



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
SZERVETLEN ÉS ANALITIKAI KÉMIA TANSZÉK

Gyógyszerjelölt molekula polimorfiájának vizsgálata off-line és in-line Raman-, valamint IR spektroszkópiával

TDK dolgozat

Készítette:

Tieger Eszter

B.Sc. vegyészmérnök hallgató

Témavezető:

Dr. Gergely Szilveszter

egyetemi adjunktus (BME ABÉT)

Dr. Kiss Violetta

kutató-fejlesztő (Sanofi KF / FML)



Budapest, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	iii
1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. A polimorfia jelensége	2
2.2. A polimorfia gyógyszeripari jelentősége	4
2.3. Polimorfiaszűrés	4
2.4. A polimorfia vizsgálatának analitikai módszerei	6
2.4.1. Rezgési spektroszkópia	6
2.4.1.1. A Raman-spektroszkópia alapjai	7
2.4.1.1.1. A Raman mikroszkóp felépítése	9
2.4.1.2. Infravörös spektroszkópia	10
2.4.1.2.1. Infravörös spektrométerek	11
2.4.1.2.2. Gyengített teljes reflexió	12
2.4.1.3. A rezgési spektroszkópia vizsgálati lehetőségei	12
2.4.2. Röntgendiffrakció	13
2.4.3. Optikai mikroszkópia	13
2.4.4. Termoanalitikai vizsgálatok	14
2.4.5. Változtatható hőmérsékletű vizsgálati módszerek	15
2.5. Kiválasztott polimorf módosulat kristályosítása	15
2.5.1. Hűtési kristályosítás	16
2.6. Folyamatelemző technológia (PAT)	18
2.7. Kemometria, sokváltozós adatelemzés	19
2.7.1. Csoportelemzés (CA)	20
2.7.2. Főkomponens-elemzés (PCA)	23
3. Anyagok és módszerek	24
3.1. Modellvegyület	24
3.2. Műszerek, berendezések	25
3.3. Eredmények értékelése	27
4. Eredmények és értékelés	28
4.1. Polimorf módosulatok minőségi vizsgálata off-line Raman-spektroszkópiával	28
4.1.1. Raman-mikroszkóppal történő vizsgálatok	28
4.1.1.1. A Raman-mikroszkóp mérési paramétereinek optimalálása	28

4.1.1.2. Polimorf módosulatok Nd-YAG lézerrel történő gerjesztése	31
4.1.1.3. Polimorf módosulatok Nd-YAG lézerrel gerjesztett spektrumainak összevetése	33
4.1.1.4. Polimorf módosulatok dióda lézerrel történő gerjesztése	39
4.1.2. Polimorf módosulatok száloptikán keresztül történő vizsgálata	41
4.2. Polimorf módosulatok in-line Raman-spektroszkópiával történő vizsgálata.....	44
4.2.1. A Raman-szonda mérési paramétereinek kiválasztása	45
4.2.2. Hőmérséklet és fordulatszám hatásának vizsgálata.....	46
4.2.3. Polimorf módosulatok szuszpenzióiról felvett Raman-spektrumok összevetése.....	53
4.2.4. Átkristályosítás vizsgálata.....	56
4.3. Polimorf módosulatok minőségi vizsgálata infravörös spektroszkópiával.....	60
4.3.1. Csúcsok asszignálása	62
4.3.2. IR spektrumok főkomponens-elemzése	68
5. Összefoglalás és kitekintés.....	74
Köszönetnyilvánítás	76
Felhasznált irodalom	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFR	<i>Automatic Fluorescence Rejection</i>	automatikus fluoreszcencia gátlás
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>	gyengített teljes reflexió
CA	<i>Cluster Analysis</i>	klaszter analízis
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	töltéscsatolt eszköz
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	differenciál pásztázó kalorimetria
DTA	<i>Differential Thermal Analysis</i>	differenciál termikus kalorimetria
FBRM	<i>Focused Beam Reflectance Measurement</i>	fókuszált sugár visszaverésének mérése
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Európai Gyógyszerügyi Hatóság
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>	Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatala
FIR	<i>Far InfraRed</i>	távoli infravörös
FT	<i>Fourier transformation</i>	Fourier-transzformáció
HS-IR	<i>Hot-Stage Infrared spectroscopy</i>	fűthető tárgyasztalú infravörös spektroszkópia
HSM	<i>Hot-Stage Microscopy</i>	fűthető tárgyasztalú mikroszkópia
HS-XRPD	<i>Hot-Stage X-Ray Powder Diffraction</i>	fűthető tárgyasztalú röntgendiffrakció
IR	<i>InfraRed</i>	infravörös
MEK	<i>Methyl ethyl ketone</i>	metil-etil-keeton
MIR	<i>Mid InfraRed</i>	analitikai infravörös
Nd-YAG	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>	neodímiummal szennyezett ittrium.-alumínium műkristály
NIR	<i>Near InfraRed</i>	közeli infravörös
PAT	<i>Process Analytical Technology</i>	folymatelemző technológia
PC	<i>Principal Component</i>	főkomponens
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	főkomponens-elemzés
TG	<i>Thermo Gravimetry</i>	termogravimetria
UV	<i>UltraViolet</i>	ultraibolya
XRPD	<i>X-Ray Powder Diffraction</i>	röntgen pordiffrakció

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A gyógyszerhatóanyagok polimorfijának vizsgálata a gyógyszergyártás létfontosságú lépése. A jelenség rendkívül összetett, ezért beható tanulmányozása a különböző analitikai módszerek összehangolt alkalmazását követeli meg. A gyógyszeriparban különösen fontos a különböző polimorf módosulatok szilárd fázisú jellemzése, a módosulatok átalakulásának vizsgálata, a különböző formák megbízható megkülönböztetése, hiszen az eltérő módosulatok biológiai hasznosulása is különböző, így a felderítetlen polimorfia potenciális veszélyforrást jelenthet, míg egy generikus gyártó szemszögéből potenciális előnyt, hiszen büntetlenül jelenhet meg a piacon „új” termékével.

Az Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatala (*Food and Drug Administration*, FDA) 2004-ben publikálta keretprogramját, melyben a folyamatelemző technológia (*Process Analytical Technology*, PAT) központi szerepet játszott. A kezdeményezés elősegíti a gyógyszeripari fejlesztés innovatív és hatékony megközelítésének alkalmazását és bővítését. A polimorfia jelenségének, az átalakulások kinetikájának vizsgálatára PAT eszközként infravörös és Raman-spektroszkópiát használnak.

Dolgozatom célkitűzése egy hatóanyag-jelölt molekula három polimorf módosulatának vizsgálata Raman-spektroszkópiával és infravörös spektroszkópiával, továbbá adott polimorf módosulat hűtéses kristályosítással történő előállításának nyomon követése Raman-szondával, a módosulatok azonosítása.

A dolgozatban bemutatott Raman-spektroszkópiával végzett kísérletek a Sanofi Kutatás és Fejlesztés Kémiai Fejlesztésének Fizikai Minőségi Laboratóriumában, az infravörös spektrumok pedig a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék Infravörös Laboratóriumában készültek.

Iparjogvédelmi okokból kifolyólag a hatóanyagjelölt molekula szerkezeti képlete a dolgozatomban nem szerepelhet, vizsgálataim bemutatását és megértését azonban ez érdeemben nem befolyásolja.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A polimorfia jelensége

A polimorfia elnevezés görög eredetű, $\pi\omicron\lambda\nu$ = sok és $\mu\omicron\rho\phi\eta$ = alak, forma szavak összekapcsolásával keletkezett. A jelenséget először Klaproth (1798) és Dawey (1789) figyelte meg a kalcit-argonit, valamint a gyémánt esetében. Magát a fogalmat Mitscherlich vezette be 1822-ben arzenát és foszfát sók vizsgálata során. Azóta a jelenség számtalan példában bukkant fel, mind az elméletben, mind pedig a gyakorlatban, komoly nehézséget okozva a fejlesztő munkában.

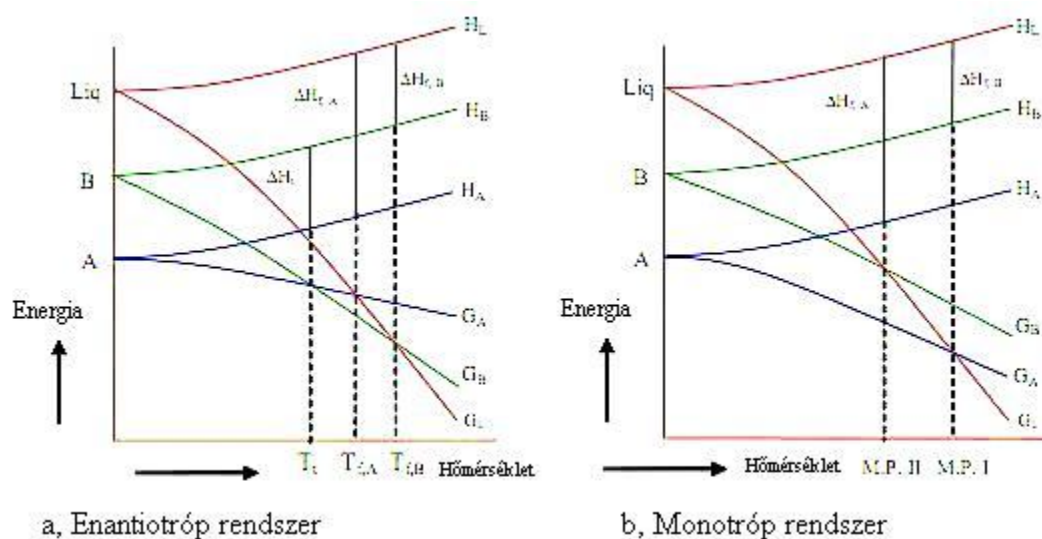
Polimorfianak azt a jelenséget nevezzük, amikor egy anyag azonos kémiai szerkezet mellett egynél több szilárd formában képes kristályosodni. A kristályrendszerek (leggyakrabban monoklin, triklin és rombos) határain belül az anyagok a molekuláris szoros illeszkedésre törekedve alkotnak kristályokat. Az alacsony kristályszimmetriák miatt a kristályrácsban belül a molekulák konformációja fizikai és kémiai hatásoktól függően megváltozhat, a módosult formák térbeli átrendeződéssel új, szoros illeszkedést érnek el. Az eredmény új elemi cella, új szimmetriákkal, mely szupramolekuláris értelemben új anyagot is jelent, új tulajdonságokkal. E jelenséget, a klasszikus ásványtani bevezetése óta (1819), polimorfianak nevezzük.

A polimorfia szervesetlen vegyületeknél sem ritkaság, de a szerves vegyületek molekuláris kristályaiban az építőelemek még változatosabban helyezkedhetnek el. Konformációs polimorfiról beszélünk, ha a molekulák különböző konformációs állapotban alkotnak szilárd fázist. Illeszkedési polimorfia esetén két különböző kristályszerkezetben a molekulák konformációs viszonyai nem különböznek jelentősen. Szerves molekulák esetében polimorfiról akkor beszélünk, ha egy, kémiaiilag azonos molekula kristályosodása során, különböző feltételek mellett, egynél több kristályformát képez. Adott körülmények között csak egy módosulat stabil, a többi metastabil, amelyek azonban esetenként hosszabb ideig is eltarthatók. Előállításuk szerint általában termodinamikailag és kinetikusan kedvezményezett formákról beszélünk. A két pólus között több módosulat is létezhet, például a cimetidin öt ismert és két pontosan nem jellemezhető (feltehetően amorf) módosulattal bír. Ezekhez járulhatnak még a kérdéses vegyület hidrátjai, illetve szolvátjai, amelyeket téves szóhasználattal pszeudopolimorfoknak szokás nevezni. [1] A szolvátoknak is lehetnek

polimorf módosulatai. Hidrátok esetén a koordinált oldószer víz, ez esetben elég gyakori a polimorfia jelensége. Az utóbbi években terjedt el a szolvatopolimorfia fogalma, mely olyan eltérő kristályszerkezetű vegyületekre vonatkozik, melyek elemi összetétele csak a szerkezetbe foglalt szolvens molekulában tér el egymástól.

Két polimorf módosulat termodinamikai értelemben kétféle viszonyban állhat egymással, monotróp vagy enantiotróp rendszert alkothatnak (**1. ábra**). Két polimorf módosulat egymással monotróp viszonyban áll, ha az egyik módosulat szabadenergiája (G_A) kisebb a másik forma szabadenergiájánál (G_B) a vizsgált tartományban ($G_A < G_B$). Ez esetben a két módosulat fázisátalakulás nélkül nem alakítható egymásba. A kisebb szabadenergiájú A módosulat stabilabb, a nagyobb szabadenergiájú B módosulat spontán exoterm reakcióval A módosulattá alakulhat.

Enantiotrópia esetén létezik reverzibilis átmenet a módosulatok között anélkül, hogy gáz- vagy folyadékfázison keresztül történne az átalakulás. Ebben az esetben a két módosulat szabadenergia görbéje egy adott T_i (K) hőmérsékleten metszi egymást és a metszéspontban a stabilitási sorrend megváltozik. [1, 2, 3]



1. ábra: Enantiotróp és monotróp rendszer energia-abszolút hőmérséklet diagramja, (A és B – a két polimorf forma; L – folyadékállapot; H – entalpia; G – szabadenergia; $\Delta H_{t,A}$ és $\Delta H_{t,B}$ – olvadáshő; ΔH_i – fázisátmenethez szükséges energia; T_i – termodinamikai átalakulási hőmérséklet)

2.2. A polimorfia gyógyszeripari jelentősége

A polimorf módosulatok az eltérő kristályszerkezetből eredően eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Az olvadáspont, oldhatóság, oldódási sebesség, alakíthatóság, stabilitás terén tapasztalható különbségek jelentősen befolyásolják a hatóanyag formulálását, a készítmény felszívódását, hatékonyságát, toxicitását, végső soron a biológiai hasznosulást.

Azokban az esetekben, amikor a hatóanyag felszívódási sebességét annak oldódási sebessége szabja meg a különböző polimorf módosulatok a biológiai hasznosíthatóságot befolyásolják, így előfordulhat, hogy egy metastabil polimorf terápiásan magasabb hatóanyagszintet okoz a kedvezőbb oldékonysága révén. Ezért a fel nem ismert polimorfia dózisonként különböző eltérésekhez vezethet a biológiai hasznosulás során. [4, 5] A polimorfia a feldolgozás különböző fázisaira is hatást gyakorol, az őrlés, granuláció, szárítás, liofilizálás, préselés módosulatonként eltérő metodikát követelhet meg. [1, 2]

A polimorfia vizsgálata kiemelkedő fontosságú, hiszen a gyógyszer-törzskönyvezési hatóságok megkövetelik a hatóanyag szilárd formáinak jellemző leírását is, egy adott hatóanyag kizárólag abban a polimorf módosulatban hozható forgalomba, melyre a hosszadalmas biológiai, biokémiai, toxikológiai, klinikai vizsgálatokat elvégezték. Egy új szilárd forma, mint új felfedezés szabadalmaztatható, így a kifejlesztő kizárólagos jogot formálhat az előállításra, forgalmazásra. A gyógyszerhatóanyag, mint kémiai szabadalom 20 éves szabadalmi oltalommal jár, a generikus gyártóknak meg kell várniuk ennek lejártát. Azonban ha a generikus gyártó fedezi fel az új formát, szabadalomsértés nélkül jelenhet meg a piacon termékével. Ezt elkerülendő az originátor gyártó igyekszik a hatóanyag minden formáját felfedezni. Ezt az eljárást polimorfiaszűrésnek nevezzük.

2.3. Polimorfiaszűrés

Egy hatóanyag polimorfijának feltárása, a megismert módosulatok jellemzőinek és relatív stabilitásának meghatározása a gyógyszerfejlesztés minél korábbi szakaszában elvégzendő feladat. Egy adott anyag polimorfijának feltárása érdekében végzett szisztematikus vizsgálat sorozatot polimorfiaszűrésnek nevezzük. A szűrés során lehetséges az egyes formák önálló kinyerése, de igen gyakran polimorf keverékek képződésével is számolnunk kell. A polimorfiaszűrés során alkalmazható eljárásokat az **1. táblázat** foglalja össze.

Alapfolyamat	Módszer	Kiindulási állapot	Változtatható paraméterek
Kristályosítás	olvadékból	alapmolekula olvadéka	hűtési sebesség, keverési sebesség
	gőzfázisból	alapmolekula gőze	nyomás, hőmérséklet
	oldatból	alapmolekula oldata	oldószer, kezdeti koncentráció, kristályosítás típusa, keverési sebesség, hűtési sebesség, bepárlási sebesség, adalékok típusa, adalékok mennyisége
	gőzdiffúzióval	alapmolekula oldata	oldószer, nem oldódó közeg
	szuperkritikus körülmények között	alapmolekula oldata	eljárás típusa, oldószer, nyomás, adagolási sebesség
	porlasztva szárítással	alapmolekula oldata	oldószer, hőmérséklet, nyomás, beadási sebesség
	fagyasztva szárítással	alapmolekula oldata	oldószer, hőmérséklet, nyomás
Nyomás alkalmazása	örlés	alapmolekula	energia, idő
	prézelés		
Termikus átalakítás	hevítés	alapmolekula vagy szuszpenziója	közeg, hőmérséklet, keverési sebesség, idő
	hevítés	alapmolekula hidrátja vagy szolvátja	hőmérséklet, idő
Besugárzás	ultrahang UV fény lézer Röntgen	alapmolekula vagy szuszpenziója	energia, idő, hőmérséklet

1. táblázat: A polimorfiaszűrésben alkalmazható eljárások

A polimorfok előidézésére irányuló kísérleteket a kémiai azonosság bizonyítása után a megtalált formák jellemzése követi, melyre a következő fejezetben tárgyalt szilárd fázisú analitikai eljárások használatosak. [1, 2]

2.4. A polimorfia vizsgálatának analitikai módszerei

A jelenség vizsgálatára alkalmas, leggyakrabban alkalmazott módszerek:

- rezgési spektroszkópia
- röntgendiffrakció
- optikai mikroszkópia
- termoanalitikai vizsgálatok
- változtatható hőmérsékletű vizsgálati módszerek.

Ezek közül a módszerfejlesztésben alkalmazott Raman-spektroszkópiát és infravörös spektroszkópiát, azaz a rezgési spektroszkópia típusait tárgyalom részletesebben dolgozatomban.

2.4.1. Rezgési spektroszkópia

A molekulák állandó mozgásban vannak. A transláció és rotáció során a molekulában lévő atomok közötti távolságok és szögek változatlanok maradnak, azonban rezgés során az atomok közötti távolságok változnak. A rezgési spektroszkópia az anyagok rezgési átmeneteinek gerjesztését felhasználó módszerek közé tartozik.

Egy N db atomból álló molekulának $3N-6$ (illetve lineáris molekula esetén $3N-5$) db független rezgése van. Ezeket a rezgéseket normálrezgéseknek nevezzük. Egy normálrezgés során a molekula valamennyi atomja ugyanazzal a frekvenciával (normálfrekvencia), azonos fázisban rezeg. Egy anyag rezgési spektrumát a normálrezgések összessége szolgáltatja.

A gyakorlati alkalmazás alapja, hogy egyes funkciós csoportoknak – függetlenül attól, hogy milyen molekulában fordulnak elő – jellemző elnyelési sávjaik vannak. E sávok helye elsősorban a csoportban szereplő atomok minőségétől, valamint az atomok közötti kémiai kötés erősségétől függ. E jellemző elnyelési sávokat adó rezgéseket az alapján lehet csoportosítani, hogy a molekulában a rezgés során milyen geometriai paraméter változik: a kötéstengely irányában végbemenő kitérést vegyértékrezgésnek, a kötésszög változását deformációs rezgésnek nevezzük. Ez utóbbi sajátos esete a négy atom által definiált torziós

szög változása (torziós rezgés). Mivel a kötősszög nyújtásához és összenyomásához lényegesen nagyobb erő szükséges, mint a kötősszög megváltoztatásához, ezen rezgések gerjesztéséhez nagyobb energia szükséges, a rezgések magasabb frekvenciájúak, így elnyelési sávjaik általában a spektrum magasabb hullámszámú tartományában találhatók. [6, 7, 8]

A rezgési spektroszkópiában használatosak a karakterisztikus csoport, illetve kötési frekvencia fogalmak. Ezek bizonyos atomcsoportokra, illetve kötésmódokra jellemző frekvenciára utalnak, hiszen két atom között vagy egy atomcsoporton belül működő erők azonos kötésmód esetén nagyjából azonosak – a molekula többi részétől függetlenül –.

A rezgési spektroszkópián belül két mérési módszert különböztetünk meg:

- Raman-spektroszkópia
- infravörös spektroszkópia

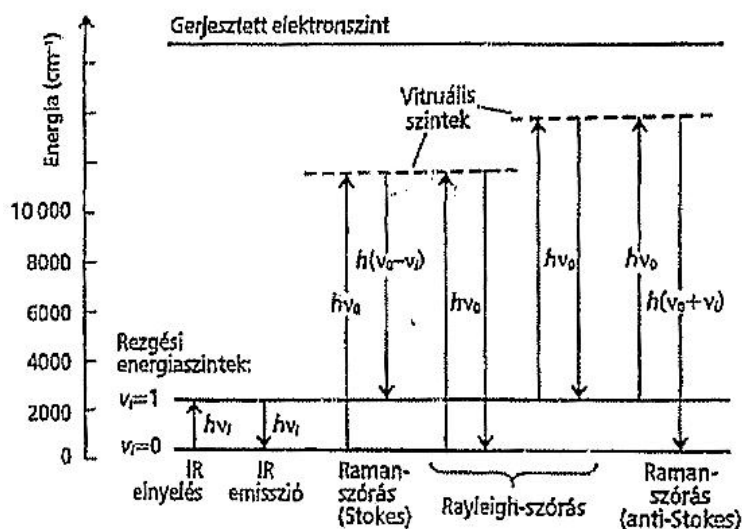
2.4.1.1. A Raman-spektroszkópia alapjai

A rezgési spektroszkópia kísérleti módszerei a vizsgálandó anyag atomjainak rezgései és az anyagra eső fény közötti kölcsönhatáson alapulnak. Ez a módszer különösen a molekuláris felépítésű vagy kovalens kötésekkel összekapcsolt atomokból álló anyagok esetén szolgáltat gazdag információt az anyag szerkezetéről, mert ezekben a molekulákban általában jól definiált, jellegzetes frekvenciájú rezgések alakulnak ki, melyek gerjesztése keskeny sávokból álló spektrumot eredményez, mely alkalmas az adott anyag azonosítására.

A Raman-szórás a rezgési átmenetek gerjesztésének közvetett módja. A jelenség lényege, hogy ha nagy intenzitású, ν_0 frekvenciájú, monokromatikus sugárzást bocsátunk egy anyagra, az a mintával kölcsönhatásba lépve elektromos mezejének erősségével arányos nagyságú dipólusmomentumot indukál az adott anyag elektronfelhőjében. A dipólusmomentum nagysága a molekula polarizálhatóságának mértékétől függ, mely az elektronfelhő deformálhatóságát jellemzi. A Raman spektroszkópiában tehát azok az átmenetek megengedettek, melyekben megváltozik a molekula polarizálhatósági tenzora. [8, 9]

Ha megvizsgáljuk a mintáról oldalirányba szóródó, gyenge fény spektrumát, abban a változatlan ν_0 frekvenciájú sugárzás mellett annál kisebb és nagyobb frekvenciáknál is ($\nu_0 - \nu_i$, illetve $\nu_0 + \nu_j$) sokkal kisebb intenzitású, új komponenseket is fel lehet fedezni. Ennek oka, hogy a besugárzó fény fotonja a besugárzott minta molekuláival rugalmasan vagy rugalmatlanul ütközhet. Rugalmas ütközéskor csak a foton iránya változik meg, energiája, azaz frekvenciája változatlan marad, ez a Rayleigh-szórás. Ha a foton rugalmatlanul ütközik a molekulával, akkor mérhetünk megváltozott frekvenciájú fényszórást, melyet felfedezőjéről

Raman-szórásnak nevezünk. A frekvenciaeltolódások mértéke azonos a vizsgált anyag molekuláira jellemző rezgési frekvenciákkal, így a Raman-szórás spektrumának vizsgálata alapján tanulmányozhatók az adott anyag rezgései (2. ábra).



2. ábra: Rezgési spektroszkópia magyarázata a rezgési energiaszintek közötti alapvető átmenetekkel

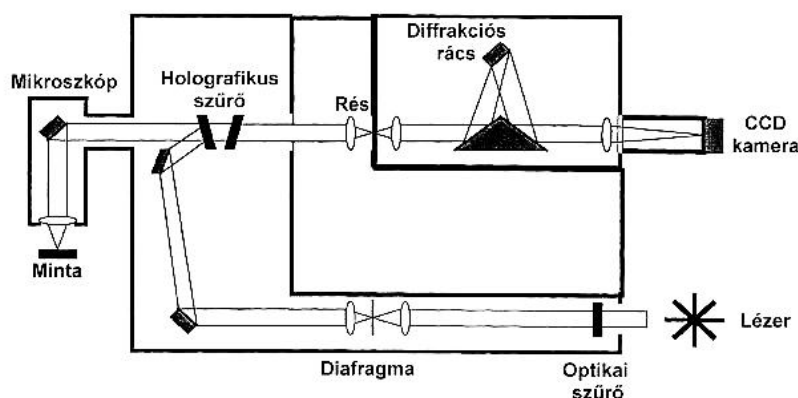
Ha a foton ad át energiát a molekulának, csökken a frekvenciája, a spektrumban a Rayleigh-sávhoz képest kisebb frekvenciánál ($\nu_0-\nu_i$) jelentkező sávokat kapunk, melyeket Stokes-sávoknak nevezünk. Ellenkező esetben, ha a foton kap energiát a molekulától, a spektrumvonalak a nagyobb frekvenciák irányába tolódnak el. Ez a spektrum anti-Stokes tartománya ($\nu_0+\nu_i$). A Stokes-sávok intenzitása nagyobb, hiszen a foton könnyebben talál gerjeszthető molekulát, mint olyat, mely neki adna át szívesebben energiát. A Raman-szórás rendkívül gyenge jelenség: míg a gerjesztő sugárzás fotonjainak többsége energia- és irányváltozás nélkül halad át az anyagon, csak mintegy 10^{-6} része szóródik a tér minden irányában változatlan energiával (Rayleigh-szórás) és csak mintegy 10^{-10} -szeres része az, mely a kisebb vagy nagyobb frekvenciájú Raman-szórást eredményezi. A Raman-sávok intenzitása a polarizálhatóság négyzetével és a gerjesztő frekvencia negyedik hatványával arányos, ezért a Raman-szórás hatékonyabban gerjeszthető a nagyobb frekvenciájú ibolyántúli (*UltraViolet*, UV) vagy látható tartományban. Általában a szimmetrikus rezgések és apoláris csoportok adnak intenzívebb Raman-sávot.

A Raman-spektrumokat nem abszolút hullámszám-skálában, hanem a gerjesztő vonaltól, mint origótól mért ún. Raman-eltolódás (Raman shift) skálában szokás ábrázolni az x -tengelyen, míg az y -tengelyen a sávok intenzitását ábrázoljuk. Így az IR és Raman-spektrumok azonos hullámszámskálában adhatók meg, mely megkönnyíti a kétféle rezgési spektrum összevetését. A Raman aktivitáshoz a vizsgált kötés vagy molekularészlet

polarizálhatósága szükséges, míg az IR aktivitás feltétele a dipólusmomentum-változás. Maximális információ a két spektrum együttes elemzéséből származhat, hiszen a két spektrum kiegészíti egymást. [8, 9, 10, 11]

2.4.1.1.1. A Raman-mikroszkóp felépítése

A készülékek többféle, általában 532, 633, 785 és 1064 nm hullámhosszú lézerrel vannak felszerelve, ezek közül az utóbbi elsősorban fényérzékeny, szerves anyagok vizsgálatára alkalmas. A gerjesztő fény intenzitásának, azaz a mintát ért sugárzás mennyiségének csökkentésére a fényútba helyezett szűrők alkalmazásával van lehetőség, így a minta sérülése elkerülhető. A berendezés a mintáról szóródó fényt rácscal bontja fel, azaz a diszperziós elven működő készülékek közé sorolható (3. ábra). A Raman-mikroszkóp alkalmazásakor a gerjesztő lézersugarakat a lencserendszer fókuszálja a minta adott részletére. A készülék alkalmas a minta egy adott pontjában spektrumfelvételre, egy meghatározott terület program szerinti feltérképezésére (*mapping*) és mélységi felvétel készítésére is. A CCD detektor (*Charge Coupled Device*) a pásztázó (*scan*) felvételt is lehetővé teszi. A detektor előnye a gyorsasága, ugyanakkor érzékeny a kozmikus sugárzásra.



3. ábra: Diódasoros detektorral felszerelt diszperzív Raman-mikroszkóp

Raman-spektroszkópiában szinte kizárólag diszperziós készülékek használatosak, megfelelő objektív alkalmazásával néhány μm -es laterális felbontás érhető el. A Fourier-transzformációs (*Fourier Transformation*, FT) Raman-készülékeket leginkább mikrospektroszkópiára használják, ekkor a lézernyalábot nagyon kicsire, 50-100 μm -re fókuszálják. A spektrumok jel/zaj viszonyának javíthatóságát szolgálja a spektrumonként optimálható felvételi idő és az akkumulációk száma. A több akkumuláció során felvett Raman-spektrumok automatikusan átlagolódnak, így a spektrumból kiszűrődnek a detektort

véletlenszerűen ért sugárzások, kozmikus eredetű csúcsok, így javul a jel/zaj viszony. A felvételi idő a CCD detektor integrálási időtartamát jelenti a spektrum felvételekor. Hosszabb idejű felvételkor csökken a statisztikus zajok aránya. A berendezéshez száloptikai rendszer is csatlakoztatható, melyen keresztül lehetőség nyílik reakciókövetésre is. [8, 9, 12]

2.4.1.2. Infravörös spektroszkópia

A molekulák kémiai szerkezetkutatásának egyik leghatékonyabb módszere az infravörös (*Infrared*, IR) spektroszkópia. A módszer az infravörös sugárzás és a molekulák kölcsönhatásán alapul. A molekulát képező atomok egymáshoz képest kis amplitúdójú mozgásokat, rezgéseket végeznek, amiket az elektromágneses sugárzás IR tartománya gerjeszteni képes.

Az infravörös spektroszkópia az infravörös sugárzás elnyelésén (abszorpció), visszaverésén (reflexió), illetve kibocsátásán (emisszió) alapul. A gyakorlatban az abszorpciós IR spektroszkópia a legelterjedtebb, de széleskörű alkalmazása van a reflexiós technikának is. Az abszorpció során a vizsgált anyag a ráeső IR sugárzásból a rezgéseire jellemző frekvenciájú komponenseket elnyeli, ezek intenzitása az anyagon való áthaladás után csökken, a spektrumban abszorpciós sáv jelenik meg.

A várttal ellentétben az IR spektrumokban általában nem $3N-6$ db rezgési sávot látunk. A sávok számát csökkenti a degeneráció jelensége, amikor szimmetriai okok miatt két vagy több normálrezgés frekvenciája megegyezik. A sávok számának csökkenését okozza az is, hogy nem minden normálrezgés IR aktív. Az IR aktivitás kritériuma ugyanis, hogy az adott rezgés során a molekula dipólusmomentuma megváltozzon. Tovább csökkenti a spektrumban látható sávok számát, ha az adott rezgés nagyon kis intenzitású, így nem emelkedik ki a zajból. A sávok számát ellenben növelik a felhangok, amikor az alapállapotból nem az első, hanem a második (vagy magasabb) gerjesztett rezgési energiaszintre kerül a rendszer. [7, 11]

Az infravörös tartományt három fő részre osztjuk:

1. közeli infravörös tartomány (*Near Infrared*, NIR: $4000-12500\text{ cm}^{-1}$): felhangok és kombinációs sávok tartománya
2. közép vagy analitikai infravörös tartomány (*Mid Infrared*, MIR: $300-4000\text{ cm}^{-1}$): vegyérték- és deformációs rezgések tartománya
3. távoli infravörös tartomány (*Far infrared*, FIR: $10-300\text{ cm}^{-1}$): nehézatomot tartalmazó csoportok vegyérték- és deformációs rezgései, torziós rezgések, kristálysírképződések, egyes forgási átmenetek tartománya. [6]

2.4.1.2.1. Infravörös spektrométerek

Az infravörös spektrométerek első generációja az ún. diszperziós készülék. Ezen készülékek fő korlátja a felbontás és a jel/zaj viszony közötti fordított arányú kapcsolat. A felbontást ugyanis a monokromátor utáni rés szélessége szabja meg: a keskeny rés nagyobb felbontást tesz lehetővé, ugyanakkor csökken a detektorra jutó fényintenzitás, ezáltal romlik a jel/zaj viszony. A diszperziós készülék olyan esetekben előnyösebb, amikor sorozatmérés jelleggel egy adott komponenszt kell hasonló környezetben meghatározni. Ez a készülék egyszerű felépítésű, így lényegesen olcsóbb.

Napjainkban már szinte kizárólag Fourier-transzformációs IR spektrométerek használatosak. Ezekkel a készülékekkel a spektrumot két lépésben kapjuk meg: az első lépés egy ún. interferogram felvétele, második lépésben ezt az interferogramot alakítjuk át energiaspektrummá Fourier-transzformációval. A készülék legfontosabb egysége az interferométer, mely a diszperziós készülékek monokromátorának helyén található. A történelmileg legelső (1891) és ma is leggyakoribb interferométer a Michelson-interferométer. A fényforrásból 45°-os beesési szöggel a fényosztóra jut a fénysugár. Ez tulajdonképpen egy féligáteresztő tükör, mely – ideális esetben – a ráeső sugárzás 50%-át átereszt a mozgó tükör felé, 50%-át pedig visszaveri az álló tükrökre. A sugarak a tükrökről visszaverődve a fényosztón találkoznak újra és interferálnak a két fényút úthosszkülönbségének megfelelően. Az interferencia eredményeként képződő úthosszkülönbség-intenzitás függvény az ún. interferogram.

A Fourier-transzformációs technikának számos előnye közül a legfontosabb, hogy az interferométer a teljes tartományban egyszerre gyűjti össze az összes frekvenciához tartozó spektrumot, a mérés ideje gyakorlatilag a tükör néhány másodperces mozgására korlátozódik. Ez a gyorsaság realizálhatóvá teszi az interferogram többszöri felvételét. Ekkor az IR detektor zaja a felvételek számával (N) négyzetgyökösen nő, míg a jel N -el arányosan, így a jel/zaj viszonyban $\sqrt{N}$ -szeres javulást érhetünk el. Az interferométerek nagyon megbízhatók, jól biztosítható a hullámszám-pontosság és nincs szükség kalibrációra. A spektrumot számítógépes adatfeldolgozás eredményeként kapjuk meg, a kész spektrummal különböző műveleteket tudunk végrehajtani, úgymint alapvonal korrekció, csúcsterület-mérés, aritmetikai műveletek (például egyes spektrumokat ki tudunk vonni egymásból) stb. [3, 6, 7]

2.4.1.2.2. Gyengített teljes reflexió

A reflexiós IR-technikák közé tartozik az gyengített teljes reflexiós technika (*Attenuated Total Reflectance*, ATR). A mintát egy például gyémánt-ZnSe kompozit, Ge stb. kristály felületére helyezzük. Az ismert nagyságú erővel a kristályra préselt mintára az infravörös sugárzás egy ZnSe kristályon és az alsó gyémántablakon át jut, és csak sokszori visszaverődéssel jut át a kristályon. A fény minden visszaverődéskor néhány mikrométer mélységig behatol a mintába, miközben az elnyeli a rá jellemző frekvenciájú komponenseket. A többszörös teljes belső reflexió megsokszorozza az abszorpció mértékét. Az ATR-technika előnye, hogy a mintát nem éri erős mechanikai behatás, mely akár a polimorf módosulatok átalakulását eredményezhetné. [6, 13]

2.4.1.3. A rezgési spektroszkópia vizsgálati lehetőségei

A Raman és IR-spektroszkópia detektálási spektrumtartománya nagyrészt átfed. A két módszer egymást kiegészítő információt ad a vizsgált molekula rotációs-vibrációs állapotairól, kivéve a 400 cm^{-1} alatti tartományt, melyről csak a Raman-spektrumok adnak felvilágosítást. E spektrumtartomány azért fontos, mert a legtöbb szilárd anyagnak található itt karakterisztikus vibrációs frekvenciája. Bár a Raman- és IR spektrumok nagyjából azonosak, a kiválasztási szabályokban fellépő különbség teszi a két módszert egymást kiegészítővé. A poláris csoportok, mint a karbonil vagy a hidrogén-kötésben részt vevő hidroxil-csoport jól látható az IR spektrumban, míg az apoláris, szimmetrikus kötések a Raman-spektrumban jelennek meg erőteljesebben. A Raman vizsgálat egyik legnagyobb előnye, hogy nem igényel különösebb mintaelőkészítést. Az IR méréseket a víz széles abszorpciós sávja zavarhatja, ezért higroszkópos anyagok nehezen vizsgálhatók IR spektroszkópiával, a Raman-spektroszkópiában ez nem okoz problémát. [12, 14] A Raman-spektrumban kevesebb az átlapolt, kombinált sáv, ezért a spektrum kiértékelése is könnyebb lehet.

A két módszert összevetve a Raman-spektroszkópia lényegesen előnyösebb a felbontás elméleti korlátait tekintve, hiszen a mintára bocsátott sugárzás hullámhosszától függően akár kevesebb, mint $1\text{ }\mu\text{m}^2$ -nyi terület vizsgálható, míg infravörös mérés esetén ez a terület $50\text{ }\mu\text{m}^2$ (hullámhossztól függően). [3] A Raman-spektroszkópia egyik legnagyobb hátránya, hogy a fluoreszcencia a Raman-szóródásnál mintegy 10^{16} -szor intenzívebben jelentkezik, valamint lézerrel történő besugárzás miatt egyes érzékeny minták vizsgálata esetén számolni kell a vizsgált anyag esetleges károsodásával. [11]

2.4.2. Röntgendiffrakció

Polimorfia tanulmányozására a röntgendiffrakciós mérés technikán belül a pordiffrakció módszerét használják leggyakrabban, mert bár az egykristály röntgendiffrakció igen széleskörű információt ad a vizsgált anyagról, a módszer felhasználhatóságát korlátozzák az egykristály előállításának nehézségei.

A módszer elve, hogy egy makroszkopikus kiterjedéssel bíró kristály minden atomja elektronfelhője révén a tér minden irányába szétszórja a röntgensugárzást. Mivel még a legkisebb kristály is nagyon nagy számú atomot tartalmaz, annak a lehetősége, hogy ezek a szétszóródó elektromágneses hullámok egymást erősítve interferáljanak majdnem zérus lenne, ha a kristályokban az atomok nem helyezkednének el a térben szabályosan ismétlődő módon. Ráadásul az egymással párhuzamosan elhelyezkedő rácssíkok távolsága a röntgensugárzás hullámhosszával nagyságrendileg összemérhető ($\lambda \approx d$), ezért egy kristály, mint optikai rács viselkedik a ráeső sugárnyalábbal szemben, így a nyaláb elhajlást (diffrakció) és interferenciát szenved rajtuk. Az eljárás a diffraktált sugarak irányának és intenzitásának megállapításán alapul. Ezek megállapításával következtethetünk a rácsszerkezet tömegpontjainak távolságviszonyaira, illetve térbeli elrendezésére.

Az elhajlott sugarak irányát a Bragg-egyenlettel állapíthatjuk meg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

A röntgensugárzás d rácstávolságú síksíkjairól csak meghatározott beesési szögek (θ) esetében diffraktálódik észlelhető mennyiségben: a kristály belsejében a párhuzamos síkokról a röntgensugár hullámhossza (λ) egész számú (n) többszörösének megfelelő útkülönbséggel visszaverődve érnek el interferenciamaximumot. A diffrakciós kép a kristályrácsra, mint periodikus térrácsra reflektálódott diszkrét helyeken megjelenő különböző intenzitású interferenciamaximumokból áll. A diffrakciós kép a kristályos vegyületek „ujjlenyomata”.

2.4.3. Optikai mikroszkópia

A szemcsék mérete és alakja fontos szerepet játszik a szilárd gyógyszerformák előállításában. Az anyagok feldolgozását a morfológiai sajátosságok döntően befolyásolják, ezért a vizsgálatok során az első teendők között a mikroszkópos vizsgálat szerepel.

Fénymikroszkóppal a kristályok külső megjelenése, habitusa tanulmányozható, mely a szilárd fázisú szerkezettel hozható összefüggésbe. A megjelenés azonban nem egyértelmű jellemzője

a szerkezetnek: egy adott molekula különböző polimorf módosulatai rendelkezhetnek azonos habitussal.

Polimorf módosulatok meghatározására alkalmas módszer a fűthető tárgyasztalú mikroszkópia (*Hot-Stage Microscopy*, HSM). A készülék segítségével vizuálisan is követhetjük a fűtés hatására bekövetkező változásokat, mint az olvadás vagy átkristályosodás. [2, 3]

2.4.4. Termoanalitikai vizsgálatok

A termoanalitikai módszerek lényege, hogy a mérés során az anyagok fizikai tulajdonságainak hőmérséklet-program hatására bekövetkező változásait regisztráljuk. Polimorfia vizsgálatokor főként a termogravimetria (*Thermo Gravimetry*, TG), a differenciál termikus analízis (*Differential Thermal Analysis*, DTA) és a differenciál pásztázó kalorimetria (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) módszere használatos.

- Termogravimetria: a hőmérséklet-program során folyamatosan regisztráljuk a minta tömegét, melyből kitűnik, hogy a vizsgált anyag milyen hőmérséklettartományban tömegállandó, illetve milyen hőmérsékleten következik be tömegváltozással járó fizikai vagy kémiai folyamat. Polimorf módosulatok esetén nem következik be tömegváltozás a mérés során, míg szolvát vagy hidrát esetén a kristályszerkezetbe épült oldószertartalom eltávozását tömegcsökkenés jelzi.
- Differenciál termikus analízis és differenciál pásztázó kalorimetria: a mintát tartalmazó tégely és a referenciatégely által leadott vagy felvett hőmennyiség közötti különbség szolgáltatja a mért jelet. Készüléktípustól függően beszélünk hőáram DSC-ről vagy teljesítménykompenzációs DSC-ről: előbbi elve hőmérsékletkülönbség-méréseken, utóbbi hőmennyiség-méréseken alapul, miközben a program úgy kompenzálja a fűtőtelteljesítményt, hogy a minta- és referenciaoldal között ne legyen hőmérsékletkülönbség. Mindkét módszer lehetővé teszi mind az átalakulási hő, mind a hőkapacitás meghatározását. [2, 3]

2.4.5. Változtatható hőmérsékletű vizsgálati módszerek

A változtatható hőmérsékletű vizsgálati módszerek közé tartozik a korábban már említett fűthető tárgyasztalú mikroszkóp, mely a megfigyelt szerkezeti változások, átalakulások vizsgálatára azonban *in situ* nem alkalmas.

Kereskedelmi forgalomban kapható hőszensorokkal ellátott fűthető tárgyasztalú mikroszkóp, mely segítségével a látható és a termikus tulajdonságokban bekövetkező változások szimultán módon tanulmányozhatók.

A röntgen pordiffraktométer fűthető tárgyasztallal való felszerelése (*Hot-Stage X-Ray Powder Diffraction*, HS-XRPD) lehetőséget nyújt a hőmérsékletváltozás során bekövetkező átalakulások azonnali szerkezetvizsgálatára, mely a polimorfiai vizsgálatokban az utóbbi években rutin módszerré vált.

Polimorf jelenségek tanulmányozásában egyre terjed a fűthető tárgyasztalú infravörös spektroszkópia (*Hot-Stage InfraRed Spectroscopy*, HS-IR), valamint a fűthető tárgyasztallal felszerelt Raman-spektroszkópia (*Hot-Stage Raman*, HS-Raman) alkalmazása is. Azonban az irodalom szerint a HS-IR technológia nem mindig ad kielégítő eredményt, mivel magasabb hőmérsékleten a felbontás és a jel/zaj arány csökkenése elfedheti a spektrumban bekövetkező apró változásokat. [3]

2.5. Kiválasztott polimorf módosulat kristályosítása

A gyógyszerhatóanyagok kristályosításakor több szempontot kell szem előtt tartani:

- hatóanyag-tartalom és kémiai tisztaság
- hozam
- kristályos vagy amorf szerkezet
- polimorfia
- szemcseméret-eloszlás
- gyógyszer-technológiai szempontok
- maradék oldószertartalom
- reprodukálhatóság, produktivitás
- környezetvédelem
- munkavédelem
- költségek.

A feladat rendkívül összetett, hiszen egyenként is nehéz ezeknek a feltételeknek eleget tenni, egyidejű kielégítésükhöz pedig számos feladatkör szervezett összehangolása szükséges.

A leggyakrabban alkalmazott kristályosítási eljárások, a

- hűtéses
- kisózásos
- csapadékképzéses

kristályosítás a túltelítés előidézésének módja szerint különböztethető meg egymástól. [2]

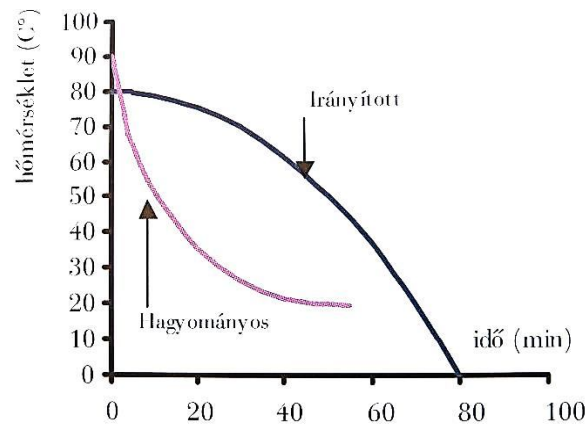
2.5.1. Hűtéses kristályosítás

A hűtéses kristályosítás a kristályosítás leggyakrabban alkalmazott módszere mind a gyógyszeripar, mind pedig a vegyipar egyéb területein. E módszer alkalmazása során az oldat túltelítését a hőmérséklet csökkentésével érjük el.

A szemcseméret-eloszlásra ható legfontosabb eljárási paraméterek:

- hűtési sebesség
- keverés
- oltás
 - oltókristály mennyisége
 - oltókristály méreteloszlása, szemcseméret homogenitása
 - oltás hőmérséklete.

A termék szemcseméret-eloszlását a kinetikai folyamatok (gócképződés és gócnövekedés) sebessége határozza meg, amelyet a hűtési körülményekkel befolyásolhatunk. [14] Ha az oldat nagyon gyorsan hűl, reprodukálhatatlan minőségű, apró szemcsés termék keletkezik. Ennek elkerülése érdekében irányított kristályosítást (*controlled cooling crystallization*) használnak (**4. ábra**), melynek lényege, hogy a túltelítés mértékét mindig a kritikus érték alatt tartjuk.



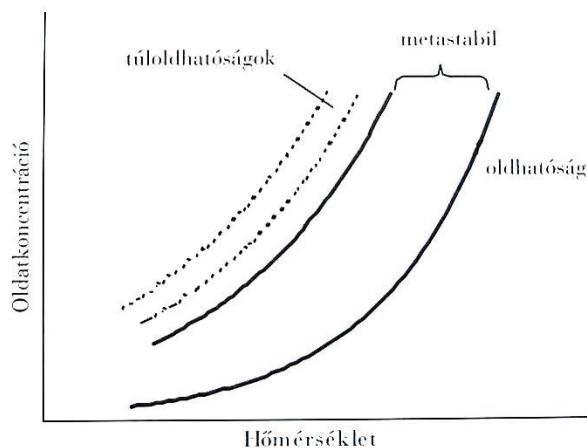
4. ábra: Az irányított és hagyományos kristályosítást bemutató hűtési görbék

Az eljárás használatakor az egyensúlyi oldhatóság elérése után kezdetben nagyon lassan hűtünk, majd a kristályosodás beindulása után gyorsíthatjuk a hűtést. A hűtési görbe mind kísérleti, mind elméleti úton meghatározható.

A keverés nagyon fontos tényező a kristályosítás során: elégséges keverést kell biztosítani, hogy a kivált szemcséket szuszpenzióban tartsuk, a megfelelő energiabevitelt, illetve a szuszpenzió homogenitását biztosítsuk, – mindazonáltal a keverés hatása nagymértékben rendszerfüggő. [15]

A fejlesztési eljárás fontos paramétere az oltás. Ha közben akarjuk tartani a kristályosodási folyamatot, akkor gyakorlatilag a túltelítés mértékének szabályozását kell megoldanunk.

A teljes kristályosítás során a túltelítést a metastabil tartományon belül kell tartanunk (5. ábra). A metastabil tartományon belül spontán kristályosodás nem történik, de az oltókristályok nőni tudnak. Ha a metastabil zónán belül valamilyen hőmérsékleten oltókristályt adunk az oldathoz, a spontán beinduló kristályosodáshoz képest egy alacsonyabb telítési szinten indukáljuk a kristályosodás beindulását, a gócnövekedés már minimális túltelítésnél is lehetséges. Az oltókristályok hozzáadása után már elegendő kristályfelület lesz jelen a növekedéshez, így a kiválás inkább növekedésre fordítódik.



5. ábra: Oldatkonzentráció-hőmérséklet diagram

Oltás alkalmazásával a szemcseméret-eloszlás szórása kisebb, az átlagméret növelhető és javul a tisztaság is. Ha az oltásra szűk frakciójú oltókristályt használunk, a termék szemcsemérete is homogénebbé válik. [2]

2.6. Folyamatelemző technológia (PAT)

Az ipari gyógyszergyártásban egyre fontosabbá válik a folyamatelemző technológia, hiszen a technológiák lépéseinek megértéséhez, a kritikus pontok definiálásához a teljes folyamat figyelemmel kísérése és kontrollálása szükséges. Kristályosítási eljárások nyomon követésére olyan in-line analitikai módszerek használatosak PAT eszközként, mint az FT-IR, NIR, Raman-spektroszkópia vagy a fókuszált sugár visszaverésének mérése (*Focused Beam Reflectance Measurement*, FBRM). Az FBRM a kristályszemcsék vizsgálatán alapul, polimorf átalakulás során változhat a szemcse habitusa, méreteloszlása. NIR spektroszkópiát leginkább reakciómonitorozásra, szárítási folyamatok vizsgálatára használják, a Raman-spektroszkópia pedig az átalakulás kinetikájának tanulmányozására alkalmas technika. [16] A PAT eszközök eredményes használatához elengedhetetlen a sokváltozós adatelemző módszerek használata, tehát a kemometria is a folyamatelemző technológiák szerves részévé válik. [17]

A Raman-spektrumok gazdag információtartalma révén a folyamatok megértése, optimalizálása és monitorozása megvalósítható, hiszen a Raman-készülékhez csatlakoztatható száloptika és a roncsolásmentes analízis lehetősége a módszert a PAT egyik legeredményesebb eszközévé teszi. [5, 12] A Raman-spektroszkópia már évtizedek óta használt eszköz a kristályosítási folyamatok nyomon követésére, hiszen megkülönböztethető

az amorf forma a kristályostól, illetve a különböző polimorf módosulatok is egymástól, de képes az oldószer általi átalakulások követésére is. [4, 9, 14]

A PAT kezdeményezés a gyógyszeripari folyamatok kockázat- és tudományalapú megközelítésére erős támogatást élvez a legfontosabb gyógyszeripari szabályozó hatóságok, az FDA és az Európai Gyógyszerügyi Hatóság (*European Medicines Agency*, EMA) által. [11]

2.7. Kemometria, sokváltozós adatelemzés

Az elmúlt években a matematikai módszerek analitikai kémiai alkalmazása a számítástechnika nagyléptékű fejlődése, valamint az analitikai kémiával való egyre szorosabb kapcsolata következtében jelentősen megnőtt.

A kemometria kifejezést már harminc éve alkalmazzák az analitikai kémiában használt matematikai módszerek megjelölésére. A kemometria fő célja a megfelelő mérési eljárások kiválasztása, az optimális kísérleti körülmények meghatározása, valamint a mérési adatok információtartalmának maximális kinyerése. Az analitikai kémiában a digitális jelfeldolgozás célja a műszerek jelének digitális formában történő kiértékelése, valamint azoknak az információknak a kinyerése, amelyek közvetlenül összefüggésbe hozhatók az anyag minőségi vagy mennyiségi jellemzőivel. A sokváltozós adatelemzés lényege, hogy a különböző változók közötti korrelációk révén lehetővé teszi a számunkra fontos változók mérhető változóktól való függésének leírását.

Vizsgálataim során a spektrumok kiértékeléséhez csoportelemzést (*Cluster Analysis*, CA) és főkomponens-elemzést (*Principal Component Analysis*, PCA) alkalmaztam.

2.7.1. Csoportelemzés (CA)

A csoportelemzés a teljes mintából kiindulva, a megfigyelt tulajdonságok értékei alapján próbálja az objektumokat csoportokba rendezni. Csoportosításon azt az eljárást értjük, mely objektumok között hasonlóságuk alapján úgy állapít meg rokonságot, hogy a csoportba tartozásról semmilyen előzetes ismeretünk vagy elvárásunk nincsen. A csoportelemzési eljárásokat más néven klaszter analízisnek is nevezik, mivel az angol cluster szó jelentése fürt, csoport. Az úgynevezett többszintű (hierarchikus) eljárás a csoportok közötti viszonyok feltérképezésére is vállalkozik, míg az egyszintű (nem hierarchikus) módszerek nem. [18]

A hierarchikus csoportosítás Arisztotelész logikáját követi, mely alapján minden rendszertani egység valamely fölé rendelt csoporthoz tartozik, és attól valamilyen sajátos jegy különbözteti meg. A hierarchikusan csoportosított objektumok fa-struktúrát képeznek, amelyben az objektumok viselik a fölérendelt objektumok tulajdonságait, de az azoktól különböző tulajdonságaikat is tovább adják az alárendelt objektumoknak.

A hierarchikus csoportosítás eredményét a dendogram szemlélteti (δενδρον [dendron] = élő fa). A dendogram fa-struktúrát követő ábra, melynek vízszintes tengelyén és azzal párhuzamos felső szintjein az objektumok (csoportok) szerepelnek, melyek közül a leg hasonlóbakat vízszintes vonalak kötnék össze. A csoportokhoz tartozó függőleges vonalak hossza (magassága) az objektumok számszerű, összefüggés szerinti hasonlóságát adja meg. A csoportok alakjáról, egyes objektumok esetleges kiugró viselkedéséről ad információt a csoport-objektum távolság ábra (*object-cluster distances*). Egy-egy ilyen ábra az objektumok valamely két csoport súlytól mért távolságát mutatja be.

A csoportosítás alapja az objektumok közötti hasonlóság. Az objektumok hasonlósága alkalmas tulajdonságvektor definíció esetén egyenértékű az objektumok tulajdonságvektorainak hasonlóságával. A tulajdonságtérben a hasonló tulajdonságvektorú objektumok (pontok) egymáshoz közel helyezkednek el, a különbözőek messze. Az objektumokat képviselő pontok közötti távolság tehát a csoportosítás szempontjából hatalmas jelentőséggel bír. [19]

A távolságfogalmak definiálása során gyakran feltételezik, hogy az objektumok olyan sokasághoz tartoznak, melyeknél megadható a tulajdonságuk szórása és kovarianciájuk. Használatos emiatt az euklideszi távolság egy változata, a Pearson-távolság, mely az egyes objektumok tulajdonságainak különbségeit az adott tulajdonságok szórásához viszonyítja, azokkal „normálja”.

$$t_{st} = \sqrt{(x_s - x_t)^T S^{-1} (x_s - x_t)} = \sqrt{\sum_j \frac{(x_{sj} - x_{tj})^2}{s_j^2}}$$

ahol	t_{st}	s és t objektum távolsága
	x_s, x_t	s és t objektum metrikus tulajdonsága (esetünkben vektor jellegű spektruma)
	j	a tulajdonság dimenziója (esetünkben a spektrum adatpontjainak száma)
	S^{-1}	variancia mátrix inverze, a szórásnégyzetek reciprokait tartalmazó $j \times j$ méretű diagonális mátrix

A Pearson-távolság dimenziómentes szám. Az egyes objektumok közötti távolság nagyítható, ha a Pearson-távolság négyzetét használjuk.

A csoportegyesítés alapjaként leggyakrabban használt távolságokat a **2. táblázat** tartalmazza.

Megnevezés	Angol kifejezés	Geometriai tartalom
Egyszerű lánc	Single linkage	A csoportok legközelebbi elemeinek távolsága
Teljes lánc	Complete linkage	A csoportok legtávolabbi elemeinek távolsága
Átlag távolság	Average linkage	Az egyesítendő csoportok elemei közötti távolságok átlaga
Súlypont	Centroid linkage	A csoportok súlypontjainak távolsága
McQuitty-távolság	McQuitty linkage	Két egyesített csoport távolságának átlaga
Medián távolság	Median linkage	A csoportmediánok távolsága
Ward-távolság	Ward linkage	Azon számított távolság, mely biztosítja, hogy az egyesített csoport csoporton belüli eltérésnégyzete minimális legyen

2. táblázat: Csoporttávolságok

Súlyponton a csoporthoz tartozó objektumoknak a tulajdonságtér origójától mért távolságaik átlagát képviselő pontot értjük:

$$c_g = \frac{1}{n_g} \sum_{i=1}^{n_g} x_i^{(g)}$$

ahol	c_g	súlypont
	n_g	a g-edik csoport objektumainak száma
	x_i	az i objektum metrikus tulajdonsága (esetünkben vektor jellegű spektruma)

Csoportmedián annak az objektumnak a helye a térben, amely objektumnál a csoporthoz tartozó objektumok felének hosszabbak, felének pedig rövidebbek a tulajdonságtér origójától mért távolságai.

A Ward-módszer törekszik az összetartozó értékek tömör csoportosítására. A Ward-féle távolság:

$$t_{ki} = -\frac{n_s + n_i}{n_s + n_t + n_i} t_{si} + \frac{n_t + n_i}{n_s + n_t + n_i} t_{ti} - \frac{n_i}{n_s + n_t + n_i} t_{st}$$

ahol	t	egyik egyesítendő csoport jele
	s	másik egyesítendő csoport jele
	k	egyesített csoport jele
	n_s, n_t	egyik, illetve másik csoport objektumainak száma
	t_{si}	s csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolságmátrix s,i eleme)
	t_{ti}	t csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolságmátrix t,i eleme)
	t_{st}	s csoport távolsága valamely t objektumtól (a távolságmátrix s,t eleme)
	t_{ki}	k csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolságmátrix k,i eleme)

A hierarchikus csoportelemzés alkalmazása ott ajánlatos, ahol követelmény a csoportosítás képi megjelenítése és nem túl nagy az objektumok száma.

A nem hierarchikus csoportosító eljárások egy lépésben törekednek arra, hogy a hasonló objektumokból csoportokat képezzenek. Többféle szempont alapján lehet csoportosítani: például az objektumok minél nagyobb számban lépjenek fel súlypontjuk körül vagy legyen egy-egy objektum minél több azonos csoportbeli társával szomszédos. [19]

2.7.2. Főkomponens-elemzés (PCA)

A főkomponens-elemzés (*Principal Component Analysis*, PCA) egy úgynevezett adatszerkezet-elemző módszer, mely segítségével a minták közötti változékonyságot vizsgálhatjuk. A kiindulási spektroszkópiai adatmátrix korrelált változói (oszlopai) közötti összefüggések vizsgálatának megkönnyítésére az eredeti változókat a főkomponens-elemzés egy olyan transzformációnak veti alá, amely új, korrelálatlan változókat eredményez. Ezek az új változók a főkomponensek, melyek az eredeti változók lineáris kombinációi, és úgy vannak sorba rendezve, hogy elől állnak azok, melyek az eredeti változók együttes varianciájának (tehát az eredeti adatsereg összes elemére számított szórásnégyzetnek) legnagyobb részéért felelősek. [18]

A főkomponens-elemzés képes egy sokváltozós adatmátrixot átalakítani egy kisebb mátrixszá, anélkül, hogy lényeges információk vesznének el. Lineáris műveletekkel egy új koordináta rendszert hoz létre, melynek tengelyei (főkomponensek) merőlegesek egymásra, s melyek közül az első a legnagyobb varianciát tartalmazó irányban áll.

A főkomponenseket tehát a maximum variancia kritériuma alapján határozzuk meg, és minden főkomponens annak a varianciának a legnagyobb részét írja le, amelyet nem magyaráznak meg az előző főkomponensek. Annyi számú főkomponenst számítunk ki, amennyi szükséges ahhoz, hogy a teljes variancia előre meghatározott százalékát megmagyarázza. A főkomponenseket úgy tekinthetjük, mint egy új koordináta-rendszer tengelyeit, értékeiket pedig az eredeti adathalmazban lévő oszlopvektor elemeinek vetítéseit ezekre a tengelyekre. [19]

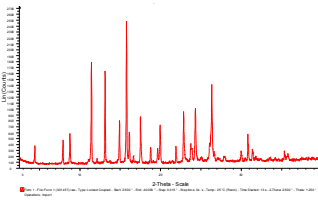
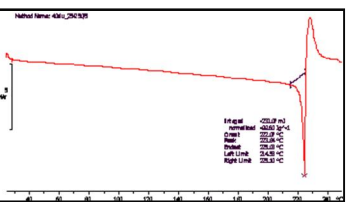
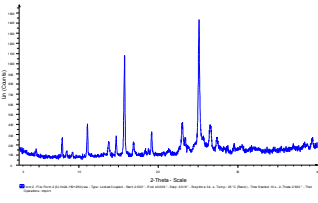
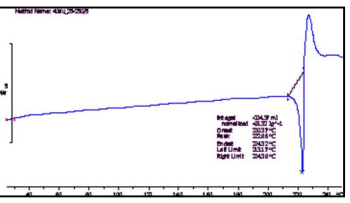
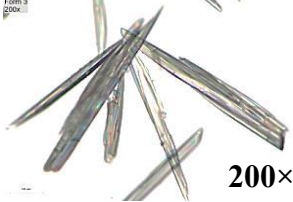
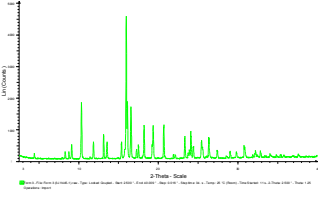
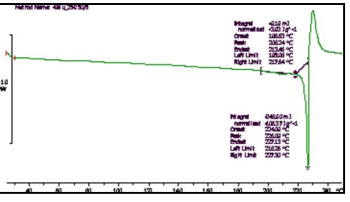
A főkomponens-együttható ábrából a tulajdonságváltozók hasonlóságaira, korrelációira lehet következtetni. Ha a korrelációs mátrixot elemezzük, akkor a főkomponens-együtthatók közvetlenül a korrelációs koefficienseket adják meg. A tulajdonságváltozók korrelációját a főkomponens-együttható vektorok által bezárt szög koszinusza adja, tehát minél kisebb a szög, annál nagyobb a tulajdonságok közötti korreláció. A nem korrelált tulajdonságok ortogonálisak. [18]

A PCA láthatóvá teszi a minták közötti hasonlóságokat és eltéréseket. A módszer legfőbb előnye, hogy nem igényel előzetes információt a mintákról vagy változókról, valamint képes a lehető legkevesebb változóval reprezentálni a teljes adatstruktúrát. A hátránya, hogy nehéz feltárni a főkomponensek fizikai, kémiai, gazdasági tartalmát, jelentését.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Modellvegyület

Vizsgálataim egy gyógyszerjelölt molekula három polimorf módosulatán (Forma 1, Forma 2 és Forma 3) végeztem. Szilárd fázisú jellemzésük mikroszkópos, röntgendiffrakciós és termoanalitikai módszerekkel történt (3. táblázat).

	Mikroszkópos megjelenés	XRPD	DSC
Forma 1			
Forma 2			
Forma 3			

3. táblázat: A három módosulat mikroszkópos megjelenése, röntgendiffraktogramja és DSC görbéje

Spontán kristályosodás során Forma 1 módosulat keletkezik. Forma 2 módosulat Forma 1-ből, 190°C-on történő hevítéssel keletkezik, ez a módosulat rendelkezik a legkisebb szemcsemérettel. Forma 3 módosulat beoltásos kristályosítási eljárással állítható elő. Forma 1 és Forma 3 polimorf módosulatok egymással termodinamikailag enantiotróp viszonyban állnak.

3.2. Műszerek, berendezések

A Raman-spektrumok off-line felvétele a SENTERRA (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Németország) diszperziós elven működő Raman-mikroszkóppal történt (6. ábra), a készüléket vezérlő OPUS 6.5 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Németország) szoftver segítségével. A készülék jellemzőit a 4. táblázat foglalja össze.



6. ábra: Bruker SENTERRA diszperzív Raman-mikroszkóp

Gerjesztő lézer	Nd-YAG (532 nm)						Dióda (785 nm)					
Gerjesztőlézer teljesítménye (mW)	0	0,2	2	5	10	20	0	3	30	75	150	300
Spektrumtartomány (cm ⁻¹)	3700-60						3500-80					
Szoftveresen választható rész-tartományok	a	1555-60 cm ⁻¹					1520-80 cm ⁻¹					
	d	1740-280 cm ⁻¹					1810-440 cm ⁻¹					
	b	2760-1545 cm ⁻¹					2635-1515 cm ⁻¹					
	c	3700-2710 cm ⁻¹					3500-2630 cm ⁻¹					
	ab	1555-60 cm ⁻¹ , 2760-1545 cm ⁻¹					1520-80 cm ⁻¹ , 2635-1515 cm ⁻¹					
	ac	1555-60 cm ⁻¹ , 3700-2710 cm ⁻¹					1520-80 cm ⁻¹ , 3500-2630 cm ⁻¹					
	bc	2760-1545 cm ⁻¹ , 3700-2710 cm ⁻¹					2635-1515 cm ⁻¹ , 3500-2630 cm ⁻¹					
	abc	3700-2710 cm ⁻¹ , 2760-1545 cm ⁻¹ , 1555-60 cm ⁻¹					3500-2630 cm ⁻¹ , 2635-1515 cm ⁻¹ , 1520-80 cm ⁻¹					
Felbontás	3-5 cm ⁻¹ vagy 9-15 cm ⁻¹											
Mikroszkóp objektív	10×, 20×, 50×, 100×											
Apertúra	25μm, 25 × 1000 μm, 50 μm, 50 × 1000 μm, 2 mm											
Detektor	CCD											
Besugárzási idő	Szabadon megválasztható											
Akkumulációk száma	Szabadon megválasztható											

4. táblázat: A Raman-mikroszkóp jellemzői

Az infravörös spektrumok off-line felvétele a PerkinElmer Spectrum 400 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) Fourier-transzformációs elven működő infravörös spektrométeren, reflexiós üzemmódban készültek (7. ábra), a készüléket vezérlő Spectrum 6.3.2 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) szoftver segítségével. A készülék méréshez használt konfigurációjának jellemzőit az 5. táblázat foglalja össze.

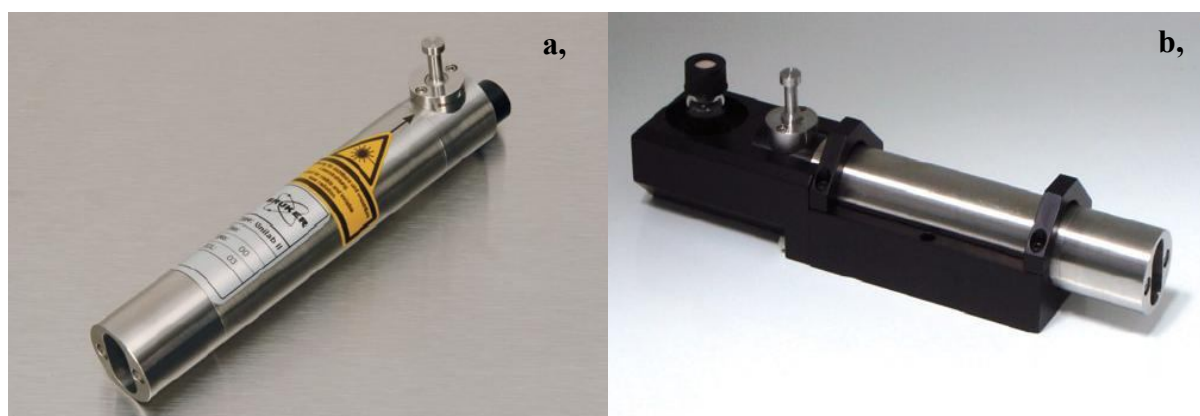


7. ábra: PerkinElmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR készülék UATR mintakezelő egységgel

Mintakezelő egység és kiegészítői	Universal ATR Sampling Accessory (UATR) Single Bounce Flat Top Plate ($l=2\ \mu\text{m}$) Composite Diamond/ZnSe Crystal
Mintatartó	Conical Pressure Attachment
Méréstechnika	Fourier-transzformációs
Működési mód	Reflexiós
Hullámhossz-választó elem	Michelson-interferométer
Fényforrás	közép és távoli IR tartományban sugárzó, hosszú életű fényforrás
Referencia	levegő
Mérési hullámhossz-tartomány	$4000\text{-}600\ \text{cm}^{-1}$
Detektor	triglicin-szulfát (TGS)
Lépésköz	$1\ \text{cm}^{-1}$
Spektrum adatpontjainak száma	3401
Alminták száma	3
Akkumulációk száma	4

5. táblázat: Az FT-IR készülék mérési paraméterei

A száloptikán keresztül végzett in-line kísérletek Bruker Unilab II (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Németország) szondával (**8. ábra**) készültek, mely az úgynevezett „merülő” szondák osztályába sorolható. A gyűjtőlencsék a kémiai ellenálló ablak mögött találhatók, így ez az elrendezés lehetővé teszi az eszköz és a minta közvetlen érintkezését. A Raman szonda 785 nm-es dióda lézerrel működik. Az eszköz mintatartó foglalathoz csatlakoztatható, így lehetőség van különböző mintatartó edényekben (küveták, üvegcsék) lévő anyagok, illetve tabletták közvetlen mérésére is.



8. ábra: Raman-szonda (a,) és a hozzá csatlakoztatható mintatartó foglalat (b,)

3.3. Eredmények értékelése

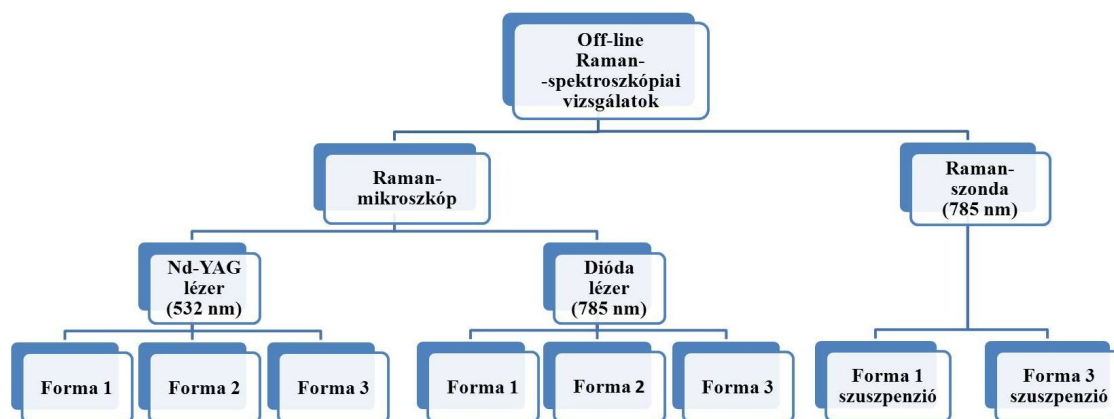
Az eredmények értékelése kemometriai elemzéssel történt az OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Németország), a Spectrum 10.00 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA), az Unscrambler 10.1 (CAMO Software AS., Oslo, Norvégia) és a Statistica 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverek segítségével.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES

4.1. Polimorf módosulatok minőségi vizsgálata off-line Raman-spektroszkópiával

A Raman-spektroszkópia elterjedten használt módszer polimorfia vizsgálatokban. Az analízis történhet mikroszkóppal, ekkor a tárgylemezre helyezett kristályok egyedi besugárzásával történik a spektrumfelvétel. Mélységi analízis során az x - és y -irányú pásztázáson túl z -irányú (mélységi) vizsgálatokat is végezhetünk. Leginkább tabletták vizsgálatára alkalmazzák ezt a módszert. Továbbá lehetőség van száloptikával történő spektrumfelvételekre is, mely lehetővé teszi a kísérlet során végbemenő folyamatok nyomon követését, de a szondához csatlakoztatható mintatartó eszköz segítségével tabletták, küvetákban lévő minták, oldatok is vizsgálhatók.

Az off-line Raman-spektroszkópiával végzett vizsgálataimat a **9. ábra** foglalja össze.



9. ábra: Szilárd fázisú Raman-spektroszkópiai vizsgálataim sémája

4.1.1. Raman-mikroszkóppal történő vizsgálatok

4.1.1.1. A Raman-mikroszkóp mérési paramétereinek optimalizálása

Az adott minta fluoreszcens tulajdonságaitól függ, milyen hullámhosszú lézer a legalkalmasabb az anyag gerjesztésére. A gerjesztő lézer és a minta kölcsönhatásának függvényében szükség van a lézer teljesítményének, valamint a besugárzás idejének optimalizálására. A mérési paraméterek optimalizálásakor előfordulhat, hogy túl nagy

lézerteljesítmény és/vagy túl hosszú besugárzási idő mellett a minta roncsolódhat, „megégphet”.

Mint ahogy az előzőekben említettem, a fluoreszcens sugárzás 10^{16} -szor nagyobb intenzitással jelentkezik, mint a Raman-szórás. Bár a készülék jellemzői között kiemelik, hogy automatikus fluoreszcencia-gátlás (*Automatic Fluorescence Rejection*, AFR), a berendezés egyik fő erénye, sajnos a jelenség mégsem küszöbölhető ki teljes mértékben. A kisebb energiájú dióda lézerrel történő besugárzás során a fluoreszcens hatás csökken, viszont mivel a Raman-sávok intenzitása a gerjesztő frekvencia negyedik hatványával arányos, ezért fluoreszcencia-csökkenést így módon csak intenzitáscsökkenés mellett érhetünk el.

A készülék beállításának optimalizálását a **4. táblázat**ban felsorolt paraméterek változtatásával, a további vizsgálatokat pedig a **6. és 7. táblázat**ban található optimalizált paraméterek beállításával végeztem.

Gerjesztő lézer	Nd-YAG (532 nm)
Lézerteljesítmény	2 mW
Spektrumtartomány	abc (3700-2710 cm^{-1} , 2760-1545 cm^{-1} , 1555-60 cm^{-1})
Felbontás	3-5 cm^{-1}
Besugárzási idő	3 s
Akkumulációk száma	6
Mikroszkóp objektív	50×
Apertúra	50×1000 μm

6. táblázat: Mérési paraméterek az Nd-YAG lézerrel történő gerjesztéskor

Gerjesztő lézer	Dióda (785 nm)
Lézerteljesítmény	3 mW
Spektrumtartomány	abc (3500-2630 cm^{-1} , 2635-1515 cm^{-1} , 1520-80 cm^{-1})
Felbontás	3-5 cm^{-1}
Besugárzási idő	3 s
Akkumulációk száma	6
Mikroszkóp objektív	50×
Apertúra	50×1000 μm

7. táblázat: Mérési paraméterek a dióda lézerrel történő gerjesztéskor

A lézerteljesítmény megválasztásakor – különösen a kisebb hullámhosszú, így nagyobb energiájú Nd-YAG lézer esetén – a fő szempont az volt, hogy információgazdag spektrumokat nyerjünk, miközben a fluoreszcenciát minél inkább elkerüljük.

A spektrumtartományt ismeretlen minta esetén célszerű minél szélesebbre választani, hiszen nem tudhatjuk előre, hogy hol várhatóak informatív sávok.

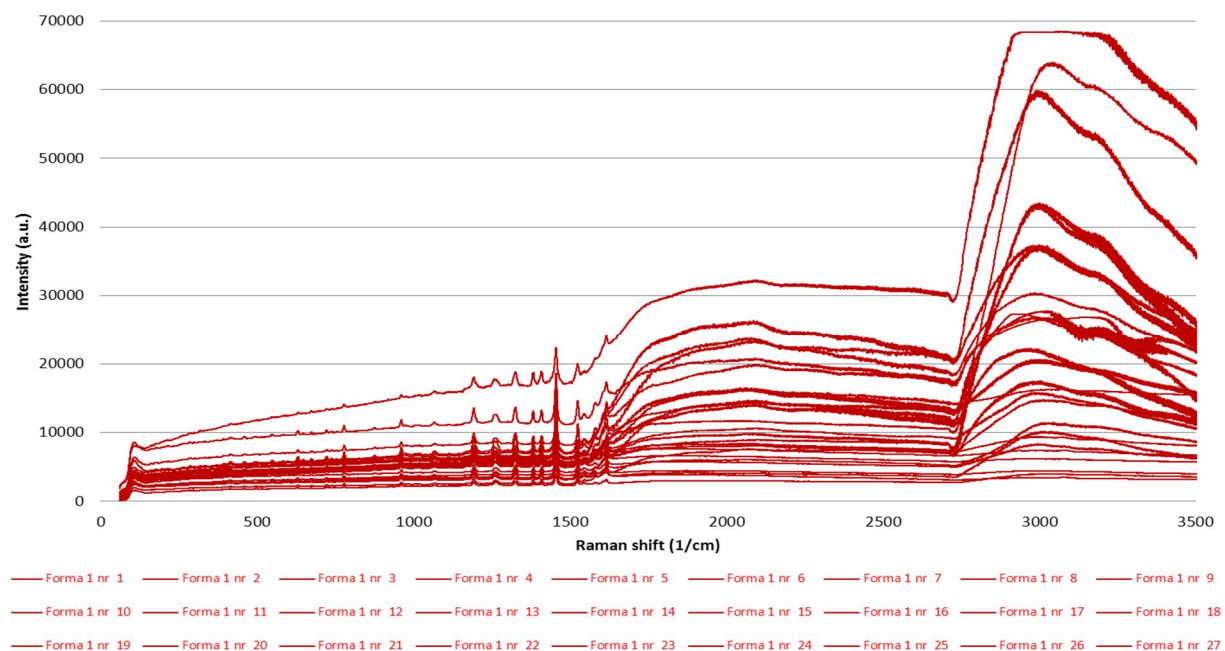
Az akkumuláció számának növelése a jel/zaj arányt hivatott javítani, azonban bizonyos határon túl növelése a mérési idő túlzott növekedését eredményezi, míg a jel/zaj arány már nem nő látványosan. Az akkumulációk számát minimum kettőre érdemes beállítani, mert csak egynél több pásztázás esetén képes a szűrő a kozmikus sugárzást kiszűrni. Erős Raman-szórást produkáló minták esetén fennáll az esélye, hogy a CCD detektor feltöltődik fotonokkal, amennyiben az expozíció ideje túl hosszú. Tehát erős Raman-szórást produkáló minták esetén több rövid akkumuláció, míg gyenge Raman-szórást adó minták esetén kevesebb hosszú letapogatást célszerű alkalmazni.

A különböző módosulatok spektumsorozatainak felvételekor minden spektrumot a tárgylemezen található kristályok más-más részéről vettem fel, mert ugyan növelte a mérési időt az újabb beállítás, fókuszálás, de ugyanazon kristály egymás utáni többszöri gerjesztése az alapvonal jelentős mértékű eltolódását és a fluoreszcencia növekedését eredményezte.

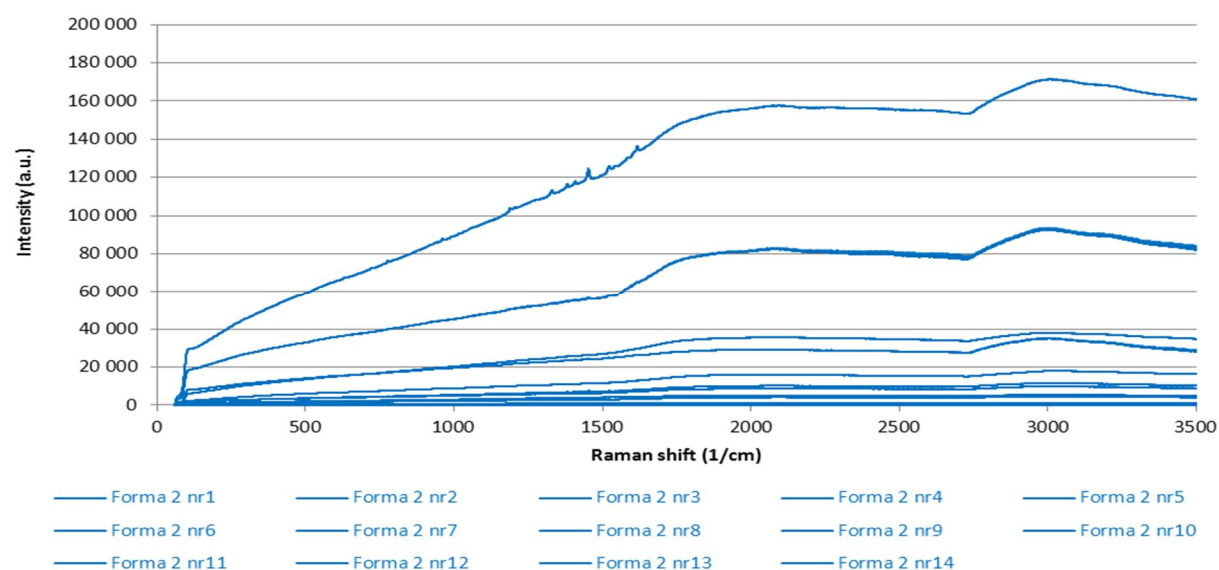
A mikroszkóphoz választott objektívet mindig az adott kristályforma mérete határozza meg.

4.1.1.2. Polimorf módosulatok Nd-YAG lézerrel történő gerjesztése

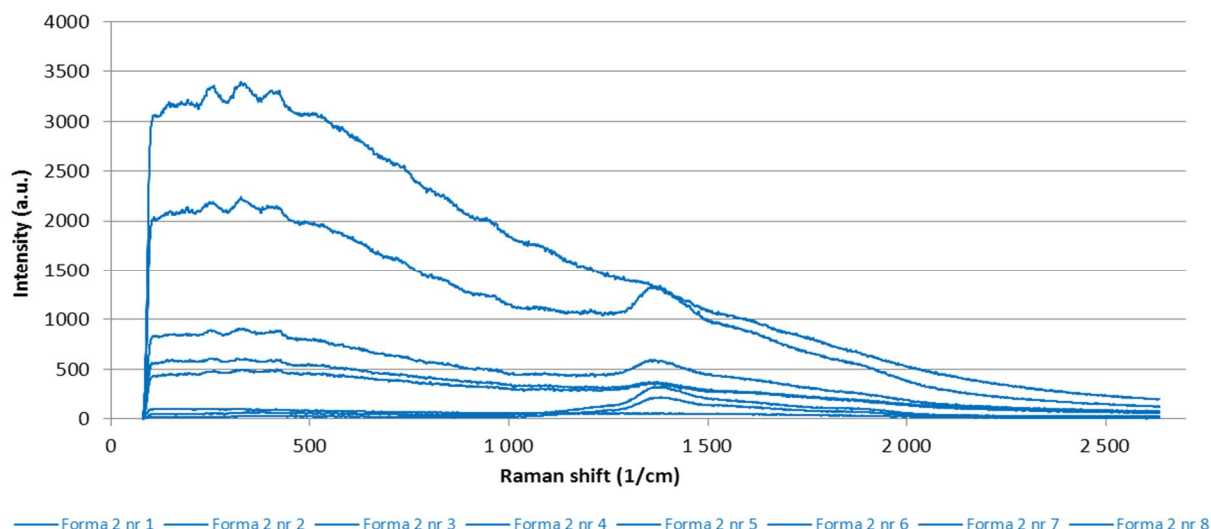
A három polimorf módosulatról a mérési paraméterek optimalizálásával kapott műszeres beállításokkal spektrumsorozatot vettem fel. A mikroszkópos tárgylemezre felvitt minták különböző kristályairól készítettem felvételeket, Forma 1 és Forma 3 módosulatok esetében 50× nagyítású objektív használatával, míg Forma 2 módosulat kis szemcséihez 100× nagyításra kellett váltanom. A polimorf módosulatok spektrumait a 10, 11., 12. és 13. ábrák mutatják be.



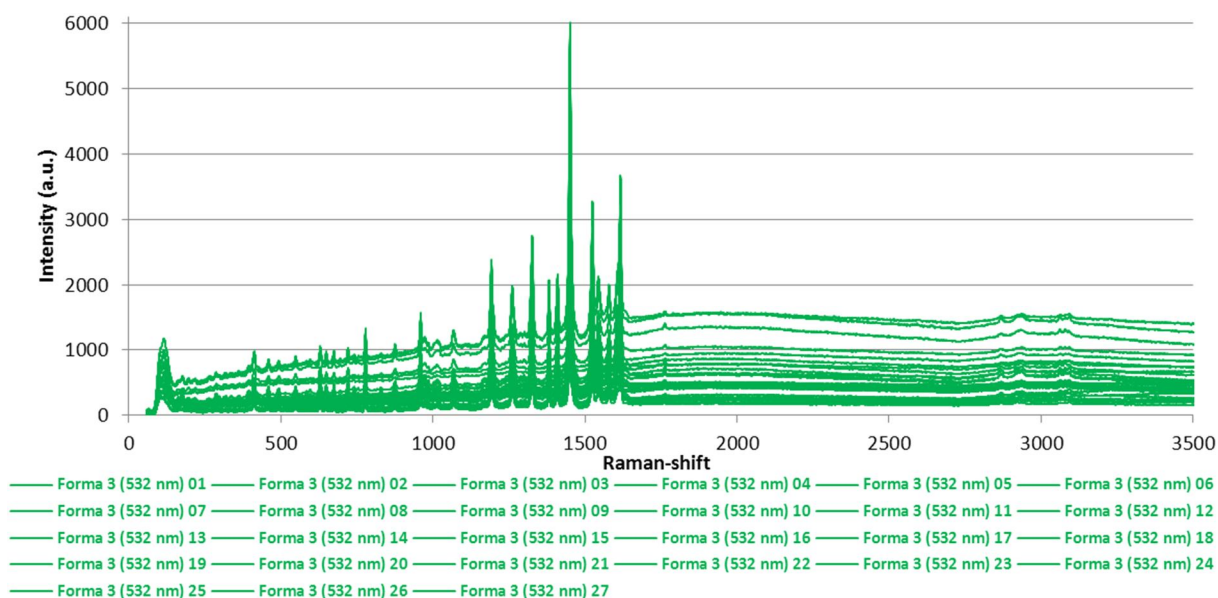
10. ábra: Forma 1 módosulat Nd-YAG lézerrel 532 nm-en gerjesztett spektrumai



11. ábra: Forma 2 módosulat Nd-YAG lézerrel 532 nm-en gerjesztett, fluoreszcens spektrumai



12. ábra: Forma 2 módosulat dióda lézerrel 785 nm-en gerjesztett, fluoreszcens spektrumai



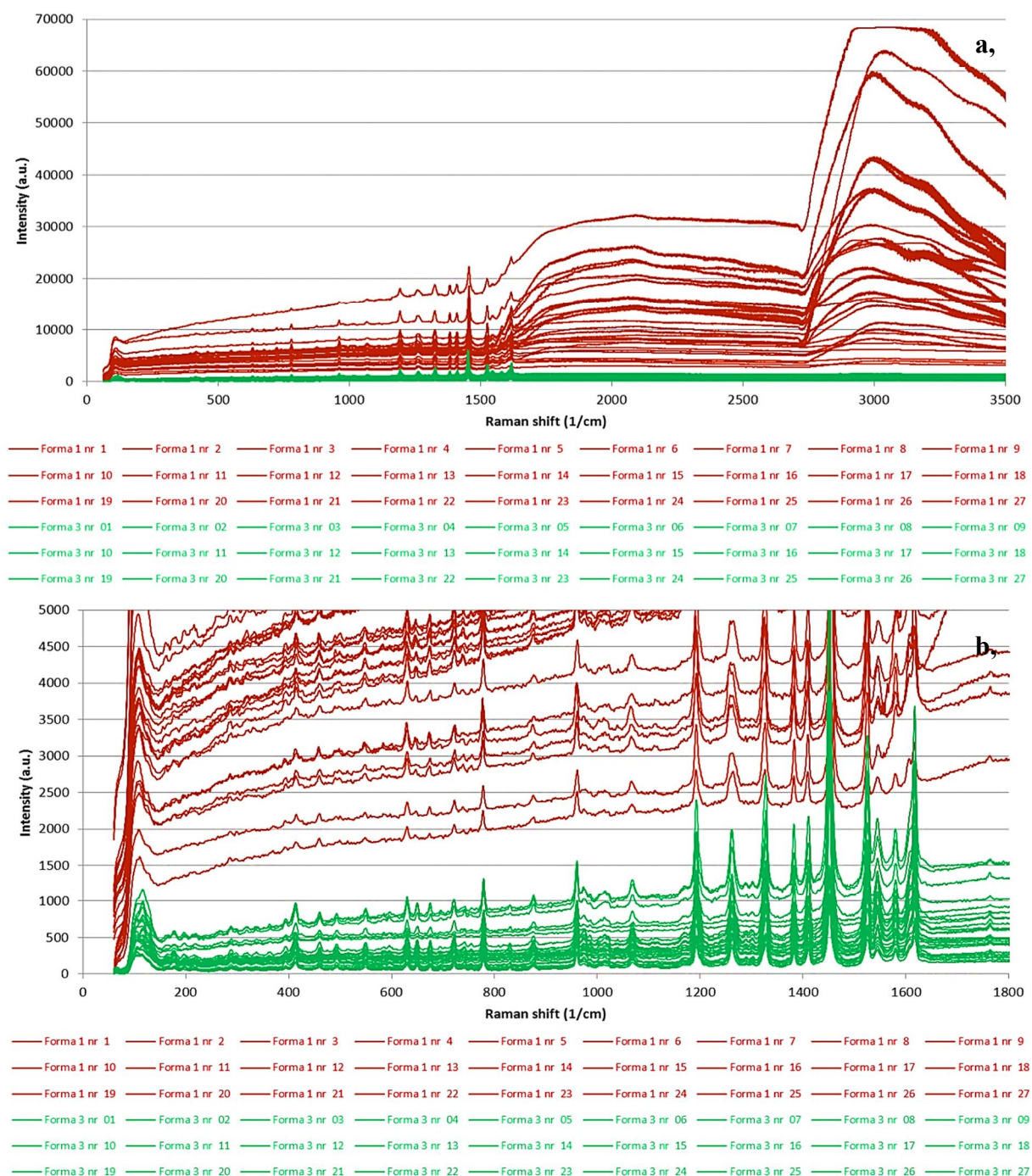
13. ábra: Forma 3 módosulat Nd-YAG lézerrel 532 nm-en gerjesztett spektrumai

Irodalmi adatok alátámasztják, hogy a Raman-sávok intenzitása fordítottan arányos a vizsgált kristály méretével. [4, 20, 21, 22] Erre szuperponálódik, hogy Forma 2 módosulat magas hőmérsékletű hevítéssel keletkezik, a két tényező együttes hatása pedig azt eredményezi, hogy a módosulat Raman-mikroszkóppal vizsgálva nem ad értékelhető spektrumot. Még a paraméterek legalkalmasabb beállításával (785 nm-es lézerrel történő gerjesztés a lehető legkisebb, 3 mW-os lézerteljesítménnyel, több, rövid letapogatással vizsgálva [vö.: 4.1.1.1. fejezet]) is rendkívül fluoreszcens spektrumot kaptam (11., 12. ábra).

Ezért a továbbiakban a Raman-mikroszkóppal és Raman-szondával végzett kísérletek során csupán Forma 1 és Forma 3 módosulatokat vizsgáltam.

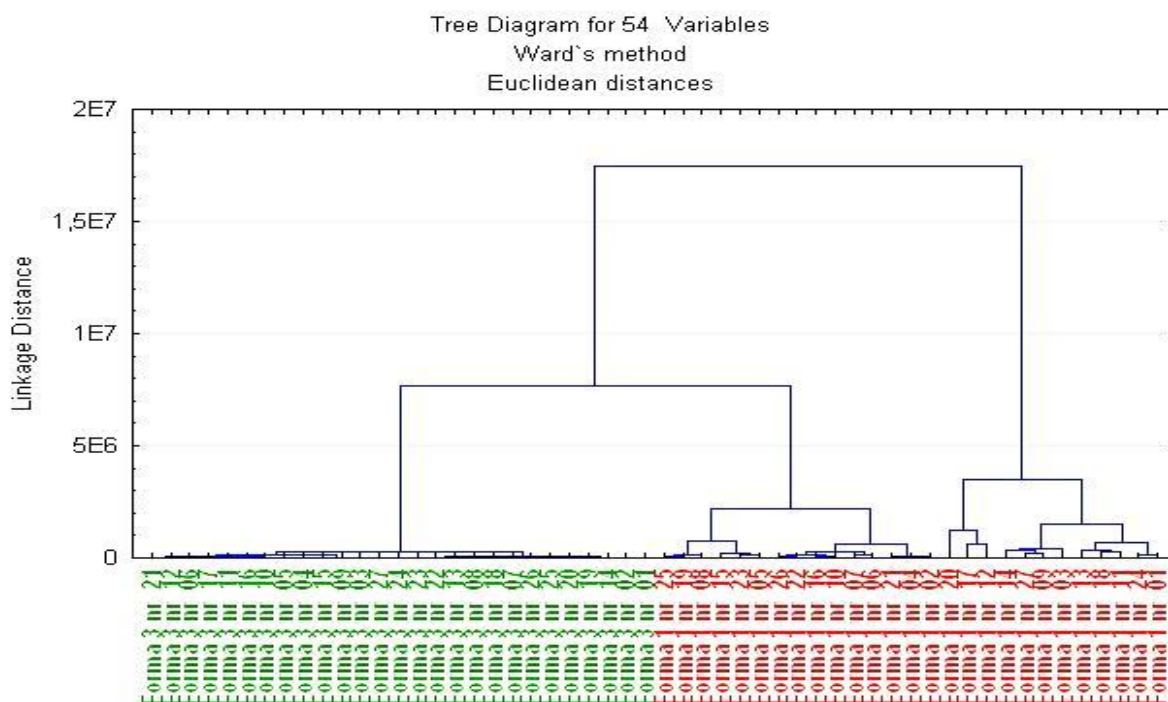
4.1.1.3. Polimorf módosulatok Nd-YAG lézerrel gerjesztett Raman-spektrumainak összevetése

Az Nd-YAG lézer hullámhosszán Forma 1 módosulat spektrumaiban nagymértékű fluoreszcencia mutatkozik (**10. ábra**). Forma 1 és Forma 3 módosulat spektrumait összevetve (**14. ábra**) jól látható az intenzitásbeli, valamint a fluoreszcens hatásból eredő különbség is.



**14. ábra: Forma 1 és Forma 3 módosulatok Nd-YAG lézerrel, 532 nm-en gerjesztett spektrumai
a, teljes spektrumtartomány
b, kinagyított részlet**

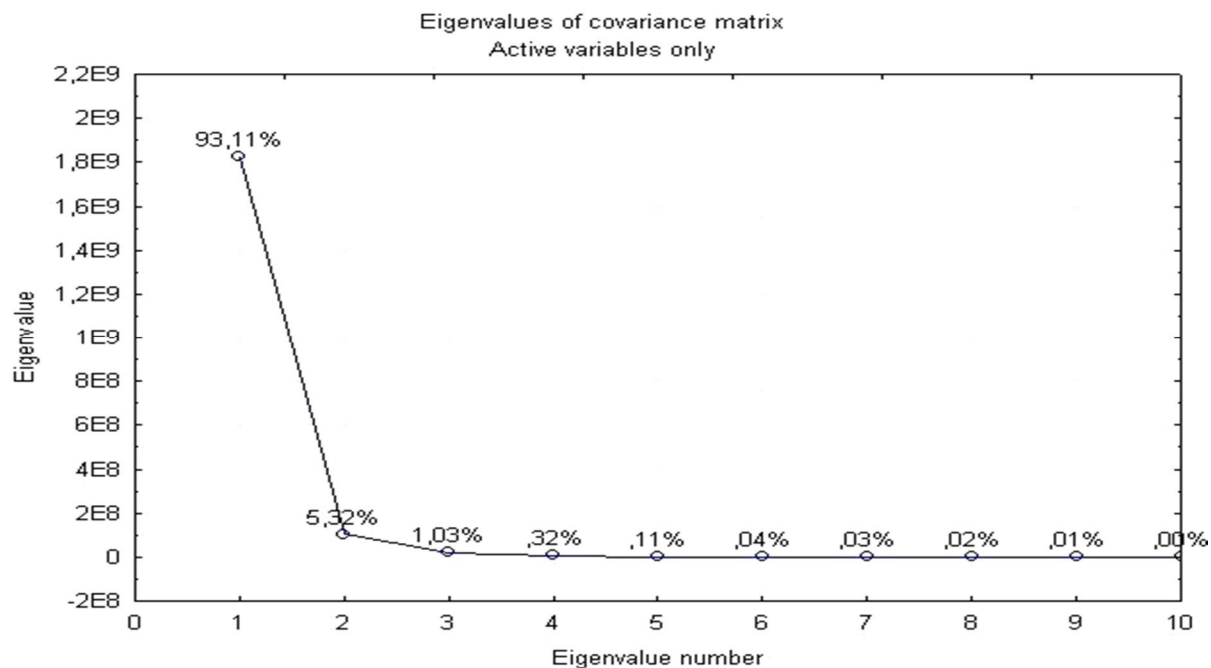
A két módosulat spektrumai között nagymértékű alapvonal-eltolódás látható (14. ábra b.). A kapott spektrumokat csoportanalízisnek vettem alá a Ward-módszer alkalmazásával (15. ábra).



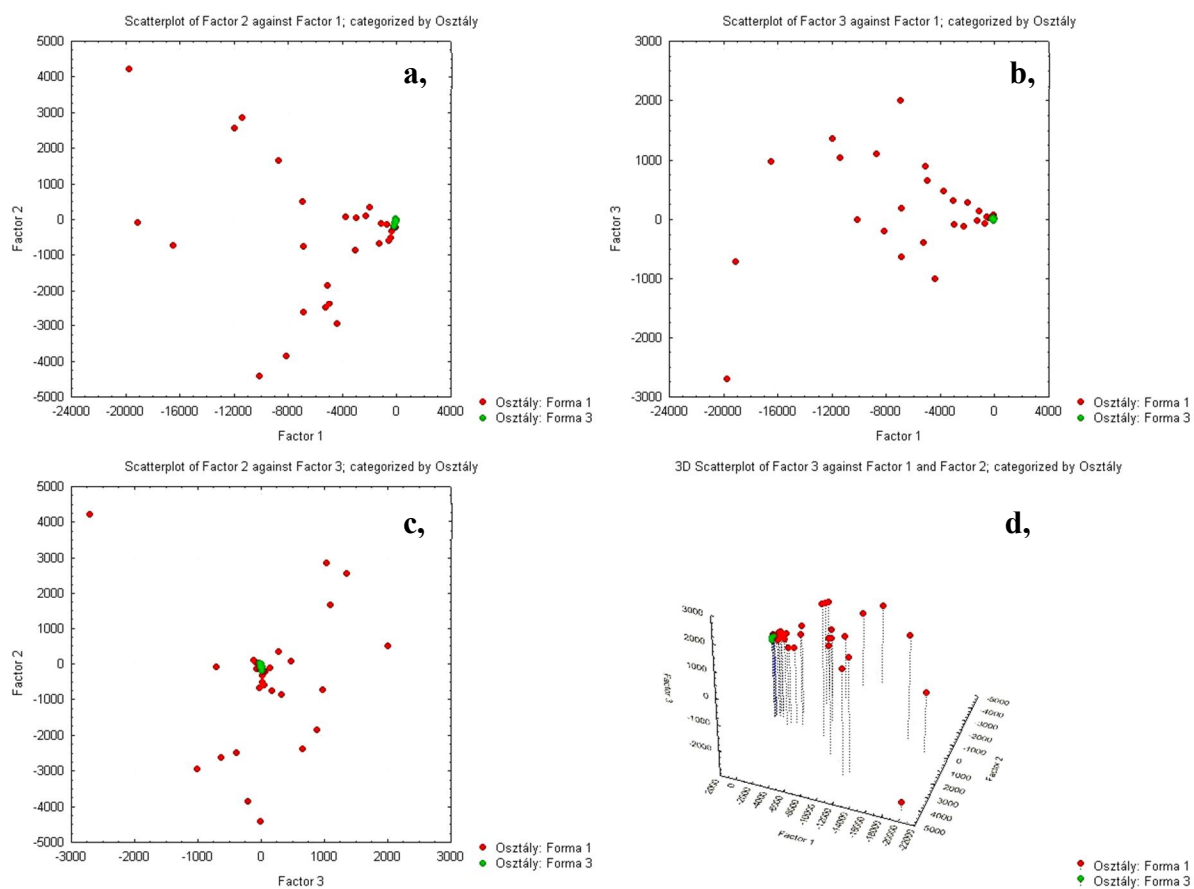
15. ábra: Forma 1 és Forma 3 Nd-YAG lézerrel, 532 nm-en gerjesztett spektrumainak dendrogramja

A csoportanalízis nem különíti el az egyes spektrumokat a módosulatoknak megfelelően (azaz két fő ágra a formák tekintetében), annak ellenére, hogy közöttük jól definiált, alapvonal-eltolódás miatti különbség tapasztalható. Viszont jól látszik a dendrogramon, hogy Forma 1 módosulat spektrumai már nagy változékonysági szinten elkülönülnek egymástól, míg Forma 3 módosulat spektrumai csak alacsony változékonysági szinten. A változékonyság okainak felderítése érdekében főkomponens-elemzést végeztem a spektrumokon.

A két módosulat spektrumairól készített hegyomlás diagram az egyes főkomponensek teljes változékonyságból leírt részesedését ábrázolja (16. ábra). Látható, hogy az első főkomponens a teljes változékonyság 93,11 %-áért felelős, a második főkomponens 5,32 %-ot, a harmadik főkomponens pedig 1,03 %-ot ír le. Mivel az első három főkomponens a teljes változékonyság 99,46 %-át leírja, ezért a velük kapott *score* értékeket mutatom be.

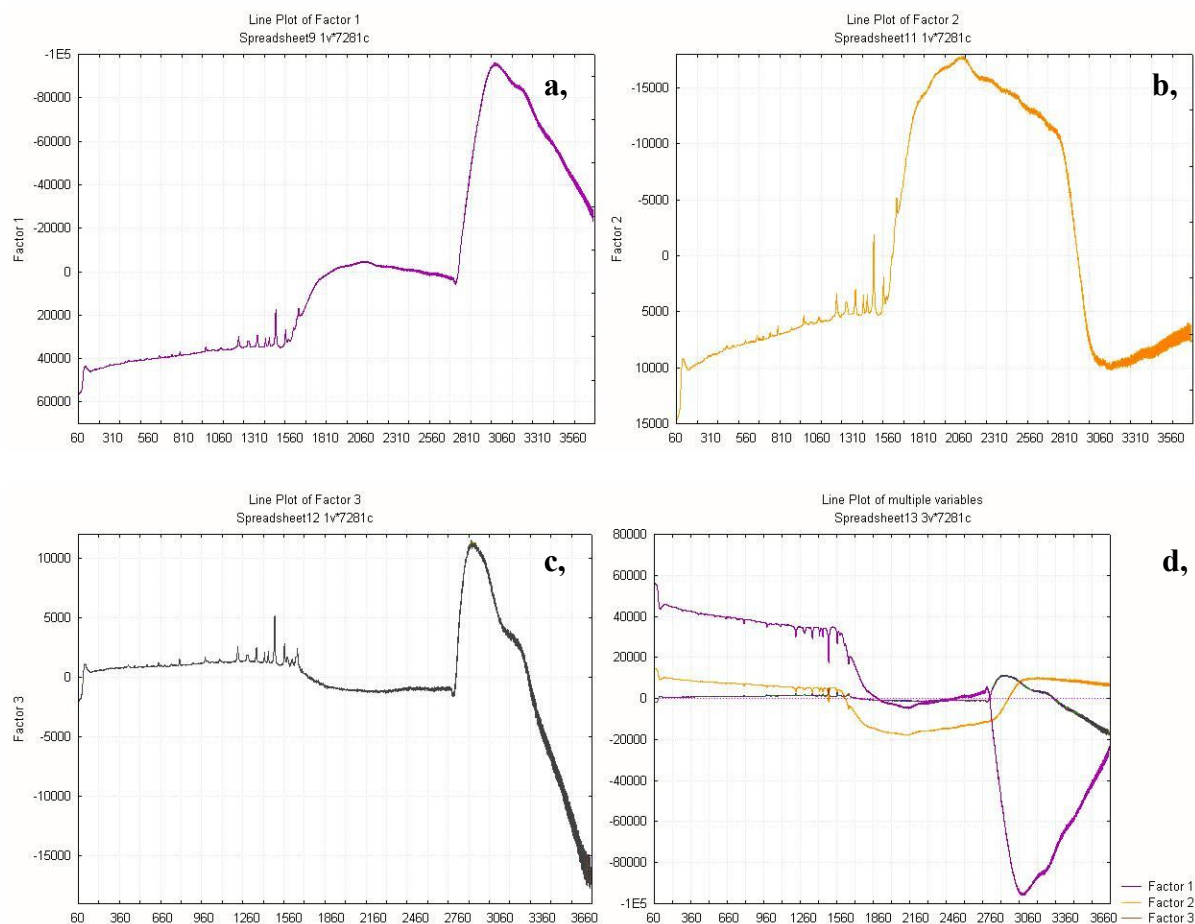


16. ábra: Forma 1 és Forma 3 módosulat Nd-YAG lézerrel gerjesztett spektrumainak PCA hegyomlás diagramja



17. ábra: a, PC1 vs PC2 score értékek
b, PC1 vs PC3 score értékek
c, PC2 vs PC3 score értékek
d, PC1 vs PC2 vs PC3 score értékek

Mind a kétdimenziós ábrázolásmódok (17. ábra a, b, c), mind pedig a háromdimenziós ábra (17. ábra d,) jól szemléltetik, hogy Forma 1 módosulat spektrumainak változékonysága mellett Forma 3 módosulat spektrumai közötti differencia elhanyagolható. Forma 1 módosulat spektrumában jelentkező eltérések felderítése érdekében a főkomponensek súlyfüggvényeit vizsgáltam (18. ábra).

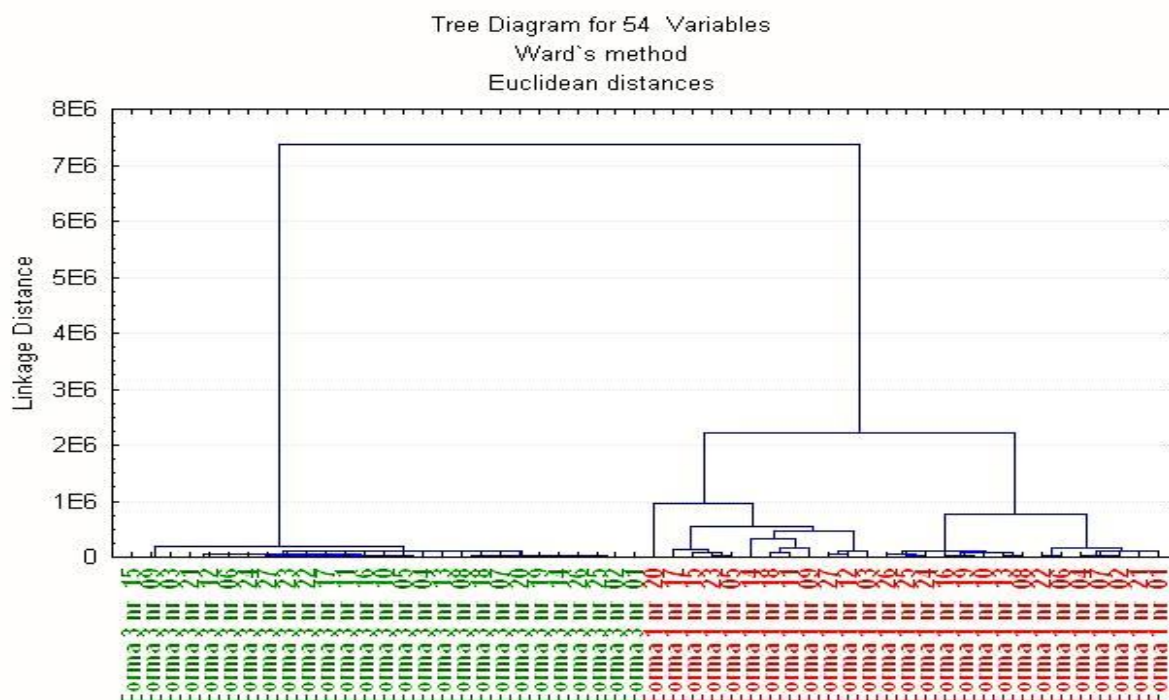


18. ábra: a, PC1 súlyfüggvénye
b, PC2 súlyfüggvénye
c, PC3 súlyfüggvénye
d, PCA első három súlyfüggvénye

Az első főkomponens súlyfüggvénye (18. ábra a,) a legnagyobb értékeket 2700-3700 cm⁻¹ hullámszám-tartományban veszi fel. Ez a főkomponens a teljes változékonyság 93,11 %-át írja le. Ez azt bizonyítja, hogy a spektrumok között fellépő eltérések döntő többségéért az ebben a hullámszám-tartományban található fluoreszcens rész felelős. A második főkomponens súlyfüggvénye esetén (18. ábra b,) a legnagyobb értékkel rendelkező tartomány az 1700-2700 cm⁻¹ hullámszám-tartományhoz rendelhető fluoreszcens görbét takarja. A harmadik főkomponens pedig a fluoreszcens görbe lecsengésében mutatkozó változékonyságot írja le (18. ábra c.). A fluoreszcens hatás révén fellépő eltérések az

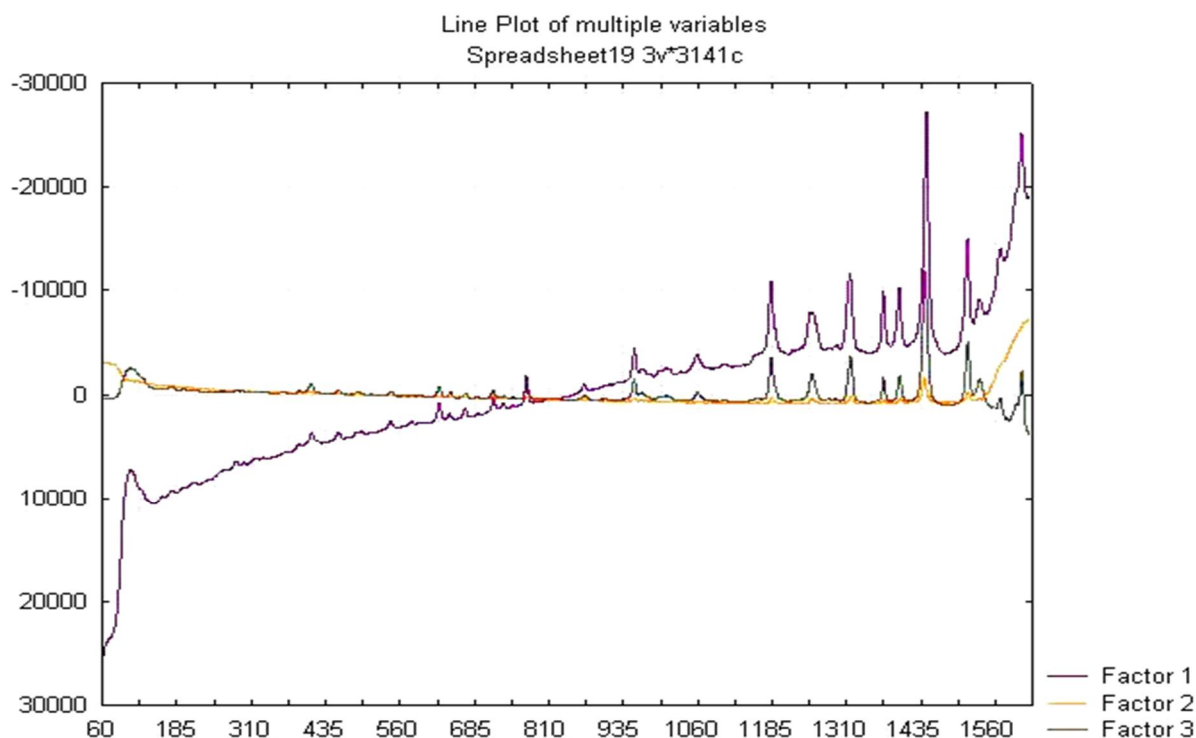
informatív Raman-csúcsokhoz képest lényegesen nagyobb változékonyságot okoznak, így a csoportelemzés eredményeként kapott dendrogram sem Forma 1 és Forma 3 módosulatok közötti, rezgési sávokban mutatkozó különbségek alapján különítette el a spektrumokat. Bizonyítást nyert, hogy a spektrumok helytelen elkülönítéséért a fluoreszcens hatás dominanciája felelős.

Ennek elkerülése érdekében a teljes spektrumtartományból csupán az információgazdag tartományokat vettem össze. Mivel 1630 cm^{-1} után már nem látható Forma 1 módosulat spektrumaiban Raman-csúcs, a spektrumokat eddig a Raman-eltolódásig hasonlítottam össze. Az így kapott csoportanalízis a **19. ábrán** látható.



19. ábra: Forma 1 és Forma 3 módosulat Nd-Yag lézerrel, 532 nm-en gerjesztett spektrumainak összevetése 1630 cm^{-1} Raman-eltolódásig

Látható, hogy a csoportelemzés ezúttal a módosulatoknak megfelelően különíti el az egyes spektrumokat, a dendrogram két fő ágra oszlik, mely ágak a polimorf módosulatoknak feleltethetők meg. Ellenőrizve a feltevést, mely szerint a módosulatok elkülönítése ez utóbbi esetben valóban a vibrációs állapotokban jelentkező különbségek alapján történt-e, az információgazdag spektrumtartomány főkomponenseinek súlyfüggvényeit vizsgáltam (**20. ábra**).

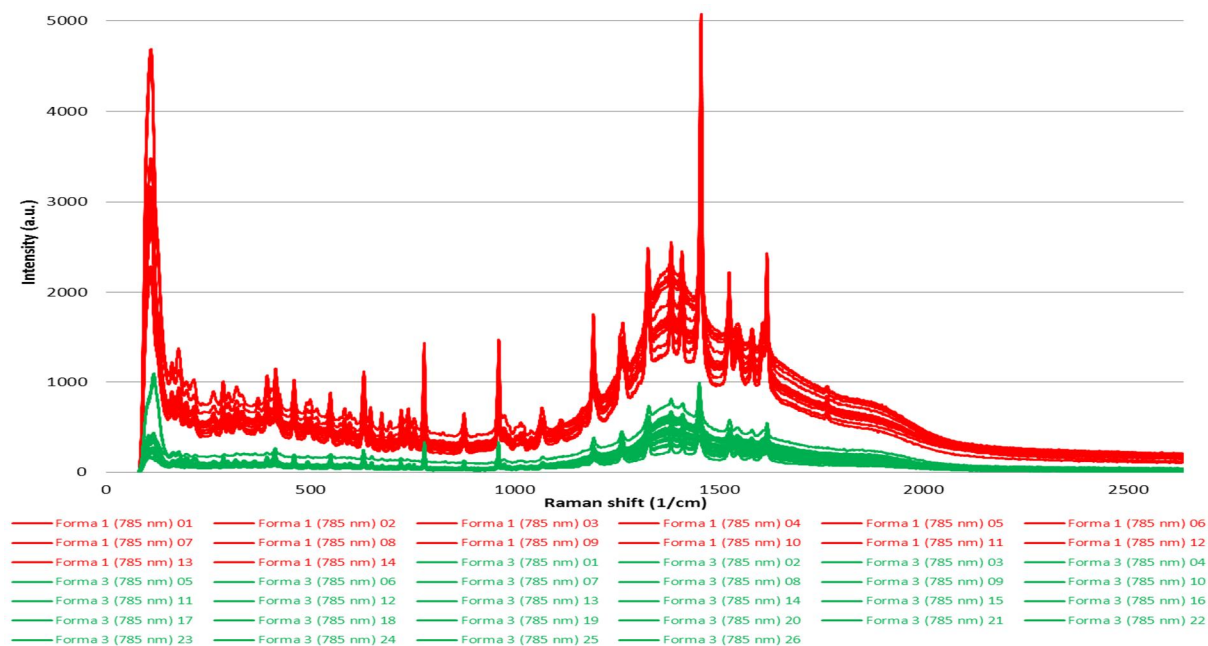


20. ábra: PCA első három súlyfüggvénye az 1630 cm^{-1} -ig tartó spektrumrészt vizsgálva

Bár az első főkomponens súlyfüggvénye esetén még jól kivehető a fluoreszcencia miatti görbület, az első három főkomponens súlyfüggvényében már a rezgési sávok dominálnak. Tehát a fluoreszcens spektrumrészletet figyelmen kívül hagyva már a polimorfíához köthető intenzitásbeli különbségek, Raman-eltolódások alapján különíti el a csoportelemzés a módosulatokat. Kijelenthető tehát, hogy matematikai módszerekkel elkülöníthetőek a polimorf módosulatok spektrumai, viszont nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a mérési mód – különösen a nagyobb energiájú, Nd-YAG lézerrel történő gerjesztés esetén – a vibrációs állapotoktól független változékonyságot okozhat.

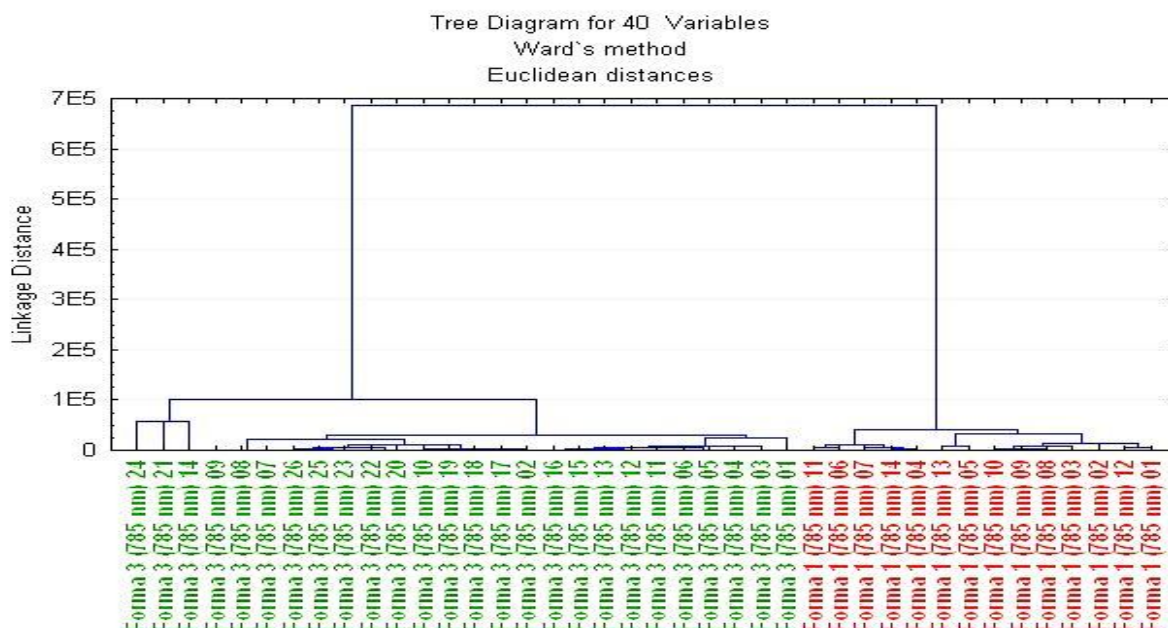
4.1.1.4. Polimorf módosulatok dióda lézerrel történő gerjesztése

A nagyobb hullámhosszú, azaz kisebb energiájú dióda gerjesztő lézer használata esetén a különböző formákról felvett párhuzamos spektrumok csak kismértékű alapvonal-eltolódást mutatnak (**21. ábra**), és a két forma spektrumai – az intenzitások alapján – jól megkülönböztethető egymástól.



21. ábra: Forma 1 és Forma 3 módosulat dióda lézerrel 785 nm-en gerjesztett spektrumai

A csoportelemzés dendogramja (**22. ábra**) valószínűleg azt az intenzitáskülönbséget tükrözi, ami a két forma Raman-spektrumának alapvonal-eltolódásából adódik.



22. ábra: Forma 1 és Forma 3 dióda lézerral 785 nm-en gerjesztett spektrumainak dendogramja

A két módosulat csoportanalízissel jól megkülönböztethető, a spektrumok két nagy ágra oszlanak, melyek megfelelnek a Forma 1 és Forma 3 módosulatokhoz rendelhető szinképeknek. Az eredmény nem meglepő, hiszen a két forma spektruma az intenzitáskülönbség alapján ránézésre is elkülönül. A módosulatok alacsonyabb változékonysági szinteken további kisebb csoportokra oszthatók, mely változékonyság a spektrumok eltérő intenzitásához rendelhető. Az intenzitáskülönbség oka nagy valószínűséggel az eltérő szemcseméretben keresendő. Az irodalomban több erre vonatkozó kutatási eredmény található, miszerint a Raman-sávok intenzitása a szemcseméret csökkenésével nő. [4, 20, 21, 22] Ha a **3. táblázat**ra visszatekintünk, láthatjuk az azonos nagyítással készült mikroszkópos képeken, hogy ez a feltevés igazolást nyert, hisz a Forma 1 kristályai apró, kb. 25-50 μm nagyságú, míg a Forma 3 kristályai kb. 500 μm méretű kristályokból állnak.

4.1.2. Polimorf módosulatok száloptikán keresztül történő vizsgálata

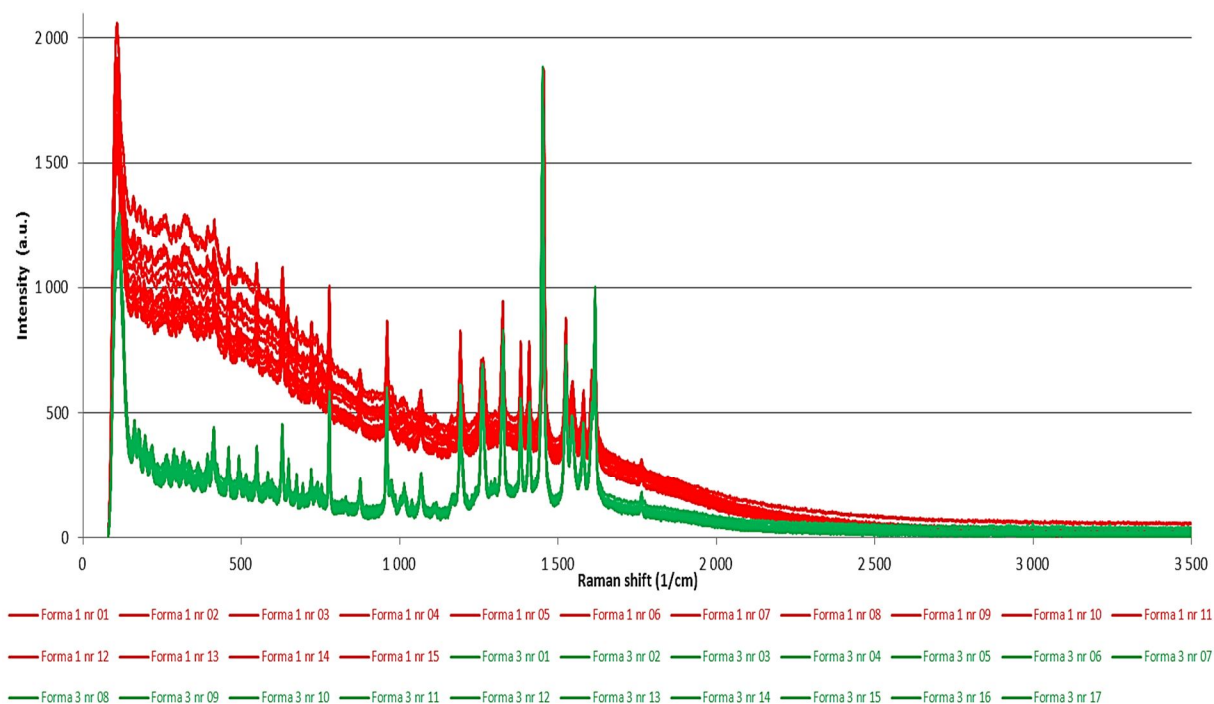
A mikroszkóppal történő mérések után a két polimorf módosulatról a mérési paraméterek optimalizálásával kapott műszeres beállításokkal (**8. táblázat**) spektrumsorozatot vettem fel száloptikán keresztül. A készülékkonstrukció alapján a Raman-szondával történő mérésekhez csak a 785 nm-en működő dióda lézer alkalmazható.

Gerjesztő lézer	785 nm
Lézerterjesztmény	3 mW
Spektrumtartomány	abc (3500-2630 cm ⁻¹ , 2635-1515 cm ⁻¹ , 1520-80 cm ⁻¹)
Besugárzási idő	3 s
Akkumulációk száma	6
Apertúra	50 × 1000 μm

8. táblázat: Mérési paraméterek a dióda lézerrel száloptikán keresztül történő gerjesztéskor

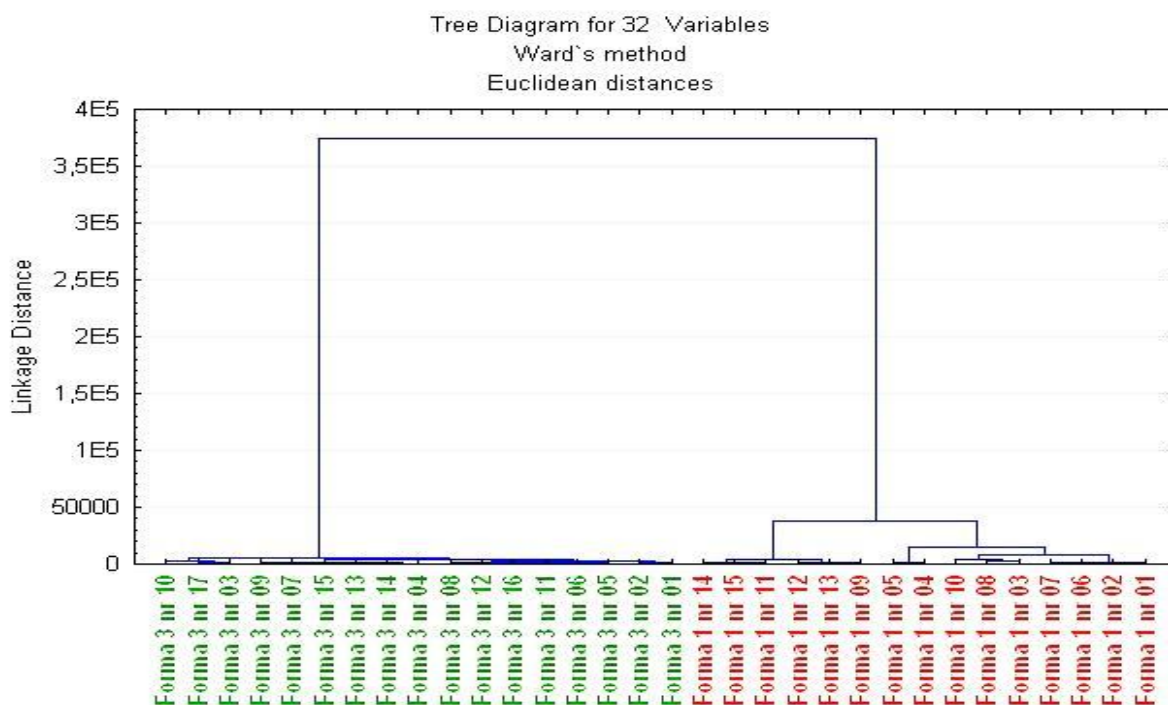
A polimorf módosulatok spektrumait a **23. ábra** mutatja be. A száloptikán keresztül felvett spektrumok esetén lényegesen kisebb az elkövethető mérési hiba valószínűsége, hiszen kiküszöböljük a különböző fókusz távolság, az eltérő méretű kristályok, illetve a kristály különböző részeinek gerjesztése által okozott bizonytalanságokat. Bár tény, hogy ezzel a módszerrel csak makroszkopikus mintát tudunk mérni, s így jóval nagyobb mintamennyiségre van szükségünk. A valódi cél – a félüzemi előállítás során történő in-line Raman-spektroszkópiai alkalmazás – megvalósítása során viszont ezzel az esetleges limitáló tényezővel nagy valószínűséggel nem kell számolnunk.

A száloptikával felvett spektrumokban a mikroszkópos mérésekhez képest (**21. ábra**) kevésbé jelentkezik a fluoreszcencia jelensége. A két forma közötti alapvető különbség a kb. 1200 cm⁻¹-ig tartó, jelentős meredekségbeli különbség.



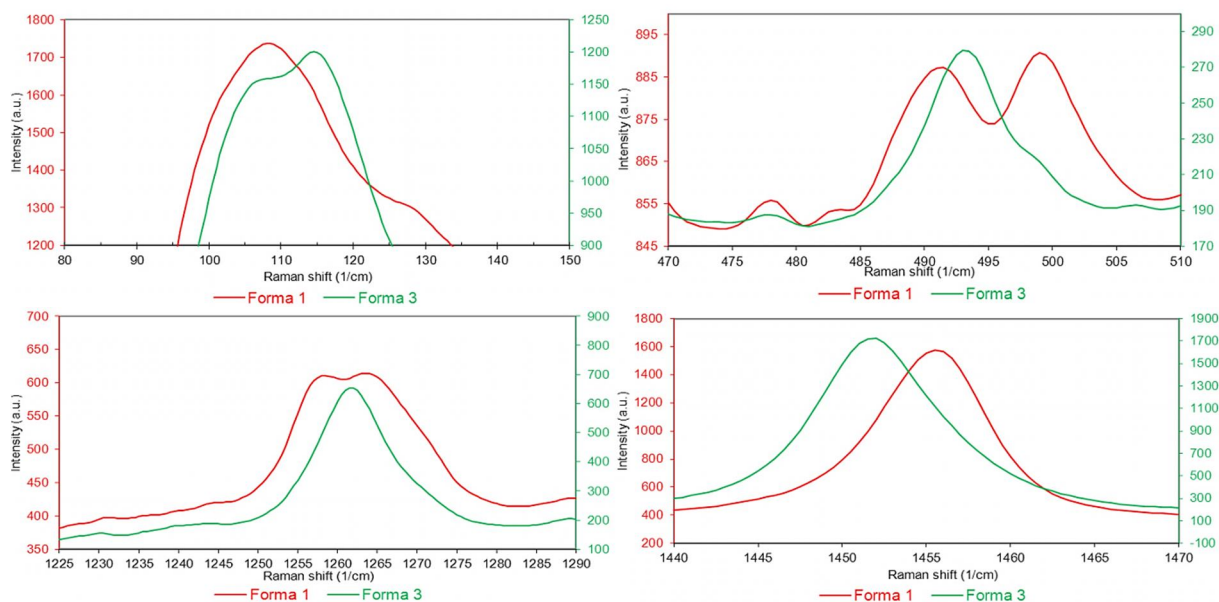
23. ábra: Forma 1 és Forma 3 száloptikán keresztül felvett spektrumai

Akárcsak a mikroszkóppal 785 nm-en felvett spektrumok esetén, a két forma spektruma – a jelentős alapvonal-különbségek miatt – ránézésre elkülöníthető, így természetesen cluster analízissel is elválást tapasztalunk a formák által definiált csoportok között (24. ábra).



24. ábra: Forma 1 és Forma 3 módosulat száloptikán keresztül felvett spektrumainak dendogramja

Szerencsére nem csak az intenzitáskülönbség az egyetlen eltérés a két forma Raman-spektruma között: a csúcsokat vizsgálva is felfedezhetők fel karakterisztikus különbségek (**25. ábra**). A későbbi, asszignációs fejezetben az itt bemutatott csúcsok közül egyet tudtam azonosítani: a $1450\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$ tartományban megfigyelhető lokális maximumok a célmolekula vázrezgéseivel kapcsolhatóak a ν_{CH} rezgéseken keresztül.

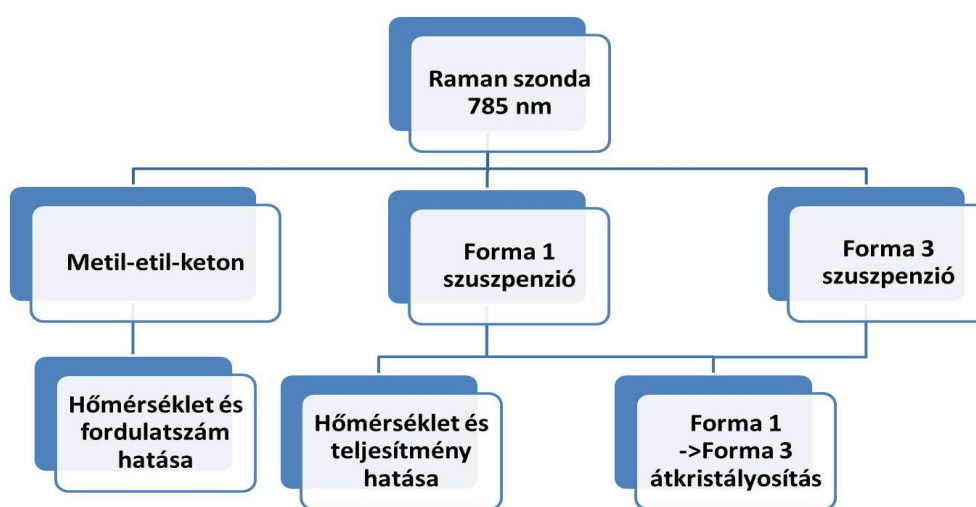


25. ábra: Forma 1 és Forma 3 spektrumaiban jelentkező különbségek

Bár makroszkopikus mintamennyiséget vizsgálva a kapott spektrumok intenzitása alacsonyabb, mely jelenséget a szemcseméret-intenzitás fordított arányú kapcsolatának tulajdoníthatunk, a kapott színeképekben kevésbé lép fel a fluoreszcencia jelensége. Ezért egy újabb spektrumkönyvtár felvételére – amennyiben elegendő minta áll rendelkezésre – biztosan a száloptikán keresztül történő vizsgálatot választanám, hiszen a spektrális tulajdonságok is kedvezőbbek, továbbá a mintakezelési, mérési bizonytalanságok mértékét is jelentősen csökkenti (vö. Forma 1 módosulat Nd-YAG lézerrel, 532 nm-en gerjesztett spektrumaival [**10. ábra**]).

4.2. Polimorf módosulatok in-line Raman-spektroszkópiával történő vizsgálata

A vonatkozó irodalom szerint a Raman-spektroszkópia évek óta használt eszköz a kristályosítási folyamatok nyomon követésére, hiszen a készülékhez csatlakozó száloptikán keresztül a kristályosítási folyamat in-line követhető. A száloptikával és reaktorba merülő szondával végzett, az adott körülmények között úttörő jellegű vizsgálataink célja polimorf módosulat kristályosítással történő előállításának monitorozása volt. Az elvégzett méréseket a **26. ábra** foglalja össze.

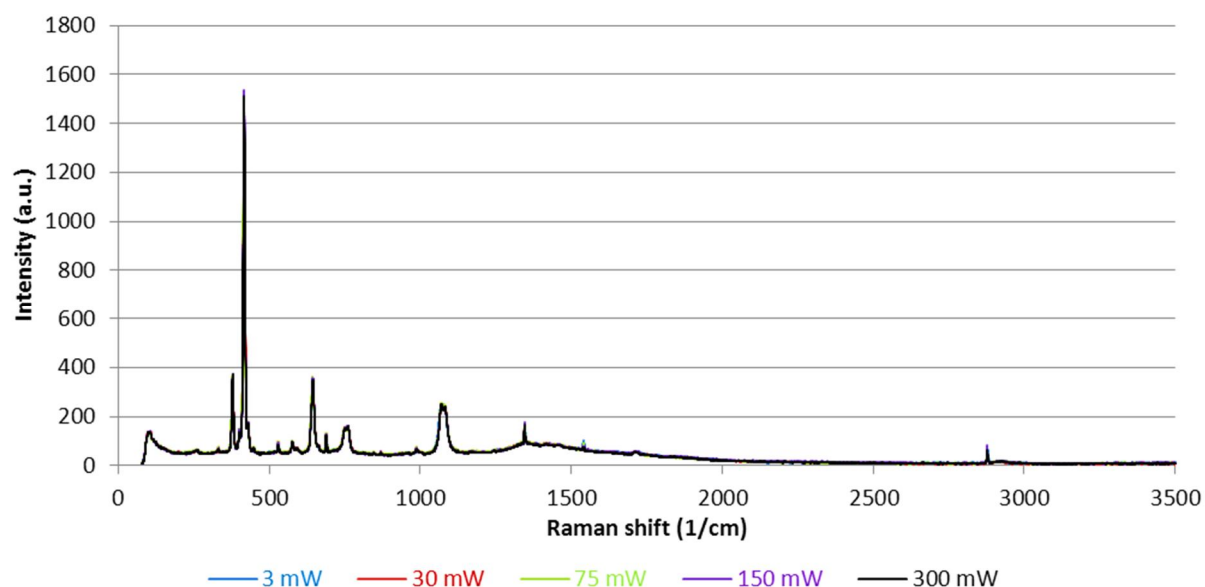


26. ábra: Raman-szondával végzett vizsgálataim sémája

Száloptikán keresztül felvettem a tiszta oldószer (metil-etil-keton) spektrumát különböző hőmérsékleteken és különböző fordulatszám mellett, vizsgáltam a paraméterek változtatásának spektrumokra gyakorolt hatását. Spektrumsorozatot készítettem a két módosulat szuszpenziójáról, végül átkristályosítási folyamat során követtem a polimorfia alakulását.

4.2.1. A Raman-szonda mérési paramétereinek kiválasztása

A szonda mérési paramétereinek optimalizálásához a kristályosítási eljárás oldószereként használt metil-etil-ketont (MEK) vizsgáltam. A tiszta oldószeren elemeztem adott hőmérsékleten a lézerteljesítmény változtatásának hatásait a Raman-sávok intenzitására, de úgy találtam, az alkalmazott teljesítmény nem befolyásolja jelentősen a kapott spektrumok tulajdonságait (27. ábra). Az in-line mérések során alkalmazott paramétereket a 9. táblázat tartalmazza.



27. ábra: MEK spektrumok különböző lézerteljesítmény alkalmazásával

Gerjesztő lézer	785 nm
Lézerteljesítmény	30 mW
Spektrumtartomány	abc (3500-2630 cm^{-1} , 2635-1515 cm^{-1} , 1520-80 cm^{-1})
Besugárzási idő	3 s
Akkumulációk száma	6
Apertúra	50 × 1000 μm

9. táblázat: Mérési paraméterek Raman-szondával történő méréskor

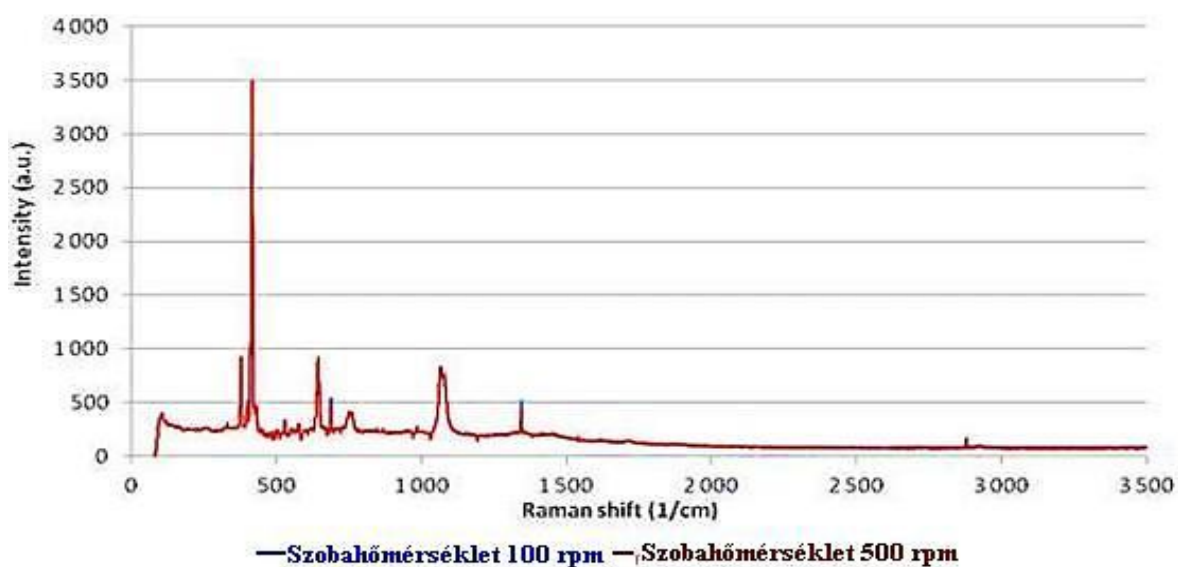
4.2.2. Hőmérséklet és fordulatszám hatásának vizsgálata

Az optimális paraméterek beállításával metil-etil-ke-ton oldószeren vizsgáltam a keverés fordulatszámának és a hőmérséklet változtatásának Raman-sávokra gyakorolt hatását. A beállított hőmérséklet és keverési sebesség értékeit a **10. táblázat** tartalmazza.

Hőmérséklet	Fordulatszám				
25 °C	100 min ⁻¹	200 min ⁻¹	300 min ⁻¹	400 min ⁻¹	500 min ⁻¹
0 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
10 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
30 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
40 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
50 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
60 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	
75 °C	100 min ⁻¹			500 min ⁻¹	

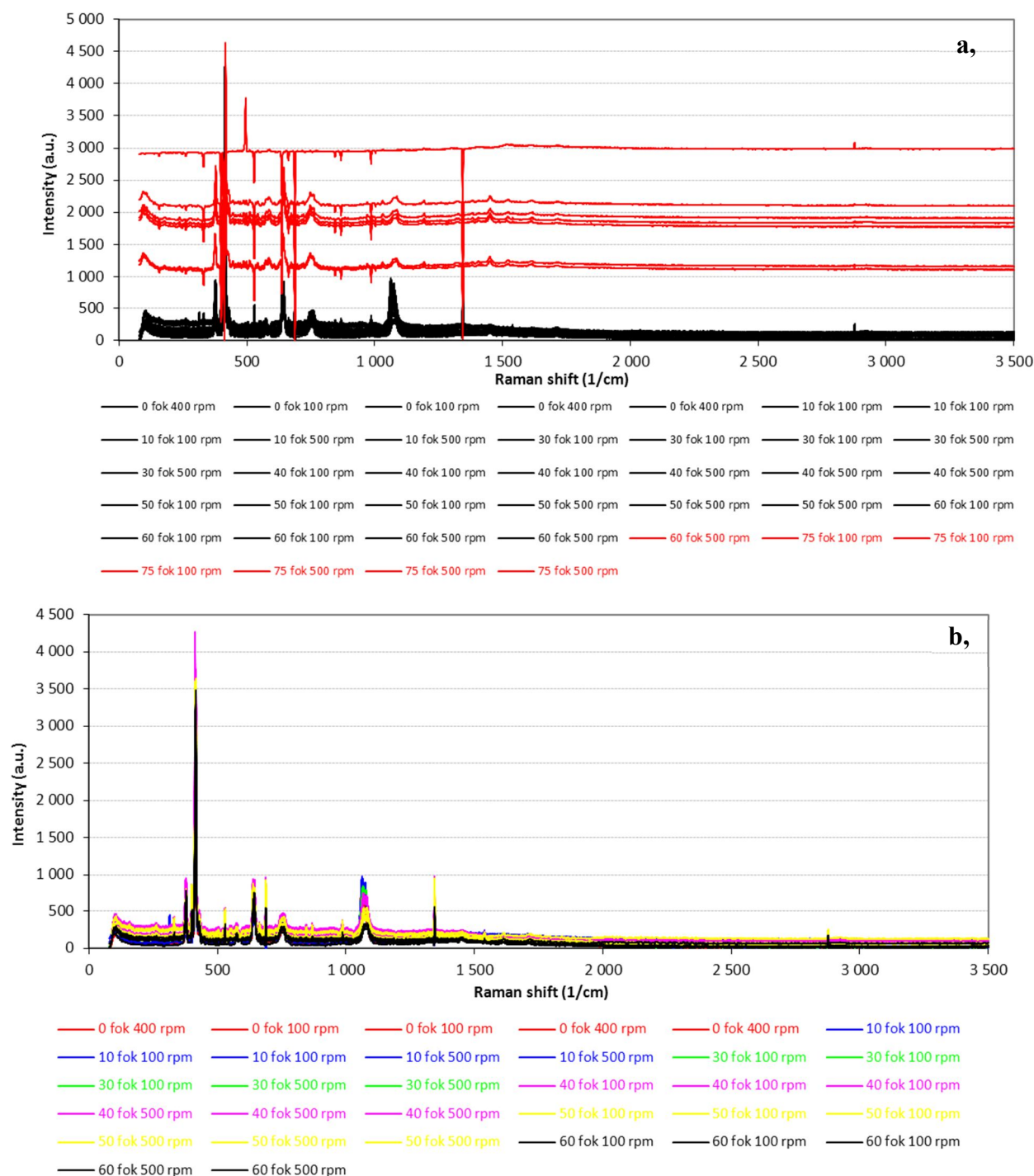
10. táblázat: Alkalmazott hőmérsékletek és fordulatszámok MEK mérésekor

Először szobahőmérsékleten vizsgáltam a fordulatszám-változással járó esetleges változásokat, de úgy tapasztaltam, a kevertetés önmagában nem befolyásolja számottevően a kapott spektrum jellemzőit (**28. ábra**).



28. ábra: MEK spektrumok különböző keverési sebesség alkalmazásával

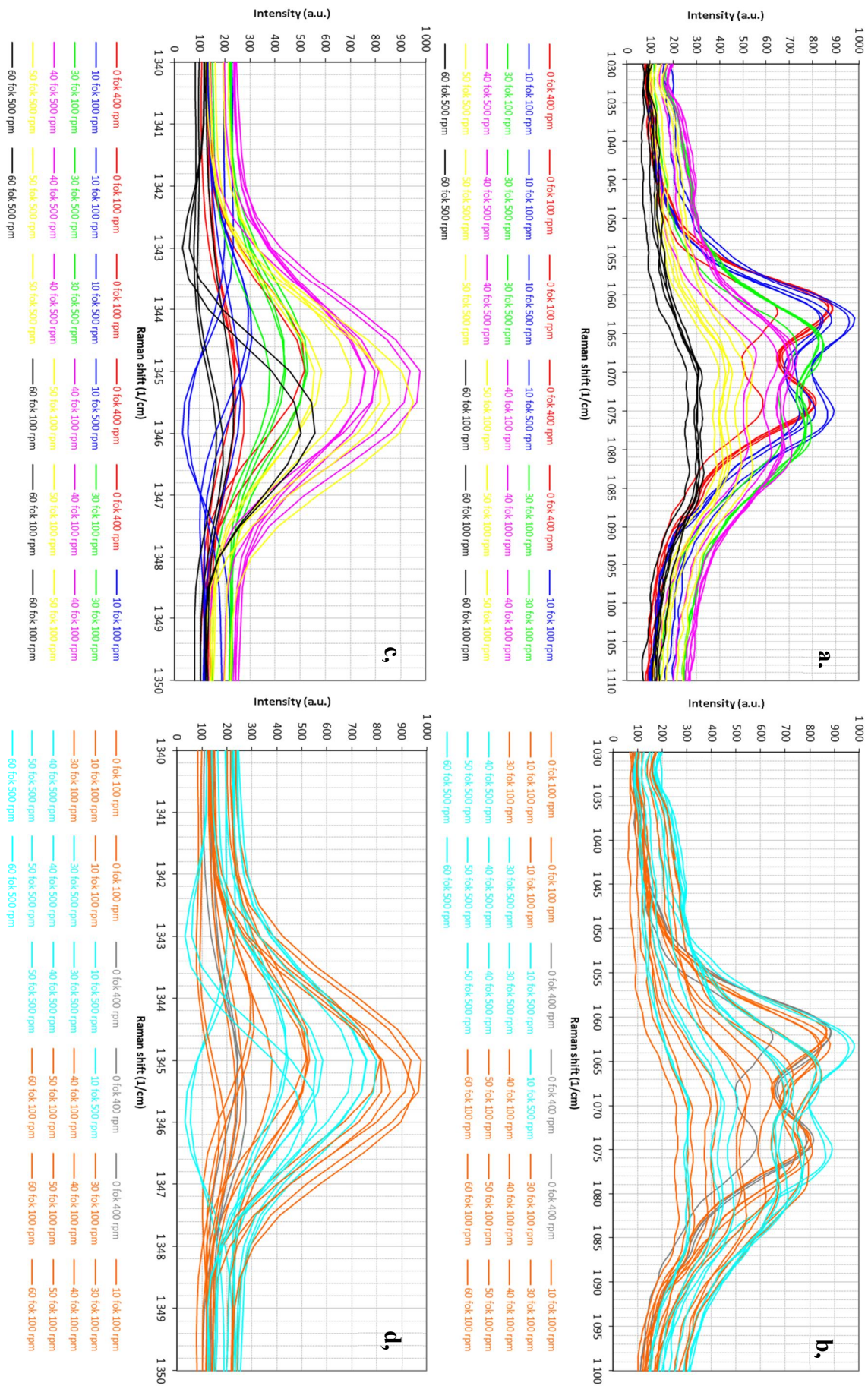
A tájékoztató mérés után az oldószert 0 °C-ra hűtöttem, de ezen a hőmérsékleten már csak két keverési sebesség mellett vettem fel spektrumokat, majd a rendszer hőmérsékletét a táblázatban látható hőmérsékletekre emelve két-két fordulatszámon vizsgáltam a bekövetkező változásokat. A kapott spektrumok a **29. ábrán** láthatóak.



29. ábra: Hőmérséklet hatása a MEK-spektrumokra
a, megfordult spektrumokat is tartalmazó ábra
b, hőmérséklet alapján színezett ábra

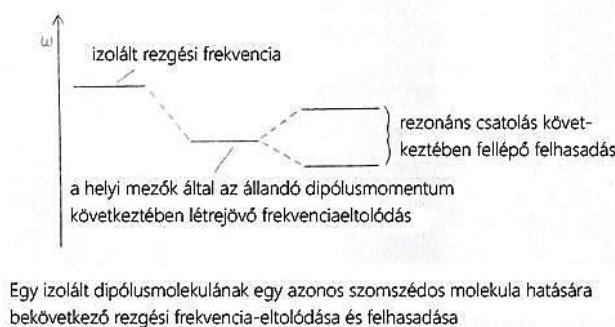
A hőmérséklet emelése szemmel látható változást eredményez már 30 °C-on: az alapvonal felfelé tolódik és ezen a hőmérsékleten 500 min⁻¹-es fordulatszámon negatív csúcsok is megjelennek. A 60 °C-on készített spektrumokban az alapvonal-eltolódás nem lép fel. Magasabb hőmérsékleten (60 °C-on, illetve 75 °C-on) a spektrumok megfordultak (**29. ábra a.)**. A spektrumokat elemezve megfigyelhető a tendencia, mely a későbbi mérések folyamán is megjelenik: a hőmérséklet emelésével a jelintenzitás lineárisan csökken, azonban a 0 °C-on mért intenzitás nem követi ezt a tendenciát.

A hőmérséklet növelése látványos hatást gyakorol a spektrumokra, azonban különböző csúcsok esetén akár ellentétes is lehet ez a hatás. Az alábbi négy diagramon (**30. ábra**), mely két változékony spektrumrészletet mutat be, a hőmérséklet és a fordulatszám hatása látható ugyanazon spektrumszakasz más-más jelölésével. Az első ábrán (**a.**) a hőmérséklet emelésével a csúcsok intenzitása észrevehetően csökken (a hőmérséklet miatt már gerjesztett, rezgést végző atomcsoportok további besugárzása már nem eredményez látványos csúcsokat). Ellenben a harmadik csúcsot ábrázoló diagramon (**c.**) a hőmérséklet növelésével nő az intenzitás-bár a tendencia nem monoton növekvő, 60 °C-on már nem érvényes. Tehát mindkét esetben közel lineáris – csak ellentétes irányú- tendencia figyelhető meg, mely a végletek esetén nem érvényes. A **b.** és **d.** ábrán az eltérő színek eltérő fordulatszámot jelölnek. Látható, hogy a fordulatszám-változtatás önmagában nem releváns, a Raman-sávok intenzitását nem befolyásolja olyan látványosan, mint a hőmérséklet.



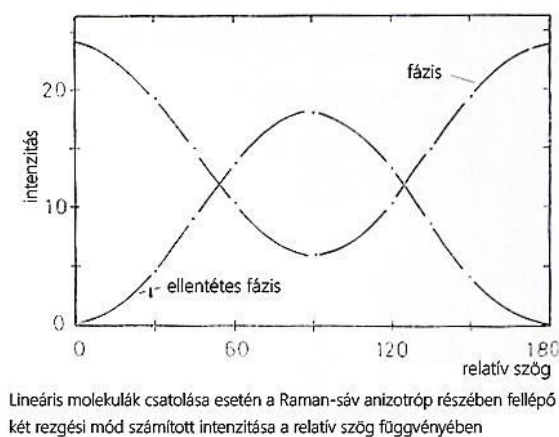
30. ábra: Hőmérséklet (a, és c), és fordulatszám (b, és d), MEK-csúcsokra gyakorolt hatása

Az általam is tapasztalt jelenség nem ismeretlen, az irodalomban [25] találunk rá magyarázatot. E szerint „két dipólusmomentum között rezonáns rezgési csatolás akkor lép fel, ha a két azonos molekula ugyanazzal a frekvenciával rezeg. Ez pedig a molekulapár degenerált energiaszintjeinek felhasadását eredményezi (31. ábra). Az eltolódás és a felhasadás mértéke a két molekula közötti geometriai viszonytól függ.



31. ábra: Rezgési frekvencia felhasadása

A nagyobb frekvencián történő felhasadás a két molekula ellentétes fázisban történő rezgésének, míg az alacsonyabb frekvencián történő felhasadás a két molekula azonos fázisban történő rezgésének eredménye. A két mód Raman-spektrumbeli relatív intenzitása meghatározott a csatoló rendszerbeli átmenet polarizálhatósága által. A Raman-tenzor két részre osztható: izotróp és anizotróp részekre.



32. ábra: Raman-sávok intenzitása a két rezgési mód esetén

A rezgési sávok folyadékokban változó terjedelmű frekvenciaeloszlást mutatnak (32. ábra). Minden folyadékban lévő gerjesztett molekula más környezetet „lát”, így más kölcsönhatási lehetőséget is. Ez eltérő frekvenciaeltolódást okoz, mely szélesíti a sávot. Ha a

termikus energia ($k \cdot T$) magasabb a kölcsönhatási energia szögfüggő részénél, akkor minden orientáció azonos valószínűséggel rendelkezik, szimmetrikus frekvenciaeloszlás lép fel. Más részről, ha a termikus energia a kölcsönhatási energiával azonos nagyságrendbe esik, minden frekvenciát súlyozni kell a Boltzmann-faktorral. Ez megfelel az energetikailag kedvező elhelyezkedések előnyben részesítésének. Növekvő kölcsönhatási energiával a maximum helye elmozdul az alapvető helyéről, a második momentum csökken és az aszimmetria nő. Az intenzitásmaximum – az első momentum – alacsony hőmérsékleten eltérést mutat a linearitástól. Amikor a hőmérséklet változik, az orientáció valószínűség-eloszlása is változik, eltérés mutatkozik a relatív intenzitásban mind a fázisban, mind pedig az ellentétes fázisban rezgő mód esetén (**33. ábra**) az anizotróp komponensben, míg az izotróp komponensben csak eltolódás lép fel.

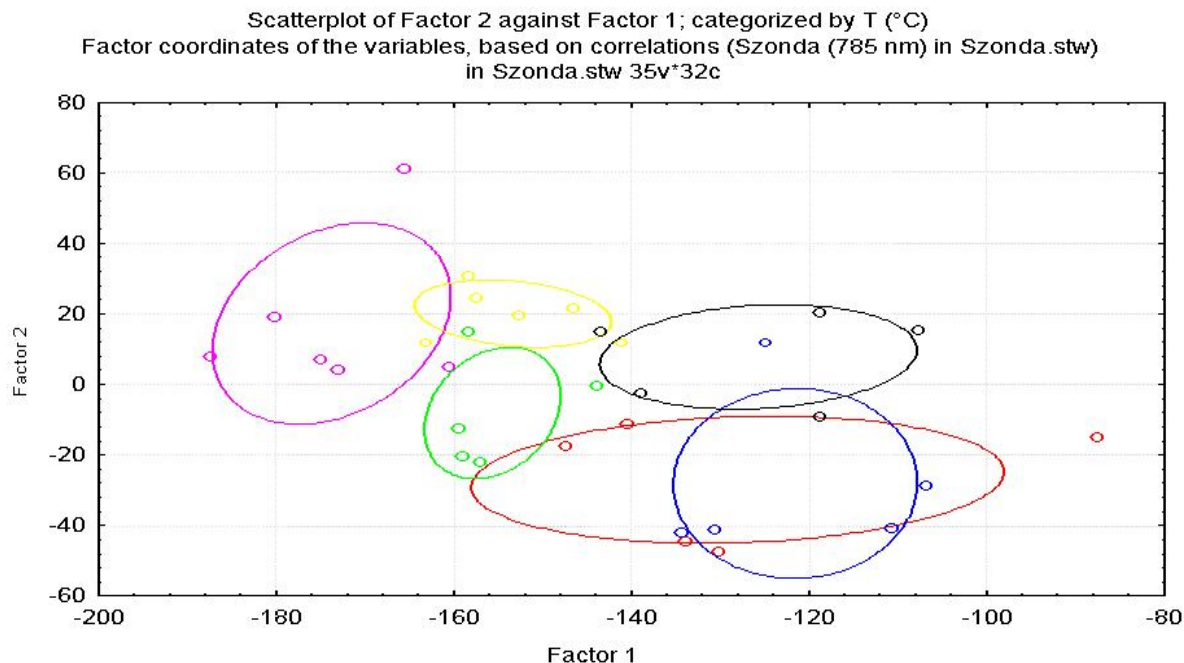


33. ábra: Izotróp és anizotróp frekvenciaeloszlás

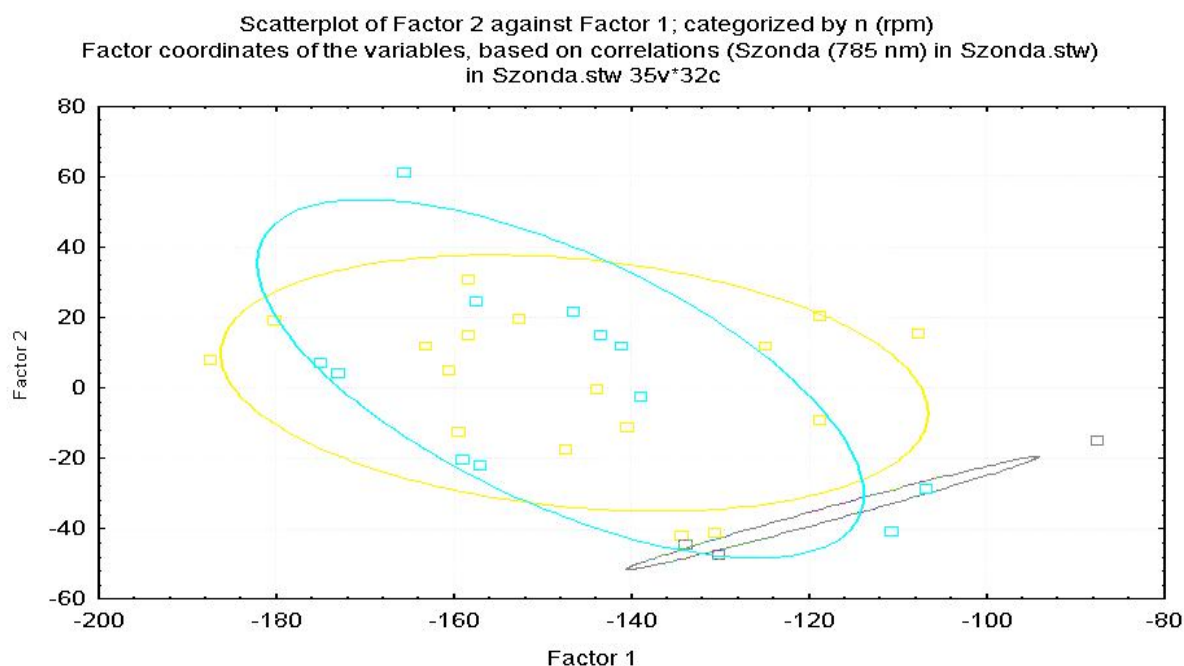
A kísérleti eredmények azt mutatják, a szerkezeti hatások folyadékokban fontos szerepet játszanak a Raman-tenzor alakjának befolyásolásában amennyiben a dipol kölcsönhatási energia $k \cdot T$ -vel azonos nagyságrendű. Infravörös adatok segítségével bizonyították, hogy az anizotróp eltolódás összefüggésbe hozható a hőmérsékletfüggő eltolódás egy részével. A Raman-tenzor izotróp részének aszimmetriája az orientáció valószínűség-eloszlásának változásával magyarázható, amint a valószínűség-eloszlás az energetikailag kedvezőbb elhelyezkedés felé tolódik el.”

A főkomponens-elemzéssel végzett vizsgálatok – ahol a spektrumok és az adott főkomponens súlyfüggvényének szorzataként kapott ún. *score* értékeket ábrázoltam –

alátámasztják, hogy a hőmérséklet a keverési sebességnél lényegesen nagyobb befolyással bír (34., 35. ábra), a különböző fordulatszámok között nagyobb az átfedés a tartományokat jelölő ellipszisek között, nem okoz akkora változékonyságot a keverési sebesség változtatása.



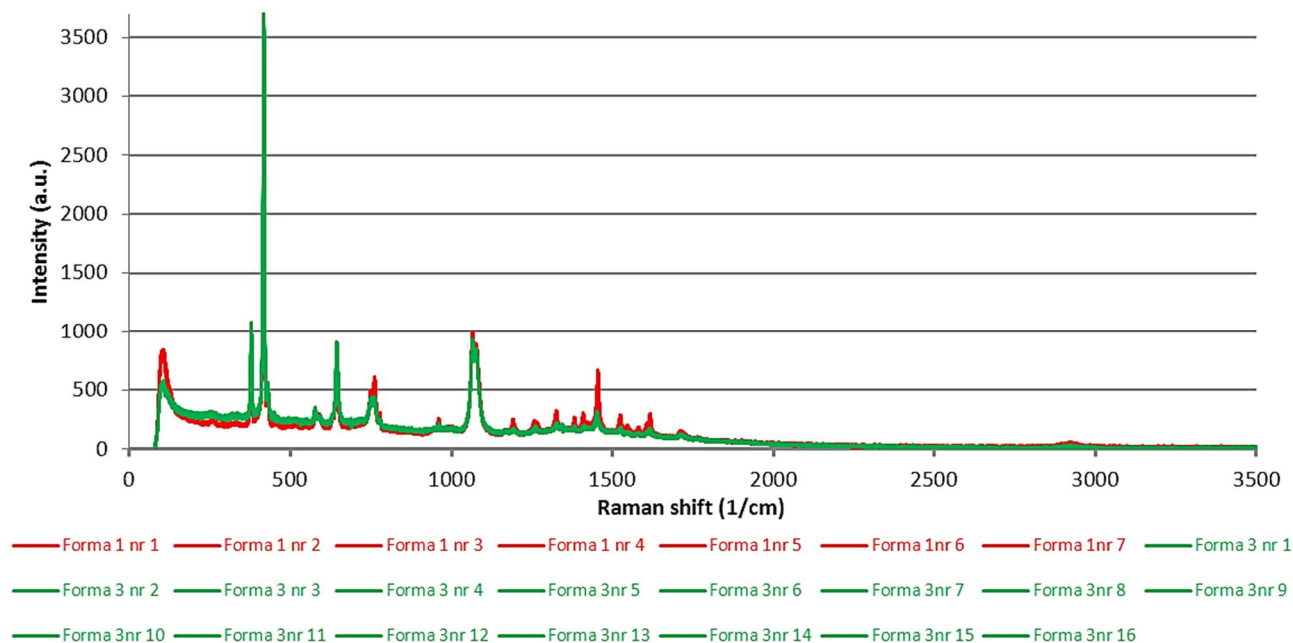
34. ábra: Hőmérséklet alapján kategorizált *score* értékek a PC2 (2,78%) vs. PC1 (94,31%) alapján
(0 °C, 10 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C)



35. ábra: Fordulatszám alapján kategorizált *score* értékek a PC2 (2,78%) vs. PC1 (94,31%) alapján
(100 rpm, 400 rpm, 500 rpm)

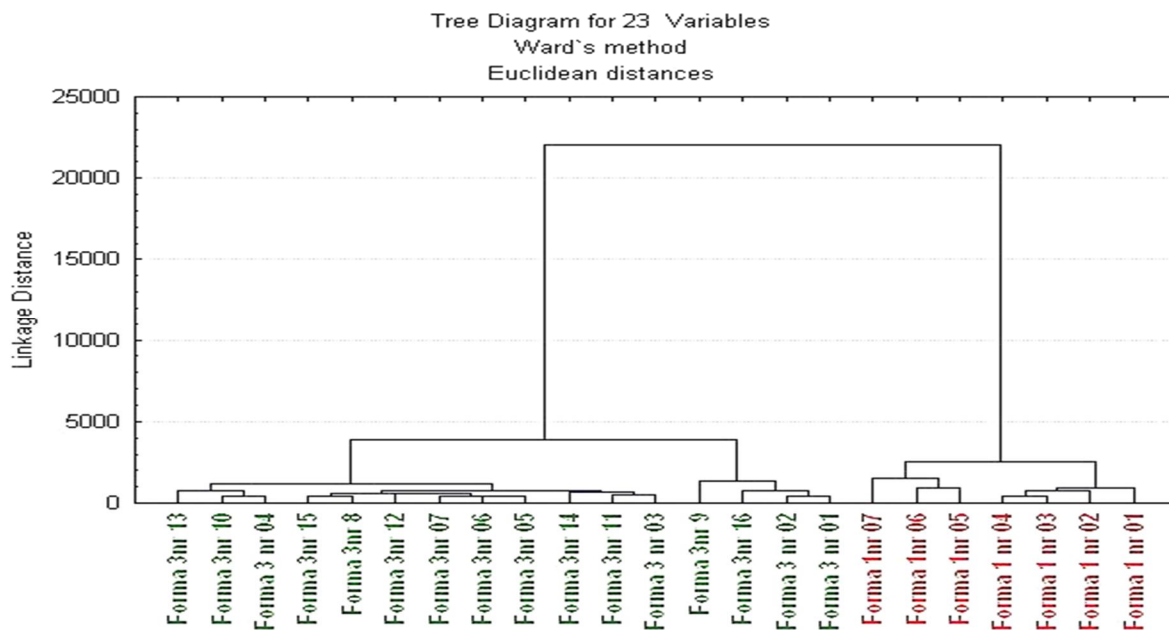
4.2.3. Polimorf módosulatok szuszpenzióiról felvett Raman-spektrumok összevetése

Forma 1 és Forma 3 módosulatból azonos koncentrációjú szuszpenziót készítettem és 25 °C-n, 300 1/min fordulatszámú kevertetés mellett felvettem a spektrumokat az optimált paraméterbeállítások mellett. A szuszpenziókról készült színek is az előbbieken említett (vö. [21 ábra]) intenzitáskülönbséget tükrözi (36. ábra).



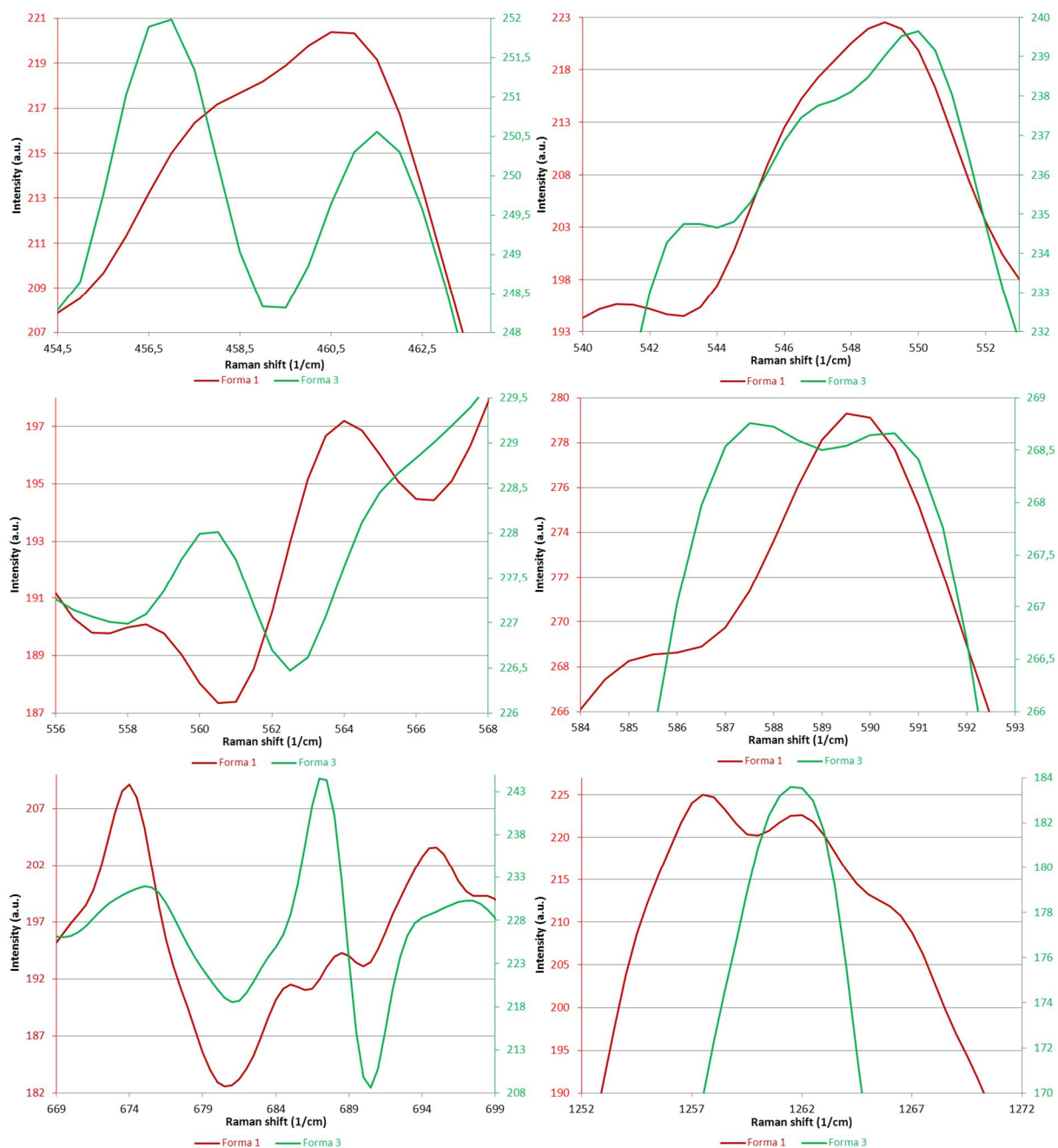
36. ábra: Raman-szondával felvett Forma 1 és Forma 3 módosulatok szuszpenzióinak spektrumai

A szuszpenziókon elvégzett csoportelemzés a spektrumokat a polimorf módosulatok alapján különítette el (37. ábra).



37. ábra: Forma 1 és Forma 3 szuszpenzió spektrumainak összevetése cluster analízissel

A két módosulat szuszpenzióiról készített szinképekből átlagspektrumokat képeztem, ezek segítségével vizsgáltam a módosulatokban fellépő spektrális eltéréseket. Ahogyan a szilárd kristályokról készített spektrumok esetén, úgy a szuszpenziók vizsgálatánál is különbségek fedezhetők fel a Raman-sávok között (**38. ábra**).



38. ábra: A két módosulat szuszpenziója közötti spektrális eltérések

Forma 1 módosulat 460,5 cm^{-1} hullámszámon szimpla csúcsot ad, míg Forma 3 módosulat kettős csúcsot, ahogyan 550 és 590 cm^{-1} -en is. Az 556-568 cm^{-1} hullámszám-tartományban a két módosulat teljesen eltérő spektrumot ad. Forma 1 módosulat esetén 687 cm^{-1} -en kettős

csúcs jelentkezik, míg Forma 3 módosulat esetén szimpla csúcs, az $1252\text{-}1272\text{ cm}^{-1}$ hullámszám-tartományban pedig Forma 1 módosulat esetén három darab csúcs figyelhető meg, míg Forma 3 módosulat spektrumában csupán egy szimpla csúcs jelentkezik. Ezen különbségek teszik a két polimorf módosulat színeképét unikálissá, általuk a két módosulat megkülönböztethető.

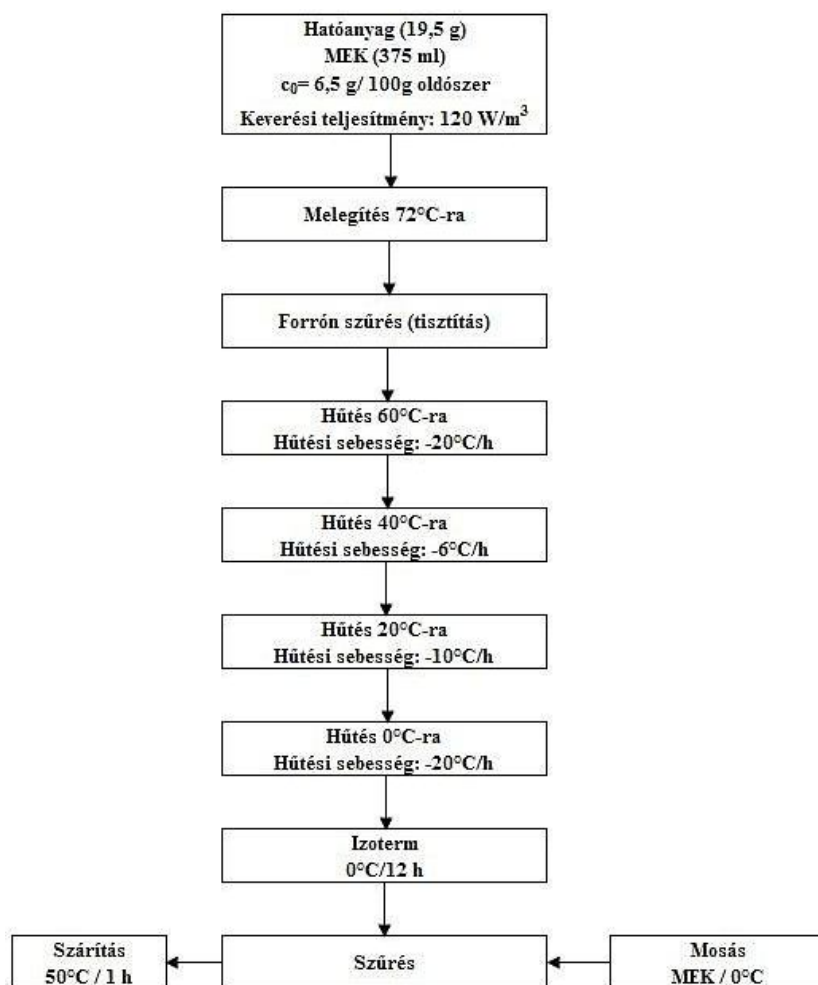
4.2.4. Átkristályosítás vizsgálata

Az átkristályosítást a termodinamikailag stabil Forma 3 módosulat előállítására kidolgozott eljárás szerint végeztem:

19,5 g Forma 1 módosulatot feloldottam 375 ml metil-etil-ketonban (MEK) 75 °C-on, 320 1/min fordulatszámú kevertetés mellett. Egy gyors, forró szűrést követően a tiszta oldatot 60 °C-ra hűtöttem -20°C/h hűtési sebességgel, majd -6°C/h-s sebességgel hűtöttem 40 °C-ig. Eközben 58°C-on beoltottam a rendszert 975 mg Forma 3 módosulat kristályaival. Miután a fehér szuszpenzió hőmérséklete elérte a 40 °C-t, a hűtés sebességét -10°C/h-ra módosítottam, ezzel a sebességgel hűlt 20 °C-ig. Végül -20°C/h-s sebességgel 0°C-ra hűtöttem a rendszert és további két órán át 0 °C-os hőmérsékleten kevertettem.

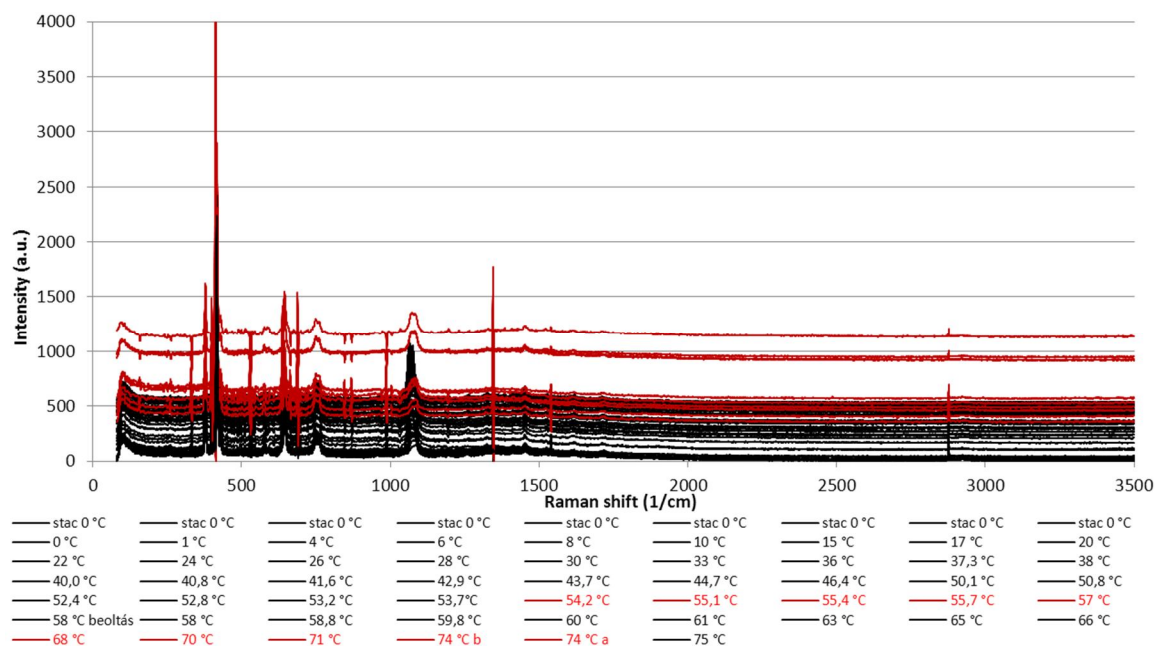
A terméket G3-as üvegszűrőn szűrtem, 37,5 ml oldószerrel (MEK) mostam 0 °C-n, végül egy órán át szárítottam 50 °C-os vákuumszáritóban. A terméket 83,6 % termeléssel kaptam.

Az eljárás menetét az alábbi folyamatábra (39. ábra) szemlélteti.



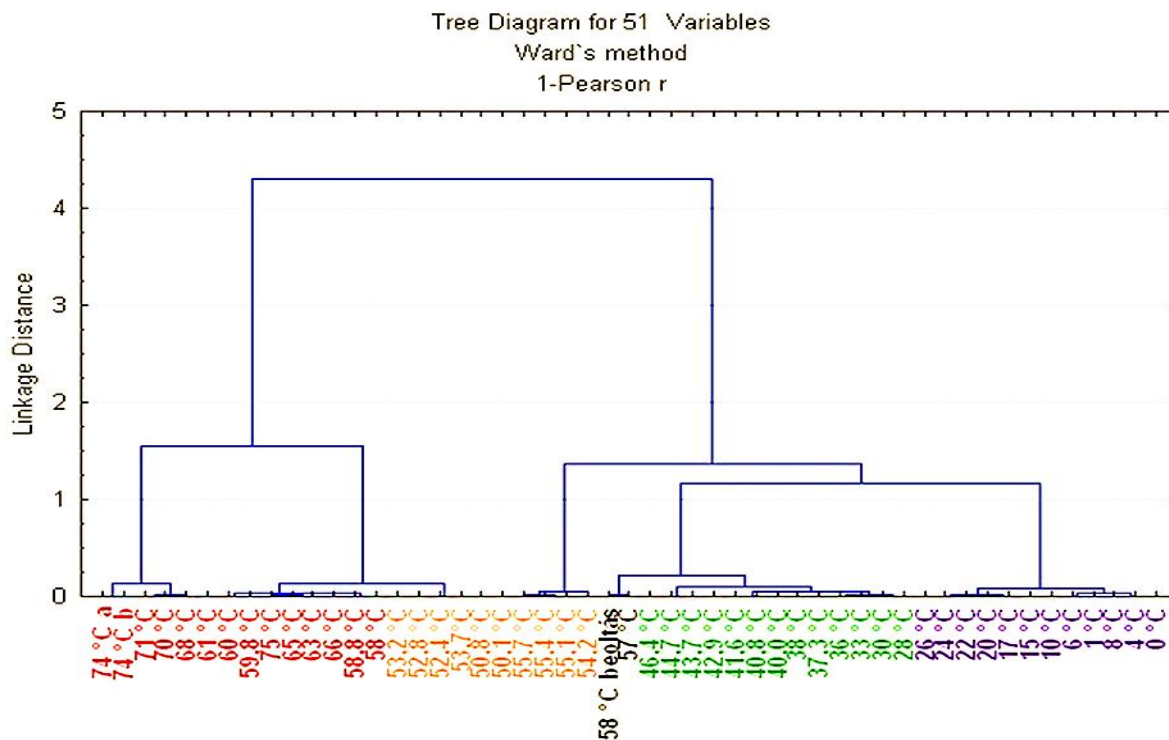
39. ábra: Átkristályosítás folyamatábrája

A művelet során néhány spektrum (eddig tisztázatlan okok miatt) megfordult (**40. ábra**), negatív csúcsok keletkeztek.

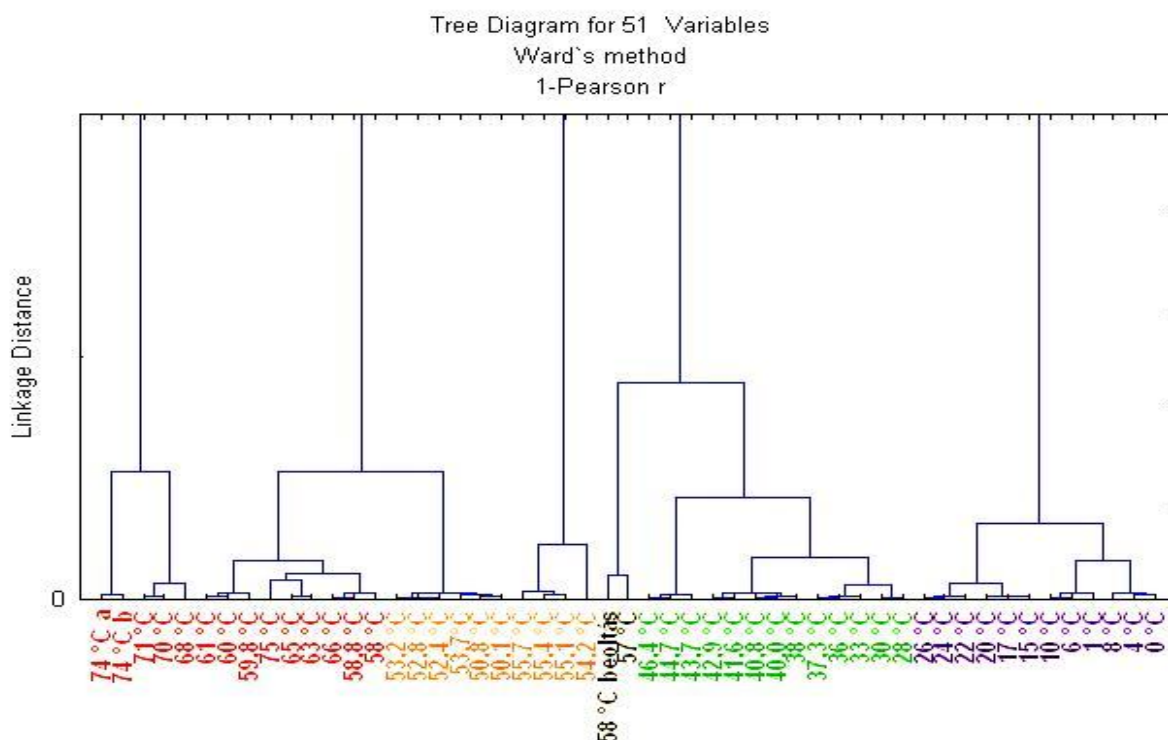


40. ábra: Átkristályosítás vizsgálata során felvett spektrumok

A spektrumokat csoportanalízisnek vetettem alá (**41-42. ábra**).



41. ábra: Átkristályosítás során felvett spektrumok dendogramja



42. ábra: Átkristályosítás során felvett spektrumok dendogramjának nagyított részlete

A csoportanalízishez a stacionér 0°C-on felvett spektrumokat eltávolítottam a halmazból, mert külön ágat alkottak. A többi spektrumot ábrázolva a cluster analízis a hőmérsékletváltozásnak – azaz az átalakulásnak – megfelelően rendezte a spektrumokat. A dendogram két ágát tekinthetjük úgy is, mint az oldott hatóanyaghoz és Forma 3 módosulathoz rendelhető ágat. A piros színnel jelölt színeképek az oldott hatóanyaghoz tartoznak, hiszen felvételük még a beoltás előtt történt, amikor a rendszerünk még csak oldat formájú volt. A beoltáskor pillanatszerűen juttattunk a rendszerbe szilárd fázisú Forma 3 módosulatot, mely az oldatban oldott állapotban lévő hatóanyag Forma 3 módosulatként történő kiválását indukálja. Feltételezéseim szerint az impulzusszerűen bevitt szilárd Forma 3 módosulat miatt került a beoltáskor, valamint közvetlenül utána készített spektrum a jobb oldali ágba.

A narancssárga színnel jelölt színeképek – úgy vélem – köztes állapotot tükröznek, felvételük a beoltás után történt, amikor a rendszerben oldott hatóanyag, valamint a Forma 3 módosulatként kivált szilárd hatóanyag is jelen volt. Ha alaposabban megvizsgáljuk a narancssárga színnel jelölt tartományt, láthatjuk, hogy mindkét főághoz tartozó spektrumok találhatók itt, de a jobb oldali ágtól eredeztethetők már magasabb változékonysági fokon elválnak a többi, már Forma 3-nak tekinthető színeképtől. A zöld, illetve lila színnel jelölt spektrumok pedig már egyértelműen Forma 3 módosulathoz tartoznak.

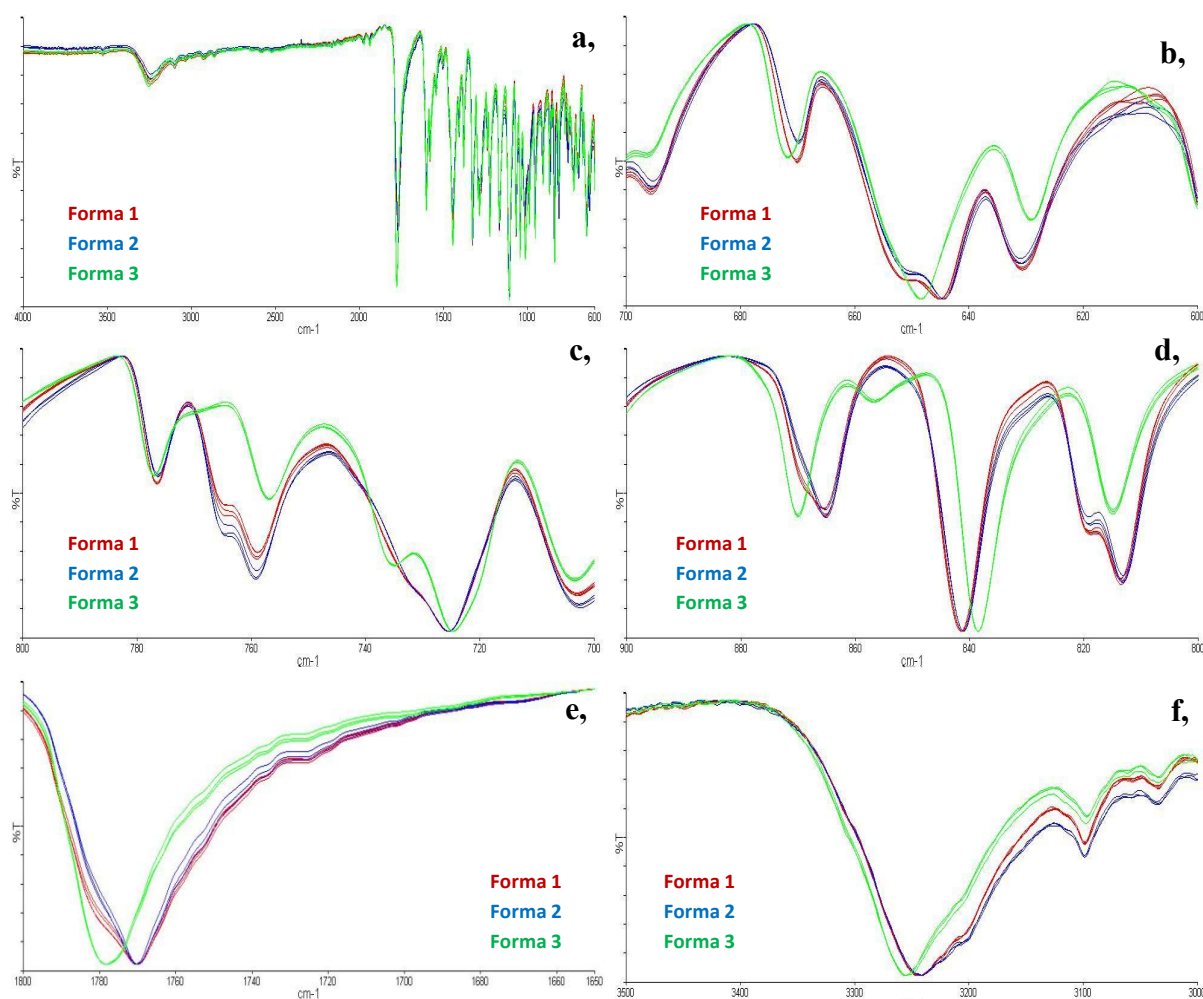
Csoportanalízis használatakor rendkívül sok múlik a választott paramétereken, vizsgálataim során leggyakrabban a Ward-módszert alkalmaztam, mely úgy rendszerezi a tagokat, hogy a létrejövő csoport csoporton belüli eltérésnégyzete minimális legyen. A választható távolságértékek közül az euklidészi, illetve az $1 - \text{Pearson-}r$ (ahol r a Pearson-féle korrelációs koefficiens) bizonyult legtöbbször megfelelőnek, ezek használatával kaptam a spektrumseregnek megfelelő elváló dendogramot.

Elmondható, hogy a Raman-spektroszkópia alkalmas az átkristályosítási folyamatok monitorozására, az átalakulás folyamata nyomon követhető. Mivel in-line módszerről van szó, az eljárást végző szakember az *in situ* változásokat is észleli, szükség esetén azonnal beavatkozhat, így a Raman-spektroszkópia esetünkben is hasznos PAT eszközzé válhat.

Az in-line technika alkalmazásával a kristályosítási folyamat időbeli változását ismerhetjük meg, ami elősegíti az átalakulás folyamatának jobb megismerését és megértését.

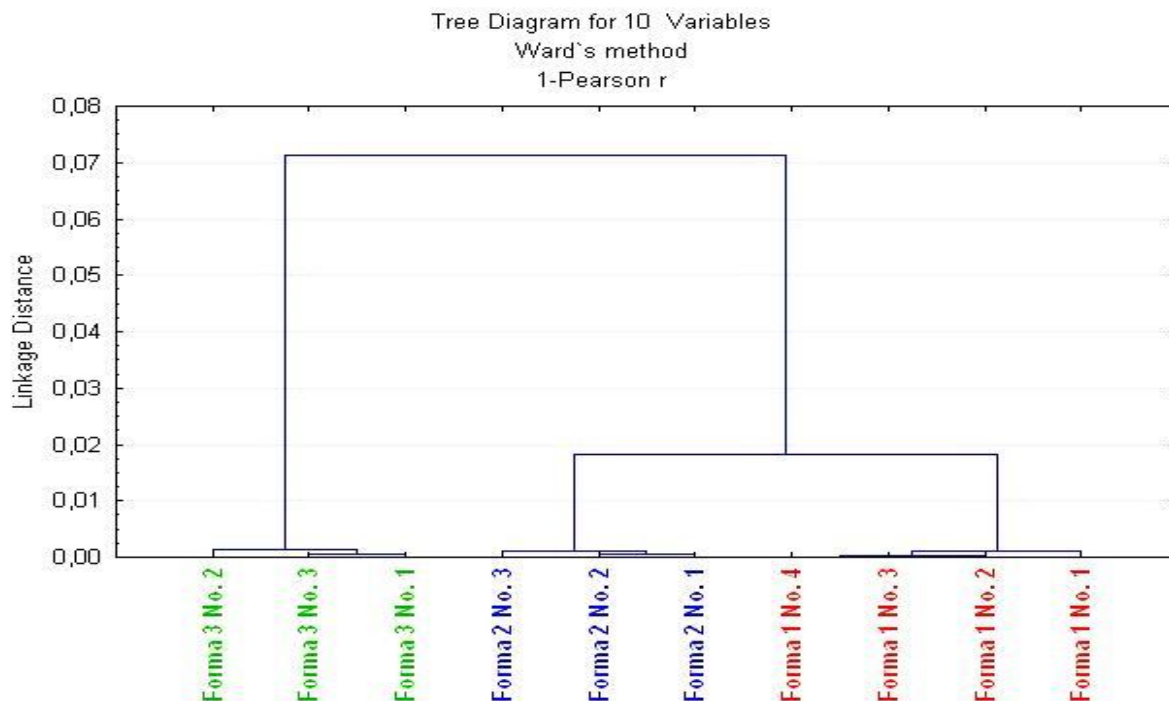
4.3. Polimorf módosulatok minőségi vizsgálata infravörös spektroszkópiával

A három polimorf módosulat közül csupán kettő (Forma 1 és Forma 3) volt alkalmas Raman-spektroszkópiával történő vizsgálatra. Az ATR feltétellel ellátott FT-IR készülékkel végzett kísérletekkel azonban az eddig nem elemezett Forma 2 módosulat is vizsgálható. Az infravörös spektrumokat elemezve (43. ábra) megállapítható, hogy Forma 1 és Forma 2 módosulatok rendkívül hasonló spektrumot adnak, míg Forma 3 módosulat spektrumai jelentősen eltérnek ezektől. Forma 1 és Forma 2 IR sávjai gyakorlatilag végig teljesen párhuzamosan futnak, Forma 3 spektrumában – ahogyan a Raman-spektrumok esetén is – nagy gyakorisággal fordul elő eltolódás a másik két formához képest vagy például kettős csúcs, míg a másik két forma az adott hullámszámon szimpla csúcsot ad.



43. ábra: A három polimorf módosulat IR spektruma autoskálázás után

Az IR spektrumok alapján feltételezhetjük, ha sikerült volna Forma 2 módosulatot is vizsgálni Raman-spektroszkópiával, várhatóan ott is ugyanezt az eredményt kaptuk volna, miszerint Forma 1 és Forma 2 módosulatok színeke gyakorlatilag azonos és Forma 3 módosulaté ettől helyenként eltér. A csoportelemzéssel készített dendrogram (44. ábra) a három módosulat spektrumait három ágra bontja, mely a polimorf módosulatokhoz rendelhetők, matematikai módszerekkel tehát az infravörös spektrumok is elkülöníthetők.



44. ábra: A három módosulat IR spektrumainak dendogramja

4.3.1. Csúcsok asszignálása

A molekula szerkezeti képletét nem mutathatom be, de a csúcsok asszignálása hasznos eszköz lehet a polimorf módosulatok eltérő viselkedésének felderítésére.

Az eltérő polaritású csoportok más-más intenzitással jelennek meg a Raman- és az IR spektrumokban. [4] A poláris karbonil-csoport rezgése a Raman-spektrumban éppen csak kiemelkedik a zajból (**23. ábra**), de az infravörös spektrumban nagy intenzitású csúcsot ad (**45. ábra b**), míg az apoláris metil-csoportok különböző rezgései nagy intenzitású csúcsokat adnak a Raman-spektrumban (**23. ábra**).

Az egyik legszélesebb sávot a vegyület laktám-típusú részének N–H vegyértékrezgése adja 3241 cm^{-1} hullámszámmal. A laktámokban lévő amidcsoport a karbonilcsoport és nitrogénatom nagy tautomerizációs hajlama miatt hibrid rezgésrendszerrel rendelkezik, melynek megfelelő sávok (amid-I, -II, -III, -IV) a különböző kötések mozgásainak más-más arányú részvételével jönnek létre. Az amid-I sávnagyobb részben a C=O vegyértékrezgéstől, kisebb részben a C–N vegyértékrezgéstől ered, esetünkben 1770 cm^{-1} -nél található. A C=O kötés öt gyűrűtagszámú laktámban található, a gyűrűfeszülés miatt a rezgés frekvenciája nő, valamint a karbonilcsoport mellett elhelyezkedő elektroaffin O-atom növeli a C=O kötés kötésrendjét, mely szintén pozitív irányú frekvenciaeltolódást eredményez. Az amid-II sáv 10-nél kisebb gyűrűtagszámú laktámok esetén nem jelenik meg a spektrumban, az amid-III sávért felelős N–H síkban deformációs részaránya pedig visszaszorul a csoportrezgésben, így az amid-III sáv sem található a színeképben. Az amid-IV sáv (671 cm^{-1}) létrehozásában több rezgésmód is részt vesz, melyek közül az O=C–N csoport síkban deformációs rezgése dominál. Az amid-V sáv kötési frekvencia jellegű és az N–H-csoport síkra merőleges deformációs rezgésmódjától származik, az irodalmi adatok alapján 700 cm^{-1} környékén jelentkezik, valamint inverzió esetén dubletté válik a sáv. Esetünkben is dublettként jelentkezik 695 és 703 cm^{-1} -nél.

Az amid-VI sáv (647 cm^{-1}) a C=O kötés síkra merőleges deformációs rezgésétől ered, közepes intenzitású csúcsot ad.

Az aromás szénhidrogének normálrezgései részben vázrezgések, részben C–H rezgések. Az ilyen típusú molekulák normálrezgései gyakran egybeesnek a degeneráltság következtében, így a színeképben kevesebb sáv jelenik meg. A kombinációs sávokon és felhangokon kívül négy alapsáv általában felismerhető.

A C–H vegyértékrezgés 3100 cm^{-1} hullámszámmal jelentkezik kis intenzitással. A C–H deformációs rezgések közül legnagyobb jelentőségűek a síkra merőleges deformációs

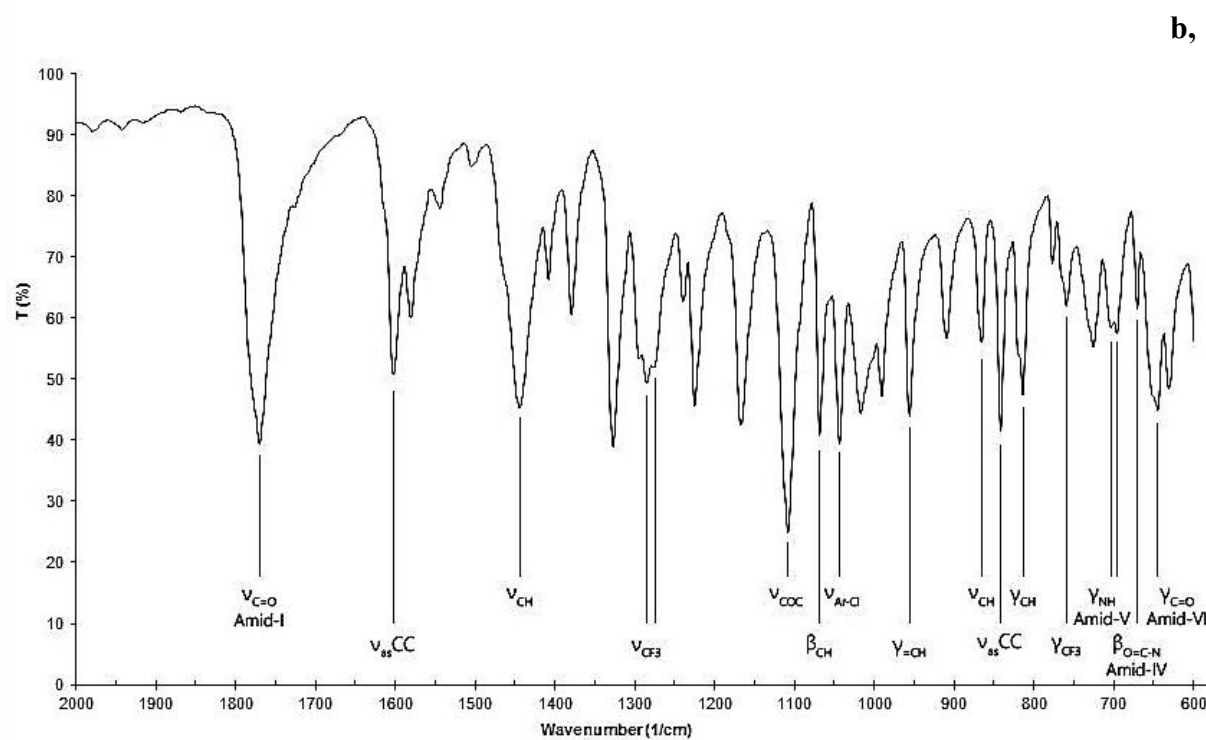
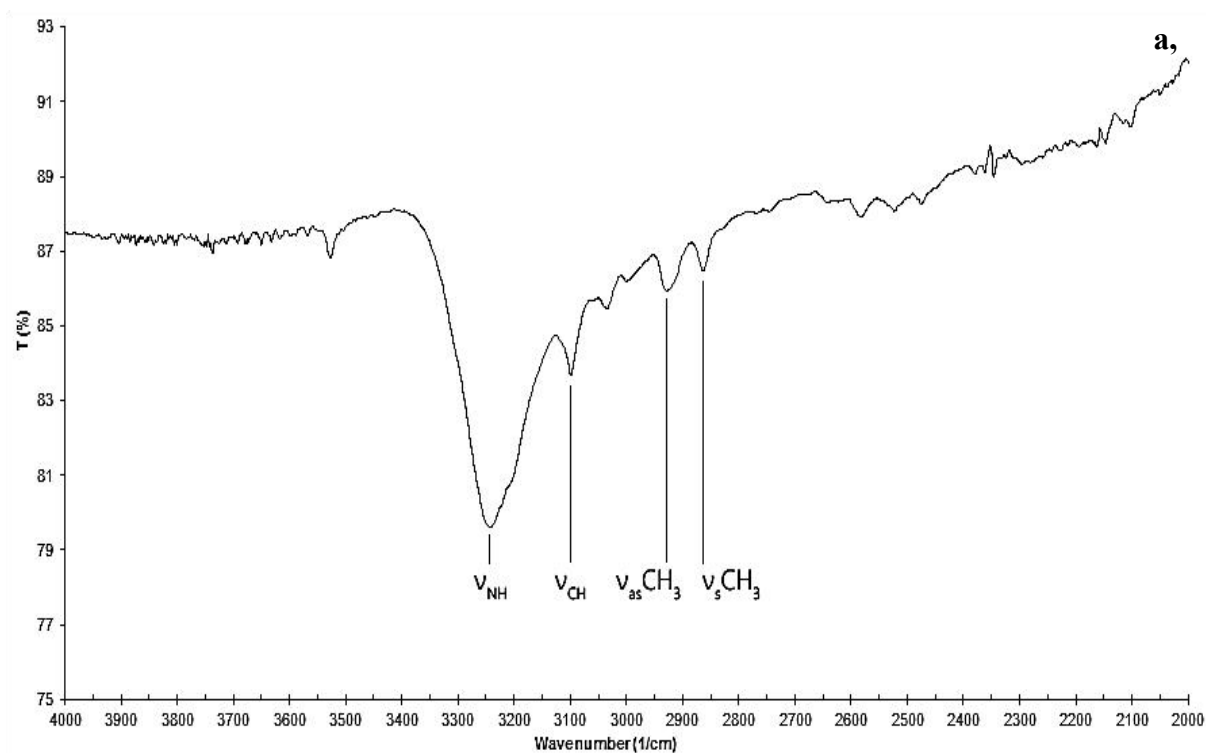
rezgések (814 cm^{-1}). Ezek a sávok mindig élesek, bár zavaró körülményt jelent, hogy a molekulában lévő aminocsoport deformációs rezgései is ebbe a tartományba tartoznak, de azok a sávok szélesebbek, így megkülönböztethetők. Az 1068 cm^{-1} -nél jelentkező síkban deformációs C–H-rezgés jellemző a szubsztitúció módjára, ahogy a vázrezgések közül az 1445 cm^{-1} -nél jelentkező sáv is a szubsztitúció módjától és a szubsztituensek elektronegativitásától függ, a Cl-atom szomszédsága növeli a sáv intenzitását a kötés polárosabbá válása miatt. Torziós =C–H rezgési sáv helye 955 cm^{-1} -nél található. Nagy intenzitású trisubsztituált aromás C–C váz-vegyértékrezgés található 1601 és 842 cm^{-1} hullámszámoknál.

Kis intenzitású CH_3 szimmetrikus vegyértékrezgés található 2865 cm^{-1} -nél, a szimmetrikus metil vegyértékrezgési sávok intenzitása mindig jóval kisebb, mint az aszimmetrikus párjaiké, mely esetünkben is nagyobb intenzitású, 2928 cm^{-1} -nél jelentkezik, mert a gyűrűben lévő N heteroatom magasabb hullámszám felé tolja el az elnyelési sávot. A C–O–C vegyértékrezgések a szénváz vegyértékrezgésekhez hasonló, de nagyobb intenzitású elnyelési sávokat eredményeznek, az aszimmetrikus C–O–C vegyértékrezgési sáv esetünkben 1108 cm^{-1} -nél jelentkezik.

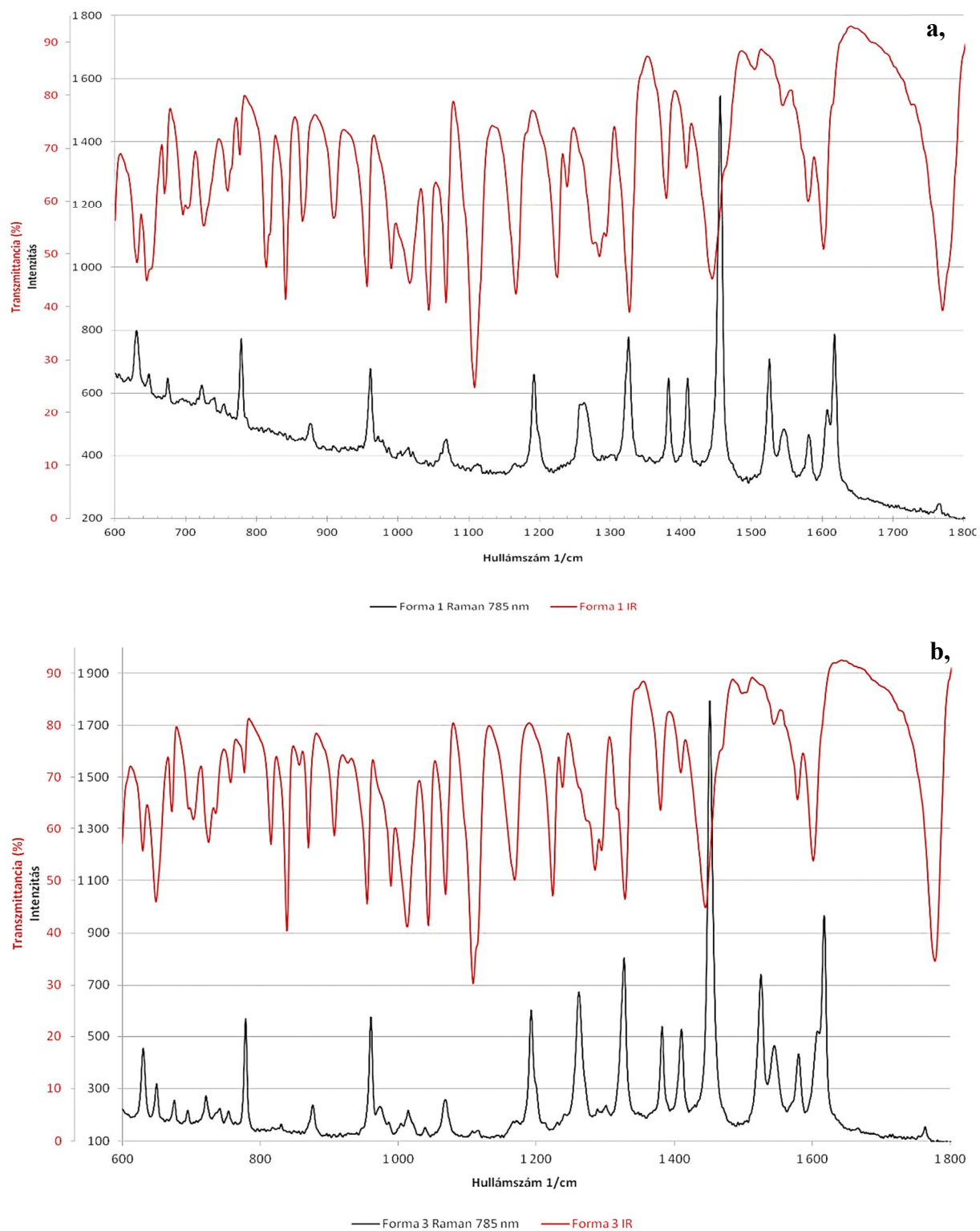
Az Ar–Cl vegyértékrezgés 1043 cm^{-1} -nél található.

A CF_3 csoport C–F vegyértékrezgése az inverziós, ún. esernyőrezgésben jelenik meg 1286 és 1294 cm^{-1} hullámszámnál, szimmetrikus deformációs rezgése pedig 760 cm^{-1} -nél jelentkezik. [23, 24]

A Raman- és IR spektrumok összevetését a **46. ábra** tartalmazza. Összehasonlításra csupán a $600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ -es tartományt tudtam felhasználni, mert a Raman-spektrumokban 1800 cm^{-1} felett nincs értékelhető sáv, az analitikai IR készülékkel pedig 600 cm^{-1} hullámszámig mértünk. Jól látható, hogy a legtöbb rezgési sáv – ha eltérő intenzitással ugyan is – mindkét spektrumban megjelenik.



45. ábra: Csúcsok asszignálása az IR spektrumon
a, 4000-2000 cm^{-1} hullámszám-tartomány
b, 2000-600 cm^{-1} hullámszám-tartomány



46. ábra: Forma 1 (a,) és Forma 3 (b,) IR és Raman-spektrumának összevetése

Rezgéstípus	Hullámszám (cm ⁻¹)	IR spektrum			Raman-spektrum	
		Forma 1	Forma 2	Forma 3	Forma 1	Forma 3
ν_{NH}	3241	3241	3241	3255	-	-
ν_{CH}	3100	3100	3100	3098	-	-
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$	2928	2928	2929	2928	-	-
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$	2865	2865	2863	2867	-	-
$\nu_{\text{C=O}}$ Amid-I	1770	1770	1770	1779	1765	1764
$\nu_{\text{as}}\text{CC}$	1601	1601	1601	1602	1606 [#]	1609 [#]
ν_{CH}	1445	1445	1445	1446	1455	1451
ν_{CF_3}	1294, 1286	1294, 1286	1294, 1286	1294, 1286	1294, 1289 [*]	1294, 1289 [*]
ν_{COC}	1108	1108	1109	1108	1112	1107
β_{CH}	1068	1068	1069	1069	1064	1067
$\nu_{\text{Ar-Cl}}$	1043	1043	1043	1043	-	1038
$\gamma_{\text{=CH}}$	955	955	956	955	960	960
ν_{CH}	867	865	865	870	876	874
$\nu_{\text{as}}\text{CC}$	842	842	841	837	-	830 [*]
γ_{CH}	814	814	813	815	-	-
γ_{CF_3}	760	760	760	757	778	778
γ_{NH} Amid-V	703, 695	703, 695	703, 695	703, 695	695 [*]	692 [*]
$\beta_{\text{O=C-N}}$ Amid-IV	671	671	670	672	673	675
$\gamma_{\text{C=O}}$ Amid-VI	647	646	645	649	647	649

11. táblázat: Az asszignált rezgési sávok megjeleni helye IR és Raman-spektrumban

Jelmagyarázat: * a rezgési sáv alig emelkedik ki a zajból

a rezgési sáv vállként jelenik meg

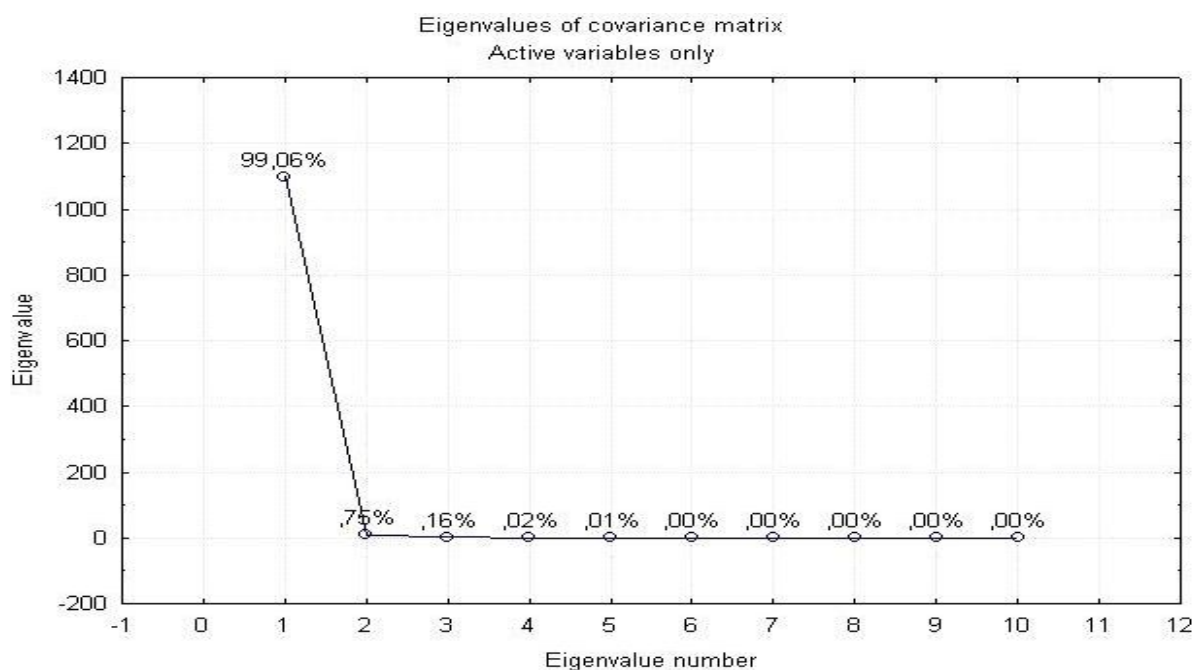
A Forma 1 módosulat Raman-színképe zajosabb, mint a Forma 3 módosulaté, ezért nem jelenik meg benne néhány sáv, mely a Forma 3 spektrumában – bár kis intenzitással – megtalálható.

A **11. táblázat**ban színezett háttér jelzi azokat az asszignált rezgési sávokat, melyeknél látványos differencia mutatkozik a különböző módosulatok között. A különbségek esetén csak azokat a hullámszám-eltolódásokat emeltem ki, melyekben az eltolódás mértéke legalább 5 cm^{-1} .

A legnagyobb intenzitású sávban, az N–H vegyértékrezgésben 14 cm^{-1} differencia figyelhető meg a Forma 1 és 2 valamint a Forma 3 módosulat között, a Forma 3 javára. Az amid-I sávhoz rendelhető karbonil vegyértékrezgésben úgyszintén, a Forma 1 és a Forma 2 1770 cm^{-1} -es hullámszám értékéhez képest a Forma 3 módosulat 9 cm^{-1} -el tolódik a nagyobb hullámszámok felé. Az 1108 cm^{-1} -nél megjelenő C–O–C vegyértékrezgés a Forma 1 és a Forma 2 esetén szimpla csúcsként, míg a Forma 3 esetén kettős csúcsként jelenik meg. A C–H vegyértékrezgés a Forma 1 és a Forma 2 módosulat esetén 865 cm^{-1} -nél jelentkezik, míg a Forma 3 módosulat esetén 870 cm^{-1} hullámszámnál. A 842 cm^{-1} -nél jelentkező ν_{asCC} sávban 5 cm^{-1} eltolódás jelentkezik a Forma1-2, valamint a Forma 3 módosulat között. A 814 cm^{-1} -nél található C–H deformációs rezgés a Forma 1 és Forma 2 esetén kettős csúcsban jelentkezik, míg a Forma 3 esetén szimpla csúcs látható. A CF_3 csoport deformációs rezgése 760 cm^{-1} -nél a Forma 1 és a Forma 2 esetén kettős csúcsként jelenik meg, míg a Forma 3 kismértékben eltolódott szimpla csúcsot ad, ahogyan a 647 cm^{-1} -nél jelentkező amid-VI sáv esetén is a Forma 1 és a Forma 2 módosulat kettőscsúcsot ad, ezzel szemben Forma 3 szimpla csúcsot.

4.3.2. IR spektrumok főkomponens-elemzése

Mivel infravörös spektroszkópiával mindhárom polimorf módosulat vizsgálhatóvá vált, értelmet nyert, hogy főkomponens-elemzéssel is megvizsgáljuk a módosulatok között fellépő különbségeket. A Forma 1 és a Forma 3 módosulatok közötti különbségek már szemmel is jól láthatóak a rezgési spektrumokban, ezért a Forma 1 és Forma 2 módosulat közötti, kisebb különbségek vizsgálatára fókuszálva érdemes sokváltozós adatelemző módszereket használnunk.

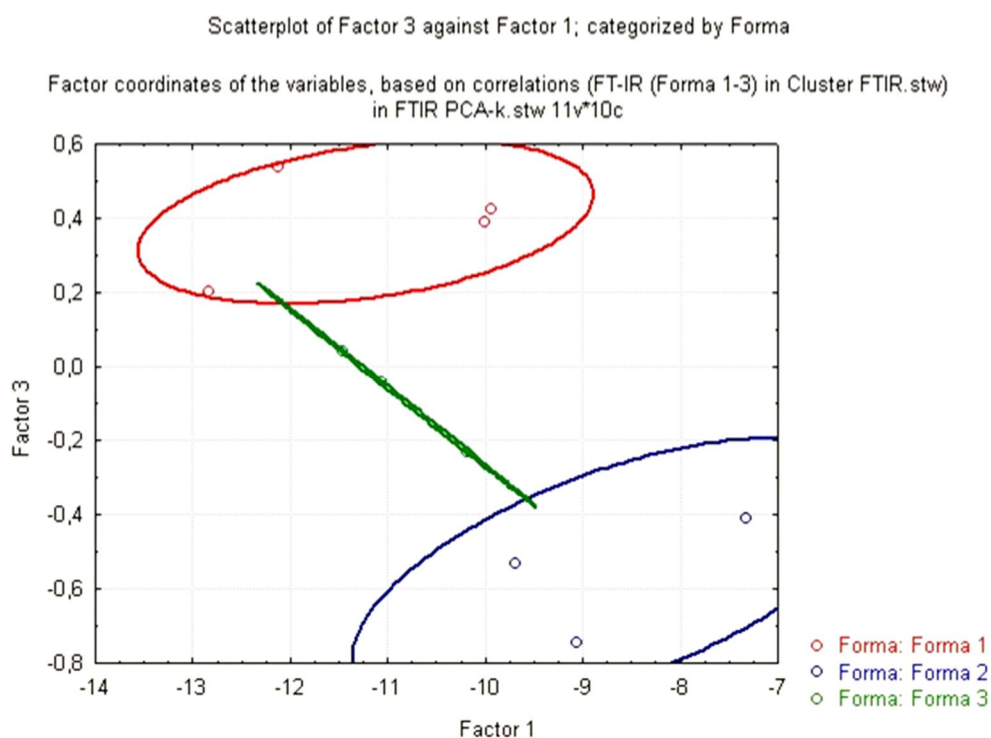


47. ábra: A három polimorf módosulat infravörös spektrumairól készített PCA „hegyomlás diagramja”

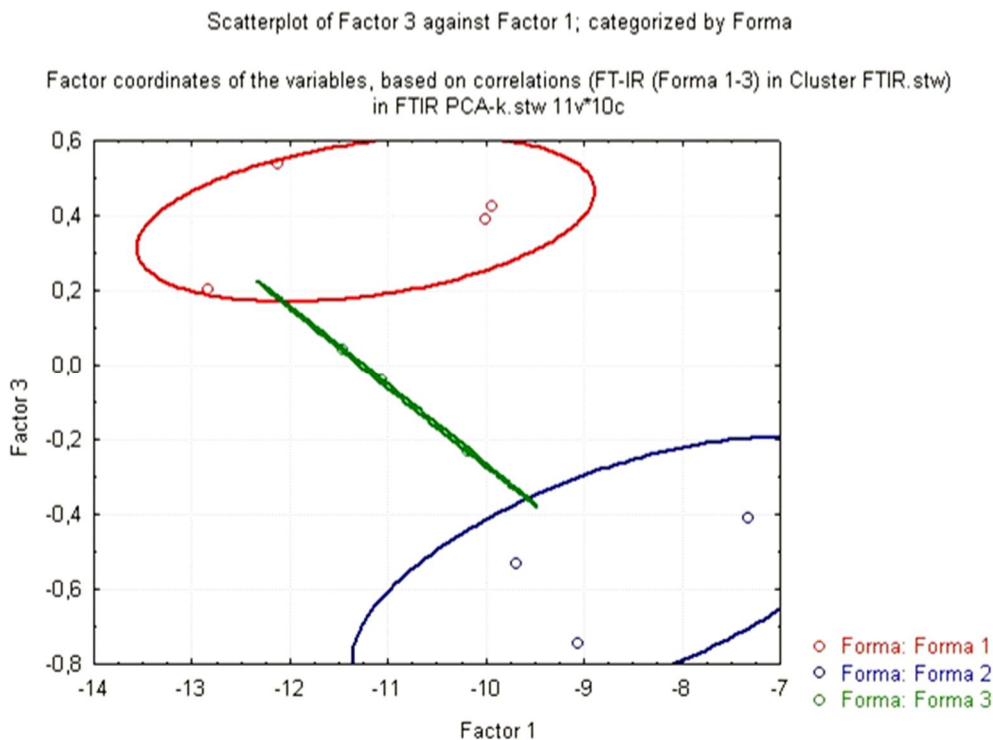
A három polimorf módosulat infravörös spektrumairól készített hegyomlás diagram (47. ábra) az egyes főkomponenseknek a teljes változékonyságból leírt részesedését mutatja be. Látható, hogy az első főkomponens a teljes változékonyság 99,06 %-át írja le. A második és harmadik főkomponensre együtt kevesebb, mint 1 % jut (PC2: 0,75%; PC3: 0,16%). Mivel az első három főkomponens a teljes változékonyság 99,97 %-át leírja, ezért a velük kapott *score* értékeket mutatom be (48-50. ábra). A kétdimenziós ábrázolásmódok közül a legjobb csoportok közti elválást a PC3 vs PC2 beállítás esetén tapasztaltam (50. ábra), ami jól megfigyelhető a háromdimenziós ábrán is (51. ábra).

Ha a súlyfüggvényeket vizsgáljuk (52. ábra), az első három súlyfüggvényt együtt ábrázolva jól megmutatkoznak a változékonyság leírásában betöltött szerepek. Mivel az első főkomponensre 99,06 % esik a teljes változékonyságból, ennek súlyfüggvénye rendelkezik a

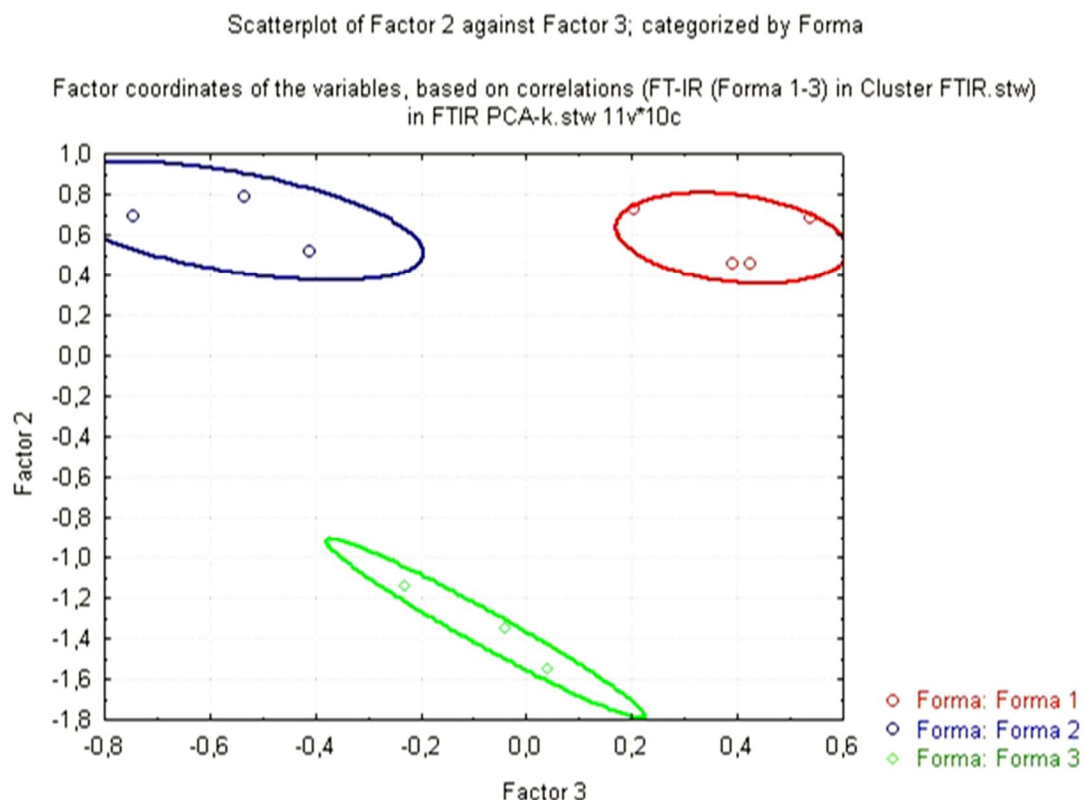
legnagyobb értékekkel, a második és harmadik főkomponensek súlyfüggvényei már látványosan kisebb értékekkel rendelkeznek.



48. ábra: PC2 vs PC1 score értékek



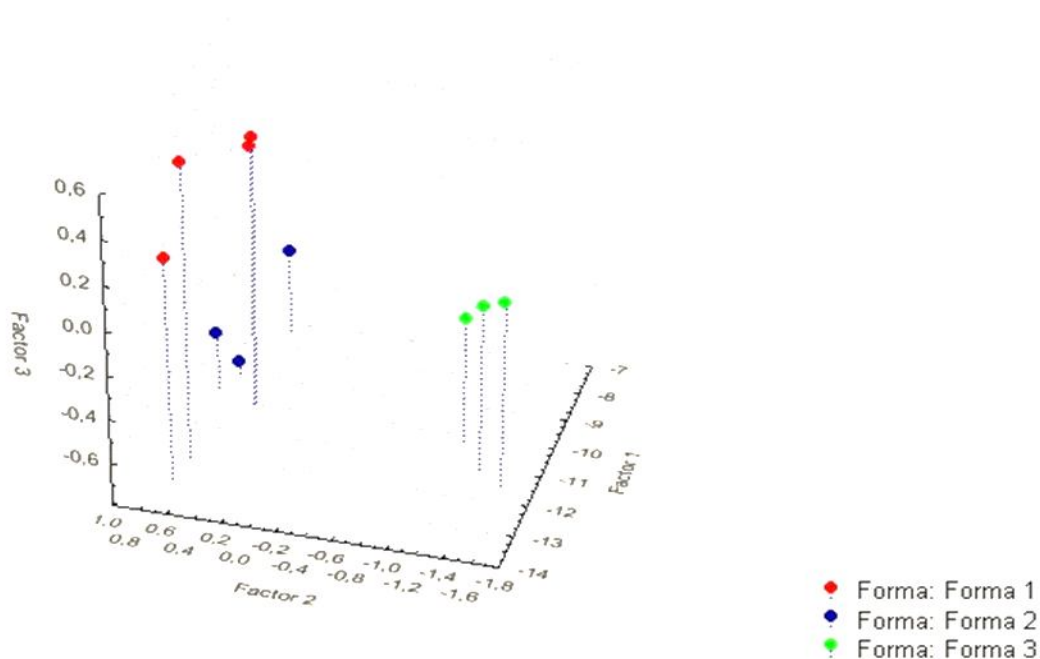
49. ábra: PC3 vs PC1 score értékek



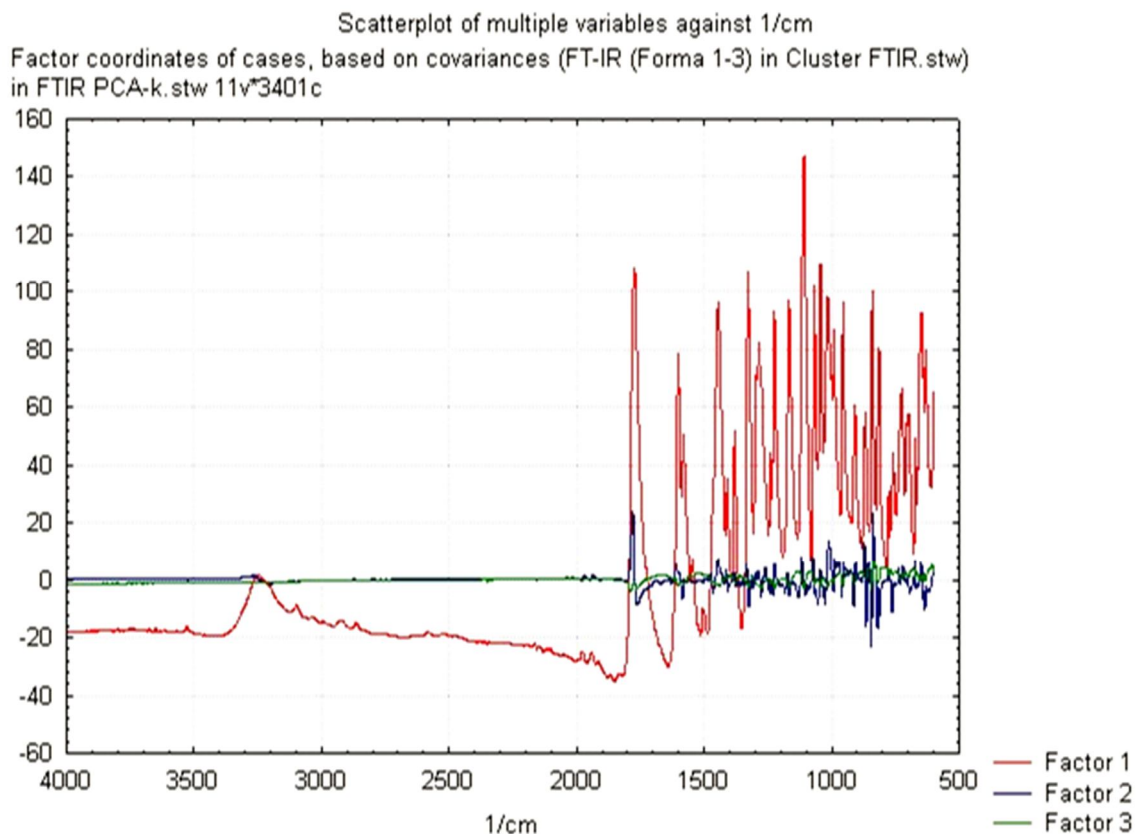
50. ábra: PC2 vs PC3 *score* értékek

3D Scatterplot of Factor 3 against Factor 1 and Factor 2; categorized by Forma

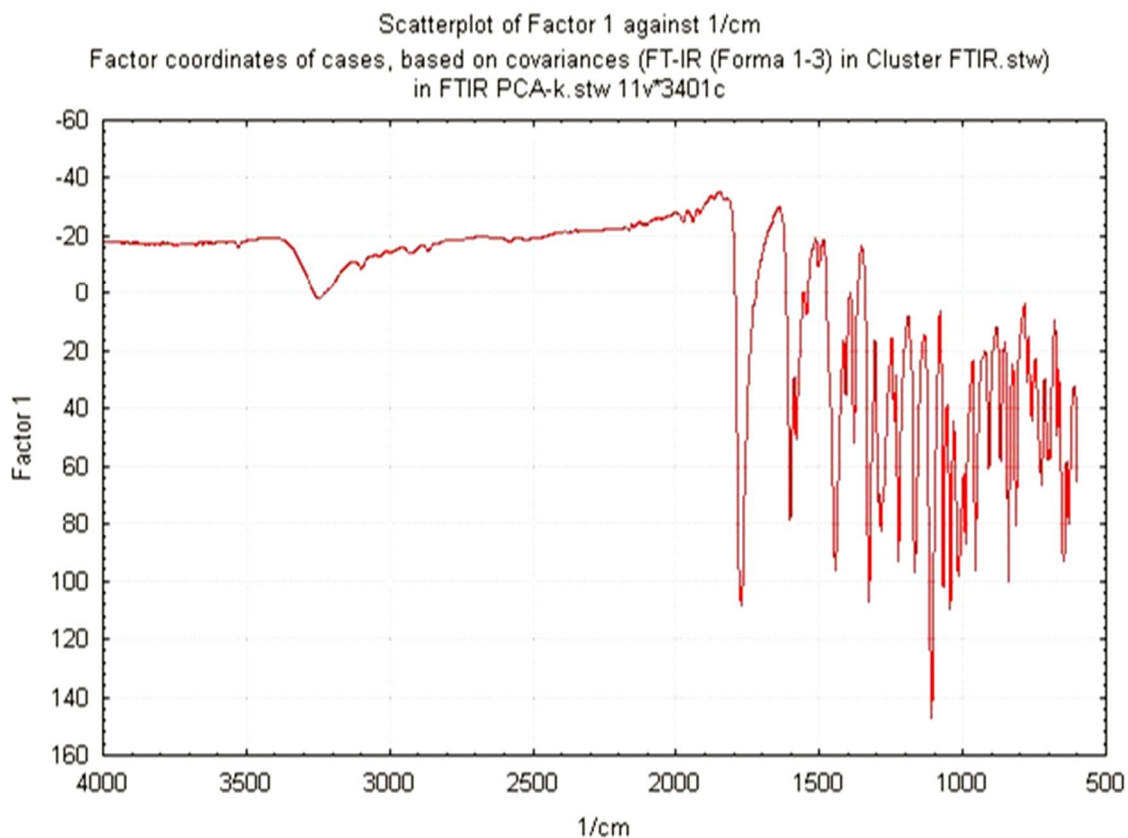
Factor coordinates of the variables, based on correlations (FT-IR (Forma 1-3) in Cluster FTIR.stw) in Cluster FTIR.stw 11v*10c



51. ábra: PC1 vs PC2 vs PC3 *score* értékek

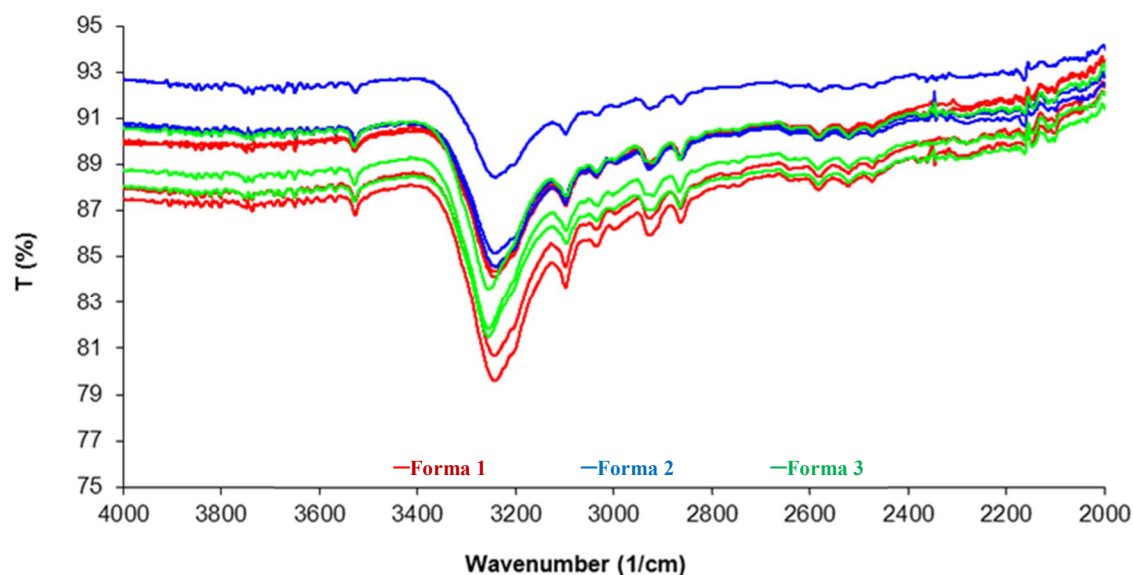


52. ábra: PCA első három súlyfüggvénye

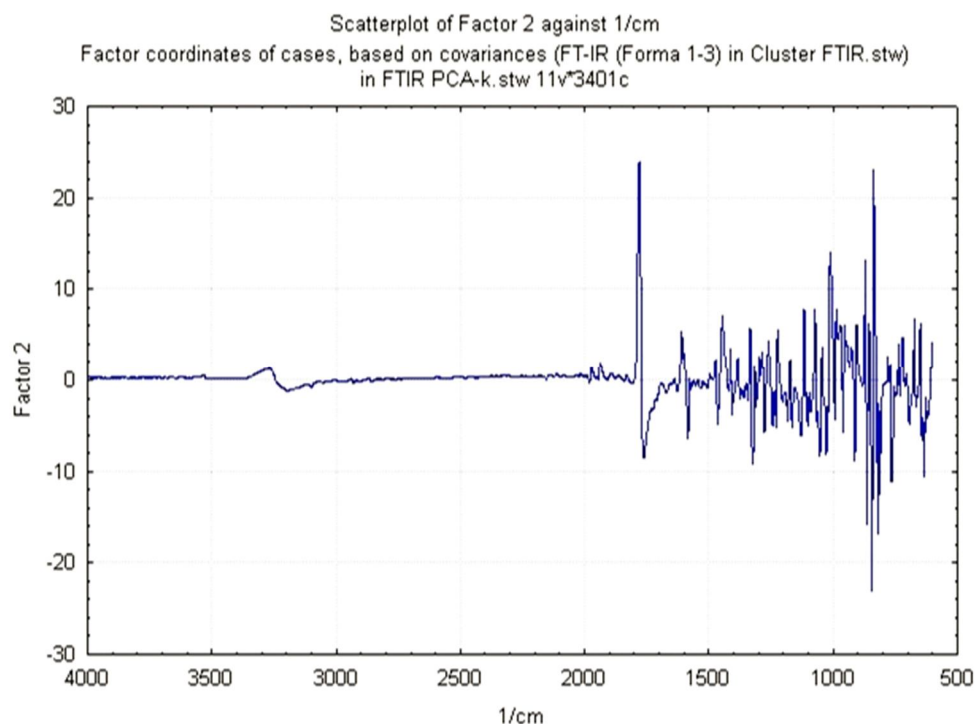


53. ábra: PC1 súlyfüggvénye

Az első főkomponens súlyfüggvénye (53. ábra) gyakorlatilag megegyezik a vizsgált anyagunk infravörös spektrumával (vö.:43. ábra a.). Ennek oka, hogy az ATR technikával történő mérés során (még ha állandó nagyságú erőt is alkalmaztam) a gyémánt-ZnSe kompozit kristály és a minta szemeséinek érintkezése eltérő lehet, ami alapvonal-eltolódást okozott minden hullámszámnál (54. ábra). Ezt a változékonyságot írja le az első súlyfüggvény.

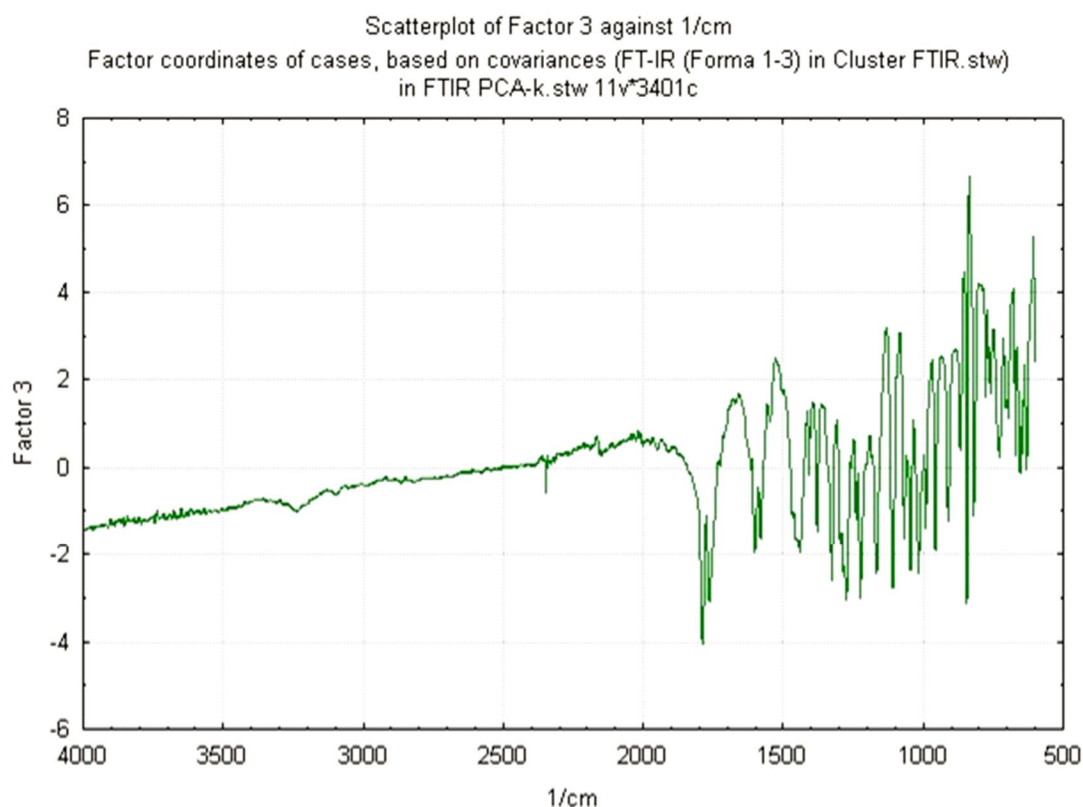


54. ábra: A három polimorf módosulat IR spektrumának részlete



55. ábra: PC2 súlyfüggvénye

A második főkomponens súlyfüggvénye esetén (**55. ábra**) a három legnagyobb értékkel rendelkező csúcs közül kettő korábban azonosítottam (1780 cm^{-1} : $\nu_{\text{C=O}}$, amid-I és 844 cm^{-1} : ν_{asCC}). Ezek közül az amid-I rezgésben jelentkezik nagymértékű különbség Forma 1 és 2, valamint a Forma 3 módosulat között (9 cm^{-1} eltolódás vö.:**43.ábra e**).



56. ábra: PC3 súlyfüggvénye

A harmadik főkomponens súlyfüggvénye esetén (**56. ábra**) a legnagyobb értékkel rendelkező csúcs (836 cm^{-1}) a korábbi asszignáció szerint nem más, mint a ν_{asCC} rezgés, mely Forma 3 módosulat esetén 5 cm^{-1} eltolódással jelentkezik.

A további súlyfüggvények elemzésétől eltekintünk, mivel a teljes változékonyságból rájuk eső részesedés elenyésző.

Tehát az asszignáció során láthattuk, hol és milyen különbségek jelentkeznek a különböző módosulatok között, a PCA pedig megmutatta, ezek közül melyek relevánsak a csoportkülönbségek felfedezésében. Ebből is látszik, a többváltozós adatelemzéssel a vizsgált rendszerek adatmátrixaiból – legyenek azok Raman- vagy IR spektrumok – újabb, komplexebb információ nyerhető.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KITEKINTÉS

Munkám célkitűzése egy hatóanyag-jelölt molekula három polimorf módosulatának vizsgálata volt Raman-spektroszkópiával és IR spektroszkópiával, továbbá adott polimorf módosulat előállításának nyomon követése Raman-szondával, a módosulatok azonosítása.

Kísérleteim során a mérési paraméterek optimalizálását követően a polimorf módosulatok minőségi vizsgálatát végeztem el.

- A Raman-spektroszkópiával vizsgálható módosulatokról spektrumfelvételeket készítettem az optimális mérési paraméterek beállításával Nd-YAG és dióda lézerrel történő gerjesztéssel.
- A spektrumokon csoportanalízist végeztem: vizsgáltam, elkülöníthetők-e a különböző módosulatok sokváltozós adatelemző módszerek alkalmazásával.
- A csoportanalízisek során megállapítottam, hogy a Forma 1 és a Forma 3 módosulat elválasztható egymástól mindkét gerjesztési mód esetén.
- Megállapítottam, hogy spektrumkönyvtár kialakításához célszerűbb a száloptikán keresztül történő gerjesztést alkalmazni, mert a kapott színekben a fluoreszcens hatás kevésbé érvényesül.
- Vizsgáltam a Raman-szonda mérési paramétereinek spektrumokra gyakorolt hatását. Az alkalmazott hőmérséklet és fordulatszám változtatásának hatásainak feltérképezésére főkomponens-elemzést végeztem.
- A főkomponens-elemzés során megállapítottam, hogy döntően a hőmérséklet befolyásolja a spektrális tulajdonságokat, a fordulatszám változtatásának nincs releváns hatása.
- Felvettem a Forma 1 és a Forma 3 szuszpenziójának spektrumait, melyeken csoportanalízist végeztem, azt vizsgálva, hogy elkülönül-e a két módosulat és megállapítottam, hogy a két módosulat szuszpenziója is elkülöníthető matematikai módszerekkel.
- Vizsgáltam a Forma 3 módosulat hűtési kristályosítással történő előállításának folyamatát, a kapott spektrumokat csoportanalízisnek vetettem alá.
- A csoportanalízis az átalakulási folyamatnak megfelelően rendezte a spektrumokat, megállapítottam, hogy az átkristályosítási folyamat sikeresen követhető a reaktorba merülő Raman-szondával.

- A polimorf módosulatokat infravörös spektroszkópiával vizsgáltam, ezzel a módszerrel a Raman-spektroszkópiával nem vizsgálható Forma 2 módosulat is elemezhetőnek bizonyult, így felvettem mindhárom módosulat IR spektrumát.
- A kapott spektrumokat csoportanalízisnek vetettem alá, vizsgáltam, elkülönül-e a három polimorf módosulat egymástól, megállapítottam, hogy a csoportanalízis alapján mindhárom polimorf módosulat elkülöníthető.
- Az IR spektrumban megjelenő rezgési sávokat asszignáltam, megjelenésük hullámszám-tartományát összevettem a Raman-spektrumok megfelelő Raman-eltolódásainak tartományával, valamint vizsgáltam, mely kötések rezgésében jelentkezik eltérés a három módosulat spektrumában.
- Az IR spektrumokat főkomponens-elemzésnek vettem alá, megállapítottam, hogy mely rezgési sávok okozzák a legnagyobb differenciát a módosulatok spektrumaiban.

Az infravörös spektroszkópia a Raman-spektroszkópiával egyenrangú vizsgálati módszer a polimorf módosulatok vizsgálatára, a különböző módosulatok Raman- és IR spektruma is unikális, a spektrális eltérések alapján a különböző polimorf módosulatok elkülöníthetők. A Raman-spektroszkópiának általában több előnyös jellemzőt tulajdonítanak, mégis esetemben az infravörös spektroszkópia volt az a módszer, mely lehetővé tette a három polimorf módosulat együttes vizsgálatát és így a molekula teljes minőségi analízisét.

Vizsgálataim is bizonyítják, nincs abszolút módszer, önmagában egyetlen spektroszkópai metodika sem alkalmas minden felmerülő probléma megoldására. A különböző vizsgálati módszerek részinformációkat szolgáltatnak, a feladatmegoldás orozslánrészét ezen részinformációk értelmezése, összesítése, kiegészítése adja. Nagyban elősegíti a problémamegoldást a sokváltozós adatelemző módszerek használata, a kemometria alkalmazása.

A valósidejű (*real-time*) mérési technikák alkalmazása egyre terjed az ipar számos területén, de különösen fontos a gyógyszeripari folyamatok során. Vizsgálataim alátámasztják, hogy a Raman-szonda alkalmas a kristályosítási folyamatok nyomon követésére, használata nagyban elősegíti az átalakulás folyamatának jobb megismerését és megértését. Kísérleteim során a polimorf átalakulás vizsgálatára koncentráltam, de a berendezés által kínált lehetőségek nem merülnek ki az általam használt alkalmazásokban, egy esetleges jövőbeli vizsgálat alapját képezhetik.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönettel tartozom Dr. Kiss Violetának a méréseim során nyújtott támogatásért, a polimorfia elméleti alapjainak megismertetéséért. Köszönet illeti a türelméért és dolgozatom alapos átvizsgálásáért is.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Gergely Szilveszternek, aki megismertetett a kemometriai adatelemzési módszerekkel, segített az eredmények értékelésében és mindig áldozott rám időt, ha kérdéssel fordultam hozzá.

Köszönettel tartozom Dr. Finta Zoltánnak, amiért lehetőséget biztosított méréseim elvégzéséhez.

Végül köszönöm Nagy Viktornak az ábrák szerkesztésében és a dolgozatom felépítésében nyújtott áldozatos segítségét.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Kálmán A.: A polimorfia jelensége és jelentősége a gyógyszeriparban.
<http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/kemia/tudnap5/kalman..html>
Megtekintés dátuma: 2011. szeptember 12.
- [2] Farkas B., Révész P.: Kristályosítástól a tablettázásig. Universitas Kiadó, Szeged, 2007.
- [3] Threlfall T.L.: Analysis of organic polymorphs. A review. *Analyst*, **120(10)**, 2435–2460 (1995).
- [4] Yu Z.Q., Chew J.W., Chow P.S., Tan R.B.H.: Recent advances in crystallization control. An industrial perspective. *Chemical Engineering Research and Design*, **85(7)**, 893–905 (2007).
- [5] Assirelli M., Xu W., Chew W.: Reactor kinetics studies via process Raman Spectroscopy, multivariate chemometrics, and kinetics modeling. *Organic Process Research Development*, **15(3)** 610-621 (2011).
- [6] Pokol Gy., Sztatisz J.: Analitikai kémia I. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2000.
- [7] Graf Z.-né, Sztatisz J.: Analitikai kémia II. Műszeres analitikai gyakorlatok. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2007.
- [8] Lewis I.R., Edwards H.G.M: Handbook of Raman spectroscopy. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- [9] Šašić S.: Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy. John Wiley & Sons, Inc., Malden, 2008.
- [10] Bertóti I., Marosi Gy., Tóth A.: Műszaki felülettudomány és orvosbiológiai alkalmazásai. B + V Lap- És Könyvkiadó, Budapest, 2003.
- [11] De Beer T., Burggraeve A., Fonteyne M., Saerens L., Remon J.P., Vervaet C.: Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *International Journal of Pharmaceutics*, **417(1-2)**, 32–47 (2011).
- [12] Das R.S., Agrawal Y.K.: Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, doi:10.1016/j.vibspec.2011.08.003 (2011).
- [13] Billes F.: Rezgési spektroszkópia. Jegyzet (egyetemi belső használatra), 2. kiadás. BME, Budapest, 2005.

- [14] Wachter J.A., Antosz F.J., Wang F., Berglund K.A.: Monitoring polymorphic transformations in real-time. (2000).
<http://161.58.205.25/resources/raman/rr/2000spring.pdf>
Megtekintés dátuma: 2011. szeptember 08.
- [15] Myerson A.S.: Handbook of industrial crystallization. Butterworth-Heinemann, Boston, 2002.
- [16] Kobayashi R., Fujimaki Y., Ukita T., Hiyama Y.: Monitoring of solvent-mediated polymorphic transitions using in situ analysis tools. *Organic Process Research Development*, **10(6)**, 1219–1226 (2006).
- [17] Rajalahti T., Kvalheim O.M.: Multivariate data analysis in pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, **417(1-2)**, 280–290 (2011).
- [18] Borosy A.P.: Sokváltozós adatelemzés. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2001.
- [19] Szepesváry P.: Többváltozós felderítő statisztika. Budapest, 2004.
<http://phys.chem.elte.hu/magyar/sokvaltozos/sokvaltozosindex.htm>
Megtekintés dátuma: 2011. április 30.
- [20] Hu Y., Wikström H., Byrn S.R., Taylor L.S.: Analysis of the effect of particle size on polymorphic quantitation by Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, **60(9)**, 977–984 (2006).
- [21] Choi H.C., Jung Y.M., Kim S.B.: Size effects in the Raman spectra of TiO₂ nanoparticles. *Vibrational Spectroscopy*, **37(1)**, 33–38 (2005).
- [22] Gupta S.K., Desai R., Jha P.K., Sahoo S., Kirin D.: Titanium dioxide synthesized using titanium chloride: size effect study using Raman spectroscopy and photoluminescence. *Journal of Raman Spectroscopy*, **41(3)**, 350–355 (2010).
- [23] Kiss J.-né, Erőss Klára: Az infravörös spektroszkópia analitikai alkalmazása. Műegyetem Kiadó, Budapest, 1993.
- [24] Pungor E.: Analitikusok kézikönyve. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1987.
- [25] Scheibe D.: Vibrational relaxation in liquids with intermolecular dipole potentials of the order of kT. *Journal of Raman Spectroscopy*, **13(2)**, 103–109 (1982).