

Procesne analitičke tehnike

Grgić, Andrej

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:217:283841>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Andrej Grgić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

PROCESNE ANALITIČKE TEHNIKE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Procesne analitičke tehnike.....	1
§ 2. PROCESNE ANALITIČKE TEHNIKE ZASNOVANE NA VIBRACIJSKOJ SPEKTROSKOPIJI IN-LINE	2
2.1. Vibracijska spektroskopija	2
2.1.1. <i>Infracrvena spektroskopija.....</i>	3
2.1.2. <i>Ramanova spektroskopija</i>	4
2.2. Vibracijska spektroskopija in-line.....	6
2.2.1. <i>NIR spektroskopija in-line.....</i>	7
2.2.2. <i>ATR spektroskopija in-line.....</i>	8
2.2.3. <i>Ramanova spektroskopija in-line.....</i>	10
§ 3. MULTIVARIJATNE METODE ANALIZE.....	12
3.1.1. <i>Analiza glavnih komponentata - PCA.....</i>	13
3.1.2. <i>Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata – PLSR.....</i>	14
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XV

§ Sažetak

Procesne analitičke tehnike (engl. *process analytical technology*, PAT) su multidisciplinarno polje koje uključuje analitičku kemiju, procesnu kemiju, procesno inženjerstvo i multivarijatne metode analize. PAT se u industriji koriste već nekoliko desetljeće za praćenje i kontrolu procesa, no u novije vrijeme uslijed sve veće primjene u farmaceutskoj industriji bilježe novi porast popularnosti. Međutim, glavna primjena PAT i dalje ostaje u istraživanju i razvoju procesa u laboratorijskoj fazi te pri povećanju obujma proizvodnje.

Tehnike vibracijske spektroskopije *in-line* jedne su od najvažnijih tehnika koje se koriste za kontrolu i praćenje fizikalnih i kemijskih procesa. Infracrvena i Ramanova spektroskopija primjenjuju se za kvantitativnu i kvalitativnu analizu sirovina, međuprodukata i produkata. Spektrometrijska mjerenja provode se pomoću sonde uronjene u procesni medij čime su omogućena mjerenja u realnom vremenu. Dobivene spektre potrebno je obraditi kemometrijskim metoda, odnosno metodama multivarijatne analize kako bi se iz njih dobila potrebna informacija o pojedinom svojstvu.

§ 1. UVOD

1.1. Procesne analitičke tehnike

Procesne analitičke tehnike (PAT) uključuju praćenje i kontrolu kemijskih reakcija i fizikalnih procesa sa svrhom dobivanja proizvoda odgovarajuće kvalitete i svojstava te smanjivanja proizvodnih troškova. PAT su multidisciplinarno područje koje obuhvaća analitičku kemiju, procesno inženjerstvo, procesnu kemiju i multivarijatnu analizu podataka.

PAT se koriste kako bi se steklo duboko razumijevanje praćenog procesa što u konačnici može dovesti do smanjenja količine otpada, povećanja efikasnosti proizvodnje, boljeg upravljanja sirovinama, povećanja sigurnosti te posljedično do smanjenja troškova proizvodnje.¹

Prema mjestu određivanja procesnih veličina PAT se dijele na:

1. *off-line* – analiza se provodi u laboratoriju na mjestu izdvojenom od proizvodnog pogona
2. *at-line* – analiza se provodi u laboratoriju na mjestu proizvodnog pogona
3. *on-line* – analiza se provodi u preusmjerenom toku uzorka koji se vraća u proces
4. *in-line* – analiza se provodi u realnom vremenu i *in situ* bez ometanja proizvodnog toka

Najveći problem analiza *off-line* i *at-line* je vremenska zadržka od trenutka prikupljanja uzorka do njegove analize te statistička i fizikalna greška prilikom uzorkovanja. Statistička greška javlja se zbog nereprezentativnosti uzorka, dok je fizikalna greška posljedica promjene stanja tvari prilikom uzorkovanja. Zbog prethodno navedenih razloga analiza *in-line* se pokazala boljom opcijom. Analiza *in-line* omogućava provođenje mjerenja *in-situ* tijekom kemijskih i fizikalnih procesa, a takav pristup ima značajne prednosti zato što se dobivaju podatci u realnom vremenu, smanjuje se mogućnost kontaminacija ili uništavanje uzorka te se smanjuje izlaganje toksičnim tvarima.² Prednost analize *in-line* leži i u tome što nema pripreme uzorka te nije potrebno praviti alikvote čime se izbjegava narušavanje ravnoteže promatranog sustava

Upravo se zbog navedenih prednosti razvio niz vibracijskih spektroskopskih tehnika *in-line* poput transmisijske spektroskopije NIR i MIR, infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju i difuznu refleksiju (DRIFT), infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju (ATR), Ramanova spektroskopija i njene inačice poput spektroskopije površinski pojačanog Ramanova raspršenja (SERS), spektroskopije površinski

pojačanog rezonantnog Ramanova raspršenja (SERRS), koherentne anti-Stokesove Ramanove spektroskopije (CARS) te spektroskopije rezonantnog Ramanova raspršenja (RRS).³

Zbog složenosti spektara dobivenih navedenim metodama rezultati se obrađuju primjenom statističkih metoda odnosno multivarijatnom analizom podataka kako bi se dobila tražena informacija o sustavu.

§ 2. PROCESNE ANALITIČKE TEHNIKE ZASNOVANE NA VIBRACIJSKOJ SPEKTROSKOPIJI IN-LINE

2.1. Vibracijska spektroskopija

Vibracijska spektroskopija služi za identifikaciju molekula na temelju njihovih vibracija. Izborna pravila za vibracijske spektre dopuštaju promjenu vibracijskog kvantnog broja za ± 1 za harmonični oscilator, odnosno ± 2 , ± 3 , ... za anharmonični oscilator. Zbog navedenih izbornih pravila u vibracijskim spektrima mogu se pojaviti vrpce gornjih ili viših tonova (približno cjelobrojni višekratnici frekvencija osnovnih vrpce) te kombinacijske vrpce (kombinacije osnovnih vibracija).

Poliatomne molekule, ovisno o broju atoma u molekuli, mogu imati više temeljnih vibracija. Broj vibracijskih stupnjeva slobode različit je za linearne i nelinearne molekule. Kod nelinearnih molekula broj vibracijskih stupnjeva slobode iznosi $3N - 6$, pri čemu je N broj atoma u molekuli. Broj stupnjeva slobode rotacije i translacije je 6 (3 rotacije + 3 translacije). Kod linearnih molekula broj vibracijskih stupnjeva slobode iznosi $3N - 5$, pri čemu je N broj atoma u molekuli. Broj stupnjeva slobode rotacije i translacije je 5 (2 rotacije + 3 translacije). Linearne molekule imaju jedan rotacijski stupanj slobode manje zato što se rotacija oko internuklearne osi ne smatra gibanjem.

Pod određenim uvjetima moguće je sprezanje vibracija poliatomnih molekula: da bi se vibracije sprezale moraju biti iste simetrije, najjača je interakcija između vibracija sličnih energija, sprega između vibracija istezanja prisutna je ako vibracije uključuju zajednički atom, sprega između vibracija svijanja prisutna je ako vibracije uključuju zajedničku vezu i sprega između vibracija svijanja i istezanja postoji ako je veza koja se rasteže sastavni dio kuta koji se svija.⁴

2.1.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (engl. *infrared*, IR) temelji se na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja u frekvencijskom rasponu $3.8 \cdot 10^{14} - 3.0 \cdot 10^{11}$ Hz, što odgovara rasponu valnih brojeva od $12500 - 10 \text{ cm}^{-1}$, odnosno rasponu valnih duljina od $0,8 - 1000 \text{ }\mu\text{m}$. IR spektar dijeli se na blisko infracrveno područje (engl. *near-infrared*, NIR) ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), srednje infracrveno područje (engl. *mid-infrared*, MIR) ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) i daleko infracrveno područje (engl. *far-infrared*, FIR) ($400 - 10 \text{ cm}^{-1}$).

Samo zračenje one frekvencije, koje posjeduje energiju koja odgovara razlici energije između dvije vibracijske razine ili njihovih viših tonova ili kombinaciji dvaju ili više vibracija, može biti apsorbirano od strane molekule čime dolazi do pobude molekule na višu energetska vibracijsku razinu. Ovisno o energiji apsorbiranog zračenja, u molekuli će se pobuditi točno određene vibracije pojedinih funkcijskih skupina. IR spektar tvari ili uzorka pokazivati će ovisnost intenziteta apsorbancije ili transmitancije o valnoj duljini ili valnom broju elektromagnetskog zračenja.

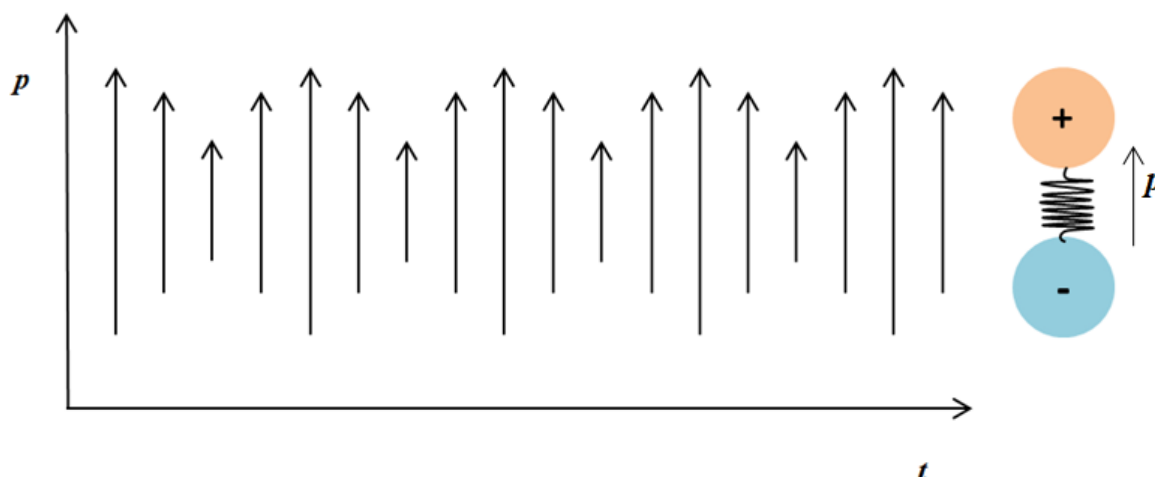
Da bi vibracija bila aktivna u IR području mora doći do vremenski periodičke promjene električnog dipolnog momenta \mathbf{p} . Električni dipolni moment je vektor usmjeren od centra pozitivnog do centra negativnog naboja te je definiran sljedećom jednačinom:

$$\mathbf{p} = \sum_{i=1}^N q_i \mathbf{r}_i \quad (2.1)$$

pri čemu q_i predstavlja naboj čestice i kojoj pripada vektor pomaka \mathbf{r}_i .

U kombinacijskim vrpama dozvoljenima zbog anharmoničnosti, nužno je da samo jedna vrpca bude aktivna (ima promjenu električnog dipolnog momenta). Ovo svojstvo može uzrokovati da neke vrpce koje nije moguće vidjeti u MIR spektru budu vidljive u NIR spektru.

Intenzitet apsorpcijske vrpce povezan je s magnitudom promjene električnog dipolnog momenta tokom pomicanja atoma za vrijeme vibracije te sa stupnjem anharmoničnosti.⁵



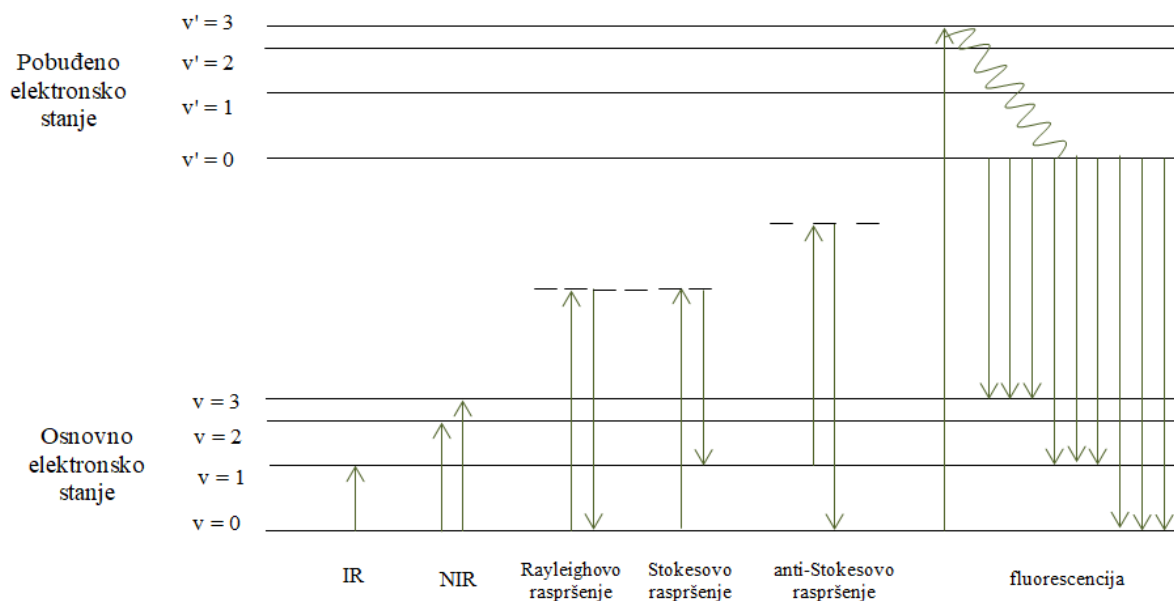
Slika 1. Oscilirajući dipol uzrokuje vremenski periodičnu promjenu električnog polja u svojoj blizini

2.1.2. Ramanova spektroskopija

Ramanov efekt prvi put je opazio 1928. godine C V. Raman, no ovaj efekt predvidio je A. Smekal još 1923. godine na osnovu teorijskih izračuna. Ramanov efekt je neelastično raspršenje elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s uzorkom.

U Ramanovoj spektroskopiji uzorak se izloži laserskom monokromatskom zračenju. Najčešće se koriste laseri čije zračenje se nalazi u VIS ili NIR dijelu spektra. Energija takvog zračenja veća je od energije potrebne da bi se molekulu pobudilo u više vibracijsko stanje. Prilikom međudjelovanja zračenja s uzorkom može doći do dva tipa raspršenja, a to su Rayleighovo raspršenje i Ramanovo raspršenje. Kod Rayleighovog raspršenja izlazni foton jednake je frekvencije, a samim time i jednake energije kao i foton koji je ušao u sustav, no izlazni foton različitog je smjera od ulaznog. Energija sustava jednaka je prije i poslije Rayleighovog raspršenja. Kod Ramanovog raspršenja ulazni i izlazni foton različitih su frekvencija, odnosno različitih su energija. Tijekom Ramanovog raspršenja dolazi do promjene energije sustava, a razlika energije sustava prije i poslije Ramanovog raspršenja jednaka je razlici energija upadnog i izlaznog fotona. Kada je riječ o Ramanovom raspršenju razlikujemo Stokesovo raspršenje i anti-Stokesovo raspršenje. Kod Stokesovog raspršenja upadni je foton veće frekvencije (veće energije) od izlaznog fotona te dolazi do porasta energije sustava. U slučaju anti-Stokesovog raspršenja upadni je foton manje frekvencije (manje energije) od izlaznog fotona te dolazi do smanjenja energije sustava. Pri sobnoj temperaturi uglavnom će dolaziti do Stokesovog raspršenja, dok će pri višim temperaturama

mnoge molekule već biti u višem vibracijskom stanju, što se može vidjeti iz Boltzmannove raspodjele, te će anti-Stokesovo raspršenje biti favorizirano.



Slika 2. Shematski prikaz IR i NIR apsorpcije, Rayleighovog, Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja te fluorescencije

Da bi vibracija molekule bila aktivna u Ramanovom spektru, tijekom vibracije mora doći do promjene polarizabilnosti, α . Polarizabilnost molekule definira se kao lakoća kojom se može deformirati elektronski oblak čestice pod utjecajem vanjskog električnog polja.

Obasjavanje uzorka svjetlošću može rezultirati pojavom više fenomena poput apsorpcije, raspršenja ili fluorescencije. Zato što je Ramanov efekt tako slab, pojava apsorpcije i fluorescencije uzrokuju velike probleme prilikom akvizicije Ramanovog spektra. Do apsorpcije laserskog zračenja može doći ako valna duljina tog zračenja odgovara apsorpcijskoj vrpici u spektru te molekule, što rezultira prijelazom molekule u pobuđeno stanje (vibracijsko ili elektronsko ovisno o valnoj duljini laserskog zračenja). Apsorbirano zračenje pretvara se u termičku energiju u procesu bez zračenja. Apsorbiranje zračenja ima iznimno veliki utjecaj na Ramanov efekt jer je intenzitet Ramanovog raspršenja proporcionalan intenzitetu laserskog zračenja. No, osim apsorpcije laserskog zračenja može doći i do apsorpcije raspršenog zračenja. Navedene smetnje se mogu ukloniti korištenjem lasere čije je zračenje neke druge valne duljine. Fluorescencija također može stvarati probleme u Ramanovoj spektroskopiji kada se molekula nađe u pobuđenom elektronskom stanju. Prvo se

u proces bez zračenja molekula spušta na osnovno vibracijsko stanje pobuđenog elektronskog stanja, nakon čega molekula prelazi u osnovno elektronsko stanje pri čemu dolazi do emisije zračenja, odnosno dolazi do fluorescencije. To emitirano zračenje prekriva Ramanov signal u Ramanov spektru. Smetnje uzrokovane fluorescencijom mogu se izbjeći korištenjem lasera čije je zračenje većih valnih duljina (manje energije) čime će se izbjeći pobuđivanje molekula u više elektronsko stanje.⁶

Ramanova spektroskopija uz to što daje informacije komplementarne infracrvenoj spektroskopiji ima još nekoliko prednosti poput jednostavne pripreme uzorka, mogućnosti snimanja vodenih otopina, široko spektralno područje, mala količina uzorka potrebna za analizu te mogućnost praćenja reakcija u realnom vremenu.⁴

2.2. Vibracijska spektroskopija *in-line*

Vibracijska spektroskopija *in-line* omogućava praćenje i kontrolu procesa na temelju promjene intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpce u spektru. Jedna od prednosti vibracijski spektroskopskih tehnika *in-line* je što omogućavaju snimanje spektara u realnom vremenu, a za to se koriste spektrometri koji su opremljeni sondom i optičkim vlaknima. Zračenje iz izvora fokusira se lećama, a do uzorka koji se analizira prenosi se optičkim vlaknima i sondom. Nakon interakcije elektromagnetskog zračenja s uzorkom raspršeno zračenje se prikuplja sondom te se potom prenosi do spektrometra i detektora odgovarajući optičkim vlaknima.⁷

Tablica 1. Usporedba najvažnijih vibracijskih spektroskopskih tehnika *in-line*⁸

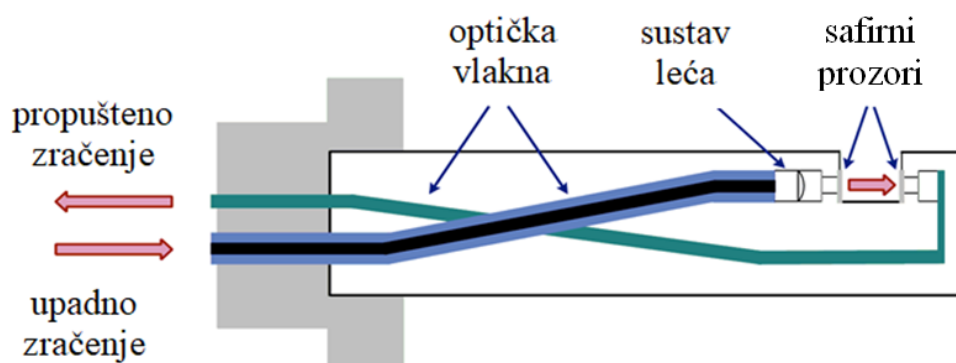
	Spektroskopska tehnika		
	NIR spektroskopija <i>in-line</i>	ATR-MIR spektroskopija <i>in-line</i>	Ramanova spektroskopija <i>in-line</i>
Podaci dobiveni snimanjem spektra	viši tonovi i kombinacijske vrpce	osnovne vibracije, viši tonovi, kombinacijske vrpce i vibracijsko-rotacijska struktura	osnovne vibracije, viši tonovi, kombinacijske vrpce i vibracijsko-rotacijska struktura
Metoda interpretacije podataka	Multivarijantne metode analize	Multivarijantne metode i omjer intenziteta pikova	Multivarijantne metode i omjer intenziteta pikova
Vrsta spektrometra	disperzivni i FTIR	FTIR	disperzivni i FT Raman
Rezolucija	< 8 cm ⁻¹	> 4 cm ⁻¹	> 4 cm ⁻¹

Vrsta sonde	Transmisijska NIR sonda i ATR-NIR sonda	ATR-MIR sonda	Ramanova sonda
Način povezivanja sonde i spektrometra	Optička vlakna	Optička vlakna	Optička vlakna
Udaljenost između spektrometra i sonde	< 100 m	> 2 m	< 100 m

2.2.1. NIR spektroskopija in-line

Spektroskopija NIR proučava interakciju uzorka s elektromagnetskim zračenjem valnih duljina u rasponu od 780 nm do 2500 nm, odnosno u rasponu valnih brojeva od 12500 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} . U spektru NIR mogu se uočiti viši tonovi i kombinacijske vrpce. Spektroskopija NIR koristi se za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa u realnom vremenu te za brzu kvantitativnu i kvalitativnu analizu tvari uključenih u promatrani proces. Postoji u više izvedbi, od kojih se najviše primjenjuje transmisijska NIR spektroskopija *in-line*. Navedena tehnika omogućava praćenje procesa *in situ* pomoću sonde NIR koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom.

U sondi NIR upadno infracrveno zračenje iz izvora prenosi se optički vlaknom do sustava leća gdje se fokusira i usmjerava na uzorak. Propušteno zračenje potom se prenosi odgovarajućim optičkim vlaknom nazad do spektrometra i detektora. Safirni prozori i oblog od inertnog metala štite sondu od okolišnih čimbenika tijekom *in situ* mjerenja.



Slika 3. Presjek transmisijske NIR sonde⁷

Odlika spektara NIR je dobar omjer signala i šuma (S/N) te jednostavno određivanje intenziteta i položaja vrpce što je vrlo važno za kvantitativnu analizu. NIR spektroskopijom moguće je snimati vodene otopine u staklenim reaktorima bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala zbog slabe apsorpcije vode i stakla. No, vrpce u NIR spektrima manje su informativne od vibracijskih vrpce u MIR području. Zbog snažnog preklapanja vrpce u NIR spektru, podaci prikupljeni spektroskopijom NIR *in-line* obrađuju se nekom od kemometrijskih metoda.

Spektroskopija NIR *in-line* se zbog svoje visoke preciznosti upotrebljava zajedno s multivarijantnim metodama analize za kvantitativnu analizu. Kombinacijom spektroskopije NIR *in-line* i kemometrijskih metoda može se određivati sastava farmaceutskih pastila tijekom procesa proizvodnje.¹⁸

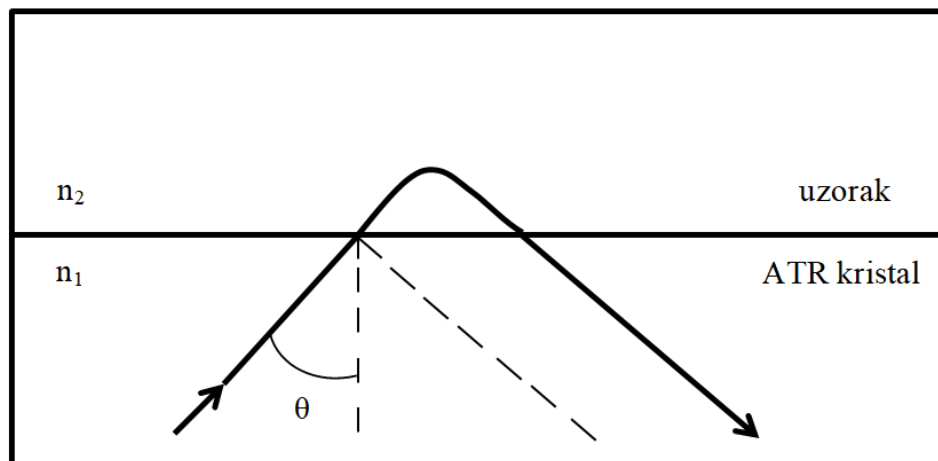
Klimkiewicz i suradnici uspješno su pratili proces pročišćavanja enzima spektroskopijom NIR *in-line* uz korištenje modela PLS.¹⁹ Spektroskopija NIR *in-line* pokazala se robusnom tehnikom prema različitim produktima (amilazama i proteazama) te prema određenim procesnim parametrima kao što su toplina i brzina procesa.

Spektroskopija NIR *in-line* se također primjenjuje i u polimernom inženjerstvu gdje se koristi za praćenje procesa ekstruzije polimera i procesnih parametre kao što su sastav polimera, viskoznost smjese i udio vlage.²⁰

Zbog mogućnosti provedbe mjerenja direktno u reakcijskoj smjesi u realnom vremenu, uz pomoć transmisivne sonde NIR, spektroskopija NIR *in-line* često se koristi za praćenje reakcija *in situ*. De Lima i suradnici razvili su metodologiju za praćenje reakcije esterifikacije *in-line* u procesu proizvodnje biodizela.²¹ NIR spektroskopijom *in-line* pratila se reakcija sojinog ulja i metanola, dok se kemometrijskim metodama uspješno predvidio sastav smjese tokom procesa.

2.2.2. ATR spektroskopija *in-line*

U IR spektroskopiji *in-line* uz prigušenu totalnu refleksiju (engl. *in-line Attenuated Total Reflection infrared spectroscopy*, ATR *in-line*) uzorak mora biti u optičkom kontaktu s ATR kristalom, koji je načinjen od materijala s visokim indeksom refrakcije poput cinkovog selenida (ZnSe), dijamanta i germanija. ATR kristal zakrivljena je oblika te se nalazi na glavi sonde. Infracrveno zračenje se fokusira na zakrivljeni rub ATR elementa pomoću seta zrcala, reflektira se kroz kristal te se pomoću drugog seta zrcala usmjerava prema detektoru.



Slika 4. Shema prigušene totalne refleksije

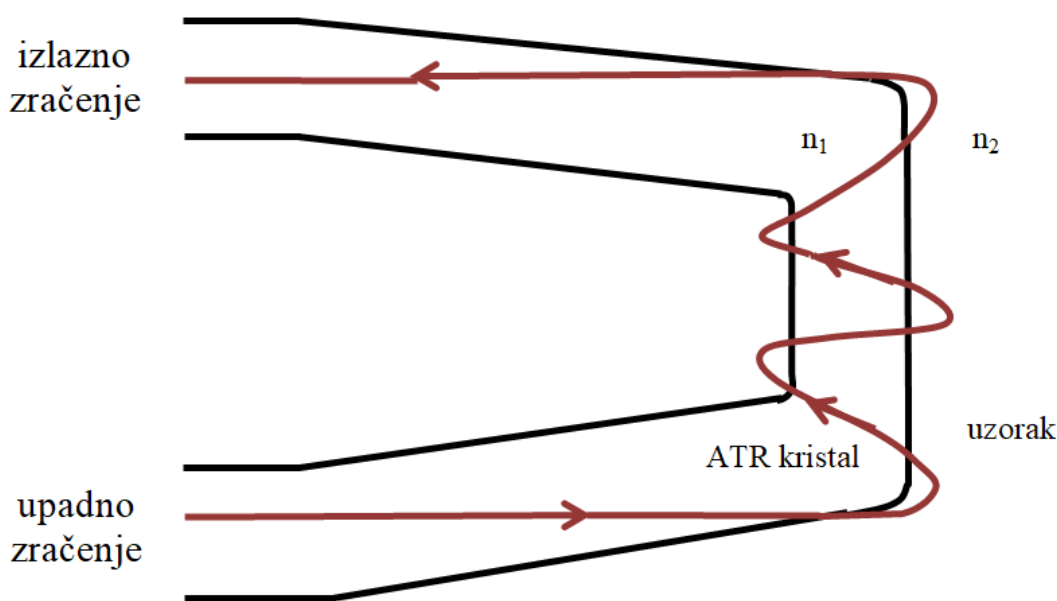
Usprkos gotovo potpunoj unutarnjoj refleksiji na granici uzorka i kristala, zračenje ipak prodire na malu udaljenost unutar uzorka. To prodiranje IR zračenja u uzorak naziva se evanescentni val. Dolazi do interakcije između evanescentnog vala i uzorka pri čemu uzorak apsorbira dio zračenja. Spektar ATR ovisit će o više parametara među kojima su kut upadnog zračenja, valna duljina upadnog zračenja, refraktivnog indeksu uzorka i ATR kristalu.

Dubina prodiranja evanescentnog vala, d_p , definirana je kao udaljenost potrebna da amplituda električnog polja padne na $1/e$ od svoje početne vrijednosti. Dubina prodiranja evanescentnog vala, d_p , može se prikazati jednadžbom:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}} \quad (2.2)$$

pri čemu je λ valna duljina, θ je kut upadnog zračenja, a n_1 i n_2 su refraktivni indeksi ATR kristala, odnosno uzorka.⁹

Uzorci koji se analiziraju spektroskopijom FTIR-ATR općenito zahtijevaju minimalnu ili nikakvu pripremu prije snimanja spektra. Još jedna od prednosti ove tehnike je neosjetljivost na utjecaj čestica i mjehurića zraka u otopina. Ključna stvar je što bolje pripremanje uzorka i kristala ATR. No, kristal ATR može biti i problem jer se kristal može uništiti uslijed grebanja njegove površine ili pojave pukotina na kristalu. Nadalje, jedan od glavnih nedostataka metode je i mala sposobnost provođenja kvantitativnih mjerenja, jer snaga apsorpcijske vrpce ovisi o indeksu loma uzorka koji je podložan promjeni uslijed promjene koncentracije ili temperature. Usprkos nekim nedostacima, tehnika ATR *in-line* predstavlja dobar izbor za praćenje fizičkih i kemijskih procesa u realnom vremenu.



Slika 5. Shematski prikaz procesa u sondi ATR

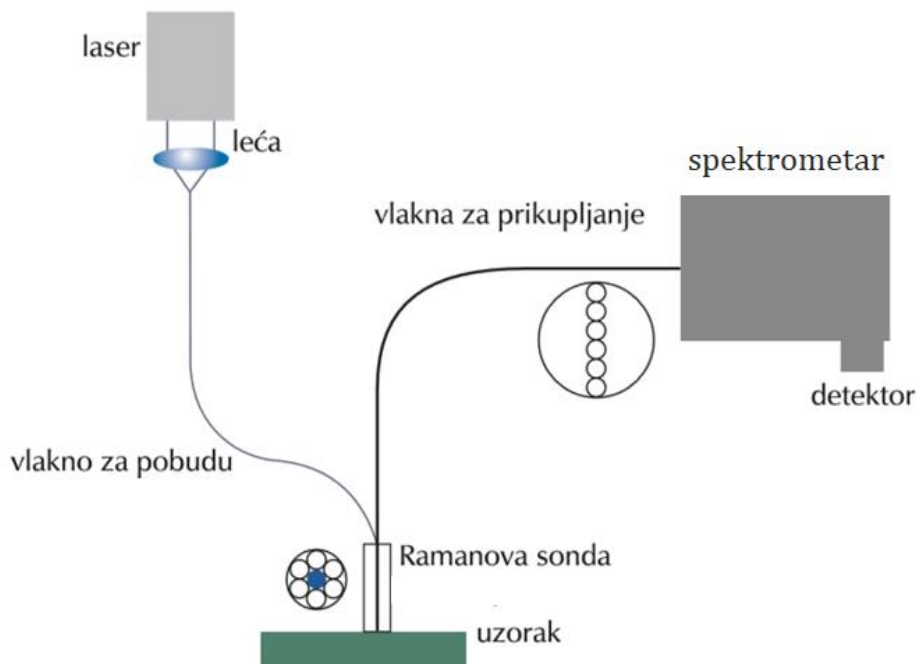
Lewiner i suradnici koristili su spektroskopiju ATR-FTIR *in-line* za praćenje kristalizacije djelotvorne tvari koja je imala više različitih polimornih formi.²² Kristalizacija djelotvorne tvari praćena je kvantitativno uz pomoć razvijenog kalibracijskog modela.

Li i suradnici proučavali su mehanizam sinteze 3,5-diamino-1,2,4-triazola spektroskopijom ATR-IR *in-line* u kombinaciji sa središnjom analizom neovisnih komponenata (engl. *kernel independent component analysis*, KICA).²³ Spektri IR dobiveni su u realnom vremenu korištenjem sonde ATR-IR.

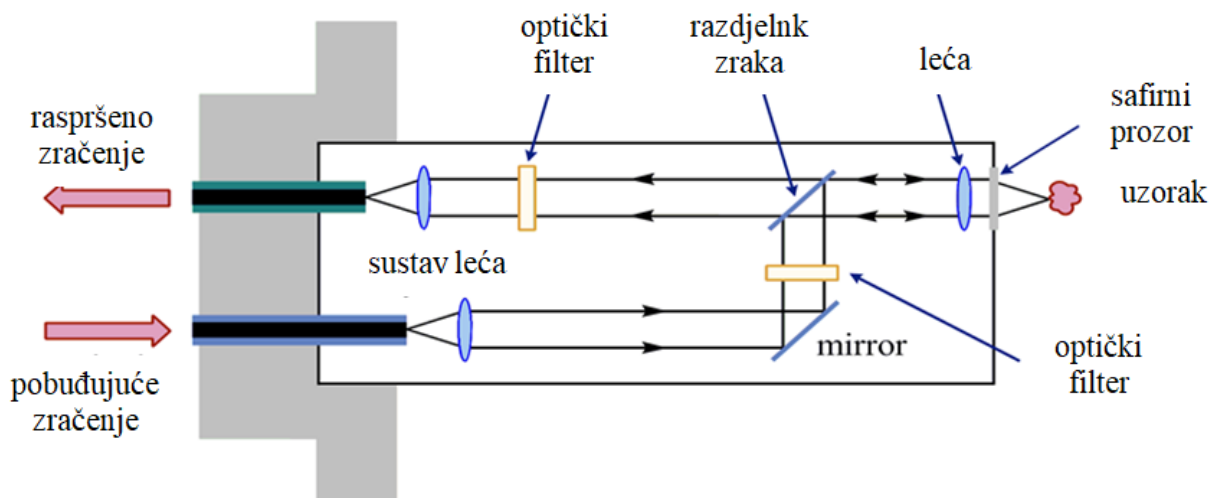
2.2.3. Ramanova spektroskopija *in-line*

Vibracijska karakterizacija tvari uključenih u fizikalne i kemijske procese se može na robustan i jednostavan način provesti korištenjem Ramanove sonde i analizom Ramanova spektra *in-line* dobivenog u realnom vremenu.

Ramanova spektroskopija *in-line* pokriva veći raspon elektromagnetskog zračenja u spektru od spektroskopije MIR te omogućava brzu, nedestruktivnu, analizu *in situ* u raznim laboratorijskim i industrijskim procesima. U spektru IR voda ima vrlo jaku vrpču, dok u Ramanovo spektru voda ima vrlo slabu vrpču što omogućava analizu vodenih otopina i sustava gdje je voda prisutna što je posebno važno za primjenu u biokemijskim procesima.

Slika 6. Ilustracija Ramanove sonde s optičkim vlaknima³

Vlakno za pobudu prenosi lasersko zračenje do sustava leća gdje se zračenje fokusira na optički filter koji osigurava da prolazi samo zračenje željene valne duljine. Nakon prolaska kroz optički filter i razdjelnik zraka, zračenje se fokusira lećom i djelomično se rasprši tijekom interakcije s uzorkom. Raspršeno zračenje se prikuplja sondom i prenosi nazad do spektrometra vlaknima za prikupljanje. Najčešće postoji samo jedno vlakno za pobudu te nekoliko vlakana za prikupljanje signala. Sonda je zaštićena od okolišnih čimbenika safirnim ili kvarcnim prozorom te oblogom od kemijski inertnog metala.



Slika 7. Presjek Ramanove sonde

Neki od nedostataka Ramanove spektroskopije *in-line* su velika osjetljivost na nehomogenost u uzorku, a razlog tome je mali promjer laserske zrake i nizak omjer signala i šuma. Utjecaj nehomogenosti smanjuje se postupkom osvjetljavanja na širokoj površini (engl. *Wide Area Illumination*, WAI), dok se omjer signala i šuma može povećati korištenjem zračenja veće snage i kraće valne duljine. No, korištenjem zračenja kraćih valnih duljina može uzrokovati fluorescenciju, a korištenje zračenja velike snage može degradirati uzorak.³

Novak i suradnici pratili su sintezu djelatne tvari entakapona u različiti otapalima.²⁴ Kombinacijom Ramanove spektroskopije i kemometrijskih metoda identificirani su produkti reakcije te je procijenjena završna točka reakcije. Rezultati su ukazali da se reakcija najbrže odvija kada se kao otapalo koristio heptan, a razlog tome je najmanji gubitak katalizatora.

Fontalvo-Gómez i suradnici koristili su Ramanovu spektroskopiju *in-line* kako bi pratili reakciju transesterifikacije.²⁵ Reakciju transesterifikacije u Ramanovom spektru može se detektirati kao promjena intenziteta vrpca pri $1000-1050\text{ cm}^{-1}$ i 1400 cm^{-1} koje odgovaraju C-O istezanju metanola. Smanjenje intenziteta ovih vrpca posljedica je trošenja metanola u reakciji.

§ 3. MULTIVARIJATNE METODE ANALIZE

Metode multivarijatne statističke analize još zvane i kemometrijske metode, prema definciji američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) također spadaju u PAT.¹⁰ Metode multivarijatne statističke analize primjenjuju različite kemometrijske postupke kako bi se dobile statističke informacije iz eksperimentalnih podataka te one simultano analiziraju podatke povezane s više različitih varijabli.

Metode multivarijatne analize mogu dati podatke koji se koriste i u kvantitativnoj i u kvalitativnoj analizi. Glavni cilj kvalitativne multivarijatne analize identifikacija je komponenti uzorka, grupiranje uzorka te prikaz njihove razlike. Kvantitativna multivarijatna analiza primjenjuje se kako bi se dobile koncentracije pojedinih komponenti u uzorku. Za određivanje veze između koncentracije komponenti i izmjerenih varijabli zahtjeva konstruiranje linearnog ili nelinearnog kalibracijskog modela. Kalibracijski model se konstruira u skladu s vrijednostima prikupljenim mjerenjem referentnih uzoraka. Te vrijednosti dodatno se obrade korištenjem metoda „mekog modeliranja“ ili „tvrdog modeliranja“. Metode „mekog modeliranja“ obrađuju podatke kao vektore i matrice bez da

uzmu u obzir oblik signala, dok metode „tvrdog modeliranja“ prikazuju eksperimentalne podatke kao linearnu kombinaciju funkcija koje odgovaraju signalu.¹¹

Multivarijatna analiza spektara pomaže u asigniranju spektralnih vrpca i omogućava kvantitativnu interpretaciju eksperimentalnih podataka. Neke od značajnijih metoda koje se često upotrebljavaju za analize spektroskopskih podataka su: analiza glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), višestruka linearna regresija (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR), regresija glavnih komponenta (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).¹²⁻¹⁵

3.1.1. Analiza glavnih komponenta - PCA

Analiza glavnih komponenta temelji se na primjeni linearne algebre. To je kvantitativna multivarijatna metoda koja prvenstveno služi kao metoda redukcije dimenzionalnosti podataka. U ovoj metodi svaki je izmjereni uzorak moguće prikazati kao točku u n -dimenzijskom prostoru u kojem svaki vektor x_i predstavlja određenu varijablu i . Taj prostor može sadržavati nekoliko tisuća zavisnih varijabli što je slučaj s primjerice jednim Ramanovim spektrom ili spektrom NIR nekog uzorka. Tada svaka valna duljina odnosno valni broj predstavlja jednu varijablu odnosno dimenziju.

Uvođenje glavne komponente (PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora i pojednostavljuje interpretaciju eksperimentalno dobivenih podataka. Prva glavna komponenta (PC1) nosi najviše informacija odnosno najveći udio opisane varijance. Sljedeća glavna komponenta (PC2) bit će ortogonalna prvoj, treća drugoj, četvrta trećoj i tako dalje. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveći udio varijance, dok će svaka sljedeća glavna komponenta nositi sve manji udio ukupne varijance. Svaku od glavnih komponenta karakteriziraju: faktorski bodovi, reziduali uzoraka, opterećenja i uzorci visokog utjecaja (engl. *Leverage value*).

Faktorski bodovi predstavljaju udaljenost točke uzorka od točke srednje vrijednosti cijelog seta po vektoru glavne komponente. Grafički prikaz faktorskih bodova je dvodimenzijska ploha gdje svaka os predstavlja jednu glavnu komponentu. Opterećenje opisuje korelaciju između originalnih vrijednosti i glavnih komponenti. Opterećenje je kosinus kuta θ_i između

vektora \mathbf{x}_i koji predstavlja varijablu i vektora glavne komponente. Što je taj kut manji, to će opterećenje biti veće i obratno, a s obzirom na to da se radi o funkciji kosinus opterećenje može poprimiti iznos od -1 do +1. Reziduali uzorka su udaljenosti svake točke od ravnine koju čine glavne komponente. Što je udaljenost točke od ravnine veća, to će takvi uzorci biti sve lošije opisani modelom PCA. *Leverage* vrijednost zapravo je euklidska udaljenost točke od ishodišta po plohi koju čine glavne komponente, a zajedno s rezidualom svakog uzorka služi za prepoznavanje graničnih točaka.¹⁶

Metoda PCA se koristi u velikom broju disciplina. Tijekom obrade spektroskopskih podataka PCA metoda može poslužiti za dobivanje informacija o napredovanju i trajanju promatranog procesa.

3.1.2. *Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata – PLSR*

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata je multivarijatna metoda za kvantitativnu analizu korelirajućih podataka. Ova metoda koristi linearnu kombinaciju modelnih varijabli kako bi dobila što bolje slaganje između ispitivanih svojstava i izmjerenih varijabli. Modelne varijable koje pokazuju dobro slaganje s izmjerenim varijablama dobivaju dodatnu težinu kako bi se poboljšala efikasnost predviđanja. Metoda PLSR smatra se regresijskim oblikom metode PCA koja prevodi podatke iz x- u y-prostor, koji su predstavljeni matricama X i Y. Matrica X sadrži izmjerene varijable m (npr. valne duljine) i objekte n (npr. spektri). Matrica Y razvrstava objekte n prema njihovim svojstvima p , kao što su koncentracija, maseni udio ili veličina čestice. Glavna svrha analize PLSR je opisati na koji način koreliraju objekti u x-prostoru te njihov položaj u odgovarajućem y-prostoru sa što manjim mogućim odstupanjima.¹⁷

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. E. Baughman, *Process analytical chemistry: introduction and historical perspective* u: K. E. Bakeev, (Ur.) *Process analytical technology*, Blackwell Publishing Lt, Oxford, UK, 2005, str. 1-12.
2. W. P. Findlay, D. E. J. Bugay, *Pharmaceut. Biomed. Anal.* **16** (1998) 921-930.
3. P. Novak, T. Jednačak, *Kem. Ind.* **62** (3-4) (2013) 71-80.
4. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013., str. 63-73.
5. C. Pasquini, *J. Braz. Chem. Soc.* **14** (2003) 198-219.
6. T. de Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J. P. Remon, C. Vervaet, *Int. J. Pharm* **417** (2011) 32-47.
7. P. Novak i T. Jednačak, *The use of vibrational spectroscopy as a tool for in-line process monitoring* u: A. L. Varney (Ur.) *Process control - theory applications and challenges*, Nova Science Publishers, New York, USA, 2014, str. 69-99.
8. Lewis, I. R. In *Handbook of Raman spectroscopy*; Lewis, I. R.; Edwards, H. G. M.; Eds.; Merce Dekker: New York, NY, 2001; pp 926-980.
9. Warterwig, S.; Neubert, R. H. H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (2005) 1144-1170.
10. *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/media/71012/download> (preuzeto 26. lipnja 2019. godine)
11. Kriesten, E.; Mayer, D.; Alsmeyer, F.; Minnich, C. B.; Greiner, L.; Marquardt, W. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **93** (2008) 108-119.
12. K. Varmuza, P. Filzmoser, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2009, str. 1-10.
13. H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality, An Introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, 2001.
14. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, 1996.
15. I. Singh, P. Juneja, B. Kaur i P. Kumar, *ISRN Anal. Chem.* **2013** (2013) 1-14.

16. http://www.camo.com/helpdocs/The_Unscrambler_Method_References.pdf (preuzeto 15. srpnja 2019. godine)
17. S. Wold S, M. Sjöström, L. Eriksson, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58** (2001) 109-130.
18. J. Mantanus, E. Ziémons, E. Rozet, B. Streel, R. Klinkenberg, B. Evrard, J. Rantanen, P. Hubert, *Talanta* **83** (2010) 305–311.
19. A. Klimkiewicz , P. P. Mortensen, C. B. Zachariassen, F. W. J. van den Berg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **132** (2014) 30-38.
20. T. Rohe, W. Becker, A. Krey, H. Nägele, S. Kölle, N. Eisenreich, *J. Near Infrared Spectrosc.* **6** (1998) 325–332.
21. S. M. De Lima, b. F. A. Silva, D. V. Pontes, C. F. Pereira, L. Stragevitch, M. F. Pimentel, *Fuel* **115** (2014) 46-53.
22. F. Lewiner, J. P. Klein, F. Puel, G. Févotte, *Chem. Eng. Sci.* **56** (2001) 2069-2084.
23. H. Li, J. Gao, H. Tang, J. Li, T. Zhang, X. Yang, *Anal. Methods* **7** (2015) 4152-4158.
24. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić, G. Vrbanec, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
25. M. Fontalvo-Gómez, J. A. Colucci, N. Velez, R. J. Romanach, *Appl. Spectrosc.* **67** (2013) 1142-1149.