

# Procesne analitičke tehnike

---

**Bilić, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:217:272121>

*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

Ivan Bilić

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, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. rujna 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Procesne analitičke tehnike.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. VARIJACIJE VIBRACIJSKE SPEKTROSKOPIJE KAO PROCESNE ANALITIČKE TEHNIKE .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Vibracijska spektroskopija .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Infracrvena spektroskopija.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Princip infracrvene spektroskopije .....	4
2.2.2. Infracrvena spektroskopija kao PAT.....	4
2.2.3. NIR spektroskopija in-line.....	5
<b>2.3. Ramanova spektroskopija.....</b>	<b>6</b>
2.3.1. Princip Ramanove spektroskopije.....	6
2.3.2. Ramanova spektroskopija kao PAT .....	7
2.3.3. Ramanova spektroskopija in-line.....	7
<b>§ 3. MULTIVARIJANTNE KEMOMETRIJSKE METODE.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Metode multivarijantne analize .....</b>	<b>9</b>
3.1.1. PCA metoda .....	10
3.1.2. MCR metoda .....	11
<b>§ 4. KORIŠTENJE RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE KAO PAT TEHNIKE U KONKRETNOM ISTRAŽIVANJU.....</b>	<b>12</b>
4.1.1. Sažetak istraživanja.....	12
4.1.2. Uloga Ramanove spektroskopije u sprezi sa MCR metodom u istraživanju.....	13
<b>§ 5. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XVI</b>



## § Sažetak

Procesne analitičke tehnike (engl. *process analytical technology*, PAT) su multidisciplinarno polje koje uključuje analitičku kemiju, procesnu kemiju, procesno inženjerstvo i multivarijatne metode analize. Zbog sve veće potrage za što boljim i što efikasnijim proizvodnim procesima, PAT u zadnje vrijeme doživljavaju nagli porast u industrijskoj upotrebi, sa naglaskom na farmaceutsku industriju. Glavni razlog tome je što korištenje PAT-a može dovesti do velikog povećanja obujma proizvodnje. Osim tog, PAT se najviše koriste u razvoju procesa u laboratorijskoj fazi.

Između mnogobrojnih tehnika koje se koriste za praćenje kontrolu i procesa, izdvajaju se *in-line* tehnike koje izvršavaju mjerenja u stvarnom vremenu bez ometanja procesnog toka, odnosno tehnike vibracijske spektroskopije. Mjerenja se vrše pomoću sonde uronjene u reakcijsku smjesu koja je konstantno povezana sa sustavom za analizu dobivenih podataka, odnosno spektara. Ti spektri se dalje obrađuju metodama multivarijantne analize te time daju potrebne informacije i podatke. Najistaknutija takva metoda je Ramanova spektroskopija.

## § 1. UVOD

### 1.1. Procesne analitičke tehnike

Procesno analitičke tehnike ( u daljnjem tekstu PAT ) se definiraju kao sustav za projektiranje, praćenje i vođenje proizvodnih procesa kontinuiranim mjerenjem ključnih parametara kvalitete procesa. Mjeriti se mogu razna svojstva sirovina te produkata, a najčešće se mjere ključne odabrane veličine koje utječu na efikasnost procesa i kvalitetu produkta. U ovom kontekstu pojam "analitički" može obuhvatiti kemijske, fizikalne, mikrobiološke i matematičke analize te analize rizika koje se, po potrebi, provode integralno.<sup>1</sup>

Postoji više načina mjerenja procesnih veličina:

- *off-line* – u analitičkom laboratoriju na mjestu izdvojenom od proizvodnog pogona;
- *at-line* – u analitičkom laboratoriju unutar proizvodnog pogona;
- *on-line* – mjerenje u preusmjerenom toku uzorka koji se vraća u proces;
- *in-line* – mjerenje u stvarnome vremenu integrirano u proces bez uzorkovanja, obično uz ometanja procesnog toka;
- *non-invasive* – integrirano mjerenje u stvarnom vremenu, pri čemu senzor nije u kontaktu s tvari koja se mjeri, a procesni tok se ne ometa.<sup>2</sup>

Glavni problemi s kojima se suočava većina tehnika su vremenski odmak od trenutka koji je od mjernog interesa, do samog dobivanja informacije o istom mjerenju. Također, bilo kakav utjecaj na reakciju koji bi uzrokovao promjenu stanja tvari je također neprihvatljiv. Iz tih razloga, vidljivo je da su najprikladniji neinvazivni senzori poput sonde dok su mjerenja *off-line* i *at-line* problematična.<sup>3</sup>

Analitičke metode *in-situ* omogućuju bolje i brže razumijevanje procesa u usporedbi s tradicionalnim *off-line* analizama. Tijekom razvoja proizvoda primjenom PAT tehnika moguće je dobiti mnoge informacije kao što su:

- kada i kojom brzinom dolazi do formiranja proizvoda,
- kojom brzinom nestaje reaktant,
- postoje li međuprodukti u reakciji,
- kada počinje kristalizacija i što utječe na njezinu brzinu,



- koji se polimorfni oblici javljaju,
- kako se mijenja homogenost otopine,
- u kojem trenutku završava mokra granulacija.<sup>2</sup>

Vibracijske spektroskopske tehnike, poput Ramanove spektroskopije (i njenih inačica), transmisijske spektroskopije NIR i MIR te raznih varijanti infracrvene spektroskopije najbolje odgovaraju traženim posebnostima *in-line* PAT tehnika pa se stoga i najčešće koriste.<sup>4</sup>

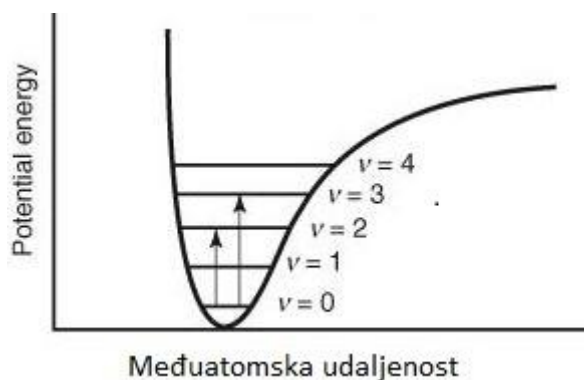
Zbog složenosti spektara dobivenih navedenim metodama rezultati se obrađuju primjenom statističkih metoda odnosno multivarijantnom analizom podataka kako bi se dobila tražena informacija o sustavu.

## § 2. VARIJACIJE VIBRACIJSKE SPEKTROSKOPIJE KAO PROCESNE ANALITIČKE TEHNIKE

### 2.1. Vibracijska spektroskopija

Vibracijska spektroskopija identificira molekule na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno promjena u vrijednosti njihovih međuatomskih udaljenosti i kuteva. Molekule tada zauzimaju diskretne vibracijske energijske razine, a razlika među njima se zbog anharmoničnosti porastom energije smanjuje. Izborna pravila za vibracijske spektre dopuštaju promjenu vibracijskog kvantnog broja za  $\pm 1$  za harmonični a  $\pm 2$ ,  $\pm 3$  itd. za anharmonični oscilator.

Držeći se tih pravila, u vibracijskim spektima se mogu pojaviti vrpce viših tonova (cjelobrojnih višekratnika frekvencija osnovnih vrpce) ili kombinacijske vrpce koje kombiniraju više osnovnih vibracija. Svi prijelazi koji ne kreću iz osnovnog ( $v = 0$ ) stanja se zanemaruju jer prema Boltzmannovoj raspodjeli, napučenost svih osim nulte razine je zanemariva.<sup>5</sup>



Slika 1. Ovisnost međuatomske udaljenosti o potencijalnoj energiji po vibracijskim energijskim razinama

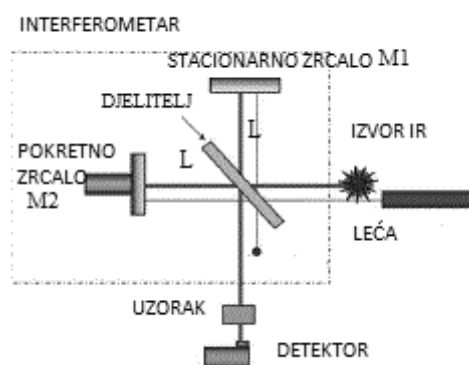
U praksi najčešće korištene tehnike vibracijske spektroskopije su Ramanova spektroskopija i infracrvene spektroskopija koje se razlikuju po tome je li njihov predmet poučavanja apsorpcija zračenja (infracrvena spektroskopija) prilikom njegovog prolaska kroz uzorak ili raspršenje istog zračenja nakon interakcije sa uzorkom (Ramanova spektroskopija).

## 2.2. Infracrvena spektroskopija

### 2.2.1. Princip infracrvene spektroskopije

Infracrvena spektroskopija (u daljnjem tekstu IR) proučava interakcije tvari i elektromagnetnog zračenja u rasponu valnih duljina 0,8 – 1000  $\mu\text{m}$ . IR detektira molekulske vibracije do kojih dolazi kada molekula apsorbira dio elektromagnetnog zračenja. Pritom molekula prelazi iz osnovnog u pobuđeno stanje što se u IR spektru detektira kao vrpca. Važno je napomenuti da će se vrpca razviti samo u slučajno periodičnih vibracija, odnosno periodične promjene dipolnog momenta molekule. IR spektar pokazuje ovisnost apsorbancije o valnoj duljini ili valnom broju.<sup>6</sup>

Snimanje infracrvenih spektara se provodi infracrvenim spektrometrom koji postoji u 2 varijacije: kao disperzivni IR spektrometar koji bilježi spektar u frekvecijskoj domeni, te kao FT-IR spektrometar (slika 2.) koji bilježi spektar u vremenskoj domeni te ga kasnije prevodi u frekvencijsku domenu korsiteći Fourierovu transformaciju.



Slika 2. Shematski prikaz FT-IR spektrometra

### 2.2.2. Infracrvena spektroskopija kao PAT

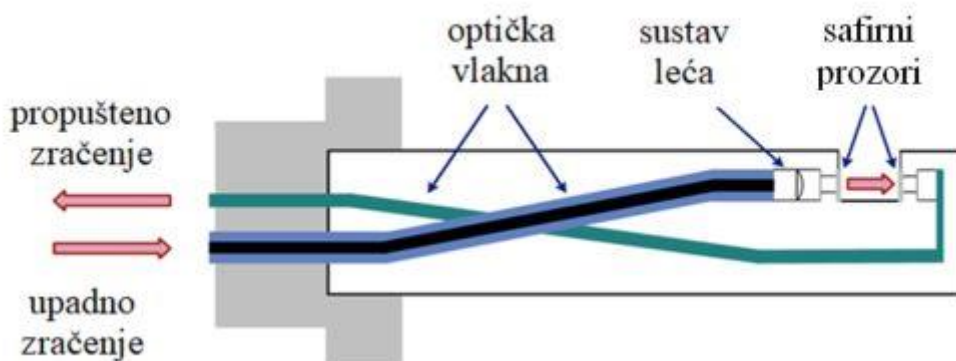
Veliko značenje infracrvene spektroskopije temelji se na visokoj informacijskoj vrijednosti spektra i na raznovrsnim mogućnostima mjerenja uzorka i pripravljanja spojeva.<sup>7</sup> Pogodna je za analizu uzoraka u svim agregatnim stanjima, što je čini vrlo raznovrsnim alatom koji se može koristiti tokom cijelog proizvodnog procesa. Najčešće se koristi za analizu organskih spojeva iako se može primjeniti i za analizu anorganskih spojeva koji sadrže višeatomne katione ili anione.

Područje absorpcije zračenja koje se proteže od 0,8 do 1000  $\mu\text{m}$  blisko infracrveno područje (0,75 do 2,5  $\mu\text{m}$ ), srednje infracrveno područje (2,5 do 25  $\mu\text{m}$ ) i daleko infracrveno područje (25 do 1000  $\mu\text{m}$ )<sup>8</sup>. Ove tehnike imaju mnoge prednosti jer omogućavaju brzo mjerenje

velikog broja veličina, a da se pri tome uzorak ne uništi. Također se mogu koristiti za at-line i on-line kontrolu procesa. Blisko infracrveno zračenje utječe na vibracije istezanja kovalentnih veza C–H, N–H i O–H u molekuli. Od tehnika bliske infracrvene spektroskopije najčešće se koristi tehnika bliske infracrvene refleksije (NIR).

### 2.2.3. NIR spektroskopija in-line

NIR spektroskopija proučava efekte interakcije uzorka sa elektromagnetnim zračenjem valnih duljina u rasponu od 780 nm do 2500 nm gdje se pojavljuju vrpce viših tonova, te kombinacijske vrpce. Koristi se za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu. Postoji nekoliko varijacija a najviše je u upotrebi transmisijaska NIR spektroskopija in-line. In-line znači da je praćenje procesa a i dobivanje rezultata moguće u realnom vremenu, a to je postignuto NIR sondom koja in-situ sudjeluje u procesu te je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom (slika 3.)



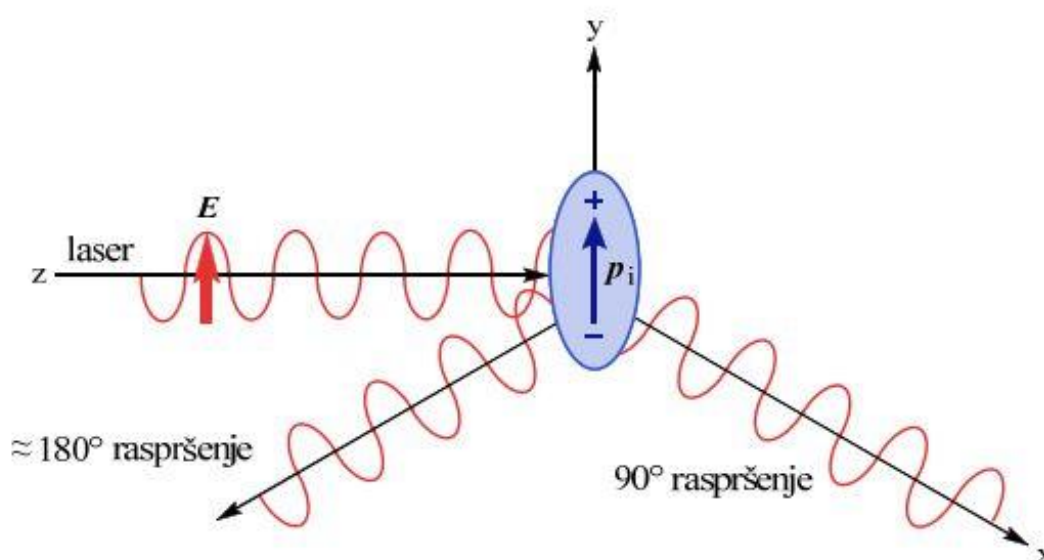
Slika 3. Presjek transmisijaska NIR sonde<sup>9</sup>

NIR spektri odlikuju se vrlo visokim omjerom signala i šuma, a intenzitet i položaj pojedinih vrpca može se vrlo točno odrediti, što je posebno važno za kvantitativnu analizu. Zbog slabe apsorpcije vode i stakla, moguće je snimanje spektara vodenih otopina uzoraka u staklenim tikvicama ili reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala. Sama tehnika se zbog svoje velike točnosti može primjenjivati i za kvantitativnu analizu, pogotovo u kombinaciji sa multivarijantnim metodama analize podataka koje daju vrlo pouzdane i jasne rezultate. NIR spektroskopija se koristi za praćenje i kontrolu procesa u širokim granama industrije, npr. vrlo je popularna u tehnologiji mliječnih proizvoda.<sup>6</sup>

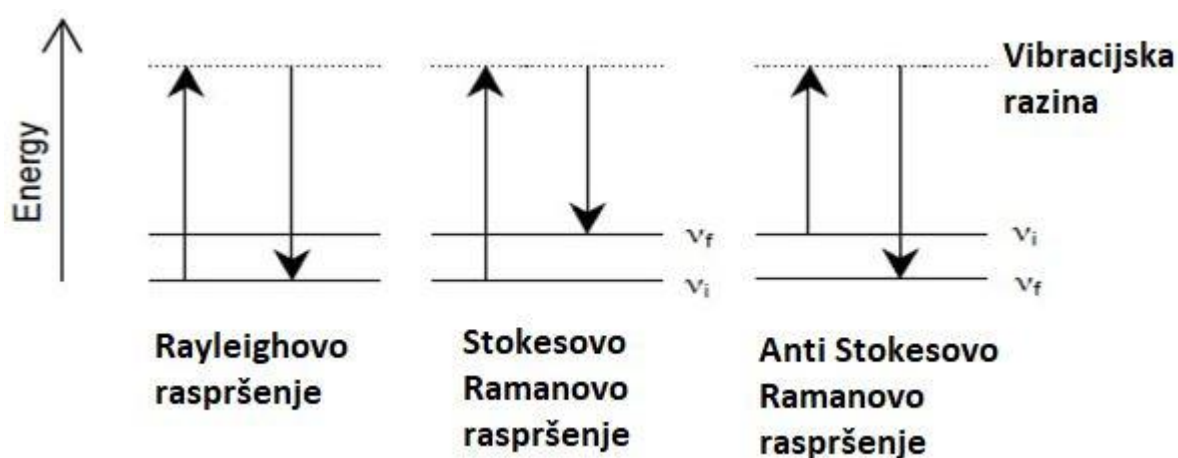
## 2.3. Ramanova spektroskopija

### 2.3.1. Princip Ramanove spektroskopije

Postoje dvije vrste raspršenja elektromagnetnog zračenja: Rayleighovo i Ramanovo. Ramanova spektroskopija je metoda koja se bazira na neelastičnom (Ramanovom) raspršenju monokromatskog svjetla. U takvom raspršenju, upadni foton nema jednaku kao izlazni foton te dolazi do promjene energije sustava. Ramanovi spektri se temelje na razlici energije sustava prije i nakon raspršenja.<sup>10</sup> Razlikujemo 2 takva slučaja: Stokesovo (sustav dobiva energiju) i anti-Stokesovo (sustav gubi energiju) raspršenje. U slučaju Rayleighovog raspršenja, nema promjene energije sustava stoga nam taj slučaj ne daje nikakve informacije o sustavu.



Slika 4. Raspršenje laserom induciranog zračenja pri prolasku kroz molekulu



Slika 5. Shematski prikaz tipova raspršenja elektromagnetnog zračenja

Ramanova spektroskopija je postala sveprisutan alat u modernoj spektroskopiji, biofizici, mikroskopiji, geokemiji i analitičkoj kemiji. Nasuprot tipičnim eksperimentima apsorpcije ili emisije, prijelazi između kvantnih nivoa atoma ili molekula su inducirani apsorpcijom ili emisijom fotona (IR, okom vidljiva svjetlost, UV).

Ramanova spektroskopija je puno manje osjetljiva nego apsorpcijske ili emisijske spektrometrije zbog urođene slabosti samog procesa raspršivanja, ali ipak, postoji mnogo prednosti, poput slobode izbora valne duljine koju ne apsorbira okolni medij, što je naročito korisno kod vodenih i mineralnih uzoraka koji imaju snažne IR apsorpcijske pojase. Također, moguće je ispitati malu količinu uzorka (svjetlost se može fokusirati na mjesta veličine mikrona), te vrijede pravila odabira na temelju simetrije koja dozvoljavaju da se tranzicije koje su „optički zabranjene“ u apsorpciji, detektiraju u raspršivanju. Od pojave lasera, sama osjetljivost Ramanove spektroskopije je znatno napredovala i ona je postala značajno polje u cijeloj spektroskopiji.

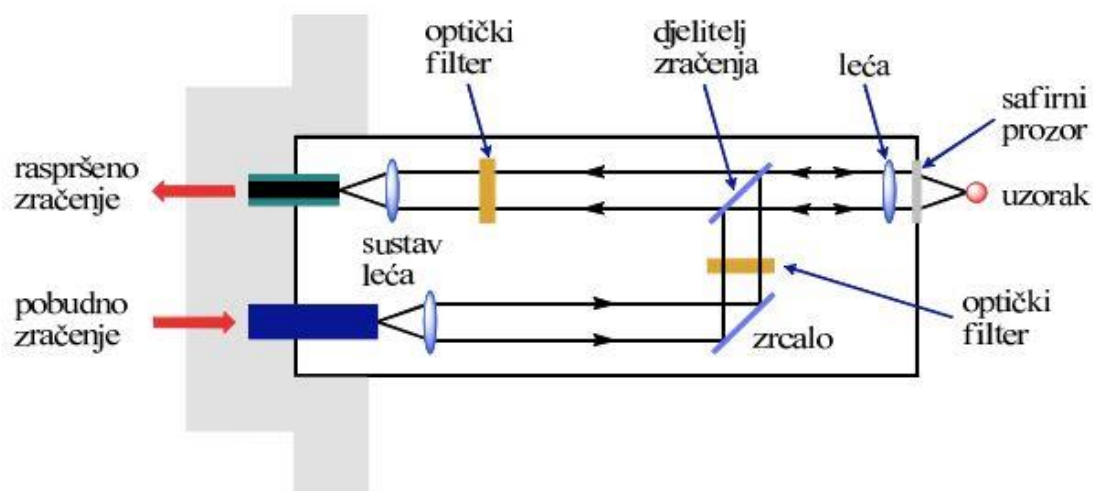
### 2.3.2. Ramanova spektroskopija kao PAT

Kao što je već navedeno, najbolje PAT tehnike su one koje mogu vršiti mjerenja u realnom vremenu, u samom procesu te pritom ne ometati isti. S obzirom da Ramanova spektroskopija odgovara svim tim uvjetima, jedna je od najkorištenijih PAT metoda modernog doba.

Naglim razvojem tehnologije lasera i detektora u zadnjih 30 godina, primjena Ramanove spektroskopije kao PAT-a u farmaceutskoj, polimerskoj i biomedicinskoj analizi, dramatično je porasla radi njene praktičnosti i točnosti. Od 1980-ih godina počela se koristiti u istraživanju aktivnih farmaceutskih supstanci (API) pri procesima identifikacije polimorfne forme, *in situ* praćenja kristalizacije te kvantitativne analize. Svi navedeni procesi mogu se sa velikom točnošću pratiti od laboratorijske do tvorničke razine što je još jedan od razloga izbora Ramanove spektroskopije kao PAT alata.<sup>10</sup>

### 2.3.3. Ramanova spektroskopija in-line

Ramanova spektroskopija in-line, slično kao i NIR spektroskopija, omogućava brzu efikasnu, i nekompromitirajuću analizu i kontrolu procesa in-situ koristeći sondu (slika 6.)

Slika 6. Presjek Ramanove in-line sonde<sup>11</sup>

Područje gdje Ramanova spektroskopija in-line ima značajnu prednost nad ostalim metodama poput IR spektroskopije je proučavanje procesa u vodenim otopinama. Naime, za razliku od njene vrpce u IR spektru, u Ramanovom spektru je vrpca vode vrlo slaba što omogućava neometanu analizu svih elemenata otopljenih u vodi. Taj efekt je vrlo značajan u biokemijskim procesima kod kojih se i Ramanova spektroskopija in-line najviše koristi, npr. vrlo rašireno područje enzimske kinetike.

Također, Ramanova spektroskopija in-line je vrlo efikasna kod procesa kristalizacije iz vodenih otopina, upravo zbog toga što voda ne zasjenjuje spektre uzoraka. Grupa autora iz kompanije Sanofi-Aventis koristila je Ramanovu spektroskopiju in-line za praćenje procesa sinteze i kristalizacije artemisina.<sup>12</sup> To istraživanje, kao i sama uloga Ramanove spektroskopije u njemu je detaljno izloženo u poglavlju 4.

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.<sup>4</sup>

## § 3. MULTIVARIJANTNE KEMOMETRIJSKE METODE

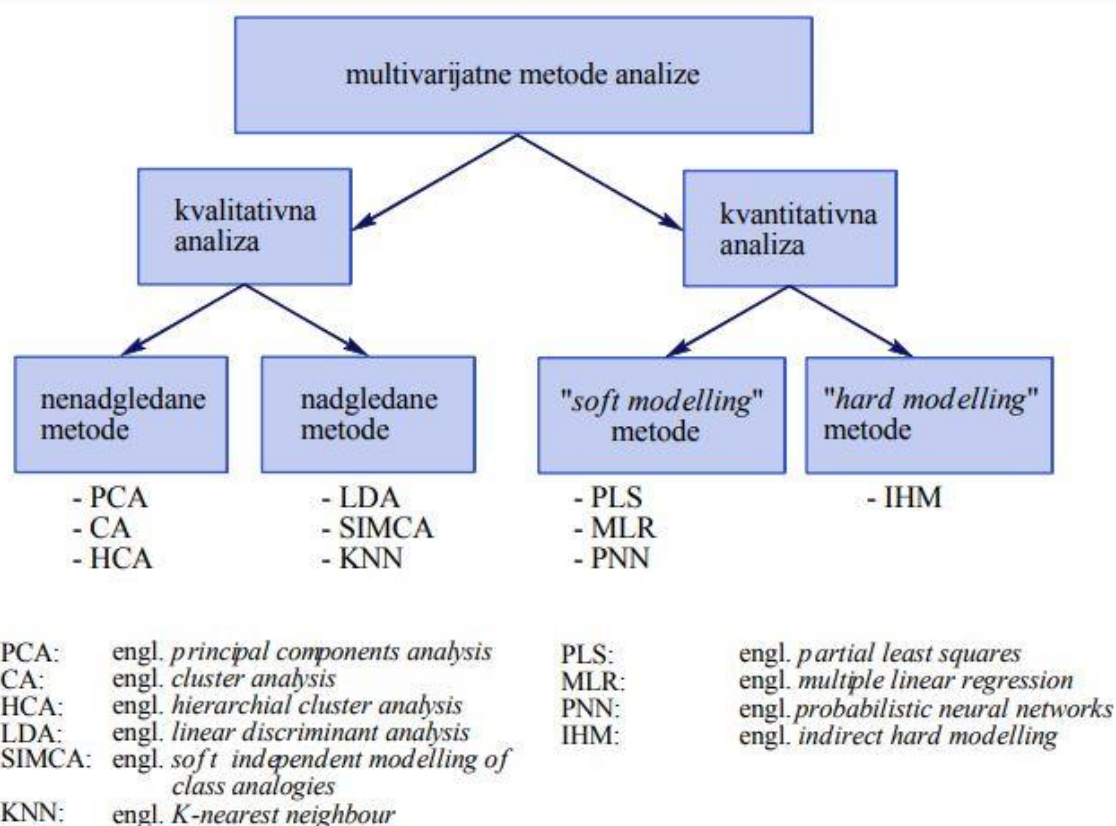
### 3.1. Metode multivarijantne analize

Metode multivarijantne statističke analize još zvane i kemometrijske metode, prema definiciji američke Agencije za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) također spadaju u PAT.<sup>3</sup> Metode multivarijantne 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. U današnje doba napredne tehnologije i mogućnosti koje pruža napredak različitih PAT tehnika, postaju nezaobilazan alat za statističku analizu velikog broja različitih spektroskopskih podataka. Sustavi koji se proučavaju često su vrlo složeni i nemoguće je obuhvatiti sve parametre klasičnim metodama analize. Iz tog razloga nužno je koristiti jednu od mnogo multivarijantnih metoda.

Informacije koje se dobiju metodama multivarijantne analize, mogu poslužiti u svrhu kvantitativne i kvalitativne analize. U kvalitativnoj analizi se traži identifikacija uzorka te određene diskretne razlike između grupe različitih uzoraka. S druge strane, u kvantitativnoj analizi, predmet interesa su koncentracije pojedinih komponenata u uzorku. 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.<sup>13</sup>

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) te multivarijantna rezolucija krivulja metodom alternirajućih najmanjih kvadrata (engl. Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares, MCR-ALS).



Slika 7. Podjela multivarijantnih metoda analize<sup>11</sup>

### 3.1.1. PCA metoda

Analiza glavnih komponenata (PCA metoda) danas je jedna od najčešće korištenih metoda multivarijantne analize. Sama metoda se temelji na principima linearne algebre, služeći prije svega redukciji dimenzionalnosti podataka. Polazna točka PCA metode je matrica podataka  $\mathbf{X}$  čiji je svaki element  $x_i$  jedno mjerenje uzorka u procesu. Ako matricu  $X$  zamislimo kao skup koordinata  $n$ -dimenzijskog prostora tada 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.<sup>14</sup>

Tako ogroman prostor  $n$  dimenzija se reducira uvođenjem PC komponente, odnosno glavne komponente koja na sebi određeni broj varijabli te time pojednostavljuje baratanje podacima iz mjerenja. Prva glavna komponenta (PC1) nosi najviše varijabli, zatim se na nju nastavlja PC2, PC3 itd. Svaka komponenta je ortogonalna na prethodnu. Osim toga, svaka glavna komponenta je opisana faktorskim bodovima, rezidualima uzoraka, opterećenju i uzorcima visokog utjecaja (eng. Leverage value).

Faktorski bodovi predstavljaju udaljenost točke uzorka od točke srednje vrijednosti cijelog seta po vektoru glavne komponente. Reziduali uzoraka su udaljenost svake točke od ravnine koju čine glavne komponente. Što je udaljenost veća to je PCA metoda nestabilnija i nepreciznija. Opterećenje opisuje korelaciju između glavnih komponenti i originalnih vrijednosti. Grafički prikaz PCA metode, je dvodimenzijaska ploha gdje svaka os predstavlja jednu glavnu komponentu koja je ortogonalna na ovu drugu

### 3.1.2. MCR metoda

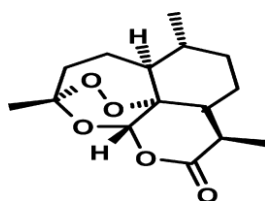
U istraživanju koje je obrađeno u nastavku rada, kao alat za obradu rezultata dobivenih pomoću disperzivnog Ramanovog spektrometra koristenjena je MCR metoda. MCR (Multivarijantna rezolucija krivulja) može se definirati kao metoda samo-modelirajuće analize smjesa.<sup>4</sup> Pogodna je za analizu spektralnih podataka (u ovom slučaju Ramanovih spektara) jer kao rezultat daje linearnu kombinaciju čistih komponenti, odnosno više spektara čistih komponenti. Izračun koncentracija i broja komponenti provodi se prema izrazu:  $X = T P^T + E$  pritom koristeći algoritam alternirajućih najmanjih kvadrata.

Za razliku od ostalih kemometrijskih metoda, MCR metoda ne daje jedinstveno rješenje ali ima fizikalno značenje te je potreban određeni kinetički model prema kojemu će rješenje biti što jedinstvenije. Takvo što je moguće postići unošenjem spektara čistih komponenti ili koncentracijskih profila kao baza inicijalne iteracije modela.

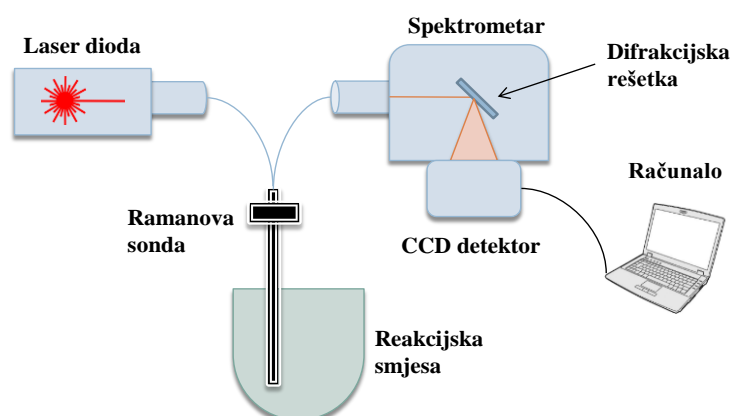
## § 4. KORIŠTENJE RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE KAO PAT U KONKRETNOM ISTRAŽIVANJU

### 4.1.1. Sažetak istraživanja

Grupa autora iz kompanije Sanofi-Aventis koristila je Ramanovu spektroskopiju u sprezi s multivarijantnim metodama za praćenje reakcija i kristalizacija prilikom sinteze antimalarika artemisina (slika 8.). Ključan korak, odnosno onaj koji je proučavan je redukcija artemisinske kiseline (u daljnjem tekstu AA) u dihidroartemisinsku kiselinu (u daljnjem tekstu DHAA) pomoću diimida kao reducensa. Diimid je generiran na 2 načina: reakcijom hidrazina i vodikova peroksida te reakcijom hidrazina i kisika. Obje metode su prvo ispitane na laboratorijskoj razini gdje se redukcija AA u DHAA uz hidrazin i kisik pokazala efikasnijim načinom. Ta metoda je nakon toga uvećana na tvorničku razinu te su mijenjani uvjeti u kojima se odvija kao i količine reaktanata. Pri svakoj reakciji, u sustavu je bila sonda disperzivnog Ramanovog spektrometra koja je prikupljala podatke (slika 9.) koji su zatim obrađivani MCR metodom. Podaci su bili prikupljeni *in-situ* te stoga nisu utjecali na reakciju.



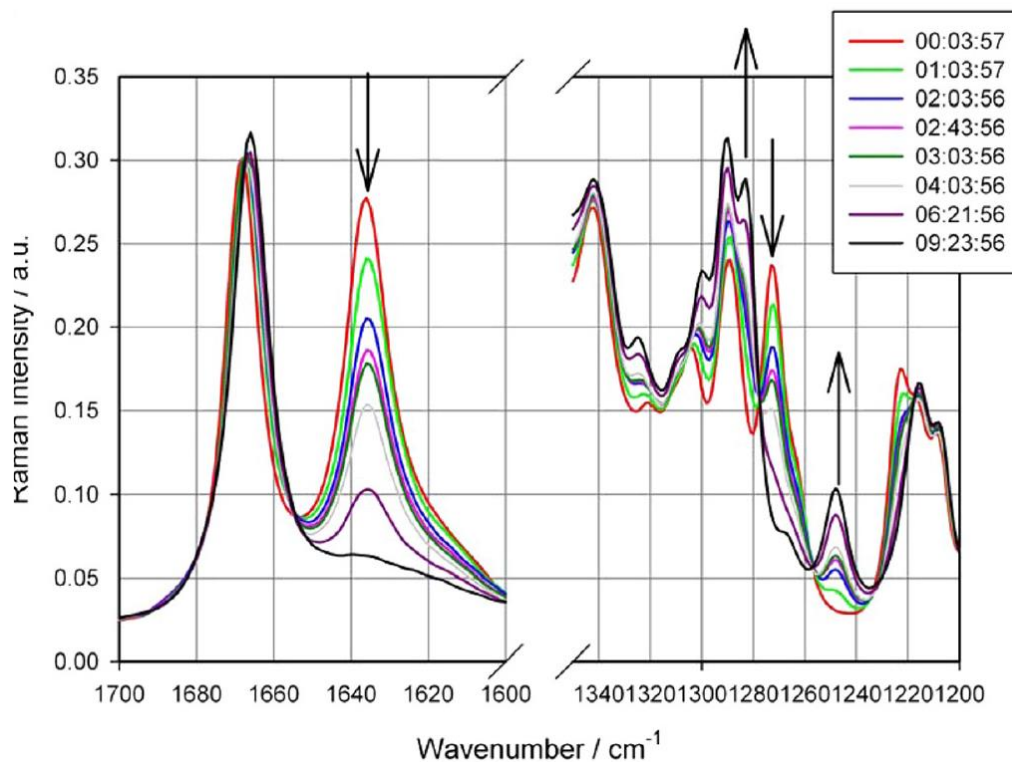
Slika 8. Struktura artemisina



Slika 9. Shematski prikaz mjerenja disperzivnom Ramanovom spektroskopijom *in-line*<sup>15</sup>

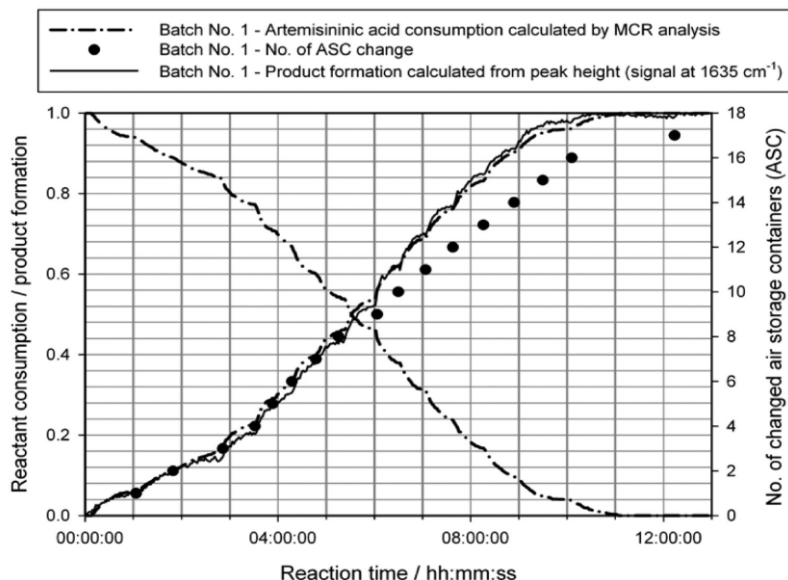
#### 4.1.2. Uloga Ramanove spektroskopije u sprezi sa MCR metodom u istraživanju

Na slici 7 prikazan je tipičan Ramanov spektar za jednu reakciju analiziranu u istraživanju, u ovom slučaju redukcija AA pomoću hidrazina i kisika. Različitim bojama su prikazani spektri snimljeni u različito vrijeme.



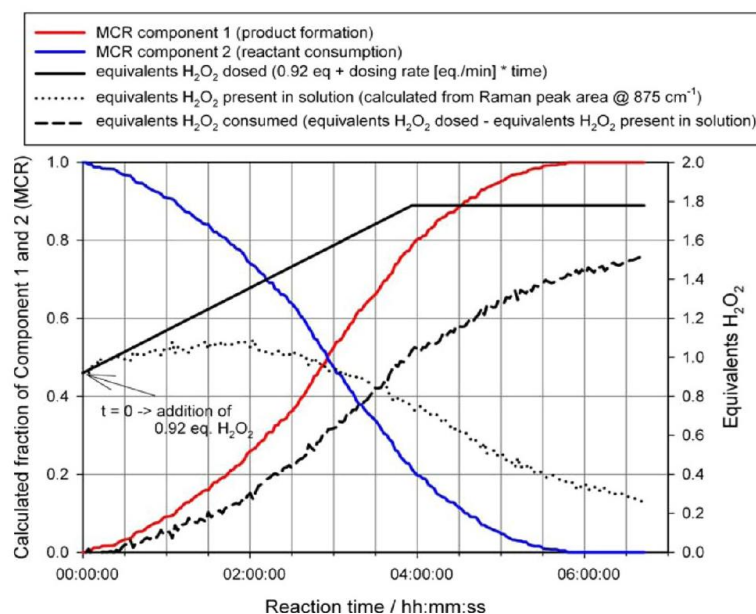
Slika 10. Ramanovi spektri redukcije AA u DHAA pomoću hidrazina i kisika u proizvodnom mjerilu

Iz takvog seta podataka ne može se iščitati puno, međutim daljnjom obradom tih podataka MCR metodom dobije se znatno jasniji prikaz nastajanja produkta i trošenja reaktanta u vremenu (slika 11.).



Slika 11. Tijek reakcije redukcije AA u DHAA pomoću hidrazina i kisika u proizvodnom mjerilu dobiven MCR analizom Ramanovih spektara

Najosjetljiviji dio cijelog procesa je izolacija DHAA kristalizacijom. Prilikom korištenja hidrazina i vodikova peroksida, DHAA bi iskristalizirao slabo, u iskorištenju manjem od 60%. Podaci dobiveni MCR analizom Ramanovih spektara nam govore i zašto (slika 12.).



Slika 12. Tijek reakcije redukcije AA u DHAA pomoću hidrazina i vodikova peroksida na laboratorijskoj razini uz koncentracijske vrijednosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  dobiven MCR analizom Ramanovih spektara

Točkastom linijom označen je udio vodikova peroksida u reakcijskoj smjesi. S obzirom da se sav  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne potroši u reakciji očito je da on ometa potpunu kristalizaciju DHAA. Imajući te podatke na umu, znanstvenicima je bilo lako izabrati opciju procesa gdje su korišteni hidrazin i kisik jer je DHAA gotovo u potpunosti izoliran a  $\text{O}_2$  nije niti bio u reakcijskoj smjesi pa nije mogao ni imati utjecaja na proces kristalizacije.<sup>12</sup>

## § 5. LITERATURNI IZVORI

1. Glassey, J. *et al.* Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals. *Biotechnol. J.* **6**, 369–377 (2011).
2. Dorić, H. & Bolf, N. MJERNA I REGULACIJSKA TEHNIKA, Procesna analitička tehnologija. *Kem. Ind.* vol. 67 466–469 (2018).
3. Administration, F. and D. Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance. (2004).
4. Jednačak, T. & Novak, P. Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. u Ind. Chem. Chem. Eng.* **62**, 71–80 (2013).
5. Novak, P. & Jednačak, T. *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama.* (TIVA, 2013).
6. Matijević, B. & Blažić, M. Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* **58**, 151–169 (2008).
7. Günzler, H. & Gremlich, H.-U. *Uvod u infracrvenu spektroskopiju.* (Školska knjiga, 2006).
8. Maljković, D. Spektrometrija. in *Tehnička enciklopedija* 150–178 (Leksikografski zavod 'Miroslav krleža', 1992).
9. Novak, P. & Jednačak, T. The use of vibrational spectroscopy as a tool for in-line process monitoring. in *Process control - theory applications and challenges* 69–99 (Nova Science Publishers, 2014).
10. Esmonde-White, K. A., Cuellar, M., Uerpmann, C., Lenain, B. & Lewis, I. R. Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 637–649 (2017).
11. Jednačak, T. Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula; Doktorski rad. (2013).
12. Feth, M. P., Rossen, K. & Burgard, A. Pilot plant PAT approach for the diastereoselective diimide reduction of artemisinin acid. *Org. Process Res. Dev.* **17**, 282–293 (2013).
13. Samadi, N., Salamati, M. & Naseri, A. Model based multi-wavelength

- spectrophotometric method for calculation of formation constants of phenanthrenequinone thiosemicarbazone complexes with some metallic cations. *Curr. Chem. Lett.* **2**, 69–76 (2013).
14. Champagne, M. & Dudzic, M. Industrial use of multivariate statistical analysis for process monitoring and control. in *Proceedings of the 2002 American Control Conference (IEEE Cat. No.CH37301)* vol. 1 594–599 (American Automatic Control Council).
15. Šahnić, D. *Kvantitativno praćenje reakcije sinteze i kristalizacije omeprazola Ramanovom spektroskopijom in-line, Literaturni pregled.* (2017).