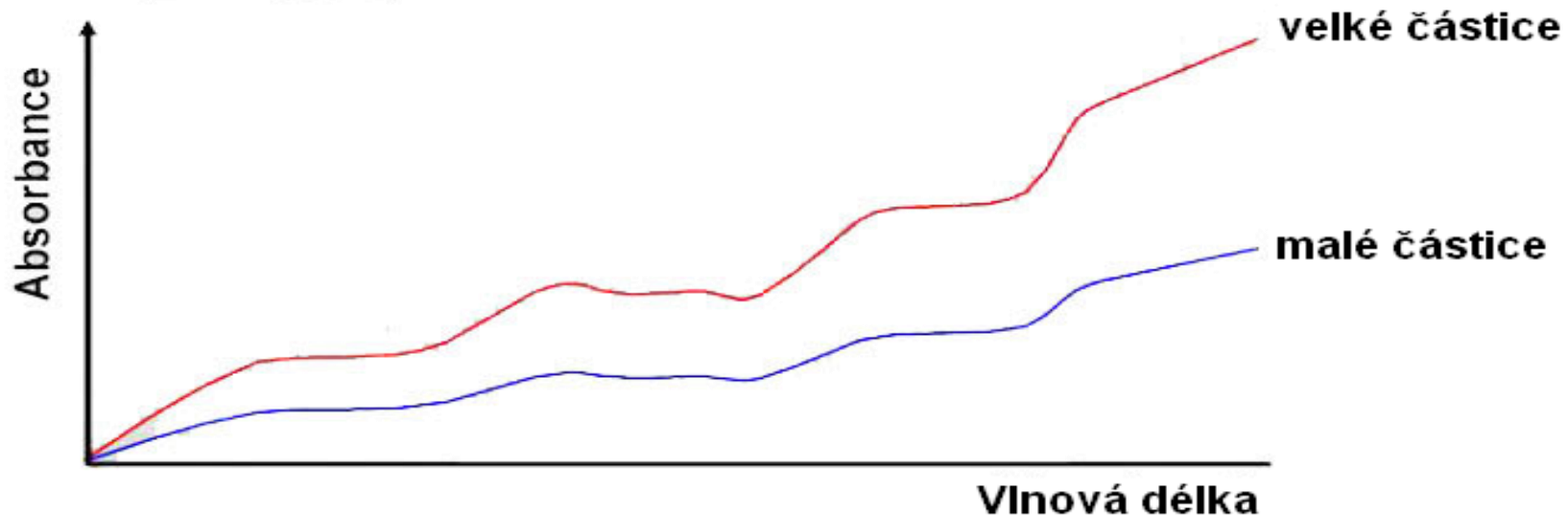
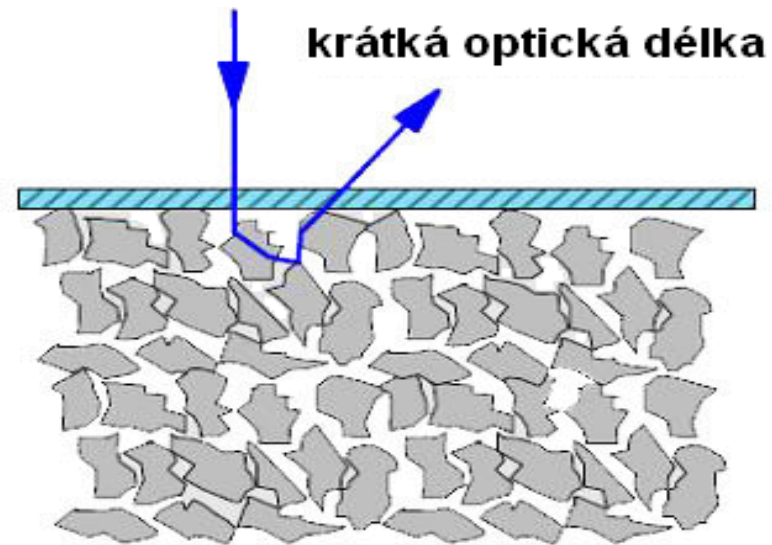
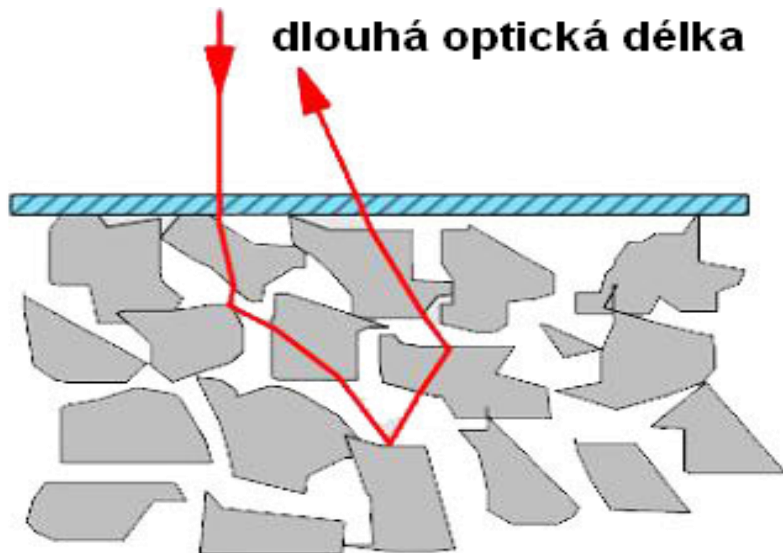


Interakce záření s pevným vzorkem



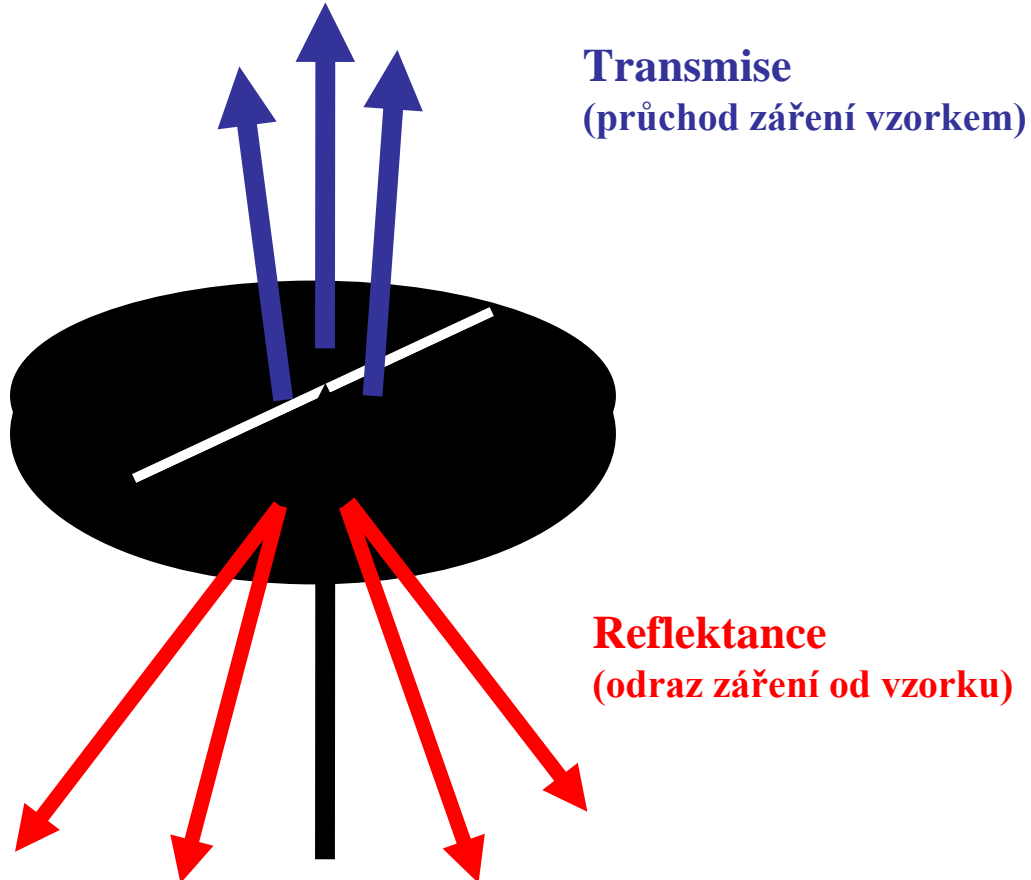
Interakce záření s pevným vzorkem

Vliv velikosti částic.



Techniky měření

- **Transmisní měření** – zeslabení zářivého toku po průchodu záření vzorkem.



- **Reflexní měření** – zeslabení zářivého toku po odrazu záření.

Techniky měření

Reflexní měření

- **Difúzní reflexe (DRIFT)** - pro pevné látky
Dopadající záření se odráží od povrchu jednotlivých malých částic.

Nástavec UpDrift s úpravou pro rotaci vzorku

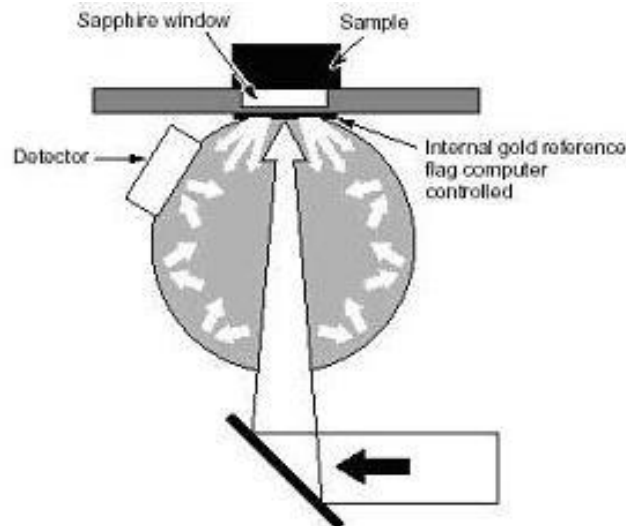


Techniky měření

Princip difúzní reflexe (DRIFT).

- **Difúzní reflexe (DRIFT)** - pro pevné látky

V rámci reflexních technik se nejčastěji uplatňuje princip difúzní reflexe s Fourierovou transformací (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform, DRIFT), kdy se dopadající záření odráží od povrchu jednotlivých malých částic práškovitého vzorku. Tento přístup se nejčastěji používá při analýzách ve farmaceutickém průmyslu.

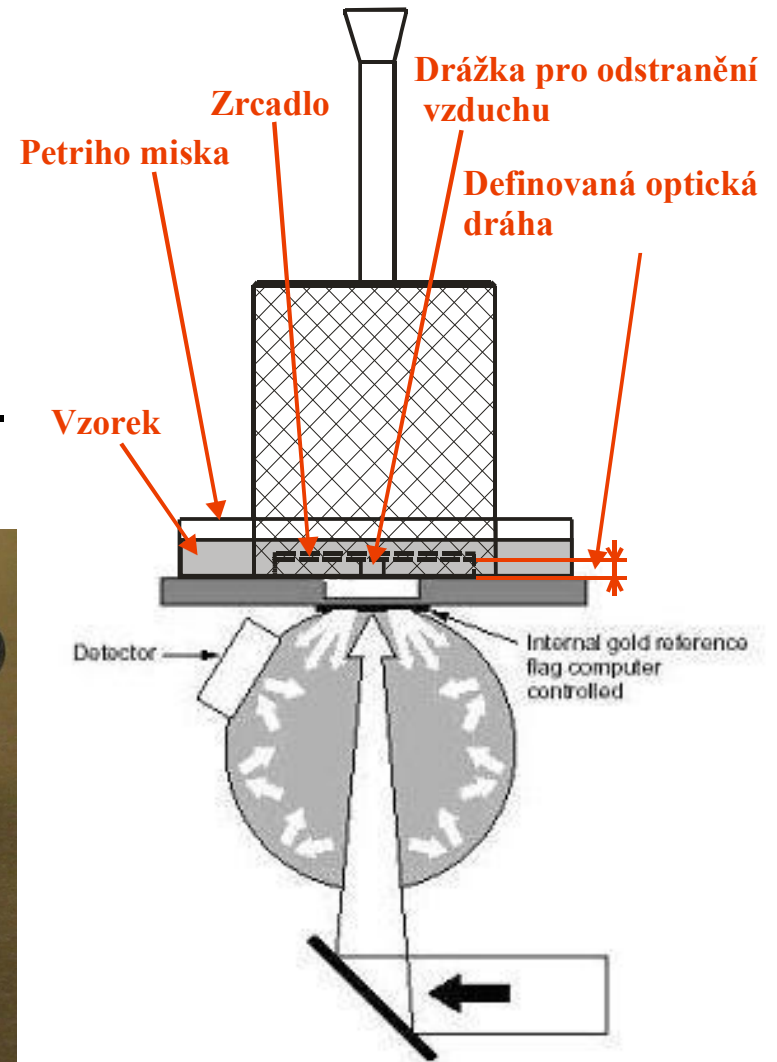
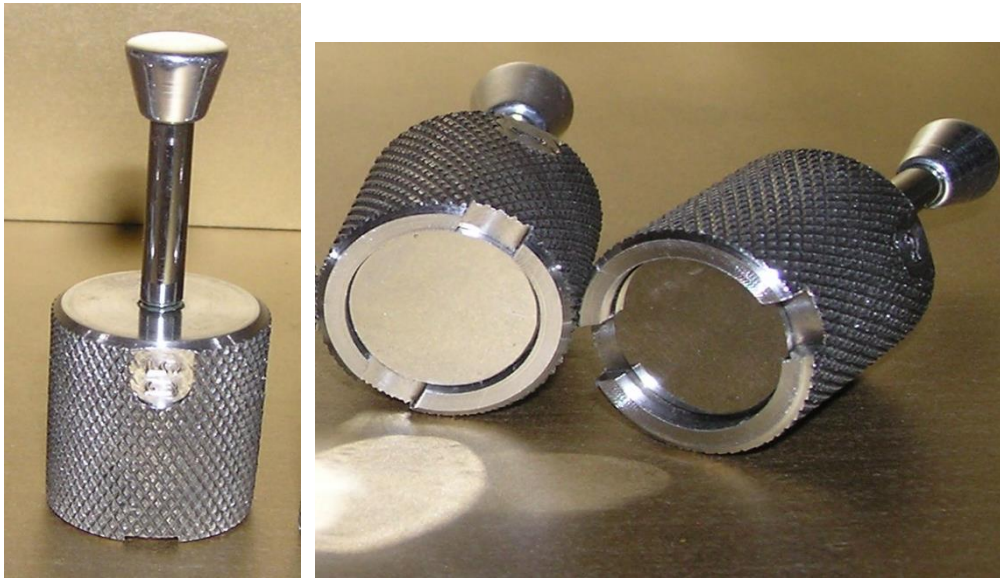


Techniky měření

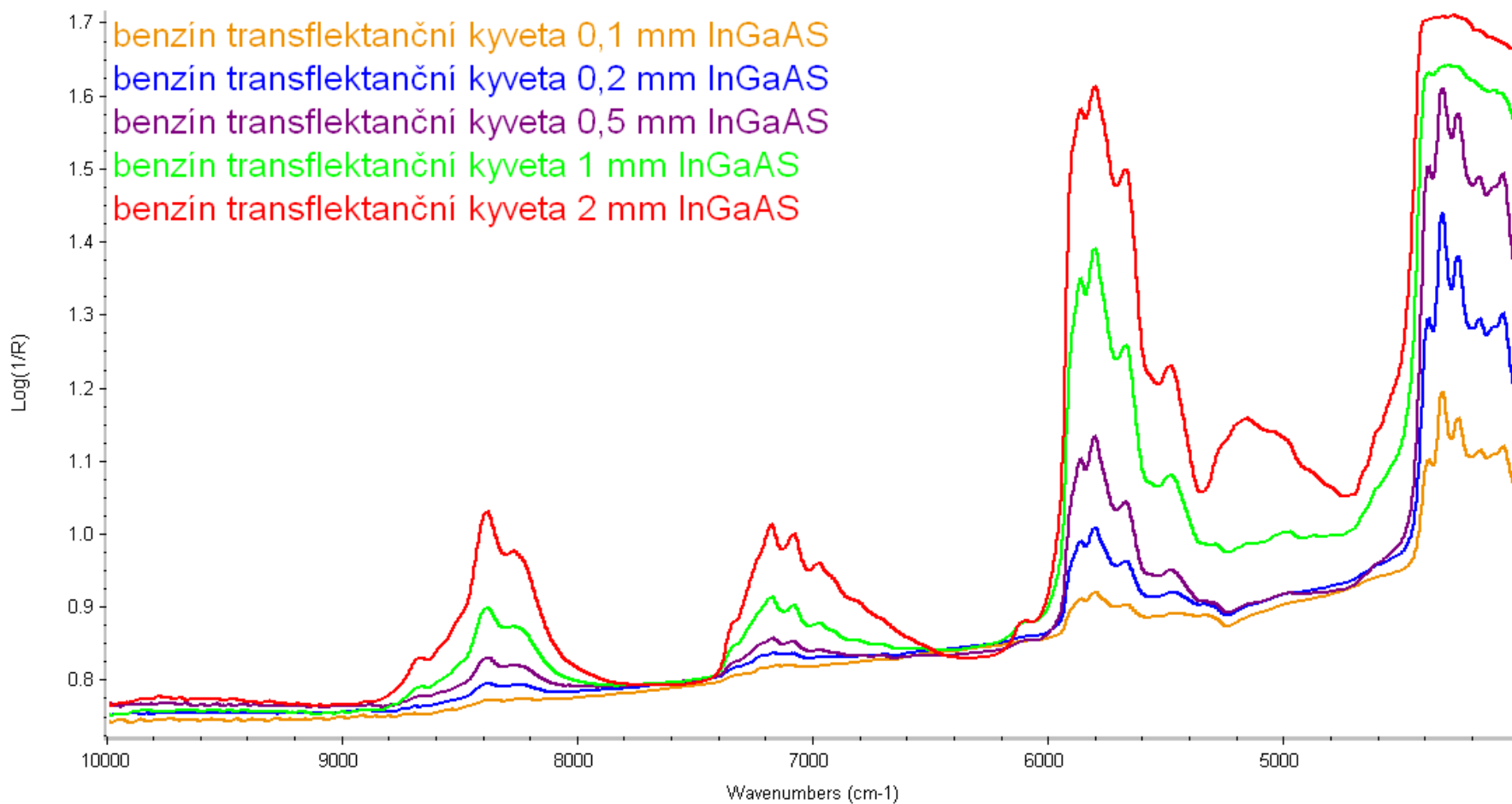
Reflexní měření

- **Transflectance** - pro kapaliny a suspenze

Dopadající záření se odráží od zrcadla transflektanční kyvety.



Vliv tloušťky vrstvy vzorku v kyvetě na odezvu v NIR spektru.



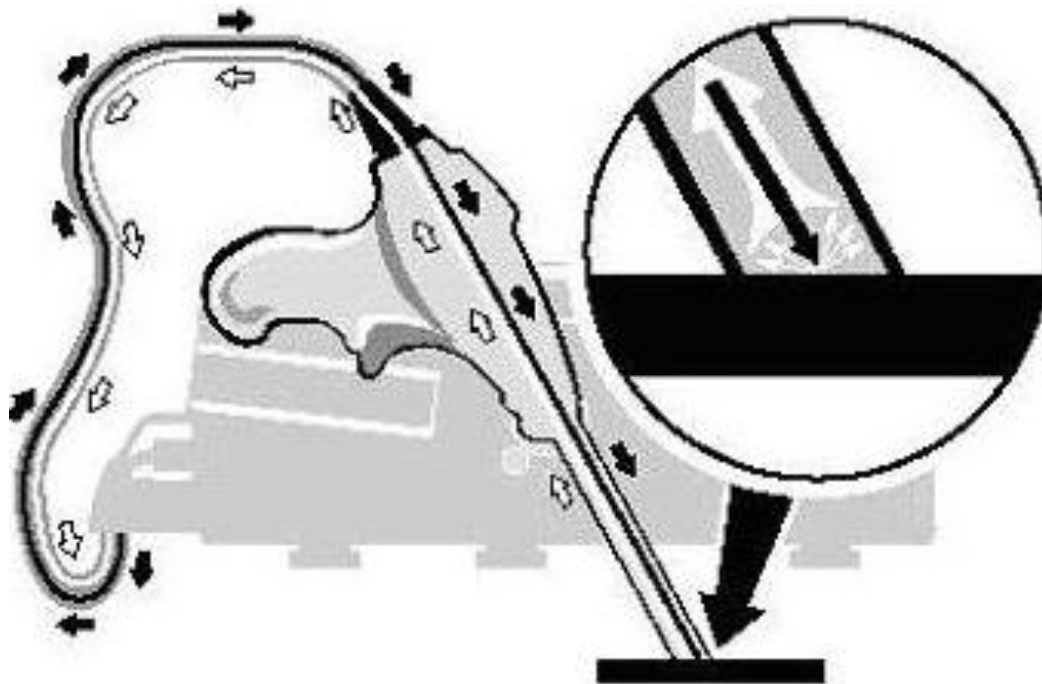
FT-IR spektrometr Vzorkovací techniky

NIR-Multiplexer systém s různými typy sond.

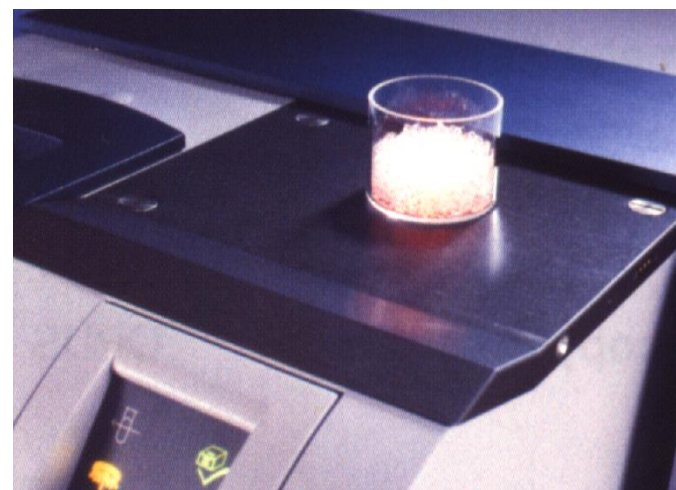


FT-IR spektrometr Vzorkovací techniky

Ruční pistolová sonda s vláknovou optikou.



FT-IR spektrometr Vzorkovací techniky



FT-IR spektrometr Vzorkovací techniky



FT-IR spektrometr Vzorkovací techniky

Zvláštní postavení mají NIR techniky v PAT (procesní analytické technologii).

NIR spektrometry lze připevnit na další zařízení a přímo jimi sledovat výrobní proces a kontrolovat tak on-line jeho průběh, lze tak např. sledovat celý průběh výroby tabletoviny.

Toto uspořádání představuje bezkontaktní analýzu, možnost sledování směrodatných odchylek jak u jednotlivých složek, tak u celé finální směsi.



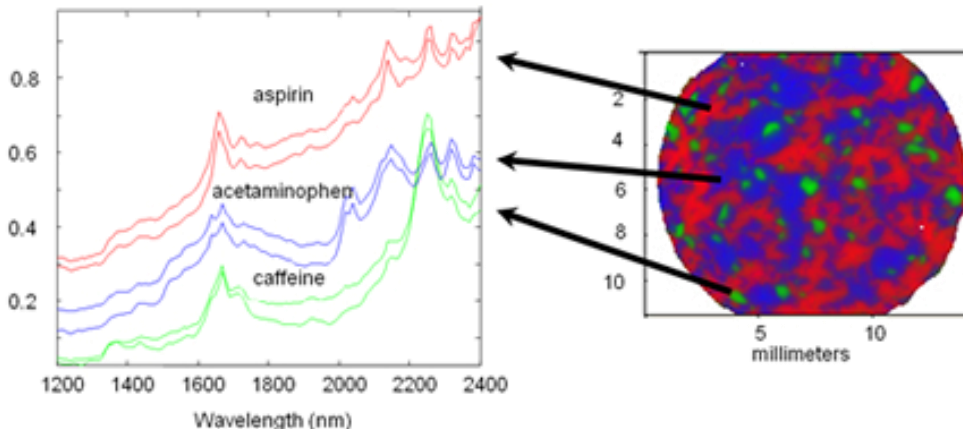
NIR Imaging

Chemický mapping/imaging – technika kombinující prostorovou a chemickou informaci.

mapping: měřeno bod po bodu spektrum v prostorově blízkých bodech

imaging: využíváno plošného detektoru k zobrazení obrazu zkoumaného vzorku

Benefity – jak v práškových směsích, ale i v lékových formách je možno určit velikost a distribuci jednotlivých složek, polymorfní distribuci, stupeň hydratace, detegovat cizorodé částice nebo určit typ a tloušťku potahu. Lze dosáhnout prostorového rozlišení až řádu mikrometrů. Lze měřit minimální množství vzorku. Tyto znalosti mohou být využity v **pochození a optimalizaci technologie a procesů**.



NIR – aplikace

Využívání NIR spektrometrie se rozšiřuje od 90. let 20. století spolu s vývojem nových IČ spektrometrů pro blízkou oblast s Fourierovou transformací.

FT-NIR spektrometrie je rychlá nedestruktivní, neinvazivní analytická metoda, která v současnosti nabízí široké spektrum využití.

Lze ji využít k testování hotových výrobků, kontrole uniformity produktů a verifikaci vstupních surovin.

Umožňuje on-line sledování výroby a má široké uplatnění v PAT.

NIR – aplikace

ANALÝZA POTRAVIN, FARMAK, PLASTŮ atd.

stanovení alkoholu a cukru v nápojích

analýza sýrů - obsah tuků, cukrů, proteinů, obsah vody

stanovení aktivní látek v tabletách

stanovení oktanového čísla a obsahu aromátů - petrochemie

stanovení aditiv v plastech

stanovení obsahu celulosy - papírenský průmysl

Ve farmacii se NIR spektrometrie využívá pro kvalitativní i kvantitativní aplikace.

Je třeba zdůraznit, že pro všechny aplikace je třeba, aby byl změřen standard, resp. série standardů. Měřením vzorků bez standardů lze pouze konstatovat, zda konkrétní vzorky vykazují odlišnost od předchozích, ale pouze na základě NIR spektra není možno říci, o jaký vzorek se jedná, resp. v čem se vzorky liší.

NIR – aplikace

- **Kvalitativní**
- **Kvantitativní**



- **Identifikace (vstupní analýza surovin, obalů)**
- **Velikost částic**
- **Obsah vody**
- **Pevnost**
- **Polymorfie**
- **Obsah API v lékové formě**
- **Obsahová stejnoměrnost dávkových jednotek**
- **Disoluce**



NUTNÉ MULTIVARIAČNÍ KALIBRAČNÍ MODELY
METODA - automatizovatelná

NIR – kvalitativní aplikace

Ve spektrech nelze určit charakteristické skupiny

⇒ porovnávají se celá spektra.



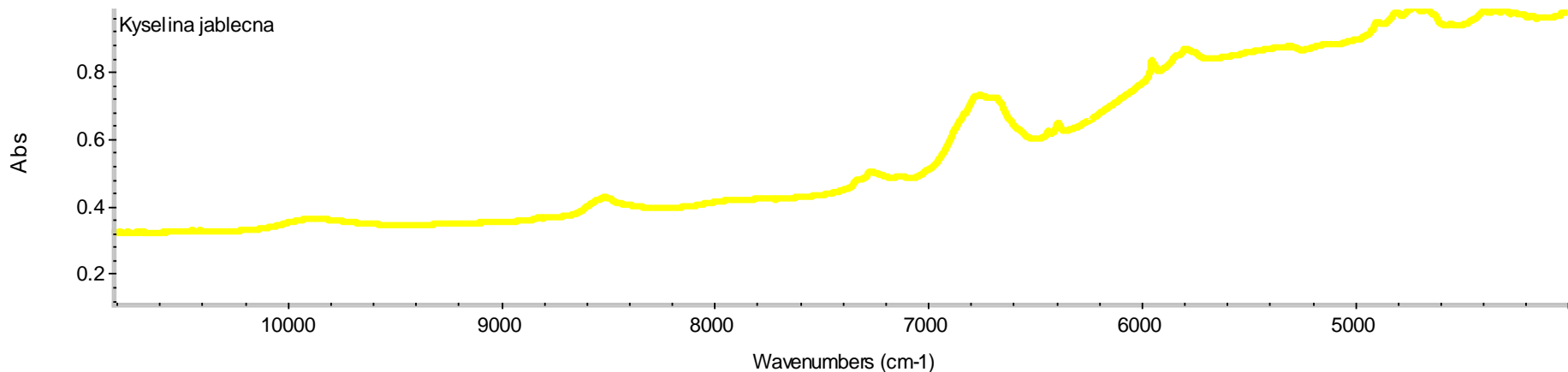
Kvalitativní vyhodnocení spekter

MIR: využití komerčních nebo vlastních knihoven
použití různých vyhledávacích algoritmů
interpretace spekter za použití tabulek pásů

NIR: využití komerčních nebo vlastních knihoven
použití různých vyhledávacích algoritmů
použití projekční DA (Discriminant Analysis)

NIR – kvantitativní aplikace

Princip Lambert-Beerova zákona není splněn vzhledem k charakteru spektra \Rightarrow porovnávají se celá spektra.



- **nutné kalibrační modely**
- **mnoho kalibračních vzorků jako standardů**
- **chemometrické algoritmy** (vícenásobná lineární regrese, regrese hlavních komponent, částečné nejmenší čtverce)

Kvantitativní vyhodnocení spekter

MIR: klasická jednokomponentní kalibrace s vyhodnocením výšky nebo plochy vhodného pásu pomocí Lambert – Beerova zákona možnost použití chemometrických algoritmů.

NIR: nelze použít Lambertův - Beerův zákon
nutnost použití chemometrických algoritmů.

NIR – aplikace

Identifikace (metoda standardu)

- API
- jednotlivé excipienty
- finální výrobek

Velikost částic, Obsah vody (metoda kalibrační přímky)

- API
- jednotlivé excipienty
- finální výrobek

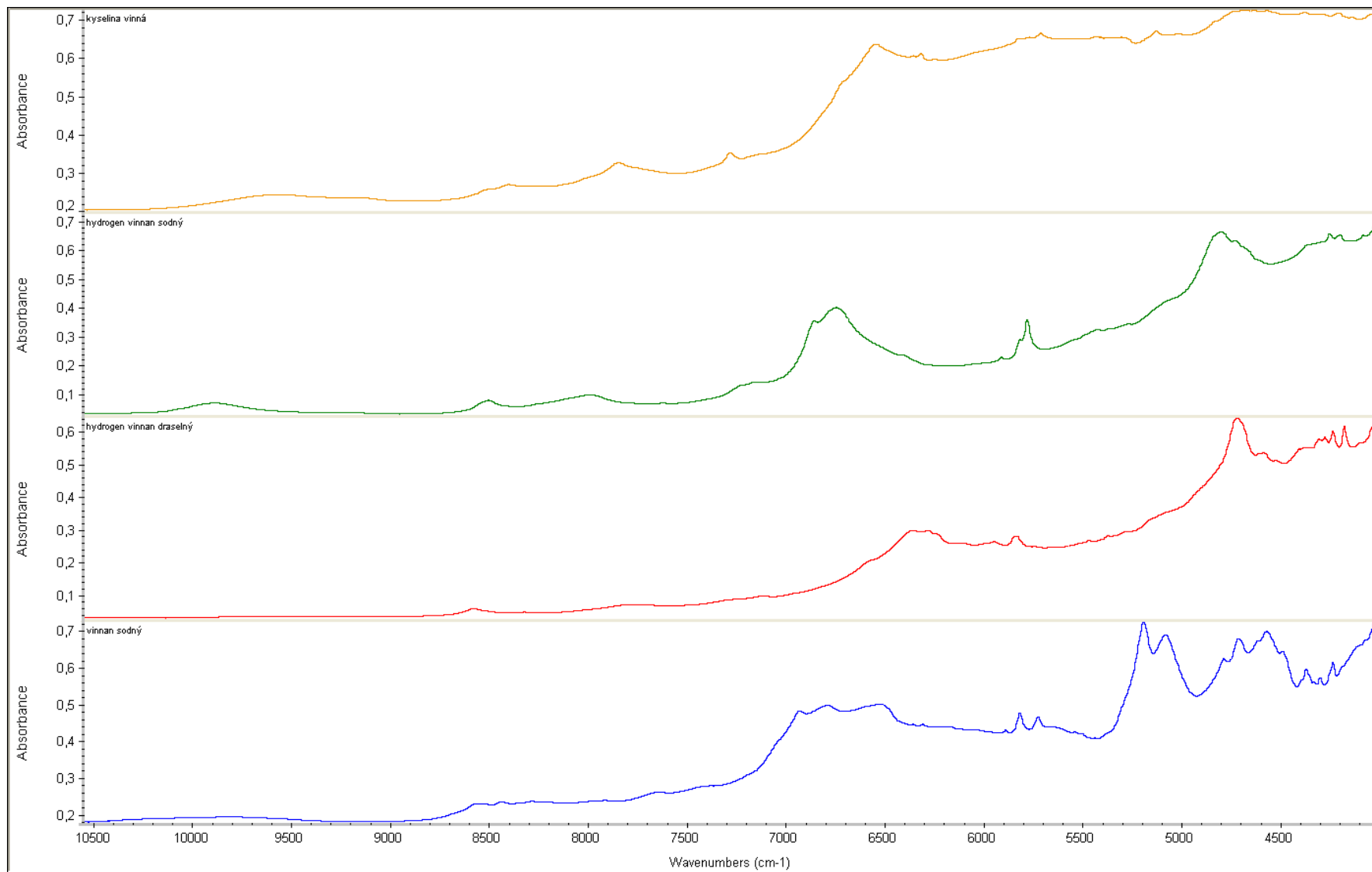
Pevnost (metoda kalibrační přímky)

- tablet

NIR – aplikace

Strukturně blízké molekuly

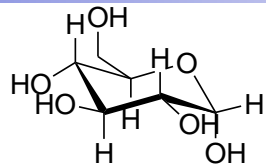
NIR spektra kyseliny vinné a jejích solí.



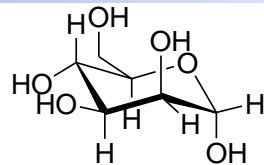
NIR – aplikace

Strukturně blízké molekuly

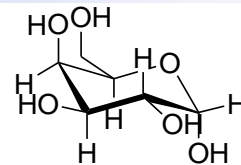
NIR spektra hexos.



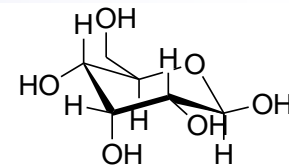
α -D-glucopyranose



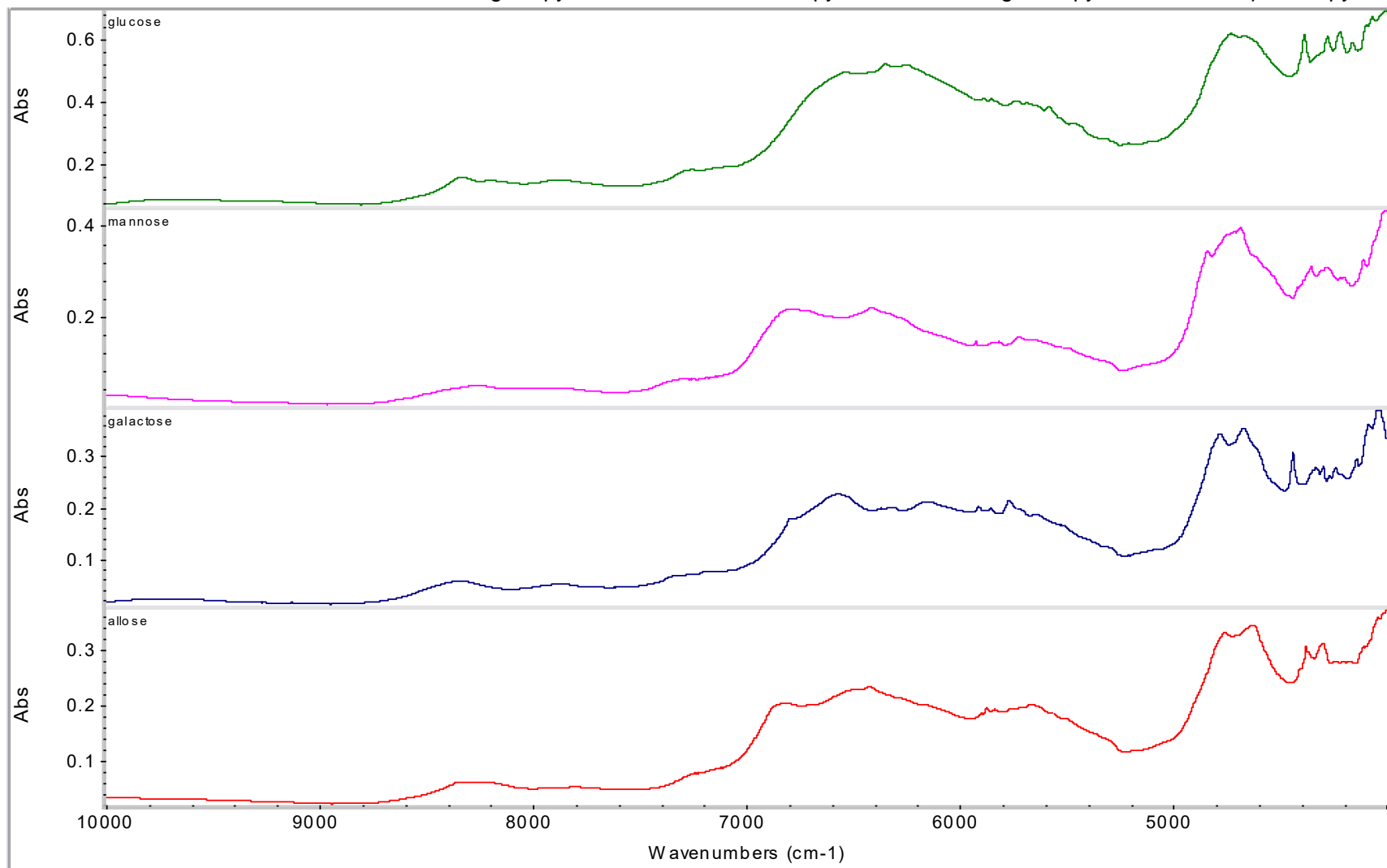
α -D-mannopyranose



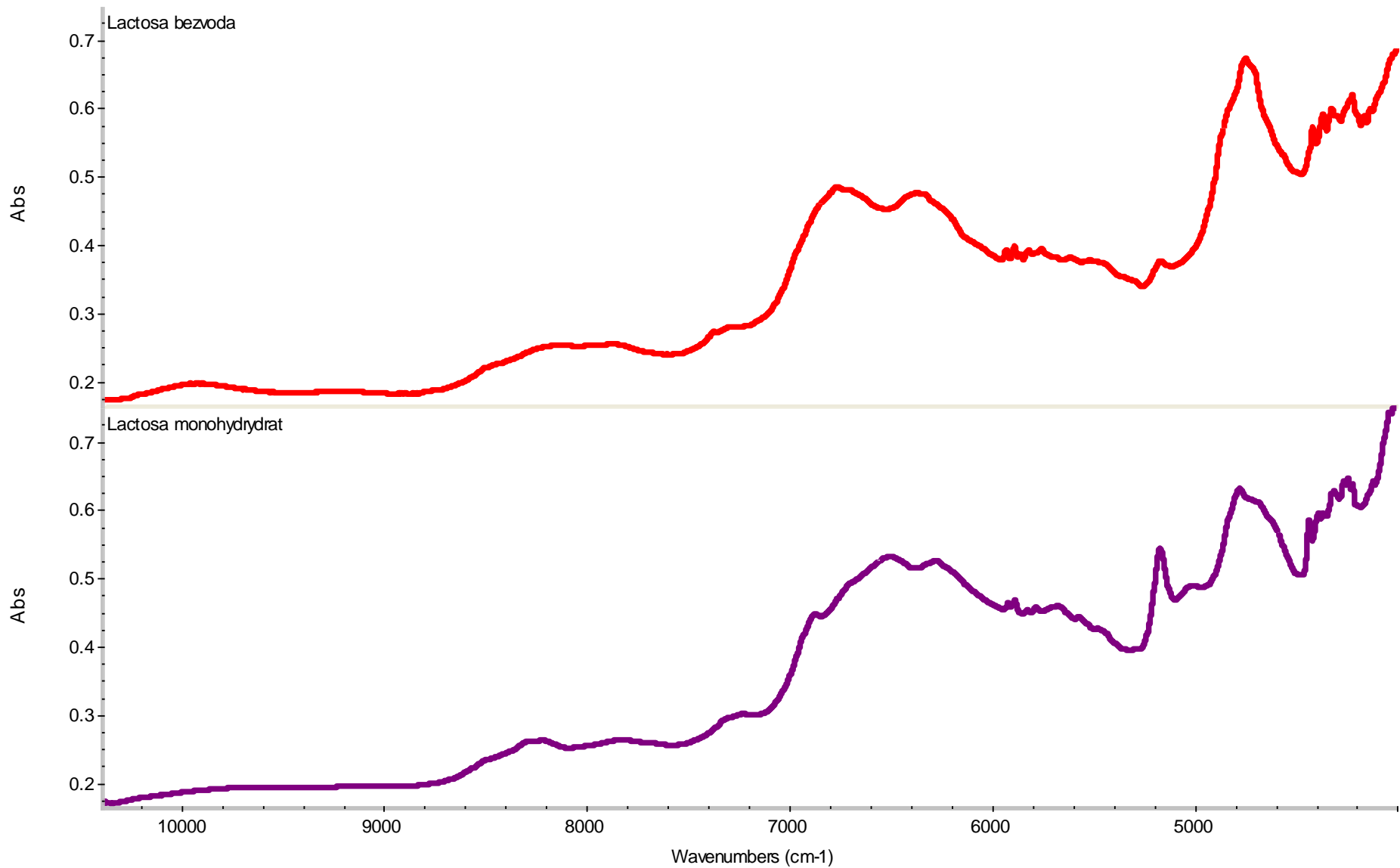
α -D-galactopyranose



β -D-allopyranose

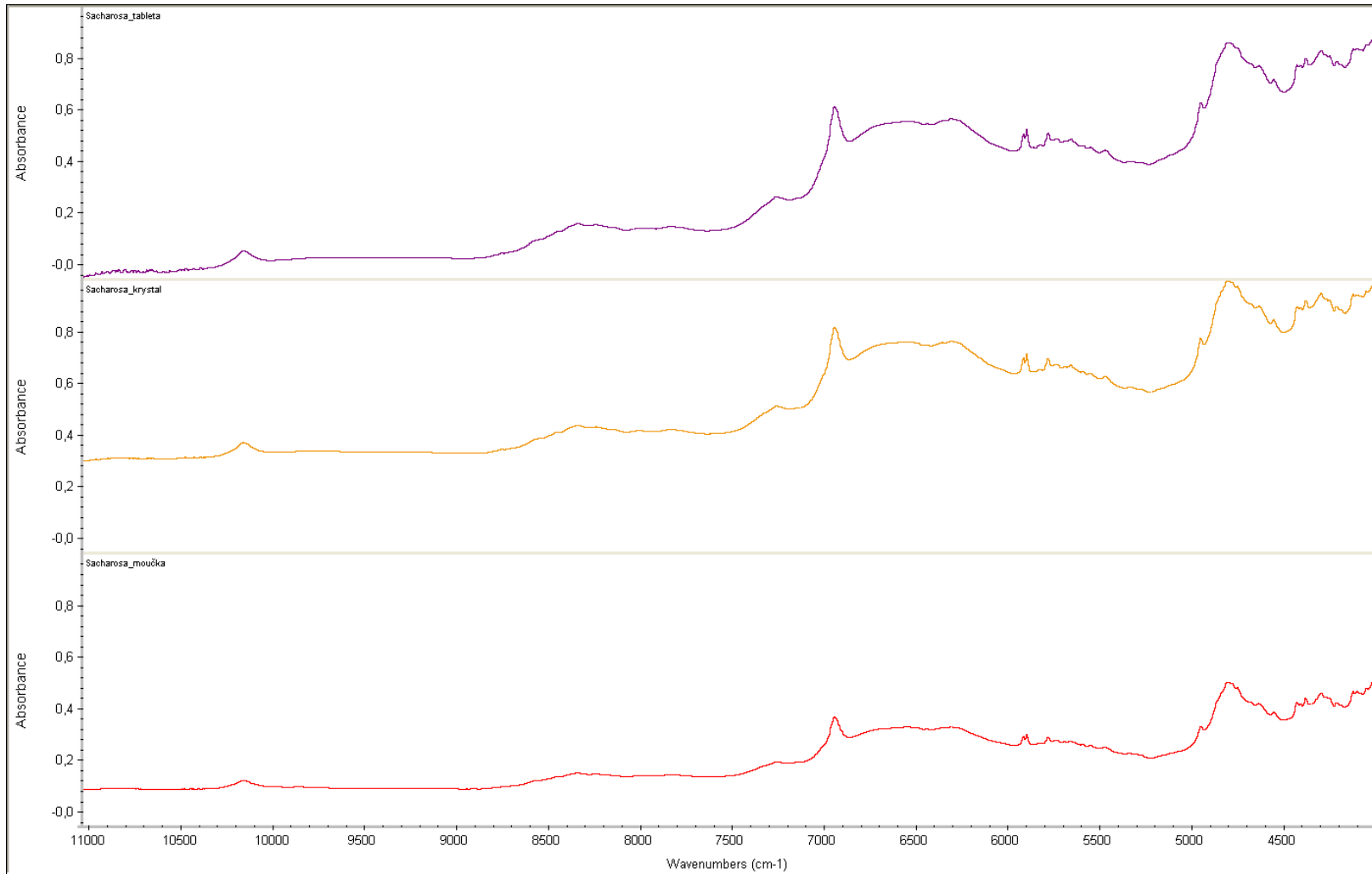


NIR – aplikace Vliv vody / vlhkosti



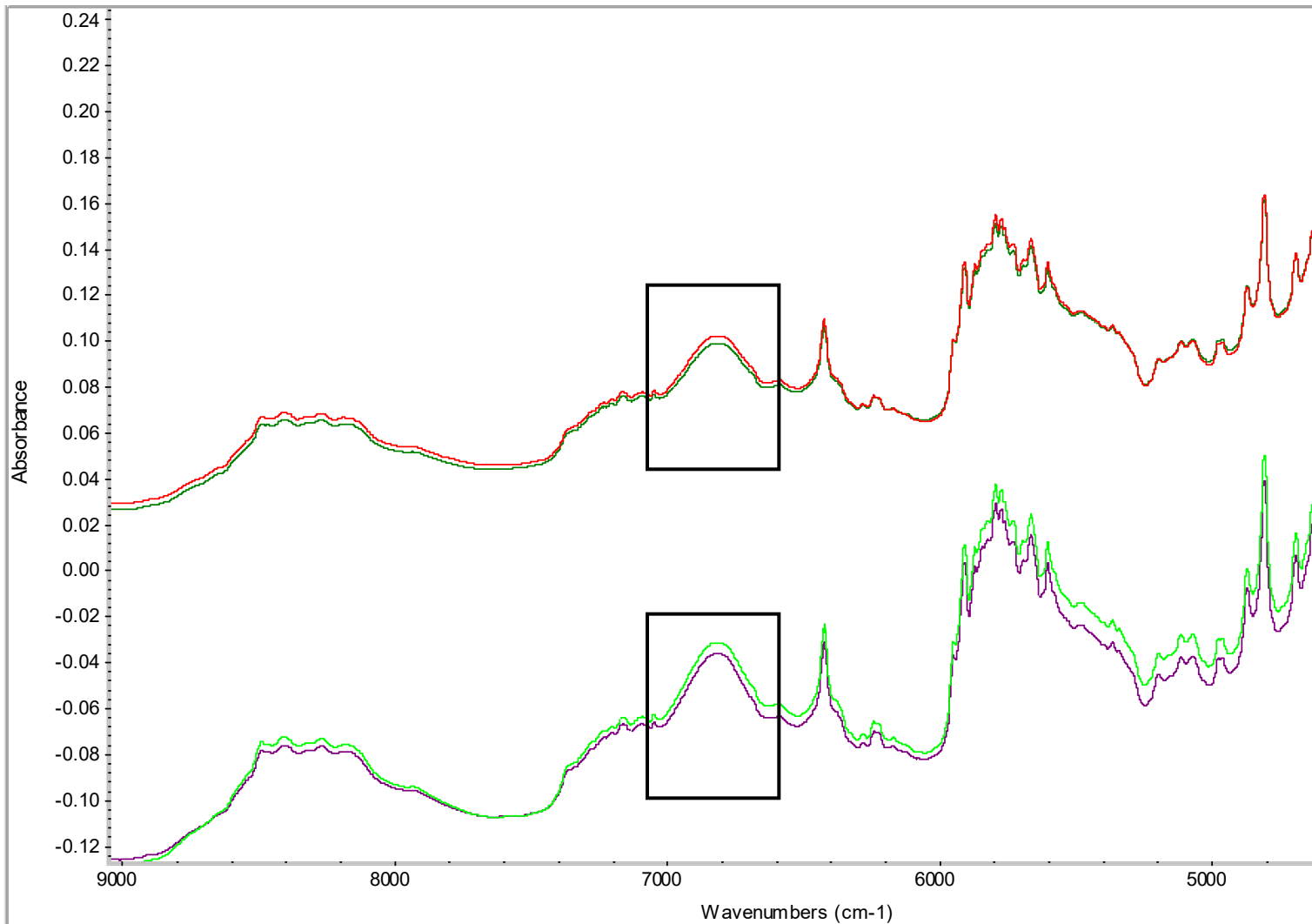
NIR – aplikace Vliv velikosti částic

NIR spektra sacharosu slisované do tablety velkým tlakem, dále sacharosu krystalické a jemně rozetřené. Rozdíly patrné ve výšce jednotlivých pásů.



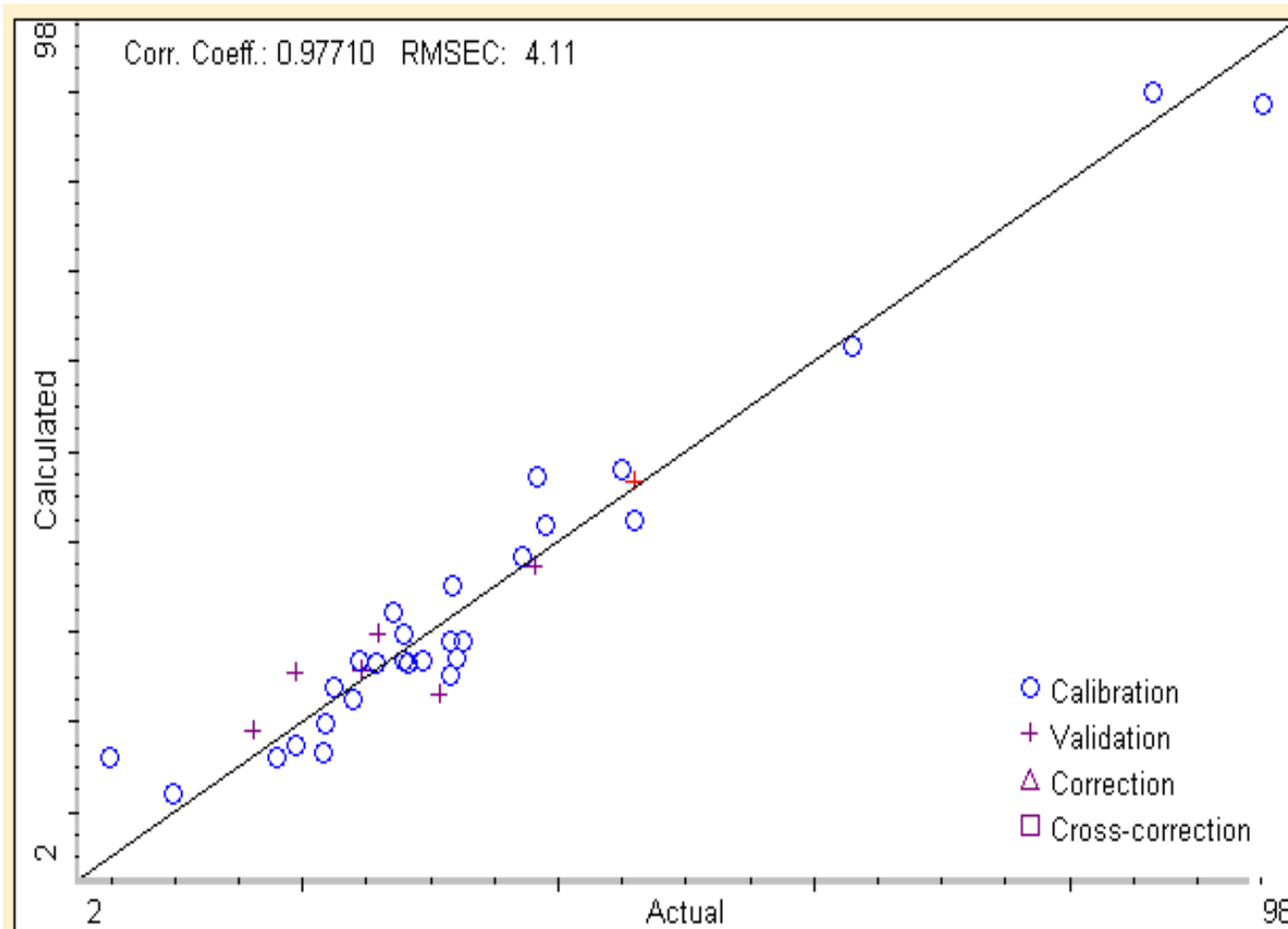
NIR – aplikace Vliv velikosti částic

NIR spektra různých šarží API s rozdílnou velikostí částic. Rozdíly patrné ve výšce jednotlivých pásů.



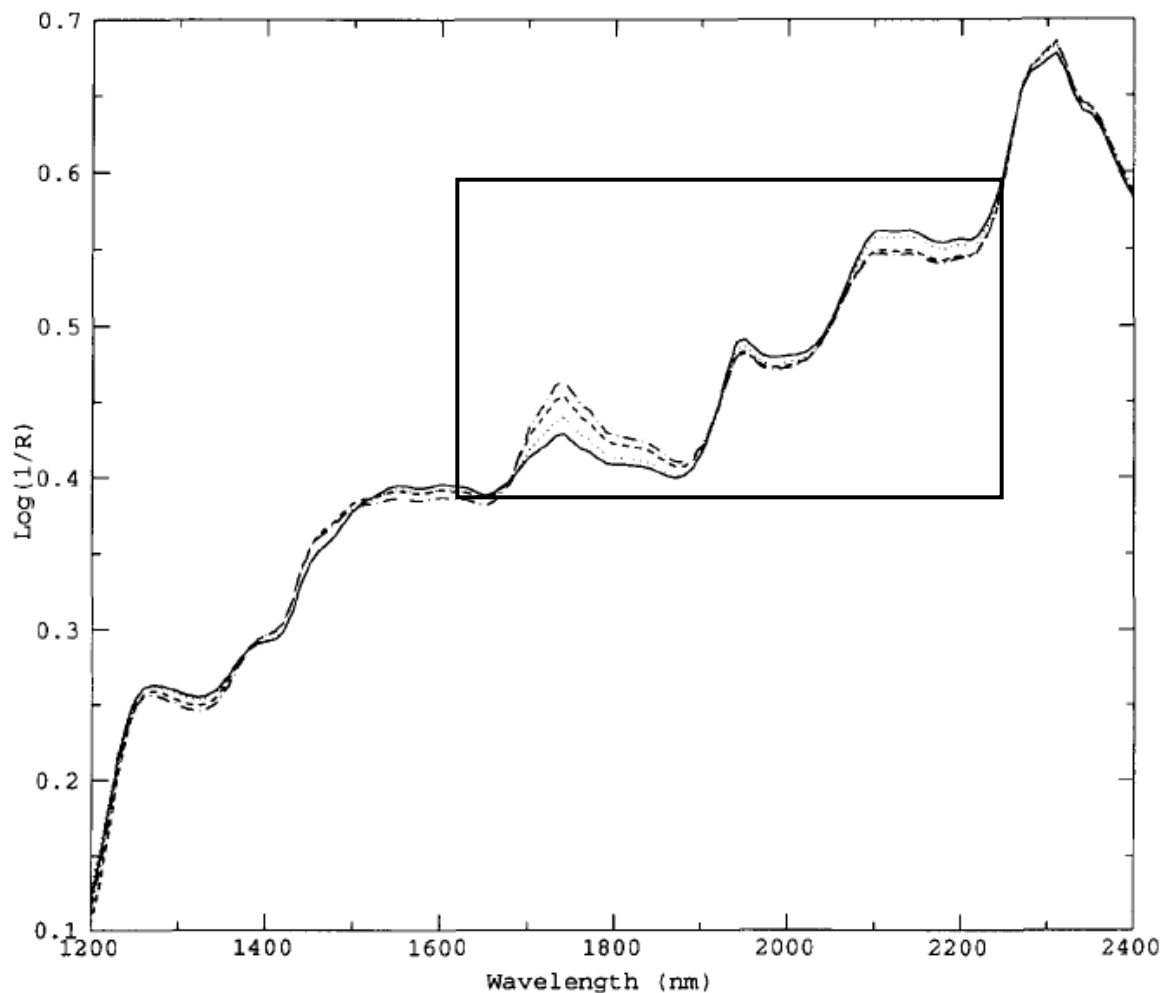
NIR – aplikace Vliv velikosti částic

Na základě NIR spekter provedena kalibrace. Hodnocení vzorků založeno na rozdílech ve výšce jednotlivých pásů *versus* hodnoty z laserové difrakce. Zpracováno chemometrikou; plocha nejmenších čtverců (partial least square, PLS).



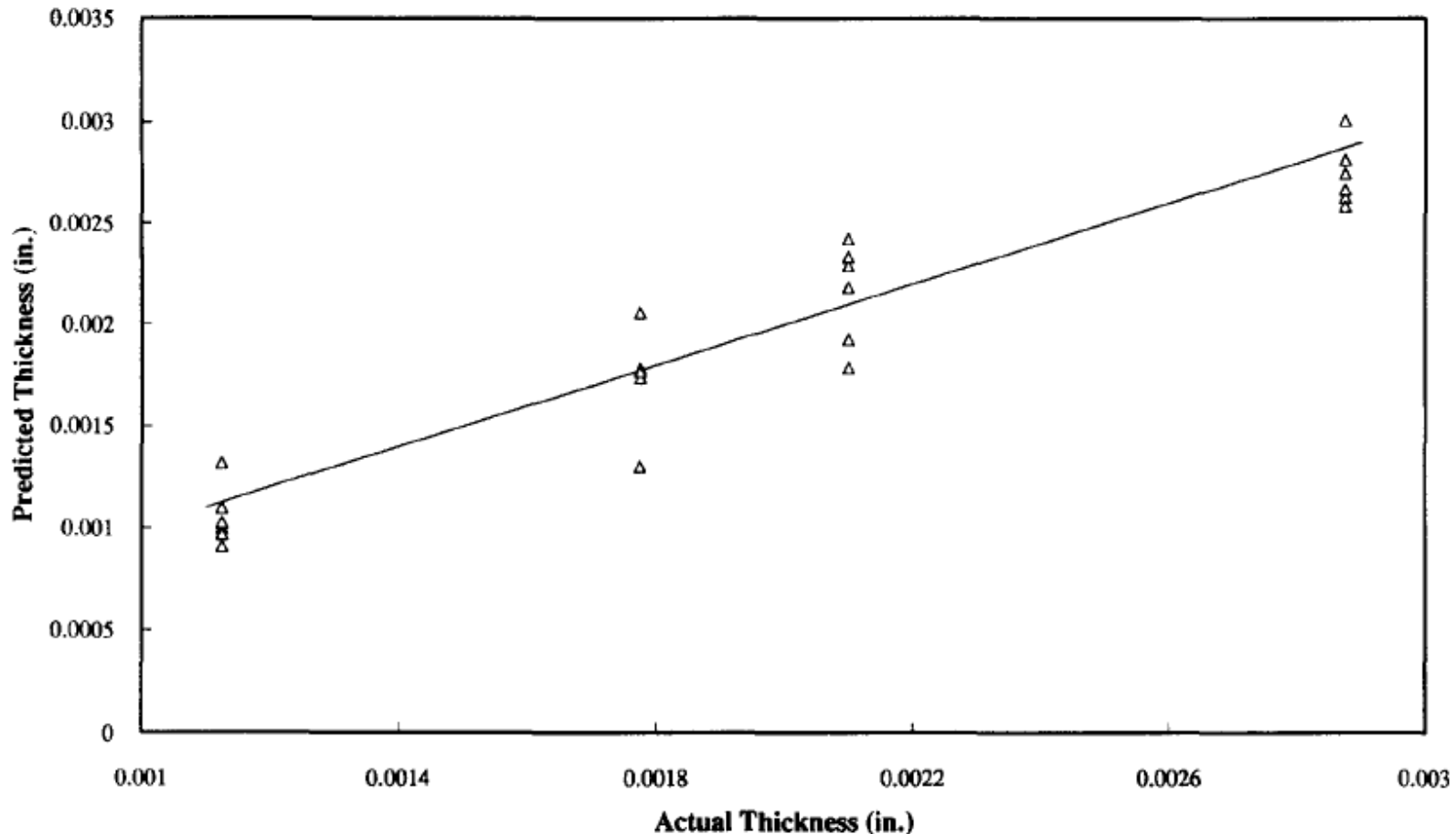
NIR – aplikace Tloušťka potahové vrstvy

NIR spektra různých šarží tablet bez potahu, s požadovanou tloušťkou potahu a s 2 % a 4 % tloušťkou potahu. Rozdíly patrné ve výšce jednotlivých pásů.



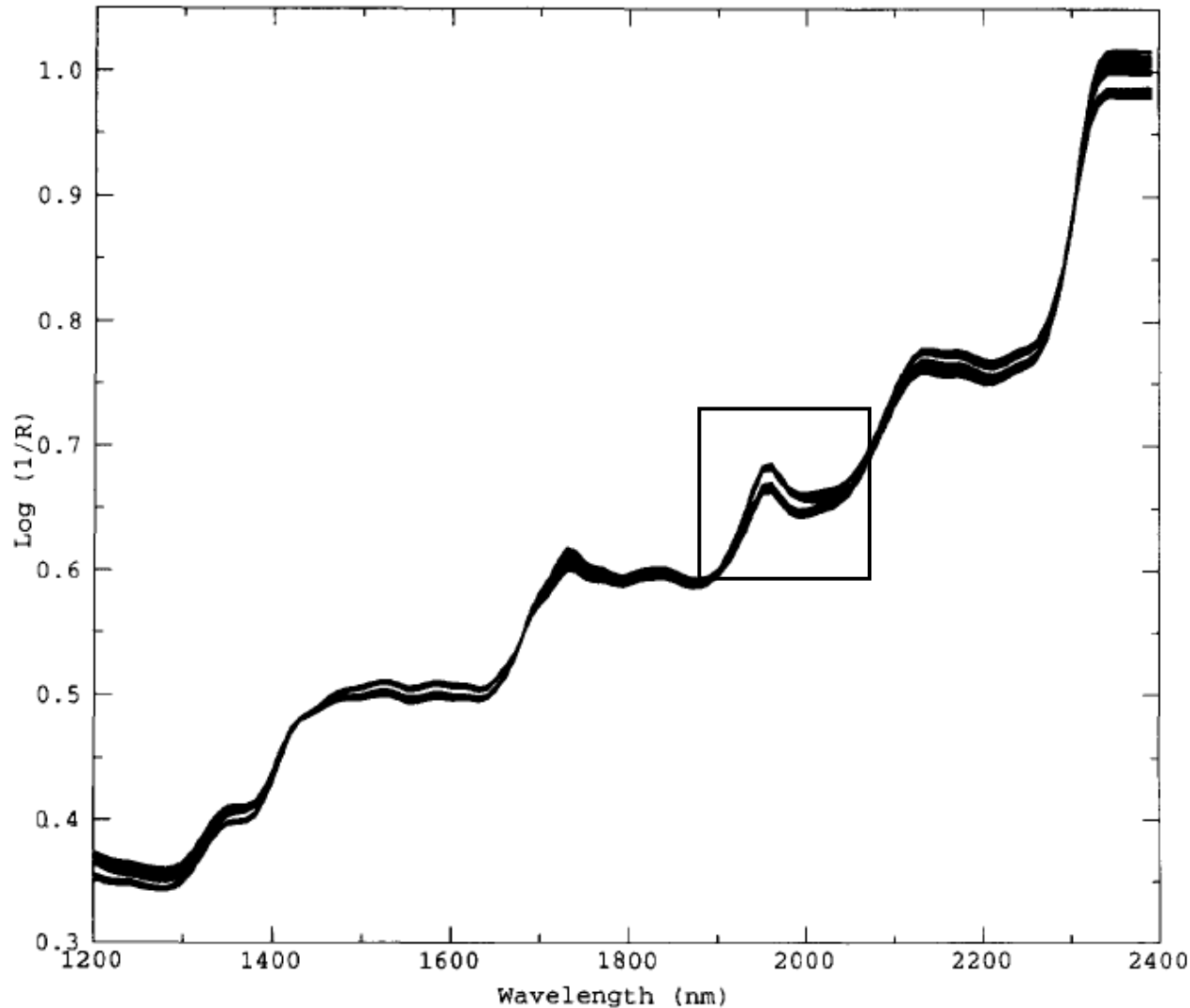
NIR – aplikace Tloušťka potahové vrstvy

Na základě NIR spekter provedena kalibrace. Hodnocení vzorků založeno na rozdílech ve výšce jednotlivých pásů *versus* skutečná tloušťka potahu zjištěná mikroskopem. Zpracováno chemometrikou, plocha nejmenších čtverců (partial least square, PLS).



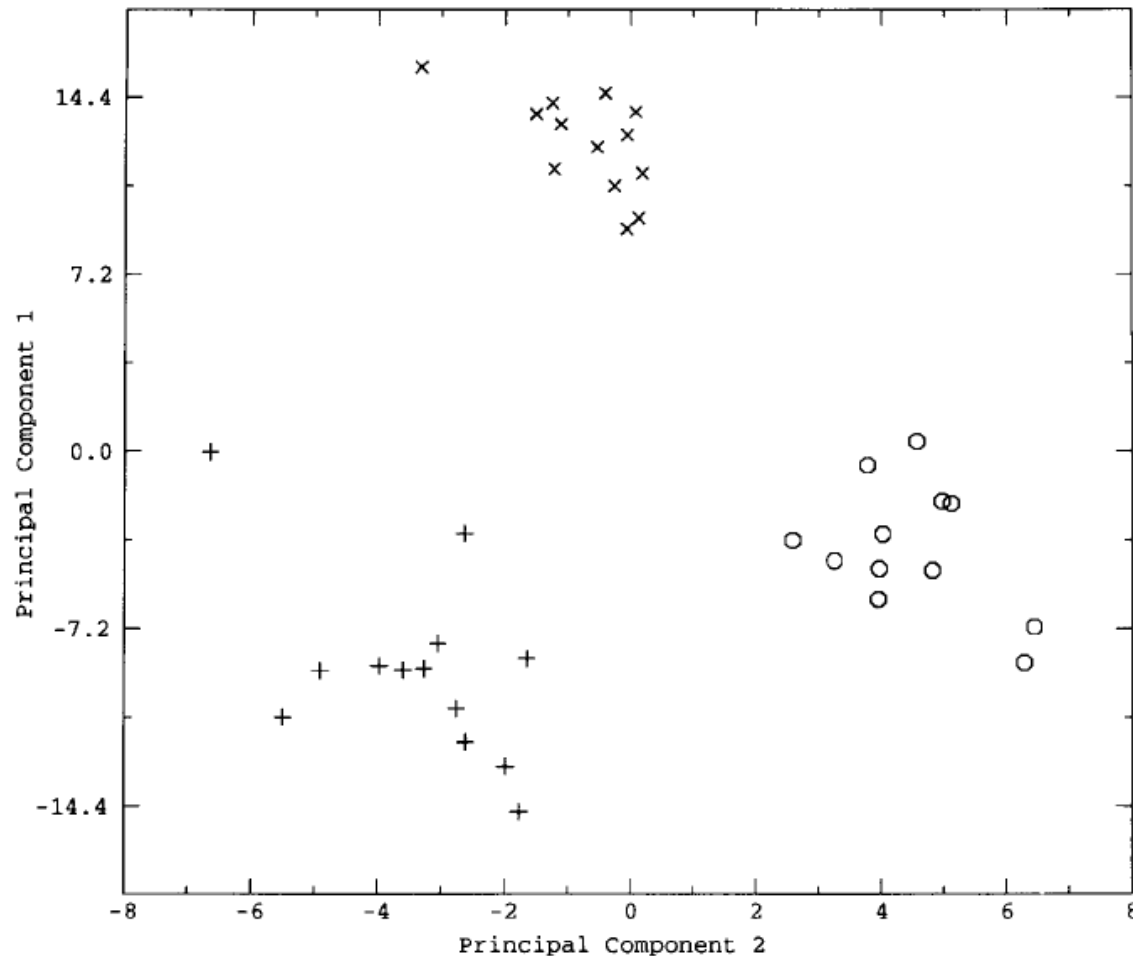
NIR – aplikace Pevnost tablet

NIR spektra různých šarží tablet vyrobených za různého lisovacího tlaku.



NIR – aplikace Pevnost tablet

Na základě NIR spekter provedena kalibrace. Hodnocení vzorků založeno na rozdílech ve výšce jednotlivých pásů *versus* skutečná pevnost. Zpracováno analýzou hlavních komponent (principal component analysis, PCA).



NIR – aplikace

Polymorfie (metoda standardu)

- **API**
- **jednotlivých excipientů**
- **finální výrobek**

Metoda srovnatelná s ostatními technikami pevné fáze.

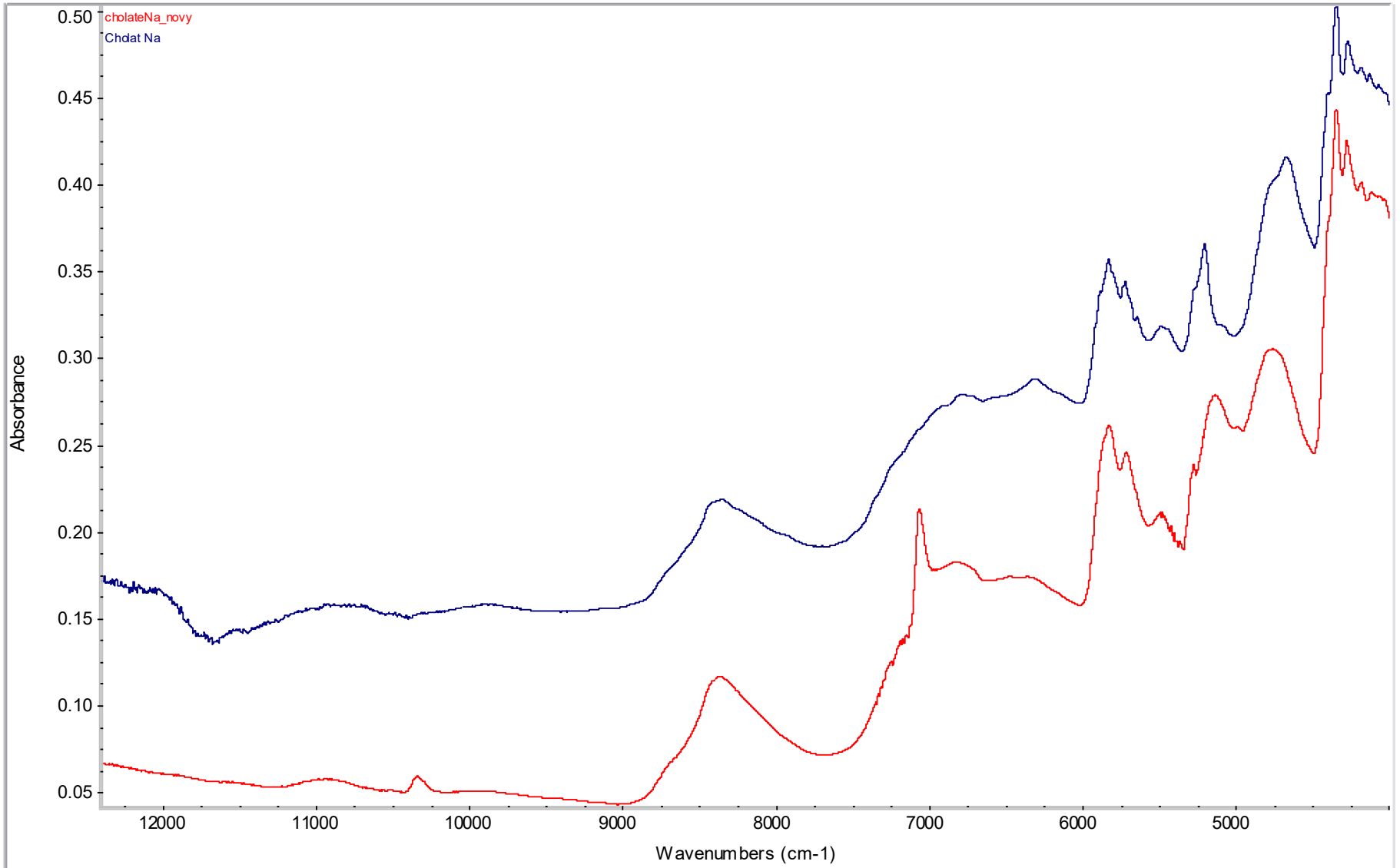
Lze užít u jakékoli API, excipientu a lékové formy v závislosti na aktuálním složení.

Vždy je nutnost porovnat se standardy a výchozími látkami (ideálně, které také podstoupily stejný proces jako vzorek).



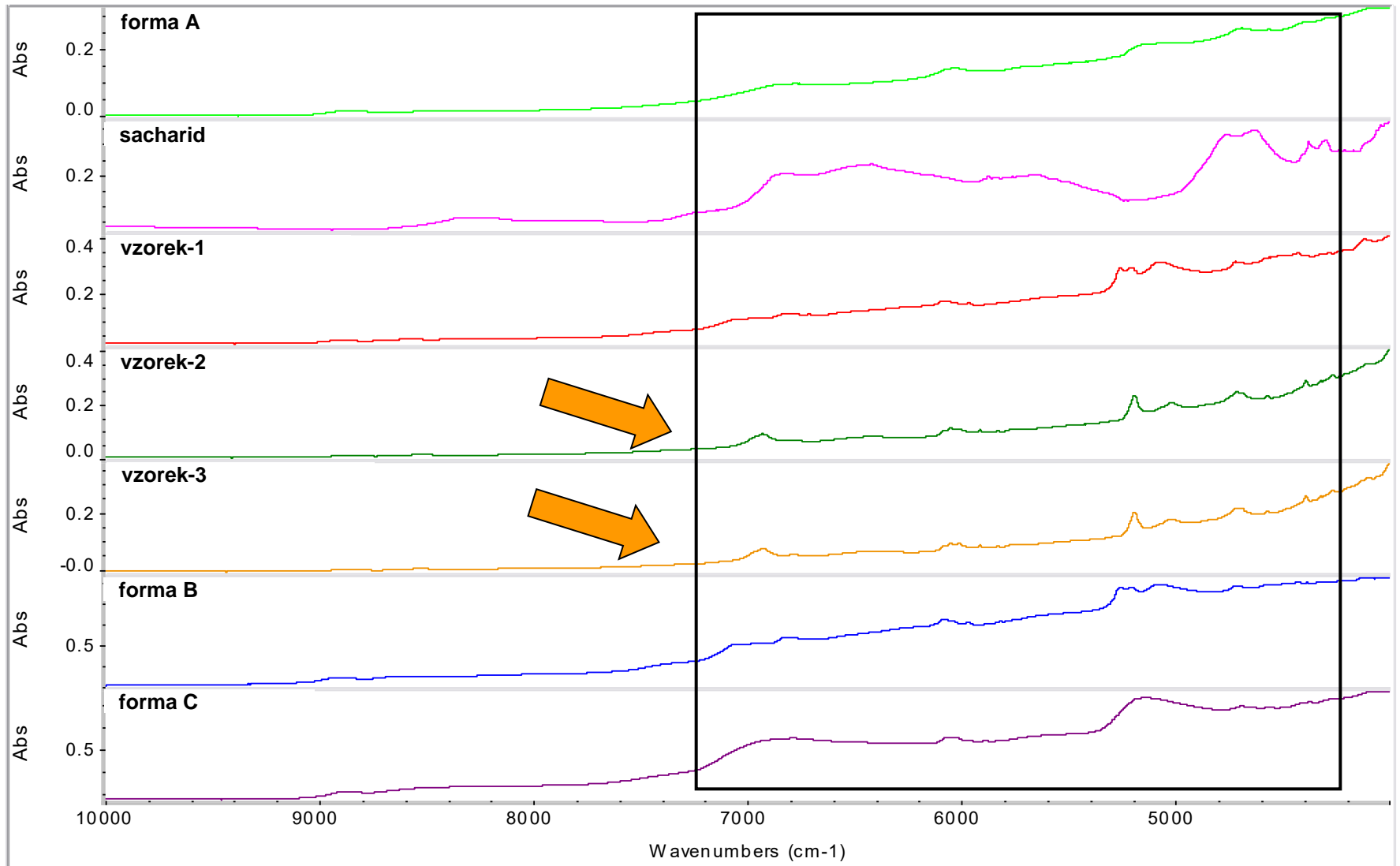
NIR – aplikace Polymorfie

Polymorfie pomocných látek.



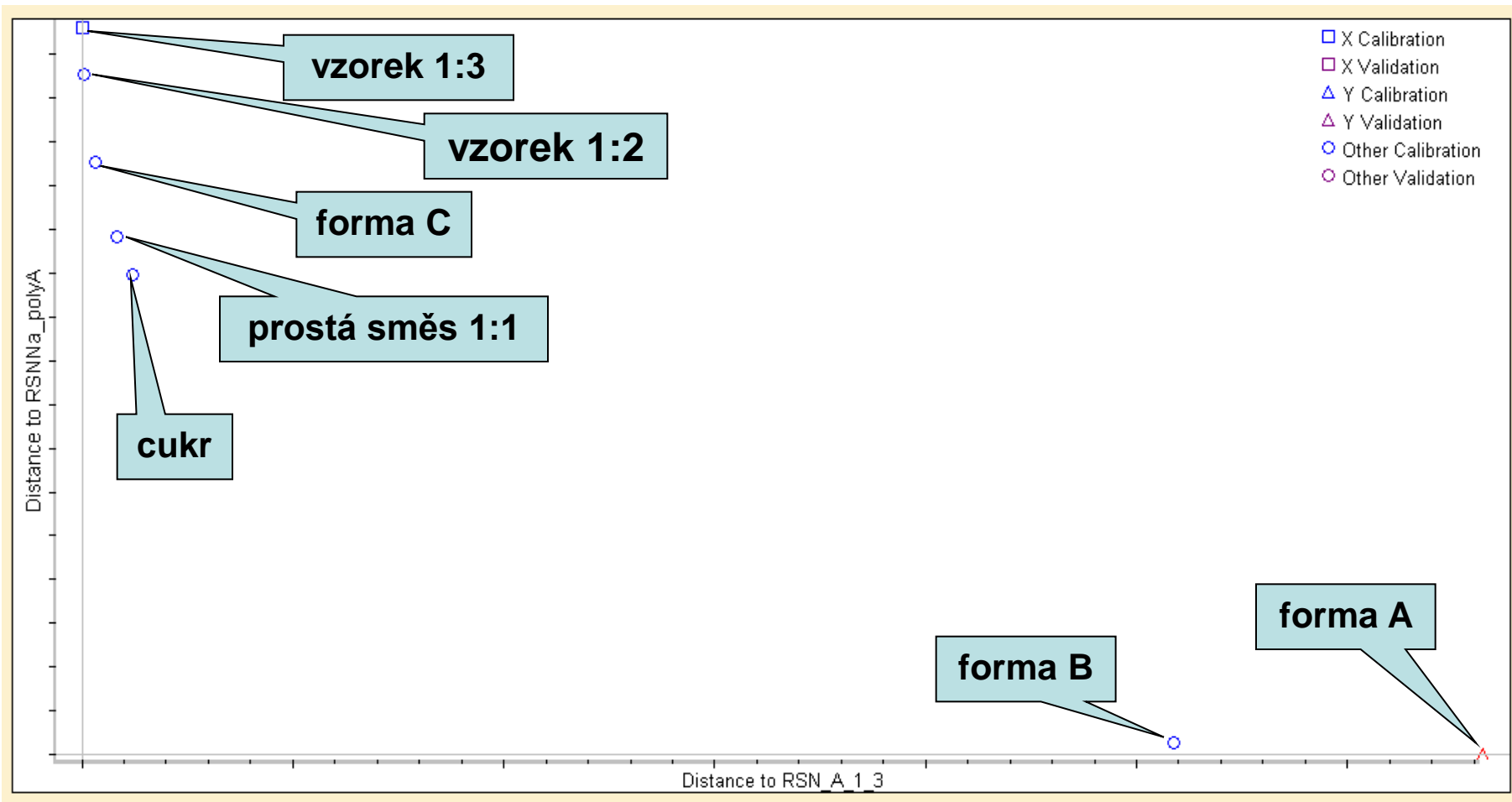
NIR – aplikace Polymorfie

Změna NIR spektra po vytvoření aduktu se sacharidem.



NIR – aplikace Polymorfie

NIR spektra pevných forem API a cukru – kalibrace a hodnocení vzorků založeno na rozdílech v jednotlivých spektrech. Zpracováno pomocí diskriminantní analýzy.



NIR – aplikace

Obsah / Obsahová stejnoměrnost dávkových jednotek (CU) (metoda kalibrační přímky)

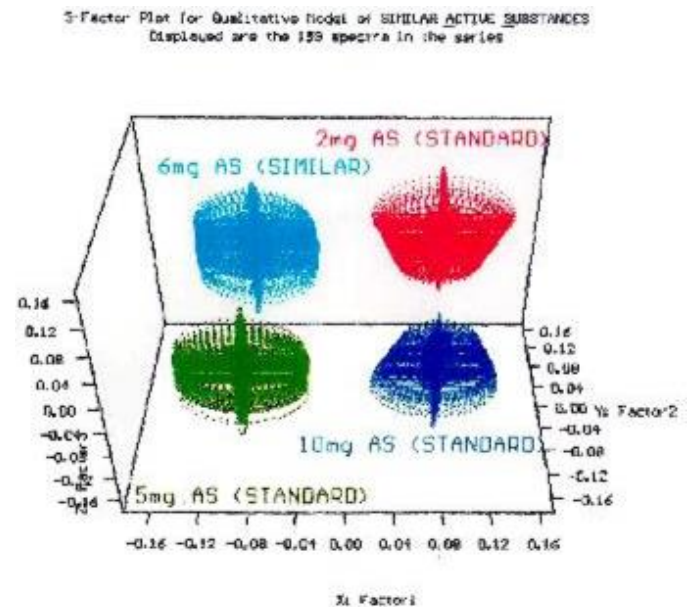
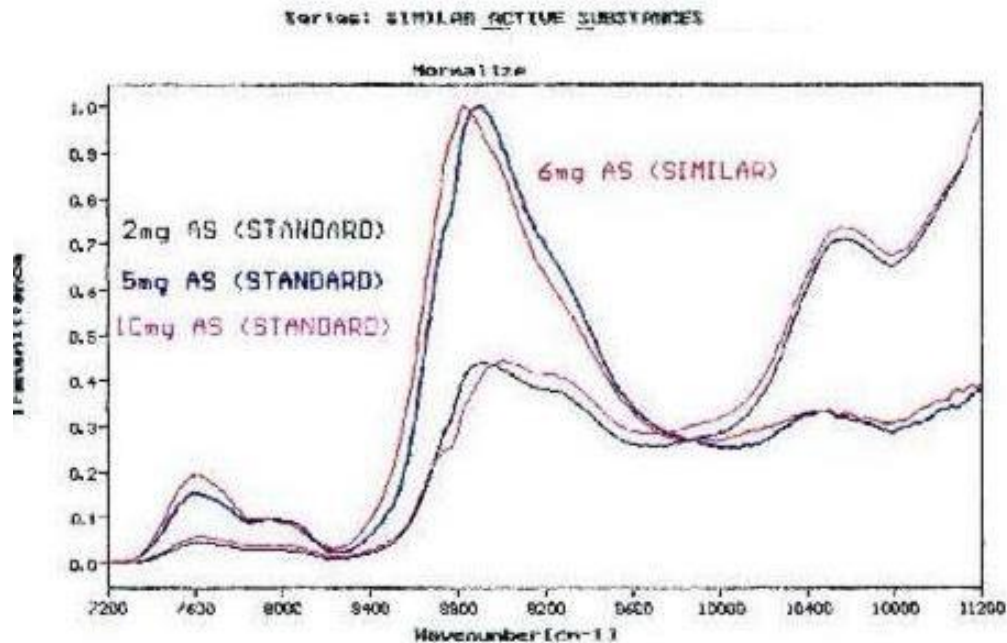
- API
- finální výrobek

Lze užít u jakékoli API, resp. lékové formy (v závislosti na aktuálním složení a množství API v tabletě, min. 5 % w/w). Lze využívat rovněž pro stanovení obsahu látek v rostlinných extraktech.

Metody nutno cross-validovat s HPLC metodou.

NIR – aplikace Obsah API

Hodnocení obsahu API v tabletách.

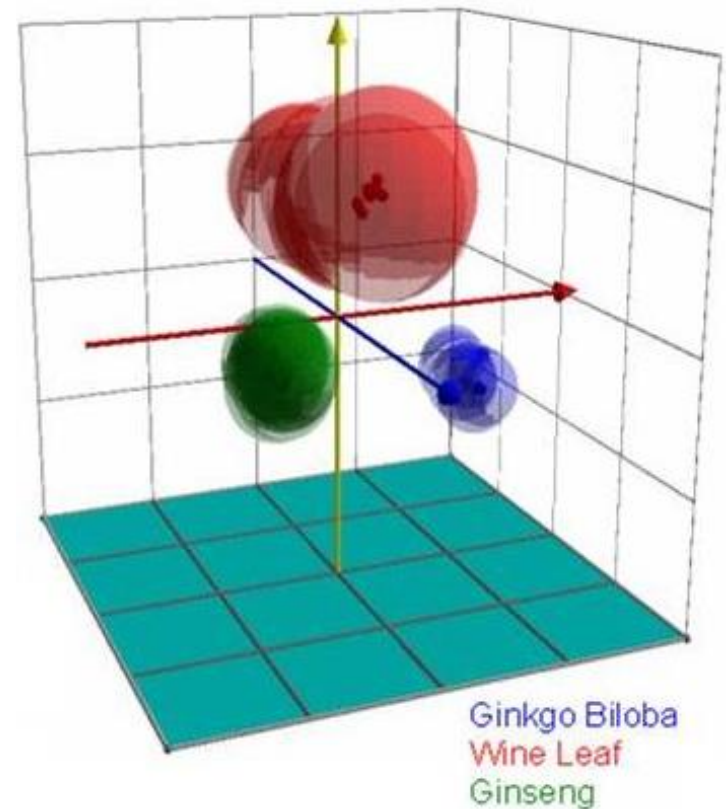
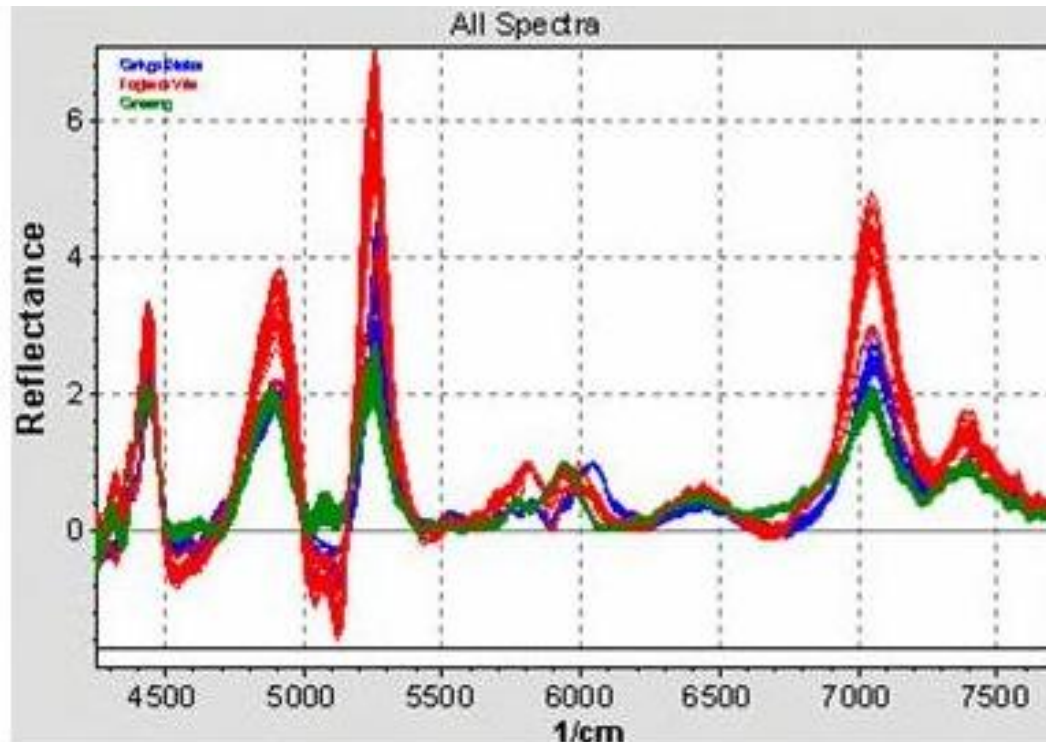


NIR – aplikace

Obsah API

Hodnocení obsahu léčivých látek v suchých rostlinných extraktech (gingo, žeň-šen, látky z vinných listů pocházejících z odlišných sklizní a regionů).

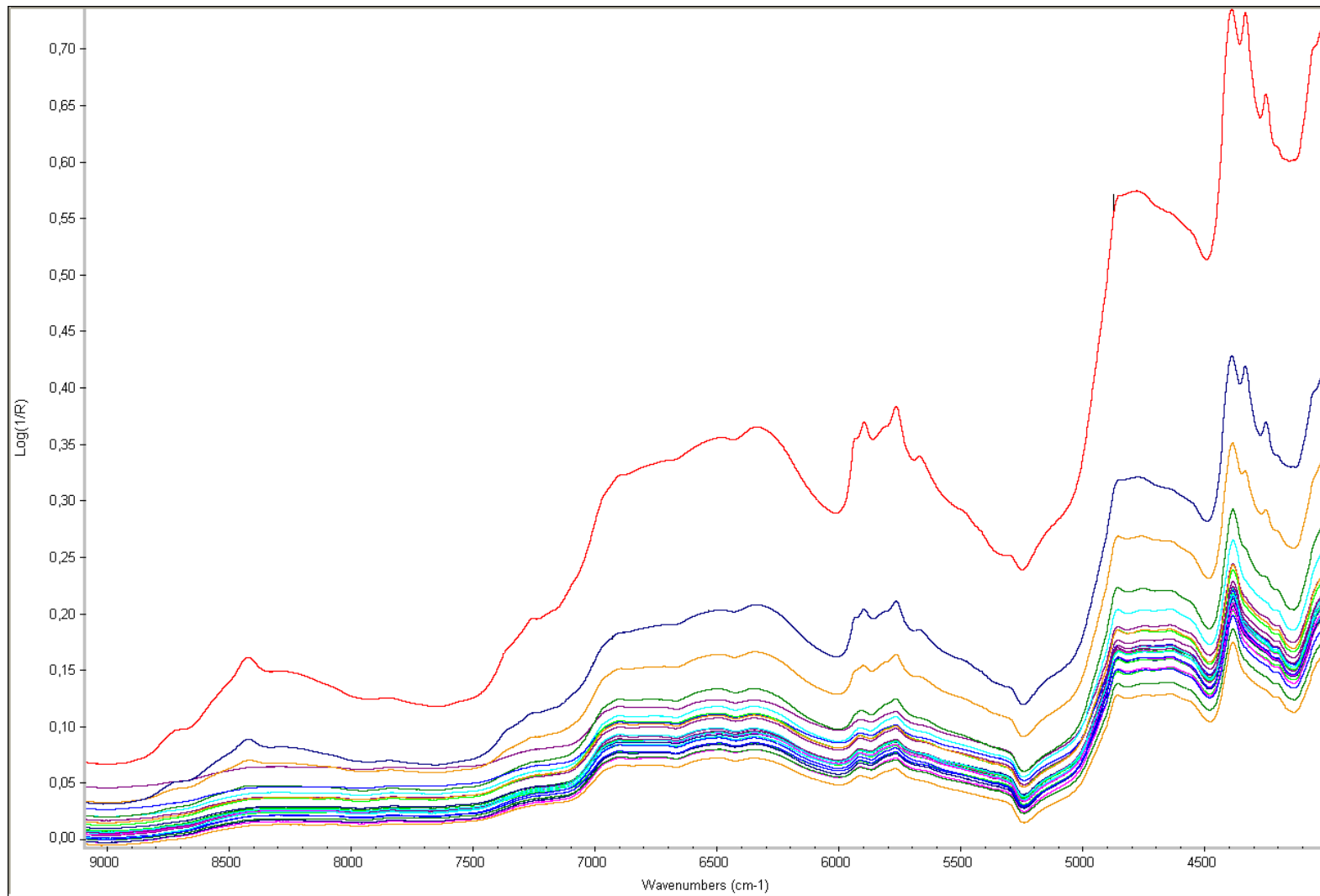
Využití clustrové analýzy. Je nutné, aby všechny clustry byly navzájem dobře rozlišené.



NIR – aplikace

Obsah zbytkových rozpouštědel

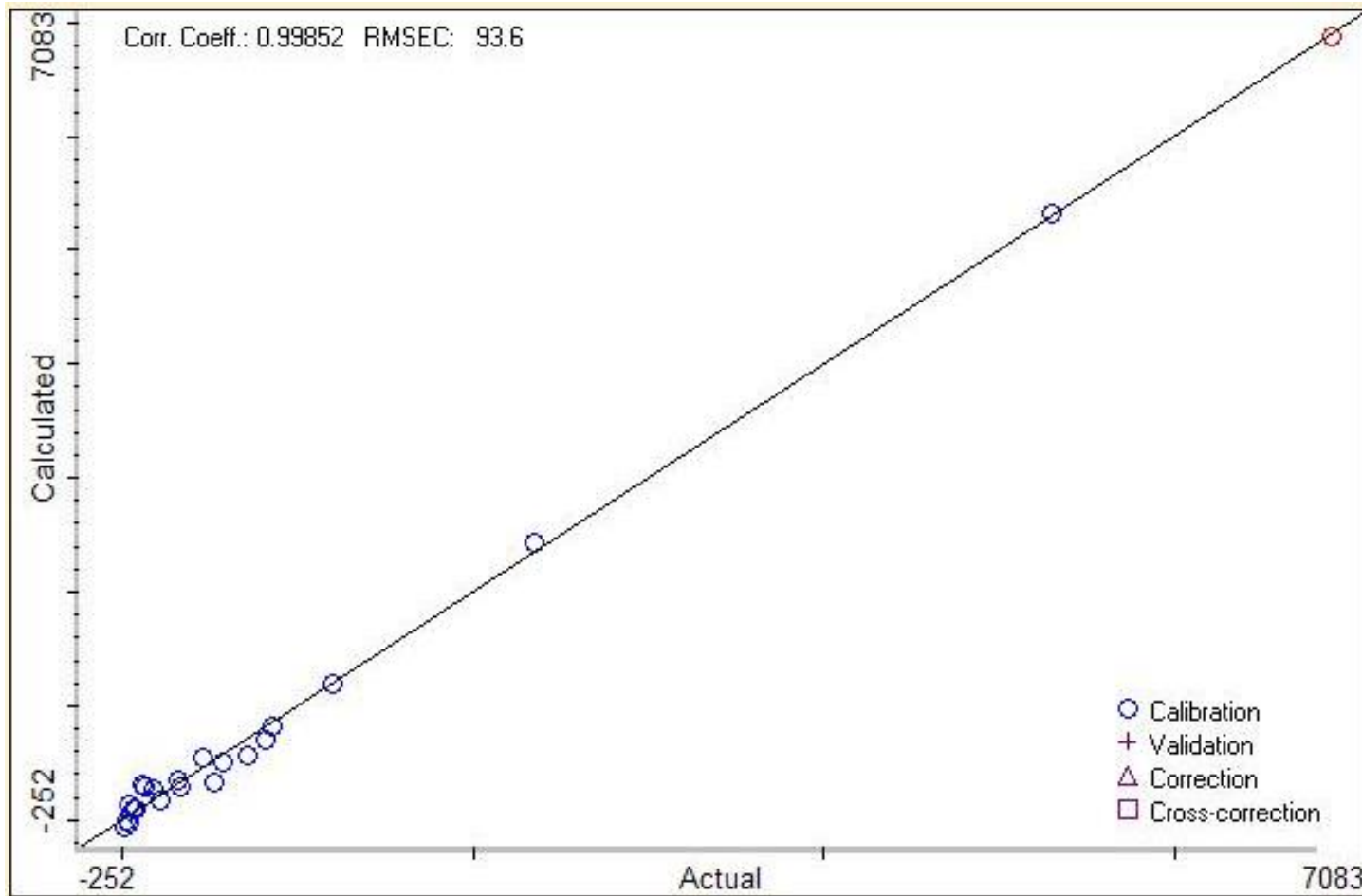
Hodnocení obsahu zbytkového ethanolu v API.



NIR – aplikace

Obsah zbytkových rozpouštědel

Hodnocení obsahu zbytkového ethanolu v API. Kalibrace a hodnocení vzorků je založeno na rozdílech v jednotlivých spektrech *versus* GC. Zpracováno diskriminantní analýzou.



NIR – aplikace Disoluce

- 1. sledování kvality disoluce a vlivu vlhkosti**
- 2. sledování vlivu potahu jádra na kvalitu disoluce**
- 3. sledování velikosti částic na kvalitu disoluce**

Všechny metody je nutno korelovat s disolucí při prvotní tvorbě závislosti mezi NIR-spektrém a sledovaným disolučním parametrem (% uvolněné API).

1. sledování kvality disoluce a vlivu vlhkosti:

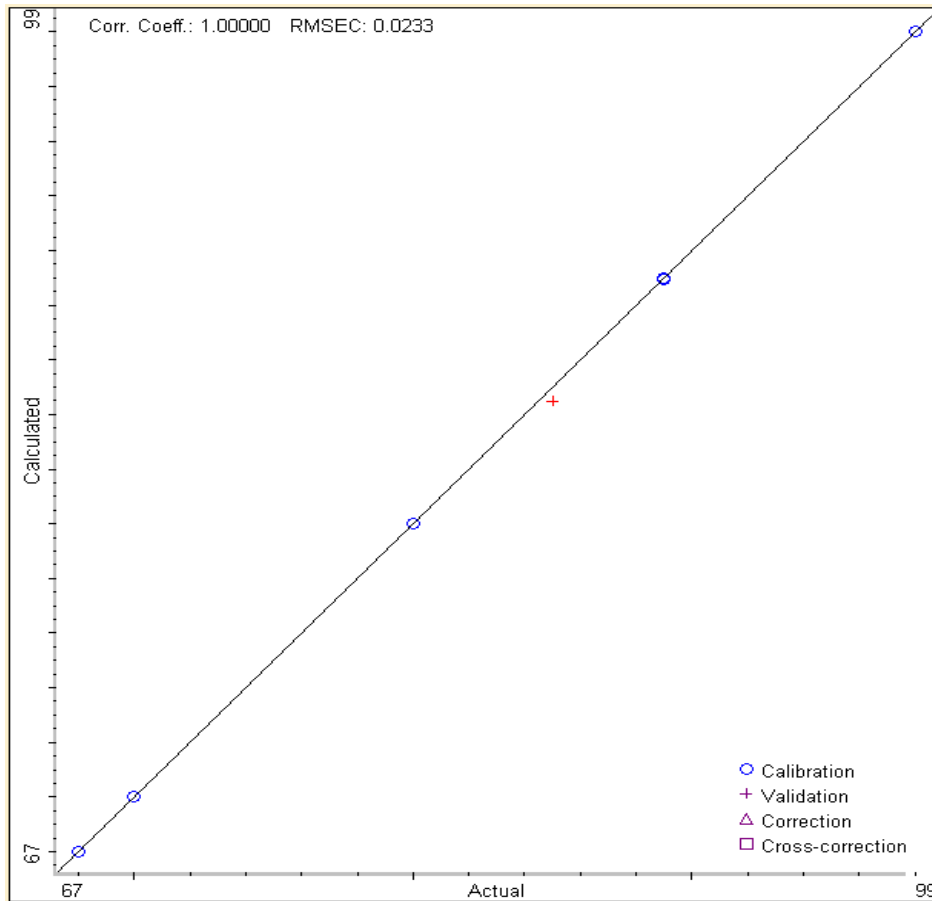
- změří se NIR-spektra a provede se disoluce s nezatíženým vzorkem
- vzorky se vloží do komory s definovaným stupněm vlhkosti
- v definovaných časových intervalech se měří NIR-spektra a provádějí disoluce zatížených vzorků
- provede se korelace změny vybraného disolučního parametru a změny v NIR-spektru
- po vytvoření závislosti lze pro další experimenty užít NIR spektroskopii

2. sledování vlivu potahu jádra na kvalitu disoluce:

- připraví se série tbl.film. s definovanou tloušťkou potahu
- změří se NIR-spektra a provede se disoluce s nepotaženou tabletou
- postupně se měří NIR-spektra a provádí se disoluce s potaženými tabletami
- provede se korelace změny vybraného disolučního parametru a změny v NIR-spektru
- po vytvoření závislosti lze pro další experimenty užít NIR spektroskopii

NIR – aplikace Disoluce

3. sledování závislosti velikosti částic API na disoluci finální lékové formy vyrobené standardním procesem s konstantním složením. Kalibrace a hodnocení vzorků založeno na rozdílech ve výšce jednotlivých pásů.



Zpracováno chemometricky, plocha nejmenších čtverců (partial least square, PLS).

NIR – aplikace

Homogenita smísení API s excipienty.

Lze užít u jakékoli API (homogenita granulátu), resp. lékové formy (homogenita tablet). Lze rovněž využívat pro on-line monitorování procesu, viz PAT.

Lze využívat:

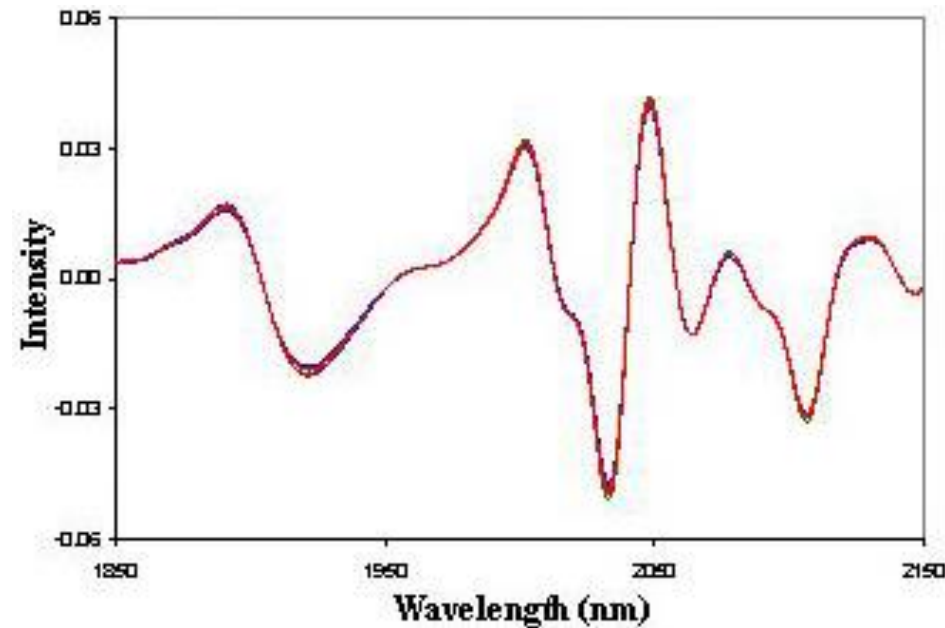
NIR reflektanci (upDrift)

NIR imaging.

NIR – aplikace Homogenita

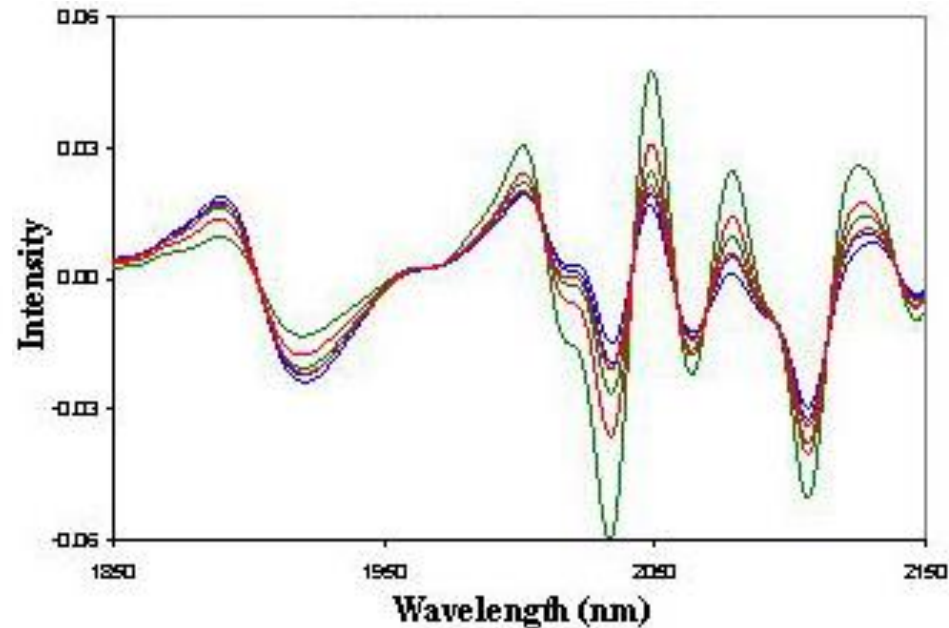
Užití tradiční NIR reflexe (nástavec UpDrift).

Měří se tablety na několika místech a hodnotí se rozptyl jednotlivých spekter z jedné tablety a více tablet.



homogenní vzorky

NEhomogenní vzorky

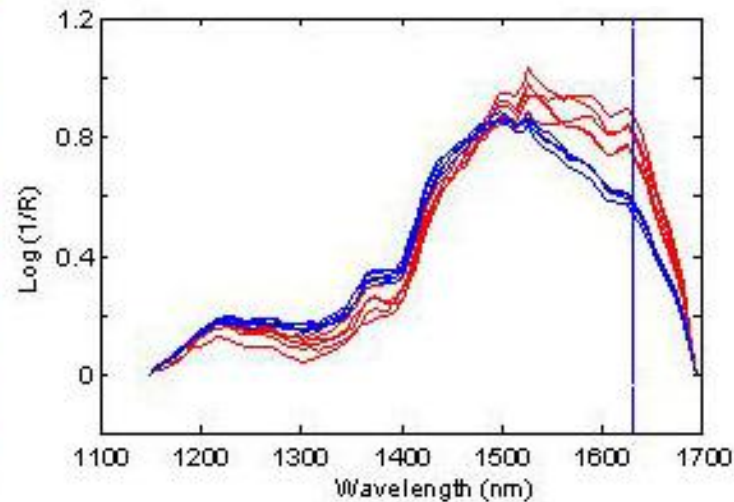
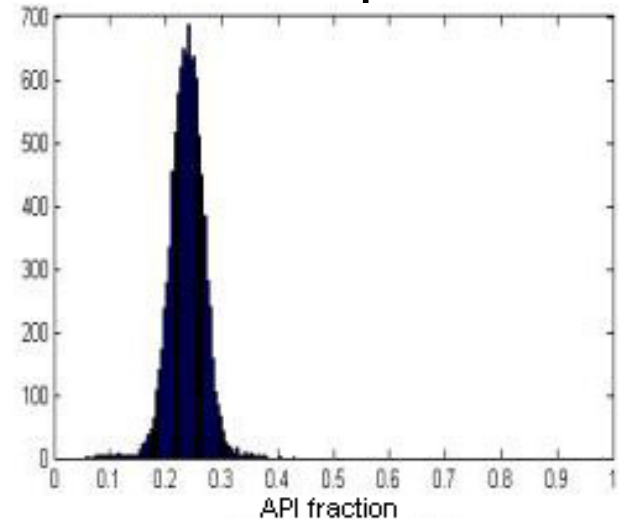
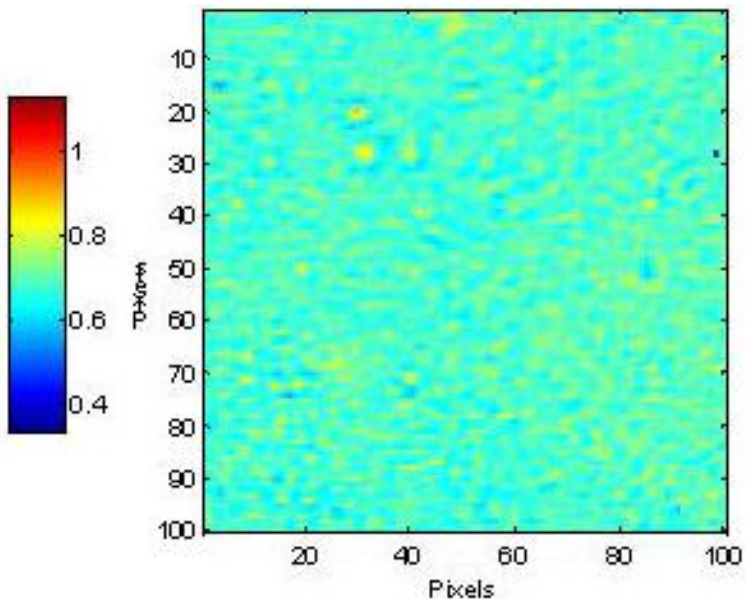


NIR – aplikace Homogenita

NIR imaging.

Proměřování povrchu vzorku pomocí mikroskopu spřaženého s NIR spektrometrem a následné chemometrické zpracování získaných dat (PLS).

homogenní vzorky

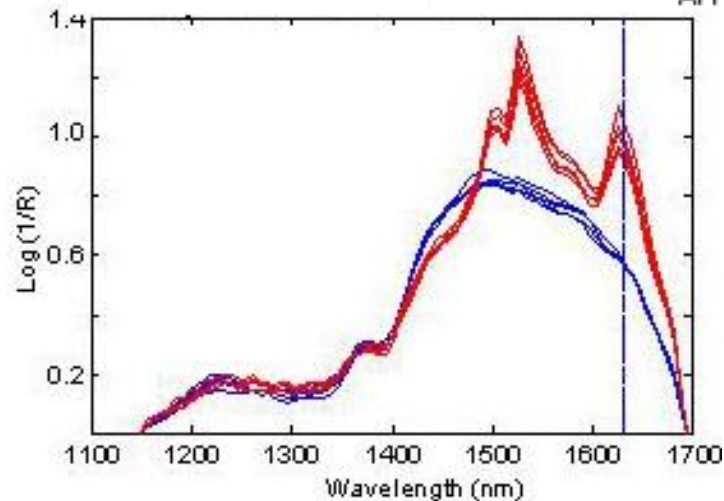
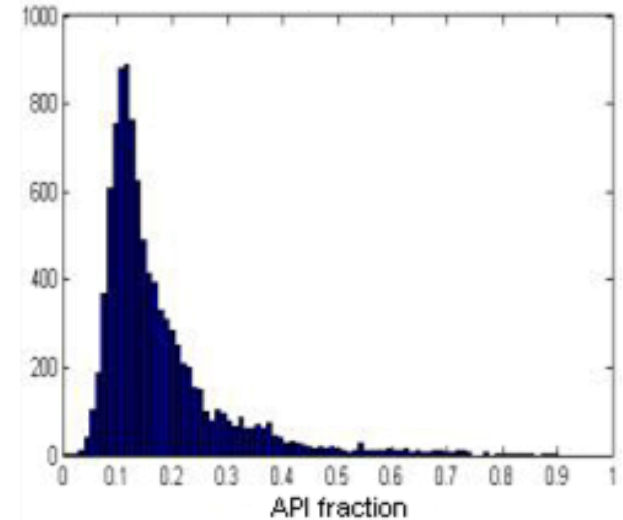
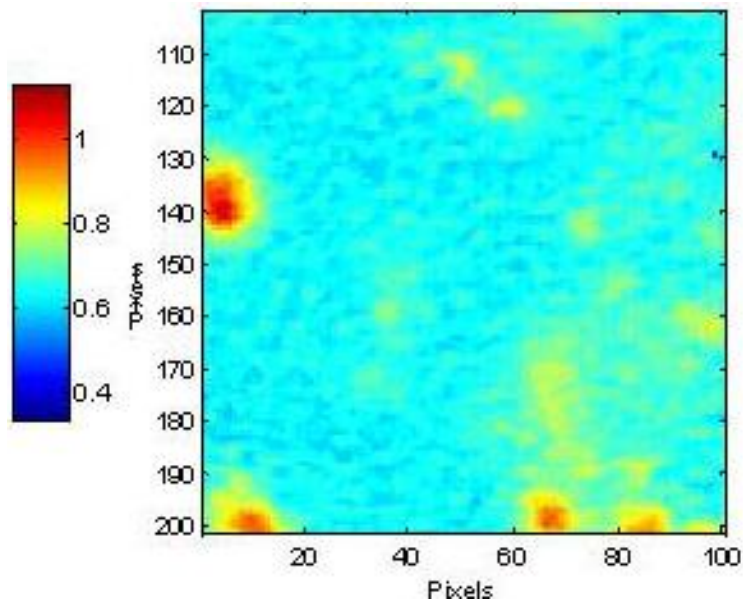


NIR – aplikace Homogenita

NIR imaging.

Proměřování povrchu vzorku pomocí mikroskopu spřaženého s NIR spektrometrem a následné chemometrické zpracování získaných dat (PLS).

částečně homogenní vzorky

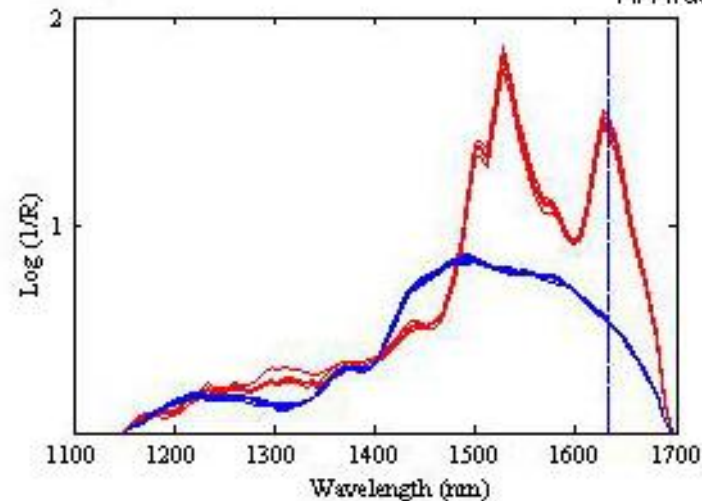
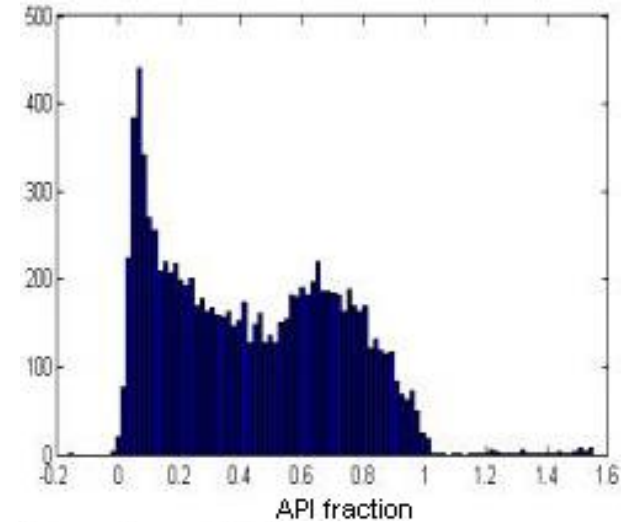
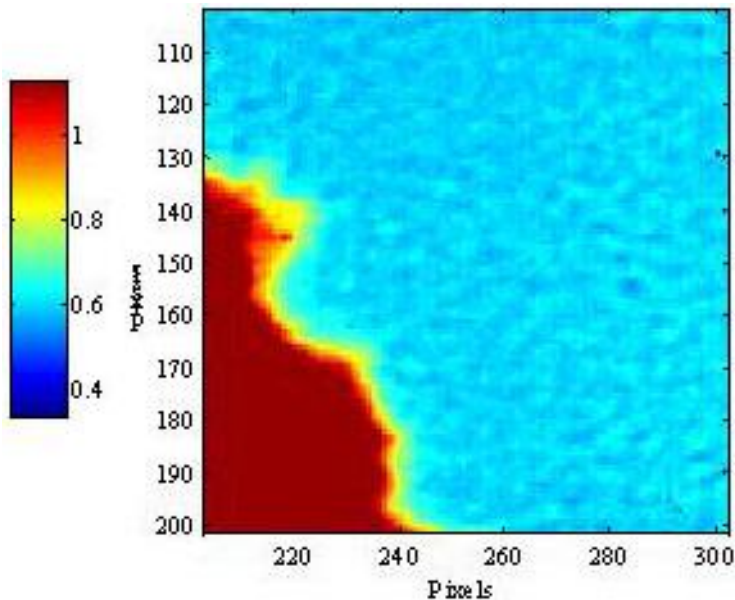


NIR – aplikace Homogenita

NIR imaging.

Proměřování povrchu vzorku pomocí mikroskopu spřaženého s NIR spektrometrem a následné chemometrické zpracování získaných dat (PLS).

NEhomogenní vzorky



Aplikace v PAT

Využití v PAT:

- sledování homogenity v průběhu výroby
- bezkontaktní analýza
- sledování směrodatných odchylek
 - jednotlivé složky
 - celkové složení

Využití na:

granulované přípravky
přímé tabletování

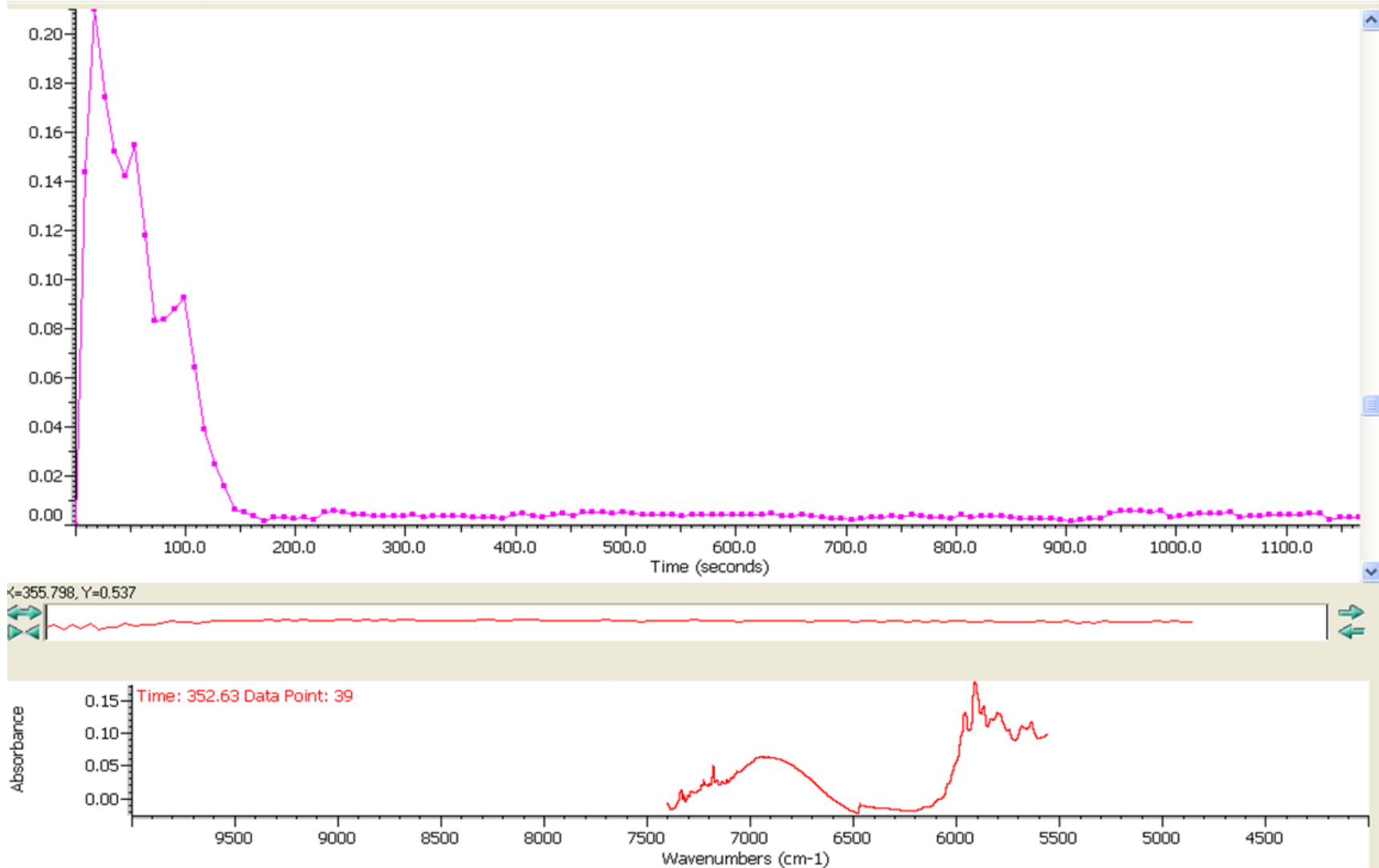
Sledované parametry:

- homogenita API
- homogenita pomocných látek



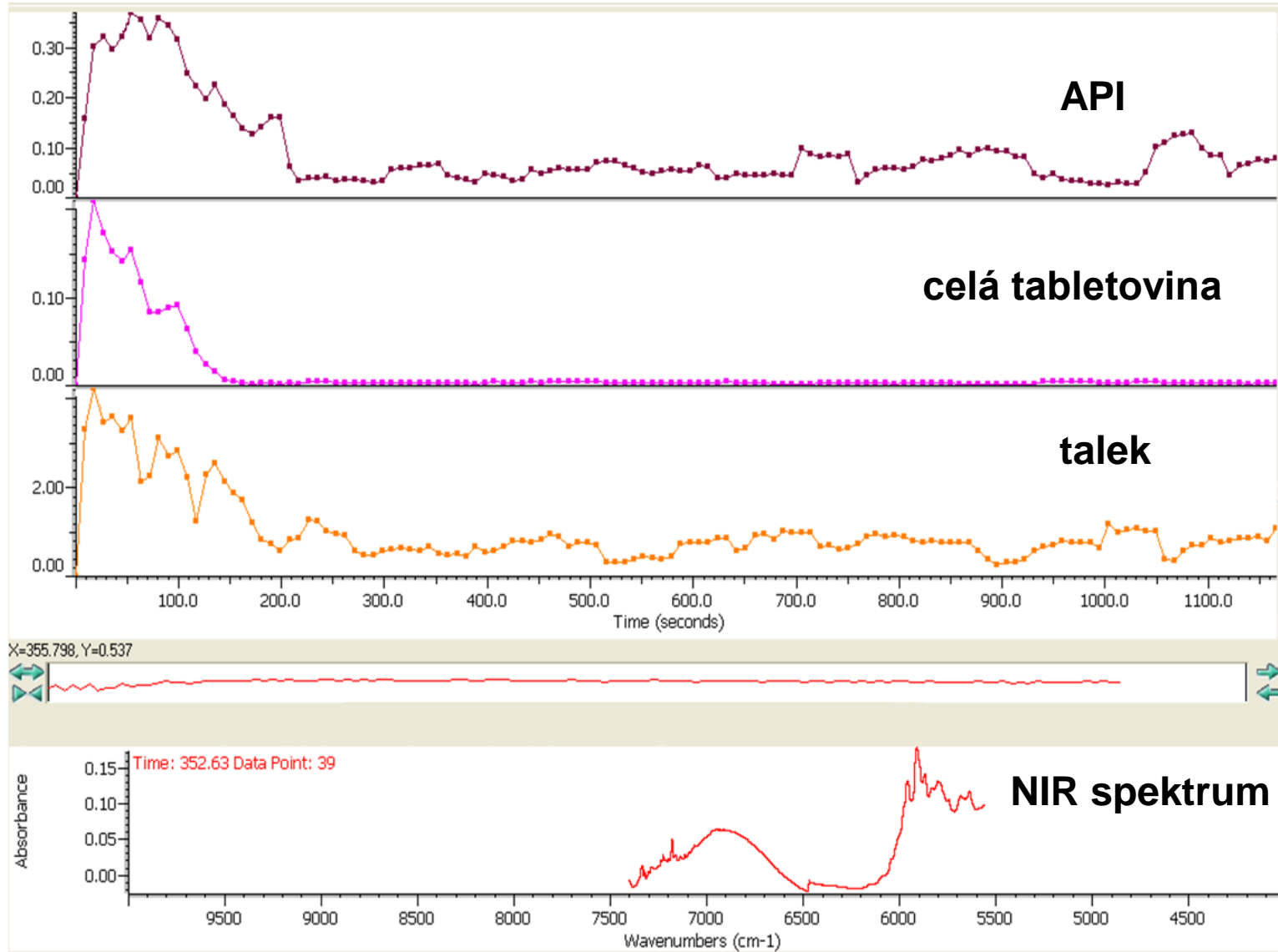
Aplikace v PAT

Vlastní měření – odchylka celkového složení tabletoviny.



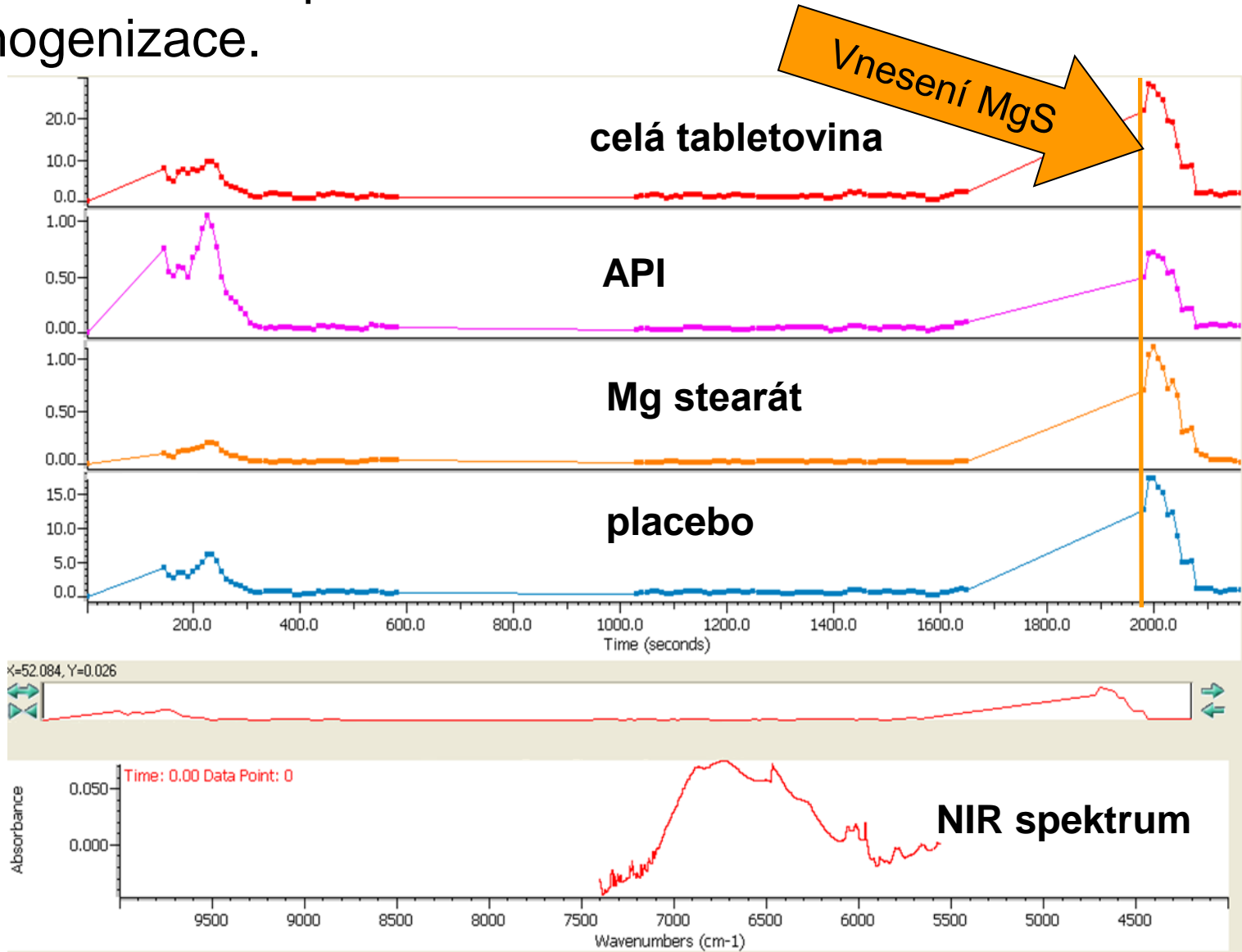
Aplikace v PAT

Vlastní měření – odchylka jednotlivých složek.



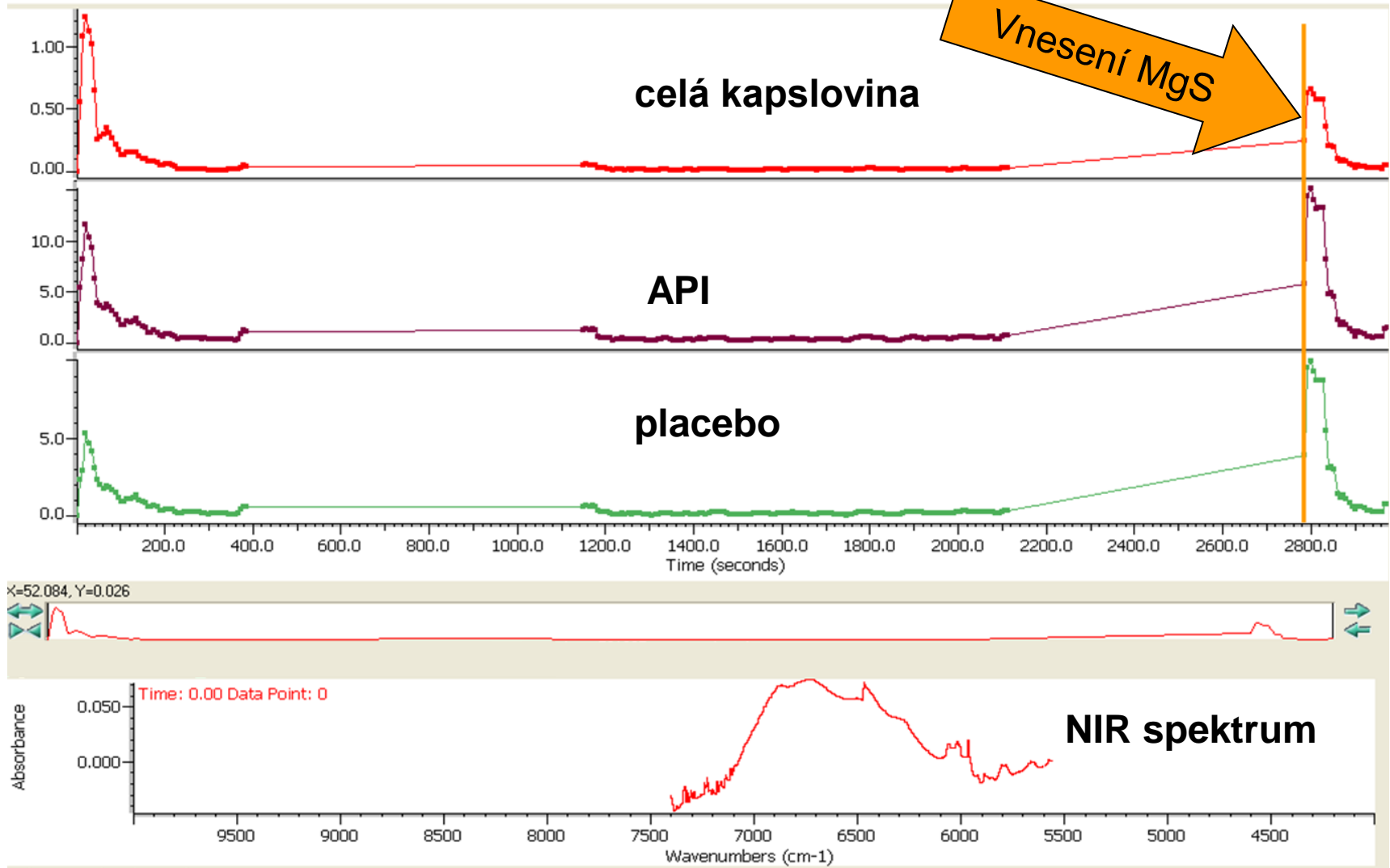
Aplikace v PAT

Vlastní měření – přídavek stearanu hořečnatého na konci homogenizace.



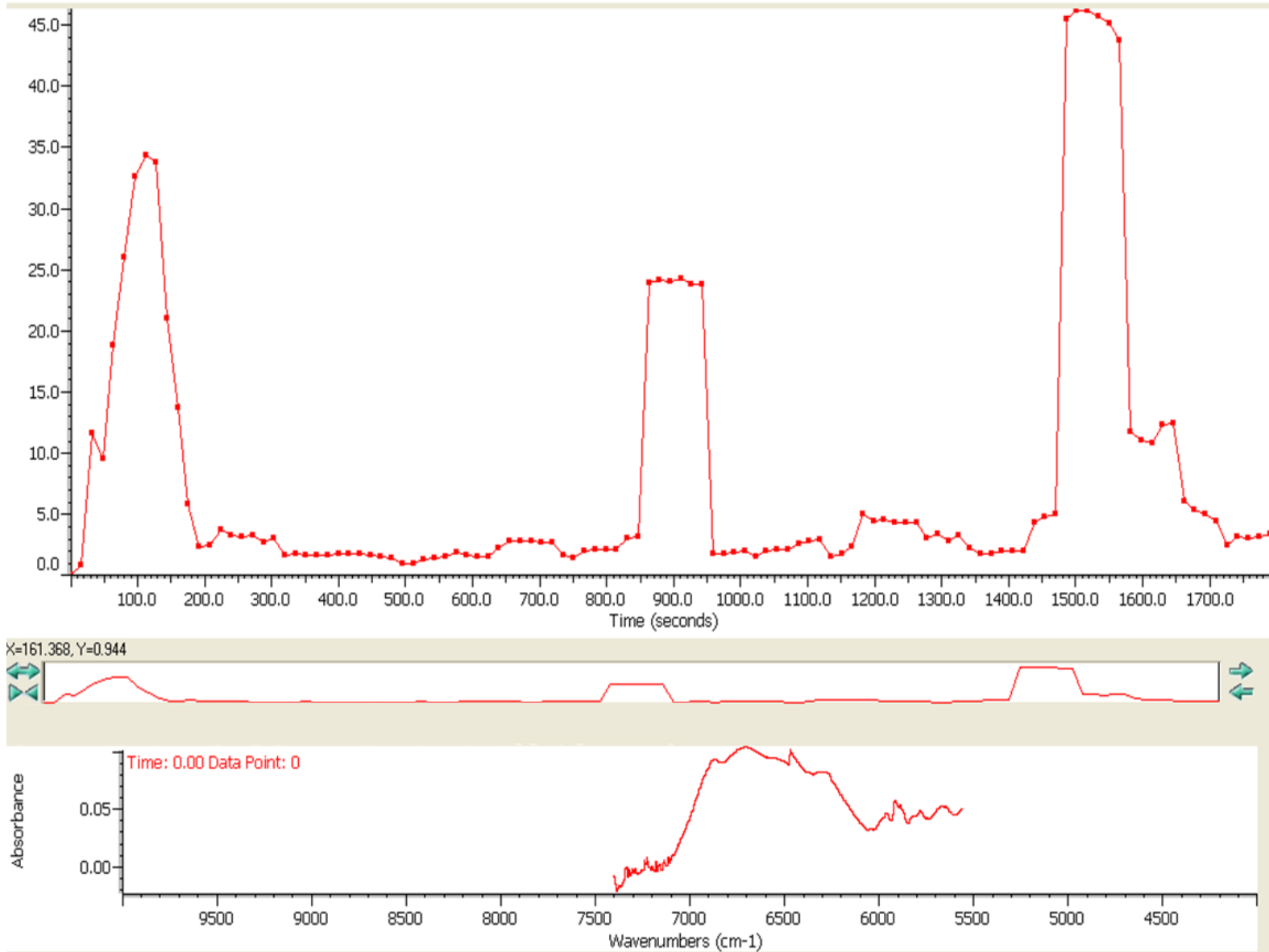
Aplikace v PAT

Vlastní měření – přídavek stearanu hořečnatého.



Aplikace v PAT

Excesy simulované u problémové homogenizace.



Aplikace v PAT

Výhody a využití:

- Homogenita tabletoviny při validacích (po kalibraci lze zjistit i kvantitativní obsah).
- Kontrola homogenity tabletoviny u „rizikových přípravků“.

Nevýhody:

- Správné určení píku sledované suroviny.
- Nalezení / nenalezení hledaného spektra – sledovaná surovina musí mít obvykle min. 2% obsah ve směsi.

Nevýhody analýz v MIR a NIR oblasti

MIR: nutnost vzorkování (nelze měřit přes obal)
přípravy vzorku před analýzou
omezené použití rozpouštědel
použití tenkých vrstev vzorků

NIR: široké absorpční pásy
nemožnost interpretace konkrétních pásů
menší citlivost na změny koncentrace stanovovaného analytu
velká citlivost na fyzikální změny analytu (teplota, vlhkost, homogenita, distribuce velikosti částic)
nutnost použití chemometrie k vyhodnocení

Výhody analýz v MIR a NIR oblasti

MIR: ostré pásy

interpretovatelná spektra

větší citlivost a selektivita

NIR: eliminace přípravy vzorku před analýzou

možnost měření silnější optické vrstvy
v křemenných kyvetách (1-50 mm)

možnost měření přes obal

nedestruktivní měření

cenově dostupná vláknová optika

Děkuji za pozornost