



NanoRam – РАМАН-СПЕКТРОМЕТР ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

С.Бутяйкин, www.czl.ru

Портативный прибор комбинационного рассеяния NanoRam компании B&WТек обладает чрезвычайно высокой молекулярной избирательностью. Он прекрасно подходит для разнообразных фармацевтических приложений – тестирования сырья, проверки готовой продукции, выявления поддельных лекарств. Изложены основы метрологического обеспечения измерений состава вещества спектрометром NanoRam.

Портативный спектрометр NanoRam благодаря своим аналитическим возможностям стал одним из лидеров мирового рынка портативных приборов комбинационного рассеяния. Его высокая разрешающая способность позволяет исследовать сложные соединения и различать связующие/таблетированные материалы, используемые в фармацевтической промышленности (целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и т. д.).

Так сложилось исторически, что идентификация этих типов соединений была возможна только с помощью систем, обладающих высокой разрешающей способностью и высоким отношением сигнал-шум. Ключевая проблема состоит в том, что комбинационное рассеяние целлюлозных материалов и сахаридов, являющихся основой пищевых добавок, не позволяет различать эти соединения из-за их высокой флуоресценции. Трудности в использовании традиционных портативных спектрометров комбинационного рассеяния, с которыми на практике сталкиваются фармацевты, связаны с относительно низкой селективностью и очень долгим временем тестирования. А это ведет к снижению надежности и несоответствию друг другу результатов, полученных разными методами тестирования. Тем

не менее, многие недостатки были преодолены благодаря последним достижениям в проектировании оптической схемы, изготовлении детекторов, в технологии термоэлектрического охлаждения и создании интеллектуальных алгоритмов программного обеспечения. Практические исследования показывают, что высокопроизводительная спектроскопия комбинационного рассеяния может быть выполнена в простом компактном устройстве, удобном для использования. Мы провели исследование с помощью портативного раман-спектрометра NanoRam, чтобы установить, способен ли он различать группы целлюлозных материалов и пищевых добавок.

Прибор NanoRam – компактный, переносной спектрометр комбинационного рассеяния с интегрированной вычислительной системой, предназначенный для идентификации материалов и соответствия их качества предъявляемым требованиям. При весе менее 1 кг он позволяет быстро разрабатывать стандартизированные и проверенные методики для приложений по определению чистоты и контроля качества. Схема устройства состоит из лазерного источника, генерирующего излучение на длине волны 785 нм, спектрографа системы Черни-Тернера и ПЗС-детектора, имеющего термоэлектрическое (ТЕ) охлаждение, что обеспечивает стабильность сигнала с низким уровнем



Таблица 1. Характеристики раман-спектрометра NanoRam

Параметр	Значение
Длина волны возбуждающего излучения лазера, нм	785
Ширина линии лазерного излучения, нм	<0,3
Рабочий диапазон длин волн спектрометра, см ⁻¹	175–2900
Разрешающая способность спектрометра, см ⁻¹ /нм	9,0/912
Тип ПЗС-детектора	Линейка ПЗС-матриц с термоохлаждением (ТЕС)
Размеры и число пикселей детектора	14×200 мкм, 2048
Температура детектора, °С	18
Время измерения, с	<20

фонового шума. Уменьшение фонового шума достигается за счет устройства контроля температуры детектора. ТЕ-охлаждение, запатентованная технология стабилизации лазера, а также высокая скорость микропроцессора позволяют создать удобный портативный прибор с лабораторным качеством работы. Обеспечиваемое прибором высокое отношение сигнал-шум является необходимым условием для успешного тестирования различных

фармацевтических целлюлозных препаратов и пищевых добавок. Характеристики спектрометра NanoRam приведены в табл.1

ИССЛЕДУЕМЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ДОБАВКИ

Для исследования были выбраны материалы, обычно используемые в качестве связующих веществ, наполнителей и добавок. Все они

Таблица 2. Результаты тестов и оценок материалов с использованием методики на определение целлюлозы

Тестируемый материал	Результаты идентификации	P-величина	Вероятность совпадения	ИК, %
Целлюлоза	Совпадение с целлюлозой	0,9998	Целлюлоза подтверждена	
ГПМЦ	Ошибка	$7,61^{-03}$	ГПМЦ	99
Лактоза	Ошибка	$2,26^{-03}$	Лактоза	100
Мальтодекстрин	Ошибка	$2,27^{-03}$	Мальтодекстрин	100
Дигидрат СаНРО ₄	Ошибка	$4,79^{-06}$	Дигидрат СаНРО ₄	100

по внешнему виду напоминали белый порошок. Это – целлюлоза (связующие/наполнители); гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) (связующие/наполнители); лактоза (подсластитель/наполнитель); мальтодекстрин (подсластитель/пищевая добавка); кальция фосфат дигидрат моногидрофосфат (СаНРО₄.Н₂О) (связующее/пищевая добавка).

МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

Процедуру тестирования вещества всегда предваряет калибровка измерительного устройства. Эта процедура стандартизирована и включает в себя разработку методик тестирования, их воспроизведение в приборе, создание стандартных мер веществ и их соединений. В основе каждой инструментальной методики – не менее

20 сканирований конкретного материала, что позволяет оценить среднее значение измеряемого параметра в партии, предназначенной для измерения. Варьирование параметров связано с изменением положения образца, упаковочным материалом в партии и некоторыми другими отклонениями. В любой разработанной методике, созданной для каждого материала, есть собственный алгоритм программного обеспечения. Согласно ему проходит обработка спектра комбинационного рассеяния (КРС) и затем путем сравнения вычисляется P-величина. По значению P-величины определяют совпадение спектров тестируемого вещества и спектров стандартных образцов. Идеальным соответствием считают случай, когда P-величина равна 1,000.

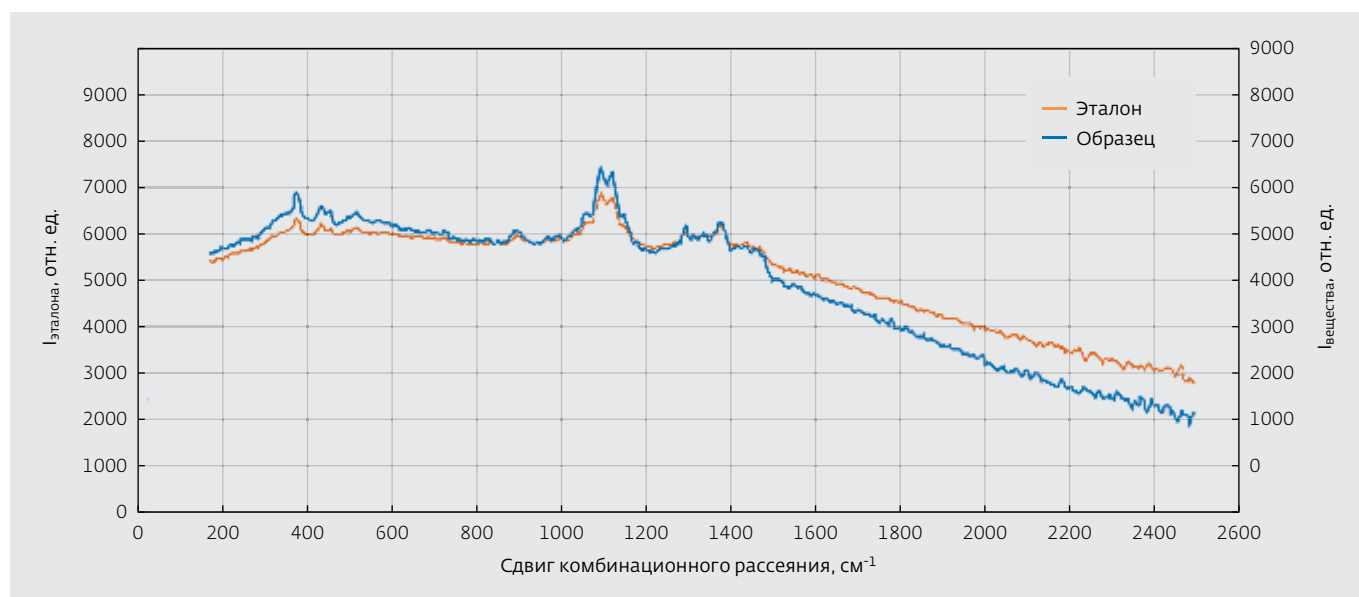


Рис.1. Сравнение спектров комбинационного рассеяния образца целлюлозы (синяя кривая) и хранящегося в памяти прибора спектра от стандартного образца целлюлозы (красная кривая). Материал – целлюлоза; название метода – "целлюлоза"; P-величина – 0,9982; результат – совпадение

Таблица 3. Результаты перекрестного тестирования всех материалов с использованием методик сравнения со стандартными веществами

Материалы	ГПМЦ	Целлюлоза	Лактоза	Мальтодекстрин	Дигидрат СаНРО ₄
Целлюлоза	Совпадение	Ошибка	Ошибка	Ошибка	Ошибка
ГПМЦ	Ошибка	Совпадение	Ошибка	Ошибка	Ошибка
Лактоза	Ошибка	Ошибка	Совпадение	Ошибка	Ошибка
Мальтодекстрин	Ошибка	Ошибка	Ошибка	Совпадение	Ошибка
Дигидрат СаНРО ₄	Ошибка	Ошибка	Ошибка	Ошибка	Совпадение

Примечание: Цветовые обозначения для Р-величины: ■ – > 0,05; ■ – 0,05...10⁻³; ■ – 10⁻³...10⁻⁶; ■ – 10⁻⁶...10⁻¹⁵; ■ – 0.

Методики обеспечивают точный и надежный метод тестирования, необходимый для однозначной идентификации материала (табл.2). После того, как прибор обучен методу оценки материала, сканирование и процесс принятия решения занимают около 20 секунд.

Пример результата сканирования, полученного с помощью этой процедуры, показан на рис.1. Сравнение спектра комбинационного рассеяния целлюлозного материала (синяя кривая) и спектра от стандартного образца целлюлозы, полученного от эталона (красная кривая) и хранящегося в памяти прибора, дало значение Р-величины, равное 0,9982. Отметим, что для чистоты эксперимента спектр КРС стандартного образца чистой целлюлозы был автоматически уменьшен по интенсивности на 1000 единиц по сравнению с неизвестным образцом (левая и правая шкалы относительного сигнала интенсивности на рис.1). Таким образом, измеренный неизвестный образец прошел соответствие на наличие целлюлозы.

Пример с результатом сравнения КРС целлюлозы и КРС ГПМЦ иллюстрирует рис. 2. Визуально очевидно, что спектр комбинационного рассеяния для образца (синяя кривая) значительно отличается от спектра для ГПМЦ (красная кривая). При этом значение Р-величины для образца низкое, составляет 2,23716⁻⁰⁶. Поэтому измеренный неизвестный образец не прошел соответствие на ГПМЦ.

Теперь рассмотрим случай, когда прибору NanoRam не удалось идентифицировать материал. Тогда программный алгоритм оценивает вероятность идентификации материала тем стандартным образцам, спектры которых уже имеются в библиотеке методик и спектров. Эта коллизия проиллюстрирована в табл. 2,

в которой показаны результаты того, как все исследуемые материалы проходили испытания с использованием методики на определение целлюлозы. Настоящей целлюлозе удалось пройти тест соответствия своего спектра эталонному спектру целлюлозы, тогда как все другие материалы с испытанием не справились. Материалы, которые не прошли тест на целлюлозу, в дальнейшем оцениваются по спектральным библиотекам прибора и определяются почти со 100%-ной точностью. Точность определения основана на индексе качества (ИК), он указан в последнем столбце табл.2. ИК используется для оценки КРС и определяется с помощью корреляционных тестов как сходство двух спектров: неизвестного спектра и спектра из библиотеки. Значение ИК, составляющее 1,00 (100%), указывает на то, что неизвестный спектр полностью совпадает со спектром из библиотеки. Когда ИК между спектром неизвестного образца и спектром из библиотеки становится меньше единицы, это говорит о том, что сравниваемые вещества становятся менее похожими друг на друга (табл.3). В самом деле, для всех материалов, которые проходили определенную методику испытаний, среднее значение ИК было более 99%, что свидетельствует об очень точном соответствии неизвестного спектра известному эталонному спектру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Так по результатам испытаний становится ясно, как с помощью портативного спектрометра комбинационного рассеяния NanoRam определить присутствие в образце материала сырья или добавок, используемых в фармацевтической и пищевой продукции. Отметим, что успешные испытания с высокой степенью точности занимают у исследователя

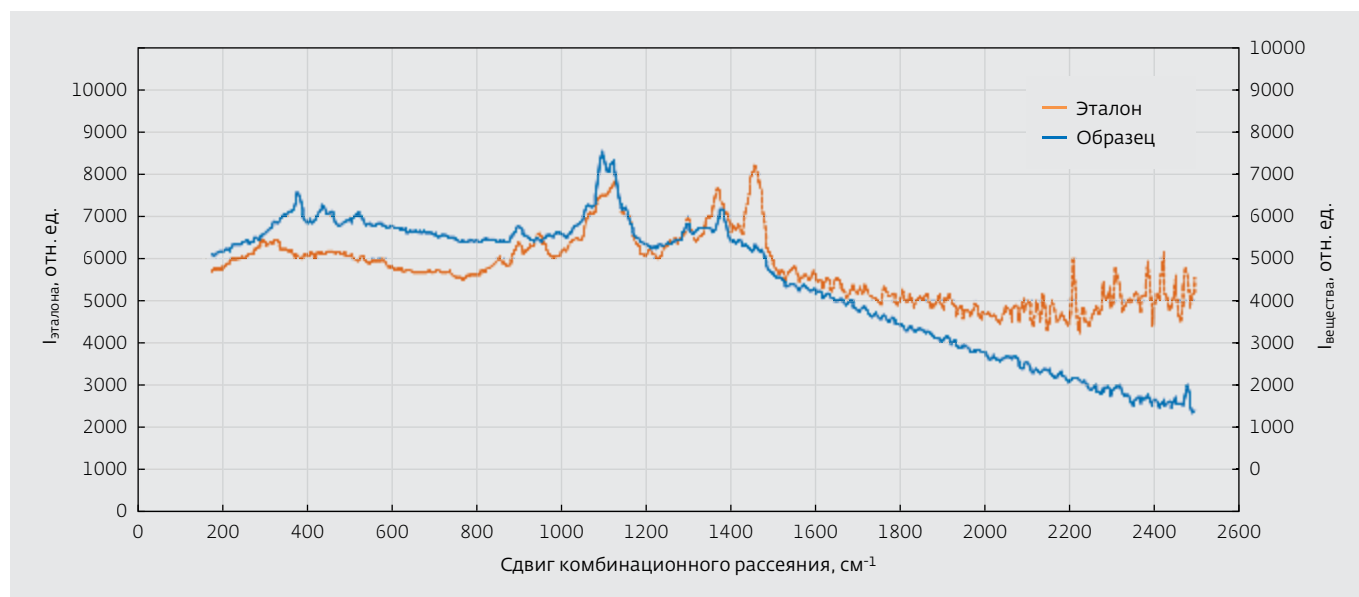


Рис.2. Сравнение КРС образца целлюлозы (синяя кривая) и хранящегося в памяти прибора спектра от стандартного образца ГПМЦ (красная кривая). Материал – целлюлоза; название метода – "ГПМЦ"; R-величина – $2,23716 \cdot 10^{-6}$; результат – ошибка.

менее 20 с. Кроме того, программное обеспечение, алгоритмы и бортовые спектральные библиотеки способны оценить вероятность идентификации этого соединения. Такие особенности методики испытаний идеально подходят для однозначной идентификации и проверки входящего сырья в фармацевтической или пищевой промышленности. ■



IDENTIFICATION OF ADDITIVES USED IN THE PHARMACEUTICAL AND FOOD INDUSTRIES WITH THE NANORAM HANDHELD RAMAN SPECTROMETER

S. Butiaykin, www.czl.ru

Today's Raman instrumentation is faster, more rugged, and less expensive than previous instrumentation. Now, with the advances in component miniaturization, the design of high performance, portable and handheld devices has introduced the technology to new application areas that were previously not possible with older, more cumbersome instruments. Handheld Raman instruments such as the NanoRam® from B&W Tek are very well-suited for pharmaceutical applications such as the testing of raw materials, verification of final products and the identification of counterfeit drugs due to the technique's extremely high molecular selectivity.

CURRENT CHALLENGES

The performance of handheld Raman instrumentation has improved dramatically with the release of the NanoRam because it can test far more complex compounds and differentiate between different binding/tableting materials used in the pharmaceutical industry such as cellulose, microcrystalline cellulose, and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Historically, identification of these types of compounds have only been achievable using research-grade, laboratory systems, which offer high resolving power and better signal to noise capability. The inherent problem is that the Raman characteristics of cellulose materials and saccharide-based food additives are not distinctive enough due to the high fluorescence nature of compounds like HPMC. The challenge that the industry currently faces using traditional handheld Raman systems is relatively poor selectivity and extremely long testing times, which leads to reliability problems and inconsistencies in the testing methods.

However, recent breakthroughs in the areas of optical design, detectors, thermo-electric cooling technology and intelligent software algorithms are proving that high performance Raman spectroscopy can be combined with simplicity and ease of use in a compact design. To exemplify this, we carried out an investigation using the NanoRam handheld Raman spectrometer, to see if it could differentiate between a group of cellulose materials and food additives.

The NanoRam is a compact, handheld Raman spectrometer and integrated computing system for material identification and verification within cGMP compliant facilities. Weighing less than 2,2lbs, it allows rapid development of standardized and validated methods for purity and quality control applications. At the heart of the device is a 785 nm wavelength laser excitation source with a crossed Czerny-Turner spectrograph and a thermoelectrically (TE)-cooled CCD detector, providing a very stable signal with low background noise. The benefits of a temperature-controlled detector to reduce background noise is emphasized in Fig.1. (Fig.1. Dark current noise for a non-cooled CCD spectrometer at room temperature (left) and a TE cooled CCD spectrometer at 18°C (right)), which shows the dark counts (noise) for a non-cooled CCD spectrometer at room temperature and a TE cooled spectrometer, operated at 18°C, using an integration time of 30 seconds. The calculated RMS (root mean square) noise level of the TE cooled spectrometer on the right is approximately five-fold lower than the non-cooled unit.

Coupling thermoelectric cooling with patented laser stabilization technology and a high speed microprocessor, this technology provides laboratory grade performance in a convenient handheld package. It has the capability of generating a signal with high signal to background noise specification, which is required for the successful testing and confirmation of different pharmaceutical cellulose compounds and food additives.

CHARACTERIZATION OF DIFFERENT MATERIALS AND ADDITIVES USED IN THE PHARMACEUTICAL AND FOOD INDUSTRY

The following materials (used as binding agents, fillers, additives and supplements, all similar-looking white powders) were selected for this investigation: Cellulose (binders/fillers); Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) (binders/fillers); Lactose (sweetening agent/filler); Maltodextrin (sweetening agent/food additive); Calcium Monohydrogen Phosphate dihydrate ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (binder/dietary supplement).

TESTING PROCEDURE

The standard operating parameters used for this study are shown in Table 1 (Handheld Raman operating parameters for the characterization of pharmaceuticals). The testing procedure involves calibrating the device using pure forms of each of the compounds to develop and store methods to test and characterize all the other materials. Each instrument "method" collects a minimum of 20 scans from the specific type of material, which allows a user to include slight variations in sampling position, packaging materials/ batches, and inconsistencies associated with multiple operators carrying out testing. Included in the customized method for each material is a proprietary software algorithm where the Raman spectrum is compared and matched with that in the method to generate a numerical P-value from which the PASS/FAIL result is determined. The methods created in this way will not only be related to the unique characteristics of the materials, but will also ensure a rugged and robust method for a reliable testing procedure required for unambiguous material identification. Once a method is developed, the total scan time and decision making process takes approximately 20 seconds to make a PASS/FAIL assessment of a material.

An example of a scan using this procedure is seen in Fig. 2 (Fig. 2. Raman spectrum of a cellulose sample (blue) overlaid with the stored cellulose method (red). The P-value in the inset table shows the cellulose was confirmed as cellulose), which shows a Raman scan of a cellulose material



(blue plot) and the stored "Cellulose Method" generated from the reference standard (red plot). A P-value of 0,9982 was obtained, which is considered an extremely good fit compared to the reference material (a P-value of 1,000 is considered a perfect fit). Note that the Raman spectrum of the pure cellulose reference material has been offset by 1000 intensity units compared to the unknown sample for clarity purposes. This unknown sample would therefore be assessed as a PASS for cellulose.

By comparison, Fig. 3 (Fig. 3. Raman spectrum of a cellulose material (blue) overlaid with the stored HPMC method (red). The P-value in the inset table shows the cellulose was NOT verified as HPMC) shows a Raman scan of cellulose using a standard method generated for HPMC. It can be seen that the Raman spectrum for the sample (blue) looks very different from the HPMC reference scan (red), as indicated by the P-value for the sample, which is 2.23716×10^{-06} . This unknown sample would therefore be assessed as a FAIL for HPMC. If a sample material has failed, the software algorithm then makes a "probable" assessment of the material's identification based on the library of methods and stored spectral information. This is exemplified in Table 2 (Results of all the materials being tested and assessed using the "Cellulose Method"), which shows all the materials being tested using the "Cellulose Method." Both the cellulose and microcrystalline cellulose PASS the cellulose ID test, whereas all the other materials FAIL it. The materials that failed the cellulose test are further evaluated against the on-board spectral libraries and confirmed as the correct material with almost 100% accuracy, based on the Hit Quality Index (HQI) in the final column. The HQI nomenclature is well-recognized for assessing Raman spectra and is defined as the similarity of two spectra, when comparing an unknown spectrum and a library spectrum via a correlation test. An HQI value of 1,00 (100%) indicates when the unknown spectrum is identical to the library spectrum, and gets smaller as the unknown and library spectra become less similar to one another. In fact, for all the materials that failed a specific method test, the average HQI value was >99%, indicating that the match of the unknown spectrum to a known reference spectrum in the library was extremely accurate.

The final part of the investigation was to test all the powders using specific methods generated by each of the pure reference materials. The results of this test are shown in Table 3 (Testing of all the materials under investigation using specific methods generated by each of the pure reference materials). It can be seen from the color-coded boxes that the NanoRam handheld Raman system has correctly confirmed all the materials that were tested using their respective methods as indicated by the green PASS boxes; while all the other materials FAILED the test, as indicated by the red and brown colored boxes. Note the color legend below the table that shows actual P-value ranges, emphasizing the severity of the failure - in other words, the lower the value, the worse the failure.

CONCLUSION

This investigation has clearly emphasized that raw materials and additives used in the pharmaceutical and food industries can be successfully tested and identified using the NanoRam handheld Raman spectrometer with a high degree of confidence in less than 20 seconds. It has also shown that even when a compound fails a test, the software algorithms and on-board spectral libraries can make a very accurate assessment of the probable identification of that compound. These capabilities make the technique ideally-suited for the unambiguous identification and verification of incoming raw materials in a pharmaceutical or food manufacturing environment. ■