

**PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ SPEKTROSKOPII
W ZAKRESIE BLISKIEJ PODCZERWIENI W ANALIZIE
WILGOTNOŚCI ŚLADOWEJ W PRODUKTACH
LECZNICZYCH WETERYNARYJNYCH
IMMUNOLOGICZNYCH**

REVIEW OF APPLICATIONS OF NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY IN ANALYSIS OF RESIDUAL
MOISTURE IN IMMUNOLOGICAL VETERINARY
MEDICINAL PRODUCTS

**Krzysztof Bulenger*, Bogumił Biernacki,
Dorota Marta Krasucka, Jakub Szumiło, Beata Cuvelier**

*Zakład Farmacji Weterynaryjnej, Państwowy Instytut Weterynaryjny –
Państwowy Instytut Badawczy
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
e-mail: Krzysztof.Bulenger@piwet.pulawy.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wstęp

1. Teoretyczne podstawy spektroskopii NIR
2. Widma absorpcyjne a wilgotność śladowa
3. Metoda referencyjna Karla Fischera a NIRS
4. Budowa modelu kalibracyjnego

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Krzysztof Bulenger jest absolwentem Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Od 2015 roku pracuje w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego i zajmuje się badaniami fizykochemicznymi produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych.

Dr n.wet. Bogumił Biernacki jest absolwentem Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od szeregu lat zajmuje się zagadnieniami z zakresu toksykologii prenatalnej, analityki pozostałości leków weterynaryjnych w żywności oraz farmacji weterynaryjnej.

Dr n.wet. Dorota Marta Krasucka jest absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od 2006 pracuje w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach jako adiunkt. Jest autorem wielu publikacji z dziedziny farmacji weterynaryjnej.

Mgr Jakub Szumiło jest absolwentem Uniwersytetu Śląskiego. Od 2015 roku pracuje w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego i zajmuje się badaniami fizykochemicznymi produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych.

Prof. dr hab. Beata Cuvelier jest absolwentką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Od 1981 roku pracuje w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach. Pełni funkcję kierownika Zakładu Farmacji Weterynaryjnej a także Redaktora Naczelnego czasopisma naukowego Journal of Veterinary Research.

ABSTRACT

However, the infrared radiation has been discovered more than 200 years ago, near-infrared spectroscopy (NIRS), as a useful method, was recognized in the 1960s. Currently, under the influence of technological development, quantitative and qualitative methods require short time and precision of measurements. NIRS has a growing recognition in the industry, particularly pharmaceutical where each component of the finished product has impact on the quality and safety of the product. Freeze-dried immunological veterinary medicinal products (IVMPs), despite high specificity, contain not too complicated matrices for analysis. Karl Fischer titration is routinely used as accurate and effective method to determine the water content in the IVMPs, but the use of near-infrared spectroscopy allows to avoid the adverse impact of environmental factors on the measurements. However, for NIRS, there is a need to create a calibration model which will be precise for high diversity of samples. The most important is the optimization of the model by eliminating the factors that might influence the measurement of water content. Quantification methods most frequently used are: MLR, PLS and PCR, which are preceded by the appropriate pretreatments (derivatives of Savitzky Golay).

Keywords: near infrared spectroscopy, Karl Fischer titration, quantitative models, residual water determination

Słowa kluczowe: spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni, miareczkowanie Karla Fischera, modele ilościowe, oznaczanie wody śladowej

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

NIRS	– spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (ang. <i>near infrared spectroscopy</i>)
PLWI	– produkty lecznicze weterynaryjne immunologiczne (ang. IVMPs)
IR <i>tion</i>)	– promieniowanie podczerwone (ang. <i>infared radia-</i>
MIR	– średnia podczerwień (ang. <i>mid infrared</i>)
FIR	– daleka podczerwień (ang. <i>far infrared</i>)
KFT	– miareczkowanie Karla Fischera (ang. <i>Karl Fischer titration</i>)
SNV	– transformacja SNV (ang. <i>Stadard Normal Variate</i>)
MSV	– trasformacja MSV(ang. <i>Multivariate Stochastic Volatility</i>)
MLR	– wielokrotna regresja liniowa (ang. <i>multiple linear regression</i>)
PCR	– regresja głównych składników (ang. <i>principal component regression</i>)
PLS	– regresja częściowych najmniejszych kwadratów (ang. <i>partial least squares</i>)
PCA	– analiza głównych składowych (ang. <i>principal component analysis</i>)
R2	– współczynnik determinacji (ang. <i>coefficient of determination</i>)
RMSEC	– średni błąd kwadratowy kalibracji (ang. <i>Root Mean Square Error of Calibration</i>)
RMSECV	– średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej (ang. <i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>)
RER	– błąd zakresu (ang. <i>response- error relationship</i>)
SEP	– standardowy błąd predykcji (ang. <i>standard error of prediction</i>)

WSTĘP

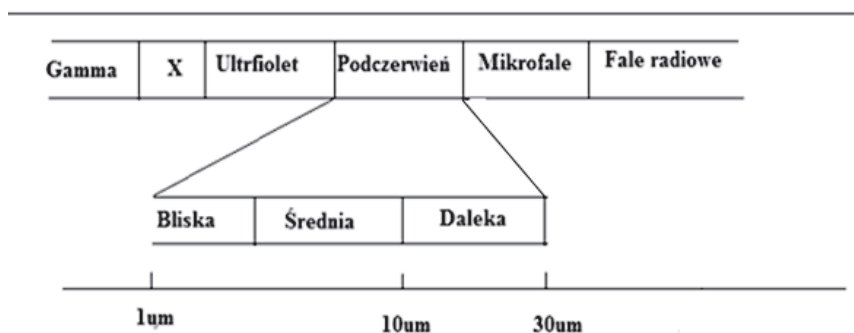
Spektroskopia jest to nauka a zarazem metoda analityczna zajmująca się analizą widm powstających w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią. Opiera się na zjawisku selektywnej absorpcji promieniowania przez próbkę. Jedną ze szczególnych metod spektroskopowych jest spektroskopia w bliskiej podczerwieni. Promieniowaniem podczerwonym (IR) określa się promieniowanie elektromagnetyczne, o długościach fali większych od widzialnych promieni czerwonych i mniejszych od najkrótszych fal radiowych. Przyjmuje się umownie, że obszar promieniowania podczerwonego obejmuje fale o długościach od około 0,74 μm do 2000 μm . IR dzieli się na: bliską podczerwień (NIR) 14 300–4000 cm^{-1} (700–2500 nm), średnią (właściwą) podczerwień (MIR) 4000–700 cm^{-1} (2500–14 300 nm) oraz daleką podczerwień (FIR) 700–200 cm^{-1} (14 300–50 000 nm) (Rys. 1) [1].

Odkrywcą IR był fizyk i kompozytor William Frederik Herschel (1800 r.) [2]. Badając temperaturę promieniowania słonecznego w różnych pasmach światła widzialnego – od fioletowego do czerwonego – zauważył, że najwyższe wskazania uzyskuje się dla termometrów ustawionych tuż za czerwonym krańcem widma słonecznego. To odkrycie opisał w pracy „Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the Sun” (Doświadczenia dotyczące załamania się niewidzialnych promieni słonecznych). Eksperyment doprowadził do odkrycia promieniowania IR. Po raz pierwszy zauważono istnienie formy światła niewidzialnego dla ludzkiego oka. Krokiem milowym dla rozwoju spektroskopii bliskiej podczerwieni było odkrycie i zarejestrowanie przez Abneya i Festinga w 1881 r. widma organicznych związków w zakresie 700–1200 nm [3]. Badacze ci wykazali obecność organicznych grup funkcyjnych, szczególnie wodoru, w widmie NIR. Prawdziwy rozwój spektroskopii bliskiej podczerwieni nastąpił jednak po drugiej wojnie światowej. W 1960 r. Karl Norris z Amerykańskiego Departamentu Rolnictwa wykazał możliwość stosowania spektroskopii NIR do oznaczania zawartości wody w produktach rolnych. Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (NIRS) obecnie jest jednym z głównych narzędzi analitycznych we współczesnych laboratoriach. Wykorzystywana jest do analizy fizykochemicznej zarówno produktów, jak i surowców. Istotą działania tej metody jest absorpcja promieniowania podczerwonego przez badany materiał, dzięki której możliwa jest analiza zawartości takich składników jak woda, węglowodany czy białka. NIRS jest techniką o szerokim zastosowaniu w przemyśle kosmetycznym, petrochemicznym, spożywczym i farmaceutycznym. Z uwagi na fakt, iż przemysł farmaceutyczny posiada bardzo restrykcyjne wymagania dotyczące kontroli jakości, zarówno surowców jak i gotowych produktów, oczywistym jest coraz większe zainteresowanie NIRS [4, 5]. Liofilizaty produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych (PLWI) ze względu na posiadane właściwości fizykochemiczne są bardzo dobrym przykładem pokazującym szerokie możliwości zastosowania bliskiej podczerwieni. Liofilizacja jako proces suszenia sublimacyjnego zamrożonych substancji, podczas którego

rozpuszczalnik jest usuwany pod wpływem niskiego ciśnienia i zmniejszonej temperatury to proces bardzo dobrze poznany. W jego efekcie wzrasta stabilność przechowywania produktów niestabilnych hydrolytycznie. Przykładem tego są produkty lecznicze weterynaryjne immunologiczne, które po procesie liofilizacji zawierają niewielką ilość wody (0,5–5%). Wilgotność to parametr, który wpływa nie tylko na wygląd i jakość szczepionki, ale również na jej okres ważności. Istnieje wiele doniesień potwierdzających wpływ wilgotności śladowej na stabilność wirusów i białek. Wykazano, że zarówno zbyt wysoka, jak i zbyt niska zawartość wody negatywnie wpływa na miano wirusa grypy, co potwierdzają późniejsze badania dotyczące stabilności innych wirusów i białek. Zaobserwowano również, że ekspozycja liofilizowanego ludzkiego fibrynogenu na wilgoć powoduje jego zmiany strukturalne. W zależności od wartości wilgotności względnej obserwowano zmiany w strukturze α -helisy i β -kartki [6–11]. Mając na uwadze szerokie możliwości spektroskopii bliskiej podczerwieni zasadniczym celem poniższej pracy było zestawienie możliwych jej zastosowań w analizie śladowej wody. Szczególnie ważne jest podkreślenie istotnej roli NIRS we współczesnej analityce, biorąc pod uwagę zarówno aspekty praktyczne, jak i doniesienia naukowe opisujące zastosowanie różnych matryc w oznaczaniu zawartości wody i narzędzi matematycznych analizujących zebrane dane.

1. TEORETYCZNE PODSTAWY SPEKTROSKOPII NIR

Istotą spektroskopii bliskiej podczerwieni jest zjawisko pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego przez związki chemiczne. Dzięki temu możliwe jest określenie parametrów ilościowych i jakościowych badanego produktu.



Rysunek 1. Widmo promieniowania elektromagnetycznego [5]

Figure 1.

Teoretyczne podstawy spektroskopii oscylacyjnej, w tym również w zakresie NIR, opisuje mechanika kwantowa. W wyniku absorbowanego promieniowania w zakresie podczerwieni następuje wzbudzenie elektronów w cząsteczce, co skutkuje zmianą energii oscylacyjnej i rotacyjnej. Powyższą sytuację dobrze opisuje oscylator

harmoniczny. Prezentuje jednak model, w którym siła przeciwdziałająca odkształceniom wiązania jest proporcjonalna do wartości tego odkształcenia. Trudno powyższą sytuację odnieść do warunków rzeczywistych, gdzie oscylacja jest tłumiona, a drgania cząsteczek wraz z upływem czasu posiadają coraz mniejszą amplitudę. Wobec powyższego lepszym modelem jest oscylator aharmoniczny, który obrazuje rzeczywiste oscylacje cząsteczek. Absorpcja promieniowania podczerwonego następuje, gdy układ będący dipolem oscylując zmienia moment dipolowy. Wodór będąc najbliższym atomem oscyluje z największą amplitudą. Na widmach w zakresie podczerwieni występują pasma absorpcyjne pochodzące od drgań podstawowych, nadtonów i kombinacyjnych. Dla zakresu bliskiej podczerwieni charakterystyczne są dwa ostatnie. Pasma nadtonów są wynikiem przejścia układu drgającego ze stanu podstawowego na drugi lub wyższy poziom energetyczny. Oddziaływanie co najmniej dwóch oscylatorów dających wspólny pik na widmie absorpcyjnym charakteryzuje pasma kombinacyjne [6].

Do pomiarów używany jest spektrofotometr zbudowany ze źródła światła, monochromatora, który emituje promieniowanie elektromagnetyczne o odpowiedniej długości fali, kuwety pomiarowej i detektora połączonych z systemem rejestrującym i obliczeniowym. Obecnie duża część przyrządów pomiarowych dla zakresu NIR oparta jest na transformacie Fouriera i nie posiadają monochromatora. Badana próbka jest umieszczona w celi pomiarowej pomiędzy źródłem promieniowania a detektorem. Istnieją trzy tryby pomiaru: transmisyjny, odbiciowy i transflektancji. Tryb transmisyjny opiera się na pomiarze spadku natężenia promieniowania o danej długości fali w wyniku przejścia promieniowania przez badaną próbkę. W tym trybie najczęściej badane są tabletki, zawiesiny, żele i ciecze. Próbka umieszczona jest pomiędzy źródłem promieniowania i detektorem. Tryb odbiciowy mierzy stosunek natężenia światła odbitego od próbki do natężenia światła odbitego od tła lub próbki o zdefiniowanych właściwościach odbiciowych. Promieniowanie bliskiej podczerwieni przenika w głąb próbki i jest częściowo absorbowane, a następnie ulega odbiciu w kierunku detektora. Technika odbiciowa wykorzystywana jest głównie do badania past, zawiesin, proszków i tabletek. Połączeniem techniki odbiciowej z transmisyjną jest tryb transflektancji. Promieniowanie przechodząc przez próbkę jest odbite za pomocą zwierciadła w kierunku próbki. W tym trybie bada się najczęściej zawiesiny i substancje ciekłe [12–17].

2. WIDMA ABSORBCYJNE A WIGOTNOŚĆ ŚLADOWA

Dla cząsteczki wody charakterystycznych jest 5 pasm absorpcji o długości: 760 nm, 970 nm, 1190 nm, 1450 nm i 1940 nm. Pasma te pochodzą od pierwszego nadtonu O–H wiązań rozciągających oraz od kombinacyjnych wiązań rozciągających oraz zginających: pierwszy nadton 1450 nm i drugi nadton 970 nm drgań rozciągających O–H oraz pik w zakresie 1887–1960 nm (rozciągające i zginające drgania kombinacyjne) [18, 19].

Zakres promieniowania bliskiej podczerwieni, dla którego woda wykazuje właściwości absorpcyjne jest szeroko wykorzystywany w przemyśle NIRS umożliwia badanie zawartości wody w proszkach, granulatach, tabletkach, kapsułkach oraz w roztworach i fiolkach zawierających liofilizat [17, 20–25]. Wyniki opisujące zawartość wody w liofilizatach potwierdzają korelację wyników otrzymywanych za pomocą kulometru Karla Fischera a NIRS, w szerokim zakresie bliskiej podczerwieni. Dalsze badania udowodniły, że za pomocą NIRS możliwe jest również obrazowanie zmiany położenia i orientacji wody w sieci krystalicznej [26–28]. Analiza liofilizatów zawierających różne proporcje mannitolu, sacharozy i wody potwierdziła możliwość analizy zróżnicowanych matryc za pomocą NIRS oraz możliwość oznaczania zawartości niewielkich ilości wody w skomplikowanych matrycach [29–31].

3. METODA REFERENCYJNA KARLA FISCHERA A NIRS

Metodą referencyjną, używaną do określenia wilgotności śladowej w PLWI jest metoda kulometryczna Karla Fischera (KFT). Miareczkowanie kulometryczne wody oparte jest na ilościowej reakcji wody z dwutlenkiem siarki i jodem w bezwodnym środowisku w obecności zasady o wystarczającej pojemności buforowania. Jod jest wytwarzany elektrochemicznie na anodzie przez utlenienie jodku, reagując z obecną w naczyniu reakcyjnym wodą i dwutlenkiem siarki. Ilość wody w substancji jest wprost proporcjonalna do zużytej ilości ładunku elektrycznego. Osiągnięcie końcowego punktu następuje w chwili zużycia całej ilości wody w komorze reakcyjnej i pojawia się nadmiar jodu. Jeden mol jodu odpowiada jednemu molowi wody, natomiast ładunek 10,71 C odpowiada 1 mg wody. Współczesne kulometry Karla Fischera umożliwiają szybkie wykonanie analizy z dużą dokładnością lecz niezbędne jest użycie drogich odczynników chemicznych [13, 31, 32]. Badanie wilgotności tą metodą może ponadto stwarzać wiele problemów proceduralnych np. przyleganie wody do ścianek naczynia pomiarowego powodujące przeszacowanie zawartości wody śladowej w liofilizatach. Ponadto pęcherzyki powietrza powstałe w wyniku zbyt intensywnej pracy mieszadła mogą zakłócać pomiar poprzez zmianę przewodnictwa roztworu. Dlatego też, istotnym staje się poszukiwanie nowych metod, które umożliwiają redukcję wpływu środowiska na badaną próbkę. Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni spełnia te wymagania. NIRS jako metoda alternatywna, uważana jest za jedną z najbardziej efektywnych i zaawansowanych. Powierzchnie szklane opakowań nie wpływają znacząco na przeprowadzone pomiary w bliskiej podczerwieni, dzięki czemu możliwe jest badanie próbek bez ich otwierania [21, 28, 33, 34]. Wyniki pomiarów otrzymanych z użyciem NIRS są uzależnione od czynników chemicznych i fizycznych takich jak: wilgotność, temperatura, stan skupienia, właściwości optyczne próbki, pozostałości rozpuszczalników i grubość próbki [15, 26, 35–38].

4. BUDOWA MODELU KALIBRACYJNEGO

Kalibracja jest procesem budowania modelu matematycznego w oparciu o widma próbek i wyniki uzyskane z użyciem metody referencyjnej. Pomiar właściwej próbki jest procesem bardzo prostym i niezbyt czasochłonnym. O wiele bardziej skomplikowanym aspektem pomiarów w spektroskopii bliskiej podczerwieni jest zbudowanie modelu kalibracyjnego. Kluczowa w procesie projektowania doświadczenia jest decyzja, czy istotniejszy jest dokładny pomiar, czy silny model odporny na wysokie zróżnicowanie prób. Najważniejszym zaś elementem jest obróbka surowych widm NIR. Badana próbka zostawia unikalne widmo (tzw. odcisk palca) zależny od wielu czynników np. właściwości fizykochemicznych, form krystalicznych czy stanu fazowego. Niezbędne są zatem odpowiednie algorytmy obliczeniowe, które pozwolą na uzyskanie istotnych informacji. Widma absorpcyjne, oprócz danych interesujących z punktu widzenia analityka, posiadają również tzw. szum fotometryczny. Powstaje on w wyniku interferencji czynników fizycznych i chemicznych oraz niedoskonałości sprzętu pomiarowego. Nadmierny szum fotometryczny negatywnie wpływa na rozdzielczość widm, dokładność modeli kalibracyjnych i zaburza stosunek sygnału do szumu [5, 7, 38].

Oznaczanie ilościowe badanej substancji na podstawie widma opiera się na odpowiednim modelu matematycznym. Bardzo popularnym rozwiązaniem jest zastosowanie liniowej kalibracji wielowymiarowej, która pokazuje zależność między zawartością badanego składnika, a wartościami absorpcji przy różnej długości fali. Do zbudowania modelu kalibracyjnego potrzebne są trzy zbiory danych: budujący (zestaw kalibracyjny zawierający 2/3 widm ujętych w modelu), sprawdzający (zestaw walidacyjny zawierający 1/3 widm ujętych w modelu) i oceniający jakość modelu w oparciu o próbki, które nie zostały użyte przy kalibracji i walidacji (zestaw testowy). Kluczowe jest zbudowanie odpowiedniej strategii obróbki danych, gdyż każde działanie nie pozostaje bez konsekwencji dla ostatecznej wersji modelu. Liczba próbek ujętych w modelu kalibracyjnym zależy od złożoności próbki i zakłóceń związanych np. z temperaturą pomiaru i zawartością wody. Podczas budowania modelu kalibracyjnego dla metody ilościowej wszystkie próbki powinny dawać wyniki ilościowe w zakresie metody. Najbardziej pożądane jest, aby zakres wartości próbek w modelu kalibracyjnym obejmował również wartości skrajne tzn. posiadał wartości możliwie najniższe i najwyższe w odniesieniu do próbek badanych w oparciu o model. Najlepiej aby były one poniżej, jak i powyżej oczekiwanej wartości. Reprezentacyjność próbek może być poprawiona poprzez laboratoryjne wykreowanie określonych właściwości np. poprzez zwiększenie lub zmniejszenie zawartości wody. Powiększy to zakres, w którym model będzie działał właściwie (Rys. 2).

Rysunek 2. Oryginalne widma PLWI z różną zawartością wody – zestaw kalibracyjny (zielony) i walidacyjny (niebieski)

Figure 2.

Obróbka widm składa się z kilku etapów. Pierwszą fazą jest wstępna obróbka surowych widm (ang. *pre-processing*) np. przy użyciu pierwszej pochodnej Savitzky'ego Golaya (usuwanie przesunięć linii bazowej) oraz drugiej pochodnej Savitzky'ego Golaya (korekcja przesunięcia oraz nachylenia linii podstawowej). Kolejnym etapem jest wybór metody kalibracji. W oparciu o liczbę zmiennych i występującą między nimi korelację stosuje się odpowiednie algorytmy kalibracji ilościowej. Wielokrotna regresja liniowa (MLR) najlepiej sprawdza się, gdy występuje mała liczba zmiennych i brak jest korelacji między nimi. Przy dużej liczbie zmiennych i silnej korelacji stosuje się: regresję głównych składników (PCR), regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) i analizę głównych składowych (PCA) [34, 39–44]. Ostatnim etapem w tworzeniu modelu jest jego optymalizacja i sprawdzenie. Istotny jest dobór odpowiedniej liczby czynników w oparciu o które model będzie dokonywał analizy. Zbyt duża ich liczba powoduje mały błąd w badaniu zbioru kalibracyjnego, ale tracą na tym możliwości predykcyjne modelu. Mała liczba czynników utrudnia odpowiednie dopasowanie modelu do danych. Do sprawdzenia wydajności modelu kalibracyjnego często wykorzystywana jest walidacja krzyżowa (cross validation). Istotne jest sprawdzenie dopasowania modelu do uzyskanych danych oraz błąd tego dopasowania w oparciu o odpowiednie parametry statystyczne takie jak: współczynnik determinacji (R^2), średni błąd kwadratowy kalibracji (RMSEC), średni błąd kwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) oraz zależność odpowiedzi od błędów (RER). Im mniejsza wartość RMSEC i RMSECV, a wartość RER większa (powyżej 20) tym model jest lepszej jakości [5, 7, 9, 10, 45, 46]. Temat opracowania modelu kalibracyjnego i jego optymalizacji jest szeroko opisany w literaturze (Tab. 1).

Tabela 1. Przykładowe oznaczenia zawartości wody w różnych typach produktów
Table 1.

Typ próbki	Typ transformacji widma
Mięso	Do zbudowania modelu użyto 294 próbek mięsa na NIR system 6500 Silver Sping MD w zakresie 400–2500 nm. W obróbce wstępnej zastosowano pierwszą pochodną $\log 1/R$. Efekt rozproszenia w widmie skorygowano poprzez transformację SNV i przesunięcie linii bazowej (detrend correction). Zastosowano regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS), ograniczając liczbę czynników do 16. Otrzymano RPD = 5,0 [47].
Oliwa	Do zbudowania modeli użyto 159 próbek wytloczyn z oliwek, w tym 108 przydzielono do walidacji. Dane były zbierane w zakresie 1000–2500 nm przy użyciu transflektacyjnej techniki pomiarowej. Grawimetryczna metoda utraty masy była metodą referencyjną. Zawartość wody w granicach 55,4–83,4%. Dwa modele stworzono w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS). W celu zmniejszenia błędu predykcji do obróbki wstępnej użyto transformacji SNV oraz pierwszą i drugą pochodną Savitsky'ego-Golay'a. RMSECV 8,3–9,4% RMSEP 0,9–1,14% [48].

Typ próbki	Typ transformacji widma
Heparyna	W modelach użyto 44 próbek z trzech serii produkcyjnej heparyny API, dla zakresów spektralnych 1100–2300 nm, zakres zawartości wody 1,8–2,3%. Próbki przebadano na Brimrose Luminar 5030 AOTF-NIR. Metodą referencyjną była utrata masy poprzez suszenie. Stworzono 5 modeli w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS): bez obróbki wstępnej (4 czynniki PLS, RMSECV = 1,24 RMSEP = 1,11), pierwsza pochodna Savitsky'ego-Golay'a (6 czynników PLS, RMSECV = 0,73 RMSEP = 0,49), druga pochodna Savitsky'ego-Golay'a (2 czynniki PLS, RMSECV = 1,28 RMSEP = 0,99), transformacja SNV (5 czynników PLS, RMSECV = 1,14 RMSEP = 1,38), transformacja MSC (1 czynnik PLS, RMSECV = 1,23 RMSEP = 1,13) [49].
Alkohol etylowy	Próbki stanowiły wysokiej czystości bezwodny etanol i metanol. Zastosowano transflekcyjny model pomiarowy w zakresie zawartości wody 1–19%. Regresja częściowych najmniejszych kwadratów (PLS), 3 czynniki PLS dla spectrum 1120–1730 nm. SECV = 0,16%, SEP = 0,16% [50].
Liofilizat mleka	Do stworzenia modelu użyto dwie serie mleka w proszku. Pierwsza zawierała 24 próbki z referencyjną metodą suszenia, a druga 81 próbek – referencyjna metoda – wolumetryczna metoda Karla Fischera. Zakres wody 2,0–6,5%. Powtarzalność 0,018% wyższa niż uzyskana metodami referencyjnymi. Model stworzony w oparciu o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) dla różnych długości fali: 1425–1475 nm (5 czynników PLS), 1900–1950 nm (3 czynniki PLS). Walidacja krzyżowa przy zastosowaniu metody „wyrzuc jeden obiekt” [51].
Liofilizaty farmaceutyczne	<p>Przy użyciu próbek liofilizatów farmaceutycznych zawierających API stworzono trzy modele kalibracyjne oparte o regresję częściowych najmniejszych kwadratów (PLS):</p> <p>a) bez obróbki wstępnej z dziewięcioma czynnikami PLS dla regionów: 1320–1635 nm i 1850–2030 nm, RMSEC(%) = 0,175, RMSEP(%) = 0,193 b) przy obróbce wstępnej za pomocą pierwszej pochodnej z pięcioma czynnikami PLS dla regionów: 1320–1635 nm; 1850–2030 nm; c) przy obróbce wstępnej z użyciem Multiplicative Scatter Correction i pięcioma czynnikami PLS dla regionu: 1639–2355 nm (FT-NIR MPA, Bruker Optics). Zakres zawartości wody 1–8%. Referencyjnie użyto wagi grawimetrycznej, przy precyzji metody 0,1% wilgotności [46].</p> <p>W oparciu o pięć serii produkcyjnych stworzono dwa modele bazujące na regresji częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) w zakresie widma 1822–1948 nm: dla pierwszego zakresu 1–40% (w/w) i SEP = 1,85% oraz dla drugiego zakresu 1–10% (w/w), SEP = 0,42%. Metodą referencyjną była metoda Karla Fischera [52].</p>

PODSUMOWANIE

Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni w analizie produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych to obiecujący kierunek w poszukiwaniu alternatywnych metod fizykochemicznych, co znajduje swoje potwierdzenie w danych literaturowych. Obecnie w Zakładzie Farmacji Weterynaryjnej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego prowadzone są badania nad opracowaniem modeli kalibracyjnych spektroskopii bliskiej podczerwieni, które mogą być używane do badań fizykochemicznych produktów leczniczych weterynaryjnych immunologicznych. Przedstawiona praca stanowi wstęp do tematyki dotyczącej NIRS w pomiarach ilościowych wody śladowej w PLWI.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

1. M. Kolbuszewski, *Lab.*, 2009, **11**, 44.
2. W. Herschel, *Philosop. Trans. Roy. Soc.*, 1800, **90**, 284.
3. W. Abney, E.R. Festing, *Philos. Trans. Roy. Soc.*, 1881, **172**, 887.
4. K.H. Norris, J.R. Hart, *Prin. Meth. Meas. Mois. Cont. Liq. Soli.*, 1965, **4**, 19.
5. P. Wrosz, A. Dopierała, J. Mazerski, *Anal.*, 2011, **3**, 24.
6. V. Wahla, O. Scheibelhofera, U. Roessla, S. Leitgeba, T. DeBeerd, J. Khinasta, *Inter. J. Pharm.*, 2015, **484**, 95.
7. Jr.R.G. Buice, T.B. Gold, R.A. Lodder, G.A. Digenis, *Pharm. Res.*, 1995, **12**, 161.
8. H. Grohgan, D. Gildemyn, E. Skibsted, J.M. Flink, J. Rantanen, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **676**, 34.
9. L. Chang, D.A. Shepherd, J. Sun, X. Tang, M.J. Pikal, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 1445.
10. M.A. Croyle, X. Cheng, J.M. Wilson, *Gene Ther.* 2001, **8**, 1281.
11. M.W.J. Derksen, P.J.M. Oetelaar, F.A. Maris, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 473.
12. P. Wrosz, Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni i klasycznej podczerwieni w analizie jakościowej i ilościowej surowców w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Rozprawa doktorska, Gdańsk 2012.
13. *European Pharmacopoeia 8.0*, 2.2.40, 62.
14. T. Demski, Wykorzystanie data mining do oceny produktów na podstawie widma NIR. Stat-Soft. Dostępny w Internecie: http://www.statsoft.pl/Portals/0/Downloads/Wykorzystanie_data_mining.pdf.
15. A. Półtorak, J. Wyrwiz, U. Ulanicka, K. Żontała, A. Stelmasiak, J. Łopacka, M. Moczowska, M. Zalewska, A. Wierzbicka, *Agricul. Engineer.*, 2013, **141**, 319.
16. X. Zhou, P. Hines, M.W. Borer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 219.
17. M.A. Czarnecki, Y. Morisawa, Y. Futami, Y. Ozaki, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 9707.
18. N. Broad, P. Graham, P. Hailey, A. Hardy, S. Holland, S. Hughes, D. Lee, K. Prebble, N. Salton, P. Warren, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
19. P. Turner, *FT- Near Infrared Spectroscopic Determination of Hydroxyl number using a fiber optic probe*, Bruker Spectroscopy Ltd. 1999.
20. O. Berntsson, G. Zackrisson, G. Ostling, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15**, 895.
21. N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.J. Eaves, W.C. Mann, W. Dziki, *Analyst*, 2000, **125**, 2054.
22. W.P. Findlay, G.R. Peck, K.R. Morris J., *Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 604.
23. J. Rantanen, O. Antikainen, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, *Pharm. Dev. Technol.*, 2000, **5**, 209.
24. X.B. Zhang, Y.C. Feng, C.Q. Hu, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **630**, 131.
25. W. Dziki, J.F. Bauer, J.J. Szpylman, J.E. Quick, B.C. Nichols, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **22**, 829.
26. M.S. Kamat, R.A. Lodder, P.P. DeLuca, *Pharm. Res.*, 1989, **6**, 961.
27. T. Norris, P.K. Aldridge, S.S. Sekulic, *Analyst*, 1997, **122**, 549.
28. H. Grohgan, M. Fonteyne, E. Skibsted, T. Falck, B. Palmqvist, J. Rantanen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 901.
29. H. Grohgan, M. Fonteyne, E. Skibsted, T. Falck, B. Palmqvist, J. Rantanen, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2010, **74**, 406.
30. D. Greiff, W.A. Rightsel, *Appl. Microbiol.*, 1968, **16**, 835.
31. *Farmakopea Polska IX*, 2.5.32, 235.
32. M. Savage, J. Torres, L. Franks, B. Masecar, J. Hotta, *Biologicals*, 1998, **26**, 119.
33. J.A. Jones, I.R. Last, B.F. MacDonald, K.A. Prebble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 1227.
34. L. Salguero-Chaparro, F. Peña-Rodríguez, *Food Sci. Technol.*, 2014, **56**, 363.
35. S. Airaksinen, M. Karjalainen, A. Shevchenko, S. Westermarck, E. Leppanen, J. Rantanen, J. Yliruusi, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 2147.

36. C.C. Corredor, D. Bu, D. Both, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **696**, 84.
37. B. Czarnik-Matusewicz, S. Pilorz, *Vib. Spectrosc.*, 2006, **40**, 235.
38. Kalibracje ilościowe i jakościowe NIR. Materiały szkoleniowe, Warszawa, 1–2 październik 2015.
39. M. Blanco, M.A. Romero, M. Alcalá, *Talanta*, 2004, **64**, 597.
40. J.H. Kalivas, *Analyt. Chim.*, 2001, **428**, 31.
41. I.R. Last, K.A. Prebble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 1071.
42. G. Reich, *Adv. Drug Deli. Rev.*, 2005, **57**, 1109.
43. Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 683.
44. L. Sukowski, NIR Based Process Analytical Technology: In-line Residual Moisture Determination for a Complete Batch Inspection of Lyophilized End-Products. Rozprawa doktorska. Basel, 2003.
45. G. Balcerowska, R. Siuda, C. Sadowski, *Acta Agrophy.*, 2008, **11**, 323.
46. J. Mantanus, E. Ziémons, P. Lebrun, E. Rozet, R. Klinkenberg, B. Streel, B. Evrard, P. Hubert, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **642**, 186.
47. M. Prevolnik, M. Škrlep, D. Škorjanc, M. Čandek-Potokar, *Tehnolog. Mesa*, 2010, **51**, 133.
48. A.S. Barros, A. Nunes, J. Martins, I. Delgadillo, *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.*, 2009, **3**, 180.
49. C. Sun, H. Zang, X. Liu, Q. Dong, L. Li, L.S. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **51**, 1060.
50. S. Cho, H. Chung, Y.A. Woo, H. J. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005, **26**, 115.
51. R. Nagarajan, P. Singh, R. Mehrotra, *J. Auto. Meth. Manage. Chem.*, 2006, **51342**, 1.
52. G.X. Zhou, Z. Ge, J. Dorwart, B. Izzo, J. Kukura, G. Bicker, J. Wyvratt, *J. Pharm. Sci.*, 2003, **92**, 1058.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 listopada 2016

