

NIRS analyysimenetelmän siirto lääketeollisuudessa

Laskennalliset menetelmät lähi-infrapuna spektrometrien
spektrien standardoimiseksi

Materiaalitekniikka/Terveysteknologian materiaalit
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Severi Anttila

Ohjaajat:
FM Mika Myrskyranta
TkT Emilia Peltola

24.04.2023
Turku

Diplomityö

Oppiaine: Materiaalitekniikka

Tekijä: Severi Anttila

Otsikko: NIRS analyysimenetelmän siirto lääketeollisuudessa

Ohjaajat: TKT Emilia Peltola, FM Mika Myrskyraanta

Sivumäärä: 45 sivua

Päivämäärä: 24.04.2023

Tiivistelmä

Lääketeollisuudessa liuottimen käyttö on erittäin runsasta ja niiden käyttöä halutaan vähentää. Liuotinvapaiden laadunvalvontamenetelmien avulla liuottimien käyttöä pystytään vähentämään. Lähi-infrapuna (NIR) spektroskopia on yksi tällaisista liuotinvapaista analyysimenetelmistä. NIR spektrin koostuessa ominais-, yli-, ja kerrannaisvärähtelyistä, analyysimallit perustuvat monimuuttujamallinnukseen.

Jokaisen värähtelyn suhde toisiinsa ja värähtelyjen intensiteetti vaikuttavat merkittävästi mallin tulokseen. Tunnistusmallin toiminta perustuu sidosten absorptioon tietyllä aallonpituudella. Jokainen molekyylin sidos absorboi säteilyä tietyllä aallonpituudella, näin jokaisella molekyylillä on omanlaisensa absorptiospektri. Pitoisuusmalli perustuu tunnistusmallissa hyödynnettävien absorptiospektrin intensiteetin analysointiin.

Monimuuttajamalliin perustuvaa analyysimallia siirrettäessä laitteelta toiselle, haasteena on laitteistojen erilaiset optiset polut. Laitteita ei pystytä valmistamaan täysin identtisiksi, eikä näin ollen laitteista johtuvaa eroa voida jättää huomioimatta. Tästä johtuen raakaspektrit eivät täysin vastaa toisiaan.

Työn tavoitteena oli esitellä matemaattisia malleja, joiden avulla eri laitteiden spektrit saadaan vastaamaan toisiaan, ja näin mahdollistetaan jo kehitettyjen analyysimallien siirtäminen laitteiden välillä. Lisäksi suoritettiin menetelmän siirron ja validoinnin menetelmän käyttöön.

Työssä menetelmä siirto PDS menetelmää hyödyntäen ei onnistunut. Siirto toteutettiin perinteisellä menetelmällä ja laitteiden optisista eroista johtuva ero sisällytettiin hyväksymiskriteereihin. Tällä tavalla toteutettuna laitteiden välinen ero on alle 3,0 %-yksikköä.

Menetelmän siirto onnistui saman laitevalmistajan kahden laitteen välillä ilman matemaattisia spektrinkäsittelyjä. Ilman spektrien käsittelyä laitteiden eroista johtuva virhe sisältyy nyt laitevirheeseen ja tiukemmilla hyväksymiskriteereillä tällä tavalla toteutettu siirto ei soveltuisi käytettäväksi. PDS menetelmä on liian järeä menetelmä kahden samalla tavalla toimivan NIR laitteen väliseen siirtoon. Tulevissa siirroissa kulmakertoimen ja virheen korjaus menetelmän käyttöä tulee tarkastella enemmän ja sen soveltuvuus arvioida syvällisemmin.

Avainsanat: NIRS, Monimuuttujamallinnus, Pitoisuusmalli, Tunnistusmalli, kemometria, menetelmän siirto, validointi

Abstract of master's thesis

Degree of program: Master's Programme in material engineering

Author: Severi Anttila

Title of thesis: NIRS method transfer in pharmaceutical industry

Thesis supervisors: DEng. Emilia Peltola, M.Sc. Mika Myrskyrinta

Number of pages: 45

Date: 24.4.2023

In the pharmaceutical industry, the use of solvents is very abundant, and the use need to be reduced. Using solvent-free quality control methods, it is possible to reduce the use of solvents. Near-infrared (NIR) spectroscopy is one such solvent-free analysis method. As the NIR spectrum consists of overtones and combination bands, the analysis models are based on multivariate modeling.

The relationship of each vibration to each other and the intensity of the vibrations significantly affect the model's result. The identification model is based on the absorption of bonds at a certain wavelength. Each molecular bond absorbs radiation at a certain wavelength; each molecule has its own absorption spectrum. The concentration model is based on the analysis of the intensity of the absorption spectrum used in the detection model.

When transferring an analysis model based on a multivariable model from one device to another, the challenge is the different optical paths of the devices. It is not possible to make the devices completely identical, and therefore the difference due to the devices cannot be ignored. Because of this, the raw spectra do not completely match each other.

The goal of the work was to present mathematical models, with the help of which the spectra of different devices can be made to match each other, and thus enable the transfer of already developed analysis models between devices. In addition, I carried out the transfer of the method and validated the method for use.

The method transfer by only using the PDS method was not successful. The method transfer was carried out using the traditional method protocol and the difference due to the optical differences of the devices was included in the acceptance criteria. Implemented in this way, the difference between the devices is less than 3.0 % units.

The transfer of the method was successful between two devices of the same device manufacturer without mathematical spectrum processing. Without processing the spectra, the error due to device differences is now included in the device error, and with stricter acceptance criteria, the transfer implemented in this way would not be suitable for use. The PDS method is too rigid for transferring between two NIR devices operating on the same platform. In future transfers, the use of the slope coefficient and the error correction method should be examined more, and its applicability assessed more deeply.

Keywords: NIRS, calibration model, quantitation model, identification model, chemometrics, method development, validation

Sisällysluettelo

1	Johdanto	7
2	Lääkeviranomaiset	9
2.1	Viranomaisten ohjeistus laadunvalvontaan NIR menetelmien osalta	10
3	Analyysimenetelmien validointi	11
3.1	Spesifisyys	11
3.2	Lineaarisuus	11
3.3	Mittausalue	12
3.4	Tarkkuus	12
3.5	Täsmällisyys	12
3.5.1	Toistettavuus	12
3.5.2	Sisäinen toistettavuus	13
3.5.3	Laboratorioiden välinen toistettavuus	13
3.6	Haavoittuvuus	13
3.7	Validointiparametrit	13
4	NIR-spektroskopia	16
4.1	Toimintaperiaate	17
4.1.1	Perusvärähtely	18
4.1.2	Ylivärähtely	19
4.2	FT-NIR spektroskopia	20
4.2.1	FT-NIR laitteisto	21
4.2.2	Mittauttavat	22
4.2.3	Spektriin vaikuttavat tekijät	22
4.2.4	Spektrin esikäsittely	23
4.3	Laskennalliset standardisointimenetelmät kalibrointien yhtenäistämiseksi	24
4.3.1	Kulmakertoimen ja virheen korjaus (SBC)- menetelmä	24
4.3.2	Shenk menetelmä	25
4.3.3	Paloittainen suora standardisointi (PDS)- menetelmä	25
5	Menetelmän siirto	27
5.1	Suunnitelma PDS menetelmää hyödyntävään siirtoon	27
5.2	Analyysimenetelmän siirron toteutus	28

5.3	Siirtoanalyysit	28
5.4	Laitteisto ja analyysimenetelmän kemometriset mallit	28
5.5	Ensisijaisen analyysimenetelmän tulokset haaste testissä	32
6	Validointi	33
6.1	Vaadittavat kriteerit	33
6.2	Tulokset	33
6.2.1	Pitoisuus mallien siirtotulokset	34
6.2.2	Näytteiden säilyvyys tulokset	37
6.3	Haaste-testi	42
7	Päätelmät	43
	Lähteet	44

Lyhenteet

EMA = European medicine agency, euroopan lääkiviranomainen

FDA = Food and Drug Administration, Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkeviranomainen

Fimea = Suomen kansallinen lääkeviranomainen

GMP = good manufacturing practise, hyvät tuotantotavat

ICH = International Council for Harmonisation, kansainvälinen harmonisoinnin neuvosto

MIR = mid-infrared, infrapunaspektrin keskimäinen osa

MRA = mutual recognition agreements, keskitetty myyntiluvan käsittely

NIR = near-infrared spectroscopy, lähi-infrapuna spektroskopia

PDS = piecewise direct standardization, paloittainen suora standardisointi

TAP = transfer of analytical procedures, menetelmän siirto

Termit:

kvalifiointi = Laitteen suunniteltu käyttöönotto

Validointi = Menetelmän toimivuuden ja luotettavuuden osoittaminen tietyissä olosuhteissa

verifiointi = Validoidun menetelmän toimivuuden varmistaminen uudessa analyysipaikassa uusilla reagensseilla.

1 Johdanto

Lääketeollisuudessa lopputuotteelta eli lääkkeeltä odotetaan erinomaista laatua. Tuotteen haluttu vaikutus on osoitettava ja sen tulee täyttää odotukset ja vaatimukset, joiden pohjalta myyntilupa tuotteelle on saatu. Tuotteen on oltava puhdas ja tarvittaessa steriili. Valmiste ei saa sisältää mitään ylimääräisiä epäpuhtauksia tai hajoamistuotteita, jotka pitkäaikaisessa käytössä voisivat vahingoittaa asiakasta. Tämän seurauksena lääketeollisuudessa keskitytään hyvin vahvasti osoittamaan laboratoriotutkimuksin tuotteen täyttävän nämä vaativat kriteerit.

Tuotteen valmistukseen käytettävät raaka-aineet tutkitaan tarkasti ennen käyttöönottoa. Tuotantolinjojen puhtaus tarkistetaan laboratoriotutkimuksin aina ennen tuotteen valmistusta. Tuotantomenetelmät ovat testattu ja validoitu täyttämään kriteerit. Näin varmistetaan, että jokaisella tuotantokerralla tuote on odotetun mukaista. Ainoastaan pieniä lopputuotteen laatuun vaikuttamatta muutoksia voi tuotantoprosessin aikana tehdä, mutta näiden muutoksien vaikutus laatuun tulee olla testattu. Tuotannon jälkeen jokainen erä analysoidaan laboratoriossa, ja näin osoitetaan tuotteen täyttävän vaatimukset myyntiin vapauttamiselle, jotka myyntiluvan edellytyksenä on asetettu.

Lääketeollisuudessa laboratorion ja analyysimenetelmien toiminta on erityisen tärkeää koko yrityksen toiminnan kannalta. Jos valmistettu erä ei täytä tiukkoja laatuvaatimuksia, on koko erä hylättävä ja hävitettävä. Lääkeaineet ovat hävitettävä ongelmajätteenä ja tämä kuormittaa erityisen paljon luontoa. Tarve varmistua raaka-aineiden, tuotannon ja lopputuotteen laadusta on siis myös yrityksen, mutta ensisijaisesti asiakkaan turvallisuuden kannalta tärkeää.

Yleisesti laboratorioanalytiikassa hyödynnetään paljon HPLC (High-performance liquid chromatography, Korkean erotuskyvyn nestekromatografia) ja GC (Gas chromatography, Kaasukromatografia) menetelmiä. Molemmat ovat kromatografisia menetelmiä, joissa tarvitaan runsaasti orgaanisia liuottimia. Laboratorion ongelmajätetuotantoa halutaan myös vähentää ja näin vähentää ympäristön kuormitusta. Ongelmajätteen vastuullinen hävittäminen on erityisen kallista, ja turhaa jätettä haluttaisiin tuottaa mahdollisimman vähän.

Orionin toiminnassa vastuullisuus on merkittävässä asemassa ja olemmekin sitoutuneet vastuullisuusohjelmassamme aktiivisesti työskentelemään ympäristön puolesta mahdollistaen kestävä kehityksen. Toimialaan liittyen vaarallisten jätteiden määrä on suuri, noin 14 000 tonnia vuosittain hävitetään vaarallisena jätteenä. Osa vaarallisesta jätteestä voidaan kierrättää ja hyödyntää lämmöntuotannossa. Suurin osa koko yrityksen vaarallisesta jätteestä syntyy

tuotannosta, ja siitä suurin osa on liuotinjätettä. Laboratoriossa syntyvistä vaarallisten jätteiden määrästä liuottimien osuus on myös suurin. Selkein ja edullisin tapa vähentää liuottimien hävityksen tarvetta on vähentää liuottimien käyttöä. Laboratoriomenetelmien osalta liuottimien käyttöä voidaan vähentää siirtymällä analyysimenetelmiin, joissa liuottimia ei tarvita. Tällaisia analyysimenetelmiä ovat esimerkiksi spektroskopiaan liittyvät menetelmät, kuten lähi-infrapuna spektroskopia (NIR), joka on yleisesti hyväksytty analytiikkakäyttöön nykyään.

NIR analyysimenetelmä verrattuna edellä mainitsemini HPLC ja GC menetelmiin, joiden tilalla NIR menetelmää voidaan hyödyntää, on myös kokonaisuudessaan edullisempi analyysimenetelmä. Siirryttäessä käyttämään NIR menetelmää HPLC menetelmän tilalla, säästöä saadaan heti investointivuoden jälkeen. NIR menetelmän käyttökustannukset ovat vain neljäsosan HPLC menetelmän käyttökustannuksista. HPLC menetelmässä näytteen ja ajoliuosten valmistukseen, sekä analyysitulosten käsittelyyn menee aikaa useita tunteja enemmän kuin NIR mittauksen tekemiseen. Liuottimia ei tarvita, joten hävitettävää vaarallista jätettä ei synny.

Työssäni perehdyn jo kehitetyn ja validoidun NIR menetelmän siirtoon. Siirrossa validoitu menetelmä siirretään käytettäväksi toisella laitteella ja toisella analyysipaikalla. Yleisesti analyysimenetelmää siirrettäessä, laitteistojen toimintakunnon osoittamisen lisäksi, osoitetaan analyysien toistettavuus. Kuuden rinnakkaisen määrittelyn keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta eikä 95 % luottamusvälin välillä saa olla liian merkittävää eroa. Monimuuttujamalliin perustuvan NIR menetelmän siirrossa on erilaiset haasteet kuin yleisesti käytössä olevien analyysimenetelmien siirrossa. Pelkästään toistettavuuden osoittaminen laitteiden välillä ei ole mahdollista, sillä menetelmässä ei ole standardia johon analyysitulosta verrataan. Laitteiden toiminnassa on pieniä eroavaisuuksia eikä kahdella laitteella mitatut spektrit ole identtisiä. Laitteiden välillä tarvitsee suorittaa spektrien laskennallinen standardisointi, jonka jälkeen uusi käytteenotettavan analyysilaitteen spektri vastaa isäntälaitteen spektriä. Tällaista menetelmänsiirtoa ole aiemmin toteutettu Orionilla. Työssäni toteutan siirron ja raportoinnin ulkopuolelle jää tulosten pohjalta tulevissa analyysisiirroissa hyödynnettävän yleismenetelmän, SOP (Standard Operating Procedure) kirjoittaminen.

2 Lääkeviranomaiset

Lääkeviranomaisten tehtävänä on valvoa lääkkeiden laatua, valmistusta, pitää huolta lääkkeiden saatavuuden varmistamisesta, informointi ja lääkehoidon korvattavuuteen osallistuminen. Suomessa kansallisena lääkeviranomaisena toimii Fimea.

Suomessa kansallisen lääkeviranomaisen Fimean strategiset tavoitteet vuodelle 2021 ovat: ”Varmistaa sekä ihmis- että eläinlääkkeiden turvallisuutta ja saatavuutta sekä lääkehoitojen järkevyyttä, edistämme Suomen terveydenhuollon etuja Euroopan lääkealan verkostoissa, tuomme innovaatioita ja neuvomme lääkealan toimijoita lääkkeen koko elinkaaren ajan osana Suomen terveysalan kasvustrategian toimeenpanoa” [1].

Fimean toiminta ja valvonta toimi perustuvat Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuksesta annettuun lakiin (593/2009), lääkelakiin (395/1987), veripalvelulakiin (197/2005) sekä kudoslakiin (101/2001), lääkkeiden velvoitevarastointilakiin (402/1984) ja huumausainelakiin (373/2008) [2].

Fimealla on runsaasti yhteistyötä Euroopan lääkevirasto EMA:n kanssa, tästä kansainvälisestä yhteistyöstä on erittäin paljon hyötyä. Lääkevalmistetta saa myydä ainoastaan maissa, joissa on viranomaisen hyväksymä lupa myydä lääkettä. Aiemmin jokaisen maan lääkeviranomaiselta on erikseen tarvinnut anoa myyntilupaa. Nykyään EMA:n keskitetyllä myyntilupahakemuksella voi saada myyntiluvan kaikkiin jäsenvaltioihin, jotka hyväksyvät keskitetyn hyväksymisprosessin [3].

EMA:n ja Yhdysvaltojen elintarvike ja lääkeviraston (FDA) yhteistyö on alkanut 2003 ja koko ajan syventynyt. 2017 yhteistyössä sovittiin MRA (mutual recognition agreements) sopimus. Sopimuksen seurauksena EMA ja FDA hyväksyvät toistensa suorittamat GMP auditoinnit. Näin molempien virastojen ei tarvitse erikseen suorittaa auditointeja, vaan FDA voi hyväksyä Fimean suorittaman auditoinnin USA:n markkinoille tarkoitettua tuotteesta.

Lääkeviranomaisten ja yritysten toiminnan helpottamiseksi ja toimintatapojen yhtenäistämiseksi vuonna 2015 perustettu ICH (International Council for Harmonisation) harmonisoi toimintatapoja yritysten ja viranomaisten välillä. ICH tarjoaa ohjeistuksia laatuun, turvallisuuteen, lääkkeentehoon osoittamiseen ja dokumenttien koostamiseen.

Kaikilta osilta harmonisointi ei ole yhteneväistä, ja Euroopalla ja Yhdysvalloilla on esimerkiksi omat farmakopeat. Euroopan farmakopea on Euroopan neuvoston julkaisu, jonka

toimittaa Strasbourgissa sijaitseva lääkkeiden laatuasioista vastaava yksikkö European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Yhdysvaltojen farmakopean toimittaa ja julkaisee FDA. Näiden maiden farmakopeoissa on hieman erilaiset suoritustavat raaka-aineiden analytiikalle ja käytettävien liuosten valmistukseen, sekä eroavuuksia analyysien aikana vallitsevan lämpötilan tai ilmankosteuden osalta.

2.1 Viranomaisten ohjeistus laadunvalvontaan NIR menetelmien osalta

ICH (International Council for Harmonisation) julkaisi päivitetyn version maaliskuussa 2022 ohjeistuksestaan ICH Q2. Uusin versio R2 on vielä lausuntokierroksella, mutta siitä voidaan jo seurata validointia suunniteltaessa. Uudessa versiossa on erityisesti lisätty monimuuttujamallien kehitystä ja niiden validointiin liittyvää ohjeistusta.

ICH Q2R2 ohjeistaa monimuuttujamallin validoinnin sisältävä ainakin kalibroinnin, sisäisen testauksen ja mallin validoinnin. Yhdessä nämä muodostavat menetelmän validoinnin.

Kalibrointi dataa hyödynnetään kalibraatiomallin rakentamisessa. Testi dataa mallin toiminnan testaamiseen ja optimointiin. Testi data tulee olla erillinen datasetti tai vaihtoehtoisesti testidata voidaan ottaa yksittäisinä arvoina kiertävällä periaatteella kalibraatiomallista. Validointiin hyödynnetään aina itsenäistä dataa. [4]

Ohjeistuksessa on myös selitetty NIR mallien kehityksessä ja validoinnissa yleiset käsitteet. Lisäksi ohjeistuksesta löytyy validointitestausten suoritukseen suositeltava testausohjeistus. [4]

EMA:n ohjeistuksessa analyysimenetelmän siirrossa kriittisesti arvioitavia mittaussparametrejä ovat: laitteiden identtisyys ja mittaussparametrien samankaltaisuus. Myös ohjelmistojen datan käsittelyn samankaltaisuus ja mittauksessa hyödynnettävän optiikan samankaltaisuus ovat kriittisiä tekijöitä menetelmän siirtoa suunniteltaessa [5].

Ohjeistuksen mukaan pienien laite-eroavaisuuksien vaikutuksesta johtuvien erojen tasoittamiseen voidaan käyttää virhe- ja kulmakertoimen korjausta tai vektorinormalisointia [5]. Jos matemaattinen korjaus ei riitä on käytettävä PDS menetelmää ja validoitava menetelmä kokonaan uudelleen. Vaihtoehtona on myös kehittää kokonaan uusi menetelmä. Jälkimmäisten vaihtoehtojen huonona puolena voi pitää sitä, että ne vaativat variaation myyntilupaan. Yleensä tämä prosessi on raskas ja aikaa vievä tapahtuma. Toki aina, jos analyysipaikkakunta muuttuu, on se ilmoitettava viranomaisille variaation avulla.

3 Analyysimenetelmien validointi

Lääketeollisuudessa kaikki analyysimenetelmät tulee validoida, eli osoitetaan menetelmien oleva sopia käyttötarkoitukseensa ja osoittaa menetelmien spesifisyys, lineaarisuus, mittausalueen laajuus, tarkkuus, toistettavuus ja haavoittuvuus. Kuvassa 1 visualisoitu menetelmän tarkkuuden ja toistettavuuden merkitystä.



Kuva 1. Visuaalinen esitys analyysimenetelmän tarkkuudesta ja toistettavuudesta. Tarkkuudessa verrataan tulosta oikeaan todelliseen pitoisuuteen ja toistettavuudessa tulosten suhdetta toisiinsa.

3.1 Spesifisyys

Spesifisyyskokeilla osoitetaan menetelmän kyky tunnistaa haluttu analyytti tutkimalla liuottimien, ja samankaltaisten yhdisteiden kuten epäpuhtauksien ja hajoamistuotteiden sekä lähtöaineiden vaikutusta analyysiin. Spesifisyysmittauksissa näyte siis sisältää kaikki lopputuotteen sisältämät aineet ja näiden vahvistava ja heikentävä vaikutus analyytin vasteelle osoitetaan. NIRS-menetelmien kehityksessä vastaavat kokeet tulee suorittaa jo menetelmää kehitettäessä, sillä lääkeaineelle tai apuaineelle ominaiset aallonpituusalueet tulee tunnistaa ja kehittää malli hyödyntäen kyseisiä aallonpituusalueita. Näin varmistetaan analyysimenetelmän soveltuvuus tuotteen analysointiin.

3.2 Lineaarisuus

Kuvaa menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Analyysimenetelmän tulee olla lineaarinen koko mittausalueella, jotta sen voidaan osoittaa olevan soveltuva analyysimenetelmäksi. Lineaarisuus tulee

osittaa visuaalisesti ja ilmoittamalla kulmakerroin, y-leikkauspiste, korrelaatiokerroin, jäännöseliösumma ja sen vapausasteet. Jäännöseliösumman, joka ilmaisee mittausten etäisyyden vaihtelua mallin odotetusta arvosta. Eli mitä pienempi jäännöseliösumma on, sitä paremmin kehitetty analyysimalli kuvaa todellisuutta. Jäännöseliösumman raportoimisen avulla voidaan vahvistaa menetelmän sopivuus. Lineaarisuuden osittamiseksi näytteet pitää mitata vähintään viideltä pitoisuustasolta.

3.3 Mittausalue

Mittausalue muodostuu alimman ja ylimmän pitoisuusnäytteen väliseltä alalta. 80 % – 120 % on tyypillinen mittausalue lopputuotteiden analytiikassa ja prosessinäytteille mittausalueena on pidetty tavallisesti hieman suurempaa aluetta 70 % – 130 %. Mittausalue voi olla myös suurempi esimerkiksi liukoisuusanalytiikassa alueen pitää olla +/- 20 % suurempi kuin ensimmäinen mitattava konsentraatio tulisi olemaan. Kyseisellä mittausalueella menetelmän tulee täyttää kaikki siltä vaadittavat validointiparametrit.

3.4 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuudessa osoitetaan useiden mittausten vertailun avulla menetelmän oikeellisuus verrattuna jo hyväksytyllä menetelmällä saatuun tulokseen, eli menetelmän kykyä antaa oikeita tuloksia. Tarkkuus muodostuu systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä, joiden summaa kutsutaan menetelmän kokonaisvirheeksi. Tarkkuuskokeesta voidaan toisinaan vaihtoehtoisesti käyttää oikeellisuus nimitystä. Ilmoitetaan tarkkuusvertailu saantoprosentteina, sekä vinouma ja 95 % luottamusvälit. Menetelmän tarkkuus on havainnollistettu kuvassa 1. Kuvassa menetelmän tarkkuus heikkenee mitä etäämmälle täsmällisestä tuloksesta mennään.

3.5 Täsmällisyys

Menetelmän täsmällisyys on erittäin oleellinen asia, jolla osoitetaan analyysimenetelmän toistettavuus paikasta, analysoijasta ja ajasta riippumatta toimivaksi. Tässä osiossa ilmoitetaan useiden ajojen keskihajonnat ja suhteellinen keskihajonta. Analyysit tehdään samasta näytteestä, mutta mittaus suoritetaan aina uudelleen.

3.5.1 Toistettavuus

Kuvaa yksittäisten tulosten eroa toisiinsa. Menetelmän toistettavuudessa ositetaan mittaustulosten paikkansapitävyyttä lyhyellä aikavälillä (yhden analyysinsuorituksen aikana)

ja tulos saadaan vertaamalla mittausten välillä ilmenevää eroa. Tässä sama näyte mitataan vähintään kuusi kertaa 100 % tasolla. Eli näyte sisältää mitattavaa ainetta yhtä paljon kuin oikea tuote. Vaihtoehtoinen tapa on mitata vähintään 3 mittausta, mutta mittauksia tulee olla kolmelta eri pitoisuustasolta. Alarajalta (70 %), todelliselta pitoisuuden tasolta (100 %) ja mittausalueen ylärajalta (130 %).

3.5.2 Sisäinen toistettavuus

Menetelmän toimivuuden kannalta on myös tärkeää, ettei sattumanvaraisilla asioilla ole vaikutusta menetelmän toimivuuteen. Sen takia on tärkeää, ettei eri analysoijalla tai mittauspäivän ajankohdalla ole vaikutusta mittaustulokseen. Yleensä tämä osoitetaan mittaamalla kuusi rinnakkaista mittausta eri päivänä ja eri analysoijan toimesta. Näin osoitetaan analyysimenetelmän toistettavuus pitkällä aikavälillä.

3.5.3 Laboratorioiden välinen toistettavuus

Kuvaa kahden eri laboratorion tulosten välistä eroa. Haluttaessa käyttää menetelmää kahdessa paikassa on se siirrettävissä validoinnin aikana tai myöhemmin lisävalidoinnilla vertaamalla kuuden rinnakkaisen analyysin keskiarvoa ja suhteellista keskihajontaa luottamusväleineen. Tällaisella menettelyllä voidaan osoittaa, ettei eri laboratoriossa tehdyillä analyysillä ole merkittävää eroa verrattuna toisiinsa.

3.6 Haavoittuvuus

Haavoittuvuuskokeilla osoitetaan, ettei tietyillä näytteeseen vaikuttavilla olosuhteilla ole vaikutusta tuloksen oikeellisuuteen. NIR analyysissä ja Divigel tuotteen osalta on poissuljettu näytteen lämpötilan vaikutus, näytevialin täyttöaste, näytteen kelpoisuusaika vialissa ja eri valmistajien vialien vaikutus. Näillä mittauksilla osoitetaan, että menetelmä toimii luotettavasti, eikä lämpötilan tai vialin täyttöasteella ole merkitystä tuloksen oikeellisuuden kannalta. Tällöin näitä ei tarvitse ottaa huomioon rutiinianalytiikassa.

3.7 Validointiparametrit

Analyysimenetelmän validointi aloitetaan menetelmän kehityksen jälkeen, kun menetelmä on todettu toimivaksi haluttuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin tarkoituksena on dokumentoidusti osoittaa kohteen toiminta toistettavasti, tarkasti ja luotettavasti ja siten

soveltuvuutensa käyttötarkoitukseen. Validoituun analyysimenetelmään ei saa tehdä mitään muutoksia ilman dokumentoitua muutostenhallintaa.

Validointiprosessi lääketeollisuudessa aloitetaan analyysimenetelmän validointisuunnitelman kirjoittamisella ja sen hyväksyttämällä. Validointisuunnitelmassa kerrotaan tarkoitus, tavoitteet ja vastuut koko validointiprossista.

Yksiselitteisesti kerrotaan tuote ja sen tarkka koostumus, sekä jokaisen yksittäisen materiaalin pitoisuus ja käyttötarkoitus tuotteessa. Kerrotaan validoinnin aikana tuotettavasta datasta ja sen dokumentoinnista ja analyttisestä käsittelystä nimeämällä käytettävät laskentakaavat. Suunnitelma siis sisältää viittauksen analyysimenetelmän suoritusohjeeseen, joka on toisen kemistin toimesta jo tarkastettu. Analyysimenetelmän validoinnin laajuus ilmoitetaan nimeämällä jokainen validointiparametri ja kertomalla niiden määritelmä ja raportoitavat tiedot. Lisäksi ilmoitetaan yleiset validoinnin hyväksymisrajat kyseiselle menetelmälle ja mahdolliset perustelut jos näitä ei noudateta tulevassa validoinnissa.

NIRS-menetelmät ovat verrattain uusia analyysimenetelmiä, eikä validointiin liittyvissä viranomaismääräyksissä ja -ohjeistuksissa ole vielä määritelty tarkkoja hyväksymiskriteerejä validointiparametreille toisin kuin vanhemmille menetelmille, esimerkiksi HPLC-menetelmille. Taulukossa 1 esitetään Divigel tuotteen etanoli ja propyleeniglykolin NIR-menetelmän validointiparametrit ja hyväksymiskriteerit. Validointi on jo suoritettu analyysimenetelmälle.

Validointimittausten jälkeen suoritus raportoidaan kuten suunnitelmassa on kerrottu. Jokaisesta käytetystä reagenssista kerrotaan tuotenumero ja erä, jotta jokaisen käytetyn reagenssin laatu voidaan varmentaa myös myöhemmin. Raportissa kerrotaan myös epäonnistuneet kokeet ja epäonnistumiseen johtaneet juurisyyt sekä korjaavat toimenpiteet. Lisäksi raportissa kerrotaan, miten laborantit perehdytettiin uuden menetelmän käyttöön ja mitä lisäkoulutusta heille on annettu.

Taulukko 1. Divigel tuotteen NIR menetelmän validointiparametrejä, ilmoitettavat tulokset sekä hyväksymiskriteerejä.

Validointiparametri	Toimenpide	Ilmoitettavat tulokset ja hyväksymiskriteerit
Spesifisyys	Malleissa käytettyjen aaltolukualueiden tulee sisältää lääkeaineelle tunnettuja aallonpituusalueita Potentiaalisia haastenäytteitä tulee käyttää tunnistusmallin validoinnissa	Lääkeaineelle spesifiset aaltolukualueet tulee tunnistaa ja vahvistaa Haastenäytteitä ei tule tunnistaa lääkeaineeksi x
Lineaarisuus	Menetelmän tulee olla lineaarinen pitoisuusalueella 70–130 % NIRS ennusteiden ja referenssianalyysimenetelmän välillä tulee olla korrelaatio koko kalibraatiomallin alueella	Ilmoitetaan seuraavat tulokset: kulmakerroin, y-leikkauspiste, korrelaatiokerroin, jäännöseliösumma ja sen vapausasteet
Mittausalue	Mittausalue määräytyy lineaarisuus- ja tarkkuuskokeen perusteella. Näistä määräävä on tarkkuuskoe.	–
Tarkkuus	NIRS tulosten ja referenssianalyysimenetelmän tulosten vertailu Lasketaan ennusteen keskivirhe eli SEP ja ulkopuolisten havaintojen määrä validointinäytteissä	Tarkkuusvertailu prosentteina, vinouma ja 95 % luottamusväli NIRS ennusteiden tulee olla hyväksyttävän lähellä referenssianalyysimenetelmän tuloksia
Toistettavuus		Ilmoitetaan keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja 95 % luottamusväli
Toistettavuus	5 rinnakkaista mittausta 100 % pitoisuudesta	
Sisäinen toistettavuus	5 mittausta 100 % pitoisuudesta. Mittauksissa eri analyysoija ja eri päivä	Tulosten tulee olla vastaavia kuin referenssianalyysimenetelmällä
Laboratorioiden välinen toistettavuus	6 mittausta 100 % pitoisuudesta	Tulosten tulee olla vastaavia tai parempia kuin lähettävän laboratorion tulokset
Haavoittuvuus	Näytteenkäsittelyyn liittyvät vaihtelut testataan (esim. näytteen lämpötila ja säilöntäaika)	Ilmoitetaan, onko tietyllä näytteenkäsittelyllä merkitystä mittaustuloksiin

4 NIR-spektroskopia

Lähi-infrapuna (NIR) spektroskopia on analyysitekniikka, jolla on paljon sovelluskohteita lääketieteellisyydessä. Analysoinnin nopeus, helppous ja liuotinvapaa työskentely ovat suurimmat positiiviset asiat, joiden takia analyysijä halutaan suorittaa yhä enemmän hyödyntäen NIR menetelmiä [6]. NIR spektri sijoittuu 800 nm ja 2500 nm välille. Tällä alueella esiintyy erityisesti C-H, N-H, O-H ja S-H sidosten ylivärähtelyjä sekä perusvärähtelyiden yhdistelmävärähtelyjä [7]. Nämä värähtelyt pitävät sisällään paljon fysikaalista ja kemiallista informaatiota tuotteesta. Tämän takia NIR spektroskopiaa voidaan hyödyntää kemiallisessa analytiikassa, fysikaalisessa analytiikassa ja prosessianalytiikassa. NIR spektroskopian etuna on myös helppous. Kemiallisia analyysijä tarvitaan monesti useampia, mutta fysikaalisten parametrien avulla pitoisuudet voidaan ennustaa yhdestäkin spektristä [8].

Lähi-infrapunasäteily on matalampienergistä kuin näkyvä valo. Tämän ansiosta säteily läpäisee kiinteääkin näytettä useampia millimetrejä. Säteily myös läpäisee joitain materiaaleja täysin muuttumattomana, esimerkiksi lasia. Tämä mahdollistaa analysoinnin lasiastioiden lävitse.

Spektriin vaikuttaa monet näytteen kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet. Analysoinnin toistettavuuden varmistamiseksi kaikki nämä tekijät tulee huomioida ja osoittaa näiden tekijöiden vaikutus tuloksiin. Tällaisia ovat esimerkiksi lämpötila ja kosteus. Myös spektrin kompleksisuus ja päällekkäiset absorptiovyöt vaikeuttavat tulosten tulkitsemista ja ne tulee ottaa huomioon mallia kehitettäessä [9]. Analyysimenetelmää voidaan käyttää vain määriteltujen rajojen sisällä ja tämä on otettava huomioon analyysimenetelmää kehitettäessä. [10]

Yleisesti aallonpituus (λ) ilmoitetaan nanometreinä (nm) ja aaltoluku (ν) senttimetrin käänteislukuna (cm^{-1}). Riippuen laitteesta ja laitevalmistajasta ilmoitustapa voi vaihdella. Yksinkertaisin tapa suorittaa käynnön nm ja cm^{-1} välillä on oheinen kaava 1.

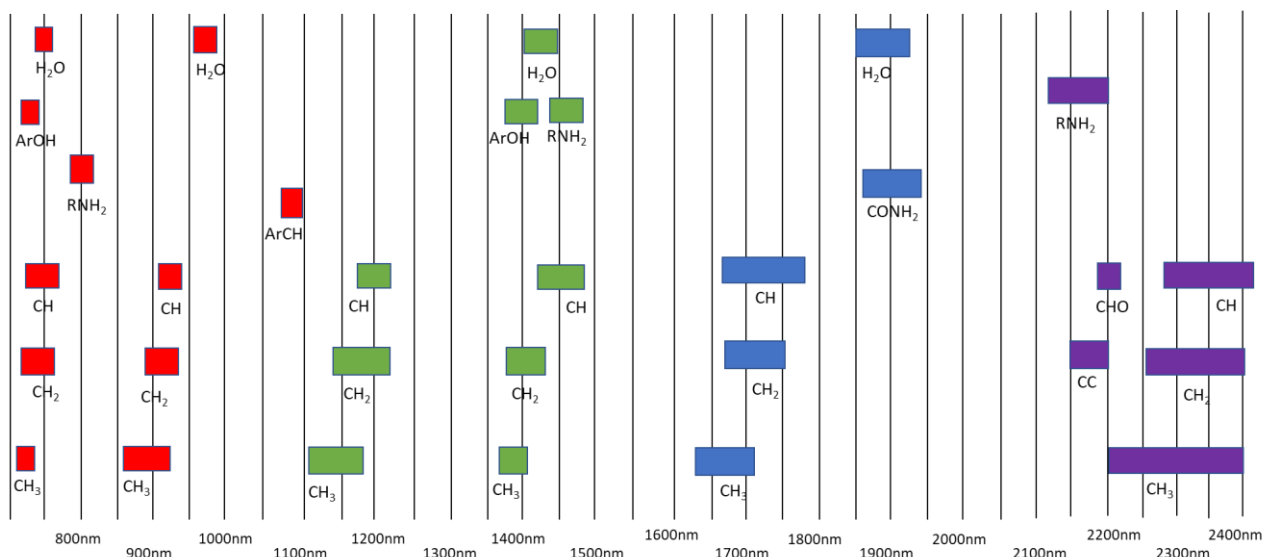
$$\nu_{\text{cm}^{-1}} = 10^7 x \frac{1}{\lambda_{\text{nm}}} \quad (1)$$

4.1 Toimintaperiaate

Lähi-infrapunasäteily sisältää runsaasti energiaa, joka lämmittää molekyyliä osuessaan niihin. Lisääntynyt lämpö lisää dipolisten molekyylien kovalenttisten sidosten värähtelyä. Sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutusta molekyylin atomien kanssa voidaan tutkia mittaamalla infrapunasäteilyn absorptiota (IR-spektri) tai siroamista (Raman-spektri).

Spektroskopiaa elektromagneettisen säteilyn alueella 800–2500 nm ($12500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$), kutsutaan NIR-spektroskopiaksi. NIR spektri koostuu yhdistelmävärähtelyistä ja ylivärähtelyistä, jotka vastaavat MIR alueen absorptio frekvenssejä. Nämä vyöt vastaavat hapen ja vedyn, hiilen ja vedyn sekä typen ja vedyn perusvärähtelyitä [11]. Tällä alueella havaitaan absorptiovyöitä molekyylin elektronitilojen muutoksista, sekä sidosten värähtelytiloista, ylivärähtelyistä ja yhdistelmävärähtelyistä. Ultravioletti-näkyvän valon alueella tapahtuva spektroskopiolla on elektronispektroskopiaa ja infrapunaspektroskopiolla tutkitaan värähtelytiloja. NIR-spektroskopia sijaitsee näiden aallonpituusalueiden välissä, ja on sekä elektronispektroskopiaa että värähtelyspektroskopiaa [7].

NIR-spektrin ala 800–2500 nm ($12500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$), voidaan jakaa karkeasti kolmeen osaan, kuten kuvassa 2 nähdään. Ensimmäinen osa kattaa alueen 800–1200 nm ($12,500\text{--}8500\text{ cm}^{-1}$). Tällä alueella absorptiovyöt ovat peräisin elektronitilojen muutoksista ja kolmannen asteen ylivärähtelytiloista. Elektronitilamuutoksia ilmentävät absorptiovyöt ovat suurimmaksi osaksi peräisin suurten molekyylien d-d-siirtymistä, varaus-siirto- (CT)-siirtymistä ja $\pi\text{-}\pi$ -siirtymistä [12]. Tämän aallonpituusalueen säteilyllä on myös hyvä läpäisykyky ja tällä alueella esiintyvät absorptiovyöt ovat erittäin heikkoja, mikä mahdollistaa biolääketieteelliset sovellukset.



Kuva 2 Ylivärähtelyt ovat ensimmäisen-, toisen-, ja 3. kertaluvun värähtelyjä keski-infrapuna (MIR)-alueen perusvärähtelyistä. (MIR-alue $> 2500\text{nm}$) Kombinaatiovärähtelyt ovat yksittäisten värähtelytaajuuksien summia ja hyvin spesifisiä. Kuvassa ensimmäisen ylivärähtelyjen sijainti merkattu sinisellä. Toisen ylivärähtelyalueen spektrialue merkattu vihreällä ja kolmannen asteen ylivärähtelyt punaisella. Violetilla on merkattu yhdistelmävärähtelyjen alue.

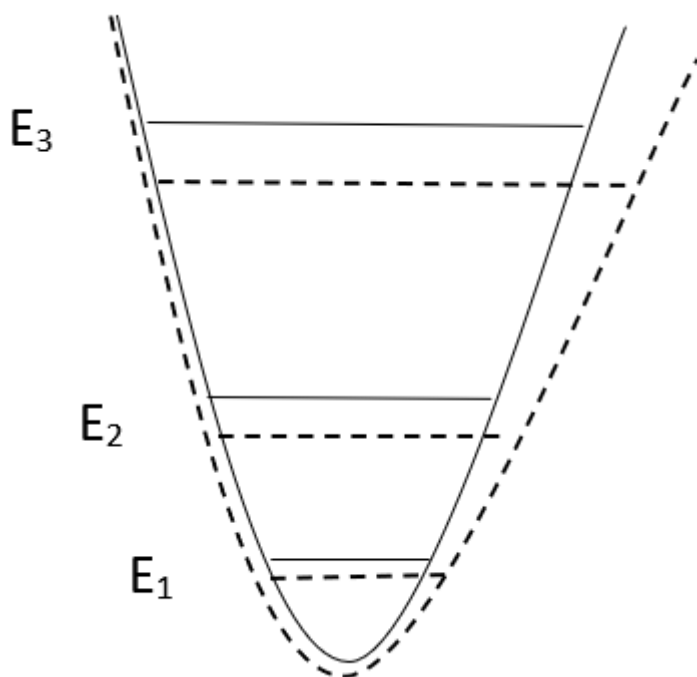
Toinen infrapunaspektrin alue on $1200\text{--}1800\text{ nm}$ ($8500\text{--}5500\text{ cm}^{-1}$). Alueella esiintyy C-H, N-H, O-H ja S-H funktionaalisten ryhmien ensimmäisen ja toisen kertaluvun värähtelyjä, venymis, kiertymis ja vääntymis värähtelyä sekä näiden yhdistelmävärähtelyä. Kolmannella alueella $1800\text{--}2500\text{ nm}$ ($5500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) ilmenevät absorptiovyöt ovat peräisin yhdistelmävärähtelyistä.

4.1.1 Perusvärähtely

Molekyylit koostuvat atomeista, joilla jokaisella on omanlaisensa massa ja jotka ovat sitoutuneet toisiinsa elastisin sidoksien. Molekyylien atomiytimet ovat jaksollisessa liikkeessä toisten suhteen ja niillä on värähtelyvapausasteita ns. normaalivärähdysten yhdistelmiä. Normaalivärähdyksissä kaikki atomiytimet värähtelevät samassa vaiheessa ja samalla taajuudella. Molekyylin sidosten värähtelymuodot riippuvat atomien lukumäärästä ja atomien välisistä sidoksista. Molekyyleillä on $3N - 6$ ominaisvärähtelyä lukuun ottamatta lineaarisia molekyyliä, joilla on $3N - 5$ ominaisvärähtelyä ($N = \text{molekyylin atomien lukumäärä}$). Esimerkiksi hiilimonoksidilla (CO) esiintyy 1 ominaisvärähtely (ν), kun taas vedellä (H_2O) esiintyy 3 ominaisvärähtelyä (ν_s , ν_{as} , δ_s).

Näillä molekyylien ominaisvärähtelyillä on tietty määrätty energia, ominaisvärähtelyenergia, joka johtuu dipolisidoksen voimakkuuteen vaikuttavista tekijöistä. Ominaisvärähtely on harmonista värähtelyä, jota esiintyy pääasiassa IR alueen aallonpituuksilla. Nämä IR alueella

ilmenevät ominaisvärähtelyt ovat peräisin molekyylin atomien kiertymisestä, vääntymisestä ja venymisestä. Tämä IR säteilyn aiheuttama vuorovaikutus mahdollistuu vain, jos aine on IR aktiivinen, eli elektrinen vektori oskilloi samalla taajuudella molekulaarisen dipolimomentin kanssa. Molekyylit ovat tavallisesti huoneenlämmössä Boltzmannin jakauman mukaan perustasolla $n = 0$. fundamentaaliset siirtymät eli ominaisvärähtely tapahtuu perustason $n = 0$ ja $n = 1$ välillä IR alueella. [13]



Kuva 3 Harmonisen ja epäharmonisen (katkoviiva) värähtelijän potentiaalienergiakäyrät sekä värähtelyenergiatasot. Pienillä etäisyyksillä epäharmonisen värähtelijän energia noudattaa melko tarkasti harmonisen värähtelijän käyrää. Kun poikkeama tasapainoetäisyydestä kasvaa, eroaa epäharmonisen värähtelijän käyrä jo selvästi harmonisen värähtelijän potentiaalienergiäkäyrästä.

4.1.2 Ylivärähtely

Suuremmilla värähtelyamplitudeilla sidosten elastisuus ei kuitenkaan noudata suoraan Hooken lakia, eikä Harmonisen oskilaattorin malli toteudu. Erityisesti aallonpituuden pienenytessä NIR alueella, molekyylin atomit absorboivat enemmän energiaa ja värähtelevä sidos pitenee voimakkaasti. Sidosten piteneminen johtuu värähtelevien molekyylien välisistä repulsiivisista voimista ja dissosiaation mahdollisuudesta [13]. Tämän seurauksena energiatasot eivät ole enää samalla etäisyydellä toisistaan, ja siirtymät yli yhden energiata-

päähän ovat mahdollisia eikä värähtely näin ole enää harmonista, vaan värähtelystä tulee epäharmonista. Värähtelyspektrissä epäharmonisuus näkyy ylivärähdyksinä (overtone), jotka painottuvat NIR-spektrin lyhyemmille aallonpituuksille. Yli yhden kvanttiluvun päähän tapahtuvia siirtymiä kutsutaan ensimmäisen kertaluvun ylivärähtelyksi. Lisäksi esiintyy toisen ja kolmannen kertaluvun ylivärähtelyä [13].

NIR-värähtelyspektri ei siis sisällä ominaisvärähtelyä, mutta sisältää ensimmäisen, toisen ja kolmannen ylivärähtelyn, sekä näiden yhdistelmävärähtelyistä koostuvan alueen.

Kaksiatomisella molekyylillä mahdollisia värähtelyjä on vain yksi, venymisvärähtely atomien välillä. Useamman atomin molekyylissä värähtelyjä on jo kiertyminen, vääntyminen ja venyminen, sekä näiden mahdolliset variaation eri suuntiin.

4.2 FT-NIR spektroskopia

FT-spektroskopiolla on muutamia ominaisuuksia, jonka vuoksi se soveltuu NIR-spektroskopiaan muita menetelmiä parempi ja jonka fysikaalisista ominaisuuksista johtuen mittaustarkkuus on parempi.

Menetelmä perustuu interferometrin mittaamiseen, eikä absorbanssin mittaamiseen. Interferometri koostuu elektromagneettisesta säteilystä, josta on interferenssin avulla supistettu pois tietty aallonpituusalue, tai jossa tietty aallonpituusalue on vahvistettu interferenssin avulla. Fourier muunnoksella interferenssi saadaan laskennallisesti muutettua absorbanssiksi. Laitteiston toiminta kuvataan myöhemmissä kappaleissa tarkemmin.

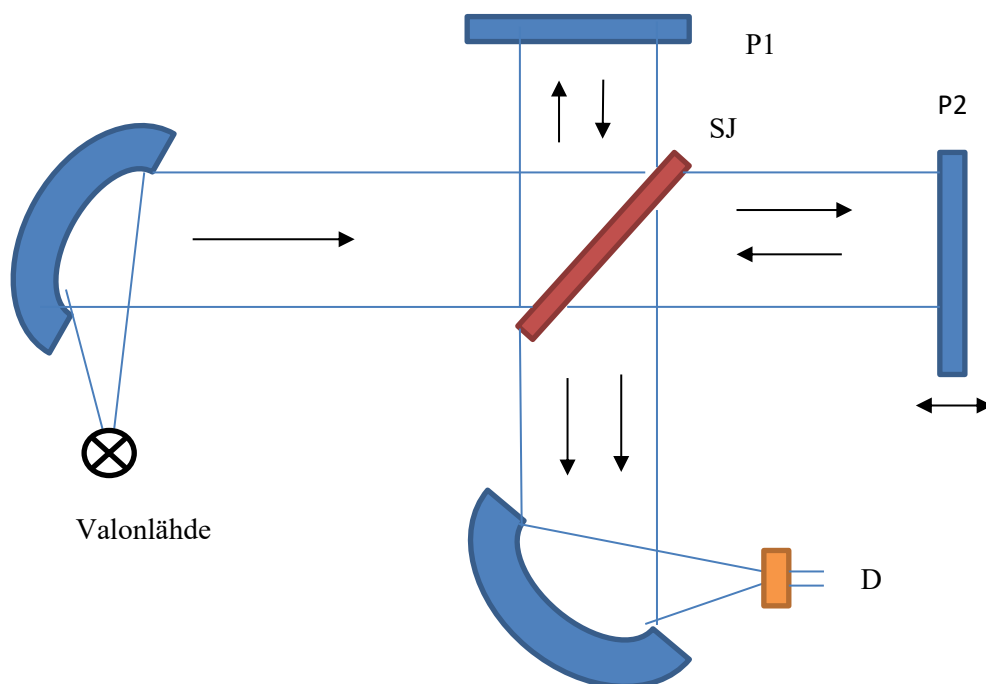
Interferogrammi sisältää informaation kaikilta aallonpituuksilta, joka Fourier muunnoksella muutettua spektriä. Toisin sanoen, spektrofotometri siis mittaa kaikki aallonpituudet samanaikaisesti. Signaalin käsittelyssä tällä on suuri etu, sillä signaalin saadaan mitattua ja tallennettua yhtenä signaalina. Tavallisesti jokainen aallonpituusalueen absorbanssi mitataan erikseen. Säteilyn tallentamisen nopeudesta johtuen signaalin ja taustakohinan suhde pysyy pienempänä. Tätä kutsutaan Fellgettin eduksi. [14]

Toinen merkittävä etu saadaan myös interferogrammista johtuen. Tavanomaisesti pieni osa analysointiin valonlähteen tuottamasta energiasta pystytään kerralla havainnoimaan ja tallentamaan. Interferogrammin tallennuksessa koko aallonpituusala saadaan tallennettua yhdellä keralla. Näin jokaisesta mittauspisteestä tallennettu data on korkeaenergisempää ja kirkkaampaa. Tätä kutsutaan Jacquinetin eduksi. [15]

Laserin aallonpituuden vaihtelusta johtuen mittaustarkkuudessa on vaihtelun verran pientä häiriötä. Fourier muunnos spektroskopiassa peilin asemaa siirtämällä saadaan aikaiseksi interferenssi aalto. Tämän menetelmän ansiosta laserin aallonpituuden pienillä variaatiolla ei juurikaan ole mitään vaikutusta [16]. Tätä kutsutaan Connesin eduksi.

4.2.1 FT-NIR laitteisto

FT-NIR menetelmässä lähi-infrapunavalo tuotetaan polykromaattisella valolähteellä. Polykromaattinen valo sisältää kaikki lähi-infrapuna alueen valon aallonpituudet, 800–2500nm (12500–4000 cm^{-1}).



Kuva 4 Kaaviokuva FT-spektrofotometrin michelsonin interferometrissä, joka koostuu valolähteestä, säteenjakajasta (SJ), liikkuvasta (P2)- ja kiinteästä peilistä (P1), näyteasettimesta ja detektorista.

FT-NIR laitteella analysoidessa tallennetaan koko laaja lähi-infrapuna-aallonpituusalueen interferogrammi. Yksittäiset vahvistetut tai heikennetyt aallonpituudet saadaan muodostettua ohjaamalla valonlähteeltä tuleva valo säteenjakajan kautta stationääriselle peilille, joka pysyy paikoillaan, ja liikkuvalla peilille. Liikkuvan peilin sijainnin muuttuessa muuttuu myös valon kulkeman matkan pituus, josta seuraa optisen polun ero (optical path difference, OPD). Tämä optisen polun ero vaikuttaa suoraan valonsäteiden vaiheeseen. Molemmilta peileiltä tulevat heijastukset yhdistyvät säteenjakajapeilillä ja vahvistavat tai heikentävät toisiaan interferenssin mukaisesti. Näin muodostuu interferogrammi. Interferogrammi ohjataan näytteen läpi, joka absorboi spektrillensä tyypillisellä tavalla tietyn aallonpituuden. Tällöin

siis absorboitu aallonpituus poistuu interferogrammista. Tämän jälkeen interferogrammi havaitaan detektorilla ja ilmaistaan säteen energian muutoksena säteiden optisen polun muutoksen funktiona. OPD ja absorbanssi voidaan muuntaa Fourier muunnoksella tavanomaiseksi spektriksi; absorbanssi frekvenssin eli energian funktiona.

4.2.2 Mittaustavat

Näytteestä riippuen, näyte voidaan mitata läpäisymittauksella, heijastusmittauksella tai läpiheijastus menetelmällä. Ensimmäiset kaksi mittaustapaa ovat yleisimmät [11]. Lääketeollisuudessa yleisesti, ja tässä työssä Divigel tuotteen analysoimisessa hyödynnetään läpimittausta.

Läpäisymittauksessa läpäisseen säteilyn, transmittanssin (T) arvo laskee näytteen absorboidessa säteilyä tietyllä aallonpituudella. Näyte asetetaan optisen säteen lähteen ja detektorin väliin. Asetelma on tyypillinen useimmille spektrofotometreille. Jäljelle jäänyt spektri voidaan esittää suoraan muodossa transmittanssi (T) tai absorbanssi (A) y-akselilla ja aallonpituus tai aaltoluku x-akselilla.

Heijastusmittauksessa antaa arvon näytteen heijastuksesta, reflektanssista (R). Tämä arvo on näytepinnasta heijastuneen säteilyn arvo jaettuna taustana toimivasta pinnasta. Riippuen näytteen kemiallisista tai fysikaalisista ominaisuuksista, NIR säteily läpäisee vaihtelevan syvyyden verran näytettä. Näytteen molekyylit voivat absorboida säteilyä ylivärähtelyihin ja perusvärähtelyjen kombinaatioihin. NIR heijastusspektri ilmoitetaan yleisesti heijastuksen kymmenkantaisena logaritmina y-akselilla ja aallonpituus tai aaltoluku x-akselilla.

Läpiheijastusmittaus on yhdistelmä läpäisymittauksesta ja heijastusmittauksesta.

Transflektanssi (T^*) mittauksessa näytteen läpäissyt säteily heijastetaan takaisin näytteen pintaan. ei absorboitunut säteily siis heijastetaan takaisin näytteen pintaan. Näin saadaan kasvatettua optisen polun pituus. Tästä saatava spektri esitetään yleensä muodossa transmittanssi y-akselilla ja aallonpituus tai aaltoluku x-akselilla.

4.2.3 Spektriin vaikuttavat tekijät

Raaka-spektriin pohjautuen yleisesti käytetään tunnistus malleja ja pitoisuusmalleja. Pitoisuusmalli perustuu molekyylin sidosten liikkeestä tietyllä aallonpituudella. Yhdellä molekyyllillä on uniikki NIR spektrinsä. Jos molekyyliin lisää funktionaalisen ryhmän, muuttuu myös NIR spektri. Kvantitatiivinen malli perustuu absorbanssin määrään, eli mitä

enemmän absorboivia sidoksia, sitä suurempi on konsentraatio. Raaka-spektriä hyödynnetään toteamis- ja pitoisuus malleissa, joten spektrin tuli kuvastaa mahdollisimman tarkasti todellisuutta. Sen takia spektriin vaikuttavat asiat tulee huomioida, tiedostaa ja pyrkiä välttämään.

NIR-mittauksiin vaikuttaa monia asioita, joilla on suoraan vaikutusta spektriin. Ympäristön lämpötilalla ja kosteudella on vaikutusta analyysiin [10].

Näytteen edustava asettelu mittausta varten on yksi kriittisistä mittaukseen vaikuttavista tekijöistä. Näytteen ollessa täysin analysoitavissa ilman likaa tai roskia näytteen ja valonlähteen sekä detektorin välillä, onnistuu analyysi paljon toistettavammin [10].

Näytteen lämpötilalla on vaikutusta erityisesti vesipitoisille liuoksille ja monille muillekin nesteille. Muutaman lämpöasteen muutos voi aiheuttaa mitattavia muutoksia spektriin ja tämä voi aiheuttaa merkittävästi analyysin tulokseen [10]. Myös jauheet ja kiinteät aineet, jotka sisältävät vettä, voivat olla herkkiä lämpötilan muutoksesta aiheutuville muutoksille.

Näytteen paksuus vaikuttaa suoraan läpäisevän valon määrään. Raaka-spektrin absorbanssi arvo ei saisi olla yli 2-yksikköä [7]. Silloin ainoastaan 0,1-prosenttia valosta läpäisee näytteen. Tähän voidaan vaikuttaa pienentämällä analysoitavan näytteen paksuutta. Lisäksi näytteen tiheydellä on suuri merkitys. Erityisesti tablettituotteiden kohdalla puristusvoimalla on vaikutusta tabletin fysikaalisiin ominaisuuksiin, jotka ilmenevät NIR-spektrissä. [17]

Näytteen iällä voi olla myös vaikutusta. Ainakin liottimia sisältävät näytteet ovat herkkiä haihduttamaan liottimia ajan saatossa. Joillain aineilla voi tapahtua kristallisoitumista ja osa aineista voi imeä kosteutta ympäristöstä [10]. Kaikilla näillä on vaikutusta näytteen NIR-spektriin ja ovat huomioon otettavia asioita selvittäessä NIR-spektroskopian soveltuvuutta kyseiseen analytiikkaan.

4.2.4 Spektrin esikäsittely

Monessa tilanteessa raakaspektri ei ole riittävä analysointiin ja mallin rakennukseen. Monesti heijastusmittausta sovellettaessa tarvitaan usein spektrin esikäsittelyä ennen mallin kehitystä. Esikäsittelyn tarkoituksena on vähentää taustasta johtuvaa vaihtelua tai vähentää tiedetyn variaatiolähteen vaikutusta mallinnukseen. Joissain tilanteissa spektri voidaan normalisoida tai sironta korjata käyttämällä esimerkiksi standard normal variate (SNV) muunnosta.

Ensimmäisen ja toisen derivaatat ovat myös yleisiä ja sallittuja. Suurempien derivaattojen käyttöä ei suositella [10].

4.3 Laskennalliset standardisointimenetelmät kalibrointien yhtenäistämiseksi

Laitteistojen välillä on pieniä eroja spektrin muodostumisessa. Laitteistojen mekaanisia osia ei ole mahdollista saada täysin identtiseksi, eikä sen seurauksena mitattu spektrikään ole täysin identtinen. Tämän ongelman kompensoimiseksi kahden laitteen spektrit voidaan laskennallisesti saada vastaamaan toisiaan täydellisesti, tätä kutsutaan standardoimiseksi.

Menetelmiä kalibraatiomallien siirtämiseksi on useampia [18]. Kalibroinnin ja ennustuksen korjaamiseksi laitteiden välillä voidaan käyttää Y-arvojen korjausta tai NIR-spektrin korjaukseen perustuvia menetelmiä.

Tarkemmin esittelen kulmakertoimen ja virheen korjaus - Slope and bias correction (SBC) [19] menetelmän, joka perustuu Y-arvojen korjaukseen. Shenk menetelmä ja paloittainen suora standardisointi – piecewise direct standardization (PDS) menetelmän, jotka perustuvat spektrin laskennalliseen korjaukseen suhteessa verrokkiin [20]. Menetelmiä voidaan käyttää osittain vaihtoehtoisina standardisointimenetelminä. Esimerkiksi SBC menetelmää voidaan hyödyntää vain pienten eroavaisuuksien tasapainottamiseen, kuten muitakin menetelmiä. Shenk menetelmällä pystytään jo laajemmin ja kattavammin standardisoimaan spektrejä, mutta PDS- menetelmä on näistä ainoa, joka ottamaan huomioon kaikki monimuuttujamallin parametrit ja sen ansiosta sitä hyödynnetään eniten.

4.3.1 Kulmakertoimen ja virheen korjaus (SBC)- menetelmä

Kulmakertoimen ja virheen korjaavassa standardointimenetelmässä vastaanottavan laitteen spektristä ennustettu tulos korjataan vastaamaan isäntälaitteen ennustusta. Menetelmän avulla standardisuoran kulmakerroin voidaan muuttaa vastaamaan isäntälaitteen standardisuoraa [18]. Kummankin laitteen kulmakerroin ja virhe määritetään regressioanalyysin avulla. Vastaanottavan laitteen korjattu ennustearvo saadaan kaavasta 2. Menetelmällä on etuinaan yhden muuttujan laskenta, joka on nopeaa ja helposti ymmärrettävä. Menetelmä soveltuu kuitenkin laitteistojen välillä, jotka hyödyntävät samanlaista tekniikkaa mittauksessa, eli esimerkiksi Fourier muunnosta hyödynnetään molemmissa laitteistoissa. Menetelmän avulla voidaan siis standardisoida ainoastaan pieniä poikkeamia laitteiden välillä.

A_k Korjattu vastaanottavan laitteen ennuste

K_{λi} Isäntälaitteen kalibraatio

I_{λi} vastaanottavan laitteen ennusteen näytespektri.

$$A_k = \text{Kulmakerroin} \cdot \sum K_{\lambda_i} \cdot I_{\lambda_i} + \text{virhe} \quad (2)$$

Korjausmenetelmässä ideana on määrittää kerroin, jolla ennustetut arvot uudessa laitteessa saadaan vastaamaan alkuperäisen laitteen ennusteen tuloksia. Menetelmässä ei hyödynnetä spektrien tuloksia vertailussa. Suurimpana heikkoutena menetelmässä on sen perustuminen ennusteiden vertailuun. Yleisesti yhdestä näytespektristä voidaan määrittää useampien aineiden pitoisuuksia. Tällaisessa tapauksessa jokaiselle aineelle tulee tehdä oma korjauskerroin. Uudelle vastaanottavalle laitteelle voisi kalibroinnin korjauksen jälkeen siirtää isäntälaitteelta mallit, jolla ennusteet lasketaan.

4.3.2 Shenk menetelmä

Menetelmän periaatteena on tunnistaa muuttuja, jonka avulla voidaan muokata vastaanottavan laitteen spektrejä vastaamaan isäntälaitteen spektrejä. Korjaus tapahtuu jokaiselle mittauspisteen arvolle [7]. Tämän jälkeen isäntälaitteen menetelmä voidaan siirtää vastaanottavaan laitteeseen. Siirrossa käytettävä näytesetin tulee kattaa koko mittausalue ja näytteitä tulee olla vähintään 30 kappaletta [7].

Menetelmässä isäntälaitteen ja vastaanottavan laitteen absorbanssien suhde määritetään ja tarvittava korjauskerroin määritetään jokaiselle aallonpituusalueelle [7]. Korjauskertoimen avulla vastaanottavan laitteen absorbanssi saadaan vastaamaan isäntälaitteen absorbanssia kyseisellä aallonpituusalueella.

4.3.3 Paloittainen suora standardisointi (PDS)- menetelmä

PDS menetelmässä spektrin aallonpituus ja absorbanssi korjataan vastaamaan isäntälaitteen aallonpituutta ja absorbanssia. Korjaus tapahtuu monimuuttuja-analyysiä hyödyntäen. Liikkuva analyysi-ikkunan kulkiessa koko muuttujan alueen poikki, saadaan isäntälaitteen ja vastaanottavan laitteiden muuttujien eroja korjaavat regressiokertoimet [19]. Analyysi-ikkunan leveyden lyhentäminen ja mittauspisteiden lisääminen parantaa PDS siirron tarkkuutta.

Absorbanssiarvot K , jotka on mitattu isäntälaitteella ($AK(\lambda_i)$) ja vastaanottavalla laitteella ($CK(\lambda_i)$) aallonpituuksilla λ_i ja aallonpituusalueella $\lambda_i - X$ to $\lambda_i + X$, voidaan laskea hyödyntämällä kerrointa ($\beta(\lambda_i)$). kerroin ($\beta(\lambda_i)$) saadaan laskettua hyödyntämällä päämuuttuja komponenttien regressiota (PCR) tai osittainen pienin neliö (PLS) laskentaa.

5 Menetelmän siirto

5.1 Suunnitelma PDS menetelmää hyödyntävään siirtoon

Analyysin siirto suunniteltiin toteutettavan päivitetyn ICH Q12 -ohjeistuksen mukaisesti hyödyntäen PDS algoritmia. Siirtoa ei kuitenkaan pystytty suorittamaan tällä menetelmällä. Espoossa sijaitsevalla Brukerin MPA I laitteella eli isäntälaitteella oli tarkoitus mitata ensin siirtoasetin näytteet. Tämän jälkeen samat näytteet suunniteltiin mitattavan Turussa Brukerin MPA II laitteella täysin samoilla mittaussparametreilla kuin Espoossa. Tämän jälkeen oli tarkoitus suorittaa Turun laitteella PDS muunnos mitatuille spektreille. Tässä vaiheessa myös Espoon laitteen spektrit siirrettäisiin Turkuun ja PDS muunnoksen avulla Turun spektrit sovitettaisiin vastaamaan Espoon spektrejä. Näin spektrit vastaisivat Espoon laitteella mitattuja spektrejä, eikä Turussa analysoidut spektrit sisältäisi laitteesta johtuvaa muutosta spektriin. PDS muunnoksen jälkeen Espoon mallin kehityksessä hyödynnetyt kalibraatiomallin mittaukset siirrettäisiin Turun laitteelle ja malli kehitettäisiin Turun laitteelle täysin samanlaiseksi kuin Espoon malli on. Näin saataisiin Turkuun täysin samanlainen malli kuin Espoossa.

Siirron jälkeen mallin validoimiseksi olisi kaksi vaihtoehtoa. Joko tehdä täysi validointi tuote erällä, jolloin tarvitaan primäärimenetelmän tulokset myös. Tai toisena vaihtoehtona on siirtää Espoosta myös validointiin hyödynnettyjen mittausten spektrit ja tehdä vastaavat validointimittaukset Espoon mitatuilla validointinäytteiden spektreillä. Tällöin validointien tulokset tulisi olla täysin samanlaiset. Ainoastaan pieni vaihtelu laitteen mittaussvirheestä johtuen sallittaisiin. Mittausvirheestä johtuva numeerinen arvo, jonka sisälle molempien NIR laitteiden tulosten eron pitäisi olla, tulisi tieteellisesti perustellen määrittää. Tällä tavalla osoitettaisiin, että tulokset vastaavat toisiaan.

Näytteinä työssä oli tarkoitus käyttää Orion Oyj:n omia lääkevalmisteita eli tuotannon Divigel eriä ja raaka-aineista laboratoriossa valmistettuja geelejä ilman estradiolihemihydraattia. Näytteiden etanoli ja propyleeniglykolin nimellispitoisuus vaihtelisivat 70–130 % välillä. Laboratoriossa valmistetut siirtonäytteet ehdittiin valmistaa Orionilla formulaatiolaboratoriossa Turussa. Laboratoriossa valmistettujen geelien pitoisuustasot nimellispitoisuudesta olivat 130 % EtOH/130 % PG, 130 % EtOH/70 % PG, 115 % EtOH/115 % PG, 115 % EtOH/95 % PG, 105 % EtOH/85 % PG, 100 % EtOH/100 % PG, 85 % EtOH/115 % PG, 85 % EtOH/85 % PG, 70 % EtOH/130 % PG ja 70 % EtOH/70 % PG.

Lisäksi siirtosetti sisälsi yhden tuotannon erän. Näytteet sisälsivät etanolia, vettä, Carbopolia Triethanolamiinia ja propyleeniglykolia. Tuotannon erä sisälsi lisäksi estradiolihemihydraattia. Näytteet ovat pitoisuuksiltaan samanlaisia, joita käytettiin menetelmän kalibraatiomallissa menetelmää kehitettäessä isäntälaitteelle.

Suunnitellun siirron toteutus keskeytyi, kun Turun laitteella ei ollut mahdollista suorittaa PDS muunnosta. Laitetoimittajan ohjeistuksen mukaan myöskään heidän kahden laitteensa välillä ei tulisi hyödyntää PDS menetelmään perustavaa siirtoa. Niinpä siirron toteutus piti miettiä uudelleen.

5.2 Analyysimenetelmän siirron toteutus

Menetelmän siirto päätettiin toteuttaa perinteisen laboratorioanalyysimenetelmän ICH Q12 - siirto-ohjeistukseen perustuen. Tällä tavalla toteutettu siirto ei poista laitteiden eroista johtuvia spektraalisia eroavaisuuksia ja jättää laitteiden tulosten välille suuremman eroavaisuuden. Tällaisessa suorassa siirrosta voisi hyödyntää kulmakertoimen ja virheen korjaus - menetelmää, jos siirto ilman sitä ei onnistu. Etuna tässä vaihtoehdossa on menetelmän helpompi siirrettävyys validoinnin osalta. Validoinnin sijasta tarvitsee tehdä vain haaste testi, jolla osoitetaan molempien paikkakuntien menetelmien tulosten eroavaisuus ensisijaisen menetelmän tuloksesta. Eli siirrosta laitteiden välinen ero ei saa olla suunniteltua 3,0 %-yksikköä isompi, eikä kummankaan paikkakunnan tulokset saa erota ensisijaisen menetelmään tuloksesta enempää kuin 5,0 %-yksikköä.

5.3 Siirtoanalyysit

Siirtoanalyysit mitattiin Espoon isäntälaitteella aamupäivällä, ja iltapäiväksi siirryttiin mittaamaan näytteet Turun laitteelle. Aikaikkuna näytevalien täyttämistä viimeiseen mittaukseen oli 21 tuntia. Näin pitkälle ajalle oli menetelmän validoinnissa osoitettu näytteiden säilyvän muuttumattomana. Näytteet mitattiin samassa järjestyksessä molemmilla laitteilla.

5.4 Laitteisto ja analyysimenetelmän kemometriset mallit

Analyysimenetelmän kaikki kemometriset mallit on kehitetty Espoossa Brukerin MPA Fourier-muunnos lähi-infrapuna spektrometri, FT-NIR MPA I käyttäen. Nyt

analyysimenetelmän kvantitatiiviset mallit etanolin ja propyleeni glykolin pitoisuuden määrittämiseksi, sekä tunnistusmallit siirrettiin Turussa sijaitsevalle Brukerin MPA Fourier-muunnos lähi-infrapuna spektrometrille, FT-NIR MPA II. Näytteet mitattiin läpäisykyky (T) -menetelmää käyttäen. Raakadatan kemometriset analyysit suoritettiin käyttäen OPUS-spektroskopiaohjelmistoa (versio 8.5)

Divigel 0,1 % -näytteet mitattiin läpäisymenetelmällä. Transmittanssi (T) kuvaa säteilyn intensiteetin vähenemisestä aallonpituuden funktiona, kun säteily kulkee näytteen läpi. Transmittanssin tulokset esitetään yleensä suoraan absorbanssina, eli $\log_{10}(1/T)$. Kyseisessä mittaustavassa näyte asetetaan optisen lähteen ja detektorin väliin. Tässä tapauksessa vialissa oleva geelin sekanäyte asetettiin näyteosastoon. Yleiset mittaussparametrit laitteittain on esitetty taulukossa 2. Skannerin nopeus on tietoisesti asetettu MPAAII:lla 15 kHz, sillä sen löydettiin tasapainottavan muuten erilaisia mittaussasetuksia, joita ei pysty muuttamaan, ja antavan saman tasoista raakaspektriä kuin Espoon MPAI laitteisto.

Taulukko 2. Bruker MPA FT-NIR spektrometriiden mittaussparametrit ja -asetukset.

Parametri	Arvo / Asetus	Arvo / Asetus
Instrumentti	Fourier-Transform (FT) NIR: Bruker's MPA I	Fourier-Transform (FT) NIR: Bruker's MPA II
Interferometri	Michelsonin interferometri / High stability interferometer with ROCKSOLID™ permanent alignment	Michelsonin interferometri / High stability interferometer with ROCKSOLID™ permanent alignment
Valon lähde	Tungsten halogeenilamppu	Tungsten halogeenilamppu
Detektori	Indium Gallium Arsenidi (InGaAs) läpimittaukselle	Indium Gallium Arsenidi (InGaAs) läpimittaukselle
Mittaus menetelmä	Läpimittaus	Läpimittaus
Skaala		
Abssissa	cm^{-1}	cm^{-1}
Ordinaatta	A; $\log_{10}(1/T)$	A; $\log_{10}(1/T)$
Mittaussparametrit		
Alue	4000–12500 cm^{-1}	4000–12500 cm^{-1}
Resoluutio	8 cm^{-1}	8 cm^{-1}
Mittausväli	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}

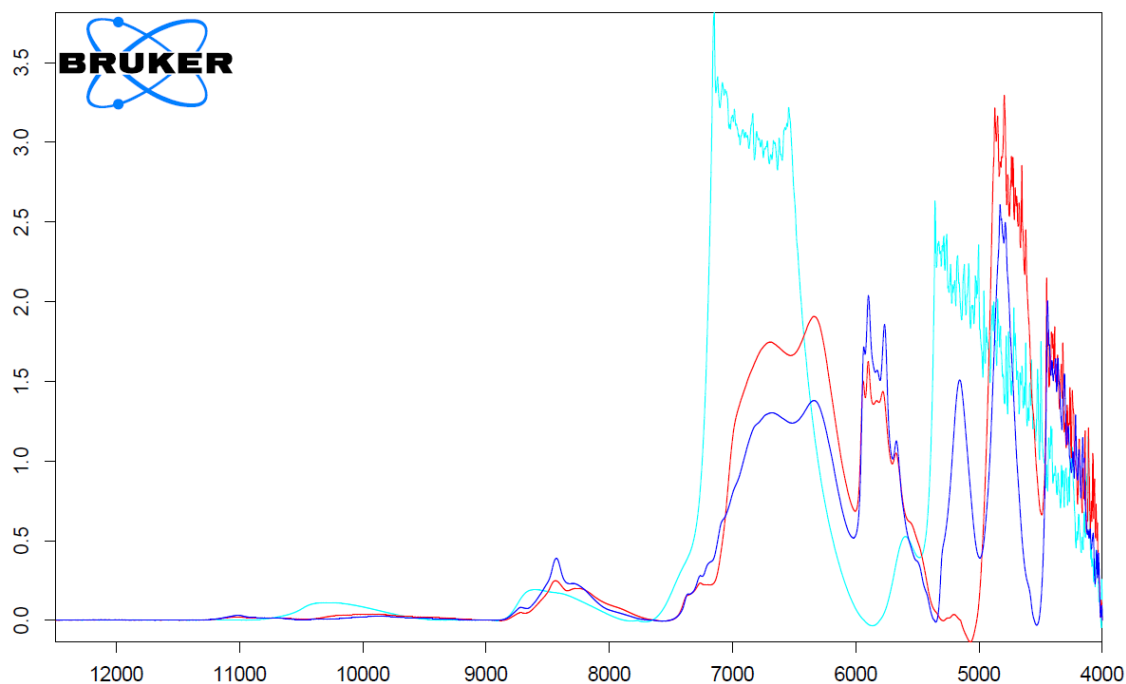
Mittauksia per spektri	64	64
Signaalin esivahvistus	1 x	1 x
Signaalin ja taustan vahvistus	Ref	Ref
Skannerin nopeus	40 kHz	15 kHz
Alipäästösuodatin	40	-2
Esivahvistin	High	Low
Lähteen asetus	Korkeaintensiteetti NIR	NIR
Tausta	Ilma (tyhjä näytepaikka)	Ilma (tyhjä näytepaikka)
Näytteenkäsittely	Geeli lasivialissa	Geeli lasivialissa

Molemmat kvantitatiiviset mallit on kalibroitu hyödyntäen monimuuttuja-analyysityökalua, PLS1 (Partial Least Squares; Projection to latent Structures). Mallissa NIRS-spektrivaste (y) on kalibroitu GC-menetelmällä saatujen varmennettujen ominaisuusarvojen (x) mukaan.

PLS1-algoritmi perustuu kaksoislineaarisiin projektiomenetelmiin, kuten esimerkiksi pääkomponentti analyysi (PCA), jossa tiedot esitetään näytesteinä (projektiio ominaisvektoriin akseliin; T) ja muuttuvat kuormitukset (ominaisvektorit, jotka ovat alkuperäisten muuttujien kulmakosineja; P). Näin luodaan uudet ortonormaali kuormitukset, jotka ovat alkuperäisten x -muuttujien lineaarisia yhdistelmiä. Näitä kutsutaan PCA:ssa pääkomponenteiksi (PC) ja PLS:ssä piileviksi muuttujiksi (LV), joita käytetään visualisoimaan spektrivaihtelu (y) tietojoukon sisällä.

Ensimmäiseen päämuuttujaan sisältyy eniten varianssitietoja, kun taas toinen päämuuttuja sisältää suurimman osan jäännöstiedoista. Kuten pääkomponentit pääkomponenttianalyysissä, PLS1-algoritmissa latenteja muuttujia (LV) käytetään selittämään vaihtelua tietojoukon sisällä. PLS1:ssä regressiotulos saadaan yhdistämällä sekä spektridatan (y) että ominaisuusdatan (x) vaihtelut. Lineaarisen pienimmän neliösumman tyyliseen laskentaan perustuva Ordinary least squares (OLS) menetelmää käytettiin etsimään sisäsuhteita ja osoittamaan sisäinen suhde. Eli ominaisuustietojen vaihtelu (x) yhdistettiin spektritietojen (y) kanssa etsimällä paras kovarianssi selittämään molemmat tietojoukot.

Propyleeniglykolin mallissa interaktiivisena alueena on 6500–5300 cm^{-1} . Etanolin mallissa interaktiivisena alueena on 9172,5–8651,7 cm^{-1} ja 6082,8–5558,3 cm^{-1} . Kuvassa 5 etanolin, propyleeniglykolin ja veden taustakorjatut NIR-spektrit mallissa käytettyjen mittausparametreillä mitattuna.



Kuva 5. Vaaleansinisellä veden NIR-spektri. Punaisella propyleeniglykoli ja sinisellä etanolin NIR-spektri koko mittausalueelta.

Mallien kehityksessä kaikki NIR-spektrit tallennettiin aaltolukualueella $4000\text{--}12500\text{ cm}^{-1}$ ja 8 cm^{-1} resoluutiolla. Mallinnuksessa spektrien esikäsitteilyyn käytettiin ensimmäistä derivaattaa (17 pts). Spektrin ensimmäisen derivaatan avulla nähdään spektrin nouseminen ja laskeminen selkeämmin.

Ensimmäisen johdannaiskäsitteilyn lisäksi keskiarvokeskitystä sovellettiin kaikille spektreille. Keskiarvokeskityksen yhteydessä keskimääräinen spektri ja keskiarvokomponenttiarvot vähennetään ennen kuin PLS-malliin perustuvat tunnistus tai kvantitatiiviset mallinnukset suoritetaan.

Mallien kehityksen jälkeen NIRS-menetelmä validoitiin vaadittavien viranomaismääräyksien ja -ohjeistuksien mukaan, (ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 1995 & 1997, European Pharmacopoeia 8. painos 2015, United States Pharmacopoeia 38. painos 2015) menetelmän validointiin kuuluivat spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, tarkkuus, toistettavuus ja haavoittuvuus.

5.5 Ensisijaisen analyysimenetelmän tulokset haaste testissä

Näytteet analysoitiin GC-menetelmällä Orionilla, CQC-laboratoriossa Turussa, rinnakkain geelin NIRS-mittausten kanssa. Tuotanto-erien sekageelinäyte valmistettiin sekoittamalla 20 pussin sisältö. GC-näytteen valmistuksen yhteydessä valmistettiin NIRS mittauksiin näyte. Eli molemmilta NIRS laitteelta oli molemmille mitatulle näytteille oma ensisijainen vertailutulos.

6 Validointi

6.1 Vaadittavat kriteerit

Kyseessä on validoidun menetelmä siirtäminen toiselle paikkakunnalle. Menetelmän mallien suoritus ei muutu mitenkään, ainoastaan raakaspektrit ovat tasoltaan erilaisia kuin toisella paikkakunnalla, johtuen eri laitteista. Tällöin tarvitsee uudelleen validoida laboratorioden välinen toistettavuus. Tämän validoimiseksi analysoin kolmesta eri tuotantoerästä kuusi rinnakkaista näytettä. Jokaisen erän kuuden rinnakkaisen näytteen keskiarvoja vertailtiin vastaaviin tuloksiin toiselta paikkakunnalta. Tulosten absoluuttinen keskiarvojen ero sai olla korkeintaan 3,0 %-yksikköä. Tällöin laitteiden välillä ei ole merkittävää eroa.

Taulukko 3. Validointikriteerit menetelmän siirrolle.

Laboratorioiden välinen toistettavuus	Analysoidaan molemmilla paikkakunnilla etanolin ja propyleeniglykolin pitoisuus kuudesta erikseen valmistetusta näytteestä kolmesta eri erästä Raportoitavat arvot: keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja 90 % luottamusväli, sekä analyysipaikkojen keskiarvojen absoluuttinen ero	Analyysipaikkojen keskiarvojen absoluuttinen ero ≤ 3.0 %-yksikköä.
Haavoittuvuus (Näytteiden säilyvyys 48 h ja 72 h)	Siirtonäytteet analysoidaan uudelleen noin. 48 h ja 72 h kuluttua valmistuksesta Raportoitavat arvot: keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja 90 % luottamusväli, sekä tulos settien keskiarvojen absoluuttinen ero	Keskiarvojen absoluuttinen ero tulos settien välillä ≤ 2.0 %-yksikköä

6.2 Tulokset

Laboratorioiden välisessä toistettavuudessa raja-arvo oli ≤ 3.0 %-yksikköä. Tämä vaatimus täyttyi jokaisen erän propyleeniglykolin ja etanolin osalta. Taulukossa 4 ja 5 on esitetty eräkohtaisesti siirtoasettien tulosten vertailu paikkakuntien tulosten välillä.

Näytteiden säilyvyys analysointiin tarkoitettussa vialeissa oli hyvä. Taulukossa 6 on esitetty suhteellisen prosenttimuutos turussa suoritettuun ensimmäiseen näytteen analyysiin.

Taulukoissa 7 ja 8 on esitetty 48 tunnin tulokset näytteiden säilyvyydessä eräkohtaisesti. Taulukossa 9 ja 10 on esitetty 72 tunnin tulokset näytteiden säilyvyydessä eräkohtaisesti. Näytteiden säilyvyydelle määritetty hyväksymiskriteeri; keskiarvojen absoluuttinen ero ≤ 2.0 %-yksikköä täyttyi kaikkien erien ja aikapisteiden osalta molemmilla malleilla, etanolilla ja propyleeniglykolilla.

6.2.1 Pitoisuus mallien siirtotulokset

Tuloksien välillä on selvä ero etanolin ja propyleeniglykolin pitoisuuden mallintamisessa. Turussa etanolin pitoisuudet ovat järjestelmällisesti matalammat kuin Espoossa. Propyleeniglykolin mallinnuksessa Turussa saadaan järjestelmällisesti matalampaa tulosta. Etanolin pitoisuustulokset muuttuivat paljon vähemmän kuin propyleeniglykolin tulokset, siirryttäessä Turkuun. Erän 1906991 propyleeniglykolin pitoisuustulosten ero oli juuri 3,0 %-yksikköä ja täytti vaatimuksen.

Taulukko 4. Kolmen eri erän etanolin pitoisuustulokset lähetävästä ja vastaanottavasta laboratoriosta. Jokaisen erän keskiarvojen absoluuttinen ero on < 3,0 %-yksikköä.

ESPOO

1906991 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3300
Luottamusväli 90 % alaraja	96,2329
Luottamusväli 90 % yläraja	96,8929
Keskiarvo	96,5629
Keskihajonta	0,6366
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6592

TURKU

1906991 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2942
Luottamusväli 90 % alaraja	95,0584
Luottamusväli 90 % yläraja	95,6468
Keskiarvo	95,3526
Keskihajonta	0,5675
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5951

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 1,2103 %-yksikköä

2053551 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2217
Luottamusväli 90 % alaraja	95,9003
Luottamusväli 90 % yläraja	96,3437
Keskiarvo	96,1220
Keskihajonta	0,4276
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,4449

2053551 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1814
Luottamusväli 90 % alaraja	95,1229
Luottamusväli 90 % yläraja	95,4857
Keskiarvo	95,3043
Keskihajonta	0,3499
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3671

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,8177 %-yksikköä

2108436 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2899
Luottamusväli 90 % alaraja	96,4360
Luottamusväli 90 % yläraja	97,0158
Keskiarvo	96,7259
Keskihajonta	0,5592
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5781

2108436 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1736
Luottamusväli 90 % alaraja	95,5871
Luottamusväli 90 % yläraja	95,9343
Keskiarvo	95,7607
Keskihajonta	0,3349
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3497

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,9652 %-yksikköä

Taulukko 5. Kolmen eri erän propyleeniglykolin pitoisuustulokset lähetävästä ja vastaanottavasta laboratorion. Jokaisen erän keskiarvojen absoluuttinen ero on < 3,0 %-yksikköä.

ESPOO

1906991 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3316
Luottamusväli 90 % alaraja	102,5726
Luottamusväli 90 % yläaraja	103,2357
Keskiarvo	102,9042
Keskihajonta	0,6396
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6215

TURKU

1906991 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3126
Luottamusväli 90 % alaraja	105,5308
Luottamusväli 90 % yläaraja	106,1559
Keskiarvo	105,8433
Keskihajonta	0,6029
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5696

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 2,9392 %-yksikköä

2053551 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2809
Luottamusväli 90 % alaraja	102,6616
Luottamusväli 90 % yläaraja	103,2234
Keskiarvo	102,9425
Keskihajonta	0,5418
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5263

2053551 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3476
Luottamusväli 90 % alaraja	104,8499
Luottamusväli 90 % yläaraja	105,5451
Keskiarvo	105,1975
Keskihajonta	0,6705
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6373

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 2,2550 %-yksikköä

2108436 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,4775
Luottamusväli 90 % alaraja	100,9900
Luottamusväli 90 % yläaraja	101,9449
Keskiarvo	101,4674
Keskihajonta	0,9210
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,9077

2108436 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3683
Luottamusväli 90 % alaraja	103,8976
Luottamusväli 90 % yläaraja	104,6341
Keskiarvo	104,2658
Keskihajonta	0,7104
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6813

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 2,7984 %-yksikköä

6.2.2 Näytteiden säilyvyys tulokset

Näytteiden säilyvyys valmistuksen jälkeen tutkittiin samalla. Aikaisemmassa validointiraportissa näytteiden säilyvyys oli tutkittu 21 tuntiin saakka. Siirryttäessä toiselle analyysipaikkakunnalle valmiiden näytteiden kanssa, tämä aikaikkuna on aika lyhyt. Nyt jokainen näyte mitattiin vastaanottavassa analyysipaikassa, eli Turussa 48 tunnin ja 72 tunnin kuluttua ensimmäisestä Turun analyysipaikan analyysistä. Näin osoitetaan näytteiden säilyvyys huoneen lämmössä useamman päivän ajan. Säilyvyys määritettiin suhteellisina prosentteina ja laskettiin verrattuna turun ensimmäiseen analysointihetkeen verrattuna, joka oli 100 %. Tulokset esitettynä taulukossa 6. Kaikki näytteet säilyivät erittäin hyvin ja näytteiden säilyvyysaika voidaan nostaa 72 tuntiin saakka. Aikapisteittäin eriteltyt tulokset taulukoissa 7-10.

Taulukko 6. Suhteellinen prosenttiosuus (suht. %). Laskettu suhteessa ajanhetkeen 0 joka on 100 %.

	Suhteellinen prosenttiosuus (suht. %)		
	0 h	48 h	72 h
1906991 näyte setti (EtOH)	100 %	100,16 %	100,07 %
2053551 näyte setti (EtOH)	100 %	100,08 %	99,84 %
2108436 näyte setti (EtOH)	100 %	99,86 %	99,83 %
1906991 näyte setti (PG)	100 %	100,06 %	100,09 %
2053551 näyte setti (PG)	100 %	99,93 %	100,30 %
2108436 näyte setti (PG)	100 %	100,34 %	99,98 %

Taulukko 7. Kolmen erillisen erän etanolipitoisuuden tulokset vastaanottavan laboratorion ensimmäisestä analyysistä ja 48 tunnin säilyvyyden tulokset. Jokaisen erän säilyvyyden keskiarvojen absoluuttinen ero on alle 2,0 %

TURKU 0 h

1906991 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2942
Luottamusväli 90 % alaraja	95,0584
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,6468
Keskiarvo	95,3526
Keskihajonta	0,5675
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5951

TURKU 48 h

1906991 näyte setti 48 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3086
Luottamusväli 90 % alaraja	95,1999
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,8171
Keskiarvo	95,5085
Keskihajonta	0,5953
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6233

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,1559 %-yksikköä

2053551 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1814
Luottamusväli 90 % alaraja	95,1229
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,4857
Keskiarvo	95,3043
Keskihajonta	0,3499
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3671

2053551 näyte setti 48 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1435
Luottamusväli 90 % alaraja	95,2365
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,5235
Keskiarvo	95,3800
Keskihajonta	0,2514
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,2636

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,0757 %-yksikköä

2108436 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1736
Luottamusväli 90 % alaraja	95,5871
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,9343
Keskiarvo	95,7607
Keskihajonta	0,3349
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3497

2108436 näyte setti 48 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2341
Luottamusväli 90 % alaraja	95,3933
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,8614
Keskiarvo	95,6273
Keskihajonta	0,3932
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,4112

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,1333 %-yksikköä

Taulukko 8. Kolmen erillisen erän propyleeniglykolin pitoisuuden tulokset vastaanottavan laboratorion ensimmäisestä analyysistä ja 48 tunnin säilyvyyden tulokset. Jokaisen erän säilyvyyden keskiarvojen absoluuttinen ero on alle 2,0 %-yksikköä.

TURKU 0 h

1906991 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3126
Luottamusväli 90 % alaraja	105,5308
Luottamusväli 90 % yläaraja	106,1559
Keskiarvo	105,8433
Keskihajonta	0,6029
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5696

TURKU 48 h

1906991 näyte setti 48 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,4000
Luottamusväli 90 % alaraja	105,5058
Luottamusväli 90 % yläaraja	106,3058
Keskiarvo	105,9058
Keskihajonta	0,6451
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6091

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,0625 %-yksikköä

2053551 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3476
Luottamusväli 90 % alaraja	104,8499
Luottamusväli 90 % yläaraja	105,5451
Keskiarvo	105,1975
Keskihajonta	0,6705
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6373

2053551 näyte setti 48 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2955
Luottamusväli 90 % alaraja	104,8320
Luottamusväli 90 % yläaraja	105,4230
Keskiarvo	105,1275
Keskihajonta	0,2514
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,4804

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,0700 %-yksikköä

2108436 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3683
Luottamusväli 90 % alaraja	103,8976
Luottamusväli 90 % yläaraja	104,6341
Keskiarvo	104,2658
Keskihajonta	0,7104
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6813

2108436 näyte setti 48 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3695
Luottamusväli 90 % alaraja	104,2496
Luottamusväli 90 % yläaraja	104,9887
Keskiarvo	104,6192
Keskihajonta	0,5855
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5597

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,3533 %-yksikköä

Taulukko 9. Kolmen erillisen erän etanolipitoisuuden tulokset vastaanottavan laboratorion ensimmäisestä analyysistä ja 72 tunnin säilyvyyden tulokset. Jokaisen erän säilyvyyden keskiarvojen absoluuttinen ero on alle 2,0 %-yksikköä.

TURKU 0 h

1906991 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,2942
Luottamusväli 90 % alaraja	95,0584
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,6468
Keskiarvo	95,3526
Keskihajonta	0,5675
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5951

TURKU 72 h

1906991 näyte setti 72 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3842
Luottamusväli 90 % alaraja	95,0396
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,8079
Keskiarvo	95,4238
Keskihajonta	0,7411
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,7766

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,0712 %-yksikköä

2053551 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1814
Luottamusväli 90 % alaraja	95,1229
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,4857
Keskiarvo	95,3043
Keskihajonta	0,3499
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3671

2053551 näyte setti 72 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1677
Luottamusväli 90 % alaraja	94,9837
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,3190
Keskiarvo	95,1513
Keskihajonta	0,3234
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3399

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,1530 %-yksikköä

2108436 näyte setti (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,1736
Luottamusväli 90 % alaraja	95,5871
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,9343
Keskiarvo	95,7607
Keskihajonta	0,3349
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,3497

2108436 näyte setti 72 h (EtOH)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3052
Luottamusväli 90 % alaraja	95,2933
Luottamusväli 90 % yläaraja	95,9037
Keskiarvo	95,5985
Keskihajonta	0,5887
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6158

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,1622 %-yksikköä

Taulukko 10. Kolmen erillisen erän propyleeniglykolin pitoisuuden tulokset vastaanottavan laboratorion ensimmäisestä analyysistä ja 72 tunnin säilyvyyden tulokset. Jokaisen erän säilyvyyden keskiarvojen absoluuttinen ero on alle 2,0 %-yksikköä.

TURKU 0 h

1906991 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3126
Luottamusväli 90 % alaraja	105,5308
Luottamusväli 90 % yläaraja	106,1559
Keskiarvo	105,8433
Keskihajonta	0,6029
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5696

TURKU 72 h

1906991 näyte setti 72 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,4938
Luottamusväli 90 % alaraja	105,4496
Luottamusväli 90 % yläaraja	106,4371
Keskiarvo	105,9433
Keskihajonta	0,9524
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,8990

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,1000 %-yksikköä

2053551 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3476
Luottamusväli 90 % alaraja	104,8499
Luottamusväli 90 % yläaraja	105,5451
Keskiarvo	105,1975
Keskihajonta	0,6705
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6373

2053551 näyte setti 72 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3445
Luottamusväli 90 % alaraja	105,1638
Luottamusväli 90 % yläaraja	105,8529
Keskiarvo	105,5083
Keskihajonta	0,6646
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6299

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,3108 %-yksikköä

2108436 näyte setti (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3683
Luottamusväli 90 % alaraja	103,8976
Luottamusväli 90 % yläaraja	104,6341
Keskiarvo	104,2658
Keskihajonta	0,7104
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,6813

2108436 näyte setti 72 h (PG)	
Luottamustaso (90,0 %)	0,3238
Luottamusväli 90 % alaraja	103,9212
Luottamusväli 90 % yläaraja	104,5688
Keskiarvo	104,2450
Keskihajonta	0,6246
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,5992

Keskiarvojen absoluuttinen ero = 0,0208 %-yksikköä

6.3 Haaste-testi

NIR-menetelmään perustuvat analyysimenetelmät ovat aina myyntiluvassa vaihtoehtoisia menetelmiä. Tämä tarkoittaa sitä, että myyntiluvassa on määritelty ensisijainen analyysimenetelmä ja tätä menetelmää vasten voidaan vaihtoehtoinen menetelmä ottaa määrääjäksi käyttöön. Vaihtoehtoisen ja ensisijaisen analyysimenetelmän antamien tulosten ero ei saa kuitenkaan merkittävästi erota toisistaan.

Ennen menetelmien käyttöönottoa tässä tapauksessa molempien paikkakuntien menetelmien antamat tulokset verrataan ensisijaisen menetelmän antamaan tulokseen. Kun tämäkin vaatimus täyttyy, on molemmilla paikkakunnilla virallisesti mahdollista suorittaa analyysit. Taulukossa 11 on haastetestin tulokset.

Taulukko 11. Haastetestin tulokset. Molempien paikkakuntien molemmat menetelmät alittivat vaatimusrajan ja ovat hyväksyttävissä käyttöön.

Haastetestin tulokset			
	Etanoli		
	Ensisijainen (GC)	NIR (Turku)	NIR (Espoo)
1. Näyte	100,103	95,831	96,328
2. Näyte	100,376	96,315	97,386
Keskiarvo	100,239	96,073	96,857
Keskiarvojen absoluuttinen ero verrattuna ensisijaiseen (GC)	0	4,1664305	3,3824305
Hyväksymis raja		< 5%	< 5%
Tulos		OK	OK
	Propyleeniglykoli		
	Ensisijainen (GC)	NIR (Turku)	NIR (Espoo)
1. Näyte	100,117	102,580	101,040
2. Näyte	99,957	103,590	100,990
Keskiarvo	100,037	103,085	101,015
Keskiarvojen absoluuttinen ero verrattuna ensisijaiseen (GC)	0	3,047967	0,977967
Hyväksymis raja		< 5%	< 5%
Tulos		OK	OK

Haastetestissä vaatimukset saavutettiin ja tulosten perusteella menetelmät molemmilla paikkakunnilla ovat soveltuvia Divigeli 0,1 % tunnistamiseen ja kvantitointiin.

7 Päätelmät

Työn tavoitteena oli siirtää NIR menetelmä Espoon Bruker MPA I laitteelta Turkuun Brukerin MPA II laitteelle. Laitteiden tiedettiin eroavan hieman toisistaan, mutta tarkoitus oli toteuttaa siirto hyödyntäen pelkästään laskennalliseen spektrin standardointiin perustuvaa PDS menetelmää. Työn edetessä PDS menetelmän käyttö ei ollutkaan mahdollista ja mallin siirtäminen toteutettiin tavanomaisen analyysimenetelmän siirron mukaisesti.

Turun laitteella ei ollut mahdollisuutta tuoda malleja PDS menetelmää hyödyntäen. Tämän takia valmistelut menetelmän siirtämiseksi Turkuun tätä menetelmää hyödyntäen jouduttiin keskeyttämään. PDS menetelmä soveltuu paremmin täysin erilaisen NIR-spektreihin perustuvien mallien yhteen sovittamiseksi ja tuomiseksi laitteistolle. PDS menetelmää hyödyntävään menetelmän siirtoon löytyy päivitetty ICH:n ohjeistus, jossa suositellaan juuri PDS menetelmän hyödyntämistä. Nyt menetelmän siirto toteutettiin HPLC menetelmän siirto-ohjeistus mukailleen. Lisähaasteeksi tällä tavalla toimittaessa tuli validointikriteerien määrittäminen. Siirtokriteerit tuli määrittää riittävän tiukoiksi, jotta siirretyn menetelmän tulostason luotettavuus säilyy. Toisaalta uudella laitteella analysoitaessa laitekohtaisista optisista poluista johtuen spektri sisältä paljon turhaa virhettä, jota ei nyt pystytty poistamaan ja se piti sisällyttää menetelmän siirtokriteereihin. PDS menetelmää hyödynnettäessä tällaisia ei olisi tarvinnut määrittää, sillä eroa ei olisi tullut. Nyt rajojen asetannassa perustelut nojaavat HPLC menetelmien siirroissa yleisesti käytettäviin rajoihin.

Työssä ei hyödynnetty toista esittelemääni spektrien standardisointiin perustuvaa laskennallista menetelmää, kulmakertoimen ja virheen korjausta. Laitevalmistajan ohjelmistossa tällainen mahdollisuus löytyy, mutta sen toimintaa ei ohjeissa kuvata kovin tarkasti. Sen takia tämän menetelmän käyttämisen soveltuvuuden arviointi ei soveltunut osaksi työtä. ICH:n ohjeistuksessa ei oteta myöskään selvästi kantaa tämän menetelmän laajasta käyttämisestä. Tulevissa siirroissa tämän menetelmän käytön soveltuvuutta arvioidaan uudelleen. Tulostasojen korjaamiseen menetelmä soveltuisi, mutta sen soveltavuus spektrien eroavaisuuksia tasoittamisen on epäselvää.

Työssä saatiin NIR analyysimenetelmä siirrettyä onnistuneet ja viranomaisvaatimukset täyttäen toiselle analyysipaikalle. Tulevia analyysisiirtoja varten perehdytään vielä tarkemmin kulmakertoimen ja virheen korjaukseen perustuvan menetelmän hyödyntämiseen.

Lähteet

- [1] Sosiaali- ja terveysministeriö, ”Sosiaali- ja terveysministeriön ja Fimean tulossopimus vuosille 2020-2023 tulostavoitteet 2021,” Sosiaali- ja terveysministeriö, Helsinki, 2021.
- [2] Sosiaali- ja terveysministeriö, ”Sosiaali- ja terveysministeriön ja Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuksen tulossopimus vuosille 2010-2011; Tulostavoitteet 2010,” Sosiaali- ja terveysministeriö, Helsinki, 2009.
- [3] European medicine agency, ”From laboratory to patient: the journey of a centrally authorised medicine,” European medicine agency, Amsterdam, 2019.
- [4] ICH Committee for Medicinal Products for Human Use, ”ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures,” European Medicines Agency, Amsterdam, 2022.
- [5] European Medicines Agency, ”Guideline on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations,” European Medicines Agency, London, 2014.
- [6] M. Dyrby, S. Engelsen, L. Norgaard, M. Bruhn ja L. Lundsberg-Nielsen, ”Chemometric Quantitation of the Active Substance (Containing C≡N) in a Pharmaceutical Tablet Using Near-Infrared (NIR) Transmittance and NIR FT-Raman Spectra,” *Appl. Spectrosc.*, nro 56, pp. 579-585, 2002.
- [7] Y. Ozaki, C. Huck, S. Tsuchikawa and S. Balling Engelsen, *Near-Infrared Spectroscopy*, Singapore: Springer, 2021.
- [8] M. Blanco ja I. Villarroya, ”NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool,” *Trends Anal. Chem.*, nro 21, pp. 240-250, 2002.
- [9] J. Luybaert, D. Massart ja Y. Vander Heyden, ”Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis,” *Talanta*, nro 72, pp. 865-883, 2007.
- [10] European directorate for the quality of medicines & healthcare, *European Pharmacopoeia 10.0*, Strasbourg: European directorate for the quality of medicines & healthcare, Council of Europe, 2019.
- [11] G. Reich, ”Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, nro 57, pp. 1109-1143, 2005.
- [12] H. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata ja H. Heise, ”Near-Infrared Spectroscopy, Principles, Instruments, Applications,” *Wiley-VCH*, 2002.
- [13] E. W. Ciurezak, ”Basic principles of near-infrared spectroscopy,” tekijä: *Handbook of near-infrared analysis*, New York, Marcel Dekker, Inc., 2001, pp. 7-18.

- [14] P. Fellgett, "On the Ultimate Sensitivity and Practical Performance of Radiation Detectors," *Journal of the Optical Society of America*, osa/vuosik. 39, nro 11, pp. 970-976, 1949.
- [15] P. R. Griffiths, H. R. Sloane ja R. W. Hannah, "Interferometers vs Monochromators: Separating the Optical and Digital Advantages," *Applied Spectroscopy*, osa/vuosik. 31, nro 6, p. 485, 1977.
- [16] P. Connes, "How light is analyzed," tekijä: *Laser and Light*, ed. by A. Schawlow, San Francisco CA, Freeman, 1969, p. 35.
- [17] R. Schneider ja K. Kovar, "analysis of ecstasy tablets: comparison of reflectance and transmittance near infrared spectroscopy," *Forensic Sci. Int.*, nro 134, pp. 187-195, 2003.
- [18] O. E. Noord, "Multivariate calibration standardization," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, osa/vuosik. 25, nro 2, pp. 85-97, 1994.
- [19] D. Bouveresse ja D. Massart, "Standardisation of near-infrared spectrometric instruments: A review," *Vibrational Spectroscopy*, osa/vuosik. 11, nro 1, pp. 3-15, 1996.
- [20] Y. Wang, D. J. Veltkamp ja B. R. Kowalski, "Multivariate instrument standardization," *Analytical chemistry*, osa/vuosik. 63, nro 23, pp. 2750-2756, 1991.