

# Kvantitativno praćenje reakcije sinteze i kristalizacije omeprazola Ramanovom spektroskopijom in-line

---

Šahnić, Damir

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:702684>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE  
Department of Chemistry

Damir Šahnić

**QUANTITATIVE MONITORING OF OMEPRAZOLE  
SYNTHESIS REACTION AND CRYSTALLIZATION  
BY IN-LINE RAMAN SPECTROSCOPY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Damir Šahnić

**KVANTITATIVNO PRAĆENJE REAKCIJE SINTEZE I  
KRISTALIZACIJE OMEPRAZOLA RAMANOVOM  
SPEKTROSKOPIJOM *IN-LINE***

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2017







University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE  
Department of Chemistry

Damir Šahnić

**QUANTITATIVE MONITORING OF OMEPRAZOLE  
SYNTHESIS REACTION AND CRYSTALLIZATION BY  
IN-LINE RAMAN SPECTROSCOPY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Professor

Zagreb, 2017



*Ovaj rad je izrađen u laboratorijima PLIVA-e Hrvatske d.o.o., odjel Istraživanje i razvoj, TAPI Pilot.*

*Najljepše zahvaljujem mom mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj stručnoj podršci i korisnim savjetima tijekom izrade ovog doktorskog rada.*

*Veliko hvala i članovima povjerenstva, izv. prof. dr. sc. Snežani Miljanić i prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću na konstruktivnim primjedbama i savjetima.*

*Hvala dr. sc. Tomislavu Jednačku na pruženoj pomoći prilikom mjerenja spektara NMR.*

*Zahvaljujem se kolegama iz PLIVA-e, Draženu Čavužiću na iznimnoj stručnoj podršci oko multivarijantnih analiza i kolegama Mislavu Runji, Miroslavi Harči i Nevenu Crnobrnji na svim savjetima i pruženoj pomoći oko kromatografskih analiza.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su me podržavali i vjerovali u mene.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i Olgi na iznimnom strpljenju, podršci i vjeri u mene. Bez vas, vaših riječi, vaših ohrabrenja i vaše žrtve ne bi bilo ni ovog rada.*

*„Svijet je velika gimnazija u koju smo došli kako bi se ojačali.“*

*Svami Vivekananda*



# Sadržaj

|   |      |
|---|------|
| SAŽETAK.....  | XI   |
| ABSTRACT .....  | XIII |
| § 1. UVOD.....  | 1    |
| § 2. LITERATURNI PREGLED .....  | 4    |
| 2.1. Istraživanje i razvoj aktivnih farmaceutskih supstanci.....  | 4    |
| 2.2. Procesna analitička tehnologija, PAT – inicijativa Američke agencije za hranu i lijekove ..                            | 6    |
| 2.3. Principi praćenja fizikalno-kemijskih promjena <i>in situ</i> .....  | 7    |
| 2.4. Vibracijska spektroskopija .....   | 9    |
| 2.5. Proces kristalizacije .....  | 18   |
| 2.6. Metode multivarijatne analize .....  | 26   |
| 2.7. Omeprazol.....   | 35   |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 37   |
| 3.1. Materijali .....   | 37   |
| 3.2. Postupak pripreme 6-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfanil]-1 <i>H</i> -benzimidazola (1) ..... | 37   |
| 3.3. Postupak pripreme 6-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1 <i>H</i> -benzimidazola (2) ..... | 38   |
| 3.4. Postupak pripreme 6-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonil]-1 <i>H</i> -benzimidazola (3) ..... | 39   |
| 3.5. Spektroskopija NMR .....   | 40   |
| 3.6. Ramanova spektroskopija .....  | 40   |
| 3.7. Kromatografske analize .....   | 42   |
| 3.8. Kalibracijski eksperimenti .....   | 44   |
| 3.9. Obrada spektara .....  | 46   |
| 3.10. Multivarijatne analize i razvoj kalibracijskog modela .....   | 47   |
| 3.11. Određivanje hidrodinamičkih parametara .....  | 48   |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 49   |
| 4.1. Sinteza i strukturna karakterizacija spojeva 1, 2 i 3 .....  | 49   |
| 4.2. Praćenje reakcije oksidacije spoja 1 Ramanovom spektroskopijom <i>in-line</i> .....                                    | 58   |
| 4.3. Analiza Ramanovih spektara <i>in-line</i> metodom PCA .....  | 61   |
| 4.4. Analiza Ramanovih spektara <i>in-line</i> metodom MCR-ALS.....   | 66   |

|   |       |
|---|-------|
| 4.5. Određivanje linearnog područja i faktora odziva HPLC metode za praćenje reakcije oksidacije..... | 67    |
| 4.6. Kalibracija pomoću otopina smjesa spojeva 1, 2 i 3 .....   | 71    |
| 4.7. Kalibracija pomoću Ramanovih spektara izmjerenih tijekom reakcije.....                           | 73    |
| 4.8. Razvoj kalibracijskog modela metodom PLSR.....   | 92    |
| 4.9. Praćenje reakcije uporabom PLSR kalibracijskog modela .....                                      | 106   |
| 4.10. Završna metoda za praćenje reakcije <i>in-line</i> .....  | 110   |
| 4.11. Kristalizacija spoja 2 .....  | 111   |
| § 5. ZAKLJUČAK .....  | 116   |
| § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....   | 117   |
| § 7. LITERATURNI IZVORI.....  | 119   |
| § 8. DODATAK .....  | XV    |
| § 9. ŽIVOTOPIS .....  | XXVII |



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### KVANTITATIVNO PRAĆENJE REAKCIJE SINTEZE I KRISTALIZACIJE OMEPRAZOLA RAMANOVOM SPEKTROSKOPIJOM *IN-LINE*

Damir Šahnić

PLIVA Hrvatska d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Opisan je razvoj kvantitativne metode praćenja reakcije sinteze i kristalizacije aktivne farmaceutske supstance, omeprazola *in situ*, Ramanovom spektroskopijom *in-line*. Praćenje *in-line* provedeno je uporabom disperzivnog Ramanovog instrumenta. Prije praćenja reakcije, reakcijske komponente su sintetizirane i okarakterizirane *off-line*, pomoću Ramanove spektroskopije i spektroskopije NMR. Spektroskopska mjerenja i komplementarne kromatografske analize, korištene za razvoj kalibracijskog modela, prikupljene su iz seta eksperimenata provedenih u mjerilu od jedne litre. Temeljem podataka prikupljenih tijekom kalibracijskih eksperimenata, razvijen je kemometrijski model metodom parcijalnih projekcija najmanjih kvadrata za sve tri reakcijske komponente, koji izračunava postotni udio svake komponente u reakcijskoj smjesi. Metoda je uspješno primijenjena u praćenju tijeka reakcije eksperimenta u kilo-laboratorijskom mjerilu. Kristalizacija omeprazola praćena je semikvantitativno metodom analize glavnih komponenata i multivarijatom rezolucijom krivulja.

(151 stranica, 126 slika, 19 tablica, 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: Kvantitativno praćenje *in situ* / multivarijatna kalibracija / omeprazol / Ramanova spektroskopija *in-line*

Mentor: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Rad prihvaćen: 06. rujna 2017.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
2. prof. dr. sc. Predrag Novak
3. prof. dr. sc. Ernest Meštrović







University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### QUANTITATIVE MONITORING OF OMEPRAZOLE SYNTHESIS REACTION AND CRYSTALLIZATION BY IN-LINE RAMAN SPECTROSCOPY

Damir Šahnić

PLIVA Hrvatska d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

The development of a quantitative in-line Raman spectroscopic method for *in situ* monitoring of the active pharmaceutical ingredient, omeprazole synthesis reaction and crystallization is described. In-line monitoring was performed using a dispersive Raman instrument. Prior to reaction monitoring, the reaction components were characterized off-line by means of Raman and NMR spectroscopy. The spectroscopic measurements and the complementary chromatographic analyses, used in the calibration model development, were gathered from a set of experiments, performed at a one liter scale. Based on the data set obtained from the calibration experiments, a partial least square regression model was developed for all three reaction components, enabling the determination of the percentage of each component present in the reaction mixture. The model was successfully applied to monitor the reaction progress in a kilo-lab scale experiment. Omeprazole crystallization was monitored semi-quantitatively by means of principal component analysis and multivariate curve resolution methods.

(151 pages, 126 figures, 19 tables, 97 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: *In-line* Raman spectroscopy / *In situ* quantitative monitoring / multivariate calibration / omeprazole

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Professor

Thesis accepted: 6 September 2017

Reviewers:

Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor  
Dr. Predrag Novak, Professor  
Dr. Ernest Meštrović, Professor



## § 1. UVOD

U današnje moderno doba, uporaba farmaceutskih proizvoda postala je sastavni i gotovo nezaobilazni dio ljudskog života. Uporaba i potražnja istih, prolazi kroz fazu kontinuiranog rasta već gotovo cijelo stoljeće što se između ostalog može pripisati sve većim napredcima u fundamentalnim istraživanjima, razvoju tehnologije, otvaranju novih tržišta te općenitom porastu životnog standarda ljudi. Posljedično tome raste i cjelokupna farmaceutska industrija te uz rast etabliranih, povećava se i broj novih, iako većinom generičkih kompanija na globalnoj razini. Svaki farmaceutski proizvod namijenjen za ljudsku uporabu podliježe rigoroznim zahtjevima regulatornih agencija prvenstveno s aspekta kvalitete proizvoda te je često specifičan za pojedino tržište. Tako primjerice razlikujemo dvije agencije za dva najveća svjetska tržišta, Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) nadležna za tržište Sjedinjenih američkih država i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) nadležna za tržište Europske unije. Regulatorni zahtjevi agencija, u proteklih su 10 godina postali znatno složeniji i rigorozniji. Ova se tvrdnja prvenstveno odnosi na zahtjeve vezane uz prikaz potpune kontrole proizvodnog procesa od strane farmaceutskih kompanija, bilo da se radi o prijavama vezanim uz aktivne farmaceutske supstance (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) ili o gotovim oblicima lijekova (engl. *Final Dosage Form*, FDF). Takvi zahtjevi proizlaze iz koncepta, tzv. kvalitete osigurane dizajnom (engl. *Quality by Design*, QbD), kojeg je prvi opisao J. M. Juran 1992. godine i koje je FDA prihvatio i učvrstio kao svojevrsni standard u industriji.<sup>1</sup> Koncept QbD u sferi farmaceutske industrije obuhvaća čitav niz smjernica koje opisuju načine menadžmenta rizika, strategije kontrole procesa proizvodnje, kvalitetno definiranje kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) i kritičkih značajki kvalitete (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA), sa svrhom ugrađivanja kvalitete u sam proizvod, primjenom navedenog koncepta tijekom istraživačko-razvojnih aktivnosti. Temeljni cilj tijekom istraživačko-razvojnih aktivnosti na jednoj API molekuli je definirati proizvodni proces koji će zadovoljiti određene kriterije. Kriteriji na koje se stavlja najveći fokus svakako su sigurnost pri izvedbi procesa, reproducibilnost odnosno konzistentnost između proizvodnih serija u smislu prinosa i kvalitete, te njegova ekonomičnost. Sigurnost i ekonomičnost procesa u najvećoj mjeri ovise o odabranom

sintetskom putu, reagensima te uvjetima procesa. Reproducibilnost, iako vezana za navedeno, u najvećoj mjeri ovisi o razumijevanju procesa te njegovoj kontroli tijekom provedbe. Cilj je dakle tijekom istraživačko-razvojnog perioda, što kvalitetnije opisati proces te definirati strategiju njegove kontrole tijekom provedbe u proizvodnom mjerilu. U tom smislu svoju primjenu sve više nalazi procesna analitička tehnologija (engl. *Process Analytical Technology*, PAT), koja obuhvaća širok spektar različitih analitičkih tehnika. Te tehnike omogućavaju uvid u kemijske i fizikalne promjene u realnom vremenu. Iako je od razvoja i početka primjene PAT-a prošlo već skoro tri desetljeća, primjena, barem prema dostupnim literaturnim podacima, još je uvijek ograničena.<sup>2,3,4</sup> Inicijativa koju 2004. godine predlaže FDA u svojem dokumentu o PAT smjernicama za industriju, trebala je potaknuti farmaceutsku industriju na značajniju primjenu.<sup>5</sup> No unatoč tome, primjena ni približno nije dosegla razine koje su predviđane u vrijeme uvođenja koncepta iako je ostvaren zamjetan broj publikacija na temu PAT-a u proteklih 10 godina.<sup>6</sup> Nadalje, i dalje postoji mnogo otvorenih pitanja i problema prilikom primjene. To se prvenstveno odnosi na nedovoljnu robusnost PAT metoda. Manjak robusnosti često je posljedica manjkavih kalibracijskih modela u aspektu nedovoljno široko opisanih procesnih varijacija kao primjerice, varijacija u količini reagensa i otapala, temperature, dinamične promjene volumena tijekom mjerenja i općenito nedovoljnog broja kalibracijskih uzoraka.

Jedna od PAT grupa koja je našla značajniju primjenu u realnim primjerima u farmaceutskoj industriji, svakako su tehnike vibracijske spektroskopije (IR i Ramanova spektroskopija) te UV/Vis spektroskopija. Napretkom u tehnologiji optičkih vlakana omogućena je primjena navedenih spektroskopskih tehnika u praćenju i kontroli različitih fizikalno-kemijskih promjena *in situ* preko principa *in-line* i *at-line* koji će biti detaljnije objašnjeni u sljedećim poglavljima.

Cilj ovog istraživanja je na primjeru API-a Omeprazola, razviti metodologiju praćenja i kontrole procesa *in situ*. Doseg istraživanja obuhvatio je praćenje i kvantifikaciju sastava reakcijske smjese tijekom reakcije pripreme Omeprazola te praćenje tijeka njegove kristalizacije. Kao tehnika praćenja odabrana je Ramanova spektroskopija principom *in-line*, prvenstveno iz razloga što reakcijska smjesa sadrži značajan udio vode i što Ramanova spektroskopija daje uvid u kristalizaciju specifičnih polimorfni formi. Navedeni sustav zajedno s potpunim multivarijantnim kalibracijskim modelom, odabran je iz razloga što se uz glavnu odvija i konsekutivna reakcija nastajanja onečišćenja pa tako ishod sintetske reakcije

direktno utječe na CQA, u ovom slučaju kemijsku čistoću izoliranog produkta te je iz tog razloga reakciju nužno zaustaviti u točno određenom omjeru svih komponenti kako bi se ostvario maksimalni prinos i čistoća. U svrhu dobivanja kvantitativnih informacija o sastavu smjese, sustav će biti kalibriran kemometrijskom tehnikom parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares Regression*, PLSR) uz pomoć komplementarnih HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) analiza. Završna metoda koja će uključivati obradu sirovih spektra i analizu istih kalibracijskim modelom, omogućiti će da se unutar maksimalno 5 minuta dobije informacija o trenutnom sastavu reakcijske smjese. Iz navedenih razloga, istraživanje može služiti kao komparativni primjer pogodnosti koje ovakva metodologija donosi naspram standardnih analitičkih tehnika *off-line* kao što je primjerice HPLC analiza uzoraka reakcijske smjese ili analiza seta spektara izmjerenih tijekom reakcije metodom PCA nakon eksperimenta, što onemogućuje praćenje u realnom vremenu. Nadalje, istraživanje će pokazati kako je, uz adekvatan izbor obrade spektara i kvalitetan pristup kalibraciji, ovakvu metodologiju moguće primjenjivati i u sustavima gdje se kroz vrijeme odvija i dinamična promjena volumena smjese. Također, biti će pokazan i diskutiran utjecaj polaznih materijala te način kako se efekti koje nose varijacije u kvaliteti istih, mogu uspješno anulirati bez utjecaja na kvalitetu cjelokupne metode.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

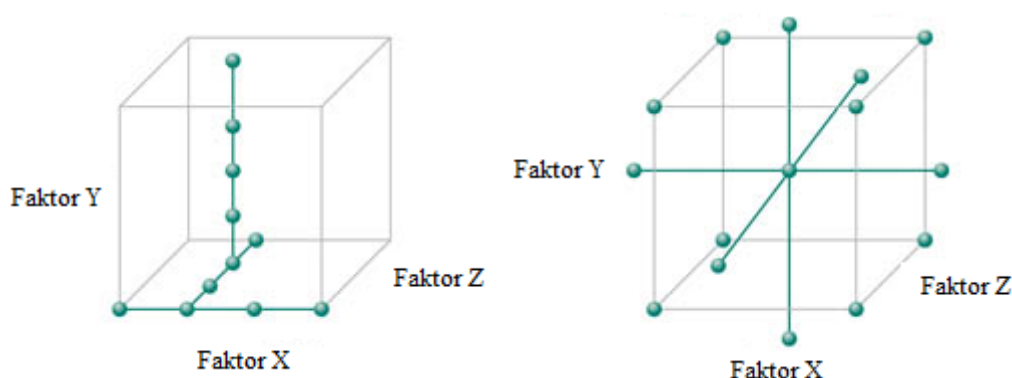
### 2.1. Istraživanje i razvoj aktivnih farmaceutskih supstanci

Proces razvoja aktivnih farmaceutskih supstanci (API) od molekule kandidata do potpuno implementiranog, industrijskog proizvodnog procesa je kompleksan te ekonomski, vremenski i strukovno izrazito zahtjevan. Prema pristupu valja razlikovati dvije grane farmaceutske industrije koje se bave istraživanjem i razvojem API-a. Prve, tzv. originatorske kompanije, koje svoje poslovanje baziraju na novim kemijskim entitetima (engl. *New Chemical Entities*, NCE) odnosno novim molekulama kao lijekovima, i druge, generičke kompanije koje te poznate molekule proizvode i stavljaju na tržište nakon isteka patentnih prava originatorskih kompanija.

Prvi korak u istraživanju i razvoju NCE-a obuhvaća sintezu velikog broja molekula kao potencijalnih novih lijekova, čime se bave grupe medicinskih kemičara. U ovoj fazi, sintezi molekula pristupa se organsko-sintetskim principom u smislu da odabrani sintetski put kao i reagensi te reakcijski uvjeti sinteze, u suštini nisu primjenjivi za uvećanje i implementaciju postupaka na većem mjerilu. Nakon definiranja ciljne molekule ili njezine odgovarajuće farmaceutski prihvatljive soli te odgovarajuće polimorfne forme, nastupa period razvoja postupka i procesa u kojem se odabire najefikasniji, siguran, ekološki prihvatljiv i ekonomski najisplativiji postupak. Ovaj je dio sličan, i u nekim slučajevima, identičan pristupu generičkih kompanija kojima je poznata ciljna molekula. Generičke kompanije tijekom ovog perioda pokušavaju naći nove sintetske putove, nove soli i/ili polimorfne forme koje bi im omogućile diferencijaciju od originatorskog proizvoda i eventualni raniji izlazak na tržište. Taj period u prosjeku traje bilo gdje između pola i dvije godine, o čemu ovisi kompleksnost molekule i broj sintetskih koraka, prije nego što postupak postane pogodan za daljnje uvećanje u industrijsko mjerilo.

Osim gore navedenog, cilj tog perioda je i prikupiti što više ključnih saznanja o utjecaju i međuovisnosti procesnih parametara, kao što su npr. količine i omjeri reagensa i otapala, temperature i temperaturni profili tijekom procesa te vremena zadržavanja pri pojedinim koracima, na kemijsku i polimorfnu čistoću te prinos izoliranog materijala i iskorištenje procesa. Gore navedeno je i integrirani dio cjelokupnog QbD koncepta. Kako bi se do navedenih saznanja došlo u što kraćem roku i sa što manje uloženi resursa, odnosno kako bi

se primjenom QbD koncepta došlo do spoznaja o CPP i CQA, procesni kemičar može posegnuti za cijelom lepezom alata koji mu stoje na raspolaganju. Jedna od skupina tih alata su računalne tehnike bazirane na statističkoj analizi. Osim cijelog niza multivarijantnih tehnika analize koje će detaljnije biti objašnjene u narednim poglavljima, u tu se skupinu može svrstati i dizajn eksperimenata (engl. *Design of Experiments*, DoE) kao jako bitna i iznimno prisutna i korištena tehnika. Iako DoE kao statistička tehnika primjenu nalazi u iznimno velikom broju znanstvenih disciplina, u istraživanju i razvoju API-a, prvenstveno ima funkciju da na temelju predloženih raspona varijabli odabranih procesnih parametara predlaže set eksperimenata kojima bi se maksimalno pokrila varijanca podataka. Nakon provedenih predloženih eksperimenata se tada statistički može razlučiti i determinirati utjecaj procesnih parametara na željene odgovore (primjerice doseg reakcije ili udio onečišćenja) odnosno odabrani izmjereni ishod i definirati tzv. prostor dizajna (engl. *Design Space*). Prostor dizajna je zapravo prostor raspona procesnih parametara u kojem je moguće provoditi proces unutar definiranog dozvoljenog odstupanja željenih ishoda prilikom čega je u obzir uzeta i međuzavisnost parametara, nešto što izostaje prilikom klasičnog pristupa mijenjanja samo jednog procesnog parametra odnosno faktora (engl. *One Variable (Factor) at a Time*, OVAT, OFAT) prilikom definiranja parametarskog prostora. Drugim riječima, prostor dizajna opisuje odnos procesnih parametara i CQA.<sup>7</sup>



Slika 2.1. Shematski prikaz OVAT (lijevo) i DoE pristupa (desno) definiranju prostora dizajna za tri ispitivana parametra.<sup>8</sup>

Na slici 2.1 shematski je prikazana razlika u rezultatima OVAT i DoE pristupa. Kocka prikazuje prostor dizajna za tri varijabilna faktora (parametri procesa). Tako je u ovom primjeru gdje faktor X ima 4 varijable, faktor Y također 4 i faktor Z, 5, jasno da ukoliko se



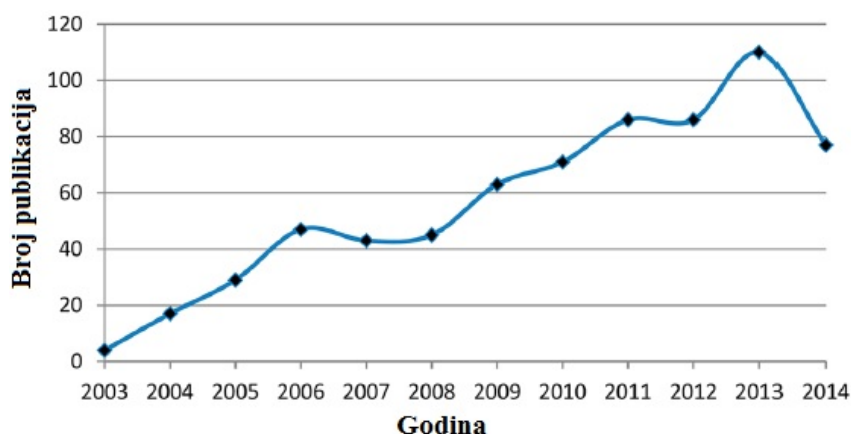
želi u potpunosti istražiti prostor dizajna, nužno je provesti 180 eksperimenata primjenom OVAT principa. Također, ukoliko postoji međuovisnost parametara, teško ju je prepoznati i opisati. U slučaju DoE pristupa prikazanog na slici, isti se prostor može opisati u svega 18 ili 21 eksperiment (ovisno koliko je replikata centralne točke) uz statistički određenu međuovisnost parametara. Mogućnost koju DoE pruža u vidu skraćivanja vremenskog perioda nužnog za razvoj, ovime postaje sasvim jasna.

DoE se ne mora nužno primjenjivati samo na razvoj procesa. Često se koristi i kao alat za definiranje eksperimenata u svrhu kalibracije mjernog sustava gdje se mjerenja provode nekom od spektroskopskih tehnika. Sve te tehnike zajedno mogu potencijalno služiti kao PAT tehnike. Jedini pravilan i cjelovit pristup istraživanju i razvoju API-a gdje koncept QbD-a može u potpunosti dobiti svoju namijenjenu formu, je zasigurno kombinacija svih tipova raspoloživih tehnika gdje god je to moguće. Poslije, gdje se pokaže potrebnim, metode *in situ* razvijene tijekom istraživačko razvojnog perioda, mogu se primijeniti u svrhu kontrole proizvodnih procesa na multitonskim skalama.

## **2.2. Procesna analitička tehnologija, PAT – inicijativa Američke agencije za hranu i lijekove**

Kao što je spomenuto u uvodnom dijelu, PAT kao princip, i posljedično inicijativa primjene istog, prvi je opisao FDA u svom dokumentu o smjernicama za industriju iz 2004 godine. Definiran je kao sustav za dizajn, analizu i kontrolu proizvodnje kroz vremenski ovisna mjerenja kritičnih značajki kvalitete i performansa sirovina i procesnih smjesa, sa ciljem osiguranja kvalitete gotovog proizvoda.<sup>5</sup> FDA ga također smatra sastavnim dijelom QbD koncepta. Glavna nit vodilja je ideja da se primjenom PAT tehnika tijekom perioda istraživanja i razvoja stekne dovoljno spoznaja o procesu kroz definiranje CPP i mjerenje CQA i da se na taj način kvalitetu proizvoda osigura samim dizajnom procesa. PAT tehnike, ako se to pokaže nužnim, mogu kasnije poslužiti i kao metode kontrole proizvodnih procesa. Do danas, opisan je i primijenjen velik broj različitih tehnika kao primjerice ultrazvučne tehnike, senzori dielektrične konstante, turbidimetrijski, konduktometrijski i fotoakustični senzori, tehnika FBRM (engl. *Focused Beam Reflectance Measurement*) i naposljetku spektroskopija UV/Vis (engl. *Ultraviolet/Visible*), FTIR (engl. *Fourier Transformed Infrared*) odnosno MIR (engl. *Mid Infrared*) i NIR (engl. *Near Infrared*) te Ramanova spektroskopija (FT i disperzivna). Područje primjene je iznimno pa se tako navedene tehnike primjenjuju na

širok spektar fizikalno-kemijskih promjena kao što su kemijske reakcije, procesi kristalizacije, destilacije i sušenja te ostale operacije proizvodnje FDF-a kao primjerice granulacija, ekstruzije, tabletiranje.<sup>4</sup> U industriji, uzlazni PAT trend je još svakako značajan. Kao što je prikazano na slici 2.2, prema publikacijama koje za ključne riječ imaju PAT i koje su indeksirane u bazi *Web of Science*, vidljiv je kontinuirani rast u periodu od 2003. do 2013. godine.<sup>6</sup>



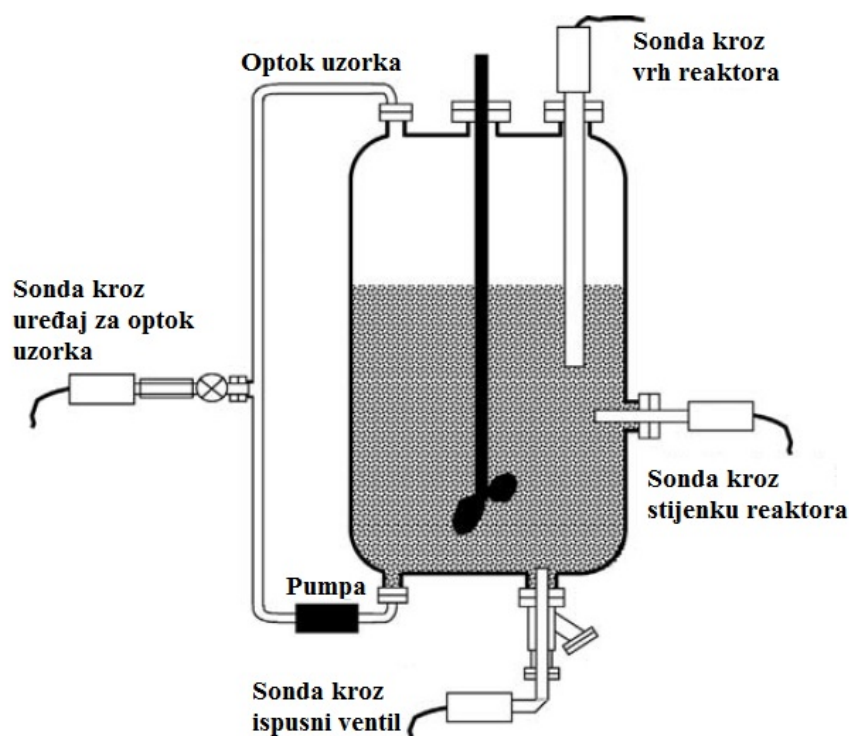
Slika 2.2 Broj publikacija godišnje s ključnom riječju PAT, indeksiranih u Web of Science bazi podataka.<sup>6</sup>

Za očekivati je da će se pozitivni trend nastaviti u narednim godinama. U industriji je zasigurno prepoznat potencijal koji primjena PAT-a može donijeti, a to se i najbolje vidi po činjenici da autori publikacija koje se bave PAT tematikom najčešće upravo i dolaze iz industrije.

### 2.3. Principi praćenja fizikalno-kemijskih promjena *in situ*

Izniman i brz tehnološki napredak prvenstveno u polju tehnologije svjetlovoda i razvoja FT (engl. *Fourier Transformed*) instrumenata, omogućio je i razvoj novih tehnologija za praćenje fizikalno-kemijskih promjena *in situ* i omogućio da koncept PAT-a u potpunosti zaživi u svojoj namjeri. Tako se danas takva mjerenja provode uz pomoć različitih tipova sonde koju su svjetlovodom povezane s mjernim instrumentom i omogućuju brzo mjerenje promjena u realnom vremenu. Prema mjernom mjestu na kojem se takvo mjerenje odvija razlikujemo nekoliko principa. Prvi je princip *in-line* gdje se mjerenje provodi direktno u kontaktu s

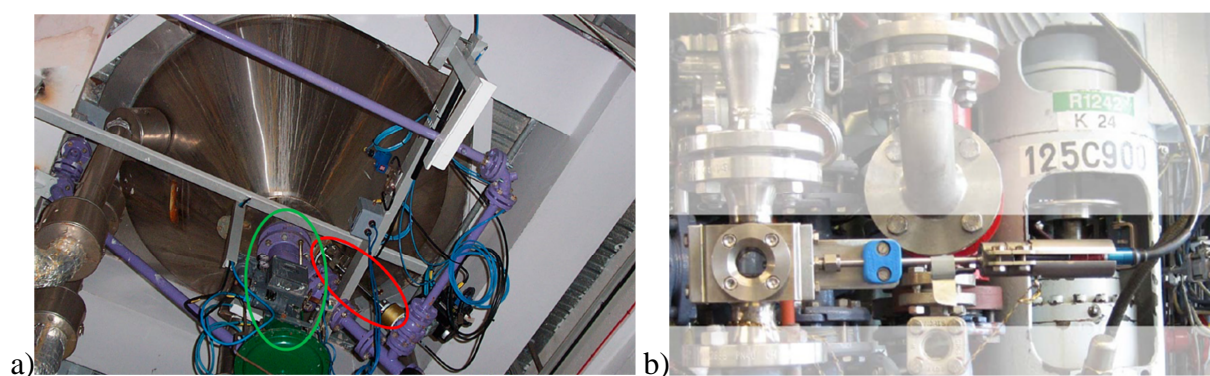
procesnom smjesom. Primjenjivati se može u svim skalama bilo da se radi o šaržnim ili kontinuiranim procesima. Drugi je princip *on-line* gdje se mjerenje provodi na uzorku procesne smjese koja je privremeno izuzeta iz glavnine smjese kao primjerice zaseban optok kao što je prikazano na slici 2.3. Oba su principa u suštini ista te oba omogućuju mjerenje *in situ* nekom od PAT tehnika. Razlika između dvije je čisto predmet praktičnosti izvedbe. Ovdje valja spomenuti i ostala dva PAT principa, a to su *at-line* i *off-line*. Princip *at-line* uključuje mjerenje uzorka procesne smjese van samog procesa prilikom čega se mjerni uređaj nalazi u neposrednoj blizini mjernog sustava. I naposljetku *off-line* koji uključuje sve tipove mjerenja na uzorcima procesnih smjesa, ali na lokaciji koja je dislocirana od mjesta gdje se odvija proces (npr. kromatografska analiza u laboratoriju kontrole kvalitete).<sup>9</sup>



Slika 2.3. Shematski prikaz principa *in-line* i *on-line*.<sup>9</sup>

Kao što je prikazano na slici 2.3, vidljivo je da se princip *in-line* u djelo može provesti na tri načina. Prvi, kroz vrh odnosno kapu reaktora ili šlif tikvice, koji je najčešći prilikom laboratorijskih mjerenja. Drugi, kroz stijenku reaktora, koji nije čest jer naknadnom primjenom na postojeći reaktor zahtijeva najinvazivniji zahvat na samom reaktoru prilikom instalacije. I treći, kroz ispusni ventil, koji je najčešći pristup prilikom mjerenja u reaktorima

pilotnih i proizvodnih veličina zbog svoje jednostavnosti primjene. Princip *on-line* primjenjuje se uporabom sustava koji omogućuje optok smjese kroz cjevovod pokraj reaktora gdje se sonda montira na sustav optoka. Ovaj princip također je čest u mjerenjima na pilotnoj i proizvodnoj veličini. Na slici 2.4a prikazan je realan primjer kompanije Astra-Zeneca gdje su Ramanovu spektroskopiju *in-line* u kombinaciji sa PLSR kalibracijskim modelom primijenili u praćenju reakcije aromatske eterifikacije u reaktoru od 1500 L.<sup>10</sup> Slika 2.4b prikazuje primjer kompanije Sanofi-Aventis gdje su Ramanovu spektroskopiju *on-line* primijenili u praćenju kristalizacije dihidroartemisinske kiseline.<sup>11</sup>



Osim znatnog smanjenja vremena analize, primjena ovakvih principa praćenja *in situ* svakako može doprinijeti prije svega efikasnosti i razumijevanju procesa. Nadalje, znatan je i doprinos u aspektu sigurnosti procesa s obzirom da su metode neinvazivne i nedestruktivne (kao što je to slučaj kod principa *at-line* i *off-line*) odnosno da ne postoji izuzimanje i manipulacija uzorkom van procesne smjese. Time se znatno smanjuje i mogućnost kros-kontaminacije kao i problematika reprezentativnosti uzoraka.

## 2.4. Vibracijska spektroskopija

Molekulska vibracijska spektroskopija bazira se na interakciji infracrvenog zračenja i molekula. Procesi promjene molekula prilikom interakcije sa infracrvenim zračenjem mogu se promatrati u vidu diskretnih (kvantiziranih) vibracijskih energetske nivoa kao što je prikazano na Morseovoj krivulji prikazanoj na slici 2.5. Svaka molekula odnosno veza u molekuli može i mora egzistirati u jednom od tih kvantiziranih nivoa bilo da se radi o

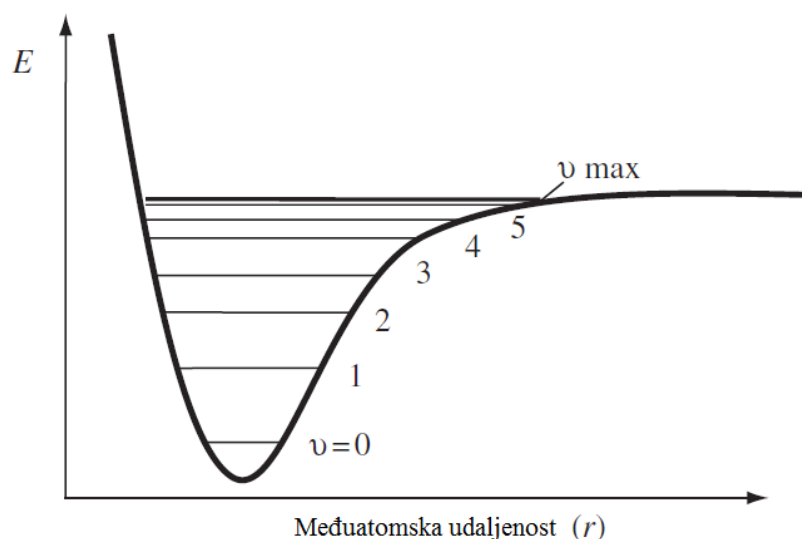
osnovnom ili pobuđenom stanju. Svaka od veza u molekuli ima svoju određenu rezonantnu frekvenciju vibracije točno određene energije. Interakcijom zračenja i molekula dolazi do promjene u tom energetsom nivou. Drugim riječima, veza u molekuli će apsorbirati zračenje samo one frekvencije ( $\nu$ ) čija energija ( $E$ ) odgovara razlici energije kvantnih energetskih nivoa, odnosno koja je jednaka rezonantnoj frekvenciji veze. Te dvije veličine međusobno su vezane Bohrovom jednačbom:

$$E = h\nu \quad (2.1)$$

gdje  $h$  označava Planckovu konstantu ( $h = 6,626 \times 10^{-34}$  J s). Kao najčešća mjerna jedinica u vibracijskoj spektroskopiji koristi se valni broj ( $\tilde{\nu}$ ) koji označava broj valova u jednom centimetru i u odnosu je s valnom duljinom ( $\lambda$ ) i frekvencijom prema sljedećim jednačbama:

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda = \nu/c \quad (2.2)$$

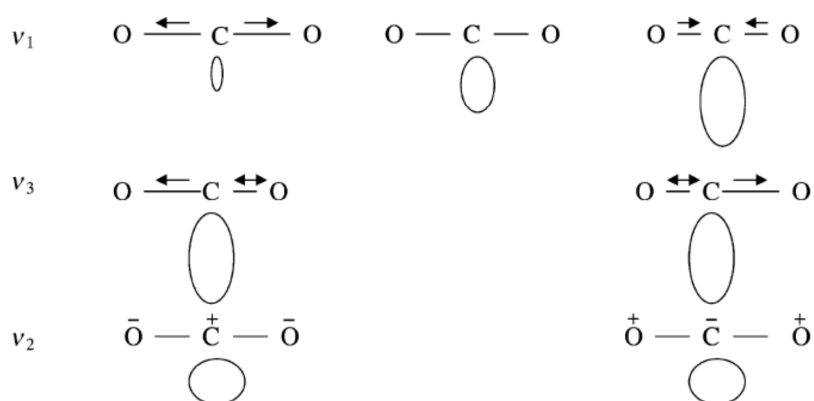
gdje  $c$  označava brzinu svjetlosti ( $c = 299792458$  m s<sup>-1</sup>).<sup>12</sup>



Slika 2.5. Morseova krivulja ovisnosti energije o međuatomskoj udaljenosti u molekuli.<sup>13</sup>

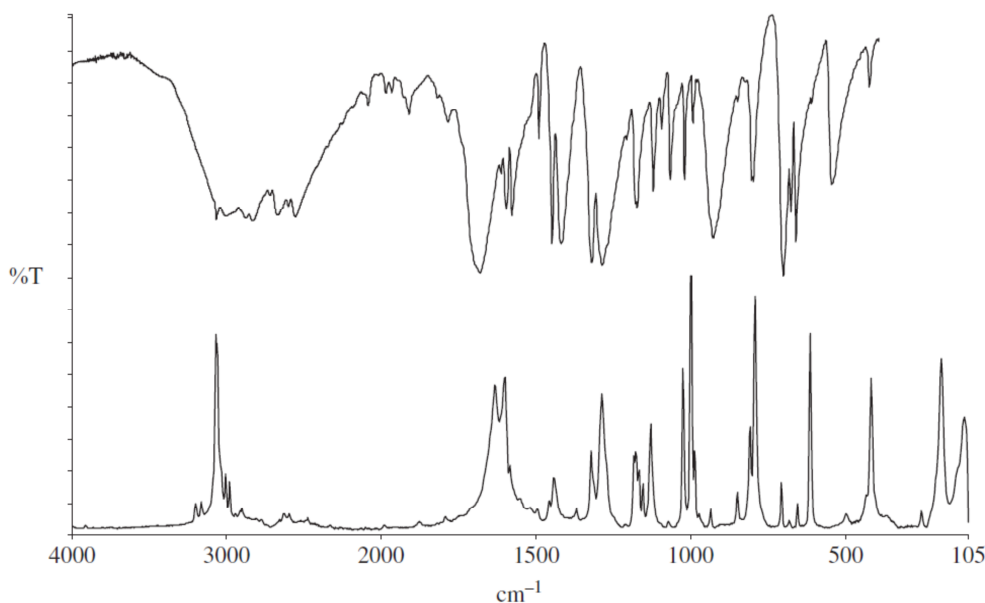
Prema tipu interakcije molekule i zračenja, razlikujemo dva tipa molekulske vibracijske spektroskopije. Prva je apsorpcijska odnosno transmisijska, ovisno o tome mjeri li se apsorbirano ili propušteno zračenje u rasponu valnih brojeva od 12500 cm<sup>-1</sup> do 10 cm<sup>-1</sup>, i nju

se općenito naziva infracrvenom spektroskopijom. Druga je Ramanova spektroskopija koja se temelji na efektu raspršenja zračenja iz monokromatskog izvora gdje pobudno zračenje može biti različite valne duljine. Još jedna bitna razlika diferencira infracrvenu od Ramanove spektroskopije. Da bi molekula mogla apsorbirati infracrveno zračenje, prilikom apsorpcije mora doći do promjene u električnom dipolnom momentu molekule dok kod Ramanove spektroskopije do raspršenja svjetlosti dolazi uslijed promjene polarizabilnosti. To je jasno prikazano na primjeru različitih vibracija linearne molekule  $\text{CO}_2$  na slici 2.6. Vibracija  $\nu_1$  prikazuje simetrično istežanje molekule prilikom čega dolazi do promjene elipsoida polarizabilnosti. Takva će vibracija dakle biti Raman aktivna, a IR neaktivna. S druge strane vibracije  $\nu_3$  koja prikazuje asimetrično istežanje i  $\nu_2$  koja prikazuje strižnu vibraciju van ravnine uslijed kojih ne dolazi do promjene polarizabilnosti biti će Raman neaktivne, ali će biti IR aktivne s obzirom da dolazi do promjene dipolnog momenta molekule uslijed vibracije.<sup>9</sup> U oba slučaja intenzitet signala biti će proporcionalan količini promjene.



Slika 2.6. Promjena u elipsoidu polarizabilnosti za vibracije molekule  $\text{CO}_2$ .<sup>9</sup>

Iz navedenih su razloga infracrvena i Ramanova spektroskopija komplementarne tehnike. To znači da će jake vrpce u infracrvenim spektrima biti slabe u Ramanovim i obratno kao što je prikazano na slici 2.7 na primjeru IR i Ramanovog spektra benzojeve kiseline.

Slika 2.7. IR i Ramanov spektar benzojeve kiseline.<sup>13</sup>

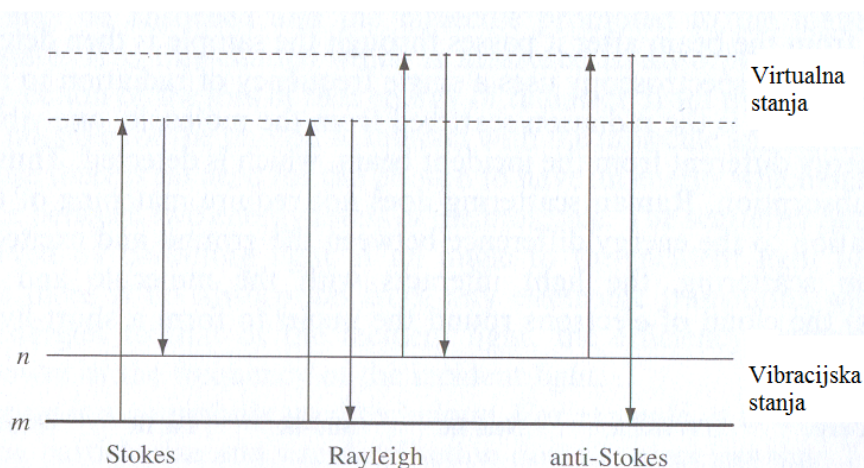
Različite tehnike infracrvene spektroskopije diferenciraju se prema području valnih duljina odnosno valnih brojeva zračenja. Tako razlikujemo blisko infracrveno područje od  $12500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ , srednje područje od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  i daleko područje od  $400\text{ cm}^{-1}$  do  $10\text{ cm}^{-1}$ . Infracrvena spektroskopija najčešće koristi prva dva područja pa tako razlikujemo NIR i MIR spektroskopiju dok raspršenje svjetla kod Ramanove spektroskopije obično upada u MIR područje bez obzira što pobudno zračenje može biti i unutar vidljivog područja.

#### 2.4.1. Ramanova spektroskopija – povijesni pregled i princip

Fenomen neelastičnog raspršenja zračenja prvi je postulirao Smekal 1923. godine, a po prvi puta su ga 1928. godine eksperimentalno potvrdili profesor Raman i njegov student Krishnah. Profesoru Ramanu je 1930. godine dodijeljena Nobelova nagrada za njegovo otkriće te je nova tehnika po njemu i dobila ime. Razvoj same tehnike odvijao se dosta sporim tempom prvenstveno iz razloga tehničke prirode. Prvo zbog činjenice da je intenzitet Ramanovog raspršenog svjetla iznimno nizak što je uzrokovalo velike probleme prilikom detekcije. Drugi veliki problem predstavljala je i fluorescencija uzorka kao posljedica korištenja lampi živinog luka koje emitiraju svjetlost u vidljivom području spektra i uzorkuju i pobudu elektronskih, a ne samo vibracijskih stanja.<sup>14</sup> Fluorescencija može značajno utjecati na prigušenje raspršene svjetlosti. Napredak je ostvaren tek 70-tih godina prošlog stoljeća kada je laserska tehnologija



postala dostupnija. Primjenom laserskog zračenja kao primarnog izvora zračenja u tehnici Ramanove spektroskopije donekle je riješen problem fluorescencije no pojavio se jedan sasvim novi koji je pak bio povezan sa problemom detekcije. Naime, kako je kvalitetna detekcija u to vrijeme zahtijevala znatno vrijeme ekspozicije, uzorci su nužno bili izloženi dužim periodima relativno jakog laserskog zračenja što je često uzrokovalo degradaciju ili denaturaciju uzoraka. Najznačajniji napredak desio se u proteklih 20 godina. Implementacija NIR lasera kao izvora zračenja u sprezi sa FT Raman instrumentnom izvedbom, dodatno je riješila problem pojave fluorescencije. Također razvoj kompaktnih NIR diodnih lasera kao i Ng:YAG lasera s jezgrom u čvrstom stanju značajno je doprinijela smanjenju ukupne veličine instrumentne izvedbe. Napredak u filterima zračenja pospješio je akviziciju Ramanovog raspršenog zračenja time što je značajno smanjena interferencija ostalih prisutnih komponenti zračenja. Implementacija detektora sakupljača naboja (engl. *Charge Coupled Device*, CCD) s disperzivnim Ramanovim spektrometrima riješio je dugogodišnji problem detekcije. Napredak u tehnologiji svjetlovoda omogućio je pak analize različitih sustava *in situ*. Cijeli ovaj niz unaprijeđenja, omogućio je da Ramanova spektroskopija doživi dramatičan i raznoliki skok u primjeni.<sup>9,13</sup>

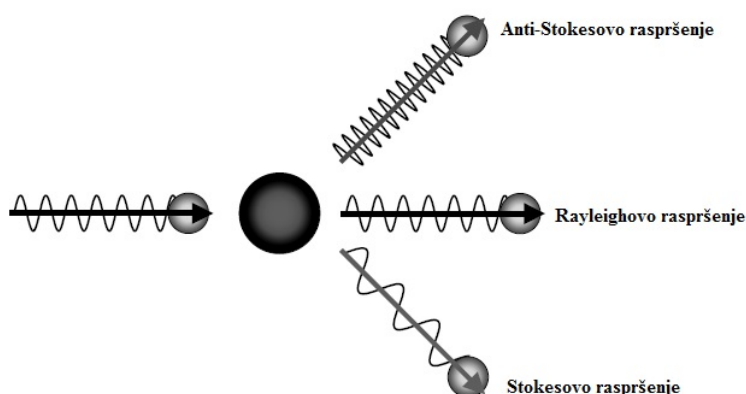


Slika 2.8. Shematski prikaz promjene u energiji vibracijskih stanja uslijed raspršenja zračenja.<sup>13</sup>

Kao što je već spomenuto, Ramanova spektroskopija temelji se na fenomenu raspršenja zračenja. U apsorpcijskoj vibracijskoj spektroskopiji foton zračenja biti će apsorbiran prema jednadžbi 2.1 odnosno samo ako njegova energija odgovara energetskej razlici između osnovnog i pobuđenog stanja. Za razliku od apsorpcije, prilikom raspršenja svjetlosti nije



nužno da zračenje ima energiju koja odgovara energetskej razlici i zato se za Ramanovu spektroskopiju koristi monokromatsko zračenje za pobudu dok kod IR spektroskopije uzorak pobuđuje određenim rasponom frekvencija zračenja. Raspršenje zračenja prilikom sudara fotona s molekulama može se odviti elastično i neelastično. Na slikama 2.8 i 2.9 prikazan je shematski princip raspršenja. Obično je da pri sobnoj temperaturi većina molekula egzistira u osnovnom vibracijskom stanju no zasigurno ne sve. Interakcijom monokromatskog laserskog zračenja s molekulom dolazi do pobude u tzv. virtualna stanja koja nisu stvarna vibracijska stanja već nastaju uslijed promjene polarizabilnosti veza. Većina fotona će se s molekulom sudariti elastično odnosno neće doći do izmjene energije, već će raspršeni fotoni imati istu frekvenciju kao i pobudni. Takvo zračenje naziva se Rayleighovo raspršenje. Jako mali broj fotona (jedan na  $10^6$ – $10^8$ ) će uslijed sudara, izmijeniti energiju s molekulom što je primjer neelastičnog sudara. Ukoliko uslijed sudara foton pobudnog zračenja preda energiju molekuli, raspršeni foton imati će manju frekvenciju od pobudnog (Stokesovo raspršenje), a ukoliko uslijed sudara molekula preda energiju fotonu, raspršeni foton imati će veću frekvenciju od pobudnog (anti-Stokesovo raspršenje).<sup>9,13</sup>



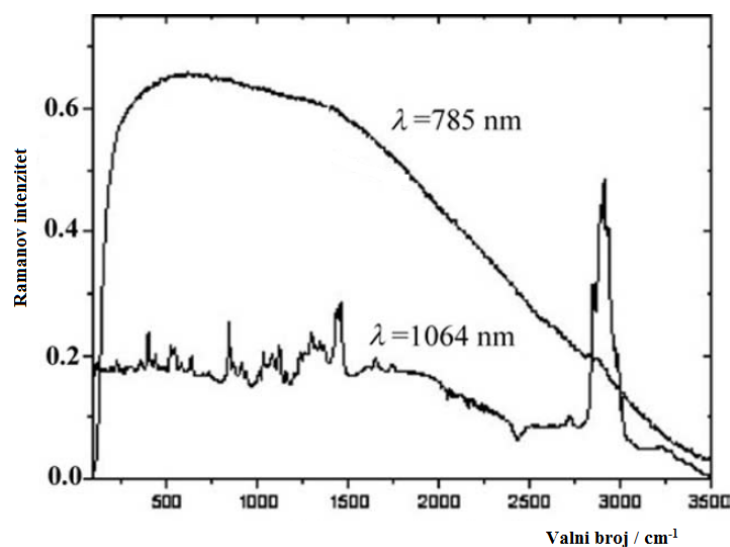
Slika 2.9. Shematski prikaz principa Ramanovog raspršenja.<sup>9</sup>

#### 2.4.2. Instrumentne izvedbe Ramanove spektroskopije

Tipični Raman instrument se sastoji od četiri glavne komponente: laser (kao izvor pobudnog monokromatskog zračenja), optički sustav pomoću kojeg se vrši pobuda i prikupljanje raspršenog zračenja (princip svjetlovodom povezane sonde, ćelija za uzorke ili mikroskopska izvedba), spektrometar (sustav za separaciju zračenja na pojedine valne duljine) i detektor.

Najčešće upotrebljavani laseri u farmaceutskoj industriji su NIR laseri pobude pri 1064 nm (Ng:YAG lasera s jezgrom u čvrstom stanju) koji se koristi u Ramanovim instrumentima

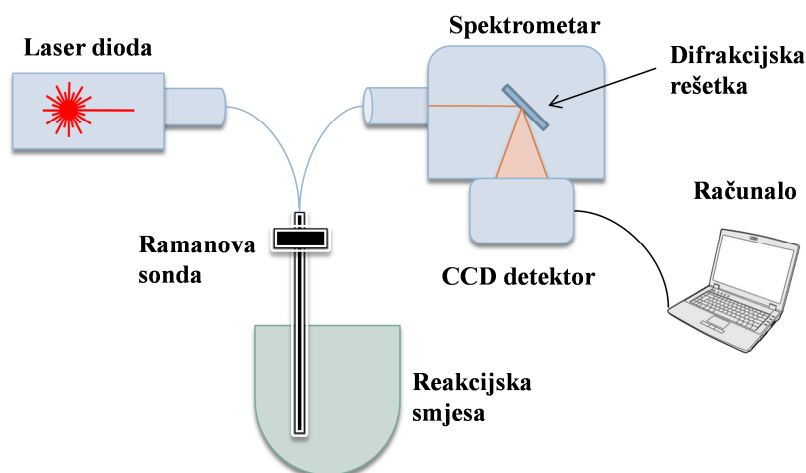
sa FT spektrometrom i 785 nm (dioda) koja se koristi u Ramanovim instrumentima s disperzivnim spektrometrom. Također postoje UV laseri i laseri u vidljivom području spektra no njihova je uporaba limitirana prvenstveno zbog problema pojave fluorescencije i degradacije uzorka. Pri odabiru lasera, u obzir valja uzeti dva glavna faktora. Prvi je činjenica da efikasnost Ramanovog signala raste što je valna duljina laserskog zračenja manja, a druga je da što je valna duljina laserskog zračenja manja, to je veća vjerojatnost pojave interferencije fluorescencije. S aspekta spektrometra razlikujemo FT i disperzivne. FT spektrometri raspršeno zračenje razlučuju Michaelsonovim interferometrom, a disperzivni spektrometri pomoću difrakcijskih rešetka. Tehnologija detektora ovisiti će o tehnologiji spektrometra. Tako su s FT spektrometrima uvijek sparni germanijski ili indij-galij-arsenidni detektori, a sa disperzivnim spektrometrima, CCD kamere. S aspekta robusnosti, disperzivni instrumenti svakako su superiorniji zbog činjenice da sadrže mali broj pomičnih dijelova i time su primjenjiviji u dinamičnim okruženjima kao što su pilotna ili proizvodna postrojenja. S druge strane česta je pojava fluorescencije uzorka zbog valne duljine pobudnog zračenja što kod FT instrumenata nije slučaj. Primjer utjecaja pobudnog zračenja na kvalitetu Ramanovog spektra i udio fluorescencije, prikazan je na slici 2.10. Tehnika odabira će prema tome svakako ovisiti o svim specifičnostima mjernog sustava i području primjene.



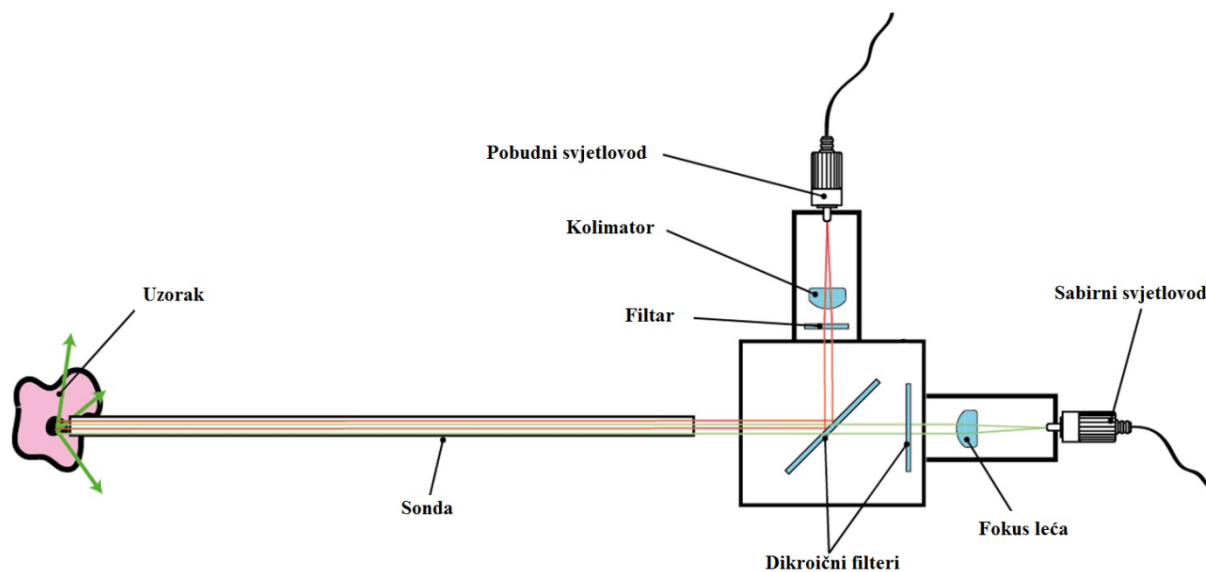
Slika 2.10. Ramanovi spektri uzorka čokolade pri različitim valnim duljinama pobudnog zračenja.<sup>15</sup>

### 2.4.3. Ramanova spektroskopija in-line

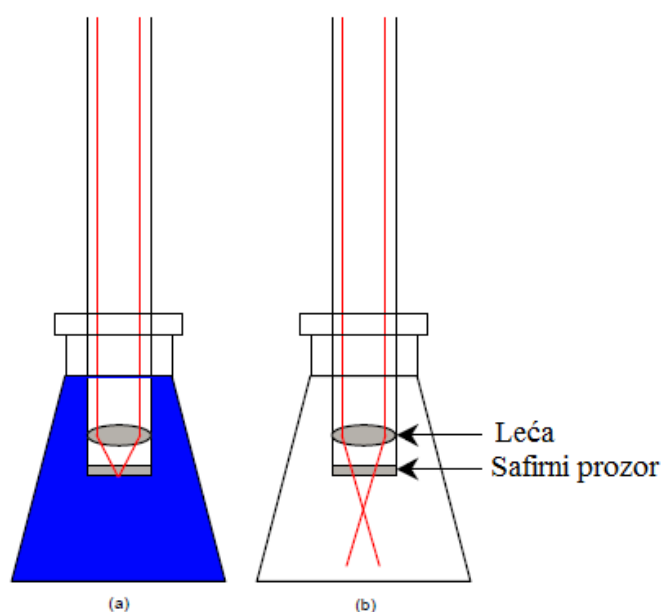
Princip *in-line* na primjeru disperzivne Ramanove spektroskopije prikazan je na slici 2.11. Mjerenje se provodi uporabom kontaktne sonde koja se uranja u reakcijsku smjesu i koja je svjetlovodom je povezana sa spektrometrom. Na slici 2.12 prikazan je presjek tipične Ramanove kontaktne sonde. Sonda se sastoji od glave u kojoj se nalazi set optičkih segmenata za filtriranje i usmjeravanje pobudnog laserskog i raspršenog zračenja, i od optičkog segmenta varijabilne dužine koji se uranja u smjesu u kojem se nalazi dodatna fokus leća i na čijem se vrhu nalazi kristalni prozor najčešće izrađen od safira. Vrh sonde shematski je prikazan na slici 2.13. Prema dubini penetracije pobudnog zračenja u mjerno polje, razlikujemo sonde kratkog i dugog fokusa. Tako su sonde kratkog fokusa primjenjive na turbidne sustave dok su dugog fokusa prikladnije za mjerenje bistrih otopina.



Slika 2.11. Shematski prikaz mjerenja disperzivnom Ramanovom spektroskopijom *in-line*.



Slika 2.12. Shematski prikaz sonde i glave sonde s putevima laserskog i raspršenog zračenja.<sup>16</sup>



Slika 2.13. Shematski prikaz vrha Ramanove sonde s a) kratkim i b) dugim fokusom.<sup>17</sup>

#### 2.4.4. Primjeri vibracijske spektroskopije kao PAT tehnike

Od svih PAT tehnika, skupina koja je našla značajniju primjenu u praćenju fizikalno-kemijskih promjena u farmaceutskoj industriji je zasigurno vibracijska spektroskopija. Pri tome su glavne primijenjene tehnike FTIR, NIR i Ramanova spektroskopija. Područje primjene je raznoliko pa se tako nalazi primjena u praćenju kemijskih reakcija,<sup>10,11,18–26</sup> biotransformacija,<sup>27,28</sup> kristalizacija,<sup>29–34</sup> liofilizacija,<sup>35</sup> ekstruzijskih procesa,<sup>36,37</sup>

homogenizacija<sup>38</sup> i granulacijskih procesa.<sup>39</sup> Nekoliko je nedavnih primjera koje svakako valja istaknuti prvenstveno zbog njihova značaja s aspekta primjene na kompleksne kemijske sustave. Cardoso et al. opisuju primjenu FTIR spektroskopije u praćenju reakcije pripreme 17- $\alpha$ -Estradiola Mitsunobuovom reakcijom. Udio reakcijskih komponenti kroz vrijeme procijenjen je na temelju promjena karakterističnih vrpci polaznog materijala, intermedijara i produkta reakcije.<sup>24</sup> Hamilton et al. opisuju primjenu FTIR spektroskopije u praćenju reakcije hidrogenacije, i NIR spektroskopije prilikom zamjene otapala prije kristalizacije produkta. Praćenje zamjene otapala baziralo se na kvantitativnoj analizi udjela metanola uz pomoć PLSR kalibracijskog modela.<sup>26</sup> Csontos et al. opisuju primjenu Ramanove spektroskopije u petlji povratne sprege kao automatske kontrole reakcije oksimacije.<sup>23</sup> Feth et al. također opisuju primjenu Ramanove spektroskopije u kontroli reakcije diastereoselektivne redukcije na temelju MCR-ALS analize podataka.<sup>11</sup> Hart et al. opisuju primjenu Ramanove spektroskopije u kontroli heterogene reakcije aromatske eterifikacije na temelju PLSR kalibracijskog modela i to u pilotnom mjerilu.<sup>10</sup> Kao što je vidljivo iz navedenih primjera, raspon primjene vibracijske spektroskopije u sprezi s multivarijantnim metodama statističke analize kao PAT-a, iznimna je i raznolika.

## 2.5. Proces kristalizacije

Od svih poznatih metoda pročišćavanja kemijskih spojeva, kristalizacija je u svakom slučaju najefikasnija, najjednostavnija, a što se tiče farmaceutskih proizvoda i najčešće korištena metoda. U farmaceutskoj industriji je od iznimne važnosti jer upravo se tim procesom ugrađuje kvaliteta u proizvode, bilo da se radi o pročišćavanju spoja, dobivanju određene polimorfne forme, morfologije ili raspodjele veličine čestica.

Proces kristalizacije, gledano s termodinamskog stajališta, omogućen je promjenom kemijskog potencijala između trenutnog i ravnotežnog stanja. U slučaju kristalizacije kemijski potencijal prikazan je u vidu koncentracija pa se njegova promjena ( $\Delta\mu$ ) može prikazati sljedećom aproksimacijom:

$$\Delta\mu = \ln\left(\frac{c}{c^*}\right) \cong \frac{c}{c^*} - 1 = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 = \sigma \quad (2.3)$$

gdje je  $c$  trenutna, a  $c^*$  ravnotežna koncentracija (topljivost), odnosno koncentracija pri kojoj je otopina zasićena pri određenoj temperaturi.  $S$  predstavlja omjer prezasićenosti, a  $\sigma$  relativnu

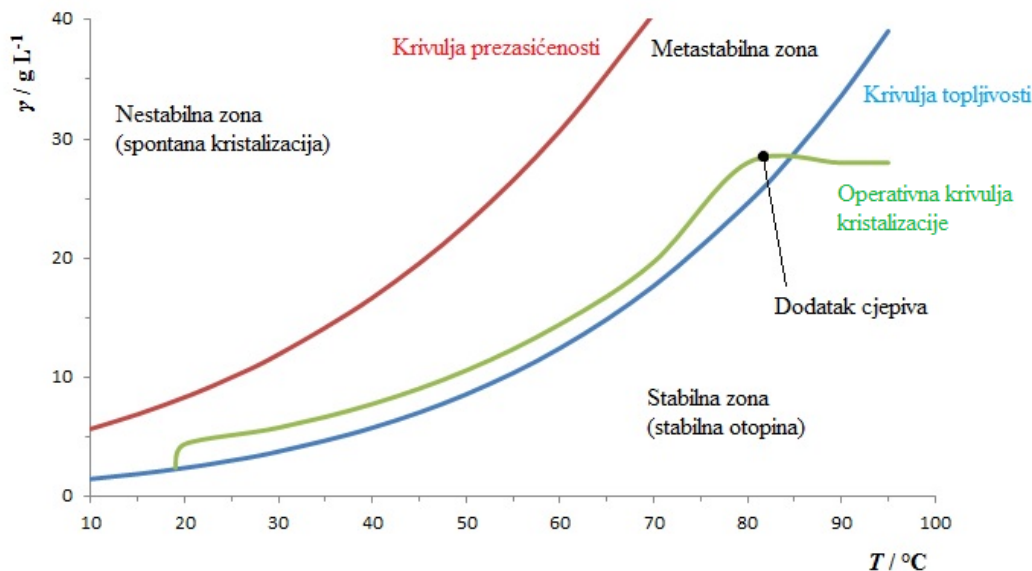
ili apsolutnu prezasićenost.<sup>40</sup> Iz praktičnih razloga prezasićenost se češće prikazuje kao razlika između trenutne i ravnotežne koncentracije prema jednadžbi:

$$\Delta c = c - c^* \quad (2.4)$$

Na slici 2.14 prikazan je Ostwald-Miersov dijagram kojim se generalno mogu prikazati kristalizacijski procesi. Dijagram je baziran na ovisnosti masene koncentracije o temperaturi te dijagram karakteriziraju značajne krivulje i zone. Prva značajna krivulja je krivulja topljivosti koja prikazuje ovisnost ravnotežne topljivosti o temperaturi, a otopina koja se nalazi na toj krivulji naziva se zasićena otopina. S desne strane te krivulje nalazi se tzv. stabilna zona. Ako se primjerice kristalizacijska otopina nalazi u toj zoni, za nju se kaže da je nezasićena i u tom slučaju ne može doći do spontane kristalizacije ili kristalizacije inicirane dodatkom cjepiva. Lijevo od krivulje topljivosti, nalazi se metastabilna zona. Kristalizacijska otopina koja se nalazi u tom području naziva se prezasićena otopina odnosno sadrži više otopljene tvari od njezine ravnotežne topljivosti. U tom području može doći do spontane nukleacije, no najčešće se kristalizacija u tom području inicira dodatkom cjepiva. Druga značajna krivulja dijagrama je krivulja prezasićenosti kao lijeva granica metastabilne zone. Lijevo od nje nalazi se tzv. nestabilna zona u kojoj zasigurno dolazi do spontane kristalizacije.

Dva glavna procesa definiraju kristalizacijski proces. Prvi je proces nukleacije pri čemu nastaju kristalni nukleusi, a drugi, rast kristala. Primarna nukleacija kao spontani proces odvija se najčešće u visokim stupnjevima prezasićenosti unutar metastabilne zone uz promjenu Gibbsove energije ( $G$ ). Što je prezasićenost veća, to je proces brži. Drugi proces je rast kristala koji je definiran difuzijskim (dolazak molekula otopljene tvari do nukleusa procesom difuzije) i integracijskim procesom (prostorna orijentacija molekule i integracija u prostornu rešetku).<sup>40</sup> Kao i kod nukleacije proces će biti brži što je stupanj prezasićenosti veći što može rezultirati inkludiranjem onečišćenja u kristal. Bitan i nepoželjan proces je i sekundarna nukleacija do koje može doći uslijed naglog povećanja prezasićenosti, primjerice naglom promjenom temperature kristalizacijske smjese. Posljedica toga je širenje krivulje raspodjele veličine čestica što kod farmaceutskih proizvoda može nepoželjno utjecati na formulaciju gotovog oblika. Nukleacija i rast su kompetitivni procesi pa tako uspješna kristalizacija ovisi prvenstveno o kvalitetnom poznavanju metastabilne zone i kontroli

trenutne prezasićenosti. Kako bi se dobili čisti kristalni spojevi uske raspodjele veličina čestica, kristalizaciju u pravilu valja provoditi iz relativno niskog prezasićenja.



Slika 2.14. Ostwald-Miersov diagram na primjeru fumaratne soli API-a. Prikazana je i operativna krivulja kristalizacije uz dodatak cjepiva i uz kontrolu stupnja prezasićenosti programiranim hlađenjem.

Šaržni kristalizacijski procesi s aspekta stvaranja prezasićenosti, generalno se provode na tri načina. Tako razlikujemo kristalizaciju hlađenjem, ukoncentriravanjem i dodatkom anti-otapala. Prilikom kristalizacije hlađenjem, prezasićenje odnosno zadiranje u metastabilnu zonu stvara se snižavanjem i kontrolom temperature kristalizacijske smjese. Uslijed kristalizacije ukoncentriravanjem, prezasićenje se obično generira povećanjem koncentracije pri definiranoj temperaturi. Kontrola se u ovom slučaju može provoditi finim definiranjem brzine destilacije otapala odnosno ukoncentriravanja. Pri kristalizaciji dodatkom anti-otapala pti definiranoj temperaturi, prezasićenost se generira postupnim smanjenjem topljivosti odnosno pomicanjem krivulje topljivosti u desno. U ovom slučaju brzina dodatka anti-otapala biti će mehanizam kontrole stupnja prezasićenosti. Valja spomenuti i reaktivnu kristalizaciju gdje se prezasićenost generira kemijskom reakcijom. U ovu grupu spadaju i kiselo-bazne precipitacije.

Doseg današnje znanosti i tehnologije otvorio je mogućnost da i kontinuirani kristalizacijski procesi nađu primjenu u redovnoj proizvodnji kemijskih spojeva.<sup>41</sup> Jedan od

načina provedbe kontinuiranih kristalizacijskih procesa je uporaba oscilatornih protočnih reaktora gdje se postiže iznimno skraćenje u vremenu procesa po jedinici mase proizvoda. Postiže se i iznimna robusnost sa aspekta kvalitete dobivenog proizvoda. Zbog činjenice da je uvećanje ovakvih procesa linearno izbjegavaju se problemi koji se pojavljuju prilikom uvećanja šaržnih kristalizacijskih procesa kao primjerice hidrodinamički efekt (različiti uvjeti miješanja) ili efekt prijenosa topline (uvjetovan omjerom volumena kristalizacijske smjese i efektivne površine prijenosa topline).

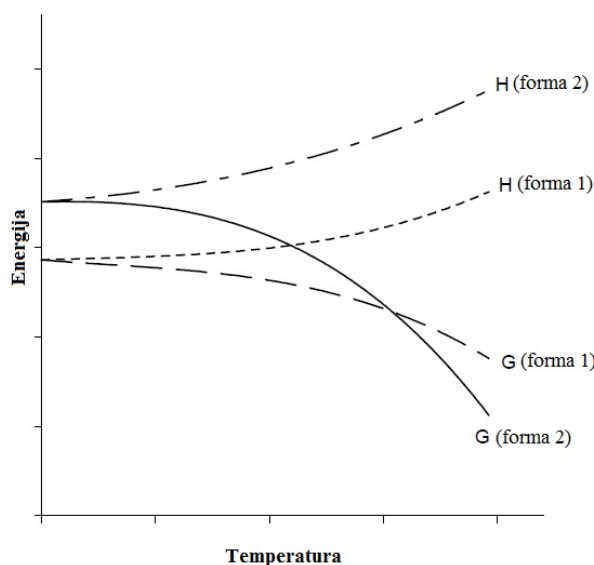
### 2.5.1. Polimorfizam organskih supstanci

Jedan bitan aspekt kristalizacijskih procesa od iznimnog interesa (sa stajališta farmaceutskih proizvoda možda i najbitniji) je polimorfizam. Polimorfizam je svojstvo da jedna tvar može egzistirati u više različitih kristalografskih oblika. Polimorfi će se razlikovati prvenstveno po kristalnom sustavu, a sukladno tome po prostornoj grupi i parametrima jedinične ćelije. Te će se razlike ogledati pak na cijeli niz različitih fizikalnih svojstava kao primjerice topljivost, talište, energije vibracijskih i elektronskih prijelaza, stabilnost, higroskopnost, tvrdoća i brojni drugi.<sup>42</sup> Kako će neki od tih parametara utjecati i na bioraspoloživost spoja, jasno je zašto je polimorfizam iznimno važan za farmaceutsku industriju. Fenomen polimorfizma i međusobne interkonverzije polimorfnih formi valja promatrati prvenstveno kao termodinamički proces. Termodinamički najstabilniji polimorf biti će onaj s najnižom Gibbsovom energijom. Prijelaz jedne forme u drugu pri stalnoj temperaturi dešavati će se uz promjenu Gibbsove energije prema sljedećoj formuli:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.5)$$

gdje je  $H$  entalpija,  $T$  termodinamička temperatura, a  $S$  entropija. Na slici 2.15 prikazana je temperaturna ovisnost entalpije i Gibbsove energije za dvije polimorfne forme jednog spoja.





Slika 2.15. Temperaturna ovisnost entalpije ( $H$ ) i Gibbsove energije ( $G$ ) za dvije različite polimorfne forme.<sup>42</sup>

Kako se temperaturna ovisnost Gibbsovih energija razlikuje za svaku od formi, krivulje će se u jednoj točki sjeći. Ta se točka zove točkom prijelaza ( $T_{TR}$ ). Kako su Gibbsove energije za oba polimorfa u toj točki iste, polimorfne forme nalaze se u ravnoteži pri toj temperaturi. Iz grafa je također jasno da pri temperaturama višim od  $T_{TR}$ , forma 2 će biti stabilnija nego forma 1, a pri temperaturama nižim od  $T_{TR}$  obratno. Također, vidljivo je da će prijelaz iz forme 1 u formu 2 pri temperaturama višim od  $T_{TR}$  biti endoterman. U točki prijelaza gdje su Gibbsove energije istih vrijednosti, izjednačavanjem jednadžbi Gibbsove energije za dvije forme dolazi se do sljedeće korisne jednadžbe:

$$\Delta H_{TR} = T_{TR} \Delta S_{TR} \quad (2.6)$$

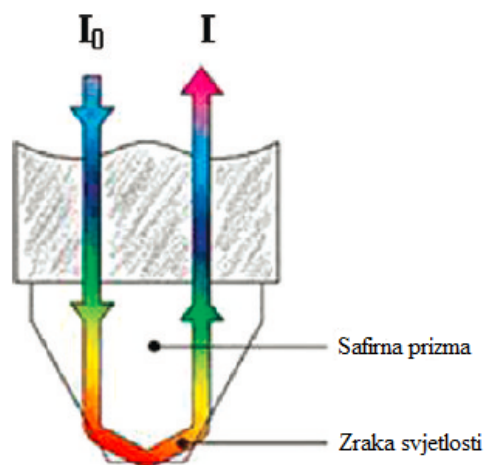
Pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) moguće je odrediti entalpiju prijelaza i prema tome izračunati i entropiju prijelaza prema jednadžbi, sve dokle god je točka prijelaza točno određena.<sup>42</sup>

### 2.5.2. Praćenje i kontrola kristalizacijskih procesa in situ

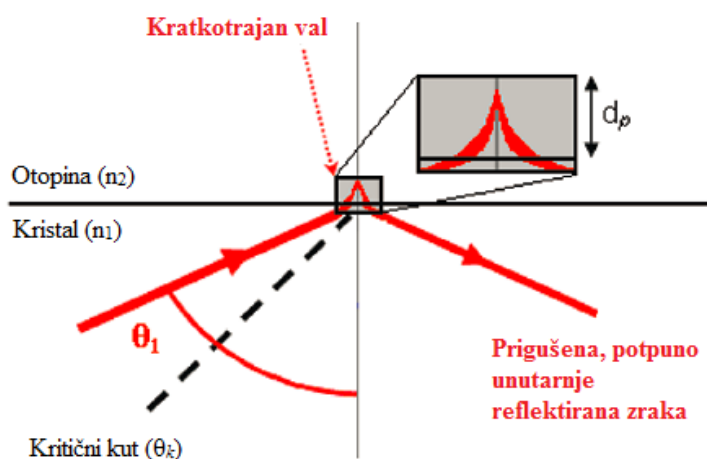
Proces kristalizacije može biti praćen različitim analitičkim tehnikama, a najčešće korištene su FTIR, NIR, UV/Vis, Ramanova spektroskopija kao primjeri spektroskopskih tehnika, te tehnika FBRM. Tehnika odabira temeljiti će se prvenstveno na cilju koji se želi postići

prilikom takvog mjerenja. Tako se tehnika FBRM koristi za određivanje veličine i broja čestica,<sup>43-45</sup> tehnike FTIR, NIR i UV/Vis za određivanje koncentracije u otopini,<sup>46-50</sup> a FTIR i Ramanova spektroskopija za praćenje kristalizacije polimorfnih formi.<sup>50,51</sup> Kvantitativno praćenje provodi se u kombinaciji sa kemometrijskim kalibracijskim modelom. Takav model razvija se kalibracijom sustava gdje se kombiniraju multivarijatne statističke metode s podacima o primjerice točnoj koncentraciji otopljenog spoja ili točnom udjelu pojedine polimorfne forme.<sup>47</sup>

Prilikom praćenja kristalizacijskih procesa primjerice principom *in-line*, više faktora mora biti uzeto u obzir prilikom izvedbe mjerenja koja mogu utjecati na kvalitetu samog mjerenja. Glavni problem koji se često javlja prilikom mjerenja bilo kojom tehnikom i tipom sonde je taloženje spoja na prozoru ili vrhu sonde što uzrokuje značajne greške. Rješenja ovog problema nema osim fizičkog čišćenja sonde. Jedan od faktora koje svakako treba uzeti u obzir je tip sonde s kojom se provodi mjerenje. Ako je cilj mjerenja ustanoviti koncentraciju otopljenog produkta u realnom vremenu tada je, ukoliko se koristi FTIR ili UV/Vis tehnika, nužno koristiti sonde prigušene totalne reflektancije (engl. *Attenuated Total Reflectance*, ATR). Navedena tehnika djeluje tako da dolazi do barem jedne refleksije zrake svjetlosti unutar ATR kristala koji je u kontaktu s mjernim medijem. Takva refleksija uzrokuje pojavu kratkotrajnog vala zračenja koji ima kratku penetraciju u medij kao što je prikazano na slici 2.17. Dubina penetracije vala u medij iznosi od 0,2 do 2  $\mu\text{m}$ . Do pojave kratkotrajnog vala dolazi isključivo u slučaju kada je indeks loma optičkog materijala od kojeg je izrađen vrh sonde, veći od mjernog medija. Na primjeru prikazanom na slici 2.16. vrh sonde sačinjen je od kristala safira u obliku prizme gdje dolazno zračenje prolazi kroz tri refleksije o bridove prizme. Materijali od kojih se izrađuje vrh sonde najčešće su safir i dijamant. A. N. Saleemi u svojoj je doktorskoj disertaciji prikazao uspješnu primjenu ATR UV/Vis tehnike u praćenju koncentracije paracetamola *in-line* prilikom eksperimenata automatizirane kontrole stupnja prezasićenosti.<sup>52</sup>



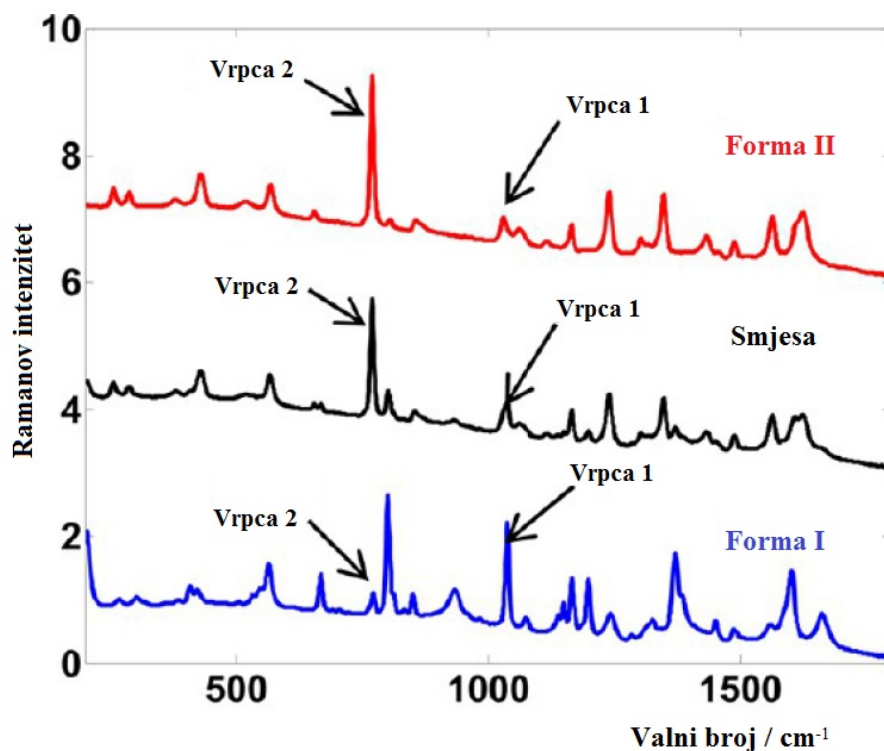
Slika 2.16. Shematski prikaz safirne prizme na vrhu UV/Vis sonde i refleksije zračenja o bridove prizme.<sup>46</sup>



Slika 2.17. Shematski prikaz refleksije unutar ATR kristala.<sup>46</sup>

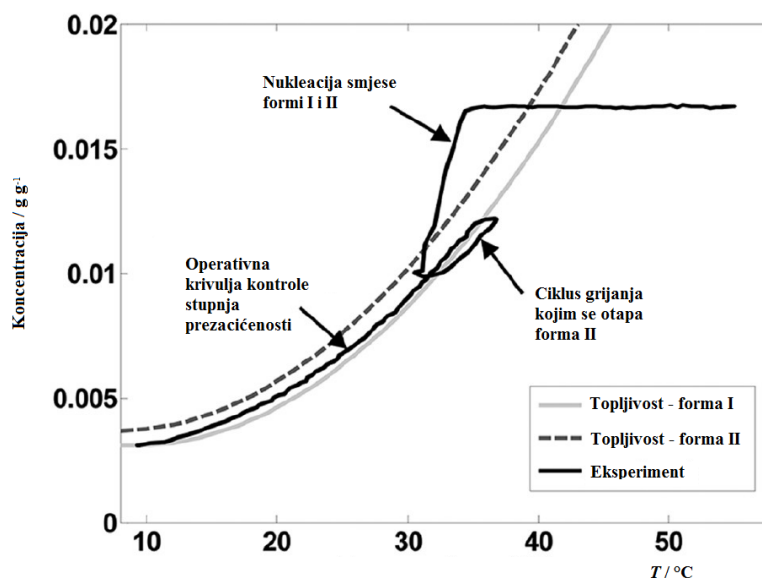
Ramanova spektroskopija *in-line*, čiji je princip razjašnjen u poglavlju 2.4.1, 2.4.2 i 2.4.3, može biti pogodna za mjerenje spektara i u otopini i u suspenziji ovisno o žarišnoj duljini svjetlosti koju leća sonde fokusira. Tako su sonde kratke žarišne duljine pogodne za mjerenja u suspenziji, a duge za mjerenja u otopinama. Unatoč kratkoj žarišnoj duljini, tijekom mjerenja u suspenziji dolazi do detekcije raspršenja o molekule suspendiranog kristalnog produkta (iako manje nego kod sonda duge žarišne duljine) pa je tako moguće razlikovati otopljeni i iskristalizirani spoj te semikvantitativno odrediti doseg kristalizacije nekog spoja. Primjena u praćenju točne koncentracije otopljenog spoja otežana je prvenstveno zbog

kompleksnosti spektra te utjecaja udjela suspendiranih tvari na prigušenje signala Ramanovog raspršenja. Zbog navedenih činjenica, Ramanova spektroskopija *in-line* prvenstveno se primjenjuje za praćenje polimorfnih transformacija tijekom kristalizacijskog procesa.



Slika 2.18. Ramanovi spektri polimorfne forme I, II i odgovarajuće smjese formi *orto*-aminobenzojeve kiseline.<sup>50</sup>

Primjena Ramanove spektroskopije prikazana je na modelnom primjeru kristalizacije specifične polimorfne forme *orto*-aminobenzojeve kiseline uz spregnutu tehniku FBRM za praćenje veličine čestica i ATR UV/Vis za praćenje koncentracije otopljene tvari (u svrhu kontrole prezasićenosti).<sup>50</sup> Profesor Zoltan K. Nagy, pionir u razvoju potpuno automatiziranih tehnika i sustava praćenja kristalizacijskih procesa, nazvao je ovakav pristup „Aktivna polimorfna povratna kontrola kristalizacijskih procesa“. Operativna krivulja kristalizacije prikazana je na slici 2.19.



Slika 2.19. Ostwald-Miersov diagram kontroliranog kristalizacijskog procesa polimorfne forme I, *orto*-aminobenzojeve kiseline.<sup>50</sup>

## 2.6. Metode multivarijatne analize

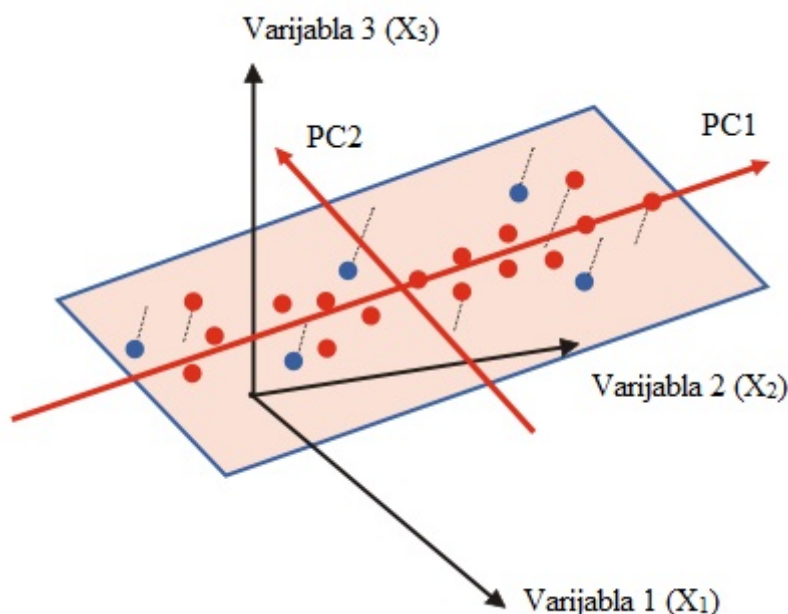
Metode multivarijatne statističke analize još zvane i kemometrijske tehnike, prema FDA definiciji također spadaju u PAT.<sup>5</sup> U današnje doba napredne tehnologije i mogućnosti koje pruža napredak u različitim PAT tehnikama, postaju nezaobilazan alat za statističku analizu velikog broja različitih spektroskopskih podataka. Ukoliko se žele ekstrahirati sve kvalitativne i kvantitativne informacije o mjernom sustavu pogotovo ako se radi o izrazito složenim sustavima, nužno je pribjeći jednoj od širokog spektra multivarijatnih metoda. Neke od značajnijih, koje se redovno koriste za analize spektroskopskih podataka, su: analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), višestruka linearna regresija (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR), regresija glavnih komponenata (engl. *Principal Component Regression*, PCR), parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square Regression*, PLSR), regresija strojevima s potpornim vektorima (engl. *Support Vector Machine Regression*, SVMR), multivarijatna rezolucija krivulja metodom alternirajućih najmanjih kvadrata (engl. *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*, MCR-ALS).<sup>53–56</sup>

Dvije najznačajnije bilinearne tehnike pomoću kojih se stvaraju prediktivni kalibracijski modeli na temelju spektroskopskih podataka su PCR i PLSR.<sup>2,57</sup> Redovno se primjenjuju u

sprezi s Ramanovom spektroskopijom,<sup>58–60</sup> FTIR<sup>61–63</sup> i NIR spektroskopijom<sup>58,63</sup> za praćenje i kvantifikaciju netipičnih kemijskih i bioloških sustava.

### 2.6.1. Analiza glavnih komponenta – PCA

Analiza glavnih komponenta temelji se na primjeni linearne algebre. Metodu su razvili Pearson (1901) i Hotelling (1933).<sup>64,65</sup> Pearson ju je okarakterizirao kao ortogonalnu linearnu projekciju s najmanjom greškom. Prvenstveno služi kao metoda redukcije dimenzionalnosti podataka kao primjerice mnogobrojni uzorci analizirani nekom od spektroskopskih metoda, i može dati jasan uvid u varijable od većeg značaja.<sup>2,55</sup> Svaki izmjereni uzorak može biti prikazan kao točka u višedimenzionalnom prostoru. Na slici 2.20 prikazan je slučaj za uzorke s tri varijable s pridruženim vektorima  $X$  radi lakšeg prikaza principa u trodimenzionalnom prostoru no realno taj prostor može sadržavati i par tisuća zavisnih varijabli kao što je slučaj s primjerice jednim Ramanovim spektrom nekog uzorka. Tada svaka valna duljina odnosno valni broj predstavlja jednu varijablu odnosno dimenziju.



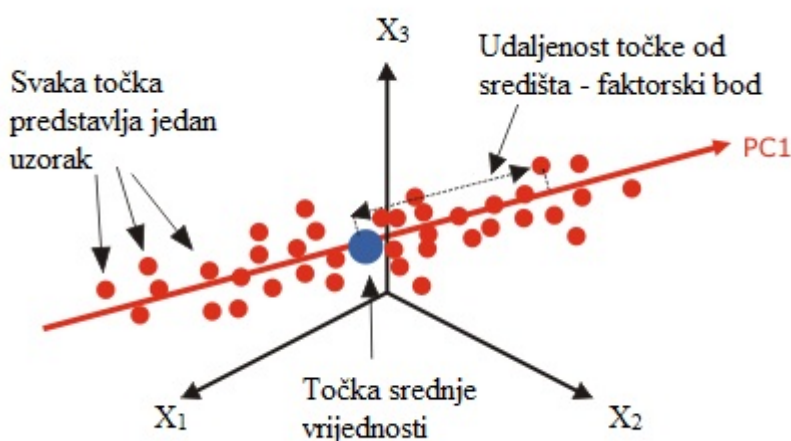
Slika 2.20. Princip PCA projekcije u trodimenzijskom prostoru. Plave točke nalaze se ispod, a crvene iznad plohe koju čine PC1 i PC2 vektori.<sup>66</sup>

Temeljna ideja PCA je sada naći vektore u prostoru 3 varijable gdje je udaljenost između točaka odnosno disperzija podataka najveća. To se ostvaruje traženjem linearnih kombinacija

inicijalnih vrijednosti varijabli koje najviše doprinose varijanci odnosno različitosti u setu podataka između točaka. U matricnom prikazu račun se odvija prema jednadžbi:

$$X = TP^T + E \quad (2.7)$$

gdje je  $X$  matrica varijabli,  $T$  je matrica faktorskih bodova,  $P$  je matrica opterećenja i  $E$  je matrica greške odnosno reziduala u ukupnoj varijanci. Dobiveni se vektori nazivaju glavnim svojstvenim vektorima ili glavnim komponentama. Proces računa je iterativan na način da prva komponenta (PC1) nosi najviše informacija odnosno najveći udio opisane varijance. Sljedeća glavna komponenta (PC2) biti će ortogonalna prvoj, treća drugoj i tako dalje. Svaka sljedeća glavna komponenta nositi će sve manji udio ukupne varijance. Svaku od glavnih komponenta karakteriziraju četiri vrijednosti: faktorski bodovi, opterećenja, reziduali uzoraka i uzorci visokog utjecaja (*engl. Leverage value*).<sup>66,67</sup>

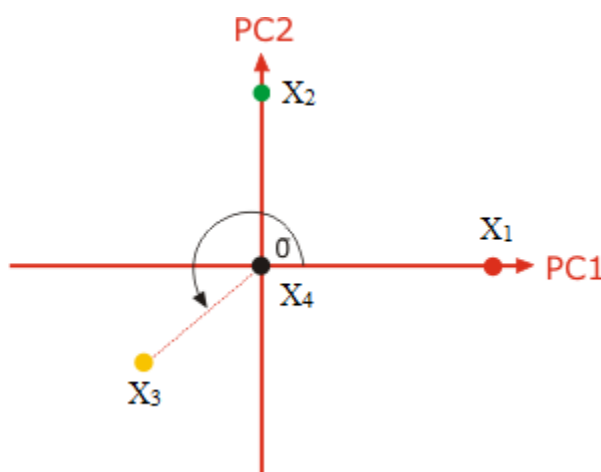


Slika 2.21. Shematski prikaz značenja faktorskog boda.<sup>66</sup>

Kao što je prikazano na slici 2.21, faktorski bodovi su udaljenost točke uzorka od točke srednje vrijednosti cijelog seta po vektoru glavne komponente. Faktorski bod za jedan uzorak zapravo opisuje njegovu karakteristiku u vezi s varijablama koja imaju značajnija opterećenja za istu glavnu komponentu. Grafički prikaz faktorskih bodova glavnih komponenti biti će dvodimenzionalna ploha gdje svaka od osi predstavlja jednu glavnu komponentu.

Opterećenja opisuju set podataka u smislu doprinosa varijabli i njihove međusobne korelacije. Svaka glavna komponenta nosi svoja opterećenja za cijeli set varijabli.

Geometrijski gledano, opterećenje je kosinus kuta između varijable i glavne komponente. Što je taj kut manji, to će opterećenje biti veće i obratno. S obzirom na funkciju kosinusa, vrijednosti opterećenja mogu se kretati između +1 i -1. Na slici 2.22 shematski je prikazan odnos varijabli i glavnih komponenti. U slučaju varijabli  $X_1$  i  $X_2$  koje leže na vektorima PC1 i PC2, kosinus kuta biti će jednak 1, što znači da je varijabla  $X_1$  u potpunosti opisana prvom glavnom komponentom, a varijabla  $X_2$  drugom glavnom komponentom. Kut između varijabli  $X_1$  i  $X_2$  iznosi  $90^\circ$  čiji je kosinus jednak nuli što znači da te varijable nisu međusobno u korelaciji. Kut između varijable  $X_3$  i PC1 veći je od  $180^\circ$  i između  $X_3$  i PC2 veći od  $90^\circ$  što znači da je varijabla  $X_3$  negativno korelirana s PC1 i PC2. Varijabla  $X_4$  stoji na sjecištu PC1 i PC2 pa prema tome nije dobro opisana ni s jednom od glavnih komponenti.

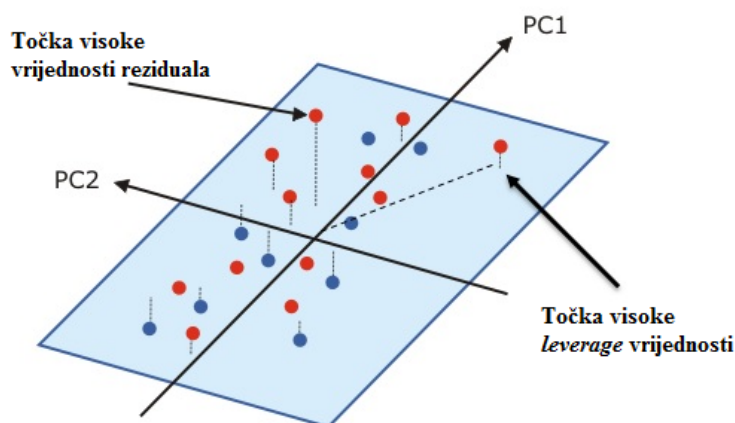


Slika 2.22. Shematski prikaz značenja opterećenja u vidu korelacije varijabli i glavnih komponenti.<sup>66</sup>

Sljedeći bitan atribut glavnih komponenti su reziduali uzoraka. Kao što je prikazano na slici 2.20, točke u PC1-PC2 prostoru su zapravo ortogonalne projekcije originalnih vrijednosti na ravninu. Reziduali svakog uzorka su udaljenosti svake točke od ravnine koju čine glavne komponente. Predstavljaju ostatak varijance koji će se u PCA modelu nalaziti u matrici greške. Što je ta udaljenost veća, to će takvi uzorci biti sve lošije opisani PCA modelom. Uzorci s velikim utjecajem, odnosno uzorci koji imaju visoku *leverage* vrijednost mogu znatno utjecati na kvalitetu PCA modela. *Leverage* vrijednost zapravo je euklidijska udaljenost točke od ishodišta po plohi koju čine glavne komponente. Ova dva parametra mogu pomoći u prepoznavanju točaka koje predstavljaju granične i/ili atipične vrijednosti. Takve točke nazivaju se *outlieri*. Problem koji se ovdje nameće je činjenica da dvije točke,



ovisno o raspodjeli ukupnog skupa na PC1-PC2 plohi, mogu imati istu euklidijska udaljenost od ishodišta, a ne moraju nužno obje biti *outlieri*. Zato se umjesto *leverage* vrijednosti češće koristi Hotellingova  $T^2$  udaljenost još zvana i Mahalanobisova udaljenost koja u obzir uzima korelaciju glavnih komponenta.<sup>68</sup>



Slika 2.23. Shematski prikaz značenja reziduala i točaka s visokim utjecajem na model (*leverage*).<sup>66</sup>

PCA se koristi u širokom spektru disciplina. Od analize spektroskopskih podataka do tehnika prepoznavanja lica. U slučaju spektroskopskih podataka može poslužiti za procjenu kvalitete seta spektara,<sup>10</sup> procjenu trajanja reakcije,<sup>20</sup> ili kao identifikacijska analiza kao primjerice diferenciranje vrsta kave na temelju NIR spektara.<sup>69</sup>

### 2.6.2. Višestruka linearna regresija – MLR

Višestruka linearna regresija zapravo je univarijatna regresijska metoda no nužno ju je spomenuti s obzirom da je sastavni dio regresije glavnih komponenti kao što će biti prikazano u narednom poglavlju. Osnovni princip metode je regresija jedne varijable  $Y$  (odziv) na setu varijabli  $X$  (prediktori) prema formuli:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k + F \quad (2.8)$$

gdje su  $b$  regresijski koeficijenti, a  $F$  greška. Cilj je naći optimalni vektor regresijskih koeficijenata  $b$  uz minimum zbroja kvadratnih pogrešaka.<sup>66,67</sup> U matričnom obliku, izraz prema kojoj se odvija regresija je sljedeći:

$$b = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (2.9)$$

Regresija uključuje operaciju inverzije disperzijske matrice ( $X^T X$ ). Problemi metode MLR u spektroskopskoj primjeni su višestruki. Prvi je što MLR može modelirati samo po jednu  $Y$  varijablu. Drugi problem je što račun ne funkcionira ako je više  $X$  varijabli nego što je uzoraka na kojima se provodi regresija. Prilikom regresije spektroskopskih podataka to je gotovo uvijek slučaj jer se želi modelirati više valnih duljina ili cijeli spektar. I treći problem je nemogućnost modeliranja kolinearnih  $X$  varijabli. Kolinearne varijable nisu linearno nezavisne odnosno ortogonalne. S obzirom da MLR pretpostavlja da svaka  $X$  varijabla nosi unikatnu informaciju o  $Y$  varijabli, što kod spektroskopskih podataka često nije slučaj, izraz  $(X^T X)^{-1}$  time postaje nedefiniran što dovodi do nepouzdanih rješenja regresijskih koeficijenata ili do izostanka rješenja u potpunosti. Uvjet za MLR je dakle mogućnost da se prediktori mogu izmjenjivati nezavisno jedan o drugome tijekom regresije.

### 2.6.3. Regresija glavnih komponenata – PCR

Metoda regresije glavnih komponenata zapravo je kombinacija PCA i MLR tehnika. Kako je MLR metodom teško modelirati spektroskopske podatke rješenje je raditi regresiju koristeći latentne varijable u ovom slučaju faktorske bodove glavnih komponenti. Na ovaj način broj varijabli odgovarati će broju uzoraka. Prvo se dakle na matrici prediktora  $X$ , koja je sačinjena od primjerice spektra s pripadajućim valnim duljinama, načini PCA čime se reducira dimenzionalnost i dobivaju latentne varijable. Zatim se načini MLR na novoj matrici  $X$  sačinjenoj od faktorskih bodova glavnih komponenti koje su ortogonalne. Time se izbjegava problem kolinearnosti  $X$  varijabli.<sup>66,67</sup>

### 2.6.4. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata – PLSR

Cilj metode PLSR je utvrditi svojstvo sustava  $Y$  (primjerice određene koncentracije) iz eksperimentalno izmjerenih prediktora  $X$  (primjerice spektri uzoraka kojima su određene koncentracije  $Y$ ) gdje su  $X$  i  $Y$  korelirani kalibracijskom funkcijom  $b$  prema izrazu:

$$Y = X b \quad (2.10)$$

Rješenje gornjeg izraza dano je izrazom 2.9. Za razliku od metode PCR koja u obzir uzima samo varijancu matrice prediktora  $X$ , metoda PLS u obzir uzima i varijancu matrice odziva  $Y$ . U svojoj osnovnoj formi PLSR je primjenjiv na jednu  $Y$  varijablu (PLS1) i nije iterativan. Algoritam se uz manje preinake može primijeniti i za modeliranje više  $Y$  varijabli (PLS2). Kao i u slučaju metode PCR, PLSR koristi latentne varijable. Razlika je što je kod PCR-a prvi korak dobivanje faktorskih bodova i opterećenja samo iz matrice prediktora  $X$  pomoću PCA dok kod PLSR-a izračun modelnih komponenti odnosno faktora (slično glavnim komponentama u PCA) uzima u obzir i  $X$  i  $Y$  matrice odnosno traži faktore iz  $X$  koji su relevantni i za  $Y$ . Rezultati se prikazuju u vidu  $T$  i  $U$  faktorskih bodova i  $P$  i  $Q$  opterećenja.  $T$  faktorski bodovi su zapravo nove koordinate točaka u  $X$  prostoru izračunate na način da je uhvaćen dio strukture podataka koji najviše opisuje varijablu  $Y$ . Faktorski bodovi  $U$  sumiraju dio podataka u  $Y$  koji je objašnjen s  $X$  za dani faktor. Odnos između  $T$  i  $U$  prikazuje odnos između  $X$  i  $Y$  za dani faktor.  $P$  opterećenja prikazuju korelaciju svake  $X$  varijable s pojedinim faktorom na isti način kao i u metodi PCA.  $Q$  opterećenja prikazuju direktan odnos između  $Y$  varijabli i  $T$  faktorskih bodova.

Prvi korak metode je kalibracija. Ukoliko se koristi NIPALS (engl. *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) dekompozicijski iterativni algoritam prvo se pronade najveći svojstveni vektor (*eigenvector*) matrice  $S$  prema izrazu:

$$S = X^T Y \quad (2.11)$$

Svojstveni vektor sadrži informacije o obje matrice i o njihovoj kovarijanci. Taj se svojstveni vektor naziva i vektorom težinskog opterećenja te pokazuje na koji način će se računati  $T$  faktorski bodovi iz matrice  $X$  kako bi se ostvario uvjet ortogonalne dekompozicije.  $P$  i  $Q$  opterećenja se nakon toga računaju regresijom  $T$  faktorskih bodova. Faktorski bodovi  $U$  računaju se iz  $Q$  opterećenja. Nakon prve iteracije, dobivene vrijednosti oduzimaju se iz matrica  $X$  i  $Y$  čime se dobivaju matrice  $E$  i  $F$ . Postupak se nastavlja traženjem sljedećih svojstvenih vektora  $E^T F$  i tako iterativno sve dok se ne dosegne maksimum funkcije:

$$u = f(t) \quad (2.12)$$

Model, sličan PCA modelu, prema kojem se odvija regresija prikazuje se sljedećim izrazima:

$$X = TP^T + E \quad (2.13)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (2.14)$$

Rregresijski koeficijenti izračunati prema izrazu 2.9 pokazuju težinu koja je dana pojedinoj  $X$  varijabli prilikom predviđanja odziva  $Y$  za svaki od faktora.<sup>70</sup> Mjerilo uspjeha kalibracije PLSR modela promatra se kroz rezidualne. Reziduali se računaju na isti način kao i kod metode PCA i u ovom slučaju predstavljaju razliku između stvarnog i predviđenog odziva  $Y$ . Time je zbroj kvadratnih pogrešaka (engl. *Sum of Squared Errors*, SSE), kvadratni zbroj vrijednosti reziduala. Korijen srednje kvadratne pogreške procjene (engl. *Root Mean Square Error of Estimation*, RMSEE) tada se računa prema izrazu:

$$RMSEE = \sqrt{\frac{1}{M-R-1} SSE} \quad (2.15)$$

gdje je  $M$  broj kalibracijskih uzoraka, a  $R$  broj faktora modela. RMSEE dobar je pokazatelj kvalitete kalibracije. Još jedan bitan parametar koji ukazuje na kvalitetu modela prilikom kalibracije je koeficijent determinacije,  $R^2$ , koji predstavlja postotak varijance u  $Y$  odzivima, reproducirane regresijom. Što su procijenjeni odzivi bliži stvarnim vrijednostima, odnosno što faktor za danu komponentu ima veći značaj, to se koeficijent sve više približava 100%. Bitan parametar je i vrijednost utjecaja na model (engl. *Leverage Value*),  $h_i$ , koji pokazuje koliko uzorak utječe na PLS model, slično kao i kod PCA metode. Vrijednosti  $h_i$  uvijek su manje od 1. Suma  $h_i$  svih uzoraka u modelu biti će jednaka broju faktora modela. Kao i kod PCA, PLSR koristi  $h_i$  i Mahalanobisovu udaljenost za detekciju *outliera* odnosno uzoraka koji značajno utječu na kvalitetu modela.

Sljedeći korak u definiranju kalibracijskog modela je njegova validacija uporabom izračunatih regresijskih koeficijenata. Validacija modela može se izvršiti na dva različita načina. Prvi je validacija iz skupa (engl. *Test Set Validation*) gdje se u ukupnom setu uzoraka (spektara) dio koristi za kalibraciju, a drugi dio za validaciju modela. Drugi način je križna validacija (engl. *Cross Validation*) gdje se iz ukupnog seta uzoraka izuzme jedan ili više njih, na ostatku uzoraka se razvije kalibracijski model, a nakon toga izuzeti uzorak/ci služe za

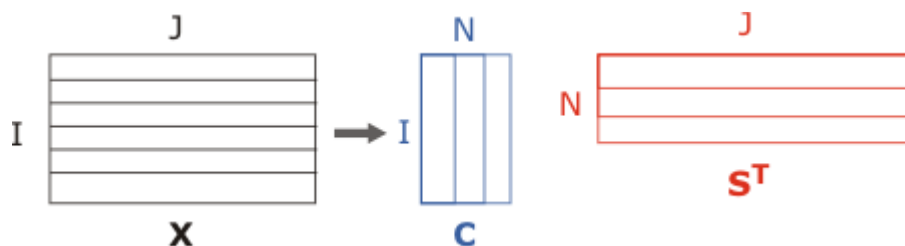
validaciju modela. Postupak je iterativan sve dok svi uzorci nisu iskorišteni za validaciju. U slučaju validacije iz skupa, vrijednost koja pokazuje koliko je dobro slaganje modela i uzoraka korištenih za validaciju je korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP). RMSEP se računa prema jednadžbi:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{M} \sum (Differ)^2} \quad (2.16)$$

gdje je  $M$  broj validacijskih uzoraka, a *Differ* je razlika između predviđenih i stvarnih  $Y$  odziva. U slučaju križne validacije iz skupa, vrijednost koja pokazuje koliko je dobro slaganje modela i uzoraka korištenih za validaciju je korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja (engl. *Root Mean Square Error of Cross Validation*, RMSECV). RMSECV se računa na isti način kao i RMSEP.<sup>71</sup> U oba slučaja, koeficijent determinacije,  $R^2$  biti će drugi od pokazatelja kvalitete validiranog modela. Zadnji i najbitniji pokazatelj kvalitete modela je broj faktora, odnosno PLS vektora nužnih za postizanje minimalne vrijednosti RMSEP ili RMSECV i maksimalne vrijednosti  $R^2$ .<sup>70</sup>

#### 2.6.5. *Multivarijatna rezolucija krivulja metodom alternirajućih najmanjih kvadrata – MCR-ALS*

Multivarijatna rezolucija krivulja može se definirati kao metoda samo-modelirajuće analize smjesa. Analiza MCR-ALS pogodna je za bilo koju vrstu podataka koja predstavlja linearnu kombinaciju čistih komponenti, dakle može se koristiti za analizu spektralnih podataka. Račun razlaže inicijalnu matricu podataka  $X$  na matricu koncentracije  $C$  i matricu komponenti  $S$  (u slučaju spektroskopskih podataka, spektre čistih komponenti) prema shemi prikazanoj na slici 2.24.



Slika 2.24. Shematski prikaz razlaganja inicijalne matrice podataka  $X$  na matricu koncentracije  $C$  i matricu komponenti  $S$ .  $I$  predstavlja broj uzoraka,  $N$  broj komponenti, a  $J$  broj  $X$  varijabli.<sup>66</sup>

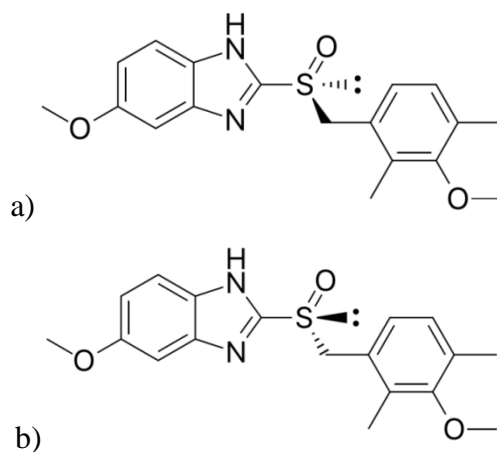
Izračun koncentracija i broja komponenti provodi se bilinearnim modelom prema izrazu 2.7 kao i u slučaju metode PCA s tim da MCR koristi algoritam alternirajućih najmanjih kvadrata. Razlika naspram metode PCA je da MCR ne daje jedinstveno rješenje, ali razlaže komponente i ima fizikalno značenje (PCA rezultati mogu se smatrati apstraktnima). MCR bez kinetičkog modela nije u stanju dati jedinstveno rješenje iz razloga što  $X = C S^T$  ima beskonačan broj rješenja. Rješenje se nalazi u zadavanju određenih ograničenja modelu kao primjerice ne-negativnost izračunatih koncentracija i spektara čistih komponenti te unimodalnost. Dodatno, na početku se mogu unijeti spektri čistih komponenti ili koncentracijski profil kao baza inicijalne iteracije modela čime se doprinosi jedinstvenijem rješenju.

## 2.7. Omeprazol

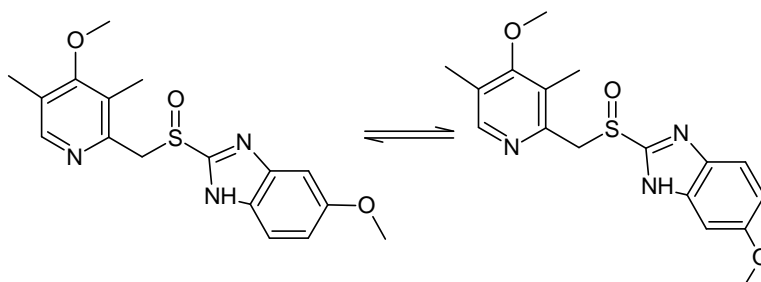
Omeprazol, 6-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazol kao potentni, selektivni i ireverzibilni inhibitor protonske pumpe, prvi je komercijalni lijek tog tipa. Razvila ga je kompanija Astra nakon više od 10 godina intenzivnog istraživanja i na tržište plasirala 1985 godine.<sup>72</sup> Indiciran je za liječenje gastroesofagijalne refluksne bolesti (GERB), čireva na želucu i dvanaestniku, čireva povezanih s Kronovom bolešću, Zollinger-Ellisonovog sindroma i krvarenja gornjeg gastrointestinalnog trakta.<sup>73,74</sup> Koristi se i kao dio kombinirane terapije antibioticima u liječenju infekcije bakterijom *Helicobacter Pylori*.<sup>75,76</sup> Djeluje na način da se ireverzibilno veže na  $-SH$  skupinu cisteina  $H^+/K^+$  ATP-aze i time blokira sekreciju želučane kiseline.<sup>77</sup>

Molekula omeprazola egzistira u dva tautomerna oblika. Ujedno molekula omeprazola sadrži trikoordinirani sulfinilni atom sumpora što znači da može egzistirati u dva

enantiomerna oblika kao što je prikazano na slici 2.25. Ukupno dakle valja razlikovati četiri specije, a to su dva enantiomera od kojih svaki može postojati u dva tautomerna oblika. Komercijalni omeprazol na tržište se stavlja kao racemat. Literaturno su opisane tri polimorfne forme omeprazola, A, B i C.<sup>78-80</sup>



Slika 2.25. Molekulska struktura a) (*S*)-(-)-omeprazola i b) (*R*)-(+)-omeprazola.<sup>81</sup>



Slika 2.26. Molekulska struktura dvaju tautomera Omeprazola.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

Prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela ovog rada, korišteni su sljedeći materijali:

- Metanol (min. 99,8%), Kemika.
- Natrijev hidroksid (min. 99%), Kemika.
- Amonijev heptamolibdat tetrahidrat (AHM, min. 99%), Kemika.
- Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, min. 30%), Kemika.
- Natrijev tiosulfat pentahidrat (NTS, min. 99,5%), Kemika.
- Octena kiselina (HOAc, min. 99,5%), Kemika.
- Natrijev hidroksid (NaOH, min. 99%), Kemika.
- 5-Metoksi-1*H*-benzimidazol-2-tiol (MTX, min. 98%), Telanga i Everest Organics.
- 2-(Klorometil)-4-metoksi-3,5-dimetilpiridin hidrokloridna sol (OMP-Cl x HCl, min. 98,5%), Changzhou Huaren, Binhai Yiangsu i Yangcheng Vio.
- Klorovodična kiselina (HCl, min. 36%, p.a.), Kemika.
- Aceton (min. 99%), Kemika.
- 2-Aminoetanol (min. 98%), Sigma.
- Acetonitril (p.a.), J. T. Baker.
- Natrijev hidrogenfosfat, bezvodni (p.a.), Kemika.

Čistoća sintetiziranih spojeva određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelovornosti prema metodi opisanoj u odjeljku 3.7. i izražena je kao udio površine signala u postotcima.

### 3.2. Postupak pripreme 6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfanil}-1*H*-benzimidazola (1)

NaOH (25,90 g, 647,50 mmol) otopljen je u smjesi metanola (325 mL) i vode (26 mL). Dodan je MTX (52,20 g, 289,63 mmol) i smjesa je miješana do potpunog otapanja. Nadalje je dodan OMP-Cl x HCl (64,00 g, 288,14 mmol) i smjesa je zagrijana na temperaturu refluksa. Nakon 60 minuta miješanja pri temperaturi refluksa, smjesa je ohlađena na 40 °C. Dodana je



voda (150 mL) tijekom 20 min i uz održavanje temperature od 38–42 °C. Zatim je pH smjese podešen 10 %-tnom (w/w) vodenom otopinom HCl na 6,3. Smjesa je miješana 120 min uz održavanje temperature od 38–42 °C. Dodan je još jedan obrok vode (150 mL) tijekom 90 minuta i uz održavanje temperature od 38–42 °C. Nastala suspenzija miješana je još 480 min pri 38–42 °C. Suspenzija je zatim ohlađena na 22 °C i miješana još 60 min te profiltrirana preko Büchnerova lijevka. Vlažni produkt opran je sa smjesom metanola i vode (1:1, v/v, 200 mL) i još jednom s vodom (200 mL) te osušen u vakuum sušnici pri 50 °C i tlaku od 30 mbara do konstantne mase. Prinos: 86,87 g. Iskorištenje: 90 %. Kromatografska čistoća: 100,0 %.

### **3.3. Postupak pripreve 6-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1*H*-benzimidazola (2)**

#### *3.3.1. Priprava spoja 2*

NaOH (25,90 g, 647,50 mmol) otopljen je u smjesi metanola (325 mL) i vode (26 mL). Dodan je MTX (52,20 g, 289,63 mmol) i smjesa je miješana do potpunog otapanja. Nadalje je dodan OMP-Cl x HCl (64,00 g, 288,14 mmol) i smjesa je zagrijana na temperaturu refluksa. Nakon 60 minuta miješanja pri temperaturi refluksa, smjesa je ohlađena na 20 °C. U suspenziju spoja **1** kao produkta reakcije, dodana je otopina AHM (1,78 g, 1,44 mmol) u vodi (40 mL). Mehanička mješalica namještena je na 400 okretaja u minuti. U smjesu je tijekom 90 minuta dodana 6 %-tna (w/w) vodena otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (172 mL, 303,44 mmol) uz održavanje temperature od 20–25 °C. Tijekom dodavanja, pH vrijednost smjese pada s početnih 10,5. Kada je pH vrijednost dosegla 9,3, ista je vrijednost održavana tijekom daljnjeg dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uporabom 40 %-tne (w/w) vodene otopine NaOH. Pet minuta po završetku dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NTS (1,42 g, 5,72 mmol) je dodan kako bi razložio suvišak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Smjesa je miješana narednih 30 min prilikom čega dolazi do kristalizacije produkta **2**. pH vrijednost smjese podešena je zatim na 9,1 uporabom 20 %-tne (w/w) vodene otopine HOAc. Smjesa je miješana narednih 3 sata uz kontinuirano održavanje pH vrijednosti na 9,1 i uz održavanje temperature od 20–25 °C. Zatim je suspenzija produkta profiltrirana preko Büchnerova lijevka. Vlažni produkt opran je s dva obroka vode (2 x 100 mL) i osušen u vakuum sušnici pri 30 °C i tlaku od 30 mbara do konstantne mase. Prinos: 76,19 g. Iskorištenje: 76,6 %.

### 3.3.2. Prekristalizacija spoja 2

Spoj 2 (10,00 g, 28,95 mmol) suspendiran je u smjesi acetona (175 mL), vode (6,8 mL) i 2-aminoetanola (320  $\mu$ L). Smjesa je zagrijana na 52 °C i miješana pri 50–55 °C do potpunog otapanja. Otopina je profiltrirana na vruće te je ukoncentrirana na volumen od 90 mL uparavanjem na rotacijskom uparivaču tijekom 15 minuta, prilikom čega dolazi do kristalizacije produkta. Otopina je zatim ohlađena na -7 °C i miješana narednih 90 minuta pri (-5)–(-10) °C. Suspenzija je profiltrirana preko Büchnerova lijevka. Vlažni produkt opran je s dva obroka smjese acetona (10 mL) i 2-aminoetanola (20  $\mu$ L) i osušen u vakuum sušnici pri 30 °C i tlaku od 30 mbara do konstantne mase. Prinos: 8,70 g. Iskorištenje: 87,0 %. Kromatografska čistoća: 100,0 %.

## 3.4. Postupak pripreve 6-metoksi-2-[[[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonyl]-1H-benzimidazola (3)

### 3.4.1. Priprava spoja 3

NaOH (0,40 g, 10,00 mmol) otopljen je u smjesi metanola (63 mL) i vode (10 mL). Dodan je spoj 2 (10,00 g, 28,95 mmol) i smjesa je miješana do otapanja. Dodana je otopina AHM (178 mg, 0,14 mmol) u vodi (4 mL). U smjesu je tijekom 10 minuta dodana 6 %-tna (w/w) vodena otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11,7 mL, 20,64 mmol) uz održavanje temperature od 20–25 °C. Smjesa je miješana pri 20–25 °C narednih 180 min. Zatim je dodan drugi obrok 6 %-tne (w/w) vodene otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11,7 mL, 20,64 mmol) tijekom 10 minuta i miješanje je nastavljeno daljnjih 180 minuta pri 20–25 °C. Tijekom ukupnog perioda miješanja pH smjese održavan je pri 9,7 uporabom 40 %-tne (w/w) vodene otopine NaOH. Nakon reakcije, pH vrijednost smjese podešena je na 7,4 uporabom 20 %-tne (w/w) vodene otopine HOAc. Smjesa je miješana 16 sati pri 20–25 °C nakon čega je ohlađena na 2 °C i miješana narednih 180 minuta pri 0–5 °C. Suspenzija je profiltrirana preko Büchnerova lijevka. Vlažni produkt opran je vodom (20 mL) i osušen u vakuum sušnici pri 40 °C i tlaku od 30 mbara do konstantne mase. Prinos: 9,93 g. Iskorištenje: 94,9 %. Kromatografska čistoća: 98,0 %.

### 3.4.2. Prekristalizacija spoja 3

Spoj 3 (1,00 g, 2,77 mmol) otopljen je u acetonu (10 mL). Tijekom 15 min pri 20–25 °C dodana je voda (25 mL). Nastala rijetka suspenzija miješana je 120 min pri 20–25 °C a zatim

je ohlađena na 2 °C i miješana narednih 120 min pri 0–5 °C. Suspenzija je profiltrirana preko Büchnerova lijevka. Vlažni produkt opran je vodom (5 mL) i osušen u vakuum sušnici pri 40 °C i tlaku od 30 mbara do konstantne mase. Prinos: 320 mg. Iskorištenje: 32,0 %. Kromatografska čistoća: 99,2 %.

### 3.5. Spektroskopija NMR

Spojevi **1**, **2** i **3** identificirani su <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C APT, COSY, HMBC i HSQC spektroskopijom NMR. Spektri su snimani na Bruker Advance III HD spektrometru u deuteriranom dimetil-sulfoksidu (DMSO-d<sub>6</sub>) pri 400 MHz. Kemijski pomaci (δ) izraženi su na ppm (dijelova na milijun) skali, prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutrašnjem standardu.

### 3.6. Ramanova spektroskopija

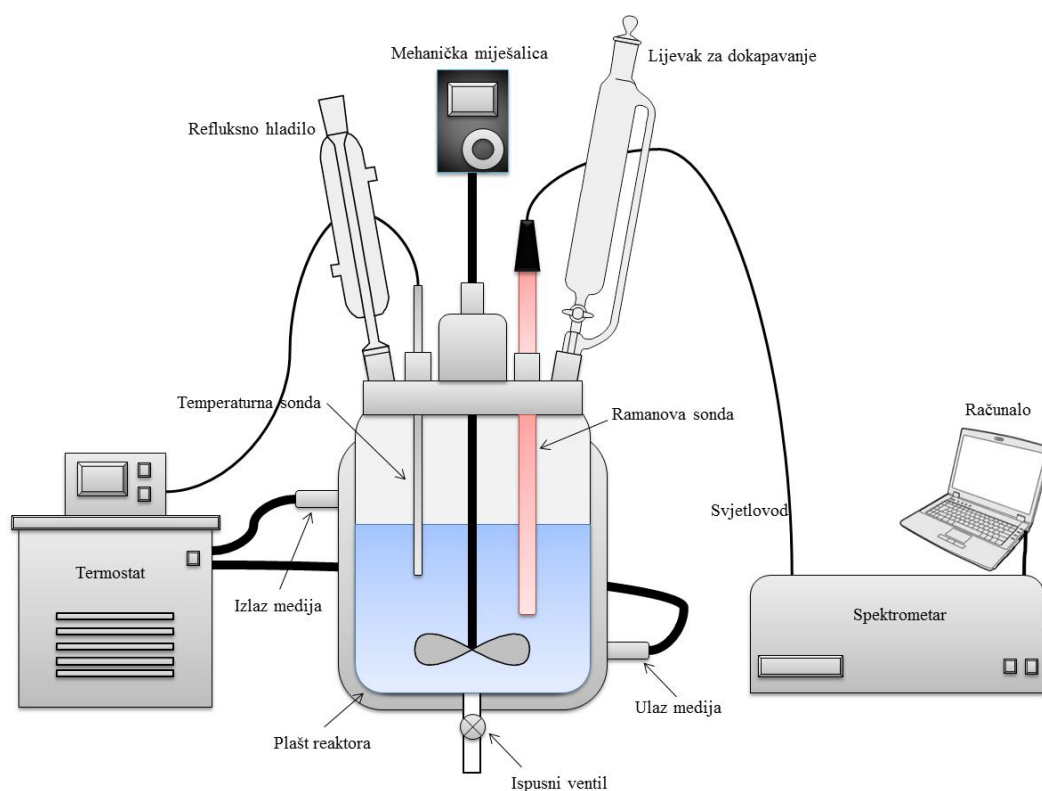
Ramanovi spektri snimani su na disperzivnom KOSI (Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, USA) Rxn1 Raman spektrometru. Spektrometar je opremljen Invictus laserskom diodom pobude pri 785 nm, CCD detektorom hlađenim Peltierovim termoelektričnim člankom i kućištem za sondu koja je sa spektrometrom povezana dovodnim i sabirnim svjetlovodima dužine 5 m.

Mjerenja su provođena u obliku jednostrukih akvizicija u području od 3500 cm<sup>-1</sup> do 100 cm<sup>-1</sup> sa vrijednošću ekspozicije u iznosu od 50 s. Snaga lasera tijekom svih tipova mjerenja iznosila je 400 mW osim pri mjerenju spektara spojeva MTX i OMP-Cl x HCl kada je snaga lasera iznosila 100 mW. Mjerenja spektara tekućih uzoraka i otopina te mjerenja *in-line* tijekom reakcija provedena su uporabom kontaktne sonde, NIR 18 SHORT, izrađene od legure *hastelloy*, promjera 1,27 cm i dužine 40 cm, s fokus lećom kratke žarišne duljine, izrađenom od safira. Spektri otopina spojeva **1**, **2** i **3** u smjesi metanola i 10 %-tne vodene otopine NaOH (70:30, v/v), masene koncentracije od 100 mg mL<sup>-1</sup>, te spektar čistog metanola, izmjereni su u polipropilenskoj kivetu. Mjerenja krutih uzoraka (MTX, OMP-Cl x HCl, AHM, **1**, **2** i **3**) provedena su uporabom bezkontaktne Ramanove sonde, NCO-0.4-NIR, radne udaljenosti od 1 cm.

### 3.6.1. Ramanova spektroskopija in-line

Mjerenja *in-line* provođena su u 1 L Optimax (Metler Toledo) reaktoru opremljenom pH, temperaturnom i Ramanovom sondom, mehaničkom miješalicom tipa turbina s 4 pera, i Peltierovim termoelektričnim člankom pomoću kojeg se sadržaj reaktora grije ili hladi. Tijekom mjerenja, izloženi dijelovi reaktora bili su zaštićeni od okolnog svjetla. Mjerenje spektara tijekom sintetskih reakcija izvršeno je na način da je prvi spektar snimljen prije početka dodavanja  $H_2O_2$  te su spektri zatim mjereni tijekom cijelog vremena dodavanja u intervalima od 5 minuta. Zadnji spektar izmjeren je 5 minuta po dodatku NTS-a. Spektri tijekom kristalizacije produkta mjereni su svakih 5 minuta kroz ukupni period od 3 sata i 15 minuta.

Mjerenja *in-line* u uvećanom mjerilu provedena su u 7 L pilotnom reaktoru (Büchi) izrađenom od legure *hastalloy*. Reaktor je opremljen pH, temperaturnom i Ramanovom sondom NIR 18 SHORT, mehaničkom miješalicom tipa zakrivljeni impeler s 3 pera, i termostatom pomoću kojeg se sadržaj reaktora grije ili hladi. Mjerenja tijekom reakcije provođena su na isti način kao i na 1 L mjerilu.



Slika 3.1. Shematski prikaz aparature korištene tijekom priprave spoja 2 i praćenja reakcije oksidacije *in-line*.



Slika 3.2. Prikaz reaktorskih jedinica korištenih za provođenje reakcija sinteze spoja **2** u mjerilu (a) 1 L (Mettler Toledo Optimax 1001) i (b) 7 L (Büchi).

### 3.7. Kromatografske analize

Kromatografske analize provedene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na instrumentu Agilent 1100 opremljenom s kvarternom pumpom, termostatiranim modulom za automatsko uzorkovanje, termostatiranim odjeljkom za kromatografsku kolonu i detektorom s varijabilnim valnim dužinama (engl. *Variable Wavelength Detector*, VWD).

Uzorci su analizirani pri sljedećim kromatografskim uvjetima:

- Kromatografska kolona: Waters XBridge C8 (150 mm x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m)
- Mobilna faza: fosfatni pufer (natrijev dihidrogen fosfat; pH 8,0; 10 mM), A; acetonitril, B
- Diluent: A-B (73:27, v/v)

- Volumen injektiranja: 10  $\mu\text{L}$
- Protok: 1,0  $\text{mL min}^{-1}$
- Gradijent: A-B (60:40, v/v), 0 min; A-B (20:80, v/v), 4 min; A-B (60:40, v/v), 4,7 min; A-B (60:40, v/v), 6–8 min
- Temperatura modula za automatsko uzorkovanje: 5  $^{\circ}\text{C}$
- Temperatura kolone: 25  $^{\circ}\text{C}$
- Valna dužina detektora: 280 nm

Priprema uzoraka fizičkih smjesa spojeva **1**, **2** i **3** u metanolu i vodi (kao što je opisano u odjeljku 3.8) te uzoraka reakcijskih smjesa tijekom mjerenja Ramanovom spektroskopijom *in-line*, provedena je na način da je 100  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese otopljeno u 20 mL diluenta. Obrada kromatograma odrađena je u programu ChemStation.

#### *3.7.1. Određivanje linearnog područja odziva*

Tijekom određivanja linearnog područja odziva, pripremljene su otopine spojeva **1**, **2** i **3** različitih masenih koncentracija u diluentu (tablica 3.1). Spojevi su odvagani u odmjerne tikvice na analitičkoj ultra-mikro vagi (model: UMX2, Metler Toledo) i razrijeđeni diluentom do oznake. Na svakom od pripremljenih uzoraka provedene su tri uzastopne analize.

Tablica 3.1. Set otopina pripremljenih u svrhu određivanja linearnog područja kromatografske metode.

| Spoj     | Odvaga broj | $m/mg$  | $V/mL$ | $\gamma/mg mL^{-1}$ |
|----------|-------------|---------|--------|---------------------|
| <b>1</b> | 1           | 5,1063  | 500    | 0,0102              |
|          | 2           | 5,2873  | 50     | 0,1057              |
|          | 3           | 5,3033  | 10     | 0,5303              |
|          | 4           | 4,9646  | 5      | 0,9929              |
|          | 5           | 9,8817  | 5      | 1,9763              |
| <b>2</b> | 1           | 5,2392  | 500    | 0,0105              |
|          | 2           | 5,1159  | 50     | 0,1023              |
|          | 3           | 5,3615  | 10     | 0,5362              |
|          | 4           | 5,1247  | 5      | 1,0249              |
|          | 5           | 7,4395  | 5      | 1,4879              |
|          | 6           | 10,2917 | 5      | 2,0583              |
| <b>3</b> | 1           | 2,7359  | 500    | 0,0055              |
|          | 2           | 5,2674  | 500    | 0,0105              |
|          | 3           | 4,9488  | 50     | 0,0990              |
|          | 4           | 5,1352  | 10     | 0,5135              |

### 3.8. Kalibracijski eksperimenti

U svrhu razvoja kalibracijskog modela bilo je potrebno pripremiti reprezentativne smjese spojeva **1**, **2** i **3** koje bi kvalitetno prikazivale realne kemijske promjene. U tu svrhu korišteni su pripremljeni spojevi u čvrstom stanju. Pripremane su otopine sva tri spoja zajedno i to u različitim koncentracijskim omjerima. Spojevi su vagani na analitičkoj semi-mikro vagi (model: AX205, Mettler Toledo) u polipropilenskoj kiveti i zatim su otopljeni u smjesi metanola, vode i 10%-tne vodene otopine NaOH, kumulativnog volumena od 1,0 mL. Nakon što je otopinama izmjeren Ramanov spektar, uzorak otopine razrijeđen je na analitičku koncentraciju (100  $\mu$ L otopine u 20 mL diluenta). Kako bi se u kalibracijski set unio i faktor dinamične promjene volumena smjese odnosno volumnog omjera metanola i vode, dio uzoraka pripreman je u smjesi kakva bi bila na polovici dodanog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (68:32, v/v), a drugi u omjeru nakon cjelokupne dodane količine na kraju reakcije (58:42, v/v). 10%-tna vodena otopina NaOH dodavana je kako bi se ostvarila približno ista pH vrijednost kao i u reakcijskoj

smjesi (> 9,3). Pri tom pH su sva tri spoja u obliku odgovarajućih natrijevih soli koje su pri tom pH dobro topive u navedenim omjerima metanola i vode.

Tablica 3.2. Nepotpuni set kalibracijskih otopina pripremanih u svrhu razvoja PLS kalibracijskog modela.

| Otopina broj | m/mg   |        |        | V(za otapanje)/ $\mu\text{L}$ |                  |                            | $\gamma(\text{za HPLC})/\text{mg mL}^{-1}$ |      |      |
|--------------|--------|--------|--------|-------------------------------|------------------|----------------------------|--|------|------|
|              | 1      | 2      | 3      | MeOH                          | H <sub>2</sub> O | NaOH <sub>(aq)</sub> , 10% | 1  | 2    | 3    |
| 1            | 42,94  | 50,36  | 6,47   | 567                           | 264              | 169                        | 0,21                                       | 0,25 | 0,03 |
| 2            | 2,20   | 97,67  | 9,20   | 567                           | 264              | 169                        | 0,01                                       | 0,49 | 0,05 |
| 3            | 31,24  | 64,79  | 6,67   | 567                           | 264              | 169                        | 0,16                                       | 0,32 | 0,03 |
| 4            | 18,83  | 68,95  | 14,62  | 567                           | 264              | 169                        | 0,09                                       | 0,34 | 0,07 |
| 5            | 51,97  | 51,56  | 0,50   | 567                           | 264              | 169                        | 0,26                                       | 0,26 | 0,00 |
| 6            | 1,52   | 96,26  | 14,90  | 567                           | 264              | 169                        | 0,01                                       | 0,48 | 0,07 |
| 7            | 43,19  | 50,56  | 20,83  | 567                           | 264              | 169                        | 0,22                                       | 0,25 | 0,10 |
| 8            | 19,20  | 78,15  | 2,61   | 567                           | 264              | 169                        | 0,10                                       | 0,39 | 0,01 |
| 9            | 71,12  | 17,33  | 17,90  | 567                           | 264              | 169                        | 0,36                                       | 0,09 | 0,09 |
| 10           | 54,25  | 32,04  | 14,42  | 567                           | 264              | 169                        | 0,27                                       | 0,16 | 0,07 |
| 11           | 49,40  | 89,20  | 50,19  | 655                           | 176              | 169                        | 0,25                                       | 0,45 | 0,25 |
| 12           | 157,08 | 5,36   | 11,08  | 655                           | 176              | 169                        | 0,79                                       | 0,03 | 0,06 |
| 13           | 42,57  | 75,82  | 68,15  | 655                           | 176              | 169                        | 0,21                                       | 0,38 | 0,34 |
| 14           | 43,94  | 33,72  | 102,00 | 655                           | 176              | 169                        | 0,22                                       | 0,17 | 0,51 |
| 15           | 58,87  | 61,95  | 57,18  | 655                           | 176              | 169                        | 0,29                                       | 0,31 | 0,29 |
| 16           | 82,39  | 82,79  | 11,28  | 655                           | 176              | 169                        | 0,41                                       | 0,41 | 0,06 |
| 17           | 85,98  | 83,54  | 9,42   | 655                           | 176              | 169                        | 0,43                                       | 0,42 | 0,05 |
| 18           | 15,94  | 104,15 | 84,55  | 655                           | 176              | 169                        | 0,08                                       | 0,52 | 0,42 |

Analizom nepotpunog seta kalibracijskih otopina prikazanog u Tablici 3.1., utvrđen je nerazmjer između pripremljenog seta te realnih mjerenja tijekom reakcije. Iz tog razloga, za prikupljanje kalibracijskog seta podataka, odlučeno je koristiti spektre izmjerene tijekom reakcija u definiranim vremenskim točkama i u sprezi sa komplementarnim podacima o udjelima spojeva **1**, **2** i **3** dobivenim iz HPLC analiza *off-line*, izraženim kao udio površine signala u postocima (%). Načinjen je set od 6 eksperimenata gdje su u svakom od eksperimenata varirani parametri, brzina dodatka i količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te dobavljač polaznog spoja MTX. Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mijenjana je kako bi se kalibracijsko područje proširilo i na veće udjele spoja **3**. Brzina dodavanja mijenjana je kako bi se unio efekt različitih omjera spojeva **1**, **2** i **3**



pri istom volumnom omjeru metanola i vode. Od šest provedenih eksperimenata, kristalizacija i izolacija produkta provedena je samo na eksperimentu KalEksp6 pri čemu je kristalizacija praćena *in-line* na način opisan u odjeljku 3.6.1.

Tablica 3.3. Set eksperimenata provedenih u svrhu generiranja skupa podataka za razvoj PLSR kalibracijskog modela.

| Eksperiment | MTX        |                | OMP-Cl x HCl |                | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mol ekv. <sup>a</sup> (n/n) | t(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/min | t(reakcija)/min |
|-------------|------------|----------------|--------------|----------------|---|---------------------------------------|-----------------|
|             | Proizvođač | Kontrolni broj | Proizvođač   | Kontrolni broj |   |                                       |                 |
| KalEksp1    | Everest    | 7025052        | Changzhou    | 7055012        | 0,80  | 90                                    | 95              |
| KalEksp2    | Everest    | 7025052        | Changzhou    | 7055012        | 1,05  | 90                                    | 95              |
| KalEksp3    | Everest    | 7025052        | Jiangsu      | 7051075        | 1,05  | 80                                    | 95              |
| KalEksp4    | Telanga    | 7073065        | Jiangsu      | 7051075        | 1,40  | 120                                   | 120             |
| KalEksp5    | Telanga    | 7045085        | Yangcheng    | 7023055        | 1,50  | 150                                   | 150             |
| KalEksp6    | Everest    | 7025052        | Yangcheng    | 7023055        | 1,05  | 85                                    | 95              |
|             | Telanga    | 7059085        |              |                |   |                                       |                 |

<sup>a</sup> molarni omjer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : MTX, 1

### 3.9. Obrada spektara

Predobrada spektara ispitivana je u programima OPUS Spectroscopy Suite verzija 7.2 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Njemačka) i Unscrambler X, verzija 10.4 (Camo Software AS, Oslo, Norveška). S obzirom na poznati interferencijski efekt pozadinske fluorescencije kod instrumenata pobude pri 785 nm, korištene su tehnike s ciljem minimiziranja utjecaja tih efekata na kvalitetu spektara. Korištene su različite tehnike predobrade spektara, kao primjerice prva i druga derivacija, korekcija višestrukog raspršenja metodom MSC (engl. *Multiplicative Scattering Correction*), različite tehnike normiranja i korekcije bazne linije te su rezultat istih međusobno uspoređivani. U konačnici, za predobradu spektara *off-line* (kruti uzorci i otopine) u programu OPUS, korišten je set tehnika u sljedećem redosljedu. Odabrano je područje valnih brojeva od 1600 cm<sup>-1</sup> do 400 cm<sup>-1</sup> (područje „otiska prsta“). Spektri su prvo normirani vektroskom metodom, a potom je bazna linija korigirana uporabom CRB metode (engl. *Concave Rubber Band*) sa 256 točaka bazne linije i u 5 iteracija.

Obrada spektara koji su izmjereni tijekom eksperimenata praćenih Ramanovom spektroskopijom *in-line* i koji su korišteni za razvoj PLSR kalibracijskog modela, izvršena je

na dva diskretna načina u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ . Prvi je identičan onome opisanom za spektre *off-line* uz dodatnu obradu metodom MSC, a drugi način je transformacija prvom derivacijom, a potom MSC. Prva derivacija načinjena je metodom Savitzky-Golay uorabom polinoma drugog stupnja uz 25 točaka bazne linije. Obrada metodom MSC odabrana je upravo iz razloga što za korekciju koristi cijeli set spektara za razliku od metode SNV (engl. *Standard Normal Variate*) koja koristi svaki zasebno jer konačni cilj je na jedinstven način obraditi cjelokupni kalibracijski set podataka.<sup>82</sup>

### 3.10. Multivarijatne analize i razvoj kalibracijskog modela

#### 3.10.1. Analiza metodom PCA

Obradeni spektri analizirani su multivarijatnom tehnikom PCA u programu The Unscrambler X, verzija 10.4 (Camo Software AS, Oslo, Norveška) kako bi se ocijenila kvaliteta seta podataka i procijenio doseg reakcije na temelju faktorskih bodova i procijenile značajne vrpce za pojedinu komponentu na temelju opterećenja. Svi modeli generirani su NIPALS algoritmom i validirani križno.

#### 3.10.2. Razvoj kalibracijskog modela metodom PLSR

Obradeni spektri podvrgnuti su regresiji metodom PLSR u programu OPUS. Validacija modela načinjena je na dva načina, križnom validacijom i validacijom iz nezavisnog skupa. Ispitan je i utjecaj tehnika obrade sirovih spektara opisanih u poglavlju 3.9 na rezultat regresije. Tijekom validacije regresijskog modela, iterativno su mijenjani parametri veličine i sastava nezavisnog skupa te broj segmenata križne validacije. Također tijekom provedbe regresijskih analiza iterativno su mijenjana i područja valnih brojeva. Tako su u jednom slučaju na setu spektara korištenom za kalibracijski model dodatno uklonjena područja valnih brojeva u kojima se nalaze karakteristične vrpce safira ( $751\text{ cm}^{-1}$ ,  $578\text{ cm}^{-1}$  i  $419\text{ cm}^{-1}$ ) od kojih je izrađen prozor Ramanove sonde. Nakon uklanjanja navedenih vrpce, za regresijske analize korištena su sljedeća područja valnih brojeva:

- $1600\text{--}758\text{ cm}^{-1}$
- $741\text{--}588\text{ cm}^{-1}$
- $571\text{--}425\text{ cm}^{-1}$

U drugom slučaju su na uklonjene vrpce safira dodatno uklonjene i vrpce metanola pri  $1459\text{ cm}^{-1}$ ,  $1159\text{ cm}^{-1}$ ,  $1117\text{ cm}^{-1}$  i  $1034\text{ cm}^{-1}$ . Nakon uklanjanja i vrpce metanola, za regresijske analize korištena su sljedeća područja valnih brojeva:

- $1600\text{--}1534\text{ cm}^{-1}$
- $1444\text{--}1179\text{ cm}^{-1}$
- $962\text{--}757\text{ cm}^{-1}$
- $741\text{--}588\text{ cm}^{-1}$
- $571\text{--}425\text{ cm}^{-1}$

Regresija je provedena NIPALS algoritmom. Kriteriji uspješnosti modela bili su minimalni RMSEP i RMSECV,  $R^2$  vrijednost regresijskih krivulja, broj korištenih faktora u modelu i konačno kvaliteta modela pri predikciji udjela spojeva **1**, **2** i **3** u spektrima koji nisu bili dio kalibracijskog i validacijskog skupa tijekom regresije.

### 3.10.3. Analiza metodom MCR-ALS

Obrađeni spektri izmjereni tijekom kristalizacije spoja **2** analizirani su multivarijatnom tehnikom MCR-ALS (engl. *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*, MCR-ALS) u programu The Unscrambler. Uvjeti modela za analizu spektara tijekom kristalizacije bili su analiza bez spektara i koncentracija s negativnom vrijednostima. Dodatno, u analizi spektara tijekom reakcije stavljen je i uvjet unimodalnosti. Osjetljivost na čiste komponente tijekom analize definirana je na 100, a maksimalan broj ALS iteracija definiran je na 200.

## 3.11. Određivanje hidrodinamičkih parametara

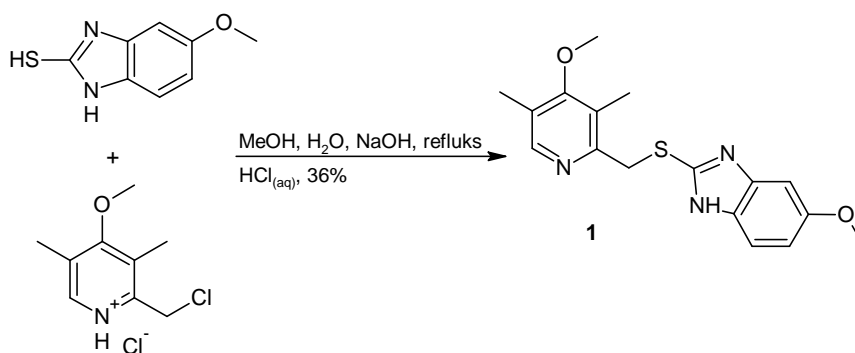
Analiza hidrodinamičkih parametara miješanja za 1 i 7 L reaktore korištene tijekom eksperimenata, provedena je u programu VisiMix Turbulent verzija 2014, 11 (Visimix Ltd., Jerusalem, Israel).

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Sinteza i strukturna karakterizacija spojeva 1, 2 i 3

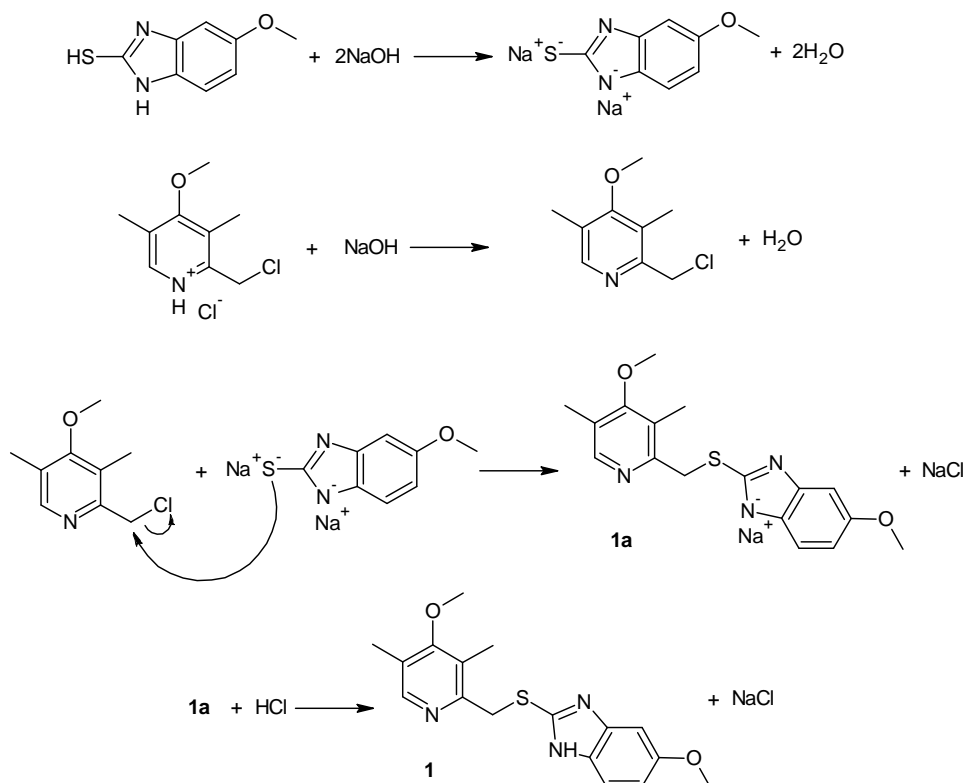
#### 4.1.1. Spoj 1

Spoj **1** pripremljen je reakcijom spojeva MTX i OMP-Cl x HCl u smjesi metanola i vode uz NaOH kao bazu pri temperaturi refluksa kao što je prikazano na Slici 4.1. Kristalizacija produkta postiže se korekcijom pH vrijednosti smjese nakon reakcije.



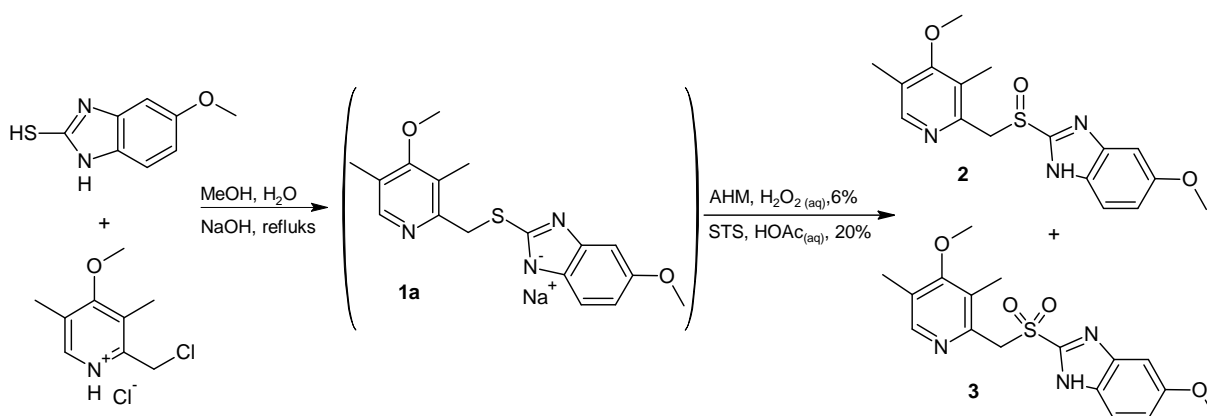
Slika 4.1. Reakcijska shema sinteze spoja **1**.

Dodavanjem spoja MTX u smjesu metanola, vode i NaOH prvo dolazi do deprotonacije na atomu sumpora i na benzimidazolnom dušiku pri čemu nastaje odgovarajući tiolat (Na<sub>2</sub>MTX) kao nukleofil u obliku natrijeve soli (slika 4.2). Nadalje, dodatkom spoja OMP-Cl x HCl u otopinu Na<sub>2</sub>MTX, prvo dolazi do neutralizacije dušika na piridinskom prstenu OMP-Cl x HCl s NaOH pri čemu nastaje NaCl i OMP-Cl te zatim u reakciji nukleofilne supstitucije između Na<sub>2</sub>MTX i OMP-Cl konačno nastaje natrijska sol sulfida, **1a**. Reakcija se vjerojatno odvija S<sub>N</sub>2 mehanizmom nukleofilne supstitucije s obzirom da pucanjem C–Cl veze u spoju OMP-Cl gdje je klorid izlazna skupina, nastaje nestabilni primarni karbokation. Neutralizacijom s HCl, **1a** prelazi u sulfid, **1**. NMR spektri dokazuju nastajanje 6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfanil}-1H-benzimidazola, **1** kao produkta reakcije i u skladu su s prethodno publiciranim podacima.<sup>83,84</sup>

Slika 4.2. Prikaz predloženog mehanizma nastajanja spoja **1**.

## 4.1.2. Spoj 2

Sinteza spoja **2** odvija se u dva sintetska koraka kao što je prikazano na slici 4.3. Tijekom pripreme spoja **2**, intermedijar **1a** se ne izolira već se reakcijska suspenzija podvrgava sljedećoj reakciji. NMR spektri dokazuju nastajanje 6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil}-1*H*-benzimidazola, **2** kao produkta reakcije i u skladu su s prethodno publiciranim podacima.<sup>83,84</sup>

Slika 4.3. Reakcijska shema sinteze spoja **2**.

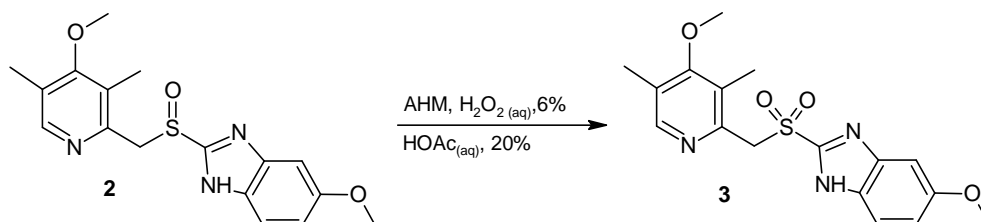
U reakciji oksidacije spoja **1a** u spoj **2**, nastaje i spoj **3** kao produkt konsektivne oksidacije **2** i u ovom se slučaju smatra onečišćenjem. S obzirom da je cilj izolirati spoj **2** u što većem prinosu i visokoj kemijskoj čistoći, time se udio neizreagiranog spoja **1** i nastalog spoja **3** na kraju reakcije smatra kritičnom značajkom kvalitete (CQA) s obzirom da definira prinos i kemijsku čistoću **2**. Tijekom razvoja postupka, eksperimentalno je utvrđeno da udjeli spojeva **1** i **3** manji od 7,0 % u reakcijskoj smjesi na kraju reakcije, daju optimalne vrijednosti iskorištenja i kemijske čistoće.

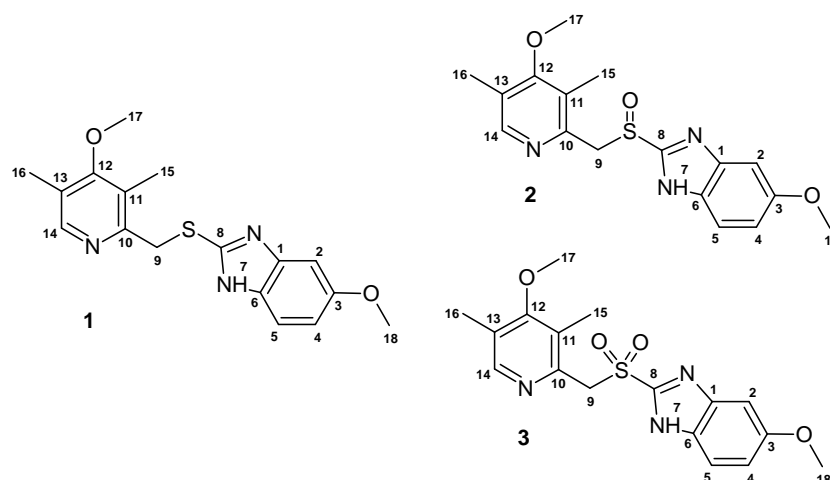
Reakcija oksidacije odvija se uz peroksomolibdatni katalitički sustav koji je detaljno opisan u literaturi kao pouzdan i robusan sustav za oksidaciju različitih organskih spojeva, između ostalog i organskih sulfida.<sup>85-88</sup> Dodatkom AHM-a u reakcijsku suspenziju spoja **3**, prvo dolazi do disocijacije heptamolibdata i nastajanja molibdatnog aniona,  $[\text{MoO}_4]^{2-}$ . Nadalje, dodatkom vodik peroksida može doći do nastajanja različitih mono- do tetra-peroksomolibdatnih aniona s tim da oni mogu egzistirati kao mono- i bi-nuklearni kompleksi. Kemijska ravnoteža odnosno raspodjela udjela pojedinih specija u otopini ovisi o molarnoj koncentraciji molibdena, molarnoj koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  i o pH vrijednosti otopine.<sup>89,90</sup> Bitno je napomenuti i da pri lužnatom pH dolazi do kompetitivnog autokatalitičkog raspada peroksomolibdata čime se troši dodatna količina  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>91</sup>

U katalitičkom sustavu primijenjenom u reakciji oksidacije, prema dostupnim literaturnim podacima i prema reakcijskim uvjetima, izvjesno je da je dominantna specija di-peroksomolibdatni anion,  $[\text{MoO}(\text{O}_2)_2(\text{OH})]^-$ . Razlog tome je raspon molarne koncentracija molibdena na početku i kraju reakcije koji se kreće od  $0,03 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH vrijednost reakcijske smjese koja je uvijek iznad 9,3 i koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  u reakcijskoj smjesi tijekom reakcije koja je uvijek niska s obzirom da se  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodaje kroz vrijeme i gotovo trenutno se troši.<sup>89</sup> Zadnja je tvrdnja potvrđena Ramanovom spektroskopijom gdje u spektrima *in-line* izostaje vrpca O–O istezanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekule pri  $875 \text{ cm}^{-1}$  te praćenjem reakcije HPLC-om gdje je uslijed linearnog dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 90 minuta primijećen i linearan pad koncentracije spoja **1** odnosno linearan rast koncentracije spoja **2** (slika 4.34). To potvrđuje da je reakcija oksidacije spoja **1** u spoj **2** brza i da nema akumulacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  te da je brzinu reakcije u ovom slučaju definirala brzina dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Što se mehanizma reakcije tiče, prema literaturnim podacima, izvjesno je da se radi o bimolekularnoj reakciji između spoja **1** i di-peroksomolibdatnog aniona koja uključuje nukleofilni napad sumpora na peroksidni kisik.<sup>86,92</sup>

## 4.1.3. Spoj 3

Sinteza spoja **3** odvija se jednom sintetskom koraku kao što je prikazano na slici 4.4. Sinteza se može načiniti na dva načina. Kao i sinteza spoja **2**, no uz dodatak veće količine  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kako bi sav spoj **2** konsektivnom reakcijom prešao u spoj **3**, ili kao što je načinjeno u sklopu ovog istraživanja, iz izoliranog spoja **2** uz isti katalitički sustav i slične reakcijske uvjete. Iz vremena trajanja reakcije (ukupno više od 6 sati) i iz količine utrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,43 molarnih ekvivalenata naspram spoja **2**), može se zaključiti da je oksidacija spoja **2** u spoj **3** znatno sporija odnosno da je koeficijent brzine reakcije za par redova veličine manji od reakcije oksidacije spoja **1** u spoj **2**. Također reakciju je bilo potrebno voditi pri višim pH vrijednostima nego tijekom sinteze spoja **2**. Zbog sporije reakcije do većeg izražaja dolazi kompetitivna reakcija raspada peroksomolibdatnog kompleksa, kao što je opisano u prethodnom poglavlju, koji je u ovom slučaju još izraženiji zbog viših pH vrijednosti. Iz istog razloga, za potpunu oksidaciju spoja **2** u spoj **3** je bila nužna i znatno veća količina  $\text{H}_2\text{O}_2$ . NMR spektri dokazuju nastajanje 6-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonyl]-1*H*-benzimidazola, **3** kao produkta reakcije i u skladu su s prethodno publiciranim podacima.<sup>83,84</sup>

Slika 4.4. Reakcijska shema sinteze spoja **3**.

4.1.4. Karakterizacija spojeva **1**, **2** i **3** spektroskopijom NMRSlika 4.5. Prikaz molekulskih struktura spojeva **1**, **2** i **3** s numeriranim atomima.Tablica 4.1.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kemijski pomaci spojeva **1**, **2** i **3** (DMSO- $d_6$ ), 400 MHz.

Numeriranje atoma za svaki spoj prikazana je na slici 4.5.

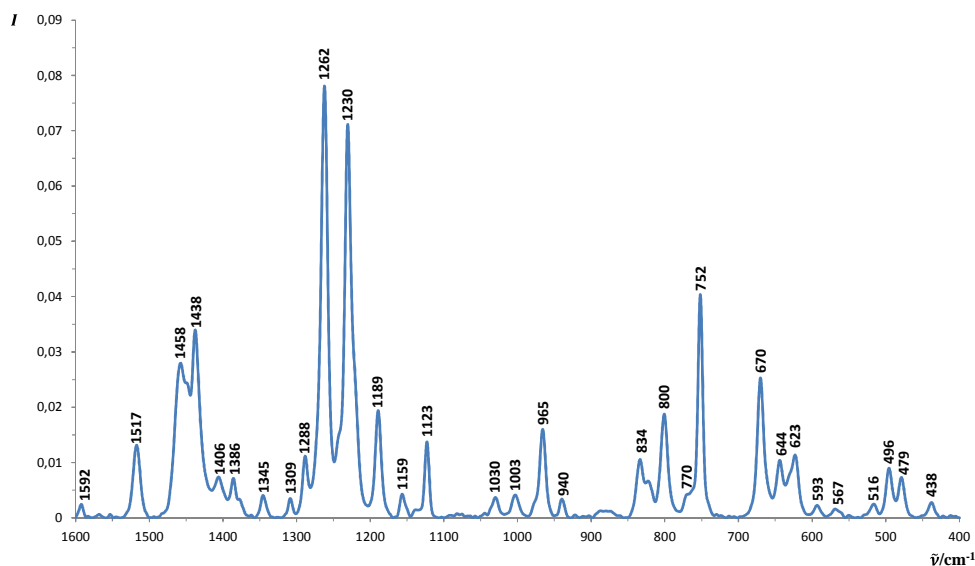
| Atom | 1                                 |                                      | 2                                 |                                      | 3                                 |                                      |
|------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
|      | $^1\text{H } \delta / \text{ppm}$ | $^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$ | $^1\text{H } \delta / \text{ppm}$ | $^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$ | $^1\text{H } \delta / \text{ppm}$ | $^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$ |
| 1    |                                   | 139,91                               |                                   | 138,72                               |                                   | - <sup>a</sup>                       |
| 2    | 6,99                              | 94,89                                | 7,10                              | 97,60                                | 7,22                              | 94,15                                |
| 3    |                                   | 155,76                               |                                   | 157,04                               |                                   | 157,81                               |
| 4    | 6,76                              | 110,88                               | 6,93                              | 113,87                               | 7,01                              | 114,42                               |
| 5    | 7,35                              | 118,01                               | 7,54                              | 118,21                               | 7,64                              | 121,23                               |
| 6    |                                   | 138,44                               |                                   | 134,90                               |                                   | 136,75                               |
| 7    | 12,47                             |                                      | 13,43                             |                                      | 13,59                             |                                      |
| 8    |                                   | 152,61                               |                                   | 153,56                               |                                   | 151,82                               |
| 9    | 4,65                              | 36,95                                | 4,73                              | 60,52                                | 5,02                              | 60,58                                |
| 10   |                                   | 154,71                               |                                   | 150,11                               |                                   | 146,68                               |
| 11   |                                   | 125,02                               |                                   | 126,95                               |                                   | 127,62                               |
| 12   |                                   | 163,91                               |                                   | 163,99                               |                                   | 163,62                               |
| 13   |                                   | 125,65                               |                                   | 125,98                               |                                   | 126,15                               |
| 14   | 8,18                              | 149,14                               | 8,19                              | 149,61                               | 8,05                              | 149,22                               |
| 15   | 2,27                              | 11,38                                | 2,17                              | 11,58                                | 2,21                              | 11,28                                |
| 16   | 3,73                              | 60,26                                | 3,69                              | 60,22                                | 3,69                              | 59,70                                |
| 17   | 2,20                              | 13,39                                | 2,20                              | 13,39                                | 2,18                              | 12,86                                |
| 18   | 3,77                              | 55,91                                | 3,81                              | 55,97                                | 3,83                              | 55,52                                |

<sup>a</sup> nije opaženo

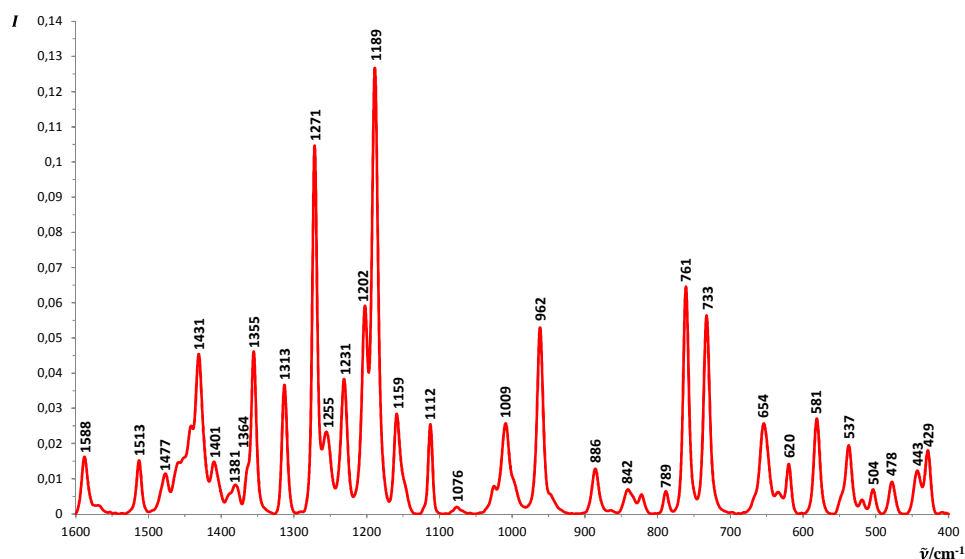


## 4.1.5. Ramanovi spektri off-line spojeva 1, 2 i 3

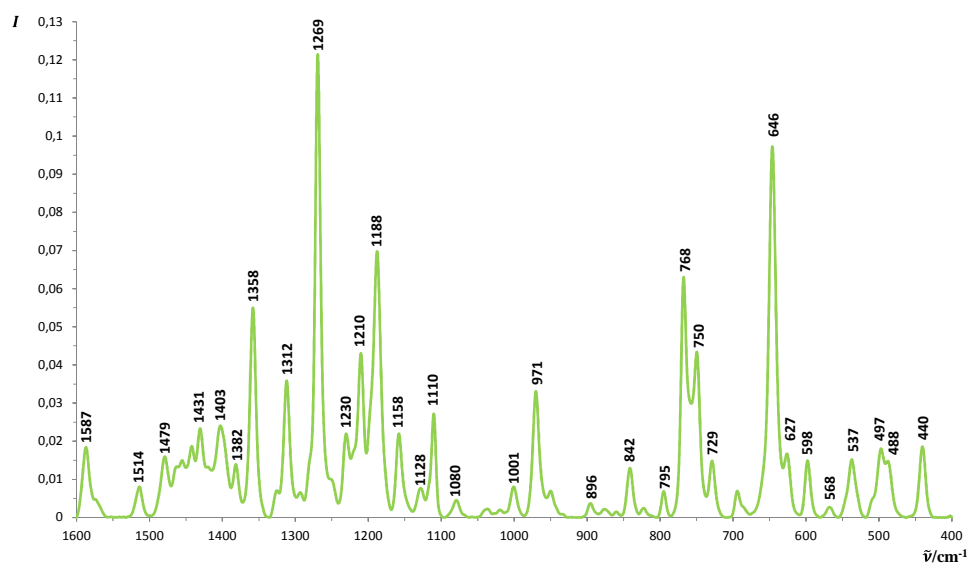
Ramanovi spektri *off-line* spojeva 1, 2 i 3 u čvrstom stanju, obrađeni na način opisan u odjeljku 3.9, prikazani su na slikama 4.6, 4.7 i 4.8. Asignacija vrpci karakterističnih za vibracije pojedinih skupina prikazana je u tablici 4.2.



Slika 4.6. Ramanov spektar *off-line* spoja 1 u čvrstom stanju u području valnih brojeva od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.7. Ramanov spektar *off-line* spoja 2 u čvrstom stanju u području valnih brojeva od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$ .



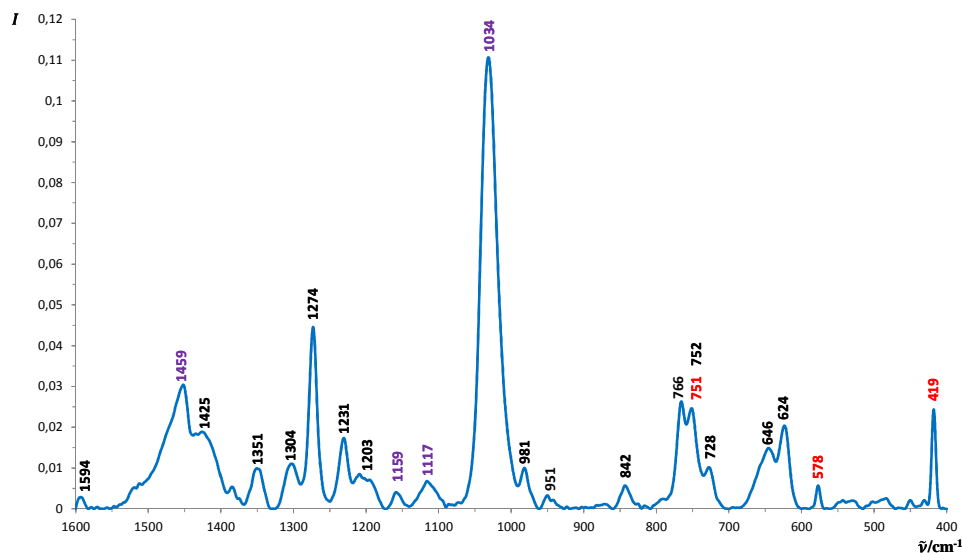
Slika 4.8. Ramanov spektar *off-line* spoja **3** u čvrstom stanju u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Tablica 4.2. Asignacija karakterističnih Ramanovih vrpca spojeva **1**, **2** i **3** u čvrstom stanju.<sup>93</sup>

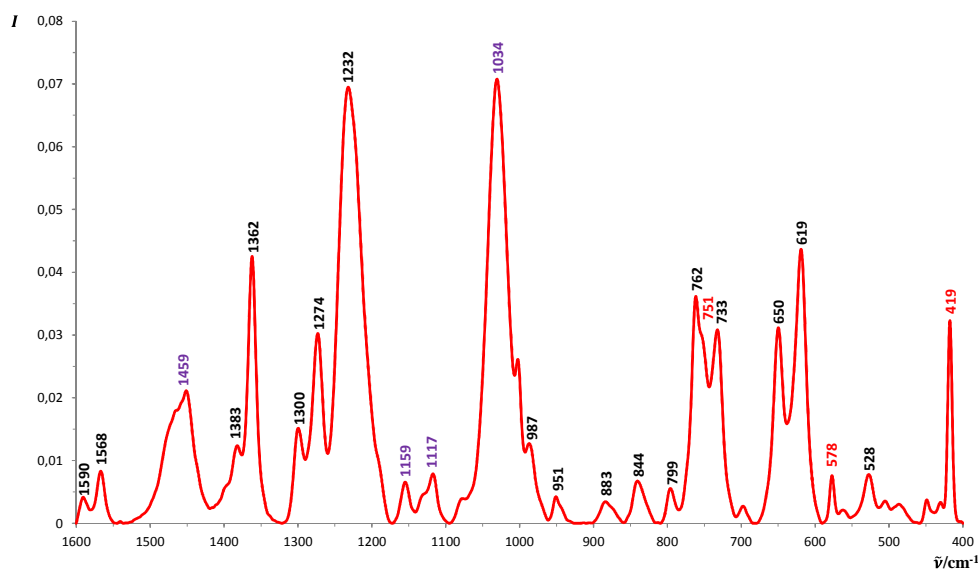
| Skupina i tip vibracije   | $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$       |                                    |                                    |
|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|   | 1                                  | 2                                  | 3                                  |
| Istezanje piridinskog i benzimidazolnog prstena                 | 1592, 1517                         | 1588, 1513                         | 1587, 1514                         |
| C-H vibracije metilnih i metilenskih skupina                    | 1458, 1438, 1406, 1386, 1345, 1309 | 1477, 1431, 1401, 1381, 1355, 1313 | 1479, 1431, 1403, 1382, 1358, 1312 |
| C-O-Ar istezanje  | 1288, 1262, 1230, 1189, 1159, 1123 | 1271, 1231, 1202, 1189, 1159, 1112 | 1269, 1230, 1210, 1188, 1158, 1110 |
| S=O istezanje   | /                                  | 1076                               | 1080                               |
| Istezanje aromatskog prstena                                    | 1003, 965                          | 1009, 962                          | 1001, 971                          |
| C-H aromatsko - deformacija van ravnine                         | 834, 800, 752                      | 886, 842, 789, 761, 733            | 896, 842, 795, 768, 750, 729       |
| C-S istezanje   | 670, 644, 623                      | 654, 620                           | 646, 627                           |
| C-O-C savijanje; deformacija aromatskih prstena u i van ravnine | 438, 479, 496, 516, 567, 593       | 429, 443, 478, 504, 537, 581       | 440, 488, 497, 537, 568, 598       |

U Ramanovim spektrima spojeva **1**, **2** i **3** u čvrstom stanju, najintenzivnije su vrpce u području od  $1290\text{ cm}^{-1}$  do  $1110\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju C-O-Ar istezanju veza eterskih skupina. Slabe vrpce pri  $1076\text{ cm}^{-1}$  u spektru spoja **2** i  $1080\text{ cm}^{-1}$  u spektru spoja **3**, odgovaraju S=O istezanju.<sup>94</sup>

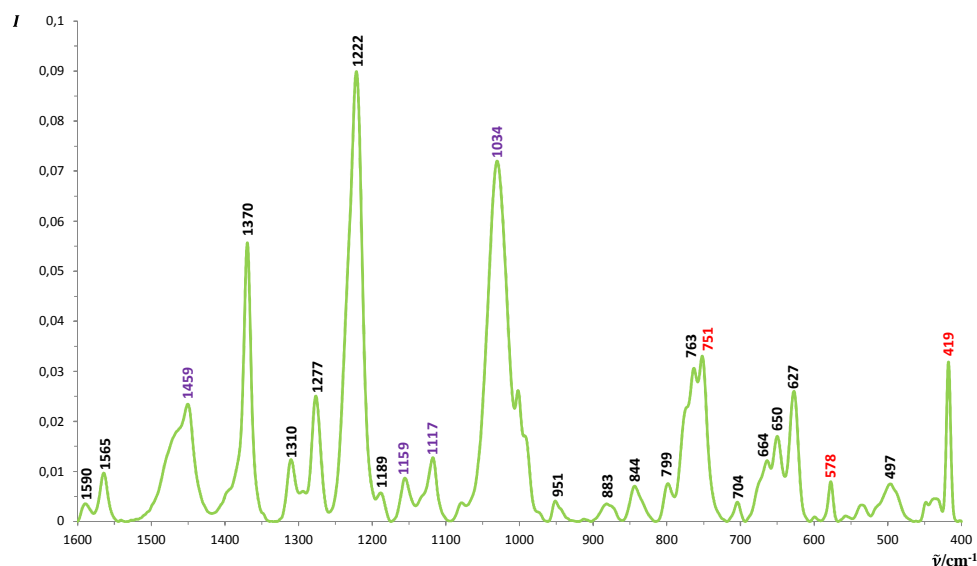
Ramanovi spektri *off-line* otopina spojeva **1**, **2** i **3** u smjesi metanola i 10 %-tne vodene otopine NaOH, obrađeni na način opisan u odjeljku 3.9, prikazani su na slikama 4.9, 4.10 i 4.11.



Slika 4.9. Ramanov spektar otopine spoja **1** u smjesi metanola i 10 %-tne vodene otopine NaOH u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.10. Ramanov spektar otopine spoja **2** u smjesi metanola i 10 %-tne vodene otopine NaOH u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .

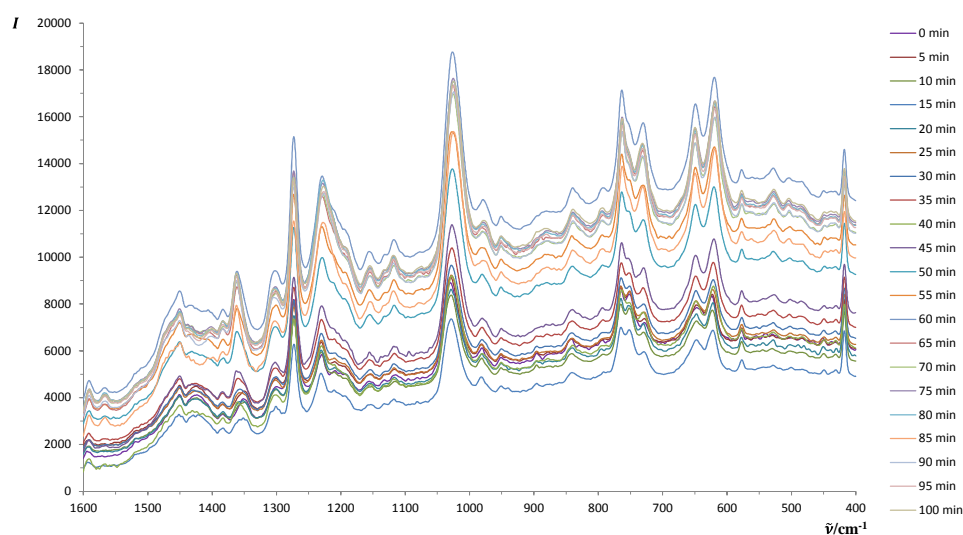


Slika 4.11. Ramanov spektar otopine spoja **3** u smjesi metanola i 10 %-tne vodene otopine NaOH u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Zbog zrcalne refleksije o safirni prozor sonde, u svim spektrima mjenim kontaktnom sondom, dolazi do pojava karakterističnih vrpca safira u spektrima pri  $751\text{ cm}^{-1}$ ,  $578\text{ cm}^{-1}$  i  $419\text{ cm}^{-1}$ .<sup>95,96</sup> Iz Ramanovog spektra otopine spoja **1**, vidljivo je da se karakteristična vrpca pri  $752\text{ cm}^{-1}$  preklapa s vrpcom safira pri  $751\text{ cm}^{-1}$ . Vrpce pri  $1459\text{ cm}^{-1}$ ,  $1159\text{ cm}^{-1}$ ,  $1117\text{ cm}^{-1}$  i  $1034\text{ cm}^{-1}$  karakteristične su za metanol, što je vidljivo i iz izmjenog spektra čistog metanola prikazanog na slici 8.3.<sup>97</sup> Iz spektara sva tri spoja također je vidljivo da ne postoje vrpce u potpunosti specifične za pojedini spoj već da se u većoj ili manjoj mjeri mogu očekivati preklapanja pojedinih vrpca u spektrima otopina smjesa spojeva i u spektrima *in-line* tijekom reakcije. To je pogotovo značajno za spektre spojeva **2** i **3** čije se karakteristične vrpce gotovo u potpunosti preklapaju. To znači da se kvantifikaciji udjela pojedine komponente i razvoju kalibracijskog modela ne može pristupiti univarijatno već isključivo uz pomoć analize multivarijatnim tehnikama. No unatoč tome, u Ramanovim spektrima postoje karakteristične vrpce koje kvalitativno mogu ukazivati na tijek reakcije. Tako primjerice smanjenje intenziteta vrpca pri  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $1351\text{ cm}^{-1}$  i  $752\text{ cm}^{-1}$  može ukazivati na trošenje spoja **1** reakcijom, dok povećanje intenziteta vrpca pri  $1568\text{ cm}^{-1}$ ,  $1362\text{ cm}^{-1}$ ,  $1232\text{ cm}^{-1}$  i  $733\text{ cm}^{-1}$  može ukazivati na nastajanje produkta **2**.

## 4.2. Praćenje reakcije oksidacije spoja 1 Ramanovom spektroskopijom *in-line*

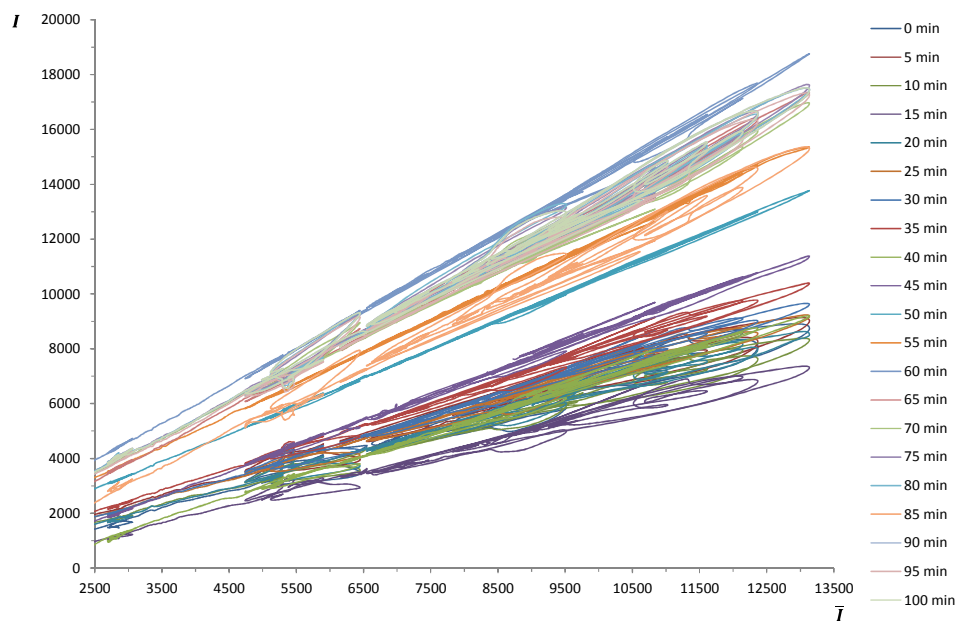
Reakcija oksidacije spoja 1 u spoj 2, praćena je mjerenjem Ramanovih spektara principom *in-line*, svakih 5 minuta tijekom reakcije u ukupnom trajanju od 100 minuta. Za reakciju pripreme spoja 1 u ovom eksperimentu korištene su sirovine, MTX od Everest kontrolnog broja 7025052 i OMP-Cl x HCl od Changzhou Huaren kontrolnog broja 7055012. Set od 21 spektar koji su izmjereni tijekom reakcije prikazan je na slici 4.12 u području valnih brojeva od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  i bez obrade.



Slika 4.12. Ramanovi spektri *in-line* izmjereni tijekom oksidacije spoja 1 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  bez obrade.

Kako bi se prikazao utjecaj pozadinske fluorescencije, varijabilne snage lasera i efekta višestrukog raspršenja zračenja tijekom reakcije, na slici 4.13 prikazana je korelacija Ramanovog intenziteta izračunatog prosječnog spektra (od ukupnih 21) s realnim intenzitetom pojedinog spektra na setu spektara prikazanom na slici 4.12. Iz korelacije su jasno vidljiva dva efekta. Prvi, aditivni koji je rezultat varijacija u snazi lasera tijekom cjelokupnog vremena mjerenja spektara i koji se na rezultate ogleda kao promjena u Ramanovom intenzitetu bazne linije između mjerenja. Drugi je efekt višestrukog raspršenja koji može biti posljedica različitog stupnja turbidnosti sustava ili primjerice mjehurića plina

koji su prisutni u otopini uslijed mehaničkog miješanja. Također je vidljivo da je efekt višestrukog raspršenja sve izraženiji kako se ide prema nižim valnim brojevima.

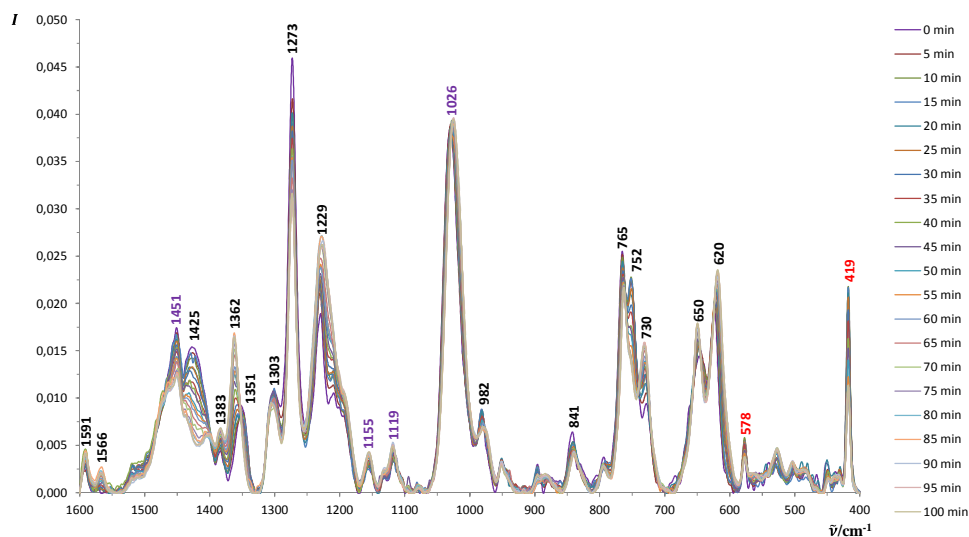


Slika 4.13. Korelacija Ramanovog intenziteta izračunatog prosječnog spektra sa realnim intenzitetima za svaki spektar.

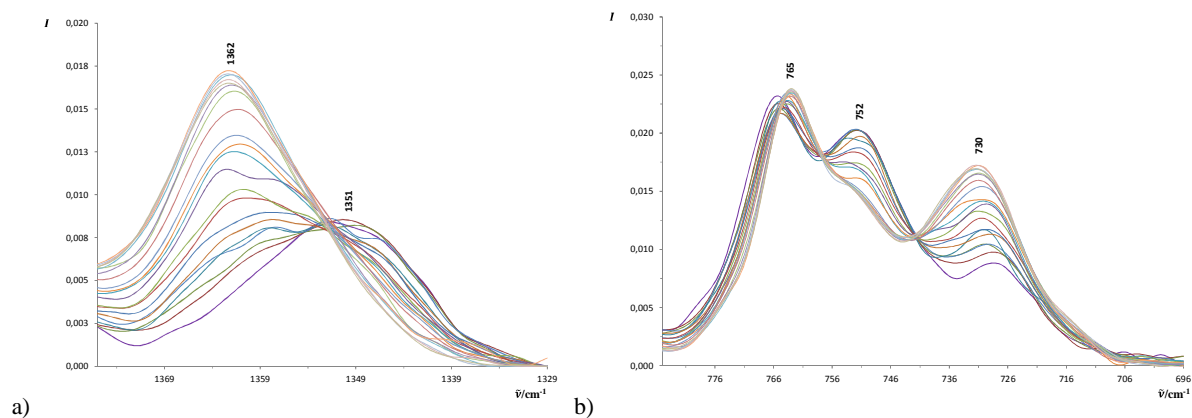
Kako bi se na spektrima korigirali navedeni efekti, spektri su obrađeni na dva različita načina. Prvo, vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i zatim MSC funkcijom. Drugi način bio je izvod prve derivacije spektara, a zatim MSC. Rezultati obrada prikazani su na slikama 4.14 i 4.16. Kvaliteta pojedine obrade evaluirana je PCA multivarijatom metodom te su rezultati prikazani i raspravljeni u sljedećem poglavlju.

Iz Ramanovih spektara *in-line* izmjerenih tijekom reakcije i obrađenih vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i MSC funkcijom, vidljivo je nastajanje novih vrpca. Vrpce pri  $1591\text{ cm}^{-1}$  i  $1566\text{ cm}^{-1}$  karakteristične za spojeve **2** i **3**, rastu u intenzitetu kroz vrijeme. Jasno raste i intenzitet vrpca pri  $1383\text{ cm}^{-1}$ ,  $1362\text{ cm}^{-1}$  i  $730\text{ cm}^{-1}$  karakterističnih za spoj **2** te  $1229\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za spojeve **2** i **3**. Vrpca pri  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $1273\text{ cm}^{-1}$  i  $752\text{ cm}^{-1}$  karakterističnim za spoj **1**, jasno se smanjuje intenzitet kroz vrijeme. Vrpce pri  $1362\text{ cm}^{-1}$  i  $1351\text{ cm}^{-1}$  te  $752\text{ cm}^{-1}$  i  $730\text{ cm}^{-1}$  tvore dvije izozbestičke točke pri  $1352\text{ cm}^{-1}$  i  $741\text{ cm}^{-1}$  u setu spektara, kao što je prikazano na slici 4.15. Pojava tih točki jasno upućuje na kemijsku ravnotežu između spojeva **1** i **2**. Zbog već prije spomenutih preklapanja vrpca spoja **3** sa

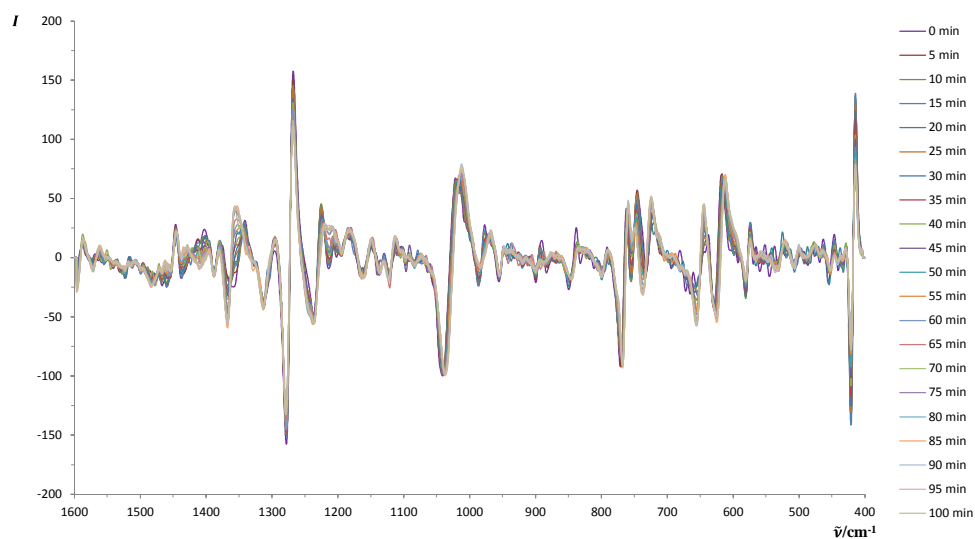
spojem **2** kao i zbog činjenice da spoja **3** reakcijom u uobičajenim uvjetima nastaje u udjelu do 10 %, njegovo nastajanje reakcijom nemoguće je kvalitativno potvrditi iz spektara *in-line*.



Slika 4.14. Normirani Ramanovi spektri *in-line* oksidacije spoja **1** u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



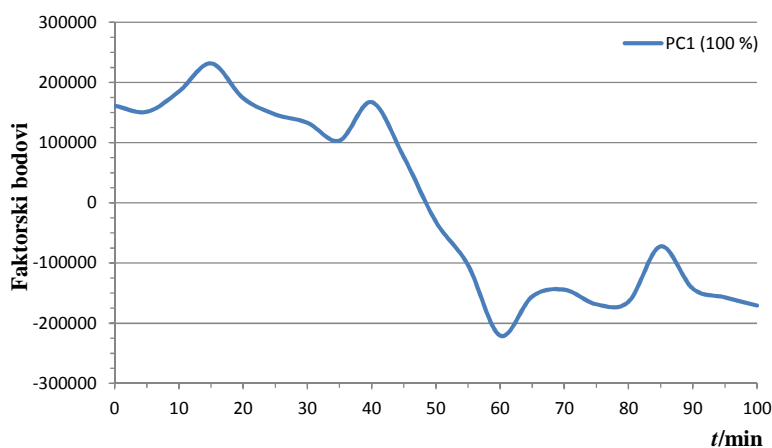
Slika 4.15. Izoabsorbne točke u Ramanovim spektrima *in-line* oksidacije spoja **1** pri a)  $1352\text{ cm}^{-1}$  i b)  $741\text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.16. Prva derivacija Ramanovih spektri *in-line* oksidacije spoja **1** u području od 1600  $\text{cm}^{-1}$  do 400  $\text{cm}^{-1}$  uz korekciju višestrukog raspršenja.

### 4.3. Analiza Ramanovih spektara *in-line* metodom PCA

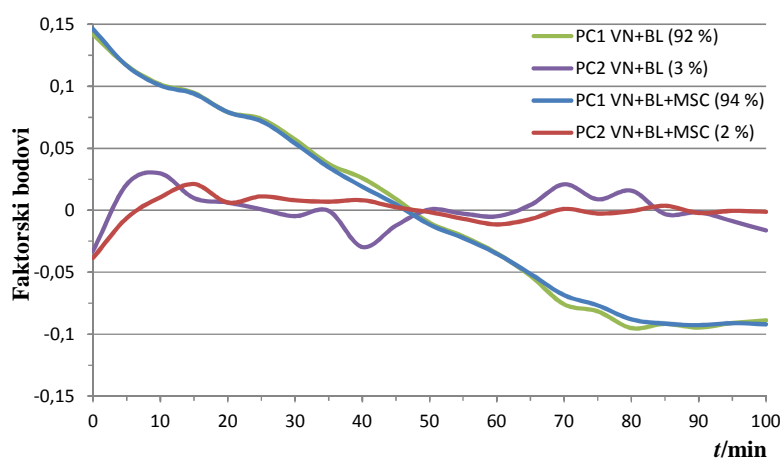
Sirovi i obrađeni Ramanovi spektri izmjereni tijekom reakcije oksidacije analizirani su metodom PCA s centriranim podacima. Na slici 4.17 prikazan je trend faktorskih bodova sirovog seta spektara za prvu glavnu komponentu (PC1).



Slika 4.17. Trend faktorskih bodova PC1 kroz vrijeme dobiven PCA analizom sirovih Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije.



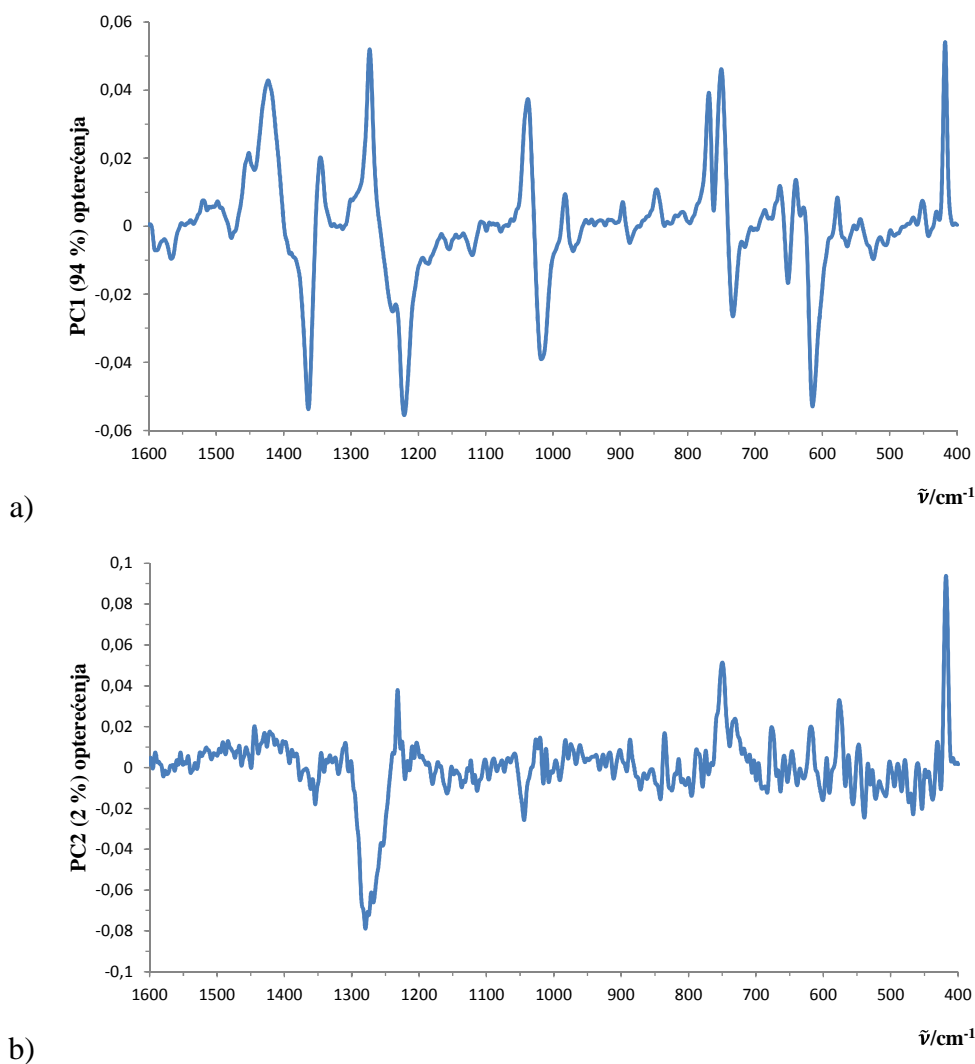
Vidljivo je da PC1 opisuje 100 % varijance u podacima i ne daje značajne informacije o tijeku reakcije. Takav rezultat zasigurno ukazuje na nužnost obrade spektara. Obradom spektara vektorskim normiranjem i korekcijom bazne linije dobiva se trend faktorskih bodova prikazan na slici 4.18. Iako bi navedene korekcije trebale biti dovoljne da isprave i aditivni efekt i efekt višestrukog raspršenja trend faktorskih bodova nakon dodatne korekcije MSC funkcijom, pokazuje kako je i MSC nužan kako bi se u potpunosti uklonili svi nepoželjni efekti i ekstrahirale sve informacije o kemijskim promjenama tijekom mjerenja. Nakon potpune obrade vidljivo je da PC1 opisuje 94 % varijance, a PC2 svega 2 %, odnosno da prve dvije glavne komponente opisuju 96 % varijance u podacima.



Slika 4.18. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije obrađenih vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i korekcijom višestrukog raspršenja.

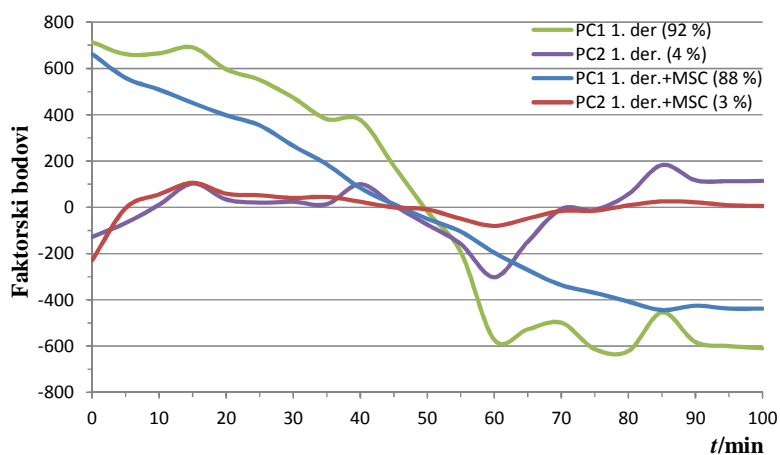
Iz faktorskih bodova PC1 vidljivo je da njihov trend kroz vrijeme opisuje tijek reakcije u smislu smanjenja udjela spoja **1**. Pregled PC1 opterećenja po pojedinom valnom broju podupire navedenu tvrdnju s obzirom da su značajna pozitivna opterećenja prisutna na karakterističnim vrpama spoja **1** pri  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $1351\text{ cm}^{-1}$  i  $752\text{ cm}^{-1}$  kao što je prikazano na slici 4.19. Također je vidljivo da nakon završetka dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i dodatka NTS-a, više nema promjena u vrijednostima faktorskih bodova PC1 i PC2. S obzirom da reakcija oksidacije započinje dok spoj **1** nije u potpunosti već parcijalno otopljen (zbog njegove topljivosti u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji i uobičajenim pH vrijednosti propisanog postupka pripreve) i da je vizualnom metodom utvrđeno da je do potpunog otapanja u dotičnom eksperimentu došlo nakon otprilike 20 minuta dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , može se utvrditi da

trend faktorskih bodova PC2 prikazuje otapanje spoja **1** unatoč niskom udjelu opisane varijance i prisustvu šuma u PC2 opterećenjima. Isti efekt primijećen je praćenjem intenziteta vrpce pri  $1425\text{ cm}^{-1}$  na setu spektara bez finalne obrade metodom MSC. Prvih 20 minuta reakcije, intenzitet vrpce raste nakon čega počinje opadati. Razlog tome je što prisutnost čestica u sustavu utječe na Ramanov intenzitet.



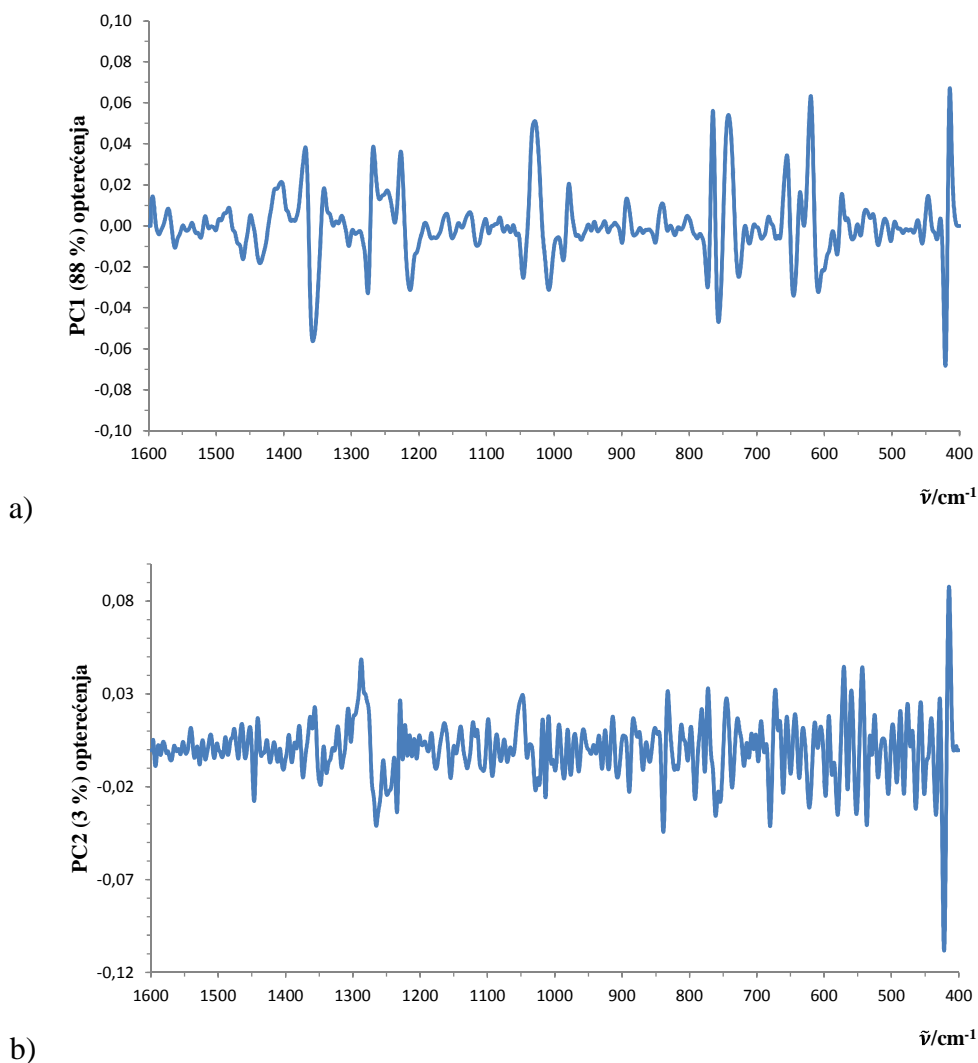
Slika 4.19. a) PC1 i b) PC2 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom skupa od 21 Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije oksidacije obrađenih vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i višestrukog raspršenja.

Ovakva analiza dakle daje kvalitativan dojam o tijeku i završetku reakcije no ne daje nikakvu informaciju o doseg i udjelima spojeva **1**, **2** i **3** tijekom i na kraju reakcije. Važnost poznavanja navedenih omjera prodiskutirana je već u prethodnim poglavljima.



Slika 4.20. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom prve derivacije Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije, korigiranih za višestruko raspršenje.

Na slici 4.20 prikazan je trend faktorskih bodova prve derivacije Ramanovih spektara *in-line* bez i uz korekciju višestrukog raspršenja. Usporedbom s trendom na slici 4.18 vidljivo je da je obrada normiranjem i korekcija bazne linije puno kvalitetnije korigira spektre. No nakon obrade MSC funkcijom u oba se slučaja dobiva gotovo identičan trend u smislu da PC1 i PC2 opisuje kemijske i fizikalne promjene tijekom reakcije na isti način. No unatoč tome, prve dvije komponente opisuju svega 91 % varijance što upućuje na moguću pojavu sustavnih grešaka prilikom korištenja podataka obrađenih na ovaj način tijekom razvoja kalibracijskog modela s obzirom da je baza metode PLSR upravo metoda PCA. Na slici 4.21 prikazana su opterećenja za prve dvije komponente.

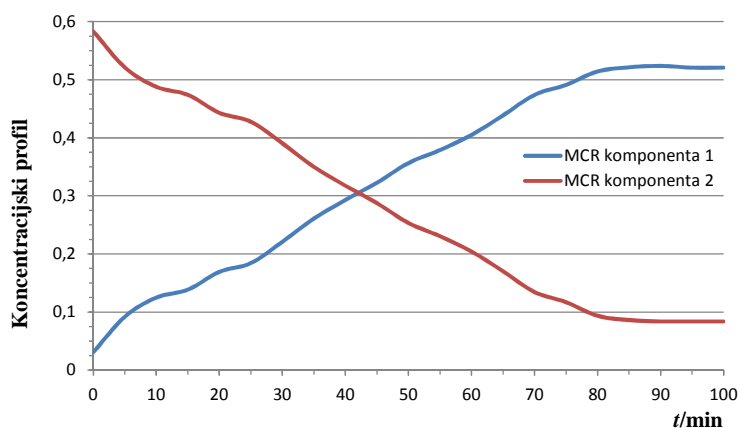


Slika 4.21. a) PC1 i b) PC2 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom prve derivacije skupa od 21 Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije oksidacije korigiranih za efekt višestrukog raspršenja.

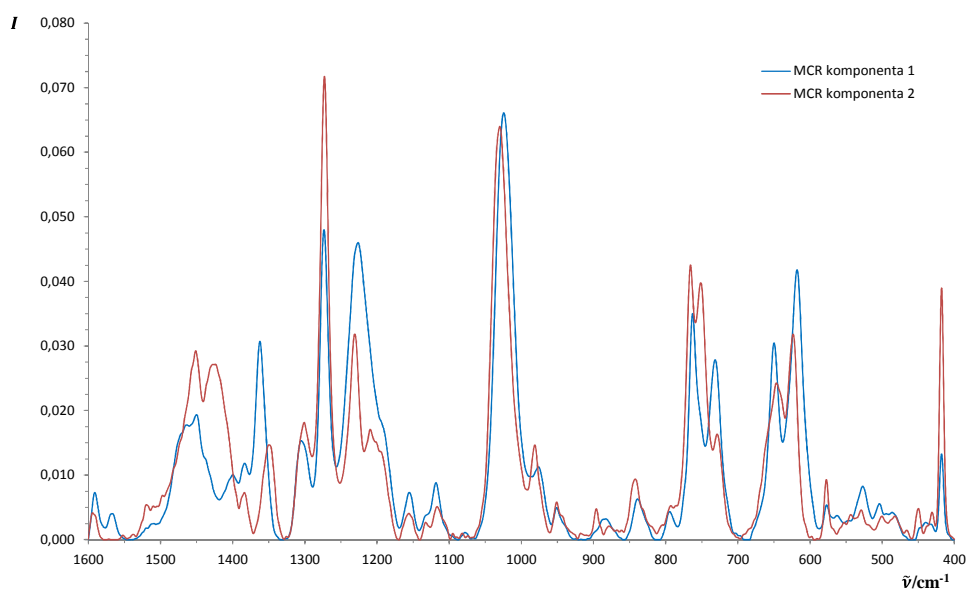
Iz provedenih analiza može se zaključiti da obje metode obrade uspješno korigiraju aditivne efekte i efekte višestrukog raspršenja. Temeljem varijance koju opisuju glavne komponente, može se zaključiti da je prva metoda obrade ipak kvalitetnija no unatoč tome, obje metode obrade su korištene tijekom obrade spektara izmjerenih u kalibracijskim eksperimentima prije razvoja kalibracijskog modela metodom PLSR.

#### 4.4. Analiza Ramanovih spektara *in-line* metodom MCR-ALS

Spektri prikupljeni tijekom reakcije oksidacije spoja **1** analizirani su i metodom MCR-ALS. Uvjeti analize opisani su u poglavlju 3.10.1. Trend koncentracijskog profila kroz vrijeme za dvije MCR komponente prikazan je na slici 4.22. Izračunati spektri čistih MCR komponenti prikazani su na slici 4.23.



Slika 4.22. Rezultat MCR-ALS analize Ramanovih spektara *in-line* tijekom reakcije oksidacije, prikazan kao vremenski trend koncentracijskog profila za MCR komponente 1 i 2.

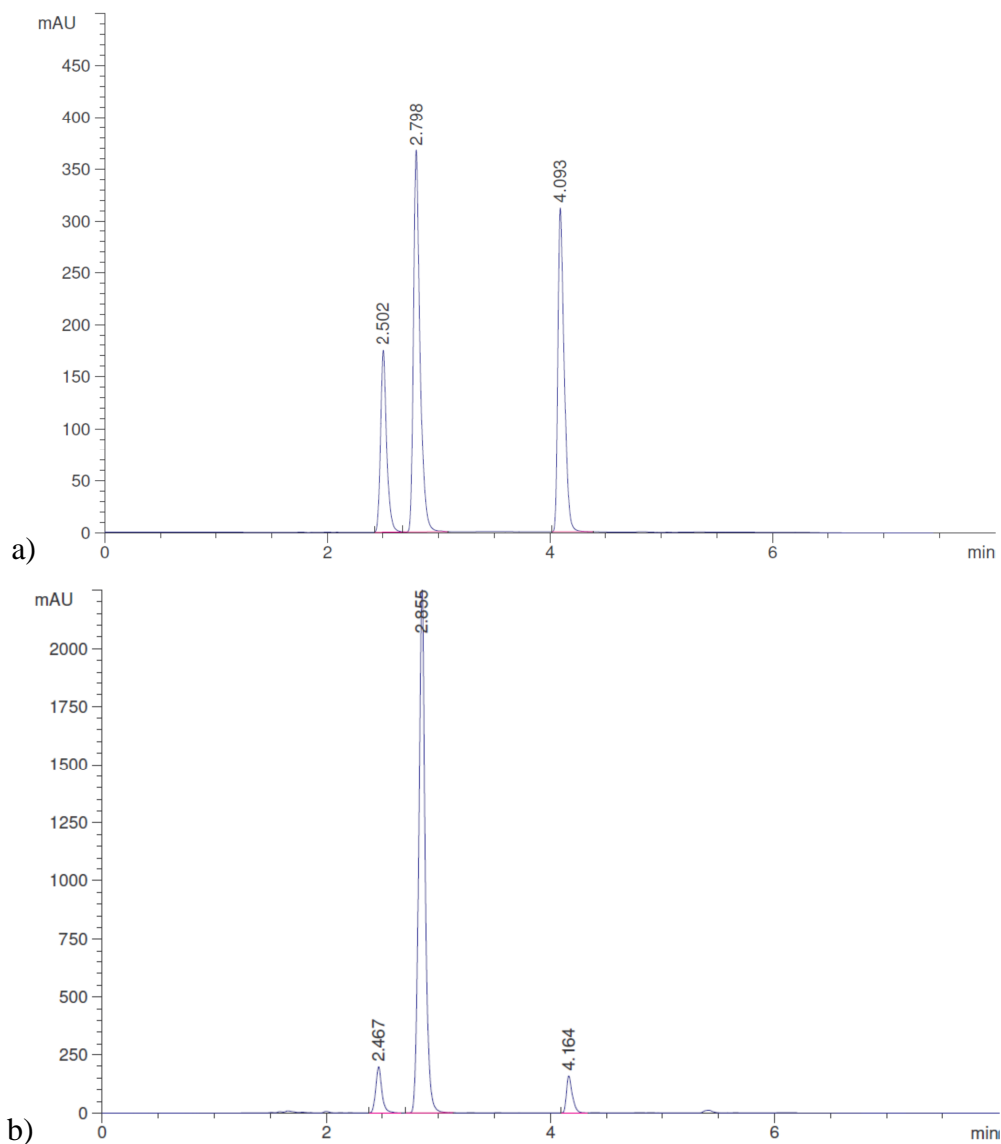


Slika 4.23. Izračunati Ramanovi spektri dviju čistih MCR-ALS komponenta.

Usporedbom spektara na slici 4.23 sa spektrima otopina čistih spojeva na slikama 4.9 i 4.10, vidljivo je da MCR komponenta 2 opisuje spoj **1**, a MCR komponenta 1, spoj **2**. Na slici 4.22 vidljivo je da MCR komponenta 2 opisuje tijek nestajanja spoja **1** na isti način kao i PC1 na slici 4.18. Kako je metoda MRC-ALS relativno niske osjetljivosti, analiza nije uspješno prepoznala i treću komponentu, spoj **3** čak ni kada su u analizu kao početni uvjet uneseni zasebni spektri otopina sva tri spoja u smjesi metanola i 10%-tne vodene otopine NaOH. Kako je spoznaja o udjelu spoja **3** u reakcijskoj smjesi od iznimne važnosti, metoda MRC-ALS u ovome se slučaju može primijeniti isključivo za kvalitativnu analizu dosega reakcije.

#### **4.5. Određivanje linearnog područja i faktora odziva HPLC metode za praćenje reakcije oksidacije**

Otopine pripravljene na način opisan u poglavlju 3.8.1 i prikazane u tablici 3.3 analizirane su HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.8. Na svakoj od pripremljenih otopina napravljene su tri uzastopne analize te je iz prosječne površine pika izračunat faktor odziva (engl. *Response Factor*, RF) za svaku od koncentracija na način da je prosječna površina od tri uzastopne analize podijeljena s masenom koncentracijom uzorka. Rezultati su prikazani u tablici 4.3. Retencijska vremena spojeva tijekom određivanja linearnog područja bila su 2,5 min za **3**, 2,8 min za **2** i 4,1 min za **1**. Reprezentativni kromatogram otopine sva tri spoja, prikazan je na slici 4.24. Za usporedbu, na istoj je slici prikazan kromatogram realne reakcijske smjese na kraju reakcije tijekom kalibracijskog eksperimenta 4.



Slika 4.24. Reprezentativni kromatogrami a) otopine spojeva **3**, **2** i **1** redom prema retencijskim vremenima i b) reakcijske smjese na kraju reakcije oksidacije.

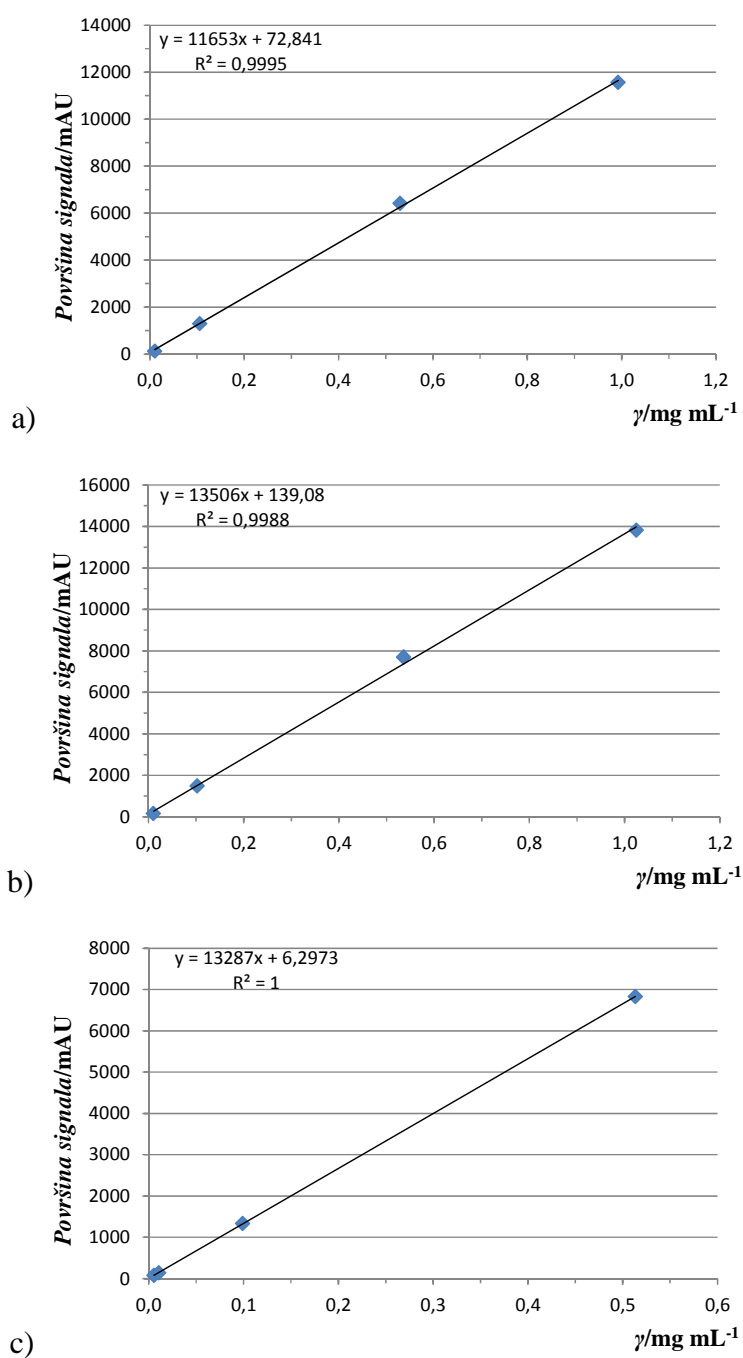
Tablica 4.3. Rezultati analiza napravljenih u svrhu određivanja linearnog područja i faktora odziva HPLC metode.

| Spoj     | Odvaga broj | $\gamma/\text{mg mL}^{-1}$ | Površina signala/mAU |         |         |           | RF       |
|----------|-------------|----------------------------|----------------------|---------|---------|-----------|----------|
|          |             |                            | 1                    | 2       | 3       | Prosječno |          |
| <b>1</b> | 1           | 0,0102                     | 127,8                | 128,4   | 128,1   | 128,1     | 12543,33 |
|          | 2           | 0,1057                     | 1290,6               | 1292,5  | 1291,2  | 1291,4    | 12212,60 |
|          | 3           | 0,5303                     | 6416,4               | 6412,1  | 6414,0  | 6414,2    | 12094,67 |
|          | 4           | 0,9929                     | 11548,2              | 11558,4 | 11569,9 | 11558,8   | 11641,25 |
|          | 5           | 1,9763                     | 16261,3              | 16236,5 | 16313,5 | 16270,4   | 8232,62  |
| <b>2</b> | 1           | 0,0105                     | 158,1                | 157,9   | 157,8   | 157,9     | 15072,28 |
|          | 2           | 0,1023                     | 1483,5               | 1486,2  | 1484,6  | 1484,8    | 14511,29 |
|          | 3           | 0,5362                     | 7706,1               | 7703,4  | 7699,5  | 7703,0    | 14367,25 |
|          | 4           | 1,0249                     | 13842,2              | 13757,6 | 13852,7 | 13817,5   | 13481,28 |
|          | 5           | 1,4879                     | 17400,3              | 17380,2 | 17370,6 | 17383,7   | 11683,38 |
|          | 6           | 2,0583                     | 20042,0              | 20197,0 | 20189,5 | 20142,8   | 9785,96  |
| <b>3</b> | 1           | 0,0055                     | 74,0                 | 73,7    | 74,2    | 74,0      | 13517,79 |
|          | 2           | 0,0105                     | 143,7                | 143,5   | 143,9   | 143,7     | 13640,51 |
|          | 3           | 0,0990                     | 1331,3               | 1330,1  | 1330,8  | 1330,7    | 13445,01 |
|          | 4           | 0,5135                     | 6822,1               | 6827,2  | 6834,6  | 6828,0    | 13296,40 |

Na slici 4.22 prikazane su ovisnosti površine signala o masenoj koncentraciji te jednadžbe pravaca. Vidljivo je da je linearno područje odziva detektora za spoj **1** od  $0,010 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $1,000 \text{ mg mL}^{-1}$ , za spoj **2** od  $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $1,000 \text{ mg mL}^{-1}$  i za spoj **3** od  $0,006 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$  koja je ujedno bila i najviša ispitivana koncentracija s obzirom na realni raspon koncentracija spoja **3** u reakcijskoj smjesi nakon razrjeđivanja uzorka na analitičku koncentraciju.

Nakon definiranog koncentracijskog raspona u kojem je odziv detektora linearan, izračunati su prosječni faktori odziva za svaki od spojeva. Za spoj **1** on iznosi 12122,96, za spoj **2**, 14358,02 i za spoj **3**, 13474,93. Ovi RF-ovi korišteni su kasnije za izračunavanje koncentracija u setu kalibracijskih otopina.





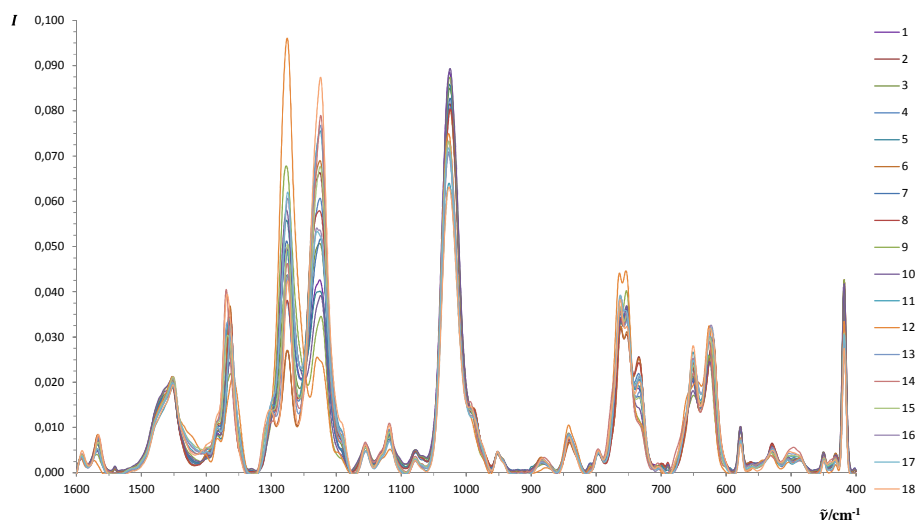
Slika 4.25. a) Linearno područje odziva detektora za spojeve a) **1**, b) **2** i c) **3** s pripadajućim jednažbama pravaca.

#### 4.6. Kalibracija pomoću otopina smjesa spojeva 1, 2 i 3

U svrhu pripreme kalibracijskog seta podataka za razvoj PLSR kalibracijskog modela, načinjen je probni set od 18 otopina (od ukupno 100 planiranih) smjesa spojeva 1, 2 i 3 pri različitim masenim koncentracija i u različitim omjerima otapala pri čemu su kao granice raspona uzimane vrijednosti iz realne reakcijske smjese. Odvage spojeva te volumeni otapala za pripremu prikazani su u tablici 3.2. Otopinama su izmjereni Ramanovi spektri te su izračunate točne masene koncentracije HPLC-om preko faktora odziva kako bi se te vrijednosti mogle koristiti za razvoj kalibracijskog PLSR modela. Rezultati koncentracija dobiveni HPLC analizama prikazani su u tablici 4.4. Set izmjerenih Ramanovih spektara obrađenih vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i korekcijom višestrukog raspršenja, prikazan je na slici 4.26.

Tablica 4.4. Površine signala i izračunate koncentracije spojeva 1, 2 i 3 u kalibracijskom setu od 18 uzoraka.

| Otopina broj | Površina signala/mAU |        |        | $\gamma(\text{uzorak})/\text{mg mL}^{-1}$ |       |       |
|--------------|----------------------|--------|--------|---|-------|-------|
|              | 1                    | 2      | 3      | 1   | 2     | 3     |
| 1            | 2563,9               | 3582,3 | 430,4  | 42,30                                     | 49,90 | 6,39  |
| 2            | 131,3                | 6531   | 596    | 2,17                                      | 90,97 | 8,85  |
| 3            | 1810                 | 4429   | 441,6  | 29,86                                     | 61,69 | 6,55  |
| 4            | 1145,2               | 4979,7 | 956,4  | 18,89                                     | 69,36 | 14,20 |
| 5            | 2962,4               | 3511,4 | 67,9   | 48,87                                     | 48,91 | 1,01  |
| 6            | 68,2                 | 5416,6 | 769,7  | 1,13                                      | 75,45 | 11,42 |
| 7            | 2382,2               | 3326,4 | 1189,9 | 39,30                                     | 46,34 | 17,66 |
| 8            | 1252,2               | 6001   | 230,3  | 20,66                                     | 83,59 | 3,42  |
| 9            | 4284,9               | 1280   | 1109,9 | 70,69                                     | 17,83 | 16,47 |
| 10           | 2897,3               | 2022,8 | 804,3  | 47,80                                     | 28,18 | 11,94 |
| 11           | 2766                 | 5909,2 | 2911,9 | 45,63                                     | 82,31 | 43,22 |
| 12           | 8557,7               | 376,8  | 621,2  | 141,18                                    | 5,25  | 9,22  |
| 13           | 2414,9               | 5005,1 | 3872,1 | 39,84                                     | 69,72 | 57,47 |
| 14           | 2474,8               | 2316,9 | 5775,3 | 40,83                                     | 32,27 | 85,72 |
| 15           | 3235,9               | 4031,4 | 3174,9 | 53,38                                     | 56,16 | 47,12 |
| 16           | 4570,2               | 5451,2 | 691,6  | 75,40                                     | 75,93 | 10,26 |
| 17           | 4306,8               | 4961,4 | 529,1  | 71,05                                     | 69,11 | 7,85  |
| 18           | 887,8                | 6692,4 | 4719,3 | 14,65                                     | 93,22 | 70,05 |

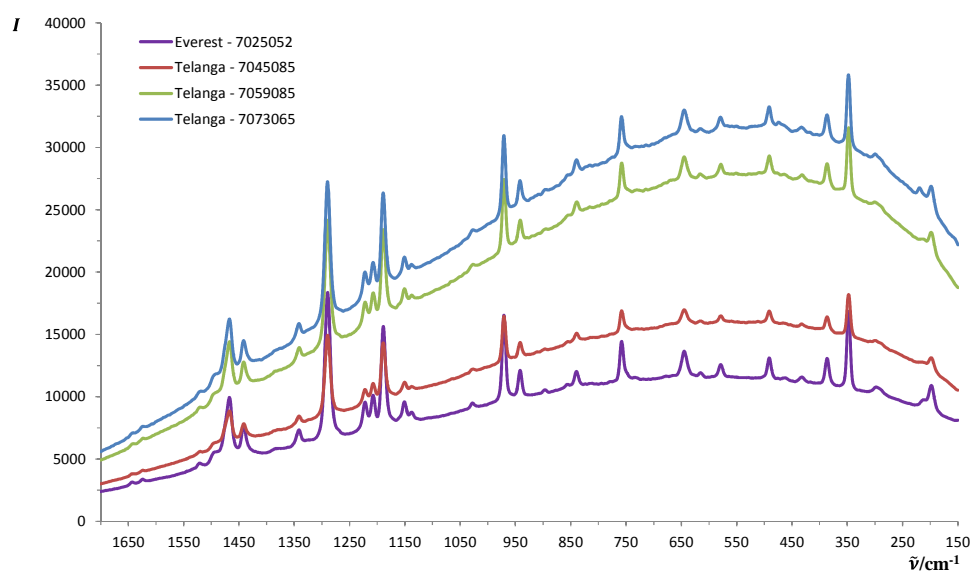


Slika 4.26. Obradeni Ramanovi spektri kalibracijskog seta otopina.

Usporedbom spektara na slici 4.26 sa spektrima *in-line* tijekom reakcije prikazane na slici 4.14, vidljive su određene razlike između dva seta. U kalibracijskom setu tako gotovo u potpunosti izostaju vrpce pri  $1425\text{ cm}^{-1}$  i  $1351\text{ cm}^{-1}$  karakteristične za **1**. Nadalje vrpce pri  $1273\text{ cm}^{-1}$  i  $1229\text{ cm}^{-1}$  znatno se razlikuju u relativnom intenzitetima od onih tijekom *in-line* mjerenja pri istim koncentracijama. Razlog tomu može biti nedostatak katalitičkog sustava u ovako pripremljenim otopinama. No unatoč tome, načinjen je probni PLSR model na navedenom setu podataka s relativno dobrim rezultatima RMSEP vrijednosti, no prilikom korištenja modela za predikciju udjela spojeva **1**, **2** i **3** iz Ramanovih spektara izmjerenih u realnom reakcijskom sustavu, utvrđeno je da model nije u stanju kvalitetno predviđati realni sustav. Iz navedenih razloga ovaj pristup kalibraciji nije dalje razvijan.

#### 4.7. Kalibracija pomoću Ramanovih spektara izmjerenih tijekom reakcije

Nakon što je pokazano da se pripremom otopina smjesa **1**, **2** i **3** ne može načiniti kalibracijski sustav koji će realno opisivati i predviđati promjene u reakciji, odlučeno je da se kalibracijski set generira iz spektara i uzoraka tijekom same reakcije. U tu svrhu načinjen je set od ukupno šest kalibracijskih eksperimenata opisan u odjeljku 3.8. i prikazan u tablici 3.2. Iako su u svakom eksperimentu spektri mjereni tijekom cijelog vremena trajanja reakcije i paralelno određivani točni udjeli spojeva HPLC analizom, za razvoj kalibracijskog modela korišteni su samo spektri nakon potpunog otapanja spoja **1** iz razloga navedenih u poglavlju 4.3. U svakom od eksperimenata varirani su parametri, brzina dodatka i količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te dobavljač polaznog spoja MTX kako bi se u kalibracijski set unijelo što više varijacija te povećala robusnost modela. Dobavljač polaznog spoja MTX variran je zato što je utvrđeno da različite šarže polaznog spoja MTX, nose najveću varijaciju u udjelu pozadinske fluorescencije. Ujedno dva navedena proizvođača trenutno se koriste u redovnoj proizvodnji omeprazola te potencijalna metoda praćenja reakcije mora biti u stanju uzeti u obzir i navedenu razliku. Na slici 4.27 su prikazani sirovi Ramanovi spektri spoja MTX, gdje je varijacija u udjelu pozadinske fluorescencije jasno vidljiva. Iz tog razloga spektri spoja MTX mjereni su uz snagu lasera od 100 mW naspram 400 mW pri kojoj su odrađena sva ostala mjerenja.

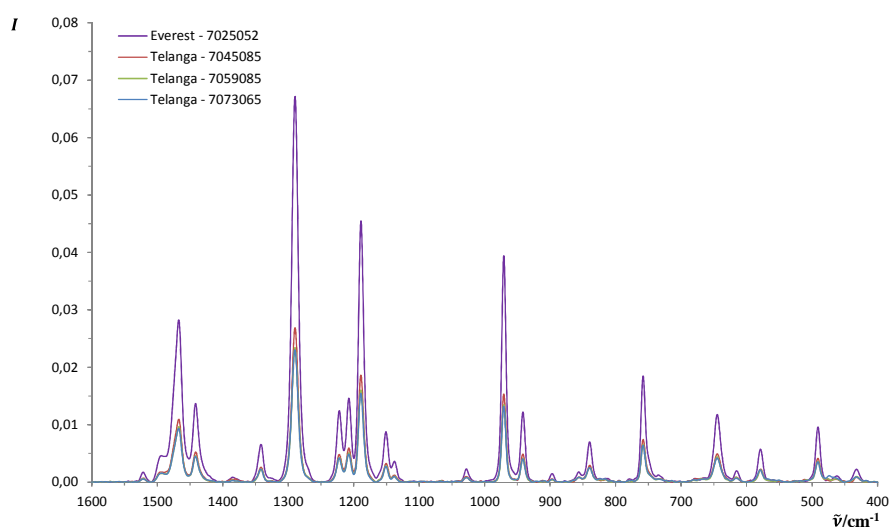


Slika 4.27. Sirovi Ramanovi spektri različitih šarži spoja MTX korištenih u kalibracijskim eksperimentima u području od 1700 cm<sup>-1</sup> do 150 cm<sup>-1</sup>.

Ramanovi spektri nakon obrade prikazani su na slici 4.29. Tu je vidljiva i razlika u relativnim Ramanovim intenzitetima između proizvođača Everest Organics i Telanga. Ta je razlika pripisana razlici u udjelu i profilu onečišćenja u MTX koju svaki od proizvođača nosi. Iako su svi korišteni materijali prošli sve analize definirane u internoj ulaznoj specifikaciji materijala, očito je da mala razlika u udjelu fluorescirajućih organskih molekula, osim utjecaja na udio pozadinske fluorescencije, u ovom slučaju negativno utječe i na odnos signala i šuma. Između krutih spojeva MTX, prikazanih na slici 4.28, vidljiva je i vizualna razlika u stupnja obojenja. Usporedbom sa slikom 4.27, također je vidljivo da povećanje stupnja obojenja prati i povećanje udjela pozadinske fluorescencije u Ramanovom spektru. S obzirom da se sinteza spoja **2** provodi bez izolacije spoja **1**, za očekivati je dakle bilo da će se navedena razlika preslikati i na spektre mjerene tijekom reakcije oksidacije spoja **1**.

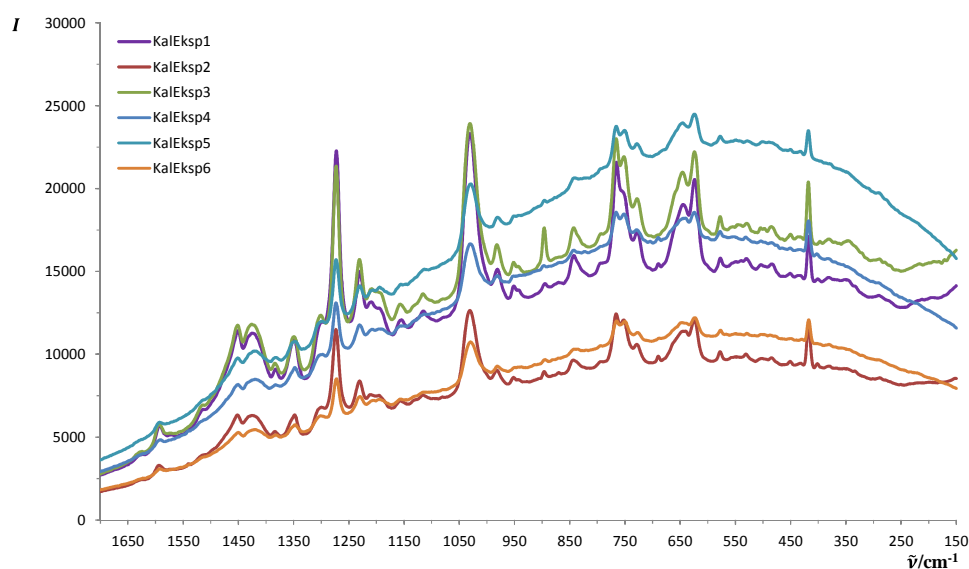


Slika 4.28. Prikaz uzoraka spoja MTX: a) Everest – 7025052, b) Telanga – 7045085, c) Telanga – 7059085 i d) Telanga – 7073065

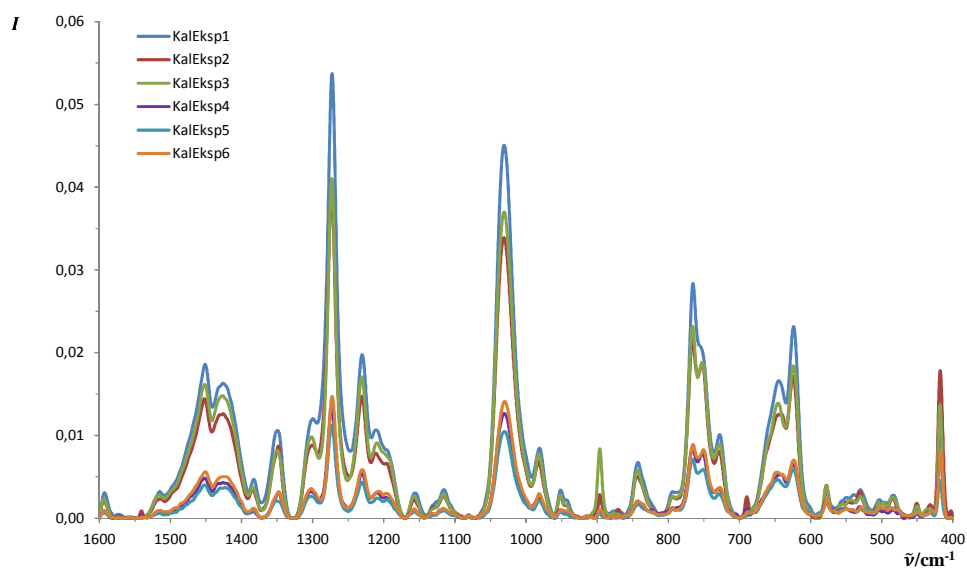


Slika 4.29. Normirani Ramanovi spektri različitih šarži spoja MTX korištenih u kalibracijskim eksperimentima uz korekciju bazne linije i u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Na slici 4.30 prikazani su sirovi Ramanovi spektri suspenzije spoja **1** prije početka dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  za svih 6 kalibracijskih eksperimenata. Vidljiv je različiti udio pozadinske fluorescencije te različit intenzitet između uzoraka odnosno različiti omjer signala i šuma u svakom zasebno. Efekt se može podijeliti u dvije grupe i to na eksperimente koje su provedeni uporabom spoja MTX od Everest Organics (KalEksp 1, 2 i 3) i Telanga (KalEksp 4, 5 i 6). Na slici 4.31 gdje su prikazani isti spektri uz obradu vektorskim normiranjem i uz korekciju bazne linije ta je razlika u relativnim Ramanovim intenzitetima još jasnije vidljiva te su intenziteti u seriji eksperimenata s MTX od proizvođača Telanga gotovo 3,5 puta manji od serije sa proizvođačem Everest.

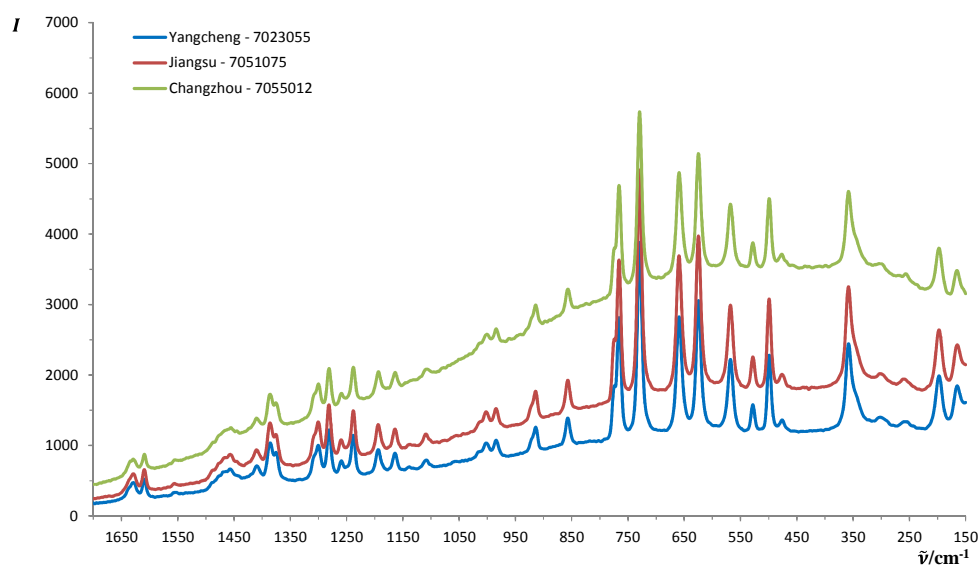


Slika 4.30. Sirovi Ramanovi spektri suspenzije spoja **1** prije dodatka  $\text{H}_2\text{O}_2$  u svih 6 kalibracijskih eksperimenata u području od  $1700\text{ cm}^{-1}$  do  $150\text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.31. Normirani Ramanovi spektri suspenzije spoja **1** prije dodatka  $\text{H}_2\text{O}_2$  u svih 6 kalibracijskih eksperimenata uz korekciju bazne linije u području od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$ .

U kalibracijskim eksperimentima korišten je i spoj OMP-Cl x HCl različitih proizvođača. U ovom slučaju nije zamijećena toliko značajan udio kao ni razlika u pozadinskoj fluorescenciji kao što je bio slučaj kod MTX. Nije bilo znatne razlike ni u relativnim Ramanovim intenzitetima nakon obrade spektara. Sirovi spektri spojeva OMP-Cl x HCl koji su bili korišteni prilikom izvedbe kalibracijskih eksperimenata, prikazani su na slici 4.32.



Slika 4.32. Sirovi Ramanovi spektri različitih proizvođača spoja OMP-Cl x HCl korištenih u kalibracijskim eksperimentima u području od  $1700 \text{ cm}^{-1}$  do  $150 \text{ cm}^{-1}$ .

## 4.7.1. Kalibracijski eksperiment 1

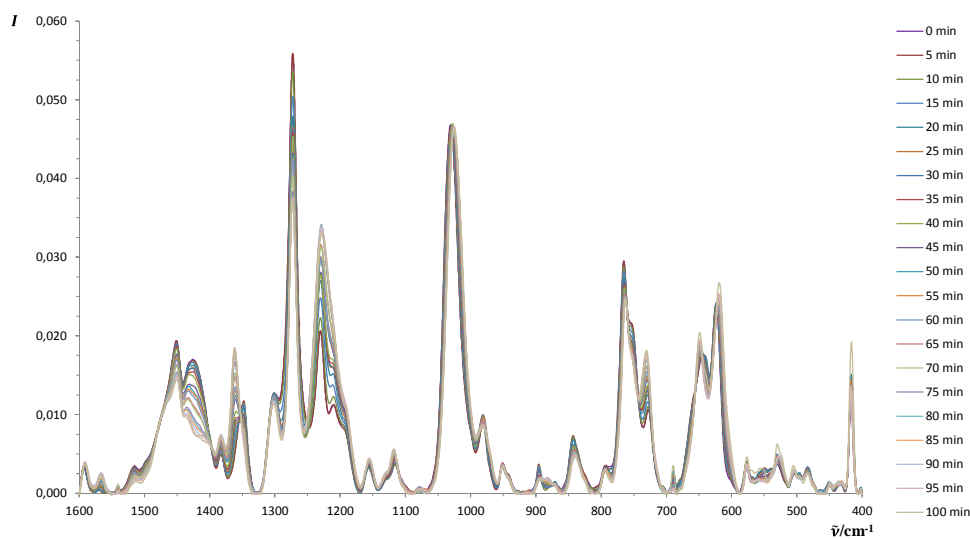
U kalibracijskom eksperimentu 1, za reakciju pripreme spoja **1** korištene su sirovine, MTX od Everest, kontrolnog broja 7025052 i OMP-Cl x HCl od Changzhou Huaren, kontrolnog broja 7055012. U reakciji pripreme spoja **2**, korišteno je 0,8 molarnih ekvivalenata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> naspram polaznog spoja MTX. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dodavan je kontinuiranom brzinom uz pomoć klipne pumpe tijekom cijelog vremena trajanja reakcije. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 Ramanov spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 10 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.5. Rezultati HPLC analiza prikazani su kao masene koncentracije i kao postotni udjeli površine signala spojeva **1**, **2** i **3**. Tijek reakcije prikazan je na slici 4.34. Iz slike je vidljivo da brzina reakcije isključivo ovisi o brini dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s obzirom da je dodavan linearnom brzinom.

Tablica 4.5. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 1.

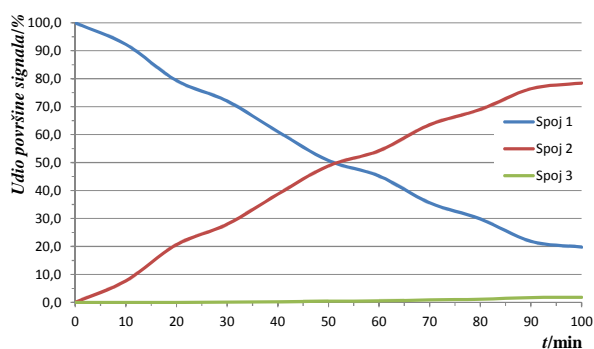
| Spektar broj   | t/min | Površina signala/MAU |        |       | $\gamma/\text{mg mL}^{-1}$ |        |      | Udio površine signala/% |      |     |
|----------------|-------|----------------------|--------|-------|----------------------------|--------|------|-------------------------|------|-----|
|                |       | 1                    | 2      | 3     | 1                          | 2      | 3    | 1                       | 2    | 3   |
| 1 <sup>a</sup> | 0     | 11186,9              | 0,0    | 0,0   | 184,56                     | 0,00   | 0,00 | 100,0                   | 0,0  | 0,0 |
| 3              | 10    | 11166,7              | 937,7  | 0,0   | 184,22                     | 13,06  | 0,00 | 92,3                    | 7,7  | 0,0 |
| 5              | 20    | 10089,2              | 2624,9 | 0,0   | 166,45                     | 36,56  | 0,00 | 79,4                    | 20,6 | 0,0 |
| 7              | 30    | 9090,3               | 3525,8 | 9,3   | 149,97                     | 49,11  | 0,14 | 72,0                    | 27,9 | 0,1 |
| 9              | 40    | 7995,9               | 5059,6 | 25,9  | 131,91                     | 70,48  | 0,38 | 61,1                    | 38,7 | 0,2 |
| 11             | 50    | 6207,4               | 5979,8 | 54,0  | 102,41                     | 83,30  | 0,80 | 50,7                    | 48,8 | 0,4 |
| 13             | 60    | 5445,4               | 6531,1 | 66,8  | 89,84                      | 90,97  | 0,99 | 45,2                    | 54,2 | 0,6 |
| 15             | 70    | 4170,2               | 7437,1 | 102,9 | 68,80                      | 103,60 | 1,53 | 35,6                    | 63,5 | 0,9 |
| 17             | 80    | 3414,0               | 7891,5 | 130,2 | 56,32                      | 109,92 | 1,93 | 29,9                    | 69,0 | 1,1 |
| 19             | 90    | 2654,5               | 9275,9 | 212,3 | 43,79                      | 129,21 | 3,15 | 21,9                    | 76,4 | 1,7 |
| 21             | 100   | 2369,0               | 9417,4 | 216,9 | 39,08                      | 131,18 | 3,22 | 19,7                    | 78,5 | 1,8 |

<sup>a</sup> Prekoncentrirani uzorak kao posljedica nehomogenog uzorkovanja 100  $\mu\text{L}$  suspenzije.





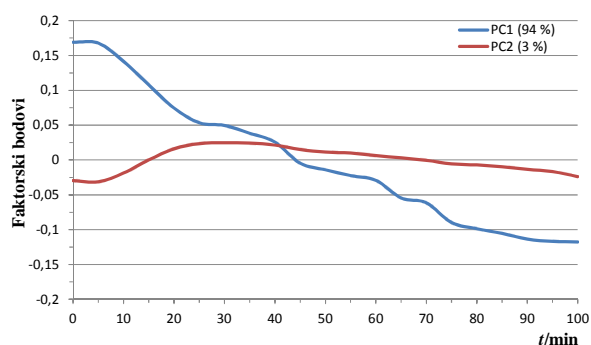
Slika 4.33. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 1 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



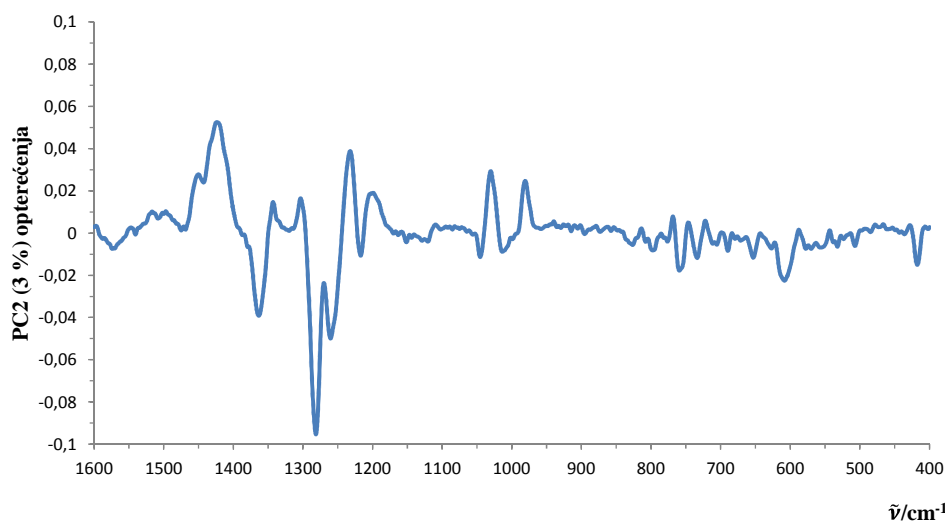
Slika 4.34. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 1 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.

Obradeni Ramanovi spektri *in-line* prikazani su na slici 4.33. Trend PC1 i PC2 faktorskih bodova prikazana je na slici 4.35. Kao i u prvom eksperimentu opisanom u poglavljima 4.2. i 4.3. do potpunog otapanja spoja **1** došlo je nakon otprilike 25 minuta dodatka  $\text{H}_2\text{O}_2$  odnosno kad je udio spoja **1** u reakcijskoj smjesi bio između 79,4 % i 72,0 %, kao što je prikazano u tablici 4.5. I u ovom slučaju PC1 opisuje tijek reakcije u smislu smanjenja udjela spoja **1**. Opterećenja po valnim brojevima gotovo su identična onim prikazanim na slici 4.19 za inicijalni eksperiment. PC2 opet dobro opisuje otapanje spoja **1** u prvih 25 minuta reakcije no za razliku od eksperimenta opisanog u poglavlju 4.3, ujedno i djelomično opisuje smanjenje udjela spoja **1** što je i vidljivo iz PC2 opterećenja, prvenstveno za vrpce pri  $1425\text{ cm}^{-1}$ . PC2 opterećenja prikazana su na slici 4.36.

Kako je tih prvih 25 minuta i za HPLC analize uzorkovana suspenzija, u Tablici 4.5 je vidljivo da je prvi uzorak van linearnog područja uslijed nehomogenog uzorkovanja. Ujedno HPLC analizom uzorka suspenzije mjeri se ukupna količina spoja **1**, a uslijed mjerenja Ramanovih spektara u suspenziji dolazi do prigušivanja signala. Time se dobiva nerazmjernost između koncentracije dobivene HPLC analizom i Ramanovog intenziteta. Iz tog razloga za kalibraciju su korišteni samo spektri u točkama 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 i 21 odnosno oni izmjereni u otopini.



Slika 4.35. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 1.



Slika 4.36. PC2 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom skupa od 21 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 1.

## 4.7.2. Kalibracijski eksperiment 2

U kalibracijskom eksperimentu 2 korišteno je 1,05 molarnih ekvivalenata  $\text{H}_2\text{O}_2$  naspram polaznog spoja MTX.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodavan je kroz lijevak za dokapavanje neravnomjernom brzinom tijekom 90 min. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 5 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.6.

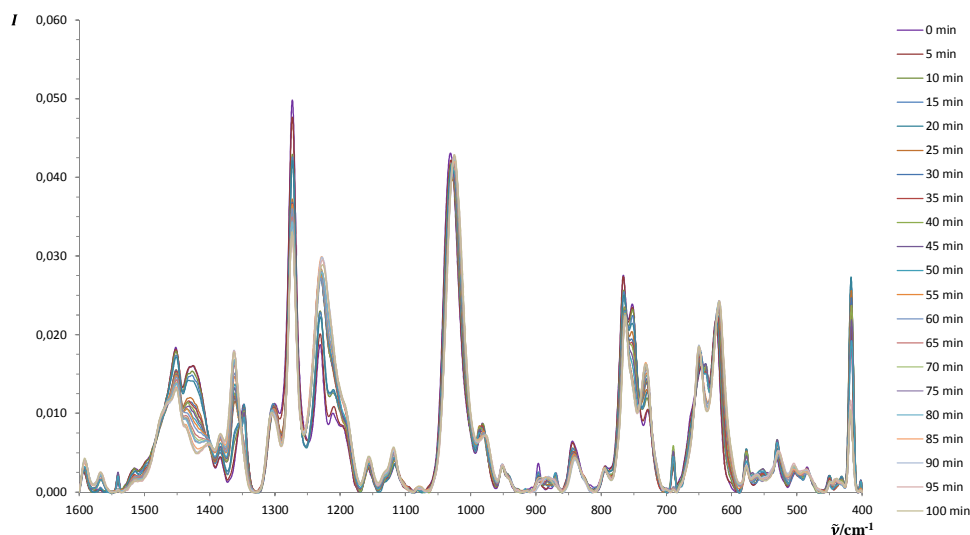
Tablica 4.6. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 2.

| Spektar broj    | t/min | Površina signala/MAU |        |       | $\gamma/\text{mg mL}^{-1}$ |        |       | Udio površine signala/% |      |     |
|-----------------|-------|----------------------|--------|-------|----------------------------|--------|-------|-------------------------|------|-----|
|                 |       | 1                    | 2      | 3     | 1                          | 2      | 3     | 1                       | 2    | 3   |
| 1               | 0     | 11274,9              | 0,0    | 0,0   | 188,04                     | 0,00   | 0,00  | 100,0                   | 0,0  | 0,0 |
| 2               | 5     | 10199,8              | 1290,4 | 0,0   | 170,11                     | 18,02  | 0,00  | 88,8                    | 11,2 | 0,0 |
| 3 <sup>a</sup>  | 10    | 9210,8               | 2841,7 | 21,8  | 153,62                     | 39,67  | 0,32  | 76,3                    | 23,5 | 0,2 |
| 4 <sup>a</sup>  | 15    | 10271,2              | 4176,5 | 33,9  | 171,30                     | 58,31  | 0,50  | 70,9                    | 28,8 | 0,2 |
| 5               | 20    | 7234,2               | 4393,3 | 45,6  | 120,65                     | 61,34  | 0,67  | 62,0                    | 37,6 | 0,4 |
| 6               | 25    | 6895,6               | 5463,9 | 82,1  | 115,00                     | 76,28  | 1,20  | 55,4                    | 43,9 | 0,7 |
| 7               | 30    | 6018,0               | 5664,7 | 76,7  | 100,37                     | 79,09  | 1,12  | 51,2                    | 48,2 | 0,7 |
| 8               | 35    | 5897,1               | 6209,2 | 98,2  | 98,35                      | 86,69  | 1,44  | 48,3                    | 50,9 | 0,8 |
| 9               | 40    | 5429,7               | 6541,4 | 104,4 | 90,56                      | 91,33  | 1,53  | 45,0                    | 54,2 | 0,9 |
| 10 <sup>a</sup> | 45    | 6390,2               | 9682,3 | 193,1 | 106,57                     | 135,18 | 2,82  | 39,3                    | 59,5 | 1,2 |
| 11 <sup>a</sup> | 50    | 4547,9               | 8527,1 | 199,6 | 75,85                      | 119,05 | 2,92  | 34,3                    | 64,2 | 1,5 |
| 12              | 55    | 2924,4               | 7955,7 | 227,2 | 48,77                      | 111,07 | 3,32  | 26,3                    | 71,6 | 2,0 |
| 13              | 60    | 2384,2               | 8027,3 | 268,7 | 39,76                      | 112,07 | 3,93  | 22,3                    | 75,2 | 2,5 |
| 14              | 65    | 2008,0               | 8122,8 | 291,4 | 33,49                      | 113,40 | 4,26  | 19,3                    | 77,9 | 2,8 |
| 15 <sup>a</sup> | 70    | 1568,0               | 7855,3 | 322,0 | 26,15                      | 109,67 | 4,71  | 16,1                    | 80,6 | 3,3 |
| 16              | 75    | 1406,0               | 8489,4 | 377,5 | 23,45                      | 118,52 | 5,52  | 13,7                    | 82,6 | 3,7 |
| 17              | 80    | 1285,2               | 8625,0 | 415,8 | 21,43                      | 120,42 | 6,08  | 12,4                    | 83,5 | 4,0 |
| 18              | 85    | 888,5                | 8416,2 | 574,8 | 14,82                      | 117,50 | 8,40  | 9,0                     | 85,2 | 5,8 |
| 19              | 90    | 569,2                | 8927,1 | 754,2 | 9,49                       | 124,63 | 11,03 | 5,6                     | 87,1 | 7,4 |
| 20              | 95    | 437,3                | 8822,8 | 786,1 | 7,29                       | 123,18 | 11,49 | 4,4                     | 87,8 | 7,8 |
| 21              | 100   | 443,0                | 9068,4 | 788,4 | 7,39                       | 126,61 | 11,53 | 4,3                     | 88,0 | 7,7 |

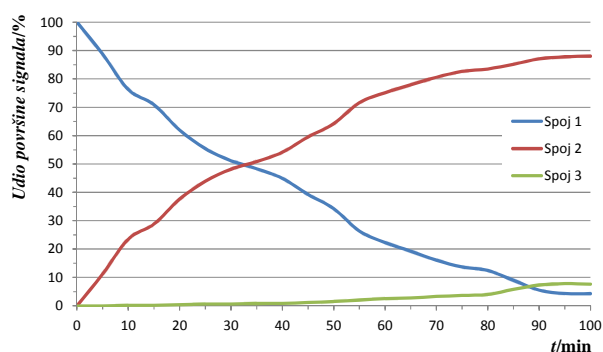
<sup>a</sup> premala ili prevelika površina uslijed netočnog uzorkovanja ili pripreme 100  $\mu\text{L}$  uzorka.

Tijek reakcije prikazan je na slici 4.38. Vidljivo je da u uzorcima 3, 4, 10, 11 i 15 dolazi do odstupanja od trenda očekivane površine signala. To se zatim negativno ogleda na

izračunate masene koncentracije. No efekt netočnog uzorkovanja ne utječe na rezultat izražen kao udio površine signala s obzirom da se radi o relativnim odnosima površina. Iz tog razloga u daljnjim eksperimentima HPLC rezultati su izražavani samo kao udio površine signala u postotcima te su iste korištene za razvoj kalibracijskog modela.



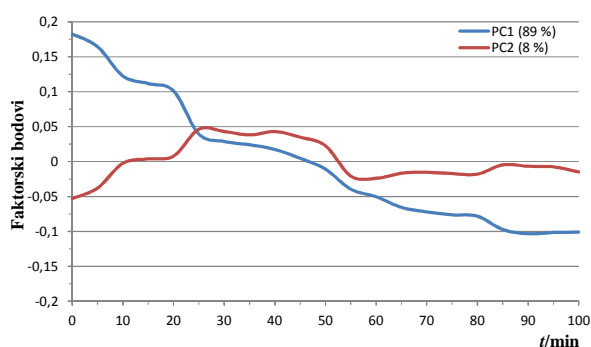
Slika 4.37. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 2 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



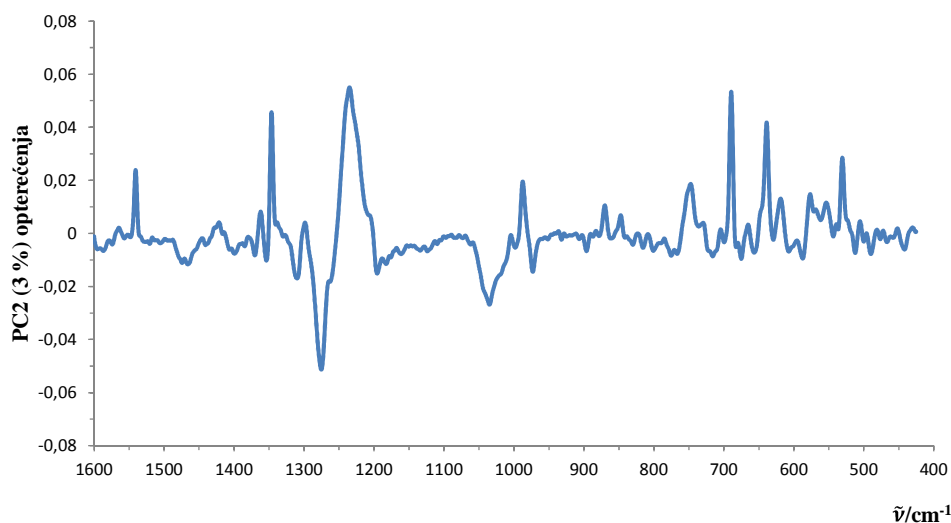
Slika 4.38. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 2 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.

U ovom je eksperimentu do potpunog otapanja spoja **1** došlo nakon otprilike 10–15 minuta dodatka  $\text{H}_2\text{O}_2$  odnosno kada je udio spoja **1** u reakcijskoj smjesi bio između 76,3 % i 70,9 % kao što je prikazano u Tablici 4.6. Iz razloga navedenih u poglavlju 4.6.1, za kalibraciju su uzeti spektri izmjereni u otopini odnosno spektri rednih brojeva od 3 do 21. Iz trenda faktorskih bodova PC1 i PC2 prikazanih na slici 4.39, vidljivo je da PC1 i u ovom eksperimentu opisuje nestajanje spoja **1** unatoč manjem udjelu opisane varijance u iznosu od

89 %. Udio varijance opisane sa PC2 raste, a time i kompleksnost promjena koju opisuje. Iz opterećenja PC2 prikazanih na slici 4.40, vidljivo je da najveća opterećenja nosi vrpca pri  $1346\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za spoj **1** i vrpca pri  $1235\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za spoj **2**. To znači da PC2 djelomično opisuje promjene u udjelu i spoja **1** i spoja **2**. Također PC2 u prvih 10 minuta opisuje otapanje spoja **1**.



Slika 4.39. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 2.



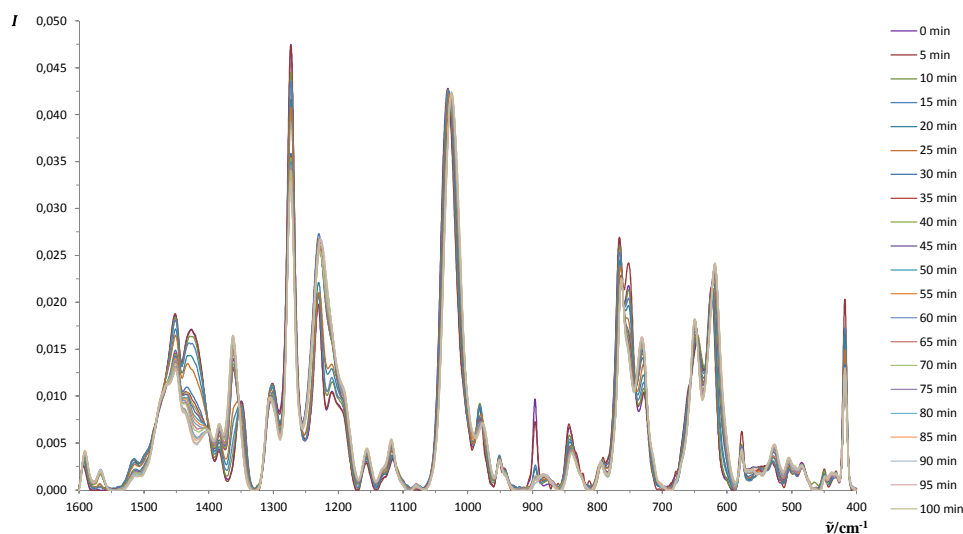
Slika 4.40. PC2 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom skupa od 21 Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 2.

## 4.7.3. Kalibracijski eksperiment 3

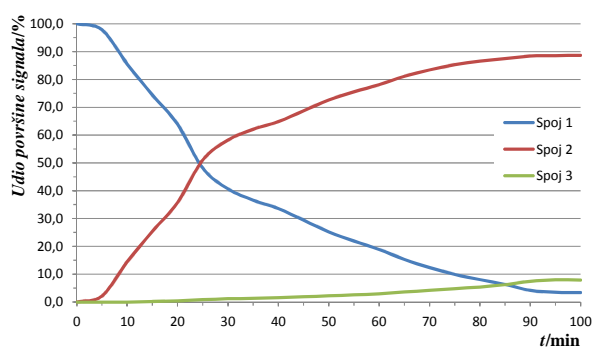
U kalibracijskom eksperimentu 3 korišteno je 1,05 molarnih ekvivalenata  $H_2O_2$  naspram polaznog spoja MTX.  $H_2O_2$  dodavan je kroz lijevak za dokapavanje neravnomjernom brzinom tijekom 80 min. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 Ramanov spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 5 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.7. Tijek reakcije prikazan je na slici 4.42. Do potpunog otapanja spoja 1 došlo je nakon 15 minuta pa su za kalibraciju uzeti spektri rednih brojeva od 4 do 21.

Tablica 4.7. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 3.

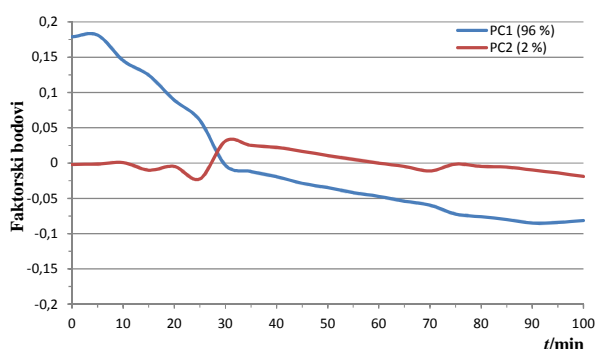
| Spektar broj | t/min | Površina signala/mAU |        |       | Udio površine signala/% |      |     |
|--------------|-------|----------------------|--------|-------|-------------------------|------|-----|
|              |       | 1                    | 2      | 3     | 1                       | 2    | 3   |
| 1            | 0     | 9038,1               | 0,0    | 0,0   | 100,0                   | 0,0  | 0,0 |
| 2            | 5     | 7481,1               | 166,5  | 0,0   | 97,8                    | 2,2  | 0,0 |
| 3            | 10    | 8963,7               | 1511,4 | 0,0   | 85,6                    | 14,4 | 0,0 |
| 4            | 15    | 9657,4               | 3291,6 | 23,3  | 74,4                    | 25,4 | 0,2 |
| 5            | 20    | 7751,8               | 4343,4 | 44,4  | 63,9                    | 35,8 | 0,4 |
| 6            | 25    | 6565,0               | 6965,3 | 117,0 | 48,1                    | 51,0 | 0,9 |
| 7            | 30    | 5374,0               | 7694,2 | 152,8 | 40,6                    | 58,2 | 1,2 |
| 8            | 35    | 4242,3               | 7191,4 | 156,5 | 36,6                    | 62,0 | 1,4 |
| 9            | 40    | 4622,8               | 8921,0 | 221,5 | 33,6                    | 64,8 | 1,6 |
| 10           | 45    | 3804,0               | 8881,0 | 243,9 | 29,4                    | 68,7 | 1,9 |
| 11           | 50    | 3042,3               | 8762,9 | 270,0 | 25,2                    | 72,6 | 2,2 |
| 12           | 55    | 2571,7               | 8867,3 | 300,3 | 21,9                    | 75,5 | 2,6 |
| 13           | 60    | 2264,2               | 9358,5 | 357,9 | 18,9                    | 78,1 | 3,0 |
| 14           | 65    | 1790,7               | 9491,2 | 419,8 | 15,3                    | 81,1 | 3,6 |
| 15           | 70    | 1437,6               | 9697,0 | 492,5 | 12,4                    | 83,4 | 4,2 |
| 16           | 75    | 1021,5               | 8787,5 | 494,6 | 9,9                     | 85,3 | 4,8 |
| 17           | 80    | 825,7                | 8865,6 | 552,9 | 8,1                     | 86,5 | 5,4 |
| 18           | 85    | 649,0                | 8986,8 | 637,9 | 6,3                     | 87,5 | 6,2 |
| 19           | 90    | 423,5                | 8962,2 | 756,7 | 4,2                     | 88,4 | 7,5 |
| 20           | 95    | 352,7                | 8983,0 | 806,7 | 3,5                     | 88,6 | 8,0 |
| 21           | 100   | 338,9                | 8811,1 | 786,1 | 3,4                     | 88,7 | 7,9 |



Slika 4.41. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 3 u području od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



Slika 4.42. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 3 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.



Slika 4.43. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 3.

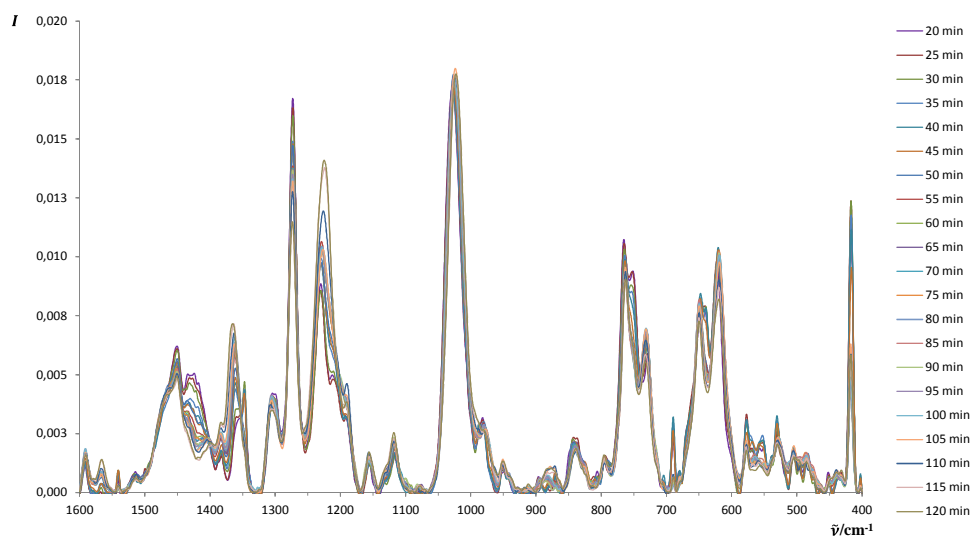
## 4.7.4. Kalibracijski eksperiment 4

U kalibracijskom eksperimentu 4 korišteno je 1,40 molarnih ekvivalenata  $\text{H}_2\text{O}_2$  naspram polaznog spoja MTX.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodavan je kroz lijevak za dokapavanje neravnomjernom brzinom tijekom 120 min. Mjerenje Ramanovih spektara započeto je nakon 20 minuta reakcije. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 Ramanov spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 5 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.8. Tijek reakcije prikazan je na slici 4.45. S obzirom da je mjerenje započeto nakon 20 minuta dodatka  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri čemu je udio spoja **1** već pao ispod 75 %, odnosno reakcijska smjesa je bila bistra otopina, za kalibraciju je uzet cijeli skup Ramanovih spektara.

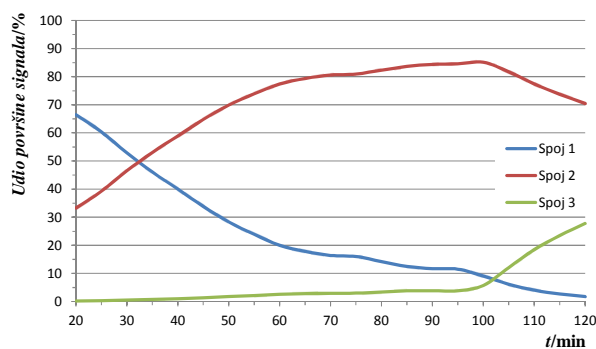
Tablica 4.8. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 4.

| Spektar broj | t/min | Površina signala/mAU |        |        | Udio površine signala/% |      |      |
|--------------|-------|----------------------|--------|--------|-------------------------|------|------|
|              |       | 1                    | 2      | 3      | 1                       | 2    | 3    |
| 1            | 20    | 6788,6               | 3398,5 | 26,5   | 66,5                    | 33,3 | 0,3  |
| 2            | 25    | 6160,6               | 4010,9 | 37,0   | 60,3                    | 39,3 | 0,4  |
| 3            | 30    | 5471,1               | 4809,5 | 58,1   | 52,9                    | 46,5 | 0,6  |
| 4            | 35    | 4776,4               | 5500,4 | 84,1   | 46,1                    | 53,1 | 0,8  |
| 5            | 40    | 4147,2               | 6101,3 | 108,1  | 40,0                    | 58,9 | 1,0  |
| 6            | 45    | 3511,6               | 6717,4 | 142,2  | 33,9                    | 64,8 | 1,4  |
| 7            | 50    | 2900,9               | 7155,2 | 180,9  | 28,3                    | 69,9 | 1,8  |
| 8            | 55    | 2460,3               | 7602,4 | 223,5  | 23,9                    | 73,9 | 2,2  |
| 9            | 60    | 2068,7               | 7984,4 | 265,1  | 20,0                    | 77,4 | 2,6  |
| 10           | 65    | 1829,2               | 8134,6 | 286,6  | 17,8                    | 79,4 | 2,8  |
| 11           | 70    | 1693,2               | 8301,8 | 305,9  | 16,4                    | 80,6 | 3,0  |
| 12           | 75    | 1651,5               | 8339,2 | 311,2  | 16,0                    | 80,9 | 3,0  |
| 13           | 80    | 1453,2               | 8406,9 | 351,1  | 14,2                    | 82,3 | 3,4  |
| 14           | 85    | 1296,8               | 8647,4 | 394,7  | 12,5                    | 83,6 | 3,8  |
| 15           | 90    | 1214,7               | 8728,3 | 402,4  | 11,7                    | 84,4 | 3,9  |
| 16           | 95    | 1177,2               | 8630,8 | 395,5  | 11,5                    | 84,6 | 3,9  |
| 17           | 100   | 910,7                | 8500,3 | 574,9  | 9,1                     | 85,1 | 5,8  |
| 18           | 105   | 589,2                | 7811,9 | 1154,9 | 6,2                     | 81,7 | 12,1 |
| 19           | 110   | 390,8                | 7423,8 | 1775,7 | 4,1                     | 77,4 | 18,5 |
| 20           | 115   | 250,7                | 6702,2 | 2131,7 | 2,8                     | 73,8 | 23,5 |
| 21           | 120   | 160,9                | 6362,5 | 2509,1 | 1,8                     | 70,4 | 27,8 |

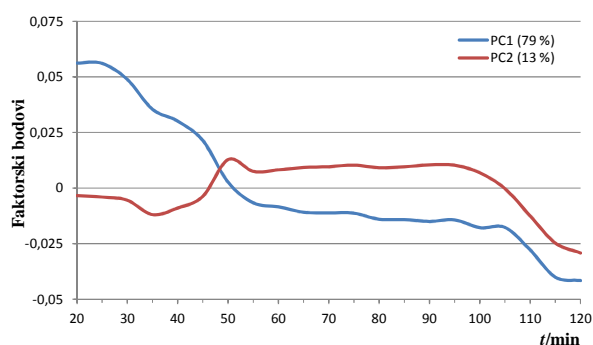




Slika 4.44. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 4 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



Slika 4.45. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 4 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.



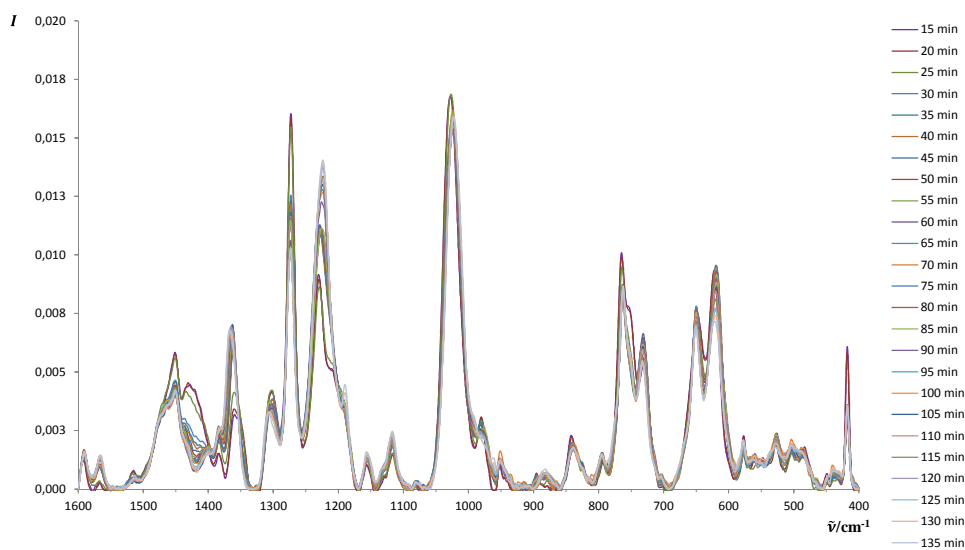
Slika 4.46. Trend faktorskih bodova PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 4.

## 4.7.5. Kalibracijski eksperiment 5

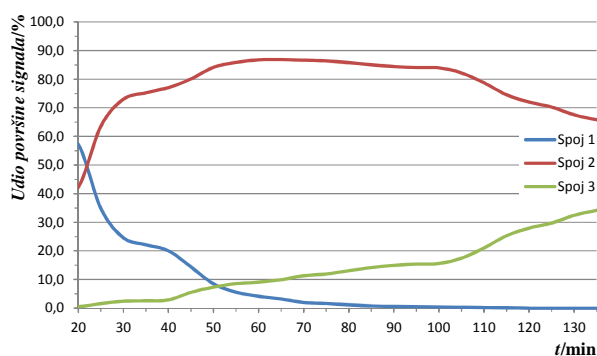
U kalibracijskom eksperimentu 5 korišteno je 1,40 molarnih ekvivalenata  $H_2O_2$  naspram polaznog spoja MTX.  $H_2O_2$  dodavan je kroz lijevak za dokapavanje neravnomjernom brzinom tijekom 120 min. Mjerenje Ramanovih spektara započeto je nakon 20 minuta reakcije. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 5 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.9. Za kalibraciju je, kao i u eksperimentu 4, uzet cijeli skup Ramanovih spektara.

Tablica 4.9. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 5.

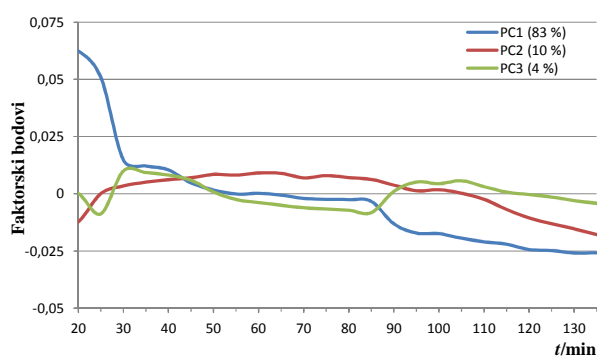
| Spektar broj | t/min | Površina signala/mAU |        |        | Udio površine signala/% |      |      |
|--------------|-------|----------------------|--------|--------|-------------------------|------|------|
|              |       | 1                    | 2      | 3      | 1                       | 2    | 3    |
| 1            | 15    | 6296,6               | 4256,1 | 49,3   | 59,4                    | 40,1 | 0,5  |
| 2            | 20    | 6607,8               | 4885,2 | 58,7   | 57,2                    | 42,3 | 0,5  |
| 3            | 25    | 3669,4               | 6678,4 | 167,4  | 34,9                    | 63,5 | 1,6  |
| 4            | 30    | 2581,1               | 7649,1 | 252,4  | 24,6                    | 73,0 | 2,4  |
| 5            | 35    | 2313,0               | 7863,0 | 270,5  | 22,1                    | 75,3 | 2,6  |
| 6            | 40    | 2130,1               | 8193,8 | 305,6  | 20,0                    | 77,1 | 2,9  |
| 7            | 45    | 1461,2               | 8124,9 | 559,1  | 14,4                    | 80,1 | 5,5  |
| 8            | 50    | 864,8                | 8548,1 | 745,8  | 8,5                     | 84,1 | 7,3  |
| 9            | 55    | 554,8                | 8539,6 | 851,3  | 5,6                     | 85,9 | 8,6  |
| 10           | 60    | 401,1                | 8357,1 | 874,5  | 4,2                     | 86,8 | 9,1  |
| 11           | 65    | 320,9                | 8735,0 | 999,8  | 3,2                     | 86,9 | 9,9  |
| 12           | 70    | 202,2                | 8704,4 | 1138,1 | 2,0                     | 86,7 | 11,3 |
| 13           | 75    | 161,4                | 8625,3 | 1193,4 | 1,6                     | 86,4 | 12,0 |
| 14           | 80    | 113,3                | 8585,2 | 1304,6 | 1,1                     | 85,8 | 13,0 |
| 15           | 85    | 72,2                 | 8269,4 | 1381,4 | 0,7                     | 85,0 | 14,2 |
| 16           | 90    | 58,4                 | 8369,3 | 1486,8 | 0,6                     | 84,4 | 15,0 |
| 17           | 95    | 48,3                 | 8305,3 | 1522,0 | 0,5                     | 84,1 | 15,4 |
| 18           | 100   | 42,7                 | 8351,7 | 1551,6 | 0,4                     | 84,0 | 15,6 |
| 19           | 105   | 31,8                 | 8095,3 | 1719,3 | 0,3                     | 82,2 | 17,5 |
| 20           | 110   | 19,6                 | 7521,6 | 2010,1 | 0,2                     | 78,7 | 21,0 |
| 21           | 115   | 12,1                 | 6961,0 | 2362,8 | 0,1                     | 74,6 | 25,3 |
| 22           | 120   | 0,0                  | 6689,5 | 2597,2 | 0,0                     | 72,0 | 28,0 |
| 23           | 125   | 0,0                  | 6462,9 | 2733,7 | 0,0                     | 70,3 | 29,7 |
| 24           | 130   | 0,0                  | 6726,6 | 3233,4 | 0,0                     | 67,5 | 32,5 |
| 25           | 135   | 0,0                  | 5844,0 | 3036,6 | 0,0                     | 65,8 | 34,2 |



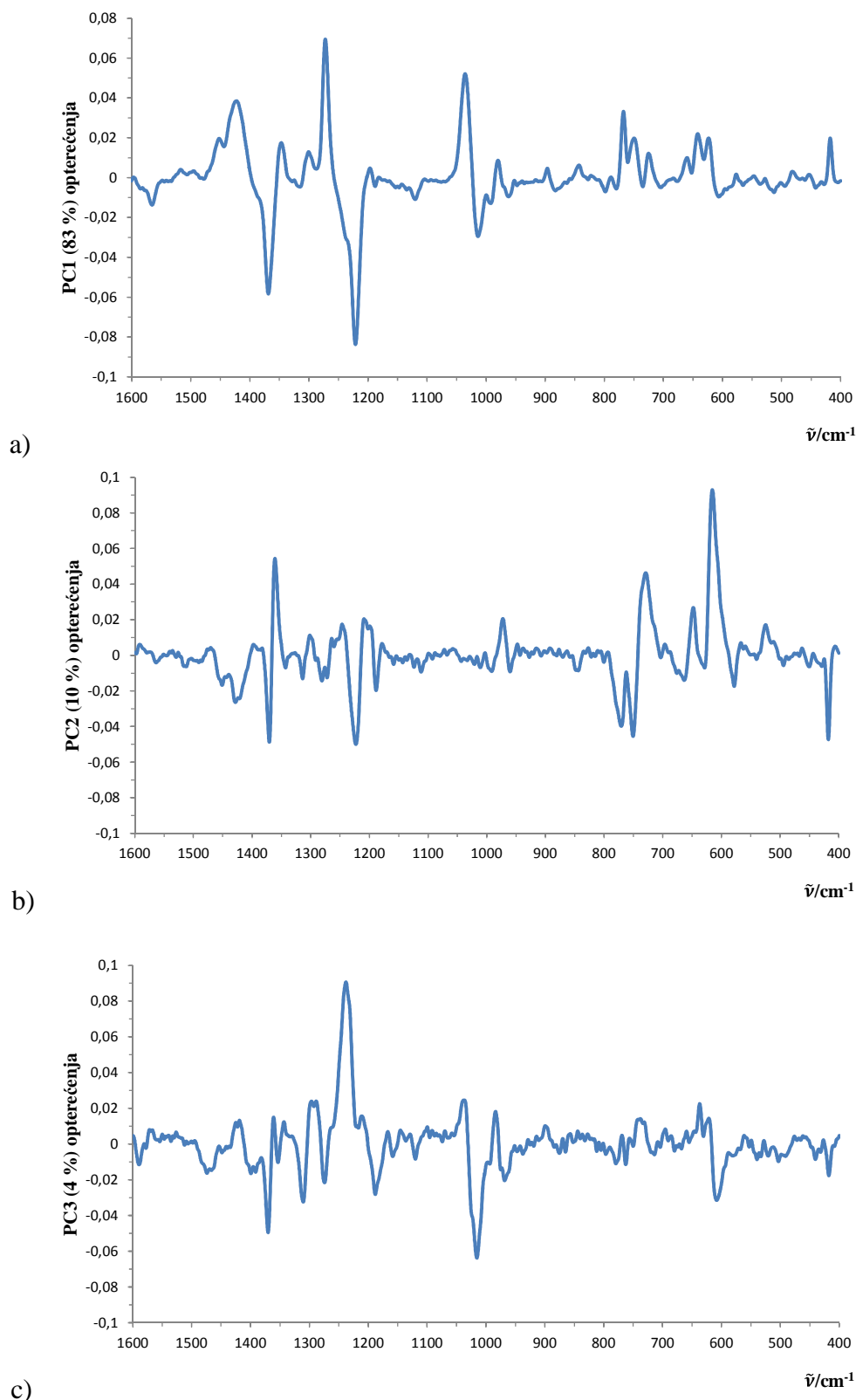
Slika 4.47. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 5 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



Slika 4.48. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 5 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.



Slika 4.49. Faktorski bodovi PC1, PC2 i PC3 kroz vrijeme dobiveni PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 5.



Slika 4.50. a) PC1, b) PC2 i c) PC3 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 5.

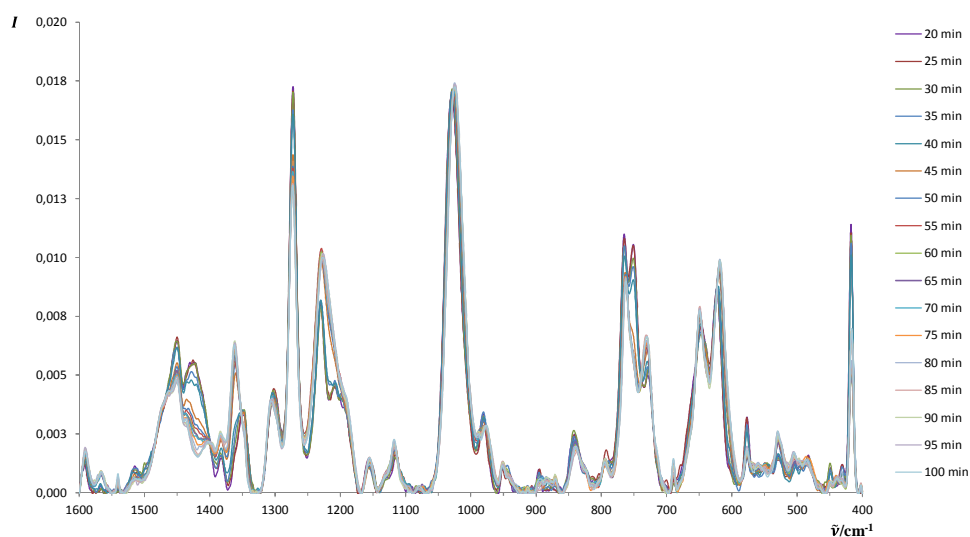
Na slici 4.49 prikazan je trend faktorskih bodova za prve tri glavne komponente. Kako je u ovom eksperimentu ciljano producirana veći udio spoja **3**, to se ogledalo na smanjenje varijance opisane sa PC1 i na povećanje varijance opisane sa PC2 i PC3. Opterećenja po valnim brojevima za PC1 slična su kao i za inicijalni eksperiment čija su PC1 opterećenja prikazana na slici 4.19a osim što u ovom slučaju pozitivno opterećenje nosi i vrpca pri  $730\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za spoj **2**. To znači da PC1 uz trošenje spoja **1**, djelomično opisuje i trošenje spoja **2** nakon što je udio spoja **1** pao ispod 1,0 % odnosno nakon 85 minuta reakcije kao što je i vidljivo na slici 4.48. PC2 nosi najveća pozitivna opterećenja za vrpce pri  $1362\text{ cm}^{-1}$  i  $730\text{ cm}^{-1}$ , karakteristične za spoj **2** što znači da dobro opisuje trend udjela spoja **2** kroz vrijeme. To je i vidljivo usporedbom HPLC i PC2 trendova na slikama 4.48 i 4.49. Konačno, vrpca s najvećim pozitivnim opterećenjem za PC3 je pri  $1229\text{ cm}^{-1}$  karakteristična i za spoj **2** i za spoj **3**.

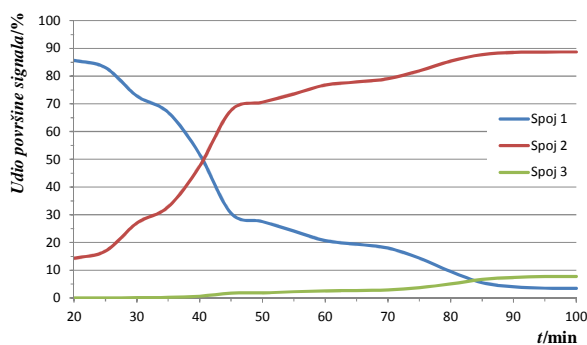
#### 4.7.6. Kalibracijski eksperiment 6

U kalibracijskom eksperimentu 6 korišteno je 1,05 molarnih ekvivalenata  $\text{H}_2\text{O}_2$  naspram polaznog spoja MTX.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodavan je kroz lijevak za dokapavanje neravnomjernom brzinom tijekom 85 min. Mjerenje Ramanovih spektara započeto je nakon 20 minuta reakcije. Za vrijeme eksperimenta izmjeren je 21 Ramanov spektar, a uzorci za HPLC analizu uzimani su svakih 5 minuta odmah po mjerenju spektra. Rezultati su prikazani u tablici 4.10. Tijek reakcije prikazan je na slici 4.52. Do potpunog otapanja spoja **1** došlo je nakon otprilike 30 minuta pa su za kalibraciju uzeti spektri rednih brojeva od 3 do 17.

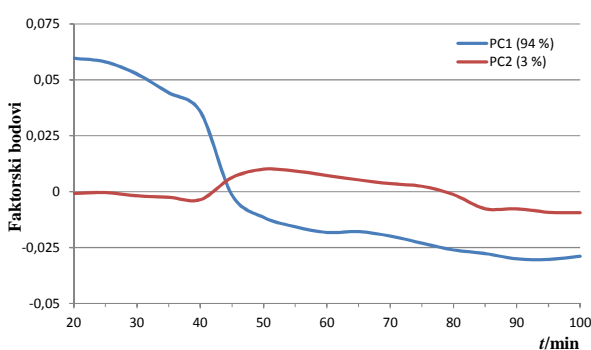
Tablica 4.10. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom kalibracijskog eksperimenta 6.

| Spektar broj | t/min | Površina signala/mAU |        |       | Udio površine signala/% |      |     |
|--------------|-------|----------------------|--------|-------|-------------------------|------|-----|
|              |       | 1                    | 2      | 3     | 1                       | 2    | 3   |
| 1            | 20    | 10456,0              | 1747,1 | 0,0   | 85,7                    | 14,3 | 0,0 |
| 2            | 25    | 10658,9              | 2169,8 | 0,0   | 83,1                    | 16,9 | 0,0 |
| 3            | 30    | 7629,8               | 2829,9 | 15,8  | 72,8                    | 27,0 | 0,2 |
| 4            | 35    | 6934,9               | 3409,3 | 22,6  | 66,9                    | 32,9 | 0,2 |
| 5            | 40    | 5243,3               | 4807,7 | 65,5  | 51,8                    | 47,5 | 0,6 |
| 6            | 45    | 3099,6               | 6859,6 | 176,1 | 30,6                    | 67,7 | 1,7 |
| 7            | 50    | 2622,8               | 6717,3 | 174,9 | 27,6                    | 70,6 | 1,8 |
| 8            | 55    | 2493,7               | 7594,5 | 233,9 | 24,2                    | 73,6 | 2,3 |
| 9            | 60    | 2125,4               | 7892,3 | 262,5 | 20,7                    | 76,8 | 2,6 |
| 10           | 65    | 2019,5               | 8105,8 | 281,5 | 19,4                    | 77,9 | 2,7 |
| 11           | 70    | 1871,7               | 8225,1 | 302,6 | 18,0                    | 79,1 | 2,9 |
| 12           | 75    | 1468,7               | 8385,3 | 381,3 | 14,3                    | 81,9 | 3,7 |
| 13           | 80    | 1043,8               | 9374,4 | 555,1 | 9,5                     | 85,4 | 5,1 |
| 14           | 85    | 553,5                | 8812,1 | 672,5 | 5,5                     | 87,8 | 6,7 |
| 15           | 90    | 405,4                | 8881,0 | 742,1 | 4,0                     | 88,6 | 7,4 |
| 16           | 95    | 356,2                | 8939,4 | 782,1 | 3,5                     | 88,7 | 7,8 |
| 17           | 100   | 350,3                | 8889,4 | 779,8 | 3,5                     | 88,7 | 7,8 |

Slika 4.51. Normirani Ramanovi spektri *in-line* kalibracijskog eksperimenta 6 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



Slika 4.52. Tijek reakcije kalibracijskog eksperimenta 6 prikazan kao promjena postotnog udjela površine signala kroz vrijeme.

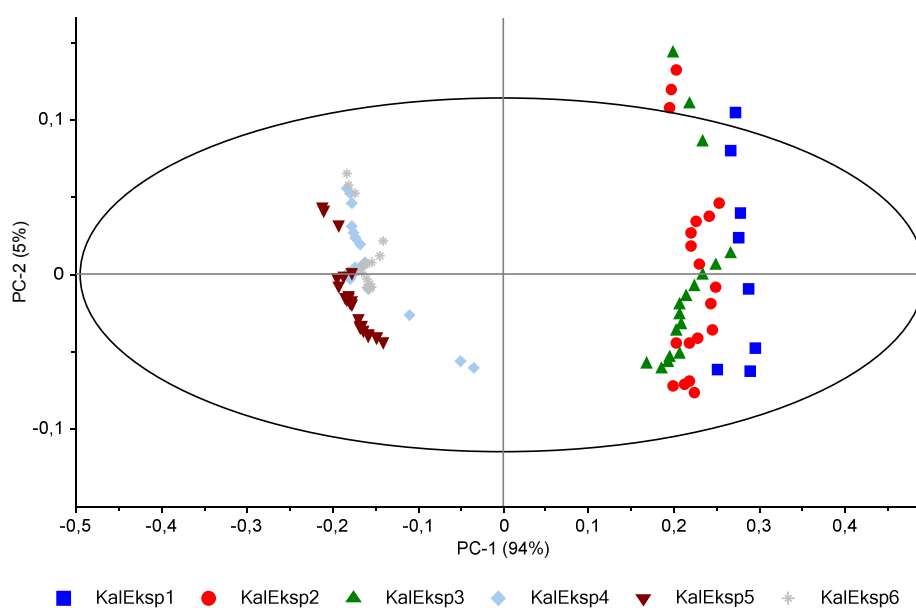


Slika 4.53. Faktorski bodovi PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kalibracijskog eksperimenta 6.

#### 4.8. Razvoj kalibracijskog modela metodom PLSR

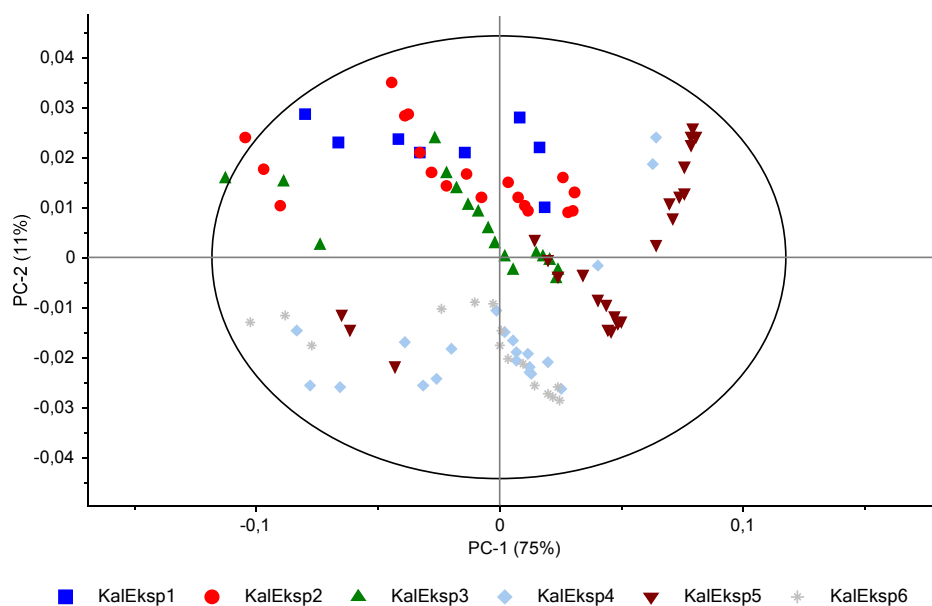
Nakon svih provedenih eksperimenata, za razvoj kalibracijskog modela iskorišteno je ukupno 105 Ramanovih spektara. Kako se pokazalo da način uzorkovanja reakcijske smjese i određivanje masene koncentracije uzorka nije pogodna metoda za komplementarne vrijednosti zbog velikih mogućih grešaka u uzorkovanju, za matricu odziva prilikom regresijskih analiza, korišteni su relativni udjeli površina signala izraženi u postotcima. Kompletni skup spektara obrađen je na dva različita načina kao što je opisano u odjeljku 3.9. Ramanovi spektri obrađeni vektorskim normiranjem i korekcijom bazne linije, analizirani su metodom PCA kako bi se utvrdila kvaliteta seta te odabrao kalibracijski i validacijski skup podataka za model. Rezultati raspodjele PC1 i PC2 faktorskih bodova, prikazani su na slici 4.54. Vidljivo je da se faktorski bodovi raspodjeljuju u dva diskretna skupa, a na temelju opterećenja PC1 vidljivo je da se takva podjela temelji na razlici u relativnim intenzitetim s

obzirom da PC1 opterećenja zapravo prikazuju srednji spektar dva skupa. Takav opaženi efekt povezan je polaznim spojem MTX koji je korišten prilikom provedbe kalibracijskih eksperimenata. Kao što je opisano na početku odjeljka 4.6, različiti udio fluorescirajućih organskih onečišćenja uzrokovao je razliku u relativnim intenzitetima između tih eksperimenata. Cjelokupni skup korigiran je metodom MSC. Raspodjela faktorskih bodova PC1 naspram PC2 te PC2 naspram PC3 nakon korekcije seta metodom MSC prikazani su na slikama 4.55 i 4.56. Vidljivo je da znatno opada udio varijance objašnjen s PC1 te da PC1, PC2 i PC3 sada značajnije opisuju realne kemijske promjene. Iako osnovna namjena metode MSC nije ovakav tip korekcije spektara, u ovome se slučaju pokazala kao iznimno kvalitetno rješenje koje, kao što će biti prikazano na rezultatima regresije, nije narušila kvalitetu informacija o kemijskim promjenama tijekom reakcije.

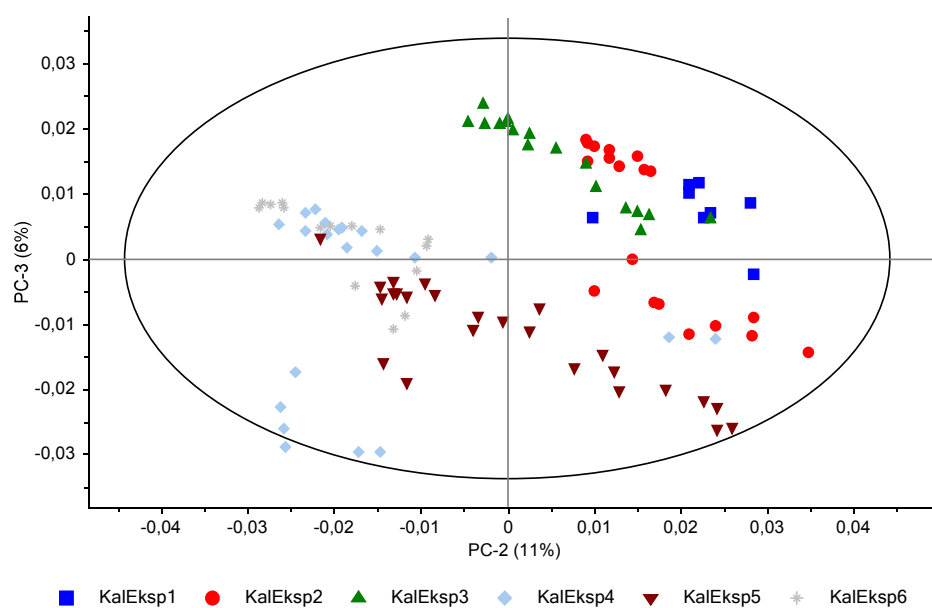


Slika 4.54. Raspodjela PC1 i PC2 faktorskih bodova za skup od 105 spektara obrađenih vektorskim normiranjem i korekciju bazne linije.



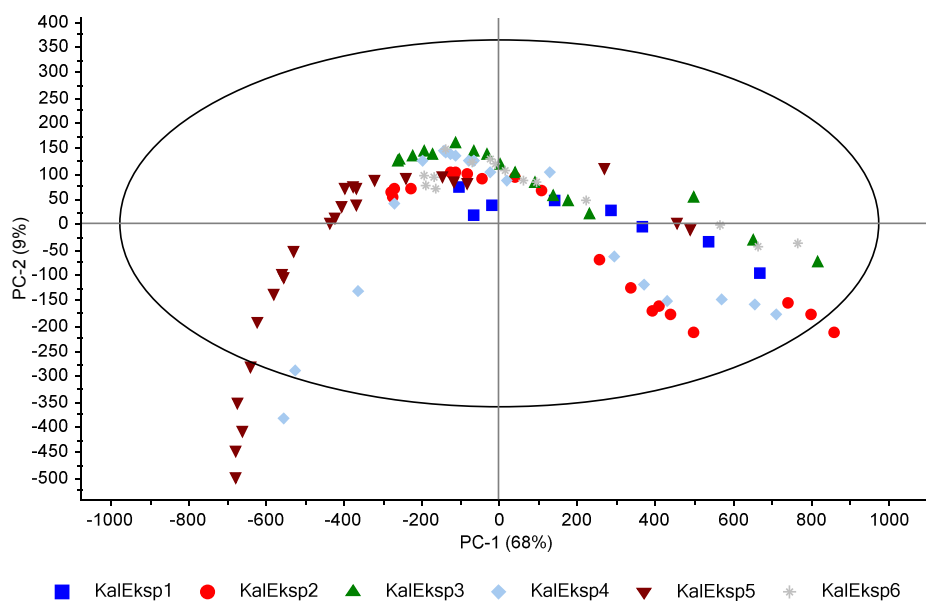


Slika 4.55. Raspodjela PC1 i PC2 faktorskih bodova za skup od 105 spektara uz dodatnu korekciju metodom MSC.

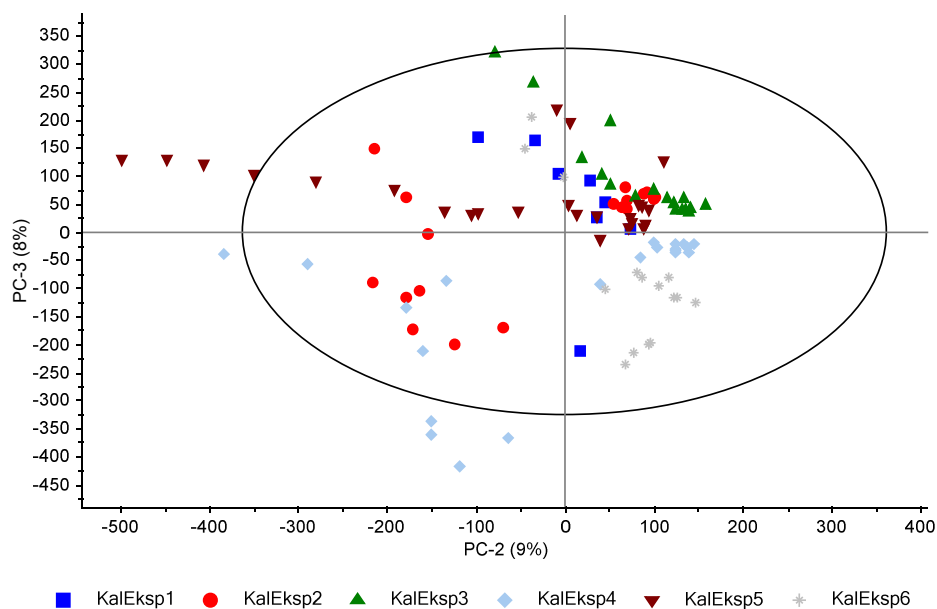


Slika 4.56. Raspodjela PC2 i PC3 faktorskih bodova za skup od 105 spektara uz dodatnu korekciju metodom MSC.

PCA analiza prve derivacije seta podataka uz obradu metodom MSC prikazana je na slikama 4.57 i 4.58.



Slika 4.57. Raspodjela PC1 i PC2 faktorskih bodova prve derivacije skupa od 105 spektara uz korekciju metodom MSC.

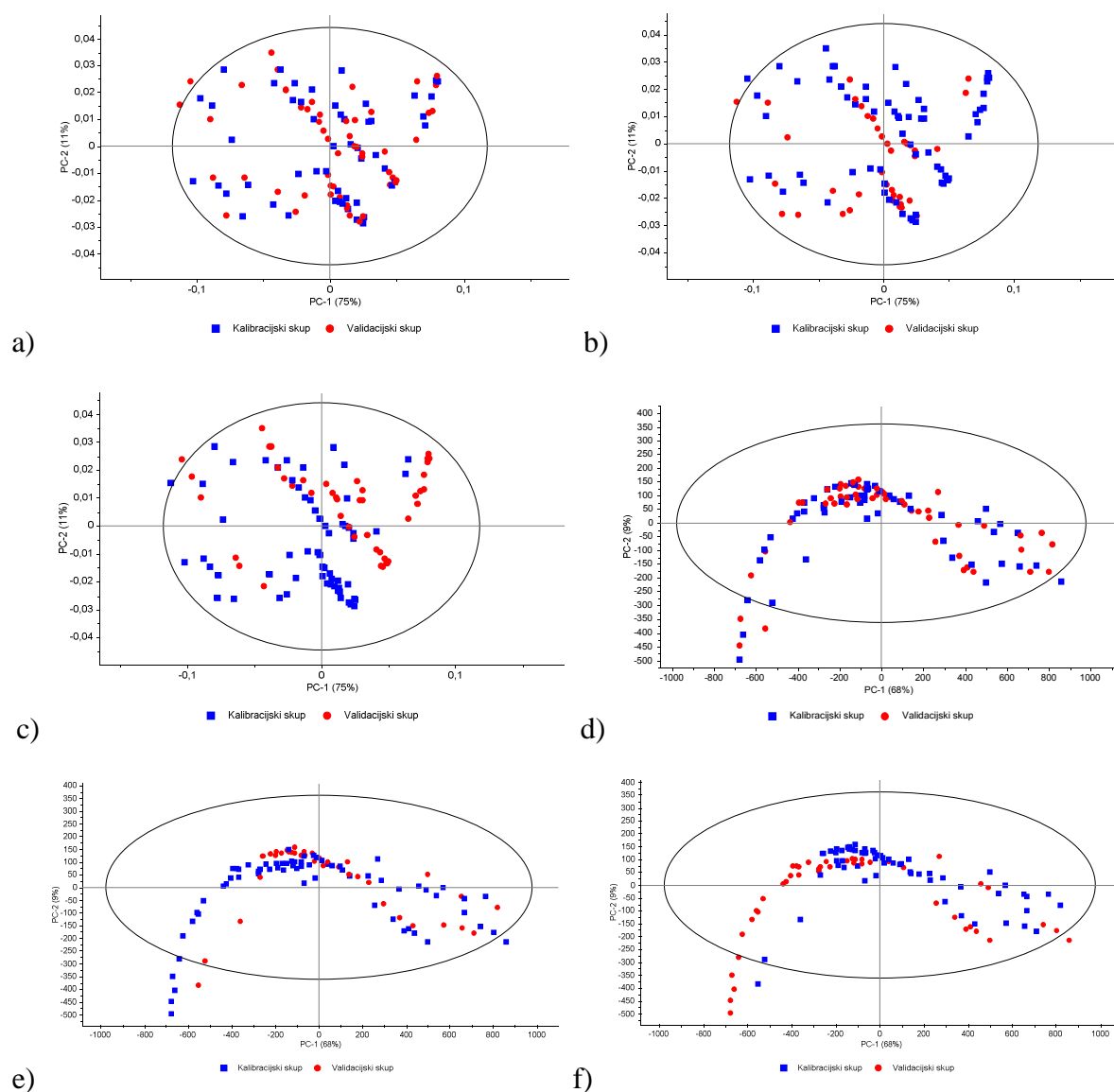


Slika 4.57. Raspodjela PC2 i PC3 faktorskih bodova prve derivacije skupa od 105 spektara uz korekciju metodom MSC.

Iteracije regresija metodom PLSR načinjene su kako bi se našla optimalna metoda obrade spektara, područje valnih brojeva prilikom kalibracije i metoda validacije modela. U tu svrhu iterativno su mijenjani parametri: metoda obrade, područje valnih brojeva za kalibraciju, te validacijska metoda, a u slučaju validacije iz skupa, optimalan validacijski skup. Rezultati su prikazani u tablicama 4.11 i 4.12. Broj faktora prikazan za svaki model, bio je onaj koji je davao najnižu vrijednost RMSEP za svaku od komponenti. Objašnjenje oznaka modela pod generalnom šifrom x-y-z je sljedeća:

- x = 1a – obrada spektara vektorskim normiranjem i korekcijom bazne linije.
- x = 1 – obrada spektara vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i korekcijom višestrukog raspršenja.
- x = 2a – prva derivacija spektara.
- x = 2 – prva derivacija spektara uz korekciju višestrukog raspršenja.
- y = A – validacija iz skupa – dobiven automatskim odabirom 50 % uzoraka na temelju faktorskih bodova PC1 i PC2 komponente (52 kalibracijska i 53 validacijska) u programu OPUS.
- y = B – validacija iz skupa – za skup su uzeti KalEksp3 i KalEksp4 (67 kalibracijska i 38 validacijska).
- y = C – validacija iz skupa – za skup su uzeti KalEksp2 i KalEksp5 (61 kalibracijska i 44 validacijska).
- y = D – križna validacija u 21 segment (izostavlja 5 uzoraka za validaciju modela po segmentu).
- z = 1 – za kalibraciju je korišteno cijelo područje od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ .
- z = 2 – izuzete su vrpce safira, za kalibraciju su korištena područja:  $1600\text{--}758\text{ cm}^{-1}$ ,  $741\text{--}588\text{ cm}^{-1}$  i  $571\text{--}425\text{ cm}^{-1}$ .
- z = 3 – model dobiven funkcijom optimizacije u programu OPUS koja traži minimum vrijednosti RMSEP, mijenjajući pri tome područja valnih brojeva za kalibraciju i validaciju modela.
- z = 4 – izuzete su vrpce safira i metanola, za kalibraciju su korištena područja:  $1600\text{--}1534\text{ cm}^{-1}$ ,  $1444\text{--}1179\text{ cm}^{-1}$ ,  $962\text{--}757\text{ cm}^{-1}$ ,  $741\text{--}587\text{ cm}^{-1}$ ,  $572\text{--}426\text{ cm}^{-1}$ .

Na slici 4.59 prikazana su PC1 i PC2 raspodjele za slučajeve x = 1, a y = A, B i C te x = 2, a y = A, B i C.



Slika 4.59. Raspodjela PC1 i PC2 faktorskih bodova za metodu obrade 1 i validacijski skup a) A, b) B i c) C te metodu obrade 2 i validacijski skup d) A, e) B i f) C.

Tablica 4.11. Rezultati PLSR modela validiranih iz skupa.

| Oznaka<br>Modela | $R^2/\%$ |       |       | RMSEP/% area |      |      | Broj faktora |   |    | Mahalanobis-ova<br>udaljenost |      |      |
|------------------|----------|-------|-------|--------------|------|------|--------------|---|----|-------------------------------|------|------|
|                  | 1        | 2     | 3     | 1            | 2    | 3    | 1            | 2 | 3  | 1                             | 2    | 3    |
| 1a-A-1           | 93,72    | 93,52 | 95,89 | 5,41         | 4,48 | 1,57 | 8            | 8 | 9  | 0,63                          | 0,61 | 0,73 |
| 1a-A-2           | 93,53    | 93,24 | 96,00 | 5,49         | 4,58 | 1,55 | 7            | 8 | 8  | 0,55                          | 0,57 | 0,63 |
| 1-A-1            | 99,80    | 99,73 | 99,81 | 0,96         | 0,91 | 0,34 | 6            | 5 | 9  | 0,41                          | 0,40 | 0,59 |
| 1-A-2            | 99,80    | 99,68 | 99,78 | 0,97         | 0,99 | 0,36 | 4            | 5 | 8  | 0,27                          | 0,36 | 0,52 |
| 1-A-3            | 99,86    | 99,78 | 99,80 | 0,82         | 0,83 | 0,35 | 4            | 4 | 8  | 0,35                          | 0,33 | 0,56 |
| 1-A-4            | 99,75    | 99,63 | 99,69 | 1,09         | 1,08 | 0,43 | 4            | 4 | 7  | 0,30                          | 0,35 | 0,45 |
| 1a-B-1           | 83,09    | 77,50 | 84,72 | 8,02         | 7,89 | 2,36 | 2            | 2 | 5  | 0,14                          | 0,15 | 0,32 |
| 1a-B-2           | 78,61    | 83,36 | 83,98 | 9,02         | 6,78 | 2,42 | 2            | 6 | 10 | 0,14                          | 0,37 | 0,60 |
| 1-B-1            | 99,51    | 99,55 | 98,68 | 1,37         | 1,11 | 0,69 | 5            | 3 | 5  | 0,24                          | 0,19 | 0,27 |
| 1-B-2            | 99,64    | 99,45 | 98,71 | 1,17         | 1,24 | 0,29 | 3            | 4 | 4  | 0,18                          | 0,23 | 0,24 |
| 1-B-3            | 99,87    | 99,75 | 99,60 | 0,72         | 0,83 | 0,38 | 3            | 3 | 9  | 0,22                          | 0,21 | 0,43 |
| 1-B-4            | 99,65    | 99,39 | 98,74 | 1,15         | 1,30 | 0,68 | 3            | 2 | 6  | 0,19                          | 0,15 | 0,31 |
| 1-C-1            | 99,14    | 99,18 | 98,58 | 2,08         | 1,58 | 1,11 | 4            | 7 | 10 | 0,25                          | 0,53 | 0,66 |
| 1-C-2            | 98,80    | 98,28 | 99,77 | 2,45         | 2,28 | 0,44 | 4            | 4 | 10 | 0,29                          | 0,38 | 0,65 |
| 1-C-3            | 99,63    | 99,68 | 99,72 | 1,36         | 0,99 | 0,50 | 5            | 5 | 9  | 0,38                          | 0,39 | 0,58 |
| 1-C-4            | 99,21    | 98,25 | 99,61 | 1,99         | 2,30 | 0,58 | 3            | 3 | 8  | 0,29                          | 0,35 | 0,51 |
| 2a-A-1           | 90,17    | 89,56 | 97,29 | 6,99         | 6,03 | 1,19 | 7            | 7 | 7  | 0,48                          | 0,50 | 0,46 |
| 2-A-1            | 99,64    | 99,49 | 99,50 | 1,35         | 1,34 | 0,51 | 7            | 4 | 5  | 0,48                          | 0,43 | 0,41 |
| 2-A-2            | 99,75    | 99,59 | 99,51 | 1,11         | 1,19 | 0,51 | 6            | 4 | 4  | 0,56                          | 0,35 | 0,36 |
| 2-A-4            | 99,70    | 99,59 | 99,61 | 1,23         | 1,20 | 0,45 | 5            | 4 | 4  | 0,43                          | 0,33 | 0,37 |
| 2-B-1            | 99,51    | 99,42 | 98,57 | 1,37         | 1,27 | 0,72 | 5            | 4 | 5  | 0,26                          | 0,23 | 0,31 |
| 2-B-2            | 99,64    | 99,29 | 99,28 | 1,18         | 1,40 | 0,51 | 5            | 4 | 3  | 0,27                          | 0,25 | 0,22 |
| 2-B-4            | 99,84    | 99,55 | 98,31 | 0,78         | 1,12 | 0,79 | 4            | 4 | 3  | 0,23                          | 0,24 | 0,23 |
| 2-C-1            | 99,60    | 99,28 | 99,62 | 1,42         | 1,47 | 0,57 | 4            | 7 | 5  | 0,26                          | 0,53 | 0,41 |
| 2-C-2            | 99,64    | 99,23 | 99,76 | 1,34         | 1,53 | 0,45 | 7            | 5 | 4  | 0,53                          | 0,41 | 0,39 |
| 2-C-4            | 99,70    | 99,07 | 99,39 | 1,24         | 1,68 | 0,73 | 7            | 5 | 5  | 0,57                          | 0,42 | 0,45 |

Za model 1-A-3 područje valnih brojeva pri kalibraciji bilo je 1600–894  $\text{cm}^{-1}$  i 794–592  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **1**, 1600–894  $\text{cm}^{-1}$  i 794–592  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **2** i 1600–592  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **3**. Za model 1-B-3 područje valnih brojeva pri kalibraciji bilo je 1600–1298  $\text{cm}^{-1}$  i 995–592  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **1**, 1600–1096  $\text{cm}^{-1}$ , 995–758  $\text{cm}^{-1}$  i 742–588  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **2** te 1600–1500  $\text{cm}^{-1}$ , 1399–1197  $\text{cm}^{-1}$ , 1096–794  $\text{cm}^{-1}$  i 693–592  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **3**. Za model 1-C-3 područje valnih brojeva pri

kalibraciji bilo je 1600–995  $\text{cm}^{-1}$  i 895–693  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **1**, 1500–995  $\text{cm}^{-1}$  i 794–693  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **2** te 1600–1197  $\text{cm}^{-1}$  i 1096–894  $\text{cm}^{-1}$  za spoj **3**.

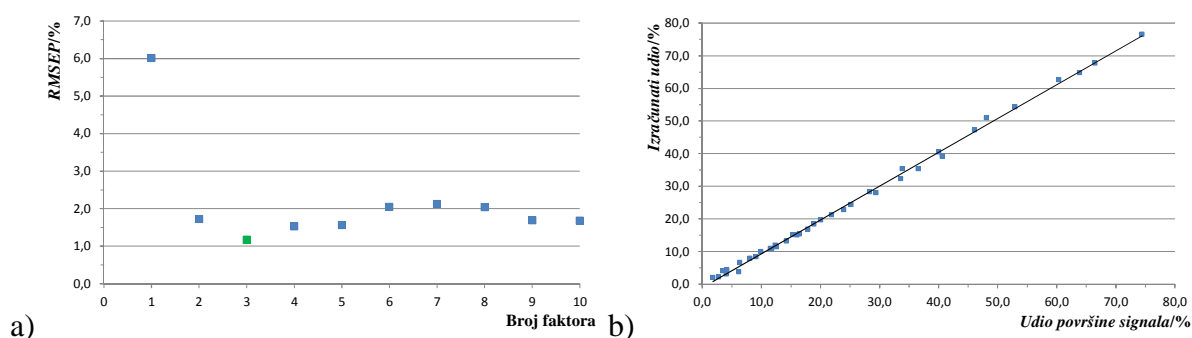
Tablica 4.12. Rezultati križno validiranih PLSR modela.

| Oznaka<br>Modela | $R^2/\%$ |       |       | RMSECV/% area |      |      | Broj faktora |   |   | Mahalanobis-ova<br>udaljenost |      |      |
|------------------|----------|-------|-------|---------------|------|------|--------------|---|---|-------------------------------|------|------|
|                  | 1        | 2     | 3     | 1             | 2    | 3    | 1            | 2 | 3 | 1                             | 2    | 3    |
| 1-D-2            | 99,56    | 99,32 | 99,59 | 1,43          | 1,47 | 0,49 | 5            | 5 | 8 | 0,18                          | 0,19 | 0,26 |
| 1-D-4            | 99,28    | 99,09 | 99,46 | 1,84          | 1,70 | 0,56 | 4            | 4 | 8 | 0,16                          | 0,18 | 0,28 |
| 2-D-2            | 99,47    | 99,11 | 99,32 | 1,58          | 1,68 | 0,63 | 5            | 4 | 5 | 0,20                          | 0,18 | 0,20 |
| 2-D-4            | 99,49    | 99,07 | 99,18 | 1,56          | 1,69 | 0,69 | 5            | 4 | 4 | 0,20                          | 0,17 | 0,19 |

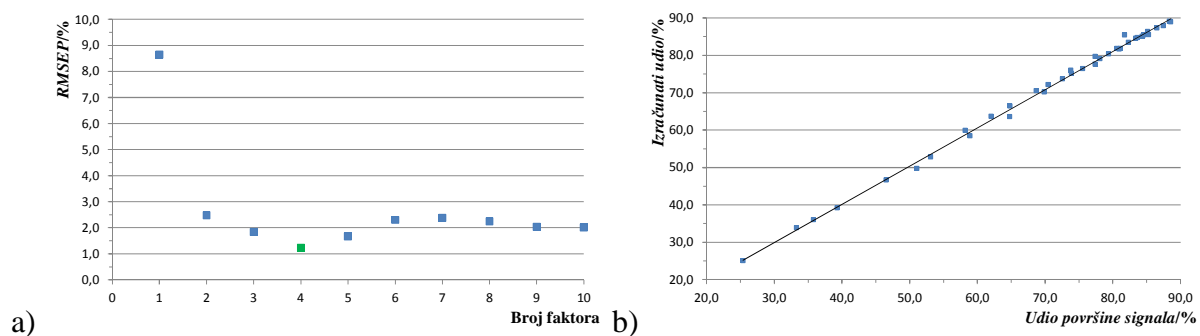
Usporedbom rezultata u Tablicama 4.11 i 4.12 vidljivo je da metoda obrade spektara znatno utječe na rezultate modela. Tako i u slučaju metoda obrade 1 i 2, dodatna korekcija metodom MSC značajno poboljšava parametre modela i to prvenstveno RMSEP i  $R^2$ . Na taj način je iz seta spektara uklonjen utjecaj polaznog materijala na spektre, opisan na početku odjeljka 4.7. To je i jasno vidljivo iz raspodjele PC1 i PC2 faktorskih bodova prikazanih na slikama 4.54 i 4.55. Nadalje, vidljivo je da izbor validacijske metode također utječe na rezultate modela. Optimalne vrijednosti parametara modela dobivene su u slučaju B gdje su kalibracijski eksperimenti 3 i 4 bili odabrani za validacijski skup. Iako su vrijednosti RMSEP bile manje u slučaju skupa A, modeli dobiveni validacijom iz skupa A koristili su više faktora za svaku od komponenata naspram skupa B. Križna validacija (D) u bilo kojem slučaju se pokazala kao inferiornija metoda validacije naspram onih iz skupova B i A. Najlošiji rezultati dobivani su validacijom iz skupa C (korišteni su kalibracijski eksperimenti 2 i 5). Iz raspodjele PC1 i PC2 faktorskih bodova za tri slučaja odabira kalibracijskog i validacijskog skupa podataka i to za obje metode obrade, vidljivo je da je raspodjela u skupu B u obje metode obrade, najbolje pokriva cjelokupno područje tako da sve točke validacijskog skupa leže u prostoru koji opisuje kalibracijski skup. S druge strane, validacijske točke skupa C leže na rubu ili čak van prostora koji opisuje kalibracijski skup i samim time validacija modela iz tog skupa implicira ekstrapolaciju vrijednosti koje su van kalibriranog područja. To se pak negativno ogleda na povećanja vrijednosti RMSEP i smanjenje vrijednosti  $R^2$  te povećanje broja faktora za svaku od komponenata. Skup A koji je odabran automatskom metodom na temelju PC1 i PC2 faktorskih bodova pak ravnomjerno pokriva cijelo područje raspodjele no to ne znači nužno da su za validacijske točke uzete one koje bi opisivale cjelokupno područje

kemijskih promjena tijekom reakcije kao što je to u slučaju skupova B i C. Iz tog razloga modeli iz skupa A koristili su u prosjeku više faktora za iste vrijednosti RMSEP dobivene validacijom iz skupa B. Nadalje, vidljivo je i da odabir područja valnih brojeva također može u većoj ili manjoj mjeri utjecati na kvalitetu modela. Najlošiji rezultati dobiveni su kalibracijom u cjelokupnom području valnih brojeva. Uklanjanjem vrpce safira iz kalibracijskog područja u svim slučajevima dolazi do smanjenja broja faktora u modelu uz neznatnu promjenu vrijednosti RMSEP ili RMSECV i  $R^2$ . Također, takvi modeli pokazuju minimum vrijednosti RMSEP i RMSECV pri navedenim faktorima što govori da vrpce safira negativno utječu na rezultat regresije. Nadalje, dodatnim uklanjanjem vrpce metanola vidljivo je da u svim slučajevima dolazi do povećanja vrijednosti RMSEP i RMSECV vrijednosti za spoj **3** što implicira da ta područja valnih brojeva nose kvantitativne informacije. U prilog tome ide i činjenica da vrpca pri  $1034\text{ cm}^{-1}$  nosi značajan regresijski koeficijent za spoj **3** kao što je prikazano na slici 4.65.

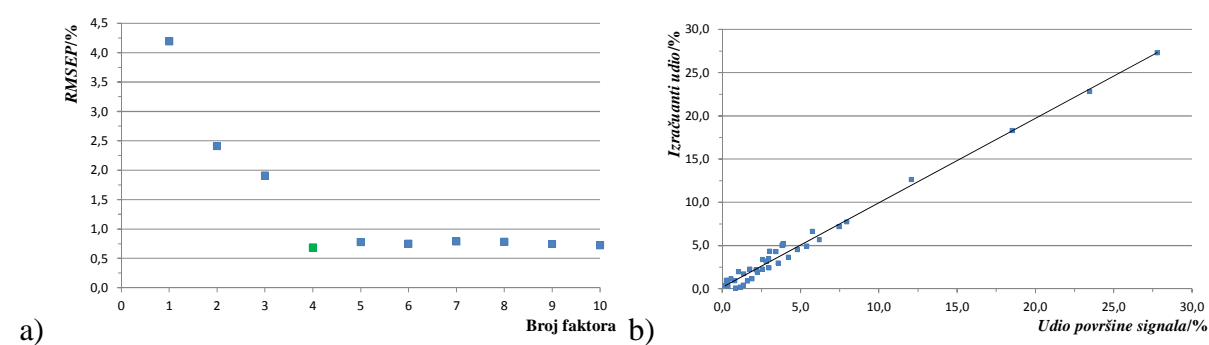
Od svih regresijskih modela, s aspekta vrijednosti  $R^2$  i RMSEP te broja faktora, optimalnima su se pokazali modeli 1-B-2 i 2-B-2. Na slikama 4.60 do 4.71 prikazana je ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora za svaku komponentu i za pojedini model, regresijske krivulje koje prikazuju korelaciju vrijednosti udjela spojeva dobivenih HPLC analizom i vrijednosti izračunatih uporabom modela te na kraju, regresijski koeficijenti za svaku komponentu pojedinog modela.



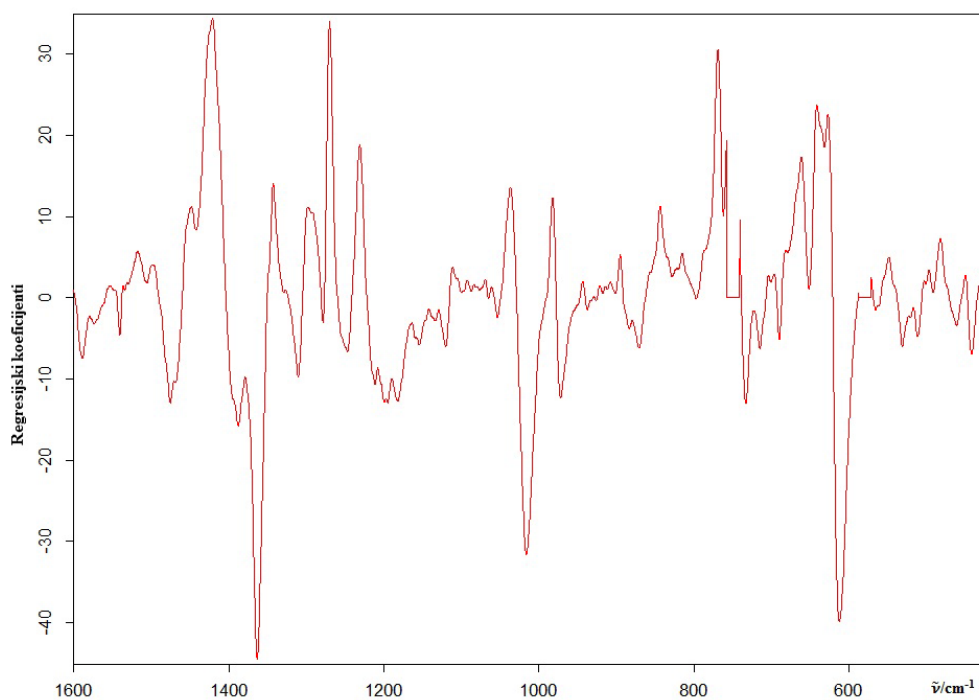
Slika 4.60. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 1-B-2 za spoj **1** s 3 faktora.



a) Slika 4.61. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 1-B-2 za spoj 2 s 4 faktora.

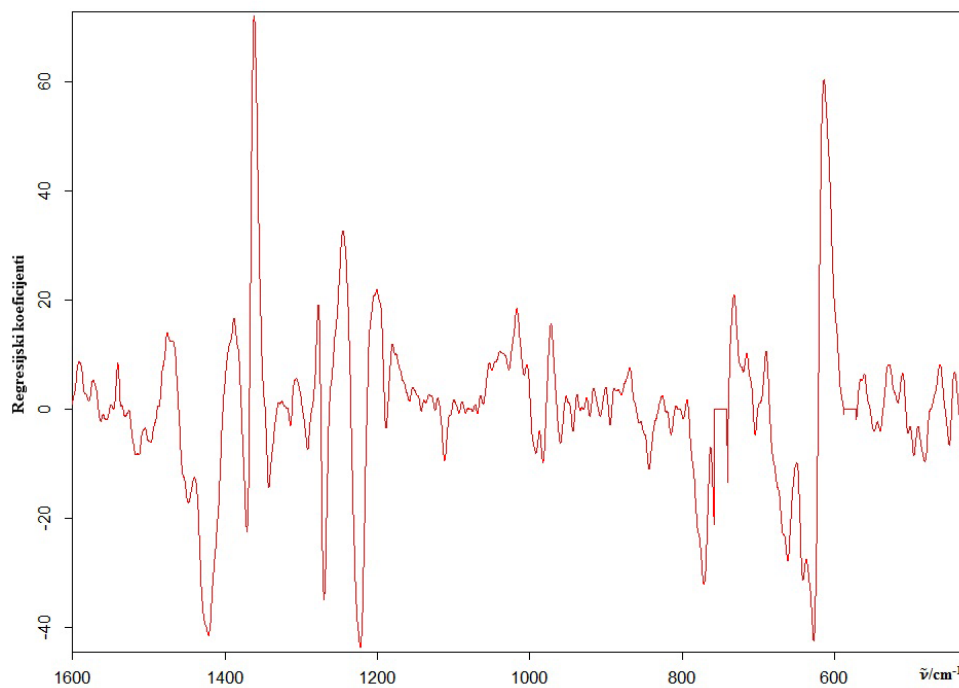


a) Slika 4.62. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 1-B-2 za spoj 3 s 4 faktora.

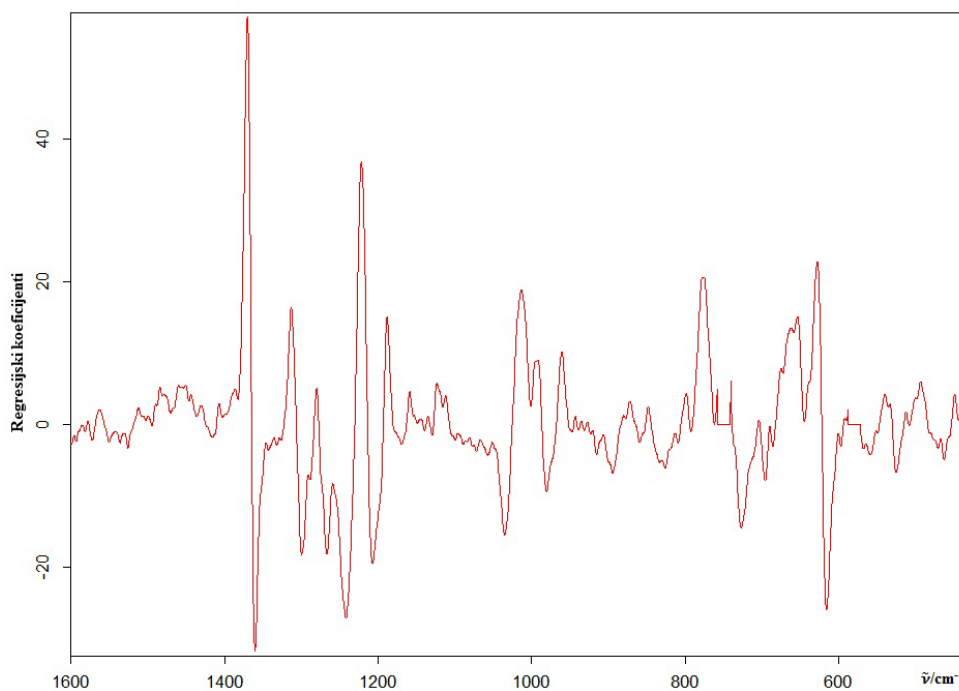


Slika 4.63. Regresijski koeficijenti modela 1-B-2 s 3 faktora za spoj 1.



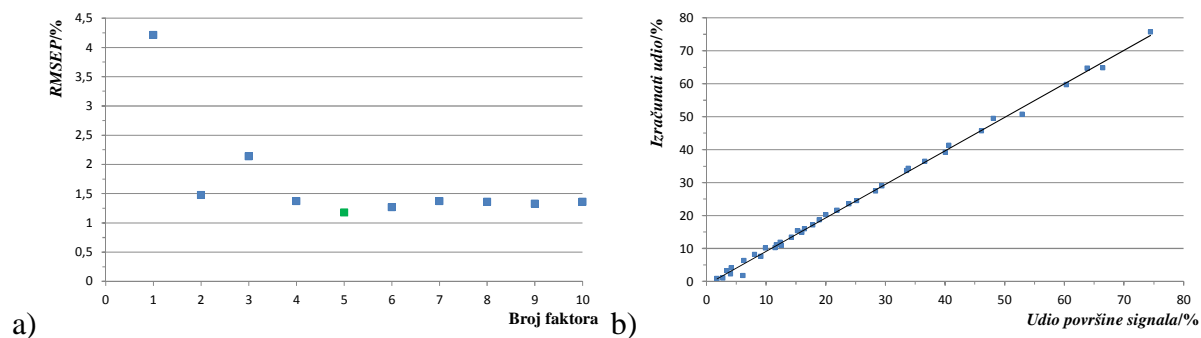


Slika 4.64. Regresijski koeficijenti modela 1-B-2 s 4 faktora za spoj 2.

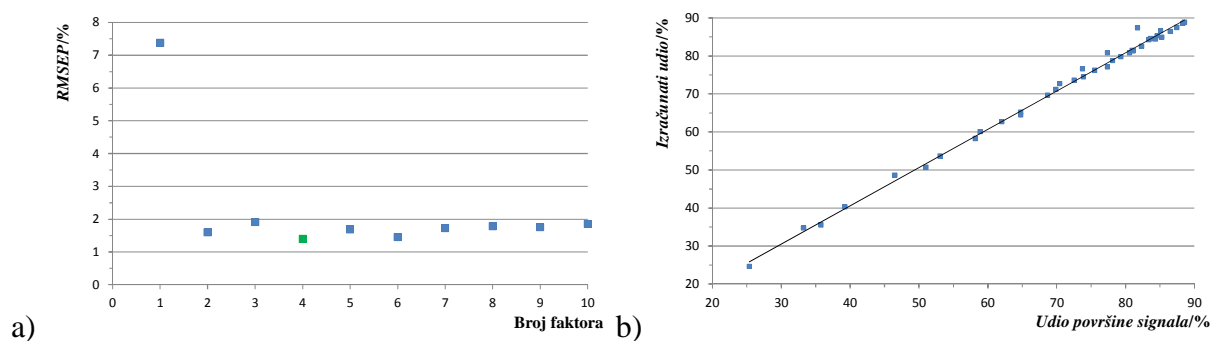


Slika 4.65. Regresijski koeficijenti modela 1-B-2 s 4 faktora za spoj 3.

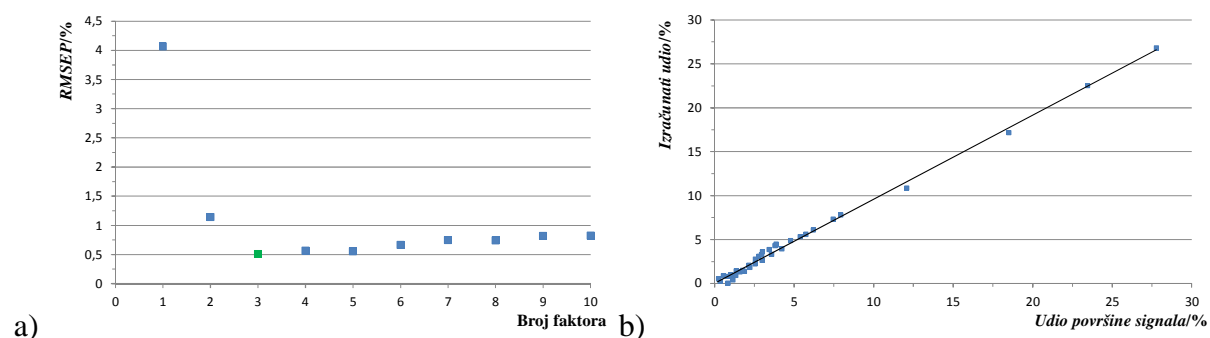
Iz regresijskih se koeficijenata modela 1-B-2 može zaključiti da svi koeficijenti sa značajnim pozitivnim vrijednostima odgovaraju karakterističnim vrpčama u spektrima metanolnih otopina sva tri spoja.



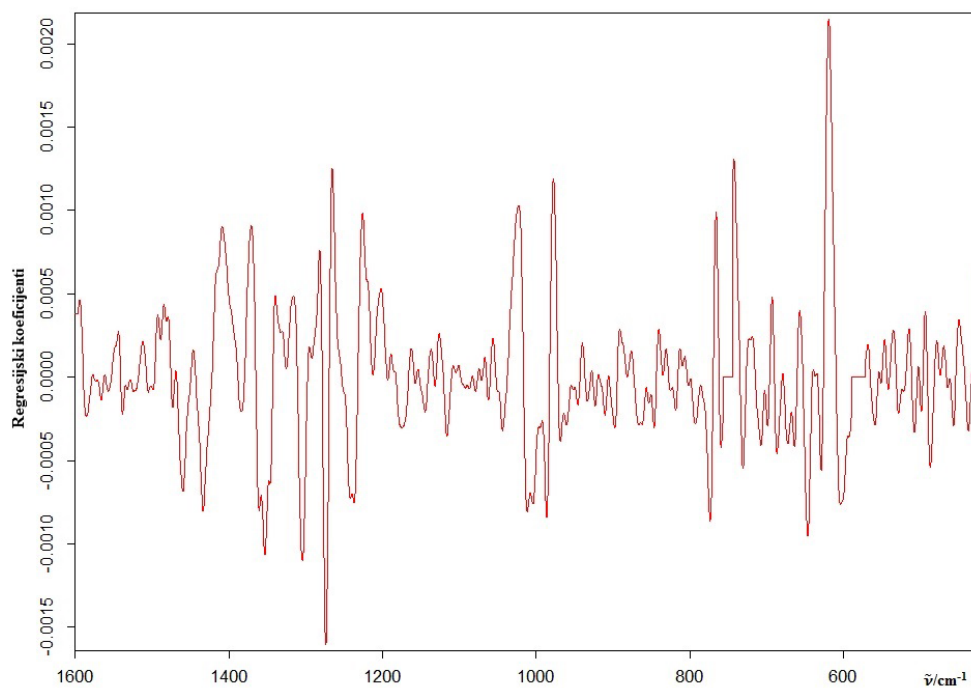
Slika 4.66. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 2-B-2 za spoj 1 s 5 faktora.



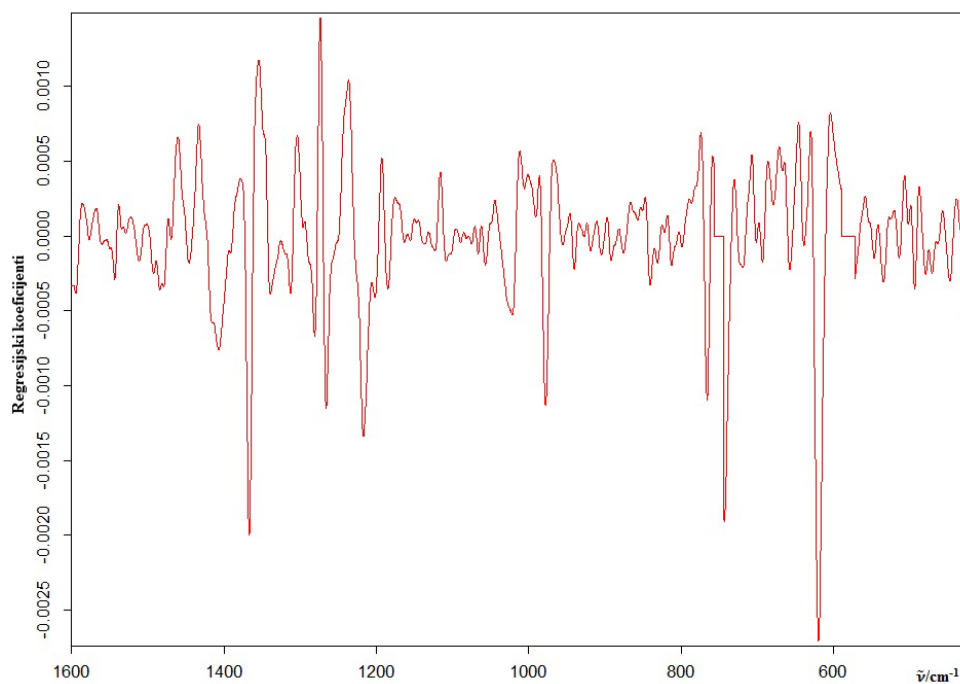
Slika 4.67. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 2-B-2 za spoj 2 s 4 faktora.



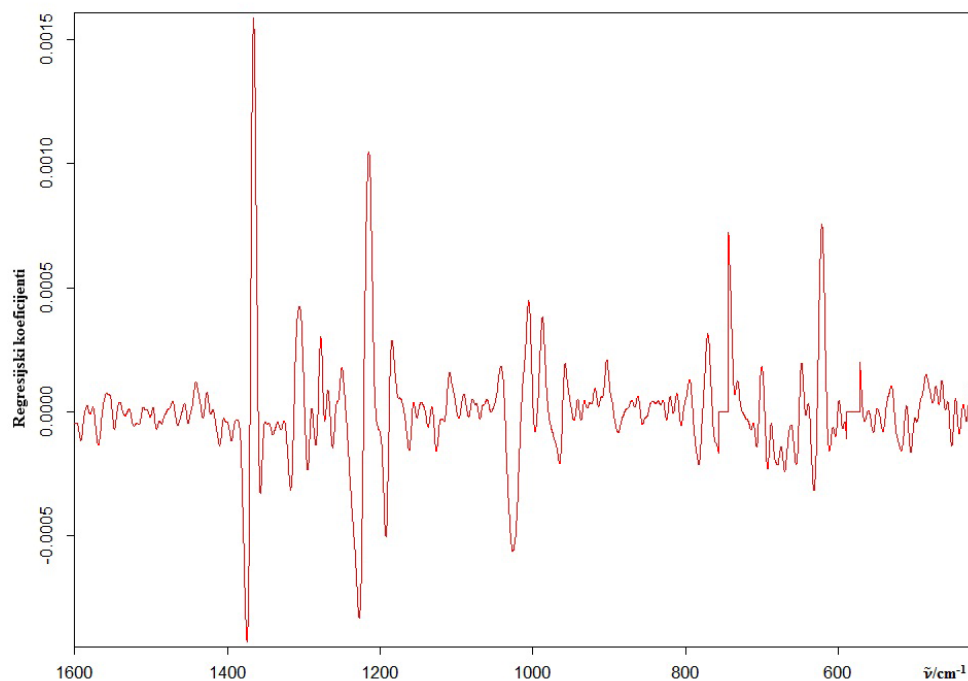
Slika 4.68. a) Ovisnost vrijednosti RMSEP o broju faktora i b) regresijski pravac validacije modela 2-B-2 za spoj 3 s 3 faktora.



Slika 4.69. Regresijski koeficijenti modela 2-B-2 s 5 faktora za spoj 1.



Slika 4.70. Regresijski koeficijenti modela 2-B-2 s 4 faktora za spoj 2.



Slika 4.71. Regresijski koeficijenti modela 2-B-2 s 3 faktora za spoj **3**.

Iz svih navedenih razloga, modeli 1-B-2 i 2-B-2 su korišteni za daljnju evaluaciju u smislu efikasnosti pri predikciji udjela spojeva **1**, **2** i **3** na skupu spektara koji nisu bili dio seta korištenog za kalibraciju i validaciju modela. U tu svrhu provedeni su eksperimenti u 1 L i 7 L mjerilu, praćeni *in-line*, uz određivanje udjela spojeva **1**, **2** i **3** korištenjem oba modela.

#### 4.9. Praćenje reakcije uporabom PLSR kalibracijskog modela

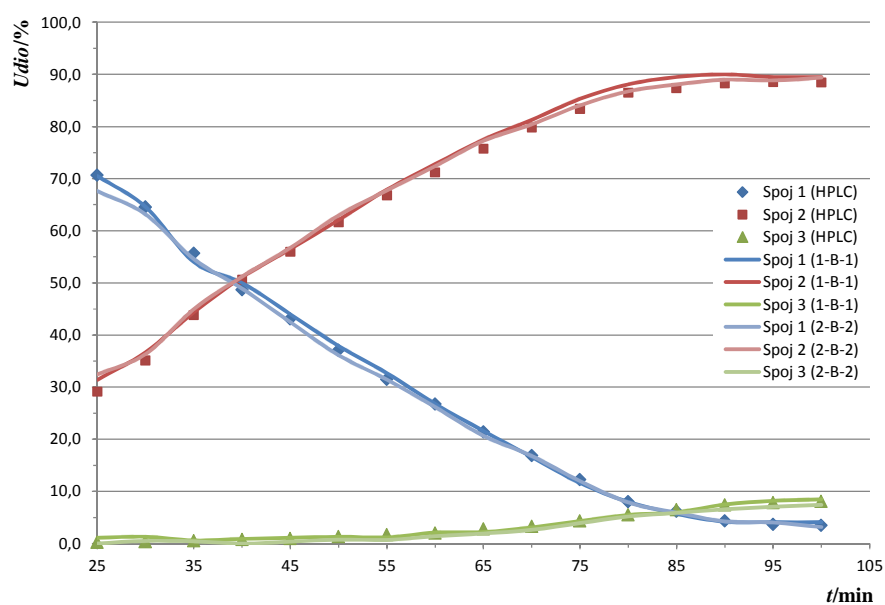
Aparatura za provedbu probnog eksperimenta na mjerilu od 1 L kojim bi se potvrdila kvaliteta predikcije PLSR modela prikazana je na slici 3.2. Za reakciju pripreme **3** u ovom eksperimentu korištene su sirovine MTX proizvođača Everest, kontrolnog broja 7025052 i OMP-Cl x HCl proizvođača Changzhou Huaren, kontrolnog broja 7055012. Količine polaznih spojeva kao i otapala opisani su u odjeljku 3.3.1. Reakcija je paralelno praćena HPLC-om i Ramanovom spektroskopijom *in-line* uz primjenu PLSR modela 1-B-2 i 2-B-2. Rezultati udjela spojeva **1**, **2** i **3** tijekom reakcije dobiveni HPLC analizama prikazani su u tablici 4.13, a modelima 1-B-2 i 2-B-2 u tablici 4.14. Na slici 4.72 je vidljivo da oba modela kvalitetno izračunavaju omjere **1**, **2** i **3** u usporedbi s HPLC rezultatima.

Tablica 4.13. Rezultati HPLC analiza uzoraka tijekom probnog eksperimenta u 1 L mjerilu.

| <i>t/min</i> | <i>Površina signala/mAU</i> |          |          | <i>Udio površine signala/%</i> |          |          |
|--------------|-----------------------------|----------|----------|--------------------------------|----------|----------|
|              | <b>1</b>                    | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>1</b>                       | <b>2</b> | <b>3</b> |
| 25           | 7800,1                      | 3214,2   | 25,9     | 70,7                           | 29,1     | 0,2      |
| 30           | 7556,7                      | 4109,2   | 39,8     | 64,6                           | 35,1     | 0,3      |
| 35           | 5493,2                      | 4321,5   | 50,5     | 55,7                           | 43,8     | 0,5      |
| 40           | 4847,5                      | 5041,4   | 75,4     | 48,6                           | 50,6     | 0,8      |
| 45           | 4254,4                      | 5521,2   | 92,9     | 43,1                           | 55,9     | 0,9      |
| 50           | 3662,1                      | 6084,0   | 128,0    | 37,1                           | 61,6     | 1,3      |
| 55           | 3123,9                      | 6625,1   | 168,7    | 31,5                           | 66,8     | 1,7      |
| 60           | 2722,8                      | 7246,5   | 207,6    | 26,8                           | 71,2     | 2,0      |
| 65           | 2084,9                      | 7363,2   | 272,1    | 21,4                           | 75,8     | 2,8      |
| 70           | 1672,6                      | 7912,4   | 331,8    | 16,9                           | 79,8     | 3,3      |
| 75           | 1200,1                      | 8163,7   | 427,4    | 12,3                           | 83,4     | 4,4      |
| 80           | 789,6                       | 8517,3   | 542,8    | 8,0                            | 86,5     | 5,5      |
| 85           | 609,7                       | 8634,3   | 637,4    | 6,2                            | 87,4     | 6,5      |
| 90           | 421,9                       | 8596,5   | 719,0    | 4,3                            | 88,3     | 7,4      |
| 95           | 359,6                       | 8702,0   | 769,7    | 3,7                            | 88,5     | 7,8      |
| 100          | 352,2                       | 8938,3   | 817,2    | 3,5                            | 88,4     | 8,1      |

Tablica 4.14. Rezultati dobiveni analizom Ramanovih spektara, izmjerenih tijekom probnog eksperimenta u 1 L mjerilu, PLSR modelima 1-B-2 i 2-B-2.

| t/min | Izračunati udio/% |      |     | Mahalanobis-ova udaljenost (1-B-2) |      |      | Izračunati udio/% |      |     | Mahalanobis-ova udaljenost (2-B-2) |      |      |
|-------|-------------------|------|-----|------------------------------------|------|------|-------------------|------|-----|------------------------------------|------|------|
|       | (1-B-2)           |      |     |                                    |      |      | (2-B-2)           |      |     |                                    |      |      |
|       | 1                 | 2    | 3   | 1                                  | 2    | 3    | 1                 | 2    | 3   | 1                                  | 2    | 3    |
| 25    | 70,5              | 31,4 | 1,1 | 0,10                               | 0,16 | 0,14 | 67,6              | 32,5 | 0,0 | 0,09                               | 0,07 | 0,09 |
| 30    | 64,6              | 36,7 | 1,3 | 0,10                               | 0,14 | 0,13 | 63,2              | 36,3 | 0,5 | 0,11                               | 0,06 | 0,11 |
| 35    | 54,0              | 44,4 | 0,6 | 0,06                               | 0,09 | 0,08 | 54,6              | 45,0 | 0,4 | 0,10                               | 0,04 | 0,08 |
| 40    | 50,0              | 51,1 | 0,9 | 0,06                               | 0,08 | 0,08 | 48,9              | 51,2 | 0,0 | 0,11                               | 0,04 | 0,09 |
| 45    | 44,0              | 56,5 | 1,1 | 0,04                               | 0,06 | 0,05 | 42,5              | 56,8 | 0,4 | 0,09                               | 0,04 | 0,06 |
| 50    | 37,9              | 62,1 | 1,3 | 0,04                               | 0,05 | 0,06 | 36,1              | 63,0 | 0,7 | 0,13                               | 0,04 | 0,08 |
| 55    | 32,7              | 67,9 | 1,2 | 0,06                               | 0,07 | 0,08 | 31,4              | 67,8 | 0,7 | 0,10                               | 0,03 | 0,07 |
| 60    | 26,8              | 72,8 | 2,1 | 0,09                               | 0,09 | 0,11 | 26,2              | 72,4 | 1,4 | 0,08                               | 0,06 | 0,05 |
| 65    | 21,6              | 77,5 | 2,2 | 0,06                               | 0,07 | 0,06 | 20,7              | 77,3 | 1,9 | 0,05                               | 0,05 | 0,03 |
| 70    | 16,6              | 81,3 | 3,1 | 0,04                               | 0,05 | 0,04 | 16,8              | 80,4 | 2,6 | 0,03                               | 0,03 | 0,02 |
| 75    | 11,6              | 85,3 | 4,3 | 0,06                               | 0,06 | 0,06 | 12,0              | 84,1 | 3,9 | 0,04                               | 0,04 | 0,03 |
| 80    | 8,0               | 88,1 | 5,5 | 0,07                               | 0,08 | 0,08 | 7,9               | 86,8 | 5,2 | 0,06                               | 0,05 | 0,04 |
| 85    | 5,7               | 89,5 | 6,0 | 0,06                               | 0,06 | 0,06 | 5,9               | 88,1 | 5,9 | 0,04                               | 0,04 | 0,03 |
| 90    | 4,2               | 90,0 | 7,5 | 0,07                               | 0,07 | 0,07 | 4,3               | 89,0 | 6,6 | 0,06                               | 0,06 | 0,03 |
| 95    | 4,1               | 89,5 | 8,2 | 0,07                               | 0,08 | 0,09 | 4,0               | 88,8 | 7,1 | 0,07                               | 0,06 | 0,03 |
| 100   | 4,1               | 89,5 | 8,5 | 0,08                               | 0,08 | 0,09 | 3,2               | 89,4 | 7,4 | 0,08                               | 0,07 | 0,04 |

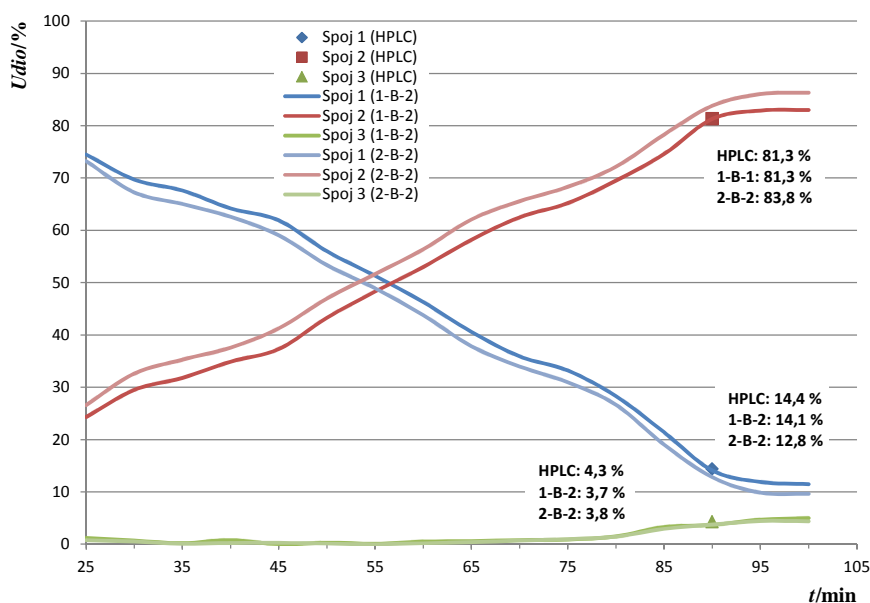


Slika 4.72. Tijek reakcije tijekom probnog eksperimenta u 1 L mjerilu.

Aparatura za provođenje eksperimenta u uvećanom mjerilu prikazana je na slici 3.2. Za reakciju pripreme spoja **1** u ovom eksperimentu korištene su sirovine, MTX proizvođača Everest kontrolnog broja 7025052 i OMP-Cl x HCl od Changzhou Huaren kontrolnog broja 7055012. Korišteno je 730,8 g (4,05 mol) polaznog spoja MTX, a sve ostale sirovine dodavane su u istim omjerima kao u postupku opisanom u poglavlju 3.3.1. Rezultati udjela spojeva **1**, **2** i **3** tijekom reakcije dobiveni modelima 1-B-2 i 2-B-2 prikazani su u tablici 4.15 i na slici 4.73. Uzorci za HPLC analizu nisu uzimani tijekom cijelog vremena reakcije već samo na kraju odnosno odmah po dodatku cjelokupne količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tablica 4.15. Rezultati dobiveni analizom Ramanovih spektara, izmjerenih tijekom probnog eksperimenta u 7 L mjerilu, PLSR modelima 1-B-2 i 2-B-2.

| <i>t/min</i> | <i>Izračunati udio/%</i> |          |          | <i>Mahalanobis-ova</i>    |          |          | <i>Izračunati udio/%</i> |          |          | <i>Mahalanobis-ova</i>    |          |          |
|--------------|--------------------------|----------|----------|---------------------------|----------|----------|--------------------------|----------|----------|---------------------------|----------|----------|
|              | <i>(1-B-2)</i>           |          |          | <i>udaljenost (1-B-2)</i> |          |          | <i>(2-B-2)</i>           |          |          | <i>udaljenost (2-B-2)</i> |          |          |
|              | <b>1</b>                 | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>1</b>                  | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>1</b>                 | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>1</b>                  | <b>2</b> | <b>3</b> |
| 25           | 74,5                     | 24,3     | 1,2      | 0,08                      | 0,15     | 0,14     | 73,2                     | 26,6     | 0,8      | 0,18                      | 0,16     | 0,08     |
| 30           | 69,7                     | 29,5     | 0,7      | 0,07                      | 0,14     | 0,14     | 67,3                     | 32,6     | 0,5      | 0,17                      | 0,16     | 0,07     |
| 35           | 67,6                     | 31,8     | 0,2      | 0,06                      | 0,14     | 0,13     | 65,0                     | 35,3     | 0,1      | 0,17                      | 0,16     | 0,06     |
| 40           | 64,2                     | 34,9     | 0,8      | 0,06                      | 0,13     | 0,12     | 62,6                     | 37,6     | 0,2      | 0,15                      | 0,14     | 0,05     |
| 45           | 61,9                     | 37,3     | 0,0      | 0,06                      | 0,16     | 0,13     | 59,0                     | 41,3     | 0,3      | 0,15                      | 0,13     | 0,05     |
| 50           | 56,0                     | 43,3     | 0,3      | 0,06                      | 0,14     | 0,15     | 53,4                     | 47,0     | 0,1      | 0,15                      | 0,13     | 0,05     |
| 55           | 51,3                     | 48,3     | 0,1      | 0,06                      | 0,14     | 0,15     | 48,9                     | 51,6     | 0,0      | 0,15                      | 0,13     | 0,05     |
| 60           | 46,3                     | 53,0     | 0,5      | 0,06                      | 0,13     | 0,16     | 43,8                     | 56,4     | 0,2      | 0,14                      | 0,12     | 0,04     |
| 65           | 40,6                     | 58,2     | 0,6      | 0,07                      | 0,15     | 0,18     | 37,9                     | 62,1     | 0,4      | 0,14                      | 0,13     | 0,05     |
| 70           | 35,9                     | 62,5     | 0,8      | 0,05                      | 0,11     | 0,13     | 34,0                     | 65,6     | 0,7      | 0,10                      | 0,09     | 0,04     |
| 75           | 33,2                     | 65,2     | 0,9      | 0,06                      | 0,12     | 0,15     | 30,9                     | 68,3     | 1,0      | 0,11                      | 0,10     | 0,04     |
| 80           | 28,3                     | 69,5     | 1,5      | 0,07                      | 0,13     | 0,15     | 26,7                     | 72,2     | 1,5      | 0,12                      | 0,11     | 0,05     |
| 85           | 21,4                     | 74,6     | 3,3      | 0,08                      | 0,16     | 0,20     | 19,0                     | 78,3     | 2,9      | 0,13                      | 0,12     | 0,07     |
| 90           | 14,1                     | 81,3     | 3,7      | 0,09                      | 0,17     | 0,20     | 12,8                     | 83,8     | 3,8      | 0,14                      | 0,12     | 0,07     |
| 95           | 11,9                     | 82,9     | 4,7      | 0,11                      | 0,18     | 0,24     | 9,8                      | 86,0     | 4,4      | 0,17                      | 0,14     | 0,08     |
| 100          | 11,5                     | 83,0     | 5,0      | 0,12                      | 0,19     | 0,26     | 9,6                      | 86,3     | 4,4      | 0,18                      | 0,16     | 0,09     |



Slika 4.73. Tijek reakcije tijekom probnog eksperimenta u 7 L mjerilu.

Iz rezultata je vidljivo da obje metode dobro opisuju tijek reakcije. Kod praćenja modelom 2-B-2 uočen je pomak vrijednosti prema višima za spoj **2** i prema nižima za spoj **1**, naspram modela 1-B-2. Nadalje, usporedbom rezultata dva modela sa rezultatom HPLC analize u 90. minuti reakcije, vidljivo je da model 1-B-2 puno točnije računa udjele triju komponenata. Izračun udjela spoja **3** zadovoljavajući je u slučaju oba modela iako je spektrima u 95. i 100. minuti u modelu 1-B-2, vrijednost Mahalanobisove udaljenosti van izračunate granične vrijednosti modela. Literaturno je poznato da računanje prve derivacije Ramanovih spektara može doprijeti povećanju šuma.<sup>82</sup> Dodatno, iz analize metodom PCA vidljivo je prve tri komponente na skupu obrađenom prvom derivacijom opisuju 7% manje ukupne varijance naspram skupa obrađenom vektorskim normiranjem i korekcijom bazne linije što može biti razlog narušene računске mogućnosti modela 2-B-2. Iz navedenih razloga model 1-B-2 odabran je kao preferirani i kao dio finalne metode za praćenje reakcije.

Iz slike 4.72 je također vidljivo da unatoč korištenju 1,05 molarnih ekvivalenata  $H_2O_2$ , reakcija nakon dodatka cjelokupne količine staje na 11,5 % neizreagiranog spoja **1** prema modelu 1-B-2. Analizom hidrodinamičkih parametara u programu Visimix, utvrđeno je da je tijekom eksperimenta u uvećanom mjerilu broj okretaja miješala u iznosu od 400 okretaja u minuti bio nedovoljan. Izračunati hidrodinamički parametri za reaktore prikazane na slici 3.2, prikazani su u tablici 4.16. Unatoč povećanju maksimalne energije rasipanja u 7 L reaktoru kao mjere snage miješanja što bi upućivalo na kvalitetno miješanje, vidljiv je porast u



parametru vremena makromiješanja od 2,5 puta. To znači da pri provedbi eksperimenta u 7 L mjerilu nije došlo do pravovremenog razmiješavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i NaOH po dodatku u reakcijsku smjesu. Takva razlika u vrijednostima je najvjerojatniji uzrok manjka  $\text{H}_2\text{O}_2$  bilo da se radi o njegovu raspadu s NaOH prije no što on reagira s molibdenskim katalizatorom ili autokatalitičkog raspada peroksomolibdatnog kompleksa prije no što on reagira sa spojem **1**. Takav rezultat na kraju reakcije uzrokovao je problematičnu kristalizaciju u smislu da je tijekom kristalizacije spoja **2** došlo do pretvaranja produkta prvo u uljnu fazu, a zatim u velike sferične aglomerate koji su se vidno lijepili po prozoru sonde. Samim time, praćenje tijeka kristalizacije tijekom ovog eksperimenta nije bilo moguće.

Tablica 4.16. Rezultati računalne analize hidrodinamičkih parametara u programu Visimix za reaktore prikazane na slici 3.2 pri brojevima okretaja miješala od  $400 \text{ o min}^{-1}$ .

| Hidrodinamički parametar                           | Reaktor       |             |
|--|---------------|-------------|
|  | Optimax (1 L) | Büchi (7 L) |
| Snaga miješanja / W                                | 0,037         | 0,260       |
| Reynolds-ov broj                                   | 17800         | 35300       |
| Prosječna brzina cirkulacije / $\text{m s}^{-1}$   | 0,011         | 0,004       |
| Srednje vrijeme cirkulacije / s                    | 10            | 57          |
| Prosječna energija rasipanja / $\text{W kg}^{-1}$  | 0,077         | 0,038       |
| Maksimalna energija rasipanja / $\text{W kg}^{-1}$ | 4,11          | 28,50       |
| Vrijeme mikromiješanja / s                         | 3             | 6           |
| Vrijeme makromiješanja / s                         | 6             | 15          |
| Stupanj aksijalne neuniformnosti / %               | 37,3          | 37,8        |
| Stupanj radijalne neuniformnosti / %               | 65,1          | 72,1        |

#### 4.10. Završna metoda za praćenje reakcije *in-line*

Završna spektroskopska metoda praćenja reakcije sinteze spoja **2** *in situ*, sastoji se od sljedećih segmenata:

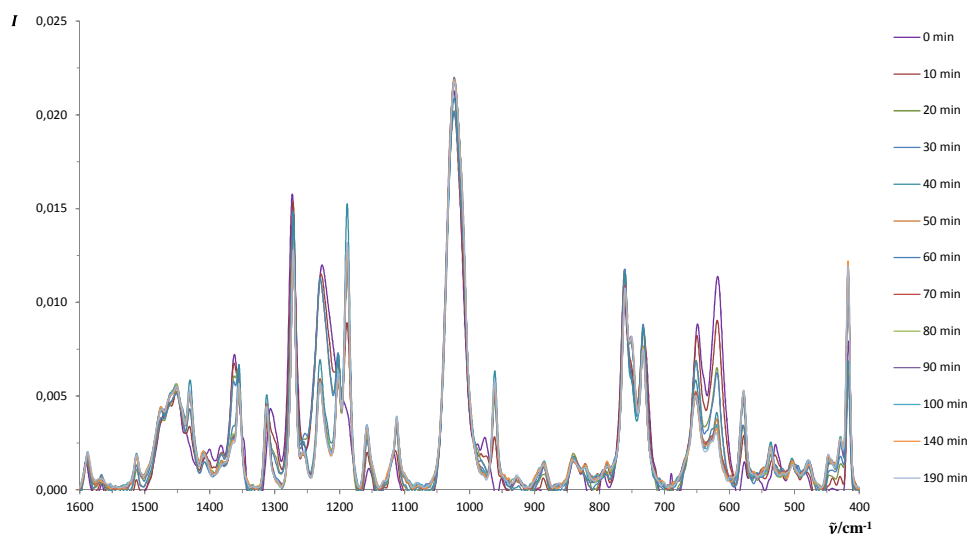
- Mjerenje spektra uz ekspoziciju detektora od 50 sekundi pri snazi lasera od 400 mW.
- Redukcija spektra na područje valnih brojeva od  $1600 \text{ cm}^{-1}$  do  $400 \text{ cm}^{-1}$ .
- Normiranje spektra vektorskom metodom.
- Korekcija bazne linije metodom CRB uz 256 točaka bazne linije i u 5 iteracija.
- Korekcija višestrukog raspršenja metodom MSC.

- Analiza spektra PLSR modelom 1-B-2.

Usporedbom s publiciranim člancima koji opisuju PLSR modele za praćenje reakcija Ramanovom spektroskopijom *in-line*, ovo je prvi put da je razvijen i opisan PLSR model koji računa relativne udjele triju komponenti tijekom reakcije i to u širokom području omjera kao i tijekom reakcije u kojoj volumen smjese nikada nije konstantan. Hart et al. opisuju PLSR model za praćenje dvije komponente tijekom reakcije eterifikacije u fazi gdje je volumen reakcijske smjese konstantan odnosno tijekom zadnjih 30 % konverzije. Kalibracija je rađena istim principom odnosno iz spektara izmjerenih tijekom reakcije i to na 47 izmjerenih Ramanovih spektara. Također u navedenom istraživanju korišten je isti spektrometar kao i u ovom, te je iz slika spektara vidljiva pojava vrpce safirnog prozora no autori ne daju nikakav komentar na dotične vrpce kao ni njihov utjecaj na kvalitetu regresijskog modela. Nadalje, autori su koristili različite kontrolne brojeve od istog proizvođača polaznog spoja i prikazali njegov utjecaj na pozadinsku fluorescenciju između kalibracijskih eksperimenata no to nije rezultiralo problemom s različitim relativnim intenzitetima već samo udjelom pozadinske fluorescencije za koji je poznato da se lako može ukloniti korekcijom bazne linije.<sup>10</sup> U ovome je istraživanju pokazano da se metodom MSC mogu korigirati i izraženiji efekti u kalibracijskom setu podataka, kao što je razlika u relativnim intenzitetima između kalibracijskih eksperimenata uzrokovana različitim profilom onečišćenja u polaznim materijalima od različitih proizvođača koji time utječu na odziv.

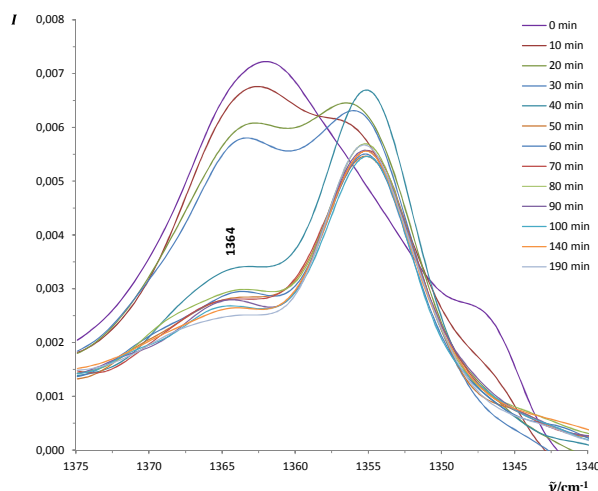
#### 4.11. Kristalizacija spoja 2

Kristalizacija spoja **2** praćena je Ramanovom spektroskopijom *in-line* na kalibracijskom eksperimentu 6. Kristalizacija je provedena na način opisan u poglavlju 3.3.1. Spektri *in-line* mjereni su svakih 5 minuta te su obrađeni vektorskim normiranjem, korekcijom bazne linije i metodom MSC. Nepotpuni skup Ramanovih spektara *in-line* prikazan je na slici 4.74. Obrađeni spektri su potom analizirani metodom PCA.

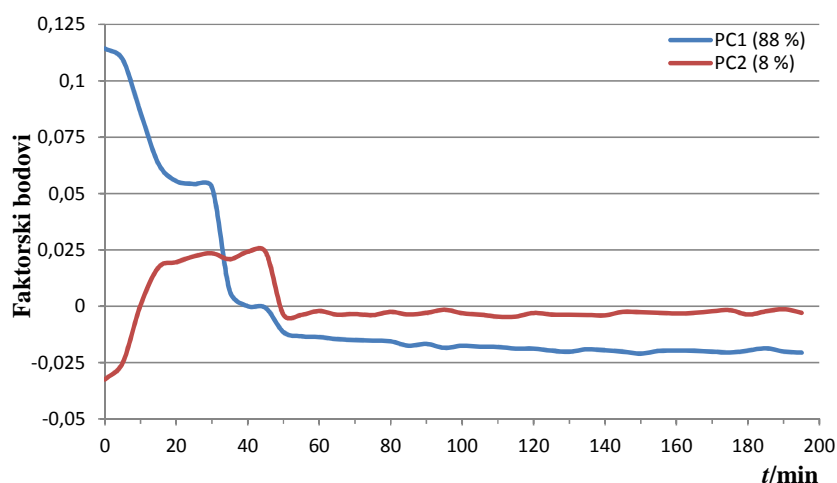


Slika 4.74. Normirani Ramanovi spektri *in-line* izmjereni tijekom kristalizacije produkta u kalibracijskom eksperimentu 6 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.

Iz Ramanovih spektara *in-line* vidljivo je da kristalizacijom produkta dolazi do znatnih promjena u smislu nestajanja i nastajanja karakterističnih vrpce. Tako primjerice nestaju vrpce pri  $1362\text{ cm}^{-1}$ ,  $1300\text{ cm}^{-1}$  i  $1227\text{ cm}^{-1}$  dok se paralelno pojavljuju vrpce pri  $1355\text{ cm}^{-1}$ ,  $1313\text{ cm}^{-1}$ ,  $1189\text{ cm}^{-1}$  i  $962\text{ cm}^{-1}$ , karakteristične za Ramanov spektar spoja **2** u čvrstom stanju. Također se može zaključiti da iz reakcijske smjese kristalizira polimorfna forma B. Polimorfi A i B se na temelju Ramanovih spektara mogu razlučiti na dva načina. Prvi je na temelju karakteristične vrpce pri  $1364\text{ cm}^{-1}$ . U slučaju polimorfa A navedena vrpca izostaje, a u slučaju polimorfa B je prisutna. Drugi je na temelju omjera relativnih intenziteta vrpce pri  $842\text{ cm}^{-1}$  i  $836\text{ cm}^{-1}$ . Omjer u iznosu većem od 1 karakterističan je za polimorf B, a manji od 1 za polimorf A.<sup>80</sup> U oba slučaja izmjereni spektri potvrđuju nastanak polimorfa B.



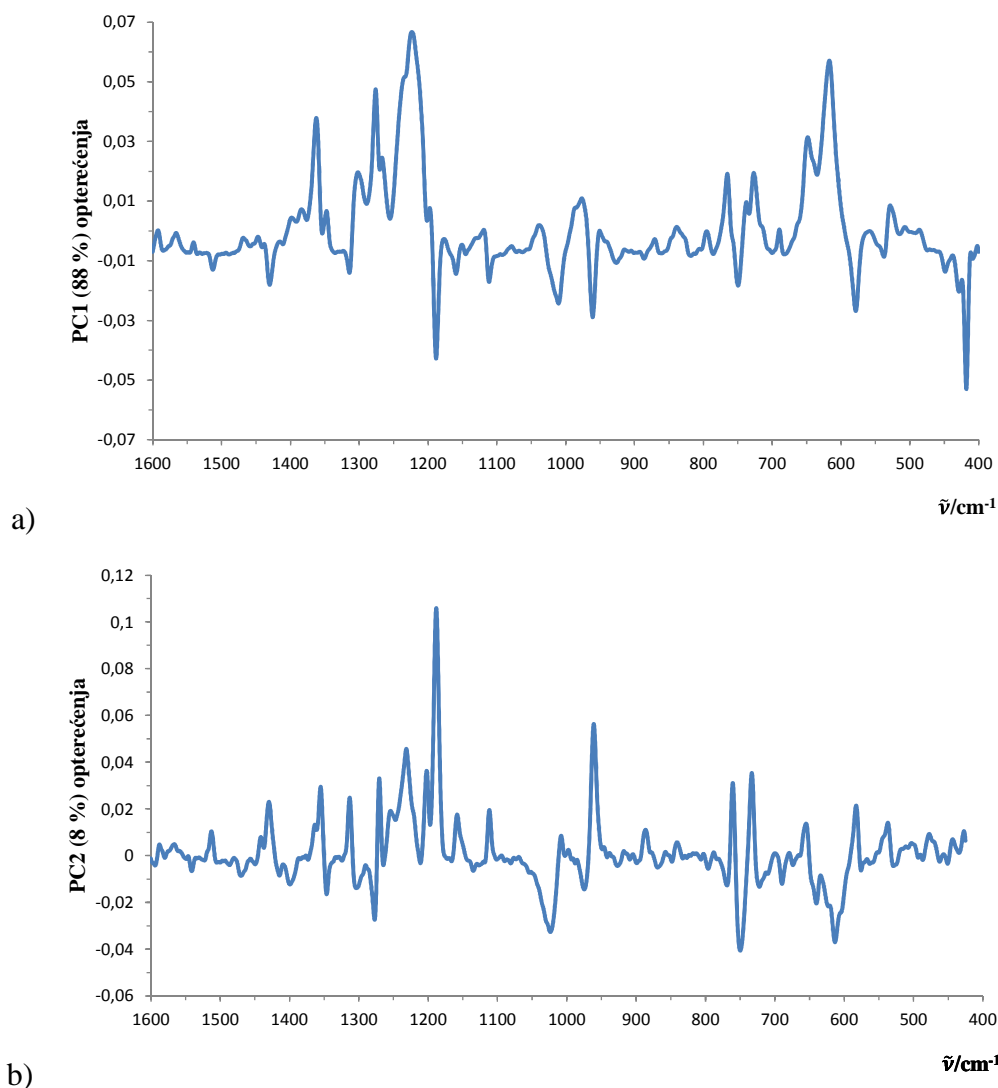
Slika 4.75. Normirani Ramanovi spektri *in-line* izmjereni tijekom kristalizacije produkta u kalibracijskom eksperimentu 6 u području od  $1600\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  uz korekciju bazne linije i višestrukog raspršenja.



Slika 4.76. Faktorski bodovi PC1 i PC2 kroz vrijeme dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizacije spoja **2** u kalibracijskom eksperimentu 6.

Iz trenda faktorskih bodova prikazanom na slici 4.76, vidljivo je da PC1 kvalitetno opisuje smanjenje koncentracije otopljenog spoja **2**. PC2 opisuje udio iskristaliziranog produkta iako je između 40. i 50. minute primijećen oštar pad u vrijednosti faktorskih bodova. U 30 minuta po dodatku NTS postiže se stacionarno stanje sustava. Tijekom tih 30 minuta primijećen je i porast pH vrijednosti sustava s 9,3 na 9,6 što je u skladu s kristalizacijom spoja **2** u neutralnom obliku. Korekcijom pH na 9,1 vidljiva je daljnja kristalizacija spoja **2**. Nakon 15 min miješanja sustav opet dolazi u stacionarno stanje te je pH ponovno korigiran. Oštar

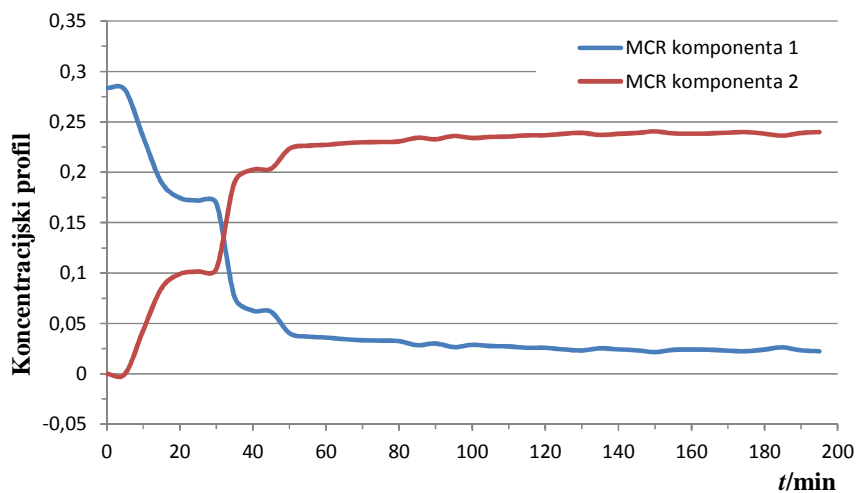
pad PC2 faktorskih bodova nakon finalne korekcije pH može se objasniti pojavom sekundarne nukleacije i naglog porasta broja čestica. Nakon ukupno 90 min od početka kristalizacije u sustavu više nema značajnih promjena.



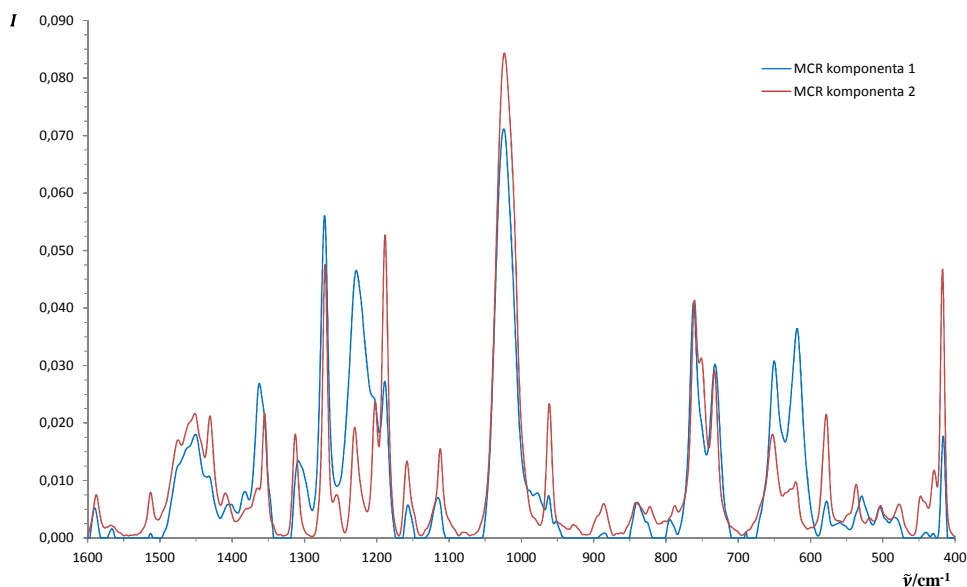
Slika 4.77. a) PC1 i b) PC2 opterećenja po valnim brojevima dobivenih PCA analizom obrađenih Ramanovih spektara *in-line* tijekom kristalizaciju u kalibracijskom eksperimentu 6.

Ramanovi spektri *in-line* analizirani su i metodom MCR-ALS. Rezultat koncentracijskog profila za dvije komponente prikazan je na slici 4.78. Vidljivo je da MCR komponenta 1 prikazuje smanjenje koncentracije spoja **2** iz otopine na sličan način kao i PC1. MCR komponenta 2 prikazuje tijekom kristalizacije spoja **2**. Na slici 4.79 prikazani su izračunati spektri čistih komponenti. Usporedbom sa slikama 4.7 i 4.10, vidljivo je da MCR komponente

1 i 2 prikazuju spektre spoja **2** u metanolnoj otopini i, izuzev vrpca metanola pri  $1459\text{ cm}^{-1}$  i  $1034\text{ cm}^{-1}$ , u čvrstom stanju.



Slika 4.78. Rezultat MCR-ALS analize Ramanovih spektara *in-line* izmjerenih tijekom kristalizacije spoja **2** nakon reakcije oksidacije, prikazan kao vremenski trend koncentracijskog profila za MCR komponente 1 i 2.



Slika 4.79. Izračunati Ramanovi spektri dviju čistih MCR-ALS komponenti tijekom kristalizacije spoja **2** nakon reakcije oksidacije.

## § 5. ZAKLJUČAK

Ovim je istraživanjem pokazano kako je sintetsku reakciju API-a omeprazola moguće pratiti kvantitativno Ramanovom spektroskopijom *in-line* u kombinaciji s prediktivnim PLSR kalibracijskim modelom. Model točno izračunava udjele sve tri reakcijske komponente na temelju Ramanovih spektara tijekom cijelog trajanja reakcije unatoč činjenici da sustav tijekom reakcije prolazi dinamičnu promjenu volumena i da je brzina dodavanja oksidansa tijekom reakcije varijabilna. Pokazano je da je analizom spektara metodom PCA moguće diskriminirati različite proizvođače polaznog spoja **1**. Također je pokazano kako metoda obrade spektara MSC može uspješno anulirati efekt fluorescirajućih onečišćenja prisutnih u polaznom materijalu, na prigušenje Ramanovog signala. Pokazano je i da metoda PCA u ovom slučaju nije pogodna za kvalitativnu procjenu trajanja reakcije s obzirom da pri različitim eksperimentalnim uvjetima udio opisane varijance kao i opterećenja po pojedinoj glavnoj komponenti znatno variraju. Ispitivane su i dvije različite metode predobrade spektara te se metoda obrade vektorskim normiranjem i korekcijom bazne linije pokazala uspješnijom od prve derivacije. Metoda je također uspješno implementirana za kvantitativno praćenje reakcije *in-line* u kilolaboratorijskom mjerilu.

Dodatno, Ramanova spektroskopija *in-line* u kombinaciji s MCR-ALS modelom uspješno je primijenjena u semikvantitativnom praćenju kristalizacije omeprazola kao i u *in situ* analizi polimorfa koji nastaje kristalizacijom.

## § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

AHM – Amonijev heptamolibdat

ALS – engl. *Alternating Least Squares*

API – engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*

ATR – engl. *Attenuated Total Reflectance*

AU – engl. *Absorbance Unit*

BL – bazna linija

CPP – engl. *Critical Process Parameters*

CQA – engl. *Critical Quality Attributes*

CRB – engl. *Concave Rubber Band*

EMA – eng. *European Medicines Agency*

FDA – engl. *Food and Drug Administration*

FDF – engl. *Final Dosage Form*

FT – engl. *Fourier Transformed*

FTIR – engl. *Fourier Transformed Infrared*

IR – engl. *Infrared*

MCR – engl. *Multivariate Curve Resolution*

MIR – engl. *Mid Infrared*

MLR – engl. *Multiple Linear Regression*

MSC – engl. *Multiplicative Scattering Correction*

NCE – engl. *New Chemical Entity*

NIPALS – engl. *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*

NIR – engl. *Near Infrared*

NTS – natrijev tiosulfat

OFAT – engl. *One Factor At a Time*

OVAT – engl. *One Variable At a Time*

PC – engl. *Principal Component*

PCA – engl. *Principal Component Analysis*

PCR – engl. *Principal Component Regression*

PLSR – engl. *Partial Least Squares Regression*



QbD – engl. *Quality by Design*

RF – engl. *Response Factor*

RMSECV – engl. *Root Mean Square Error of Cross Validation*

RMSEE – engl. *Root Mean Square Error of Estimation*

RMSEP – engl. *Root Mean Square Error of Prediction*

SEE – engl. *Sum of Squared Errors*

SNV – engl. *Standard Normal Variate*

SVRM – engl. *Support Vector Machine Regression*

UV – engl. *Ultraviolet*

Vis – engl. *Visible*

VN – vektorsko normiranje

VWD – engl. *Variable Wavelength Detector*

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. J.M. Juran, *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality into Goods and Services*, Free Press, 1992.
2. E. Baughman, *Process analytical chemistry: introduction and historical perspective* u: K. E. Bakeev, (Ur.) *Process analytical technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2005, str. 1–12.
3. P. Novak i T. Jednačak, *The use of vibrational spectroscopy as a tool for in-line process monitoring* in: A. L. Varney (Ur.) *Process control - theory applications and challenges*, Nova Science Publishers, New York, USA, 2014, str. 69–99.
4. L. L. Simon, H. Pataki, G. Marosi, F. Meemken, K. Hungerbühler, A. Baiker, S. Tummala, B. Glennon, M. Kuentz, G. Steele, H. J. M. Kramer, J. W. Rydzak, Z. Chen, J. Morris, F. Kjell, R. Singh, R. Gani, K. V. Gernaey, M. Louhi-Kultanen, J. O'Reilly, N. Sandler, O. Antikainen, J. Yliruusi, P. Froberg, J. Ulrich, R. D. Braatz, T. Leysens, M. von Stosch, R. Oliveira, R. B. H. Tan, H. Wu, M. Khan, D. O'Grady, A. Pandey, R. Westra, E. Delle-Case, D. Pape, D. Angelosante, Y. Maret, O. Steiger, M. Lenner, K. Abbou-Oucherif, Z. K. Nagy, J. D. Litster, V. K. Kamaraju i M.-S. Chiu, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 3-62.
5. *Guidance for industry, PAT – a framework for innovative pharmaceutical development, Manufacturing and Quality Assurance*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Rockville, MD, U.S.A., 2004., <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf> (preuzeto 07. siječnja 2017. godine)
6. L. L. Simon, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 1-2.
7. *Guidance for industry, Q8(R2) Pharmaceutical Development*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Rockville, MD, U.S.A., 2009., <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073507.pdf> (preuzeto 07. siječnja 2017. godine)
8. M. R. Owen, C. Luscombe, L. Wah, S. Godbert, D. L. Crookes i D. Embiata-Smit, *OPRD.5* (2001) 308–323.
9. S. Šašić, *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2008.
10. R. J. Hart, N. I. Pedge, A. R. Steven i K. Sutcliffe, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 196–202.
11. M. P. Feth, K. Rosen i A. Burgard, *Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 282-293.

12. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 2004.
13. E. Smith i G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Inc., West Sussex, England, 2005.
14. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy For Chemical Analysis*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2000, str. 1-5.
15. S. Warterig i R. H. H. Neubert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (2005) 1144-1170.
16. O. A. C. Stevens, J. Hutchings, W. Gray, R. L. Vincent i J. C. Day, *J. Biomed. Opt.* **21** (2016) 1-6.
17. Raman Products Technical Note No. 1250, *Immersion Optic For Reaction Monitoring*, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, MI, USA, 2014, <http://ibscaribe.com/pdfs/products/pat-analyzers/raman/sampling3-mr-probe2-immersion.pdf> (preuzeto 13. siječnja 2017. godine)
18. O. Svenson, M. Josefson i F. W. Langkilde, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **49** (1999) 49–66.
19. M. Assirelli, W. Xu, i W. Chew, *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 610-621.
20. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić i G. Verbanec, G, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
21. T. Jednačak, P. Novak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, J. G. Khinast, J. Plavec, P. Šket i J. P. Vuković, *Acta Chim. Slov.* **61** (2014) 161–169.
22. V. S. Tumuluri, M. S. Kemper, A. Sheri, S.-R. Choi, I. R. Lewis, M. A. Avery i B. A. Avery, *Org. Process Res. Dev.* **10** (2006) 927–933.
23. I. Csontos, H. Pataki, A. Farkas, H. Bata, B. Vajna, Z. K. Nagy, G. Keglevich i G. J. Marosi, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 189-195.
24. F. S. P. Cardoso, G. E. Mickle, M. A. da Silva, P. T. Baraldi i F. B. Ferreira, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 306-311.
25. N. Haddad, B. Qu, H. Lee, J. Lorenz, R. Varsolana, S. Kapadia, M. Sarvestani, X. W. Feng, C. A. Busacca, D. Hebrault, S. Rea, L. Schellekens i C. H. Senanyake, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 132–138.
26. P. Hamilton, M. J. Sanganee, J. P. Graham, T. Hartwig, A. Ironmonger, C. Priestley, L. A. Senior, D. R. Thompson i M. R. Webb, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 236–243.
27. S. Goldrick, E. Mercer, G. Montague, D. Lovett i B. Lonnox, *IFAC Proceedings Volumes*, **47** (2014) 6222-6227.
28. E. Hirsch, H. Pataki, A. Farkas, H. Bata, P. Vass, C. Feher, Z. Barta, L. Parta, I. Csontos, A. Ballagi, Z. K. Nagy i G. J. Marosi, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 1721-1727.
29. E. Simone, A. N. Saleemi i Z. K. Nagy, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 167-177.

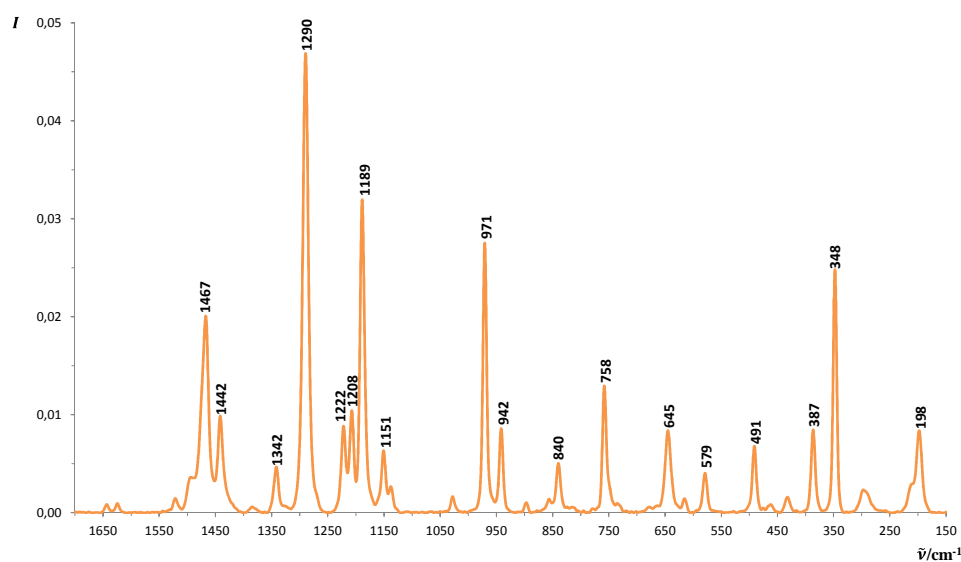
30. H. Hongxun, S. Weiyi, M. Barrett, V. Caron, A. Healy i B. Glennon, *Org. Process. Res. Dev.* **14** (2010) 1209-1214.
31. G. Févotte, *Chem. Engl. Res. Des.* **85** (2007) 906–920.
32. T. Jednačak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, M. Marijan, J. G. Khinast i P. Novak, *Acta Pharm.* **64** (2014) 1–13.
33. H. Pataki, I. Csontos, Z. K. Nagy, B. Vajna, M. Molnar, L. Katona i G. Marosi, *Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 493-499.
34. K. A. Powell, A. N. Saleemi, C. D. Rielly i Z. K. Nagy, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 626-636.
35. M. C. Sarraguça, T. De Beer, C. Vervaet, J.-P. Remon i J. A. Lopes, *Talanta* **83** (2010) 130–138.
36. L. Saerens, L. Dierickx, B. Lenain, C. Vervaet, J. P. Remon i T. De Beer, *T. Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77** (2011) 158–163.
37. L. Saerens, N. Segher, C. Vervaet, J. P. Remon i T. De Beer, *Anal. Chim. Acta* **806** (2014) 180–187.
38. G. J. Vergote, T. R. M. De Beer, C. Vervaet, J. P. Remon, W. R. G. Baeyens, N. Diericx i F. Verpoort, *Eur. J. Pharm. Sci.* **21** (2004) 479–485.
39. H. Wikström, P. J. Marsac i L. S. Taylor, *J. Pharm. Sci.* **94** (2005) 209–219.
40. A. G. Jones, *Crystallization Process Systems*, Butterworth-Heinemann, Woburn, USA, 2002, 62-63, 124-128.
41. S. Lawton, G. Steele i P. Shering, *Org. Process Res. Dev.* **13** (2009) 1357-1363.
42. H. G. Brittain, *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, Informa Healthcare USA Ltd., New York, USA, 2009, str. 1-10.
43. J. W. Chew, P. S. Chow i R. B. H. Tan, *Cryst. Growth Des.* **7** (2007) 1416-1422.
44. T. Leyssens, C. Baudry i M. L. Escudero Hernandez, *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 413-426.
45. N. K. Adlington, S. N. Black i D. L. Adshead, *Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 557-567.
46. P. Billot, M. Couty i P. Hosek, *Org. Process Res. Dev.* **14** (2010) 511-523.
47. S. S. Kadam, E. van der Windt, P. J. Daudey i H. J. M. Kramer, *Cryst. Growth Des.* **10** (2010) 2629-2640.
48. C. H. Hsieh, J. Billeter, M. E. P. McNally, R. M. Hoffman i P. J. Gemperline, *Anal. Chem.* **85** (2013) 5367-5375.
49. G. X. Zhou, M. Fujiwara, X. Y. Woo, E. Rusli, H. Tung, C. Starbuck, O. Davidson, Z. Ge i R. D. Braatz, *Cryst. Growth Des.* **6** (2006) 892-898.
50. E. Simone, A. N. Saleemi, N. Tonnon i Z. K. Nagy, *Cryst. Growth Des.* **14** (2014) 1839-1850.
51. B. O'Sullivan i B. Glennon, *Org. Process Res. Dev.* **9** (2005) 884-889.

52. A. N. Saleemi, Strategic Feedback Control of Pharmaceutical Crystallization Systems, Doktorski rad, Loughborough University, 2011., str. 135-146.
53. K. Varmuza, P. Filzmoser, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2009, str. 1-10.
54. H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality, An Introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, 2001.
55. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, 1996.
56. I. Singh, P. Juneja, B. Kaur i P. Kumar, *ISRN Anal. Chem.* **2013** (2013), 1-14.
57. H. Swierenga, A. P. de Weijer, R. J. van Wijk i L. M. C. Buydens, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **49** (1999) 1-17.
58. J. B. Cooper, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **46** (1999) 231-247.
59. Y. Sun, Comparison and Combination of Near-infrared and Raman spectra for PLS and NAS quantitation of glucose, urea and lactate, Magistarski rad, University of Iowa, 2013., str. 14-38.
60. M. Muratore, *Anal. Chim. Acta* **793** (2013) 1-10.
61. A. Rohman, D. Y. Setyaningrum i S. Riyanto, *International Journal of Spectroscopy* **2013** (2013) 1-5.
62. A. M. Gomez Caravaca, R. M. Maggio, V. Verardo, A. Cichelli i L. Cerretani, *LWT Fd. Sci. Tech.* **50** (2013) 153-159.
63. J. P. McLean, G. Jin, M. Brennan, M. K. Nieuwoudt i P. J. Harris, *Can. J. For. Res.* **44** (2014) 820-830.
64. K. Pearson, *Philosophical Magazine* **2** (1901) 559-572.
65. H. Hotelling, *Journal of Educational Psychology* **24** (1933) 417-441.
66. <http://www.camo.com/downloads/U9.6%20pdf%20manual/The%20Unscrambler%20Methods.pdf> (preuzeto 03. veljače 2017. godine)
67. [http://www.camo.com/helpdocs/The\\_Unscrambler\\_Method\\_References.pdf](http://www.camo.com/helpdocs/The_Unscrambler_Method_References.pdf) (preuzeto 03. veljače 2017. godine)
68. I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis, Second Edition*, Springer-Verlag, New York, USA, 2002.
69. C. Zhang, C. Wang, F. Liu i Y. He, *J. Spectrosc.* **2016** (2016) 1-7.
70. S. Wold, M. Sjöström i L. Eriksson, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **58** (2001) 109-130.
71. <http://files.nocnt.ru/hardware/science/senterra/opus65-doc-en/quant.pdf> (preuzeto 15. veljače 2017. godine)
72. J. Fischer i C. R. Ganellin, *Analogue-based Drug Discovery*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2006, str. 81-111.

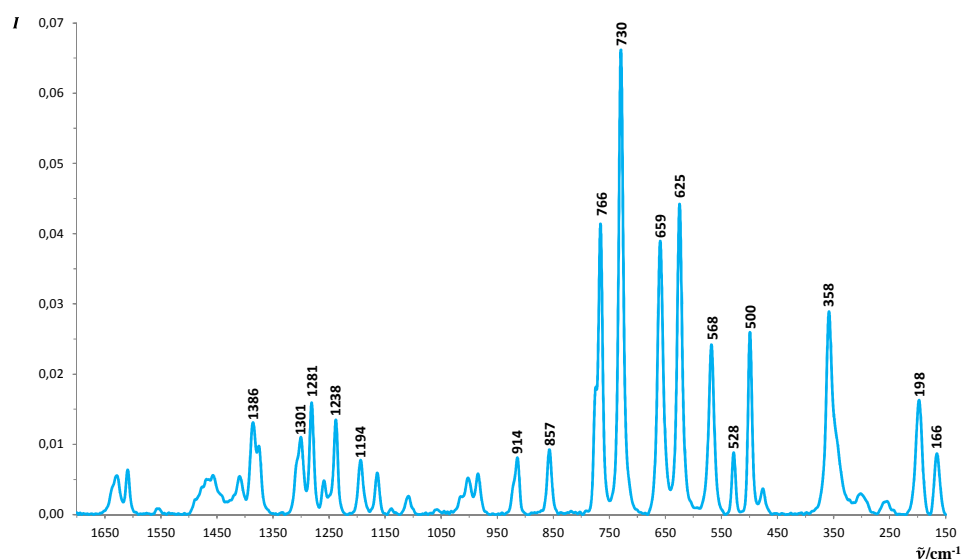
73. <https://www.drugs.com/monograph/omeprazole.html> (preuzeto 14. ožujka 2017. godine)
74. D. McTavish, M. M.-T. Buckley i R. C. Heel, *Drugs* **42** (1991) 138–170.
75. M. I. Wilde, *Drugs* **48** (1994) 91-132.
76. H. D. Langtry, M. I. Wilde, *Drugs* **56** (1998) 447–486.
77. J. M. Shin, O. Vagin, K. Munson, M. Kidd, I. M. Modlin i G. Sachs, *Cel. Mol. Life Sci.* **65** (2008) 264-281.
78. N. H. Milac, A. Copar, B. Podobnik, A. C. Belcic, A. Kosak, B. Ornik i U. Urleb (Lek Pharmaceuticals d.d.), United States Patent US 7553856 B2, 30. lipnja 2009. godine.
79. K. Lövquist, G. Sundén, D. Noreland i I. Ymén (Astra Aktiebolag), United States Patent 6150380, 21. studenog 2000. godine.
80. K. Lövquist, G. Sundén, D. Noreland i I. Ymén (AstraZēneca AB), United States Patent US 6384059 B1, 07. svibnja 2002. godine.
81. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/40/Omeprazole\\_enantiomers.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/40/Omeprazole_enantiomers.svg) (preuzeto 14. ožujka 2017. godine)
82. J. Huang, S. Romero Torres, M. Moshgbar, *Am. Pharmaceut. Rev.*, 1. listopada 2010, <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116330-Practical-Considerations-in-Data-Pre-treatment-for-NIR-and-Raman-Spectroscopy/> (preuzeto 09. siječnja 2017. godine)
83. R. M. Claramunt, C. López i J. Elguero, *ARKIVOC* **5** (2006) 5–11.
84. R. M. Claramunt, C. López, I. Alkorta, J. Elguero, R. Yang i S. Schulman, *Magn. Reson. Chem.* **42** (2004) 712–714.
85. C. Yang, Q. Jin, H. Zhang, J. Zhu, B. Yu i J. Deng, *Green Chem.* **11** (2009) 1401-1405
86. C. A. Bunton i N. D. Gillitt, *J. Phys. Org. Chem.* **15** (2002) 29-35.
87. A. Rezaeifard, R. Haddad, M. Jafarpour i M. Hakimi, *ACS Sustainable Chem. Engl.* **2** (2014) 941-950.
88. L. Zong, C. Wang, A. M. P. Moeljadi, X. Ye, R. Ganguly, Y. Li, H. Hirao i C.-H. Tan, *Nat. Commun.* **7** (2016) 1-7.
89. L. J. Csányi, I. Horváth i Z. M. Galbács, *Transition Met. Chem.* **14** (1989) 90-94.
90. N. J. Campbell, A. C. Dengel, C. J. Edwards i W. P. Griffith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **6** (1989) 1203-1208.
91. Tytko, K.-H. *Gmelin Handbook of Inorganic Chemistry: Molybdenum, Supplement Volume B 3b*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA, 1988 str. 135.
92. S. Campestrini, V. Conte, F. Di Furia i G. Modena, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 5721-5724.
93. J. B. Lambert, H. F. Shurvell i R. G. Cooks, *Introduction to Organic Spectroscopy*, Macmillan Publications, New York, USA, 1987, str. 174-177.

- 
94. M. I. S. Sastri i S. Singh, *Proc. Indian Acad. Sci.* **95** (1985) 499-508.
  95. L. I. Berezhinsky, V. P. Maslov, V. V. Tetyorkin, V. A. Yukhymchuk, *Semicond. Phys., Quantum Electron. Optoelectron.* **8** (2005) 37-40.
  96. V. Palanza, D. Di Martino, A. Paleari, G. Spinolo i L. Prosperi, *J. Raman Spectrosc.* **39** (2008) 1007-1011.
  97. J. F. Mammone i S. K. Sharma, *J. Phys. Chem.* **84** (1980) 3130-3134.

## § 8. DODATAK

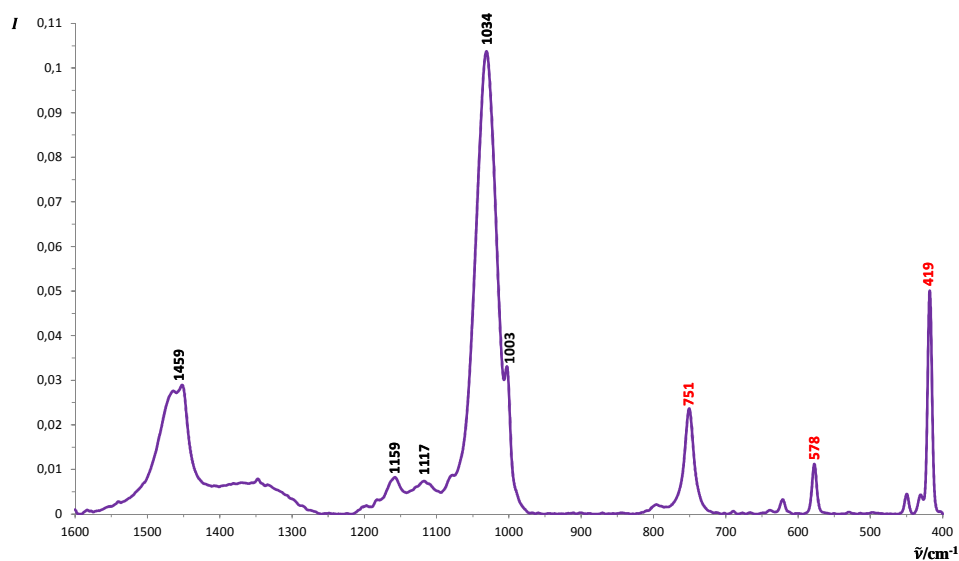


Slika 8.1. Obradeni Ramanov spektar *off-line* spoja MTX u čvrstom stanju u području valnih brojeva od  $1700\text{ cm}^{-1}$  do  $150\text{ cm}^{-1}$ . Snaga lasera pri mjerenju iznosila je  $100\text{ mW}$ .

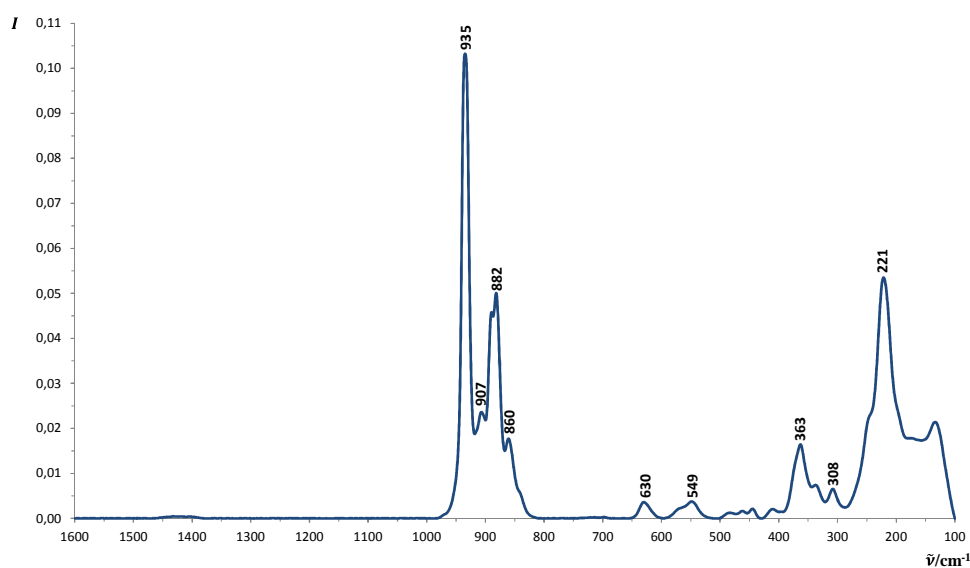


Slika 8.2. Obradeni Ramanov spektar *off-line* spoja OMP-Cl x HCl u čvrstom stanju u području valnih brojeva od  $1700\text{ cm}^{-1}$  do  $150\text{ cm}^{-1}$ . Snaga lasera pri mjerenju iznosila je  $100\text{ mW}$ .

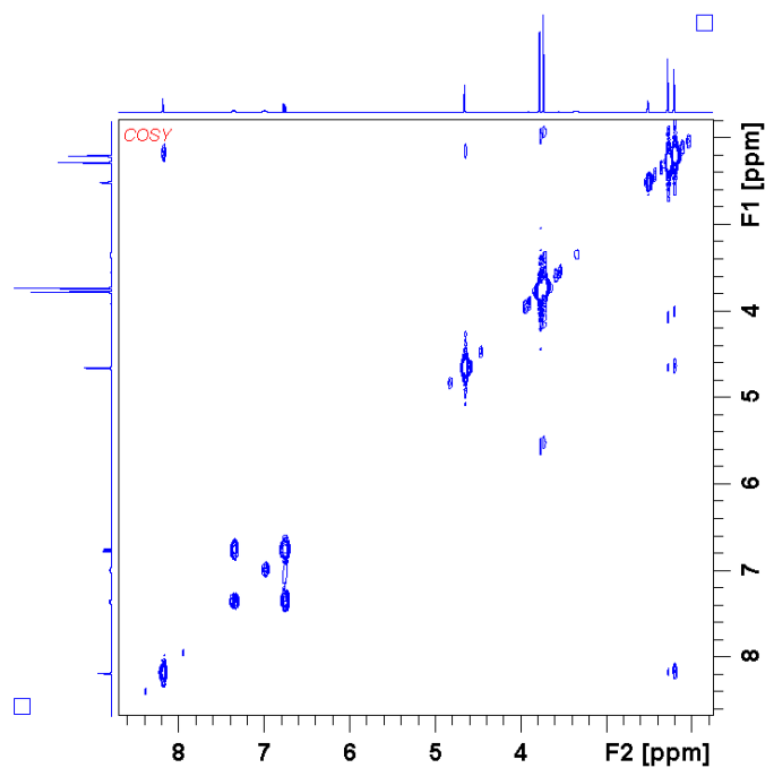




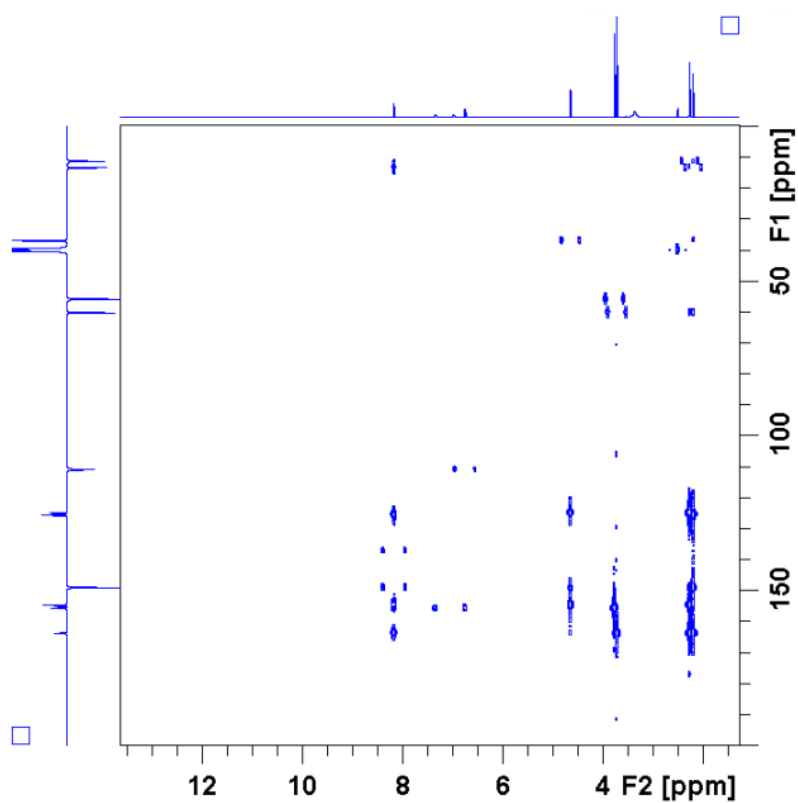
Slika 8.3. Obradeni Ramanov spektar *off-line* metanola u području valnih brojeva od 1600  $\text{cm}^{-1}$  do 400  $\text{cm}^{-1}$ .



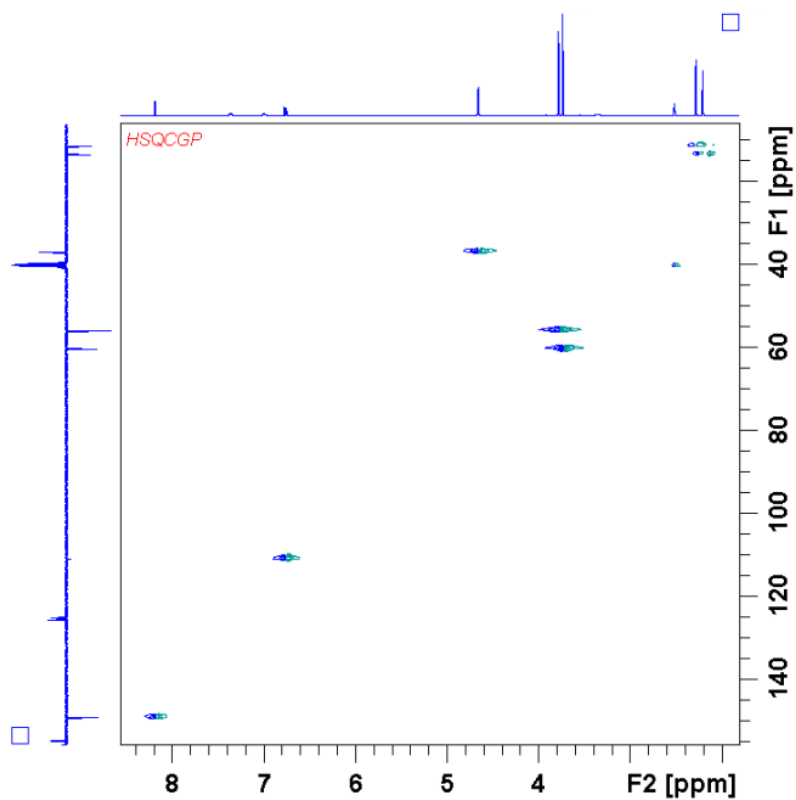
Slika 8.4. Obradeni Ramanov spektar *off-line* spoja AHM u čvrstom stanju u području valnih brojeva od 1600  $\text{cm}^{-1}$  do 100  $\text{cm}^{-1}$ .



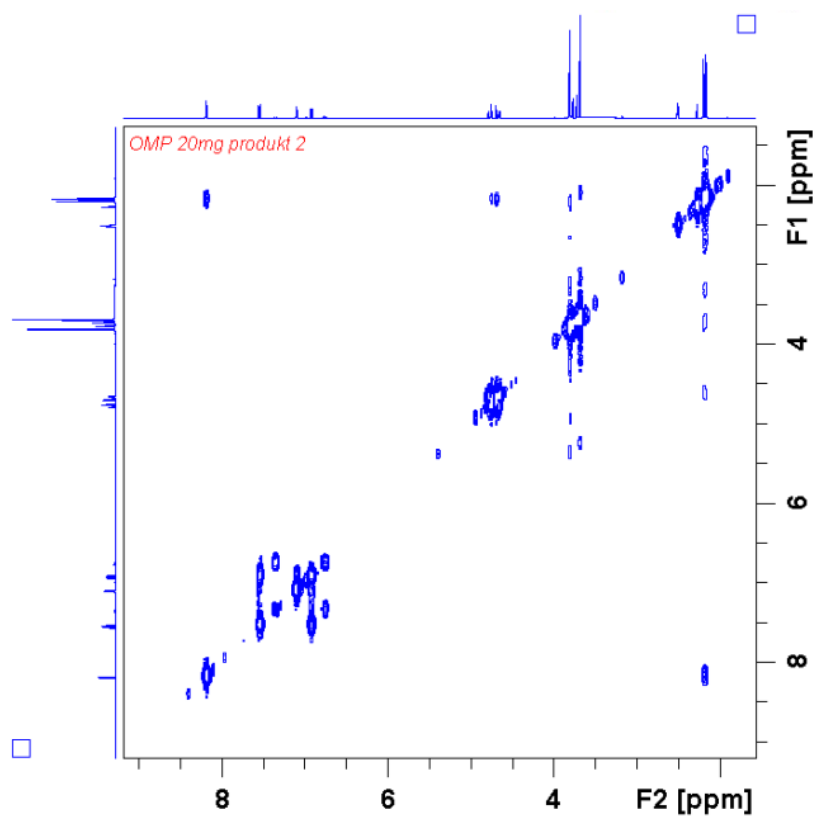
Slika 8.5. COSY spektar spoja 1.



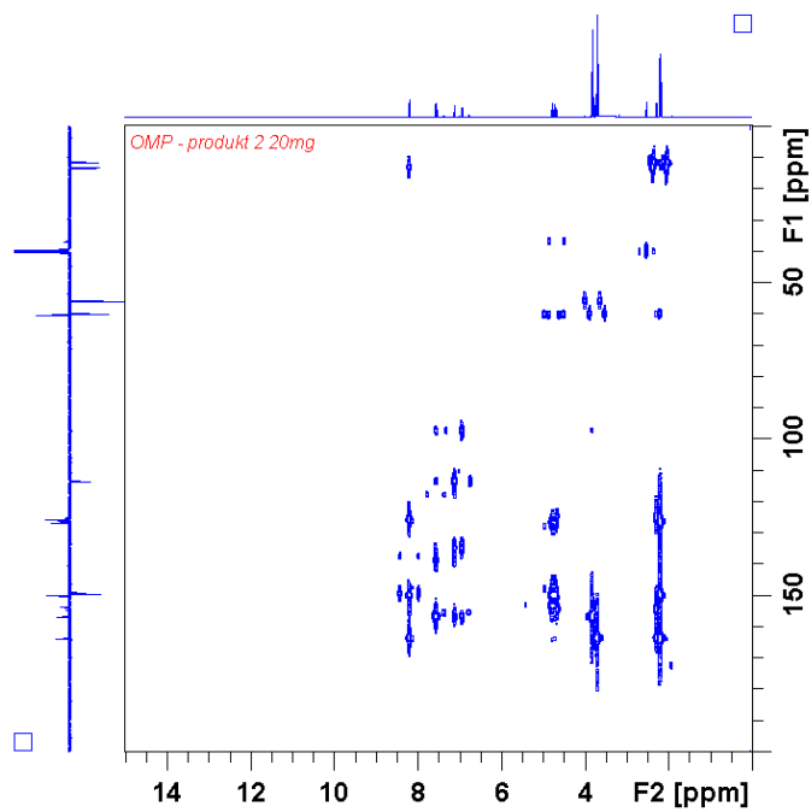
Slika 8.6. HMBC spektar spoja 1.



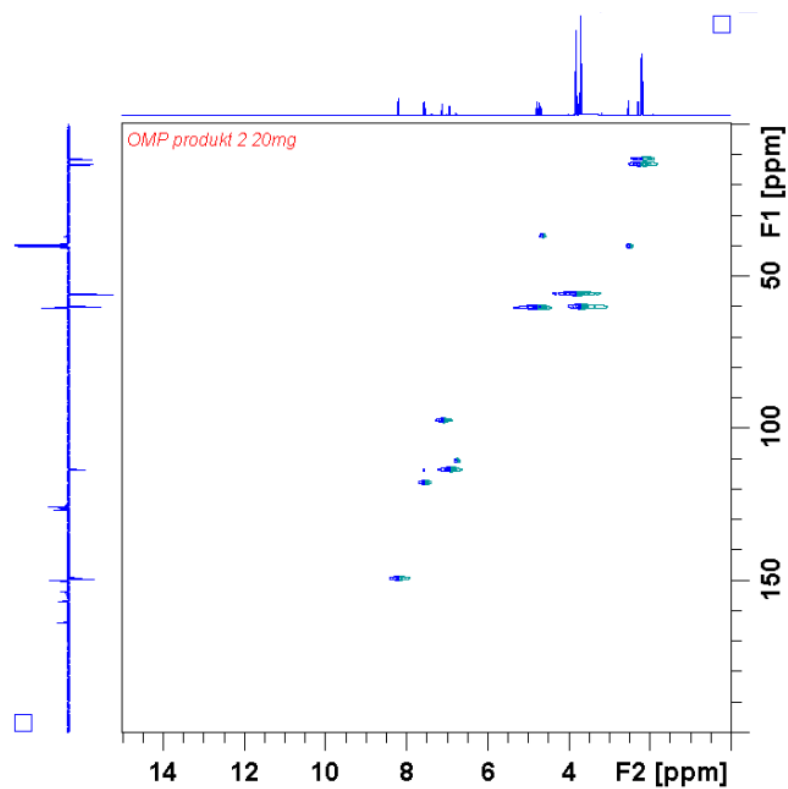
Slika 8.7. HSQC spektar spoja 1.



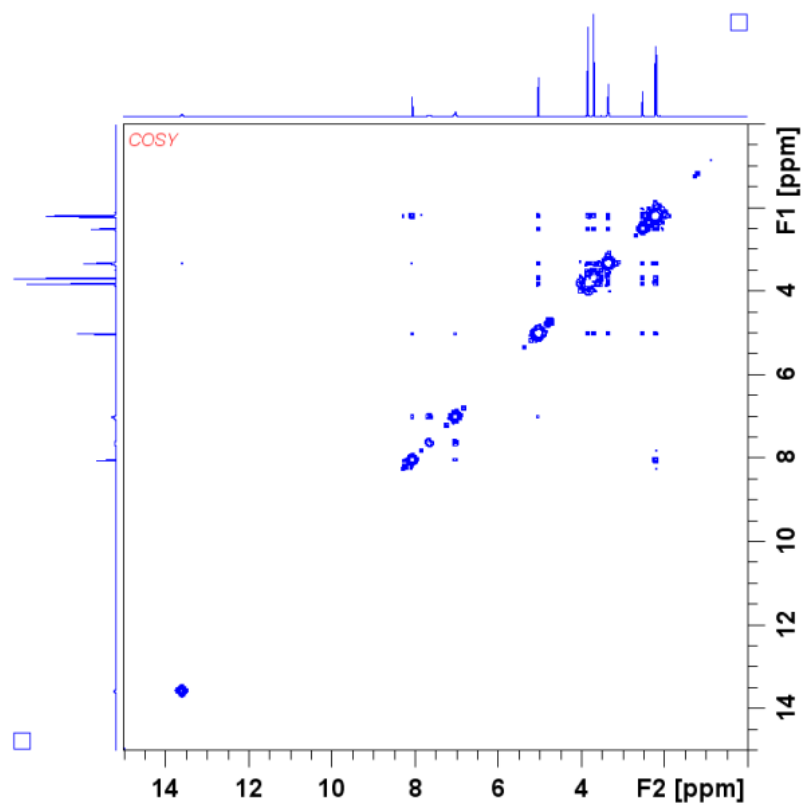
Slika 8.8. COSY spektar spoja 2.



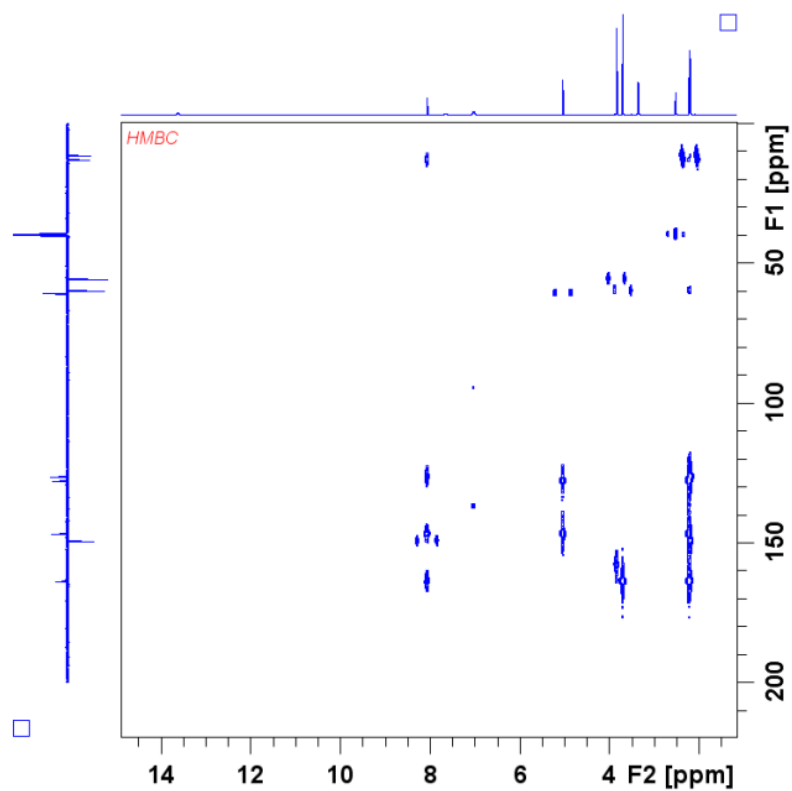
Slika 8.9. HMBC spektar spoja 2.



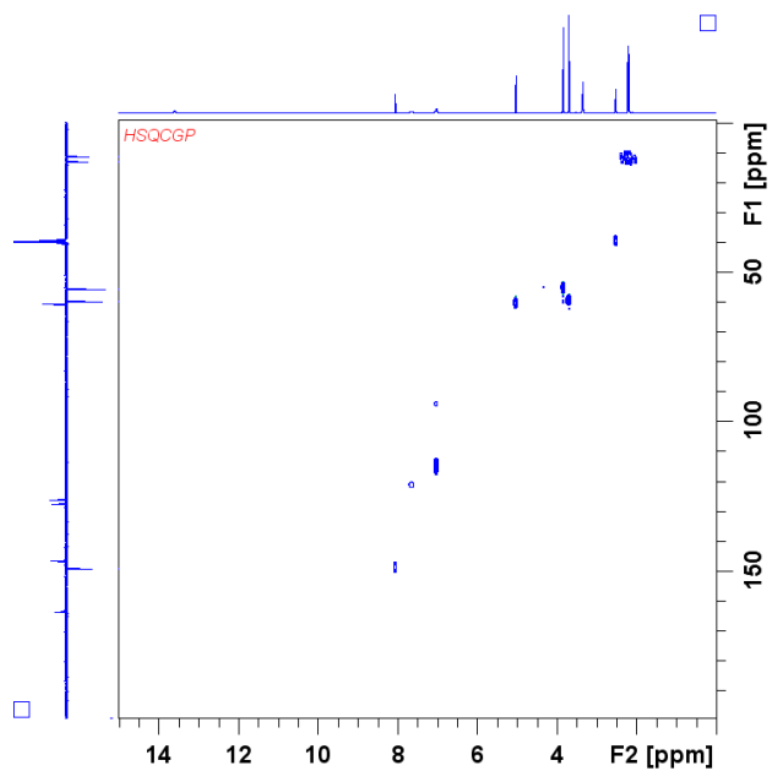
Slika 8.10. HSQC spektar spoja 2.



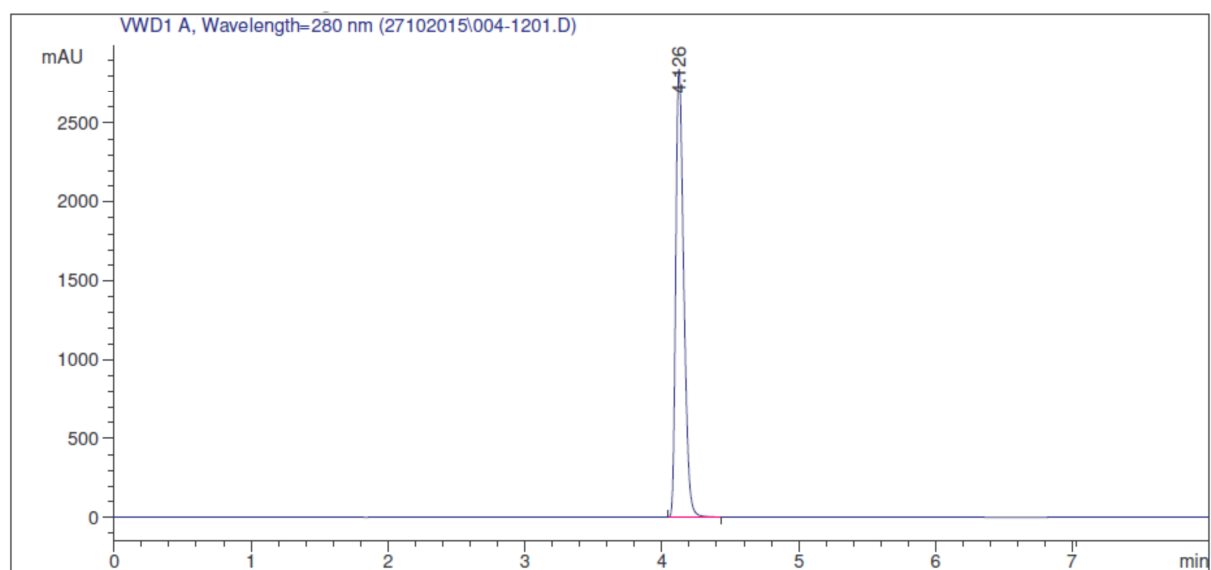
Slika 8.11. COSY spektar spoja 3.



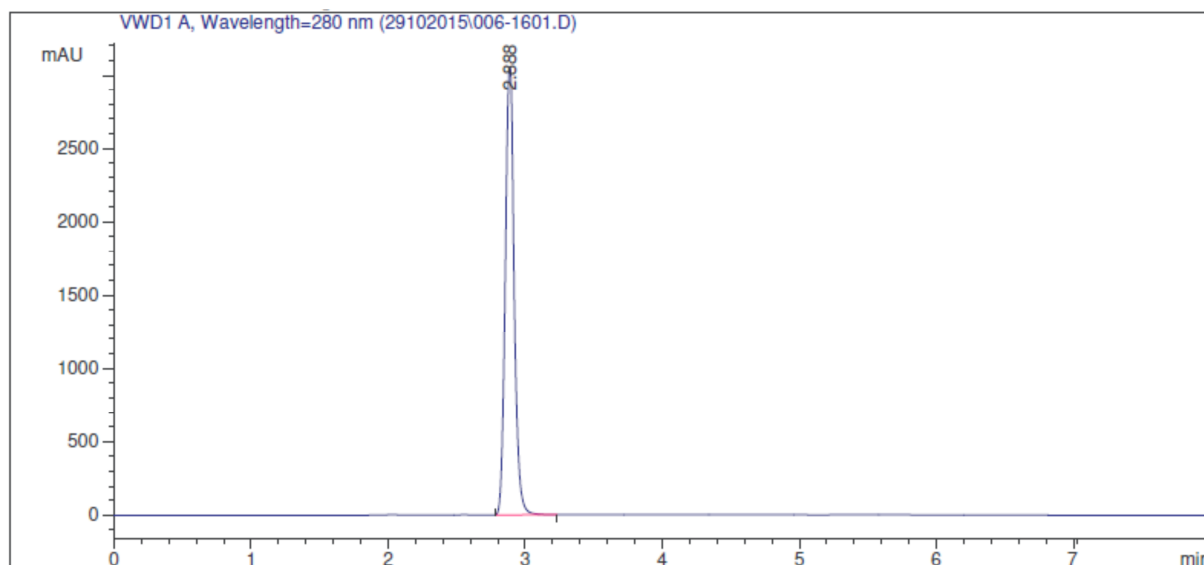
Slika 8.12. HMBC spektar spoja 3.



Slika 8.13. HSQC spektar spoja 3.

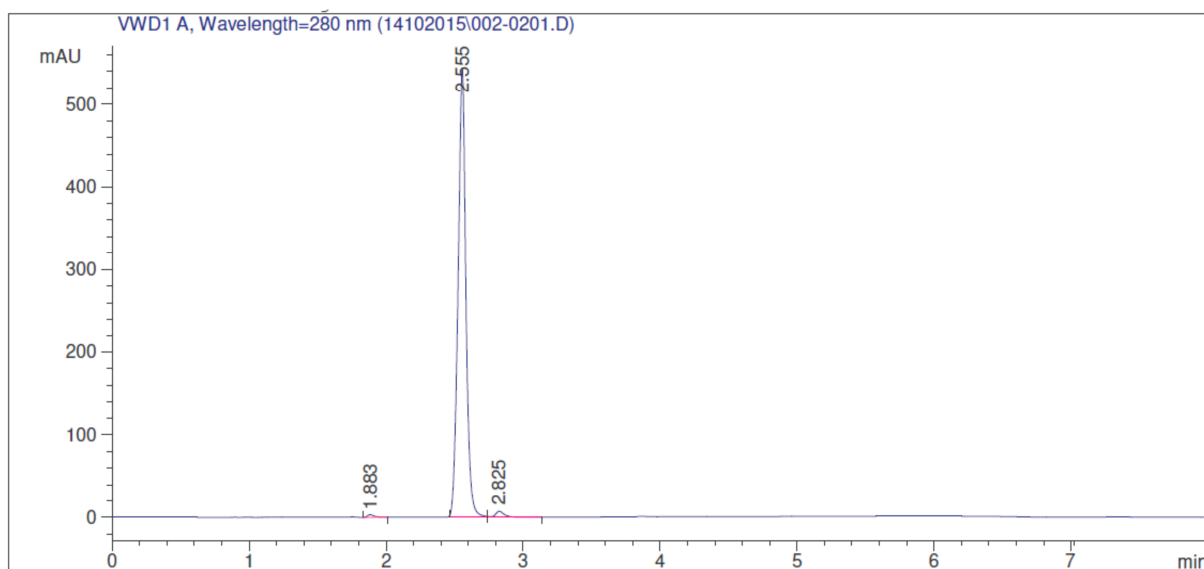


Slika 8.13. Kromatogram spoja 1. Retencijsko vrijeme: 4,13 min. Kromatografska čistoća: 100,0 %.

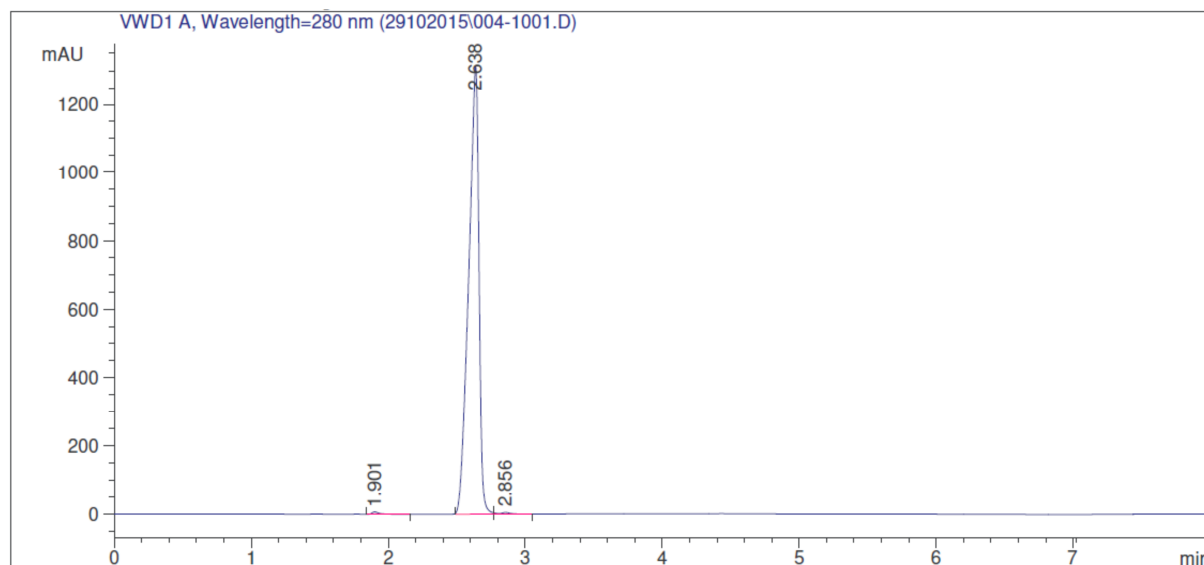


Slika 8.13. Kromatogram prekrizaliziranog spoja **2**. Retencijsko vrijeme: 2,89 min.

Kromatografska čistoća: 99,2 %.

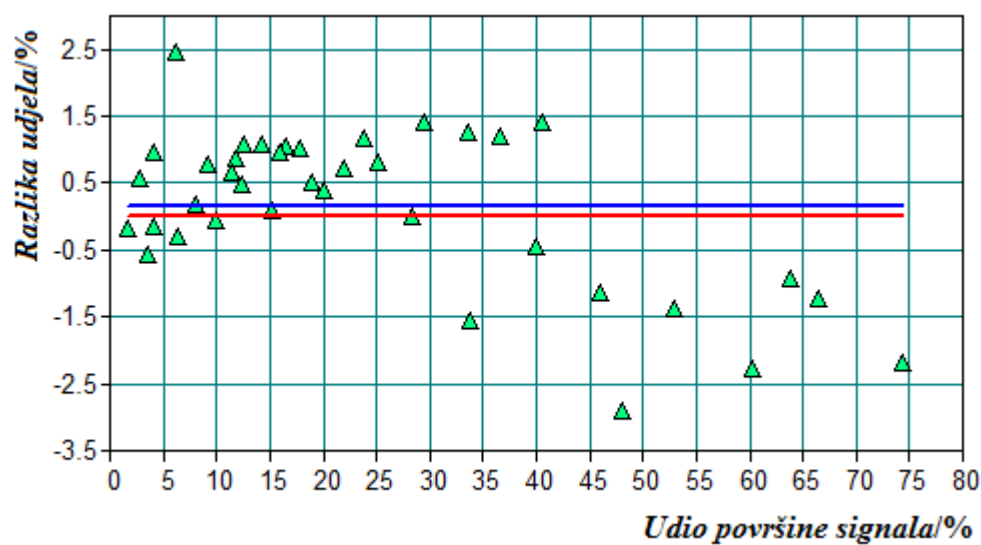


Slika 8.13. Kromatogram sirovog spoja **3**. Retencijsko vrijeme: 2,56 min. Kromatografska čistoća: 98,0 %.



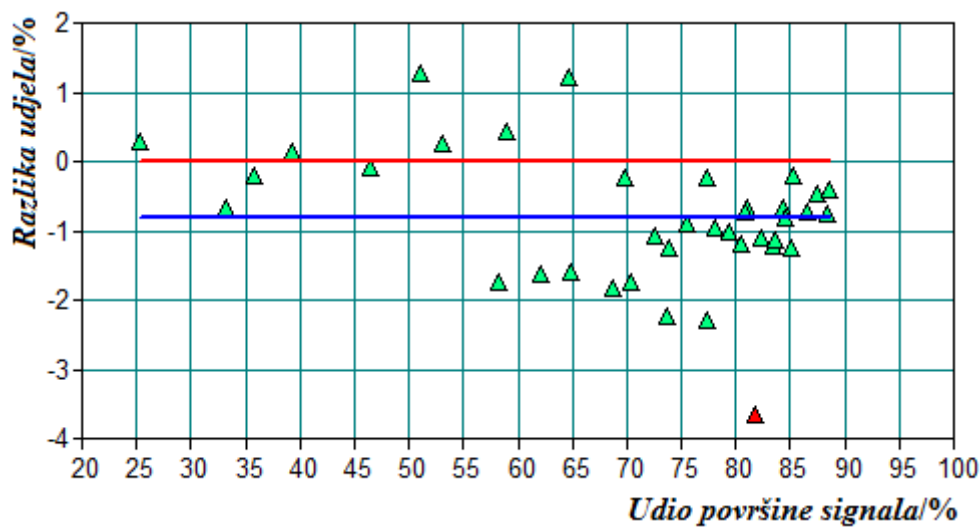
Slika 8.13. Kromatogram prekrizaliziranog spoja **3**. Retencijsko vrijeme: 2,64 min.

Kromatografska čistoća: 99,2 %.

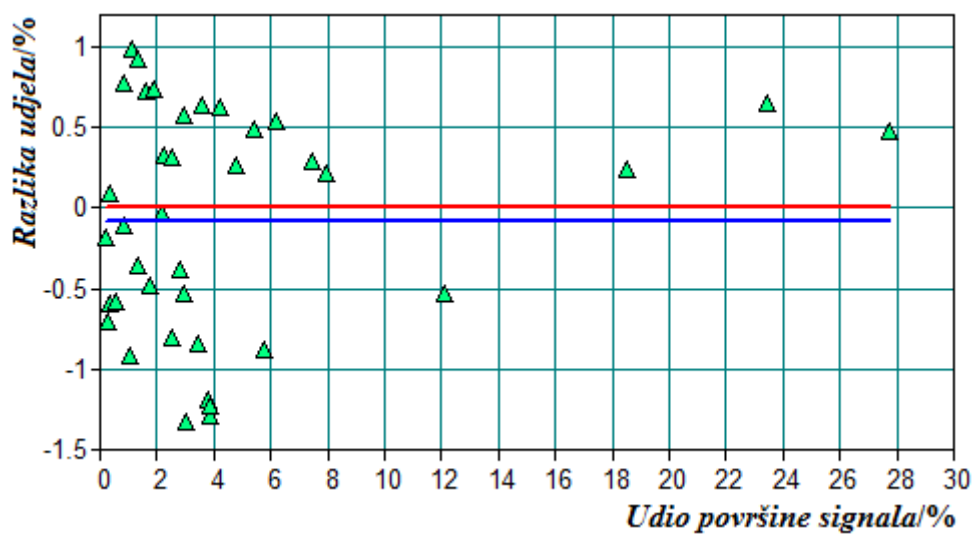


Slika 8.14. Dijagram korelacije odstupanja regresijskih vrijednosti od stvarnih vrijednosti udjela spoja **1** i stvarne vrijednosti udjela spoja **1** na validacijskim uzorcima modela 1-B-2 sa 3 faktora.

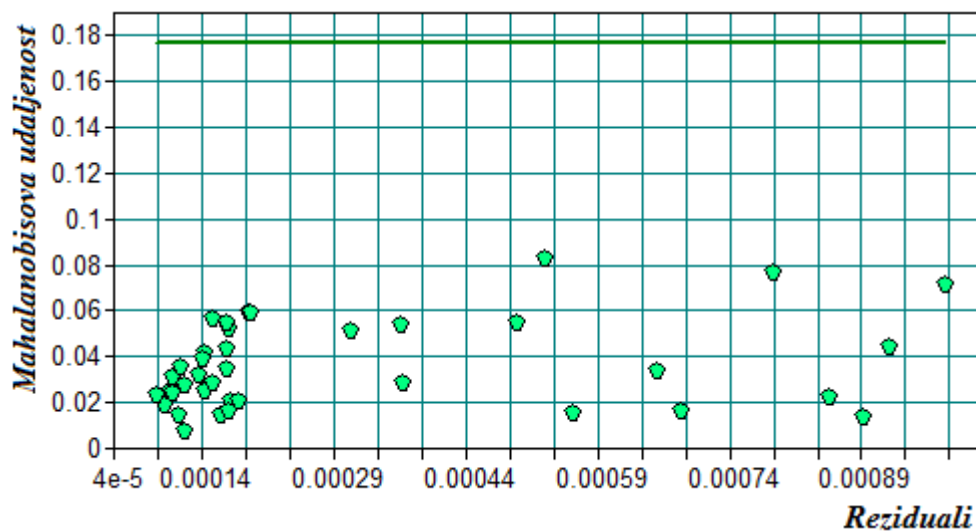




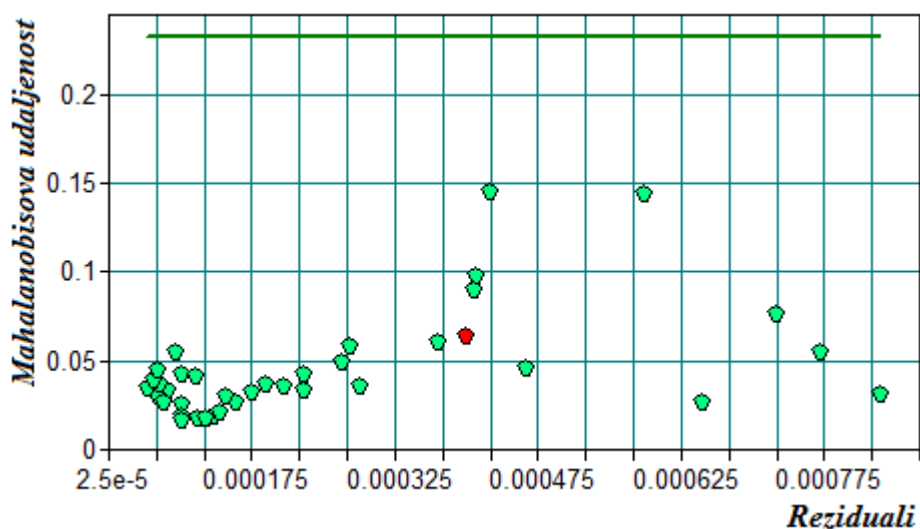
Slika 8.15. Dijagram korelacije odstupanja regresijskih vrijednosti od stvarnih vrijednosti udjela spoja 2 i stvarne vrijednosti udjela spoja 2 na validacijskim uzorcima modela 1-B-2 sa 4 faktora.



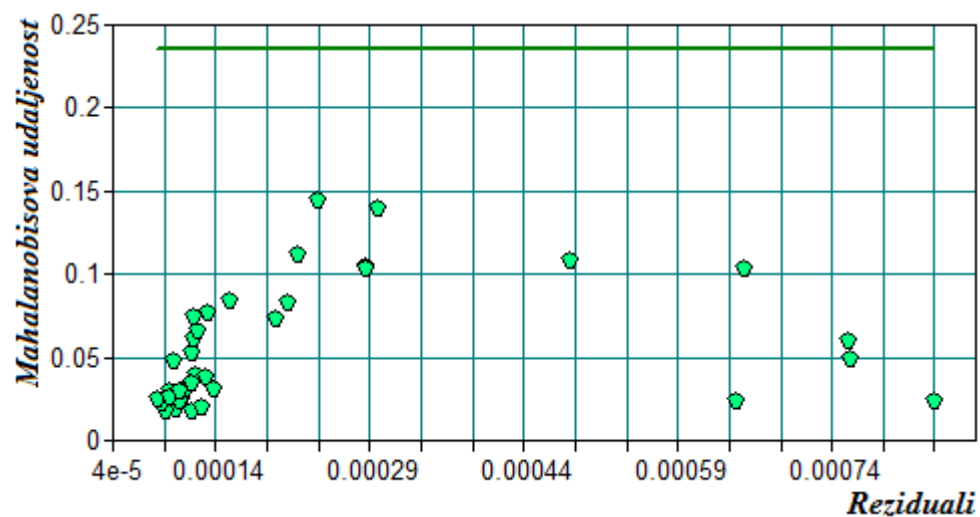
Slika 8.16. Dijagram korelacije odstupanja regresijskih vrijednosti od stvarnih vrijednosti udjela spoja 3 i stvarne vrijednosti udjela spoja 3 na validacijskim uzorcima modela 1-B-2 sa 4 faktora.



Slika 8.17. Dijagram korelacije Mahalanobisove udaljenosti i reziduala validacijskih spektara modela 1-B-2 za spoj 1 sa 3 faktora.



Slika 8.18. Dijagram korelacije Mahalanobisove udaljenosti i reziduala validacijskih spektara modela 1-B-2 za spoj 2 sa 4 faktora.



Slika 8.19. Dijagram korelacije Mahalanobisove udaljenosti i reziduala validacijskih spektara modela 1-B-2 za spoj 3 sa 4 faktora.

## § 9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 14. ožujka 1985. godine u Zagrebu gdje sam pohađao osnovnu školu Josipa Račića, a potom IX. gimnaziju. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijski odsjek, smjer dipl. inž. kemije, upisao sam 2003. godine. Diplomski rad pod naslovom „Sinteza adamantilnih amida *O*-manozil i *O*-galaktozil L-serina“ izradio sam u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Srđanke Tomić-Pisarović i neposrednim vodstvom dr. sc. Rosane Ribić. Diplomirao sam u prosincu 2007. godine te sam odlikovan Medaljom Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh tijekom studija.

Tijekom zadnje dvije godine studija, bio sam stipendist PLIVA-e, te sam po završetku studija u siječnju 2008. godine, u PLIVA-i zaposlen u odjelu Razvoj postupaka kemije na radnom mjestu Suradnika u razvoju. Nakon godinu dana rada prelazim na poziciju Voditelja grupe u odjelu Pilotni laboratorij i postrojenje gdje dobivam odgovornost vođenja projekata u vidu razvoja i uvećanja novih procesa priprave aktivnih farmaceutskih supstanci. Početkom 2017. godine promoviran sam u Višeg voditelja grupe i dodatno na odgovornosti vezane uz vođenje projekata, dobivam i odgovornost za Laboratorij za kristalizacijske procese gdje se počinjem intenzivno baviti primjenom tehnika Procesne analitičke tehnologije i naprednih tehnika upravljanja u kristalizacijskim procesima.

Doktorsku sam disertaciju izradio u Pilotnom laboratoriju odjela Istraživanje i razvoj, TAPI Pilot, PLIVA Hrvatska d.o.o. pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka.

### Popis znanstvenih radova:

D. Šahnić, E. Meštrović, T. Jednačak, I. Habinovec, J. Parlov-Vuković, P. Novak, *Org. Process Res. Dev.* **20** (2016) 2092-2099.

**DOI:** 10.1021/acs.oprd.6b00323