



# Tecnología analítica de procesos

## Uso de la espectroscopía Raman como herramienta versátil

**Thomas Padlo, Philip Zhou, Katherine A. Bakeev**

B & W Tek, Newark, DE, USA

**Jaime de Sousa**

Microbeam S.A. (distribuidor y servicio técnico de B & W Tek)

La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica idónea para el desarrollo y control de procesos en los laboratorios de desarrollo de las industrias química, farmacéutica y similares. Este artículo demuestra la utilidad de la espectroscopía portátil Raman como una herramienta sencilla y versátil para la Tecnología Analítica de Procesos (PAT), para la identificación de materias primas, monitorización *in situ* de reacciones en el desarrollo de Ingredientes Farmacéuticos Activos (API) y para la monitorización de procesos en tiempo real

**PALABRAS CLAVE:** Espectroscopía, Control de procesos

Raman spectroscopy is a spectroscopic technique suitable for the development and control of processes in the development laboratories of the chemical, pharmaceutical and similar industries. This paper demonstrates the usefulness of Raman portable spectroscopy as a simple and versatile tool for Process Analytical Technology (PAT), for the identification of raw materials, *in situ* monitoring of reactions in the development of Active Pharmaceutical Ingredients (API) and for the monitoring of processes in real time

**KEYWORDS:** Spectroscopy, Process control

### INTRODUCCIÓN

La analítica de procesos ha estado en uso durante casi 70 años, comenzando en las industrias petroquímica y química, utilizando fotómetros infrarrojos y dispositivos como sensores de oxígeno y conductividad como analizadores de procesos, para controlar los procesos de fabricación y refino. Estos sensores uniparamétricos y otros, continúan siendo utilizados incluso cuando se adoptan sensores multiparamétricos incluyendo los sistemas espectroscópicos. El análisis de procesos puede darnos el pulso de un proceso y es importante en la fabricación de productos de calidad, desde la recepción de materia prima y el desarrollo de procesos de reacción, hasta la producción a gran escala.

La Tecnología Analítica de Procesos (PAT, por sus siglas en inglés) es el uso de analizadores off-line, at-line o in-line para obtener datos analíticos más rápido, con mayor frecuencia y con alta precisión para aumentar los controles de fabricación de materiales biológicos o químicos, así como una ayuda en la comprensión del proceso para su optimización y mejora [2].

En la industria farmacéutica, el interés en PAT ha crecido desde la publicación en 2004 de la guía de la FDA de EE.UU. sobre la utilización de PAT en la industria farmacéutica. PAT es más que la medida de un proceso, ya que se pretende garantizar un produc-

to consistente, y por tanto comienza en la verificación de la materia prima utilizada en la fabricación. Las herramientas espectroscópicas, incluyendo la espectroscopía Raman, se pueden utilizar *in situ* o ser conectadas a un bucle de muestreo en un proceso, para monitorizar la composición química con información espectral completa, dando una imagen molecular total de los cambios que ocurren en el proceso.

La cantidad de datos que se pueden recoger puede superar la velocidad dada de un proceso, de forma que en las primeras fases del desarrollo del mismo, puede utilizarse para comprender un proceso y su dinámica, posibles reacciones secundarias y vías cinéticas. La capacidad de controlar los procesos para lograr productos consistentes a través de la verificación de datos durante la producción, y la comprensión y el control del proceso, se reconocen en la guía de 2012 de la Agencia Europea de Medicamentos sobre las pruebas de liberación en tiempo real [3].

## ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

La espectroscopía Raman es una forma de espectroscopía molecular basada en láser, que proporciona especificidad y sensibilidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias a través de sus vibraciones moleculares. Se utiliza en muchos ambientes diferentes como herramienta analítica para el estudio de sólidos, líquidos, lodos y gases. La instrumentación de mano se puede utilizar para la identificación no destructiva de materias primas entrantes. La técnica tiene la capacidad de realizar mediciones a través de envases transparentes o traslúcidos, minimizando la necesidad de muestreo y proporcionando una identificación rápida. La espectroscopía Raman posee alta selectividad y especificidad para la identificación de muchos

compuestos orgánicos e inorgánicos incluyendo disolventes, excipientes e ingredientes activos típicos. El espectro Raman de diferentes polimorfos de un material es a menudo bastante distinto, ya que las vibraciones moleculares varían con la disposición de las moléculas, lo que permite una fácil discriminación. Un ejemplo de esto se da en la Figura 1, en la que se muestran los espectros Raman de alfa-lactosa y beta-lactosa medidos con el NanoRam® portátil de B & W Tek.

## ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA MONITORIZACIÓN DE PROCESOS

Muchos instrumentos Raman están interconectados mediante una sonda acoplada a una fibra óptica, lo que le da la versatilidad y flexibilidad necesarias para realizar mediciones en diferentes lugares, incluyendo *in situ*, como es, a menudo, requisito para la monitorización de procesos. Hace más de una década, los desarrollos de hardware que condujeron

FIGURA 1. Espectros Raman de dos formas polimórficas de lactosa: alfa-lactosa y beta-lactosa

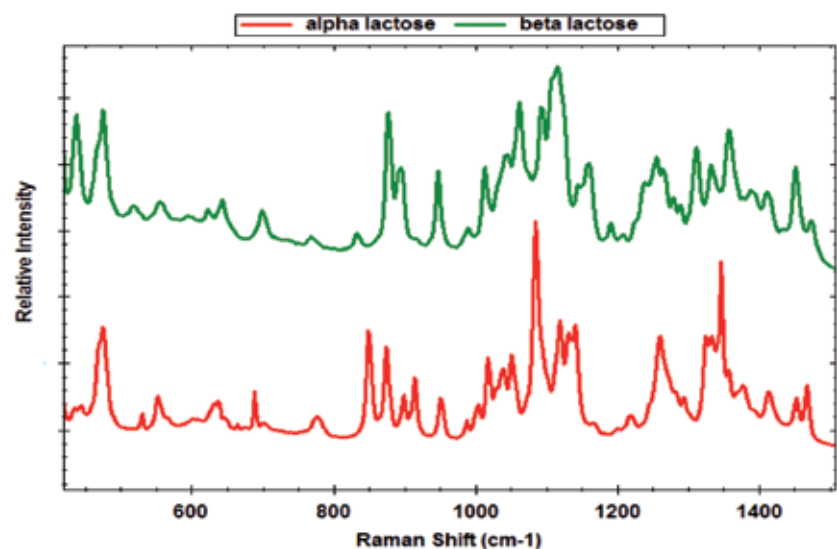
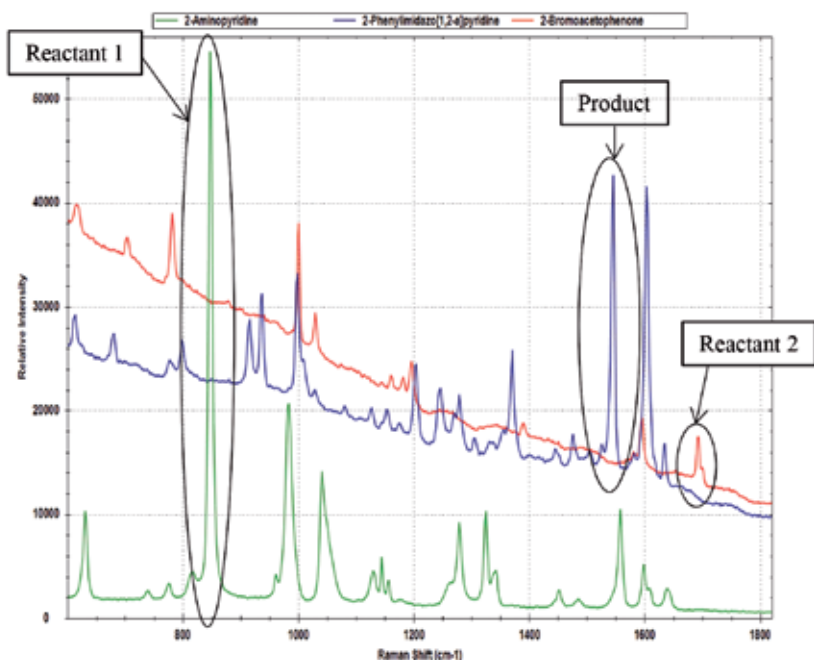


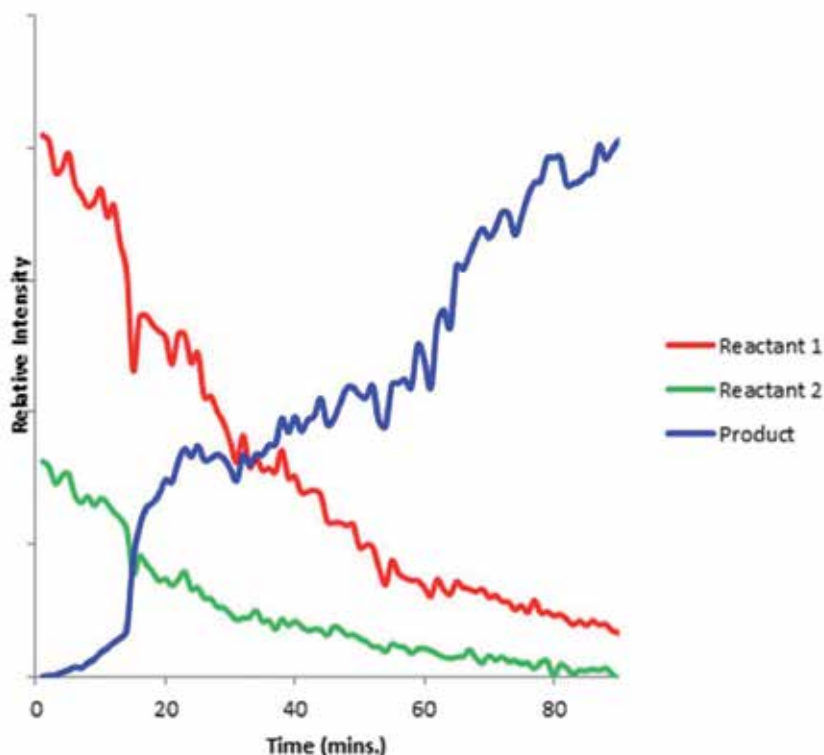
FIGURA 2. Espectrómetro portátil i-Raman® Plus con sonda de inmersión acoplada a fibra inmersa en el medio de reacción



**FIGURA 3.** Superposición de los espectros Raman de los reactivos y producto para la primera síntesis, Verde es 2-aminopiridina (reactivo), Rojo es 2-bromoacetofenona (reactivo) y Azul es el Producto Final: 2-Fenilimidazo [1,2-a] piridina.



**FIGURA 4.** Evolución máxima de los dos picos de reactivo y producto



a un aumento en la adopción de la espectroscopía Raman, han sido destacados como el desarrollo de láseres compactos, la introducción de detectores de dispositivos de carga espectroscópica, mejoras en la óptica de muestreo (incluidas las sondas de fibra óptica) y los avances en poderosos ordenadores personales y software asociado, para recolectar y analizar grandes volúmenes de datos [4] Estos, así como el avance de la tecnología en la miniaturización por láser y espectrómetro, y filtros mejorados para el rechazo de la luz láser y las sondas de fibra óptica, han permitido el desarrollo de sistemas de espectroscopía Raman portátiles que se pueden desplegar y transportar a diferentes ubicaciones para usos que incluyen análisis de procesos.

Existen otras técnicas espectroscópicas complementarias a Raman tales como FTIR y NIR, pero debido a la interfaz de muestreo flexible de la espectroscopía Raman, la alta tasa de muestreo y la alta especificidad espectral, Raman es una herramienta de valor incalculable para el análisis cualitativo y cuantitativo de sistemas químicos, y para la monitorización de reacción y determinación del punto final de la síntesis química y reacciones de polimerización [5], hidrogenación, hidrólisis y caracterización polimórfica. El rango de operaciones farmacéuticas en las que Raman se ha aplicado para PAT incluye el diseño de producto, la síntesis de API, formulación, cristalización, molienda, mezcla, granulación, secado, elaboración de comprimidos, embalaje y verificación del producto final [6, 7].

La aplicación de las herramientas PAT a principios del proceso de desarrollo proporcionan la comprensión del proceso y ayudan en el diseño de procesos robustos para fabricar productos de calidad de manera consistente. En el desarrollo de un proceso, hay muchos parámetros que pueden ser evaluados y muchos experimentos realizados, con el fin de optimizar el rendimiento, la pureza y el tiempo de ciclo. Para enten-

der el impacto de los cambios de los parámetros del proceso, en el propio proceso y los productos se pueden realizar mediciones *in situ* que relacionen directamente los parámetros del proceso con las propiedades del producto.

En la elección de las herramientas de medición durante el desarrollo del proceso, se deben definir las necesidades del sistema químico en términos de "propósito, especificidad, sensibilidad, tiempo de ciclo, en línea / fuera de línea, cualitativo / cuantitativo, precisión y exactitud", y debe ser elegida la tecnología apropiada que cumpla los criterios definidos [8, 9]. En las primeras fases del desarrollo del proceso, disponer de información puramente cualitativa sobre el progreso de la reacción puede ser suficiente para medir la terminación de la reacción. La evolución temporal de la reacción puede determinarse a partir de la tendencia del reactivo, y las concentraciones relativas de producto basadas en la altura o área del pico en un espectro pueden usarse para seguir una reacción, incluso cuando otros parámetros de reacción, tales como disolvente y otros reactivos o temperatura, varían de una reacción a otra.

En reacciones en las que se requiere un control estequiométrico, puede ser necesaria una medida cuantitativa de las concentraciones de reactivos. Pueden realizarse mediciones fuera de línea por HPLC y desarrollarse modelos de calibración cuantitativos, pero estos modelos son dependientes de la matriz y, a menudo, requieren una actualización o un nuevo desarrollo cuando se cambia la matriz de reacción.

Vamos a presentar un ejemplo de Raman aplicado en el desarrollo de proceso y también un ejemplo de monitorización cuantitativa de un proceso de cristalización a gran escala. En ambos casos se utilizó la espectroscopía portátil Raman, proporcionando la versatilidad para utilizar el equipo en un laboratorio de desarrollo de procesos y trasladarlo entre laboratorios para monitorizar diferentes reacciones a medida que continuaba el trabajo de desarrollo, y posteriormente transferir el equipo para monitorizar el proceso a gran escala.

### DETALLES EXPERIMENTALES PARA LA COMPRENSIÓN DEL PROCESO DE SÍNTESIS DE API

El objetivo de este estudio fue determinar el punto final de la reacción química para la síntesis de 2-fenilimidazo [1,2-a] piridina. Este compuesto se encontraba en desarrollo como API para química medicinal, y la cromatografía en capa fina tradicional (TLC) se utilizó para verificar la terminación de la reacción. Habitualmente se toman muy pocas alícuotas durante las reacciones a pequeña escala, y el cálculo del tiempo para el muestreo de determinación del punto final se basa en la observación de una precipitación en la mezcla de reacción, seguida de la prueba de TLC. La información sobre el progreso de la reacción, así como la posible formación de productos intermedios y productos secundarios, sólo es posible cuando los espectros Raman se recogen regularmente a lo largo de la reacción.

## Empresa especializada en el ámbito de la calibración, validación y montaje de equipos electrónicos y de sistemas de control



integramos soluciones

#### Calibración:

- Calibración *in situ* y en laboratorio
- Realización de planes de calibración
- Servicio integral de calibraciones

#### Validaciones / Cualificaciones:

- Validación y mapeo de equipos térmicos
- Validaciones de procesos
- Cualificación de sistemas informáticos
- Cualificación de instalaciones y equipos
- Cualificación de sistemas

#### Montaje:

- Automatización de Sistemas
- Diseño de paneles de control y distribución
- Montajes eléctricos y de instrumentación
- Mantenimiento preventivo
- Migración de PLCs
- Implantación de sistemas de trazabilidad
- Cesión de personal cualificado en estos servicios



Técnicos en  
Calibración y  
Montaje, S.A.

#### CENTRAL:

Avda. Somosierra, 22  
Parque Empresarial Inbisa 1, Nave 1A  
28703 S.S. de los Reyes  
Tel: 91 653 25 00 - Fax: 91 652 35 79

#### DELEGACION BARCELONA:

C/ Matéu Benet, 38  
08034 Barcelona

tcm@tcm-spain.com  
www.tcm-spain.com





La monitorización de la reacción con espectroscopía Raman *in situ* reduce la necesidad de tomar muestras para su análisis y también proporciona información en tiempo real sobre el progreso de la reacción.

La instalación experimental consistió en un espectrómetro Raman portátil i-Raman® Plus de B & W Tek con una fuente de excitación láser de 785nm y 300mW conectada a un espectrógrafo equipado con un detector de arrays CCD back-thinned, que cubre un rango espectral de 65  $\text{cm}^{-1}$  – 3.200  $\text{cm}^{-1}$ . La interfaz de muestreo usada es un haz de fibras ópticas acopladas a una sonda de inmersión para permitir mediciones *in situ* durante las reacciones. El instrumento Raman se usó para monitorizar la síntesis de 2-fenilimidazo [1,2-a] piridina. La sonda de inmersión se insertó en el matraz de fondo redondo para la medición directa a lo largo de la reacción, como se ve en la Figura 2. Los reactivos de partida se suspendieron en acetonitrilo y se añadió una pequeña cantidad de bicarbonato sódico para neutralizar el ácido bromhídrico que se forma durante el proceso de reacción. La reacción se colocó bajo atmósfera de argón y se calentó a 80°C durante aproximadamente dos

horas. Los espectros Raman se recogieron durante la reacción cada minuto, con un tiempo de integración de tres segundos y un promediado de diez espectros.

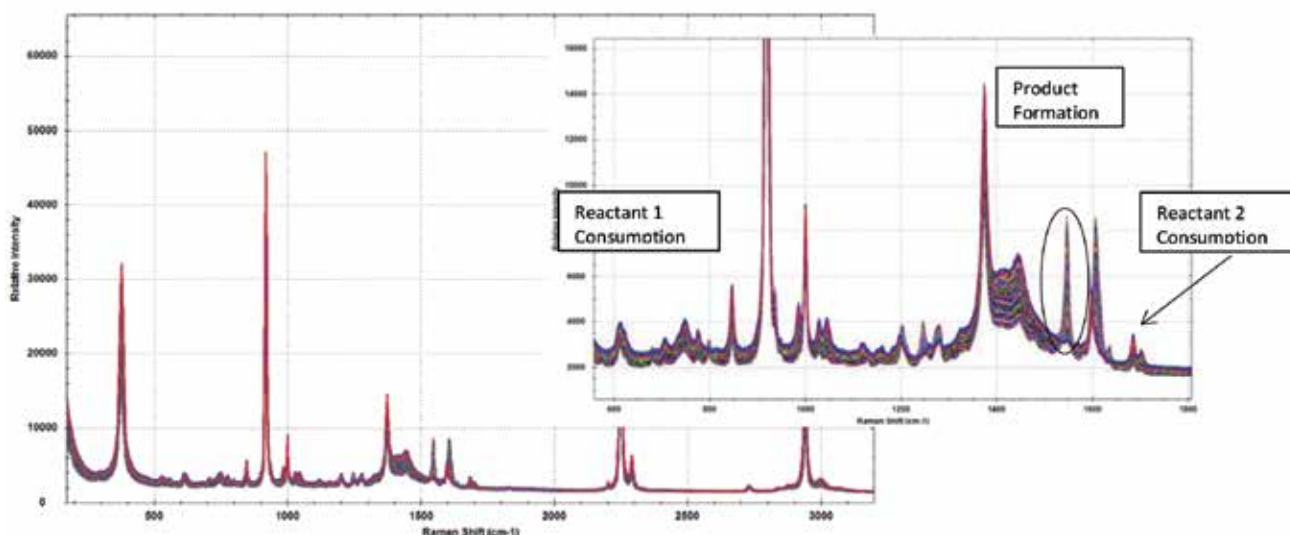
En esta reacción química de tipo SN2 para el desarrollo de un compuesto químico medicinal, el objetivo del estudio del proceso era obtener una buena comprensión de la reacción y detectar el punto final de la reacción. En esta síntesis, la 2-aminopiridina se hace reaccionar con 2-bromoacetofenona para formar 2-fenilimidazo [1,2-a] piridina. Para monitorizar la reacción se llevó a cabo un enfoque univariante de monitorización de los picos de reactivo y de producto usando el software BWSP® de B & W Tek.

Para la reacción de la síntesis de 2-fenilimidazo [1,2-a] piridina se tomó un espectro para cada uno de los materiales de partida y producto final, con el fin de identificar los picos Raman a monitorizar durante el transcurso de la reacción. Como se muestra en la Figura 3, las tres regiones de interés son 847  $\text{cm}^{-1}$  (2 - aminopiridina, reactivo 1), 1.547  $\text{cm}^{-1}$  (producto final) y picos dobles anchos entre 1.684 – 1.702  $\text{cm}^{-1}$  (2 - bromoacetofenona, reactivo 2).

Debido a la especificidad del espectro Raman y el hecho de que estos picos identificados se superponen con otros picos Raman de disolvente u otros componentes de reacción, el análisis univariante puede ser utilizado de manera eficaz. Durante el progreso de la reacción, se monitorizaron los dos picos de producto a 1547  $\text{cm}^{-1}$  y 1603  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, como se muestra en la Figura 4 mostrando la finalización de la reacción.

Los espectros Raman recogidos a lo largo de la monitorización de la reacción se muestran en la Figura 5, con los picos de reactivos disminuyendo claramente mientras que el pico del producto aumenta simultáneamente a medida que progresa la reacción. El análisis univariante proporcionó información de soporte sobre el punto final de la reacción como se muestra en la Figura 6, donde la superposición del primer y último espectro de la reacción ilustra el consumo completo de los reactivos. En base a las gráficas de pico máximo de los reactivos y producto junto con la superposición del primer y último espectros recogidos, Figura 6, la reacción parece terminar en 2 horas. La medición de varias pruebas mostró que esto

**FIGURA 5.** Datos de monitorización de la reacción Raman: obsérvese el consumo de los dos reactivos, picos de a 847  $\text{cm}^{-1}$  (reactivo 1) y la banda ancha entre 1684  $\text{cm}^{-1}$  - 1702  $\text{cm}^{-1}$  (reactivo 2) así como la formación del producto a 1547  $\text{cm}^{-1}$





A member of  
Excellence United



Process Technology Pharma

# ULTIMAS INNOVACIONES

Tecnologías de contención  
para laboratorio



GCC – La nueva referencia  
en recubrimiento



MODCOS – Para un cambio sencillo entre  
proceso en lotes y proceso en continuo



es consistente, e indican que Raman puede ser utilizado para la detección de punto final de la reacción.

### DETALLES EXPERIMENTALES PARA LA MONITORIZACIÓN CUANTITATIVA DE LA CRISTALIZACIÓN

En este ejemplo, las medidas en tiempo real son utilizadas para mejorar la eficiencia del proceso y la calidad del producto de ácido bórico, y el producto importante en las operaciones de refinado del boro. La concentración de sulfato de sodio y ácido bórico debe ser controlada para optimizar el proceso y minimizar los costes de producción. Si los niveles de estos dos componentes están fuera de este rango, el proceso produce grandes cantidades de residuos, lo que repercute en gran medida en los costes del proceso. El nivel de sulfato de sodio está típicamente en el intervalo de 22-34%, siendo el nivel más eficiente el 30%, justo por debajo del límite de solubilidad del 31,8%.

El proceso de cristalización acuosa de borato sódico y ácido sulfúrico para la formación de ácido bórico y sulfato de sodio se monitorizó utilizando el sistema portátil i-Raman® Plus, con sonda de inmersión industrial instalada para procesar el flujo del proceso. El Raman, con una excitación láser de 785 nm, fue aplicado a 350 mW de potencia, y los datos recogidos con 3 segundos de tiempo de integración, realizando 10 promedios. Como el proceso es largo, los espectros se recogieron cada hora. El instrumento fue alojado en una carcasa NEMA, proporcionando un ambiente operativo estable de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , y protección contra el agua y el polvo.

Los modelos cuantitativos para el cálculo de la concentración de los productos se desarrollaron usando la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) en el software quimiométrico BWIQ®. Se midieron los espectros Raman de 80 muestras de producción con el Raman portátil en

el laboratorio y se determinaron los valores de referencia para el ácido bórico y el sulfato de sodio usando métodos de titración, proporcionando los valores de referencia. El instrumento se instaló entonces en la línea del proceso y se recogieron otros datos cercanos a la concentración del objetivo de proceso. Se muestreó la reacción y se midieron valores de referencia adicionales por titulación para aumentar los modelos de calibración PLS. La Figura 7 muestra el

mejor ajuste del modelo de regresión PLS para el sulfato sódico que tiene un intervalo de concentración objetivo de 22-34%.

Los datos espectrales Raman fueron corregidos en la línea de base y normalizados calculando la regresión PLS sobre la región espectral, que incluye la vibración de elongamiento simétrico de  $993\text{ cm}^{-1}$  del grupo funcional sulfato mostrado en la Figura 8.

El sistema Raman portátil facilitó el desarrollo de modelos de calibración

FIGURA 6. Superposición del primer y último espectro de la reacción, evidenciando el consumo de reactivos y la formación del producto

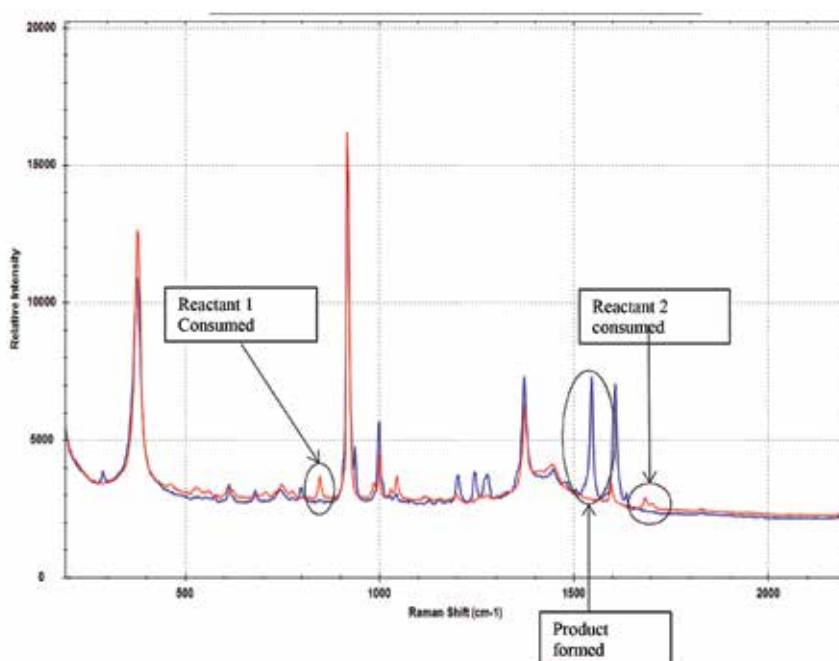
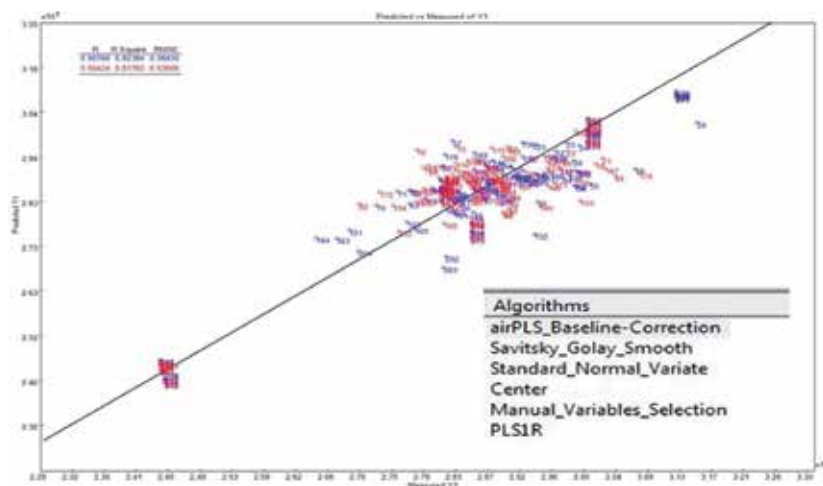


FIGURA 7. Modelo de regresión PLS para el % de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en el proceso de cristalización





**3M** Science.  
Applied to Life.™

3M Purification

# Filtración escalable y desechable.

## Sistema Zeta Plus™ Encapsulado.

La mejor elección para sistemas desechables de filtración en profundidad.

- El diseño del soporte pivotante favorece una carga y descarga fácil, sencilla y ergonómica de los filtros encapsulados.
- Posibilidad de alojar en un solo soporte una o dos etapas de filtración.
- Diseñado para aplicaciones tanto Upstream de clarificación de cultivos celulares y eliminación de impurezas como para aplicaciones Downstream de reducción de impurezas.



**Rápido**



**Fácil**



**Limpio**

Para más información contacte con [filtracion.es@3m.com](mailto:filtracion.es@3m.com) o visite la página web [www.3m.com/es/filtracion](http://www.3m.com/es/filtracion)



inicial en el laboratorio utilizando muestras de producción retenidas. El sistema fue entonces instalado en la planta y la calibración expandida antes de ser utilizada para monitorizar con éxito el proceso.

Los valores predichos para el nivel de sulfato de sodio durante el mes de producción se muestran en la Figura 9. El gráfico de tendencias incluye las líneas límite de las concentraciones objetivo y el límite de solubilidad. La monitorización del proceso ilustra las fluctuaciones en el proceso, e indica también que durante este período de producción, los niveles de sulfato de sodio se mantuvieron por debajo del límite de solubilidad.

## CONCLUSIONES

La espectroscopía Raman para análisis de procesos es una herramienta de valor incalculable para la inspección de materias primas entrantes, el desarrollo de procesos y la monitorización del proceso de producción. Puede proporcionar información crítica para entender las reacciones que tienen beneficios significativos para la industria química, farmacéutica y otras. Este trabajo demuestra la versatilidad y capacidad de los espectrómetros Raman portátiles y su utilidad en el desarrollo y comprensión de un proceso. La aplicación de la espectroscopía Raman en diversas etapas

de desarrollo y proceso contribuye a la capacidad de fabricar productos de calidad de manera consistente. Al tener una mejor comprensión del proceso, los parámetros clave del mismo se pueden determinar y las operaciones se desarrollan con estos bien controlados.

En este trabajo se demostró la capacidad de la espectroscopía Raman portátil en la etapa de desarrollo del proceso para obtener la comprensión del mismo y de las reacciones químicas, específicamente en la determinación de los puntos finales de reacción, y en la monitorización completa del proceso cuantitativo. Los datos espectrales Raman fueron valiosos para monitorizar cualitativamente una reacción sintética en desarrollo. También se proporcionó un ejemplo de una implementación en línea de espectroscopía Raman en un proceso de fabricación a escala completa con medición cuantitativa de productos de cristalización.

## Referencias

- [1] Dickens, J.E. "Overview of Process Analysis and PAT" in Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 2nd edition, Sussex, UK; Wiley 2010, K.A. Bakeev, ed.
- [2] for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, Rockville, MD, Sept 2004
- [3] European Medicines Agency (EMA) Guideline on Real Time Release Testing, EMA/CHMP/QWP/811210/2009-Rev1, March 29, 2012.
- [4] Slater, J.B., Tedesco, J.M., Fairchild, R., and Lewis, I.R., "Raman Spectrometry and Its Adaptation to the Industrial Environment", in Handbook of Raman Spectroscopy, I.R. Lewis and H.G.M. Edwards, Ed., CRC Press, New York (2001).
- [5] Jestel, N.L. "Raman Spectroscopy" in Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 2nd edition, Sussex, UK; Wiley 2010, K.A. Bakeev, ed.
- [6] Paudel, A., Raijada D., and Rantanen, J., Raman Spectroscopy in Pharmaceutical Product Design, Advanced Drug Delivery Reviews 89, 3–20 (2015).
- [7] Rantanen, J. Process Analytical Applications of Raman Spectroscopy, J. Pharm. Pharmacol. 59, 171-177 (2007).
- [8] Reid, G.L., et al. (2012) Process Analytical Technology (PAT) in Pharmaceutical Development. American Pharmaceutical Review. June 20, 2012.
- [9] Chen, X. et al. In Situ Monitoring of Emulsion Polymerization by Raman Spectroscopy: A Robust and Versatile Chemometric Analysis Method. Organic Process Research & Development. 19(8), 995-1003 (2015).

FIGURA 8. Espectros Raman del producto y reactivos del proceso de cristalización

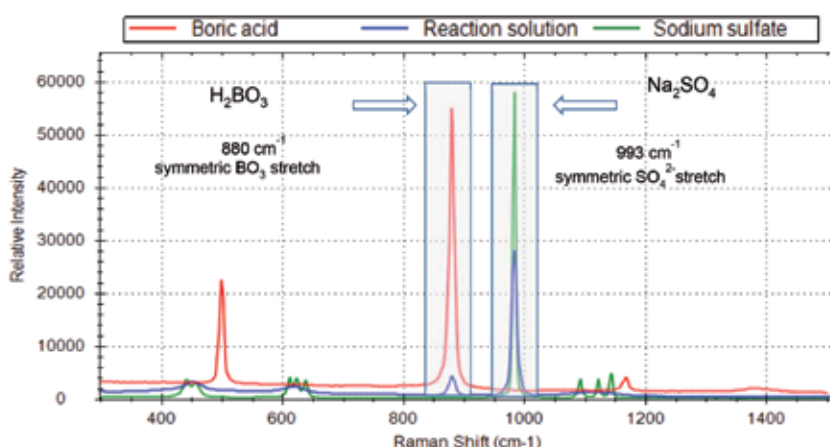


FIGURA 9. Valores en línea predichos por Raman para el sulfato de sodio, medido durante un mes, con los valores objetivos indicados

