



Application Note 410000006-B

Spettroscopia Raman a bassa frequenza

La spettroscopia Raman è uno strumento analitico che consente la misurazione della struttura molecolare e l'identificazione dei materiali in base alle modalità rotazionali e vibrazionali di una molecola. La maggior parte dei sistemi Raman da laboratorio commerciali coprono la regione spettrale delle impronte digitali che va da 200 a 3400 cm^{-1} .

La sonda B&W Tek i-Raman Plus BAC102 può

accedere alle modalità a frequenza più bassa fino a 65 cm^{-1} , fornendo una soluzione conveniente per misurazioni su una gamma più ampia. L'accesso alle regioni a frequenza più bassa fornisce informazioni chiave per applicazioni nella caratterizzazione delle proteine [1], nel rilevamento e nell'identificazione dei polimorfi [2], insieme alla determinazione della fase materiale e della struttura.

INTRODUZIONE

La regione a bassa frequenza aumenta il contenuto informativo della regione delle impronte digitali dello spettro Raman e amplia le possibili applicazioni

molecolari, come il rilevamento dei legami idrogeno. Il risultato è una maggiore sensibilità di rilevamento e differenziazione di materiali molto simili.

Aminoacidi

La spettroscopia Raman è un modo moderno per studiare la struttura e la conformazione degli elementi costitutivi delle proteine: gli amminoacidi. Nello specifico, il contenuto informativo vibrazionale in uno spettro Raman può aiutare nell'interpretazione delle interazioni molecolari e dei processi biologici[3].

A differenza di molte sostanze che non presentano picchi inferiori a $\sim 400\text{ cm}^{-1}$, la porzione a bassa

frequenza dello spettro Raman è una fonte di informazioni necessaria per uno studio completo degli amminoacidi. Ciò è evidente nell'intero spettro Raman della L-asparagina, da $65\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (Figura 1). La Figura 1 mostra sia la regione dell'impronta digitale (blu) che la regione Raman a bassa frequenza (rossa) per la L-asparagina; notare le tre bande dominanti al di sotto di 200 cm^{-1} .

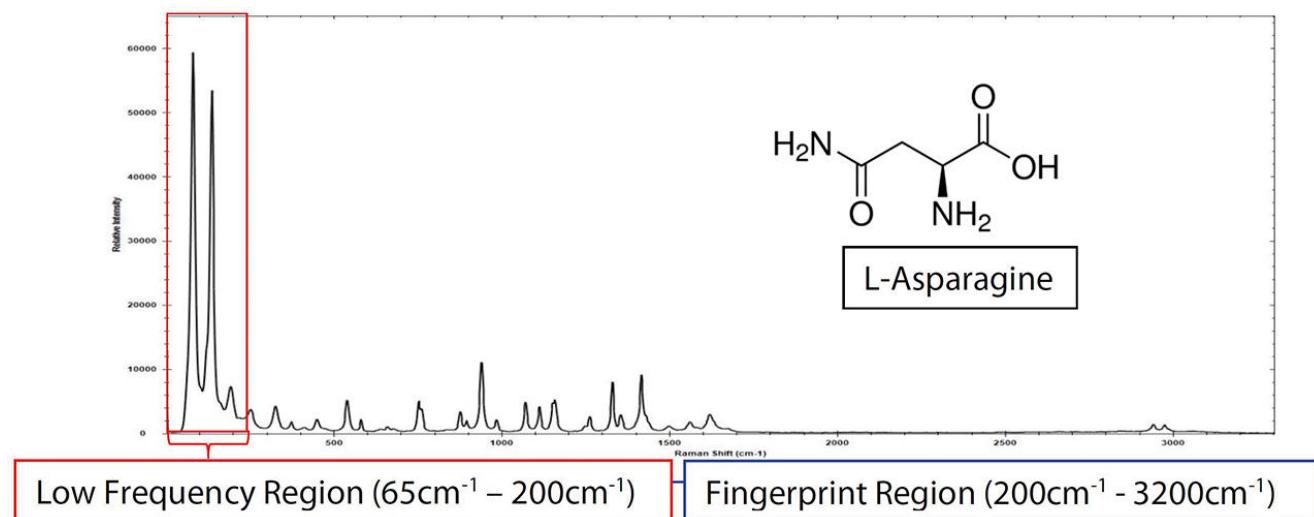


Figure 1. i-Raman Plus e una sonda BAC102 di grado E sono stati utilizzati per raccogliere gli spettri a bassa frequenza della L-asparagina con un tempo di integrazione totale di 1,2 s.

ANALISI

In questa applicazione è stato utilizzato i-Raman Plus 785S, lo spettrometro Raman da laboratorio di B&W Tek che utilizza CleanLaze® brevettato. Questo strumento presenta un'eccitazione laser da 785 nm con una larghezza di linea inferiore a 0,2 nm e una potenza massima di 300 mW.

i-Raman Plus è dotato di un CCD sensibile, raffreddato tramite TE e assottigliato. Una sonda BAC102 di grado E, che utilizza una tecnologia proprietaria, supporta la raccolta dati entro un intervallo spettrale completo di $65\text{--}33500\text{ cm}^{-1}$ con una risoluzione spettrale di $4,5\text{ cm}^{-1}$.

Gli spettri Raman sono stati raccolti a temperatura ambiente utilizzando una potenza laser di 300 mW

con tempi di integrazione compresi tra 100 millisecondi e 10 secondi (**Tabella 1**).

Tabella 1. Parametri sperimentali.

Strumentazione	Impostazioni di acquisizione	
i-Raman Plus 785S	Laser Power	300 mW
BAC102 probe	Integration time	1.2 s
BWSpec software	Averages	1

RISULTATI: RILEVAMENTO DI POLIMORFI

Determinare la forma strutturale degli ingredienti farmaceutici attivi (API) è una preoccupazione primaria per l'industria farmaceutica. Ciò è particolarmente vero durante lo sviluppo, la produzione e il controllo di qualità dei farmaci.

Le API mostrano polimorfismo: composizione chimica identica ma diverse strutture allo stato solido. I polimorfi possono influenzare la biodisponibilità e

l'indice terapeutico. L'efficacia di un farmaco può essere compromessa se viene utilizzata la forma sbagliata [2]. Gli pseudo-polimorfi includono solventi sospesi in una struttura reticolare.

La **Figura 2** è un esempio dello pseudo-polimorfo D-glucosio, che dimostra la capacità della sonda di grado E di rilevare differenze tra la forma monoidrata e quella anidra a frequenze inferiori a 200 cm^{-1} .

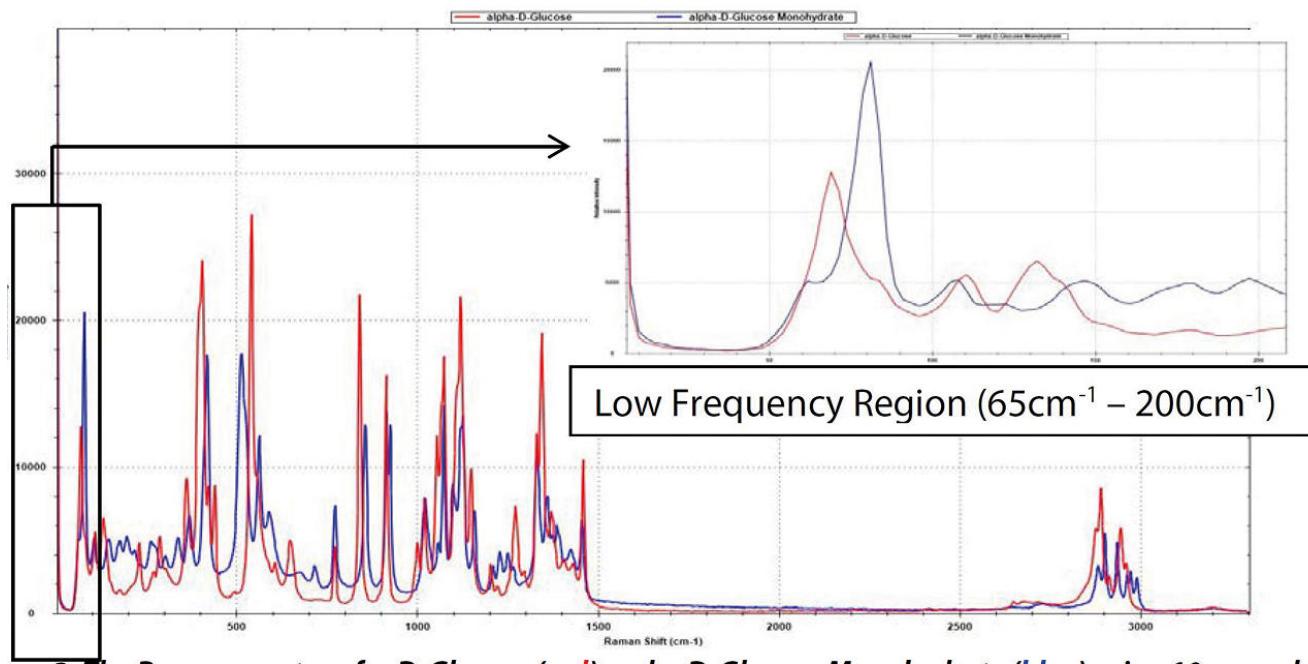


Figura 2. Spettri Raman di α -D-glucosio (rosso) e α -D-glucosio monoidrato (blu), ottenuti con un tempo di integrazione di 10 s. Si noti la differenza significativa tra i due pseudo-polimorfi nella gamma delle basse frequenze (vedi intarsio).

RESULTS: MONITORING PHASE CHANGE

È necessaria una specificità eccezionale per monitorare i cambiamenti di fase come la cristallizzazione nei processi chimici. La sonda di grado E a bassa frequenza può monitorare tali cambiamenti di fase, come dimostrato per lo zolfo (**Figura 3**). L'-a-zolfo solido è stato depositato su un vassoio di alluminio e riscaldato con una piastra calda mentre gli spettri Raman sono stati raccolti con una sonda di grado E e i-Raman Plus, utilizzando la potenza del

laser al 100% (~300 mW) e un tempo di integrazione di 0,1 s per sia la fase solida che quella liquida.

Dopo che il campione è stato riscaldato al di sopra del suo punto di fusione a 115,2 °C, il picco a bassa frequenza a $83,6\text{ cm}^{-1}$ si è allargato e spostato, indicando il cambiamento dalla forma α a quella λ . Si noti che non ci sono cambiamenti osservabili all'interno della regione dell'impronta digitale (**Figure 3**).

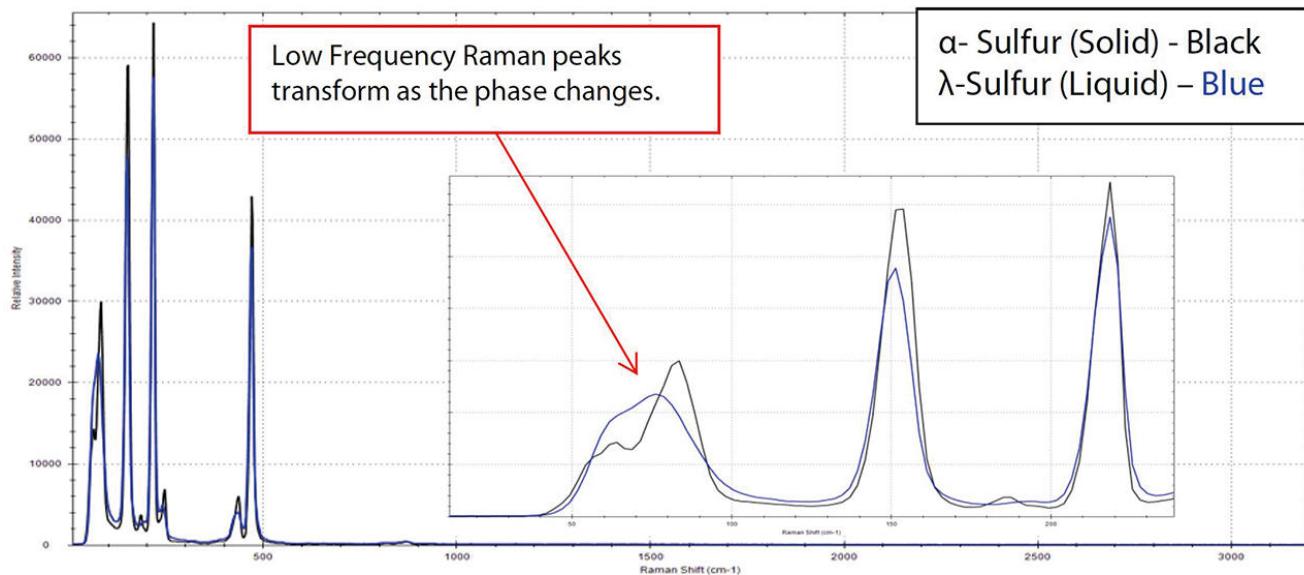


Figure 3. Spettri Raman dello zolfo in transizione dalla forma α -cristallina alla forma λ -liquida, presi con un tempo di integrazione di 0,1 s. Si noti un significativo ampliamento dei picchi situati nella regione delle basse frequenze (vedi intarsio).

CONCLUSIONE

Lo spettrometro Raman i-Raman Plus 785S, abbinato alla sonda di grado E a bassa frequenza, può essere uno strumento prezioso per applicazioni che richiedono rilevamento a bassa frequenza fino a 65 cm^{-1} . La capacità di caratterizzare polimorfi e forme solvatate supporta i processi di produzione e formulazione nelle industrie farmaceutiche e

biologiche.

Oltre alla caratterizzazione di proteine, polimorfi e fasi, la spettroscopia Raman a bassa frequenza può essere utilizzata anche per studiare reticolati di semiconduttori [4], nanotubi di carbonio [5], celle solari e un assortimento di minerali, pigmenti e pietre preziose.

RIFERIMENTI

1. Teixeira, A. M. R.; Freire, P. T. C.; Moreno, A. J. D.; et al. High-Pressure Raman Study of L-Alanine Crystal. *Solid State Communications* **2000**, *116* (7), 405–409.
[https://doi.org/10.1016/S0038-1098\(00\)00342-2](https://doi.org/10.1016/S0038-1098(00)00342-2).
2. Larkin, P. J.; Dabros, M.; Sarsfield, B.; et al. Polymorph Characterization of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) Using Low-Frequency Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2014**, *68* (7), 758–776.
<https://doi.org/10.1366/13-07329>.
3. Golichenko, B. O.; Naseka, V. M.; Strelchuk, V. V.; et al. Raman Study of L-Asparagine and L-Glutamine Molecules Adsorbed on Aluminum Films in a Wide Frequency Range. *Semicond Phys. Quantum Electron. Optoelectron.* **2017**, *20* (3), 297–304.
<https://doi.org/10.15407/spqeo20.03.297>.
4. Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2019.
5. Pelletier, M. J. *Analytical Applications of Raman Spectroscopy*, 1st ed.; Blackwell Science: Oxford, 1999.

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



Spettrometro Raman portatile i-Raman Plus 785S

i-Raman® Plus 785S fa parte della nostra serie di spettrometri Raman portatili insignita di premi ed è dotato della nostra innovativa tecnologia spettrometrica intelligente. Questo spettrometro Raman portatile utilizza un sensore con array CCD ad elevata efficienza quantica, il raffreddamento termoelettrico e un intervallo dinamico elevato per garantire prestazioni eccezionali con il minimo rumore, anche in caso di tempi di integrazione che arrivano fino a 30 minuti. In questo modo è possibile misurare anche segnali Raman deboli.

Lo strumento i-Raman Plus 785S si caratterizza per la combinazione unica di ampia gamma spettrale ed elevata risoluzione con configurazioni che consentono di effettuare misure da 65 cm^{-1} a 3.350 cm^{-1} . La base piccola, la leggerezza e il consumo ridotto di energia permettono di eseguire analisi Raman dappertutto, a livello di ricerca. i-Raman Plus è dotato di sonda a fibra ottica per un campionamento facile ed è utilizzabile con un supporto per cuvette, un videomicroscopio, un tavolo scorrevole XYZ con supporto per sonda, nonché con il nostro software per l'analisi multivariata BWIQ® e il software per l'identificazione BWID®. Con lo strumento i-Raman Plus, avrete sempre una soluzione Raman ad alta precisione per l'analisi qualitativa e quantitativa.



Ampliamento sonda Raman con trigger (785 nm)

Modulo con sonda Raman a fibre ottiche di qualità di laboratorio per un Cut-on-Start da 65 cm^{-1} con trigger manuale, diametro di $105\text{ }\mu\text{m}$, NA di 0,22 fibra ottica per eccitazione a 785 nm, diametro di $200\text{ }\mu\text{m}$, NA di 0,22 per acquisizione Raman. Assorbanza > 6; fibra lunga 1,5 m con connettore SMA905 sul lato spettrometro e FC/PC sul lato laser. Finestra in vetro di quarzo sigillata con adesivo per il campionamento senza contatto. Distanza di lavoro 5,4 mm. Non adatta all'immersione.