



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
ÅBO YRKESHÖGSKOLA**

Opinnäytetyö

**RAAKA-AINEIDEN TUNNISTUS
RAMAN-SPEKTROSKOPIALLA**

Riitta Myllymäki

Laboratorioala

2009

Laboratorioala	
Tekijä: Riitta Myllymäki	
Työn nimi: Raaka-aineiden tunnistus Raman-spektroskopiolla	
Ohjaajat: Jouko Vihanto, Taina Hovinen ja Mika Myrskyranta	
Opinnäytetyön valmistumisajankohta: Joulukuu 2009	Sivumäärä: 27
<p>Opinnäytetyön aiheena on Raman-spektroskopian käyttö raaka-aineiden tunnistuksessa. Raman-spektroskopia perustuu Raman-sirontaan, jonka Raman havaitsi 1928. Raman-sirontaa tapahtuu, kun molekyylin kemialliset sidokset kohtaavat valon fotonit ja fotonien energia muuttuu. Raman-sironta on hyvin heikkoa ja mittausta häiritsee huomattavasti voimakkaammat Rayleigh-sironta ja fluoresenssi. Vasta 1980-luvulla tekniikka oli riittävän kehittynyttä, että Raman-spektroskopiaa pystyttiin hyödyntämään käytännön analytiikassa.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Orion Pharma Oyj:lle, jossa Raman-spektroskopiaa käytetään raaka-aineiden tunnistukseen. Raaka-aineet toimitetaan varastoon erilaisissa astioissa ja yksi erä voi sisältää monta astiaa. Nykyisessä systeemissä kootaan astiakohtaiset näytteet ja sekanäytteet, mitkä toimitetaan kemialliseen laadunvalvontaan analysoitaviksi. Raman-spektroskopian tarkoituksena on korvata astiakohtaiset analyysit. Raman-spektroskopian etuja on, ettei se vaadi näytteenkäsittelyä ja näytteet voidaan mitata suoraan läpinäkyvien pakkausmateriaalien läpi. Huono puoli on, ettei tekniikka sovellu kaikille raaka-aineille.</p> <p>Ennen Raman-spektroskopian varsinaista käyttöönottoa, laitteelle on luotava menetelmäkirjasto, joka käsittää jokaiselle raaka-aineelle oman menetelmän ja referenssispektrin, jota vasten tunnistus tehdään. Lisäksi jokainen menetelmä on validoitava. Validointi käsittää selektiivisyydestin ja toistettavuustestin. Selektiivisyydestin vaatimuksena on, ettei raaka-aine saa tunnistua ristiin ja toistettavuuden vaatimus ettei RSD saa ylittää 20 % rajaa.</p> <p>Lisäksi opinnäytetyö sisältää menetelmäkehitystä, sillä joillakin raaka-aineilla RSD ei pysynyt rajoissa. Ongelmia aiheuttivat muovipipetit, jotka ovat laadultaan hyvin epätasaisia. Opinnäytetyö sisältää myös tutkimusta voidaanko Raman-spektroskopiaa hyödyntää valmisteiden tunnistukseen, sillä niiden nykyiset analyysimenetelmät ovat hyvin monimutkaisia.</p>	
Hakusanat: Raman-spektroskopia, raaka-aine	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto, Lemminkäisenkatu	

Laboratory Technology	
Author: Riitta Myllymäki	
Title: Identification of raw materials by Raman spectroscopy	
Instructors: Jouko Vihanto, Taina Hovinen and Mika Myrskyraanta	
Date December 2009	Total number of pages 27
<p>The objective of the thesis was the identification of raw material using Raman spectroscopy and it was carried out for Orion, a Finnish pharmaceutical company located in Turku, Espoo and Kuopio. In the pharmaceutical industry, all raw materials must be analyzed before starting the production. The raw materials are delivered to the warehouse in large containers and a single batch might consist of many containers. In the warehouse, a sample is collected from each container and a composite sample is collected from each batch. They are analyzed in chemical quality control and when the analyses are completed, the batch is released for production.</p> <p>Raman spectroscopy is based on Raman scattering discovered by Raman in 1928. When the photons of light interact with the chemical bonds of a molecule, some energies of the photons change. Raman scattering is very weak and can easily be covered by Rayleigh scattering and fluorescence. Recovering the weak signal has been the major problem with Raman spectroscopy and it was in the 1980s that the technology was sufficiently developed to overcome these problems.</p> <p>Raman spectroscopy offers an opportunity to analyze the contents of the containers as the composite sample is collected. The Raman spectrometer can be used for noninvasive analysis as long as the packing material is transparent. The actual measurement is very easy and fast. The procedure offers major saving in time and a more specific method for the identification.</p> <p>The assignment includes developing methods and validating them. In order to develop a method, a reference spectrum must be created. The identification is based on the reference spectrum and it is critical to link the correct reference spectrum to correct method. The validation process included testing the selectivity and repeatability of the method. The requirement for the selectivity is that there are no positive matches for other substances. The requirement for the repeatability is an RSD no greater than 20 %. There was also method development when the RSD exceeded the requirement and investigations concerning the reasons for the poor repeatability.</p>	
Keywords: Raman spectroscopy, raw material	
Deposit at: TU AS Library at Lemminkäisenkatu	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	RAMAN-SPEKTROSKOPIA	8
2.1	Raman-sironta	8
2.2	Raman-spektroskopian kehitys	9
2.3	Mittausta häiritsevät tekijät	10
3	AHURA TRUSCAN	13
3.1	Tekniset tiedot ja laitteen toimintaperiaate	13
3.2	Mittaus Ahuran Truscanilla	14
3.3	Identifioinnin periaate	15
4	RAMAN LÄÄKETEOLLISUUDESSA	17
4.1	Raaka-aineiden tunnistus	17
4.2	Valmisteiden tunnistus	18
4.3	Menetelmien luominen	19
5	VALIDOINTI	20
5.1	Validointisuunnitelma	20
5.2	Tulokset	21
5.3	Ongelmatapaukset	22
5.3.1	Lasikyvetti, muovipipetti vai minigrip-pussi	22
5.3.2	Isopropyylimyristaatti (Isopropyl myristate), maapähkinäöljy (Arachis oil) ja Jojoba öljy (Jojoba Oil)	24
5.3.3	Nylon 12	25

LIITTEET

Liite 1. Opinnäytetyön kansilehti

Liite 2. Tiivistelmä

Liite 3. Abstract

Liite 4. Sisällysluettelo

Liite 5. Lähdeluettelo

KUVIOT

Kuva 1. Raman- ja Rayleigh-sironta.	8
Kuva 2. Raman-spektroskopian kehitys vuosien varrella	9
Kuva 3. Laserin energia korkeampi kuin molekyylin virittymisenergia.	11
Kuva 4. Fluoresenssi spektrissä.	11
Kuva 5. Ahura Truscan laitteen toimintaperiaate.	13
Kuva 6. Päivittäinen systeemisopivuustesti.	14
Kuva 7. Truscanin erilaiset mittapääät.	15
Kuva 8. p-arvoon vaikuttavat tekijät.	16
Kuva 9. Valmiste c:n mittaus blisterin läpi (musta), liivatekapselin (vih.) läpi ja sisustasta (pun.).	18
Kuva 10. Selektiivisyydesti.	21
Kuva 11. Nylon 12 (pun. ja vihr.) ja muovin (musta) spektrit.	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Validoinnin tulokset raaka-aineille	22
Taulukko 2. p-arvon vaihtelu eri materiaaleilla	23
Taulukko 3. Toistettavuuden erot lasiputkessa ja muovipipetissä.	24

1 JOHDANTO

Lääketeollisuudessa kaikki raaka-aineet on tunnistettava ennen valmistusprosessin aloittamista. Raaka-aineet toimitetaan varastoon esimerkiksi muovi- tai paperisäkeissä tai peltiastioissa ja yksi raaka-aine erä voi käsittää useita eri astioita. Raaka-aineista otetaan astiakohtaiset näytteet ja sekanäytteet ja analysoidaan kemiallisessa laadunvalvonnassa. Identifiointiin voidaan käyttää esimerkiksi IR- spektroskopiaa, taitekerrointa tai tippalukua. Lisäksi kootaan vielä sekanäyte, josta tutkitaan esimerkiksi epäpuhtaudet ja pitoisuus.

Raman-spektroskopian tarkoitus on korvata astiakohtaiset analyysit. Raman-spektroskopian ehdoton valttikortti muihin analyysimenetelmiin verrattuna on mahdollisuus mitata läpinäkyvien pakkausmateriaalin läpi. Kaikkien raaka-aineiden kohdalla tätä ei tietenkään voida hyödyntää, mutta joka tapauksessa näytteen käsittely on hyvin vähäistä. Lisäksi Raman tarjoaa spesifisemmän analyysimenetelmän kuin taitekerroin tai tippaluku. Raman-spektroskopian huono puoli on, ettei se sovellu kaikille raaka-aineille. Jokaisen raaka-aineen soveltuvuus on arvioitava ajamalla testispektri.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli jatkaa mittavaa raaka-aineiden validointi- ja kehitysprosessia. Ennen validointia laitteelle on ajettava referenssispektri, jonka perusteella laite tekee tunnistuksen. Menetelmän luonti tapahtuu nimeämällä menetelmä ja liittämällä siihen oikea referenssispektri. Validoinnissa todetaan menetelmän selektiivisyys ja toistettavuus. Vaatimus selektiivisyydelle on, ettei raaka-aine saa tunnistua muuksi. Toistettavuus toteutetaan mittaamalla raaka-aine yhdeksän kertaa ja laskemalla p-arvoille RSD. p-arvo kuvaa tunnistumisen onnistumista, ja jotta tunnistus on positiivinen, p-arvon tulee olla yli 0,05.

Opinnäytetyö tehtiin Orion Oyj:lle ja opinnäytetyön valvojana toimi Mika Myrskyraanta. Orionin historia alkaa vuodesta 1917 ja tänä päivänä Orionilla on

toimintaa Turussa, Espoossa ja Kuopiossa. Orion kehittää, markkinoi ja valmistaa lääkkeitä ja lääkeaineiden vaikuttavia aineita sekä diagnostisia testejä.

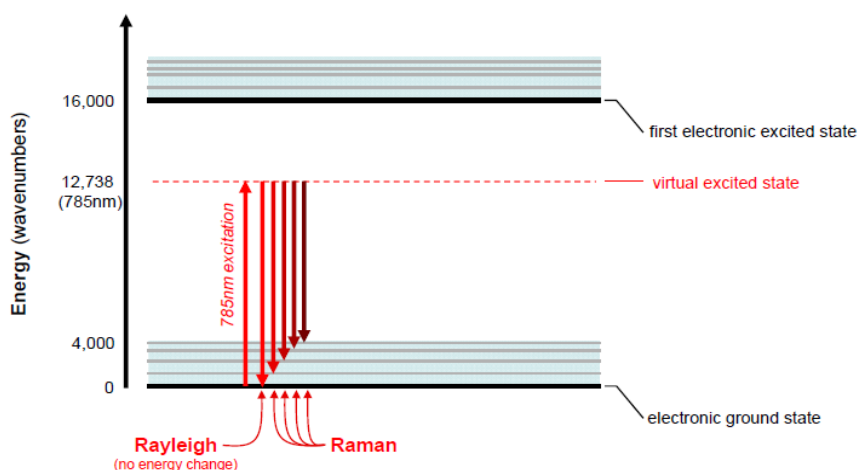
2 RAMAN-SPEKTROSKOPIA

2.1 Raman-sironta

Molekyylit koostuvat atomeista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa sidoksin. Nämä sidokset eivät ole jäykkiä vaan värähtelevät eri aallonpituuksilla. Kun valon fotonit kohtaavat molekyylin, useimpien fotonien energiat pysyvät muuttumattomana sironnassa. Tätä kutsutaan elastiseksi tai Rayleigh-sironnaksi. Joidenkin fotonien energia kuitenkin muuttuu ja tätä kutsutaan Raman sironnaksi¹.

Raman-sirontaa syntyy, kun molekyyli kohtaa valon säteilyn ja molekyylin polarisoitavuus muuttuu. Molekyylissä syntyy indusoitu dipolimomentti, joka emittoi säteilyä. Säteily sisältää sekä Rayleigh-sirontaa että Raman-sirontaa. Raman-sironnassa energia muuttuu molekyylin sidosten värähtelyn seurauksena.²

Kuvassa 1 on kaavio, jossa kuvataan energian muutosta. Rayleigh-sironnassa fotonien energia palautuu noltilaan, jolloin energia ei ole muuttunut. Raman-sironnassa taas fotonit eivät palaudu noltilaan, joten niiden energiassa on tapahtunut muutos.



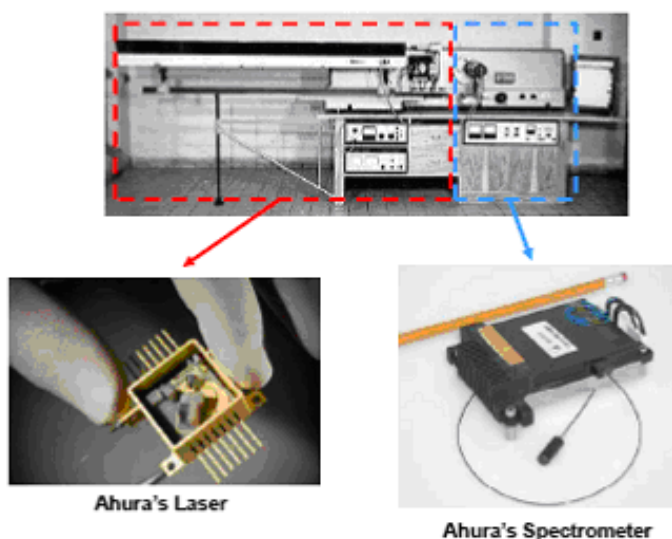
Kuva 1. Raman- ja Rayleigh-sironta (Ahura Scientific- Truscan Technical Training Slides)

Raman-sironta on Rayleigh-sirontaa huomattavasti heikompi. Monilla molekyyeillä Raman-sirontaa tapahtuu noin yhdellä fotonilla miljoonasta. Yksi Raman-spektroskopian haasteista onkin ollut heikon Raman-sironnan havaitseminen.³

2.2 Raman-spektroskopian kehitys

Raman sironnan keksivät Krishna ja Raman vuonna 1928. Ilmiön keksimisestä lähtien aiheesta on julkaistu lukuisia tutkimuksia, jotka pitkään keskittyivät käsittelemään ilmiötä yleisellä tasolla. Raman-spektroskopiaan liittyi paljon teknisiä ongelmia, kuten heikko intensiteetti, häiritsevä fluoresenssi ja riittämätön valon keräys ja detektointi. Tekniset ongelmat estivät Raman-spektroskopian hyödyntämisen käytännön analytiikassa.

Vasta 1980-luvulla ilmestyi tutkimuksia, joissa tekniikka yhdistettiin kemiallisiin analyyseihin. 1980-luvun lopulla esiteltiin Raman-spektroskopia, jossa hyödynnettiin Fourier-muunnosta (Fourier-transform, FT), ”charge coupled device”-detektoria (CCD), lähi-infarapuna laseria (NIR) ja tietokoneita. Alla olevassa kuvassa on vuosien varrella tapahtunut kehitys.



Kuva 2. Raman-spektroskopian kehitys vuosien varrella (Ahura Scientific- Truscan Technical Training Slides).

FT-tekniikassa ei ole monokromaattoria vaan se perustuu Michelsonin interferometriin. Tekniikassa ei erotella eri aallonpituuksia vaan detektorille johdetaan yksi säde, joka sisältää kaikki aallonpituudet. FT-tekniikan käyttö Raman-spektroskopiassa on hyödytöntä ilman NIR-laserin käyttöä. Jos viritys tapahtuu näkyvällä valolla, mittauksen kohina on niin voimakasta, että FT-tekniikasta ei ole mitään hyötyä.

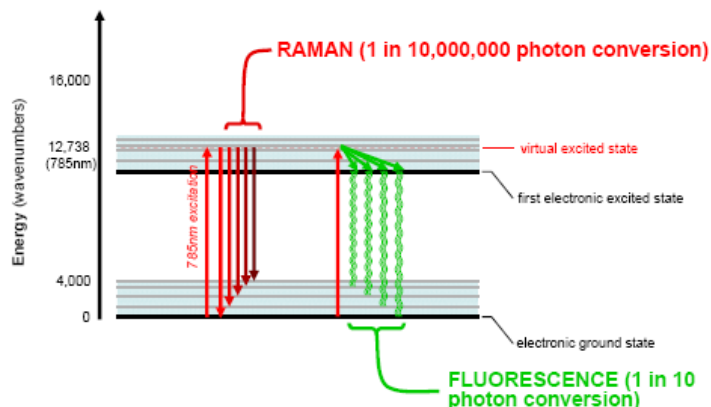
CCD-detektoria hyödyntävässä laitteessa kerätään optiikan avulla sironnut valo ja johdetaan se dispersiiviselle spektrometrille, joka erottelee aallonpituudet. CCD-detektori mittaa jokaisen aallonpituuden intensiteetin ja käsittelee datan spektriksi.³

Huolimatta siitä, mitä mittaustekniikkaa käytetään (FT tai dispersiivinen) NIR-lasereiden käyttö pienentää huomattavasti fluoresenssia. Vaikka Raman-sironta on heikompaa NIR-lasereilla kuin näkyvällä valolla, fluoresenssin pienentyminen on niin mittava saavutus, että se on mahdollistanut Raman analytiikan laajemman käytön.⁴

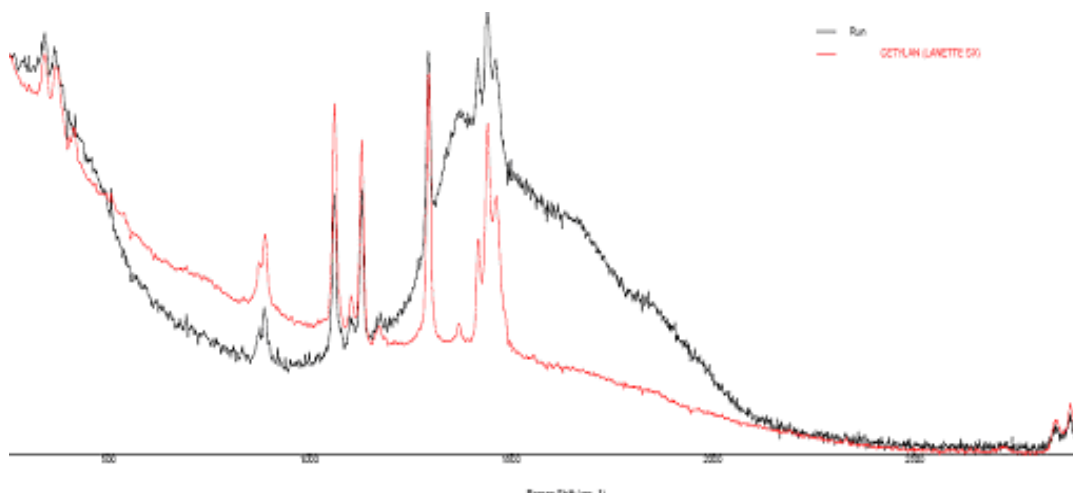
2.3 Mittausta häiritsevät tekijät

Fluoresenssi on pitkään ollut Raman-spektroskopian suurin haaste. Jopa heikko fluoresenssi voi helposti peittää alleen Raman-signaalin. Fluoresenssi myös hidastaa datan keräystä, jolloin analyysi kestää huomattavasti kauemmin. Fluoresenssia esiintyy usein molekyyileillä, joiden virittymisenergia on alhaisempi kuin laserin energia. Fluoresenssia esiintyy 400-550 nm:ssä hyvin suurella osalla yhdisteitä, mutta 1064 nm:ssä fluoresenssi häiritsee vain 1-2 % yhdisteitä.⁴

Kuvassa 3 molekyylin virittymisenergia on alhaisempi kuin laserin, jolloin todennäköisyys fluoresenssille kasvaa. Kuvassa 4 on saman raaka-aineen kaksi eri spektriä. Mustassa spektrissä fluoresenssi peittää alleen piikkejä, jotka näkyvät punaisessa spektrissä, kun fluoresenssi ei häiritse.



Kuva 3. Laserin energia korkeampi kuin molekyylin virittymisenergia (Ahura Scientific- Truscan Technical Training Slides).



Kuva 4. Fluoresenssi spektrissä.

Molekyylin rakenne tai väri voi myös estää yhdisteen analysoimisen Raman spektroskopiolla. Parhaiten Raman spektroskopia soveltuu orgaanisten yhdisteiden ja moniatomisten epäorgaanisten yhdisteiden tunnistuksiin, mutta poikkeuksia löytyy. Alifaattisten hiiliketjujen Raman-sironta on yleensä heikkoa. Voimakkaasti polaaristen pienten molekyylien Raman-sironta on erittäin heikkoa, joten ne harvemmin soveltuvat analysoitaviksi Raman spektroskopiolla. Esimerkiksi veden Raman-sironta on niin heikkoa, että sitä ei käytännössä pystytä havaitsemaan.

Mustat tai tumman väriset näytteet ovat ongelmallisia, sillä Ramanin tehokas laser saa ne kuumenemaan liikaa. Liuottimien tutkimista suljetuissa ampulleissa on vältettävä, sillä laser voi kuumentaa näytettä, jolloin paine kasvaa ja ampulli voi räjähtää. ¹

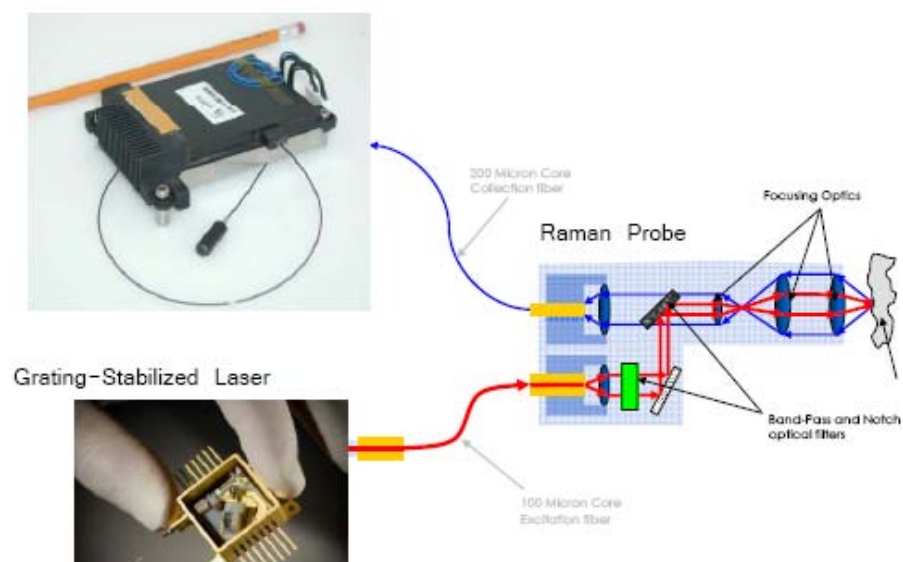
3 AHURA TRUSCAN

3.1 Tekniset tiedot ja laitteen toimintaperiaate

Ahuran Truscan on noin A4-paperin kokoinen laite ja se on alun perin suunniteltu Yhdysvaltain armeijan käyttöön. Laite on iskunkestävä ja sitä voidaan käyttää äärimmäisissä olosuhteissa. Truscanin laserin viritysaallonpituus on $785 \pm 0,5$ nm eli kyseessä on lähi-infrapunalaser. Laitteen spektrometri on dispersiivinen (single-pass) ja detektorina CCD.

Kuvassa 5 on yksinkertaistettu kaavio laitteesta. Punainen nuoli kuvaa laserilta lähtevää valoa, joka johdetaan kuituoptiikan avulla suodattimelle ja siitä edelleen näytteeseen. Sininen nuoli kuvaa sirontaa, josta erotetaan optiikan ja suodattimien avulla voimakas Rayleigh-säteily.

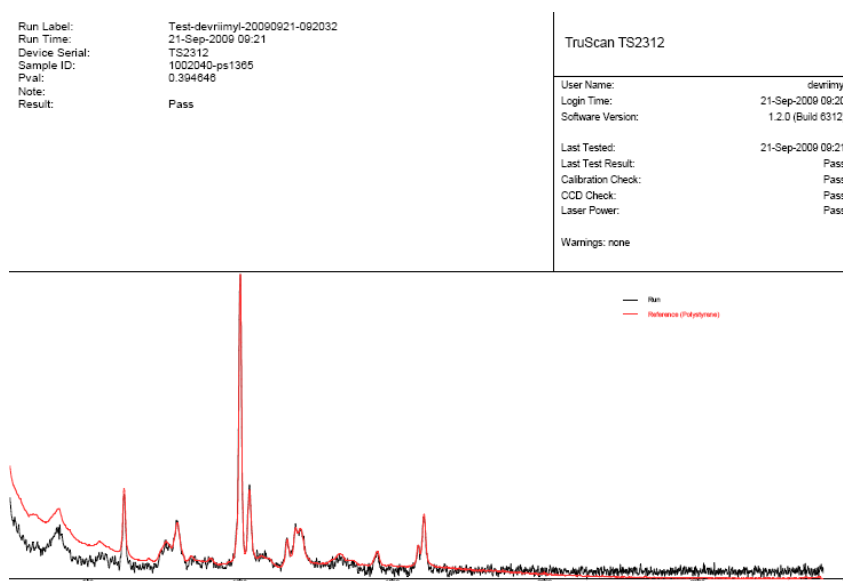
Thin-Pack Spectrometer



Kuva 5. Ahura Truscan laitteen toimintaperiaate (Ahura Scientific- Truscan Technical Training Slides).

3.2 Mittaus Ahuran Truscanilla

Laiteen päivittäiseen tarkistukseen kuuluu viivakoodilukijan testaus sekä systeemisopivuuden testaus polystyreenilla. Laitteeseen on tallennettu polystyreenin spektri ja päivittäisessä testauksessa laitteen tulee tehdä positiivinen tunnistus. Kuvassa 6 on päivittäisen tarkastuksen spektri.



Kuva 6. Päivittäinen systeemisopivuustesti.

Truscanilla pystytään mittaamaan hyvin erilaisia näytteitä. Läpinäkyviin muovipusseihin pakatut jauheet voidaan mitata ”nose cone” -mittapäällä, jolloin laser fokuoitetuu pakkausmateriaalin ohi. Kapselit ja tabletit voidaan mitata ”tablet holder” -mittapäällä, joka ruuvataan kiinni laitteeseen. Kapseli tai tabletti asetetaan jousen varaan, joka pitää sen paikallaan. Nestemäiset aineet voidaan mitata ”vial holder” -mittapäällä. Nestemäinen näyte mitataan joko lasisessa kyvetissä tai kertakäyttöpipetissä. Alla olevassa kuvassa on kolme erilaista mittapäätä.

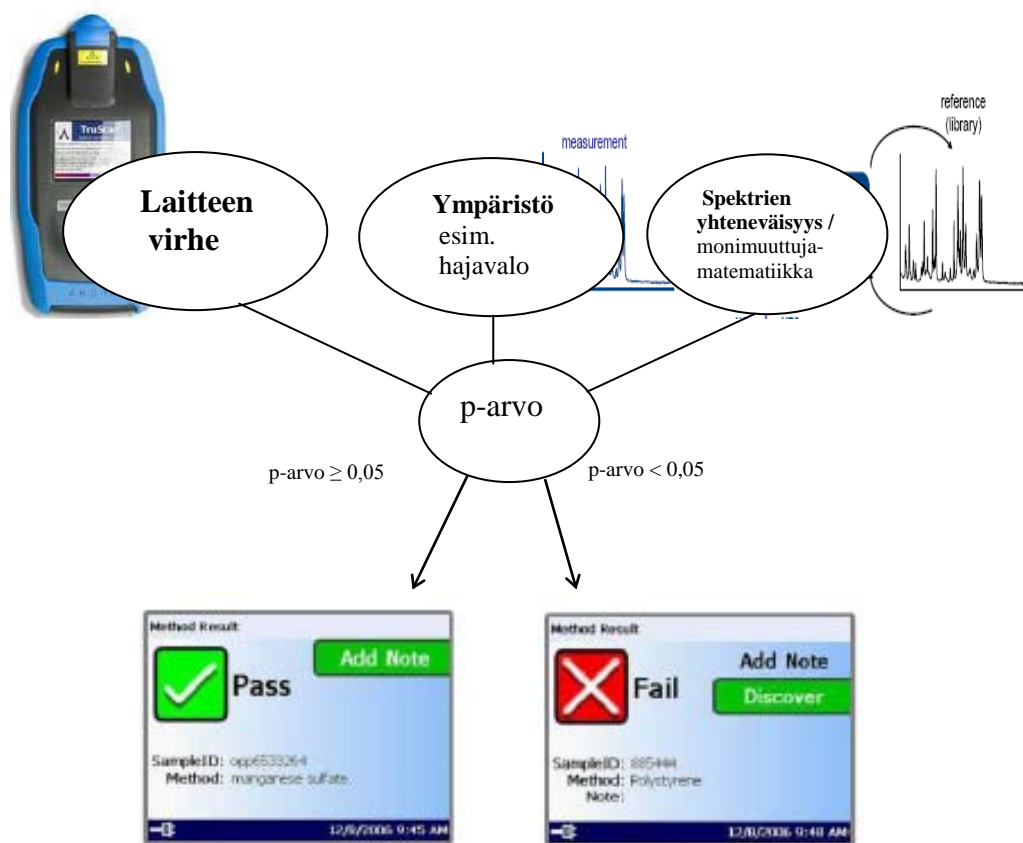


Kuva 7. Truscanin erilaiset mittapäät (Ahura Scientific- Truscan Technical Training Slides).

3.3 Identifiointin periaate

Identifiointi perustuu referenssispektreihin, jotka ajetaan laitteelle ennen menetelmän luontia. Referenssispektrejä mitataan maksimissaan 30 minuuttia, mutta spektrin ajo voidaan keskeyttää aikaisemmin, jos spektrin laatu on riittävä. Referenssispektriä mitattaessa voidaan myös seurata fluoresenssin voimakkuutta. Lisäksi laitteessa on Ahuran oma spektrikirjasto, joka kattaa noin 4000 ainetta.

Laitteen antama tulos on joko PASS tai FAIL. Laite laskee p-arvon, joka kuvaa tunnistuksen onnistumisen todennäköisyyttä. p-arvoon vaikuttaa kuvan 8 mukaisesti laitteen oma mittausvirhe, ympäristö ja lisäksi spektrien yhteneväisyys. Mikäli p-arvo on alle 0,05, laite antaa FAIL-tuloksen. FAIL-tuloksen myötä laite antaa mahdollisuuden ”Discovery”-toimintoon, jolloin laite vertaa saatua spektriä kaikkiin kirjaston spektreihin. Discovery-toiminnossa on kolme vaihtoehtoa: vastaavuus löytyy menetelmäkirjastosta, laite löytää seoksen tai vastaavuutta ei löydy.



Kuva 8. p-arvoon vaikuttavat tekijät.

4 RAMAN LÄÄKETEOLLISUUDESSA

4.1 Raaka-aineiden tunnistus

Raaka-aineiden identifiointi nykyisellä systeemillä tapahtuu kemiallisessa laadunvalvonnassa. Jokaisesta varastoon toimitettavasta erästä otetaan astiakohtaiset näytteet sekä sekanäytteet. Raman tarjoaa mahdollisuuden nopeuttaa toimintaa, sillä identifiointi tapahtuisi suoraan näytteenotossa. Lisäksi mittaustapa on huomattavasti nopeampi, kun mittaus voidaan tehdä joissakin tapauksissa suoraan pakkausmateriaalin läpi.

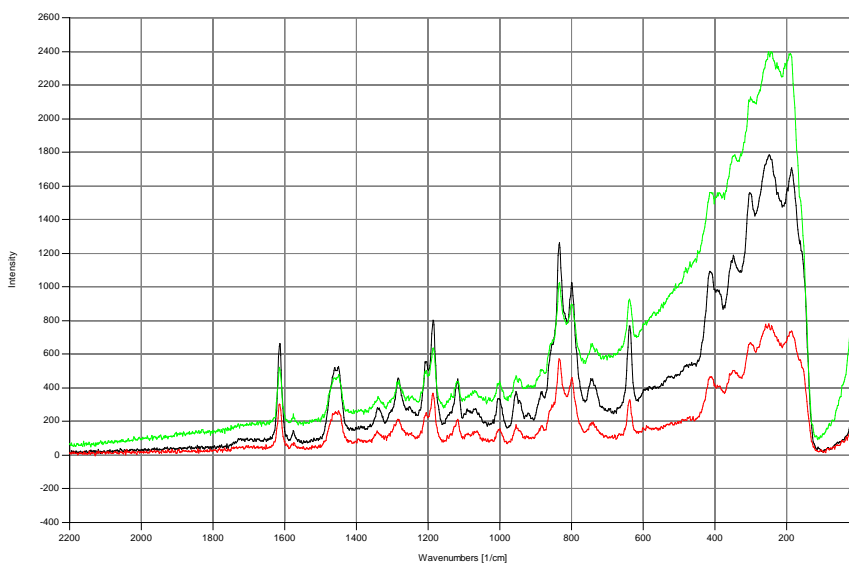
Ennen kuin raaka-aineen tunnistus Raman-spektroskopiolla voidaan ottaa käyttöön, täytyy jokaiselle aineelle luoda menetelmä, johon liitetään ko. raaka-aineen referenssispektri. Lisäksi menetelmä on validoitava, johon kuuluu selektiivisyydesti ja toistettavuudesta. Raaka-aineita on useita satoja, joten Raman-spektroskopian käyttöönotto on hyvin mittava projekti.

Sekaannusten välttämiseksi mittaus aloitetaan sakannaamalla viivakoodinlukijalla raaka-aineen materiaalinumero, jolloin laite ohjaa oikeaan menetelmään. Jos näytteenotossa saadaan samasta raaka-aineesta kolme FAIL-tulosta, raaka-aineesta otetaan astiakohtaiset näytteet ja lähetetään kemialliseen laadunvalvontaan. Raaka-aine identifioidaan primäärimenetelmällä ja mikäli primäärimenetelmä antaa positiivisen tuloksen, päivitetään raman menetelmään ko. raaka-aine-erän referenssispektri. Erän hylkäykseen vaaditaan siis myös primäärimenetelmän negatiivinen tulos.

4.2 Valmisteiden tunnistus

Valmisteiden tunnistus Raman-spektroskopiolla on vielä kehitysvaiheessa. Kehityskohteina olevat tuotteet valmistetaan ulkopuolella ja ne toimitetaan Orionille valmiina tuotteina. Tarkoituksena on korvata työläävät HPLC:llä toteutettavat toteamisanalyysit. Tutkimuksen kohteena oli kolme valmistetta: valmiste a (bisoprololi), valmiste b (bisoprololi ja hydroklooritiatsidi) ja valmiste c (ibuprofeeni).

Valmiste c on nestemäinen valmiste, joka on pakattu liivatekapseleihin. Helpoin vaihtoehto mittaamiselle olisi blisterin läpi nose cone -mittapäällä. Mittaus ei kuitenkaan onnistunut, sillä laite ei tunnistanut ibuprofeenia. Laite ei myöskään tunnistanut ibuprofeenia, kun mittausta yritettiin liivatekapselin läpi. Puristamalla nestemäinen sisus ulos ja mittaamalla se muovipipetissä, laite tunnisti valmisteen seokseksi, jossa yhtenä komponenttina oli ibuprofeeni. Tuotteesta ajettiin referenssispektri ja luotiin laitteelle menetelmä. Kuvassa 9 punainen spektri on mitattu sisustasta. Musta spektri on mitattu blisterin läpi ja vihreä liivatekapselin läpi.



Kuva 9. Valmiste c:n mittaaminen blisterin läpi (musta), liivatekapselin (vihreä) läpi ja sisustasta (punainen).

Valmiste a ja b ovat tabletteja ja ne mitattiin tablet holderilla. Valmisteita oli eri vahvuuksina ja kaikista vahvuuksista ajettiin referenssispektrit ja luotiin menetelmät. Koska valmiste a ja b sisältävät samaa vaikuttavaa ainetta, riskinä on ristiintunnistus, jota ei voi valmisteilla sallia. Selektiivisyystesti kuitenkin osoitti, että valmisteet a ja b eivät tunnistu ristiin.

4.3 Menetelmien luominen

Jokaisen raaka-aineen kohdalla on arvioitava erikseen, soveltuuko aine Raman analytiikkaan. Raaka-aineesta ajetaan ensin spektri, josta nähdään onko vastaavuutta raaka-ainekirjastoon ja onko spektrissä tunnistettavia piikkejä.

Jos spektrissä ei ole kohinasta eroavia piikkejä, menetelmän luontia ei voida jatkaa, sillä Raman-sironta on liian heikkoa tai fluoresenssi häiritsee analyysia liian voimakkaasti. Mikäli vastaavuutta raaka-ainekirjastoon löytyy, menetelmän luontia jatketaan tapauskohtaisesti.

Menetelmän luonti jatkuu mittaamalla referenssispektri, jonka jälkeen menetelmä nimetään ja oikea referenssispektri liitetään oikeaan menetelmään. Referenssispektri voidaan jälkeenpäin vielä päivittää, jos normaalissa analyysikäytössä tulee FAIL-tuloksia.

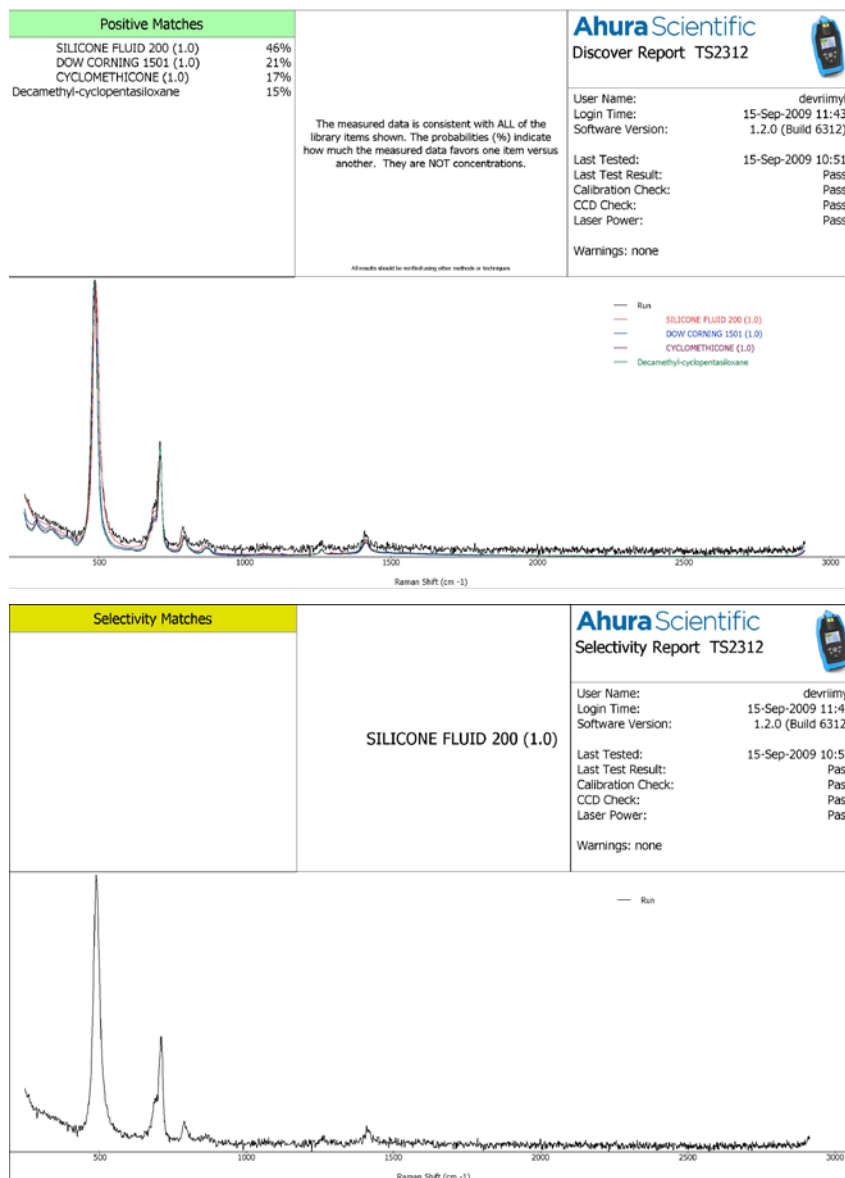
5 VALIDOINTI

5.1 Validointisuunnitelma

Validoinnissa tutkitaan selektiivisyyttä sekä mittausten p-arvojen toistettavuutta. Validoinnissa raaka-aineen on oltava eri erää kuin referenssispektrin. Valmisteiden validoinnissa käytetään kolmea eri erää. Selektiivisyystestissä laite vertaa kerättyä spektriä laitteen omaan kirjastoon sekä jo olemassa oleviin menetelmiin ja referenssispektreihin. Laite ilmoittaa lähisukuiset yhdisteet sekä positiiviset tunnistukset.

Selektiivisyystestin vaatimus on, ettei aine saa tunnistua muuksi. Tästä kuitenkin poikettiin, sillä opinnäytetyössä käytetyt raaka-aineet olivat ei-lääkkeellisten voiteiden eli perusvoiteiden raaka-aineita. Perusvoiteiden raaka-aineet ovat suurimmaksi osaksi seoksia ja osalla on pohjana on sama raaka-aine. Raaka-aineiden samankaltaisuus johtaa ristiintunnistuksiin, mutta sekaannusten riskiä voidaan kuitenkin pienentää, kun raaka-aineen tunnistuksessa käytetään viivakoodinlukijaa, jolloin laite ohjaa automaattisesti oikeaan menetelmään. Kuvassa 9. on esimerkki selektiivisyystestistä. Ensimmäisessä kuvassa on raportti positiivisista tunnistuksista ja toisessa on raportti lähisukuisista yhdisteistä.

Toistettavuus tutkitaan mittaamalla ko. raaka-aine 9 kertaa ja laskemalla p-arvoille RSD. Vaatimuksena RSD:lle on $< 20\%$.



Kuva 10. Selektiivisyystesti.

5.2 Tulokset

Validointi suoritettiin 19 raaka-aineelle ja yhdelle valmisteelle. Validoitavat raaka-aineet olivat kaikki perusvoiteita, joten niiden kohdalla selektiivisyydellä ei ollut vaatimuksia. Käytännössä validoinnin onnistumisen määritti toistettavuus. Mikäli toistettavuus pysyi sallittujen rajojen sisällä, validointi onnistui. Taulukossa 1 on raaka-aineiden validoinnin toistettavuuden tulokset.

Taulukko 1. Validoinnin tulokset raaka-aineille

Raaka-aine	Toistettavuus/ %	Muut huomiot
Paraffin Hard	15,2	Mitattu minigrip-pussissa
Silicone Fluid 200	6,4	Mitattu muovipipetissä
Uniphen P-23	9,1	Mitattu muovipipetissä
Olivem 900	16,9	Mitattu minigrip-pussissa
Lanette O	16,2	Mitattu minigrip-pussissa
Cetylan (Lanette sx)	14,6	Mitattu minigrip-pussissa
Simusol 165	17,2	Mitattu minigrip-pussissa
Dow Corning 1501	4,7	Mitattu muovipipetissä
Sodium Hyaluronate	10,0	Mitattu minigrip-pussissa
Phytosqualane 92 %	11,8	Mitattu muovipipetissä
Compritol 888 ATO	9,5	Mitattu muovipipetissä
Rice Bran Oil	15,7	Mitattu muovipipetissä
Disodium Phosphate Dode	11,3	Mitattu minigrip-pussissa
Isopropyl Myristate	11,9	Mitattu lasiputkessa
Arachis oil refined	12,1	Mitattu lasiputkessa
Jjoba oil	15,2	Mitattu lasiputkessa
Perfume bright	13,7	Mitattu lasiputkessa
Hydrillen 9	23,6	Mitattu minigrip-pussissa
Nylon 12	28,0	Mitattu muovipipetissä

Valmisteiden kohdalla validoitiin ibuprofeenia sisältävä valmiste c. Selektiivisyystestissä ei ollut ristiintunnistumisia ja toistettavuuden RSD oli 14 %. Validoinnista on kuitenkin todettava, että toistettavuustestissä ei käytetty kolmea eri erää, joten validointi on suoritettava uudestaan.

5.3 Ongelmatapaukset

5.3.1 Lasikyvetti, muovipipetti vai minigrip-pussi

Raaka-aineita voidaan mitata erilaisten läpinäkyvien materiaalien läpi. Perusoletus on, ettei pakkausmateriaali vaikuta mittaukseen, sillä laser fokusoituu pakkausmateriaalin ohi. Kuitenkin on huomattu, kun mitataan lasikyvetillä, spektrissä esiintyy fluoresenssia paljon useammin kuin muovipipetillä mitattaessa. Eri

pakkausmateriaalien vaikutusta p-arvoon testattiin mittaamalla kuusi kertaa eri materiaalien läpi.

Testissä oli mukana kolme eri raaka-ainetta, emulgoivaa vahaa (Cetylan (lanette sx)), oliiviuutetta (Phytosqualane 92 %) ja maapähkinäöljyä (Arachis oil). Cetylan on pellettimäinen raaka-aine ja se mitattiin minigrip-pussissa, muovipipetissä ja lasiputkessa. Phytosqualane 92 % ja Arachis oil ovat hyvin viskooseja nesteitä ja ne mitattiin muovipipetissä ja lasikyvetissä. Alla olevassa taulukossa on mittausten p-arvojen suhteelliset keskihajonnat ja keskiarvot.

Taulukko 2. p-arvon vaihtelu eri materiaaleilla

Raaka-aine	Lasiputki		Muovipipetti		Minigrip	
	RSD/ %	Ka	RSD/ %	Ka	RSD/ %	Ka
Cetylan (lanette sx)	55,60	0,16	8,58	0,34	15,80	0,40
Phytosqualane 92 %	7,36	0,52	6,64	0,51	--	--
Arachis Oil	19,06	0,14	46,50	0,16	--	--

Cetylanin tulokset olivat odotettuja, sillä tiedossa oli, että mittauksessa lasikyvetin kanssa esiintyy fluoresenssia. Muovipipetillä mitattaessa saatiin huomattavasti parempi toistettavuus kuin minigrip-pussilla, mutta p-arvojen keskiarvo oli parempi minigrip-pussilla. Kun vertailussa oli Phytosqualane 92 %, toistettavuus oli hieman parempi lasikyvetillä. Arachis oilin toistettavuus oli huomattavasti parempi lasikyvetillä.

Mittaustulosten eroihin ei ole tarjolla tarkkaa selitystä, sillä Ahuran mukaan pakkausmateriaali ei vaikuta mittaukseen. Manuaalissa oli vain maininta huonolaatuisesta lasista, joka voi aiheuttaa fluoresenssia. On vaikea ottaa kantaa siihen, oliko käytetty lasi huono- vai hyvänlaatuista. Yksi varteenotettava syy eroihin voisi olla lasikyvettien tasalaatuisuus. Muovipipetit ovat laadultaan hyvin erilaisia, toiset vähän paksumpia ja toiset hieman ohuempia. Paksummat pipetit olivat sameampia, jolloin nestemäisten näytteiden kohdalla erot pipeteissä vaikuttavat toistettavuuteen.

Pellettimäisen Cetylanin kohdalla toistettavuus oli lähes tuplasti parempi muovipipetissä kuin minigrip-pussissa. Erot voidaan selittää näytteen erilaisella pakkautumisella ja lisäksi vial holder -mittapäällä on helpmpi saada toistettavampia tuloksia, sillä laser on aina yhtä kaukana, toisin kuin nose cone -mittapäällä.

5.3.2 Isopropyylimyristaatti (Isopropyl myristate), maapähkinäöljy (Arachis oil) ja Jojoba öljy (Jojoba Oil)

Isopropyylimyristaatti (Isopropyl myristate), maapähkinäöljy (Arachis oil) ja jojoba öljy (Jojoba oil) ovat olomuodoltaan samanlaisia eli öljymäisiä nesteitä. Niille on myös yhteistä, että validoinnissa useista yrityksistä huolimatta toistettavuus ei ollut sallittujen raja-arvojen sisällä. Edellisessä vertailussa todettiin nestemäisten näytteiden toistettavuuden olevan parempi lasikvetissä, joten validointia yritettiin lasikvetissä. Alla olevassa taulukossa on kolmen raaka-aineen toistettavuus lasiputkessa ja muovipipetissä mitattuna.

Taulukko 3. Toistettavuuden erot lasiputkessa ja muovipipetissä.

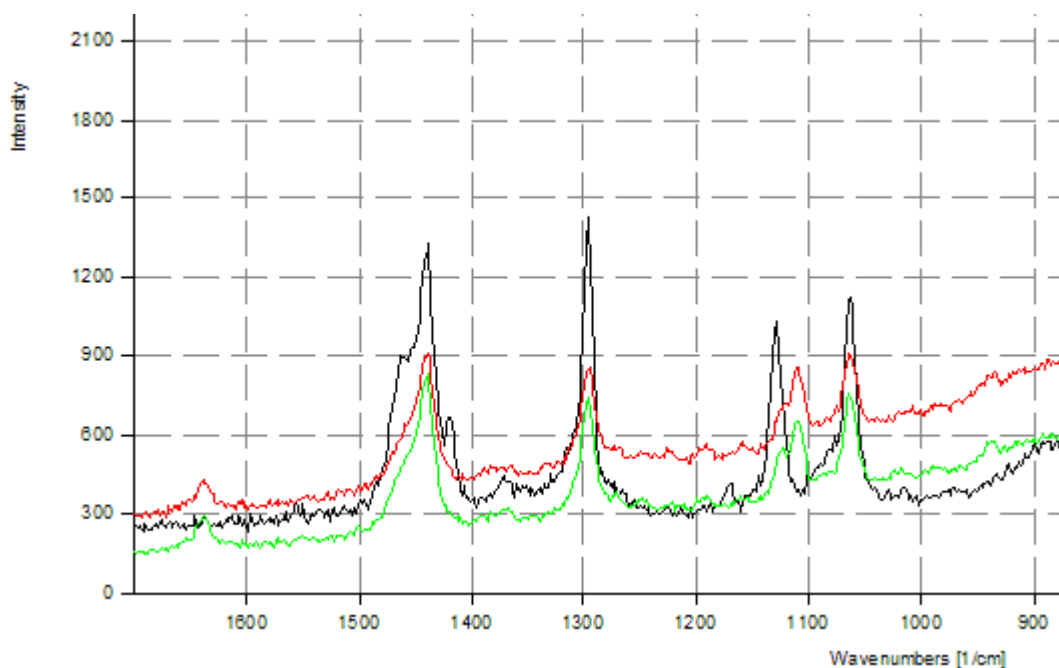
Raaka-aine	Lasiputki		Muovipipetti	
	RSD/ %	Ka	RSD/ %	Ka
Isopropyl myristate	11,9	0,522	32,9	0,546
Arachis Oil	12,1	0,176	47,0	0,164
Jojoba Oil	15,2	0,165	28,4	0,352

Toistettavuus on huomattavasti parempi lasiputkessa, mutta p-arvojen keskiarvo suurimassa osassa on huonompi.

5.3.3 Nylon 12

Nylon 12:n referenssispektri ajettiin muovipipetissä, mutta kun selektiivisyyttä yritettiin mitata minigrip-pussissa, laite ei löytänyt yhtään positiivista tunnistusta eli referenssispektri ei vastannut mittauksen spektriä. Epäselväksi jäi, miksi laite ei tunnistanut Nylon 12, kun laserin pitäisi fokuoittaa pakkausmateriaalin ohi ja sen ei pitäisi vaikuttaa mittaukseen.

Ongelmaa lähdettiin käsittelemään pakkausmateriaalin osalta. Jos pakkausmateriaali vaikuttaa mittaukseen, voitaisiin se todeta vertaamalla muovipipetin ja kahden eri materiaalin läpi mitattuja spektrejä. Muovipipetin spektri mitattiin asettamalla useita pipettejä sisäkkäin. Kuvassa 11 musta spektri on muovin, punainen Nylon 12:n minigrip-pussissa ja vihreä Nylon 12:n muovipipetissä.



Kuva 11. Nylon 12 (pun. ja vihr.) ja muovin (musta) spektrit.

Kuvassa näkyy, että muovilla on joitakin samoja piikkejä, mutta spektrit eivät kuitenkaan ole niin yhteneväiset, että voitaisiin sanoa, että muovi vaikuttaa Nylon 12:n spektriin. Sen sijaan muovipipetissä ja minigrip-pussissa mitatut spektrit ovat kovin yhteneväiset, mutta kuten todettu mittaukseen vaikuttaa monet muutkin tekijät kuin pelkkä spektrien yhteneväisyys.

Muovi ei siis aiheuttanut ylimääräisiä piikkejä, jonka vuoksi tunnistus epäonnistui. Eroja voidaan perustella kahden mittauksen erilaisuudella. Nylon 12 on hyvin hienojakoinen jauhe ja kun mittaus tehtiin minigrip-pussissa, jauhe pakkautuu tiukaksi pakettiksi. Tällaisessa olosuhteessa laserin voi olla vaikea fokusoitua mitattavaan aineeseen ja näin spektrin laatu kärsii. Muovipipetissä taas jauhe laitetaan spaattelilla pipettiin, jolloin se laskeutuu ilmavammin pipettiin, jolloin laser pystyy paremmin fokusoitumaan näytteeseen.

6 LOPPULAUSE

Opinnäytetyön tavoitteena oli tehdä menetelmäkehitystä ja validoida menetelmiä Raman-spektroskopiaan perustuvalla Ahuran Truscan-laitteella. Validoitavia raaka-aineita oli yhteensä 19, joista kahden raaka-aineen validointi epäonnistui. Menetelmäkehitys kasvatti rooliaan, sillä validoinneissa oli muutamia ongelmia.

Tavoitteen voidaan sanoa täyttyneen, sillä 19 raaka-aineesta vain kahden validointi epäonnistui. Toisaalta projekti herätti enemmän kysymyksiä kuin antoi vastauksia. Mittauksissa käytetyn pakkausmateriaalin vaikutus toistettavuuteen yllätti ja syyt eroihin jäivät osittain selvittämättä. On kuitenkin todettava, että käytännön työskentelyä syiden selvittäminen ei edistä, sillä olennaista on, että menetelmä on validi ja toimii. Raaka-aineita on niin monta, että jokaisen yksityiskohtainen tutkiminen ei ole resurssien järkevää käyttöä. Riittää, että pakkausmateriaalin vaikutuksista ollaan tietoisia ja toisaalta mikäli ongelmia esiintyy, menetelmää ja mittaustapaa voidaan muuttaa.

Se, miten Raman-spektroskopia käytännössä tulee toimimaan, jää vielä nähtäväksi, koska prosessi on vielä kesken. Vaikka Truscan on helppo käyttää ja menetelmien luominen on hyvin yksinkertaista, laitteen hyödyntämä tekniikka on monimutkaista. Jokainen mittaustapahtuma on ainutkertainen ja tulokseen vaikuttaa monta eri muuttujaa. Raman spektroskopia tarjoaa kuitenkin mittavia taloudellisia säästöjä ja mahdollisuuden tehostaa toimintaa.

LÄHTEET

- ¹ Ahura Scientific, Opetusmateriaali (Truscan- Technical Training Slides)
- ² Laurence A. Nafie, 2001, Theory of Raman Scattering. Kirjassa: Ian R. Lewis, Howell G. M. Edwards (toim.) Handbook of Raman Spectroscopy- From the Research Laboratory to the Process Line, Marcel Dekker Inc., New York, USA
- ³ Richard L. McCreery, 2000, Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, Wiley-Interscience, New York, USA
- ⁴ Siegfried Wartewig (2003) IR and Raman Spectroscopy Fundamental Processing, Wiley-VCH, Weinheim, Germany