

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ИК ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ: ЗНАНИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СОБЛЮДЕНИЯ ТРЕБОВАНИЙ

■ П. Смит, ■ Дж. Селлорс
Компания PerkinElmer

Благодаря созданию уникального «молекулярного отпечатка», ИК-спектроскопия – это полезный аналитический инструмент для выявления поддельных лекарственных препаратов. В то время как технология в этой области значительно усовершенствовалась, уровень подготовки соответствующих специалистов значительно снизился. Авторы данной работы выделяют лучшие подходы, необходимые для соблюдения требований, предъявляемых к методу ИК-спектроскопии при производстве фармацевтической продукции.

По нашим оценкам, в 2011 году (1) объем продаж фальсифицированной продукции составил около 52 млрд Евро, что в свою очередь оказало влияние на развитие целого ряда мер по защите сети поставщиков и пациентов. Важной технологией, позволяющей быстро и легко выявить поддельные лекарственные препараты, является инфракрасная спектроскопия. ИК-спектроскопия позволяет довольно быстро получить «молекулярный отпечаток» для сравнения тестируемого препарата с подлинным. Действительно, простота подготовки образца и наличие емких спектральных библиотек позволяют судить о том, что ИК-спектроскопия – это «первостепенное средство для выявления поддельных лекарственных препаратов» (2, 3).

Для анализа и интерпретации различий между инфракрасными спектрами требуется хорошее понимание основ этого метода анализа. В рамках «стандартной» методики тестирования лекарственных препаратов ИК-спектроскопия применяется для подтверждения подлинности сырья или материала, полученного в результате проверенного производственного процесса, однако при этом в ряде предупредительных писем Управления по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (далее FDA), указывают на фундаментальные ошибки в эффективном использовании ИК-спектроскопии из-за плохого понимания этого метода анализа (4, 5).

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (Фурье-ИКС) – это проверенный метод для идентификации химических веществ. Данный метод может использоваться для определения содержания различных органических и неорганических веществ в твердых, жидких и газообразных образцах. Поскольку ИК – спектроскопия также позволяет осуществлять количественный анализ, то имеется возможность измерить количество вещества, присутствующего в образце (6). Для идентификации газообразных веществ в фальсифицированных лекарственных препаратах применяется совмещенный анализ методами термогравиметрии и инфракрасной спектроскопии. ИК-спектроскопия также используется для проверки распределения субстанции в готовом таблетированном изделии, и это в свою очередь становится



частью производственного процесса. В общей главе Фармакопеи США (USP) «Испытание на подлинность лекарственных веществ спектральными методами» <197> говорится о том, что: «ИК-спектр поглощения вещества, по сравнению со спектром, одновременно полученным для соответствующего эталона фармакопеи США, обеспечивает, пожалуй, самые убедительные доказательства идентичности вещества, которые могут быть реализованы в любом единичном тесте» (7). Неопровержимость данного утверждения вызвала огромный интерес фармацевтической промышленности к методике идентификации лекарственных препаратов с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье.

Хотя оборудование и программное обеспечение для ИК-спектроскопии постоянно продолжает развиваться, потеря компаниями знаний и специалистов по спектроскопии становится очень большой проблемой. В сочетании с путаницей относительно того, что требуется разными Фармакопеями, это непонимание приводит к проблемам соблюдения требований регламентирующих органов. В предупредительном письме FDA говорится, о том, что: «Данная практика является неприемлемой и вызывает серьезные опасения в отношении целостности и достоверности лабораторного анализа, проведенного вашей компанией». (8)

ИДЕНТИФИКАЦИИ ПО ИК-СПЕКТРАМ

Имея достаточный опыт и справочную литературу, как, например, Беллами, Кольхап и др. (9-11) можно проанализировать ИК-спектр для определения природы и числа функциональных групп в анализируемом веществе. Однако для идентификации материала требуется сравнить исследуемый ИК-спектр с ранее зарегистрированным стандартным спектром.

При поставке лекарственных препаратов на рынки сбыта требуется соблюдать соответствующие стандарты государственной фармакопеи. На сегодняшний день существует по крайней мере 42 государственные Фармакопеи (12), каждая из которых предполагает идентификацию лекарственных препаратов с помощью эталонного химического материала или сертифицированного эталонного спектра. Некоторые Фармакопеи содержат эталонные ИК-спектры, используемые для определения соответствия лекарственных препаратов требованиям Фармакопеи. Фармакопея ЕС поддерживает использование эталонных спектров, но не включает их, в то время как фармакопея США не поддерживает методику идентификации лекарственных препаратов по эталонным спектрам: в Общей главе <197> разъяснено, что соответствующие эталоны фармакопеи США должны использоваться и документироваться одновременно (7). Предупредительные письма, выпущенные FDA, содержат указания, согласно которым не рекомендуется использовать эталонные материалы фармакопеи США, а в одном из последних писем подчеркивается, что недопустимо использовать эталонные спектры материалов для Китайской фармакопеи (13,14). Каждая фармакопея требует использования эталонных химических материалов данной конкретной фармакопеи.

При использовании или создании эталонного спектра в лаборатории необходимо соблюдать два основных требования с целью снижения риска несоответствия при использовании ИК-спектроскопии. Во-первых, спектр стандартного вещества должен быть соответствующего качества – это необходимо проверять и документировать. Спектр стандартного образца используется для сравнения партий материала, поэтому очень важно, чтобы он сам был очень хорошего качества. Второе требование гласит, что при использовании стороннего эталонного ИК-спектра супервайзер или руководитель лаборатории обязаны обосновать и задокументировать данное действие для утверждения квалифицированным специалистом. Первый момент очень важен, поскольку традиционные приемы подготовки проб твердых веществ для снятия ИК-спектров весьма разнообразны. Например, выполняется смешивание пробы с галогенидами щелочных металлов и прессование таблеток (USP <197K>) или приготовление суспензий в вазелиновом масле или другом растворителе (USP <197m>) (7), при этом качество полученного ИК-спектра будет зависеть от мастерства и опыта исследователя.

Среди приемов пробоподготовки особое место занимает спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО или Attenuated Total Reflection ATR), которая позволяет получить ИК-спектры хорошего качества для широкого перечня различных материалов за очень короткий отрезок времени.

Кроме того, метод НПВО, за счет непосредственного прижатия образца к плоской рабочей поверхности отражающей призмы, исключает какие-либо вариации в ИК-спектрах при растирании твердых веществ или применении высокого давления.

ИК-Фурье спектрометры PerkinElmer

ИК-Фурье спектрометры PerkinElmer серии *Frontier* – это мощная и гибкая платформа для работы в среднем и ближнем диапазонах ИК-излучения. Широкий выбор приставок и аксессуаров не только позволяет проводить идентификацию и контролировать подлинность препаратов, но также выполнять экспрессный входной контроль исходных субстанций.

ИК-Фурье спектрометр PerkinElmer *Spectrum Two* – это бескомпромиссное решение для работы в среднем диапазоне ИК-излучения. Применение инновационных разработок позволяет значительно снизить затраты на эксплуатацию прибора.



Frontier



Spectrum Two

Authorized Distributor

PerkinElmer

 For the Better



SchelTec

 Total Laboratory

Компания АО «Шелтек АГ»
 Авторизованный дистрибьютор PerkinElmer
 в странах СНГ, Грузии и Монголии
 119334, Москва, ул. Косыгина, 19
 тел.: (495) 935-8888; факс: (495) 564-8787
info@scheltec.ru www.scheltec.ru

Благодаря увеличению производительности и постоянству один и тот же метод может применяться к различным типам материалов, что в свою очередь полностью изменило подход к подготовке проб. Эти преимущества весьма полезны при тестировании поддельных лекарственных препаратов, поскольку метод НПВО позволяет более эффективно проверять большое количество образцов. Фармакопея США активно поддерживает использование новой технологии НПВО, так Глава USP <851> гласит: стандартный способ, используемый для измерения коэффициента отражения, называется Нарушенное Полное Внутреннее Отражение (НПВО), (15) Глава USP <197> добавляет: «НПВО <197А> и методы<197Е> могут использоваться в качестве альтернативных методов для <197К>, <197m>, <197F> и <197S>, при проведении количественного анализа, при этом необходимый эталонный спектр следует получить аналогичным способом» (7).

Однако это не применяется для других фармакопей. Из всех фармакопей, упомянутых в данной статье, фармакопея США является единственной, где задокументирована равнозначность метода НПВО.

КАЧЕСТВО РАБОТЫ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА

До появления ИК-Фурье спектрометров широко применялось использование регистрации ИК-спектров материала в два этапа: первый этап включал получение спектра образца и составление таблицы пиков полос поглощения; второй этап включал в себя наложение некоторых пиков спектра пленки полистирола на спектр тестируемого образца. Данная процедура позволяла точно определять волновые числа. До 2007 года данная практика являлась обязательной для Индийской Фармакопеи, но, как и с другими Фармакопеями, рассмотренными в этой статье, эти требования остались в прошлом.

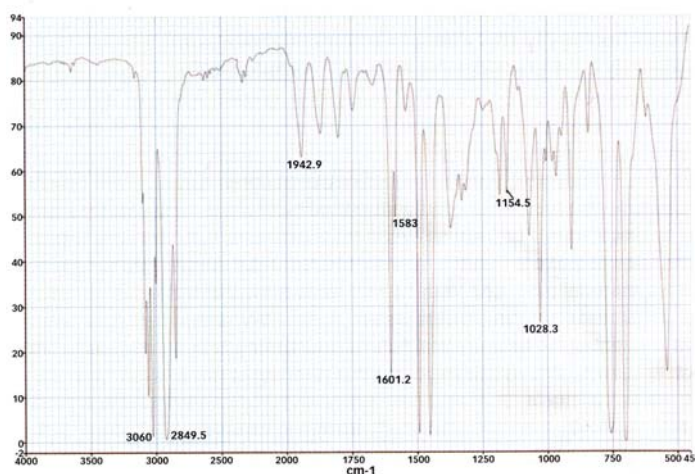


Рисунок 1. Пример ИК-спектра образца полистирола (получен при разрешении 4 см⁻¹)

Хотя и не существует простого и идеального калибровочного стандарта, полистирол, часто упоминающийся в Фармакопеях, получил широкое применение и имеет доступные сертифицированные стандартные образцы (16). ИК-спектр полистирола приведен на Рис.1, а в Табл. 1 представлено сравнение требований различных Фармакопей к аналитическим приборам.

Международная Фармакопея предлагает использовать рекомендации производителей оборудования при работе с прибором. Однако, несмотря на то, что на сегодняшний день в Фармакопее США не указаны критерии качества работы оборудования, FDA уже предупредила американские фармацевтические компании о последствиях за невыполнение калибровки ИК-спектрометров (См. 21CFR211.160 (б)) (16-20).

Таблица 1: Требования Фармакопеи к ИК-спектрометрам

Требования	Фармакопея США	Фармакопея ЕС	Фармакопея Японии	Фармакопея Индии	Фармакопея Китая	Международная Фармакопея
Рекомендуемая толщина полистирола	Не применяется	0,035 мм	0,04 мм	0,035 мм	0,04 мм	Изготовитель
Тест оптического разрешения: Предел 1 Значение между 2870 и 2849,5 см ⁻¹	Не применяется	>0,33A	>18%	>0,33A	>18%	Изготовитель
Тест оптического разрешения: Предел 2 Значение между 1589 и 1583 см ⁻¹	Не применяется	>0,08A	>12%	>0,08A	>12%	Изготовитель
Тест оптического разрешения: Предел 3 7 пиков между 3110 и 2850 см ⁻¹	Не применяется	Нет	Нет	Нет	Да	Изготовитель
Точность определения волновых чисел (Фармакопея ЕС и Индии) 3060,0 см ⁻¹ 2849,5 см ⁻¹ 1942,9 см ⁻¹ 1601,2 см ⁻¹ 1583,0 см ⁻¹ 1154,5 см ⁻¹ 1028,3 см ⁻¹	Не применяется	см ⁻¹ ± ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0	см ⁻¹ ± ±1,5 ±1,5 ±1,5 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0	см ⁻¹ ± ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0 ±1,0	см ⁻¹ ± 3027±5 2851±5 1601±1 1028±1 907±1	Изготовитель
Воспроизводимость (между 2 сканами) - %T - Волновое число (3000 см ⁻¹) (1000 см ⁻¹)	Не применяется	Нет		Нет	Нет	Изготовитель

Примечание: Международная Фармакопея при поддержке Всемирной Организации Здравоохранения, указывает, что прибор должен соответствовать стандартам производительности, установленным заводом-изготовителем. Таким образом, производители оборудования должны рекомендовать набор тестов для проверки функциональных характеристик приборов. Такие требования включены в Европейскую Фармакопею по умолчанию.

Таблица 2: Требования Фармакопеи к идентификации веществ с помощью ИК-спектроскопии

Требования	Фармакопея США	Фармакопея ЕС	Фармакопея Японии	Фармакопея Индии	Фармакопея Китая	Международная Фармакопея
Издание/ссылка	USP 34-NF 29	7.0 (2011)	XV (2006)	IP 2010	2010	2008
Глава	<197> <851>	2.2.24	2.25	2.4.6	Приложение VC	1.7
Идентификация с использованием эталонного спектра	Да	Да	Да	Да	Да	Да
Идентификация с использованием эталонного спектра	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
Эталонные спектры включены	Нет	Нет	Да	Да	Да	Да
Спектры доступны в интернете	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
Указаны характеристики приборов	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
Примечание: Фармакопея Великобритании не включена, поскольку она относится к Европейской Фармакопеи						

Сложившаяся ситуация является очень деликатной, поскольку затрагивает коммерческие интересы компаний, производящих аналитическое оборудование, и поставляющих свою продукцию в США, т.к. Заказчики часто интересуются «соответствием аналитических приборов требованиям Фармакопеи США». Однако при этом только Фармакопея Японии (JP) требует проверки воспроизводимости результатов измерения для аналитических приборов.

Полосы поглощения полистирола, использующиеся для калибровки длины волн, приведены в Таблице 1. В Фармакопеи Японии, Европы и Индии при тестировании длины волны максимум широкой полосы поглощения равен приблизительно 1943 см^{-1} . Этот максимум связан наличием с обертонов и составной полосы ароматического ядра (6), но изначально он не был сертифицирован в Национальном институте стандартов и технологий (NIST) 1921b.

Национальный Институт Стандартов и Технологий (США) теперь включает этот калибровочный пик в сертифицированные стандартные образцы, но из-за слабой интенсивности и значительного уширения погрешность измерения длины волны для максимума этого пика довольно высока, поэтому пригодность этого пика остается сомнительной. Поэтому, Национальный Институт Стандартов и Технологий (США) ограничивает использование данного пика к определенным алгоритмом измерения положения пика.

Некоторые полосы поглощения полистирола чувствительны к разрешающей способности прибора, что делает их хорошим выбором для проверки оптического разрешения. Тем не менее, в дисперсионных ИК-спектрометрах пропускание в случае Предела 2 составляет 12% (см. Таб. 1). Для ИК-Фурье спектрометров это значение приближается к 10% Т при разрешении 4 см^{-1} . Единственный способ гарантированно преодолеть предел 12% Т для ИК-Фурье спектрометра – это выполнить сканирование с более высоким разрешением. Многие фармацевтические компании собрали доказательства в поддержку значения 10% Т для Предела 2, для чего отравили образцы полистирола в различные экспертные лаборатории для регистрации спектра, подтверждения Предела 2 и обоснования использования значения 10% Т для данного предела. В принципе, намного проще было бы регистрировать все спектры с более высоким разрешением, поскольку эта процедура не должна вызывать проблемы при работе с ИК-Фурье спектрометрами. Тем не менее, многие коммерческие и исторические спектры, в том числе и спектры, применяемые в Фармакопее, были записаны с разрешением 4 см^{-1} , и сканирование с другим разрешением вызовет проблемы совместимости.

Научным решением данной проблемы является замена значения в Фармакопее на значение, которое может быть достигнуто при 4 см^{-1} при работе с ИК-Фурье спектрометрами.

Предел 3 указывается только в Фармакопеи Китая, и данный тест выполняется при разрешении 4 см^{-1} . В этих случаях были бы очень полезны рекомендации Международной конференции по гармонизации для идентификации лекарственных препаратов с помощью ИК-спектроскопии. Эти рекомендации помогли бы прояснить конкретные требования к ИК-идентификации, а также обеспечить последовательный подход и упростить понимание требований Фармакопеи.

СРАВНЕНИЕ ФАРМАКОПЕИ

В Таблице 2 сравниваются требования шести версий Фармакопей к идентификации веществ по их ИК-спектрам. В том случае, когда спектр образца отличается от спектра эталона, все Фармакопеи объясняют этот факт присутствием другой кристаллической формы, с типичной формулировкой (Фармакопея США): «Если существует разница между ИК-спектром анализируемого образца и стандарта, растворите равные части анализируемого образца и стандарта в равных объемах подходящего растворителя, а затем выпарите раствор досуха в одинаковых контейнерах при одних и тех же условиях, а затем повторите тест для остатка после выпаривания»(15).

Не существует каких-либо общепринятых критериев или мер, которые следует предпринимать при обнаружении различия между спектрами. Один из факторов неопределенности – это насколько значительной должна быть разница между спектрами прежде, чем следует предпринимать какие-либо действия? На этот вопрос не существует простого ответа, однако, например, растирание твердых веществ до мелкодисперсных порошков или изготовление суспензий может повлиять на их ИК-спектр. Это воздействие должно быть задокументировано, поскольку может помочь защитить специалиста по ИК-анализу (18, 19). Кроме того, детальное изучение ИК- спектров помогает аналитикам получить представление о том, какая информация, содержащаяся в спектре, может помочь предотвратить случаи некорректного применения ИК-спектроскопии, или случаи, когда спектры между несколькими химически-родственными материалами идентичны (20-22). Использование специализированного программного обеспечения, специально разработанного для фармацевтической промышленности, также может помочь уменьшить риск возникновения таких грубых ошибок.

РАЗЛИЧИЯ СООТВЕТСТВИЙ

Фармакопея США предусматривает механизм использования метода НПВО в качестве альтернативы другим способам подготовки образцов. Для других Фармакопей, любая компания, которая желает использовать метод НПВО в качестве альтернативного метода анализа образца, обязана обосновать данное решение. Означает ли это, что метод НПВО может быть включен в требования Фармакопей? На самом деле, это зависит от уровня детализации отчетности, зарегистрированного Фармацевтической Компанией. Механизм внесения изменений в зарегистрированный процесс зависит от количества вносимых изменений. Существует три типа одобрения изменения в нормативных актах:

- основное изменение – требуется предварительное одобрение (например, предаттестационная проверка)
- умеренное изменение – уведомление в течение определенного срока
- незначительные изменения – внесение изменений и только затем уведомление регулирующего органа

Изменение методов подготовки проб классифицируется, как незначительное изменение. В Европе, согласно новой централизованной шкале вариаций, данное изменение попадает под категорию 1А (незначительное изменение). В США данные изменения могут вноситься при годовом обновлении, если процедура идентификации с помощью ИК-спектроскопии включает в себя методы и приемы подготовки проб.

Есть ли в настоящее время опыт применения НПВО, например, в Европейской Фармакопее? Прежде всего необходимо отметить, что статьи фармакопей содержат в себе описание аналитических методов, а не описание исследования определенных целевых лекарственных препаратов (23). Там, где есть соответствующее научное обоснование, фармакопея разрешает использовать альтернативные методы подготовки проб. Три шага, которые необходимо будет предпринять для использования НПВО в качестве альтернативного метода пробоподготовки:

- Обоснование – исключить различия в приемах подготовки проб.
- Декларирование равнозначности испытаний – при идентификации.
- Критерий успешного прохождения испытания.

Использование НПВО для подготовки проб решает проблемы получения спектров хорошего качества для таблеток с КВг или суспензий в вазелиновом масле, а также исключает непоследовательность и огромное разнообразие приемов подготовки проб (в частности, ручной помол пробы с помощью ступки и пестика). При декларировании равнозначности необходимо сначала использовать метод, указанный в Фармакопее, а затем применить метод НПВО с использованием того же эталонного материала и образца. Это позволит документально подтвердить равнозначность ИК-идентификации с помощью НПВО.

БУДУЩЕЕ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ

Все чаще в фармацевтической промышленности ИК-Фурье спектроскопия используется аналитиками, которые не являются специалистами и лишь изредка используют данную методику (24). Эта тема была поднята английским специалистом по спектроскопии Джеффом Дентом более 15 лет назад, когда он написал открытое письмо в журнал *Spectrochimica Acta* о потере экспертного уровня специалистов в области ИК-спектроскопии (25). Эта тенденция продолжилась, что в свою

очередь подтолкнуло производителей ИК-спектрометров к разработке более мощного и удобного программного обеспечения. Теперь программное обеспечение проверяет приставки НПВО на наличие посторонних примесей (путем сравнения текущего и предыдущего спектров) и включает автоматизированное удаление полос поглощения водяного пара в атмосфере. Программное обеспечение также может быть сконфигурировано для идентификации материала с использованием процедуры сравнения спектров.

Компании-изготовители ИК-спектрометров при разработке программного обеспечения все чаще привлекают к сотрудничеству бывших штатных спектроскопистов, где их специальные знания и опыт работы имеют неограниченное значение. В настоящее время, существует потребность в интеллектуальных инструментах, которые могут выполнять тесты самодиагностики. Например, соединение для удаленной диагностики при определении неисправности прибора, или даже руководство по самостоятельной установке оборудования без привлечения специалиста Сервисной Службы, а также для самостоятельного выполнения тестов по квалификации оборудования. Теперь архитектура программного обеспечения может включать в себя обновления, на тот случай, если ограничения в требованиях Фармакопей будут изменены. Кроме того, наличие дружественного интерфейса с интерактивной системой помощи и курсом обучающего видео означает, что существует гораздо меньше шансов для случайных ошибок, совершаемых пользователями при эксплуатации оборудования. В свою очередь, это снижает риски несоответствия стандартам, которые аудиторы могут выявить в ходе инспекции.

СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. R. ColliаSuzuki, «The War Against Counterfeit Drugs», *Pharmaceutical Technology* (31 March 2011).
2. B. Perks, «Faking it», *Chemistry World* 8(1), (January 2011).
3. P. Coombes, «Advances in technology in the fight against counterfeiting», *BNET website* (January/February 2011).
4. FDA, FDA Warning Letter KAN 2011-02 (8 November 2010).
5. FDA, FDA Warning Letter NYK 2011-09 (10 November 2010).
6. P. Smith, «Analysis of Crosslinked polystyrene based polymers using FT-IR/Raman Spectroscopy», MSc Thesis, (Birkbeck College, University of London, UK, 1989).
7. USP 34–NF 29 General Chapter <197>, «Spectrophotometric Identification Tests».
8. FDA, FDA Warning Letter WL-310-10-01 (28 January 2010).
9. L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules, Volume One* (Chapman & Hall Ltd, UK, 3rd ed., 1975).
10. L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules, Volume Two* (Chapman & Hall Ltd, UK, 2nd ed., 1980).
11. D. Lin-Vien et al., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules* (Academic Press, UK, 1991).
12. World Health Organisation (WHO), «Index of Pharmacopoeias» (2004). www.who.int, accessed 16 August 2011.
13. FDA, FDA Warning Letter WL:320-11-01 (15 October 2010).
14. FDA, FDA Warning Letter WL:320-10-005 (13 May 2010).
15. USP 34–NF 29 General Chapter <851>, «Spectrophotometry and Light Scattering».
16. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Chalmers and Peter Griffiths, Eds. (John Wiley & Sons, Ltd, UK 2001).
17. FDA, FDA Warning Letter CIN-11-108087-01 (12 October 2010).
18. FDA, FDA Warning Letter W/L 05/03 (29 October 2002).
19. FDA, FDA Warning Letter 10-ATL-06 (9 December 2009).
20. FDA, FDA Warning Letter 2008-DAL-WL-10 (8 May 2008).
21. FDA, FDA Warning Letter 2008-DAL-WL-03 (31 October 2008).
22. FDA Warning Letter 2009-NOL-17 (21 August 2009).
23. L. Torbeck, *Pharmaceutical Technology* 29(2) (2005).
24. De Palma, «FTIR Spectroscopy: Picking up steam in Nontraditional Markets», *Lab Manager* (5 July 2010).
25. G. Dent, «The gap between experienced spectroscopist and part time users», *Letter to Spectrochimica Acta*. (1995).