

VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROMETRIE PŘI TESTECH SHODY VE FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU A PŘI DETEKCI PADĚLKŮ LÉČIV – NOVÉ MOŽNOSTI MOBILNÍCH ZAŘÍZENÍ

ČERNOHORSKÝ T.

RMI s.r.o., Lázně Bohdaneč, sale@rmi.cz

Jedním z požadavků cGMP (Current Good Manufacturing Practices) ve farmaceutickém průmyslu jsou testy shody (testy totožnosti materiálu, RMID – Raw Material Identification) u aktivních farmaceutických látek (API) a pomocných látek na vstupu do farmaceutických výrob. Testy totožnosti vstupních materiálů jsou dále požadovány i pro řadu farmaceutických produktů, jestliže jsou během výrobního procesu transportovány mezi výrobními jednotkami, tak aby byla vyloučena záměna materiálů. Testy totožnosti dnes tvoří velkou část analýz prováděných ve farmaceutickém průmyslu a jakékoliv zrychlení nebo zlevnění analýz má velké dopady do ekonomiky provozu. S novými požadavky na tzv. 100% testování totožnosti na vstupu výrob dále vzrůstá význam této problematiky.

1 Úvod

Novou oblastí využití, která se stává velmi důležitou, je identifikace padělků léčiv na základě testování chemické totožnosti (ale nejen chemické totožnosti, často se jedná o několik komplementárních metod sledujících i jiné parametry). Problematika masivního vstupu padělaných léčiv na trh již není pouze problémem rozvojových zemí, ale jak ukazují studie z poslední doby, stává se závažným problémem i v ekonomicky rozvinutých zemích.

Jako ideální metody pro testy chemické totožnosti se jeví metody vibrační spektroskopie, neboť na rozdíl od jiných používaných metod (HPLC, kapilární elektroforéza, klasické techniky na bázi mokré chemie) umožňují rychlé získání výsledku při relativně nízkých nákladech na analýzu.

2 Infračervená spektrometrie ve střední oblasti spektra

Historicky nejrozšířenější instrumentální technikou pro testování chemické totožnosti farmaceutických materiálů je infračervená spektrometrie ve střední oblasti spektra (mid-IR spektrometrie). Tato technika je již také dlouhou dobu zakotvena v řadě norem (USP – United States Pharmacopeia, EP – European Pharmacopeia, Český lékopis). Hlavní příčinou širokého rozšíření této techniky byla její dobrá dostupnost, relativně přijatelné ceny zařízení, schopnost měřit vzorky v různých formách a hlavně vysoká specifčnost techniky. Absorpční pásy u Mid-IR spektrometrie odpovídají základním vibračním molekul (intenzita pásů odpovídá druhé mocnině změny dipólového momentu během vibrace molekuly). Píky ve spektrech tak přímo souvisí s chemickou strukturou měřené látky a mid-IR spektra, tak představují jakýsi „otisk prstu“ měřeného vzorku. Oproti výše uvedeným výhodám má však tato technika také některá omezení, která se stávají limitujícími zejména v poslední době, kdy vzrůstají nároky na rychlost analýzy a komplexní validaci metod. Hlavním problémem mid-IR spektrometrie jsou vyšší nároky na přípravu vzorku. Vždy je vyžadováno vzorkování a ve většině případů také mletí vzorku, případně lisování do tablet před vlastní analýzou. Toto jsou časově náročné procesy, včetně vzorkování, neboť to se musí provádět ve speciálních čistých prostorech. U mletí a lisování se navíc přidává problém s validací metody na potenciální „cross“ kontaminace.

3 NIR spektrometrie

Další technikou, která byla zavedena do farmaceutické praxe pro testování totožnosti, je NIR spektrometrie (první práce se objevily již před 30 lety). Její hlavní výhodou jsou žádné nebo malé nároky na přípravu vzorku v porovnání s mid-IR spektroskopií. U naprosté většiny zařízení je ale stále požadováno vzorkování (není možné přímé měření přes obaly) nebo je nutné použít optickou sondu. To ale také znamená porušení originálního balení a přesun analýzy do

čistých prostorů. Hlavní nevýhodou NIR spektrometrie je nízká selektivita a citlivost v porovnání s mid-IR spektroskopií. Absorpční pásy v NIR spektrometrii totiž odpovídají kombinačním vibračním a overtonům, spektra tudíž mají málo pásů, ty jsou široké a vykazují nízkou intenzitu. NIR spektrometrie může být navíc závislá také na dalších fyzikálních parametrech vzorku, jako je například velikost částic. Tyto vlastnosti výrazně komplikují použití techniky při identifikaci chemické totožnosti materiálů ve farmaceutickém průmyslu. Je nutné vytvářet knihovny, kdy každá látka je reprezentována větším počtem spekter vzorků z různých šarží materiálu. Při větším sortimentu vstupních materiálů pak knihovny běžně obsahují několik set spekter. Díky nízké citlivosti a selektivitě je nutné používat poměrně komplikované chemometrické procedury pro tvorbu identifikačních modelů, nízká selektivita je pak příčinou řady komplikací při tzv. „negativní validaci“ metody, tedy prokazování negativního identifikačního výsledku pro všechny ostatní látky ve vytvořené knihovně. Zpravidla je nutné prověřovat široké spektrum látek, které jsou díky nízké selektivitě „spektrálně“ blízké analyzované látce. Problémy samozřejmě nastávají i u strukturně blízkých látek (například rozlišení laktosy monohydrát a bezvodé laktosy). Z výše uvedených důvodů je tvorba identifikačních modelů, jejich validace a periodická údržba u NIR spektrometrie ekonomicky velmi náročný proces, jehož náklady velmi často mnohonásobně překračují cenu pořízeného hardware. Další problémy u NIR spektrometrie nastávají, jestliže se přenášejí knihovny/identifikační modely mezi jednotlivými přístroji. Vzhledem k nízké citlivosti se často vyhodnocují velmi malé změny absorbance při vybraných vlnótech, metody jsou pak málo robustní vzhledem na variaci parametrů mezi jednotlivými NIR spektrometry a přenos metod mezi přístroji tak bývá komplikovaný. Zásadní posun v této oblasti přinesly až NIR spektrometry založené na MOEMS (Mikro Opticko-Elektro-Mechanické Systémy), kdy celý spektrometr je situován na jednom čipu a je možné docílit velmi vysoké reprodukovatelnosti výroby.

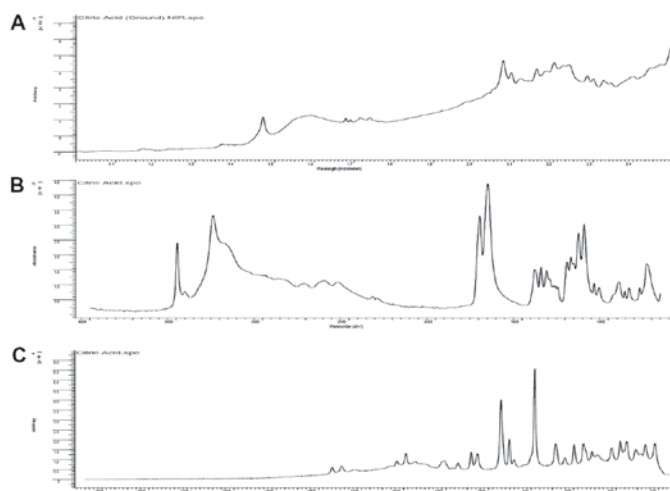
4 Ramanova spektrometrie

Třetí technikou z oblasti vibrační spektroskopie, která je využitelná pro testování totožnosti, je Ramanova spektrometrie. Ramanova spektrometrie stejně jako mid-IR spektrometrie měří základní vibrace molekul (intenzita pásů odpovídá druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibrace molekuly) a poskytuje tak opět vysokou selektivitu. Obě techniky mají však různou relativní citlivost pro různé funkční skupiny. Ramanova spektrometrie je více citlivá pro nepolární vazby a méně citlivá pro polární vazby. U infračervené spektroskopie je tomu naopak, proto například voda silně absorbuje v infračervené oblasti a naopak u Ramanovy spektrometrie ji je možné využít jako ideální rozpouštědlo (vykazuje velmi slabý pás). Zkušenosti z posledních let ukazují, že Ramanova

Pokračování na další straně

spektrometrie je pro testování totožnosti farmaceutických materiálů nejlépe využitelnou technikou. Kromě vysoké selektivity (porovnání mid-IR, NIR a Ramanova spektra kyseliny citronové je na obrázku 1) nemá prakticky žádné nároky na přípravu vzorku a umožňuje i bezkontaktní měření, měření vodných roztoků nebo měření přímo skrz transparentní a semitransparentní obalové materiály. Odpadá tak potřeba vzorkování materiálů v čistých prostorech, případně požadavky na jejich další úpravu. Analýzy je možné přesunout přímo do vstupních skladů farmaceutických výrob nebo do výrobních procesů, kde je možné provádět testování totožnosti přímo v originálních baleních bez nutnosti jejich otevření. V současné době dodavatelé surovin již standardně nabízejí dodávky v obalech, které mají transparentní okénka z polypropylenu a umožňují tak rychlou analýzu i pro jinak neprůhledné obaly (například papírové pytle). To přináší zvýšení produktivity, bezproblémový přechod na 100% testování, minimalizování rizika kontaminace produktu a současně eliminaci případné expozice obsluhy testovanou látkou. Samozřejmě jsou i výrazné úspory provozních nákladů. Jediným omezením Ramanovy spektrometrie jsou problémy při měření vzorků, které vykazují vysokou vlastní fluorescenci při vlnové délce použitého budicího laseru.

Obr. 1 – NIR (A), mid-IR (B) a Ramanovo (C) spektrum kyseliny citronové. (Převzato z materiálů firmy Thermo Scientific, USA)



Ramanova spektrometrie se tak jeví jako optimální technika pro testování chemické totožnosti farmaceutických materiálů, jejímu většímu rozšíření však v minulosti bránilo několik faktorů, zejména se jednalo o vysokou cenu přístrojové techniky. Zařízení byla velká, těžká a vyžadovala stabilní prostředí, analýza zpravidla vyžadovala podstatně delší čas než v případě mid-IR nebo NIR spektrometrie.

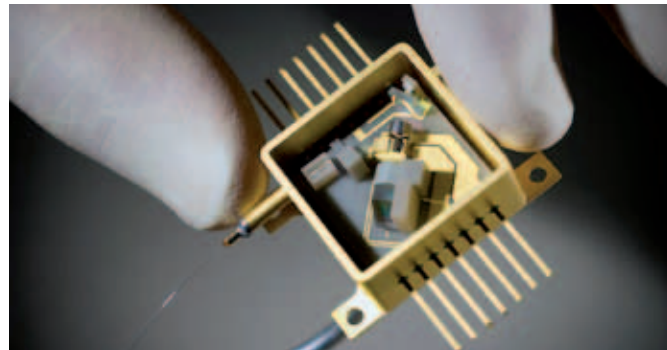
Zásadní průlom nastal s příchodem vysoce účinných CCD detektorů, nové generace filtrů pro odstranění rozptýleného záření laseru a nových generací polovodičových laserů. Tyto inovace umožnily konstrukci stolních disperzních Ramanových spektrometrů s vysokou citlivostí, které otevřely cestu k použití Ramanovy spektrometrie ve farmaceutickém průmyslu, a to nejen pro testování shody, ale například i pro detekci padělků léčiv [1,2]. Ramanova spektrometrie byla také implementována do všech významných norem, jedná se zejména o USP (Chapter 851 Spectroscopy and Light Scattering [3]), Chapter 1120 Raman Spectroscopy [4], „in process revision of Chapter 197“ s nově navrhovaným názvem Spectroscopic Identification Tests [5] a Evropský lékopis 2-2-48 Ramanova spektroskopie [6].

5 Technologie mobilních Ramanových spektrometrů TruScan

Zcela nové možnosti se otevřely s příchodem vysoce sofistikovaných mobilních Ramanových spektrometrů. Tyto spektrometry byly původně vyvinuty pro rychlou detekci nebezpečných látek přímo v terénu a představovaly obrovský technologický pokrok. Díky novým technologiím se podařilo zkonstruovat malá a velmi

robustní zařízení, která nabízela výkonnost a stabilitu shodnou s velkými laboratorními systémy. Na obrázku 2 je ukázka moderního polovodičového laseru s výkonem 300 mW, který je používán v tomto typu spektrometrů. Tento laser má jak optickou stabilizaci, tak i teplotní stabilizaci na bázi termoelektrického chlazení, svými rozměry přitom zabírá plochu menší jak jeden čtvereční palec!

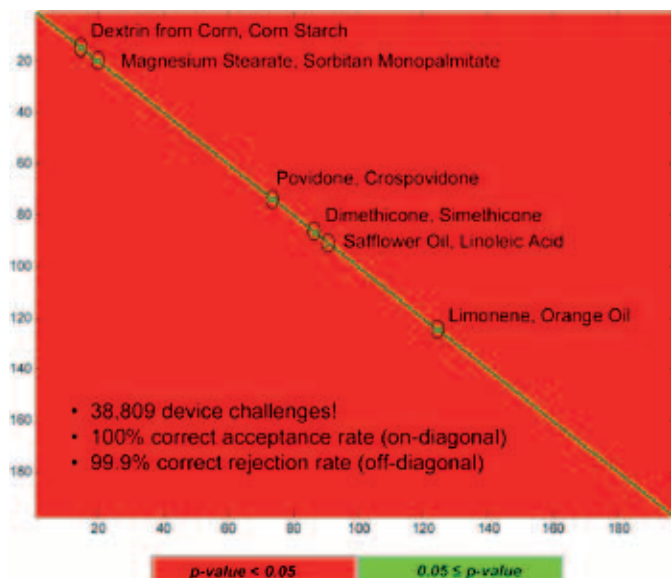
Obr. 2 – Opticky a termicky stabilizovaný laser pro využití v Ramanově spektrometrii, vlnová délka 785 nm, výkon 300 mW (převzato z materiálů firmy Ahura Scientific, USA)



Tato zařízení samozřejmě přímo vybízela k použití ve farmaceutickém průmyslu, neboť hardware již umožňoval přenesení analýz z laboratoře přímo do skladů a výrob a analýzu přes transparentní obaly. Dalším krokem byl vývoj specializovaného firmware a software, který by jednak odstranil nevýhody laboratorních systémů (závislost na konečném rozhodnutí obsluhy) a zároveň umožnil přenesení analýzy mimo laboratorní prostředí (potlačení vlivů okolního prostředí na finální výsledek analýzy, zvýšení spolehlivosti algoritmů pracujících se spektrálními knihovny). Výsledkem vývoje byla technologie TruScan představená firmou Ahura Scientific (USA) v roce 2007, která představovala komplexní řešení této problematiky, a to jak po stránce hardware, tak zejména firmware a software. Tato technologie v krátkém čase zaznamenala takřka „explozivní“ rozšíření ve farmaceutickém průmyslu, neboť pouhé tři roky po jejím uvedení na trh již devět z deseti největších světových farmaceutických výrobců tuto technologii používalo nebo bylo ve fázi její implementace a v roce 2011 byla již implementována u všech deseti firem. Technologie TruScan totiž umožňuje kompletní přenesení laboratoře přímo do místa analýzy. Hardware produkuje Ramanova spektra shodné kvality jako laboratorní systémy, a to i v prostředí skladů a výrob, navíc celý systém (hardware a software) komplexně eliminuje vliv obsluhy na konečné rozhodnutí o shodě. Tvorba identifikačních modelů (tvorba a správa knihoven) je přitom snadná a nevyžaduje žádné znalosti chemometrie ze strany obsluhy. Díky vysoké selektivitě a novým patentovaným technologiím práce se spektrálními knihovny je navíc i snadná a rychlá validace metody. To samé platí i pro přenos metod mezi jednotlivými přístroji, technologie umožňuje zcela bezproblémovou distribuci metod a knihoven mezi jednotlivými přístroji. Řada světových farmaceutických výrobců již používá systém, kdy si jednotlivé podniky mezi sebou předávají již hotové metody nebo využívají centrální databáze metod, ze které si mohou jednotlivé závody snadno nahrávat potřebné metody do svých přístrojů. Všechny výše uvedené vlastnosti v konečném důsledku vedou nejen k velkým finančním úsporám, ale také ke zlepšení spolehlivosti testů shody a minimalizování chyb způsobených obsluhou.

Zajímavé schopnosti této technologie demonstroval následující test selektivity. Bylo vybráno 197 látek (API, pomocných látek, rozpouštědel) s důrazem na to, aby ve skupinách byly i strukturně podobné látky, v řadě případů i látky prakticky totožné. Primární spektra pro tvorbu knihovny byla změřena na třech různých spektrometrech TruScan nepocházejících z jedné výrobní šarže. Následně byla spektra spojena do jedné knihovny a distribuována na další tři spektrometry, opět pocházejících z různých výrobních šarží a ty byly použity pro měření vlastního testu selektivity. V tomto testu byly změněny všechny vzorky proti všem identifikačním metodám (matrice

Obr. 3 – Test selektivity pro 197 látek. Shoda je považována za prokázanou, pokud hodnota p je vyšší jak 0,05 (převzato z materiálů firmy Thermo Scientific, USA)



38 809 měření). Pro vyhodnocení shody se na rozdíl od tradičních knihoven vyhodnocuje veličina p (podrobný popis je v článku [6]). Výsledky jsou shrnuty na obrázku 3, správná identifikace shody (hodnota p větší jak 0,05) byla dosažena u všech případů (100% úspěšnost), u 99,9 % analýz byla správně vyhodnocena neshoda s materiálem (hodnota p menší jak 0,05), přičemž pro 99 % látek byla hodnota p menší jak 1.10^{-13} . To ukazuje na vysokou robustnost nově používaných algoritmů, zejména vezme-li se v potaz i to, že daný experiment v sobě současně zahrnoval přenos spekter mezi šesti různými spektrometry TruScan během celého experimentu.

Obr. 4 – Spektrometr TruScan RM (převzato z materiálů firmy Thermo Scientific, USA)



Jak je patrné z obrázku 3, technologie nebyla schopna rozlišit pouze velmi podobné nebo téměř shodné látky, jako například API Povidone a Crospovidone nebo pomocné látky jako limonem a pomerančový olej nebo kukuřičný škrob a dextrin z kukuřice.

Technologie je také velmi dobře použitelná pro detekci padělků léčiv na základě chemické identifikace shody (v ideálním případě v kombinaci s mobilními NIR analyzátory nové generace, neboť NIR spektrometrie je citlivá i na granulometrii a některé další fyzikální parametry). I v oblasti detekce padělků léčiv zaznamenala technologie úspěšné rozšíření během pouhých tří let. Kromě řady farmaceutických firem ji využívají i organizace jako WHO, FDA a řada národních institucí pro kontrolu léčiv.

Dokončení na další straně



Dodávky náročné přístrojové techniky, instalace, zaškolení, vývoj metodik, poradenský servis, komplexní řešení problémů

Pernštýnská 116
533 41 Lázně Bohdaneč
tel. 466 921 885, fax. 466 921 404
sale@rmi.cz
www.rmi.cz

Mobilní průmyslové spektrometry pro 21. století



Thermo Scientific TruScan RM

Mobilní Ramanův spektrometr pro rychlé a přesné identifikace materiálů, cGMP a CFR Part 21 kompatibilní. Robustní a lehké zařízení s parametry laboratorních Ramanových spektrometrů.

Typické aplikace:

- Testy shody ve farmaceutickém průmyslu
- Detekce padělků léčiv
- Verifikace kritických vstupních surovin v průmyslu



Thermo Scientific TruDefender FT

Mobilní FT IR spektrometr velmi robustní konstrukce pro terénní měření a použití v průmyslu.

Typické aplikace:

- Identifikace materiálů
- Tenké filmy a povlaky
- Rozpouštědla a mazadla
- O-kroužky
- Plasty a polymery
- Rychlá identifikace odpadů ve spalovnách nebezpečných odpadů



Thermo Scientific microPhazir

Unikátní mobilní NIR analyzátory využívající technologii MOEMS.

Typické aplikace:

- Testy shody ve farmaceutickém průmyslu
- Detekce padělků léčiv
- Rychlá analýza plastů v recyklačních provozech
- Screening výskytu azbestu ve stavebních materiálech
- Textilní materiály a vlákna
- Zemědělství
- Potravinářský průmysl

Thermo
SCIENTIFIC
DISTRIBUTOR

Navštivte nás na výstavě LABOREXPO 2011, stánek B1

V současné době je firma Ahura Scientific již součástí firmy Thermo Scientific, která vytvořila novou samostatnou divizi s názvem Portable Analytical Instruments (PAI). To potvrzuje současný trend, maximální snahu o přenos analýzy z laboratoře do místa, kde je analýza skutečně potřeba. V roce 2011 byla uvedena na trh již druhá generace této technologie TruScan RM (obr. 4), která znamenala další skokový pokrok v oblasti hardware a přinesla také řadu vylepšení v oblasti software.

Literatura

- [1] S. Mazurek, R. Szotak, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006) 1225–1230
 [2] Y. Roggo, K. Degardin, M Margot, *Talanta* 81 (2010) 988–995
 [3] United States Pharmacopeia/National Formulary (USP32/NF27), Chapter 851, 373 (2009)
 [4] United States Pharmacopeia/National Formulary (USP32/

NF27), Chapter 1120, 626 (2009).

[5] *Pharmacoepial Forum* 35, 152 (2009).

[6] *European Pharmacopeia* 5.8 Edition 2007

[7] D.E. Bugay, R.C. Brush, *Applied Spectroscopy* 64 (2010) 467–475

Abstract

THE USE OF RAMAN SPECTROSCOPY FOR RAW MATERIAL ID AND DETECTION OF COUNTERFEIT PRODUCTS IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY – NEW POSSIBILITIES OF HAND HELD SPECTROMETERS

Summary: The summary of methods for raw material identification (RMID) and detection of counterfeit pharmaceutical products is presented. The main topic is devoted to application of Raman spectroscopy as new popular technique for these applications. The advantages of robust, rugged and fully cGMP compliant hand-held Raman spectrometers is presented.

Key words: Raw material identification, detection of counterfeit, Raman spectrometry, cGMP