

**Ismeretlen összetételű gyógyszerkészítmények Raman-térképezése
és az adatok kemometriai elemzése**

Készítette:

Farkas Attila

Gyógyszervegyész-mérnöki mesterszak, V. évfolyam

Témavezető:

Dr. Marosi György

Egyetemi tanár

Konzulens:

Vajna Balázs

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A Raman-szórás jelensége és a Raman-mikrospektrometria kialakulása	6
2.2. A kémiai térképezés és alkalmazása ismert komponenseket tartalmazó tabletták vizsgálatára	7
2.3. Felderítő statisztikai módszerek komponensek tiszta spektrumainak becslésére gyógyszeripari mintákon	9
2.4. A gyógyszerhatóanyagok polimorfiája; polimorfok és amorf-kristályos hányad vizsgálata szilárdfázisú analitikai módszerekkel	10
3. Felhasznált anyagok és módszerek	14
3.1. A kísérletek során felhasznált anyagok és mintaelőkészítési módszerek	14
3.1.1. Két tablettá technológiai jellemzése a Raman-térképezés alapján	14
3.1.2. Modelltablettá a vizsgálatok és kemometriai módszerek ellenőrzésére	14
3.1.3. Elterő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén eloszlású komponenssel	14
3.1.4. Hatóanyagpolimorfok Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerek segítségével	14
3.1.4.1. Három komponensű keverék vizsgálata	14
3.1.4.2. Amorf hatóanyag kristályosodásának kimutatása	15
3.1.5. Hasonló kémiai szerkezetű segédanyagok tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel	15
3.1.6. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása	15
3.2. A kísérletek során felhasznált módszerek és berendezések	15
3.2.1. A berendezések adatai	15
3.2.2. Mintaelőkészítési módszerek és körülmények	18
3.2.2.1. Tabletták technológiai jellemzése a Raman-térképezés alapján	18
3.2.2.2. Gyógyszertablettá vizsgálata kemometriai módszerekkel	18
3.2.2.3. Elterő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén eloszlású komponenssel	18
3.2.2.4. Gyógyszerpolimorfok Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerek segítségével	18
3.2.2.5. Amorf gyógyszerhatóanyag kristályosodásának kimutatása	19
3.2.2.6. Hasonló kémiai szerkezetű segédanyagok tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel	19
3.2.2.7. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása	19
4. Eredmények és értékelésük	20
4.1. Két tablettá technológiai jellemzése Raman-térképezés segítségével	20
4.1.1. Vizsgálatok és adatfeldolgozás	20
4.1.2. CLS modellezés eredményei	21
4.1.3. A Raman mikroszkópos technológiai elemzés lehetőségeinek összegzése	24
4.2. Egy gyógyszertablettá vizsgálata kemometriai módszerekkel	24
4.2.1. Vizsgálatok ismertetése, adataelemzés	24
4.2.2. Tisztakomponens-spektrumok becslése különböző kemometriai módszerekkel	25
4.2.3. Zaj hatása a spektrumbecslés hatékonyságára	27
4.2.4. A Raman térképeket elemző kemometriai módszerek összevetésének összegzése	31

4.3. Eltérő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén komponens-eloszlás esetén.....	31
4.3.1. A komponensspektrumok meghatározása	32
4.3.2. A különböző kemometriai módszerek eredményei	33
4.3.3. Összegzés a tabletták vizsgálatához.....	39
4.4. Hasonló szerkezetű összetevők tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel.....	40
4.4.1. Gyógyszerpolimorfok Raman–spektrumainak becslése.....	40
4.4.1.1. Háromkomponensű keverék vizsgálata	40
4.4.1.2. Amorf gyógyszerhatóanyag kristályosodásának kimutatása.....	43
4.4.2. Segédanyagkeverék vizsgálata	44
4.4.3. Hasonló Raman-spektrumú komponenskeverékek kemometriai elemzésének összegzése	46
4.5. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása.....	46
5. Összefoglalás.....	50
6. Köszönetnyilvánítás	52
7. Függelék (matematikai összefoglaló).....	53
7.1. Kémiai térkép adatszerkezete	53
7.2. Alkalmazott kemometriai módszerek.....	53
7.2.1. Klasszikus legkisebb négyzetek módszere (Classical Least Squares, CLS) ¹⁸ ..	53
7.2.2. Főkomponens-analízis (Principal Component Analysis, PCA) ^{24, 25}	53
7.2.3. Önmodellező keverékelemzés (Simple-To-Use Self-Modeling Mixture Analysis, SMMA vagy SIMPLISMA)	54
7.2.4. Többváltozós görbefuladás–alternáló legkisebb négyzetek módszere (Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares, MCR-ALS) ³⁴	55
7.2.5. Pozitív mátrix faktorizálás (Positive Matrix Factorization, PMF) ⁴³	55
7.2.6. Simplex Identification via Split Augmented Lagrangian (SISAL) ^{46, 47}	56
7.3. Spektrumok összehasonlítására szolgáló jellemzők számítási képletei.....	57
8. Irodalomjegyzék.....	58

Rövidítésjegyzék:

ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared, gyengített teljes reflexió-Fourier transzformációs infravörös
BTEM	Band Target Entropy Minimization, speciális faktoranalízisen alapuló kemometria módszer
CCD detektor	Charge-Coupled Device,
'closure'	anyagmérleg, MCR-ALS egyik beállítása
CLS	Classical Least Squares, klasszikus legkisebb négyzetek módszere
'D'	direct compaction, közvetlen préseléssel készült
DSC	Differential Scanning Calorimetry, differenciális pásztázó kalorimetria
<i>fpeak</i>	a PMF program egyik paramétere, amellyel a koncentrációk változatosságát tudjuk jellemezni a spektrumok esetén (az adathalmazban a csúcsintenzitásoknak van egy bizonyos szórása)
'F'	fluidized bed granulation, fluidizációs granulálással készült
He-Ne lézer	hélium-neon gázlézer
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography, nagy nyomású/teljesítményű folyadékkromatográfia
HPLC-MS	High Pressure/Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, nagy nyomású/teljesítményű folyadékkromatográfia-tömegspektrometria csatolt technika
HPMC	hidroxipropil-metilcellulóz, cellulóz alapú polimer segédanyag
'HS'	high-shear granulation, örvényáramú granulálással készült
korr.	korrelációs együttható (0 és 1 között változó érték, amely a hasonlóságra utal)
LOF	Lack-of-fit, illeszkedés hiánya, matematikai érték, mely megmutatja, hogy két spektrum pontjai mennyire illeszkednek egymásra (egy relatív eltérés négyzetösszeg)
MCR-ALS	Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares, többváltozós görbefelbontás - alternáló legkisebb négyzetek módszere
MVSA	Minimum Volume Simplex Analysis, legkisebb térfogatú szimplex alapuló elemzés
Nd-YAG	Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet, neodímiummal szennyezett itrium-alumínium gránát, szennyezett ionkristálylézerek egy fajtája
NIR	Near-infrared, közeli infravörös
PCA	Principal Component Analysis, főkomponens-analízis
PLS	Partial Least Squares, részleges legkisebb négyzetek módszere
PMF	Positive Matrix Factorization, pozitív mátrix faktorizálás
SIMPLISMA/SMMA	Simple-to-use Interactive Self-Modeling Mixture Analysis, önmodellező keverékelemzés
SISAL	Simplex Identification via Split Augmented Lagrangian
ss-NMR	solid state-Nuclear Magnetic Resonance, szilárd fázisú magmágneses rezonancia
TG	termogravimetria
XRPD	X-ray powder diffraction, röntgen-pordiffrakció

1. Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerkutatás és -fejlesztés során egyre fontosabbá válik a minél nagyobb hatékonyságú analitikai módszerek használata. Mindazonáltal egyre nagyobb problémát jelentenek a gyógyszergyártók és a társadalom számára a hamisított, illegális gyógyszerkészítmények fokozódó megjelenése a gyógyszerpiacokon (főként a fejlődő országokban). Ezek a készítmények nem GMP előírások között készülnek, így a minőségük sem lehet biztosított. Több hiányossága is lehet ezen termékeknek. Nem tartalmazzak vagy csak kevesebb hatóanyagot, vagy rossz adagolás miatt többet tartalmazzak az előírtnál. Szabálytalan gyártási eljárás miatt lehet hatástalan is a készítmény (rossz polimorf vagy rossz segédanyagrendszer). Rosszabb esetben az eljárás során mérgező anyag is kerülhet ezekbe a szerekbe. A gyógyszerhamisítók üldözésében is segítséget nyújthat a minták roncsolásmentes vizsgálata.

Szilárd gyógyszerformák esetén fontos információkat szerezhetünk a termék fizikai és biológiai tulajdonságairól, ha ki tudjuk mutatni a különböző összetevők, köztük a minor komponensek mennyiségét és térbeli eloszlatottságát a készítményben. Korábban bizonyosságot nyert, kutatócsoportunk munkája révén is, hogy a Raman-spektrometria az előbbi célok elérésére jól alkalmazható ismert gyógyszeripari mintákon.

A gyógyszerhamisítványok és illegális szerek esetében jelentős kihívást jelent, hogy a minták vizsgálatakor azokról sok esetben semmilyen információ nem áll rendelkezésre. Ezért az analitika fejlődésének egyik útja az információ minél hatékonyabb kinyerése a mérések során kapott adathalmazokból. Ezalatt azt értem, hogy elsőként a komponenseket azonosítjuk az ismeretlen (vagy illegális) készítményekben. Másodszorban becsüljük (kissé durván) a komponensek koncentrációt. Végül technológiai jellegzetességeket is meg tudunk határozni. Mindezen eredmények meghatározását a tabletta sérülése (roncsolásmentesen) nélkül valósítjuk meg, tehát további vizsgálatokra is alkalmasak maradnak.

Hamis gyógyszerekben megfigyelhetünk eltérő polimorfokat, nem várt komponenseket szennyezéseket. Ugyanígy iparjogvédelmi, szabadalmi szempontból is egyre sarkalatosabb ponttá válik a különböző hatóanyagok polimorf módosulatainak megkülönböztetése, kimutatása, stabilitásának vizsgálata. Nemcsak a kívánt élettani hatások eléréséhez és a felszívódás biztosításához szükséges a megfelelő polimorf módosulat megtalálása, hanem új szabadalmi igényt is bejelenthet az, aki új, hatásosabb és kevesebb mellékhatást okozó polimorfot képes előállítani. A polimorfia kérdésének egyre növekvő jelentősége szükségessé teszi az analitikai módszerek fejlődését, hogy a morfológiai változások érzékenyen követhetők legyenek nemcsak a feldolgozásra váró tiszta hatóanyagban, de a késztermékekben is.

A Raman-térképezés által a szilárd gyógyszerformák jól vizsgálhatók. Egy felület elemzésekor az adott felületnek rengeteg pontjáról készítünk felvételt. Ez hatalmas adathalmazt jelent, amelyet kezelni kell. Ebből az adatsokaságból felderítő statisztikai módszerekkel minőségi információk nyerhetők ki. Főként olyan esetekben fontos e módszerek használata, amikor nem ismert összetételű (pl. ismeretlen szennyezéseket tartalmazó) készítményekben kell a komponenseket meghatározni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A Raman-szórás jelensége és a Raman-mikrospektrometria kialakulása

A rezgési spektrometria az anyagok rezgési energia-átmeneteit felhasználó szerkezetvizsgálati módszerek összessége. Ha a fény frekvenciája megegyezik az atomok közötti rezgések frekvenciájával, az adott rezgések gerjesztése révén az anyag elnyelheti a ráeső fény energiájának egy részét. Az anyagok azonban csak egy részét nyelik el a rájuk eső megfelelő frekvenciájú fénynek is – a többi részét visszaverik, vagy áteresztik. A három mennyiség aránya az anyagra jellemző tulajdonság, s így beszélünk abszorpció, reflexió és transzmisszió színeiről. A molekulában az atomok állandó rezgőmozgásban vannak egyensúlyi helyzetük körül, amit ún. normálrezgés reprezentál. A normálrezgés olyan mozgásforma, amelynek során a molekula minden atomja azonos fázisban és azonos frekvenciával (de nem feltétlenül azonos amplitúdóval) rezeg. A rezgési spektrumot alkotó frekvenciák a molekulát felépítő atomok tömegétől, geometriai elrendeződésétől és a közöttük lévő kötések erősségétől függenek. A molekularezgések gerjesztésére alkalmas fény frekvenciája általában $4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ közötti tartományba esik,

Az *infravörös (IR)* spektrometria elméletét és gyakorlatát Griffiths és de Haseth részletesen tárgyalják könyvükben, így ez a dolgozat arra nem tér ki.

Egy anyag besugárzásakor az arról visszaverődő fény rugalmas ütközés esetében ugyanolyan energiával reflektálódik, mint amilyen a besugárzott fény energiája. Ez a Rayleigh-szórás jelensége. A Raman-szóródás ezzel ellentétben a fotonok rugalmatlan ütközésén alapul. Ekkor a visszavert fény a besugárzó frekvenciánál kisebb, vagy nagyobb frekvenciájú fotonokat is tartalmaz.

A fotonok molekulákon történő rugalmatlan szóródását először elméleti úton vezette le Brillouin¹ és Smekal², majd néhány év múlva (1928-ban) Raman mutatta ki kísérleti úton³. A kezdetben fellendülő kutatások a Raman-szórás kis hatáskeresztmetszete miatt (kb. minden $10^6\text{--}10^8$ gerjesztő fotonra jut egy „Raman foton”) azonban megrekedtek egészen a lézerek felfedezéséig^{4,5}. Ekkor új lendületet vett a műszerfejlesztés, és 1974-ben már az első mikrospektrométer megépítésére is sor került^{6,7}, amely térképfelvételek készítését is lehetővé tette.

A Raman-szórt fény kis intenzitásának növeléséhez nagy energiájú monokromatikus fényt használnak. Ezt UV, látható vagy a közeli IR tartományba eső lézer adja. A Raman-szórás intenzitása a besugárzó fény hullámhosszának negyedik hatványával arányos, ezért a látható tartományba eső fénnel sokkal jobb jel/zaj viszony érhető el. Ez esetben viszont jelentkezhet a fluoreszcencia jelensége. A fluoreszcencia jelenségének kiküszöbölésére alkalmazhatunk az UV tartományban sugárzó lézereket, ez esetben azonban kiemelten fennáll a minta roncsolódásának veszélye. Látható lézer esetén segíthet a hosszabb ideig történő besugárzás is. A fény detektálásához kezdetben fotoelektronsokszoró detektort használtak, amellyel a spektrum felvétele több órás mérés időt vett igénybe. A felvételi idő a CCD detektorok kifejlesztésével másodperces nagyságrendűvé csökkent. A rugalmasan szórt, ún. Rayleigh-fotonokat elnyelő, notch filternek nevezett féligáteresztő tükrök alkalmazásával a jelátvitel megnövekedett és így lehetővé vált nagyon gyenge, kis intenzitású sávok detektálása is. Az ún. konfokális rendszerek kialakításával a térbeli felbontás mikrométeres

nagyságrendűvé és a vizsgált mintatérfogat „vastagsága”, azaz a mélységélesség szabályozhatóvá vált. (Diszperziós készülékeknél a mélységélesség növelésével gyakran jelentős fluoreszcencia csökkenés is elérhető.)

A Raman spektrometria kiválasztási szabályai eltérnek az infravörös spektrometria kiválasztási szabályaitól. Utóbbi esetben a molekula dipólusmomentumának kell megváltozni a rezgési átmenet során, míg Raman-szórás esetén a polarizálhatósági tenzornak. Így az IR és a Raman spektrum tehát egymást kölcsönösen kiegészítő információtartalmat hordoz⁸.

A Raman spektrometria nagy előnye, hogy a spektrum felvételéhez *gyakorlatilag semmiféle mintaelőkészítést nem igényel*.

A Raman spektrometria *kvantitatív* alkalmazásának alapja a következő egyenlet⁹:

$$I(\nu)_R = \frac{2^3 \pi^3}{45 \cdot 3^2 \cdot c^4} * \frac{h I_L N * (\nu_0 - \nu)^4}{\mu \nu (1 - e^{-h\nu/kT})} * [45(\alpha'_a)^2 + 7(\gamma'_a)^2] \quad (2.1.)$$

ahol c a fénysebesség, h a Planck-féle állandó, I_L a besugárzás intenzitása, N a fotonnal ütköző molekulák száma, ν a molekula rezgési frekvenciája (Hz), ν_0 a besugárzó lézer frekvenciája (Hz), μ a rezgő atomok redukált tömege, k a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet, α'_a a polarizálhatósági tenzor izotróp tagjának nyoma, γ'_a a polarizálhatósági tenzor anizotróp tagjának második invariánsa.

Az egyenlet szerint a Raman szórás intenzitása arányos azon molekulák számával, amelyek a besugárzás által érintett mintatérfogatban helyezkednek el. Ebből következik továbbá, hogy a Raman intenzitás arányos a forrás intenzitásával, tehát az érzékenység növelhető nagyobb teljesítményű lézer alkalmazásával. Ennek határt szab a minta hőtűrőképessége: nagy lézerteljesítmény alkalmazásakor a minta degradálódhat.

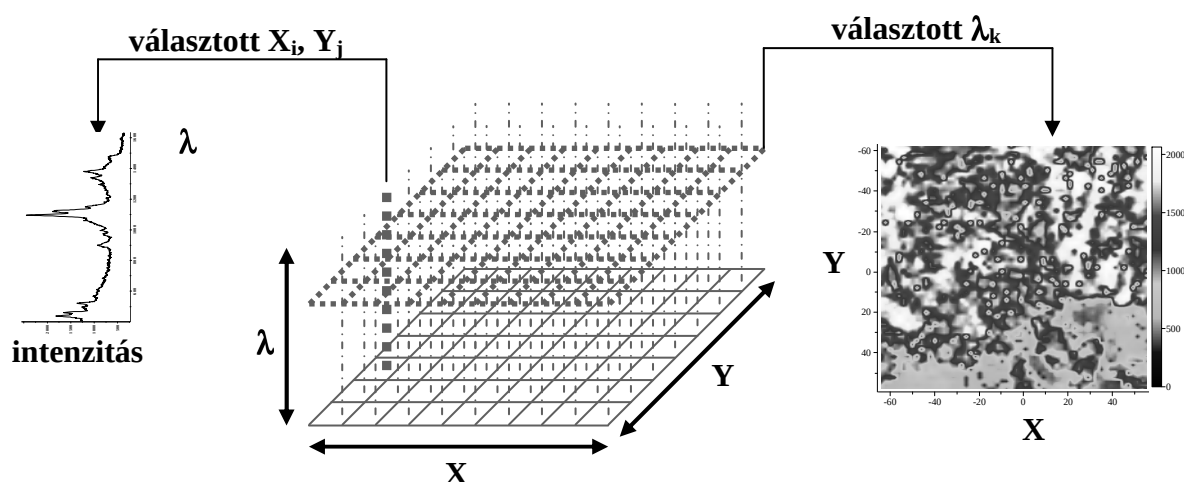
A Raman-spektrumokra jellemző a lineáris szuperpozíció, tehát az összspektrum a keveréket alkotó komponensek az egyedi Raman-spektrumok súlyozott átlagaként tevődik össze. Ez az állítás azért igaz jó közelítéssel, mert a Raman-fotonok alacsony számuk miatt a gerjesztő fény fotonaival csekély eséllyel lépnek kölcsönhatásba.

2.2. A kémiai térképezés és alkalmazása ismert komponenseket tartalmazó tabletták vizsgálatára

A kémiai térképezés alapja, hogy a spektrométert és a mikroszkópot összekapcsolva olyan technikát használunk, amely által a vizsgált anyagról nemcsak spektrális, hanem térbeli információkhoz jutunk. A „kémiai térképezés” fogalmát elsősorban a rezgési (infravörös vagy Raman-) spektroszkópián alapuló képalkotásra használjuk. A kapott térképekben lévő adathalmaz struktúrája egy hiperspektrális adatkockaként képzelhető el¹⁰. A felvétel fényképszerűen (teljes felületi képalkotás – global imaging) illetve – ahogy én is dolgoztam – pontonkénti térképezéssel (point mapping) is megvalósítható. A kocka alapjának élei X és Y , amelyek azon pontok térbeli koordinátáit mutatják, amelyeken mérés történt a mozgatható tárgyasztal segítségével. Az i -edik X és a j -edik Y mérési pontpár kiválasztásával a harmadik dimenziót alkotó λ hullámszám-értékekhez tartozó intenzitásértékeket, tehát a ponthoz tartozó (MIR, NIR vagy Raman) spektrumot láthatjuk. Míg egy adott (k -adik) hullámszám (λ) kiválasztásával az adott hullámszámon mért intenzitásértékeinek ábráját tekinthetjük meg a

hely függvényében, a teljes vizsgált felületen. Az 2.1. ábrán látható, hogyan áll össze egy ilyen 3 dimenziós adathalmaz.

A kémiai térképezés a rezgési spektrometria egyik legdinamikusabban fejlődő területe. A tudomány és az ipar egyre több területen fedezi fel kedvező tulajdonságait és alkalmazásának előnyeit (például az élelmiszeripar területén is vizsgáltak már (csokoládé) mintákat Raman térképezéssel¹¹). Ezeknek a technikáknak a fejlődése a gyógyszerkészítmény-technológiában is töretlen. A közelmúltban megjelent közlemények több alkalmazási lehetőséget is ismertetnek ezen a területen^{8 12}. Azért kerül előtérbe e technika egyre inkább az utóbbi időben, mert a hagyományos minőségellenőrzéshez használt HPLC-MS csatolt technika roncsolásos, drága, minta sok előkészítést igényel s nem ad információt a komponensek eloszlásáról (azaz a készítmény belső szerkezetéről).



2.1.ábra: A kémiai térképek szerkezete

Mindezekkel ellentétben szilárd fázisban történő kémiai térképezéses vizsgálattal lehetővé válik információk kinyerése többek között az egyes összetevők homogenitásáról¹³¹⁴, a részecskeméretéről¹⁵, illetve a Raman-sávok élességének köszönhetően a hatóanyag (vagy éppen a segédanyagok) polimorfiajáról¹⁶ vagy izomerkeverék eltérő kristályformáinak eloszlásáról¹⁷. Kvantitatív információt is kaphatunk a tablettáról megfelelő kalibrációs minták és regressziós elemzés alkalmazásával.

Egy kiválasztott λ hullámszámnál látható térkép már informatív lehet egy bizonyos komponens térbeli elhelyezkedésére nézve, amennyiben az adott sáv arra az egy komponensre jellemző, azaz és jól elkülönül a szomszédos sávoktól, továbbá a csúcsterület (magasság) egyenesen arányosan változik a koncentrációval (hasonló marad a csúcs alakja). (Másképp fogalmazva, ha megvalósul a Lambert-Beer törvény.) Amennyiben a fenti feltételek nem, vagy csak részben teljesülnek, alkalmazhatunk olyan többváltozós (elsőrendű) kalibrációs módszereket, mint például a klasszikus legkisebb négyzetek (Classical Least Squares, CLS¹⁸), vagy a részleges legkisebb négyzetek módszere (Partial Least Squares, PLS⁹). Ennek az alkalmazása NIR-térképezés példáján hatóanyag-hordozó rendszerre, illetve hétkomponensű tablettára (ekkor 3 faktorról dolgoztak a minor komponensek elhanyagolása miatt) egyaránt megtalálható a szakirodalomban¹⁹. Hamis Heptodin tablettákban a jó eredményeket kaptak a hatóanyag mennyiségének becslésére²⁰ és ötkomponensű tableta összetételének vizsgálatára²¹. Vizsgálták a kutatók nulladrendű (csúcshintegrállal arányos) és elsőrendű (CLS)

kalibrációt avicel/paracetamol eltérő arányú porkeverék és háromkomponensű segédanyagkeverék ATR-FTIR térképezésből kapott adatainak esetébenl rendszerén. Úgy találták, hogy a névleges koncentráció értékeket a módszerek jól visszaadták²².

2.3. Felderítő statisztikai módszerek komponensek tiszta spektrumainak becslésére gyógyszeripari mintákon

A kémiai térképek nagyszámú adatból álló halmazt reprezentálnak. Ebben rejlik az információ, amelyet matematikai, felderítő statisztikai módszerek segítségével lehet kinyerni. Már a 20. század első felében alkalmaztak egyéb tudományterületeken (pl. pszichometria) effajta eljárásokat, de az analitika és fizikai kémia csak a 1960-as évek végén, illetve 1970-es évek elején kezdte felfedezni a sokváltozós adatelemzésben (ún. kemometriában) rejlő lehetőségeket.²³

A kemometriai módszerek alapvetően két részre bonthatók. Az egyik csoportot alkotó (az 2.3. fejezetben megismert) módszerek a tiszta ill. egyéb ismert referencia-spektrumokra hagyatkoznak és azokkal modellezik a mintákat.

A másik csoportot a referencia-spektrum nélkül dolgozó módszerek köre teszi ki. Ezek a módszerek kvalitatív információk felderítésére alkalmasak olyan esetekben is, amikor nem áll rendelkezésre semmilyen előzetes információ a vizsgált mintákról. A működési elvüket illetve matematikájukat a függelékben (7.2. fejezet) fejtettem ki.

Ez a csoport tovább bontható a mechanizmusuk szerint. Az egyik legrégebb óta alkalmazott faktoranalízisen alapuló módszer a főkomponens-elemzés (principal component analysis, PCA^{24,25}). Geladi az összefoglaló közleményében külön kitér egy példával erre az alkalmazásra²². Főkomponens-analízis és PLS segítségével sikerült holland kutatóknak tabletták rezgési spektroszkópiával történő vizsgálatakor a hamisítványokat megtalálni²⁶. Ugyanígy Puchert és társai hamisított gyógyszerek hamisságának megállapítására végeztek vizsgálatokat közeli infravörös spektroszkópia és kémiai térképezés segítségével²⁷. Egy belga kutatócsoport Raman-térképezés segítségével és PCA felhasználásával vizsgálatok Viagra® hamisítványokat²⁸. Egy másik munkájukban a PCA már nem volt hatékony Viagra® és Cialis® hamisítványok és utánzatok megkülönböztetésére, csak PLS modellezéssel tudtak a tabletták között különbséget tenni²⁹. Widjaja és társa egy másik faktoranalízisen alapuló módszert, az ún. BTEM-et (band-target entropy minimalization) alkalmazták sikerrel kis mennyiségű magnézium-sztearát kimutatására³⁰.

Léteznek olyan jelfeldolgozó módszerek is, melyek alkalmazásakor a mért adatsort nem kell egy másik altérbe vetíteni, és a számítások során végig fizikai értelemben is interpretálhatóak maradnak a spektrumok. Ilyen például a komponensek legkevesbé átlapoló sávjait megtaláló önmodellező-keverékelemzés (simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis, röviden: SIMPLISMA vagy SMMA)³¹. Francia kutatók használták ólom és cink szennyező porok Raman-mikrospektrometriás vizsgálatakor^{32, 33}.

Az előbbi módszerek által adott eredményeket pontosíthatják az iterációs eljárások, mint az többváltozós görbefulválítás - alternáló legkisebb négyzetek módszere (röviden MCR-ALS³⁴) Ezt többször alkalmazták gyógyszeripari minták Raman^{35,36} és NIR^{37,38,39} térképének elemzésére, de használták folyóban található peszticidek azonosítására is⁴⁰. Ezzel a módszerrel NIR térképeken hatóanyag eloszlását is vizsgálták a kinyert spektrumok alapján⁴¹.

Az MCR-ALS-hez hasonló elven működik az ún. a pozitív mátrix faktorizálás (PMF)^{42,43} Az előző módszereket több tanulmány is taglalja különböző rendszereken összehasonlítva.^{14,17,44}

A hiperspektrális térben a mérési adatok legkisebb térfogatú sokszögbe (ún. simplexbe) történő „zárásán” alapszik az MVSA (minimum volume simplex analysis)⁴⁵ és ennek egy továbbfejlesztett változata, a SISAL (simplex identification via split augmented Lagrangian)⁴⁶, amely az előzőnél gyorsabb és nagyobb adathalmazt képes feldolgozni. Lopes⁴⁷ ezt az újonnan kifejlesztett módszert az MCR-ALS-sel veti össze közeli infravörös spektroszkópiával hamisítványokon mért adatokon. A tanulmányukban levont következtetéseket azonban komoly elméleti hibák terhelik, melyre Rajkó hívta fel a figyelmet egy nemrég megjelent közleményében⁴⁸.

A fejezetben ismertetett tanulmányok alapján látható, hogy igen sok különböző matematikai eljárás alkalmas a Raman-térképek feldolgozására és az alkotóelemek spektrumainak becslésére. Az e témában megjelent közlemények jelentős része azonban egyszerre egy (vagy kevés) módszerre összpontosít. Gyakorlati szempontból jelentős kérdés, hogy melyik adatfeldolgozási módszert érdemes választani egy ismeretlen komponenseket (is) akár homogén eloszlásban tartalmazó készítmény Raman-térképezéses vizsgálata esetén.

További fontos gyakorlati probléma a polimorf szennyezések megjelenése a hatóanyagban: a szakirodalomban azonban nem található olyan közlemény, amelyben nagyon hasonló (egymással erősen korreláló) spektrumokat próbáltak volna elválasztani ezekkel a módszerekkel. Ezért munkámban egyazon gyógyszerhatóanyag különböző polimorf módosulataiból készült keverékeken vizsgáltam, hogy várhatóan melyik módszer a legalkalmasabb a szennyezések azonosítására.

Emellett kémiaiilag (így spektrálisan) hasonló segédanyagok keverékeiről készült Raman-térképeken is alkalmaztam az egyes algoritmusokat, hogy megállapítsam, milyen hatékonysággal deríthetők fel a kisebb különbségek a többféle hasonló segédanyagot tartalmazó készítményekben.

2.4. A gyógyszerhatóanyagok polimorfiája; polimorfok és amorf-kristályos hányad vizsgálata szilárdfázisú analitikai módszerekkel

Definíció szerint a polimorfia az anyagok azon képessége, hogy különböző szerkezetű kristályos fázisokat alakítsanak ki – ezek a *polimorf módosulatok*. Vegyületnek oldószerrel szilárd fázisban képezett különböző rendezettségű adduktjait szolvátoknak (korábbi elnevezéssel pszeudopolimorfoknak) nevezzük. (Ha a koordinált oldószer víz, hidrátokról beszélünk.) Végül a „deszolvatált szolvátok” elnevezést kapták az olyan módosulatok, amelyek a szolvátokból keletkeznek a koordinált oldószer elvonása révén, miközben megtartják a szolvát kristályszerkezetét⁴⁹.

A polimorfia tágabb értelmű definíciójába beletartoznak az amorf formák is, amelyek a valódi polimorfokkal ellentétben nem kristályosak, azaz szerkezetükre hosszú távú rendezettség (periodikusan ismétlődő elemi cella) nem jellemző, rövid távú rendezettséget azonban mégis mutathatnak, amely a szomszédos építőelemek kapcsolatára jellemző. Az amorf forma rendszerint kémiaiilag is kevésbé stabil (és higroszkóposabb), mint a kristályos módosulatok.

A hatóanyagok polimorfiája egyre növekvő jelentőséggel bír a gyógyszeriparban. A gyógyszerek általában szilárd formában kerülnek a páciensek szervezetébe. A gyógyszerkészítményekben, mint a hatóanyagot körülvevő mátrixban a gyártás közben és után változások mehetnek végbe, így a tárolás közben módosulhatnak a termékek biológiai tulajdonságai. Fontos tehát annak a vizsgálata, hogy mely polimorfok stabilabbak és arányokat tudjunk mondani, illetve az is, hogy a késztermékekben is már kis mértékű polimorfszennyezéseket ki lehessen mutatni. A mai hatósági szabályok alapján egyazon hatóanyag eltérő polimorf módosulatait szabadalmilag védetté lehet tenni (mely nem kevesebb, mint 20 év oltalmat jelent). Emellett a stratégiai szempontot is figyelembe kell venni, hogy egy létező molekula új polimorf módosulatait megtalálni sokszor egyszerűbb és olcsóbb, mint teljesen új molekulát fejleszteni. Nagyérzékenységgű vizsgálatok szükségesek azonban annak eldöntésére, hogy az új, megtalált polimorf módosulat nem alakul-e át időközben egy már szabadalmilag védett, stabilabb módosulattá.

A polimorfok vizsgálata több szilárdfázisú analitikai módszer⁵⁰ segítségével is megvalósítható.

Röntgen-pordiffrakció (XRPD). A röntgen-pordiffrakciós vizsgálat során egy polikristályos porminta diffrakciós felvételét készítik el. A diffrakciós képen megjelenő intenzitások karakterisztikus diffrakciós szögekhez tartoznak, ezek pedig egyértelműen jellemzőek az adott szilárd fázisra. A diffrakciós képen megjelenő vonalak helye és azok intenzitásai a polimorf módosulatok egyértelmű megkülönböztetését teszik lehetővé, a vonalak hiánya pedig amorf szerkezetre utal. Sok esetben alkalmazzák ezt az eljárást. Az egyik tanulmány két polimorf vizsgálata esetén detektálási korlátot is meghatároz 2% körül⁵¹.

Termoanalitika: A termogravimetria (TG) a minta tömegcsökkenését, a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) pedig a hőfelvételt/hőleadását adja meg adott hőmérsékletprogram megvalósítása közben. A szolvátok azonosítására, illetve jellemzésére a TG és a DSC együtt használatos. A DSC alkalmas olvadási, üvegesedési hőmérséklet megállapítására, valamint hőhatással járó másodrendű fázisátalakulások követésére.

Japán kutatók javasolták az egyik tanulmányukban⁵² a HPLC és a DSC közös értékelését úgy, hogy a teljes hatóanyag-mennyiség az előbbi technikával, míg a kristályos hányad az utóbbival lett meghatározva.

Szilárd fázisú NMR (ss-NMR). A módszer az utóbbi évtizedben vált a polimorfiai vizsgálatok integráns részévé. Elsősorban a ¹³C-, a ¹⁵N- és a ³¹P-NMR alkalmazható a szerves anyagok körében. Az NMR készülékekben a mágneses térbe helyezett mintát mágneses impulzusok sorozatával gerjesztjük különféle pulzusszekvenciákkal (PFT-NMR), majd a vevőtekercsben a jel szabad lecsengését mérjük, és azt Fourier-transzformálva kapjuk a spektrumot. A módszer előnye, hogy nem csupán megkülönböztetni képes az egyes polimorf módosulatokat, hanem közvetlen szerkezeti információkkal is szolgál.^{53 54}

Rezgési spektrometria (IR, Raman⁵⁵). A rezgési spektrometria jelentős területet foglal el a polimorfia kutatásában, melynek alapvető oka, hogy a rezgési spektrum mintegy ujjlenyomatszerűen képes megjeleníteni a molekula teljes rezgési erőter-rendszerét. Minden változás, ami a molekula konformációját, vagy a molekulák egymáshoz viszonyított orientációját érinti a rácsban, leképeződik a rezgési spektrumban: vagy a sávok helyének eltolódásában, vagy az intenzitások jelentős módosulásában, vagy csupán abban, hogy a sávok kontúrja láthatóan deformálódik. Technológiai szempontból különös jelentőségű tény,

hogy sok esetben az amorf forma is rendelkezik jellemző spektrumrészlettel⁸. A rezgési spektrometria egy igen újszerű képviselője a Terahertz spektrometria⁵⁶, amelynél a távoli infravörös tartományban gerjesztett kristályrezgések kimondottan jól vizsgálhatók. Az egyes polimorf módosulatok között nagyobbak a spektrális különbségek, mint a többi módszer esetében. (Hátránya azonban, hogy mikroszkóppal csatolva csak igen rossz laterális felbontás érhető el vele.) Karabas és társai⁵⁷ Risperidon tabletta példáján mutatta be a különböző hatóanyag-polimorfok azonosítását. Nagyon kis mennyiségű hatóanyagot tartalmazó tabletta esetén már bizonytalan volt (kis csúcsintenzitás miatt) az azonosítás.

A Raman-mikrospektrometriás vizsgálatok iránt egyre fokozódik az igény, annak érdekében hogy segítségükkel a polimorfok átalakulását követni és befolyásolni tudják. Gamberini és társai Raman-mikroszkópiával vizsgálták a tamoxifen⁵⁸ és chloramphenicol⁵⁹ nevű hatóanyagok átalakulását fűthető tárgyasztal segítségével. Megkülönböztették több módosulatukat, illetve felderítették egymásba alakulásuk és stabilitásuk körülményeit. (Ugyanilyen módszerrel – de kisebb laterális felbontással - alkalmazható az IR-mikrospektrometria is⁶⁰.) Meg kell jegyezni, hogy ezekben a vizsgálatokban a mikrospektrométerrel manuálisan kiválasztott pontokban mértek spektrumokat, és nem végeztek kémiai térképezést.

Clark és társai számos példában mutatják be a Raman térképezés alkalmazhatóságát különböző polimorf módosulatok detektálására⁶¹. Két példában ismertetik polimorf szennyezések lokalizálását kémiailag tiszta hatóanyagokban. Ezen túlmenően tablettázás előtti porkeverékekben is vizualizálták különböző módosulatú hatóanyagok térbeli eloszlását. Könyvükben bemutatják, hogy Raman térképezéssel követhetők a kristálmódosulatot érintő, a technológiai lépések (pl. extrúzió vagy bevonás) során bekövetkező változások.

Több közlemény szerzői is beszámoltak arról, hogy kis mennyiségű hatóanyag-polimorfszennyezést mutattak ki tablettákban^{62,63}. Mivel a különböző módosulatok spektruma alig tért el egymástól, továbbfejlesztett klaszterezési eljárásokat használtak a hatóanyag szemcséinek minél pontosabb elkülönítésére a térképen. Raman-mikroszkópia és atomierő-mikroszkópia együttes alkalmazására is található példa⁶⁴, ahol a szerzők állítása szerint a két módszer jól kiegészíti egymást amorf anyagok felszínének vizsgálatában. E közleményben az is bemutatásra került, hogy a térképezés nemcsak a felszínen, hanem a minta mélyebb rétegeiben is megvalósítható, további hasznos információt nyújtva.

Egy kutatócsoport transzmissziós üzemmódú Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) térképezés alkalmazását mutatta be szabályozott körülmények közötti polimorfia-változások nyomonkövetésére^{65,66}. A módszerrel szinte valós időben követhető nifedipine átalakulása a β módosulatából az α módosulatba 38 °C hőmérséklet és 80% relatív páratartalom mellett. Nifedipine és nitrendipine hatóanyagokból készült film formájú keverékeket is vizsgáltak (40 °C hőmérséklet, 90% relatív páratartalom mellett).

Carvalho és társai egy megjelenés alatt álló közleményükben bemutatják, hogy a fentiekhez hasonló módon a NIR-kémiai térképezés is alkalmas polimorfok eloszlásának és mennyiségének becslésére.⁶⁷

A gyógyszer technológiai szempontból kedvező (gyorsabb kioldódás, jobb felszívódás) amorf módosulatok egyre nagyobb figyelmet kapnak a gyógyszeriparban. Nagy jelentőségű lenne az amorf hatóanyagok kezdeti kristályosodásának vizsgálatára alkalmas módszer⁶⁸, hogy abból az anyag hosszabb távú stabilitására lehessen következtetni. Egy ilyen nyomnyi

kristályosságot tartalmazó amorf hatóanyagot vizsgált Raman-térképezéssel egy közelmúltban publikált közleményben Widjaja és csoportja⁶⁹. A felvett térképből egy speciális, faktoranalízisen alapuló kemometriai módszerrel (BTEM algoritmus – Band Target Entropy Minimization) becsülték meg az amorf és a kristályos hatóanyag spektrumát. A spektrumok jól korreláltak a referenciákkal, ezért alkalmasnak vélték arra, hogy kimutatható legyen a kristályosság már a kristályosodás alacsony fokán.

A szakirodalomban nem találtam olyan részletes munkát, melyben a Raman-térképezésen alapuló kemometriai módszerek összehasonlító vizsgálatát valósították volna meg gyógyszeripari mintákon. Ezért dolgozatomban kitérek az ismert komponenseket tartalmazó készítmények bemutatásán kívül a különböző felderítő statisztikai módszerek összehasonlítására, melyeket ismeretlen összetételű mintákra alkalmaztam. Ezeknek a módszereknek a hatékonyságát még nem elemezték egyetlen közleményben sem, ezért fontosnak tartottam, hogy olyan anyagokon teszteljem, melyek próbára teszik az egyes algoritmusok alkalmazhatóságát. Ilyen sarokpontok lehetnek a különböző technológiával készült ismeretlen tabletták jellemzése vagy nagyon hasonló spektrumok (hatóanyagpolimorfok vagy hasonló szerkezetű segédanyagok) elválasztása egymástól.

3. Felhasznált anyagok és módszerek

3.1. A kísérletek során felhasznált anyagok és mintaelőkészítési módszerek

3.1.1. Két tabletta technológiai jellemzése a Raman-térképezés alapján

Az iparjogvédelmi szempontok miatt meg nem nevezett, „A” és „B” jelekkel jelölt tablettákat eltérő forrásból szereztünk be céllal, hogy azokat összehasonlítsuk a Raman-mikrospektrometria felhasználásával. A két tabletta közül az egyik az originátor terméke volt, míg a másik egy magas szintű hamisítványnak tekinthetjük. A tabletták öt komponensből álltak; tartalmaztak hatóanyagot, hidroxipropil-metil cellulózt (hipromellózt), laktóz-monohidrátot, magnézium-sztearátot és karboximetil cellulóz (kroszkarmellóz)-Ca sót.

3.1.2. Modelltabletta a vizsgálatok és kemometriai módszerek ellenőrzésére

A vizsgálatokhoz modelltablettaként egy kereskedelembe kapható gyógyszerkészítményt választottunk, melyet iparjogvédelmi okok miatt a továbbiakban „T” betűvel jelölünk. A modelltabletta összetételét tekintve a hatóanyag mellett laktóz-monohidrátot, kukoricakeményítőt és magnézium-sztearátot tartalmazott. Ezeknek ismerete csak az ellenőrzés és összehasonlítás céljából volt szükséges.

3.1.3. Eltérő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén eloszlású komponenssel

A modelltabletták azonos összetétellel készültek. Tartalmaztak 10% hatóanyagot, továbbá főtömegben 76% mikrokristályos cellulózt, majd további 10% kukoricakeményítőt, 3% hidroxipropil-metilcellulózt és 1% magnézium-sztearátot. Ezek a százalékok tömegarányokban értendők.

A három eltérő gyártási technológiát a tabletta nevében 'D', 'HS' és 'F' rövidítésekkel jeleztem. A 'D' jelzésű tablettát granulálási lépés nélkül közvetlenül préseléssel (*direct compaction*) készítették. A 'HS' tabletta komponenseit a préselést megelőzően örvényáramú granulálással (*high-shear granulation*) aggregálták granulátumszemcsékké, így előállítva a hatóanyag homogén eloszlását. Az 'F' tabletta esetén a granulálási folyamat egy fluidizációs granulálásból (*fluidized bed granulation*) állt, amely szintén a hatóanyagnak közel homogén eloszlását eredményezte.

3.1.4. Hatóanyagpolimorfok Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerek segítségével

3.1.4.1. Három komponensű keverék vizsgálata

A gyógyszerhatóanyag-polimorfok vizsgálata során a carvedilol (nemszelektív béta blokkoló hatású szívgyógyszer) három módosulatát használtam. Ezek a carvedilol I., carvedilol B és carvedilol III. elnevezést kapták. Mindegyik módosulatot porrá őrölt formában használtam fel.

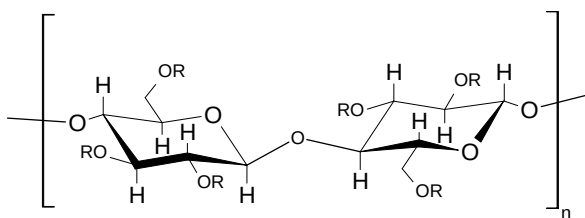
3.1.4.2. Amorf hatóanyag kristályosodásának kimutatása

D hatóanyag amorf formája porlasztva szárítással került előállításra. A mintákat lezárt dobozokban tartottuk, s az amorf állapot minőségének megőrzése érdekében a dobozokat mélyhűtve tároltuk.

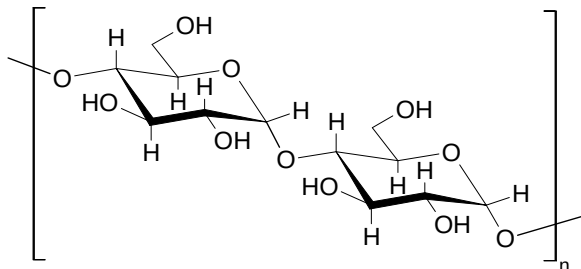
3.1.5. Hasonló kémiai szerkezetű segédanyagok tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel

A segédanyagkeverék-rendszerrel végzett vizsgálataimhoz etilcellulózt, hidroxipropil-metilcellulózt és kukoricakeményítőt használtam fel.

A cellulóz β -D-glükopiranoz egységekből épül fel 1-4-es kötésekkel, ahogy az 3.1. ábra mutatja. A keményítőben α -D-glükopiranoz egységek kapcsolódnak össze 1-4-es kötésekkel. A keményítő egy része helikális szerkezetű amilózból és elágazó láncokból (a bizonyos egységenként található 1-6 kötések miatt) álló amilopektinből épül fel (3.2. ábra).



3.1. ábra: A módosított cellulóz szerkezete



3.2. ábra: A keményítő szerkezete

A keményítő egy része helikális szerkezetű amilózból és elágazó láncokból (a bizonyos egységenként található 1-6 kötések miatt) álló amilopektinből épül fel (3.2. ábra). A szerkezeti hasonlóság miatt tartottam alkalmasnak ezekből az anyagokból a modellkeverék előállítását, hiszen a molekülszerkezetből adódóan e vegyületek Raman-spektrumai is nagyon hasonlóak.

3.1.6. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása

A minták két komponenssel készültek. Ezekben a modellekben spironolakton volt a hatóanyag, míg a segédanyag -amelyben a hatóanyag eloszlatták- a Soluplus[®] nevet viselte, amely egy polivinil-kaprolaktám–polivinil-acetát–polietilén-glikol tartalmú kopolimer (kb. 118 kDa). Ezekből 10 és 20%-os hatóanyag-tartalommal készített extrudátumokat és elektroszpinnigél készült szálakat kaptam a méréshez.

3.2. A kísérletek során felhasznált módszerek és berendezések

3.2.1. A berendezések adatai

Raman-mikrospektrométer: A Raman vizsgálatokat a Jobin Yvon cég által gyártott, LabRam típusú Raman mikroszkópon végeztem.

A gerjesztést háromféle lézer sugárforrással végezhetjük. A munkám során He-Ne lézert nem használtam, így ennek az adatai nem kerültek a táblázatba. A használt lézer tulajdonságait az alábbi táblázat ismerteti.

Frekvenciakettőzött Nd-YAG lézer használatakor rövid mérésidővel is jó jel-zaj viszony érhető el. Éppen ezért minden mintát először ezzel próbáltunk meg vizsgálni, a többire akkor tértünk át, ha ezzel a gerjesztő lézerrel végzett vizsgálat valamilyen akadályba ütközött. A leggyakrabban előforduló problémaként a fluoreszcencia és a lézersugárral bevitt teljesítmény által okozott degradáció vagy átalakulás lépett fel a vizsgált mintatérfogatban. A diódalézer előnyösen alkalmazható nagy háttérű, fluoreszcens minták vizsgálatára, és alkalmazásakor rendkívül ritkán fordul elő a minta megváltozása.

3.1. táblázat: A gerjesztő lézerek adatai és a lézersugarak átmérői a fókuszpontban

	Hullámhossz (λ) [nm]	Energia (E) [eV]	Teljesítmény a mintán (I0) [mW]	D* [μ m] 10 $\times$ NA 0,25	D* [μ m] 50 $\times$ NA 0,7	D* [μ m] 100 $\times$ NA 0,9	Makrolencse [μ m]
Frekvencia- kettőzött Nd:YAG	532	2,33	15	2,553	0,912	0,709	~500
Dióda	785	1,58	19	3,768	1,346	1,047	

* a lézersugár számított átmérője a fókuszpontban; az „NA” rövidítés a numerikus apertúrát jelenti

A berendezésben a lézersugár egy megfelelő optikai tükör- és szűrőrendszeren keresztül egy (mikrométeres felbontást biztosító) Olympus BXC-40 típusú optikai mikroszkópba jut. A sugár a mikroszkóp cserélhető objektívjein keresztül kerül a mintára. Négy objektívet használhattam: 10 $\times$, hosszú fókusztávolságú 50 $\times$ és 100 $\times$ nagyításút, illetve egy 40 mm fókusztávolságú ún. makrolencsét, amellyel egyszerre nagy mintafelszín vizsgálható. (Az objektívek helyére egy mintatartó is felszerelhető, amelybe folyadékküvetát helyezhetünk fluidumok vizsgálata esetén.)

A minta roncsolódásának elkerülésére a lézerfény intenzitása, így a mintára eső teljesítmény semleges szűrőkkel csökkenthető, amely az intenzitást 1/2 (D0.3), 1/4 (D0.6), 1/10 (D1), 1/100 (D2), 1/1000 (D3), 1/10000 (D4)-ed részére csökkenti. Látható hullámhossz-tartományú lézer esetén a fényútba depolarizátor is helyezhető.

A mintán szóródó fotonokat szintén az említett objektívek gyűjtik össze. A frekvenciaváltozás nélkül visszaszórt Rayleigh sugárzást a gerjesztő frekvenciának megfelelő, fényútba helyezett, ún. „notch-szűrők” távolítják el. A készülék a mintáról szóródó fényt diffrakciós ráccsal bontja fel. Kétféle spektrális felbontás alkalmazható, 1800 és 950 vonás/mm vonalsűrűségű ráccsal. A szokásos beállítások mellett a spektrális felbontás körülbelül 3 cm⁻¹.

A Raman-fotonokat 256×1024 pixeles CCD (Charge-Coupled Device) detektor érzékeli. A detektor beütésszáma maximált, mely felett a pixelek telítődnek, tehát „kiolvasásig” további fotonok detektálására nem alkalmasak. (Éppen ezért okoz problémát a fluoreszcens háttér jelenléte.) A Raman sávok intenzitásai a spektrumokban a Raman eltolódás függvényében, a detektorra érkező fotonokkal arányos egységekben (a. e., azaz „aktuális egység”, angol kifejezéssel „arbitrary unit”) kerülnek ábrázolásra. A detektor említett telítődésének az intenzitásskála 32 000-es értéke felel meg.

Az ily módon összeállított berendezés alkalmas a minta egy kiválasztott pontjában történő spektrumfelvételt, egy meghatározott terület program szerinti feltérképezésére (mapping) és mélységi felvétel készítésére is. A térképezést motorizált tárgyasztal és egy automatikusan fókuszáló rendszer segíti (a mintafelületről visszaszórt fény intenzitása alapján). Az utóbbiban az objektívek – és így a fókuszpont – mozgatását piezo-kristály végzi. Az *autofókusz* – mikrométerskálán – érdes felületek program szerinti térképezését is lehetővé teszi.

A Raman-mikroszkópok *térbeli felbontását* a lézersugár fókuszpontjában gerjesztődő mintatérfogat határozza meg, amely elsődlegesen az alkalmazott objektívtől függ. A nagyítás mértéke a laterális (síkbeli) felbontásra, míg az objektíven áthaladó fénysugár törésszöge (amelynek jellemzésére az objektív numerikus apertúra értéke szolgál) a mélységi felbontásra van hatással. Bármennyire is fókuszáljuk a mintát ért lézersugarat, a fókuszról távolodva nincs éles intenzitásváltozás. Ennek következménye, hogy a gyűjtőlencsén áthaladó Raman szórás nemcsak a fókusz síkban levő mintáról hordoz információt. A mélységélesség javítására szolgál az ún. *konfokális elrendezés* kialakítása. A nem kívánt mélységből érkező sugarakat a detektor előtt elhelyezett kis átmérőjű lyuk (*diafragma*) szűri ki. Ehhez a rács előtt a fénysugarakat egy olyan gyűjtőlencsén vezetik át, melynek gyújtópontja éppen a diafragma közepére esik. Így az az elektromágneses hullám, amely nem a kívánt mélységben levő (lézersugárra merőleges) síkból érkezik, nem tud áthaladni a lyukon, tehát nem jut el a detektorra. Az ilyen elrendezés *valódi konfokalitást* biztosít. (A mélységélesség javítása a CCD detektorok jeleinek jelintenzitás-alapú, elektronikus szűrésével is megoldható, azonban sok esetben pontatlanabbul. Ezt alkalmazzák a *pseudo-konfokális* rendszerekben.)

A spektrométert minden vizsgálat előtt szilícium egykristály minta segítségével kalibráltam mindegyik lézer esetén (amennyiben az adott napon ez korábban nem történt meg). A kalibrálás a következőképpen történt: a mikroszkóp objektívét szilícium lap felületére fókuszáltam a minta optikai képe, majd a mintára eső lézerfolt optikai képe segítségével, végül a valós idejű spektrumfelvétel opcióval fél másodpercenként 850 cm^{-1} középpontú spektrumot vettem fel a szilícium lapról. Eközben folytattam a fókuszálást, egészen addig, amíg a Si egyetlen detektálható sávjának intenzitása maximálissá nem vált. Ezen – elvileg $520,5\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkező – sávra Gauss-Lorentz-függvényt illesztettem (ezt a működtető szoftver lehetővé teszi). Amennyiben a függvény maximuma nem $520,5\text{ cm}^{-1}$ -nél volt, az optikai rács „Zero” értékét úgy állítottam át, hogy ez a maximum az $520,5\text{ cm}^{-1}$ hullámszámmal essen. Ezután az optikai rács állását újfent 850 cm^{-1} -re állítottam (ugyanis a Zero érték átállításakor a rács relatív pozíciója megváltozik), és újabb spektrumot vettem fel a szilíciumról. Újabb függvényillesztéssel ellenőriztem a sávmaximum helyét. Ezután – ha kellett – újra módosítottam a Zero értéket. Ezzel az iteratív megoldással 2-3 lépésben

megtalálható az a megfelelő beállítás, ahol a szilíciumról felvett spektrum sávja pontosan az elméleti $520,5\text{ cm}^{-1}$ hullámszámon jelentkezik.

3.2.2. Mintaelőkészítési módszerek és körülmények

3.2.2.1. Tabletták technológiai jellemzése a Raman-térképezés alapján

A tablettákat töréssel elfeleztem, majd a törési felszínre $10\times$ -es objektívvel fókuszálva kb. $700\text{ }\mu\text{m} \times 700\text{ }\mu\text{m}$ -es területet térképeztem fel $10\text{ }\mu\text{m}$ -es lépésközzel. A spektrumfelvételi idők az „A” tabletta esetén $5\times 2\text{ s}$, míg a „B”-vel jelölt tablettánál $6\times 2\text{ s}$ voltak. A gerjesztéshez frekvenciakettőzött Nd-YAG lézert (532 nm) használtam. Minden felvett Raman-spektrum a $324\text{--}1771\text{ cm}^{-1}$ közötti hullámszámtartományról készült.

Három alkotókomponensről (hipromellóz, laktóz-monohidrát és magnézium-sztearát) a saját korábbi vizsgálataink során felépített spektrumkönyvtárunkban találtunk referenciaspektrumokat, míg a hatóanyag és a kroszkarmellóz-Ca esetében a gyógyszergyárból küldött tiszta anyagokról készítettem spektrumot. Ezeket használtuk a modellezés során.

3.2.2.2. Gyógyszertabletta vizsgálata kemometriai módszerekkel

A vizsgálat során a tablettát kettétörtem, majd a törési felület $130\text{ }\mu\text{m} \times 130\text{ }\mu\text{m}$ -es területén $2\text{ }\mu\text{m}$ -es lépésközökkel térképfelvételt készítettem. (A felületi érdesség okozta fókuszálási hibák kiküszöbölését automatikus fókuszáló rendszer segíti, mely minden térképpont felvétele előtt a mintafelületről visszaszórt fény intenzitása alapján korrigálja, jelen esetben a minta lokális felületi síkjára állítja a lézersugár fókuszát.) A felület mindegyik pontjáról 3 db 2 másodperces felvétel átlagolásával készült a spektrum.

3.2.2.3. Eltérő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén eloszlású komponenssel

A Raman-térképezéshez a 785 nm -es dióda lézert használtam. A $10\times$ -es és a $100\times$ -os objektívet használtam a térképezés és a referenciaspektrumok felvétele során. A spektrométer a $400\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszámtartományt vette fel.

A tiszta összetevők Raman-spektrumai $100\times$ -os nagyítás mellett, 100 s felvételi idővel és 2 spektrum átlagolásával készültek.

A térképezésnél kis felbontáskor a $10\times$ -es nagyítást és $10\text{ }\mu\text{m}$ -es lépésközt, míg nagy felbontáskor a $100\times$ -os nagyítást és $2\text{ }\mu\text{m}$ nagyságú lépésközt állítottam be. Az összes kísérletben az egyedi spektrumok felvétele $30\times 2\text{ s}$ -ig tartott (2 spektrum átalaga). Amikor a $10\times$ -es objektívet használtam, akkor a rendelkezésre álló időnek megfelelően 28×28 ponttól 33×33 pontig változott a térképezett terület. A $100\times$ -os objektívvel készült térképek 60×60 pontból álltak.

3.2.2.4. Gyógyszerpolimorfok Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerek segítségével

A referenciaspektrumok felvételéhez a megfelelő polimorfkristályokat a tárgyasztalra téve és a felszínre fókuszálva pontmérésekkel vettem fel a Raman-spektrumokat. A hatóanyag polimorfainak Raman-spektrumait a jó jel-zaj viszony elérése érdekében a Nd-YAG lézerrel vettem fel. A spektrumok a $238\text{--}1698\text{ cm}^{-1}$ hullámszámtartományról készültek. A kétkomponensű és a háromkomponensű keveréket por formájában fizikailag homogenizálva majd a tárgyasztalon spatulával ellapítva térképeztem a beállított nagyságú területet.

A háromkomponensű rendszert $10\times$ -es nagyítás mellett térképeztem. Spektrumok 29×29 pontról készültek, amelyek egy $1400\text{ }\mu\text{m} \times 1400\text{ }\mu\text{m}$ -es ($50\text{ }\mu\text{m}$) felületen helyezkedtek el. A detektor minden pontból 5×1 s-ig gyűjtötte a fotonokat.

3.2.2.5. Amorf gyógyszerhatóanyag kristályosodásának kimutatása

Az amorf és a kristályos D hatóanyagról egyaránt referencia-spektrumot vettem fel. A spektrumrögzítés Nd-YAG lézert és $10\times$ -es nagyítást alkalmazva a $456\text{--}1881\text{ cm}^{-1}$ hullámszámtartományban történt. Az amorf mintát szobahőmérsékleten (25°C-on) tartva vizsgáltam a kristályosodását. Több alkalommal térképet vettem fel egy $3600\times 3600\text{ }\mu\text{m}$ -es nagyságú területről $100\text{ }\mu\text{m}$ -es lépésközzel, 2×5 s felvételi idővel D0.3-as intenzitásszűrővel.

3.2.2.6. Hasonló kémiai szerkezetű segédanyagok tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel

Először az egyes anyagokat tárgylemezre helyeztem, és róluk pontméréseket végeztem. Meggyőződhettem arról, hogy a minták Raman-spektruma nagyon hasonló, továbbá igazíthattam a felvételi időket a későbbi térképezéshez. A kiválasztott segédanyagokból megegyező tömegeket mértem be, és ezt az anyaghalmazt egy dörzsmocsárban homogenizáltam. A keveréket a tárgylemezen ellapítva vettem fel arról térképet. A $10\times$ -es objektívvel történő 31×31 pont mérése egyenként 60×1 s ideig tartott. $50\text{ }\mu\text{m}$ -nek beállított lépésköz egy $1500\text{ }\mu\text{m} \times 1500\text{ }\mu\text{m}$ -es felületrész pásztázását tette lehetővé.

3.2.2.7. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása

A kapott mintákból tömörített síkfelületű tablettáformákba préseltem (Camilla OL95 présszerszám). Az extrudált készítményeket először dörzsmocsárban megőröltem. Az alumínium fóliákra képzett nanoszálakat spatulával gyűjtöttem össze, majd ezeket a szálakat préseltem le. A préselt mintákról diódlézerrel (758 nm) $10\times$ -es nagyítás mellett $50\text{ }\mu\text{m}$ -es lépésközzel 25×25 pont térképezését (20%-os fizikai keverék esetén 31×31 pont) végezte el a készülék. Egyetlen pont mérése 30×3 s-ig tartott. Ezekkel a paraméterekkel kb. $1\times 1\text{ mm}$ nagyságú felületről kaptam információt.

4. Eredmények és értékelésük

A munkám több kísérleti részre oszlott. Elsőként megvizsgáltam az általában használt klasszikus legkisebb négyzetek módszerével hogyan lehet tabletták összehasonlítását elvégezni. Ezt követően már egy ismeretlen összetételű gyógyszer-tabletta Raman-térképéből nyertem ki kvalitatív információkat. Szükségesnek tartottam, hogy eltérő gyártástechnológiával készült szintén ismeretlen tablettákon is vizsgáljam a különböző kemometriai módszereket. Érdekelt, hogy a nedves granulálással előállított homogén eloszlású komponens kimutatása okozhat-e különbségeket a módszerek között. Ilyen vizsgálatra az irodalomban nem találtam példát. A továbbiakban olyan anyagok keverékein teszteltem a módszerek hatékonyságát, amelyek a spektrumaik erős hasonlósága okán megnehezíthetik a tiszta spektrumaik meghatározását. Ilyen spektrumai a gyógyszerhatóanyagok polimorf módosulainak vannak, melyek meghatározása kulcskérdés lehet technológiai szempontból, akár ismeretlen készítményekben is. Egy amorf hatóanyagból nyomnyi kristályosságot is megpróbáltam kimutatni. Némely segédanyagok is mutatnak ilyen hasonlóságot, ezért kiválasztott poliszacharidok keverékét is vizsgáltam. Két komponensnek nemcsak a spektrumai, hanem a koncentrációi is korrelálhatnak egymással. Így végül olyan hatóanyag rendszereket mutatok be, amelyekben a hatóanyag a segédanyaggal majdnem teljesen homogén kolloid diszperziót képezve van jelen.

4.1. Két tablettá technológiai jellemzése Raman-térképezés segítségével

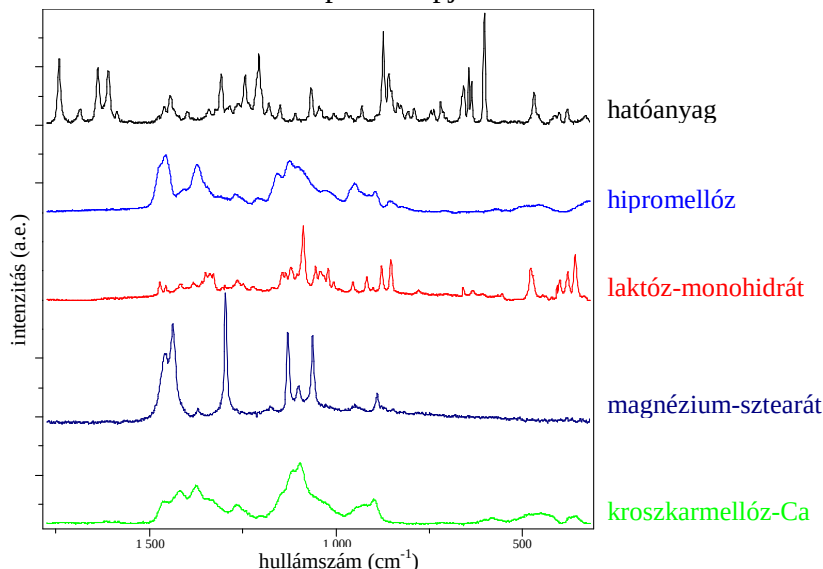
A tablettákat iparjogi szempontok miatt „A” és „B” jelzéssel azonosítottam. Az originális „A” és hamisított „B” készítmények összehasonlítására a Raman-térképezést használtam. A törési felület vizsgálatából számos következtetést vonhattam le, így egyúttal ez a fejezet a Raman-térképezés alkalmasságát is demonstrálja a szilárd készítmények technológiai jellemzésére. Meg kellett határozni ugyanis, hogy a tablettákról készült térképek alapján milyen mértékben válaszolhatók meg a gyártási technológiával kapcsolatos kérdések. Egyes komponensek esetében a szemcseméretre is meghatározást kívántam kidolgozni az alkalmazott analitikai technikával. Továbbá a tabletták komponenseinek arányára vonatkozóan mennyiségi becslés végzésének lehetőségét is vizsgálni kívántam. Mindezen vizsgálatokat az előzetes ismeretek figyelembevételével tudtam elvégezni, ami az jelentette, hogy az alkotóelemek és spektrumaik rendelkezésemre álltak.

4.1.1. Vizsgálatok és adatfeldolgozás

Két tablettáról LabRam típusú Raman-mikroszkóppal készült térkép Nd-YAG (532 nm) gerjesztő lézer segítségével. A térképeket alapvonal-korrekciónak vetettem alá a fluoreszcens háttér zavaró hatásának kiküszöbölése céljából. Ezután minden spektrumot egységnyi területre normáltam a kiértékeléskor a fókuszálásból eredő hiba kiegyenlítése érdekében. Az összetevők eloszlástérképeinek létrehozása klasszikus legkisebb négyzetek módszerével (CLS) történt a kiindulási anyagok referencia-spektrumainak felhasználásával. (A módszer ismertetését ld. a függelékben.)

4.1.2. CLS modellezés eredményei

A tablettákat alkotó komponensek Raman-spektrumai az 4.1.1. ábrán láthatók. Ezek ismeretében CLS modellezést alkalmazva minden mérési pontban meghatározható az egyes komponensek spektrális koncentrációja (azonban ez nem feltétlenül egyezik meg a valódi koncentrációval, ezért ezt a továbbiakban illesztési paraméternek hívjuk). Ha az egyes összetevők illesztési paramétereit színskálán ábrázoljuk a helykoordináták függvényében, a 4.1.2. ábrán látható eloszlástérképeket kapjuk.



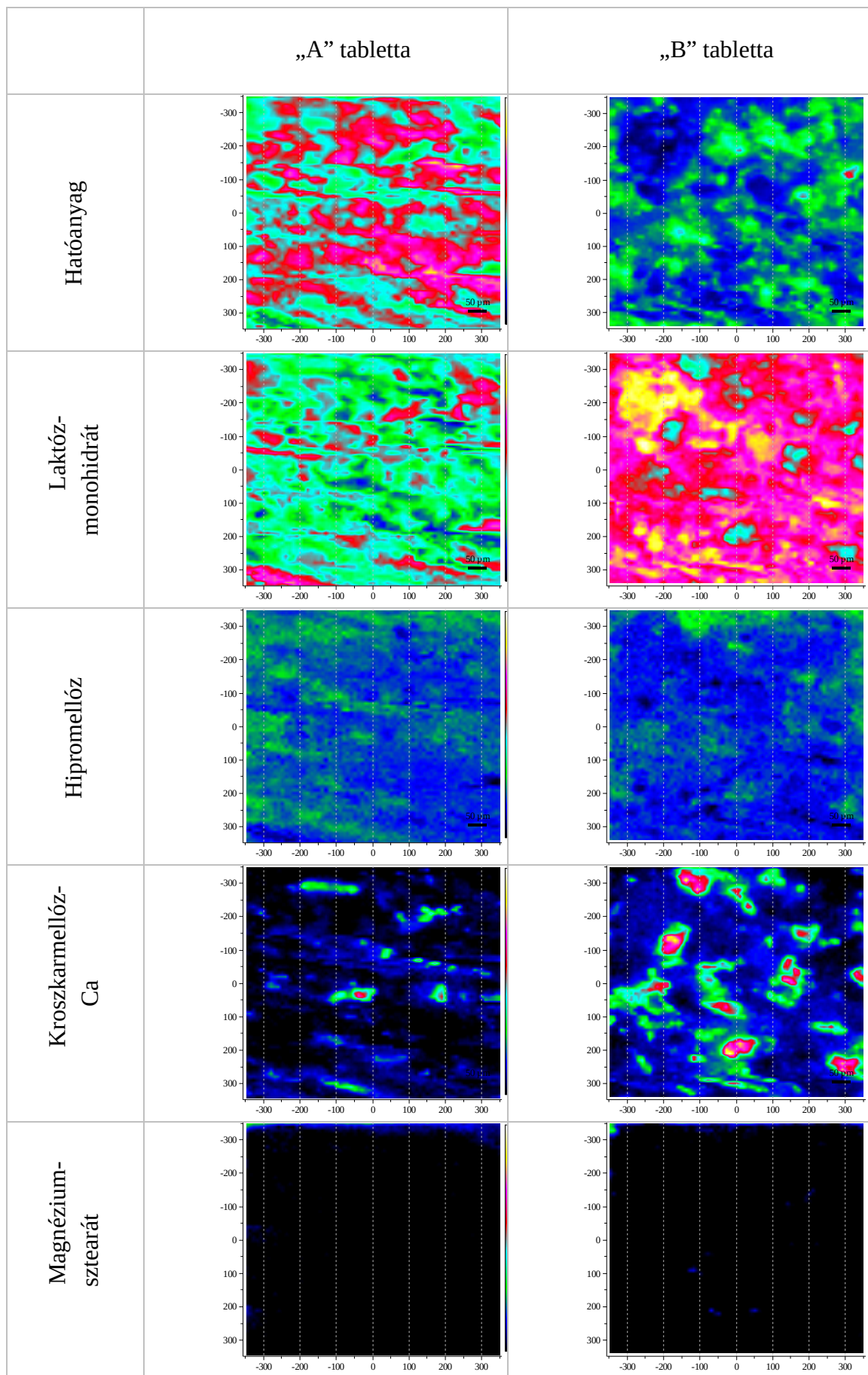
4.1.1. ábra: A két tabletta tiszta komponenseinek Raman-spektrumai

Az „A” tabletta esetében a hatóanyag a tabletta teljes törési felszínén megtalálható. Spektrumát a térkép minden pontban detektáltam. A koncentrációértékek bizonyos szórása mellett megállapítható, hogy a hatóanyag eloszlása a tablettában kis mértékű heterogenitást mutat (a hatóanyag illesztési paraméterének relatív szórása 23,4%, ld. 4.1.1. táblázat). A hipromellóz segédanyag egyenletesen van elosztatva, minden pontban jelen van.

Ezzel szemben – ahogy a 4.1.2. ábra is mutatja - a kroszkarmellóz-kalcium-sója 20-50 µm-es szemcsék formájában fordul elő a tablettában. Számos mérési pontban ez az alkotó nem volt észlelhető.

A magnézium-sztearát a jelen vizsgálati körülmények mellett alig volt detektálható. Ennek oka, hogy mennyisége nagyon csekély a többi komponens mennyiségéhez képest.

A „B” tabletta esetében a törési felületen ugyancsak mindenhol megtalálható a hatóanyag. Vannak területek, ahol jóval több található, ugyanígy vannak hatóanyagban „szegényebb” területek is. A részecskeméretet elemezve jellemzően 50 µm körüli mérettartományt határoztam meg. A néhány ennél nagyobb szemcse valószínűleg több szemcse összetapadása révén jöhetett létre. (Az eloszlástérképen látható tartományméretek a valós szemcseméretnek csak közelítő becslésére alkalmasak.)



4.1.2. ábra: „A” és „B” tabletták komponenseinek eloszlása

A laktóz-monohidrát töltőanyag szintén minden pontban előfordul. Valamelyest kevésbé heterogén az eloszlása, mint az „A” tablettában, ez az illesztési paraméterek vagy spektrális koncentrációk relatív szórásának csökkenésében is megmutatkozik.

Hipromellóz minden mérési pontban előfordul a szétosztatott állapota miatt. Ugyanakkor kisebb heterogenitások (hipromellózban szegény területek ill. lokális dúsulások) is megfigyelhetők.

A magnézium-sztearát itt is nagyon kevésbé detektálható, így ennek az eloszlásáról nem vonhatók le következtetések.

A kroszkarmellóz-kalcium meglehetősen sok pontban mérhető volt, és jól látható a térképen, hogy nagyobb méretű, 50-100 µm nagyságú szemcséket alkot.

Az 4.1.1. táblázatban közölt illesztési paraméterek nem alkalmasak pontos koncentrációk megállapítására, a két készítmény összehasonlítására azonban igen

4.1.1. táblázat: Az illesztési paraméterek átlaga a különböző komponensek esetén a Raman-térképeken

komponens	„A”		„B”	
	<i>átlag</i>	<i>szórás</i>	<i>átlag</i>	<i>szórás</i>
Hatóanyag	49,4%	23,4%	19,2%	37,4%
Laktóz-monohidrát	38,3%	29,9%	64,7%	17,3%
Hipromellóz	10,0%	18,6%	8,3%	28,0%
Kroszkarmellóz-kalcium	2,2%	--*	7,8%	--*
Magnézium-sztearát	--**	--**	--**	--**

* A kis mennyiség miatt a relatív szórás számszerű értékének megadása félrevezető lehet.

** A nagyon egyenletes elosztatottság és a csekély mennyiség miatt csak századokban mérve volt detektálható.

Az 4.1.1. táblázat eredményeiből is látható, hogy a „B” készítményben jóval kevesebb hatóanyagot találunk. A laktóz-monohidrát és a hatóanyag egymáshoz viszonyított aránya is jelentősen eltér a két tablettában. Az alkotóelemek pontos koncentrációinak ismerete nélkül is elmondható, hogy a hamis „B” tablettában a hatóanyag laktóz-monohidrát-hoz viszonyított aránya ötöde az „A”-ban tapasztalt arányhoz képest.

A hipromellóz nagyságrendileg közel azonos mennyiségben volt jelen a tablettákban. Mindkét tablettában jellemző erre a komponensre a jó elosztatottság, bár a „B” tablettában helyenként nagyobb heterogenitások is észlelhetők.

A kroszkarmellóz-kalciumból a „B” tablettában több található a Raman-térképek alapján. Emellett – ami egyértelműen látható a vizualizált eloszlástérképek alapján – e segédanyag szemcsemérete jelentősen nagyobb, mint az „A” tablettában. Továbbá némi elkenődés is tapasztalható, azaz olyan pontokban is detektálható kis mértékben, ahol nincs a közelben kroszkarmellóz-kalcium szemcse.

4.1.3. A Raman mikroszkópos technológiai elemzés lehetőségeinek összegzése

A technológiai meghatározást szolgáló Raman-térképezéses vizsgálatok összegzéseként megállapítható, hogy sikerült két gyógyszerkészítményt technológiai szempontból összehasonlítani. Jellemezhető az egyes komponensek eloszlásának heterogenitása mind vizuálisan, mind számszerűen a CLS módszerrel számolt illesztési paraméterek relatív szórása alapján. Emellett a képek alapján becsülhető egyes összetevők jellemző szemcsemérete is, mely más analitikai módszerrel nem oldható meg a már legyártott készítményben.

Bár az illesztési paraméterek kalibráció nélkül nem feleltethetők meg az alkotóelemek valódi koncentrációinak, összefüggésben vannak azokkal, így a két készítmény mennyiségi szempontból is összehasonlítható. Az egyes alkotóelemek relatív mennyisége a két tablettában, illetve több komponens egymáshoz viszonyított aránya a készítményekben számszerűen összehasonlítható. A mennyiségi összehasonlítás megbízhatóságának növelésére további (pl. DSC) vizsgálatok szükségesek.

Egy valódi ipari példán demonstráltam a Raman-térképezés alkalmazhatóságát gyógyszeripari területen. A térképek segítségével levont következtetések nagyban hozzájárulhatnak a fejlesztés alatt álló készítmények szerkezetének megértéséhez, illetve a hamis termékek teljeskörű jellemzéséhez.

4.2. Egy gyógyszertabletta vizsgálata kemometriai módszerekkel

Az előző fejezetben bemutattam, hogy az összetevők referenciaspektrumainak ismeretében elvégezhető a belőlük készült gyógyszertabletták részletes technológiai elemzése. Azonban a gyakorlatban számos esetben előfordul, hogy nem ismerjük mindegyik jelenlévő komponenst, vagy akár egyiket sem. Erre példák a hamisítványok vagy az illegális (pl. kábítószer tartalmú) készítmények, illetve a gyógyszeriparban azok az esetek, mikor ismeretlen szennyezők vannak jelen a gyártásközi vagy -végtermékben. Jelen fejezetben azt vizsgáltam, hogy az előzőekben bemutatott részletes technológiai vizsgálat elvégezhető-e akkor is, ha semmilyen előzetes információval nem rendelkezünk a vizsgálandó készítményről.

4.2.1. Vizsgálatok ismertetése, adatelemzés

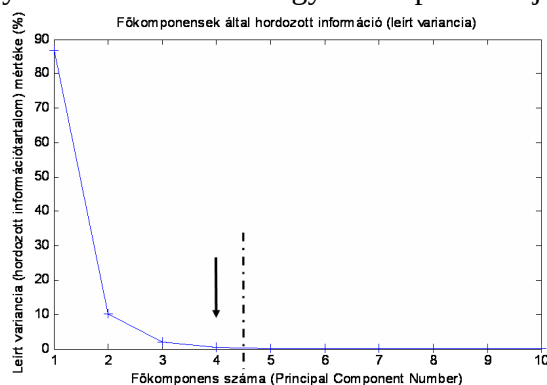
A vizsgálatokat egy „T”-jelű modelltablettán végeztem, mely esetében nem használtam fel a beteg tájékoztatón illetve a 3.1.2. fejezetben is leírt összetételt. Ennek az ismerete nélkül próbáltam a mért adatokból újraalkotni a komponensek Raman-spektrumait. Kemometriai módszereket használtam a tiszta alkotókomponensek spektrumainak kinyeréséhez. Ezek a következők voltak:

- főkomponens-analízis (principal component analysis, PCA)
- önmodellező keverék-elemzés (simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis, SIMPLISMA)
- többváltozós görbefuladás – alternáló legkisebb négyzetek módszere (multivariate curve resolution – alternating least squares, MCR-ALS)
- pozitív mátrix faktorizálás (positive matrix factorization, PMF)

Az elkészült Raman-térképet alapvonal-korrigáltam és egységnyi görbe alatti területre normáltam. A számításokat MatLab 7.6 szoftverrel (MathWorks, USA), PLS_Toolbox 5.5 kiegészítővel (Eigenvector Research, USA) és a Paatero által fejlesztett^{35 36} PMF2 nevű programjával végeztem.

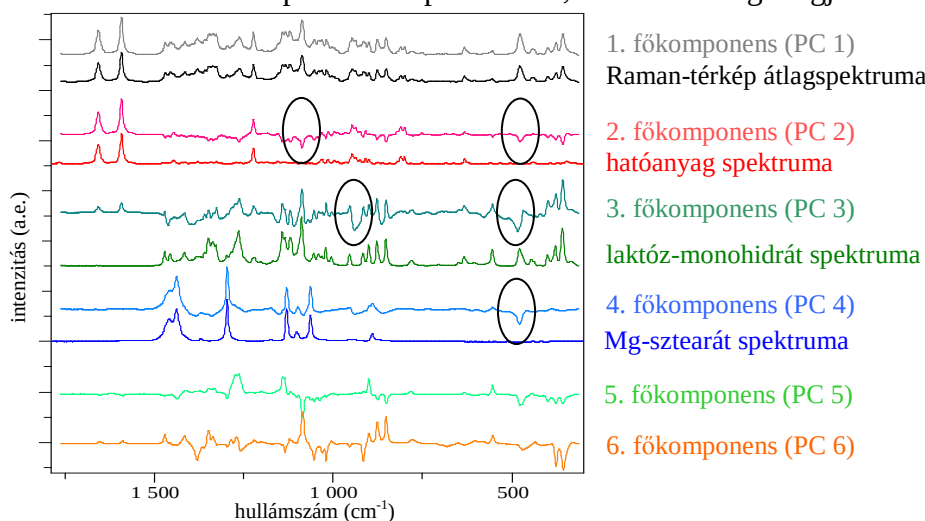
4.2.2. Tisztakomponens-spektrumok becslése különböző kemometriai módszerekkel

A PCA segítségével, az egyes főkomponensekhez (jobb oldali sajátvektorokhoz, ld. 7.2.2. fejezet) tartozó szinguláris értékek alapján elméletileg lehetséges a tablettát alkotó komponensek számának meghatározása. A 4.2.1. ábrán látható, hogy a ötödik főkomponens már minden szempontból elhanyagolhatóan kevés információt hordoz, az adathalmazban tapasztalható variancia túlnyomórészt az első négy főkomponens írja le.



4.2.1. ábra: A „T” tablettáról készült Raman-térkép főkomponenseinek információtartalma

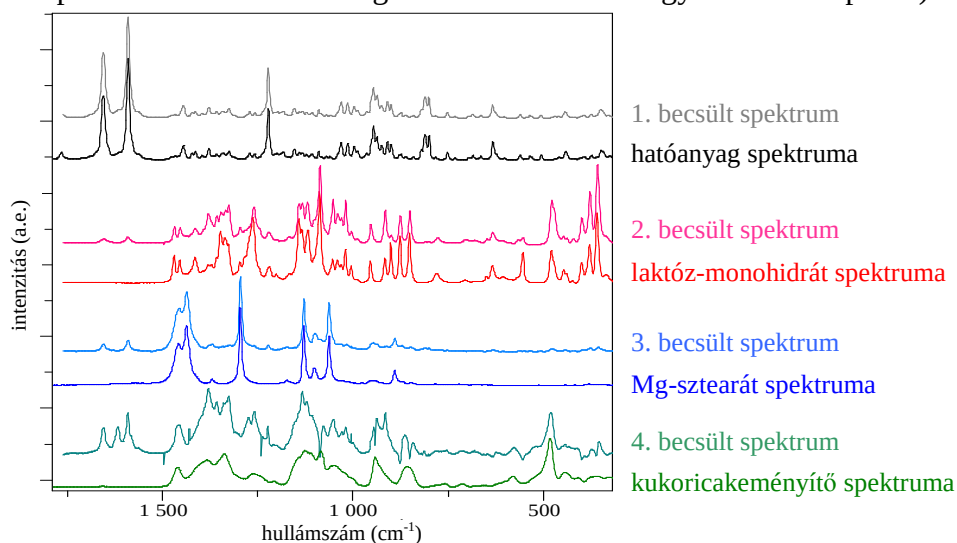
Az 4.2.2. ábrán a főkomponensek láthatók. Megfigyelhető, hogy az első főkomponens (szürke) leginkább az átlagspektrumra (fekete) hasonlít, ami logikusan következik abból a tényből, hogy a legtöbb információt egy spektrumhalmazból éppen az átlagspektrum hordozza. A tiszta komponensek szempontjából azonban ez nem nyújt hasznos adatot. Ellenben a második, harmadik és negyedik főkomponensek alapján már azonosítható a hatóanyag, a laktóz-monohidrát és a Mg-sztearát jelenléte a tablettában. A matematikai elvből következik (ám az 4.2.2. ábrán is látható), hogy a főkomponensek sohasem tisztán tartalmazzák a kiindulási komponensek spektrumait, hanem mindig megjelenik bennük több



4.2.2. ábra: A Raman-térképből PCA alapján becsült komponensek Raman-spektrumai

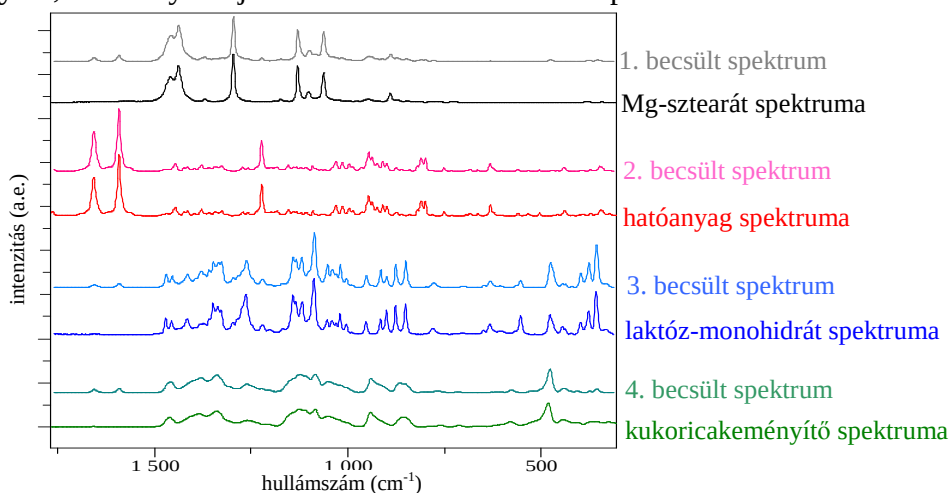
másik komponensre jellemző sáv, akár pozitív, akár negatív irányban (példaként ld. az ellipszissel jelölt területeket az 4.2.2. ábrán). Az ötödik főkomponenstől kezdődően a 4.4.2. ábrán látottakkal összhangban nem találunk újabb komponenshez tartozó rezgési sávot. A főkomponens-analízis során kukoricakeményítő jelenlétére utaló jelet nem találtam.

A SIMPLISMA algoritmus is lehetőséget ad az alkotóelemek számának matematikai becslésére, azonban ez a szakirodalom szerint is kevésbé megbízható, így célszerű egy szubjektív módon kiválasztott számmal felülbecsülni a lehetséges komponensek számát, majd vizuális ellenőrzéssel eldönteni, hogy a kapott spektrumok közül hány rendelhető eltérő kiindulási anyagokhoz. Ebben az esetben 10 tiszta komponens jelenlétét feltételeztem (ennél több komponens az esetek többségében nem tartalmaz egy tabletta korpusza).



4.2.3.ábra A tabletta Raman-térképéből SIMPLISMA módszerrel becsült komponens-spektrumok összehasonlítása a komponensekről felvett referencia-spektrumokkal

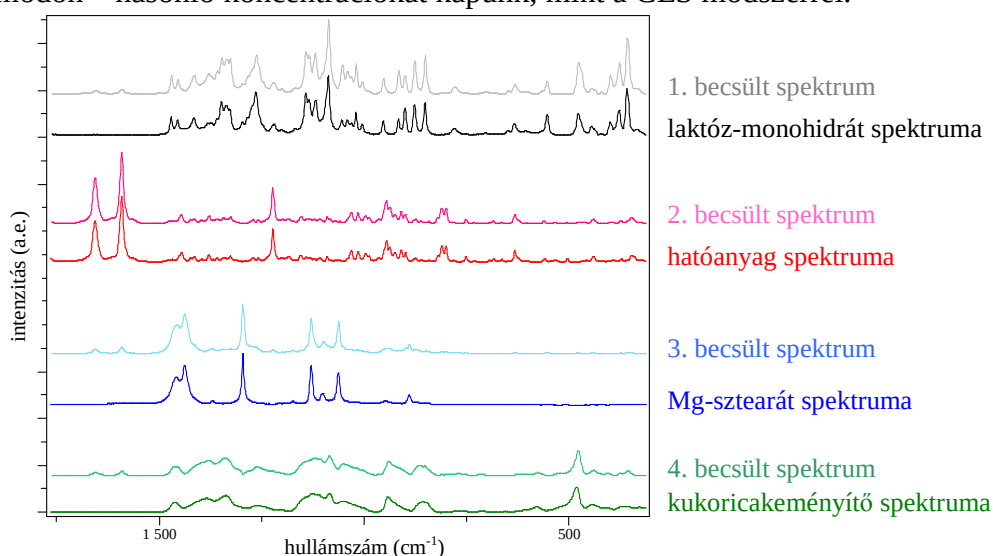
A 4.2.3. ábrán látható, hogy a módszer az első három komponens (hatóanyag, laktóz-monohidrát és magnézium-sztearát) a változók (hullámszámok) „tisztasága” alapján képes volt jól megbecsülni. A negyedik komponens (kukoricakeményítő) spektrumát azonban szemmel láthatóan kevésbé derítette fel. A spektrum még felismerhető benne, de már közel sem mutat olyan pontosságot, mint az ábrán fölötte lévő spektrumok. A módszer előnye, hogy a komponensek túlbecslése csak kis változást okoz a már megtalált spektrumokban, illetve az eljárás gyors, és könnyen újraszámolható kevesebb komponensre.



4.2.4. ábra: A „T” tabletta Raman-térképéből MCR-ALS módszerrel becsült spektrumok 4 komponensre

A többváltozós görbefelbontás-alternáló legkisebb négyzetek módszere (MCR-ALS) a fentiekkel ellentétben elméletileg sem alkalmas a komponensek számának meghatározására. Az eljárást csak úgy lehetett használni, ha megfelelő kiindulási becsléseket adunk meg. A komponensek száma lehet egy ilyen bemenő paraméter. Esetemben a SIMPLISMA által kapott 4 spektrumot adtam meg a program számára. (Ennél jóval pontatlanabb, durvábban becsült spektrumokkal is tud dolgozni a módszer.)

A 4.2.4. ábrán látható, hogy az MCR-ALS módszerrel szinte tökéletesen megkaptuk a kiindulási komponensek spektrumait. E módszer további előnye, hogy alkalmazásával – érthető módon – hasonló koncentrációkat kapunk, mint a CLS módszerrel.



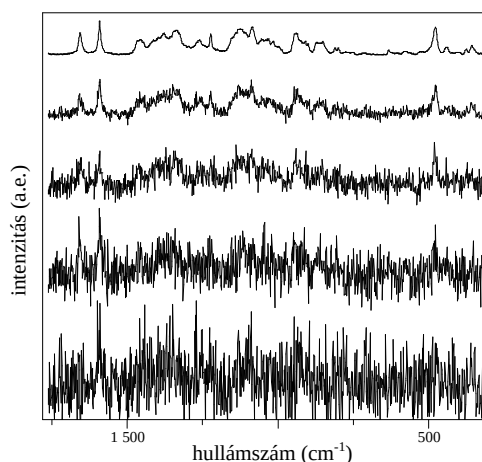
4.2.5. ábra A „T” tabletta Raman-térképéből PMF módszerrel becsült spektrumok 4 komponensre

A pozitív mátrix faktorizálás az MCR-ALS-hez alapjában hasonló, de lefutási módjában különböző iterálást végezve és pozitív megkötéseket érvényre juttatva jut el a megoldásokhoz (ld. 7.2.5. fejezet). Így a kapott spektrumok hasonlóan jó minőségűek lettek, mint az MCR-ALS esetén. Lényegi különbségek nem tűnnek fel a két módszer által kapott Raman-spektrumok között.

4.2.3. Zaj hatása a spektrumbecslés hatékonyságára

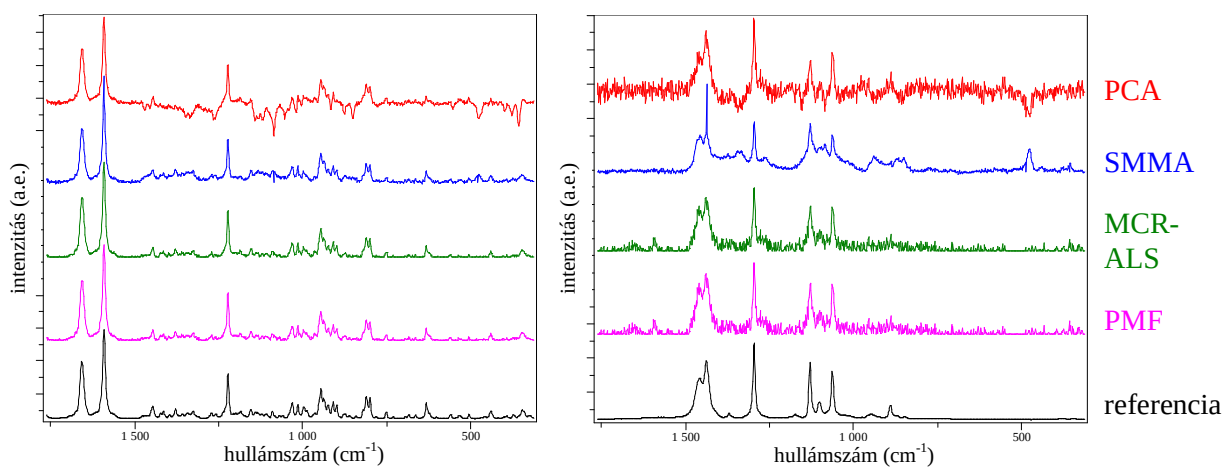
Egy Raman-térkép spektrumai többféle forrásból származó zajjal terheltek (pl. kívülről beérkező fotonok, detektor zaj). A felvételi idő növelésével a spektrumok csúcshintenzitásai egyre növekednek, így a jel-zaj viszony javul, a zajokat így kiküszöböljük. A négy kemometriaival történő vizsgálatokat zajjal terhelt spektrumokra is kiterjesztettem a Raman-térkép spektrumaihoz történő egyenletes, illetve normális eloszlású mesterséges zaj hozzáadásával. A zajok mértéke a Raman-térképen 1%-tól (a kísérlet során tapasztalt zajszint) egészen 50 %-ig terjedt. A 4.2.6. ábrán látható egy példa a spektrumok változására növekvő zaj mellett. Jól láthatóan 50 %-os zajszint esetén már a spektrumok nagyobb intenzitású csúcsai is alig különíthetők el a zajtól. Az általam vizsgált kemometriaival azonban

ilyen feltételek mellett is képesek a tabletta komponens spektrumait becsülni. A 10. ábrán a legnagyobb zajszintnél becsülhető hatóanyag illetve magnézium-sztearát segédanyag spektrumait ábrázoltam.



4.2.6. ábra. A Raman-térkép egyik spektruma a kísérleti (~1%) illetve 5%, 15%, 30% és 50% hozzáadott zajszint mellett

A spektrumok közti hasonlóság a korrelációs együtthatóval (correlation coefficient) és az illeszkedés hibájával (lack-of-fit, LOF) számszerűsíthető (4.2.1. táblázat). Ebből egzakt következtetéseket tudtam levonni.



4.2.7. ábra A baloldaliak a hatóanyag, míg jobboldaliak a Mg-sztearát 50%-os zaj esetén megállapított Raman-spektrumai (kivéve a Mg-sztearát spektrumának becslése SMMA-val, mert az SMMA esetében 15%-nál magasabb zajszint mellett nem volt becsülhető a Mg-sztearát spektruma)

A 4.2.1. táblázatban feltüntetett korrelációs együtthatók alacsony értékeiből látható, hogy a PCA nem volt képes megfelelően visszaadni a tisztakomponens-spektrumokat. Ezt a 4.2.2. ábra is illusztrálja. További, már említett hátránya a módszernek, hogy a keményítő spektruma a főkomponensek között nem is jelent meg.

4.2.1. táblázat A korrelációs együttható és LOF értékek, illetve a detektált komponensek különböző zajszinteknél.

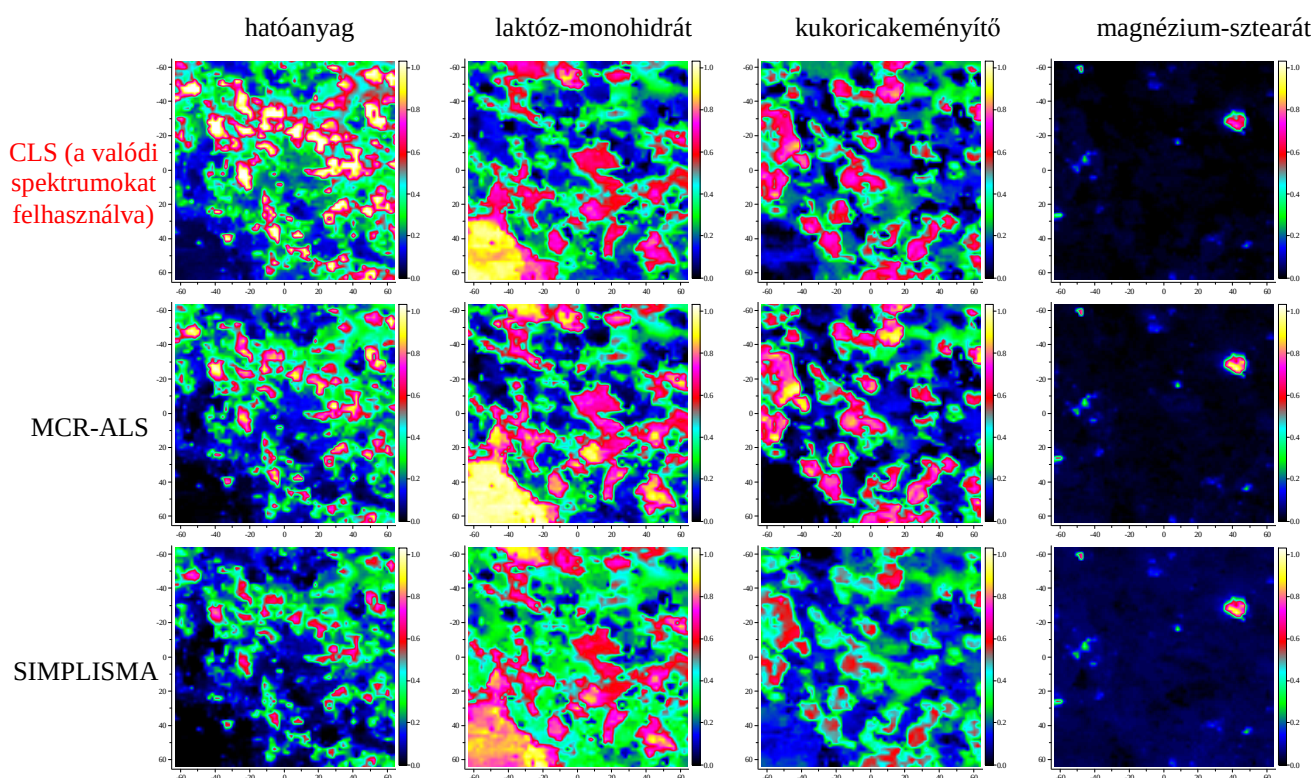
Komponens	Zajszint		Módszerek			
			PCA	SMMA	MCR	PMF
API	~1%	korr.	0,8459	0,9955	0,9956	0,9956
		LOF	73,2	10,0	9,2	9,2
	5%	korr.	0,8457	0,9944	0,9957	0,9956
		LOF	73,2	10,3	9,2	9,2
	15%	korr.	0,8456	0,9900	0,9958	0,9958
		LOF	73,3	12,2	9,4	9,5
	30%	korr.	0,8446	0,9892	0,9953	0,9954
		LOF	73,3	12,7	10,4	10,3
	50%	korr.	0,8415	0,9714	0,9935	0,9935
		LOF	73,7	20,7	13,1	13,1
Laktóz-monohidrát	1%	korr.	0,3542	0,9590	0,9586	0,9612
		LOF	125,6	23,4	23,4	22,5
	5%	korr.	0,3551	0,9589	0,9586	0,9593
		LOF	125,6	23,4	23,4	23,2
	15%	korr.	0,3520	0,9619	0,9606	0,9593
		LOF	125,8	22,5	22,8	23,2
	30%	korr.	0,3498	0,9544	0,9583	0,9582
		LOF	125,7	24,3	23,7	23,8
	50%	korr.	0,3443	0,9307	0,9546	0,9545
		LOF	126,3	29,9	24,9	24,9
Kukorica-keményítő	1%	korr.	-- ^a	0,9445	0,9398	0,9402
		LOF	-- ^a	27,0	26,4	26,1
	5%	korr.	-- ^a	0,9440	0,9402	0,9394
		LOF	-- ^a	27,0	26,4	26,3
	15%	korr.	-- ^a	0,9330	0,9383	0,9371
		LOF	-- ^a	28,4	26,5	26,9
	30%	korr.	-- ^a	0,9047	0,9336	0,9334
		LOF	-- ^a	33,9	27,8	27,9
	50%	korr.	-- ^a	-- ^a	0,9276	0,9270
		LOF	-- ^a	-- ^a	29,8	29,9
Magnézium-sztearát	1%	korr.	0,8936	0,9878	0,9853	0,9830
		LOF	56,8	14,5	16,6	18,3
	5%	korr.	0,8924	0,9103	0,9837	0,9822
		LOF	57,0	40,8	17,6	18,7
	15%	korr.	0,8855	0,8112	0,9780	0,9777
		LOF	57,8	57,1	20,7	21,1
	30%	korr.	0,8648	-- ^a	0,9708	0,9716
		LOF	61,2	-- ^a	23,2	23,2
	50%	korr.	0,7817	-- ^a	0,9329	0,9338
		LOF	72,1	-- ^a	34,6	34,5

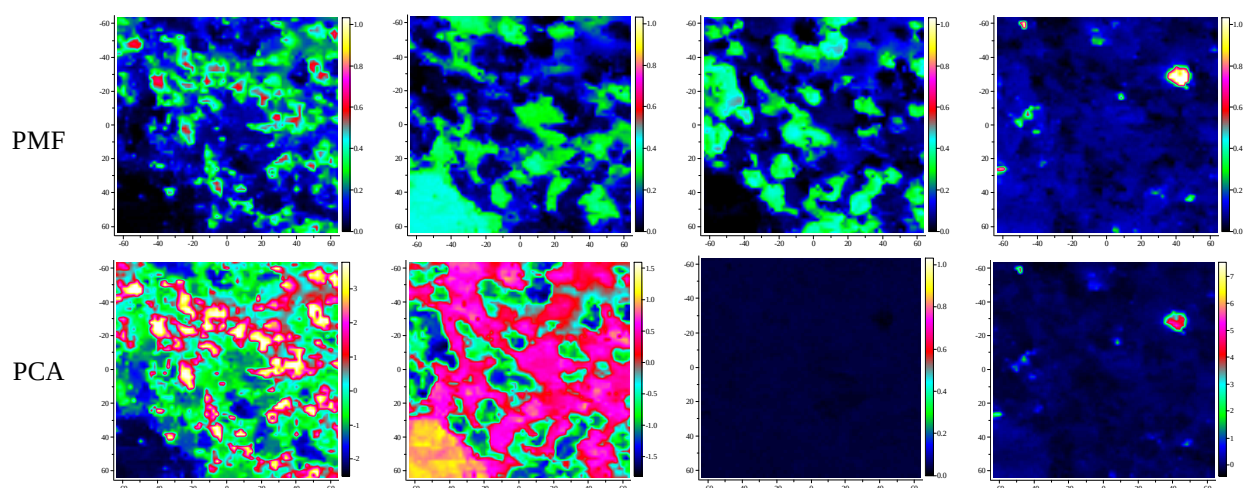
^a Nem volt detektálható

A görbefulbontással dolgozó módszerek (SMMA, MCR-ALS, PMF) zajmentes esetben egyaránt képesek voltak a összes előforduló tiszta spektrum kimutatására. Az SMMA a nagyobb mennyiségben előforduló (major) komponenseket az összes zajszint mellett megfelelően detektálta, azonban a csak igen kis mennyiségben jelenlévő minor komponenst (esetünkben a magnézium-sztearátot) a zaj növekedésével egyre rosszabb mértékben mutatta ki (lásd 4.2.1. táblázat). A két - különbözőképpen működő - PMF és MCR-ALS algoritmus a referenciákra szintén nagyon hasonlító tiszta spektrumokat adtak. Ez a két módszer a növekvő zajszintek mellett is bizonyítottan hatékonyan működött a modelltabletta esetén. Ezt jól illusztrálja a 4.2.7. ábra (látható, hogy a magnézium-sztearát 50 % zajjal terhelt térképekből kinyert becsült spektrumai is nagy hasonlóságot mutatnak a referenciával. A jellemző csúcsok egyértelműen beazonosíthatók (pl. 1296 cm^{-1}).

A módszerekből kapott spektrumokkal a CLS modellezéshez hasonlóan a Raman koncentráció-térképeket is létre tudtam hozni. Ezeket a 4.2.8. ábrán mutatom be. A képek alapján megfigyelhető, hogy tulajdonképpen mindegyik módszerrel megközelítőleg meghatározható a komponensek relatív térbeli eloszlása. A referencia módszerhez képest legpontosabb eredményt az MCR-ALS szolgáltatja (hiszen ezzel kaphatók vissza legjobban maguk a spektrumok is), a PCA pedig a leggyengébb eredményt adta, azaz csupán durva közelítésre alkalmas. Megjegyzendő, hogy a PCA módszer esetében a főkomponens-együtthatók (ún. score-ok) térképszerű ábrázolása annak ellenére aránylag jól láttatja heterogenitásokat, hogy csak három komponens alapján mutatja az eloszlást (a kukoricakeményítő spektruma nem volt azonosítható).

Fontos kiemelni, hogy Raman-térképezéssel a minor komponensek is jól detektálhatók. Ezt jól példázza a Mg-sztearát jó detektálhatósága, amely ugyan igen kis mennyiségben van jelen a tablettában, de mivel eloszlása heterogén, a spektruma és koncentráció-eloszlása - kis átlagos koncentrációja ellenére - egyaránt igen pontosan becsülhető.





4.2.8. ábra A „T”-tabletta komponenseinek eloszlástérképe a különböző kemometriai módszerekkel kinyert spektrumok alapján

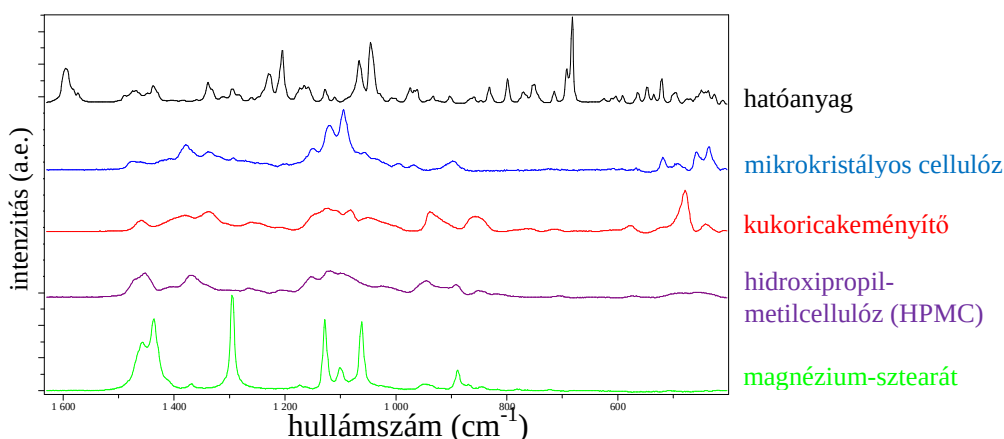
4.2.4. A Raman térképeket elemző kemometriai módszerek összevetésének összegzése

Ebben a részben a „T”-jelű modelltablettán bemutattam, hogy a Raman-mikrospektrometriában használt térképezés mint analitikai módszer a sokváltozós adatelemzési technikákkal kombinálva alkalmas teljesen ismeretlen minták összetételének és komponenseik térbeli koncentráció-eloszlásának meghatározására. Az eredmények alapján elmondható, hogy a cél elérésére többé-kevésbé mindegyik kemometriai módszer alkalmazható. Az SMMA jól használható komponensek számának becslésére, de 30 %-nál nagyobb zajok esetén a tiszta spektrumok jelentősebben romlanak. A MCR-ALS és PMF algoritmusokkal nagyon jó becsléseket lehet adni a tiszta komponensek spektrumaira még jelentős zaj megjelenésekor is.

A felderítő statisztikai módszerekkel kapott térbeli koncentráció-eloszlások a CLS-hez nagyon hasonló képet mutatnak, azaz ezen eljárások alkalmazásával egy tabletta vizsgálatakor - akár ismertek az összetevői, akár teljesen ismeretlen tablettáról van szó - ugyanolyan következtetésekre lehet jutni (gyártástechnológia, szemcseméret, homogenitás meghatározása). A legjobban kvalifikált specifikus módszereknek az MCR-ALS és a PMF, bizonyultak, amelyeket akkor is használhatunk, ha feltétlenül pontos információkra van szükség. Közelítő becslések elvégzésére a PCA is megfelelhet.

4.3. Eltérő gyártási technológiával készített modelltabletták vizsgálata homogén komponens-eloszlás esetén

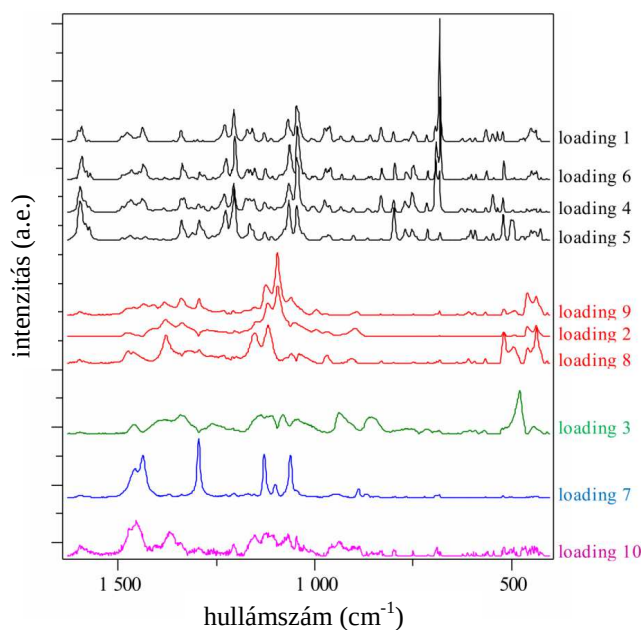
Az előző fejezetben bemutattam, hogy ismeretlen tabletta esetén milyen módszerek segítségével lehetett a komponensspektrumokat megkapni. Ekkor a sávok nagy változatossága sokat segített a komponensek megtalálásában. Azonban lehetséges olyan eset is, amikor egy ismeretlen tablettában valamelyik alkotó igen homogén módon oszlik el. A három vizsgált modelltabletta azonos összetétellel, de eltérő gyártási technológiával készült. A 4.3.1. ábrán láthatók az összetevők spektrumai, amelyeket a későbbi összehasonlításokhoz is felhasználtam.



4.3.1. ábra: A tabletták összetevőinek referencia Raman-spektrumai

4.3.1. A komponensspektrumok meghatározása

A főkomponens-analízis azt mutatta, hogy a tizedik-tizenötödik főkomponens utáni spektrumok főként eltérő mértékű zajból, az alapvonal ingadozásából és különböző csúcsokból álltak. A matematikai sajátértékek közül nem mindegyik mond sokat. A komponenseket túlbecsülve természetesen kaptam olyan spektrumokat, amelyek egymáshoz nagyon hasonlítottak. Feltételeztem, hogy ezek tulajdonképpen ugyanazt a komponenst mutatják, így a végleges becsléshez ezen hasonló spektrumok átlagát vettem. Egy Raman térkép pszeudorangja számítások alapján 10 és 30 közé esik, de törekedtem a minél kevesebb tényezőt használni. Ebben a törekvésben megerősített, hogy korábbi tanulmányok alapján minden esetben elegendő volt 10 főkomponenst használni. Így mindegyik módszer esetén 10 spektrumot választottam ki, kivéve a SISAL esetén, ahol 8 spektrum is elegendő volt. (Mert 8 felett szingularitási problémák adódtak.) A hatóanyag és a cellulóz spektrumok egyes csúcsainak polarizációs hatások okozta nagy változatosságai miatt 5 spektrum kiválasztása (valódi összetevők számának megfelelően) nem minden esetben volt elegendő az összes összetevő megtalálásához, azonban 10 kiválasztása esetén a legtöbb komponenst meg lehetett találni.



4.3.2. ábra: A 'D' tabletta Raman-térképéből MCR-ALS módszerrel kapott spektrumok

A 4.3.2-es ábra mutatja, hogy tapasztalati úton, hogyan rendeltem egymáshoz a hasonló spektrumokat. Példának a 'D' tabletta Raman-térképe alapján MCR-ALS módszerrel kapott első 10 becsült spektrumot mutatja az ábra. E szerint az 1, 4, 5 és 6 spektrumok a hatóanyag spektrumának felelnek meg, miközben a 2, 8 és 9 spektrumok a cellulóz Raman-spektrumához hasonlítanak. A 3, 7 és 10 spektrumokat sorrendben a keményítő, magnézium-sztearát és hipromellóz (HPMC) Raman-spektrumaihoz rendeltem. Ha nem ismerjük a referenciaspektrumokat, akkor is megtehetjük a csoportosításokat, amennyiben az egyes spektrumok közötti korrelációs együtthatókat kiszámítjuk. A 4.3.2. ábrához tartozó korrelációs mátrixot készítettem el. A 4.3.1. táblázatban láthatóak a számított együtthatók. A viszonylag nagyobb értékek alapján a spektrumokat egymáshoz rendeltem, de ehhez mindenképpen szükség volt szemrevételezéshez is.

4.3.1. táblázat: A 'D' tablettáról készült nagyfelbontású Raman-térkép alapján MCR-ALS-sel kapott spektrumok korrelációs mátrixa

	load. 1	load. 2	load. 3	load. 4	load. 5	load. 6	load. 7	load. 8	load. 9	load. 10
load. 1	1	0,02	-0,01	0,71 ^a	0,43 ^a	0,75 ^a	0,12	0,09	0,04	0,05
load. 2	0,02	1	0,47 ^b	0,13	0,06	0,10	0,19	0,45 ^a	0,55 ^a	0,90 ^b
load. 3	-0,01	0,47 ^b	1	0,06	0,00	0,01	0,07	0,35 ^b	0,42 ^b	0,33 ^b
load. 4	0,71 ^a	0,13	0,06	1	0,62 ^a	0,78 ^a	0,26	0,21	0,08	0,14
load. 5	0,43 ^a	0,06	0,00	0,62 ^a	1	0,62 ^a	0,15	0,23	0,12	0,09
load. 6	0,75 ^a	0,10	0,01	0,78 ^a	0,62 ^a	1	0,25	0,11	0,10	0,12
load. 7	0,12	0,19	0,07	0,26	0,15	0,25	1	0,25	0,25	0,40 ^b
load. 8	0,09	0,45 ^a	0,35 ^b	0,21	0,23	0,11	0,25	1	0,64 ^a	0,39 ^b
load. 9	0,04	0,55 ^a	0,42 ^b	0,08	0,12	0,10	0,25	0,64 ^a	1	0,51 ^b
load. 10	0,05	0,90 ^b	0,33 ^b	0,14	0,09	0,12	0,40 ^b	0,39 ^b	0,51 ^b	1

^a Nagy korrelációt mutató, egymáshoz tartozó spektrumok

^b Nem korrelációt mutató, de eltérő komponensekhez tartozó spektrumok

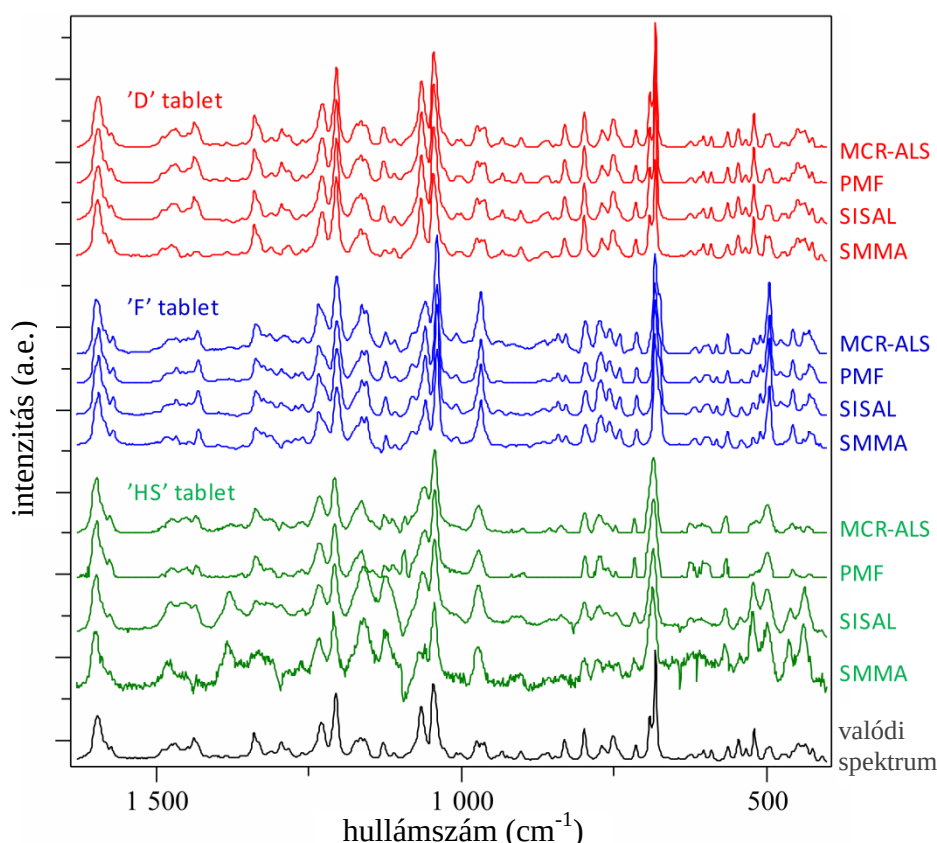
4.3.2. A különböző kemometriai módszerek eredményei

A tabletták gyártási technológiájától, a Raman-térképek felbontásától és a használt kemometriai módszerektől függően eltérő számú összetevőnek a Raman-spektrumát tudtam kinyerni az adatokból. Amennyiben az összetevők heterogén módon oszlottak el (a 'D' tabletta esetén) és 100×-os nagyítású térképet használtam, akkor a MCR-ALS-sel és a PMF-fel mindegyik komponenst detektálni tudtam. A SISAL és SMMA módszerek a HPMC spektrumát nem voltak képesek kiadni valószínűleg azért mert nagy a hasonlóságuk a keményítő spektrumához. A 'HS' és az 'F' tabletta vizsgálatakor mindegyik módszer csak 4 komponenst tudott kimutatni. A nedves technológiákban a kis mennyiségű HPMC eloszlása kevésbé volt heterogén, jobban diszpergálódott, így egyik kemometriai módszerrel sem tudtam a tiszta Raman-spektrumát megkapni.

A 10×-es nagyítású térképek esetén a metódusok kevesebb eredmény adtak. A 'D' és 'F' tabletták kisebb felbontású térképeiből négy komponensspektrumot (hatóanyag, cellulóz, keményítő, HPMC) lehetett találni az MCR-ALS és a PMF módszereket használva. A

magnézium-sztearát spektrum kimutatásának hiánya kísérleti okokra vezethető vissza. Ugyanis nagyon kis szemcseméretben és kis mennyiségben fordult elő e segédanyag a tablettákban, így a 10×-es nagyítás használatakor a kimutatási határa alá került. A SISAL és az SMMA az ötből mindössze három spektrumot derített fel, hiszen a HPMC-nek nem voltak elég szelektív csúcsai. A 'HS' tabletták kis felbontású Raman-térképét vizsgálva az MCR-ALS, a SISAL és a PMF esetén három komponens (cellulóz, keményítő és hatóanyag) spektrumát tudtam az adatokból kiszedni. Eközben az SMMA két spektrumot tudott felderíteni: a keményítőét és a hatóanyag valamint a cellulóz jellemző csúcsaiból képzett keverékspektrumot.

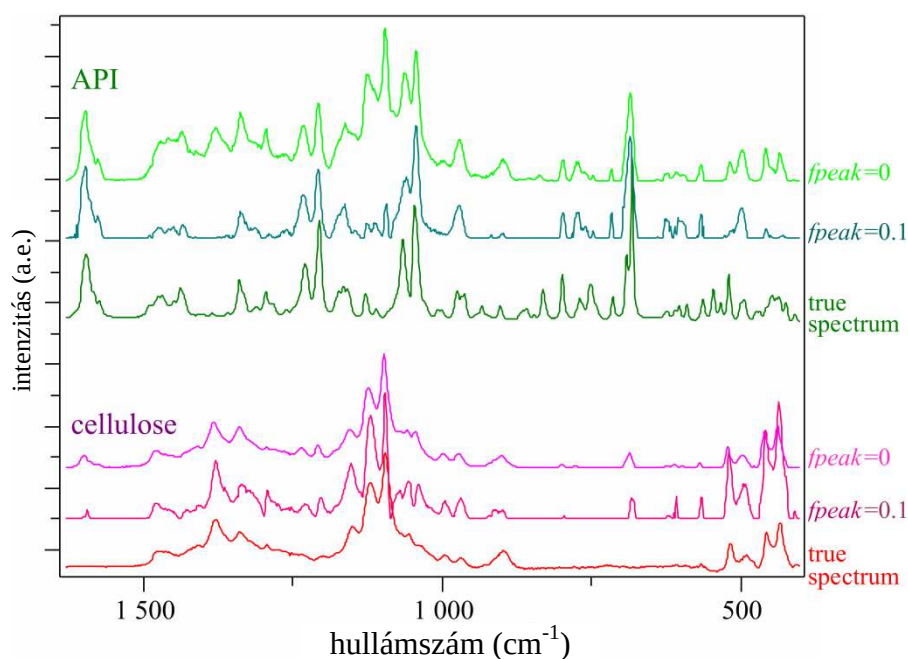
A nagyobb felbontás nemcsak több komponens felderítését teszi lehetővé, hanem a kinyert tiszta spektrumok minőségén is javít. Ugyanis 100×-os nagyítás mellett a kisebb felvett mintatérfogatban nagyobb valószínűséggel lesz kevesebb komponens, mint a 10×-es nagyítással felvett nagyobb mintatérfogatban. Így a 100×-os nagyítás mellett nagyobb a mért spektrumok változatossága, amely segíti a módszerek hatékonyabb működését. Minden további közölt vizsgálati eredmény a nagyobb felbontás esetére vonatkozik, hiszen a kemometria módszerek is jobban működtek a 100×-os nagyítással végzett vizsgálatok mellett.



4.3.3. ábra: A becsült hatóanyagspektrumok különböző tabletták esetében valamennyi vizsgált kemometria módszerrel feldolgozva

A 4.3.3. ábrán mutatom be a tiszta spektrumok becslését a hatóanyag példáján valamennyi használt kemometria módszerrel mindhárom tablettára vonatkozóan. A kapott spektrumok az ábra alján lévő referenciaspektrummal hasonlíthatók össze. A 'D' tabletták nagy felbontású Raman-térképéből kapott spektrumok és az eredeti spektrum között elhanyagolható

különbség adódott. Az 'F' tablettához rendelhető becsült hatóanyag-spektrumok némileg mindegyik esetben eltérnek. Ez adódhat abból, hogy a hatóanyagban polimorf átalakulás ment végbe a granulálás során. Az eltérés a 'HS' tablettá esetén - melyben a hatóanyag eloszlása meglehetősen homogén - azonban evvel önmagában nem magyarázható. A becsült és az eredeti spektrum között jelentősebb eltéréseket találtam. Míg az MCR-ALS és a PMF jó minőségben választotta el a többtől a hatóanyag spektrumát, addig a SISAL és az SMMA által kapott spektrumok tartalmaztak pozitív (pl. 436, 1120, 1380 cm^{-1}) és negatív (1095 cm^{-1}) csúcsokat is a cellulóz spektrumából. Ezeket a torzításokat megfigyeltem az MCR-ALS és a PMF spektrumokon is, de ott a mértéke nagyon csekélynek mutatkozott. Úgy tűnik, hogy ez a két módszer (MCR-ALS és PMF) egyaránt jól használható még csaknem teljesen homogén hatóanyag-eloszlás esetén is. Minazonáltal meg kell említem, hogy amíg az MCR-ALS egyidőben mindegyik spektrumra megfelelően jó becslést adott, addig a PMF ugyanezt nem tudta megvalósítani. Alapbeállítás mellett ugyanis ($f_{peak}=0$) jelentős cellulóz jel megjelenés tűnt fel a hatóanyag spektrumán. Ugyanakkor ezt a spektrumromlást az „ f_{peak} ” paramétert megnövelve (a legjobb eredmény $f_{peak}=0,1$ -nél figyeltem meg) ki lehetett küszöbölni,



4.3.4. ábra: PMF-fel becsült hatóanyag és cellulóz spektrumok a 'HS' tablettára eltérő algoritmus paraméterek mellett

bár mindez a többi összetevő spektrumának a romlását okozta. Ezt a hatást mutatja a 4.3.4. ábra. Tehát olyan esetekben, amikor egy ismeretlen készítmény vizsgálatára kerül sor (pl. illegális készítmény) sokkal nehezebbé válik a belső paraméter beállítása, ahol semmi nem utal arra, hogy milyen f_{peak} érték mellett érdemes PMF algoritmus használni.

A 4.3.2. táblázatban összefoglalva láthatók mindegyik számított spektrum és az eredeti referenciaspektrumok közötti korrelációs együttható és az illeszkedés hiányának (lack-of-fit) értékei. Ezek a számértékek igazolják az a 4.3.3. ábra alapján tett állításokat is. A hatóanyag-spektrumokat legjobban az MCR-ALS és a PMF módszerekkel lehetett megbecsülni.

Utóbbinál a megtalált *fpeak* belső paraméter állításával jártam el. A SISAL és az SMMA jelentősen rosszabb, amennyiben a hatóanyagnak eloszlása homogén volt a tablettában.

4.3.2. táblázat: A nagyfelbontású Raman-térképekből kinyert spektrumok minőségének számított értékei

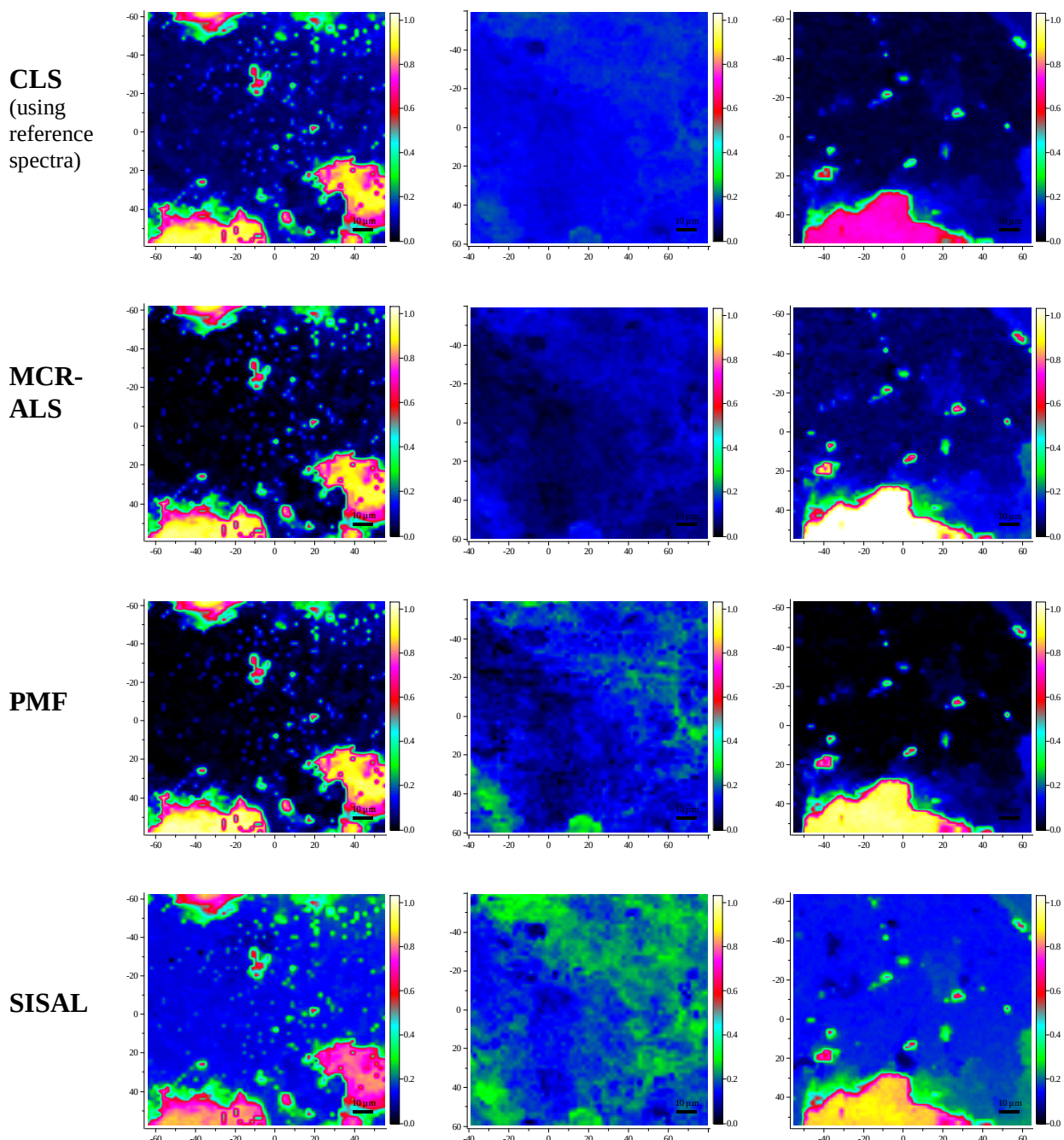
Összetevő	Gyártási tétel (technológia)	Korrelációs együtthatók				Lack of fit %			
		MCR- ALS	PMF ^a	SISAL	SMMA	MCR- ALS	PMF ^a	SISAL	SMMA
Hatóanyag	D	0,9930	0,9939	0,9914	0,9595	9,72	9,20	12,24	24,40
	HS	0,8608	0,8416 (0,5515)	0,7479	0,5839	42,93	47,61 (75,21)	58,76	72,16
	F	0,7865	0,7806	0,7671	0,7598	52,80	53,83	56,28	59,74
Cellulóz	D	0,9856	0,9945	0,9866	0,9803	14,84	9,22	15,83	17,39
	HS	0,9647	0,8262 (0,9687)	0,9735	0,9685	22,00	49,23 (21,24)	19,49	20,89
	F	0,9770	0,9803	0,9824	0,9803	18,16	16,77	20,68	17,39
Keményítő	D	0,9601	0,9403	0,9041	0,8508	20,61	25,14	33,10	49,59
	HS	0,9679	0,9392 (0,9682)	0,9606	0,8973	19,01	29,25 (18,59)	20,67	36,73
	F	0,9366	0,9613	0,7570	0,8526	28,24	21,71	55,94	42,68
Mg- sztearát	D	0,9932	0,9939	0,9026	0,9486	10,56	10,07	41,36	31,21
	HS	0,9616	0,9523 (0,9610)	0,9335	0,9294	24,97	29,76 (25,46)	34,84	34,58
	F	0,9962	0,9957	0,9909	0,9703	7,97	8,50	14,65	22,34
HPMC	D	0,8566	0,6670	--	--	40,18	58,67	--	--
	HS, F	--	--	--	--	--	--	--	--

^a A zárójelen kívüli értékek a hatóanyagra kapott legjobb eredményeket mutatják (*fpeak*=0.1), a zárójelen kívüli értékek a segédanyagokra vonatkozó legjobb eredmények (*fpeak*=0).

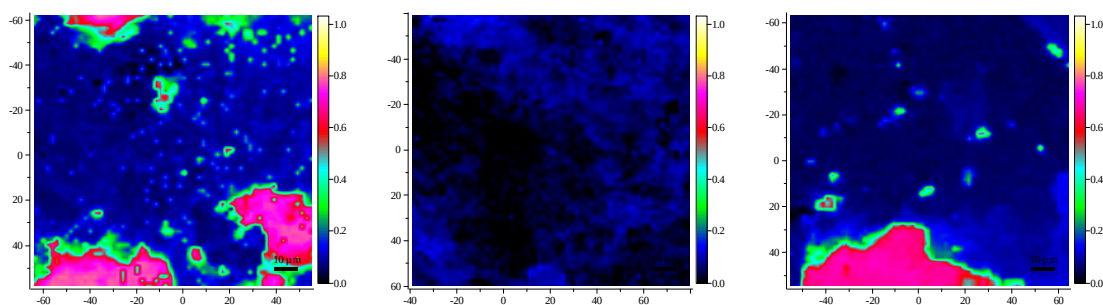
A hatóanyagot vizsgálva, a 'HS' és az 'F' tabletták esetében kisebb korrelációs és nagyobb LOF értékek adódtak, mint a 'D' tabletta esetében. Ez a már említett okkal, a hatóanyag polimorf átalakulásával magyarázható.

A segédanyagok esetében is különbségeket tapasztaltam az értékek között. A cellulózzal általánosságban elmondható, hogy a spektrumát bármelyik alkalmazott kemometria módszerrel jó közelítéssel megkaptam. Ennek két alapvető oka lehet. Egyrészt ez az összetevő volt jelen minden tablettában a legnagyobb mennyiségben. Másodsorban Raman spektrumában több elkülönülő, éles -csúcs könnyíti meg az azonosítást. A magnézium-sztearát esetében kissé nagyobb szórások vannak, de az éles rezgési csúcsainak köszönhetően a spektrumát kis koncentrációja ellenére is mindegyik alkalmazott technikával jól rekonstruáltam. A keményítő spektrumában is van néhány majdnem különálló csúcs, elválaszthatósága a többi spektrumtól mégis nehezebb volt. Az MCR-ALS és a PMF becslése jól korrelált és megfelelően illeszkedett az eredeti spektrummal, miközben a SISAL és az SMMA átlagosan rosszabb eredményeket adott. A HPMC spektrumokat csak a 'D' tabletta vizsgálatakor az MCR-ALS és a PMF módszerekkel tudtam kinyerni, és az előbbi pontosabban becsülte ennek az összetevőnek a spektrumát. A PMF oszlopaiban látható zárójelezett és nem zárójelezett értékek közti különbségek alátámasztják a 4.3.4. ábrából levont következtetéseket.

Miután meghatároztam a detektálható komponensek számát és spektrumát ezek alapján megvizsgáltam a koncentrációk kiszámíthatóságát is. A spektrumok számának (korábban említett) szándékos túlbecsülése miatt, csak bizonyos spektrumok átlagolása után megkapott végső becsült tiszta spektrumokat használva alkalmaztam a legkisebb négyzetek módszerét (CLS) a koncentrációk becslésére. A 4.3.5. ábrán a különböző tablettákban lévő hatóanyag eloszlástérképeit ábrázoltam. Szemre is jól látható, hogy az MCR-ALS majdnem ugyanolyan



SMMA



4.3.5.ábra: A különböző módszerekkel becsült hatóanyag eloszlásai a Raman-térképeken koncentrációtérképet mutat, mint a referenciaspektrumokat felhasználó CLS. Elviekben az MCR-ALS-sel kapott képek akár még jobban is közelítik a valóságot mint a CLS. Ugyanis az MCR-ALS tekintetbe veszi a hatóanyag lehetséges polimorfiajának változását. Ezt CLS-sel nem tudnánk kivitelezni, mert a referencia spektrum csak egyféle polimorf változatot mutat. Sok esetben bizonyos polimorf módosulatok csak a készítményben a formuláció során keletkeznek, és tisztán elő sem állíthatók, hogy abból referencia spektrumot tudjunk felvenni.

A becsült spektrális koncentrációk mindegyik összevőre összehasonlíthatók, melyet különböző statisztikai jellemzőkkel a 4.3.3. táblázatban foglaltam össze. Ezen illesztési paraméterek átlaga alkalmas a valódi koncentrációk becslésére. Látható az értékekből, hogy az átlagkoncentrációk becslésében az MCR-ALS és a PMF bizonyult a legjobbnak amennyiben legalább kissé heterogén volt a hatóanyag-eloszlás ('D' és 'F' tabletták esete). Homogén hatóanyag-eloszlás esetén viszont nem tudtam egyértelmű trendet megfigyelni abban a vonatkozásban, hogy melyik módszer mutatta a legkisebb különbséget a referencia CLS módszerhez képest.

A relatív szórások a komponensek heterogenitásával hozhatók összefüggésbe. A 4.3.3. táblázatban megadott értékekből látni lehet, hogy a CLS relatív szórásértékeit a legtöbb esetben a legjobban az MCR-ALS és az SMMA közelítette meg. Azokban az esetekben, ahol az SMMA produkálta a CLS-hez legközelebbi relatív szórás értékeket, ott a második mindig az MCR-ALS lett. A SISAL-lal is közeli szórás értékeket kaptam a CLS-hez, míg a PMF a többihez képest a legkevésbé hasonló értékeket adta.

4.3.3. táblázat: A referencia és becsült spektrumokból meghatározott koncentrációk statisztikai jellemzői

		hatóanyag					cellulóz				
		CLS (ref.)	MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA	CLS (ref.)	MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA
'D' tabletták	átlag%	21,3	17,3	22,2	25,0	18,4	72,5	74,2	62,1	57,1	64,7
	rel.sz. %	25,9	27,4	29,8	20,7	20,4	26,0	28,2	30,9	19,5	23,7
	RMSD% ^a		4,0	5,9	6,6	6,4		6,4	12,1	16,9	8,2
'HS' tabletták	átlag%	15,3	7,7	16,1 ^b	19,8	2,6	74,5	67,9	65,0 ^b	62,5	79,3
	rel.sz. %	2,1	2,6	6,5 ^b	4,7	2,2	7,0	7,2	13,2 ^b	8,2	7,1
	RMSD% ^a		7,6	4,7 ^b	5,3	12,7		6,7	11,8 ^b	12,1	5,1
'F' tabletták	átlag%	13,5	17,5	15,2	25,2	35,5	76,2	68,0	70,1	59,0	3,3
	rel.sz. %	20,9	26,2	27,8	20,0	15,3	25,1	23,2	28,2	18,4	1,5
	RMSD% ^a		6,7	8,2	12,0	24,2		8,7	9,2	18,7	76,6

		keményítő					Mg-sztearát				
		CLS (ref.)	MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA	CLS (ref.)	MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA
'D' tabletta	átlag%	4,3	3,8	0,8	12,2	1,8	1,9	3,6	8,8	5,8	15,0
	rel.sz. %	4,5	4,1	9,4	4,9	4,3	3,1	5,3	6,3	5,8	4,0
	RMSD% ^a		3,4	6,7	8,2	3,5		3,7	9,2	4,8	13,2
'HS' tabletta	átlag%	6,0	7,1	10,8 ^b	12,0	2,7	4,2	17,3	8,0 ^b	5,7	15,4
	rel.sz. %	5,8	5,4	11,2 ^b	6,9	5,2	3,7	4,6	6,3 ^b	6,4	4,6
	RMSD% ^a		1,3	7,8 ^b	6,5	3,6		13,1	4,7 ^b	3,0	11,2
'F' tabletta	átlag%	7,6	7,2	0,6	8,1	20,8	2,8	7,3	14,1	7,7	40,4
	rel.sz. %	8,1	5,5	11,6	4,7	10,2	6,5	7,0	8,4	8,1	14,0
	RMSD% ^a		7,3	9,1	5,7	15,4		4,6	12,0	5,2	39,2

^a A referenciaspektrumokra kapott CLS koncentrációkhoz viszonyított átlagos középérték eltérések.

^b Kapott PMF koncentrációk a spektrumbecslésre használt $f_{peak} = 0.1$ értéknél a hatóanyagra és $f_{peak} = 0$ értéknél a segédanyagokra.

A Raman-térkép alapján a becsült spektrumokból megállapított koncentrációkat egyenként is össze tudtam hasonlítani a CLS-sel meghatározott koncentrációkkal. Így számítottam ki az átlagos középérték eltéréseket (százalékosan), hogy megnézzem, melyik módszerekhez rendelhető koncentrációk hasonlítottak a legjobban a CLS értékekhez. Ebben a vonatkozásban átlagosan az MCR-ALS volt a legjobb annak ellenére, hogy a 'HS' tablettában és az 'F' tablettában lévő keményítőre sem a legkisebb értéket adta. Egyes esetekben a SISAL-t viszonylag jónak találtam. Az SMMA teljesítménye tágran ingadozott komponensenként illetve aszerint, hogy milyen eljárással készült a tabletták. Ez alkalmatlanná teszi ezt a módszert a gyakorlati használatra. A PMF jó eredményeket mutatott, de ahogy a 'HS' tabletták esete is mutatja, nem tudott minden spektrumra azonos beállítások mellett ugyanolyan jó eredményeket szolgáltatni. Ez bizonytalanságokat okoz, ha valaki ez a módszert választja egy valóban teljesen ismeretlen komponens Raman-térképének elemzéséhez.

4.3.3. Összegzés a tabletták vizsgálatához

A bemutatott vizsgálatokból látható, hogy a használt görbefelbontáson alapuló módszerek számára - amelyek általában nagyon hasonló pontossággal működnek - kihívást jelentenek azok az esetek, amikor az ismeretlen tablettában legalább az egyik komponens eloszlása majdnem teljesen homogén (szűk koncentrációtartományban fordul elő). A legnagyobb számú tiszta komponensspektrumokat az MCR-ALS illetve a PMF volt képes megtalálni, illetve ezek a módszerek becsülték meg a legnagyobb pontossággal az összetevőket. Az MCR-ALS és a PMF egyaránt pontos becslést tud adni a tiszta komponens spektrumokra, de csak az MCR-ALS módszer az, amelyik akkor is magas minőségű becsléseket ad mindegyik komponensre, ha az egyik komponens koncentrációja (esetemben a hatóanyag) csaknem konstans. A PMF eltérő paraméterek beállítása mellett többszörös futtatást kívánt, hogy mindegyik komponensspektrumot jó minőséggel tudja visszaadni.

Bizonyítottam, hogy a SISAL és az SMMA módszer érzékenyebb a homogenitásra. A SISAL és az SMMA is meglehetősen tisztán adta meg a komponensspektrumokat, de a hatékonyságuk az előző két módszeré alatt maradt. Ezek az algoritmusokban rejlő részletekkel magyarázhatók. A SISAL a spektrumokra nem alkalmaz nem-negativitási

megszorításokat, így nyilván előjöhetnek negatív (értelmetlen) csúcsok is. Másrészt a komponenseket magukba rejtő szimplexen alapuló megközelítés akkor jó, ha a kísérleti spektrumok a szimplex oldalain eloszlanak (változatosabbak). Ha egy komponens egyenletesen oszlik el (mint például a 'HS' tabletta esetén), akkor ez nem teljesül.

Az SMMA gyengébb teljesítőképességét az okozhatja, hogy a kiválasztott tiszta hullámszámoszlopok nem teljesen tiszták, zajjal szennyezettek. Homogén esetben tovább ront a módszer hatékonyságán az a tény is, hogy a szűk eloszlású tiszta csúcson megjelennek a zajok. Ez jelentősen befolyásolja a számítást.

4.4. Hasonló szerkezetű összetevők tiszta Raman-spektrumainak becslése kemometriai módszerekkel

Az 4.2 fejezetben bemutatam, hogy az összetevők térbeli eloszlása megfelelő matematikai eljárások segítségével felderíthető akkor is, ha az összes alkotó Raman-spektrumát a készítményről felvett Raman-térképből kell megbecsülni. Az 4.2. fejezetben vizsgált tabletta egy éles, intenzív rezgési sávokkal rendelkező hatóanyagból és három szokványos, igen gyakran alkalmazott segédanyagból (laktóz-monohidrát, kukoricakeményítő, magnézium-sztearát) állt. Ezen alkotók Raman spektrumai – az összetevők igen eltérő kémiai szerkezetéből következően – nagymértékben különböztek egymástól. Másképpen fogalmazva e spektrumok ortogonálisnak tekinthetők, ezért a kemometriai módszerekkel történő szétválasztásuk elméletileg sem jelent nagy kihívást. A 4.3. fejezetben megvizsgált három tabletta összetevőinek Raman-spektrumai (4.3.1. ábra) is felderíthetőek voltak, habár a HPMC spektrumát csak a 'HS' tablettában tudtam kimutatni.

A gyakorlatban azonban számos olyan termék létezik, ahol a készítményben több, igen hasonló Raman-spektrummal jellemezhető komponens is jelen van (vagy jelen lehet). Akár teljesen ismeretlen (hamisított vagy illegális) vagy rosszul jellemzett készítmények is lehetnek a vizsgálat tárgyai, amelyekben olyan összetevők vannak, melyek Raman-spektrumai nagymértékben átfednek egymással. A két leggyakoribb ilyen eset a következő: ha egy gyógyszer-tablettában több hasonló kémiai szerkezetű segédanyagot alkalmaznak (pl. többféle cellulóz-származék ugyanabban a tablettában, illetve ha valamelyik alkotó – főként a hatóanyag – több különböző polimorf módosulatban is jelen van a készítményben). Jelen fejezetben azt terveztem megvizsgálni, hogy egymással erős korrelációt mutató spektrumok is szétválaszthatók-e felderítő statisztikai és jelfeldolgozó módszerekkel.

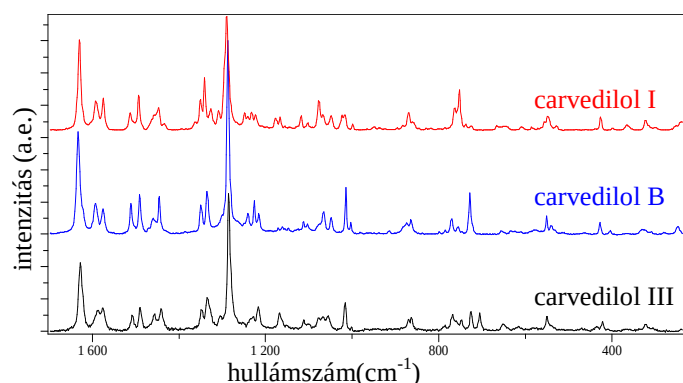
4.4.1. Gyógyszerpolimorfok Raman-spektrumainak becslése

4.4.1.1. Háromkomponensű keverék vizsgálata

Az első modellem a carvedilol hatóanyag három polimorf módosulatából állt. A carvedilol I, B és III-as típusú polimorf módosulatát vetettem össze egymással. A módosulatokat egyenlő tömegarányban összekevertem, majd a porkeverékről a 3.2.2.4. fejezetben leírt módon Raman-térképet készítettem.

Amint a 4.4.1. ábrán látható, a három Raman-spektrum erősen átfed. Főleg az B és a III típusok között fedezhető fel sok hasonlóság. Így várhatóan még nehezebbé válik az egyes

tiszta spektrumok kinyerése a halmazból. Az alkalmazott por állagú minták tisztaságát por-röntgendiffrakcióval ellenőriztem.



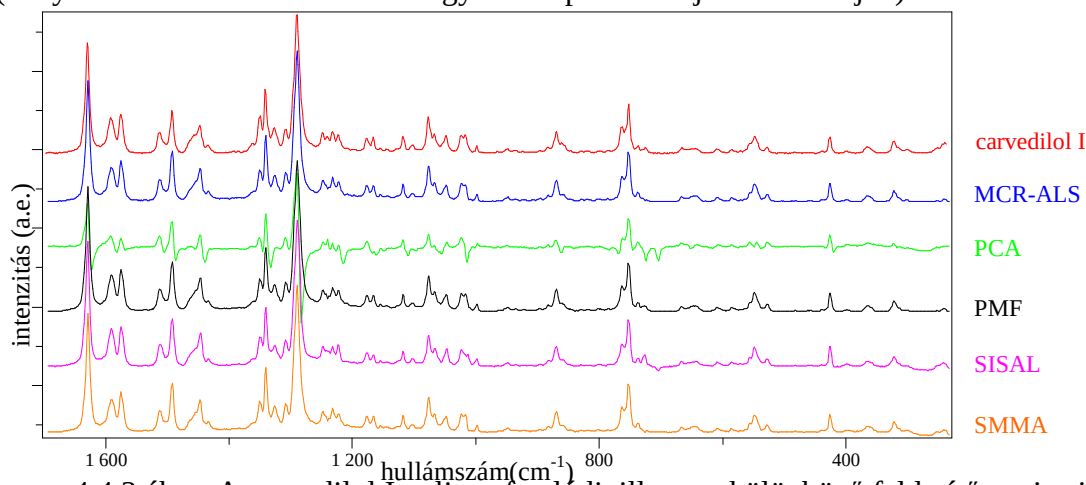
4.4.1.ábra A három carvedilol-polimorf spektruma

Az egyes polimorfok 1:1:1 arányú keverékének térképezésekor az egyes térkép-spektrumok felvételi ideje 5×1 s volt. Ez a rövid idejű gerjesztés elegendően nagy intenzitású csúcsokat adott, így az egész vizsgálat nem tartott tovább másfél óránál. A kapott 841 mérési pont már elegendő volt arra, hogy abból elválasszam a tiszta komponensek Raman-spektrumait. Az elválasztás pontosságát öt felderítő statisztikai módszerrel vizsgáltam, amelyek a következők:

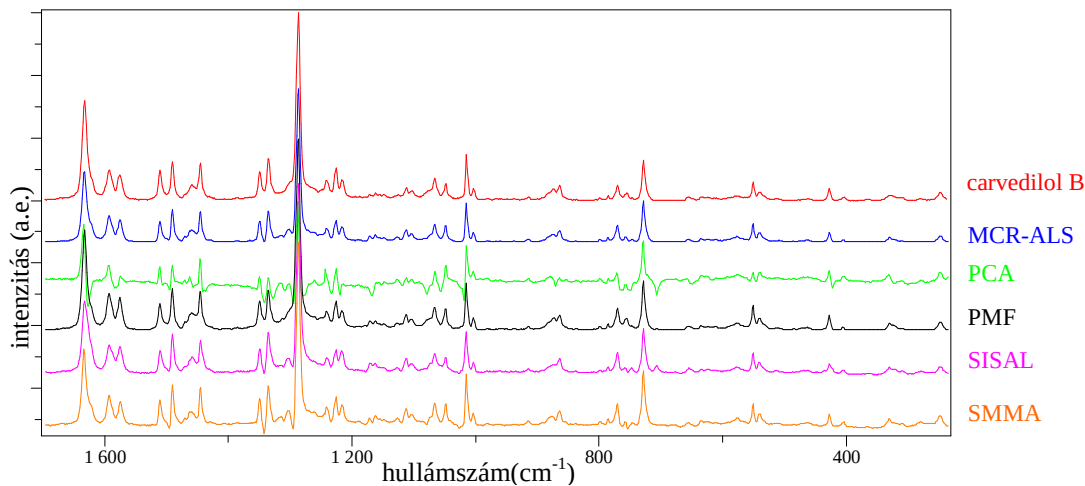
- főkomponens analízis, principal component analysis, PCA
- önmodellező keverékelemzés, self-modeling mixture analysis, SMMA
- többváltozós görbefulatás– alternáló legkisebb négyzetek módszere, multivariate curve resolution – alternating least squares, MCR-ALS
- simplex identification via split augmented Lagrangian, SISAL
- positive matrix factorization, PMF

A módszerek változó eredményességgel tudták megbecsülni a megfelelő tisztakomponens-spektrumokat az adathalmaz alapján. Az egyes módszerek által becsült spektrumok a 4.4.2. -4.4.4. ábrákon láthatók.

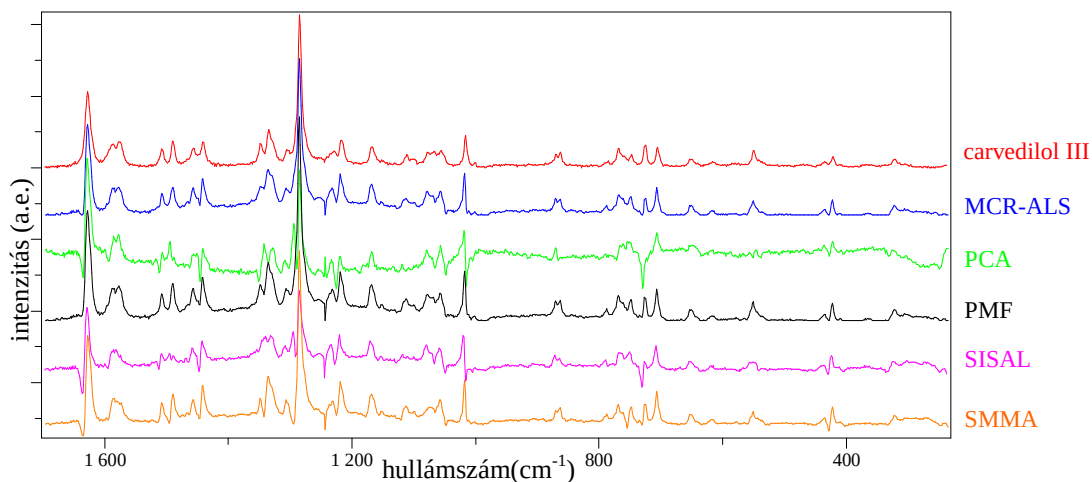
A főkomponens-elemzés esetében a keverék öt legnagyobb szinguláris értékű főkomponensét vizsgáltam meg, és ezek közül a második, harmadik és negyedik komponenst ábrázoltam, mert ezek hordozták valamelyest a tiszta spektrumok jegyeit. Látható, hogy a PCA nem szolgáltat megfelelő minőségű spektrumokat: egyrészt zavaró negatív csúcsok vannak jelen (ami elkerülhetetlen ennél a módszernél), másrészt pedig a pozitív sávok helyzete sem mindig egyezik meg a megfelelő referenciaspektrumban lévő sávokkal. (Helyenként összecszerelődnek az egyes komponensek jellemző sávjai.)



4.4.2.ábra: A carvedilol I polimorf valódi, illetve a különböző felderítő statisztikai módszerekkel becsült spektruma



4.4.3.ábra: A carvedilol B polimorf valódi, illetve a különböző felderítő statisztikai módszerekkel becsült spektruma



4.4.4.ábra: A carvedilol III polimorf valódi, illetve a különböző felderítő statisztikai módszerekkel becsült spektruma

Az SMMA módszerrel történő vizsgálat a 708, 731 és 1296 cm^{-1} hullámszámoknál lévő intenzitásérték változására épült (mely sávokat az algoritmus maga találta meg az adatmátrix oszlopainak a 7.2.3. fejezetben leírt statisztikai vizsgálata alapján). Az első értéknél található csúcs a III-as módosulatra, a középső a B polimorfra, míg az utóbbi az I-esre jellemző. Ez a módszer is viszonylag jó minőségű spektrumokkal szolgált. A SISAL módszer a carvedilol I és B spektrumai esetében jó eredményeket szolgáltatott, ellenben a III módosulat spektrumát meglehetősen rossz minőségben adta ki. Az MCR-ALS-sel történt vizsgálat jó eredménnyel zárult, csakúgy, mint a PMF módszer.

A fenti megállapításokat a becsült és a valódi tiszta Raman-spektrumok korrelációs koefficienseinek értékei is tükrözik. Az értékeket a 4.4.1. táblázatban foglaltam össze.

A táblázatból kitűnik, hogy a legrosszabbul az I-es, míg legjobban a B hatóanyag-polimorf Raman-spektrumát sikerült elválasztani. Általánosságban véve a legjobb korrelációt a tiszta hatóanyag-polimorfok spektrumaival a PMF módszerrel becsült spektrum adta. Az MCR-ALS és az SMMA is jól korreláló spektrumokat adott. A SISAL egyedül a III-as

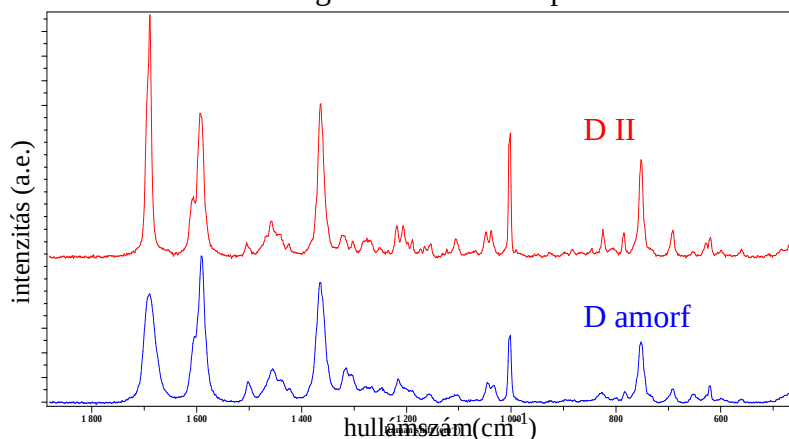
polimorf esetén adott gyengébb hasonlóságot az eredetihez viszonyítva. A PCA eredményein látszik, hogy a módszer ilyen mértékű hasonlóságot mutató spektrumok elválasztására nem alkalmas.

4.4.1. táblázat: A három módosulat becsült és referencia-spektrumainak korrelációs együtthatói

	MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA	PCA
Carvedilol I	0,8300	0,8552	0,8315	0,8360	0,0290
Carvedilol B	0,9364	0,9332	0,9550	0,9167	0,3545
Carvedilol III	0,9095	0,9144	0,7652	0,9086	0,4740

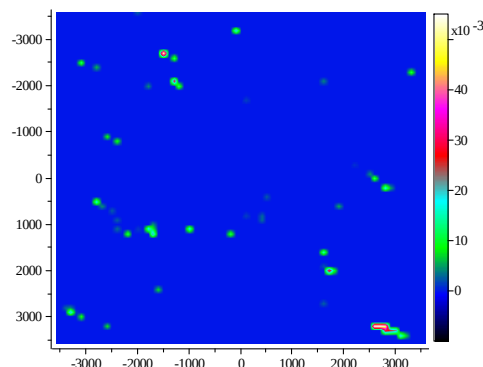
4.4.1.2. Amorf gyógyszerhatóanyag kristályosodásának kimutatása

A D hatóanyag kristályos és amorf formájának spektrumai között nagyon elenyészőek a különbségek, ahogy a 4.4.5. ábra is mutatja.. A különbség legjobban az amorf módosulat 1689 cm^{-1} -nél lévő csúcsának a II-es típusú kristályos módosulat 1691 cm^{-1} felé való tolódásában nyilvánul meg. Továbbá a kristályos fázisra jellemző csúcsnak nagymértékben megnő az intenzitása és csökken a félértékszélessége az amorfhoz képest.



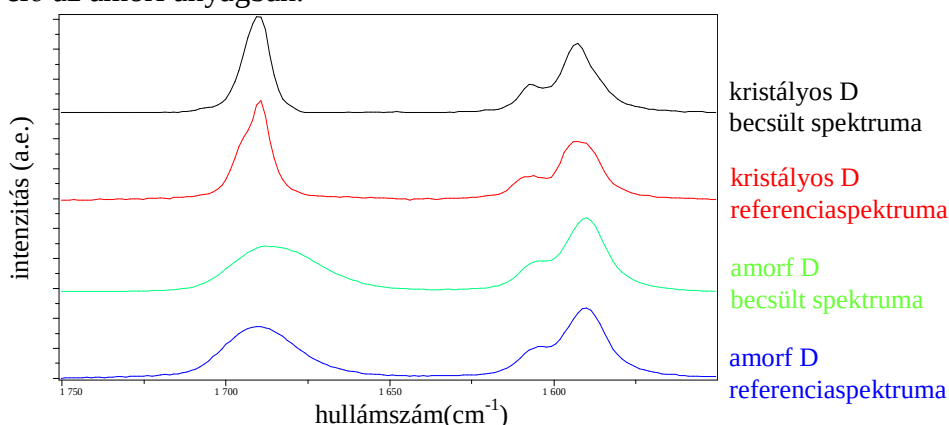
4.4.5. ábra: A D hatóanyag II-es kristályformájának és amorf fázisának Raman-spektruma

Raman-térképezéssel a tiszta amorf hatóanyagban a tárolás során spontán elkezdődő kristályosodást egyértelműen kimutattam. Példaként az amorf D hatóanyag előállítását követően 7 héttel történt mérést láthatjuk a 4.4.6. ábrán. A szokásos alapvonal-korrekció és egységnyi területre normálás után a térkép spektrumait a CLS módszerrel modelleztem. Az ábrán kék színű területen nem lehetett detektálni a kristályos hatóanyagot, egyes pontokban azonban, kis intenzitással, már megjelenik a kristályos fázis (zöld, piros és sárga színnel jelölve a növekvő intenzitást a térképen).



4.4.6. ábra: A kristályos D hatóanyag eloszlása az amorf környezetben 7 hét után

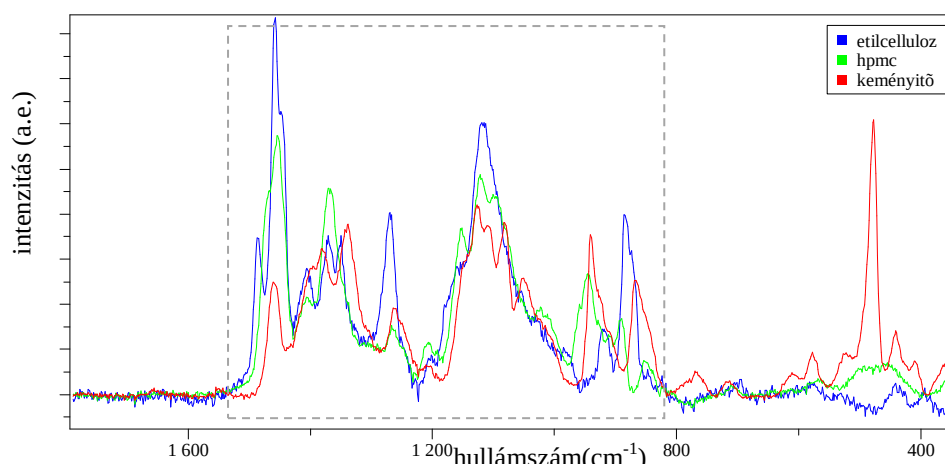
Ezek után MCR-ALS módszerrel kíséreltem meg a kristályos forma spektrumát megkapni. A teljes tartományon az MCR-ALS-sel nem sikerült megfelelő eredményt elérni, ezért a későbbiekben az 1550 és 1750 cm^{-1} közötti tartományt használtam fel. Ebben a tartományban van a legnagyobb különbség az amorf és a kristályos spektrum között. A 4.4.7. ábrán látható az eredmény, amely a 'closure' (anyagmérleg) 1 értékre történő beállítása mellett tudtam megvalósítani. A MCR-ALS módszer hatékonyságát mutatja, hogy a kristályos hatóanyag spektruma még akkor is kimutatható volt, ha az csak tizedszázaléknyi mértékben fordult elő az amorf anyagban.



4.4.7. ábra: Az MCR-ALS-sel becsült spektrumok és a referenciaspektrumok

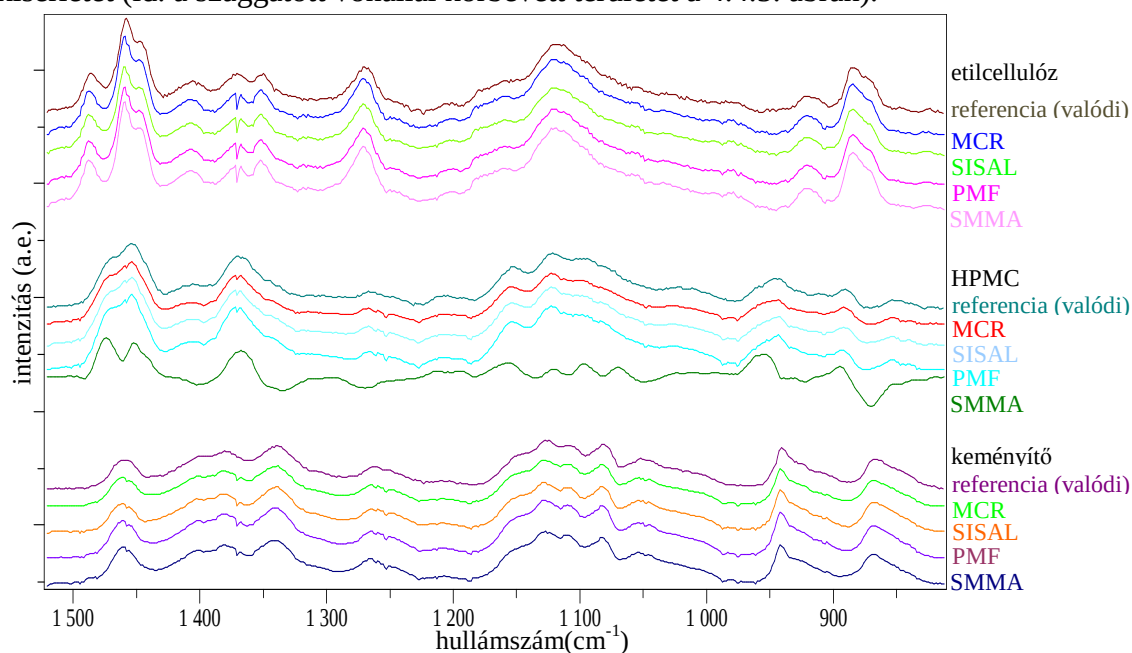
4.4.2. Segédanyagkeverék vizsgálata

Egyes segédanyagok esetében szelektív, éles rezgési sávok nem figyelhetők meg, illetve egyes, kémiaiilag hasonló szerkezetű vegyületek Raman-spektrumai nagyon hasonlítanak egymáshoz. Ilyenek például a tablettákban kötőanyagként használatos módosított cellulózok vagy a keményítő. A kiválasztott három segédanyagról azonos felvételi idővel ($60 \times 1\text{ s}$) készültek spektrumok, melyeket a 4.4.5. ábra illusztrál. A keverékről elkészült térkép 961 pontból állt. Ezek közül 2 zavaró hibás pontot fedeztem fel, amelyet a Matlab programban eltávolítva 959 pontból tudtam továbbdolgozni.



4.4.8. ábra: A három segédanyagról felvett referencia-spektrumok

A 4.4.8. ábrán látszik, hogy a spektrumok teljes szélességét figyelembe véve a keményítő viszonylag éles, 477 cm^{-1} körül megjelenő éles sávja miatt a tiszta spektrumok becslése nem lenne nehéz feladat. Céлом azonban az volt, hogy a teljes tartományon átfedő spektrumok szétválasztását teszteljem a különböző módszerekkel, és ilyen „neheztett” feltételek mellett válasszam ki a legjobban teljesítő módszert. Ezért a keményítőnek a 477 cm^{-1} -nél található éles sávját kihagyva, a $813\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ hullámszám-tartományra korlátoztuk a kísérletet (ld. a szaggatott vonallal körbevett területet a 4.4.5. ábrán).



4.4.9. ábra: A három segédanyag különböző módszerekkel becsült Raman-spektruma

A spektrumok elválasztását négyféle módszerrel végeztem el. Ezek a korábban megismert SMMA, SISAL, MCR-ALS és PMF voltak. A 4.4.9. ábrán a spektrumok sorban fentről lefelé haladva az etilcellulóz, a hidroxipropil-metil-cellulóz (HPMC) és végül a keményítő spektrumai. A valódi tiszta spektrumok, mint referenciák után sorrendben az MCR-ALS, a SISAL, a PMF és az SMMA által kapott eredmények jönnek. Ezek között szabad szemmel nem sok különbség volt felfedezhető: ennek következtében a korrelációs

koefficiensek és az illeszkedés hiányának (lack-of-fit, röviden LOF) értékei kiszámításával hasonlítottam össze a módszereket. Ezen értékeket a 4.4.2. táblázatban foglaltam össze.

4.4.2. táblázat: A három módosulat becsült és referencia-spektrumainak korrelációs együtthatói

		MCR-ALS	PMF	SISAL	SMMA
Etilcellulóz	kor.	0,9865	0,9867	0,9865	0,9851
	LOF	10,5	10,5	10,4	10,75
HPMC	kor.	0,9922	0,9923	0,9924	0,6302
	LOF	8,3	7,8	7,5	91,1
Keményítő	kor.	0,9910	0,9907	0,9926	0,9836
	LOF	7,4	7,55	6,9	10,1

A korrelációs együtthatók és az illeszkedés hiányát leíró LOF paraméter egyöntetűen azt mutatják, hogy a legjobban a SISAL által kapott spektrumok felelnek meg a valóságnak. A PMF és az MCR sem sokkal rosszabb, egymáshoz nagyon hasonló adatokat produkált. A különbségek nagyon kicsik, ezért további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a SISAL szignifikánsan jobb eredményeket ad-e a másik két módszernél.

Az SMMA minden mutatóban a leggyengébb eredményt adta. Ennek valószínű oka az, hogy az algoritmus a hidroxipropil-metil-cellulóz spektrumában nem talált olyan sávot, amelynek intenzitására jó modellt tudott volna építeni.

4.4.3. Hasonló Raman-spektrumú komponenskeverékek kemometriai elemzésének összegzése

Összegzésként kijelenthető, hogy a Raman-térképekből a kemometria segítségével nemcsak a 4.2 és 4.3. fejezetekben bemutatott kémiaiag különböző komponensek spektrumai becsülhetők jól, hanem azoknak a keverékkomponensek spektrumai is, amelyek igen nagymértékben hasonlítanak egymásra. Mind a gyógyszerpolimorfok, mind a hasonló szerkezetű segédanyagok esetében sikerült kiválasztani azt a módszert, amely a legjobban visszaadta az összetevők valódi Raman-spektrumát.

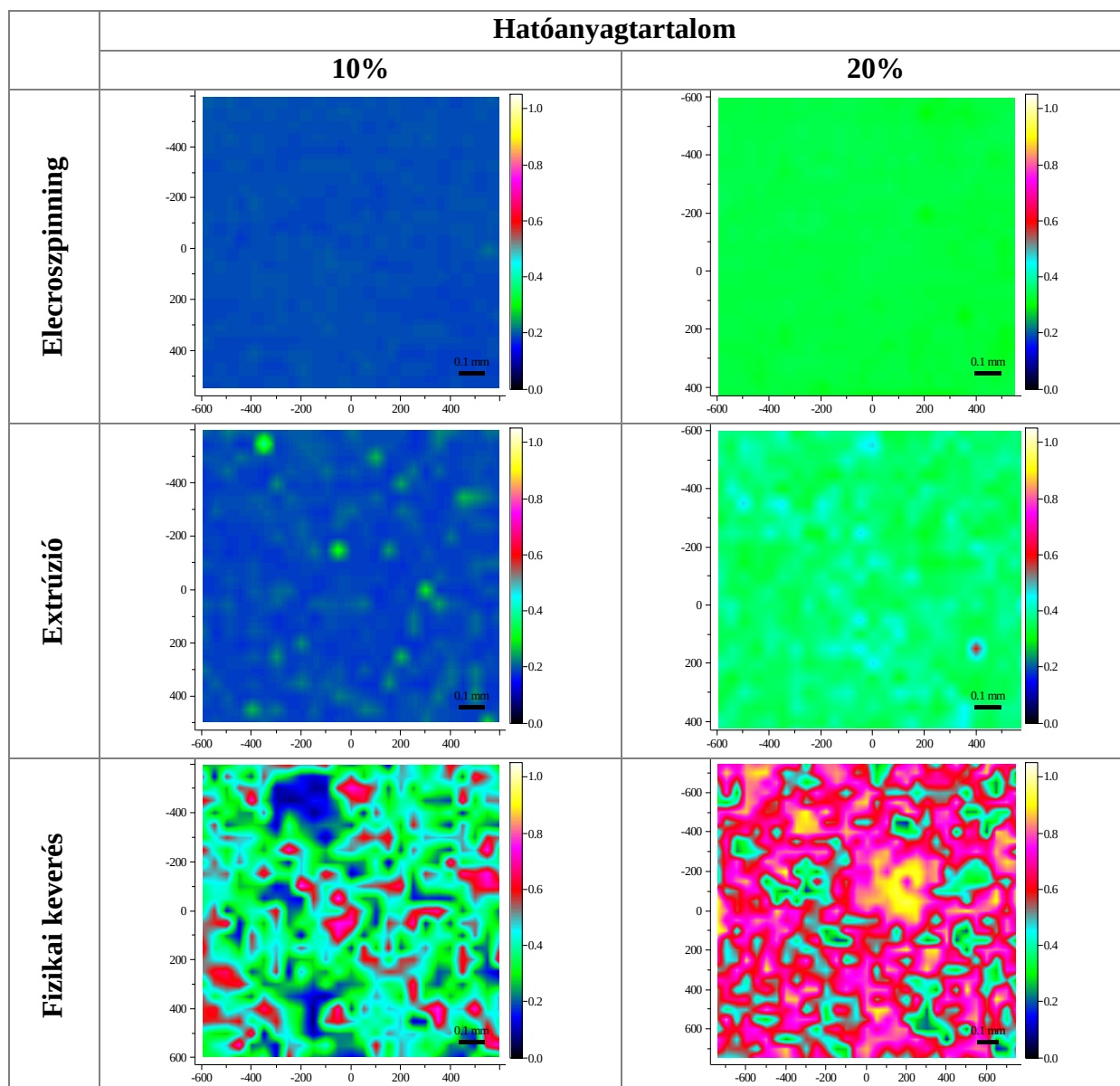
Kijelenthető tehát, hogy a Raman-térképezés akkor is alkalmazható ismeretlen polimorf- vagy kémiai szennyezőket tartalmazó gyógyszeripari minták vizsgálatára, ha azok Raman spektruma nem sokban tér el a készítményben jelenlévő többi komponensétől. Továbbá ismeretlen összetevőket tartalmazó termékek összetétele akkor is felderíthető, ha több, kémiaiag hasonló komponenst is tartalmaz.

4.5. Extrúzióval és elektrosztatikus szálképzéssel készült homogén hatóanyag-segédanyag rendszerek bemutatása

Az előző fejezetben bemutattam, hogy miként működnek egyes kemometriai módszerek, amennyiben a spektrumok erősen korrelálnak egymással. Nemcsak a spektrumok korrelálhatnak, hanem a koncentrációknak is lehet nagyon szűk eloszlása. A 4.3. fejezetben a nedves gyúrással készült 'HS' tabletta esetén láhattuk, hogy egy komponens homogén eloszlása a módszerek hatásosságát megváltoztatja. Ebben a fejezetben olyan mintákat

mutatok be, amelyekben mindkét a rendszert alkotó komponens nagyon homogén eloszlást mutatott. Ilyen homogén rendszerek készíthetők extrúziós technikával és elektromos erőterben oldatból történő nanoszálak húzásával is.

A kapott minták két eltérő koncentrációban tartalmazták a spironolakton hatóanyagot és a Soluplus segédanyagot. A minták 10 és 20% hatóanyagtartalommal készültek Ezeket a 3.2.2.6. fejezetben leírtak alapján előkészítettem, és mindegyik mintáról Raman-térképet készítettem. Az összehasonlítás érdekében a fizikai keveréket is megvizsgáltam. A 4.5.1. ábrán láthatók azok a képek, amelyeket CLS modellezéssel a referenciaspektrumok alapján készültek. Ezek a képek 0-tól 1-ig terjedő skálán mutatják, hogy milyen súlyozással számolta



4.5.1. ábra: CLS modellezéssel készült hatóanyageloszlás-térképek

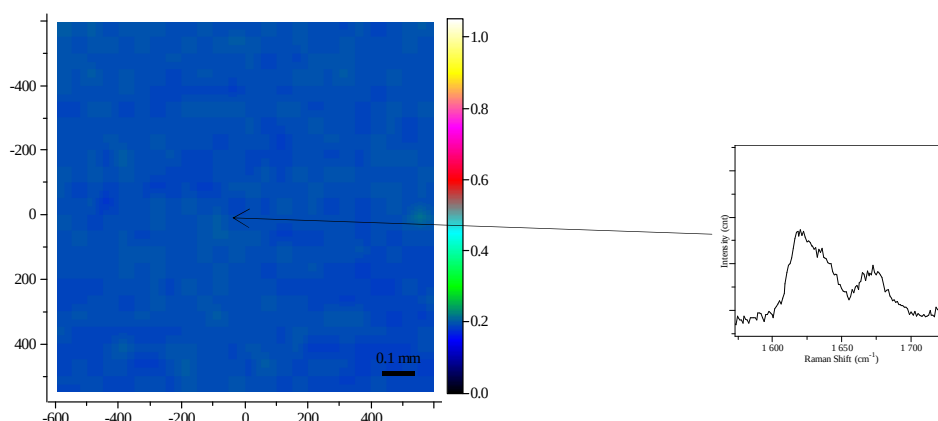
a hatóanyagot a legkisebb négyzetek módszere (CLS). A nulla érték a 0%, míg az egyes érték 100%-nak tekinthető. Az elektrosztatikus szálképzéssel előállított mintákon a színezésből is látható, hogy teljesen egyöntetű a spironolakton eloszlása. Az extrudált minták egyes

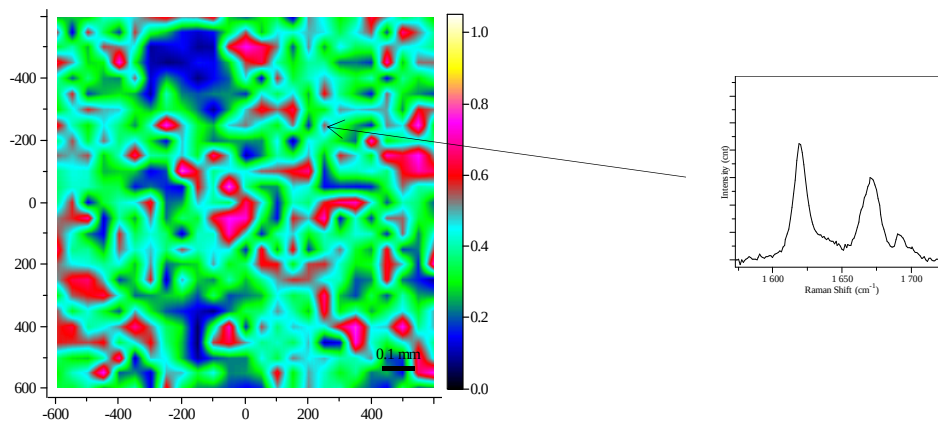
pontokban már fluktuációt mutatnak a koncentrációértékben. A fizikai keverékeken viszont sok heterogén területet fedezhetünk fel. Ezeket a koncentrációeloszlásokat lehet jellemezni statisztikákkal mint az átlag, a relatív szórás, a terjedelem vagy a minimum és maximum értékek. Ezeknek a kiszámítása után a kapott eredményeket a 4.5.1. táblázatban szerkesztettem össze.

4.5.1. táblázat: A Raman-térképek koncentrációeloszlásának jellemző értékei

	10% hatóanyagtartalom			20% hatóanyagtartalom		
Statisztikai jellemző	Elektroszpinningelt szálak	Extrudátum	Fizikai keverék	Elektroszpinningelt szálak	Extrudátum	Fizikai keverék
Átlag	19,82	20,01	39,78	35,79	37,66	64,65
<u>Szórás</u>	<u>0,56</u>	<u>2,04</u>	<u>17,09</u>	<u>0,69</u>	<u>3,15</u>	<u>19,20</u>
Minimum	18,34	17,18	5,49	32,93	31,33	12,84
Maximum	23,71	41,37	82,70	39,98	59,79	94,67
Terjedelem	5,38	24,20	77,21	7,05	28,45	81,83

Az értékek alapján egyértelműen látszik a különbség. A legfontosabb értékben, a szórásban az elektrosztatikus szálképzéssel készült minták esetében adódott a legalacsonyabb érték. Az extrudátum kissé nagyobb szórást mutatott. A hatóanyagra kapott átlagok azért adódnak ekkorának, mivel intenzitásértékei a segédanyagokénál jelentősebbek. Ebből adódhatott pontatlanság. A fizikai keverék átlagértékei azért lehetnek ilyen nagyok, mert a kisebb szemcseméretű hatóanyag befedte a nagyobb szemcséjű segédanyagot. Eközben az extrúzió és az elektrosztatikus szálhúzás során valódi szilárd kolloid diszperzió jött létre. Ezt mutatja az is, hogy hatóanyag amorfizálódott. Az egyes pontokban egyértelműen látszódott ez a folyamat.





4.5.2. ábra: Az amorfizálódás szemléltetése

A 4.5.2. ábrán a különbség egyértelműen kitűnik. A két pontból kiemelt spektrumrészletek láttatják azt, hogy az 1700 cm^{-1} környéki tartományban nem jelenik meg csúcs akkor, ha amorffá válik a kristályos hatóanyag.

A további céljaim közé tartozik annak megállapítása, hogy a görbefulbontáson alapuló kemometriai módszerek (főleg az MCR-ALS-re fókuszálva) segítségével megkaphatók-e a kiindulási spektrumok.

5. Összefoglalás

A gyógyszeripari fejlesztések során, valamint az illegális gyógyszerpiacokon jelentős mennyiségben jelennek meg nem pontosan ismert összetételű, valamint teljesen ismeretlen eredetű (hamisított vagy illegális) készítmények, melyek a gyártóknak a műszaki kihíváson túlmenően anyagi, sőt esetleg egészségügyi károkat okozhatnak. A bizonytalan minőségű készítmények visszaszorítása elsődleges, kiemelt feladat. E feladat megoldása során jó lehetőséget nyújt a Raman-mikrospektrometria, mely a kémiai térképezéssel összekapcsolva újabb irányokat adhat a gyógyszerformák roncsolásmentes vizsgálatához.

Munkám során valódi példákon keresztül mutattam be, miként lehet a Raman-térképezés segítségével gyógyszertabletta belső szerkezetét felderíteni. Munkám során először két készítményt hasonlítottam össze. Az egyik egy tipikus originális gyógyszertabletta volt, melyről magasszintű hamisítványok készülhetnek, a másik az eredetivel megegyező összetételű tabletta, amely esetében előállítási technológia sajátjaival kapcsolatban kellett következtetéseket levonni. A vizsgálatok alapján becslést adtam a mennyiségi összetételükre illetve egyes komponensek jellemző szemcseméretére vonatkozóan. Olyan kis különbségeket sikerült detektálni, amit más analitikai módszerrel feltárni nagy nehézségekbe ütközött volna.

Az összehasonlítást az alapanyagok referencia-spektrumainak felhasználásával végeztem el. A gyógyszeripari gyakorlatban legtöbbször pontos ismerettel rendelkeznek a vizsgált készítmény összetevőiről. Azonban bizonyos esetekben a komponensek spektrumi nem ismertek (esetenként a komponensek száma sem). Ilyen kihívásokat jelenthetnek pl. az illegális vagy hamisított tabletta, amelyek esetében a komponensekről nem rendelkezünk ismerettel. Egy ilyen ismeretlennek feltételezett tablettán bemutattam, hogy előzetes információk nélkül is azonosíthatjuk a komponenseket, közelítő becslés adhatunk a mennyiségükre illetve a heterogenitásuk meghatározása alapján a gyártási módról is lehet képet alkotni. A Raman-spektrometrián alapuló kémiai térképezés során nyert adathalmazból megfelelő sokváltozós adatelemzési (kemometriai) módszerekkel a tiszta komponensek spektrumait is meg tudtam becsülni.

A módszerek alkalmazása heterogén eloszlású komponensek esetén megfelelő pontossággal volt megvalósítható. Ennek oka, hogy a sávok nagy intenzitásbeli különbségeket mutatnak. Ezen túlmenően azonban megvizsgáltam a módszerek alkalmazhatóságát abban az esetben is, amikor az egyik komponens nagyfokú homogenitást mutatott. Az ilyen modelltablettákon a görbefelbontáson alapuló módszerek gyártási technológiától függetlenül is megfelelően visszaadták a komponensek spektrumait. Megállapítottam, hogy a legalkalmasabb MCR-ALS illetve PMF módszerrel elválasztani a spektrumokat egymástól, de homogén eloszlású összetevőt tartalmazó készítmény esetén egyértelműen az MCR-ALS-t találtam a legjobb módszernek a gyógyszerkészítmények vizsgálatára.

A vizsgált kemometriai módszerek többsége kémiailag különböző komponensek esetén nagy biztonsággal, jól alkalmazhatónak bizonyult. A gyógyszertechnológiai gyakorlatban általában ilyen példákkal találkozunk, de előfordulhatnak erősen korreláló Raman-spektrumú alkotók is egy ismeretlen készítményben. Ilyenek például a hatóanyag polimorfokat tartalmazó készítmények spektrumi, illetve a poliszacharid típusú segédanyag komponensek primer vizsgálati eredményei is. A két modellen tesztelt kemometriai algoritmusok közül

főként az MCR-ALS és a PMF módszer adott - még nagyobb zajjal terhelt spektrumokra - is nagyon jó eredményeket. A dolgozat ezen megállapításainak fontos eredménye lehet, hogy ily módon sikerül meggyorsítani a gyógyszeripari anyagvizsgálatokat hiszen rosszabb jel-zaj viszony, azaz rövidebb felvételi idő mellett is hatékonyan meghatározhatók lehetnek a keveréket alkotó komponensek spektrumai. Az MCR-ALS módszerrel szennyeződések is kimutathatók egy anyagalmazon belül. Ezt bizonyítottam kristályosságnyomok meghatározásával egy alapvetően amorf mintán.

Amellett, hogy két komponens spektruma nagyon hasonló, további analitikai kihívást jelent, ha koncentrációjuk erősen korrelál. Ilyen hatóanyag-segéganyag rendszereken végzett elemzéseket olyan gyógyszerrendszereken mutattam be, melyeket extrúzióval vagy elektrosztatikus szálképzéssel hoztak létre. A hatóanyageloszlás különbségei az alkalmazott statisztikai módszerekkel jól kimutathatók voltak. Ezeken a rendszereken további vizsgálatokat szeretnék végezni a felderítő statisztikai módszerek segítségével, legfőbbképp az MCR-ALS-sel.

A Raman-mikrospektrometria, a kémiai térképezés és a kemometria összekapcsolása a TDK dolgozat készítése során egy hatékonyan működő analitikai rendszernek bizonyult a vizsgált gyógyszerrendszerek jellemzésére, amely várhatóan képes megfelelni a dinamikusan fejlődő gyógyszerkészítmény-gyártás kihívásainak és esetlegesen egyes gyógyszerhamisítást felderítő eljárásokban is segítséget nyújthat.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám során segítséget nyújtottak. Köszönetet mondok a tanszéki kutatócsoport tagjainak a hasznos tanácsaikért és azért, hogy irányításuk alatt munkálkodhattam ezen a témán. Nagy Zsombor Kristófnak és Balogh Attilának külön hálás vagyok a nanoszálak és az extrudátumok elkészítéséért. Végül, de nem utolsósorban megköszönöm támogatást a mellettem álló és optimistán biztató családomnak és barátaimnak.

7. Függelék (matematikai összefoglaló)

Ez a fejezet a TDK munkámban használt kemometriai módszerek működési elvéről, matematikai alapjairól ad rövid áttekintést.

7.1. Kémiai térkép adatszerkezete

Mindegyik algoritmus előtt a kapott 3-dimenziós adattömböt ($n \times m \times \lambda$, n és m a pontok száma a X és az Y irányban, illetve a λ a hullámszám-csatornák száma) leképezzük 2-dimenziós felületre a térbeli koordináták összevonásával. Az így kapott $\mathbf{X}$ lesz az $(n \times m) \times \lambda$ nagyságú adatmátrix, amellyel továbbdolgozhatunk.

A sokváltozós értékelési módszerek két fő csoportba oszthatjuk: *a priori* (előzetes) ismereteket igénylő illetve ezeket nem igénylő módszerek. Az első csoportból a CLS módszerét mutatom be, míg a második csoportban lévők rövidített nevei az ismertetés sorrendjében: PCA, SIMPLISMA, MCR-ALS, PMF, valamint SISAL.

A térképekből származó adathalmazok kemometriai módszerekkel történő értékelését különböző előkészítési lépések előzik meg. A TDK munkám során végzett vizsgálatok döntő többségében a spektrumok meghatározott hullámszámú pontjaira illesztett szakaszonként lineáris függvényvel végzett alapvonal-korrekciót alkalmaztam a fluoreszcens háttér eltávolítása céljából, ezután pedig egységnyi görbe alatti területre normáltam a spektrumokat a fókuszálási bizonytalanságból eredő intenzitás-ingadozás kiküszöbölése érdekében.

7.2. Alkalmazott kemometriai módszerek

7.2.1. Klasszikus legkisebb négyzetek módszere (Classical Least Squares, CLS)¹⁸

Az $\mathbf{X}$ adathalmaz a klasszikus, rezgési spektroszkópiában is érvényes Lambert-Beer-törvényre alapozva két mátrix szorzataként áll össze:

$$\mathbf{X} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (7.1)$$

Ha $\mathbf{X}_{r \times \lambda}$, akkor $\mathbf{C}_{r \times p}$ a komponensek koncentrációértékeit tartalmazza az összes ($r = n \times m$) mért pontban, míg a $\mathbf{S}_{p \times \lambda}^T$ mátrix p -edik sorában a p -edik tiszta összetevő spektruma található. (Itt $r = n \times m$ a mért pontok száma, λ a csatornák száma, míg p a komponensek száma). Az $\mathbf{E}$ az $\mathbf{X}$ adatmátrixszal megegyező méretű, és a hiba (a valódi koncentrációktól való eltérés) értékeit tartalmazza.

A referencia spektrumok ismeretében a koncentrációk mátrixa egyszerű műveletek (pszeudoinvertálás) elvégzésével kifejezhető:

$$\mathbf{C} = \mathbf{X} \mathbf{S} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad (7.2)$$

Fordított esetben – a pontokban lévő koncentrációprofil ismerte – az alkotó spektrumai hasonlóképpen meghatározhatók:

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{X} \quad (7.3)$$

Így juthatunk a legegyszerűbben koncentráció-eloszlásokhoz a mért térképekből.

7.2.2. Főkomponens-analízis (Principal Component Analysis, PCA)^{24, 25}

Az egyik leggyakrabban használt hagyományos többváltozós kiértékelési módszer. Az eljárás elve ún. faktorelemzésen alapul, mely módszercsalád tagjai új változókat hoznak létre és az eredetinél kisebb dimenziójú hipertérbe vetítik az adatokat. Ezek az új változók

magukban foglalják a teljes adatsor információtartalmának nagy részét. A létrejövő főkomponensek – amennyiben nem alkalmazunk speciális forgatási eljárásokat – egymástól függetlenek és ortogonálisak, számuk a mintában lévő komponensek számával összefüggésben van.

A módszer végezhető az $\mathbf{X}$ szingulárisérték-felbontásával (analóg módon négyzetes mátrixok esetén ez a sajátérték-felbontás).

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{\Theta}\mathbf{V}^T \quad (7.4.)$$

A képletben $\mathbf{U}_{r \times r}$ és $\mathbf{V}_{\lambda \times \lambda}^T$ ortonormált négyzetes mátrixok, amelyek rendre $\mathbf{X}\mathbf{X}^T$ és $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ sajátvektorait tartalmazzák. A $\mathbf{\Theta}_{r \times \lambda}$ mátrix diagonális elemei az ún. szinguláris értékek, míg a többi eleme zérus. (Az egyes sajátvektorokhoz tartalmazó szinguláris értékek nagysága jellemzi az adott faktor azaz sajátvektor „fontosságát”: százalékos skálára transzformálva megadja, hogy az adott faktor az adathalmaz varianciájának hány százalékát írja le.) Ha az $\mathbf{X}$ mátrix rangja p (faktorok száma) és $p < r$, akkor a teljesen zérus (vagy ahhoz közeli) szinguláris értékű oszlopok ill. sorok elhagyhatók:

$$\mathbf{X} = \tilde{\mathbf{U}}\tilde{\mathbf{\Theta}}\tilde{\mathbf{V}}^T + \mathbf{E} \quad (7.7.)$$

A (7.7.) egyenlet szerinti felírásban a főkomponensek kapcsolatba hozhatók a Raman spektrumokkal ($\hat{\mathbf{S}}^T = \tilde{\mathbf{V}}^T$), illetve a főkomponens-együtthatók a koncentrációkkal ($\hat{\mathbf{C}} = \tilde{\mathbf{U}}\tilde{\mathbf{\Theta}}$). A PCA egyik hátránya, hogy spektrumok esetében általában az ortogonalitás nem mindig teljesül, márpedig a szingulárisérték-felbontás ezt „rákényszeríti” a sajátvektorokra – ez igen gyakran negatív intenzitásértékű, fizikailag értelmetlen sávok megjelenésével jár.

A főkomponens-analízist általában az adatmátrix centrálása után szokták elvégezni (azaz Raman-térképezés esetében az átlagspektrumot ki kellene vonni a térkép minden spektrumából), azonban gyógyszerek kémiai térképezése esetében ez nem javasolt eljárás⁷⁰, mert az első főkomponens, azaz átlagspektrum⁷¹ sokszor a legnagyobb mennyiségben jelenlévő összetevőhöz (általában töltőanyaghoz) köthető.

7.2.3. Önmodellező keverékelemzés (Simple-To-Use Self-Modeling Mixture Analysis, SMMA vagy SIMPLISMA)³¹

Ez a módszer az adattömb fizikailag nem interpretálható transzformációja helyett csupán arra hagyatkozik, hogy minden alkotó komponens esetében a többi összetevő sávjaival legkevésbé átlapoló, csak az adott komponensre jellemző sávot választja ki. Ún. „tisztasági értékek” számíthatók minden komponensre. A j -edik komponens i -edik változójának tisztasági értéke (p_{ij}) az alábbi képlettel számítható:

$$p_{ij} = \omega_{ij} \frac{\sigma_i}{\mu_i + \alpha} \quad \mu_i = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r x_{ij} \quad \sigma_i = \sqrt{\frac{1}{r} \sum_{j=1}^r (x_{ij} - \mu_i)^2} \quad (7.6.)$$

ahol μ_i a i -edik változó (i -edik hullámszámcsatornához tartozó intenzitásértékek) számtani átlaga, σ_i a i -edik változó standard szórása, ω_{ij} egy determinánsból számolt súlyérték, amely megakadályozza, hogy egy komponens jellemző sávjának megtalálása után olyan sávot válasszunk ki a következő lépésben, amely ugyanahhoz a komponenshez tartozik. (Nem mindegyik algoritmus alkalmazza ezt a súlytényezőt, el is lehet hanyagolni.) α az ún. eltolási (offset) érték a zaj csökkentésére. (Az eltolási érték nevezőhöz (μ_i) történő hozzáadásával megakadályozható, hogy egy sáv azért tűnjön tisztának, mert nagyon kicsi az intenzitásának a várható értéke. Másképpen fogalmazva, a 0 várható értékű, csak zajt tartalmazó hullámszámkomponensek így már nem adnak magas p_{ij} értékeket, és nem hisszük őket tiszta sávoknak.)

Az eljárás mindegyik adott j -edik komponensre kiválasztja a legnagyobb tisztaságértékkel rendelkező hullámszám-csatornát. Ez lesz tehát az adott komponensre leginkább jellemző rezgési sáv. A sávok kiválasztását követően a módszer az intenzitások

arányában állapítja meg a koncentrációmátrixot, akár úgy, hogy magukat a kiválasztott oszlopokban jelen lévő intenzitásértékeket helyettesíti a koncentrációmátrixba. A becsült $\hat{\mathbf{C}}$ mátrixból a CLS egyenletét felhasználva a tiszta spektrumok megbecsülhetők.

$$\hat{\mathbf{S}}^T = (\hat{\mathbf{C}}^T \hat{\mathbf{C}})^{-1} \hat{\mathbf{C}}^T \mathbf{X} \quad (7.7)$$

A módszer hátránya, hogy negatív koncentrációértékeket is adhat, melyek fizikailag nem interpretálhatók (bár általában akkor jelennek meg, amikor az adott összetevő nincs jelen az adott mérési pontban). Másik probléma, hogy a koncentrációmátrix becsléséhez kiválasztott hullámszám-csatornákat spektrális zaj terheli, ami megjelenik a koncentrációkban csakúgy, mint a 7.7. egyenlet alapján becsült tisztakomponens-spektrumokban.

7.2.4. Többváltozós görbefulbontás–alternáló legkisebb négyzetek módszere (Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares, MCR-ALS)³⁴

Az algoritmus egy iteratív optimáláson alapszik, amely becsült koncentrációkból ($\hat{\mathbf{C}}$) és becsült spektrumokból ($\hat{\mathbf{S}}^T$) indul ki. Ez a becslés vizsgálataink alapján (éles, szelektív rezgési sávok megléte esetén) lehet annyi is, hogy csupán a komponensek számával megegyező számú, véletlenszámokból álló vektort adunk meg, vagy például a SIMPLISMA által becsült koncentrációkat vagy spektrumokat adjuk meg a program számára. Az algoritmus lényege, hogy a legkisebb négyzetek módszerével próbálja meg a (7.1.) egyenletben lévő E hibtagot csökkenteni. Az alábbi célfüggvényt használja:

$$\mathbf{Q} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{\lambda} \left\| \mathbf{x}_{ij} - \sum_{k=1}^p \mathbf{c}_{ik} \mathbf{s}_{kj}^T \right\|^2 \quad (7.8.)$$

Ezt a négyzetes hibát az eljárás úgy csökkenti, hogy a becsült koncentrációkból spektrumokat, illetve a becsült spektrumokból koncentrációkat számít a (7.2.) és (7.3.) egyenleteket felhasználva. Minden egyes számított $\hat{\mathbf{C}}$ illetve $\hat{\mathbf{S}}^T$ után előre beállított, általában fizikai követelményekhez rendelhető matematikai korlátokat érvényesít. Ilyen korlátok lehetnek az intenzitásértékek és a koncentrációk nemnegativitása vagy unimodalitása, az anyagmérleg (a számított koncentrációk összege konstans legyen), a spektrumok normalitása, illetve, hogy a számított koncentrációprofil illeszkedjen egy elméleti modellből számított koncentrációprofilra (pl. valós időben, spektrometriával követett, ismert kinetikájú folyamatok vizsgálata esetében). Ez a technika szélesben alkalmazott, mert az alkalmazható korlátok tárháza igen széles, mely meglehetősen sokoldalúvá teszi az algoritmust.

7.2.5. Pozitív mátrix faktorizálás (Positive Matrix Factorization, PMF)^{42, 43}

A művelet az (7.1.) egyenletben lévő hibtagot igyekszik csökkenteni. Legyen ez esetben a becsült $\mathbf{C}$ mátrix $\mathbf{G}$, illetve $\mathbf{S}^T$ mátrix $\mathbf{F}$, ekkor a hibtag felírható:

$$\mathbf{E} = \mathbf{X} - \mathbf{GF} \quad (7.9.)$$

Tehát – az egyes hibtagokhoz tartozó bizonytalanság ismeretében – az alábbi függvényt kell minimalizálni:

$$\mathbf{Q}(\mathbf{E}) = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{\lambda} \left(\mathbf{E}_{ij} / \sigma_{ij} \right)^2 \quad (7.10.)$$

Az (7.10.) egyenletben r és λ rendre a sorok és az oszlopok száma, míg σ_{ij} a mért értékek standard szórása (bizonytalansági faktor). A program $\mathbf{Q}(\mathbf{E})$ célfüggvény minimalizálását

valósítja meg gradiensszámításon alapuló optimalizálási módszerrel, úgy, hogy közben G és F értékeire a nemnegativitást alkalmazza.

$$Q(\mathbf{E}, \mathbf{G}, \mathbf{F}) = Q(\mathbf{E}) + P(\mathbf{G}) + P(\mathbf{F}) + R(\mathbf{G}) + R(\mathbf{F}) =$$

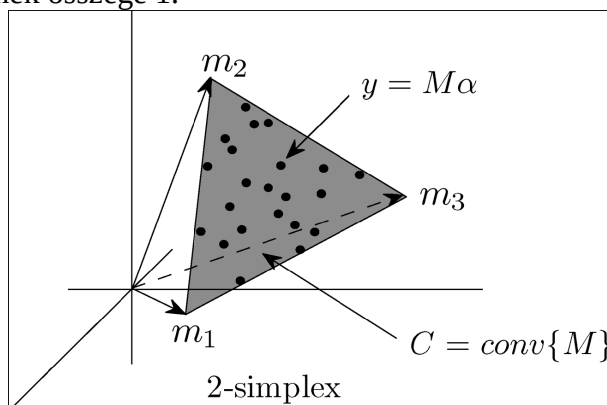
$$\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{\lambda} (\mathbf{E}_{ij} / \sigma_{ij})^2 - \alpha \sum_{i=1}^r \sum_{h=1}^p \log \mathbf{G}_{ih} - \beta \sum_{h=1}^p \sum_{j=1}^{\lambda} \log \mathbf{F}_{hj} + \gamma \sum_{i=1}^r \sum_{h=1}^p \mathbf{G}_{ih}^2 + \delta \sum_{h=1}^p \sum_{j=1}^{\lambda} \mathbf{F}_{hj}^2 \quad (7.11.)$$

A program a (7.10.) egyenletet kiegészíti $P(\mathbf{G})$ és $P(\mathbf{F})$ büntető (penalty), illetve $R(\mathbf{G})$ és $R(\mathbf{F})$ szabályozó (regularization) tagokkal. Az α és β értékek a logaritmikus büntető tagok erősségét kontrollálják és a nemnegativitási kritérium érvényesítéséért felelnek, míg hasonlóan a γ és δ oefficiensek a szabályozó tagok, azaz a normalitási kritérium erősségét befolyásolják. Az α , β , γ és δ értékek nagyon kicsik, így az iteráció végére hatásuk elhanyagolhatóvá válik. A szabályozó tagok mindig szükségesek, hogy kiküszöböljék a modellből a szingularitást.

További beállítási lehetőséget ad az *fpeak* nevű paraméter, amely a koncentrációk és a spektrumok változatosságát írja le. A negatív *fpeak* értékek azt a követelményt jelentik, hogy a számított koncentrációk széles tartományban, „kontrasztos módon” változzanak (legyenek vagy (majdnem) nulla, vagy magas koncentrációértékek). A pozitív értékek ugyanilyen hatással vannak a spektrumokon belüli intenzitásértékekre.

7.2.6. Simplex Identification via Split Augmented Lagrangian (SISAL)^{46, 47}

Az algoritmus elvének lényege, hogy a p darab tiszta komponens spektrumait vektorként tekintve a p -dimenziójú térben egy $(p-1)$ dimenziójú szimplexet feszít ki. A feltételezés szerint a tiszta komponensek a szimplex csúcsainak felelnek meg. A mért (általában több összetevő keverékéhez tartozó) spektrumok értelemszerűen ebben a kifeszített térben helyezkednek el úgy, hogy a vektorok megfelelő (a koncentrációval analóg jelentésű) együtthatókkal szorozódnak. Az együttható-vektorok értékei nem lehetnek negatívak és az egyes vektorok elemeinek összege 1.



7.1. ábra: A y mért adatok elhelyezkedése egy háromkomponensű elegy esetén

A 7.1. ábrán látható példa egy 3 komponensű elegy komponensei (m_1, m_2, m_3) által kifeszített sík (2 dimenziós sokszög). Ennek a belsejében helyezkednek el a mért adatok. A csúcsokat (tiszta komponensek) bizonyos megkötésekkel (koncentrációk nemnegativitása) állapítja meg a módszer, azt is szem előtt tartva, hogy a mért spektrumokat magába foglaló alakzat mérete a legkisebbre csökkenjen. A legkedvezőbb megoldás eléréséhez a program Lagrange-féle iteráló (optimalizáló) algoritmust használ.

7.3. Spektrumok összehasonlítására szolgáló jellemzők számítási képletei

A becsült spektrumok „minősége” jellemezhető a referencia-spektrumokkal történő számszerű összehasonlítással. Ennek több útja lehetséges, ezek közül kettőt választottam.

A korrelációs együttható igen gyakran alkalmazott, robusztus módja az összehasonlításnak (spektrumkönyvtári keresőalgoritmusok is gyakran alkalmazzák):

$$korr = \frac{\sum_{i=1}^{\lambda} (s_i - \bar{s}_i)(t_i - \bar{t}_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{\lambda} (s_i - \bar{s}_i)^2 \sum_{i=1}^{\lambda} (t_i - \bar{t}_i)^2}} \quad (7.12.)$$

A Pearson-féle korrelációs együttható számítást alkalmaztam. A 7.12. és a 7.13. képletben a becsült (**s**) és az valódi (**t**) spektrum intenzitásértékeinek különbségét alkalmazzuk a megfelelő hullámszámoknál.

Másik lehetőség az illeszkedés hiányának kiszámítása (lack-of-fit):

$$LOF = \frac{\sum_{i=1}^{\lambda} (s_i - t_i)^2}{\sum_{i=1}^{\lambda} t_i^2} \quad (7.13.)$$

Ez az érték megadja, hogy a becsült spektrum mennyire jól illeszkedik a valódi (tiszt) spektrum pontjaira. A hatékony összehasonlításhoz természetesen mindkét spektrumot normálni kell. Érzékenyebben jelzi a kis eltéréseket a korrelációs együtthatónál.

8. Irodalomjegyzék

- ¹ L. Brillouin *Ann. Phys.* 88, 17 (1922)
- ² A. Smekal *Naturwissenschaften* 11, 873 (1923)
- ³ C.V. Raman, K.S. Krishnan: A New Type of Secondary Radiation, *Nature* 121, 501-2 (1928)
- ⁴ A. Schawlow, C. H. Townes *Phys. Rev.* 122, 1940 (1958)
- ⁵ T. H. Maiman *Nature* 187, 493 (1960 London)
- ⁶ G. J. Rosasco, E. S. Etz, W. A. Cassatt *IVth Int. Conf. Raman Spectrosc.* Brunswick USA (1974)
- ⁷ M. Delhay, P. Dhamelinourt *IVth Int. Conf. Raman Spectrosc.* Brunswick USA (1974)
- ⁸ G.Keresztury: *Rezgési spektroszkópiai módszerek (IR, Raman)*, in: I.Bertóti, Gy.Marosi, A.Tóth (Eds.): *Műszaki felülettudomány és orvosi biológiai alkalmazásai*, B+V Lap- és könyvkiadó KFT, Budapest, 2003, p. 166-186
- ⁹ M. J. Pelletier: Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry, *Appl. Spectrosc.* 57 (1), (2003)
- ¹⁰ A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, S.E.J. Bell, Recent applications of Chemical Imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 69 10-22. (2008)
- ¹¹ I. A. Larmour, K. Faulds, D. Graham: Rapid Raman mapping for chocolate analysis, *Anal. Methods*, 2, 1230-1232 (2010)
- ¹² C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet: Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review *J Pharm Biomed Anal.* 48 (3), 533-53 (2008)
- ¹³ S. C. Brown, M. Claybourn, D. Sievwright, V. Fearnside, C. Ashman: Lean Raman Imaging for Rapid Assessment of Homogeneity in Pharmaceutical Formulations, *Appl. Spectrosc.* 64, 442-447 (2010)
- ¹⁴ B. Vajna, I. Farkas, A. Szabó, Z. Zsigmond, G. Marosi: Raman microscopic evaluation of technology dependent structural differences in tablets containing imipramine model drug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 30-38 (2009)
- ¹⁵ W.H. Doub, W.P. Adams, J.A. Spencer, L.F. Buhse, M.P. Nelson, P.J. Treado: Raman chemical imaging for ingredient-specific particle size characterization of aqueous suspension nasal spray formulations: a progress report, *Pharm. Res.* 24 934-945 (2007)
- ¹⁶ A. Docoslis, K. L. Huszarik, G. Z. Papageorgiou, D. Bikiaris, A. Stergiou, E. Georgarakis: Characterization of the distribution, Polymorphism, and stability of Nimodipine in its solid dispersions in polyethylene glycol by micro-Raman spectroscopy and powder X-ray diffraction, *AAPS J.* 9(3): E361-E370 (2007)
- ¹⁷ N. Furuyama, S. Hasegawa, T. Hamaura, S. Yada, H. Nakagami, E. Yonemochi, K. Terada: Evaluation of solid dispersions on a molecular level by the Raman mapping technique, *Int. J. Pharm* 361, 12-18 (2008)
- ¹⁸ L. Zhang, M. J. Henson, S. S. Sekulic: Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet, *Anal. Chim. Acta* 545, 262-278, (2005)
- ¹⁹ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet: Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: A feasibility study, *Talanta* 73, 733-741 (2007)
- ²⁰ M. B. Lopes, J.-C. Wolff, J. M. Bioucas-Dias, M. A. T. Figueiredo: Determination of the composition of counterfeit HeptodinTM tablets by near infrared chemical imaging and classical least squares estimation, *Anal. Chim. Acta* 641, 46-51 (2009)
- ²¹ J. M. Amigo, C. Ravn: Direct quantification and distribution assessment of major and minor component in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37, 76-82 (2009)
- ²² K. L. A. Chan, N. Elkhider, S. G. Kazarian: Spectroscopic imaging of compacted pharmaceutical tablets, *Chem. Eng. Res. Des.*, 83 (A11), 1303-1310 (2005)
- ²³ P. Geladi: Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics, *Spectrochim. Acta Pt B*, 58, 767-782 (2003)
- ²⁴ W.E. Lawton, E.A. Sylvestre, *Technometrics* 13 617. (1971)
- ²⁵ Borosy A.P., Héberger K.: *Sokváltozós adatelemzés (Kemometria)*, Nemzeti Tankönyvkiadó (2001)
- ²⁶ P. de Peinder, M. J. Vredenburg, T. Visser, D. de Kaste: Detection of Lipitor[®] counterfeits A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 688-694 (2008)
- ²⁷ T. Puchert, D. Lochmann, J.C. Menezes, G. Reich: Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) for counterfeit drug identification—A four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 138-145 (2010)
- ²⁸ P. Y. Sacré, E. Deconinck, L. Saerens, T. De Beer, P. Courselle, R. Vancauwenberghe, P. Chiap, J. Crommen, J. O. De Beer: Detection of counterfeit Viagra[®] by Raman microspectroscopy imaging and multivariate analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56, 454-461 (2011)
- ²⁹ P. Y. Sacré, E. Deconinck, T. de Beer, P. Courselle, R. Vancauwenberghe, P. Chiap, J. O. de Beer: Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53, 445-453, (2010)

- ³⁰ E. Widjaja, R. K. H. Seah: Application of Raman microscopy and band-target entropy minimization to identify minor components in model pharmaceutical tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46, 274-281, (2008)
- ³¹ W. Windig, J. Guilment: Interactive Self-Modeling Mixture Analysis, *Anal. Chem.*, 63, 1425-1432., (1991)
- ³² Y. Batonneau, J. Laureyns, J.-C. Merlin, C. Bremard: Self-modeling mixture analysis of Raman microspectrometric investigations of dust emitted by lead and zinc smelters (2001) *Anal. Chim. Acta*, 446 (1-2), 23-37 (2001)
- ³³ N. Dupuy, Y. Batonneau: Reliability of the contribution profiles obtained through the SIMPLISMA approach and used as reference in a calibration process: Application to Raman micro-analysis of dust particles, *Anal. Chim. Acta*, 495 (1-2), 205-215, (2003)
- ³⁴ R. Tauler: Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 30, 133-146 (1995)
- ³⁵ B. Vajna, I. Farkas, A. Farkas, H. Pataki, Z. Nagy, J. Madarász, G. Marosi: Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman mapping and multivariate curve resolution, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56, 38-44 (2011)
- ³⁶ B. Vajna, H. Pataki, Z. Nagy, I. Farkas, G. Marosi: Characterization of melt extruded and conventional Isoptin formulations using Raman chemical imaging and chemometrics, *Int. J. Pharm* 419, 107-113 (2011)
- ³⁷ J. M. Amigo, C. Ravn: Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37 (2), 76-82, (2009)
- ³⁸ J. Amigo, J. Cruz, M. Bautista and S. MasPOCH, J. Coello and M. Blanco. Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis, *Trends Anal. Chem.*, 27, 696-713, (2008)
- ³⁹ J. Cruz, M. Blanco: Content uniformity studies in tablets by NIR-CI, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56, 408-412 (2011)
- ⁴⁰ M. Terrado, D. Barceló, R. Tauler: Quality assessment of the multivariate curve resolution alternate least squares method for the investigation of environmental pollution patterns in surface water, *Environ. Sci. Technol.*, 43, 5321-5326, (2009)
- ⁴¹ F. Franch-Lage, J. M. Amigo, E. Skibsted, S. MasPOCH, J. Coello: Fast assessment of the surface distribution of API and excipients in tablets using NIR-hyperspectral imaging, *Int. J. Pharm* 411, 27-35 (2011)
- ⁴² P. Paatero, and U. Tapper: Positive matrix factorization: a non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values, *Environmetrics*, 5, 111-126. (1994)
- ⁴³ P. Paatero: Least squares formulation of robust non-negative factor analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 37, 23-35., (1997)
- ⁴⁴ L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J. P. Huvenne: Multivariate curve resolution methods in imaging spectroscopy – Influence of extraction methods and instrumental perturbations, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43 (6), 2057-2067, (2003)
- ⁴⁵ J. Li, J. M. Bioucas-Dias: Minimum Volume Simplex Analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data, in *IEEE International Geoscience and Remote sensing Symposium -IGARSS2008*, Boston, (2008)
- ⁴⁶ J. M. Bioucas-Dias: A variable splitting augmented Lagrangian approach to linear spectral unmixing, in *First IEEE GRSS Workshop on Hyperspectral Image and Signal Processing-WHISPERS'2009*, Grenoble, France, (2009)
- ⁴⁷ M. B. Lopes, J.-C. Wolff, J. M. Bioucas-Dias, M. A. T. Figueiredo: Near-infrared hyperspectral unmixing based on a minimum volume criterion for fast and accurate chemometric characterization of counterfeit tablets, *Anal. Chem.*, 82, 1462-1469, (2010)
- ⁴⁸ R. Rajkó: Comments on “Near-infrared hyperspectral unmixing based on a minimum volume criterion for fast and accurate chemometric characterization of counterfeit tablets”, *Anal. Chem.*, 82, 8750-8752 (2010)
- ⁴⁹ A. Burger, R. Ramberger: On the polymorphism of the pharmaceuticals and other molecular crystals I. Theory of thermodynamic rules, *Mikrochim. Acta*, Wien, 1979, 259
- ⁵⁰ A. W. Newman, S. R. Byrn: Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products *Drug Discov. Today*, 8, 898-905 (2003)
- ⁵¹ M. Varasteh, Z. Deng, H. Hwang, Y. J. Kim, G. B. Wong: Quantitative determination of polymorphic impurity by X-ray powder diffractometry in an OROS[®] formulation, *Int. J. Pharm* 366, 74-81 (2009)
- ⁵² T. Kohinata, M. Fujii, S. Nakamura, N. Hamada, E. Yonemochi, K. Terada: Quantitative determination of amorphous nifedipine hydrochloride in long-acting formula (NIC-LA[®]) using light anhydrous silicic acid, *Chem. Pharm. Bull.*, 52 (12), 1451-1457 (2004)
- ⁵³ Patrick A. Tishmack, D. E. Bugay, S R. Byrn: Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy—pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.*, 92, 441–474 (2002)
- ⁵⁴ R. T. Berendt, D. M. Sperger, E.J. Munson, P.K. Isbester: Solid-state NMR spectroscopy in pharmaceutical research and analysis, *Trends Anal. Chem.*, 25 (10), 977-984. (2006)

- ⁵⁵ Y. Xie, W. Tao, H. Morrison, R. Chiu, J. Jona, J. Fang, N. Cauchon: Quantitative determination of solid-state forms of a pharmaceutical development compound in drug substance and tablets, *Int. J. Pharm.*, 362, 29-36 (2008)
- ⁵⁶ G. Winnewisser: Spectroscopy in the terahertz region, *Vib. Spectrosc.* 8(2) 241-253 (1995)
- ⁵⁷ I. Karabas, M.G. Orkoula, C.G. Kontoyannis: Analysis and stability of polymorphs in tablets: The case of Risperidone, *Talanta*, 71 1382–1386 (2007)
- ⁵⁸ M.C. Gamberini, C. Baraldi, A. Tinti, F. Palazzoli and V. Ferioli: Vibrational study of tamoxifen citrate polymorphism, *J. Mol. Struct.*, 840(1-3), 29-37 (2007)
- ⁵⁹ M.C. Gamberini, C. Baraldi, A. Tinti, C. Rustichelli, V. Ferioli and G. Gamberini: Solid state characterization of chloramphenicol palmitate. Raman spectroscopy applied to pharmaceutical polymorphs, *J. Mol. Struct.* 785(1-3), 216-224 (2006)
- ⁶⁰ A. Rossi, A. Savioli, M. Bini, D. Capsoni, V. Massarotti, R. Bettini, A. Gazzaniga, M. E. Sangalli, F. Giordano: Solid-state characterization of paracetamol metastable polymorphs formed in binary mixtures with hydroxypropyl-methyl-cellulose, *Thermochim. Acta* 406(1-2), 55-67 (2003)
- ⁶¹
- ⁶² M.J. Henson, L. Zhang, Drug characterization in low dosage pharmaceutical tablets using Raman microscopic mapping, *Appl. Spectrosc.* 60, 1247–1255 (2006)
- ⁶³ W.-Q. Lin, J.-H. Jiang, H.-F. Yang, Y. Ozaki, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Characterization of Chloramphenicol Palmitate Drug Polymorphs by Raman Mapping with Multivariate Image Segmentation Using a Spatial Directed Agglomeration Clustering Method, *Anal. Chem.* 78, 6003–6011 (2006)
- ⁶⁴ S. Ward, M. Perkins, J. Zhang, C.J. Roberts, C.E. Madden, S.Y. Luk, N. Patel, S.J. Ebbens, Identifying and Mapping Surface Amorphous Domains, *Pharm. Res.* 22, 1195–1202 (2005)
- ⁶⁵ K.L.A. Chan, S.G. Kazarian, D. Vassou, V. Gionis, G.D. Chryssikos: In situ high-throughput study of drug polymorphism under controlled temperature and humidity using FT-IR spectroscopic imaging, *Vib. Spectrosc.* 43, 221–226 (2007)
- ⁶⁶ K.L.A. Chan, S.G. Kazarian: Macro FTIR imaging in transmission under a controlled environment, *Vib. Spectrosc.* 42, 130–134 (2006)
- ⁶⁷ W. F. de Carvalho Rocha, G. P. Sabin, P. H. Março, R. J- Poppi: Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 106, 198-204 (2011)
- ⁶⁸ A. Heinz, C. J. Strachan, F. Atassi, K. C. Gordon, T. Rades: Characterizing an Amorphous System Exhibiting Trace Crystallinity: A Case Study with Saquinavir, *Cryst. Growth Des.* 8(1), 119-127 (2008)
- ⁶⁹ E. Widjaja, P. Kanaujia, G. Lau, W. Kiong Ng, M. Garland, C. Saal, A.Hanefeld, M. Fischbach, M. Maio, R.B.H. Tan: Detection of trace crystallinity in an amorphous system using Raman microscopy and chemometric analysis, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42, 45-54 (2010)
- ⁷⁰ S. Šašić: An in-depth analysis of Raman and near-infrared chemical images of common pharmaceutical tablets, *Appl. Spectrosc.* 61, 239-250 (2007).
- ⁷¹ B. Vajna, G. Patyi, Z. Nagy, A. Bódis, A. Farkas, G. Marosi: Comparison of chemometric methods in analysis of pharmaceuticals with hyperspectral Raman imaging, <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.2943>