

# Определение содержания влаги в фармацевтическом сырье с использованием портативного спектрометра ближней ИК области

## Краткое содержание

Портативные переносные спектрометры Thermo Scientific быстро запускаются в работу для проведения анализа порошков и гранул непосредственно на производственной линии. Целью настоящей статьи является демонстрация возможностей спектрометра для количественного определения содержания влаги в углеводородных смесях, а также предложение эффективной процедуры приготовления стандартов для полной калибровки и сокращенной калибровки второго и третьего уровня в процессе экспресс-оценки конечного показателя высушивания.

Внедрение подобных процедур предполагает наличие образцов сырья, смесителя, весов и сушильного термостата, необходимых для воспроизведения процедуры. Поскольку в качестве вспомогательного метода используется спектроскопия в ближней инфракрасной области, полученные спектры часто коррелируют с результатами стандартных анализов. При валидации калибровки эффективным является использование для определения содержания влаги стандартного оборудования, такого, как весы для определения потери в массе при высушивании (LOD) или прибор для титрования по методу Карла Фишера.



## Введение

Определение содержания влаги является важной процедурой при производстве многих порошков. Порошкообразные вещества обладают большой площадью поверхности и, как следствие, могут впитывать большое по массе количество воды.

Впитываемая вода изменяет взаимодействие между отдельными частицами порошка, тем самым изменяя параметры производственного процесса получения порошка. Вода изменяет текучесть, плотность материала и его отношение к нагреванию. Гигроскопичные материалы,

такие, как сахар, крахмал, и, в меньшей степени, целлюлоза могут впитывать достаточно большое количество воды.

Влажные порошки также изменяют свойства готовой продукции. При производстве продуктов питания и лекарственных средств влага может сокращать срок годности продукта. При производстве продуктов питания избыточная влага может привести к появлению постороннего привкуса, поскольку вода стимулирует активность ферментов и рост бактерий и грибов. При производстве лекарственных средств избыточная влага приводит к разложению действующего вещества или к распаду таблеток. Экспресс-оценка содержания влаги в порошках, пищевых продуктах, муке, сахаре, крахмале и микрокристаллической целлюлозе, необходима для контроля процесса калибровки, требующего следующих условий: увлажнения исследуемого материала, смешивания и гомогенизации смеси сухого и влажного материала, проверки содержания влаги и сбора данных спектроскопии в ближней ИК-области. Большинство из видов необходимого оборудования является типичным для оснащения лаборатории по разработке состава лекарственного средства или продукта питания. Метод приготовления увлажненной смеси основан на работе Vojnovic et. al.1 Были подготовлены флаконы со смесью сухого и влажного вещества с содержанием влаги от 3% до 20%. Содержание влаги подтверждалось с помощью взвешивания на весах для определения LOD. Спектры в ближней ИК-области регистрировались по нижней части стеклянных флаконов вместимостью 20 мл.

## Влажная смесь лактозы/крахмала

Для смесителя Patterson-Kelley с оболочкой на 8 кварт была произведена корректировка процедуры. Использование усилительной планки позволило добавлять воду и быстро гомогенизировать смесь. В смеситель Patterson-Kelley с усилительной планкой помещалась смесь массой 4 кг из лактозы (2,7 кг) и кукурузного крахмала (1,3 кг). Материалы перемешивались в течение пяти минут с одновременным использованием вращения и усилительной планки. По прошествии 5 минут смесь проверялась на однородность визуально с помощью отбора пробы и размазывания ее по листу бумаги. Никакого разделения компонентов смеси не наблюдалось. Для отбора проб сухих материалов использовались две бутылки из темного стекла вместимостью 500 мл.

Далее проводилось повторное перемешивание (с использованием вращения и усилительной планки) с добавлением 800 мл воды через отверстие для добавления жидкостей. После добавления воды перемешивание продолжалось в течение 10 минут, при этом, в соответствии с руководством Patterson-Kelley по приготовлению смесей, общее время перемешивания составило 15 минут. После окончания перемешивания для проведения дальнейших экспериментов были отобраны и помещены на хранение в бутылки из темного стекла пробы влажной смеси.

С целью оценки содержания влаги в сухом и влажном веществе определялось содержание летучих веществ с помощью весов для определения LOD с применением установочных параметров, рекомендованных производителем для определения содержания влаги в кукурузном крахмале. Навеска образца массой 3 г высушивалась при температуре 90°C в течение 11 минут. При этом фиксировалась масса навески до и после высушивания, а разница использовалась при расчете процентного содержания влаги в образце. Средние значения и стандартные отклонения определялись по трем повторностям.

### Приготовление образцов

Образцы приготавливали путём смешивания влажного и сухого материала в различных соотношениях. В общей сложности, для проведения испытания было сделано 11 образцов. Образцы были получены с помощью добавления от 0% до 100% влажного материала к сухому, с шагом 10%. Также, с учётом аналогичного экспериментального диапазона было приготовлено 6 дополнительных образцов для проведения независимого теста. Чистый влажный и сухой материал помещали непосредственно в 40-мл боросиликатные флаконы, быстро закрывали крышкой и взвешивали на аналитических весах. Показатели массы были определены с точностью до 0,1 мг. Результаты калибровки представлены в Таблице 1. Содержимое флаконов перед закрытием крышкой быстро перемешивали с помощью металлического шпателя. Флаконы помещали в термостат с температурой 60°C на 5 часов для ускорения достижения равновесия, затем охлаждали в течение ночи. Содержимое каждого 40-мл флакона разделяли между двумя 20-мл флаконами, один направляли на исследование в ближней ИК-области, другой на определение потери в массе при высушивании.

### Определение спектра в ближней ИК области

Спектр определяли с помощью спектрометра microPHAZIR. Перед снятием спектров прибор стабилизировался в течение 30 минут и проходил калибровку длин волн. В качестве стандартного спектра использовали средний спектр 10 сканирований тефлонового эталона. Каждый спектр образца получали путём 5 сканирований образцов через дно 20-мл стеклянных флаконов. Спектры образца регистрировали в 3 независимых местах нижней части флакона.

### Материалы:

- 2,7 кг моногидрата лактозы (Supertab Spray Dried – лактоза, Новая Зеландия, серия номер BN290120)
- 1,3 кг кукурузного крахмала (Argo Pure Corn Starch)
- 800 мл водопроводной воды
- 500 мл сосуды из тёмного стекла
- предварительно промытые 40 мл флаконы EPA с тефлоновой перегородкой

### Оборудование:

- Лабораторный смеситель (Patterson-Kelley Master Lab Blender, модель В с усилительной планкой)
- Лабораторный сушильный термостат (Precision Scientific 25EM с температурным регулятором Watlow 942)
- Весы для определения потери в массе при высушивании (Mettler Toledo HG63)
- БИК спектрометр microPHAZIR
- Программное обеспечение Method Generator

### Результаты и комментарии

Спектрометрия в ближней ИК области требует приготовление однородных образцов. Объёмы образца, необходимые для определения потери в массе при высушивании (LOD) и определения спектра в ближней ИК области (NIR) очень разные. Объём образца для LOD анализа составляет примерно 5 мм<sup>3</sup>, для NIR анализа – около 5 мм<sup>3</sup>. Это обуславливает более высокую чувствительность NIR анализа к неоднородности на шкале от 5 мм<sup>3</sup> до 50 мм<sup>3</sup>. Процедура была разработана для быстрого получения результатов в условиях однородности распределения влаги. Добавление влажного материала по частям, перемешивание и последующее приведение в равновесие при повышенной температуре позволяет влаге быстро распределяться между влажным и сухим материалом.

Однородность материала может быть продемонстрирована. Для этого определяли содержание влаги в максимально влажном материале и в материале в состоянии поставки. Летучая фракция в материале в состоянии поставки составила 3,17% ( $\pm 0,03\%$  м./м.), в максимально влажном материале – 19,4% ( $\pm 0,8\%$  м./м.). Планки погрешностей одного стандартного отклонения определяли по трём повторностям. Эти значения близки к значениям, полученным для полного блока калибровки, как показано в Таблице 1. Сокращённая калибровка с использованием 2 или 3 стандартов (см. описание далее) может быть проведена в течение 30 минут. Полная калибровка, как правило, может быть выполнена в рамках одной рабочей смены, если поверочный анализ не требуется. Поверочный анализ может занять ещё 2-3 рабочие смены. Постоянные эксперименты по определению влажности требуют 20-40 дней для установления равновесия. После этого однородность распределения влаги в сосудах всё равно должна быть проверена.

В этих условиях возможен рост кристаллов, плесени и бактерий. Флаконы из боросиликатного стекла являются распространённым и оптимальным вариантом контейнера для спектроскопии в ближней ИК области. Стекло максимально прозрачное и обладает относи-

Блок	Образец	Расчётное значение	Фактическое значение
Калибровка	1	3,17	3,12
	2	4,72	4,49
	3	6,49	6,34
	4	7,92	7,97
	5	9,52	9,42
	6	11,50	11,62
	7	13,10	13,38
	8	14,93	15,32
	9	16,83	17,36
	10	17,79	18,3
	11	19,40	20,15
Испытание	2	4,29	3,99
	4	7,56	7,37
	5	9,49	9,41
	7	13,12	13,28
	8	15,43	15,77
10	17,15	17,6	
среднее значение		11,32	11,46
погрешность (стандартное отклонение)		0,34	

Таблица 1 – Разница между расчётными и фактическими показателями содержания влаги для калибровочного и испытуемого блоков.

тельно плоской поверхностью, что обеспечивает однородность исследования образца спектрометром. Основными источниками неоднородности показаний анализа являются заполнение материала и размеры частиц.

Подгруппа первичных спектров, полученных с помощью спектрометра, показана на Рисунке 1. Полоса поглощения при 1940 нм принадлежит воде. Выраженность полосы зависит от величины содержания воды в материале. Спектры отстранены друг от друга. Вероятно, это происходит в связи с изменением прозрачности материала, обусловленным влагой и заполнением. Часто спектры обрабатывают, чтобы убрать вариации, которые не относятся к изучаемым свойствам. Коррекция по исходному уровню – одна из распространённых методик. Поскольку в NIR спектроскопии полосы широкие и накладывающиеся, используют дополнительные методы. Условия предварительной обработки были оптимизированы для разделения различных уровней влажности и минимизации PLS ошибок прогнозирования. Лучшим способом предварительной обработки является сглаживание по методу Savitsky-Golay с использованием первой производной (окно с тремя точками, полином второго порядка) с последующей нормализацией диапазона. Предварительно обработанные данные показаны на Рисунке 2. Метод частных наименьших квадратов (PLS) был выбран в качестве калибровочного метода, поскольку отклик воды в порошках, по сути, является нелинейным при измерении диффузного отражения; это связано с изменением показателей преломления частиц, поглощения и размера частиц.

Для PLS модели диапазон длин волн был урезан до 1665-2232 нм. Это позволило избежать областей, в которых показатели поглощения были слишком высокими для получения оптимального сигнала.

Была сгенерирована 3-факторная PLS модель, в результате среднеквадратическая ошибка (RMSE) для экспериментальных данных составила 0,17% влаги при коэффициенте корреляции 0,999. В результате проведения валидации модели в независимом испытании была получена RMSE прогноза, 0,28%, и  $R^2$ , 0,997, см. Рисунок 3. Сопоставимые погрешности наблюдаются в стандартном методе.

Аналогичное исследование было проведено для поточного спектрометра NIR компании FOSS для контроля содержания влаги в смеси лактозы, микрокристаллической целлюлозы и воды. Смесь анализировали с помощью метода определения потери влаги при высушивании в диапазоне 5-10%. Была сгенерирована 2-факторная PLS модель, в результате среднеквадратическая ошибка (RMSE) калибровки составила 0,22% при  $R^2$ , равном 0,99. Показатель RMSE прогноза для экспериментального блока составил 0,42%, т.е., был выше. Оба результата выше, чем результаты, зарегистрированные для спектрометра. Увеличение показателя RMSE прогноза, вероятно, вызвано проблемами, связанными с внедрением лабораторного прибора для поточного оптического анализа.

### Экспресс калибровка

На основании сведений, полученных при построении полной калибровки, может быть разработан общий приемлемый метод экспресс калибровки для процесса определения конечного показателя высушивания углеродной смеси или квалификационного испытания. Целью является использование одного образца для построения рабочей модели прогнозирования. Как мы уже знаем, отклик на содержание влаги не является линейным. Поэтому необходимо сделать калибровку по трём точкам, чтобы привнести некоторый изгиб. Использование дополнительных образцов обеспечивает усреднение и общее увеличение достоверности прогнозирования калибровки. Вместе с тем, процесс приготовления и анализа дополнительных образцов занимает время. Калибровка по двум точкам может быть проведена с использованием одного образца и LOD весов для определения потери в массе при высушивании. Образец анализируют с помощью спектрометра во влажном состоянии, высушивают и определяют массу на LOD весах, охлаждают и снова анализируют с помощью спектрометра. В условиях предварительной обработки, позволяющих минимизировать нелинейность отклика в ближней ИК области спектра, может быть построена модель калибровки по двум точкам. Это может быть сделано в течение 30 минут или ещё быстрее. Мы смоделировали эту процедуру с помощью спектров самого сухого и самого влажного материала, которые были использованы при построении полной калибровки. Возможные условия предварительной обработки и параметры моделирования были протестированы с помощью перекрёстной валидации с исключением пяти.

Модели калибровки были протестированы с помощью тестового набора и могут быть непосредственно сравнены с вышеуказанными значениями. Наиболее удачные условия предварительной обработки отличаются от условий полной калибровки.

Стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением (SNV), 2-ая производная Savitzky-Golay (окно с пятью точками, полином второго порядка) и максимальная нормализация были использованы для диапазона 1759-2114 нм. Показатель SNV вносит поправку для изменений эффективной длины пути и удаляет мультипликативный эффект. Два фактора были использованы в PLS модели для объяснения изменения влаги и других вариаций. Уровень погрешности, выраженной в форме RMSE прогноза, составляет 0,61% м./м. Большая часть этой погрешности – остаточная нелинейность отклика, а не снижение точности. Это изменение условий предварительной обработки и фактор увеличения двух погрешностей вполне ожидаемы, поскольку цели калибровок различны. Для сравнения, калибровка по трём точкам была разработана с помощью той же самой методики. Дополнительным образцом был промежуточный, содержащий 11,5% м./м. воды. Оптимальные условия предварительной обработки: SNV, 1-ая производная Savitzky-Golay (окно с тремя точками, полином второго порядка) и нормализованный единичный вектор в диапазоне 1759-2114 нм. Была использована 2-факторная PLS калибровка. Погрешность прогноза составила 0,37% м./м., что немного лучше, по сравнению с калибровкой по двум точкам. Нелинейный отклик смоделирован лучше, в результате показатель RMSE прогноза более низкий. Точность немного увеличена, см. Рисунок 4. Различия нормализации подчёркивают различные особенности спектра, однако, имеют сходный эффект.

### Закключение

Точная калибровка для определения влаги в углеводородах может быть проведена с помощью спектрометра и одного образца в среднем за 30 минут. Показатели RMSE прогноза для калибровки по 11, 3 и 2 точкам сходны, и обеспечивают устойчивую PLS калибровку для диапазона содержания влаги 3-20% м./м., что достаточно для определения конечного показателя высушивания, добавления влаги и гранулирования углеводородных материалов. Калибровка может быть проведена за более короткий промежуток времени, чем стандартный метод, если используется один образец. В этом случае точность сопоставима со стандартным методом, и при этом появляется преимущество быстрого проведения оценки.

Эти калибровки наиболее применимы для исходной оценки влажности образцов из нескольких контейнеров или определения конечного показателя высушивания, если процессы продолжительны или существует необходимость отбора нескольких образцов. NIR анализ обладает такими преимуществами, как точность и быстрота процедуры. Как и любые другие дополнительные методы, эти калибровочные процедуры не учитывают вариабельность от серии к серии. Повторное построение калибровок для нескольких серий и архивирование спектров для последующих анализов позволит вывести калибровки на уровень, при котором они будут устойчивыми и смогут быть использованы без необходимости перекалибровки по двум точкам.

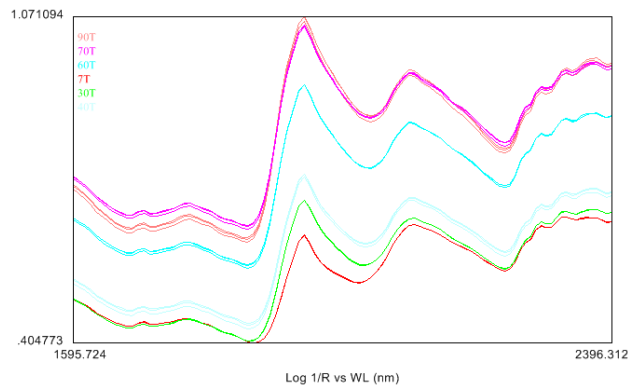


Рисунок 1. Необработанные спектры образцов с различным % содержания влаги

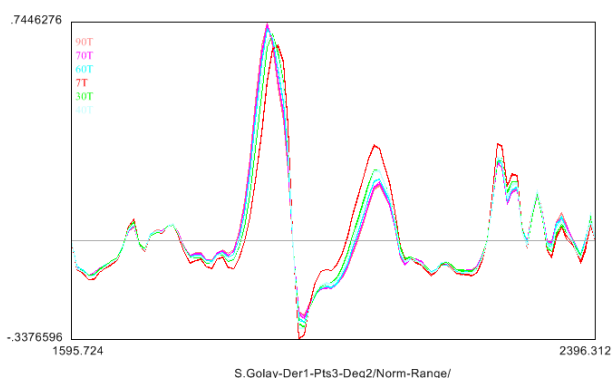


Рисунок 2. Предварительно обработанные спектры образца

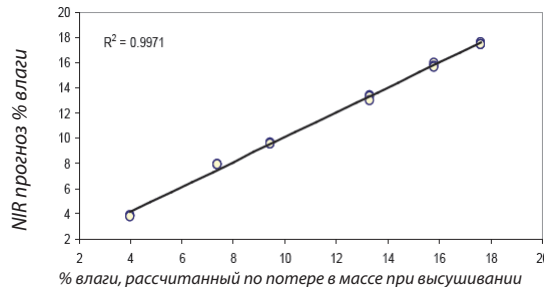


Рисунок 3. Сравнение прогноза и значений LOD испытываемых образцов. Показатель RMSE прогноза = 0,28 м./м.

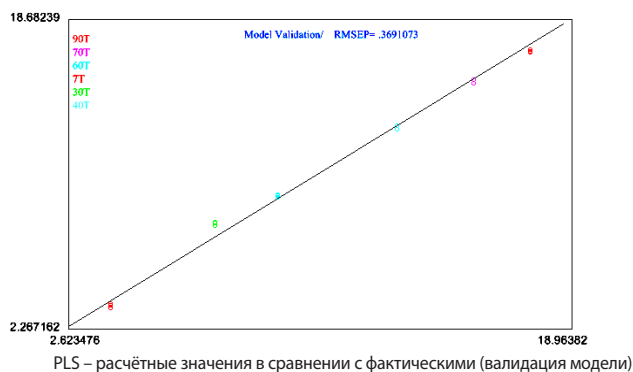


Рисунок 4. Результаты прогноза для калибровки по трём точкам

© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc. Все права защищены. Все торговые марки являются собственностью компании Thermo Fisher Scientific Inc. и её дочерних организаций. Спецификации, условия и расценки могут быть изменены. Не все продукты доступны во всех странах. Для получения подробной информации, пожалуйста, обратитесь к местному дистрибьютеру.