

# Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji *in-line* i primjena u industriji

KUI – 7/2013  
Prispjelo 10. travnja, 2012.  
Prihvaćeno 18. srpnja, 2012.

T. Jednačak\* i P. Novak

Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Procesne analitičke tehnike (PAT) primjenjuju se u mnogim fazama industrijskih procesa s ciljem njihova boljeg razumijevanja, osiguranja kvalitete putem optimalnog dizajna i pravovremenog utvrđivanja procesnih odstupanja. PAT uključuju praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te identifikaciju parametara koji na njih utječu. Značajno mjesto među procesnim analitičkim tehnikama zauzimaju tehnike vibracijske spektroskopije *in-line*. One omogućuju praćenje proizvodnih procesa *in situ*, u realnom vremenu, uz manje izlaganje opasnim materijalima te manju mogućnost kontaminacije, uništavanja uzorka ili narušavanja ravnoteže u reakcijskom sustavu. Zbog svih navedenih prednosti tehnike vibracijske spektroskopije *in-line* se uspješno primjenjuju u različitim industrijskim granama. Na temelju karakterističnih vibracijskih vrpca u infracrvenim i Ramanovim spektrima *in-line* moguće je pratiti kristalizaciju, otapanje, polimorfne prijelaze i kemijske reakcije. Dobiveni spektri vrlo često se zbog složenosti dalje obrađuju primjenom multivarijantnih metoda analize podataka. U posljednje vrijeme razvijen je velik broj tehnika vibracijske spektroskopije *in-line* i multivarijantnih metoda analize podataka, no u ovome radu opisane su samo najznačajnije tehnike i one koje se danas najviše primjenjuju.

Ključne riječi: *Procesne analitičke tehnike, vibracijska spektroskopija in-line, praćenje industrijskih procesa, multivarijantne metode analize podataka*

## Uvod

Procesne analitičke tehnike (PAT) uključuju praćenje i kontrolu industrijskih procesa radi dobivanja proizvoda odgovarajuće kvalitete i svojstva. Područje PAT je interdisciplinarno te obuhvaća metode analitičke kemije, procesne kemije, procesnog inženjerstva i multivarijantne analize podataka.

PAT omogućuju identifikaciju parametara koji utječu na pojedini proces, praćenje procesa u realnom vremenu, dobivanje podataka koji se mogu obraditi multivarijantnim metodama analize te razvoj procesne kontrolne strategije.<sup>1,2</sup>

Prema mjestu određivanja PAT se mogu podijeliti na:

1. *off-line* – analiza se provodi u dislociranom laboratoriju,
2. *at-line* – analiza se provodi u laboratoriju u mjestu proizvodnje,
3. *on-line* – analiza uključuje uzorkovanje, analizu i vraćanje uzoraka u proces proizvodnje,
4. *in-line* – analiza se odvija u realnom vremenu, omogućava mjerenje *in situ*, bez uzorkovanja.

Nedostatci mjerenja *off-line* i *at-line* su nemogućnost dobivanja podataka u realnom vremenu te prisutnost stati-

stičkih i fizikalnih pogrešaka prilikom uzorkovanja. Statičke pogreške pojavljuju se ako analizirani uzorak nije reprezentativan, dok fizikalne pogreške nastaju zbog promjena u materijalu uslijed procesa uzorkovanja.

Za razliku od gore navedenih tehnika, analiza *in-line* omogućava praćenje fizikalnih i kemijskih procesa *in situ*. Takav pristup ima mnogo prednosti, od kojih treba spomenuti manje izlaganje opasnim materijalima, snimanje u realnom vremenu te manju mogućnost kontaminacije ili uništavanja uzorka.<sup>3</sup> Tijekom analize *in-line* nema potrebe za uzimanjem alikvota i narušavanjem ravnoteže u reakcijskom sustavu.

Zbog svih navedenih prednosti, PAT *in-line* uspješno se primjenjuju u različitim industrijskim granama, kao što su industrija polimera, nafte, poluvodiča, stakla, katalizatora te prehrambena i farmaceutska industrija.<sup>2,4</sup> Nadalje, regulatorne agencije sve više nameću primjenu analitičkih tehnika *in-line* za praćenje procesa u farmaceutskoj industriji kao tehnike izbora.<sup>1</sup>

Stoga je u posljednje vrijeme razvijen velik broj tehnika *in-line* koje se temelje na:

– infracrvenoj spektroskopiji u bliskom infracrvenom području (engl. *Near Infrared spectroscopy*, NIR) poput transmisijske spektroskopije NIR, infracrvene spektroskopije uz Fourierovu transformaciju i difuznu refleksiju (engl. *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform spectroscopy*,

\* Autor za dopisivanje: Tomislav Jednačak, dipl. inž., asistent  
e-pošta: tjednacac@chem.pmf.hr

T a b l i c a 1 – Usporedba najvažnijih tehnika vibracijske spektroskopije in-line<sup>4</sup>T a b l e 1 – The comparison of the most important in-line vibrational spectroscopic techniques<sup>4</sup>

Svojstvo Property	NIR-spektroskopija NIR spectroscopy	ATR-MIR-spektroskopija ATR-MIR spectroscopy	Ramanova spektroskopija Raman spectroscopy
podaci dobiveni asignacijom spektra data obtained by spectral assignment	kombinacijske vibracije i viši tonovi combination bands and overtones	osnovne vibracije; kombinacijske vibracije i viši tonovi; vibracijsko-rotacijska struktura fundamental vibrations; combination bands and overtones; vibrational-rotational structure	osnovne vibracije; kombinacijske vibracije i viši tonovi; vibracijsko-rotacijska struktura fundamental vibrations; combination bands and overtones; vibrational-rotational structure
vrsta spektrometra spectrometer type	disperzivan; FTIR dispersive; FTIR	FTIR	disperzivan; FT-Raman dispersive; FT Raman
razlučivanje resolution	< 8 cm <sup>-1</sup>	> 4 cm <sup>-1</sup>	> 4 cm <sup>-1</sup>
metode interpretacije interpretation methods	multivarijantne metode multivariate methods	omjer intenziteta signala; multivarijantne metode peak intensity ratio; multivariate methods	omjer intenziteta signala; multivarijantne metode peak intensity ratio; multivariate methods
vrsta sonde probe type	transmisijska NIR-sonda; ATR-NIR-sonda transmission NIR probe; ATR-NIR probe	ATR-MIR-sonda ATR-MIR probe	Ramanova sonda Raman probe
način spajanja sonde i spektrometra probe-spectrometer interface	optička vlakna optical fibres	optička vlakna optical fibres	optička vlakna optical fibres
udaljenost sonde od spektrometra spectrometer-probe distance	100 m	2 m	100 m

DRIFT) te infracrvene spektroskopije uz prigušenu totalnu refleksiju (engl. *Attenuated Total Reflectance infrared spectroscopy*, ATR),

– infracrvenoj spektroskopiji u srednjem infracrvenom području (engl. *Middle Infrared spectroscopy*, MIR), kao što su transmisijska spektroskopija MIR, DRIFT i ATR),

– Ramanovoj spektroskopiji te njezinim modifikacijama poput koherentne anti-Stokesove Ramanove spektroskopije (engl. *Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*, CARS), spektroskopije rezonantnog Ramanova raspršenja (engl. *Resonant Raman Spectroscopy*, RRS), spektroskopije površinski pojačanog Ramanova raspršenja (engl. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS), odnosno spektroskopije površinski pojačanog rezonantnog Ramanova raspršenja (engl. *Surface-Enhanced Resonant Raman Spectroscopy*, SERRS).

Rezultati dobiveni navedenim eksperimentalnim tehnikama vrlo često se zbog složenosti spektara dalje obrađuju primjenom statističkih metoda kao što je analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) i parcijalni najmanji kvadrati (engl. *partial least squares*, PLS).<sup>5,6</sup> Na taj način dobiva se statistički opis pojedinih procesnih parametara koje je potrebno optimirati da bi se

unaprijedio proces proizvodnje i osigurala kvaliteta konačnog proizvoda.

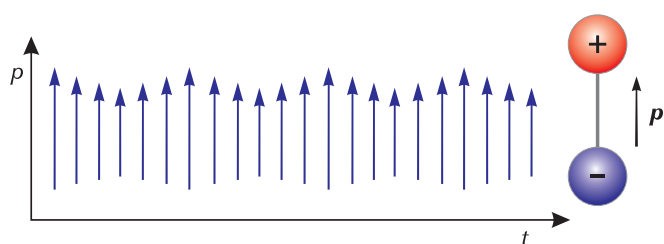
U ovome radu bit će opisane samo najvažnije tehnike vibracijske spektroskopije *in-line* i one koje se danas najviše primjenjuju. Njihova usporedba prikazana je u tablici 1.

## Vibracijska spektroskopija

Vibracijska spektroskopija primjenjuje se za identifikaciju molekula na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno periodičkih promjena kuteva i međuatomskih udaljenosti.<sup>7,8</sup> Vibracijske spektroskopske tehnike mogu se temeljiti na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetskog zračenja, pa stoga razlikujemo infracrvenu odnosno Ramanovu spektroskopiju.

Infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*, IR) proučava interakcije tvari i elektromagnetnog zračenja u rasponu valnih brojeva od 12 500 cm<sup>-1</sup> do 10 cm<sup>-1</sup>, odnosno valnih duljina od 0,8 μm do 1000 μm. IR-spektar pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnoj duljini ili valnom broju. Područje IR-spektra može se po-

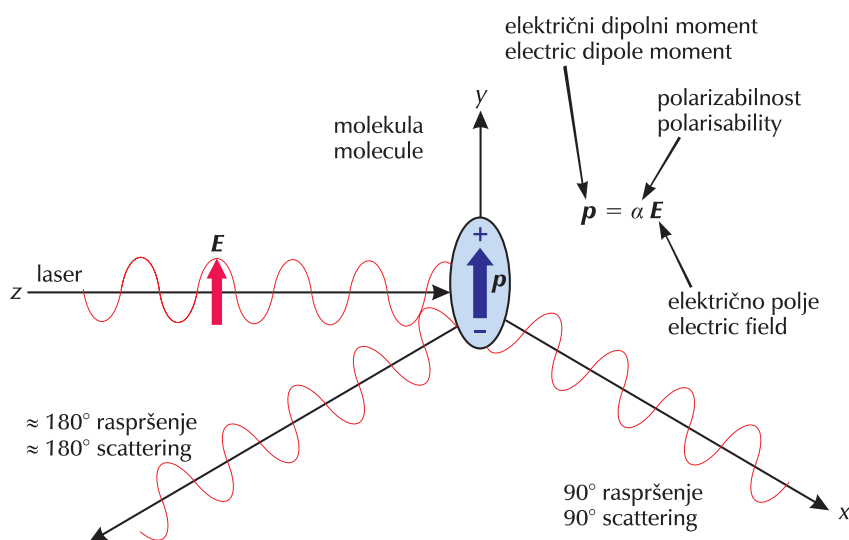
dijeliti na blisko ( $12\,500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), srednje ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ ) i daleko ( $400\text{ cm}^{-1}$  do  $10\text{ cm}^{-1}$ ). Za organske spojeve najzanimljivije je srednje područje infracrvenog spektra, gdje se nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve. Navedeno područje može se podijeliti na područje funkcijskih skupina ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $1400\text{ cm}^{-1}$ ) i područje otiska prsta ( $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $1400\text{ cm}^{-1}$ ), koje je specifično za svaki uzorak. U infracrvenom spektru bit će opažene samo one vibracije kod kojih dolazi do vremenski periodičke promjene električnog dipolnog momenta  $\mathbf{p}$  (slika 1). Ovisno o energiji apsorbiranog kvanta zračenja, u molekuli će se pobuditi točno određene vibracije pojedinih funkcijskih skupina. Zbog općenito slabe sprege s ostalim vibracijama, one se mogu promatrati odvojeno, što omogućava primjenu infracrvene spektroskopije kao analitičke tehnike.



Slika 1 – Titrajući dipol uzrokuje vremenski periodičku promjenu električnog polja u svojoj blizini

Fig. 1 – Oscillating dipole induces time-periodic variation of the electric field surrounding it

Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom (Ramanovu) raspršenju elektromagnetskog zračenja zbog međudjelovanja s uzorkom. Razlika u energiji sustava prije i nakon Ramanova raspršenja uglavnom odgovara srednjem infracrvenom području elektromagnetskog zračenja. Stoga se Ramanova spektroskopija može primijeniti kao



Slika 2 – Raspršenje zračenja pod kutovima od  $90^\circ$  i približno  $180^\circ$ . Električno polje inducira električni dipolni moment u molekuli.

Fig. 2 – Scattering of radiation at the angles measuring  $90^\circ$  and approximately  $180^\circ$ . Electric field induces electric dipole moment in the molecule.

tehnika komplementarna infracrvenoj spektroskopiji za analizu molekula na temelju njihovih vibracija.

Da bi vibracija molekule bila aktivna u Ramanovu spektru, tijekom vibracije mora doći do promjene polarizabilnosti,  $\alpha$ . Lasersko zračenje koje dolazi do molekule može se raspršiti pod različitim kutovima (slika 2).

## Infracrvena spektroskopija in-line u bliskom infracrvenom području

Infracrvena spektroskopija in-line u bliskom infracrvenom području (engl. *in-line Near Infrared spectroscopy, in-line NIR*) primjenjuje se za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu.<sup>2,9</sup> Obuhvaća područje od  $12\,500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ , gdje se pojavljuju vrpce viših tonova (harmonika) i kombinacijske vrpce. Postoji u nekoliko izvedbi, od kojih se najviše primjenjuje transmisijska in-line-NIR. Navedena tehnika omogućava praćenje procesa *in situ* pomoću NIR-sonde koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom.

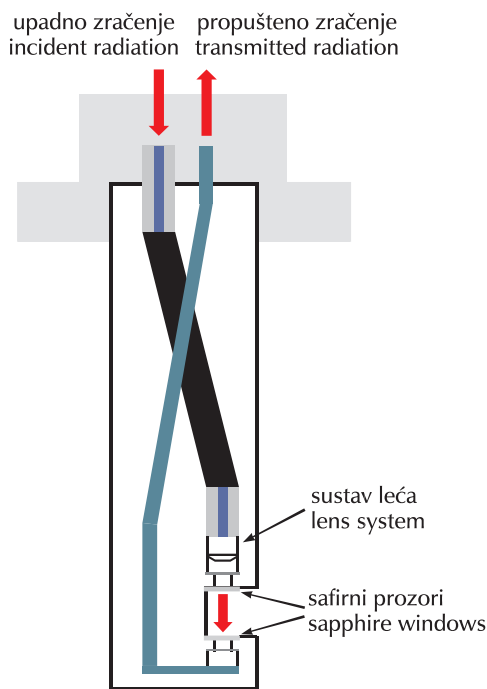
Presjek transmisijske NIR-sonde prikazan je na slici 3. Upadno zračenje prenosi se optičkim vlaknom do sustava leća pomoću kojega se usmjerava prema uzorku, gdje dolazi do njegove djelomične apsorpcije. Propušteno zračenje zatim se odgovarajućim optičkim vlaknom prenosi do detektora. Obloga od inertnog metala i safirni prozori štite sondu od vanjskih utjecaja prilikom mjerenja *in situ*.

NIR-spektri odlikuju se velikim omjerom signala i šuma, a položaj i intenzitet vrpce može se vrlo točno odrediti, što je osobito važno za kvantitativnu analizu. Zbog slabe apsorpcije vode i stakla moguće je snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala. S druge strane, vrpce u NIR-spektrima manje su informativne, a u mnogim slučajevima dolazi i do njihova preklapanja. Stoga je dobivene podatke potrebno obraditi multivarijantnim metodama analize.

NIR-spektroskopija in-line uspješno je primijenjena u polimernom inženjerstvu za praćenje procesa ekstruzije polimera i dobivanje uvida u procesne parametre, poput sastava polimera, udjela vlage i viskoznosti smjese.<sup>9</sup>

Ovom tehnikom mogu se pratiti i biokemijski procesi, primjerice kultivacija monoklonalnih antitijela.<sup>10</sup> Nadalje, NIR-spektroskopija in-line pronalazi primjenu u mesnoj industriji za kontrolu kvalitete mesnih preradevina tijekom procesa obrade<sup>11</sup> te farmaceutskoj industriji za praćenje pojedinih koraka prilikom razvoja lijeka.<sup>12,13</sup>

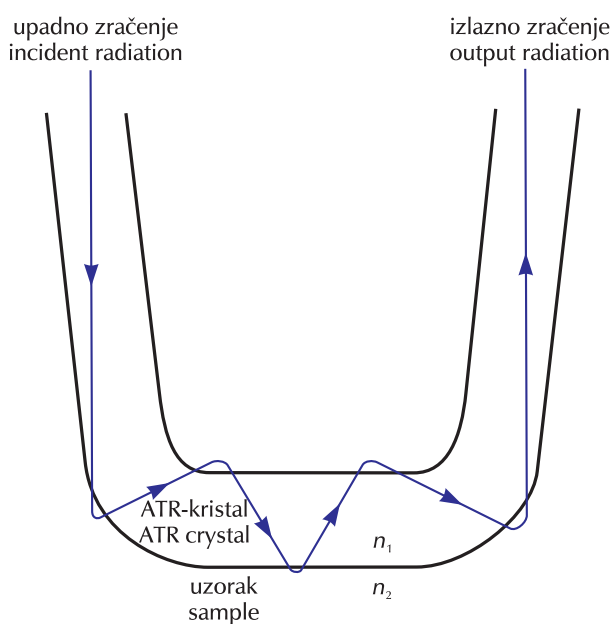
Zbog velike točnosti, NIR-spektroskopija in-line uspješno se primjenjuje za kvantitativnu analizu. U kombinaciji s multivarijantnim metodama analize podataka, ova tehnika se može primijeniti za određivanje sastava farmaceutskih pastila tijekom procesa proizvodnje te klasifikaciju uzoraka prema količini djelatne tvari.<sup>14</sup>



Slika 3 – Presjek transmisijske NIR-sonde  
Fig. 3 – Cross-section of the transmission NIR probe

### Infracrvena spektroskopija *in-line* uz prigušenu totalnu refleksiju

U tehnici infracrvene spektroskopije *in-line* uz prigušenu totalnu refleksiju (engl. *in line Attenuated Total Reflection infrared spectroscopy*, ATR *in-line*) uzorak se stavlja u optički kontakt s obzirom na ATR-kristal napravljen od materijala visokog indeksa loma, primjerice ZnSe.<sup>15</sup> ATR-kristal zakrivljena je oblika te se nalazi na glavi sonde (slika 4). Upadno infracrveno zračenje se fokusira na rub



Slika 4 – Prikaz procesa u ATR-sondi  
Fig. 4 – Illustration of the process in ATR probe

ATR-elementa pomoću zrcala, reflektira kroz kristal te na kraju usmjerava na detektor. Usprkos gotovo potpunoj unutarnjoj refleksiji na granici uzorka i kristala, zračenje ipak malo prodire unutar uzorka. Navedena pojava naziva se evanescentni val. Tijekom interakcije uzorka s evanescentnim valom dolazi do apsorpcije zračenja.

Dubina prodiranja evanescentnog vala,  $d_p$ , definirana je kao udaljenost potrebna da amplituda električnog polja padne na  $1/e$  od svoje početne vrijednosti. Ona ovisi o valnoj duljini ( $\lambda$ ), indeksima loma ATR-kristala ( $n_1$ ) i uzorka ( $n_2$ ), te kutu upada ( $\theta$ ):

$$d_p = \frac{\lambda}{2 \delta n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_1/n_2)^2}} \quad (1)$$

Prednosti ove metode su neosjetljivost na utjecaj čestica i mjehurića zraka u otopini te jednostavno snimanje referentnog spektra za koji može poslužiti i spektar zraka.<sup>2</sup> Pri tome nije potrebna ponovna kalibracija sonde. Jedan od glavnih nedostataka ove metode jest slaba mogućnost kvantitativnih mjerenja, jer snaga apsorpcijske vrpce ovisi o indeksu loma uzorka. Indeks loma može se promijeniti zbog promjena koncentracije uzorka ili temperature. Usprkos nekim nedostacima, tehnika ATR *in-line* zbog lakoće primjene te neosjetljivosti na nehomogenosti u otopini predstavlja dobar izbor za praćenje fizičkih i kemijskih procesa u realnom vremenu.

Jedan od takvih procesa je kristalizacija djelatne tvari koja može postojati u obliku nekoliko polimorfnih formi.<sup>16</sup> Infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju *in-line* primijenjena je za kvantitativno praćenje navedenog procesa. Preduvjet za kvantitativnu analizu bila je konstrukcija baždarne krivulje prema navedenim koracima:

- definiranje raspona koncentracije i temperature; konstrukcija krivulje topljivosti i koncentracijskog profila;
- odabir točaka za mjerenje apsorpcije u određenom rasponu koncentracije i temperature; mjerenje apsorpcije odabranih otopina u eksperimentalnim uvjetima; otope se poznate količine proučavane tvari te se snime spektri pri različitim temperaturama; izračunavanje vrijednosti koeficijenta  $a_i$  ( $i = 0, 1, 2, 3$ ) u jednadžbi (2):

$$c(A, T) = a_0 + a_1 A + a_2 A^2 + a_3 A T \quad (2)$$

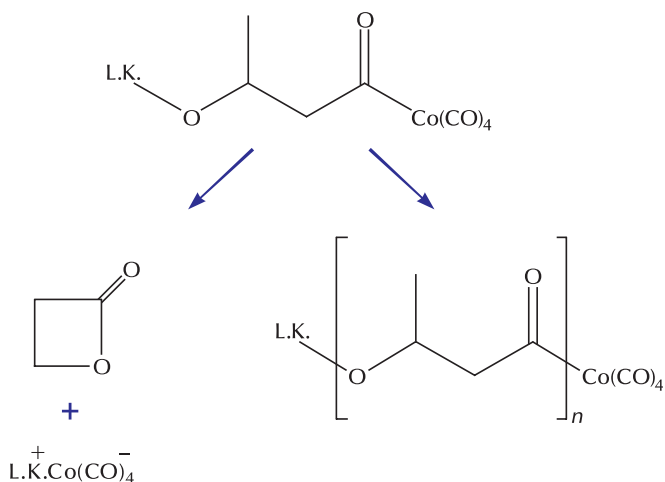
$c$  – koncentracija otopljene tvari

$A$  – apsorpcija pri valnoj duljini maksimuma

$T$  – temperatura

Pomoću navedenog modela izračunata je koncentracija djelatne tvari otopljene u etanolu pri različitim temperaturama te je dobivena procjena koncentracijskog profila. Ovaj primjer pokazuje kako je ATR *in-line* korisna tehnika za praćenje polimorfnih prijelaza *in situ* i određivanje krivulja topljivosti djelatnih tvari.

Nadalje, tehnika ATR *in-line* primijenjena je za praćenje *in situ* reakcije između epoksida i ugljikova monoksida uz prisutnost soli Lewisove kiseline (L.K.) i kobaltova tetra-karbonila.<sup>17</sup> Nastali reakcijski produkti (shema 1) detektirani su na temelju karakterističnih vrpca u ATR-spektrima *in-line*. Na taj način dobiven je uvid u kinetičke parametre i raspodjelu produkata u reakcijskoj smjesi pri različitim temperaturama i tlakovima.



S h e m a 1 – Završni korak reakcije između epoksida i ugljikova monoksida uz prisutnost soli Lewisove kiseline i kobaltova tetrakarbonila,  $\text{L.K.Co(CO)}_4$ <sup>17</sup>

S c h e m e 1 – The final step of the reaction between epoxide and carbon monoxide in the presence of Lewis acid – cobalt tetracarbonyl salt,  $\text{L.K.Co(CO)}_4$ <sup>17</sup>

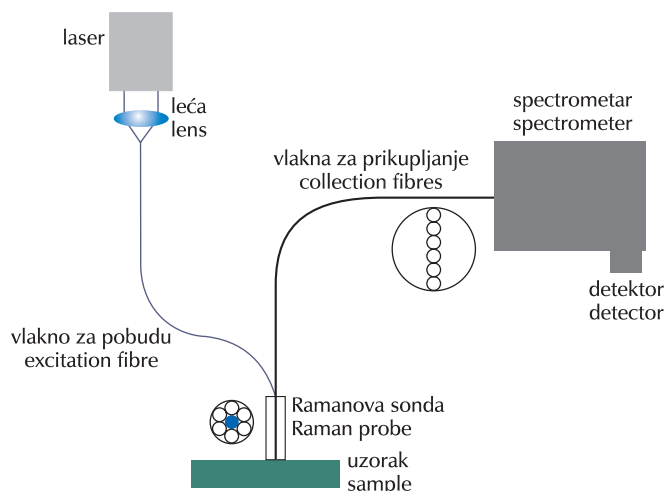
Kombinacijom *in-line* ATR s drugim tehnikama može se dobiti potpuniji uvid u procesne parametre. Tako je primjerice ATR *in-line* u kombinaciji s diferencijalnom elektrokemijskom spektrometrijom masa (DEMS) primijenjena za istovremenu detekciju stabilnih adsorbiranih vrsti i reakcijskih međuprodukata te praćenje kinetike oksidacije ugljikovog monoksida na platinskoj elektrodi.<sup>18</sup> Za dobivanje procjene koncentracije *in situ* pojedinih vrsti u smjesi te ostalih procesnih parametara, ATR-spektri mogu se obraditi multivarijantnim metodama analize podataka.<sup>19</sup>

## Ramanova spektroskopija *in-line*

Vibracijska karakterizacija farmaceutskih proizvoda može se na robustan, jednostavan i siguran način izvoditi tehnikom Ramanove spektroskopije *in-line*, pomoću Ramanove sonde (slika 5).<sup>4,20,21</sup> Pobudno zračenje prenosi se optičkim vlaknom za pobudu preko sonde do uzorka, a zatim se raspršeno zračenje skuplja te optičkim vlaknima prenosi do spektrometra i na kraju do detektora. Obično postoji jedno vlakno za pobudu te nekoliko vlakana za prikupljanje signala. Većina Ramanovih sondi posjeduje konfiguraciju uz povratno raspršenje. Kod procesnih Ramanovih sondi vlakna za pobudu i prikupljanje smještena su prostorno blizu, što omogućava praćenje procesa u realnom vremenu. Jedna od prednosti sondi jest i njihova fleksibilnost te prilagodljivost eksperimentalnim uvjetima.

Ramanova spektroskopija *in-line* omogućuje nedestruktivnu analizu *in situ* pomoću sonde. Široko spektralno područje i mogućnost snimanja u vodenim otopinama čine Ramanovu spektroskopiju *in-line* jednom od tehnika izbora za praćenje i kontrolu industrijskih procesa.

Ova tehnika primjenjuje se u biokemiji za praćenje kristalizacije enzima i reakcija kataliziranih pomoću enzima<sup>22,23</sup>, kemiji materijala<sup>24</sup> te industriji polimera za kontrolu procesa otapanja, kristalizacije i proizvodnje.<sup>25–27</sup> Nadalje, Ra-

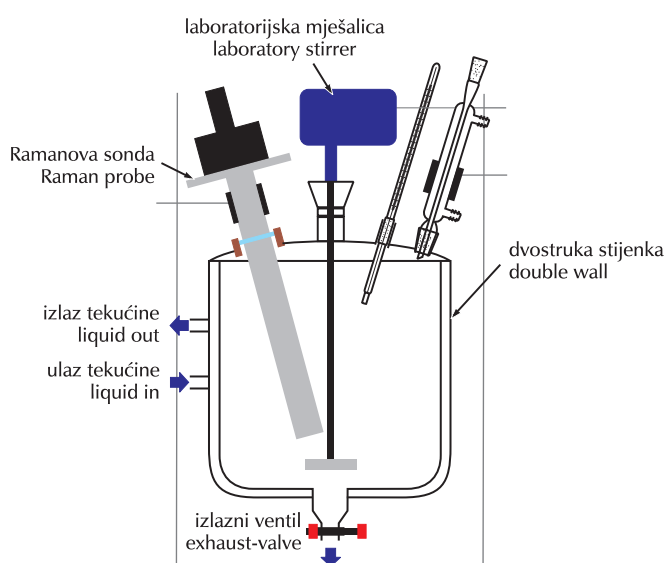


S l i k a 5 – Grafički prikaz Ramanove sonde s optičkim vlaknima  
F i g. 5 – Graphic illustration of the fibre-optic Raman probe

manovom spektroskopijom *in-line* moguće je pratiti procese u farmaceutskoj industriji, poput homogenizacije, kristalizacije i sinteze djelatnih tvari.<sup>28–34</sup>

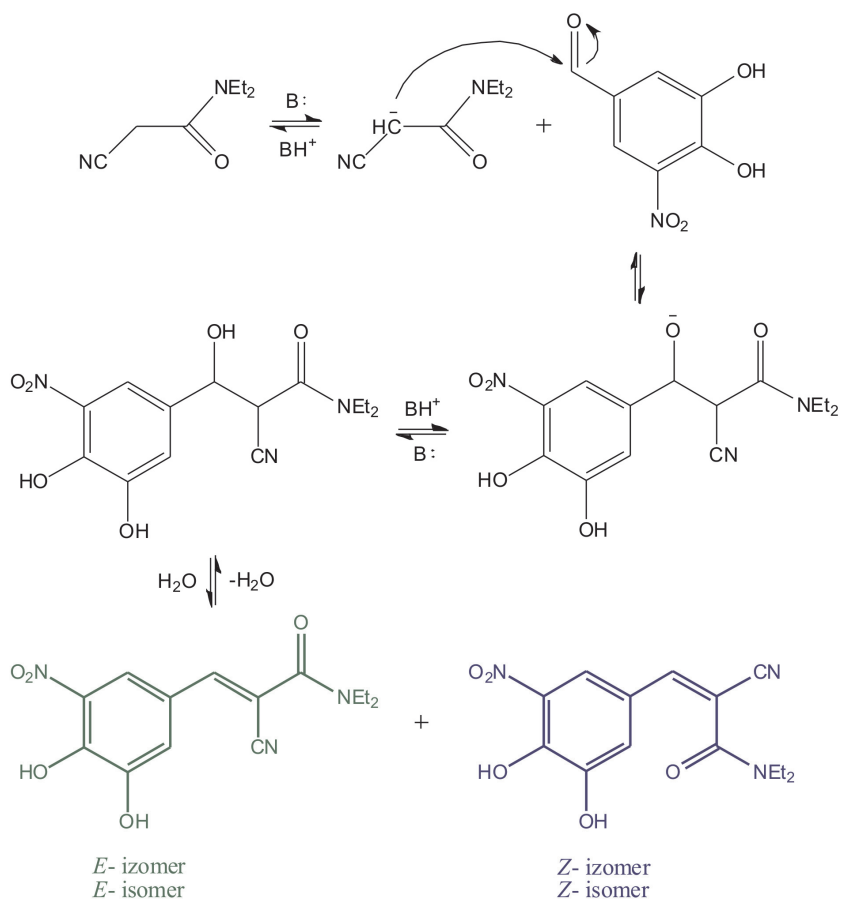
Za praćenje procesa u laboratorijskim uvjetima može se upotrijebiti aparatura prikazana na slici 6. Sastoji se od Ramanove sonde, miješalice i termometra uronjenih u laboratorijski reaktor s dvostrukom stijenkom. Temperatura u reaktoru održava se pomoću termostatisane kupelji koja osigurava kontinuirani protok tekućine u prostoru između stijenki reaktora.

Aparatura prikazana na slici 6 primijenjena je za praćenje Knoevenagelove kondenzacijske reakcije između 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-*N,N*-dietilacetamida (shema 2), koja je završni korak prilikom sinteze dje-



S l i k a 6 – Aparatura za praćenje procesa Ramanovom spektroskopijom *in-line*

F i g. 6 – The laboratory setup for *in-line* Raman process monitoring



S h e m a 2 – Prikaz Knoevenagelove kondenzacijske reakcije između 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehida i 2-cijano-N,N-dietilacetamida

S c h e m e 2 – Illustration of the Knoevenagel condensation reaction between 3,4-dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde and 2-cyano-N,N-diethylacetamide

latne tvari entakapona.<sup>34</sup> Sintezom entakapona nastaju dva izomera, *E* i *Z* u međusobnom omjeru 2:1.<sup>35</sup> Ramanova sonda uronjena u reakcijsku smjesu omogućila je detekciju *in situ* oba izomera na temelju njihovih karakterističnih vibracijskih vrpca. Ramanovi spektri *in-line* snimljeni tijekom Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u toluenu, izobutil-acetatu i heptanu prikazani su na slici 7. Vrpca koja se pojavljuje pri oko 2200  $\text{cm}^{-1}$  može se pripisati  $\text{C}\equiv\text{N}$  istezanju karakterističnom za oba izomera entakapona. S druge strane, pojava vrpce amidnog  $\text{C}=\text{O}$  istezanja pri 1590  $\text{cm}^{-1}$  ukazuje na nastanak *E*-izomera entakapona u reakcijskoj smjesi.

S obzirom na preklapanje ostalih vrpca i složen sastav reakcijske smjese, nastanak *Z*-izomera entakapona nije bilo moguće nedvojbeno potvrditi analizom Ramanovih spektara *in-line*. Stoga su za njihovu asignaciju te određivanje trajanja reakcije u svakom otapalu primijenjene statističke metode, o kojima će biti riječi u sljedećem poglavlju.

Na sličan način može se pratiti kristalizacija djelatne tvari. Kontrola procesa kristalizacije posebno je značajna ako se tvar pojavljuje u više polimornih oblika s različitim fizičko-kemijskim svojstvima.<sup>36,37</sup> Odabirom optimalnih kinetičkih i termodinamičkih parametara proces kristalizacije može se usmjeriti prema farmaceutski najzanimljivijem polimornom obliku. S obzirom da svaki polimorni oblik

pokazuje razlike u Ramanovim spektrima, za njihovu detekciju i identifikaciju može se upotrijebiti Ramanova sonda prikazana na slici 6.

Najvažniji nedostaci Ramanove spektroskopije *in-line* su osjetljivost na nehomogenosti u uzorku zbog malog promjera laserske zrake te nizak omjer signala i šuma. Utjecaj nehomogenosti može se umanjiti postupkom osvjetljavanja na širokoj površini (engl. *Wide Area Illumination*, WAI).<sup>38</sup> Zračenje pritom fokusira pri većoj žarišnoj duljini na šire područje. Nadalje, omjer signala i šuma se može povećati primjenom pobudnog zračenja kraće valne duljine i veće snage. S druge strane, takvo zračenje može uzrokovati fluorescenciju i degradaciju uzorka. Danas postoje različite modifikacije ove spektroskopske tehnike kojima se navedeni učinci mogu umanjiti.<sup>4,21,38</sup>

## Multivarijantne metode analize podataka

Metode multivarijantne analize podataka su kemometrijske metode koje se primjenjuju za dobivanje informacija iz kemijskih podataka pomoću statističkih postupaka.<sup>5,6,39,40</sup> U kombinaciji s metodama *in-line* omogućavaju bolje razumijevanje fizičkih i kemijskih procesa te dobivanje proizvoda s optimalnim svojstvima.

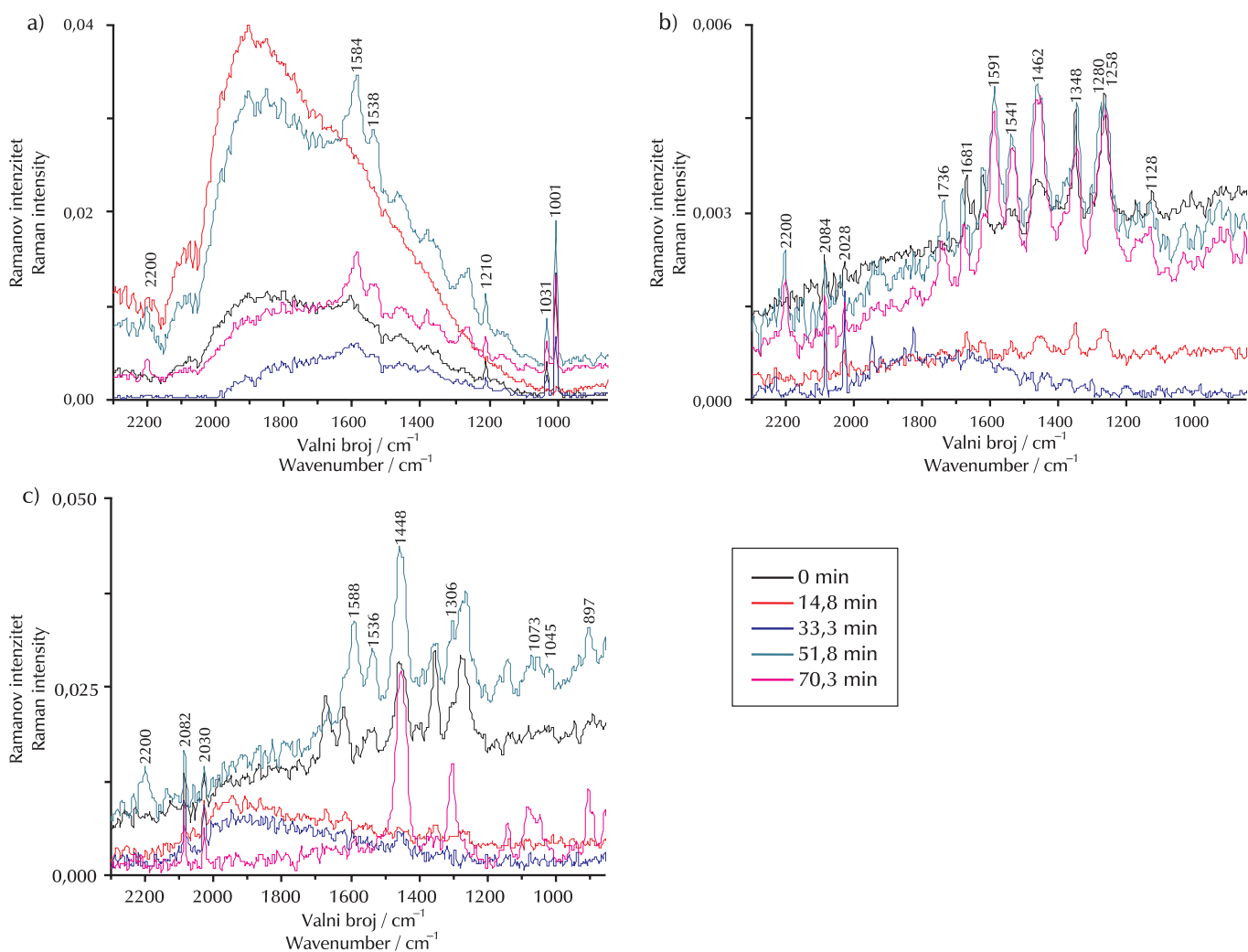
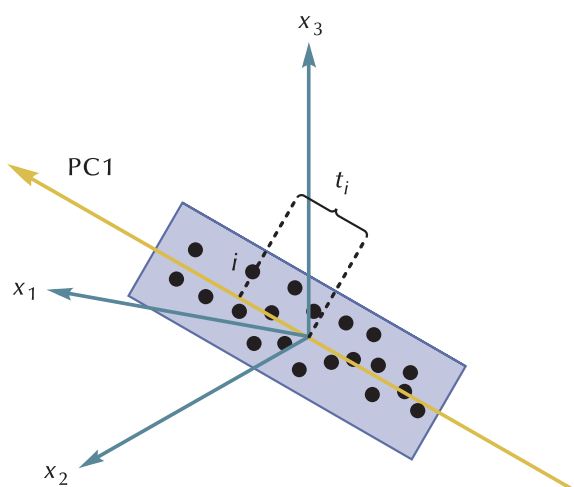
Najčešće primjenjivane metode multivarijantne analize podataka su:

- a) Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Components Analysis*, PCA)
- b) Parcijalni najmanji kvadrati (engl. *Partial Least Squares*, PLS)

### a) Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Components Analysis*, PCA)

PCA omogućava analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizičkog ili kemijskog procesa. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u *n*-dimenzijskom prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ). Uvođenjem glavnih komponenti (engl. *principal components*, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavnjuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3,...). Glavne komponente su međusobno ortogonalne. Udaljenost  $t_i$  projekcije točke  $i$  na glavnu komponentu od ishodišta koordinatnog sustava naziva se *score*-vrijednost (slika 8).

Vizualizacija podataka se često izvodi pomoću tzv. faktorskih bodova (eng. *score plots*). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se

Slika 7 – Ramanovi spektri in-line Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u a) toluenu, b) izobutil-acetatu i c) heptanu<sup>34</sup>Fig. 7 – In-line Raman spectra of the Knoevenagel condensation reaction in a) toluene, b) isobutyl-acetate and c) heptane<sup>34</sup>Slika 8 – Prva glavna komponenta (PC1) u trodimenzionalnom prostoru te odgovarajuća score-vrijednost  $t_i$  za točku  $i$ Fig. 8 – The first principal component (PC1) in three-dimensional space and corresponding score value  $t_i$  for point  $i$ 

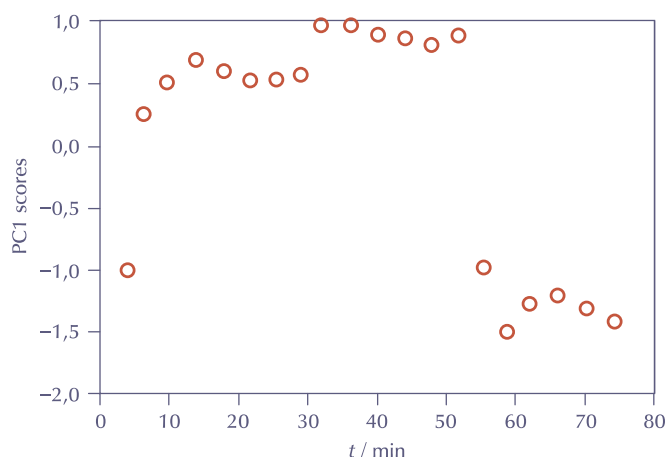
vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava i njihovo grupiranje.

Korelacija između originalnih varijabli i glavnih komponenti može se opisati tzv. opterećenjem (eng. *loading*), što predstavlja kosinus kuta između originalne varijable i glavne komponente.

PCA se može primijeniti za obradu podataka dobivenih Ramanovom spektroskopijom *in-line*, primjerice prilikom sinteze djelatne tvari (slika 9). Na taj način može se dobiti uvid u tijek reakcije te procijeniti njezino trajanje.

#### b) Parcijalni najmanji kvadrati (eng. *Partial Least Squares, PLS*)

Metodom PLS mogu se analizirati podaci usprkos malim razlikama u spektrima. Za razliku od PCA, podaci se metodom PLS opisuju pomoću fizičkog modela u kojemu broj varijabli treba biti što je moguće manji. U PCA su glavne komponente određene samo varijancom mjerenih varijabli i neovisne su o njihovom slaganju s traženim svojstvom, dok se u PLS-u latentne varijable odabiru tako da se dobije



Slika 9 – Faktorski bodovi prve glavne komponente za skup od 20 Ramanovih spektara in-line snimljenih za vrijeme Knoevenagelove kondenzacijske reakcije u izobutil-acetatu<sup>34</sup>

Fig. 9 – PC1 score plot for a set of 20 in-line FT-Raman spectra of the Knoevenagel condensation reaction in isobutyl acetate<sup>34</sup>

najbolje slaganje proučavanog svojstva i mjerene varijable. PLS se može smatrati regresijskim oblikom PCA koji linearnim multivarijantnim modelom povezuje podatke smještene u dvije matrice,  $\mathbf{X}$  i  $\mathbf{Y}$ . Matrica  $\mathbf{X}$  sadrži varijable  $p$  (npr. valne duljine) te objekte  $n$  (npr. spektre), dok matrica  $\mathbf{Y}$  daje informaciju o traženom svojstvu  $m$ , primjerice veličini čestica, koncentraciji, itd.

Svaki mjerenoj podatak odgovaraju dvije točke, jedna u  $x$ -prostoru opisanom matricom  $\mathbf{X}$ , a druga u  $y$ -prostoru opisanom matricom  $\mathbf{Y}$ . Svrha analize PLS je opisati odnos između objekata u  $x$ -prostoru i njihovog položaja u odgovarajućem  $y$ -prostoru uz minimalna odstupanja.

Tehnike *in-line* (ATR i DRIFT) u kombinaciji s multivarijantnim metodama analize (PCA i PLS) uspješno su primijenjene za praćenje procesa kristalizacije tvari koja može postojati u obliku više polimorfni oblika.<sup>41</sup> Polimorfni sastav dobivenih kristala određen je rendgenskom difrakcijom na prahu. Za interpretaciju dobivenih podataka primijenjena je analiza PCA uz prikaz *score plot*. Prema prikazu *score plot* uzorci su podijeljeni u dvije skupine: prvu skupinu čine uzorci dobiveni kristalizacijom iz propan-1-ola, dok se u drugoj skupini nalaze uzorci dobiveni kristalizacijom iz otapala koja sadrže vodu. Podaci dobiveni rendgenskom difrakcijom ukazuju na razlike u polimorfnom sastavu uzoraka ovih dviju skupina. Stoga se može zaključiti da se PCA može primjenjivati kao komplementarna metoda za razlikovanje dobivenih kristala prema polimorfnom sastavu. Za predviđanje udjela pojedinih komponenata u smjesi dobiveni spektri *in-line* obrađeni su metodom PLS. Analiza PLS predviđela je postojanje manje zastupljenih polimorfni oblika uz točnost koja je usporediva s rendgenskom difrakcijom na praškastom uzorku.

## Zaključak

Procesne analitičke tehnike primjenjuju se u mnogim fazama industrijskih procesa, olakšavaju njihovo razumijevanje, omogućavaju osiguranje kvalitete optimalnim dizajnom i pravovremenim utvrđivanjem procesnih odstupanja.

Značajno mjesto među procesnim analitičkim tehnikama zauzimaju tehnike vibracijske spektroskopije *in-line*. One omogućuju praćenje proizvodnih procesa u realnom vremenu, *in situ*, uz manje izlaganje opasnim materijalima, manju mogućnost kontaminacije, uništavanja uzorka ili narušavanja ravnoteže u reakcijskom sustavu.

Svaka tvar u vibracijskom spektru ima karakteristične vrpece. Stoga se na temelju karakterističnih vrpca u infracrvenim i Ramanovim spektrima *in-line* može pratiti kristalizacija, otapanje, polimorfni prijelazi i kemijske reakcije. Praćenjem fizičkih i kemijskih procesa *in situ* mogu se odrediti parametri koji na njih utječu. Statistički opis pojedinih procesnih parametara dobiva se obradom dobivenih eksperimentalnih podataka multivarijantnim metodama analize, poput analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) i parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares*, PLS). Statističke metode olakšavaju interpretaciju dobivenih podataka i optimiranje procesnih parametara. Pravilnim podešavanjem parametara proces kristalizacije može se usmjeriti prema dobivanju polimorfa s najboljim svojstvima, a kemijska reakcija prema dobivanju traženog produkta uz optimalno iskorištenje. Nadalje, praćenjem polimornog prijelaza dobivaju se informacije o termodinamičkoj i kinetičkoj stabilnosti spoja, što omogućava odabir najpovoljnijih uvjeta njegove proizvodnje.

S obzirom na prednosti procesnih analitičkih tehnika poput infracrvene i Ramanove spektroskopije *in-line*, regulatorne agencije nameću njihovu primjenu kao tehnike izbora za proučavanje farmaceutskih kristalnih oblika.<sup>1</sup> Stoga se očekuje da će njihova uloga u budućnosti biti još značajnija.

## ZAHVALA

Autori se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i sporta (projekt br. 119-1191342-1083), Hrvatskoj zakladi za znanost i Plivi d. o. o. (projekt Razvoj i primjena *in-line* metode Ramanove spektroskopije u istraživanju lijekova) na financiranju dijela istraživanja.

## Popis simbola i kratica

### List of symbols and abbreviations

- $A$  – apsorbanca  
– absorbance
- $a_i$  – koeficijenti ( $i = 0, 1, 2, 3$ )  
– coefficients ( $i = 0, 1, 2, 3$ )
- $c$  – množinska koncentracija, mol dm<sup>-3</sup>  
– amount concentration, mol dm<sup>-3</sup>
- $d_p$  – dubina prodiranja evanescentnog vala,  $\mu\text{m}$   
– evanescent wave propagation depth,  $\mu\text{m}$
- $n$  – indeks loma  
– refractive index
- $p$  – električni dipolni moment, C m  
– electric dipole moment, C m
- $T$  – temperatura, K  
– temperature, K
- $\alpha$  – električna polarizabilnost, C m<sup>2</sup> V<sup>-1</sup>  
– electric polarizability, C m<sup>2</sup> V<sup>-1</sup>



- $\theta$  – kut upada elektromagnetskog zračenja, °, rad  
– angle of incidence, °, rad
- $\lambda$  – valna duljina,  $\mu\text{m}$   
– wavelength,  $\mu\text{m}$
- ATR – infracrvena spektroskopija uz prigušenu totalnu refleksiju  
– attenuated total reflectance infrared spectroscopy
- CARS – koherentna anti-Stokesova Ramanova spektroskopija  
– coherent anti-Stokes Raman spectroscopy
- DEMS – diferencijalna elektrokemijska spektrometrija masa  
– differential electrochemical mass spectroscopy
- DRIFT – infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju i difuznu refleksiju  
– diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy
- FTIR – infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju  
– Fourier-transform infrared spectroscopy
- FT Raman – Ramanova spektroskopija uz Fourierovu transformaciju  
– Fourier-transform Raman spectroscopy
- in-line* ATR – infracrvena spektroskopija *in-line* uz prigušenu totalnu refleksiju  
– *in-line* attenuated total reflection infrared spectroscopy
- in-line* NIR – infracrvena spektroskopija *in-line* u bliskom infracrvenom području  
– *in-line* near infrared spectroscopy
- IR – infracrvena spektroskopija  
– infrared spectroscopy
- L.K. – Lewisova kiselina  
– Lewis acid
- MIR – spektroskopija u bliskom infracrvenom području  
– middle infrared spectroscopy
- NIR – spektroskopija u bliskom infracrvenom području  
– near infrared spectroscopy
- PAT – procesne analitičke tehnike  
– process analytical techniques
- PC – glavne komponente  
– principal components
- PCA – analiza glavnih komponenti  
– principal component analysis
- PLS – parcijalni najmanji kvadrati  
– partial least squares
- RRS – spektroskopija rezonantnog Ramanova raspršenja  
– resonant Raman spectroscopy
- SERRS – spektroskopija površinski pojačanog rezonantnog Ramanova raspršenja  
– surface-enhanced resonant Raman spectroscopy
- SERS – spektroskopije površinski pojačanog Ramanova raspršenja  
– surface-enhanced Raman spectroscopy
- WAI – osvjetljavanje na širokoj površini  
– wide area illumination

## Literatura References

1. Lawrence X. Yu, R. A. Lionberger, A. S. Raw, R. D'Costa, H. Wu, A. S. Hussain, Applications of Process Analytical Technology to Crystallization Processes, Elsevier Science, Amsterdam, 2003.
2. K. E. Bakeev, Process Analytical Technology, Blackwell Publishing Ltd., Oxford 2005.
3. W. P. Findlay, D. E. Bugay, Utilization of Fourier transform-Raman spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **16** (1998) 921–930.
4. R. Lewis, H. G. M. Edwards, Handbook of Raman Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, 2001.
5. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1997.
6. R. G. Brereton, Applied Chemometrics for Scientists, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
7. H. Günzler, H. U. Gremlich, Uvod u infracrvenu spektroskopiju (preveli prof. dr. sc. Z. Meić i dr. sc. G. Baranović), Školska knjiga, Zagreb, 2006.
8. M. Hesse, H. Maier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
9. Th. Rohe, W. Becker, A. Krey, H. Nägele, S. Kölle, N. Eisenreich, In-line monitoring of polymer extrusion processes by NIR spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.* **6** (1998) 325–332.
10. C. Hakemeyer, U. Strauss, S. Werz, G. E. Jose, F. Folque, J. C. Menezes, At-line NIR spectroscopy as effective PAT monitoring technique in Mab cultivations during process development and manufacturing, *Talanta* **90** (2012) 12–21.
11. G. Tøgersen, J. F. Arnesen, B. N. Nilsen, K. I. Hildrum, On-line prediction of chemical composition of semi-frozen ground beef by non-invasive NIR spectroscopy, *Meat Sci.* **63** (2003) 515–523.
12. M. J. Lee, D. Y. Seo, H. E. Lee, I. C. Wang, W. S. Kim, M. Y. Jeong, G. J. Choi, In-line NIR quantification of film thickness on pharmaceutical pellets during a fluid bed coating process, *Int. J. Pharm.* **403** (2011) 66–72.
13. A. D. Karande, P. W. S. Heng, C. V. Liew, In-line quantification of micronized drug and excipients in tablets by near infrared (NIR) spectroscopy: Real time monitoring of tableting process, *Int. J. Pharm.* **396** (2010) 63–74.
14. J. Mantanus, E. Ziémons, E. Rozet, B. Streeel, R. Klinkenberg, B. Evrard, J. Rantanen, P. Hubert, Building the quality into pellet manufacturing environment – Feasibility study and validation of an in-line quantitative near infrared (NIR) method, *Talanta* **83** (2010) 305–311.
15. S. Wartewig, R. H. H. Neubert, Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **57** (2005) 1144–1170.
16. F. Lewiner, J. P. Klein, F. Puel, G. Févotte, On-line ATR FTIR measurement of supersaturation during crystallization processes. Calibration and applications on three solute/solvent systems, *Chem. Eng. Sci.* **56** (2001) 2069–2084.
17. M. Allmendinger, M. Zintl, R. Eberhardt, G. A. Luinstra, F. Molnar, Online ATR-IR investigations and mechanistic understanding of the carbonylation of epoxides – the selective synthesis of lactones or polyesters from epoxides and CO, *J. Organomet. Chem.* **689** (2004) 971–979.
18. M. Heinen, Y. X. Chen, Z. Jusys, R. J. Behm, In situ ATR-FTIRS coupled with on-line DEMS under controlled mass transport conditions – A novel tool for electrocatalytic reaction studies, *Electrochim. Acta* **52** (2007) 5634–5643.
19. Z. P. Chen, J. Morris, A. Borissova, S. Khan, T. Mahmud, R. Penchev, K. J. Roberts, On-line monitoring of batch cooling crystallization of organic compounds using ATR-FTIR spectroscopy coupled with an advanced calibration method, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **96** (2009) 49–58.
20. D. Pappas, B. W. Smith, J. D. Winefordner, Raman Spectroscopy in Bioanalysis, *Talanta* **51** (2000) 131–144.

21. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, Wiley, New York, 2000.
22. A. M. Schwartz, K. A. Berglund, The use of Raman spectroscopy for *in situ* monitoring of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop, *J. Cryst. Growth* **203** (1999) 599–603.
23. K. C. Schuster, H. Ehmoser, J. R. Gapes, B. Lendl, *On-line FT-Raman spectroscopic monitoring of starch gelatinisation and enzyme catalysed starch hydrolysis*, *Vib. Spectrosc.* **22** (2000) 181–190.
24. I. L. Tuinman, J. Veenstra, J. C. M. Marijnissen, B. Scarlett, J. Schoonman, Raman spectroscopy as an on-line measurement technique in a laser-CVD reactor during production of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, *J. Aerosol Sci.* **27** (1996) S295–S296.
25. S. E. Barnes, M. G. Sibley, H. G. M. Edwards, P. D. Coates, Process monitoring of polymer melts using in-line spectroscopy, *Trans. Inst. Meas. Contr.* **29** (2007) 453–465.
26. B. H. Stuart, A Fourier transform Raman spectroscopy study of the crystallization behaviour of a poly(ether ether ketone)/poly(ether sulphone) blend, *Spectrochim. Acta Part A* **53** (1997) 107–110.
27. J. Monni, P. Niemelä, L. Alvila, T. T. Pakkanen, Online monitoring of synthesis and curing of phenol–formaldehyde resins by Raman spectroscopy, *Polymer* **49** (2008) 3865–3874.
28. T. R. M. De Beer, W. R. G. Baeyens, J. Ouyang, C. Vervae, J. P. Remon, Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension, *Analyst* **131** (2006) 1137–1144.
29. L. E. O'Brien, P. Timmins, A. C. Williams, P. York, Use of *in situ* FT-Raman spectroscopy to study the kinetics of the transformation of carbamazepine polymorphs, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **36** (2004) 335–340.
30. G. Févotte, *In situ* Raman spectroscopy for in-line control of pharmaceutical crystallization and solids elaboration process: A review, *Chem. Eng. Res. Des.* **85** (2007) 906–920.
31. A. Caillet, F. Puel, G. Févotte, Quantitative *in situ* monitoring of citric acid phase transition in water using Raman spectroscopy, *Chem. Eng. Process.* **47** (2008) 377–382.
32. O. Svensson, M. Josefson, F. W. Langkilde, *Reaction monitoring using Raman spectroscopy and chemometrics*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **49** (1999) 49–66.
33. O. Svensson, M. Josefson, F. W. Langkilde, The synthesis of metoprolol monitored using Raman spectroscopy and chemometrics, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **11** (2000) 141–155.
34. P. Novak, A. Kišić, T. Hrenar, T. Jednačak, S. Miljanić, G. Vrbanc, *In-line* reaction monitoring of entacapone synthesis by Raman spectroscopy and multivariate analysis, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **54** (2011) 660–666.
35. J. Leppänen, E. Wegelius, T. Nevalainen, T. Järvinen, J. Gyntner, J. Huuskonen, Structural studies of acyl esters of entacapone, *J. Mol. Struct.* **562** (2001) 129–135.
36. A. Kwokal, T. T. H. Nguyen, K. J. Roberts, Polymorph-directing seeding of entacapone crystallization in aqueous/acetone solution using a self-assembled molecular layer on Au (100), *Cryst. Growth Des.* **9** (10) (2009) 4324–4334.
37. R. Hilfiker, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, John Wiley & Sons, Inc., Weinheim 2006.
38. J. Aaltonen, K. C. Gordon, C. J. Strachan, T. Rades, Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids, *Int. J. Pharm.* **364** (2008) 159–169.
39. M. J. Adams, *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2004.
40. J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Pearson Education, Harlow 2005.
41. K. Pöllänen, A. Häkkinen, S. P. Reinikainen, J. Rantanen, M. Karjalainen, M. Louhi-Kultanen, L. Nyström, IR spectroscopy together with multivariate data analysis as a process analytical tool for in-line monitoring of crystallization process and solid-state analysis of crystalline product, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **38** (2005) 275–284.

## SUMMARY

### Process Analytical Techniques Based on *In-Line* Vibrational Spectroscopy and their Industrial Applications

T. Jednačak\* and P. Novak

Process analytical techniques (PAT) involve the monitoring and control of physical and chemical processes as well as the identification of important process parameters in order to obtain the products with desired properties. PAT have been applied in various industrial process phases to ensure better process understanding, quality by optimal design and determination of process disturbances in time. *In-line* vibrational spectroscopic techniques are one of the major process analytical techniques used today. The most frequently used *in-line* vibrational spectroscopic techniques are near infrared spectroscopy (NIR), attenuated total reflectance middle infrared spectroscopy (ATR-MIR) and Raman spectroscopy (Table 1, Figs. 1 and 2). They provide *in situ* real-time monitoring of the production processes by using different types of *in-line* probes (Figs. 3–5) which reduce exposure to hazardous materials and contamination, sample degradation or equilibrium perturbations in the reaction system. Due to the aforementioned advantages, *in-line* vibrational spectroscopic techniques have been successfully applied for different industrial purposes. The analysis of characteristic vibrational bands in *in-line* infrared and Raman spectra enable the monitoring of different processes such as crystallization, dissolution, polymorphic transitions and chemical reactions (Scheme 1, Figs. 6 and 7). The obtained data are, due to their complexity, very often further processed by multivariate data analysis methods (Fig. 9), such as principal components analysis (PCA) and partial least squares (PLS). The basic principles of PCA and PLS are shown in Fig. 8. A number of different *in-line* vibrational spectroscopic techniques as well as multivariate data analysis methods have been developed recently, but in this article only the most important and most frequently used techniques are described.

Department of Chemistry, Faculty of Science,  
University of Zagreb, Horvatovac 102a,  
10 000 Zagreb, Croatia

Received April 10, 2012  
Accepted July 18, 2012