



Τεχνική Αναφορά ΤΔ003.01

Φασματοσκοπική ταυτοποίηση φαρμακευτικών ουσιών και εκδόχων Βιομηχανική εφαρμογή φασματοσκοπίας ATR

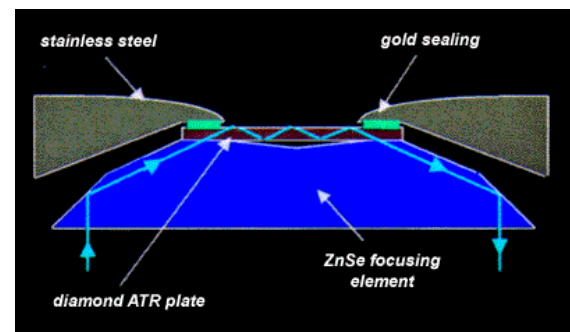
Η φαρμακοβιομηχανία υποχρεώνεται από την νομοθεσία να προβαίνει σε ενδελεχή χαρακτηρισμό των πρώτων υλών που χρησιμοποιεί ανά παρτίδα και περιέκτη. Σε πολλές περιπτώσεις ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση γίνεται μέσω των δονητικών φασμάτων υπερύθρου. Η παρούσα αναφορά εστιάζεται στην ορθή κατάστρωση και αποτελεσματική εφαρμογή μεθοδολογιών ταυτοποίησης φαρμακευτικών πρώτων υλών με φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (mid-infrared, IR).

Ο συνηθέστερος τρόπος συλλογής φασμάτων IR είναι με την διάταξη της διαπερατότητας. Ωστόσο μόνο ορισμένα υλικά συσκευασίας είναι αρκετά διαφανή και λεπτά ώστε να επιτρέπουν την διέλευση της δέσμης υπερύθρου και την συλλογή αξιόπιστου φάσματος. Εναλλακτικά, οι περισσότεροι χρήστες προβαίνουν στην αραίωση του δείγματος τους με βρωμιούχο κάλιο (KBr) και την παρασκευή δείγματος σε μορφή δισκίου (πελέτας). Η διαδικασία ενέχει σοβαρά μειονεκτήματα: Δεν εφαρμόζεται σε υδατογενή δείγματα λόγω της υγροσκοπικότητας του KBr. Δεν εφαρμόζεται σε κηρώδεις ουσίες επειδή αυτές δεν μπορούν να λειοτριβηθούν. Είναι δυνατόν να προκαλέσει υδρόλυση ή ιονεναλλαγή του δείγματος. Δεν είναι επαναλήψιμη. Το δείγμα δεν είναι ανακτήσιμο μετά την μέτρηση. Τέλος, είναι χρονοβόρα και ακατάλληλη για την μέτρηση μεγάλου αριθμού δοκιμίων.

Η ιδανική μέτρηση του φάσματος υπερύθρου πρέπει να μην απαιτεί προετοιμασία του δείγματος, να εφαρμόζεται εξ ίσου σε στερεά, κόνιες και υγρά, να είναι επαναλήψιμη και μη καταστροφική για το δείγμα. Η κατ' εξοχήν μέθοδος συλλογής φασμάτων που συνδιάζει όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα είναι γνωστή ως **Αποσβεννύμενη Ολική Ανάκλαση** (Attenuated Total Reflectance, **ATR**).

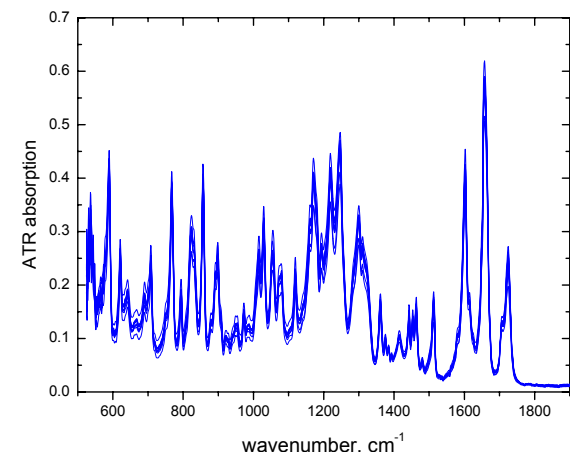
Συνοπτικά, το δείγμα έρχεται σε επαφή με κρύσταλλο υψηλού δείκτη διάθλασης, περατό στο υπέρυθρο, μέσα από τον οποίο διέρχεται η οπτική δέσμη υπό γωνία ολικής ανάκλασης

Σχήμα 1). Η δέσμη δημιουργεί ένα στάσιμο κύμα στην μεσεπιφάνεια κρυστάλλου δείγματος το οποίο συλλέγει το φάσμα του υλικού από ένα εξαιρετικά μικρό «βάθος διείσδυσης» της τάξης των λίγων μικρών. Δείγματα σε μορφή σκόνης ή υμένια συγκρατούνται σε επαφή με τον κρύσταλλο με την βοήθεια ειδικής πρέσσας.



Σχήμα 1. Ενδεικτική τομή διάταξης ATR με διαμάντι τριών ανακλάσεων. Η δέσμη υπερύθρου οδηγείται μέσω ενός στοιχείου εστίασης από ZnSe σε κρύσταλλο από διαμάντι υπό γωνία ολικής ανάκλασης.

Τυπικά, τα φάσματα που συλλέγονται με την τεχνική ATR απαιτούν χρόνο συλλογής 1-2 λεπτών και μηδενικό χρόνο προετοιμασίας. Είναι συνεπώς δυνατή η συλλογή μεγάλου αριθμού φασμάτων με ασφάλεια, ταχύτητα, και υψηλή επαναληψιμότητα.

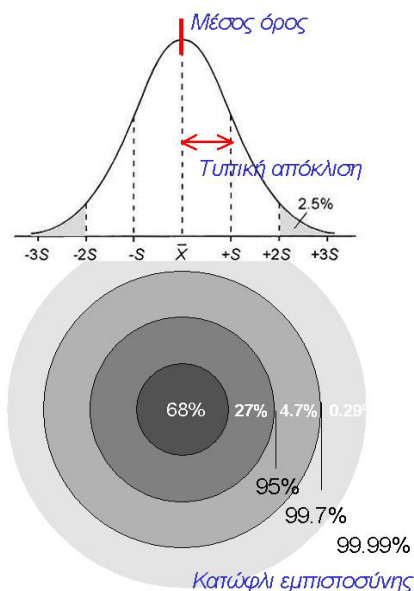


Σχήμα 2. Σύγκριση 11 διαφορετικών παρτίδων / περιεκτών φαρμακευτικής ουσίας μέσω των φασμάτων ATR. Τα φάσματα έχουν συλλεγεί με εξάρτημα διαμαντιού απλής ανάκλασης

Η υψηλή πιστότητα των φασμάτων ATR φαίνεται στο Σχήμα 2, όπου παρατίθενται τα φάσματα 11 δειγμάτων φαρμακευτικής δραστηριότητας που αντιστοιχούν σε διαφορετικές παρτίδες και περιέκτες. Παρά την πολυπλοκότητα της φασματικής υπογραφής, είναι φανερό ότι τα φάσματα εμφανίζουν **υψηλό βαθμό ομοιότητας**: Αν ένα από τα υλικά που μελετήθηκαν ήταν αποδεκτό «πρότυπο» της ουσίας, ο αναλυτής θα είχε την τάση να ταυτοποιήσει θετικά όλα τα υπόλοιπα.

Πρέπει να επισημανθεί ότι η παραπάνω (εξαιρετικά συνηθισμένη) προσέγγιση, η οποία στηρίζεται στην οφθαλμοφανή εκτίμηση του βαθμού ομοιότητας, ενέχει σημαντικούς κινδύνους: Δεν είναι ικανή να εντοπίσει διαφορές ανάμεσα σε υλικά με παρεμφερή χημική δομή (π.χ. σειρά εκδόχων πολυαιθυλενογλυκολών PEG με μικρές διαφορές στο μοριακό βάρος), ούτε είναι ικανή να προσδιορίσει δείγματα που ενδεχομένως εμφανίζουν μερική χημική υποβάθμιση (υδρόλυση, φωτοαποδόμηση κλπ.).

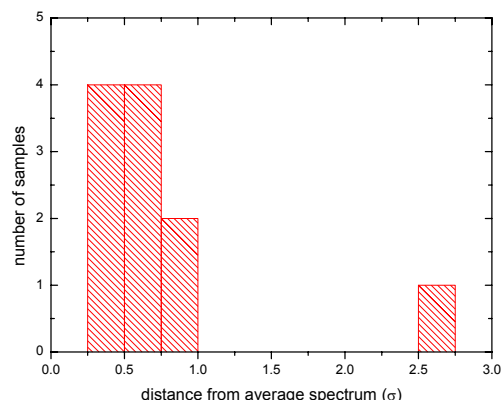
Είναι προφανές ότι απαιτείται **ποσοτική αποτίμηση του βαθμού ομοιότητας** ως προς συγκεκριμένα φασματοσκοπικά κριτήρια. Αυτό επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό της στατιστικής κατανομής των φασμάτων που αποδίδει το «μέσο φάσμα» και την τυπική απόκλιση γύρω από αυτό (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Στατιστική κατανομή, τυπική απόκλιση, % πληθυσμοί και κατώφλια εμπιστοσύνης γύρω από τον μέσο όρο.

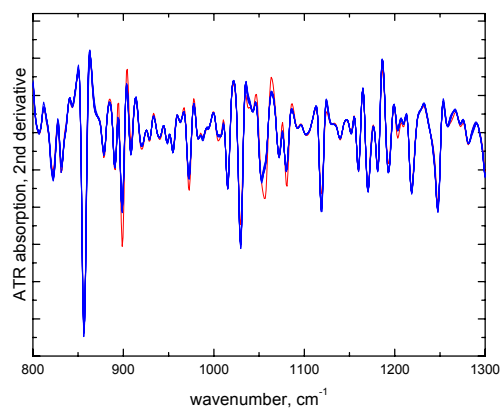
Ο υπολογισμός της κατανομής (με βάση φασματοσκοπικά κριτήρια) επιτρέπει την μέτρηση της απόστασης του αγνώστου δείγματος από τον μέσο όρο των γνωστών, και την έκφρασή της ως πολλαπλάσιο της τυπικής

απόκλισης της κατανομής. Η στατιστική επεξεργασία των φασμάτων του Σχήματος 2, με κριτήριο την 2^η παράγωγο της απορρόφησης στην περιοχή 600-1600 cm⁻¹, δίνει τιμή της τυπικής απόκλισης $\sigma=0,064$. Η κατανομή των αποστάσεων των 11 δειγμάτων από τον μέσο όρο τους (Σχήμα 4) δείχνει ότι ένα από τα δείγματα απέχει από τον μέσο όρο απόσταση μεγαλύτερη του 2.5σ, και συνεπώς η πιθανότητα να ανήκει στην κατανομή είναι μικρότερη από 1.24 %!



Σχήμα 4. Αποστάσεις των φασμάτων του Σχ. 2 από τον μέσο όρο τους, εκφρασμένες ως πολλαπλάσια της τυπικής απόκλισης σ . Το δείγμα στα δεξιά της εικόνας αποκλίνει από την κατανομή με κατώφλι εμπιστοσύνης >98.8%

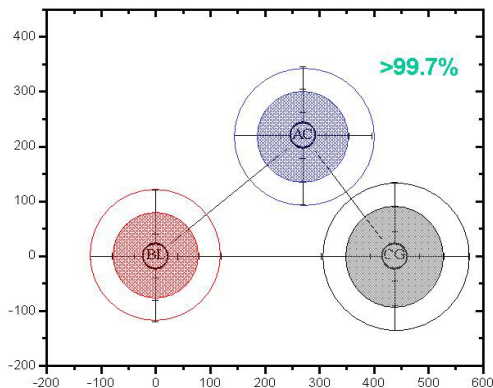
Η απόκλιση του συγκεκριμένου δείγματος (η οποία αποδίδεται σε προϊόντα διάσπασης της δραστηριότητας) είναι εμφανής στο Σχήμα 5, που απεικονίζει τα φάσματα στην περιοχή του κριτηρίου σύγκρισης.



Σχήμα 5. Απεικόνιση των 11 φασμάτων του Σχήματος 1, στην περιοχή του κριτηρίου σύγκρισης. Το φάσμα του δείγματος που αποκλίνει εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα.

Η ίδια στατιστική προσέγγιση επιτρέπει την κατάστρωση φασματοσκοπικών μεθοδολογιών ταυτοποίησης που περιλαμβάνουν περισσότερους πληθυσμούς, συχνά δεκάδες ή εκατοντάδες. Στο Σχήμα 6 απεικονίζεται ο αλγόριθμος διάκρισης τριών πληθυσμών με εμπιστοσύνη καλύτερη από 3σ (99.7%). Περισσότεροι πληθυσμοί δεν είναι δυνατόν να

αποδοθούν σε δύο διαστάσεις, αλλά ο χειρισμός τους είναι απλός με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού. Το φάσμα του αγνώστου δείγματος «τοποθετείται» ως προς τα μέσα φάσματα των πληθυσμών, και η απόστασή του από αυτά αξιολογείται με βάση τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις.



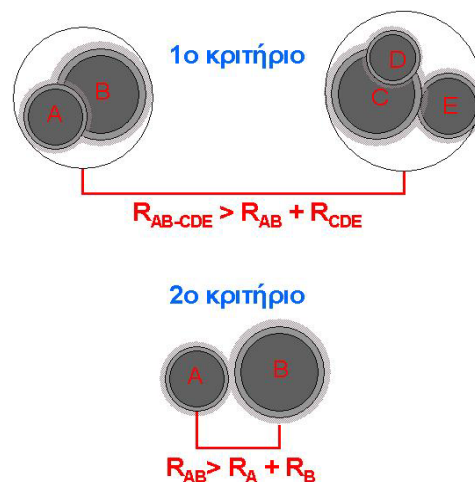
Σχήμα 6. Αλγόριθμος ταυτοποίησης τριών υλικών. Οι εξωτερικές διάμετροι των κύκλων αντιστοιχούν σε κατώφλι εμπιστοσύνης 3σ (99.7%)

Η εφαρμογή ενός μοναδικού κριτηρίου στην περίπτωση των πολλών πληθυσμών, οδηγεί συχνά στην υποδιαίρεσή τους σε διακριτά υποσύνολα επικαλυπτόμενων πληθυσμών που χαρακτηρίζονται από παρεμφερή χημική δομή (π.χ. υδατάνθρακες). Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την κατάστρωση και εφαρμογή **ιεραρχικής σειράς κριτηρίων**, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.

Από τα παραπάνω καθίσταται προφανές ότι η έννοια του «**προτύπου δείγματος**» έχει μικρή αξία στην εφαρμογή των φασματοσκοπικών (και όχι μόνον) μεθοδολογιών ταυτοποίησης, και θα πρέπει να αντικατασταθεί με την έννοια της «**αποδεκτής στατιστικής κατανομής**».

Το γεγονός ότι η φαρμακοβιομηχανία διατηρεί αρχείο πρώτων υλών και προϊόντων ανά παρτίδα, διευκολύνει την συλλογή φασμάτων, την στατιστική τους επεξεργασία και την κατάστρωση του αλγορίθμου ταυτοποίησης

μέσω του προσδιορισμού της κατάλληλης ιεραρχίας κριτηρίων.



Σχήμα 7. Ιεραρχική σειρά κριτηρίων ταυτοποίησης. Η εφαρμογή του πρώτου κριτηρίου επιτρέπει την διάκριση των υποομάδων AB και CDE, αντιμετωπίζοντάς τις ως ψευδοκανονικές κατανομές. Εάν το δείγμα ταυτοποιηθεί ως AB, η εφαρμογή δεύτερου κριτηρίου επιτρέπει την διάκριση του A από το B.

Τόσο τα φάσματα υπερύθρου όσο και τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης αποτελούν σε βάθος χρόνου σημαντικό **αποθετήριο πληροφορίας** για την εταιρεία διότι επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς το εύρος της κατανομής των πρώτων υλών, τον συσχετισμό του με τους προμηθευτές ή τις συνθήκες αποθήκευσης κλπ. Προϋπόθεση για αυτό είναι η περιοδική **επαναξιολόγηση** και «**συντήρησή**» των αλγορίθμων ταυτοποίησης, από προσωπικό με επαρκή κατάρτιση. Η συντήρηση διασφαλίζει την **επικαιροποίησή** τους ως προς το μέγεθος και τον αριθμό των πληθυσμών που περιλαμβάνουν. Η επαναξιολόγηση αποσκοπεί στην επαναρρύθμιση των κριτηρίων αξιολόγησης με στόχο την καλύτερη δυνατή ταύτιση των στατιστικών κατωφλίων εμπιστοσύνης με τις επιθυμητές προδιαγραφές.

Το Εργαστήριο Φασματοσκοπικών Εφαρμογών του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ παρέχει ερευνητικές υπηρεσίες σε βιομηχανικούς φορείς που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων: τον χαρακτηρισμό (ταυτοποίηση, conformity) πρώτων υλών, ενδιάμεσων και προϊόντων με γρήγορο και μη καταστρεπτικό τρόπο, ανά παρτίδα, ακόμα και ανά περιέκτη, την ανάπτυξη ειδικών μεθοδολογιών ποιοτικού & ποσοτικού ελέγχου που στηρίζονται σε φασματοσκοπικές τεχνικές (συνήθως φασματοσκοπία NIR) και χημειομετρία, καθώς και τον σχεδιασμό έμπειρων αυτοματοποιημένων συστημάτων για την on line παρακολούθηση της παραγωγής. Επίσης παρέχει συμβουλευτικές υπηρεσίες για την διείσδυση σε νέες αγορές μέσω της ανάπτυξης προϊόντων και διεργασιών υψηλής προστιθέμενης αξίας, συμμετέχει σε δράσεις τεχνομεστειίας, εκπαίδευσης και κατάρτισης προσωπικού, και αναλαμβάνει συμβουλευτικό ρόλο στην αξιολόγηση νέων τεχνολογιών ή αποτελεσμάτων τρίτων. Για τις υπηρεσίες αυτές το Εργαστήριο αναζητεί, και σε πολλές περιπτώσεις δημιουργεί, την ζήτηση της αγοράς μέσω των συστηματικών επαφών με στελέχη του βιομηχανικού R & D, της υλοποίησης διερευνητικών έργων, της ανάληψης έργων μεσοπρόθεσμης διάρκειας και, τέλος, της ανάληψης υπεργολαβιών μακροχρόνιας συνεργασίας.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις βιομηχανικές εφαρμογές της δονητικής φασματοσκοπίας επισκεφθείτε την ιστοσελίδα <http://www.eie.gr/nhrf/institutes/tpci/researchteams/mspc/mspc-asl-gr.html> ή επικοινωνήστε με τους ερευνητές του ΕΙΕ Β. Γκιώνη (210-7273820, vaionis@eie.gr) ή Γ. Χρυσικό (210-7273819, gdcnryss@eie.gr)