

Anvendelse af Ramanspektrometri i procesanalytisk teknologi

Ramanspektrometri er en meget anvendt analytisk metode inden for mange kemiske discipliner. Denne oversigt giver en indgang til det farmaceutiske område

Af Jukka Rantanen og Claus Cornett, Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

For at forstå de kemiske og fysiske fænomener, der styrer farmaceutiske enhedsoperationer er det nødvendigt med nye angrebsvinkler. Reeltidsinformationer om processerne tillader sikrere og mere effektiv produktion af lægemidler. Her gives en oversigt over anvendelser af Ramanspektrometri ved procesanalyse af faste lægemidler.

Ramanspektroskopi er velegnet til procesanalyse

Ved en typisk lægemiddelformulering er der under fremstillingsprocessen mange fejlkilder, der har kritisk indflydelse på det færdige produkts egenskaber. Lægemiddelstoffet (Active Pharmaceutical Ingredient, API) eller hjælpestoffer kan f.eks. stresses, hvis der er fugt til stede eller temperaturen ændres. Ved analyse af slutproduktet vil det ikke være muligt at implementere tidlig detektion af problemer eller komplicerede relationer mellem dem. U.S. Food and Drug Administration (FDA) har indført en vejledning med denne problemstilling i fokus. Proces Analytisk Teknologi (PAT) er et system til udvikling og implementering af nye redskaber til fremstilling og kvalitetssikring af lægemidler. FDA kategoriserer PAT i fire grupper:

- Multivariate redskaber til design, dataopsamling og -analyse
- Procesanalytatorer
- Proceskontrolredskaber
- Kontinuerlig forbedring og videnstyringsredskaber

Målet er at forbedre og modernisere farmaceutisk produktion og kvalitetssikring i overensstemmelse med *Current Good Manufacturing Practices (CGMPs) for the 21st century*. Principperne i disse rammer inkorporeres p.t. i *ICH guidance on Pharmaceutical Development (Q8)* (ICH: International Conference on Harmonization). I fremtiden bliver udfordringen at indbygge den korrekte procesanalytiske indfaldsvinkel i enhver produktionsproces.

Nær Infrarød (NIR) spektroskopi anvendes inden for moderne procesanalytisk kemi [1]. I visse tilfælde bruges NIR nærmest synonymt med PAT, men der er mange andre redskaber til analyse. Ramanspektrometri giver indsigt i produktionsprocessen og åbner nye muligheder for at forstå enhedsoperationer. Ved fast-fase-doseringsformer opnås hurtig og noninvasiv information fra processtrømmen, selv i vandigt miljø.

Princippet i Ramanspektrometri er at bestråle en substans med monokromatisk lys og detektere det lys, der spredes ved andre frekvenser. Frekvensforskellen mellem den indgående og den spredte stråling er det karakteristiske Ramanskift.

Ramaneffekten er svag, så ud over en kraftig eksitationskilde er gode filtre nødvendige for at fjerne eksitationslinjen fra den opsamlede stråling. Prøver i fast-, væske- og gasfase kan analyseres med minimal eller ingen prøveforberedelse.

Hidtil har anvendelsen af Ramanspektrometri været begrænset inden for farmaceutisk processteknik pga. apparaturets

høje pris og problemer med interface til processen. Den senere tids fremskridt inden for optoelektronik, computerteknologi, dataoverførsel og dataanalysemetoder har nu muliggjort reeltids noninvasiv måling på farmaceutiske enhedsoperationer vha. Ramanspektroskopi. Det vil gøre det muligt at opnå videnskabelig forståelse af produktionsprocessen og risikobaseret farmaceutisk udvikling, produktion og kvalitetssikring i overensstemmelse med PAT-ideen.

Ramanspektrometri på farmaceutiske enhedsoperationer

Der er et stigende antal studier af Ramanspektrometri i procesomgivelser og muligheden for at anvende Ramanspektrometri inden for polymerindustri [2], bioprocesser [3] og fødevarerindustri [4] undersøges.

En oversigt [5] gennemgår anvendelse af Ramanspektroskopi ►



Contract Laboratory

More than 15 years of experience in chemical and microbiological GMP analyses for the pharmaceutical industry

Large facilities for stability and photo stability studies at ICH and individual conditions

Fermentation and downstream processing in pilot and laboratory scales

More than a lab

DB Lab A/S
Tel: +45 6593 2920
dmlab@dblab.dk
www.dmlab.dk



inden for farmaciområdet og sammenligner FT-Raman og dispersive instrumenter. *Journal of Raman Spectroscopy* har introduceret farmaceutiske anvendelser af Ramanspektroskopi [6]. Anvendelse af spektroskopiske værktøjer til fast-fase-analyse og sammenligninger af Ramanspektrometri med andre fast-fase-analyseværktøjer er blevet reviewed [7,8]. Centrale problemstillinger i relation til kvantitativ analyse vha. Ramanspektrometri er beskrevet i en tutorial [9]. Det publicerede arbejde er hovedsageligt fokuseret på fast-fase-analyse af små organiske forbindelser, men Ramanspektrometri kan også bruges til analyse af andre doseringsformer som flydende og dispergerede systemer. Forbindelser kan analyseres i vand, hvilket gør det lettere at foretage *in situ*-analyser. Teknikken er også en nyttig metode ved undersøgelse af sammenhængen mellem struktur, dynamik og funktion af biomakromolekyler [10]. Den stigende anvendelse af biomakromolekylære lægemiddelstoffer gør det nødvendigt at finde proceskontrolværktøjer til brug under disse krævende produktionsforhold.

I de følgende afsnit gives et overblik over mulighederne for at anvende Ramanspektrometri ved procesanalyse af farmaceutiske enhedsoperationer relateret til faste lægemiddelformer. Gennemgangen følger produktionsprocessen med start ved syntesen og slutter med fillovertrækningsprocessen. Et flow-chart over enhedsoperationerne ses i figur 1 sammen med en oversigt over potentielle anvendelser af Ramanspektroskopi.

Syntese

Ramanspektrometri kombineret med multivariate teknikker (kemometri) er blevet brugt til at følge reaktioner [11]. Syntese og hydrolyse af ethylacetat er undersøgt. For at undgå overlap i spektrene anbefales at man anvender effektive forbehandlingsmetoder (standard normal variate og differentierede/afledte spektre) sammen med principal component analyse (PCA) og

partial least squares (PLS). Hastighedskonstanter for modelsystemet stemmer godt med publicerede værdier.

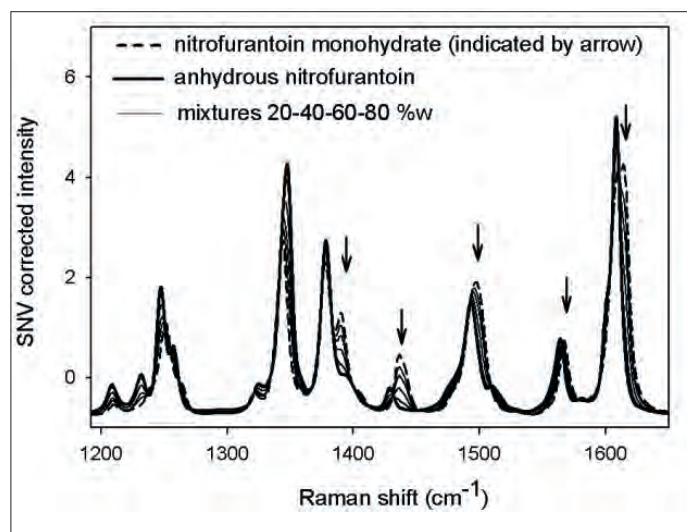
Krystallisation

Det næste trin i produktionsprocessen er krystallisation. Denne foretages for at opnå den ønskede renhed, krystalform (polymorf), overfladeegenskaber og partikelstørrelse og -formfordeling. Et eksempel med ritonavir illustrerer behovet for nye værktøjer ved procesanalyse og kontrol af krystallisationsprocessen og også ved implementering af screening for krystalformer [12]. Antal publicerede arbejder om realtidsanalyse af krystallisation af farmaceutiske ingredienser er begrænset. Batchkrystallisation udføres ofte i vandige medier, så Ramanspektroskopi er et nyttigt værktøj til proceskontrol og -overvågning. Lysozym-koncentrationsændringer *in situ* ved "hængende-dråbe"-krystallisering er beskrevet [13]. Ændringer i sammensætningen af krystalformer er blevet overvåget og kvantiteret med inline Ramanspektroskopi [14,15,16,17,18,19,20]. Raman er beskrevet brugt til realtidsovervågning af fænomener relateret til antisolvent tilsætning [18]. Samtidig overvågning af moderluden og krystalformer dannet ved krystallisation er studeret [19]. Derudover blev solventmedierede omdannelser karakteriseret. Ramanspektroskopi kan bruges til at studere fast-fase-omdannelsesmekanismer [21,22]. *In situ*-måling af partikelstørrelsesfordelinger med væske og fast-fase-analyse er beskrevet [20]. Væskefasen blev analyseret vha. IR-spektroskopi og den faste fase med Ramanspektroskopi. Kombinationen af de to metoder tillod overvågning og modellering af de fænomener, der bestemmer den solventmedierede omdannelse af modelforbindelsen. Ramanspektrometri kan også udrede mekanismer for co-krystaldannelse [23]. Flerkomponent krystallinske systemer kan have bedre farmaceutiske egenskaber end enkeltkomponent systemer.

Ramanspektrometri er velegnet til at kvantitere krystalmodifikationer i fast fase. Metodens følsomhed - kombineret med minimal prøveforberedelse - åbner vide perspektiver for hurtig og pålidelig fast-fase-analyse [24,25,26,27,28,29,30]. Både univariate og multivariate metoder har været anvendt ved udvikling af kvantitative modeller. Derudover kan Ramanspektrometri anvendes ved kvantitering af krystallinitet [31,32,33,34]. Dette er specielt nyttigt ved overvågning af formalings- og spraytørringsprocesser, hvor omdannelser relateret til krystalliniteten forekommer. Ramanspektrometri har været brugt til at identificere fast-fase-omdannelser af uorganiske materialer [35] og er blevet kombineret med high-throughput (HTS) polymorfi-

ENHEDSOPERATION	INFORMATION
SYNTESE	Procesovervågning (reaktionsgrad, hastighedskonstanter, nedbrydning)
KRYSTALLISATION	Procesovervågning (både i opløsning og fast fase, detektion af kimdannelse, overvågning af fast fase egenskaber).
FORMALING	Procesinducerede omdannelser (polymorfiske overgange, dannelse af amorf materiale)
BLANDING	Procesovervågning (homogeneitet af blanding)
GRANULERING	Procesinducerede overgange (polymorfiske overgange, solvater)
TØRRING	Procesinducerede overgange (polymorfisk desolvning)
TABLETTERING	Kvantitering af aktivt stof, procesinducerede overgange (trykinduceret amorf dannelse)
OVERTRÆKNING	Procesovervågning (mængde af polymer -> ensartethed af fillovertræk)
PAKNING	Identifikation
HOLDBARHED	Overvågning af stabilitet, identifikation af forfalskninger

Figur 1. Flow-chart over enhedsoperationer anvendt til fremstilling af faste doseringsformer med mulige anvendelser af Ramanspektrometri til procesmåling.



Figur 2. Ramanspektre (SNV-korrigerede) af nitrofurantoin med stigende hydrat-mængde.

screening [36,37]. Der er et stigende behov for tidlig screening af krystalformer og identifikation af den mest stabile modifikation. Efter ritonavir-tilfældet blev high-throughput krystallisationseksperimenter udført for at karakterisere mangfoldigheden af ritonavirs fast-fase-former [38].

Kort opsummeret muliggør Ramanspektrometri detaljeret analyse af krystallisationsprocessen og åbner for partikeldesign på molekylært niveau. Ydermere kan Ramanspektroskopi benyttes til at overvåge og modellere fast-fase-omdannelser. Ved kontrol/styring af fast-fase-fænomener er det vitalt at inddrage krystallisering som en kritisk enhedsoperation i den overordnede udviklingsramme.

Blanding

En af de dårligst forståede enhedsoperationer inden for produktionen af faste doseringsformer er blanding af pulvere. Ramanspektrometri er anvendt til inline-overvågning af blandingsprocesser [39]. Heterogene blandinger kan karakteriseres ved "spektroskopisk" billeddannelse både vha. Raman- og Nær Infrarød spektroskopi [40]. Optagelse og databehandling af kemiske Ramanbilleder er blevet diskuteret [41,42]. Effekten af forskellig slags samplingoptik ved procesanalyse af faste stoffer, herunder en multivariat model til overvågning af pulverblanding er undersøgt [43]. Loadings for principal komponentanalysen blev fortolket på baggrund af de observerede spektroskopiske egenskaber.

Granulering

Granulering er en enhedsoperation, der ofte er nødvendig. Under granuleringprocessen kan materialet undergå faseovergang ved udsættelse for f. eks. opløsningsmidler og termisk eller mekanisk stress [44]. Mulige faseændringer kan være overgange mellem krystalformer, solvat dannelse, "desolvatering", dannelse af amorf regioner og krystallisering af amorf materiale. Ramanspektrometri kan anvendes til atline [45] og inline [46] analyse af hydratdannelse under vådgranulering (figur 2) og realtidsinformation er brugt til at verificere en model udviklet til at forudsige omdannelseskinetik for hydratdannelse. Ramanspektrometri giver også indsigt i interaktioner mellem vand og faste stoffer i formuleringer, hvilket muliggør forståelsen af hjælpestoffers rolle i den tidlige udviklingsfase. Vand-polymer-vekselvirkninger for polymermaterialer af farmaceutisk interesse er undersøgt [47]. Ramanspektrometri kan detektere hydratdannelse ved tilstedeværelse af hjælpestoffer og den rolle, hjælpestofferne spiller ved overgang mellem krystalformer [48]. FT-Ramanspektroskopi har været anvendt til at evaluere muligheden for at anvende carrageener til at beskytte lægemiddelstoffer mod overgange mellem krystalformer [49]. Det viste sig muligt at detektere både genkrystallisering af amorf komponenter og dehydrering efter tabletteringsprocessen. Ved en extrusions-spheroniseringsproces kunne effekten af vand på strukturen af cellulose forklares [50]. Vådgranulering efterfølges af tørring, hvor produktet udsættes for termisk stress. Brugen af Ramanspektrometri til at detektere fast-fase-ændringer under fluidisering er undersøgt [51]. Ramanspektrometri kan også anvendes til at forklare mekanismerne for termisk inducerede faseovergange [52,53].

Tablettering

En af de mest attraktive sider ved Ramanspektrometri – og andre brugbare PAT-sensorer

Proces Analytisk Teknologi

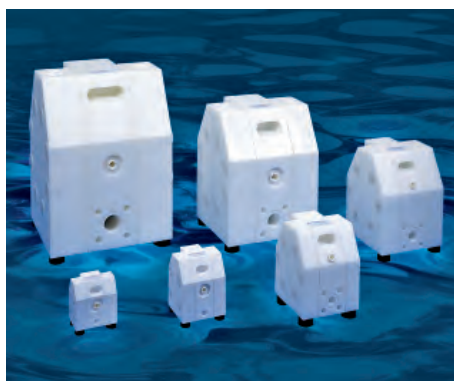
International Conference on Harmonization,
ICH: <http://www.ich.org>
FDA (US Food and Drug Administration)
PAT overview: <http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm>
EMA (European Medicines Agency) PAT overview:
<http://www.emea.europa.eu/Inspections/PAThome.html>

– er muligheden for realtidskvantitering af aktive komponenter i doseringsformer. Dette åbner mulighed for analyse af f.eks. hver tiende tablet og giver helt nye perspektiver inden for kvalitetssikring og -kontrol. Fremtidens udfordringer inden for farmaceutisk forskning vil være at etablere bredt accepterede procedurer for kontinuerlig produktion og realtidsfrigivelse af lægemiddelprodukter. Ramanspektrometri har været anvendt til kvantitering af komponenter i Antacid-tabletter [54], og den er blevet anvendt som direkte assay for acetylsalicylsyre og det vigtigste nedbrydningsprodukt, salicylsyre [55]. Teknikken tillader noninvasiv kvantitativ analyse af gelkapsler selv gennem blisterpakker [56]. Også hjælpestoffernes indflydelse på kvantitering af diltiazem hydrochlorid er beskrevet [57] og Ramanspektroskopi som værktøj til overvågning af tabletteringsprocesser er behandlet [58]. Andre potentielle anvendelsesområder er til hurtig analyse af procesinducerede ændringer/overgange under tabletteringsprocessen og hurtig verifikation af krystalform i de færdige tabletter [29,59]. Der er udarbejdet en kvantitativ metode til bestemmelse af krystalliniteten af indomethacin i en model-tabletformulering [60], og muligheden for yderligere at anvende modellen ved identifikation og kortlægning af tryk-induceret dannelse af amorf regioner er blevet diskuteret.

Overtrækning

Ofte overtrækkes lægemidler, hvilket kan ske med en vandig opløsning af en polymer. Ramanspektroskopi anvendes inden for forskellige områder af analyse af filmovertræk, men ikke bredt inden for det farmaceutiske område. Konfokal Ramanmikroskopi er blevet anvendt ved analyse af den kemiske sammensætning af udvalgte små områder af en overtrukket overflade [61], mens en opstilling med et roterende fokus af laseren under overtrækningsprocessen og videre til kvantitativ karakterisering af variationer i overtrækningen også er beskrevet [62]. En kvantitativ model for tykkelsen af overtrækket og farvestoffers

www.pumpegruppen.dk Tlf. +45 45 93 71 00
Fax +45 45 93 47 55



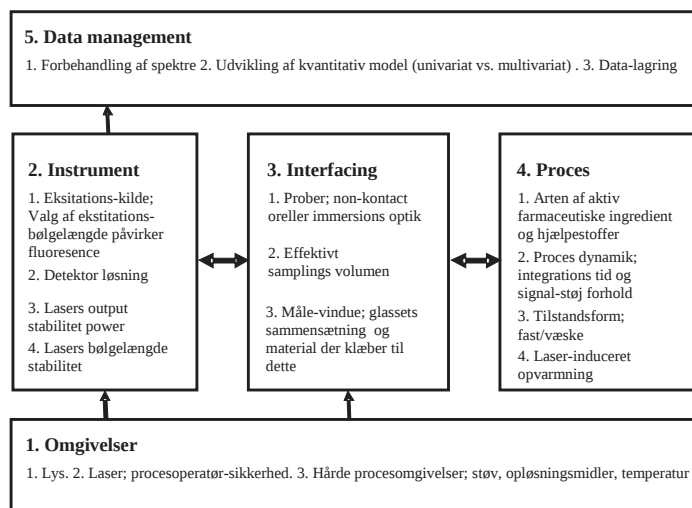
UNITEC™ Laboratoriepumper

Trykluftdrevne laboratoriepumper i polyethylene eller PTFE. Kapaciteter fra 1-500 liter/min, max 7 bar. Kan leveres med ekstraudstyr, f.eks.:

- Drænsystem af pumpe
- Membranbrudsensor
- Dobbeltmembran med sensor
- Indbygget pulsationsdæmper
- Stroke counter
- ATEX-certifikat

**PUMPE
GRUPPEN A/S**

info@pumpegruppen.dk



Figur 3. Faktorer, der har betydning for kobling af Ramanspektrometri til procesmiljøet.

indflydelse på fluorescens samt modellens robusthed er ligeledes beskrevet [63].

Udfordringer inden for proces-Ramanspektrometri

Der er forskellige kilder til fejl ved anvendelse af Ramanspektrometri inden for procesanalyse. Figur 3 opsummerer disse og i det efterfølgende diskuteres forskellige måder at undgå dem på.

For det første giver interfacet til processen problemer pga. procesomgivelserne. Instrumentet kan blive udsat for f.eks. opløsningsmidler, temperaturvariationer eller støv. Laserlyskildens stabilitet og bølgelængde kan påvirkes. Forsegling og lange optiske fibre skåner for stress fra omgivelserne. Operatørens sikkerhed må varetages ved arbejde med lasere. Lys fra omgivelserne kan føre til artefakter i de optagne data. Ligesom for andre analytiske værktøjer er selve interfacet/tilkoblingen til processen et problem ved Ramanspektrometriske målinger. Analysen kan foretages invasivt ved at "neddykke" sensoren i en beholder/et rør eller noninvasivt ved brug af optik, så sensoren ikke er i direkte kontakt med materialet. Et grundlæggende problem er at holde "interface-glasset" (eller neddykningsproben) rent under målingen. Andre spørgsmål er, om man måler på repræsentative dele af materialet og om det er i fokus. Undertiden er det nyttigt at integrere proben med en prøveudtagningsfacilitet, så der måles på en statisk prøve. Dette

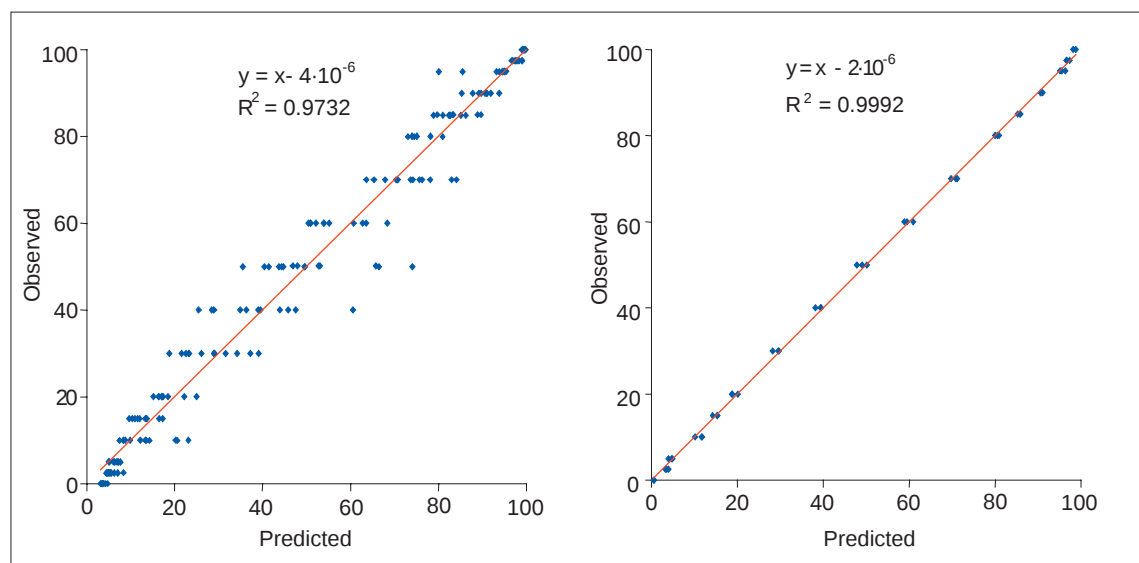
har tidligere været anvendt ved NIR-metoder [64], men kan let modificeres til en Raman-probe.

Et andet problem med Ramanspektrometri er det lille areal, der måles på, og da de anvendte lasere har en lille indtrængningsdybde, er det volumen, der måles på lille. Der kan bødes på dette vha. optik, så det belyste areal bliver større (spot size of laser). Kvantitativ analyse med fokus på mulige eksperimentelle fejl er blevet diskuteret [65] (figur 4). Ved at forøge det belyste område og antallet af punkter, der måles på tabletoverfladen, er det muligt at finde et sæt optimale målebetingelser, der minimerer målefejlen. Det er vigtigt at tage partikelstørrelsen i betragtning, når man fastlægger de eksperimentelle parametre. Forskelligt samplingudstyr til brug ved *inline*-måling er blevet evalueret [43,66]. Bl.a. er betydningen af *spot size* for analyse af hhv. granulater og tabletter blevet undersøgt og *spot sizes* på hhv. 60, 150 og 3000 μm er testet [43]. Ved krystallisation er der observeret partikkelstørrelsesrelaterede problemer ved kvantitering af krystalformer i relation til polymorfistudier [20].

Opvarmning af prøvematerialet er et problem. Ved at flytte prøvematerialet i måleprocessen kan opvarmningen minimeres. Ved de fleste anvendelser af Ramanspektrometri inden for procesanalyse er prøven allerede i bevægelse. Prøveopvarmning af farmaceutiske materialer er undersøgt og en model udviklet for at estimere den nødvendige prøveflytningshastighed for at minimere opvarmningen [67].

Undertiden observeres en fluorescensbaggrund, der kan minimeres ved at vælge den rigtige eksitations-bølgelængde. Valg af bølgelængde for fire modellægemiddelstoffer og 5 eksitations-bølgelængder inden for UV-, synligt lys (VIS)- og NIR-områderne er undersøgt [68]. For disse stoffer er fluorescens et problem ved eksitation med synligt lys, hvorimod lavere fluorescensintensitet blev observeret ved både UV- og NIR-eksitation. På den anden side resulterede UV-eksitation i større grad af nedbrydning af prøven og identifikation af forskellige krystalformer var ikke så effektiv som ved NIR- og VIS-eksitation.

Efter valg af interface til processen begynder den mest udfordrende del af arbejdet. Det er nødvendigt at opnå forståelse af processen ud fra den målte information. Første trin er at identificere variationer i de spektrale data og forklare årsagerne til disse. Forbehandling af spektrene (f. eks. beregning af første eller anden afledet) eller interne standarder er ofte nødvendige for at fremhæve variationen og lette tilordning af signaler og udvikling af kvantitative modeller. Afhængig af hvilke spektrale egenskaber der observeres, kan der udvikles univariate (f.eks. forholdet mellem to toppe) eller multivariate modeller [9]. Absorptioner er ofte godt resolveret i Ramanspektre, så der



Figur 4. Indflydelse af spot size på kvantitative målinger. Overvågning af kontinuerlig blanding vha.: a) Lille spot size b) Stor spot size.

Definitioner

Inline: Målinger tages direkte i processtrømmen.

Online: Målinger tages ved at en del af processtrømmen dirigeres "gennem" sensoren.

At line: Aliquot udtages og måles "ved" processen.

Offline: Aliquot udtages og måles væk fra processen.

Antisolvent: Solvent, der mindsker opløseligheden af opløst stof.

Polymorfi: Det, at et stof kan findes i flere krystalformer.

Inden for den farmaceutiske sektor indrages pseudopolymorfi – forekomst som hydrat/solvat – typisk også i en polymorfiudredning.

kan ofte opnås robuste univariate procesmodeller [69]. Der er adskillige kilder til eksperimentelle fejl, som skal vurderes, før man vælger en multivariat model [70]. Univariate og multivariate modeller for kemiske Ramanbilleder er sammenlignet [41] og en bedre kvalitet af de kemiske billeder blev opnået ved anvendelse af en principal komponent (PCA)-baseret indfaldsvinkel. Alle overvågningsanvendelserne resulterer i meget store datamængder, hvorfor en velfungerende databaseløsning er en vigtig del af en procesanalytisk løsning.

Konklusion

Ramanspektrometri er et effektivt redskab til at garantere en sikker og effektiv produktion af lægemidler. Meget er sket siden Chandrasekhara Venkata Raman i 1921 fik sine første ideer om dette spredningsfænomen, mens han observerede Middelhavets blå opalescens [71]. Fremskridt inden for optoelektronik, computerteknologi, dataoverførsel og datanalysemetoder har muliggjort realtids- og noninvasiv Ramanspektrometrisk analyse af farmaceutiske enhedsoperationer. Derved opnås indsigt i processerne på molekylært niveau. Der er stadig brug for forskning for at erkende Ramanspektrometriens fulde potentiale som procesanalytisk værktøj.

E-mail-adresser

Jukka Rantanen: jtr@farma.ku.dk

Claus Cornett: clco@farma.ku.dk

Referencer

Link til artiklens referencer kan findes på Dansk Kemis webside – adressen er: www.dansk kemi.dk

Nyt om...

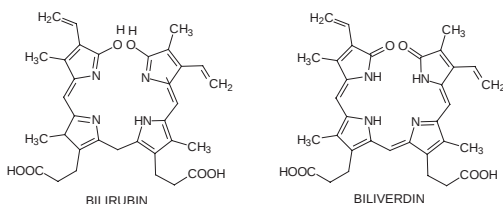
... Galdefarvestoffet bilirubin i planter

Det rødorange bilirubin er det fremherskende farvestof i den menneskelige galde,

hvorimod det grønne biliverdin er det eneste farvestof i fugles galde og normalt ikke forekommer hos raske mennesker. Det er tidligere isoleret fra planter. Bilirubin er imidlertid nu isoleret fra planteriget nemlig fra *Strelitzia nicolai*.

Carl Th.

Animal Pigment Bilirubin Discovered in Plants, *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 2009, side 2830.



AlphaOmega kemikaliestyring

Arbejdsplads- brugsanvisninger - nu automatisk



Powered by
CHYMEIA

AlphaOmega

- er et nyt dansk program, der automatisk kontrollerer, genererer og opdaterer både arbejdspladsbrugsanvisninger og sikkerhedsdatablade. AlphaOmega LAB er udviklet specielt til laboratorier. Se mere på kemikaliestyring.dk

CHYMEIA • Jernbanegade 23 B • 4000 Roskilde
www.chymeia.dk • info@chymeia.dk • 7240 1622