



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Gyógyszerhatóanyag polimorfia vizsgálata Raman- és IR spektroszkópiával

TDK dolgozat

Készítette:

Lőrincz Áron

B.Sc. biomérnök hallgató

Témavezetők:

Dr. Gergely Szilveszter

egyetemi adjunktus (BME ABÉT)

Dr. Kiss Violetta

kutató-fejlesztő (Sanofi KF / FML)



Budapest • 2011

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3 -
1. Bevezetés és célkitűzések.....	5 -
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 A polimorfia jelensége	7
2.2 A polimorfia gyógyszeripari jelentősége	9
2.3 Polimorfiaszűrés	10
2.4 A polimorfia vizsgálatának analitikai módszerei.....	12
2.4.1 Röntgendiffrakció	12
2.4.2 Optikai mikroszkópia	13
2.4.3 Rezgési spektroszkópia	14
2.4.3.1.1 A Raman-spektroszkópia elméleti háttere	16
2.4.3.1.2 Raman készülékek	18
2.4.3.1.3 A Raman–mikroszkóp felépítése	18
2.4.3.1.4 Raman-spektroszkópia alkalmazása polimorfia vizsgálatban.....	20
2.4.3.2.1 Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere.....	20
2.4.3.2.2 Az infravörös készülék felépítése és működése	21
2.4.3.2.3 Az infravörös spektroszkópia alkalmazása a gyógyszeriparban	24
2.5 PAT - folyamatellenőrző technológia.....	25
2.6 Adatfeldolgozáshoz használt számítási módszerek.....	26
2.6.1 Főkomponens analízis (PCA).....	26

2.6.2	Cluster analízis (CA)	27
3.	Anyagok és módszerek	30
3.1	Modellvegyület	30
3.2	Polimorf módosulatok szuszpenziós vizsgálata	33
4.	Műszerek, berendezések	34
4.1	Raman-spektroszkópiás mérésekhez használt készülékek	34
4.1.1	A készülék jellemzői:	35
4.2	Fourier-transzformációs NIR mérésekhez (FT-NIR) használt készülék	36
4.3	Eredmények értékelése	37
5.	Eredmények értékelése	38
5.1	A Raman-készülék mérési paramétereinek optimalálása	38
5.2	A kísérletterv tematikája	40
5.3	Polimorf módosulatok minőségi (kvalitatív) vizsgálata	42
5.3.1	Polimorf módosulatok szilárd formáiról Raman-mikroszkópos módszerrel spektrumsorozat létrehozása és szelekciója	42
5.3.2	Polimorf módosulatok szilárd formáiról Raman-szondás módszerrel spektrumsorozat létrehozása és azok szelekciója	47
5.4	Polimorf módosulatok szilárd formáiról analitikai infravörös-spektroszkópia módszerrel spektrumsorozat létrehozása és szelekciója	51
5.5	Polimorf módosulatok vizsgálata szuszpenzióban Raman-szonda segítségével	58
5.5.1	Próbakísérlet leírása és elemzése	58
5.5.2	Polimorf transzformációs vizsgálat reaktorban in-line nyomon követéssel	68
6.	Összefoglalás	81
	Köszönetnyilvánítás	84
	Felhasznált irodalom	85

Rövidítések jegyzéke

AFR	<i>Automatic Fluorescence Rejection</i>	<i>automatikus fluoreszcencia gátlás</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>	<i>gyengített teljes reflexió</i>
CA	<i>Cluster Analysis</i>	<i>klaszter analízis</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	<i>töltéscsatolt eszköz</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	<i>differenciál pásztázó kalorimetria</i>
DTA	<i>Differential Thermal Analysis</i>	<i>differenciál termikus kalorimetria</i>
FBRM	<i>Focused Beam Reflectance Measurement</i>	<i>fókuszált sugár visszaverésének mérése</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	<i>Európai Gyógyszerügyi Hatóság</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>	<i>Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatala</i>
FIR	<i>Far InfraRed</i>	<i>távoli infravörös</i>
FT	<i>Fourier Transformation</i>	<i>Fourier-transzformáció</i>
HS-IR	<i>Hot-Stage Infrared spectroscopy</i>	<i>fűthető tárgyasztalú infravörös spektroszkópia</i>
HSM	<i>Hot-Stage Microscopy</i>	<i>fűthető tárgyasztalú mikroszkópia</i>
HS-XRPD	<i>Hot-Stage X-Ray Powder Diffraction</i>	<i>fűthető tárgyasztalú röntgendiffrakció</i>
IR	<i>InfraRed</i>	<i>infravörös</i>
IPA	<i>2-propanol</i>	<i>izopropil-alkohol</i>
MIR	<i>Mid InfraRed</i>	<i>analitikai infravörös</i>
Nd-YAG	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>	<i>neodímiummal szennyezett ittrium-alumínium műkristály</i>
NIR	<i>Near InfraRed</i>	<i>közeli infravörös</i>
PAT	<i>Process Analytical Technology</i>	<i>folyamatelemző technológia</i>

PC	<i>Principal Component</i>	<i>főkomponens</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	<i>főkomponens-elemzés</i>
TG	<i>Thermo Gravimetry</i>	<i>termogravimetria</i>
UV	<i>UltraViolet</i>	<i>ultraibolya</i>
XRPD	<i>X-Ray Powder Diffraction</i>	<i>röntgen pordiffrakció</i>

1. Bevezetés és célkitűzések

A gyógyszergyártás és -kutatás területén napjainkban már elengedhetetlen fontosságú a szilárd halmazállapotú gyógyszerhatóanyagok vizsgálata. Az eltérő formák ugyanis eltérő fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkeznek, amik döntően befolyásolják annak felhasználhatóságát és biológiai hasznosulását. A polimorfia jelentősége gazdasági szempontból sem csekély, ugyanis a felderítetlen módosulatok teret engedhetnek a generikus gyártók megjelenésének a piacon, ami az organikus gyártó számára hatalmas veszteségeket jelent.

A szerves molekulák polimorfiájának vizsgálata nagyon összetett és szerteágazó tudományág, ami számos kihívás és probléma elé állítja a témával foglalkozó kutatókat. A problémák tanulmányozása és megoldása pedig megköveteli a különböző analitikai módszerek együttes, harmonikus alkalmazását.

Az új technikák megjelenése segíti a felmerülő kérdések mélyebb tanulmányozását, valamint lehetőséget ad olyan új folyamatelemző technológiák (Process Analytical Technology; PAT) kifejlesztésére, amelyek segítségével átfogóbb képet alkothatunk a problémakörökről. A szélesebb ismeretek pedig lehetőséget adnak pontosabb elemzések készítésére, a technológiák finomítására és a gyártástechnikák jobb szabályozására, amik végső soron mind gazdasági előnyhöz juttatnak minket.

Szakdolgozatom célkitűzése egy Sanofi által fejlesztésre kiválasztott hatóanyag molekula öt polimorf módosulatának vizsgálata Raman- és infravörös spektroszkópiával, valamint annak a kérdéskörnek a megvizsgálása, hogy a Raman-száloptika segítségével lehetséges-e a molekula polimorf transzformációs reakciójának in-line nyomon követése. A kutatás úttörőnek mondható, mert Magyarországon a Raman-spektroszkópia ilyen jellegű felhasználása még gyerekcipőben jár.

A dolgozatban bemutatott vizsgálatok Raman-spektroszkópiával végzett kísérletei a Sanofi Zrt. Kutatás és Fejlesztés Kémiai Fejlesztésének Fizikai minőségi laboratóriumában, az infravörös spektroszkópiai kísérletek pedig a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékének Infravörös laboratóriumában készültek.

Iparjogvédelmi okok miatt szerkezeti képlet nem szerepel a dolgozatomban, azonban ez nem befolyásolja érdemben az elvégzett munka bemutatását és megértését.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A polimorfia jelensége

A polimorfia elnevezés a görög sok (πολν) és alak (μορφη) szavakból eredeztethető. A fogalmat Mitscherlich vezette be 1822-ben arzenát és foszfát sók vizsgálata során. Magát a jelenséget pedig Klaproth (1798) és Dawey (1789) figyelte meg elsőként a kalcit-argonit, valamint a gyémánt esetében. Azóta a jelenség számtalan példában bukkant fel, mind az elméletben, mind pedig a gyakorlatban, komoly nehézséget okozva a fejlesztő munkában. 1969-ben pedig Penzien és Schmidt bevezették a „crystal engineering” fogalmát, új szemléletet honosítva meg így ezen a területen.¹

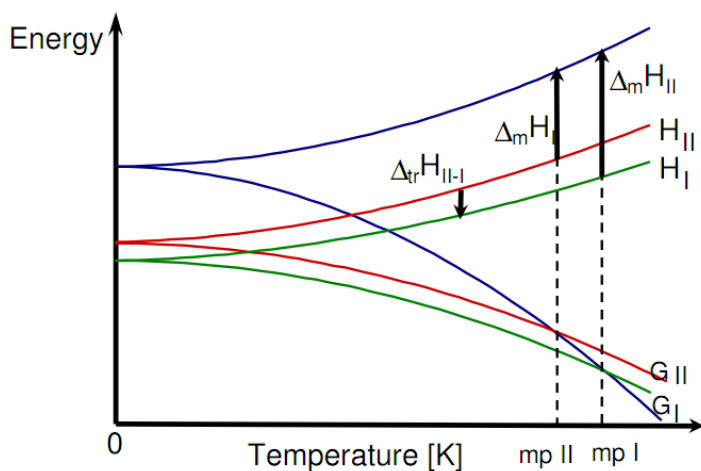
Polimorfiának azt a jelenséget nevezzük, amikor a megegyező kémiai összetételű anyagok többféle szilárd formában is képesek kristályosodni. Ennek oka lehet például a kristályrácsokban elhelyezkedő molekulák eltérő konformációja, illetve az, ha az azonos konformációjú molekulák eltérően rendeződnek el. Az eltérő kristályszerkezet eltérő rácsenergiával, ezáltal eltérő fizikai valamint fizikai-kémiai jellegzetességekkel is jár.²

A polimorfia szervesetlen vegyületeknél is több helyen előfordul, de a szerves vegyületek kristályaiban a molekulák még sokszínűbben kapcsolódhatnak össze. A fogalmon belül konformációs, valamint illeszkedési polimorfia különböztethető meg.

Két polimorf módosulat termodinamikai értelemben kétféle viszonyban állhat egymással: monotróp vagy enantiotróp rendszert alkothatnak.

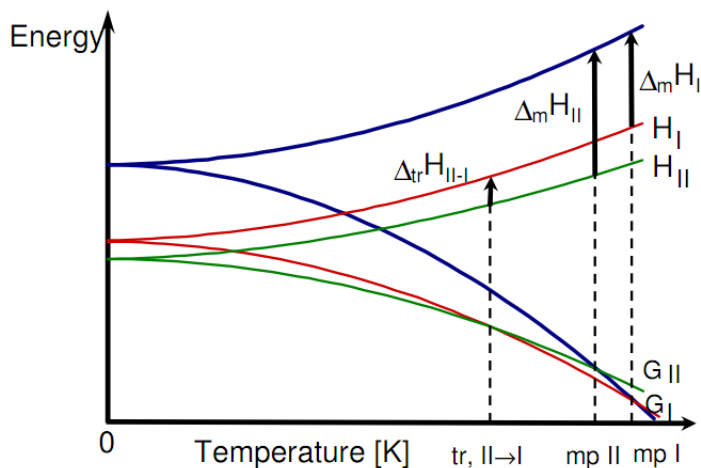
Monotrópiáról akkor beszélhetünk, ha az egyik módosulat szabadenergiája (G_A) kisebb a másik forma szabadenergiájánál (G_B) a vizsgált tartományban ($G_A < G_B$). Ez esetben a két módosulat fázisátalakulás nélkül nem alakítható egymásba. A kisebb szabadenergiájú A módosulat stabilabb, a nagyobb szabadenergiájú B módosulat spontán exoterm reakcióval A módosulattá alakulhat (1. ábra).

Enantiotrópiánál létezik reverzibilis átmenet a módosulatok között anélkül, hogy gáz- vagy folyadékfázison keresztül történne az átalakulás. Ebben az esetben a két módosulat szabadenergia ($G_A; G_B$) görbéje egy adott T ($^{\circ}\text{C}$) hőmérsékleten metszi egymást és a metszéspontban a stabilitási sorrend megváltozik (**2. ábra**).^{1;3}



1. ábra: Monotróp dimorf rendszer E/T diagramja

T : abszolút hőmérséklet
 H : entalpia
 G : Gibbs-féle szabadenergia
 E : energia
 mp_I & mp_{II} : olvadáspontok
 $\Delta_t H$: fázisátmenethez szükséges energia
 $\Delta_m H$: olvadáshő



2. ábra: Enantiotróp dimorf rendszer E/T diagramja

T : abszolút hőmérséklet
 H : entalpia
 G : Gibbs-féle szabadenergia
 E : energia
 mp_I & mp_{II} : olvadáspontok
 $\Delta_t H$: fázisátmenethez szükséges energia
 $\Delta_m H$: olvadáshő

2.2 A polimorfia gyógyszeripari jelentősége

A polimorf módosulatok az eltérő kristályszerkezetből eredően eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Ilyen például az olvadáspont, oldhatóság, oldódási sebesség, alakíthatóság, stabilitás stb. Ezen tulajdonságok egy gyógyszerhatóanyag esetében jelentősen befolyásolják annak formulálási tulajdonságait, a készítmény felszívódását, hatékonyságát, toxicitását, s így összességében a biológiai hasznosulást.^{4;5;6}

A kristályrács energiája befolyásolja az oldhatóságot és az oldódási sebességet, így amennyiben a különböző formák oldékonysága eltér egymástól, akkor ennek komoly hatása van az adott szilárd anyag gyógyszerre alakításának esélyeire, és az aktív hatóanyag felszívódására az alkalmazott gyógyszerformából.

A polimorfia a feldolgozás különböző fázisaira is hatást gyakorol, az őrlés, granuláció, szárítás, liofilizálás, préselés módosulatonként eltérő metodikát követelhet meg.¹³

A polimorfia jelensége igen gyakori a gyógyszerhatóanyagoknál. Egyes irodalmi források szerint 32-51%-ban fordul elő, míg más felmérések szerint a kristályos hatóanyagok körülbelül 90%-ánál fordul elő a jelenség.^{2;7}

Elmondható tehát, hogy a polimorfia vizsgálata rendkívül fontos, hiszen a gyógyszer törzskönyvezési hatóságok megkövetelik a hatóanyag szilárd formáit jellemző leírást is. Egy gyógyszerhatóanyag, csak olyan polimorf módosulatban hozható forgalomba, melyen a hosszadalmas biológiai, biokémiai, toxikológiai, klinikai vizsgálatokat elvégezték. A forgalomba hozatal után egy új módosulat megjelenése a vizsgálatok megismétlését teszi szükségessé, amely jelentős anyagi veszteséget jelent a gyártónak. Ezen felül egy addig nem ismert új szilárd forma megjelenése szabadalmazásra kerülhet, mint új felfedezés, így a kifejlesztő 20 évig kizárólagos jogot kaphat a hatóanyag fejlesztésére és gyártására. Azonban ha más gyártók esetlegesen megtalálnák a hatóanyagnak addig nem ismert polimorf módosulatát, akkor a szabadalmi jog megsértése nélkül kezdhetik el annak a gyártását, így tehát különös fontossággal bír, hogy az organikum gyártói a hatóanyaguk minden lehetséges módosulatát felkutassák.

Az organikus és generikus⁸ készítmények engedélyezését az ICH (International Conference on Harmonisation) ajánlása szabályozza, amelyet az európai (European Medicines Agency; EMEA) és az amerikai gyógyszerhatóság (U.S. Food and Drug Administration; FDA) is elfogadott.

2.3 Polimorfiaszűrés

Egy hatóanyag polimorf módosulatainak és azok jellemzőinek megismerése a fejlesztés folyamán rendkívül fontos és az elsődlegesen elvégzendő feladatok közé tartozik. Egy adott anyag polimorfijának feltárása érdekében végzett szisztematikus vizsgálatsorozatot polimorfiaszűrésnek nevezzük. Ez teszi lehetővé, hogy a fejlesztésre kiválasztott polimorf módosulat (röviden forma) a kitűzött céloknak megfelelő legyen, és minimálisra csökkentsünk egy, a fejlesztés későbbi szakaszában előjövő polimorfia probléma lehetőségét. A polimorfiaszűrés során lehetséges az egyes formák önálló kinyerése, de igen gyakran polimorf keverékek képződésével is számolnunk kell. A vizsgálatsorozat során alkalmazható eljárásokat az **1. táblázat** foglalja össze.

A polimorfok előidézésére irányuló kísérleteket a megtalált formák jellemzése követi. Az elsődleges feladat a kémiai azonosság bizonyítása, melyet a kapott szilárd fázisok jellemzése követ. Ehhez a következő fejezetben tárgyalt szilárd fázisú analitikai eljárások használatosak.¹²

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	őrlés prézelés	alapmolekula	energia, idő
Termikus átalakítás	hevítés	alapmolekula vagy szuszpenziója	közeg, hőmérséklet, keverési sebesség, idő
	hevítés	alapmolekula hidrátja és/vagy szolvátja	hőmérséklet, idő
Besugárzás	ultrahang UV fény lézer Röntgen	alapmolekula vagy szuszpenziója	energia, idő, hőmérséklet

1. táblázat A polimorfiaszűrésben alkalmazható eljárások¹

2.4 A polimorfia vizsgálatának analitikai módszerei

Az elmúlt évtizedekben nagy fejlődésen mentek át a polimorfia vizsgálatára alkalmas műszerek, mely egyrészt a felmerülő új problémák megoldására való törekvésnek, továbbá a módosulatokban rejlő gazdasági érték megőrzésének köszönhető.

A jelenség vizsgálatára alkalmas leggyakrabban használt módszerek:

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

A felsorolt módszerek közül munkám során használt Raman- és infravörös spektroszkópiával foglalkozom részletesebben dolgozatomban, melyek közül a Raman módszer a magyar gyógyszeriparban még igen újszerűnek mondható, ami különösen érdekessé teszi a munkát.

2.4.1 Röntgendiffrakció

A röntgendiffrakció a szilárd anyagok szerkezetének vizsgálatában alapvető fontosságú. A módszer alapja, hogy a vizsgált szilárd anyagok kristályainak minden atomja az elektronfelhője révén a tér minden irányába szétszórja a rájuk eső sugárzást. Miután minden kristályt sok rendezetten elhelyezkedő atom épít fel, így a szétszóródó hullámok egymással interferálnak, így leképezve az anyag szilárd fázisú szerkezetét.⁹

A diffrakció egyenletét Lawrence Bragg írta le:

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

Δs	interferáló hullámok útkülönbsége
n	1, vagy 1-nél nagyobb egész szám
λ	beeső monokromatikus röntgensugárzás hullámhossza
d	azon párhuzamos rácssíkok távolsága, amely a sugarakat diffraktálja
θ	a beeső sugárzásnak a diffraktáló síksereggel bezárt hegyesszöge

A diffrakciós kép a kristályrácson, mint periodikus térrácson reflektálódott, diszkrét helyeken megjelenő különböző intenzitású interferencia maximumokból áll. A diffrakciós kép tulajdonképpen a kristályos vegyületek „ujjlenyomata”-ként tekinthető. A röntgendiffrakciós módszerrel történő polimorfia vizsgálatra a pordiffrakciós módszert alkalmazzák leginkább, bár a legpontosabb információk az egykristály-röntgendiffrakciós módszerrel nyerhetőek, de ennek lehetőségei sokszor igen korlátozottak az egykristály előállításának nehézségei miatt.

2.4.2 Optikai mikroszkópia

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.

A kristályok a szemcsék mérete és alakja, az élek arányai, és a kristálylapok által bezárt szögek alapján kristálytani osztályokba sorolhatók, ezenfelül pedig a megjelenésről a kristály növekedési tulajdonságaira is lehet következtetni. Ezek a tulajdonságok mind számottevő jelentőséggel bírnak a szilárd gyógyszerformák előállításánál. Az anyagok feldolgozását a morfológiai sajátságok nagyban befolyásolják, ezért a vizsgálatok

megkezdésénél az elsők között szerepel a mikroszkópos vizsgálat. Bár a kristályok alakja és mérete fontos tulajdonság, de sohasem döntő polimorfia szempontjából, mert a különböző formák is gyakran rendelkeznek hasonló habitussal.

Polimorf módosulatok vizsgálatára alkalmas módszer a fűthető tárgyasztalú mikroszkópia (Hot-stage Microscopy, HSM). A készülék használatával az olyan változásokat is könnyen meg lehet figyelni, mint az olvadás vagy átkristályosodás, annak köszönhetően, hogy a fázisátalakulást gyakran a polarizált fényben is jól látható fénytörési tulajdonságok változása jellemzi.^{1;4;10}

2.4.3 Rezgési spektroszkópia

A rezgési spektroszkópia a rezgési energia átmenetek gerjesztésén alapuló szerkezetvizsgálati módszerek összessége.

A molekulák folyamatos mozgásban vannak. A transláció és rotáció során a molekulában lévő atomok által bezárt szögek és távolságaik állandóak maradnak, viszont az atomok közötti távolságok folyamatosan változnak. Pontosabban azonos sebességgel haladnak egy irányban, illetve állandó szögsebességgel forognak a meghatározott tengelyük körül, miközben lényegi helyzetük és orientációjuk nem változik. Ezeket a mozgásokat úgynevezett normálrezgésnek hívjuk, és ilyenkor a molekula összes atomja ugyanazzal a frekvenciával (normálfrekvencia) rezeg, de a fázisuk lehet azonos vagy ellentétes is. Egy anyag rezgési spektrumát ezeknek a mozgásoknak az összessége határozza meg. A spektrum képében ezen felül még közrejátszhatnak az esetlegesen megjelenő felhangok, valamint a kombinációs és differenciasávok is.

A molekuláknak $3N-6$ db független rezgése lehet, ahol N az atomok számát jelöli. Abban az esetben, ha lineáris elrendezésű atomról beszélünk, ez a szám $3N-5$ -re módosul.

A rezgési spektroszkópia gyakorlati felhasználásának alapja, hogy egyes funkciós csoportoknak jellemző elnyelési sávjaik vannak. Ezek az elnyelési sávok mindig jelen vannak, függetlenül attól, hogy milyen molekulában található az adott funkciós csoport, helyük pedig csak az atomok közötti kötések minőségétől függ.

Az elnyelési sávokat adó rezgéseket az alapján csoportosítjuk, hogy azok milyen geometriai paramétert változtatnak meg a vizsgált molekulában. Így megkülönböztethető:

- **vegyérték rezgés**: a kötéstengely irányában végbemenő rezgés,
- **deformációs rezgés**: a kötésszög változásán alapuló rezgés,
 - **torziós rezgés**: a deformációs rezgések közé tartozik, és a négy atom által bezárt torziós szöget változtatja.

Abban az esetben, ha a besugárzó elektromágneses sugárzás megegyezik az atomok közötti kötések frekvenciájával, a gerjesztett anyag elnyelheti a sugárzás egy részét (abszorpció), miközben a többit átereszti (transzmisszió) vagy esetlegesen visszaveri azt (reflexió).¹¹⁹¹²

A rezgési spektroszkópián belül két fő csoport létezik:

- Raman-spektroszkópia,
- infravörös spektroszkópia.

Dolgozatomban mindkét módszerrel végeztem vizsgálatokat.

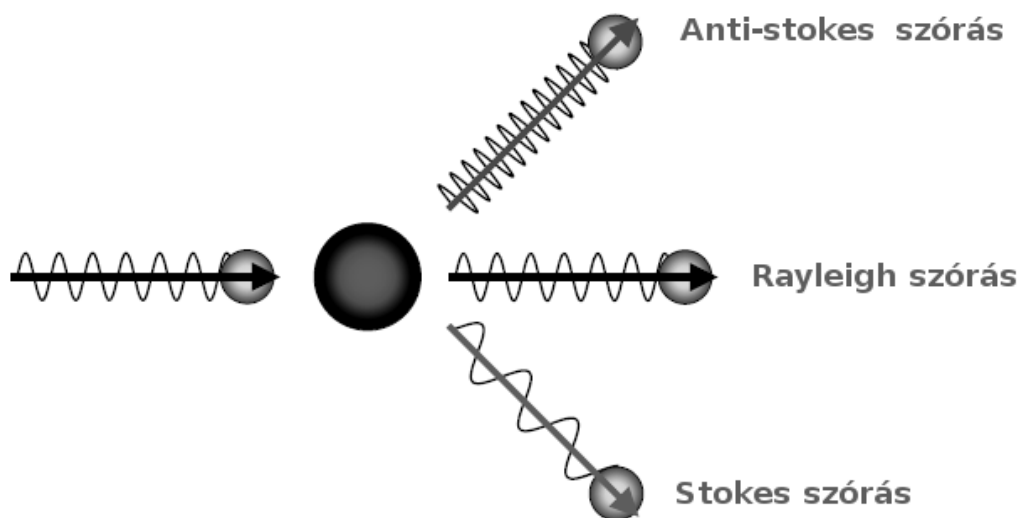
2.4.3.1 Raman-spektroszkópia

2.4.3.1.1 A Raman-spektroszkópia elméleti háttere

A Raman-spektroszkópia a foton és molekula ütközése során fellépő úgynevezett Raman-szórásról alapszik. A besugárzó fény által kibocsátott fotonok a molekulával való rugalmas ütközés során általában nem veszítenek az energiájukból, így a mintáról szóródó fény frekvenciája lényegében megegyezik a besugárzott fény energiájával. Ezt a jelenséget Rayleigh-szórásnak nevezzük.

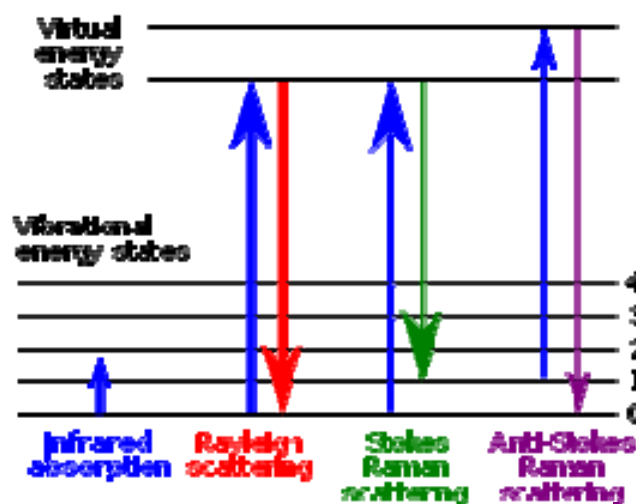
Abban az esetben, ha a foton rugalmatlanul ütközik a molekulával, megváltozik annak a frekvenciája, és ezt a fényszórást hívjuk Raman-szórásnak. Fontos tudni, hogy ezekben az esetekben a frekvencia változásának mértéke azonos a vizsgált anyag molekuláira jellemző rezgési frekvenciákkal, így a fellelhető spektrumok alapján vizsgálhatóak az adott anyag rezgései. Ez a módszer különösen akkor szolgáltat sok értékes információt, ha a vizsgált anyag molekuláris felépítésű vagy kovalens kötésekkel összekapcsolt atomokból áll, mert ezeknek jellegzetes frekvenciájú rezgésénél kapunk kellően keskeny sávú spektrumokat, amik jó alapot szolgáltatnak az adott anyag azonosítására.

Ha a foton ad át energiát a molekulának, csökken a frekvenciája, a spektrumban a Rayleigh-sávhoz képest kisebb 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 (**3. ábra**).



3. ábra: Anti-stokes, Stokes és Rayleigh szórás¹³

A molekula a kisebb energiájú rezgési szintről a gerjesztés hatására, egy magasabb szintre kerül, majd a gerjesztési energia kisugárzása közben, újra egy kisebb energiájú szintre tér vissza (4. ábra).



4. ábra Rezgési spektroszkópia magyarázata a rezgési energiaszintek közötti alapvető átmenetekkel¹⁴

A Raman-spektroszkópiához mindig valamilyen nagy energiájú monokromatikus fényt használunk, mivel a Raman-szóródás aránya rendkívül kicsi: a Rayleigh-szóráshoz viszonyítva csak mintegy 10^{-6} résznyi hányada szóródik tovább változatlan energiával. Ezért a vizsgálathoz nagy energiájú fényre van szükség, így általában látható vagy a

közeli infravörös fényt sugárzó lézert alkalmaznak. A legelterjedtebb fényforrások a Nd-YAG (532nm és 1064nm), a He-Ne (633nm), valamint a dióda (785 nm) lézerek. Mivel a Raman-szórás intenzitása a besugárzó fény negyedik hányadával arányos, ezért a látható tartományba eső fénnel jobb jel/zaj arányok érhetőek el. Ennél a tartománynál viszont igen nagy a fluoreszcencia megjelenésének az esélye, ami az infravörös tartományokban viszont gyakorlatilag nem ismert.

A Raman-spektrumokat nem abszolút hullámszám-skálában, hanem a gerjesztő vonaltól, mint origótól mért ún. Raman-eltolódás (*Raman shift*) skálában szokás ábrázolni az abcisszán míg az ordinátán a sávok intenzitását ábrázoljuk. Így az IR és Raman-spektrumok azonos hullámszám-skálában adhatók meg, mely megkönnyíti a kétféle rezgési spektrum összevetését.^{11;15;13;16}

2.4.3.1.2 Raman készülékek

A Raman-spektroszkópiában diszperzív és Fourier-transzformációs (FT) Raman-spektrométerek egyaránt használatosak. A diszperzív spektrométert a Raman-mikroszkópiában alkalmazzák, működése a fény diffrakcióján alapul. A készülék jellemzője a nagy érzékenység, működéséhez nem szükséges nagy teljesítményű lézer, és nem tartalmaz mozgó alkatrészeket, hátrányaként említhető a spektrális felbontás és a hullámszám esetében fennálló kompromisszum, valamint a spektrumban megfigyelhető változó felbontás.

Az FT-Raman készüléket leginkább a mikrospektroszkópiában alkalmazzák, fényforrása közeli infravörös sugárforrás (legelterjedtebb az 1064 nm Nd-YAG lézer). Jellemzője a kiváló hullámszám pontosság, hátránya a viszonylag kicsi érzékenység.

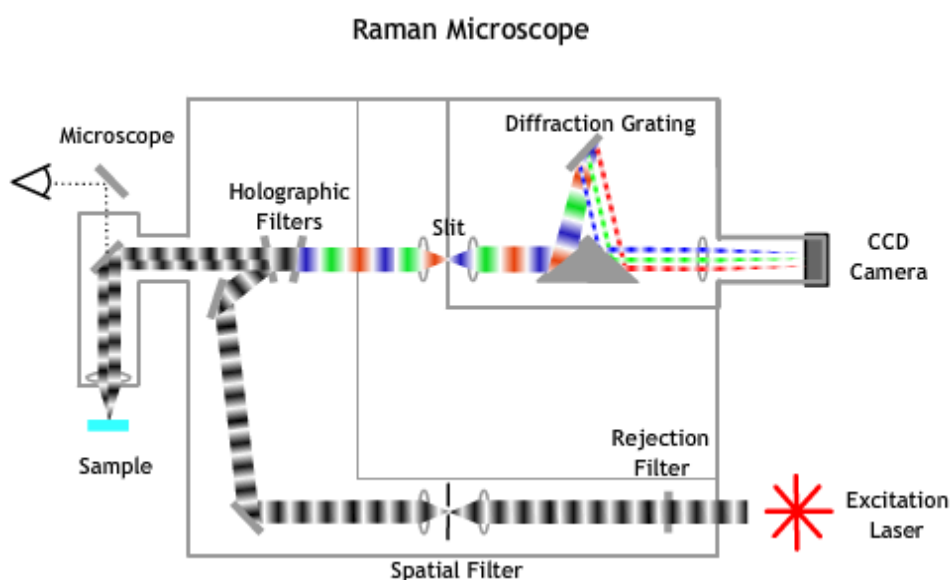
A berendezésekben legelterjedtebben CCD-detektort (Charge Coupled Device) használnak, továbbá optikai szálak alkalmazásával in-line monitorozás is megoldható (szonda).^{11;13}

2.4.3.1.3 A Raman-mikroszkóp felépítése

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.

A készülékek többféle lézerrel felszerelve rendelhetők (532 nm, 633 nm, 785 nm és 1064 nm), melyek közül a 785 nm hullámhosszú lézer 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 ráccsal bontja fel, azaz a diszperziós elven működő készülékek közé sorolható (5. ábra).



5. ábra: Raman-mikroszkóp vázlatos rajza¹⁴

Ha a Raman-készülékünket mikrospektroszkópiás vizsgálatra kívánjuk használni, akkor lehetőségünk van arra, hogy a lézernyalábot akár 50-100 μm -re fókuszáljuk.

A kapott spektrumunk jel/zaj arányát a mérési paraméterek – akkumulációk száma, besugárzási idő és energia – optimalizálásával javíthatjuk. Többszörös akkumuláció beállításával a szoftver a felvett spektrumokat automatikusan átlagolja, így csökkentve a véletlenszerű besugárzások, illetve kozmikus sugarak hatását. A készülék paramétereinek beállításáról részletesebben az optimalálással foglalkozó fejezetben írok.⁴

2.4.3.1.4 Raman-spektroszkópia alkalmazása polimorfia vizsgálatban

A Raman-spektroszkópia polimorfia vizsgálatban való alkalmazása három megközelítéssel történhet.⁴

- Egyedi kristályok vizsgálata polarizált fénymikroszkóppal: a Raman-mikroszkópiában használatos készülékek lehetővé teszik igen kis mennyiségű minta tárgylemezen történő vizsgálatát és az egyes, azonos vagy eltérő habitusú kristályokat besugározva felvehető azok Raman-spektruma. A vizsgálat elvégezhető manuálisan, illetve automatikusan, motorizált tárgyasztal segítségével. Utóbbi esetben a vizsgált kristályok pozíciója tárolható.¹³
- Mélységi analízis: a Raman-mikroszkópia az x- és y-irányú analízis mellett z-irányú (mélységi) vizsgálatokra is alkalmas.
- Raman-szonda: optikai szálak alkalmazásával a Raman-spektroszkópia alkalmas on-line, in-line folyamatkövetésre és szabályozásra. Mint PAT (Process Analytical Technology) eszköz, lehetőséget nyújt kristályosítási folyamatok esetében a kristályosodó polimorf módosulat vizsgálatára..¹⁵¹⁷

2.4.3.2 Infravörös spektroszkópiái

Az infravörös spektroszkópia alapja, hogy az IR tartományban az anyagok a fizikai és kémiai szerkezetüktől függően nyelik el, verik vissza és engedik át a különböző hullámhosszúságú sugárzásokat. Az IR spektroszkópia mérési tartománya az elektromágneses sugárzás $780 - 3 \times 10^5$ nm régiójába esik. Ez az analitikai eljárás is – mint a Raman-spektroszkópia – a vegyületek rezgéseit vizsgálja, a fő különbség viszont az, hogy amíg a Raman-spektroszkópiánál a fotonok rugalmatlan szóródásait vizsgáljuk, addig az infravörös technika esetén a fotonok elnyelését elemezzük.

2.4.3.2.1 Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere

Az IR spektroszkópia lényegében hasonló elven működik (fény — anyag kölcsönhatás), mint a Raman-spektroszkópia. Itt is a minta és a fotonok kölcsönhatása révén gerjesztődik a molekulák rezgési és forgási állapota, miközben a molekula

rezgéseire jellemző része elnyelődik, míg más része áthalad a mintán, vagy egyéb utat jár be (szóródik, illetve elhajlást szenved)¹⁸

Az IR tartomány három fő részre bontható:

- közeli IR tartomány (NIR, 0,78-2,5 μm),
- közép vagy analitikai IR tartomány (*mid infrared*, MIR, de gyakrabban csak IR-ként rövidítik, 2,5-50 μm),
- távoli IR tartomány (far infrared, FIR, 50-1000 μm).

Rezgési spektroszkópiáról beszélhetünk a NIR és (M)IR tartományokban, míg a kis energiájú FIR a forgási spektroszkópiához kapcsolható.

A fent említett infravörös módszerek között munkám során a közép, úgynevezett analitikai IR technikával foglalkoztam mélyrehatóbban.

2.4.3.2.2 Az infravörös készülék felépítése és működése

Az IR hullámhossz-tartományban működő készülékek több szempont (optikai konfiguráció, fényforrás, detektor, optikai elrendezés stb.) szerint is csoportosíthatóak. Két fő típusuk létezik az optikai konfiguráció alapján a diszperziós, valamint a Fourier-transzformációs spektrométerek.

Az FT-IR spektrométerekben egy interferométer van a minta előtt, amely az IR sugárforrásból érkező fényt két sugárra bontja. Az egyik egy álló, a másik egy mozgó tükörről verődik vissza. A mérés során az interferogramot mérjük, amely a Fourier-transzformációval alakítható át spektrummá. Ez napjainkban a fejlett számítástechnikai háttér miatt könnyen megoldható, így a diszperziós készülékek lassan kiszorulnak a gyakorlati alkalmazásból.

A csoportosítás történhet még az alkalmazott fényforrás, detektor és a mérési elrendezés szerint is. Ezek közül az utolsó, a mérési elrendezés típusa képezi elsődlegesen a megkülönböztetés alapját és gyakorlati jelentősége is kiemelt.

Transzmissziós mérési elrendezésnél a fény áthatol a mintán, s ezáltal a minta esetleges heterogenitásából adódó mérési hiba csökken. A nagyobb szemcseméretű minták informatívabb spektrumot adnak, túl kicsi szemcseméret a sugárzás nagyobb hányadának visszaverődését eredményezi, ami a detektorra jutó fény mennyiségének csökkenéséhez, illetve a jel/zaj viszony romlásához vezet. Ennél az elrendezésnél az

alkalmazott elektromágneses sugárzás frekvenciája és ennél fogva energiája is nagyobb, ami a megfelelő áthatolóképességet biztosítja. A mérés kivitelezése előtt a minta rétegvastagságának optimalizálása szükséges.¹⁸

Ha a mintával kölcsönhatásba lépő sugárzás intenzitása I_0 és a mintán áthatolóé pedig I_T , akkor a transzmittancia (T) az **2. egyenlet** szerint definiálható:

$$T = \frac{I_T}{I_0} \quad (2)$$

Az előzőek értelmében tehát a transzmittancia nem más, mint a mintára eső és az azon áthaladó fény intenzitásának hányadosa. Miután a transzmittancia a vizsgált alkotó koncentrációjával (c) nem lineárisan, hanem logaritmikusan változik, így sor került egy származtatott mennyiség, az abszorbancia (A) bevezetésére, ami a transzmittancia negatív tízes alapú logaritmus, s így már lineáris kapcsolatban áll a koncentrációval (**3. egyenlet**).

$$A = -\lg T = a \cdot l \cdot c = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

Az abszorbancia a vizsgált minta l rétegvastagságával és az ún. abszorpciós koefficienssel is arányosan változik, utóbbi pontos elnevezése és mértékegysége az alkalmazott koncentrációegységhez igazodik ($[a]=\text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ – abszorpciós koefficiens, ill. $[\varepsilon]=\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ – moláris abszorpciós koefficiens). A **3. egyenlet** a molekulaszpektroszkópiában Lambert–Beer-törvényként is ismeretes.⁹

Átlátszatlan, zavaros, vagy túlságosan nagy abszorpciós képességű minták vizsgálata esetén célszerűbb a transzmissziós mérési elrendezés helyett egy másik, diffúz reflektanciának nevezett konstrukció használata. Ezen elrendezésnél a minta felszínére merőlegesen esik a fénysugár, majd onnan minden irányba visszaverődik. A reflexiós készülékek geometriai felépítésének optimalizálása során az az eredmény született, hogy a beeső fénysugárral 45°-os szöget bezáró irányban elhelyezett detektor képes a mintáról visszavert fény legnagyobb arányának mérésére, így a mintáról spektroszkópiai információ legoptimálisabban ebben a felépítésben nyerhető. Megemlítendő, hogy reflexiós mérési elrendezésnél a mintát érő fénysugár penetrációs képessége néhány (tized) milliméter, így a kapott spektroszkópiai információ is a minta ezen felszíni rétegeire vonatkozik. A transzmisszióhoz hasonlóan a

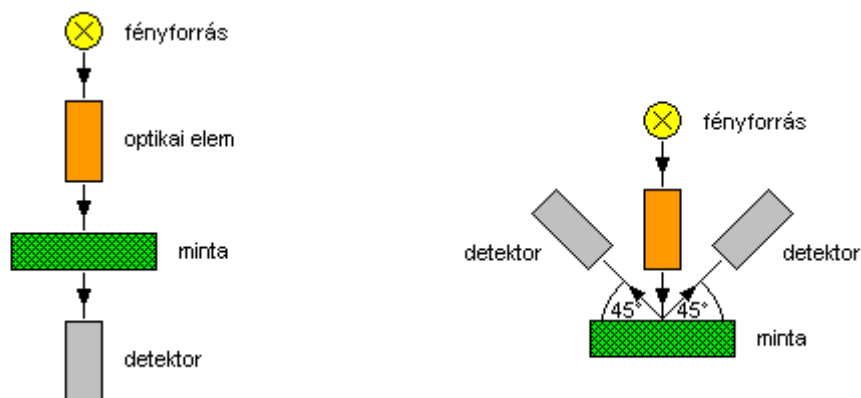
reflektancia (R) is definiálható, ami nem más, mint a beeső fény mintáról visszavert hányadának intenzitásának (I_R), ill. egy nem abszorbeáló standard felületről (például fehér kerámia, BaSO_4 , Al_2O_3 , MgO) visszavert hányadának intenzitásának (I_{St}) hányadosa (4. egyenlet).

$$R = \frac{I_R}{I_{St}} \quad (4)$$

Reflexiós méréseknél ugyancsak bevezetjük az abszorbancia fogalmát, mely ebben az esetben a 5. egyenlet szerint származtatható:

$$A = -\lg R \quad (5)$$

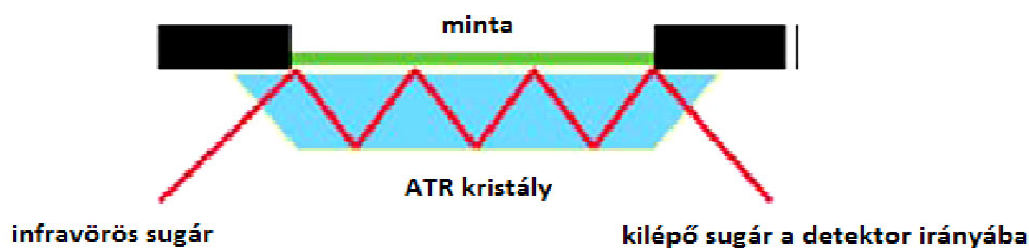
A 2-5. egyenletekben definiált mennyiségek mind monokromatikus sugárzásra vonatkoznak.¹⁸ A transzmissziós és reflexiós mérési elrendezés sematikus képe a 6. ábrán látható.



6. ábra: Transzmissziós (balra) és reflexiós (jobbra) mérési elrendezés]

A gyengített teljes reflexiós (*Attenuated Total Reflectance*, ATR) technika alkalmazásával elkerülhetjük azokat a problémákat, amelyeket a fény rövid úthossza okoz, és a belső reflexió megsokszorozásával növelhetjük az abszorpció mértékét. Ezzel az eljárással különösen jó eredményeket értek el viszkózus anyagok mérése során. A módszer a közép IR régióban a leghatékonyabb, mert itt erősebb az abszorpció. In-line alkalmazás nem elterjedt, mert az érzékenység függ az ATR kristály felületére lerakódott szennyeződésektől és a felület eróziójától. Az ATR-rel végzett kísérletek során a minta szorosan a kristályon helyezkedik el, ez a folyadékok esetén automatikusan megvalósul, azonban a szilárd mintáknál fokozottan figyelni kell arra, hogy ez a szoros

érintkezés létre jöjjön a kristály és a minta között. A kristály törésmutatója nagyobb, mint a mintáé és értéke általában nagyobb, mint kettő. Az IR fénysugár olyan szögben lép be a kristály és a minta felülete közé, hogy ott teljesen reflektál a kristály és a minta között. A mérés alatt egy vagy több reflexió után a sugarak elhagyják a kristályt és a detektorba jutnak.^{19;20} Az ATR-rel végzett mérés elrendezése a **7. ábrán** látható.



7. ábra: Az ATR kristály alkalmazása

2.4.3.2.3 Az infravörös spektroszkópia alkalmazása a gyógyszeriparban

Az iparban a gyógyszerhatóanyagok szintézisének gyártásközi vizsgálata gyakran szembesíti az analitikus szakembereket azzal az elvárással, hogy minél gyorsabban minél több adatot nyújtsanak a reakció(k) lefolyásáról. A laboratóriumi gyakorlatban néhány perc alatt csak egy-egy viszonylag egyszerűen mérhető paraméterről (például pH vagy refrakció) kaphatunk képet. Komplexebb információt, mint hatóanyag, oldószer, víz vagy szennyező tartalmat gyakran csak idő- és energiaigényes kromatográfiás vagy titrimetriás eljárások szolgáltatnak. Az IR spektroszkópia egy olyan analitikai módszer, ami alkalmas lehet ezen idő- és anyagigényes technikák kiváltására oly módon, hogy gyakorlatilag azokkal közel megegyező pontosságú információt szolgáltat.

Az IR spektroszkópia több területen is megjelent a gyógyszeriparban, ilyen például a gyógyszerek azonosítása, a gyógyszerek tisztaságának, ill. ezek kristályszerkezetének vizsgálata, az aktív gyógyszerkészítmények és a segédanyagok közötti kapcsolat feltárása, az antibiotikumok szabadalmaztatásának kivitelezése stb. Az IR nagyszerűen alkalmazható más módszerekkel kiegészülve a kutatásokban, elemzésekben, azonosításban ezen a területen is. Ezt az analitikai módszert alkalmazzák a polimorfia vizsgálatoknál is. A gyógyszerhatóanyagok polimorfijának kutatása komplex analitikai szemléletmódot követel meg. A kutatónak ismernie kell az alkalmas módszerek

lehetőségeit és a megszerezhető eredmények összefüggéseit ahhoz, hogy a különféle polimorf rendszerek viselkedését részleteiben megérthesse.²¹

2.5 PAT – folyamatelemző technológia

Gyógyszerhatóanyagok gyártásánál egyre jelentősebb igény jelentkezik a folyamatfelügyeleti technológiák (Process Analytical Technology, PAT) fejlesztésére. A PAT olyan komplex rendszer, amely magában foglalja a gyártás monitorozását, tervezését, irányítását és értékelését (8. ábra). Segítségével az egész gyártási folyamat nyomon követhető, így segíti annak megértését, hozzájárulva ezzel a további fejlesztéshez, a műveletek optimalizálásához, adott esetben pedig egy hatékonyabb gyártástechnológiai rendszer kidolgozásához.



8. ábra: A PAT vázlata

Általánosságban elmondható, hogy a PAT mára a gyógyszerhatóanyag gyártás egyik megkerülhetetlen tényezőjévé vált, és annak a leggyorsabban fejlődő eszköze közé sorolható. A legelterjedtebb folyamatanalízis technológiák a Raman-spektroszkópia, a NIR valamint az FT-IR, melyek alkalmazásához szükség van a sokváltozós adatelemző módszerek használatára, azaz a kemometriai módszerek használatának bevezetése elengedhetetlen.²²

2.6 Adatfeldolgozáshoz használt számítási módszerek

A spektrumokat főkomponens elemzéssel (*Principal Component Analysis, PCA*) valamint cluster analízissel (*Cluster Analysis, CA*) dolgoztam fel. A következőkben a két kiértékelési módszer elméleti hátterét mutatom be.

2.6.1 Főkomponens analízis (PCA)

A főkomponens analízis olyan adatstruktúra elemző módszer, melynek segítségével a minták közötti változékonyságot analizálhatjuk.

A kezdeti spektroszkópai adatmátrix korrelált változói közötti összefüggések vizsgálatának megkönnyítésére az eredeti változókat a PCA egy olyan transzformációnak veti alá, amely új, korrelálatlan változókat eredményez. Az új változók az ún. főkomponensek, melyek az eredeti változók lineáris kombinációi, és oly módon vannak sorba rendezve, hogy elől állnak az eredeti változók együttes varianciájának legnagyobb részéért felelősek (9. ábra).

	Raman shift (1/cm)						főkomponensek				
	80,0	80,5	...	3499,5	3500		PC1	PC2	PC3	...	PCj
minták	Nº 1					⇒	Nº 1				
	Nº 2						Nº 2				
	Nº 3						Nº 3				
	⋮						⋮				
	Nº i						Nº i				

9. ábra: Az eredeti adatmátrix transzformálása Raman-spektrumok esetén

A súlyfüggvényt a spektrumokkal beszorozva kapjuk a spektrumokhoz tartozó értékszám (ún. score) adatokat, így az eredeti változók, vagyis a hullámhosszak által kifeszített tér alacsonyabb, esetünkben két- vagy három dimenziójú síkba, ill. térbe vetíthető.

A főkomponensek sorrendjét az adja meg, hogy minden soron következő főkomponens annak a varianciának a legnagyobb részét írja le, amelyet nem magyaráznak az előző

főkomponensek. Ezért az adatokban lévő variancia legnagyobb részét az első főkomponens adja. A másodikban több információ van, mint a harmadikban, és így tovább. Ha az összes főkomponenst használnánk, a teljes variancia 100%-át mutatnánk meg. Általában csak annyi főkomponenst veszünk figyelembe, amennyivel a variancia bizonyos százalékát (például 95%-át) le tudjuk írni. Ezzel a módszerrel a valamely szempont szerint esetlegesen létrejött populációk egyszerűen felfedezhetők. [23]

2.6.2 Cluster analízis (CA)

Csoportosításon (clustering) azt az eljárást értjük, amely objektumok között hasonlóságuk (tulajdonságtérbeli közelségük) alapján úgy állapít meg rokonságot (csoportosulást, csoportba tartozást), hogy a csoportba tartozást illetően semmiféle előzetes ismeretünk vagy elvárásunk nincsen. Az objektumok csoportba rendezése tekinthető „alakjuk” rokonsága felismerésének, a csoportosítás tehát alakfelismerésnek is hívható. Ha az előzetes elvárások nélkül csoportosítunk, „nem felügyelt alakfelismerést” (unsupervised pattern recognition) végzünk.

A csoportosítási módszereket hierarchikus és nem hierarchikus módszerekre szokás osztani. A hierarchikus csoportosítás Arisztotelész logikáján alapszik, amennyiben minden rendszertani egység valamely föléje rendelt csoporthoz („*genus proximus*”) tartozik, és attól valamilyen sajátos jegy („*differentia specifica*”) különbözteti meg. Hierarchikusan csoportosított objektumok fa-struktúrát képeznek, amelyben az objektumok viselik a fölérendelt objektumok tulajdonságait, viszont azoktól különböző tulajdonságaikat is „örökítik” alárendelt objektumaiknak.

A hierarchikus csoportosítás eredményét a dendrogram mutatja be. A dendrogram fastruktúrát szemléltető rajz, amelynek vízszintes tengelyén és azzal párhuzamos felső szintjein (rajzolhatóság szempontjából) célszerű elrendezésben objektumok (csoportok) vannak, melyek közül a leginkább hasonlókat vízszintes vonalak kötnek össze. A csoportokhoz tartozó függőleges vonalak hossza (magassága, ordinátája) az objektumok (csoportok) számszerű, összefüggés szerinti hasonlóságát adja. A csoportosítás alapja az objektumok közötti hasonlóság. Az objektumok hasonlósága alkalmas tulajdonságvektor definíciók esetén egyenértékű az objektumok tulajdonságvektorainak hasonlóságával. A tulajdonságok terében a hasonló

tulajdonságvektorú objektumok (pontok) egymáshoz közel esnek, a különbözők messze. Az objektumokat képviselő pontok közötti távolságnak a csoportosítás szempontjából döntő funkciója van.

A távolságfogalmak definiálása során gyakran gondolják, hogy az objektumok olyan sokaságokhoz tartoznak, melyeknél megadható a tulajdonságok szórása és kovarianciájuk, így a távolság definíciójában célszerűen felléphet az **S** szórás-, ill. **C** kovariancia mátrix. Így a távolságot célszerű lehet az objektumok kovariancia ellipszoidjai méreteit felhasználva definiálni. Használatos emiatt az euklideszi távolság olyan módoszata, a Pearson-távolság, amely bizonyos objektumok tulajdonságainak eltéréseit az adott tulajdonságok szórásához viszonyítja, azokkal „normálja”:

$$t_{st} = \sqrt{(\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_t)^T \mathbf{S}^{-1} (\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_t)} = \sqrt{\sum_j \frac{(x_{sj} - x_{tj})^2}{s_j^2}} \quad (6)$$

ahol t_{st} az s és t objektumok távolsága

$\mathbf{x}_s$, ill. $\mathbf{x}_t$ rendre az s és t objektumok metrikus tulajdonsága (esetünkben vektor jellegű spektruma)

j a tulajdonság dimenziója (esetünkben a spektrum adatpontjainak száma)

$\mathbf{S}^{-1}$ a variancia mátrix inverze, a szórásnégyzetek reciprokait tartalmazó $\mathbf{j} \times \mathbf{j}$ méretű diagonális mátrix

A Pearson-távolság dimenziómentes. Az egyes objektumok távolsága nagyítható, ha a Pearson-távolság négyzetét használják.

A csoportok egymástól való távolságának mérési módja folyamán ki kell választani a csoportok azon pontjait, amelyek közé az ismert (euklideszi, manhattan stb.) távolságokat be kell fektetni. Az **2. táblázatban** felsorolt csoporttávolságok közül lehet választani.

magyar megnevezés	angol megnevezés	geometria tartalom
Egyszerű lánc	single linkage	a csoportok <u>legközelebbi</u> elemeinek távolsága
Teljes lánc	complete linkage	a csoportok <u>legtávolabbi</u> elemeinek távolsága
Átlag távolság	average linkage	az egyesítendő csoportok elemei közötti <u>távolságok átlaga</u>
Súlypont	centroid linkage	a csoportok <u>súlypontjainak</u> távolsága
McQuitty-távolság	McQuitty linkage	az egyesített csoport távolsága: a két egyesített <u>csoport távolságának átlaga</u>
Medián távolság	median linkage	a csoport <u>mediánok</u> távolsága
Ward-távolság	Ward linkage	azon számított távolság, amely biztosítja, hogy az egyesített csoport csoporton belüli <u>eltérésnégyzete</u> minimális legyen

2. táblázat: Csoporttávolságok

Ha bevezetjük a **3. táblázat** jelöléseit a csoportok közti távolság számításához, akkor a csoportok távolsága (t_{ki}) az egyszerű lánc (single linkage) esetében a következő képlettel számítható: ²⁴

$$t_{ki} = 0,5 \cdot t_{si} + 0,5 \cdot t_{ti} - 0,5 \cdot |t_{si} - t_{ti}| \quad (7)$$

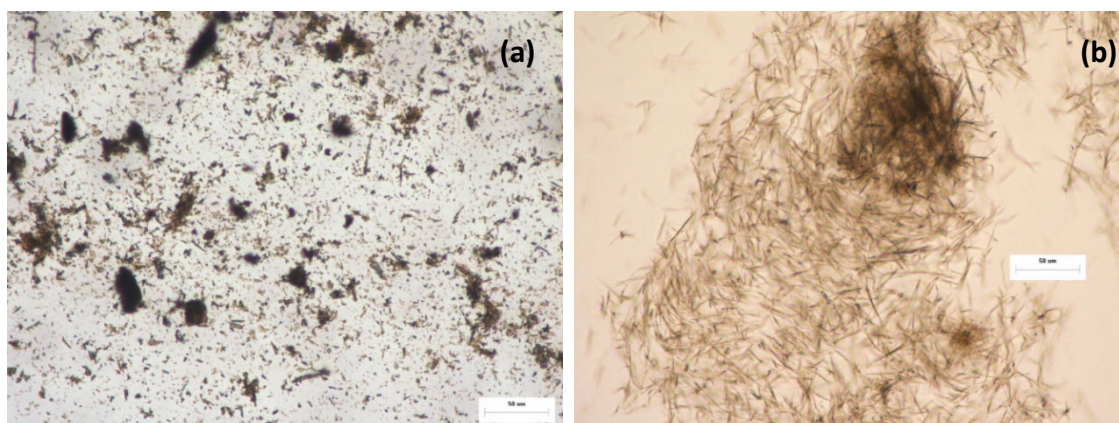
T	az egyik egyesítendő csoport jele
S	a másik egyesítendő csoport jele
K	az egyesített csoport jele
n_s és n_t	az egyik, ill. másik csoport objektumainak száma
t_{si}	az s csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolság mátrix s,i eleme)
t_{ti}	a t csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolság mátrix t,i eleme)
t_{st}	az s és t csoportok távolsága egymástól (a távolság mátrix s,t eleme)
t_{ki}	a k csoport távolsága valamely i objektumtól (a távolság mátrix k,i eleme)

3. táblázat: Jelölések csoporttávolságok számításához

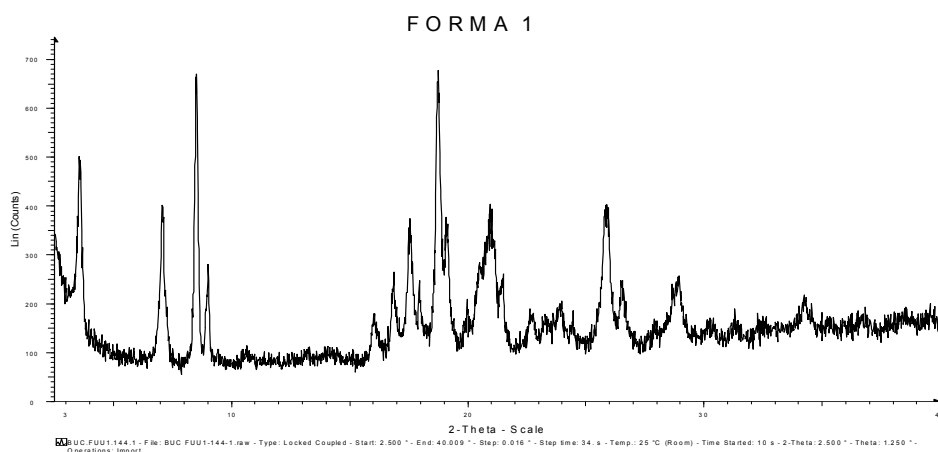
3. Anyagok és módszerek

3.1 Modellvegyület

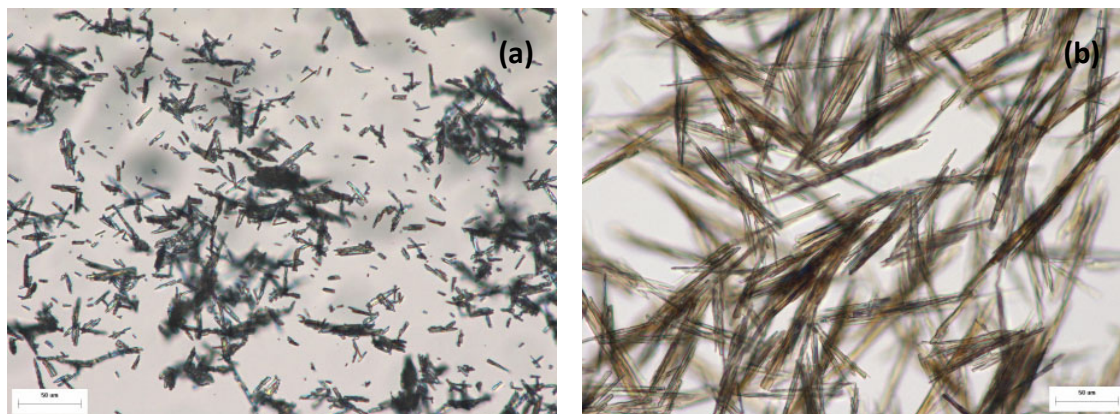
A vizsgálatokat egy gyógyszerjelölt molekula öt módosulatával (továbbiakban Forma 1, Forma 2, Forma 3, Forma 4 és Forma 5) végeztem. A minták szilárd fázisú jellemzése optikai mikroszkóppal, röntgendiffrakcióval, és termooanalitikai vizsgálatokkal történt. A módosulatok mikroszkópos megjelenése és röntgen diffraktogramja a **10.-17. ábrákon** láthatóak.



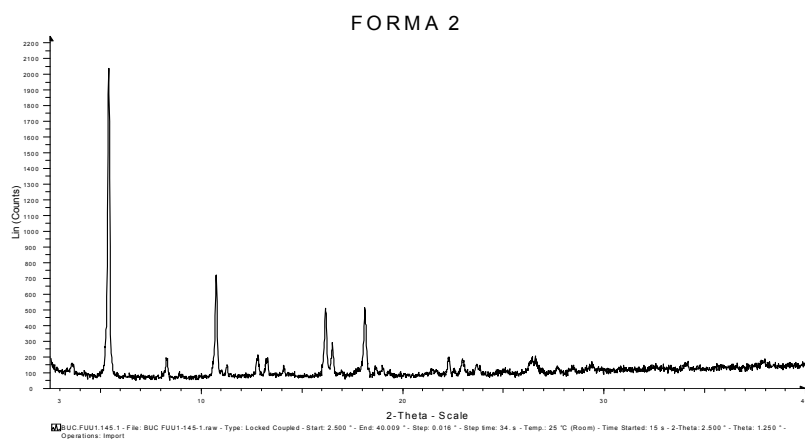
10. ábra: Forma 1 polimorf módosulat szilárd fázisú (a) és szuszpenziós (b) megjelenésének mikroszkópos képe



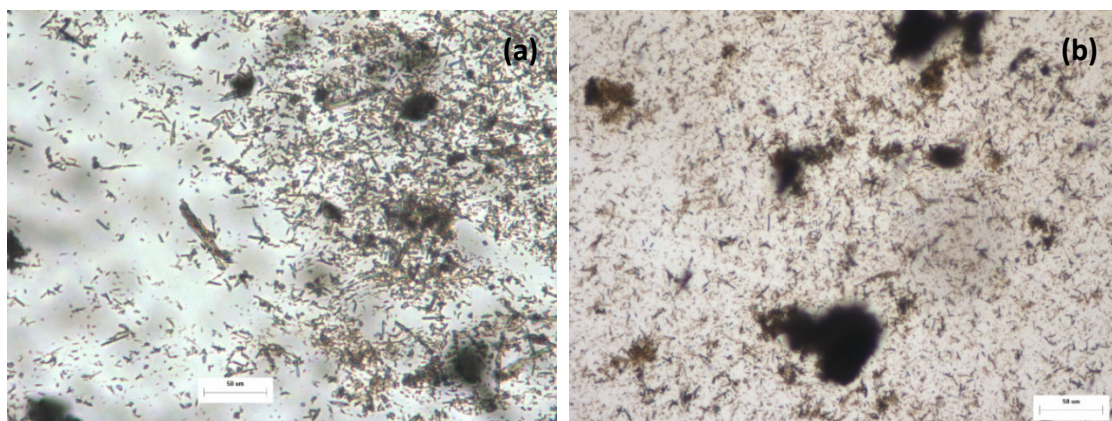
11. ábra: Forma 1 polimorf módosulat röntgendiffraktogramja



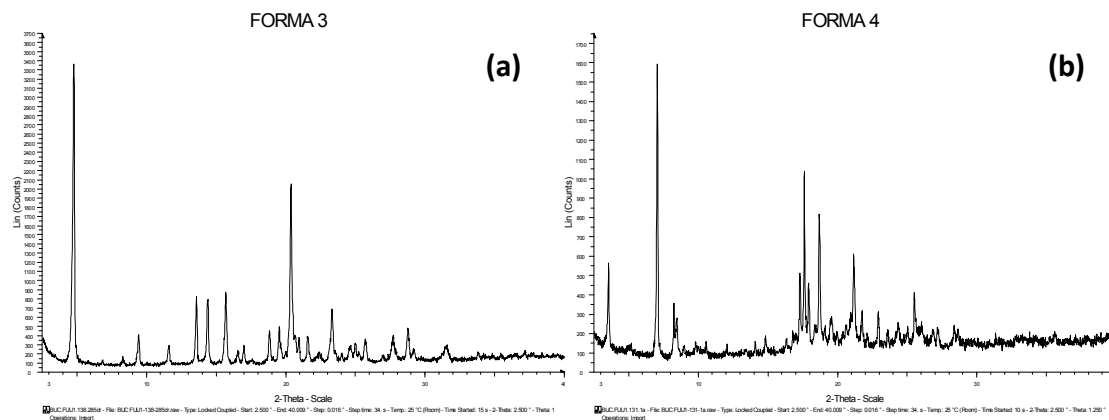
12. ábra: Forma 2 polimorf módosulat szilárd fázisú (a) és szuszpenziós (b) megjelenésének mikroszkópos képe



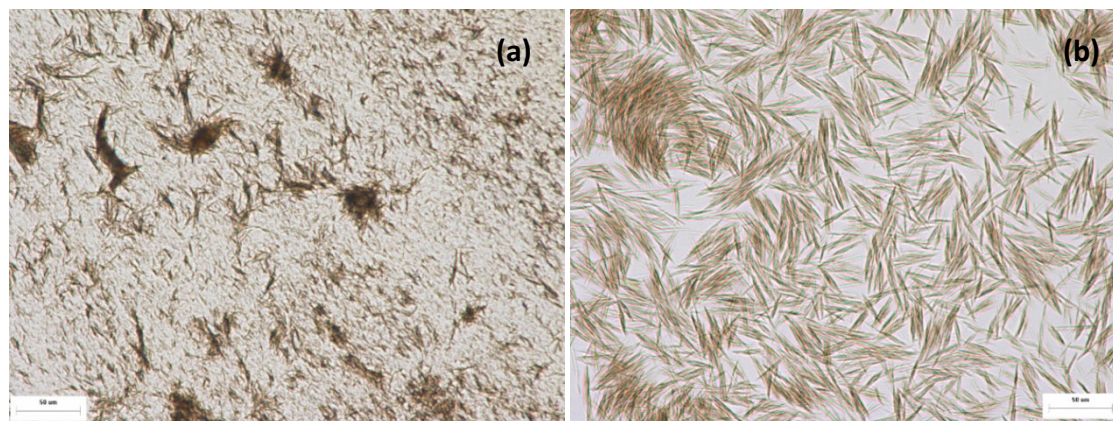
13. ábra: Forma 2 polimorf módosulat röntgendiffraktogramja



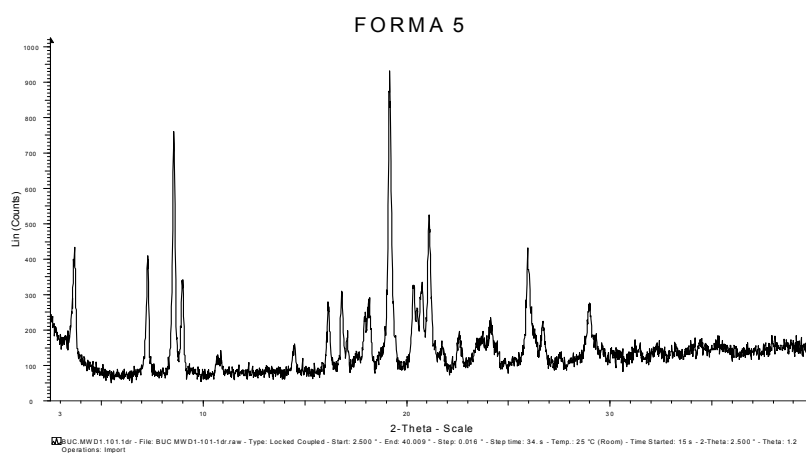
14. ábra: Forma 3 (a) és Forma 4 (b) polimorf módosulat szilárd fázisú megjelenésének mikroszkópos képe



15. ábra: Forma 3 (a) és Forma 4 (b) polimorf módosulat röntgendiffraktogramja



16. ábra: Forma 5 polimorf módosulat szilárd fázisú (a) és szuszpenziós (b) megjelenésének mikroszkópos képe



17. ábra: Forma 5 polimorf módosulat röntgendiffraktogramja

3.2 Polimorf módosulatok szuszpenziós vizsgálata

A fejlesztésre kiválasztott Forma 5 módosulat előállítása kétlépéses folyamatban történik. Az első lépés egy kristályosítási eljárás, melynek során Forma 2 módosulat keletkezik, amely a második, polimorf transzformációs lépésben Forma 1 módosulaton keresztül a kívánt Forma 5 módosulattá alakul. Így a modellvegyület öt formája közül csak a polimorf transzformáció folyamatában résztvevő három formát vizsgáltam száloptika segítségével (**18. ábra**).



18. ábra: A polimorf transzformáció menete

A polimorf transzformációs eljárás alapján a kísérletet egy felső keverős, 25 °C-ra temperált reaktorban végeztem, amire a száloptikát rácsatlakoztatva adott időközönként felvettem a szuszpenzió spektrumát.

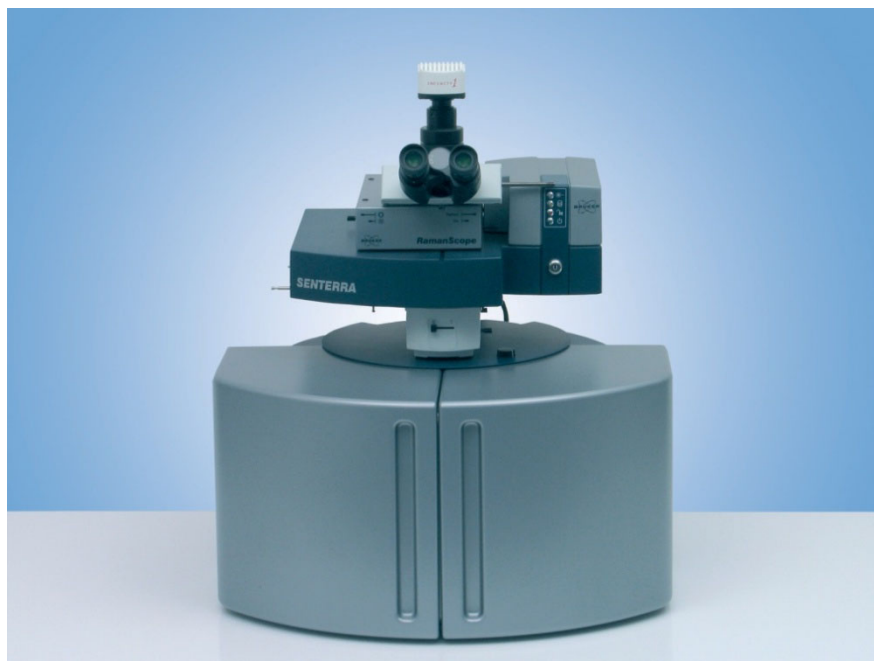
Az eljárás menete: a reaktorba bemértem a szuszpendáló szeremet, ami 80%-os (V/V) izopropil-alkohol (IPA), melyben adott mennyiségű lizint oldottam, megakadályozandó a modellvegyület szuszpenzióban való szétesését. A lizin beoldódását követően adott kevertetési sebesség mellett beadagoltam a reaktorba az adott mennyiségű Forma 2 módosulatot. A kristályok pár másodperc alatt szuszpendálódtak a vizes IPA-s közegben, így egy fehér színű, hígabb állagú szuszpenziót kaptam.

Az eljárás szerint Forma 2 módosulat jelentős része körülbelül 15-20 perc elteltével átalakul Forma 1 módosulattá, ami makroszkopikusan is jól észrevehető változással jár, mert a szuszpenzió állaga sűrűbb hatású lesz, mondhatni „bedagad”. A jelenséget észlelve másfélszeresére növeltem a keverési sebességet, majd körülbelül 40 perc elteltével hozzáadtam a szuszpenzióhoz a Forma 5 oltókristályt. A hozzáadott Forma 5 módosulat hatására nagyjából 24 óra elteltével az összes Forma 1 módosulat átalakul Forma 5 módosulattá alakult, a szuszpenzió állagának változása mellett (újra „hígabb” hatású lett).

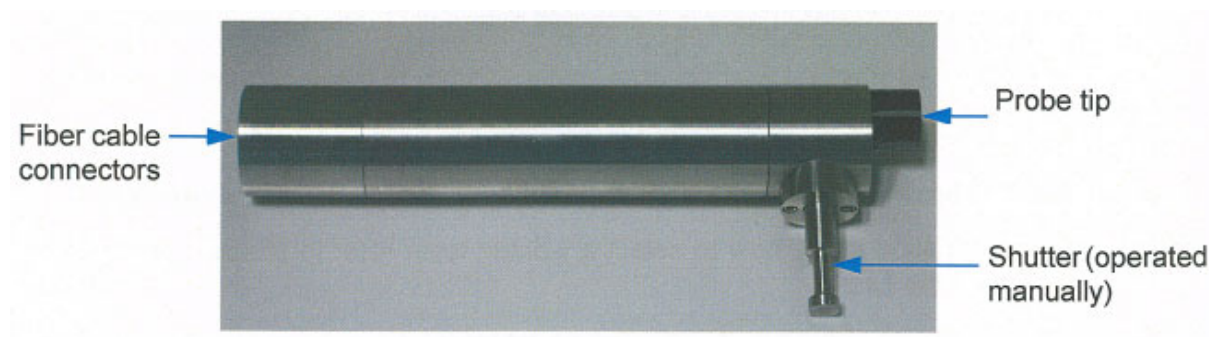
4. Műszerek, berendezések

4.1 Raman-spektroszkópiás mérésekhez használt készülékek

A spektrumok felvétele a Bruker SENTERRA (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Németország) diszperzív Raman-mikroszkóppal és szondával történtek (**19.-20. ábrák**), a készüléket vezérlő OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Németország) szoftver segítségével.



19. ábra: Bruker SENTERRA diszperzív Raman-mikroszkóp



20. ábra: Bruker SENTERRA Raman-szonda

4.1.1 A készülék jellemzői:

- Gerjesztő lézer:
 - Nd-YAG (532 nm),
 - dióda (785 nm).
- Gerjesztő lézer teljesítménye:
 - -Nd-YAG (532 nm):
0 mW; 0,2 mW; 2 mW; 5 mW; 10 mW; 20 mW;
 - -dióda (785 nm):
0 mW; 3 mW; 30 mW; 75 mW; 150 mW; 300 mW.
- Spektrumtartomány: 60-3700 1/cm (Nd-YAG), illetve 80-3500-80 1/cm (dióda)

Szoftveresen választható résztartományok:

	<u>dióda (785 nm)</u>	<u>Nd-YAG (532 nm)</u>
a	80-1520 1/cm	60-1555 1/cm
d	440-1810 1/cm	280-1740 1/cm
b	1515-2635 1/cm	1545-2760 1/cm
c	2630-3500 1/cm	2710-3700 1/cm
ab	80-1520 & 1515-2635 1/cm	60-1555 & 1545-2760 1/cm
ac	80-1520 & 2630-3500 1/cm	60-1555 & 2710-3700 1/cm
bc	1515-2635 & 2630-3500 1/cm	1545-2760 & 2710-3700 1/cm
abc	80-1520 & 1515-2635 & 2630-3500 1/cm	60-1555 & 1545-2760 & 2710-3700 1/cm

- Felbontás: 3-5 1/cm, illetve 9-15 1/cm
- Mikroszkóp objektív: 10×, 20×, 50×, 100×
- Apertúra: 25 μm, 25 × 1000 μm, 50 μm, 50 × 1000 μm, 2 mm
- Detektor: CCD
- Besugárzási idő: szabadon megválasztható
- Akkumulációk száma: szabadon megválasztható

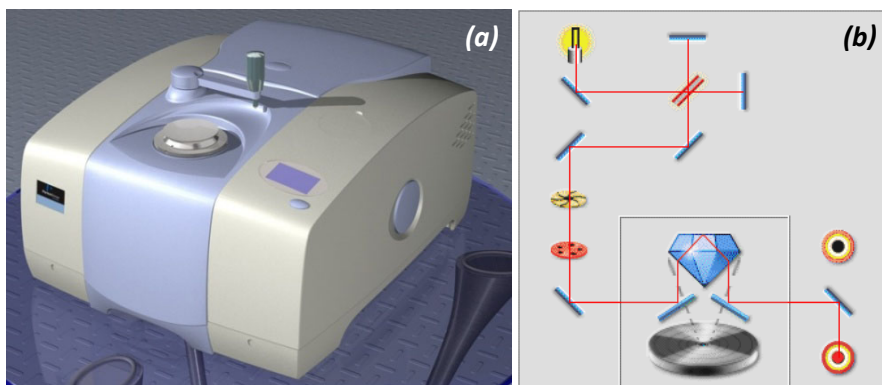
A mérési paraméterek optimalizálására és azok kiválasztására a dolgozatban később kitérek még.

4.2 Fourier-transzformációs NIR mérésekhez (FT-NIR) használt készülék

Az infravörös spektrumok felvétele a PerkinElmer Spectrum 400 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) FT-IR/FT-NIR spektrométeren történtek Spectrum 10.00 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) szoftver segítségével.

A minták FT-IR spektrumai az alábbi készülékparaméterek beállításával készültek.

• Spektrométer	<i>Spectrum 400</i>
• Mintakezelő egység (21./a ábra)	<i>Universal ATR Sampling Accessory (UATR) Single Bounce Flat Top Plate ($l = 2 \mu\text{m}$) Composite Diamond/ZnSe Crystal</i>
• Mintatartó	<i>Conical Pressure Attachment</i>
• Optikai elrendezés (21./b ábra)	<i>Fourier- transzformációs reflexió</i>
• Működési mód	<i>Michelson-interferométer</i>
• Hullámhosszválasztó elem	<i>közép és távoli IR tartományban sugárzó, hosszú életű fényforrás</i>
• Fényforrás	
• Referencia	<i>levegő</i>
• Mérési hullámhossz-tartomány	<i>600-4000 $1/\text{cm}$</i>
• Detektor	<i>triglicin-szulfát (TGS)</i>
• Lépésköz	<i>1 cm^{-1}</i>
• Spektrum adatpontjainak száma	<i>3401</i>
• Alminták száma	<i>3</i>
• Almintánkénti spektrumok száma	<i>4</i>



21. ábra: A PerkinElmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spektrométer az UATR feltétellel (a), valamint az így kapott optikai elrendezés vázlata (b)

4.3 Eredmények értékelése

Az eredmények értékelését kemometriai módszerekkel végeztem, a következő szoftverek felhasználásával:

- Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA),
- Statistica 9.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA),
- Unscrambler 10.1 (CAMO Software AS, Oslo, Norvégia),
- Spectrum 10.00 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

5. Eredmények értékelése

5.1 A Raman-készülék mérési paramétereinek optimalizálása

A kapott minták vizsgálatánál számba kell venni, hogy milyen kölcsönhatások léphetnek fel a gerjesztő lézer és a minta között, ezért ennek függvényében szükség van a lézer teljesítményének (mW), valamint a besugárzás idejének (s) optimalizálására. Előfordulhat, hogy túl nagy energiával, vagy túl hosszú ideig végezzük a besugárzást, aminek következtében a mintánk fizikailag roncsolódhat, például megolvadhat vagy megéghet. Utóbbi az optika kormolódását is okozhatja, ezért erre különösen fontos ügyelni. Célszerű a több lépéses optimalizálásra olyan anyagot választanunk, amelyikből nagyobb mennyiség áll rendelkezésünkre. Ajánlott a legkisebb besugárzási energiáról és kis időről indulni, majd fokozatosan növelni ezeket az értékeket, amíg megfelelő intenzitású és jel/zaj arányú spektrumot nem kapunk. Egyes mintáknál felléphet fluoreszcens hatás is, amit a besugárzási energia vagy az ismétlések csökkentésével, valamint a két mérés közötti idő növelésével tudunk a legjobban kiküszöbölni.

Megvizsgáltam a kapott öt szilárd forma (Forma 1 – Forma 5.) mindegyikét mikroszkópos módszerrel (532 nm-es és 785 nm-es gerjesztő lézerekkel), valamint Forma 1, Forma 2 és Forma 5 szilárd és szuszpenziós megjelenését száloptikával is (785 nm-es gerjesztő lézer segítségével).

Az optimalizálást mindkét gerjesztő lézer esetében külön végeztem el, mert a két lézer esetében a szoftveresen választható teljesítmények eltérőek.

532nm esetében:

0 mW; 0,2 mW; 2 mW; 5 mW; 10 mW; 20 mW.

785nm esetében:

0 mW; 3 mW; 30 mW; 75 mW; 150 mW; 300 mW.

A vizsgálat során az 532 nm-es gerjesztő lézer esetében az 5 mW-os teljesítmény bizonyult a leghatékosabbnak, mivel 2 mW-nál a csúcsok intenzitása még nagyon kicsi volt, viszont 10 mW-nál már egyes anyagoknál fluoreszcens hatások léptek fel. A 785

nm-es gerjesztő lézer esetében ugyanilyen megfontolások alapján esett a választás a 30 mW-os értékre, mert ez bizonyult minden forma esetében a legoptimálisabbnak. A besugárzási időt, illetve az ismétlések számát úgy választottam meg, hogy a spektrumok megfelelő jel/zaj aránnyal rendelkezzenek. A mérési paramétereket a **4. és 5. táblázat**ban foglaltam össze.

Gerjesztő lézer:	532 nm (Nd-YAG)	785 nm (dióda)
Spektrumtartomány:	abc (60-1555 & 1545-2760 & 2710-3700)	abc (80-1520 & 1515-2635 & 2630-3500)
Felbontás:	3-5 cm ⁻¹	3-5 cm ⁻¹
Mikroszkóp objektív:	20 ×	20 ×
Apertúra:	50 μm × 1000 μm	50 μm × 1000 μm
Teljesítmény:	max. 5 mW	max. 30 mW
Besugárzási idő:	4 s	4 s
Akkumulációk száma:	6	6

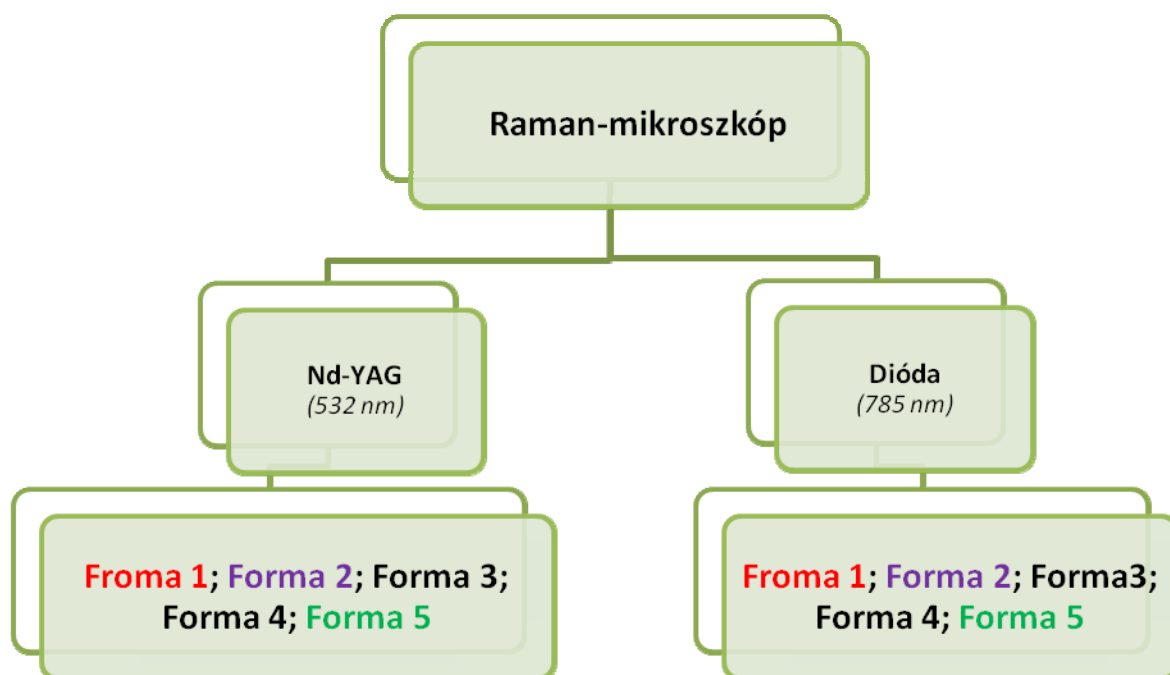
4. táblázat: Mikroszkóppal történő Raman-mérések optimált paraméterei

Gerjesztő lézer:	785 nm (dióda)
Spektrumtartomány:	abc (60-1555 & 1545-2760 & 2710-3700)
Felbontás:	3-5 cm ⁻¹
Mikroszkóp objektív:	20 ×
Apertúra:	50 μm × 1000 μm
Teljesítmény:	30 mW
Besugárzási idő:	2 s
Akkumulációk száma:	6

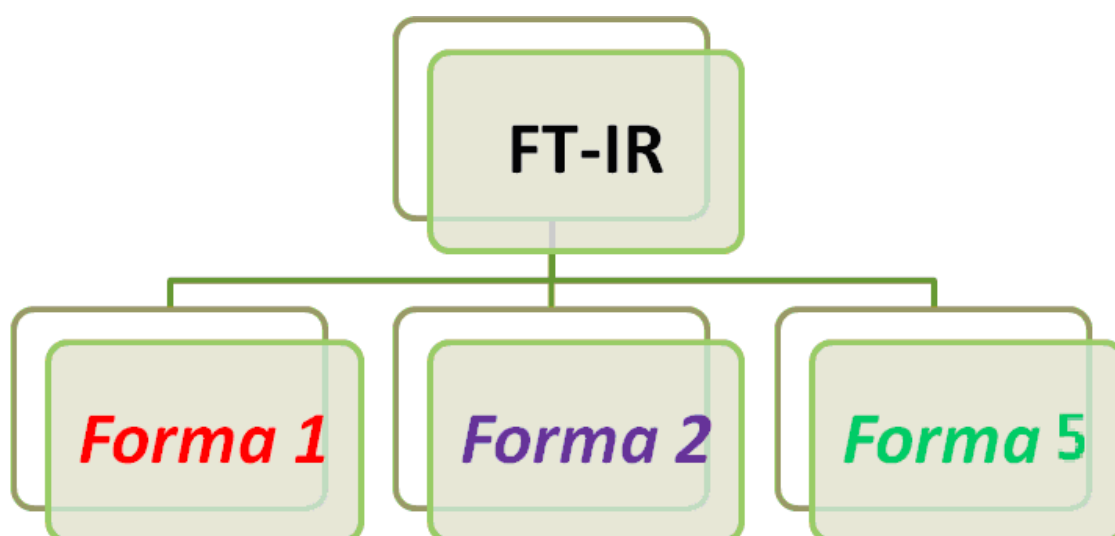
5. táblázat: Száloptikával történő Raman-mérések optimált paraméterei

5.2 A kísérletterv tematikája

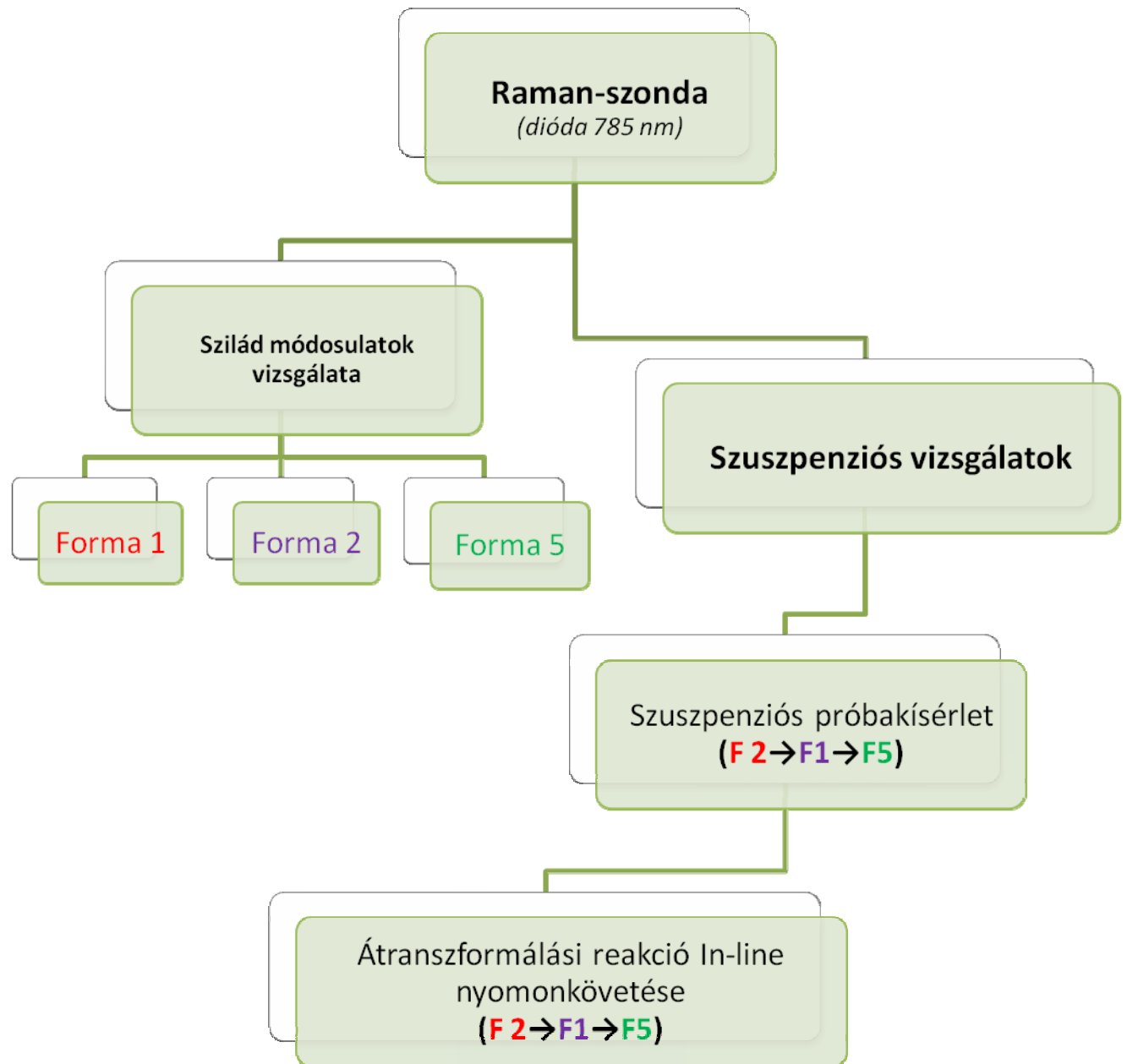
A **22.-24. ábrákon** látható táblázatok az általam végzett vizsgálatok hierarchikus felépítését mutatják be.



22. ábra: A Raman-mikroszkópos vizsgálatok felépítése



23. ábra: Az analitikai infrával végzett vizsgálatok vázlata

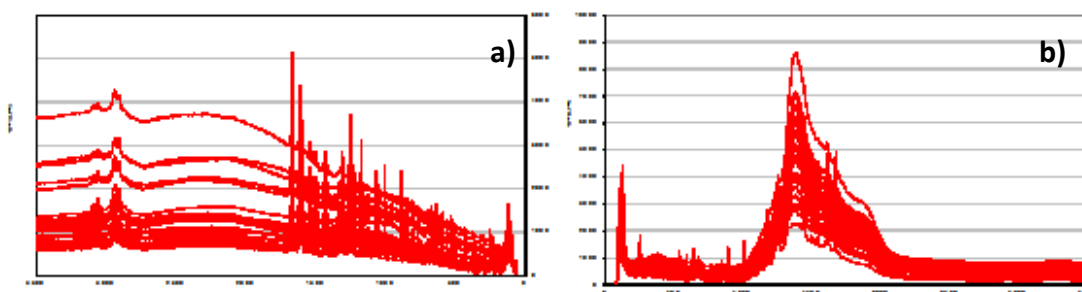


24. ábra: A Raman-száloptikával végzett kísérletek felépítése

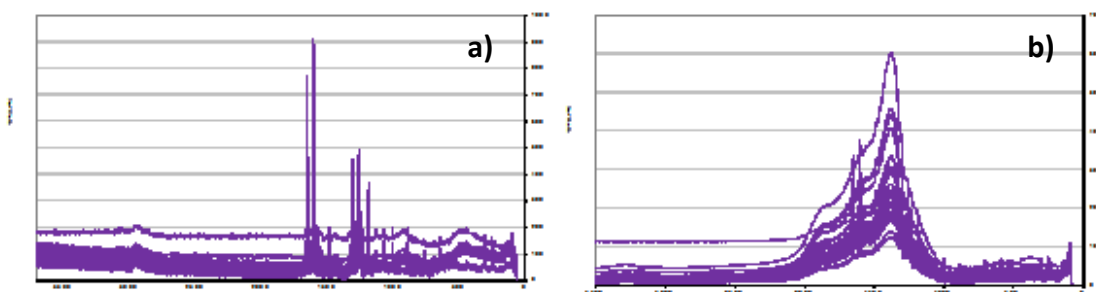
5.3 Polimorf módosulatok minőségi (kvalitatív) vizsgálata

5.3.1 Polimorf módosulatok szilárd formáiról Raman-mikroszkópos módszerrel spektrumsorozat létrehozása és szelekciója

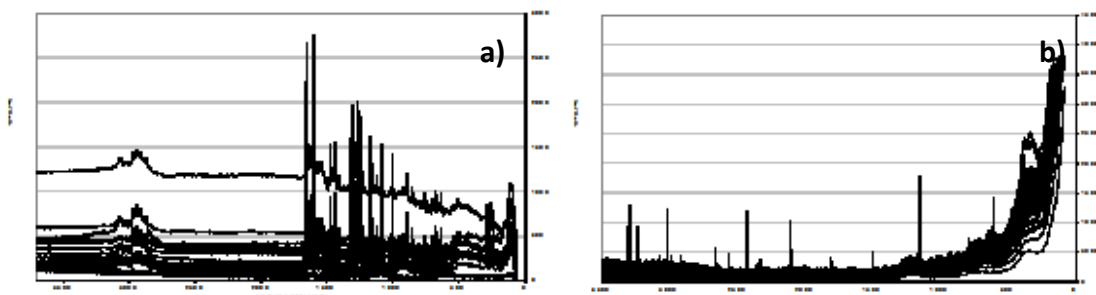
Az öt polimorf módosulatról – a mérési paraméterek optimalálása eredményeként kiválasztott beállítások segítségével – felvettem a spektrumokat, mind az 532 nm-es, mind pedig a 785 nm-es gerjesztő lézer segítségével. A mikroszkópos tárgylemezre felvitt kristályokról minden forma esetében 30-30 helyen besugározva készítettem el a felvételsorozatokat. (25.-29. ábra)



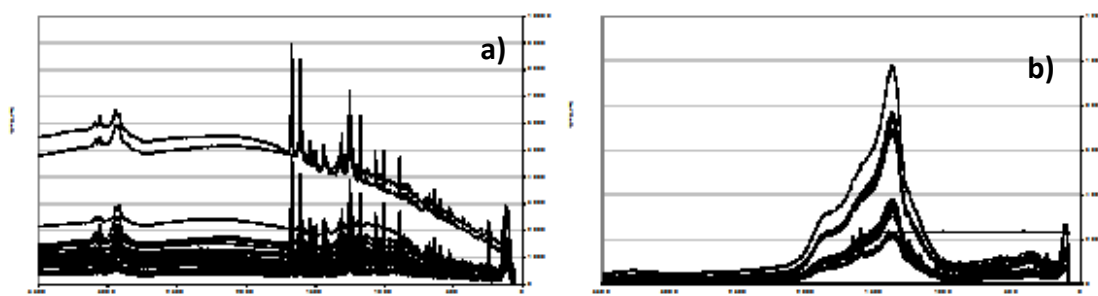
25. ábra: Forma 1 módosulat mikroszkóppal készült spektrumfelvételei 532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel



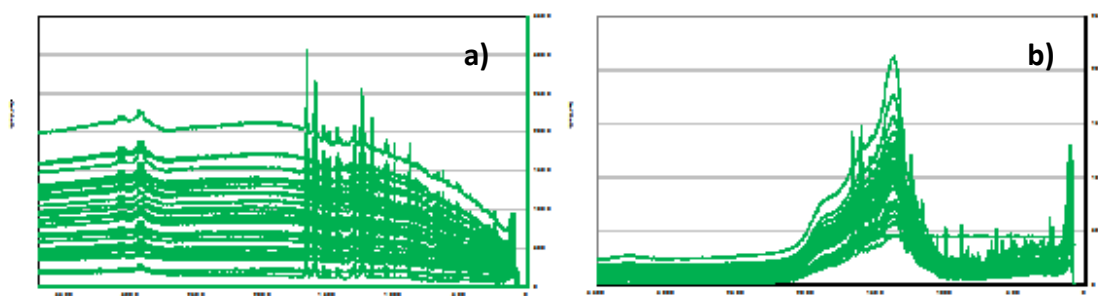
26. ábra: Forma 2 módosulat mikroszkóppal készült spektrumfelvételei 532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel



27. ábra: Forma 3 módosulat mikroszkóppal készült spektrumfelvételei 532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel



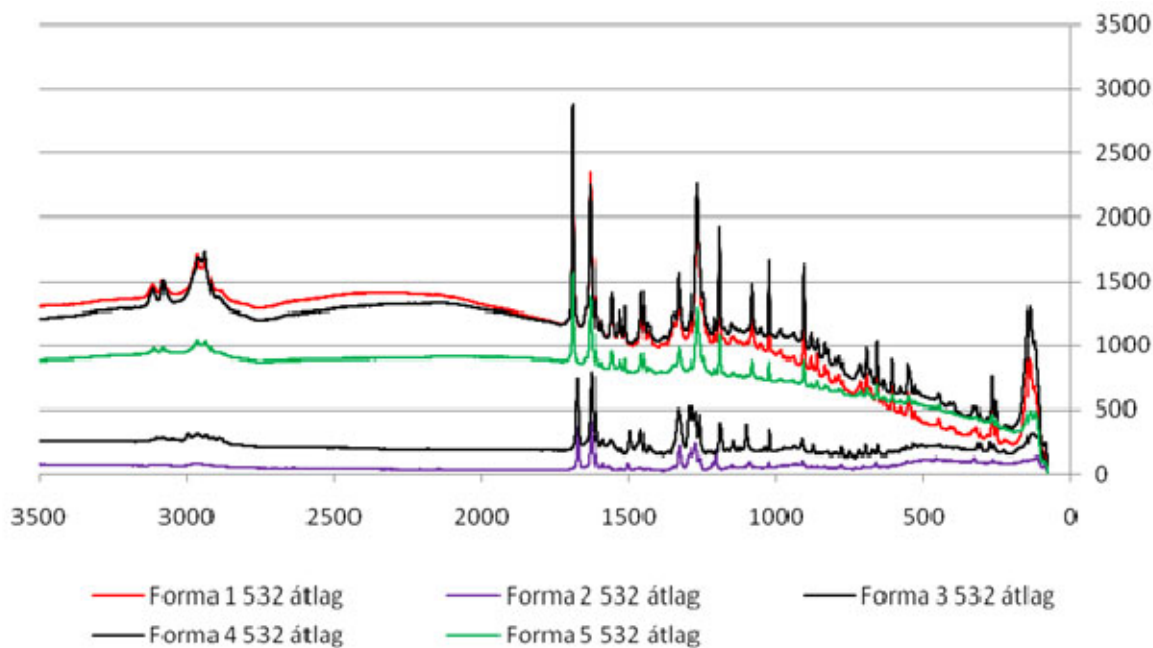
**28. ábra: Forma 4 módosulat mikroszkóppal készült spektrumfelvételei
532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel**



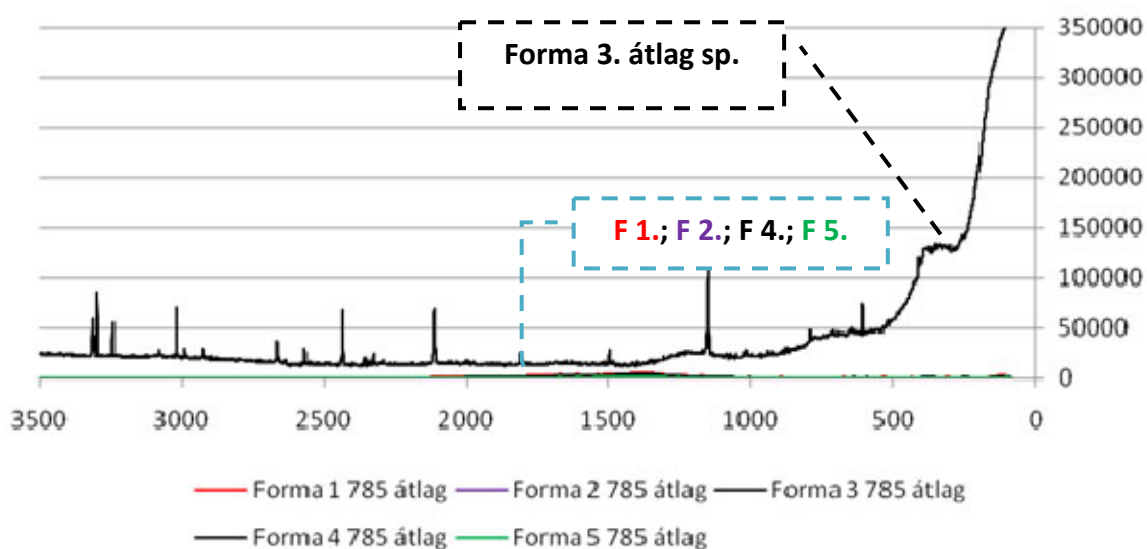
**29. ábra: Forma 5 módosulat mikroszkóppal készült spektrumfelvételei
532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel**

Az ábrákon jól látható, hogy a mérési módszernél az optimálása ellenére, alapvonal eltolódások tapasztalhatóak. Ezt leginkább azzal magyarázhatjuk, hogy a felvett spektrum minőségét nagyban befolyásolja, hogy a minta mely részéről készül a felvétel. Ilyen befolyásoló tényező lehet például a kristály formája, mérete, esetleges törésvonalak vagy átfedések. Általánosságban az is elmondható, hogy ha önálló kristályon végzünk besugárzást, akkor kisebb intenzitású csúcsokat kapunk, mintha nagyobb, több kristályból álló csoportokon tennénk ugyanezt. Egy adott pontról ismételt felvételek készítése során előfordulhatott az anyag károsodása (olvadás) is. Ezek a körülmények mind olyan további változékonyságokat jelentenek, melyeket kiküszöbölni nehezen, vagy egyáltalán nem tudunk, de mindenképpen törekedni kell a hatásaik csökkentésére. Ennek eszközeként alkalmazhatunk spektrumszelekciót, matematikai kezeléseket, súlyozásokat és többváltozós adatelemző módszereket egyaránt. Egyes formák esetén nagy eltérés tapasztalható az alapvonalak lefutásában akkor is, ha nem lép fel a fluoreszcencia jelensége, és a spektrumok lefutása is hasonló. Ez a változékonyság a méréstechnikából származtatható, hatása az előzőekben említett módszerekkel kezelhető.

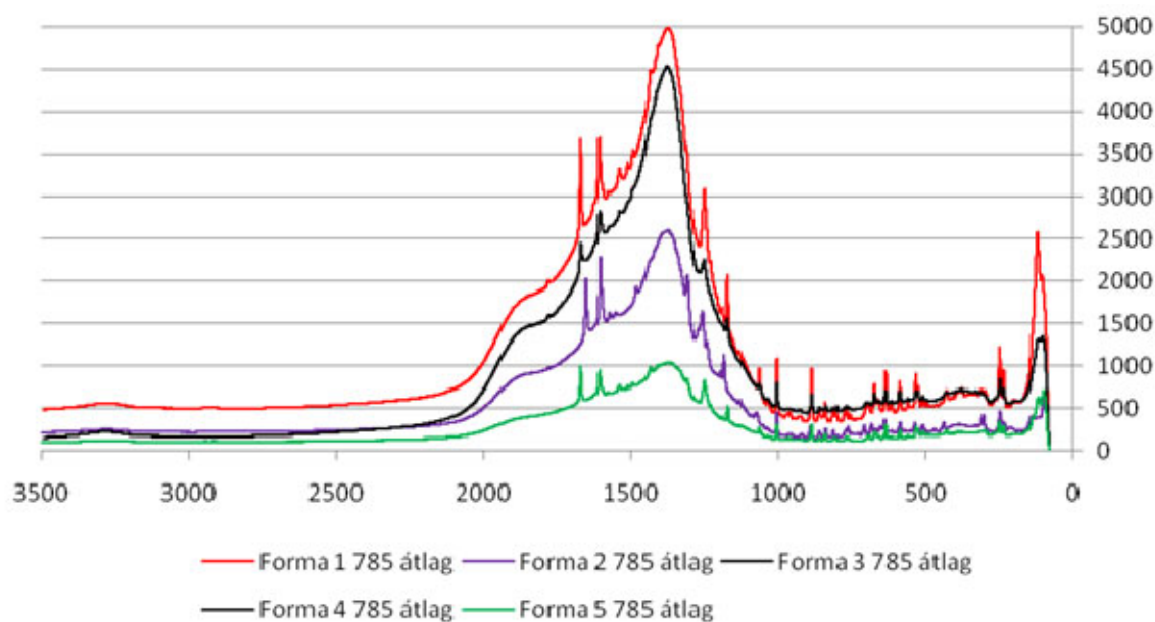
Elkészítettem a kapott halmazok átlagspektromait (30.-32. ábra), melyeket egymásra rakva és a lefutásukat megvizsgálva jól megfigyelhetőek az egyes polimorf módosulatok spektrumai közötti különbségek.



30. ábra: Az öt polimorf módosulat mikroszkóppal készült felvételeinek (532 nm) átlag spektrumai



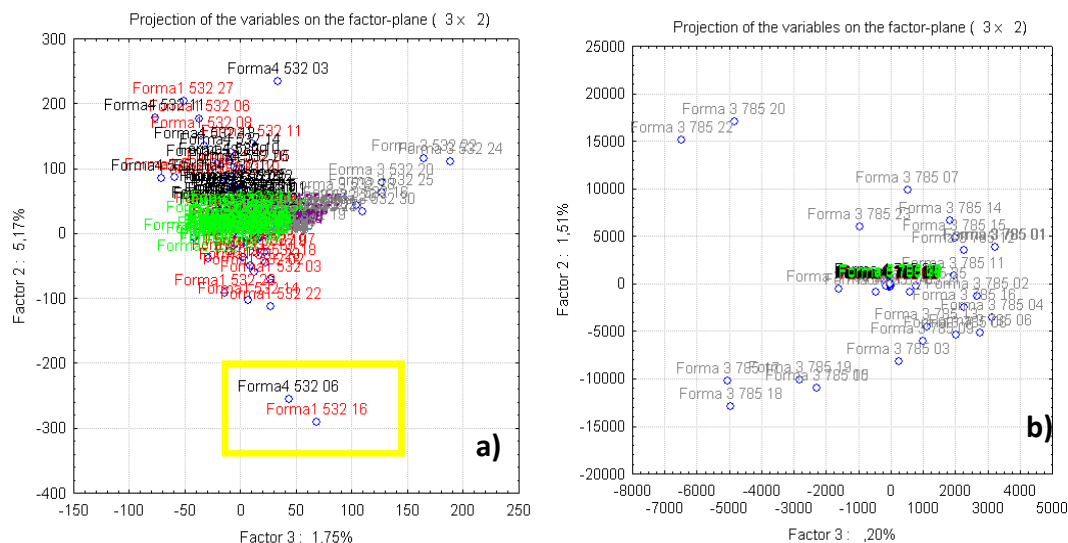
31. ábra: Az öt polimorf módosulat mikroszkóppal készült felvételeinek (785 nm) átlag spektrumai a teljes intenzitástartományban



32. ábra: Az öt polimorf módosulat mikroszkóppal készült felvételeinek (785 nm) átlag spektrumai a kisebb intenzitástartományban

A **31. ábrán** látható, hogy Forma 2 spektrumának intenzitása két nagyságrenddel nagyobb, mint az egyéb formák (Forma 1, Forma 3, Forma 4, Forma 5) spektrumainak, ami egyértelműen fluoreszcens hatásra utal. Hogy a többi spektrum is jól megfigyelhető legyen, ezért a **32. ábrán** átállítottam az intenzitás skáláját 0-5000-ig. Bár a spektrumok lefutásának tanulmányozásakor megfigyelhetőek kisebb különbségek az egyes polimorf módosulatok között, de a legszembetűnőbb változékonyság a formák jelintenzitásában és a fluoreszcens hatás mértékében láthatóak.

Főkomponens elemzéseket végeztem a kapott spektrumhalmazokon (**33. ábra**). A vizsgálat előtt a spektrumokon alapvonal korrekciót nem hajtottam végre, és adat-előkezelést sem végeztem.

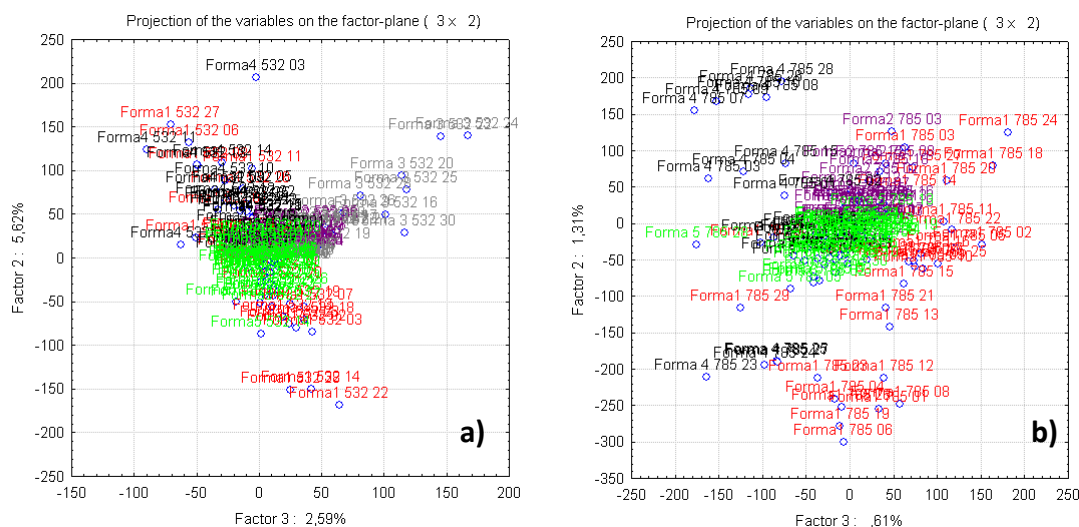


33. ábra: Az öt polimorf módosulat mikroszkóppal és 532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel készült, teljes spektrumhalmazainak főkomponens elemzése során kapott score ábrák

A kapott eredményeket szemlélve észrevehető, hogy a **33./a ábra** esetében két spektrum (Forma 4 532 06, Forma1 532 16) erőteljesen elválik a populációtól, melyeket az ábrán sárga színnel körbekerítettem. Ezenkívül jól látszik, hogy a szürkével jelölt Forma 3. pontjai jobban elkülönülnek a többi forma adathalmazától, viszont a score pontok nagyobb része terülnek el, jobban szóródnak, mint a többi forma értékszám pontjai.

A **33./b ábrán** Forma 3 értékszám pontjai terülnek el az egész diagramon, miközben a másik négy módosulat spektrumaiból képzett populációk gyakorlatilag egy pontba vannak besűrítve. Ez azzal magyarázható, hogy Forma 3 spektrumainak intenzitása a 785 nm-es lézerrel felvéve mintegy két nagyságrenddel nagyobbak, mint a többi polimorf módosulatról készült spektrumai (vö.: **31. ábra**).

Ezután az 532 nm-es mérések esetében eltávolítottam a két kiugró pont spektrumát az adathalmazból, a 785 nm-es méréseknél pedig kivettem a Forma 3 módosulat spektrumait, és újra elvégeztem a főkomponens elemzéseket (**34. ábra**).

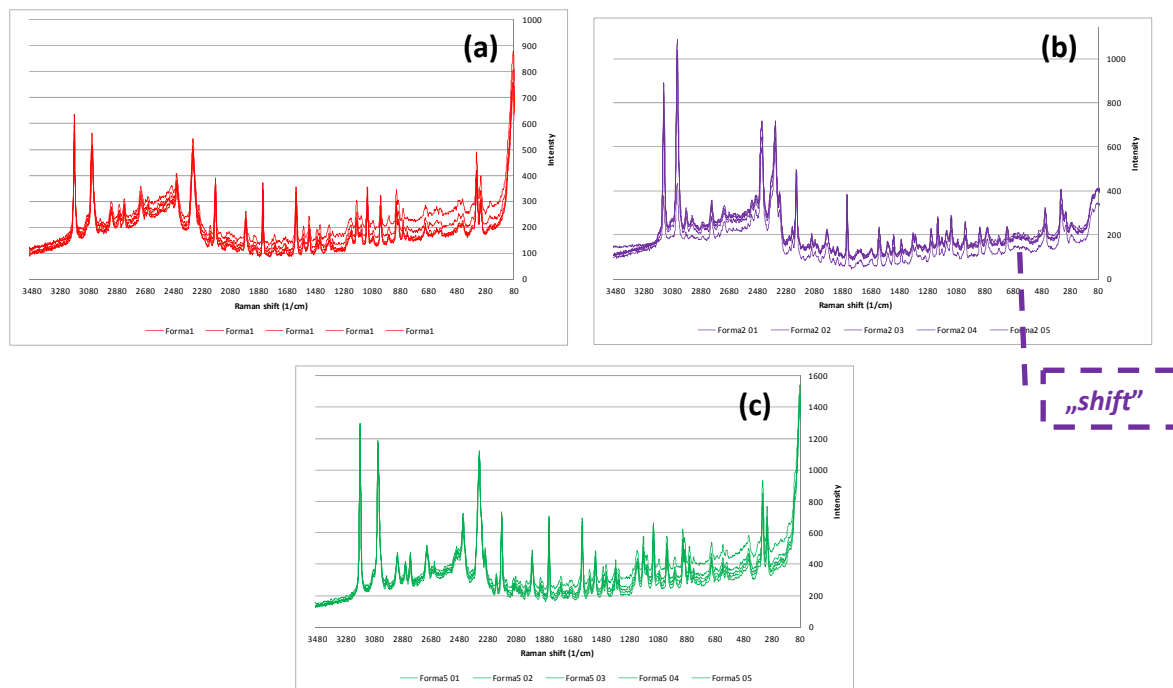


34. ábra: Az öt polimorf módosulat mikroszkóppal és 532 (a) és 785 (b) nm-es gerjesztő lézerrel készült, szűrt spektrumhalmazainak főkomponens elemzése során kapott score ábrák

A kiugró tagok elvétele után (**34./a ábra**), valamint Forma 3 spektrumainak kihagyása után (**34./b ábra**) javultak ugyan a csoportok közti szétválások, de ez még mindig nem mondható polimorfia vizsgálat szempontjából kielégítőnek.

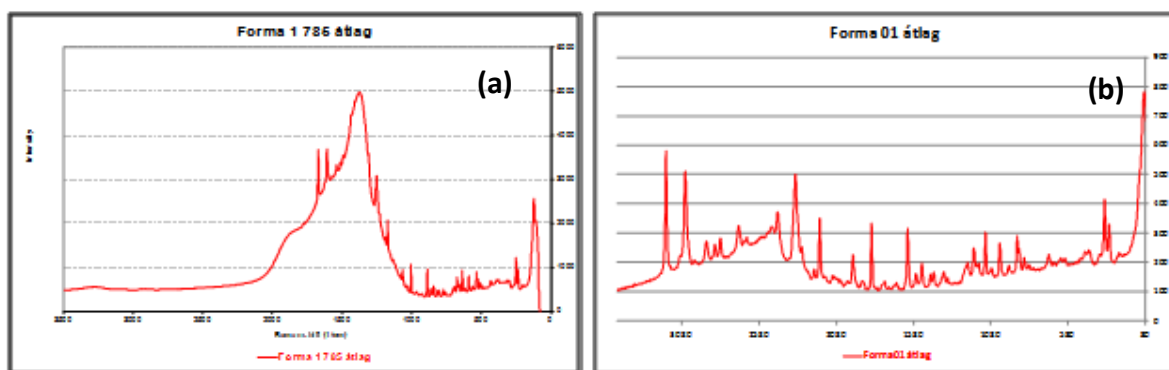
5.3.2 Polimorf módosulatok szilárd formáiról Raman-szondás módszerrel spektrumsorozat létrehozása és azok szelekciója

A szilárd polimorf módosulatok közül háromról száloptikával és a hozzá tartozó 785 nm-es gerjesztő lézerrel is rögzítettem spektrumokat. Azért döntöttem úgy, hogy a Forma 1, Forma 2 és Forma 5 polimorf módosulatok kristályait ezzel a technikával is megvizsgálom, mert dolgozatom fő témája ennek a három módosulatnak polimorf transzformációjának követése és annak kiértékelése. A felvett spektrumsorozatok, valamint azok átlagspektrumai a **35. ábrán** láthatóak.

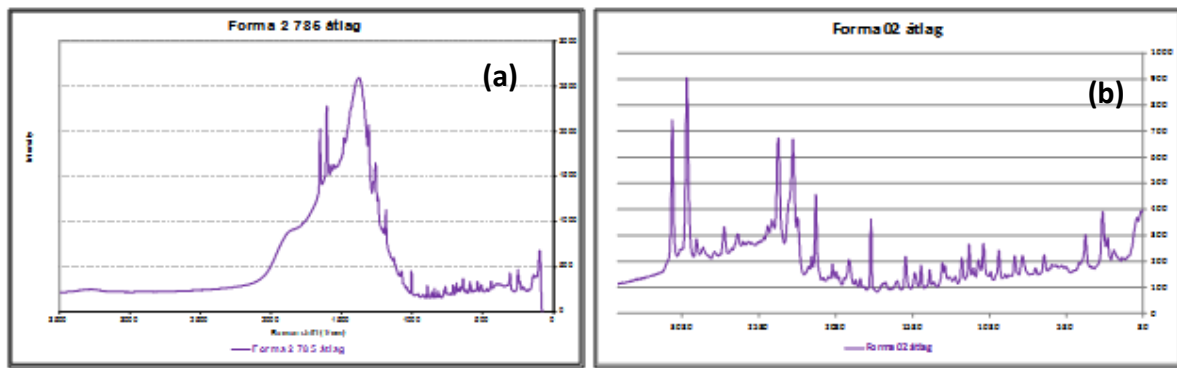


35. ábra: Forma 1 (a), Forma 2 (b) és Forma 5 (c) módosulatok száloptikával készült spektrumfelvételei 785 nm-es gerjesztő lézerrel

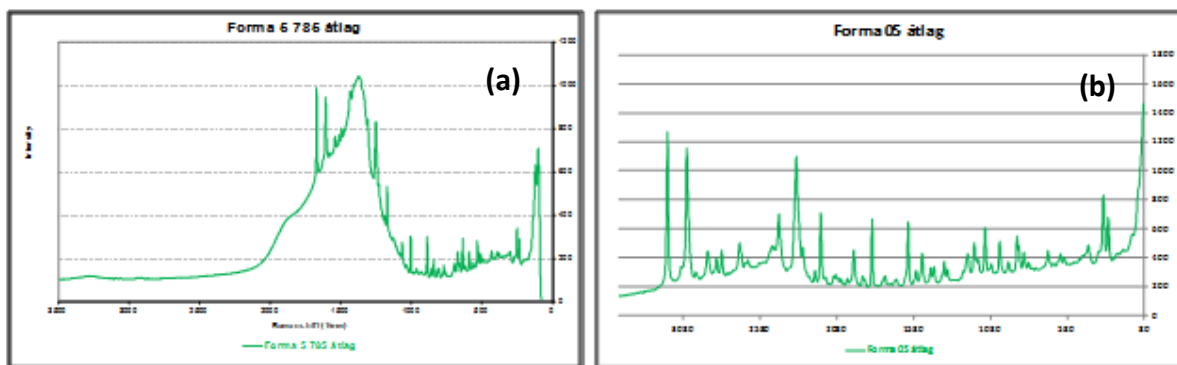
Elkészítettem ezeknek a halmazoknak az átlagspektrumait is, majd összevettem őket a mikroszkópos felvételek alapján készült átlagspektrumokkal (36.-38. ábra).



36. ábra: Forma 1 módosulat mikroszkóppal (a) és száloptikával (b) 785 nm-es gerjesztő lézerrel készült felvételeinek átlagspektrumai



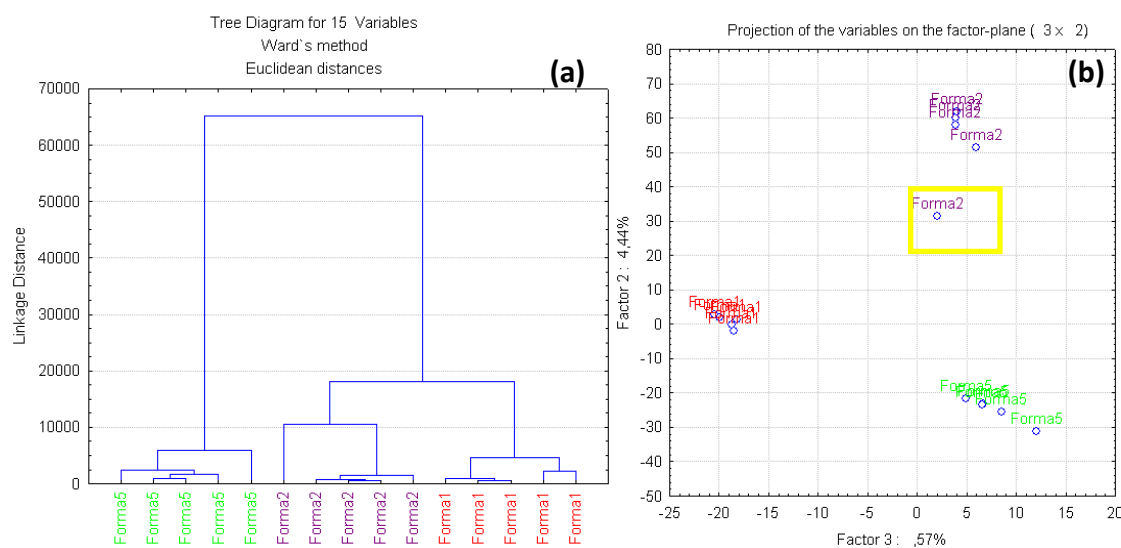
37. ábra: Forma 2 módosulat mikroszkóppal (a) és száloptikával (b) 785 nm-es gerjesztő lézerrel készült felvételeinek átlagspektrumai



38. ábra: Forma 5 módosulat mikroszkóppal (a) és száloptikával (b) 785 nm-es gerjesztő lézerrel készült felvételeinek átlagspektrumai

Ha az elkészült átlagspektrumokat az adott formáknál egymáshoz hasonlítjuk, akkor megállapíthatjuk, hogy a mikroszkóppal felvett spektrumok jelintenzitása ugyan egy nagyságrenddel nagyobb, mint a száloptikával készített felvételeké, azonban utóbbinál nem jelentkezik az a fluoreszcens hatás, ami a mikroszkópos felvételeknél a spektrum alapvonalán, a mérési tartomány közepén egy nagy „hegyet” eredményez, elnyomva így sok informatív csúcsot.

Elkészítettem a száloptikával felvett spektrumhalmazok csoport- és főkomponens elemzését (39. ábra).



39. ábra: A három kiemelt polimorf módosulat szálóptikával és 785 nm-es gerjesztő lézerrel készült spektrumhalmazainak csoport- (a) és főkomponens elemzése (b) során kapott dendrogram és score ábra

A dendrogramon és az értékszám ábrán szembejövő a polimorf módosulatok éles elkülönülése, szétválása. A főkomponens elemzés diagramjánál látható (39./b ábra), hogy az egyik Forma 2 spektrum egy kicsit különvált a többi társának csoportjától, aminek oka az 33./b ábrán szemléltetett eltolódás (*shift*).

A kapott eredmények tekintetében tehát elmondható, hogy a szálóptikával készült felvételek jobban értékelhető, információban gazdagabb spektrumot adnak ezeknek a módosulatoknak az esetében. A szálóptikával készült felvételek lényegében mentesek a fluoreszcens jelenségtől, ami elnyomja a csúcsokat, valamint – mivel itt egy nagyobb tömegben lévő mintáról készül a felvétel –, a spektrum felvétele jobban reprodukálható, mint egy Raman-mikroszkópos felvételnél. A mikroszkóp esetében ugyanis annak mérési technikájából adódóan egyedülálló kristályokról, esetleg pár kristály átlapolási pontjáról készül a felvétel. Ezekben az esetekben közrejátszanak a kristály formájából, éleiből, esetlegesen törésvonalak meglövéseiből adódó hibák.

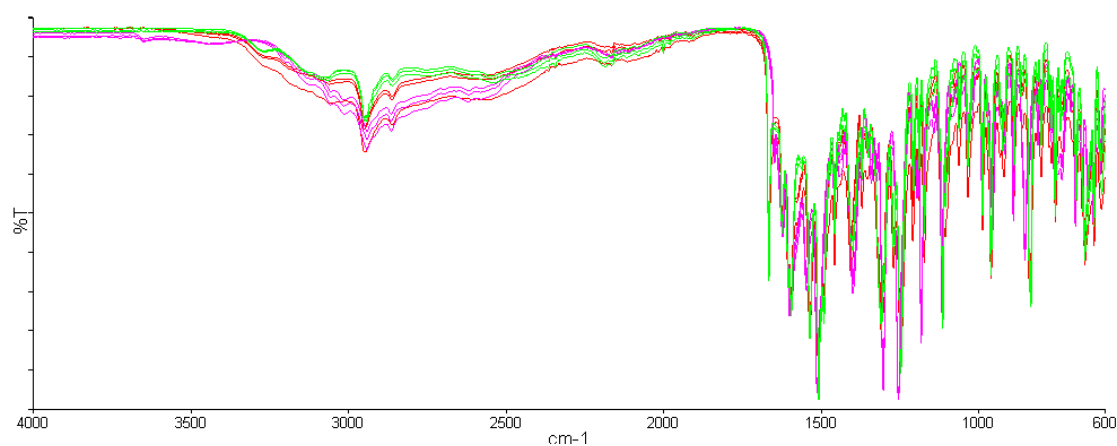
A polimorf módosulatok szilárd formáinak Raman-mikroszkópos és Raman-szondás méréseiről szóló fejezetek összegzéseként – eredményeim tükrében – azt az ajánlást tenném, hogy ha a jövőben folytatódik az általam vizsgált hatóanyag átkristályosítási műveletére a PAT rendszer kiépítése, akkor a Raman-szonda a reaktorban való szuszpenziós reakció monitorozása mellett – amelyre dolgozatomban később még

részletesebben kitérek –, használható a kiszűrt kristályok minőségi vizsgálatára is, ami anyagi/kényelmi/praktikussági szempontokból megfontolandó.

5.4 Polimorf módosulatok szilárd formáiról analitikai infravörös-spektroszkópia módszerrel spektrumsorozat létrehozása és szelekciója

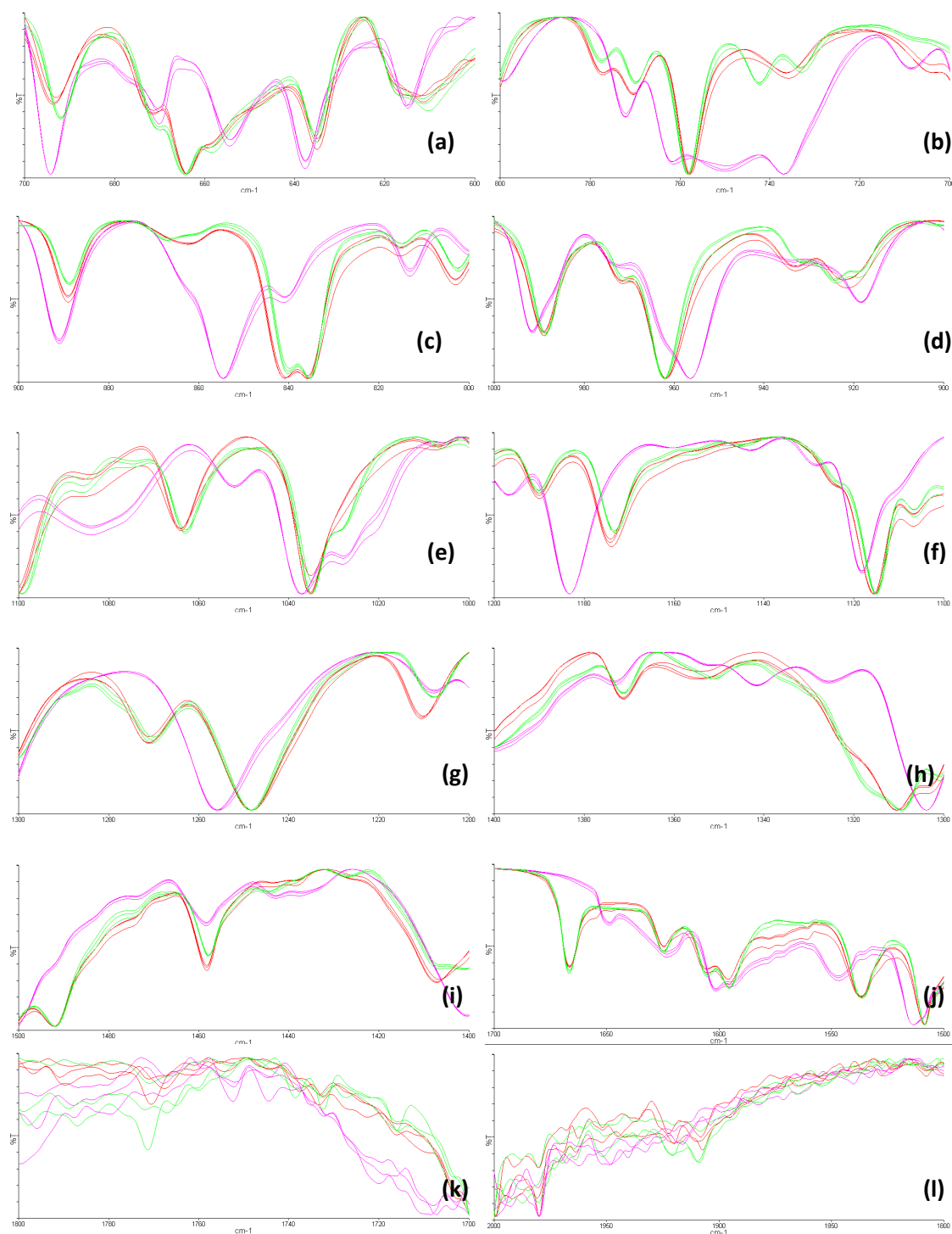
A polimorf módosulataim Raman-spektroszkópiai lehetőségeit feltérképezve megállapítottam, hogy jól reprodukálható eredményeket csak akkor kaphatunk, ha egyszerre nagyobb tömegű mintáról vesszük fel Raman-spektrumokat, mivel a kristályok törésvonalai miatt okozott fényszóródási probléma csak így küszöbölhető ki. Ez egy PAT rendszerben való használatnál – a mintaanyag mennyiségének szempontjából – valószínűleg nem is jelent problémát a (fél)üzemi körülmények között, viszont a laboratóriumi vizsgálatoknál sok esetben gondot jelenthet a „minimum” mennyiség előteremtése. Más helyzetben – ha nem a jelenleg tárgyalt mintaanyagot kell vizsgálni, hanem másikat – nem lehetünk biztosak benne, hogy csupán a Raman-technikával elég információt kapunk az adott anyagról. Előfordulhat olyan eset is, hogy a kapott anyag nagyon sérülékeny, és a nagy energiájú gerjesztő lézertől roncsolódik, vagy esetleg erős fluoreszcens jelenség lép fel, ami értékelhetetlenné teszi a kapott Raman-spektrumokat. Ilyen esetekben jelenthet jó megoldást az analitikai infravörös technika. A Raman- és az IR módszerek mérési elvükből kifolyólag jól kiegészítik egymást, hiszen míg a Raman-technika a gerjesztő fotonok rugalmatlan szórásaival foglalkozik, addig az IR módszerek ezek elnyelődését vizsgálja.

Azért, hogy az FT-IR technika használati lehetőségeit feltérképezsem a kapott modellvegyületemnél, a Forma 1, Forma 2 és Forma 5 módosulataimról ATR méréstechnikával felvételeket készítettem (40. ábra). (Sajnos mire a méréseimre sor került, már nem volt elérhető a másik két módosulatból minősített minta, így ezekről nem készültek felvételek.)



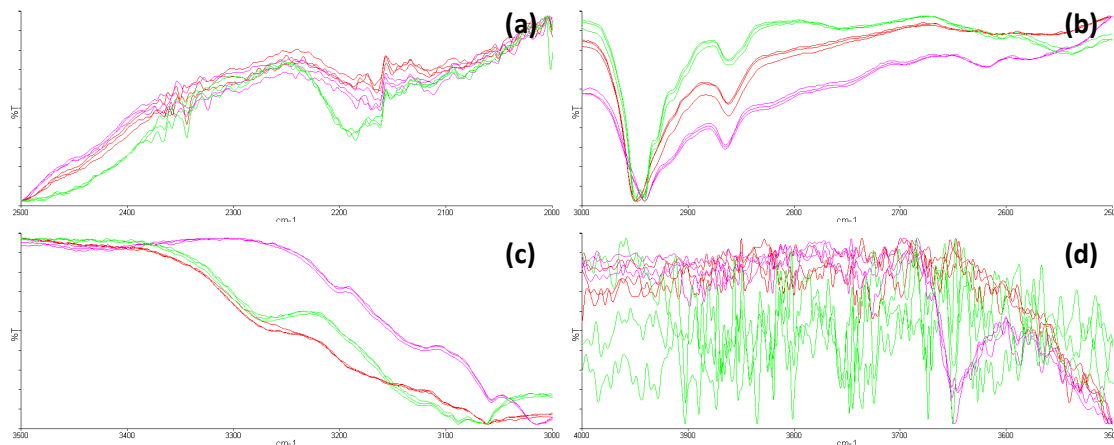
**40. ábra: A három polimorf módosulat FT-IR spektrumai autoskálázás után
a teljes hullámszám-tartományban
(Forma 1, Forma 2, Forma 5)**

Ha az IR spektrumok lefutását részletesen szemügyre vesszük (**41.-42. ábra**), akkor gyakorlatilag minden egyes kinagyított régióban szemmel látható különbségeket találhatunk a három polimorf módosulat IR spektrumai között.



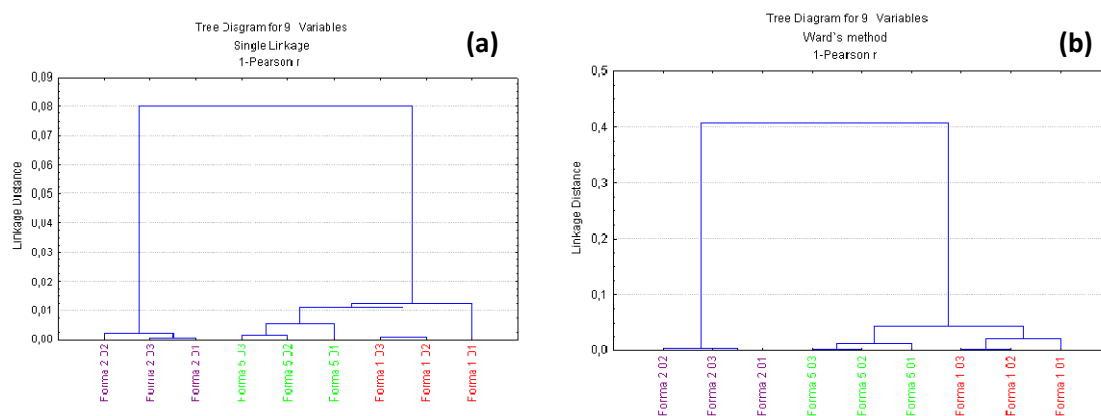
**41. ábra: A három polimorf módosulat FT-IR spektrumai autoskálázás után
a kiemelt hullámszám-tartományokban:**

**(a) 600-700, (b) 700-800, (c) 800-900, (d) 900-1000,
(e) 1000-1100, (f) 1100-1200, (g) 1200-1300, (h) 1300-1400,
(i) 1400-1500, (j) 1500-1700, (k) 1700-1800, (l) 1800-2000, 1/cm
(Forma 1, Forma 2, Forma 5)**



42. ábra: A három polimorf módosulat FT-IR spektrumai autoskálázás után a kiemelt hullámszám-tartományokban:
(a)2000-2500, (b) 2500-3000, (c) 3000-3500, (d) 3500-4000, 1/cm
(Forma 1, Forma 2, Forma 5)

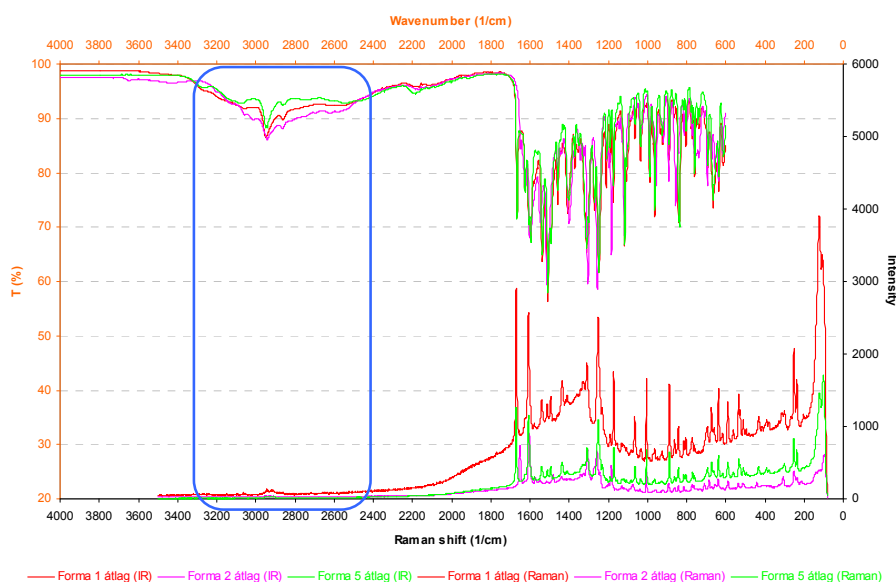
Ez azt mutatja, hogy mintaanyagunk kis mennyiségű polimorf módosulatainak szétválasztását ezzel a technikával – a Raman-mikroszkópos spektrumokhoz képest jobb jel/zaj arányú IR spektrumoknak köszönhetően – még egyszerűbben meg tudjuk oldani. Ennek bizonyítására csoportelemzést is készítettem (**43. ábra**).



43. ábra: A három polimorf módosulatról készített FT-IR spektrumok teljes hullámszám-tartományára (600-4000 1/cm) elvégzett csoportelemzések dendrogramjai egyszerű lánc (a) és Ward-módszer (b) csoporttávolságokkal

A kapott dendogramok fényében tehát kijelenthető, hogy esetünkben az FT-IR készülék is éppen olyan alkalmas a kapott anyag polimorf módosulatainak megkülönböztetésére, mint a Raman-spektroszkópiai technika.

Annak a felvetésnek az alátámasztására, hogy az FT-IR a mi esetünkben jó kiegészítője lehet a Raman-technikának, össze kell vetnünk a Raman-szondával és az FT-IR-el felvett spektrumokat, hogy látunk-e valamilyen különbséget vagy hasonlóságot a lefutásuk között. Ezért egy diagramon ábrázoltam azokat az átlagspektrumokat, melyeket az adott Raman- és IR technikával egy-egy formára kapott spektrumhalmaz átlagolásával képeztem (44. ábra).



44. ábra: A három polimorf módosulatról készített FT-IR és Raman-spektrumhalmaz átlagspektrumainak összevetése (Forma 1, Forma 2, Forma 5)

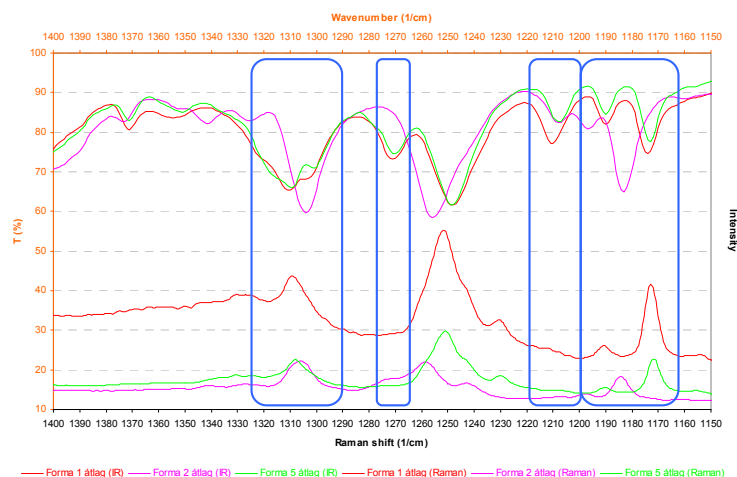
Ha a 44. ábrára pillantunk, egyből szembeötlik két fő különbség az átlagspektrumok között. Az egyik, hogy a két technika mérési tartománya nem egyezik meg. Míg a Raman-száloptika a 785 nm-es lézer segítségével 80-3500 1/cm között veszi fel a spektrumokat, addig az FT-IR készülék 600-4000 1/cm között teszi meg ugyanezt. Ezen felül jól látható még, hogy az FT-IR készülékkel készített spektrumok 2400-3400 1/cm között is rendelkeznek egy információban gazdag tartománnyal (44. ábra kiemelt része), ami főként az alaprezgések helye, de kiértékelés szempontjából ez is fontos

lehet. Ezzel szemben a Raman-száloptikával felvett spektrumoknál ebben a tartományban gyakorlatilag nincsenek csúcsok, illetve kis intenzitásuk, rossz jel/zaj arányuk miatt elhanyagolható a jelentőségük.

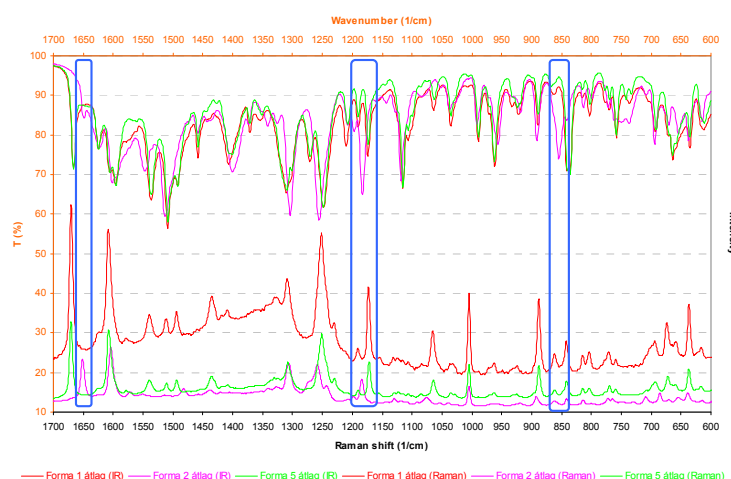
Közelebbről is megvizsgáltam a két technikával kapott átlagspektrumok lefutását egy-egy részlet kiemelésével (**45.-47. ábra**).



45. ábra: A három polimorf módosulatról készített FT-IR és Raman-spektrumhalmaz átlagspektrumainak összevetése a 2600-3000 1/cm tartományban (Forma 1, Forma 2, Forma 5)



46. ábra: A három polimorf módosulatról készített FT-IR és a Raman-spektrumhalmaz átlagspektrumainak összevetése az 1150-1400 1/cm tartományban (Forma 1, Forma 2, Forma 5)



47. ábra: A három polimorf módosulatról készített FT-IR és Raman-spektrumhalmaz átlagspektrumainak összevetése az 1700-600 1/cm tartományban (Forma 1, Forma 2, Forma 5)

Ha alaposabban szemrevételezzük a **45-46. ábrát**, akkor megfigyelhető, hogy az azonos formáknál a két módszerrel felvett spektrumok lefutása igencsak hasonló, azonban az intenzitásokban különbségek vannak. Láthatunk továbbá olyan tartományokat is, ahol ugyan mindkét esetben megvan az adott csúcsunk, azonban azok eltérő formájúak. Ilyen eset látható például a **45. ábra** első kiemelt részén, ahol a Raman-száloptikával felvett spektrumnál Forma 1 és Forma 5 esetében erős kettős csúcsokat látunk, Forma 2 esetében viszont csak egy széles, tompa csúcsot. Ugyanitt az FT-IR technikával felvett spektrumnál két szimpla (Forma 1 és Forma 2) és egy dupla (Forma 5) csúcsot kaptunk. Ezen régió mellett közvetlenül – a **45. ábra** második kiemelt részén – három, a Raman-spektrumokon nem látható IR csúcsot is detektáltunk. További, ehhez hasonló tartományok kerültek kiemelésre a **46.-47. ábrán** is.

Az FT-IR mérések kiértékelésének összefoglalásaként tehát elmondható, hogy esetemben a szilárd anyagok polimorfia vizsgálatánál az FT-IR is hasonlóan jól alkalmazható eszköz, mint a Raman száloptika, és a két készülék jól kiegészíti egymást ezen a téren. Ha tehát a vizsgálatok során a legkörültekintőbben akarunk eljárni, akkor érdemes a polimorf módosulatainkat ilyen módszerrel is megvizsgálni. Sajnos esetemben a mérés idején nem állt rendelkezésre a Forma 3-ból több minősített minta, amiről FT-IR-el is felvehettem volna a spektrumokat, mivel ott bizonyosan áthidalható lett volna a fluoreszcens jelenség okozta probléma.

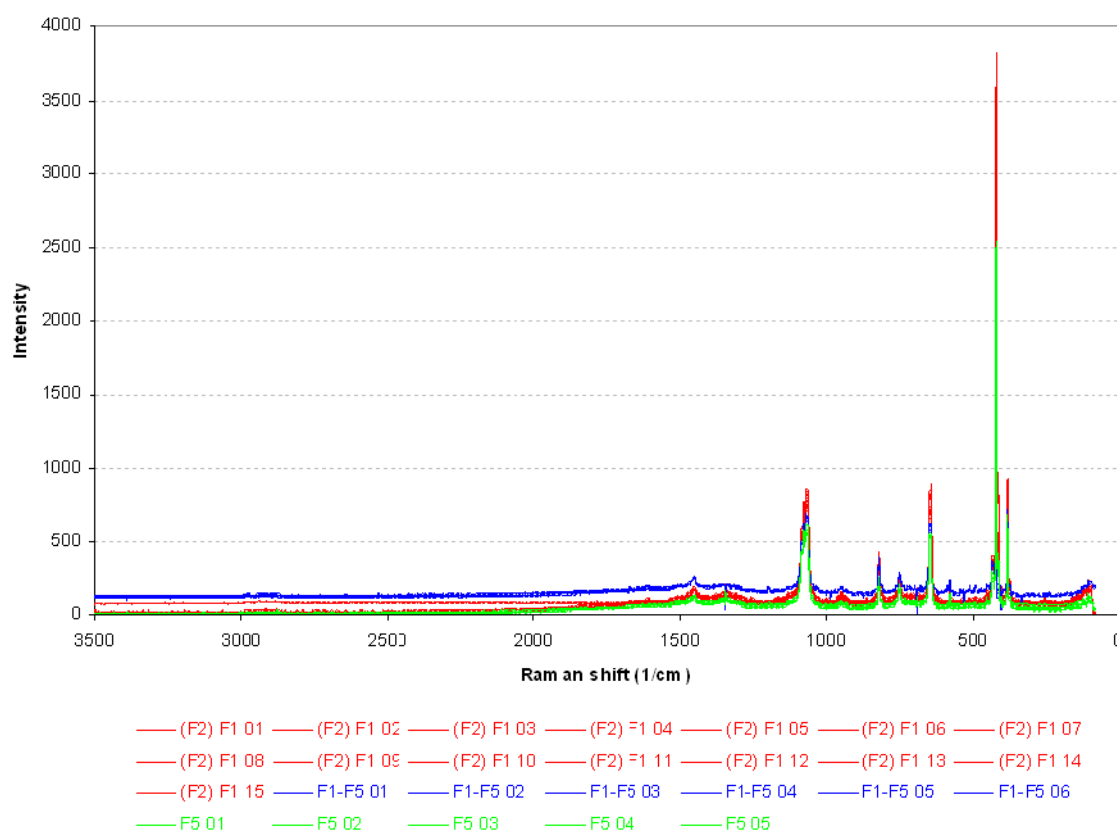
5.5 Polimorf módosulatok vizsgálata szuszpenzióban Raman-szonda segítségével

Az „3. Anyagok és módszerek” c. fejezet alatt már részleteztem a vizsgált polimorf módosulatokat, és az is említésre került, hogy ezek közül három formát (Forma 1, Forma 2, Forma 5) kiemelten kezelek. Mivel számunkra Forma 5 az előállítani kívánt céltermék, ezért a fő feladat az ehhez vezető polimorf transzformációs eljárás monitorozása szuszpenziós közegben. Egy teljes mérési tartományra – abc (60-1555 & 1545-2760 & 2710-3700) – beállított felvétel készítése körülbelül 4 percet vesz igénybe, ami nagyon megnehezíti a gyorsan lejátszódó átalakulások pontos nyomon követését, esetünkben az első lépését amikor a Forma 2 → Forma 1 átalakulás játszódik le.

Az elsődleges feladat tehát az volt, hogy ezt a mérési időt valamilyen módon lerövidítsük annyira, hogy kellő rendszerességgel tudjunk felvételeket készíteni. Erre alapvetően két megoldás adott. Az első az, hogy lerövidítjük a besugárzási időt és lecsökkentjük az akkumulációk számát, tehát eltérünk az optimalizálás során beállított értékektől. Ez értelemszerűen a spektrum képének a minőségi romlásával járna, így nem ajánlott. A másik lehetőség, hogy nem a teljes spektrumtartományt vesszük fel (abc), hanem annak csak egy bizonyos részét, amivel nagyban csökkenthetjük a mérési időnket. Ezt abban az esetben tehetjük meg, ha találunk a spektrumoknál egy olyan érzékeny tartományt, amely elég információval szolgál majd ahhoz, hogy a különböző módosulatok spektrumait megkülönböztethessük egymástól.

5.5.1 Próbakísérlet leírása és elemzése

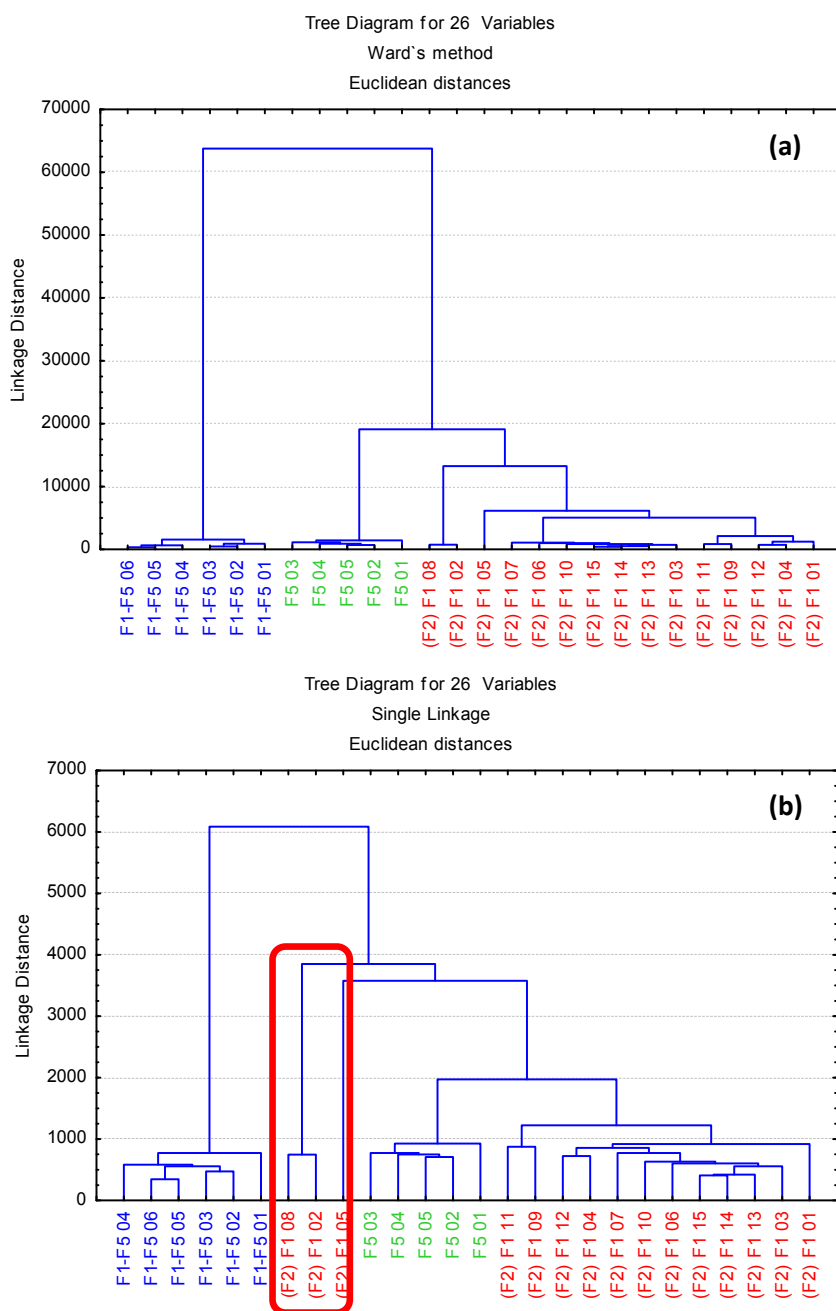
Ahhoz, hogy megtudjam, melyik lehetőséggel élhetek, először egy próba kísérletet végeztem, mely során teljes spektrumtartományú felvételeket készítettem (48. ábra).



48. ábra: A próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok

Az ábrán a spektrumokat három fő csoport szerint jelöltem aszerint, hogy a szuszpenzió akkor milyen polimorf módosulatot vagy módosulatokat tartalmazott. Ennek alátámasztásához röntgendiffrakciós felvételeket készítettem. A piros színnel jelöltek a Forma 1 spektrumai, a kékek egy Forma 1 és Forma 5 módosulatokat tartalmazó vegyes szuszpenzióról készültek, míg a zöld szín a Forma 5 spektrumait jelzi. Jól látható, hogy a spektrumok bár hasonló lefutásúak, mégis jól elkülönülő csoportokat alkotnak. Az is megfigyelhető, hogy az információban gazdag spektrumtartomány körülbelül 80-1500 1/cm-ig tart, így a későbbiekben valószínűleg elegendő lehet ennek a tartománynak a használata.

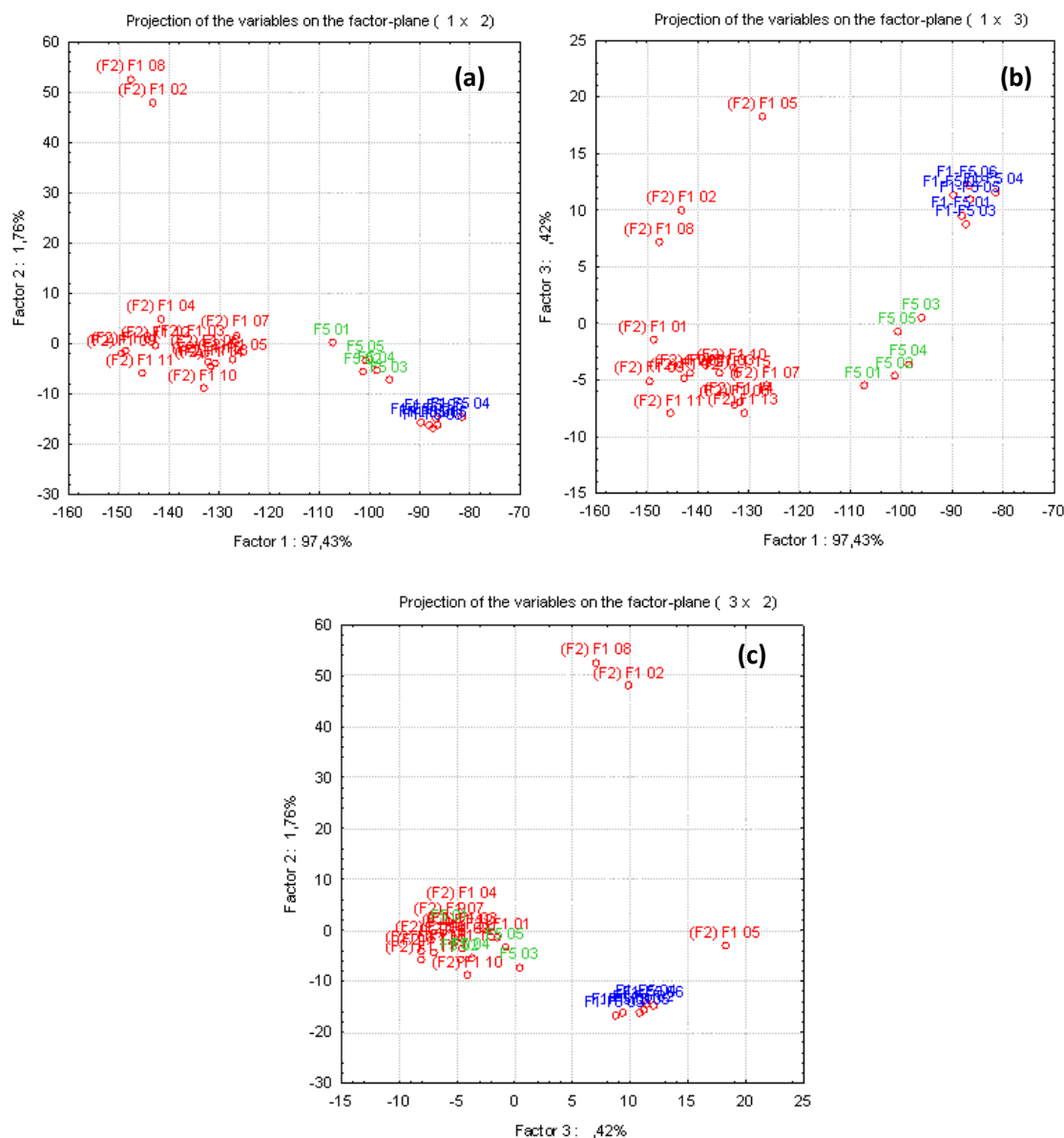
Ezt követően a teljes spektrumtartományon csoportelemzést hajtottam végre. A spektrumokon előzetes alapvonal korrekciót nem hajtottam végre, és a feldolgozásukat adat-előkezelés nélkül, egyszerű lánc és Ward-módszer szerinti csoporttávolság-számításokkal végeztem (49. ábra).



49. ábra: A próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-3500 1/cm) elvégzett csoportelemzések dendogramjai Ward-módszer (a) és egyszerű lánc (b) csoporttávolságokkal

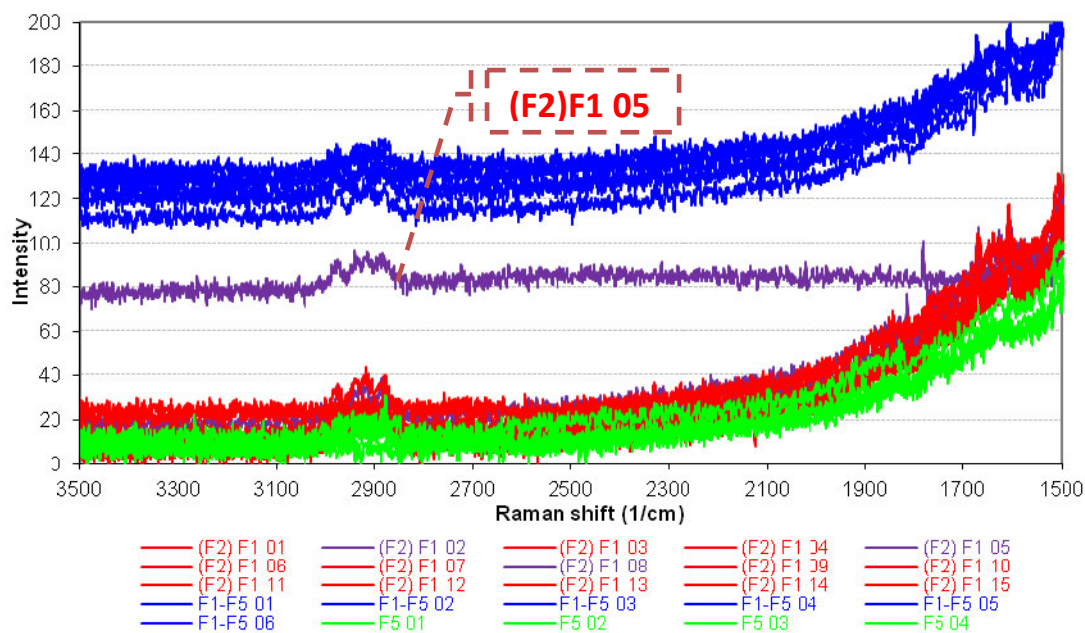
A két ábra közötti különbség jól látható. Az első esetében, ahol Ward-módszert alkalmaztam, az elkülönülés tökéletes volt, azonban az egyszerű lánc csoporttávolság alapján történő elemzésnél három spektrumot – (F2)F1 02, (F2)F1 05, (F2)F1 08 – külön ágakra rendezett.

A spektrumokon ezután főkomponens elemzéseket végeztem, melynek score értékeit a **50. ábra** mutatja be.

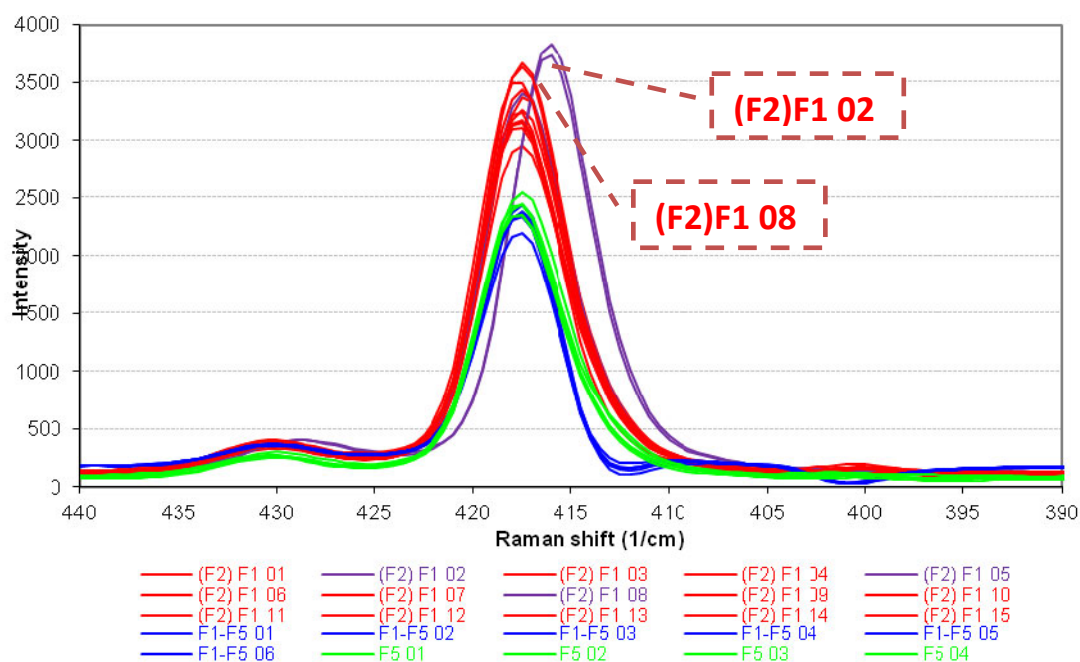


50. ábra: A próba átkristályosításról származó spektromok teljes tartományára (80-3500 1/cm) elvégzett főkomponens elemzés score ábrái

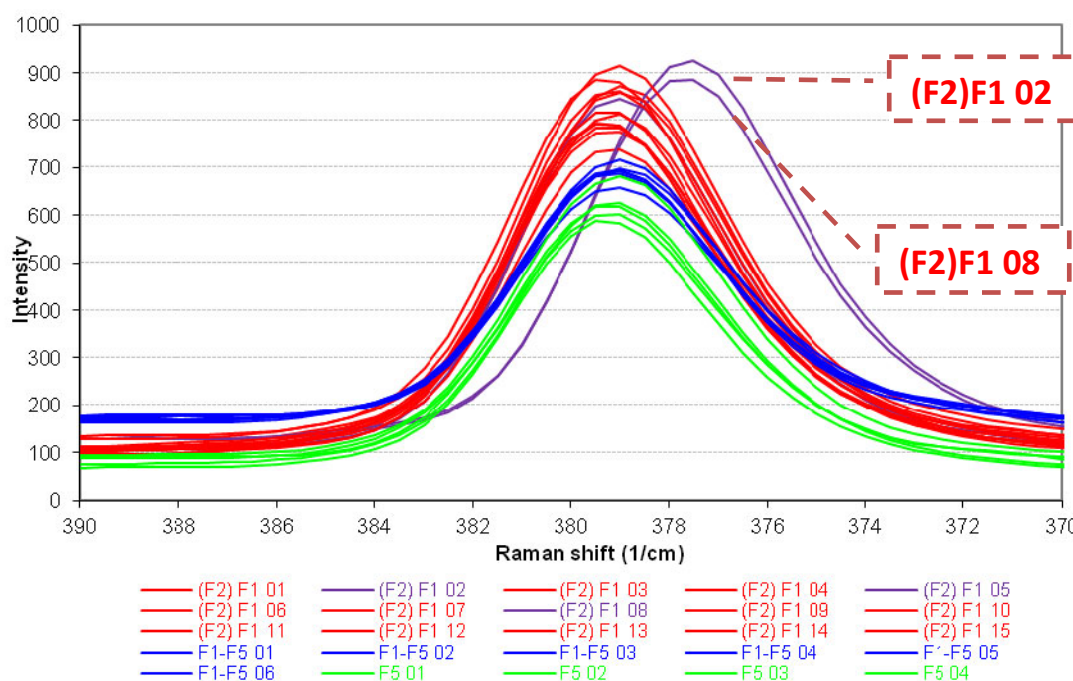
A spektrumok főkomponens elemzését vizsgálva látható, hogy a csoportokat jól és markánsan elkülöníti, ám a csoportelemzésnél a Ward-módszerrel is különválasztott 3 spektrum itt is a halmazokon kívül helyezkedik el (*outlier*). Azért, hogy ennek a magyarázatát megtaláljam, megvizsgáltam a spektrumom lefutását (**51.-53. ábra**), hogy ott milyen eltéréseket észlelek.



51. ábra: Kiemelt eltérések a próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok 3500-1500 1/cm-es tartományában



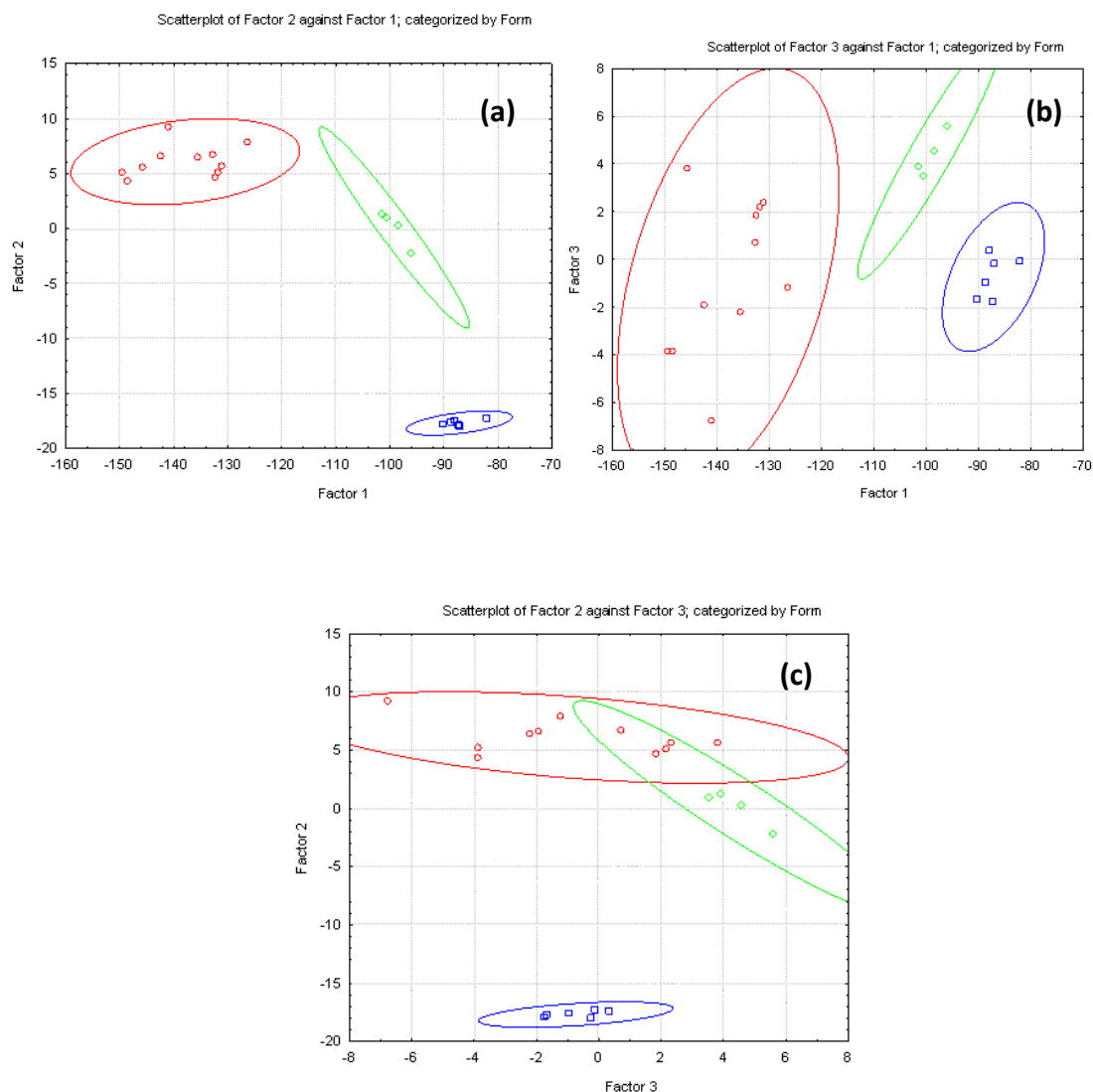
52. ábra: Kiemelt eltérések a próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok 440-390 1/cm-es tartományában



53. ábra: Kiemelt eltérések a próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok 390-370 1/cm-es tartományában

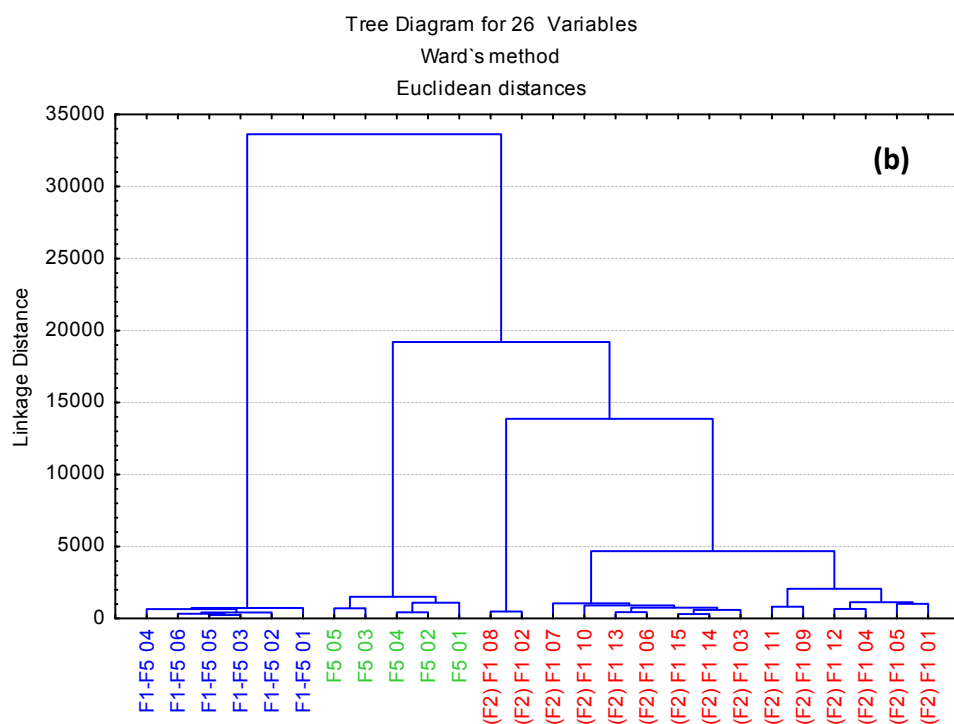
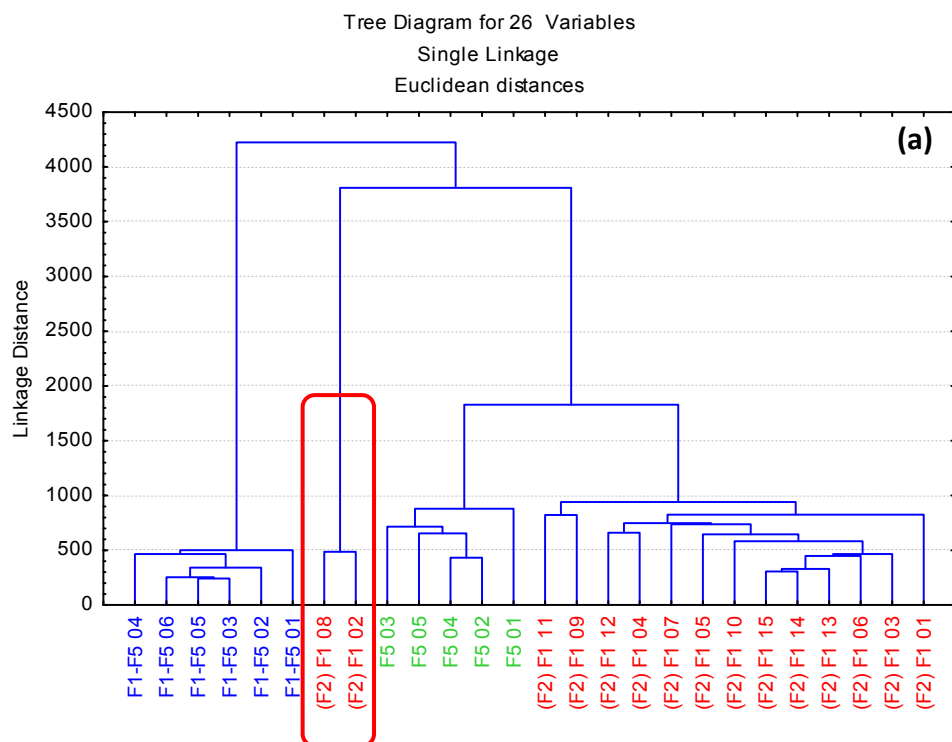
Jól látható, hogy a lila színnel kiemelt 3 spektrum – (F2)F1 02, (F2)F1 05, (F2)F1 08 – lefutása eltér a többiétől. Az (F2)F1 05-ös spektrumnál (51. ábra) egy alapvonal eltolódás figyelhető meg körülbelül az 1700 és 3500 1/cm közötti tartományban, míg a másik két spektrumnál a 52.-53. ábrákon jól megfigyelhető egy bizonyos eltolódás a spektrumok lefutásában. Ezen spektroszkópiai eltérések ismeretének fényében, már érthető a statisztikai elemzéseknél tapasztalt anomália.

Az outlier spektrumok kiszűrésével készített újabb főkomponens elemzés során 90%-os konfidencia intervallumot magába foglaló szórás ellipsziseket illesztettem a két főkomponens által megadott score értékekre (54. ábra). Az ábrázoláshoz kiválasztott főkomponensek függvényében a csoportok többé-kevésbé elváltak, csak a PC2 vs. PC3 esetén látható némi átfedés az (F2)F1 és F5 csoportok között.

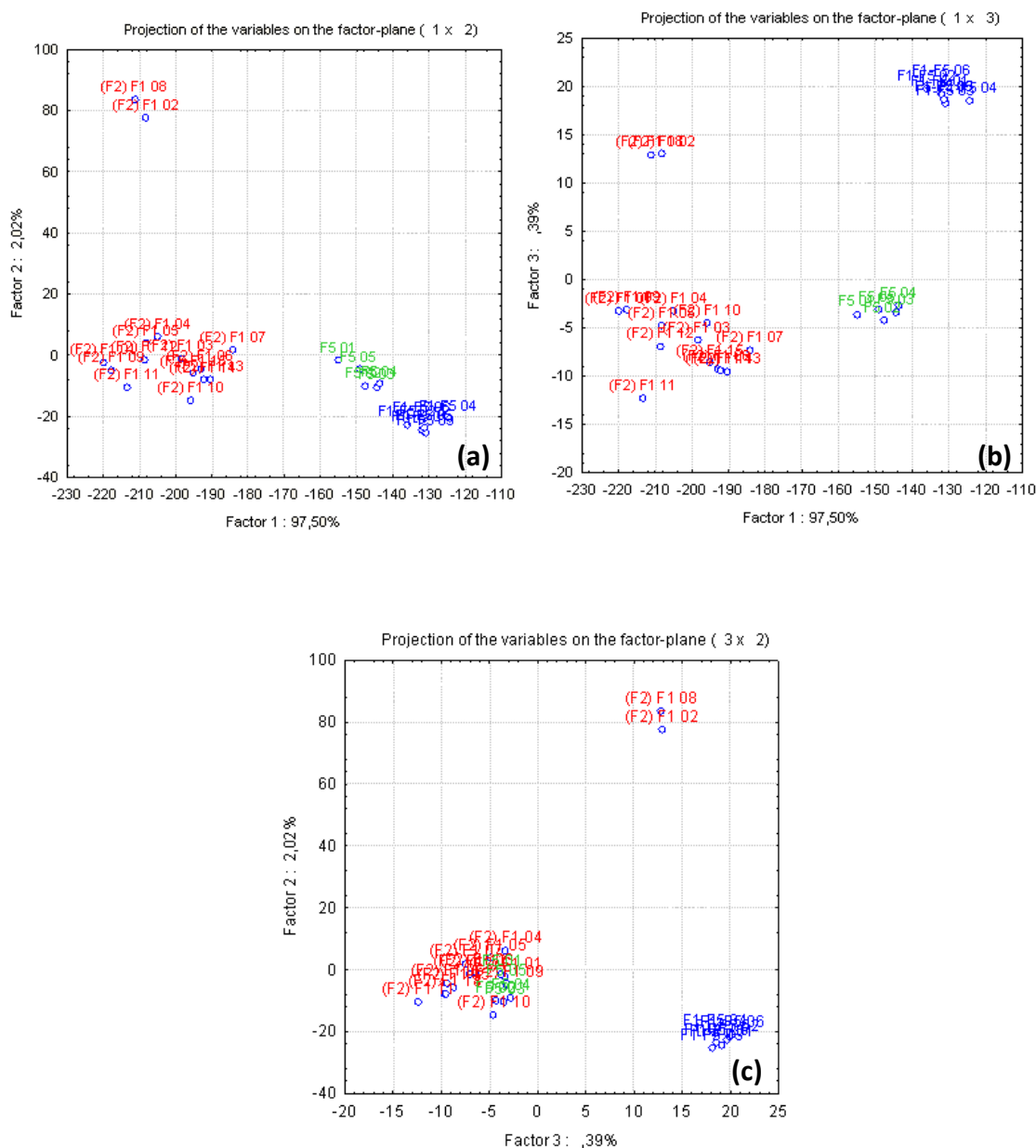


54. ábra: A próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-3500 1/cm) elvégzett főkomponens elemzés score ábrái a 90%-os konfidencia intervallumot jelölő szórás ellipszisekkel

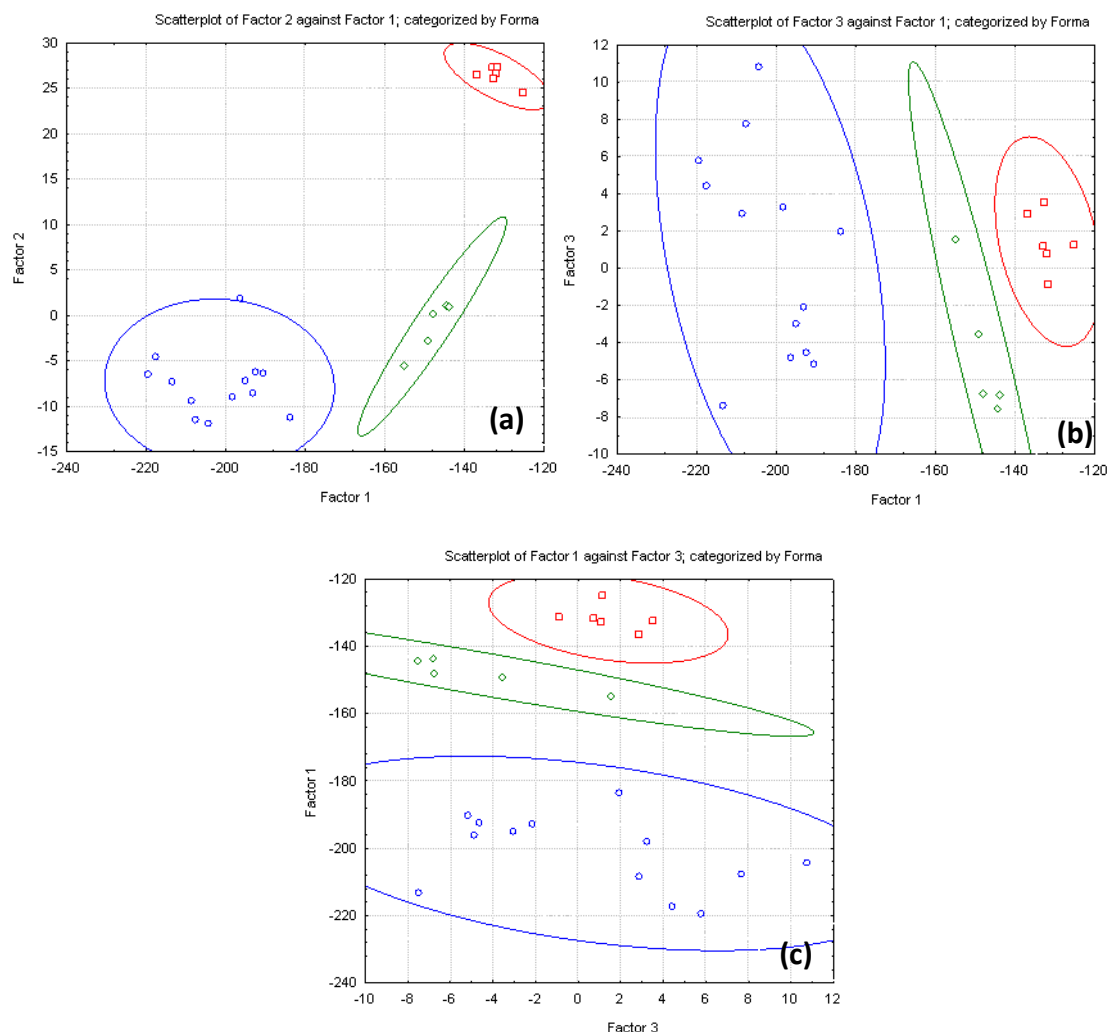
Ahhoz, hogy az előzetes feltevést – miszerint elegendő a spektrum 80-1500 1/cm-es tartományának felvétele, és hogy az így kapott eredmények nem mutatnak majd szignifikáns eltérést a teljes mérési tartomány esetén imént bemutatottaktól –, ugyanezeket a vizsgálatokat elvégeztem a 80-1500 1/cm közötti, csonkolt spektrumokon is. A csoportelemzéssel kapott dendogramokat a **55. ábra**, a főkomponens elemzésekkel kapott score ábrákat – outlier szűrés előtt, majd outlier szűrés után, szórás ellipszisekkel – a **56.-57. ábrák** mutatják.



55. ábra: A próba átkristályosításról származó spektrumok csonkolt tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett csoportelemzések dendrogramjai Ward-módszer (a) és egyszerű lánc (b) csoporttávolságokkal



56. ábra: A próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok csonkolt tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett főkomponens elemzés score ábrái



57. ábra: A próba átkristályosításról száloptikával készített spektrumok csonkolt tartományára (80-1500 $1/\text{cm}$) elvégzett főkomponens elemzés score ábrái a 90%-os konfidencia intervallumot jelölő szórás ellipszisekkel

Látható, hogy az egyszerű lánc módszerrel elvégzett csoportelemzés (55./a ábra), valamint a főkomponens elemzés (56. ábra) már nem különíti el az (F2)F1 05-ös spektrumot, ami szintén az támasztja alá, hogy a korábbi, csoporton kívüli elhelyezkedés az 1700 $1/\text{cm}$ -nél kezdődő alapvonal eltolódás okozta.

Ha összevetjük a teljes és a csonkolt spektrumok statisztikai elemzéseit, akkor megállapítható hogy gyakorlatilag nem tapasztalható komoly eltérés, így a jövőben elegendő a 80-1500 $1/\text{cm}$ közötti szakasz felvétele és elemzése.

Előre vetíthetjük a próba vizsgálat PCA score ábráinak elemzése alapján – mely szerint a minták jól elkülönülő csoportokat alkotnak, és a rájuk illesztett szórás

ellipszisek sincsenek egymással átfedésben –. hogy valószínűleg a módszer jól használható in-line monitorozási feladatokhoz. Ennek megállapításához újabb vizsgálatokat végeztem, amelyeket a következő fejezetben részletesen tárgyalok.

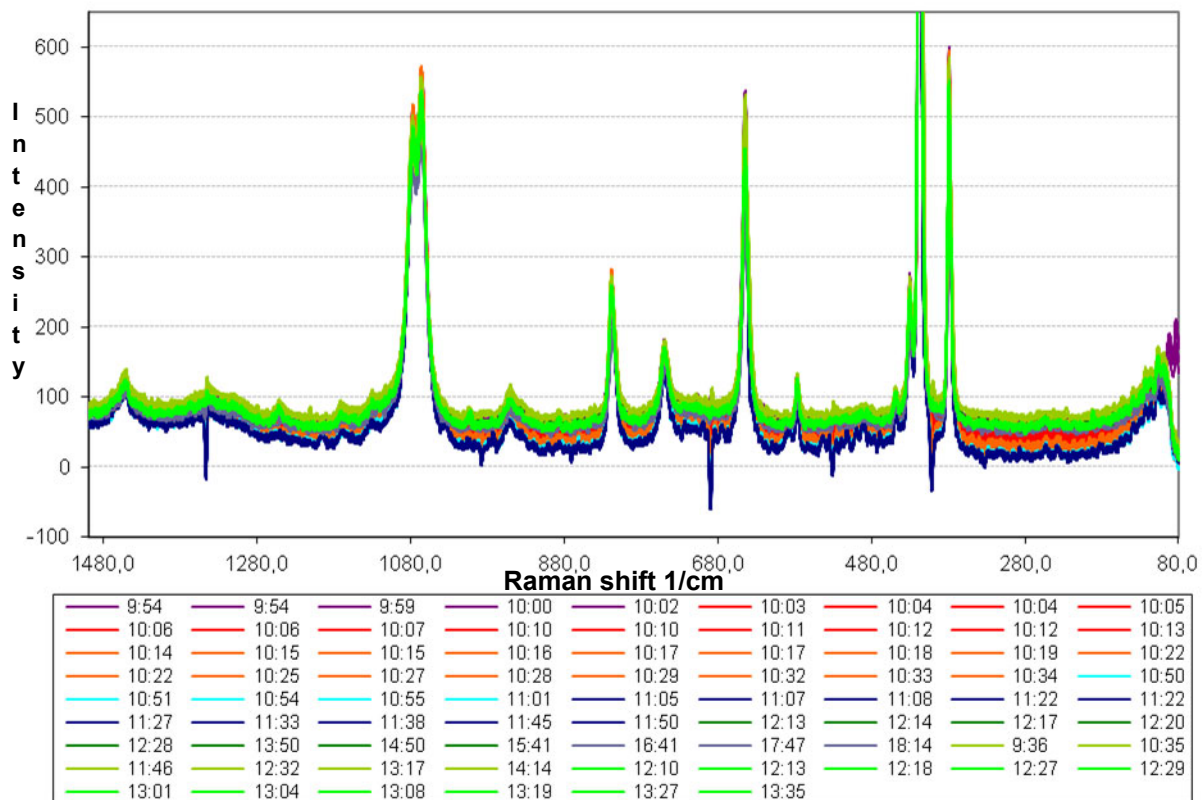
5.5.2 Polimorf transzformációs vizsgálat reaktorban in-line nyomon követéssel

A próba kísérlet elvégzése és kiértékelése után megismételtem a kísérletet egy felső keverős, temperálható reaktorban. Mivel a próba kísérlet kiértékelésénél igazoltuk, hogy elegendő a 80-1500 1/cm-es spektrumszakasz felvétele, így itt már erre állítom be a Raman-készüléket vezérlő szoftvert.

A polimorf transzformációs folyamat első lépése, a Forma 2 → Forma 1 átalakulás igen gyorsan, körülbelül 10-15 perc alatt lezajlik, ezért kezdetben sűrűn vettem fel a spektrumokat a pontosabb nyomon követés érdekében. Az ezt követő Forma 1 → Forma 5 átalakulás nagyjából 24 órán át tart, ezért itt körülbelül egy órás időközöket hagytam a spektrumfelvételek között. Sajnos a szoftver hiányossága, hogy nem lehet beállítani automatikus spektrumgyűjtésre, így az éjszakai időszakban nem történt újabb adatrögzítés.

A gyakorlatban a reaktort nem csak 24 óráig, hanem további két napig járattuk, és minden nap felvettünk még egy spektrumhalmazt.

A kísérlet során felvett spektrumokat az alább látható **58. ábra** mutatja.

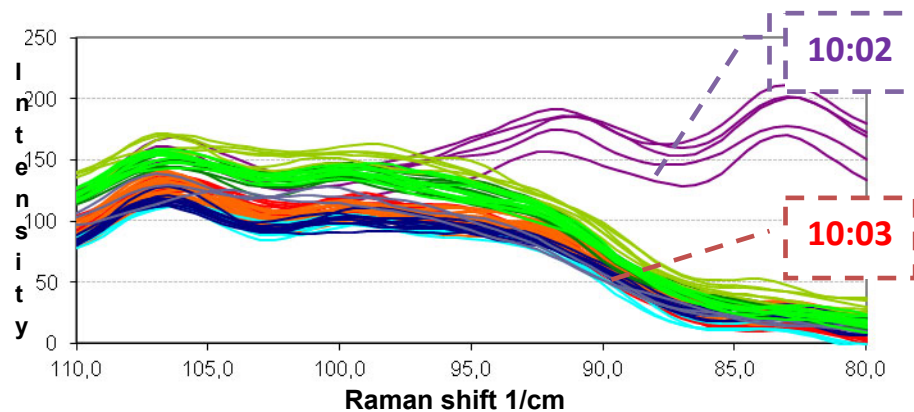


58. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok

A folyamatot különböző időszakokra bontottam fel, és ez alapján színeztem ki a spektrumokat.

I. szakasz: Forma 2. módosulat szuszpenzióban (lila)

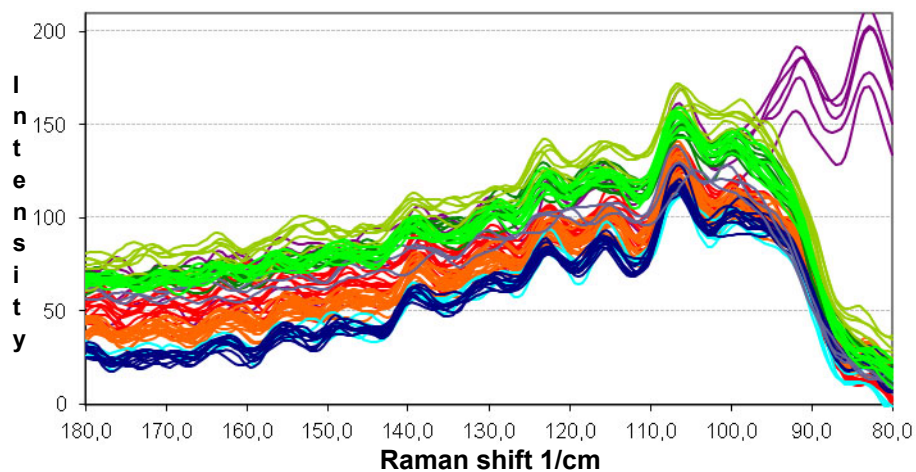
Ez a szakasz addig tartott, amíg a szuszpenzióban hirtelen bekövetkezett a „bedagadás”, ami Forma 1 szuszpenzió tipikus tulajdonsága. Körülbelül ezzel egy időben (10:03) a spektrum 95-80 1/cm-es szakasza látványosan „letört”, miközben az egy perccel ezelőtti mintavételezésnél ez a változás még nem látszódott (10:02) (59. ábra). A jelenség bekövetkeztével mintát vettünk a reaktorból, és röntgendiffrakcióval alátámasztottuk, hogy a szuszpenzió valóban Forma 1 kristályokat tartalmazott.



59. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
80-110 1/cm közti tartománya

II. szakasz: Forma 1. módosulat a szuszpenzióban (piros)

Jól megfigyelhető az alapvonal intenzitásának folyamatos csökkenése (60. ábra). Ez a szakasz addig tart, amíg elkezdnek megjelenni markáns negatív spektrumok.



60. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
80-180 1/cm közti tartománya

III. szakasz: Forma 1. mellett Forma 5. módosulatok megjelenése (narancs)

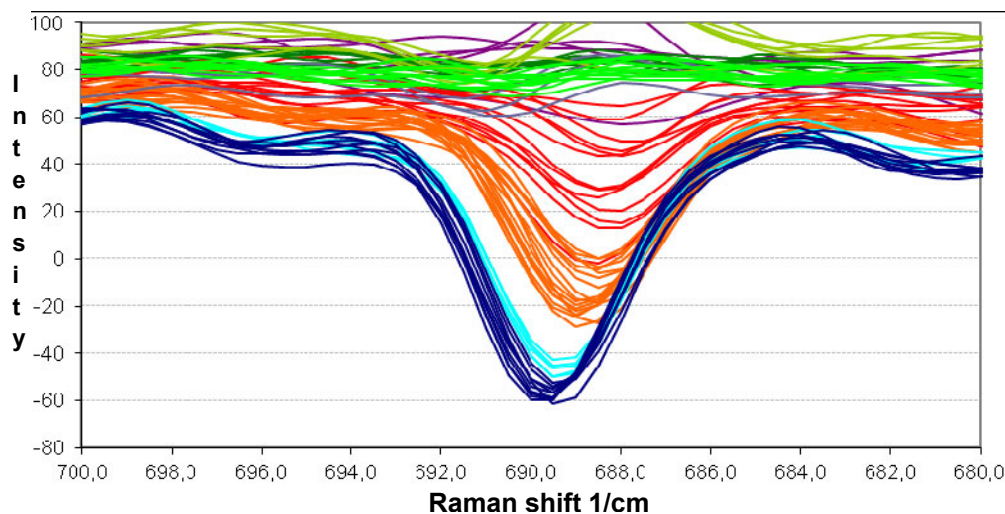
A spektrumokban elkezdnek megjelenni markáns negatív csúcsok, amik a próba kísérlet tapasztalatai alapján Forma 5 megjelenését jelzik. Ennek alátámasztását röntgen iffrakcióval elvégeztük.

IV. szakasz: Forma 5. oltókristályok hozzáadása a szuszpenzióhoz (világoskék)

Ez egy rövid szakasz, amely addig tart, amíg a reaktorba beadagolt Forma 5 kristályok teljesen szuszpendálódnak.

V. szakasz: Forma 1. kristályok átalakulása felgyorsul (sötétkék)

Jól megfigyelhető a negatív csúcsok folyamatos növekedése, ami arra utal, hogy az átalakulás felgyorsult (61. ábra).



61. ábra: Az átkristályosításról szálóptikával készült spektrumok
680-700 1/cm közti tartománya

VI. szakasz: Forma 5. kristályok feldúsulnak (sötétzöld)

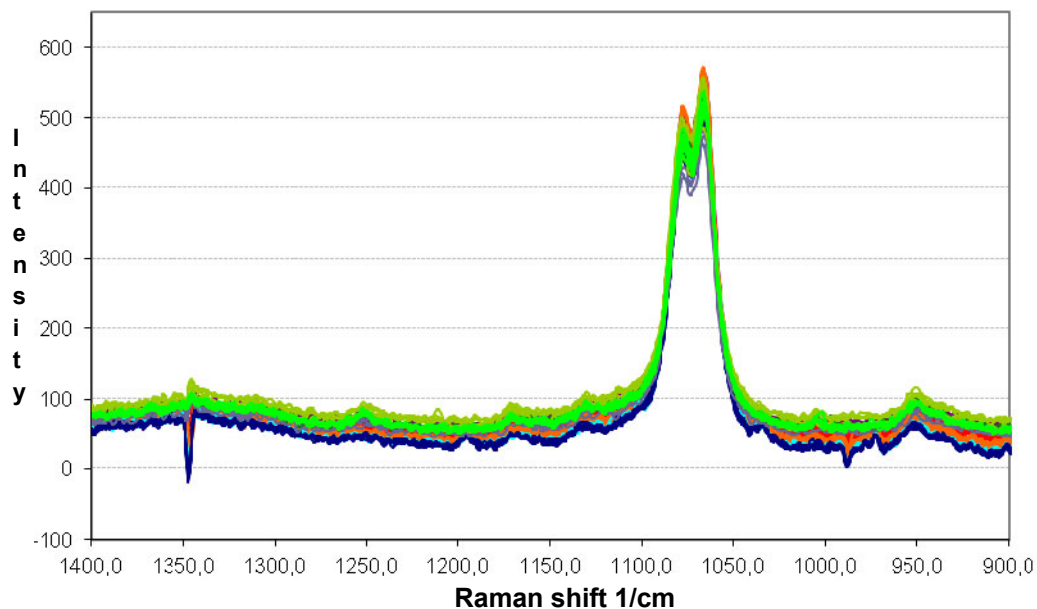
A negatív spektrumok eltűnnek, és az alapvonal intenzitása megnő, ami a Forma 5 kristályok feldúsulását jelzi, mivel a kisebb szemcsemérettel nagyobb intenzitás jár.

VII. szakasz: Második napon készült felvételek (pasztel zöld)

Láthatóan nincs nagy eltérés a sötétzöld spektrumokhoz képest.

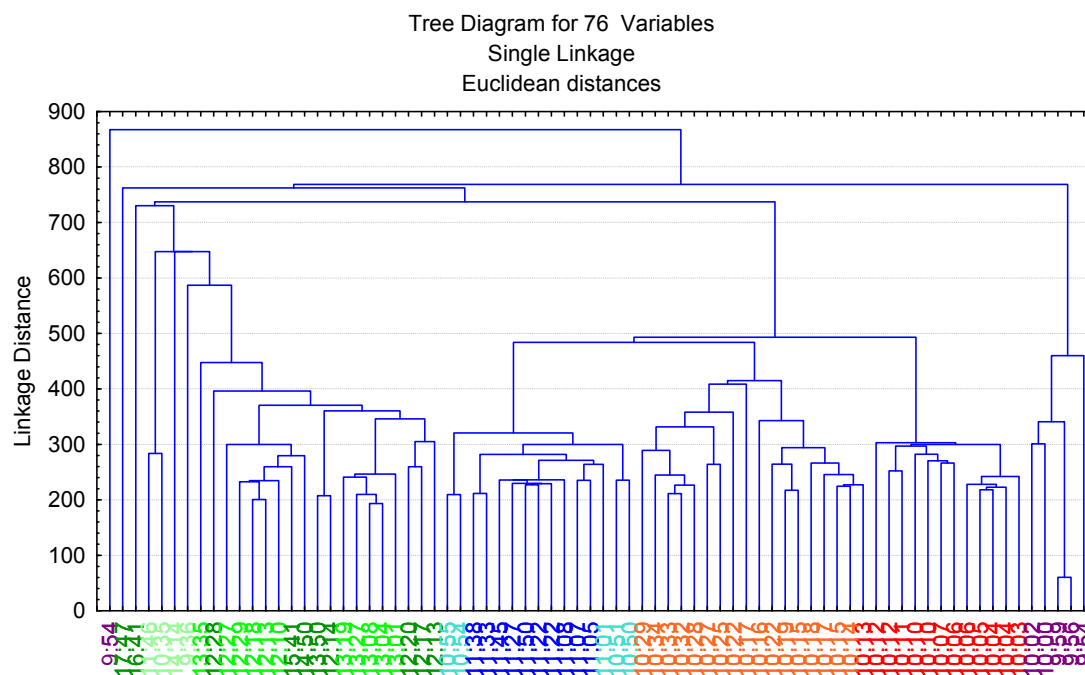
VIII. szakasz: Harmadik napon készült felvételek (világos zöld)

Itt sem tapasztalható számottevő eltérés az előző két szakaszhoz képest (62. ábra).

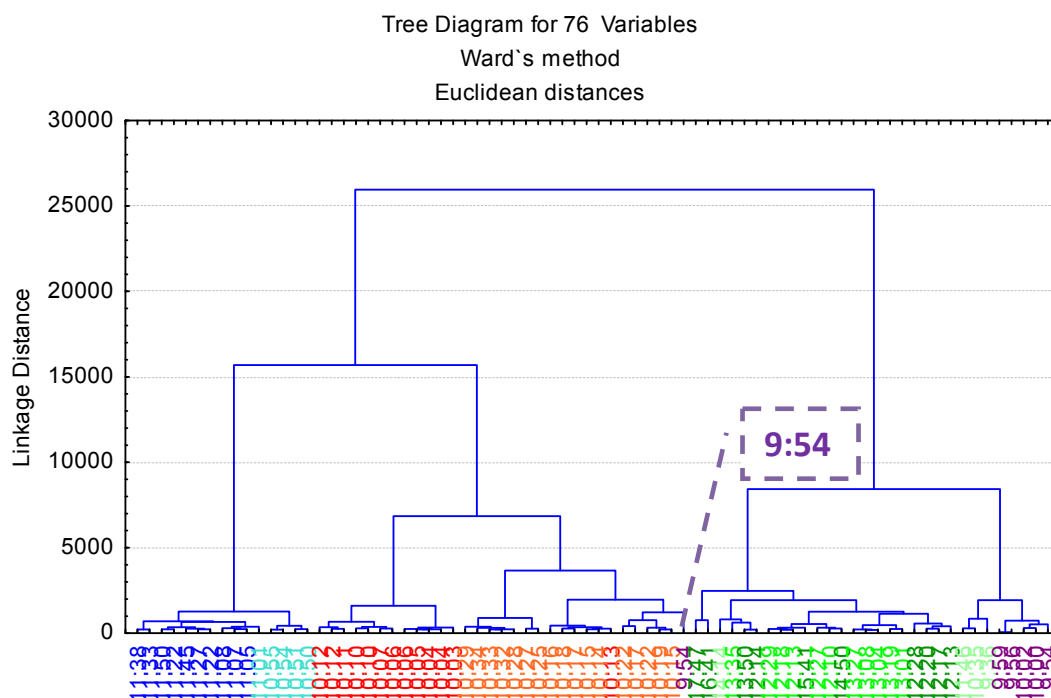


**62. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
900-1400 1/cm közti tartománya**

Miután a spektrumokat rögzítettem és színekkel jelöltem, hogy mely szakaszba tartoznak, csoportelemzést hajtottam végre (63.-64. ábra).

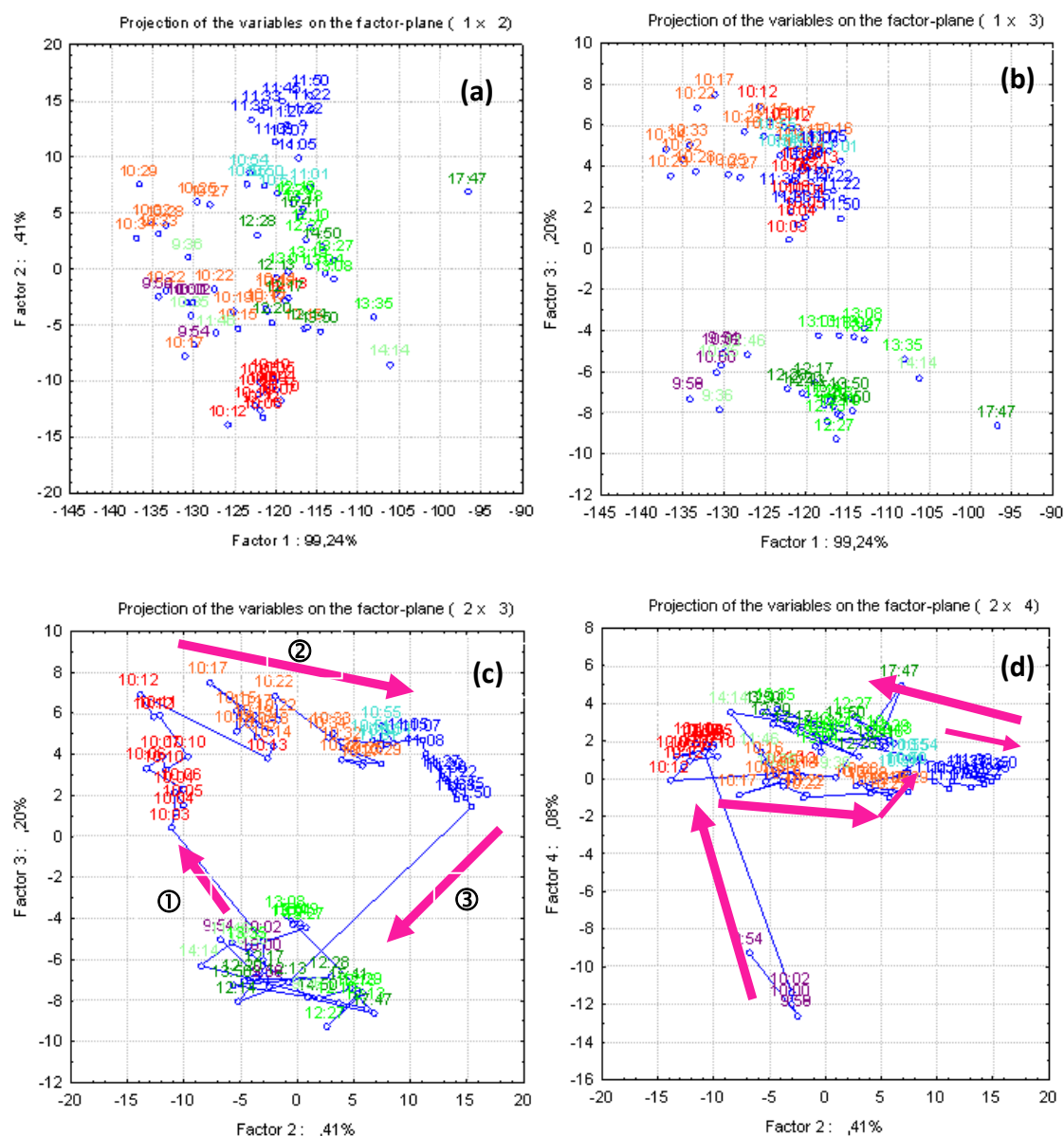


63. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett csoportelemzések dendrogramja egyszerű lánc csoporttávolságokkal



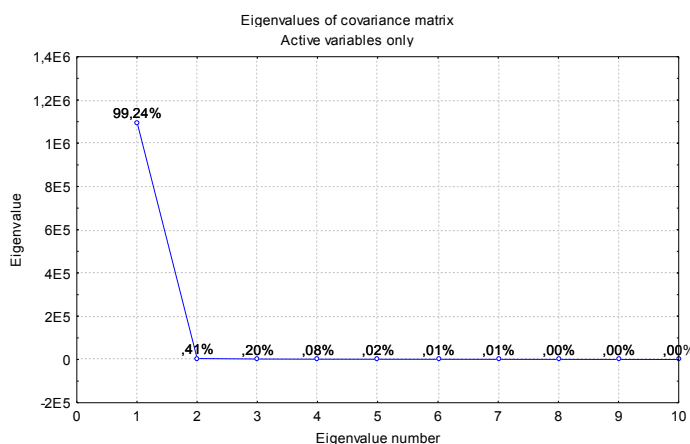
64. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett csoportelemzések dendrogramjai Ward-módszer csoporttávolságokkal

Ezután a spektrumok főkomponens elemzését készítettem el (65. ábra).



65. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett főkomponens elemzés kétdimenziós score ábrái az 1-4 főkomponensek felhasználásával

A teljes változékonyságból egy adott faktorokra eső részt a „hegyomlás diagram” szemlélteti (66. ábra). Látható, hogy az első négy főkomponens együtt a teljes változékonyság 99,93%-át leírja.

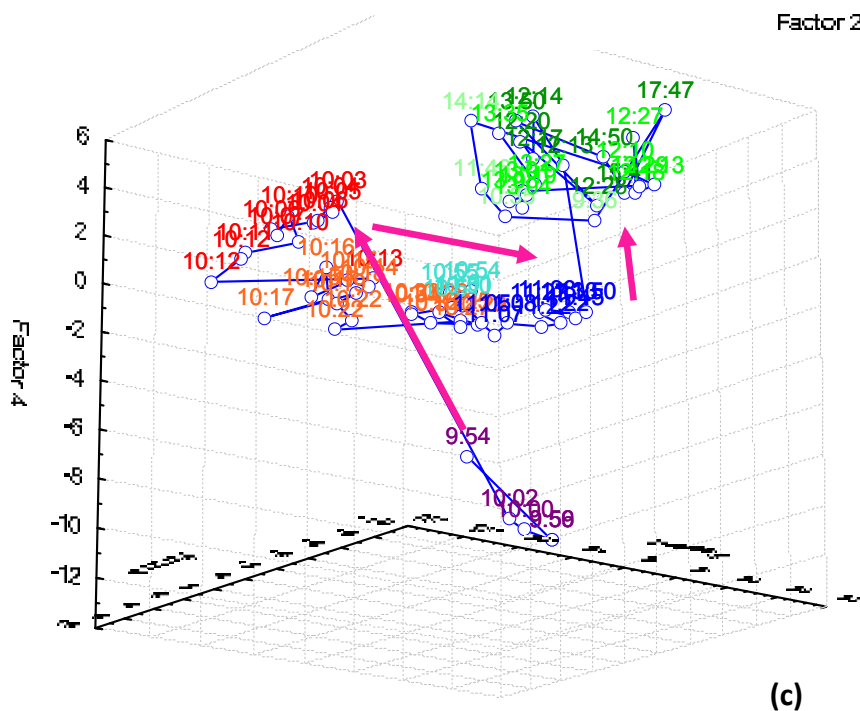
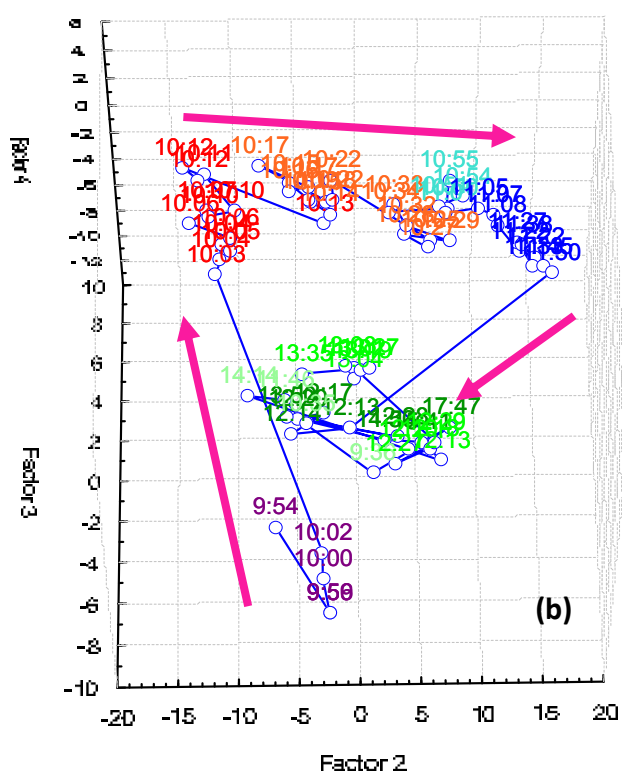


66. ábra: A főkomponensek részesedése a teljes változékonyság leírásából

Általánosságban elmondható, hogy a csoportok elválnak egymástól, különösen a 64/c ábra esetében. Egy vonallal összekötve az időben egymás után felvett spektrumokat (64/c-d ábra) szépen kirajzolódnak a transzformációs kísérlet egymást követő szakaszai.

Ha a 64/c ábrát alaposabban megnézzük, akkor a reakció időbeli lefutásában két nagy szakadást figyelhetünk meg. Az első szakadás akkor következik be, amikor a Forma 2 → Forma 1 átalakulás megtörténik (①). Ez a gyors átalakulással magyarázható. Ezután egy szép időbeli átmenet látható (②), ami jól mutatja be a reakció folyamatosságát, majd egy újabb szakadás következik (③), amely az hiányzó éjszakai méréseknek tudható be. Megfigyelhető továbbá, hogy a Forma 2 és Forma 1 módosulatok spektrumai igen közel helyezkednek el egymáshoz, ami valószínűleg az alapvonal intenzitásukkal magyarázható. Azonban, hogy erről szemléletesebb képet kapjunk, elkészítettem a spektrumok score értékeinek háromdimenziós eloszlásának képét (67. ábra).

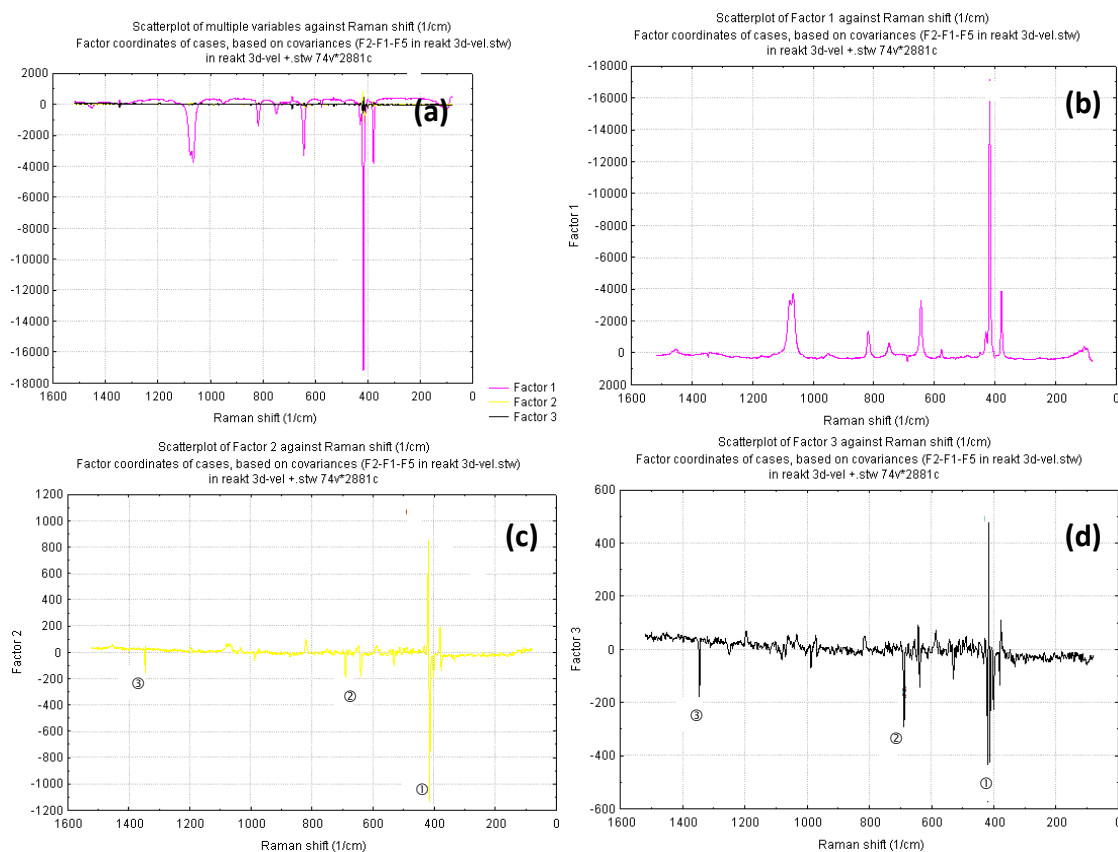
3D Scatterplot of Factor 4 against Factor 2 and Factor 3



76

A háromdimenziós képeket szemlélve beigazolódik az a feltevés, miszerint a Forma 2 és Forma 5 módosulatok spektrumai csak az alapvonal intenzitásuk miatt lehetnek a kétdimenziós képeken egy helyen, a háromdimenziós ábránál ezek egymás alatt helyezkednek el. Jól kirajzolódik továbbá a folyamat időbeli előrehaladása, és szépen látszódik, ahogy az egyes szakaszok követik egymást.

Elkészítettem a spektrumsorozat főkomponens elemzésével kapott súlyfüggvényeinek ábrázolását is, hogy megtudjam, mely csúcsok változásai a legfontosabbak a polimorf transzformációs folyamat lefutásának nyomon követésénél (68. ábra).

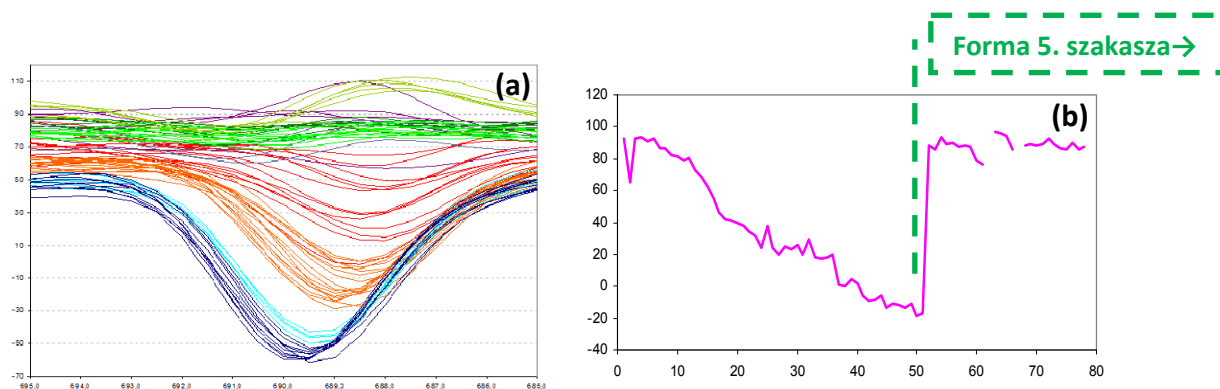


**68. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készített spektrumok teljes tartományára (80-1500 1/cm) elvégzett főkomponens elemzés súlyfüggvényei az 1-3 főkomponensek felhasználásával:
(a) PC1 + PC2 + PC3, (b) PC1, (c) PC2, (d) PC3 súlyfüggvények**

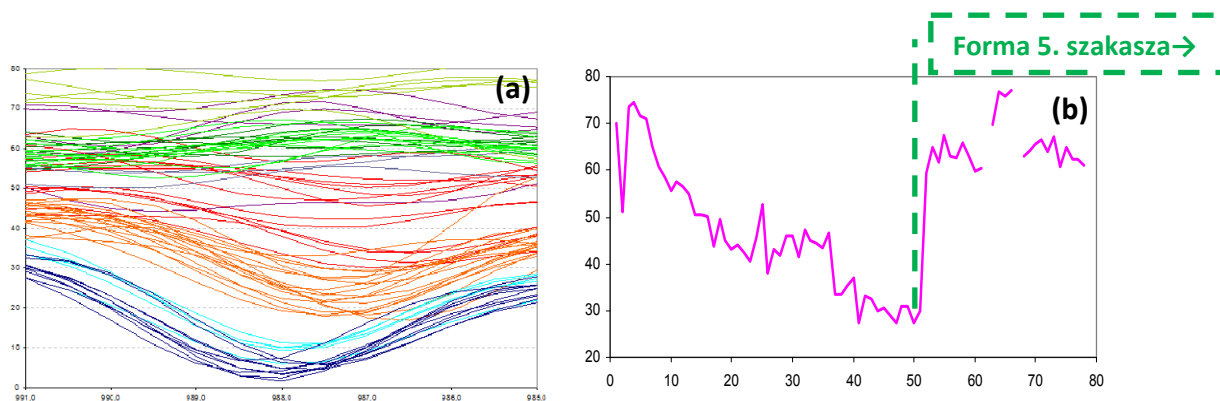
A **68. ábrán** látható diagramok közül az elsőt (**68./a ábra**) együtt látható a három faktor súlyfüggvénye. Ha az 1. főkomponens szerint készült súlyfüggvényt (**68./b ábra**) összevetjük az eredeti spektrumok lefutásával (**58. ábra**) gyakorlatilag magát a spektrumot kapjuk vissza. Ez igazolja azt a kísérlet szakaszokra bontásánál tett feltevést, miszerint a főbb pozitív csúcsok nem módosulnak a folyamat során, csupán a spektrum intenzitása változik meg, ami a különböző kristálméretek eltérő fényszórásának köszönhető. Ellenben ha megnézzük a 2. és 3. főkomponenshez tartozó súlyfüggvényeket (**68./c-d ábra**), akkor ott azokon a helyeken láthatunk csúcsokat, ahol a spektrumok jelentősebben változtak a kísérlet során.

Az ábrákon is jelölt helyek gyakorlatilag megegyeznek azokkal, ahol a spektrumokon a polimorf transzformáció menete során a folyamatosan növekedő negatív csúcsok kialakultak. Annak igazolására, hogy ezek a csúcsok valóban alkalmasak a transzformáció előrehaladásának követésére, csúcsdinamika vizsgálatot végeztem (**69.-71. ábra**).

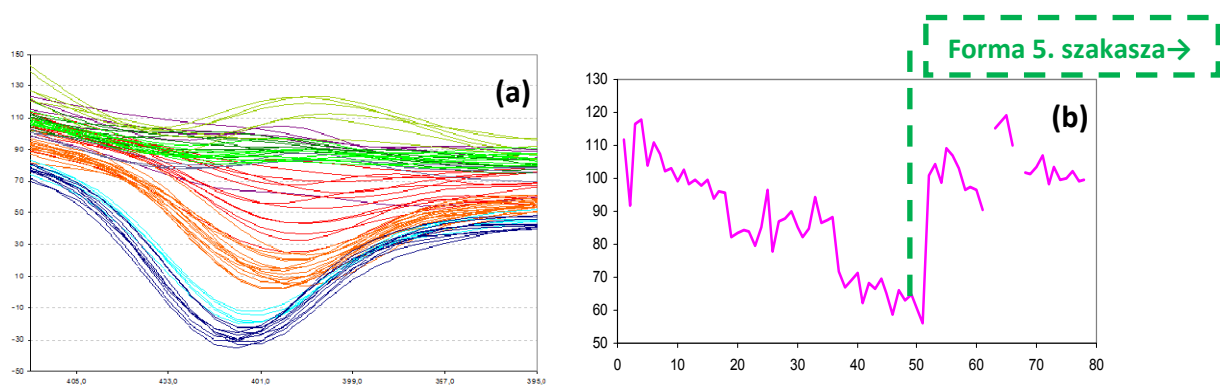
A csúcsdinamika vizsgálatot úgy végeztem, hogy kijelöltem a spektrumsorozaton azt a szűk tartományt, amin csak a vizsgálni kívánt csúcs van rajta (**69.-71./a ábra**). Negatív csúcs esetén egy minimum értéket, pozitív csúcs esetén egy maximum értéket kereső függvény segítségével meghatároztam a tartomány szélső értékeit minden egyes spektrumon, majd ezeket a spektrumok sorszámának függvényében ábrázoltam (**69.-71./b ábra**). A 2. és 3. főkomponenshez tartozó súlyfüggvények alapján kiemelt szakaszok és a hozzájuk tartozó lokális szélső érték függvények a **69.-71. ábrákon** láthatóak.



69. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
680-700 $1/\text{cm}$ közti tartománya (a)
és az itt meghatározott lokális minimumok változása a mérések sorrendjében (b)



70. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
985-991 $1/\text{cm}$ közti tartománya (a)
és az itt meghatározott lokális minimumok változása a mérések sorrendjében (b)



71. ábra: Az átkristályosításról száloptikával készült spektrumok
395-405 $1/\text{cm}$ közti tartománya (a)
az itt meghatározott lokális minimumok változása a mérések sorrendjében (b)

A **69.-71. ábrákon** egyértelműen látszik, hogy a csúcsok lokális minimum értékei az alapvonalhoz viszonyítva egyre kisebbek, s a csúcsok alapvonaltól számított abszolút intenzitásai a transzformáció előre haladtával folyamatosan nőnek.

Az in-line vizsgálatokról szóló fejezetek lezárásaként, a kapott eredmények tükrében kijelenthető, hogy a Raman-száloptikás mérés technika valószínűleg eredményesen lesz alkalmazható a Forma 2 $\rightarrow$ Forma 1 $\rightarrow$ Forma 5 transzformációs folyamat in-line nyomon követésére, a kidolgozott módszer alapján, akár félüzemi körülmények között is.

6. Összefoglalás

Munkám célkitűzése egy hatóanyag molekula öt polimorf módosulatának vizsgálata Raman- és infravörös spektroszkópiával, valamint annak a kérdéskörnek a megvizsgálása, hogy a Raman-száloptika segítségével lehetséges-e a molekulánk transzformációs folyamatának in-line nyomon követése.

Dolgozatom első részében az öt formát vizsgáltam Raman-mikroszkóp és kétféle gerjesztő lézer – Nd-YAG (532 nm) és dióda (785 nm) – segítségével. Az optimálások elvégzése után mind az öt módosulatnak elkészítettem a spektrumkönyvtárát. Ezután főkomponens elemzést végeztem a kétfajta lézerrel (Nd-YAG; dióda) felvett spektrumhalmazokon. Az „outlier” spektrumok kisselektálását követően ismételten főkomponens analízist végeztem, ami alapján megállapítható, hogy az „egykristályos” spektrumfelvételtől adódó hibák miatt a spektrumok szórása nagy, így ez a módszer a vizsgált anyagunk esetében nem mondható kielégítőnek polimorfia vizsgálat szempontjából.

A mikroszkópos kísérlet után az polimorf transzformációs folyamatban szereplő három módosulatot vizsgáltam Raman-szondán keresztül dióda (785 nm) gerjesztő lézer segítségével. Ebben az esetben nagyobb mennyiségű mintáról vettem fel a spektrumokat, ezért ennek köszönhetően nem jelentkeztek a mikroszkópnál tapasztalt problémák. Az elvégzett csoport- és főkomponens elemzések alapján elmondható, hogy a formák jól elválnak egymástól, így a hatóanyagunk esetében a mérés technika kiválóan alkalmazható polimorfiavizsgálatra. Amennyiben a hatóanyag félüzemi gyártására a jövőben kiépítenek egy folyamatelemző (PAT) rendszert, ez a technika ideális lehet az alapanyag és a szűrés utáni szilárd végtermékünk minőség-ellenőrzéseinek elvégzésére.

A szilárd módosulatokon elvégzett Raman-spektroszkópiai vizsgálatok kiegészítéseként három formának (Forma 1; Forma 2; Forma 5) felvettem az FT-IR spektrumait, majd ezeket összevettem a szilárd módosulatokról Raman-szondával felvett spektrumokkal. A részletes elemzés után megállapítottam, hogy az FT-IR módszerrel felvett spektrumok lefutásának „trendje” hasonlít a Raman-szondával

felvett spektrumokéra, azonban bizonyos csúcsok eltérő intenzitással jelentkeznek, illetve kivehetőek olyanok is, amelyek a Raman-spektrumok esetében nem láthatóak. Az FT-IR módszerrel felvett spektrumokon is elvégeztem a csoportelemzést, és a formák itt is jól elkülönültek egymástól.

Összegzésként tehát elmondható, hogy a hatóanyagunk esetében az infravörös spektroszkópiai módszer ugyanolyan jól használható, mint a Raman-spektroszkópiai, a két technika jól kiegészíti egymást, ezért az igazán alapos vizsgálatok érdekében ezek összehangolt alkalmazása ajánlott.

Miután végeztem a szilárd módosulatokon végzett kísérletek kiértékelésével, rátértem dolgozatom fő kérdésének kivizsgálására, miszerint alkalmas-e a Raman-szonda a módosulataink szuszpenzióban való vizsgálatára, és polimorf transzformációs folyamat in-line nyomon követésére.

Ehhez először egy próba kísérletet végeztem, ahol az optimálást követően adott időközönként spektrumokat vettem fel. A kapott spektrumokkal egy időben mintát vettem a szuszpenzióból, és alátámasztásként röntgendiffrakciós vizsgálatokat végeztünk.

A kapott spektrumokon csoport- és főkomponens analíziseket végeztem, aminek eredményeképpen megállapítható, hogy a szuszpenzióban lévő formák jól elkülöníthetőek egymástól.

A kísérlet közben azonban újabb probléma merült fel. A teljes spektrumtartomány felvételének hosszú ideje (kb. 4 perc) miatt nehézkes a kísérlet olyan gyors vizsgálata, amit annak egyes lépései megkövetelnek. Ezért az eredetileg felvett spektrumokon megkerestem a legjobb jel/zaj arányú szakaszt, és ezt kiemelve újból elvégeztem a csoport- és főkomponens analíziseket, amiket kiértékelve kijelenthető, hogy a módosulatok ebben az esetben is ugyanolyan biztonsággal szétválaszthatóak.

A kísérletsorozat zárásaként elvégeztem egy reaktoros transzformációs kísérlet in-line monitorozását, a próbakísérletben kapott beállítások alapján. A felvett spektrumhalmazt a folyamat egyes lépései, valamint a kísérlet alatt alátámasztásként elvégzett röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján időbeli szakaszokra bontottam. Ezután a felvett spektrumhalmazokon csoportelemzést végeztem, ami alapján jól láthatóak az egyes szakaszoknak az elkülönülései. Ezután főkomponens elemzéseket végeztem,

amelyek kettő és háromdimenziós kimeneti értékszám (score) ábráin az idővonalat berajzolva, szemléletesen látszódik a reakció lefutásának menete, és szépen kivehetőek azoknak az egyes szakaszai.

A felvett spektrumokon a főkomponens elemzések súlyfüggvényei segítségével megkerestem, hogy melyek a kísérlet lefutása alatt a leginkább változékony régiók, majd néhány kiválasztott részen csúcsdinamika vizsgálatot végeztem annak megértésére, hogy ezek a részek időben hogyan változnak.

A kísérleti eredményeimet összegezve kijelenthetem, hogy a Raman-szonda alkalmas a hatóanyag polimorf transzformációs folyamat in-line monitorozására, ezért a jövőben félüzemi gyártás köré esetlegesen kiépülő folyamatelemzési (PAT) rendszer gerincét képezheti.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Dr. Gergely Szilveszter**nek, aki megismertette velem a spektroszkópia rejtelmeit és szépségeit, bevezetett a kemometria adatkezelő módszerek világába, és áldozatos munkájával hozzájárult a szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Kiss Violetta**nak a munkám során nyújtott sok segítségért és türelméért. A tőle kapott szakmai támogatásért, amivel hozzájárult fejlődésemhez valamint azért, hogy az elvégzett mérések lehetőségét megteremtette.

Külön köszönettel tartozom továbbá **Prof. Salgó András**nak és **Dr. Finta Zoltán**nak, hogy a segítségükkel létrejött ez az együttműködés, amelynek keretében az én dolgozatom is született.

Felhasznált irodalom

- 1 **Farkas B., Révész P.:** Kristályosítástól a tablettázásig. Universitas Kiadó, Szeged (2007).
- 2 **Hilfiker R.:** Polymorphism. Wiley, (2006).
- 3 **Kálmán A.:** A polimorfia jelensége és jelentősége a gyógyszeriparban.
<http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/kemia/tudnap5/kalman.html>
(megtekintés: 2011. április 30.)
- 4 **Kiss V.:** Gyógyszerjelölt molekula polimorfiájának vizsgálata Raman spektroszkópiával.
(Szakmérnöki szakdolgozat.) BME, Budapest (2010).
- 5 **Byrn S., Pfeiffer R., Ganey M., Hoiberg C.; Poochikian G.:** Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. *Pharmaceutical Research*, **12(7)**, 945-954 (1995).
- 6 **Huang L.-F., Tong W.-Q.:** Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56(3)**, 321-334 (2004).
- 7 **Theyer A.M.:** Form And FunctionThe choice of pharmaceutical crystalline form can be used to optimize drug properties, and cocrystals are emerging as new alternatives. *Chemical & Engineering News*, **85(25)**, 17-30 (2007).
- 8 **Food and Drug Administration (FDA), Center of Drug Evaluation and Research (CDER):** Guidance for industry. ANDAs: Pharmaceutical solid polymorphism. Chemistry, manufacturing, and controls information (2007).
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf> (megtekintés: 2011. április 30.)
- 9 **Pokol Gy., Sztatisz J.:** Analitikai kémia I. Műegyetemi Kiadó, Budapest (2000).
- 10 **Threlfall T.L.:** Analysis of organic polymorphs. A review. *Analyst*, **120(10)**, 2435-2460 (1995).
- 11 **Lewis I.R., Edwards H.G.M.:** Handbook of Raman spectroscopy. Marcel Dekker, New York (2001).
- 12 **Graf Z.-né, Sztatisz J.:** Analitikai kémia II. Műszeres analitikai gyakorlatok. Műegyetemi Kiadó, Budapest (2007).
- 13 **Šašić S.:** Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy. John Wiley & Sons, (2008).
- 14 **Wikipedia:** Raman spectroscopy.
http://www.en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy

(megtekintés: 2011. április 30.)

- 15 **Bertóti I., Marosi Gy., Tóth A.:** Műszaki felülettudomány és orvosbiológiai alkalmazásai. B + V Lap- és Könyvkiadó, (2003).
- 16 **McCreery R.L.:** Raman spectroscopy for chemical analysis. Wiley, (2000).
- 17 **Black D.B., Lovering E.G.:** Estimation of the degree of crystallinity in digoxin by X-ray and infrared methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **29(1)**, 684-687 (1977).
- 18 **Gergely Sz.:** Gabonák nyersanyag minősítése: Közeli infravörös spektroszkópia. (Laborleirat.) BME, Budapest (2005).
- 19 **Segtnan V.H., Isaksson T.:** Evaluating near infrared techniques for quantitative analysis of carbohydrates in fruit juice model systems. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **8(2)**, 109-116 (2000).
- 20 **Barth A.:** Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1767(9)**, 1073-1101 (2007).
- 21 **El-Kabbany F., Taha S., Hafez M.:** IR spectroscopic analysis of polymorphism in diphenyl carbazide. *Journal of American Science*, **6(8)**, 263-270 (2010).
- 22 **Rajalahti T., Kvalheim O.M.:** Multivariate data analysis in pharmaceuticals. A tutorial review. *International Journal of Pharmaceutics*, **417(1-2)**, 280-290 (2011).
- 23 **Borosy A.P., Héberger K., Horvai Gy., Kolossváry I., Lengyel A., Paksy L., Rajkó R., Szepesváry P.:** Sokváltozós adatelemzés (kemometria). Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2001).
- 24 **Szepesváry P.:** Sokváltozós statisztikai módszerek.
<http://phys.chem.elte.hu/magyar/sokvaltozos/sokvaltozosindex.htm>
(megtekintés: 2011. április 30.)